

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4347564号
(P4347564)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月24日(2009.7.24)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z C C M	
BO 1 J 19/00	(2006.01)	BO 1 J 19/00	3 2 1	
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 0 2	
GO 1 N 35/02	(2006.01)	GO 1 N 35/02	B	

請求項の数 20 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2002-544162 (P2002-544162)
 (86) (22) 出願日 平成13年11月26日(2001.11.26)
 (65) 公表番号 特表2004-514152 (P2004-514152A)
 (43) 公表日 平成16年5月13日(2004.5.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2001/004437
 (87) 国際公開番号 W02002/041992
 (87) 国際公開日 平成14年5月30日(2002.5.30)
 審査請求日 平成16年11月25日(2004.11.25)
 (31) 優先権主張番号 100 58 394.6
 (32) 優先日 平成12年11月24日(2000.11.24)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 390039413
 シーメンス アクチエンゲゼルシャフト
 Siemens Aktiengesellschaft
 ドイツ連邦共和国 D-80333 ミュンヘン
 ヴィッテルスバッハープラッツ 2
 Wittelsbacherplatz
 2, D-80333 Muenchen,
 Germany
 (74) 代理人 100075166
 弁理士 山口 巖

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生化学分析方法と装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

互いに化学的又は生化学的に反応する物質を受け入れるための少なくとも2個の反応室を備えるマイクロ反応アレイを使用する生化学分析方法において、酵素結合による同定反応における反応室間の化学的な干渉(クロストーク)を避けるための方法であって、下記の事項を特徴とする方法。

局所的に区切られた反応室を第1容積部として使用し、

反応室を供給容積部として知られる第2容積部を介して互いに結合させ、

個々の反応室内で量的におよび/又は種類の相違する酵素結合反応を進行させ、更に

反応室と供給容積部との間の物質移動を各々必要に応じて一方向又は両方向において許容し又は阻止し、この物質移動の阻止が、機械的な押し型によりハウジング上部が反応室を閉鎖することにより、行なわれる。

【請求項 2】

第1時点(t_1)で、反応室と供給容積部との間で所定の物質移動を行い、第2時点(t_2)で、反応室間の物質移動を極めて広範囲に抑制又は阻止することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 3】

所定の物質移動のために、反応室を機械的に開・閉することを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項 4】

反応室の閉鎖を、供給容積部の排除で実現することを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】

所定の時点での物質移動のため、反応室内に存在する物質と供給容積部に存在する物質との間の相境界を一時的に透過性であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項6】

個別の相互に分離した反応室内で、物質のコンビナトリアル解析および/又は合成を行うことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項7】

酸化還元リサイクル法での使用を特徴とする請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項8】

酵素結合反応法での使用を特徴とする請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

供給容積部(4)から互いに化学的又は生化学的に反応する物質を受け入れるための局所的に区切られた少なくとも2つの反応室(10、10'・・・)と、反応室(10、10'・・・)を閉鎖するための手段とを有する平面アレイであることを特徴とする請求項1から8のいずれか1項に記載の方法を実施するための装置。

【請求項10】

反応室(10、10'・・・)が、各々1μリットル未満の容積を有することを特徴とする請求項9記載の装置。

20

【請求項11】

平面アレイ(8、8'・・・)が、シリコン基板(1)上に取付けられたことを特徴とする請求項9記載の装置。

【請求項12】

反応室(10、10'・・・)が、シリコン上に被着されたポリマ層(11)で相互に分離されたことを特徴とする請求項11記載の装置。

【請求項13】

反応室(10、10'・・・)が、シリコン基板内へマイクロ構造技術で形成されたことを特徴とする請求項11記載の装置。

【請求項14】

30

複数の反応室(10、10'・・・)が、物質移動のために開放され、かつ液体を充填された空洞であり、供給容積部(4)と接触し、その結果複数の反応室が同時に充填可能であることを特徴とする請求項3記載の装置。

【請求項15】

液体を充填された反応空洞(10、10'・・・)と供給容積部(4)との間の物質移動が閉鎖により阻止され、この際空気等の他の媒質が空洞(10、10'・・・)へ到達しないことを特徴とする請求項9記載の装置。

【請求項16】

反応室(10、10'・・・)を閉鎖する閉鎖層が存在することを特徴とする請求項9記載の装置。

40

【請求項17】

閉鎖が、シリコーンゴム等の部分的に弾性の平面状ポリマ層(5)により行われることを特徴とする請求項16記載の装置。

【請求項18】

反応室(10、10'・・・)の開口部の閉鎖が、供給容積部(4)の排除により行われることを特徴とする請求項17記載の装置。

【請求項19】

反応室(10、10'・・・)が、ゲルが充填された空洞(3)により形成され、該空洞が物質移動のためにゲルと供給容積部との相境界を有することを特徴とする請求項9～18のいずれか1項に記載の装置。

50

【請求項 20】

相境界の閉鎖により、ゲルが充填された反応室（10、10'・・・）間の物質移動が阻止されることを特徴とする請求項19記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、他の物質と化学的又は生化学的に反応する物質を受け入れる少なくとも2個の反応室を備えたマイクロ反応アレイを使用する生化学的分析方法に関する。更に本発明は、本方法を実施するための装置にも関する。

【0002】

生命科学産業（医薬品）、食品技術、農業技術（植物保護）における新規活性物質の開発のため、医学診断において、更に一般バイオテクノロジーにおける様々な課題を解決するためにも、現代では益々多くコンビナトリアル解析ないし合成が利用されている。このために、例えば約 $12 \times 8 \text{ cm}^2$ のアレイ面積上で同時反応させるために96ウエル又は更に384ウエルを組み込んだアレイ構造の反応ウエルを用いる所謂マイクロタイタープレート技術が使用されている。このアレイ密度は将来更に上昇しようが、これは種類の異なる化学反応を、益々密に配置された反応室内で発生させねばならないことを意味する。

10

【0003】

極めて多いのは、例えば平面基板、所謂DNAチップ上に僅か数 $10 \mu\text{m}$ の間隔で、 mm^2 当たり例えば数百の位置密度で配置した、例えば様々なDNA捕捉分子のアレイにおける状況である。例えば未知のDNAの分析学的検出において自由に移動可能な分子が関わっている場合は、そうした高密度アレイでは化学的クロストークが発生する。

20

【0004】

例えば特異性が高く検出限界が低いというような一連の理由から、生化学分析では酵素結合検出方法が頻繁に利用されている。一般に広く普及しているのは、例えば医学診断および研究分野における所謂ELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay（酵素結合免疫吸着検査法））試験である（B. Alberts他（編集）、Molekularbiologie der Zelle（細胞の分子生物学）（1997）、第3巻、第216頁、VCHワインハイムの文献を参照）。更にDNAチップの分野で使用するためには、よく知られている酸化還元リサイクル法において酵素マーカを用いる方法が使用されている（A. V. D. Berg, P. Bergveld（編集）、 $\mu\text{TAS}'94$ 研究会のプロシーディング集（1994）、第249～254頁、Kluwer Academic Publishers、ドルトレイト）。

30

【0005】

技術文献の中で報告されている全てのケースで、酵素は所謂アッセイと呼ばれる装置の液相内に自由に存在するのではなく結合されているので、「酵素標識」として主として検出すべき物質をマーキングする。このとき検出すべき物質への酵素分子の「結合」は常に化学量論的に行われる。これを増幅する、つまり増強するために、酵素が添加されている基板分子が高速で分解される。この分解がそのつど使用された基板ないしは発生する生成物に従って例えば光学的又は電気化学的に定量される。このために、使用する方法とは無関係に、特に生成物Pの濃度上昇、即ち時間依存性関数 $dc(P)/dt$ が追求される。

40

【0006】

そのアッセイを先行技術の項で詳細に説明したように1つのアレイ内で実施すると、酵素によって形成され、自由に移動する反応生成物が隣接する酵素を含まないアレイ位置へ到達し、そこで酵素標識が存在するかのように見せかける可能性がある。これはクロストークと呼ばれており、測定誤差を導き、それにより間違った結果を生じる可能性がある。

【0007】

このため本発明の課題は、クロストークを回避することで先行技術に比べ高い信頼性を持ち、更に「擬陽性」の結果の排除を保証できる方法と相応の装置を提供することである。精度の上昇に伴い、特に測定効率を改善できる。

【0008】

50

この課題は、本発明に従うと上記の種類の方法において請求項 1 に記載の方法により解決される。その他の態様は従属する方法請求項に示す。対応装置は、特許請求項 1 4 の対象である。これに関連するその他の態様は従属する物の請求項に記載してある。

【0009】

本発明に従う方法では、局所的に区切った反応室を第 1 容積部として使用する。この際反応室は供給容積部として知られる第 2 容積部を介して互いに結合し、個々の反応室内では量的におよび / 又は種類の相違する化学的ないし生化学的反応が進行する。種類の異なる反応とは、質的に異なるプロセスである。この際同様に、反応室と供給容積部との間の物質移動が各々必要に応じ—又は両方向において許容されるか阻止される。

【0010】

本発明の本質的な長所は、反応室が密に隣接するにも係らず、測定結果を歪める可能性がある干渉性のクロストークが不可能になり、その結果選択性が改善されることにある。更に、本発明により検出感度も上昇する。即ち検出限界が極めて低い量へ移動する。

【0011】

検出感度の上昇を実際的に実現するには、基板 / 生成物濃度の時間的変化をできる限り上昇させることが重要である。これは本発明に従う方法では反応容積を著明に 1 μ リットル未満、特に 1 nリットルの範囲に迄低下させ、かつそれに結び付いている基板 / 生成物濃度変化を上昇することにより達成される。

【0012】

本発明に従う装置は、1つの平面基板上に装置されている数 mm^2 、好ましくは 1 ~ 約 10 mm^2 上の、各々 2 以上、典型的には数百の位置を備えるアレイである。各アレイは反応室アレイとして形成され、反応室と一緒に接近できる供給容積部を備えた容器の構成要素である。このような供給容積部は、例えばそれを通して検出又は合成反応のために必要な化学 / 生化学物質の全体的な液体処理を進行させる貫流セル内に反応室アレイを埋め込むことで実現できる。

【0013】

貫流セル内で平面基板に対向する、例えばシリコンゴム製の弾性膜又は層を用いると、本発明の好適な第 1 実施形態では基板に機械的装置を強く押し付けることで個々のアレイ位置に形成された反応室を相互に分離し、その結果クロストークを効果的に防止できる。この装置は、それらを用いると反応室で形成されたキャビティが閉鎖される、例えば蓋、押し型 (スタンプ) 又は密封性の膜の形状で形成できる。キャビティを閉じると、個別アレイ位置の上方の液体室の容積も減少するので、化学 / 生化学反応に伴い惹起される基板 / 生成物の濃度が上昇する。これにより同時に検出感度が上昇する利点がある。

【0014】

本発明の別の好適な実施形態では、遮断液で被覆することにより同様の効果を得る。反応キャビティ内の液体と混合しない適切な遮断液を貫流導管に充填すると、これはシリコン製押し型を用いたアレイキャビティの閉鎖と同一の作用を果たす。遮断液は例えばシリコン油である。本実施形態の有益な変形例では、反応室に、遮断液が貫流導管内に流入した際に水分を含有し、反応室へ機械的安定性を与えるヒドロゲルを充填する。ヒドロゲルとして、シリコン油に関し要求される特性を示す、例えばポリアクリルアミドを使用する。

【0015】

本発明の方法の更なる変形例では、関与する材料と物質との相異なる化学的溶解挙動を利用する。本発明に従う装置のこの実施形態でも、反応室にヒドロゲルを充填するとよい。供給容積部の貫流導管内のヒドロゲル - 反応室と適切な液相との間で溶解挙動が相違するため、反応遊離体は液相からヒドロゲル相内へ進入するが、反応生成物はもはやヒドロゲル相から離れられない結果となる。この反応遊離体は、例えば酵素基質である。

【0016】

本発明の詳細および長所を、特許請求項と結び付いた図面を基に、下記の実施例の図の説明から明らかにする。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

図面には、同一ないし同様に作用する部分に同一ないし対応する参照符号を付してある。以下、これら図面を部分的に共通して説明する。

【 0 0 1 8 】

図1で1は、例えばシリコンチップの結晶構造表面によって形成された平面状表面を持つ基板を示す。基板1上に、光学的／電氣的検出器2、2'・・・のアレイが、それらを用いて一方では捕捉分子、他方では分析物分子を使用する所謂酵素結合反応を用いるバイオ分析検査が行われるアレイ位置8、8'・・・に形成されている。アレイ位置8、8'・・・上に相違する捕捉分子110、120・・・が存在するので、各特定のアレイ位置上では相異なる分析物分子を検出できる。

10

【 0 0 1 9 】

詳細には、図1ではバイオ分析検査のための方法において、アレイ位置8の上の第1捕捉分子は110、アレイ位置8'の上の第2捕捉分子は120、分析物分子は200そして所謂酵素標識は300で示す。このとき、例えば捕捉分子110は相補的分析物分子200と特異的に反応するので、アレイ内で位置特異的に酵素標識300を固定化する。引き続き遊離体として添加される酵素基質400は酵素標識300の触媒作用によって生成物500に変換させられる。

【 0 0 2 0 】

従って分析物分子200は、図1では捕捉分子110と反応するが、捕捉分子120とは反応しない。ウエハー1の各分析位置8、8'・・・上では、そこに装置した光学的／電氣的検出器2、2'・・・を用いて、基板／生成物の増減を測定できる。測定技術上特に有益なのは電氣的検出器である。

20

【 0 0 2 1 】

先行技術では、分析位置8、8'・・・それ自身と、それらの間隔とをできる限り小さくすべく努力している。しかし先行技術では、個々の位置8、8'・・・間で、所謂化学的クロストークが発生する可能性がある点が問題になる。これは、先に遊離体であると定義した酵素基質400も、第1アレイ位置8の反応生成物500も第2アレイ位置8'へ達する可能性があることを意味する。仮に隣接位置に達すると、陽性結果であるように見せかける疑似信号が発生する。実際には、これは「偽陽性」信号とも呼ばれている。

【 0 0 2 2 】

図2～4では、別の代替実施形態のためのアレイに各々1μリットル未満の個別容積を持つ個々の反応室10、10'・・・を設けている。この際反応室10、10'・・・は、通常の作業条件下では相互に分離されている。

30

【 0 0 2 3 】

図2は、反応室10、10'・・・を壁11、11'・・・により分離したある装置の活動を3段階で例示する。壁11、11'・・・は、特別な幾何学的実施形態では、例えば内径150μm、外径180μm並びに高さ50μmの、フォトリソで成形された円形のポリマーリングにより実現できる。反応室10、10'・・・には、例えば電解質7中に溶解させた酵素基質等の反応遊離体が充填されるが、この際電解質液2は供給容積部4を経て個別反応室へ供給される。

40

【 0 0 2 4 】

反応室10、10'・・・は、図2ではハウジング上部5により機械的押し型6を用いて閉鎖できる。開放状態では、キャビティの上方に液状電解質を含む供給容積部4が存在する。図2では、最初にハウジング上部5を取り除いた際に開放しているチャンバとしての反応室10、10'・・・に電解質／遊離体7が貫流にて充填されるが、電解質7のためのリザーバは、ここでは示していない。反応キャビティ10、10'・・・が電解質／遊離体7で充填されると、押し型6を用いて、例えばシリコン膜から形成したハウジング上部5が既に述べたようにポリイミドからなる壁11、11'・・・上に載せられる。この結果反応室10、10'・・・が閉鎖され、それに伴いその後の物質移動が防止される。

50

【 0 0 2 5 】

図3では、下方領域を図2と同様に構成している。壁11、11'・・・は、図3では明白にならない特別な実施形態では、例えば150 μmの内径d (d = 2r)、180 μmの外径D並びに5 μmの高さhを有し、特にフォトリソプロセスで成形された円形のポリマリングで実現できる。この寸法の結果として生じる約0.1 nリットル ($r^2 h = 75 \mu m^2 \times 3.14 \times 5 \mu m$) の充填量を持つ反応キャビティには、この特別な実施形態では、例えばポリアクリルアミド等の含水能力の高いヒドロゲル3を充填する。ヒドロゲル3には、その後特異的DNA検出のため捕捉DNAを固定化させて組み込むことができる。

【 0 0 2 6 】

アッセイを実現するため、反応室10、10'・・・に、再び共通の供給容積部4を経て緩衝液、試薬類そして最後に酵素基質を供給する。全反応室10、10'・・・の1つのヒドロゲル3が酵素基質含有緩衝液と平衡して酵素変換が始まった後、供給容積部4に例えばシリコン油等の遮断液を流す。これは反応室の上方の液体をシリコン油で追い出すように作用する。ヒドロゲル構造は反応室の機械的安全性をもたらす。シリコン油中では酵素生成物が不溶のため、ヒドロゲルから隣接反応室への酵素生成物の拡散を防止できる。そこで反応生成物は隣接反応室に到達することなく反応室内に高度に蓄積する。その結果、同様に高い感受性と選択性が生ずる。

【 0 0 2 7 】

本質的に、図2、3に従う2つの実施例では、各反応室10、10'・・・に最初に供給容積部4から貫流する電解質7を充填し、その後例えばシリコン油9等の、電解質7と界面を形成する物質を供給する。この界面によって、もはや物質移動が不可能となり、干渉性の歪曲を排除できる。

【 0 0 2 8 】

図3に従う実施形態の特別な変形例では、反応室10、10'・・・に、シリコン油等の遮断液9が貫流導管に進入した際に水を含む反応室10、10'・・・に機械的安全性を与えるポリアクリルアミド等のヒドロゲル3を充填する。

【 0 0 2 9 】

図4は、本質的には図2における構造と一致している。反応室10、10'・・・を、図2、3と同様供給容積部4からの貫流で充填する。ここでは、Eで示す反応遊離体は、特異的な溶解挙動により、充填後に反応室10、10'・・・内に存在する電解質7内へ進入する能力を有している。

【 0 0 3 0 】

図4に示す装置では、反応室内の反応は上述のとおりに行進する。尤もこの反応では、ここではPで示す、反応生成物の特異的な溶解挙動に伴いPからの物質放出は不可能である。従って、同様に干渉性のクロストークを防止できる。この実施形態でも、図3と同じく、反応室にヒドロゲル3を充填するとよい。

【 0 0 3 1 】

上述の方法とそれに関連する装置は、特に医学診断およびバイオテクノロジーで使用すると良好な結果を得ることができる。本質的な誤差要因であるクロストークを排除できることから、従来方法と比べ一層正確な結果を入手できる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 先行技術に従った測定構成を示す図である。

【 図 2 】 AからCは機械的に閉鎖するための装置例を3段階で示す図である。

【 図 3 】 AからCは遮断媒質を用いてキャビティを閉鎖する対応装置例を3段階で示す図である。

【 図 4 】 AからCはキャビティの閉鎖が関与する媒質の相違する溶解挙動により達成される第3の装置例を3段階で示す図である。

【 符号の説明 】

1 基板、3 ヒドロゲル、7 電解質、8、8' アレイ位置、9 シリコン油、1

10

20

30

40

50

0、10' 反应室、11、11' 壁、110、120 捕捉分子、200 分析物分子、300 酵素標識、400 酵素基質、500 反应生成物。

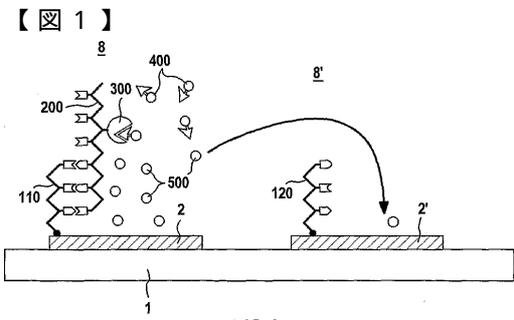
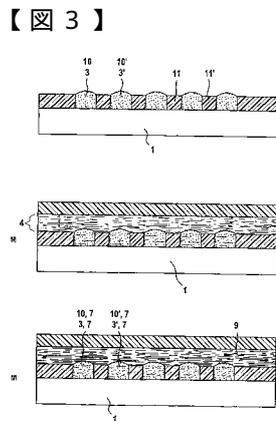
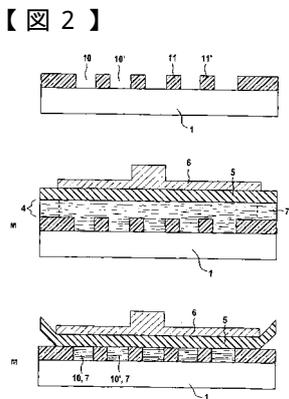
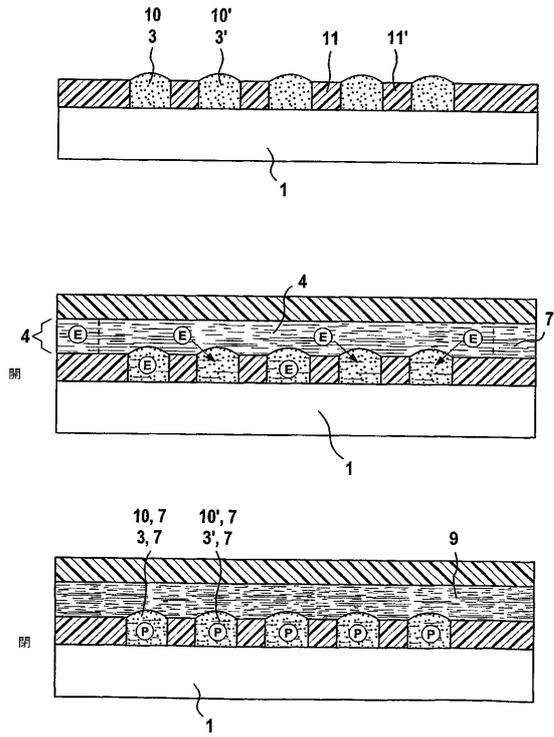


FIG 1



【 図 4 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ムント、コンラート
ドイツ連邦共和国 9 1 0 8 0 ウッテンロイト ランゲンブルッカー ヴェーク 1 0
- (72)発明者 グンブレヒト、ヴァルター
ドイツ連邦共和国 9 1 0 7 4 ヘルツォーゲンアウラッハ イン デア レーテ 1
- (72)発明者 シュタンツェル、マンフレート
ドイツ連邦共和国 9 1 0 5 6 エルランゲン タウヌスシュトラッセ 1 0 0
- (72)発明者 ヒンチュケ、ライナー
ドイツ連邦共和国 1 3 1 2 7 ベルリン グラーフェンシュタインシュトラッセ 6 1 ツェー

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 米国特許第0 6 1 4 3 4 9 6 (U S , A)
国際公開第0 2 / 0 2 5 2 8 9 (W O , A 1)
Anal Biochem , 1 9 9 8 年 , Vol.259, No.1, Page.34-41
Micro Total Anal. Syst., Proc. .mu.TAS '94 Workshop, 1st (1995), Meeting Date 1994, 24
9-54.

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53
B01J 19/00
G01N 37/00
G01N 35/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	生化分析方法和装置		
公开(公告)号	JP4347564B2	公开(公告)日	2009-10-21
申请号	JP2002544162	申请日	2001-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	西门子公司		
申请(专利权)人(译)	西门子激活日元Gezerushiyafuto		
当前申请(专利权)人(译)	西门子激活日元Gezerushiyafuto		
[标]发明人	ムントコンラート グンブレヒトヴァルター シュタンツェルマンフレート ヒンチュケライナー		
发明人	ムント、コンラート グンブレヒト、ヴァルター シュタンツェル、マンフレート ヒンチュケ、ライナー		
IPC分类号	G01N33/53 B01J19/00 G01N37/00 G01N35/02 B01L3/00 C40B60/14		
CPC分类号	B01J19/0093 B01J19/0046 B01J2219/00317 B01J2219/00333 B01J2219/00335 B01J2219/00351 B01J2219/00608 B01J2219/00612 B01J2219/00621 B01J2219/00644 B01J2219/00659 B01J2219/ /00783 B01J2219/00828 B01J2219/0086 B01J2219/00867 B01L3/502 B01L3/50853 B01L2200/0642 B01L2200/0673 B01L2300/0819 B01L2300/0829 C40B60/14 G01N27/3277		
FI分类号	G01N33/53.ZCC.M B01J19/00.321 G01N37/00.102 G01N35/02.B		
代理人(译)	山口岩		
审查员(译)	三木隆		
优先权	10058394 2000-11-24 DE		
其他公开文献	JP2004514152A JP2004514152A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用微反应阵列的生物化学分析方法，所述微反应阵列包括至少两个反应室，用于化学或生物化学反应在一起的物质。反应室的体积小于1 μ l，反应室通过流过物填充在一起，之后保留在其中的物质的化学或生物化学反应在反应室中分离，防止各反应室中反应物之间的串扰，并且反应产物在密封时保留在反应室中。该装置包括至少两个用于接收物质的反应室，该平面阵列包括用于关闭反应室以防止质量交换的装置。

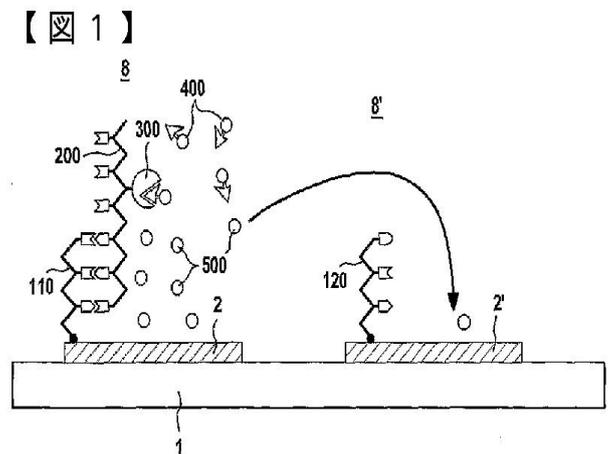


FIG 1