

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5006494号
(P5006494)

(45) 発行日 平成24年8月22日 (2012. 8. 22)

(24) 登録日 平成24年6月1日 (2012. 6. 1)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 M
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 M 1/34 (2006. 01)	C 1 2 M 1/34 Z
GO 1 N 21/64 (2006. 01)	GO 1 N 21/64 G
GO 1 N 21/78 (2006. 01)	GO 1 N 21/78 C
請求項の数 15 (全 27 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-517147 (P2001-517147)	(73) 特許権者	504109610
(86) (22) 出願日	平成12年8月3日 (2000. 8. 3)		バイエル・テクノロジー・サービシーズ・
(65) 公表番号	特表2003-507705 (P2003-507705A)		ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテ
(43) 公表日	平成15年2月25日 (2003. 2. 25)		ル・ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/007529		Bayer Technology Se
(87) 国際公開番号	W02001/013096		r v i c e s G m b H
(87) 国際公開日	平成13年2月22日 (2001. 2. 22)		ドイツ連邦共和国51368レーフェルク
審査請求日	平成19年8月2日 (2007. 8. 2)		ーゼン
(31) 優先権主張番号	1486/99	(74) 代理人	100078662
(32) 優先日	平成11年8月13日 (1999. 8. 13)		弁理士 津国 肇
(33) 優先権主張国	スイス (CH)	(74) 代理人	100131808
			弁理士 柳橋 泰雄
		(72) 発明者	アーベル, アンドレアス ペー
			スイス国 ツェーハー 4054 バーゼ
			ル ロートベルクシュトラッセ 16アー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数の分析物を測定するためのデバイス及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

平面型光導波路を有するセンサプラットフォームと、
前記平面型光導波路に直接的に又は封止媒体によって接続された密封層と、
少なくとも前記センサプラットフォームに隣接して開放された凹部からなり、少なく
とも長さ方向と幅方向に2つずつ配置された密封層内の複数の標本区画と、
を含み、

前記標本区画のそれぞれは、一つの導波路領域を含み、導波路領域の2次元配列中の5
つ以上の離散的な測定領域に固定化された異なる分析対象物の特異的認識及び結合のため
の異なる生物学的又は生化学的認識要素を有し、

前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサプラットフォームの一部とし
て、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、

前記標本区画は、前記平面型光導波路から離れる方に面する側で、標本又はその他の試
薬の供給又は除去を局所的に行うための開口部を有するデバイス。

【請求項 2】

標本区画内の各々で、単一の標本区画における5つ以上の測定領域のうちの1つ以上の
測定領域が、基準のために使用される請求項1記載のデバイス。

【請求項 3】

センサプラットフォームの一部としてのフィルム光導波路が、層(a)よりも低い屈
折率を有する第2の光透過層(b)の上の第1の光透過層(a)を有するフィルム光導波

10

20

路である請求項 1 又は 2 記載のデバイス。

【請求項 4】

横方向に分離された測定領域 (d) が、前記センサプラットフォーム上の生物学的、生化学的又は合成の認識要素を横方向に選択的に被着させることによって生成される請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のデバイス。

【請求項 5】

分析物に関して「化学的に中性」である化合物が、非特異的結合又は吸着を最小限にすべく、横方向に分離された測定領域 (d) の間に被着されている請求項 4 記載のデバイス。

【請求項 6】

1 以上のルミネセンスを測定するための分析システムであって、
a . 少なくとも 1 つの励起光源、
b . 請求項 1 ~ 5 のいずれかのデバイス、
c . センサプラットフォーム上の少なくとも 1 つ以上の測定領域 (d) から発出する光を記録するための少なくとも 1 つの検出器、
を含む分析システム。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの光源によって放射される励起光が、コヒーレント光であり、光透過層 (a) 内への内部結合のために、共鳴角度で 1 以上の測定領域上に向けられている請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項記載のデバイスを有する請求項 6 の分析システム。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの横方向分解検出器が、検出のために用いられる請求項 6 又は 7 記載の分析システム。

【請求項 9】

励起光の発射と、1 以上の測定領域からの放射光の検出とが、1 以上の標本区画について逐次的に実施される請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項記載の分析システム。

【請求項 10】

横方向に分離した少なくとも 5 つの測定領域上の 1 以上の標本におけるルミネセンスにより 1 以上の分析物を、デバイスを用いて測定する方法であって、

デバイスは、平面型光導波路を有するセンサプラットフォームと、

前記平面型光導波路に直接的に又は封止媒体によって接続された密封層と、

少なくとも前記センサプラットフォームに隣接して開放された凹部からなり、少なくとも長さ方向と幅方向に 2 つずつ配置された密封層内の複数の標本区画と、
を含み、

前記標本区画のそれぞれは、一つの導波路領域を含み、導波路領域の 2 次元配列中の 5 つ以上の離散的な測定領域に固定化された異なる分析対象物の特異的認識及び結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素を有し、

前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサプラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発し、

前記標本区画は、前記平面型光導波路から離れる方に面する側で、標本又はその他の試薬の供給又は除去を局所的に行うための開口部を有し、

励起光が測定領域へと誘導され、標本中又は測定領域上の発光し得る物質を励起してルミネセンスを放射せしめ、発せられたルミネセンスを測定する方法。

【請求項 11】

前記測定領域が、平面型光導波路内で誘導される励起光のエバネッセント場と光学的に相互作用する請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

1 以上のルミネセンスの測定以外に、測定領域上の有効屈折率の変化が、測定される請求項 10 又は 11 記載の方法。

【請求項 13】

抗体又は抗原、レセプター又はリガンド、キレート剤又は「ヒスチジン - タグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNA又はRNAストランド、DNA又はRNA類似体、酵素、酵素コファクター又は阻害物質、レクチン、及び炭水化物を含む群の中の1以上の分析物を同時に又は逐次的に、定量的に又は定性的に測定する請求項10～12のいずれか1項記載の方法。

【請求項14】

検査対象標本が、光学的に濁った液体、又は表層水、土壌若しくは植物抽出物、又は生体プロス若しくはプロセスプロスである請求項11～13のいずれか1項記載の方法。

【請求項15】

薬学研究、コンビナトリアル化学、臨床及び前臨床開発におけるスクリーニング方法の化学的、生化学的又は生物学的分析物を定量的又は定性的に測定するための、

親和性スクリーニング及び調査におけるリアルタイム結合性研究及び動態パラメータの測定のための、

分析物、特にDNA及びRNA分析物の定性的及び定量的測定のため、及びゲノム内のゲノミック又はプロテオミック差を測定するための、

タンパク質 - DNA相互作用を測定するための、

mRNA発現及びタンパク質合成についての制御メカニズムを測定するための、

毒性研究の発生のため及び発現プロファイルの測定のため、生物学的及び化学的マーカー化合物を測定するための、

医薬品の開発研究、人間及び獣医学診断、農業化学製品の開発研究における抗体、抗原、病原体又は細菌を測定するための、

症候性及び前症候性の植物診断のための、

医薬品開発における患者の層別化のため及び治療薬選択のための、

食品及び環境分析における病原体、有害物質及び有害細菌、特にサルモネラ、プリオン及び細菌の測定のための、請求項10～14のいずれか1項記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、複数の標本区画を含むデバイスであって、前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合とのための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画において5つ以上の離散的な測定領域に固定化され、前記測定領域におけるこれらの生物学的又は生化学的認識要素は、直接的に、又は付着促進層と場合によってはさらなる層とによって、前記標本区画の境界を形成するセンサープラットフォームの一部として、光導波路の表面上に固定化されている。かくしてセンサープラットフォームは、異なる実施形態で提供することができる。

【0002】

本発明は、前記センサープラットフォームの異なる実施形態を有する本発明によるデバイスと、少なくとも1つの励起光源と測定領域から発せられる光を検出する少なくとも1つの検出器とを有するルミネセンスの測定のための光学系と、センサープラットフォーム上の測定領域と1以上の標本を接触せしめる供給手段と、を含む分析システムにも関する。本発明のさらなる目的は、本発明によるセンサープラットフォームと、光学系と、分析システムとを用いたルミネセンスの検出のための方法、及び定量的親和力の検知やその他の利用分野のためのこれらの方法の使用である。

【0003】

本発明の目的は、複数の分析物を同時に高感度で測定することを可能にするものであり、複数の少量標本区画を有する測定構成を提供することにある。

【0004】

複数の分析物を測定するためには、異なる分析物の測定が、別個の標本区画やいわゆるマイクロタイタープレートの「ウェル」内で実施されるような方法が主として現在用いられている。最も一般的には、単一のウェルを満たすのに数百マイクロリットルの量が必要とされる標準的に約8 cm × 12 cmの占有面積に対し8 × 12ウェルのピッチ（幾何上の行と

10

20

30

40

50

列の配置)を有するプレートである。しかしながら、数多くの応用分野において、できるかぎり少ない標本量を用いて単一の標本区画内の多くの分析物を測定できることが望ましい。

【0005】

米国特許第5,747,274号においては、少なくとも3つの梗塞マーカから複数のマーカを測定することに基づき心筋梗塞を早期認識するための測定用配置及び方法が記述されており、ここでは、これらのマーカの測定は、個別標本区画内又は共通の標本区画内で実施でき、単一の(共通の)標本区画は、後者のケースについての開示に従うと、連続した流路として具備され、その1つの境界は例えば、3つの異なるマーカについての抗体が上に固定化されている膜によって形成されている。しかしながら、共通の支持体上にこのタイプの複数の標本区画又は流路の配置についての提案は全く存在しない。さらに、測定領域のサイズに関する幾何学的情報も全く存在しない。

10

【0006】

WO84/01031、米国特許第5,807,755号、米国特許第5,837,551号及び米国特許第5,432,099号においては、固体支持体上において、部分的に 1mm^2 を大きく下回る小さな「スポット」の形状における分析物についての特異的認識要素を固定化することが提案されている。この固定化した形状の目的は、インキュベーション時間のみに依存し、絶対的標本量(連続流がない状態で)とは基本的に関係であるようなやり方で、存在する分析物分子のわずかな部分のみを結合させながら、分析物の濃度を測定できるということにある。関連した例で開示されている測定用配置は、従来のマイクロタイタープレート内での蛍光測定による測定に基づいている。そのために、最高3つの異なる蛍光標識づけされた抗体のスポットが共通のマイクロタイタープレートウェル内で測定されるような配置も記述されている。これらの特許明細書において理論的論証に従って、スポットサイズを最小限にすることが望ましいと思われる。しかしながら、背景信号から区別しなければならない最低の信号の大きさのために、スポットサイズについてさらに低い限界が設定されることになる。

20

【0007】

より低い検出限界を達成するために、近年、分析物の測定がエバネッセント場とのその相互作用に基づき、これが光導波路内の光の誘導と結びつけられており、又ここで、分析物分子の特異的認識及び結合のための生化学又は生物学的認識要素が導波路の表面上に固定化されているような数多くの測定用配置が開発されてきた。

30

【0008】

光波は、光学的により稀な媒質つまりより低い屈折率の媒質によって囲まれている平面の薄膜導波路内に結合されている場合、導波層の界面での全反射によって誘導される。この配置では、わずかな電磁エネルギーが、より低い屈折率の媒質内に進入する。この部分はエバネッセント(減衰)場と呼ばれる。エバネッセント場の強度は、導波層自体の厚さ及び導波層とそれを取り囲む媒質の屈折率の比によって大幅に左右される。薄い導波管の場合、すなわち層厚さが誘導すべき光の波長と同じか又はそれよりも小さい場合、誘導される光の離散的モードを区別することができる。かかる方法の利点は、分析物との相互作用が、およそ数百ナノメートルにある隣接媒質内へのエバネッセント場の進入深度に制限され、(バルク)媒質の深いところからの干渉信号を主として回避できる点である。このタイプの第1の提案されている測定用配置は、数百マイクロメートルから数ミリメートルまでの厚さをもつ透明なプラスチック又はガラスの繊維又はプレートの如ききわめて多モードの自立式単層導波路を基礎とするのであった。

40

【0009】

米国特許第4,978,503号においては、液体標本が毛管力によりキャビティ内に引き込まれ、光透過性の側壁が自立式多重モード導波路として設けられ、少なくともキャビティに面するこの側壁(「パッチ」)の一部の表面上において、標本からの分析物の認識及び結合のための生化学認識要素が固定化されている測定用配置が開示されている。複数の離散的なパッチの配置を有するアレイの製造について記述されているが、さらなる説明

50

によると、パッチが、毛細管のカバープレートとベースプレートの組合せのために設けられた連結用リンクによって互いに横方向に分離されており、このため、アレイの分離後に、毛細管の各々が、固定化された認識要素の1つのパッチのみを収納することが教示されている。さらに、この配置の欠点は、毛細管内に引き込まれた液体の交換が用意されておらず、例えば多重工程分析試験にはかかる交換が望ましいという点である。

【0010】

WO94/27137においては、異なる分析物を測定するための異なる認識要素を有する「パッチ」が自立式光学基板導波路（単層導波路）上に固定化され、励起光は末端表面で内部結合し（「前面」又は「末端端部」結合）、横方向に選択的な固定化が光活性化可能な架橋剤を用いて実施される測定用配置が開示されている。開示によると、いくつかのパッチを共通の平行な流路又は標本区画内に行の形のように配置することができ、平行な流路又は標本区画は、導波路内の光誘導を損なうことがないようにするため、センサーとして使用される導波路上の範囲の全長にわたり伸長している。しかしながら、比較的小さいサイズ、即ち、 1 cm^2 のベース面積よりも著しく小さいサイズの標本区画内に複数のパッチを2次元に集積することについての示唆は全くない。WO97/35203に開示されている類似の配置においては、配置についてのいくつかの実施形態が開示されており、これは、異なる分析物を測定するための異なる認識要素が、低い分析物濃度、場合によっては高い分析物濃度の検量用溶液のため及び標本のための分離した平行流路又は標本区画の中に固定化されているものである。ここでも、標本収容用の共通区画内で異なる認識要素に高い集積密度をいかに達成するかについての示唆は全く示されていない。さらに、非常に多モードの自立式単層導波路の感度は、非常に低い検出限界を達成する必要のある数多くの利用分野にとって十分なものではない。

【0011】

感度を改善して同時に大量生産でより容易に製造すべく、平面型薄膜導波路が提案されてきた。最も単純なケースでは、平面型薄膜導波路は、支持部材（基板）、導波層、上層（それぞれ分析すべき標本）といった3層系から成り、導波層は最も高い屈折率を有している。付加的な中間層がさらに、平面型導波路の作用を改善することができる。

【0012】

平面型導波路に励起光を内部結合するためのいくつかの方法が知られている。最も早期に使用されていた方法は、前面結合又はプリズム結合に基づくものであり、エアギャップに起因する反射を低減すべくプリズムと導波路との間に液体を一般に採り入れたものであった。これら2つの方法は主として、比較的厚い層厚の導波路、すなわち特に自立式導波路と、屈折率が2よりも極めて小さい導波路と、に適している。しかしながら、高屈折率の非常に薄い導波層に励起光を内部結合するためには、結合格子を使用することがはるかに簡潔な方法である。

【0013】

光フィルム導波路の中で誘導される光波のエバネッセント場内での分析物の測定の異なる方法を区別することができる。適用される測定原理に基づいて、例えば、一方では蛍光やより一般的なルミネセンス方法、そして他方では屈折方法を判別することができる。このため、表面プラズモン共鳴を生成するための発射された励起光の共鳴角を測定対象量とした場合には、屈折率がより低い誘電層上における薄い金属層内での表面プラズモン共鳴の生成方法を屈折方法の群内に含めることができる。表面プラズモン共鳴も同様に、ルミネセンスの増幅のためや、ルミネセンス測定における信号対バックグラウンドの比の改善のために使用可能である。表面プラズモン共鳴の生成のための条件と、導波構造だけでなくルミネセンス測定との組合せと、については、文献、例えば米国特許第5,478,755号、5,841,143号、5,006,716号及び4,649,280号の中で記述されている。

【0014】

本出願においては、「ルミネセンス」という語は、光励起や、電気又は化学又は生化学又は熱励起の如き光励起以外の励起の後に、紫外線から赤外線までの範囲内での光子の自然

10

20

30

40

50

発出を意味する。例えば、化学ルミネセンス、生物ルミネセンス、電気ルミネセンス、さらに、特に蛍光及びリン光が「ルミネセンス」という語の中に内含される。

【 0 0 1 5 】

屈折測定方法の場合において、導波路に対する分子吸着又は導波路からの脱着の結果としてもたらされる有効屈折率の変化が、分析物検出のために使用される。有効屈折率のこの変化は、格子結合器センサーの場合には格子結合器センサー内へ又は外への内部結合又は外部結合のための結合角度の変化から測定され、干渉計センサーの場合には検知用分岐及び干渉計の基準用分岐の中に誘導された測定光の間の位相差の変化から測定される。

【 0 0 1 6 】

誘導された波の内部及び / 又は外部結合用として 1 以上の結合格子を使用するための技術的現状は、例えば、K.Tiefenthaler, W.Lukosz, 「集積光化学センサーとしての格子結合器の感度」、J. Opt. Soc. Am.B 6、209 (1989) ; W.Lukosz, Ph.M.Nellen, Ch.S tamm, P.Weiss 「集積光化学センサーとしての平面導波路上の出力格子結合器」、Sensors and Actuators B 1、585 (1990) ; 及び T. Tamir, S.T.Peng, 「格子結合器の分析と設計」Appl. Phys. 14、235 - 254 (1977) の中で記述されている。

【 0 0 1 7 】

米国特許 5,738,825 号では、全てプレート内に伸長する孔を有するマイクロタイタープレートと、ベースプレートとしての薄膜導波路と、から成る配置が開示されており、後者の薄膜導波路は、透明な自立式基板上的薄い導波フィルムで構成されている。観察された結合角度の変化の結果から、測定すべき分析物分子の吸着又は脱着に起因する有効屈折率の変化を測定するために、励起光の内部及び外部結合のための回折格子は、孔を有するマイクロタイタープレートとベースプレートとしての薄膜導波路とによって形成された開放標本区画に接触した状態で設けられている。格子構造上で標本区画内に認識要素を結合すると、1つの標本区画内で複数の分析物を測定することに注意が払われておらず、屈折測定原理、すなわち結合角度の相対的な変化の測定のため、ほとんど実施できないものと思われる。

【 0 0 1 8 】

前述の屈折方法は、それらがいわゆる分子標識である付加的なマーカー分子を使用することなく適用できるという利点を有している。しかしながら、これらの無標識方法の欠点は、測定原理の選択性がさらに低いことに起因して、達成可能な検出限界が、分析物の分子量に応じてピコないしはナノモル濃度範囲に制限されており、例えば診断の応用分野といったような近代の微量成分分析の数多くの応用分野にとって不十分であるという点にある。

【 0 0 1 9 】

より低い検出限界を達成するためには、ルミネセンスベースの方法は、信号生成の選択性がより高いものであるために、より適切なものと思われる。この配置では、ルミネセンス励起は、より屈折率の低い媒質内へのエバネッセント場の進入深度、すなわち、媒質内への進入深度が約数百ナノメートルの導波領域のすぐ近傍に制限される。この原理は、エバネッセントルミネセンス励起と呼ばれている。

【 0 0 2 0 】

透明な支持材料上のわずかな数百ナノメートルの薄い導波フィルムに基づくきわめて屈折性の高い薄膜導波路を用いることにより、近年、感度を著しく増大させることができた。例えば、WO 95 / 33197 では、回折光学素子としてのレリーフ格子によって励起光が導波フィルム内に結合される。センサープラットフォームの表面は、分析物を含有する標本に接触し、エバネッセント場の進入深度内に位置づけられたルミネセンス能力をもつ物質から等方発出されたルミネセンスは、フォトダイオード、光電子増倍管又は CCD カメラの如き適切な測定用配置によって測定される。導波路内にバック結合されたエバネッセント励起された放射の一部も同様に、格子のような回折光学素子によってアウト結合され測定され得る。この方法は、例えば WO 95 / 33198 号の中で記述されている。

【 0 0 2 1 】

特に明細書W O 9 5 / 3 3 1 9 7 及びW O 9 5 / 3 3 1 9 8 号内に技術的現状として記述されたエバネッセンス励起されたルミネセンスの検出のための全ての方法の欠点は、均質なフィルムとして層が形成されたセンサープラットフォームの導波層上ではつねに1つの標本しか分析できないという点にある。同じセンサープラットフォーム上でさらなる測定を行うためには、単調で退屈な洗浄又は清浄工程を連続して必要とする。このことは、特に第1の測定における分析物とは異なる分析物を測定しなくてはならない場合に当てはまる。免疫検定においては、これは一般に、センサープラットフォーム上に固定化された層全体を交換しなければならないこと、さらには丸ごと新しいセンサープラットフォームを使用しなければならないことを意味している。

【0022】

10

例えば、明細書W O 9 6 / 3 5 9 4 0 では、基本的に単モードの平面型非有機導波路で同時に又は逐次的にルミネセンスベースの複数の測定を専ら実施するために、励起光が別々に発射される少なくとも2つの離散的な導波領域が1つのセンサープラットフォーム上に設けられた配置(アレイ)が提案されてきた。しかしながら、離散的な導波領域へのセンサープラットフォームの分割が結果としてもたらす欠点は、共通のセンサープラットフォーム上における離散的な導波領域内に離散的な測定領域を備えるためには比較的広いスペースが必要となり、そのため再び比較的低い密度の異なる測定領域(つまりいわゆる「特徴」)しか行えない点にある。

【0023】

20

本発明の精神では、液体標本内の1つ以上の分析物の認識のため、生物学的又は生化学的又は合成の認識要素により占有されている領域によって、空間的に分離した測定領域(d)が画定されることになる。これらの領域は、例えば、点、円、矩形、三角形、楕円又は線といった形のあらゆる幾何形状を有することができる。

【0024】

平面型導波路のエバネッセント場内で励起されたルミネセンスの測定用の測定用配置のための標本区画の設計のための数多くのその他の配置に加えて、W O 9 8 / 2 2 7 9 9 では、既知のマイクロタイタプレート形状を有する配置も提案されている。しかしながら、単一の標本区画内で固定化された異なる認識要素に結合された複数の分析物の測定は、この開示中においても同様に扱われていない。

【0025】

30

従って、非常に感度の高い分析方法で多大な労力を費やすことなく、複数の分析物を同様に測定することができ、適切なセンサープラットフォームと組合わされた小容積の標本区画を提供する必要性が存在する。

【0026】

驚くべきことに、現在、共通のセンサープラットフォーム上の標本区画の2次元アレイの一部として単一の標本区画内の異なる生物学的又は生化学的認識要素を有する複数の測定領域の配置によって、特に薄膜導波路である適切な導波路のエバネッセンスフィールドの非常に効率の良い蛍光励起の選ばれた組合せに基づいて、(従前のマイクロタイタプレート上でのE L I S A 試験といったような)既知の古典的配置及び方法に比べて著しく低い検出限界及び高い測定領域集積密度を達成することができることが発見された。これにより、分析を単純化すべく付加的な洗浄工程なく実際の生物学的親和性分析のためにルミネセンス標識付けされた結合パートナーを添加した上で、ある一定の分析の検出工程中のルミネセンスによる分析物の測定を実施することができる。

40

【0027】

驚くべきことに、例えば分析の再現性に関して統計的に関連性ある情報はすでに、単一の標本区画内に異なる生物学的又は生化学的認識要素及び複数の測定領域を配置することに基づいて、単一の標本の添加後に単一の測定において生成可能である。それによって生成されたデータは、離散的な標本区画内の対応する数の単一の測定の結果よりも低い変動性によって特徴づけられており、これは互いに独立した測定値の変動性及び誤差の数多くの潜在的な付加的な原因が同時測定においては除外され得るからである。かくして、上述の

50

既知の分析方法（例えばELISA）と比較して、分析時間及び標本及び試薬の所要量の著しい削減を達成することができる。特に、非特異的結合、交差反応性、標本溶液のpH又は PO_2 の測定といったような化学パラメータの測定のための基準用測定は、かかる基準用測定のための標本区画内に1以上の測定領域を設けると、あらゆる単一標本区画内で実施することができる。かくして、かかる測定が異なる標本区画内で実施される従来の方法と比べて、これらの基準用測定の信頼性を著しく改善し得る。

【0028】

デバイス及びそれを用いて実施される分析方法では、プレートあたりの測定回数及び処理量を著しく改善することができる。かくしてプレート間における標準的に大きい変動を除去することによる他のものに加えて、測定の再現性と異なる標本での結果の比較可能性とを著しく改善することができる。例えば、単一のセンサープラットフォーム上の400個の測定領域の各々を含む96個の標本区画の場合、標準的に400個のマイクロタイタープレートを必要とする例えば薬品開発用の広範な連結した測定を単一のセンサープラットフォーム上で実施することができる。標本及び試薬の量の著しい削減及びそれに付随する標本調製のための労力の削減に加えて、結果の信頼性及び精度は、上述の理由から著しく改善される。

【0029】

かくして、本発明に従ったデバイス及び方法は、従来の既知の分析システム及び方法では提供できない次のような機能を提供する：

- 単一のセンサープラットフォーム／デバイス上での高速分析の展開；
- 単一のセンサープラットフォーム／デバイス上での未知の標本の用量応答曲線の測定、クロストーク及び分析；
- 単一で少量の標本内でのきわめて感度の高い多重分析物測定；
- 単一のセンサープラットフォーム上での広範な測定セットの実行。

【0030】

本発明の対象は、センサープラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層（g）（図1に従う）と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサープラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の標本区画を2次元配置で形成するデバイスであって、前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合とのための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画においける5つ以上の離散的な測定領域（d）（図1に従う）に固定化され、前記測定領域は、前記標本区画の境界表面を形成するセンサープラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容するように作動し得るデバイスである。

【0031】

標本区画内の各々で、単一の標本区画における5つ以上の測定領域のうちの一つが、基準のために使用することができる。

【0032】

同じ化学的又は光学的パラメータを基準とするための測定領域が、センサープラットフォームにわたって分布した複数の標本区画内で使用され、センサープラットフォームにわたって前記化学的又は光学的パラメータの横方向の分布を測定することができるときに、有利となる。例えば、利用できる励起光の強度は、測定されるべき光学パラメータとして理解されるべきものである。このようにして測定された化学パラメータの分布から、特に、異なる標本、例えば、標本の準備の結果として異なる標本区画に加えられる標本の組成、濃度又は体積の相違を考慮に入れることができる。

【0033】

デバイスの実施例として好ましいものは、測定領域が、平面型光導波路内において光学的

10

20

30

40

50

に相互作用して励起光のエバネッセント場を誘導するものである。

【0034】

センサプラットフォームの一部としての光導波路が、非有機材料好ましくはガラス、又は有機材料、好ましくはポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート若しくはポリスチレンを含む群から選択されるプラスチックを含む多重モード又は単一モードの導波路であり、これらの材料は、少なくとも励起及びルミネセンス波長において光透過性を示す。この場合に、センサプラットフォームの一部としての光導波路は、自己支持するものでよい。

【0035】

好ましいデバイスは、センサプラットフォームの一部としてのフィルム光導波路が、層(a)よりも低い屈折率を有する第2の光透過層(b)(図1に従う)の上の第1の光透過層(a)(図1に従う)を有するフィルム光導波路であるものである。

10

【0036】

第2の光透過層(b)の材料が、ガラス、石英又は好ましくはポリカーボネート、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート若しくはポリスチレンを含む群の透明な熱可塑性プラスチックを含むこととしてもよい。

【0037】

光透過層(a)の表面上で可能な限り強いエバネッセント場を生成するためには、導波性光透過層(a)の屈折率が、隣接する層の屈折率よりも極めて大きいものであることが望ましい。第1の光透過層(a)の屈折率が、1.8より大きいときには、特に有利となる。

20

【0038】

例えば、第1の光透過層(a)が、 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 、又は ZrO_2 を含むことが好ましい。特に、第1の光透過層(a)が、 Ta_2O_5 又は Nb_2O_5 を含むことが好ましい。

【0039】

導波性光透過層(a)の屈折率以外には、その厚さが、より低い屈折率を有する隣接層と層(a)との間の界面で可能な限り強いエバネッセント場を生成するための第2の制御パラメータである。層厚さが、励起波長の少なくとも1つのモードにおける誘導にとって充分であるかぎり、導波層(a)の厚さが減少するに従って、エバネッセント場の強度は増大する。このようにして、1つのモードを誘導する最小の「カットオフ」層厚さは、このモードの波長に依存する。「カットオフ」層厚さは、より短い波長の光の場合よりも長い波長の光の場合の方が大きい。しかしながら、「カットオフ」層厚さに近づくにつれて、同様に望ましくない伝搬損失も強く増大し、かくして、好ましい層厚さを選択するための下限が更に設定される。好ましいのは、所定の励起波長において1モードから3モードまでのもののみを誘導することができる光透過層(a)の層厚さである。特に、好ましいのは、この所定の励起波長について単一モード導波路に至らしめる層厚さである。誘導された光の離散的なモードの特性が、横方向モードを基準とするもののみであることがわかる。

30

【0040】

これらの必要条件の結果として、第1の光透過層(a)の厚さは、40~300nm、好ましくは100~200nmである。第1の光透過層(a)の厚さが100~200nmの間にあるときに、特に有利となる。

40

【0041】

光導波性層(a)に誘導された1つのモードの伝搬損失の量は、下にある支持層の表面粗さによって、及びこの支持層中に含まれ得る発色団の吸収によって大きく決定され、これは、(この支持層内への)層(a)で誘導されたモードのエバネッセント場の進入したときにおけるこの支持層内の望ましくないルミネセンスの励起の危険性と付加的に結びつけられる。さらには、光透過層(a)及び(b)の異なる熱膨張率に起因して、熱応力が発生しうる。化学的に感応性ある光透過層(b)の場合、例えば、透明な熱可塑性プラスチ

50

ックからなる層の場合には、層 (b) を侵し得る溶剤が進入するのを防ぐ、例えば、光透過層 (a) 中の微細孔を通して防ぐことが望ましい。

【 0 0 4 2 】

従って、光透過層 (a) と (b) との間に、層 (a) よりも低い屈折率を有しかつ層 (a) に接触し、かつ、厚さが 5 nm ~ 1 0 0 0 0 nm、好ましくは 1 0 nm ~ 1 0 0 0 nm である付加的な光透過層 (b ') (図 1 に従う) が位置づけられているときには、有利となる。この中間層の目的は、下側に位置づけられた層に対し層 (a) における微細孔を密封することにより、表面粗度を層 (a) よりも小さく減少させること、又は下側に位置づけられた 1 以上の層へ層 (a) 内で誘導された光のエバネッセント場が進入することを減少させること、又は下側に位置づけられた 1 以上の層に対する層 (a) の付着性を改善すること、又は光センサープラットフォーム内で熱により誘発された応力を低減すること、又は下側に位置づけられた層から光透過層 (a) を化学的に分離することにある。

10

【 0 0 4 3 】

光透過層 (a) 上に生物学的、生化学的又は合成の認識要素を被着させるための方法は数多く存在する。例えば、物理的吸着又は静電的相互作用により被着をなし得る。更に一般には、認識要素の配向性は、統計的なものである。さらに、分析プロセス内で用いられた試薬及び分析物を含む標本が、異なる組成を有するときには、固定化された認識要素の一部が洗い流される危険性存在する。従って、生物学的、生化学的又は合成の認識要素の固定化のために、付着促進層 (f) が、光透過層 (a) 上に被着されているときには、有利なものとなる。この付着促進層も透明であるべきである。特に、付着性促進層の厚さは、導波層 (a) から上に位置付けられた媒質内へのエバネッセント場の進入深度を上回ってはいならない。従って、付着促進層 (a) は、2 0 0 nm 未満、好ましくは 2 0 nm 未満の厚さを有するべきである。付着促進層は、シラン、エポキシド及び「自己組織化した機能化単層」を含む群の化合物を含むことができる。

20

【 0 0 4 4 】

測定領域の定義で記されたように、横方向に分離された測定領域 (d) が、センサープラットフォーム上の生物学的、生化学的又は合成の認識要素を横方向に選択的に被着させることによって生成され得る。ルミネセンス能力を有する分析物に接触せしめられたとき、又は固定化された認識要素に対する結合のため分析物と競合する分析物のルミネセンスによりマーキングされた類似体に接触せしめられたとき、又は多工程分析においてルミネセンスによりマーキングされた結合パートナーに接触せしめられたときに、ルミネセンス能力を有するこれらの分子は、固定化された認識要素によって占有された領域によって画定される測定領域内でのみ選択的にセンサープラットフォームの表面に結合する。

30

【 0 0 4 5 】

生物学的、生化学的又は合成の認識要素の被着のためには、インクジェットスポッティング、ピン若しくはペンによる機械的スポッティング、マイクロ接触印刷、又は平行若しくは交差微細流路内に供給された時点、圧力差の適用時点又は電気若しくは電磁ポテンシャルの印加時点での生物学的又は生化学的又は合成の認識要素と測定領域との流動的接触、を含む方法の群のうちの 1 以上の方法が、適用され得る。

【 0 0 4 6 】

生物学的又は生化学的又は合成の認識要素として、分子インプリントを提供すべく、核酸 (DNA 、 RNA) 、核酸疑似体 (ペプチド核酸、 PNA) 、抗体、アプタマー、膜に結合した及び単離されたレセプター、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」、化学合成によって生成されたキャビティなどを含む群の成分が被着させら得る。

40

【 0 0 4 7 】

最後に挙げたタイプの認識要素は、「分子インプリンディング」として文献中に記載されている方法によって生成されるキャビティのことである。この手順においては、大部分が有機溶液中にある分析物又は分析物 - 類似体は、重合体構造の中に封入されている。このため、それは「インプリント」と呼ばれる。次に分析物又はその類似体は、適切な試薬の

50

添加時点で重合体構造から溶解させられ、重合体構造内に空のキャビティを残す。この空のキャビティは次に、分析物の測定のためのその後のプロセスにおいて高い立体選択性を有する結合箇所として使用され得る。

【0048】

同様に、細胞の全体又は細胞の断片が、生物学的又は生化学的な認識要素として被着され得る。

【0049】

いわゆる非特異的結合によって生ずる信号による、すなわち、分析物の測定に利用される分析物又はその他の成分の結合によって引き起こされる信号による分析方法の検出限界の多くの場合において、生物学的、生化学的又は合成の認識要素が設けられた領域に結合されているのみならず、これらの認識要素によって占有されていない、例えば、疎水性吸着又は静電相互作用の時点でセンサプラットフォームの領域内でも結合されている。従って、分析物に関して「化学的に中性」である化合物が、非特異的結合又は吸着を低減すべく、横方向に分離された測定領域(d)の間に被着されているときに、有利なものとなる。それ自体分析物又は分析物の類似体又は多工程分析内のさらなる結合パートナーの認識及び結合のための特異的結合箇所をもたず、その存在のために分析物又はその類似性又はさらなる結合パートナーがセンサプラットフォームの表面にアクセスするのを妨げているような化合物が、「化学的に中性の」化合物と呼ばれる。

10

【0050】

例えば、アルブミン、特にウシ血清アルブミン、ニシン精子又は同様にポリエチレングリコールを含む群の化合物を、「化学的に中性の」化合物として利用することができる。

20

【0051】

測定領域(d)への励起光の内部結合が、光透過層(a)に形成された1以上の格子構造(c)(図1に従う)によって実施されることが好ましい。

【0052】

1つの測定領域から他の測定領域への光学的クロストークは、導波路内に内部結合された光、特にバック結合されたルミネセンス光が広がったときに発生しうる。かかるクロストークを防止するためには、光透過層(a)に誘導された光の外部結合が、光透過層(a)内に形成された格子構造(c')(図1に従う)によって実施されるときに有利となる。その結果、光透過層(a)内に形成された格子構造(c)及び(c')が同じか又は異なる周期性を有し、かつ互いに平行にか又は非平行に配置され得る。

30

【0053】

特に、格子構造(c)及び(c')が内部結合及び/又は外部結合格子として互換性があるようにして使用することができる。

【0054】

格子構造(c)と、場合によっては付加的な格子構造(c')とが、200nm~1000nmの周期、及び3nm~100nm、好ましくは10nm~30nmの格子変調深度を有するときには、有利となる。

【0055】

第1の光透過層(a)の厚さに対する変調深度の比が、0.2以下であることが好ましい。

40

【0056】

格子構造(c)が、直角、三角又は半円形の断面形状を有するレリーフ格子、又は実質的に平面の光透過層(a)内の屈折率の周期的変調を有する位相格子又は体積格子であってもよい。

【0057】

ルミネセンスの増強又は信号対雑音比を改善すべく、薄い金属層、好ましくは金又は銀の層は、場合によっては層(a)、例えばシリカ又はフッ化マグネシウムの層よりも小さい屈折率の付加的誘電層上において、光透過層(a)と固定化された生物学的又は生化学的認識要素との間に被着されており、金属層と、場合によっては付加的中間層と、の厚さは

50

、励起波長及び／又はルミネセンス波長において表面プラズモンが励起されうるように選択されるときには、さらに有利となり得る。

【 0 0 5 8 】

多くの利用分野について、格子構造 (c) が、一定の周期を有する回折格子であることが有利となる。このとき、格子構造 (c) による励起光の内部結合の測定領域に対する共鳴角度は、格子構造の全領域で均等である。しかしながら、極めて異なる波長を有する異なる光源からの励起光を内部結合することが意図されている場合には、内部結合のための対応する共鳴角度は、極めて異なるものであり得、このためセンサプラットフォームを収納する光学系における調整のため、又は不利な結合角度を空間的に変動させるための付加的なコンポーネントに対する必要性を招く可能性がある。例えば、結合角度の大きい差を減少させるべく、格子構造 (c) が、多重回折格子であることが有利であり得る。標本との接触に起因する内部及び外部結合角度の変化を回避しなければならない利用分野については、格子構造 (c) と、場合によっては付加的格子構造 (c') とが、標本区画の領域の外側に位置づけられていることが有利となり得る。

10

【 0 0 5 9 】

一方、その他の利用分野、特に、広き領域の励起のためには、格子構造 (c) と、場合によっては付加的格子構造 (c') とが、複数の又は全ての標本区画の範囲にわたって伸長していることが好ましい。

【 0 0 6 0 】

格子構造 (c) により内部結合された励起光が、複数の標本区画の上に伸長する範囲にわたって、光透過層 (a) に伝搬し得る場合には、上に重なる表面領域でセンサプラットフォームに接触する緊密封止層 (g) の材料が、少なくともエバネッセント場の進入深度内の励起されたルミネセンス放射及び励起放射の双方について光透過性であることが必要である。

20

【 0 0 6 1 】

このとき、反射光又は散乱光を減少させるためには、層 (g) が 2 層システムの形で設けられ、そのうちセンサプラットフォームの表面に接触する状態となる第 1 の層は、励起放射及び励起されたルミネセンス放射に対し透過性であり、一方センサプラットフォームからさらに離れて位置づけられる隣接層は、励起放射及び励起されたルミネセンス放射のスペクトル範囲内で吸収性であることが有利となる。

30

【 0 0 6 2 】

一方、励起光、及び場合によっては導波性光透過層 (a) 内にバック結合されて生成されたルミネセンス光の伝搬が、層 (a) 内で単一の標本区画の範囲に制限され得る利用分野のためには、センサプラットフォームに接触する緊密封止層 (g) の材料が、励起放射及び励起されたルミネセンス放射のスペクトル範囲内で吸収性であることが有利となる。

【 0 0 6 3 】

センサプラットフォームに接触する緊密封止層 (g) の材料が、自己付着性であるときには、有利となる。

【 0 0 6 4 】

従って、センサプラットフォームに接触する緊密封止層 (g) の材料が、ポリシロキサンを含むことが特に好ましい。

40

【 0 0 6 5 】

5 ~ 1 0 0 0、好ましくは 1 0 ~ 4 0 0 個の測定領域が、1 つの標本区画内に位置づけられることが好ましい。

【 0 0 6 6 】

さらに、標本区画内の個々の測定領域が、0 . 0 0 1 ~ 6 mm²の面積を占め、異なる測定領域が、類似の又は異なるサイズをもち得ることが好ましい。

【 0 0 6 7 】

好ましくは、標本区画の各々が、1 0 0 nl ~ 1 mlの容積を有する。

【 0 0 6 8 】

50

本発明に従ったデバイスは、閉鎖流システムとして及び開放システムとしての双方で作動できる。第1の場合には、デバイスは、光透過層(a)から離れて面した側で、標本区画は、標本、又は場合によっては付加的な試薬の供給又は除去のための入口及び出口の開口部を除いて閉じられており、標本、及び場合によっては付加的な試薬の供給又は除去が、閉鎖型フローシステム内で実施され、かつ共通の入口及び出口の開口部を有する測定領域又はセグメントに液体を供給する場合には、前記入口及び出口の開口部が、好ましくは行毎又は列毎に指定される。

【0069】

かくして、標本、及び場合によっては付加的な試薬の供給が、圧力差又は電気又は電磁ポテンシャルの影響を受ける平行又は交差型微細流路の中で実施される。

10

【0070】

開放システムの場合には、本発明に従ったデバイスは、標本区画が、光透過層(a)から離れる方に面する側で、標本又はその他の試薬の供給又は除去を局所的に指定する開口部を有するようになされている。さらに、分析中に加湿されかつ測定領域に接触される試薬のための区画が設けられていてもよい。

【0071】

センサプラットフォーム上に光学的又は機械的に認識可能なマークが設けられ、光学系内の調整が容易になり、かつ/又は標本区画の凹部を含む層(g)にセンサプラットフォームを組合せることが容易になると有利である。

【0072】

20

本発明のさらなる対象は、1以上のルミネセンスを測定するための分析システムであって、

- 少なくとも1つの励起光源、
 - 上に開示した実施例の1つのデバイス、
 - センサプラットフォーム上の少なくとも1つ以上の測定領域(d)から発出する光を記録するための少なくとも1つの検出器、
- を含む分析システムである。

【0073】

かくして、少なくとも1つの光源によって放射される励起光が、コヒーレント光であり、光透過層(a)内への内部結合のために、共鳴角度で1以上の測定領域上に向けられているときには、有利となる。

30

【0074】

複数の測定領域又は全ての測定領域を同時に励起するためには、少なくとも1つの光源の励起光が、拡大用光学部分により実質的に平行な光束まで広げられ、光透過層(a)内に内部結合する共鳴角度で1以上の測定領域上に向けられていることが好ましい。

【0075】

しかしながら、測定領域の外側でルミネセンス信号を減少させるためには、同様に、少なくとも1つの光源からの励起光が、1つの光源の場合には1つの又は複数の光源の場合には複数の回折光学素子好ましくはダマン格子又は屈折光学素子好ましくはマイクロレンズアレイによって、共通の光源から発せられた個別ビームは可能なかぎり同じ強度で複数の個別ビームへと分割され、該個別ビームは、互いに実質的に平行に、横方向に分離された測定領域上へと向けられるときにも、有利となり得る。

40

【0076】

単一の光源の強度が不十分である場合、又は異なる発出波長の光源が必要である場合、例えば、生物学的利用分野の場合には、等しいか又は異なる放射波長を有する2つ以上のコヒーレント光源が、励起光源として使用されるときには、有利となる。

【0077】

複数の測定領域からの信号を別々に記録するためには、少なくとも1つの横方向分解検出器が、検出のために使用されることが好ましい。かくして、少なくとも1つの横方向分解検出器として、CCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダ

50

イオードアレイ、マルチチャンネルプレート及びマルチチャンネル光電子増倍管で形成された群の中の少なくとも1つの検出器が使用され得る。

【0078】

本発明による分析システムにおいて、上で開示した実施形態のいずれかに従うと、透過された光束の整形のためのレンズ又はレンズ系、光束を偏移させるため、及び場合によっては付加的に整形するための平面又は曲面ミラー、光束を偏移させるため、及び場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、光束の一部分をスペクトル的に選択的に偏向するためのダイクロイックミラー、透過された光の強度を調節するためのニュートラルフィルタ、光束の一部分をスペクトル的に選択的に透過させるための光学フィルター若しくはモノクロメータ、又は励起光又はルミネセンス光の離散的な偏光方向を選択するための偏光選択的要素、を含む群の光学部品が、1以上の励起光源とセンサプラットフォームとの間、及び/又は前記センサプラットフォームと1以上の検出器との間に位置づけられている。

10

【0079】

数多くの利用分野において、励起光が、1 fsec ~ 10 minの持続時間のパルスの形で発射されると有利である。

【0080】

動力学的な測定のため、又は分析システムのコンポーネント又はセンサプラットフォーム自体の材料又は標本中の蛍光汚染と高速崩壊蛍光の弁別のためには、測定領域からの発出光が、時間分解測定されることが有利である。

20

【0081】

本発明による分析システムが、光源の位置における励起光又は励起光の拡大の後における励起光若しくは個別ビームへ多重化した後における励起光、1以上の横方向に分離された測定領域の位置からの励起波長の散乱光、及び格子構造(c)又は(c')により外部結合された励起波長の光、を含む群のうちの光の信号を、基準のために測定するための専用コンポーネントを含むことがさらに好ましい。かくして、放射光及び基準信号の測定のための測定領域が同一であることが特に有利となる。

【0082】

励起光の発射、及び単数又は複数の測定領域からの発出光の検出も同様に、単数又は複数の標本区画について逐次的に実施され得る。かくして、逐次的励起及び検出を、ミラー、偏向プリズム及びダイクロイックミラーを含む群の中の可動光学コンポーネントを用いて実施することができる。標準的には、市販のいわゆるスキャナが、逐次的励起のため及び生物分析アレイシステムのために使用され、これは、励起光ビームを、通常は可動ミラーを用いて、調査すべき領域にわたり逐次的に走査させるものである。かくして、大部分のスキャナシステムの場合には、照射された表面と励起光ビームとの間の角度は変更される。しかしながら、本発明によるセンサプラットフォームの導波層内への励起光の内部結合のための共鳴条件を満たすためには、この角度は基本的に一定に保たなければならない、すなわち、本発明による光学系内で実現すべきスキャナは、角度保持機能を有しなければならない。しかしながら、同時に、センサプラットフォーム上の励起された領域の大きさも変化してはならない。従って、本発明のもう1つの対象は、逐次的励起及び検出が、実質的に焦点及び角度を保つスキャナを用いて実施される光学系にある。

30

40

【0083】

もう1つの実施形態では、センサプラットフォームが逐次励起及び検出工程の間で移動する。この場合、1以上の励起光源と、検出のために使用されるコンポーネントとは、空間的に固定された位置に位置づけられ得る。

【0084】

本発明のもう1つの対象は、センサプラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層(g)と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサプラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の

50

標本区画を２次元配置で形成するデバイスを用いて、横方向に分離した少なくとも５つの測定領域上の１以上の標本におけるルミネセンスにより１以上の分析物を測定する方法であって、前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画内において５つ以上の離散的な測定領域（ｄ）に固定化され、前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサプラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容するように作動可能し得て、励起光が測定領域へと誘導され、標本中又は測定領域上の発光し得る物質を励起してルミネセンスを放射せしめ、発生されたルミネセンスを測定する方法である。

10

【００８５】

従って、前記測定領域が、平面型光導波路内で誘導される励起光のエバネッセント場と光学的に相互作用することが好ましい。

【００８６】

以上に開示した方法においては、（１）等方的に放射されたルミネセンス、又は（２）光透過層（ａ）内に内部結合された格子構造（ｃ）により外部結合されるルミネセンス、又は（１）及び（２）の両方の部分を含むルミネセンスが同時に測定される。

【００８７】

本発明による方法におけるルミネセンス又は蛍光の生成のためには、３００nm～１１００nmの波長で励起されることができ放射するルミネセンス又は蛍光標識を使用することができる。

20

【００８８】

ルミネセンス又は蛍光標識は、従来のルミネセンス又は蛍光染料、又は半導体に基づくいわゆる発光又は蛍光ナノ粒子であってもよい（W.C.W.Chan and S.Nie「超感応性非等方性検出のための量子ドット生物接合体」Science 281（1998）2016-2018）。

【００８９】

ルミネセンス標識が、分析物に結合され得るか、又は競合分析においては分析物類似体に結合され得るか、多工程分析においては固定化された生物学的、生化学的若しくは合成の認識要素の結合パートナーの１つに結合され得るか、又は生物学的、生化学的若しくは合成の認識要素に結合され得る。

30

【００９０】

さらに、第１のルミネセンス標識と類似の又は異なる励起波長及び類似の又は異なる放射波長の第２の又はそれ以上のルミネセンス標識を使用することもできる。かくして、第２の又はそれ以上のルミネセンス標識が、第１のルミネセンス標識と同じ波長で励起され、別の波長で放射することと有利となり得る。

【００９１】

その他の利用分野については、適用される発光染料の励起及び放射スペクトルが、重複しないか又は部分的にのみ重複すると有利となる。

【００９２】

本発明による方法では、供与体として作用する第１の発光染料から受容体として作用する第２の発光染料への電荷又は光学エネルギーの伝達が、分析物の検出のために使用されることも有利となる。

40

【００９３】

さらに、１以上のルミネセンスの測定以外に、測定領域上の有効屈折率の変化が、測定されると有利となり得る。さらに、１以上のルミネセンス、及び／又は励起波長での光信号の測定が、偏光選択的に実施されると有利となり得る。この方法は、同様に、１以上のルミネセンスが、励起光のものとは異なる偏光で測定されることをも可能にしている。

【００９４】

上で開示された実施形態のうちいずれか１つに従った本方法に基づく方法は、抗体又は抗

50

原、レセプター又はリガンド、キレート剤又は「ヒスチジン - タグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNA又はRNAストランド、DNA又はRNA類似体、酵素、酵素コファクター又は阻害物質、レクチン、及び炭水化物を含む群の中の1以上の分析物を同時に又は逐次的に、定量的に又は定性的に測定することを可能にする。

【0095】

上で開示した方法は、(ポリメラーゼ連鎖反応、PCRといったような)生物学的又は生化学的増殖メカニズムを用いることなく、生体材料を直接測定することを可能にする。アプローチの単純化以外に、ここでは、mRNAと観察されたシグナルとの間の線形相関が達成される;すなわち(非常に低い濃度で生ずる生物学的に関連性あるmRNAである)aksiiいわゆる「稀少メッセージ」を定量的にかつ高感度で測定できる。96個のウェルのプレートプラットフォーム上の測定を並列に実施することにより、これまでにない品質及び処理量を得る結果(例1.e参照)に至ることが可能になる。その結果として、前臨床及び臨床研究によって生成される複数の標本を、手操作による現行の方法に比べてはるかに高速でかつより精確に分析することができる。

10

【0096】

さらに、1つの物質のスポット上の2つの蛍光マーカを検出することにより、単一の実験内で相対的誘発を直接測定することが可能となる(例2.e参照)。従って、チップからチップの参照は必要とされない。従って、センサープラットフォームの一括処理から一括処理の再現性について必要とされる質は、十分に低くすることができる。

20

【0097】

検査対象標本が、血液、血清、血漿、リンパ液、尿又は卵黄の如き天然に生ずる体液でもよい。

【0098】

検査対象標本が、光学的に濁った液体、又は表面水、土壌若しくは植物抽出物、又は生体ブロス若しくはプロセスブロスでもよい。

【0099】

検査対象標本は、生体組織から採取することもできる。

【0100】

本発明のさらなる主題は、薬学研究、コンビナトリアル化学、臨床及び前臨床開発におけるスクリーニング方法の化学的、生化学的又は生物学的分析物を定量的又は定性的に測定するための、親和性スクリーニング及び調査におけるリアルタイム結合性研究及び動態パラメータの測定のための、分析物、特にDNA及びRNA分析物の定性的及び定量的測定のため、及び単一ヌクレオチド多形現象の如きゲノム内のゲノミック又はプロテオミック差を測定するための、タンパク質 - DNA相互作用を測定するための、mRNA発現及びタンパク質(生)合成についての制御メカニズムを測定するための、毒性研究の発生のため及び発現プロファイルの測定のため、特にmRNA、タンパク質、ペプチド又は小分子有機(メッセンジャー)化合物の如き生物学的及び化学的マーカー化合物を測定するための、及び医薬品の開発研究、人間及び獣医学診断、農業化学製品の開発研究における抗体、抗原、病原体又は細菌を測定するための、症候性及び前症候性の植物診断のための、医薬品開発における患者の層別化のため及び治療薬選択のための、食品及び環境分析における病原体、有害物質及び有害細菌、特にサルモネラ、プリオン及び細菌の測定のための上述の実施形態のいずれかに従った方法の使用。

30

40

【0101】

本発明について、以下の例を用いて説明、実証する。

【0102】

例1:腫瘍組織内の異なる場所からの選択されたmRNAの発現パターンの差の同時測定のためのデバイス及び方法

組織を、孤立した腫瘍(この場合、前立腺)上の異なる部位から採取し、腫瘍組織内の部位の機能として選択されたmRNAの発現パターンの差について検査する。結果は、組織学検査とは独立して、専ら遺伝的な情報に基づく結論を考慮する。このような標本の中の

50

その方法及び見方の生物学的関連性については、文献中で記述されている (Kristina A. Col, David B. Krizmann 及び Michael R. Emmert-Buch, 「ガンの遺伝学 - 3Dモデル」, Nature Genetics Supplement 21 (1999) 38 - 41)。

【0103】

96個の標本区画の各々の中に400個の離散的な測定領域を有するデバイスのセンサープラットフォーム上における生物学的認識要素の準備及び被着

a) 発ガン現象又は炎症反応に関与する100個の遺伝子のクローン - 文献中 (Kristina A. Col, David B. Krizmann 及び Michael R. Emmert-Buch, 「ガンの遺伝学 - 3Dモデル」, Nature Genetics Supplement 21 (1999) 38 - 41 及びその中で引用された参考文献を参照) に記述された結果に基づく - と、典型的にはこれらの反応に関与しないが理想的な場合には一定の発現レベルを示し、このため標準化のために利用できるような遺伝子 (β -アクチン、GAPDH、チューブリン-a、ユビキチン、ホスホリパーゼA2などといったようないわゆる「ハウスキーピング遺伝子」) のクローンと、をセンサープラットフォーム上の別々の測定領域内で固定化させるべき生物学的認識要素として選択する。

10

【0104】

その他のもの以外で、疾病と潜在的関連性をもつ第1の遺伝子群には、セリン/トレオニンキナーゼ (STK2)、プロテアソームのベータサブユニット (PSMB4)、CD36-抗原 (コラーゲンI型レセプター、トロンボスポンジンレセプター)、ホスホリパーゼA2 (PLA2G1B)、リボソームタンパク質L17 (RPL17)、デスモグレイン (COL4A4)、「活性化転写因子3」 (ATF3)、アネクチン1 (ANX)、さらなる修復酵素、キナーゼなどが含まれる。

20

【0105】

必要とされる遺伝子材料は、UniGene SET NIH Cancer Genome Anatomy Projects からか又は代替的には、I. M. A. G. E 関連の材料を販売する商業的供給業者からプラスミドの形で得ることができる。対応するcDNAを生成するためのプラスミド内の遺伝子配列のトランスファー及び増幅は、対応するプライマー対を用いて実施され、約300~1000塩基対の長さをもつ2本鎖分子 (プローブcDNA) を導く。

【0106】

b) 幅7.6mm×長さ11.2mm×厚さ0.7mmの外形寸法を有するセンサープラットフォームを使用し、その表面上に、古典的マイクロタイタープレートの7mm×7mmの内径をもつ96個のウェルを配置することができる。基板材料 (光透過層 (b)) は、AF45のガラス (633nmでの屈折率 $n = 1.52$) から成る。周期360nm、格子深さ25+/-5nmで、上述のとおりセンサープラットフォームの幅に対し平行な格子ラインの配向性をもつ表面レリーフ格子の連続構造を基板内に生成する。光透過層 (b) 上の Ta_2O_5 の導波性光透過層 (a) は、633nmで2.15の屈折率 (層の厚さが150nm) をもつ。被着プロセスにより、格子構造は、ほぼ1:1の縮尺で導波層の表面内に移送される。

30

【0107】

生物学的又は生化学的又は合成の認識要素の固定化のための準備として、超音波装置内のクロロホルムでセンサープラットフォームを清浄し、グリシジルオキシプロピルトリメトキシシンでのシラン化反応によって化学的に活性化され、かくして生物学的認識要素としてプローブcDNAの固定化のために準備される。市販の圧電制御されたマイクロピペット (Gesim, GroBerkmannsdorf, DE) を用いて、各々10滴 (0.1nl) のスポットとして50ng/ μ lの濃度で個々のcDNAを被着し、約150 μ mの離散的な測定領域としてのスポットを結果として得る。20×20のスポット配置 (400個のアレイを特徴とする) の中には、固定化工程の終わりで、統計アルゴリズムによって定義された認識要素としての100の異なるcDNAの位置は、純粋な統計的な手法で既知で予め定められている方法で、同じcDNAを有するつねに4つの測定領域が設けられている。スポットの中心間距離は、300 μ mであり、スポットは、センサープラットフォーム上で6mm×6mmの領域に及び、アレイを包囲する7mm×7mmの正方形の凹部を有するポリジメチルシロ

40

50

キサン (P D M S) の密封層 (g) と共に、 9 6 個のウェルのプレートを形成する。 9 6 個のあらゆる標本区画の底部には、センサープラットフォーム上に同一パターンの離散的な測定領域が生成される。固定化は、熱処理、すなわち 3 0 分間に最高 6 0 まで加熱することによって最適化できる。

【 0 1 0 8 】

c) 標本材料

(現象論的に正常及び悪性の組織の双方において) 前立腺の異なる位置から、例えば、微細な組織片として組織材料 (約 5 0 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 細胞) を採取する。組織を凍結状態で切開し、標準フェノール / クロロホルム抽出により「全 R N A 」を抽出する。Oligotex スピнкаラム (Qiagen, Hilden, DE) を用いて、全 R N A 片から m R N A を分離する。C y 5 - 標識づけされた核酸塩基 (C y 5 - d U T P ; Pharmacia Amersham) の存在下で逆転写酵素プロセス (例えば Life Technologies) により、蛍光標識付けされた c D N A 分子中へ全ての m R N A 分子を移す。得られた材料を、ハイブリダイゼーション緩衝液内で溶解し、かくして、最大 1 0 ng / μ l の合計濃度を有する液体標本を得る。

【 0 1 0 9 】

d) 分析システム

光学系

i) 励起ユニット

センサープラットフォームは、コンピュータ制御式調整モジュール上に取付けられており、例 1 b に挙げられているセンサープラットフォーム内への内部結合のため格子構造 (I) 上に発射された励起光ビームによって照射された領域の主軸に運動の中心がある状態で、格子ラインに対し平行な軸を中心とした回転及び格子ラインに対し平行かつ垂直な並進運動を可能にする。レーザーが励起光源として作用した直後に、測定データが収集されない場合に光路を遮断するためのシャッターが光路内に存在する。さらに、励起光強度を段階的に又は連続的に変動させるため、センサープラットフォームに向かって励起光の光路において、この位置や他の位置にも、ニュートラルフィルタ又は偏光子を取付けることができる。

【 0 1 1 0 】

6 3 2 . 8 nm のヘリウムネオンレーザーからの励起光ビームは、 2 5 倍の拡大レンズを用いて、断面が直径 2 5 mm の円形の平行光束にまで拡張される。この励起光束の中心部分から、長さ 1 0 mm $\times$ 幅 1 0 mm の正方形の領域 (格子構造の用語に基づく) を選択し、ダイクロイックミラー (6 5 0 D R L P , Omega Optical , Brattle borough , VT , USA) を通過した後、励起光スポット内を中心とする 9 6 個のアレイのうちの 1 つの上に光透過層 (a) を介して向ける。センサープラットフォームは、最大の内部結合となるように調整され、これは測定精度内で反射光と同じ角度で内部結合した後、センサープラットフォームを介しての励起光の透過の最小値によって確定され、及び連続格子構造 (c) により外部結合された励起光と反射した励起光の総和の最大値によって確定される。最適な内部結合の角度は、目視により、又はコンピュータ制御の下では、増幅器に接続されたフォトダイオードの信号から測定され得、このフォトダイオードは、関連した光路に位置づけられている。このようにして、内部結合のための共鳴角度として 3 . 5 $^{\circ}$ という角度が決定される。

【 0 1 1 1 】

ii) 検出

ペルチェ冷却 (動作温度 - 3 0) を有する C C D カメラ (T E 3 / A , Astrocarn , Cambridge , UK) を、横方向の分解検出器として使用する。信号収集及び C C D チップ上への集光は、Heligon Tandem 対物レンズ (Rodenstock , 2 $\times$ Cine-Heligon 2 . 1 / 1 0 0 mm) を用いて実施される。中心波長 6 8 0 nm で、帯域幅 4 0 nm の 2 つの干渉フィルタ (Omega Optical , Brattleborough , Vermont) と、(減衰された散乱励起光と、測定領域からはるかに弱いルミネセンス光と、の透過のための) ニュートラルフィルタ又は (測定領域からの減衰励起光の透過のための) 干渉フィルタと組合わせたニュートラルフィルタ

のいずれかと、が、Heligon Tandem 対物レンズの2つの部分の間で、フィルターホイール上に取付けられる。励起波長と発出波長との信号を交互に測定する。市販の画像分析ソフトウェア (Image Pro Plus) を用いてデータ分析を実施する。

【0112】

e) ハイブリダイゼーション反応のルミネセンス検出方法:

第c)節の「標本材料」において記述した如き調製された30 μ lの液体標本を、手動で又は実験室用ロボット (例えばBeckman 2000) を用いて、上述した如きデバイスの96個の標本区画の各々の中に充てんする。次に、標本区画をフタで密封し、各ウェル上に100 μ lの蒸気空間を残す。

【0113】

第1の熱工程では (30分間で85 まで温度を上昇させる)、表面に固定化された2本鎖cDNAを、デハイブリダイゼーションし (分離させ)、標本中のCy5標識づけされた1本鎖cDNAを用いたハイブリダイゼーションのために準備する。43 までゆっくりと冷却して (1分あたり約2)、その後の8時間にわたる43 での熱平衡状態にすると、いわゆるストリンジェントな条件下で、相補的Cy5標本付けされた分子を有する固定化された1本鎖cDNAのハイブリダイゼーションを可能にする (完全に相補的な1本鎖のみのハイブリダイゼーション)。これらの状況は、残留標本液体を交換し、かつ温度を周囲温度まで低下させると安定化させることができる。

【0114】

個々の標本区画内のアレイの (光学的) 読取りのためには、上述したデバイスを、開示した分析システム内に挿入し、上述した如く、励起波長の透過のためにフィルターホイールの位置において制御されて、96個の標本区画のうちの最初のものアレイの中で励起光の最大内部結合に調整される。その後、測定領域 (スポット) からの蛍光の強度を、ルミネセンス波長での透過のためのフィルター位置で測定する。次の標本区画からのルミネセンス信号の読取りのための次の位置までデバイスを搬送すると、他の標本区画内のアレイの読取りが逐次的に (つねに各々400個の測定領域を有する標本区画が次々と) 実施される。

【0115】

例2: マイクロアレイに基づく高速かつ高度で並列的なディファレンシャル測定方法による毒物学及び薬物代謝における酵素誘導の型及び量の測定

薬品開発においては、薬物代謝の検査及び毒物学研究は、実験動物及び人間における生体異物 (生物学的及び/又は薬学的に活性の化学物質) の適用後に実施される。その他のものの以外で、「第1経路代謝」として肝臓内の第1の代謝分解反応が調査される。かかる物質の適用の後、往々にして「酵素誘導」すなわち標準的にP450イソ酵素 (混合型機能性モノオキシゲナーゼ) の群の中の肝臓内の代謝に関与する酵素の濃度に対する影響が観察される。この変化は次に、かかる物質のさらなる代謝の質及び速度に影響を及ぼす。新しい薬学的に活性な物質をテストする過程で、テストプログラムの非常に早期の段階で、未処置の (誘発されていない) 生体の代謝に比較して高い感度でかつ定量的にmRNAのレベルに対するこれらの影響を測定することが必要である。

【0116】

96個の標本区画の各々の中に400個の離散的な測定領域を有するデバイスのセンサープラットフォーム上での生物学的認識要素の調製及び被着

a) 肝臓内の「第1経路代謝」に関与する文献中に記述された20の最も重要なシクロムP450イソ酵素のクローンと、標準的にこれらのプロセスに関与せず理想的なケースではその発現レベルが恒常なものにとどまり、従って標準化のために利用できるような遺伝子 (β -アクチン、GAPDH、チューブリン-a、ユビキチン、ホスホリパーゼA2などといったようないわゆる「ハウスキーピング遺伝子」) の5つのクローンと、を、センサープラットフォーム上の別々の測定領域内で固定化させるべき生物学的認識要素として選択する。

【0117】

その他のもの以外で、選択された生物学的マーカー物質の第1の群には、CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1、CYP3A2、CYP4A1が含まれる。

【0118】

必要とされる遺伝子材料は、市販されているプラスミドの形で得ることができる。対応するcDNAを生成するためのプラスミド内の遺伝子配列の移送及び増幅は、対応するプライマー対を用いて実施され、約300～1000塩基対の長さをもつ2本鎖分子（プローブcDNA）を導く。

【0119】

b) 幅76mm×長さ112mm×厚さ0.7mmの外形寸法を有するセンサプラットフォームを使用し、その表面上には、センサプラットフォームに面する開放凹部を有するポリカーボネートプレートに前記センサプラットフォームを組み合わせることにより、古典的マイクロタイタープレートのピッチ（行列の配置内）の幅7mm×長さ7mm×高さ0.15mmの内形寸法を有する96個のマイクロフローセルを配置することができる。凹部を囲むシールリングを用いて、凹部は、互いに対し密封されている。

10

【0120】

基板材料（光透過層（b））は、AF45のガラス（633nmで屈折率 $n = 1.52$ ）から成る。格子ライン（360nm周期）がセンサプラットフォームの幅に対し平行で格子深さが $12 + / - 3$ nmである内部及び外部結合格子対の周期的な配列（「ラスト」）が基板内に生成され、ここで格子ラインはセンサプラットフォームの全幅にわたって伸長している。後続する格子対の間の距離は9mmであり、個々の格子構造（センサプラットフォームの長さに対し平行な）個々の格子構造の長さは0.5mmである。格子対の内部及び外部結合格子間の距離は5.5mmであり、上述のポリカーボネートプレートにセンサプラットフォームを組合せた後、つねに標本区画の（内側）領域内での励起光の内部及び外部結合を可能にする。

20

【0121】

光透過層（b）上の Ta_2O_5 の導波性光透過層（a）は、633nmで2.15の屈折率（層厚さ150nm）を有する。被着プロセスによって、格子構造は、ほぼ1:1の縮尺で導波層の表面内に移送される。

【0122】

ポリカーボネートプレートにセンサプラットフォームを組合せたことによって形成された標本区画には、センサプラットフォームと反対側の境界表面に円錐形に開けられた開口部を有し、かくして、標準型の市販のポリプロピレンのピペットチップを挿入することによって標本区画の充てん又は除去が可能となる。

30

【0123】

生物学的又は生化学的又は合成の認識要素の固定化のための準備として、超音波装置内のクロロホルムでセンサプラットフォームを清浄し、グリシジルオキシプロピルトリメトキシンでのシラン化反応によって化学的に活性化され、かくして生物学的認識要素としてプローブcDNAの固定化のために準備される。市販の圧電制御されたマイクロピペット（Gesim, GroBerkmannsdorf, DE）を用いて、各々10滴（0.1nl）のスポットとして50ng/ μ lの濃度で個々のcDNAを被着し、約150 μ mの離散的な測定領域としてのスポットを結果として得る。10×10のスポット配置（100のアレイを特徴とする）の中には、固定化工程の終わりで、統計アルゴリズムによって定義された認識要素としての25の異なるcDNAの位置は、純粋な統計的な手方で既知で予め定められている方法で、同じcDNAを有し、つねに4つの測定領域が設けられている。スポットの中心間距離は、400 μ mであり、スポットは、センサプラットフォーム上で4mm×4mmの領域に及ぶ。固定化は、熱処理、すなわち30分間で最高60℃まで加熱することによって最適化できる。

40

【0124】

標本区画が密封用シールによって互いに流動的に密封され、かつスポットによって形成さ

50

れた100個の測定領域のアレイが標本区画の底面を中心となるように、記述されたポリカーボネートプレートは、準備されたセンサブラットフォームに組合わせられる。

【0125】

c) 標本材料

i) (生体異物で処理されていない)未誘発実験動物からのmRNA

液体窒素を用いて、屠殺したマウスからの約250mgの肝臓をショック凍結させ、乳鉢内ですりつぶし、クロロホルムで脱脂する。その後、標準フェノール/クロロホルム抽出により「全RNA」を分離する。Oligotexスピンカラム(Oiagen, Hilden, DE)を用いて、全RNA分画からmRNAを分離する。Cy5-標識づけされた核酸塩基(Cy5-dUTP; Pharmacia Amersham)の存在下で逆転写酵素プロセス(例えばLife Technologies)内で、蛍光標識付けされたcDNA分子中へと全てのmRNA分子を移送する。得られた材料を、ハイブリダイゼーション緩衝液内で溶解させ、かくして、最大10ng/μlの全濃度を有する液体標本を得る。

10

【0126】

ii) (生体異物例えばフェノバルビタールで処理した)誘発された実験動物からのmRNA

蛍光標識付けをCy5ではなくCy3(Amersham Pharmacia)を用いて実施するという点を唯一の相違点として、例2.c.i)に類似した方法で調製を実施する。

【0127】

iii) 調製物i)及びii)からの標識づけされたmRNAを1:1の比で混合する。

20

【0128】

d) 分析システム

光学系

i) 励起ユニット

センサブラットフォームは、コンピュータ制御式調整モジュール上に取付けられており、例2bに挙げられているセンサブラットフォーム内への内部結合のため格子構造(I)上に発射された励起光ビームによって照射された領域の主軸に運動の中心がある状態で、格子ラインに対し平行な軸を中心とした回転及び格子ラインに対し平行かつ垂直な並進運動を可能にする。レーザーが励起光源として作用した直後に、測定データが収集されない場合に光路を遮断するためのシャッターが光路内に存在する。さらに励起光強度を段階的に又は連続的に変動させるため、センサブラットフォームに向かって励起光の光路内において、この位置や他の位置にも、ニュートラルフィルタ又は偏光子を取付けることができる。

30

【0129】

ヘリウムネオンレーザー(2mw)からの励起光を、円柱レンズを用いて、(センサブラットフォームの格子ラインに対して平行に)断面スリットタイプの光ビームまで広げる。励起光ビームの周辺上部及び下部領域をスリット絞りでマスキングし、ここで励起光ビームは、わずかに発散するものの格子ラインに対して平行で、格子ラインに対し垂直な投射において平行である。格子構造上のスリットタイプの断面を有する結果として得られた光束は、標本区画の1つの中の内部結合格子の右縁部上に向けられる。励起光スポットのサイズは、およそ長さ0.8mm×幅4mmである。センサブラットフォームは、最大内部結合について調整され、これは、内部結合された励起光の誘導モードに沿って(散乱により)発出された発散光の最大強度によって確定される。この最大値は、誘導モードに沿って発散された光の画像化と同時に目視によっても決定でき、光電子検出器の上に、例えば横方向の分解能検出器の一例としてはCCDカメラの画素の上に、又は横方向には分解しない検出器の1例としてはフォトダイオードの上に、画像システムによって収光される。同じ条件下で、導波路内で透過し、外部結合格子で外部結合した励起光のための最大信号も測定される。3.8°という値が、内部結合のための共鳴角度として決定される。

40

【0130】

第2の励起光源として、543nmでの発出する緑色ヘリウムネオンレーザーが使用される

50

。励起光ビームは、上述のヘリウムネオンレーザーの赤色ビーム（633nm）と同じ光路内に誘導され得、その後、その光路は、固定位置間におけるモータの駆動により又は手動により揺動することも可能であるミラーにより、妨げられる。内部結合のための共鳴角度の調整は、上述した如き同じ方法で実施され、ここでは、15°という値が決定される。

【0131】

ii) 検出

ペルチェ冷却（運転温度 -30°）を有するCCDカメラ（TE3/A、Astrocam, Cambridge, UK）を、横方向の分解検出器として使用する。信号の収集及びCCDチップ上への集光は、Heligon Tandem対物レンズ（Rodenstock, 2×Cine-Heligon 2.1/100mm）を用いて実施する。中心波長680nmで帯域幅40nmの2つの干渉フィルター（Omega Optical, Brattleborough, Vermont）と、（減衰された散乱励起光と、測定領域からはるかに弱いルミネセンス光と、の透過のための）ニュートラルフィルタ又は（測定領域からの減衰励起光の透過のための）干渉フィルターと組合わせたニュートラルフィルタのいずれかと、が、Heligon Tandem 対物レンズの2つの部分の間で、フィルターホイール上に取付けられる。励起波長と発出波長との信号を交互に測定する。市販の画像分析ソフトウェア（Image Pro Plus）を用いてデータ分析を実施する。

【0132】

e) ハイブリダイゼーション反応のルミネセンス検出方法

実験室用ロボットを用いて、上述した方法に従って調製された生体材料を、96マイクロフローセルの各々に個別に充てんする。第1の熱工程では（30分間で85°まで温度を上昇させる）、表面に固定化された2本鎖cDNAを、デハイブリダイゼーションし（分離させ）、次いで、標本中のそれぞれCy5標識づけ又はCy3標識づけされた1本鎖cDNAを用いたハイブリダイゼーションのために準備する。43°までゆっくりと冷却して、（1分あたり約2°）次いで、8時間にわたる43°での熱平衡状態にすると、いわゆるストリンジェントな条件下で、ただし異なる標識のついた分子のいずれをも動力学的にも熱力学的にも選ぶことなく、それぞれ相補的にCy5又はCy3標識分子を用いた固定化された1本鎖cDNAのハイブリダイゼーションを可能にする（完全に相補的な1本鎖のみのハイブリダイゼーション）。もう1つの工程では、蛍光まで励起できる未結合材料ならびに表面に非特異的に結合した材料を除去するため、実験室ロボットを使用して、純粋なハイブリダイゼーション緩衝液で、残存液体を交換する。

【0133】

ルミネセンス測定の後、再生のためのカオトロピック試薬としての2モルの尿素を実験室用ロボットに供給することができる。この（再生）プロセスは、80°まで温度が上昇することによって達成される。10mMのリン酸緩衝液でのフラッシング及び純粋ハイブリダイゼーション緩衝液内の再平衡化の後、流体/アレイシステムを再使用することができる。

【0134】

個々の標本区画内のアレイの（光学的）読取りのためには、上述したデバイスを、開示した分析システム内に挿入し、上述した如く、励起波長の透過のためにフィルターホイールの位置において制御されて、96個の標本区画のうちの最初のものアレイの中で励起光（最初は633nmのもの）の最大内部結合に調整される。その後、測定領域（スポット）からの蛍光の強度を、ルミネセンス波長での透過のためのフィルター位置で測定する（最初はCy5についてフィルター680DF40、Omega Optical, Brattleborough, Vtを用いる）。次の標本区画からのルミネセンス信号の読取りのための次の位置までデバイスを搬送すると、他の標本区画内のアレイの読取りが逐次的に（つねに各々100個の測定領域を有する標本区画が次々と）実施される。

【0135】

次いで、デバイスは、第1の標本区画内のアレイのための内部結合位置に戻され、ミラーを揺動した後、緑色励起光（543nm）の最大内部結合に調整される。その後、アレイの測定領域（スポット）からの蛍光の強度を、より短い波長のルミネセンスでの透過のため

のフィルターホイールの位置で測定する（Cy3については、フィルター580DF40、Omega Optical, Brattleborough, Vt）。次の標本区画からのルミネセンス信号の読取りのための次の位置までデバイスを搬送すると、他の標本区画内のアレイの読取りが逐次的に（つねに各々100個の測定領域を有する標本区画が次々と）実施される。

【0136】

例3：1つの及び複数の標本内の複数のサイトカインマーカートンパク質の同時定量的測定のためのデバイス及び方法（多サイトカインプレート）。

a) デバイスとして、外形寸法101.6mm×101.6mm（4インチ×4インチ）×厚さ0.7mmの正方形のセンサプラットフォームが用いられ、これは、分析体積（10μl～100μl）を収容するための標本区画が設けられて、9mmの（中心間）距離で各々直径7mmの円形開口部が内部に形成されている厚さ5mmのPDMS層（ポリジメチルシロキサン、Sylgard 184 Silicon Elastomer Kit, Dow Corning）と接合されている。層内の開口部は、11行と11列の形状をして（合計121ウェル）配置されている。散乱光を抑制すべく、重合体材料には黒色顔料でインキ着けがほどこされている。

【0137】

基板材料（光透過層（b）は、AF45のガラス（633nmでの屈折率 $n = 1.52$ ）から成る。周期360nm、格子深さ $25 + / - 5$ nmの表面レリーフ格子の連続構造を、センサプラットフォームの縁部に対し平行な格子ラインの配向性を有する基板内に生成する。光透過層（b）上の Ta_2O_5 の導波性光透過層（a）は、633nmで 2.15 の屈折率（層厚さ150nm）をもつ。被着プロセスにより、格子構造は、ほぼ1：1の縮尺で導波層の表面内に移送される。

【0138】

有機汚染を除去するため、酸素プラズマに暴露すると、センサプラットフォームの表面を清浄する。次いで、モノ-リン酸オクタデシルの単層を含む付着性促進層を、自動組立てプロセスにより親水性導波路表面上に被着する。この表面の修正により、非常に疎水性の高い表面に導く（水に対する接触角度 $100^\circ \sim 110^\circ$ ）。表面修正のプロセスは、文献内に詳述されている（D. Brorelli et al., Langmuir 15（1999）4324-4327）。

【0139】

サイトカインマーカートンパク質の認識及び結合のための生物学的認識要素として異なる抗体を有する25スポットの121のアレイ（11行×11列で配置）を、インクジェットプロッタNPIC型（Gesim GmbH, GroBerkmannsdorf, DE）の各々を用いて、付着性促進層でコーティングされたセンサプラットフォームの疎水性表面上に被着させ、ここでアレイは各々5行×5列の形状をして配置されている。

【0140】

b) 糖含有（0.1%トレハロース）、リン酸緩衝シラン（pH7.4）中100μg/mlの濃度で抗体を被着させ、2～3時間飽和水蒸気雰囲気内で液体状態でインキュベートさせ、次いで、洗浄し、窒素でブロー乾燥させる。1mmの（中心間）距離でスポットの平均直径は、0.5mmである。サイトカインの認識、特に異なるインターロイキンの認識のための常に5つの異なる抗体を、個々のアレイの5つの列において使用する。各アレイ内には、供給された標本で既に行われたあらゆる測定の各々から統計的分析の再現性についてのデータを生成すべく、生物学的認識要素と同じインターロイキン抗体を有する5つの測定領域が設けられる。このため、（アレイ内の）生物学的認識要素としてのインターロイキン-抗体の各々を有する測定領域の位置は、統計アルゴリズムによって決定され、固定化工程の終りで25スポットアレイ内の5つの異なるインターロイキン抗体の位置を、予め定められた純統計的手法で知ることができる。次いで、記述した既知の分析方法（例えばELISA）に比べて、分析時間及び必要とする標本量を著しく減らすことにより後続する分析工程を達成し得、これらの知られた分析方法は、一般に離散的な標本区画内で個々の複数の測定を行なうことと、必要な個々の測定の数が多いことに起因して分析の再現性を決定するために複数のマイクロタイタープレートを使用することと、を必要とす

る。

【 0 1 4 1 】

タンパク質で覆われていない（センサープラットフォームの）残りの疎水性表面は、その後の分析工程の間の２次的抗体の非特異的結合を抑制すべく、 10 mg/ml の血清アルブミン（インキュベーション時間は 10 分 ）で遮られる。抗体の固定化の終了後、準備されたセンサープラットフォームは、つねに１つのアレイがPDMS層の 121 の開口部の各々の中に位置づけられるようにして、PDMS層に接合される。

【 0 1 4 2 】

c) 分析システム

光学系

i) 励起ユニット

センサープラットフォームは、コンピュータ制御式調整モジュール上に取付けられており、例 $3a$)に挙げられているセンサープラットフォーム内への内部結合のため格子構造（ I ）上に発射された励起光ビームによって照射された領域の主軸に運動の中心がある状態で、格子ラインに対し平行な軸を中心とした回転及び格子ラインに対し平行かつ垂直な並進運動を可能にする。レーザーが励起光源として作用した直後に、測定データが収集されない場合に光路を遮断するためのシャッターが光路内に存在する。さらに、励起光強度を段階的に又は連続的に変動させるため、センサープラットフォームに向かって励起光の光路においてこの位置や他の位置にも、ニュートラルフィルタ又は偏光子を取付けることができる。

【 0 1 4 3 】

632.8 nm のヘリウムネオンレーザーからの励起光ビームは、 25 倍の拡大レンズを用いて、断面が直径 25 mm の円形の平行光束にまで拡張される。この励起光束の中心部分から、長さ $16\text{ mm} \times$ 幅 16 mm の正方形の領域（格子構造の用語に基づく）を選択し、ダイクロミックミラー（ 650 DRLP 、Omega Optical, Brattleborough, VT, USA）を通過した後、励起光スポットの中心部分内に位置する 121 のアレイのうちの 4 つの群に光透過層（ a ）を介して向けられる。センサープラットフォームは、最大の内部結合となるように調整され、これはセンサープラットフォームを介しての励起光の透過の最小値によって確定され、及び測定精度内で反射光と同じ角度で内部結合した後、連続格子構造（ c ）により外部結合された励起光と反射した励起光の総和の最大値によって確定される。最適な内部結合の角度は、目視により、又は、コンピュータ制御の下では、増幅器に接続されたフォトダイオードの信号から決定され得、このフォトダイオードは、関連した光路に位置づけられている。このようにして、内部結合のための共鳴角度として 3.5° という角度が決定される。

【 0 1 4 4 】

ii) 検出

ペルチェ冷却（動作温度 -30 ）を有するCCDカメラ（TE3/A, Astrocams, Cambridge, UK）を、横方向の分解検出器として使用する。信号収集及びCCDチップ上への集光は、Heligon Tandem対物レンズ（Rodenstock, $2 \times \text{Cine-Heligon } 2.1/100\text{ mm}$ ）を用いて実施される。中心波長 680 nm で帯域幅 40 nm の２つの干渉フィルタ（Omega Optical, Brattleborough, Vermont）と、（減衰された散乱励起光と、測定領域からの弱くはるかに弱いルミネセンス光と、の透過のための）ニュートラルフィルタ又は（測定領域からの減衰励起光の透過のための）干渉フィルタと組合わせたニュートラルフィルタのいずれかと、が、Heligon Tandem 対物レンズの２つの部分の間で、フィルタホイール上に取付けられる。励起波長と発出波長との信号を交互に測定する。市販の画像分析ソフトウェア（Image Pro Plus）を用いてデータ分析を実施する。

【 0 1 4 5 】

d) 分析方法

測定すべきサイトカインの特異的認識のためには、サンドイッチ分析の方式が選択される。選択されたインターロイキン（インターロイキン $IL\#1 \sim IL\#5$ ）の各々について

、 0 . 1 % の血清アルブミン及び 0 . 0 5 % の Tween 2 0 を有するリン酸緩衝溶液中の 1 1 の検量用溶液を調製する（インターロイキン濃度； 0、 0 . 5、 1、 2、 5、 1 0、 2 0、 5 0、 1 0 0、 2 0 0、 3 0 0 pg / ml）。さらに、 5 つのインターロイキンの各々を同じ濃度で含み、 5 つのインターロイキンの全ての 1 1 の混合型検量用溶液が調製され、統計的（混合）方法で、未知の濃度のインターロイキンを含有する 5 5 の標本溶液を生成した。次に、対応する特異的ビオチニル化 2 次インターロイキン抗体（つねに 2 0 0 ピコモル）で個々の検量用溶液を、 1 時間予備インキュベートした。同様にして、 5 つの異なるビオチニル化 2 次インターロイキン抗体（各々 2 0 0 ピコモル）の混合物で混合型検量用溶液及び標本溶液を、同じく 1 時間予備インキュベートした。

【 0 1 4 6 】

次に、 5 0 μ l の個々の検量用溶液を、センサープラットフォーム上の最初の 5 列の標本区画内に充てんし、後続する蛍光測定の実験工程において各列内のインターロイキンにつき 1 つの個々の検量曲線（用量応答曲線）の生成を可能にする。後に分析物混合物の存在下で対応する検量曲線を生成するべく、第 6 番目の列の 1 1 個の標本区画の各々の中に 5 0 μ l の混合型検量用溶液を充てんする。対応するやり方で、 5 5 個の標本溶液を、標本区画の残りの列の全体にわたり分配する。 1 2 1 個の測定溶液の全てのインキュベーション時間は 3 0 分である。その後、緩衝液（ 0 . 1 % の血清アルブミンと 0 . 0 5 % の Tween 2 0 を添加したリン酸緩衝溶液）で標本区画を洗浄する。蛍光測定による最終的分析工程では、緩衝溶液（ 0 . 1 % の血清アルブミン及び 0 . 0 5 % Tween 2 0 を付加したリン酸緩衝溶液）中の 5 0 μ l の 1 - ナノモル Cy 5 - ストレプトアビジン（Amersham Pharmacia）を標本区画の各々に充てんし、 1 2 1 アレイ内の全ての測定領域からの蛍光信号を、 1 5 分間のインキュベーション時間の後に測定する。

【 0 1 4 7 】

個別の標本区画内のアレイの（光学的）読取りのためには、上述したデバイスを、開示した分析システム内に挿入し、上述した如く、励起波長の透過のためにフィルターホイールの位置において制御されて、 9 6 個の標本区画のうちの最初の 4 つのアレイの中で励起光の最大内部結合に調整される。その後、測定領域（スポット）からの蛍光の強度を、ルミネセンス波長での透過のためのフィルター位置で測定する。次の標本区画からのルミネセンス信号の読取りのための次の位置までデバイスを搬送すると、他の標本区画内のアレイの読取りが逐次的に（つねに各々 2 5 の離散的な測定領域を有する 4 つの標本区画の群について）実施される。

10

20

30

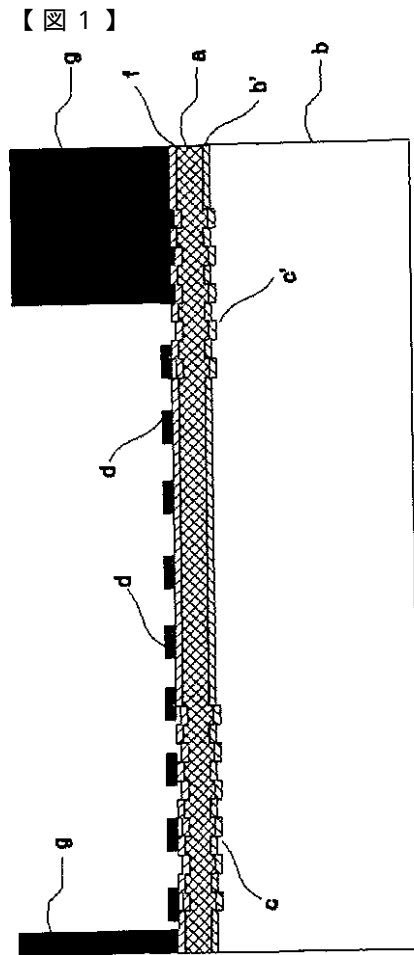


Abbildung 1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/58 (2006.01)		G 0 1 N 33/58	A
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/58	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		G 0 1 N 37/00	1 0 3
		C 1 2 N 15/00	F
		C 1 2 Q 1/68	A

- (72)発明者 ドゥベネック, ゲルト エル
ドイツ国 デー - 7 9 1 8 9 パート クロツィンゲン エツマッテンヴェーク 3 4
- (72)発明者 エーラート, マルクス
スイス国 ツェーハー - 4 3 1 2 マグデン イム ブリュエール 6
- (72)発明者 クレスバッハ, ゲルハルト エム
ドイツ国 デー - 7 9 2 1 9 シュタウフェン ブルクハルデンヴェーク 6
- (72)発明者 パウラク, ミヒャエル
ドイツ国 デー - 7 9 7 2 5 ローフェンブルク アンデルスバッハシュトラッセ 5
- (72)発明者 シュールマン - マーダー, エヴェリーネ
スイス国 ツェーハー - 5 0 8 9 ツアイヒェン タールヒューベル 1

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 5 6 1 0 (J P , A)
特表平 0 8 - 5 1 0 3 3 1 (J P , A)
特表 2 0 0 0 - 5 0 6 9 8 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G01N 33/53
C12M 1/00
C12M 1/34
G01N 21/64
G01N 21/78
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/566
G01N 33/58
G01N 37/00
C12N 15/09
C12Q 1/68

专利名称(译)	用于测量多种分析物的装置和方法		
公开(公告)号	JP5006494B2	公开(公告)日	2012-08-22
申请号	JP2001517147	申请日	2000-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	ZEPTOSENS		
申请(专利权)人(译)	Tsueputozensu股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜耳技术Sabishizu-GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	アーベルアンドレアスパー ドゥベネックゲルトエル エーラートマルクス クレスパッハゲルハルトエム パウラクミヒャエル シュールマンマーダーエヴェリーネ		
发明人	アーベル,アンドレアス パー ドゥベネック,ゲルト エル エーラート,マルクス クレスパッハ,ゲルハルト エム パウラク,ミヒャエル シュールマン-マーダー,エヴェリーネ		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/34 G01N21/64 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/58 G01N37/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6816 G01N21/25 G01N21/552 G01N21/77 G01N33/543		
CPC分类号	G01N21/648 C12Q1/6816 G01N21/253 G01N21/552 G01N21/7703 G01N33/54373 C12Q2565/628		
FI分类号	G01N33/53.M C12M1/00.A C12M1/34.Z G01N21/64.G G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/566 G01N33/58.A G01N33/58.Z G01N37/00.102 G01N37/00.103 C12N15/00.F C12Q1/68.A		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫		
优先权	1999001486 1999-08-13 CH		
其他公开文献	JP2003507705A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种装置包括平面光波导，作为传感器平台的一部分，并且直接或通过密封介质连接到平台，密封层。密封层直接或通过密封介质形成紧密密封层。密封层包括至少朝向传感器平台敞开的多个凹部，其以二维布置形成相应的多个样品隔室。每个样品室具有不同的生物或生物化学识别元件，用于特定识别和结合不同分析物，固定在五个或更多个离散测量区域中，其中测量区域与从光波导发出的激发光进行光学相互作用，如传感器平台的一部分形成样品隔室的分界线，并且其中样品隔室可操作以从接收的样品或试剂溶液中清除，然后任选地不经洗涤步骤接收供应给样品或试剂溶液的其他样品或试剂溶液。相同的样品室。

Abbildung 1

