

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**WO2005/090972**

発行日 平成20年2月7日 (2008.2.7)

(43) 国際公開日 **平成17年9月29日 (2005.9.29)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	2 G 0 5 8
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 M	
<b>GO 1 N 37/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 37/00 1 0 1	
<b>GO 1 N 35/08 (2006.01)</b>	GO 1 N 37/00 1 0 2	
	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2006-511242 (P2006-511242)	(71) 出願人	000226862 日水製薬株式会社 東京都台東区上野三丁目2 3 番9号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/004953	(74) 代理人	100099139 弁理士 光来出 良彦
(22) 国際出願日	平成17年3月18日 (2005.3.18)	(72) 発明者	奥 裕一 茨城県結城市北南茂呂1 0 7 5 - 2 日水 製薬株式会社 研究本体内
(31) 優先権主張番号	特願2004-78394 (P2004-78394)	(72) 発明者	赤羽 修一 茨城県結城市北南茂呂1 0 7 5 - 2 日水 製薬株式会社 研究本体内
(32) 優先日	平成16年3月18日 (2004.3.18)	Fターム(参考)	2G058 DA07
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的物質の分析キット、分析装置及び分析方法

## (57) 【要約】

分析装置の製造過程に熱の負荷や、接着剤に含まれている有機化合物等の影響が存在しても、失活等の影響が無く、しかもマイクロチャンネルの流路となる部分に免疫物質等を容易に固定化可能な分析装置を提供する。

分析キットは、分析装置と試薬を組み合わせたものである。分析キットに使用される分析装置1は、幅1  $\mu\text{m}$  - 5 mm、深さ1  $\mu\text{m}$  - 750  $\mu\text{m}$ の断面の流路2が形成された、極微量の液体試料の分析に適したいわゆるマイクロ流体システムに属するものであり、生物学的物質の分析に適する。分析キットに用いられる分析装置1は、第1部材5、第2部材6の何れかに流路2幅5 mm以下の溝を形成し、2枚の部材を接合したときに流路2となる箇所の一部(捕獲ゾーン7)に核酸を結合させておき、これら2枚の部材を接合する。試薬は、分析装置1の2枚の部材を接合した後に、使用されるので、融着や接着剤の影響を受けない。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次の試薬 A、試薬 B 及び分析装置を組み合わせてなる分析キットであって、試薬 A と試薬 B は同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キット：

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の第 1 核酸 (N1) が固定化された分析装置；

ii) 該分析装置の捕獲ゾーンに固定化された第 1 核酸 (N1) の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 (N2) と、測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 1 リガンド (L1) とからなる結合体 (N2 - L1) を含む試薬 A；及び、

iii) 測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 2 リガンド (L2) と標識物 (M) が結合されてなる結合体 (L2 - M) を含む試薬 B。

## 【請求項 2】

次の試薬 A、試薬 B'、試薬 C 及び分析装置を組み合わせてなる分析キットであって、試薬 A、試薬 B' 及び試薬 C の内 2 種以上は同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キット：

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の第 1 核酸 (N1) が固定化された分析装置；

ii) 該分析装置の捕獲ゾーンに固定化された第 1 核酸 (N1) の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 (N2) と、測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 1 リガンド (L1) とからなる結合体 (N2 - L1) を含む試薬 A；

iii) 測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 2 リガンド (L2) を含む試薬 B'；及び、

iv) 該第 2 リガンド (L2) に特異的結合性を有する第 3 リガンド (L3) と、標識物 (M) とからなる結合体 (L3 - M) を含む試薬 C。

## 【請求項 3】

次の試薬 A と分析装置を組み合わせてなる標識物を含まない分析キット：

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の第 1 核酸 (N1) が固定化された分析装置；及び、

ii) 該分析装置の捕獲ゾーンに固定化された第 1 核酸 (N1) の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 (N2) と、測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 1 リガンド (L1) とからなる結合体 (N2 - L1) を含む試薬 A。

## 【請求項 4】

次の試薬 B と分析装置を組み合わせてなる分析キット：

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の第 1 核酸 (N1) が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質 (O) に対し特異的結合性を有する第 1 リガンド (L1) と、前記固定化第 1 核酸 (N1) に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 (N2) とからなる結合体 (N2 - L1) を、第 1 核酸 (N1) と第 2 核酸 (N2) との特

10

20

30

40

50

異的結合により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置；及び、

ii) 測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 2 リガンド (L 2) と標識物 (M) が結合されてなる結合体 (L 2 - M) を含む試薬 B。

【請求項 5】

次の試薬 A、試薬 B'、試薬 C 及び分析装置を組み合わせてなる分析キットであって、試薬 A、試薬 B' 及び試薬 C の内 2 種以上が同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キット；

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の第 1 核酸 (N 1) が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質 (O) に対し特異的結合性を有する第 1 リガンド (L 1) と、前記固定化第 1 核酸 (N 1) に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 (N 2) とからなる結合体 (N 2 - L 1) を、第 1 核酸 (N 1) と第 2 核酸 (N 2) との特異的結合により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置；及び、

ii) 測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 2 リガンド (L 2) を含む試薬 B'。

iii) 該第 2 リガンド (L 2) に特異的結合性を有する第 3 リガンド (L 3) と、標識物 (M) とからなる結合体 (L 3 - M) を含む試薬 C。

【請求項 6】

次の試薬 A、試薬 B 及び分析装置を組み合わせてなる分析キットであって、試薬 A と試薬 B は同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キット；

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第 1 核酸 (N 1 g : g は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置；

ii) 該捕獲ゾーンに固定化された複数種類の第 1 核酸 (N 1 g : g は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 (N 2 h : h は整数) と、測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (O k : k は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド (L 1 i : i は整数) とからなる結合体 (N 2 h - L 1 i : h と i は独立した整数) を含む試薬 A；及び、

iii) 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (O k : k は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド (L 2 j : j は整数) と、1 種類以上の標識物 (M l : l は整数) が結合されてなる結合体 (L 2 j - M l : j と l は独立した整数) を含む試薬 B。

【請求項 7】

次の試薬 A、試薬 B'、試薬 C 及び分析装置を組み合わせてなる分析キットであって、試薬 A、試薬 B' 及び試薬 C の内 2 種以上が同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キット；

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第 1 核酸 (N 1 g : g は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置；

ii) 該捕獲ゾーンに固定化された複数種類の第 1 核酸 (N 1 g : g は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 (N 2 h : h は整数) と、測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (O k : k は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド (L 1 i : i は整数) とからなる結合体 (N 2 h - L 1 i : h と i は独立した整数) を含む試薬 A；

iii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) を含む試薬  $B'$  ; 及び、

iv) 該1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) に種類毎に特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド ( $L3m$  :  $m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - MI$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬  $C$ 。

【請求項8】

次の試薬  $A$  と分析装置を組み合わせてなる標識物を含まない分析キット：

i) 幅  $1\mu m - 5mm$ 、深さ  $1\mu m - 750\mu m$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置；

ii) 該分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の塩基配列に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬  $A$ 。

【請求項9】

次の試薬  $B$  と分析装置とを組み合わせてなる分析キット：

i) 幅  $1\mu m - 5mm$ 、深さ  $1\mu m - 750\mu m$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と、前記複数種類の固定化第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を、第1核酸と第2核酸の特異的結合により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置；及び、

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質の種類毎に特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) が結合されてなる結合体 ( $L2j - MI$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬  $B$ 。

【請求項10】

次の試薬  $B'$  及び試薬  $C$  と分析装置とを組み合わせてなる分析キット：

i) 幅  $1\mu m - 5mm$ 、深さ  $1\mu m - 750\mu m$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と、前記複数種類の固定化第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を、第1核酸と第2核酸の特異的結合性により形成して捕獲ゾーンに各々独立して固定化してなる分析装置；及び、

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) を含む試薬  $B'$  ;

iii) 該1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) の種類毎に対応した特異的結

10

20

30

40

50

合性を有する 1 種類以上の第 3 リガンド ( $L 3 m$  :  $m$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M l$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L 3 m - M l$  :  $l$  及び  $m$  は整数) を含む試薬 C。

【請求項 1 1】

前記生物学的物質、第 1 リガンド ( $L 1$  又は  $L 1 i$  :  $i$  は整数)、第 2 リガンド ( $L 2$  又は  $L 2 j$  :  $j$  は整数) 及び / 又は第 3 リガンド ( $L 3$  又は  $L 3 m$  :  $m$  は整数) が、免疫学的物質、受容体、受容体に結合する物質、糖類、糖タンパク質、糖脂質、レクチン及び核酸から選ばれたものである請求項 1 乃至 1 0 の何れか 1 項記載の分析キット。

【請求項 1 2】

前記第 1 リガンド ( $L 1$  又は  $L 1 i$  :  $i$  は整数) 及び / 又は第 2 リガンド ( $L 2$  又は  $L 2 j$  :  $j$  は整数) が、異なる反応性を有する請求項 1、2、3、4、5、6、7、9 又は 1 0 記載の分析キット。

10

【請求項 1 3】

前記第 1 リガンド ( $L 1$  又は  $L 1 i$  :  $i$  は整数) 及び / 又は第 2 リガンド ( $L 2$  又は  $L 2 j$  :  $j$  は整数) が、同一の反応性を有する請求項 1、2、3、4、5、6、7、9 又は 1 0 記載の分析キット。

【請求項 1 4】

前記標識物 ( $M$  又は  $M l$  :  $l$  は整数) が、酵素、金属コロイド、ラテックス、核酸、発光物質、蛍光物質、インタカレーター、ビオチン、アビジン、及びストレプトアビジンから選ばれたものである請求項 1 乃至 1 0 の何れか 1 項記載の分析キット。

【請求項 1 5】

前記第 1 部材又は第 2 部材が、ガラス、ポリジメチルシロキサン、セラミックス、アクリロニトリル・ブタジエンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリル・エチレンプロピレンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリルスチレン樹脂、メタクリルスチレン樹脂、ポリアミド・ナイロン樹脂、ポリブチレンテレフタレート樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレンテレフタレート・ポリエステル樹脂、ポリイミド樹脂、メタクリル樹脂、ポリアセタール樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリフェニレンエーテル樹脂、ポリフェニレンサルファイド樹脂、ポリスチレン樹脂、熱可塑性エラストマー樹脂、アロイ、液晶ポリマー樹脂、シクロオレフィン樹脂、熱可塑性樹脂、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、ジアリルフタレート樹脂、環状オレフィンコポリマー、及び、これらの部材表面が修飾されたものから選ばれたものである請求項 1 乃至 1 0 の何れか 1 項記載の分析キット。

20

30

【請求項 1 6】

前記第 1 部材又は第 2 部材の材質は同一である請求項 1 乃至 1 0 の何れか 1 項記載の分析キット。

【請求項 1 7】

前記第 1 部材又は第 2 部材の材質は異なる請求項 1 乃至 1 0 の何れか 1 項記載の分析キット。

【請求項 1 8】

幅  $1 \mu m - 5 mm$ 、深さ  $1 \mu m - 750 \mu m$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の第 1 核酸 ( $N 1$ ) が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質 ( $O$ ) に対し特異的結合性を有する第 1 リガンド ( $L 1$ ) と、前記固定化第 1 核酸 ( $N 1$ ) に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 ( $N 2$ ) とからなる結合体 ( $N 2 - L 1$ ) を、第 1 核酸 ( $N 1$ ) と第 2 核酸 ( $N 2$ ) との特異的結合性により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置。

40

【請求項 1 9】

幅  $1 \mu m - 5 mm$ 、深さ  $1 \mu m - 750 \mu m$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部

50

材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と、前記複数種類の固定化第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) とからなる結合体 ( $L1i - N2h$  :  $i$  と  $h$  は独立した整数) を、第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性により結合して捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化してなる分析装置。

【請求項20】

前記生物学的物質 ( $O$  又は  $Ok$  :  $k$  は整数) 及び/又は第1リガンド ( $L1$  又は  $L1i$  :  $i$  は整数) が、免疫学的物質、受容体及び核酸から選ばれたものである請求項18又は19記載の分析装置。

10

【請求項21】

前記第1部材又は第2部材が、ガラス、ポリジメチルシロキサン、セラミックス、アクリロニトリル・ブタジエンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリル・エチレンプロピレンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリルスチレン樹脂、メタクリルスチレン樹脂、ポリアミド・ナイロン樹脂、ポリブチレンテレフタレート樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレンテレフタレート・ポリエステル樹脂、ポリイミド樹脂、メタクリル樹脂、ポリアセタール樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリフェニレンエーテル樹脂、ポリフェニレンサルファイド樹脂、ポリスチレン樹脂、熱可塑性エラストマー樹脂、アロイ、液晶ポリマー樹脂、シクロオレフィン樹脂、熱可塑性樹脂、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、ジアリルフタレート樹脂、環状オレフィンコポリマー、及び、これらの部材表面が修飾されたものから選ばれたものである請求項18又は19記載の分析装置。

20

【請求項22】

前記第1部材又は第2部材の材質は同一である請求項18又は19記載の分析装置。

【請求項23】

前記第1部材又は第2部材の材質は異なる請求項18又は19記載の分析装置。

【請求項24】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

30

i) 幅  $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ  $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸 ( $N1$ ) が固定化された分析装置を用意すること；

ii) 該第1核酸 ( $N1$ ) に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸 ( $N2$ ) に、測定すべき生物学的物質に特異的結合性を有する第1リガンド ( $L1$ ) を結合させてなる結合体 ( $N2 - L1$ ) を含む試薬Aを用意すること；

iii) 測定されるべき生物学的物質 ( $O$ ) の存在が疑われる液体試料、及び試薬Aを予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析装置の流路に導入し、複合体を流路内に固定化させること；

40

iv) 固定化された複合体を測定すること。

【請求項25】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 幅  $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ  $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸 ( $N1$ ) が固定化された分析装置を用意すること；

ii) 該第1核酸 ( $N1$ ) に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸 ( $N2$ ) に、

50

測定すべき生物学的物質に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)を結合させてなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aを用意すること；

iii) 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料、及び試薬Aを予め混合せずに別々に該分析装置の流路に導入し、複合体を流路内に固定化させること；

iv) 固定化された複合体を測定すること。

【請求項26】

次のi) - iv)の要件を含む分析方法：

i) 幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の複数種類の塩基配列の第1核酸(N1g : gは整数)が種類毎に各々独立して固定化された分析装置を用意すること；

ii) 該複数種類の第1核酸(N1g : gは整数)に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸(N2h : hは整数)に、測定されるべき1種類以上の生物学的物質(Ok : kは整数)の種類毎に応じて特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド(L1i : iは整数)を結合させてなる結合体(N2h - L1i : hとiは独立した整数)を含む試薬Aを用意すること；

iii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質(Ok : kは整数)の存在が疑われる液体試料、及び試薬Aを予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析装置の流路に導入し、複合体を流路内に固定化させること；

iv) 固定化された複合体を測定すること。

【請求項27】

次のi) - iv)の要件を含む分析方法：

i) 幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の複数種類の塩基配列の第1核酸(N1g : gは整数)が種類毎に各々独立して固定化された分析装置を用意すること；

ii) 該複数種類の第1核酸(N1g : gは整数)に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸(N2h : hは整数)に、測定されるべき1種類以上の生物学的物質(Ok : kは整数)の種類毎に応じて特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド(L1i : iは整数)を結合させてなる結合体(N2h - L1i : hとiは独立した整数)を含む試薬Aを用意すること；

iii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質(Ok : kは整数)の存在が疑われる液体試料、及び試薬Aを該分析装置の流路に別々に導入し、複合体を流路内に固定化させること、

iv) 固定化された複合体を測定すること。

【請求項28】

次のi) - iv)の要件を含む分析方法：

i) 請求項1記載の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. 及びc. の材料の内2種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；

a. 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬A、

c. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)と、標識物(M)が直接的に結合されてなる結合体(L2-M)を含む試薬B；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2

10

20

30

40

50

)との特異的結合性、第1リガンド(L1)と生物学的物質(O)との特異的結合性、及び第2リガンド(L2)と生物学的物質(O)との特異的結合性により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-L2-M)を形成すること；

iv) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-L2-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

【請求項29】

次のi) - iv)の要件を含む分析方法：

i) 請求項1記載の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. 及びc.の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬A、

c. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)と、標識物(M)が直接的に結合されてなる結合体(L2-M)を含む試薬B；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合性、第1リガンド(L1)と生物学的物質(O)との特異的結合性、及び第2リガンド(L2)と生物学的物質(O)との特異的結合性により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-L2-M)を形成すること；

iv) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-L2-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

【請求項30】

次のi) - iv)の要件を含む分析方法：

i) 請求項2記載の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. c. 及びd.の材料の内2種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；

a. 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬A、

c. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)を含む試薬B'、及び、

d. 該第2リガンド(L2)に特異的結合性を有する第3リガンド(L3)と、標識物(M)とからなる結合体(L3-M)を含む試薬C；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合性、第1リガンド(L1)と生物学的物質(O)との特異的結合性、第2リガンド(L2)と生物学的物質(O)との特異的結合性、及び第2リガンド(L2)と第3リガンド(L3)との特異的結合性により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-L2-L3-M)を形成すること；

iv) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-L2-L3-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

【請求項31】

次のi) - iv)の要件を含む分析方法：

i) 請求項2記載の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. c. 及びd.の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的

10

20

30

40

50

塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬A、

c. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)を含む試薬B'、及び、

d. 該第2リガンド(L2)に特異的結合性を有する第3リガンド(L3)と、標識物(M)とからなる結合体(L3-M)を含む試薬C；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合性、第1リガンド(L1)と生物学的物質(O)との特異的結合性、第2リガンド(L2)と生物学的物質(O)との特異的結合性、及び第2リガンド(L2)と第3リガンド(L3)との特異的結合性により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-L2-L3-M)を形成すること；

iv) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-L2-L3-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

【請求項32】

次のi) - v)の要件を含む分析方法：

i) 請求項3記載の分析キットを用いること；

ii) 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料から、予め標識物(M)を導入してなる標識物導入生物学的物質(O-M)を調製しておくこと、

iii) 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aと、前記標識物導入生物学的物質(O-M)とを、予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-M)を形成すること；

v) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

【請求項33】

次のi) - v)の要件を含む分析方法：

i) 請求項3記載の分析キットを用いること；

ii) 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料から、予め標識物(M)を導入してなる標識物導入生物学的物質(O-M)を調製しておくこと、

iii) 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aと、前記標識物導入生物学的物質(O-M)とを、混合せずに別々に、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-M)を形成すること；

v) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

【請求項34】

次のi) - iv)の要件を含む分析方法：

i) 請求項4記載の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b.の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料と、

b. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(

10

20

30

40

50

- L 2 ) と、標識物 ( M ) が直接的に結合されてなる結合体 ( L 2 - M ) を含む試薬 ;
- iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 ) 中の第 1 リガンド ( L 1 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、及び結合体 ( L 2 - M ) 中の第 2 リガンド ( L 2 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合により、固定化された結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - M ) を形成すること ;
- iv) 該固定化結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - M ) に含まれる標識物 ( M ) を測定することによって、生物学的物質 ( O ) を測定すること。

【請求項 3 5】

次の i ) - iv) の要件を含む分析方法 :

- i ) 請求項 4 記載の分析キットを用いること ;
- ii) 次の a . b . の材料を混合することなく別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること :
- a . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) の存在が疑われる液体試料と、
- b . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 2 リガンド ( L 2 ) と、標識物 ( M ) が直接的に結合されてなる結合体 ( L 2 - M ) を含む試薬 ;
- iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 ) 中の第 1 リガンド ( L 1 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、及び結合体 ( L 2 - M ) 中の第 2 リガンド ( L 2 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合により、固定化された結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - M ) を形成すること ;
- iv) 該固定化結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - M ) に含まれる標識物 ( M ) を測定することによって、生物学的物質 ( O ) を測定すること。

【請求項 3 6】

次の i ) - iv) の要件を含む分析方法 :

- i ) 請求項 5 記載の分析キットを用いること ;
- ii) 次の a . b . 及び c . の材料の 2 種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること :
- a . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) の存在が疑われる液体試料、
- b . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 2 リガンド ( L 2 ) を含む試薬 B '、
- c . 該第 2 リガンド ( L 2 ) に特異的結合性を有する第 3 リガンド ( L 3 ) と、標識物 ( M ) とからなる結合体 ( L 3 - M ) を含む試薬 C ;
- iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 ) 中の第 1 リガンド ( L 1 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、第 2 リガンド ( L 2 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、及び第 2 リガンドと第 3 リガンドとの特異的結合性により、固定化された結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - L 3 - M ) を形成すること ;
- iv) 該固定化結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - L 3 - M ) に含まれる標識物 ( M ) を測定することによって、生物学的物質 ( O ) を測定すること。

【請求項 3 7】

次の i ) - iv) の要件を含む分析方法 :

- i ) 請求項 5 記載の分析キットを用いること ;
- ii) 次の a . b . 及び c . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること :
- a . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) の存在が疑われる液体試料、
- b . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 2 リガンド ( L 2 ) を含む試薬 B '、
- c . 該第 2 リガンド ( L 2 ) に特異的結合性を有する第 3 リガンド ( L 3 ) と、標識物 ( M ) とからなる結合体 ( L 3 - M ) を含む試薬 C ;
- iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 ) 中の第 1 リガンド ( L 1 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、第 2 リガンド ( L 2 ) と生物学

的物質 (O) の特異的結合性、及び第 2 リガンドと第 3 リガンドとの特異的結合性により、固定化された結合体 (N1 - N2 - L1 - O - L2 - L3 - M) を形成すること；

iv) 該固定化結合体 (N1 - N2 - L1 - O - L2 - L3 - M) に含まれる標識物 (M) を測定することによって、生物学的物質 (O) を測定すること。

【請求項 38】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 請求項 6 記載の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . c . の材料の 2 種類以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；

10

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第 1 核酸 (N1g : g は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 (N2h : h は整数) と、1 種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド (L1i : i は整数) とからなる結合体 (N2h - L1i : h と i は独立した整数) を含む試薬 A の溶液；

c . 該生物学的物質 (Ok : k は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド (L2j : j は整数) と 1 種類以上の標識物 (Ml : l は整数) からなる結合体 (L2j - Ml : j と l は独立した整数) を含む試薬 B ；

20

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第 1 核酸 (N1g : g は整数) と、複数種類の第 2 核酸 (N2h : h は整数) との特異的結合性、複数種類の第 1 リガンド (L1i : i は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) との特異的結合性、及び 1 種類以上の第 2 リガンド (L2j : j は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) との特異的結合性により、種類毎に各々独立して固定化された結合体 (N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - Ml : g、h、i、j、k、l は独立した整数) を形成すること；

iv) 前記工程で得られた複数種類の固定化結合体 (N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - Ml : g、h、i、j、k、l は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 (Ml : l は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) を測定すること。

30

【請求項 39】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 請求項 6 記載の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . c . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 捕獲ゾーンに固定化された複数種類の第 1 核酸 (N1g : g は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 (N2h : h は整数) と、1 種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド (L1i : i は整数) とからなる結合体 (N2h - L1i : h と i は独立した整数) を含む試薬 A の溶液；

40

c . 該生物学的物質 (Ok : k は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド (L2j : j は整数) と 1 種類以上の標識物 (Ml : l は整数) からなる結合体 (L2j - Ml : j と l は独立した整数) を含む試薬 B ；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化されている第 1 核酸 (N1g : g は整数) と、複数種類の第 2 核酸 (N2h : h は整数) との特異的結合性、複数種類の第 1 リガンド (L1i : i は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) との特異的結合性、及び 1 種類以上の第 2 リガンド (L2j : j は整数) と 1 種類以上の生物

50

学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - MI : g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) を形成すること;

iv) 前記工程で得られた複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - MI : g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

【請求項40】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法:

i) 請求項7記載の分析キットを用いること;

10

ii) 次の a. b. c. 及び d. の材料の内2種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること:

a. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) と、1種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aの溶液;

20

c. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) を含む試薬B'、及び、

d. 該第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) の種類ごとに対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド ( $L3m : m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - MI : m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬C;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性、1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性、及び1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) と1種類以上の第3リガンド ( $L3m : m$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) を形成すること;

30

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

【請求項41】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法:

40

i) 請求項7記載の分析キットを用いること;

ii) 次の a. b. c. 及び d. の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること:

a. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) と、1種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aの溶液;

50

c. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) を含む試薬  $B'$ 、及び、

d. 該第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) の種類ごとに対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド ( $L3m : m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - MI : m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬  $C$  ;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性、1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性、及び1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) と1種類以上の第3リガンド ( $L3m : m$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) を形成すること ;

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

#### 【請求項42】

次の i) - v) の要件を含む分析方法 :

i) 請求項8記載の分析キットを用いること ;

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI : k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、

iii) 捕獲ゾーンに各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) の塩基配列に対応して少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬  $A$  と、前記1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI : k$  と  $l$  は独立した整数) とを、予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら該分析キットの分析装置の流路に導入すること ;

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性により、各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI : g, h, i, k, l$  は独立した整数) を形成すること ;

v) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI : g, h, i, k, l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

#### 【請求項43】

次の i) - v) の要件を含む分析方法 :

i) 請求項8記載の分析キットを用いること ;

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI : k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、

iii) 捕獲ゾーンに各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) の塩基配列に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬  $A$  と、前記1種類以上の標識物導入生物学

10

20

30

40

50

的物質 ( $Ok - MI : k$  と  $l$  は独立した整数) とを混合せずに別々に、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性により、各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI : g, h, i, k, l$  は独立した整数) を形成すること；

v) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI : g, h, i, k, l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

10

【請求項44】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 請求項9記載の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a . 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) が直接的に結合されてなる結合体 ( $L2j - MI : j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬；

20

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 ( $N1g - N2h - L1i : g, h, i$  は独立した整数) 中の複数の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の特異的結合性、及び試薬中の結合体 ( $L2j - MI : j$  と  $l$  は独立した整数) の1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の特異的結合により、各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - MI : g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) を形成すること；

iv) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - MI : g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

30

【請求項45】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 請求項9記載の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . の材料を混合せずに別々に、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a . 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) が結合されてなる結合体 ( $L2j - MI : j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬；

40

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 ( $N1g - N2h - L1i : g, h, i$  は独立した整数) 中の複数の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の特異的結合性、及び試薬中の結合体 ( $L2j - MI : j$  と  $l$  は独立した整数) の1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の特異的結合により、各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - MI : g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) を形成すること；

50

iv) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - M1 : g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

【請求項 46】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 請求項 10 記載の分析キットを用いること；

ii) 次の a. b. 及び c. の材料の 2 種類以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；

a. 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b. 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) を含む試薬 B'、

c. 該第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する第 3 リガンド ( $L3m : m$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - M1 : m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 C；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている結合体 ( $N1g - N2h - L1i : g$ 、 $h$ 、 $i$  は独立した整数) 中の第 1 リガンド ( $L1i : i$  は整数) と生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の特異的結合性、第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) と生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の特異的結合性、及び第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) と第 3 リガンド ( $L3m : m$  は整数) との特異的結合性により、固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  は独立した整数) を形成すること；

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数) を測定することによって、生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

【請求項 47】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 請求項 10 の分析キットを用いること；

ii) 次の a. b. 及び c. の材料を混合することなく別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b. 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) を含む試薬 B'、

c. 該第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する第 3 リガンド ( $L3m : m$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - M1 : m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 C；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている結合体 ( $N1g - N2h - L1i : g$ 、 $h$ 、 $i$  は独立した整数) 中の第 1 リガンド ( $L1i : i$  は整数) と生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の特異的結合性、第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) と生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の特異的結合性、及び第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) と第 3 リガンド ( $L3m : m$  は整数) との特異的結合性により、固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  は独立した整数) を形成すること；

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整

10

20

30

40

50

数)を測定することによって、生物学的物質( $O_k$  :  $k$  は整数)を測定すること。

【請求項48】

次のi) - v)の要件を含む分析方法：

- i) 請求項18記載の分析装置を用いること；
- ii) 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料から、予め標識物(M)を導入してなる標識物導入生物学的物質(O-M)を調製しておくこと、
- iii) 該分析装置の流路に、該標識物導入生物学的物質(O-M)を導入すること；
- iv) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1リガンド(L1)と第2核酸(N2)とからなる結合体(L1-N2)における第1リガンド(L1)と、該標識物導入生物学的物質(O-M)における生物学的物質(O)の特異的結合により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-M)を形成すること；
- v) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

10

【請求項49】

次のi) - v)の要件を含む分析方法：

- i) 請求項19記載の分析装置を用いること；
- ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質( $O_k$  :  $k$  は整数)の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物(MI : I は整数)を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質( $O_k - MI$ 、 $k$  とI は独立した整数)を調製しておくこと、
- iii) 該分析装置の流路に、該1種類以上の標識物導入生物学的物質( $O_k - MI$ 、 $k$  とI は独立した整数)を導入すること；
- iv) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている複数種類の第1リガンド(L1i : i は整数)と該1種類以上の標識物導入生物学的物質( $O_k - MI$ 、 $k$  とI は独立した整数)における1種類以上の生物学的物質( $O_k$  :  $k$  は整数)の特異的結合により、固定化された結合体(N1g - N2h - L1i -  $O_k - MI$  : g、h、i、k、I は独立した整数)を形成すること；
- v) 該固定化結合体(N1g - N2h - L1i -  $O_k - MI$  : g、h、i、k、I は独立した整数)に含まれる1種類以上の標識物(MI : I は整数)を測定することによって、1種類以上の生物学的物質( $O_k$  :  $k$  は整数)を測定すること。

20

【請求項50】

請求項24 - 49の何れか1項記載の分析方法であって、流路の流速が0.1 ~ 50  $\mu$ L / 分である分析方法。

30

【請求項51】

(1) 幅1  $\mu$ m - 5 mm、深さ1  $\mu$ m - 750  $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材を用意し、

該溝は第1部材と第2部材を接合したときに流路となる部分であり、該第1部材又は第2部材の何れかに、あるいは両方に、流路入口及び流路出口を有し、

(2) 第1部材及び/又は第2部材における流路となることが予定されている部分であって、測定されるべき生物学的物質を捕獲するためのゾーンとなる部分に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)を固定化し、

40

(3) 次いで、第1部材及び第2部材を融着又は接着剤により接合することにより流路を形成した接合体とし、

(4) 該接合体の流路に、捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aを導入し、捕獲ゾーンの第1核酸(N1)に該結合体(N2-L1)を特異的結合により固定化させることを特徴とする分析装置の製造方法。

【請求項52】

(1) 幅1  $\mu$ m - 5 mm、深さ1  $\mu$ m - 750  $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材を用意し、

50

該溝は第 1 部材と第 2 部材を接合したときに流路となる部分であり、該第 1 部材又は第 2 部材の何れかに、あるいは両方に流路入口及び流路出口を有し、

( 2 ) 第 1 部材及び / 又は第 2 部材における流路となることが予定されている部分であって、測定されるべき生物学的物質を捕獲するためのゾーンとなる部分に、任意の塩基配列の複数種類の第 1 核酸 ( N 1 g : g は整数 ) を各々独立させて固定化し、

( 3 ) 次いで、第 1 部材及び第 2 部材を融着又は接着剤により接合することにより流路を形成した接合体とし、

( 4 ) 該接合体の流路に、捕獲ゾーンに固定化された複数種類の第 1 核酸 ( N 1 g : g は整数 ) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 ( N 2 h : h は整数 ) と、測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド ( L 1 i : i は整数 ) とからなる結合体 ( N 2 h - L 1 i : h と i は独立した整数 ) を含む試薬 A を流して、捕獲ゾーンの複数種類の第 1 核酸 ( N 1 g : g は整数 ) に該結合体 ( N 2 h - L 1 i : h と i は独立した整数 ) を特異的結合により固定化させることを特徴とする分析装置の製造方法。

10

【請求項 5 3】

融着温度が 7 0 - 1 4 0 である請求項 5 1 又は 5 2 記載の分析装置の製造方法。

【請求項 5 4】

前記生物学的物質及び / 又は第 1 リガンド ( L 1 ) が、免疫学的物質、受容体及び核酸から選ばれたものである請求項 5 1 又は 5 2 記載の分析装置の製造方法。

【請求項 5 5】

前記第 1 部材又は第 2 部材が、ガラス、ポリジメチルシロキサン、セラミックス、アクリロニトリル・ブタジエンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリル・エチレンプロピレンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリルスチレン樹脂、メタクリルスチレン樹脂、ポリアミド・ナイロン樹脂、ポリブチレンテレフタレート樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレンテレフタレート・ポリエステル樹脂、ポリイミド樹脂、メタクリル樹脂、ポリアセタール樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリフェニレンエーテル樹脂、ポリフェニレンサルファイド樹脂、ポリスチレン樹脂、熱可塑性エラストマー樹脂、アロイ、液晶ポリマー樹脂、シクロオレフィン樹脂、熱可塑性樹脂、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、ジアリルフタレート樹脂、環状オレフィンコポリマー、及び、これらの部材表面が修飾されたものから選ばれたものである請求項 5 1 又は 5 2 記載の分析装置の製造方法。

20

30

【請求項 5 6】

前記第 1 部材又は第 2 部材の材質は同一である請求項 5 1 又は 5 2 記載の分析装置の製造方法。

【請求項 5 7】

前記第 1 部材又は第 2 部材の材質は異なる請求項 5 1 又は 5 2 記載の分析装置の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微小断面の流路を有するマイクロチップと呼ばれる生物学的物質を分析するための分析装置、該分析装置と試薬からなる分析キット、及び該分析装置を用いた分析方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

最も一般的に生体高分子を分析する方法は、臨床検査である。臨床検査において、通常 5 ~ 1 0 m L の採血管に血液を収集し、血漿や血清部分に含まれる抗原、抗体などを分析する。疾病の診断は、複数の検査項目の組み合わせと臨床症状によって為されるため、医師はその疾病の可能性によって検査項目の組み合わせを考察する。このような検査において、患者からの採血後、検査室に検体が搬送され、そこに設置された大型の検査装置で

50

、複数の異なった項目が測定される。その後、測定結果が医師に通知され、数日後に来院した患者に検査結果を基にした疾病の結果が通知される。こうした分析装置としては、検査室などに備え付けられる大型のものが一般的であり、運転の際に予めウォーミングアップが必ず必要であるため、緊急を要する検査にはあまり適していない。このような分析装置を用いる検査においては、乳幼児、高齢者にとっては、採血量が多いため、非常に負担であり、また、検査にタイムラグが生じ、適切な治療が行えないという問題もあった。

#### 【 0 0 0 3 】

こうした点を打開するために、種々の検査法を用いた試薬開発が行われてきている。例えば、特開昭 6 3 - 5 0 3 5 1 8 号公報 ( 特許文献 1 ) を用いた方法や、米国特許 6 , 4 4 8 , 0 0 1 ( 特許文献 2 ) に示すイムノクロマトグラフ法が挙げられる。これらの技術を用いた方法では、名刺の 1 / 2 程度の大きさの試薬を室温で保存でき、ベットサイドで極めて簡便に分析対象物の有無を判定することが可能となっている。しかしながら、これらの方法は判定を目視により行うため、感度が必ずしも高くなく、また、定量を行う事はできず、1 回の分析に採血量 1 0 0  $\mu$  L 程度を要することから、患者負担を軽減するに至っていない。

10

#### 【 0 0 0 4 】

こうした点を打開するために、特開昭 6 3 - 2 7 3 0 4 2 号公報 ( 特許文献 3 ) に記載されているようなエバネッセント波を用いた分析装置も開発されている。この装置を用いると、定量を行う事は可能となるが、1 回の分析に採血量 2 0 ~ 5 0  $\mu$  L を要するために、先の分析技術よりも改善されているものの、解決には至っていない。

20

#### 【 0 0 0 5 】

近年、MicroTAS ( Micro Total Analysis System, マイクロ総合分析システム ) といわれるマイクロ流体システム技術を用いた分析方法が考案され、生体高分子の分析、同定、精製等に用いられてきている。その背景には、ゲノム解析、プロテオミクスなどに代表されるバイオ技術分野において、極微量のサンプルから短時間で多くの情報を入手したいという要望が高まっていることがある。

#### 【 0 0 0 6 】

マイクロ流体システムでは、流路を小型化、マイクロ化することにより、単位体積あたりの反応表面積が増大することがわかっているため、このことから反応時間が大幅に短縮でき、単位時間あたりに入手できる情報が多くなる。さらに、その容量が微量なので流体の温度均一性を保つのが容易になり、また、試薬使用量及び廃液を大幅に削減できるなど、多くの効果が得られる。

30

#### 【 0 0 0 7 】

このように、マイクロ流体システムは、化学産業、製薬産業をはじめ、食品産業、農業技術など多くのバイオ関連産業を含む、非常に多くの産業に大きな影響を与えるものと考えられる。

#### 【 0 0 0 8 】

こうしたマイクロ流体システムを用いた免疫測定は、S a t o らによって実証されている ( Analytical Chemistry 2001, 73, 1213 1218 ( 非特許文献 1 ) 、特開昭 2 0 0 1 - 4 6 2 8 号公報 ( 特許文献 4 ) ) 。彼らの方法では、ガラス製のマイクロチップ中の幅 2 0 0  $\mu$  m、深さ 1 0 0  $\mu$  m、長さ 5 0 . 4 m m の流路の途中にダムのような構造を設け、このダムで堰き止められることが可能な粒径のポリスチレンビーズにマウス抗腫瘍胎児性抗原抗体を結合させておく。流路入口から、このマウス抗腫瘍胎児性抗原抗体結合ビーズを流し込みダム手前に該抗体結合ビーズを堰き止めることにより、抗体結合ビーズ領域を作る。ここに、種々の濃度の腫瘍胎児性抗原を流し込み、マウス抗体結合ビーズ - 抗原結合体を作る。洗浄後、ウサギ抗腫瘍胎児性抗原抗体を反応させて、マウス抗体結合ビーズ - 抗原 - ウサギ抗腫瘍胎児性抗原抗体結合体を作る。さらに洗浄後、金コロイド標識抗ウサギ I g G 抗体を反応させて、マウス抗腫瘍胎児性抗原抗体結合ビーズ - 抗原 - ウサギ抗腫瘍胎児性抗原抗体 - 金コロイド標識抗ウサギ I g G 抗体結合体を作る。この後、洗浄後、熱レンズ顕微鏡 ( Analytical Chemistry 2001, 73, 2112 2116 ( 非特許文献 2 ) ) で、結合した金コロイ

40

50

ド量から結合した抗原である、癌胎児性抗原の濃度を定量するというものである。彼らは、従来の酵素免疫測定法 (ELISA) で、45 時間要していた反応をマイクロ流体システムを用いることにより 30 分にまで短縮することに成功しており、測定感度も ELISA で 1 ng / mL であったのに対して、マイクロ流体システムを用いることにより、0.03 ng / mL の検出感度に達している。さらに、用いるサンプル容量も 5  $\mu$ L と微量になっている。

#### 【0009】

しかしながら、Satoら分析に用いるマイクロチップ作製の工程が非常に複雑で、コストダウンが図れないのが最大の欠点である。例えば、該マイクロチップの作成の具体的な工程には、次のものが挙げられる。始めに、パイレックス (登録商標: コーニング社製) 製のガラスの洗浄を行う。通常、数種類の薬液を用いて洗浄を行う。乾燥後、このガラスにフォトレジストを塗布する。この後、露光装置にマスク、ガラスをセットして露光する。この後、現像液に浸して現像を行い、所定時間経過後にリンス液中で洗浄する。洗浄後、フッ化水素でエッチングを行い、この時点で流路を作製する。この後、フォトレジストを除去して、流路が彫られた側は完成となる。流体を流せるようにするには、この流路が彫られたガラスに、流路入口及び流路出口をドリルなどで穴開け加工した対となるガラスを密着させ、650 5 時間程度融着させる。こうして、流体を流すことが可能なマイクロチップが完成する。しかし、抗原などの生体高分子の結合を分析するためにはこれだけでは不十分で、抗体を結合させたポリスチレンビーズを、流路入口から流し込み、反応領域となる箇所に堰き止め、これで始めて生体高分子の分析に用いることが可能になる。以上のように、ガラスを用いたチップは工程が非常に多く、大量生産に必ずしも向いておらず、コストダウンを図ることができない。

#### 【0010】

このように、Satoらの分析に用いるマイクロチップ作製においては、マイクロチャンネルを形成するための2枚の基板の融着に650 程度の加熱を必要とする。このため、抗体等のタンパク質に対して加熱を避けるために、2枚の基板の融着することによりマイクロチャンネルを形成した後に、抗原抗体反応により試料中の免疫物質を捕獲させるための固相としてガラスビーズ又は高分子ビーズに結合させた抗体を、該マイクロチャンネル内に導入して、マイクロチャンネル内部に堰き止めた状態として使用しなければならない。

#### 【0011】

素材にプラスチックを用いたマイクロチップ製造技術も報告されている (Analytical Chemistry; 69(14); 2626-2630 (非特許文献3))。非特許文献3に示されているマイクロチップはDNAを電気泳動で分離するための装置にすぎず、生物学的物質を特異的結合により捕獲し分析するものではない。非特許文献3に示されているマイクロチップの作製方法は、射出成型により微細流路に対応する鋳型に融解したプラスチックを流し込み、微細流路に対応する部材を成型し、これとは別に準備した部材を何らかの方法で接着することにより、微細流路を有するマイクロチップを作製するというものである。この方法は、ガラスチップなどに比べると、工程が少なく大量生産、コストの面で非常に有利である。しかしながら、この方法でSatoらの行った様な様式で生物学的物質を特異的結合により捕獲し分析するには、ダムのような形状を鋳型となる側に設けておき、上述のような方法でマイクロチップを作製し、抗体結合ビーズを導入することにより実施するしかない。そのため、マイクロチップ自体は安価にできるにもかかわらず、その後の工程のために、必ずしもコスト的にメリットがあるとは考えられない。

#### 【0012】

WO 01 / 034302 (特許文献5) に、マイクロ流体デバイスを用いた生体材料とのハイブリダイゼーションのためのバイオチャンネルアッセイが報告されている。該文献にはマイクロチャンネル内に形成されたマイクロ構造物、または充填されたビーズ上に、特異的結合対メンバー、例えば、DNA、RNA、ポリペプチド、核酸および抗体/抗原を固定した状態で、マイクロチャンネル内に試料を流して、結合対を生成し検出することが示

されているが、生物学的物質が失活しないように、分析装置を製造することに関して具体的な提案はない。

【 0 0 1 3 】

W O 0 2 / 0 6 5 1 3 8 ( 特 許 文 献 6 ) に、生体高分子と試料との結合の検出をマイクロチップ上で行ったり、結合した化合物を回収しその同定を行うことが示されている。

【 特 許 文 献 1 】 特 開 昭 6 3 - 5 0 3 5 1 8 号 公 報

【 特 許 文 献 2 】 米 国 特 許 6 , 4 4 8 , 0 0 1

【 特 許 文 献 3 】 特 開 昭 6 3 - 2 7 3 0 4 2 号 公 報

【 特 許 文 献 4 】 特 開 昭 2 0 0 1 - 4 6 2 8 号 公 報

【 特 許 文 献 5 】 W O 0 1 / 0 3 4 3 0 2

10

【 特 許 文 献 6 】 W O 0 2 / 0 6 5 1 3 8

【 特 許 文 献 7 】 特 開 平 1 1 - 1 8 7 9 0 0 号 公 報

【 特 許 文 献 8 】 米 国 特 許 5 , 4 4 5 , 9 3 4

【 特 許 文 献 9 】 米 国 特 許 5 , 8 0 7 , 5 2 2

【 特 許 文 献 1 0 】 特 開 2 0 0 0 - 3 5 6 6 1 1 号 公 報

【 特 許 文 献 1 1 】 特 表 平 9 - 5 0 3 0 6 0 号 公 報 ( W O 9 5 / 0 8 7 7 4 )

【 非 特 許 文 献 1 】 Analytical Chemistry 2001, 73, 1213 1218

【 非 特 許 文 献 2 】 Analytical Chemistry 2001, 73, 2112 2116

【 非 特 許 文 献 3 】 Analytical Chemistry;69(14);2626 2630

【 非 特 許 文 献 4 】 FASEB J. 2000 Jun;14(9):1041 60.

20

【 非 特 許 文 献 5 】 J.Biomol Struct Dyn. 1999 Oct;17(2):175 91

【 発 明 の 開 示 】

【 発 明 が 解 決 し よ う と す る 課 題 】

【 0 0 1 4 】

抗原、抗体の免疫学的物質等の相互に特異的結合性を有する生物学的物質の何れか一方を、マイクロチップ内のチャンネルと呼ばれる流路内に固定化するのに、流路を形成するための2枚の部材の流路となる箇所にて、測定すべき生物学的物質の何れか一方を固定化して、次いで2枚の部材を熱融着や接着剤により接合する方法が用いられる。この接合の際に必要なとされる熱や、或いは接着剤の影響により、生物学的物質の特異的結合性の失活が引き起こされるといった問題があった。マイクロチップのような極めて微量な生物学的物質を正確な量で固定化し、極めて微量な検体に含まれていると疑われる測定すべき生物学的物質を精度よく分析するための分析装置を構築するには、接合時の熱や、接着剤に含まれる揮発性有機化合物の影響は無視できない。

30

【 0 0 1 5 】

そこで、分析装置の製造過程に熱の負荷や、接着剤に含まれている有機化合物等の影響が存在しても、失活等の影響が無く、しかもマイクロチャンネルの流路となる部分に免疫物質等を容易に固定化可能な分析装置の出現が望まれる。

【 0 0 1 6 】

従来のマイクロチャンネルを形成した生物学的物質の分析装置は、測定すべき特定の生物学的物質に特化したものであり、他の生物学的物質の分析に容易に転用できず、汎用性がないので、製造コストにおいて不利であった。

40

【 0 0 1 7 】

本発明はこれらの課題を解決するためになされるものである。

【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

【 0 0 1 8 】

本発明の生物学的物質の分析に使用される分析装置は、極微量の液体試料の分析に適したいわゆるマイクロ流体システムに属するものである。本発明の分析キットに用いられる分析装置は、2枚の部材の何れかに流路幅5mm以下の溝を形成し、2枚の部材を接合して、幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の流路を形成している。これら2枚の部材を接合する前に、流路となる箇所の一部に核酸を結合させておき、その後、接合

50

した後に、該核酸に相補的結合性を有する核酸と、測定されるべき生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドを結合させてなる結合体を含む試薬を分析装置の流路に導入して、該リガンドを分析装置内に固定化させているので、該リガンドは、分析装置の製造における2枚の部材の接合の際の熱融着による熱や接着剤からの有機溶剤の影響を受けることがなく、生物学的物質を捕獲する機能が保たれる。

【0019】

本発明の分析方法の一番目の基本的な発明は、液体試料と分析試薬を混合したものを分析装置に導入する方法であり、次のi) - iv)の要件を含む分析方法である。

【0020】

i) 幅 $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置を用意すること；

10

ii) 該第1核酸(N1)に少なくとも相補的な塩基配列を有する第2核酸(N2)に、測定すべき生物学的物質に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)を結合させてなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aを用意すること；

iii) 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料、及び試薬Aを予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、前記分析装置の流路に導入し、複合体を流路内に固定化させること；

20

iv) 固定化された複合体を測定すること。

【0021】

本明細書において「少なくとも相補的」とは、核酸の相補鎖の組合せが完全に一致した場合に一番強力な結合が期待できるが、完全でない場合でも結合性を期待できることを意味する。

【0022】

本発明の分析方法の二番目の基本的な発明は、液体試料と分析試薬を混合せずに別々に分析装置に導入する方法であり、次のi) - iii)の要件を含む分析方法である。

【0023】

次のi) - iv)の要件を含む分析方法である。

30

【0024】

i) 幅 $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置を用意すること；

ii) 該第1核酸(N1)に少なくとも相補的な塩基配列を有する第2核酸(N2)に、測定すべき生物学的物質に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)を結合させてなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aを用意すること；

iii) 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料、及び試薬Aを予め混合せずに別々に該分析装置の流路に導入し、複合体を流路内に固定化させること；

40

iv) 固定化された複合体を測定すること。

【0025】

本発明の分析方法は、複数種類の分析されるべき生物学的物質の分析方法にも適用できる。本発明の分析方法の三番目の基本的な発明は、液体試料と分析試薬を混合したものを分析装置に導入する方法であり、次のi) - iv)の要件を含む分析方法である。

【0026】

i) 幅 $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と

50

第2部材の接合前に、任意の複数種類の塩基配列の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置を用意すること;

ii) 該複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) に、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に応じて特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) を結合させてなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aを用意すること;

iii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、及び試薬Aを予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、前記分析装置の流路に導入し、複合体を流路内に固定化させること;

iv) 固定化された複合体を測定すること。

10

#### 【0027】

本発明の分析方法の四番目の基本的な発明は、液体試料と分析試薬を混合せずに別々に該分析装置の流路に導入する方法であり、次のi) - iv) の要件を含む分析方法である。

i) 幅  $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ  $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の複数種類の塩基配列の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置を用意すること;

20

ii) 該複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) に、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に応じて特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) を結合させてなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aを用意すること;

iii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、及び試薬Aを前記分析装置の流路に別々に導入し、複合体を流路内に固定化させること;

iv) 固定化された複合体を測定すること。

30

#### 【0028】

上記の各分析方法において、試薬と液体試料を分析装置に導入することにより、分析装置の流路内に複合体として固定化させ、また、形成された複合体に標識物を結合させ、該標識物を測定することにより、生物学的物質を測定することができる。

#### 【0029】

本発明の分析方法は、サンドイッチ測定方法だけではなく、競合法を原理とする種々の低分子化合物から高分子化合物の測定にも適用できる。

#### 【0030】

本発明の分析方法における分析対象物は、生物学的物質であり、高分子としては、抗原、抗体、糖鎖、糖タンパク質、レクチン、受容体、DNA、RNAであり、その他、生体中の物質と特異的に結合することができる物質であり、その物質の分子量に依存しないものが挙げられる。これらの分析対象物を分析するための試料には、血液、血漿、血清、尿、唾液、その他体液や、DNA、RNA、染色体や、DNA、RNAを増幅させたもの、抗原、抗体、糖鎖、受容体を含む物体が試料となりうる。

40

#### 【0031】

##### 分析装置

図1は本発明に用いられる分析装置の概略を示した平面図であり、図2はその断面図の1例である。1は分析装置であり、第1部材5と第2部材6が接合されて構成されている。第1部材5には、幅  $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、好ましくは  $5\mu\text{m} - 2\text{mm}$ 、最も好ましくは  $10\mu\text{m} - 500\mu\text{m}$ 、深さ  $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$ 、好ましくは  $5\mu\text{m} - 500\mu\text{m}$ 、最も好ましくは  $10\mu\text{m} - 100\mu\text{m}$  の断面の溝が形成されており、第2部材6と接合されたときに

50

、流路 2 を形成する。流路の一方の端には流路入口 3 と他方の端には流路出口 4 が設けられている。この流路入口、流路出口の間に試薬、試料を導入するための導入口を 1 個以上設けることや、目的に応じてこうした流路につながる別の流路を設けることも可能である。流路 2 内には、生物学的物質を捕獲し、分析するための捕獲ゾーン 7 が設けられている。

#### 【 0 0 3 2 】

図 3 は、流路入口が一つであり、流路の途中で複数の流路に分岐し、流路出口が複数ある場合の分析装置の態様を示す。図 3 の分析装置 1 A では、一つの流路 2 から分岐した複数の各流路内に、生物学的物質を捕獲し、分析するための捕獲ゾーン 7 - 1、7 - 2、7 - 3、7 - 4、7 - 5、7 - 6 が設けられ、流路において一つの流路入口 3 と複数の流路出口 4 - 1、4 - 2、4 - 3、4 - 4、4 - 5、4 - 6 が設けられている。

10

#### 【 0 0 3 3 】

図 4 は、流路入口が複数であり、各流路の途中で 1 本の流路に収束し、流路出口が一つの場合の分析装置の態様を示す。図 4 の分析装置 1 B では、複数の各流路 2 内に、生物学的物質を捕獲し、分析するための捕獲ゾーン 7 - 1、7 - 2、7 - 3、7 - 4、7 - 5、7 - 6 が設けられ、流路において複数の流路入口 3 - 1、3 - 2、3 - 3、3 - 4、3 - 5、3 - 6 と一つの流路出口 4 が設けられている。

#### 【 0 0 3 4 】

図 5 は、流路入口が一つであり、流路の途中で複数の流路に分岐し、さらに各流路の途中で 1 本の流路に収束し、流路出口が一つの場合の分析装置の態様を示す。図 5 の分析装置 1 C では、一つの流路 2 から分岐した複数の各流路内に、生物学的物質を捕獲し、分析するための捕獲ゾーン 7 - 1、7 - 2、7 - 3、7 - 4、7 - 5、7 - 6 が設けられ、分岐する手前の流路において一つの流路入口 3 が設けられ、収束した後の流路において一つの流路出口 4 が設けられている。

20

#### 【 0 0 3 5 】

図 6 は、1 種類以上の生物学的物質を分析するための分析装置であり、流路入口が一つであり流路出口が一つである場合の態様を示す。試料中に含まれる生物学的物質を捕獲するための捕獲ゾーンにおいて、該生物学的物質を含む複合体を捕獲するための第 1 核酸 ( $N1g : g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化されている。

#### 【 0 0 3 6 】

前記に説明した流路を複数有する図 3、図 4、図 5 のタイプの分析装置では、各流路内に捕獲ゾーンを設け、各捕獲ゾーン毎に種類の異なる生物学的物質を含む複合体を捕獲させるための第 1 核酸 ( $N1g : g$  は整数) を固定化してもよく、また、各捕獲ゾーンにおいて第 1 核酸 ( $N1g : g$  は整数) を種類毎に各々独立して固定化してもよい。又、各捕獲ゾーンにおいて、複数種類の第 1 核酸 ( $N1g : g$ ) を混在させて固定化することもできる。勿論、複数の捕獲ゾーンにおいて全て同一種類の第 1 核酸 ( $N1$ ) を固定することもできる。これらの流路入口、流路出口の途中で試薬、試料を導入するための導入口をさらに 1 個以上設けることや、目的に応じてこうした流路につながる別の流路を設けることも可能である。

30

#### 【 0 0 3 7 】

本発明における分析装置 1 内に形成される流路 2 の断面は、正方形、長方形、多角形、半円形、円弧形、U 字形、V 字形の何れであってもよい。

40

#### 【 0 0 3 8 】

第 1 部材 5 及び第 2 部材 6 の材質としては、ポリジメチルシロキサン ( P D M S : 略語、Anal.Chem.,Vol.69,pp.3451 3457,1997 )、アクリル系樹脂 (Anal.Chem.,Vol.69,pp.26 26,1997)、ポリメチルメタクリレート ( P M M A : 略語、Anal.Chem.,Vol.69,pp.4783,19 97)、ガラス、環状オレフィンコポリマー、あるいは、これらの部材の表面にダイヤモンドもしくはダイヤモンドライクカーボン (特開 2 0 0 2 - 3 6 5 2 9 3 号公報)、cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)、Surmodics、Reacti Bind (Analytical Biochemistry, 317 (2003) 76 84 )、ポリ-L-リジン、カルボジイミド、アミノ基、アルデヒド基

50

、マレイミド基、デキストランなどで表面が修飾された物質等が用いられる。

#### 【0039】

第1部材及び第2部材は、例えば、次の方法により製造することができる。まず鋳型をシリコンウエハーのエッチングにより作成しておく。これに融解したポリマーを流し込んで構造を転写し、ポリマーを固化させる。転写により、幅 $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、好ましくは $5\mu\text{m} - 2\text{mm}$ 、最も好ましくは $10\mu\text{m} - 500\mu\text{m}$ 、深さ $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$ 、好ましくは $5\mu\text{m} - 500\mu\text{m}$ 、最も好ましくは $10\mu - 100\mu\text{m}$ の断面の溝の流路が形成され、分析有効長が数 $\text{mm} \sim$ 数 $10\text{cm}$ の分析装置の部材が形成される。PDMSを素材とすればガラスやPDMSとの自然吸着により簡単に流路のシーリングが行える。プラスチックを用いたマイクロチャンネルは量産化が容易なので、コストの点で有利である。また

10

#### 【0040】

##### 分析キット

前記した課題を解決するための本発明の分析キットには、次の一番目～十番目の分析キットが挙げられる。

#### 【0041】

本発明の一番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬Aと試薬Bと分析装置を組み合わせてなる分析キットであって、試薬Aと試薬Bが同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キットである。すなわち、本発明の一番目の分析キットに用いられる分析装置は、幅 $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置である。また、本発明の一番目の分析キットに用いられる試薬Aは、該分析装置の捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的な配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬である。また、本発明の一番目の分析キットに用いられる試薬Bは、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)と標識物(M)が結合されてなる結合体(L2-M)を含む試薬である。

20

30

#### 【0042】

本明細書に記載の分析キットにおいて、「試薬Aと試薬Bが同一の系に含まれている」とは、試薬Aと試薬Bが均一に混ざり合った状態のことを意味し、「試薬Aと試薬Bが独立して存在する」とは、試薬Aと試薬Bが別体となって、分離した状態であることを意味する。

#### 【0043】

図7は、本発明の一番目の分析キットの概念図を示し、第1リガンド(L1)と第2リガンド(L2)が抗体である場合の、分析装置、第1試薬、第2試薬が独立して存在する例を示す。枠で囲った意味は他とは独立して存在していること、すなわち、別体となって、分離した状態で使用可能なことを意味する。図7における11は、分析装置の流路内の捕獲ゾーンのみを示しており、固相(S)上に第1核酸(N1)が固定されている状態の図である。図7における12は、第2核酸(N2)に第1リガンド(L1)としての抗体が結合されてなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aを表す図である。図7における13は、第2リガンド(L2)としての抗体に標識(M)が結合してなる結合体(L2-M)を含む試薬Bを表す図である。

40

#### 【0044】

標識(M)と第2リガンド(L2)の結合様式は、本発明の一番目の分析キットに限られず、本発明の全ての分析キットに適用される。図7では試薬A12と試薬B13は異な

50

る枠の中に表され、即ち、互いに独立して存在することが示されているが、図7とは異なる形態として、試薬A12と試薬B13が同一の枠に存在し、均一に混合された形態、即ち、同一の系でもよい。

【0045】

本発明の二番目の分析キットは、前記第一番目の分析キットにおいて、第2リガンド(L2:抗体)に標識(M)が結合してなる結合体(L2-M)を含む試薬Bに代えて、次の試薬B'と試薬Cを使用するものである。即ち、本発明の二番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬A、試薬B'、試薬C及び分析装置を組み合わせる分析キットであって、試薬A、試薬B'及び試薬Cの内2種以上は同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キットである。

10

【0046】

i) 幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置;

ii) 該分析装置の捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的な配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬A;

iii) 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)を含む試薬B';及び、

20

iv) 該第2リガンド(L2)に特異的結合性を有する第3リガンド(L3)と、標識物(M)とからなる結合体(L3-M)を含む試薬C。

【0047】

本発明の三番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、以下の分析装置と試薬Aからなり、標識物を含まないキットである。本発明の三番目の分析キットは、標識物を予め導入した生物学的物質を分析対象物としているため、キットの構成要素として標識物を含ませる必要がない。

【0048】

i) 幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置;及び、

30

ii) 該分析装置の捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的な配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬A。

本発明の四番目の分析キットは、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合のキットである。即ち、本発明の四番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬Bと分析装置を組み合わせる分析キットである。

40

【0049】

i) 幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質(O)に対し特異的結合性を有する第1リガンド(L1)と、前記固定化第1核酸(N1)に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)とからなる結合体(N2-L1)を、第1核酸(N1)と第2核酸(N2)との特異的結合により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置;及び、

50

ii) 測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 2 リガンド (L 2) と標識物 (M) が結合されてなる結合体 (L 2 - M) を含む試薬 B。

【0050】

図 8 は、前記本発明の四番目の分析キットの概念図であって、特に、第 1 リガンド (L 1) と第 2 リガンド (L 2) が抗体である場合の分析キットを示す。図 8 において四角い枠で囲った意味は、分析装置、試薬が独立して存在していることを示す。図 8 における 14 は、分析装置の流路内の捕獲ゾーンのみを示した分析装置であり、固相 (S) 上に第 1 核酸 (N 1) が固定され、第 2 核酸 (N 2) と第 1 リガンド (L 1) からなる結合体 (N 2 - L 1) が相補的核酸塩基の特異的結合により該第 1 核酸 (N 1) に結合された状態を示す。図 8 における 15 は、第 2 リガンド (L 2 : 抗体) に標識 (M) が結合してなる結合体 (L 2 - M) を含む試薬 B を表す。

10

【0051】

本発明の五番目の分析キットは、前記四番目の分析キットにおいて、第 2 リガンド (L 2) に標識 (M) が結合してなる結合体 (L 2 - M) を含む試薬 B に代えて、次の試薬 B' と試薬 C を使用するものである。即ち、本発明の五番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬 A、試薬 B'、試薬 C 及び分析装置を組み合わせる分析キットであって、試薬 A、試薬 B' 及び試薬 C の内 2 種以上が同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キットである。

【0052】

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び/又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の第 1 核酸 (N 1) が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質 (O) に対し特異的結合性を有する第 1 リガンド (L 1) と、前記固定化第 1 核酸 (N 1) に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 (N 2) とからなる結合体 (N 2 - L 1) を、第 1 核酸 (N 1) と第 2 核酸 (N 2) との特異的結合により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置；及び、

20

ii) 測定されるべき生物学的物質 (O) に特異的結合性を有する第 2 リガンド (L 2) を含む試薬 B'。

iii) 該第 2 リガンド (L 2) に特異的結合性を有する第 3 リガンド (L 3) と、標識物 (M) とからなる結合体 (L 3 - M) を含む試薬 C。

30

【0053】

本発明の六番目の分析キットは、前記一番目の分析キットの構成を基にして、1 種類以上の生物学的物質の分析ができるように改造したものである。即ち、本発明の六番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬 A、試薬 B 及び分析装置を組み合わせる分析キットであって、試薬 A と試薬 B は同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キットである。

【0054】

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び/又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第 1 核酸 (N 1<sub>g</sub> : g は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置；

40

ii) 該捕獲ゾーンに固定化された複数種類の第 1 核酸 (N 1<sub>g</sub> : g は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 (N 2<sub>h</sub> : h は整数) と、測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (O<sub>k</sub> : k は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド (L 1<sub>i</sub> : i は整数) とからなる結合体 (N 2<sub>h</sub> - L 1<sub>i</sub> : h と i は独立した整数) を含む試薬 A；及び、

iii) 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (O<sub>k</sub> : k は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド (L 2<sub>j</sub> : j は整数) と、1 種類以上

50

の標識物 ( $MI : I$  は整数) が結合されてなる結合体 ( $L 2 j - MI : j$  と  $I$  は独立した整数) を含む試薬 B。

【0055】

本明細書において、複数種類の第1核酸 ( $N 1 g : g$  は整数) とは、 $N 1 1$ 、 $N 1 2$ 、 $N 1 g$  ( $g$  は整数) からなる複数種類の第1核酸を意味する。同様に、複数種類の第2核酸 ( $N 2 h : h$  は整数) も  $N 2 1$ 、 $N 2 2$ 、 $N 2 h$  ( $h$  は整数) からなる複数種類の第2核酸を意味する。複数種類の第1リガンド ( $L 1 i : i$  は整数) に付した  $i$ 、1種類以上の第2リガンド ( $L 2 j : j$  は整数) に付した  $j$ 、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) に付した  $k$ 、1種類以上の標識物 ( $MI : I$  は整数) も、各々の物質の種類が1、2、等の1種類以上又は複数種類存在することを意味する。

10

【0056】

本発明の七番目の分析キットは、前記二番目の分析キットの構成を基にして、1種類以上の生物学的物質の分析ができるように改造したものであり、かつ、前記六番目の分析キットにおいて、第2リガンド-標識物(試薬B)に代えて、第2リガンド(試薬B')、第3リガンド-標識物(試薬C)とした分析キットである。即ち、本発明の七番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬A、試薬B'、試薬C及び分析装置を組み合わせてなる分析キットであって、試薬A、試薬B'及び試薬Cの内2種以上は同一の系に含まれていても、或いは独立して存在してもよい分析キットである。

【0057】

i) 幅  $1 \mu m - 5 mm$ 、深さ  $1 \mu m - 750 \mu m$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N 1 g : g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置;

20

ii) 該捕獲ゾーンに固定化された複数種類の第1核酸 ( $N 1 g : g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N 2 h : h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L 1 i : i$  は整数) とからなる結合体 ( $N 2 h - L 1 i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬 A;

iii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L 2 j : j$  は整数) を含む試薬 B' ; 及び、

30

iv) 該1種類以上の第2リガンド ( $L 2 j : j$  は整数) に種類毎に特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド ( $L 3 m : m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI : I$  は整数) とからなる結合体 ( $L 3 m - MI : m$  と  $I$  は独立した整数) を含む試薬 C。

【0058】

本発明の八番目の分析キットは、前記三番目の分析キットの構成を基にして、1種類以上の生物学的物質の分析ができるように改造したものである。本発明の八番目の分析キットは、標識物を導入した複数種類の分析対象物のための分析キットであり、標識物を含まない。即ち、本発明の八番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬Aと分析装置とからなる分析キットである。

40

【0059】

i) 幅  $1 \mu m - 5 mm$ 、深さ  $1 \mu m - 750 \mu m$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N 1 g : g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置;

ii) 該分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N 1 g : g$  は整数) の塩基配列に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N 2 h : h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整

50

数)の種類毎に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド( $L1i$  :  $i$  は整数)とからなる結合体( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数)を含む試薬A。

【0060】

本発明の九番目の分析キットは、前記四番目の分析キットの構成を基にして、1種類以上の生物学的物質の分析ができるように改造したものである。本発明の九番目の分析キットは、試薬の一部としての、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが分析装置内に固定化されている場合のキットであり、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬Bと分析装置を組み合わせてなる分析キットである。

【0061】

i) 幅 $1\mu m - 5mm$ 、深さ $1\mu m - 750\mu m$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸( $N1g$  :  $g$  は整数)が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質( $Ok$  :  $k$  は整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド( $L1i$  :  $i$  は整数)と、前記複数種類の固定化第1核酸( $N1g$  :  $g$  は整数)の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸( $N2h$  :  $h$  は整数)とからなる結合体( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数)を、第1核酸と第2核酸の特異的結合により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置;及び、

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質の種類毎に特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド( $L2j$  :  $j$  は整数)と1種類以上の標識物( $MI$  :  $I$  は整数)が結合されてなる結合体( $L2j - MI$  :  $j$  と  $I$  は独立した整数)を含む試薬B。

【0062】

本発明の十番目の分析キットは、前記五番目の分析キットの構成を基にして、1種類以上の生物学的物質の分析ができるように改造したものである。本発明の十番目の分析キットは、試薬の一部としての、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが分析装置内に固定化されている場合のキットであり、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬B'と試薬Cと分析装置を組み合わせてなる分析キットである。

【0063】

i) 幅 $1\mu m - 5mm$ 、深さ $1\mu m - 750\mu m$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸( $N1g$  :  $g$  は整数)が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質( $Ok$  :  $k$  は整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド( $L1i$  :  $i$  は整数)と、前記複数種類の固定化第1核酸( $N1g$  :  $g$  は整数)の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸( $N2h$  :  $h$  は整数)とからなる結合体( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数)を、第1核酸と第2核酸の特異的結合性により形成して捕獲ゾーンに各々独立して固定化してなる分析装置;及び、

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質( $Ok$  :  $k$  は整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド( $L2j$  :  $j$  は整数)を含む試薬B' ;

iii) 該1種類以上の第2リガンド( $L2j$  :  $j$  は整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド( $L3m$  :  $m$  は整数)と、1種類以上の標識物( $MI$  :  $I$  は整数)とからなる結合体( $L3m - MI$  :  $m$  と  $I$  は独立した整数)を含む試薬C。

【0064】

本発明の分析キットに含まれる第1リガンド( $L1$ )、場合によって含まれる第2リガンド( $L2$ )、及び第3リガンド( $L3m$  :  $m$  は整数)には、免疫学的物質、受容体、受

容体に結合する物質、糖類、糖タンパク質、糖脂質、レクチン及び核酸から選ばれたものが挙げられる。本発明の分析キットを構成するために使用することができる核酸には、5塩基以上の核酸塩基からなるDNA、RNA、PNA (FASEB J. 2000 Jun;14(9):1041-60. (非特許文献4))、あるいはLNA (Locked Nucleic Acidの略語: J Biomol Struct Dyn. 1999 Oct;17(2):175-91 (非特許文献5))が挙げられる。

#### 【0065】

本発明の分析キットに含まれる第1リガンド(L1)及び第2リガンド(L2)は、反応性が同一であっても、異なってもよい。例えば、第1リガンド(L1)及び第2リガンド(L2)が抗体であって、測定されるべき生物学的物質が抗原である場合には、各々第1リガンド(L1)及び第2リガンド(L2)は、同一の生物学的物質に存在する異なるエピトープに反応性を有するものであってもよいし、同一のエピトープに反応性を有するものであってもよい。

10

#### 【0066】

分析対象物が核酸である場合にも、前記各分析キットと同様な分析キットを構成することができる。具体的には、前記各分析キットにおいて、第1リガンド(L1)として、測定すべき核酸の少なくとも相補的塩基配列を含む第1プローブ核酸(PrN1)を用い、且つ、第2リガンド(L2)として、測定すべき核酸において、第1プローブ核酸(PrN1)の結合部位とは異なる部位に結合することができる第2プローブ核酸(PrN2)を用いることにより、前記各分析キットと同様な構成の核酸を分析する分析キットを作製することができる。

20

#### 【0067】

本発明の分析キットに使用できる標識物(M)には、蛍光物質、金属コロイド、酵素、核酸、金属、糖、レクチン、ビオチン、ビオチンに結合性を有する物質(ストレプトアビジン、アビジン、ニュートリアビジン)が挙げられる。1種類以上の生物学的物質の分析のための本発明の分析キットにおける第2リガンド又は第3リガンドに結合される1種類以上の標識物(MI: Iは整数)は、各々同一の物質であってもよく、異なる物質であってもよい。

#### 【0068】

標識を導入された分析対象物としての生物学的物質を分析する装置として、試薬が分析装置の流路内の捕獲ゾーンに固定化されている分析装置であれば、該試薬を別体として用いることなく、分析装置を構築することができる。このような生物学的物質の分析装置は、幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質(O)に対し特異的結合性を有する第1リガンド(L1)と、前記固定化第1核酸(N1)に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)とからなる結合体(N2-L1)を、第1核酸(N1)と第2核酸(N2)との特異的結合性により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置である。該分析装置では、標識が導入された生物学的物質を分析対象物としているので、分析するのに標識物を含む試薬を用いる必要がなく、後記に詳述する分析方法で適用できる。

30

40

#### 【0069】

また、標識を導入された分析対象物としての1種類以上の生物学的物質を分析する装置として、次の分析装置を構成することができる。即ち、幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸(N1g: gは整数)が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質(Ok: kは整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド(L1i: iは整数)と、前記複数種類

50

の固定化第1核酸(N1g : gは整数)の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸(N2h : hは整数)とからなる結合体(L1i - N2h : iとhは独立した整数)を、第1核酸(N1g : gは整数)と第2核酸(N2h : hは整数)との特異的結合性により結合して捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化してなる分析装置である。

#### 【0070】

上記の本発明の各分析キットに用いられる分析装置、あるいは本発明の各分析装置において、第1部材、或いは第2部材の流路となる箇所の捕獲ゾーンとなる部位に、DNAを結合させる方法としては、サーマルインクジェットヘッドにより核酸を含む液体を液滴として、固相に付着させて、核酸を固定化する方法(特開平11-187900(特許文献7))、シリコン等の支持体にフォトリソグラフ法で複数のオリゴヌクレオチドを並べて形成するアフィメトリクス方式(米国特許5,445,934(特許文献8)等)、またはスライドガラスに多種の核酸をスポッティングによって並べて固定化するスタンフォード式(米国特許5,807,522(特許文献9))などが本発明における分析装置の製造方法に適用可能である。

10

#### 【0071】

上記の本発明に用いられる各分析装置では、流路内に固定化された第1核酸(N1)に、さらに該第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列の第2核酸(N2)と第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む溶液を流路内に送液して、結合体(N2-L1)を該第1核酸(N1)に特異的に結合させて固定化させているので、結合体(N2-L1)の固定化の作業は、第1部材と第2部材を接合した後に行うことができる。即ち、本発明では結合体(N2-L1)の固定化の作業は、第1部材と第2部材を接合の後に行われるので、第1リガンド(L1)が抗体、タンパク質等の熱や、接着剤により失活しやすい物質である場合、第1部材と第2部材の接合時の熱や接着剤の影響が第1リガンド(L1)に及ばないという利点がある。

20

#### 【0072】

また、本発明に用いられる分析装置では、固定化された第1核酸(N1)と、その後固定化を行う第2核酸(N2)と第1リガンド(L1)からなる結合体(N2-L1)は、別体として作製されているので、固定化された第1核酸(N1)を有する分析装置を作製しておけば、第1リガンドの種類を変えた種々の結合体(N2-L1i : iは整数)を作製し、目的とする生物学的物質の種類に応じて、特異的に結合できる結合体(N2-L11)、(N2-L12)、(N2-L1n)の内の一つを選択し、前記固定化した第1核酸(N1)に結合させて固定化できる。したがって、本発明に用いられる分析装置は、生物学的物質の種類に特化した専用の分析装置を製造するための個々の多段の製造プロセスを行うことなく、生物学的物質の種類に応じた、第2核酸と第1リガンドからなる種々の結合体(N2-L11)、(N2-L12)、(N2-L1i : iは整数)を用意しておけば、固定化された第1核酸(N1)を有する一種類の分析装置で無限の種類の生物学的物質に対応した分析や、或いは分析装置の調製が簡単なプロセスで行える。

30

#### 【0073】

##### 分析方法

本明細書において「分析」とは、分析対象物の存在の有無の確認、或いはその量を測定することを意味する。

40

#### 【0074】

本発明の4種類の基本的な分析方法は、前記した通りである。さらに具体的な本発明の分析方法の態様を以下に示す。

#### 【0075】

前記一番目の分析キット(即ち、試薬A、試薬B、分析装置を含む分析キット)を用いた本発明の一番目の分析方法は、試薬A、試料、試薬Bの2種以上を予め混合したものを分析装置に導入し、その後、残りの材料があればさらに導入する分析方法である。即ち、前記一番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次のi) - iv)の要件を

50

含む：

- i) 前記一番目の分析キットを用いること；
- ii) 次の a . b . 及び c . の材料の内、任意の 2 種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；
  - a . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) の存在が疑われる液体試料、
  - b . 捕獲ゾーンに固定化された第 1 核酸 ( N 1 ) の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 ( N 2 ) と、測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 1 リガンド ( L 1 ) とからなる結合体 ( N 2 - L 1 ) を含む試薬 A、
  - c . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 2 リガンド ( L 2 ) と、標識物 ( M ) が直接的に結合されてなる結合体 ( L 2 - M ) を含む試薬 B ；
- iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第 1 核酸 ( N 1 ) と、第 2 核酸 ( N 2 ) との特異的結合性、第 1 リガンド ( L 1 ) と生物学的物質 ( O ) との特異的結合性、及び第 2 リガンド ( L 2 ) と生物学的物質 ( O ) との特異的結合性により、固定化された結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - M ) を形成すること；
- iv) 該固定化結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - M ) に含まれる標識物 ( M ) を測定することによって、生物学的物質 ( O ) を測定すること。

【 0 0 7 6 】

前記一番目の分析キット ( 即ち、試薬 A、試薬 B、分析装置を含む分析キット ) を用いた本発明の二番目の分析方法は、試薬 A、試料、試薬 B を混合することなく別々に任意の順で分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記一番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次の i ) - iv) の要件を含む：

- i) 前記一番目の分析キットを用いること；
- ii) 次の a . b . 及び c . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；
  - a . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) の存在が疑われる液体試料、
  - b . 捕獲ゾーンに固定化された第 1 核酸 ( N 1 ) の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 ( N 2 ) と、測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 1 リガンド ( L 1 ) とからなる結合体 ( N 2 - L 1 ) を含む試薬 A、
  - c . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 2 リガンド ( L 2 ) と、標識物 ( M ) が直接的に結合されてなる結合体 ( L 2 - M ) を含む試薬 B ；
- iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第 1 核酸 ( N 1 ) と、第 2 核酸 ( N 2 ) との特異的結合性、第 1 リガンド ( L 1 ) と生物学的物質 ( O ) との特異的結合性、及び第 2 リガンド ( L 2 ) と生物学的物質 ( O ) との特異的結合性により、固定化された結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - M ) を形成すること；
- iv) 該固定化結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - M ) に含まれる標識物 ( M ) を測定することによって、生物学的物質 ( O ) を測定すること。

【 0 0 7 7 】

前記二番目の分析キット ( 即ち、試薬 A、試薬 B '、試薬 C、分析装置からなる分析キット ) を用いた本発明の一番目の分析方法は、液体試料、試薬 A、試薬 B '、試薬 C の 2 種以上を予め混合したものを分析装置に導入し、その後、残りの材料があればさらに導入する分析方法である。即ち、前記二番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次の i ) - iv) の要件を含む：

- i) 前記二番目の分析キットを用いること；
- ii) 次の a . b . c . 及び d . の材料の内 2 種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；
  - a . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) の存在が疑われる液体試料、
  - b . 捕獲ゾーンに固定化された第 1 核酸 ( N 1 ) の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第 2 核酸 ( N 2 ) と、測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合

性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬A、

c. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)を含む試薬B'、及び、

d. 該第2リガンド(L2)に特異的結合性を有する第3リガンド(L3)と、標識物(M)とからなる結合体(L3-M)を含む試薬C；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合性、第1リガンド(L1)と生物学的物質(O)との特異的結合性、第2リガンド(L2)と生物学的物質(O)との特異的結合性、及び第2リガンド(L2)と第3リガンド(L3)との特異的結合性により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-L2-L3-M)を形成すること；

iv) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-L2-L3-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

#### 【0078】

前記二番目の分析キット(即ち、試薬A、試薬B'、試薬C、分析装置からなる分析キット)を用いた本発明の二番目の分析方法は、液体試料、試薬A、試薬B'、試薬Cを別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記二番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次のi)-iv)の要件を含む：

i) 前記二番目の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. c. 及びd. の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬A、

c. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)を含む試薬B'、及び、

d. 該第2リガンド(L2)に特異的結合性を有する第3リガンド(L3)と、標識物(M)とからなる結合体(L3-M)を含む試薬C；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合性、第1リガンド(L1)と生物学的物質(O)との特異的結合性、第2リガンド(L2)と生物学的物質(O)との特異的結合性、及び第2リガンド(L2)と第3リガンド(L3)との特異的結合性により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-L2-L3-M)を形成すること；

iv) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-L2-L3-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

#### 【0079】

生物学的物質(O)が抗原である場合について、前記一番目の分析キットを用いた本発明の一番目、二番目の各分析方法、或いは前記二番目の分析キットを用いた本発明の一番目、二番目の各分析方法を適用したときの、適用後の捕獲ゾーンにおける状態を図9に示す。図9の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)に、結合体(N2-L1-O-L2-M)が捕獲されている。

#### 【0080】

また、測定されるべき生物学的物質(O)が核酸(ON)である場合について、前記一番目の分析キットを用いた本発明の一番目、二番目の各分析方法、或いは前記二番目の分析キットを用いた本発明の一番目、二番目の各分析方法を適用したときの、適用後の捕獲ゾーンにおける状態を図10に示す。図10は、図9におけるリガンドL1を、測定されるべき核酸(ON)に特異的に結合する第1プローブ核酸(PrN1)に置き換え、さらに図9におけるリガンドL2を、測定されるべき核酸(ON)のさらに別の部位へ特異的に結合する第2プローブ核酸(PrN2)に置き換えたものである。すなわち、固相(S)上に第1核酸(N1)が固定化されており、該第1核酸の塩基配列に対して少なくとも

10

20

30

40

50

相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき核酸(ON)に対して特異的結合性を有する第1プローブ核酸(PrN1)とを結合させてなる第1プローブ結合体(N2-PrN1)が、第1核酸(N1)と第2核酸(N2)との特異的結合性により結合されており、さらに測定されるべき核酸(ON)が、第1プローブ核酸(PrN1)と核酸(ON)との特異的結合性により前記プローブ核酸結合体(N2-PrN1)と結合されており、さらに、測定されるべき核酸(ON)に対して特異的結合性を有する第2プローブ核酸(PrN2)と標識物(M)とからなる第2プローブ結合体(PrN2-M)が、第2プローブ核酸(PrN2)と測定されるべき核酸(ON)との特異的結合性により結合されている。

#### 【0081】

前記三番目の分析キット(即ち、標識物を含まない分析キット)を用いた本発明の一番目の分析方法は、標識を導入した生物学的物質を分析対象物とした分析方法であり、液体試料と試薬Aを予め混合しておいたものを、分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記三番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次のi)-v)の要件を含む：

- i) 前記三番目の分析キットを用いること；
- ii) 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料から、予め標識物(M)を導入してなる標識物導入生物学的物質(O-M)を調製しておくこと、
- iii) 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aと、前記標識物導入生物学的物質(O-M)とを、予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら該分析キットの分析装置の流路に導入すること；
- iv) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-M)を形成すること；
- v) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

#### 【0082】

前記三番目の分析キット(即ち、標識物を含まない分析キット)を用いた本発明の二番目の分析方法は、標識を導入した生物学的物質を分析対象物とした分析方法であり、液体試料と試薬Aを混合することなく、別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記三番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次のi)-v)の要件を含む：

- i) 前記三番目の分析キットを用いること；
- ii) 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料から、予め標識物(M)を導入してなる標識物導入生物学的物質(O-M)を調製しておくこと、
- iii) 捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aと、前記標識物導入生物学的物質(O-M)とを、混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；
- iv) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第1核酸(N1)と、第2核酸(N2)との特異的結合により、固定化された結合体(N1-N2-L1-O-M)を形成すること；
- v) 該固定化結合体(N1-N2-L1-O-M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

#### 【0083】

本発明の標識物導入生物学的物質は、公知の種々の方法で作製することができる。例えば、試料からpoly(A)<sup>+</sup>RNAを精製し、oligo(dT)<sup>12-18</sup> primer

10

20

30

40

50

、dNTP、及び、蛍光色素であるCy5 或いはCy3で標識されたdUPT存在下で、T7RNAPolymeraseを反応させることによって、RNAを増幅させ、この増幅したRNAを生物学的物質とすることが可能である。あるいはこれを鋳型として逆転写酵素を反応させることによって、Cy5 或いはCy3で標識されたDNAを調製しこれを生物学的物質とすることも可能である。

【0084】

したがって、本発明の標識物導入生物学的物質は、測定されるべき生物学的物質(O)に標識物(M)を導入したものだけではなく、測定されるべき生物学的物質(O)を基にして合成された別の種類の生物学的物質(O)、例えば、RNAから逆転写酵素によって合成されたDNA、に標識物(M)を導入したものを含む。

10

【0085】

本発明の四番目の分析キット(即ち、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合のキット)を用いた一番目の分析方法であり、液体試料と試薬を予め混合したものを分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記四番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法是、次のi) - iv)の要件を含む：

i) 前記四番目の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料と、

20

b. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)と、標識物(M)が直接的に結合されてなる結合体(L2 - M)を含む試薬；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている結合体(N1 - N2 - L1)中の第1リガンド(L1)と生物学的物質(O)の特異的結合性、及び結合体(L2 - M)中の第2リガンド(L2)と生物学的物質(O)の特異的結合により、固定化された結合体(N1 - N2 - L1 - O - L2 - M)を形成すること；

iv) 該固定化結合体(N1 - N2 - L1 - O - L2 - M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

【0086】

前記四番目の分析キット(即ち、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合のキット)を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料と試薬を別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記四番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法是、次のi) - iv)の要件を含む：

30

i) 前記四番目の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. の材料を混合することなく別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき生物学的物質(O)の存在が疑われる液体試料と、

b. 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)と、標識物(M)が直接的に結合されてなる結合体(L2 - M)を含む試薬；

40

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている結合体(N1 - N2 - L1)中の第1リガンド(L1)と生物学的物質(O)の特異的結合性、及び結合体(L2 - M)中の第2リガンド(L2)と生物学的物質(O)の特異的結合により、固定化された結合体(N1 - N2 - L1 - O - L2 - M)を形成すること；

iv) 該固定化結合体(N1 - N2 - L1 - O - L2 - M)に含まれる標識物(M)を測定することによって、生物学的物質(O)を測定すること。

【0087】

前記五番目の分析キット(即ち、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合のキットであって、四番目のキットにおいて、第2リガンド - 標識物(試薬B)に代えて、第2リガンド(試薬B')、第3

50

リガンド - 標識物 ( 試薬 C ) とした分析キット) を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬 B'、試薬 C のうち 2 種以上を予め混合したものを分析装置に導入し、その後残りの種類の材料がある場合には、残りの材料を分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記五番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次の i) - iv) の要件を含む：

- i) 前記五番目の分析キットを用いること；
- ii) 次の a . b . 及び c . の材料の 2 種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること：
  - a . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) の存在が疑われる液体試料、
  - b . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 2 リガンド ( L 2 ) を含む試薬 B'、
  - c . 該第 2 リガンド ( L 2 ) に特異的結合性を有する第 3 リガンド ( L 3 ) と、標識物 ( M ) とからなる結合体 ( L 3 - M ) を含む試薬 C ；
- iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 ) 中の第 1 リガンド ( L 1 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、第 2 リガンド ( L 2 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、及び第 2 リガンドと第 3 リガンドとの特異的結合性により、固定化された結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - L 3 - M ) を形成すること；
- iv) 該固定化結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - L 3 - M ) に含まれる標識物 ( M ) を測定することによって、生物学的物質 ( O ) を測定すること。

10

20

#### 【 0 0 8 8 】

前記五番目の分析キット ( 即ち、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合のキットであって、四番目のキットにおいて、第 2 リガンド - 標識物 ( 試薬 B ) に代えて、第 2 リガンド ( 試薬 B' )、第 3 リガンド - 標識物 ( 試薬 C ) とした分析キット) を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬 B'、試薬 C のうち 2 種以上を混合することなく、別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記五番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次の i) - iv) の要件を含む：

- i) 前記五番目の分析キットを用いること；
- ii) 次の a . b . 及び c . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること：
  - a . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) の存在が疑われる液体試料、
  - b . 測定されるべき生物学的物質 ( O ) に特異的結合性を有する第 2 リガンド ( L 2 ) を含む試薬 B'、
  - c . 該第 2 リガンド ( L 2 ) に特異的結合性を有する第 3 リガンド ( L 3 ) と、標識物 ( M ) とからなる結合体 ( L 3 - M ) を含む試薬 C ；
- iii) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 ) 中の第 1 リガンド ( L 1 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、第 2 リガンド ( L 2 ) と生物学的物質 ( O ) の特異的結合性、及び第 2 リガンドと第 3 リガンドとの特異的結合性により、固定化された結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - L 3 - M ) を形成すること；
- iv) 該固定化結合体 ( N 1 - N 2 - L 1 - O - L 2 - L 3 - M ) に含まれる標識物 ( M ) を測定することによって、生物学的物質 ( O ) を測定すること。

30

40

#### 【 0 0 8 9 】

前記六番目の分析キット ( 即ち、1 種類以上の生物学的物質の分析のための、液体試料、試薬 A、試薬 B、分析装置からなるキット) を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬 A、試薬 B のうち 2 種以上を予め混合したものを分析装置に導入し、その後残りの種類の材料がある場合には、残りの材料を分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記六番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次の i) - iv) の要件を含む：

- i) 前記六番目の分析キットを用いること；

50

ii) 次の a . b . c . の材料の 2 種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること：

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第 1 核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、1 種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬 A の溶液；

c . 該生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の標識物 ( $Ml$  :  $l$  は整数) からなる結合体 ( $L2j - Ml$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 B ；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第 1 核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第 2 核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第 1 リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、及び 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - Ml$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) を形成すること；

iv) 前記工程で得られた複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - Ml$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $Ml$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) を測定すること。

#### 【0090】

前記六番目の分析キット (即ち、1 種類以上の生物学的物質の分析のための、液体試料、試薬 A、試薬 B、分析装置からなるキット) を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬 A、試薬 B を混合することなく、別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記六番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次の i) - iv) の要件を含む：

i) 前記六番目の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . c . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること：

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 捕獲ゾーンに固定化された複数種類の第 1 核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、1 種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬 A の溶液；

c . 該生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の標識物 ( $Ml$  :  $l$  は整数) からなる結合体 ( $L2j - Ml$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 B ；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化されている第 1 核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第 2 核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第 1 リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、及び 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - Ml$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) を形成すること；

10

20

30

40

50

iv) 前記工程で得られた複数種類の固定化結合体 (N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - MI : g、h、i、j、k、l は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 (MI : l は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) を測定すること。

【0091】

前記七番目の分析キット (即ち、1種類以上の生物学的物質の分析のための、液体試料、試薬A、試薬B'、試薬C、分析装置からなるキット) を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬A、試薬B'、試薬Cを予め混合したものを分析装置に導入し、その後残りの種類の材料がある場合には、残りの材料を分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記七番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次のi) - iv) の要件を含む：

10

i) 前記七番目の分析キットを用いること；

ii) 次のa、b、c、及びdの材料の内2種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；

a. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化された複数種類の第1核酸 (N1g : g は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 (N2h : h は整数) と、1種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド (L1i : i は整数) とからなる結合体 (N2h - L1i : h とi は独立した整数) を含む試薬Aの溶液；

20

c. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド (L2j : j は整数) を含む試薬B'、及び、

d. 該第2リガンド (L2j : j は整数) の種類ごとに対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド (L3m : m は整数) と、1種類以上の標識物 (MI : l は整数) とからなる結合体 (L3m - MI : m とl は独立した整数) を含む試薬C；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化されている複数種類の第1核酸 (N1g : g は整数) と、複数種類の第2核酸 (N2h : h は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド (L1i : i は整数) と1種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) との特異的結合性、1種類以上の第2リガンド (L2j : j は整数) と1種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) との特異的結合性、及び1種類以上の第2リガンド (L2j : j は整数) と1種類以上の第3リガンド (L3m : m は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 (N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g、h、i、j、k、l、m は独立した整数) を形成すること；

30

iv) 該固定化結合体 (N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g、h、i、j、k、l、m は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 (MI : l は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) を測定すること。

40

【0092】

前記七番目の分析キット (即ち、1種類以上の生物学的物質の分析のための、液体試料、試薬A、試薬B'、試薬C、分析装置からなるキット) を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬A、試薬B'、試薬Cを混合することなく、別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記七番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次のi) - iv) の要件を含む：

i) 前記七番目の分析キットを用いること；

ii) 次のa、b、c、及びdの材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 (Ok : k は整数) の存在が疑わ

50

れる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、1種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aの溶液;

c. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) を含む試薬B'、及び、

d. 該第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) の種類ごとに対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド ( $L3m$  :  $m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - MI$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬C;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、及び1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と1種類以上の第3リガンド ( $L3m$  :  $m$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) を形成すること;

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) を測定すること。

#### 【0093】

前記八番目の分析キット(即ち、標識物が組み込まれた1種類以上の生物学的物質を分析するための分析キット)を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬A、を予め混合したものを分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記八番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次のi) - v)の要件を含む;

i) 前記八番目の分析キットを用いること;

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI$  :  $k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、

iii) 捕獲ゾーンに各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の塩基配列に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aと、前記1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI$  :  $k$  と  $l$  は独立した整数) とを、予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入すること;

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性により、各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI$  :  $g, h, i, k, l$  は独立した整数) を形成すること;

v) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI$  :  $g, h, i, k, l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) を測定すること。

#### 【0094】

前記八番目の分析キット(即ち、標識物が組み込まれた1種類以上の生物学的物質を分

析するための分析キット)を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬A、を混合することなく別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記八番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次のi) - v)の要件を含む：

i) 前記八番目の分析キットを用いること；

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数)を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $O_k - M_l$  :  $k$  と  $l$  は独立した整数)を調製しておくこと、

iii) 捕獲ゾーンに各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N_{1g}$  :  $g$  は整数)の塩基配列に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N_{2h}$  :  $h$  は整数)と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数)とからなる結合体 ( $N_{2h} - L_{1i}$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数)を含む試薬Aと、前記1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $O_k - M_l$  :  $k$  と  $l$  は独立した整数)とを混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N_{1g}$  :  $g$  は整数)と、複数種類の第2核酸 ( $N_{2h}$  :  $h$  は整数)との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数)と1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)との特異的結合性により、各々独立して固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数)を形成すること；

v) 該複数種類の固定化結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数)に含まれる1種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数)を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)を測定すること。

#### 【0095】

前記九番目の分析キット(即ち、1種類以上の生物学的物質を分析するための分析キットであって、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合の分析キット)を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料と試薬を予め混合したものを分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記九番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次のi) - iv)の要件を含む：

i) 前記九番目の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)の存在が疑われる液体試料、

b. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数)と、1種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数)が直接的に結合されてなる結合体 ( $L_{2j} - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数)を含む試薬；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i}$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$  は独立した整数)中の複数の第1リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数)と1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)の特異的結合性、及び試薬中の結合体 ( $L_{2j} - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数)の1種類以上の第2リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数)と1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)の特異的結合により、各々独立して固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数)を形成すること；

iv) 該複数種類の固定化結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数)に含まれる1種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数)を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数)を測定すること。

#### 【0096】

前記九番目の分析キット(即ち、1種類以上の生物学的物質を分析するための分析キッ

トであって、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合の分析キット)を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料と試薬を混合することなく別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記九番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次の i) - iv) の要件を含む：

i) 前記九番目の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) が結合されてなる結合体 ( $L_{2j} - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬；

10

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i}$  :  $g, h, i$  は独立した整数) 中の複数の第 1 リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、及び試薬中の結合体 ( $L_{2j} - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) の 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合により、各々独立して固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - M_l$  :  $g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) を形成すること；

20

iv) 該複数種類の固定化結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - M_l$  :  $g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) を測定すること。

#### 【 0 0 9 7 】

前記十番目の分析キット (即ち、1 種類以上の生物学的物質のための分析キットであって、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合の分析キット)を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬 B'、試薬 C のうち 2 種以上を予め混合したものを分析装置に導入し、その後残りの種類の材料がある場合には、残りの材料を分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記十番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次の i) - iv) の要件を含む：

30

i) 前記十番目の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . 及び c . の材料の 2 種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) を含む試薬 B'、

40

c . 該第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する第 3 リガンド ( $L_{3m}$  :  $m$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L_{3m} - M_l$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 C ；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i}$  :  $g, h, i$  は独立した整数) 中の第 1 リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) と生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、及び第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と第 3 リガンド ( $L_{3m}$  :  $m$  は整数) との特異的結合性により、固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - L_{3m} - M_l$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立し

50

た整数)を形成すること;

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数)に含まれる1種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数)を測定することによって、生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)を測定すること。

【0098】

前記十番目の分析キット(即ち、1種類以上の生物学的物質のための分析キットであって、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合の分析キット)を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬B'、試薬Cを混合することなく別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記十番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次のi) - iv)の要件を含む;

10

i) 前記十番目の分析キットを用いること;

ii) 次のa. b. 及びc. の材料を混合することなく別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること;

a. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)の存在が疑われる液体試料、

b. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j : j$  は整数)を含む試薬B'、

c. 該第2リガンド ( $L2j : j$  は整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する第3リガンド ( $L3m : m$  は整数)と、1種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数)とからなる結合体 ( $L3m - M1 : m$  と  $l$  は独立した整数)を含む試薬C;

20

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている結合体 ( $N1g - N2h - L1i : g, h, i$  は独立した整数)中の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数)と生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)の特異的結合性、第2リガンド ( $L2j : j$  は整数)と生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)の特異的結合性、及び第2リガンド ( $L2j : j$  は整数)と第3リガンド ( $L3m : m$  は整数)との特異的結合性により、固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数)を形成すること;

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数)に含まれる1種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数)を測定することによって、生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)を測定すること。

30

【0099】

標識物が分析対象物に導入されている場合の分析装置及び分析方法

標識物が導入された分析対象物としての生物学的物質を分析する装置として、該分析装置内に試薬が固定されている装置は、本発明の分析に利用できる。該分析装置は、即ち、幅  $1 \mu m - 5 mm$ 、深さ  $1 \mu m - 750 \mu m$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、任意の塩基配列の第1核酸 ( $N1$ ) が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質 ( $O$ ) に対し特異的結合性を有する第1リガンド ( $L1$ ) と、前記固定化第1核酸 ( $N1$ ) に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸 ( $N2$ ) とからなる結合体 ( $N2 - L1$ ) を、第1核酸 ( $N1$ ) と第2核酸 ( $N2$ ) との特異的結合により捕獲ゾーンに形成して固定化してなる分析装置である。

40

【0100】

また、標識物が導入された分析対象物としての生物学的物質を分析する装置として、該分析装置内に試薬が固定されている分析装置を用いた本発明の分析方法は、次のi) - v)の要件を含む;

i) 標識物が導入された分析対象物としての生物学的物質を分析する装置として、該分析装置内に試薬が固定されている前記した装置を用意すること;

50

- ii) 測定されるべき生物学的物質 (O) の存在が疑われる液体試料から、予め標識物 (M) を導入してなる標識物導入生物学的物質 (O - M) を調製しておくこと、
- iii) 該分析装置の流路に、該標識物導入生物学的物質 (O - M) を導入すること；
- iv) 分析装置の捕獲ゾーンに固定化されている第 1 リガンド (L 1) と第 2 核酸 (N 2) とからなる結合体 (L 1 - N 2) における第 1 リガンド (L 1) と、該標識物導入生物学的物質 (O - M) における生物学的物質 (O) の特異的結合により、固定化された結合体 (N 1 - N 2 - L 1 - O - M) を形成すること；
- v) 該固定化結合体 (N 1 - N 2 - L 1 - O - M) に含まれる標識物 (M) を測定することによって、生物学的物質 (O) を測定すること。

## 【 0 1 0 1 】

10

前記標識物を導入された生物学的物質を分析する装置として、該分析装置内に試薬が固定されている装置を用いて、1 種類以上の生物学的物質を分析するための分析装置及びその分析方法は次のようになる。

## 【 0 1 0 2 】

即ち、該 1 種類以上の生物学的物質の分析装置は、即ち、幅  $1 \mu\text{m} - 5 \text{mm}$ 、深さ  $1 \mu\text{m} - 750 \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、任意の塩基配列の複数種類の第 1 核酸 ( $N 1 g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド ( $L 1 i$  :  $i$  は整数) と、前記複数種類の固定化第 1 核酸 ( $N 1 g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 ( $N 2 h$  :  $h$  は整数) とからなる結合体 ( $L 1 i - N 2 h$ ) を、第 1 核酸 ( $N 1 g$  :  $g$  は整数) と第 2 核酸 ( $N 2 h$  :  $h$  は整数) との特異的結合により形成して捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化してなる分析装置である。

20

## 【 0 1 0 3 】

また、標識物が導入された分析対象物としての 1 種類以上の生物学的物質を分析する装置として、該分析装置内に試薬が固定されている分析装置を用いた本発明の分析方法は、次の i) - v) の要件を含む：

- i) 標識物が導入された分析対象物としての 1 種類以上の生物学的物質を分析する装置として、該分析装置内に試薬が固定されている前記した装置を用意すること；
- ii) 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め 1 種類以上の標識物 ( $M l$  :  $l$  は整数) を導入してなる 1 種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $O k - M l$ 、 $k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、
- iii) 該分析装置の流路に、該 1 種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $O k - M l$ 、 $k$  と  $l$  は独立した整数) を導入すること；
- iv) 分析装置の捕獲ゾーンに各々独立して固定化されている複数種類の第 1 リガンド ( $L 1 i$  :  $i$  は整数) と該 1 種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $O k - M l$ 、 $k$  と  $l$  は独立した整数) における 1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) の特異的結合により、固定化された結合体 ( $N 1 g - N 2 h - L 1 i - O k - M l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) を形成すること；
- v) 該固定化結合体 ( $N 1 g - N 2 h - L 1 i - O k - M l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M l$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) を測定すること。

30

40

## 【 0 1 0 4 】

本発明の上記何れの分析方法において用いる分析装置の流路の流速が  $0.1 \sim 50 \mu\text{L} / \text{分}$  であることがマイクロ流体システムを構築する上で望ましい。

## 【 0 1 0 5 】

本発明の上記何れの分析方法において、分析装置の流路に、試料、試薬を導入するには、例えば、シリンジポンプ、ペリスタポンプを用いて液体を加圧して送液する場合、シリ

50

ンジポンプ、ペリスタポンプを用いて吸引することにより送液する方法、電気浸透流を用いて溶液自体を流さずに溶質のみを流す方法が挙げられる。

【0106】

本発明の上記何れの分析方法において、標識物を検出する方法は、蛍光測定、発光測定、分光光度的測定、熱レンズ測定、表面プラズモン吸収測定、電気化学的測定、目視による測定があげられる。熱レンズ測定には、特開2000-356611号公報（特許文献10）に記載された分析方法で、非常に高感度に検出できる。マイクロ化学技研株式会社より販売されている、ITML-10やITML-11を用いて測定が可能である。また、Yamaguchiら（Y. Baba et al. (eds), Micro Total Analysis Systems 2002, Vol. 1, 281-283）の技術によるSELFOCレンズを用いた小型化された熱レンズ顕微鏡デバイスを用いた測定も可能である。

10

【0107】

本発明の上記何れの分析方法において、分析対象物は、前記分析キットに関する説明に示したとおりである。

【0108】

ランダムアクセス分注システムを用いることによって、無限大の測定の組み合わせの中から、選択された任意の1つの組み合わせ項目の測定を実施することが可能となる。特表平9-503060号公報（WO95/08774）（特許文献11）に記載されているようなランダムアクセス分注システムを本発明における分析装置に適用することによって、無限大の測定の組み合わせの中から選択された、任意の1つの組み合わせ項目の自動測定を実施することが可能となる。例えば、1つのマイクロチップ中に10種類の異なる配列A、B～Jを有するオリゴヌクレオチドを結合させておき、それぞれ、A～Jに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドに異なる10種類の免疫学的配位子を結合させ、それぞれの免疫学的配位子に相当する標識物質を結合させた物質を準備しておくことで、10<sup>10</sup>の組み合わせから選択された1つの任意の組み合わせ測定を実施することができる。さらに、それぞれ、A～Jに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドに異なる100種類の免疫学的配位子を結合させ、それぞれの免疫学的配位子に相当する標識物質を結合させた物質を準備しておくことで、100<sup>10</sup>の組み合わせから選択された1つの組み合わせの測定を実施することができる。

20

【0109】

分析装置の製造方法

本発明の分析装置の製造方法は、2枚の部材を融着する前に2枚の部材の流路となることが予定されている箇所に、リガンドを結合するための核酸を固定化しておくことに特徴を有する。本発明の分析装置の製造方法には、次の方法が挙げられる。

30

【0110】

(1) 幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材を用意し、

該溝は第1部材と第2部材を接合したときに流路となる部分であり、該第1部材又は第2部材の何れかに、或いは両方に、流路入口及び流路出口を有し、

(2) 第1部材及び/又は第2部材における流路となることが予定されている部分であって、測定されるべき生物学的物質を捕獲するためのゾーンとなる部分に、任意の塩基配列の核酸(N)を固定化し、

40

(3) 次に、第1部材及び第2部材を熱融着又は接着剤により接合することにより流路を形成した接合体とし、

(4) 該接合体の流路に、捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的な塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質に特異的な結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aを導入し、捕獲ゾーンの第1核酸(N1)に該結合体(N2-L1)を特異的な結合により結合させて固定化することにより分析装置を得る。

【0111】

50

測定すべき生物学的物質が複数種類の場合には次の分析装置の製造方法が好ましい。

【0112】

(1) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材を用意し、

該溝は第1部材と第2部材を接合したときに流路となる部分であり、該第1部材又は第2部材の何れかに、あるいは両方に流路入口及び流路出口を有し、

(2) 第1部材及び/又は第2部材における流路となることが予定されている部分であって、測定されるべき生物学的物質を捕獲するためのゾーンとなる部分に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$ は整数)を各々独立させて固定化し、

(3) 次に、第1部材及び第2部材を融着又は接着剤により接合することにより流路を形成した接合体とし、

(4) 該接合体の流路に、捕獲ゾーンに固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$ は整数)の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$ は整数)と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$ は整数)とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$ と $i$ は独立した整数)を含む試薬Aを流して、捕獲ゾーンの複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$ は整数)に該結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$ と $i$ は独立した整数)を特異的結合により固定化することにより1種類以上の生物学的物質の分析に適した分析装置を得る。

【0113】

本発明における分析装置の製造に用いる第1部材及び第2部材の材質は、ガラス、ポリジメチルシロキサン、セラミックス、アクリロニトリル・ブタジエンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリル・エチレンプロピレンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリルスチレン樹脂、メタクリルスチレン樹脂、ポリアミド・ナイロン樹脂、ポリブチレンテレフタレート樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレンテレフタレート・ポリエステル樹脂、ポリイミド樹脂、メタクリル樹脂、ポリアセタール樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリフェニレンエーテル樹脂、ポリフェニレンサルファイド樹脂、ポリスチレン樹脂、熱可塑性エラストマー樹脂、アロイ、液晶ポリマー樹脂、シクロオレフィン樹脂、熱可塑性樹脂、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、ジアリルフタレート樹脂、環状オレフィンコポリマー、及び、これらの部材表面が修飾されたものから選ばれたものが挙げられる。第1部材と第2部材は、同じ材質であっても、異なる材質であってもよい。

【0114】

本発明の分析装置の製造において、上記の各材質の第1部材及び第2部材の融着温度は、 $70 - 140$  であることが好ましい。 $70$  未満であると融着が十分ではなく、また $140$  を越えると、これらの部材に直接固定される第1核酸が熱により影響を受けるからである。また、核酸はタンパク質に比べて溶剤に対して失活しないことが知られていることから (Molecular cloning second edition, Sambrook, Fritsch, Maniatis著, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (非特許文献6); Applied Biosystem DNA Synthesizer model 391 user manual (非特許文献7))

前記に説明した、分析キット、分析装置、分析方法、分析装置の製造方法において、使用されるリガンドは、測定されるべき生物学的物質に対して特異的結合性を有するものである。例えば、測定されるべき生物学的物質が、抗原である場合にはリガンドは抗体であり、抗体である場合にはリガンドは抗原であり、核酸である場合にはリガンドはプローブ核酸 ( $PrN$ ) である。

【発明の効果】

【0115】

本発明の分析装置の製造方法を用いると、生体高分子等の生物学的物質の分析を行うための、マイクロ流体システムによる生物学的物質の分析装置を簡単な製造プロセスで、再現性高く製造することができるようになる。また、本発明の分析装置と試薬を組み合わせ

た分析キットを用いると、精度高く生体高分子を分析することができるようになり、臨床診断において有用である。

【0116】

本発明に使用する分析装置における第1核酸(N1)を結合した流路中に、該核酸に少なくとも相補的塩基配列を有する核酸に第1リガンド(L1)を結合させることにより、直接、第1リガンド(L1)を固相に結合させる場合に比べて、以下の1.~3.の優位点が出現する。

【0117】

1. 生物学的物質を捕捉するためのリガンドとしての免疫学的配位子は一般的にタンパク質で有ることが多いが、タンパク質の場合は、熱、有機溶媒などに不安定で、例えば、  
 プラスチック素材のシーリングなどにおいて75~112 5分以上の条件が必要となる  
 が(L.E. Locascio ら、J. Chromatogr. A、857(1999)275-284)、タン  
 パク質はこうした温度ではきわめて不安定である。そのため、免疫学的配位子を直接プラ  
 スチックなどに固定化を行い、シーリングを行った場合、失活してしまう可能性が極めて  
 高い。しかしながら、オリゴヌクレオチドなどの核酸は、タンパク質に比べて熱や種々の  
 有機溶媒に対して安定であることがわかっているため、100 以上の温度でシーリング  
 を行っても、相補的な核酸と結合能を保持していることが容易に予測される。実際、本明  
 細書中、実施例で記載するが110 で1時間加温してもハイブリダイゼーションの効率  
 に影響が無いことが確認されている。そのため、本発明の様式により製造されたチップを  
 用いると、固定化された核酸に対する相補的な核酸を免疫学的配位子に結合させ、相補的  
 核酸-免疫学的配位子複合体を流路に流し、固相に結合された核酸と該相補的核酸-免疫  
 学的配位子複合体を結合させることにより、容易に免疫学的配位子を結合させた微細流路  
 を有するチップを作製することが可能となる。この一連の反応は、それぞれの試薬ごとに  
 反応を行っても、反応の一部あるいは全てを同時に行うこともできる。例えば、Cain  
 ら(Allergy(1998)53、1213-1215)は、ダニ由来のアレルゲンの一種であるDer p1、Der f1などを熱処理してその抗原性の失活の程度を確認  
 している。この実験成績によると、Der p1は100 30分の加熱によってもとの  
 抗原性の85%が、また、Der f1は、100 30分の加熱によって98%の抗原  
 性が失活することが確認されている。アレルギー検査のためにプラスチック材料上にこう  
 した抗原を塗布し、溝を有する部材との熱融着を行う工程により抗原性が失活してしまい  
 、正しい測定を行うことができない可能性が非常に高い。しかしながら、本発明による方法  
 を用いるとこうした熱による抗原性の失活を回避できるため、抗原性失活のない状態で  
 測定を行うことが可能となる。

【0118】

次に接着剤を用いて第1部材と第2部材を接合した場合を考察する。例えば、核酸を抽出  
 する際に、フェノール抽出が一般的に行われている。これは、生体試料から核酸を抽出  
 する際に、フェノールによってタンパク質を変性させて沈殿させ、変性しない核酸を水相  
 中に回収するという方法である。核酸はこの条件、つまりフェノールに曝露されても変性  
 することはないし、これ以外にも、有機溶媒を用いた精製として、フェノール/クロロホルム  
 /イソアミルアルコール(25/24/1)、クロロホルム/フェノール(1/1)  
 、イソプロパノールを用いた方法(非特許文献6)があるが、こうした条件下でも変性す  
 ることはない。しかしながら、タンパク質はこうした条件下で変性してしまうことが知ら  
 れている。また、オリゴヌクレオチド合成時に、アセトニトリル(100%)、ジクロロ  
 メタン(86%)、テトラヒドロフラン(84%)を用いるが(非特許文献7)、こうした  
 溶媒中でも核酸は変性しないが、タンパク質は多くの場合変性してしまう。

【0119】

以上のことから、タンパク質を固相に結合させた場合は、固相化したタンパク質が接着  
 剤に含まれる有機溶媒に曝露されることにより、変性してしまう可能性が非常に高いが、  
 核酸を固相化させた場合には、結合性が低下する可能性はタンパク質に比べると遙かに低  
 い。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 0 】

2. 免疫学的配位子を安定に微細流路中に固定できても、分析項目が変わると それに対応した免疫学的配位子を固定化したチップを作製する必要があった。そのため、固定化する免疫学的配位子の物性に適切な固定化条件を実験的に求め、その条件で固定化する必要があった。この作業は、比較的物性が一定している抗体の場合は難しい作業ではないが、物性の大きく異なる抗原の場合は再現性良く固定化することは非常に難しい作業であった。しかしながら、本発明の方法によると、固定化するのは核酸であり、アミノ酸配列により物性が大きく異なる免疫学的配位子に比べて、配列の違いで大きく物性が異なることはなく、ほとんど同条件で結合させることができることが知られている、核酸の固定化方法をそのまま流用することが可能である。

10

## 【 0 1 2 1 】

また、安定に固定化できる条件を見いだすことができても、測定すべき生物学的物質の種類に応じて異なるリガンドとしての免疫学的配位子や核酸を固定化したチップを調製する必要があり、製造計画を綿密に立てる必要があった。そうしなければ、不良在庫を抱え込んでしまうことになりかねなかった。しかしながら、本発明の方法によれば、測定対象物が免疫学的活性物質であっても、あるいは、核酸であっても、測定対象物とは全く関係がない任意の配列の核酸を固定化することで、それぞれの測定項目と用いるチップは完全に独立に考えることができるようになる。例えば、塩基配列 1 を結合した微細流路中に結合させたチップがあれば、塩基配列 1 に相補的な塩基配列 1' に抗 B 型肝炎表面抗原抗体を結合させたものと組み合わせれば、そのチップは B 型肝炎表面抗原用に用いることができるし、このチップと塩基配列 1' に C 型肝炎抗原を結合させたものを組み合わせれば、そのチップは C 型肝炎抗体検出用に用いることができる。さらに、塩基配列 1' に、脂肪細胞分化に関連する遺伝子の配列の一部に結合する配列を結合させておき、脂肪細胞分化に関連する遺伝子の配列に結合する標識された核酸があれば、今まで免疫学的配位子の検出・測定に用いていたチップをそのまま、脂肪細胞分化に関連する遺伝子配列の検出にも用いることが可能になる。このことは、1つの核酸固定化チップと、これに結合する相補的核酸が結合した分析対象物に結合する複合体が有れば、ありとあらゆる測定対象物を 1 種類の核酸固定化チップで分析できるようになることを意味しており、チップ製造コストの大幅なコストダウンを実施することが可能となる。

20

## 【 図面の簡単な説明 】

30

## 【 0 1 2 2 】

【 図 1 】 本発明に用いられる分析装置の一例を示す概略的な平面図である。

【 図 2 】 図 1 の断面図である。

【 図 3 】 流路入口が一つであり、流路の途中で複数の流路に分岐し、流路出口が複数ある場合の分析装置の態様を示す図である。

【 図 4 】 流路入口が複数であり、各流路の途中で 1 本の流路に収束し、流路出口が一つの場合の分析装置の態様を示す図である。

【 図 5 】 流路入口が一つであり、流路の途中で複数の流路に分岐し、さらに各流路の途中で 1 本の流路に収束し、流路出口が一つの場合の分析装置の態様を示す図である。

【 図 6 】 1 種類以上の生物学的物質を分析するための分析装置であり、流路入口が一つであり流路出口が一つである場合の態様を示す図である。

40

【 図 7 】 本発明の一番目の分析キットの概念図を示し、第 1 リガンド ( L 1 ) と第 2 リガンド ( L 2 ) が抗体である場合の、分析装置、第 1 試薬、第 2 試薬が独立して存在する場合の例を示す図である。

【 図 8 】 本発明の四番目の分析キットの概念図を示し、第 1 リガンド ( L 1 ) と第 2 リガンド ( L 2 ) が抗体である場合の、分析装置、試薬が独立して存在している場合の例を示す図である。

【 図 9 】 生物学的物質 ( O ) が抗原である場合について、一番目の分析キット及び二番目の分析キットを用いた一番目、二番目の各分析方法を適用したときの、適用後の捕獲ゾーンにおける状態を示す図である。

50

【図10】測定されるべき生物学的物質が核酸(ON)である場合の、捕獲ゾーンに結合される結合体を示す図である。

【図11】実施例1の分析の結果をグラフとして示す図である。

【図12】チップA、チップB、チップC-1、チップC-2を用いて、HBs抗原を含む、或いは含まない試料と反応させた場合に、DNAマイクロアレイスキャナー(Biodetect 645 Reader:商品名、GeneScan社製)で蛍光強度を検出した結果を表すグラフである。

【図13】基板にオリゴヌクレオチドを塗布した後に熱融着により調製したプラスチック製チップを用いた免疫測定の結果を表すグラフである。

【符号の説明】

【0123】

- 1、1A、1B、1C、1D、11、14 分析装置
- 2 流路
- 3、3-1、3-2、3-3、3-4、3-5、3-6 流路入口
- 4、4-1、4-2、4-3、4-4、4-5、4-6 流路出口
- 5 第1部材
- 6 第2部材
- 7、7-1、7-2、7-3、7-4、7-5、7-6 捕獲ゾーン
- 12 試薬A
- 13、15 試薬B

【実施例1】

【0124】

5'末端にアミノ基を導入した配列番号1に示したAmino group CGA CGG ATC CCC GGG AAT TC(配列番号1)なる配列を有するオリゴヌクレオチドAを合成し、オリゴヌクレオチドA 8.45 μMとなるように、EDTA 1 mMを含むPBS(-)で希釈した。この溶液を、ジーンスライド(商品名、株式会社日本パーカーライジング製)上に直径1 mmになるようにスポットした。この後、100 °Cに加温したホットプレート上で1時間加温し、オリゴヌクレオチドAを共有結合により固定化した。次いで、2×SSC/0.2% SDSで15分洗浄し、90 °Cの2×SSC/0.2% SDSで5分洗浄後、滅菌水で洗浄して、乾燥させて、オリゴヌクレオチドA固定化スライドガラスを調製した。

【0125】

前記工程(1)で調製したオリゴヌクレオチドAを固定化したオリゴヌクレオチド固定化スライドガラスに、微細流路となる溝(幅:300 μm、高さ、100 μm)が形成されているポリジメチルシロキサン(以下、PDMSと呼ぶ)の平板を、スライドガラス上に固定化したオリゴヌクレオチドA上に流路が設置されるように圧着するように貼り合わせるにより接合して、チップを作製した。チップの内部に形成された流路(幅:300 μm、高さ、100 μm)に、2% BSAおよび1 mM EDTAを含むPBSを15分間送液し、次いで、固定化したオリゴヌクレオチドAと相補的なオリゴヌクレオチドB結合抗HBs抗体(Okuraの方法(J Immunol Methods, 2001 Dec 1;258(12):73-84.)により調製)を500 μg/mLの濃度になるように0.1% BSAおよび1 mM EDTAを含むPBS(以下、0.1% PBS)で希釈したものを15分間送液した。次いで、0.1% PBSで5分間送液することにより洗浄し、50 ng/mLになるように0.1% PBSで調製したHBs抗原を15分間送液した。この後、0.1% PBSで5分間送液して洗浄し、1 μg/mL、10 μg/mL、30 μg/mLあるいは50 μg/mLの濃度に0.1% PBSで調製したCy5標識抗HBs抗体を15分間送液した。すべての反応は、37 °C、流速1 μl/minで行った。

【0126】

(3)分析

スライドガラス部とPDMS部を分離し、スライドガラス部について、Biodetect 645/4チップリーダー(商品名、ジーンスキャン社製)を用いてCy5の蛍光強度を測定

10

20

30

40

50

した。その結果を表 1、図 1 1 に示した。単位はシグナル強度ユニットである。この結果より、Cy 5 標識抗体の濃度としては、30  $\mu$ g/ml が適していると考えられた。

【0127】

【表 1】

Cy5標識抗体の濃度検討

Cy5-IgG濃度 HBs濃度	1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	30 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml
0ng/ml	6292.00	6038.33	6745.33	6407.67
50ng/ml	6744.50	7328.50	9209.75	8349.75

【0128】

(4) 抗体の直接固定化

前記工程(2)のオリゴヌクレオチド B 結合抗 HBs 抗体に用いた同じ抗体を、1000  $\mu$ g/ml となるように、PBS(-)で希釈した。この溶液を、ジーンスライド(商品名、株式会社日本パーカーライジング製)に直径 1mm になるようにスポットした。この後、110℃に加熱したホットプレート上の 1 時間加熱下で、あるいは、室温で抗体を固定化した。次いで、PBS(-)で 5 分洗浄後、滅菌水で洗浄して、乾燥させて、抗 HBs 抗体固定化スライドガラスを調製した。

20

【0129】

(5) 流路の作製および反応 2

前記工程(4)で調製した抗 HBs 抗体固定化スライドガラスに、微細流路となる溝(幅: 300  $\mu$ m、深さ、100  $\mu$ m)が形成されているポリジメチルシロキサンを、常温で圧着するようにして貼り合わせチップを作製した。内部に形成された微細流路に、2% BSA および 1mM EDTA を含む PBS を 15 分間送液し、次いで、50 ng/ml になるように 0.1% PBS で調製した HBs 抗原を 15 分間送液した。この後、0.1% PBS で 5 分間送液して洗浄し、30  $\mu$ g/ml の濃度に 0.1% PBS で調製した Cy 5 標識抗体を 15 分間送液した。すべての反応は、37℃、流速 1  $\mu$ l/min で行った。この後、前記工程(3)と同様にチップ上の反応性をチップリーダーで確認した。この結果、室温で抗体を固定化した場合には、反応を確認することができたが、110℃で固定化した場合には、反応性を確認することができなかった。

30

【0130】

(実施例 1 の考察)

前記工程 5 と工程 3 の結果から、抗体を固定化する従来の方法では、射出成型によって調製した流路溝を有する部材とフィルムあるいは平板を熱融着などで接着させて、マイクロ流体チップを作製する際の熱で抗体が失活してしまう可能性が非常に高く、免疫学的な検出には用いるチップを調製することができない。しかしながら、本発明による方法を用いれば、核酸は、110℃ 1 時間加熱しても安定に結合性を示していることから、射出成型によって調製した流路溝を有する部材と、フィルムあるいは平板を熱融着などで接着させて、マイクロ流体チップを作製し、チップ流路内に結合させた DNA と少なくとも相補的塩基配列を有する DNA' を抗体に結合させたものを反応させ、(基板 - DNA) - (DNA' - 抗体)なる複合体を形成させ、この後、抗原を反応させた後、Cy 5 標識抗体を結合させて、(基板 - DNA) - (DNA' - 抗体) - (抗原) - (Cy 5 標識抗体)が形成されることによって免疫学的な検出が可能であることがわかった。

40

【実施例 2】

【0131】

3 種類の材料(B型肝炎表面抗原である HBs に対するモノクローナル抗体、マウス正

50

常抗体、オリゴヌクレオチド A ) を、材料毎に別々の各ジーンスライド ( 商品名、株式会社日本パーカーライジング製 ) 上に、加熱して固定化させて ( 固定化処理 a、固定化処理 b、固定化処理 c ) 3 種類の固定化処理された固定化基板を得た。得られた 3 種類の固定化基板上に、微細流路となる溝を形成した平板部材を接着させて、接合体の内部に形成された微細流路内に固定化材料が固定化されている 3 種類の異なる接合体を得た。

#### 【 0 1 3 2 】

その後、オリゴヌクレオチド A が固定されている固定化基板については当該オリゴヌクレオチド A に相補的なオリゴヌクレオチド B で標識した抗 H B s 抗体、あるいは、相補的オリゴヌクレオチド B で標識したマウス正常抗体を、オリゴヌクレオチドの相補的結合により、固定化し、免疫反応を実施した。一方、抗体 ( B 型肝炎表面抗原である H B s に対するモノクローナル抗体、マウス正常抗体 ) を直接、基板に固定化した固定化基板においても同様に、免疫反応を行った。これらの処理の詳細及び結果を以下に具体的に記載する。

10

#### 【 0 1 3 3 】

##### ( 1 ) D N A 又は抗体の固定化

##### 固定化処理 a

ジーンスライド ( 商品名、株式会社日本パーカーライジング製 ) 上にマウスモノクローナル抗 H B s 抗体 5 0 0  $\mu$  g / m L を含む P B S をマイクロピペットでスポットし、37 で 1 時間インキュベーションし固相化後、MilliQ水で洗浄し、乾燥させた。この後、固定化基板を 1 3 0 で 2 0 分間加熱することによりガラス固定化基板 A を得た。

20

#### 【 0 1 3 4 】

##### 固定化処理 b

ジーンスライド ( 商品名、株式会社日本パーカーライジング製 ) 上にマウス正常抗体 5 0 0  $\mu$  g / m L を含む P B S をマイクロピペットでスポットし、37 で 1 時間インキュベーションして固相化した後、MilliQ水で洗浄し、乾燥させた。この後、固定化基板を 1 3 0 で 2 0 分間加熱することによりガラス固定化基板 B を得た。

#### 【 0 1 3 5 】

##### 固定化処理 c

前記実施例 1 で用いたオリゴヌクレオチドと同一の 5 ' 末端にアミノ基を導入した配列番号 1 で示すオリゴヌクレオチド A 2 5  $\mu$  M を含む P B S をジーンスライド ( 商品名、株式会社日本パーカーライジング製 ) 上に塗布して、80 で 1 時間インキュベーションして固相化した。95 水浴中で 5 分間ブロッキングを行い、MilliQ水で洗浄し乾燥させた。その後、基板を 1 3 0 で 2 0 分間加熱することによりガラス固定化基板 C を得た。

30

#### 【 0 1 3 6 】

前記工程 ( 1 ) で調製したガラス固定化基板 A、ガラス固定化基板 B、ガラス固定化基板 C に、微細流路となる溝 ( 幅 3 0 0  $\mu$  m、深さ 1 0 0  $\mu$  m ) が形成されたポリジメチルシロキサン ( P D M S ) の平板 ( フルイドウェアテクノロジーズ社製、ストレート型 ) を、P D M S の粘着性を利用してそれぞれ圧着して、各ガラス固定化基板と平板の間に微細流路 ( 流路幅 3 0 0  $\mu$  m、流路深さ 1 0 0  $\mu$  m ) を形成したチップ A、チップ B、チップ C を作製した ( なお、A、B、C はガラス固定化基板の A、B、C に対応する。 ) 。得られた各チップは、全長が 7 5 m m で、幅が 2 5 m m の直方体であり、該チップには流路の入口及び出口が末端より 5 m m の位置に口径 1 m m で形成され、流路幅 3 0 0  $\mu$  m、流路深さ 1 0 0  $\mu$  m の流路が 4 本、各流路の間隔が 7 m m で平行に形成されている。次いで、各チップの内部に形成された流路に、1 % B S A、1 m M E D T A を含む P B S を送液することによりブロッキングを行った。

40

#### 【 0 1 3 7 】

次いで、前記工程で得られたブロッキングされたチップ C の微細流路に、5 0  $\mu$  g / m L G A A T T C C C G G G G A T C C G T C G ( 配列番号 2 で表されるオリゴヌクレオチド B ) 標識抗 H B s 抗体、および 1 % B S A、1 m M E D T A を含む P B S を 1 5 分間送液し、1 % B S A、1 m M E D T A を含む P B S を 3 分間送液し洗浄して、チ

50

チップC - 1を得た。一方、前記工程で得られた別のブロッキングされたチップCの微細流路に、50  $\mu$ g / mL GAATTC CCGGGATCCGTCG (配列番号2で表されるオリゴヌクレオチドB) 標識マウス正常抗体および1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを15分間送液し、1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを3分間送液し洗浄して、チップC - 2を得た。

【0138】

(3) 抗原結合量の検討

チップAによる 抗原結合量の確認

前記工程(2)で得られた、ブロッキングされたチップAの微細流路に、50 ng / mL HBs抗原、1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを15分間送液し、1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを3分間送液し洗浄して、HBs抗原を含むPBSで処理したチップAを得た。

10

【0139】

一方、HBs抗原を含まず、1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを送液した以外は、前記HBs抗原で処理したチップAを得る工程と同様にして、HBs抗原を含まないPBSで処理したチップAを得た。

【0140】

次いで、前記工程で得られた各チップAに対して、30  $\mu$ g / mL ビオチン修飾抗HBs抗体、1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを15分間送液し、1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを3分間送液し洗浄した。前記工程で得られた各チップ(HBs抗原を含むPBSで処理したチップA、HBs抗原を含まないPBSで処理したチップA)に対して、最後に、10  $\mu$ g / mL Cy5標識ストレプトアビジン、1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを15分間送液し、1% BSA、1mM EDTAを含むPBSを3分間送液し洗浄した。その後、PDMS部分を剥がし、基板をMilliQ水で洗浄後、チップリーダーで蛍光強度を検出して、抗原結合量を確認した。その結果を縦軸に蛍光強度を表すグラフとして図12に示す。

20

【0141】

チップBによる 抗原結合量の確認

前記「チップAによる抗原結合量の確認」の欄に示した抗原結合量を確認する処理において、チップAの代わりにチップBを用いた以外は、同様にして抗原結合量を確認した。その結果を縦軸に蛍光強度を表すグラフとして図12に示す。

30

【0142】

チップC - 1による 抗原結合量の確認

前記「チップAによる抗原結合量の確認」の欄に示した抗原結合量を確認する処理において、チップAの代わりにチップC - 1を用いた以外は、同様にして抗原結合量を確認した。その結果を縦軸に蛍光強度を表すグラフとして図12に示す。

【0143】

チップC - 2による 抗原結合量の確認

前記「チップAによる抗原結合量の確認」の欄に示した抗原結合量を確認する処理において、チップAの代わりにチップC - 2を用いた以外は、同様にして抗原結合量を確認した。その結果を縦軸に蛍光強度を表すグラフとして図12に示す。

40

【0144】

(4) 結果

図12のグラフによれば、HBs抗原とは反応することの無いマウス正常抗体を基板に結合させ加熱処理した場合でも、HBs抗原を流路内に送液した場合に、HBs抗原を含まない溶液を送液した場合よりも高い値が得られている。この結果から、抗HBs抗体を直接基板に結合させ、加熱処理を行った場合の反応は非特異的な結合によるものと考えられる。これは加熱処理により抗体が失活し、失活した抗体に非特異的に抗原が吸着した結果と考えられる。これに対して、オリゴヌクレオチドを介した結合の場合は、抗HBs抗体を用いた場合と、正常抗体を用いた場合で明確な差が認められることがわかる。このこ

50

とは、この反応が非特異的な反応ではなく、抗原抗体反応に由来する反応であることを示唆している。

【0145】

したがって、プラスチックの熱融着工程において、基板を約130 程度で約20分間程度加熱するような熱融着工程を含む、微細流路中に生体分子を結合させる方法として、オリゴヌクレオチドを介する方法は、マイクロ流路内に生体高分子を直接結合させるよりも優れていることが図12の結果より強く示唆される。

【実施例3】

【0146】

本実施例3は、基板にオリゴヌクレオチドを塗布した後に熱融着により調製したプラスチック製チップを用いた免疫測定に関する。

10

【0147】

(1) プラスチック製チップの製造

アルデヒド活性化処理されたシクロオレフィン基板(住友ベークライト社製)を用い、外形の全長が75mmで、幅が25mmの直方体の基板とし、該基板に口径1mmの流路入口及び流路出口を基板の末端から5mmの位置に切削加工により形成し、流路幅300 $\mu$ m、流路深さ100 $\mu$ mの流路を形成するための溝を4本、各流路が平行で間隔が7mmとなるように、切削加工により形成して流路溝基板を得た。

【0148】

これとは別に、アルデヒド活性化処理シクロオレフィン基板に25mM NH<sub>2</sub> ATA GTG TTC TGG GTT AGC AAなる配列を有するオリゴヌクレオチド(配列番号3で表されるオリゴヌクレオチドC)を含む溶液をマイクロピペットを用いて、流路溝基板と貼り合わせた場合に流路溝上に並ぶように、直径約1mmのスポットを15カ所塗布して固相化処理を行った。このオリゴヌクレオチドCを固定化した基板と前記工程で得られた流路溝基板を110~135の間で熱融着処理により接合させ、流路幅300 $\mu$ m、流路深さ100 $\mu$ mの流路を形成してなるプラスチック製チップを得た。

20

【0149】

(2) 免疫測定

前記工程で得たプラスチック製チップの流路内に、1% BSA、1mM EDTAを含むPBS(以下、PBS-BSA)を送液することによりブロッキングを行った。前記工程(1)で固相化したオリゴヌクレオチドCと相補的な配列であるTTG CTA ACC CAG AAC ACT AT(配列番号4で表されるオリゴヌクレオチドD)を結合させた抗HBs抗体50 $\mu$ g/mLを含むPBS-BSAを10分間送液し、次いで、PBS-BSAのみを3分間送液することにより洗浄した。次いで、HBs100ng/mLを含むPBS-BSAを10分間送液し、次いで、PBS-BSAのみを3分間送液することにより洗浄した。この後、ビオチン標識抗HBs抗体1 $\mu$ g/mLを含むPBS-BSAを10分間送液し、次いで、PBS-BSAのみを3分間送液することにより洗浄した。続いて、HRP(西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ)標識ストレプトアビジン(ロシュ社製)50mU/mLを含むPBS-BSAを10分間送液し、次いで、PBS-BSAのみを3分間送液することにより洗浄した。続いてHRPの基質であるSABlu(同仁化学研究所)を送液しながら、HRPの酵素活性により発色したSABluをSELFOC型熱レンズ顕微鏡GRIN Spectra(マイクロ化学技研社製)により検出した。得られた熱レンズ信号強度(Voltage)を縦軸に示したグラフとして図13に示す。

30

40

【0150】

(3) 結果

図13のグラフによれば、HBsAgを反応させていないBlankに比べ、100ng/mLのHBsAgを反応させたときに高いシグナルが得られたことがわかる。このことはプラスチック製チップの作製に必要な熱融着処理によっても固定化したオリゴヌクレオチドは失活せず、オリゴヌクレオチドを固定化後に熱融着したチップを用いて生体高分子の検出が可能であることを示している。

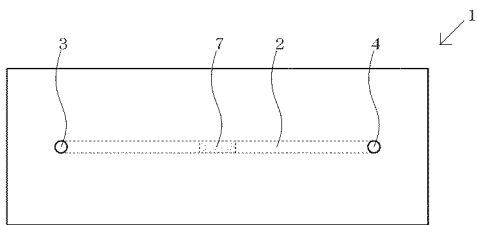
50

【産業上の利用可能性】

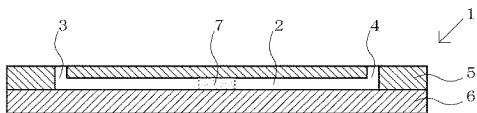
【0151】

生体高分子等の生物学的物質の存在の確認、量の計測が、微量な試料で迅速に行えるため、試料採取における人体への苦痛が和らげ、臨床診断において有用である。本発明の生物学的物質の分析は、化学産業、製薬産業をはじめ、食品産業、農業技術など多くのパイオ関連産業において有用である。

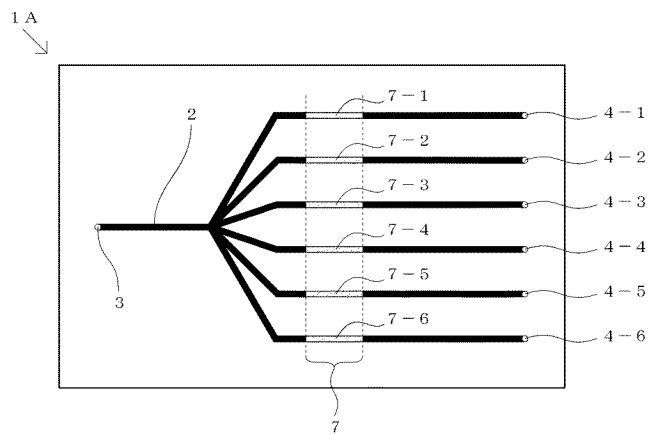
【図1】



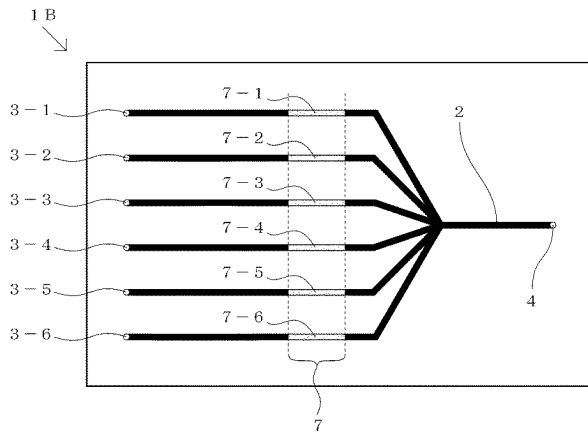
【図2】



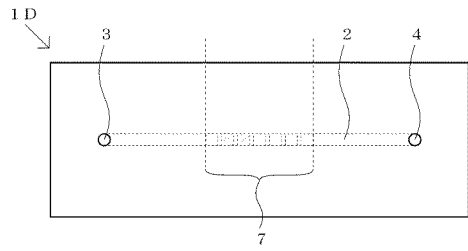
【図3】



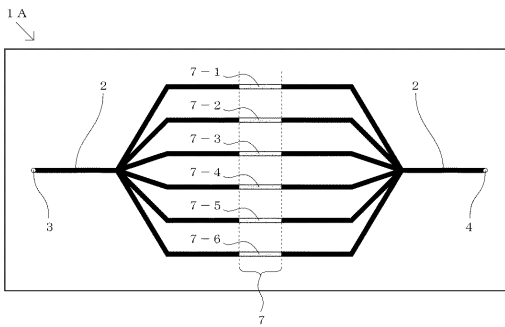
【図4】



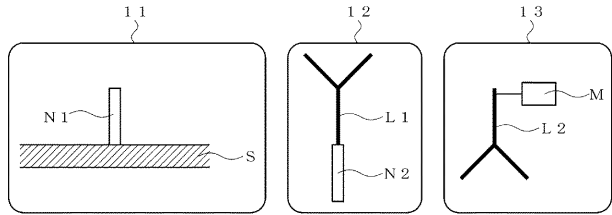
【図6】



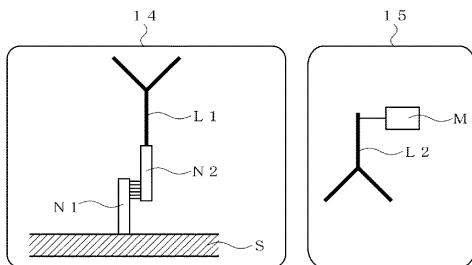
【図5】



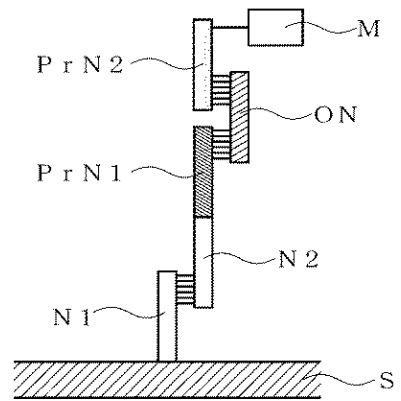
【図7】



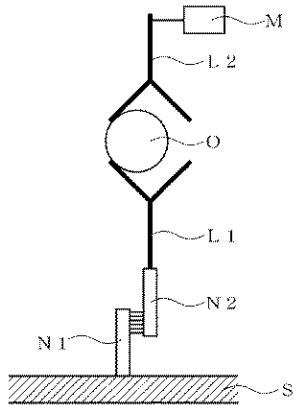
【図8】



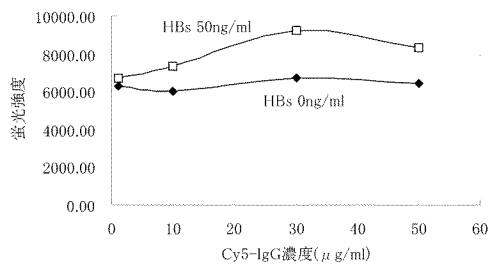
【図10】



【図9】

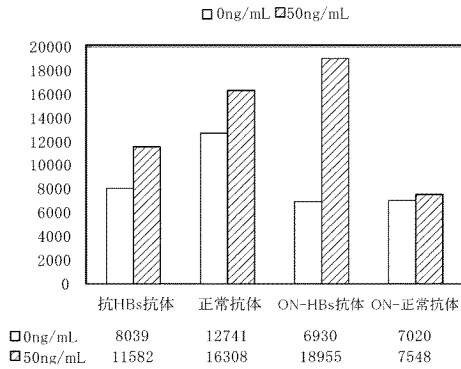


【図11】

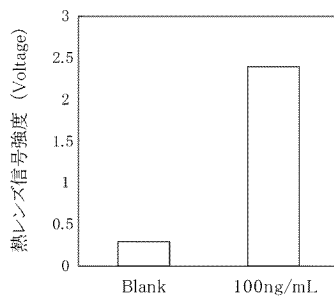


Cy5標識抗体の濃度検討

【図 1 2】



【図 1 3】



## 【配列表】

2005090972000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成18年10月13日(2006.10.13)

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

こうした点を打開するために、種々の検査法を用いた試薬開発が行われてきている。例えば、特表平1-503174号公報（特許文献1）を用いた方法や、米国特許6,448,001（特許文献2）に示すイムノクロマトグラフ法が挙げられる。これらの技術を用いた方法では、名刺の1/2程度の大きさの試薬を室温で保存でき、ベットサイドで極めて簡便に分析対象物の有無を判定することが可能となっている。しかしながら、これらの方法は判定を目視により行うため、感度が必ずしも高くなく、また、定量を行う事はできず、1回の分析に採血量100μL程度を要することから、患者負担を軽減するに至っていない。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

WO02/065138（特許文献6）に、生体高分子と試料との結合の検出をマイク

口チップ上で行ったり、結合した化合物を回収しその同定を行うことが示されている。

- 【特許文献 1】特表平 1 - 5 0 3 1 7 4 号公報
- 【特許文献 2】米国特許 6 , 4 4 8 , 0 0 1
- 【特許文献 3】特開昭 6 3 - 2 7 3 0 4 2 号公報
- 【特許文献 4】特開 2 0 0 1 - 4 6 2 8 号公報
- 【特許文献 5】W O 0 1 / 0 3 4 3 0 2
- 【特許文献 6】W O 0 2 / 0 6 5 1 3 8
- 【特許文献 7】特開平 1 1 - 1 8 7 9 0 0 号公報
- 【特許文献 8】米国特許 5 , 4 4 5 , 9 3 4
- 【特許文献 9】米国特許 5 , 8 0 7 , 5 2 2
- 【特許文献 1 0】特開 2 0 0 0 - 3 5 6 6 1 1 号公報
- 【特許文献 1 1】特表平 9 - 5 0 3 0 6 0 号公報 ( W O 9 5 / 0 8 7 7 4 )
- 【非特許文献 1】Analytical Chemistry 2001, 73, 1213 1218
- 【非特許文献 2】Analytical Chemistry 2001, 73, 2112 2116
- 【非特許文献 3】Analytical Chemistry;69(14);2626 2630
- 【非特許文献 4】FASEB J. 2000 Jun;14(9):1041 60.
- 【非特許文献 5】J.Biomol Struct Dyn. 1999 Oct;17(2):175 191
- 【非特許文献 6】Molecular cloning second edition, Sambrook、Fritsch、Maniatis著、ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989, 9.14 9.19
- 【非特許文献 7】Applied Biosystems DNA Synthesizer model 391 user manual " User Bulletin No.50 "

10

20

【手続補正 3】

- 【補正対象書類名】明細書
- 【補正対象項目名】0 0 2 6
- 【補正方法】変更
- 【補正の内容】
- 【0 0 2 6】

i) 幅  $1 \mu\text{m} - 5 \text{mm}$ 、深さ  $1 \mu\text{m} - 750 \mu\text{m}$ の断面の溝を有する第 1 部材と、該溝を覆うことができる第 2 部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第 1 部材上及び / 又は第 2 部材上の捕獲ゾーンにおいて、第 1 部材と第 2 部材の接合前に、任意の複数種類の塩基配列の第 1 核酸 ( $N1g : g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置を用意すること;

30

ii) 該複数種類の第 1 核酸 ( $N1g : g$  は整数) に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 ( $N2h : h$  は整数) に、測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に応じて特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド ( $L1i : i$  は整数) を結合させてなる複数種類の複合体 ( $N2h - L1i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬 A を用意すること;

iii) 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、及び試薬 A を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、前記分析装置の流路に導入し、複合体を流路内に固定化させること;

40

iv) 固定化された複合体を測定すること。

【手続補正 4】

- 【補正対象書類名】明細書
- 【補正対象項目名】0 0 2 7
- 【補正方法】変更
- 【補正の内容】
- 【0 0 2 7】

本発明の分析方法の四番目の基本的な発明は、液体試料と分析試薬を混合せずに別々に該分析装置の流路に導入する方法であり、次の i) - iv) の要件を含む分析方法である。

i) 幅  $1 \mu\text{m} - 5 \text{mm}$ 、深さ  $1 \mu\text{m} - 750 \mu\text{m}$ の断面の溝を有する第 1 部材と、該

50

溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の複数種類の塩基配列の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置を用意すること ;

ii) 該複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) に、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に応じて特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) を結合させてなる複数種類の結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬 A を用意すること ;

iii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、及び試薬 A を前記分析装置の流路に別々に導入し、複合体を流路内に固定化させること ;

iv) 固定化された複合体を測定すること。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

本発明の分析方法における分析対象物は、生物学的物質であり、高分子としては、抗原、抗体、糖鎖、糖タンパク質、レクチン、受容体、DNA、RNAであり、その他、生体中の物質と特異的に結合することができる物質であり、その物質の分子量に依存しないものが挙げられる。これらの分析対象物を分析するための試料には、血液、血漿、血清、尿、唾液、その他体液や、DNA、RNAを含むもの、染色体や、DNA、RNAを増幅させたもの、抗原、抗体、糖鎖、受容体を含む物体が試料となりうる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

i) 幅  $1\mu m - 5mm$ 、深さ  $1\mu m - 750\mu m$  の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸 ( $N1$ ) が固定化された分析装置 ;

ii) 該分析装置の捕獲ゾーンに固定化された第1核酸 ( $N1$ ) の塩基配列に少なくとも相補的な配列を有する第2核酸 ( $N2$ ) と、測定されるべき生物学的物質 ( $O$ ) に特異的結合性を有する第1リガンド ( $L1$ ) とからなる結合体 ( $N2 - L1$ ) を含む試薬 A ;

iii) 測定されるべき生物学的物質 ( $O$ ) に特異的結合性を有する第2リガンド ( $L2$ ) を含む試薬 B ; 及び、

iv) 該第2リガンド ( $L2$ ) に特異的結合性を有する第3リガンド ( $L3$ ) と、標識物 ( $M$ ) とからなる結合体 ( $L3 - M$ ) を含む試薬 C。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

本発明の五番目の分析キットは、前記四番目の分析キットにおいて、第2リガンド ( $L2$ ) に標識 ( $M$ ) が結合してなる結合体 ( $L2 - M$ ) を含む試薬 B に代えて、次の試薬 B

'と試薬Cを使用するものである。即ち、本発明の五番目の分析キットは、試薬と分析装置が別体であり、次の試薬B'、試薬C及び分析装置を組み合わせてなる分析キットである。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

i) 幅 $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質(O)に対し特異的結合性を有する第1リガンド(L1)と、前記固定化第1核酸(N1)に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)とからなる結合体(N2-L1)を、第1核酸(N1)と第2核酸(N2)との特異的結合により捕獲ゾーンに結合体(N1-N2-L1)の形態で形成して固定化してなる分析装置；

10

ii) 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)を含む試薬B'；及び、

20

iii) 該第2リガンド(L2)に特異的結合性を有する第3リガンド(L3)と、標識物(M)とからなる結合体(L3-M)を含む試薬C。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

i) 幅 $1\mu\text{m} - 5\text{mm}$ 、深さ $1\mu\text{m} - 750\mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸(N1g : gは整数)が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質(Ok : kは整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド(L1i : iは整数)と、前記複数種類の固定化第1核酸(N1g : gは整数)の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸(N2h : hは整数)とからなる結合体(N2h-L1i : hとiは独立した整数)を、第1核酸と第2核酸の特異的結合性により形成して捕獲ゾーンに結合体(N1g-N2h-L1i : g、h及びiは独立した整数)の形態で各々独立して固定化してなる分析装置；

30

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質(Ok : kは整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド(L2j : jは整数)を含む試薬B'；及び、

40

iii) 該1種類以上の第2リガンド(L2j : jは整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド(L3m : mは整数)と、1種類以上の標識物(Ml : lは整数)とからなる結合体(L3m-Ml : mとlは独立した整数)を含む試薬C。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

50

## 【補正の内容】

## 【0064】

本発明の分析キットに含まれる第1リガンド(L1、又はL1i:iは整数)、場合によって含まれる第2リガンド(L2、又はL2j:jは整数)、及び第3リガンド(L3、又はL3m:mは整数)には、免疫学的物質、受容体、受容体に結合する物質、糖類、糖タンパク質、糖脂質、レクチン及び核酸から選ばれたものが挙げられる。本発明の分析キットを構成するために使用することができる核酸には、5塩基以上の核酸塩基からなるDNA、RNA、PNA(FASEB J. 2000 Jun;14(9):1041-60.(非特許文献4))、あるいはLNA(Locked Nucleic Acidの略語:J Biomol Struct Dyn. 1999 Oct;17(2):175-191(非特許文献5))が挙げられる。

10

## 【手続補正11】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0067

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0067】

本発明の分析キットに使用できる標識物(M)には、蛍光物質、金属コロイド、酵素、核酸、金属、糖、レクチン、ビオチン、ビオチンに結合性を有する物質(ストレプトアビジン、アビジン、ニュートリアビジン)が挙げられる。1種類以上の生物学的物質の分析のための本発明の分析キットにおける第2リガンド又は第3リガンドに結合される1種類以上の標識物(Ml:lは整数)は、各々同一の物質であってもよく、異なる物質であってもよい。

20

## 【手続補正12】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0069

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0069】

また、標識を導入された分析対象物としての1種類以上の生物学的物質を分析する装置として、次の分析装置を構成することができる。即ち、幅1µm-5mm、深さ1µm-750µmの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸(N1g:gは整数)が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質(Ok:kは整数)の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド(L1i:iは整数)と、前記複数種類の固定化第1核酸(N1g:gは整数)の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸(N2h:hは整数)とからなる結合体(N2h-L1i:iとhは独立した整数)を、第1核酸(N1g:gは整数)と第2核酸(N2h:hは整数)との特異的結合性により結合して捕獲ゾーンに種類毎に独立して固定化してなる分析装置である。

30

40

## 【手続補正13】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0089

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0089】

前記六番目の分析キット(即ち、1種類以上の生物学的物質の分析のための、試薬A、試薬B、分析装置からなるキット)を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬A、試薬Bのうち2種以上を予め混合したものを分析装置に導入し、その後残りの

50

種類の材料がある場合には、残りの材料を分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記六番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次の i ) - iv) の要件を含む：

i ) 前記六番目の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . c . の材料の 2 種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること：

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の存在が疑われる液体試料、

b . 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第 1 核酸 (  $N_1 g$  :  $g$  は整数 ) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 (  $N_2 h$  :  $h$  は整数 ) と、1 種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド (  $L_1 i$  :  $i$  は整数 ) とからなる結合体 (  $N_2 h - L_1 i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数 ) を含む試薬 A の溶液；

c . 該生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド (  $L_2 j$  :  $j$  は整数 ) と 1 種類以上の標識物 (  $M_l$  :  $l$  は整数 ) からなる結合体 (  $L_2 j - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数 ) を含む試薬 B ；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第 1 核酸 (  $N_1 g$  :  $g$  は整数 ) と、複数種類の第 2 核酸 (  $N_2 h$  :  $h$  は整数 ) との特異的結合性、複数種類の第 1 リガンド (  $L_1 i$  :  $i$  は整数 ) と 1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) との特異的結合性、及び 1 種類以上の第 2 リガンド (  $L_2 j$  :  $j$  は整数 ) と 1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) との特異的結合性により、種類毎に各々独立して固定化された結合体 (  $N_1 g - N_2 h - L_1 i - O_k - L_2 j - M_l$  :  $g$  、  $h$  、  $i$  、  $j$  、  $k$  、  $l$  は独立した整数 ) を形成すること；

iv) 前記工程で得られた複数種類の固定化結合体 (  $N_1 g - N_2 h - L_1 i - O_k - L_2 j - M_l$  :  $g$  、  $h$  、  $i$  、  $j$  、  $k$  、  $l$  は独立した整数 ) に含まれる 1 種類以上の標識物 (  $M_l$  :  $l$  は整数 ) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) を測定すること。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 9 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 9 0】

前記六番目の分析キット ( 即ち、1 種類以上の生物学的物質の分析のための、試薬 A、試薬 B、分析装置からなるキット ) を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬 A、試薬 B を混合することなく、別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記六番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次の i ) - iv) の要件を含む：

i ) 前記六番目の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . c . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること：

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の存在が疑われる液体試料、

b . 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第 1 核酸 (  $N_1 g$  :  $g$  は整数 ) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 (  $N_2 h$  :  $h$  は整数 ) と、1 種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド (  $L_1 i$  :  $i$  は整数 ) とからなる結合体 (  $N_2 h - L_1 i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数 ) を含む試薬 A の溶液；

c . 該生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の種類毎に対応した特異的結合性を有す

10

20

30

40

50

る1種類以上の第2リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) からなる結合体 ( $L_{2j} - MI$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 B ;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N_{1g}$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N_{2h}$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、及び1種類以上の第2リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - Ok - L_{2j} - MI$  :  $g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) を形成すること ;

iv) 前記工程で得られた複数種類の固定化結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - Ok - L_{2j} - MI$  :  $g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0091

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0091】

前記七番目の分析キット (即ち、1種類以上の生物学的物質の分析のための、試薬 A、試薬 B'、試薬 C、分析装置からなるキット) を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬 A、試薬 B'、試薬 C を予め混合したものを分析装置に導入し、その後残りの種類の材料がある場合には、残りの材料を分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記七番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次の i) - iv) の要件を含む ;

i) 前記七番目の分析キットを用いること ;

ii) 次の a . b . c . 及び d . の材料の内2種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること ;

a . 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N_{1g}$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N_{2h}$  :  $h$  は整数) と、1種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N_{2h} - L_{1i}$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬 A の溶液 ;

c . 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) を含む試薬 B'、及び、

d . 該第2リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) の種類ごとに対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド ( $L_{3m}$  :  $m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L_{3m} - MI$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 C ;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N_{1g}$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N_{2h}$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、1種類以上の第2リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、及び1種類以上の第2リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と1種類以上の第3リガンド ( $L_{3m}$  :  $m$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - Ok - L_{2j} - L_{3m} - MI$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) を形成すること ;

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0092

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0092】

10

前記七番目の分析キット (即ち、1 種類以上の生物学的物質の分析のための、試薬 A、試薬 B'、試薬 C、分析装置からなるキット) を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬 A、試薬 B'、試薬 C を混合することなく、別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記七番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次の i) - iv) の要件を含む：

i) 前記七番目の分析キットを用いること；

ii) 次の a. b. c. 及び d. の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること：

a. 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

20

b. 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第 1 核酸 ( $N1g : g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 ( $N2h : h$  は整数) と、1 種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド ( $L1i : i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬 A の溶液；

c. 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) を含む試薬 B'、及び、

d. 該第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) の種類ごとに対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 3 リガンド ( $L3m : m$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - MI : m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 C；

30

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第 1 核酸 ( $N1g : g$  は整数) と、複数種類の第 2 核酸 ( $N2h : h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第 1 リガンド ( $L1i : i$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性、1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性、及び 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L2j : j$  は整数) と 1 種類以上の第 3 リガンド ( $L3m : m$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) を形成すること；

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - MI : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

40

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

前記八番目の分析キット (即ち、標識物が組み込まれた 1 種類以上の生物学的物質を分

50

析するための分析キット)を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬A、を予め混合したものを分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記八番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次のi) - v)の要件を含む：

- i) 前記八番目の分析キットを用いること；
- ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI$  :  $k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、
- iii) 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の塩基配列に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aと、前記1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI$  :  $k$  と  $l$  は独立した整数) とを、予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；
- iv) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性により、各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) を形成すること；
- v) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

前記八番目の分析キット(即ち、標識物が組み込まれた1種類以上の生物学的物質を分析するための分析キット)を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬A、を混合することなく別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記八番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次のi) - v)の要件を含む：

- i) 前記八番目の分析キットを用いること；
- ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI$  :  $k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、
- iii) 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の塩基配列に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aと、前記1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI$  :  $k$  と  $l$  は独立した整数) とを混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；
- iv) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性により、各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) を形成すること；
- v) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を測定する

ことによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0097】

前記十番目の分析キット(即ち、1種類以上の生物学的物質のための分析キットであって、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合の分析キット)を用いた本発明の一番目の分析方法であり、液体試料、試薬B'、試薬Cのうち2種以上を予め混合したものを分析装置に導入し、その後残りの種類の材料がある場合には、残りの材料を分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記十番目の分析キットを用いた本発明の一番目の分析方法は、次のi) - iv)の要件を含む：

10

i) 前記十番目の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. 及びc.の材料の2種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること：

a. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

20

b. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) を含む試薬B'、

c. 該第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する第3リガンド ( $L3m$  :  $m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $Ml$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - Ml$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬C；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 ( $N1g - N2h - L1i$  :  $g, h, i$  は独立した整数) 中の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、及び第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と第3リガンド ( $L3m$  :  $m$  は整数) との特異的結合性により、固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - Ml$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) を形成すること；

30

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - Ml$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $Ml$  :  $l$  は整数) を測定することによって、生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

前記十番目の分析キット(即ち、1種類以上の生物学的物質のための分析キットであって、試薬の一部、即ち、生物学的物質に特異的結合性を有するリガンドが、分析装置内に固定化されている場合の分析キット)を用いた本発明の二番目の分析方法であり、液体試料、試薬B'、試薬Cを混合することなく別々に分析装置に導入する分析方法である。即ち、前記十番目の分析キットを用いた本発明の二番目の分析方法は、次のi) - iv)の要件を含む：

40

i) 前記十番目の分析キットを用いること；

ii) 次のa. b. 及びc.の材料を混合することなく別々に該分析キットの分析装置

50

の流路に導入すること：

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) を含む試薬  $B'$ 、

c . 該第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する第 3 リガンド ( $L_{3m}$  :  $m$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L_{3m} - M_l$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 C ;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i}$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$  は独立した整数) 中の第 1 リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) と生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、及び第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と第 3 リガンド ( $L_{3m}$  :  $m$  は整数) との特異的結合性により、固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - L_{3m} - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  は独立した整数) を形成すること；

iv) 該固定化結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - L_{3m} - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) を測定することによって、生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正 2 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 3】

また、標識物が導入された分析対象物としての 1 種類以上の生物学的物質を分析する装置として、該分析装置内に試薬が固定されている分析装置を用いた本発明の分析方法は、次の i) - v) の要件を含む：

i) 標識物が導入された分析対象物としての 1 種類以上の生物学的物質を分析する装置として、該分析装置内に試薬が固定されている前記した装置を用意すること；

ii) 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め 1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) を導入してなる 1 種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $O_k - M_l$ 、 $k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、

iii) 該分析装置の流路に、該 1 種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $O_k - M_l$ 、 $k$  と  $l$  は独立した整数) を導入すること；

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第 1 リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) と該 1 種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $O_k - M_l$ 、 $k$  と  $l$  は独立した整数) における 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合により、固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) を形成すること；

v) 該固定化結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 0】

( 1 ) 幅  $1 \mu\text{m} - 5 \text{mm}$ 、深さ  $1 \mu\text{m} - 750 \mu\text{m}$  の断面の溝を有する第 1 部材と、該

10

20

30

40

50

溝を覆うことができる第2部材を用意し、

該溝は第1部材と第2部材を接合したときに流路となる部分であり、該第1部材又は第2部材の何れかに、或いは両方に、流路入口及び流路出口を有し、

(2) 第1部材及び/又は第2部材における流路となることが予定されている部分であって、測定されるべき生物学的物質を捕獲するためのゾーンとなる部分に、任意の塩基配列の核酸(N1)を固定化し、

(3) 次いで、第1部材及び第2部材を熱融着又は接着剤により接合することにより流路を形成した接合体とし、

(4) 該接合体の流路に、捕獲ゾーンに固定化された第1核酸(N1)の塩基配列に少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)と、測定されるべき生物学的物質に特異的結合性を有する第1リガンド(L1)とからなる結合体(N2-L1)を含む試薬Aを導入し、捕獲ゾーンの第1核酸(N1)に該結合体(N2-L1)を特異的結合により結合させて固定化することにより分析装置を得る。

10

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0113】

本発明における分析装置の製造に用いる第1部材及び第2部材の材質は、ガラス、ポリジメチルシロキサン、セラミックス、アクリロニトリル・ブタジエンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリル・エチレンプロピレンゴム・スチレン樹脂、アクリロニトリルスチレン樹脂、メタクリルスチレン樹脂、ポリアミド・ナイロン樹脂、ポリブチレンテレフタレート樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリエチレンテレフタレート・ポリエステル樹脂、ポリイミド樹脂、メタクリル樹脂、ポリアセタール樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリフェニレンエーテル樹脂、ポリフェニレンサルファイド樹脂、ポリスチレン樹脂、熱可塑性エラストマー樹脂、アロイ、液晶ポリマー樹脂、シクロオレフィン樹脂、熱可塑性樹脂、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、ジアリルフタレート樹脂、環状オレフィンコポリマー、及び、これらの部材表面が修飾されたものから選ばれたものが挙げられる。第1部材と第2部材は、同じ材質であっても、異なる材質であってもよい。

20

30

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0114】

本発明の分析装置の製造において、上記の各材質の第1部材及び第2部材の融着温度は、70 - 140 であることが好ましい。70 未満であると融着が十分ではなく、また140 を越えると、これらの部材に直接固定される第1核酸が熱により影響を受けるからである。また、核酸はタンパク質に比べて溶剤に対して失活しないことが知られていることから (Molecular cloning second edition, Sambrook、Fritsch、Maniatis著、ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989, 9.14 9.19 (非特許文献6); Applied Biosystem's DNA Synthesizer model 391 user manual "User Bulletin No.50" (非特許文献7)) である。

40

前記に説明した、分析キット、分析装置、分析方法、分析装置の製造方法において、使用されるリガンドは、測定されるべき生物学的物質に対して特異的結合性を有するものである。例えば、測定されるべき生物学的物質が、抗原である場合にはリガンドは抗体であり、抗体である場合にはリガンドは抗原であり、核酸である場合にはリガンドはプローブ核酸(P r N)である。

50

## 【手続補正 25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0124】

(1) DNAの固定化

5'末端にアミノ基を導入した配列番号1に示したAmino group CGA CGG ATC CCC GGG AAT TC (配列番号1)なる配列を有するオリゴヌクレオチドAを合成し、オリゴヌクレオチドA 8.45 μMとなるように、EDTA 1 mMを含むPBS(-)で希釈した。この溶液を、ジーンスライド(商品名、株式会社日本パーカーライジング製)上に直径1 mmになるようにスポットした。この後、100℃に加熱したホットプレート上で1時間加熱し、オリゴヌクレオチドAを共有結合により固定化した。次いで、2×SSC/0.2% SDSで15分洗浄し、90℃の2×SSC/0.2% SDSで5分洗浄後、滅菌水で洗浄して、乾燥させて、オリゴヌクレオチドA固定化スライドガラスを調製した。

10

## 【手続補正 26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0125

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0125】

(2) 流路の作製および反応1

前記工程(1)で調製したオリゴヌクレオチドAを固定化したオリゴヌクレオチド固定化スライドガラスに、微細流路となる溝(幅:300 μm、高さ、100 μm)が形成されているポリジメチルシロキサン(以下、PDMSと呼ぶ)の平板を、スライドガラス上に固定化したオリゴヌクレオチドA上に流路が設置されるように圧着するように貼り合わせるにより接合して、チップを作製した。チップの内部に形成された流路(幅:300 μm、高さ、100 μm)に、2%BSAおよび1 mM EDTAを含むPBSを15分間送液し、次いで、固定化したオリゴヌクレオチドAと相補的なオリゴヌクレオチドB結合抗HBs抗体(Okuraの方法(J Immunol Methods, 2001 Dec 1;258(12):73-84.)により調製)を500 μg/mLの濃度になるように0.1%BSAおよび1 mM EDTAを含むPBS(以下、0.1%PBS)で希釈したものを15分間送液した。次いで、0.1%PBSで5分間送液することにより洗浄し、50 ng/mLになるように0.1%PBSで調製したHBs抗原を15分間送液した。この後、0.1%PBSで5分間送液して洗浄し、1 μg/mL、10 μg/mL、30 μg/mLあるいは50 μg/mLの濃度に0.1%PBSで調製したCy5標識抗HBs抗体を15分間送液した。すべての反応は、37℃、流速1 μl/minで行った。

30

## 【手続補正 27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0136

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0136】

(2) チップの作製及びブロッキング

前記工程(1)で調製したガラス固定化基板A、ガラス固定化基板B、ガラス固定化基板Cに、微細流路となる溝(幅300 μm、深さ100 μm)が形成されたポリジメチルシロキサン(PDMS)の平板(フルイドウェアテクノロジーズ社製、ストレート型)を、PDMSの粘着性を利用してそれぞれ圧着して、各ガラス固定化基板と平板の間に微細流路(流路幅300 μm、流路深さ100 μm)を形成したチップA、チップB、チップCを作製した(なお、A、B、Cはガラス固定化基板のA、B、Cに対応する)。得

50

られた各チップは、全長が75mmで、幅が25mmの直方体であり、該チップには流路の入口及び出口が末端より5mmの位置に口径1mmで形成され、流路幅300 $\mu$ m、流路深さ100 $\mu$ mの流路が4本、各流路の間隔が7mmで平行に形成されている。次いで、各チップの内部に形成された流路に、1%BSA、1mMEDTAを含むPBSを送液することによりブロッキングを行った。

【手続補正28】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項4】

次の試薬Bと分析装置を組み合わせてなる分析キット：

i) 幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質(O)に対し特異的結合性を有する第1リガンド(L1)と、前記固定化第1核酸(N1)に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)とからなる結合体(N2-L1)を、第1核酸(N1)と第2核酸(N2)との特異的結合により捕獲ゾーンに結合体(N1-N2-L1)の形態で形成して固定化してなる分析装置；及び、

ii) 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)と標識物(M)が結合されてなる結合体(L2-M)を含む試薬B。

【手続補正29】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項5】

次の試薬B'、試薬C及び分析装置を組み合わせてなる分析キット：

i) 幅1 $\mu$ m - 5mm、深さ1 $\mu$ m - 750 $\mu$ mの断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の第1核酸(N1)が固定化された分析装置であって、測定されるべき生物学的物質(O)に対し特異的結合性を有する第1リガンド(L1)と、前記固定化第1核酸(N1)に対し少なくとも相補的塩基配列を有する第2核酸(N2)とからなる結合体(N2-L1)を、第1核酸(N1)と第2核酸(N2)との特異的結合により捕獲ゾーンに結合体(N1-N2-L1)の形態で形成して固定化してなる分析装置；

ii) 測定されるべき生物学的物質(O)に特異的結合性を有する第2リガンド(L2)を含む試薬B'；及び、

iii) 該第2リガンド(L2)に特異的結合性を有する第3リガンド(L3)と、標識物(M)とからなる結合体(L3-M)を含む試薬C。

【手続補正30】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項9】

次の試薬Bと分析装置とを組み合わせてなる分析キット：

10

20

30

40

50

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と、前記複数種類の固定化第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を、第1核酸と第2核酸の特異的結合により捕獲ゾーンに結合体 ( $N1g - N2h - L1i$  :  $g, h$  及び  $i$  は独立した整数) の形態で形成して固定化してなる分析装置; 及び、

10

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質の種類毎に特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $I$  は整数) が結合されてなる結合体 ( $L2j - MI$  :  $j$  と  $I$  は独立した整数) を含む試薬 B。

【手続補正31】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項10

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項10】

20

次の試薬 B' 及び試薬 C と分析装置とを組み合わせる分析キット:

i) 幅  $1\ \mu\text{m} - 5\ \text{mm}$ 、深さ  $1\ \mu\text{m} - 750\ \mu\text{m}$ の断面の溝を有する第1部材と、該溝を覆うことができる第2部材とを接合することにより液体が通過できる流路が形成され、該流路内に設けた第1部材上及び/又は第2部材上の捕獲ゾーンにおいて、第1部材と第2部材の接合前に、任意の塩基配列の複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) が種類毎に各々独立して固定化された分析装置であって、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と、前記複数種類の固定化第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を、第1核酸と第2核酸の特異的結合性により形成して捕獲ゾーンに結合体 ( $N1g - N2h - L1i$  :  $g, h$  及び  $i$  は独立した整数) の形態で各々独立して固定化してなる分析装置;

30

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) を含む試薬 B' ; 及び、

iii) 該1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド ( $L3m$  :  $m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $I$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - MI$  :  $I$  及び  $m$  は整数) を含む試薬 C。

【手続補正32】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項39

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項39】

40

次の i) - iv) の要件を含む分析方法:

i) 請求項6記載の分析キットを用いること;

ii) 次の a . b . c . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること:

a . 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

50

b. 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、1種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aの溶液;

c. 該生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) からなる結合体 ( $L2j - MI$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬B;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、及び1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - MI$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) を形成すること;

iv) 前記工程で得られた複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - MI$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正33】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項40

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項40】

次のi) - iv) の要件を含む分析方法:

i) 請求項7記載の分析キットを用いること;

ii) 次のa. b. c. 及びd. の材料の内2種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること;

a. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b. 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) と、1種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aの溶液;

c. 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) を含む試薬B'、及び、

d. 該第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) の種類ごとに対応した特異的結合性を有する1種類以上の第3リガンド ( $L3m$  :  $m$  は整数) と、1種類以上の標識物 ( $MI$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L3m - MI$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬C;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i$  :  $i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、及び1種類以上の第2リガンド ( $L2j$  :  $j$  は整数) と1種類以上の第3リガンド ( $L3m$  :  $m$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok$

10

20

30

40

50

-  $L 2 j - L 3 m - M l$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) を形成すること ;

iv) 該固定化結合体 ( $N 1 g - N 2 h - L 1 i - O k - L 2 j - L 3 m - M l$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M l$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正 3 4】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 1】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法 :

i) 請求項 7 記載の分析キットを用いること ;

ii) 次の a . b . c . 及び d . の材料を混合せずに別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること :

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第 1 核酸 ( $N 1 g$  :  $g$  は整数) の種類毎に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第 2 核酸 ( $N 2 h$  :  $h$  は整数) と、1 種類以上の被測定生物学的物質の種類毎に対応した特異的結合性を有する複数種類の第 1 リガンド ( $L 1 i$  :  $i$  は整数) とからなる結合体 ( $N 2 h - L 1 i$  :  $h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬 A の溶液 ;

c . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L 2 j$  :  $j$  は整数) を含む試薬 B '、及び、

d . 該第 2 リガンド ( $L 2 j$  :  $j$  は整数) の種類ごとに対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 3 リガンド ( $L 3 m$  :  $m$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M l$  :  $l$  は整数) とからなる結合体 ( $L 3 m - M l$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬 C ;

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第 1 核酸 ( $N 1 g$  :  $g$  は整数) と、複数種類の第 2 核酸 ( $N 2 h$  :  $h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第 1 リガンド ( $L 1 i$  :  $i$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、1 種類以上の第 2 リガンド ( $L 2 j$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) との特異的結合性、及び 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L 2 j$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の第 3 リガンド ( $L 3 m$  :  $m$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に各々独立して固定化された結合体 ( $N 1 g - N 2 h - L 1 i - O k - L 2 j - L 3 m - M l$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) を形成すること ;

iv) 該固定化結合体 ( $N 1 g - N 2 h - L 1 i - O k - L 2 j - L 3 m - M l$  :  $g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M l$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $O k$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正 3 5】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 2】

次の i) - v) の要件を含む分析方法 :

i) 請求項 8 記載の分析キットを用いること ;

10

20

30

40

50

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI : k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、

iii) 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) の塩基配列に対応して少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aと、前記1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI : k$  と  $l$  は独立した整数) とを、予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

10

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI : g, h, i, k, l$  は独立した整数) を形成すること；

v) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI : g, h, i, k, l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

【手続補正36】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

20

【補正対象項目名】請求項43

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項43】

次のi) - v) の要件を含む分析方法：

i) 請求項8記載の分析キットを用いること；

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI : k$  と  $l$  は独立した整数) を調製しておくこと、

iii) 捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化された複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) の塩基配列に対応した少なくとも相補的塩基配列を有する複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) と、測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) に特異的結合性を有する複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) とからなる結合体 ( $N2h - L1i : h$  と  $i$  は独立した整数) を含む試薬Aと、前記1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - MI : k$  と  $l$  は独立した整数) とを混合せずに別々に、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

30

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第1核酸 ( $N1g : g$  は整数) と、複数種類の第2核酸 ( $N2h : h$  は整数) との特異的結合性、複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数) と1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) との特異的結合性により、種類毎に各々独立して固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI : g, h, i, k, l$  は独立した整数) を形成すること；

40

v) 該複数種類の固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - MI : g, h, i, k, l$  は独立した整数) に含まれる1種類以上の標識物 ( $MI : l$  は整数) を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数) を測定すること。

【手続補正37】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項44

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項44】

50

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 請求項 9 記載の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) が直接的に結合されてなる結合体 ( $L_{2j} - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬；

10

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i}$  :  $g, h, i$  は独立した整数) 中の複数の第 1 リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、及び試薬中の結合体 ( $L_{2j} - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) の 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合により、種類毎に 各々独立して固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - M_l$  :  $g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) を形成すること；

iv) 該複数種類の固定化結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - M_l$  :  $g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) を測定すること。

20

【手続補正 38】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 5】

次の i) - iv) の要件を含む分析方法：

i) 請求項 9 記載の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . の材料を混合せずに別々に、該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

30

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と、1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) が結合されてなる結合体 ( $L_{2j} - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) を含む試薬；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i}$  :  $g, h, i$  は独立した整数) 中の複数の第 1 リガンド ( $L_{1i}$  :  $i$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合性、及び試薬中の結合体 ( $L_{2j} - M_l$  :  $j$  と  $l$  は独立した整数) の 1 種類以上の第 2 リガンド ( $L_{2j}$  :  $j$  は整数) と 1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) の特異的結合により、種類毎に 各々独立して固定化された結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - M_l$  :  $g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) を形成すること；

40

iv) 該複数種類の固定化結合体 ( $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - M_l$  :  $g, h, i, j, k, l$  は独立した整数) に含まれる 1 種類以上の標識物 ( $M_l$  :  $l$  は整数) を測定することによって、1 種類以上の生物学的物質 ( $O_k$  :  $k$  は整数) を測定すること。

【手続補正 39】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

50

【補正対象項目名】請求項 4 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 6】

次の i ) - iv) の要件を含む分析方法：

i ) 請求項 1 0 記載の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . 及び c . の材料の 2 種以上の材料を予め混合して複合体を形成した後、あるいは形成させながら、該分析キットの分析装置の流路に導入し、その後、残りの種類の材料がある場合には、更に該材料を該流路に導入すること；

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド (  $L_{2j}$  :  $j$  は整数 ) を含む試薬  $B'$ 、

c . 該第 2 リガンド (  $L_{2j}$  :  $j$  は整数 ) の種類毎に対応した特異的結合性を有する第 3 リガンド (  $L_{3m}$  :  $m$  は整数 ) と、 1 種類以上の標識物 (  $M_l$  :  $l$  は整数 ) とからなる結合体 (  $L_{3m} - M_l$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数 ) を含む試薬 C ；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 (  $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i}$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$  は独立した整数 ) 中の第 1 リガンド (  $L_{1i}$  :  $i$  は整数 ) と生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の特異的結合性、第 2 リガンド (  $L_{2j}$  :  $j$  は整数 ) と生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の特異的結合性、及び第 2 リガンド (  $L_{2j}$  :  $j$  は整数 ) と第 3 リガンド (  $L_{3m}$  :  $m$  は整数 ) との特異的結合性により、固定化された結合体 (  $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - L_{3m} - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  は独立した整数 ) を形成すること；

iv) 該固定化結合体 (  $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i} - O_k - L_{2j} - L_{3m} - M_l$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  は独立した整数 ) に含まれる 1 種類以上の標識物 (  $M_l$  :  $l$  は整数 ) を測定することによって、生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) を測定すること。

【手続補正 4 0】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 4 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 4 7】

次の i ) - iv) の要件を含む分析方法：

i ) 請求項 1 0 の分析キットを用いること；

ii) 次の a . b . 及び c . の材料を混合することなく別々に該分析キットの分析装置の流路に導入すること；

a . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の存在が疑われる液体試料、

b . 測定されるべき 1 種類以上の生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の種類毎に対応した特異的結合性を有する 1 種類以上の第 2 リガンド (  $L_{2j}$  :  $j$  は整数 ) を含む試薬  $B'$ 、

c . 該第 2 リガンド (  $L_{2j}$  :  $j$  は整数 ) の種類毎に対応した特異的結合性を有する第 3 リガンド (  $L_{3m}$  :  $m$  は整数 ) と、 1 種類以上の標識物 (  $M_l$  :  $l$  は整数 ) とからなる結合体 (  $L_{3m} - M_l$  :  $m$  と  $l$  は独立した整数 ) を含む試薬 C ；

iii) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている結合体 (  $N_{1g} - N_{2h} - L_{1i}$  :  $g$ 、 $h$ 、 $i$  は独立した整数 ) 中の第 1 リガンド (  $L_{1i}$  :  $i$  は整数 ) と生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の特異的結合性、第 2 リガンド (  $L_{2j}$  :  $j$  は整数 ) と生物学的物質 (  $O_k$  :  $k$  は整数 ) の特異的結合性、及び第 2 リガンド (  $L_{2j}$  :  $j$  は整数 ) と第 3 リガンド (  $L_{3m}$  :  $m$  は整数 ) との特異的結合性により、固定化された結合体

10

20

30

40

50

( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数)を形成すること；

iv) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - L2j - L3m - M1 : g, h, i, j, k, l, m$  は独立した整数)に含まれる1種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数)を測定することによって、生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)を測定すること。

【手続補正41】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項49

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項49】

次のi) - v)の要件を含む分析方法：

i) 請求項19記載の分析装置を用いること；

ii) 測定されるべき1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)の存在が疑われる液体試料から、予め1種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数)を導入してなる1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - M1, k$  と  $l$  は独立した整数)を調製しておくこと、

iii) 該分析装置の流路に、該1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - M1, k$  と  $l$  は独立した整数)を導入すること；

iv) 分析装置の捕獲ゾーンに種類毎に各々独立して固定化されている複数種類の第1リガンド ( $L1i : i$  は整数)と該1種類以上の標識物導入生物学的物質 ( $Ok - M1, k$  と  $l$  は独立した整数)における1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)の特異的結合により、固定化された結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - M1 : g, h, i, k, l$  は独立した整数)を形成すること；

v) 該固定化結合体 ( $N1g - N2h - L1i - Ok - M1 : g, h, i, k, l$  は独立した整数)に含まれる1種類以上の標識物 ( $M1 : l$  は整数)を測定することによって、1種類以上の生物学的物質 ( $Ok : k$  は整数)を測定すること。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/004953
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/53, G01N37/00  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/53, G01N37/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-156493 A (MULTILYTE LTD.), 30 May, 2003 (30.05.03), Claims; Par. Nos. [0026], [0027] & WO 1995/024649 A1 & EP 0749581 A & US 2002/0182617 A1	1-57
Y	JP 2003-522963 A (ACLARA BIOSCIENCES INC.), 29 July, 2003 (29.07.03), Claims; Par. Nos. [0008], [0039], [0040] & WO 2001/061041 A2 & US 2002/0058329 A1 & EP 1259324 A	1-57
Y	JP 04-273065 A (Hitachi, Ltd.), 29 September, 1992 (29.09.92), & EP 0488152 A	1-57
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 April, 2005 (15.04.05)		Date of mailing of the international search report 10 May, 2005 (10.05.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004953

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-221485 A (Minolta Co., Ltd.), 09 August, 2002 (09.08.02), & US 2002/0064800 A1	1-57
Y	JP 10-504962 A (Beckman Instruments, Inc.), 19 May, 1998 (19.05.98), & WO 1996/006948 A1 & US 5648213 A & EP 0779934 A	1-57
A	JP 04-204379 A (Hitachi, Ltd.), 24 July, 1992 (24.07.92), & EP 0488152 A3	1-57
A	JP 07-118291 A (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 09 May, 1995 (09.05.95), (Family: none)	1-57
A	JP 2002-214241 A (Minolta Co., Ltd.), 31 July, 2002 (31.07.02), & US 2002/0064483 A1	1-57

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2005/004953									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>7</sup> G01N 33/53, G01N37/00											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>7</sup> G01N 33/53, G01N 37/00											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2005年										
日本国実用新案登録公報	1996-2005年										
日本国登録実用新案公報	1994-2005年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
Y	JP 2003-156493A (マルティライト リミテッド) 2003.05.30 【特許請求の範囲】、【0026】、【0027】 & WO 1995/024649 A1 & EP 0749581 A & US 2002/0182617 A1	1-57									
Y	JP 2003-522963A (アクララ バイオサイエンシーズ、インコーポ レイテッド) 2003.07.29 【特許請求の範囲】、【0008】、【003 9】、【0040】 & WO 2001/061041 A2 & US 2002/0058329 A1 & EP 1259324 A	1-57									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 22.06.2005		国際調査報告の発送日 10.5.2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区段が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3496								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2005/004953
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 04-273065 A (株式会社日立製作所) 1992.09.29 & EP 0488152 A	1-57
Y	JP 2002-221485 A (ミノルタ株式会社) 2002.08.09 & US 2002/0064800 A1	1-57
Y	JP 10-504962 A (ベックマン インストルメンツ インコーポレ ーテッド) 1998.05.19 & WO 1996/006948 A1 & US 5648213 A & EP 0779934 A	1-57
A	JP 04-204379 A (株式会社日立製作所) 1992.07.24 & EP 0488152 A3	1-57
A	JP 07-118291 A (日水製薬株式会社) 1995.05.09 (ファミリーなし)	1-57
A	JP 2002-214241 A (ミノルタ株式会社) 2002.07.31 & US 2002/0064483 A1	1-57

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 35/08 A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),  
EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,  
CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,  
CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,L  
U,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT  
,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . S E L F O C

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	生物物质分析试剂盒，分析仪器和分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2005090972A1</a>	公开(公告)日	2008-02-07
申请号	JP2006511242	申请日	2005-03-18
申请(专利权)人(译)	日水制药有限公司		
[标]发明人	奥裕一 赤羽修一		
发明人	奥裕一 赤羽修一		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 G01N35/08 B01L3/00		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L2300/0636 B01L2300/0816 B01L2300/0864		
FI分类号	G01N33/543.525.E G01N33/53.M G01N37/00.101 G01N37/00.102 G01N33/543.525.U G01N35/08.A		
F-TERM分类号	2G058/DA07		
优先权	2004078394 2004-03-18 JP		
其他公开文献	JP4850061B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

即使在分析仪的制造过程中存在热负荷或粘合剂中所含的有机化合物的影响，也没有诸如失活之类的影响，此外，在成为微通道的流动通道的部分中存在免疫物质等。提供了一种能够容易地固定的分析仪 分析试剂盒是分析设备和试剂的组合。分析试剂盒中使用的分析装置1属于所谓的微流体系统，适用于分析极少量的液体样品，其中形成了宽度为1 $\mu$ m-5mm且深度为1 $\mu$ m-750 $\mu$ m的通道2。是的，适合分析生物物质。在分析套件中使用的分析器1在第一构件5或第二构件6中的流路2中具有宽度为5mm或更小的凹槽，并且当两个构件接合时成为流路2。核酸结合到其中的一部分（捕获区7），这两个成员相连。由于试剂是在将分析仪1的两个部件连接在一起后才使用的，因此不受熔融或粘合剂的影响。