

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4812223号
(P4812223)

(45) 発行日 平成23年11月9日(2011.11.9)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 2
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 21/76

請求項の数 51 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2002-501026 (P2002-501026)	(73) 特許権者	504109610
(86) (22) 出願日	平成13年5月25日 (2001.5.25)		バイエル・テクノロジー・サービシーズ・
(65) 公表番号	特表2004-510130 (P2004-510130A)		ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテ
(43) 公表日	平成16年4月2日 (2004.4.2)		ル・ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/005995		Bayer Technology Se
(87) 国際公開番号	W02001/092870		r v i c e s G m b H
(87) 国際公開日	平成13年12月6日 (2001.12.6)		ドイツ連邦共和国51368レーフェルク
審査請求日	平成20年5月20日 (2008.5.20)		ーゼン
(31) 優先権主張番号	2000 1104/00	(74) 代理人	100078662
(32) 優先日	平成12年6月2日 (2000.6.2)		弁理士 津国 肇
(33) 優先権主張国	スイス(CH)	(74) 代理人	100131808
			弁理士 柳橋 泰雄
		(72) 発明者	パウラク, ミヒャエル
			ドイツ国、79275 ローフェンブルク
			、アンデルスバッハシュトラッセ 5
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多分析対象物測定のためのキット及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

多種の分析対象物の同時定性測定及び/又は定量測定のためのキットであって、
 少なくとも一つの励起波長で透明な層(a)を、少なくとも前記励起波長で同じく透明である、層(a)よりも低い屈折率の層(b)の上に有し、かつ、前記励起光を層(a)に内結合するための、前記層(a)中で変調される少なくとも一つの格子構造(c)を有する光学薄膜導波路を含むセンサプラットフォームと、
 前記分析対象物の特異的認識及び/又は結合のための、及び/又は前記分析対象物との特異的相互作用のための、別個の計測区域(d)に直接又は層(a)上の付着促進層を介して固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素の少なくとも一つのアレイであって、アレイが、分析対象物測定のための一以上の分析区域と、参照のための計測区域と、のセグメントに配置されている、アレイと、

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段であって、参照のための二以上の同一の計測区域が、層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に対して平行な計測区域のアレイ又はセグメント内に配置されている、手段と、を含み、

前記分析対象物に関して分析される液体試料が、前記センサプラットフォーム上の前記計測区域と直接又はさらなる試薬との混合ののち接触させられるキット。

【請求項2】

キットが、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として、層(a)の近接場で生成される一以上のルミネセンスの校正のた

め的手段をさらに含み、

較正のための手段が、既知の濃度で試料に加えられる分析対象物の測定のために、生物学的又は生化学的又は合成認識要素が供給される一以上の計測区域を含む、請求項 1 記載のキット。

【請求項 3】

異なる分析対象物を検出するための別個の計測区域で異なる計測区域上に固定化された認識要素の密度が、共通のアレイでの異なる分析対象物の測定により、ルミネセンス信号が同程度の大きさになることにより、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線を光電子システムの調節の変更なしに記録することができるような方法で選択される、請求項 1 ~ 2 のいずれか記載のキット。

10

【請求項 4】

一以上のアレイが、分析対象物測定又は参照のための、前記セグメント内で同様である生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有する二以上の計測区域のセグメントを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか記載のキット。

【請求項 5】

アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイが、共通の群の分析対象物の測定のために設けられている、請求項 1 ~ 4 のいずれか記載のキット。

【請求項 6】

同じ分析対象物のためにセグメント又はアレイの一以上の計測区域が設けられ、かつ、関連した固定化された生物学的又は生化学的認識要素が前記分析対象物に対して異なる親和力を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか記載のキット。

20

【請求項 7】

アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイが、異なる群の分析対象物の測定のために設けられている、請求項 1 ~ 6 のいずれか記載のキット。

【請求項 8】

二以上のアレイが、前記アレイ上の類似した分析対象物の測定のために、計測区域及び/又は計測区域のセグメントの同様な幾何学配列を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載のキット。

【請求項 9】

二以上のアレイが、前記アレイ上の類似した分析対象物の測定のために、計測区域及び/又は計測区域のセグメントの異なる幾何学配列を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか記載のキット。

30

【請求項 10】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、試料の供給の前にすでにこれらの計測区域に被着されている分子であって、事前に固定化されたルミネセンス標識された分子を有するルミネセンスマーカスポットによって実施される、請求項 1 ~ 9 のいずれか記載のキット。

【請求項 11】

ルミネセンスマーカスポットが、センサプラットフォーム全体に及ぶスクリーンとして設けられている、請求項 10 記載のキット。

40

【請求項 12】

ルミネセンスマーカスポット内のルミネセンス標識された分子の密度が、固定化のための同様な、ただし標識されていない分子との混合により、ルミネセンスマーカスポットの領域からのルミネセンス強さが分析対象物測定に専用の計測区域からのルミネセンス強さと同程度の大きさになるような方法で選択される、請求項 10 ~ 11 のいずれか記載のキット。

【請求項 13】

ルミネセンスマーカスポット内のルミネセンス標識された分子の密度及び濃度が、アレイ内で均一であり、好ましくはセンサプラットフォーム全体で均一である、請求項 10 ~ 12 のいずれか記載のキット。

50

【請求項 14】

種々のルミネセンスマーカスポットの間の距離及び/又はサイズが、別個の計測区域からのルミネセンス強さの測定の所望の局所分解度に適合されている、請求項 10 ~ 13 のいずれか記載のキット。

【請求項 15】

センサプラットフォーム上の各アレイが、少なくとも一つのルミネセンスマーカスポットを含む、請求項 10 ~ 14 のいずれか記載のキット。

【請求項 16】

少なくとも一つのルミネセンスマーカスポットが、分析対象物測定のための計測区域の各セグメントに隣接して設けられている、請求項 10 ~ 15 のいずれか記載のキット。

10

【請求項 17】

各アレイが、前記アレイの領域で内結合される励起光の二次元分布の測定のために、内結合される励起光の伝播方向に対して平行及び/又は垂直なルミネセンスマーカスポットの連続した行及び/又は列を含む、請求項 10 ~ 16 のいずれか記載のキット。

【請求項 18】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、多数の局所分解参照信号の平均値の測定を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか記載のキット。

【請求項 19】

一以上の分析対象物の結合又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層 (a) の近接場で生成される一以上のルミネセンスを校正するための手段が、測定される分析対象物の既知の濃度を有する校正溶液を所定数のアレイに塗布することを含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか記載のキット。

20

【請求項 20】

センサプラットフォームの 8 ~ 12 個のアレイが、校正のために専用にて当てられている、請求項 19 記載のキット。

【請求項 21】

異なる制御された密度で固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有するいくつかの計測区域が、これらの計測区域に共通である分析対象物の測定のために、一以上のアレイに常に設けられている、請求項 1 ~ 20 のいずれか記載のキット。

【請求項 22】

分析対象物の校正曲線が、種々の制御された密度の十分に大きな差でアレイの種々の計測区域に固定化された、前記分析対象物の生物学的又は生化学的又は合成認識要素を含むアレイに一つの校正溶液を塗布することにより、すでに確立することができ、前記分析対象物と前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素との結合を示す信号の濃度依存性が既知である、請求項 21 記載のキット。

30

【請求項 23】

一以上のアレイが、校正のために、既知の濃度で試料に加えられる分析対象物の測定に専用の一以上の計測区域を含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか記載のキット。

【請求項 24】

少なくとも一つの励起光源と、
請求項 1 ~ 23 のいずれか記載のキットと、
センサプラットフォーム上の一以上の計測区域 (d) から発せられる光を検出するための少なくとも一つの検出器と
を含む、一以上のルミネセンスを測定するための分析システム。

40

【請求項 25】

請求項 1 ~ 23 のいずれか記載のキット及び/又は請求項 24 記載の分析システムを使用する多種の分析対象物の同時定性測定及び/又は定量測定の方法であって、前記分析対象物に関して分析される一以上の液体試料を、前記キットの一部としてのセンサプラットフォームの計測区域と接触させ、前記計測区域で利用可能な励起光強さを局所分解的な方法で参照する、方法。

50

【請求項 26】

一以上の前記試料と接触させた計測区域から層(a)の近接場で生成され、前記計測区域に固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素に対する一以上の分析対象物の結合から、又は前記分析対象物と前記固定化された認識要素との相互作用から生じる一以上のルミネセンスを較正する、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

アレイの一以上のセグメントの上で又は一以上のアレイの上で、共通の群の種々の分析対象物を同時に測定する、請求項25～26のいずれか記載の方法。

【請求項 28】

種々の群の種々の分析対象物を、アレイの一以上のセグメントの上で又は一以上のアレイの上で同時に測定する、請求項25～27のいずれか記載の方法。

10

【請求項 29】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、センサプラットフォームから励起波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項25～28のいずれか記載の方法。

【請求項 30】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、ルミネセンスの励起に使用されるもう一つの励起波長でセンサプラットフォームから発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項25～29のいずれか記載の方法。

【請求項 31】

局所分解参照のための励起波長を、一以上の分析対象物の検出のための又は参照もしくは較正のための検定の間、ルミネセンスが可能でありかつ被着される分子が、前記波長で吸収を有しないか、又はできるだけ低い吸収しか示さないような方法で選択する、請求項30記載の方法。

20

【請求項 32】

センサプラットフォームから発せられる励起光の像の生成を、計測区域から発せられるルミネセンスの集光の場合と同じ光路を使用して実施する、請求項29～31のいずれか記載の方法。

【請求項 33】

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、センサプラットフォームからルミネセンス波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含む、請求項25～32のいずれか記載の方法。

30

【請求項 34】

一以上の試料を、前記試料中で測定される分析対象物を測定するための種々のトレーサ試薬の混合物でプレインキュベートしたのち、これらの混合物を単一の供給工程で対応する専用アレイと接触させる、請求項25～33のいずれか記載の方法。

【請求項 35】

トレーサ試薬の濃度を、ルミネセンス信号が同程度の大きさになるような方法で、共通のアレイにおける種々の分析対象物の測定により、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線が光電子システムの調節なしで記録することができるような方法で選択する、請求項25～34のいずれか記載の方法。

40

【請求項 36】

一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近接場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、センサプラットフォームの一以上の専用計測区域での分析のために、既知の濃度の分析対象物を、分析される一以上の試料に添加することを含む、請求項25～35のいずれか記載の方法。

【請求項 37】

一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近接場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、未知の試料及び対照試料を塗布したのちのルミネセンス強さの比較を含む、請求項25～36のいずれ

50

か記載の方法。

【請求項 38】

未知の試料及び対照試料を異なるアレイに塗布する、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

未知の試料及び対照試料を同じアレイに順に塗布する、請求項 37 記載の方法。

【請求項 40】

未知の試料と対照試料とを混合したのち、その混合物をセンサプラットフォームの一以上のアレイに塗布する、請求項 37 記載の方法。

【請求項 41】

未知の試料及び対照試料で測定される分析対象物の検出を、未知の試料及び対照試料のための異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有するルミネセンス標識を使用して実施する、請求項 37 ~ 40 のいずれか記載の方法。

10

【請求項 42】

種々の群の分析対象物の測定を、異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用して実施する、請求項 25 ~ 41 のいずれか記載の方法。

【請求項 43】

異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用して測定を実施する、請求項 25 ~ 41 のいずれか記載の方法。

【請求項 44】

分析対象物の較正曲線を、種々の制御された密度の十分に大きな差でアレイの種々の計測区域に固定化された、前記分析対象物の生物学的又は生化学的又は合成認識要素を含むアレイに単一の較正溶液を塗布することにより、確立し、前記分析対象物と前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素との結合を示す信号の濃度依存性が既知である、請求項 25 ~ 43 のいずれか記載の方法。

20

【請求項 45】

一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層 (a) の近接場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、本質的に一定の濃度の一連の試料中の一以上の分析対象物の存在によって生じるルミネセンス強さの測定を含む、請求項 25 ~ 44 のいずれか記載の方法。

【請求項 46】

抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくはヒスチジンタグ成分、オリゴヌクレオチド、DNA もしくは RNA スtrand、DNA もしくは RNA 類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害薬、レクチン及び炭水化物を含む群の一以上の分析対象物の同時又は順次の定量測定又は定性測定のための、請求項 25 ~ 45 のいずれか記載の方法。

30

【請求項 47】

試験される試料が、天然の体液又は卵黄又は光学的に濁った液体又は組織流体又は表面水又は土壌又は植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであるか、又は、生物学的組織部分又は細胞培養物もしくは細胞抽出物から採取されるものである、請求項 25 ~ 46 のいずれか記載の方法。

40

【請求項 48】

天然の体液が、血液、血清、血漿、リンパ液又は尿である、請求項 47 記載の方法。

【請求項 49】

薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定、アフィニティースクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定、分析対象物の定性及び定量測定、毒性発生研究ならびに遺伝子及びタンパク質発現プロファイルの測定ならびに医薬品研究開発、ヒト及び獣医診断学、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの測定、症候性及び前症候性植物診断学、医薬品開発における患者層別化及び治療薬選択、食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌の測定のた

50

めの、定量又は定性分析のための、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか記載のキット及び / 又は請求項 2 4 記載の分析システム及び / 又は請求項 2 5 ~ 4 8 のいずれか記載の方法の使用。

【請求項 5 0】

分析対象物の定性及び定量測定が、DNA 及び RNA 分析学のための分析対象物の定性及び定量測定である、請求項 4 9 記載のキット及び / 又は分析システム及び / 又は方法の使用。

【請求項 5 1】

細菌が、サルモネラ、プリオン及びバクテリアの細菌である、請求項 4 9 記載のキット及び / 又は分析システム及び / 又は方法の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本発明は、多種の分析対象物の同時定性及び定量のためのキットの種々の実施態様に関する。本発明はまた、本発明によるキットに基づく分析システム及びそれを使用して実施される一以上の分析対象物の測定の方法ならびにその使用に関する。

【0002】

多種の分析対象物の測定のためには、現在、種々の分析対象物の測定をいわゆるマイクロタイタプレートの別個の試料区画又は「ウェル」の中で実施するような方法が主に使用されている。もっとも一般的なものは、通常は約 8 cm x 1 2 cm のフットプリント上で 8 x 1 2 ウェルのピッチ（行及び列としての幾何学配列）を有し、単一のウェルを充填するのに約 1 0 0 マイクロリットルの量を必要とするプレートである。しかし、多くの用途にとっ

20

【0003】

米国特許第 5 , 7 4 7 , 2 7 4 号では、少なくとも 3 種の梗塞マーカのいくつかの測定によって心筋梗塞を早期認識するための計測構造及び方法が記載されている。これらのマーカの測定は、個々の試料区画中で又は共通の試料区画中で実施することができ、後者の場合の開示によると、単一の（共通の）試料区画が連続流路として設けられ、この一つの境界がたとえば膜によって形成され、この膜に 3 種の異なるマーカに対する抗体が固定化される。しかし、このタイプのいくつかの試料区画又は流路を共通の支持体上に配置するという示唆はない。さらに、計測区域のサイズに関して幾何学的情報がない。

30

【0004】

WO 8 4 / 0 1 0 3 1、米国特許第 5 , 8 0 7 , 7 5 5 号、米国特許第 5 , 8 3 7 , 5 5 1 号及び米国特許第 5 , 4 3 2 , 0 9 9 号には、分析対象物に特異的な認識要素を、部分的に 1 mm² を有意に下回る小さな「スポット」の形で、固体支持体に固定化することが提案されている。この固定化形状の目的は、存在する分析対象物分子の小さな部分だけと結合することにより、インキュベーション時間だけに依存し、試料の絶対量には本質的に依存しない（連続流が存在しない）方法で分析対象物の濃度の測定を実施できることである。関連する例で開示された計測構造は、従来のマイクロタイタプレートにおける蛍光計測による測定に基づく。また、それに関して、蛍光標識された 3 種までの異なる抗体のスポットが共通のマイクロタイタプレートウェルで計測される構造が記載されている。これら

40

【0005】

近年、より低い検出限界を達成するため、分析対象物の測定が、光学導波路中を誘導される光に関連する減衰フィールドとの相互作用に基づく多くの計測構造であって、分析対象物分子の特異的認識及び結合のための生化学的又は生物学的認識要素が導波路の表面に固定化されている多くの計測構造が開発された。

【0006】

光波が、光学的により希薄な媒体、すなわちより低い屈折率の媒体によって包囲された平

50

面薄膜導波路に結合すると、その光波は、導波層の界面における全反射によって誘導される。このような構造では、電磁エネルギーの一部が低屈折率媒体に浸透する。この一部がエバネッセント（減衰）フィールドと呼ばれる。減衰フィールドの強さは、導波層そのものの厚さと、導波層の屈折率及びそれを包囲する媒体の屈折率との比と、に非常に大きく依存する。薄い導波路の場合、すなわち、誘導される光の波長と同じ層厚さ又はそれよりも小さい層厚さの場合、誘導される光の別個のモードを区別することができる。このような方法の利点として、分析対象物との相互作用は、隣接媒体中への減衰フィールドの浸透深さ（約100ナノメートル程度）に限られ、（バルク）媒体の深さからの干渉信号をおおむね避けることができる。最初に提案されたこのタイプの計測構造は、約100マイクロメートルから数ミリメートルまでの厚さを有し、高マルチモードで自立性の単層導波路、たとえば透明なプラスチック又はガラスのファイバ又はプレートに基づくものであった。

10

【0007】

感度を改善すると同時に大量生産で製造しやすくするために、平面薄膜導波路が提案されている。もっとも簡単なケースでは、平面薄膜導波路は、支持材料（基板）と、導波層と、スーパストレート（及び分析する試料）との三層システムからなり、導波層が最高の屈折率を有している。さらなる中間層が平面導波路の動作をさらに改善することができる。

【0008】

励起光を平面導波路に内結合する方法がいくつか公知である。もっとも初期に使用された方法は、エアギャップによる反射を減らすため、一般には液体がプリズムと導波路との間に導入される、前面結合又はプリズム結合に基づくものであった。これら二つの方法は、主に、比較的大きな層厚さの導波路、すなわち、特に自立性の導波路について、及び屈折率が2よりも有意に小さい導波路について適している。しかし、高い屈折率の非常に薄い導波層に励起光を内結合させるためには、結合格子の使用が、有意には、より洗練された方法である。

20

【0009】

本出願では、「ルミネセンス」とは、光学的又は光学的以外の励起ののち、たとえば電氣的又は化学的又は生化学的又は熱的な励起ののちの、紫外線から赤外線までの範囲の光子の自発的放出をいう。たとえば、ケミルミネセンス、バイオルミネセンス、エレクトロルミネセンス、特に蛍光及びリン光が共通に「ルミネセンス」の下で含まれる。

30

【0010】

より低い検出限界を達成するためには、より高い信号生成の選択性のため、有効屈折率の変化に基づく方法（たとえば格子カプラセンサ又は表面プラズモン共鳴に基づく方法）よりもルミネセンスベースの方法が適当であると思われる。

【0011】

この構造では、ルミネセンス励起は、より低い屈折率の媒体への減衰フィールドの浸透深さに、すなわち、媒体への浸透深さが約100ナノメートル程度であるとき、導波区域に近接する区域に限られる。この原理は減衰ルミネセンス励起と呼ばれている。

【0012】

近年、透明な支持材上のわずか100ナノメートルほどの薄い導波膜に基づく屈折率の高い薄膜導波路により、感度を大幅に高めることができた。たとえばW095/33197には、回折光学要素としてのレリーフ格子によって励起光を導波膜中に結合する方法が記載されている。センサプラットフォームの表面を、分析対象物を含有する試料と接触させ、減衰フィールドの浸透深さ内に位置し、ルミネセンスが可能な物質から等方的に発せられるルミネセンスを、適切な計測構造、たとえばフォトダイオード、光電子増倍管又はCCDカメラによって計測する。また、減衰的に励起された放射線のうち、導波路中に逆結合した部分を、格子のような回折光学要素によって外結合し、計測することができる。この方法は、たとえばW095/33198に記載されている。

40

【0013】

現在の技術水準として特に明細書W095/33197及びW095/33198に記載

50

されている、減衰的に励起されるルミネセンスを検出する方法すべての欠点は、センサプラットフォームの、均質な膜として形成された導波層上で常に一つの試料しか分析することができないことである。同じセンサプラットフォーム上でさらなる計測を実施するためには、退屈な洗浄又は清浄工程が絶え間なく求められる。これは、初めの計測の分析対象物とは異なる分析対象物を測定しなければならない場合、特に当てはまる。免疫分析の場合、これは一般に、センサプラットフォームの固定化層をまるごと交換しなければならないか、全く新たなセンサプラットフォームを使用しなければならないことを意味する。したがって、多種の分析対象物の特に同時測定を実施することはできない。

【0014】

たとえば、明細書W096/35940には、本質的に単モードの平面無機導波路を用いて同時又は順次にルミネセンススペースの多数の計測を独占的に実施するため、励起光が別々に投射される少なくとも二つの別個の導波区域が一つのセンサプラットフォーム上に設けられる構造(アレイ)が提案されている。しかし、センサプラットフォームを別個の導波区域に分割することから生じる欠点は、共通のセンサプラットフォーム上の別個の導波領域における別個の計測区域のための比較的大きな空間を必要とすることであり、この理由のため、ここでもまた、比較的低密度の種々の計測区域(又はいわゆる「フィーチャ」)しか達成することができない。

【0015】

本発明の本質による「局所的(又は横方向もしくは空間的)に分けられた計測区域」又は「別個の計測区域」なる言い回しの使用は、本発明の後の部分でさらに正確に定義する。

【0016】

W098/22799には、平面導波路の減衰フィールドで励起されるルミネセンスを測定するための計測構造の試料区画の設計のための多数の他の構造の他に、公知のマイクロタイタプレートの形を有する構造も提案されている。しかし、単一の試料区画内に固定化された種々の認識要素への結合による多種の分析対象物の測定は、この開示でも扱われていない。

【0017】

米国特許第5,525,466号及び第5,738,992号には、自立型マルチモード導波路、好ましくは光ファイバタイプ導波路の減衰フィールドにおける蛍光励起に基づく光学センサが記載されている。励起光の内結合とマルチモード導波路に逆結合された蛍光の外結合とは、遠位端内結合及び外結合によって実施される。このようなマルチモード導波路の作動原理により、それによって検出される分析対象物測定のための蛍光信号が、試料と相互作用する全面の単一の積分値として得られる。主に信号の正規化のため、たとえば、信号に影響を及ぼす表面欠陥を考慮に入れるため、測定される分析対象物の特異的認識及び結合のための生化学的又は生物学的又は合成認識要素の他に、蛍光参照化合物がセンサ表面に同時に固定化される。しかし、基本的なセンサ原理により、局所的に分解されないが単一の積分計測値に影響する正規化が可能である。結果として、種々の分析対象物の測定は、異なる励起波長を有する標識を使用するか、前に結合した分析対象物を除去したのち順に計測することによってしか実施することができない。上記理由のため、これらの構造は、前記の参照法とともに、多種の分析対象物の同時測定に適しているとは言い難いが、適しているとは思えない。

【0018】

米国特許第5,631,170号及び欧州特許出願093,613には、特に光学導波路の減衰フィールドにおける蛍光励起に基づくセンサのための種々の参照方法が論じられている。欧州特許出願093,613には、「計測区域」に隣接する領域で参照する方法が記載されている。特に、この開示では、センサプラットフォーム上の同じ領域からの参照及び(分析対象物)計測信号を使用する必要性が強調されている。可能な実施態様として、動力学的(時間分解)計測が挙げられている。理由は、分析対象物結合の動力学は、物理的な導波路パラメータ及び局所的に信号に影響する可能性のある欠陥に依存しないからである。しかし、動力学的方法の欠点として、外部パラメータの依存、たとえば個々の試

10

20

30

40

50

料の温度及び粘度への依存が記載されている。米国特許第5,631,170号には、分析対象物濃度から独立した単一の参照信号を生成し、共に固定化されたフルオロフォアによる参照が記載されている。分析対象物結合のための特異的認識要素及び参照のための共に固定化されたフルオロフォアは、センサプラットフォーム上に統計学的混合物として設けられることが好ましい。さらには、同時較正の方法が、「毛細管充填装置」(CFD)の例で、(たとえば競合免疫分析で)試料に加えて既知の量の分析対象物がCFDの局所領域に塗布される、たとえばこれらの加えられる既知の量の分析対象物をこの目的に専用の試薬区画(たとえばセンサ表面から反対側に位置する)からの試料の塗布によって溶解させることによって塗布される用途として提示されている。

【0019】

国際特許出願WO97/35181には、導波路中に形成された「ウェル」の中に(すなわち、前記導波路の表面に)種々の認識要素を有するパッチを被着させ、それらを、一以上の分析対象物を含有する試料溶液と接触させる、一以上の分析対象物の同時測定の方法が記載されている。較正のためには、並行して、所定の分析対象物濃度の溶液を、同様なパッチを有するさらなるウェルに塗布する。一例として、多種の分析対象物の並行測定のためには、常に、種々のウェルごとに異なる別個のパッチ及び認識要素を有する3個のウェル(高い分析対象物濃度の較正溶液及び低い分析対象物濃度の較正溶液ならびに試料溶液の計測のため)が提示される。局所分解参照の示唆はない。

【0020】

Analytical Chemistry Vol. 71(1999) 4344-4352には、窒化ケイ素導波路上の多分析対象物免疫分析が提示されている。種々の生物学的認識要素を有する3個の通路状の認識領域(計測区域)で3種までの分析対象物の同時測定が記載されている。分析対象物及びトレーサ抗体が、混合物として、三つの計測区域を覆う試料セルに加えらる。バックグラウンドは常に、分析対象物を含まない専用溶液によって事前に決定される。この開示に基づく、種々の計測区域に関してバックグラウンド測定が局所分解的に実施されるのか、積分的に実施されるのかが明らかではない。較正曲線の生成のためには、センサプラットフォームは再生されないため、常に新たなセンサプラットフォーム上で多数の個々の計測を実施しなければならない。センサプラットフォーム上のごく少数の計測区域及び検定設計からの生じるプロセスに直面すると、種々のセンサプラットフォームを使用するとき方法の精度が低下し、方法の期間が大幅に増すため、これは欠点と見なさざるを得ない。

【0021】

また、Analytical Chemistry Vol. 71(1999) 3846-3852には、3種の異なる分析対象物の同時測定のための多分析対象物免疫分析が提示されている。Bacillus globigii、MS2バクテリオファージ及びブドウ球菌エンテロトキシンBが、群バクテリア、ウイルス及びタンパク質の分析対象物の例として使用され、これらの分析対象物に対する抗体が、(自立性マルチモード)導波路として作用するガラスプレート上で常に二つの平行な行(通路)に固定化されている。この開示の続きに記載された多分析対象物検定の過程で、固定化された認識要素の行に対して垂直な流路を有するフローセルがガラスプレート上に配置される。洗浄溶液(緩衝剤)、一以上の分析対象物を含有する試料、洗浄溶液(緩衝剤)、トレーサ抗体(個々に又はカクテル混合物として)及び洗浄溶液(緩衝剤)の順次添加によってサンドイッチ免疫分析が実施される。計測区域に隣接して計測したバックグラウンド信号を除去することにより、計測した局所蛍光強さを修正する。同じくこの論文には、励起光強さの局所差を考慮に入れるという示唆はない。また、この構造は、多種の分析対象物の同時測定のための一連の計測を必要な較正とともに実施することを許さないが、そのような目的のために、いくつかの異なるセンサプラットフォームの使用、又は特に免疫分析の場合には限られた程度にしか可能ではない、プラットフォーム上で中間再生をしながら計測を順次繰り返し実施することのいずれかを要する。

【0022】

Biotechniques 27(1999) 778-788には、マイクロアレイに基づくELISAs(酵素結合免疫吸収検定)を開発するために、標準マイクロタイタプレート(約8cm×12cm)のフ

10

20

30

40

50

ットプリント上で、それぞれが1列36個で4列のスポット（すなわち、ウェル1個あたり全部で144個）を有する96ウェルの構造が提示されている。6×6個の計測区域のうち、位置づけるためと、蛍光「アルカリホスファターゼ基質」（ELF（登録商標））の添加による検定の酵素的検出工程のために塗布される試薬の効能の制御のためと、に常に1行及び1列が「ビオチニル化BSAマーカ」専用に当てられる。この構造は、従来の検定（ELISAs）のスループットの有意な増大の可能性を示す。しかし、実証された感度（13.4 ng/mlウサギIgG）が満足であるとは思えない。

【0023】

概して、多種（すなわち3種以上）の分析対象物の速やかな同時高感度測定のための以下の課題、すなわち

10

一つのセンサプラットフォーム上での多種の分析対象物のピコモル範囲の検出限界での同時測定、

流体工学に対する要件を最小限にするための、できるだけ簡単な検定プロトコル（たとえば、いくつかのトレーサ分子で測定される多種の分析対象物を含有する試料の混合物の塗布）、

励起光強さの局所差を考慮に入れるための局所分解参照、

場合によっては、同じセンサプラットフォーム上での同時校正計測の実施

に対する共通の解決法がこれまで提供されていないことが注目されなければならない。

【0024】

本発明の主題は、多種の分析対象物の同時定性測定及び/又は定量測定のためのキットであって、

20

少なくとも一つの励起波長で透明な層（a）を、少なくとも前記励起波長で同じく透明である、層（a）よりも低い屈折率の層（b）の上に有し、かつ、前記励起光を層（a）に内結合するための、前記層（a）中で変調される少なくとも一つの格子構造（c）を有する光学薄膜導波路を含むセンサプラットフォームと、

前記分析対象物の特異的認識及び/又は結合のための、及び/又は前記分析対象物との特異的相互作用のための、別個の計測区域（d）に直接又は層（a）上の付着促進層を介して固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素の少なくとも一つのアレイと、

計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段と、場合によっては、

一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として、層（a）の近接場で生成される一以上のルミネセンスの校正のための手段と、を含み、

30

前記分析対象物に関して分析される液体試料が、前記センサプラットフォーム上の前記計測区域と直接又はさらなる試薬との混合ののち接触させられるキットである。

【0025】

前記課題は、本発明によるキットによって解決することができる。特に、驚くことに、本発明によるキットを使用することにより、個々の分析対象物の測定のための個々の検定の対応する数で、試料中の多種の分析対象物の同時測定の同様に高い感度及び再現性を達成することができることがわかった。

【0026】

40

本発明の本質では、液体試料中の一又は多種の分析対象物の認識のため、空間的に分けられた計測区域（d）が、その上に固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素によって占有される区域によって画定される。これらの区域は、いかなる形状、たとえばドット、円、矩形、三角形、楕円又は線の形を有することもできる。

【0027】

属性「光学的透明性」の下では、この属性を特徴とする材料は、少なくとも、一以上のルミネセンスの励起に使用される一又はいくつかの励起波長で、本質的に透明であると、ひいては吸収を示さないと理解される。

【0028】

光学的に透明な層（a）の所与の層厚さに関して、本発明の構造の感度が高ければ高いほ

50

ど層 (a) の屈折率と隣接媒体の屈折率との差が増大する、すなわち、層 (a) の屈折率が高まる。第一の光学的に透明な層 (a) の屈折率は 1 . 8 よりも高いことが好ましい。

【 0 0 2 9 】

層 (a) 性質に対するもう一つの重要な要件は、前記層中を誘導される光の伝播損失が可能な限り低いことである。第一の光学的に透明な層 (a) は、 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 又は ZrO_2 の群の材料、特に好ましくは TiO_2 又は Nb_2O_5 又は Ta_2O_5 の群の材料を含む。そのような材料のいくつかの組み合わせを使用することもできる。

【 0 0 3 0 】

層 (a) の所与の材料及び所与の屈折率に関して、層厚さが下限値よりも大きい限り、層厚さが小さければ小さいほど感度は高くなる。下限値は、層厚さが、誘導される光の波長に依存する値よりも低下すると、光誘導の停止によって決まり、また、非常に薄い層の場合、層厚さの減少とともに伝播損失が増大することによって決まる。層 (a) の厚さとその屈折率との積が、層 (a) 中に結合される励起光の励起波長の $1 / 10 \sim 1$ 、好ましくは $1 / 3 \sim 2 / 3$ であるならば、それは有利である。

【 0 0 3 1 】

光学的に透明な層 (b) は、低い吸収及び蛍光を特徴とすべきであり、理想的には、吸収及び蛍光を示さないべきである。さらには、表面粗さは低いべきである。理由は、層 (b) の表面粗さは、被着方法に依存して多少なりとも顕著な程度に、導波層として意図される被着後の層 (a) の表面粗さに影響するからである。層 (a) の界面における表面粗さの増大は、誘導光の散乱損失の増大につながり、それは望ましくない。これらの要求は多種の材料によって満たされる。第二の光学的に透明な層 (b) の材料は、ケイ酸塩、たとえばガラスもしくは石英、又はポリカーボネート、ポリイミド、アクリレート、特にポリメチルメタクリレートもしくはポリスチロールによって形成される群の透明な熱可塑性もしくは金型成形性プラスチックを含むことが好ましい。

【 0 0 3 2 】

層 (a) 中で変調される格子構造 (c) が、 $200\text{nm} \sim 1000\text{nm}$ の周期と $3\text{nm} \sim 100\text{nm}$ 、好ましくは $10\text{nm} \sim 50\text{nm}$ の変調深さとを有することが好ましい。それに関して、第一の光学的に透明な層 (a) の変調深さと厚さとの比は 0 . 4 以下であることが好ましい。

【 0 0 3 3 】

格子構造は、種々の幾何学形状に設けることができる。格子構造 (c) は、いかなるプロファイル、たとえば矩形、三角形又は半円形のプロファイルのレリーフ格子又は本質的に平坦な光学的に透明な層 (a) で屈折率の周期変調を有する位相もしくは容積格子であることもできる。

【 0 0 3 4 】

構造の一つの実施態様に関しては、格子構造 (c) は、均一な周期の回折格子であることが好ましい。

【 0 0 3 5 】

しかし、特定の用途、たとえば異なる波長の励起光を同時に内結合する場合、格子構造 (c) が多回折格子であるならば、それは有利であることができる。

【 0 0 3 6 】

特定の実施態様の場合、格子構造 (c) が、光学的に透明な層 (a) に内結合される励起光の伝播方向に対して垂直又は平行に、横方向に変化する周期数を有することが好ましい。

【 0 0 3 7 】

多くの実施態様の場合、センサプラットフォームは、格子構造 (c) によって層 (a) に内結合されかつ層 (a) 中を誘導される励起光の伝播方向に配置されることが好ましい層 (a) の均一な非変調領域を含むことが好ましい。

【 0 0 3 8 】

10

20

30

40

50

一般に、格子構造(c)は、計測区域(d)への励起光の内結合、及び/又は層(a)中に逆結合されるルミネセンス光の外結合に使用することができる。

【0039】

したがって、一般的な実施態様として、センサプラットフォームは、同様な又は異なる周期の多数の格子構造(c)を、場合によっては、層(a)の隣接する均一な非変調領域とともに、共通の連続基板上に含む。

【0040】

本発明によるキットを使用する検定用途の場合、多数の計測区域がその上に位置するアレイとして有する層(a)の非変調領域が、層(a)中を誘導される内結合された光の伝播方向に隣接している格子構造(c)によって適当な励起光を内結合することが一般に有利である。計測区域の隣接するさらなるアレイを有するもう一つの格子構造が、第一の格子構造と計測区域の第一のアレイとに隣接して誘導光の伝播方向に設けられるなどするならば、それは有利である。層(a)中を誘導される光は、非変調領域を通過したのち、常に再び外結合される。誘導される光の伝播方向に対して垂直な方向に(すなわち、格子線に対して平行に)、計測区域のさらなるアレイが設けられる。したがって、誘導される励起光を外結合するための専用の格子構造(c)が、計測区域の各アレイの後に、内結合される励起光の伝播方向に設けられ、内結合される励起光の伝播方向に対して垂直に、異なるアレイの個々の格子構造を設けることができるか、又は、これらの格子構造がセンサプラットフォーム全体にかけてこの方向(内結合される励起光の伝播方向に対して垂直)に延びることができることが好ましい。これは、センサプラットフォームの層(a)中を誘導される励起光の伝播方向で後続するアレイのための内結合格子が、前記伝播方向で先行するアレイの内結合格子で内結合された励起光の外結合格子として使用されることを意味する。

【0041】

特定の用途、たとえば、異なる励起波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用する場合、格子構造が、異なる波長の励起光を内結合するために異なる周期数の二以上の格子構造を重畳したものであり、格子線が互いに対して平行又は非平行、好ましくは非平行に向き、二つの重畳された格子構造の場合では、それらの格子線が好ましくは互いに対して垂直であるならば、それは有利である。

【0042】

変調された格子構造をその中に有する区分と、隣接する非変調区分とへのセンサプラットフォームの分割は、実施に際して、二つの連続格子構造の間の計測区域の単一のアレイに要する面積(前記アレイ専用の少なくとも一つの格子構造を含む)を、格子構造の製造のためと適した励起光束の内結合のためとの現在の技術能力に直面する $0.1\text{mm}^2 \sim 1\text{mm}^2$ 程度である一定の最小値未満に減らすことができないことを意味する。したがって、格子構造(c)又は層(a)中でいくつかの格子構造を重畳したものが、本質的にセンサプラットフォームの全領域にわたって変調されるならば、それは、多数の小面積アレイが望まれる構造に特に有利である。

【0043】

本発明の特別な実施態様の場合、光学システムにおける調節の簡素化のため及び/又は分析システムの一部としての試料区画への接続のための光学的又は機械的に認識可能なマークが、センサプラットフォーム上に設けられることが好ましい。

【0044】

層(b)の自己蛍光を排除することができないならば、特に、ポリカーボネートのようなプラスチックを含むならば、又は層(a)における光誘導に対する層(b)の表面粗さの影響を減らすため、中間層が層(a)と(b)との間に被着されるならば、それは有利であることができる。したがって、層(a)よりも低い屈折率を有しかつ層(a)に接する、厚さ $5\text{nm} \sim 10000\text{nm}$ 、好ましくは $10\text{nm} \sim 1000\text{nm}$ のさらなる光学的に透明な層(b)が、光学的に透明な層(a)と(b)との間に位置することが、本発明の構造のもう一つの実施態様に特徴的である。

【0045】

生物学的又は生化学的又は合成認識要素のもっとも簡単な固定化方法は、たとえば認識要素とベースプレートとの間の疎水性相互作用による物理的吸着にある。しかし、これらの相互作用の程度は、媒体の組成とその物理化学的性質、たとえば極性及びイオン強度とによって強く影響されることがある。特に、多工程検定で異なる試薬を順次に添加する場合、表面への認識要素の付着は、吸着固定化しただけでは不十分であることが多い。本発明によるキットの好ましい実施態様では、付着は、生物学的又は生化学的又は合成認識要素の固定化のための、ベースプレートへの付着促進層(f)の被着によって改善される。特に、固定化される生物学的又は生化学的認識要素の場合、付着促進層は、また、これらの認識要素の自然な生物学的又は生化学的環境における結合能力に比較して「生適合性」を改善する、すなわち、認識要素の結合能力を保存し、変性を避けるのに貢献することができる。付着促進層(f)は、厚さ200nm未満、好ましくは20nm未満であることが好ましい。付着促進層を形成するためには、多くの材料を使用することができる。制限なしに、付着促進層(f)は、シラン、エポキシド、官能化された帯電の又は極性のポリマー及び「自己組織化パッシブ又は官能化単分子又は二分子層」を含む群からの一以上の化合物を含むことが好ましい。

10

【0046】

本発明のキットの重要な態様は、生物学的又は生化学的又は合成認識要素が別個の(横方向に分けられた)計測区域(d)に固定化されることである。これらの別個の計測区域は、生物学的又は生化学的又は合成認識要素をセンサプラットフォーム上に空間選択的に被着させることによって形成することができる。被着には多くの方法を使用することができる。一般性の制限なしに、生物学的又は生化学的又は合成認識要素は、「インクジェットスポットティングと、ピン、ペンもしくは毛管による機械的スポットティングと、「マイクロコンタクトプリント」と、生物学的又は生化学的又は合成認識要素を平行の又は交差したマイクロチャネルに供給し、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルに暴露することによって計測区域と流体接触させることと光化学的又は光リソグラフィー固定化方法と、を含む方法の群からの一以上の方法によってセンサプラットフォームに被着させる。

20

【0047】

前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素としては、核酸(たとえばDNA、RNA、オリゴヌクレオチド)及び核酸類似体(たとえばPNA)、モノクロナールもしくはポリクロナール抗体、ペプチド、酵素、アプタマー、合成ペプチド構造、可溶性の膜結合タンパク質及び膜から単離したタンパク質、たとえば受容体、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」及びそれらの錯形成相手、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成された空洞などを含む群からの成分が被着される。また、完全な細胞、細胞成分、細胞膜又はそれらの断片を生物学的又は生化学的又は合成認識要素として被着させることを意図する。

30

【0048】

本発明のキットのさらなる特別な実施態様は、異なる計測区域上の異なる分析対象物を検出するための別個の計測区域に固定化された認識要素の密度が、共通のアレイでの異なる分析対象物の測定により、ルミネセンス信号が同程度の大きさになる、すなわち、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線を光電子システムの調節の変更なしに記録することができるような方法で選択されることを特徴とする。

40

【0049】

いくつかの用途では、計測区域のアレイが、分析対象物測定のための一以上の分析区域と、参照のための、すなわち、物理パラメータ及び/又は塗布される種々の試料の間の化学的違いの測定のための計測区域と、のセグメントに配置されていることが好ましい。それに関して、一以上のアレイは、分析対象物測定又は参照のための、前記セグメント内で同様である生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有する二以上の計測区域をセグメントを含むことができる。しかし、セグメントはまた、互いに異なる認識要素を有するいくつかの別個の計測区域を含むことができる。

50

【0050】

本発明のキットの一つの可能な実施態様には、アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイが、共通の群の分析対象物の測定のために、たとえば固定化された抗サイトカイン抗体を使用して種々のサイトカインの測定するために設けられることが特徴的である。同様な方法で、アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイをいわゆる「マーカタンパク質」の全セットの同時測定に使用することができる。これは、たとえば、体内で細胞内的又は細胞外的に起こることができ、たとえば、特定の疾病、たとえば変性疾患、ある種のガン又は自己免疫疾患によって生じ、それらを示唆する高い濃度で明らかである。

【0051】

分析対象物の測定のための、固定化される認識要素は、通常、前記分析対象物に対してできるだけ高い特異性及び結合親和力を示し、かつ、前記分析対象物と（生）化学的に類似しているかもしれない他の分析対象物に対してできるだけ低い交差反応性を有するような認識要素である。特定の用途、たとえば免疫分析学における低分子量化合物の測定又は核酸分析学における単点突然変異の検出の場合には、（生）化学的に大部分の類似化合物との交差反応をほとんど避けることができない。そのような用途では、同じ分析対象物のためにセグメント又はアレイの一以上の計測区域が設けられかつ関連した固定化された生物学的又は生化学的認識要素が前記分析対象物に対して異なる親和力を有する本発明のキットの実施態様が有利であることができる。それに関して、認識要素が、異なる、ただし（生）化学的にいくらか類似した分析対象物に対するそれらの親和力が認識要素ごとに異なる特徴的な方法で変化するような方法で選択されるならば、それは好都合である。そして、指紋と同様な方法で、一つの分析対象物に関して異なる認識要素を有する異なる計測区域からの信号の総計から分析対象物の正体を決定することができる。

【0052】

もう一つの実施態様は、アレイの一以上のセグメント又は一以上のアレイが、異なる群の分析対象物の測定のために、たとえば疾病の治療のための医薬品及び/又はそれらの代謝産物及び/又は前記疾病の指示薬化合物、たとえばいわゆる「マーカタンパク質」の測定のために設けられることを特徴とする。

【0053】

これは、上記「マーカタンパク質」の全セットの濃度ならびに疾病治療のために投与された薬物とそれらの代謝産物との濃度を一回の計測で測定することを可能にする。可能な組み合わせの多様性により、たとえば医薬品開発の促進又は最適な薬物治療を決定するための患者層別化の促進に大きな潜在性がある。

【0054】

特定の用途の場合、たとえば、共通のセンサプラットフォーム上の多数のアレイからの結果の再現性の様子が高い優先順位を有する用途の場合、二以上のアレイが、前記アレイ上の類似した分析対象物の測定のために、計測区域及び/又は計測区域のセグメントの同様な幾何学配列を有するならば、それは有利である。

【0055】

他の用途の場合、たとえば共通のセンサプラットフォーム上で同様な構造を複製することによって起こりうるので、結果に対する体系的誤差の影響を最小限にすることが重要である。たとえば、そのような用途の場合、二以上のアレイが、前記アレイ上の類似した分析対象物の測定のために、計測区域及び/又は計測区域のセグメントの異なる幾何学配列を有するならば、それは有利であることができる。

【0056】

共通のセンサプラットフォーム上に多数を再び設けることができる別個のアレイ中に多数の計測区域を有する本発明のキットは、比較的少量の試料溶液、試薬及び場合によっては較正溶液を一つの同じプラットフォームで使用することにより、本質的に同一の条件の下で同様な計測の多くのタイプの再現又は多数の複製を実施する可能性をもたらす。したがって、たとえば、一回の計測で統計的データを生成することができる。従来の方法ならば、多数回の個々の計測を要し、これに応じて、合計の計測時間はより長くなり、試料及び

10

20

30

40

50

試薬の消費はより多量になるであろう。二以上の同一の計測区域が、各分析対象物の測定のために、又はセグメントもしくはアレイ内での物理的もしくは化学的参照のために、設けられることが好ましい。それに関して、前記同一の計測区域は、たとえば、計測区域のアレイ又はセグメントの連続した行又は列又は対角線に配置することができる。参照の様子は、センサプラットフォームの物理的又は化学的パラメータ、たとえば励起光強さの局所差（以下を参照）ならびに試料によって誘発される影響、たとえばそのpH、イオン強度、屈折率、温度などに関連することができる。

【0057】

他方、他の用途では、前記同一の計測区域が、計測区域のアレイ又はセグメント内で統計的に分布しているならば、それは有利であることができる。

10

【0058】

一般に、固定化された認識要素は、測定される分析対象物をできるだけ高い特異性で認識し、それと結合するような方法で選択される。しかし、通常は、特に計測区域に固定化された認識要素の間に空の場所がまだあるならば、ベースプレートの表面上の分析対象物分子の非特異的吸着が起こることを予想しなければならない。したがって、横方向に分けられた計測区域の間の領域が、分析対象物又はそれらのトレーサ化合物、すなわち、分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物、好ましくは、たとえば、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナルもしくはモノクロナル、測定される一又は多種の分析対象物に対して異質もしくは経験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイの場合）、洗浄剤、たとえばTween 20（登録商標）

20

）、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物（特にポリヌクレオチドハイブリダイゼーション検定の場合）又は帯電していないが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランによって形成される群からの化合物の非特異的結合の最小化のために、「パシベート」され、横方向に分けられた計測区域（d）の間に被着されていることが好ましい。

30

【0059】

上記のように、生物学的又は生化学的又は合成認識要素の固定化の前に付着促進層がセンサプラットフォームに被着される本発明によるキットのこのような実施態様は、大部分とはいえないにしても多くの用途で有利である。それに関して、分析対象物又はそれらのトレーサ化合物の最小化のための横方向に分けられた計測区域の間の領域のパシベーションの機能が、さらなる化合物の被着なしに、センサプラットフォームへの前記付着促進層の被着によって満たされるような実施態様が好ましい。

【0060】

本発明のキットは、非常に多数の個々の計測区域を含むことができる。100,000個までの計測区域が二次元配列で設けられかつ単一の計測区域が0.001mm²~6mm²の面積を有することが好ましい。

【0061】

本発明のさらなる主題は、生成された計測区域を上にし光学的に透明な層（a）の上のセンサプラットフォームの上面が、さらなるボディと、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと前記ボディとの間に、互いに対して流体的に封止される一以上の試料区画を生成するための一以上の空間的凹み（空洞）が形成されるような方法で組み合わせられ、前記試料区画が、一以上の計測区域又は計測区域のセグメントもしくはアレイをそれぞれ含む本発明のキットの実施態様である。それに関して、センサプラットフォームと組み合わせられる前記ボディとは、本発明では、自立性の構造だけでなく、たとえば、キットの使用条件で、このように設けられた（この場合は通常開いた）試料区画から隣接する試料区画への液体の移動を防ぐ、場合によってはマイクロメートル単位の薄さの被着された構造化被覆をもう。

40

【0062】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、試料区画が、互いに対して流体的に封止され

50

たフローセルとして設けられ、それぞれに、少なくとも一つの入口及び少なくとも一つの出口が設けられ、かつ、場合によっては、さらに、各フローセルの少なくとも一つの出口が、フローセルを出る液体を収容するように働くことができる流体的に接続された液溜めに通じていることである。

【0063】

それに関して、フローセルを出る液体を収容するための場合によって設けられるさらなる液溜めが、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディの外壁の凹みとして設けられるならば、それは有利である。

【0064】

ベースプレートとしてのセンサプラットフォームとそれと組み合わされるボディとの間に空洞を生成するためにはいくつかの技術的解決方法がある。一つの可能な構造では、生成されるフローセルのレイのピッチ（行及び／又は列として幾何学配列）を有する三次元構造が、センサプラットフォーム上にベースプレートとして形成される。ベースプレート上のこれらの構造は、たとえば、互いに隣接するフローセルの間に壁又は壁の一部、たとえばソケットを形成することができ、フローセルは、ベースプレートと適切に形成されたボディとの組み合わせによって形成される。フローセルのレイの生成のためには、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームとそれと組み合わされるボディとの間の空洞を生成するために、センサプラットフォームに凹みが設けられる。

10

【0065】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、凹みが、ベースプレートとそれと組み合わされるボディとの間に空洞を生成するため、前記ボディに設けられることである。

20

【0066】

フローセルのレイを生成するためにベースプレートと組み合わされるボディは、単一の工作物からなることができる。別の実施態様では、ベースプレートと組み合わされるボディは、いくつかの部品から形成され、前記ボディの組み合わせ部品は、好ましくは、不可逆的に組み合わされるユニットを形成する。

【0067】

ベースプレートと組み合わされるボディは、前記ボディとベースプレートとの組み合わせを容易にする補助手段を含むことが好ましい。

【0068】

配列は、多数、すなわち2～2000個、好ましくは2～400個、もっとも好ましくは2～100個の別個の試料区画を含むことがさらに好ましい。

30

【0069】

たとえば、試料及び／又は試薬の塗布がディスペンサによって直接実施される用途の場合、試料区画は、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディの、計測区域に対して反対側で開口していることが好ましい。

【0070】

試料区画のピッチ（行及び／又は列としての幾何学配列）は、標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチ（幾何学配列）に合致することが好ましい。

【0071】

本発明のキットの一部としての試料区画の配列のもう一つの実施態様に特徴的であることは、それがさらなるカバートップ、たとえば箔、膜又はカバープレートによって閉止されることである。

40

【0072】

フローセルの容量は、ベース区域のサイズ及び凹みの深さの変化により、大きな範囲内で異なることができ、その結果、各試料区画の内部容積は、通常0.1µl～1000µl、好ましくは1µl～20µlである。それに関して、種々のフローセルの容積は、同様であることもできるし異なることもできる。

【0073】

ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと前記ベースプレートと組み合わされる

50

ボディとの間の空洞の深さは、 $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $20 \sim 200 \mu\text{m}$ であることが好ましい。アレイの空洞の大きさは、均一であることもできるし多様であることもでき、ベース区域は、いかなる形状、好ましくは矩形もしくは多角形又は他の幾何学形状を有することもできる。ベース区域の横方向寸法もまた、広い範囲で異なることができ、通常、ベースプレートと前記ベースプレートと組み合わせられるボディとの間の空洞のベース面積は、 $0.1 \text{mm}^2 \sim 200 \text{mm}^2$ 、好ましくは $1 \text{mm}^2 \sim 100 \text{mm}^2$ である。

【0074】

ベース区域の角は丸められていることが好ましい。丸められた角は、流動プロフィールに好ましい方法で影響し、形成されるかもしれない気泡の除去を容易にし、その形成を防ぐ。

10

【0075】

試料又は試薬を多数の試料区画に同時に供給するためには、手動又は自動化試薬投入のためのマルチチャンネルピペットを使用することができ、本発明の試料区画の配列の入口が同じピッチ（行及び/又は列としての幾何学配列）で配置されているならば、個々のピペットは一又は二次元のアレイに配置される。したがって、好ましくは、配列のピッチは、標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチに合致する。それに関して、約 9mm の（中心間）距離で 8×12 個のウェルの配列が工業規格として確立されている。たとえば同じ距離で配置された 3 、 6 、 12 、 24 及び 48 個のウェルを有する小さめのアレイがこの規格に準拠する。フローセルの小さめのアレイとして設けられた本発明の試料区画のいくつかの配列は、また、前記フローセルの個々の入口が約 9mm の距離の整数倍で位置するような方法で組み合わせることができる。

20

【0076】

最近、同じフットプリント上に 96 の整数倍のウェルとして 384 個及び 1536 個のウェルを有し、ウェル間距離をそれに応じて減らしたプレートが使用されており、これらもまた、標準マイクロタイタプレートと呼ばれる。本発明の配列の試料区画のピッチを、各フローセルの入口及び出口を含め、これらの規格に適合させることにより、工業的に確立され、利用されている多くの実験室用ピペット及びロボットを試料供給に使用することができる。

【0077】

本発明によるキットの一部としての試料区画の配列の外寸がこれらの標準マイクロタイタプレートのフットプリントに合致することが好ましい。

30

【0078】

本発明によるさらなる特別な実施態様は、上記性質を有する本発明のキットの一部として、たとえば1列に $2 \sim 8$ 個の試料区画又はたとえば1行に $2 \sim 12$ 個の試料区画があり、試料区画そのものが、標準マイクロタイタプレートの寸法を有するキャリア（「メタキャリア」）と、フローセルの入口のピッチ（行及び/又は列としての幾何学配列）が標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチ（幾何学配列）に合致するような方法で組み合わせられている配列である。

【0079】

試料区画の配列とメタキャリアとの接続は、たとえば、1回しか使用しないためのものであるならば、接着によって又は接着せずに正確な嵌め合いによって実施することができ、多数回使用するためのものであるならば、掛け止め又は挿入によって実施することができる。メタキャリアの材料は、たとえば、成形性、金型成形性又はロール練り性のプラスチック、金属、ケイ酸塩、たとえばガラス、石英又はセラミックスを含む群から選択することができる。

40

【0080】

フローセルの入口のピッチ（行及び/又は列としての幾何学配列）が標準マイクロタイタプレートのウェルのピッチ（幾何学配列）、すなわち、 9mm （ 96 ウェルプレートに対応）又は 4.5mm （ 384 ウェルプレートに対応、上記を参照）又は 2.25mm （ 1536 ウェルプレートに対応、上記を参照）の整数倍に合致するような方法で、このような試料

50

区画のいくつかの行又は列は、また、単一のメタキャリアと、組み合わせることもできる。

【0081】

当然、本発明による試料区画の配列は、別のピッチ（幾何学形状）で配置することもできる。

【0082】

ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディ及び場合によってはさらなるカバートップの材料は、実際に意図する用途の要件を満たさなければならない。具体的な用途に依存して、これらの要件は、たとえば、酸性又は塩基性の媒体、塩、水溶液の一部としてのアルコールもしくは洗浄剤又はホルムアミドとの接触による化学的及び物理的安定性や、温度変動（たとえば -30 ~ 100）時の安定性や、ベースプレート及びそれと組み合わされるボディの可能な限り同様な熱膨張率や、光学特性（たとえば非蛍光性、反射率）や、機械加工性などに関連する。ベースプレートと組み合わされるボディ及び場合によってはさらなるカバートップの材料は、メタキャリアの材料と同じ群から選択されることが好ましい。それに関して、上述した部品（ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わされるボディ、カバートップ）は、均一な材料で構成されることもできるし、異なる材料を層状に又は横方向に接続させた、材料が互いに置き換わることができる混合物又は組成物を含むこともできる。

10

【0083】

本発明の非常に重要な側面は、利用可能な励起光強さの局所分解参照の可能性に関する。エピルミネーション又はトランスミッションイルミネーションの配置で励起光を照射する従来の構造の場合、照射区域の利用可能な励起光強さは、主として、励起光束の断面の励起光密度によって決まる。この場合、照射面（たとえばガラスプレート）の性質の局所差は二次的影響しかもたない。しかし、本発明のキットの場合、センサプラットフォームの物理的パラメータの局所差、たとえば励起光を光学的に透明な層（a）に内結合するための格子構造（c）の内結合効率又は光学的に透明な層（a）中を誘導されるモードの伝播損失の局所差が主に重要である。

20

【0084】

したがって、本発明のさらなる重要な主題は、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、センサプラットフォームから励起波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含むような本発明のキットの実施態様である。それに関して、伝播損失は、局所的に誘導される光の強さに本質的に比例すると考えられる。伝播損失は、主に、光学的に透明な層（a）及び下に位置する基板（光学的に透明な層（b））の表面粗さ及び均一性によって決まる。特に、このタイプの参照は、局所的に利用可能な励起光強さの、その伝播方向における局所的低下が、たとえば、励起波長で吸収性である、層（a）の減衰フィールドにおける分子の高い局所濃度によって生じる励起光の吸収によって起こるならば、この低下を考慮に入れることができる。

30

【0085】

しかし、誘導光の強さに対する発せられた散乱光の比例性の仮定は、層（a）と接触した局所的巨視的散乱中心により放出（外結合が起こる場所では有効ではない。これらの場所では、放出される散乱光は、誘導光と比較して正比例よりも有意に強くなる。したがって、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、センサプラットフォームからルミネセンスで発せられる光の像の同時又は順次生成を含むならば、それはまた有利である。当然、両方の方法を組み合わせることもできる。参照像の生成により、計測信号の収集に対する結像光学部品の種々の影響が除かれる。したがって、計測区域から発せられるルミネセンスの集光の場合と同じ光路を使用して、センサプラットフォームから発せられる励起光の像の生成を実施することが好ましい。

40

【0086】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、ルミネセンスの励起に使用されるもう一つの励起波長でセンサ

50

ラットフォームから発せられる光の像の同時又は順次生成を含むことである。それに関して、「光化学漂白」の影響を避けるため又は最小限にするため、一以上の分析対象物の測定のための又は参照もしくは校正のための方法の過程で塗布される分子が吸収を示さない又はできるだけ低い吸収しか示さない励起波長が選択されることが好ましい。

【0087】

さらには、センサプラットフォームから発せられる励起光を参照するための像の局所分解度が、100 μm未満、好ましくは20 μm未満であることが好ましい。また、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、計測区域の間の又は計測区域に隣接したところでの実際のルミネセンス波長のバックグラウンド信号の測定を含むことが好ましい。

10

【0088】

本発明によるキットの特徴的な好ましい実施態様は、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、「ルミネセンスマーカスポット」、すなわち、事前に固定化されたルミネセンス標識された分子（すなわち、試料の供給の前にすでにこれらの計測区域に被着されている分子）を有する計測区域からのルミネセンス強さによって実施されることである。それに関して、「ルミネセンスマーカスポット」が、センサプラットフォーム全体に及ぶスクリーンとして設けられることが好ましい。

【0089】

以下さらに詳細に記載するように、好ましくは局所分解検出器、たとえばCCDカメラ（CCD：電荷結合素子）が信号検出に使用される。これらの検出器は、その感光素子（ピクセル）が、局所光信号の検出のための下限しきい値を画定する一定の（主に温度依存性の）バックグラウンド信号を出力し、高い光強さの検出のための最大能力（飽和）を有することが特徴的である。所与の露光時間に関して、信号検出のダイナミックレンジは、これらのしきい値の差によって定められる。分析対象物検出のためのルミネセンス信号及び参照信号の両方がこのダイナミックレンジ内にあるべきである。それに関して、両方の信号が同程度の大きさであるならば、すなわち、たとえばそれらが一以上の10単位よりも大きく異ならないならば、それは有利である。本発明によると、たとえば、「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度が、固定化のための同様な、ただし標識されていない分子との混合により、「ルミネセンスマーカスポット」の領域からのルミネセンス強さが分析対象物測定に専用の計測区域からのルミネセンス強さと同程度の大きさになるような方法で選択されるならば、これを達成することができる。

20

30

【0090】

好ましくは、「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度及び濃度は、アレイ内で類似し、好ましくはセンサプラットフォーム全体で均一である。

【0091】

このタイプの参照の場合、局所分解度は、主として、アレイ内及びセンサプラットフォーム全体の「ルミネセンスマーカスポット」の密度によって決まる。好ましくは、種々の「ルミネセンスマーカスポット」の間の距離及び/又はサイズは、別個の計測区域からのルミネセンス強さの測定の所望の局所分解度に適合される。

【0092】

センサプラットフォーム上の各アレイが、少なくとも一つの「ルミネセンスマーカスポット」を含むことが好ましい。少なくとも一つの「ルミネセンスマーカスポット」が分析対象物測定のための計測区域の各セグメントに隣接して設けられるならば、それは有利である。

40

【0093】

アレイ内及びセンサプラットフォーム上に「ルミネセンスマーカスポット」を幾何学的に配置するための多様な可能性がある。可能な配列は、たとえば、各アレイが、前記アレイの領域で内結合される励起光の二次元分布の測定のために、内結合される励起光の伝播方向に対して平行及び/又は垂直な「ルミネセンスマーカスポット」の連続した行及び/又は列を含むことである。

50

【0094】

これは、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、多数の局所分解参照信号の平均値の測定を含むことを意図する。

【0095】

本発明によるキットのさらなる特徴は、一以上のルミネセンス信号の存在で計測されたルミネセンス信号を校正するための手段に関する。可能な実施態様として、一以上の分析対象物の結合又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近接場で生成される一以上のルミネセンスを校正するための前記手段は、測定される分析対象物の既知の濃度を有する校正溶液を所定数のアレイに塗布することを含む。たとえば、センサプラットフォームの8~12個のアレイを校正のために専用にあてることができる。

10

【0096】

本発明によるキットは、一つのセンサプラットフォーム上の多数の計測区域に基づく、これまで記載されていないもう一つの機会を可能にする。この機会として、異なる既知の濃度の多数の校正溶液を一以上のアレイに塗布する必要はなく、校正のための専用の計測区域における既知であるが異なる局所濃度で分析対象物検出のために塗布される生物学的又は生化学的又は合成認識要素を固定化することが可能である。異なる分析対象物濃度の異なる校正溶液を、認識要素を有するアレイに単一の均一な固定化密度で塗布することによって校正曲線を生成することが可能であるだけでなく、主として、単一の校正溶液を、異なる固定化密度で設けられた認識要素を有するアレイに塗布することにより、分析対象物とその認識要素との間の結合活性及び多数の結合イベントを表すそのような標準曲線を生成することが可能である。この簡素化されたタイプの校正にとって、分析対象物とその認識要素との間の結合挙動が周知であり、分析対象物に専用の計測区域における最低固定化密度と最高固定化密度との差、すなわち違いが、分析対象物検出のための検定に当てられる全適用範囲を校正がカバーするのに十分な大きさであることが重要である。

20

【0097】

したがって、本発明のさらなる主題は、異なる制御された密度で固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有するいくつかの計測区域が、これらの計測区域に共通である分析対象物の測定のために、一以上のアレイに常に設けられているキットである。それに関して、分析対象物の校正曲線が、種々の制御された密度の十分に大きな「差」でアレイの種々の計測区域に固定化された、前記分析対象物の生物学的又は生化学的又は合成認識要素を含むアレイに一つの校正溶液を塗布することにより、すでに確立することができ、前記分析対象物と前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素との間の結合を示す信号の濃度依存性が既知であることが特に好ましい。

30

【0098】

本発明によるキットのもう一つの実施態様では、異なるサイズ(直径)のいくつかの計測区域が常に一以上の分析対象物の測定に当てられる。この実施態様は、予想される信号強さ(専用計測区域の面積単位あたりの信号の高さ)が前記計測区域の面積の減少とともに増大するという公知の事実により、前記分析対象物を測定するためのダイナミックレンジの増大を可能にする。

【0099】

本発明によると、一以上のアレイが、校正のために、既知の濃度で試料に加えられる分析対象物の測定に専用の一以上の計測区域を含むもう一つの実施態様がある。この実施態様は、分析分離法におけるいわゆる標準の添加と匹敵しうる。また、この実施態様に関して、一つ又はすべての試料に加えられる分析対象物と固定化された認識要素との間の結合挙動が周知であることが必要条件である。そして、たとえば、この既知のさらなる分析対象物の場合の結合信号の差(たとえば、試料の物理的性質、たとえば粘度などの違いから生じる)から、測定される未知の濃度の分析対象物の結合挙動の対応する差に対して外挿することができる。この実施態様は、前記の組み合わせに特に適している。

40

【0100】

本発明のさらなる主題は、本発明によるキットの所与の実施態様を有する分析システムで

50

あって、格子導波路構造（センサプラットフォーム）から発せられる一以上のルミネセンスを測定するための少なくとも一つの検出器をさらに含む分析システムである。

【0101】

特に、本発明の主題は、
少なくとも一つの励起光源と、
本発明のキットと、
センサプラットフォーム上の一以上の計測区域（d）から発せられる光を検出するための少なくとも一つの検出器と
を含む、一以上のルミネセンスを測定するための分析システムである。

【0102】

本発明の分析システムの一つの可能な実施態様に特徴的であることは、励起光が、エピルミネーション又はトランスイルミネーション配置で計測区域に照射されることである。

【0103】

ルミネセンス光の検出は、格子構造（c）又は（c'）によって外結合されたルミネセンス光が検出器によっても集光されるような方法で実施されることが好ましい。

【0104】

本発明の分析システムの好ましい実施態様に特徴的であることは、少なくとも一つの光源から発せられる励起光が本質的に平行であり、光学的に透明な層（a）に内結合するための共振角で、層（a）中で変調される格子構造（c）に照射されることである。

【0105】

一つの可能性として、少なくとも一つの光源からの励起光が拡大光学部品によって本質的に平行な光束に拡大され、光学的に透明な層（a）に内結合するための共振角で、層（a）中で変調される大きな寸法の格子構造（c）に照射される。

【0106】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、少なくとも一つの光源からの励起光が、一つの回折光学要素により、又は光源がいくつかある場合には多数の回折光学要素、好ましくはDammann格子又は屈折光学要素、好ましくはマイクロレンズアレイにより、共通の光源から発せられるできるだけ同じ強さの多数の個々の光線に分割され、個々の光線が、互いに対して本質的に平行に、層（a）に内結合するための共振角で格子構造（c）に照射されることである。

【0107】

ある改良に特徴的であることは、同じ又は異なる発光波長の二以上の光源を励起光源として使用することである。

【0108】

たとえば、CCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャンネルプレート及びマルチチャンネル光電子増倍管によって形成される群の少なくとも一つの局所分解検出器を信号検出に使用することが好ましい。

【0109】

本発明は、透過した光束を成形するためのレンズもしくはレンズシステムや、光束を偏向させるための、場合によってはさらに成形するための平面もしくは湾曲したミラーと、光束を偏向させるための、場合によってはスペクトル分離するためのプリズムや、光束の部分をスペクトル選択的に偏向させるためのダイクロイックミラーや、透過した光の強さを調整するためのニュートラルフィルタや、光束の部分をスペクトル選択的に透過させるための光学フィルタもしくはモノクロメータや、励起もしくはルミネセンス光の別個の偏光方向を選択するための偏光選択要素、を含む群の光学部品が、一以上の励起光源とセンサプラットフォームとの間及び/又は前記センサプラットフォームと一以上の検出器との間に位置することを特徴とする分析システムを含む。

【0110】

光励起は連続的に実施することができる。しかし、励起光を1 fsec ~ 10 minの間隔のパルスで投射することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0111】

分析システムの進んだ実施態様に特徴的であることは、計測区域からの発光が時間分解的に計測されることである。

【0112】

本発明による分析システムの一つの実施態様では、発光の投射及び検出がすべての計測区域で同時に実施される。もう一つの実施態様に特徴的であることは、励起光の投射と一以上の計測区域からの発光の検出とが一以上の試料区画で順に実施されることである。また、励起光の順次投射と一以上の計測区域からの発光の検出とを単一の試料区画内で数回実施することが可能である。

【0113】

それに関して、ミラー、偏向プリズム及びダイクロイックミラーを含む群の可動光学部品を使用して励起及び検出を順に実施することが好ましい。順に実施される励起及び検出は、また、励起光及びルミネセンス光を一以上の計測区域に向かう方向及びそれから離れる方向に順に誘導するための、可動ガラス繊維（光ファイバ）ガラスファイバ束（光ファイバ束）を使用して実施することができる。

【0114】

種々の計測区域からのルミネセンスを順に検出する場合、局所分解検出器は必須ではないが、そのような場合、簡単な（局所分解ではない）検出器、たとえば従来の光電子増倍管又はフォトダイオードもしくはアバランシェフォトダイオードを使用することができる。

【0115】

特に、本質的に焦点及び角度保存型のスキャナを使用して励起及び検出を順に実施することが好ましい。

【0116】

また、順次の励起及び検出を伴う分析システムのもう一つの実施態様に特徴的であることは、上述した実施態様のいずれかの配列が順次の励起及び検出の過程の間で動かされることである。

【0117】

また、本発明による分析システムは、一以上の試料をセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるための供給手段をさらに含むことが好ましい。

【0118】

一つの可能な実施態様として、試料区画は、試料又は試薬の場所を指定した供給又は除去のための開口を光学的に透明な層（a）とは反対の側に有する。

【0119】

分析システムの改良に特徴的であることは、一以上の分析対象物を測定する方法の過程で湿潤されかつ計測区域と接触させられる試薬のための区画が設けられることである。特別な実施態様に特徴的であることは、前記試薬のためのこれらさらなる区画が、ベースプレートとしてのセンサプラットフォームと組み合わせられるボディに設けられることである。

【0120】

本発明のさらなる主題は、上記実施態様のいずれかのキット及び/又は本発明の分析システムを使用する多種の分析対象物の同時定性測定及び/又は定量測定の方法であって、前記分析対象物に関して分析される一以上の液体試料を、前記キットの一部としてのセンサプラットフォームの計測区域と接触させ、前記計測区域で利用可能な励起光強さを局所分解的な方法で参照し、場合によっては、前記試料と接触させた計測区域から層（a）の近接場で生成され、前記計測区域に固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素に対する一以上の分析対象物の結合から、又は前記分析対象物と前記固定化された認識要素との相互作用から生じる一以上のルミネセンスを較正する方法である。

【0121】

励起光は、格子構造（c）によって計測区域に向けて光学的に透明な層（a）に内結合されることが好ましい。

【0122】

10

20

30

40

50

本発明の方法の一つの可能な実施態様に特徴的であることは、センサプラットフォームが、格子構造(c)によって層に内結合されかつ層(a)中を誘導される励起光の伝播方向に配置されることが好ましい層(a)の均一な非変調領域を含むことである。

【0123】

(第一)等方的に発せられるルミネセンス、又は(第二)光学的に透明な層(a)に内結合されかつ結合格子(c)によって外結合されるルミネセンス、又は両部分(第一及び第二)を含むルミネセンスを同時に計測することが好ましい。

【0124】

また、前記ルミネセンスの生成のため、励起されることができ、300nm~1100nmの波長で発光する発光染料又は発光ナノ粒子をルミネセンス標識として使用することが本発明の一部である。

10

【0125】

ルミネセンス標識を、分析対象物に結合させるか、競合検定では、分析対象物類似体に結合させるか、多工程検定では、固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素の結合相手の一つに結合させるか、又は生物学的又は生化学的又は合成認識要素に結合させることが好ましい。

【0126】

方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、第一のルミネセンス標識と同様な又は異なる励起波長の二番目以降のルミネセンス標識と、同様な又は異なる発光波長と、を使用することである。

20

【0127】

それに関して、二番目以降のルミネセンス標識を、第一のルミネセンス標識と同じ波長で励起させることができ、他の波長で発光させることができることが好ましい。

【0128】

他の用途の場合、塗布される発光染料の励起スペクトルと発光スペクトルとが重複しないか、又は部分的にしか重複しないならば、それは有利である。

【0129】

方法のもう一つの変形に特徴的であることは、供与体として作用する第一の発光染料から受容体として作用する第二の発光染料への電荷又は光エネルギーの移動を分析対象物の検出に使用することである。

30

【0130】

方法のもう一つの可能な実施態様に関して、一以上のルミネセンスの消衰の程度を測定することが特徴的である。

【0131】

方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、一以上のルミネセンスの測定の他に、計測区域における有効屈折率の変化を測定することである。

【0132】

方法の改良は、ルミネセンスの一以上の測定及び/又は励起波長における光信号の測定を偏光選択的に実施することを特徴とする。

【0133】

一以上のルミネセンスを、励起光の偏光とは異なる偏光で計測することが好ましい。

40

【0134】

本発明の方法の好ましい実施態様にとって、種々の計測区域上の種々の分析対象物の検出のための別個の計測区域に固定化された認識要素の密度を、共通のアレイでの種々の分析対象物の測定により、ルミネセンス信号が同程度の大きさになるような方法で、すなわち、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線を光電子システムの調節の変更なしに記録することができるような方法で選択することが特徴的である。

【0135】

方法の改良にとって特徴的であることは、計測区域のアレイを、分析対象物測定のための一以上の計測区域と、参照のための、すなわち、物理パラメータ及び/又は塗布される種

50

々の試料の間の化学的違いの測定のための計測区域と、のセグメントに配置することである。それに関して、一以上のアレイは、分析対象物測定又は参照のための、前記セグメント内で同様である生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有する二以上の計測区域のセグメントを含むことができる。しかし、セグメントはまた、互いに異なる認識要素を有するいくつかの別個の計測区域を含むこともできる。

【0136】

本発明の方法のもう一つの可能な変形に特徴的であることは、アレイの一以上のセグメントの上で又は一以上のアレイの上で、共通の群の種々の分析対象物、たとえば種々のサイトカインを、種々の抗サイトカイン抗体へのその結合によって同時に測定することである。

10

【0137】

特定の用途、たとえば免疫分析学における低分子量化合物の測定又は核酸分析学における単点突然変異の検出の場合には、(生)化学的に大部分の類似化合物との交差反応をほとんど避けることができない。そのような用途では、同じ分析対象物のためにセグメント又はアレイの一以上の計測区域が設けられ、関連の固定化された生物学的又は生化学的認識要素が前記分析対象物に対して異なる親和力を有する本発明によるキットの実施態様が有利であることができる。それに関して、異なる分析対象物、ただし(生)化学的にいくらか類似した分析対象物に対するそれらの親和力が認識要素ごとに異なる特徴的な方法で変化するような方法で、認識要素が選択されるならば、それは好都合である。そして、指紋と同様な方法で、単一の分析対象物に関して異なる認識要素を有する異なる計測区域からの信号の総計から分析対象物の正体を決定することができる。

20

【0138】

もう一つの可能な変形に特徴的であることは、種々の群の種々の分析対象物、たとえば疾病の治療のための医薬品及び/又はそれらの代謝産物及び/又は前記疾病の指示薬化合物、たとえばいわゆる「マーカタンパク質」を、アレイの一以上のセグメントの上で又は一以上のアレイの上で同時に測定することである。

【0139】

たとえば、再現性の側面を調査するために、セグメント又はアレイ内での各分析対象物の測定又は物理的もしくは化学的参照のために二以上の同一の計測区域を設けるならば、それは有利であることができる。それに関して、前記同一の計測区域を、計測区域のアレイ又はセグメントの連続した行又は列又は対角線に配置することができる。

30

【0140】

他の問題に対処する場合、たとえば、励起条件の体系的局所差を調査する場合、前記同一の計測区域を計測区域のアレイ又はセグメント内で統計的に分布させるならば、それは有利であることができる。

【0141】

本発明の方法による一つの可能な実施態様に特徴的であることは、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、センサプラットフォームから励起波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含むことである。それに関して、計測区域から発せられるルミネセンスの収集の場合と同じ光路を使用して、センサプラットフォームから発せられる励起光の像の生成を実施することが好ましい。

40

【0142】

方法のもう一つの可能な実施態様として、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照は、センサプラットフォームからルミネセンス波長で発せられる光の像の同時又は順次生成を含む。

【0143】

もう一つの実施態様に特徴的であることは、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照のための手段が、ルミネセンスの励起に使用されるもう一つの励起波長でセンサプラットフォームから発せられる光の像の同時又は順次生成を含むことである。それに関して、局所分解参照のための励起波長が、「光化学漂白」の影響を避ける、又は最小限にす

50

ることができるように、一以上の分析対象物の検出のための又は参照もしくは較正のための検定の間で、ルミネセンスが可能でありかつ塗布される分子が、前記波長で吸収を示さない又はできるだけ低い吸収しか示さないような方法で選択されることが好ましい。

【0144】

センサプラットフォームから発せられる励起光を参照するための像の局所分解度が100 μm未満、好ましくは20 μm未満であることが好ましい。

【0145】

本発明の方法のさらなる主題は、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照を、「ルミネセンスマーカスポット」によって、すなわち、事前に固定化されたルミネセンス標識された分子（すなわち、試料の供給の前にすでにこれらの計測区域に被着されていた分子）を有する計測区域からのルミネセンス強さによって実施することである。

10

【0146】

それに関して、「ルミネセンスマーカスポット」を、センサプラットフォーム全体に及ぶスクリーンとして設けることが好ましい。

【0147】

本発明の方法の改良は、ルミネセンス標識された分子の密度を、固定化のための同様な、ただし標識されていない分子との混合により、「ルミネセンスマーカスポット」の領域からのルミネセンス強さが分析対象物測定に専用の計測区域からのルミネセンス強さと同程度の大きさになるような方法で選択することである。

【0148】

方法の好ましい実施態様に特徴的であることは、「ルミネセンスマーカスポット」内のルミネセンス標識された分子の密度及び濃度が、アレイ内で均一であり、好ましくはセンサプラットフォーム全体で均一であることである。

20

【0149】

ルミネセンスが可能である分子は、外部励起光による限られた数のサイクルの励起にしか暴露することができず、発されるルミネセンスによって非活性化したのち、光化学的に破壊される、すなわち、一般にはもはやルミネセンスが可能ではない別の分子に変わることは公知の事実である。このプロセスが一般に「光漂白」と呼ばれる。活性化及び非活性化の可能なサイクルの数は、特定のタイプの分子に特徴的な平均値（放射性化合物の半減期に匹敵しうる）である。本発明による方法における参照の有効性をできるだけ大きな程度に保証するため、光学システムの調節の間にたとえば「光漂白」によって生じる「ルミネセンスマーカスポット」からの信号の減少を最小限にすることが好ましい。

30

【0150】

また、計測区域で利用可能な励起光強さの横方向分解参照が、多数の局所分解参照信号の平均の測定を含むことが好ましい。

【0151】

測定方法で塗布される一以上の試料及び試薬の供給は、いくつかの工程で順に実施することができる。一以上の試料を、前記試料中で測定される分析対象物を測定するための種々のトレーサ試薬の混合物でプレインキュベートしたのち、これらの混合物を単一の供給工程で対応する専用のアレイと接触させることが好ましい。

40

【0152】

本発明の方法の好ましい実施態様に特徴的であることは、トレーサ試薬、たとえばサンドイッチ免疫分析における二次トレーサ抗体及び/又はルミネセンス標識ならびに場合によってはさらなるルミネセンス標識されたトレーサ試薬の濃度を、ルミネセンス信号が同程度の大きさになるような方法で、すなわち、共通のアレイにおける種々の分析対象物の測定により、同時に実施される分析対象物測定のための関連した較正曲線が光電子システムの調節なしで記録することができるような方法で選択する。

【0153】

本発明の方法の実施態様のさらなる主題は、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近接場で生成される一

50

以上のルミネセンスの較正が、測定される前記分析対象物の既知の濃度を有する一以上の較正溶液を、分析される一以上の試料が同じ又は異なる供給工程で塗布されるセンサプラットフォーム上で同じ又は他の計測区域又は計測区域のセグメント又は計測区域のアレイに塗布することを含むことである。

【0154】

方法の特別な実施態様に特徴的であることは、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近接場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、センサプラットフォームの一以上の専用計測区域での分析のために、場合によっては既知の濃度のさらなる分析対象物を、分析される一以上の試料に添加することを含むことである。

10

【0155】

方法のもう一つの好ましい実施態様に特徴的であることは、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近接場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、未知の試料及び対照試料を塗布したのちのルミネセンス強さの比較、たとえば、「野生型」DNA試料及び「突然変異DNA」試料を塗布したのちの比較を含むことである。それに関して、未知の試料及び対照試料を異なるアレイに塗布することが可能である。

【0156】

この方法のもう一つの変形に特徴的であることは、未知の試料及び対照試料を同じアレイに順に塗布することである。一般に、この実施態様では、未知の試料の供給と対照試料の供給との間に再生工程、すなわち、第一の試料の供給ののちに形成する認識要素 - 分析対象物複合体を解離させ、続いて、解離した分析対象物分子を試料区画から取り出したのち、第二の試料の供給を実施する工程が必要である。同様な方法で、いくつかの試料を試測区域のアレイ上でその分析対象物に関して順に分析することができる。

20

【0157】

方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、未知の試料と対照試料とを混合したのち、その混合物をセンサプラットフォームの一以上のアレイに塗布することである。

【0158】

本発明の方法の改良に特徴的であることは、未知の試料及び対照試料で測定される分析対象物の検出を、未知の試料及び対照試料のための異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有するルミネセンス標識を使用して実施することである。

30

【0159】

たとえば、種々の群の分析対象物の測定を、異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用して実施することが好ましい。

【0160】

いくつかの異なるルミネセンス標識の使用はまた、共通の群の異なる分析対象物の測定に有利であることができる。本発明の方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、たとえば、共通の群の分析対象物、たとえばサイトカインの間の交差反応性を測定するため、異なる励起及び/又はルミネセンス波長を有する二以上のルミネセンス標識を使用して測定を実施することである。

40

【0161】

上記のように、単一のセンサプラットフォーム上に多数の計測区域を有する本発明によるキットは、一以上のアレイ上で一以上の分析対象物を定性及び/又は定量するための簡素化されたタイプの較正の可能性を提供する。最良の場合、センサプラットフォームからの信号の本発明の新規なタイプの較正のために単一の較正溶液の塗布しか要らない。したがって、本発明による方法のこの改良にとって、異なる制御された密度で固定化された生物学的又は生化学的又は合成認識要素を有するいくつかの計測区域を、これらの計測区域に共通である分析対象物の測定のために、一以上のアレイに常に設けておくことが好ましい。方法のこの改良にとって、分析対象物の較正曲線を、種々の制御された密度の十分に大きな「差」でアレイの種々の計測区域に固定化された、前記分析対象物に対する生物学的

50

又は生化学的又は合成認識要素を含むアレイに単一の較正溶液を塗布することにより、すでに確立することができ、前記分析対象物と前記生物学的又は生化学的又は合成認識要素との間の結合を示す信号の濃度依存性が既知であることが特徴的である。

【0162】

本発明の方法のさらなる好ましい変形にとって特徴的であることは、一以上の分析対象物の結合の結果として又は一以上の分析対象物との特異的相互作用の結果として層(a)の近接場で生成される一以上のルミネセンスの較正が、本質的に一定の濃度の一連の試料中の一以上の分析対象物の存在によって生じるルミネセンス強さの測定を含むことである。特にDNA分析学では、たとえばいわゆる「野生型」試料と「突然変異」試料との比較のため、いわゆるハウスキーピング遺伝子が公知であり、その含量は種々の起源(組織、有機体のタイプなど)の一連の試料の中で本質的に一定である。同様に、免疫分析学では、一定の免疫グロブリンが公知であり、その濃度は、共通のタイプの有機体からの試料の間ではわずかに異なる。

10

【0163】

本発明の一部は、抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジンタグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNAもしくはRNAストランド、DNAもしくはRNA類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害薬、レクチン及び炭水化物を含む群の一以上の分析対象物の同時又は順次の定量測定又は定性測定のための、上記実施態様のいずれかの方法である。

【0164】

また、方法の可能な実施態様に特徴的であることは、試験される試料が、天然の体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄又は光学的に濁った液体又は組織流体又は表面水又は土壌又は植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであるか、又は、生物学的組織部分又は細胞培養物もしくは細胞抽出物から採取されることである。

20

【0165】

本発明のさらなる主題は、薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定、アフニティースクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定、特にDNA及びRNA分析学のための分析対象物の定性及び定量分析、毒性発生研究ならびに遺伝子及びタンパク質発現プロファイルの決定ならびに医薬品研究開発、ヒト及び獣医診断学、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、症候性及び前症候性植物診断学、医薬品開発における患者層別化及び治療薬選択、食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、本発明によるキット及び/又は本発明の分析システム及び/又は本発明の方法の使用である。

30

【0166】

本発明の範囲を制限することなく、本発明を以下の例でさらに説明する。

【0167】

適用例

例1

分析のための一又は多数の試料中の多種のサイトカインマーカの同時定量のためのキット
a) 本発明によるキットの主要部品は、外寸113.5mm×75.0mm×0.7mm厚さの矩形のセンサプラットフォームを、散乱光による影響を抑えるためインクで黒くした厚さ1.1mmのポリカーボネート(PC)層と合わせたものであった。PC層には、側面の各々が7mm×7mmの開口した正方形の凹み(ウェル)を中心間距離9mmで設けており、これらを、分析する量(10~100µl)の試料を収容するための試料区画として使用した。センサプラットフォームとPC構造との組み合わせが全部で96個の試料区画を含むよう、12列×8行で凹みを一面に配置した。

40

【0168】

センサプラットフォームの基材(光学的に透明な層(b))は、AF45ガラス(633

50

nmでの屈折率 $n = 1.52$) からなるものであった。基板中に連続面レリーフ格子 (センサプラットフォームの 75 mm の全長にかけて) を距離 9 mm 、幅 0.5 mm で生成した (格子構造によってセンサプラットフォームの層 (a) に内結合される励起光の伝播方向に)。これらの格子は、 360 nm の周期及び 12 nm の深さを有し、格子線がウェルの列に対して平行に向くものであった。光学的に透明な層 (b) 上の光学的に透明な Ta_2O_5 の導波層 (a) は、 633 nm で 2.11 の屈折率 (層厚さ 150 nm) を有するものであった。被着法により、光学的に透明な層 (b) の格子構造を被着層 (a) の表面にほぼ $1:1$ の実物大で転写した。

【0169】

ポリカーボネート構造と組み合わせる前に、センサプラットフォームの表面を、湿式化学法により、まずイソプロパノールで数回、次にペルオキシジ硫酸アンモニウム 2.5% を含有する濃硫酸で清浄した。

【0170】

次に、モノ-オクタデシルホスフェートの1分子層 (単分子層) を付着促進層として親水性導波路面に自己集合によって被着した。この表面改質が疎水性の表面 (水に対する接触角約 110°) を生じさせた。表面改質の方法は、文献にさらに詳細に記載されている (D. Brovelli et al., Langmuir 15(1999)4324-4327)。

【0171】

インクジェットプロッタのモデル NPIC (GeSiM、ドイツ Grosserkmannsdorf) を使用して、付着促進層を設けられたセンサプラットフォームの疎水面に、 42 個の計測区域 (スポット) (各々のアレイあたり 7 列 \times 6 行の配列) の同一アレイ 96 個 (12 列 \times 8 行に配列) を生成した。

【0172】

サイトカインの群の分析対象物として、種々のヒトインターロイキンの測定のための認識要素 (認識要素 : モノクロナールマウス抗体、抗 hIL-2 、抗 hIL-4 及び抗 hIL-6) を、 10% リン酸緩衝塩溶液 (PBS、 $\text{pH}7.4$) 中 $300 \sim 1000\ \mu\text{g/ml}$ の濃度で再構成した。次に、抗体溶液を、 10% PBS ($\text{pH}7.4$) で、実際の抗体の対応する抗原に対する親和力によって決まる異なる程度に稀釈した。単一分析対象物インターロイキン免疫分析の前に、十分な濃度 (抗 hIL-2 抗体及び抗 hIL-6 で $100\ \mu\text{g/ml}$ 、抗 hIL-4 抗体で $50\ \mu\text{g/ml}$) を測定しておいた。このようにして、一つのアレイでの3種のインターロイキンすべての同時測定の検定で予想される信号強さが同程度の大きさになるようにした。具体例のこの見地に関して、別個の計測区域で測定される対応する分析対象物に対して種々の親和力を有する種々の認識要素の固定化密度の適切な選択により、多数の異なる分析対象物の同時測定の検定で予想される信号強さのダイナミックレンジが一つのアレイ内で同程度の大きさになることが可能である。

【0173】

抗体を付着促進層に被着させたのち、それ (センサプラットフォーム) を飽和水蒸気雰囲気中で 15 分間インキュベートした。次に、後の測定方法でトレーサ抗体の非特異的結合を最小限にするため、センサプラットフォームの、タンパク質で覆われていない疎水性面を、 0.05% Tween 20 の添加混合物を含有するウシ血清アルブミン (BSA) の PBS (1 mg/ml 、 $\text{pH}7.4$) 溶液で飽和させた。そして、センサプラットフォームを水洗し、窒素で乾燥させた。

【0174】

$500\ \mu\text{m}$ の中心間距離で配置されたスポットの直径は約 $220\ \mu\text{m}$ であった。単一のアレイの各々は、3種の異なる認識要素 (hIL-2 、 hIL-4 及び hIL-6 の認識のため) ならびに Cy5 で蛍光標識されたウシ血清アルブミン (Cy5-BSA) を有する「ルミネセンスマーカースポット」を含んでいた。それに関して、これらの「ルミネセンスマーカースポット」のルミネセンス強さもインターロイキン検定の過程で予想される信号強さの変化のダイナミックレンジ内になるような方法で固定化密度を選択した。実例として、BSA分子1個あたりCy5分子10個の標識レートでCy5-BSAの25ピコモル溶

10

20

30

40

50

液が固定化溶液中の Cy 5 - BSA の最適濃度であると決定した。加えて、固定化溶液としての、蛍光標識された BSA 分子と非標識 BSA 分子との混合物の適用は、蛍光標識されたタンパク質しか含有しない溶液の適用よりも、「ルミネセンスマーカスポット」中の蛍光標識された BSA 分子を対応する低めのタンパク質濃度で均一に分布させることに有意に適していた。すでに述べた、10% PBS (pH 7.4) 中非標識 BSA 25 µg/ml の濃度及び Cy 5 - BSA 25 pM の含量の固定化溶液が最適であることがわかった。「ルミネセンスマーカスポット」の被着の再現性を、上記と同様にして製造したセンサプラットフォームを使用して調査し、通常の市販スキャナ (Genetic Microsystems 418 Array Scanner) を使用して計測した。それにより、常に「ルミネセンスマーカスポット」で積分してわずか 3% ~ 4% のルミネセンス強さの差を測定した。

10

【0175】

種々の認識要素を、図 1 に示すように、1 行 4 個で 3 行の同一の計測区域 (スポット) に配置した。これらの行は、供給される試料あたり各個々の計測からの検定再現性に関してすでに統計的な情報を得るため、導波路中の励起光の伝播方向に対して平行に配置した。「ルミネセンスマーカスポット」は、認識要素を有するスポットの行に対して平行に、1 行 4 個で 4 行のスポットに配置した。「ルミネセンスマーカスポット」は、分析対象物検出のための計測区域に隣接するところで利用可能な励起光を参照するために使用した。層 (a) に内結合され、層 (a) 中を誘導される励起光の伝播方向に対して平行な行への配列はまた、伝播方向での励起光の減衰の測定に使用した。さらには、1 列 7 個の「ルミネセンスマーカスポット」2 列をアレイの始まり及び終わりに設けた。内結合され、誘導される励起光の伝播方向に関して。これらを、内結合格子の線に対して平行な、利用可能な励起光強さの均一性の測定に使用した。

20

【0176】

例 2

本発明によるキットを有する分析システム

センサプラットフォームを、格子線に対して平行及び垂直な方向への並進と、センサプラットフォームの格子線に対して平行な回転軸を中心とする回転と、を可能にするコンピュータ制御調節装置に取り付けた。励起光源として使用されるレーザの直後には、計測データを収集しないとき光路を塞ぐために使用されるシャッタを光路中に配置した。さらには、ニュートラルフィルタ又は偏光子を、この位置又はセンサプラットフォームに向かう励起光のさらなる光路中の他の位置で光路に挿入して、励起光強さを段階的又は連続的に変化させることができる。

30

【0177】

632.8 nm のヘリウムネオンレーザ (Melles-Griot, 05-LHP-901、1.1 mW) の励起光を円柱レンズによって一次元に拡大し、スリット型ダイアフラム (開口 0.5 mm × 7 mm) に通して、ほぼ矩形の断面及びほぼ均一な断面強さの光束を生成した。それに関して、内結合条件での TE₀ モードの励起のため、レーザ光の偏光をセンサプラットフォームの格子線に対して平行に調節した。励起光を、センサプラットフォームの背面から、すなわち、光学的に透明な層 (b) に通して、96 個の試料区画の 1 個の中の内結合格子に投射し、この例の条件下、試料区画内の計測区域のアレイの内結合格子を常に正方形ウェルの左端に位置させた。光学的に透明な層 (a) への最大限の内結合のため、センサプラットフォームと照射される励起光束との間の角度を、上記軸を中心にした回転によって調節した。センサプラットフォームの上記パラメータの場合、空気中の内結合のための共振角は約 2.6° であった。

40

【0178】

Kodak CCD チップ KAF 0401 E-1 を備えたペルチェ冷却の CCD カメラ (Ultra Pix 0401E、Astrocam、英国 Cambridge) (動作温度 - 30) を局所分解検出器として使用した。Computar タンデム型対物レンズ (f = 50 mm、1 : 1.3) を使用して、信号収集及び CCD チップへの焦点合せを実施した。フィルタ交換機には、中心透過波長 680 nm で帯域幅 40 nm の 2 個の干渉フィルタ (Omega、バーモント州 Brattleborough) を取り付け、

50

ニュートラルフィルタ（減衰し、散乱した励起光及び計測区域からのはるかに弱めのルミネセンス光を透過させるため）又は干渉フィルタと組み合わせたニュートラルフィルタ（計測区域から散乱した減衰励起光を透過させるため）をタンデム型対物レンズの2個の半分の間に配置した。励起波長での信号とルミネセンス波長での信号とを交互に計測できた。市販の像解析ソフトウェア（ImagePro Plus）を使用してデータ解析を実施した。

【0179】

例3

本発明によるキットを使用する検出方法

測定されるインターロイキンの特異的認識のために、サンドイッチアッセイのフォーマットを選択した。

10

【0180】

試料調製

3種のインターロイキン（hIL-2、hIL-4及びhIL-6）すべてを同じ濃度（00、10、30、70、150、300、600、1000pg/ml）でそれぞれ含有する、定量されるインターロイキンの混合校正溶液8種それぞれを、BSA0.1%及びTween 20 0.05%を含有するPBS（pH7.4）50µl中で製造した。これらの校正溶液は、センサプラットフォーム上の対応する専用アレイに塗布することにより、3種すべての分析対象物の校正曲線の同時生成のために専用に使用した。

【0181】

次に、校正溶液ならびに分析対象物として測定される3種のインターロイキンを未知の濃度で含む試料を、それぞれ、3種の二次ポリクロナールトレーサ抗体の混合物（0.1% BSA及び0.05% Tween 20を含むPBS（pH7.4）中、 5×10^{-10} M ビオチニル化抗hIL-2抗体、 10^{-10} M ビオチニル化抗hIL-4抗体及び 10^{-10} M ビオチニル化抗hIL-6抗体）を含有する溶液50µlと混合した。そして、それぞれ100µl容量のこれらの混合物を、0.1% BSA及び0.05% Tween 20を含有するPBS（pH7.4）中Cy5-ストレプトアビジン（ 5×10^{-10} M、Amersham-Pharmacia）の溶液と混合した。上記で報じた3種の異なるトレーサ抗体の濃度は、抗原-二次抗体複合体の、認識要素として別個の計測区域に固定化されたそれらのモノクロナール認識抗体への特異的結合から生じる蛍光の強さの予想される変化が同程度の大きさになる、すなわち、光電子システムの調節の変更なしに対応する校正曲線を記録することができるような方法で選

20

30

【0182】

この具体例のこの見地において、トレーサ試薬の濃度の適切な選択により、別個の計測区域に固定化された対応する認識要素への特異的結合から生じる予想される蛍光の強さが、一つの検定で同時に測定されるすべての分析対象物で同程度の大きさになる、すなわち、光電子システムの調節の変更なしに対応する校正曲線を記録することができることが実証された。

【0183】

そして、製造された混合溶液を暗所で1時間インキュベートしたのち、インキュベートしたもの（各100µl）を試料区画に充填した。それに関して、校正溶液を、濃度を増しながら、アレイA1～H1の試料区画（マイクロタイタプレートフォーマット、図1を参照）に充填し、未知の濃度の3種のインターロイキンを分析対象物として含有する、分析する88個の試料を他の試料区画A2～H12に充填した。暗所で2時間さらにインキュベートしたのち、アレイを計測した。

40

【0184】

アレイの読み出し

異なるアレイの計測区域から蛍光信号を読み出すために、試料区画を上にも有し、溶液を含有するセンサプラットフォームを、分析システム内に位置する上記調節装置に取り付けた。各アレイからのルミネセンス信号を測定するため、センサプラットフォームを、計測されるアレイに専用の格子構造により、励起光の最大内結合が得られるように調節した。こ

50

の調節は、励起波長のためのフィルタ交換機を配置することによって制御した。そして、計測区域（スポット）からの蛍光の強さを、ルミネセンス波長のためのフィルタ交換機的位置によって計測した。センサプラットフォームを、次の試料区画からルミネセンス信号を読み出すための次の位置へと並進させるにより、さらなる試料区画のアレイの読み出しを順に実施した。

【0185】**データ分析及び参照**

市販の像解析ソフトウェア（ImagePro Plus）を使用して像解析を実施した。それに関して、各アレイのスポットごとに積分蛍光強さを測定した。このようにして、3種のインターロイキンに関してアレイあたり常に4個の蛍光強さの積分値を得たのち、これら4個の

10

【0186】

さらには、インターロイキン測定のための常に4個の計測区域の対応する行の前のアレイの最初の列及び後のアレイの最後の列の2個のCy5-BSA参照スポット（「ルミネセンスマーカスポット」）を同様な方法で解析し、平均を出した。この平均参照値を、同じ行に位置する分析対象物測定のための計測区域からのルミネセンス信号の修正に常に使用した。

【0187】

相応に、同じ行のインターロイキン計測区域の前及び後のCy5-BSA参照スポットの平均値をアレイごとに測定した。次に、3種の分析対象物それぞれに測定した合計96の

20

【0188】

種々のセンサプラットフォーム（本例の場合、3種のプラットフォーム）での結果の比較のため、上記方法によって修正したルミネセンス強さを、0 pg/mlのインターロイキン濃度の場合の正規化値1にセットした。

【0189】

一例として、インターロイキン4の測定で得られ、この多分析対象物の免疫分析の較正に専用である修正していない未加工データを図2に示す。図中、蛍光強さの積分値はhIL4濃度の関数として示されている。図3は、上記平均計算の方法によって得られた較正データを示す。

30

【0190】

図4の連続した曲線は、これらの修正されたデータに当てはめたヒル関数を表す。塗りつぶしていない記号は、3種の異なるセンサプラットフォームを使用して測定された修正された較正信号を表す。塗りつぶした円は、それから測定した、種々のhIL4濃度の平均値を表す。このように、本発明のキット及びそれに基づく測定法により、すなわち、常に単一のセンサプラットフォームで実施される完全な多分析対象物免疫分析で、各プラットフォームでの完全な較正曲線の生成により、種々のセンサプラットフォームを比較した場合（図5）でさえ、わずか5%~20%の信号の可変性が達成されることが驚くべき結果として得られた。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 1行4個で3行の同一の計測区域（スポット）に配置した種々の認識要素を示す図である。

【図2】 多分析対象物の免疫分析の較正に専用である修正していない未加工データを示す図である。

【図3】 平均計算の方法によって得られた較正データを示す図である。

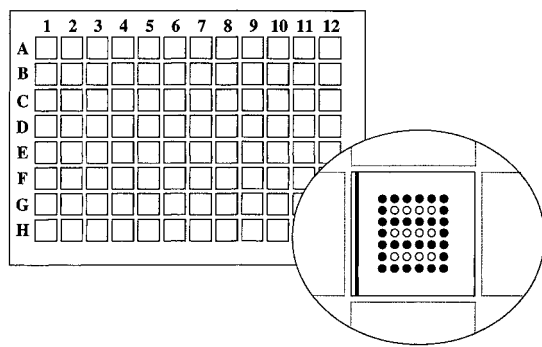
【図4】 修正されたデータに当てはめたヒル関数を示す図である。

【図5】 3種の異なるセンサプラットフォームを使用して測定された修正された較正信

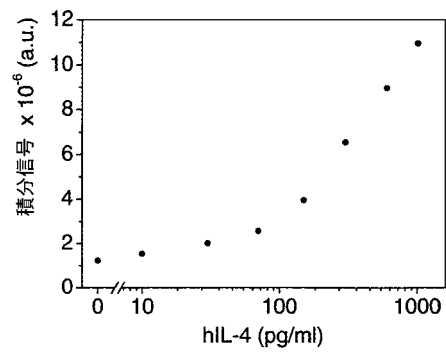
50

号を示す図である。

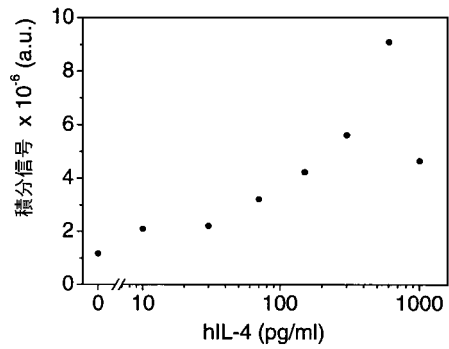
【図1】



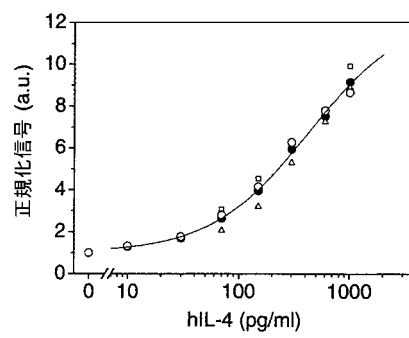
【図3】



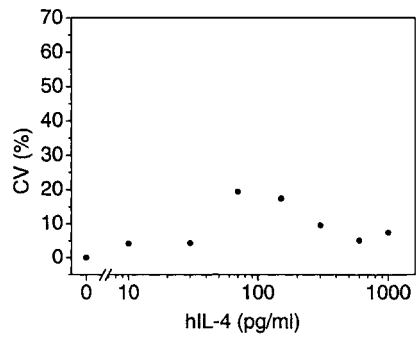
【図2】



【図4】



【 図 5 】



フロントページの続き

- (72)発明者 シック, エギンハルト
ドイツ国、79618 ラインフェルデン、ノルドシュワベナー・シュトラッセ 9
- (72)発明者 アーベル, アンドレアス・ペー
スイス国、ツェーハー - 4054 バーゼル、ロットベルクシュトラッセ 16アー
- (72)発明者 ドゥフェネク, ゲルト・エル
ドイツ国、79189 パート・クロツィンゲン、エツマッテンヴェーク 34
- (72)発明者 エーラート, マルクス
スイス国、ツェーハー - 4312 マグデン、イム・ブリューエル 6
- (72)発明者 クレスパツハ, ゲルハルト・エム
ドイツ国、79219 シュタウフェン、ブルクハルデンヴェーク 6
- (72)発明者 シュールマン - マーダー, エヴェリーネ
スイス国、ツェーハー - 5089 ツアイヒェン、タールヒューベル 1
- (72)発明者 ボップ, マルティン・アー
スイス国、ツェーハー - 4053 バーゼル、ブルンマッットシュトラッセ 11

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特表平11-505610(JP,A)
特開平05-209886(JP,A)
PLOWMAN T E, ANALYTICAL CHEMISTRY, 米国, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1999年10月
1日, V71N19, P4344-4352
MENDOZA L G, BIOTECHNIQUES, 米国, EATON PUBLISHING, 1999年10月, V27N4, P778,780,
782-786,788

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98
G01N 21/64
G01N 21/76
G01N 37/00

专利名称(译)	用于多分析物测定的试剂盒和方法		
公开(公告)号	JP4812223B2	公开(公告)日	2011-11-09
申请号	JP2002501026	申请日	2001-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	ZEPTOSENS		
申请(专利权)人(译)	Tsueputozensu股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜耳技术Sabishizu-GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	パウラクミヒャエル シックエギンハルト アーベルアンドレアスパー ドウフェネクゲルトエル エーラートマルクス クレスバツハゲルハルトエム シュールマンマーダーエヴェリーネ ポップマルティンアー		
发明人	パウラク,ミヒャエル シック,エギンハルト アーベル,アンドレアス・パー ドウフェネク,ゲルト・エル エーラート,マルクス クレスバツハ,ゲルハルト・エム シュールマン-マーダー,エヴェリーネ ポップ,マルティン・アー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N37/00 G01N21/64 G01N21/76 B01L3/00 G01N21/25 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	B01L3/5085 G01N21/6452 G01N21/648 G01N33/54373 G01N2021/6441 G01N2021/6482 Y10S435/808 Y10S435/975 Y10S436/805 Y10S436/808		
FI分类号	G01N33/543.597 G01N37/00.102 G01N21/64.F G01N21/76		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫		
优先权	2000001104 2000-06-02 CH		
其他公开文献	JP2004510130A5 JP2004510130A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

层 (a) 在至少一个激发波长下是透明的, 用于同时测定和/或定量测定几种分析物, 其折射率低于层 (a), 其至少在相同的激发波长下也是透明的直接地或通过粘附促进层, 传感器平台由薄光波导组成, 该光波导在层 (b) 的顶部具有至少一个光栅结构 (c), 具有折射率并在层 (a) 中调制本发明涉及试剂盒的各种实施方案, 其包括固定在层 (a) 中并布置在单独的测量区域 (d) 中的至少一个生化或合成检测元件阵列。检测元件用于分析物的特异性识别和/或结合和/或与其的特定相互作用。根据本发明的试剂盒还可以提供用于局部分辨率参考测量区域中存在的激发光强度的装置, 任选地由于一种或多种分析物之间的结合或它包括一个或多个用于校准由于与分析物的特定相互作用而在层 (a) 的近场中产生的至少一种发光的装置。分析分析物的液体样品是传感器平台上的测量区域

【 2 図】

