

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-503866

(P2010-503866A)

(43) 公表日 平成22年2月4日(2010.2.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	
	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
	GO 1 N 33/543 5 1 5 D	
	GO 1 N 33/543 5 1 5 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

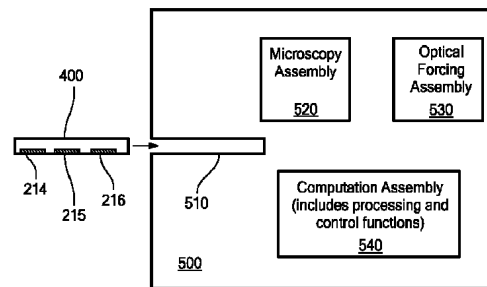
(21) 出願番号 特願2009-528509 (P2009-528509)
 (86) (22) 出願日 平成19年9月14日 (2007.9.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年5月11日 (2009.5.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/078561
 (87) 国際公開番号 W02008/034102
 (87) 国際公開日 平成20年3月20日 (2008.3.20)
 (31) 優先権主張番号 60/844,911
 (32) 優先日 平成18年9月15日 (2006.9.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/844,890
 (32) 優先日 平成18年9月15日 (2006.9.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/844,910
 (32) 優先日 平成18年9月15日 (2006.9.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509073420
 ヘモネティクス コーポレイション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 8 4, ブレインツリー, ウッド ロ
 ード 4 0 0
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ナットソン, クリストファー
 アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 6 4 0,
 シカゴ, ノース マグノリア アベニ
 ュー 4 7 1 2 ナンバー 1
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 官能化された表面に関する粒子の光学的操作による表面マッピング

(57) 【要約】

粒子の表面特性を分析するための方法および装置を提供する。粒子の表面特性の分析方法は、第1の化学種に対する特異的な結合親和性を有する第1の捕捉域と第1の粒子を結合すること、第1の粒子に光学力を適用すること、第1の粒子の光学力に対する反応を検知すること、および第1の粒子表面上の第1の化学種の有無、または量を判断するために検知反応を使用することを含む。本プロセスは、複数の粒子をテストするために、並行して繰り返されてもよい。粒子の表面特性の直接的なテストに加え、本方法は、自由または固定化検体の有無、または量を判断するために直接的、間接的、および競合的測定法で使用されてもよい。光学力を使用するために調整されるアビディティを有する捕捉域を備えた流体カートリッジを提供する。本方法を実施するためのソフトウェアルーチンも提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それぞれが表面を有する 1 つ以上の粒子の表面特性を分析するための方法であって、化学種に対し所与の親和性を有する少なくとも 1 つの捕捉域を有するサンプルホルダに複数の粒子を有する懸濁液を導入することと、

結合相互作用が該少なくとも 1 つの捕捉域と該粒子の少なくともサブセットとの間で生じることを可能とするように、該複数の粒子の少なくともサブセットを該少なくとも 1 つの捕捉域と接触させることであって、該結合相互作用は、該粒子の表面構造に関係している、ことと、

該粒子の少なくともサブセットのうちの少なくとも 2 つに同時に光学力を適用することであって、該力は、該粒子の反応を引き起こす傾向にあり、該反応は、該粒子と該少なくとも 1 つの捕捉域との間の結合相互作用の有無、または程度に依存する、ことと、

該光学力に対する該少なくとも 2 つの粒子の該反応を検知することと、

該粒子表面と該捕捉域との間に配置された化学種の有無、または量を判断するために該検知反応を使用することと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記光学力を適用することは、HOTを使用することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記接触させることは、複数の粒子を単一の捕捉域と接触させることを含み、光学力に対する該複数の粒子の前記反応が検知される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

結合相互作用が該第 1 の捕捉域と該第 1 の粒子との間で生じることを可能とするように、第 1 の化学種に対し特異的な結合親和性を有する第 1 の捕捉域と第 1 の粒子を接触させることであって、該結合相互作用は、該第 1 の粒子の表面と該第 1 の捕捉域との間に配置される該第 1 の化学種の分子の存在に関係している、ことと、

結合相互作用が、該第 2 の捕捉域と該第 2 の粒子との間で生じることを可能とするように、第 2 の化学種に対し特異的な結合親和性を有する第 2 の捕捉域と第 2 の粒子を接触させることであって、該結合相互作用は、該第 2 の粒子の表面と該第 2 の捕捉域との間に配置される該第 2 の化学種の分子の存在に関係している、ことと、

該第 1 および第 2 の粒子に光学力を適用することであって、該力は、該粒子の反応を生じさせる傾向にある、ことと、

該光学力に対する該第 1 および第 2 の粒子の該反応を検知することと、

該第 1 の粒子表面と該第 1 の捕捉域との間に配置された該第 1 の化学種、および該第 2 の粒子表面と該第 2 の捕捉域との間に配置された該第 2 の化学種の有無、または量を判断するために該検知反応を使用することと

をさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記粒子に力を適用することの前に粒子を同定することをさらに含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

粒子を同定すること、

第 1 のグループの同定された粒子を選択すること、

該第 1 のグループの粒子に光学力を適用すること、

第 2 のグループの粒子を選択すること、および

該第 2 のグループの粒子に光学力を適用すること

をさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

データ取得閾値に達するように、前記プロセスを反復することをさらに含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

前記力は、前記捕捉域に垂直かつ該捕捉域から離れる向きの成分を有する、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記力は、前記捕捉域により画定される平面と平行な成分を有する、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記力は、前記捕捉域により画定される平面に垂直である第 1 の方向と、平面と平行な第 2 の方向との双方において、該捕捉域から離れた位置に非結合粒子を変位させる傾向にある、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記反応は、前記捕捉域から粒子を除去することを含む、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記粒子は、細胞である、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記化学種は、細胞表面抗原である、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記粒子は赤血球であり、少なくとも 1 つの捕捉域は、細胞表面抗原に特異的なプローブを含む、請求項 13 に記載の方法。

20

【請求項 15】

前記判定は、血液型をさらに判定するために使用される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記血液型は、3 つ以上の細胞表面抗原の判定を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記血液型は、マイナーな血液型である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記プローブは、抗体、抗体断片、ペプチドリガンド、およびアプタマーのうちの 1 つである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

前記接触させることは、溶液を介して前記粒子が沈殿することを可能とすることを含む、請求項 1 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 20】

前記接触させることは、前記粒子を沈殿させるために重力を使用することをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記接触させることは、前記粒子を沈殿させるために光学力を使用することをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記光学力は、前記第 1 の粒子が沈殿した実質的に同一の溶液中に包含されている間に、該第 1 の粒子に適用される、請求項 19 に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記接触させることは、一部は前記第 1 の表面により、そして一部は第 1 の表面から離れたカバーにより画定される容積に溶液を導入することをさらに含み、該表面と該カバーのうちの少なくとも 1 つが実質的に光学的に透明である、請求項 1 から 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記カバーは、前記第 1 の粒子の直径の 1 倍を超えかつ 1000 倍未満の距離で前記第 1 の表面から離れている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

50

前記カバーは、前記第 1 の粒子の直径の 2 倍を超えかつ 20 倍未満の距離で前記第 1 の表面から離れている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記カバーは、15 ミクロンから 500 ミクロンの範囲の距離で前記第 1 の表面から離れている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記カバーは、前記第 1 の表面と該カバーにより画定される空間の閉塞を生じないくらい十分に大きい、前記第 1 の粒子が 10 分未満で沈殿できるくらい十分に小さい距離だけ該表面から離れている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記光学力を適用することは、ホログラフィック光ピンセットの使用を含む、請求項 1 から 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

少なくとも第 1 の捕捉域は、第 1 の標的部分に対して特異性を有する複数のプローブ分子を含み、該プローブ分子は、その上に複数の第 1 の標的部分を有する粒子に対してアビディティを有するように構成されており、該プローブ分子の該構成は、規定範囲内の力で除去することが可能であるように選択されている、請求項 1 から 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記規定範囲は、1 から 1000 pN である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記規定範囲は、10 から 200 pN である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記規定範囲は、20 から 100 pN である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

第 2 の捕捉域は、第 2 の標的部分に対して特異性を有する複数のプローブ分子を含み、該プローブ分子は、その上に複数の第 2 の標的部分を有する粒子に対してアビディティを有するように前記表面において構成されており、該プローブ分子の該構成は、規定範囲内の力で除去することが可能であるように選択されている、請求項 29 から請求項 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記規定範囲は、1 から 1000 pN である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記規定範囲は、10 から 200 pN である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記規定範囲は、20 から 100 pN である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

捕捉域の前記プローブ分子は、前記表面と該プローブを連結するリンカ部分の長さを変更することにより、規定範囲で除去するように構成されている、請求項 29 から請求項 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

捕捉域の前記プローブ分子は、該プローブの面密度を変更することにより、規定範囲で除去するように構成されている、請求項 29 から請求項 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

第 1 および第 2 の密度を達成するように、前記プローブを離すために非結合性表面部分を使用することをさらに含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

細胞の細胞表面抗原を特徴付けることをさらに含み、前記面密度は、該細胞表面上の細胞表面抗原の予測密度に基づき選択される、請求項 38 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

光学力を適用することは、粒子から隔たった位置に光学トラップの中心を置くことを含み、該粒子のポテンシャルエネルギーは、前記表面でかなりあり、該光学トラップの中心で最小であるため、該粒子が該トラップの光学力により該表面から除去される場合、該粒子は、該光学トラップの中心に移動する、請求項 1 から 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記接触させることは、受動的流動により溶液に前記第 1 の粒子を導入することを含む、請求項 1 から 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

時間とともに前記光学力の大きさを増すように、粒子に適用される該力の大きさを変動させることと、前記表面から前記粒子を除去するために必要な力の量を記録することとをさらに含む、請求項 1 から 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記粒子表面上の前記第 1 の化学種の有無、または量を判定するために、前記記録された力を基準力と比較することを含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記検知することは、自動顕微鏡検査を使用することを含む、請求項 1 から 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記光学力を適用することは、自動化されている、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

分析前に前記サンプルを希釈することおよび濾過することから選択された操作を実施するために、前記サンプルホルダを使用することをさらに含む、請求項 1 から 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記光学力を適用することは、HOTを使用することを含む、請求項 1 から 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

患者の血液サンプル中の複数の血液細胞表面抗原の有無、または量を判定するための方法であって、

血液サンプルを希釈することと、

該希釈血液サンプルを第 1 および第 2 の捕捉域と該希釈血液サンプルを接触させることであって、該第 1 の域は第 1 の血液細胞抗原に対して特異的な親和性を有するように官能化され、該第 2 の域は、第 2 の血液細胞抗原に対して特異的な親和性を有するように官能化される、ことと、

除去する成分を有する第 1 の光学力を該第 1 の域の少なくとも 1 つの細胞に適用することであって、該第 1 の力は、該第 1 の血液細胞抗原が細胞上に存在しない場合、該第 1 の域から該細胞を除去するのに十分な大きさであるが、該第 1 の血液細胞抗原が存在する細胞を除去するには不十分な大きさである、ことと、

除去する成分を有する第 2 の光学力を該第 2 の域の少なくとも 1 つの細胞に適用することであって、該第 2 の力は、該第 2 の血液細胞抗原が細胞に存在しない場合、該第 2 の域から該細胞を除去するのに十分な大きさであるが、該第 2 の血液細胞抗原が存在する細胞を除去するには不十分な大きさである、ことと、

該域から該細胞の除去または非除去を検知することとを含む、方法。

【請求項 5 0】

接触させることは、重力下で前記細胞が沈殿することを可能にすることをさらに含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

10

20

30

40

50

1つ以上の粒子上の標的部分の有無、または量を分析する装置であって、
 基質と、
 基質上に配置された第1および第2捕捉域と、
 を含み、

各捕捉域は、複数のプローブ部分を含み、該第1および第2の捕捉域のアビディティは、該捕捉域に対してより高い親和性を有する粒子が、変位させる光学力の存在下で保持される傾向にあり、該捕捉域に対してより低い親和性を有する粒子が、変位させる光学力の存在下で変位させられる傾向にあるように構成され、該光学力は規定範囲内にある、装置。

【請求項52】

10

カバーであって、ベース、捕捉域、およびカバーのうちの少なくとも1つが光学的に透明である、カバーと、

該捕捉域と該カバーとにより画定される容積の入口および出口と、

該捕捉域から該カバーを離し、哺乳類の細胞を含む溶液が導入されると、大部分の細胞が5分以内に該捕捉域に沈殿するような大きさのスペースであって、該捕捉域と該カバーにより画定される該容積への受動的流動による溶液の導入を可能とする大きさであるスペースと

をさらに含む、請求項51に記載の装置。

【請求項53】

前記カバーは、光学的に、赤外光に透明である、請求項52に記載の装置。

20

【請求項54】

前記規定範囲は、1から1000 pNである、請求項51または52に記載の装置。

【請求項55】

前記規定範囲は、10から200 pNである、請求項54に記載の装置。

【請求項56】

前記規定範囲は、20から100 pNである、請求項55に記載の装置。

【請求項57】

前記装置は、血液型検査のために構成される、請求項51から56のいずれか1項に記載の装置。

【請求項58】

30

前記装置は、前記サンプルを希釈することおよび濾過することから選択されるサンプルの操作手順を実施するように作動可能である、請求項51から57のいずれか1項に記載の装置。

【請求項59】

IgM溶液を複数の抗原結合領域を含むフラグメントの溶液に分割することと、

該結合領域を抗原結合サブフラグメントにさらに分割することと、

第1の抗原の特異的結合認識用の捕捉域を生成するために該サブフラグメントを基質に付着させることと

を含む、方法。

【請求項60】

40

第2の抗原の特異的結合認識用の第2の捕捉域を生成することをさらに含む、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

粒子を前記第1および第2の捕捉域にさらに曝し、該粒子表面上に存在する抗原を同定するために、該域に対する該粒子の親和性をランク付けする、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

前記粒子は細胞である、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

前記親和性をランク付けすることは、前記粒子へ光学力を適用することを含む、請求項60に記載の方法。

50

- 【請求項 6 4】
力は、同時に第 2 の粒子に適用される、請求項 6 3 に記載の方法。
- 【請求項 6 5】
前記力は、HOT を使用して適用される、請求項 6 4 に記載の方法。
- 【請求項 6 6】
溶液中の複数の分子の有無、または量を判定するための方法であって、
第 1 の固定化プローブを伴う少なくとも第 1 の捕捉域と第 2 の固定化プローブを伴う第 2 の捕捉域とを有する基質を提供することと、
該プローブに検体分子を結合させるのに十分な条件下で検体溶液と該捕捉域を接触させることと、
結合検体分子の複数種に特異的に結合する固定化汎用性プローブを有する粒子と該結合検体を接触させることと、
光学力を該粒子に適用することと、
該汎用性プローブと該結合検体との間の結合に依存する該光学力に対する該粒子の反応を観察することと
を含む、方法。
- 【請求項 6 7】
複数の粒子と前記結合検体を接触させることと、該粒子に光学力を適用することと、該粒子の反応を観察することとをさらに含む、請求項 6 6 に記載の方法。
- 【請求項 6 8】
前記粒子への前記力の適用は、同時に実施される、請求項 6 7 に記載の方法。
- 【請求項 6 9】
前記検体溶液は、流体連通が前記捕捉域間で確立されるような方法で複数の捕捉域に接触する、請求項 6 7 に記載の方法。
- 【請求項 7 0】
前記検体溶液は、捕捉域間の流体連通なしに複数の捕捉域に接触する、請求項 6 7 に記載の方法。
- 【請求項 7 1】
前記検体溶液は患者の抗体を含む、請求項 6 6 から 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 7 2】
前記汎用性プローブは、前記患者の抗体のうちの少なくとも 1 つの種類に対する広範な選択性を有する二次抗体を含む、請求項 7 1 に記載の方法。
- 【請求項 7 3】
前記種類は、IgG、IgE、IgA、および IgM のうちの 1 つから選択される、請求項 7 2 に記載の方法。
- 【請求項 7 4】
コンピュータシステムとともに使用するための有形のコンピュータ可読媒体上のコンピュータプログラム製品であって、
捕捉域に接触している複数の着目粒子を同定するためのコンピュータコードと、
該粒子への変位させる光学力の適用を作動するためのコンピュータコードと、
該光学力に対する観察した該粒子の反応を記録するためのコンピュータコードと
を含む、コンピュータプログラム製品。
- 【請求項 7 5】
複数の顕微鏡視野を選択するためのコンピュータコードをさらに含む、請求項 7 4 に記載のコンピュータプログラム製品。
- 【請求項 7 6】
閾値量のデータが蓄積された時を判定するためのコンピュータコードをさらに含む、請求項 7 4 に記載のコンピュータプログラム製品。
- 【請求項 7 7】
複数の粒子の表面特性を分析するための方法であって、

10

20

30

40

50

該複数の粒子を含有する懸濁を基質上に複数の捕捉域を有する流体カートリッジに導入することであって、該カートリッジは、カバーにより結合される流体カラムを画定することと、

該捕捉域に接触するように該粒子を沈殿させることと、
 光学力を該粒子に適用することと、
 該光学力に対する該粒子の反応を観察することと
 を含み、

該流体カラムの高さは、赤血球が10分未満の時間で該捕捉域に接触するように沈殿することを可能とするように選択される、方法。

【請求項78】

前記時間は5分未満である、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

競合的測定法のための方法であって、

複数のサンドイッチ構造を生成することであって、各サンドイッチ構造は、基質に固定される第1のプローブ分子の集まりと、可逆的に該第1のプローブ分子に結合する代理分子の集まりと、可逆的に該代理分子に結合する複数の第2のプローブ分子を担持する粒子とを含む、ことと、

検体溶液を導入することと、

該第1および第2のプローブ分子に対する親和性を有する検体分子が、該粒子と該基質との間の結合強度を変更するように、該代理分子の少なくともいくつかを変位させるのに十分な時間インキュベートすることと、

光学力を該粒子に適用することと、

該光学力に対する該粒子の反応を観察することと、

該検体溶液の内容を判定するために該反応を使用することと

を含む、方法。

【請求項80】

異なる対応する検体分子に特異的なサンドイッチ構造が、複数の検体種について報告するように、前記基質の異なる領域に配置される、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

前記代理分子は、対応する検体分子より、前記粒子と前記基質との間でより強い結合力を生み出す傾向がある、請求項79または請求項80に記載の方法。

【請求項82】

前記代理分子は、対応する検体分子より、前記粒子と前記基質との間でより弱い結合力を生み出す傾向がある、請求項79または請求項80に記載の方法。

【請求項83】

光学力は、複数の粒子に同時に適用される、請求項79から82のいずれか1項に記載の方法。

【請求項84】

HOT性能と顕微鏡を使用する成分サンプル処理システムであって、

包囲体と、

サンプル領域を有するサンプルステージと、

HOTサブシステムであって、

レーザと、

回折光学要素と、

該サンプル領域に誘導されたHOT放出口と、

該サンプル領域に誘導された供給源出力を有する少なくとも1つの照明源と、

該サンプル領域と光学的に整列可能な対物レンズと、

該サンプル領域にフォーカスされるように構成されたカメラと

を含む、HOTサブシステムと

を含み、

10

20

30

40

50

少なくとも、該サンプル領域、該HOT放出口、および該照明源出力は、該包囲体に包囲されている、システム。

【請求項 85】

前記システムおよび全ての構成要素は可搬構造上に担持される、請求項 84 に記載の成分サンプル処理システム。

【請求項 86】

統合コンピュータインターフェース、蓋の開放に応じてレーザ照明を遮断するための安全機構、流体サンプルカートリッジを位置決めするためのジグ、車輪付き台、および搭載された照明源から成る群から選択される少なくとも一つの特徴をさらに含む、請求項 84 に記載のシステム。

10

【請求項 87】

図示および説明されたHOTおよび顕微鏡のためのシステム。

【請求項 88】

図示および説明された流体カートリッジ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

本出願は、米国仮特許出願第 60 / 844 , 911 号 (2006 年 9 月 15 日出願、名称「Determination of antigen-antibody attachment for protein assay and blood typing manipulation of multiple bodies within an optically defined potential」、米国仮特許出願第 60 / 844 , 890 号 (2006 年 9 月 15 日出願、名称「Substrate Functionalization for Blood Typing」、米国仮特許出願第 60 / 844 , 910 号 (2006 年 9 月 15 日出願、名称「Analytical cartridge for optical manipulation」、米国仮特許出願第 60 / 844 , 763 号 (2006 年 9 月 15 日出願、名称「Compact sample testing apparatus incorporating holographic optical trapping」、米国仮特許出願第 60 / 931 , 451 号 (2007 年 5 月 22 日出願、名称「Analytical cartridge for blood typing」) に基づく優先権を主張する。これらすべての仮特許出願は、本明細書においてその全体が参照により引用される。

20

30

【0002】

(技術分野)

本発明は、細胞表面抗原分析を含む分析目的において検体またはプローブ粒子を操作するために光学的に生成された力の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

マイクロプレートおよびバイオチップ等の形態での配列分子の使用は、自然界について回収される情報量をさらに増加させた。多くのバリエーションが知られるが、このような配列の使用は、一般的に、基質上のプローブまたは検体の固定化、および他の溶液相分子と固定化分子の相互作用を測定するための種々の技術の使用を含む。このような配列技術の特異な実施例は、マイクロプレート、核酸バイオチップ (例えば、Affymetrix および Illumina から実用化されているもの) およびタンパク質バイオチップ (例えば、Invitrogen ProtoArrayTM) で実施される免疫測定法 (例えば、酵素結合の免疫測定法、ELISA) を含む。バイオチップは、通常、ガラス基質を使用するが、ELISA 用のマイクロプレートは、しばしば、照射されたポリスチレンから構成される。配列は、固定化分子は、互いにまたは基準特性に関して、画定され

40

50

た位置に配置されるという意味で一般的に規則正しいが、いわゆる「溶液相測定法」も実用化されている。Luminescence X-MapTM技術は、ビーズ懸濁液への検体の結合を測定する。懸濁液は、結合プローブと対応する比率を変えた2つの蛍光性識別子分子の混合物とで共に標識化された多数の粒子を混合し生成される。結合型の蛍光で標識化された検体は、フローサイトメータを使用して識別子比率に沿って検知される。

【0004】

個別の分子の検知に加え、粒子（生体細胞を含む）は、配列技術を使用して分析される。例えば、ELISAまたはフローサイトメータを介して細胞表面抗原を検知することは、当該分野で周知である。Oberhardtの特許文献1は、共役抗体受容体を用いた複数の捕捉域の1つに結合した細胞を検知するために顕微鏡を使用して細胞をテストしたことを開示している。

10

【0005】

従来の配列の主な限界は、分析を有用にするため、通常、平衡に十分に近い結合状態に達するための長いインキュベーション時間が必要なことである。これは、サンプルまたは試薬が、長時間、場合によっては、一般的な営業日の8時間より長いELISAマイクロプレートまたはパイオチップでインキュベーションさせることを必要とする場合がある。このような遅延は、さらなる出費、緊急事態での使用の妨げ、遅延インキュベーション時間中の試薬の分解によるデータ品質の低下を生じる可能性がある。従来のアプローチの他の限界としては、労働および設備の観点からさらなる出費をもたらす検体の標識化ステップと厳密な洗浄ステップの必要性であり、データ品質に影響する場合がある。マイクロプレートベースのアプローチは、比較的、大量のテストサンプルおよび試薬を使用する。

20

【0006】

当該分野で周知のように、異なる患者からの赤血球（「RBC」）は、それらの表面上に異なる抗原を有し、特異なRBC抗原を有する患者からこれらの抗原を欠損する他の患者へ全血を輸血すると、受血者に有害な免疫反応を引き起こす場合がある。したがって、血液型の判定は、一般的に、凝集測定法により実施される。

【0007】

血液型の判定は、被験者のRBCの表面に存在する血液型抗原または抗体の同定を必要とする。血液型AおよびB抗原は、種々の抗原がRhシステムと関連付けられるように、一般的に同定されるが、D抗原は、臨床的に最も重大な意味を持つ。現在、血液型の判定は、血液型抗体（例えば、Hillyardらの特許文献2を参照）に加え、赤血球（RBC）の凝集を検知することにより実施される。血液サンプルの凝集は、添加された抗体に対応する抗原において陽性の結果を示す（例えば、血液型抗原A、血液型抗原Rh）。

30

【0008】

個人により抗体反応性に変動があるため、そして、被験者の血液内に抗体が事前に存在する可能性があるため、偽の結果の可能性が存在する。偽の結果は、誤った血液型の判定を導き、今度は、有害な輸血反応の可能性をもたらす場合がある。さらに、現在の技術は、テストに比較的大量の血液（約3mL）を必要とする。したがって、少量を使用しながら血液型を判定する能力は、提供者の快適さを増大し、新生児溶血性疾患（HDN）を被る新生児等の貧血性患者に対処するときに非常に役立つ。単一のサンプルから血液型を判定できる能力は、現在、テストされる抗原ごとに複数の個別の反応容量に別々に注入される血液サンプルを使用する既存の技術に対して著しい改善でもあるだろう。

40

【0009】

さらに、それぞれが特異な検体に対して周知の特異な親和性を有する種々の試薬に関して、少数のRBC、または他の細胞あるいはより一般的な有機体の並行相互作用を判断する能力は、重要な分析および診断価値があるだろう。ABおよびRhシステムの双方の抗原に関する単一の血液サンプルからのRBCの並行測定法は、このようなシステムの一用途の実施例である。

【0010】

ホログラフィック光トラッピング（HOT）は、生物学的構成要素等の微視的およびナ

50

ノスケール粒子の操作において有用な手段を提供する。ホログラフィック光トラッピングの基本原理だけでなく、そのような光トラッピングを生成および使用するために構成されるシステムは、特許文献3～特許文献5に開示されており、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0011】

顕微鏡ベースのシステムでの小サンプル粒子の検査において、顕微鏡システムの光学と一致するように保持されるように、顕微鏡スライド等の流体カートリッジにサンプルを設置することが必要である。このような流体カートリッジは、サンプルスライド、サンプルチップまたはカバースリップとしても知られる。ホログラフィック光トラッピング技術で有用なサンプルスライドは、特許文献6、特許文献7に開示されており、参照によりその全体が本明細書に援用される。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】米国特許第6,251,615号明細書

【特許文献2】米国特許第4,894,347号明細書

【特許文献3】米国特許第6,055,106号明細書

【特許文献4】米国特許出願第10/701,324号明細書

【特許文献5】米国特許出願第09/886,802号明細書

【特許文献6】米国特許出願第10/294,599号明細書

20

【特許文献7】米国特許出願公開第20030119177号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明の具体的な実施形態によると、方法は、それぞれが表面を有する1つ以上の粒子の表面特性を分析するために使用される。本方法は、化学種に所与の親和性を有する少なくとも1つの捕捉域を有するサンプルホルダに複数の粒子を有する懸濁液を導入すること、結合相互作用は粒子の表面構成に関連するが、結合相互作用が少なくとも1つの捕捉域と粒子の少なくともサブセットとの間で生じるように、少なくとも1つの捕捉域と複数の粒子の少なくともサブセットを接触させること、力は、粒子の反応を引き起こす傾向にあり、反応は、粒子と少なくとも1つの捕捉域との間の結合相互作用の有無、または程度に依存するが、粒子の少なくともサブセットの少なくとも2つに光学力を同時に適用すること、光学力への少なくとも2つの粒子の反応を検知すること、および粒子の表面の組成を判定するために検知反応を使用することを含む。

30

【0014】

光学力の適用は、ホログラフィック光トラッピング(HOT)の使用を含む。接触は、単一の捕捉域と複数の粒子を接触させること、および光学力に対する複数の粒子の反応を検知することを含む。本方法は、結合相互作用が、第1の粒子の表面上の第1の化学種の分子の存在に関連するが、結合相互作用が第1の捕捉域と第1の粒子との間で生じるように、第1の化学種に特異的な結合親和性を有する第1の捕捉域と第1の粒子を接触させること、結合相互作用が、第2の粒子の表面上の第2の化学種の分子の存在に関連するが、結合相互作用が第2の捕捉域と第2の粒子との間で生じるように、第2の化学種に特異的な結合親和性を有する第2の捕捉域と第2の粒子を接触させること、力は、粒子の反応を引き起こす傾向にあるが、第1および第2の粒子に光学力を適用すること、光学力に対する第1および第2の粒子の反応を検知すること、第1の粒子表面上の第1の化学種の、および第2の粒子表面上の第2の化学種の有無、または量を判定するために検知反応を使用することを含んでもよい。

40

【0015】

本方法は、粒子に力を適用する前に粒子を同定することを含んでもよい。また、本方法は、粒子の同定、同定された粒子の第1のグループの選択、第1のグループの粒子への光

50

学力の適用、第2のグループの粒子の選択、および第2のグループの粒子への光学力の適用を含んでもよい。

【0016】

本方法のステップは、データ取得閾値に達するように反復されてもよい。

【0017】

力は、捕捉域に垂直な成分と捕捉域から離れる向きの成分を有してもよい。代替的に、または追加で、力は、捕捉域により画定される平面と平行する成分を有してもよい。力は、捕捉域により画定される平面に垂直である第1の方向と、平面と平行する第2の方向の双方に、捕捉域から離れた位置に非結合粒子を変位させる傾向にある。

【0018】

反応は、捕捉域から粒子を除去することを含んでもよい。

【0019】

粒子は細胞であってもよい。化学種は、細胞表面抗原であってもよい。

【0020】

一実施形態において、粒子は赤血球であり、少なくとも1つの捕捉域は、細胞表面抗原特異性プローブを含む。さらに、判定は、例えば、マイナーな血液型 (minor blood type) 等、3つ以上の表面抗原に関わる血液型を含む、血液型をさらに判定するために使用されてもよい。

【0021】

プローブは、例えば、抗体、抗体断片、またアプタマーであってもよい。接触ステップは、例えば、粒子を沈殿させるために重力を使用する、または粒子を沈殿させるために光学力を使用する等、溶液を介して粒子を沈殿させることを含んでもよい。接触は、一部、第1の表面により、そして一部、第1の表面から離れたカバーにより画定される容積に溶液を導入することを含んでもよく、表面とカバーの少なくとも1つが実質的に光学的に透明である。カバーは、第1の粒子の直径の1倍を超えかつ1000倍未満の距離で第1の表面から離れていてもよい。カバーは、第1の粒子の直径の2倍を超えかつ20倍未満の距離で第1の表面から離れていてもよい。カバーは、15ミクロンから500ミクロンの範囲の距離で第1の表面から離れていてもよい。カバーは、第1の表面とカバーにより画定される間隔の閉塞を生じないような十分な長距離で前記表面から離れ、カバーは、さらに、10分未満で第1の粒子が沈殿できるくらい十分に小さい。光学力の適用ステップは、

【0022】

第1の捕捉域は、第1の標的部分に対して特異性を有する複数のプローブ分子を含んでもよく、プローブ分子は、その上の複数の第1の標的部分を有する粒子に対してアビディティを有するように構成されており、プローブ分子の構成は、規定範囲内の力で除去されるように選択される。規定範囲は、例えば、1から1000 pN、10から200 pN、または20から100 pNであってもよい。本方法は、第2標的部分に対して特異性を有する複数のプローブ分子を含む第2の捕捉域を含んでもよく、プローブ分子は、その上の複数の第2標的部分を有する粒子に対してアビディティを有するように表面上に構成され、プローブ粒子の構成は、規定の範囲の力で除去されるように選択される。規定範囲は、

【0023】

光学力の適用は、粒子から間隔をあけた位置に光トラップの中心を置くことを含み、粒子のポテンシャルエネルギーは、表面でかなりあり、光トラップの中心で最小であるため

10

20

30

40

50

、粒子がトラップの光学力により表面から除去される場合、粒子は、光トラップの中心に移動する。

【0024】

接触は、受動的流動により溶液に第1の粒子を導入することを含んでもよい。

【0025】

本方法は、時間とともに力の規模を増大するように、粒子に適用する光学力の規模を変更すること、および表面から粒子を除去するために必要な力の量を記録することを含んでもよい。本方法は、第1の粒子表面上の第1の化学種の有無、または量を判定するために、記録された力を基準力と比較することを含んでもよい。検知は、自動顕微鏡検査の使用を含んでもよい。光学力の適用は自動であってもよい。

10

【0026】

サンプルホルダは、分析前のサンプルの希釈および濾過から選択される操作を実施するために使用されてもよい。

【0027】

本発明の実施形態において、方法は、患者の血液サンプル中の複数の血液細胞表面抗原の有無、または量を判定するために使用される。本方法は、血液サンプルの希釈、第1の域が第1の血液細胞抗原において特異な親和性を有するように官能化され、第2の域が第2の血液細胞抗原において特異な親和性を有するように官能化される、第1および第2の捕捉域と希釈した血液サンプルとの接触、第1の血液細胞抗原が細胞上に存在しない場合、第1の光学力は第1の域から細胞を除去するのに十分な大きさであるが、第1の血液細胞抗原が存在する細胞を除去するのに不十分な大きさである、第1の域で少なくとも1つの細胞に対する除去成分を有する第1の力の適用、第2の血液細胞抗原が細胞上に存在しない場合、第2の光学力は第2の域から細胞を除去するのに十分な大きさであるが、第2の血液細胞抗原が存在する細胞を除去するのに不十分な大きさである、第2の域で少なくとも1つの細胞に対する除去成分を有する第2の力の適用、および域から細胞の除去または非除去の検知を含む。接触は、細胞が重力下で沈殿することをさらに含んでもよい。

20

【0028】

本発明の実施形態において、1つ以上の粒子上の標的部分の有無、または量の分析のための装置は基質を含み、第1および第2の捕捉域は基質上に配置され、それぞれの捕捉域が複数のプローブ部分を含み、第1および第2捕捉域のアビディティが構成されるため、捕捉域により高い親和性を有する粒子が変位させる光学力の存在下で保持される傾向にあり、捕捉域により低い親和性を有する粒子が変位させる光学力の存在下で置換される傾向にあり、光学力は、特定の範囲にある。

30

【0029】

任意に、本装置は、ベース、捕捉域、およびカバーの少なくとも1つが任意に透明であるカバー、捕捉域およびカバーにより画定される容積の入口および出口、捕捉域からカバーを離し、哺乳類細胞を含有する溶液を導入する時に、大部分の細胞が5分以内に捕捉域に沈殿するような大きさのスペースを含んでもよい。本スペースは、また、捕捉域とカバーにより画定される容積への溶液の受動的流動を介した導入が可能な大きさである。

【0030】

本装置は、光学的に赤外光に対し透明であるカバーを含んでもよい。本装置における規定範囲は、例えば、1から1000 pN、10から200 pN、または20から100 pNであってもよい。本装置は、血液型の判定のために構成されてもよく、サンプルの希釈および濾過から選択されるサンプルの操作手順を実施するように作動可能であってもよい。

40

【0031】

本発明の実施形態において、本方法は、複数の抗原結合性領域を含む溶液のフラグメントにIgM溶液を分割すること、結合領域を抗原結合サブフラグメントにさらに分割すること、および第1の抗原の特異な結合認識用の捕捉域を生成するために、サブフラグメントを基質に付着させることを含む。本方法は、第2の抗原の特異な結合認識用の第2の捕

50

捉域を生成することも含んでよい。本方法は、同類の粒子を第1および第2の捕捉域に曝し、粒子表面に存在する共通抗原を同定するために領域に粒子の親和性をランク付けすることを含んでもよい。粒子は、細胞であってもよい。親和性のランク付けは、粒子への光学力の適用を含んでもよい。力は、同時に第2の粒子に適用されてもよい。力は、HOTを使用して適用されてもよい。

【0032】

一実施形態において、第1の固定化プローブを有する少なくとも第1の捕捉域と、第2の固定化プローブを有する第2の捕捉域をもつ基質の提供、プローブに検体分子を結合させるのに十分な条件下での検体溶液と捕捉域との接触、複数種の結合性検体分子に特異的に結合する固定化された汎用性プローブを有する粒子と結合性検体との接触、粒子への光学力の適用、および汎用性プローブと結合性検体との間の結合に依存する光学力に対する粒子の反応の観察を含む、溶液中の複数の分子の有無、または量を判定するための方法がある。

10

【0033】

任意に、または追加で、本方法は、複数の粒子と結合性検体との接触、粒子への光学力の適用、および粒子の反応の観察を含んでもよい。粒子への力の適用は、同時に実施されてもよい。検体溶液は、捕捉域中に確立される液体の連通を生じるような方法で複数の捕捉域に接触してもよい。代替的に、または追加で、検体溶液は、捕捉域間の流体連通なしに複数の捕捉域に接触してもよい。検体溶液は、患者の抗体を含んでもよい。汎用性プローブは、少なくとも患者の抗体の種類に対して広範な選択性をもつ2次的抗体を含んでもよい。抗体の種類は、IgG、IgE、IgA、およびIgMの1つから選択されてもよい。

20

【0034】

本発明の実施形態において、コンピュータシステムとともに使用するための有形のコンピュータ可読媒体上のコンピュータプログラム製品は、捕捉域に接触する複数の着目粒子を同定するためのコンピュータコードと、粒子への光学力置換の適用を作動するためのコンピュータコードと、光学力に対する観察した粒子の反応を記録するためのコンピュータコードとを含む。

【0035】

任意に、または追加で、コンピュータプログラム製品は、複数の顕微鏡視野を選択するためのコンピュータコードおよび/または、閾値量のデータが蓄積された時を判定するためのコンピュータコードを含んでもよい。

30

【0036】

本発明の実施形態において、複数の粒子の表面特性を分析するための方法は、カバーにより結合されたカートリッジが流体カラムを画定する、複数の粒子を含有する懸濁を基質上に複数の捕捉域を有する流体カートリッジに導入し、捕捉域に接触するように粒子を沈殿させ、光学力を粒子に適用し、光学力に対する粒子の反応を観察することを含む。流体カラムの高さは、10分未満または5分未満の時間で、捕捉域に接触するように赤血球が沈殿するように選択される。

【0037】

本発明の実施形態において、競合的測定法の方法は、各サンドイッチ構造が基質に固定される第1のプローブ分子の集まりを含み、第1のプローブ分子に可逆的に結合する代理分子の集まりと、代理分子に可逆的に結合する複数の第2のプローブ分子を担持する粒子の集まりである複数のサンドイッチ構成の生成と、検体溶液の導入と、第1および第2のプローブ分子に対して親和性を有する検体分子が、粒子と基質との間の結合強度を変更するように、代理分子の少なくともいくつかを変位させるのに十分な時間のインキュベーションと、光学力の粒子への適用と、光学力に対する粒子の反応の観察と、検体溶液の内容を判定するための反応の使用を含む。

40

【0038】

サンドイッチ構成は、異なる対応する検体分子に対して特異的であり得、複数の検体種

50

について報告するために、基質の異なる領域に配置される。代理分子は、対応する検体分子より粒子と基質との間で強い結合力を生み出す傾向にあってもよい。代替的に、または追加で、代理分子は、対応する検体分子より粒子と基質との間で弱い結合力を生み出す傾向にあってもよい。光学力は、複数の粒子に同時に適用されてもよい。

【0039】

本発明の実施形態において、成分サンプル処理システムは、HOT性能と顕微鏡を使用し、包囲体と、サンプル領域を用いたサンプル台と、レーザ、回折光学要素、サンプル領域に誘導されるHOT放出口、サンプル領域に誘導される供給源出力を有する少なくとも1つの照明源、サンプル領域と光学的に整列可能な対物レンズ、およびサンプル領域にフォーカスされるように構成されたカメラを含むHOTサブシステムとを含む。少なくとも、サンプル領域、HOT放出口、および照明源出力は、包囲体に囲まれている。

10

【0040】

任意に、または追加で、全ての構成要素は、可搬構造上に担持される。本システムは、統合コンピュータインターフェース、蓋の開放に応じてレーザ照明を遮断するための安全機構、流体サンプルカートリッジを配置するためのジグ、および車輪付き台からなる群から選択される少なくとも1つの特徴も含んでもよい。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】図1は、本発明の一実施形態における、粒子表面の分析方法のフローチャートである。

20

【図2】図2は、図1の方法を用いて使用するための捕捉域を有する装置の平面図である。

【図3】図3は、分析血液細胞を有する図2の装置を示す。

【図4】図4は、抗体プローブを有する捕捉域を含む図2-3の装置の横断面図を示す模式図である。

【図5】図5は、細胞が捕捉域に沈殿した後の図4の装置を示す模式図である。

【図6】図6は、図2-4の装置の横断面図と種々のプローブ密度を図示した模式図である。

【図7】図7は、図2-4の装置の横断面図と生体不活性部分の使用を図示した模式図である。

30

【図8】図8は、本発明の一実施形態における、分析用カートリッジと装置を含むシステムを示す模式図である。

【図9】図9は、本発明の一実施形態における、斜図でカートリッジを示す模式図である。

【図10】図10は、本発明の一実施形態における、統合されたアセンブリにより製造された図9のカートリッジの分解図である。

【図11】図11は、本発明一実施形態における、複数の分析チャンバを有するカートリッジである。

【図12】図12は、本発明の別の実施形態における、複数の分析チャンバを有するカートリッジである。

40

【図13a】図13aは、本発明の一実施形態における、毛管作用によりカートリッジに流体を充填するプロセス中の図12のカートリッジを示す。

【図13b】図13bは、本発明の一実施形態における、集積流体サンプルカートリッジを示す。

【図13c】図13cは、本発明の一実施形態における、別の流体サンプルカートリッジを示す。

【図14】図14は、本発明の一実施形態における、HOTと顕微鏡を組み合わせた装置を模式的に示す。

【図15】図15は、本発明の一実施形態における、HOTと顕微鏡を組み合わせた代替装置を模式的に示す。

50

【図 1 6】図 1 6 は、図 1 4 - 1 6 の実施形態で使用するための顕微鏡の斜視図を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、図 1 4 - 1 6 の実施形態で使用するための H O T サブシステムの斜視図を示す。

【図 1 8】図 1 8 本発明の実施形態における、H O T と顕微鏡を組み合わせたコンパクトで可搬性のある装置の模式図を示す。

【図 1 9】図 1 9 は、図 1 9 の装置の構成要素を模式的に示す。

【図 2 0】図 2 0 は、自動装置上で図 1 の方法を実施するためのソフトウェア実装用のフローチャートである。

【図 2 1】図 2 1 は、被覆捕捉域を生成するために I g M 抗体を細分化するための反応スキームである。

【図 2 2 a】図 2 2 a は、検体抗原が基質に付着し、粒子標識プローブにより認識される、本発明の実施形態に従う測定法を模式的に示す。

【図 2 2 b】図 2 2 b は、抗原がプローブにより認識されない、図 2 2 a の測定法を模式的に示す。

【図 2 3 a】図 2 3 a は、検体抗原が基質に付着し、抗体の複合体と粒子標識プローブにより認識される、本発明の実施形態に従う測定を模式的に示す。

【図 2 3 b】図 2 3 b は、抗原が複合体により認識されない、図 2 3 a の測定法の模式図である。

【図 2 4】図 2 4 は、粒子と捕捉域との間の結合力がサンプルの導入により低下する、本発明の実施形態に従う競合的測定法を示す反応スキームである。

【図 2 5】図 2 5 は、粒子と捕捉域との間の結合力がサンプルの導入により増大する、本発明の実施形態に従う競合的測定法を示す反応スキームである。

【発明を実施するための形態】

【0042】

本発明の前述の特徴は、図を伴う以下の発明を実施するための最良の形態を参照することにより、より容易に理解されるだろう。

【0043】

定義。本明細書および請求項で使用される場合、以下の用語は、文脈上必要な場合以外は、示される意味を有するものとする。

【0044】

「光学力」とは、任意の方向に粒子を変位させる傾向のある高められたポテンシャルエネルギーの状態を生成するために適切に誘導またはパターン化された照明を使用して粒子に加えられる力を意味する。

【0045】

「粒子」とは、表面を有し、光学力により操作できる物質を意味する。細胞およびウイルスは、種々の形状の微小球またはマイクロビーズ等の、小さな重合体物質および無機物質のように「粒子」である。

【0046】

粒子に関連して、「表面」は、プローブにアクセス可能な粒子の一部を意味する。

【0047】

流体カートリッジまたは他のサンプルホルダに関連して、「受動的流動」とは、サンプルホルダが、ポンプを使用せずに、毛管作用または他の方法により流体を引き出すことを意味する。

【0048】

粒子分析のための装置に関連する時、用語「自動顕微鏡検査」とは、適切な位置決めおよび/またはソフトウェアルーチンを通して、装置が、それらの位置を分析および記録するために粒子を少なくとも自動的に位置付けることを意味する。

【0049】

粒子の表面上の実体に関連する時、「化学種」とは、任意の分子、分子集合体、高分子、高分子集合体、または部分を意味する。用語「化学種」は、ペプチド、タンパク質、炭

10

20

30

40

50

水化物、糖タンパク質、抗体、核酸、重合体、薬物複合体等の生物学的および非生物学的高分子を明示的に含む。

【0050】

「プローブ」とは、任意の標的粒子、分子、集合体または部分に対して特異的な結合優先性を有する、分子実体、分子、または分子実体の集合体を意味する。

【0051】

「捕捉域」とは、任意の検体と特異的に相互作用可能な表面領域を与える受容体を含む表面領域を意味する。

【0052】

本明細書および任意の付属の請求項で使用されるように、「配列」とは、1または複数の時間点で、規則的に間隔をあげ、周期的に間隔をあげ、またはそれ以外で、離れた空間的位置に配置される一連の複数の要素を意味する。

10

【0053】

「血液型」とは、A、B、Rh（国際輸血学会により定義されるように、Rh1からRh53の全ての53のRh抗原を含む）、A₃、A_x、A_{end}、A_m、A_y、A_{e1}、B₃、B_x、B_m、B_{e1}、Duffy、Kell、Kidd、Lewis、MNS、Lutheran、Diego、Cartwright、Xg、Scianna、Dombrock、Colton、Landsteiner-Weiner、Chido-Rodgers、H、Kx、Gerbich、Cromer、Knops、Indian、Ok、Raph、John Miltion Hagen、I、Globoside、GIL、および他の血液型抗原から選択される任意の個々または抗原の組み合わせの判定を含む。

20

【0054】

本発明の例示的な実施形態は、相互作用する表面性質に関する情報を抽出する目的のために粒子表面と他の表面との間の相互作用を観察するための、および表面の組成、表面と相互作用する検体、または他の検体サンプルの特性に関する情報を使用するための方法および装置に関する。相互作用は、分子認識要素と相互作用する細胞の能力をテストする目的のため、細胞を含む複数の粒子に標的光学力を加えることにより探索されてもよい。平行光トラッピングまたは光ピンセット技術を使用することにより、このようなテストは、多様な高品質の測定を得るために、迅速かつコスト的に有効な方法で実施され得る。実施形態は、並行して粒子に力を加え、加えた力への反応を検知するための自動化装置を使用する装置および方法にも関する。本発明の側面は、とりわけ、細胞表面抗原（例えば、血液型の判定、および癌または他の疾患状態の診断）の分析を含む生物分析および生物化学分析、抗体または他の疾患状態の生物マーカー特性の分析、およびタンパク質チップ上に配列された抗体を使用したタンパク質の分析のために適用できる。本発明の特定の実施形態は、粒子を分析するための、薄い、透明なチャンバの使用に関する。チャンバは薄いため、粒子は、一般的に、従来の親和性生物測定法で達成されるより非常に早く捕捉域と接触できる。

30

【0055】

図1は、本発明の実施形態における粒子の表面特性の特徴付けの方法のフローチャートである。分析手順の過程において、分析される複数の粒子が、1つ以上の捕捉域（ステップ100）と関連付けられ、接触する。捕捉域は、特定の表面特性を有する粒子を捕捉するようにデザインされている。捕捉域との粒子の接触は、重力沈下、または遠心分離、磁気粒子への磁場の適用あるいは光ピンセット（HOTの使用を含む）の使用等、より能動的に加えられる力を介して達成されてもよい。粒子密度が重力沈下において非常に低い場合、後者の能動的な方法が好ましい場合がある。次に、光学力が、粒子の位置を乱す傾向にある方法で粒子に適用される（ステップ110）。光学力は、捕捉域に垂直、または捕捉域から離れて配向される成分（例えば、平面捕捉域が使用される時、面外力）を有してもよい。光学力は、表面または捕捉域の平面に平行である成分を有してもよい。光学力は、捕捉域の平面に対して直交する平面で粒子を対角に移動させるように（例えば、水平お

40

50

よび垂直方向の双方に粒子を変位させるように粒子を加速するよう試みること)デザインされてもよい。力の大きさおよび方向は、一定であってよく、予めセットされたパターンに従って移動、または粒子を観察することにより得られるフィードバックに従って移動し、捕捉域に関する粒子の結合状態に依存する種々の方法で、粒子を乱す傾向にあってもよい。直線の移動に加え、力、またはタイミングをとったパターンの力は、粒子がスピンし、捻れ、または別様に変形し(柔軟な場合)前後に動き、またはこれらの行動の組み合わせを誘発し得る。適切な装置の検知モジュール(例えば、以下に説明する図8の自動顕微鏡検査)は、力に反応する粒子の攪乱の存在または程度を判定するために使用される(ステップ120)。例えば、粒子は、光学力の適用の結果として捕捉域から除去および変位される場合がある。粒子の力への検知反応は、粒子表面と捕捉域との間の相互作用の特性を判定するために使用される。判定される特性は、粒子の表面上あるいは捕捉域の化学種の有無、または量を含む。代替的に、検知反応は、粒子および捕捉域が相互作用する(例えば、競合的結合剤の存在または量、温度、アロステリックエフェクタ、または溶液の特性)環境の特徴を判定するために使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【0056】

特定の実施形態において、捕捉域は、特定の化学種に特異的な結合親和性をもつプローブを含む。光学力による置換に抵抗するこのような捕捉域と接触する粒子の相対的または絶対的な傾向は、プローブが特異的である化学種が粒子の表面に存在するかどうかを示す。実施形態において、粒子上の化学種の量または濃度も判定されてもよい。図24-25を参照して説明されるものを含む他の実施形態において、粒子と捕捉域の相互作用は、溶液中の検体の有無、または量を分析するために使用される。以下に説明するように、図1の方法の特定の例示的实施形態は、マイクロ流体カートリッジにサンプルを導入し、抗体被覆捕捉域と接触するために、流体サンプルに存在する細胞を重力下で沈殿させることにより、粒子を捕捉域と関連付けることを含む。次に、カートリッジは、細胞上に存在する表面抗原について判定し、血液型に到達するために、捕捉域上の細胞を位置付け、力を適用し、力に反応する細胞の位置変化を検知する自動装置に挿入される。

【0057】

本発明の実施形態の多くの重要な用途は、本明細書で説明する実施例において、本質的に生物学的または生物化学的であるため、分析される粒子は細胞である。しかしながら、多くの他の種類の粒子は、非制限的に、ウイルス、小胞、細胞器官、シリカ微小球、ポリスチレンまたは重合体の微小球、結合されたサンプル検体分子を伴う他の重合体微小球、不規則形状の微構造、蛍光的に、または標識化された微構造、バーコード微構造(核酸コード化識別子、蛍光またはラマン活性識別子等を含む)および半導体、コアシェルナノ粒子、量子ドット、磁気微小球および金属構造を含む無機構造で特徴付けられてもよい。粒子は、例えば、0.1から100ミクロンの大きさの範囲であってよく、特定の実施形態においては、直径が1から10ミクロンの間である。一般的に、粒子は、所与の培地での分析に使用されるある波長で光学力に影響されやすいという意味で、光学的に活性であるべきである。

【0058】

図2は、複数の捕捉域210を伴う基質200の平面図を示す。各捕捉域は、特定の化学種に対してプローブによって官能化される表面を有する。免疫測定法とバイオチップ結合表面において、捕捉域210は、捕捉域で固定化プローブのアンサンプルを有してもよい。基質200は、(代替実施形態では、照明は上から、または両経路からであるが)粒子の光画像化およびプローブと反対側からの照明を介した光学力の適用を可能にする種々の波長の光に対して透過性であってよい。プローブは、例えば、ガラス基質200上のシラン、または他の適切な化学性質を使用して、表面に共有結合的にリンクされ、エポキシ、チオール、アミン、または当該分野で知られる他の反応基を使用してよい。抗体フラグメントを付着するための一特定のスキームは、図21を参照に以下で説明される。捕捉域210は、例えば、ゲルパッド(例えば、米国特許第6,642,000号の開示を参照)、ウェル、毛細管、または他の構造の基質に付着させる非平面構造を含んでもよい

。3つの捕捉域210を示すが、それ以上またはそれ以下が提供されてもよい。基質200は、基本的に固定され、粒子をテストするために使用される光学力を用いた移動が不可能である。代替的に、捕捉域210は、3次元配列を形成するために光ピンセットを用いて並行に操作可能であってもよい（例えば、捕捉域210は、光学的に活性な粒子の表面に配置される）。2003年12月12日に出願され、参照として本明細書に組み込まれる米国特許出願第10/1735,39号は、3次元配列の生成を開示している。

【0059】

上述のように、捕捉域210は、所与の化学種に特異な親和性を有するプローブを含む。つまり、捕捉域は、検体サンプルに存在する可能性のある他の種より、より高い親和性をもつ1種に選択的に結合する。したがって、捕捉域を伴うテストサンプルの実体の結合相互作用は、捕捉域が特異な親和性を有するようにデザインされた化学種のサンプルに存在することを示している。本発明の実施形態に使用されてもよいプローブの実施例は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド（およびその化学誘導体）、直鎖または環状DNA（例えばプラスミド、コスミド、BAC、AC）、メッセンジャーRNA、cDNA、ミトコンドリアRNA、人工RNA、アプタマー、PNA（ペプチド核酸）、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え体、改変抗体、抗体フラグメント、抗原、ハプテン、抗体FABサブユニット（必要なら修飾）、領域抗体、人工抗体、タンパク質、修飾タンパク質、組換えタンパク質、組換え抗原、酵素、酵素補因子または阻害剤、タンパク質複合体、レクチン、ヒスチジン標識タンパク質、タグづけタンパク質、分子インプリント、合成抗体、膜受容体、細胞全体、細胞フラグメントおよび細胞下部構造、シナプス、アゴニスト/アンタゴニスト、細胞、細胞器官（例えば、ミクロソーム）、小分子（ベンゾジアゼピン、プロスタグランジン、抗生物質、薬物、代謝物、薬物代謝物、自然産物等）、炭水化物および誘導体（免疫優性糖を含む）、ステロイド、ホルモン、ペプチド、自然または人工重合体、自然および人工受容体、およびその化学誘導体、キレート剤、クラウンエーテルリガンド、超分子アセンブリ、指示薬（pH、電位、膜電位、酸化還元電位）、および組織サンプル（組織マイクロアレイ）を含む。

【0060】

図3は、劣性および稀な血液型の判定を含む、血液型判定に有用な実施形態における赤血球表面抗原において抗体プローブを含むように官能化される捕捉域210を有する特定の実施形態での平面基質200を示す。第1の捕捉域210は、A抗原（抗A抗体）に選択的に結合する1種以上の抗体と官能化され、第2の捕捉域211は、B抗原（抗B抗体）に選択的に結合する1種以上の抗体と官能化され、第3の捕捉域212は、Rh因子（抗R因子h抗体）に選択的に結合する1種以上の抗体と官能化される。さらなる捕捉域は、さらなる抗原をテストするために（例えば、4、5、または10以上の抗原さえを含む劣性または稀な血液型をテストするため）、必要に応じて提供されるだろう。使用には、ランセットを使用して少量の液滴の血液（例えば、0.1から10マイクロリットル）を患者から採取し、抗凝血剤（例えば、ヘパリン、金属キレート剤（例えば、EDTA、シトレート/ACDA）EDTA、ワルファリン、または他の凝血阻害剤）を含む緩衝等張塩溶液で希釈する。希釈された血液サンプルを基質に分配し、血液サンプル内の細胞を沈殿させることにより、表面の捕捉域に接触する。沈殿は、重力下で沈降プロセスを通して生じるが、遠心分離、磁気分離、または他の方法も使用されてもよい。さらに以下で考察するように、表面200上のサンプル上の溶液は、適切に低い高さに保持される時、適切な数の粒子の重力沈殿が、それらの他の方法が不要になる、急速な方法（例えば、10分未満、5分、または1分）で生じる。希釈の規模は、各細胞-表面抗原判定のために複数の細胞を使用して測定がなされるように、複数の赤血球220が各捕捉域に沈殿されるように選択される。実施例として、全血の1000倍希釈は、凝血剤（例えば、EDTAを含むリン酸緩衝、またはトリス緩衝食塩水）を含む緩衝食塩水からなる希釈剤を使用してなされてもよい。サンプルが希釈された全血の場合、リンパ球230も捕捉域210上に沈殿し得るが、ごく一部であり、これらの細胞は、無視されて得る。代替的な実施形態においては、リンパ球はRBCの代わりに、またはRBCに加えて分析され得る。別の域

10

20

30

40

50

のように示されるが、捕捉域 210 は、各域の境界が（例えば、基質上の分界の観察、または基準表面に対する相対的な位置により）分かる限り、連続している可能性もある。任意に、捕捉域 210 は、チャンバまたはウェルの固体壁を含む物理的障壁により、または疎水性あるいは疎液性介在領域を生成するように基質の表面エネルギーの操作を介して分離されてもよい。

【0061】

ソフトウェアベースの画像認識ルーチンが、赤血球 220 を同定するために使用される。赤血球 220 の同定は、リンパ球 230 または他の物質から赤血球を区別するために、自動顕微鏡検査および画像認識を使用してもよい。画像認識ルーチンは、非制限的に、赤色、高コントラスト、大きさ、円形度、および縁の連続性を含む、種々の特徴の認識に基づき赤血球を同定してもよい。画像認識ルーチンは、画像焦点を考慮してもよく、背景を取り去るために背景に物質がない画像を使用してもよい。細胞の状態も分析されてもよい。コントラストは、細胞状態の指標の 1 つである。細胞の種類と状態の分析に基づき、1 つ以上の細胞 220 が選択され、光学力が細胞または複数の細胞 220 に適用される。光学力は、光ピンセットまたは光トラップの形態であってもよく、実施形態において、ホログラフィック光ピンセットを使用して適用される。力は、表面 200 から離れるように配向される成分を有するため、大きさが十分な場合、力は、表面（および任意に、さらに同一または別の方向に）から細胞 220 を変位させる傾向にある。一般的に、変位させる可能性のある力の成分は、基質 200 の平面に直交である方向であるが、横への変位を生成するために、基質の平面内に、または平面近くであってもよい。力が、所与の捕捉域 210 の抗体により認識される抗原を含まない細胞 220 を変位させるのに十分に強いが、認識される抗原を含む細胞 220 を除去するのに十分に強くない場合、細胞 220 の変位は、細胞 220 の表面上のその抗原の欠損を示し、変位がないことは、細胞 220 上の細胞表面抗原の存在を示す。本プロセスは、統計的に有意な結果に到達するように、各捕捉域 210 内の複数の細胞から反復されてもよい。本プロセスは、力が同時に複数の細胞 220 に適用されるように、並行して実施されてもよく、細胞 220 の変位も、並行して検知されてもよい。特定の実施形態において、並行プロセスは、HOT を使用して達成される。

【0062】

したがって、本明細書で説明する方法および装置を使用することにより、多くの利点が生じる。並行または直列的方法で複数のプローブの種類を使用することは、例えば、血液型または亜種を判定するための RBC の分析等、対応可能な粒子のより完全な特徴付けを可能にする。本プロセスは、例えば、5 から 10 分以下の迅速な方法で、特に、並行プロセスの使用、および高さの低い液体層からの粒子沈殿により実施されてもよい。図 22a 25 に関して、以下に説明するように、上述の技術が種々の種類の測定法に適用されてもよい。

【0063】

上述のように、光学力は、中心と放射状の勾配領域を有する力場により説明され得る光トラップの形であってもよいため、勾配領域に配置される粒子は、高められたポテンシャルエネルギーを有し、抵抗力がなく、中心に向かって変位される傾向にある。光トラップは、細胞 220 上にセンタリングされてもよく、トラップは、捕捉域 210 の細胞 220 の親和性をテストするために、基質 200 に対してその初期位置から離れて移動される。本方法で、除去される細胞は、トラップの中心と共に移動する傾向がある。代替的に、トラップは、細胞 220 上に依然として光学力を及ぼすのに十分に近いように細胞 220 から離れてセンタリングされてもよい。本配置において、弱い結合細胞は、トラップの中心方向に加速し、そこに留まる傾向にある。光トラップは、力が対角に細胞 220 を変位させる傾向があるように、垂直および水平方向の双方に細胞 220 から離れて配置されてもよい。いずれの配置においても、除去する光学力は、定性的な結果を得るために一定のレベルで適用されるか、または捕捉域 210 の細胞 220 の親和性を定量化するために、経時的に徐々に増大されてもよい。この定量的な実施形態において、除去力（細胞 220 が

10

20

30

40

50

捕捉域 210 から除去される適用された光学力に関するパラメータ)は、既知の、または同時期に測定された基準値と比較されてもよい。例えば、抗原に覆われた「標準」粒子は、希釈液を用いて含まれてもよく、細胞 220 の除去力は、この粒子に対する除去力と比較されてもよい。これらの粒子は、長時間保管される場合、安定であるようにデザインされてもよい(例えば、抗原、抗原擬態、または他の実施形態においてはプローブで覆われたガラス粒子から構成される)。所与の捕捉域 210 における細胞 220 または他の粒子の除去力は、制御または基準捕捉域 210 の除去力とも比較されてもよい。分析目的のためには、十分な力が非結合または非特異的結合粒子を変位させるために適用される場合、捕捉域により認識される特異的結合粒子を除去するほどに十分に大きな力を適用する必要はない。しかしながら、場合によっては、さらなる分析または使用のため(例えば、細胞培養での成長、細胞中の核酸またはタンパク質の分析等)、捕捉域からのこのような細胞または他の粒子を「引き裂く」ことが所望される可能性がある。

10

20

30

40

50

【0064】

捕捉域 210 が、所与の粒子に対して非常に低いアビディティを有し、粒子が光学力の適用により変位される場合、最も判断されることは、粒子と捕捉域 210 との間の結合力が、変位させる力より小さいことである。同様に、捕捉域 210 が、所与の粒子に対して非常に高いアビディティを有し、粒子が光学力の適用により変位されない場合、最も判断されることは、粒子と捕捉域 210 との間の結合力が、変位させる力より大きいことである。したがって、所望に応じて、細胞 220 または他の粒子の表面特性は、粒子に対して変動するアビディティを有する捕捉域 210 に対して粒子の親和性をテストすることにより、動的範囲を増すことで定量的に判断され得る。

【0065】

図 4 は、それぞれが、赤血球(「RBC」)220 の異なる血液型抗原 225 に対し選択的な結合親和性を有する、2つの捕捉域 210 (214 および 215 と称する)を有する基質 200 の模式的な断面図を示す。第 1 の抗原に対して生じさせられた抗体 300 を、リンカ 310 を介して捕捉域 214 で基質 200 に付着する。第 2 の抗原(第 1 抗原と異なる)に対して生じさせられた抗体 300' を、リンカ 310 を介して捕捉域 215 で基質 200 に付着する。抗体をガラス、プラスチック、または金属表面に付着するための方法に関しては、当該分野において非常によく知られている。たとえば、種々のシラン結合化学および同種官能性または異種官能性クロスリンカは、Pierce Biotechnologies (Rockford, IL) および Gelest (Morrisville, PA) から入手可能である。しかしながら、以下でより完全に説明するように、本発明の方法を用いて使用するために最適なプローブ固定方法および構造は、新しい一連の課題を示す。

【0066】

図 5 は、赤血球が重力下で沈殿した後の赤血球 220 を示し、その結果、それらは基質 200 の表面上の抗体と接触している。いくつかの非特異性結合が、抗体 300、リンカ 310、または基質 200 の表面の間で生じる可能性があるが、所与の捕捉域の抗体 300 が特異的である細胞 220 上の細胞表面抗原 225 の存在は、これらの細胞 220 がより強く基質 200 に付着することを生じるため、適切な大きさと配向された光学力が適用される時、認識された抗原 225 を有するこれらの細胞 220 は残存し、認識された抗原 225 を持たないこれらの細胞 220 は、捕捉域(項目 214 または 215)から離れた方向に変位される。

【0067】

細胞 220 の結合の強度は、抗原 225 の抗体 300、300' の親和性、基質 200 上の抗体 300、300' の面密度、細胞 220 の表面上の抗原の密度(多くの細胞表面抗原は、細胞膜で「浮く」ことができ、1つの領域に凝縮できるが)を含む、いくつかの要素により判定される。複数のプローブ標的相互作用(ここでは、抗体-抗原相互作用)から生じる全体的な結合力は、捕捉域の「アビディティ」と称する。

【0068】

赤血球 220 が薄い液体層（例えば、1 mm から 0.5 mm またはそれ未満、またはさらに 1、2 の赤血球の単一層により占有される近高さとはほぼ同じくらい薄い）に添加される場合、赤血球は、迅速に（例えば、10 分未満）、捕捉域 214 - 215 に接触するであろう。追加のインキュベーション時間が、細胞抗原の転位、細胞の形態変化、また他の作用のため、細胞 220 と捕捉域 214 - 215 との間での最適な結合相互作用のために必要な場合がある。それにもかかわらず、平衡に十分に近いポイントに達するための結合反応の全体的な時間は、結合のために対流と拡散の組み合わせを介してインキュベーションに多くの時間を必要とする従来の免疫測定法技術と比較して非常に短い。

【0069】

本明細書に説明する粒子表面分析方法は、光学力の強度に制限範囲をもつ専用装置を使用してもよい。光エネルギーを過剰に使うことは（細胞が非常に強く結合するため）、細胞または抗体への損傷、局所温度の上昇（流体の流れを生じる）、または測定結果の低下の可能性があるため、光学力の強度をある範囲に制限することには利点がある。逆に、光学力を過剰に使用（弱い結合細胞と関連し）することは、動的範囲が乏しく、実験データの信頼性を低下させる結果となる可能性がある。したがって、本発明の実施形態は、規定範囲内の細胞 220 に対してアビディティを保持するように調節される捕捉域 214、215 をもつ基質を使用する。例えば、範囲は、1 から 1000 pN であってもよい。しかしながら、十分な信号/ノイズを維持しながら過度の光加熱作用を避けるために、範囲は、10 から 200 pN、または 20 から 100 pN に選択される。実施形態において、アビディティは、照明が 1064 で、トラップごとに約 500 mW の力を有する HOT により生成される規模の光学力の使用に調節される。

【0070】

図 6 および 7 は、調節された捕捉域 214 および 215 を有する基質 200 を模式的に図示する。図 6 において、抗体 300 の面密度は、調整される。捕捉域 214 は、より低い密度を有し、捕捉域 215 は、より高い密度を有する。このような捕捉域の製造は、シラン、クロスリンカ、または抗体の量を制限し、活性および不活性遮断薬の使用を含んでもよい。アビディティもクロスリンカの長さ（例えば、5 から 50 炭素原子）を変えらることにより変更されてもよい。

【0071】

図 7 は、抗体 300 と生体不活性部分 320 の双方を含む、捕捉域 214 および 215 を示す。生体不活性部分 320 は、例えば、シラン結合を介して基質 200 にリンクされるポリエチレングリコール部分等の親水性重合体であってもよい。生体不活性部分 320 は、細胞 220 と捕捉域との間の非特異性結合相互作用に最小またはマイナスの影響を与え、抗体密度を低下させる役割を果たす。生体不活性部分は、存在する場合、捕捉域間の領域上でも含まれる。リンカ 310 も生体不活性であってもよい、または生体不活性構成要素を有する。抗体 310 の面密度も、反応性であるが不活性な試薬と抗体を組み合わせることにより変更されてもよい（例えば、アミノ反応性クロスリンカが使用されるときは、グリシン、またはスルフヒドリル反応性クロスリンカが使用されるときは、システイン等）。

【0072】

細胞 220 のように柔軟な粒子は、捕捉域 214、215 に強く結合する時、平らになるように変形し得る。結果、光学力を使用して細胞を回復させるのは困難な可能性がある。細胞の回復は、血液型判定等の単純な分析方法には必要ないが、他の用途において、ユーザは、さらなる実験、または使用のために細胞を回復したい場合がある。ガラス微小球等の強固な粒子が分析される場合、平らな基質 200 と曲がった粒子との間の幾何学的な不適正が、粒子と捕捉域との間の相互作用の十分なアビディティを制限するだろう。したがって、粒子湾曲のスケールに有意な長さを有する柔軟なリンカ 310 を選択することにより、細胞 220 または他の粒子は、より大きな湾曲を保持しながら捕捉域 214 に結合されるだろう。例えば、プローブの長さは、10 nm、100 nm または 1 μm を超えるように調整されてもよい。代替的に、粒子のスケールで湾曲領域を有する（例えば、マイ

10

20

30

40

50

クロウエル、または毛細管) 基質 200 が、そこに位置する粒子をよりうまく補完するために使用されてもよい。本代替実施形態において、光ピンセットが湾曲領域に粒子を位置付けるために使用されてもよい。

【0073】

図8は、本明細書における図1の方法を実施するための、高度自動システムの模式図である。流体カートリッジ400は、複数の捕捉域214、215、および216を有する。使用において、カートリッジ400は、分析されるサンプルで充填され、本装置500のジグ510にカートリッジ400を位置付けることにより、光学装置500に装着される。カートリッジ400は、手で、ジグ510に装填され、取り外されるか、またはより完全な自動操作においては、ロボット形式に操作される。一実施形態において、ジグは、装置500の蝶番蓋を持ち上げることによりアクセスされる。装置は、顕微鏡アセンブリ520および光学力適用アセンブリ530を含む。顕微鏡アセンブリは、捕捉域214-216に関する粒子を位置付けるための光学と、光学力適用アセンブリ530により光学力の適用に粒子の反応を検知するための光学とを含む。光学力適用アセンブリ230は、捕捉域214-216上の粒子の位置に関する情報を使用し、粒子の表面上の化学実体に対し特異な捕捉域214-216のプロープにより認識される、弱い結合または非結合性粒子を変位させる傾向があるが、強い結合粒子を除去しない大きさになる配向および大きさの力を粒子に適用する。代替的に、光学力適用アセンブリ530は、種々の力を適用し、顕微鏡アセンブリは、これらの力への粒子の反応を検知し、計算アセンブリ540は、粒子変位の時に適用された力のレベルを記録する。一実施形態において、光学力は、光ホログラフィックピンセット(HOT)を介して生成される。HOTの使用は、画像化し、力を適用する光学のための共通焦点面を可能にする(HOTトラッピング平面は、特定の顕微鏡アセンブリを用いて作動するように最適に調節されるので)利点があり、粒子が3次元で複数の場所に配置されても、同時に、複数の粒子への力の適用を可能にする。顕微鏡アセンブリ520および光学力適用アセンブリは、共通の計算アセンブリ540により制御される。計算アセンブリ540は、プロセッサ、制御回路、データ保存媒体、およびデータ入力/アウトプットサブアセンブリを含んでもよく、パーソナルコンピュータ、または専用アプリケーション特定ハードウェアを含んでもよい。計算アセンブリ540の構成要素は、物理的に離れていてもよく、さらに装置500の外(例えば、コンピュータネットワーク上)に存在してもよいが、本明細書で説明する方法を実施するために、データ通信を行う。当該分野の既存のシステムと違い、装置500は、同時に複数の粒子に光学力を適用し、検知することが可能であってもよい。計算アセンブリ540は、ユーザにデータの分析および提示を行ってもよく、直接的または間接的に(例えば、パッケージされ)流体カートリッジ400に関連する機械可読識別子(例えば、バーコード、RFID等)と測定結果を関連付けてもよい。

10

20

30

【0074】

流体カートリッジ400は、ごく少量の生体構成要素が検査に利用できるように構成されてもよい。対象の生体構成要素のほんの少量の細胞を使用することは、必要なサンプル量を大幅に削減し、研究室での診断テストを促進する。減少したサンプルサイズにより、収集された各サンプルは、より多くの診断テストを実施するために使用されるだろう。また、サンプルサイズの減少は、サンプルの提供者の痛みおよび不快さを軽減する。

40

【0075】

図9-13の実施形態に示すように、流体カートリッジ400は、内部貯蔵槽、毛細管、および液体サンプルの導入とサンプルの移動を促進する通路から構成されてもよい。任意に、流体カートリッジは、当該分野に精通した者に周知のように、種々の従来のまたは微小流体の原理を使用して、希釈液または他の物質との混合を促進するだろう。図示されるシンプルで低コストな構成において、流体カートリッジ400は、流体カートリッジ400の空洞を通して受動的流動を達成するために、科学的原理の表面張力を利用する。毛管作用、流体流動方向および速度は、表面の湿潤特性および内部チャネルと空洞の幾何学的大きさを変動させることにより調節する。流体カートリッジ400は、重力、空気圧、

50

水力、機会的または光作動機構を含む電気浸透作動力により生成された流体流動にも依存し得る。

【0076】

一実施形態において、流体カートリッジ400は、ユーザが少量のサンプル流体を導入してもよい吸入口を有するように構成される。血液等の流体サンプルは、血液型判定診断テストを実施する場合、毛管作用によりサンプル貯蔵槽に誘導される。サンプル流体は、サンプルが測定される照合チャンバに導入される。血液型判定手順の内容において、照合チャンバ（本明細書で「サンプルチャンバ」とも称する）は、捕捉域を含んでもよい。サンプルが捕捉域と相互作用した後、HOTがサンプルの得られた相互作用を測定するために使用されてもよい。さらに、流体カートリッジ400は、ガスが逃げるように、そして

10

【0077】

図9-11は、流体カートリッジ400の一実施形態を示す。流体カートリッジ400は、複数の重合体積層板から形成されてもよい。種々の構成の内部構成および形状は、レーザ焼灼術等の切断技術により、複数層のプラスチックシートで形成されてもよい。代替的に、構成要素は、従来の機構、射出形成、3Dプリント、フォトエッチング、または他の技術により作製されてもよい。得られたシートおよびカバースリップは、形成された内部空洞を有する積層板を形成するために、接着剤、超音波溶接、または他の技術を使用して結合される。レーザ切断により、流体カートリッジ400にポイント、チャンネル、弁、貯蔵槽および他の流体特徴を作成できる。

20

【0078】

図9は、本発明の一実施形態における流体カートリッジ400を図示する。流体カートリッジ400は、複数の重合体層から形成されてもよい本体612を含む。ベース614は、層間にサンドイッチした接着層を用いた複数の重合体層から形成される。ベース614の空洞は、被覆層616がカートリッジ400の製造中に追加される場合、少なくとも1つの毛細管618および1つ以上の分析チャンバ620を形成する。また、サンプルの導入のため、少なくとも1つ以上の吸入口622が流体カートリッジ400に形成される。出口24は、ガスを逃がすため、サンプルを取り出すため、またはシリンジが出口を通して適用される時にホルダの流動を制御するために提供されてもよい。整合孔626は、

30

【0079】

図10は、図9のカートリッジ400の分解図を示す。流体カートリッジ400は、重合体積層のレーザ焼灼に基づく技術を使用して、製作および組み立てられてもよい。複数層のプラスチックシートは、出入口、チャンネル、弁、貯蔵槽および他の流体構成要素を含む積層チップを形成するために、レーザで切断され、結合される。多重積層チップの層は、最初に、AutoCAD等のCADソフトウェアを使用して処理される。各層は、次に、CADファイルからの変換により、汎用レーザシステムC2レーザ切断システムを使用して切断される。ベース614層は、次に、3次元構造を形成するために、任意に透明な感圧接着剤の薄い層を使用して一緒に結合される。ポリエステル、アクリルおよびシリコンエラストマーを含む、種々のプラスチックが、ベース層として使用されてもよい。各ベースプラスチック層は、シリコン処理された剥離裏打層により保護された感圧接着剤の2つの層によりサンドイッチされる。レーザ切断後、剥離層を除去し、各層に開けられ

40

50

た整合孔 6 2 6 を通して取り付けられる一連のポストに切断部を合わせる。層は、厚みを出すために重ねられる。これらを一緒に圧縮した後、組み立てられた構造は、ラミネート機のローラを通して圧縮される。本プロセスは、複数の層構造を形成するために反復されてもよい。ベース 6 1 4 が、毛細管およびチャンバ用に所望する形状で作製された後、被覆層 6 1 6 が追加される。特に、カバースリップ 6 2 8 は、切断されたチャンバおよび毛細管を覆うのに十分な大きさだが、基板全てを覆うほどには適用されない。カバースリップ 6 2 8 は、接着層 6 3 0 (ベースに適用されるが、カバースリップが通過するための窓がある)により囲まれている。他の接着層は、カバースリップの上に適用され、透明な重合体カバー層が、ベース 6 1 4 を密封するために接着剤およびカバースリップに適用され、密封された流体カートリッジ 4 0 0 を製作する。完成した流体カートリッジ 4 0 0 は、例えば、約 1 インチ × 3 インチの標準の顕微鏡台に乗る標準サイズであってもよい。分析チャンバ 6 2 0 を固定する流体カートリッジ 4 0 0 に使用される材料は、光に対して透過性であるため、流体カートリッジ 4 0 0 は、顕微鏡照明により照射され、H O T レーザエネルギーが、サンプルと相互作用できる。分析チャンバ 6 2 0 は、1 つ以上の捕捉域 (例えば、図 2 - 3 の項目 2 1 0) を含む。

10

【 0 0 8 0 】

図 1 1 は、複数のサンプル分析チャンバ 6 2 0 および接続毛細管 6 1 8 を伴う流体カートリッジ 4 0 0 を示す。カートリッジ 4 0 0 は、ユーザがサンプルを含有する少量の粒子を毛管作用で貯蔵槽 6 3 4 に導入させる吸入口 6 3 1 を有する。サンプルは、次に、毛細管 6 3 5、および粒子の沈降 (すなわち、沈殿) および捕捉域との相互作用を可能にする分析チャンバ 6 2 0 に入る。サンプルは、圧力下で導入されるか、またはより簡単に、適切な大きさの毛細管 6 1 8 の毛管作用を使用して導入されてもよい。上の実施例において、カバースリップ 6 2 8 の下表面は、サンプル中に存在すると仮定される特定の抗原に結合するために官能化された 1 つ以上の捕捉域を有してもよい。サンプルと接触した後、捕捉域は、H O T システムで探索され、捕捉域に密着したサンプル粒子は、結合強度を確認するために「引っ張られ」てもよい。実験結合強度を設定された予測結合強度のマトリックスと比較すると、細胞表面抗原等の特異的 化学実体が存在するかどうかを確認できる。官能化された捕捉域の適用が使用された領域において、非特異的結合の発生阻止を助けるため、カバースリップを他の物質で被覆することは有用である。シランは、本明細書にその全体が参照として組み込まれる米国特許第 5, 6 2 0, 8 5 7 号に開示されるように、本目的において有用である場合がある。

20

30

【 0 0 8 1 】

図 1 2 および 1 3 a は、本発明の一実施形態における流体カートリッジの代替的な構成を示す。図 1 2 は、本発明の実施形態における血液型判定を含む、粒子分析の実施に有用なサンプルカートリッジ 4 0 0 の平面図を示す。カートリッジ 4 0 0 は、ベース 7 1 2 を含む。整合孔 6 2 6 は、分析装置 5 0 0 のジグ内の位置付けを可能にする。吸入口 6 2 2 は、分析のためのサンプルを受け入れる。サンプルが吸入口 6 2 2 に適用されると、カートリッジ 4 0 0 は、複数の毛細管 6 2 8 を通して互いに分離されてもよいサンプル分析チャンバ 6 2 0 にサンプルを引き入れる。図 1 3 は、一部充填された状態のカートリッジ 4 0 0 を示す。同時に、閉じ込められた空気は出口 7 2 4 から逃げる。最終的に、サンプルチャンバは、完全にサンプルで充填される。代替的に、サンプルは、出口 7 2 4 を介して、ポンプで、または負圧をかけることによりカートリッジから引き出されてもよい。上述のように、一度分析チャンバ 6 2 0 が充填されると、粒子は、沈殿し捕捉域に接触する。分析チャンバ 6 2 0 の上および / 下表面は、光学的に透過性であり、画像化および光ピンセットを可能にするため、粒子が画像化され、捕捉域のプロープとの潜在的結合相互作用のテストのための光学力を受ける。図 1 2 - 1 3 に示すように、主な血液型抗原の分析のために捕捉域 2 1 0 を有するが、カートリッジ 4 0 0 は、広範な粒子表面の分析に適応されてもよい。

40

【 0 0 8 2 】

カートリッジ 4 0 0 のサンプルチャンバ 6 2 0 は、互いに分離しているため、捕捉域は

50

、異なるプローブによって容易に官能化され得る。例えば、捕捉域は、クロスリンカ分子を使用して反応性を与えられてもよく、異なる抗体溶液が、複数のチャンバ620に同時に分注されてもよい。代替的に、捕捉域210を生成するために官能化される個々の基質（図示せず）は、複数のチャンバ620に配置され、装着されてもよい。例えば、捕捉域210は、次に装着されるガラスチップにプリントされてもよい。代替的に、複数の捕捉域210は、単一の連続した基質（例えば、図9のチャンバ620内）上に製造される。カートリッジ400は、図10の積層方法を使用して構築される。代替的に、毛細管、チャンバおよび吸入口は、ベース材料のブロックから機械加工またはエッチングされるか、または材料はこれらの空洞に成形されてもよい。適切なガasketおよびカバーが、次に、ベースに固定されてもよい。カバーは、吸入口622へのサンプルアクセスのために貫通孔を含んでもよい。

10

【0083】

図13bは、本発明の一実施形態における、高度に集積されたプログラム可能な流体カートリッジ400の模式図を示す。カートリッジ400は、分析前にサンプルを自動的に希釈し、試薬を自動的に分注できる。流体カートリッジ400は、例えば、空気圧または電気機械的な通路を介して遠隔で制御または操作できる内蔵された制御弁とポンプ、および、インライン濾過器を含む。任意に、カートリッジ400は、フィードバック制御ループで使用するためのデータを作成するために、内部センサまたは圧力計を有してもよい。種々の弁およびポンプ（例えば、柔軟な膜弁および膜ポンプ）が、オンボードでの流体操作および制御のために、カートリッジ400に含まれてもよい。分析手順に使用する前に、カートリッジは、予め充填された緩衝液貯蔵槽およびビーズ溶液貯蔵槽を有する。入力弁および換気弁の双方を開放したままにすることにより、緩衝液またはビーズ溶液が、毛管作用により貯蔵槽に誘導される。貯蔵槽を充填した後、入力弁および換気弁を閉じる。これで、カートリッジが、使用前に長時間、制御された環境で保存される（例えば、製造され、予め充填された状態でユーザに輸送される）。使用中、サンプル流体（例えば、血液型判定手順の全血）は、最初に、吸入口（インプット2）からサンプル貯蔵槽に導入される。弁V3からV6までとポンプP1、P2の適切な操作により、血液サンプルは、テストチャンバ（テスト領域1）に入る前に、緩衝液と混合され、希釈される。濾過器（PI）は、血液サンプルの混入物また凝集物を除去するのに有用である。希釈された血液サンプル等の処理されたサンプルも、テスト領域に入る前に、不要な物質（例えば、細胞または特異な抗体）を除去するために濾過されてもよい（F2およびF3）。テスト領域の処理されたサンプルおよび表面捕捉域と相互作用するために、特定の表面特性を有する粒子またはビーズを（P3、P4および弁7から14を制御することにより）導入することも可能である。

20

30

【0084】

図13cは、本発明の一実施形態における別の流体カートリッジを示す。カートリッジは、多重層の重合体基質から形成されてもよい。カートリッジは、テスト領域、緩衝液貯蔵槽、全血貯蔵槽と全ての流体通路を含む流体層、および個々の弁およびポンプを操作するために分配および使用される全ての空気圧チャンネル（図示せず）を含む、空気圧制御層から成る。カートリッジは、一体化された多岐管を介して、外部空気圧または機械的供給源とこれらの空気圧制御チャンネルを接続する、接続部（カートリッジの下部近傍に示される）を有する。弁は、通常、閉じられ、カートリッジ内の通常の流体圧力に対して密封できる。緩衝液は、最初に、毛管作用または圧力駆動手順により貯蔵槽に導入される。貯蔵槽は、次に、弁v3およびv4を閉じることにより密封される。血液が血液貯蔵槽に誘導された後、弁V1およびV2が開放される。厳密にポンプ速度と量を制御することにより、緩衝液および血液サンプルが混合され、テスト領域に確実にプライムされる。

40

【0085】

図9-13cの実施形態において、サンプル分析チャンバの床と天井との間の距離は、粒子が沈殿するために必要な時間、光学装置500の達成可能な焦点深度、および非常に狭いチャンバが詰まる傾向との間のバランスを最適にするように選択されてもよい。例え

50

ば、チャンバのカバーは、重力に対して垂直に配向され、室温で保たれる時、細胞または他の粒子が10分以内に捕捉域に沈殿するように、15から100ミクロンの間でチャンバのベースから離され得る。他の側面において、カバーおよびベースは、分析される粒子の直径の2から10倍の間で、または分析される粒子の直径の3から5倍の間で離されていてもよい。実施形態において、間隔は、調節されてもよいため、保持される流体の高さは、溶液中の任意の赤血球の実質的なフラグメント、大部分、または実質的に全てが10分未満で沈殿することを可能にする。異なる大きさおよび密度の粒子は、異なる速度で沈殿し、チャンバの高さは適切に調節されることに留意する。

【0086】

図14-19は、可搬式パッケージ内に相互接続された複数の複合システムを含むコンパクトなHOTアプリケーション顕微鏡装置500を示す。HOT光学力適用アセンブリおよび画像機能を操作するために必要な全ての構成要素を含むことに加え、装置は、ユーザインターフェース構成要素も含む。例えば、システムは、モニタ、キーボード、マウス、および可能ならタッチスクリーンユーザインターフェース画面をさらに含む。

10

【0087】

用語が本明細書で使用される場合、ホログラフィック光トラッピングは、粒子の操作を可能にするために、特定量の流体内で光学勾配力(optical gradient force)を生成するためのホログラフィック方法の使用を包含する。一般的に、単色光(例えば、連続波レーザー光)は、反射により操作される動的位相パターニング光学要素、つまり、空間光変調器(SLM)により分光され、反射ビームの位相(および位相のみ)は、ビーム内の位置関数としてリアルタイムで変調され得る。光学勾配力の性質は、非常によく理解されている原理であり、HOT、光ピンセット、光トラップ、光学渦、光ボトル、光学勾配、およびより一般的には光学的に定義されたポテンシャル等の専門用語の使用により本発明の関連に実装され得る。ホログラフィック光トラッピングの方法は、例えば、1998年2月2日に出願された米国特許第6,055,106号(「Grier」)および2003年12月12日に出願された米国特許出願第10/1735,395号(「Gruber」)に記載されており、参照により本明細書に援用される。

20

【0088】

実質的に単色の光学ビームが、任意の適切なレーザーにより提供されるように、流体量に対して画定されるポテンシャルを生成するために使用される。有用なレーザーは、個体レーザー、ダイオード励起レーザー、半導体レーザー、ファイバレーザー、ファイバによりホストされたレーザー(fiber-hosted laser)、気体レーザー、色素レーザー、アレキサンドラレーザー、自由電子レーザー、VCSELレーザー、ダイオードレーザー、Tiサファイアレーザー、ドープYAGレーザー、ドープYLFレーザー、ダイオード励起YAGレーザー、およびフラッシュランプポンプYAGレーザーを含む。10mWから20Wの間で操作される、ダイオード励起Nd:YAGレーザーが望ましい。生体物質の調査のために光学力場を形成するために使用されるレーザービームの好適な波長は、赤外、近赤外、可視赤、緑、および可視青波長を含み、約400nmから約1200nmの波長が最も望ましい。プローブまたは標的との異なる相互作用を最適化するために選択される、異なる波長の複数のレーザーの同時または順次使用も可能である。

30

40

【0089】

装置は、医療環境で一般的に見られる可動フレームまたはカートに装着するのに適切な大きさおよび形状の包囲体内に含まれてもよい。一般的に、可動医療および診断装置用のカートは、患者のベッドまたは手術室の横の空間を占めるのに十分に小さく作られてもよい。例えば、装置を装着したカートは、移動のために4つの車輪のついた、約26インチ、長さが約26インチ、幅が18インチ、そして高さが約32インチ(腰の高さ)、またはそれより小さくてもよい。HOTシステムおよび顕微鏡の包囲体は、日常のメンテナンスおよび内部構成要素の修正において、容易にアクセス可能であるべきである。ユーザインターフェース構成要素は、ベース包囲体システムの付属物として装着されてもよく、柔軟な導管またはワイヤレス伝送技術を用いて相互接続されてもよい。コンパクトなシステ

50

ムは、顕微鏡画像化能力を有し、対物レンズ、カメラ、および必要なチューブレンズを含む。

【0090】

本システムは、調査中のサンプルの照明機能を提供する。明視野顕微鏡、蛍光顕微鏡、または両方の照明が提供されてもよい。本システムは、光源が関連のある視野全体を照明するためにサンプルの上にある、明視野照明機能を含んでもよい。このような光源は、直接、包囲ハウジングに組み込まれてもよい。蛍光顕微鏡において、蛍光光源は、包囲ハウジング内に含まれ、サンプルの下から照明を提供するように配置されてもよく、または、例えば、装置の蝶番蓋に伴われたダイオード等、上からであり得る。顕微鏡に一般的に使用されるこれらを含む他の画像化モードも装着されてもよい。

10

【0091】

顕微鏡対物レンズおよびHOT構成要素の焦点は、エンドユーザによる簡単な操作を促進するために中央源から制御される。サンプルホルダが手動または自動的に充填される時、サンプル台は、少なくとも、XおよびY軸の移動制御を提供する。台の動きは、機械化され、中央源から制御されてもよい。システムは、1インチ×3インチ、および2インチ×3インチであるサンプルスライドを収容できることが予想される。スライドの厚さは、1mmから3mmの範囲であってもよい。しかしながら、システムおよび台は、図9-13のカートリッジ400を含む、他の大きさおよびサンプル調製の構成を受け入れられるように構成されてもよいことを理解するべきである。システムの包囲を保つために、台にサンプルを取り付けるためにユーザにより開放され、次に、システム操作前に閉じられるアクセス口またはサンプル窓を提供してもよい。機構を調節する自動Z軸は、異なる種々のサンプルプレートの厚さを自動的に検知し、次に、台の距離を対物レンズに調節することにより厚さの差異に対して自動的に修正する。自動Z軸調節機構は、カートリッジ400の表面がどこにあるかをおおよそ同定するために使用されてもよい。次に、画像化処理ルーチンが、所与の領域の着目粒子を同定し、HOT起動前に台の最終の高さを設定するために異なる高さで、一連の明視野画像を分析するために使用されてもよい。

20

【0092】

システムに関する全てのレーザー源は、キャビネットハウジング内に包囲されている。少なくとも1つのレーザーがHOTシステムに使用されるが、さらなるレーザーが複数のサンプルの操作、照明の提供、または焦点の監視のために提供されてもよいことが想定される。レーザーおよび任意の必要な伝送導管の全てが、可動カート内、好ましくは、システムの包囲ハウジング/キャビネット内に含まれる。装置は、HOTシステムを制御するために構成されるコンピュータシステム、動力付き焦点システム、自動焦点システム、およびユーザインターフェース構成要素も含む。コンピュータシステムは、Microsoft Windows（登録商標）およびNational Instruments LabViewソフトウェアシステム等の簡単に使用できるソフトウェアを使用してもよい。システムの全電気構成要素に必要な電力は、特定の地域で使用される、任意の電気壁コンセントと互換性のある単一電源コードから提供されてもよい。例えば、電源コードは、110ボルト、15または20AMPの電気供給と整合させてもよい。装置は、コンパクトで、可動で、使い易いため、従来 of 保健医療または診断研究環境で使用されてもよい。

30

40

【0093】

図14は、顕微鏡およびカメラ構成要素を伴うHOTシステムの概略図を示す。図は、米国特許出願第10/701324号から複製され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。図は、構成要素の大きさと配置の理由から固定されているシステムを示す。本装置は、回折光学素子(DOE)13、伝送光学L1を通り、分光器51を通過し、領域「B」に位置するサンプルに作用し得る、レーザービーム10を生成するYAGを伴うHOT構成要素システムを使用する。さらに、システムは、上からの画像照明、およびサンプルの画像を捉え、画像をオペレータ65に伝送するための、下に位置するビデオカメラ64Cを含む。画像は、ビデオスクリーンに伝送されてもよい。本システムは、さらに、オペレータが使用する制御ソフトウェアを提供する、種々の電子構成要素にリンクするコ

50

ンピュータ 66 を含む。このような既存の当該分野システムは、従来の顕微鏡、レーザ、照明、およびビデオカメラ構成要素を利用し、かなり大きくなる。各構成要素サブシステムは、従来は、安定した、作業台環境でそのようなシステムの組み立てを必要としていた、比較的安定した搭載表面を必要とする。

【0094】

米国特許出願第 091886, 802 号から複製した他の HOT システムおよび顕微鏡の組み合わせを、図 15 から 17 に示すが、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。図 2A に模式的に示すように、システム構成要素は、前述のシステムの構成要素と類似する。HOT レーザ 102 は、ビームを光学素子 22 に向け、焦点レンズ 12 の後方孔 28 を通して器 10 中の検体に誘導するように、分光器 30 にビーム 1100 を生成する。このシステムの主要部は、図 16 に示す顕微鏡である。顕微鏡 60 は、上 61 からの照明源、対物レンズ 56 および前金具 54 で受容される HOT システム用にハウジングを提供するために大きく、固定されている。HOT レーザシステムは、光ファイバ 150 を通して外部レーザ源に接続されている。図 2C に示すように、HOT サブシステム 50 は、複数の鏡および 1 つ、次に 2 つの伝送レンズ T01 および T02、光学素子 51、光チャネル 53A および 53D、および分光器 58 を着装するために、ハウジング 52 を提供する。

10

【0095】

これらの図に示されていないが、顕微鏡 60 に接続されるのは、コンピュータ、カメラ、サンプル台、移動および焦点機構、およびレーザ発生器等の追加の構成要素である。従来のスケールの顕微鏡 60 の周辺に相互接続されなければならない複数の複合サブシステムは、システム全体の可搬性を無くしてしまう。

20

【0096】

本発明の例示的实施形態におけるコンパクトで可動な HOT 顕微鏡装置 500 を図 18 に示し、構成要素部分の模式図を図 19 に示す。装置 500 は、装置の作業構成要素を格納するために包囲体 902 を含む。包囲体は、軽量で、耐久性があり、HOT で使用される波長でのレーザ光の伝送を阻止できる、任意の硬質な材料から作製される。包囲体は、好ましくは、例えば、カート等の車輪構造 904 上に配置可能、または車輪構造 904 の一部である。カート 904 は、少なくとも 2 つの車輪 906 を有し、好ましくは、安定性のため、4 つの車輪を有する。

30

【0097】

装置 500 は、コンピュータ 908 およびレーザ発生器 910 および 912 等の大型電気構成要素、および電源供給等の他の大型電気構成要素等が、可動カートのさらなる安定性のため、より低い重心を保持するために下部 914 に配置されるように構成されてもよい。このような構成要素は、外部にレーザ光を放出しない場合、包囲される必要はない。安全上の問題、光伝送要件、有限移動能力、レーザ光の侵入のため、包囲されなければならない光放出構成要素は、包囲体 902 により包囲される上部 916 に格納されてもよい。包囲体 902 は、それを介してユーザが装置 500 内部構成要素にアクセスでき、装置により操作されるサンプルカートリッジ 400 を配置できる蓋 918 等、閉鎖可能な開口部を有するように構成されてもよい。代替的に、トレイが、自動的に装置 500 から延び出し、カートリッジ 400 を受容するために引込み、分析のために適切にトレイを位置決めしてもよい。当該分野に周知のように、回転機構およびスプリング装填のスロットを含む、サンプルカートリッジを装置に装填するための他の機構も、使用されてもよい。可動カバー 918 により保護される開口部 920 は、オペレータが、サンプル台 924 のサンプル領域 922 にサンプルカートリッジ 400 を配置できるように十分な大きさでなければならない。カバー 918 は、カバーが開放されているときに装置が危険に操作されないように、停止スイッチを含まなければならない。サンプル台 924 は、カバーの直下に位置付けられる。台システムは、Nikon TE2000U 用の H117 XY 台を用いた Prior ProScan II Controller および焦点つまみカラーであつてもよい。台 924 および焦点ノブは、エンコーダを有してもよい。対物レンズ 92

40

50

6は、カートリッジ400上の捕捉域を画像化するため、およびホログラフィック光トラップを形成するために、サンプル台924の直下に位置付けられる。対物レンズ926は、Nikon CF1 Plan Apo 40X Air NA=0.95, WD=0.12-0.16であってもよい。対物タレットは、Nikon TE200タレットであってもよい。

【0098】

HOTサブシステム928は、対物レンズ926の直下に位置し、BioRyx200 (Arayx, Inc.)の使用に適合され得る。回折光学素子(DOE)、スポットプロック、コリメータ、および他の関連するレンズおよびリレー光学を含むHOTサブシステムの構成要素は、光学力を発生するために使用される所与の単色光波長(例えば、1064nm)用に構成されてもよい。使用されるDOEは、例えば、Boulder Nonlinear System(機種P512-1064)の空間光変調器(SLM)であってもよい。SLMは、高電力操作に対して絶縁被覆を有してもよい。中央スポットプロックは、SLMからのゼロ次反射および高次域を遮断するために使用されてもよい。HOTシステムは、サンプル台に向けられた放射口を有する。2色性ミラー927が、他の照明および画像波長が、同時に光路を介して伝送される間に、HOTサブシステム928から放射される光学トラッピング光をカートリッジ400に誘導するために使用されてもよい。

10

【0099】

レーザをレーザ源に接続するための光ファイバ930は、Oz光ファイバであってもよい。HOTレーザは、FCコネクタを用いたIPG10Wファイバレーザであってもよい。さらに、マイクロレーザシステムFC20-IR-T/A等のHOTサブシステムを接続するために、コリメータが使用されてもよい。HOTサブシステムは、回折光学素子を制御するためのコンピュータ908への接続(図示せず)も有する。

20

【0100】

照明源を含む他の構成要素が、包囲体902内に含まれてもよい。コンパクトシステム用の一照明方法は、明視野照明源932を使用する。サンプル領域922の上から照明を提供するために、明視野照明932のためのコンパクト構成要素の1つは、図18に示すように、可動カバー918にそれを配置することである。このような明視野照明932は、一定の照明を確保するために、拡散器934で約525nmの波長を出力するLED光源を含んでもよい。

30

【0101】

代替的な照明源、または好ましくは、追加の照明源が、サンプル領域922の下に位置付けられる蛍光励起照明器936を含んでもよい。蛍光励起光は、励起フィルタ938を通して2色性ミラー940に伝送される。蛍光照明は、落射蛍光キューブ(例えば、TE2000Uキューブ(Nikon)のDAPI-FITC/TR)に結合されるExcite照明器等のサブアセンブリの一部であってもよい。代替的に、蛍光励起の照明源は、カバー918内のサンプル領域の上に位置する包囲体902に組み込まれてもよい。

40

【0102】

他の任意の構成要素サブシステムは、対物レンズ926に対して台924の自動焦点を補助するレーザ整合誘導システム(LAG)942である。LAG整合レーザ942は、635nmで操作するダイオードであってもよい。レーザは、離れた遠隔レーザ源912により出力されてもよく、レーザ光は、光ファイバ944を通して主包囲体902に伝送されてもよい。代替的に、レーザ942は、902包囲体内に直接装着するのに十分に小さくてもよい。整合レーザ942は、直接、または光ガイド944(例えば、光ファイバ)を通すかのいずれかで、発光フィルタ950を通してサンプル台対物領域へ次に進むレーザエネルギーを伝送する、2色性ミラー等の分光器948にレーザビーム946を送達する。

【0103】

50

システムの使用性を補助する他のサブシステム構成要素は、共通の計算アセンブリ 5 4 0 によるか、または装置のオペレータへの分析のためのサンプルの画像を収集し、伝送するためのカメラ 9 5 2 である。カメラは、電荷結合素子 (C C D) または等価物であってもよい。カメラは、好ましくは、サンプル台 9 2 4 のサンプル領域 9 2 2 の位置と整合されるように、包囲体 9 0 2 に装着される。カメラ光学の一部は、カメラの表面に画像を集束するためにチューブレンズ 9 5 4 を含んでもよい。システム用の適切なカメラの実施例は、冷却型カラー Q i m a g i n g R e t i g a E x i である。ビデオ出力は、他の制御、監視およびデータ分析特徴も表示できるコンピュータ画面 9 5 6 上で見ることができる。

【 0 1 0 4 】

システムは、ユーザにテキストを表示するための L C D ユーザインターフェーススクリーン 9 5 6 を含む、ユーザインターフェース 9 6 0 を介して制御されてもよく、タッチスクリーン機能を提供してもよい。代替的に、ユーザインターフェース 9 6 0 は、システムの自動プロセスを開始するためのいくつかのプッシュボタン制御 9 6 2 を提供してもよい。さらなる代替は、示されていないが、本発明の種々のサブシステムを制御できるコンピュータ上に格納されるソフトウェアと直接対話するためのコンピュータキーボードであってもよい。

【 0 1 0 5 】

コンパクト H O T / 顕微鏡システムの全てのサブシステムおよび個々の構成要素は、当該分野で公知の従来の機械的締結具により、車輪構造に装着されてもよい。さらに、従来の緩衝システムが追加されてもよい。

【 0 1 0 6 】

図 8 および 1 8 の装置 5 0 0 は、高度に自動化された操作を可能にする。図 2 0 は、装置 5 0 0 に実装される例示的な制御スキームのフローチャートである。直列的に説明されているが、実施形態の多くのまたは全ての操作は、複数の粒子上で並行して、装置 5 0 0 により実施されてもよい。カートリッジ 4 0 0 にサンプルを充填し、同一領域 9 2 2 にカートリッジを実装した後、そして粒子を沈殿させ、捕捉域 2 1 0 に接触させた後、分析が開始されてもよい。分析は、ボタンを押すことにより (物理的または G U I を介して) 手動で開始されてもよい (ステップ 1 2 0 0) 。代替的に、顕微鏡アセンブリ (図 8 の項目 5 2 0) は、計算アセンブリ (図 8 の項目 5 4 0) と共に、カートリッジ 4 0 0 の存在を検知し、粒子が沈殿フェーズを終了した時を判定するために粒子を追跡し、それから、光学力分析を開始してもよい。必要に応じて、時間の延長が、粒子の捕捉域 2 1 0 へのさらなる結合のために割り当てられる。カセットの温度も、結合を最適化するため、または一定の結果を確実にするために自動的に制御されてもよい。装置は、自動的に捕捉域 (ステップ 1 2 0 5) に焦点を当てる。装置は、次に、自動的に 1 つ以上の粒子を探し、次に、即時分析のために、これらの 1 つ以上を選択する (ステップ 1 2 1 0) 。任意に、装置は、特異な一連の基準を満たすかどうかを判定するために粒子を画像化する (1 2 2 0) 。例えば、血液型判定において、リンパ球が区別されていない場合、リンパ球の光学力は、せいぜい時間を無駄にするだけであって、最悪の場合、結果を歪める。装置は、パターン認識ルーチン、大きさおよび形状データ (例えば、赤血球または他の粒子の特定の外観範囲内の物質の検知) 、吸光データ (例えば、赤血球の赤色の検知) 、蛍光顕微鏡データ (例えば、色素または標識化された抗体の存在) 、他のスペクトルデータまたはこの判定のための他の非スペクトル評価を使用してもよい。装置は、次に、粒子に変位させる可能性のある力を適用するために選択された粒子の近傍で、光場勾配を自動的に作動する (ステップ 1 2 3 0) 。力の適用中および / または適用後に粒子の画像化を継続することにより、力に応じて粒子の任意の変位を検知 (ステップ 1 2 4 0) することで、粒子の捕捉域の親和性またはアビディティが判断されてもよい。上述のように、捕捉域は、標的検体種を特異的に結合するプローブを含むため、粒子の表面上のこれらの検体の存在が判定される。後続の分析のため、装置は、関係した捕捉域の観点から、コンピュータメモリに分析した各粒子の位置を記録する。捕捉域の同定は、機械可読マーカから、基準マーク (カ

10

20

30

40

50

トリッジは特定の配向での挿入においても重要である)に関するカートリッジの配向の情報から、または他の方法から判定されてもよい。粒子の選択および分析は、終了閾値が満たされるまで、任意の自動焦点ステップで反復される(ステップ1250)。閾値は、例えば、総計での分析された粒子の所与の数、各捕捉域での分析された所与の数、最大時間の経過、または統計上の誤差指標(例えば、特定値以下の基準偏差の達成)であってもよい。さらに、複数の視野が、単一の捕捉域210内、または複数の捕捉域210でのいずれかで採取されてもよい。位置の誤差を補正するために、自動焦点ルーチンが、視野での各変更に従って実施されてもよい。データが、次に分析され、ユーザに提出される(ステップ1260)。血液型判定、または他の臨床使用の場合、分析は、血液型または他の臨床的に適切な意味上の価値を含んでもよい。

10

【0107】

図21は、IgMから誘導された抗原結合タンパク質フラグメントを用いて捕捉域210等の表面を被覆するための方法を含む、一実施形態を模式的に示す。IgM分子を含有する溶液が2-メルカプトエチルアミンHCl、ジチオスレイトール、または2-メルカプトエタノール等のジスルフィド還元剤を用いて処理される。例えば、Pierce Biotechnology (Rockford, IL)のImmunoPur IgMフラグメンテーションキットは、種々の分割方法の使用説明書および試薬を含む。これらの反応は、還元時間、温度、および還元剤の相対濃度を制御することにより、特定の分子量で抗体フラグメントを生産できる。これらのフラグメントは、次に、ガラスまたは結晶スライド、粒子、3次元構造、樹脂、またはゲル等のマトリックス上で固定されてもよい。得られたマトリックスは、次に、IgMにより認識された抗原に対し特異な親和性を有する。一実施形態において、マトリックスは、ガラススライドまたはガラススライド領域である。固定化は、種々の結合化学性質を使用して実施されてもよいが、いくつかは、Pierce Biotechnology (Rockford, IL)から入手可能である。例えば、スルホサクシニミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)は、フラグメント上のスルフヒドリル基をガラスマトリックス上のアミノ-シランにクロスリンクするために使用されてもよい。このような多重マトリックス(独立的構造上に配置される領域または連続構造の近傍または離れた領域上の共に配置される領域)は、変動する親和性の領域を作製するためにフラグメントで被覆されてもよい。細胞は、複数の領域に曝されてもよい。強度に関するパラメータまたは細胞と表面との間の相互作用の相対強度を観察することにより、表面上の抗原が同定されてもよい。一実施形態において、細胞は、赤血球であり、抗原特異性結合領域は、血液型を認識する。

20

30

【0108】

前述のように、上述の本方法および装置は、血液型判定だけでなく、他の多くの生物、生物化学、および化学分析手順に有用であろう。例えば、赤血球の分析の代わりに、リンパ球、培養細胞、バクテリア、生検組織等を分析してもよい。1つ以上のプローブが各捕捉域で使用されてもよく、例えば、捕捉域は、混合されると、一定の種類の幹細胞または癌細胞において特異性を付与する3つの抗体の混合物を有してもよい。梅毒、HIV、または肝炎B細胞表面抗原のテストは、同様の種類のタンパク質結合リガンド測定法を使用することにより想定されてもよい。分析される細胞は、使用前に精製される(例えば、蛍光活性化細胞分類の使用)。さらに、多数の異なるサンプルは、単一の基質上でテストされるか、または多数の異なる単一サンプルテストが、単一基質上でテストされてもよい。

40

【0109】

本発明の実施形態を用いて実施される莫大な種類の測定法が存在するが、これらの多くは、以下に記述する、次の3つのカテゴリーに該当する;直接測定法、間接測定法、および競合的測定法。

【0110】

直接測定法は、直接標識化されたプローブ分子が標的と相互作用する方法に関するパラメータ観察の実施を含む。光学力への反応の観察に関する実施形態において、標識は、粒

50

子等、光学的に活性な物質であってもよい。例えば、固定抗体を有する直径が1から100ミクロンのガラスまたはプラスチックビーズは、特異的に、または非特異的に基質に結合する標的検体を探索するために使用されてもよい。検体は、共有結合的に、または非共有結合的に、基質に結合してもよい。プローブおよび標識は、例えば、プローブとして作用する表面タンパク質を発現する自然または遺伝子組換え細胞等、単一の生物学的実体に混合されてもよい。血液型判定測定法において、赤血球は、全ての赤血球に共通する抗原を使用する表面に付着され、粒子は、赤血球と接触する血液型抗原を保有し、そして結合粒子の光学力への反応性は、細胞表面を特徴付けるためのパラメータとして使用されてもよい。図22aおよび22bは、直接測定法の実施例を示す。検体抗原225は、捕捉域210に結合され、固定抗体プローブ300を伴う粒子220は、捕捉域210と接触し、結合される。該当する場合、結合相互作用の強度は、上述のように、光学力の適用を使用して判定される。抗体300が、図22aに示すように、抗原225を認識する場合、抗体300が非結合抗原225'を認識しない、図22に示す、代替シナリオで必要とされるよりも強力な力が、粒子220の置換に必要とされる。代替的に、標的が、抗体であってもよく、粒子上のプローブが、抗原であってもよい。

10

【0111】

対照的に、間接測定法は、第1のプローブに結合される第2のプローブの性質の検知を含む。直接測定法と同様、パラメータは、第2のプローブが適切に標識されると、第2のプローブの光学力であってもよい。第2のプローブは、第1のプローブの化学実体、または第1のプローブ（または別様に微粒子）の標識のいずれかに特異的であってもよい。図23aに図示する実施例において、非標識の単クローンマウス抗体310が、第1のプローブとして使用され、固定標的抗原225（例えば、直接、基質200上に固定されるか、または固定細胞に組み込まれる）と接触し、第2のプローブは、多クローンウサギ抗マウス抗体である付着プローブ部分300で標識化された粒子220であってもよい。第2のプローブ粒子220は、第1のプローブ抗体310と接触し、結合を可能にし、粒子への光学力の適用に対する反応を観察することにより特異的な結合相互作用のためにテストされてもよい。図22bに示すように、特異的な結合反応の欠損は、低光学力レベルでの粒子220の変位を可能にする。他の実施例において、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）抗原は、基質に付着される。基質は、患者の血清に曝される。HIV抗体が存在する場合、これらは、基質上でHIV抗原に結合する。患者の血清は、緩衝液で洗浄することにより除去され、実質的に不攪乱状態の特異的な結合抗体を残存させる。ヒト抗体に特異な粒子標識化された抗体（例えば、ウサギ抗ヒトIgG）が、導入され、光学力の適用を介して、特異な結合をテストされる。この種類の測定法は、一つのみまたは数種類のみの粒子標識化されたプローブが、遥かに多くの数の検体分子を検知するために使用され得るので、多重化の関連において、特に利点がある。例えば、ヒト病原体に対する種々の抗原は、複数の域間で流体連通を生じるような方法において、離れた捕捉域および添加された抗体を含む患者サンプル（例えば、血液または血清）で固定される場合がある。抗体が結合するのに十分な時間を与えた後、粒子標識化された抗ヒト抗体（例えば、抗IgG、抗IgM、抗IgG、抗IgAまたはその組み合わせ）の溶液が添加され、捕捉域に結合することを可能にさせる。光学力（並行光学力を含む）は、次に、患者の過去の病原体暴露または免疫状態についての結論に達するための粒子の反応を探索するために使用されてもよい。このような技術は、1から4の間の標識化された粒子種を並行して使用して、いくつかの、10または100もの抗原に適用されてもよい。非常にわずかの粒子種しか必要としないため、結果を解析するために、各粒子種に、例えば、異なる励起または発光波長のフルオロフォアでタグをつけることは、比較的簡単である。他の実施例において、患者の抗体のプロファイルは、アレルギー診断の目的のため、多数の抗原に関して判定されてもよい。

20

30

40

【0112】

競合的測定法は、結合検体またはレポータ、または他の分子の変位と付随した現象を検知することを含む。参照により本明細書に組み込まれる、Weetalらの米国特許第

50

5620857号は、光ピンセットを使用した競合的免疫測定法を実施するための方法を開示している。しかしながら、開示された測定法は、せいぜい、直列的な方法で実施され、より少ないデータポイントをもたらすにすぎない。したがって、ほとんどの情報が所与の時間で得られず、同様に、低い信頼結果を得るだろう。対照的に、本明細書で説明される競合的測定法実施形態は、例えば、HOTを使用して同時に多数の粒子をテストすることにより、並行した方法で実施されてもよい。結果として、より多くのデータポイントが、より高い信頼結果および/またはより多くの種類の標的がテストされてもよい。図24および25は、競合的結合で光学力を使用するいくつかの測定法構成を示す。

【0113】

図24の反応スキームに示すように、3重サンドイッチ構造が、捕捉域214および215で形成される。サンドイッチは、基質結合プローブ300'、基質の捕捉域上に共有結合的に固定される代理分子227、および粒子上220に共有結合的に固定される粒子結合プローブ300から成る。代理分子227は、標的サンプルの着目検体のプローブと少なくとも同一または類似する、プローブ300および300'に対する結合能を有してもよい。捕捉域214および215は、異なる検体225に特異的であるプローブ300および300'および代理分子を有する。例えば、代理物は、着目抗原の組換え形態であってもよい。さらに、基質結合プローブ300'は、種々の着目検体に異なる親和性または特異性を有してもよく、適切な代理分子227および粒子結合プローブ300を用いて3重複合体として事前に構築されてもよい。サンプルが添加される時、検体分子がプローブ300および300'において親和性を有する場合、これらは、相対結合定数および質量作用に依存する度合いで、平衡に近づくための所与の適切な時間で、代理分子227を変位させる傾向にある。粒子220および捕捉域が、中間濃度の検体225の下、多価の方法で相互作用する場合、いくつかの代理分子のみが、競合的に変位される傾向にある。これらの中間状態は、粒子を置換させるために必要な光学力の量の差異として検知される。

【0114】

図25は、代理分子227が、検体分子225よりプローブ300および300'に対して低い親和性を有する、競合的測定法のための反応スキームを示す。捕捉域214および215は、異なる検体225に対して特異的であるプローブ300、300'および代理分子を有する。結果として、代理分子が、添加されたサンプルから標的検体225により競合的に変位される場合、捕捉域215と粒子220との間の結合相互作用は、増大し、これは、粒子を変位させるために必要な光学力の増加として検知されてもよい。捕捉域214が非相互反応検体に親和性を有する場合、この域のサンドイッチにおける結合力は、攪乱されないだろう。他の測定法実施形態と同様に、本プロセスは、複数の粒子(例えば、3、5、10、100、またはそれ以上)上で並行して実施されてもよい。

【0115】

図24-25の競合的測定法の代替実施形態において、標的サンプルは、同時に1つの標的域のみに接触する、または複数の標的域に接触するように添加されてもよい。例えば、捕捉域は、個々、実質的に分離されたサンプルホルダのウェルであり得、サンドイッチ構造は、基質結合抗体300'を伴う捕捉域に適切な代理分子227を添加し、洗浄し、粒子結合プローブ300の添加し、そして再度洗浄することによって作製され得る。その後、構造は、使用可能な状態になる。

【0116】

しかしながら、捕捉域が、単一の流体構造内の単一基質上の単なる領域である場合、状況は、著しくより複雑になる。この場合、添加された流体は、複数の捕捉域と連通する。結果として、代理分子は、複数のプローブの種類を採取し、適切なプローブと結合するように長時間、捕捉域と共にインキュベートされる必要がある場合がある。粒子220は、沈殿するのに十分に重い傾向にあるため、これらが、複数の捕捉域210に向かう傾向にない。これを克服するために、粒子結合プローブ溶液が、適切な捕捉域201上に直接分配されてもよい。拡散および相互反応を避けるために、一次的なウェル構造が

形成されてもよい。一次的なウェル構造は、沈殿するのに十分に長い時間、基質に押し付けられるピペットチップであってもよい。代替的に、貫通穴の配列が、基質と接触してもよく、粒子が分配され、貫通孔の配列を除去する前に沈殿が可能になる。また他の代替的な実施形態において、捕捉域は、基質の小さいくぼみに位置し、添加されるウェルに含有可能な量（正のメニスカスを可能にする表面エネルギー作用による）よりも少量の粒子含有流体量が添加される。大量の添加された試薬およびサンプルは、複数のくぼみから溢れ、全ての捕捉域にアクセスするであろう。

【0117】

いずれの場合も、得られた流体連通サンドイッチ配列構造は、溶液中の複数の検体の競合的結合測定法に使用されてもよい（例えば、3、10、100、または1000またはより異なる検体が測定されてもよい）。特定の実施例において、サンドイッチ配列は、診断または研究目的のため、生物学的サンプルの数十から数千もの異なるタンパク質を検知できるプロテオミクスセンサである。位置が既知の（例えば、個別の捕捉域にタグ付けまたは位置された）複数のサンドイッチ構造の種類を使用することにより、動的範囲を増大してもよい。複数のサンドイッチ構造は、異なる検体濃度範囲に反応するように構成されてもよい。例えば、代理分子およびプローブの相対的な親和性は、異なる濃度範囲での同一検体を検知するように構成された複数の捕捉域間で異なる。

【0118】

（実施例1、自動顕微鏡検査および光学力を使用した血液型判定分析）

ユーザは、サンプルドアを開け、サンプルチップを内部に配置する。ユーザは、ドアを閉め、タッチスクリーン上の「テスト開始」ボタンを押す。対物レンズ、したがって、画像面は、カートリッジカバー（カバースリップ）の底より遥かに低いところ（1mmくらい）から始まる。顕微鏡台は、限界を探するためにその限界へ移動し、次に、サンプルチップ上の第1の捕捉域の中心に対応する位置へ移動する。ソフトウェアは、赤色自動焦点レーザをオンにし、焦点ノブが回転するように誘導し、対物レンズを100 $\mu\text{m}/\text{s}$ 以上で上げる。カメラ画像は、システムが、レーザの反射がカバースリップの底表面から離れたことを表す赤いフラッシュを感知するまで観察される。適切なアルゴリズムは、レーザの反射がピークの時を判断するために使用される。次に、自動焦点レーザを切り、緑のLED照明をオンにし、画像面が、ほぼカバースリップの中央になる（底表面の位置、および予測されたカバースリップの厚さに基づく）ように、対物レンズを調節する。デジタルカメラは、赤血球同定に使用される任意の後続画像から取り去られる背景画像を取得する。焦点機構は、次に、カバースリップの上部と予測される位置の約20 μm 下まで画像面を移動するように誘導される。焦点は、次に、さらにいっそうゆっくりと上げられ、画像変化するカメラ画像が取得される。アルゴリズムは、赤血球が焦点に入ってきた時、および再び焦点の外へ去った時を判断する。一度、正確な平面を通過すると、焦点はその平面に戻り、サンプル中の無処理RBCがどこであるかを判断するために、画像処理が実行される。大きさ、円形度、および縁の連続性に基づき、利用可能なRBCが同定される。他に非常に近いもの、または光トラップが到達できない領域、またはカメラ画像の端に非常に近いものは、無視される。残りのRBCは、1回に4つ、テストされる（利用可能なレーザにより与えられる限度）。光トラップは、各細胞の中央に配置され、カバースリップにほぼ平行に7 $\mu\text{m}/\text{s}$ で20 μm 移動されるが、トラップは、数ミクロン細胞の上に配置されるため、細胞が一般的に体験する移動は、表面に対する垂直から幾分斜めである。

【0119】

撮像視野上の全てのテスト可能なRBCが確認されるまで、同様の手順が反復される。RBCが、移動後、元の位置の短距離内に残留しなかった場合、表面に固着したものと考えられる。二項分布の統計的テストに基づき、ソフトウェアは、同じ捕捉域上の別の撮像視野に移動するか、結果を受け入れ、次の捕捉域に移動するかを決定する。前者の場合、次の撮像視野の位置は、移動時間を最小限にし、捕捉域の中央への密接度を最大限にするように、開始撮像視野の周りの螺旋状パターンに基づき選択される。統計により、多くの

撮像視野は、必要に応じて、単一の捕捉域のために確認される場合がある。台が同じ捕捉域内で移動した場合、自動焦点は、RBCが予測される位置のわずか10ミクロン下から始まるが、画像ベースの自動焦点ルーチンは、一般的に、台が異なる撮像視野に移動するたびに使用される。一度、捕捉域が完了すると、台は、次の捕捉域の中央に撮像視野を移動し、画像ベースの自動焦点が再び使用される。一度、統計が、全ての捕捉域において収集されると、タッチスクリーンは結果を表示し、LEDおよびレーザは切られ、台は1mm下に移動し、第1の捕捉域の中央に戻り、ユーザは、自由にサンプルチャンバを開け、チップを取り出すことができる。

【0120】

代替実施形態において、表面分析のために開示された方法は、コンピュータシステムを用いて使用するためにコンピュータプログラム製品として実装されてもよい。そのような実装は、コンピュータ可読媒体（例えば、ディスク、CD-ROM、ROM、または固定ディスク）等の有形媒体に固定されるか、またはモデムもしくは媒体を通してネットワークに接続される通信用アダプタ等の他のインターフェースデバイスを介して伝送可能な、一連のコンピュータ命令を含んでもよい。媒体は、有形媒体（例えば、光学またはアナログ通信回線）、またはワイヤレス技術を用いて実装された媒体（例えば、マイクロ波、赤外または他の伝達技術）のいずれかであってもよい。一連のコンピュータ命令は、システムに関して、本明細書に前述の機能性の全てまたは一部を実装する。当業者は、このようなコンピュータ命令が多くのコンピュータアーキテクチャまたは操作システムを用いて使用するための数多くのプログラム言語で書かれていることを理解されたい。

【0121】

さらに、このような命令は、半導体、磁気、光学、または他の記憶デバイス等の任意の記憶デバイスに保存されてもよく、光学、赤外、マイクロ波、または他の伝送技術等の任意の通信技術を使用して伝送されてもよい。このようなコンピュータプログラム製品は、印刷文書または電子文書（例えば、パッケージソフトウェア）を伴う取り外し可能な媒体として配布されるか、コンピュータシステムにあらかじめ装填済みであるか（例えば、システムROMまたは固定ディスク）、またはサーバあるいはネットワークからの電子掲示板（例えば、インターネットまたはワールド・ワイド・ウェブ）から配信されてもよい。当然ながら、本発明のいくつかの実施形態は、ソフトウェア（例えば、コンピュータプログラム製品）とハードウェアの双方の組み合わせとして実装されてもよい。また本発明の他の実施形態は、完全にハードウェア、または完全にソフトウェア（例えば、コンピュータプログラム製品）として実装される。

【0122】

本発明の記述された実施形態は、単に実施例であって、数多くの変形および修正が、当業者に理解されるだろう。全てのこのような変形および修正は、付属の特許請求の範囲に定義されるように、本発明の範囲内であるものとする。

10

20

30

【 図 1 】

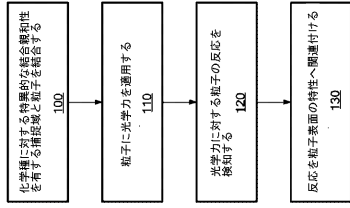


FIG. 1

【 図 2 】

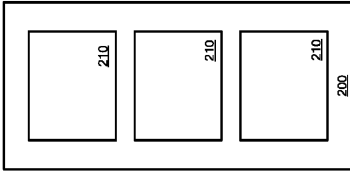


FIG. 2

【 図 3 】

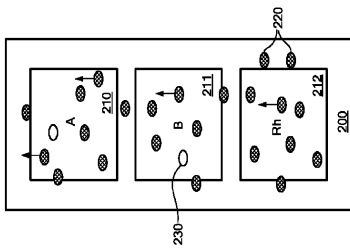


FIG. 3

【 図 4 】

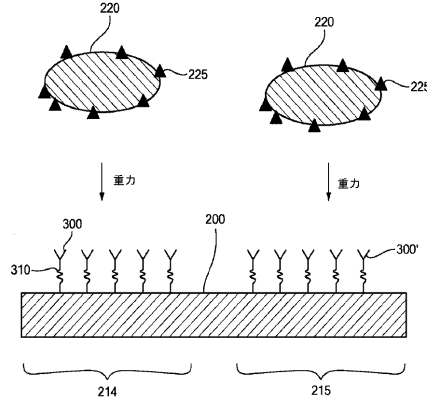


FIG. 4

【 図 5 】

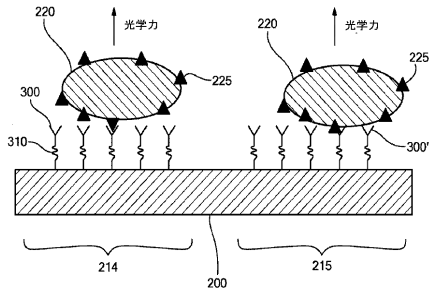


FIG. 5

【 図 8 】

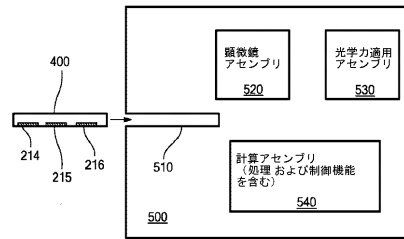


FIG. 8

【 図 6 】

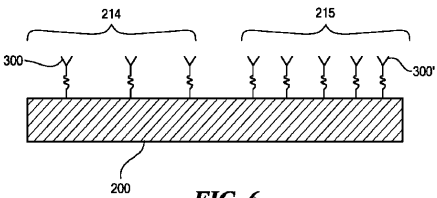


FIG. 6

【 図 9 】

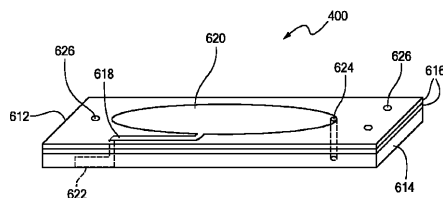


FIG. 9

【 図 7 】

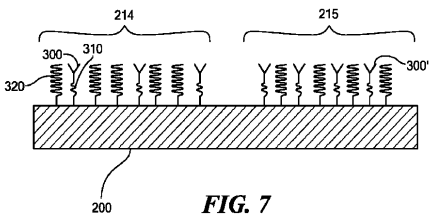


FIG. 7

【 図 1 0 】

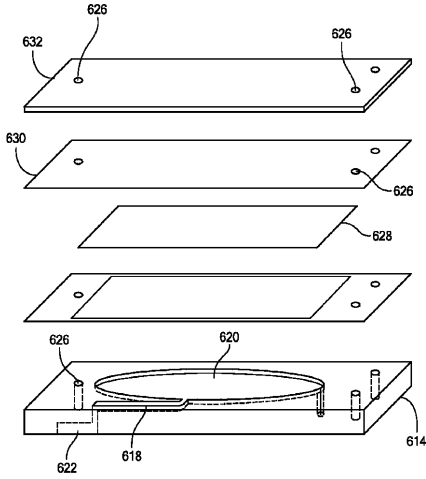


FIG. 10

【 図 1 1 】

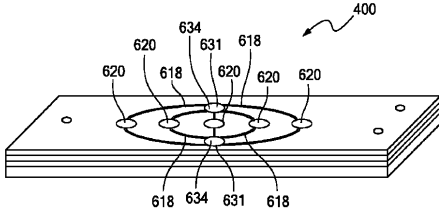


FIG. 11

【 図 1 2 】

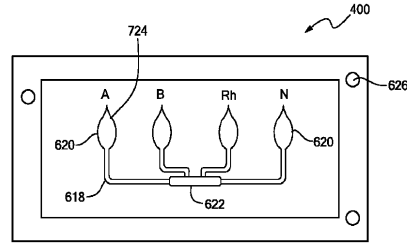


FIG. 12

【 図 1 3 a 】

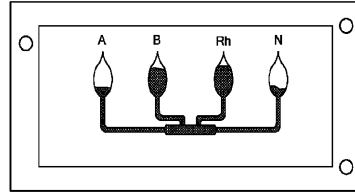


FIG. 13a

【 図 1 3 b 】

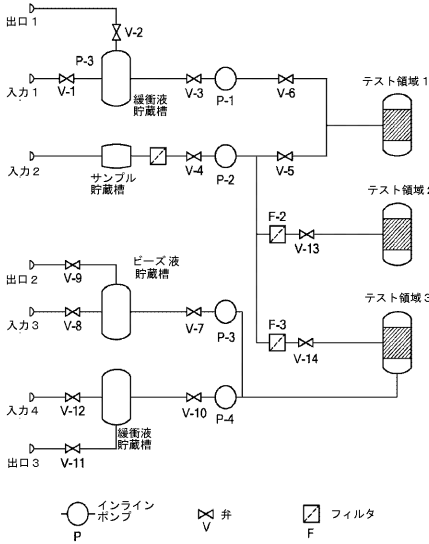


FIG. 13b

【 図 1 3 c 】

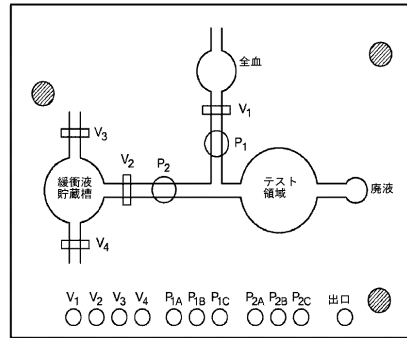


FIG. 13c

【 図 1 4 】

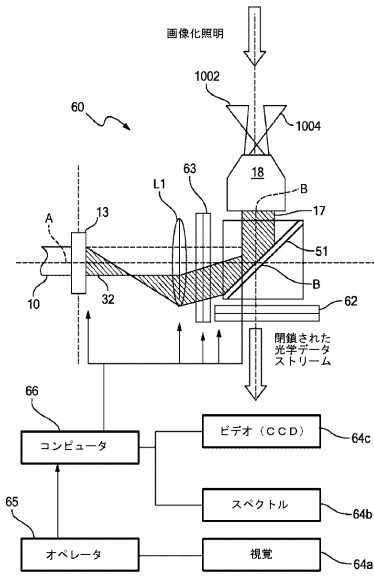


FIG. 14

【 図 1 5 】

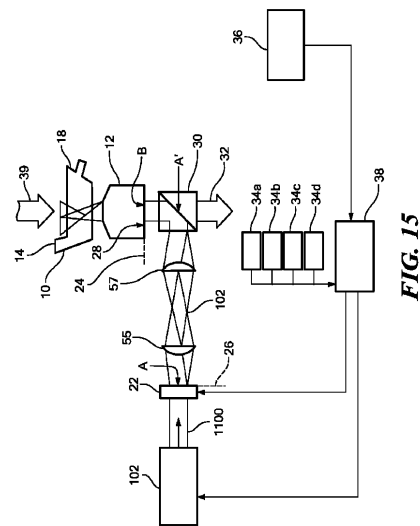


FIG. 15

【 図 1 6 】

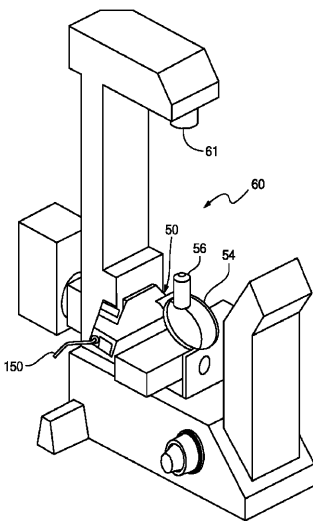


FIG. 16

【 図 1 7 】

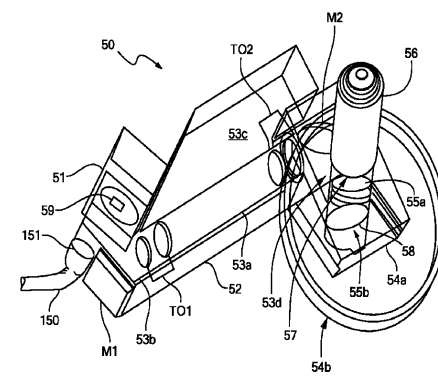


FIG. 17

【 図 18 】

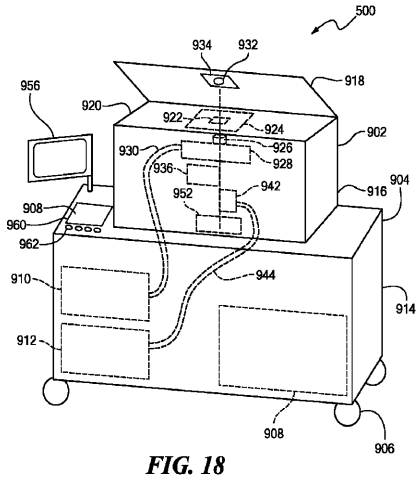


FIG. 18

【 図 19 】

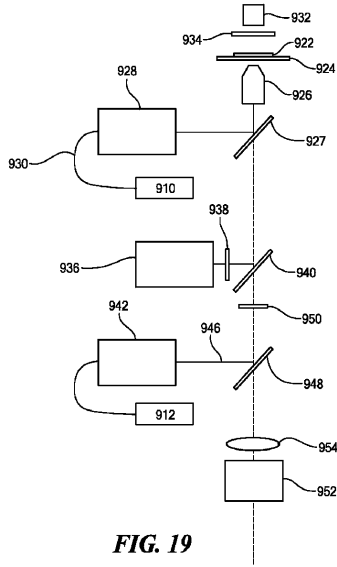


FIG. 19

【 図 20 】

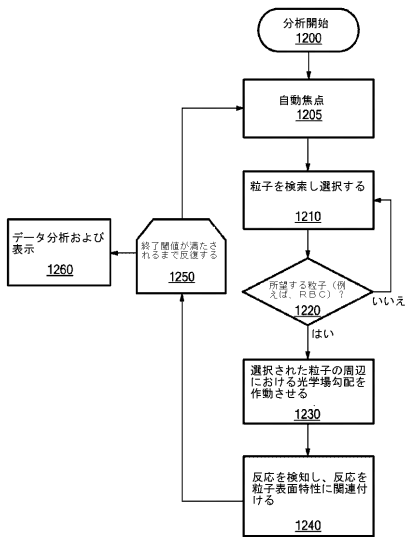


FIG. 20

【 図 21 】

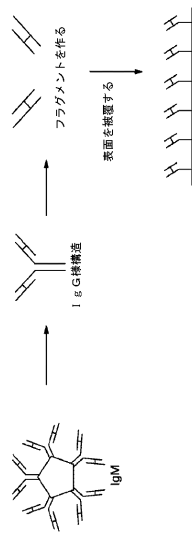


FIG. 21

【 図 22 a 】

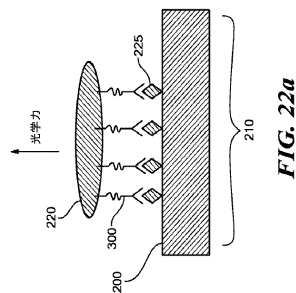
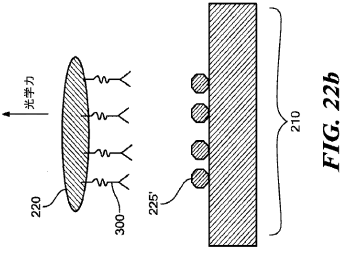
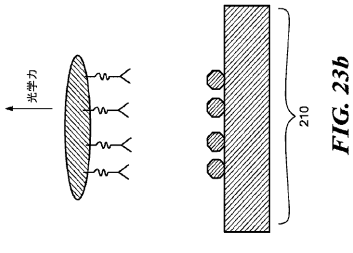


FIG. 22a

【 図 2 2 b 】



【 図 2 3 b 】



【 図 2 3 a 】

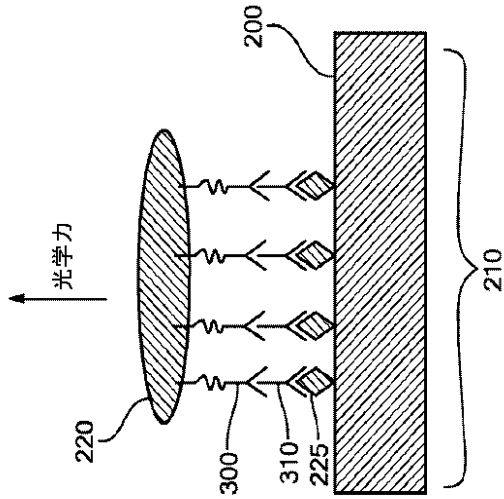
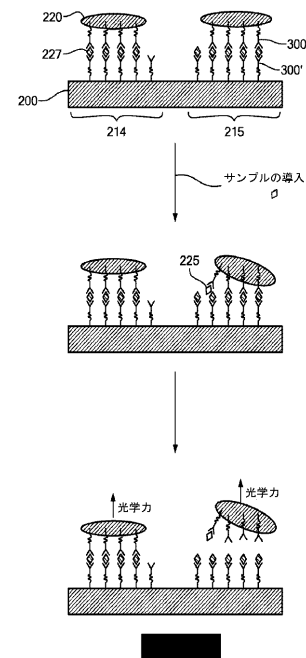


FIG. 23a

【 図 2 4 】



【 図 2 5 】

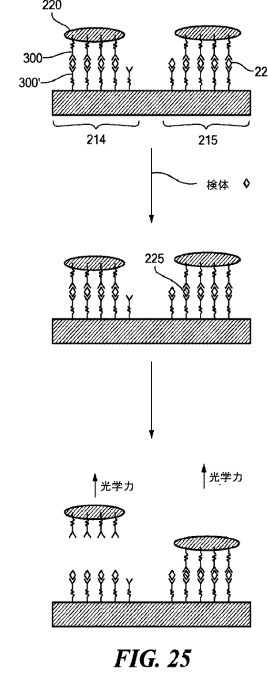


FIG. 25

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/078561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/134603 A1 (PLEWA JOSEPH S [US] ET AL) 22 June 2006 (2006-06-22) abstract; figure 2	84-88
X	BOCKELMANN U ET AL: "Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips." BIOPHYSICAL JOURNAL MAR 2002, vol. 82, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 1537-1553, XP002475579 ISSN: 0006-3495 abstract; figures 1,2,10,11,14 -/-	1-83
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 document 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 10 April 2008		Date of mailing of the international search report 21/04/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weijland, Albert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/078561

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZLATANOVA JORDANKA ET AL: "Stretching and imaging single DNA molecules and chromatin." JOURNAL OF MUSCLE RESEARCH AND CELL MOTILITY 2002, vol. 23, no. 5-6, 2002, pages 377-395, XP019256112 ISSN: 0142-4319 abstract; figures 6,9	1-83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/078561

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006134603	A1	22-06-2006	NONE

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 33/543 5 1 1 N

(31) 優先権主張番号 60/844,763

(32) 優先日 平成18年9月15日(2006.9.15)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/931,451

(32) 優先日 平成19年5月22日(2007.5.22)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(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, LV, MC, MT, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 デューク, クリスタル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94305, スタンフォード, ブラックウェルダール コー
ト 123

(72) 発明者 スターシー, ゲイリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02050, マーシュフィールド, ハムプステッド ウ
エイ 51

(72) 発明者 ミュース, ダン
アメリカ合衆国 イリノイ 60037, シカゴ, イースト 56ティーエイチ ストリート
1700

(72) 発明者 ターナー, エバン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホーヤ, プール ストリート 9424

(72) 発明者 アッカキア, オスマン
アメリカ合衆国 イリノイ 60616, シカゴ, サウス キング ドライブ 2851,
アパートメント 1702

(72) 発明者 フー, ハオジュン
アメリカ合衆国 イリノイ 60565, ナパービル, スパイス レーン 2039

(72) 発明者 ランセロット, ロバート
アメリカ合衆国 イリノイ 60010, バリントン, オールド ファーム ロード 221
16

(72) 発明者 チャクラバーティー, タニア
アメリカ合衆国 イリノイ 60615, シカゴ, サウス ハーパー 5337, アパート
メント 2

(72) 発明者 ブラッドリー, ケニス
アメリカ合衆国 イリノイ 60521, ヒンズデール, エヌ. ガーフィールド アベニュー
424

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010503866A5	公开(公告)日	2010-10-28
申请号	JP2009528509	申请日	2007-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	F莫奈遗传学公司		
申请(专利权)人(译)	Haemonetics公司		
[标]发明人	ナットソンクリストファー デューククリスタル ステシーゲイリー ミュースダン ターナーエバン アッカキアオスマン フーハオジュン ランセロットロバート チャクラバーティータニア ブラッドリーケニス		
发明人	ナットソン, クリストファー デューク, クリスタル ステシー, ゲイリー ミュース, ダン ターナー, エバン アッカキア, オスマン フー, ハオジュン ランセロット, ロバート チャクラバーティー, タニア ブラッドリー, ケニス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/48 G01N33/54373 G01N33/80		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.525.E G01N33/543.525.U G01N33/543.515.D G01N33/543.515.F G01N33/543.511.N		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/844911 2006-09-15 US 60/844890 2006-09-15 US 60/844910 2006-09-15 US 60/844763 2006-09-15 US 60/931451 2007-05-22 US		
其他公开文献	JP2010503866A		

摘要(译)

提供了用于分析颗粒表面性质的方法和设备。用于分析颗粒的表面性质的方法包括将第一颗粒与对第一化学物质具有特定结合亲和力的第一捕获区域相关联，向第一颗粒施加光学力，感测第一颗粒对第一颗粒的响应。光学力，并使用感测的响应来确定第一颗粒表面上第一化学物质的存在，不存在或数量。可以并行重复该过程以测试多个粒子。除了直接测试颗粒的表面性质外，该方法还可用于直接，间接和竞争性测定，以确定游离或固定化分析物的存在，不存在或数量。提供了一种具有捕获区的流体盒，所述捕获区具有针对使用光学力而调整的特性。还提供了用于执行该方法的软件例程。

