

(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2010-523973

(P2010-523973A)

(43) 公表日 平成22年7月15日(2010.7.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	2 G O 4 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 5	2 G O 5 9
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 2	4 B O 2 4
GO 1 N 33/552 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 C	4 B O 6 3
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-502083 (P2010-502083)	(71) 出願人	503159210
(86) (22) 出願日	平成20年3月21日 (2008.3.21)		エス アール ユー バイオシステムズ、
(85) 翻訳文提出日	平成21年11月30日 (2009.11.30)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/003751		アメリカ合衆国 01801 マサチュー
(87) 国際公開番号	W02008/121250		セッツ州 ウォーバーン、ジル ストリー
(87) 国際公開日	平成20年10月9日 (2008.10.9)		ト 14 エー
(31) 優先権主張番号	60/921,001	(71) 出願人	504389991
(32) 優先日	平成19年3月30日 (2007.3.30)		ノバルティス アーゲー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スイス国 ツューハー 4002 バーゼ
(31) 優先権主張番号	60/998,880		ル、リヒトシュトラーセ 35
(32) 優先日	平成19年10月11日 (2007.10.11)	(74) 代理人	100100158
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 バイオセンサのための較正および正規化の方法

(57) 【要約】

格子に基づくセンサデザインの較正および正規化の方法が開示されている。センサは、標識不使用およびルミネセンス（例えば、蛍光）の両方による増幅検出に対して最適化するように作製してもよい。そのようなセンサは、格子または適切な被膜を有する別の周期的構造に基づくものであり、用途の多様性を顕著に増加させ、センサ表面の各位置または捕捉要素についての定性的および定量的な情報を提供する新規な概念の実現を可能にする。本発明は、これらの異なるモードを利用して、品質管理（QC）工程およびセンサの各個別位置の較正を実行する。それにより、それらの質および局部的密度変動に基づいてアッセイデータをフラッグ化することができ、バッチ変動および表面に印刷された沈着プローブまたは物質の変動を補正することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

周期的な格子構造および表面に多数のプロープ位置を有するバイオセンサ上に固定されたプロープまたはプロープアレイについての固定化の質および／または量の評価方法であって、プロープに分析物が結合するに先立って、固定化されたプロープの固定化の質および／または量を空間分解法により各プロープ位置において個別に評価する方法であり、

(1) 上記バイオセンサから 2 次元のデータおよび／または画像を、

(A) エバネッセント共鳴モードにおいては、プロープに結合させた結合ルミネセンス標識剤を励起させ、バイオセンサからの発光データを収集することによって取得し、および

(B) 標識不使用モードにおいては、バイオセンサ表面の 2 次元画像および、バイオセンサのプロープ位置の画像を含む 2 次元画像の部分群についてのピーク波長値 (PWV) データを入手する (ここでピーク波長値はバイオセンサへの光の共鳴結合によりバイオセンサから反射された光のピーク波長を含む) ことによって取得する工程と、

(2) 該 2 次元のデータおよび／または画像から、バイオセンサ表面に固定されたプロープまたはプロープアレイについての固定化の質および／または量の特徴化する工程を含む該評価方法。

10

【請求項 2】

上記バイオセンサが多数のサンプル領域を有し、各該サンプル領域はバイオセンサに結合する生物学的物質を含有する予定のものであって、

さらに上記アレイは周期的な格子構造を有する表面として形成され、

上記工程 (1) が、

(1) バイオセンサの 2 次元画像を取得する工程と、

(2) バイオセンサのサンプル領域の画像を含む 2 次元画像の部分のピーク波長値 (PWV) データを取得する工程と、ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくバイオセンサからの反射光のピーク波長を含むものであり、および

(3) 該ピーク波長値データから、上記アレイのサンプル領域への生物学的物質の結合量についての定量的情報を取得する工程を含む請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3】

周期的な格子構造および表面に多数のプロープ位置を有するバイオセンサ上に固定されたプロープまたはプロープアレイについての固定化の質および／または量の評価方法であって、プロープに分析物が結合するに先立って、固定化されたプロープの固定化の質および／または量を空間分解法により各プロープ位置において個別に評価する方法であり、

(1) バイオセンサのプロープ位置のピーク波長値 (PWV) データを測定する工程と、

(2) 空間分解法で、プロープ位置の 2 次元画像 (PWV 画像) を取得する工程と、

(3) PWV データから、バイオセンサに固定されたプロープの固定化の質および／または量についての定量的な情報を取得する工程を含む該評価方法。

30

【請求項 4】

標識されたサンプルを多数のプロープ位置に適用する工程と、

多数のプロープ位置についてエバネッセント共鳴 (ER) の測定値を取得する工程と、

取得した定量的情報を用いて ER 測定値を正規化する工程をさらに含む請求項 2 記載の方法。

40

【請求項 5】

上記 ER 測定値の正規化を、正規化式 (1) により行う請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

標識されたサンプルを多数のプロープ位置に適用する工程と、

多数のプロープ位置についてエバネッセント共鳴 (ER) の測定値を取得する工程と、

取得した定量的情報を用いて ER 測定値を正規化する工程をさらに含む請求項 3 記載の方法。

【請求項 7】

上記 ER 測定値の正規化を、正規化式 (1) により行う請求項 6 記載の方法。

50

【請求項 8】

上記 P W V データおよび画像が、バイオセンサの表面に固定される予定の物質の量および形態を示すものであり、および上記方法が、固定された物質に対してサンプルのハイブリダイゼーションを行った後で取得されたデータおよび画像を較正するために、上記 P W V データおよび上記データを使用する工程をさらに含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 9】

上記方法が、バイオセンサの製造プロセスの 1 以上の工程において、標識不使用の P W V のデータおよび画像および / または E R 測定値を取得する工程をさらに含むものであり、以下の工程を 1 以上含む請求項 1 記載の方法：

バイオセンサ表面の洗浄、バイオセンサ表面の修飾、バイオセンサ表面への物質の固定化、バイオセンサの洗浄工程、バイオセンサの乾燥工程、およびバイオセンサ表面へのサンプルのハイブリダイゼーション工程。

【請求項 10】

上記方法が、ハイブリダイゼーション前の P W V の画像 / データに基づいてハイブリダイゼーション後に取得されたデータおよび画像を補正する工程をさらに含み、それによりバイオセンサに固定された固定捕捉物質の量および形態の変化の較正 / 補正を行う、請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

上記バイオセンサがさらに基体を含み、および上記バイオセンサの表面が、該基体の屈折率 n_1 よりも大きい屈折率 n_2 を有する物質からなる高屈折率層で被覆され、該層の厚さが $10 \sim 1000 \text{ nm}$ であり、周期性が $100 \sim 1000 \text{ nm}$ の範囲であり、および該基体が、平面状、円筒状、円錐状、または楕円状の形状を有する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 12】

塩画像がさらに取得および解析され、該塩画像は支持体に固定するプローブをスポットする方法により得られるものであり、該方法は、支持体に固定するプローブを含む塩含有溶液をスポットする工程を含み、必要に応じて、プローブを含む上記塩含有溶液を乾燥し、およびプローブが固定された位置の画像を取得するものであり、該画像はすべての洗浄工程の前に取得され、それにより、特定の位置における塩の不存在が、特定位置に固定するプローブのスポットリングがその特定位置では行われなかったことを示す、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

上記バイオセンサの基体が、ガラス、石英、金属酸化物、誘電物質、無機または有機の高屈折率物質、シリコン、ポリマー、プラスチック、P E T、P C、P U、C O P s、低蛍光バックグラウンドプラスチック物質、接着剤層およびそれらの組み合わせからなる群から選択された物質から作製されている請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

上記バイオセンサが、光学的に透明な層を有し、該層が、 Ta_2O_5 、 TiO_2 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 ZnO または HfO_2 である金属酸化物からなる群から選択された無機物質、あるいはポリアミド、ポリイミド、P P、P S、P M M A、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリチオエーテル、またはポリ(フェニレンスルフィド)およびそれらの誘導体からなる群から選択された有機物質を用いて形成されている請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

上記固定されたプローブまたはプローブアレイが、以下の少なくとも 1 種により標識されている請求項 1 記載の方法：

スパーサー分子、エネルギードナー、エネルギーアクセプター、電子 - ドナー、電子 - アクセプター、発色団、発光団、蛍光物質、燐光標識剤、分光標識剤、生物学的官能基、または化学修飾剤。

【請求項 16】

上記方法が、固定された物質をバイオセンサ上に置く工程をさらに含み、該固定された

10

20

30

40

50

物質が、分子量 1000 ダルトン未満の分子、分子量が 1000 ~ 10,000 である分子、アミノ酸、核酸、脂質、炭水化物、核酸ポリマー、ウィルス粒子、ウィルス成分、細胞成分、およびウィルス成分または細胞成分の抽出物、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体 (s c F v)、F (a b) 断片、F (a b') 2 断片、F v 断片、小さな有機分子、細胞、ウィルス、バクテリア、ポリマー、ペプチド溶液、タンパク質溶液、化学化合物ライブラリー溶液、一本鎖 DNA 溶液、二本鎖 DNA 溶液、一本鎖 DNA 溶液および二本鎖 DNA 溶液の組み合わせ、RNA 溶液、オリゴヌクレオチド誘導体および生物学的サンプルからなる群から選択される請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

上記プローブまたはプローブアレイが標識されていない請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 18】

請求項 1 の工程 (3) で取得された定量的情報を用いて、エバネッセント共鳴 (E R) のデータ / 画像を校正する請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1 の工程 (3) で取得された定量的情報を用いて、標識不使用の P W V データおよび / または画像を校正する請求項 17 記載の方法。

【請求項 20】

バイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを取得する工程をさらに含み、固定化の質および / または量の特徴化を上記のバイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを差し引いた後で行う請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 21】

表面に固定されたプローブのアレイを有するバイオセンサであって、周期的な格子構造を有するバイオセンサを用いて分析物を検出および / または定量する方法であって、

上記分析物の存在および / または濃度を上記固定されたプローブに対して正規化し、

上記固定されたプローブの存在および / または濃度を、バイオセンサの表面に分析物が結合する前にアレイの位置で評価する該方法。

【請求項 22】

上記固定されたプローブの存在および / または濃度を、バイオセンサ表面の 2 次元画像、およびバイオセンサのプローブ位置の画像を含む 2 次元画像の部分についてのピーク波長値 (P W V) のデータを用いて評価し、該ピーク波長値が、バイオセンサへの光の共鳴結合に基づくバイオセンサからの反射光のピーク波長を含む請求項 21 記載の方法。

30

【請求項 23】

バイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを取得する工程をさらに含み、正規化を上記のバイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを差し引いた後で行う請求項 21 記載の方法。

【請求項 24】

さらに以下の工程を含む請求項 24 記載の方法：

(1) サンプルのハイブリダイゼーションを行うためにバイオセンサを処理する工程と、
(2) 該サンプルをバイオセンサにハイブリダイズする工程と、および
(3) バイオセンサのハイブリダイズ後の画像を記録する工程 (ここで得られる画像は結合したサンプルを示す)。

40

【請求項 25】

上記バイオセンサの標識不使用モードで、ハイブリダイゼーション後の標識不使用の画像を記録する工程をさらに含む請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

上記バイオセンサから発生するバックグラウンドレベルの信号を補正するために、バックグラウンドを差し引くことを実行する工程をさらに含む請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

取得したハイブリダイゼーション前のデータに基づいて、ハイブリダイゼーション後の画像を補正する工程をさらに含み、それにより、バイオセンサ上の捕捉物質の変動を補正

50

する、請求項 25 記載の方法。

【請求項 28】

上記標識されたサンプルが、血液、血漿、血清、核酸、胃腸分泌液、組織または腫瘍のホモジュネート、滑液、便、唾液、痰、シスト液 (cyst fluid)、羊膜液、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙、前立腺液、生検液、体液、およびそれらの抽出物 / 誘導物からなる群から選択されたサンプルを含む請求項 4 記載の方法。

【請求項 29】

上記プローブをプリンターを用いてバイオセンサ上に沈積させる請求項 1 記載の方法。

【請求項 30】

上記バイオセンサを液体保有容器の内面に付着させる請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 31】

上記液体保有容器が、マイクロタイタープレート、試験管、ペトリ皿およびマイクロ流体用チャンネルらなる群から選択される請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

以下の工程からなるマイクロアレイチップの非接触定性分析方法：

(a) 周期的な格子構造 (図 1 ~ 7) からなる表面に多数のサンプル領域 802 を有するマイクロアレイチップ (図 8) を用意する工程と、
(b) 該格子構造に捕捉要素を沈着させる工程と、
(c) 該マイクロアレイチップ (図 8、9A) の 2 次元画像を取得する工程と、
(d) 該マイクロアレイチップのサンプル領域の画像を含む 2 次元画像の部分のピーク波長値 (PWV) のデータ (図 9B) を取得する工程 (ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくマイクロアレイからの反射光のピーク波長を含む) と、および
(e) (1) 2 次元画像または (2) ピーク波長値のいずれかから、マイクロアレイのサンプル領域への捕捉要素の結合についての定性的な情報を取得する工程。

20

【請求項 33】

上記捕捉要素をピエゾアレイプリンターを用いて沈着させる請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】

上記物質をピンプリンターを用いて適用または沈着させる請求項 32 記載の方法。

【請求項 35】

工程 (e) で取得した定性的な情報が、バイオセンサ表面の位置の関数としての捕捉要素の結合の特性を表すことを含む請求項 32 記載の方法。

30

【請求項 36】

上記捕捉要素を、核酸物質およびタンパク質からなる群から選択する請求項 32 記載の方法。

【請求項 37】

以下の工程からなるマイクロアレイチップ (図 8) の分析方法：

(a) 周期的な格子構造 (図 1 ~ 7) からなる表面に多数のサンプル領域 802 を有するマイクロアレイチップを用意する工程と、
(b) 該サンプル領域に生物学的物質を適用する工程と、
(c) 該マイクロアレイチップ (図 8、9A) の 2 次元画像を取得する工程と、
(d) 該マイクロアレイチップのサンプル領域の画像を含む 2 次元画像の部分のピーク波長値 (PWV) のデータ (図 9B) を取得する工程 (ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくマイクロアレイからの反射光のピーク波長を含む) と、
(e) 第 2 のサンプル物質をサンプル領域に適用することを含むハイブリダイゼーション工程を行う工程と、
(f) ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの 2 次元画像 (図 9C) を取得する工程と、および
(g) ハイブリダイゼーション工程後のサンプル領域の画像を含む 2 次元画像の部分のピーク波長値 (PWV) のデータを取得する工程。

40

【請求項 38】

50

上記ハイブリダイゼーション工程が、生物学的物質に蛍光プローブを適用する工程を含む請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

上記ハイブリダイゼーション工程後、サンプル領域のエバネッセント共鳴 (ER) の測定値を取得する工程をさらに含む請求項 37 記載の方法。

【請求項 40】

上記マイクロアレイチップから ER 測定値を取得する工程と、工程 (d) で取得したピーク波長値 (PWV) のデータから取得した、サンプル領域に結合した生物学的物質の量の定量的なデータを参照して上記 ER 測定値を正規化する工程とをさらに含む請求項 37 記載の方法。

10

【請求項 41】

記載なし。

【請求項 42】

上記バイオセンサに付着させた生物学的物質が DNA マイクロアレイを含む請求項 36 記載の方法。

【請求項 43】

標識不使用方法および標識使用方法を組み合わせた方法を含むハイブリダイゼーションプロトコルに従って、バイオセンサに付着した DNA の量を決定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本出願は、2007年3月30日に出願された米国仮出願番号60/921,001号および2007年10月11日に出願された米国仮出願番号60/998,880号に対する、米国特許法(35 U.S.C.)第119条(e)による優先権の利益を主張する。

【0002】

本発明は、全体として、支持体上に固定されたプローブアレイの品質を評価する方法に関するものであって、標識された分析物が結合する前に、固定されたプローブの存在および/または量をアレイの各位置で個々に評価する。

【背景技術】

30

【0003】

マイクロアレイや、材料アレイを利用する他のアッセイ形式は、種々の領域、例えばライフサイエンス、医薬における薬品の研究および開発、そして近年は臨床分野等におけるデータの量と質を増加させるための強力な手段となっている。重要なキーテクノロジーであることは理解されているが、マイクロアレイのデータは、依然として種々の実験誤差源に悩まされており、それにより、長期間の研究や他の研究機関とのデータの比較が困難となっている。実験上のバラツキを減らしかつ制御するために、製造バッチおよび処理バッチのバラツキを実験計画時に考慮する必要がある。

【0004】

マイクロアレイおよび他のアレイに基づく技術の重要な問題は、プラットフォーム上の特定の場所における固定された捕捉成分の量が、プラットフォームの表面の結合能力、使用された捕捉成分溶液の濃度、温度、湿度、インキュベーション時間、沈着方法等のプロセスパラメータの影響を受けて、広い範囲で変化する可能性があることである(不在又は行方不明を含む)。したがって、これらのプロセス工程の品質管理は非常に重要である。

40

【0005】

ハイブリダイゼーションに続いて、プローブ-分析物の信号は、ハイブリダイゼーションに先立って固定されたオリゴヌクレオチドの配列と、ハイブリダイゼーションに先立って固定されたオリゴヌクレオチドの量の両方に依存する。現在の方法では、固定されたオリゴヌクレオチドの量だけを決定することはできない。較正のために特別に指定され標識されたランダムオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされたアレイは、アレイ集団の中に

50

存在する種々の配列を一様に代表するものではない。マイクロアレイまたはアレイに基づく他の技術を用いて行われる較正化および正規化の測定に広く使用されている別の方法は、基準サンプルを用いる方法であり、その基準サンプルはハイブリダイゼーションの工程において対象となるサンプルと混合され、両方のサンプルは異なる蛍光標識試薬を保持する（例えば、CY3 / 緑発光およびCY5 / 赤発光）。基準サンプルの一定量のアリコートは、基準として全実験を通して分配される。この方法は、信号強度がさらに基準サンプルと捕捉成分配列に依存するという問題を解決しない。プローブのオリゴヌクレオチドの量は決定することができない。さらに、相対的な較正のみが可能であり、基準サンプル中の少量の特徴 / 配列の較正は不十分である。例えば、実験の偏りを防ぐために、色素交換が必要とされるかもしれない。

10

【0006】

他の方法、例えば色素標識 / 染色の方法等も、上述の問題を有する、所定の製造バッチの個々のマイクロアレイを単に分析するだけである。

【0007】

本開示の方法は、サンプルの標識不使用による検出およびサンプルのルミネセンス / 蛍光増幅を支援する格子に基づくバイオセンサ (grating-based biosensors)、を用いて使用するのに適したものであり、以下にエバネッセント共鳴 (ER) 技術として言及されるものである。両方のタイプのサンプル検出および測定についての簡単な紹介を以下で述べる。両方の検出方法のための技術およびバイオセンサ構造の両者についての詳細な説明は、公開された PCT 特許出願 WO 2007 / 019024 においてなされており、そのすべての内容は出典明示により本明細書の一部となる。

20

【0008】

標識不使用検出用センサ

格子に基づくセンサは、新しい種類の光学装置であり、100 nm 以下の精度で材料を正確に沈着およびエッチングできる半導体作製手段の近年の進歩により可能となったものである。

【0009】

フォトリソグラフィ結晶のいくつかの特性は、フォトリソグラフィ結晶を、格子型の標識不使用光学バイオセンサとしての応用に対しての理想的な候補としている。第1に、フォトリソグラフィ結晶の反射 / 透過の挙動は、生物学的物質（例えば、タンパク質、DNA、細胞、ウイルス粒子及びバクテリア等）の該結晶上への吸着によって容易に調整することができる。検出可能なその他の種類の生物学的物質には、小さな低分子量分子（すなわち、分子量が1000 ダルトン (Da) 未満および1000 Da と10,000 Da の間である物質）、アミノ酸、核酸、脂質、炭水化物、核酸ポリマー、ウイルス粒子、ウイルス成分および細胞成分（例えば、特に限定するものではないが、ベシクル、ミトコンドリア、膜、構造特徴成分、ペリプラズム (periplasm) またはそれらの抽出物等）、が含まれる。これらの種類の物質について、それらの有限の誘電率により、それら自身を通過する光の光路長を変化させることができることが示されている。第2に、フォトリソグラフィ結晶の反射 / 透過スペクトルは非常に狭くできるので、簡単な照明装置と検出装置を用いるだけで、生化学的結合に伴う光学特性のシフトを高分解能で決定することができる。第3に、フォトリソグラフィ結晶構造は、電磁場の伝搬を高度に局在化させるように設計できるので、一つのフォトリソグラフィ結晶の表面を用いることにより、多数の生化学結合現象を、3 ~ 5 ミクロン未満の範囲内の隣接領域間で光学干渉を起こすことなく、同時に測定することができる。最後に、高い表面 / 体積比率と、生化学試験サンプルと接触する領域に電磁場強度を集中させる能力とを備えた実際のフォトリソグラフィ結晶装置を組み立てるために、広範囲の材料と作製方法を用いることができる。材料と作製方法は、プラスチック系材料を用いた高体積装置の製造または半導体材料を用いた高感度特性を最適化するように選択することができる。

30

40

【0010】

格子型バイオセンサの代表的な例が、

B. T. カニングハム、P. リ、B. リン及び J. ペパー、センサーズ・アンド・アク

50

チュエーターズ B、第 81 巻 (2002 年)、第 316 頁～第 328 頁 (「直接的な生化学的アッセイ法としての熱量測定による共鳴反射」)、

B. T. カニングハム、J. キュウ、P. リ、J. ペパー及び B. フー、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ B、第 85 巻 (2002 年)、第 219 頁～第 226 頁 (「標識の介在しない生化学的相互作用の多重同時検出のための熱量測定によるプラスチック製共鳴光学的バイオセンサ」)、及び

A. J. ヘス及び R. P. V. ドウイン、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー、第 124 巻 (2002 年)、第 10596 頁～第 10604 頁 (「ナノスケールの光学的バイオセンサ：三角形の銀ナノ粒子の局在化表面プラズモン共鳴スペクトロスコピーに基づくアプローチの感度と選択度」)、に開示されている。

10

【0011】

フォトニック結晶バイオセンサを組み合わせることの利益を、他のあらゆる標識不使用のバイオセンサ技術が超えることはないであろう。高感度、小型、低コストで高度に並列的であるバイオセンサと、簡単、小型で耐久性のある読取り装置の開発により、従来経済的観点から使用できなかった、医薬の開発 (discovery)、診断試験、環境関連試験および食品安全等の分野におけるバイオセンサの使用が可能となるであろう。

【0012】

バイオセンサとして機能するようにフォトニックバンドギャップ装置を適応させるため、構造のいくつかの部分は試験サンプルに接触している必要がある。生体分子、細胞、タンパク質、または他の物質が、フォトニック結晶の一部に導入され、局所的に閉じ込められた電磁場強度が最大となる場所に吸着される。その結果、結晶の中への光の共鳴結合が変更され、反射/透過の出力 (すなわち、ピーク波長) が同調され、すなわち、シフトする。反射による出力のシフト量は、センサ上に存在する物質の量に関係している。センサは、センサの中に光を導入して反射光または透過光を捕捉する照明 - 検出装置と共に用いられる。反射光または透過光は、ピーク波長のシフトを測定する分光器へ送られる。

20

【0013】

共鳴光結合 (resonant light coupling) の高い品質係数 (Q)、高い電磁エネルギー密度、および強い光学的閉じ込めを提供するフォトニック結晶の機能を利用して、高感度のバイオセンサを製造することができる。ここで、Q は、共鳴周波数におけるピーク波長の鋭さを示す尺度である。フォトニック結晶バイオセンサは、試験サンプルが周期格子に浸透し、生体分子または細胞の付着による結晶の表面誘電率の変化によって共鳴光結合条件に同調するように設計される。共鳴の高い Q 値および結合電磁場と表面結合物質との強い相互作用に起因して、報告されている最高感度を有するいくつかのバイオセンサ装置がフォトニック結晶から得られている (カニングハムらによる前記の論文参照)。この種の装置が、200 ダルトン (Da) 未満の分子量を有する分子を高い信号対雑音の許容範囲で検出する機能及び個々の細胞を検出する機能を有していることは証明されている。フォトニック結晶内において共鳴的に結合した光は空間的に効果的に閉じ込めることができるので、フォトニック結晶表面は、アレイ形式による多数の同時におこなわれる生化学的アッセイを可能にする。この場合、相互に 10 μ m 未満の隣接領域は独立して測定することができる。この点に関しては次の文献を参照されたい：P. リ、B. リン、J. ゲルステンマイヤー及び B. T. カニングハム、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ B、2003 年 (「生体分子の相互作用の標識を介在させないイメージングに関する新規な方法」)。

30

40

【0014】

フォトニック結晶構造に基づく標識不使用バイオセンサには多くの実用的な利点がある。蛍光物質、放射性リガンド又は二次的レポーターを使用しない生化学的な細胞性結合の直接的検出法は、実験上の不正確さ、即ち、分子のコンフォメーションに対する標識の効果、活性な結合性エピトープの遮断、立体障害、標識サイトへの不到達性、又は実験における全ての分子に対して同等に機能する適当な標識を見出すことができないことによってもたられる不正確さの問題を除去する。標識を使用しない検出法は、アッセイ法の開発に

50

要する時間と労力を著しく単純化すると共に、失活、貯蔵寿命及びバックグラウンド蛍光のための必要な実験的道具を必要としない。標識を使用しないその他の光学的バイオセンサに比べて、フォトリソグラフィの機能は、広帯域の光源（例えば、白熱電球又はLED）から垂直の入射角で光を照射し、反射される色彩のシフトを測定することによって容易に調べることができる。簡単な励起／読取りスキームの利用により、実験室用器具に使用するのに適した安価で小型の強靱なシステム、及びケア医療用診断法や環境の監視に使用される手持ちの携帯システムを得ることが可能となる。フォトリソグラフィ自体は電力を消費しないので、この種の装置は、種々の液体状又は気体状のサンプリングシステム内へ容易に埋設することができる。あるいは、この種の装置は、単一の照明／検出基地によって建物内の何千ものセンサの状態が追跡される光学的ネットワーク中に配置させることができる。フォトリソグラフィバイオセンサは広範囲の材料と方法によって製造することができるが、連続的なフィルム状シートを用いておこなうプラスチックに基づく製法によれば、高感度の構造体を得られることが判明している。従来はその他のバイオセンサに対しては経済的に不適当とされていたプラスチックに基づく設計と製法によれば、低コスト／アクセスが要求される用途において使用されるべきフォトリソグラフィバイオセンサが得られる。

【0015】

本発明の譲受人の一人は、フォトリソグラフィバイオセンサ及び標識不使用下での結合の検出のためのこれに関連する検出装置（BINDという。）を開発した。このセンサと検出装置は次の特許文献に記載されている：米国特許出願公報2003/0027327号、同2002/0127565号、同2003/0059855号および同2003/0032039号並びに米国特許第7023544号。共鳴ピーク波長のシフトの検出法は、米国特許出願公報2003/0077660号に教示されている。これらの特許文献に記載されているバイオセンサは、プラスチック製のフィルム又は基体の連続的シート上へ適用された一次元的又は二次元的な周期的構造化表面を含む。この結晶の共鳴波長は、垂直入射におけるピーク反射率を、0.5ピコメータの波長分解能が得られる分光計を用いて測定することによって決定される。三次元的なヒドロゲル表面の化学的性質を利用しないで得られた質量検出感度（ 1 pg/mm^2 よりも小さな値）は、その他の市販のバイオセンサによっては証明されていない。

【0016】

前記の特許出願の明細書に記載されているバイオセンサ装置の基本的な利点は、プラスチック材料を用いる連続的な工程（1～2フィート/分）によって大量生産できることである。このようなセンサを大量生産する方法は、米国特許出願公報2003/0017581号に記載されている。

【0017】

システムの組立に関する詳細は、米国特許出願公報2003/0017581号に記載されている。周期的構造アレイの別の例は、国際公開WO 01/02839号にも記載されている。

【0018】

図1に示すように、バイオセンサ10の周期的表面構造体は低屈折率を有する材料12から形成されており、該材料は、より屈折率の高い材料14によって被覆されている。低屈折率材料12は透明なプラスチック材料からなる基体シート16と結合される。この表面構造体は、ポリエステル製の基体16の表面上での連続的製膜法を用いることによって、シリコンウェーハ「マスター」金型（即ち、所望の複製構造体のネガ）からの硬化エポキシ層12の内部で複製される。液状のエポキシ12をマスター格子の形態に適合させ、次いで紫外線の照射によって硬化させる。好ましくは、硬化エポキシ12を、ポリエステル製のシート状の基体16に接着させ、シリコンウェーハから剥離させる。センサの製造工程は、屈折率の高い材料である酸化チタン（ TiO_2 ）を硬化エポキシ12の格子表面上へスパッタリング法により120nmの厚さで堆積させることによって完結する。酸化チタンを堆積させた後、マイクロプレートの切片（3×5インチ）をセンサのシートから切り取り、該切片を、底のない96個のウェル及び384個のウェルを具有するマイクロタイ

タープレートの底部へエボキシを用いて結合させる。

【0019】

図2に示すように、マイクロタイタープレートのウェルを規定するウェル20は液体サンプル22を保有する。底なしマイクロプレートとバイオセンサ構造体を組み合わせたものは集合的にバイオセンサ装置26として図示する。この方法によれば、非常に低いコストで、フォトニック結晶のセンサを平方ヤードの規模で大量生産することができる。

【0020】

フォトニック結晶のバイオセンサ用の検出装置は、構造が簡単で、安価で、消費電力が少なく、強靱である。このシステムの模式図を図2に示す。反射される共鳴を検出するためには、白色光光源からの光を、光ファイバー32（直径：100 μm ）とコリメーターレンズ34を通して、通常はマイクロプレートの底部を垂直の入射角で通過させることによってセンサーの表面領域（直径が1mmまでの領域）へ照射する。検出ファイバー36は、スペクトロメーター38を用いる分析用の反射光を集めるための照射ファイバー32を用いて束ねられる。8個の一連の照明/検出ヘッド40は直線上に配置されるので、反射スペクトルは、マイクロプレートの一列内の8個の全てのウェルから一度に集められる。図3を参照。マイクロプレート+バイオセンサ10は、X-Y軸方向でのアドレスで呼び出せる作動ステージ（図2には図示せず）上にあるので、マイクロプレート内の各々のウェル列は順次アドレス指定することができる。測定時間は、作動段階の速度によって制限されるが、この装置を使用する場合には、96個の全てのウェルに関する測定は約15秒間でおこなわれる。図2及び図3に示すシステムの構成に関するさらに詳細な説明は、

10

20

【0021】

蛍光増幅センサ

米国特許第6707561号には、当該分野においてはしばしば「エバネッセント共鳴（ER；evanescent resonance）」と呼ばれている格子に基づくバイオセンサ技術が記載されている。この技術においては、サブミクロンスケールの格子構造を用いてルミネセンス信号（例えば、蛍光、化学ルミネセンス、エレクトロルミネセンス、燐光等の信号）を増幅させた後、格子表面上に結合した分子であって蛍光標識を保有する1つの分子へ結合させる。ER技術は、非増幅アッセイに比べて著しく低い濃度の被検体の結合検出を可能にする蛍光体に基づくアッセイの感度を増大させる。

30

【0022】

ER技術においては、光学的共鳴を発生させ、かつ結合がおこなわれる格子表面上へレーザー光を集める光学的格子を、高屈折率コーティング膜（詳細は以下に示す。）と組み合わせる。実際は、レーザースキャナーが、一般的には格子の上からいくらかの入射角（ θ ）でセンサを掃引する。一方、検出器はセンサの表面からの光学的波長の長い蛍光を検出する。また、一度にセンサの大面积の測定を可能とするCCD（電荷結合型装置）カメラを用いる非掃引の光学的機構を設けてエバネッセント共鳴を発生させることもできる。設計により、ERセンサの光学的特性によってほぼ100%の反射（共鳴として知られている反射）を特定の入射角とレーザー波長（ λ ）においてもたらすことができる。格子構造によるその内部へのレーザー光の閉じ込めによって、消失場の範囲内（一般的には1~2nm）に結合した蛍光体からの発光を増幅させる。従って、共鳴においては、透過光の強度はゼロ近くまで低下する。

40

【0023】

前述のように、先に言及した特許出願の明細書に記載されている標識不使用バイオセンサにおいては、サブミクロンスケールの格子構造が使用されるが、該格子構造は、ER用の格子に比べて、幾何学的形態と使用目的の点で著しく相違する。実用に際しては、標識を使用しない技術とER技術は、共鳴に近い光学的特性に関して異なる要求を有する。共鳴現象におけるスペクトルの幅と位置が主として相違する。共鳴幅は、波長に対して反射率又は透過率としてプロットされる共鳴特性の波長尺度での半値幅（full width at half maximum）を指す。また、該共鳴幅は前記のQ係数とも呼ばれている。共鳴幅は、入射角

50

(θ)の関数として反射率又は透過率を表示する曲線上にプロットされる共鳴特性の幅(度)も指す。

【0024】

所望により、標識不使用の格子に基づくセンサからできるだけ幅の狭い共鳴ピークを発生させることによって、結合性の低いことを示すピーク位置の小さな変化の検出を促進させることができる。標識不使用のセンサは、より多くの試料を結合させるために大きな格子表面積を有するという利点を有する。現在の実施においては、より大きな表面積は、他の方法も存在するが、格子をより深くすることによって得られる。現在市販されている標識不使用のセンサによれば850nm近くで共鳴が得られるので、標識不使用のBIND検出装置はこの波長を読み取るように最適化されている。

10

【0025】

これとは反対に、実用的なER格子センサは、固定された波長のレーザー光を使用すると共に、物理的な可変因子(例えば、格子に蓄積する試料の種類やセンサの製造条件の相違等)の存在下での固定入射角において共鳴が発生することを保証するために、比較的幅広い共鳴が利用できるように設計されている。一般に、場の強度は共鳴幅に伴って減少するので、実用的なERセンサの設計には共鳴幅における調和が要求される。適当な共鳴幅を選択することによって、ER信号の利得を保持すると共に、アッセイ、測定器具及びセンサの可変範囲にわたって一定の増幅度が得られる。典型的な用途においては、Cy5として知られているような一般的な蛍光性染料を励起させるために633nmの波長が使用される。一部のERスキャン計測器によれば、最大のレーザー蛍光体カップリング(coupling)に対して共鳴を同調させるように入射角を調整することが可能である。しかしながら、このような実用的態様には、適切な調整手段を採用しない限り、許容できない変化をもたらす要因が含まれる。

20

【0026】

既知のER設計においては、標識を使用しない最適設計に比べて深さの浅い格子が採用されている。例えば、前述の米国特許第6707561号明細書においては、「透明層」(即ち、屈折率の大きな被覆層)の厚さに対する格子の深さの比は1未満(好ましくは0.3~0.7に規定されている。標識を使用しない最適な設計においては、同様に規定される比が1よりも大きな値(好ましくは1.5よりも大きな値)の格子が採用されている。標識を使用しない設計においては、格子の深さは、一般的には格子の線幅又は半周期によって定義される。例えば、現在実用化されている市販の標識不使用センサの半周期は275nmであり、格子の深さは約276nmであり、幾何学的比は1:1である。この同じセンサの設計においては、格子の上部面上には大きな屈折率を有する酸化物被覆層(厚さ:約90nm)が形成される。従って、米国特許第6707561号明細書に記載の定義によれば、このセンサにおける格子の深さ:酸化物層の厚さは約3:1である。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0027】

本開示は、格子に基づくバイオセンサ設計の較正および正規化の方法を提供する。そのバイオセンサは、単一の装置内において2種の検出方式(標識不使用増幅方式及びルミネセンス(例えば、蛍光)増幅方式)に対して最適化できるように組み立ててもよい。そのようなセンサは、格子または適切な被膜を有する別の周期的な構造を有するものであり、用途の多様性を顕著に増加させ、マイクロアレイ/バイオセンサの各位置についての定量的および定性的な情報/データを提供する新規な概念を実現することを可能とする。

40

【0028】

本開示は、これらの異なるモードを利用して、センサ作製の種々の段階における品質管理(QC)およびバイオセンサのそれぞれの個別位置の較正を実行する。それにより、アッセイデータには、該アッセイデータの品質および局所密度の変化に応じてフラッグをつけることができ、バイオセンサのパッチおよび印刷の変化を補正することが可能である。

【0029】

50

本開示は、ERおよび標識不使用技術を組み合わせて用いるものであり、それにより、すべての固定された捕捉要素および一つのバッチ（バッチ内（intra batch））で製造されたすべてのマイクロアレイの校正だけでなく、定性／定量情報を得ることができる。本発明の方法は、製造バッチによる差異（バッチ間（inter batch））を補正することもできる。本発明の方法に用いるバイオセンサは、誘電性薄膜を有する周期構造化マイクロアレイ基体に基づくものを用いることができ、例えば、国際公開WO 01/02839、米国特許出願公報2003/0027327号、同2002/0127565号、同2003/0059855号または同2003/0032039号、または米国特許第6707561号または同7023544号に記載されている。これらの構造は、フォトニック結晶またはフォトニックバンドギャップ物質としても記載されている。

10

【課題を解決するための手段】

【0030】

一つの観点として、本開示は、基体上に固定されたプローブアレイのプローブの固定化の質及び／または量を評価する方法を提供する。固定されたプローブの存在および／または量は、分析物と結合する前に、空間分解法で、アレイの各位置において個別に評価される。

【0031】

一つの態様として、支持体は、屈折率が n_1 である光学的に透明な基体と、該基体の表面に形成され、 n_1 より大きい屈折率 n_2 を有する非金属の光学的に透明な層を有しており、該支持体は、該支持体に組み込まれた1以上の格子構造または波形構造を有し、該構造はそれぞれが一つのまたは多数の捕捉要素または捕捉位置に対応する1以上の検出領域を有するものであり、上記波形構造は周期的な溝群を有するものである。該溝の深さは、3nmから上記の光学的に透明な層の厚さまでの範囲である。光学的に透明な層の厚さは、30～1000nmの範囲である。波形構造の周期は、200～1000nmの範囲であり、上記の光学的に透明な層の厚さに対する溝の深さの比は、0.02から1の範囲であり、溝の周期に対する溝幅の比は0.2～0.8の範囲である。そのため、ERモードにおいては、上記支持体に適切な角度で入射するコヒーレント光は、透過光の減少と入射光の異常に高い反射を妨げることのできる、個々のビームまたは回折次数（diffraction orders）へと回折され、それにより、1以上の検出領域の表面にエバネッセント場を発生させることができる。あるいは、プラットホームに適切な角度で入射するコヒーレント光および直線偏光は、透過光のほとんどすべての消滅と入射光の異常に高い反射を妨げることのできる、個々のビームまたは回折次数（diffraction orders）へと回折され、それにより、1以上の検出領域または検出場所の表面にエバネッセント場を発生させることができる。

20

30

【0032】

支持体またはバイオセンサ表面に固定された物質群のそれぞれの存在および／または量は標識不使用モードで測定される。この方法は、製造／調製に用いられるすべての段階の工程、特に物質の固定化（印刷／アレイ化、マイクロアレイの製造）の前および後における支持体のピーク波長値（PWV）のデータまたは支持体位置の測定を含み、上記PWVのデータの変化を用いて、空間分解法で、変換器（transducer）の2次元画像（PWV画像）を構築することができる。これらの画像は各プロセス工程の定量的な情報を提供する。特に、PWVのデータ／画像は、固定予定の物質の量および形態を表示する。PWVのデータ／画像は、変換器上の固定された物質を定量するのに使用することができ、およびバイオセンサ上に固定された物質の質と、空間分解された定量化の評価に使用することができ、さらに、標識されたサンプル（ルミネセンス、蛍光または他の標識法）を用いてハイブリダイゼーションを行った後で得られたデータおよび画像を校正するための、下流でのデータ／画像処理に使用することができる。

40

【0033】

一つの態様として、本開示は、標識不使用のPWVのデータ／画像測定および／またはER測定を、例えば、支持体／変換器の表面洗浄、表面修飾、物質の固定化、洗浄工程、

50

乾燥工程、サンプルのハイブリダイゼーションの前後において、プロセスのすべての段階で、配列 / 順番に関係なく実施することができる方法を提供する。この場合、処理工程は適合させた適切な方法で、繰り返して実施するかあるいはプロセスの複数の段階で実施することもできる。

【 0 0 3 4 】

別の態様として、本開示は、ハイブリダーゼーション後の画像形成工程の信号を、ハイブリダーゼーション前の P W V の画像 / データに基づいて補正することができる方法を提供するものであり、それにより、バイオセンサに固定された固定化捕捉物質の量および形態の変化の較正 / 補正を行うことができる。

【 0 0 3 5 】

さらに別の態様として、本開示は、基体の屈折率 n_1 より大きい屈折率 n_2 を有する物質からなるナノ粒子の層でセンサ表面を被覆する方法を提供する。表面に付着したナノ粒子は同様の大きさを有し、ここに記載したように、装置 / 変換器 / 支持体の光学的な結合 / 共鳴を可能とする周期的な構造 / 配置として機能する。ナノ粒子の大きさは、好ましくは $10 \sim 1000 \text{ nm}$ 、得られる周期は $100 \sim 1000 \text{ nm}$ の範囲であり、基体の形状は、平面状、円筒状、円錐状、球状または楕円状である。

【 0 0 3 6 】

さらに別の態様として、本開示は、バイオセンサの塩画像 (salt image) をさらに取得して解析する方法を提供する。塩画像は、支持体に固定させるべきプローブをスポッティングする方法により得られる。スポッティングの方法は、支持体に固定すべきプローブを含む塩溶液をスポッティングする工程と、必要に応じてプローブを含む塩溶液を乾燥させ、およびプローブが固定された場所の画像を取得する工程を含む。あらゆる洗浄工程の前に画像を取得する。それにより、特定の場所に塩が存在しないことは、その特定の場所に固定されるべきプローブのスポッティングが起こらなかったことを示す

【 0 0 3 7 】

本開示は、光学的に透明な基体を、有機物質および / または無機物質から製造する方法も提供するものであり、その材料として、例えば、ガラス、石英、金属酸化物、誘電物質、無機または有機の高屈折率物質、シリコン、ポリマー、プラスチック、PET、PC、PU、接着剤層およびそれらの物質の組合せを挙げることができる。バックグラウンド蛍光が少ない物質が好ましいと考えられる。

【 0 0 3 8 】

一つの態様として、光学的に透明な層を、無機物質、例えば、 Ta_2O_5 、 TiO_2 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 ZnO 、 HfO_2 等の金属酸化物を用いて、あるいは有機材料、例えば、ポリアミド、ポリイミド、PP、PS、PMMA、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリチオエーテル、またはポリ(フェニレンスルフィド)およびそれらの誘導体を用いて形成する。

【 0 0 3 9 】

一つの態様として、固定された物質、および / または分析物 / サンプル分子、および / またはアッセイに必要な付加的な成分 / 種を、スパーサー分子、エネルギードナー、エネルギーアクセプター、電子ドナー、電子アクセプター、発色団、発光団 (luminophores)、蛍光物質 (flurophores)、燐光標識剤、分光標識剤、生物学的官能基、または化学修飾剤を用いて標識または修飾する。

【 0 0 4 0 】

一つの態様として、プローブおよび / またはサンプルおよび / またはアッセイに関与する他の種 (スパーサー、エネルギードナー、エネルギードナー、電子ドナー、電子アクセプター) は標識しない。

【 0 0 4 1 】

エバネッセント共鳴 (ER) データ / 画像は、定量的な情報、即ち、P W V の画像 / データを用いて較正することができる。さらに、標識不使用 / P W V のデータおよび / または画像は、定量的な情報、すなわち、P W V の画像 / データを用いて較正する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

本方法は、バイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトル／データを取得する工程も含み、そこでは、バックグラウンド信号のスペクトルを差し引いて、定量的な情報を取得する。

【 0 0 4 3 】

別の観点として、本開示は、固定されたプローブのアレイを用いて分析物を検出および／または定量する方法を提供する該方法においては、分析物の存在および／または濃度を、その固定されたプローブの存在および／または濃度に対して正規化し、固定されたプローブの存在および／または濃度を、分析物の結合に先立って、アレイの各位置で個別に評価する。

10

【 0 0 4 4 】

一つの態様として、バックグラウンドを差し引く方法を適用して、すべての種類の画像に対するバックグラウンドのレベルを補正することができる。当該分野において既知のバックグラウンドを差し引くいずれかの適当な方法を用いてもよく、その詳細は特に重要ではない。

【 0 0 4 5 】

別の態様として、プロセスの異なる段階で取得されたデータ／画像は、例えば、校正および／またはバックグラウンド補正のために、適切なアルゴリズムを用いて新しい画像またはデータを計算するのに用いることができる。サンプルのハイブリダーゼーションを行うために、マイクロアレイを前処理または処理することができる。次いで、サンプルはマイクロアレイ／支持体にハイブリダイズされ、ハイブリダーゼーション後の処理がマイクロアレイ／支持体に対して行われ、ルミネセンスに基づくハイブリダーゼーション後の画像が、マイクロアレイ／支持体のルミネセンスモードで記録される。得られた画像は、結合した分析物質であって、ルミネセンス - 標識された分析物質を示す。代わりにあるいは追加として、ハイブリダーゼーション後の標識不使用の画像を、標識不使用モードで記録することができる。これは、固定された物質／捕捉プローブおよびサンプルのインキュベーションから得られた結合物質を示すものである。

20

【 0 0 4 6 】

バックグラウンドを差し引く方法を、すべての種類の画像のバックグラウンドレベルを補正するために適用してもよい。さらに、ハイブリダーゼーション後の画像の信号を、前に取得したハイブリダーゼーション前のデータに基づき補正することにより、マイクロアレイ上の捕捉物質の変化を校正／補正することができる。

30

【 0 0 4 7 】

さらに別の観点として、本開示は、多数のサンプル領域を有するマイクロアレイであって、各サンプル領域が該マイクロアレイに結合した、標識されたまたは標識されていない捕捉プローブを潜在的に保有するマイクロアレイの分析方法を提供する。該方法においては、該マイクロアレイが周期的な格子構造からなる表面として形成されている。該方法の工程は、(a) マイクロアレイの二次元画像を取得する工程と、(b) アレイの捕捉プローブ領域の画像を含む、画像の部分群についてのピーク波長値 (P W V) データを取得する工程 (ここで、ピーク波長値は、格子構造への光の共鳴結合によるアレイからの反射光のピーク波長を含む) と、および (c) ピーク波長値データから、アレイのサンプル領域に対する捕捉プローブの結合／沈着／固定化の量に関する定量的な情報を取得する工程を含む。

40

【 0 0 4 8 】

別の態様として、本方法は、(d) サンプル領域に標識されたサンプル (例えば、ルミネセンス、蛍光) を適用する工程と、(e) サンプル領域のエバネッセント共鳴 (E R) の測定値を取得する工程と、(f) 工程 (c) で得られた定量的な情報を用いて E R の測定値を正規化する工程とをさらに含む。

【 0 0 4 9 】

さらに別の態様として、本方法は、マイクロアレイから発生する P W V のバックグラウ

50

ンド信号を取得する工程をさらに含む。この場合、P W V データからバックグラウンド信号を差し引いた後に工程 (c) の定量的な情報を作成する。

【 0 0 5 0 】

標識されたサンプルを、核酸、タンパク質およびタンパク質断片、ペプチド、いずれかの生物学的に関連する結合パートナー、細胞またはその断片、化学的検知可能物等からなる群から選択することができる。

【 0 0 5 1 】

さらに別の態様として、本方法は、2次元画像またはピーク波長値データのいずれかを分析することにより、サンプル物質の結合 / 固定化についての定性データまたは定量データを取得する工程をさらに含む。

10

【 0 0 5 2 】

アレイ要素 (捕捉要素) を、例えば、マイクロアレイプリンター、ピンプリンター、インクジェットプリンター、光固定化システム、あるいは公知または後で開発された他の技術等を有する適切な装置またはシステムを備えたマイクロアレイ / バイオセンサ / 基体のプラットフォームに適用することができる。一つの態様として、ピエゾアレイプリンターを用いて、捕捉要素物質を塗布または沈着させることができる。

【 0 0 5 3 】

別の観点として、本開示は、印刷されたマイクロチップの非接触的定性分析方法を提供する。該方法は、(a) 周期的な格子を有する構造体の表面に多数のサンプル領域を有するマイクロアレイまたはバイオセンサを用意する工程と、(b) 該マイクロアレイに捕捉要素を沈着させる工程と、(c) 該マイクロアレイの二次元画像を取得する工程と、(d) 該マイクロアレイのサンプル領域群の画像群を含む2次元画像の部分群についてのピーク波長値 (P W V) を取得する工程 (ここで、該ピーク波長値は、格子構造への光共鳴結合によるマイクロアレイからの反射光のピーク波長を含む) と、(e) (1) 2次元画像または (2) ピーク波長値から、マイクロアレイのサンプル領域群へまたはサンプル領域上への捕捉要素の結合についての定性的な情報を取得する工程を含む。

20

【 0 0 5 4 】

工程 (e) の方法で取得された定性的または定量的な情報を、基体上の位置の関数として、結合 / 固定された物質の量から決定することができる。

【 0 0 5 5 】

捕捉要素は、核酸物質、タンパク質または化学的 / 生物学的 / 物理的 / 光学的に修飾したそれらの誘導体 / 断片からなる群から選択された物質から選択することができる。一般に、センサ作製のために、あらゆる有機、無機、生物学的または化学的な特性を有する捕捉要素を用いることができる。

30

【 0 0 5 6 】

さらに別の観点として、本開示は、以下の工程を含むマイクロアレイチップの分析方法を提供する。該方法は、(a) 周期的な格子を有する構造体の表面に固定された多数の捕捉要素を有する、マイクロアレイチップを用意する工程と、(b) 固定された該捕捉要素に対し生物学的物質 / 生物学的サンプルを適用する工程と、(c) 該マイクロアレイチップの2次元画像を取得する工程と、(d) 該マイクロアレイチップのサンプル領域群の画像群を含む2次元画像の部分群についてのピーク波長値 (P W V) を取得する工程 (ここで、該ピーク波長値は、格子構造への光共鳴結合によるマイクロアレイからの反射光のピーク波長を含む) と、(e) 固定された該捕捉要素にサンプル物質を適用する工程を含むハイブリダイゼーション工程を実行する工程と、(f) ハイブリダイゼーション後、該マイクロアレイチップの2次元画像を取得する工程と、(g) ハイブリダイゼーション後の該マイクロアレイチップのサンプル領域群の画像を含む、2次元画像の部分群のピーク波長値 (P W V) を取得する工程とを含む。

40

【 0 0 5 7 】

ハイブリダイゼーション工程は、生物学的物質のルミネセンス・プローブまたは蛍光プローブを適用する工程を含むことができる。サンプル領域群のエバネッセント共鳴 (E R

50

）測定の取得は、ハイブリダイゼーション後に行うことができる。E R 測定値は、工程（d）で取得されたピーク波長値（P W V）データから取得されるサンプル領域群に結合した生物学的物質の量についての定量的データを参照して正規化される。

【0058】

本開示は、DNA マイクロアレイの品質管理方法を提供するものであり、それにより、標識不使用方法により決定された品質管理データを使用するための統計的頑健性基準が確立される。

【0059】

さらに、本開示は、標識不使用方法および標識使用方法の利用を含む種々のプロトコル / プロセス（例えば、ハイブリダイゼーション）に先立ってあるいはその後にバイオセンサに付着させたDNAの量の決定方法を提供する。

10

【0060】

例示的な実施態様を添付図に基づいて説明する。これらの実施態様及び添付図は、本願発明を例示的に説明するためのものであって、本願発明を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、格子に基づくバイオセンサ配置の従来例を示す図である。

【図2】図2は、バイオセンサに照光し、バイオセンサからの反射光のピーク波長のシフトを測定するための、従来のバイオセンサおよび検出システムを示す図である。

【図3】図3は、底なしのマイクロタイタープレートまたは他の適切な液体保有容器の底に付着させた図1の構造体からなるバイオセンサ装置の全ウェル列を読み取る8個の照光ヘッドの配置を示す図である。

20

【図4】図4Aおよび図4Bは、それぞれ、格子構造の中の周期的なホール（hole）で特徴付けられる2次元格子構造の斜視図および断面図であり、該格子構造は、水媒体においてX偏光により照光された場合にはB I N D（標識無し）検出用に最適化される一方、空気媒体においてY偏光により照光された場合にはE R検出用に最適化される。

【図5】図5Aおよび図5Bは、それぞれ、格子構造の中の周期的なポスト（post）で特徴付けられる2次元格子構造の斜視図および断面図であり、該格子構造は、水媒体においてX偏光により照光された場合にはB I N D（標識無し）検出用に一方向に最適化される一方、空気媒体においてY偏光により照光された場合にはE R検出用に一方向に最適化される。

30

【図6】図6Aから図6Cは、単位セルの図であり、E Rセンサと標識不使用センサを組み合わせたさらに別の態様についての、2段の2次元格子構造を示す。

【図7】図7は、E Rおよび標識不使用の格子に基づくセンサを組み合わせた画像読取りシステムの模式図である。

【図8】図8は、検出システム（例えば図7に示すような）のCCDカメラで撮影したマイクロアレイ型のバイオセンサの画像であり、バイオセンサは図11に示すような周期的な格子構造を有し、多数の捕捉要素を有している。

【図9】図9Aから図9Cは、図8のバイオセンサの捕捉要素の領域の一つの一部についての異なる画像を示すものであり、個々の捕捉要素の位置は、図9A、9B、9Cの中の円で示される。図9Aは、図8の領域群の一つの「塩画像」であり、捕捉要素（例えば、オリゴヌクレオチド）およびプリントパuffアとからなると予想される印刷されたスポットまたは印刷された場所を示す。画像の中のスポットまたは場所の実際の形態は、種々であり、作製工程に依存する。画像は、定性的な情報のみ、例えば、捕捉物質がチップ表面上に正確に印刷または沈着されなかった等の情報のみを与える。この情報を、捕捉要素の各々についての基礎的な質フラッグとして使用することができる。図9Bは、バイオセンサの表面から過剰の物質を除去する洗浄工程の後で取得された、図9Aの領域の標識不使用のP W V画像である。個々の場所の強度は、マイクロアレイ上の個々の場所に固定されたまたは沈着されたオリゴヌクレオチドの固定化物質質量に対応する。強度測定値（「B I N D」データ）は、図3または図7、あるいは別のタイプの検出システムを用いて作

40

50

製される。検出システムにより測定されたピーク共鳴波長のシフトは、図 9 B の標識不使用画像の作製のために、ピクセル・バイ・ピクセル基準 (pixel-by pixel basis) で決定し、そのシフトの強度は色彩または相対輝度あるいはその両方に変換される。図 9 C は、図 7 のシステムについての E R モードで取得した画像であり、領域群の蛍光強度は、用いたサンプル中における特定の m R N A の存在量に対応する。

【図 1 0】図 1 0 は、バイオセンサのプラットフォームの別の形態を示すものであり、該形態には、円盤状、同心構造等の国際特許出願 W O 0 1 / 0 2 8 3 9 に示したものが含まれる。検知要素 (図 1 0 A 参照) は、種々の配置、例えば、矩形状、円状、六角中心状 (hexagonal-centric)、楕円状、直線状または迷路状に配置することができる。検知領域 (図 1 0 B 参照) は、矩形状、円状または他のどのような形状でもよい。溝は、等間隔の直線状または等間隔の円形状のいずれかに配置してもよく、あるいはそのような構造の部分構造に対応するものでもよい。プラットフォーム (図 1 0 C から図 1 0 F 参照) は、矩形状または円盤状あるいは他のあらゆる形状でもよい。プラットフォームは、1 以上の検知領域からなり、各検知領域は 1 以上の捕捉要素からなり、各捕捉要素は 1 以上の標識されたまたは標識されていない捕捉分子からなることができる。プラットフォーム (図 1 0 C から図 1 0 F 参照) は、矩形状または円盤状あるいは他のいずれかの形状でもよい。プラットフォームは、1 以上の検知領域からなり、各検知領域は 1 以上の捕捉要素からなり、各捕捉要素は 1 以上の標識されたまたは標識されていない捕捉分子からなることができる。

プラットフォームは、マイクロタイター型のプレート / 装置 (図 1 0 G 参照) に取り付けることができ、それにより、各マイクロタイターウェルで 1 以上のアッセイを行うことができる。これは、各マイクロタイタープレートの大きさに関係なく、すべてのタイプのプレート、すなわち、9 6 , 3 8 4 , 1 5 3 6 またはそれ以上のウェルを有するものについて可能である。

【図 1 1】図 1 1 は、図 8 および図 9 に示したものと類似する E R センサの模式図である。

【図 1 2】図 1 2 は、E R / B I N D 複合センサの模式図である。

【図 1 3】図 1 3 A および図 1 3 B は、図 1 2 に示した E R / B I N D 複合センサの単位セルの 2 つの上面図であり、高屈折率層の厚さが格子の深さよりも大きいことを示す。

【図 1 4】図 1 4 A および図 1 4 B は、図 1 2 に示した E R / B I N D 複合センサの単位セルの 2 つの上面図であり、格子の深さが高屈折率層の厚さよりも大きいことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 6 2】

本発明の方法においては、いわゆるエバネッセント共鳴を発生させることのできる周期的表面格子の構造を有するバイオセンサを用いてもよい。エバネッセント共鳴は、先行技術、例えば論文、S S . ワン、R . マグヌソン著、「導波モード共鳴フィルターの理論および応用」、アプライド・オブティックス、第 3 2 巻 (1 4 号)、第 2 6 0 6 頁 ~ 第 2 6 1 3 頁 (1 9 9 3 年 5 月 1 0 日)、および論文、O . パリオーラ著、「導波機能要素としての結合格子」、ピュア・アンド・アプライド・オブティックス、第 5 巻、第 4 5 3 頁 ~ 第 4 6 9 頁 (1 9 9 6 年) に理論的に記載されている現象である。これらの論文で説明されているように、共鳴現象は平面誘電層回折格子で起きるものであり、回折格子の溝が十分な深さを有し、波形構造体への入射光が特定の角度である場合において、反射波と透過波との間で光学エネルギーが概ね 1 0 0 % 交換される。この現象は、プラットフォームの検知領域で活用され、該プラットフォームでは、検知領域は十分な深さの回折溝を有しており、検知領域でエバネッセント共鳴が発生する角度でプラットフォームの検知領域に光を入射させる。これにより、検知領域の中に強化されたエバネッセント場が形成され、該エバネッセント場は研究対象のサンプルを励起させるのに使用される。上述の 1 0 0 % 交換が起きるのは、平行ビームと線形偏向させたコヒーレント光を用いた場合に起きること、および強化されたエバネッセント場の効果は非平行の集束させたレーザー光の非偏光を用いても達成できることに留意すべきである。共鳴条件下でチップに入射される励起フォトン

は、入射側の薄い波形の金属酸化物表面上で結合する。変換器の形状に起因して、高屈折率

10

20

30

40

50

物質からなる波形薄膜層の中にエネルギーが局部的に閉じ込められる。その結果、強い電磁場がチップ表面に発生する。その効果はエバネッセント共鳴によるものであり、そして表面に近い発色団の蛍光強度を増加させることができる。利用可能な励起エネルギーを閉じ込めることにより、用いる光学検出システムの光学特性に応じて、有効な場の強度を100倍まで増加させることができる。

【0063】

共鳴状態では、透過ビームが相殺され（破壊的干渉）、反射ビームが建設的に干渉するように各ビームは干渉し、異常に高い反射を生じさせる。上述の波形の層構造体に対し適切なパラメータを選択することにより、励起エネルギーを高度に局在化させた状態に保持することができる。その構造体は、文献においてフォトリックバンドギャップ構造体として記載されているものであり、屈折率が周期的、空間的に変化する物質を用いており、特定波長域では特定の方向には電磁放射が伝搬することができない。フォトリックバンドギャップ構造体は、高度に局在化されたモードの出現を可能とする。例えば、C. アドラー、E. R. パイクおよびS. サーカー著、「一つのフォトン状態の局在化」、フィジカル・レビュー・レターズ、第79巻、第9号、第1585頁～第1587頁（1997年）の論文を参照されたい。その構造体は、モード局在化に対応して非常に大きな伝搬ロスを与える。本開示のバイオセンサまたは変換器（ここでは、両方の用語は互換的に使用できる。）は、例えばガラスまたはポリマーから組み立てられた光学的に受動的なプラットフォームと異なり、光学的に能動的であると考えることができる。ここで、光学的に能動的であるとは、エネルギーの閉じ込めにより、励起ビームの電磁場を増大させることを意味する。

10

20

【0064】

バイオセンサの基体は、ガラス、 SiO_2 、石英、シリコン等の無機物質、異なる有機および無機成分から形成する、あるいは複合物質の層として形成することができる。あるいは、基体をポリマー等の有機物質、好ましくは、ポリカーボネート（PC）、ポリ（メチルメタクリレート）（PMMA）、ポリイミド（PI）、ポリスチレン（PS）、ポリエチレン（PE）、ポリエチレンテレフタレート（PET）またはポリウレタン（PU）から形成することができる。基体物質として、ポリカーボネートまたはシクロ・オレフィンポリマー、例えば“Zeonor”（登録商標）も含むことができる。

【0065】

このような有機物質は、ポイント・オブ・ケア（POC）および個人用の医療用途に特に好ましいものであり、なぜなら、ガラスはそのような環境では許容されないからである。プラスチック基体は、ガラスよりもはるかに容易に構造を付与できる（例えば、エンボス化）。

30

【0066】

非金属の光学的に透明な層を無機物質から形成することができる。あるいは、該層は有機材料から形成することもできる。一例として、光学的に透明な層は、 Ta_2O_5 、 TiO_2 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 ZnO 、 HfO_2 等の金属酸化物である。

【0067】

あるいは、非金属の光学的に透明な層を、ポリアミド、ポリイミド、ポリプロピレン（PP）、PS、PMMA、ポリアクリル酸、ポリアクリルエーテル、ポリチオエーテル、ポリ（フェニレンスルフィド）およびそれらの誘導体（例えば、S. S. ハードデッカーら著、ジャーナル・オブ・ポリマー・サイエンス（B：ポリマー・フィジックス）、第31巻、第1951頁～第1963頁、1993年を参照）等の有機物質から作製することもできる。

40

【0068】

周期的格子または溝の深さは、3 nmから光学的に透明な層の厚さまで、好ましくは10 nmから光学的に透明な層の厚さまで、例えば、30 nmから光学的に透明な層の厚さまでである。光学的に透明な層の厚さの範囲は、30から1000 nm、例えば50から300 nm、好ましくは50～200 nmであり、波形構造体の周期は200から100

50

0 nmの範囲、例えば、200から500 nm、好ましくは250～500 nmであり、溝深さの光学的に透明な層に対する比率は0.02から1、例えば0.25から1、好ましくは0.3から0.7であり、溝幅の溝周期に対する比率（デューティ・サイクル（duty-cycle））は、0.2から0.8、例えば0.4から0.6である。

【0069】

溝には、断面が矩形形状のものを通常用いてもよい。あるいは、溝には、断面が正弦波状のものまたは断面鋸歯状のものを用いてもよい。表面構造は、一般的に対称としてもよい。好ましい形状として、断面が、矩形形状、正弦波状および台形状を挙げることができる。あるいは、溝には、断面鋸歯状（ブレード格子（blazed grating））または他の非対称の形状のものを用いてもよい。別の観点として、溝の深さは変化してもよく、例えば周期的に変化してもよい。

10

【0070】

支持体またはプラットフォームは、正方形形状または矩形形状でもよく、溝は表面を覆うようにプラットフォームに沿って直線的に延在してもよい。あるいは、プラットフォームは、円盤状でもよく、溝は円状または直線状でもよい。

【0071】

溝（または隆起部分）を基体の表面に形成させてもよい。あるいは、光学的に透明な層の表面に溝を形成させてもよい。さらに別の形として、界面である基体の表面と光学的に透明な層の表面の両方に溝を形成させてもよい。格子構造は、1次元形状および2次元形状に変化させることもでき、それには、発行されたPCT出願WO2002/017024に開示されているような、2段状の2次元格子が含まれ、出典明示によりその内容は本明細書の一部となる。

20

【0072】

単一の検知領域の波形表面を、特定の一つの励起波長および特定の一つのタイプの偏向のために最適化させてもよい。適切な手段を用いることにより、例えば、互いに平行なまたは垂直な複数の周期的構造体を重ね合わせることで、周期的な表面レリーフが得られ、それはプラットフォームの多波長使用に適したものである（「多色」用途）。あるいは、一つのプラットフォームの個々の検知領域を、異なる波長および/または偏向配向のために最適化させてもよい。

【0073】

波形（格子）表面の構造を開発することができ、その性能を、コンピュータとソフトウェアプログラム G Solver（グレーティング・ソルバー・ディベラップメント・カンパニー、アレン、テキサス、www.gsolver.com）を用いてシミュレートすることができる。種々の幾何学的大きさおよびパラメータ、間隔、ウェル深さ、材料、および材料に関連する屈折率データを用いて、コンピュータおよびシミュレーションの実行を行うことにより設計について検討を行うことが可能であり、透過率と θ の関係を示す曲線および波長と反射との関係を示す曲線を予想することができる。そのシミュレーションは、サンプルが乾燥し、かつサンプルが水または公知の屈折率を有する他の流体媒体に懸濁している場合に実行できる。そのシミュレーションにより、設計者は、ER検出および標識不使用検出の両方の要求を満たすように、種々の設計パラメータ（厚さ、移行部（transitions）、周期等）を最適化（即ち変化させる。）することができる。

30

40

【0074】

本発明の較正および正規化の方法は、標識不使用（BIND）およびERの両方の測定値を最適化できる方法で作製されたバイオセンサを用いて実施することができる。そのバイオセンサは、水平面における1次元格子構造、2次元格子構造、または2段の2次元格子構造を保持できる。そのバイオセンサについての複数の可能なおよび限定されない例が、図4A～4B、図4A～5Bおよび図6A～6Cに関連して記載される。

【0075】

図4Aおよび4Bは、BINDおよびERバイオセンサを組み合わせた態様の2次元の“ホール”の一つの特別の例を示している。単一の装置を用いたER検出および標識不使

50

用 (B I N D) 検出の両方に対して最適化できるように、バイオセンサは 2 次元で作製されている。図 4 A および 4 B は、それぞれ、格子構造の周期的ホール 2 1 0 で特徴付けられた 2 次元格子構造を有する単位セルの、斜視図と断面図を示している。格子構造は、水モードの B I N D (標識不使用) 検出および空気モードの E R 検出を最適化する。装置は、厚さ 7 8 n m で上方の T i O ₂ 層 1 0 4 と、基材となる支持体シートに適用された図示された格子パターンを有する紫外線硬化物質からなる下方の支持体層 1 0 2 を有している。

【 0 0 7 6 】

図 4 A および図 4 B に示す 2 次元単位セルは、図示しているように X 軸に垂直な入射偏光は B I N D 信号を発生させ、Y 軸に垂直な入射偏光は E R 測定を可能とするように、設計されている。この方法を用いることにより、B I N D および E R の共鳴波長 (特定の入射角における、好ましくは垂直に近い入射角における) を別々に選択することができ、それにより、B I N D および E R の共鳴波長をそれぞれ異なる値とすることができる。本態様に記載された結合された B I N D / E R 構造体は、近赤外線領域 (~ 8 0 0 - 9 0 0 n m) における B I N D 共鳴を提供する一方、C y 5 蛍光物質の励起のための 6 3 2 . 5 n m での E R 共鳴を提供可能とするように最適化される。この例では、B I N D 測定時はセンサ上が水環境であり、E R 測定時はセンサ上が空気環境であることを前提としている。E R および B I N D に異なる波長を用いるためには、矩形 " ホール " (2 1 0) を有する単位セルを選択することを必要とする。そのため、単位セルは X 方向と Y 方向で大きさが異なってもよい。例えば、B I N D 波長のためには X 方向の周期が 5 5 0 n m であり、低い E R 共鳴波長のためには Y 方向では 4 3 2 n m である。作製方法は、高屈折率の誘電層の厚さが X 方向および Y 方向で同じであることを要求する。作製方法を簡単にするためには、均一な格子深さを有する構造がよい。構造の基本的な機能は変化しないが、この作製方法によれば、結果として、ホールの角が丸くなる。図 4 および 4 B に図示したような構造の作製および試験にコンピュータを用いる場合、設計者が、許容可能な結果が達成できる範囲内で、単位セル、格子深さおよび被膜層の固有の大きさを変化させ、 θ の関数として場強度、ピーク波長、反射率および他の試験についてシミュレーションを行い、および他の大きさを選択することは、当業者には理解できるであろう。そのため、図 4 A および 4 B の例は、態様を例示的に説明するためのものであって、発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 7 7 】

ポストを特徴とする繰り返し単位セルを用いた 2 次元格子構造について図 5 A から 5 B を参照して説明する。図 5 A および 5 B は、センサ表面に形成された周期的なポスト群 2 2 0 を特徴とする 2 次元格子構造の単位セルの斜視図と断面図をそれぞれ示す。各単位セルは一つのポスト 2 2 0 を有する。ポスト群 2 2 0 は、基材シート (不図示) に適用された支持体物質 1 0 2 (例えば、紫外線硬化ポリマー) の中に立設された突出物である。複数の図に示すように、その突出物および支持体に対して、高屈折率を有する被膜 (例えば、T i O ₂) が適用されている。該構造体は、X 方向偏光を用いて水環境で行う B I N D (標識不使用) 検出と、Y 方向偏光を用いて空気環境で行う E R 検出に対して最適化されている。

【 0 0 7 8 】

図 5 A および 5 B の構造は、精密結合波解析 (Rigorous Coupled Wave Analysis) (R C W A) コンピュータシミュレーションにより研究されたものである。図 4 A および 4 B に示した前の構造単位セルは、z 方向のより高い平面で規定される領域により包囲された " ホール " 領域を含むものであるが、図 5 A および 5 B の格子構造は、z 方向のより低い平面で規定される領域により包囲された中心にある " ポスト " 領域を含むものである。前のように、図 5 A および 5 B の構造は、B I N D / E R 結合構造を示すものであり、該構造は近赤外波長領域 (約 8 0 0 - 9 0 0 n m) での B I N D 共鳴を発生させる一方、C y 5 蛍光物質の励起のために 6 3 2 n m での E R を発生させるように最適化されたものである。この例では、また、その構造が、B I N D 測定時にはセンサ上が水環境であり、E R

測定時にはセンサ上が空気環境であることを前提としている。ERおよびBINDに対して異なる波長を用いる必要があるため、矩形の”ポスト”単位セルを選択することが必要となる。そのため、単位セルは、X方向とY方向で異なる大きさを有する。例えば、BIND波長に対してはX方向の周期は530nmであり、低いER共鳴波長に必要とされるY方向では414nmである。作製方法は、また、高屈折率の誘電層の厚さがX方向およびY方向で同じであることを要求する。作製方法を簡単にするためには、均一な格子深さを有する構造がよい。構造の基本的な機能は変化しないが、この作製方法によれば結果として、ホールが角が丸くなる。図5Aおよび5Bの例は、態様を例示的に説明するためのものであって、発明の範囲を限定するものではない。もちろん、固有の大きさは変化させることができる。

10

【0079】

図6Aから6Cは、ER検出および標識不使用検出の結合のために作製および設計されたバイオセンサ格子構造の単位セル500のさらに別の態様を示す3つの斜視図である。この構造体の特徴のいくつかを理解するために、エバネッセント共鳴(ER)センサおよび標識不使用(BIND)センサに関係するデザイン上の特徴を概括することは役立つであろう。それらのセンサは、3つの基本的なデザイン上の特徴、すなわち、共鳴波長、共鳴幅および格子の深さが異なる。

【0080】

共鳴波長

ERセンサでは、励起波長のわずかな範囲内(約±2nm)で共鳴が起こることが好ましい。励起光が一般にレーザーから発生し、非常に狭いバンド幅を有しているので、この要求は、ER共鳴の波長の選定に対して高い制限(specificity)を置くものである。BINDモードの操作にはこのような制限はなく、別の波長での共鳴を用いることによる利点がある。例えば、環境照明の波長範囲外の波長を用いたり、あるいはER励起源からBINDモードの操作信号を分光的に分離することにより、考えられる重複検出の問題をなくすることができる。

20

【0081】

共鳴幅

ERセンサは、生物学的被膜厚さや照明開口数等の変数が存在しても、励起波長と重複する十分な共鳴幅を持つ必要がある。実際、ER共鳴では、約5nm未満の半値幅(FWHM)を持つべきではなく、より好ましくは10~15nmである。一方、BINDの感度は、概ね $1 / [(FWHM)^{1/2}]$ に比例して増加するが、これはピーク位置の不確実性がピーク幅が狭くなるにつれて減少するからである。

30

【0082】

格子深さ

BINDセンサは、格子に付着する生物学的物質が増加するとともに、共鳴波長のシフトも大きくなる。深い格子は、結合する生物学的物質のためのより大きな表面積を提供する。ERの格子深さが大きくなると、ER効果は必ずしも向上せず、低下することがある。

【0083】

先に記載した2次元構造は、均一な格子深さを有している(例えば、ポストの例ではポスト群の高さが均一であり、あるいはホールの例ではホール群の深さが均一である。)。単一の格子深さを求めることは、ピーク幅と表面積の両方(すなわちBIND P W V シフト)において、BIND特性およびER特性を妥協させる必要がある可能性がある。

40

【0084】

図6A~6Cのバイオセンサの構造は、2段状の2次元構造である。その構造の詳細については、以下に詳細に説明する。この構造は、狭いTM BIND共鳴および高いBINDシフト特性を保持しながら、広いTE ER共鳴を同時に発生させることができる。前述の2次元構造と同様に、BINDおよびER格子は、異なる周期を有しており、それにより、別々に決定された共鳴波長を有している。

50

【0085】

図6A～6Cに示したこの”2段状の””comBIND”の構造は、多数の繰り返し単位セル群500からなり、それぞれのセルは、Y方向に延在し比較的深いBIND格子504の上に、X方向に延在し比較的浅いER格子502を重ねたものである。図6Aから6Cは、この構造の一つの”単位セル”を示し、XY平面で複製されると、完全な格子を形成する。

【0086】

単位セル500は、マスターの格子ウェハを用いて、PETフィルム等の基材となる支持体シート（不図示）に適用された紫外線硬化ポリマー層524からなる。該ポリマー層524は、BIND格子構造504を有しており、該構造は低い領域と高い領域が交互にY方向に延在している。X方向では、格子は交互する低い領域と高い領域を有しており、紫外線硬化ポリマー層524からなる低い領域に対する高い領域の相対的な高さは、X方向の方がY方向よりも非常に小さい。

【0087】

TiO₂（あるいはSiO₂またはTa₂O₅）層522を、紫外線硬化ポリマー層の上に堆積させる。図示した態様では、この層は均一な厚さを有している。層522は、上方の繰り返し面506、508、510および512と、下方の繰り返し面514、516、518および519を含んでいる。下方の面514、516、518および519は、紫外線硬化ポリマー層の上面の上に配置されている。空気または水のサンプル媒体520は、TiO₂またはSiO₂層522の上方の面506、508、510、512に接するように置かれている。

【0088】

図6Aから6Cを見ることにより理解されるように、”2層・2次元”格子構造は、Y方向の比較的深いBIND格子504を含んでおり、上方の格子および下方の格子、それぞれ506/508および510/512を特徴とする。単位セルのBINDの外観によれば、より多くのサンプル物質を添加することを可能とするとともに、格子により多くの物質が付着することを可能することにより、大きな共鳴シフトを可能する。BIND（Y方向）の深い格子は、結合する生物学的物質のためにより大きな表面積を提供する。

【0089】

X方向に延在するER格子502は、逆に、高い領域506および低い領域508（および高い領域510および低い領域512も）を有する比較的浅い格子パターンからなる。良好なBIND検出能力に加え、最適な幅を持つ広いTE-ER共鳴を提供できることも同時に期待されている。

【0090】

レーザー（ER）と白色光光源（BIND）に対し異なる励起角度を用いることで、別々に動作させることもできる。レーザービームまたは白色光光源を、プラットホームに対する角度θで入射するように向けることができる。角度θは、

$$\sin \theta = n - \lambda / \Lambda, \text{ で定義することができ、}$$

ここで、Λは回折溝の周期、λは入射光の波長およびnは光学的に透明な層の有効屈折率である。国際公開WO 01/0289を参照されたい。

【0091】

図6A～図6Cの構造の明らかな利点は、ER構造体とBIND構造体を別々に動作させることができることである。ここで、ER検出またはBIND検出のいずれかについて最適化された構造体の大きさだけが、図6Aから図6CのERセンサおよびBINDセンサの結合のために使用されるべきである。図6Aから図6Cの単位セルを有する構造体の固有の大きさはもちろん変化させることができるが、一つの代表的な態様として、BIND格子504は周期が約260～約1500nmであり、格子深さ（面506と面510との間の距離）が100nm～約3000nmである。ER格子502の場合、周期は約200nm～約1000nm、深さ（面506と面508との間、および面510と面515との間のZ方向距離）は10nm～約300nmである。

【0092】

図6Aから図6Cの構造体は、精密結合波解析(Rigorous Coupled Wave Analysis)(RCWA)を用いてコンピュータでシミュレートされ、X方向にER格子構造を付加したものと付加しないものの両方について、シミュレートした反射スペクトルが得られた。その解析結果は、発行されたPCT出願WO2007/019024に開示されているので、ここでは簡潔のために説明しない。

【0093】

これまでER技術は、格子に対し平行に偏向された入射光により誘起される共鳴モード、ここではTEモードまたはTE偏向として定義される、を用いている。標識不使用検出技術は、一般的に、格子に対し垂直に偏向された入射光により誘起される共鳴モード、ここではTMモードまたはTM偏向として定義される、を用いている。このモードは、サンプルが液体媒体に懸濁している場合には、最も狭い共鳴を生成させる。2次元格子では、この差異は明確ではなくなるため、単一のピークが両方に対して用いることができる。また、理論的には、TMピークはERに使用でき、TEピークはBINDに使用できる。ERのTEモードおよびBINDのTMモードは、一つの可能な態様であり、どんな形にも限定するものではない。上記の組合せ/構成は、説明した利点を有するものであり、他の構成も本発明の範囲に含まれる。

10

【0094】

標識不使用モードの検出時には、生物学的分子は、例えば、 TiO_2 被膜に付着し、その被膜の光学的厚さを実質的に増加させる。その結果、共鳴のピーク波長値(PWV)がシフトする。固定された物質の量に対する大きなPWVシフトは、高い検出感度を示すものである。コンピュータシミュレーションで格子構造を比較する場合、生物学的物質の添加のシミュレーションは、仮定の生物学的層を付加するよりも、例えば TiO_2 層の厚さを増加させることでモデル化することができる。この方法は、他の格子構造についての検討でもその有効性が実証されている。

20

【0095】

光学的に透明な層(バイオセンサ支持体)の表面は、1以上の捕捉要素を保持可能な、1以上の波形検知領域を含んでも良い。

【0096】

本発明の方法で使用する支持体は、基体層の反対側の周期的な格子の表面に設けた被覆層をさらに含むことができる。被覆層が存在する場合、1以上の特定の捕捉要素が、2次元格子の反対側の被覆層の表面に固定されている。被覆層は、2次元格子を構成する物質よりも低い屈折率を有する物質からなることが好ましく、それによりER特性を最小限にまで低減できる。被覆層には、例えば、ガラス(スピンオンガラス(SOG)を含む)、エポキシまたはプラスチックを用いることができる。

30

【0097】

例えば、バイオセンサの屈折率の要求を満たす種々のポリマーを、被覆層として用いることができる。SOGは、その好ましい屈折率、取り扱い易さ、および豊富なガラスの表面活性化技術を用いて特定の捕捉要素で容易に活性化できるため、使用することができる。バイオセンサ表面の平坦性が特定のシステム構成の問題とならない場合、SiN/ガラスの格子構造を検出面として直接用いることができ、ガラス表面に対すると同様の手段を用いて活性化を行うことができる。

40

【0098】

2次元格子の上に平坦化用被覆層がなくても、共鳴反射も得ることができる。よって、支持体は、構造化された高屈折率物質の薄膜で被覆された基体のみを含むことができる。平坦化用被覆層を使用しなくても、環境媒体(空気または水等)が格子を満たす。そのため、上面だけでなく、特定の捕捉要素に曝露される、バイオセンサの1次元または2次元格子のすべての面に捕捉要素が固定される。

【0099】

各プローブ/捕捉要素(プローブと捕捉要素という用語は、ここでは互換的に用いてい

50

る。)は、親和性反応が可能な個々の捕捉分子および/またはその混合物を含むことができる。個々の捕捉要素の形状には、矩形状、円形状、楕円状またはいずれかの他の形状が含まれる。個々の捕捉要素の面積は、 $1\mu\text{m}^2 \sim 10\text{mm}^2$ 、例えば $20\mu\text{m}^2 \sim 1\text{mm}^2$ 、好ましくは $100\mu\text{m}^2 \sim 1\text{mm}^2$ である。捕捉要素を、規則的な2次元配列に配置することができる。

【0100】

捕捉要素の中心と中心(c t c)の距離は、 $1\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ 、例えば $5\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ 、好ましくは $10\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ である。

【0101】

検知面積当たりの捕捉要素の数は、 $1 \sim 1,000,000$ 、好ましくは $1 \sim 100,000$ である。別の観点として、プラットフォームに固定される捕捉要素の数は限定されず、例えば、遺伝子、DNA配列、DNAモチーフ、DNAマイクロサテライト、一塩基多型(SNPs)、種のゲノムまたは重要な器官を構成するタンパク質断片または細胞断片、またはそれらの選択物または組合せの数に対応するものである。さらなる観点として、本発明のプラットフォームは、2以上の種、例えばマウスとラットのゲノムを含むこともできる。

10

【0102】

1以上の特定の結合する物質/プローブ/捕捉要素は、2次元格子の上にまたは存在する場合には被覆層の上に、例えば、物理吸着または化学結合により固定される。特定の結合する物質としては、例えば、核酸、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体(scFv)、F(ab)断片、F(ab')₂断片、Fv断片、小さな有機分子、細胞、ウイルス、バクテリア、または生物学的サンプルを挙げることができる。生物学的サンプルは、例えば、血液、血漿、血清、胃腸分泌液、組織または腫瘍のホモジュネート、滑液、便、唾液、痰、シスト液(cyst fluid)、羊膜液、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙、または前立腺液を挙げることができる。

20

【0103】

1以上の特定の捕捉要素は、バイオセンサまたは変換器の上に識別可能な位置を有するマイクロアレイの中に配置されている。特定の捕捉要素のマイクロアレイは、本発明のバイオセンサの表面上の1以上の特定の捕捉要素からなるものであり、該表面は多くの識別可能な位置を有し、各位置は異なる特定の捕捉要素または異なる量の特定の捕捉要素を有している。

30

【0104】

例えば、アレイは $1, 10, 100, 1,000, 10,000, 100,000, 1,000,000$ 、または $1,000,000$ の識別可能な位置を有している。そのようなバイオセンサの表面はマイクロアレイと呼ばれるが、これは、1以上の特定の捕捉要素が、X-Y座標における規則的な格子パターンとして通常展開されているからである。しかしながら、本発明の方法で用いるマイクロアレイは、規則的なパターンまたは不規則なパターンで展開された1以上の特定の結合性物質を含むものである。例えば、識別可能な位置は、1以上の特定の捕捉要素のスポットのマイクロアレイとして規定することができる。マイクロアレイのスポットは、その直径が約 $20 \sim 500\mu\text{m}$ とすることができる。マイクロアレイのスポットは、その直径を約 $50 \sim 200\mu\text{m}$ とすることもできる。1以上の特定の捕捉要素をそれらの特定の結合パートナーと結合させることができる。

40

【0105】

本発明で用いる支持体上のマイクロアレイは、特定の捕捉要素の1以上の微小滴を、例えば、2次元格子上または被覆層表面上のx-y格子位置の上に置くことにより作製することができる。1以上の結合パートナーを含む試験サンプルに対してバイオセンサを曝すと、結合パートナーは、該結合パートナーに対して高い親和性を有する特定の捕捉要素を有するマイクロアレイの特定の位置に選択的に引き寄せられる。特定位置のいくつかは、その表面に結合パートナーを引き寄せるが、他の位置は結合パートナーを引き寄せない。

【0106】

50

特定の捕捉要素は、本発明の方法に用いる支持体の表面に添加される結合パートナーのみと結合する。特定の捕捉要素は、その結合パートナーとは結合するが、バイオセンサの表面に添加された別の結合パートナーとは実質的に結合しない。例えば、特定の捕捉要素が抗体でその結合パートナーが特定の抗原である場合、抗体はその特定の抗原のみと結合し、他の抗原とは実質的に結合しない。結合パートナーとしては、例えば、核酸、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体 (s c F v)、F (a b) 断片、F (a b') 2 断片、F v 断片、小さな有機分子、細胞、ウィルス、バクテリア、および生物学的サンプルを挙げることができる。生物学的サンプルとしては、例えば、血液、血漿、血清、胃腸分泌液、組織または腫瘍のホモジュネート、滑液、便、唾液、痰、シスト液 (cyst fluid)、羊膜液、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙、または前立腺液を挙げることができる。

10

【0107】

本発明の方法で用いるマイクロアレイの一例は、核酸マイクロアレイであり、アレイ内の各特定位置は異なる核酸分子を保有している。この態様では、核酸マイクロアレイ内のスポットが、試験サンプル中の核酸の対抗鎖を有する相補的な化学的結合を検出する。

【0108】

支持体 / プラットホームは、光学的に透明な層の表面に配置された接着促進層を含むことが可能であり、それにより捕捉分子を固定化する。該接着促進層は、アッセイおよび検出の性能をさらに向上させる多孔性層 (セラミックス、ガラス、S i) またはゲル層を含むことも可能であり、そのいずれかを捕捉要素の固定およびサンプルの分析を行うための媒体として用いることができ、それによりアッセイおよび検出の性能をさらに向上させあるいはゲル電気泳動検出における分析物の混合物の分離が可能となる。プラットホームには、それぞれが自身の屈折用溝を有する、多数の検出領域または検出場所を設けることができる。

20

【0109】

換言すると、支持体 / バイオセンサ上への 1 以上の捕捉要素 / プローブの固定化は、特定の捕捉要素が濯ぎ処理により洗い流されないように、および試験サンプル中の結合パートナーとの結合がバイオセンサ表面により邪魔されないように行われる。種々の種類のマイクロアレイおよびバイオセンサに用いるため、例えばガラスに対して特定の捕捉要素を共有結合させるために、複数の異なるタイプの表面化学的実験が実行された。これらと同じ方法を、本発明のバイオセンサに対しても容易に適用することができる。バイオセンサの表面調製により 1 以上の捕捉要素と結合させるための適切な官能基を保有させることは、バイオセンサの作製プロセスに不可欠な部分である。

30

【0110】

そこで、物理吸着 (すなわち、化学的結合剤を使用しない。)、化学結合 (すなわち、化学的結合を使用する。)、または静電的 / クーロン力の相互作用を用いて 1 以上の特定の捕捉要素をバイオセンサに付着させることができる。化学結合は、特定の捕捉要素のバイオセンサ表面に対する強い付着力を発生させるとともに、表面に結合した分子に対し特定の配向および配置を与えることができる。例えば、化学結合のいくつかの種類には、例えば、アミン活性化、アルデヒド活性化、およびニッケル活性化が含まれる。これらの表面を用いて、複数の異なる種類の化学結合剤をバイオセンサの表面に付着させることができる。アミン表面は、複数の種類の結合剤を付着させるのに用いることができるが、アルデヒド表面は、別の結合剤を用いることなく、タンパク質を直接結合させることができる。ニッケル表面は、組み込まれたヒスチジン (his) 標識 (tag) を有する分子を結合させるのに用いることができる。ニッケル活性化表面による “his で標識された” 分子の検出は、公知である (ホワイトサイド著、アナリティカル・ケミストリー、第 68 巻、第 490 頁 (1996 年))。

40

【0111】

特定の捕捉要素のプラスチック、エポキシ、または高屈折率物質への固定化は、ガラスに対する固定化について記載されている不可欠なやり方により行うことができる。しか

50

し、酸洗浄工程は、その処理が特定の捕捉要素が固定されている物質に損傷を与える場合には、除くことができる。

【0112】

結合パートナーの濃度が約 0.1 ng/ml 未満の場合の結合パートナー（標識不使用モードにおける分析物）の検出には、バイオセンサに結合している結合パートナーをバイオセンサ表面の追加層の中に増幅または変換することができる。バイオセンサに沈着した増加質量は、光路長が増加するので容易に検出することができる。バイオセンサ表面により大きい質量を付与することにより、表面上の結合パートナーの光学密度も増加し、それにより、追加質量がない場合に比べて共鳴波長が大きくシフトする。質量の追加は、例えば、酵素的に“サンドイッチ”アッセイにより、または、種々の大きな組成を有して適切に共役したビーズまたはポリマーの形でバイオセンサの表面に質量を直接付加することにより行うことができる。この原則は、他の種類の光学的バイオセンサにも利用され、質量増幅なしの場合の感度限界の1500倍以上の感度向上が得られることが実証された。例えば、ジェニソンら著、「光学的に被覆されたシリコン上の核酸ターゲットの干渉に基づく検出」、ネイチャー・バイオテクノロジー、第19巻、第62頁～第65頁（2001年）を参照されたい。

10

【0113】

一例として、 NH_2 活性化バイオセンサの表面は、該表面に固定された一本鎖DNA捕捉プローブを含む特定の捕捉要素を保有することができる。該捕捉プローブは、その相補的なターゲット結合パートナーと選択的に相互作用する。一方、該結合パートナーは、“検出”分子と結合する配列または標識を含むように設計することができる。該検出分子は、例えば、ホースラディッシュ・パーオキシダーゼ（HRP）に対する結合剤を保有することができ、適切な酵素に曝された場合には、検出分子が存在する場合のみ、バイオセンサ上に追加物質を選択的に沈着させる。その操作により、例えば、300 の検出可能生体物質を数分以内でバイオセンサに付与することができる。

20

【0114】

検出感度を向上させるために、“サンドイッチ”方式を用いることもできる。この方式は、低分子量の分子の存在を増幅するために分子量の大きな分子を用いることができる。例えば、分子量が例えば約 0.1 kDa ～約 20 kDa の結合パートナーを、例えば、スクシンイミジル-6-[α -メチル- α -(2-ピリジル-ジチオ)トルアミド]ヘキサノエート（SMP T）、またはジメチルピメリミデート（DMP）、ヒスチジン、またはビオチン分子でタグすることができる。標識がビオチンの場合、ビオチン分子は、分子量が 60 kDa のストレプタビジン（streptavidin）と強く結合する。ビオチン/ストレプタビジンの相互作用は非常に特異的であり、ストレプタビジンは小さな結合パートナーのみの場合の60倍に信号を増幅する。

30

【0115】

化学的に誘導された小さな粒子を用いることにより、検出感度をさらに向上させることができる。直径が約 $3 \sim 300 \text{ nm}$ である、コロイド状の金からなる“ナノ粒子”、種々のプラスチック、またはガラスを、結合パートナーと選択的に共有結合できる分子種で被覆することができる。例えば、ストレプタビジンとの共有結合で被覆されたナノ粒子は、バイオセンサ表面のビオチンでタグした結合パートナーの視覚化を促進するために用いることができる。ストレプタビジン自身の分子量は 60 kDa であるが、誘導されたビードは、例えば 60 kDa を含むいずれかの大きさの分子量も有する。大きなビードの結合は、バイオセンサ表面の光学密度の大きな変化、および観測の容易な信号をもたらす。この方法は、感度解像度を約1000倍向上させることができる。

40

【0116】

本開示のプラットホームに用いることができるバイオセンサのプラットホームの一つの特徴は、光学的に透明な層に入射する光エネルギーが、波形プラットホームの特性により、層の外に速やかに回折される。したがって、導波は起こらず、あるいは無視できる程度である。一般に、伝搬距離は $100 \mu\text{m}$ 以下であり、好ましくは $10 \mu\text{m}$ 以下である。こ

50

れは、非常に驚くべきほど短い距離である。伝搬距離は、放射エネルギーが $1/e$ に減る距離である。

【0117】

共鳴条件を作るための適切な角度は、プラットホームへの入射光の全反射の角度により規定される。好ましい角度は、45度未満、例えば、30度以下、例えば、20度～10度以下、例えば、0.1度～9.9度である。角度は垂直入射に等しいかまたは概ね等しくてもよい。

【0118】

光発生手段は、コヒーレントレーザー光を放射するレーザーを含むことができる。他の適当な光源には、放射スペクトル線が十分なコヒーレント光を有する、HgまたはXe等の放電ランプまたは低圧ランプ、および発光ダイオード(LED)が含まれる。

装置は、プラットホームに角度 θ で入射させるようにレーザービームを指向させる光学部品、およびコヒーレントビームの偏向面を決定する部品であり、例えば、偏光を直線的に伝送するように取り付けられた部品も含むことができる。角度 θ は、式 $\sin \theta = n - \lambda / \Lambda$ 、で定義され、ここで、 Λ は回折溝の周期、 λ は入射光の波長、 n は光学的に透明な層の有効屈折率である。

【0119】

使用できるレーザーの例として、ガスレーザー、固体レーザー、色素レーザー、半導体レーザーを挙げることができる。必要であれば、非線形光学部品を用いて放射波長を2倍にすることができる。特に適したレーザーとしては、放射波長が275～753nmである、アルゴンイオンレーザー、クリプトンイオンレーザー、アルゴン/クリプトンイオンレーザー、およびヘリウム/ネオンレーザーを挙げることができる。特に適したものは、大きさが小さく低エネルギー消費である半導体物質を用いたダイオードレーザーまたは周波数二倍化ダイオードレーザーである。

【0120】

別の適当な励起方法は、VCSEL(垂直型空洞表面放出レーザー)であり、プラットホーム上の認識要素を個別に励起することができる。

【0121】

一つの態様として、本発明の方法で用いる支持体は、すべての偏光角を有する光を含む白色光で照射される。バイオセンサ格子の繰り返し特性に対する偏光角の配向が共鳴波長を決定する。例えば、線と間隔の繰り返しセットからなる“直線格子”のバイオセンサ構造体は、別々の共鳴反射を発生させることのできる2種の光学的偏光を有する。線に対して垂直に偏向されている光は、“s偏光”と呼ばれ、線に対して平行に偏向されている光は“p偏光”と呼ばれる。入射光のsおよびp成分はフィルターを透過していない照射ビーム中に同時に存在し、それぞれが別々の共鳴信号を発生させる。支持構造体は、一つの偏光(s偏光)のみの特性を最適化するように通常設計することが可能であり、最適化されていない偏光は偏向フィルターにより容易に除去される。

【0122】

偏光依存性を除いて、すべての偏光角が同じ共鳴反射スペクトルを与えるようにするため、同心リングのセットからなる別の構造体を用いることができる。この構造体では、各同心リングの内径と外径の差が格子周期の約半分に等しい。それぞれの連続するリングは、その内径が前のリングの内径よりも約一つ分の格子周期だけ大きい。同心リングのパターンは、マイクロアレイスポットまたはマイクロタイタプレートウェル等の単一のセンサ位置を覆うように延在する。独立したマイクロアレイスポットまたはマイクロタイタプレートウェルは、それぞれ、その中に中心がある別々の同心リングパターンを有している。その構造体のすべての偏光方向は、同じ断面構造を有している。その同心リング構造体は、偏光依存性を保持するために、その中心に正確に照射する必要がある。同心リング構造体の格子周期は、共鳴反射光の波長未満である。格子周期は約0.01～約1 μ mである。格子の深さは約0.01～約1 μ mである。

【0123】

別の態様として、格子の特定の位置に照射ビームを集中させることなく、ホールまたはポストのアレイを、上述の同心円構造体に密接させて配置する。同じ角度で3方向から表面に入射する3つのレーザービームの光学的干渉により、そのアレイパターンが自動的に形成される。このパターンでは、ホール（またはポスト）は、密充填六角形のアレイの角に集中している。ホールまたはポストは、各六角形の中心にも存在している。ホールまたはポストのその六角格子は、同じ断面構造を“認識する”3つの偏光方向を有している。そのため、六角形の格子構造は、どの偏光角の光を用いても、等価な共鳴反射スペクトルを与える。したがって、不要な反射信号成分を除去するためには、偏光フィルターは不要である。ホールまたはポストの周期は、約 $0.01\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $1\text{ }\mu\text{m}$ であり、深さまたは高さは約 $0.01\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $1\text{ }\mu\text{m}$ である。

10

【0124】

検出システム（一例として以下の図7を参照）を、蛍光等のルミネセンスを検出できるように配置することができる。分析物分子を捕捉分子に結合させる時に、フェルスター（Foerster）蛍光エネルギー移動（FRET）が起きるように、親和性パートナーを標識することができる。ルミネセンス強度の最大値を、層システムの屈折率値および対応するフレネル係数に応じて、最も高い異常な反射位置に対して僅かにシフトさせることができる。

【0125】

サンプルは、希釈しないで、または溶媒を添加して用いることができる。適切な溶媒として、水、水性バッファー溶液、タンパク質溶液、天然あるいは人工のオリゴマーまたはポリマー溶液、および有機溶媒を挙げることができる。適切な有機溶媒には、アルコール、ケトン、エステル、脂肪族炭化水素、アルデヒド、アセトニトリルまたはニトリルが含まれる。

20

【0126】

可溶化剤または添加剤を含むこともでき、それには、ジエチルピロカーボネート、フェノール、ホルムアルデヒド、SSC（クエン酸ナトリウム / 塩化ナトリウム）、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、バッファー試薬、酵素、逆転写酵素、リボヌクレアーゼ、有機または無機のポリマー等の有機または無機の化合物あるいは生化学試薬を挙げることができる。

【0127】

サンプルは、用いる溶媒に溶解しない成分、例えば、顔料粒子、分散剤および天然または合成のオリゴマーまたはポリマーを含むこともできる。

30

【0128】

ルミネセンス標識剤は、センサ表面と相互作用する、捕捉要素、分析物中の分析される分子、または内在性 / 外来性の対象、スパーサー分子、プライマー、生体物質等の他のいずれかの種類を修飾するのに用いることができる。

【0129】

マーカーとして使用できるルミネセンス色素を、分析物中に存在するおよび / またはプラットフォームに付着した、1または多数の親和性結合パートナー（またはそれらの誘導体）に、化学的にあるいは物理的に、例えば静電的に結合させることができる。合成オリゴマーおよび合成ポリマーだけでなく、DNA、RNA、糖類、タンパク質、またはペプチド等の天然由来のオリゴマーまたはポリマーが親和性反応に含まれる場合には、インターカレート色素も適している。ピオチン / アビジン結合等の生物学的相互作用またはヒス - 標識結合等の金属錯体形成により、分析物溶液に存在する親和性パートナーに発光団を付着させることができる。

40

【0130】

1または多数の親和性結合パートナーの存在を定量的に決定するために、1または多数のルミネセンスマーカーを、分析物溶液に存在する親和性パートナー、プラットフォームに固定された捕捉要素、または分析物溶液に存在する親和性パートナーおよびプラットフォームに固定された捕捉要素の両方に付着させることができる。

50

【0131】

フェルスターエネルギー移動または光誘起電子移動と適合させるために、ルミネセンスマーカーの分光学的特性を選択することができる。アクセプターおよびドナーのルミネセンスの距離および濃度依存性を、分析物分子の定量に用いることができる。

【0132】

親和性結合パートナーの定量は、親和性反応に含まれる分子に結合したドナーおよびアクセプターの間の分子間および/または分子内の相互作用に基づいて行うことができる。親和性結合パートナーに共有結合したルミネセンス・ドナーおよびルミネセンス・アクセプターの分子内集合体、親和性反応においてドナーとアクセプターの間の距離を変化させる分子ビーコン (S. ティアギラ著、ネイチャー・バイオテクノロジー) を、捕捉分子または分析物溶液に添加する添加剤として用いることもできる。また、pH および電位に反応する発光団または酵素活性に反応する発光団を用いることができ、例えば、酵素が媒介する蛍光性誘導体形成を行うことができる。

10

【0133】

トランスフルオロスフィア (transfluorosphere) またはその誘導体を蛍光標識に用いることができ、および化学ルミネセンス分子またはエレクトロルミネセンス分子をマーカーとして用いることができる。

【0134】

400 nm ~ 1200 nm の範囲にルミネセンスを有するルミネセンス化合物は、1 以上の親和性パートナーに付着させるために官能基付与がされまたは修飾されたもので、以下の物質の誘導体を挙げることができる。

20

ポリフェニルおよびヘテロ芳香族化合物、

スチルベン、

クマリン、

キサンテン色素、

メチン色素、

オキサジン色素、

ローダミン、

フルオレセイン、

クマリン、スチルベン、

30

ピレン、ペリレン、

シアニン、オキサシアニン、フタロシアニン、ポルフィリン、ナフトロシアニン、アゾベンゼン誘導体、ジスチリルビフェニル、

遷移金属錯体、例えば、ポリピリジル/ルテニウム錯体、トリス (2, 2' ビピリジル)

ルテニウムクロライド、トリス (1, 10 - フェナントロリン) ルテニウムクロライド、

トリス (4, 7 ジフェニル - 1, 10 - フェナントロリン) ルテニウムクロライドおよび

ポリピリジル/フェナジン/ルテニウム錯体、例えば、オクタエチル - 白金 - ポルフィリン、

ユーロピウム錯体およびテルビウム錯体はルミネセンスマーカーとして用いることができ

40

、

ナノ粒子、マイクロ粒子、

エバネッセント場により励起可能な他のいずれかの発光物質。

【0135】

血液または血清の分析には、吸収波長および発光波長が 400 nm ~ 1000 nm の範囲にある色素が適している。さらに、2 光子励起および 3 光子励起に適した発光団を用いることができる。

【0136】

本発明に適した色素は、共有結合のための官能基を保有することができ、例えば、フルオレセインのイソチオシアネートまたは NH₂ エステル等のフルオレセイン誘導体を挙げることができる。また、アマシャムライフサイエンス社 (テキサス州) およびモレキュラ

50

ープローブ社から商業的に入手可能な機能性蛍光色素も適している。他の適した色素として、RNA鎖またはDNA鎖に酵素的に組み込まれるデオキシヌクレオトリホスフェート(dNTP)で修飾した色素も含まれる。

【0137】

さらに、適した色素には、クオンタム・ドット・パーティクルズ(Quantum Dot Particles)またはビーズ(Beads)(インビトロジェン・コーポレーション、カルスバッド、カルフォルニア)またはそれらの誘導体または遷移金属錯体誘導体が含まれ、それらは、一つおよび同じ特定の波長で励起され、誘導体は異なる波長のルミネセンス発光を示す。

【0138】

分析物は、結合したルミネセンスマーカーにより直接的に検出してもよく、あるいは添加されたルミネセンス標識種との競合により、または、1および/または多数の分析物種および/または捕捉要素に結合し、マーカーとして使用されるルミネセンス・ドナーおよびルミネセンス/電子アクセプターの間の、濃度、距離、pH、電位または酸化還元電位に依存する相互作用により、間接的に検出してもよい。ドナーのルミネセンスおよび/または消光剤(quenchers)のルミネセンスを測定して分析物を定量することができる。

【0139】

同様にして、分析物分子が捕捉分子に結合した際に電子移動または光誘起電子移動が蛍光を消光させるように、親和性パートナーを標識することができる。

【0140】

ルミネセンスに適した検出器には、CCDカメラ、光電子増倍管、アバランシャフォトダイオード、フォトダイオード、ハイブリッド光電子増倍管、またはそれらのアレイが含まれる。例えば、米国特許出願公報2003/0027327、2002/0127565、2003/0059855および2003/0032039、または米国特許第7,023,544号に記載されているように、検出は標識剤なしでも行うことができ、これらの内容は出典明示により本明細書の一部になる。検出手段を、さらに屈折率変化を検出するように配置することもできる。一つの共通のプラットフォーム上の検知領域またはすべての領域に照射するように入射ビームを調整することが可能である。あるいは、検知領域の分析すべき微小サブ領域だけを照射するようにビームを調整することができ、およびプラットフォームの検知領域をスキャンするために、ビームおよび/またはプラットフォームを、相対的に移動させることが可能なように調整することができる。

【0141】

プラットフォーム上に沈着させる捕捉要素または認識要素としては、多種多様なものが存在する。一般的に、用いる捕捉分子は、親和性反応が可能である必要がある。本発明のプラットフォームとともに使用できる認識分子または捕捉分子には以下のものが挙げられる。

ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド(およびそれらの化学的誘導体)、

DNA(二本鎖または一本鎖) a)線状(およびそれらの化学的誘導体)

b)円状(例えば、プラスミド、コスミド、BAC、AC)

全RNA、メッセンジャーRNA、cRNA、ミトコンドリアRNA、人工RNA、アプタマーPNA(ペプチド核酸)

ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、組み換え抗体、改変抗体(engineered antibodies)、抗原、ハプテン、抗体FABサブユニット(必要により変性させた)

タンパク質、変性タンパク質、酵素、酵素共同因子または酵素インヒビター、タンパク質錯体、レクチン、ヒシチジン標識タンパク質、ヒスチジン標識化合物用キレート(HIS標識)、標識化タンパク質、人工抗体、分子インプリント、プラスチックボディ(plastibodies)、

膜レセプター、全細胞、細胞断片および細胞サブストラクチャー、シナプス、

作用薬/拮抗薬、細胞、細胞オルガネラ、例えばミクロソーム、ベンゾジアゼピン(benzodiazapines)等の小さな分子、プロスタグランジン、

10

20

30

40

50

抗体、薬物、代謝産物、薬物代謝産物、
天然物、
炭水化物およびその誘導体、
天然および人工リガンド、
ステロイド、ホルモン、
ペプチド、

天然ポリマーまたは人工ポリマー
分子プローブ、

天然レセプターおよび人工レセプターおよびそれらの化学的誘導体、
キレート剤、クラウンエーテル、リガンド、超分子集合体、
指示薬（pH、電位、膜電位、酸化還元電位）、
組織サンプル（組織マイクロアレイ）。

10

【0142】

捕捉分子の活性および密度は、公知の多くの方法を用いて最適化することができる。

【0143】

周期的構造体は、表面にナノ粒子を付着させることにより作製することもでき、該ナノ粒子は、同程度の大きさを有し、および光学的な結合／共鳴が可能な周期的構造体として作用する。

【0144】

格子に基づくバイオセンサからB I N DデータおよびE Rデータを取得するための複数の検出システム300については、公開されたP C T出願 W O 2007/019024に記載されている。それらの一つを図7に示す。図7のシステム300は、一つの画像読取りシステムである。バイオセンサ100は、標識不使用検出のための、シャープな共鳴ピークを有する光学スペクトル、および蛍光信号を顕著に増大させるための、バイオセンサのエバネッセント領域における高い電磁場の両方を示すように設計されている。該読取りシステムは、これらバイオセンサの特性を利用して、これらの効果の両方を読み出す。この読取りシステムは、バイオセンサからの一方または両方の信号を測定する能力を有する。

20

【0145】

E R + B I N Dのバイオセンサ100は、ここでは“c o m B I N Dセンサ”と呼ぶものであり、センサの底面から光学的に応答指令信号を受ける。バイオセンサ100の上面については、バイオセンサを水または別の液体に浸漬することができ、あるいは空気に曝すこともできる。バイオセンサが検出するように設計されているいずれかの分子または細胞の結合相互作用は、バイオセンサ100の上面で起きる。バイオセンサ100は、液体保有容器を有する大きな分析装置の一部でもよく、該容器の例として、例えば、8列のウェル、それぞれが12ウェルを有する行からなるマイクロウェルプレートを挙げることができる。バイオセンサは、マイクロアレイスライドの構成要素であってもよい（図8参照）。図7の図面には、単一のウェル（検出領域）302の断面が示されており、何十、何百、何千の検出領域が存在することが理解されるであろう。

30

【0146】

画像読取りおよび画像検出システム300は、E R光源340としてレーザー（例えばH e N eレーザー）、ハロゲン白色光源またはL E D 352を含むより広いスペクトルを有するB I N D光源350、およびE R画像および標識不使用画像の両方を連続画像として捕捉するための共通の検出器として働くC C Dカメラシステム338を有している。システム300は、光源340および352からの入射光372を結合しおよびバイオセンサに向けるように働く二色性ミラー364および330を有する光学ビーム結合サブシステムを有している。二色性ミラー330は、検出のために信号光を集め、それをレンズ336へ送り、該信号光は該レンズにおいて、C C Dカメラ338により画像化される。

40

【0147】

光線370は、バイオセンサ100の下方に存在し、照射光372および反射光374

50

からなる。反射光 374 は、直接反射、およびバイオセンサ上に蛍光物質が存在する場合には蛍光発光を含む。

【0148】

レンズシステム 336 を通して CCD カメラ 338 により検出された信号は、電子工学的にあるいはコンピュータ・アルゴリズムにより処理され、B I N D (標識不使用) データ 380 または E R データ 382 になる。そのデータは保存され、表示され、および図 7 に示す計測のためのコンピュータまたはワークステーション等の分析機器 (不図示 ; しかしデータ 382 および 380 へのアクセスを有する) により読取りシステム 300 を用いて分析することができる。さらに、B I N D データ 380 と E R データ 382 とを組み合わせることにより、ユーザーは、新規なバイオセンサ 100 に独特な、結合相互作用または細胞相互作用についての情報を取得することができる。

10

【0149】

図示された構成において、光学部品 340 , 350 および 330 は入射放射線の単一ビーム 372 を生成させるように設計され、およびバイオセンサ 100 の表面のすべてのウェル 302 または結合サイトからのデータを連続して取得できるように、バイオセンサを X 方向および Y 方向に移動させる。バイオセンサ 100 を、当業者によく知られた X - Y 移動ステージ (不図示) の上に置くことにより、その動きを発生させてもよい。特定のウェルまたは結合サイト 302 が、ビーム 372 に対して合致する位置にある場合、一つの態様として、光源 340 および 350 を連続して動作させ (またはバイオセンサへの直接放射を選択的に行う。) 、第 1 および第 2 の画像 (一方が E R 画像で他方が B I N D 画像である) を CCD カメラ 338 により撮影する。CCD 画像の連続収集は、ビーム選択機構 360 (例えばシャッター) を用いて促進することができ、該機構は光源 340 または光源 350 のいずれかからの光を、二色性ミラー 330 へ選択的に通過させ、バイオセンサへと反射させる。ビーム選択は、電子工学的に行うことができ、例えば、光源 340 および 350 のオンオフ時間を電子工学的に制御する。あるいは、両方の光源を同時に動作させ、および両方のビームが通過するように選択機構 360 を動作させて入射ビーム 372 が両光源からの光を含むようにすることもできる。この場合、CCD カメラ 338 は、E R 情報および B I N D 情報の両方を含む単一の画像を撮影する。次いで、CCD カメラ 338 からの撮影された画像に対し画像処理技術を適用して、複合画像から B I N D 成分と E R 成分を抽出する。検出システムにより測定されたピーク共鳴波長シフトは、図 9 B に示すような標識不使用画像を得るために、ピクセルバイピクセル (pixel by pixel) 基準および該シフトの強度に基づいて、色彩または相対輝度のいずれか、あるいは両方に変換される。

20

30

【0150】

E R 光源 340 には、レーザー、例えば、ヘリウム - ネオン (H e N e) レーザーを用いてもよい。レーザービーム 341 は、ビームエキスパンダー等のビーム調整装置 342 をさらに通過する。ビームエキスパンダー 343 は、小さな直径のレーザービームを大きな直径のレーザービームへと拡大させる。出力ビーム 343 は平行にされ、直線的に偏向される。バイオセンサは、特定の偏向において、入射光に対して E R 効果を発生させる。直線的に偏向させた出力レーザービームを作製できるように設計されたレーザーを用いて偏向させてもよい。

40

【0151】

B I N D (標識不使用) 用光源 350 は、ハロゲン光源または L E D 光源 352 および波長調整機構 356 を有するモノクロメータ 354 を具備していてもよい。光源 352 から発光される光線 353 はもともと広帯域であるが、モノクロメータ 354 の出口の光線 355 は単色性である。

【0152】

モノクロメータ 354 からの出力光線 355 は、ビーム調整装置 358、例えばコリメーターにより調整される。ミラー 365 は、調整装置 358 から出力される光線 349 を二色性ミラー 364 へと向ける。光源 340 および 350 からの結合した光は、366 で

50

示され、該光はビームの分離／結合アセンブリー 330 へ送られ、該アセンブリーは該光をバイオセンサ 100 の底面に送る。

【0153】

BIND 用光源 350 には、波長可変レーザーを用いてもよい。その場合には、ビーム調整装置 358 は、ビームエキスパンダーである。波長可変レーザーまたはフラッシュランプを、BIND 測定および ER 測定の両方の単一の照射源として使用できることに留意されたい。

【0154】

また、偏光は BIND 信号の検出を促進するので、光源 352 内に偏光器を設けて光 363 を直線的に偏向させてもよい。あるいは、光指向化要素 (light-directing element) 365 に、ランダム偏光 359 を直線偏光 363 に変換する偏向ビームスプリッターを用いてもよい。

10

【0155】

レーザーにより励起された蛍光信号を検出するため、ビームの分離／結合アセンブリー 330 は、光学フィルター 332 および 334 のセットを組み込んでいる。フィルター 332 は二色性フィルターであり、該フィルターはサンプルからの蛍光を透過させる一方、レーザー光を反射する。フィルター 332 は、BIND 波長域、好ましい一例として 830 nm ~ 900 nm において、ビーム・スプリッターとしても機能する。フィルター 334 は、2つの波長域内、すなわちレーザーにより励起された蛍光波長域および BIND 波長域内の光のみを透過させる。画像レンズ 336 は、バイオセンサ表面の蛍光を収集し、CCD カメラ 338 の焦点面上に該蛍光の焦点を合わせる。

20

【0156】

図 7 の構成は、ER 検出のため、入射光 372 に対してバイオセンサを回転させる回転装置も含んでいる。一の可能な態様として、回転装置 331 をビームの分離／結合アセンブリー 330 に取付け、矢印で示すように回転させる（それにより、入射光を角度約 θ だけ回転させる）。別の態様として、回転装置 331 を除き、その代わりに回転可能装置 333 を XY 移動ステージに取付け、該回転可能装置により、図 26 の装置 333 の左に矢印で示したように、XY 移動ステージを（固定された）入射ビームに対して回転させる。

【0157】

所望の特性を得るために、追加のレンズ、ミラーおよび光学フィルターを読取りシステムに組み込むことができる。BIND 検出と ER 検出との間の好ましくないクロストームを除去するために、適切に設計された光学フィルターを用いることができる。また、電子工学的または機械的なシャッター 360 であるビーム選択機構を、2 チャンネルの光照射および検出を正確に同期させるために用いることができ、それにより、すべてのクロストークを除去するために、一つの光源のみがバイオセンサに所定時間照射される。

30

【0158】

図 7 に記載したバイオセンサ読取りシステムの大きな利点は、同じバイオセンサ位置で、BIND データと ER データの両方を同時に（または高速連続で）収集できることである。高解像度の画像化方法は、細胞に基づくアッセイまたはマイクロアレイ等の高含有量のバイオアッセイ (high content bioassays) には有用である。

40

【0159】

積分一点検出器を CCD カメラ 338 の代わりに用いることができる。その場合、システムは、入射放射線 372 の位置の上のセンサの動きと検出器出力とを同期させて画像を作製する。

【0160】

バイオセンサから ER データを取得するための CCD カメラの使用についてのさらなる詳細については、技術文献、例えば、ディーター・ノイシェファーおよびウォルフガング・ブタッハら著、バイオセンサおよびバイオエレクトロニクス、第 18 巻 (2003 年)、第 489 頁 ~ 第 497 頁に記載されており、この内容は出典明示に本明細書の一部となる。

50

【 0 1 6 1 】

バイオセンサの較正および正規化の方法についての以下の記載および実施例は、本開示の例示に過ぎないものであり、本開示を限定するものではない。

【 実施例 】

【 0 1 6 2 】

E R スライド ("ノバチップ (NovaChip) ") の詳細については、例えば、D . ノイシェファーら著、バイオセンサおよびバイオエレクトロニクス、第 1 8 巻、第 4 8 9 頁 ~ 第 4 9 7 頁 (2 0 0 3 年) 、または W . ブダッハら著、アナリティカル・ケミストリー、第 7 5 巻、第 2 5 7 1 頁 ~ 第 2 5 7 7 頁 (2 0 0 3 年) に記載されている。その方法は、異常反射に起因する現象を利用するものであり、S . S . ワンおよび R . マグヌソン著、アブライド・オブティックス、第 3 2 巻 (第 1 4 号) 、第 2 6 0 6 頁 ~ 第 2 6 1 3 頁 (1 9 9 3 年) 、または O . パリオーら著、ピュア・アンド・アブライド・オブティックス、第 5 巻、第 4 5 3 頁 ~ 第 4 6 9 頁 (1 9 9 6 年) を参照されたい。共鳴条件でチップ上に入射する励起光子は、入射サイトの薄い波形の金属酸化物表面へ一体化する。変換器の形状により、エネルギーは、高屈折率物質からなる波形薄膜の中に局在的に閉じ込められる。その結果、強い電磁場がチップの表面に発生する。その効果はエバネッセント共鳴によるものであり、表面に近い発色団の蛍光強度を増大させる。利用可能な励起エネルギーを閉じ込めることにより、用いる光学検出システムの光学特性に応じて、1 0 0 倍まで有効場強度を増大させることができる。実施例に記載された実験に用いたノヴァチップは、波長 6 3 3 n m の垂直 T E 偏光に対して 2 度の共鳴角を有する。ティーキャン (Tecan) ・マ
10
20
マイクロアレイ・レーザースキャナーを用いた蛍光の信号 / ノイズ比は、同じ条件で処理されたガラススライドと比較し、約 1 0 ~ 2 0 倍増加することが認められた。

【 0 1 6 3 】

図 8 は、図 7 の C C D カメラにより撮影されたバイオセンサの写真であり、該バイオセンサは、多数の捕捉要素位置を有するマイクロアレイ形状である図 1 1 の格子構造を有し、該位置は図 3 に示すように、密集して領域群の各群を構成している。

【 0 1 6 4 】

図 9 A ~ 9 C は、図 8 のバイオセンサのスポットまたは捕捉要素の領域の異なる 3 つの画像を示すものであり、個々の捕捉要素位置は、図 9 A 、 9 B および 9 C の円で視覚化されている。
30

【 0 1 6 5 】

図 9 A は、図 8 の領域群の一つの " 塩画像 " であり、捕捉要素 (例えば、オリゴヌクレオチド) および印刷バッファーからなることが期待されている印刷されたスポットまたは位置を示す。画像の中のスポット位置の実際の形態は、様々であり、処理条件に依存する。画像は定性的な情報のみを提供し、例えば、スポットについて、捕捉物質がチップ表面に正確に印刷されていない / 沈着していない等である。この情報を、各捕捉要素に対する基本的な品質フラグとして用いることができる。

【 0 1 6 6 】

図 9 B は図 9 A の領域群の標識不使用画像であり、バイオセンサ表面から過剰物質を除去する洗浄工程後に撮影したものである。個々の位置の強度は、マイクロアレイの各位置に固定された / 沈着されたオリゴヌクレオチドの固定物質量に対応する。強度測定値 (" B I N D " データ) は、図 3 または図 7 のいずれかのシステムか、あるいは P C T 出願 W O 2 0 0 7 / 0 1 9 0 2 4 に開示されているように分光計を用いた異なるシステムを用いて取得する。
40

【 0 1 6 7 】

図 9 C は、図 7 のシステムを用いて E R モードで撮影した画像であり、領域の強度は、ハイブリダイズしたサンプル中の特定の m R N A の量に対応することを示す。

【 0 1 6 8 】

マイクロアレイの作製

マイクロアレイ (図 8 に示したものの一つ) を洗浄し、例えば、W . ブダッハら著、ア
50

ンリティカル・ケミストリー、第75巻、第2571頁～第2577頁(2003年)に記載されているように作製し、A R O S・ヒューマン・v3・オリゴヌクレオチド、70量体、オペロン社からのセットを、23、相対湿度55～60%でマイクログリッド・プリンターを用いてアレイ化した(約37k 機能(features)/1 反復試験片(replicates)、プリント・バッファ-4 x S S C / 0.001%サルコシル)。スライドは使用するまで密封して保存した。

【0169】

バッファ-

洗浄バッファ-: 50 mM NaCl、20 mM リン酸ナトリウムバッファ- pH 6.5、1 mM EDTA、0.1% (重量/体積) SDS。

ハイブリダイゼーション・バッファ-: エキスプレス・Hyb・バッファ- (BD # 8015-1) / ホルムアミド (Fluka # 47671) 70 / 30 (体積: 体積)、100 µg / ml サケ精子。

【0170】

マイクロアレイの品質管理

1. 散乱画像 (scatter images)、"塩" 画像、定性化 (qualification)

続いて、光源に633 nmのレーザー(赤)を用いてティーキャンレーザーキャナー(ゲイン120)によりマイクロアレイをスキャンした。散乱した光の画像、すなわち、スポットバッファ-からの塩の大部分で構成されるスポットの物理的なプロフィールによって直接散乱されたレーザー光の画像である、を集めるために検出ユニットの光学フィルターを除去した。そのため、これらの画像は"塩" 画像とも呼ばれる。図9Aは、この用途例に用いたマイクロアレイのクローズアップである。この画像の分析により、不明なスポット、粒子または人工物の確認ができるので、この画像により、マイクロアレイの品質の大まかな最初の評価を行うことができる。

【0171】

2. 標識不使用モード、定量化

次いで、マイクロアレイを洗浄して、未結合のオリゴヌクレオチドおよびスポットバッファ-塩を除去した。結合したオリゴヌクレオチドは、表面の反応性基に付着した状態である。洗浄工程は、攪拌機含有容器中でウォッシュ・バッファ- (Wash Buffer) を用いて20秒間、次いで脱イオン水で3倍に希釈したウォッシュ・バッファ-を含む第2の容器中で20秒間洗浄した。次いで、窒素流中でスライドを乾燥した。

【0172】

洗浄後、残留するオリゴヌクレオチド物質の16 Bit・TIF 標識不使用画像を、SRUBioシステム社のBIND・TM・スキャナーを用いて撮影した。標識不使用スキャンは、TM共鳴のスペクトルシフトを15 µm / ピクセルの解像度で撮影する。図9Bは、図9Aの"塩" 画像に対応する標識不使用画像の領域を示している。

【0173】

標識不使用スキャナーの操作原理

標識不使用スキャナーは、光源と、平行な白色光をセンサの表面に向ける光学部品とを含む。撮像分光器は、センサからの反射光を受光し、画像を生成させるが、該画像は、一つの軸が空間的な線走査を表し、第2の軸が線走査における各ピクセルにおける反射スペクトルを知らせるものである。ソフトウェアは、反射スペクトルの中に、ピーク波長値(PWV)と呼ばれる、TM共鳴のスペクトル位置を決める。線走査は、スライドを徐々に横切ってPWV画像を組み立てる。オリゴヌクレオチドのスポットに対応するピクセルは、結合物質がない領域よりもより高いPWVを有している。標識不使用信号は、スポットに対応するピクセルと周囲(バックグラウンド)のピクセルとの間のPWVの差(シフト)からなる。あるいはまたはこの分析に加えて、スポットティングの前にベースラインPWVスキャンを行い、スポット後の画像からそのベースラインPWV値を差し引くことができる。PWVのシフトは、図9Bに示すような画像を得るために、色彩または強度に変換される。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 4 】

サンプル / R N A プロセッシング

市販のヒューマン・レファレンス (human reference) R N A (ストラタジーン (Strat agene)) を、アムピオン標識キット (# 1 7 5 3) のプロトコルと物質を用いて標識した。この実験は、標識した R N A を 1 0 0 n g 用いた。

【 0 1 7 5 】

マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションおよびルミネセンス / 蛍光画像のスキニング

ティーキャン社のティーキャン・H S 4 8 0 0・ハイブリダイゼーションステーションが、マイクロアレイの前洗浄、ハイブリダイゼーション、および後洗浄を行った。前洗浄は、ウォッシュ・バッファーを用いる室温 / 7 5 / 5 0 (各 2 0 秒) の洗浄およびそれに続くハイブリダイゼーション・バッファーを用いる 5 0 での 1 0 秒洗浄を 3 回繰り返した。次いで、ハイブリダイゼーション・バッファー中に 1 0 0 n g 濃度の標識された R N A を含むサンプル 1 0 0 μ L を、5 0 のフローチャンバに注入し、1 分攪拌した。7 5 で 1 0 分保持した後、攪拌状態で、温度 4 2 で 1 6 時間保持した。後洗浄は、4 2 でのウォッシュ・バッファーを用いる洗浄および追加の 2 3 での洗浄 (各 2 0 秒) を 4 回繰り返した。最後に、スライドを希釈したウォッシュ・バッファーで室温で 3 回洗浄し、窒素流中で乾燥させ、ティーキャン蛍光レーザーキャナー (ゲイン 8 0 %) を用いて直ぐにスキャンした。画像は 1 6 B i t T I F ファイルで保存した。図 9 C は、蛍光モード画像の参照領域を示すもので、前に説明した " 塩 " (図 9 A) および標識不使用 (図 9 B) の画像に対応する。

10

20

【 0 1 7 6 】

画像プロセッシングおよび品質管理

スポットまたは捕捉要素の領域は、図 9 A、9 B および 9 C に示すように、解析ソフトウェア (アレイプロ (ArrayPro)) により、図を用いて境界が描かれている。

【 0 1 7 7 】

図 9 A は散乱モードであり、" 塩画像 " が、洗浄後にオリゴヌクレオチド捕捉要素が得られることが期待される印刷スポットを画像化している。実際のスポット形態は、処理条件によって変化する。この画像は、個々の捕捉要素の存在および品質に関する定性的な情報のみを提供する。この情報は、大きな印刷エラーのフラッグとして用いることができる。

30

【 0 1 7 8 】

図 9 B では、標識不使用モード画像は、スポット領域から過剰の (未結合の) 物質を除去する洗浄工程の後に得られる。個々の捕捉領域の標識不使用信号の強度は、固定された物質 (オリゴヌクレオチド) の量に対応する。そのため、この信号は、次のハイブリダイゼーション工程において結合可能なプローブ物質の量についての定量的な値を提供する。

【 0 1 7 9 】

図 9 C は E R / 蛍光モード画像であり、各捕捉領域 (スポット) の信号強度は、該領域のプローブ物質に結合した、標識された m R N A の量に対応する。

【 0 1 8 0 】

標識不使用モードおよびルミネセンス / 蛍光モードで得られた画像は、アレイプロ (メディアサイベルネティックス社、米国) を用いて解析した。1 0 行 (R) × 1 0 列 (C) のサブセクションを、本サンプル (比較および較正が可能ないように全画像について同じセクション) について用いた。以下の 3 つの表 1 a、1 b および 1 c は、図 9 A、9 B および 9 C の画像に描かれた 1 0 × 1 0 のスポットアレイの行 1 からのデータを定量化している。表では、各スポットの内側の平均値 (" 生 " 信号) から各スポットを囲むその場所の " バックグラウンド " リングを差し引いて、" 実質 " 強度を得ている。

40

【 0 1 8 1 】

【表 1】

表 1a.

散乱モードにおける最初の10個のスポット／遺伝子データ

行	列	バックグラウンド	生強度	実質強度
1	1	174	881	707
1	2	113	1384	1271
1	3	116	1247	1131
1	4	110	701	591
1	5	107	2997	2889
1	6	132	2264	2132
1	7	110	1478	1368
1	8	112	1191	1079
1	9	113	1743	1630
1	10	108	2001	1893

10

【0182】

表 1 a は、散乱または " 塩 " 画像の最初の 10 個のスポット／遺伝子 (R = 1、C = 1 ~ 10) の強度を解析して得られたデータを定量化している。強度の閾値の定義 (または、一般的な、より洗練された規則、アルゴリズム) により、不正確に沈着したスポットの確認が可能となる。表 2 も参照すると、そこでは、散乱モードの強度の閾値が、不明と認められるこれらのスポット／捕捉要素のフラッグに使用されている。この手順は自動化が可能であり、マイクロアレイの製造バッチの品質の最初の評価が可能となる。

20

【0183】

表 1 b は、最初の 10 個のスポット／遺伝子 (R = 1、C = 1 ~ 10) の標識不使用モードで得られたデータを示している。また、閾値を定義することにより (または、一般的な、より洗練された規則、アルゴリズムにより)、不正確に沈着したスポットの確認が可能となる。また、標識不使用の実質強度は、沈着した物質の校正を可能とする。

30

【0184】

【表 2】

表 1b.

最初の10個のスポット／遺伝子 (R=1、C=1~10) の標識不使用モードのデータ

行	列	バックグラウンド	生強度	実質強度
1	1	13565	17680	4116
1	2	14393	18111	3718
1	3	14673	17789	3116
1	4	13268	18966	5698
1	5	13919	14164	245
1	6	13740	19423	5683
1	7	14093	21452	7359
1	8	14243	18267	4025
1	9	14094	17194	3100
1	10	14804	18883	4078

40

【0185】

例えば、最初のオリゴヌクレオチド I (行 = 1、列 = 1)、オリゴヌクレオチド (1、1) は、4116 カウントの実質信号を有する。オリゴヌクレオチド (1、7) は、7359 カウントの強度を有し、それはより多くの物質が固定されていることを示している。これらの値は、各スポットにおける相対プローブ密度を与えるものであり、次の蛍光モー

50

ド信号を正規化するための基礎を提供するものである。オリゴヌクレオチド(1,5)は、245カウントという非常に低い実質信号を示しているが、それは不明スポットとして解釈することができ、すなわち、その位置は信頼性のあるデータを提供できるだけの十分な量のプローブ物質を保有していない。

【0186】

この手順の自動化により、各捕捉要素の中に固定された印刷遺伝子密度の定量化だけでなく、マイクロアレイの印刷バッチの品質についての迅速および詳細な評価を提供できる。

【0187】

表1cは、オリゴヌクレオチドの同じセットについての対応する蛍光データを示している。その蛍光信号は、ハイブリダイゼーションの間の遺伝子結合事象の周波数に応答する。印刷されたプローブ遺伝子の密度と、プローブと分析物の間の共通遺伝子の周波数の両方が、遺伝子結合の周波数を決定し、それにより両方の要因が蛍光信号に影響を与える。例えば、低い蛍光信号は、不明スポットまたは標的サンプルの無視できる程度の遺伝子発現によるものである。

10

【0188】

【表3】

表1c.

オリゴヌクレオチドの同じセットについての対応するルミネセンス／蛍光データ

行	列	バックグラウンド	生強度	実質強度
1	1	46	637	592
1	2	45	56	10
1	3	46	51	5
1	4	45	51	7
1	5	45	46	1
1	6	45	50	5
1	7	44	54	10
1	8	46	50	3
1	9	46	50	5
1	10	47	63	16

20

30

【0189】

表2は、3つのデータセットをすべて組み合わせている。

【0190】

【表 4】

表 2.
各オリゴヌクレオチドの校正のために組み合わされたデータセット

すべてのデータ (任意単位)		散乱		標識不使用モード		ルミネセンスモード		
行	列	実質強度	QC閾値到達?	実質強度	QC閾値到達?	未校正の実質強度	校正後の実質強度	沈着
1	1	707	1	4116	1	592	719	OK
1	2	1271	1	3718	1	10	14	OK
1	3	1131	1	3116	1	5	8	OK
1	4	591	1	5698	1	7	6	OK
1	5	2889	1	245	0	1	不明	不明
1	6	2132	1	5683	1	5	5	OK
1	7	1368	1	7359	1	10	7	OK
1	8	1079	1	4025	1	3	4	OK
1	9	1630	1	3100	1	5	8	OK
1	10	1893	1	4078	1	16	20	OK
2	1	1761	1	5136	1	6	6	OK
2	2	1171	1	4205	1	8	10	OK
2	3	747	1	5646	1	149	132	OK
2	4	1427	1	3868	1	6	8	OK
2	5	851	1	3565	1	4	6	OK
2	6	746	1	2761	1	3	6	OK
2	7	806	1	4916	1	525	534	OK
2	8	936	1	3580	1	119	167	OK
2	9	862	1	2578	1	1	2	OK
2	10	1289	1	3531	1	8	12	OK
3	1	31	0	86	0	2	不明	不明
3	2	875	1	4612	1	18	19	OK
3	3	1491	1	3866	1	3	4	OK

上記の表の散乱の実質強度の列の非常に弱いフラグまたは不明スポットに閾値を適用する。標識不使用スキンの実質強度は、各位置における固定された捕捉要素の量についての定量的な情報を与える。例えば、オリゴヌクレオチド(1, 5)および(1, 3)は非常に低い値を有する。また、閾値を定義することにより不明スポットのフラグ化ができる。さらに、標識不使用強度による蛍光信号の正規化は、固定された物質の量のバラツキを補正することができる。表2の第3セクションはこの正規化を達成している。

【0192】

以下の正規化式の適用により、蛍光(またルミネセンスとも呼ぶ。)信号(LNI_{校正後})を、標識不使用スキンにより決定されたプローブ物質の量に正規化する。

$$\text{式(1)} \quad \text{LNI}_{\text{校正後}} = \text{LNI}_{nc} * \text{スケーリング値} / \text{LFNI}$$

ここで、LNI_{nc}は、校正されていない蛍光信号を表し、LFNIは標識不使用の実質強度を表す。5000ctsのスケーリング値またはターゲット標識不使用値が、蛍光信号のカウント範囲を確保している。スポット印刷のバラツキの影響を減少させるまたは補正することにより、較正值が遺伝子発現レベルの評価におけるバラツキを減少させる。この実施例では示していないが、“塩”画像は、バッファー組成物のエラーまたは人工プロセスのいずれかを通して、バッファー溶液の成功した沈着を示すものであり、現実のプローブ物質の固定化を示すものではない。標識不使用の信号は、標識された分析物の結合事象の前(この実施例では)に、実際のプローブ固定化レベルを直ぐに知らせる。

【0193】

図10は、バイオセンサのプラットフォームの別の形状を示すもので、国際特許出願WO 01/02839に示したように円盤状、同心状等を含む。検知要素(図10A参照)は、種々の方法、例えば、矩形状、円状、六角同心状、楕円状、直線状または迷路状等に配置することができる。検知領域(図10B参照)は、矩形状、円形状または他のあらゆる形状をとることができる。溝は、等間隔の直線状または等間隔の円状のいずれかに配置することができる、あるいはそのような構造体の部分であってもよい。プラットフォーム(図10c~10Fを参照)は、矩形状または円盤形状のいずれか、あるいは他のあらゆる形状をとることができる。プラットフォームは、1つまたは多数の検知領域を含むことができ、各該検知領域は1つまたは多数の捕捉要素を含むことができ、および各該捕捉要素は1つまたは多数の標識されたまたは標識されていない捕捉分子を含むことができる。プラットフォームを、マイクロタイタータイプのプレート/装置(図10G参照)に取り付けることができ、それにより、各マイクロタイターのウェルで1つまたは多数のアッセイを行うことができる。このことは、各マイクロタイタープレートの大きさに関係なく、すべてのプレートタイプ: 96, 384, 1536またはそれより大きなウェル数、について実施が可能である。

【0194】

図11は、図8および図9に示したものと同様のERセンサの模式図である。

【0195】

図12は、ER/BIND複合センサの模式図である。

【0196】

図13Aおよび図13Bは、図12に示したER/BIND複合センサの単位セルの2つの図を示すものであり、高屈折率層の厚さが格子深さよりも大きい。

【0197】

図14Aおよび図14Bは、図12に示したER/BIND複合センサの単位セルの2つの図を示すものであり、格子深さが高屈折率層の厚さよりも大きい。

【0198】

上記の説明から、我々が、

周期的な格子構造および表面に多数のプローブ位置を有するバイオセンサ上に固定されたプローブまたはプローブアレイについての固定化の質および/または量の評価方法であ

10

20

30

40

50

って、プローブに分析物が結合するに先立って、固定化されたプローブの固定化の質および/または量を空間分解法により各プローブ位置において個別に評価する方法であり、

(1) 上記バイオセンサから2次元のデータおよび/または画像を、

(A) エバネッセント共鳴モードにおいて、プローブに結合させた結合ルミネセンス標識剤を励起させ、バイオセンサからの発光データを収集し、および

(B) 標識不使用モードで、バイオセンサ表面の2次元画像および、バイオセンサのプローブ位置の画像を含む2次元画像の部分群についてのピーク波長値(PWV)データを取得する工程(ここでピーク波長値はバイオセンサへの光の共鳴結合によりバイオセンサから反射された光のピーク波長を含む)と、および

(2) 該2次元のデータおよび/または画像から、バイオセンサ表面に固定されたプローブまたはプローブアレイについての固定化の質および/または量を特徴化する工程とを含む該評価方法、を開示したことが理解されるであろう。

【0199】

一つの態様として、バイオセンサが多数のサンプル領域を有し(図8、図9A~図9C)、各該サンプル領域はバイオセンサに結合する生物学的物質を含有する予定のものであって、

さらに上記アレイは周期的な格子構造からなる表面として形成され(図1から図6)、上記工程(1)が、

バイオセンサの2次元画像を取得する工程と(図8)、

バイオセンサのサンプル領域の画像を含む2次元画像の部分のピーク波長値(PWV)データを取得する工程(図9B)(ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくバイオセンサからの反射光のピーク波長を含む)と、および

該ピーク波長値データから、上記アレイのサンプル領域への生物学的物質の結合量についての定量的情報を取得する工程とからなる(例えば、BINDデータから得られる。表1Bおよび表2も参照)。

【0200】

プローブは、プリンター、piezoアレイプリンターまたはピンプリンターの使用を含む、あらゆる適切で知られた方法を用いて沈着させることができる。

【0201】

また、バイオセンサを液体保有容器、例えば、底なしマイクロウェルプレート、試験管、ペトリ皿、およびマイクロ流体チャンネル等の内面に取り付けることができる。

【0202】

別の態様として、周期的な格子構造および表面に多数のプローブ位置を有するバイオセンサ上に固定されたプローブまたはプローブアレイについての固定化の質および/または量の評価方法であって、プローブに分析物が結合するに先立って、固定化されたプローブの固定化の質および/または量を空間分解法により各プローブ位置において個別に評価する方法であり、

バイオセンサのプローブ位置のピーク波長値(PWV)データを測定する工程と、

空間分離法で、プローブ位置の2次元画像(PWV画像)を取得する工程と(図9B)、PWVデータから、バイオセンサに固定されたプローブの固定化の質および/または量についての定量的な情報を取得する工程(例えば、BINDデータから得られる。表1Bおよび表2も参照)を含む該評価方法である。

【0203】

上記方法において、該方法が、さらに、

1) 標識されたサンプルを多数のプローブ位置に適用する工程と、

2) 多数のプローブ位置についてエバネッセント共鳴(ER)の測定値を取得する工程と(図9C)、

3) 取得した定量的情報を用いてER測定値を正規化する工程を含む。

一態様として、ER測定値の正規化を正規化方程式(1)に基づき行う。

【0204】

10

20

30

40

50

一態様として、PWVデータおよび画像は、バイオセンサ表面に固定予定の物質の量および形態を示すものである。本発明の方法は、固定された物質へのサンプルのハイブリダイゼーションの後で得られたデータおよび画像を較正するために、PWVデータおよび画像を用いる工程をさらに含む。

【0205】

本開示の方法のいくつかの態様として、本発明の方法は、バイオセンサの製造プロセスの1以上の工程において、標識不使用のPWVのデータおよび画像(図9B)および/またはER測定値(図9C)を取得する工程をさらに含むものであり、以下の工程の1以上を含む。

バイオセンサ表面の洗浄、バイオセンサ表面の修飾、バイオセンサ表面への物質の固定化、バイオセンサの洗浄工程、バイオセンサの乾燥工程、およびバイオセンサ表面へのサンプルのハイブリダイゼーション工程。

【0206】

追加として、本発明の方法は、ハイブリダイゼーション前のPWVの画像/データに基づいて(図9B)ハイブリダイゼーション後に取得されたデータおよび画像を補正する工程(図9C)をさらに含み、それによりバイオセンサに固定された固定捕捉物質の量および形態の変化の較正/補正を行う。

【0207】

いくつかの態様において、バイオセンサは基体の形をとり(例えば、ポリエステルシートまたはマイラー(MYLAR)シート)、および該バイオセンサの表面が、該基体の屈折率 n_1 よりも大きい屈折率 n_2 を有する物質(例えば、 TiO_2)からなる高屈折率層で被覆され、該層の厚さが10~1000nmであり、周期性が100~1000nmの範囲であり、および該基体が、平面状、円筒状、円錐状、または楕円状の形状を有する。

【0208】

いくつかの態様において、塩画像(図9A)がさらに取得されおよび解析される。該塩画像は支持体に固定するプローブをスポットする方法により得られるものであり、該方法は、支持体に固定するプローブを含む塩含有溶液をスポットする工程を含み、必要に応じて、プローブを含む上記塩含有溶液を乾燥し、およびプローブが固定された位置の画像を取得するものであり、該画像はすべての洗浄工程の前に取得され、それにより特定の位置における塩の不存在が、特定位置に固定するプローブのスポッティングがその特定位置では行われなかったことを示す。

【0209】

バイオセンサ(図1~図7)の基体は、ガラス、石英、金属酸化物、誘電物質、無機または有機の高屈折率物質、シリコン、ポリマー、プラスチック、PET、PC、PU、COPs、低蛍光バックグラウンドプラスチック物質、接着剤層およびそれらの組み合わせからなる群から選択された物質から作製されている。

【0210】

バイオセンサは、光学的に透明な層を有することが好ましく、該層は、 Ta_2O_5 , TiO_2 , Nb_2O_5 , ZrO_2 , ZnO または HfO_2 である金属酸化物からなる群から選択された無機物質、あるいはポリアミド、ポリイミド、PP、PS、PMMA、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリチオエーテル、またはポリ(フェニレンスルフィド)およびそれらの誘導体からなる群から選択された有機物質を用いて形成されている。

光学的に透明な層は、周期的な表面格子物質層または格子上に沈着させた高屈折率の誘電物質のいずれかを挙げることができる。

【0211】

本開示の方法では、固定されたプローブまたはプローブアレイが、以下の少なくとも1種により標識されている。

スパーサー分子、エネルギードナー、エネルギーアクセプター、電子ドナー、電子アクセプター、発色団、発光団、蛍光物質、燐光標識剤、分光標識剤、生

10

20

30

40

50

物学的官能基、または化学修飾剤。

他の態様では、プローブアレイは標識されていない。

【0212】

該方法は、固定された物質をバイオセンサ上に置く工程をさらに含み、該固定された物質が、分子量1000ダルトン未満の分子、分子量が1000～10,000である分子、アミノ酸、核酸、脂質、炭水化物、核酸ポリマー、ウィルス粒子、ウィルス成分、細胞成分、およびウィルス成分または細胞成分の抽出物、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体(scfv)、F(ab)断片、F(ab')₂断片、Fv断片、小さな有機分子、細胞、ウィルス、バクテリア、ポリマー、ペプチド溶液、タンパク質溶液、化学化合物ライブラリー溶液、一本鎖DNA溶液、二本鎖DNA溶液、一本鎖DNA溶液および二本鎖DNA溶液の組み合わせ、RNA溶液、オリゴヌクレオチド誘導体および生物学的サンプルからなる群から選択される。

10

【0213】

いくつかの態様では、バイオセンサ上に沈積させたプローブアレイは標識されていない。この場合、エバネッセント共鳴(ER)のデータ/画像(図9C)はバイオセンサから得られ、センサから得られるBIND測定値または画像から得られる定量的な情報を用いて較正される。

【0214】

本開示の方法では、該方法は、バイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを取得する工程をさらに含み、固定化の質および/または量の特徴化をバイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを差し引いた後で行う。

20

【0215】

さらに別の観点として、表面に固定されたプローブのアレイを有するバイオセンサであって、周期的な格子構造を有するバイオセンサを用いて分析物を検出および/または定量する方法であって、上記分析物の存在および/または濃度を上記固定されたプローブに対して正規化するものであって、上記固定されたプローブの存在および/または濃度を、バイオセンサの表面に分析物が結合する前にアレイの位置で評価する。固定されたプローブの存在および/または濃度を、バイオセンサ表面の2次元画像、およびバイオセンサのプローブ位置の画像を含む2次元画像の部分についてのピーク波長値(PWV)のデータを用いて評価し、該ピーク波長値は、バイオセンサへの光の共鳴結合に基づくバイオセンサからの反射光のピーク波長からなる。

30

【0216】

該方法は、バイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを取得する工程をさらに含み、正規化を上記のバイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを差し引いた後で行う。

【0217】

該方法は、さらに以下の工程を含む：

サンプルのハイブリダイゼーションを行うためにバイオセンサを処理する工程と、

該サンプルをバイオセンサにハイブリダイズする工程と、および

バイオセンサのハイブリダイズ後の画像を記録する工程(ここで得られる画像は結合したサンプルを示す)。

40

【0218】

この方法は、バイオセンサの標識不使用モードで、ハイブリダイゼーション後の標識不使用の画像(図9B)を記録する工程をさらに含む。

【0219】

該方法は、取得したハイブリダイゼーション前のデータに基づいてハイブリダイゼーション後の画像を補正する工程をさらに含み、それによりバイオセンサ上の捕捉物質の変動を補正する。

【0220】

本発明に用いるサンプルは標識することができ、該サンプルは、例えば、血液、血漿、

50

血清、核酸、胃腸分泌液、組織または腫瘍のホモジュネート、滑液、便、唾液、痰、シスト液 (cyst fluid)、羊膜液、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙、前立腺液、生検液 (biopsies)、体液、およびそれらの抽出物 / 誘導物からなる群から選択されたサンプルを含む。

【0221】

別の観点として、以下の工程からなるマイクロアレイチップの非接触定性分析方法である。

(a) 周期的な格子構造 (図1~7) からなる表面に多数のサンプル領域 802 を有するマイクロアレイチップ (図8) を用意する工程と、

(b) 該格子構造に捕捉要素を沈着させる工程と、

(c) 該マイクロアレイチップ (図8、図9A) の2次元画像を取得する工程と、

(d) 該マイクロアレイチップのサンプル領域の画像を含む2次元画像の部分のピーク波長値 (PWV) のデータ (図9B) を取得する工程 (ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくマイクロアレイからの反射光のピーク波長を含む) と、および
(e) (1) 2次元画像または (2) ピーク波長値のいずれかから、マイクロアレイのサンプル領域への捕捉要素の結合についての定性的な情報を取得する工程。

この方法では、捕捉要素は、ピエゾアレイプリンターまたはピンプリンターを用いて沈着させることができる。

【0222】

工程 (e) で得られる定性的な情報は、バイオセンサ表面の位置の関数として捕捉要素の結合の特性を表す。捕捉要素は変更することができ、一つの態様では、核酸物質およびタンパク質からなる群から選択される。

【0223】

本開示のさらに別の観点として、以下の工程からなるマイクロアレイチップ (図8) の分析方法である。

(a) 周期的な格子構造 (図1~7) からなる表面に多数のサンプル領域 802 を有するマイクロアレイチップを用意する工程と、

(b) 該サンプル領域に生物学的物質を適用する工程と、

(c) 該マイクロアレイチップ (図8、9A) の2次元画像を取得する工程と、

(d) 該マイクロアレイチップのサンプル領域の画像を含む2次元画像の部分のピーク波長値 (PWV) のデータ (図9B) を取得する工程 (ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくマイクロアレイからの反射光のピーク波長を含む) と、

(e) 第2のサンプル物質をサンプル領域に適用することを含むハイブリダイゼーション工程を行う工程と、

(f) ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの2次元画像 (図9C) を取得する工程と、および

(g) ハイブリダイゼーション工程後のサンプル領域の画像を含む2次元画像の部分のピーク波長値 (PWV) のデータを取得する工程。

【0224】

この方法の一つの態様として、上記ハイブリダイゼーション工程が、生物学的物質に蛍光プローブを適用する工程を含む。

【0225】

該方法は、上記ハイブリダイゼーション工程後、サンプル領域のエバネッセント共鳴 (ER) の測定値を取得する工程をさらに含む。特に、該方法は、上記マイクロアレイチップから ER 測定値を取得する工程と、工程 (d) で取得したピーク波長値 (PWV) のデータから取得した、サンプル領域に結合した生物学的物質の量の定量的なデータを参照して上記 ER 測定値を正規化する工程とをさらに含む。バイオセンサに付着した生物学的物質は、DNA マイクロアレイの形をとる。

【0226】

さらに別の観点として、ここに記載した標識不使用方法および標識使用方法を組み合わせ

10

20

30

40

50

せた方法を含むハイブリダイゼーションプロトコルに従って、バイオセンサに付着した DNA の量を決定する方法である。

【0227】

以下は、本記載に用いた用語の定義である。

”プラットフォーム”、“バイオセンサ”または”支持体”：1つまたは多数の検知領域を含むすべての変換器/チップである。

【0228】

”ピーク波長値(PWV)”：共鳴条件下で周期的構造体に入射する入射光により発生する共鳴の位置および強度であり、検出システムにより測定される。換言すると、PWV の測定は、各場所における透過ビームまたは異常高反射の位置および強度の測定からなる。

10

【0229】

”検知領域”：共鳴効果によりエバネッセント場を作り出すことができ、および1つまたは多数の捕捉要素を保有することができる、すべての波形化された領域。

【0230】

”捕捉要素”、“位置(location)”または”プローブ”：1つまたは様々な種類の捕捉分子を含む個々の検知スポット。

【0231】

”アレイの位置(location of the array)”または”支持体の領域(regions of the support)”は、沈着させた/付着させた物質のすべてのスポットに限定されるものと理解されるべきではない。該”支持体の領域”の最小の大きさは、用いる検出システムの光学解像度に依存する。換言すると、本発明の方法は、例えば、(スキニング)ピクセル-ワイズで実施することができる。

20

【0232】

”配向”は、直線的に偏向された光の電場ベクトルが、バイオセンサの周期的な表面格子に平行または垂直であることを意味するものと理解されるべきである。

【0233】

”コヒーレント光”は、放射線のコヒーレンス長、すなわち、入射ビームが規定された位相関係を有する空間的な範囲が、バイオセンサの厚さに比べて大きいことを意味するものと理解されるべきである。

30

【0234】

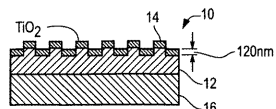
等価なもの

本発明は、本出願に記載された特定の態様に限定されるべきものではなく、それらの態様は本発明の各観点を単に例示的に説明するものである。当業者には明らかなように、本発明の精神および範囲を逸脱しない範囲で、本発明について多くの修正および変形が可能である。本明細書に列挙されたものに加え、本発明の範囲内において機能的に等価な方法および装置は、前述の記載から当業者には明らかであろう。そのような修正および変形は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれるものである。本発明は、特許請求の範囲に含まれる範囲に等価なすべての範囲とともに添付の特許請求の範囲の用語のみによって限定されるべきである。

40

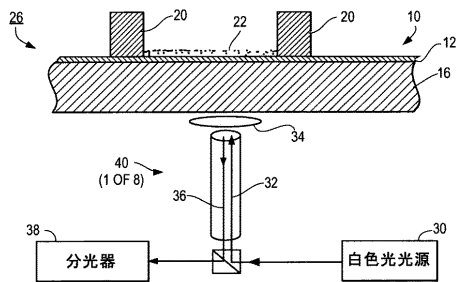
【図 1】

従来技術

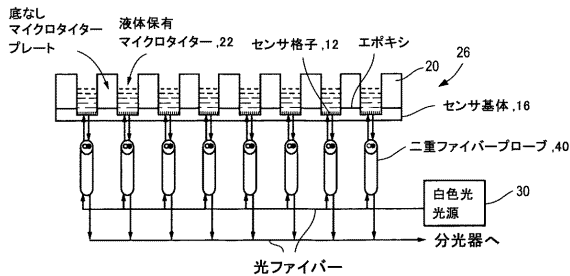


【図 2】

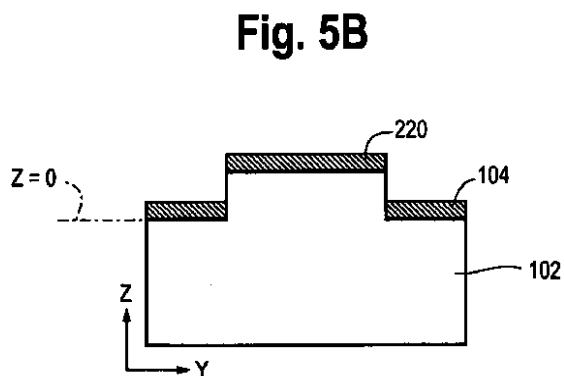
従来技術



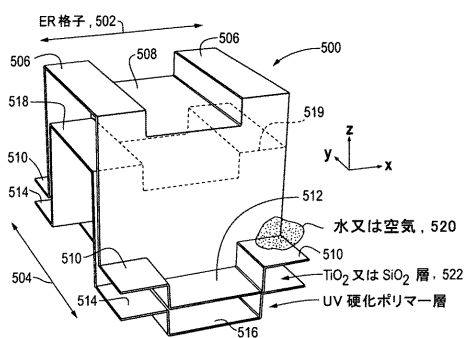
【図 3】



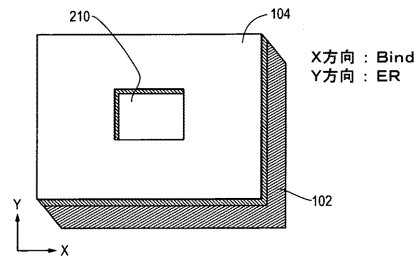
【図 5 B】



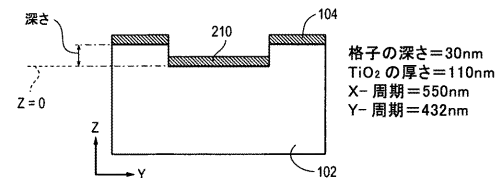
【図 6 A】



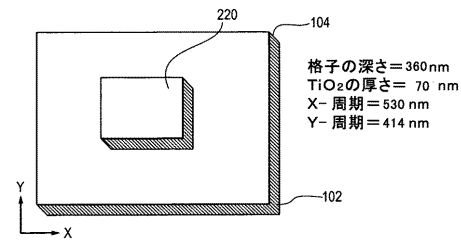
【図 4 A】



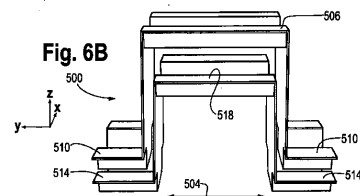
【図 4 B】



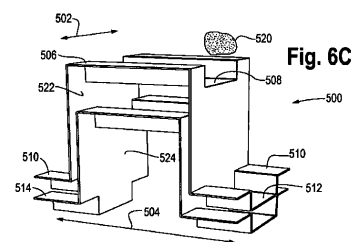
【図 5 A】



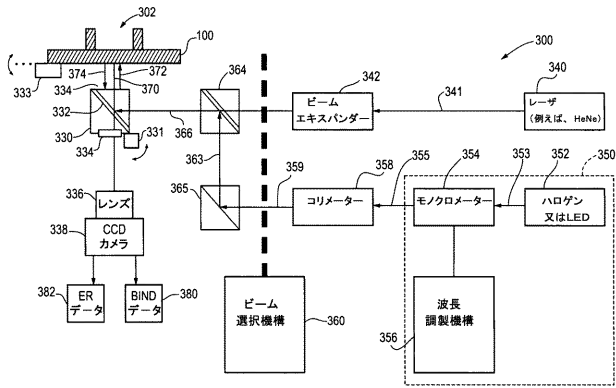
【図 6 B】



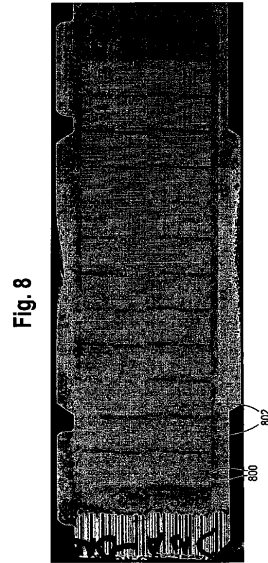
【図 6 C】



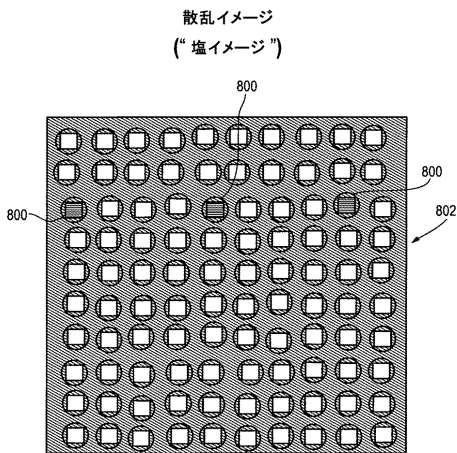
【図 7】



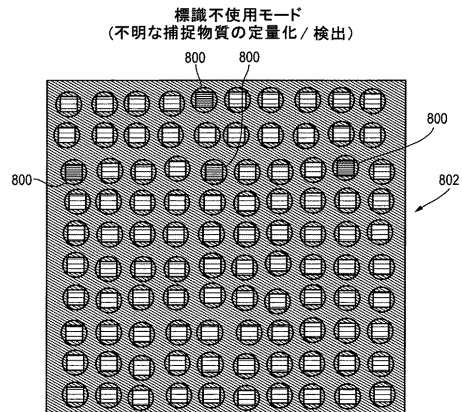
【図 8】



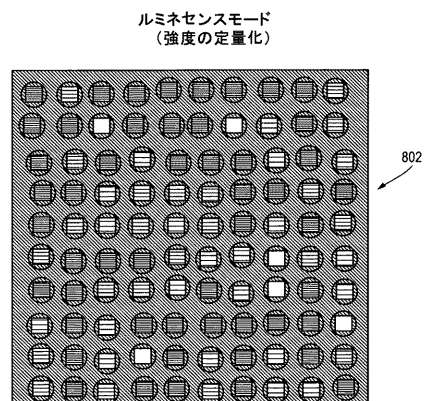
【図 9 A】



【図 9 B】



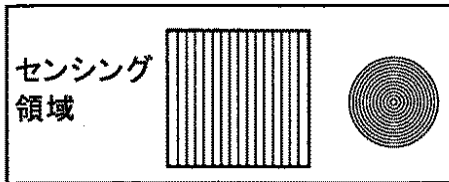
【図 9 C】



【図 10 A】

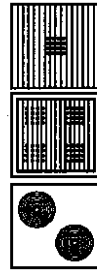


【図 10 B】



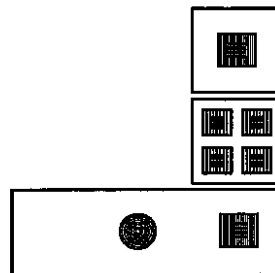
【図 10 C】

Fig. 10C

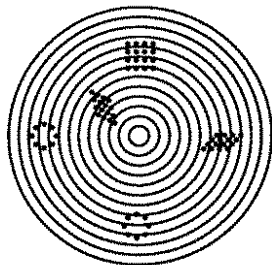


【図 10 D】

Fig. 10D

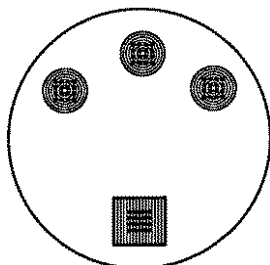


【図 10 E】



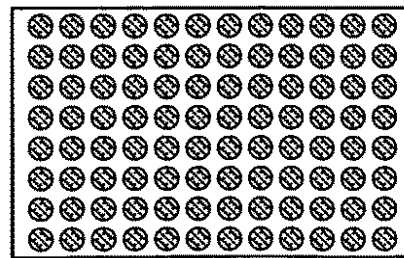
円盤状プラットホーム

【図 10 F】

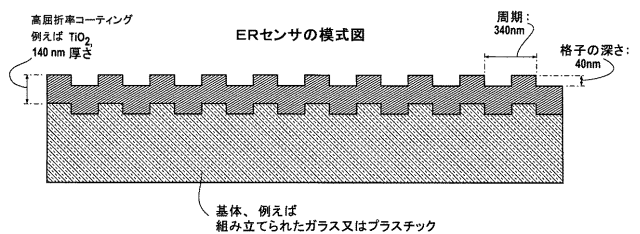


円盤状プラットホーム

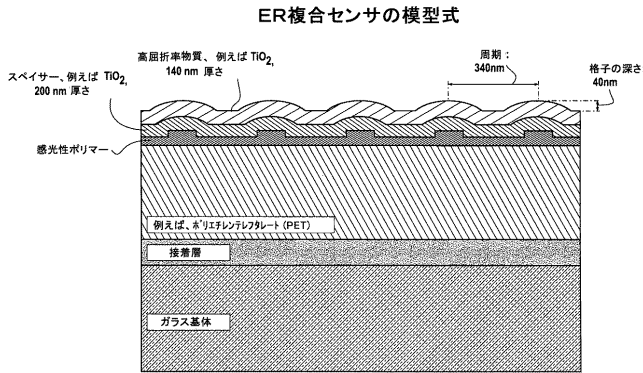
【図 10 G】

マイクロタイター / ナノタイター型
デバイス

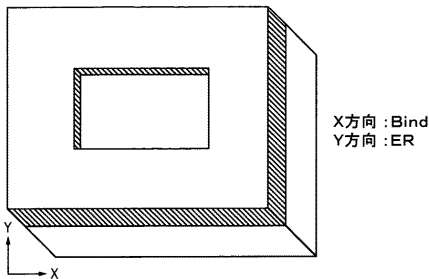
【図 11】



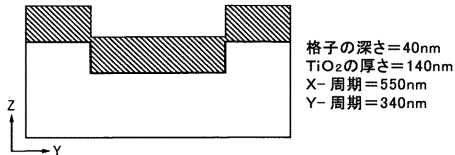
【図 1 2】



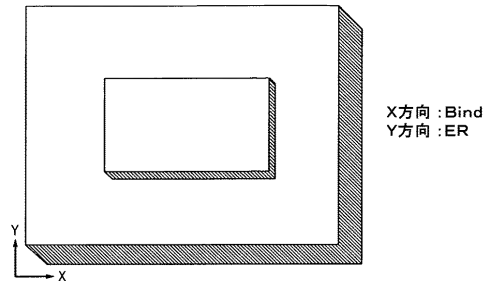
【図 1 3 A】



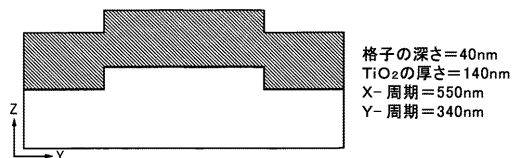
【図 1 3 B】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



【手続補正書】

【提出日】平成21年11月30日(2009.11.30)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

周期的な格子構造および表面に多数のプロープ位置を有するバイオセンサ上に固定されたプロープまたはプロープアレイについての固定化の質および/または量の評価方法であって、プロープに分析物が結合するに先立って、固定化されたプロープの固定化の質および/または量を空間分解法により各プロープ位置において個別に評価する方法であり、

(1) 上記バイオセンサから2次元のデータおよび/または画像を、

(A) エバネッセント共鳴モードにおいては、プロープに結合させた結合ルミネセンス標識剤を励起させ、バイオセンサからの発光データを収集することによって取得し、および

(B) 標識不使用モードにおいては、バイオセンサ表面の2次元画像および、バイオセンサのプロープ位置の画像を含む2次元画像の部分群についてのピーク波長値(PWV)データ入手する(ここでピーク波長値はバイオセンサへの光の共鳴結合によりバイオセンサから反射された光のピーク波長を含む)ことによって取得する工程と、

(2) 該2次元のデータおよび/または画像から、バイオセンサ表面に固定されたプロープまたはプロープアレイについての固定化の質および/または量を特徴化する工程を含む該評価方法。

【請求項 2】

上記バイオセンサが多数のサンプル領域を有し、各該サンプル領域はバイオセンサに結

合する生物学的物質を含有する予定のものであって、
さらに上記アレイは周期的な格子構造を有する表面として形成され、
上記工程（１）が、

- （１）バイオセンサの２次元画像を取得する工程と、
- （２）バイオセンサのサンプル領域の画像を含む２次元画像の部分のピーク波長値（PWV）データを取得する工程と、ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくバイオセンサからの反射光のピーク波長を含むものであり、および
- （３）該ピーク波長値データから、上記アレイのサンプル領域への生物学的物質の結合量についての定量的情報を取得する工程を含む請求項１記載の方法。

【請求項３】

周期的な格子構造および表面に多数のプロープ位置を有するバイオセンサ上に固定されたプロープまたはプロープアレイについての固定化の質および／または量の評価方法であって、プロープに分析物が結合するに先立って、固定化されたプロープの固定化の質および／または量を空間分解法により各プロープ位置において個別に評価する方法であり、
（１）バイオセンサのプロープ位置のピーク波長値（PWV）データを測定する工程と、
（２）空間分解法で、プロープ位置の２次元画像（PWV画像）を取得する工程と、
（３）PWVデータから、バイオセンサに固定されたプロープの固定化の質および／または量についての定量的な情報を取得する工程を含む該評価方法。

【請求項４】

標識されたサンプルを多数のプロープ位置に適用する工程と、
多数のプロープ位置についてエバネッセント共鳴（ER）の測定値を取得する工程と、
取得した定量的情報を用いてER測定値を正規化する工程をさらに含む請求項２記載の方法。

【請求項５】

上記ER測定値の正規化を、正規化式（１）により行う請求項４記載の方法。

【請求項６】

標識されたサンプルを多数のプロープ位置に適用する工程と、
多数のプロープ位置についてエバネッセント共鳴（ER）の測定値を取得する工程と、
取得した定量的情報を用いてER測定値を正規化する工程をさらに含む請求項３記載の方法。

【請求項７】

上記ER測定値の正規化を、正規化式（１）により行う請求項６記載の方法。

【請求項８】

上記PWVデータおよび画像が、バイオセンサの表面に固定される予定の物質の量および形態を示すものであり、および上記方法が、固定された物質に対してサンプルのハイブリダイゼーションを行った後で取得されたデータおよび画像を校正するために、上記PWVデータおよび上記データを使用する工程をさらに含む、請求項３記載の方法。

【請求項９】

上記方法が、バイオセンサの製造プロセスの１以上の工程において、標識不使用のPWVのデータおよび画像および／またはER測定値を取得する工程をさらに含むものであり、以下の工程を１以上含む請求項１記載の方法：

バイオセンサ表面の洗浄、バイオセンサ表面の修飾、バイオセンサ表面への物質の固定化、バイオセンサの洗浄工程、バイオセンサの乾燥工程、およびバイオセンサ表面へのサンプルのハイブリダイゼーション工程。

【請求項１０】

上記方法が、ハイブリダイゼーション前のPWVの画像／データに基づいてハイブリダイゼーション後に取得されたデータおよび画像を補正する工程をさらに含み、それによりバイオセンサに固定された固定捕捉物質の量および形態の変化の校正／補正を行う、請求項８記載の方法。

【請求項１１】

上記バイオセンサがさらに基体を含み、および上記バイオセンサの表面が、該基体の屈折率 n_1 よりも大きい屈折率 n_2 を有する物質からなる高屈折率層で被覆され、該層の厚さが $10 \sim 1000 \text{ nm}$ であり、周期性が $100 \sim 1000 \text{ nm}$ の範囲であり、および該基体が、平面状、円筒状、円錐状、または楕円状の形状を有する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 12】

塩画像がさらに取得および解析され、該塩画像は支持体に固定するプローブをスポットする方法により得られるものであり、該方法は、支持体に固定するプローブを含む塩含有溶液をスポットする工程を含み、必要に応じて、プローブを含む上記塩含有溶液を乾燥し、およびプローブが固定された位置の画像を取得するものであり、該画像はすべての洗浄工程の前に取得され、それにより、特定の位置における塩の不存在が、特定位置に固定するプローブのスポットングがその特定位置では行われなかったことを示す、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

上記バイオセンサの基体が、ガラス、石英、金属酸化物、誘電物質、無機または有機の高屈折率物質、シリコン、ポリマー、プラスチック、PET、PC、PU、COPs、低蛍光バックグラウンドプラスチック物質、接着剤層およびそれらの組み合わせからなる群から選択された物質から作製されている請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

上記バイオセンサが、光学的に透明な層を有し、該層が、 Ta_2O_5 、 TiO_2 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 ZnO または HfO_2 である金属酸化物からなる群から選択された無機物質、あるいはポリアミド、ポリイミド、PP、PS、PMMA、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリチオエーテル、またはポリ(フェニレンスルフィド)およびそれらの誘導体からなる群から選択された有機物質を用いて形成されている請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

上記固定されたプローブまたはプローブアレイが、以下の少なくとも 1 種により標識されている請求項 1 記載の方法：

スパーサー分子、エネルギードナー、エネルギーアクセプター、エレクトロン・ドナー、エレクトロン・アクセプター、発色団、発光団、蛍光物質、燐光標識剤、分光標識剤、生物学的官能基、または化学修飾剤。

【請求項 16】

上記方法が、固定された物質をバイオセンサ上に置く工程をさらに含み、該固定された物質が、分子量 1000 ダルトン未満の分子、分子量が $1000 \sim 10,000$ である分子、アミノ酸、核酸、脂質、炭水化物、核酸ポリマー、ウィルス粒子、ウィルス成分、細胞成分、およびウィルス成分または細胞成分の抽出物、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体 (scFv)、F(ab) 断片、F(ab')₂ 断片、Fv 断片、小さな有機分子、細胞、ウィルス、バクテリア、ポリマー、ペプチド溶液、タンパク質溶液、化学化合物ライブラリー溶液、一本鎖 DNA 溶液、二本鎖 DNA 溶液、一本鎖 DNA 溶液および二本鎖 DNA 溶液の組み合わせ、RNA 溶液、オリゴヌクレオチド誘導体および生物学的サンプルからなる群から選択される請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

上記プローブまたはプローブアレイが標識されていない請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 の工程 (3) で取得された定量的情報を用いて、エバネッセント共鳴 (ER) のデータ / 画像を校正する請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1 の工程 (3) で取得された定量的情報を用いて、標識不使用の PWV データおよび / または画像を校正する請求項 17 記載の方法。

【請求項 20】

バイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを取得する工程をさらに

含み、固定化の質および／または量の特徴化を上記のバイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを差し引いた後で行う請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 1】

表面に固定されたプローブのアレイを有するバイオセンサであって、周期的な格子構造を有するバイオセンサを用いて分析物を検出および／または定量する方法であって、

上記分析物の存在および／または濃度を上記固定されたプローブに対して正規化し、

上記固定されたプローブの存在および／または濃度を、バイオセンサの表面に分析物が結合する前にアレイの位置で評価する該方法。

【請求項 2 2】

上記固定されたプローブの存在および／または濃度を、バイオセンサ表面の 2 次元画像、およびバイオセンサのプローブ位置の画像を含む 2 次元画像の部分についてのピーク波長値 (PWV) のデータを用いて評価し、該ピーク波長値が、バイオセンサへの光の共鳴結合に基づくバイオセンサからの反射光のピーク波長を含む請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

バイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを取得する工程をさらに含み、正規化を上記のバイオセンサから発生するバックグラウンド信号のスペクトルを差し引いた後で行う請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

さらに以下の工程を含む請求項 2 4 記載の方法：

- (1) サンプルのハイブリダイゼーションを行うためにバイオセンサを処理する工程と、
- (2) 該サンプルをバイオセンサにハイブリダイズする工程と、および
- (3) バイオセンサのハイブリダイズ後の画像を記録する工程（ここで得られる画像は結合したサンプルを示す）。

【請求項 2 5】

上記バイオセンサの標識不使用モードで、ハイブリダイゼーション後の標識不使用の画像を記録する工程をさらに含む請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

上記バイオセンサから発生するバックグラウンドレベルの信号を補正するために、バックグラウンドを差し引くことを実行する工程をさらに含む請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 7】

取得したハイブリダイゼーション前のデータに基づいて、ハイブリダイゼーション後の画像を補正する工程をさらに含み、それにより、バイオセンサ上の捕捉物質の変動を補正する、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 8】

上記標識されたサンプルが、血液、血漿、血清、核酸、胃腸分泌液、組織または腫瘍のホモジュネート、滑液、便、唾液、痰、シスト液 (cyst fluid)、羊膜液、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙、前立腺液、生検液、体液、およびそれらの抽出物／誘導物からなる群から選択されたサンプルを含む請求項 4 記載の方法。

【請求項 2 9】

上記プローブをプリンターを用いてバイオセンサ上に沈積させる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 0】

上記バイオセンサを液体保有容器の内面に付着させる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 1】

上記液体保有容器が、マイクロタイタープレート、試験管、ペトリ皿およびマイクロ流体用チャンネルらなる群から選択される請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

以下の工程からなるマイクロアレイチップの非接触定性分析方法：

- (a) 周期的な格子構造 (図 1 ~ 7) からなる表面に多数のサンプル領域 8 0 2 を有するマイクロアレイチップ (図 8) を用意する工程と、
- (b) 該格子構造に捕捉要素を沈着させる工程と、

(c) 該マイクロアレイチップ(図8、9A)の2次元画像を取得する工程と、
(d) 該マイクロアレイチップのサンプル領域の画像を含む2次元画像の部分のピーク波長値(PWV)のデータ(図9B)を取得する工程(ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくマイクロアレイからの反射光のピーク波長を含む)と、および
(e) (1) 2次元画像または(2) ピーク波長値のいずれかから、マイクロアレイのサンプル領域への捕捉要素の結合についての定性的な情報を取得する工程。

【請求項33】

上記捕捉要素をピエゾアレイプリンターを用いて沈着させる請求項32記載の方法。

【請求項34】

上記物質をピンプリンターを用いて適用または沈着させる請求項32記載の方法。

【請求項35】

工程(e)で取得した定性的な情報が、バイオセンサ表面の位置の関数としての捕捉要素の結合の特性を表すことを含む請求項32記載の方法。

【請求項36】

上記捕捉要素を、核酸物質およびタンパク質からなる群から選択する請求項32記載の方法。

【請求項37】

以下の工程からなるマイクロアレイチップ(図8)の分析方法：

(a) 周期的な格子構造(図1～7)からなる表面に多数のサンプル領域802を有するマイクロアレイチップを用意する工程と、

(b) 該サンプル領域に生物学的物質を適用する工程と、

(c) 該マイクロアレイチップ(図8、9A)の2次元画像を取得する工程と、

(d) 該マイクロアレイチップのサンプル領域の画像を含む2次元画像の部分のピーク波長値(PWV)のデータ(図9B)を取得する工程(ここで、該ピーク波長値は格子構造への光の共鳴結合に基づくマイクロアレイからの反射光のピーク波長を含む)と、

(e) 第2のサンプル物質をサンプル領域に適用することを含むハイブリダイゼーション工程を行う工程と、

(f) ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの2次元画像(図9C)を取得する工程と、および

(g) ハイブリダイゼーション工程後のサンプル領域の画像を含む2次元画像の部分のピーク波長値(PWV)のデータを取得する工程。

【請求項38】

上記ハイブリダイゼーション工程が、生物学的物質に蛍光プローブを適用する工程を含む請求項37記載の方法。

【請求項39】

上記ハイブリダイゼーション工程後、サンプル領域のエバネッセント共鳴(ER)の測定値を取得する工程をさらに含む請求項37記載の方法。

【請求項40】

上記マイクロアレイチップからER測定値を取得する工程と、工程(d)で取得したピーク波長値(PWV)のデータから取得した、サンプル領域に結合した生物学的物質の量の定量的なデータを参照して上記ER測定値を正規化する工程とをさらに含む請求項37記載の方法。

【請求項41】

上記バイオセンサに付着させた生物学的物質がDNAマイクロアレイを含む請求項36記載の方法。

【請求項42】

標識不使用方法および標識使用方法を組み合わせた方法を含むハイブリダイゼーションプロトコルに従って、バイオセンサに付着したDNAの量を決定する方法。

【手続補正2】

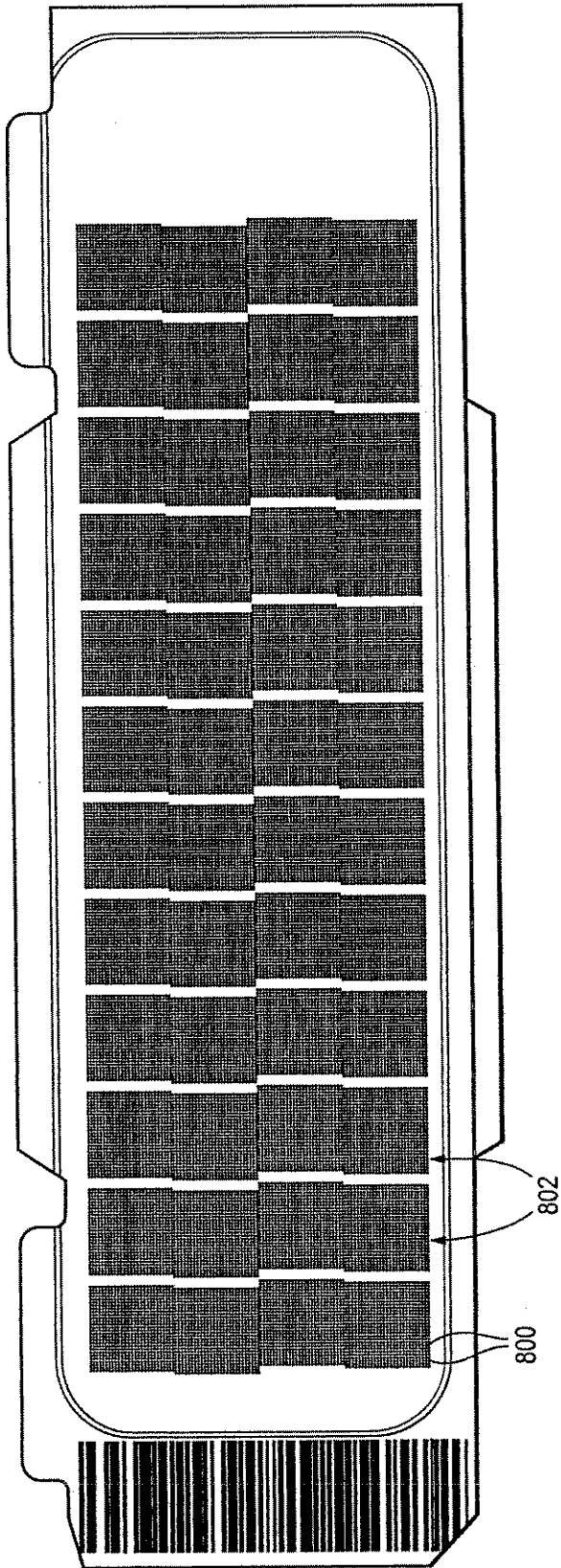
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US08/03751												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/48(2006.01); C12Q 1/00(2006.01) USPC: 702/19; 435/6 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) U.S.: 702/19; 435/6 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 practicable, search terms used) EAST														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>US PGPUB 2002/0127565 A1 (Cunningham et al.) 12 September 2002 (12.09.2002), entire document.</td> <td>1-4, 6, 9, 13-19, 21-22, 28, 30-32, 35-37, 39-40, 42, 43 8, 10, 12, 20, 23, 29, 33, 34, 38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US PGPUB 2003/0077660 A1 (Pien et al.) 24 April 2003 (24.04.2003), entire document.</td> <td>8, 10, 38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US PGPUB 2004/0115826 (Budach et al.) 17 June 2004; (17.06.2004) entire document.</td> <td>29, 33, 34</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	US PGPUB 2002/0127565 A1 (Cunningham et al.) 12 September 2002 (12.09.2002), entire document.	1-4, 6, 9, 13-19, 21-22, 28, 30-32, 35-37, 39-40, 42, 43 8, 10, 12, 20, 23, 29, 33, 34, 38	Y	US PGPUB 2003/0077660 A1 (Pien et al.) 24 April 2003 (24.04.2003), entire document.	8, 10, 38	Y	US PGPUB 2004/0115826 (Budach et al.) 17 June 2004; (17.06.2004) entire document.	29, 33, 34
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X — Y	US PGPUB 2002/0127565 A1 (Cunningham et al.) 12 September 2002 (12.09.2002), entire document.	1-4, 6, 9, 13-19, 21-22, 28, 30-32, 35-37, 39-40, 42, 43 8, 10, 12, 20, 23, 29, 33, 34, 38												
Y	US PGPUB 2003/0077660 A1 (Pien et al.) 24 April 2003 (24.04.2003), entire document.	8, 10, 38												
Y	US PGPUB 2004/0115826 (Budach et al.) 17 June 2004; (17.06.2004) entire document.	29, 33, 34												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tbody> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"I" 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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" 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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" 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													
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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													
"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)	"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													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family													
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 23 July 2008 (23.07.2008)		Date of mailing of the international search report 31 JUL 2008												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized Officer Michael Borin, Ph.D. PRIMARY EXAMINER Telephone No. (571) 272-1600												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US08/03751

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 24-27 and 41
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 24 is dependent from itself. Claims 25-27 are dependent from claim 24. There is no claims numbered 41.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

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 33/545 (2006.01)	G 0 1 N 33/552	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/553	
G 0 1 N 21/27 (2006.01)	G 0 1 N 33/545	A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	G
	G 0 1 N 21/27	C
	C 1 2 Q 1/68	A
	C 1 2 N 15/00	F

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, 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

(74) 代理人 100103115

弁理士 北原 康廣

(72) 発明者 ヴォルフガング・エルンスト・グスタフ・ブダハ

ドイツ連邦共和国デー - 7 9 1 4 8 シュリーゲン - マウヘン、アウツゲナー・シュトラッセ 3 番

(72) 発明者 ディーター・ノイシェーファー

スイス 4 1 3 2 ムッテンツ、パッペルヴェーク 6 番

(72) 発明者 スティーブン・シー・シュルツ

アメリカ合衆国 0 3 8 2 4 ニューハンプシャー州リー、シープ・ロード 1 7 番

(72) 発明者 ブライアン・ティ・カニンガム

アメリカ合衆国 6 1 8 0 1 イリノイ州シャンペン、ブライトン・コート 1 7 0 5 番

(72) 発明者 ランス・ジー・ライニング

アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州ブライトン、レスリー・ロード 1 2 番

(72) 発明者 ピーター・ワイ・リ

アメリカ合衆国 0 1 8 1 0 マサチューセッツ州アンドーバー、コブリー・ドライブ 1 番

(72) 発明者 ブラント・バインダー

アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州チェスナット・ヒル、シングル・ツリー・ロード 4 0 番

(72) 発明者 ガンガダル・ジョギカルマト

アメリカ合衆国 0 2 1 4 0 マサチューセッツ州ケンブリッジ、クレイトン・ストリート 5 7 番

(72) 発明者 アレックス・ポーソディ

アメリカ合衆国 0 1 8 5 1 マサチューセッツ州ローウェル、ワイルダー・ストリート 3 4 8 番

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 BA17 CA03 DA06 EA01 EA02 EA13 FA01 GA07

GB02 GB05 GB16 HA01 HA07 HA09 HA11 KA01 KA02 KA05

KA09 LA03 NA01

2G059 AA01 BB04 BB12 BB13 BB14 CC16 DD13 EE02 EE07 FF01

GG01 GG02 HH01 HH02 HH06 JJ02 JJ07 JJ19 JJ23 KK02

KK04

4B024 AA11 CA09 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR55 QR66 QR82 QS36 QX02

专利名称(译)	生物传感器的校准和标准化方法		
公开(公告)号	JP2010523973A	公开(公告)日	2010-07-15
申请号	JP2010502083	申请日	2008-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	SRU生物系统公司 瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	ES伯爵宇生物系统公司 诺华公司		
[标]发明人	ヴォルフガングエルンストグスタフブダハ ディーターノイシェーファー スティーブンシーシュルツ ブライアンティカニンガム ランスジーライング ピーターワイリ ブラントバインダー ガンガダールジョギカルマト アレックスポーソディ		
发明人	ヴォルフガング・エルンスト・グスタフ・ブダハ ディーター・ノイシェーファー スティーブン・シー・シュルツ ブライアン・ティ・カニンガム ランス・ジー・ライング ピーター・ワイ・リ ブラント・バインダー ガンガダール・ジョギカルマト アレックス・ポーソディ		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/543 G01N37/00 G01N33/552 G01N33/553 G01N33/545 G01N33/53 G01N21/27 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/54373 B01L3/5085 G01N21/4788 G01N21/552 G01N21/554 G01N21/6428 G01N21/645 G01N21/648 G01N21/7743		
FI分类号	G01N21/64.F G01N33/543.595 G01N37/00.102 G01N33/543.525.C G01N33/543.525.U G01N33/552 G01N33/553 G01N33/545.A G01N33/53.M G01N21/64.G G01N21/27.C C12Q1/68.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/BA17 2G043/CA03 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/EA02 2G043 /EA13 2G043/FA01 2G043/GA07 2G043/GB02 2G043/GB05 2G043/GB16 2G043/HA01 2G043/HA07 2G043/HA09 2G043/HA11 2G043/KA01 2G043/KA02 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/LA03 2G043 /NA01 2G059/AA01 2G059/BB04 2G059/BB12 2G059/BB13 2G059/BB14 2G059/CC16 2G059/DD13 2G059/EE02 2G059/EE07 2G059/FF01 2G059/GG01 2G059/GG02 2G059/HH01 2G059/HH02 2G059 /HH06 2G059/JJ02 2G059/JJ07 2G059/JJ19 2G059/JJ23 2G059/KK02 2G059/KK04 4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063 /QR66 4B063/QR82 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	60/921001 2007-03-30 US 60/998880 2007-10-11 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

公开了一种用于校准和标准化基于网格的传感器设计的方法。可以使传感器通过无标记和发光（例如，荧光）来优化扩增检测。这种传感器基于具有晶格或合适涂层的另一种周期性结构，并且显著增加了应用的多功能性，并且可以用于定性和定量它可以实现提供信息的新概念。本发明利用这些不同的模式，以执行进程和传感器的每个单独位置的质量控制（QC）校准。因此，可以基于质量和局部密度变化来标记化验数据，并且可以校正沉积的探针或印刷在表面上的物质的批次变化和变化。

行	列	バックグラウンド	生強度	実質強度
1	1	13565	17680	4116
1	2	14393	18111	3718
1	3	14673	17789	3116
1	4	13268	18966	5698
1	5	13919	14164	245
1	6	13740	19423	5683
1	7	14093	21452	7359
1	8	14243	18267	4025
1	9	14094	17194	3100
1	10	14804	18883	4078