

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3974528号
(P3974528)

(45) 発行日 平成19年9月12日(2007.9.12)

(24) 登録日 平成19年6月22日(2007.6.22)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	M
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 C
GO 1 N 33/548 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
GO 1 N 33/551 (2006.01)	GO 1 N 33/545	Z

請求項の数 12 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-558470 (P2002-558470)	(73) 特許権者	503211471
(86) (22) 出願日	平成13年12月11日(2001.12.11)		アウトジエノミクス・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2004-523749 (P2004-523749A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア・92009、カールスバッド、カミーノ・ビダ・ローブル・2270ーケイ
(43) 公表日	平成16年8月5日(2004.8.5)	(74) 代理人	100062007
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/047991		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開番号	W02002/057416	(74) 代理人	100113332
(87) 国際公開日	平成14年7月25日(2002.7.25)		弁理士 一入 章夫
審査請求日	平成16年7月8日(2004.7.8)	(74) 代理人	100114188
(31) 優先権主張番号	09/735,402		弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成12年12月12日(2000.12.12)	(74) 代理人	100103920
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良バイオチップ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標識した抗リガンドの化学発光又は蛍光検出による試料液の分析のためのバイオチップであって、

多機能マトリックス層と連結された支持体を含み、前記多機能マトリックスはリガンドと連結されていて、

前記リガンドは、連結部分の第2部分を介してマトリックス層の表面に連結されており、

前記多機能マトリックス層は、

(a) 無機酸化物、炭素系材料、及び/または光吸収剤からなる群から選択される、支持体の自己蛍光を低減する材料；

(b) 両性イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤及び非イオン性界面活性剤からなる群より選択される、支持体の電荷効果を低減する界面活性剤；

(c) 前記マトリックスとリガンドが接触すると、マトリックスがリガンドと接触しているマトリックス上にリガンドのスポットを形成する、連結部分の第2部分と特異的に且つ非共有結合で結合し得る連結部分の第1部分を全マトリックス層にわたって分配して含み、

前記バイオチップが、試料液が多機能マトリックス層表面と直接接触すると、リガンドが試料液中の標識化抗リガンドに結合するように設計されており、そして

前記多機能マトリックス層が共焦点顕微鏡を用いて化学発光又は蛍光により標識化抗リ

10

20

ガンドの結合を検出が可能なように堆積することを特徴とする前記バイオチップ。

【請求項 2】

支持体が有機ポリマー又は無機ポリマーを含む請求項 1 に記載のバイオチップ。

【請求項 3】

ポリマーがポリエチレン、ポリエステル及びポリスチレンから構成される群から選択される請求項 2 に記載のバイオチップ。

【請求項 4】

更に支持体と多機能マトリックス層の間に親水性介在層を含む請求項 1 に記載のバイオチップ。

【請求項 5】

多機能マトリックス層が水性溶媒を含む請求項 1 に記載のバイオチップ。

10

【請求項 6】

多機能マトリックス層がアガロース、ポリアクリルアミド及びゼラチンから構成される群から選択される材料を含む請求項 5 に記載のバイオチップ。

【請求項 7】

更に第 2 の多機能マトリックス層を含んでおり、前記第 2 の多機能マトリックス層は、第 1 の多機能マトリックス層と連結されており、さらに

(a) 無機酸化物、炭素系材料、及び / または光吸収剤からなる群より選択される、支持体の自己蛍光を低減する材料；

(b) 両性イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤及び非イオン性界面活性剤からなる群より選択される、支持体の電荷効果を低減する界面活性剤；

20

を全体にわたり含み、

前記第 2 の多機能マトリックスの表面凸凹は、支持体の表面凸凹より少ないことを特徴とする、請求項 1 に記載のバイオチップ。

【請求項 8】

リガンドがヌクレオチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、及び薬理活性分子の少なくとも 1 種を含む請求項 1 に記載のバイオチップ。

【請求項 9】

リガンドが多機能マトリックス層の内部に少なくとも部分的に埋込まれている請求項 1 に記載のバイオチップ。

30

【請求項 10】

第 1 部分がアビジン又はストレプトアビジンを含み、第 2 部分がビオチンを含む請求項 1 に記載のバイオチップ。

【請求項 11】

抗リガンドがポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、及び薬理活性分子から構成される群から選択される請求項 1 に記載のバイオチップ。

【請求項 12】

試料液が血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、細胞溶解液及び緩衝液から構成される群から選択される請求項 11 に記載のバイオチップ。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は分析装置である。

【背景技術】

【0002】

ゲノミクス及びプロテオミクス研究に伴い、莫大な数のヌクレオチド及びペプチド配列を分析に利用できるようになった。従って、莫大な数の既知遺伝子又はポリペプチドの存在及び / 又は量に関する試料の高スループットスクリーニングが近年大きな関心を集めている。当分野では種々の装置と方法が知られており、これらの装置と方法の多くは固定化核酸プローブを使用する多重核酸配列のスクリーニングに応用されている。他の用途とし

50

ては、このようなプローブをマイクロアレーで使用すると、薬理ゲノミクス、遺伝子発現、化合物スクリーニング、毒物検査、一塩基変異多型 (SNP) 分析、及び短いタンデム反復 (STR) 分析等の種々の分野で大規模な平行実験が可能になる。

【0003】

核酸配列をキャリアーに固定化する方法は多数のものが当業者に公知であるが、その全て又は殆ど全てに1種以上の欠点がある。例えば、サザン又はノーザンプロット型システムでは、分析しようとする核酸を固相 (例えばナイロン又はニトロセルロースメンブレン) にプロットして (例えば紫外線照射により) 固定化し、非特異的結合部位のブロッキング後に目的配列に相補的な配列をもつ1種以上のプローブで探索する。このような固定化は比較的簡単であるが、このようなアッセイにおける支持体 (例えばガラス、メンブレン) は比較的高い固有バックグラウンドシグナルを示すことが多い。更に、このようなシステムで使用するメンブレンは手間及び/又は時間のかかるブロッキング段階を必要とすることが多い。更に、検出システム (例えば放射性同位体検出、蛍光、化学発光検出等) によってはハイブリダイズしたプローブの直接検出が困難なことが多く、比較的感度の悪いことが多い。更に、このようなメンブレンの多くは比較的疎水性であるため、メンブレンの高密度負荷を達成するのは困難なことが多い。

10

【0004】

固体支持体への抗リガンド又はリガンド負荷密度が比較的低いことに伴う問題の少なくとも一部を解消するために、種々のアプローチが行われている。Peggらの米国特許第5,279,951号に記載されているような1アプローチでは、疎水性炭化水素鎖をもつ中心環構造がプラスチック支持体に結合し、末端反応基をもつ少なくとも1個の親水性鎖がプローブ分子と反応するヘテロ2機能架橋剤を使用して核酸又は他のプローブ分子をプラスチック支持体に固定化している。このようなヘテロ2機能架橋剤は一般に比較的高いリガンド又は抗リガンド密度を実現できるが、ヘテロ2機能架橋剤とプローブ分子 (即ちリガンド又は抗リガンド) の間の共有結合形成は一般に複数の反応基で特定エピトープ又は特定反応基に特異的ではない。更に、利用可能なプラスチック支持体はヘテロ2機能架橋剤に有効に結合するためには表面が比較的疎水性でなければならず、支持体に添加する試料液の容量が比較的少ない場合には問題になる。

20

【0005】

別のアプローチでは、Suttonらの米国特許第5,262,297号に記載されているようにヘテロ2機能架橋剤を介さずにプローブ分子を固体支持体に結合している。Suttonの固体ポリマー支持体は原子数8~50の連結基と2個以上のアルキレン、アリーレン、アルキレンアリーレン又はアリーレンアルキレン基をもつポリマー支持体表面から延びる多数の反応性カルボン酸基を含むコポリマーを含む。この場合、プローブ分子を反応基と反応させ、プローブ分子を固体ポリマー支持体に結合させる。しかし、プローブ分子の特定化学種によっては反応基とプローブ分子の反応にプローブ分子の化学的又は構造的安定性を損なう反応条件が必要となることがある。更に、分析前に未反応反応基をブロックする必要があるので、アッセイ時間及び試薬費用が著しく増す。

30

【0006】

あるいは、Hoffmanらの米国特許第5,034,428号に記載されているように、電離放射線を予め照射しておいた親水性ポリマー支持体にプローブ分子を固定化 (即ちグラフト) する。予備照射段階は一般に空気中で-78℃で実施するが、グラフト段階は無酸素雰囲気下に0℃で実施する。Hoffmanのグラフト法はプローブ分子を共有結合できるので、比較的高いプローブ分子密度でも利用できるが、プローブ分子の化学的又は構造的安定性や、装置費用が比較的高いなど、まだ種々の問題がある。

40

【0007】

別のアプローチでは、フォトリソグラフィ法を使用して核酸試験アレーを作製すると、捕獲プローブの密度を比較的高くすることができる (例えば1アレー当たり10000プローブ以上)。このような高密度アレー用システムは例えば米国特許第5,599,695号、5,843,655号及び5,631,734号に記載されている。高密度アレー

50

ーはシーケンシング又は複雑な遺伝分析に特に有用であるが、多数の欠点が残っている。例えば、このような高密度アレーの注文合成は僅かの例外を除く全個人及び/又は組織にとって非常に費用が高いと思われる。更に、このようなアレーの作製には特殊な化学反応を使用するので、非核酸プローブ（例えば受容体、抗体及び他のポリペプチド）を利用するのが不可能ではないとしても困難である。あるいは、MaskosとSouthern (Nucleic Acid Research 1679, 1992)に記載されているように、核酸をガラス支持体に結合させるためにリンカーシステムを使用して固相核酸合成を実施することもできる。しかし、やはり上述と同様の問題がある。

【0008】

更に、公知システムの全部又は大半はプローブ分子を結合する支持体の表面が比較的平坦でなければならず、特に結合した抗リガンドを光学的に検出するシステムでは殊更である。このようなシステムで表面が平坦でないとして一般に表面に結合したプローブ分子の少なくとも一部の結果が擬陰性や著しく弱くなる。更に、支持体が光学的に活性である（即ち入射光を吸収又は反射したり、自己蛍光等を示す）公知システムの多くでは光学検出が一層複雑になりかねない。

【特許文献1】米国特許第5,279,951号

【特許文献2】米国特許第5,262,297号

【特許文献3】米国特許第5,034,428号

【特許文献4】米国特許第5,599,695号

【特許文献5】米国特許第5,843,655号

【特許文献6】米国特許第5,631,734号

【非特許文献1】MaskosとSouthern, Nucleic Acid Research 1679, 1992

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

このように、プローブ分子をバイオチップに結合する種々のシステムが当分野で知られているが、まだ多くの問題がある。従って、プローブ分子をバイオチップに結合する改良方法及びシステムが依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明はマトリックス層が支持体と連結されており、更に試料液に含まれる1種以上の抗リガンドと特異的に結合する複数のリガンドを含む改良バイオチップに関する。好適支持体は有機ポリマー又は無機ポリマー又は材料（例えばポリエチレン、ポリエステル、ポリスチレン、ガラス又は金属）を含み、好適マトリックス層は水性溶媒とゲル（例えばアガロース、ポリアクリルアミド又はゼラチン）を含む。親水性介在層を介して所期マトリックス層を支持体と連結することができる。

【0011】

本発明の主題の1側面では、マトリックス層は支持体の自己蛍光、入射光吸収、電荷効果、及び/又は表面凹凸を低減する多機能マトリックス層である。更に、所期バイオチップは追加のマトリックス層を含むことができ、マトリックス層の少なくとも1個は界面活性剤、湿潤剤、緩衝液及び/又は光吸収剤を含むことができる。

【0012】

本発明の主題の別の側面では、所期リガンドとしてはヌクレオチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、薬理活性分子、細菌細胞、真核細胞及び/又はウイルス（又はそのフラグメント）が挙げられる。従って、所期抗リガンドとしてはヌクレオチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、薬理活性分子、細菌細胞、真核細胞及び/又はウイルス（又はそのフラグメント）が挙げられ、そのいずれも（例えば血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、緩衝液、細胞溶解液等であるか又はそれらから誘導される）試料液中に含むことができる。

10

20

30

40

50

【0013】

本発明の主題の更に別の側面では、リガンドは多機能マトリックス層の内部に少なくとも部分的に埋込まれている。あるいは、所期リガンドは連結部分を介して多機能マトリックス層と連結されていてよく、利用可能な連結部分はマトリックス層と連結される第1部分（例えばアビジン又はストレプトアビジン）とリガンドと連結される第2部分（例えばビオチン）を含むことができ、第1部分と第2部分は相互に非共有結合を形成する。

【0014】

本発明の主題の更に別の側面では、所期バイオチップは複数の第1リガンドと複数の第2リガンドを含むことができ、複数の第1及び第2リガンドは異なる部類（例えばポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、薬理活性分子、細菌細胞、真核細胞及びウイルス）に属する。

10

【0015】

以下、添付図面を参照して本発明の好適態様の詳細な説明により本発明の種々の目的、特徴、側面及び利点を更に説明するが、図面中、類似番号は類似要素を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本明細書で使用する「バイオチップ」なる用語は複数のリガンドと複数の所定位置において連結された支持体を意味する。所期バイオチップにおけるリガンドの数は本発明の主題に必須でないが、利用可能なバイオチップは少なくとも10、より好ましくは少なくとも100、最も好ましくは少なくとも1000個の化学的又は構造的に別個のリガンドを含むことが一般に好ましい。

20

【0017】

更に本明細書で使用する「リガンド」なる用語は、一般に温度25℃で生理的緩衝液条件（例えば、pH6.5～8.5および天然コンホメーション、生存性及び/又は抗リガンドのワトソン・クリックハイブリダイゼーション（リガンドと抗リガンド間の）を維持するために十分なイオン強度）下に解離定数 $K_D = 10^{-2}$ M、より一般には $K_D = 10^{-3}$ Mで抗リガンドと結合する任意分子、分子複合体又は細胞を意味する。本明細書で使用する「抗リガンド」なる用語は、一般に温度25℃と生理的緩衝液条件（即ちpH6.5～8.5および天然コンホメーション、生存性及び/又は抗リガンドの（リガンドと抗リガンド間の）ワトソン・クリックハイブリダイゼーションを維持するために十分なイオン強度）下に解離定数 $K_D = 10^{-2}$ M、より一般には $K_D = 10^{-3}$ Mでリガンドと結合する任意分子、分子複合体又は細胞を意味する。従って、リガンドと抗リガンドはアフィニティー対を形成するとみなすべきである。

30

【0018】

同様に本明細書で使用する「マトリックス」なる用語は物質（即ちリガンド、添加剤及び/又は連結剤）が少なくとも部分的に埋込まれた実質的に非液体の支持媒体を意味し、前記物質は更に支持媒体に共有結合していてもよい。本明細書で使用する「実質的に非液体の支持媒体」なる用語は（支持媒体が直接結合している）表面を水平位置から鉛直位置に移したときに支持媒体と同一寸法の表面から25℃で60分間に移動する支持媒体が10容量%以下であることを意味する。

40

【0019】

所期支持媒体は化学的に均質（即ち1種の分子種のみから構成される）でもよいし、不均質（即ち2種以上の分子種から構成される）でもよい。例えば、利用可能な支持媒体としてはゲル（例えばゼラチン、アガロース、ポリアクリルアミド等）、多孔質三次元ポリマー網目構造（例えばポリアクリレンエーテル、ケイ素含有無機ポリマー）、半相互浸透性又は相互浸透性ポリマー網目構造等が挙げられる。他方、コロイド液や溶媒は本定義の範囲では実質的に非液体の支持媒体とみなさない。更に、多機能（例えばホモ又はヘテロ2機能以上）架橋剤やその層もマトリックスとみなさない。

【0020】

全般に改良バイオチップは支持体と連結されたマトリックス層を含み、更に複数の所定

50

位置に複数のリガンドを含み、試料液がマトリックスの少なくとも一部に接触するとリガンドは試料液に含まれる1種以上の抗リガンドと結合する。

【0021】

より詳細には、図1に示すように、バイオチップの1例100は、疎水性介在層150を介して1層のマトリックス層又は複数のマトリックス層120A、120B及び120Cが担持された支持体110を含む。マトリックス層120Aには所定位置に複数のリガンド130が埋込まれている。リガンド130の一部は抗リガンド140と結合する。マトリックス層120Aには第1部分162と第2部分164を含む連結部分160も(少なくとも一部に)埋込まれており、第2部分はリガンド130と連結されており、連結部分160と連結されたリガンド130の一部は抗リガンド140と連結される。

10

【0022】

支持体については、所期支持体は長さ及び幅が約2.0~3.0cmで厚みが約0.1mm~1.0mmのほぼシート状構造であることが一般に好ましい。好適支持体は更に有機又は無機ポリマーを含み、特に好ましい有機ポリマーとしてはポリエチレン、ポリスチレン、又はポリエステル(最も好ましくはMylar(登録商標)(ポリエチレンフタレートポリマー))が挙げられる。しかし、本発明の主題の別の側面では、利用可能な支持体の構造と材料は多種多様である。例えば、比較的剛性の材料(即ち手で力を加えたときに変形しない材料)が好ましい場合には、所期材料としては金属(例えばアルミニウム)、金属合金(例えば真鍮)又はガラス(例えばホウケイ酸ガラス)が挙げられる。特に、支持体が所期バイオチップのハウジングの一体部分を形成する場合には剛性材料が有利であると考えられる。他方、比較的柔らかい材料(即ち手で力を加えたときに変形する材料)が好ましい場合には、利用可能な材料としては特に有機ポリマーフィルム(例えばポリエチレン、ポリスチレン、又はポリエステル)、ニトロセルロース、紙等が挙げられる。更に、熱的性質(例えば熱伝達)、機械的性質(例えば超音波弾性)、光学的性質(例えば反射率、吸収又は自己蛍光)等の他のパラメータの1種以上により適切な材料を選択してもよい。更に、所期支持体は上記材料の2種以上を併用してもよい。

20

【0023】

同様に、所期支持体は妥当な任意寸法又は形状とすることができ、支持体と連結されたマトリックス層を少なくとも部分的に支持するものであれば、如何なる寸法及び形状でもよいとみなすべきである。例えば、リガンド密度が比較的低い場合には、2.0~10.0cm以上の寸法(幅及び/又は長さ)が考えられる。他方、特にリガンド数が比較的少なく(例えば100以下)、密度が比較的高い場合には、1.0~2.0cm以下の寸法(幅及び/又は長さ)が妥当である。厚みについては、多様な厚みを利用でき、特定厚みは特に所望される物理的又は機械的性質に少なくとも部分的に依存すると考えられる。例えば、支持体をキャリアーに結合する場合には、比較的薄い支持体(例えば約0.01mm~2mm)が妥当である。別例として熱伝導性と適度な機械的安定性が所望される場合には、厚みは0.5mm~5mmとすることができる。更に別例として支持体がハウジングの一体部分である場合には、厚みは5mm~2cm以上とすることができる。更に、支持体は長方形が一般に好ましいが、円形、楕円形、台形又は不規則形状等の他の形状も利用できると考えられる。

30

40

【0024】

支持体の化学的性質に応じて支持体とマトリックスの間の1層以上の介在層をバイオチップに加えてもよいとみなすべきである。例えば、支持体が比較的疎水性であり(例えばMylar(登録商標)100)、マトリックスが比較的親水性である場合には支持体に親水性介在層を加えてもよい。また、支持体が比較的親水性であり(例えばポリカーボネート)、マトリックスが比較的疎水性である場合には支持体に疎水性介在層を加えてもよい。親水性又は疎水性介在層として機能することができる材料は多数のものが当分野で知られており、このような材料は(a)支持体の少なくとも1つの表面に付着し、(b)介在層を介さない支持体へのマトリックス層の付着に比較して(介在層を介する)支持体へのマトリックス層の付着を改善すると一般に考えられる。

50

【0025】

例えば、特に利用可能な親水性介在層としては親水性ゲルが挙げられ、特に好ましい親水性ゲルとしてはゼラチンが挙げられる。あるいは、有機ポリマー組成物（例えば親水性プラスチック）や、一部が疎水性部分を持ち、別の部分が親水性部分をもつヘテロ2機能分子から親水性介在層を形成してもよい。また、利用可能な疎水性介在層としてはケイ素含有材料も挙げられ、特に好ましいケイ素含有材料としてはシランが挙げられる。あるいは、有機ポリマー組成物（例えば親水性プラスチック、ろう）や、一部が疎水性部分を持ち、別の部分が親水性部分をもつヘテロ2機能分子から疎水性介在層を形成してもよい。

【0026】

更に、利用可能な親水性又は疎水性介在層は種々の方法で配置できると考えられ、利用可能な堆積方法は一般に少なくとも部分的に使用する特定材料に依存する。例えば、親水性介在層がゼラチンである場合には、支持体に流し塗り又はドクターブレードで塗布することができる。他の材料は化学蒸着、スピンコーティング、*in situ*重合等により堆積することができる。従って、介在層の所望厚みに応じて2層以上の介在層を支持体に配置してもよく、各層は10ミクロン以下から約2mm以上までの厚みとすることができる。また、予め親水性又は疎水性層を含む多数の支持体が市販されている（後記参照）。更に、支持体が親水性であり、マトリックス層が親水性である場合（又は支持体が疎水性であり、マトリックス層が疎水性である場合）には、介在層は完全に省略してもよいとみなすべきである。

【0027】

マトリックス層については、マトリックスは可溶化物質又は懸濁物質の網目構造を含むことが好ましく、特に好ましいマトリックス材料としてはゼラチン、アガロース及びポリアクリルアミドが挙げられる。利用可能な他のマトリックス材料としては多孔質三次元ポリマー網目構造、半相互浸透性又は相互浸透性ポリマー網目構造等が挙げられる。所期マトリックス層の厚みは実質的に広い範囲とすることができ、一般に利用可能なマトリックス層は10ミクロンから1~10mm以上の厚みであると一般に考えられる。しかし、一般にはマトリックス層は50ミクロン~2mmの厚みであることが好ましい。マトリックス層の材料に応じて、本発明ではあらゆる層堆積法を使用できるとみなすべきであり、介在層の堆積について上述した通りである。更に、所期バイオチップは2層以上のマトリックス層を含むものでもよいとみなすべきであり、2層以上のマトリックス層を使用する場合には、マトリックス層の数は2~10（及びそれ以上）であると考えられる。

【0028】

特に好ましい側面では、網目構造はリガンド及び/又は連結部分の少なくとも一部を連結/埋込み及び保持するのに十分な密度をもつ。しかし、リガンド及び/又は連結部分の少なくとも一部を連結/埋込み及び保持するものであれば、他のマトリックス材料も利用できると考えられる。

【0029】

リガンド及び/又は連結部分の少なくとも一部の連結/埋込みは共有でも非共有でもよい。例えば、リガンド及び/又は連結部分の少なくとも一部がマトリックスに非共有結合されている場合には、マトリックス材料は立体相互作用によりリガンド及び/又は連結部分の少なくとも一部を保持するのに十分な密度をもつと考えられる。別の観点では、好適マトリックス材料の網目構造はリガンド及び/又は連結部分の少なくとも一部を少なくとも部分的に封入していると考えられる。他方、リガンド及び/又は連結部分の少なくとも一部がマトリックスに共有結合されている場合には、マトリックス材料はリガンド及び/又は連結部分の少なくとも一部に含まれる反応基と共有結合を形成する少なくとも1個の反応基をもつと考えられる。多数の反応基が当分野で知られており、これらの基のいずれも本発明で使用できると考えられる。例えば、マトリックスがアガロースを含む場合には、利用可能な基としては(CNB_r-アガロース又は無水マレイン酸改変アガロースとして市販されている)臭化シアン又は無水マレイン酸が挙げられる。他の反応基として

10

20

30

40

50

は種々の求核基、求電子基、又は架橋剤と特異的に反応できる基が挙げられる。

【0030】

従って、所期バイオチップのリガンドはマトリックス層（と場合により介在層）を介して支持体に連結されるとみなすべきであり、リガンドとマトリックスの連結は直接的（即ち連結部分を介さない）でもよいし、間接的（即ち連結部分を介する）でもよく、更に共有的で非共有的でもよい。

【0031】

特に好ましい形態では、リガンドは連結部分を介してマトリックス層と連結されており、連結部分は第1部分（例えばアビジン、ストレプトアビジン、又はその変形）と第2部分（例えばビオチン）をもつ。このような好適形態では、マトリックスは第1部分（上記参照）を少なくとも部分的に埋込むか又はこれと共有結合され、第2部分はリガンドと共有結合されていると考えられる。連結部分の第1部分と第2部分間の高度に特異的で強い非共有結合相互作用により、リガンドはマトリックス層と間接的に連結される。

10

【0032】

従って、好適形態では、マトリックス層には第1部分が実質的に均一に分配しており、単にマトリックスを所望リガンドと接触させるだけで（共有的又は非共有的に）第2部分を含む任意所望リガンドをマトリックスの任意所望部分と連結させることができ、リガンドとマトリックスの結合長は主に連結部分の第1部分と第2部分の結合長によって決定されるとみなすべきである。更に、特異的分子相互作用によりリガンドをマトリックスと連結させることにより、抗リガンド接触の前にマトリックスをブロックする段階が不要になるとみなすべきである。即ち、所期マトリックスは供給業者や更には末端消費者が容易且つ廉価にカスタマイズできるとみなすべきである。

20

【0033】

当然のことながら、多数の他の第1部分と第2部分が相互に高度且つ特異的に結合して多種多様の結合パートナーを生じ、このような第1及び第2部分のすべても本発明で利用できるとみなすべきである。例えば、第1部分は抗体又はそのフラグメントを含み、第2部分は前記抗体の対応するタンパク又は非タンパク性抗原を含むことができる。あるいは、代替連結部分の第1及び第2部分として非タンパク性分子が好ましい場合には、対応する相補的配列をもつ1本鎖核酸を第1及び第2部分として使用することができる。更に他の第1及び第2部分としては、水素結合、親水性及び/又は疎水性相互作用、イオン結合、静電結合等の1種以上の特異的分子相互作用を介して安定な複合体（即ち $K_D \approx 10^{-5} M$ ）を形成するものも考えられる。

30

【0034】

本発明の主題の更に別の側面では、所期マトリックス層はマトリックス層に付加機能を付与するために種々の物質を加えることができ、特に好ましい機能としては支持体の自己蛍光、支持体の入射光吸収、支持体の電荷効果、及び支持体の表面凹凸の少なくとも1種の低減が挙げられる。従って、所期バイオチップは1種以上の多機能マトリックス層を含むことができるとみなすべきである。

【0035】

例えば、支持体が自己蛍光を示す（即ち特定波長でフルオロフォアを加えずに蛍光発光する）材料を含む場合には、マトリックスで利用可能な添加剤は自己蛍光を低減する物質を含むと考えられる。特に好ましい添加剤としては無機酸化物（例えば酸化鉄、酸化チタン等）、炭素系材料（例えばカーボンブラック）、及び自己蛍光波長に吸収最大をもつ光吸収剤が挙げられる。

40

【0036】

同様に、支持体が入射光を吸収及び/又は散乱させる（例えばリガンドに結合された抗リガンドに結合されたフルオロフォアの蛍光を発生する）材料を含む場合には、マトリックスで利用可能な添加剤は入射光の吸収及び/又は散乱を低減する物質を含むと考えられる。特に好ましい添加剤としては色素（例えば直接又は間接染料、天然又は合成色素）、無機酸化物（例えば酸化鉄、酸化チタン等）、及び炭素系材料（例えばカーボンブラック

50

)が挙げられる。

【0037】

別例としてマトリックスが電荷効果を示す材料を含む場合には、(添加剤を加えないマトリックスと比較して)電荷効果を低減する種々の物質をマトリックス層に添加できると考えられる。本明細書で使用する「電荷効果」なる用語は(a)少なくとも部分的にマトリックスに固有であり、(b)マトリックスに加えた液滴(容量約100pL以下~約50μL)を円形から非円形、半月形又は不規則形状に変形させる効果を意味する。電荷効果を低減するために特に好ましい添加剤としては界面活性剤が挙げられ、イオン性、両性イオン性及び非イオン性界面活性剤のいずれでもよい。例えば、所期界面活性剤としてはTweeen(登録商標)、Brig(登録商標)、Triton(登録商標)、種々のスルホン酸とその塩及び種々の第4級アンモニウム化合物とその塩が挙げられる。

10

【0038】

更に別例では、マトリックス層の付加によりリガンドを連結できる層を提供するのみならず、支持体の表面凹凸を著しく低減できることに留意すべきである。光学検出により検出するバイオチップでは、リガンドを結合する支持体表面が凹凸であると焦点面が内在的に変動するので表面凹凸は特に望ましくない。図3は凹凸面310-Sをもつ凹凸支持体310を含むバイオチップの1例300を示す。凹凸面310-S上には第1マトリックス層320Cが配置されており、第1マトリックス層320Cは表面凹凸が低減した表面320C-Sをもつ。表面310C-S上には第2マトリックス層320Bが配置されており、第2マトリックス層320Bは320C-Sと310-Sの両者に比較して表面凹凸が低減した表面320B-Sをもつ。最後に、表面310B-S上には第3マトリックス層320Aが配置されており、第3マトリックス層320Aは320B-S、320C-S及び310-Sと比較して表面凹凸が低減した表面320A-Sをもち、表面320A-Sは実質的に平面である(最高点と最低点間の最大鉛直方向偏差が10ミクロン以下、より好ましくは1ミクロン以下である)。(マトリックス層に埋込むか又は結合された)リガンドには抗リガンド340が結合されている。

20

【0039】

更に別例では、バイオチップ又は試料液(例えばルシフェラーゼ反応用緩衝液)における抗リガンドとリガンドの結合又は抗リガンドもしくは他の成分の生化学(酵素又は非酵素)変換に適した生化学反応環境(例えば核酸ハイブリダイゼーションのための中性pHと低塩)を少なくとも部分的に提供する緩衝液又は緩衝液系を更にマトリックス層に加えることも考えられる。利用可能な緩衝液及び緩衝液系としては両性緩衝液や、酸性塩と酸の対応する塩基の対が挙げられる。更に、所期緩衝液及び緩衝液系は特定化学環境を提供するために添加剤を加えてもよく、利用可能な添加剤としては還元剤、チオール反応剤、塩、防腐剤等が挙げられる。

30

【0040】

更に別例では、マトリックスの収縮及び膨潤量を抑制又は低減するための1種以上の湿潤剤を更にマトリックス層に加えることが考えられる。マトリックスの収縮と膨潤の抑制は特定焦点面を維持するのに有利であると考えられ、利用可能な湿潤剤としてはグリセロール、各種油類、糖類及び選択された界面活性剤が挙げられる。

40

【0041】

更に当然のことながら、各添加剤を別々のマトリックス層に加えてもよいが、1層に1種以上の添加剤を併用するほうが一般に好ましい。例えば、支持体に結合された第1マトリックス層に湿潤剤のみを加え、第2層に緩衝液と、支持体の自己蛍光を低減する物質を加えてもよい。しかし、マトリックス層の1層以上における各添加剤の数と分配は本発明の主題には必須でないとみなされる。

【0042】

リガンドについては、本発明のバイオチップはリガンドをマトリックス層と所期形態で連結するので、リガンドの特定化学種は本発明の主題を限定しないとみなすべきである。従って、所期リガンドとしては単分子、複数の分子の複合体、ウイルス、及び原核及び

50

ノ又は真核細胞又はそのフラグメントが挙げられる。特に好ましい分子の例としては薬理活性分子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴ及びポリヌクレオチド（1本鎖又は2本鎖）、糖類、脂質、アミノ酸、オリゴ及びポリペプチド（例えばサイトカイン、酵素、抗体及び抗体フラグメント）、ホルモン等が挙げられる。特に好ましい複数分子の複合体の例としては、多成分受容体、抗体（例えばIgM、IgE等）、2本鎖及び3本鎖核酸、PNA等が挙げられる。特に好ましいウイルス及びウイルスフラグメントの例としては、DNA及びRNAウイルス（例えばHBV、HCV、HIV、RSV、HSV、インフルエンザ等）が挙げられ、原核及び真核細胞の例としてはグラム陽性細菌（例えばBacillus種）、グラム陰性細菌（例えばEscherichia種）、幹細胞、癌細胞、リンパ系細胞、免疫コンピテント細胞等が挙げられる。従って、本発明の所期バイオチップは第1類の分子（例えば核酸-オリゴヌクレオチド）に属する複数の第1リガンドと、第2類の分子（例えばポリペプチド-サイトカイン）に属する複数の少なくとも第2のリガンドを含むことができると特にみなすべきである。多重類バイオチップの1例200を図2に示し、第1類の分子に属する複数の第1リガンド240Aが1つのマトリックス層上で第2類の分子に属する複数の第2リガンド240Bの近傍に配置されている。

10

【0043】

所期バイオチップは複数の化学的に別個のリガンドを含むことが一般に好ましいが、バイオチップのマトリックス上の特定位置に異なる量のリガンドを配置することにより、同一リガンドを2個以上含むバイオチップを抗リガンドの定量に利用できるとみなすべきである。

20

【0044】

従って、特定リガンドの量は非常に広い範囲をとることができるが、各リガンドは約1pmol未満～約1mmolの量で特定位置に存在すると一般に考えられる。リガンドの分子量に応じ、特にリガンドが分子の複合体又はウイルス又は細胞である場合には、更に少量のリガンドも予想され、一般に単コピー～1fmol以下の範囲である。

【0045】

所期リガンドは種々の形態（上記参照）でマトリックス層と連結することができるので、マトリックス層への添加方法は非常に多様であるとみなすべきである。しかし、リガンドを溶媒（例えば緩衝液）に溶かしてマトリックス層の表面に添加した後、連結部分の第1部分と第2部分の相互作用を介してリガンドをマトリックス層の表面又はその近傍に保持することが一般に好ましい。第2部分をリガンドと連結する方法は多数のものが当分野で公知であり、公知方法のいずれも利用できると考えられる（例えばビオチン化ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドは一般に市販されており、タンパク性試料のビオチン化キットも市販されている）。あるいは、マトリックス層が硬化する前にリガンドを溶媒（例えば緩衝液）に溶かしてマトリックス層の表面又は表面下に添加した後、硬化したマトリックス層との立体相互作用により表面又はその近傍にリガンドを保持してもよい。

30

【0046】

リガンドの量、化学種及びノ又はマトリックス層への連結方法に関係なく、各リガンドを所定位置でマトリックス層に添加すると、当分野で周知の多数の方法を使用して前記位置で抗リガンドの結合を検出できると考えられる。例えば、利用可能な検出方法としては放射性同位体検出、光学検出（例えば蛍光、ルミネセンス、吸収等）、及び電気化学的検出が挙げられる。

40

【0047】

従って、抗リガンド（即ちリガンドと結合する分子又は材料）の種類も非常に多様であるとみなすべきであり、所期リガンドとアフィニティー対を形成する全分子又は材料が考えられる。従って、所期抗リガンドとしては単分子、複数分子の複合体、ウイルス、及び原核及びノ又は真核細胞又はそのフラグメントが挙げられる。

【0048】

特に好ましい分子の例としては、薬理活性分子（例えば抗体、抗真菌剤、抗ウイルス剤、酵素阻害剤、ビタミン類、抗新生物剤、DNA又はRNA結合分子等）、ヌクレオシド

50

、ヌクレオチド、オリゴ及びポリヌクレオチド（1本鎖又は2本鎖）、糖類、脂質、アミノ酸、オリゴ及びポリペプチド（例えばサイトカイン、酵素、抗体及び抗体フラグメント）、ホルモン等が挙げられる。特に好ましい複数分子の複合体の例としては、多成分受容体、抗体（例えばIgM、IgE等）、2本鎖及び3本鎖核酸、PNA等が挙げられる。特に好ましいウイルス及びウイルスフラグメントの例としては、DNA及びRNAウイルス（例えばHBV、HCV、HIV、RSV、HSV、インフルエンザ等）が挙げられ、原核及び真核細胞の例としてはグラム陽性細菌（例えばBacillus種）、グラム陰性細菌（例えばEscherichia種）、幹細胞、癌細胞、リンパ系細胞、免疫コンピテント細胞等が挙げられる。

【0049】

10

従って、所期試料液としては抗リガンドの少なくとも1種を含む全液体が挙げられ、特に所期試料液としては体液（例えば血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、細胞溶解液等）や非体液（例えば緩衝液、処理体液等）が挙げられ、所期試料液は水性液体が好ましい。しかし、利用可能な試料液はDMSO、DMF、アルコール等の非水性液体を適宜加えてもよいとも考えられる。

【0050】

従って、所期バイオチップはリガンドと連結された多機能マトリックス層と連結された支持体を含み、多機能マトリックス層は支持体の自己蛍光、支持体の入射光吸収、支持体の電荷効果及び支持体の表面凹凸の少なくとも1種を低減し、試料液がバイオチップと接触すると、リガンドは試料液に含まれる抗リガンドと特異的に結合すると考えられる。

20

【0051】

更に、所期バイオチップは複数の第1所定位置に配置され、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、薬理活性分子、細菌細胞、真核細胞及びウイルスから構成される群から選択される類に各々属する複数の第1リガンドと、複数の第2所定位置に配置され、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、薬理活性分子、細菌細胞、真核細胞及びウイルスから構成される群から選択される類に各々属する複数の第2リガンドを含むことができ、第1リガンドの各々の類と第2リガンドの各々の類は同一ではない。本明細書で使用する「所定位置」なる用語はマトリックス層上の基準位置に対する所定位置と、マトリックス層上のリガンドの位置に対する所定位置を意味する。

【0052】

30

更に、所期バイオチップは支持体と連結されたマトリックス層と、マトリックス層に所定位置で連結された複数のリガンドを含むことができ、マトリックス層が第1の表面凹凸をもち、支持体が第2の表面凹凸をもち、第1の表面凹凸が第2の表面凹凸よりも少ない。

【0053】

更に別の側面では、所期バイオチップはマトリックス層で少なくとも部分的に覆われた支持体を含むことができ、リガンドを液体に加えてマトリックス層に添加すると、リガンドは液体からマトリックス層に結合し、リガンドをマトリックス層に添加すると、マトリックス層は実質的に円形のリガンド堆積領域を形成するに十分に電荷効果を低減する。

【0054】

40

更に別の側面では、所期バイオチップはマトリックス層と少なくとも部分的に連結された支持体を含むことができ、マトリックス層は更に複数の所定位置で複数のリガンドと連結されており、試料液がバイオチップと接触すると複数のリガンドの少なくとも1個は試料液に含まれる抗リガンドと結合する。

【0055】

以下、実施例により本発明の目的に係るバイオチップの1例の製造を説明する。しかし、本明細書に記載する発明の概念から逸脱せず多数の変形が可能であるとみなすべきである。

【実施例1】**【0056】**

50

マトリックスコーティングとフルオロフォア検出

Dupont Corporation (Dupont Corp., カタログ番号 P4C1A) からゼラチンコーティング付きの光学的に純粋な厚み 100 ミクロンの Mylar を入手した。後述するようにアガロースの水溶液を調製した。Cy3 マーカー (NEN Life Sciences) を溶液に加え、よく混合して均質懸濁液とした。後述するように Leneta Wire-Cator (BYK-Gardner Corporation) を使用して Cy3 - アガロース溶液をキャリアーに均一に塗布した。塗膜を放冷させた。Bio-Rad MRC-104 共焦点顕微鏡と Omnicrome 643 100 Kr-Ar レーザー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) を使用して被覆キャリアーの多重 200 ミクロン領域を 550 nm 波長で順次励振した。顕微鏡は 570 nm の検出 (発光) 波長でマトリックスの表面の各 200 ミクロン領域に画像を検出した。本実施例の結果、親水性介在層により片側が親水性になった疎水性ポリマー支持体に水性マトリックスが付着することが判明した。更に、本実施例の結果、親水性介在マトリックス層は蛍光マーカーの蛍光検出を妨げないことも判明した。

10

【実施例 2】

【0057】

遮光剤の濃度

遮光剤として酸化鉄 6 g を加えた 2% アガロース水溶液を後述するように調製した。実施例 1 からの Cy3 - アガロースを被覆したキャリアーを実施例 1 からの支持体に被覆し、酸化鉄 - アガロース溶液の 200 ミクロン層を作成し、放冷させた。実施例 1 と同一手順を使用し、マトリックスの表面の各 200 ミクロン領域で画像を検出した。実施例 1 の共焦点顕微鏡を使用してマトリックスの表面に画像が検出されなくなるまで同一支持体で酸化鉄 - アガロースコーティング段階を 5 回繰返した。Cy3 画像を完全に遮断した酸化鉄の合計濃度に基づき、キャリアーを光学的に不活性にするために (即ち支持体からの自己蛍光又は支持体の入射光吸収を抑制するために) 必要な遮光剤の量を確認した。当業者は上記手順を使用してキャリアーを光学的に不活性にするために必要な任意遮光剤の量を決定できると理解すべきである。従って、本実施例はキャリアーを光学的に不活性にするために必要な自己蛍光又は入射光吸収を低減する物質の量の測定方法を実証するものである。

20

30

【実施例 3】

【0058】

単マトリックス層構成

実施例 2 で確認した濃度の酸化鉄 - アガロース溶液の単層を使用して実施例 2 の手順を繰返した。実施例 1 の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、Cy3 画像はやはり完全に遮断された。本実施例はキャリアーを光学的に不活性にするために必要な遮光剤の合計量を 1 回のコーティングで添加できることを実証するものである。

【実施例 4】

【0059】

リガンドとマトリックスの連結

2.25 重量% ストレプトアビジンを加えた 2 重量% アガロース水溶液を後述するように調製した。次に実施例 1 からの支持体の片面にストレプトアビジンアガロース溶液を塗布した。次にオリゴ A (NEN Life Science Products) のアリコート水性緩衝液に加えて完全マトリックスの表面に堆積させ、ビオチン - ストレプトアビジン相互作用によりマトリックスと架橋させた。実施例 1 の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、マトリックスの表面の各 200 ミクロン領域に画像が検出された。本実施例の結果、一部がリガンドに連結され、別の部分がマトリックスに連結された (ここでは埋め込んだ) 連結部分を使用してリガンドをマトリックスと連結できることが判明した。

40

【0060】

オリゴ A - 5' 位をビオチン化し、3' 位を Cy3 標識した配列番号 1。

50

【 0 0 6 1 】

【 化 1 】

配列番号 1 = 5'-AAT CCA GAT ATA GTC ATC TAG CAA TAC A-3'

【 実施例 5 】

【 0 0 6 2 】

リガンドとマトリックスの付着

実施例 4 の手順を繰返した。但し、オリゴ A の添加後に被覆支持体を脱イオン水で繰返し洗浄し、感知エレメントがマトリックスの表面にほぼ不可逆的に結合されていることを確認した。実施例 1 の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、マトリックスの表面の各 200 ミクロン領域に画像が検出された。本実施例の結果、連結部分を介してリガンドをマトリックスと連結すると、後に脱イオン水で洗浄しても影響ないことが判明した。

10

【 実施例 6 】

【 0 0 6 3 】

遮光剤

実施例 4 からのストレプトアビジンを加えたアガロース水溶液を実施例 1 の支持体の片面に塗布した。次に、実施例 3 からの遮光剤アガロース溶液を初期マトリックスコーティングの上に塗布した。実施例 1 の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、画像は検出されなかった。本実施例の結果、架橋剤を加えたマトリックスに遮光剤を堆積させるとキャリアは光学的に不活性になることが判明した。

20

【 実施例 7 】

【 0 0 6 4 】

遮光剤と連結部分を含むマトリックス層

N u F I X (登録商標)として市販されているアルデヒド活性化アガロースにストレプトアビジンを加えた溶液を後述するよう調製した。実施例 6 の手順を繰返した。次に、遮光剤を加えたマトリックス層に N u F I X (登録商標)溶液を塗布し、放冷させた。実施例 1 の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、画像は検出されなかった。本実施例の結果、遮光剤を加えたマトリックス層に架橋剤を加えたマトリックス層を堆積しても遮光剤がキャリアを光学的に不活性にする能力に影響ないことが判明した。

30

【 実施例 8 】

【 0 0 6 5 】

マトリックス層に架橋した標識リガンド

実施例 7 の手順を繰返した。次に、マトリックス層の表面に実施例 4 からのオリゴ A のアリコートに堆積し、放冷させた。実施例 1 の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、マトリックスの表面の各 200 ミクロン領域に画像が検出された。本実施例の結果、蛍光標識リガンドは遮光剤を加えたマトリックス層の上面に結合すると検出可能な蛍光シグナルを発生することが判明した。

【 実施例 9 】

【 0 0 6 6 】

未標識リガンドは画像を生じない

オリゴ B (N E N L i f e S c i e n c e P r o d u c t s) を使用して実施例 7 の手順を繰返した。実施例 1 の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、画像は検出されなかった。本実施例の結果、マトリックス層の表面に連結された未標識リガンドは比色シグナルを発生しないことが判明した。

40

【 0 0 6 7 】

オリゴ B - 5' 位をピオチン化し、3' 位を標識していない配列番号 1。

【 0 0 6 8 】

【化2】

配列番号1 = 5'-AAT CCA GAT ATA GTC ATC TAG CAA TAC A-3'

【実施例10】

【0069】

マトリックス層に結合されたりガンドに結合された抗リガンドの検出

実施例9の手順を繰返した。オリゴBに部分的に相補的なオリゴC (NEN Life Science Products) のアリコートマトリックスの表面に堆積させ、オリゴBとハイブリダイズさせた。この実験を3回反復し、オリゴCを4時間、8時間及び一晩ハイブリダイズさせた。実施例1の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、マトリックスの表面の各200ミクロン領域に画像が検出された。本実施例の結果、マトリックスの表面に結合されたりガンドにハイブリダイズする蛍光標識抗リガンド(例えば核酸)は蛍光シグナルを発生することが判明した。

10

【0070】

オリゴB - 5'位をピオチン化し、3'位を標識していない配列番号1。

【0071】

オリゴC - 3'位をCy3標識した配列番号2。

【0072】

【化3】

20

配列番号1 = 5'-AAT CCA GAT ATA GTC ATC TAG CAA TAC A-3'

配列番号2 = 5'-TTA GCT CGA CTC AGG GAT CCG GAT TGT ATT GCT
AGA-3'

【実施例11】

【0073】

バイオチップの形成

TeleChem International, Inc., Sunnyvale, Californiaから210ミクロンピンを入手した。ピンスポッターの重量が堆積されるオリゴの量を決定するような対応する4点金属スポットティングブロックを現地金属加工店で加工してもらった。実施例7の手順を繰返した。次に実施例9からのオリゴBをマトリックスの表面の2点にスポットした。実施例1の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、画像は検出されなかった。次に、デバイスを脱イオン水で洗浄し、共焦点顕微鏡でもう一度試験した。画像は検出されなかった。本実施例の結果、マトリックスの表面にスポットした未標識核酸リガンドは蛍光シグナルを発生しないことが判明した。

30

【実施例12】

【0074】

バイオチップのハイブリダイゼーションアッセイ

実施例11の手順を繰返した。次に、オリゴC (NEN Life Science Products) のアリコートマトリックスの表面に堆積させ、オリゴBとハイブリダイズさせ、マトリックスの表面にスポットした。脱イオン水で洗浄後、実施例1の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、マトリックスの表面に2つの別個のスポット画像が検出された。最後に、ストレイ・ライトをマトリックスの下面に接触させ、共焦点顕微鏡でもう一度試験した。ストレイ・ライトは検出画像に悪影響を生じなかった。

40

【0075】

本実施例の結果、マトリックスの表面に結合されたりガンドは操作中に固定したままでマトリックスの表面上を移動しないことが判明した。更に、本実施例の結果、上面以外の表面からデバイスに入射するストレイ・ライトは遮光剤がキャリアーを光学的に不活性に

50

する能力に影響しないことも判明した。

【実施例 13】

【0076】

バイオチップで実施した核酸サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ

本発明のバイオチップで標準核酸サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイを実施した。実施例 11 の手順を繰返した。オリゴ E (NEN Life Science Products) のアリコートマトリックスの表面に堆積させ、オリゴ B とハイブリダイズさせ、マトリックスの表面にスポットした。脱イオン水で洗浄後、オリゴ F のアリコートマトリックスの表面に堆積させ、オリゴ E とハイブリダイズさせた。脱イオン水で洗浄後、実施例 1 の共焦点顕微鏡とレーザーを使用した処、マトリックスの表面に 2 つの別個のスポット画像が検出された。核酸サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイの詳細な説明については、当業者は Sambrook, J. ら, vol. 1 - 3, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989 を参照できる。

10

【0077】

オリゴ B - 5' 位をビオチン化し、3' 位を標識していない配列番号 1。

【0078】

オリゴ E - 3' 位を標識していない配列番号 2。

【0079】

オリゴ F - 3' 位を Cy 3 標識した配列番号 3。

20

【0080】

【化 4】

配列番号 1 = 5'-AAT CCA GAT ATA GTC ATC TAG CAA TAC A-3'

配列番号 2 = 5'-TTA GCT CGA CTC AGG GAT CCG GAT TGT ATT GCT
AGA-3'

配列番号 3 = 5'-ATC CGG ATC CCT-3'

30

【実施例 14】

【0081】

IL - 2 のサンドイッチイムノアッセイ

当分野で周知のプロトコールを使用して市販捕獲抗体 (例えば抗 IL - 2) をビオチンに結合し、Pix Sys 3500 分配ワークステーション (Cartesian Technologies, CA) を使用してビオチン化抗体をストレプトアビジン被覆マトリックスに転写した。抗体スポットをマトリックス上で室温で 15 分間インキュベートし、0.1% Tween - 20 と 0.01% アジ化ナトリウムを加えた 0.1 M Tris 緩衝液 (pH 7.6) を使用して 3 回洗浄した。インターロイキン - 2 (10 ng/ml) 100 μl をマイクロアレーに分配し、アッセイを 45 分間室温でインキュベートした。IL - 2 インキュベーション後に Cy - 5 標識抗体 (抗 IL - 2) 溶液 100 μl を加え、アッセイを 45 分間室温でインキュベートした。0.1% Tween - 20 と 0.01% アジ化ナトリウムを加えた 0.1 M Tris 緩衝液 (pH 7.6) を使用してマイクロアレーを 3 回洗浄した。圧縮空気を使用してスポットを乾燥し、Scan Array 5000 XL (Packard Bioscience, MA) を使用して 10 ミクロン分解能で走査した。全スポットは実質的に同一の蛍光強度を示した。

40

【0082】

マトリックスの堆積又はコーティング

マトリックス層を支持体上に堆積させる方法の 1 例は、マトリックスコーティングとして使用するのに適した溶融材料をキャリアーに迅速に分配する。溶液が支持体の表面に広

50

がる直後に *Leneta Wire-Cator* 又は1平方メートル当たり規定容量を放吐出することが可能なフィルムアプリアクターをキャリアーに適用し、液状マトリックス材料を支持体の表面に均一に広げる。このようなコーティングアプリアクターは *BYK Gardner Corporation* から市販されている。マトリックス層が乾燥するまで被覆支持体を室温に維持する。

【0083】

第1マトリックス層

ビーカーに入れた水約1.5リットルを約60℃になるまで加熱し、1リットルメスシリンダーに注入する。1平方メートル当たり50mlを吐出することが可能な巻線コーティングロッドをシリンダーに入れて暖める。5.25インチゼラチン被覆 *mylar* (ポリエステル) キャリヤー1枚を長さ約20インチに切断し、実験台等の平坦な表面に一方の短辺を貼付ける。親水性側(ゼラチン被覆側)を表にする。スパチュラを使用し、円錐遠心分離機/培養管に2%アガロース10gを配量する。緩衝液A 10mlを加える。管に緩く栓をして電子レンジに入れ、溶解するまで20秒ずつ強で加熱する。管を沸騰させないように注意する。迅速に操作し、巻線ロッドを温水から取出し、ペーパータオルで乾燥させる。支持体に載せる。培養管を水浴から取出し、内容物の約1/2をコーティングロッドの上から注ぐ。溶液が支持体に広がる直後にロッドを軽くつかみ、塗膜を延ばす。被覆支持体を室温で20分間放置する。その後、少なくとも2時間風乾してもよい。

10

【0084】

第2マトリックス層

ビーカーに入れた水約1.5リットルを約60℃になるまで加熱し、1リットルメスシリンダーに注入する。1平方メートル当たり200mlを排出することが可能な巻線コーティングロッドをシリンダーに入れて暖める。第1マトリックス層を堆積又は被覆した支持体を実験台等の平坦な表面にコーティング側を表にして貼付ける。スパチュラを使用し、円錐遠心分離機/培養管に2%アガロース10gと酸化鉄を配量する。緩衝液B 10mlを加える。管に緩く栓をして電子レンジに入れ、溶解するまで20秒ずつ強で加熱する。管を沸騰させないように注意する。迅速に操作し、巻線ロッドを温水から取出し、ペーパータオルで乾燥させる。被覆支持体に載せる。培養管を水浴から取出し、内容物の約1/2をコーティングロッドの上から注ぐ。溶液が被覆支持体に広がる直後にロッドを軽くつかみ、塗膜を延ばす。被覆支持体を室温で20分間放置する。その後、少なくとも2時間風乾してもよい。

20

30

【0085】

第3マトリックス層

NuFIX (登録商標) 20gを2リットルビーカーに配量する。脱イオン水1リットルを加え、ホットプレートに載せてゆっくりと沸騰させる。アガロース全体が完全に溶解するまでガラスロッドでときどき攪拌する。熱を止め、塵が入らないようにビーカーにアルミニウムホイルをかぶせて混合物を室温まで放冷させる。硬化後にアガロースを標識すると、後期使用に備えて冷蔵庫で密閉保存することができる。

【0086】

スパチュラを使用し、円錐遠心分離機/培養管に2% *NuFIX* (登録商標) 10gを配量する。緩衝液C 2mlを加える。管に緩く栓をして電子レンジに入れ、溶解するまで20秒ずつ強で加熱する。管を沸騰させないように注意する。10ml使い捨て培養管で緩衝液C中の10mg/mlストレプトアビジン溶液3.0mlを調製する。ストレプトアビジン溶液を水浴で50℃まで暖める。ストレプトアビジン溶液を暖めた後、2.5mlを取出し、上記段階4からの管に加える。*NuFIX* (登録商標)/ストレプトアビジン溶液14.5mlを混合し、50℃水浴で2時間保温する。*NuFIX* (登録商標)/ストレプトアビジン溶液が反応する間に以下のように調製する。10ml使い捨て円錐管で1.33Mシアノホウ水素化ナトリウム1mlを緩衝液D 1mlに加え、第2の10ml使い捨て円錐管で300mMヒスチジン1.5mlを緩衝液D 20mlに加える。*NuFIX* (登録商標)/ストレプトアビジン溶液を2時間保温後、300mMヒスチジン1

40

50

．67mlを加える。よく混合し、50 に1時間保温する。1時間保温後、1.33M シアノホウ水素化ナトリウム0.29mlを加える。Tween-20を0.04g加えてよく混合し、1時間50 で反応させる。水素ガスが発生する可能性があるので管は密栓しない。管を通気させる。ビーカーに入れた水約1.5リットルを約60 になるまで加熱し、1リットルメスシリンダーに注入する。1平方メートル当たり200mlを放出することが可能な巻線コーティングロッドをシリンダーに入れて暖める。被覆支持体を実験台等の平坦な表面にコーティング側を表にして貼付ける。迅速に操作し、巻線ロッドを温水から取出し、ペーパータオルで乾燥させる。被覆支持体に載せる。培養管を水浴から取出し、内容物の約1/2をコーティングロッドの上から注ぐ。溶液がキャリアに広がる直後にロッドを軽くつかみ、塗膜を延ばす。被覆支持体を室温で20分間放置する。その後、少なくとも2時間風乾してもよい。

10

【0087】

複数のリガンドをもつアフィニティマトリックスの作製

プラットフォームの表面にリガンドを堆積させるには当分野で通常使用される方法を使用できる。リガンドは一般に好ましくは120~200 μ m間隔で約20~1000 μ mのスポット直径の液滴として堆積する。所期マトリックスは全接触及び非接触法によりスポットするのに適している。当分野で公知のスポットティング装置及び方法としてはシリンジ-ソレノイド、ソリッドピンレプリケーター、クイルスプリットピン、ピンセット、Pin-and-Ring T (登録商標)、ジェット圧電ポンプが挙げられるが、これらに限定されない。スポットティング技術の詳細な説明については、当業者は“Microarray Biochip Technology”, Mark Schena編, Eaton Publishing, Natick, MA, 2000を参照できる。

20

【0088】

所期バイオチップ上における抗リガンドとリガンドのインキュベーションは一般に抗リガンドをリガンドに特異的に結合させる条件で数秒間~数時間実施される。インキュベーション後にバイオチップを洗浄剤で洗浄してもよく、洗浄剤は緩衝液でもそうでなくてもよいし、界面活性剤を加えてもよい。

【0089】

(例えば第1マトリックス層の)2%アガロース: 乾燥アガロース20gを2リットルビーカーに配量する。脱イオン水1リットルを加え、ホットプレートに載せてゆっくりと沸騰させる。アガロース全体が完全に溶解するまでガラス攪拌ロッドでときどき攪拌する。熱を止め、塵が入らないようにビーカーにアルミニウムホイルをかぶせて混合物を室温まで放冷させる。硬化後にアガロースを標識すると、後期使用に備えて冷蔵庫で密閉保存することができる。

30

【0090】

(例えば第2マトリックス層の)酸化鉄を加えた2%アガロース(遮光剤): 乾燥アガロース20gを2リットルビーカーに配量する。脱イオン水500mlを加え、ホットプレートに載せてゆっくりと沸騰させる。アガロース全体が完全に溶解するまでガラスロッドでときどき攪拌する。酸化鉄6gを容器に配量し、完全且つ均一に分散するまで混合する。第2の2リットルビーカーで脱イオン水約750mlを約80 まで暖める。80

40

脱イオン水を加えて酸化鉄調製物の容量を1リットルにする。均一旦つ完全に分散するまで分散液を混合する。熱を止め、塵が入らないようにビーカーにアルミニウムホイルをかぶせて混合物を室温まで放冷させる。硬化後にアガロースを標識すると、後期使用に備えて冷蔵庫で密閉保存することができる。

【0091】

緩衝液A: 小攪拌棒付き250ml三角フラスコに脱イオン水100mlを加える。磁気攪拌機でゆっくりと攪拌する。0.01モルHepes遊離酸を加えて溶解させる。pHを測定し、0.5モルNaOH又は0.5モルHClを使用して7.4 \pm 0.05に調整する。Tween-20を0.02g加える。脱イオン水を使用してフラスコ内の容量を200mlにし、攪拌して内容物を完全に溶解させる。

50

【0092】

緩衝液B： 小撈拌棒付き250ml三角フラスコに脱イオン水100mlを加える。磁気撈拌機でゆっくりと撈拌する。0.01モルメタン-エタンスルホン酸(MES)を加えて完全に溶解させる。pHを測定し、0.5モルNaOH又は0.5モルHClを使用して 6.8 ± 0.05 に調整する。Tween-20を0.03g加える。脱イオン水を使用してフラスコ内の容量を200mlにし、撈拌して内容物を完全に溶解させる。

【0093】

緩衝液C： 小撈拌棒付き250ml三角フラスコに脱イオン水100mlを加え、磁気撈拌機でゆっくりと撈拌する。1.0mM第二リン酸ナトリウムを加える。pHを測定し、0.5モルNaOH又は0.5モルHClを使用して 5.8 ± 0.05 に調整する。脱イオン水を使用してフラスコ内の容量を200mlにし、撈拌して内容物を完全に溶解させる。

10

【0094】

緩衝液D： 小撈拌棒付き250ml三角フラスコに脱イオン水100mlを加え、磁気撈拌機でゆっくりと撈拌する。2.0mM第二リン酸ナトリウムを加える。pHを測定し、0.5モルNaOH又は0.5モルHClを使用して 7.0 ± 0.05 に調整する。脱イオン水を使用してフラスコ内の容量を200mlにし、撈拌して内容物を完全に溶解させる。

【0095】

以上、改良バイオチップの特定態様と適用について開示した。しかし、当業者に自明の通り、本明細書に記載する発明の概念から逸脱せずに上記以外の多数の変形が可能である。従って、本発明の主題は特許請求の範囲の趣旨以外には制限されない。更に、明細書と特許請求の範囲の解釈に当たり、全用語は文脈に合わせて可能な限り最も広義に解釈すべきである。特に、「含む」及び「含んで」なる用語は要素、成分又は段階を非排他的に表すものと解釈すべきであり、明示する要素、成分又は段階が存在していてもよいし、これらを使用してもよいし、明示しない他の要素、成分又は段階と併用してもよい。

20

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】本発明の主題に係るバイオチップの1例の概略水平断面図である。

【図2】本発明の主題に係るバイオチップの別例の概略平面図である。

30

【図3】本発明の主題に係るバイオチップの更に別例の概略水平断面図である。

【符号の説明】

【0097】

100 バイオチップ

110 支持体

120A マトリックス層

120B マトリックス層

120C マトリックス層

130 リガンド

140 抗リガンド

40

150 疎水性介在層

160 連結部分

162 第1部分

164 第2部分

200 バイオチップ

240A 第1リガンド

240B 第2リガンド

300 バイオチップ

310 凹凸支持体

310-S 凹凸面

50

- 3 2 0 A 第3マトリックス層
- 3 2 0 B 第2マトリックス層
- 3 2 0 C 第1マトリックス層
- 3 4 0 抗リガンド。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Autogenomics, Inc.		
Kureshi, Fareed		
<120> Improved Biochip		10
<130> 788.05-PCT		
<160> 3		
<170> PatentIn version 3.1		
<210> 1		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 1		
aatccagata tagtcatcta gcaatac	27	20
<210> 2		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 2		
ttagctcgac tcagggatcc ggattgtatt gctaga	36	
<210> 3		
<211> 12		
<212> DNA		
<213> Synthetic Oligonucleotide		30
<400> 3		
atccggatcc ct	12	

【 図 1 】

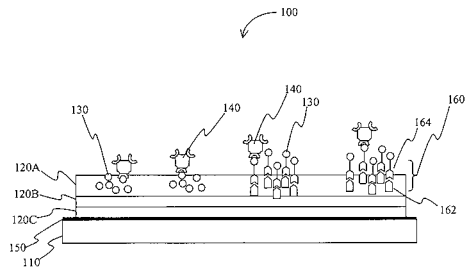


Figure 1

【 図 2 】

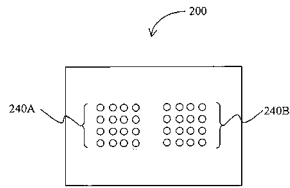


Figure 2

【 図 3 】

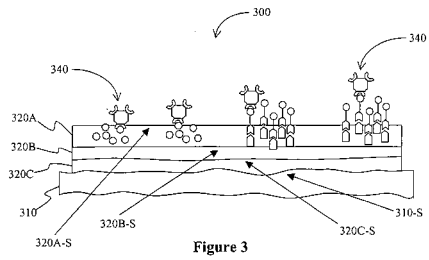


Figure 3

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/548	Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/551	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		C 1 2 M 1/00	A
		C 1 2 N 15/00	Z N A F
		G 0 1 N 37/00	1 0 2

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 マハント, ビジヤイ

アメリカ合衆国、カルフォルニア・9 2 5 6 2、ムリエタ、ワイルド・マスタング・ロード・4 2
2 9 9

(72)発明者 クレシヤイ, ファリード

アメリカ合衆国、カルフォルニア・9 2 0 1 4、デル・マー、パイナール・プレイス・2 1 3 2

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 国際公開第00/037934(WO, A1)

特開平06-174719(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

G01N 33/543

G01N 33/545

G01N 33/548

G01N 33/551

G01N 33/566

C12M 1/00

C12N 15/09

G01N 37/00

专利名称(译)	改进生物芯片		
公开(公告)号	JP3974528B2	公开(公告)日	2007-09-12
申请号	JP2002558470	申请日	2001-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	欧封闭ENO混合股份有限公司忘川每次		
申请(专利权)人(译)	欧封闭ENO搭配, Incorporated的Rete算法每次		
当前申请(专利权)人(译)	欧封闭ENO搭配, Incorporated的Rete算法每次		
[标]发明人	マハントビジヤイ クレシヤイフアリード		
发明人	マハント,ビジヤイ クレシヤイ,フアリード		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/548 G01N33/551 G01N33/566 C12M1/00 C12N15/09 G01N37/00 C40B40/06 C40B40/10 C40B40/12 G01N33/542		
CPC分类号	G01N33/542 B01J2219/00497 B01J2219/00527 B01J2219/00605 B01J2219/0061 B01J2219/0063 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/0072 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01J2219 /00731 C40B40/06 C40B40/10 C40B40/12 G01N33/54366		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/53.U G01N33/543.525.C G01N33/543.525.U G01N33/545.Z G01N33/548.Z G01N33/551 G01N33/566 C12M1/00.A C12N15/00.ZNA.F G01N37/00.102		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	09/735402 2000-12-12 US		
其他公开文献	JP2004523749A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

改进的生物芯片包括与载体偶联的基质层, 其中基质层包括在多个预定位置的多个配体, 并且配体与包含在样品溶液中的抗配体结合。优选的基质层是多功能基质层, 其减少支持自发荧光, 入射光吸收, 电荷效应和/或表面不规则性, 并且所需的生物芯片可包括另外的基质层。预期的生物芯片可用于检测和/或定量各种抗配体, 包括多肽, 多核苷酸, 碳水化合物, 药理活性分子, 细菌或真核细胞和/或病毒。

【图3】

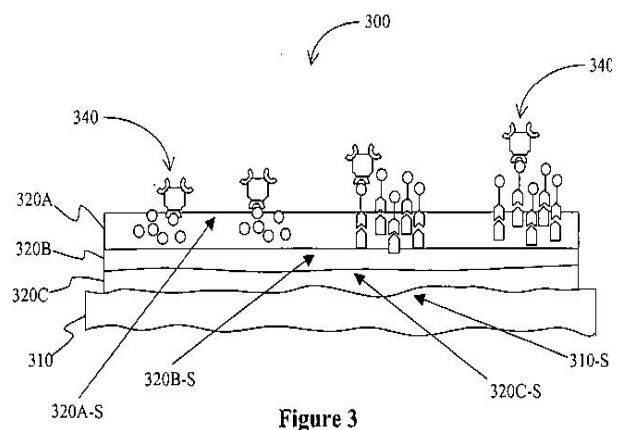


Figure 3