

(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2007-528692

(P2007-528692A)

(43) 公表日 平成19年10月18日(2007.10.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	2G059
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	4B024
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 595	4B029
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	4B063
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 37/00 102	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2005-500431 (P2005-500431)	(71) 出願人 503381741 メイバン・テクノロジーズ・エルエルシー アメリカ合衆国カリフォルニア州91107 7・パサデナ・スイート3・ノースシエラ マドレ 145 145 N. Sierra Madre , Suite 3, Pasadena, CA 91107 U. S. A.
(86) (22) 出願日 平成15年5月28日 (2003. 5. 28)	(74) 代理人 100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日 平成18年1月24日 (2006. 1. 24)	(72) 発明者 ラスマン、ウィリアム アメリカ合衆国カリフォルニア州90035 5・ロスアンゼルス・ピコブールバード 9911
(86) 国際出願番号 PCT/US2003/017137	
(87) 国際公開番号 W02004/106357	
(87) 国際公開日 平成16年12月9日 (2004. 12. 9)	
(31) 優先権主張番号 10/158, 995	
(32) 優先日 平成15年5月28日 (2003. 5. 28)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子化合物を認識する方法及び装置

(57) 【要約】

【課題】 分子化合物を認識する方法を提供する。

【解決手段】 プローブ - 標的ペアに一意的に反応及び結合して質量増加をもたらす質量増強要素及び/またはエバネッセント場摂動増幅器を提供し、プローブ - 標的反応の識別性を高める。プローブ - 標的ペアはハイブリダイズされた dsDNA であり、適切な質量増強増幅器は抗二本鎖 DNA マウス IgM である。プローブ - 標的結合体に十分な配列対がある例では、適切な担体においてストレプトアビジンにより増幅されるビオチンを有している配列特異副溝結合ポリアミドを用いることができる。好適実施形態では、複数のプローブがマイクロアレイの部位に固定され、各プローブが異なる標的に特異的である。エバネッセント場の摂動を観察するための全反射を利用するオプティクスについて説明する。

【選択図】 図 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分子プローブの結合分子標的と非結合分子標的間に摂動を加える方法であって、
表面と前記表面に近接するエバネッセント場とを形成する基板を提供する過程と、
前記表面上に分子プローブを固定する過程と、
前記分子標的を含有する溶液に前記分子プローブを曝露する過程と、
前記分子標的が前記分子プローブに結合したときにのみ前記エバネッセント場に選択的に摂動を加える過程と、
前記エバネッセント場を観察する過程と、
前記エバネッセント場の摂動と前記分子標的の前記分子プローブへの結合とを相互に関連付ける過程とを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記基板が、全反射を利用して前記エバネッセント場を形成し、
前記分子プローブが、一本鎖セグメントを有する核酸を含み、
前記分子標的が、前記分子プローブの前記一本鎖セグメントとハイブリダイズしかつそれによって二本鎖セグメントを形成する傾向にある一本鎖セグメントを有する核酸を含み、
前記エバネッセント場に選択的に摂動を加える前記過程が、前記二本鎖セグメントに選択的に結合する傾向にある免疫グロブリンを含有する溶液に前記表面を曝露する過程を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記エバネッセント場に選択的に摂動を加える前記過程が、前記免疫グロブリンに選択的に結合する傾向にある物質を含有する溶液に前記表面を曝露する過程を更に含むことを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記基板が、全反射を利用して前記エバネッセント場を形成し、
前記分子プローブが、免疫グロブリンを含み、
前記分子標的が、前記免疫グロブリンに結合しかつそれによって複合体を形成する傾向にある抗原を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記エバネッセント場に選択的に摂動を加える前記過程が、前記複合体に選択的に結合する傾向にある物質を含有する溶液に前記表面を曝露する過程を更に含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記基板が、全反射を利用して前記エバネッセント場を形成し、
前記分子プローブが、一本鎖セグメントを有する核酸を含み、
前記分子標的が、前記分子プローブの前記一本鎖セグメントとハイブリダイズしかつそれによって二本鎖セグメントを形成する傾向にある一本鎖セグメントを有する核酸を含み、

前記エバネッセント場に選択的に摂動を加える前記過程が、前記二本鎖セグメントに選択的に結合する傾向にある配列特異的ポリアミドを含むような質量増幅成分を含有する混合物に前記表面を曝露する過程を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 7】

前記配列特異的ポリアミドが、ビオチン、金属ミクロスフェア、金属コロイド、ポリスチレンミクロスフェア、ナノスフェア、アビジン、ストレプトアビジン、免疫グロブリンからなる群のメンバに結合することを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫グロブリンが、二本鎖 DNA に選択的に結合する傾向にあるマウス IgM であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

50

分子プローブの結合分子標的と非結合分子標的間に摂動を加える方法であって、
 表面を形成する基板を提供する過程と、
 前記表面上に分子プローブを固定する過程と
 前記分子標的を含有する溶液に前記分子プローブを曝露する過程と、
 前記分子標的が前記分子プローブに結合されたときにのみ前記表面上で少なくとも1つの高分子量成分を選択的に凝集する過程と、
 前記表面上で前記高分子量成分を検出する過程と、
 前記高分子量成分の検出と前記分子標的の前記分子プローブへの結合とを相互に関連付ける過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項10】

前記基板が、平面スライドを含み、
 前記分子プローブが、一本鎖セグメントを有する核酸を含み、
 前記分子標的が、前記分子プローブの前記一本鎖セグメントとハイブリダイズしかつそれによって二本鎖セグメントを形成する傾向にある一本鎖セグメントを有する核酸を含み、
 前記表面上で少なくとも1つの高分子量成分を選択的に凝集する前記過程が、前記二本鎖セグメントに選択的に結合する傾向にある免疫グロブリンを含有する溶液に前記表面を露出させる過程を含むことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項11】

前記表面上で少なくとも1つの高分子量成分を選択的に凝集する前記過程が、前記免疫グロブリンに選択的に結合する傾向にある物質を含有する溶液に前記表面を曝露する過程を更に含むことを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記基板が、平面スライドを含み、
 前記分子プローブが、免疫グロブリンを含み、
 前記分子標的が、前記免疫グロブリンに結合しかつそれによって複合体を形成する傾向にある抗原を含むことを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項13】

前記表面上で少なくとも1つの高分子量成分を選択的に凝集する前記過程が、前記複合体に選択的に結合する傾向にある物質を含有する溶液に前記表面を曝露する過程を更に含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記基板が、平面スライドを含み、
 前記分子プローブが、一本鎖セグメントを有する核酸を含み、
 前記分子標的が、前記分子プローブの前記一本鎖セグメントとハイブリダイズしかつそれによって二本鎖セグメントを形成する傾向にある一本鎖セグメントを有する核酸を含み、
 前記表面上で少なくとも1つの高分子量成分を選択的に凝集する前記過程が、前記二本鎖セグメントに選択的に結合する傾向にある配列特異的ポリアミドを含む質量増幅成分を含有する混合物に前記表面を曝露する過程を含むことを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項15】

前記配列特異的ポリアミドが、ポリエチレングリコール、ビオチン、金属マイクロスフェア、金属コロイド、ポリスチレンマイクロスフェア、ナノスフェア、アビジン、ストレプトアビジン、免疫グロブリンからなる群のメンバに結合されることを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記免疫グロブリンが、二本鎖DNAに選択的に結合する傾向にあるマウスIgMであることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項17】

10

20

30

40

50

サンプルにおける作用物質を同定する方法であって、前記作用物質（標的）とその特異結合相手（プローブ）との反応により同定する該方法が、

- a. サンプルプローブ物質を基板に適用する過程と、
- b. 前記プローブ物質を標的物質に曝露する過程と、
- c. 前記プローブ物質と前記標的物質との結合体に特異的に結合するような質量増幅器物質を適用する過程とを含み、

これによって、前記プローブ - 標的結合体の部位に前記質量増幅器物質を結合させ、前記プローブ - 標的結合部位に実質的により大きな構造を形成させて、検出機器による認識を容易にすることを特徴とする方法。

【請求項 18】

10

前記プローブ物質がオリゴヌクレオチドであり、

前記標的物質が前記プローブ物質に相補的なオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記質量増幅器物質が抗二本鎖 DNA マウス Ig M であることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記質量増幅器物質がマイクロスフェアに結合されることを特徴とする請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

20

前記質量増幅器物質を加える前記過程の前に、ビオチンに結合された ds DNA 配列特異的副溝結合分子を加える追加過程を含むことを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

標的 - プローブ - 増幅器の結合体に二次増幅器物質を適用してより大きな結合体を与える追加過程を含むことを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

二次増幅器物質としてヤギ抗マウス Ig M Ig G を適用する追加過程を含むことを特徴とする請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

質量増幅器物質としてストレプトアビジンを適用する追加過程を含むことを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記プローブ物質が非ヒト Ig G であり、

前記標的物質がヒト Ig G であり、

前記質量増幅器物質が非ヒト抗ヒト Ig G Ig G であることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 26】

前記プローブ物質が非ヒト Ig G であり、

前記標的物質がヒト Ig G であり、

前記質量増幅器物質非ヒト抗ヒト Ig G Ig M であることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 27】

生体活性物質（抗原）を同定するためのバイオアッセイ法であって、

a. 前記生体活性物質（抗原）のプローブ（抗体）を基板に固定する過程と、

b. 前記プローブ（抗体）の部位で前記生体活性物質（抗原）を前記基板に適用し、前記抗原と前記抗体の反応複合体を形成する過程と、

c. 前記抗原と前記抗体の前記反応複合体への親和性を有する前記生体活性物質（抗原）または前記プローブ（抗体）のいずれかがより実質的に大きな容積及び質量の増幅複合体（一次増幅抗体）を適用する過程とを含み、

これによって、前記生体活性物質と前記プローブの前記反応複合体の部位に前記増幅複

50

合体を結合させ、前記反応複合体の質量及び容積より実質的に大きな質量及び容積の凝集体構造が得られるようにすることを特徴とする方法。

【請求項 28】

前記生体活性物質（抗体）または前記増幅複合体（一次増幅抗原）のいずれかより実質的に大きな容積及び質量の第 2 の増幅複合体（二次増幅抗原）を適用する過程を更に含み、

前記第 2 の増幅複合体（二次増幅抗体）が、前記反応結合体及び前記複合体（一次増幅抗体）に結合し、前記反応複合体の前記部位で前記質量及び容積を更に増加させることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

未知標的物質を同定する装置であって、

10

a. 第 1 の表面を有する担体と、

b. 同定可能なサブセットに配列された特定の標的物質に各プローブが特異的であるような複数のプローブと、

c. プローブ-標的相互作用の部位に複数のプローブ-標的-質量増強増幅器複合体を形成する複数の質量増強増幅器物質とを含み、

これによって、特定のプローブ部位におけるプローブ-標的相互作用の存在により前記標的物質の同一性が示されるようにすることを特徴とする装置。

【請求項 30】

未知標的物質を同定する装置であって、

a. 平面表面を有する担体と、

20

b. 各プローブが異なる標的と既知反応を示すような、前記表面に固定されたプローブのアレイと、

c. 前記プローブとそれぞれ対応する標的との結合体に対する既知の一意的な誘引力を有する質量増強増幅器物質とを併有し、

これによって、前記プローブの前記アレイの 1 プローブに反応する未知標的物質と前記質量増強増幅器物質を結合させ、容易に識別可能な質量増強された反応産物を前記反応部位に創製することで前記アレイ内の前記反応部位の位置によって未知標的物質を一意的に同定するようにすることを特徴とする装置。

【請求項 31】

前記担体がスライドグラスであることを特徴とする請求項 30 に記載の装置。

30

【請求項 32】

第 1 の屈折率を有しかつその表面からの全反射を形成する透過手段を含む光学式読取装置を更に含み、

前記担体が、前記全反射表面に近接する第 2 の表面を有することを特徴とする請求項 30 に記載の装置。

【請求項 33】

前記担体が、前記光学式読取装置の屈折率と同じであるように選択された屈折率を有することを特徴とする請求項 30 に記載の装置。

【請求項 34】

前記プローブが、オリゴヌクレオチド、一本鎖 DNA (ssDNA)、非ヒト IgG、ポリマー、DNA と RNA のハイブリッド、ロックされた核酸、多糖、タンパク質を含むクラスから選択され、

40

前記標的が、前記プローブへの一意的な親和性を有する物質のクラスから選択され、

前記質量増強質量増幅器物質が、プローブ-標的結合体への一意的な親和性を有する物質のクラス、即ち、抗二本鎖 DNA マウス IgM、ミクロスフェアに結合された抗二本鎖 DNA マウス IgM、ビオチンに結合された配列探知物質ポリアミド、ポリエチレングリコールに結合された配列探知物質、抗二本鎖 DNA マウス IgM に結合された配列探知物質ポリアミド、ミクロスフェアに結合された配列探知物質ポリアミド、抗 DNA と RNA のハイブリッドマウス IgG、非ヒト抗ヒト IgG、非ヒト抗ヒト IgG, IgGM から選択され、

50

それぞれの組合せにおけるプローブと標的の結合体が、前記クラスから選択される質量増強増幅器物質に一意的な誘引力を有するようなプローブ-標的ペアの産出を可能にしていることを特徴とする請求項30に記載の装置。

【請求項35】

未知標的物質を同定する方法であって、

a. 各プローブが異なる標的物質に特異的であるようなプローブのアレイを固定する過程と、

b. 前記アレイに未知標的物質を適用して少なくとも1つのプローブ-標的ペアを形成する過程と、

c. 形成された任意のプローブ-標的ペアに結合するように適合させた質量増強増幅器物質を適用する過程とを含み、

これによって、プローブ-標的ペアのみに接着する前記質量増強増幅器物質との結合体により、形成された任意のプローブ-標的ペアの検出をより容易にすることを特徴とする方法。

10

【請求項36】

前記質量増強増幅器物質が接着されている形成されたプローブ-標的ペアに結合するように適合させた二次質量増強増幅器物質を適用し、検出装置によってより容易に同定されるような著しく大きなプローブ-標的部位を与える過程を更に含むことを特徴とする請求項35に記載の方法。

【請求項37】

生体活性物質(抗体)を同定するバイオアッセイ法であって、

a. 前記生体活性物質(抗体)のプローブ(抗原)を基板に固定する過程と、

b. 生体活性物質(抗体)を前記基板に前記プローブ(抗原)の部位で適用して前記抗原と前記抗体との反応複合体を形成する過程と、

c. 前記抗原と前記抗体との前記反応複合体への親和性を有する前記生体活性物質(抗体)または前記プローブ(抗原)のいずれかより実質的に大きな容積及び質量の増幅複合体(一次増幅抗原)を適用する過程とを含み、

これによって、前記生体活性物質と前記プローブの前記反応複合体の部位に前記増幅複合体を結合させ、前記反応複合体の質量及び容積より実質的に大きな質量及び容積の凝集体構造が得られるようにすることを特徴とする方法。

20

30

【請求項38】

前記生体活性物質(抗体)または前記増幅複合体(一次増幅抗原)のいずれかより実質的に大きな容積及び質量の第2の増幅複合体(二次増幅抗原)を適用する過程を更に含み、

前記第2の増幅複合体(二次増幅抗原)が前記反応した結合体及び前記複合体(一次増幅抗原)に結合し、前記反応複合体の前記部位で前記質量及び容積を更に増加させることを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記二次増幅器物質に特異的な免疫グロブリンを三次増幅器物質として適用する追加過程を含むことを特徴とする請求項22に記載の方法。

【請求項40】

前記三次増幅器物質がIgMを含むことを特徴とする請求項39に記載の方法。

40

【請求項41】

ストレプトアビジンへの親和性を有する分子を三次増幅器物質として適用する追加過程を含むことを特徴とする請求項24に記載の方法。

【請求項42】

装置であって、

a. 第1の表面を有するスライドと、

b. 前記表面上に固定されたDNAセグメント(オリゴマー)のアレイと、

c. 二本鎖のハイブリダイズされた複合体をそこに形成するために前記オリゴマーに結合されたマッキングDNAセグメントと、

50

d. 前記ハイブリダイズされた複合体に接着された I g M 分子とを含むことを特徴とする装置。

【請求項 4 3】

前記 I g M 分子が、蛍光ラベルされた分子であることを特徴とする請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 4 4】

前記 I g M 分子が、磁氣的にラベルされた分子であることを特徴とする請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 4 5】

前記 I g M 分子が、色でラベルされた分子であることを特徴とする請求項 4 2 に記載の装置。 10

【請求項 4 6】

前記 I g M 分子が、電氣的透過性が高い分子によりラベルされることを特徴とする請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 4 7】

前記アレイが複数のサブアレイを含み、

前記各サブアレイには異なる DNA オリゴマーが固定され、

前記複数のサブアレイの少なくとも 1 つのサブアレイのオリゴマーには異なる DNA マッチングセグメントが結合され、そこで二本鎖のハイブリダイズされた複合体が形成され、

前記装置が、前記複数のサブアレイの前記少なくとも 1 つのサブアレイのハイブリダイズされた複合体にのみ接着された I g M 分子を更に含むことを特徴とする請求項 4 2 に記載の装置。 20

【請求項 4 8】

前記アレイが複数のサブアレイを含み、

前記各サブアレイには異なる DNA オリゴマーが固定され、

前記複数のサブアレイの少なくとも 1 つのサブアレイのオリゴマーには異なる DNA マッチングセグメントが結合され、そこで二本鎖のハイブリダイズされた複合体が形成され、

前記装置が、前記複数のサブアレイの前記少なくとも 1 つのサブアレイのハイブリダイズされた複合体にのみ接着された I g M 分子を更に含むことを特徴とする請求項 4 3 に記載の装置。 30

【請求項 4 9】

前記アレイが複数のサブアレイを含み、

前記各サブアレイには異なる DNA オリゴマーが固定され、

前記複数のサブアレイの少なくとも 1 つのサブアレイのオリゴマーには異なる DNA マッチングセグメントが結合され、そこで二本鎖のハイブリダイズされた複合体が形成され、

前記装置が、前記複数のサブアレイの前記少なくとも 1 つのサブアレイの前記ハイブリダイズされた複合体にのみ接着された I g M 分子を更に含むことを特徴とする請求項 4 4 に記載の装置。 40

【請求項 5 0】

前記アレイが複数のサブアレイを含み、

前記各サブアレイには異なる DNA オリゴマーが固定され、

前記複数のサブアレイの少なくとも 1 つのサブアレイのオリゴマーには異なる DNA マッチングセグメントが結合され、そこで二本鎖のハイブリダイズされた複合体が形成され、

前記装置が、前記複数のサブアレイの前記少なくとも 1 つのサブアレイの前記ハイブリダイズされた複合体にのみ接着された I g M 分子を更に含むことを特徴とする請求項 4 5 に記載の装置。 50

【請求項 5 1】

前記アレイが複数のサブアレイを含み、

前記各サブアレイには異なる DNA オリゴマーが固定され、

前記複数のサブアレイの少なくとも 1 つのサブアレイのオリゴマーには異なる DNA マatching セグメントが結合され、そこで二本鎖のハイブリダイズされた複合体が形成され、

前記装置が、前記複数のサブアレイの前記少なくとも 1 つのサブアレイの前記ハイブリダイズされた複合体にのみ接着された Ig M 分子を更に含むことを特徴とする請求項 4 6 に記載の装置。

【請求項 5 2】

作用物質（標的）とその特異結合相手（プローブ）との反応によりサンプルにおける作用物質を同定する方法であって、

前記プローブが DNA セグメント（オリゴマー）であり、

前記標的が前記プローブによりハイブリダイズされた（二本鎖）複合体を形成可能なマatching DNA セグメントであり、

前記方法が、

a . DNA セグメント（プローブ）を担体上に固定する過程と、

b . 適用された標的に前記プローブを曝露し、ハイブリダイズされた複合体を形成する過程と、

c . ハイブリダイズされた複合体にのみ接着する能力で選択された Ig M 分子を適用する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 5 3】

前記 Ig M 分子が、蛍光ラベルされた分子であることを特徴とする請求項 5 2 に記載の装置。

【請求項 5 4】

前記 Ig M 分子が、磁氣的にラベルされた分子であることを特徴とする請求項 5 2 に記載の装置。

【請求項 5 5】

前記 Ig M 分子が、色でラベルされた分子であることを特徴とする請求項 5 2 に記載の装置。

【請求項 5 6】

前記 Ig M 分子が、電氣的透過性が高い分子によりラベルされることを特徴とする請求項 5 2 に記載の装置。

【請求項 5 7】

前記分子プローブが、ロックされた核酸を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記基板が、全反射を利用して前記エバネッセント場を形成し、

前記分子プローブが、一本鎖セグメントを有する核酸を含み、

前記分子標的が、前記分子プローブの前記一本鎖セグメントとハイブリダイズしかつそれによって二本鎖セグメントを形成する傾向にある一本鎖セグメントを有する核酸を含み、

前記エバネッセント場に選択的に摂動を加える前記過程が、前記二本鎖セグメントに選択的に結合する傾向にある分子を含有する溶液に前記表面を曝露する過程を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記二本鎖セグメントに選択的に結合する傾向にある前記分子が、

ds DNA に特異的な Ig G、

ds DNA に特異的な Fab 断片、

ds DNA に特異的な F(ab')₂ 断片、

DNA と RNA のハイブリッドに特異的な Ig G、

10

20

30

40

50

DNAとRNAのハイブリッドに特異的なFab断片、
 DNAとRNAのハイブリッドに特異的なF(ab')₂断片、
 DNAとRNAのハイブリッドに特異的なIgG、
 DNAとLNAのハイブリッドに特異的なFab断片、
 DNAとLNAのハイブリッドに特異的なF(ab')₂断片、
 dsDNAに特異的なIgM四量体、
 dsDNAに特異的なIgM単量体、
 dsDNAに特異的なIgM Fab断片、及び
 dsDNAに特異的なIgM F(ab')₂断片

からなる群から選択された分子を含むことを特徴とする請求項58に記載の方法。

10

【請求項60】

前記基板が、全反射を利用して前記エバネッセント場を形成し、

前記分子プローブが多糖を含み、

前記分子標的が、前記分子プローブに結合しかつそれによって複合体を形成する傾向にある免疫グロブリンを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項61】

前記エバネッセント場に選択的に摂動を加える前記過程が、前記複合体に選択的に結合する傾向にある物質を含有する溶液に前記表面を曝露する過程を更に含むことを特徴とする請求項60に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子の相互作用を定性的及び定量的に検出する方法及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

先行技術及び本発明の説明に先立ち、明細書中で使用される語句の用語について解説しておく。「プローブ」は、固定されているか或いは自由に動くことができるかいずれかである既知の実体(entity)を意味する。「標的」または「リガンド」は、ある特定のプローブと特定の相補的または反応的關係を有することが分かっている「未知の」実体である。プローブと標的とが結合したもの(プローブ-標的複合体)は、「複合体」または「ペア」と呼ばれることもある。

30

【0003】

「一次増幅器(primary amplifier)」または「質量増強装置(mass enhancing unit)」は、ペアと、またはペアに結合するリンク要素と相互に作用するか或いは結合する「嵩のある(bulky)」実体である。「二次増幅器」は、一次増幅器と相互に作用し、或いは一次増幅器-プローブ-標的ペア複合体の結合体と相互に作用して、新たな結合体を形成する。「三次増幅器」は、一次増幅器-プローブ-標的ペア複合体または増幅器と相互に作用し得る任意の逐次的な質量増強体(successive mass enhancer)である。

40

【0004】

「かさばり係数(bulk factor)」は、増幅器分子量対プローブ-標的ペア分子量の比率である。しかし、嵩(容積)または質量は、プローブ-標的ペアの認識増強において一次パラメータであるとは限らない。検出装置にとっては光学特性や電気特性など他のパラメータが重要であることもある。

【0005】

「未知」分析物を同定するためにプローブと標的の反応(プローブ-標的反応)を研究している研究者達は、一般的には「標的」化合物の標識(マーキングまたはタギング)に頼っていた。プローブと標的分子の反応が検出及びシグナリングできるからである。従来技術では、蛍光、放射性、または「有色」のタグまたはマーカを結合または接着可能なり

50

ンク化合物を使用することがあった。これらマーカの検出及びシグナリングのための技術も開発された。その結果、これらの試験では常にタギングまたはマーキング過程を含む余計な過程が必要になってしまった。

【0006】

本願出願人の同時係属の先行出願では、全反射(TIR)表面のエバネッセント場で生じる分子反応を、偏光ビーム及びエバネッセント場における変化に対応し得る追加の光学素子を利用して検出し、CCDカメラチップなどの光学検出によって認識可能な、他と区別できる表示を提供し得ることを教示している。検出装置には他にも、分光計、重量装置、サイズ除外装置、電荷質量比分離装置などがある。

【0007】

先行技術文献には、特許文献1乃至3が含まれる。これらに教示されている内容は、引用を以って本明細書の一部となす。

【0008】

これらの出願では、全反射(TIR)表面のエバネッセント場において、表面上で反応が起こる。偏光光ビームは、表面に向けられ、そこから全反射する。エバネッセント場に物質が存在すると、反射ビームの偏光特性が変わる。反応前、反応中、反応後に、得られたビームはCCDチップ/カメラなどの検出器に向けられるが、これによって、可視化しようとする全表面の可視化が可能になる。その後、反応部位は未反応部位と異なる特徴を示す。その特徴の位置がどこであるかによって、その特徴を生じさせた反応を同定することができる。

【0009】

試薬、反応領域及び非反応領域が、非常に感度の良い検出システムを必要とするほど十分に小さければ、唯一の特徴であっても検出が困難であることもある。概して、先行技術は、反応の同定ができるようにするためにタギングまたはマーキングに頼っていた。本願出願人による別の出願では、マーキングまたはタギング過程を必要とはしなかったが、反応を検出し、反応物を同定するための感度の高い技術が必要であった。

【0010】

【特許文献1】US Application Serial Number 09/614,503, filed July 7, 2000

【特許文献2】US Application Serial Number 09/838,700, filed April 19, 2001(米国特許出願公開第20020021443号)

【特許文献3】US Application Serial Number 10/046,620, filed December 12, 2002(米国特許出願公開第20020093654号)

【特許文献4】米国特許第4,508,832号

【特許文献5】米国特許第6,228,578号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明に基づけば、任意の反応の結果物であり得る複合体産物(例えば生理活性物質の場合には抗体)を用いてプローブ-標的反応を発達、増強または「増幅」することができる。それによって、得られた化合物を低感度の機器で検出することができる。或いは、より少量の標的であっても検出できるように、感度の良い機器の検出限界を効率的に下げることができる。

【0012】

例えば、「プローブ」分子があり、これが「標的」分子への独占的または特異的親和性を有するとき、両分子がプローブ-標的ペアを形成することが知られている。更に、プローブ-標的ペアのクラスまたはプローブ-標的ペアのクラスの特定のサブセットに対して一意的な誘引力または親和性を有する「増幅器」分子または化合物がある。

【0013】

核酸プローブは、相補RNAまたはDNA配列と反応してハイブリダイズし、二本鎖配列を形成することができる。ハイブリダイゼーションが生じると、二本鎖核酸物質の長さ

10

20

30

40

50

に特異的な抗体が加えられ、インキュベートされる。一般的に、抗体の分子量及び容積はプローブ及び標的と比べて何倍にもなるので、プローブ-標的結合体はより大きな、増強されたものになる。これは、より低い感度の光学系または他の系を用いても、より容易に検出される。

【0014】

特許文献4には、生物検定法と共に偏光解析法の使用に関する記載がある。特許文献4に記載されているように、生物検定または免疫検定は、生体活性物質(即ち「抗原」とその生体活性物質に特異的に結合される複合体(即ち「抗体」との反応に基づいている。本発明は、生物検定または免疫検定の実施において非常に有益であり得ると信じられている。更に、特許文献5には、DNAプローブ/RNA標的のハイブリッドへの特異親和性を有する免疫グロブリンを用いたDNAプローブ/RNA標的ハイブリッドの認識が開示されている。特許文献5は、引用を以って本明細書の一部となす。プローブ-標的-増幅器は、化学ルミネセンスを生じさせる更なるプロセッシングによって或いはハイブリッド特異免疫グロブリンに特異的に結合する蛍光二次免疫グロブリンを用いることによるのみ検出される。

10

【0015】

本発明では、ハイブリダイゼーション中またはハイブリダイゼーション後の任意の時点で検出を行うことができる。感度は、質量増幅によって増加させる。本発明の方法を示すために用いられる特定の具体例としての実施形態では、一本鎖DNA(「ssDNA」)はプローブである。各々が異なる配列を有するような、表面に付けられるプローブのマトリックスにより表面を準備することができる。各プローブ要素に対するマトリックス中のXY位置は既知である。未知標的化合物をssDNAとして準備し、プローブ物質と反応させる。プローブと標的とが相補配列を有すれば、部位で反応が生じることになり、2つの一本鎖DNAサンプルが二本鎖DNA(「dsDNA」)鎖にハイブリダイズすることになる。試験では、任意の特定のXY位置での反応により、未知物質または「標的」が一意に同定される。

20

【0016】

一次増幅抗体(amplifying antibody)は、ここで、マトリックス表面に導入される。一次増幅抗体の抗原はdsDNAである。可変領域の構造によって決定されるようなdsDNAに対する特異性で、増幅抗体を選択する。増幅抗体は、一般的に、ハイブリダイズされたペアより桁違いに大きい。IgA、IgM、IgGなど特定のクラスの抗体は全て、異なる分子構造及び質量を有し、全て容積が比較的大きい。ハイブリダイゼーションが生じた部位では、増幅抗体は、dsDNAに結合することになる。ある一定の条件下では、増幅抗体は凝集するか或いは凝集塊を生成し、プローブ-標的ペアに結合した抗体の核となり、サイズ及び容積が大きい構造となる。或いは、活性Fab断片またはF(ab')₂断片は、それぞれパepsin分解またはpepsin分解によって免疫グロブリンから分離され、より小さくかつ立体的、動力学的に好ましい認識装置を与えることができる。この場合、抗体断片のビオチン化は、アビジンまたはアビジンを含有する巨大化合物とのリンクを与えることになる。

30

【0017】

或いは、一次増幅抗体に特異的な二次増幅抗体を付加することができる。二次増幅抗体は、一次抗体に結合し、特定のXY位置でより大きな物体を創製することになる。この物体は、比較的感度が低いオプティクスなど低感度の機器で検出可能であり、マトリックス全体を可視化できるようなカメラを用いて容易に認識される。そのような凝集体または凝集塊は、いくつかの表面技術のうち特に、原子力顕微鏡による検出が可能である。これにより、高さプロファイル変化を決定することができる。

40

【0018】

別の適用例では、非ヒトIgGとヒト免疫グロブリンは、ヒト血清において抗体を検出する手段としてのプローブ-標的ペアであり、それによって人が特定の抗原に曝露されたかどうか判定する。非ヒト抗ヒト免疫グロブリン複合体に特異的またはヒト免疫グロブリン

50

ンのみに特異的である I g M を一次増幅抗体として用いるのであれば、ペアの容積は 2 . 5 倍増加し得る。更に、そのようなペアと共に使用可能な増幅抗体によって、別のプローブ - 標的ペアを同定することができる。

【 0 0 1 9 】

更に別の実施形態では、マーカの有無を問わず、ハイブリダイズされたペアまたは一次増幅抗体のいずれかに反応的な二次増幅抗体を用い、質量の違いに基づく分離プロセスを利用した技術による反応ペアの検出能力を向上させることもできる。

【 0 0 2 0 】

他の分析物と共に本発明を利用することもできる。そのような他の実施形態においては、電子顕微鏡または従来顕微鏡、比色分析、重量分析、クロマトグラフィー、及び分光法によって、結果を観察することができる。タグまたはマーカの使用が望ましければ、別の従来技術をかなり低いレベルの感度で用いることもできる。

10

【 0 0 2 1 】

従って、本発明の目的は、感度の低い技術を用いて分析結果を得ることができるような、より容易に同定される標的 - プローブ結合体を提供することである。

【 0 0 2 2 】

本発明の別の目的は、感度の良い検出機器に対してより低い検出レベルを示し得るような、より容易に同定される標的 - プローブ結合体を提供することである。本発明の更なる目的は、プローブと標的との相互作用の結果を増幅し、低感度の検出スキームの使用を可能にすることである。

20

【 0 0 2 3 】

本発明の更なる目的は、プローブと標的との相互作用の結果を増幅することによって、検出限界を低下させることである。

【 0 0 2 4 】

本発明の更に別の目的は、分子プローブ - 標的複合体に特異的な化合物を利用し、プローブ - 標的反応へのシグナル応答を「増幅」することである。

【 0 0 2 5 】

本発明の更に別の目的は、特定のプローブ - 標的反応または理想的にはプローブ - 標的 - 一次増幅器複合体に結合される一次増幅化合物に結合し得るような二次増幅化合物を利用することである。

30

【 0 0 2 6 】

本発明の特徴である新規な機能は、本発明の構造とその操作方法の両方に関して更なる目的及び利点と共に、以下の発明の詳細な説明と本発明の好適実施例を例示している添付の図面とから理解されるであろう。しかしながら、これらの図面は説明のために用いているだけであり、それによって本発明を限定する意図がないことは明確に理解されるであろう。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 7 】

一般的な先行技術の配列を図 1 に示す。ここでは、標的 1 1 が基板 1 5 に結合されたプローブ 1 3 とハイブリダイズし、同一性が確認されるような検出可能なプローブ - 標的ペア 1 7 を形成している。先行技術においては、タグまたはラベル 2 3 を有する増幅器 2 1 が結合できるような特定のリンカー 1 9 を付加することは一般的によく行われてきた。通常、標的へのリンクリガンドの付加を含む分離処理過程があれば、タグまたはラベル 2 3 が存在する。しかしながら、プローブ - 標的ペア 1 7 を検出可能にしているのは、タグまたはラベルの存在である。タグまたはラベル 2 3 に敏感な機器により、標的を一意に同定することが可能になる。

40

【 0 0 2 8 】

本発明に基づく方法及び装置の具体例としての実施形態を図 2 に示す。プローブ要素 1 2 は、場合によっては s s D N A 断片であり、基板 1 0 に結合される。好適実施例においては、基板 1 0 をスライドガラスとすることができる。

50

【0029】

引き続き図2を参照すると、プローブssDNA12と標的ssDNA14の結合体がハイブリダイズしてdsDNAペア16を形成する一連の過程が示されている。そのようなハイブリダイズされたdsDNAペア16に対して、抗体または一次増幅体30が存在する。一次増幅体30は、ハイブリダイズされたdsDNAペア16のみに結合することができ、ssDNAプローブ12または標的要素14には結合することができない。

【0030】

このようにして、プローブ-標的ペアの部位で幾分大きな構造を凝集するか或いは凝集塊を生成することが可能である。それによって、マトリックス内に唯一の大きな構造ができる。この構造は、限定されるものではないが例えば光学的、電気的、組織分布的、重量法、または他の質量摂動技術などを含む低感度の検出器によって、より容易に検出可能なものであり得る。

10

【0031】

図3は、固定されたプローブ12を有する基板10を起点として、本発明によって得られる種々の結合体の相対的なサイズの経時的な変化を示す。図中で説明しているように、プローブ標的ペア16は、基板10の表面上でナノメートルスケールでの膜厚の測定が可能である。一次増幅体30を加えると、スケールは30ナノメートル範囲まで増大するが、これは原子力顕微鏡などの感度の良いシステムにまたは本願出願人の同時係属出願の技術で検出可能である。これらの値を用いて、分光計や重量装置など他の「精細な」検出システムにより、プローブ-標的反応の証拠を見つけることができる。

20

【0032】

本発明の技術は、それに対して特定の増幅器化合物が同定され得るような任意のプローブ-標的ペアに有用である。分子ステージで比較可能な大きさのプローブと反応することができる未知物質または標的を含むどのような状態でも、この技術を適用できると信じられている。プローブ-標的結合体に結合することができる増幅物質は、同定可能である。

【0033】

例1：オリゴヌクレオチドプローブ及び標的；IgM一次増幅体

本発明の利用価値がある一分野は、表面が乾燥状態であるアルデヒド誘導体化されたガラス基板上におけるオリゴヌクレオチドプローブ-標的ペアの走査検出である。そのプロセスには、次の過程が含まれる。

30

【0034】

窒素気流を用いてスーパーアルデヒド(Superaldehyde)(テレケム・インターナショナル社(Telechem International)製)スライドを洗浄する。

【0035】

トリス-E D T A - 塩化ナトリウム緩衝液(「T E - N a C l 緩衝液」)を用いて、3'末端C6アミノ修飾30merオリゴヌクレオチドをスライド表面に斑点状に付け、これをプローブとして働かせる。

【0036】

室温(25)、相対湿度30%以下で12時間、プローブを乾燥させる。

【0037】

0.2% SDS(デシル硫酸ナトリウム)中で勢いよく攪拌して基板を2分間、2回すすぎ、未結合のオリゴヌクレオチド(DNA)を除去する。

40

【0038】

再蒸留水(ddH₂O)中で勢いよく攪拌して基板を2分間、1回すすぐ。

【0039】

窒素気流により基板を乾燥させる。

【0040】

1.5gのNaBH₄を450mlのリン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解することによって新鮮な水素化ホウ素ナトリウム溶液を調製する。10%エタノールを133ml加える。

50

- 【0041】
この溶液により基板を室温で5分間処置し、遊離アルデヒドを低減する。
- 【0042】
0.2% SDS中で基板を室温で1分間、2回すすぐ。
- 【0043】
ddH₂O中で基板を室温で1分間、1回すすぐ。
- 【0044】
窒素気流中で試料基板を乾燥させる。
- 【0045】
TE-NaCl (トリス-EDTA、1M NaCl) 緩衝液に溶解した相補オリゴヌクレオチド標的に基板を室温で12時間浸す。 10
- 【0046】
窒素気流により試料基板を乾燥させる。
- 【0047】
PBS緩衝液に溶解した抗dsDNA増幅抗体溶液に基板を室温で1時間浸す。
- 【0048】
窒素気流により試料基板を乾燥させる。
- 【0049】
試料基板はこのとき、原子力顕微鏡によって「読取」可能である。原子力顕微鏡は、ハイブリダイズされたペア及び対応する増幅器を検出することになる。 20
- 【0050】
ポリスチレンマイクロスフェアは、バングス・ラボラトリーズ (Bangs Laboratories, Inc.) (9025 Technology Drive, Fishers, IN46038-2886; www.bangslabs.com) から25nm乃至1000nmの大きさのものを誘導体化された形で入手することができる。IgGは、顧客から提供される。IgGはFc部分を介して接着されるが、可変領域は抗原への結合のために利用可能で曝露された状態にしておく。まずは100nmの球を選択するのが好ましい。光学的なプロービング方法が望ましいのであれば、所望の波長を吸収するようにマイクロスフェアを染色することができる。マイクロスフェアをヤギ抗マウスIgMに結合させ、一次増幅抗体に対する二次増幅器として働くようにすることができる。好適な方法は、次の通りである。 30
- 【0051】
例1に記載されているように、ハイブリダイズされた表面を準備し、IgMを加える。
- 【0052】
原液をPBSで10倍希釈し、希釈マイクロスフェア溶液を調製する。
- 【0053】
10マイクロリットルの希釈溶液により表面を30分間インキュベートする。
- 【0054】
PBSですすぐ。
- 【0055】
dH₂Oですすぐ (乾式読取方式を用いる場合は任意)。 40
- 【0056】
観察：少なくとも10倍のシグナル増強。
- 【0057】
市販の配列特異ポリアミド製品である配列探知物質SEQUENCE SEEKER (登録商標) を用いて二本鎖プローブ-標的ペアに結合させるのであれば、ストレプトアビジンでコーティングされたポリスチレンマイクロスフェアが好ましい (必要に応じて染色または未染色のものを選択) (SEQUENCE SEEKER (登録商標), Prolix, Inc., Bothell, WA; www.prolix.com)。
- 【0058】 50

ハイブリダイズされた表面を準備する。

【0059】

乾燥したSEQUENCE SEEKER (登録商標) を等量の無水エタノールで希釈する。

【0060】

SEQUENCE SEEKER (登録商標) をTE緩衝液にて1%質量/体積まで希釈する。超音波処理を行うと溶解が促進される。

【0061】

10マイクロリットルの溶液により30分間表面をインキュベートする。

【0062】

TE緩衝液で表面をすすぎ、未結合のSEQUENCE SEEKER (登録商標) を除去する。 10

【0063】

原液をPBSで10倍希釈し、希釈マイクロスフェア溶液を調製する。

【0064】

10マイクロリットルの希釈溶液により30分間表面をインキュベートする。

【0065】

TE緩衝液ですすぐ。

【0066】

観察：少なくとも10倍のシグナル増強。

【0067】

(乾式読取方式を用いる場合は任意で) dH₂Oですすぐ。 20

【0068】

ハイブリダイズされたDNAまたはdsDNAに結合可能である抗体の使用に加えて、市販のポリアミドがある。これは、SEQUENCE SEEKER (登録商標) (ProInx, Inc., Bothell, WA; www.proinx.com) として商業的に知られており、ビオチンなどの特定の化合物に抱合され得る。SEQUENCE SEEKER (登録商標) は、ハイブリダイズされたDNAの鎖に引き付けられる。配列に5塩基対の適切な配列が含まれる場合には、ポリアミド自体がdsDNAの副溝(minor groove)に結合することになる。

【0069】

この例では、配列探知物質は増幅器ではないが、抗体の可変領域において特定のペプチド構造に類似の「認識装置」として働き、これが特異性に関与する。ビオチンは、配列探知物質に結合してストレプトアビジンまたはストレプトアビジン結合化合物とのリンク化合物として働くが、質量増幅器としても働くことができる。好適な方法は次の通りである。 30

【0070】

乾燥したビオチン化SEQUENCE SEEKER (登録商標) を等量の無水エタノールで希釈する。

【0071】

SEQUENCE SEEKER (登録商標) をTE緩衝液にて1%質量/体積まで希釈する。超音波処理を行うと溶解が促進される。

【0072】

10マイクロリットルの溶液により30分間表面をインキュベートする。 40

【0073】

TE緩衝液で表面をすすぎ、未結合のSEQUENCE SEEKER (登録商標) を除去する。

【0074】

ストレプトアビジンを増幅器として用いる場合：

100マイクロモルのストレプトアビジン溶液をTE緩衝液にて調製する。

【0075】

10マイクロリットルの希釈溶液により10分間表面をインキュベートする。

【0076】

TE緩衝液ですすぐ。 50

【0077】

(乾式読取方式を用いる場合は任意で) d H 2 O ですすぐ。

【0078】

観察：グラフに示されている比率または表面飽和までシグナルが増大する。

【0079】

ストレプトアビジン結合マイクロスフェアを用いる場合：

原液を P B S で 1 0 倍希釈して希釈マイクロスフェア (ストレプトアビジンマイクロスフェア。Bangs Labs) 溶液を調製する。

【0080】

1 0 マイクロリットルの希釈溶液により 3 0 分間表面をインキュベートする。

10

【0081】

T E 緩衝液ですすぐ。

【0082】

(乾式読取方式を用いる場合は任意で) d H 2 O ですすぐ。

【0083】

観察：シグナルはマイクロスフェアの表面飽和点まで 5 0 倍に増大するであろう。

【0084】

一部の一次増幅体 3 0 を、プローブ - 標的ペアに結合させた一次増幅体に結合させるか或いは凝集塊生成させることができる。

【0085】

再び図 2 及び図 3 を参照すると、ハイブリダイズされたプローブ - 標的ペア 1 6 に結合される一次増幅体 3 0 に結合することができる二次増幅体 3 2 もある。次に、プローブ標的反応の部位で幾分大きな構造を凝集するか或いは凝集塊を生成することが可能である。それによって、マトリックス内に唯一の大きな構造ができる。この構造は、限定されるものではないが例えば光学的、重量法、組織分布的または他の質量摂動技術などを含む低感度の検出器によって、より容易に検出可能なものであり得る。

20

【0086】

二次増幅体 3 2 を加えると、サイズが約 2 . 5 倍増加する。好適な方法は次の通りである。

【0087】

抗体原液を P B S で 1 0 倍に希釈し、1 0 マイクロリットルにする。

30

【0088】

予め準備したプローブ標的 - I g M 基板を溶液で 3 0 分間インキュベートする。

【0089】

P B S ですすぐ。

【0090】

(乾式読取方式を用いる場合は任意で) d H 2 O ですすぐ。

【0091】

観察：4 つの I g G が表面でそれぞれの I g M に接着するならば、シグナルは約 2 倍になる。

40

【0092】

ストレプトアビジンは、ビオチンへの親和性を有するタンパク質である ($K_{a s s o c} = 1 0^{15}$)。1 若しくは複数のストレプトアビジン分子が、SEQUENCE SEEKER (登録商標) が有しているビオチンに結合し得る。ストレプトアビジン自体は d s D N A プローブ - 標的ペアより大きく (6 8 キロダルトン)、一次質量増幅効果を与える。

【0093】

標的としての非免疫グロブリン抗原の例として、タンパク質アレイを挙げるができる。これは、加工食品に汚染アレルゲン、G M O がいないことを証明する、農産業にとって重要なものである。警察及び国家保安当局は、本発明を用いて、T N T などの爆発物検出に用いられる既存のアレイの向上を願うかもしれない。

50

【0094】

プローブ要素12は、他の異なるプローブ(またはssDNA断片)のマトリックスの一部であるのが好ましい。既知マトリックス配列は、未知標的プローブまたはssDNAとの適合性(match)を与えることができ、その同定は試験によってわかる。

【0095】

この具体例としての実施形態のための手順には、上記例1で引用したオリゴプローブのための過程が含まれる。但し、マルチウェルプレート(例えば396ウェルプレート)には多数の異なるプローブが載置される。プレートを位置決定ロボットに載置するが、このロボットは、ソフトウェア及び実験者により決定される配列パターンでオリゴプローブをスライド上にプリントする。

【0096】

本願出願人が先行特許出願において教示しているように、基板は全反射(TIR)を有することができる。プローブ要素は、エバネッセント場に載置される。

【0097】

再び図2及び図3を参照すると、二次増幅体32に結合する三次増幅器34もある。これはプローブ標的反応の部位において更にもっと大きな結合体を創製し、多くの検出スキームにおいて検出の閾値を低下させる。

【0098】

三次増幅器34は部位に結合できるので、サイズは初期プローブ標的厚さの値から更に20倍に増大することになる。二次及び三次増幅体または増幅器を追加することにより、「巨視的な(gross)」検出システム、例えば顕微鏡検査、ろ過または他のサイズ除外技術、及び任意の質量ベースの分離システムを使用することが可能になる。

【0099】

ストレプトアビジンは容易に入手でき、更にもっと大きい種々の物質、例えば、ポリスチレン、ポリアニン、金属マイクロスフェアに結合される。更に、ストレプトアビジンは、ビオチンに対して4つの結合部位を有し、ビオチン化抗体またはビオチン化マイクロスフェアの接着を可能にする。これは二次増幅体として働く。ストレプトアビジン自体も抗体に対する特異的な標的として働き、その場合には、二次増幅体になる。

【0100】

図7は、ナノメートル(nm)で表される相対高さを示す棒グラフである。グラフに見られるように、カバーなしのアルデヒドスライド表面は、2.2nmの高さを有する。1µMのDNAプローブを接着すると、高さは2.4nmに増加する。1µMのDNAプローブと1µMのDNA標的のプローブ-標的ペアは、3.9nmの高さを有する。一次増幅器である0.1µlの抗体を加えると、高さは7.2nmに増加する。しかし、一次増幅器として過剰な抗体が加えられると、高さは10倍の72nmまで増加する。

【0101】

実験を確認すると、1µlの抗体を有する1µMのDNAプローブの高さは2.3nmしかなく、カバーなしのスライド上の抗体単独の高さは2.6nmしかない。ハイブリダイズされたプローブ-標的ペアは、十分な一次増幅物質の存在下で、容易に検出可能な高さの著しい変化を示すことになることがこのグラフから明白である。

【0102】

表1(図8を参照)は、適切なプローブ-標的結合体と、各結合体に適した一次、二次、及び場合によっては三次増幅器を示している。

【0103】

SEQUENCE SEEKER(登録商標)に代えて、ロックされた核酸(「LNA(登録商標), Proligo LLC, www.proligo.com; subsidiary of Degussa AG, www.degussa.com」として知られるある種の核酸類似体によって、特定の二本鎖核酸配列を特異的に同定することも可能であることにも留意されたい。

【0104】

図4は、増幅の結果を観察するために全反射(TIR)を用いるような本発明の具体例

10

20

30

40

50

としての実施形態を示す。偏光光源アセンブリ 112 は、光源 126 と、ビーム形成要素 128 (光源の性質がビーム形成を有用または必要にするようなものであれば) と、偏光子 130 と、光学リーダー 132 とを有する。光全反射アセンブリ 114 は、光学表面 136 を有する光学素子 134 を有する。図 4 には、光学表面 136 の上の試験片スライド 138 と、両者の間の屈折率整合物質 140 も示されている。屈折率整合のために、全反射表面 (TIR 表面) は試験片スライド 138 の上面 139 として画定される。試験片 142 はスライド 138 の TIR 表面 139 上にある。

【0105】

光学素子 134 は、入射光ビーム 120 と出射光ビーム 122 とを関連付けるように屈折率整合したスライド 138 と共に配置されたプリズムである。ビームは、TIR 表面 139 で 1 回だけ反射した後、プリズムから出る。光学表面 136 上に試験片を直接載置するのであれば、そのときの光学表面 136 は TIR 表面になる。しかしながら、通常はこのように適用されることはない。というのも、試験片 (バイオチップ等) は通常、もっと簡便に試験片スライド 138 上で準備され、装置に載置されるからである。

10

【0106】

いずれにしても、如何なる構成にせよ TIR 表面を有する光学構造があって、ビームは、入射光学構造と出射光学構造の間の TIR 表面で 1 回だけ反射する。換言すれば、試験片に光学的と接触する TIR 表面があり、それによって、全反射に関連するエバネッセント場が試験片と相互に作用する。反射は、TIR 表面でたった 1 回しかない。

【0107】

反射後検出器アセンブリ 116 は、偏光子 144 と、2次元アレイ検出器 146 とを有するが、CCD 型のカメラであるのが好ましい。プロセッサ 118 は特別にプログラムされたコンピュータであり、画像を処理して、画像が形成された領域全体で空間的に分解される膜厚変化を表示するための出力手段である。全反射によって生じるビームの断面に局所偏光状態で空間的に分布する変化を検出することにより、画像が得られる。これは、表面上の分解可能な各点に対して基板表面上の物質のアレイにおける存在及び組成の情報を与える。検出器ポジションに対応する試験片アレイの位置に載置された試験片上の物質を示す反射ビームの断面に、異なる偏光状態変化が含まれる。プロセッサ 118 は、データを電気シグナル 124 として受信し、偏光状態の変化を 2次元アレイ上で空間的に特徴付ける。一実施形態においては、プロセッサ 118 において、光処理アセンブリ 112 からの入射光の既知偏光状態と、試験片アレイに空間的に分布する斑点のポイントの地図を与えるようなビーム内に 2次元的に空間的に分散した反射光 122 の変化した偏光状態とを比較することによって、分析及び処理を行う。その後、プロセッサ 118 によって偏光シフトを解析することにより、化学試験片における要素の存在及び特性の情報が得られる。偏光状態の変化を決定するために、他の既知技術、例えば NULL 処理 (null processing) や位相変調を用いることもできる。

20

30

【0108】

或いは、光源要素 126 として、発光ダイオード (LED)、スーパーluminescent diode (SLD)、白熱光源、またはレーザを用いることもできる。LED または SLD を用いる場合には、図 4 に示す構成が適している。図 4 におけるビーム形成要素 128 はコリメータである。白熱光源を用いる場合には、光学フィルタも用いる。

40

【0109】

一実施形態においては、装置のための光源 126 は、中程度の帯域幅の準単色光源である。本発明に基づけば、光源 126 は中程度の帯域幅の LED であるのが好ましい。帯域幅は、約 10 ナノメートル乃至 50 ナノメートルの半値全幅波長であるのが好ましく、より好ましいのは約 30 ナノメートル乃至 50 ナノメートルの半値全幅波長である。

【0110】

図 4 に示されているような光学リーダー 132 に関して、別の実施形態では、光学リーダーを出射ビーム経路 122 に載置する代わりに偏光子 144 の前に載置することもできる。図 5 を参照すると、別の実施形態が示されている。光源がレーザ 150 であるとき、

50

レーザによって生じるスペックルパターンにおける最小と最大のスペックル変動の差分 (speckle offsetting fluctuation) を生じさせるように、可動式ディフューザ 152 を適合させている。可動式ディフューザ 152 は機械式アクチュエータ 154 に取り付けられるが、機械式アクチュエータ 154 は、スペックル変動の差分を生じさせるためのモータ及びサーボ装置であるのが好ましい。ビーム 120 はその後、ビーム形成要素 128、偏光子 130、光学リーダー 132 を通って進み、光源アセンブリ 120 から放出される。

【0111】

電気化学計測器または誘電計測器によって検出する場合、認識装置、一次増幅器、または二次増幅器に結合された金属ナノスフェアを用いることもできる。1つの発展した方法論では、同様にコロイド銀でコーティングされた、ストレプトアビジンに結合した金ナノスフェアを用いてビオチン化生体分子を増幅する。

10

【0112】

ビオチン化 DNA、RNA、またはタンパク質標的を用いるのであれば、ストレプトアビジン-金ナノ粒子による増強は、銀コロイド増強の有無を問わず、偏光解析法、反射率測定、エバネッセント技術、顕微鏡検査、高解像度走査、走査電気化学プローブ顕微鏡検査、及び原子間力顕微鏡 (AFM) によってプローブされるときにシグナルを増幅することになる。

【0113】

当業者によって特定のプローブ-標的系に適合させることができるような一般的な手順を以下に示す。

20

【0114】

1% BSA を含む PBS に 200 倍乃至 500 倍希釈させたストレプトアビジン-ナノゴールド (Streptavidin-Nanogold) (登録商標) (Nanoprobes, Inc., Yaphank, NY; www.nanoprobes.com) を有するハイブリダイズされたアレイを室温で 60 分間インキュベートする。

【0115】

0.1% のアイシングラスと 0.1% のトウィーン 20 とを含む PBS を 3 回変えて各 5 分間洗浄する。

【0116】

蒸留水中で少なくとも合計 10 分間繰り返し洗浄し、最後に超純水 (EM 等級) 中で 2 回すすぐ。

30

【0117】

溶液 A 及び B を調製する。

【0118】

溶液 A : 80 mg の酢酸銀 (コード 85140 ; Fluka, Buchs, Switzerland) を 40 mL のガラス再蒸留水に溶かす。(酢酸銀結晶は 15 分以内に連続攪拌によって溶解可能である。)

溶液 B : 200 mg のドロキノン を 40 mL のクエン酸緩衝液に溶かす。

【0119】

使用直前に溶液 A と溶液 B を混合する。

40

【0120】

金-セプタビジン (septavidin) 増強されたアレイを増強溶液により 30 分間インキュベートする。

【0121】

蒸留水により 3 回洗浄する。

【0122】

好適検出方法を用いてアレイをプローブする。密封フローセル装置及び敏感に反応する検出システムを用いて in situ 処理及びプロービングを行うことによって、ハイブリダイゼーション及び処理中のプロービングが可能になり、操作する人為要素を減らす一方で、動的な測定を可能にすることになる。

50

【0123】

以上のように、比較的lowレベルの感度でプローブ-標的の結合体を検出するための方法及び物質について図示及び説明してきた。プローブ-標的ペアに質量増幅器を加える（リンク要素の有無は問わない）。質量増幅器が存在することで、他のプロセス過程がなくともプローブ-標的ペアの検出が可能になる。二次及び三次増幅器などの質量増幅器を追加することによって、より低感度の検出機器及び/または低濃度の標的物質を用いることを可能にする。

【0124】

本技術分野の専門家達は、本発明の技術が他の分野にも適用できることを認識し、これらの教示を用いてこの概念を更に別の分析物に適用するであろう。然るに、本発明は、特許請求の範囲に記載された請求項によってのみ限定されるものである。

10

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図1】放射性ラベルまたは蛍光ラベルに依存している先行技術の検出スキームの模式図である。

【図2】本発明に基づく具体例としての検出技術の模式図である。

【図3】本発明に基づく方法及び装置の具体例としての実施形態を参照して教示される種々の段階とサイズとを関連付けている図である。

【図4】本発明に基づく方法及び装置の具体例としての実施形態の一側面として、全反射による光学観察を示す図である。

20

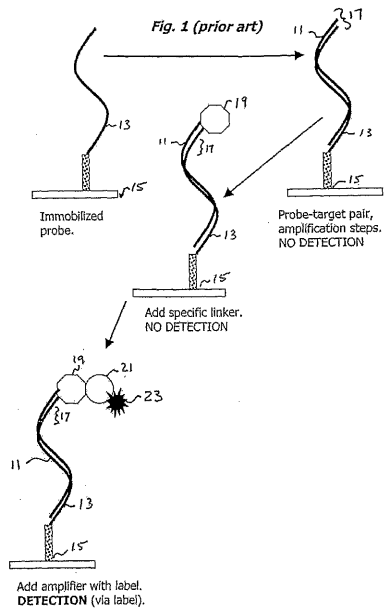
【図5】本発明に基づく方法及び装置の具体例としての実施形態の一側面として、全反射による光学観察を示す図である。

【図6】本発明に基づく方法及び装置の具体例としての実施形態の一側面として、種々のプローブ-標的ペアと層厚さとを関連付けている表である。

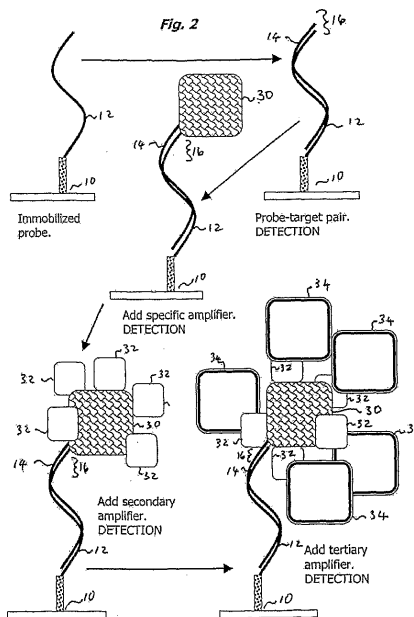
【図7】本発明に基づく方法及び装置の具体例としての実施形態の一側面として、種々のプローブ-標的ペアと層厚さとを関連付けているグラフである。

【図8】本発明に基づく方法及び装置の使用への具体例としてのアプローチを要約した表である。

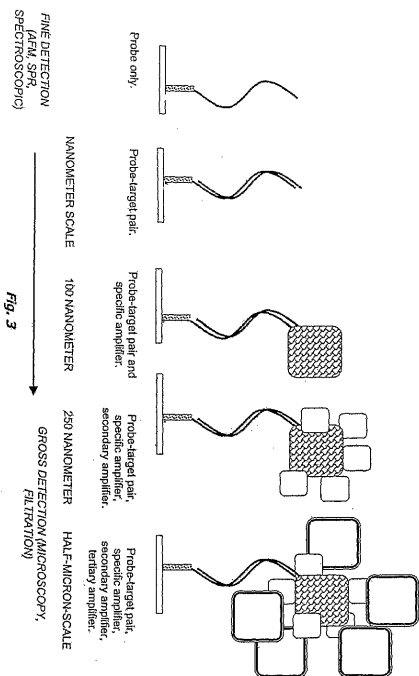
【 図 1 】



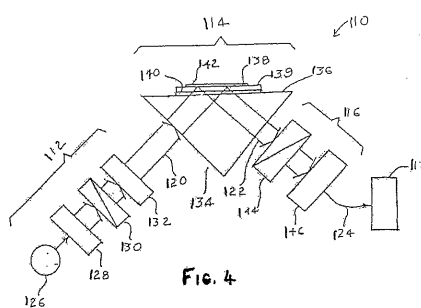
【 図 2 】



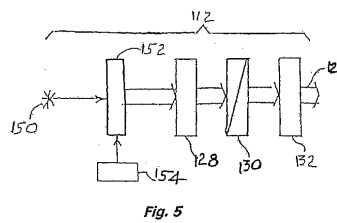
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 6 】

TABLE: THICKNESS

Item #	Sample Surface	Data Label	Thickness (nm)
1	Bare superaldehyde slide	bare	2.2
2	1 μM DNA probe only	probe	2.4
3	1 μM DNA probe with 1 μM DNA target	probe/target	3.9
4	1 μM DNA probe, 1 μM DNA target, 0.1 μl antibody	probe/target/0.1 μl Ab	7.2
5	1 μM DNA probe, 1 μM DNA target, 1.0 μl (excess) antibody	probe/target/1.0 (excess) μl Ab	72
6	1 μM DNA probe, 1.0 μl antibody	probe/Ab	2.3
7	1.0 μl antibody on bare slide	Ab	2.6

Fig. 6

【 7 】

BAR CHART: THICKNESS

(Numbers at bottom correspond to item numbers of Fig. 6)

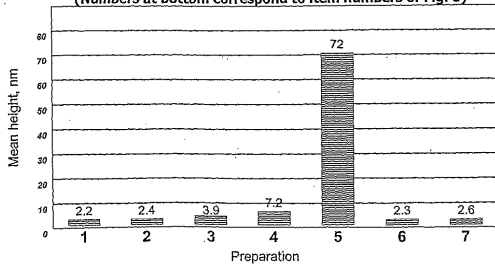


Fig. 7

【 8 】

Fig. 8 (TABLE)

Application	Amplified Target Pair (RT)	Amplification Schemes		
		Primary	Secondary	Tertiary
Oligo or cDNA Array with Reverse Transcription or Amplification or without PCR	Double Stranded DNA (every 10+ base pairs)	Bulk Factor AB1188 (Applied Biosystems) Stranded DNA probe Stranded DNA target AB418 anti-double-stranded DNA mouse IgM coupled to 300nm Polymer Microbeads	Goat Anti-mouse IgG (Sigma) 100 μl (5 μg/ml)	Mouse Anti-Goat-IgG (Sigma) 60 Mouse Anti-Goat-IgG-IgG (Sigma) 8
	Double Stranded DNA (specific 5' base pairs)	Stranded DNA probe Stranded DNA target SEQUENCE SPECIFIC Coupled to Ab	Streptavidin-Coupled 150H- Lectin (Bang Laboratories, Inc.) 10 Streptavidin-Coupled 250nm Lectosome Anti-biotin Goat IgG (Sigma)	Anti-streptavidin IgG (Sigma) 8 Mouse Anti-Goat-IgG (Sigma) 60
Oligo or cDNA Array without Reverse Transcription	DNA-RNA hybrid	SEQUENCE SPECIFIC TM (Prolix WA) coupled to 250nm Polymer Microsphere (Prolix) HC Express Array Anti-DNA-RNA hybrid Mouse IgG (Dipens)	Goat Anti-mouse-IgG (Sigma) 60 Goat Anti-mouse-IgG (Sigma)	Mouse Anti-goat-IgM (Sigma) 8 Mouse Anti-goat-IgG (Sigma) 8 Mouse Anti-goat-IgG (Sigma) 60
Memory Antibody Array	Non-human Anti-human IgG	Non-human Anti-human IgG	Anti-Primary IgG (Sigma) 5 Anti-Primary IgG (Sigma) 5 Anti-Primary IgG (Sigma) 2	

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/17137
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07H 21/04; C12M 3/00; C12Q 1/68; G01J 4/00; G01N 21/00, 21/17, 33/00, 33/53, 33/543, 33/557 US CL : 356/73.1, 319, 320, 369; 422/68.1; 435/4, 5, 6, 7.1, 7.9, 7.92, 287.1-288.5; 436/164, 172, 518-532 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. : Please See Continuation Sheet		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched STN, Derwent		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,508,832 A (CARTER et al) 02 April 1985 (02.04.1985), whole document.	1-61
A	US 6,228,578 B1 (IMPRAIM et al) 08 May 2001 (08.05.2001), whole document.	1-61
A	US 6,274,872 B1 (KATERKAMP) 14 August 2001 (14.08.2001), whole document.	1-61
A	US 2002/0021443A1 (VENKATASUBBARAO et al) 21 February 2002 (21.02.2002), whole document.	1-61
Y,P	US 2002/0093654 A1 (LIEBERMAN et al) 18 July 2002 (18.07.2002), whole document.	1-61
Y,E	US 6,594,011 B1 (KEMPEN) 15 July 2003 (15.07.2003), whole document.	1-61
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" inter 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 22 July 2003 (22.07.2003)	Date of mailing of the international search report 03 NOV 2003	
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. (703)305-3230	Authorized officer Kardie Paulmanabhan Telephone No. 703-308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/17137

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:

356/73.1, 319, 320, 349, 364-369, 445, 446; 422/50, 52, 58, 59, 68.1, 82.11; 433/4, 5, 6, 7.1, 7.9, 7.92, 287.1-288.5; 436/164, 172, 518-532

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 21/27	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	U
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N	21/27	C
		C 1 2 N	15/00	F

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, AU, BA, BB, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, RO, SC, SG, TN, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA

(72) 発明者 ラリン、デイビッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 7 7 6 ・ サンガブリエル・アパートメントエイチ・イースト
 ライブオークストリート 1 1 4

(72) 発明者 ゴウ、フェイメング
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 7 8 0 ・ テンプルシティ・リンローズストリート 1 0 0 3
 7

(72) 発明者 ハン、シュボ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 8 0 3 ・ アルハンブラ・アパートメント 1 6 ・ ベニトアベ
 ニュー 1 0 1 5

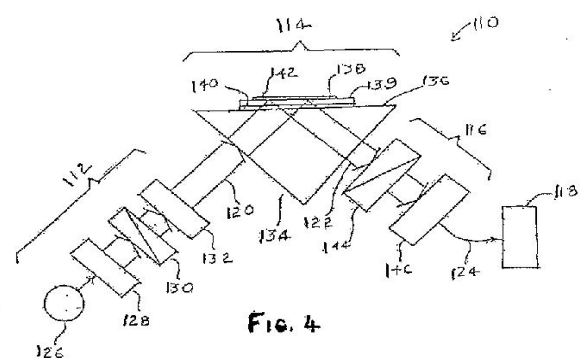
F ターム(参考) 2G059 AA01 CC16 CC17 DD03 DD13 EE02 GG01 GG02 JJ02 JJ12
 JJ19 KK04
 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 HA14
 4B029 AA07 AA11 CC02 CC03 CC08 FA15
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR55 QR82
 QS33 QS34 QS39 QX01

专利名称(译)	用于识别分子化合物的方法和设备		
公开(公告)号	JP2007528692A	公开(公告)日	2007-10-18
申请号	JP2005500431	申请日	2003-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	MAVEN TECH		
申请(专利权)人(译)	霉斑技术有限责任公司		
[标]发明人	ラスマンウィリアム ラリンデイビッド ゾウフェイメング ハンシュボ		
发明人	ラスマン、ウィリアム ラリン、デイビッド ゾウ、フェイメング ハン、シュボ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/00 G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 G01N21/27 C12N15/09 C07H21/04 G01N21/21 G01N21/55 G01N21/75		
CPC分类号	G01N21/21 C07H21/04 G01N21/552 G01N33/54373 G01N2021/757		
FI分类号	C12Q1/68.A C12M1/00.A G01N33/543.595 G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/53.U G01N21/27.C C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G059/AA01 2G059/CC16 2G059/CC17 2G059/DD03 2G059/DD13 2G059/EE02 2G059/GG01 2G059 /GG02 2G059/JJ02 2G059/JJ12 2G059/JJ19 2G059/KK04 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA11 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029 /CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063 /QX01		
优先权	10/158995 2003-05-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种识别分子化合物的方法。提供一种质量增强元件和/或瞬逝场微扰放大器，其独特地与探针-靶对发生反应并结合，从而导致质量增加，从而增强了探针-靶标反应的区别性。探针-靶对是杂交的dsDNA，合适的质量增强型放大器是抗双链DNA小鼠IgM。在探针-靶缀合物中具有足够的序列对的实例中，可以使用在合适的载体中具有通过链霉亲和素扩增的生物素的序列特异性小沟结合聚酰胺。在一个优选的实施方式中，将多个探针固定在微阵列的位点，每个探针对不同的靶标特异性。描述了利用全内反射观察瞬逝场的扰动的光学器件。[选择图]图2

【 图 4 】



【 图 5 】