



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 33 650 T2** 2006.04.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 904 542 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 33 650.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/02748**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 906 727.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/032212**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.02.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.09.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.03.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.06.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.04.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/543** (2006.01)

G01N 21/55 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

609410 01.03.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB

(73) Patentinhaber:

Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif., US

(72) Erfinder:

OBREMSKI, Robert, Yorba Linda, US; SILZEL, W., John, Yorba Linda, US

(74) Vertreter:

Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European Patent Attorneys, 81671 München

(54) Bezeichnung: **System zum simultanen Durchführen einer Vielzahl von Ligandenbindungs-Untersuchungen**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft die Analyse einer biologischen Fluidprobe.

[0002] Durch die Kosten für die medizinische Versorgung wird ein signifikanter Prozentsatz des Bruttosozialprodukts verbraucht. Ein wesentlicher Teil der Kosten für die medizinische Versorgung wird für Labortests aufgewandt, die arbeitsintensiv sein können. Solche Labortests können das Testen bezüglich einer Mehrzahl von Analyten in Blut, Urin oder Rückenmarksflüssigkeit umfassen.

[0003] Bei Labortests ist die Zeit entscheidend. Unter bestimmten Umständen erfordert die erfolgreiche Behandlung eines Patienten schnelle Ergebnisse von Labortests.

[0004] Bei Labortests ist auch die Empfindlichkeit wichtig. Häufig liegt eine interessierende Substanz in sehr kleinen Mengen vor. In vielen Situationen erfordert eine genaue Diagnose des Zustands eines Patienten das Vermögen zur Detektion dieser sehr kleinen Mengen. Vorhandene Testsysteme sind gewöhnlich dahingehend unzureichend, dass sie mindestens einen der nachstehenden Nachteile aufweisen: Hohe Kosten, langsame Ergebnisse oder niedrige Empfindlichkeit.

[0005] Die internationale Veröffentlichung WO 94/27137 A betrifft ein Verfahren zum Detektieren eines Analyten, bei dem eine Vorrichtung mit einem planaren Wellenleiter eingesetzt wird, bei dem Einfangmoleküle in diskreten Flecken immobilisiert sind und der Analyt durch die Ausführung von Immuntests auf Fluoreszenzbasis detektiert wird. Die europäische Patentanmeldung EP-A-0 184 600 betrifft einen Lichtwellenleiter mit einer oder mehreren Beschichtungen) von Reaktanten, die für zu analysierende Spezies spezifisch sind.

[0006] Demgemäß besteht ein Bedarf für ein System zum wirtschaftlichen Analysieren biologischer Fluide, das (1) kostengünstig ist, (2) schnelle Ergebnisse liefert und (3) kleine Analytmengen detektieren kann.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft ein System, das diese Anforderungen erfüllt. Insbesondere detektiert dieses System Analyten bei niedrigen Konzentrationen kostengünstig und schnell. Das System kann einen Test gleichzeitig bezüglich einer Mehrzahl von Analyten durchführen oder das System kann eine Mehrzahl von Proben bezüglich eines einzelnen Analyten testen.

[0008] Das System weist den zusätzlichen Vorteil auf, dass es mit nicht-komplexen Geräten automatisiert werden kann.

[0009] Das System umfasst ein Verfahren zum Detektieren eines Zielanalyten in einer Probe unter Verwendung eines speziellen Detektors, der einen Wellenleiter umfasst, auf dem eine Mehrzahl diskreter Sonden vorliegt. Jede Sonde umfasst einen spezifischen Bindungspartner für einen ausgewählten Analyten und mindestens eine der Proben ist eine reaktionsfähige bzw. reagierende Sonde, die einen spezifischen Bindungspartner für den Zielanalyten umfasst. Vorzugsweise ist der spezifische Bindungspartner kovalent an den Wellenleiter gebunden. Die Probe wird auf den Detektor derart aufgebracht, dass der Zielanalyt an dessen spezifischen Bindungspartner bindet. Laserlicht wird in den Detektor eingeleitet bzw. eingekoppelt, so dass abklingendes Licht bzw. Evaneszenzlicht von dem Wellenleiter abstrahlt und auf die Sonden auftrifft. Jedwedes Licht, das von einer Sonde mit einem daran gebundenen Zielanalyten emittiert wird, unterscheidet sich von dem Licht, falls ein solches vorliegt, das von der gleichen Sonde ohne daran gebundenen Zielanalyten emittiert wird. Die Lichtemission von den Sonden wird detektiert und aus einer solchen Detektion kann das Vorliegen oder die Abwesenheit des Zielanalyten in der Probe bestimmt werden.

[0010] Diese Differenz bei der Lichtemission kann durch Binden einer lichtemittierenden Verbindung, wie z.B. eines Fluorophors, an den Zielanalyten entweder vor oder nach dessen Bindung an dessen spezifischen Bindungspartner bewirkt werden. Die lichtemittierende Verbindung emittiert Licht, wenn das Laserlicht in den Detektor eingeleitet wird. Beispielsweise kann das Fluorophor an einen zweiten spezifischen Bindungspartner für den Zielanalyten gebunden werden, wobei eine Sandwichstruktur auf dem Detektor ausgebildet wird, die das Fluorophor, den zweiten spezifischen Bindungspartner, den Zielanalyten und den spezifischen Bindungspartner umfasst.

[0011] Alternativ können die Sonden eine lichtemittierende Verbindung umfassen, wobei das Vorliegen des Zielanalyten, der an die Sonde bindet, das von der lichtemittierenden Verbindung emittierte Licht beeinflusst.

[0012] In einer anderen Version der Erfindung kann anstelle der Verwendung einer lichtemittierenden Verbin-

ung eine lichtmodulierende Verbindung, wie z.B. ein Fluorophorquencher oder ein Verstärker an den Zielanalyten gebunden werden, wobei an die Sonde im Vorhinein eine lichtemittierende Verbindung gebunden worden ist, deren lichtemittierende Eigenschaften durch die lichtmodulierende Verbindung beeinflusst werden.

[0013] Das erfindungsgemäße System kann zum Screening einer Mehrzahl von Proben bezüglich des ausgewählten Zielanalyten verwendet werden. Dies kann durch die Verwendung verschiedener lichtemittierender Verbindungen zum Binden an den Zielanalyten in verschiedenen Proben erreicht werden, wobei die unterschiedlichen lichtemittierenden Verbindungen Licht mit einer detektierbaren Differenz emittieren, wenn sie dem Evaneszenzlicht ausgesetzt werden.

[0014] Dieses System kann auch zum Detektieren einer Mehrzahl von Zielanalyten in einer einzelnen Probe verwendet werden. Dies wird durch die Verwendung eines Detektors mit einer Mehrzahl verschiedener diskreter Sonden bewirkt, wobei mindestens einige der Sonden an Zielanalyten in der Probe binden können. Die Probe wird auf den Detektor aufgebracht, so dass die Zielanalyten an einen entsprechenden spezifischen Bindungspartner binden. Laserlicht wird in den Detektor eingeleitet, so dass Evaneszenzlicht von dem Wellenleiter abgestrahlt wird und auf der Sonde auftrifft, wobei Licht, falls ein solches vorliegt, das von einer Sonde mit einem daran gebundenen Zielanalyten emittiert wird, von dem Licht, falls ein solches vorliegt, das von der gleichen Sonde ohne daran gebundenem Zielanalyten emittiert wird, verschieden ist. Durch die Detektion der Lichtemission von den Sonden ist es möglich, zu bestimmen, welche der Zielanalyten in der Probe vorliegen.

[0015] Die vorliegende Erfindung kann sowohl für die qualitative Analyse als auch für die quantitative Analyse verwendet werden. Für die qualitative Analyse wird eine bekannte Menge eines Analogons des Zielanalyten für einen kompetitiven Test auf den Detektor aufgebracht.

[0016] Der Wellenleiter kann eine wasserdurchlässige Deckschicht mit einem Brechungsindex aufweisen, der geringer ist als der Brechungsindex des Wellenleiters, wie z.B. ein Sol-Gel. Die Deckschicht kann die Eingrenzung des Laserstrahls innerhalb des Substrats verbessern und dadurch das Hintergrundrauschen und die Hintergrundstörung vermindern.

[0017] In einer anderen Version der Erfindung ist der Brechungsindex der Deckschicht im Wesentlichen mit dem Brechungsindex des Substrats identisch oder größer als dieser. In dieser Version wird die lichtemittierende Verbindung mittels Epi-Beleuchtung durch eine Laserlichtquelle, die senkrecht zur Ebene des Substrats angeordnet ist, angeregt. An jedem diskreten Bereich wird die Emission von Licht mit einer Wellenlänge, die von derjenigen des eintretenden Lasers verschieden ist, detektiert.

[0018] Ein bevorzugter Detektor umfasst einen Wellenleiter mit einer ersten und einer zweiten Oberfläche, die sich gegenüber liegen. Der Brechungsindex des Wellenleiters ist größer als derjenige des den Wellenleiter umgebenden Mediums. Wenn demgemäß ein Laserlicht in den Wellenleiter mit einem Eintrittswinkel über einem kritischen Winkel eingeleitet wird, strahlen Evaneszenzwellen von der ersten und der zweiten Oberfläche ab. In diskreten Bereichen auf mindestens einer der Oberflächen des Wellenleiters liegt eine Mehrzahl von Sonden mit bekannter Erkennung bezüglich ausgewählter Zielanalyten vor. Der Wellenleiter kann im Wesentlichen planar sein, wobei die Sonden in einer zweidimensionalen Anordnung bzw. Matrix vorliegen, wobei ein Fluorophor in die Sonden einbezogen ist. Beispielsweise können die Sonden eine Mehrzahl diskreter Flecken bzw. Punkte sein, die auf die Oberfläche des Wellenleiters gedruckt worden sind.

[0019] Die vorliegende Erfindung umfasst auch eine Vorrichtung, die bezüglich einer Umwandlung des Lichts von einer Laserlichtquelle, die typischerweise einen in etwa bleistiftförmigen Strahl emittiert, zu einem Strahl effektiv ist, der zum Einführen in das Ende des Wellenleiters geeignet ist.

[0020] Dieses System weist den Vorteil auf, dass es nur eine kleine Anzahl einfacher Schritte umfasst, was wiederum die Automatisierung durch ein nicht-komplexes Gerät erleichtert. Beispielsweise liegen in einer Version der Erfindung nur drei Handhabungsschritte vor, d.h. (1) das Aufbringen der Probe auf einen Wellenleiter, wobei mit den Sonden auf dem Wellenleiter eine lichtreaktionsfähige Verbindung einbezogen worden ist, (2) Einleiten von Laserlicht in den Wellenleiter und (3) Detektieren des emittierten Lichts.

[0021] Der Test ist empfindlich genug, um einen Zielanalyten bei niedrigen Konzentrationen zu detektieren. Der Test wurde bis hinab zu 10^{-13} -molar durchgeführt. Diese Erfindung stellt einen beträchtlichen Zeit- und Kostenvorteil gegenüber Verfahren des Standes der Technik bereit. Deshalb ist die Erfindung wirtschaftlich, zeiteffizient und empfindlich.

[0022] Diese und andere Merkmale, Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden mit Hilfe der folgenden Beschreibung der Erfindung, den beigefügten Ansprüchen und den beigefügten Zeichnungen besser verständlich, wobei:

[0023] [Fig. 1](#) eine perspektivische Ansicht eines Wellenleiters gemäß der vorliegenden Erfindung mit einer zweidimensionalen Anordnung von Sonden in der Form von Punkten auf einer Oberfläche des Wellenleiters ist,

[0024] [Fig. 2](#) eine perspektivische Ansicht eines zweiten Wellenleiters gemäß der vorliegenden Erfindung mit beabstandeten Sondenstreifen auf dem Wellenleiter mit einer Sol-Gel-Deckschicht ist,

[0025] [Fig. 3](#) eine perspektivische Ansicht eines dritten Wellenleiters gemäß der vorliegenden Erfindung mit punktförmigen Sonden auf beiden Oberflächen des Wellenleiters ist, die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) Querschnittsansichten der Wellenleiter von [Fig. 1](#) bzw. [Fig. 2](#) sind, die Licht zeigen, das in den Wellenleiter in einem Winkel eintritt, der größer ist als ein kritischer Winkel,

[0026] [Fig. 5](#) ein schematisches Diagramm einer Vorrichtung zur Durchführung einer erfindungsgemäßen Analyse ist,

[0027] [Fig. 6](#) eine perspektivische Ansicht ist, welche die zylindrische Optik der Vorrichtung von [Fig. 5](#) und den Lichtweg durch die zylindrische Optik zeigt,

[0028] [Fig. 7](#) eine Kalibrierungskurve für einen kompetitiven Immuntest zur quantitativen Analyse von Digoxin in einer Probe zeigt, die erfindungsgemäß analysiert worden ist, und

[0029] [Fig. 8](#) ein CCD-erzeugtes Bild für eine qualitative Hybridisierungsanalyse bezüglich DNA-Oligonukleotiden in einer Probe zeigt, die erfindungsgemäß analysiert worden ist.

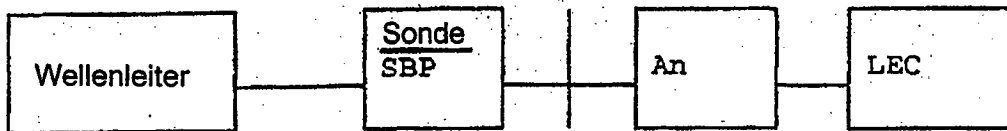
[0030] Die vorliegende Erfindung betrifft ein System zum gleichzeitigen Durchführen von Mehrfachliganden-Bindungstests mit einer Probe, die möglicherweise Zielanalyten enthält, wobei ein Komplex zwischen einem spezifischen Bindungspartner an einer Sonde und einem Zielanalyten unter Verwendung von Evaneszenzwellen und (einer) lichtreaktionsfähigen Verbindung oder Verbindungen detektiert wird.

[0031] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 1](#) wird eine Mehrzahl verschiedener Sonden **20** (mit den Buchstaben aa bis xx bezeichnet) mit spezifischen Bindungspartnern in diskreten Bereichen **22** auf die obere Fläche **23** und die untere Fläche **25** eines planaren Wellenleiters **24** aufgebracht. Der Wellenleiter **24** weist einen Brechungsindex auf, der größer ist als der Brechungsindex des den Wellenleiter umgebenden Mediums, wobei es sich üblicherweise um Luft handelt. Jede Sonde **20** umfasst einen spezifischen Bindungspartner mit einer bekannten Erkennung bezüglich eines ausgewählten Zielanalyten, wie z.B. eines monoklonalen Antikörpers, eines DNA-Oligonukleotids oder eines Enzym-Cofaktors. An einen bestimmten Analyten kann mehr als eine Sonde gebunden sein, d.h. es kann eine Mehrzahl von Sonden vorliegen, die für eine verbesserte Empfindlichkeit bezüglich eines Analyten wie z.B. Digoxin reagieren. Tatsächlich können alle Sonden **20** bezüglich eines einzelnen Analyten reagieren.

[0032] Eine Probe wird auf den Wellenleiter **24** derart aufgebracht, dass Zielanalyten in der Probe an den spezifischen Bindungspartner an einer reagierenden Sonde binden. Unter Bezugnahme auf die [Fig. 4A](#) wird Laserlicht **42** in den Wellenleiter **24** in einem Winkel eingeleitet, der größer ist als ein kritischer Winkel (nachstehend definiert), so dass eine innere Gesamtreflexion **28** des Laserlichts vorliegt und Evaneszenzwellen **30** von der Oberfläche des Wellenleiters abstrahlen.

[0033] Es gibt mehrere Variationen dieses Systems. In einer ersten Variation wird eine lichtemittierende Verbindung, die lumineszierend ist, vor dem Aufbringen der Probe auf den Wellenleiter im Vorhinein an Zielanalytmoleküle (z.B. DNA/RNA, Proteine, Polysaccharide und dergleichen) gebunden. An denjenigen diskreten Bereichen, bei denen ein Zielanalyt einen Komplex mit einer reagierenden Sonde bildet, wird Licht emittiert. Diese erste Version kann schematisch wie folgt dargestellt werden:

(1)



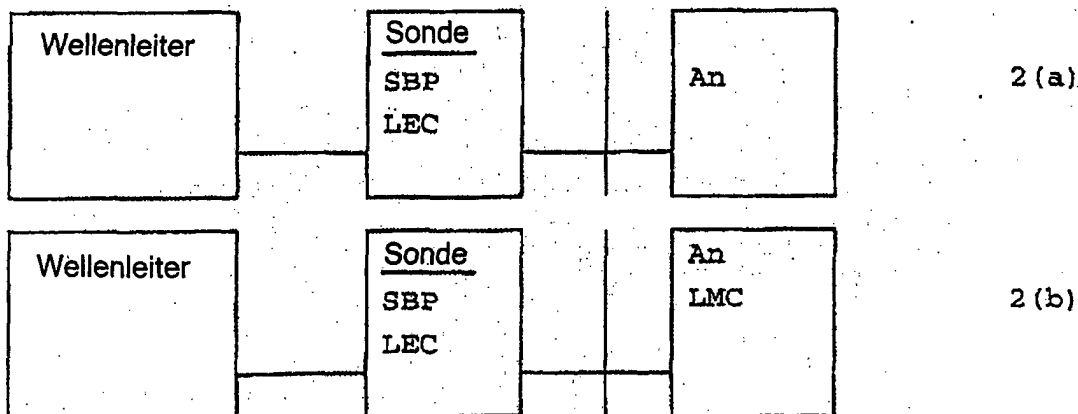
worin "SBP" für "spezifischer Bindungspartner", "An" für "Zielanalyt" und "LEC" für lichtemittierende Verbindung steht.

[0034] Eine Mehrzahl (mindestens zwei) lichtemittierender Verbindungen, die Licht mit verschiedenen Wellenlängen emittieren und an verschiedene Zielanalyten binden, können verwendet werden. Dies ermöglicht eine gleichzeitige Detektion verschiedener Zielanalyten oder Proben mit einem einzigen Wellenleiter in einem einzigen Test.

[0035] Alternativ werden mehrere lichtemittierende Verbindungen, die Licht mit verschiedenen Wellenlängen emittieren, jedoch an den gleichen Zielanalyten binden, verwendet, um gleichzeitig eine Mehrzahl von Proben bezüglich des Zielanalyten zu analysieren. Wenn beispielsweise der Zielanalyt in der ersten Probe vorliegt, emittiert eine erste LEC, und wenn der Zielanalyt in der zweiten Probe vorliegt, emittiert eine zweite LEC Licht mit einer unterschiedlichen Wellenlänge.

[0036] In einer zweiten Variation ist die lichtemittierende Verbindung mit dem spezifischen Bindungspartner an jeder Sonde an jedem der diskreten Bereiche einbezogen und wird nicht zu Beginn an den Zielanalyten gebunden. An denjenigen diskreten Bereichen, bei denen der Zielanalyt in einer Probe an einen spezifischen Bindungspartner an einer Sonde gebunden hat, wird die Lichtemission entweder verstärkt oder gequenchet.

[0037] Diese zweite Version kann schematisch als



dargestellt werden, wobei "LMC" für "lichtmodulierende Verbindung" steht, d.h. einen Lichtverstärker, einen Lichtquencher oder einen Lichtwellenlängenshifter bzw. -verschieber. In dieser zweiten Variation ist der Wellenleiter mit einer Sonde ausgestattet, welche die LEC und einen spezifischen Bindungspartner für den Zielanalyten umfasst. In dem Detektionsschritt wird der Analyt allein (2(a)) oder der Analyt mit einer LMC (2(b)) an den spezifischen Bindungspartner gebunden.

[0038] Eine Mehrzahl verschiedener lichtmodulierender Verbindungen mit verschiedenen modulierenden Effekten kann verwendet werden, um gleichzeitig eine Mehrzahl von Zielanalyten in der Probe zu detektieren. LMC's, die miteinander zusammenwirken, werden ausgewählt, d.h. der Effekt der einen behindert oder beseitigt nicht den Effekt einer anderen. Dies kann die Detektion und die Unterscheidung zwischen verschiedenen Zielanalyten verbessern sowie den gleichzeitigen Test verschiedener Klassen von Zielanalyten weiter erleichtern. Die verschiedenen LMC's binden an verschiedene Zielanalyten oder Proben und modulieren die LEC unterschiedlich.

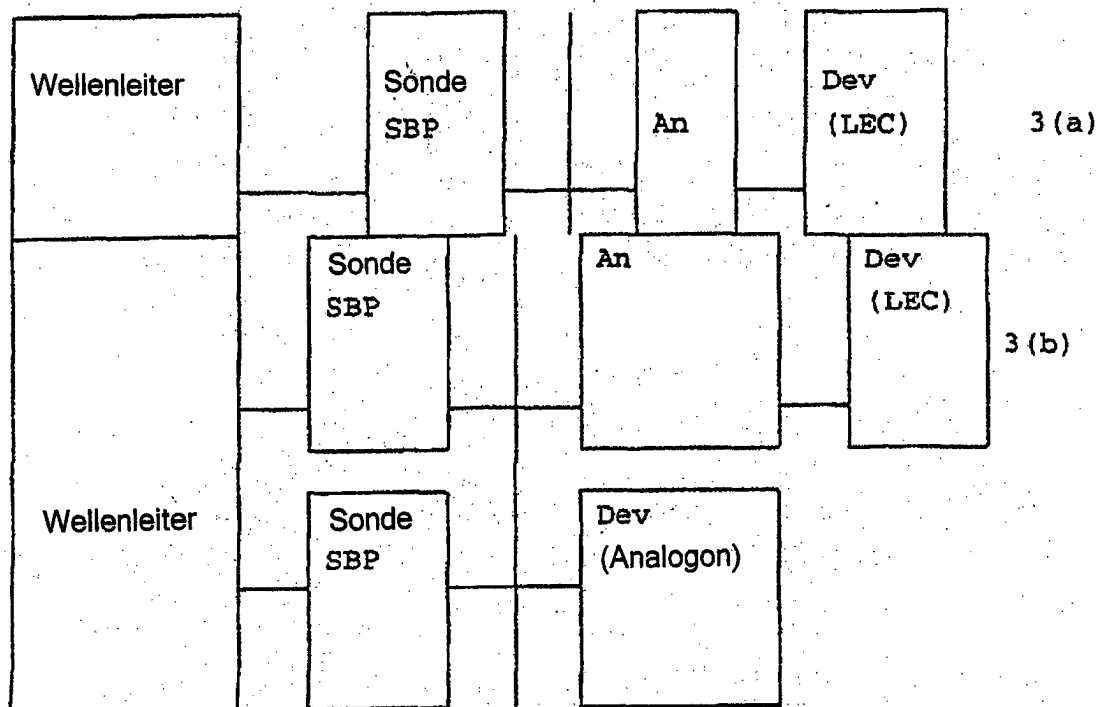
[0039] Alternativ können verschiedene LMC's mit verschiedenen modulierenden Effekten zum Binden an den gleichen Zielanalyten, jedoch in unterschiedlichen Proben, verwendet werden. Diese Variation stellt den gleichzeitigen Test verschiedener Proben bezüglich des Zielanalyten bereit.

[0040] In einer dritten Variation der Erfindung wird nach dem Aufbringen der Probe auf den Wellenleiter ein Entwickler auf den Wellenleiter aufgebracht. Der Entwickler umfasst eine lichtemittierende Verbindung, die an den an einen spezifischen Bindungspartner gebundenen Zielanalyten bindet, so dass ein Konjugat oder eine Sandwichstruktur gebildet wird.

[0041] Das System kann für einen quantitativen kompetitiven Test verwendet werden. Beispielsweise kann der Entwickler eine bekannte Menge eines Analogons des Ziels umfassen, das mit dem Zielanalyten bezüglich der Bindung an die Sonde konkurriert. Folglich binden der Zielanalyt und das Analogon an die Sonde in einem Verhältnis auf der Basis ihrer jeweiligen Konzentrationen. Der Wellenleiter wird mit einer lichtemittierenden Verbindung behandelt, die bezüglich des Bindens an den Zielanalyten spezifisch ist, jedoch nicht an das Analogon bindet. Je größer die Menge des Zielanalyten ist, die an die Sonde bindet, desto mehr lichtemittierende Verbindung liegt an der Sonde vor und desto größer ist das Lichtemissionssignal.

[0042] Alternativ kann die lichtemittierende Verbindung zum Binden an das Analogon und nicht an den Zielanalyten spezifisch sein. Folglich ist die Signalintensität umso geringer, je größer die Konzentration des Zielanalyten verglichen mit der Konzentration des Analogons ist. Zur Umrechnung der Signalintensität in die Konzentration des Zielanalyten wird eine Kalibrierungskurve verwendet.

[0043] Diese dritte Variation kann schematisch wie folgt dargestellt werden:



wobei "Dev" für "Entwickler" steht. Das Schema 3(a) zeigt einen qualitativen Bindungstest und das Schema 3(b) zeigt einen quantitativen Konkurrenztest.

Wellenleiter

[0044] Der Wellenleiter **24** ist eine im Wesentlichen transparente, planare Materialplatte. Er weist bezogen auf das den Wellenleiter umgebende Medium einen ausreichend hohen Brechungsindex auf, so dass er ein tretendes Licht, das auf den Wellenleiter auftrifft, eingrenzt, und das Licht überträgt, wenn der Winkel des ein tretenden Lichts größer als der kritische Winkel **26** ist der arcsin des Quotienten aus dem Brechungsindex des umgebenden Mediums dividiert durch den Brechungsindex des Wellenleiters **24**. Unter diesen Bedingungen strahlt ein elektromagnetisches Feld unterhalb der Oberfläche des Wellenleiters. Dieses Feld, das als Evaneszenzwelle bekannt ist, dringt in das umgebende Medium ein und weist ein Vermögen zum Anregen einer lichtemittierenden Verbindung (z.B. eines Fluorophors) auf der Oberfläche des Films auf. Die "Evaneszenzwelle" ist derjenige Teil des Lichts, der über die Oberfläche des Wellenleiters hinaus mit einem Material in Wechselwirkung treten kann.

[0045] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 4A](#) ist der Wellenleiter **24** aus einem lichtleitenden Material hergestellt,

das bei der Laserwellenlänge in ausreichender Weise frei von lichtabsorbierenden Materialien ist, um eine unangemessene Wechselwirkung mit dem Laserlicht, das durch den Wellenleiter hindurchtritt, zu vermeiden. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung ist der Wellenleiter **24** planar. Der Brechungsindex des Wellenleitermaterials ist größer als der Brechungsindex des Mediums, welches das Wellenleitermaterial umgibt, nämlich Luft, so dass ein Laserstrahl **42**, der in den Wellenleiter in einem Winkel, der größer ist als der kritische Winkel **26**, eingeleitet wird, innerhalb des Wellenleiters **24** eingegrenzt wird und die Evaneszenzwellen **30** an den Oberflächen des Wellenleiters vorliegen.

[0046] Qualitativ ausgedrückt ist (1) das Vermögen des Wellenleiters zum Eingrenzen des Laserstrahls umso größer, (2) das Eindringen der Evaneszenzwelle in das umgebende Medium umso geringer und (3) der Abstrahlwinkel zum Eingrenzen des Strahls innerhalb des Wellenleiters umso größer, je größer der Brechungsindex des Wellenleiters ist. Diese Faktoren konkurrieren miteinander. Beispielsweise ist ein größerer Brechungsindex bevorzugt, um den Strahl einzugrenzen. Ein kleinerer Brechungsindex ist jedoch für ein größeres Eindringen durch die Evaneszenzwellen bevorzugt. Das Material, das als Wellenleiter ausgewählt wird, beruht auf einem Kompromiss zwischen diesen konkurrierenden Faktoren.

[0047] Typische Materialien für den Wellenleiter sind Polystyrol, Polypropylen, Borosilikat (Glas) und Polycarbonat. Polystyrol ist aufgrund dessen Verträglichkeit mit langwelligem Licht im Nahinfrarotbereich des Spektrums und dessen etablierter Effizienz und üblichen Gebrauchs als immunchemisches Substrat ein bevorzugtes Material. Polystyrol-Wellenleitermaterialien sind von Polyfiltronics, Inc., 100 Weymouth Street, Rockland, Maryland 02370 (617) 878-1133 erhältlich.

[0048] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 4A](#) sind dünnere Wellenleiter mehr bevorzugt als dickere Wellenleiter. Dies ist darauf zurückzuführen, dass dünnere Wellenleiter zu einem stärkeren Zurückwerfen des Laserstrahls von der ersten und der zweiten Oberfläche des Wellenleiters führen. Dies ist als "höherer Ausbreitungsmodus" in dem Wellenleiter bekannt. Ein höherer Ausbreitungsmodus führt zu einer besseren Erzeugung von Evaneszenzwellen **30**, die von der gesamten Oberfläche des Wellenleiters mit einer Minimierung zum Ausschluss dunkler Flecken abstrahlen. Der Wellenleiter kann eine große Dicke von etwa 2,54 mm (100 mil) aufweisen. Idealerweise weist der Wellenleiter eine Dicke zwischen etwa 0,0254 mm (1 mil) bis etwa 0,254 mm (10 mil) auf.

[0049] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 1](#) weist der Wellenleiter **24** typischerweise entweder einen rechteckigen oder einen quadratischen Querschnitt auf. Bei einem rechteckigen Wellenleiter beträgt die Länge des Wellenleiters etwa 2,54 cm (1 Zoll) bis etwa 10,16 cm (4 Zoll) bei einer bevorzugten Länge von 7,62 cm (3 Zoll). Die Breite des Wellenleiters beträgt zwischen etwa 0,254 cm (0,1 Zoll) bis etwa 2,54 cm (1 Zoll), wobei die bevorzugte Breite 0,64 cm (0,25 Zoll) beträgt. Längere Wellenleiter können verwendet werden. Wenn die Länge des Wellenleiters zunimmt, treten jedoch ein Abfall der Laserstrahlintensität und ein Problem mit einem Durchhängen des Wellenleiters auf. Ein gewisses Durchhängen des Wellenleiters beeinflusst die Empfindlichkeit oder die Effektivität des Tests in nachteiliger Weise. Da sich die Technologie für das Aufbringen von Sonden (nachstehend beschrieben) auf diskrete Bereiche verbessert, kann die Größe des Wellenleiters zu der Größe einer typischen US-Briefmarke und sogar noch kleiner vermindert werden.

[0050] Gegebenenfalls werden Kanäle in den Wellenleiter einbezogen, um den Wellenleiter in Bereiche abzugrenzen. Dies wird entweder durch (i) eine chemische Abscheidung oder eine Dampfabcheidung eines lichtblockierenden Materials, (ii) ein Drucken auf den Wellenleiter oder (iii) die Verwendung eines hydrophoben Mittels durchgeführt. Der Vorteil der Kanäle besteht darin, flüssige Proben auf gewünschte Bereiche des Wellenleiters einzugrenzen oder Licht auf gewünschte Bereiche einzugrenzen. Dies ist beim gleichzeitigen Test einer Mehrzahl von Proben sowie einer Mehrzahl von Zielanalyten nützlich.

Sonden

[0051] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 1](#) umfassen die Sonden **20** einen spezifischen Bindungspartner und können im Wesentlichen aus einem spezifischen Bindungspartner, der an den Wellenleiter gebunden ist, bestehen. Ein spezifischer Bindungspartner ist ein erstes Molekül, das mit einem zweiten Molekül oder einer Substanz, die als der Zielanalyt bezeichnet wird, einen Komplex oder ein Konjugat bildet. Der spezifische Bindungspartner weist eine Stelle auf, die eine hohe Avidität und Affinität für den Zielanalyten aufweist. Eine hohe Avidität bedeutet, dass die Stelle den Zielanalyten unter Ausschluss anderer Substanzen spezifisch bindet, und eine hohe Affinität bedeutet eine starke Assoziation mit dem Zielanalyten. Der spezifische Bindungspartner ("SBP") kann natürlich vorkommen oder künstlich gebildet worden sein.

[0052] Viele der Verbindungen, die herkömmlich in diagnostischen Verfahren als spezifische Bindungspartner verwendet werden, können als Sonden **20** verwendet werden. Beispiele für spezifische Bindungspartner umfassen:

(1) Einzelsträngige Polynukleotide von DNA ("Desoxyribonukleinsäuren") und RNA ("Ribonukleinsäuren")

[0053] Die SBP's weisen eine Länge zwischen etwa 5 Basen bis etwa 25 Basen auf, wobei eine bevorzugte Länge etwa 12 Basen ist. Diese SBP's hybridisieren an eine einzelsträngige DNA oder RNA in der Probe.

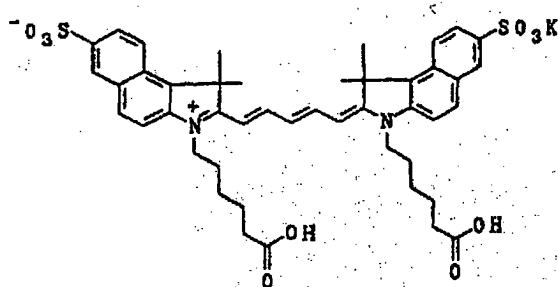
(2) Antikörper und Fragmente von Antikörpern

[0054] Die Antikörper gehören jedweder der verschiedenen Klassen oder Unterklassen von Immunglobulin an, wie z.B. IgG, IgA, IgM, IgD und IgE entweder menschlichen oder tierischen Ursprungs wie z.B. von Schafen, Hasen, Ziegen und Mäusen. Zusätzlich zu intakten Antikörpern sind Antigen-bindende Fragmente verwendbar, wie z.B. Fab, Fab' und Fab'₂. Die Antikörper oder Fragmente können mit der Hybridomtechnologie, mittels Klonen und Expression oder Bereitstellen auf einer Bakteriophage hergestellt werden.

(3) Enzyme, Rezeptoren und andere Proteine mit einer Bindungsstelle, die für ein ausgewähltes Molekül spezifisch ist.

[0055] Lichtreaktionsfähige, lichtemittierende und lichtmodulierende Verbindungen Der Ausdruck "lichtreaktionsfähige Verbindung" bezieht sich auf zwei Arten von Molekülen. Erstens bezieht sich der Ausdruck auf Moleküle, die durch Evaneszenzwellen angeregt werden, so dass sie Licht emittieren, d.h. auf lichtemittierende Verbindungen. Zweitens bezieht sich der Ausdruck auf Moleküle, die nicht notwendigerweise selbst Licht emittieren, sondern vielmehr die Anregungswellenlänge und die Lichtemission eines anderen Moleküls verstärken, quenchen oder verschieben. Diese lichtreaktionsfähigen Verbindungen werden als "lichtmodulierende Verbindungen" bezeichnet. Der Effekt einer lichtmodulierenden Verbindung besteht darin, die Wellenlänge von Licht zu emittieren, zu quenchen, zu verstärken oder zu verschieben.

[0056] Geeignete Moleküle, die durch Evaneszenzwellen angeregt werden, Licht zu emittieren, sind Fluorophore, nämlich Phthalocyaninfarbstoffe, LaJolla Blau (Si-Phthalocyanin mit axialen PEG-Liganden), Fluoresceinisothiocyanat ("FITC"), Rhodaminisothiocyanat, 2,4-Dinitrofluorbenzol, Phenylisothiocyanat, Dansylchlorid, substituierte Rhodaminisothiocyanate ("XRITC"), Tetraethylrhodaminisothiocyanat ("TRITC"), Cadaverin ("TRAP") und Phycobiliproteine (z.B. Allophycocyanin, HDITCP (1,1',3,3',3',3'-Hexamethyl-4,4',5,5'-dibenzo-2,2'-indotricarbocyaninpercholoat) und Phycoerythrin), Fluorophore, die im US-Patent 4,877,965 diskutiert werden, die unter Bezugnahme einbezogen wird, und das Molekül, das nachstehend gezeigt ist, welches einen Carbonsäure-Endteil zur Konjugation aufweist und als DBCY5 bekannt ist.



[0057] Geeignete Moleküle, die von Evaneszenzwellen zur Lichtemission angeregt werden, eine hohe Avidität aufweisen und für doppelsträngige Nukleinsäuren spezifisch sind, sind Ethidiumbromid, Acridinorange (C. I. Nr. 46005), Chinacrin, Diethidiumbromid, Diacridin-orange und verschiedene Heterodimere der vorstehend genannten Verbindungen. Das US-Patent 5,268,486 (Waggoner) beschreibt einen Arylsulfonatcyaninfarbstoff, der an DNA/RNA bindet, wobei das Patent unter Bezugnahme einbezogen wird.

[0058] Geeignete lichtmodulierende Verbindungen sind Cyclodextrine, H₂O₂ und andere Peroxiderivate.

[0059] Die folgende Tabelle zeigt lichtmodulierende Verbindungen, die zusammen mit verschiedenen lichtemittierenden Verbindungen nützlich sind, und den Effekt (dazugehörige Eigenschaftsänderung) der lichtmodulierenden Verbindung.

lichtemittierende Verbindung	lichtmodulierende Verbindung	Effekt		
		E	Q	WLS
Fluorescein	Cyclodextrin	-		
Fluorescein	Rhodamin			-
DBCY5	Peroxid		-	

wobei "E" für "Verstärkung", "Q" für "Quenchen" und "WLS" für "Wellenlängenverschiebung" steht.

Binden von Sonden an den Wellenleiter

[0060] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 2](#) kann die Konfiguration der diskreten Bereiche **22** auf der Wellenleiteroberfläche eine Anordnung paralleler Streifen sein. Unter Bezugnahme auf die [Fig. 1](#) ist eine bevorzugte Konfiguration diskreter Bereiche auf der Wellenleiteroberfläche eine Matrix aus Reihen und Spalten von Punkten bzw. Flecken. Die Form der diskreten Bereiche **22** kann eine beliebige Form sein, welche die Detektion durch einen Detektor ermöglicht, z.B. Quadrate, Dreiecke oder Sterne. Eine bevorzugte Form sind Punkte bzw. Flecken (in etwa rund) und Streifen (in etwa rechteckig). Punkte bzw. Flecken sind eine mehr bevorzugte Form, um die maximale Ausnutzung der Oberfläche des Wellenleiters zu erleichtern.

[0061] Die diskreten Bereiche **22** können als Detektionsgrenze der Analyse eine geringe Größe aufweisen. Typischerweise erfordern die Detektionsgrenzen eine Größe des diskreten Bereichs von mindestens etwa 20^{-2} bei einer 1:1-Bildgebungsoptik. Die Sonden werden in diskreten Bereichen auf mindestens eine Oberfläche des Wellenleiters aufgebracht. Unter Bezugnahme auf die [Fig. 3](#) können die Sonden **20** und **20'** auf beide Oberflächen des Wellenleiters aufgebracht werden.

[0062] Das US-Patent 5,429,807 (Mattson et al.), das auf den Inhaber des vorliegenden Patents, Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, Kalifornien), übertragen worden ist, beschreibt ein Verfahren, das zum Aufbringen von Sonden in diskreten Bereichen auf dem Wellenleiter geeignet ist. Insbesondere beschreibt dieses Patent ein automatisiertes Verfahren zur Durchführung einer Makromolekülsynthese auf einer Wellenleiteroberfläche, wodurch eine zweidimensionale Anordnung von Biopolymeren in diskreten Bereichen auf der Oberfläche erhalten wird.

[0063] Ein weiteres Verfahren zum Aufbringen von Sonden in diskreten Bereichen auf dem Wellenleiter ist die Verwendung eines Tintenstrahldruckers. Typischerweise weist ein käuflicher Tintenstrahldrucker etwa vier Düsen bzw. Strahlen auf, die jeweils mit einer unterschiedlichen Sonde beladen werden können. Ein Tintenstrahldrucker, der für die Mikroherstellung kundenspezifischer Einheiten vorgesehen ist, weist typischerweise sechs Düsen bzw. Strahlen auf, die mit verschiedenen Sonden beladen werden können. Diese käuflichen oder für die Mikroherstellung vorgesehenen Tintenstrahldrucker können so modifiziert werden, dass sie mehr "Düsen bzw. Strahlen" bereitstellen, so dass eine größere Anzahl verschiedener Sonden in einem einzelnen Durchlauf des Wellenleiters durch den Drucker aufgebracht werden kann. Der Wellenleiter kann durch eine Mehrzahl von Tintenstrahldruckern geschickt werden, wobei jeder Tintenstrahldrucker Sonden aufbringt. Alternativ wird ein Stapel von Wellenleiterplatten durch einen einzelnen Tintenstrahldrucker geschickt, um Sonden aufzubringen. Die Düsen werden dann gereinigt und mit verschiedenen Sonden beladen und das Verfahren wird so oft wiederholt, wie es erforderlich ist.

[0064] Beispielsweise kann ein Bandpassfilter bezüglich des Lichts von dem Laser verwendet werden, um sicherzustellen, dass nur Licht mit einer gewünschten Wellenlänge in den Wellenleiter eingeleitet wird, d.h. nur Licht mit einer Wellenlänge, auf welche der Farbstoff reagiert. Entsprechend kann ein Emissionsbandfilter zwischen dem Wellenleiter und der Detektionsvorrichtung zum Ausfiltern des Lichts aller Wellenlängen bereitgestellt werden, die von denjenigen verschieden sind, von denen erwartet wird, dass sie von dem ausgewählten Fluorophor emittiert werden.

[0065] Die folgenden US-Patente, die unter Bezugnahme einbezogen werden, beschreiben Verfahren und Vorrichtungen zum Binden von Polynukleotiden und/oder Polypeptiden an Polypropylen, Polystyrol, Glas und andere Wellenleitermaterialien: US-Patent 5,135,785 (Farnsworth), 4,065,412 (Dreyer), 4,704,256 (Hood), 4,603,114 (Hood), 3,652,761 (Weetal), 4,695,537 (Dorsett), 5,242,797 (Hirschfeld) und 4,631,211 (Houghten). Verfahren zur Derivatisierung von Polypropylen zum Binden an Polynukleotide sind in der gleichzeitig anhängigen US-Patentanmeldung mit der Nummer 07/091,100 beschrieben, das auf den Inhaber des vorliegenden Patents, Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, Kalifornien), übertragen worden ist.

[0066] Kontrollsonden können zum Testen bezüglich Fehlern bei der Durchführung eines Tests verwendet werden. Eine Kontrollsonde reagiert auf Kontroll-Zielanalyten. Eine oder mehrere Kontrollsonde(n) wird bzw. werden auf den Wellenleiter an diskreten Bereichen aufgebracht, wie es vorstehend beschrieben worden ist. Die zu analysierende Probe wird mit Kontrollanalyten versetzt. Wenn der Test richtig funktioniert, gibt es ein positives Signal für den Kontrollanalyten. Wenn kein positives Signal erhalten wird, zeigt dies ein Problem mit dem Test. Das als Kontrolle verwendete Molekül ist kein Zielanalyt, bei dem es sich um den Gegenstand der Analyse handelt.

Wasserdurchlässige Deckschicht

[0067] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 2](#) kann gegebenenfalls eine wasserdurchlässige Deckschicht **32** auf die Oberflächen **23** und **25** des Wellenleiters aufgebracht werden. Typischerweise ist die wasserdurchlässige Deckschicht ein Sol-Gel. Unter Bezugnahme auf die [Fig. 4B](#) besteht die Funktion der wasserdurchlässigen Deckschicht **32** darin, die Eingrenzung des Laserstrahls innerhalb des Wellenleiters zu verstärken. Insbesondere können Defekte auf den Oberflächen **23** und **25** des Wellenleiters vorliegen (z.B. Kratzer und Schnitte), durch die Licht aus dem Wellenleiter heraus gebrochen werden kann. Die wasserdurchlässige Deckschicht **32** fängt dieses austretende Licht ein und reflektiert es innerhalb des Wellenleiter-wasserdurchlässige Deckschicht-Komplexes.

[0068] Typische Sol-Gele sind transparente Oxidgläser, die Licht durchlassen und wasserdurchlässig sind. Sol-Gele können durch Hydrolyse und Polykondensation von Alkoxiden wie z.B. Tetramethylorthosilikat hergestellt werden. Ein typisches Herstellungsverfahren wird in Science, 255, 1113–1115 (1992) von Zink et al. diskutiert.

[0069] Der Brechungsindex des Sol-Gels kann durch Alterung oder Mischen der Zusammensetzung mit Materialien auf TiO_2 -Basis modifiziert werden.

[0070] Das Sol-Gel kann auf den Wellenleiter mittels Schleuderbeschichten aufgebracht werden. Das Schleuderbeschichten kann vor oder nach dem In-Kontakt-Bringen des Wellenleiters mit der Probe stattfinden. Wenn das Sol-Gel mittels Schleuderbeschichten zuerst aufgebracht wird, dann wird die Probe auf das Sol-Gel aufgebracht und sie dringt durch das Sol-Gel zu den Sonden durch.

Eine Mehrzahl von Sondenschichten auf dem Wellenleiter

[0071] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 3](#) wird bei einer Ausführungsform der Erfindung ein erster Satz von Sonden **22** auf die erste Oberfläche **23** und ein zweiter Satz von Sonden **22'** auf die zweite Oberfläche **25** des Wellenleiters **24** aufgebracht. Unter Bezugnahme auf die [Fig. 5](#) strahlen dann, wenn ein Laserstrahl **42** in den Wellenleiter **24** eingeleitet wird, Evaneszenzwellen **30** und **30'** aus sowohl der ersten Oberfläche **23** als auch der zweiten Oberfläche **25** des Wellenleiters und regen Sonde-Probe-Komplexe sowohl auf der ersten Oberfläche **23** als auch auf der zweiten Oberfläche **25** des Wellenleiters **24** an.

[0072] In einer anderen Ausführungsform werden Sonden in einer dreidimensionalen Anordnung in einem Würfel eingebettet. Der Würfel ist ein „Schichtkuchen“ aus Wellenleiter mit dazwischen angeordnetem Sol-Gel. In diesem Fall wird der Brechungsindex des Sol-Gels höher gemacht als der Brechungsindex des Kunststoffs, so dass das Sol-Gel zu dem Wellenleiter wird.

Binden einer lichtreaktionsfähigen Verbindung an eine Probe oder eine Sonde

[0073] Verfahren zum Binden einer lichtreaktionsfähigen Verbindung an Zielanalyten in einer Probe und/oder an einen spezifischen Bindungspartner an einer Sonde sind dem Fachmann bekannt und umfassen Verfahren wie diejenigen, die in L. M. Smith et al., Nucleic Acids Research, Band 213, Seite 2399 (1985); B. S. Packard et al., Biochemistry Biophysics Acta, Band 769, Seite 2010208 (1984); P. K. Bhattacharyya et al., Biochemistry Biophysics Research Communities, Band 101, Seiten 273–280 (1981); H. Haigler et al., Proceedings of The National Academy Of Science U.S.A., Band 75, Seiten 3317–3321 (1978); M. J. Anderson et al., Journal of Physiology, Band 237, Seiten 385–400 (1974); R. D. Spencer et al., Clinical Chemistry, Band 19, Seiten 838–844 (1973); Y. Zagyansky et al., Science, Band 191, Seiten 466–468 (1976); A. N. DeBelder et al., Carbohydrate Research, Band 30, Seiten 375–378 (1973); T. Oonishi et al., Journal of Immunological Methods, Band 84, Seiten 143–154 (1985); Arriaga et al., Anal. Chim. Acta, 299, 319–326, 1995; Chang et al., Anal. Chem. 67, 959–966, 1995; Chang et al., Anal. Chem. 67, 959–966, 1995; Fadden et al., Anal. Biochem., 225, 81–88, 1995; Zakharov et al., Anal. Biochem. 224: 195–198, 1995; Fukase et al., J. Carbohydr. Chem, 13,

715–736, 1994; Liu et al., *Bioorganic Chem.*, 22, 29–35, 1994; Mansour et al., *Cytometry*, 15, 272–276, 1994; Sikorski et al., *Tetrahedron Lett.*, 35, 4275–4278, 1994; Starke et al., *Nucleic Acids Res.*, 22, 3997–4001, 1994; V. V. Didenko, *Anal. Biochem.*, 213, 75–78, 1993; Guldutuna et al., *Clin. Chim. Acta*, 214, 195–207, 1993; Mansfield et al., *Bio-Techniques*, 15: 274–279, 1993; Mujumdar et al., *Bioconjugate Chem.*, 4, 105–111, 1993; Robertson et al., *J. Comp. Neurol.*, 328, 485–500, 1993; Rothenberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11939–11943, 1993; Wang et al., *Anal. Chem.*, 65, 3518–3520, 1993; Williams et al., *Anal. Chem.*, 65, 601–605, 1993; S. Hase, *J. Protein Chem.*, 11, 387, 1992; Kobayashi et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 186–189, 1992; Okano et al., *Anal. Biochem.*, 202, 120–125, 1992; Ragnarson et al., *Histochemistry*, 97, 329–333, 1992; Y. Ran Kim et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 97, 331–337, 1992; T. Sano et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1534–1538, 1992; Schmitz et al., *Cytometry*, 13, 478–484, 1992; J. Suzuki et al., *Clin. Chem.*, 38, 752–755, 1992; Y. Tsuruta et al., *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)* 40, 1626–1628, 1992; K. Yamaki et al., *Jpn. J. Pharmacol.*, 58, 299–307, 1992; P. Zhuang et al., *Biotechnol. Prog.*, 8, 204–210, 1992; J. Corsetti et al., *Anal. Biochem.*, 195, 122–129, 1991; Diamandis et al., *Clin. Chem.*, 37, 1486–1491, 1991; Friedman et al., *Dil. Brain Res.*, 560, 297–302, 1991; Meadows et al., *J. Immunol. Methods*, 143, 263–272, 1991; G. Patonay et al., *Anal. Chem.*, 63, 321A–327A, 1991; A. Rigglin et al., *Anal. Chem.*, 63, 468–474, 1991; E. Sakal et al., *Biochem.*, 30, 8899–8904, 1991; R. Shimazawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 259–265, 1991; Y. Uchimura et al., *Gene*, 108, 103–108, 1991; W. Volker et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 39, 1385–1394, 1991; J. G. Westmur, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 26, 227–259, 1991; Yamada et al., *Anal. Biochem.*, 199, 132–136, 1991; Oser et al., *Anal. Biochem.*, 191, 295–302, 1990; und im US-Patent 5,268,486 (Waggoner) beschrieben sind. Eine bevorzugte Technik zum Binden eines Fluorophors an einen Zielanalyten in der Probe und/oder der Sonde ist derart, dass das Fluorophor mit einem langkettigen Carbonsäure-Endteil versehen wird. Das Fluorophor kann dann unter Verwendung eines Kopplungsmittels wie z.B. Carbodiimid an Amingruppen oder andere nucleophile Gruppen gebunden werden.

[0074] Die Empfindlichkeit und die Vielseitigkeit des Tests kann durch die Verwendung einer Mehrzahl lichtreaktionsfähiger Verbindungen verbessert werden, wenn (1) mit bestimmten Sonden eine lichtreaktionsfähige Verbindung assoziiert ist und mit anderen Sonden eine andere lichtreaktionsfähige Verbindung assoziiert ist und/oder (2) verschiedene lichtreaktionsfähige Verbindungen an verschiedene Proben gebunden sind. Der Ausdruck „lichtreaktionsfähige Verbindungen“ bezieht sich sowohl auf „lichtemittierende Verbindungen“ als auch auf „lichtmodulierende Verbindungen“. Das Assoziieren verschiedener lichtreaktionsfähiger Verbindungen mit verschiedenen Sonden erleichtert es einem Detektor, zwischen Sonden an verschiedenen diskreten Bereichen zu unterscheiden. Dies wird z.B. dadurch erreicht, dass die lichtemittierenden Verbindungen Licht bei verschiedenen Wellenlängen emittieren. Dies verbessert die Vielseitigkeit und die Empfindlichkeit des Tests, da eine lichtreaktionsfähige Verbindung, die zur Wechselwirkung mit einem bestimmten Zielanalyten in einer Probe am Besten geeignet ist, mit der Sonde für diesen Zielanalyten assoziiert werden kann. Eine andere lichtreaktionsfähige Verbindung, die am Besten zur Wechselwirkung mit einem zweiten Zielanalyten in der Probe geeignet ist, kann mit der Sonde für den zweiten Zielanalyten assoziiert werden.

[0075] Das Assoziieren verschiedener lichtreaktionsfähiger Verbindungen mit verschiedenen Proben ermöglicht die Analyse von mehr als einer Probe gleichzeitig. Dies wird z.B. durch die Verwendung lichtreaktionsfähiger Verbindungen erreicht, die Licht bei Wellenlängen emittieren, die ausreichend verschieden sind, so dass ein Detektor (nachstehend diskutiert) zwischen den Wellenlängen unterscheiden kann.

Laserlicht

[0076] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 5](#) kann eine Laserlichtquelle **38** ein Nahinfrarot-Laser („NIR“-Laser), ein Laser mit sichtbarem Licht oder ein Ultraviolett-Laser („UV“-Laser) sein. Langwelliges Licht im Nahinfrarotbereich ist bevorzugt, da langwelliges Licht das Hintergrundrauschen vermindert und die Verwendung ladungsgekoppelter Detektoren („CCD“) erleichtert. In nassen Proben (nachstehend beschrieben) ist die bevorzugte Wellenlänge nicht größer als etwa 1000 nm, da größere Wellenlängen zu einer Störung führen, die durch das Laserlicht verursacht wird, das mit Wasser in der nassen Probe eine Wechselwirkung eingeht, und das Si einer CCD nicht reagiert. In trockenen Proben liegt die bevorzugte Wellenlänge bei etwa 600 bis etwa 960 nm, da nur die Si-Reaktion von Bedeutung ist. Kleine Wellenlängen im Ultraviolettbereich des Spektrums können auch verwendet werden, jedoch ist ultraviolettes Licht nicht mit einer Übertragung durch einen Polystyrol-Wellenleiter kompatibel. Die Leistungsabgabe des Lasers beträgt etwa 1 mW bis etwa 100 mW. Ein Diodenlaser (z.B. Galliumarsenid) ist eine bevorzugte Laserlichtquelle. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Diodenlaser käuflich und billig sind sowie eine geeignete Leistung aufweisen.

[0077] Käufliche Diodenlaser, die zur Verwendung in dieser Erfindung geeignet sind, sind Galliumarsenid-Laser, die Laserlicht bei 650, 660 oder 670 nm emittieren, und die von Toshiba (Tokio, Japan) als Modelle Nr.

TOLD9321, TOLD9412, TOLD9520 verkauft werden; 750, 790 und 810 nm-Laser, die von Sharp Corp. (Osaka, Japan) als Modelle LTU16, LTU24, LTU31 verkauft werden, und ein Laser mit eingebauter Optik, der von Lasiris, Inc. (St. Laurent, Quebec, Kanada) als Modell Nr. SNF 501-H verkauft wird.

[0078] Die Laserlichtquelle **38** emittiert einen bleistiftförmigen Strahl **40**, der in den schlitzförmigen Lichtstrahl **42** umgeformt werden muss. Eine optische Vorrichtung **44**, die vom nicht-Gauss-Typ ist, ist aufgrund ihrer Einfachheit bevorzugt. Eine solche optische Vorrichtung ist im US-Patent 4,826,299 und im kanadischen Patent 1,276,829 beschrieben. Die Vorrichtung nutzt Prismen, um eine „Liniendetektor“-Funktion zu erreichen. Eine solche optische Vorrichtung des nicht-Gauss-Typs ist von Lasiris, Inc. (St. Laurent, Quebec, Kanada) als Modell Nr. SNF-501-H und SLH-501-H erhältlich.

[0079] Das Umformen kann auch unter Verwendung einer Optik **44** des Gauss-Typs erreicht werden, insbesondere mit einer zylindrischen Optik, einer Kantendetektoroptik oder einer sphärischen Optik. Eine zylindrische Optik ist bevorzugt. Unter Bezugnahme auf die [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) umfasst die zylindrische Optik eine erste plankonvexe zylindrische Linse **46** und eine optionale zweite plankonvexe zylindrische Linse **48**, die im Wesentlichen identisch sind. Die plankonvexen Zylinderlinsen weisen eine planare Fläche **50** und **50'** auf. Genau gegenüber jeder planaren Fläche liegt eine konvexe Fläche **52** und **52'**. Die Linsen sind aus Quarz- oder Borosilikatglas hergestellt. Die Abmessungen der Linse liegen zwischen etwa 0,2" (L) × 0,1" (B) × 0,2" (T) bis etwa 1" (L) × 0,5" (B) × 2" (T), wobei bevorzugte Abmessungen 0,5" (L) × 0,1" (B) × 0,2" (T) sind (1" entspricht 2,54 cm). Die Brennweite der plankonvexen Zylinderlinse liegt zwischen etwa 3 mm bis etwa 20 mm, wobei eine bevorzugte Brennweite zwischen 5 mm und 6 mm liegt. Die Linse ist von Melles Griot Corp., Irvine, Kalifornien, als Teil #01 LCP 000 oder 01 LCP 124 erhältlich.

[0080] Eine einzelne plankonvexe zylindrische Linse ist bevorzugt. Alternativ wird ein System aus zwei plankonvexen zylindrischen Linsen verwendet. Die beiden plankonvexen zylindrischen Linsen **46** und **48** sind in einer Vorderseite-Vorderseite-Konfiguration angeordnet. Zwischen den Linsen kann ein Filter angeordnet werden.

[0081] Die Intensität der Lichtemission von einer Laserdiode folgt einer Gauss-Verteilung. Trotz dieser Gauss-Verteilung liegt üblicherweise eine im Wesentlichen gleiche Beleuchtung über die Gesamtheit des Wellenleiters vor. Wenn das analytische Verfahren an der Empfindlichkeitsgrenze für die Detektion durchgeführt wird, kann es erforderlich sein, eine ungleichmäßige Beleuchtung zu korrigieren. Der Fachmann ist mit mathematischen Formeln zur Kompensation der Gauss-Verteilung der Laserlichtintensität vertraut. Als Alternative zu einer mathematischen Korrektur wird eine lichtemittierende Verbindung mit einer bekannten Emission auf den Wellenleiter aufgebracht. Diese Verbindung dient als interner Standard, bezüglich dessen Korrekturen auf der Basis der detektierten Emission und der bekannten Emission durchgeführt werden.

[0082] Es kann ein proximales Prisma **58** vorliegen, das an dem Endabschnitt **56** des Wellenleiters **24** angeordnet ist, wo Licht in den Wellenleiter eintritt. Der Zweck dieses proximalen Prismas **58** liegt darin, den Abstrahlwinkel **26** des Schlitzstrahls in den Wellenleiter so einzustellen, dass er kleiner als der kritische Winkel ist. Vorzugsweise stellt das Prisma den Abstrahlwinkel so ein, dass das beste Signal-Hintergrund-Verhältnis bereitgestellt wird. Die mehr bevorzugten Abstrahlwinkel liegen bei etwa 1° bis etwa 39°, wobei 30° am meisten bevorzugt sind.

[0083] Unter weiterer Bezugnahme auf die [Fig. 5](#) kann an dem distalen Abschnitt **62** des Wellenleiters **24** gegebenenfalls ein Kopplungsprisma **60** vorliegen, d.h. am Ende des Substrats gegenüber dem Ende, an dem Laserlicht den Wellenleiter **24** verlässt. Der Zweck dieses Kopplungsprismas besteht darin, das Laserlicht **42** und Evaneszenzwellen **30** von dem Wellenleiter **24** austreten zu lassen. In einer Konfiguration, bei der die Kopplungsprismen **58** und **60** an beiden Enden des Wellenleiters **24** angeordnet sind, dienen die Prismen dem zusätzlichen Zweck, dass sie eine Plattform zum Halten des Wellenleiters **24** sind.

[0084] Die Kopplungsprismen sind dreieckige Blöcke. Typischerweise haben die Kopplungsprismen Abmessungen von etwa 1 mm (L) × 1 mm (B) × 1 mm (T) bis etwa 3 cm (L) × 3 cm (B) × 3 cm (T). Die Kopplungsprismen sind aus Quarz- oder Borosilikatglas hergestellt. Der Brechungsindex liegt bei etwa 1,4 bis etwa 1,6. Ein geeignetes Prisma, das als halbsphärisches Prisma bekannt ist, ist von Harrick Scientific, Ossining, New York, erhältlich.

[0085] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 5](#) müssen die Grenzflächen zwischen den Prismen **58** und **60** und den Abschnitten der Substrate **56** und **62** im Wesentlichen frei von Luftblasen sein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Luftblasen eine Beugung des Laserlichts verursachen, was zu einem Hintergrundrauschen und einem

Verlust an Laserintensität führt. Ein Weg zum Erreichen einer blasenfreien Grenzfläche besteht darin, auf die Grenzfläche ein Kopplungsfluid aufzubringen. Das Kopplungsfluid hat den gleichen Brechungsindex wie das Prisma. Das Kopplungsfluid ist von Cargille Laboratories unter der Bezeichnung REFRACTIVE INDEX MATCHING FLUID erhältlich. Die Verwendung eines Kopplungsfluids hat den zusätzlichen Nutzen der einheitlichen Verstärkung des lateralen Felds. Ein weiterer Weg zum Erreichen einer blasenfreien Grenzfläche besteht darin, Druck auf das Prisma auszuüben, um es gegen den Wellenleiter zu drücken, so dass jedwede Luftblasen herausgedrückt werden. Dies kann durch einen Klemmmechanismus erreicht werden.

Detektionsvorrichtung, Bildgebungsoptik und konfokale Linse

[0086] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 5](#) kann ein Detektor **64**, der zur Detektion von emittiertem Licht verwendet wird, eine Ladungsübertragungsvorrichtung („CTD“) sein. Eine CTD weist eine zweidimensionale Mehrfachsäulen-Anordnung, d.h. Pixel, auf. Wenn Licht auftrifft, baut jede Säule (Pixel) eine Ladung auf und erzeugt ein Ausgangssignal. Das an einem diskreten Bereich auf dem Wellenleiter emittierte Licht wird auf die aktive Detektionsoberfläche der CTD fokussiert und wird abhängig von dem emittierenden Bereich und der Vergrößerung und der Fokussierung der Sammeloptik ein oder mehrere Pixel beleuchten. Die auf allen beleuchteten Pixeln angesammelte Ladung wird in einem Ausgangssignal aufsummiert. Dieses Aufsummieren kumulativer Ladungen wird als „Binning“ bezeichnet. Es gibt zwei Haupttypen von CTD's, nämlich eine ladungsgekoppelte Vorrichtung („CCD“) und eine Ladungsinjektorvorrichtung („CID“). CCD's sind von Photometrics Ltd., Tucson, Arizona, und Princeton Instruments, Princeton, New Jersey, erhältlich.

[0087] Der Detektor **64** kann mit einer Bildgebungsoptik, einschließlich einer konfokalen Linse **66**, ausgestattet werden. Der Detektor kann mit Filtern ausgestattet werden, um Licht abzuhalten, das eine von einer ausgewählten Wellenlänge verschiedene Wellenlänge aufweist. Solche Filter werden verwendet, wenn bei dem Test verschiedene lichtreaktionsfähige Verbindungen eingesetzt werden, die Licht bei verschiedenen Wellenlängen emittieren.

Zielanalyten

[0088] Eine beispielhafte Liste von Zielanalyten, bezüglich derer ein Test durchgeführt werden kann, sind: (1) Hormone, einschließlich unter anderem Insulin, follikelstimulierendes Hormon, Progesteron, Östron, Testosteron, Adrenalin (Epinephrin) und Noradrenalin (Norepinephrin); (2) illegale Drogen, einschließlich unter anderem Amphetamine, Methamphetamine, Mescaline, Lysergsäurediethylamid (LSD), Morphin und N-Ethyl-3-piperidylbenzilat; (3) Immunfaktoren, einschließlich unter anderem Interferon, Leukotriene und Makrophagenbeschichtung-stimulierender Faktor; (4) mit Krebs zusammenhängende Moleküle, einschließlich unter anderem Myelome, neoembryonische Antigene, epidermalartiger Wachstumsfaktor, insulinartiger Wachstumsfaktor und Tumornekrosefaktor; (5) Antikörper gegen Viren und Krankheiten, einschließlich unter anderem Antikörper gegen Hepatitis, AIDS (erworbene Immunschwächekrankheit), Polymyelitis, Masern, Diphtherie und Gelbfieber; (6) Toxine und Gifte, einschließlich unter anderem Arsenik, Strychnin und bakterielle Endotoxine, und (7) verschiedene Blutkomponenten und Proteine, einschließlich unter anderem Immunglobuline, Komplementproteine, Lipoproteine mit niedriger Dichte, Lipoproteine mit hoher Dichte, Cholesterin und Serumalbumin.

Verfahren

[0089] Zur Durchführung eines Tests wird eine Probe gegebenenfalls im Vorhinein mit einer oder mehreren lichtreaktionsfähigen Verbindungen) umgesetzt. Die lichtreaktionsfähige Verbindung kann entweder eine lichtemittierende Verbindung oder eine lichtmodulierende Verbindung sein. Wenn die Probe nicht im Vorhinein mit einer lichtemittierenden Verbindung umgesetzt wird, umfassen die Sonden auf dem Wellenleiter eine lichtemittierende Verbindung oder es wird ein Entwickler verwendet. Wenn eine lichtemittierende Verbindung an eine Probe gebunden wird, kann es bevorzugt sein, eine lichtmodulierende Verbindung in die Sonden auf dem Wellenleiter einzubeziehen.

[0090] Der nächste Schritt besteht darin, eine Probe auf den Wellenleiter aufzubringen. Dies kann durch Eintauchen, Gießen, Bürsten oder Sprühen durchgeführt werden. Der Wellenleiter wird geeigneten Bedingungen unterworfen, um die Bildung eines Komplexes zwischen der Sonde und jedweden Zielanalyten in der Probe zu erleichtern. Dies kann eine Inkubation bei einer erhöhten Temperatur, ein Erhöhen oder Vermindern des pH-Werts oder der Salzkonzentration erfordern. Wenn beispielsweise die Sonde ein Antikörper ist, kann es erforderlich sein, bei einer erhöhten Temperatur zu inkubieren. Wenn die Sonde ein Oligonukleotid ist, kann es erforderlich sein, eine Waschlösung anzuwenden, um die Salzkonzentration zu vermindern. Die erforderlichen Reaktionsbedingungen und -zeiten sind dem Fachmann auf der Basis des jeweiligen Zielanalyten und des je-

weiligen spezifischen Bindungspartners klar.

[0091] Wenn ein Entwickler (z.B. ein monoklonaler Antikörper oder ein Zielanalytanalogen mit einer daran gebundenen lichtreaktionsfähigen Verbindung) verwendet wird, wird dieser in der gleichen Weise wie die Probe auf den Wellenleiter aufgebracht, und zwar abhängig vom Typ des Tests gleichzeitig oder aufeinander folgend. Der Wellenleiter wird dann geeigneten Bedingungen unterworfen, um die Bildung eines Komplexes zwischen Entwickler und Zielanalyt-Sonde, wie es vorstehend beschrieben worden ist, bezüglich der Bildung des Komplexes Probe-Sonde zu erleichtern.

[0092] Der Wellenleiter muss nicht getrocknet werden. D.h., die Analyse kann "nass" durchgeführt werden. Die Analyse nass durchführen zu können ist einer der Vorteile dieser Version der Erfindung, da die Zeit und die Kosten eines Trocknungsschritts eingespart werden. Ferner vereinfacht das Fehlen eines Trocknungsschritts die automatisierten Verarbeitungsgeräte. Wenn die Analyse nass durchgeführt wird, emittiert die Laserlichtquelle Licht zwischen etwa 600 nm bis etwa 960 nm. Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 960 nm geht mit Wasser in der nassen Probe eine Wechselwirkung ein, was gegebenenfalls zu falschen Ergebnissen führt.

[0093] Gegebenenfalls kann der Wellenleiter getrocknet werden, bevor ein Laserstrahl in den Wellenleiter eingeleitet wird. Es ist bevorzugt, den Wellenleiter zu trocknen, wenn die ausgewählte lichtreaktionsfähige Verbindung Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 960 nm erfordert, oder um die Empfindlichkeit der Analyse zu verbessern. Gegebenenfalls kann eine Sol-Gel-Deckschicht auf den Wellenleiter aufgebracht werden, falls eine Sol-Gel-Deckschicht nicht vor dem Aufbringen der Probe aufgebracht worden ist. Dies ist bevorzugt, wenn eine hohe Empfindlichkeit erforderlich ist, da das Sol-Gel jedwede diffuse Reflexion vermindert.

[0094] Ein Laserstrahl wird in den Wellenleiter eingeleitet und die Emission jedweden Lichts von jedem diskreten Bereich wird detektiert.

Modifiziertes Verfahren unter Verwendung einer Epi-Beleuchtung

[0095] Eine Version dieser Erfindung nutzt eine Epi-Beleuchtung anstelle des Einleitens von Laserlicht in das Substrat. Diese Version der Erfindung wird gemäß dem Verfahren durchgeführt, das vorstehend beschrieben worden ist, wobei die folgenden Modifizierungen vorgenommen werden. Es werden lichtreaktionsfähige Komponenten ausgewählt, die Licht bei einer Wellenlänge emittieren, die von der Wellenlänge des eintretenden Lichts verschieden ist. Der Wellenleiter wird mit einem Sol-Gel mit einem Brechungsindex beschichtet, der im Wesentlichen mit dem Brechungsindex des Wellenleiters identisch ist. In den Wellenleiter wird Licht in einem Winkel eingeleitet, der zu der Ebene des Wellenleiters in etwa senkrecht ist. Der Detektor wird mit einem Filter ausgestattet, um Licht mit einer Wellenlänge, die gleich der Wellenlänge des eintretenden Lichts ist, abzuhalten. Die Detektion von Licht an einem diskreten Bereich zeigt die Gegenwart des speziellen Zielanalyten in der Probe an.

Beispiel 1

[0096] Dieses Beispiel zeigt einen Versuch, erfindungsgemäß eine quantitative Analyse bezüglich Digoxin durchzuführen.

[0097] Ein Wellenleiter wurde in einer Dicke von 4 mm aus einem Polystyrolfilm ausgebildet. Auf den Wellenleiter wurde Avidin in Flecken- bzw. Punktform aufgedruckt. Eine Mehrzahl von Proben, die eine vorgegebene Konzentration an freiem Digoxin enthielten, wurde unter Verwendung von Digoxin als Zielanalyt hergestellt. Die Proben wurden mit einer 10^{-9} -molaren Konzentration von biotinyliertem Digoxin versetzt, das als Analogon wirkte, um mit dem freien Digoxin um die Bindung an einen fluoreszierend markierten monoklonalen Antikörper zu konkurrieren, mit dem die Probe ebenfalls versetzt wurde. Die mit den vorstehend genannten Substanzen versetzten Proben wurden auf den Wellenleiter aufgebracht und mit Avidin-Flecken bzw. -Punkten reagieren gelassen. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff war DBCY5, der mit einer NHS-Estergruppe zur Reaktion mit der Aminogruppe an dem Antikörper synthetisiert worden ist. Der an den Zielanalyten gebundene, Farbstoff-markierte Antikörper wurde dann wegmaskiert, wobei der fluoreszierend markierte Antikörper zurückblieb, der an das biotinylierte Digoxin gebunden worden war. Der Test wurde mit einem Phosphatpuffer durchgeführt, um den pH-Wert bei etwa 7,6 zu halten. Nachdem jede Probe auf den Wellenleiter aufgebracht worden ist, wurde die Probe 30 min inkubiert und dann trocken geblasen.

[0098] Laserlicht von einem Gallium-Aluminiumarsenid-Laser bei etwa 670 nm wurde auf den Wellenleiter an-

gewandt und zur Aktivierung des Farbstoffs verwendet.

[0099] Die [Fig. 7](#) zeigt die Reaktionskurve von dem Test. Die Kurve zeigt, dass diese Technik bei einer qualitativen Analyse gut war, jedoch bei einer quantitativen Analyse nur eingeschränkt erfolgreich war. Spätere Experimente zeigten, dass der spezifische Bindungspartner kovalent an dem Wellenleiter gebunden war.

Beispiel 2

[0100] Dieses Beispiel zeigt die qualitative Detektion eines DNA-Oligonukleotid-Zielanalyten.

[0101] Der verwendete Wellenleiter wurde in einer Dicke von etwa 3 mm aus einem Polypropylenfilm hergestellt. Ein Oligonukleotid mit kurzer Sequenz, das zu dem Zielanalyten komplementär war, wurde unter Verwendung einer Acylfluorid-Kupplung kovalent an den Wellenleiter gekuppelt und diente als Sonde. Sowohl das Ziel als auch die Sonde waren etwa 10 bis 15 Nukleotide lang. Der Zielanalyt wurde mit CY5-Farbstoff vorbehandelt und auch mit einer Avidin-Verknüpfung ausgestattet. Der CY5-Farbstoff ist mit dem vorstehend gezeigten DBCY5-Farbstoff identisch, jedoch ohne die beiden äußersten Benzolringe. Die Sonde wurde mit einer Biotin-Verknüpfung ausgestattet. Auf einer seiner Oberflächen wies der Wellenleiter eine Schicht aus Reihen und Spalten von Flecken bzw. Punkten der Sonde auf. Die Probe wurde auf den Wellenleiter aufgebracht, inkubiert und getrocknet. Ein Laser stellte Licht bei 670 nm bereit.

[0102] Die [Fig. 8](#) zeigt die Ergebnisse. In der [Fig. 8](#) zeigt ein heller Fleck bzw. Punkt das Binden des Ziel-Oligonukleotids an die Sonde an, während ein dunkler Fleck bzw. Punkt bedeutet, dass sich in einer Probe kein Ziel-Oligonukleotid befindet.

[0103] Das erfindungsgemäße System weist signifikante Vorteile auf. Es ermöglicht die kostengünstige und schnelle Analyse von Proben bezüglich einer Mehrzahl von Analyten unter Verwendung eines überschaubaren und einfachen Verfahrens. Es kann Zielanalyten genau detektieren. Darüber hinaus kann der in dem System verwendete Detektor durch herkömmliche Druckgeräte hergestellt werden. Das Verfahren kann mit einer nicht-komplexen Ausrüstung automatisiert und sowohl für eine qualitative als auch für eine quantitative Detektion verwendet werden.

[0104] Als die am meisten bevorzugte Version der vorliegenden Erfindung, wie sie gegenwärtig vorgesehen ist, ist der Wellenleiter aus Polystyrol hergestellt, wobei der spezifische Bindungspartner Avidin ist, das mit einer Photokopplungstechnik, wie z.B. derjenigen, die von BSI Surface Modification Sciences, Eden Prairie, Minnesota, erhältlich ist und unter der Marke "PHOTOLINK" verkauft wird, an das Polystyrol gebunden wird. Eine Probe wird mit einem Antikörper für den Zielanalyten behandelt, wobei DBCY5-Fluorophor an den Antikörper gebunden ist. Es wird ein Analogon des Zielanalyten verwendet, wobei das Analogon den an Biotin gebundenen Zielanalyten umfasst. Der Laser ist ein Gallium-Aluminiumarsenid-Laser, der Licht bei etwa 670 nm emittiert. In diesem bevorzugten Verfahren bindet das an das Biotin gebundene Zielanalogon mittels einer Avidin-Biotin-Verknüpfung an das Avidin auf dem Wellenleiter. Das Analogon trägt eine Menge an DBCY5-markiertem Antikörper, der die Konkurrenz zwischen dem Analyten und dem Analogon bezüglich Antikörper-Bindungsstellen anzeigt. Je mehr Zielanalyt in der Probe vorliegt, desto weniger Analogon bindet und desto schwächer ist das emittierte Signal.

[0105] Zusätzliche Informationen bezüglich der vorliegenden Erfindung finden sich in einem Bericht mit dem Titel "NIR Fluorescence Imaging Detection of Ligand Binding on a Planar Evanescent Wave Sensor".

[0106] Obwohl die vorliegende Erfindung sehr detailliert unter Bezugnahme auf bestimmte bevorzugte Versionen der Erfindung beschrieben worden ist, sind auch andere Versionen möglich. Beispielsweise kann für das Licht von dem Laser ein Bandpassfilter verwendet werden, um sicherzugehen, dass nur Licht mit einer bestimmten Wellenlänge in den Wellenleiter eingeleitet wird, d.h. nur Licht mit einer Wellenlänge, auf die der Farbstoff reagiert. Entsprechend kann ein Emissionsbandfilter zwischen dem Wellenleiter und der Detektorvorrichtung zum Ausfiltern des Lichts mit allen Wellenlängen außer denen, von denen erwartet wird, dass sie von dem ausgewählten Fluorophor emittiert werden, bereitgestellt werden. Daher sollte der Schutzbereich der beigefügten Ansprüche nicht auf die vorliegende Beschreibung bevorzugter Versionen beschränkt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Detektieren zumindest eines Zielanalyts in einer Probe bzw. Stichprobe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- a) Bereitstellen eines Detektors, umfassend einen planaren Wellenleiter (24), mit einer Vielzahl von diskreten Sonden (20) daran, wobei die Sonden eine zweidimensionale Anordnung bzw. Matrix bilden, wobei jede Sonde einen spezifischen Bindungspartner für ein spezifisches bzw. gewähltes bzw. ausgewähltes Analyt beinhaltet, wobei zumindest eine der Sonden eine reaktionsfähige bzw. reagierende Sonde ist, welche einen spezifischen Bindungspartner für das Zielanalyt beinhaltet, wobei zumindest eine Sonde ein Oligonukleotid umfaßt und mit einem komplementären Oligonukleotid als seinen spezifischen Bindungspartner,
- b) Anwenden bzw. Auftragen bzw. Aufbringen der Probe an dem Detektor, derart daß das Zielanalyt an seinen spezifischen Bindungspartner bindet bzw. anbindet;
- c) Einleiten bzw. Einkoppeln von Laserlicht (42) in den Detektor, so daß das abklingende bzw. rückwirkende bzw. Licht Evaneszenzlicht (30) von dem Wellenleiter strahlt und auf die Sonden auftrifft, wobei Licht, welches, falls überhaupt, von einer Sonde mit daran gebundenen bzw. haftendem Zielanalyt ausgestrahlt ist, verschieden ist von dem Licht, welches, wenn überhaupt, von derselben bzw. dergleichen Sonde ohne daran gebundenem bzw. haftendem Zielanalyt ausgestrahlt wird; und
- d) Detektion der Emission von Licht von den Sonden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine Sonde ohne daran gebundenem Zielanalyt im wesentlichen kein Licht emittiert und eine Sonde mit daran gebundenem Zielanalyt genügend Licht detektiert, um während des Detektionsschritts detektiert zu werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, umfassend den Schritt eines Anbringens einer lichtemittierenden Verbindung bzw. einer Mischung bzw. einer Masse an das Zielanalyt, bevor oder nachdem das Zielanalyt an seinen spezifischen Bindungspartner bindet, wobei die lichtemittierende Verbindung Licht emittiert, wenn das Laserlicht in den Detektor eingeleitet ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die lichtemittierende Verbindung an dem Zielanalyt befestigt bzw. angebracht ist, bevor die Probe dem Detektor zugeführt bzw. an den Detektor angebracht bzw. angehaftet ist.

5. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die lichtemittierende Verbindung ein Fluorophor ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei jede Sonde eine lichtemittierende Verbindung enthält.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Laserlicht eine Wellenlänge größer als etwa 960 nm hat und das Verfahren weiterhin den zusätzlichen Schritt des Trocknens des Wellenleiters vor Einleiten des Laserlichts umfaßt.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Laserlicht eine Wellenlänge von 600 bis 960 nm hat.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die spezifischen Bindungspartner kovalent an den Wellenleiter angehaftet bzw. geklebt bzw. gebondet sind.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sonde eine lichtemittierende Verbindung enthält, und das Verfahren den Schritt des Anbringens an das Zielanalyt umfaßt, bevor oder nachdem das Zielanalyt an seinen spezifischen Bindungspartner bindet, eine lichtmodulierende Verbindung bzw. Verbindung bzw. Mischung bzw. Masse, wobei die lichtmodulierende Verbindung das Licht beeinflusst, welches von der lichtemittierenden Verbindung emittiert wird, wenn das Laserlicht in den Detektor eingeleitet wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die lichtmodulierende Verbindung ein Quencher bzw. Löscher ist, welcher verhindert, daß die lichtemittierende Verbindung Licht emittiert.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die lichtmodulierende Verbindung an dem Zielanalyt befestigt ist, bevor die Probe an dem Detektor angebracht ist.

13. Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend, die Sonde einem Analogon des Zielanalyts auszusetzen, wobei das Analogon fähig ist, an dem gleichen bzw. selben spezifischen Bindungspartner zu binden, an welchen das Zielanalyt binden kann, so daß das Analogon und das Zielanalyt kompetitiv bzw. konkurrierend an die reaktionsfähigen Sonden binden; und Entfernen der Proben von dem Detektor vor dem Schritt des Einleitens des Laserlichts in den Detektor, so daß abklingendes Licht von dem Wellenleiter strahlt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Analoga eine lichtemittierende Verbindung enthalten, so daß lediglich reaktive Sonden mit daran angebondenem Analogon Licht emittieren.

15. Verfahren nach Anspruch 1, zum Analysieren einer Vielzahl von Proben für das gleiche bzw. selbe Zielanalyt, weiterhin umfassend ein Behandeln einer jeden Probe mit einer unterschiedlichen lichtemittierenden Verbindung, so daß die lichtemittierenden Verbindungen, welche an den Zielanalyten in den Proben festmachen um Konjugate bzw. Paare zu erzeugen; wobei der Schritt des Anbringens der Proben an dem Detektor derart ist, daß die Konjugate an den reaktionsfähigen Sonden binden; und wobei der Schritt des Eintretens des Laserlichts in den Detektor derart ist, daß abklingendes Licht von dem Wellenleiter strahlt und auf die reaktionsfähigen Sonden auftrifft, wodurch Licht erzeugt wird, welches von der lichtemittierenden Verbindung emittiert wird, wobei die verschiedenen lichtemittierenden Verbindungen verschiedenes Licht emittieren.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die verschiedenen lichtemittierenden Verbindungen Licht emittieren, welches in Wellenlänge, Intensität oder Farbe verschieden sind.

17. Verfahren nach Anspruch 1 zum Detektieren einer Vielzahl bzw. mehrfacher Zielanalyten in einer Probe, weiterhin umfassend den Schritt eines Behandeln der Zielanalyten mit einer Mehrzahl von verschiedenen lichtemittierenden Verbindungen, wobei jede lichtemittierende Verbindung an einem entsprechenden Zielanalyt festmacht, wobei die lichtemittierenden Verbindungen Licht emittieren, wenn das Laserlicht in den Detektor eingeleitet ist, wobei die verschiedenen lichtemittierenden Verbindungen verschiedenes Licht emittieren.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die lichtemittierenden Verbindungen an dem Zielanalyt angebunden sind, bevor die Probe an dem Detektor angebracht ist.

19. Verfahren nach Anspruch 1 zum Analysieren einer Probe beinhaltend zumindest ein Zielanalyt unter Benutzung einer Licht-reaktionsfähigen Verbindung, weiterhin umfassend, daß der Detektor ein Substrat mit einer Vielzahl von Sonden mit bekannter Erkennung zu ausgewählten bzw. selektierten bzw. ausgesuchten Zielanalyten in bestimmten Bereichen hat, mit einer Deckschicht mit einem Brechungsindex im wesentlichen gleich oder größer als ein Brechungsindex des Substrats, wobei die Deckschicht wasserpermeabel bzw. wasserdurchlässig ist; und wobei der Schritt des Zuführens bzw. des Befestigens der Proben an den Sonden auf dem Substrat derart ist, daß das Zielanalyt an die entsprechenden Sonden bindet; und wobei der Schritt des Einleitens bzw. Einkoppelns von Laserlicht das Substrat mit Epi-Beleuchtung (englisch: epi-illumination) beleuchtet; und wobei der Schritt des Detektierens der Emission von Licht von den Sonden an den diskreten Bereichen ist.

20. Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend, daß der Detektor ein Substrat daran hat mit einer Mehrzahl von Sonden mit bekannter Erkennung zu selektierten bzw. ausgewählten Zielanalyten in diskreten Bereichen mit einer Deckschicht mit einem Brechungsindex im wesentlichen gleich oder größer als ein Brechungsindex des Substrats, wobei die Deckschicht wasserpermeabel ist; der Schritt des Bereitstellens eines wasserhaltigen bzw. einer wässrigen Probe mit zumindest einem Zielanalyt; und wobei der Schritt des Anbringens der Probe an den Sonden an bzw. auf dem Substrat derart ist, daß Zielanalyte an entsprechenden Sonden binden; und wobei der Schritt des Einleitens von Laserlicht das Substrat mit Epi-Beleuchtung beleuchtet; und wobei der Schritt des Detektierens der Emission von Licht von den Sonden an den diskreten Bereichen jeglichen Lichts mit einer Wellenlänge verschieden zu der der epi-illumination ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die wasserpermeable Deckschicht ein Sol-Gel ist.

22. Detektor zum Detektieren eines Zielanalyts, umfassend:

a) einen planaren Wellenleiter (**24**) mit ersten und zweiten entgegengesetzten bzw. gegenüberliegenden Flächen und einem Brechungsindex größer als sein umgebendes Medium, so daß Laserlicht, welches in den Wellenleiter unter einem Eintrittswinkel größer als einem kritischen Winkel (**26**) eingeleitet bzw. eingekoppelt ist in abklingendem bzw. rückwirkendem Licht (**30**) resultiert; und

b) eine Mehrzahl von diskreten Sonden (**20**) auf dem Wellenleiter, welche eine zweidimensionale Anordnung bzw. Matrix bilden, wobei jede Sonde einen spezifischen bzw. gewählten bzw. ausgesuchten Bindungspartner bzw. Haftungspartner für ein selektiertes bzw. ausgewähltes Analyt umfaßt, wobei wenigstens eine Sonde ein Oligonukleotid umfaßt, und mit einem komplementären Oligonukleotid als seinem spezifischen Bindungspartner, wobei zumindest eine der Sonden eine reaktionsfähige Sonde ist, welche einen spezifischen Bindungspartner für das Zielanalyt umfaßt.

23. Detektor nach Anspruch 22, wobei die erste Fläche des Wellenleiters eine erste Menge von Sonden umfaßt und die zweite Fläche des Wellenleiters eine zweite Menge von Sonden umfaßt.

24. Detektor nach Anspruch 22, wobei der Wellenleiter im wesentlichen Planar ist.

25. Detektor nach Anspruch 22, wobei Sonden eine lichtemittierende Verbindung bzw. Verbindung bzw. Mischung bzw. Masse umfassen.
26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die lichtemittierende Verbindung ein Fluorophor ist.
27. Detektor nach Anspruch 22, wobei eine lichtmodulierende Verbindung mit der Sonde umfaßt ist.
28. Detektor nach Anspruch 27, wobei die lichtmodulierende Verbindung ein Quencher bzw. Löscher ist.
29. Detektor nach Anspruch 27, wobei die lichtmodulierende Verbindung ein Verstärker ist.
30. Detektor nach Anspruch 27, wobei die lichtmodulierende Verbindung ein Wellenlängenshifter bzw. -verschieber ist.
31. Detektor nach Anspruch 22, wobei verschiedene lichtreaktionsfähige Verbindungen mit verschiedenen Sonden umfaßt sind.
32. Detektor nach Anspruch 22, wobei die Form bzw. der Umriß der Sonden Kreise bzw. Punkte sind.
33. Detektor nach Anspruch 22, wobei die Form der Sonden Striche sind.
34. Detektor nach Anspruch 22, wobei eine Mehrzahl von Sonden an der ersten und zweiten Fläche des Wellenleiters sind.
35. Detektor nach Anspruch 22, wobei die spezifischen bzw. ausgewählten Bindungspartner kovalent an dem Wellenleiter angehaftet bzw. geklebt bzw. gebondet sind.
36. Detektor nach Anspruch 22, weiterhin umfassend eine wasserpermeable bzw. wasserdurchlässige Deckschicht an zumindest einer der Flächen, wobei die Deckschicht einen Brechungsindex kleiner als der Brechungsindex des Wellenleiters hat.
37. Detektor nach Anspruch 36, wobei die wasserpermeable Deckschicht ein Sol-Gel ist.
38. Vorrichtung zum Messen der Anregung bzw. Erhöhung einer lichtemittierenden Verbindung bzw. Mischung bzw. Masse mittels abklingender bzw. rückwirkender Wellen, umfassend:
 - (a) eine Laserlichtquelle (**38**), welche einen näherungsweise büschelförmigen Strahl bzw. Schmalbündelstrahl bzw. schmal gebündelten Strahl bzw. Bleistiftstrahl (**40**) emittiert;
 - (b) Schlitz formende Optiken bzw. schlitzförmige Optiken (**44**), welche positioniert sind, um den schmal gebündelten Laserlichtstrahl zu empfangen, um den Strahl in einen schlitzförmigen Lichtstrahl (**42**) zu transformieren;
 - (c) einen planaren Wellenleiter (**24**) mit einem Brechungsindex größer als sein umgebendes Medium, welcher positioniert ist, um den schlitzförmigen Laserstrahl zu empfangen, so daß ein Einfallswinkel größer als ein kritischer Winkel (**26**) vorliegt, welcher in einer abklingenden Welle (**30**) resultiert; wobei der Wellenleiter darin eine lichtemittierende Verbindung hat und durch die abklingenden Wellen angeregt wird und eine Mehrzahl von Sonden (**20**) an der Fläche des Wellenleiters hat, welche eine zweidimensionale Anordnung bzw. Matrix formen; und
 - (d) eine Detektionseinrichtung (**64**), welche positioniert ist, um Licht zu messen, welches von der lichtemittierenden Verbindung emittiert wird.
39. Vorrichtung nach Anspruch 38, mit einem proximalen Prisma, welches den Wellenleiter kontaktiert, wo der schlitzförmige Laserstrahl empfangen wird, so daß der schlitzförmige Laserstrahl erst durch das Prisma und dann in den Wellenleiter eintritt, wobei das Prisma dazu dient, den Eintrittswinkel zu verändern bzw. anzupassen.
40. Vorrichtung nach Anspruch 38, mit einem distalen Prisma, welches den Wellenleiter in einen Abstand kontaktiert, weg von wo der schlitzförmige Laserstrahl empfangen wird, wobei das distale Prisma zum Ausbluten bzw. Austreten des Laserstrahls aus dem Wellenleiter dient.
41. Vorrichtung nach Anspruch 38 mit dem zusätzlichen Element einer konfokalen Linse zwischen dem Detektor und dem Wellenleiter, so daß der Detektor bei einer bestimmten Tiefe in Zusammenhang bzw. Beziehung mit dem Wellenleiter fokussiert werden kann.

42. Vorrichtung nach Anspruch 38, wobei die Laserlichtquelle Licht von 600 nm bis 960 nm emittiert.

43. Vorrichtung nach Anspruch 38, wobei verschiedene lichtemittierende Verbindungen an dem Wellenleiter sind.

44. Artikel zur chemischen Analyse, umfassend:

(a) ein planares Substrat (**24**), welches zur Epi-Beleuchtung (englisch epi-Illumination) ausgelegt ist, mit einer erster und einer zweiter Oberfläche bzw. mit ersten und zweiten Oberflächen (**23**, **25**);

(b) eine Mehrzahl von Sonden (**20**) mit bekannter Erkennung von ausgewählten bzw. selektierten Molekülen in diskreten Bereichen (**22**) an bzw. auf zumindest einer der Flächen des Substrats, welche eine zweidimensionale Anordnung bzw. Matrix bilden; und

(c) eine Deckschicht (**32**) an zumindest einer der Flächen des Substrats, welche Sonden darauf bzw. daran hat, wobei zumindest eine Sonde ein Oligonukleotid umfaßt und mit einem komplementären Oligonukleotid als sein spezifischer bzw. ausgewählter Bindungspartner, wobei die Deckschicht im wesentlichen den gleichen oder einen größeren Brechungsindex hat, als der Brechungsindex des Substrats, wobei die Deckschicht permeabel bzw. durchlässig für Wasser ist.

45. Artikel nach Anspruch 44, wobei das Substrat zum Epi-Beleuchten (englisch epi-illumination) entgegengesetzt bzw. gegenüberliegende erste und zweite im wesentlichen planare Flächen aufweist und weiterhin ein mit den Sonden beinhaltenes Fluorophor umfaßt.

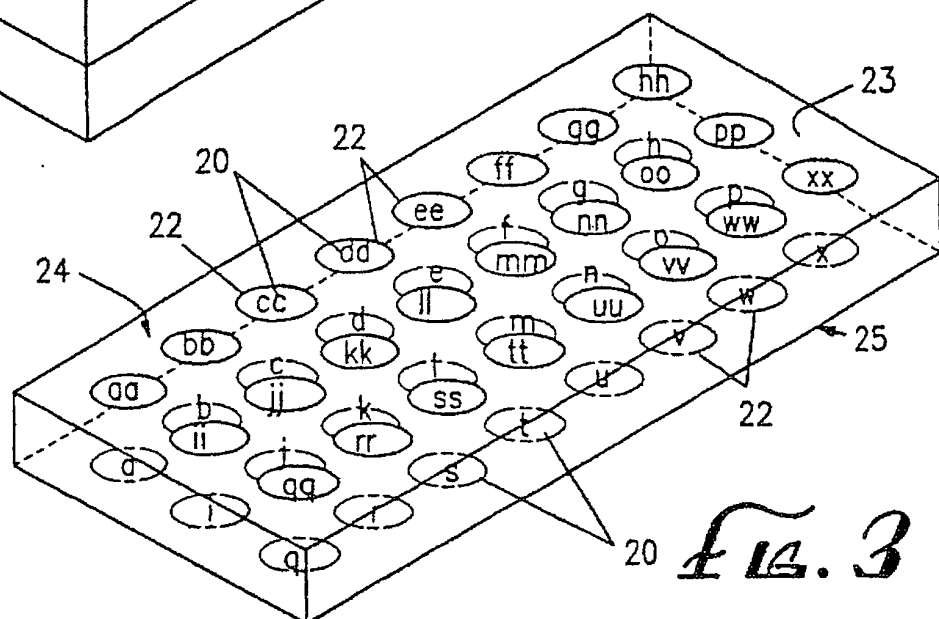
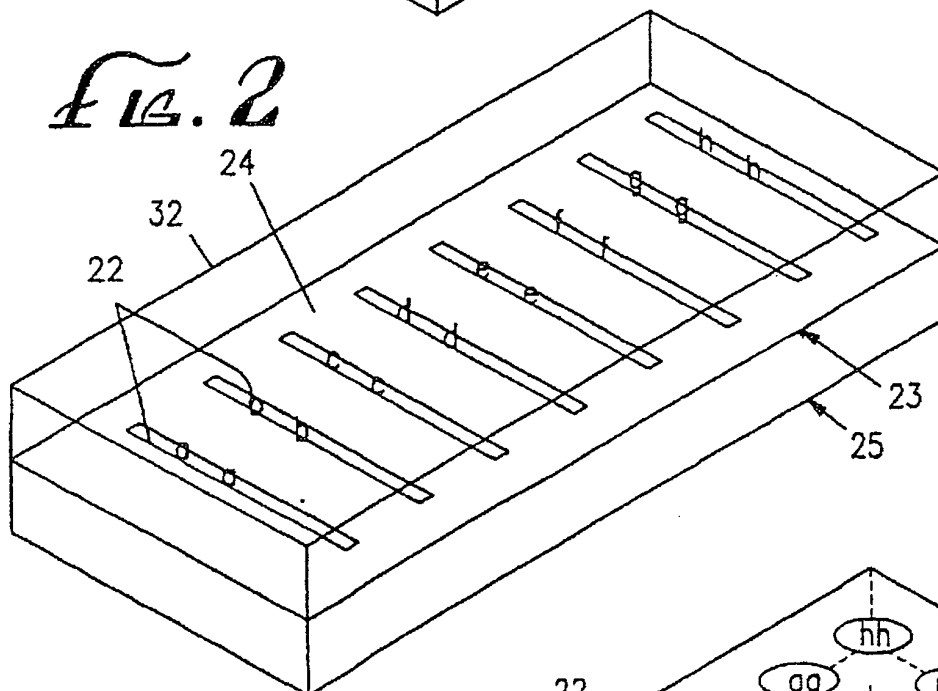
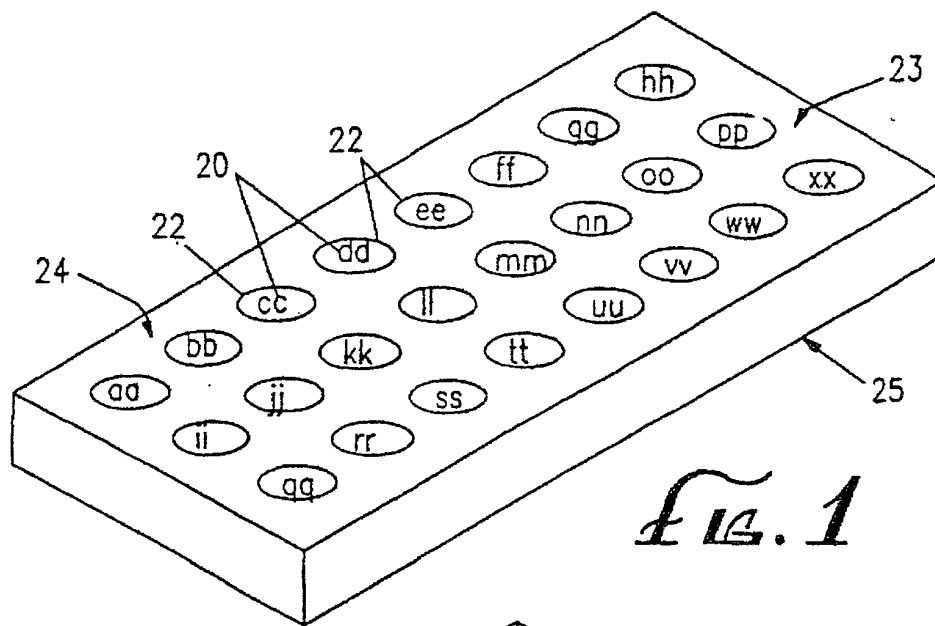
46. Artikel nach Anspruch 44 oder 45, wobei die wasserdurchlässige Deckschicht ein Sol-Gel ist.

47. Artikel nach Anspruch 44, mit dem zusätzlichen Element einer lichtreaktionsfähigen Verbindung bzw. Mischung bzw. Masse, welches mit zumindest einigen der Sonden beinhalten ist.

48. Artikel nach Anspruch 44 oder 45, wobei eine Mehrzahl von Sonden in diskreten Bereichen an bzw. auf der ersten und zweiten Oberfläche(n) des Substrats sind.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



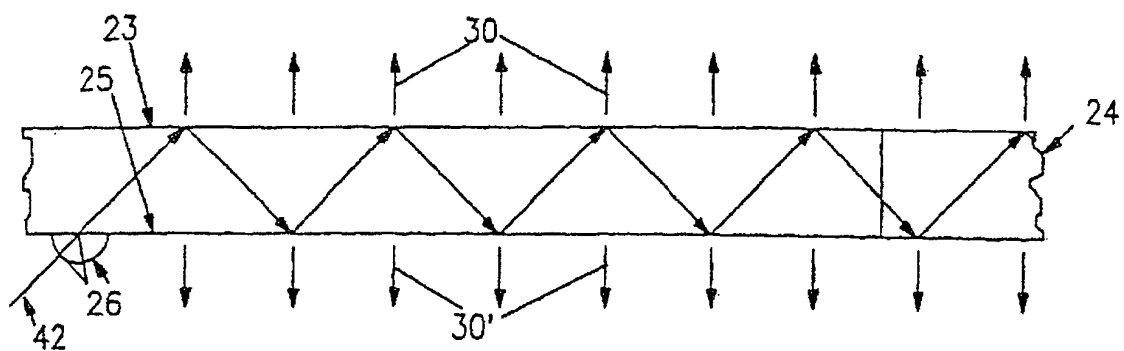


Fig. 4A

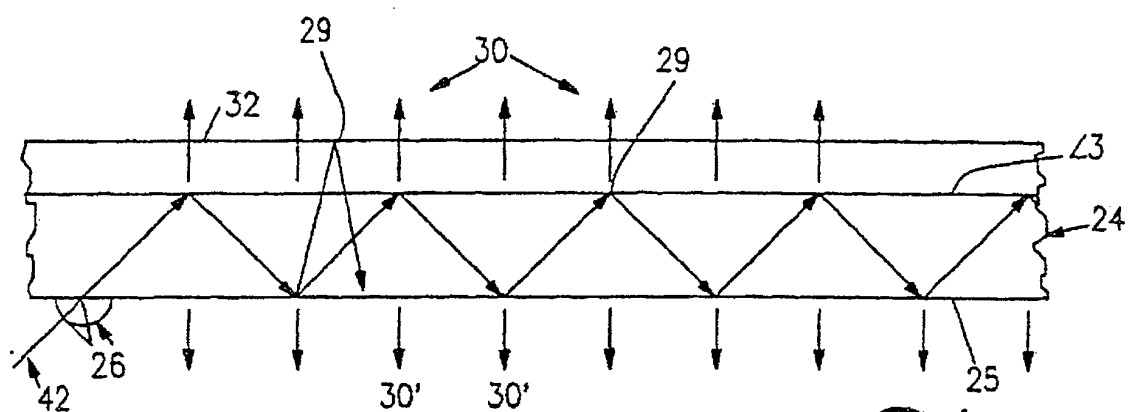


Fig. 4B

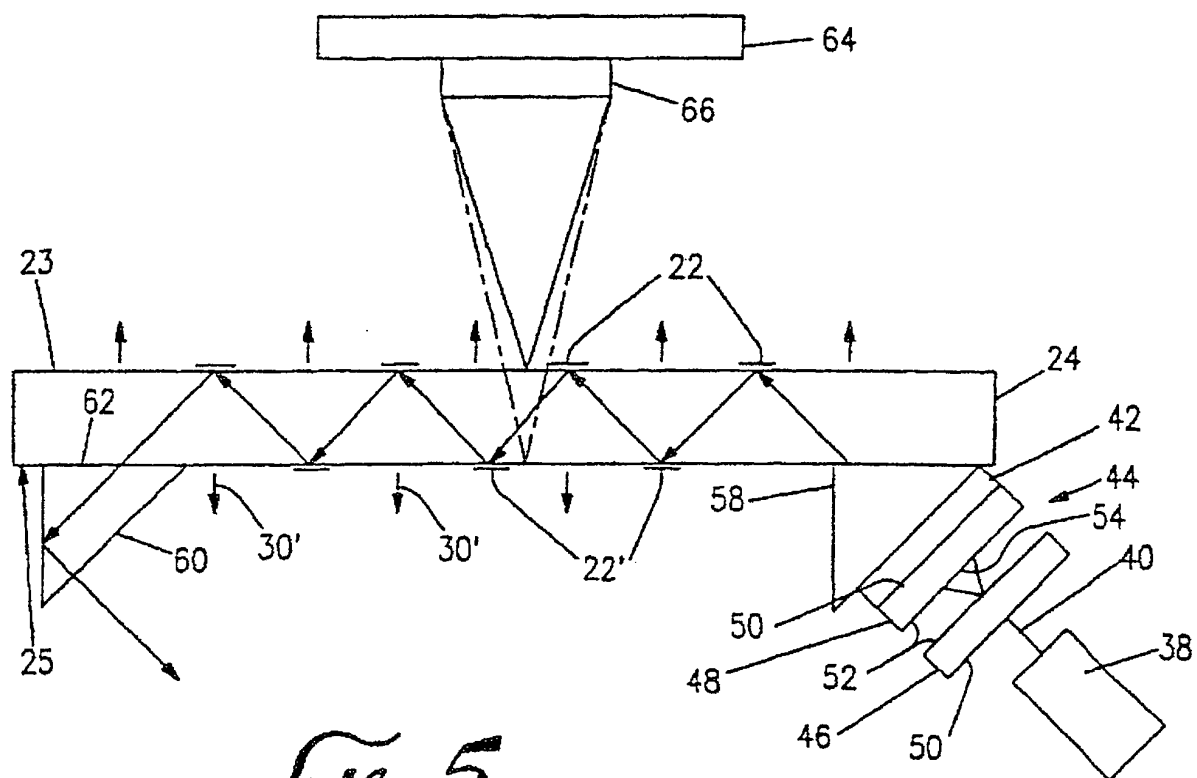


Fig. 5

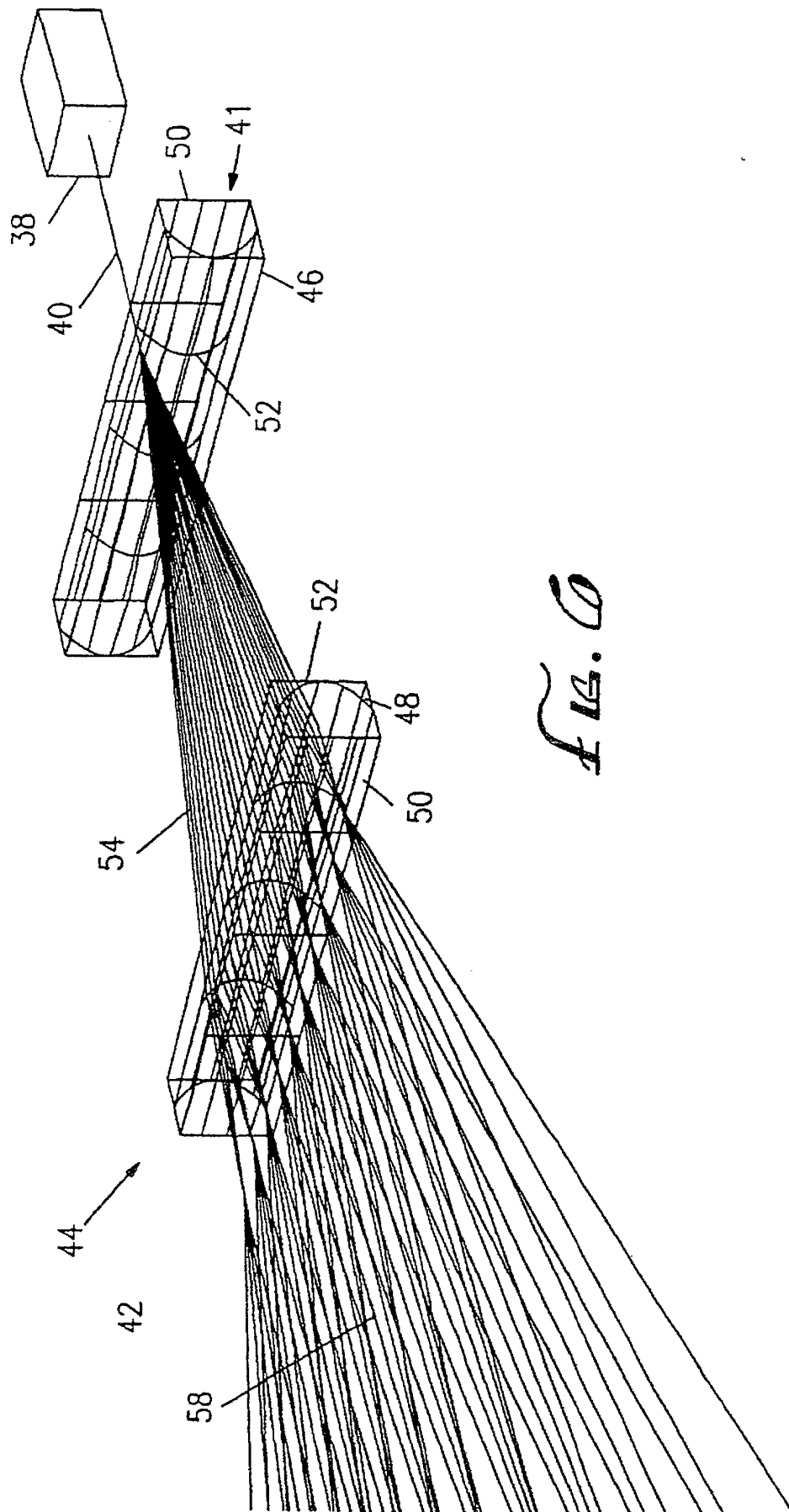


Fig. 6

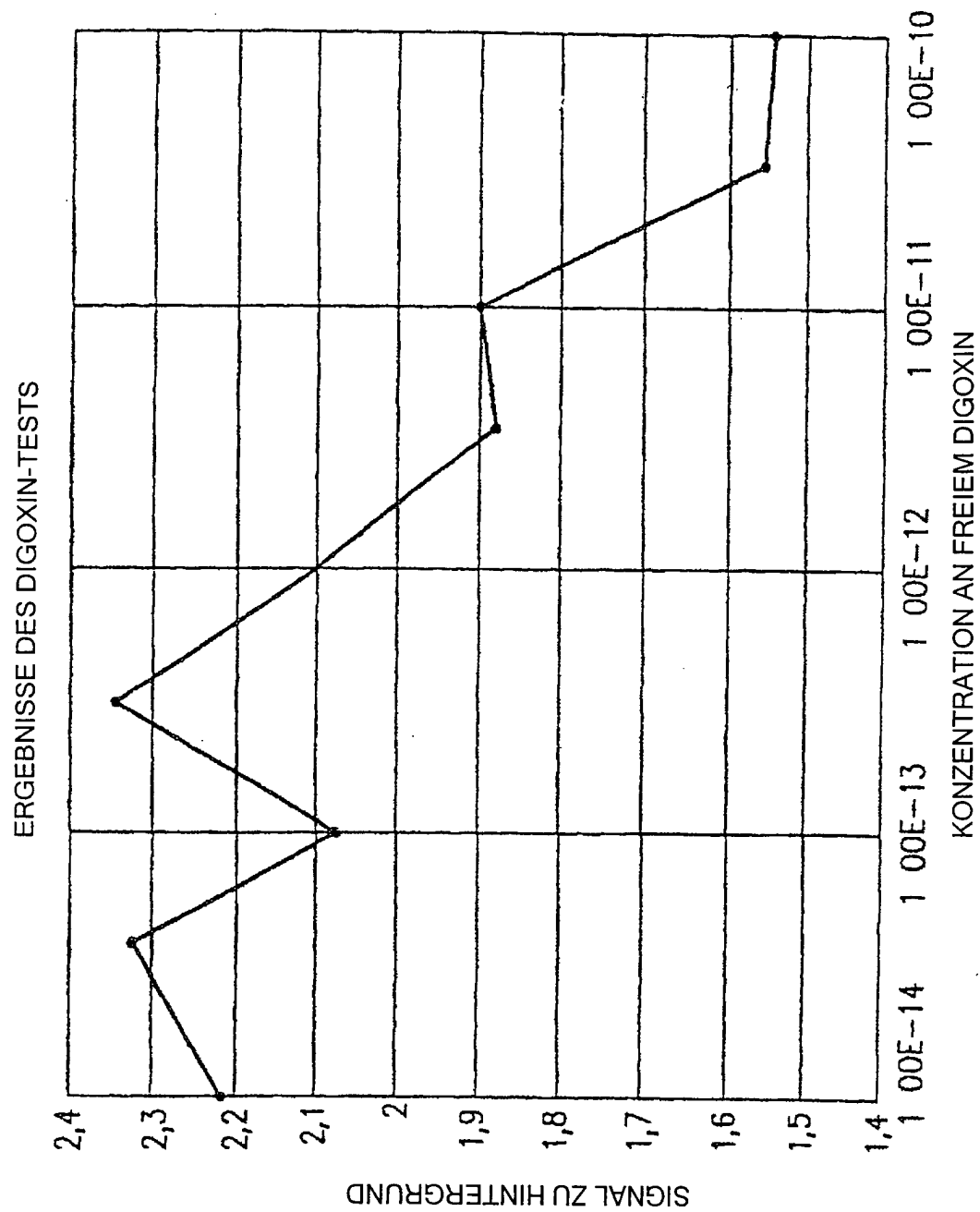


fig. 7

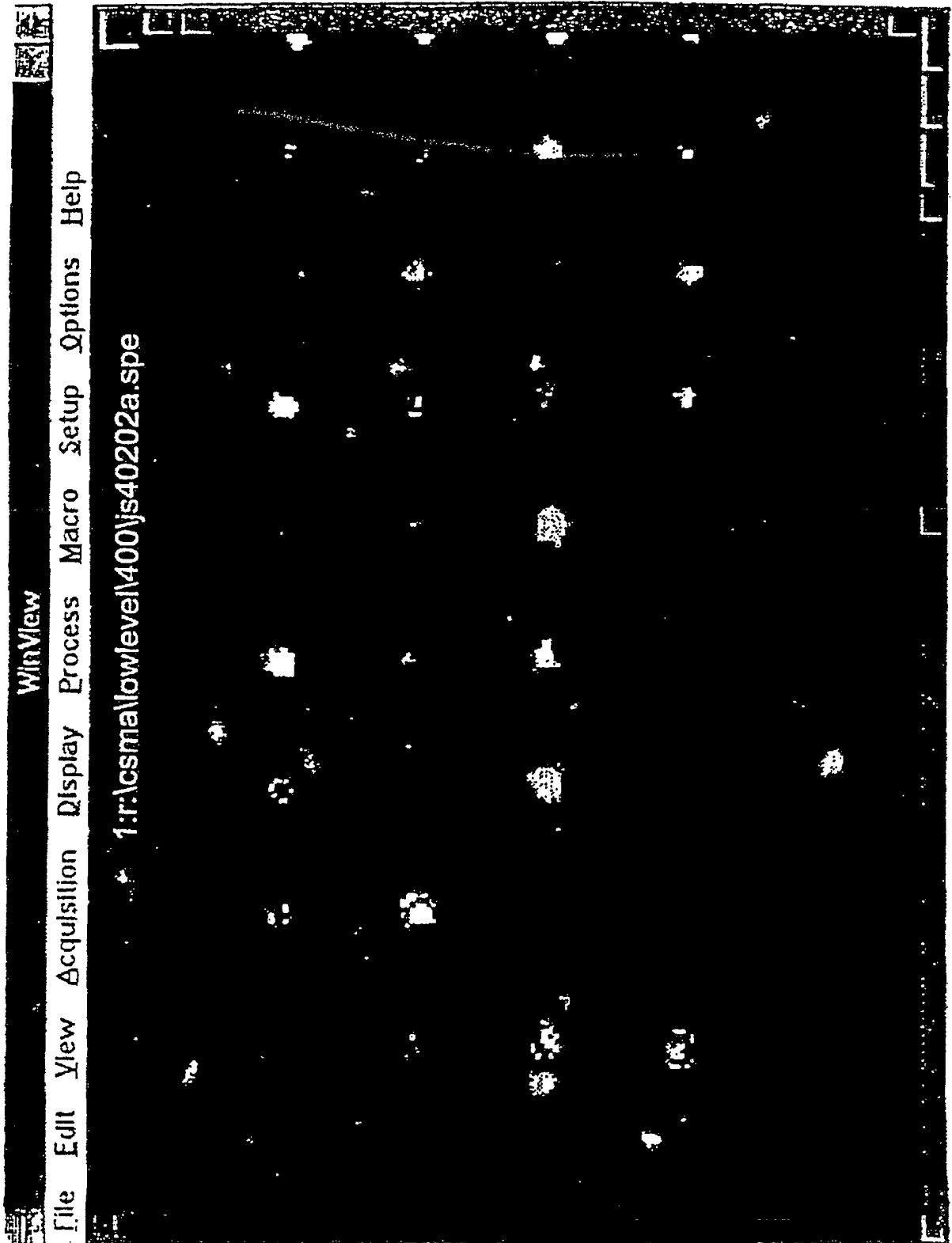


Fig. 8