

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5079958号
(P5079958)

(45) 発行日 平成24年11月21日(2012.11.21)

(24) 登録日 平成24年9月7日(2012.9.7)

(51) Int.Cl.

G01N 21/76 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

F 1

G01N 21/76
G01N 33/532

B

請求項の数 6 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2001-512276 (P2001-512276)
 (86) (22) 出願日 平成12年7月21日 (2000.7.21)
 (65) 公表番号 特表2003-505691 (P2003-505691A)
 (43) 公表日 平成15年2月12日 (2003.2.12)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2000/019845
 (87) 國際公開番号 WO2001/007896
 (87) 國際公開日 平成13年2月1日 (2001.2.1)
 審査請求日 平成19年7月18日 (2007.7.18)
 (31) 優先権主張番号 60/144,891
 (32) 優先日 平成11年7月21日 (1999.7.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 310009775
 アプライドバイオシステムズリミテッド
 ライアビリティー カンパニー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カーラズバッド バンアレンウェイ 57
 91
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】発光検知ワークステーション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の発光サンプルを分析するための照度計であって、
 電荷結合素子(CCD)カメラと、
 複数のウエルであって、各々のウエルが前記複数の発光サンプルのうちの単一のサンプルを含むためのものである複数のウエルと、
 前記複数のウエルのうちの対応するウエルと整合された複数のグリッド開口を備えており且つ前記複数のウエルと前記CCDカメラとの間に配置されていて前記ウエルからの平行及びほぼ平行な光線のみが前記CCDカメラによって撮像されるのを可能にするコリメータと、

同コリメータの基端に配置されたフレネルレンズと、

同フレネルレンズとCCDカメラとの間に配置されたカメラレンズと、

前記フレネルレンズと前記CCDカメラとの間に配置されたフィルタと、を含み、

前記コリメータは前記フレネルレンズと前記複数のウエルとの間に配置されている、照度計。

【請求項 2】

請求項1に記載の照度計であって、

前記複数の発光サンプルの各々が、生物発光物質又は化学発光物質のうちの一つである、照度計。

【請求項 3】

10

20

請求項 1 に記載の照度計であって、
前記フィルタが、波長を変えるためのフィルタ部材を含んでいる、照度計。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の照度計であって、
前記フレネルレンズ上の凝結を防止するための霜取り装置を更に含んでいる、照度計。

【請求項 5】

照度計内の複数の発光サンプルを分析する方法であって、

前記複数の発光サンプルを、各々の複数のサンプルウエル内に発光サンプルを配置するステップと、

電荷結合素子カメラを設けるステップと、

前記複数のサンプルウエルと前記 C C D カメラとの間に、前記複数のサンプルウエルのうちの対応するウエルと整合された複数のグリッド開口を備えているコリメータを配置するステップと、

フレネルレンズを前記コリメータの基端に配置するステップと、

前記フレネルレンズと前記 C C D カメラとの間にカメラレンズを配置して前記ウエルからの平行及びほぼ平行な光線のみが前記 C C D カメラによって撮像されるのを可能にするステップと、を含む方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の照度計であって、

前記コリメータが前記複数のウエルの基端に位置決めされている、照度計。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、発光を検知し且つ定量する装置及び方法の分野に関し、より特定すると、発光に基づくアッセイから発光される光を検知し且つ定量する装置及び方法の分野に関する。更に特定すると、本発明は、目標化合物の存在又は量の指示としての発光（ルミネッセント）アッセイからの生物発光及び/又は化学発光のような発光を検知し且つ定量するための装置及び方法に関する。本発明の好ましい実施形態は、撮像素子として電荷結合素子（C C D）カメラ及び同撮像素子によって収集されたデータを分析するためのコンピュータを含んでいる。更に好ましい実施形態は、高いスループットスクリーニング（high throughput screening）（HTS）用途において使用するための能力を有し且つアッセイプレートのロボットによる操作を提供する。

20

【0002】

関連技術の説明

物質の発光の分析及び特に生物発光（BL）又は化学発光（CL）のどちらかの分析は、種々の発光分析物の定量的な測定をする極めて有用な方法になりつつある。

【0003】

最近は、イムノアッセイプロトコルにおける分析物を定量的に分析するために発光検知を利用する方法が導入されて来ている。このような発光イムノアッセイ（LLA）は、免疫特異的抗体（immuno specific antibodies）又はハイブリダイズ核酸配列（hybridizing nucleic acid sequences）とこれに似た特定のリガンドの反応特異性を、光の検知によって得られる高い感度と組み合わせることの可能性が提案している。伝統的には、放射性の試薬がこのような目的のために使用されて来ており、LIA試薬の特異性及び感度は、概して、伝統的なラジオラベリングを採用しているものに似ている。しかしながら、LIAは、放射性試薬に対してLIA試薬の無毒性及びより長い保存性を有するため、多くの用途にとっての好ましい分析方法である。

30

【0004】

他の発光試薬の中では、Tropix, Inc. によって開発された 1, 2 - ジオキセタンのような化学発光化合物及びキサンタンエステルのような他の安定した化学発光分子等が商業用途にある。これらの化合物は、試薬、頻繁には、目標化合物の存在又は特異的な不

40

50

存在においてのみ存在するアルカリフォスファターゼのような酵素によって引き起こされる分解によって光を放出するように誘発される。発光の検知は定性的指示であり、射出された光の量は、存在する誘発試薬すなわち目標化合物の量の指示に適している。その他の良く知られた発光化合物も同様に使用することができる。

【 0 0 0 5 】

発光の放出は、放出された光の量を増幅するか又は増す促進薬の存在によって、ときどき促進することができる。これは、発光の抑制を減じる微環境において発光試薬を引きこもらせる試薬を使用することによって達成することができる。多くの生物学的作業は、水性媒体内で必然的になされる。水は、典型的には、光の放出を抑制する。水に可溶性の重合性オニウム塩（アンモニウム、ホスホニウム、スルホニウム等）のような化合物を提供することにより、発光性化合物を引きこもらせるかもしれない水が排除されている小さい領域が設けられても良い。

10

【 0 0 0 6 】

発光反応を監視するために使用される装置（照度計：luminometer）の大半は、射出された光子を検知するために一つ以上の光電子増倍管（PMTs）を使用している。PMTを基礎とするマイクロプレート照度計がプレートの全てのウエル（溜め）からの信号を測定することができる速度は、使用されるPMTの数によって制限される。殆どのマイクロプレート照度計は、たった一つのPMTを有し、従って、384ウエルプレートは、96ウエルプレートを読み取るのに必要とされる時間の四倍の時間を必要とする。

20

【 0 0 0 7 】

生物学的研究の性質は、多くのサンプルが同時に、例えば化学発光物質が酵素と反応するようにアッセイされることを指示する。これは、特に、濃度、組成、媒体等によって変わる何千ものサンプルが試験されなければならない遺伝子スクリーニング及び薬物の発見において特に当てはまる。これは、多数のサンプルが同時に反応せしめられ、発光によって排除されることを必要とする。しかしながら、化学発光又は生物発光は時間と共に減少するかもしれないので、高速度の処理の必要がある。たくさんのサンプルを同時にスクリーニングすることによって、改良されたより速いデータ収集時間がもたらされ、これは、それに続くより速いデータ分析及び分析データの改善された信頼性を可能にする。

【 0 0 0 8 】

各特定のサンプル分析物の発光が所望の正確度で分析されるようにするために、各サンプルからの発光は、同時に分析されつつあるサンプルから隔離されなければならない。このような環境においては、外部光源又は隣接するサンプルからの迷光は、これらの光のレベルが低いときでさえ問題を生じ得る。一般的なアッセイ、特に高いスループットスクリーニング（HTS）を採用しているアッセイは、試験されるべき多くのサンプルを収容するための反応チャンバとして、たくさんのウエル（溜め）が設けられたマイクロプレートのプラスチックトレイを使用している。現在使用されているプレートとしては、96-ウエルプレート及び386-ウエルプレートがある。HTS速度及び小型化に対する増加しつつある要望に応答して、1536個のウエルを有するプレートが導入されつつある。正確な発光分析に対する特に困難な障害は、高い信号強度を有するウエルに隣接したサンプルウエル内の光が不注意に検知されることである。この隣接するサンプルによる光測定干渉の現象は、“クロストーク”と称され、これらのウエル内の信号が実際には弱い場合には、隣接するウエル内のサンプルに誤った値を割り当てることにもなり得る。

30

40

【 0 0 0 9 】

既に提案されたいいくつかの照度計としては、米国特許第4,772,453号、米国特許第4,366,118号及びヨーロッパ特許第EP 0025350号に記載されたものがある。米国特許第4,772,453号は、複数のサンプル細胞を担持しているプラットホーム上に配置された固定の光検知器を有している照度計を記載している。各細胞は、サンプルからの光が光検知器に導かれる開口の下方に配置される。米国特許第4,366,118号は、サンプルの直線状のアレイから発光された光がサンプルの上方ではなく横で検知される照度計を記載している。最後に、ヨーロッパ特許第EP 0025350号

50

は、サンプルウエルの底部を通して射出される光がウエルの下方に配置された可動の光検知器によって検知される照度計を記載している。

【0010】

ヨーロッパ特許第E P 0025350号に開示されているように、検知の直前に発光反応を開始させるための液体注入装置が採用されている照度計の更なる改善が提案されて来た。また、米国特許第4,099,920号においては、照度計において使用するために、温度制御機構が提案されて来た。発光サンプルの温度制御は、例えば、高温でサンプルを培養することが望ましい場合に重要であるかもしだれない。

【0011】

HTS用途のための種々の光検知装置が市場において入手可能である。これらの装置としては、Amersham/PharmaciaによるLEADseeker(登録商標)、PerkinElmerによって提供されているViewLux(登録商標)及びMolecular DevicesからのCLIPR(登録商標)がある。これらの装置は全て、高価で寸法が大きく(床設置モデル)、プレートの準備及び装荷のためのロボット装置とのほんの限られた両立性を有し、限られた作動範囲を有し、及び/又はクロストークを低減させないか又は原因を明らかにしていない光学的方法を使用している。使用される光学装置は、典型的には、プレートの端縁に設けられたウエルの歪んだ視野を提供する複雑なテレセントリックな光学レンズ系であり、この光学装置は、しばしば高価でありその費用は20万ドルを超える。おそらく、最も一般的な検知装置は、パッカード社から販売されているPMTに基づく検知装置であるTopCount(登録商標)である。TopCount装置は、所望の作動範囲を有しているけれども、1,536ウエルプレートを読み取ることができず且つプレート全体を同時に撮像することができない。

10

20

【0012】

隣接するサンプルからのクロストークは、撮像に基づく装置における改良された発光分析の開発に対して重大な障害となつたままである。このことは、発光サンプルが隣接するサンプルからの光と干渉し得る迷光を生成する簡単な光学系の現象として理解することができる。更に、サンプルを極めて低い光レベルのサンプルを検知し且つ分析することができる照度計の開発が、クロストーク干渉に対して特に必至である。

【0013】

発明の概要
従来技術によっては満足されない上に特定した必要性に対処すべく、本発明の主要な目的は、発光サンプルの分析を許容する光検知装置を提供することである。本発明の更に別の目的は、多数の発光サンプルを同時に分析することができる光検知装置を提供することである。本発明の好ましい実施形態においては、ウエルプレートが1536個ものウエルを含んでいる、ウエル内に保持された多数のサンプルを同時に分析する光検知装置が提供されている。本発明は更に、分析中に多数のウエルトレイのロボットによる操作を含んでいる。

30

【0014】

本発明の更に別の目的は、隣接するサンプルからのクロストーク、特に分析されるべきサンプルよりも高い光レベルの出力を有する隣接のサンプルからのクロストークを最少にしつつ、低い光レベルの発光サンプルを分析することができる発光検知装置を提供することである。

40

【0015】

本発明の装置は、ウエルプレート上に垂直コリメータを備え、ウエルの数に適合する大きさを有するフレネルレンズ構造を採用している。従って、1536-ウエルプレートは、プレートのウエルと整合した1536個の細胞を備えたプレート上の暗視野コリメータ(dark colimator)を採用するであろう。コリメータの上方にはフレネルレンズが固定されており、このフレネルレンズは、レンズの上方の視野が、プレート上の位置(端縁であってもよい)にかかわらず、各ウエル内を真っ直ぐに見下ろしているように見えるように光を屈折させる。

50

【0016】

フレネルレンズの上方には、迅速にプレート全体の像を付与するために、35mmの広角レンズを介して見て、一度にプレート全体の像を撮るために、CCDカメラが配置されている。CCDとフレネル／コリメータとの間には、典型的にはフィルタホイール上に配列されたフィルタがレンズに対してある角度で配設されている。このフィルタは、射出される光の特定の波長を許容し且つその他の波長の全てを反射又は吸収するように選択される。種々の波長で光を放出する多数の試薬から射出された光の連続的な検知を許容するために、いくつかのフィルタがホイール上に設けられても良い。

【0017】

サンプルは、ロボットにより且つ自動化された準備装置によって良好に動作するように設計された装荷装置を介して、光学的検知プラットホームに供給される。既に反応混合物が設けられたウエルプレートが、人間又は好ましくはロボットによってシャトル上に配置される。

10

【0018】

シャトル上のプレートの整合は、コリメータのグリッドアレイに適合するために緊密な公差条件にもかかわらず比較的粗雑であってもよい。シャトルが装荷位置を離れると、弾性手段が、プレートを厳格に一致した整合状態へと付勢する。シャトルは、プレートを、一度にコラム内に16個までのウエルを収容することができるオーバーヘッド注入バー(*injection bar*)の下に位置決めする。予め加えられていない場合には、誘発試薬又は発光試薬がサンプルに添加され、プレートは、同プレートを横切って次のウエルのコラムを装荷するために前方へと割送りされ、コリメータは、コリメータ及びフレネルレンズと整合される。多くの反応は高温でのみより良く進行するので、サンプルチャンバは絶縁され且つチャンバ内の又はチャンバに提供される空気を加熱するための加熱手段が設けられている。チャンバ内の温度を室温近くに維持するための及び温度を正しく制御するために、チャンバには熱交換器が設けられても良い。

20

【0019】

多数ウエルのプレート全体からの発光は、多数の波長が採用される場合に異なるフィルタを介する連続的な撮像によって、一度に撮像される。得られた信号は、コリメータによって減じられたクロストークを更に減じるために処理され、発光の存在及び量は、自動化されたソフトウェアを使用しているパーソナルコンピュータによって迅速に検知され且つ計算される。次いで、データが、ウエル毎の強度として報告されるか又は特定のアセイ基準に照らして更に分析される。

30

【0020】

好ましい実施形態の説明

添付図面と組み合わせて考えたときに、以下の詳細な説明を参考にすることによってより良く理解できるようになるので、本発明のより完全な理解及び本発明の結果として得られる利点の多くは容易に得ることができる。

【0021】

いくつかの図面を通して同様の符号が同一の又は対応する部品を示している図面、特に図1を参照すると、本発明の発光検知装置の好ましい実施形態は、好ましい実施形態においては1,536以上もの数とし得る複数のサンプルウエル20を含むマイクロプレート(プレート)10を運ぶためにシャトル又はトレイを使用している。当業者は、サンプルウエル20の数は、照度計の構成要素の物理的寸法及び光学的特性によってのみ限定され、本発明の技術によって限定されるものではないことを認識するであろう。サンプルウエル20は、本発明の装置に供給される前に、手動又はロボットによって分析物を充填されてもよい。化学発光に必要な試薬は、分析物が供給管の列40を介してプレートをトレイ上に配置する前に供給される注入装置30によって自動的に充填されてもよい。典型的には、サンプルウエルは、化学発光試薬を含んでいるであろう。これらの試薬は、サンプル内の分析物の濃度に比例した強度で光を発する。この光は、極めて低い強度であることもあり、所望の検知限界を達成するためには十分な感度を有する装置を必要とする。

40

50

【 0 0 2 2 】

注入装置 30 の動作は、好ましい実施形態においては本発明の照度計の全ての構成要素の作動を制御する中央演算処理装置 50 によって制御される。データ収集、分析及び提示もまた処理装置 50 によって制御されても良い。更に、本発明の好ましい実施形態においては、注入装置 30 は、分析物に緩衝液を添加し且つ各々全て中央演算処理装置 50 の制御下で維持されるか又はつかの間の強い発光である発光撮像の“輝き (glow) ”及び/又は“閃光 (flash) ”を可能にする試薬を添加するために使用することもできる。

【 0 0 2 3 】

分析物がサンプルウェル 20 内に配置された後に、プレート 10 は、CCD カメラ 70 が発光サンプルを正確に撮像できるようにするために、電荷結合素子 (CCD) カメラ 70 から固定焦点距離に配置されるか又はすぐ下方に設けられた光学チャンバ 60 内に配置されているサンプルチャンバ 55 内に配置される。多くの発光試薬及び特異な発光反応は温度に依存するので、サンプルチャンバ 55 は、正確に温度制御されることができるのが好ましい。中央演算処理装置 50 は各サンプルトレイ 10 内のサンプルウェル 20 の動き及び注入を制御するので、温度制御は、個々のサンプルプレート 10 の温度を変えることができる中央演算処理装置 50 によって提供される。本発明の照度計の好ましい実施形態においては、中央演算処理装置 50 はまた、本発明の照度計内での分析物の操作を含む動作を行う工業ロボット (図示せず) をも制御する。

【 0 0 2 4 】

プレート 10 がサンプルチャンバ 55 内に配置されると、光学系 80 が、完全なマイクロプレート 10 の像を単一の像として CCD カメラ 70 に供給する。

本発明の照度計の作動は合成された連続的な動作であり、照度計の全ての構成要素は協働して正確で正しく且つ信頼性のあるデータを提供するけれども、本発明は、三つの別個の一体化された系、すなわち、光学系、機械系及び処理系を参照することによってより容易に理解することができる。以下の全体としての動作の例を説明しながら、各々の動作を以下に説明する。

【 0 0 2 5 】**光学系**

図 2 を参照すると、光学系 80 が更に詳細に示されている。プレート 10 内に配置されたプレートウェル 20 内の分析物からの発光による光線 100 は、最初に、暗視野コリメータ 110 内を通過する。コリメータ 110 は、CCD カメラ 70 による最終的な撮像のために平行及びほぼ平行な光線のみがサンプルウェル 20 を出て行くのを許容する。コリメーション作用は、サンプルウェル 20 からの迷光の防止及び発光サンプル間のクロストークの排除の助けとなる。コリメータ 110 は、サンプルからの迷光の制限を高めるために、サンプルトレイ 10 に対して密封係合されるか又はごく近接せしめられている。各ウェル 10 は、コリメータ 110 内の対応するグリッド開口と厳密に整合されている。コリメータ 110 から出た発光光線は、フレネル視野レンズ 120 を通過し、このフレネル視野レンズは光をフィルタ 130 に向けて集光させる。本発明の好ましい実施形態においては、コリメータ 110 とフレネル視野レンズ 120 とは、ユーザーが交換することができるカセット内に包装されている。このような装置の交換は、種々の分析物の光学特性及びプレート内のウェルの分布を変えることに必然的に伴う。

【 0 0 2 6 】

フレネル視野レンズの使用は、いくつかの理由により光学系を入れ替えるためには好ましい。最初に、設計及び物質の改良は、実質的にはそれ本来の制約を排除しつつ、フレネルレンズの優れた光学的機能を利用して来た。今日においては、多くのフレネルレンズが、散乱光が極めて少ない殆ど傷の無い表面を形成している成形樹脂によって作られている。散乱光の除去は、本発明の照度計における隣接するサンプル間のクロストークを排除する重要な要素である。更に、フレネルレンズ及びその他の光学系の製造において一般的に採用される改良されたタイプの樹脂は、研磨されたガラスレンズに匹敵する光学的品質を有している。

【0027】

コンピュータ制御のダイヤモンド研磨のような高度な技術による方法を使用すると、複雑な非球面を、フレネルレンズを注型するための長持ちする型内で加工することができる。この方法によりフレネルレンズを製造して、本発明におけるように、電荷結合素子カメラにとって最も有効である正確な光学結像作用を得ることができる。更に、フレネルレンズは、フラットで極めて薄く成形できるという点で従来のレンズにまさる利点を提供する。フレネルレンズの形状により、フレネルレンズを照度計のハウジング内に直接一体化することが容易にでき、低い光のサンプルの正しい撮像にとって必要な光不透過性を高めることができる。更に、フレネルレンズは、匹敵する従来のガラスレンズよりも遙かに低廉である。

10

【0028】

他の如何なるレンズと同様に、フレネルレンズからの全体のビームの広がりは、レンズの焦点距離に対する光源の大きさに依存する。発光アッセイサンプルのようなより小さい光源及びより長い焦点距離は、よりコンパクトなビームを形成する。本発明の照度計における光学系の幾何学的構造及び寸法を最小化することに対して実際的な制限があるので、フレネル視野レンズ120の使用は、細かく調整された光学系に対して最も大きな機会を提供する。プレート10からの放射光はレンズ20を通過し、CCD70において得られる像が全てのウエル（例えば、横方向に配置された端縁のものであっても）内へ直接見下ろせるように屈折せしめられる。この特徴は、典型的には“テレセントリック”と呼ばれている。

20

【0029】

更に、本発明の好ましい実施形態においては、フィルタ130がホイール上に形成され、この構造においては、種々のフィルタ要素が、分析されているサンプルの発光特性に依存してホイールの種々の部分を占めている。フィルタ130は、反射された迷光が視野の外側で反射されるように、CCDに対して20°ないし30°の角度で傾斜せしめられるのが好ましい。特に、フィルタホイール130は、高品質の結像を許容するばかりでなく、種々の波長で発光する種々の試薬の発光を分離するために使用することもできる種々の波長範囲の選択を可能にする。フィルタホイール130はまた、サンプルプレート10内の個々のサンプルウエル20の中央演算処理装置50による制御と同様に中央演算処理装置50によって制御される。多くのアッセイにおいては、本発明に参考として組み入れられている係属中の米国特許出願第08/579,787号において取り組まれているような、種々の波長において発光する多数発光試薬が单一のウエル内で採用されている。多数のフィルタを使用することによって、各々が順に結像され、予め記憶された校正ファクタを使用して得られるデータから、正確な濃度を測定することができる。フィルタ130には、選択されたバンドパスと結合して又は独立した要素して作動する赤外フィルタ（IR）が設けられているのが好ましい。出願人は、板状の燐光からIR（赤外）線の迷光が生じて、異常に高いバックグラウンドを生じることを発見した。

30

【0030】

フィルタホイール130からのサンプルによって射出された光は、好ましい実施形態においては大きい開口で歪みの少ないカメラレンズであるカメラレンズ140を通る。カメラレンズ140は、CCDチップ70上に像を結ぶ。本発明の好ましい実施形態においては、CCDカメラ70は、冷却された低ノイズで高い分解能の素子である。レンズは、低い光のレベル（F1.4）で大きい開口数の35mm広角レンズであるのが好ましい。倍率は3ないし6、好ましくは約5.5であるのが好ましい。好ましい実施形態においては、CCDカメラ70には、作動範囲（請求の範囲の本発明においては約10⁵である）を広げるために、Northstar（登録商標）照度計と称される焦点ぼけ防止CCDチップが設けられている。焦点ぼけは、单一の画素に光が当たり過ぎ光電子がCCD素子のウエル容量をオーバーフローして周りの画素を消失させてしまうときに起こる。更に、本発明の照度計の好ましい実施形態においては、選択されたCCDカメラは、約-35までのCCDの冷却を提供する液体冷却熱電気（ペルチエ）素子を含んでおり、このCCDは

40

50

、各々が $16\text{ }\mu\text{m}$ 角であって $20.5\text{ mm} \times 16.4\text{ mm}$ の全作動領域を形成している 1280×1024 画素を有している。量子効率平均15%は、 450 nm ないし 800 nm の範囲に亘っている。出力は、16ビットの精度にデジタル化され、画素は、電子ノイズを低減させるために、“貯蔵(bin)”することができる。

【0031】

ここに開示された特徴を使用することによって、本発明の照度計は、高い密度のサンプルトレイの高品質の結像を提供することができる空間解像度を有する。ノイズ性能及びCCD温度は、所望の検知限界を提供するように設計されている。

【0032】

機構

10

本発明の照度計の機械系は、CCDカメラ70によって読み取ることができるように、コリメータ110と整合されたマイクロプレートの自動化され且つ高いスループットの正確な供給を達成するように設計されている。この目的のために、図3に示されているように、本発明の照度計のシャトル200は、プレート10が、好ましくはロボットアームのようなロボット装置によってシャトルに装荷され、シャトル200が次いでサンプルチャンバ55に向かって運ばれる装荷位置202から、読み取り位置203まで並進する。シャトル200は、一般的なステッピングモーター(図示せず)によって並進せしめられる。シャトル200がサンプルチャンバ55に向かって進むと、シャトル200は注入装置30の下で停止し得る。注入装置30は、図4の下方により詳細に図示されている。依然として図3を参照すると、注入装置30は、リザーバ204から抜き取った流体試薬を給送する。注射器ポンプ205が、リザーバ204から流体試薬を抜き取り、同流体試薬を注入チューブ40へと圧送する。二方向弁206は、注射ポンプ205によってリザーバ204から抜き取られ且つ注射ポンプ205によって圧送された流体の供給チューブ40への流通を制御している。実際の動作においては、使用されている注入ポートと同じ数の注入チューブ40が存在し、たくさんの注射ポンプ205も使用される。図4の下方に図示されているように、注入装置30は、16個以下の注入ポート302を有している。注入装置が使用されているときに照度計と結合して使用されるプレートは、典型的には、一つの列内に16個以下のウエルが準備される。シャトル200がプレート10を注入装置30の下まで進むと、シャトル200は、ウエルの第1の列208が注入装置30の下方に直接整合するように停止する。正確な量の分析物がウエルの第1の組に供給され、シャトル200は、ウエルの第2の列内へ試薬を注入するために、一つの列を前方へ割り送りする。この過程は、全てのウエルが充填されるまで繰り返される。その後に、シャトル200は、ヒンジ止めされたドア212を通ってサンプルチャンバ55内へと前方に進む。別のやり方では、ドア212は、ギロチンドア又は同様のタイプの閉鎖機構であっても良い。プレート10のウエルは、次いでサンプルチャンバ55内で読み取られる。読み取りが完了すると、シャトル200は装荷位置202へと戻る。

20

【0033】

シャトル200が注入バーのところへ進む前に、プレート内への正しい供給のために、チューブに流体を十分に入れる必要があるかもしれない。樋304は、矢印で示されたシャトル200の移動方向に平行なその貯蔵位置から、同移動方向に直角な注入装置30のすぐ下方に横たわる位置まで回転する。注入装置30及びチューブ204内の流体は、樋304内へ供給され且つ吸引によって取り出される。シャトルがサンプルチャンバ55に向かって移動せしめられると、樋304は、次いで、シャトル200の移動方向から離れて同移動方向に平行なその休止位置へと戻る。装荷位置202への戻り動作の際に、シャトル200上のロケータ214はカム216と係合する。ロケータ214は、カム216と係合したときにロケータ214がプレート10から凹むように、弹性手段上に取り付けられている。これによって、正しい位置決めの要件なしで、プレート10の取り外し及び新しいプレート10のロボットアーム又はその他の供給源からの供給が可能になる。シャトル200が装荷位置202から移動して離れるときに、ロケータ214は、前方へ付勢されてプレート10を定位置に確実に位置決めする。プレート10は、ロケータ214の弾

30

40

50

性的な付勢によって肩部 217 に当接せしめられて保持される。

【0034】

得られた結果が正しい試験サンプルと関連付けられるように、各プレートは正しく特定されることが重要である。殆どのHTS研究所においては、殆どのマイクロプレートは、唯一の“バーコード”で標識される。標識は、プレート自体の面に直角な面上に配置されることが多い。各プレートの正しい特定を可能にするために、バーコードリーダー 218 が、概して符号 299 によって指示された照度計ハウジング内のドア 212 のすぐ上、例えば、アーム又はフランジ 220 上に取り付けられる。バーコードリーダー 218 は、ミラー 222 上に合焦され、これは、次いで、シャトル 200 に到達したときにプレート 10 の前方端縁又は先端から直接読み取ることが可能になる。このように、各プレートがサンプルチャンバ内に到達する前に、その濃度は、処理演算装置 50 内に正しく記録され、得られた結果はその濃度と関連付くことができる。当業者は、種々の整合構造及びバーコードリーダー 218 及びミラー 222 の両方の位置決めが所望の特定をもたらすことを認識するであろう。10

【0035】

図 4 により明確に示されているように、注入装置 30 は、アッセイされているプレート上のウエルの全体の数に対応する位置が設けられたアクチュエータホイール 306 の作動によって正しく配置される。同様に、プレートの異なる厚みを明確にするために、垂直方向の位置をホイール 308 によって制御しても良い。シャトル 200 の単純な並進運動及び運ばれる各プレートの正しい位置決め及び特定を仮定すれば、サンプルチャンバ 55 内への及びサンプルチャンバ 55 からのマイクロプレート試験プレートの迅速なサイクリングをなすことができる。20

【0036】

本発明の光学系と関連させて上記したように、使用されている発光エミッタの選択された波長に含まれる光以外の光の通過を反らせるフィルタが設けられる。このフィルタアセンブリは、図 5 に分解図で示されている。フィルタフレーム 502 は、フィルタホイール 506 のハブに結合されたアーム 504 によって支持されている。たくさんの異なるフィルタが単一のホイール上に設けられても良い。フィルタ 508 自体は、グロメット、ねじ又はその他の保持器具 512 によってフレーム 502 に固定されているカバー 510 によってフレームにしっかりと取り付けられ且つ保持されている。上記したように、フィルタホイールは、如何なる反射も視野の外側へ導くために、フィルタ 508 をコリメータ 110 に対して通常は約 22° で傾斜させてフレーム 502 内に保持するように位置決めされる。光は、カメラレンズ 140 及び CCD カメラ 70 と整合されたフィルタ開口 508 内を通過する。更に上記したように、フィルタ 508 は、フィルタ自体の構成要素として又は測定される光用のフィルタに追加して設けられる構成要素として、赤外遮断装置を含むのが好ましい。赤外遮断装置は、外部からの光線によって生じる赤外放射が CCD カメラによって受け取られた像を変えるのを防止するためのものである。30

【0037】

光学チャンバ 60 が図 6 に示されている。図示されているように、光学チャンバ 60 には、サンプルハウジング 604 が取り付けられている光学ハウジング 602 が結合されている。プレート 10 が光学チャンバ 60 内に装荷されると、プレートはサンプルハウジング 604 内に固定される。サンプルハウジング 604 は、コリメータ 110 と整合されて配置されており、サンプルハウジング 604 の上方にはフレネルレンズ 120 が設けられている。多くの発光アッセイは室温で設けることができるけれども、いくつかの発光アッセイは高い温度を必要とする。この装置の照度計には、サンプルチャンバが設けられており、同サンプルチャンバ内では、サンプルハウジング 604 は、好ましい実施形態においてはポリウレタンホームである絶縁体 606 と、サンプルチャンバ 55 内の温度を約 42 の室温よりも高い温度まで上げるためのヒーター要素 608 と、を担持している。40

【0038】

雰囲気状態においてさえ、プレート 10 の充填されたウエルから発生する水蒸気の結果と50

して、凝結がフレネルレンズ 120 の表面上に集まる傾向がある。霜取り装置 610 は、チャンバが霧囲気状態にある場合に、霧囲気状態又はチャンバの温度よりもほんの数度、好ましくは 2 ないし 3 ° 加熱された空気の流れを、フレネルレンズ 120 の表面を横切って導き、凝結を効率的に防止する。光学チャンバ 60 の内側の頂部には、撮像前に所望の波長を濾波するために波長を変えるフィルタ 614 を取り付けても良いフィルタホイール 612 を駆動するフィルタモーター 610 が取り付けられている。もちろん、光がフィルタ 614 を通過した後に CCD カメラ上に導かれるように光学チャンバ 60 の光学ハウジング 602 内に符号 616 で示された領域が設けられている。光学チャンバ 60 の大きさは、図 6 においては、光学チャンバ 60 とフィルタホイール 612 と霜取り装置 610 との間の関係を図示するために誇張されている。実際には、フィルタは、光学チャンバ 60 の内側でサンプルハウジング 604 の外側に配置されているが、所望の機能を依然として達成しながら代替え的な配置が可能である。 10

【 0039 】

図 6A には、本発明の好ましい実施形態における新規なロボット機構 616 の平面図で示されており、このロボット機構 616 は、高いスループットスクリーニング (HTS) において使用するための能力を提供する。図 6A を参照すると、動作は以下の通りである。ロボットプレートスタック 620、622、624、626 及び 628 の各々は、垂直スタック内に配列された多数のサンプルプレート 10 によって満たされている。図 6A の好ましい実施形態においては、ロボットプレートスタック 628 は、廃棄スタックとして示されている。残りのロボットプレートスタック 620、622、624 及び 626 は、演算処理装置 50 (図示せず) によって制御されるソフトウェアによって供給されるようにプログラムすることができる。これらのスタックのいずれかからプレートを装荷するか又は掴み取るために、ロボットアーム 630 は、演算処理装置 50 内にプログラムされたソフトウェアの制御によって、所望のロボットプレートスタックへと垂直方向で且つ回転して移動する。演算処理装置 50 によって命令されたとき、この装置の移送装置 200 は、サンプルプレート 10 を、装荷位置 202 から読み取り位置 203 へと運び、撮像が完了すると装荷位置 202 へと戻す。図 6A に示された本発明の実施形態においては、サンプルプレート 10 を装荷位置 202 から読み取り位置 203 へと移動し且つ装荷位置 202 まで戻る経過時間は、典型的には、撮像時間を含む 30 ないし 120 秒である。 20

【 0040 】

ステージング (切り離し) 位置 632 及び 634 が、ロボットアーム 630 の位置に対して 45 度の位置に配置されている。一つの実施形態においては、撮像が進んでいる間に、ロボットアーム 630 は、サンプルプレート 10 をステージング位置 632 に配置することができ、サンプルプレート 10 を装荷位置 202 に配置する準備ができている。撮像が完了した時に、ロボットアームは、読み取られたプレートを、装荷位置 202 からステージング位置 634 まで移動させることができ、次いで、同プレートをステージング位置 632 から装荷位置 202 へ装荷し、サンプルプレート 10 が撮像されている間に、ロボットは、プレートを、ステージング位置 634 から廃棄スタック 628 へと移動させ、新しいサンプルプレート 10 をステージング位置 632 に配置する。実際には、ステージング位置は、装荷位置とほぼ同じ高さにあり、従って、動きが迅速である。好ましい実施形態においては、ロボットアーム 630 は、撮像が一続きであるよりもむしろ撮像が進んでいる間にロボットプレートスタック 620、622、624 及び 626 のいずれかへと時間がかかる動きを行う。 40

【 0041 】

ステージング位置 632 及び 634 においては、单一のサンプルプレート 10 のためのサイクル時間は、72 秒の全サイクル時間に対して、ステージング領域から / ステージング領域までの二つの動き (各々 3 秒) プラス読み取り位置 203 への / 読み取り位置からの二つの移送の動き (各々 3 秒) プラス積分時間 (像露出) 時間 (典型的には 60 秒) である。ステージング位置 632 及び 634 を使用しない場合の時間は、126 秒の全体に対して、スタックへの二つの動き (各 30 秒) プラス二つの移送 (各 3 秒) プラス積分時間 50

(典型的には60秒)である。ロボット機構616の好ましい実施形態に記載されているように、ステージング位置632及び634の使用はサイクル時間を43%だけ減じる。

【0042】

処理

上記したように、本発明の照度計のワークステーションの機械系及び光学系は、フレネルレンズ/コリメータの使用を十分に利用してCCDカメラによる単一の像視検及びそれに続く分析を可能にするHTS環境における正しく定量的な発光の値を提供するように設計されている。コリメータ、レンズ及びカメラは、互いに結合して、従来技術における試みにおいて経験されるクロストークを減少させる。得られた信号は、更に、図7に図示されているように、演算処理装置50又はその他の方法に装荷されたソフトウェアによって更に処理して、得られた値を更に精緻なものにする。

【0043】

ここに記載された本発明の一体化された機械系及び光学系によって収集された像のデータを処理する前に、本発明の一体化された処理構成要素は、信頼性のあるデータ収集するために、最初に、これらの一体化された機械系及び光学系の機械的整合を制御しなければならない。この過程は、演算処理装置50の制御下で行われる。整合試験を行うためには、本発明の発光検知は、所謂温かいウエルと呼ばれる試験プレートの4つの試験サンプルウエルから発光された光を測定する。好ましい実施形態においては、この温かいウエルは、整合試験のために使用されるサンプルトレイの各コーナーの近くに配置される。4つの温かいウエルの各々から隣接するウエルのクロストークが分析され、これらの値が比較される。コリメータがサンプルトレイ上に正しく整合されたとき、クロストークの値が4つの温かいウエルに対して対称的であろう。本発明のソフトウェアは、試験サンプルウエルの不正確な数、不正確な強度又は不正確な配置のようなあらゆる検知されたエラーをフラグをたてて合図する。エラーがないことを検知した後か又は検知され且つフラグをたてて合図されたエラーを補正した後に、本発明のソフトウェアは、サンプルウエルのトレイ、コリメータ、フレネルレンズ及びCCDカメラアセンブリの正しい整合を決定するために、対称性の計算を行う。本発明の公知の実施形態においては、以下のステップを行うことによって、対象性の計算を行うために公知のソフトウェア技術が採用されている。

【0044】

1. 温かいウエルと垂直及び水平の隣接するウエルの強度を引き出す。

2. 温かいウエルの各々に対して、水平及び垂直の隣接するウエルの強度の平均値を別個に計算する。

【0045】

3. 水平及び垂直の方向の各々に対して、実際の隣接する強度と平均値との差を計算する。

4. パーセンテージの強度の値に変換するために、この差を温かいウエルによって正規化する。

【0046】

5. これらの差の最も悪い場合の絶対値を見つけ、それを全体の不整合として表示する。

6. 温かいウエルの右側(水平方向)に隣接する4つのウエルを平均化することによって、X方向(水平)の平均の不整合を計算する。

【0047】

7. 温かいウエルの頂部(垂直方向)に隣接する4つのウエルを平均化することによって、Y方向(垂直)の平均の不整合を計算する。

8. 温かいウエルの頂部における左側の温かいウエルの垂直隣接ウエルを平均化することによって回転方向の不整合を計算し、それを右側の温かいウエルの垂直隣接ウエルの平均値から差し引き、それによって、隣接するウエルの値のあらゆる傾きを指示する。

【0048】

ステップAにおいては、各々のフィルタ/エミッタのための3つの実際の像が撮られる。

A_1 はカーソル前方(precursor)の像であり、 A_2 は十分な積分時間の像であり

10

20

30

40

50

、 A_3 はカーソル後方 (post-cursor) の像である。カーソル前方の像とカーソル後方の像とは、画素の飽和の問題を避け且つ検知作動範囲を伸ばすために撮られる。カーソル前方の像及びカーソル後方の像は、たくさんの飽和した画素を含むべきでない少ない積分時間の像を指している。十分な積分時間の像の 6 個以上の画素が飽和すると、カーソル前方の像とカーソル後方の像とが一緒に平均化されて、ウエルの領域のための実際のデータを形成する。6 個の画素の飽和がない場合には、十分な積分時間の像が使用される。

【0049】

ステップ B においては、各画素を明確に分離し且つ読み取るために、各像は、端縁検知及びマスキングを受け、処理ステップは、それによって各ウエルの端縁又は対応する光の像が特定されるか又は注釈を付けられて、本明細書に参考例として組み入れられている米国特許出願第 09/351,660 号に開示されている各ウエル領域を離れて設定して明確に分離する。 B_1 、 B_2 及び B_3 の各々に対して、各々、カーソル前方の像、十分な積分時間の像及びカーソル後方の像と称される端縁の検知及びマスキングがなされる。これらの像は、次いで、"異常値" 補正、補正又は異常値及び異常の "削り出し (shaving)" を受ける。この方法においては、重要な領域内の画素は、"異常値" を特定するために試験される。この異常値は、検知された光の強度に関して、それらの近辺と全体として一致しないものであり、所与の画素又は小さい画素領域の強度が近辺の画素又は画素領域と著しく異なる場合には、次いで、周囲の画素又は領域の平均値が使用されて、エラーデータと置き換えられる。これは、宇宙線によって生じるもののようなランダムな光線によるものであり得る。この方法において、このタイプの強度は補正される。

10

【0050】

続いて、ステップ C において、各像、 C_1 、 C_2 及び C_3 は、マスクで画定された重要な領域の各々の中の平均の画素値を得るために、暗バックグラウンドを差し引く暗減算 (dark subtraction) を受ける。この減算は、周期的に更新される記憶されたライブラリからウエル毎になされる。

20

【0051】

特に、暗減算は、光が無いときにおいてさえ、CCD カメラが低レベルの画素又は貯蔵値 (bin value) を出力できるという事実に対して補正するためになされる。この値は、位置及び積分時間の不变量である電子バイアス電圧と、位置によって変わり得る "暗電流" とを含んでおり、且つ積分時間と CCD の温度に比例している。CCD はまた、光の入力にかかわらず常に高いレベル又は飽和している欠陥画素を有していても良い。

30

【0052】

本発明の処理ソフトウェアは、ステップ C において、実際のサンプルウエルの像データから、このバックグラウンド像又はデータを差し引く。関連技術における当業者が認識するように、実際の像のすぐ前又は後の "暗" 像を撮像し、両方の場合に同じ積分時間のための像を撮像すること、及び実際の像データからこの "暗" 像データを差し引くことは知られている。本発明の好ましい実施形態においては、"暗" 像データは、好ましくは、特別な時間間隔で迅速に補正される最初の "暗" 像バックグラウンドはスタートアップ時に補正され、次いで、典型的には、像処理動作中に 4 時間間隔でなされる。

40

【0053】

バックグラウンド像は、積分時間 - 不変要素と積分時間 - 変動要素とを有しているので、データは、最小積分時間と最大積分時間とにおいて各サンプルウエルに対して補正され、"傾斜 / 遮断" ラインが、公知のデータ分析技術を使用して、2 つのデータポイント間で計算される。この計算は、最小と最大との間のあらゆる積分時間に対するデータ補間 (interpolation) を許容し、最小積分時間と最大積分時間との下又は上の積分時間のためのデータ補外 (extrapolation) を許容する。

【0054】

本発明の好ましい実施形態においては、CCD 出力増幅器によって起こされる 2 つの別個の暗電流機能を有する CCD カメラが採用されている。増幅器の作動は熱を発生し、必ず

50

バックグラウンド“暗”像データを形成する。好ましい実施形態においては、増幅器は、10秒未満の積分時間に対して連続的に作動し、一方、10秒以上の積分時間に対しては読み取り動作の直前までオフされたままである。10秒以上の積分時間に対して計算された“傾斜／遮断”ラインは、次いで、必ず、10秒未満の積分時間に対して計算された“傾斜／遮断”ラインよりも低い傾斜を有する。ステップCにおいては、処理ソフトウェア要素は、演算処理装置50内の0ないし10秒の積分時間領域の両方に対して別個の収集及び最小二乗回帰を可能にし、“暗”バックグラウンド像が個々のAOLの各々に対して別個に記憶される。

【0055】

“暗”電流及びバイアスもまた常に変動し得る。処理ソフトウェア要素は、“暗”バックグラウンド像が撮られたときに撮られる積分時間が（上記の回帰ライン技術を使用して）正規化された（上記した視野の外側の）“暗基準”画素値を、実際のサンプルウエル像が撮られている間に撮られた“暗基準”画素値とを比較することによって、この作用に対して補正する。これらの値の差は、次いで、“暗”バックグラウンドデータに対して全体的な数として適用できるように、差し引かれるか加算される。これは、バイアスドリフトを補正し且つ全体的なCCD温度ドリフトをも補正する。

10

【0056】

上記したように、ステップCの上記の“暗バックグラウンド”補間／減算の全てはウエル毎になされる。

20

ステップDにおいては、画素の飽和が起こってカーソル前方及びカーソル後方の像の平均値が使用されなければならない場合には、像データに、カーソル前方の像によって表されるパーセンテージ（例えば、3%）の逆数が掛けられる。

【0057】

ステップEにおいては、ウエルのデータが、完全に均一な入力照射に対する系の応答の逆数である校正ファイルを使用している均一性変動値に対して補正される。

【0058】

ステップFにおいては、データを全体として処理し且つ二次元データアレイからの三次元像の再生がなされるのと同じ形態で最終的な像を作成することによって、クロストーク補正がなされる。

【0059】

30

特に、ステップFの好ましい実施形態においては、インパルス応答関数（IRF）が96ウエルプレートタイプの96個のウエル全てに対して収集される。これは、所与のプレート内の一つの特定のウエルを高強度の照射光源によって満たし、プレートを撮像し、プレート内の全てのウエルの応答をこの一つの高強度のウエルに対して分析することによってなされる。IRFは、完全なデータの組に対して所望される異なるウエル位置の各々に対してこの方法を繰り返すことによって全てのウエルに対して別個に収集される。384ウエルタイプに対しては、96個のサンプリング領域が選択され、選択された領域間でのウエルのデータは、二次元で補間される。好ましい実施形態においては、96サンプリング領域は、外側から始まり中心に向かって、2つの行毎及び2つの列毎からなる。384ウエルプレートにおいては行と列との数が等しいので、2つの中心の行と2つの中心の列とが補間される。384ウエルプレート内の反射もまた利用され且つ欠けている入力データの反射を予測し且つ補間するために使用される。更に、好ましい実施形態においては、全てのウエルが高強度のウエルに対して正規化される。

40

【0060】

続いて、ステップFにおいて、各ウエルのためのウエルIRF値の二次元アレイが“展開”されて一次元列アレイにされ、他のウエルに対するIRF値の二次元アレイが、以下の表1に示されているように連続する列として加算される。

【0061】

【表1】

表1－列1へと展開されるデータ

A 1 のため の I R F	B 1 のため の I R F	C 1 のため の I R F	
A 1	A 1	A 1	その他
B 1	B 1	B 1	
C 1	C 1	C 1	
D 1	D 1	D 1	
E 1	E 1	E 1	
F 1	F 1	F 1	
G 1	G 1	G 1	
H 1	H 1	H 1	
A 2	A 2	A 2	
B 2	B 2	B 2	
C 2	C 2	C 2	
その他	その他	その他	

10

【 0 0 6 2 】

$N \times N$ マトリックスの形態を有する展開されたマトリックス（式中、 N = 補正されるウエルの数）は、反射ファクタを含む装置間のクロストークの完全な特性を含んでいる。この展開されたマトリックスは、次いで、公知のマトリックス反転方法を使用して反転させ、且つ実際のアッセイデータから展開された一次マトリックスをマトリックスかけ算して補正として使用される。この計算方法は、[真の光源分布] を解くためのマトリックス代数学として示すこともできる：

20

$$[\text{真の光源分布}] \times [\text{系の I R F}] = [\text{装置出力}]$$

$$[\text{真の光源分布}] = \{ 1 / [\text{装置の I R F}] \} \times [\text{装置出力}]$$

続いて、上記の処理によって得られた計算されたウエルの強度は、校正されて、公知のレポータ酵素 (reporter enzyme) の濃度のような重要な絶対パラメータにされる。この校正は、関連技術の当業者によく知られている種々の校正曲線のいずれかを作成する正規化方法によって行われる。

30

【 0 0 6 3 】

任意的なステップ G においては、処理された像情報が、試験された物質との適当な相関関係を得るために、調整前の必要な処理を受ける。特に、好みの実施形態においては、本発明の処理ソフトウェアは、多要素分析を行うことができる。基本的な問題は、他の種々の試薬含んでいる単一のサンプル内の単一の試薬の濃度を別個に計算することである。典型的には、本発明と共に使用される試薬は、種々のスペクトル（おそらく重なっている）に亘って射出するように系統立てられる。一体化された光学要素に関して既に述べたように、多数の試薬から光を分離する第 1 のステップは、他の目標でない試薬の発光に対する感度を最小にしつつ、目標試薬の発光に対する感度を最大にするように設計された光学バンドパスフィルタによって達成される。本発明の好みの実施形態においては、目標試薬の発光スペクトルの各々に対して一つの光学フィルタがある。

40

【 0 0 6 4 】

光学フィルタは干渉素子であるので、それらのバンドパス特性は、濾波される発光の入射角に依存して変化する。各ウエルの特定の配置と光学フィルタに対して特異であるので、入射角は、各ウエルに対して特異である。従って、全ての計算及び濾波率は、サンプルウエル毎に特異でなければならない。多要素の校正は以下のようにしてなされる。

【 0 0 6 5 】

実際の複合（たくさんの試薬）サンプルに先立って、各ウエル内の単一の試薬のみを含む標準規格品の撮像が行われ且つ分析される。これらの標準規格品は、各ウエルに対して、

50

各光学フィルタのための多要素係数として集合的に使用される一組の係数を形成するであろう。所与の光学フィルタに対して、そのフィルタのための目標試薬は最も高い出力を生成するべきである。その他の試薬もまた、フィルタのバンドパス内のスペクトルを有しているかもしだれず且つこれらの目標でない試薬のスペクトルのフィルタ信号への重なりの測定値であるより小さい出力を生成するであろう。例えば、目標試薬に対するフィルタの出力は、850であり、その他の2つの試薬に対するフィルタの出力は、各々、100と50である。3つの試薬が单一のウエル内に一緒に加えられた場合には、全体の出力は100であり、比率は、850:100:50であった。これらの係数は、各々のウエル位置及びフィルタに対して別個に測定されて、連立方程式のための係数の完備した組を付与する。これによって、一つのサンプルウエル内の試薬の濃度のいかなる組み合わせの解決を可能にするであろう。更に、好ましい実施形態においては、これらの係数はまた、“全体の発光”内の全体の強度の読み取りによって正規化され、その結果、この計算は、单一の試薬のみが“全発光”フィルタによって測定された場合に装置が測定する強度と同じ強度をもたらすであろう。この計算は、青と緑の試薬（計算においてはRとして省略されている）及び青と緑と全発光のフィルタ（計算においてはFとして省略されている）の簡単な場合に対して以下のように示すことができる：

$L_{e t A} = (青 R \text{ ないし } 青 F \text{ に対する装置の出力}) / (青 R \text{ ないし } 全発光 F \text{ に対する装置の出力})$

$L_{e t B} = (緑 R \text{ ないし } 青 F \text{ に対する装置の出力}) / (緑 R \text{ ないし } 全発光 F \text{ に対する装置の出力})$

$L_{e t C} = (青 R \text{ ないし } 緑 F \text{ に対する装置の出力}) / (青 R \text{ ないし } 全発光 F \text{ に対する装置の出力})$

$L_{e t D} = (緑 R \text{ ないし } 緑 F \text{ に対する装置の出力}) / (緑 R \text{ ないし } 全発光 F \text{ に対する装置の出力})$ 。

【0066】

これらの係数は、多色での試験を行う前に、各ウエルに対して測定される。そして、多試薬/多色に対しては、

$(青 F \text{ の装置の出力}) = A \times (青 R \text{ の真の強度}) + B \times (緑 R \text{ の強度})$ 及び

$(緑 F \text{ の装置の出力}) = C \times (青 R \text{ の真の強度}) + D \times (緑 R \text{ の強度})$

これらの2つの連立方程式は、次いで、演算処理装置50の制御下で、処理ソフトウェアによって青及び緑の試薬の真の強度に対して解かれる。

【0067】

更に、ステップGにおいて、各フィルタに対する装置のなまの出力は、方程式を解く前に積分時間に対して正規化される。結果として得られた強度は、上記した基準を使用して、濃度として計算することができる。

【0068】

最後に、ステップHにおいて、分析されたデータは、再び演算処理装置50によって制御されたユーザーが受け入れ可能な形態で表される。

本発明は、作動範囲及びNorthStar（登録商標）照度計の自由度を例示しているHTS形式で実施されたアッセイの例を参照することによって、更に理解することができる。

【0069】

例

例1 - 精製されたcAMPの測定

cAMP標準規格品が逐次希釈され且つアルカリ性フォスファターゼ結合cAMP及び抗-cAMPを備えた96ウエルアッセイに添加した。これらのプレートを、cAMP-Screen（登録商標）プロトコルによって処理し、CSPD/Sapphire-II（登録商標）を添加して30分経過した後に、NorthStar（登録商標）上で1分間撮像した。精製されたcAMPの0.06pMの感知は、NorthStar（登録商標）のワークステーション上でcAMP-Screen（登録商標）によってなされる。

10

20

30

40

50

結果を図8に示す。

【0070】

例2-C2細胞を発現するアドレナリン作用性 2レセプタ内でのcAMP誘導

C2細胞を発現するアドレナリン 2レセプタを、96-ウエルプレート(10,000細胞/ウェル)内にプレートし、イソプロテレノールによって10分間刺激した。cAMP製品を、cAMP-Screenアッセイを使用している細胞溶菌液内で定量した。アッセイプレートをCSPD/Sapphire-II(登録商標)を添加して30分経過した後に、NorthStar(登録商標)上で1分間撮像した。刺激されたアドレナリンレセプタからのNorthStar(登録商標)上で、次第に増えるcAMPのレベルを検知した。結果を図9に示す。

10

【0071】

例3-384-及び1,536-ウェル形式のLuc-Screen(登録商標)レポート遺伝子アッセイ

pCRE-Lucをトランスフェクトされた細胞を、96-、384-及び1,536-ウェルプレート内に接種し、フォルスコリン(forskolin)によって20時間培養し、Luc-Screen(登録商標)システムによってアッセイした。pCRE-Lucは、cAMP応答要素(CRE)の制御による発光酵素レポーター遺伝子を含んでいる。フォルスコリンは、アデニレートシクラーゼの不可逆性の活性化による細胞内のcAMP製品を含んでいる。全てのプレートの形式が、比較可能なフォルスコリン誘導cAMPレベルを示している。結果を図10に示す。

20

【0072】

例4-pCRE-LucでトランスフェクトされたNIH-3T3細胞のフォルスコリン誘導

pCRE-Lucでトランスフェクトされた細胞を96-ウェルプレート内で接種した。4つのランダムなウェルを、1mMのフォルスコリンによって17時間誘導し、Luc-Screen(登録商標)システムによってアッセイした。結果を図11に示す。

【0073】

例5-ルシフェラーゼ及び - ガラクトシダーゼレポーター酵素のDual-Light(登録商標)の定量

NIH/3T3細胞を、pCRE-Luc及びp gal-1 Controlによって一緒にトランスフェクトし且つ96-ウェルマイクロプレート(2×10⁴細胞/ウェル)内に接種した。細胞は、17時間フォルスコリンによって培養した。細胞にModified Dual-Light(登録商標)Buffer Aを添加し且つ10分間培養した。Modified Dual-Light(登録商標)Buffer Bを注入し且つルシフェラーゼで触媒作用を施した発光を迅速に測定した。30分後に、Accelerator-IIを添加し、次いで、 - ガラクトシダーゼで触媒作用を施した発光を、NorthStar(登録商標)HTSワークステーション上で定量した。定量結果を図12に示す。

30

【0074】

例6-ルシフェラーゼレポータの正規化した折り畳み誘導

40

ルシフェラーゼ活性化の折り畳み誘導(fold induction)を、 - ガラクトシダーゼ活性化に対する正規化に統いて計算した。Dual-Light(登録商標)アッセイは、正規化のための制御レポータの使用を可能にし又は遺伝子発現によって特異性でない作用を監視することが可能になる。これを図13に示す。

【0075】

例7-アンタゴニスト活性化に対するBAPTA-AM作用

CHO-Aeq-5HT2Bに、コエレンテラジン(coelenterazine)h+/-0.5μM BAPTA-AMを4時間装荷した。アンタゴニスト メチセルギドを、30分間、装荷された細胞に添加した。1μMアゴニストa-Me-5HTを注入し、発光された光を、NorthStar(登録商標)システム上で20秒間積分した。メ

50

チセルギド (0.6 μM) に対してレポートされた I C 5 0 は、B A P T A - A M の存在下で変化しない。得られたデータを図 1 4 に示す。

【 0 0 7 6 】

例 8 - オレクシン 2 レセプタの刺激されたペプチド アゴニスト上で B A P T A - A M の作用

C H O - A e q - O X 2 - A 2 細胞に、コエレンテラジン (c o e l e n t e r a z i n e) h + / - 0.6 μM B A P T A - A M を 4 時間装荷した。ペプチド アンタゴニスト オレクシン B をウエル内に注入し、発光された光を、N o r t h S t a r (登録商標) システム上で 20 秒間積分した。N o r t h S t a r (登録商標) システム上でこのアッセイを使用したとき、オレキシン B (0.75 nM) に対してレポートされた E C 5 0 は、B A P T A - A M の存在下で変化しない。これは図 1 5 に示す。

10

【 0 0 7 7 】

以上、本発明を特定の実施形態及び例を参考にして説明した。指示されていない場合でも、いかなる実施例又は例も限定することは意図していない。本発明の技術の経験なく及び請求の範囲内で、当業者は変形例を想到できるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明による発光検知装置の好ましい実施形態の断面図である。

【図 2】 本発明による発光検知装置の光学系の詳細な断面図である。

【図 3】 本発明のプレート移送装置の断面図である。

【図 4】 本発明の注入装置のアームアセンブリの斜視図である。

20

【図 5】 フィルタホイールアセンブリの分解図である。

【図 6】 図 6 は、光学ハウジングの断面図である。

図 6 A は、本発明のロボット機構の平面図である。

【図 7】 本発明の処理方法のフローチャートである。

【図 8】 例 1 ないし 1 0 における本発明を使用して得られた結果を示すグラフである。

【図 9】 例 1 ないし 1 0 における本発明を使用して得られた結果を示すグラフである。

【図 1 0】 例 1 ないし 1 0 における本発明を使用して得られた結果を示すグラフである。

。

【図 1 1】 例 1 ないし 1 0 における本発明を使用して得られた結果を示すグラフである

。

30

【図 1 2】 例 1 ないし 1 0 における本発明を使用して得られた結果を示すグラフである

。

【図 1 3】 例 1 ないし 1 0 における本発明を使用して得られた結果を示すグラフである

。

【図 1 4】 例 1 ないし 1 0 における本発明を使用して得られた結果を示すグラフである

。

【図 1 5】 例 1 ないし 1 0 における本発明を使用して得られた結果を示すグラフである

。

【図1】

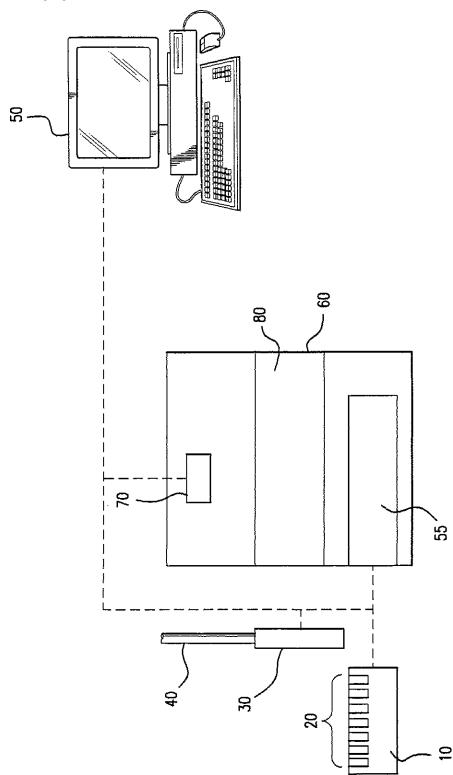


FIG. 1

【 四 2 】

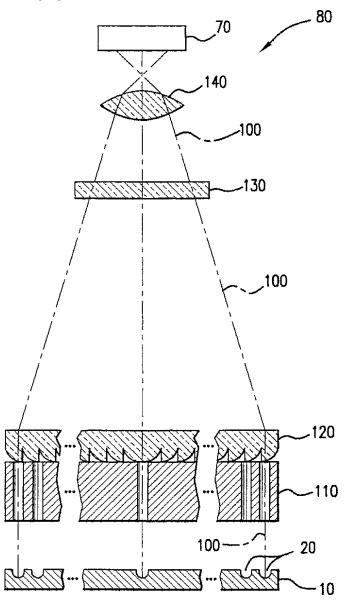


FIG.2

【図3】

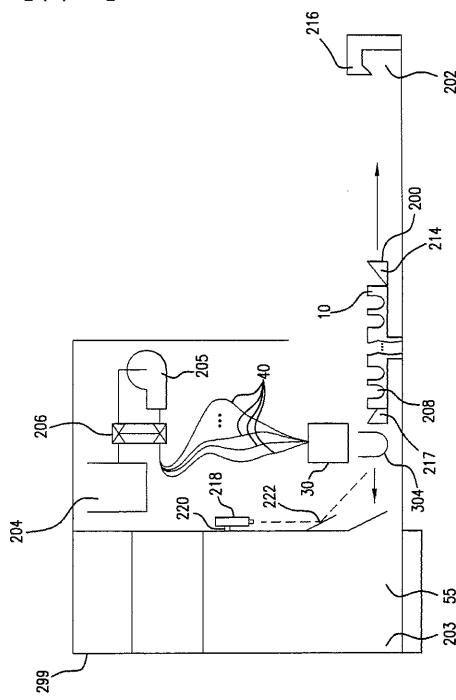


FIG.3

【 図 4 】

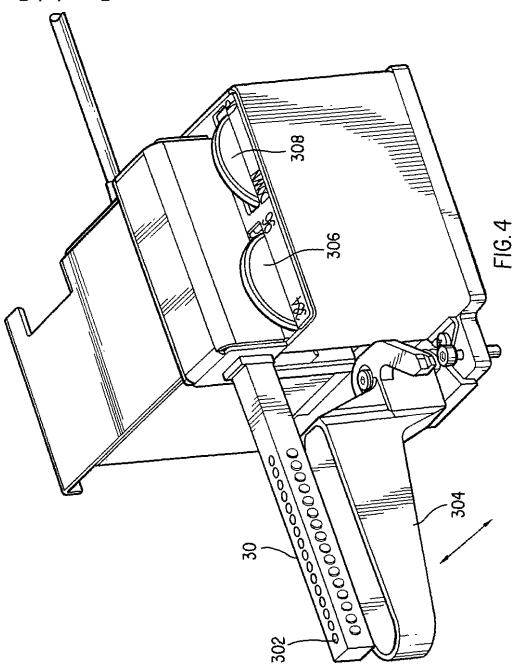


FIG. 4

【図5】

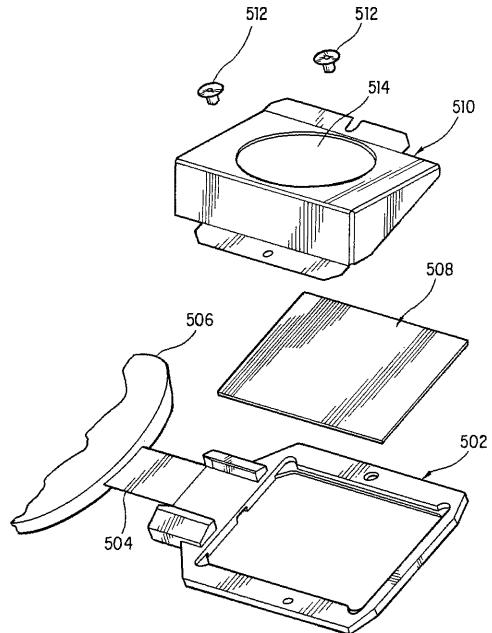


FIG. 5

【図6】

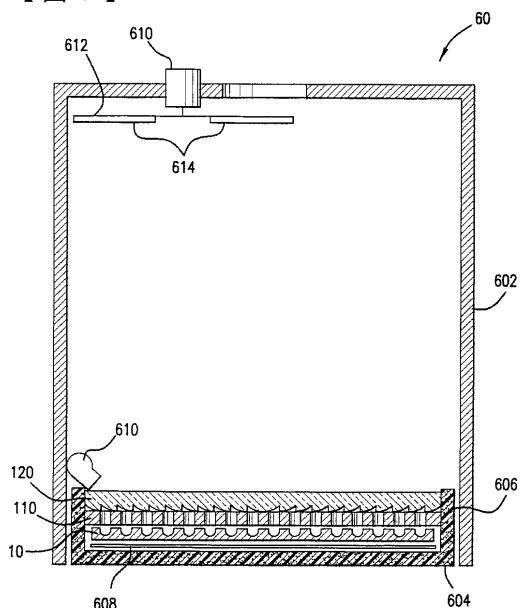


FIG. 6

【図6A】

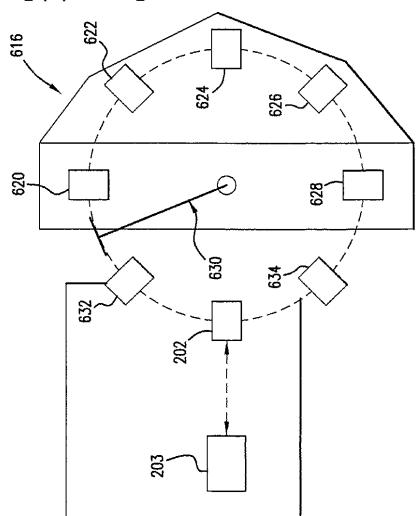


FIG. 6A

【図7】

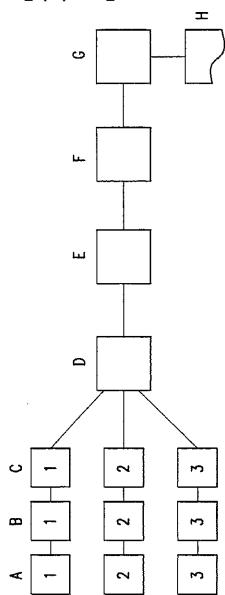


FIG. 7

【図 8】

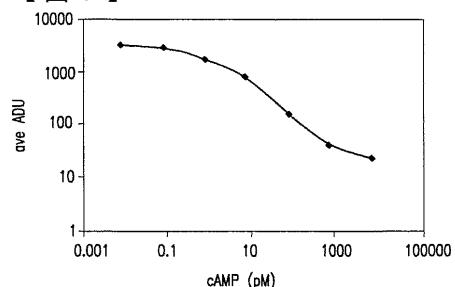
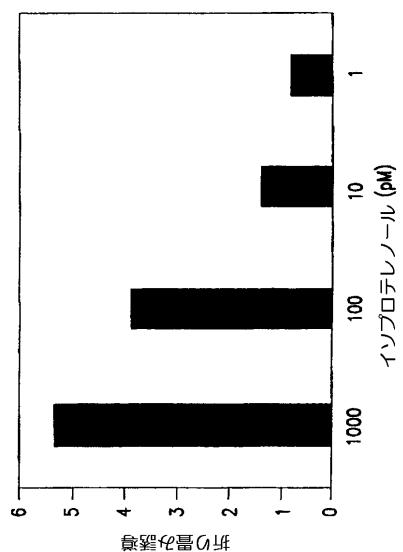
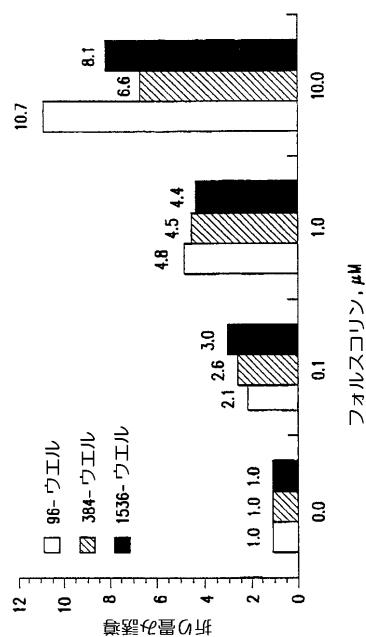


FIG.8

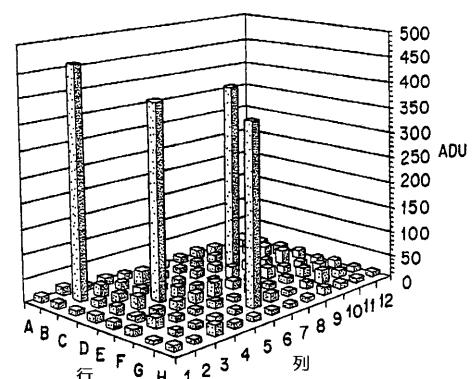
【図 9】



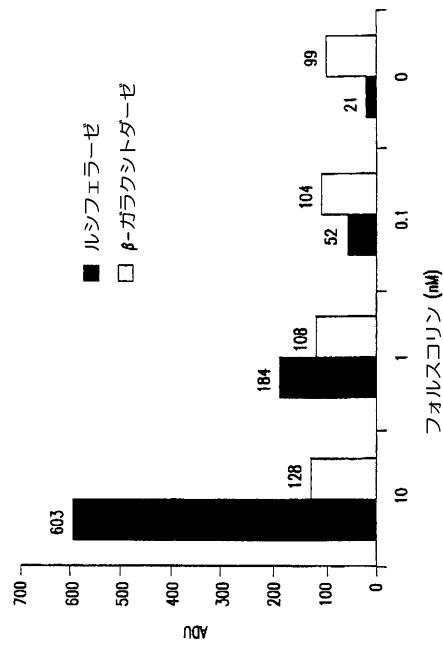
【図 10】



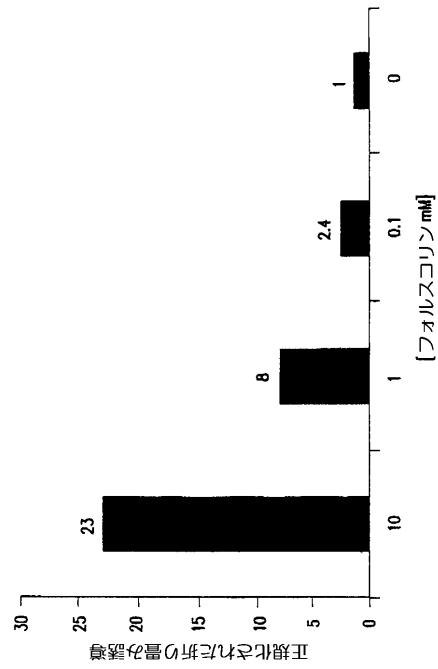
【図 11】



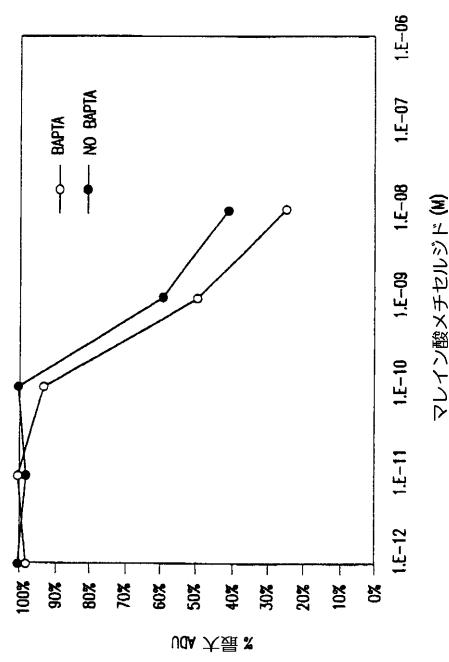
【図 1 2】



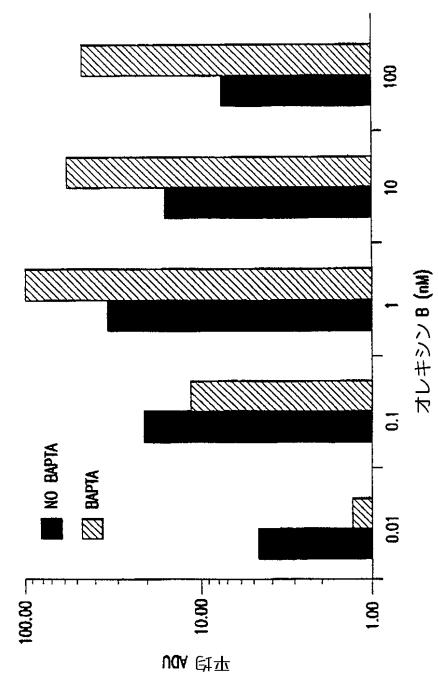
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



フロントページの続き

(74)代理人 100093089
弁理士 佐久間 滋

(72)発明者 ガンビーニ,マイケル・アール
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01740,ボルトン,エニー・ムーア・ロード 24

(72)発明者 ヴォイタ,ジョン・シー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01776,サドバリー,メイナード・ファーム・ロード 9
9

(72)発明者 アトウッド,ジョン
アメリカ合衆国

(72)発明者 デシマズ,ブルース・イー,ザ・セカンド
アメリカ合衆国カリフォルニア州94526,ダンヴィル,ウェスタン・スター・プレイス 63
0

(72)発明者 ラカトス,エドワード
アメリカ合衆国コネチカット州06801,ベセル,リッジデイル・ロード 56

(72)発明者 レヴィ,ジェフ
アメリカ合衆国コネチカット州06611,トランブル,ゲイトハウス・ロード 46

(72)発明者 メタル,イスラエル
アメリカ合衆国ニューヨーク州11367,フラッシング,78・アベニュー 144-15

(72)発明者 サバク,ジョージ
アメリカ合衆国コネチカット州06468,モンロー,ブルックサイド・ドライブ 19

(72)発明者 ウォン,ヨン・ドン
アメリカ合衆国コネチカット州06897,ウィルトン,モリアリティ・ドライブ 73

審査官 高 場 正光

(56)参考文献 国際公開第99/023474 (WO, A1)
特開平02-239844 (JP, A)
国際公開第99/060381 (WO, A1)
国際公開第00/022417 (WO, A1)
特開平11-241947 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00 - 21/83
G01N 33/48 - 33/98
G01N 35/00 - 37/00