(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-523111
(P2018-523111A)
(43)公表日　平成30年8月16日(2018.8.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/543	***(2006.01)***	G01N	33/543	５６５Ｅ	
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/543	５６５Ｕ	
		G01N	33/53	Ｍ	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）

(21)出願番号	特願2017-564672 (P2017-564672)
(86)(22)出願日	平成28年6月28日 (2016.6.28)
(85)翻訳文提出日	平成30年1月24日 (2018.1.24)
(86)国際出願番号	PCT/EP2016/064953
(87)国際公開番号	WO2017/001374
(87)国際公開日	平成29年1月5日 (2017.1.5)
(31)優先権主張番号	15174655.9
(32)優先日	平成27年6月30日 (2015.6.30)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　514156563
アイメック・ヴェーゼットウェー
ＩＭＥＣ　ＶＺＷ
ベルギー、ベー－３００１ルーヴァン、カペルドリーフ７５番
(74)代理人　100101454
弁理士　山田　卓二
(74)代理人　100122297
弁理士　西下　正石
(72)発明者　リタ・フォス
ベルギー３００１ルーヴァン、カペルドリーフ７５番　アイメック・ヴェーゼットウェー内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分析物認識分子の表面固定

(57)【要約】
化学基Y^1で官能基化された表面（２’）に分析物認識分子（１）を固定する方法であって、該化学基Y^1が、連結分子（７）の化学基X^2と反応して化学基Y^2を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、該化学基Y^2が、該分析物認識分子（１）と反応するのに適したものであり、ａ）該官能基化表面（２’）を提供するステップ、ｂ）該官能基化表面（２’）を、ｉ）該連結分子（７）とｉｉ）該分析物認識分子（１）とを同時に含む溶液（６）と接触させるステップを含む、方法。

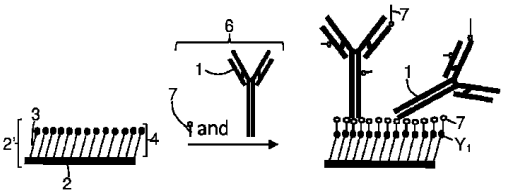
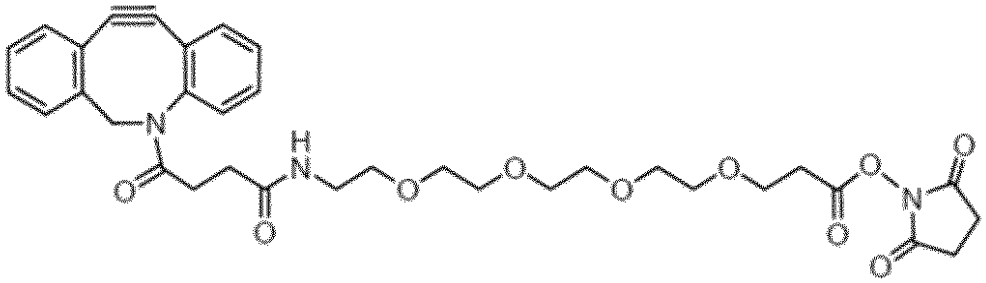


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
化学基Y^1で官能基化された表面（２’）に分析物認識分子（１）を固定する方法であって、該化学基Y^1が、連結分子（７）の化学基X^2と反応して化学基Y^2を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、該化学基Y^2が、該分析物認識分子（１）と反応するのに適したものであり、
ａ．該官能基化表面（２’）を提供するステップ、
ｂ．該官能基化表面（２’）を、ｉ．該連結分子（７）とｉｉ．該分析物認識分子（１）とを同時に含む溶液（６）と接触させるステップ
を含む、方法。
【請求項２】
前記分析物認識分子（１）が、－NH_2基、－ＳＨ基、－ＣＯＯＨ基、－ＯＨ基、アルデヒド基、ケトン基、ホスフェート基およびピロホスフェート基から選択される少なくとも１つの基を含み、前記連結分子（７）が、該少なくとも１つの基と反応するのに適したものである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記分析物認識分子（１）が－NH_2基を有し、かつY^2が、ｏ－アシルイソウレア、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、塩化スルホニル、アルデヒド、オキシラン、カルボキシル、カーボネート、アリール化剤、イミドエステル、酸無水物、フルオロフェニルエステルおよびヒドロキシメチルホスフィン誘導体から構成される群から選択されるか、あるいは該分析物認識分子（１）が－ＳＨ基を有し、かつY^2が、活性ハロゲン、マレイミド、アジリジン、アクリロイル、ビニルスルホン、アリール化剤およびジスルフィドから構成される群から選択されるか、あるいは該分析物認識分子（１）が－ＣＯＯＨ基を有し、かつY^2が、ジアゾアルカンおよびジアゾアセチルから構成される群から選択されるか、あるいは該分析物認識分子（１）がアルデヒド基またはケトン基を有し、かつY^2が、ヒドラジドおよび－NH_2から構成される群から選択されるか、あるいは該分析物認識分子（１）がホスフェート基またはピロホスフェート基を有し、かつY^2がカルボニルジイミダゾールである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記分析物認識分子（１）が－NH_2基を有し、Y^2がＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
Y^1が、－N_3、アルキンおよび－ＣＯＯＨから構成される群から選択され、
・Y^1が－N_3である場合、X^2が、歪みを有するかまたは有さないアルキンであり、該アルキンが歪みを有さない場合、ステップｂが、歪みを有さないアルキンと－N_3との反応を可能にするのに適した触媒の存在下で行われ、
・Y^1が、歪みを有するかまたは有さないアルキンである場合、X^2が－N_3であり、該アルキンが歪みを有さない場合、ステップｂが、歪みを有さないアルキンと－N_3との反応を可能にするのに適した触媒の存在下で行われ、
・Y^1が－ＣＯＯＨである場合、X^2がカルボジイミドかまたはジアゾ基＝N_2かのどちらかである、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
Y^1が－N_3であり、X^2がシクロアルキンのアルキン基である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記連結分子（７）が一般式：

【化１】



を有する、請求項４に従属する請求項６に記載の方法。

【請求項８】

前記溶液（６）が、少なくとも１μＭに等しい濃度で前記連結分子（７）を含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項９】

前記溶液（６）が、最大１ｍＭ、好ましくは最大１００μＭ、より好ましくは最大１０μＭの濃度で前記連結分子（７）を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０】

前記分析物認識分子（１）が、少なくとも1×10^{-12}ｍｏｌ／ｌに等しい濃度で前記溶液（６）中に存在する、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】

前記分析物認識分子（１）と前記連結分子（７）とを含む前記溶液（６）が、ステップｂの前に前記分析物認識分子（１）と前記連結分子（７）とを最大でも２時間、好ましくは最大でも３０分混合することによって調製される、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２】

前記連結分子（７）が一般式$X^2-R^2-Y^2$を有し、式中、R^2が、分枝を有するかまたは有さない飽和または不飽和の有機基であって、１～３０個の炭素原子を含み、－Ｎ－、－Ｏ－および－Ｓ－から構成される群から選択される１つ以上のヘテロ原子を場合によって含み、１つ以上のオキソ置換基を場合によって含む、有機基である、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１３】

ステップｂが、前記官能基化表面（２’）への前記溶液（６）の液滴の堆積を含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】

前記官能基化表面（２’）が、分析物（１０）と固定された前記分析物認識分子（１）との相互作用に際して可読信号出力を生成するための変換器と連結される、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】

ｉ．化学基X^2を有する連結分子（７）であって、該化学基X^2が、表面（２’）の化学基Y^1と反応して化学基Y^2を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、該化学基Y^2が、分析物認識分子（１）と反応するのに適したものである、連結分子（７）と、

ｉｉ．該分析物認識分子（１）と

を同時に含む、溶液（６）。

【請求項１６】

ａ．化学基X^2を有する連結分子（７）を含む第１溶液（６’）であって、該化学基X^2が、表面（２’）の化学基Y^1と反応して化学基Y^2を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、該化学基Y^2が、分析物認識分子（１）と反応するのに適したものである、第１溶液（６’）と、

ｂ．該分析物認識分子（１）を含む第２溶液（６’’）と
を含み、該第１溶液と該第２溶液とが、ひとたび混ざり合えば、
・少なくとも１μＭに等しく最大でも１ｍＭに等しい濃度の該連結分子（７）と
・少なくとも１×１０$^{-12}$ｍｏｌ／ｌに等しい濃度の該分析物認識分子（１）と
を含む溶液（６）を形成するようになっている、パーツのキット。
【請求項１７】
試料流体中の分析物（１０）を検出するためのセンサをさらに含み、該センサが、
ｉ．化学基Ｙ^{1}で官能基化された表面（２’）であって、該化学基Ｙ^{1}と前記連結分子（７）とを反応させて該分析物認識分子（１）との反応に適する反応生成物を形成することによって該分析物認識分子（１）を固定するのに適した、表面（２’）、および
ｉｉ．該官能基化表面（２’）に連結された変換器であって、分析物（１０）と固定された該分析物認識分子（１）との相互作用に際して可読信号出力を生成するのに適した、変換器
を含む、請求項１５に記載のパーツのキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、センサ、特に試料中の分析物を検出するためのバイオセンサの分野に関する。詳しくは、本発明は、分析物認識分子をセンサの表面に固定する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
ラボオンチップデバイスとも呼ばれる集積化小型バイオセンサデバイスにおいて、バイオセンサは、迅速で自動化された分析物の流動時検出を可能にするマイクロ流体基盤の一部である。最適な感度を保証するためには、センサ領域上への分析物認識分子または受容体の部位選択的な連結が要求される。
【０００３】
様々なバイオセンサデバイスに分析物認識分子を確実に共有結合させるために、有機シランの自己組織化単分子層を主とした様々な表面化学が試みられてきた。この目的のために、分析物認識分子（例えば抗体）に対して反応性である官能基を有するシラン、例えばエポキシーシランが使用されてきた。しかしながら、これらの反応性官能基は加水分解されやすく、貯蔵時には、とりわけH_2O含有雰囲気中において、それらの安定性に限界がある。その代替としてより好適に広く使用される手法は、より低い反応性を有する基をリンカー基と組み合わせて使用する手法である。この手法の一例は、Ｊ．Ｒｙｋｅｎら（ｓｅｎｓｏｒｓ ａｎｄ ａｃｔｕａｔｏｒｓ Ｂ ２００（２０１４）１６７－１７２）によって記述されており、第１ステップにおいて架橋剤を使用してシランを活性化させ、その結果として第２ステップにおいてシランを分析物認識分子と反応させることができるということに基づいている。これは、まず架橋剤を使用してバイオセンサ基材を活性化し、その後に別反応において分析物認識分子を複合化させる、という２段階式プロトコルを用いて行われる。
【０００４】
費用対効果の高い方法で分析物認識分子を全ウェハ規模で固定するためには、バイオセンサ変換器の領域上に微小液滴のアレイを生じさせる非接触式マイクロアレイ印刷技術（「スポッティング」）が最も適している。スポッティングを可能にするには、基材も、分析物認識分子をスポッティングするために使用する溶液も、十分に安定でなければならない。しかも、２段階式手法は、実際上の実現が特に高処理能環境において簡単でない、中間洗浄ステップを伴う精密な堆積を必要とする。したがって、従来技術の上記欠点のうちの１つ以上を克服または改善する、表面に分析物認識分子を固定する方法が、当該技術分野において必要とされている。
【発明の概要】
【０００５】

本発明の目的は、分析物認識分子を表面に固定するための良好な方法、溶液、およびパーツのキットを提供することである。

【０００６】

本発明の実施形態の利点は、官能基化表面への分析物認識分子の固定を１段階式に実施することができ、それによって製造を簡単にすることができるという点である。

【０００７】

本発明の実施形態の利点は、表面に分析物認識分子が固定されようとする前に、－ＳＨまたは－NH_2よりも大きな反応性を有する反応性基が分析物認識分子に導入されることがなく、それにより、官能基化表面への分析物認識分子の固定の前に分析物認識分子が経時的に安定であることが保証されるという点ある。

【０００８】

本発明の実施形態の利点は、分析物認識分子が表面と接触する直前まで連結分子が表面または分析物認識分子と接触しないという点である。これは、表面および分析物認識分子を経時的に安定にすることを助長する。

【０００９】

本発明の実施形態の利点は、本発明の１段階式方法が、固定プロセスに対する良好な制御をもたらし、かつ（典型的には、分析物認識生体分子の生物学的活性を温存することによって）分析物検出能力の温存をもたらすという点である。

【００１０】

本発明の実施形態の利点は、それが、従来技術の２段階式方法に代わって同等の制御および分析物検出能力を有する優れた１段階式代替策を意味するという点である。

【００１１】

本発明の実施形態の利点は、分析物認識分子の固定の前に官能基化表面が長期にわたって安定であることができるという点である。

【００１２】

本発明の実施形態の利点は、表面への分析物認識分子の固定が（とりわけそれが共有結合である場合に）非常に安定であるという点である。

【００１３】

本発明の実施形態の利点は、分析物認識分子の小さな液滴の均質で緻密なアレイを、非接触式マイクロアレイ印刷によって１段階で簡単にスポッティングできるという点である。２段階式方法には、連続するスポッティングステップ間での重ね合わせが良好でない可能性があるという欠点があり、正確な精密印刷のためには良好なアラインメントが要求される。しかも、２段階式方法は中間洗浄ステップを必要とする。

【００１４】

上記目的は、本発明に係る方法およびデバイスによって達成される。

【００１５】

第１の態様において、本発明は、化学基Y^1で官能基化された表面に分析物認識分子を固定する方法であって、化学基Y^1が、連結分子の化学基X^2と反応して化学基Y^2を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、化学基Y^2が、分析物認識分子と反応するのに適したものであり、

ａ．官能基化表面を提供するステップ、

ｂ．官能基化表面を、

ｉ．連結分子と

ｉｉ．分析物認識分子と

を同時に含む溶液（６）と接触させるステップ

を含む、方法に関する。

【００１６】

第２の態様において、本発明は、

ｉ．化学基X^2を有する連結分子であって、化学基X^2が、表面の化学基Y^1と反応して化学基Y^2を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、化学基Y^2が、分析物

認識分子と反応するのに適したものである、連結分子と、
ｉｉ．分析物認識分子と
を同時に含む、溶液に関する。
【００１７】
第３の態様において、本発明は、
ａ．化学基X^2を有する連結分子を含む第１溶液であって、化学基X^2が、表面の化学基Y^1と反応して化学基Y^2を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、化学基Y^2が、分析物認識分子と反応するのに適したものである、第１溶液と、
ｂ．分析物認識分子を含む第２溶液と
を同時に含み、
第１溶液と第２溶液とが、ひとたび混ざり合えば、
・少なくとも１μＭに等しく最大でも１ｍＭに等しい濃度の連結分子と
・少なくとも1×10^{-12}ｍｏｌ／ｌに等しい、好ましくは1×10^{-8}ｍｏｌ／ｌに等しい濃度の分析物認識分子と
を含む溶液を形成するようになっている、パーツのキット。
【００１８】
本発明の詳細な好ましい態様は、添付の独立請求項および従属請求項に示されている。単に特許請求の範囲において明記されているとおりとせずに、従属請求項による特徴を独立請求項の特徴およびその他の従属請求項の特徴と適宜組み合わせてもよい。
【００１９】
この分野では方法およびデバイスの絶え間ない改善、変化および進化があったが、本発明の概念は、従来技術からの逸脱を含めて実質的に新規で斬新な改善を提供し、結果としてより効率的で確実な方法およびこの性質を有するデバイスを提供すると考えられる。
【００２０】
本発明の教示は、分析物認識分子を表面に固定するための改良された方法および器械を考案することを可能にする。
【００２１】
本開示の上記およびその他の特性、特徴および利点は、本発明の原理を例示する添付の図面と併せて理解される以下の詳細な説明から明らかとなろう。この説明は、本発明の範囲を限定するものではなく、単に例示のために与えられているにすぎない。以下で引用している参照番号は、添付の図面に言及するものである。
【図面の簡単な説明】
【００２２】
【図１】図１は、本発明の一実施形態による分析物認識分子を固定する方法の概略図である。
【図２】図２は、本発明の実施形態において分析物認識分子の固定後に得られた、連結分子濃度の関数としてのＳＰＲ信号のグラフである。
【図３】図３は、本発明の実施形態において分析物の認識後に得られた、連結分子濃度の関数としてのＳＰＲ信号のグラフである。
【図４】図４は、本発明の実施形態に従って分析物の認識後に得られた、分析物濃度の関数としてのＳＰＲ信号のグラフである。
【図５】図５は、様々な表面にウシ胎仔血清を接触させた後に得られたＳＰＲ信号を比較したグラフであり、当該表面のうち１つは、本発明の実施形態に従って作製されたものである。
【図６】図６は、本発明の実施形態においてブロッキング剤の使用とその非使用とを比較した概略図である。
【図７】図７は、本発明の実施形態に従って官能基化表面を覆うために使用したブロッキング剤の性質の関数としての、蛍光分析物によって放射される蛍光のグラフである。
【図８】図８は、分析物認識分子の固定に使用したブロッキング剤の性質の関数としての、蛍光分析物によって放射される蛍光のグラフである。

【発明の詳細な説明】
【００２３】
本発明を特定の実施形態に関して若干の図面を参照して説明することにするが、本開示はそれに限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。描写されている図面は単なる概略にすぎず、限定を加えるものではない。図面中、例示目的のためにいくつかの要素の大きさが誇張され、縮尺どおりに描かれていない場合がある。寸法および相対寸法は、本発明の実際の具体化には対応していない。
【００２４】
さらに、明細書および特許請求の範囲において第１、第２、第３のような用語は、類似要素を区別するために使用されており、必ずしも時間的順序、空間的順序、序列の順序またはその他のいかなる様式の順序を表現するためのものでもない。そのように使用される用語は適切な状況下で交換可能であり、本明細書に記載されている本発明の実施形態は、本明細書に記載または図示されているのとは別の順序で機能することが可能であることは理解されるべきである。
【００２５】
さらに、説明および特許請求の範囲において頂部、底部、上、下などの用語は、説明を目的として使用されており、必ずしも相対的な位置を表現するためのものではない。そのように使用される用語は、適切な状況下で交換可能であり、本明細書に記載されている本発明の実施形態は、本明細書に記載または図示されているのとは別の配向で機能することが可能であることは理解されるべきである。
【００２６】
特許請求の範囲において使用される用語「含む」は、それに続いて列挙されている手段に限定されると解釈されるべきでなく、その他の要素またはステップを排除するものでないことに留意されたい。したがってそれは、言及された特性、整数、ステップまたは構成要素の存在を明記していると解釈されるべきではあるが、１つ以上の他の特徴、整数、ステップもしくは構成要素またはそれらの群の存在または追加を排除するものではない。例えば、「手段ＡおよびＢを含むデバイス」という表現の範囲は、構成要素ＡおよびＢのみから構成されるデバイスに限定されるべきでない。本発明に関してそれは、デバイスに関連する唯一の構成要素がＡおよびＢであるということを意味する。
【００２７】
同様に、特許請求の範囲においても使用される用語「連結された」は、直接的な接続のみに限定されると解釈されるべきでないことに留意されたい。「連結された」および「接続された」という用語はその派生語と併せて使用され得る。これらの用語が互いに同義語として意図されていないことは理解されるべきである。例えば、「デバイスＢに連結されたデバイスＡ」という表現の範囲は、デバイスＡの出力がデバイスＢの入力に直接接続されたデバイスまたはシステムに限定されるべきではない。それは、Ａの出力とＢの入力との間に、他のデバイスまたは手段を含めた経路であり得る経路が存在することを意味する。「連結された」とは、２つ以上の要素が物理的もしくは電気的に直接接触していることまたは、２つ以上の要素が互いに直接接触していないがなおも互いに協力もしくは相互作用していることを意味する。
【００２８】
この明細書全体を通じて、「１つの実施形態」または「一実施形態」に対する言及は、その実施形態との関連において記載された特定の特徴、構造または特性が本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれていることを意味する。したがって、この明細書全体にわたって様々な場所に出現する語句「１つの実施形態において」または「一実施形態において」は、必ずしも全てが同じ実施形態を指しているわけではないがその可能性はある。さらに、本開示から当業者にとって明らかであろうように、１つ以上の実施形態において特定の特徴、構造または特性をいかなる適切な様式で組み合わせてもよい。
【００２９】
同様に、本開示の例示的実施形態についての記載の中で、本開示を簡素化しかつ本発明

の様々な特質のうちの１つ以上についての理解を助けることを目的として本開示の様々な特徴が時として単一の実施形態、図またはその説明にまとめられていることを理解すべきである。しかしこの開示方法は、特許請求の範囲に記載の本発明には各請求項で明確に述べられている以外の特徴も必要であるという意味を反映していると解釈されるべきでない。むしろ本発明の特質は、以下の特許請求の範囲が反映しているように、開示された上記の単一の実施形態の全ての特徴よりも少ない特徴に存する。したがって、詳細な説明の後に続く特許請求の範囲は、各請求項を本発明の別個の実施形態として独立させた状態で、本明細書のこの詳細な説明の中に明確に組み込まれる。

【００３０】

さらに、本明細書に記載のいくつかの実施形態は、他の実施形態には含まれていないいくつかの特徴を含むが、当業者に理解されるであろうように、様々な実施形態の特徴の組み合わせを本発明の範囲内に含めることが意図されている。例えば、下記の特許請求の範囲において、特許請求の範囲に記載のいずれかの実施形態をいかなる組み合わせで用いることもできる。

【００３１】

本明細書において提供される説明には、数多くの具体的な詳細が示されている。しかしながら、これらの具体的な詳細がなくても本開示の実施形態が実践され得るということは理解される。他の事例では、この説明の理解を不明瞭にしないために、周知の方法、構造体および技法を詳細に示していない。

【００３２】

以下の用語は、単に本開示の理解を助けるために提供される。

【００３３】

本明細書中で使用する場合、別段の定めがない限り、「分析物」という用語は、検査において分析物認識分子に結合することによって検出されることができる要素（典型的には化合物）を指す。この結合は選択的であり、好ましくは特異的である。したがって、分析物は、例えば、限定されるものではないが、それに対する天然の抗体が存在するかまたはそれに対する抗体を調製することができるいかなる物質であることもできる。分析物は、相補的核酸鎖（ＤＮＡ、ＰＮＡ、ＲＮＡ）、ハプテン、炭水化物、脂質、細胞、タンパク質、ホルモン、抗生物質、抗体、抗原、酵素、薬物または乱用薬物とすることができるが、これらに限定されない。

【００３４】

これより、本発明のいくつかの実施形態の詳細な説明によって本発明を説明することにする。本発明は添付の特許請求の範囲の条項によってのみ限定されるので、本発明のその他の実施形態を本発明の技術的教示内容から逸脱することなく当業者の知識に従って構成できることは明らかである。

【００３５】

第１の態様において、本発明は、分析物認識分子を表面に固定する方法に関する。

【００３６】

この固定は、共有結合、静電結合、水素架橋結合またはそれらの組み合わせなど、いかなる種類の化学結合によって達成することもできる。好ましくは、固定は共有結合によって達成され得る。

【００３７】

分析物認識分子は、分析物と相互作用する分子であり、好ましくは、分析物に対して選択的、好ましくは特異的に結合する分子である。

【００３８】

実施形態において、分析物認識分子は、タンパク質などの第１の生体分子であり得る。好ましくは、分析物認識分子はタンパク質である。例えば、タンパク質は、抗体または酵素とすることができる。抗体の場合、分析物は、その抗体に特異的な抗原とすることができる。酵素の場合、分析物は、その酵素に特異的な基質とすることができる。

【００３９】

ある実施形態では、分析物認識分子は生体認識分子であってもよく、つまり分析物は生体分子であってもよい。

【００４０】

実施形態において、分析物認識分子は、少なくとも１つの－NH_2基、－ＳＨ基、－ＣＯＯＨ基、－ＯＨ基、アルデヒド基もしくはケトン基、またはホスフェート基もしくはピロホスフェート基を含んでもよく、連結分子は、－NH_2基、－ＣＯＯＨ基、－ＯＨ基、アルデヒド基もしくはケトン基、またはホスフェート基もしくはピロホスフェート基とそれぞれ反応するのに適したものである。好ましくは、分析物認識分子は、少なくとも１つの－NH_2または－ＳＨを含み得る。

【００４１】

分析物認識分子が－NH_2基を有する実施形態では、Y^2は、ｏ－アシルイソウレア、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、塩化スルホニル、アルデヒド、オキシラン、カルボキシル、カーボネート、アリール化剤、イミドエステル、酸無水物、フルオロフェニルエステルおよびヒドロキシメチルホスフィン誘導体から構成される群から選択され得る。

【００４２】

分析物認識分子が－ＳＨ基を有する実施形態では、Y^2は、活性ハロゲン（例えば、ハロアセチル、ベンジルハライドおよびアルキルハライド）、マレイミド、アジリジン、アクリロイル、ビニルスルホン、アリール化剤およびジスルフィド（例えばピリジルジスルフィド）から構成される群から選択され得る。

【００４３】

分析物認識分子が－ＣＯＯＨ基を有する実施形態では、Y^2は、ジアゾアルカンおよびジアゾアセチルから構成される群から選択され得る。

【００４４】

分析物認識分子がアルデヒド基またはケトン基を有する実施形態では、Y^2は、ヒドラジドおよび－NH_2から構成される群から選択され得る。

【００４５】

分析物認識分子がホスフェート基またはピロホスフェート基を有する実施形態では、Y^2は（例えば、－NH_2と反応させるための）カルボニルジイミダゾールであり得る。

【００４６】

活性ハロゲンのなかでの相対反応性はＩ＞Ｂｒ＞Ｃｌ＞Ｆであり、Ｆはほぼ非反応性である。

【００４７】

アリール化剤は、芳香族求核置換を受けることができる置換反応性基を環上に含有している反応性芳香族化合物である。この置換反応性基は、典型的にはハロゲンまたはスルホネート基である。環上の電子求引基（例えば、ニトロ）の存在は、置換反応性基の反応性を増加させる。アリール化剤の置換反応性基の反応性の相対比率は、Ｆ＞Ｃｌ，Ｂｒ＞スルホネートである。

【００４８】

好ましくは、Y^2はＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルである。

【００４９】

Y^2基は、分析物認識分子に対するY^2基の反応性がY^1に対するX^2の反応性よりも低くなるように選択することが好ましい。これは、各分析物認識分子と反応する連結分子の数を制限し、それによって分析物に対する分析物認識分子の親和性を温存する。

【００５０】

分析物認識分子と連結分子とを含む溶液はさらに、安定化剤を含み得る。

【００５１】

安定性を助長するために分析物認識分子に添加することができる化合物の例は、例えば、タンパク質構造を破壊する－２０℃での氷結晶の形成を防止する凍結保護剤、例えばグリセロールまたはエチレングリコール；タンパク質のタンパク質分解切断を防止するプロ

テアーゼ阻害剤、例えば、フェニルメチルスルホニルフルオライド、ベンズアミジン、ペスタチンＡ、ロイペプチン、アプロチニン、アンチパイン、ＥＤＴＡおよびＥＧＴＡ；微生物の増殖を抑制する抗菌剤、例えばNaN_3またはチメロサール；－ＳＨ基の金属誘発酸化を回避する金属キレート化剤、例えばＥＤＴＡ；タンパク質を還元状態に維持する還元剤、例えばジチオスレイトール（ＤＴＴ）および２－メルカプトエタノール（２－ＭＥ）；水和殻を安定化して凝集を防止するポリオールおよび糖、例えば、グリセロール、エリスリトール、アラビトール、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、マンニスドマンニトール、グルコシルグリセロール、グルコース、フルクトース、スクロース、トレハロース、イソフルロシド；タンパク質凝集を防ぐポリマー、例えば、デキストラン、レバンおよびポリエチレングリコール；アミノ酸および誘導体、例えば、グリシン、アラニン、プロリン、タウリン、ベタイン、オクトピン、グルタメート、サルコシン、α－アミノ酪酸、トリメチルアミンＮ－オキシド；低濃度の大きなアニオンを有する塩、例えば、クエン酸塩、硫酸塩、酢酸塩、リン酸塩、および４級アミンである。

【００５２】

安定剤は、商業的に（例えば、Ｓｕｒｍｏｄｉｃｓ、Ｇｗｅｎｔ　Ｇｒｏｕｐから）入手できる、上に列挙した成分を含む溶液であるかもしれないし、その他の配合物であるかもしれない。

【００５３】

分析物を含む試料は、典型的には、分析物を含む流体である。実施形態では、流体は気体または液体である。好ましくは、それは液体である。好ましくは、それは水溶液である。好ましくは、それは生物学的液体、例えば、血液、血清または尿である。

【００５４】

表面は、典型的には、基材の表面である。

【００５５】

実施形態では、基材は、金属、金属酸化物、金属窒化物、金属酸窒化物、半金属、半金属酸化物、半金属窒化物、半金属酸窒化物および半金属炭化物から構成される群から選択される無機基材であり得る。

【００５６】

無機基材は、好ましくは、Ｓｉ、SiO_2、Si_3N_4、ＳｉＣ、SiO_xN_y、Al_2O_3、ＡｌＮ、TiO_2、ＴｉＮ、ＴｉＣ、ＴｉＣＮ、Ta_2O_3、ＴａＮ、ＴａＣ、ＴａＣＮ、ZrO_2、HfO_2、ＨｆＳｉＯ、ＨｆＳｉＯＮ、ＺｒＳｉＯ、ＺｒＳｉＯＮ、ＨｆＮ、Ａｕ、Ｐｔ、Ｐｄ、ＲｕおよびＣｕから構成される群から選択され、式中のｘは０～２である。式中のｙは０～１．３３である。

【００５７】

化学基Y^1がシランによって導入され、これらの基材が表面に活性酸素種を有さない場合、これらの表面は、シランとの反応を可能にするためにヒドロキシル化されていることが好ましい。

【００５８】

実施形態では、基材は、有機ポリマー層でコーティングされていてもよく、またはポリマー基材などの有機基材であってもよい。例えば、ポリマー基材またはポリマー層は、Y^1側鎖および／または末端基を有するポリマーで作ることができよう。

【００５９】

実施形態では、表面はマイクロ流体システムの一部であってもよい。

【００６０】

実施形態では、表面はマイクロ流体流路の底部または頂部であってもよい。第１の態様の方法は、マイクロ流体デバイスのマイクロ流体流路内に分析物認識分子を固定するのに特に有用である。マイクロ流体デバイスは寸法の小さいマイクロ流体流路を含み、流路の側壁を形成する前（または後）に分析物認識分子を非常に限られた場所に固定することが有益である。第１の態様の方法の接触ステップが単一のステップに基づくので、それによってこの固定が簡単になる。

【００６１】
実施形態において、表面は、マイクロ流体流路、マイクロウェル、容器、またはそれらの少なくとも一部を形成するように形作られ得る。
【００６２】
簡単に述べると、変換器を表面に連結させるステップ、上記表面を底に含む流路（例えば微小流路）をパターニングするステップ、第１の態様のいずれかの実施形態による方法によって分析物を上記表面に固定するステップ、および上記流路の頂部にカバーを設けるステップを含む、マイクロ流体バイオセンサを形成する方法に、本発明に係る方法を組み込むことができる。デバイスを完成させるためのさらなるステップは、デバイスのボンディング、ダイシングおよびパッケージングである。
【００６３】
マイクロ流体工学上の構成は当業者に周知であるので、さらに詳しく述べることはしない。
【００６４】
実施形態において、表面には、分析物と固定された分析物認識分子との相互作用（例えば結合）に際して可読信号出力を生成するための変換器が連結され得る。分析物認識分子が固定されている表面と、変換器とが組み合わさって存在することにより、分析物の検出を可能にするセンサの主要な要素が形成される。
【００６５】
表面は、連結分子（７）の化学基X^2と反応するのに適した化学基Y^1で官能基化される。
【００６６】
実施形態では、化学基Y^1による表面の官能基化は、ウェハの全表面に対して行われ得る。
【００６７】
実施形態では、化学基Y^1で官能基化された表面は、化学基Y^1を含む少なくとも１つの第１分子種によって形成された層が重ねられた表面からなり得る。
【００６８】
実施形態では、層は自己組織化層であり得る。
【００６９】
実施形態では、層は単分子層、好ましくは自己組織化単分子層であり得る。多分子層も勿論可能であるが、この方法に必要なのは表面上に化学基Y^1が存在することであるため、空間を多く取り過ぎないためには単分子層で十分でありかつ好ましい。これは、流路内を流れる流体のための空間を減らし過ぎるべきでないマイクロ流体工学において特に興味深い。
【００７０】
実施形態において、層（多分子層または単分子層）は、厚みが１０μｍ以下であり得るが、好ましくは厚みが最大でも１０ｎｍである。これは、流体が流れるために利用できる空間を小さくし過ぎるべきでないマイクロ流体用途において有益である。好ましくは、光センサなどの特定のセンサの場合、層の厚さは０．５～５ｎｍであり得る。
【００７１】
様々な方法を用いて層を提供することができる。単分子層は、化学基Y^1を含む第１分子種を含む溶液中でのディップコーティングによる自己組織化によって最も良好に提供される。より厚い層は、例えばそのような溶液のスピンコーティングによって提供することができる。溶液は、典型的には溶媒中の１～１０％溶液である。典型的な溶媒の例は、トルエン、ＴＨＦ、シクロヘキサンおよびベンゼンである。
【００７２】
実施形態において、Y^1官能基による表面の官能基化は、気相堆積によって行うことができる。この堆積法では、第１分子種の蒸気を熱および／または低圧によって発生させてその後に表面に堆積させることができる。そのような気相コーティングは溶液コーティン

グよりも好ましい、というのも、それはより良好に制御され、より効率的であるからである。しかしながら、第１分子種を揮発させることができないのであれば、勿論、溶液に基づく方法を用いることができる。

【００７３】

加えて、電解グラフト化、例えば、導電性表面上のジアゾニウム塩の還元、Ｓｉ－Ｈに対するアルキンのグラフト化によって官能基$Ｙ^{1}$を導入することも可能であるが、その他の反応も可能である（例えば、ＢｉｌａｎｇｅｒおよびＰｉｎｓｏｎ、Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｒｅｖ．４０、３９９５－４０４８（２０１１）参照）。

【００７４】

実施形態において、本方法のステップａは、

ａ１．裸出表面を提供するステップと、

ａ２．少なくとも１つの第１分子種を含む第１組成物に裸出表面を接触させるステップと

を含み得、少なくとも１つの第１分子種は、化学基$Ｙ^{1}$と、少なくとも１つの第１分子種を裸出表面に付着させるのに適した化学基$Ｘ^{1}$とを含む。

【００７５】

実施形態において、少なくとも１つの第１分子種は、一般式$Ｘ^{1}－Ｒ－Ｙ^{1}$を有し得、式中、Ｒは、スペーサー、例えば、直鎖または分枝鎖の飽和または不飽和の有機ラジカルである。好ましくは、Ｒは直鎖不飽和有機ラジカルである。

【００７６】

実施形態において、Ｒは、フェニレン基またはアルケン基を含み得る。これは、例えば、表面が電気化学センサに属する場合に有益である。

【００７７】

実施形態において、Ｒは、３～４００個の原子、好ましくは３～３２０個の原子、より好ましくは３～２５０個の原子、さらにより好ましくは３～８０個の原子、最も好ましくは３０～８０個の原子から構成され得る。これらの原子は、炭素、水素および酸素から選択されることが好ましい。

【００７８】

実施形態では、$Ｘ^{1}－Ｒ－Ｙ^{1}$は、構造式が$Ｘ^{1}－（Ｒ^{1}）_{q}－（Ｏ［ＣＨ_{2}］_{t}ＣＨ_{2}）_{m}－Ｏ－（ＣＨ_{2}）_{o}－Ｙ^{1}$、または$Ｘ^{1}－（Ｒ^{1}）_{q}－（Ｏ［ＣＨ_{2}］_{t}ＣＨ_{2}）_{m}－（ＣＨ_{2}）_{o}－Ｙ^{1}$、好ましくは$Ｘ^{1}－（Ｒ^{1}）_{q}－（Ｏ［ＣＨ_{2}］_{t}ＣＨ_{2}）_{m}－Ｏ－（ＣＨ_{2}）_{o}－Ｙ^{1}$であり得る。

【００７９】

ｏは０～３０、好ましくは０～３の整数であり、最も好ましくはｏは０である。

【００８０】

ｍは、０～１５０００、好ましくは１～１２５０、より好ましくは２～１０００、３～５００、３～１００、３～５０、３～３０、３～２０、３～１５、３～１０、３～８の整数である。あるいは、ｍは、０～３０、１～２０、１～１５、１～１０、１～８、または１～６の整数である。実施形態において、ｍは０であってもよい。いくつかの実施形態では、ｍとｏとの両方が０である。

【００８１】

ｑは０または１である。

【００８２】

ｔは１または２であり、好ましくは１である。

【００８３】

$Ｒ^{1}$は、好ましくは、安定で規則的な単分子層が形成されるように選択される。

【００８４】

$Ｒ^{1}$は、好ましくは、自己組織化単分子層の形成を促進するものであり、有機鎖、例えばヒドロカルビレン基であることができる。有機基はｎ個の炭素原子を含むことができ、ｎは、１、３、６、８または１０以上、好ましくは１～３０、より好ましくは３～３０の

整数である。R^1はまた、－ＣＯ－（ケトン）、－ＣＯＮＨ、－ＣＯＮＨＣＯ－、－ＣＳＮＨ－、－ＣＳ－などを割り込ませたヒドロカルビル基を表すこともできる。例えば、ヒドロカルビレン基は、場合により、ヒドロカルビレン基の主鎖に１つ以上のカルボキシ基を含むことができる。ヒドロカルビレン基に１つ以上のヘテロ原子を割り込ませることもできる。ヘテロ原子は、－Ｎ－、－Ｏ－および－Ｓ－から構成される群から選択することができる。特に、ヘテロ原子はＯであることができる。例えば、R^1は、ヒドロカルビレン基の主鎖に１つ以上のヘテロ原子を含むことができる。有機基は、分岐したものであることもできる。R^1は、ヒドロカルビレン基である第１部分と、酸素などのヘテロ原子を割り込ませたヒドロカルビレン基である第２部分とを含むことができる。

【００８５】

有益な実施形態では、R^1は、アルキル鎖－$(CH_2)_n$－であってもよく、またはそれを含んでいてもよく、ｎは、１～３０、好ましくは３～３０、例えば３～２５、好ましくは３～２０、例えば、５～２０または８～１６または１０～１６の整数である。

【００８６】

好ましい実施形態において、R^1は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルキル－アルキル、シクロアルケニル、シクロアルケニルアルキルおよびシクロアルキルアルケニルから構成される群から選択される、１～３０個の炭素原子を有する（好ましくは３～３０個の炭素原子を有する）飽和またはエチレン性不飽和のヒドロカルビレン基であり得、上記基は、場合により、窒素、酸素および硫黄から選択される１つ以上のヘテロ原子を主鎖中に含み、上記基は場合によって１つ以上のオキソ置換基を含む。

【００８７】

実施形態において、X^1－Ｒ－Y^1は、X^1－$(CH_2)_n$－$(OCH_2CH_2)_m$－Ｏ－$(CH_2)_o$－Y^1、またはX^1－$(CH_2)_n$－$(OCH_2CH_2)_m$－$(CH_2)_o$－Y^1、好ましくはX^1－$(CH_2)_n$－$(OCH_2CH_2)_m$－Ｏ－$(CH_2)_o$－Y^1であり得、ｍ、ｎおよびｏは、０～３０の範囲内で独立に選択される整数であり、ｍおよびｎの少なくとも１つは０より大きい。

【００８８】

いくつかの実施形態では、ｎは８～１３であり得る。

【００８９】

いくつかの実施形態では、ｍは６～９であり得る。そのようなｍの値は、通常、第１分子種で形成された層の空間占有率と第１分子種の溶解度との間での最良の妥協点を与える。

【００９０】

実施形態において、ｏは０に等しくてもよい。

【００９１】

実施形態において、ステップｂは、裸出表面を少なくとも１つの第１分子種の蒸気と接触させるステップを含み得る。

【００９２】

実施形態において、少なくとも１つの第１分子種は、長さの異なる少なくとも２つの第１分子種を含み得る。これは、コーティングの防汚特性を向上させるので有益である。

【００９３】

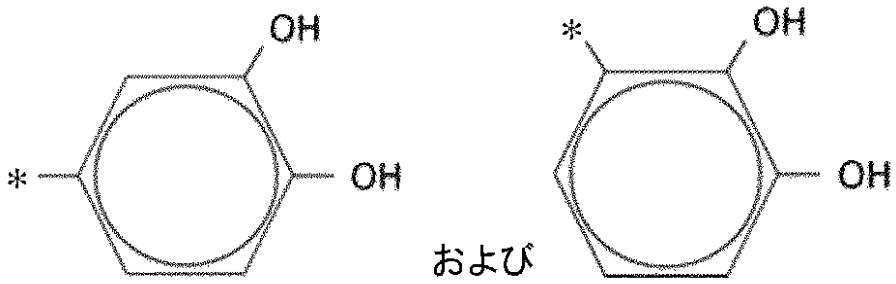
この最後の実施形態では、少なくとも２つの第１分子種は、ｎが同じでありながら、ｍが異なっていてもよい。

【００９４】

実施形態において、X^1は、X^1ａ、X^1ｂおよびX^1ｃから構成される群から選択され得、ここで、

・X^1ａは、－$SiZ_x(CH_3)_y$（式中、Ｚは、Ｃｌ、OCH_3およびOCH_2CH_5から構成される群から選択され、ｙ＝０、１または２であり、ｘ＝３－ｙである）、－ＣＯＯＨ、－$PO(OH)_2$、－NH_2、

【化１】



から構成される群から選択され、式中、＊はＳｉ原子との結合点を指し示し、
・Ｘ^{1}ｂは－ＳＨまたは－ＳｅＨであり、
・Ｘ^{1}ｃは、－ＣＨ＝ＣＨ$_{2}$および－Ｃ≡ＣＨから構成される群から選択され、
ここで、Ｘ^{1}がＸ^{1}ａである場合、裸出表面はＯＨ基（Ｘ^{1}ａに対して反応性）を含み、
ここで、Ｘ^{1}がＸ^{1}ｂである場合、裸出表面は金属表面であり、
ここで、Ｘ^{1}がＸ^{1}ｃである場合、基Ｙ^{1}は－Ｎ$_{3}$ではなく、裸出表面はＳｉ－Ｈ基を含む。

【００９５】
Ｙ^{1}は、分析物認識分子（例えば、その分子の－ＮＨ$_{2}$基および／または－ＳＨ基）と反応するよりも速やかにＸ^{2}と反応すべく選択されることが好ましい。好ましくは、Ｙ^{1}は分析物認識分子と直接反応しない。したがって、Ｙ^{1}としてアルデヒドは好ましくない。

【００９６】
実施形態において、Ｙ^{1}は、－Ｎ$_{3}$、アルキンおよび－ＣＯＯＨから構成される群から選択され得、ここで、
・Ｙ^{1}が－Ｎ$_{3}$である場合、Ｘ^{2}は、歪みを有するかまたは有さないアルキンであり、アルキンが歪みを有さない場合、ステップｂは、歪みを有さないアルキンと－Ｎ$_{3}$との反応を可能にするのに適した触媒の存在下で行われ、
・Ｙ^{1}が、歪みを有するかまたは有さないアルキンである場合、Ｘ^{2}は－Ｎ$_{3}$であり、アルキンが歪みを有さない場合、ステップｂは、歪みを有さないアルキンと－Ｎ$_{3}$との反応を可能にするのに適した触媒の存在下で行われ、
・Ｙ^{1}が－ＣＯＯＨである場合、Ｘ^{2}はカルボジイミドかまたはジアゾ基＝Ｎ$_{2}$かのどちらかである。

【００９７】
－Ｎ$_{3}$基は、非常に安定でありそれゆえに非常に安定な表面を提供する、という利点を有する。

【００９８】
－ＣＯＯＨは、それほど好ましくはない。

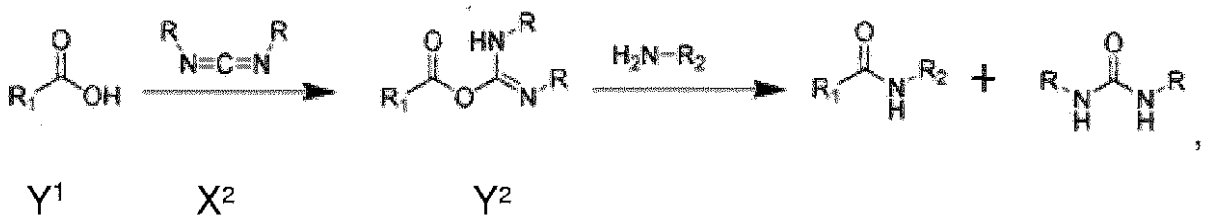
【００９９】
適切な触媒は銅系触媒である。Ｃｕ（Ｉ）触媒もＣｕ（ＩＩ）触媒も適している。Ｃｕ（Ｉ）触媒が好ましい。一般に、Ｃｕ（Ｉ）触媒またはＣｕ（ＩＩ）触媒の量は、アルキンおよびアジドを含有する化合物の０．０１～５重量％の範囲となる。Ｃｕ（Ｉ）触媒は、Ｃｕ（ＩＩ）種およびアスコルビン酸塩などの還元剤を添加することによって提供されるかもしれない。

【０１００】
実施形態において、Ｙ^{1}とＸ^{2}との結合反応速度は、Ｙ^{2}と分析物認識分子との結合反応速度よりも大きいものであり得る。

【０１０１】

一実施形態において、Ｙ^{1}は－ＣＯＯＨであってもよく、Ｘ^{2}はカルボジイミドであってもよく、Ｙ^{2}はｏ－アシルイソ尿素であってもよい。Ｘ^{2}がカルボジイミドである場合、連結分子は典型的には基Ｘ^{2}のみを含み、基Ｙ^{2}はＸ^{2}とＹ^{1}との反応後にのみ形成される。その結果、この連結分子は、分析物認識分子の付着を可能にするものの、最終反応生成物中には存在しない。したがってそれは、官能基化表面と分析物認識分子との間にスペーサーを導入しない。これは以下の反応スキームで説明される：

【化２】



ここで、Ｒ$_{1}$－ＣＯＯＨは官能基化表面を表し、Ｒ$_{2}$－ＮＨ$_{2}$は分析物認識分子を表す。官能基化表面とカルボジイミドとの反応生成物がＲ$_{2}$－ＮＨ$_{2}$と反応する前に、その反応生成物をＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）と反応させることが可能であり、それによって今度はＲ$_{2}$－ＮＨ$_{2}$と反応することができるＮＨＳ－エステルが形成される。

【０１０２】

そのようなＹ^{1}基およびＸ^{2}基の選択の利点は、反応生成物のＹ^{2}（ｏ－アシルイソ尿素）と分析物認識分子の－ＮＨ$_{2}$との反応がＹ^{1}とＸ^{2}の反応の前に起こり得ないことである。

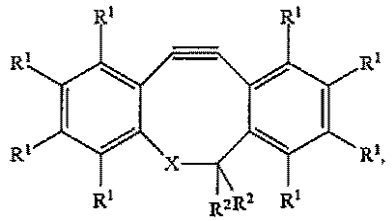
【０１０３】

例えば、Ｙ^{1}は－ＣＯＯＨであってもよく、連結分子は１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドまたはその塩であってもよい。

【０１０４】

実施形態において、Ｙ^{1}は－Ｎ$_{3}$であってもよく、Ｘ^{2}はシクロアルキンのアルキン基であってもよい。これは有益なことである、というのも、シクロアルキンのアルキン基が通常は歪みを有しており、それによって反応性が歪みのないシクロアルキンよりも高くなるからである。結果として、この歪みを有するアルキンは触媒を必要とせずに－Ｎ$_{3}$基と反応することができる。シクロアルキンの例は、式：

【化３】



で与えられ、式中、各Ｒ^{1}は独立に、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、ニトラート、ニトライト、スルフェートおよび、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$の有機基から構成される群から選択され；各Ｒ^{2}は独立に、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、ニトラート、ニトライト、スルフェートおよび、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$の有機基から構成される群から選択され；Ｘは、リンカーを介してＹ^{2}基に接続された炭素または窒素基であることができる。具体例は、実施例で使用するＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（Ｊｅｎａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、ドイツ）である。

【０１０５】

そのようなＹ^{1}基およびＸ^{2}基の選択の利点は、Ｙ^{1}とＸ^{2}との反応が通常はＹ^{2}と分

析物認識分子の－NH_2または－ＳＨとの反応よりも速いものとなることである。
【０１０６】
実施形態において、X^2およびY^2は、X^2がY^2よりもY^1とより速やかに反応するように選択される。これは、連結分子の重合を回避することを可能にする。
【０１０７】
好ましい実施形態では、Y^1は－N_3であり、X^2は、歪みを有するアルキンであり、Y^2はＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルである。この実施形態は、－N_3官能基化表面が安定であり、X^2とY^1との反応速度がY^2と分析物認識分子の－NH_2との反応速度よりも大きい、という利点を有する。
【０１０８】
実施形態において、溶液はｐＨが４～９であり得る。最適なｐＨは、使用する架橋剤の種類に依存する。実施例で使用する架橋剤の場合、ｐＨは好ましくは５～９、より好ましは５～７である。
【０１０９】
実施形態において、溶液はイオン強度が０．０１～０．５Ｍである。
【０１１０】
実施形態において、溶液は緩衝化合物をさらに含み得る。例えば、緩衝化合物は、酢酸ナトリウム／酢酸緩衝剤であってもよい。
【０１１１】
実施形態において、緩衝化合物は、１級アミノ基または２級アミノ基を含まないものであり得る。
【０１１２】
実施形態において、溶液は水性であり得る。好ましい実施形態は、ｐＨが４～９であり、イオン強度が０．０１～０．５Ｍであり、緩衝化合物を含む、水溶液である。
【０１１３】
いくつかの実施形態では、溶液は均質化剤を含み得る。均質化剤の例は、ベタイン、ポリオール（例えばグリセロール）、糖（例えばトレハロース）、および界面活性剤（例えばＴｗｅｅｎ－２０）である。
【０１１４】
実施形態において、溶液は、少なくとも１μＭに等しい濃度の連結分子を含み得る。
【０１１５】
実施形態において、溶液は、最大でも１ｍＭ、好ましくは最大でも１００μＭ、より好ましくは最大でも１０μＭの濃度で連結分子を含み得る。
【０１１６】
実施形態において、分析物認識分子は、少なくとも1×10^{-12}ｍｏｌ／ｌに等しい、好ましくは少なくとも1×10^{-8}ｍｏｌ／ｌに等しい濃度で溶液中に存在し得る。
【０１１７】
実施形態において、溶液は、分析物認識分子および連結分子を含み得、分析物認識分子と連結分子とをステップｂの前に最大でも３時間、好ましくは最大でも１時間、最も好ましくは最大でも３０分間混合することによって調製され得る。
【０１１８】
実施形態において、連結分子は一般式$X^2-R^2-Y^2$を有し得、式中、R^2は、分岐または分岐でない飽和または不飽和の有機基であって、１～３０個の炭素原子を含み、－Ｎ－、－Ｏ－および－Ｓ－から構成される群から選択される１つ以上のヘテロ原子を場合によって含み、１つ以上のオキソ置換基を場合によって含む、有機基である。
【０１１９】
実施形態において、R^2は、いずれかの実施形態で定義されているＲとして定義され得る。
【０１２０】
実施形態において、連結分子は一般式が$X^2-(CH_2)_n-(OCH_2CH_2)_m-$

Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_o$－Ｙ^{2}であり得、式中、ｎは、０～３０、好ましくは０～１０の整数であり、ｍは、０～１５０００、好ましくは０～１０の整数であり、ｏは、０～３０、好ましくは０～１０の整数であり、ｎ＋ｍ＋ｏは少なくとも１に等しい。

【０１２１】

実施形態において、ｍは、１～１０、好ましくは２～６であり得る。ｍをその範囲内にすることは、連結分子を可溶化するのに役立ち得る。

【０１２２】

実施形態において、ステップｂは、溶液の液滴（液滴の大きさは好ましくは１ｐＬ～２０００ｐＬである）を官能基化表面に堆積させることを含み得る。例えば、ステップｂは、非接触式マイクロアレイ印刷ステップを含み得る。特定の高度なスポッティングツールは、ＡＦＭ様チップを使用する直接描画プロセスによって少量の溶液（１０$^{-15}$～１０$^{-18}$　Ｌ）を堆積させることができる。

【０１２３】

液滴による溶液の堆積は、マイクロ流体デバイスに含まれる表面に分析物認識分子を導入するための現在最も好ましい方法である。本発明は、堆積を液滴によって行う場合に特に有利である。第１の液滴が堆積された場所に第２の液滴を正確に堆積させなければならず、第１の液滴と第２の液滴との間に洗浄工程を必要とする、液滴を介した２段階式堆積を用いることは、実際には著しく困難である。本発明では、ステップｂが１段階で実施されるので、第２の液滴を必要としない。

【０１２４】

あるいは、ステップｂは、表面を横切って溶液を流すステップを含んでもよい。表面が流体デバイスの流路の底部または頂部に含まれる場合、ステップｂは、流路内に溶液を流すステップを含み得る。

【０１２５】

実施形態において、Ｙ^{1}化学基による表面の官能基化の後（または最中）、好ましくは分析物認識分子の固定の後（または最中）にブロッキング剤が導入され得る。ブロッキング剤の存在は有益である、というのも、それは分析物の損失および、分析物と表面との非特異的結合を防止するからである。

【０１２６】

このブロッキング剤は、分析物認識分子を有している表面が分析物と接触する前に導入される。あるいは、それは分析物と一緒に同じステップで導入されるかもしれない。これにより、分析物認識分子を有していないいかなる表面部分も覆うことが可能となり、それにより、分析物認識分子から逸れて分析物と表面とが非選択的または非特異的に相互作用する程度が軽減される。適切なブロッキング剤の例は、ウシ血清抽出物、例えば、Ａｓｓａｙ　Ｄｉｌｕｅｎｔ（ウシ血清を含有するリン酸緩衝生理食塩水）、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）および、Ｘ^{2}基とポリエチレングリコール基とを含む化合物（例えば、ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＯＨまたはＤＢＣＯ－ＰＥＧ　５ｋＤａ）である。好みによるが、それらは少なくとも６個のエチルグリコール単位を有しているべきである。

【０１２７】

第２の態様において、本発明は、

ｉ．化学基Ｘ^{2}を有する連結分子であって、化学基Ｘ^{2}が、表面の化学基Ｙ^{1}と反応して化学基Ｙ^{2}を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、化学基Ｙ^{2}が、分析物認識分子と反応するのに適したものである、連結分子と、

ｉｉ．分析物認識分子と

を同時に含む、溶液に関する。

【０１２８】

実施形態において、連結分子および分析物認識分子は独立に、第１の態様のいずれかの実施形態で定義されているとおりであり得る。

【０１２９】

第３の態様では、本発明は、

ａ．化学基X^2を有する連結分子を含む第１溶液であって、化学基X^2が、表面の化学基Y^1と反応して化学基Y^2を含む反応生成物を形成するのに適したものであり、化学基Y^2が、分析物認識分子と反応するのに適したものである、第１溶液と、
ｂ．分析物認識分子を含む第２溶液と
を同時に含み、
第１溶液と第２溶液とが、ひとたび混ざり合えば、
・少なくとも１μＭに等しく最大でも１ｍＭに等しい濃度の連結分子（７）と
・少なくとも1×10^{-12}ｍｏｌ／ｌに等しい、好ましくは少なくとも1×10^{-8}ｍｏｌ／ｌに等しい濃度の分析物認識分子（１）と
を含む溶液（６）を形成するようになっている、パーツのキットに関する。

【０１３０】
実施形態において、連結分子、分析物認識分子および、両成分を混合した溶液は、独立に、第１の態様のいずれかの実施形態で定義されているとおりであり得る。

【０１３１】
実施形態において、パーツのキットはさらに、試料流体中の分析物を検出するためのセンサを含み得、当該センサは、
ｉ．化学基Y^1で官能基化された表面であって、化学基Y^1と連結分子とを反応させて分析物認識分子との反応に適する反応生成物を形成することによって分析物認識分子を固定するのに適した、表面、および
ｉｉ．官能基化表面に連結された変換器であって、分析物と固定された分析物認識分子との相互作用に際して可読信号出力を生成するのに適した、変換器
を含む。

【０１３２】
実施形態において、表面は、第１の態様のいずれかの実施形態で定義されているとおりであり得る。

【０１３３】
実施形態において、センサはバイオセンサであり得る。

【０１３４】
実施形態において、センサはマイクロ流体デバイスであり得、表面は、マイクロ流体流路の底部に含まれ得る。

【０１３５】
実施形態において、可読信号出力を、操作者へ伝達されて解釈されることができる情報に変換するために、変換器が信号データプロセッサと連結され得る。

【０１３６】
本発明のさらなる態様は、表面に固定された分析物認識分子を含むデバイスであって、表面への分析物認識分子の固定が、第１の態様で定義されている方法によって得られる、デバイスに関する。

【０１３７】
さらに別の態様では、本発明は、試料流体中の分析物を検出するためのセンサに関し、当該センサは、
ｉ．先の態様において定義したデバイス、および
ｉｉ．表面に連結された変換器であって、分析物と固定された分析物認識分子との相互作用に際して可読信号出力を生成するのに適した、変換器
を含む。

【０１３８】
好ましい実施形態によれば、センサは、試料中の分析物の存在を判定するのに適している。センサは、バイオセンサチップ（表面プラズモン共鳴ＳＰＲチップ、表面弾性波ＳＡＷチップ、．．．）として作動するように構成されることができる。

【０１３９】
実施形態において、表面は変換器の表面であり得る。変換器は、限定はされないが、表

面プラズモン共鳴センサ、表面弾性波センサ、水晶振動子マイクロバランス、電流センサ、光学センサ、容量センサ、すだれ状電極またはＣｈｅｍＦＥＴセンサの一部とすることができる。変換器の一例は、プラズモン共鳴の配置である。これは、本発明の実施例で使用する変換器である。変換器の別の例は、分析物認識分子が固定された表面を含むすだれ状電極である。

【０１４０】

さらに別の態様では、本発明は、試料中の分析物の存在を検出する方法であって、試料を、本発明のいずれかの実施形態で定義されている表面と接触させることを含む、方法に関する。

【０１４１】

さらに別の態様では、本発明は、試料中の分析物の存在を検出するための、本発明のいずれかの実施形態で定義されているデバイスまたはセンサの使用に関する。

【０１４２】

図１は、本発明の一実施形態による方法の図解を示す。図１の左側には、化学基Y^1が存在する表面（２’）が描写されている。化学基Y^1は第１分子種（３）に属する。第１分子種（３）は、表面（２’）に自己組織化単分子層（４）を形成する。Y^1化学基で官能基化された表面（２’）に対して、後に、連結分子（７）と分析物認識分子（１）（ここでは抗体（１））とを同時に含む溶液（６）を接触させる。この接触ステップの結果は図１の右側に描写されており、官能基化表面（２’）が連結分子（７）と反応し、いくつかの連結分子（７）が抗体（１）とさらに反応したことが示されている。

【実施例】

【０１４３】

以下の実施例では、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）感度測定をＢｉａｃｏｒｅ３０００システム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、英国）で実施した。ＳＰＲ反射率傾斜位置は自動的に任意応答単位（ＲＵ）に変換される。

【０１４４】

実施例１：概念の証明および連結分子（７）の最適濃度の評価。

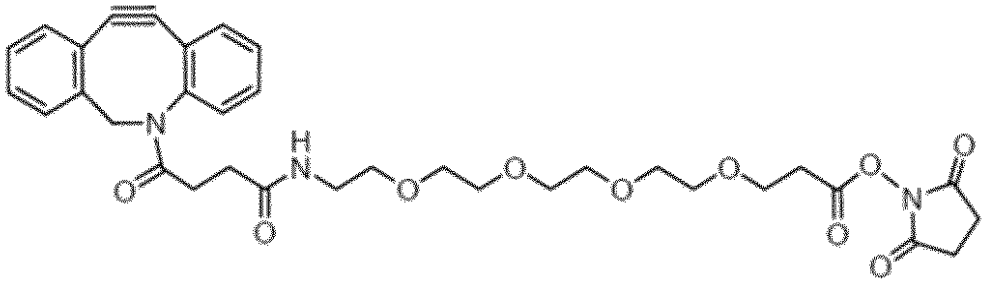
【０１４５】

SiO_2被覆Ａｕ基材を、Ｊ．Ｆｙｋｅｎら（ｓｅｎｓｏｒｓ　ａｎｄ　ａｃｔｕａｔｏｒｓ　Ｂ２００（２０１４）１６７－１７２）の記載にあるとおりに調製および洗浄した。洗浄後、SiO_2被覆Ａｕ基材を気相堆積ツールに移した。基材を１００μｌのシランと共に２５ｍｂａｒで１４０℃まで加熱した。これにより、シランが蒸発して１時間表面と反応し、それによって官能基化表面（２’）を含む基材が得られる。次いで、これらの基材を第１基材（Ｓｃ）と基材セット（Ｓｘ）とに分けた。第１基材（Ｓｃ）は、比較例を実施するために使用した。基材セット（Ｓｘ）は、本発明の実施形態を実施するために使用した。

【０１４６】

第１基材（Ｓｃ）の官能基化表面（２’）を次のとおりに処理した。捕捉抗体（１）の固定は、Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００ツールで２０℃の温度で実施した。第１基材（Ｓｃ）を配置した後、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）泳動用緩衝液（１５０ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのリン酸カリウム、ｐＨ７．４）を使用してプライミングステップを行った。固定に先立って、ＥｔＯＨ／H_2O（１／１）中のＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）（Ｊｅｎａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、ドイツ）を流速５μｌ／分で５０μｌ注入することによって基材（Ｓｃ）の官能基化表面（２’）を活性化させた。ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）は以下の化学式を有する：

【化４】



【０１４７】

その次のステップで、１５０μｌの抗ＰＳＡ抗体（１）溶液（Ｆｕｊｉｒｅｂｉｏ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、米国ペンシルベニア州）（１５ｍＭの酢酸緩衝液中２５０μｇ／ｍｌ、ｐＨ５．５）を同じ流速で注入した。共有結合していない抗体を表面（２’）から除去するために、少量のグリシン／ＨＣｌ（５μｌ、１０ｍＭ、ｐＨ２．２）を２回投入した。官能基化表面（２’）と抗ＰＳＡ固定後の表面（２’）との測定ＳＰＲ信号の差を図２（Ｙ軸上の黒い点）に示す。比較用の上記２段階式プロトコルで得られたこの信号を基準点とする。

【０１４８】

セット（Ｓｃ）の各基材の官能基化表面（２’）を以下のとおりに処理した。比較例の場合と同様に、捕捉抗体（１）の固定をＢｉａｃｏｒｅ ３０００ツールで２０℃の温度で実施した。各基材（Ｓｘ）に対して、配置後にリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）泳動用緩衝液（１５０ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのリン酸カリウム、ｐＨ７．４）を使用してプライミングステップを行った。固定に先立って、各基材（Ｓｘ）に関して異なる濃度でＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）が添加された２００μｌの抗ＰＳＡ抗体溶液（１５ｍＭの酢酸緩衝液中２５０μｇ／ｍｌ、ｐＨ５．５）の注入剤を、流速５μｌ／分で各基材（Ｓｘ）の官能基化表面（２’）に接触させた。ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）の濃度は１μＭ未満から１ｍＭ付近にまで及んでいた。これらの実験は、新鮮な混合物ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）／抗ＰＳＡ抗体を使用して１回、そして３０分経過した混合物を使用して１回、実施した。官能基化表面（２’）と各濃度での抗ＰＳＡ固定後の表面（２’）との測定ＳＰＲ信号の差を、両タイプの混合物について図２に示す（新鮮な混合物は黒丸、３０分経過後の混合物は白丸）。図２から分かるように、ＳＰＲ信号は新鮮な混合物の方が３０分経過後の混合物よりもわずかに良好であった。これは、新鮮な混合物を使用する場合の方が、基材上に固定することができる抗ＰＳＡの量がわずかに多いということを示唆している。しかしながら、３０分経過後の混合物であってもＳＰＲ信号は十分明らかに良好なままである。したがって、ウェハレベルでのスポッティングに関して混合物の安定性は十分良好であると見受けられる。より長い寿命を有する混合物を使用して分解をさらに調査したところ、１．５時間経過後の混合物を使用した場合に著しい減少は認められなかった。したがって、さらに古い場合（例えば、２または３時間経過後の混合物）であってもＳＰＲ信号は十分良好なままである、と問題なく仮定できる。さらに、１μＭより低いＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）濃度の使用は、基準点よりも劣るＳＰＲ信号を与えるが、１μＭより高い濃度は、基準点に比べて常に少なくとも同程度のＳＰＲ信号を与え、大抵はより優れたＳＰＲ信号を与える、ということが分かる。これは、ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）の濃度が低すぎると抗ＰＳＡの表面固定が比較的少なくなることを指し示している。これらの実験からさらに導き出せることは、１ｍＭより高いほとんどの試験濃度においてＳＰＲ信号が（３０分経過後の混合物であっても）基準点より良好であったことである。このことは、基材上に固定することができる抗ＰＳＡの量が、本発明の場合（ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）と抗ＰＳＡとを混合物として導入する場合）には、従来技術の場合（最初にＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）を導入し、後から抗ＰＳＡを導入する場合）と比較して少なくとも同等であり、通常はより多い、というこ

とを指し示している。

【０１４９】

次に図３を参照する。図３は、抗ＰＳＡによるＰＳＡ認識の前後に測定したＳＰＲ信号の差をＹ軸上に示す。比較用の２段階式プロトコルでは約５５０ａ．ｕ．の値が測定された。この値を基準点とする。本発明の１段階式プロトコル（混合物ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）／抗ＰＳＡの使用による抗ＰＳＡの固定を伴うもの）では、１μＭより高く１０μＭより低いＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ（７）濃度の場合に、ＳＰＲ信号が基準点と少なくとも同等となった。１０μＭを超えると、ＳＰＲ信号は、基準点より低いながらも依然として良好なＰＳＡ検出を可能とするに足る高さであった。この１０μＭ以上でのＰＳＡ認識の明らかな減少は、おそらく、ＰＳＡによる認識に有害となるであろう多数のＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ分子（７）によって抗ＰＳＡがある程度変性を受けたことに起因している。ここでもまた、新鮮な混合物を３０分経過後の混合物と比較した場合に認められるＳＰＲ信号の低下は、新鮮な混合物の方が通常は良好であるがしかし３０分経過後の混合物がそれほど悪くないことおよび、１時間、さらには数時間の混合物を依然として使用することができるであろうことを指し示している。図２および図３から、本発明の抗ＰＳＡ固定のための１段階式プロセスは従来技術の２段階式プロセスに対する実行可能な代替策である、と早くも結論付けることができる。これは重要なことである、というのも、先行技術に比べて１段階式プロセスは、官能基化表面（２’）を単一の溶液と接触させるたった１つのステップしか必要としないという利点を有するからである。それゆえたった１回のスポット堆積だけで十分であり、これに対して従来技術は、一方の上に他方を重ねる２回のスポット堆積ステップを必要とし、それは高処理能環境において実際の実現が簡単でない。

【０１５０】

図４は、従来技術の２段階式抗ＰＳＡ固定プロトコル（白丸）か、または本発明の１段階式抗ＰＳＡ固定プロトコル（黒丸）かのどちらかを用いて行った実験を、分析する溶液中のＰＳＡ濃度の関数として示す。図から分かるように、ＳＰＲ信号は、従来技術の２段階式プロトコルでも本発明の１段階式プロトコルでもほぼ同一である。

【０１５１】

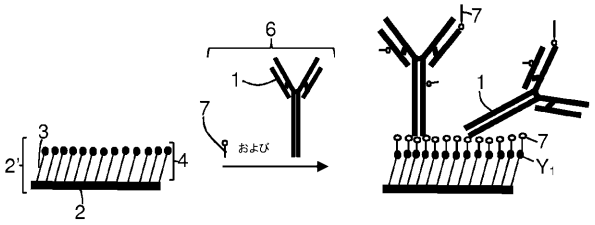
図５は、基材の表面官能基化のタイプに応じたウシ胎仔血清の非特異的結合の程度を評価するために行った実験の結果を示す。非官能基化ＳｉＯ２表面（２）の場合、ウシ胎仔血清の非特異的結合によって約２３００ａ．ｕ．の非常に大きなＳＰＲ信号が観測された。－N_3基を有する官能基化表面（２’）の場合、ウシ胎仔血清の非特異的結合に起因するＳＰＲ信号は、より低かったとはいえ約８００ａ．ｕ．となり依然として相対的に高かった。抗ＰＳＡが固定されている表面（２’）の場合、先行技術の２段階式方法によるものであるか本発明の１段階式方法によるものであるかにかかわらず、ウシ胎仔血清の非特異的結合によるＳＰＲ信号は相対的に低く同程度の大きさ（約４５０ａ．ｕ．）であった。これらの結果は、固定された分析物認識分子に対する非特異的結合の問題は、従来技術と本発明とで同程度の大きさであることを指し示している。

【０１５２】

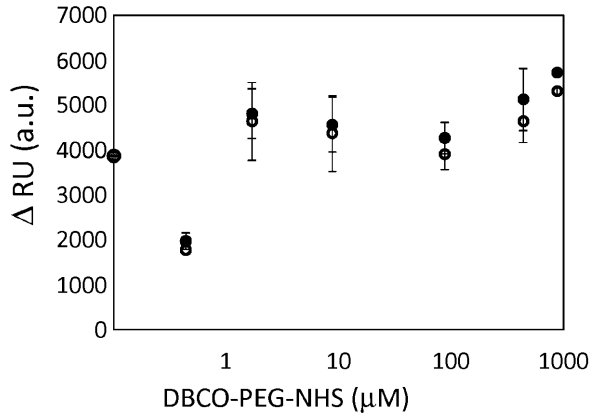
図６は、非特異的結合による問題を軽減する方略を概略で示す。分析物認識分子（１）が連結分子（７）を介して官能基化表面（２’）にひとたび結合したならば、分析物認識分子のない表面部分をブロッキングすることが有益である。これにより、分析物認識分子から逸れて分析物が非特異的に結合するのを回避することが可能になる。これを達成するには、分析物認識分子を官能基化表面（２’）に固定した後にその官能基化表面（２’）にブロッキング分子を堆積させることができる。図６の左側には、分析物認識分子が固定された官能基化表面（２’）が示されている。図６の右側は、分析物認識分子が固定されて分析物と接触している官能基化表面（２’）の、ブロッキングを有するとき（下）または有していないとき（上）の状況を示す。図６の上部に見られるように、分析物と表面との非特異的結合が生じる。図６の下部に見られるように、ブロッキング剤を使用した場合には分析物認識分子による特異的結合のみが生じる。

【０１５３】
図７は、官能基化表面（２’）を被覆するために使用するブロッキング剤の性質の関数として、蛍光分析物によって放射される蛍光のグラフを示す。図から分かるように、どのブロッキング剤の場合も、何も無い場合と比べればはるかに良好であり、最も良い結果は、ＤＢＣＯ－ＰＥＧ　５ｋＤａ分子（Ｊｅｎａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、ドイツ）を使用した場合に得られた。ここで、ＤＢＣＯ部分はＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ分子（７）のそれと同じであり、ＰＥＧ　５ｋＤａは分子量約５０００Ｄａのポリエチレングリコールである。２番目に良好なブロッキング剤は５％のＢＳＡ溶液であった。
【０１５４】
図８は、分析物認識分子（１）（抗ＩｇＧ）の固定後に使用するブロッキング剤の性質の関数として、蛍光分析物（蛍光Ａｔｔｏ－６４７　ＩｇＧ）によって放射される蛍光のグラフを示す。その実験を実施するために、最初に官能基化表面（２’）を、混合物としての分析物認識分子（１）／ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ分子（７）（１つを除く全ての事例において９μＭ）と接触させ、その後にブロッキング剤と接触させ、最後に分析物と接触させた。図から容易に分かるように、蛍光は、使用したブロッキング剤とは無関係に同程度のレベルであり、但し、混合物中の連結分子（７）の濃度が１μＭである場合は別である。その場合では蛍光が劣っている。これは、固定中の連結分子（７）の濃度が低いと分析物の特異的結合の減少につながるという事実を示している。
【０１５５】
さらなる実験において、本発明の方法を用いることによって官能基化表面に蛍光抗体をスポッティングした。－N_3基を含む自己組織化単分子層によってSiO_2表面を官能基化した。ｐＨ５の酢酸緩衝液中のＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ分子（９μＭ）を含んだ調製したての溶液中の様々な濃度の（Ａｔｔｏ－６４７蛍光標識で官能基化された）蛍光ＩｇＧを、その官能基化表面に滴下した。結果として生じる、蛍光ＩｇＧが固定された表面を、後にＰＢＳ緩衝液で洗浄した。試験した種々の蛍光ＩｇＧ濃度は、３μｇ／ｍｌ、６μｇ／ｍｌ、１２．５μｇ／ｍｌ、２５μｇ／ｍｌ、５０μｇ／ｍｌおよび１００μｇ／ｍｌであった。２種類の溶液を使用した。一方の種類は均質化剤を含まず、他方の種類は均質化剤としてベタイン０．２Ｍを含んでいた。蛍光強度を、液滴上の位置の関数として測定した。液滴内の均質性は、どちらの種類の溶液でも良好であり、高い抗体濃度（５０μｇ／ｍｌ以上）では特に良好であった。液滴内の均質性は、ベタインが存在する場合に、特に抗体濃度が低いときほど、向上した。
【０１５６】
さらなる実験において、本発明の方法を用いることによって官能基化表面に抗ＩｇＧ捕捉抗体をスポッティングした。－N_3基を含む自己組織化単分子層によってSiO_2表面を官能基化した。ｐＨ５の酢酸緩衝液中のＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ分子（９μＭ）を含んだ調製したての溶液中の様々な濃度の抗ＩｇＧ捕捉抗体を、その官能基化表面に滴下した。次いで、ＢＳＡによるブロッキングステップを実施した。最後に、固定された蛍光ＩｇＧを有する表面に、（Ａｔｔｏ－６４７蛍光標識で官能基化された）蛍光ＩｇＧを接触させた。試験した種々の抗ＩｇＧ濃度は、６μｇ／ｍｌ、１２μｇ／ｍｌ、２５μｇ／ｍｌ、５０μｇ／ｍｌおよび１００μｇ／ｍｌであった。２種類の溶液を使用した。一方の種類は均質化剤を含まず、他方の種類は均質化剤としてベタイン０．２Ｍを含んでいた。蛍光強度を、液滴上の位置の関数として測定した。液滴内の均質性は良好であり、高い抗ＩｇＧ濃度（５０μｇ／ｍｌ以上）では特に良好であった。捕捉されたＩｇＧの存在は、対応する蛍光信号によって検出することができた。
【０１５７】
本発明に係るデバイスについて、好ましい実施形態、具体的な構成および配置、ならびに材料を本明細書中で述べてきたが、本発明の範囲から逸脱することなく形態および細部に様々な変更または改変がなされ得るということを理解されたい。例えば、上に示した方式はどれも、用い得る手順の単なる代表例である。本発明の範囲内で、記載されている方法に対してステップの追加または削除がなされてもよい。

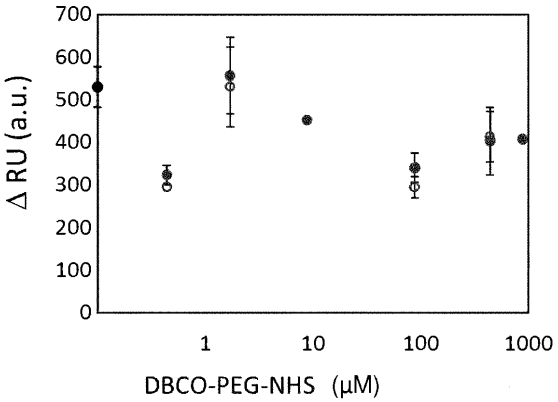
【図１】



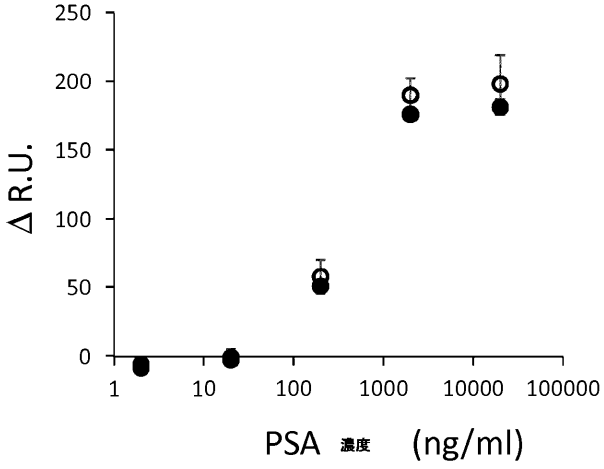
【図２】



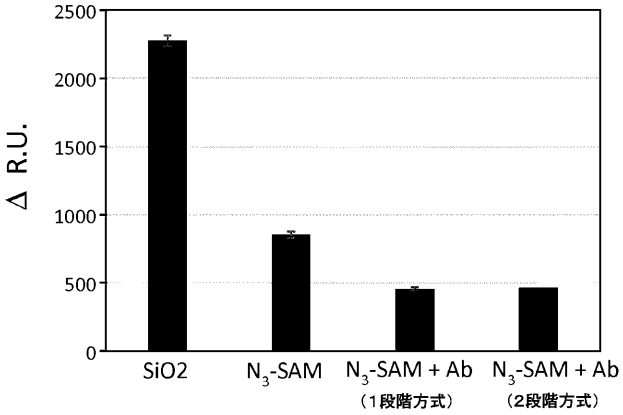
【図３】



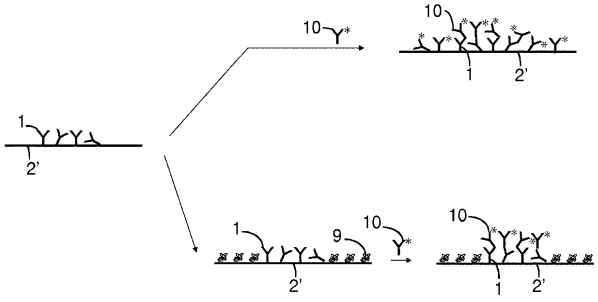
【図４】



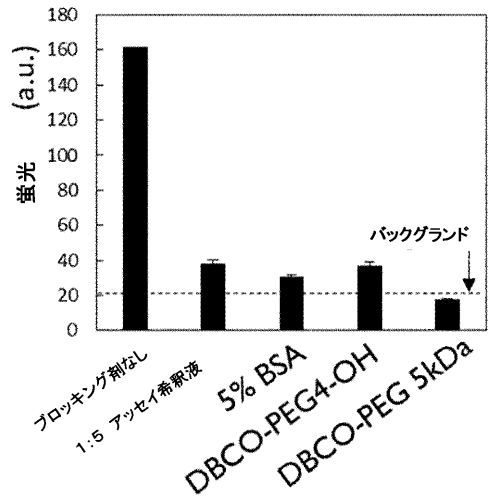
【図５】



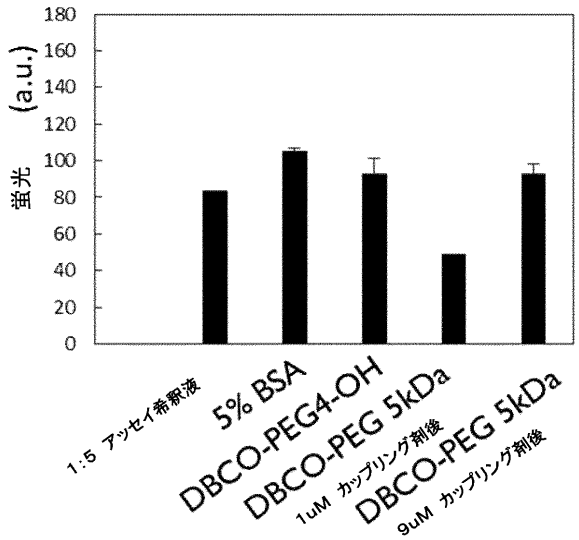
【図６】



【図７】


蛍光 (a.u.)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
バックグランド
ブロッキング剤なし
1:5 アッセイ希釈液
5% BSA
DBCO-PEG4-OH
DBCO-PEG 5kDa

【図８】


蛍光 (a.u.)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1:5 アッセイ希釈液
5% BSA
DBCO-PEG4-OH
DBCO-PEG 5kDa
1uM カップリング剤後
DBCO-PEG 5kDa
9uM カップリング剤後

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/064953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/543 G01N33/547
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MISRA ET AL: "Immobilization of oligonucleotides on glass surface using an efficient heterobifunctional reagent through maleimide-thiol combination chemistry", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 369, no. 2, 2007, pages 248-255, XP022231381, Scheme 1, Approach I	15
X	WO 2014/056896 A2 (ALBERT LUDWIGS UNIVERSITÄT FREIBURG) 17 April 2014 (2014-04-17)	1,2,10, 11,15-17
Y	claims 1,7,19; figure 1	3-9, 12-14

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 October 2016	13/10/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gunster, Marco

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/064953

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NALINIKANTH KOTAGIRI ET AL: "Antibody Quantum Dot Conjugates Developed via Copper-Free Click Chemistry for Rapid Analysis of Biological Samples Using a Microfluidic Microsphere Array System", BIOCONJUGATE CHEMISTRY., vol. 25, no. 7, 2014, pages 1272-1281, XP055307278, page 1279, left-hand column, paragraph 2; figure 1	15
X	ZHOU X ET AL: "IMPROVING THE SIGNAL SENSITIVITY AND PHOTOSTABILITY OF DNA HYBRIDIZATIONS ON MICROARRAYS BY USING DYE-DOPED CORE-SHELL SILICA NANOPARTICLES", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 76, no. 18, 2004, pages 5302-5312, XP001209769, Scheme 1; page 5305, left-hand column, paragraph 2	15
X	WO 2013/181697 A1 (UNIV MELBOURNE) 12 December 2013 (2013-12-12) claims 50,52,54; examples 10,16	15
Y	EP 2 532 639 A1 (MODIQUEST B V) 12 December 2012 (2012-12-12) figure 1	3-9, 12-14
Y	YONGFENG ZHAO ET AL: "Chemoselective fabrication of high density peptide microarray by hetero-bifunctional tetra(ethylene glycol) linker for click chemistry conjugation", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH. PART A, vol. 100A, no. 1, 2012, pages 103-110, XP055307077, figure 1	3-9, 12-14
Y	WO 2012/079030 A2 (UNIV CALIFORNIA) 14 June 2012 (2012-06-14) figure 1	3-9, 12-14
Y	Scientific Thermo: "Crosslinking Handbook", 2012, Thermo Fischer Scientific, XP055307610, pages 1-54, the whole document	3-9, 12-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/064953

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014056896 A2	17-04-2014	EP 2903740 A2	12-08-2015
		WO 2014056896 A2	17-04-2014
WO 2013181697 A1	12-12-2013	NONE	
EP 2532639 A1	12-12-2012	NONE	
WO 2012079030 A2	14-06-2012	US 2013338044 A1	19-12-2013
		WO 2012079030 A2	14-06-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

(72)発明者 カロリーン・ヤンス
ベルギー３００１ルーヴァン、カペルドリーフ７５番 アイメック・ヴェーゼットウェー内
(72)発明者 ティム・スタケンボルフ
ベルギー３００１ルーヴァン、カペルドリーフ７５番 アイメック・ヴェーゼットウェー内