

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6076308号
(P6076308)

(45) 発行日 平成29年2月8日(2017.2.8)

(24) 登録日 平成29年1月20日(2017.1.20)

(51) Int.Cl. F I
 GO 1 N 23/223 (2006.01) GO 1 N 23/223
 GO 1 N 23/22 (2006.01) GO 1 N 23/22 3 1 0
 GO 1 N 23/22 3 2 0

請求項の数 12 外国語出願 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2014-202871 (P2014-202871)	(73) 特許権者	510041348
(22) 出願日	平成26年10月1日(2014.10.1)		エックスアールプロ・サイエンシーズ・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2010-521206 (P2010-521206)の分割		アメリカ合衆国・ニューメキシコ・87544・ロス・アラモス・ディービー・ロード・278・スイート・ディー
原出願日	平成20年8月15日(2008.8.15)	(74) 代理人	100108453
(65) 公開番号	特開2015-4692 (P2015-4692A)		弁理士 村山 靖彦
(43) 公開日	平成27年1月8日(2015.1.8)	(74) 代理人	100064908
審査請求日	平成26年10月3日(2014.10.3)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	60/965,052	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成19年8月16日(2007.8.16)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウェルプレート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プレートであって、前記プレートを貫通する少なくとも一つのホールを有するプレート；及び

前記ホールを覆う膜であって、前記ホールが前記膜に対して垂直に配向される、膜を含み、

前記ホールが前記膜と接続する位置において、前記ホールが、前記膜と平行な少なくとも一つの寸法において10マイクロメートルから2ミリメートルの直径を有し、

前記膜が、恒久的に前記プレートに取り付けられ、

前記膜が、硫黄、リン、または塩素から選択された元素の少なくとも一つを、約4重量%未満だけ有する、

X線蛍光分光分析による測定用の一つ又はそれ以上の試料を調製する装置。

【請求項2】

前記プレートが、使用条件下において化学的に不活性である、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

前記ホール内の溶液の体積が減少する時間の少なくとも一部の間に、接触ラインの長さが減少するように、前記ホールが形成され、

前記接触ラインが前記溶液と前記ホールの固体表面とによって画定される、請求項1に記載の装置。

【請求項4】

10

20

前記膜に接続される前記ホールの周辺部によって画定された面から 100 nm の最小距離だけ、前記膜が変形する、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 5】

前記ホールが、2 マイクロリットルから 2 ミリリットルの間の体積の溶液を X 線蛍光分析による測定のために調製可能であるように構成される、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記ホールが、10 マイクロリットルから 250 マイクロリットルの間の体積の溶液を X 線蛍光分析による測定のために調製可能であるように構成される、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 7】

前記ホールが前記膜に接続する位置における前記ホールの直径が、試料を照射する際の X 線励起ビームの面積の 100 倍大きいまたは 100 倍小さい面積以内である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 8】

プレートであって、前記プレートを貫通する少なくとも一つのホールを有するプレート；及び

前記ホールを覆う膜であって、前記ホールが前記膜に対して垂直に配向される、膜を含み、

前記ホールが前記膜と接続する位置において、前記ホールが前記膜と平行な少なくとも一つの寸法において 10 マイクロメートルから 2 ミリメートルの間の直径を有し、

前記ホール内の溶液の体積が減少する時間の少なくとも一部の間に、接触ラインの長さが減少されるように、前記ホールが形成され、前記接触ラインが前記溶液と前記ホールの固体表面とによって画定され、

前記膜が、恒久的に前記プレートに取り付けられ、

前記膜が、硫黄、リンまたは塩素から選択された元素の少なくとも一つを約 4 重量%未満だけ有する、

X 線蛍光分光分析による測定用の一つ又はそれ以上の試料を調製する装置。

【請求項 9】

前記膜に接続する前記ホールの周辺部によって画定された面から 100 nm の最小距離だけ、前記膜が変形する、請求項 8 に記載の装置。

【請求項 10】

前記ホールが、2 マイクロリットルから 2 ミリリットルの間の体積の溶液を X 線蛍光分析による測定のために調製可能であるように構成される、請求項 8 に記載の装置。

【請求項 11】

前記ホールが、10 マイクロリットルから 250 マイクロリットルの間の体積の溶液を X 線蛍光分析による測定のために調製可能であるように構成される、請求項 8 に記載の装置。

【請求項 12】

前記ホールが前記膜に接続する位置における前記ホールの直径が、試料を照射する際の X 線励起ビームの面積の 100 倍大きいまたは 100 倍小さい面積以内である、請求項 8 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分光分析用の試料の調製に関する。

【背景技術】

【0002】

X 線蛍光 (XRF) 分光分析法は、化学的試料中に存在する元素を測定し、試料中のこれらの元素の量を測定するために使用される有力な分光技術である。この方法の基本的な物理的原理は、特定の元素の原子が X 線放射で照射された場合に、その原子が、K 殻電子

10

20

30

40

50

のようなコア電子を放出することである。その後、結果として生じる原子は、励起状態にあり、そして、放出された電子を高いエネルギー軌道からの電子で置換することにより、これが、基底状態に戻る事が可能である。これが、光子の放出を伴う。放出された光子のエネルギーが、2つの軌道のエネルギーの差と等しい。各元素が、特有の軌道エネルギーの組を有し、従って、特有のX線蛍光(XRF)スペクトルを有する。

【0003】

XRF分光計は、X線ビームを試料に照射し、試料からのX線蛍光を検出し、及び試料中に存在する元素を測定するためにX線蛍光を使用し、これらの元素の量を測定することの可能な装置である。通常、商用のエネルギー分散型X線蛍光分光計は、EDAX Eagle XPLエネルギー分散型X線蛍光分光計であり、微小焦点X線管、リチウム泳動シリコン固体検出器、処理電子機器、及びAmetekのEDAX部門、91 McKee Drive Mahwah, NJ 07430から入手可能であるベンダー供給型オペレーティングソフトウェアを備える。波長分散型X線蛍光分光計の例としては、Rigaku Americas, 9009 New Trails Drive, The Woodlands, TX 77381から入手可能なZSX Primusがある。原理上は、いずれの元素が、XRFで検出され、計量されうる。

10

【0004】

典型的なタンパク質薬物分析が、ナノモルからマイクロモルのタンパク質濃度及び薬物濃度で実行される。このタンパク質濃度及び薬物濃度が、同じである必要はない。X線蛍光による乾燥試料の分析のための従来の技術は、約10マイクロモルの最小濃度を有する1マイクロリットル又はそれ未満の溶液から堆積された乾燥試料を測定することが出来るのみである(参照により本願明細書に組み込まれる非特許文献1を参照)。この試料調製法は、タンパク質及びタンパク質薬物複合体の分析のためには不十分であり、試料を堆積する溶液の生物学的に関連のある濃度が、10マイクロモル未満でなければならず、好ましくは、100ナノモル未満でなければならない。

20

【0005】

現状の技術は、薄い溶液の分析、特に、約10マイクロモル未満の濃度を有するタンパク質の薄い溶液の分析には不十分である。

【0006】

X線蛍光分光分析を使用した測定用の試料の調製方法を簡素化する必要がある。本発明は、この必要性に対処するように設計される。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Thomasin C. Miller, Christopher M. Sparks, George J. Havrilla, Meredith R. Beebe, Semiconductor applications of nanoliter droplet methodology with total reflection X-ray fluorescence analysis, Spectrochimica Acta Part B 59 (2004) 1117-1124

40

【非特許文献2】Miller TC等 'Semiconductor applications of nanoliter droplet methodology with total reflection x-ray fluorescence analysis' Spectrochimica Acta B. 2004, 59: 1117-1124

【非特許文献3】Miller TC及びGJ Havrilla. 'Nanodroplets: a new method for dried spot preparation and analysis' X-Ray Spect 2004, 33: 101-106

【発明の概要】

50

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明のある態様が、X線蛍光分光分析による測定用の試料を調製する装置を含む。この装置が、プレートを貫通する一つ以上のホールを有するプレートを用意する。このホールが、プレートの一側上で、膜によって覆われる。このホールの直径が、膜がホールを覆う位置での一つの寸法において、500マイクロメートル未満である。この膜が、X線に対し半透明である。

【0009】

本発明の他の態様が、X線蛍光分光分析による測定用の試料を調製する装置を含む。この装置が、プレートを貫通する一つ以上のホールを有するプレートを用意する。このホールが、プレートの一側上で、プレートに対する防水密封を形成する取り外し可能なカバーによって覆われる。このカバーが、実質的に、オスmium、イットリウム、イリジウム、リン、ジルコニウム、白金、金、ニオブium、水銀、タリウム、モリブデン、硫黄、鉛、ピスマス、テクネチウム、ルテニウム、塩素、ロジウム、パラジウム、アルゴン、銀、及びトリウムの元素を含まない。このホールの直径が、カバーがホールを覆う位置における一つの寸法において、約500マイクロメートル未満である。

10

【0010】

本発明のさらに他の態様が、X線蛍光分光分析による測定用の試料を調製する方法を含む。この方法が、10マイクロモル未満の溶質を含み、約2マイクロリットルから約2ミリリットルの間の体積を有する溶液を提供する段階を含む。この溶液が濃縮され、X線蛍光分光分析を使用して分析される。

20

【0011】

本発明の付加的な目的、利点及び新規な特徴が、部分的に以下の記載において説明され、部分的に以下の調査に基づいて当業者には明らかとなり、又は、本発明の実施により理解されうる。本発明の目的及び利点が、特に添付した特許請求の範囲において規定された手段及び組合せを用いて達成され及び実現されうる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明の概略図を描いたものを示す。

【図2】ホール8の形状の実施例を示すプレート4の断面図を示す。

30

【図3】装置2を使用して及びピペットにより調製されたタンパク質試料を示す。

【図4】装置2を使用して及びピペットにより調製されたタンパク質試料のX線蛍光スペクトルを示す。

【図5】装置2を使用して及びピペットにより調製されたタンパク質試料の断面厚さプロファイルの比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

簡潔にいうと、本発明は、X線蛍光分光分析による測定用の試料を調製するための装置を含む。この装置が、プレートを貫通する一つ又はそれ以上のホールを有するプレートを用意する。このホールが、プレートの一側上で、膜によって覆われる。このホールの直径が、膜がホールを覆う位置での一つの寸法において、500マイクロメートル未満である。この膜が、X線に対し半透明である。また、本発明が、X線蛍光分光分析による測定用の試料を調製するための装置を含む。この装置が、プレートを貫通する一つ又はそれ以上のホールを有するプレートを用意する。このホールが、プレートの一側上で、プレートに対する防水密封を形成する取り外し可能なカバーによって覆われる。このカバーが、実質的に、オスmium、イットリウム、イリジウム、リン、ジルコニウム、白金、金、ニオブium、水銀、タリウム、モリブデン、硫黄、鉛、ピスマス、テクネチウム、ルテニウム、塩素、ロジウム、パラジウム、アルゴン、銀、及びトリウムの元素を含まない。このホールの直径が、膜がホールを覆う位置での一つの寸法において、約500マイクロメートル未満である。また、本発明が、X線蛍光分光分析による測定用の試料を調製する方法を含む。この

40

50

方法が、10マイクロモル未満の溶質を含み、約2マイクロリットルから約2ミリリットルの間の体積を有する溶液を提供する段階を含む。この溶液が集められ、X線蛍光分光分析を使用して分析される。

【0014】

本発明が、プレート4及び膜6を備えた装置2を含む。膜6が、プレート4の一表面を覆う。プレート4が、一つ又はそれ以上のホール8を有する。ホール8が、膜6によって覆われたプレート4の表面から、プレート4の反対の表面に向かって、プレート4を貫通する。膜6が、プレート4に結合されてよい。

【0015】

装置2が、膜6及びプレート4の接合部において、溶媒を漏らすべきではない。好ましくは、装置2が、約100°Fを超える温度、又は海水位での地球の重力定数の約20倍を超える加速度、又は760torr未満の大気圧のいずれかにさらされた場合に、膜6及びプレート4の接合部が、防水密封を維持する。

【0016】

プレート4の外側の隅部の12.7mm(0.5000インチ)以内の位置から測定した場合に、プレート4の寸法が、より好ましくは、127.76mm±0.25mm×85.48mm±0.25mmである。プレート4が、実質的に長方形である場合、又はプレート4が、底部上にフランジを有する場合、プレート4又はそのフランジが、好ましくは、3.18mm±1.6mmの外側に対する隅部の半径を有する。プレート4が、一つ又はそれ以上の、面取りした面又は斜めの隅部を有する長方形である場合、いずれの斜めでない隅部の半径は、好ましくは、外側に対して3.18mm±1.6mmである。装置2が、96個のホール8を備える場合、ホール8が、好ましくは、8行×12列のように配置される。この場合、プレート4の少なくとも一つの縁端とホール8の第一列の中心との間の距離が、好ましくは、14.38mm±4mmである。ホール8の各列の間の距離が、好ましくは、9mm±4mmである。プレート4の少なくとも一つの縁端とホール8の第一行の中心との間の距離が、好ましくは、11.24mm±4mmである。ホール8の各行の間の距離が、好ましくは、9mm±4mmである。ホール8の少なくとも一つが、好ましくは、特徴的な方法でマークされ、さらに好ましくは、各行が、特徴的な方法でマークされ、各列が、特徴的な方法でマークされる。装置2が、384個のホール8を備える場合、ホール8が、好ましくは、16行×24列のように配置される。この場合、プレート4の少なくとも一つの縁端とホール8の第一列の中心との間の距離が、好ましくは、12.13mm±4mmである。ホール8の各列の間の距離が、好ましくは、4.5mm±2mmである。プレート4の少なくとも一つの縁端とホール8の第一行の中心との間の距離が、好ましくは、8.99mm±4mmである。ホール8の各行の間の距離が、好ましくは、4.5mm±2mmである。ホール8の少なくとも一つが、好ましくは、特徴的な方法でマークされ、さらに好ましくは、各行が、特徴的な方法でマークされ、各列が、特徴的な方法でマークされる。装置2が、1536個のホール8を備える場合、ホール8が、好ましくは、32行×48列のように配置される。この場合、プレート4の少なくとも一つの縁端とホール8の第一列の中心との間の距離が、好ましくは、11.005mm±4mmである。ホール8の各列の間の距離が、好ましくは、2.25mm±1mmである。プレート4の少なくとも一つの縁端とホール8の第一行の中心との間の距離が、好ましくは、7.865mm±4mmである。ホール8の各行の間の距離が、好ましくは、2.25mm±1mmである。ホール8の少なくとも一つが、好ましくは、特徴的な方法でマークされ、さらに好ましくは、各行が、特徴的な方法でマークされ、各列が、特徴的な方法でマークされる。好ましくは、プレート4が、7mmから35mmの間の高さを有する。上面12及び底面10が、好ましくは、実質的に、互いに平行である。プレート4が、プレート4の一つ以上の側面上にフランジを備えてよい。プレート4がフランジを備える場合、プレート4の底にある平面からフランジの上端部を測定したフランジの高さは、好ましくは1mmから10mmの間であり、さらに好ましくは、2.41mm±0.38mm、6.10mm±0.38mm又は7.62mm±0.38mmである。プレート

10

20

30

40

50

4 が、いずれの隅部上に面取り面を備え又は備えず、実質的に長方形である場合、プレート4の少なくとも2つの側面上のフランジが、プレート4の底にある平面からフランジの上端部を測定した際に同じフランジ高さを有することが好ましい。フランジの上端部で測定した場合に、好ましくは、フランジが、プレート4から少なくとも0.5mmだけ、好ましくは1.27mmだけ延長する。いずれの面取り面が、好ましくは、フランジを有さない。プレート4上のフランジが、遮断部(interruptions)又は突起部(projections)を有してよい。好ましくは、フランジ上のいずれの遮断部又は突起部のいずれの端部が、遮断部又は突起部を有するフランジに実質的に垂直であるプレート4の端部から最小47.8mmである。

【0017】

プレート4が、好ましくは、プラスチックから構成されるが、プレート4を構成するための金属の使用が、プレート4をさらに耐久性のあるものにする。プレート4が、好ましくは、5.0299インチ(±0.5インチ)の長さ×3.3654インチ(±0.5インチ)の幅の寸法を有する。プレート4の高さが、好ましくは、1ミリメートルと150ミリメートルの間である。最も好ましくは、プレート4が、ANSI/SBS 1-2004及びANSI/SBS 2-2004に対応する。プレート4が、上面12及び底面10を有する。

【0018】

プレート4が、プレート4の底面10及びプレート4の上面12を貫通する一つ又はそれ以上のホール8を有する。96個のホール8、384個のホール8、又は1536個のホール8が存在する場合、ホール8の位置決めが、好ましくは、ANSI/SBS 4-2004に対応する。ホール8が、プレート4を貫通する。上面12上で、ホール8が、500マイクロメートルから30ミリメートルの間の直径を有する。底面10上で、ホール8が、10マイクロメートルから2ミリメートルの間の直径を有し、好ましくは、50マイクロメートルから500マイクロメートルの間の直径を有し、最も好ましくは、50マイクロメートルから350マイクロメートルの間の直径を有する。各ホール8が、好ましくは、上面12と底面10によって定義された平面の間を少なくとも10マイクロリットルに維持するために十分な体積を有する。各ホール8が、任意に、シリコン又はホール8の壁に結合するタンパク質を最小化する他のコーティングで覆われてよい。ホール8が、円錐形、又はプレート4の上面12における円錐の広い端部及びプレート4の底面10における円錐の狭い端部を備えた切頂円錐形であってよい。ホール8が、上部において円筒状であり、底部において円錐形又は切頂円錐形であってよい。ホール8が、上部において円筒状であり、中央部において円錐形又は切頂円錐形であり、底部において円筒状であってよい。ホール8が、上部において円筒状であり、中央部において円錐形又は切頂円錐形であり、プレート4の底面10上に底部円錐開口部の広い端部を備えた底部において円錐形であってよく、この構成において、ホール8が垂鈴型である。液体がホール8を流れることを可能にするいずれの形状が可能である。好ましくは、ホール8の最も広い部分における周囲の長さが、ホール8が膜6によって覆われる部位におけるホール8の周囲の長さよりも大きい。

【0019】

ホール8が、使用条件下において、化学的に不活性であるべきである。好ましくは、ホール8が、試料18のXRF測定を妨げる汚染物質を放出しない。さらに好ましくは、水、タンパク質、ジメチルスルホキシド又はジメチルホルムアミドを含む溶液に50で3時間の間さらされた場合に、いずれの化学形体においても、ホール8が、10億分の5以上の硫黄を放出せず、又は、10億分の5以上の塩素を放出せず、又は10億分の5以上のリンを放出しない。

【0020】

また、好ましくは、試料18が、粗い表面内に取り込まれないように、ホール8が、滑らかである。ホール8内のいずれの表面形体が、ホール8の内側の面に垂直である寸法において200マイクロメートル未満である。好ましくは、ホール8の内側の面が、約20

10

20

30

40

50

マイクロメートル未満の二乗平均平方根 (RMS) 粗さを有する。200マイクロメートルの内部くぼみ (internal depression) を有するホール8が、本発明に適用可能に機能する。約5マイクロメートルの粗さを有するホール8が、本発明に適用可能に機能する。ホール8の側面に付着するようになる試料18の量を最小化するために、ホール8が、約45°未満の先端角 (included angle) を有し、さらに好ましくは、約42°未満であり、最も好ましくは約40°未満である。全てのホール8が、これらの先端角を有することが可能であり、又は、断面積が減少したホール8の部分のみが、この先端角を有するように加工されることが可能である。

【0021】

溶液、ホール8の固体表面、及び大気との間の界面を定義するラインは、接触ラインと呼ばれる。好ましくは、溶液の体積が減少する時間の少なくとも一部の間、接触ラインの長さが減少するように、ホール8が加工される。膜6が分離される場合に、試料18の一部が膜6に付着することが好ましく、従って、膜6に隣接するホール8が、その最も狭い位置でのホール8よりも広いことが好ましい。

【0022】

ホール8が、底部において、即ち、ホール8が膜6に隣接する位置において、小さな断面積を有するべきである。好ましくは、この位置におけるホール8の断面が、ある寸法において直径約500マイクロメートル未満であり、さらに好ましくは、他の寸法において、直径1000マイクロメートル未満であり、ホール8が膜6と隣接する位置におけるホール8の全体の断面積が、約0.005平方センチメートル未満である。

【0023】

膜6が、プレート4の底面10にわたって配置される。膜6が、任意の接着剤14によって、プレート4の底面10に対して保持される。あるいは、膜6が、任意の底プレート16によって、プレート4の底面10に対して保持され、この場合、膜6が、底プレート14とプレート4の底面10との間に配置される。ガasket 20が、膜6と底プレート16との間に配置されてよい。膜6が、熱又は溶剤によって、プレート4の底面10に結合されてよい。膜6が、恒久的にプレート4に取り付けられてよく、又は、これが、取り外し可能であってよい。好ましくは、膜6が、実質的に、少なくとも一つの硫黄、リン、又は塩素の元素を含まない。適当な材料の例には、Porvair # 229302, Porvair # 229112, Porvair # 229058, Porvair # 229304, 及び Porvair # 229301 が含まれ、いずれも、Porvair plc, Brampton House, 50 Bergen Way, King's Lynn, Norfolk PE30 2JG, UK から入手可能であり、さらに、アルミホイル (例: Bio-Rad Laboratories, 1000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 から入手可能な Microseal 'F' Foil) が含まれる。膜6に使用されてよい他のテープには、超薄ポリエステル表面保護テープ、耐薬品性 Surllyn 表面保護テープ、耐摩耗性ポリウレタン表面保護テープ、シリコン接着剤又はアクリル接着剤を備えた耐熱性カプトンテープ、UV耐性ポリエチレン表面保護テープ、クリーン-リリース (Clean-Release) ポリエチレン表面保護テープ、ロー-スタティック (Low-Static) ポリイミドテープが含まれ、いずれも、McMaster-Carr, 6100 Fulton Industrial Blvd., Atlanta, GA 30336-2852 から入手可能である。膜6に使用されてよい他の材料には、0.02マイクロメートルの厚さである99.99%の純金箔 (Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 U.S.A. から入手可能); 0.07マイクロメートルの厚さである99.95%の純アルミホイル (Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 U.S.A. から入手可能); 0.1マイクロメートルから20マイクロメートルの厚さの PARYLENE N (登録商標) (Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 U.S.A. から入手可能); 0

10

20

30

40

50

．5マイクロメートルの厚さから25．0マイクロメートルの厚さの99．99%の純チタン箔（Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 U.S.A.から入手可能）；及び4マイクロメートルの厚さから8マイクロメートルの厚さのポリプロピレン（Lebow Company, 5960 Mandarin Ave., Goleta, CA 93117 U.S.A.から入手可能）が含まれる。都合良く使用される他の基質は、API, AP3, ProLINE Series 10, ProLINE Series 20, DuraBeryllium基質であり、Moxtek, 452 West 1260 North, Orem, Utah 84057から入手可能である。膜6に使用されてよい他の材料は、Ultralene（登録商標）、mylar、ポリカーボネート、prolene、及びカプトンであり、SPEX CertiPrep Ltd, 2 Dalston Gardens, Stanmore, Middlesex HA7 1BQ, ENGLANDから入手可能である。都合良く使用される他の材料は、Hostaphan（登録商標）、ポリエステル、及びEtnom（登録商標）であり、ChempLex Industries, Inc., 2820 SW 42nd Avenue, Palm City, FL 34990-5573 USAから入手可能である。都合良く使用される他の材料は、Zone Free Film Part ZAF-PE-50であり、Excel Scientific, 18350 George Blvd, Victorville, CA, 92394から入手可能である。このリストは、網羅的なものではなく、膜6に他の材料が使用されてよい。膜6が、フッ化炭素から形成されてよい。また、好ましくは、膜6が、実質的に、1.9 KeVと3 KeVの間のエネルギーを含むX線蛍光放射ピークを有する元素を含まないが、これは、これらのピークが、生化学的及び生物学的用途への装置2の適用に関係する大部分の信号に干渉する傾向があるためである。1.9 KeVと3 KeVの間のエネルギーを含むX線蛍光放射ピークを有する元素は、オスミウム、イットリウム、イリジウム、リン、ジルコニウム、白金、金、ニオブウム、水銀、タリウム、モリブデン、硫黄、鉛、ビスマス、テクネチウム、ルテニウム、塩素、ロジウム、パラジウム、アルゴン、銀、及びトリウムである。シリコンを含むX線検出器を使用するX線蛍光分光計とともに装置2を使用する場合、また、好ましくは、膜6が、1.9 KeVと3 KeVの間のエネルギーを含むX線蛍光エスケープピーク（即ち、X線蛍光放射ピークマイナス1.74 KeV）を有する元素を含まないが、これは、これらのエスケープピークが、生化学的及び生物学的用途への装置2の適用に関係する大部分の信号に干渉する傾向があるためである。1.9 KeVと3 KeVの間のエネルギーを含むX線蛍光エスケープピークを有する元素は、カルシウム、テルリウム、ヨウ素、スカンジウム、キセノン、セシウム、バリウム、チタン、及びランタンである。本願明細書において“実質的に含まない”とは、約4重量%未満のものとして定義される。膜6が、試料18の厚さを測定するために使用されうる付加的な化学元素を含んでよい。波長分散型X線蛍光が使用される場合、膜6の元素の純度は、重要ではなく、この場合、膜6が、試料を測定するために使用される元素（複数可）を実質的に含まないべきである。膜6が、タンパク質付着を増加させるように処理されてよく、処理の非-包括的なリストが、酸素若しくは窒素プラズマ又はポリ-リジンを備えた処理膜6を含む。

【0024】

膜6が、プレート4に結合される場合、膜6が、試料18とともに変形すべきである。膜6が、100ナノメートルの最小距離だけ、膜6に隣接するホール8の周囲によって定義された面から変形する。

【0025】

膜6が、プレート4から取り外し可能である場合、通常の使用の間に負荷を与えた結果として、プレート4が変形する。プレート4が、10マイクロメートルの最小距離だけ、平面膜6から変形する。

【0026】

膜6が、プレート4の底面10から取り外し可能ではない場合、好ましくは、膜6が、

10

20

30

40

50

2.3 KeVのエネルギーを含むX線に対し半透明である。この場合、半透明とは、膜6がX線検出器及び試料18によって定義されたラインと垂直である面内に配置された場合に、膜6と垂直でありかつ2.3 KeVのエネルギーを含むX線の少なくとも5%が膜6を通過することを可能にするものとして定義される。(膜6がプレート4の底面10から取り外し可能ではない場合)膜6用に使用されうる材料の組成及び厚さが、様々な材料に対し、X線減衰パラメータを使用して計算され又は測定されてよい。(膜6がプレート4の底面10から取り外し可能ではない場合)膜6に適した材料の非-網羅的なリストが、約195マイクロメートル未満の厚さであるポリプロピレン、及び約105マイクロメートル未満の厚さであるポリカーボネートを含む。

【0027】

X線蛍光分光計とともに装置2が使用される。好ましくは、一つ又はそれ以上のホール8内に試料18の溶液を配置することにより、装置2が使用される。試料18を含む溶媒の少なくとも一部が、蒸発される。好ましくは、試料18の溶媒の少なくとも80%が、蒸発され、さらに好ましくは、実質的に試料18の溶媒の全てが、蒸発される。好ましくは、約22 以上である高い温度又は約760 torr以下である減少した大気圧を使用して、溶媒が蒸発される。好ましくは、装置2が、Savant Speed Vac Plus SC 250DDA又はThermo Savant SPD 1010 Speed Vac (登録商標)のような真空遠心分離機内に配置される。好ましくは、装置2が遠心分離される間に、溶媒が、試料18から除去され、プレート4の底面10を貫通し膜6上に至るホール8の部分に集められることにより試料18が濃縮される。装置2の利点は、試料が、小さな領域内において濃縮されることである。膜6が、取り外し可能であり、かつ、膜6が、半透明でないほど十分に厚い場合(半透明とは、膜6がX線検出器及び試料18によって定義されたラインと垂直である面内に配置された場合に、膜6と垂直でありかつ2,300 eVのエネルギーを含むX線の少なくとも5%が膜6を通過することを可能にするものとして定義される)、膜6が、プレート4から取り外され、X線蛍光分光計内で測定される(例えば、EDAX, 91 McKee Drive Mahwah, NJ 07430から入手可能であるEDAX Eagle III μ probe、又はThermo Fisher Scientific, Inc., 81 Wymant Street, Waltham, MA 02454から入手可能なMicroXR VXR Microbeam XRF System)。この場合、膜6が、X線蛍光分光計内で配向され、試料18が、X線蛍光分光計のX線検出器と膜6との間にある。好ましくは、膜6が、フレーム20内に維持され、膜6を平面に維持する。上に定義したように、膜6が、X線に対し半透明である場合、プレート4から膜6を取り外すことなく、試料18が、測定されうる。膜6がX線に対し半透明である場合、膜6がプレート4から取り外されるか否かにかかわらず、試料18が、試料18とX線検出器との間に配向された膜6を備え、X線蛍光分光計を使用して測定されてよい。プレート4から膜6を取り外さないことによる利点は、プレート4が、フレームとして機能するため、付加的なフレーム20が必要ないということである。膜6を取り外すことによる利点は、試料18が、膜6から減衰することなく測定されうることである。好ましくは、溶媒を蒸発させた後、そのビームサイズが試料18のサイズと適合するX線蛍光分光計とともに装置2が使用され、この場合、適合するビームサイズが、試料18に入射するX線フラックスの少なくとも80%を含むX線励起ビームの面積が試料18の面積の100倍以内であるように定義される。X-Ray Optical Systems, Inc., 15 Tech Valley Drive, East Greenbush, N.Y. 12061によって提供されるポリキャピラリー(polycapillary)焦点調節レンズなどによって、X線励起源が、焦点調節されてよい。コリメータ又はX線励起源上の他のタイプの焦点調節レンズを備えたX線蛍光分光計も可能である。

【0028】

X線蛍光分光分析測定用の試料を調製するために装置2を使用することの利点は、非特許文献2又は非特許文献3に記載されているように、膜上に試料を印刷する又は単にピペ

10

20

30

40

50

ットで取ることに対し、装置2を使用した場合におけるその測定制限が優れているということである。装置2を使用することの第二の利点は、多くの生物学的試料が、例えばタンパク質の薄い溶液のような、薄い溶液として調製されることである。装置2は、比較的大きな体積の試料の溶液が調整されることを可能にし、及び、試料が最適な特性を備えた試料の乾燥したスポットで濃縮されることを可能にする。好ましくは、溶液の体積が、2マイクロリットルから2ミリリットルの間であり、さらに好ましくは、10マイクロリットルと250マイクロリットルの間である。一方、従来試料調製方法は、測定のために十分な量の試料を堆積するために、高度に濃縮された試料の溶液を必要とする。また、一方で、従来試料調製方法は、それらのプリンターヘッドを準備し又はそれらの容器を満たすために、大量の試料を必要とし、高価な試料を浪費する。例えば、試料中における約30ピコグラムの硫黄を測定することを要求する。10ナノリットルの溶液を使用しうる標準的な堆積方法を使用する場合、初期溶液中の硫黄の濃度が、100マイクロモルである必要がある。装置2を使用する場合、100マイクロリットルの溶媒が使用され、10ナノモルの初期試料濃度となる。生物学、生化学及び薬剤開発に対しては、数十又は数百マイクロモルの濃度の溶液と比べて、ナノモルの濃度を有する溶液で機能することが出来ることが重要である。タンパク質又は核酸とともに装置2が使用される場合、タンパク質又は核酸中の硫黄、リン、又は硫黄とリンの組み合わせの質量が、好ましくは、50フェムトグラムと1マイクログラムの間であり、最も好ましくは、試料18中のリン、硫黄又はこれらの組み合わせの質量が、100ピコグラムと100ナノグラムの間である。

【0029】

プレート4の底面10を貫通するようなホール8の形状によって決定される形状に試料18が堆積される。試料18に対し最も効果的な形状は、X線蛍光分光計のX線励起ビームのサイズと同様なものである。通常、試料18とX線励起ビームとの両方は、その輪郭がほぼ円形である。同様に、これに関連して、試料18の面積が、試料18を照射するX線励起ビームの面積の100倍大きい又は小さい面積以内であることを意味する(例えば、試料18の直径が、試料18を照射するX線励起ビームの10倍以内である)。好ましくは、試料18が、試料18を照射するX線励起ビームの面積の25倍大きい又は小さい面積以内である(例えば、試料18の直径が、試料18を照射するX線励起ビームの5倍以内である)。試料18を照射するX線励起ビームの面積が、試料18の面積よりも著しく大きい場合、X線光子が無駄になる。試料18を照射するX線励起ビームの面積が、試料18の面積よりも著しく小さい場合、測定時間が、不必要に長くなる、又は試料18の他の一部が測定されないことにより、無駄になる。

【0030】

通常、試料18が、防止剤、共同因子、金属、タンパク質、砂糖又は他の化学種の追加によって任意に変更される核酸又はタンパク質の水溶性試料を含む。都合よく、試料18が、X線蛍光機器を使用して測定されてよい。好ましくは、このX線蛍光機器が、以下のものの少なくとも一つを含む：モノキャピラリー(monocapillary)焦点調節レンズ、ポリキャピラリー焦点調節レンズ、コリメータ、微小焦点X線管、シンクロトロンX線源、線形加速X線源、ロジウムX線管、モリブデンX線管、クロムX線管、銀X線管、パラジウムX線管、単色X線源、多色X線源、偏光X線源、共焦点X線蛍光分光計集束装置、PINダイオード検出器、半導体X線検出器、ゲルマニウム又はドーブゲルマニウムX線検出器、シリコン又はドーブシリコンX線検出器、波長分散型X線蛍光分光計、エネルギー分散型X線蛍光分光計、全反射X線蛍光分光計、等。

【0031】

膜6が、装置2とともに使用されるX線蛍光分光計で測定可能な付加的な化学元素を含む場合、これらの元素が、試料18の厚さを測定するために使用されてよい。例えば、膜6が、シリコンを含む場合、試料18によるシリコンX線信号の減衰により、試料18の厚さを予測することが可能となる。図5は、装置2を使用して堆積されたタンパク質試料及びピペットを使用して堆積されたタンパク質試料の相対的な厚さを示す。試料中において消滅するリング及び堆積試料の代替のリングを示すピペットにより堆積された試料と比

10

20

30

40

50

較して、装置 2 を使用して堆積されたタンパク質試料が、さらに十分にコンパクトであり、リング形状ではない。図 3 が、ピペットによって堆積された試料の写真を示す。また、図 3 が、装置 2 を使用して堆積された試料の写真を示す。装置 2 を使用して堆積された試料よりも、ピペットを使用して堆積された試料が、著しく大きく、よりリング形状を有する。図 4 に示されるように、装置 2 を使用して堆積されたさらにコンパクトな試料が、X 線蛍光スペクトル内のさらに強い信号を与える。試料 18 が存在しない領域における膜 6 からの信号（例えばシリコン信号）を測定し及び試料 18 によって覆われている膜 6 の領域からの同じ元素の信号を測定することにより、厚み補正がなされる。測定された量によって X 線信号を弱めることが必要である試料 18 の厚さを計算することにより、膜からの X 線信号における差異が、試料 18 の厚さに関連しうる。

10

【0032】

装置 2 が、タンパク質とともに使用されてよい。多くのタンパク質が、緩衝剤を必要とし、特定の範囲内に pH を維持し（例えば、pH 緩衝剤）、化学物質のレドックス状態を維持し（例えば、レドックス緩衝剤）、又はイオン強度を維持する（例えば、等張緩衝剤）。多くの緩衝剤が、化学物質の測定に干渉しうる元素を含む。好ましくは、化学元素が試料 18 中に存在する場合、この緩衝剤が、4 以上の原子番号を有する少なくとも 1 つの化学元素を含まないべきである。好ましくは、化学元素が試料 18 中に存在する場合、この緩衝剤が、8 以上の原子番号を有する少なくとも 1 つの化学元素を含まないべきである。好ましくは、この緩衝剤が、以下の化学物質又は官能基の少なくとも一つを含まないべきである：ジメチルスルホキシド、チオール、硫酸アニオン、スルホン酸アニオン、塩素アニオン、臭化物アニオン、フッ化物アニオン、ヨウ化物アニオン、過塩素酸アニオン、リン酸アニオン、及びホスホン酸アニオン。好ましくは、この緩衝剤が、以下の化学物質又は官能基の一つ又はそれ以上を含むべきである：アミン、イミン、硝酸アニオン、亜硝酸アニオン、アンモニウムカチオン、酢酸アニオン、カルボン酸アニオン、炭酸アニオン、イミニウムカチオン；これらの化学物質が、最小の X 線蛍光干渉を有する補正された緩衝特性を提供する。最も好ましくは、この緩衝剤が、トリス硝酸塩としても知られているトリス（エタノール）アミン硝酸塩のようなアンモニウム硝酸塩を含む。

20

【0033】

好ましくは、本発明において使用されるタンパク質が、タンパク質と弱く結合する又は化学的に結合しない pH 緩衝剤、レドックス緩衝剤及び等張緩衝剤を含む化学物質を除去するように精製される。また、この精製が、試料の品質の低下の原因となる塩を除去する。弱い結合とは、約 10 ミリモルより弱い結合親和性を有することを意味するものとして定義される。この脱塩段階が、Roche Applied Science, PO Box 50414, Indianapolis, IN, 46250 から入手可能な Sephadex G-25 を使用する Quick Spin Protein Column のようなサイズ排除クロマトグラフィー又はゲルろ過クロマトグラフィーを都合よく使用して行われる。このプロセスが、96-ウェル、384-ウェル、又は 1536-ウェルプレートフォーマットのようなウェルプレートフォーマットを使用した多重化に適している。Pierce Biotechnology Inc., PO Box 117, Rockford, Illinois, 61105 から入手可能な Zeba 96-ウェルプレートのような分離システムが、特に都合が良い。緩衝剤及び他の弱い結合化学物質を除去することによる利点は、それらの除去が、所望の X 線蛍光信号を減衰させうる若しくは誤った X 線蛍光信号を追加しうる緩衝元素、又は回折及び他の同様なプロセスを通して非-蛍光 X 線信号を形成する緩衝元素を最小化することである。

30

40

【0034】

シングル-プレックス又はマルチプレックスの両方のゲルろ過クロマトグラフィープロセスが、Thermo Fisher Scientific, product # 11210923, 450 Fortune Blvd, Milford, MA, 01757 から入手可能な IEC CL40 のような遠心分離機、又は、Millipore, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821 から入手可能な M

50

ultiScreen Vacuum manifold with Direct Stackなどの真空装置のような真空マニホールドであって、同様にMilliporeから入手可能な標準的な真空ポンプ（例えば、Millipore, Catalog # WP61 115 60）に取り付けられる真空マニホールドを使用して迅速に処理されてよい。好ましくは、分離が、300秒未満だけ遠心分離が実行され、さらに好ましくは、30秒未満だけ遠心分離が実行される。他の方法の分離としては、7000gで3時間の間、遠心分離されるCentricon YM-3を使用して実行されうるような限外ろ過がある。

【0035】

装置2とともに、サイズ排除カラムによる脱塩が、装置2におけるホール8の位置及び数と同じであるウェルの位置及びウェルの数を有する脱塩ウェルプレートを使用することにより、都合よく使用されてよい。脱塩プレートが、装置2の上に配置され、試料2の溶液が、脱塩プレートのウェルの一つ又はそれ以上内に配置される。試料18を含む溶液が、脱塩プレートを通り抜け、装置2のホール8内に入るまで、積層された脱塩プレート及び装置2が、遠心分離される。次に、上記のように、装置2が、真空遠心分離機内に配置される。あるいは、試料18の溶液が、脱塩され、例えばピペットによって、装置2に移されてよい。

10

【0036】

試料18がタンパク質を含む場合、好ましくは、これが、10マイクロモル未満の濃度で、さらに好ましくは、100ナノモル未満の濃度で存在すべきである。タンパク質に加え、使用されうる他の生体分子には、核酸、多糖、ペプチド、及びタンパク質のような他の生物学的に誘導された分子を含み、好ましくは、10マイクロモル未満の濃度で、さらに好ましくは、100ナノモル未満の濃度で溶液中に存在する。

20

【0037】

本発明の上記の記載が、説明及び記載を目的として示されたが、これは、網羅的なものとし又は本発明を開示内容と一致するものに制限することを意図したものではなく、当然ながら、上記の教示内容を考慮し、多くの改良及び変更が可能である。

【0038】

本発明の原理及びその実際の適用を最も良く説明し、これによって、当業者が、意図された特定の使用に適した様々な改良を伴う様々な実施形態において本発明を最も良く利用することが出来るようにするために、実施形態が選択され、及び記載された。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって定義されると考えられる。

30

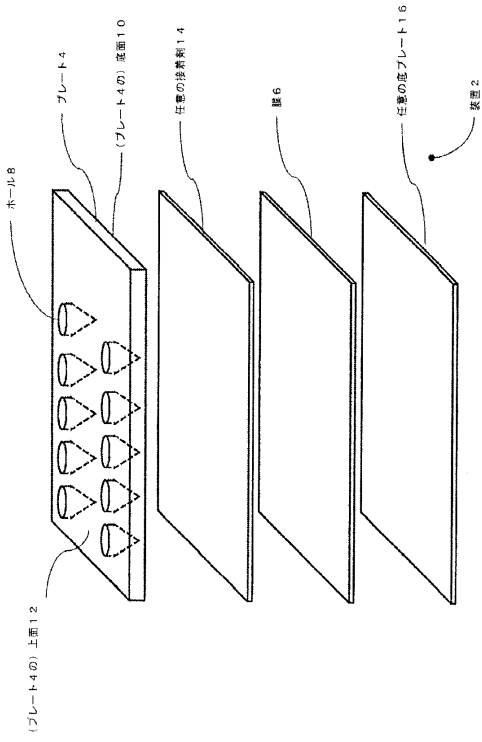
【符号の説明】

【0039】

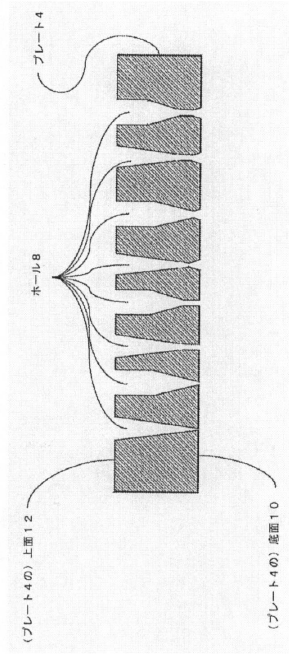
- 2 装置
- 4 プレート
- 6 膜
- 8 ホール
- 10 底面
- 12 上面
- 14 接着剤
- 16 底プレート

40

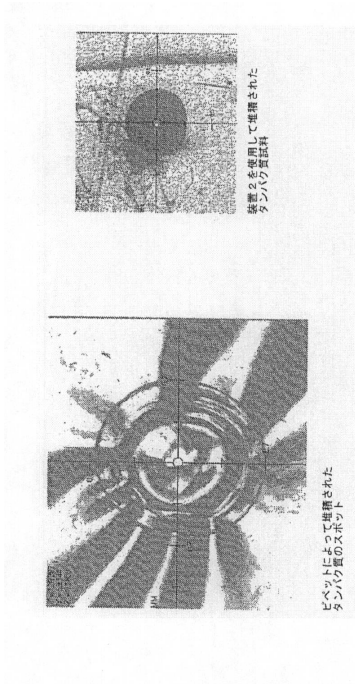
【図1】



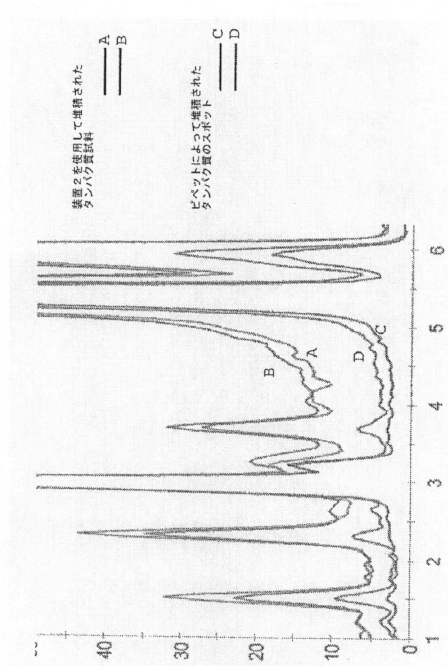
【図2】



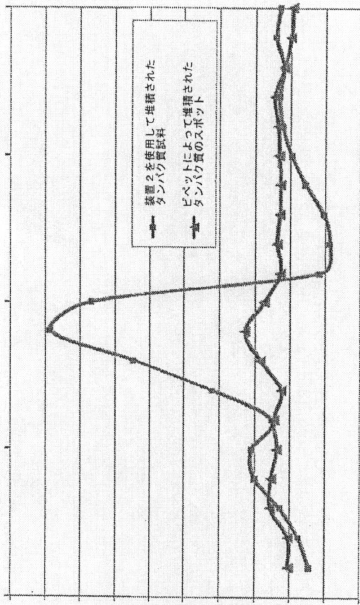
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

- (72)発明者 エヴァ・アール・バーンバウム
アメリカ合衆国・ニューメキシコ・87544・ロス・アラモス・カミノ・モラ・1930
- (72)発明者 ベンジャミン・ピー・ワーナー
アメリカ合衆国・ニューメキシコ・87544・ロス・アラモス・テワ・ループ・903
- (72)発明者 シャロン・エム・ボールドウィン
アメリカ合衆国・ニューメキシコ・87507・サンタ・フェ・カレ・シンソソテ・82ビー
- (72)発明者 ジェニファー・エー・パーガー
アメリカ合衆国・ニューメキシコ・87544・ロス・アラモス・アズール・ドライブ・103
- (72)発明者 レベッカ・エル・イー・ミラー
アメリカ合衆国・ニューメキシコ・87544・ロス・アラモス・フォーティーセカンド・ストリート・1430

審査官 比嘉 翔一

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0039585(US, A1)
特開2003-090810(JP, A)
特開2000-230912(JP, A)
特開2004-109107(JP, A)
米国特許第05544218(US, A)
特開2007-064901(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 23/00 - 23/227
G01N 1/00 - 1/44
JSTPlus(JDreamIII)