

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-163402

(P2004-163402A)

(43) 公開日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 21/03

GO 1 N 21/64

F I

GO 1 N 21/03

GO 1 N 21/64

Z

G

テーマコード (参考)

2 GO 4 3

2 GO 5 7

審査請求 有 請求項の数 23 O L 外国語出願 (全 83 頁)

(21) 出願番号 特願2003-171103 (P2003-171103)
 (22) 出願日 平成15年6月16日 (2003.6.16)
 (31) 優先権主張番号 02013189.2
 (32) 優先日 平成14年6月14日 (2002.6.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 503217082
 スティフング フュア ディアノスティシ
 ュ フォルシュング
 Stiftung für Diagno
 stische Forschung
 スイス国 1785 クレシア シュール
 モラ プラッツ ロンド
 Praz Rond, 1785 Cre
 ssier sur Morat, Sw
 izerland

最終頁に続く

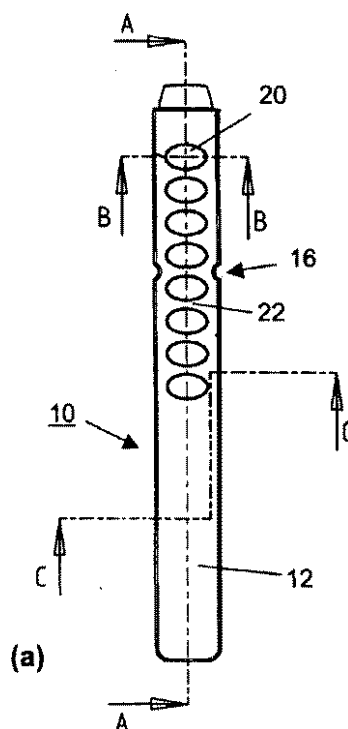
(54) 【発明の名称】 エバネッセント場法を使用して物質を定量する読み取り装置のキューベット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生化学的および光学的なプロパティの両方を備え、非常に感度が高く、再現可能な高速の定量を可能にする、エバネッセント場法を使用して物質を定量する読み取り装置用の安価なキューベットを提供する。

【解決手段】 定量する物質を含む溶液を受ける少なくとも1つのウェル20を有する少なくとも1つのウェル部18と、ウェル部18の側壁部材22を支持し、ウェル20の肋起面30を提供する少なくとも1つの基部とを備え、基部は光学的に透明な材料で作製され、ウェル20の肋起面30に垂直に交差する面B-Bに等脚台形の横断面形状を有つ。基部は、肋起光ビームを少なくとも部分的に、入射点から肋起面30における反射、入射点に戻る環状の光路に沿って導く。

【選択図】 図1 (a)



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エバネッセント場法を使用した定量のための読み取り装置用のキュベット（１０）であって、

定量する物質を含む溶液を受ける少なくとも１つのウェル（２０）を有する少なくとも１つのウェル部（１８）と、

ウェル部（１８）の側壁部材（２２）を支持し、ウェル（２０）の励起面（３０）を提供する少なくとも１つの基部（２４）と

を備え、

基部（２４）は光学的に透明な材料で作製され、ウェル（２０）の励起面（３０）に垂直に交差する面（Ｂ－Ｂ）に等脚台形の横断面形状を有し、台形は、同じ長さの第１の辺および第２の辺（２６Ｓ、２８Ｓ）、および平行の上辺および下辺（３２Ｓ、３０Ｓ）を有し、

基部（２４）はさらに、

励起面（３０）から間隔を空け、励起面に平行な下部面（３２）であって、前記面（Ｂ－Ｂ）における下部面（３２）の横断面は、台形の下辺（３２Ｓ）である下部面と、

外部の励起光源の励起光ビーム（３４）を受ける第１の面（２６）であって、前記面（Ｂ－Ｂ）における第１の面（２６）の横断面は台形の第１の辺（２６Ｓ）である第１の面と、

第１の面（２６）の反対側にある第２の面（２８）であって、前記面（Ｂ－Ｂ）における第２の面（２８）の横断面は台形の第２の辺（２８Ｓ）である第２の面と、

を備え、

基部（２４）は、励起光ビーム（２４）を少なくとも部分的に、第１の面（２６）上の入射点から励起面（３０）における反射、第２の面（２８）および下部面（３２）を介し、入射点に戻る環状の光路に沿って導くように適合されるキュベット。

【請求項 2】

台形の高さ H が、

$$H = -\frac{A \sin(\beta - \gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))} - \left(-\frac{A}{2} + \frac{A \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))} \right) \tan(\beta + \gamma)$$

によって与えられ、 $(90^\circ - \gamma)$ は下辺（３２Ｓ）と第１の辺（２６Ｓ）の間の台形の底角であり、 n_2 は、基部（２４）の屈折率であり、A は台形の上辺（３０Ｓ）の長さであり、かつ

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right)$$

である請求項 1 に記載のキュベット（１０）。

【請求項 3】

下辺の反射角 $d = 90^\circ - (\beta + \gamma)$ は、 $\arcsin(1/n_2)$ より大きく、 n_2 は基部（２４）の屈折率であり、かつ

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right)$$

である請求項 1 または 2 に記載のキュベット（１０）。

【請求項 4】

励起面の反射角 $\varepsilon = 90^\circ - (\beta - \gamma)$ は $\arcsin(1/n_2)$ より大きく、 n_2 は基部 (24) の屈折率であり、かつ

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right)$$

である請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のキュベット (10)。

【請求項 5】

台形は、実質的に、高さ H および幅 A および A/H n_2 を有する長方形である請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のキュベット (10)。

10

【請求項 6】

ウェル部 (18) および基部 (24) は、好ましくは PMMA、ポリスチレン、ポリカーボネート、SAN、シクロコポリマオレフィン、またはポリオレフィンを含むレジン材料で一体形成される請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のキュベット (10)。

【請求項 7】

キュベット (10) は複数のウェル (20) を備える請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のキュベット (10)。

【請求項 8】

励起面 (30) が親水性である請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のキュベット。

【請求項 9】

励起面 (30) は少なくとも部分的に親水性化合物で被覆される請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のキュベット。

20

【請求項 10】

反応相手 R1 としての化合物は、任意選択で被覆した励起面 (30) に固定化され、前記反応相手 R1 は、反応相手 R2 としての定量する物質に対する親和力を有する請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のキュベット。

【請求項 11】

前記反応相手 R2 は、蛍光体を含む部分を含む請求項 10 に記載のキュベット。

【請求項 12】

反応相手 R1 としての化合物のための固定用化合物が、任意選択で被覆した励起面 (30) に固定化され、前記反応相手 R1 は、反応相手 R2 としての定量する物質に対する親和力を有する請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のキュベット。

30

【請求項 13】

前記反応相手 R1 または前記固定用化合物は凍結乾燥形態で存在する請求項 10 から 12 のいずれか一項に記載のキュベット。

【請求項 14】

前記凍結乾燥した反応相手 R1 または前記凍結乾燥した固定用化合物は、1 つまたは複数の緩衝化合物、1 つまたは複数のタンパク質性化合物、1 つまたは複数の親水性化合物または 1 つまたは複数の錯化剤／抗凝固剤、および任意選択で静菌性化合物、またはこれらの成分の 1 つまたは複数を含む混合物を含む凍結乾燥したスペーサ層によって覆われる請求項 13 に記載のキュベット。

40

【請求項 15】

前記凍結乾燥したスペーサ層は、

(A) 反応相手 R1 を励起面 (30) に固定化した場合には、蛍光体を含む化合物または反応相手 R3 としての化合物またはそれらの混合物、または

(B) 前記固定用化合物を励起面 (30) に固定化した場合には、反応相手 R1、または蛍光体を含む化合物、または反応相手 R3 としての化合物、またはこれらの 2 つまたは 3 つを含むそれらの混合物

のいずれかを含む凍結乾燥物によって覆われ、

前記反応相手 R3 は、反応相手 R2 としての定量する物質に対する親和力を有し、前記反

50

応相手 R 3 は、任選択で蛍光体を含む部分を含み、前記蛍光体を含む化合物は、反応相手 R 2 または反応相手 R 3 に対する親和力を有する請求項 1 4 に記載のキュベット。

【請求項 1 6】

請求項 1 0 から 1 5 のいずれか一項に記載のキュベットの作製プロセスであって、

(a) 請求項 1 から 9 のいずれか一項に定義した励起面 (30) またはキュベットの上に反応相手 R 1 または前記固定用化合物を固定化するステップを含むプロセス。

【請求項 1 7】

さらに、(b) 1 つまたは複数の緩衝化合物、1 つまたは複数のタンパク質性化合物、1 つまたは複数の親水性化合物または 1 つまたは複数の錯化剤／抗凝固剤、および任意選択で静菌性化合物、またはこれらの成分の 1 つまたは複数を含む混合物を含む凍結可能な溶液 I を、前記固定化した反応相手 R 1 または前記固定化した固定用化合物の上に塗布するステップと、

(c) 前記溶液 I を凍結して凍結スペーサ層を得るステップとを含む請求項 1 6 に記載のプロセス。

【請求項 1 8】

ステップ (c) の後に、凍結した溶液 I を凍結乾燥する請求項 1 7 に記載のプロセス。

【請求項 1 9】

(A) 反応相手 R 1 を励起面 (30) に固定化した場合には、蛍光体を含む化合物または反応相手 R 3 としての化合物またはそれらの混合物、または (B) 前記固定用化合物を励起面 (30) に固定化した場合には、反応相手 R 1、または蛍光体を含む化合物、または反応相手 R 3 としての化合物、またはこれらの 2 つまたは 3 つを含むそれらの混合物、のいずれかを含む凍結可能な溶液 I I を、前記凍結スペーサ層の上に塗布するステップと、

(e) 前記溶液 I I を凍結して、凍結した溶液 I の上に凍結した溶液 I I を得るステップと、

(f) キュベット中の凍結内容物を凍結乾燥して凍結乾燥物を得るステップとをさらに含む請求項 1 7 に記載のプロセス。

【請求項 2 0】

医学的または獣医学的診断、食物分析、環境分析、化学的または生化学的分析、または発酵プロセスの分析における請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のキュベットの使用方法。

【請求項 2 1】

免疫反応を介した物質の質的および／または量的な判定のための請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のキュベットの使用方法。

【請求項 2 2】

免疫反応を介した物質の質的および／または量的な判定のための請求項 1 0 から 1 3 のいずれか一項に記載のキュベットの使用であって、

固定化した反応相手 R 1、または固定化した固定用化合物、または凍結乾燥したスペーサ層と接触させて、反応相手 R 2 としての定量対象の物質と、(A) 反応相手 R 1 を励起面 (30) に固定化した場合には、蛍光体を含む化合物、または反応相手 R 3 としての化合物、またはそれらの混合物、または (B) 前記固定用化合物を励起面 (30) に固定化した場合には、反応相手 R 1、または蛍光体を含む化合物、または反応相手 R 3 としての化合物、またはこれらの 2 つまたは 3 つを含むそれらの混合物、のいずれかとを含む溶液を配置するステップであって、固定化された反応相手 R 1 または固定化された固定用化合物の上に錯体が形成され、前記錯体は、

(i) 反応相手 R 1、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 2、または

(i i) 反応相手 R 1、反応相手 R 2、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 3、または

(i i i) 反応相手 R 1、反応相手 R 2、反応相手 R 3、および蛍光体を含む化合物、ま

たは

(i v) 固定用化合物、反応相手 R 1、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 2、または

(v) 固定用化合物、反応相手 R 1、反応相手 R 2、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 3、または

(v i) 固定用化合物、反応相手 R 1、反応相手 R 2、反応相手 R 3、および蛍光体を含む化合物

のいずれかを含むステップと、

前記錯体を介して励起面 (30) に結合した蛍光体を光源のエバネッセント場によって励起し、生じる蛍光を測定するステップと

を含むキュベットの使用方法。

10

【請求項 23】

免疫反応を介した物質の質的および／または量的な判定のための請求項 15 に記載のキュベットの使用であって、

キュベット中の凍結乾燥した内容物と接触させて、反応相手 R 2 としての定量する物質を含む溶液を配置するステップであって、固定化した反応相手 R 1 または固定化した固定用化合物の上に錯体が形成され、前記錯体は、

(i) 反応相手 R 1、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 2、または

(i i) 反応相手 R 1、反応相手 R 2、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 3、または

(i i i) 反応相手 R 1、反応相手 R 2、反応相手 R 3、および蛍光体を含む化合物、または

20

(i v) 固定用化合物、反応相手 R 1、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 2、または

(v) 固定用化合物、反応相手 R 1、反応相手 R 2、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 3、または

(v i) 固定用化合物、反応相手 R 1、反応相手 R 2、反応相手 R 3、および蛍光体を含む化合物

のいずれかを含むステップと、

前記錯体を介して励起面 (30) に結合した蛍光体を光源のエバネッセント場によって励起し、生じる蛍光を測定するステップと

を含むキュベットの使用方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エバネッセント場法を使用して物質を定量する読み取り装置用のキュベット、物質を定量するために処理されるキュベットを作製する方法、および前記キュベットを使用して物質を定量する方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

医学的診断、特に免疫学的診断は、主として E L I S A (酵素結合免疫吸着検定法) 法に基づく。免疫検定についての最近の記事を H a g e , A n a l . C h e m . 71 (1991)、294R~304Rに見出すことができる。E L I S A テストは、抗原や抗体の濃度を判定するために使用される。初めに、検査する物質 (例えば抗原) を固体基板に接触させて配置し、その基板に検査する物質に固有の反応相手をまず結合させる (例えば抗体)。第2の反応相手である研究対象の物質を、基板に結合した第1の反応相手と結合することにより、検査する物質を固体基板上で濃縮させる。次いで、検査する物質の第3の反応相手 (例えば別の抗体) を基板と接触させて配置し、その第3の反応相手を比色法による検出が可能とする酵素でマークする。その第3の反応相手が、基板表面に結合した検査

50

対象の物質と反応する（すなわち結合する）と、酵素反応を介して着色された生成物が生成され、これを光学的に評価することができる。多くの場合ポリスチレン製である、96個のウェルを備える標準化されたプラスチック製のプレートが一般に固体基板として使用される。プラスチックウェルの表面は、免疫学的検出に十分な量の吸着を通じて、ナノグラム範囲のタンパク質と結合する。主として免疫グロブリンである第3の反応相手を酵素でマークするにはいくつかの方式がある。今日使用されているマーカは、例えばペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼである。

【0003】

E L I S Aは、感度および特定性の点で良好な結果をもたらし、到達可能な検出限界はナノグラム範囲またはそれ以下である。この原理に基づく各種の定量の実施形態がある。それらの実施形態を用いると、問題に応じて抗原または抗体を検出することができる。 10

【考案の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、ウェルに異なる試薬を次々に加え、再度取り出さなければならぬため、E L I S A法の大きな不都合点はテストの扱いである。全体で10以上のピペッティング、洗浄、およびインキュベーションのステップが必要となる可能性がある。したがって、E L I S A法は非常に時間がかかり、労力を要し、特別に訓練を受けた作業者によって注意深く行わなければならない。E L I S A法の別の不都合点は、定量または試験のためのすべてのインキュベートおよび洗浄のステップに、通例は1時間あるいはそれ以上の時間がかかることである。 20

【0005】

エバネッセント場法では、例えば表面上の生体分子の相互作用を直接観察することができる。この場合には、溶液中の反応物質の相互作用を硬質の基質面上で測定する。リガンドの結合を「表面プラズモン共鳴」として「実時間」で物理的に測定することが可能である。E L I S A法と比較した利点は、試薬を加えた後にそれ以上のピペッティングステップがないことと、待機のステップがないことである。過去には、このような測定を行うには高価な装置と特殊な界面化学を有する複数層のセンサーチップを必要とした。こうした不都合点により、この方法は日常的な診断には使用されなくなっている。

【0006】

反応面上の生化学的な相互作用プロセスを定量するエバネッセント場法では、通例、分析対象の物質を含む溶液を入れるウェルを有するキュベットを用いる。数多くの診断および分析の用途では、使い捨てまたは消耗用のキュベットが好ましいことから低価格のキュベットに対する大きな需要が存在する。しかし、生化学分析ツールは同時に、感度および再現性に関する増大し続ける要件を満たさなければならない。したがって、キュベットは、製造コストと生化学的／光学的プロパティに関する厳格な必要条件をともに満たさなければならない。 30

【0007】

したがって、本発明の根底にある技術的課題は、すぐれた生化学的および光学的なプロパティの両方を備え、非常に感度が高く、再現可能な高速の定量を可能にする、エバネッセント場法を使用して物質を定量する読み取り装置用の安価なキュベットを提供することである。さらに、キュベットを作製する方法を提供し、前記キュベットは日常的な診断にすぐに使用できるように処理される。 40

【0008】

上述の技術的課題の解決は、特許請求の範囲に特徴を述べる実施形態を提供することによって実現される。

【課題を解決するための手段】

【0009】

詳細には、エバネッセント場法を使用した定量を行う読み取り装置用のキュベットが提供され、このキュベットは

定量する物質を含む溶液を受ける少なくとも1つのウェルを有する少なくとも1つのウェル部と、
 ウェル部の側壁部材を支持し、ウェルの励起面を提供する少なくとも1つの基部とを備え、
 基部は光学的に透明な材料で作製され、ウェルの励起面に垂直に交差する面に等脚台形の横断面形状を有し、台形は、同じ長さの第1の辺および第2の辺、および平行の上辺および下辺を有し、
 基部はさらに、
 励起面から間隔を空け、励起面に平行な下部面であって、前記面における下部面の横断面は、台形の下辺である下部面と、
 外部の励起光源の励起光ビームを受ける第1の面であって、前記面における第1の面の横断面は台形の第1の辺である第1の面と、
 第1の面の反対側にある第2の面であって、前記面における第2の面の横断面は台形の第2の辺である第2の面と、
 を備え、
 基部は、第1の面上の入射点から励起面における反射、第2の面および下部面を介し、入射点に戻る環状の光路に沿って励起光ビームを少なくとも部分的に導くように適合される。

10

【0010】

好ましくは、ブルースター基準 $\tan \alpha = n_2 / n_1$ を満たすように第1の面に入射する励起光ビームの入射角 α を選択し、 n_2 は基部の屈折率であり、 n_1 は例えば空気など環境の屈折率である ($n_1 = 1$)。励起光ビームがその入射面で直線的に偏光する場合は、基部の第1の面で励起光ビームの反射は生じない。その代わりに、励起光ビームは屈折角度 β で基部内に屈折する。

20

【0011】

続いて、ウェルの励起面、すなわち基部と定量対象の物質を含む溶液との界面で励起光ビームが全反射することが好ましい。励起面で反射した励起光ビームは、ウェル内に貫通する電磁的なエバネッセント場を生成する。エバネッセント場は、励起面の垂直方向に、ウェル中に向かって指数関数的に減衰する。励起面に隣接する領域では、定量する物質がエバネッセント場によって最適に励起され、蛍光シグナルを観察することができる。エバネッセント場がウェル中に向かって急速に減衰すると、励起領域は、通例は励起面からウェルに向かう 100 nm 以下の空間に限定される。したがって、溶液のボリューム内では物質の最適な励起が生じない。

30

【0012】

続いて、反射した光ビームは基部の第2の面に当たる。光ビームの偏光面が変わらない（すなわち第1の面に入射する励起光ビームの偏光面と同じである）場合には、光ビーム全体が第2の面で屈折し、基部を離れる。ただし、基部の製造に使用できる多くの材料は複屈折性であり、第2の面に入射する反射した光ビームの偏光面は、最初の偏光面と一致しない。この場合は、第2の面に入射する光ビームは部分的に第2の面で反射する。この反射した光ビームは続いて基部の下部面に向かう方向に伝播し、好ましくは下部面で全反射する。

40

【0013】

本発明によれば、基部の台形形状と、基部の屈折率 n_2 は、下部面で反射した光ビームが最初の入射励起光ビームと実質的に同じ入射点または範囲で第1の面に当たるように選択する。すなわち、光ビームは、閉じた環状の光路をなすように基部内で反射し、導かれる。光ビームは励起面、第2の面、そして下部面で反射し、第1の面へこの順序で戻る。基部で反射した光ビームは、部分的に再び第1の面で反射し、第1の面で屈折した励起光ビームと同じ環状の光路に沿って伝播する。下部面で反射した光ビームも部分的に第1の面で屈折し、基部を離れる。

【0014】

50

この基部の特殊な光学的設計により、従来のキュベット設計と比較して著しい利点を得られる。具体的には、基部内における励起光ビームの伝播経路の光路長が、従来のキュベット中の励起光ビームの光路長と比べて比較的短い。任意のキュベット、特に安価な消耗用キュベットの基部は、例えばプラスチックなど光学的な不純物や欠点がある材料で作られるので、基部内の励起光ビームの光路長が短いのが好ましい。光路長が長いと、光学的不純物によって散乱した光の寄生光の強度が大きくなる。この寄生光は、ウェルに入り、溶液のボリューム中の物質を励起する可能性がある。これにより寄生的なバックグラウンド信号が発生し、検出しようとする蛍光シグナルの信号対雑音比を減少させる。本発明によるキュベットの別の利点は、従来のキュベットに比べて、比較的大きな検出角度を可能にする、すなわちより大きな角度範囲にわたって蛍光シグナルを検出できるという事実にある。

10

【0015】

好ましい実施形態によれば、台形の高さHは次の式によって与えられ、

$$H = -\frac{A \sin(\beta - \gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))} - \left(-\frac{A}{2} + \frac{A \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))} \right) \tan(\beta + \gamma)$$

式中 $(90^\circ - \gamma)$ は下辺と第1の辺との間の台形の底角であり、 n_2 は基部の屈折率であり、Aは台形の上辺の長さであり、そして

20

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right)$$

である。

【0016】

台形の高さHは、下辺に垂直な方向における台形の上辺と下辺の間の距離である。上記の関係は、屈折率が $n_1 = 1$ の気体環境内で操作されるキュベットに当てはまる。さらに、基部の第1の面に入射する励起光ビームは、ブルースター角 $\alpha_B = \arctan(n_2)$ に相当する入射角で第1の面に当たるように方向付けられるものと仮定した。 γ は、下辺の垂直方向と、台形の第1の辺および第2の辺との間の角度を定義する台形の傾斜角である。 β は、基部の第1の面で屈折する励起光ビームの屈折の角度である。

30

【0017】

第1の面への励起光ビームの入射角 α がブルースター角 α_B と一致する場合、角度 β は基部の材料の屈折率 n_2 のみに依存する。上辺の所与の長さAおよび台形の台形傾斜角 γ について、上記の式を使用して台形の高さHを計算することができる。ただし、励起光ビームの入射角 α は、正確にブルースター角 α_B に一致する必要はないことに留意されたい。代わりに、ブルースター角 α_B に相対的な α の角度偏差が生じる可能性があるが、効率が低下する。この場合、入射励起光ビームがその入射面で直線的に偏光する場合には第1の面では反射の損失が生じないので、入射角 α は、ブルースター角 α_B になるように選択することが好ましい。例えば励起光ビームの入射角 α がブルースター角 α_B から 10° ずれる場合、台形の第1の面における反射による損失は、入射励起光ビームの最初の強度 I_0 のほぼ1%になる。これは、直線的に偏光しない、従来の半導体レーザダイオードによって発される光の一部分とほぼ同じ桁に相当する。したがって、実質的な効率性を犠牲にすることなく、上記の入射角 α についての厳格な条件を緩和することができる。

40

【0018】

本発明の好ましい実施形態によれば、下辺の反射角 $\delta = 90^\circ - (\beta + \gamma)$ は、 $\arcsin(1/n_2)$ より大きく、 n_2 は基部の屈折率であり、そして

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right)$$

である。

【0019】

キュベットの基部中の励起光ビームの環状の光路に沿って、光ビームは基部の下部面で（内側に）全反射することが好ましい。このために、下辺の反射角 δ （下辺の垂直方向と下辺に入射する光ビームの間の角度）は、 $\arcsin(1/n_2)$ より大きくなくてはならない。下辺の反射角 δ は、第1の面で反射する光ビームの反射角 β の関数である。

10

【0020】

本発明の好ましい実施形態によれば、励起面の反射角 $\varepsilon = 90^\circ - (\beta - \gamma)$ は、 $\arcsin(1/n_2)$ より大きく、 n_2 は基部の屈折率であり、そして、

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right)$$

である。

【0021】

上述の実施形態と同様に、励起光ビームが基部の励起面によって（内側に）全反射することも非常に好ましい。その場合は、電磁的なエバネッセント場だけが、定量対象の物質を励起面に非常に近い空間内で励起する。ウェルのポリウム中の物質の光学的な励起は生じない。したがって、励起辺の反射角 ε は、 $\arcsin(1/n_2)$ より大きいことが好ましい。励起辺の反射角は、励起面に当たる励起光ビームと、励起面の垂直方向の間の角度である。

20

【0022】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、台形は実質的に、高さ H および幅 A および $A/H \cdot n_2$ の長方形である。励起面の垂直方向に平行な横断面における基部の長方形は、完全な長方形からのわずかな角度のずれ（数度）も包含すべきことを理解されたい。この例では、長方形の幅 A と高さ H の関係は、基部の屈折率 n_2 に対応するように選択することが好ましい。この関係は、入射励起光ビームの入射角 α がブルースター角 $\arctan(n_2)$ に一致するように選択する限り有効である。

30

【0023】

本発明のキュベットは、ガラス、石英、シリコンまたは透明ポリマ、またはこれら材料の任意の組み合わせなど、好ましくは波長範囲が $600 \sim 700 \text{ nm}$ である、光学的に透明な材料で作製される。このキュベットは、ポリスチレンなどのプラスチック、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリシクロオレフィン、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネート、SAN、シクロコポリマオレフィン（COC；例えばTOPASまたはZEONEXの商標名で流通する）などのポリオレフィン、および／またはこれらプラスチックの混合物または配合物を含むことが特に好ましい。原理的には、基本的に当該のスペクトル範囲（例えば可視範囲）の光を吸収せず、好ましくは特に蛍光体分子を結合させるための適切な被覆の塗布を可能にする任意のプラスチックまたはレジンが適する。材料は、特に射出成形のために処理特性を向上させる添加物を含むことができる。上述の材料の分散関係は知られているので、ウェルおよび基部の大きさの任意の必要な調節は計算によって行うことができる。一実施形態では、分散光によって生じる放出を排除するために、プラスチックを例えば淡青色に着色することもできる。当該の波長で基部は光学的に透明であることが好ましく、これに対しウェル部は光を吸収する材料または不透明な材料で作製することができる。プラスチックキュベットは、射出成形によって安価に得ることができ、好ましくは $1 \sim 400 \mu\text{l}$ 、特に好ましく

40

50

は $5 \sim 200 \mu\text{l}$ の反応容積を有する。本発明のキュベットは1個体として作製することが好ましい。内側の面および／または放出面、すなわち放出されたビームがキュベットから出る面を研磨して好ましくは最大で 10 nm の表面粗さにすることも利益となる可能性がある。

【0024】

ウェル部および基部は一体成形することが好ましい。例えば、ウェル部および基部は、射出成形によって形成することができる。あるいは、ウェル部と基部を別々に形成し、例えば基部の屈折率と一致する屈折率を有する接着剤を使用してそれらの部分を組み立てることも可能である。ウェル部および基部は、上述のようなポリマを含む材料で形成することが好ましい。

10

【0025】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、キュベットは、複数のウェル部を備える。例えば、ウェル部は、単一のキュベットで複数の定量を行えるように、棒形状のキュベット中に線状に配置することができる。複数のウェル部に対して1つのみの基部を提供することが好ましい。

次いで本発明について、添付図面とともに例として説明する。

【0026】

図1(a)に、本発明によるキュベットの好ましい実施形態を示す。キュベット10は、実質的に棒形状であり、キュベット10を操作し、リーダに取り付けるための操作部12を有する。図1(b)に示すように、操作部12にはその中にくぼみ14が形成されている。キュベット10の操作部12の反対側には、分析部16が形成される。分析部16は、分析する物質を含む溶液を入れるウェル20を有する複数のウェル部18を有する。ウェル20の側壁22は、分析部16全体の上に延在する基部24によって支持される。図1に示す好ましい実施形態では、基部24はウェル部18と一体形成されている。キュベットは、射出成形し、例えばポリスチレン158Kからなることが好ましい。

20

【0027】

図1(d)に、図1(a)の線B-Bに沿ったキュベットの横断面図を示す。この横断面は、ウェル部18のウェル20の肋起面30に右の角度から交差する平面でとらえたものであり、すなわち横断面は肋起面30の垂直方向と平行である。キュベット10の基部24は、外部からの肋起光源(図示せず)の肋起光ビームを受ける第1の面26を有する。第2の面は、第1の面26の反対側に配置される。基部24の下部は、肋起面30から間隔を空け、肋起面30と平行な下部面32によって形成される。図1(d)に示す断面図では、キュベット10の基部24の形は等脚台形状である。図1(d)および図2も参照すると、台形の上辺30Sは、ウェル部18の側壁部材22を横切って延長した肋起面30によって形成される。台形の下辺32Sは、下部面32によって形成される。台形の長さが等しい第1の辺26Sおよび第2の辺28Sは、それぞれ第1の面26および第2の面28によって形成される。面を参照する際は参照符号26、28、30、および32を使用し、台形の辺または脚部を参照する際は参照符号26S、28S、30S、および32Sを使用する。

30

【0028】

台形の第1の辺26Sおよび第2の辺28Sは、上辺30Sまたは下辺32Sの垂直方向に対して 2° の角度 γ だけ傾斜している。この基部24の第1の面26および第2の面28のわずかな傾きにより、成形後にキュベットを射出成形型から取り出すのを助ける。

40

【0029】

図2に、本発明の別の好ましい実施形態によるキュベットの基部24の概略的な横断面図を示す。図2に、半導体レーザダイオードであることが好ましい外部からの肋起光源の肋起光ビーム34の光路を示す。肋起光ビーム34は、基部24の第1の面26によって受け取られる。入射する肋起光ビーム34の入射角 α は、ブルースター角 $\alpha_B = \arctan(n_2/n_1)$ に一致することが好ましく、ここで n_2 は基部24の屈折率であり、 n_1 は通常は空気である周辺環境の屈折率である。この場合は $n_1 = 1$ である。【0030

50

】

励起面 30（上辺 30S）の上方に、定量する物質を含む溶液を受けるウェル 20 が形成される。図を簡潔にするために図 2 にはウェル部 18 を示していない。ただし、励起面 30 は動作上、屈折率 n_2 の基部 24 と、屈折率 n_3 のウェル 20 中の溶液との界面になることを理解されたい。【0031】

励起光ビーム 34 は、台形の第 1 の面 26（図 2 の第 1 の辺 26S）で屈折する。屈折した光ビームは続いて、励起面 30（図 2 の上辺 30S）に当たり、そこで内側に全反射して、第 2 の面 28 の方向に伝播する。入射励起光ビーム 34 が、その入射面で完全に直線的に偏光する場合は、第 1 の面 26 で入ってくる励起光ビーム 34 の反射が生じない。さらに、理想的な光学的条件（基部 24 の材料が複屈折性でない）下では、励起光ビーム 34 は、第 2 の面 28 で屈折することにより基部 24 から離れる。ただし、励起光ビームの偏光面が妨害されるように基部 24 の典型的な材料は複屈折性である。したがって、第 2 の面 28 で光ビーム 34 の部分的な反射が生じる。反射した光ビームは、下部面 32（下辺 32S）の方向に伝播し、好ましくは下部面 32 で全反射する。【0032】

基部 24 は、下部面 32 で反射した光ビームが、入射する励起光ビーム 34 が最初に第 1 の面 26 に当たるのと実質的に同じ点または領域で第 1 の面 26 に当たるように設計する。すなわち、励起面 30（上辺 30S）と、上辺 30S の垂直方向に入ってくる励起光ビーム 34 の入射点との間の距離である連結する高さ h が、下部面 32 で反射した光ビームが第 1 の面 26 に当たる高さと同じになる。このように、キュベット 10 の基部 24 は、入射励起光ビーム 34 が全く同じ開始点／領域と終点／領域を有する（閉じた）環状の光路に沿って基部 24 内で導かれるように設計する。図 2 に示す励起光ビーム 24 は、実際の励起光ビームが有限のビーム幅を有する程度まで簡略化していることを理解されたい。ビーム幅は、励起面 30 の所定の範囲を励起するように調整することが好ましい。有限のビーム幅を有する平行光の励起光ビーム 34 についても、上記の環状の光路の基準が当てはまる。【0033】

キュベット 10 の基部 24 内の環状の光路は、従来のキュベットと比べて数多くの利点がある。例えば、環状の光路の光路長（往復で $2l + 2k$ 。図 2 を参照）は、従来のキュベットの光路長よりもかなり短い。キュベットの光路の光路長を短縮することは、基部 24 に必ず存在する不純物で散乱する光の強度が下がることを意味する。さらに、基部 24 のこの設計は、蛍光を収集／検出するための視野角度または検出角度をより大きくすることを可能にする。従来のキュベット設計では蛍光は比較的小さな角度範囲でしか検出できないのに対して、本発明によるキュベット 10 の検出角度はより大きくして改良された蛍光シグナルを得ることが可能である。さらに、基部 24 の台形形状は、当技術分野で知られる射出成形技術を使用した製造が比較的容易である。詳細には、射出成形技術の精度が一般には光学的に平坦な表面に十分なものであるので、基部 24 の第 1 の面 26 および第 2 の面 28 は必ずしも光学的に研磨する必要がない。

【0034】

以下で、図 2 を参照して、本発明の好ましい実施形態の好ましい設計手順を説明する。

【0035】

基部 24 の励起面 30 および下部面 32 による励起光ビームの内側への全反射を得るために、励起面の角度 ε および下部面の角度 δ は、全反射のための個々の臨界角よりも大きくなくてはならない。したがって、

$$\varepsilon(\beta, \gamma) > \varepsilon_{\min}$$

$$\delta(\beta, \gamma) > \delta_{\min}$$

ここで

$$\varepsilon(\beta, \gamma) = 90^\circ - (\beta - \gamma)、$$

$$\delta(\beta, \gamma) = 90^\circ - (\beta + \gamma)、かつ$$

$$\delta(\beta, \gamma) = 90^\circ - (\beta + \gamma) \text{ である。}$$

全反射のための臨界角は、

$$\delta_{\min} = \arcsin(n_1 / n_2)、かつ$$

$\varepsilon_{\min} = \arcsin(n_3 / n_2)$ である。

先に述べたように、複屈折材料（例えばプラスチック材料）を使用して基部 24 を製造する場合には、基部 24 の励起光ビーム 34 の閉じた光路（環状の光路）が非常に好ましい。基部 24 内に閉じた光路を得るには次の条件を満たさなくてはならない。

【0036】

$$A / 2 + h \tan(\gamma) = l \cos(\beta - \gamma),$$

$$h = l \sin(\beta - \gamma),$$

$$A / 2 + h \tan(\gamma) = k \cos(\beta + \gamma),$$

式中、 l は、第 1 の面 26 の入射点から励起面 30 の入射点までの光路の長さであり、 k は、基部 24 の対称形の環状光路についての第 1 の面 26 と下部面 32 の入射点間の光路の長さである。 A は、第 1 の辺 26 S と第 2 の辺 28 S を結ぶ上辺 30 の長さである。 10

【0037】

上記の条件から台形の高さについての次の式が得られることが分かる。

$$H = -\frac{A \sin(\beta - \gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))} - \left(-\frac{A}{2} + \frac{A \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))} \right) \tan(\beta + \gamma)$$

対称形の環状の光路、すなわち台形の上辺 30 S および下辺 32 S での反射が個々の辺の中心で生じる環状光路を基部 24 に得る入射励起光ビーム 34 の連結する高さ h は、次の式によって与えられる。 20

$$h = -\frac{A \sin(\beta - \gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))}$$

連結する高さ h は、励起光ビーム 34 のビーム幅と一致することが好ましい。

【0038】

台形が長方形であり、入射励起光ビーム 34 がブルースター角 $\alpha_B = \arctan(n_2 / n_1)$ より小さな角度で入射する特殊な事例では、関係 A/H の単純な関係を計算することができる。長方形 ($\gamma = 0$) の場合、 30

$$\tan(\beta) = \frac{H/2}{A/2}$$

α がブルースター角 α_B に一致する場合、第 1 の面 26 で反射した光ビームと屈折した光ビームの間の角度は 90° であり、

$$\tan(\beta) = \tan(90^\circ - \alpha) = \frac{1}{\tan(\alpha)}$$

40

である。

したがって、

$$\tan(\alpha) = \frac{n_2}{n_1} = \frac{A}{H}$$

本発明の好ましい実施形態では、キュベットの励起面 30 は親水性であることが好ましい。

【0039】

例えば表面を少なくとも部分的に親水性の化合物で被覆することにより、実質的に親水性 50

の励起面 30 を得ることができる。親水性の励起面 30 を提供するために使用できる親水性化合物系は、例えば、ラジカルを生成するために励起面に X 線処理を行った上にポリスチレンを被覆してなる励起面に共有結合するアリルデキストランなどのデキストラン誘導体である。詳細には、アリルデキストランを使用して親水性の励起面 30 を作製する一例は次の通りである：キュベットであるポリスチレンチップ (^{60}Co を 26 kGray で γ 線照射) を提供し、約 150 kD の分子量を有するアリルデキストラン溶液 (水に 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 50 μl を加え、室温で 16 時間インキュベートする。この溶液を吸引し、ポリスチレンチップを 3 回水で洗浄する。ナトリウム (メタ) 過ヨウ素酸塩 (水に 30 mM) の溶液 50 μl を室温で 1 時間インキュベートした後、溶液を吸引し、ポリスチレンチップを PBS で 3 回洗浄する。次いでニュートラアビジンの溶液 (0.1 M NaHCO₃ に 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、pH 9.3) 50 μl を加え、室温で 2 時間インキュベートし、続いてシアノホウ水素化ナトリウム溶液 (5 M) 0.5 μl を加え、室温で 15 分間インキュベートし、続いてエタノールアミンの水溶液 (300 mM) 25 μl を加えて室温で 15 分間インキュベートする。これらの溶液を吸引し、ポリスチレンチップを PBS で 3 回洗浄する。ポリスチレンチップの余分な反応点は、100 μl のブロック溶液 (例えば PBS、1% BSA、0.25% Tween 20) 中で 1 時間室温でインキュベートすることによってブロックする。

10

【0040】

あるいは、親水性の励起面 30 を提供するために使用できる親水性の化合物系は、ポリエリジン／グルタルアルデヒド系である。詳細には、一例は次の通りである。キュベットであるポリスチレンチップ (^{60}Co を 26 kGray で γ 線照射) を提供し、ポリエリジンの溶液 (PBS plus (100 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄、100 mM NaCl pH 7.5) に 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 50 μl を加え、室温で 16 時間インキュベートする。溶液を吸引し、ポリスチレンチップを PBS で 3 回洗浄する。グルタルアルデヒドの溶液 (PBS plus に 1%) 50 μl を室温で 1 時間インキュベートした後、溶液を吸引し、ポリスチレンチップを PBS で 3 回洗浄する。次いで、ニュートラアビジン溶液 (0.1 M NaHCO₃ に 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、pH 9.3) 50 μl を加え、室温で 2 時間インキュベートし、続いてシアノホウ水素化ナトリウムの溶液 (5 M) 0.5 μl を加え、室温で 15 分間インキュベートし、その後エタノールアミンの水溶液 (300 mM) を 25 μl 加え、室温で 15 分間インキュベートする。これらの溶液を吸引し、ポリスチレンチップを PBS で 3 回洗浄する。ポリスチレンチップの余分な反応点は、100 μl のブロック溶液 (例えば PBS、1% BSA、0.25% Tween 20) で室温で 1 時間インキュベートすることによってブロックする。

20

30

【0041】

上述の親水性化合物による励起面の被覆は、例えばいわゆる「島構造」あるいは単分子層を形成することができる。

【0042】

本発明のさらなる好ましい実施形態によれば、反応相手 R1 である化合物をキュベットの励起面 30 に固定化 (すなわち結合し)、上記で概説したように励起面を親水性化合物で被覆することができる。用語「固定化された」は、反応相手 R1 が吸着 (「直接の吸着」) により励起面 30 に付着したことを意味することが好ましい。ただし、反応相手 R1 は、例えば抗体、抗原、ストレプトアビジン、アビジン、ニュートラアビジンなどのタンパク質、あるいはビオチンなどの化合物といった固定用化合物を介して励起面 30 に固定化することもできる。反応相手 R1 は、共有結合を介して励起面 (30) に固定化することもできる。これは、例えば、アクリル酸塩を含む励起表面のカルボジイミドによる変換によって提供することができる。

40

【0043】

一般に、本発明の意味における用語「固定化された」および「結合された」は、反応相手、または固定用化合物や蛍光体を含む化合物などの化合物を、励起面 30 などの表面または別の反応相手および／または化合物に付着させることを意味し、イオン、極性または非

50

極性の相互作用に基づく相互作用など、共有結合および非共有結合の相互作用両方を含む。

【0044】

反応相手R1または固定用化合物は、一般的な方法で励起面に配置することができる。例えば、反応相手R1または固定用化合物として機能するタンパク質を励起面に被覆することができる。反応相手R1または固定用化合物は、吸着または共有結合によって表面に結合できることが好ましい。このステップの後、ブロッキング化合物を含む別の溶液で励起面を処理することが好ましく、反応相手R1または固定用化合物を含まない励起面上の範囲を、例えば定量を行うために使用する溶液中の化合物とは基本的に反応しないブロッキング化合物としての別のタンパク質によってブロックする。

10

【0045】

本発明の好ましい実施形態では、反応相手R1または固定用化合物は凍結乾燥形態で存在する。

【0046】

本発明のさらに別の好ましい実施形態では、凍結乾燥した反応相手R1または凍結乾燥した固定用化合物を凍結乾燥したスペーサ層で覆う。スペーサ層の成分は、HEPESなどの1つまたは複数の緩衝化合物、BSAなどの1つまたは複数のタンパク質化合物、デキストランなどの1つまたは複数の親水性ポリマ、EDTAなどの1つまたは複数の錯化剤／抗凝固剤、および任意選択でトリメトプリム および／または サルファメトキサゾールなどの抗菌性化合物、およびこれらの成分の1つまたは複数を含む混合物からなる群から選択することが好ましい。さらにスペーサ層は反応相手R3を含んでもよい。

20

【0047】

本発明のさらなる好ましい実施形態では、キュベットは、凍結乾燥した反応相手R1または固定用化合物およびスペーサ層の他に、凍結乾燥したスペーサ層を覆う凍結乾燥物を含む。この凍結乾燥物は、

(A) 反応相手R1を励起面30に固定化した場合には、蛍光体を含む化合物または反応相手R3としての化合物またはそれらの混合物、または

(B) 前記固定用化合物を励起面30に固定化した場合には、反応相手R1、または蛍光体を含む化合物、または反応相手R3としての化合物、または前記成分の2つまたは3つを含むそれらの混合物

30

のいずれかを含み、

前記反応相手R3は定量する反応相手R2としての物質に対する親和力を有し、前記反応相手R3は、任意選択で蛍光体を含む部分を含み、前記蛍光体を含む化合物は反応相手R2または反応相手R3に対する親和力を有する。

【0048】

本発明の好ましい実施形態では、用語「固定用化合物」、「反応相手R1」、「反応相手R2」、および「反応相手R3」は、一般に、単クローンまたは多クローン抗体、抗原として機能するタンパク質、ストレプトアビジン、アビジンなど特定の化合物に対する親和力を有するタンパク質、および例えばビオチンなど特定のタンパク質に親和力を有する化合物など、リガンド結合系の各1部分を含む。例えば、励起面に固定化された固定用化合物はストレプトアビジンであり；反応相手R1は、反応相手R2に対する単クローン抗体であり、ストレプトアビジン／ビオチン系を介した励起面への固定化を可能にするためにビオチンが共役しており；定量する物質である反応相手R2は抗体として機能し；反応相手R3は、反応相手R2に対する単クローン抗体であり、蛍光測定を可能にするために、蛍光体を含む化合物が共役している（図3も参照）。

40

【0049】

さらに、本発明によれば、上記で定義したキュベットを作製するプロセスが提供され、このプロセスは、

(a) 反応相手R1または固定用化合物をキュベットの励起面30に固定化するステップを含む。

50

【0050】

本発明のプロセスは、さらに次のステップを含むことができる。

(b) HEPESなどの1つまたは複数の緩衝化合物、BSAなどの1つまたは複数のタンパク質性化合物、ポリ(エチレングリコール)など1つまたは複数の凍結保護物質、スクロースなどの1つまたは複数の凍結乾燥保護物質、n-オクチル-β-D-グルコピラノシドなどの1つまたは複数の界面活性剤、アスコルビン酸など1つまたは複数の酸化防止剤、デキストランなどの1つまたは複数の親水性化合物、EDTAなどの1つまたは複数の錯化剤／抗凝固剤、および任意選択で、トリメトプリムおよび／またはスルファメトキザゾールなどの静菌性化合物、およびこれら成分の1つまたは複数を含む混合物を含むことができる凍結可能な溶液(好ましくは水溶液)Iを、前記固定化された反応相手R1または固定化された固定用化合物の上に塗布するステップ、および

10

(c) 前記溶液Iを凍結して、凍結スペーサ層を得るステップ。

【0051】

本発明のプロセスのステップ(c)の後に、キュベットの凍結した内容物を凍結乾燥して、物質の定量にすぐに使用できる状態のキュベットを得ることができる。

【0052】

本発明のプロセスはさらに次のステップを含むことができる。

(d) HEPESなどの1つまたは複数の緩衝化合物、BSAなどの1つまたは複数のタンパク質性化合物、デキストランなどの1つまたは複数の親水性化合物、ポリ(エチレングリコール)など1つまたは複数の凍結保護物質、スクロースなどの1つまたは複数の凍結乾燥保護物質、n-オクチル-β-D-グルコピラノシドなどの1つまたは複数の界面活性剤、アスコルビン酸など1つまたは複数の酸化防止剤、Tween20またはBrj35などの1つまたは複数のイオン性および／または非イオン性サーファクタント、NaClなどの1つまたは複数の塩類、グリシンなどの1つまたは複数の充填剤、および任意選択で、トリメトプリムおよび／またはスルファメトキザゾールなどの静菌性化合物、およびLissamine Green B、Indigocarmine、Brilliant BlackまたはCu-Chlorophyllなどの1つまたは複数の染料、およびこれら成分の1つまたは複数を含む混合物を含むことができる凍結可能な溶液(好ましくは水溶液)IIであって、

20

(A) 反応相手R1を励起面30に固定化した場合には、蛍光体を含む化合物または反応相手R3としての化合物またはそれらの混合物、または

30

(B) 固定用化合物を励起面30に固定化した場合には、反応相手R1、または蛍光体を含む化合物、または反応相手R3としての化合物、または前記成分の2つまたは3つを含むそれらの混合物

のいずれかを含む溶液IIを前記凍結スペーサ層の上に塗布するステップ、

(e) 前記溶液IIを凍結して、凍結した溶液Iの上に凍結した溶液IIを得るステップ、および

(f) キュベット中の凍結した内容物を凍結乾燥して、物質の定量に直ちに使用できる状態の凍結乾燥物を得るステップ。

【0053】

40

反応相手R3などの次の反応相手を加える前に、スペーサ層は表面を完全に覆うべきであり、凍結乾燥させる前は凍結した固体である。通常はこの次の反応相手を加えることにより凍結したスペーサ層は溶解しないが、仮に溶解するとしてもスペーサ層の上部だけが溶解する。実施する定量の機能にとって、次の反応相手が、プロセスのどの時点にも反応相手R1または固定用化合物と直接接触しないことが不可欠である。

【0054】

本発明の意味で、用語「定量する物質」は、すでに上述したように用語「反応相手R2」に対応する。

【0055】

本発明のキュベットは、好ましくは免疫学的反応を介した物質の質的および／または量的

50

な判定を行うために、医学的または獣医学的診断、食物分析、環境分析、化学的または生物学的分析、あるいは発酵プロセスの分析の諸方法で使用するすることができる。

【0056】

本発明によるキュベットを使用した方法は、次のステップを含む。

【0057】

固定化した反応相手 R 1、または固定化した固定用化合物、または凍結乾燥したスぺーサ層と接触させて、反応相手 R 2 としての定量対象の物質と、(A) 反応相手 R 1 を励起面 30 に固定化した場合には、蛍光体を含む化合物、または反応相手 R 3 としての化合物、またはそれらの混合物、または (B) 前記固定用化合物を励起面 30 に固定化した場合には、反応相手 R 1、または蛍光体を含む化合物、または反応相手 R 3 としての化合物、または前記成分の 2 つまたは 3 つを含むそれらの混合物、のいずれかを含む溶液を配置するステップであって、固定化された反応相手 R 1 または固定化された固定用化合物の上に錯体が形成され、前記錯体は、

(i) 反応相手 R 1、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 2、または

(i i) 反応相手 R 1、反応相手 R 2、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 3、または

(i i i) 反応相手 R 1、反応相手 R 2、反応相手 R 3、および蛍光体を含む化合物、または

(i v) 固定用化合物、反応相手 R 1、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 2、または

(v) 固定用化合物、反応相手 R 1、反応相手 R 2、およびそこに共役した蛍光体を含む部分または蛍光体を含む化合物を含む反応相手 R 3、または

(v i) 固定用化合物、反応相手 R 1、反応相手 R 2、反応相手 R 3、および蛍光体を含む化合物

のいずれかを含むステップと、

前記錯体を介して励起面 30 に結合した蛍光体を光源のエバネッセント場（すなわち、外部からの励起光源の励起光ビームを印加するとキュベット（または基部）内に生成されるエバネッセント場）によって励起し、生じた蛍光を測定するステップ。

【0058】

本発明のより好ましい実施形態で、この方法は、凍結乾燥した反応相手 R 1 または固定用化合物、凍結乾燥したスぺーサ層、および (A) 反応相手 R 1 を励起面 30 に固定化した場合には、蛍光体を含む化合物または反応相手 R 3 としての化合物またはそれらの混合物、または (B) 前記固定用化合物を励起面 30 に固定化した場合には、反応相手 R 1、または蛍光体を含む化合物、または反応相手 R 3 としての化合物、または前記成分の 2 つまたは 3 つを含むそれらの混合物、のいずれかを含むキュベットを使用し、前記方法は次のステップを含む。

【0059】

キュベット中の凍結乾燥した内容物と接触させて、反応相手 R 2 としての定量対象の物質を含む溶液を配置するステップであって、上記で概説したように固定化した反応相手 R 1 または固定化した固定用化合物の上に錯体が形成されるステップ、および前記錯体を介して励起面 30 に結合した蛍光体を光源のエバネッセント場によって励起し、生じる蛍光を測定するステップ。

【0060】

本発明の好ましい実施形態では、キュベットで使用する方法は、色形成システムの代わりに蛍光体を使用した E L I S A 法に基づく。

【0061】

本発明によれば、用語「錯体」および「共役」は、2 つ以上の好ましくは化学的または生物学的な物質間の分子の連結または結合として理解される。錯体または共役は、特に抗原抗体反応によって好まれる選択的および／または特異的な反応によって形成されることが

10

20

30

40

50

好ましい。

【0062】

本発明によれば、用語「反応」は、2つ以上の反応相手の共有結合および非共有結合の相互作用をともに含み、両タイプの相互作用は錯体中で逐次生じることができる。非共有結合の相互作用は、例えば、反応相手のヴァンデルワールスの相互作用、極性および／またはイオン相互作用を意味することができる。本発明において、用語「反応相手」は、一般に別の物質に対する親和力を有する化合物を意味する。

【0063】

本発明の方法の好ましい一実施形態では、反応相手R2である定量する物質はそれ自体で、表面に固定化された反応相手R1に対する親和力を有することができ、したがってその反応相手R1に直接結合することができる。例えば定量する物質が抗体である場合は、その抗体に固有の抗原を表面上に配置することができ、その逆も可能である。 10

【0064】

別の好ましい実施形態では、定量する物質、すなわち反応相手R2自体は、（基本的に）表面上の固定用化合物に対して親和力を持たないか、またはわずかな親和力しか持たない。この場合、表面に接触させて配置する溶液は、例えば、反応相手R1を含む別の化合物と、定量する物質の結合部位を含む。反応相手R1は、表面上の固定用化合物と結合することができ、したがって定量する物質を間接的に表面に固定化する。この別の連結は、定量する物質と、表面の固定用化合物間のブリッジ要素として機能する。例えば、表面上の固定用化合物としてアビジンが存在することができる。したがってもう一方の化合物（すなわち反応相手R1）は、定量する物質の結合部位の他に、例えば、表面に固定化されたアビジンに結合できるビオチンを含む。この実施形態には、アビジン（またはストレプトアビジン）を被覆した表面が、多くの抗体および抗原と異なり、より良好に凍結乾燥させることができ、また乾燥または凍結した形態において非常に安定しているという利点がある。また、アビジン（またはストレプトアビジン）／ビオチン系は、非常に高い解離定数KDを有する。また、アビジン（またはストレプトアビジン）を被覆した表面上で一連の異なる定量を行い、定量する物質の上にある、溶液を被覆した表面と接触させて配置されたもう一方の化合物だけを定量することも可能である。 20

【0065】

図3に、本発明で使用する方法のこの実施形態を概略的に示す。励起面30と接触させて配置した溶液中には、互いに隣接して、定量する物質（すなわち反応相手R2）40、蛍光体を含む部分または化合物からなる反応相手R3 44、および固定用化合物48に対する親和力がある反応相手R1 46が存在する。固定用化合物48は励起面に結合する。反応相手R3および反応相手R1は、定量する物質（共役50）に吸着し、共役50は、反応相手R1を介して、表面上の固定用化合物48に結合して錯体52を形成する。したがって、蛍光体を含む反応相手R3を含む錯体52が励起面30に結合し、エバネッセント場54の蛍光を測定することにより定量することができる。 30

【0066】

本発明における方法のこの実施形態には、アビジン（ストレプトアビジン）／ビオチン系の他に、例えばタンパク質が例えばヒスチジン、ヒスチジントグ、レクチン、および／またはジゴキシゲニンのような1つまたは複数のリガンドの選択的および／または特異的な結合部位を有するすべてのリガンドまたはリガンド結合系が適しており、また上記で概略したように当然抗原／抗体系も適する。 40

【0067】

本発明によれば、用語「蛍光体」、「蛍光体を含む化合物」、および「蛍光体を含む部分」は、蛍光性であれば特に限定は示さず、例えば、フィコビリソーム、フィコビリタンパク質、低分子量の蛍光を発する化学化合物または量子ドットなどの蛍光を発する化合物を含む。本発明によれば、Allophycocyanine（APC）、Cryptofluor Crimson、またはCryptofluor Redなどのフィコビリタンパク質を、蛍光を発するタンパク質として使用することができる。蛍光を発する低分 50

子量化合物の例として、Cy 5 または BODIPY (4, 4-difluoro-4-borata-3a, 4a-diaza-s-indazene を有する蛍光) を挙げることができる。600~700 nm の波長範囲の吸収が効率的な蛍光を発する染料が好ましい。

【0068】

蛍光体に代えて、蛍光体の前駆物質である化合物を使用することができ、例えば pH 値を変えるか、または保護基を分割することにより、測定プロセスの前にその化合物から蛍光体を放出する。

【0069】

本発明によれば、用語「蛍光体」および「蛍光体を含む化合物」および「蛍光体を含む部分」は、燐光を発する化合物も含む。そのような燐光を発する化合物を蛍光体として使用する場合は、励起から時間差をもって放射される燐光を判定する。したがって、放射時間を測定時間と分離することが可能である。

10

【0070】

蛍光体を含むこの化合物は、定量する物質の結合部位も有することができる。例えば、蛍光体は、反応相手 R3 としての抗体に結合した状態で入手することができる。この蛍光体を含む抗体は、抗原である定量する物質、例えばタンパク質と抗原抗体反応で反応できることが好ましい。

【0071】

別の実施形態では、定量する物質（すなわち反応相手 R2）自体が、蛍光体を含む化合物として提供される。この実施形態では、特に検出限界が低いことを特徴とする競合アッセイを行う。

20

【0072】

本発明の方法を用いると各種の物質を検出することができる。この方法は、特に、タンパク性または非タンパク性のホルモンなどのホルモン、抗原、抗体、またはハプテンなどのタンパク質、DNS、オリゴヌクレオチドまたは RNA、医薬品、ウイルス、バクテリアなどのヌクレイン酸のような生物学的に能動的な物質を定量するのに適している。しかし、この方法は、環境毒物、毒素、乱用薬物、治療用薬物などの検出にも使用することができる。本発明の方法は、例えば、血液など人体体液中の HIV 抗体、HBC 抗体、または HCV 抗体などの免疫グロブリンを検出するための抗原と抗体の二重の定量も含む。

【0073】

免疫反応によって定量対象の物質を検出することが特に好ましい。

30

【0074】

表面に結合した蛍光体をエバネッセント場で励起する際には、キュベット／溶液相の境界で全反射が起こるように、光ビームをある角度で表面の下部に向ける。これにより、溶液中の表面の上方にエバネッセント場が形成され、これは数百ナノメートルまで流体中に侵入することができる。本発明によれば、表面の上 400 nm、好ましくは 200 nm、特に好ましくは 50~150 nm の高さにエバネッセント場が形成されるように、少なくとも 60°~90° の入射角が好ましい。このエバネッセント場内で、発された光が適切な蛍光体を励起することができる。放射された蛍光を例えば増倍型光電管で検出し、評価する。

40

【0075】

エバネッセント場には表面に結合した蛍光体だけがあるので、この結合した蛍光体だけが最適に励起され、光子を放出する。蛍光体を含み、溶液中で結合していない化合物はエバネッセント場の領域に存在せず、したがって基本的に励起されず、また基本的に光子も放出しない。したがって、この仕組みにより、それより前の分離および／または洗浄ステップなしで、上澄み溶液中に蛍光体がある状態で表面に結合した蛍光体を量的に判定することが可能になる。

【0076】

光源には単色光を使用することができる。好ましくは蛍光体の放出を妨害しない波長の光を使用すべきである。その光が少なくとも 635 nm の波長を発するレーザが特に光源と

50

して好ましい。詳細には、上澄み溶液が血清である場合、血清に固有の蛍光はおよそ 580 nm なので、600～700 nm の波長を発するレーザが好ましい。

【0077】

本発明の一実施形態では、表面に結合した蛍光体の付加は、時間とともに進行する反応により直接（実時間で）測定することができる。表面に結合した蛍光体の量は蛍光体を含む化合物の元の量に正比例するので、本発明の方法は、さらに追加的な洗浄および／またはピペティングステップを必要とせずに、溶液にある反応物質を実時間で量的に判定することを可能にする。

【0078】

蛍光体の吸収係数および放射特性は非常に良好なので、検出限界は小さい。わずか数分の後に反応を質的および／または量的に算定することができる。 10

【0079】

ただし、キュベット中の光ビームの散乱は理想的でなく、分散光を低減する物理的措置をとった場合でも問題を呈する。散乱により、光がキュベット中のボリュームにも入り、そこでバックグラウンド蛍光を生じさせる。本発明で、用語「ボリューム」は、蛍光体を含む結合していない化合物を含む、エバネッセント場の外側にある液体と解釈する。光ビームの偏光は、プラスチック製キュベットとガラス製キュベットの両方にも入り込む。この結果、特に、脱共役の際に励起光の反射が生じ、いわゆる迷走光が生じ、この迷走光が、ボリュームおよび表面の散乱効果とともに、ボリュームの励起を生じさせる可能性がある。 20

【0080】

本発明によれば、ボリューム中の蛍光体の励起は、表面と接触させて配置する溶液に、蛍光体の吸収および／または放出範囲内の吸収度を有する少なくとも 1 種の染料が添加されている場合にさらに抑制することができる。

【0081】

ボリュームに加えられた染料の吸収度は、本発明では蛍光体の吸収および／または放出範囲に連係する。単一の染料または染料の混合を使用することができる。蛍光体の吸収範囲は、一般に、使用する光源の波長と相関する。染料がそのスペクトル範囲で最大の吸収度を有する必要はなく、吸収度スペクトル中の肩で充分である。例えば、APC または Cy5 のような蛍光体を使用する場合、使用する染料は、例えば Brilliant Blue FCF など、600～700 nm の吸収を有することができる。加える染料の濃度は、放射される光の周波数によって決まる。貫通光が基本的に表面の上方 1 mm 内で吸収されるように、染料の濃度はその染料に応じて調整することができる。染料の最適な濃度を求めるために、初めにボリュームの蛍光およびエバネッセント場の蛍光、すなわち表面の蛍光を様々な染料濃度について測定する。次いで、表面の蛍光とボリュームの蛍光の比を染料の濃度に対してプロットする。この比の最大値が最適の染料濃度に相当する。本発明によれば、「信号／雑音比」は、表面の蛍光（シグナル）対ボリュームの蛍光（「ノイズ」）の比である。「基本的に吸収される」とは、強度の相殺が 70 % であり、好ましくは 80 % であり、特に好ましくは少なくとも 90 % であることを意味することができる。 30

【0082】

例えば、Brilliant Blue FCF を染料として使用する場合、ボリュームの蛍光の 95 % 以上を抑制するには 0.04 mM の濃度で充分である。例えば、Brilliant Blue FCF の濃度は少なくとも 0.001 mM であることが好ましい。 40

【0083】

寸法が小さく低価格であることにより、本発明のキュベットは日常的な診断および分析に適する。実際の応用では、このタイプのキュベットはあらかじめ作製し、特殊なラベルで閉じて市販することができる。すでに上記で概説したように、事前の作製には、キュベットの表面に第 1 の反応相手を被覆すること、および必要な場合には次いで被覆されていない箇所をブロックすることが含まれる。被覆済みのキュベットが凍結乾燥または乾燥 50

した状態で提供されることが特に好ましい。通し番号を付したキュベットを提供することにより、製造ロット、検出反応、およびサンプルの明確な帰属をいつでも得ることが可能になる。

【0084】

引用することのできる具体的な用途の例は、E L I S Aの原理に基づく各種の定量である。E L I S Aテストは、抗原または抗体の濃度を判定するために使用することができる。具体的な抗原の例は、H B V Sタンパク質、H C G、心臓マーカタンパク質、およびステロイドホルモン、ペプチドホルモン、甲状腺ホルモンなどのホルモンである。H I V抗体定量、S型肝炎抗体定量、または抗体仲介型のヘパリン起因血小板減少など、以前の感染または特定の病気の兆候を示す抗体定量を上げることができる。本発明のキュベットを使用して、飲料水中のアトラジンなど植物保護製品の検出も可能である。 10

【0085】

検出用の試薬をラベルすることができ、その試薬がある受容体に対する固有のリガンドである場合には、本発明のキュベットを使用して非免疫的な定量も行うことができる。したがって、受容体分子がキュベットの表面に結合し、ラベルされたリガンドまたはホルモンなどが特異的にその受容体に結合することができる。ホルモン受容体は、天然の受容体または組み換え型の受容分子であることができる。これは、薬品が蛍光的に誘導され、受容体タンパク質がキュベットの表面に固定化された、医薬品の競合アッセイである可能性がある。あるいは、薬品を受容体の表面に固定化し、蛍光ラベルした受容体が結合する。この応用例は、気晴らしのための麻薬にも使用することができる。 20

【0086】

また、本発明のキュベットでR N AまたはD N Aの検出も行うことができる。キュベットの表面に固定化された相補鎖がラベルされたオリゴヌクレオチドを捕捉することができる。オリゴヌクレオチドは例えばA P Cでラベルすることができる。

【0087】

本発明によるキュベットを使用すると、上記で定義した物質を定量する方法により、驚くべきことに、一般的なE L I S A法に比べて分析感度が少なくとも10倍になり、一般的なE L I S A法に比べて分析時間が少なくとも10分の1になる。

【0088】

以下で本発明について実施例を使用してさらに説明するが、言うまでもなくこれは特許請求の範囲によって付与される保護範囲を限定しない。 30

【実施例】

【0089】

以下の実施例では、10分(=600秒)間にわたり1秒ごとに光子を測定した。通常は、0分の開始時と10分後に計数した光子を測定し、差を計算する。この差は正であり、定量で測定される抗原に正比例する。例えば10000個の光子などいくつかの統計事象が認められる場合は、nの平方根の3倍として統計誤差を計算する。この例では、 3×10000 の平方根 $= 3 \times 100 = 300$ 個の光子になる。

【0090】

実験では、これら2つの時間点だけではなく、この10分間に600の時間点で測定を行っている。それらの点は直線に沿う。ここで線形回帰関数でトレンド関数を生成し、線形曲線を計算すると、99.99%の信頼区間の総合誤差は約30光子に低下する。これは、2点の計算によって実現される300光子の誤差の10分の1であることを意味する。したがって、この線形の回帰により分析の検出限界が10倍向上する。 40

【0091】

実施例1：ストレプトアビジン表面へのビオチン-HRP結合のキネティクス

N u n c社のm a x i s o r pマイクロプレートにニュートラアビジン(0.1MのN a H C O 3に10 μ g / m l)で室温で終夜被覆した。次いでマイクロプレートをT B S T (10mM T r i s p H 7.5、150mM N a C l、0.1% T w e e n 20)で3回洗浄した。ビオチン化したホースラディッシュペルオキシダーゼ(「H R P」。P i e r 50

c e 社から市販) の溶液 (T B S T に 10 ng/ml) をウェルに加え、1 分～6 時間までの様々な時間にわたってインキュベートした。ウェルを T B S T で 6 回、T B S (10 mM Tris pH 7. 5、 150 mM NaCl) で 3 回洗浄した。T M B (K P L 社から市販) で結合 H R P を明らかにし、室温で 10 分間インキュベートした後に 630 nm で光学濃度を測定した。この結果を図 4 に示す。

【0092】

図 4 は、マイクロプレートにビオチン化 H R P が結合する時間の関数としての O D 630 のグラフである。10 分後におよそ 0. 75 の O D が認められる。6 時間の反応時間経過後の最大 O D は 2. 10 である。10 分後に、拡散に基づく定量により H R P について最大値のおよそ 30 % のシグナルが示され、これにより有意味の結果を測定することが可能になる。例えば蛍光検出システムが利用できる場合は、結合がより少ないレベルを補償することができる。なお高速かつ高感度の定量を得ることができる。

【0093】

実施例 2：マウス I g G の滴定

(A) E L I S A 法

N u n c 社の m a x i s o r p マイクロプレートのウェルを、ストレプトアビジンの溶液 (P B S p l u s ($100 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 100 mM NaCl pH 7. 5) に $10 \mu\text{g/ml}$) で室温で終夜被覆した。次いで溶液を吸引し、ウェルを P B S ($10 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 137 mM NaCl pH 7. 4) で 4 回洗浄した。残る反応点をブロックするために、P B S p l u s に 1 % B S A の溶液をウェルに加え、1 時間放置した。

【0094】

1 ステップおよび 3 ステップの E L I S A 手順を行った。この定量は、マウス I g G を検出するサンドイッチ E L I S A 法である。

【0095】

0. 025 % の T w e e n 20 を含む 1 % の B S A P B S p l u s に、ビオチン化したヤギ抗マウス I g G (J a c k s o n 社から市販) の溶液 $1 \mu\text{g/ml}$ 、ヤギ抗マウス H R P (J a c k s o n 社から市販) $8 \mu\text{g/ml}$ 、および様々な量のマウス I g G (J a c k s o n 社から市販) を室温で 0. 5 時間インキュベートすることにより 1 ステップ E L I S A を行った。

【0096】

0. 025 % T w e e n 20 を含む 1 % B S A P B S p l u s 中でビオチン化したヤギ抗マウス I g G $1 \mu\text{g/ml}$ を 1 時間インキュベートし、続いて P B S による洗浄を 3 回行うことによって 3 ステップ E L I S A を行った。次いで同じ緩衝液中で様々な量のマウス I g G をインキュベートし、次いで P B S で 3 回洗浄し、続いて同じ緩衝液中でヤギ抗マウス H R P $8 \mu\text{g/ml}$ を 1 時間インキュベートした。

【0097】

これらのインキュベートステップ後の手順は両方の E L I S A 法で同じであり、P B S で 5 回洗浄し、次いで着色のために T M B を 10 分間加え、 630 nm で O D を読み取った。結果を図 5 (A) に示す。

【0098】

図 5 (A) にサンプル中のマウス I g G 濃度の関数としての O D 630 のプロットを示す。マウス I g G の検出限界は、40 分経過後の 1 ステップ E L I S A ではおよそ 3 ng/ml 、あるいは 3 時間経過後の 3 ステップ E L I S A では 1 ng/ml である。

【0099】

実施例 2：マウス I g G の滴定

(B) 蛍光定量

ポリスチレンから射出成形で製造された、本発明のキュベットの一例としての蛍光チップをコバルト 60 線源でガンマ線照射した。結果得られるポリスチレン表面をタンパク質吸着のために活性化する。ウェルを P B S p l u s (100 mM KPO_4 、 100 mM

NaCl pH 7.5) に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトアビジンの吸着によって室温で終夜被覆した。溶液を吸引し、ウェルを PBS (10mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 137mM NaCl pH 7.4) で 4 回洗浄した。残りの反応点をブロックするために、PBSP plus 中に 0.25% Tween 20 の溶液をウェルに加え、1 時間放置した。

【0100】

マウス IgG を検出する 1 ステップの免疫検定を行い、エバネッセント励起により結合蛍光を測定した。

【0101】

0.05% の Tween 20 を含む 1% BSA PBSP plus 中の、ビオチン化したヤギ抗マウス IgG $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、活性化 APC (Intergen から市販) の供給者によって与えられる手順に従って作製したヤギ抗マウス APC の共役 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、および様々な量のマウス IgG の混合物をポリエチレン製の蛍光チップに加えた。次いでチップを直接リーダの中に置き、蛍光光子の放出を時間の経過とともに監視し、記録した。反応が進行すると、蛍光分子が表面に結合し、測定される蛍光が時間とともに増大する。時間 0 と 10 分後に光子数を測定し、差を計算することにより、エバネッセント場によって励起された表面における生化学反応によるいくつかの光子数が得られる。この光子の増加は、サンプル中の抗原濃度に依存する。チップごとにバックグラウンドに微小なばらつきがある。このチップごとのばらつきは、10 分間の測定時間中には変化せず、したがって結果には現れない。0.1 ~ $10000 \text{ng}/\text{ml}$ の範囲にわたってマウス IgG の量を滴定した。結果を図 5 (B) に示す。

【0102】

図 5 (B) は、サンプル中のマウス IgG 濃度の関数としての 10 秒間隔で測定された数として表した蛍光光子を示す。

【0103】

検出限界は、装置内の光子のバックグラウンド放出の平方根の 3 倍に相当する、測定される光子の統計的変動によって与えられる。この例ではバックグラウンド蛍光は 50000 であり、これは $3 \times 707 = 2121$ 個の統計的変動をもたらす。

【0104】

0.1 ng/ml のマウス IgG を含むサンプルは、装置の検出限界をかなり上回る 50000 光子のシグナルを生じさせた。したがって、実施例 2 (A) で述べたように、同等の ELISA 法に比べて 10 倍感度が高いシステムである。

【0105】

実施例 3：異なる基質におけるマウス IgG の滴定

実験条件と試薬は、実施例 2 (B) に示すものと同じである。サンドイッチアッセイでは、ビオチン化したヤギ抗マウス IgG $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、活性化 APC の供給者によって与えられる手順に従って作製したヤギの抗マウス APC 共役 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、および様々な量のマウス IgG (Jackson 社から市販される) の混合物を使用する。測定は、(a) 0.05% Tween 20 を含む 1% の BSA PBSP plus ; および (b) 人間の EDTA 血漿、の 2 つの異なる基質で行った。結果を図 6 に示す。

【0106】

図 6 は、サンプル中のマウス IgG 濃度の関数として 1 秒間隔で測定した数として表した蛍光光子を示す。

【0107】

BSA、PBS、Tween 20 の合成混合物か、人間の血漿などの天然の基質を使用して、両方の緩衝系で結果を比較することができる。血漿は、顕著な自己蛍光は生成しないと思われる。

【0108】

実施例 4：キュベット中の凍結乾燥物の作製

本発明のキュベットの一例であるポリスチレンチップを提供し、ポリスチレンへの吸着に

10

20

30

40

50

よってアビジン層を作製した。あるいは、上述の方法の1つ（ポリエルリジンまたはアリルデキストラン）を使用した。一般的な文脈で、用語「アビジン」は、アビジン、ストレプトアビジン、またはニュートラアビジン、または任意の他のビオチン結合分子を包含する。溶液 I（例えば 20 mM H e p e s pH 7. 5、1 % B S A、1 % デキストラン T 7 0、10 mM E D T A、および任意選択で 32 mg / ml のトリメトプリムおよび 160 mg / ml のスルファメトキサゾール）50 μ l / ウェルを加え、-20 $^{\circ}$ C で 4 時間凍結した。溶液 I はスぺーサ層を形成する。次いで、溶液 I I（例えば 20 mM H e p e s pH 7. 5、5. 1 % B S A、1 % デキストラン T 7 0、2 % グリシン、1 % ブリジ、0. 5 % T w e e n 2 0、100 mM N a C l、および任意選択で 32 mg / ml のトリメトプリムおよび 160 mg / ml のスルファメトキサゾール、および L i s s a m i n e G r e e n B、I n d i g o c a r m i n、B r i l l i a n t B l a c k B N、あるいは C u - C h l o r o p h y l l i n などの染料）10 μ l / ウェルを凍結したスぺーサ層の上に加え、-20 $^{\circ}$ C で 4 時間凍結させた。溶液 I I は、例えば 50 μ g / ml のヤギの抗マウス I g G - X L - A P C または 5 μ g / ml のヤギの抗マウス I g G など反応性免疫グロブリンを含む。最後に、チップを凍結乾燥してすぐに使用できる状態のキュベットを得た。

10

【符号の説明】

【0109】

- 10 キュベット
- 12 操作部
- 14 くぼみ
- 16 分析部
- 18 ウェル部
- 20 ウェル
- 22 ウェルの側壁部材
- 24 基部
- 26 第1の面
- 28 第2の面
- 30 肋起面
- 32 下部面
- 26 S 台形の第1の辺
- 28 S 台形の第2の辺
- 30 S 台形の上辺
- 32 S 台形の下辺
- 40 反応相手 R 2
- 44 反応相手 R 3
- 46 反応相手 R 1
- 48 固定用化合物
- 50 共役
- 52 錯体
- 54 エバネッセント場

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1（a）】本発明によるキュベットの好ましい実施形態の平面図である。

【図1（b）】図1（a）の線 A - A に沿ったキュベットの横断面図である。

【図1（c）】図1（a）に示すキュベットの下端側の側面図である。

【図1（d）】図1（a）の線 B - B に沿った横断面図である。

【図1（e）】図1（a）の線 C - C に沿ったキュベットの横断面図である。

【図1（f）】図1（a）に示すキュベットの透視図である。

【図2】本発明の別の好ましい実施形態によるキュベットの基部の略図であり、光ビーム

50

の光路を概略的に示している。

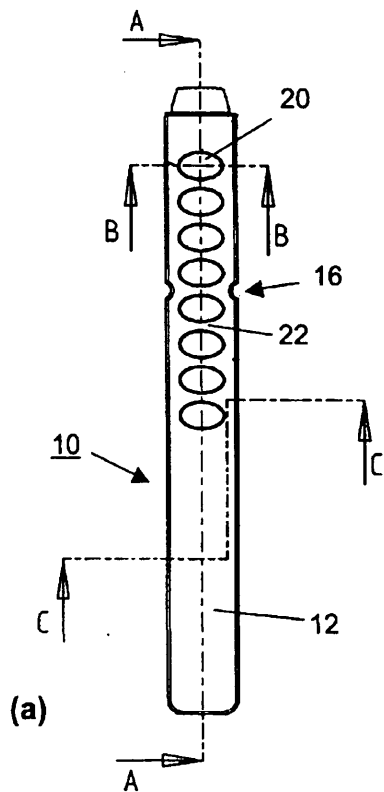
【図 3】本発明のキュベットを使用して物質を定量する方法の一実施形態の略図である。

【図 4】ストレプトアビジン表面に結合するビオチン HRP のキネティクス図である。

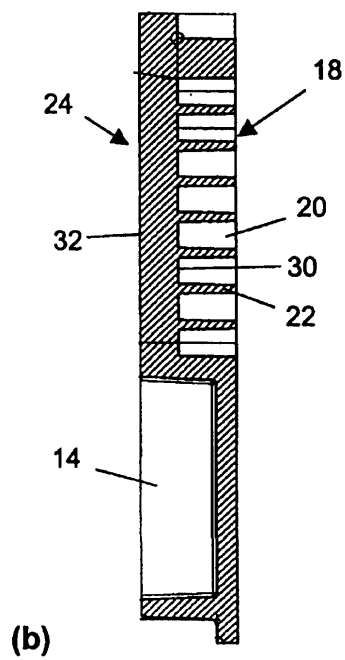
【図 5】(A) は E L I S A 法によるマウス I g G 滴定の図であり、(B) は蛍光定量によるマウス I g G 滴定の図である。

【図 6】様々な基質におけるマウス I g G の滴定の図である。

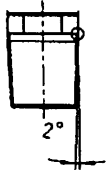
【図 1 (a)】



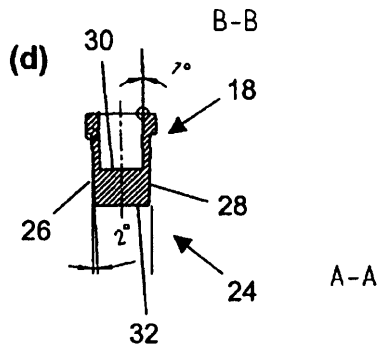
【図 1 (b)】



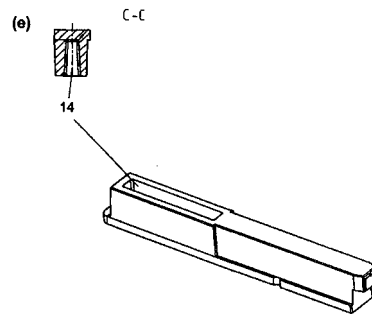
【図 1 (c)】



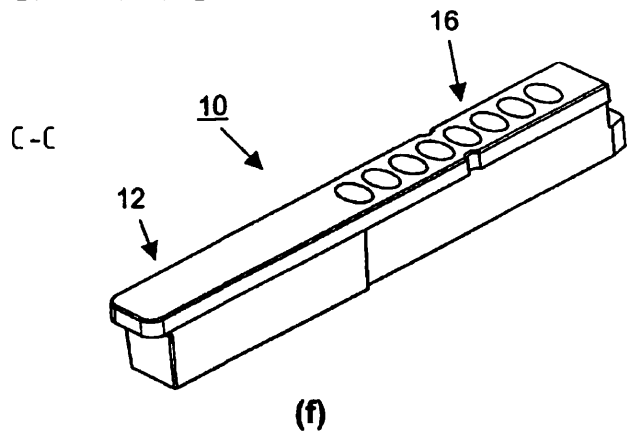
【図 1 (d)】



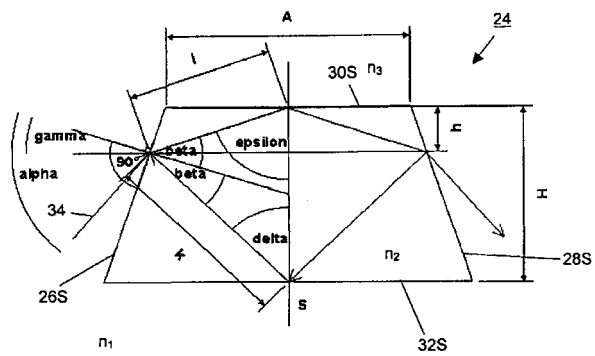
【図 1 (e)】



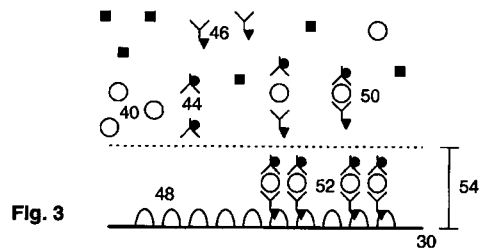
【図 1 (f)】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

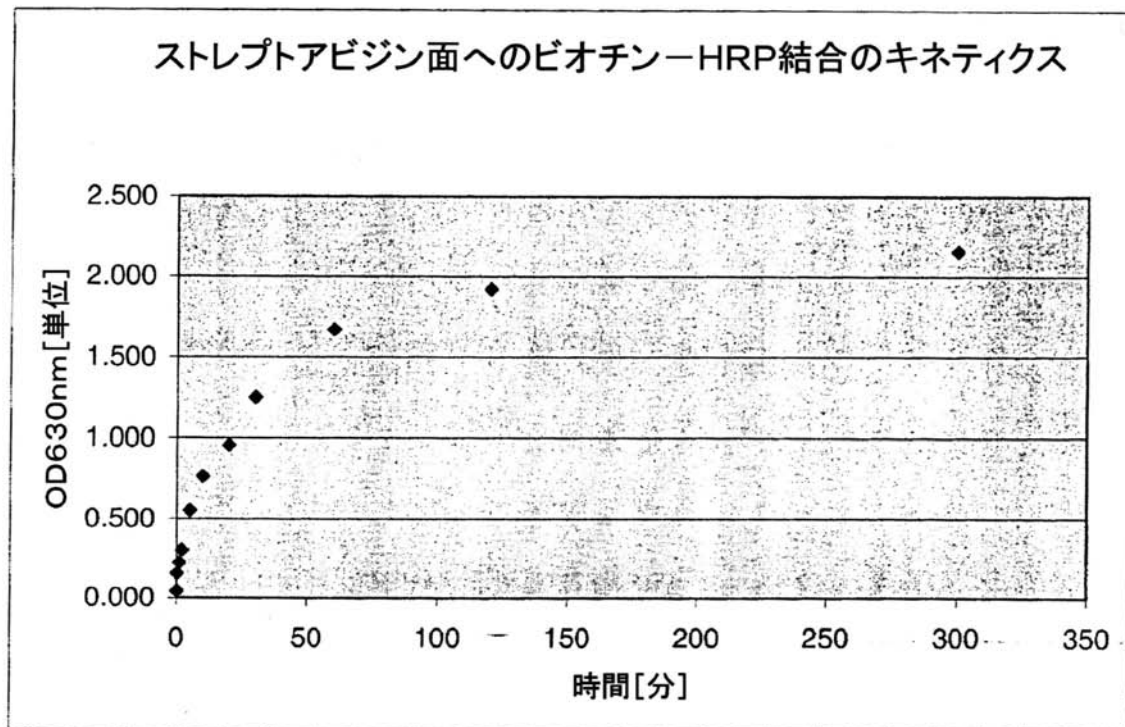


Fig. 4

【図 5】

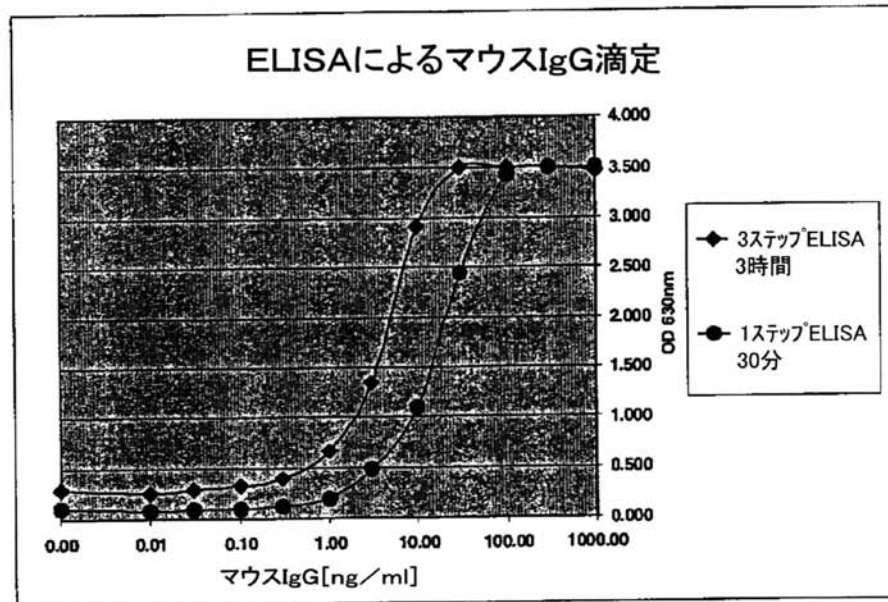


Fig. 5(A)

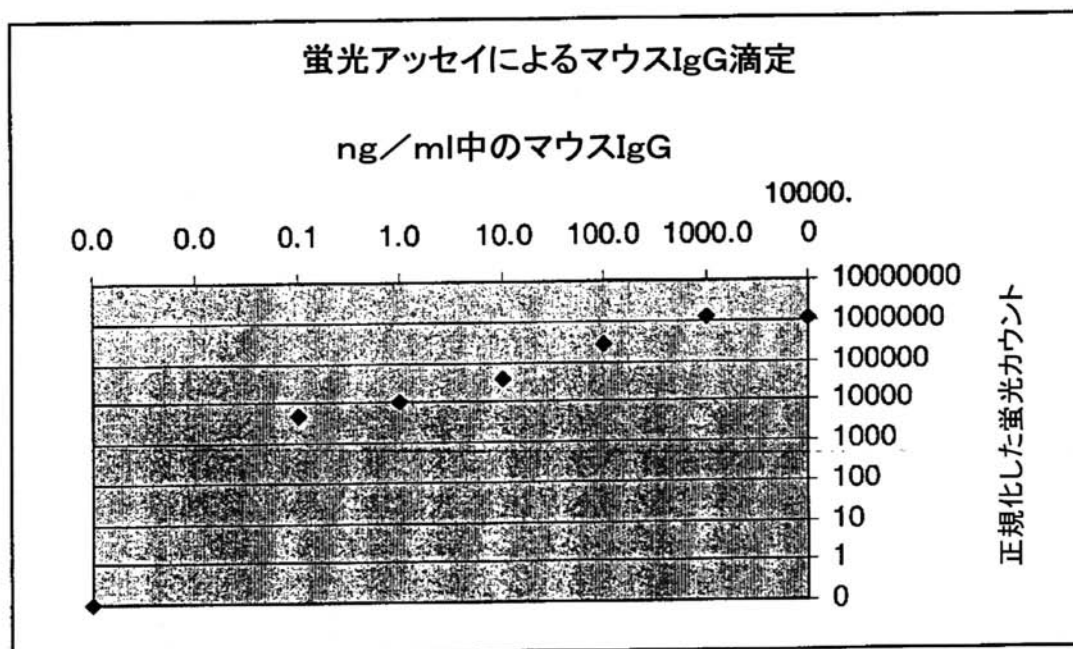


Fig. 5(B)

【図 6】

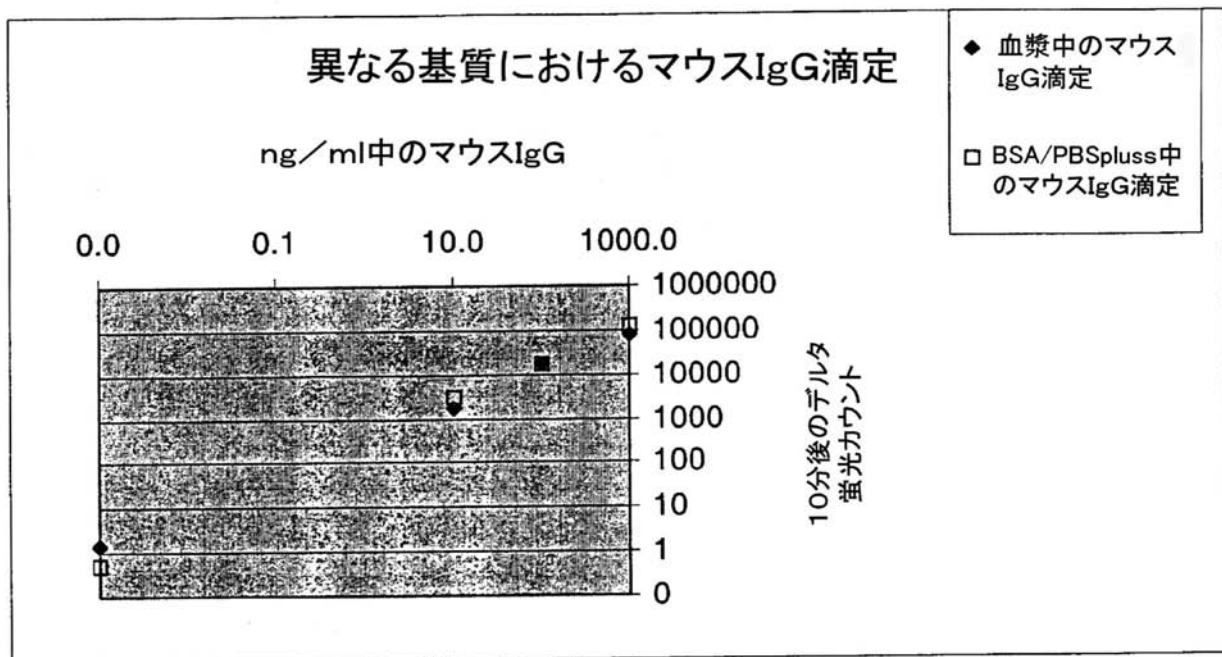


Fig. 6

フロントページの続き

- (71)出願人 300039133
ロイツェ エレクトロニク ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ウント
コンパニー
Leuze electronic GmbH + Co
ドイツ連邦共和国 オーヴェン テック インデアブライケ 1
In der Braike 1, D-73277 Owen/Teck, Germany
- (74)代理人 100065215
弁理士 三枝 英二
- (74)代理人 100076510
弁理士 掛樋 悠路
- (74)代理人 100086427
弁理士 小原 健志
- (74)代理人 100090066
弁理士 中川 博司
- (74)代理人 100094101
弁理士 館 泰光
- (74)代理人 100099988
弁理士 斎藤 健治
- (74)代理人 100105821
弁理士 藤井 淳
- (74)代理人 100099911
弁理士 関 仁士
- (74)代理人 100108084
弁理士 中野 睦子
- (72)発明者 シュワラー マンフレッド
スイス国 1785 クレシア オウブレジ
- (72)発明者 クアピル ゲラルド
ドイツ国 73277 オーヴェン/テック レーベンヴェッグ 1
- Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA02 DA06 EA01 FA03 KA02 KA05 KA09
2G057 AA04 AB01 AB04 AC01 BA01 BB01 BB02 BB04 BB06 BD04

【外国語明細書】

1 Title of Invention

A cuvette for a reader device for assaying substances using the evanescence field method

2 Claims

1. A cuvette (10) for a reader device for assays using the evanescence field method comprising:

- at least one well portion (18) having at least one well (20) for receiving a solution containing substances to be assayed; and
- at least one base portion (24) supporting side wall members (22) of the well portion (18) and providing an excitation surface (30) of the well (20);

wherein the base portion (24) is made of an optically transparent material and has a cross-sectional shape of an isosceles trapezoid in a plane (B-B) perpendicularly intersecting the excitation surface (30) of the well (20), the trapezoid having first and second sides (26S, 28S) of equal length and parallel base and top sides (32S, 30S);

wherein the base portion (24) further comprises

- a base surface (32) being spaced apart from and parallel to the excitation surface (30), the cross section of the base surface (32) in said plane (B-B) being the base side (32S) of the trapezoid;
- a first surface (26) for receiving an excitation light beam (34) of an external excitation light source, the cross section of the first surface (26) in said plane (B-B) being the first side (26S) of the trapezoid; and
- a second surface (28) opposite to the first surface (26), the cross section of the second surface (28) in said plane (B-B) being the second side (28S) of the trapezoid;

and wherein the base portion (24) is adapted to guide the excitation light beam (24) at least partially along an optical round path from a point of incidence on the first surface (26) via reflections on the excitation surface (30), the second surface (28) and the base surface (32) back to the point of incidence.

2. The cuvette (10) according to claim 1, wherein the height H of the trapezoid is given by

$$H = -\frac{A \sin(\beta - \gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma)\tan(\gamma))} - \left(-\frac{A}{2} + \frac{A \sin(\beta - \gamma)\tan(\gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma)\tan(\gamma))} \right) \tan(\beta + \gamma),$$

wherein $(90^\circ - \gamma)$ is the trapezoid base angle between the base side (32S) and the first side (26S), n_2 is the refractive index of the base portion (24), A is the length of the top side (30S) of the trapezoid and

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right).$$

3. The cuvette (10) according to claim 1 or 2, wherein the base side reflection angle $d = 90^\circ - (\beta + \gamma)$ is greater than $\arcsin(1 / n_2)$, n_2 being the refractive index of the base portion (24) and

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right).$$

4. The cuvette (10) according to anyone of the preceding claims, wherein the excitation side reflection angle $\theta = 90^\circ - (\beta - \gamma)$ is greater than $\arcsin(1/n_2)$, n_2 being the refractive index of the base portion (24) and.

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right).$$

5. The cuvette (10) according to anyone of the preceding claims, wherein the trapezoid is substantially a rectangle having a height H and a width A and $A / H \approx 1.2$.
6. The cuvette (10) according to anyone of the preceding claim, wherein the well portion (18) and the base portion (24) are unitarily formed of a resin material, preferably comprising PMMA, polystyrene, polycarbonate, SAN, cyclocopolymerolefine or polyolefine.
7. The cuvette (10) according to anyone of the preceding claims, wherein the cuvette (10) comprises a plurality of wells (20).
8. The cuvette according to anyone of claims 1 to 7, wherein the excitation surface (30) is hydrophilic.
9. The cuvette according to anyone of claims 1 to 7, wherein the excitation surface (30) is at least partially coated with a hydrophilic compound.
10. The cuvette according to anyone of claims 1 to 9, wherein a compound as reaction partner R1 is immobilized on the optionally coated excitation surface (30), said reaction partner R1 having an affinity to the substance being assayed as reaction partner R2.
11. The cuvette according to claim 10, wherein said reaction partner R2 comprises a fluorophor-containing moiety.
12. The cuvette according to anyone of claims 1 to 9, wherein an anchoring compound for a compound as reaction partner R1 is immobilized on th

e optionally coated excitation surface (30), said reaction partner R1 having an affinity to the substance being assayed as reaction partner R2.

13. The cuvette according to anyone of claims 10 to 12, wherein said reaction partner R1 or said anchoring compound is present in lyophilized form.

14. The cuvette according to claim 13, wherein said lyophilized reaction partner R1 or said lyophilized anchoring compound is covered by a lyophilized spacer-layer containing one or more buffer compounds, one or more proteinaceous compounds, one or more hydrophilic compounds or one or more complexing agents/anticoagulants and optionally bacteriostatic compounds, or a mixture containing one or more of these constituents.

15. The cuvette according to claim 14, wherein said lyophilized spacer-layer is covered by a lyophilisate comprising either

(A) a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof, provided that the reaction partner R1 is immobilized on the excitation surface (30); or

(B) reaction partner R1 or a fluorophor-containing compound or compound as reaction partner R3 or a mixture thereof containing two or three of them, provided that said anchoring compound is immobilized on the excitation surface (30);

said reaction partner R3 having an affinity to the substance being assayed as reaction partner R2, wherein said reaction partner R3 comprises optionally a fluorophor-containing moiety, and said fluorophor-containing compound having an affinity to reaction partner R2 or to reaction partner R3.

16. A process for the preparation of a cuvette according to anyone of claims 10 to 15, comprising the step of:

(a) immobilizing reaction partner R1 or said anchoring compound on the excitation surface (30) or the cuvette defined in any one of claims 1 to 9.

17. The process according to claim 16, further comprising the steps of :

(b) applying a freezable solution I containing one or more buffer compounds, one or more proteinaceous compounds, one or more hydrophilic compounds or one or more complexing agents/anticoagulants and optionally bacteriostatic compounds, or a mixture containing one or more of these constituents onto said immobilized reaction partner R1 or said immobilized anchoring compound; and

(c) freezing said solution I to obtain a frozen spacer-layer.

18. The process according to claim 17, wherein after step (c) the frozen solution I is lyophilized.

19. The process according to claim 17, further comprising the steps of :

(d) applying a freezable solution II containing either (A) a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof, provided that the reaction partner R1 is immobilized on t

the excitation surface (30), or (B) reaction partner R1 or fluorophor-containing compound or a compound as a reaction partner R3 or a mixture thereof containing two or three of them, provided that said anchoring compound is immobilized on the excitation surface (30), onto said frozen spacer-layer;

(e) freezing said solution II to obtain a frozen solution II on the frozen solution I; and

(f) lyophilizing the frozen content in the cuvette to obtain a lyophilisate.

20. Use of the cuvette according to anyone of claims 1 to 15 in medical or veterinary medical diagnostics, food analysis, environmental analysis, chemical or biological analysis, or analysis of fermentation processes.

21. Use of the cuvette according to anyone of claims 1 to 15 for a qualitative and/or quantitative determination of substances via immunological reactions.

22. Use of the cuvette according to anyone of claims 10 to 13 for the qualitative and/or quantitative determination of substances via immunological reactions, including the steps of:

- placing in contact with the immobilized reaction partner R1 or with the immobilized anchoring compound or with the lyophilized spacer-layer a solution that contains the substance being assayed as reaction partner R2 and either (A) a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof, provided that the reaction part

ner R1 is immobilized on the excitation surface (30), or (B) reaction partner R1 or a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof containing two or three of them, provided that said anchoring compound is immobilized on the excitation surface (30), wherein a complex forms on the immobilized reaction partner R1 or on the immobilized anchoring compound, said complex containing either

(i) reaction partner R1 and reaction partner R2 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(ii) reaction partner R1, reaction partner R2 and reaction partner R3 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(iii) reaction partner R1, reaction partner R2, reaction partner R3 and the fluorophor-containing compound; or

(iv) the anchoring compound, reaction partner R1 and reaction partner R2 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(v) the anchoring compound, reaction partner R1, reaction partner R2 and reaction partner R3 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(vi) the anchoring compound, reaction partner R1, reaction partner R2, reaction partner R3 and the fluorophor-containing compound; and

- exciting the fluorophor bonded to the excitation surface (30) via said complex by the evanescence field of a light source and measuring the fluorescence produced.

23. Use of the cuvette according to claim 15 for a qualitative and/or quantitative determination of substances via immunological reactions, including the steps of:

- placing in contact with the lyophilized content in the cuvette, a solution that contains the substance being assayed as reaction partner R2, wherein a complex forms on the immobilized reaction partner R1 or on the immobilized answering compound, said complex containing either

(i) reaction partner R1 and reaction partner R2 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(ii) reaction partner R1, reaction partner R2 and reaction partner R3 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(iii) reaction partner R1, reaction partner R2, reaction partner R3 and the fluorophor-containing compound; or

(iv) the anchoring compound, reaction partner R1 and reaction partner R2 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(v) the anchoring compound, reaction partner R1, reaction partner R2 and reaction partner R3 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(vi) the anchoring compound, reaction partner R1, reaction partner R2, reaction partner R3 and the fluorophor-containing compound; and

- exciting the fluorophor bonded to the excitation surface (30) via said complex by the evanescence field of a light source and measuring the fluorescence produced.

3 Detailed Description of Invention

The present invention relates to a cuvette for a reader device for assaying substances using the evanescence field method, to a method for

preparing a cuvette processed for assaying substances and to a method for assaying substances using said cuvette.

Medical diagnostics, especially immunological diagnostics, is largely based on the ELISA (Enzyme-Linked-Immunoabsorbent Assay). A recent review of immune assays can be found in Hage, Anal. Chem. 71 (1999), 294R-304R. An ELISA test is used to determine the concentration of antigens or antibodies. The substance being studied (for example, an antigen) is first placed in contact with a solid substrate to which a specific reaction partner for the substance being studied is first coupled (for example, an antibody). By bonding the substance being studied as the second reaction partner to the first reaction partner coupled to the substrate, the substance being studied is concentrated on the solid substrate. Then, a third reaction partner (for example, another antibody) for the substance being studied is placed in contact with the substrate, and this third reaction partner is marked with an enzyme, which allows colorimetric detection. When this third reaction partner reacts with (i.e. binds to) the substance being studied coupled to the surface of the substrate, a colored product is produced via an enzymatic reaction that can be evaluated optically. Standardized plastic plates, frequently made of polystyrene, with 96 wells are mostly used as the solid substrate. The surface of the plastic wells binds proteins in the nanogram range through absorption in a quantity sufficient for immunological detection. There are several ways of marking the third reaction partner, which is mostly an immunoglobulin, with an enzyme. Markers currently used are, for example, peroxidase or alkaline phosphatase.

ELISAs give good results in terms of sensitivity and specificity, and the detection limits that can be reached are in the nanogram range of

r below it. There is a wide variety of embodiments of assays that are based on this principle. With it, antigens or antibodies can be detected, depending on what the question is.

However, a major disadvantage of the ELISA is handling the test, since different reagents are added to the wells one after another and must be removed again. Ten or more pipetting, washing and incubation steps in all may be necessary. Thus, ELISAs are very time-consuming and labor-intensive, and must be done by specially trained personnel with great care. Another disadvantage of the ELISA is the time it takes for all the incubation and washing steps for an assay or test, which normally lasts one hour or more.

With the evanescence field method, the interaction of biomolecules, for example, on a surface can be observed directly. Here, the interaction of reactants in solution is measured with a solid matrix surface. It is possible to measure the bonding of the ligands physically as "surface plasmon resonance" in "real time". The advantages compared to an ELISA are the elimination of other pipetting steps after the addition of the reagents and the elimination of the waiting steps. In the past, expensive apparatuses and multi-layer sensor chips with special surface chemistry were needed for such measurements. These disadvantages prevent the method from being used in routine diagnostics.

Evanescence field methods for assaying biochemical interaction processes on reaction surfaces regularly employ cuvettes having wells for receiving the solution containing the substances to be analyzed. For numerous diagnostical and analytical applications, one-way or expendable cuvette would be preferable so that a significant demand for low-cost cuvettes

es exists. At the same time, however, biochemical analysis tools must suffice ever increasing requirements concerning sensitivity and reproducibility. Therefore, cuvettes must both fulfill strict prerequisites regarding production costs and biochemical/optical properties.

Thus, the technical problem underlying the present invention is to provide an inexpensive cuvette for a reader device for assaying substances using the evanescence field method having both excellent biochemical and optical properties allowing highly sensitive, reproducible and fast assays. Further, a method for preparing a cuvette should be provided, said cuvette being processed so that it is ready to use in routine diagnostics.

The solution to the above technical problem is achieved by providing the embodiments characterized in the claims.

In particular there is provided a cuvette for a reader device for assays using the evanescence field method comprises:

- at least one well portion having at least one well for receiving a solution containing substances to be assayed; and
- at least one base portion supporting side wall members of the well portion and providing an excitation surface of the well;

wherein the base portion is made of an optically transparent material and has a cross-sectional shape of an isosceles trapezoid in a plane perpendicularly intersecting the excitation surface of the well, the trapezoid having first and second sides of equal length and parallel base and top sides;

wherein the base portion further comprises

- a base surface being spaced apart from and parallel to the excitation

ion surface, the cross section of the base surface in said plane being the base side of the trapezoid;

- a first surface for receiving an excitation light beam of an external excitation light source, the cross section of the first surface in said plane being the first side of the trapezoid; and
- a second surface opposite to the first surface, the cross section of the second surface in said plane being the second side of the trapezoid;

and wherein the base portion is adapted to guide the excitation light beam at least partially along an optical round path from a point of incidence on the first surface via reflections on the excitation surface, the second surface and the base surface back to the point of incidence.

Preferably, the angle of incidence α of the excitation light beam incident on the first surface is chosen so that it meets the Brewster criteria $\tan \alpha = n_2 / n_1$, wherein n_2 is the refractive index of the base portion and n_1 is the refractive index of the environment, for example air ($n_1 = 1$). If the excitation light beam is linearly polarized in its plane of incidence, no reflection of the excitation light beam on the first surface of the base portion will occur. Instead, the excitation light beam will be refracted with an angle of refraction β into the base portion.

Subsequently, the excitation light beam is preferably totally reflected by the excitation surface of the well, i.e. the interface between the base portion and the solution containing the substances to be assayed. The excitation light beam reflected by the excitation surface produces an electromagnetic evanescent field which penetrates into the well. The evanescent field exponentially decays in a normal direction of the e

excitation surface into the well. In a region adjacent to the excitation surface, the substances to be assayed will be optically excited by the evanescence field so that a fluorescence signal may be observable. As the evanescence field rapidly decays into the well, the excitation region is confined to a space of not more than typically 100 nm from the excitation surface into the well. Therefore, no optical excitation of substances in the volume of the solution will occur.

Subsequently, the reflected light beam will impinge on the second surface of the base portion. If the plane of polarization of the light beam remains unchanged, (i.e. remains identical to the plane of polarization of the excitation light beam incident on the first surface), the entire light beam will be refracted on the second surface and will leave the base portion. However, many materials which may be used to manufacture the base portion are birefringent so that the plane of polarization of the reflected light beam incident on the second surface will not correspond to the initial plane of polarization. In this case, the light beam incident on the second surface will be partially reflected on the second surface. This reflected light beam will subsequently propagate in a direction towards the base surface of the base portion and will preferably be totally reflected on the base surface.

According to the present invention, the trapezoidal shape of the base portion and the refractive index n_2 of the base portion are selected so that the light beam reflected by the base surface impinges on the first surface on substantially the same point or area of incidence as the initial incoming excitation light beam. In other words, the light beam is reflected and guided in the base portion in such a way to make a closed optical round path. The light beam will be reflected by the excitation

surface, the second surface and the base surface back to the first surface in this order. The light beam reflected by the base portion will partly be reflected again by the first surface and will propagate along the same optical round path as the excitation light beam refracted at the first surface. The light beam reflected by the base surface will also be partly refracted by the first surface so as to leave the base portion.

This special optical design of the base portion offers significant advantages when compared to conventional cuvette designs. In particular, the path length of the propagation path of the excitation light beam in the base portion is relatively short when compared to path lengths of excitation light beams in conventional cuvettes. Since the base portion of any cuvette, especially a low cost expendable cuvette, will be made of a material, for example plastic, having optical impurities or faults, a short path length of the excitation light beam in the base portion is preferable. A long path length will result in a larger parasitic light intensity of light scattered by optical impurities. This parasitic light may enter the well and excite substances in the volume of the solution. This yields a parasitic background signal reducing the signal to noise ratio of the fluorescence signal to be detected. Another advantage of a cuvette according to the present invention resides in the fact that, when compared to conventional cuvettes, the cuvette allows for a relatively large detecting angle, i.e. the fluorescence signal may be detected over a larger angular range.

According to a preferred embodiment, the height H of the trapezoid is given by

$$H = -\frac{A \sin(\beta - \gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))} - \left(-\frac{A}{2} + \frac{A \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma) \tan(\gamma))} \right) \tan(\beta + \gamma),$$

wherein $(90^\circ - \gamma)$ is the trapezoid base angle between the base side and the first side, n_2 is the refractive index of the base portion, A is the length of the top side of the trapezoid and

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right).$$

The height H of the trapezoid is the distance between the top and base sides of the trapezoid in a direction perpendicular to the base side. The above relation holds for a cuvette which is to be operated in a gaseous environment having a refractive index $n_1 = 1$. Furthermore, it was assumed that the excitation light beam incident on the first surface of the base portion is oriented so as to impinge on the first surface with an angle of incidence corresponding to the Brewster angle $\alpha_B = \arctan(n_2)$. γ is a trapezoid inclination angle defining the angle between a normal direction of the base side and the first and second sides of the trapezoid. β is the angle of refraction of the excitation light beam refracted on the first surface of the base portion.

If the angle of incidence α of the excitation light beam on the first surface corresponds to the Brewster angle α_B , the angle β is only dependent on the refractive index n_2 of the material of the base portion. For a given length A of the top side and the trapezoid inclination angle γ of the trapezoid, the height H of the trapezoid can be calculated using the above formula. It should be noted, however, that the angle of incidence α of the excitation light beam does not need to correspond exactly to the Brewster angle α_B . Instead, angular deviations of α relative to the Brewster angle α_B are possible but will result in a decreased efficiency. The angle of incidence α is preferably chosen to be the Brewster angle α_B since in this case no reflection losses will occur on the first surface if the incident excitation light beam is linearly polarized in its plane of incidence. If, for example, the angle of incidence α of the excitation light beam deviates from the Brewster angle α_B by 10° , the losses due to reflections on the first surface of the trapezoid will be in the order of 1% of the initial intensity I_0 of the incident excitation light beam. This corresponds to appro

ximately the same order of magnitude as the portion of light emitted by a conventional semiconductor laser diode which is not linearly polarized. Therefore, it is possible to relax the above stringent condition on the angle of incidence α without sacrificing substantial efficiency.

According to a preferred embodiment of the present invention, the base side reflection angle $\delta = 90^\circ - (\beta + \gamma)$ is greater than $\arcsin(1 / n_2)$, n_2 being the refractive index of the base portion and

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right).$$

Along the optical round path of the excitation light beam in the base portion of the cuvette, the light beam is preferably totally (internally) reflected on the base surface of the base portion. For this end, the base side reflection angle δ (angle between a normal direction of the base side and the light beam incident on the base side) has to be larger than $\arcsin(1 / n_2)$. The base side reflection angle δ is a function of the angle of refraction β of the light beam reflected on the first surface.

According to a preferred embodiment of the present invention, the excitation side reflection angle $\varepsilon = 90^\circ - (\beta - \gamma)$ is larger than $\arcsin(1 / n_2)$, n_2 being the refractive index of the base portion and

$$\beta \approx \arcsin\left(\frac{\sin(\arctan(n_2))}{n_2}\right).$$

Similarly to the embodiment described above, it is also strongly preferred that the excitation light beam is totally (internally) reflected by the excitation surface of the base portion. In this case, only the electromagnetic evanescent field will optically excite the substances to be analysed in a space very close to the excitation surface. An optical excitation of substances in the volume of the well will not occur. Thus, the excitation side reflection angle ε is preferable larger than $\arcsin(1/n_2)$. The excitation side reflection angle is the angle between the excitation light beam impinging on the excitation surface and a normal direction of the excitation surface.

According to another preferred embodiment of the present invention, the trapezoid is substantially a rectangle having a height H and a width A and $A/H \cong n_2$. It should be understood that the rectangular shape of the base portion in a cross-sectional plane parallel to the normal direction of the excitation surface should also encompass small angular deviations (a few degrees) from a perfect rectangular shape. The relation of the width A the height H of the rectangle is in this case preferably chosen to correspond to the refractive index n_2 of the base portion. This relation holds as long as the angle of incidence α of the incident excitation light beam is chosen to correspond to the Brewster angle $\arctan(n_2)$.

The cuvette of the present invention is made of optically transparent material, preferably in the wavelength range of from 600 to 700 nm, such as glass, quartz, silicones or transparent polymers or any combinations of these materials. The cuvette especially preferably contains a plastic, such as polystyrene, a polyolefin such as polypropylene, polyethylene, polyethylene terephthalate, a polycycloolefin, polyacrylonitrile, p

olymethylmethacrylate, polycarbonate, SAN, cyclocopolymerolefine (COC; distributed of example under the brand names TOPAS or ZEONEX) and/or mixtures or blends of these plastics. In principle, any plastic or resin is suitable that basically absorbs no light in the spectral range of interest (for example the visible range) and preferably allows the application of a suitable coating for in particular binding fluorescent molecules. The material may contain additives to improve the processing characteristics, in particular for injection molding. Since the dispersion relations of the above materials are known, any necessary adjustments of the size dimensions of the well and base portions may be performed by calculations. In one form of embodiment, the plastic can also be dyed, for example light blue, in order to filter out an emission caused by scattered light. At the wavelengths of interest, the base portion is preferably optically transparent whereas the well portion may be made of a light absorbing or opaque material. Plastic cuvettes can be obtained inexpensively by injection molding and preferably have a reaction volume of 1 to 400 μl , and especially preferred 5 to 200 μl . Preferably, the cuvette of the present invention is made in one piece. It can also be an advantage if the inside and/or emission surface, i.e., the surface from which the emitted beam comes out of the cuvette, is/are polished to a surface roughness of preferably 10 nm maximum.

Preferably, the well portion and the base portion are unitarily formed. For example, the well and base portions may be formed by injection moulding. Alternatively, it is also possible to separately form the well portion and the base portion and to assemble these portions using for example an adhesive having a refractive index matching the refractive index of the base portion. Preferably, the well and base portions are formed of a material comprising polymers such as listed above.

According to another preferred embodiment of the present invention, the cuvette comprises a plurality of well portions. For example, the well portions may be linearly arranged in a bar-shaped cuvette so that a plurality of assays may be performed with a single cuvette. Preferably, only a single base portion is provided for the plurality of well portions.

The present invention will now be described by way of example in connection with the accompanying drawings.

In Fig. 1(a), a preferred embodiment of the cuvette according to the present invention is shown. The cuvette 10 is substantially bar-shaped and has a handling portion 12 for handling and mounting the cuvette 10 into a reader. As shown in Fig. 1(b), the handling portion 12 has a recess 14 formed therein. Opposite to the handling portion 12 of the cuvette 10, an analyzing portion 16 is formed. The analyzing portion 16 has a plurality of well portions 18 having wells 20 for receiving a solution containing substances to be analysed. The side walls 22 of the wells 20 are supported by a base portion 24 which extends over the whole analyzing portion 16. In the preferred embodiment shown in Fig. 1, the base portion 24 is integrally formed with the well portion 18. Preferably, the cuvette is injection moulded and consists of, for example, Polystyrene 158 K.

In Fig. 1(d), a cross-sectional view of the cuvette along line B-B of Fig. 1(a) is depicted. The cross-section is taken in a plane intersecting an excitation surface 30 of a well 20 of the well portion 18 at right angles, i.e. the cross-sectional plane is parallel to the normal dir

ection of the excitation surface 30. The base portion 24 of the cuvette 10 has a first surface 26 for receiving an excitation light beam of an external excitation light source (not depicted). A second surface is arranged opposite to the first surface 26. The bottom of the base portion 24 is formed by a base surface 32 which is spaced apart from and parallel to the excitation surface 30. In the cross-section shown in Fig. 1(d), the base portion 24 of the cuvette 10 has the shape of an isosceles trapezoid. Referring also to Fig. 1(d) and Fig. 2, the top side 30S of the trapezoid is formed by the excitation surface 30 extended across the side wall members 22 of the well portion 18. The base side 32S of trapezoid is formed by the base surface 32. The first side 26S and the second side 28S of equal length of the trapezoid are formed by the first surface 26 and the second surface 28, respectively. References numerals 26, 28, 30 and 32 will be used when referring to the surfaces and reference numerals 26S, 28S, 30S and 32S will be used for the sides or legs of the trapezoid.

The first and second sides 26S, 28S of the trapezoid are inclined by an angle γ of 2° with respect to a normal direction of the top side 30S or the base side 32S. This small inclination of the first and second surfaces 26 and 28 of the base portion 24 aids in removing the cuvette from the injection mould after moulding.

Fig. 2 shows a schematic cross-sectional view of a base portion 24 of a cuvette according to another preferred embodiment of the present invention. In Fig. 2, the optical path of an excitation light beam 34 of an external excitation light source, preferably a semiconductor laser diode, is depicted. The excitation light beam 34 is received by the first surface 26 of the base portion 24. Preferably, the angle of incidence α

of the incident excitation light beam 34 corresponds to the Brewster angle $\alpha_B = \arctan(n_2 / n_1)$, wherein n_2 is the refractive index of the base portion 24 and n_1 is the refractive index of the surrounding environment, typically air. In this case, $n_1 = 1$.

Above the excitation surface 30 (top side 30S), a well 20 for receiving a solution containing substances to be assayed is formed. The well portion 18 is, for the sake of simplicity, not shown in Fig. 2. It should be understood, however, that the excitation surface 30 will operationally be the interface between the base portion 24 having the refractive index n_2 and the solution having a refractive index n_3 in the well 20.

The excitation light beam 34 is refracted on the first surface 26 (first side 26S in Fig. 2) of the trapezoid. The refracted light beam subsequently impinges on the excitation surface 30 (top side 30S in Fig. 2), where it is internally totally reflected so as to propagate in the direction of the second surface 28. If the incident excitation light beam 34 is perfectly linearly polarized in its plane of incidence, no reflections of the incoming excitation light beam 34 will occur on the first surface 26. Furthermore, under ideal optical conditions (material of the base portion 24 not by birefringent), the excitation light beam 34 will leave the base portion 24 by being refracted on the second surface 28. However, typical materials for the base portion 24 are birefringent so that the plane of polarization of the excitation light beam will be disturbed. Therefore, partial reflections of the light beam 34 on the second surface 28 occur. The reflected light beam propagates in the direction of the base surface 32 (base side 32S) where it is preferably totally reflected.

The base portion 24 is designed such that the light beam reflected by the base surface 32 impinges on the first surface 26 on substantially the same point or area where the incoming excitation light beam 34 initially hits the first surface 26. In other words, the coupling height h being the distance between the excitation surface 30 (top side 30S) and the point of incidence of the incoming excitation light beam 34 in a normal direction of the top side 30S is the same height under which the light beam reflected by the base surface 32 impinges the first surface 26. Thus, the base portion 24 of the cuvette 10 is designed such that an incident excitation light beam 34 is guided in the base portion 24 along an (closed) optical round path having identical starting and ending points/areas. It should be understood that the excitation light beam 24 shown in Fig. 2 is simplified to the extent that an actual excitation light beam will have a finite beam width. The beam width is preferably adjusted so as to excite a predetermined area of the excitation surface 30. Also for an excitation light beam 34 of parallel light having a finite beam width, the above optical round path criteria holds.

The optical round path in the base portion 24 of the cuvette 10 has numerous advantages when compared to conventional cuvettes. For example, the path length of the optical round path ($2l + 2k$ for a round trip, see Fig. 2) is considerably shorter than the path length in conventional cuvettes. Reducing the path length of the optical path in the cuvette implies a reduction of the intensity of light scattered at impurities which are inevitably present in the base portion 24. Furthermore, the design of the base portion 24 allows for a larger viewing or detecting angle for collecting/detecting the fluorescence light. Whereas in conventional cuvette designs, the fluorescence can only be detected in a relatively small angular range, the detecting angle of a cuvette 10 according to th

e invention may be larger resulting in an improved fluorescence signal. Furthermore, the trapezoidal shape of the base portion 24 is relatively easy to manufacture using injection moulding techniques known in the art. In particular, the first and second surfaces 26 and 28 of the base portion 24 do not necessarily need to be optically polished since the accuracy of the injection moulding technique will regularly be sufficient for an optically flat surface.

In the following, referring to Fig. 2, a preferred design procedure of a preferred embodiment of the present invention will be described:

In order to obtain total internal reflections of the excitation light beam 34 by the excitation and base surfaces 30, 32 of the base portion 24, the excitation surface angle ε and the base surface angle δ must be larger than the respective critical angles for total reflections. Hence,

$$\begin{aligned}\varepsilon(\beta, \gamma) &> \varepsilon_{\min} \\ \delta(\beta, \gamma) &> \delta_{\min},\end{aligned}$$

wherein

$$\begin{aligned}\varepsilon(\beta, \gamma) &= 90^\circ - (\beta - \gamma); \\ \delta(\beta, \gamma) &= 90^\circ - (\beta + \gamma); \text{ and} \\ \delta(\beta, \gamma) &= 90^\circ - (\beta + \gamma).\end{aligned}$$

The critical angles for a total reflections are

$$\delta_{\min} = \arcsin(n_1 / n_2); \text{ and}$$

$$\delta_{\min} = \arcsin (n_3 / n_2).$$

As stated previously, a closed optical path (an optical round path) of the excitation light beam 34 in the base portion 24 is strongly preferred, if birefringent materials (for example plastic materials) are used to manufacture the base portion 24. In order to have a closed optical path within the base portion 24, the following conditions must be met:

$$A / 2 + h \tan(\gamma) = l \cos (\beta - \gamma),$$

$$h = l \sin (\beta - \gamma),$$

$$A / 2 + h \tan(\gamma) = k \cos (\beta + \gamma),$$

wherein l is the optical path length between the point of incidence on the first surface 26 to the point of incidence on the excitation surface 30 and k is the optical path length between the points of incidence on the first and base surfaces 26 and 32 for a symmetrical optical round path in the base portion 24. A is the length of the top side 30 connecting the first and second sides 26S, 28S.

It can be shown that the above conditions yield the following expression for the height H of the trapezoid:

$$H = -\frac{A \sin(\beta - \gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma)\tan(\gamma))} - \left(-\frac{A}{2} + \frac{A \sin(\beta - \gamma)\tan(\gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma)\tan(\gamma))} \right) \tan(\beta + \gamma).$$

The coupling height h of an incident excitation light beam 34 having a symmetrical optical round path in the base portion 24, i.e. a round path wherein the reflections on the top and base sides 30S, 32S of the trapezoid are in the center of the respective sides is given by

$$h = -\frac{A \sin(\beta - \gamma)}{2(-\cos(\beta - \gamma) + \sin(\beta - \gamma)\tan(\gamma))}.$$

The coupling height h should preferably be in agreement with the beam width of the excitation light beam 34.

For the special case wherein the trapezoid is a rectangle and the incident excitation light beam 34 is incident under the Brewster angle $\alpha_B = \arctan(n_2 / n_1)$, a simple relation for the relation A / H can be calculated. For a rectangle ($\gamma = 0$),

$$\tan(\beta) = \frac{H/2}{A/2}.$$

If α corresponds to the Brewster angle α_B , the angle between the light beam reflected and refracted at the first surface 26 is 90° , so that

$$\tan(\beta) = \tan(90^\circ - \alpha) = \frac{1}{\tan(\alpha)}.$$

Therefore,

$$\tan(\alpha) = \frac{n_2}{n_1} = \frac{A}{H}.$$

In a preferred embodiment of the present invention the excitation surface 30 of the cuvette is preferably hydrophilic. A substantially hydrophilic excitation surface 30 can be obtained, for example, by at least partially coating the surface with a hydrophilic compound. Hydrophilic compound systems which can be used for providing a hydrophilic excitation surface 30, are, for example, dextrane derivatives, such as allyl dextrane, which are covalently coupled to the excitation surface made up of e.g. a polystyrene upon X-ray treatment of the excitation surface to generate radicals. In particular, an example for preparing a hydrophilic excitation surface 30 using allyl dextran is as follows: a polystyrene chip as cuvette (γ radiated with 26 kGray, ^{60}Co) is provided and 50 μl of a solution of allyldextran having a molecular weight of about 150kD (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in water) is added and incubated for 16h at room temperature. The solution is aspirated and the polystyrene chip is washed three times with water. After incubation with 50 μl of a solution of sodium(meta)periodate (30mM in water) for 1h at room temperature, the solution is aspirated and the polystyrene chip is washed three times with PBS. Then 50 μl of a solution of neutravidin (40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 0.1M NaHCO_3 , pH 9.3) is added and incubated for 2h at room temperature, followed by an addition of 0.5 μl of a solution of sodium-cyanoborohydride (5 M) and incubation for 15 min at room temperature, and subsequently by adding and incubating with 25 μl of an aqueous solution of ethanolamine (300 mM) for 15 min at room temperature. The solutions are aspirated and the polystyrene chip is washed three times with PBS. The excess reactive sites of the polystyrene chip are blocked by incubating in a 100 μl blocking solution (e.g. PBS, 1% BSA, 0.25% Tween 20) for 1h at room temperature.

Alternatively, a hydrophilic compound system which can be used for providing a hydrophilic excitation surface 30, is the poly-L-lysine/glu

tardialdehyde-system. In particular, an example therefore is as follows: a polystyrene chip as cuvette (γ radiated with 26 kGray, ^{60}Co) is provided and 50 μl of a solution of poly-L-lysine (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBSplus (10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 100 mM NaCl pH 7.5), is added and incubated for 16h at room temperature. The solution is aspirated and the polystyrene chip is washed three times with PBS. After incubation with 50 μl of a solution of glutardialdehyde (1% in PBSplus) for 1h at room temperature, the solution is aspirated and the polystyrene chip is washed three times with PBS. Then 50 μl of a solution of neutravidin (40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 0.1M NaHCO_3 , pH 9.3) is added and incubated for 2h at room temperature, followed by an addition of 0.5 μl of a solution of sodium-cyanoborohydride (5 M) and incubating for 15 min at room temperature, and subsequently by adding and incubating of 25 μl of an aqueous solution of ethanolamine (300 mM) for 15 min at room temperature. The solutions are aspirated and the polystyrene chip is washed three times with PBS. The excess reactive sites of the polystyrene chip are blocked by incubating in a 100 μl blocking solution (e.g. PBS, 1% BSA, 0.25% Tween 20) for 1h at room temperature.

The coating of the above mentioned hydrophilic compounds on the excitation surface can form, for example, so-called "island-structures" or monolayers.

According to a further preferred embodiment of the present invention a compound as reaction partner R1 is immobilized (i.e. bonded) on the excitation surface 30 of the cuvette, wherein the excitation surface may be coated with hydrophilic compounds as outlined above. The term "immobilized" preferably means that the reaction partner R1 is adhered to the excitation surface 30 by absorption ("direct absorption"). However, the reaction partner R1 can also be immobilized to the excitation surface 3

0 via an anchoring compound, for example a protein such as an antibody, an antigen, streptavidin, avidin, neutravidin, or compounds such as biotin. The reaction partner R1 can also be immobilized on the excitation surface (30) via covalent bond(s). This can be provided by, for example, conversion with a carbodiimide of an acrylate-containing excitation surface.

In general, the terms "immobilized" and "bonded" in the sense of the present invention mean adhesion of a reaction partner or a compound such as an anchoring compound or a fluorophor-containing compound, to a surface such as the excitation surface 30, or to another reaction partner and/or compound, and include both covalent and non-covalent interactions, such as interactions based on ionic, polar or non-polar interactions.

The reaction partner R1 or the anchoring compound can be placed on the excitation surface by a common method. For example, a protein serving as reaction partner R1 or an anchoring compound can be coated on the excitation surface. Reaction partner R1 or the anchoring compound can preferably be bonded to the surface by absorption or by covalent bond(s). After this step, the excitation surface is preferably treated with another solution containing blocking compounds, and areas on the excitation surface not containing reaction partner R1 or the anchoring compound are blocked or will be blocked, for example by another protein as a blocking compound that basically does not react with the components in the solutions used for performing the assay.

In preferred embodiments of the present invention, the reaction partner R1 or the anchoring compound are present in lyophilized form.

In yet another preferred embodiment of the present invention the lyophilized reaction partner R1 or the lyophilized anchoring compound is covered by a lyophilized spacer-layer. The constituents of the spacer-layer are preferably selected from the group consisting of one or more buffer compounds such as HEPES, one or more proteinaceous compounds such as BSA, one or more hydrophilic polymers such as dextran, one or more complexing agents/anticoagulants such as EDTA and optionally bacteriostatic compounds such as Trimethoprim and/or Sulfamethoxazole, and a mixture containing one or more of these constituents. Further, the spacer layer may also contain the reaction partner R3.

In further preferred embodiments of the present invention, the cuvette contains, besides the lyophilized reaction partner R1 or the anchoring compound and the spacer-layer, a lyophilisate which covers the lyophilized spacer-layer. This lyophilisate comprises either

(A) a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof, provided that reaction partner R1 is immobilized on the excitation surface 30; or

(B) reaction partner R1 or a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof containing two or three of said constituents, provided that said anchoring compound is immobilized on the excitation surface 30;

said reaction partner R3 having an affinity to the substance being assayed as reaction partner R2, wherein said reaction partner R3 comprises optionally a fluorophore-containing moiety, and said fluorophore-containing compound having an affinity to reaction partner R2 or to reaction part

ner R3.

In preferred embodiments of the present invention, the terms "anchoring compound", "reaction partner R1", "reaction partner R2" and "reaction partner R3" in general, include each one part of ligand-binding system such as monoclonal or polyclonal antibodies, proteins functioning as antigens, proteins having an affinity to specific compounds, such as streptavidin, avidin etc., and compounds having an affinity to e.g. specific proteins, such as biotin. For example, the anchoring compound immobilized on the excitation surface, is streptavidin; the reaction partner R1 is a monoclonal antibody directed against reaction partner R2, having a biotin conjugated thereto in order to allow immobilisation on the excitation surface via the streptavidin/biotin-system; the reaction partner R2 which is the substance being assay, functions as an antigen; and reaction partner R3 is a monoclonal antibody directed against reaction partner R2, having a fluorophor-containing compound conjugated thereto in order to allow fluorescence measurements (see also Fig. 3).

Further, according to the present invention there is provided a process for the preparation of a cuvette as defined above, comprising the step of:

- (a) immobilizing reaction partner R1 or the anchoring compound on the excitation surface 30 of the cuvette.

The process of the present invention may further comprise the steps of:

- (b) applying a freezable (preferably aqueous) solution I which may contain one or more buffer compounds such as HEPES, one or more proteinaceous

us compounds such as BSA, one or more cryoprotectants such as poly(ethylene glycol), one or more lyoprotectants such as sucrose, one or more detergents such as n-octyl- β -D-glucopyranoside, one or more antioxidants such as ascorbic acid, one or more hydrophilic compounds such as dextran, one or more complexing agents/anticoagulants such as EDTA and optionally bacteriostatic compounds such as Trimethoprim and/or Sulfamethoxazole and a mixture containing one or more of these constituents, onto said immobilized reaction partner R1 or the immobilized anchoring compound; and

(c) freezing said solution I to obtain a frozen spacer-layer.

After step (c) of the process of the present invention, the frozen content of the cuvette can be lyophilized to obtain a cuvette which is ready to use for assaying substances.

The process of the present invention may further comprise the steps of:

(d) applying a freezable (preferably aqueous) solution II which may contain one or more buffer compounds such as HEPES, one or more proteinaceous compounds such as BSA, one or more hydrophilic compounds such as dextran, one or more cryoprotectants such as poly(ethylene glycol), one or more lyoprotectants such as sucrose, one or more detergents such as n-octyl- β -D-glucopyranoside, one or more antioxidants such as ascorbic acid, one or more ionic and/or nonionic surfactants such as Tween 20 or Brij 35 T, one or more salts such as NaCl, one or more fillers such as Glycin and optionally bacteriostatic compounds such as Trimethoprim and/or Sulfamethoxazole, one or more dyes such as Lissamine Green B, Indigocarmine, Brilliant Black or Cu-Chlorophyll, and a mixture containing one or more o

f these constituents,

containing either (A) a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof, provided that reaction partner R1 is immobilized on the excitation surface 30, or (B) reaction partner R1 or the fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof containing two or three of said constituents, provided that the anchoring compound is immobilized on the excitation surface 30, onto said frozen spacer-layer;

(e) freezing said solution II to obtain a frozen solution II on the frozen solution I; and

(f) lyophilizing the frozen content in the cuvette to obtain a lyophilisate which is ready to be used for assaying substances.

The spacer layer should completely cover the surface and, prior to lyophilisation, is a frozen solid, before the next reaction partner, such as reaction partner R3 is added. This addition usually not melt the frozen spacer layer, but if at all, only the top of the spacer layer will melt. It is essential for the functionality of the assay to be carried out with that the next reaction partner will not be in direct contact with reaction partner R1 or the anchoring compound at any time during the process.

In the sense of the present invention, the term "substance being assayed" corresponds to the term "reaction partner R2", as already mentioned above.

The cuvette of the present invention can be used in methods for me

dical or veterinary medical diagnostics, food analysis, environmental analysis, chemical or biological analysis, or analysis of fermentation processes, preferably for the qualitative and/or quantitative determination of substances via immunological reactions.

The method using the cuvette according to the present invention, includes the steps of:

- placing in contact with the immobilized reaction partner R1 or with the immobilized anchoring compound or with the lyophilized spacer-layer a solution that contains the substance being assayed as reaction partner R2 and either (A) a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof, provided that the reaction partner R1 is immobilized on the excitation surface 30, or (B) reaction partner R1 or a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof containing two or three of said constituents, provided that said anchoring compound is immobilized on the excitation surface 30, wherein a complex forms on the immobilized reaction partner R1 or on the immobilized anchoring compound, said complex containing either

(i) reaction partner R1 and reaction partner R2 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(ii) reaction partner R1, reaction partner R2 and reaction partner R3 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(iii) reaction partner R1, reaction partner R2, reaction partner R3 and a fluorophor-containing compound; or

(iv) the anchoring compound, reaction partner R1 and reaction partner R2 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(v) the anchoring compound, reaction partner R1, reaction partner R2 and reaction partner R3 which comprises a fluorophor-containing moiety or a fluorophor-containing compound conjugated thereto; or

(vi) the anchoring compound, reaction partner R1, reaction partner R2, reaction partner R3 and a fluorophor-containing compound; and

- exciting the fluorophor bonded to the excitation surface 30 via said complex by the evanescence field of a light source, (i.e. by the evanescence field generated within the cuvette (or base portion) when applying an excitation light beam of an external excitation light source) and measuring the fluorescence produced.

In a more preferred embodiment of the present invention the method uses the cuvette containing lyophilized reaction partner R1 or the anchoring compound, the lyophilized spacer-layer, and either (A) a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof, provided that reaction partner R1 is immobilized on the excitation surface 30, or (B) reaction partner R1 or a fluorophor-containing compound or a compound as reaction partner R3 or a mixture thereof containing two or three of said constituents, provided that said anchoring compound is immobilized on the excitation surface 30, said method including the steps of:

- placing in contact with the lyophilized content in the cuvette a solution that contains the substance being assayed as reaction partner R2, wherein a complex forms on the immobilized reaction partner R1 or on t

the immobilized anchoring compound as outlined above; and

- exciting the fluorophor bonded to the excitation surface 30 via said complex by the evanescence field of a light source and measuring the fluorescence produced.

In preferred embodiments of the present invention, the method to be used in the cuvette is based on an ELISA using a fluorophor instead of a colour-formation system.

According to the present invention, the terms "complex" and "conjugate" are understood to be a molecular coupling or bonding between two or more preferably chemical or biochemical substances. The complex or conjugate is preferably formed by means of selective and/or specific reactions, especially preferred by antigen-antibody reactions.

According to the invention, the term "reactions" includes both covalent and non-covalent interactions of two or more reaction partners, wherein both types of interaction can take place one after another within a complex. Non-covalent interaction can mean, for example, Van der Waals interaction, polar and/or ionic interaction of reaction partners. The term "reaction partner" means in general a compound with an affinity for another substance in the present invention.

In one preferred embodiment of the method in the present invention, the substance being assayed as reaction partner R2 can itself have an affinity for reaction partner R1 immobilized on the surface, and can therefore bond directly with that reaction partner R1. When the substance being assayed is an antibody, for example, an antigen specific for that a

antibody can be placed on the surface, or vice versa.

In another preferred embodiment, the substance, i.e. reaction partner R2, being assayed itself has (basically) no affinity or only a small affinity for an anchoring compound on the surface. In this case, the solution to be placed in contact with the surface contains, for example, another compound that contains reaction partner R1 and a binding site for the substance being assayed. Reaction partner R1 can bond to the anchoring compound on the surface and thus fixes the substance being assayed indirectly to the surface. This other connection serves as a bridge element between the substance being assayed and the anchoring compound on the surface. For example, avidin can be present as the anchoring compound on the surface. The other compound (i.e. reaction partner R1) then contains, besides a bonding site for the substance being assayed, for example biotin which can bond to the avidin immobilized on the surface. This embodiment has the advantage that a surface coated with avidin (or streptavidin), unlike many antibodies and antigens, can be better lyophilized and are very stable in dried or lyophilized of form. In addition, the avidin (or streptavidin)/biotin system has a very high dissociation constant K_D . It is also possible for a series of different assays to be done on a surface coated with avidin (or streptavidin) and to assay only the other compound, which is placed in contact with the surface with the solution, on the substance being assayed.

Figure 3 shows this embodiment of the method used in the present invention schematically. In the solution placed in contact with the excitation surface 30 are, next to one another, the substance (i.e. reaction partner R2) being assayed 40, a reaction partner R3 44 comprising a fluorophor-containing moiety or compound, and reaction partner R1 46 having

an affinity to the anchoring compound 48. The anchoring compound 48 is bonded to the excitation surface. The reaction partner R3 and the reaction partner R1 are absorbed on the substance being assayed (conjugate 50), and the conjugate 50 is bonded via reaction partner R1 on the anchoring compound 48 on the surface to form complex 52. Thus, complex 52, which includes reaction partner R3 containing a fluorophor, is bonded to the excitation surface 30 and can be assayed by measuring the fluorescence in the evanescent field 54.

For this embodiment of the method in the present invention, besides the avidin (or streptavidin)/biotin system, all ligands or ligand-binding systems are suitable in which proteins, for example, have selective and/or specific binding sites for one or more ligands, like for example histidine, histidine tags, lectin and/or digoxigenin, and naturally antigen/antibody systems, as already outlined above.

According to the present invention, the terms "fluorophor", "fluorophor-containing compound" and "fluorophor-containing moiety" do not exhibit particular limitations as long as being fluorescent and include, for example, a fluorescing compound, such as phycobilisomes, phycobiliproteins, low-molecular weight fluorescing chemical compounds or quantum dots. According to the present invention, phycobiliproteins, such as Allophycocyanine (APC), Cryptofluor Crimson or Cryptofluor Red can be used as fluorescing proteins. Cy5 or BODIPY (fluorophores having 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indazene) can be cited as examples of low-molecular weight fluorescing compounds. Fluorescing dyes with an efficient absorption in the wavelength range from 600 to 700 nm are preferred.

Instead of a fluorophor, a fluorophor precursor compound can be used

ed, from which the fluorophor is released before the measurement process, for example, by changing the pH value or by splitting a protective group.

According to the present invention, the terms "fluorophor" and "fluorophor-containing compound" and "fluorophor-containing moiety" also include phosphorescing compounds. If such a phosphorescing compound is used as a fluorophor, the phosphorescence radiated, which is staggered in time from the excitation, is determined. Thus, it is possible to separate the radiation time from the measurement time.

This compound containing a fluorophor may also have a binding site for the substance being assayed. For example, the fluorophor can be bonded to an antibody as reaction partner R3. This antibody containing a fluorophor can preferably react in an antigen-antibody reaction with the substance being assayed as an antigen, for example a protein.

In another embodiment, the substance (i.e. reaction partner R2) being assayed itself comes as a compound containing a fluorophor. In this embodiment, competitive assays are done, which are characterized especially by a low detection limit.

With the method in the present invention, a wide variety of substances can be detected. The method is especially suitable for assaying biologically active substances, like hormones, such as proteinaceous or non-proteinaceous hormones, proteins like antigens, antibodies or haptens, nucleic acids such as DNA, oligonucleotides or RNA, pharmaceuticals, viruses, bacteria, etc. But the method can also be used to detect environmental poisons, toxins, drugs of abuse, therapeutic drugs, etc. The method

of the present invention includes also double antigen antibody assays for the detection of e.g. immunoglobins such as HIV-, HBC- or HCV-antibodies in human body fluids e.g. blood.

It is especially preferred for the substances being assayed to be detected by immunological reactions.

When exciting the fluorophor bonded to the surface with an evanescent field, a beam of light is pointed at the bottom of the surface at an angle such that total reflection occurs at the cuvette/solution phase boundary. This forms an evanescent field above the surface in the solution, which can penetrate up to several hundred nanometers into the fluid. According to the present invention, an angle of incidence of at least 60° to 90° is preferred, so that an evanescent field at a height up to 400 nm, preferably 200 nm, and especially preferred 50 to 150 nm, is formed over the surface. Within this evanescent field, the beamed light may excite suitable fluorophors. The fluorescent light emitted is detected with a photomultiplier, for example, and evaluated.

Since only the fluorophor bonded to the surface is in the evanescent field, only this bonded fluorophor is optimally excited and emits photons. A compound that contains fluorophor and is not bound in the solution is not in the area of the evanescent field, is therefore basically not excited and also basically emits no photons. This arrangement thus allows quantitative determination of fluorophor bonded to the surface in the presence of fluorophor in the supernatant solution without a prior separation and/or washing step.

Monochromatic light can be used as the light source. Light should

be used that has a wavelength that preferably does not interfere with the emission of the fluorophor. A laser is especially preferred as a light source, whose light emits a wavelength of at least 635 nm. In particular, if the supernatant solution is a serum, lasers that emit wavelengths from 600 to 700 nm are preferred, since serum's inherent fluorescence is roughly at 580 nm.

In one embodiment of the invention, the addition of the fluorophor bonded to the surface can be measured directly (in real time) with a time-progressive reaction. Since the quantity of a fluorophor bonded to the surface is directly proportional to the original amount of compound containing fluorophor, the method in the invention makes it possible to make a quantitative determination of reactants found in the solution in real time without other additional washing and/or pipetting steps.

Since the absorption coefficients and the emission properties of fluorophors are very good, the detection limits are small. After only a few minutes, reactions can be assessed qualitatively and/or quantitatively.

However, the scatter of the light beam in the cuvette, which is not ideal, poses a problem, even if physical measures are taken to reduce the scatter light. Due to scatter, light also gets into the volume in the cuvette and causes background fluorescence there. The term "volume" is understood in the present invention to be the liquid outside the evanescent field, which contains unbonded compounds containing fluorophor. The polarization of the light beam can also be turned in both plastic and glass cuvettes. This leads, in particular, to reflections of the excitation light during uncoupling, creating so-called vagabond light, which, along with volume and surface scatter effects, can result in excitation o

f the volume.

According to the present invention, excitation of the fluorophor in the volume can be further suppressed if the solution to be placed in contact with the surface has at least one dye added to it that has an absorption in the absorption and/or emissions range of the fluorophor.

The absorption of the dye added to the volume is coordinated with the absorption and/or emission range of the fluorophor in the invention.

One individual dye or a mixture of dyes can be used. The absorption range of the fluorophor generally correlates with the wavelength of the light source used. It is not necessary that the dye have an absorption maximum in this spectral range; a shoulder in the absorption spectrum can suffice. For example, if fluorophors like APC or Cy5 are used, the dye used can have an absorption between 600 nm and 700 nm, like for example Brilliant Blue FCF. The concentration of dye added depends on the frequency of the light radiated. The concentration of dye can be adjusted, depending on the dye, so that the penetrating light can basically be absorbed within 1 mm above the surface. To determine the optimal concentration of dye, first the volume fluorescence and the fluorescence in the evanescent field, i.e., the surface fluorescence, are measured for various concentrations of dye. Then, the ratio of surface fluorescence to volume fluorescence is plotted against the concentration of dye. The maximum of this ratio represents the optimum concentration of dye. According to the present invention, "signal/noise ratio" is the ratio of surface fluorescence (signal) to volume fluorescence ("noise"). "Basically absorbed" can mean an intensity cancellation of 70%, preferably 80% and especially preferred at least 90%.

For example, when Brilliant Blue FCF is used as the dye, a concentration of 0.04 mM is enough to suppress far more than 95% of the volume fluorescence. For example, the concentration of Brilliant Blue FCF is preferably at least 0.001 mM.

The small dimension and low price make the cuvette of the present invention feasible in routine diagnostics and analysis. In practical application, this type of cuvette can be pre-prepared and sold commercially closed with a special label. As already outlined above, the pre-preparation includes coating the surface of the cuvette with the first reaction partner R1 and, if necessary, then blocking the uncoated places. It is especially preferred if the coated cuvette comes lyophilized or dried. Providing the cuvette with a serial number makes it possible to have clear attribution of the manufacturing lot, the detection reaction and the sample at any time.

Examples of specific applications that can be cited are a wide variety of assays that are based on the principle of ELISA. An ELISA test can be used to determinate the concentration of antigens or antibodies. Examples of specific antigens are HBV S-protein, HCG, cardiac marker proteins, and hormones such as steroid hormones, peptide hormones, thyroid hormones. Antibody assays, indicative of a previous infection or indicative for a specific disease symptom, such as a HIV antibody assay, Hepatitis S antibody assay or the antibody mediated Heparin Induced Thrombocytopenia can be cited. Also the detection of plant protection products, such as atrazine, in drinking water is possible using the cuvette of the present invention.

Non-immuno assays can also be performed using the cuvette of the p

resent invention, when a detecting reagent can be labelled and this reagent is a specific ligand for a receptor. Therefore a receptor molecule is bound to the surface of the cuvette and the labelled ligand or hormone etc., can specifically bind to the receptor. Hormone receptors can be natural receptors or recombinant receptor molecules. This can be a competitive assay for pharmaceutical drugs where the drug is fluorescently derivatized and the receptor protein is immobilised on the surface of the cuvette. Alternatively, the drug is immobilised on the surface of the receptor and the fluorescent labelled receptor is binding. The application can also be used for recreational drugs.

Also RNA or DNA detection can be performed with the cuvette of the present invention. A complementary strand immobilised on the surface of the cuvette can capture a labelled oligonucleotide. The oligonucleotide can be labelled for example with APC.

When using the cuvette according to the present invention, the above defined methods for assaying substances result surprisingly in analytical sensitivity of at least 10 times better than in common ELISAs and in analysis time of at least 10 times shorter than in common ELISAs.

The present invention will be further explained below using examples, which are, of course, not limiting the scope of protection conferred by the claims.

Examples

In the following examples the photons were measured every second over a time of 10 min (=600sec). Normally, the photons counted at the sta

rt at 0 min and after 10 min are measured and the difference is calculated. This difference is positive and directly proportional to the antigen measured in the assay. If a number of statistical events, e.g. 10000 photons (n) is observed, the statistical error is calculated as three times to the square root of n . In this example $3 \times \text{square root of } 10000 = 3 \times 100 = 300$ photons.

In the experiment, there is measured not only these two time points, but during these 10 min 600 time points. The points fit on a straight line. If now a trend function is generated with a linear regression function and a linear curve is calculated, the overall error for a 99,99% confidence interval is reduced to about 30 photons. This means one tenth of the 300 photons error achieved by the 2 point calculation. Therefore this linear regression improves the analytical detection limit by a factor of 10.

Example 1: Kinetic of biotin-HRP binding to streptavidin surface

A Nunc maxisorp microplate was coated with a solution of neutravidin ($10\mu\text{g/ml}$ in 0.1M NaHCO_3) overnight at room temperature. Then it was washed 3 times with TBST ($10\text{mM Tris pH } 7.5$, 150mM NaCl , $0.1\%\text{Tween } 20$). A solution of biotinylated horseradish peroxidase ("HRP", commercially available from Pierce) (10ng/ml in TBST) was added to the wells and incubated for various times from 1 minute to 6 hours. The wells were washed 6 times with TBST and 3 times with TBS ($10\text{mM Tris pH } 7.5$, 150mM NaCl). Bound HRP was revealed by TMB (commercially available from KPL) and the optical density at 630nm measured after 10 minutes incubation at room temperature. The results are shown in Figure 4.

Figure 4 is a plot of OD 630 as a function of binding time for the

biotinylated HRP to the microplate. After 10 minutes one observes an OD of approximately 0.75. The maximum OD after 6 hours of reaction time is 2.10. After 10 minutes a signal of approximately 30% of the maximum value is shown for HRP by a diffusion based assay and so it is possible to measure a meaningful result. If a for example fluorescence detection system is available one can compensate for the less bound label and still have a fast and sensitive assay.

Example 2: Mouse IgG titration

(A) ELISA

A Nunc maxisorp microplate well was coated with a solution of streptavidin (10 $\mu\text{g/ml}$ in PBSplus (100mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 100mM NaCl pH 7.5)) overnight at room temperature. Then the solution was aspirated and the wells washed 4 times with PBS (10mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137mM NaCl pH 7.4). To block remaining reactive sites, a solution of 1%BSA in PBSplus was added to the well and left for 1 h.

A one-step and a three step ELISA procedure were performed. The assay is a sandwich ELISA detecting mouse IgG.

The one-step ELISA was carried out by incubating a solution of biotinylated goat anti-mouse IgG (commercially available from Jackson) at 1 $\mu\text{g/ml}$, goat anti-mouse HRP (commercially available from Jackson) at 8 $\mu\text{g/ml}$ and various amounts of mouse IgG (commercially available from Jackson) in 1% BSA PBSplus containing 0.025% Tween 20 for 0,5h at room temperature

The three-step ELISA was carried out by a 1 h incubation with the

biotinylated goat anti mouse IgG at 1 $\mu\text{g/ml}$ in 1% BSA PBSplus containing 0.025% Tween 20 followed by three PBS washes. Then a incubation with various amounts of mouse IgG in the same buffer followed by three PBS washes, followed by a 1 h incubation with goat anti mouse HRP at 8 $\mu\text{g/ml}$ in the same buffer.

After these incubation steps the procedure was identical for both ELISA methods and consisted of 5 PBS washes followed by the addition of TMB for colour development for 10 minutes and reading the OD at 630nm. The results are shown in Figure 5 (A).

Figure 5 (A) shows a plot of OD 630 as a function of the mouse IgG concentration in the sample. Detection limits of mouse IgG are approximately 3ng/ml for the one-step ELISA after 40 minutes or 1ng/ml for the three-step ELISA after 3 hours.

Example 2: Mouse IgG titration

(B) Fluorescence assay

A fluorescence chip as an example for the cuvette of the present invention, made by injection molding from polystyrene was γ -radiated with a Cobalt-60 source. The resulting polystyrene surface is activated for protein absorption. The wells were coated by absorption of streptavidin at 10ug/ml in PBSplus (100mM KPO_4 , 100mM NaCl pH 7.5) overnight at room temperature. The solution was aspirated and the wells washed 4 times with PBS (10mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137mM NaCl pH 7.4). To block remaining reactive sites, a solution of 0.25% Tween 20 in PBSplus was added to the well and left for 1 hour.

A one-step immunoassay detecting mouse IgG was performed and bound fluorescence measured by evanescence excitation.

A mixture of biotinylated goat anti-mouse IgG at 1 $\mu\text{g/ml}$, goat anti-mouse APC conjugate made according to the procedure given by the supplier of activated APC (commercially available from Intergen) at 10 $\mu\text{g/ml}$ and various amounts of mouse IgG in 1% BSA PBSplus containing 0.05% Tween 20 were added to the polystyrene fluorescence chip. The chip was then placed immediately in the reader and the emission of fluorescence photons was monitored over time and recorded. As the reaction proceeds, fluorescent molecules bind to the surface and the measured fluorescence increases with time. Measuring the photon counts at time 0 and at 10 minutes and calculating the difference give a number of photon counts due to the biochemical reaction at the surface excited by the evanescence field. This increase of photons depends on the antigen concentration in the sample. There is a minor variation in the background from chip to chip. This chip to chip-variation does not change during the measuring time of 10 minutes and therefore does not appear in the result. The amount of mouse IgG was titrated over the range from 0.1 to 10000 ng/ml. The results are shown in Figure 5 (B).

Figure 5 (B) shows the fluorescence photons expressed as counts measured in 10 second intervals as a function of the mouse IgG concentration in the sample.

The detection limit is given by the statistical variation of measured photons, which correspond to 3 times the square root of the background emission of photons in the apparatus. The background fluorescence is

in this example 500000 which gives a statistical variation of $3 \times 707 = 2121$ counts.

The sample containing 0.1 ng/ml mouse IgG resulted in a signal of 5000 photons, well above the detection limit of the device. Therefore the system that is ten times more sensitive than a comparable ELISA as described in Example 2 (A).

Example 3: Titration of mouse IgG in different matrices

Experimental conditions and reagents are the same as shown in Example 2 (B). The sandwich assay uses a mixture of biotinylated goat anti-mouse IgG at 1 $\mu\text{g/ml}$, goat anti-mouse APC conjugate made according to the procedure given by the supplier of activated APC at 10 $\mu\text{g/ml}$ and various amounts of mouse IgG (commercially available from Jackson). Measurements were made in two different matrices: (a) in 1% BSA PBSplus containing 0.05% Tween 20; and (b) in human EDTA plasma. The results are shown in Figure 6.

Figure 6 shows the fluorescence photons expressed as counts measured in 1 second intervals as a function of the mouse IgG concentration in the sample.

Results are comparable in both buffer systems, using either the synthetic mixture of BSA, PBS, Tween 20 or a natural matrix such as human plasma. Plasma does not seem to generate noticeable autofluorescence.

Example 4: Preparation of lyophilisate in the cuvette

A polystyrene chip as an example for the cuvette of the present invention was provided and an avidin layer was prepared by absorption onto polystyrene. Alternatively, one of the methods mentioned above (poly-L-lysine or allyl dextran) was used. The term "avidin" in the general context encompasses avidin or streptavidin or neutravidin or any other biotin binding molecule. 50 μ l/well of solution I (e.g. 20mM Hepes pH7.5, 1% BSA, 1% Dextran T70, 10mM EDTA and optionally 32mg/ml Trimethoprim and 160mg/ml Sulfamethoxazole) was added and frozen for 4 h at -20° C. The solution I forms the spacer-layer. Then 10 μ l/well solution II (e.g. 20mM Hepes pH7.5, 1% BSA, 1% Dextran T70, 2% Glycin, 1% Brij, 0,5% Tween 20, 100mM NaCl and optionally 32mg/ml Trimethoprim and 160mg/ml Sulfamethoxazole and a dye such as Lissamine Green B, Indigocarmine, Brilliant Black BN or Cu-Chlorophyllin) was added on the top of the frozen spacer layer and frozen for 4h at -20° C. Solution II contains the reactive immunoglobulins, e.g. 50 μ g/ml goat anti-mouse IgG-XL-APC or 5 μ g/ml goat anti-mouse IgG. Finally, it was lyophilized to give the cuvette ready for use.

- 10 cuvette
- 12 handling portion
- 14 recess
- 16 analysing portion
- 18 well portion
- 20 well
- 22 side wall members of wells
- 24 base portion
- 26 first surface
- 28 second surface
- 30 excitation surface
- 32 base surface

26S first side of trapezoid
28S second side of trapezoid
30S top side of trapezoid
32S base side of trapezoid
40 reaction partner R2
44 reaction partner R3
46 reaction partner R1
48 anchoring compound
50 conjugate
52 complex
54 evanescence field

4 Brief Description of Drawings

Fig. 1(a) A top view of a preferred embodiment of a cuvette according to the invention;

Fig. 1(b) a cross-sectional view of the cuvette along the line A-A in Fig. 1(a);

Fig. 1(c) a side view of the lower end side of the cuvette shown in Fig. 1(a);

Fig. 1(d) a cross-sectional view along the line B-B of Fig. 1(a),

Fig. 1(e) a cross-sectional view of the cuvette along the line C-C of Fig. 1(a);

Fig. 1(f) perspective views of the cuvette shown in Fig. 1(a);

Fig. 2 a schematic drawing of a base portion of a cuvette according to another preferred embodiment of the present invention, wherein the optical path of the light beam is schematically depicted;

Fig. 3 a schematic view of one embodiment of the method for assaying substances using the cuvette of the present invention;

Fig. 4 a kinetic of biotin-HRP binding to streptavidin surface;

Fig. 5 a mouse IgG titration in ELISA (A) and fluorescence assay (B);

Fig. 6 a titration of mouse IgG in different matrices.

1 Abstract

The present invention relates to a cuvette for a reader device for assaying substances using the evanescence field method, to a method for preparing a cuvette processed for assaying substances and to a method for assaying substances using said cuvette.

2 Representative Drawing

Fig.1

Fig. 1(a)

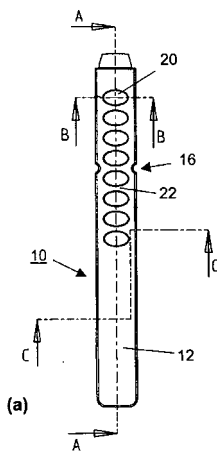


Fig. 1(b)

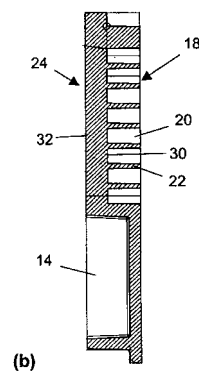


Fig. 1(c)

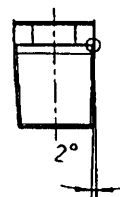


Fig. 1(d)

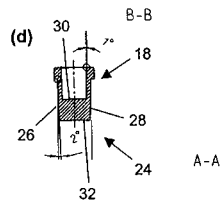


Fig. 1(e)

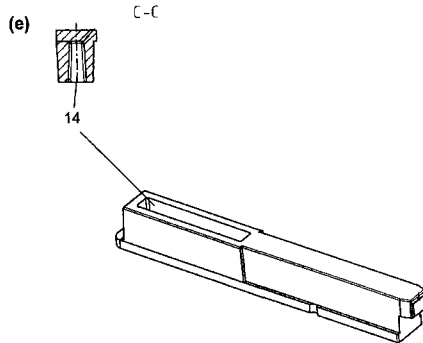


Fig. 1(f)

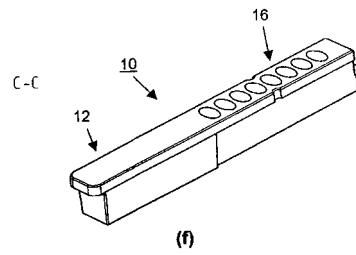


Fig. 2

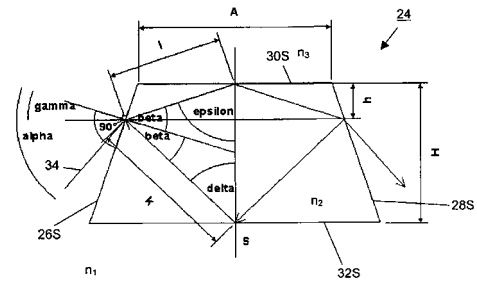


Fig. 3

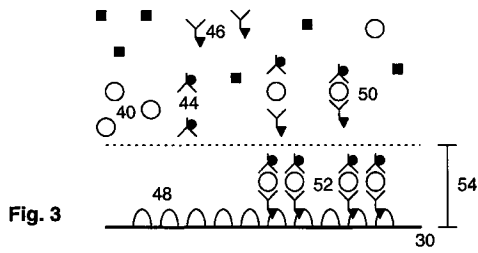


Fig. 3

Fig. 4

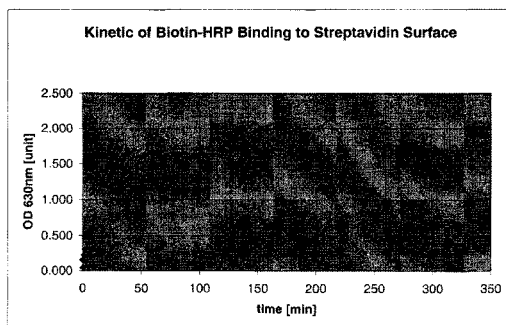


Fig. 5

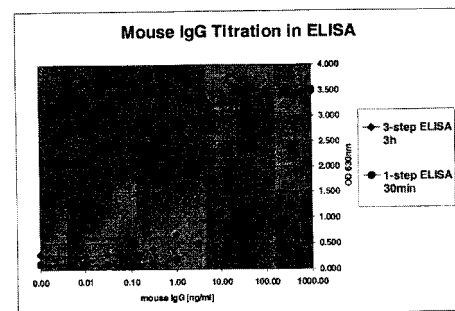


Fig. 6

