

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6430366号
(P6430366)

(45) 発行日 平成30年11月28日(2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日(2018.11.9)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 21/76 Z N A
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/532 B
請求項の数 22 (全 97 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2015-506043 (P2015-506043)	(73) 特許権者	590003283
(86) (22) 出願日	平成25年4月15日(2013.4.15)		コモンウェルス サイエントフィック
(65) 公表番号	特表2015-521274 (P2015-521274A)		アンド インダストリアル リサーチ オ
(43) 公表日	平成27年7月27日(2015.7.27)		ーガナイゼーション
(86) 国際出願番号	PCT/AU2013/000378		オーストラリア国 オーストラリアン キ
(87) 国際公開番号	W02013/155553		ャピタル テリトリリー2601, アクトン
(87) 国際公開日	平成25年10月24日(2013.10.24)		, クルーニーズ ロス ストリート, シー
審査請求日	平成28年4月4日(2016.4.4)		エスアイアールオー ブラック マウンテ
(31) 優先権主張番号	61/624,899		ン サイエンス アンド イノベーション
(32) 優先日	平成24年4月16日(2012.4.16)		パーク
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	2013204332		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成25年4月12日(2013.4.12)	(74) 代理人	100064908
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 志賀 正武
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 検体の検出または試料の分類のための方法およびシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の検体を検出する方法であって、

- i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスを通じて、
- a) 試料、
- b) 前記検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含むセンサ分子であって、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内であり、前記デバイスに固定されない、センサ分子、
- c) 前記化学発光ドナーの基質、を流動させることと、
- i i) 前記センサ分子、試料、および基質を、前記デバイスにおいて混合することと、
- i i i) 電気光学感知デバイスを使用して、前記化学発光ドナーによる前記基質の修飾を検出し、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの間に起こるエネルギー移動を比率として算出することと、を含み、
- 前記アクセプタードメインに対する前記化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、前記検体が前記センサ分子に結合すると変化する、方法。

【請求項2】

試料を分類する方法であって、

- i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスを通じて、
- a) 前記試料、

b) 1つ以上の検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含むセンサ分子であって、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体（複数可）の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内であり、前記デバイスに固定されない、センサ分子、

c) 前記化学発光ドナーの基質、
を流動させることと、

i i) 前記センサ分子、試料、および基質を、前記デバイスにおいて混合することと、

i i i) 電気光学感知デバイスを使用して、前記化学発光ドナーによる前記基質の修飾を検出し、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの間に起こるエネルギー移動を比率として算出することと、

i v) 前記電気光学感知デバイスからの少なくとも1つのシグナルを処理し、電気光学応答パターンを、1つ以上の目的の試料の1つ以上の所定の特徴と相関させることと、

v) 前記応答パターンの前記相関性に基づいて、前記試料を分類することと、
を含み、

前記アクセプタードメインに対する前記化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、前記1つ以上の検体が前記センサ分子に結合すると変化する、方法。

【請求項3】

前記検体のうちの1つ以上が、未知である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記方法は、前記検体をリアルタイムで検出するために使用することができる、および／または約1秒～約100秒の範囲内で実行される請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記センサ分子および基質は、異なるマイクロチャネルを通じて前記デバイスに進入する、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

以下の特徴の1つ以上またはすべてにあてはまる：

i) 前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとのフェルスター距離は、少なくとも5.6nmである、

i i) 前記センサ分子に結合するか、前記センサ分子から解放される前記検体は、BRET比における変化をもたらす、これは最大観測BRET比の15%以上である、あるいは

i i i) 前記アクセプタードメインは、約50nm～約150nmのストークスシフトを有する、

請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記電気光学感知デバイスによって検出される量子収率は、約8%未満、または約5%未満、または約2%未満である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記試料は、液体、気体、気体で事前平衡化されている液体、エマルジョン、または懸濁液である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

i) 前記マイクロ流体デバイスを通る流量は、約1μl/時間～約1.5ml/時間である、および／または

i i) 前記マイクロ流体デバイスを通じた流動は、連続流動、バッチ流動、またはストリップ流動である、

前請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

ステップi i i) は、約1pl～約200μlの容積を有する反応チャンバにおいて行われる、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

10

20

30

40

50

前記検体に結合する前記ドメインは、タンパク質または核酸である、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記タンパク質は、受容体、臭気物質結合タンパク質、フェロモン結合タンパク質、酵素、リガンド担体、細菌周辺質結合タンパク質、または G タンパク質共役型受容体である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

以下の特徴の 1 つ以上またはすべてにあてはまる：

i) 前記化学発光ドナードメインは、生物発光タンパク質である；

i i) 前記基質は、ルシフェリン、カルシウム、セレンテラジン、またはセレンテラジンの誘導体もしくは類似体である、あるいは

i i i) 前記アクセプタードメインは、蛍光性アクセプタードメインである、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

i) 前記生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼまたは生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントである、および／あるいは

i i) 前記基質は、ルシフェリン、セレンテラジン、またはセレンテラジンの誘導体もしくは類似体である、および／あるいは

i i i) 前記アクセプタードメインは、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、Venus、mOrange、またはこれらのいずれか 1 つの生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

同じマイクロ流体デバイスを使用して、2 つ以上の異なる検体を同時または順次に検出することを含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記マイクロ流体デバイスは、

a) それぞれが前記センサ分子、基質、および試料用である 3 つの入力マイクロチャネル、または

b) 一方が前記基質用で、他方が前記センサ分子および試料の事前混合物用である、2 つの入力マイクロチャネル、または

c) 一方が前記センサ分子用で、他方が前記基質および試料の事前混合物用である、2 つの入力マイクロチャネル、

の 1 つ以上のセットを備える、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

以下の特徴の 1 つ以上またはすべてにあてはまる：

i) 少なくとも 1 つのマイクロチャネルは、少なくとも 1 つの他のマイクロチャネルとは異なる容積を有する反応チャンバを備える、

i i) 少なくとも 1 つのマイクロチャネルは、同じかまたは異なる容量の 2 つ以上の反応チャンバを備える、あるいは

i i i) 前記電気光学感知デバイスは、少なくとも 2 つの異なる波長チャネルを有する、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

試料中の検体を検出するためのマイクロ流体システムであって、

i) 前記検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含むセンサ分子を含有するのに好適な少なくとも 1 つのレザーバーであって、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の ± 50 % 以内であり、前記センサ分子は前記デバイスに固定されない、少なくとも 1 つのレザーバーと、

i i) 1 つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスと、

i i i) 前記センサ分子、前記試料、および前記化学発光ドナードメインの基質を、前

10

20

30

40

50

記デバイスにおいて混合するための手段と、

i v) 前記センサ分子への前記検体の結合を検出するための反応チャンバと、

v) 電気光学感知デバイスと、を備え、

前記アクセプタードメインに対する前記化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、前記検体が前記センサ分子に結合するときに変化する、システム。

【請求項 19】

i) 前記検体をリアルタイムで検出するために使用することができる、および／または

i i) 前記マイクロ流体デバイスは、2つ以上の検体の検出を可能にするように設計される、

請求項 18 に記載のシステム。

10

【請求項 20】

試料を分類するためのマイクロ流体システムであって、

i) 1つ以上の検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含むセンサ分子を含有するのに好適な少なくとも1つのレザーバーであって、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内であり、前記センサ分子は前記デバイスに固定されない、少なくとも1つのレザーバーと、

i i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスと、

i i i) 前記センサ分子、前記試料、および前記化学発光ドナードメインの基質を、前記デバイスにおいて混合するための手段と、

20

i v) 前記センサ分子への前記検体の結合を検出するための反応チャンバと、

v) 電気光学感知デバイスと、

を備え、

前記アクセプタードメインに対する前記化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、前記1つ以上の検体が前記センサ分子に結合すると変化する、システム。

【請求項 21】

目的の分子に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスを通じて、

a) 候補化合物、

30

b) 前記目的の分子、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインを含むセンサ分子であって、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの距離および相対配向は、前記候補化合物の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内であり、前記デバイスに固定されない、センサ分子、

c) 前記化学発光ドナーの基質、

を流動させることと、

i i) 前記センサ分子、前記候補化合物、および基質を、前記デバイスにおいて混合することと、

i i i) 電気光学感知デバイスを使用して、前記化学発光ドナーによる前記基質の修飾を検出し、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの間に起こるエネルギー移動を比率として算出することと、

40

v) 前記電気光学感知デバイスからの少なくとも1つのシグナルを処理して、前記候補化合物が前記センサ分子に結合するかどうかを判定することと、

v i) 前記化合物が前記センサ分子に結合する場合、それを選択することと、

を含み、

前記アクセプタードメインに対する前記化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、前記候補化合物が前記センサ分子に結合すると変化する、方法。

【請求項 22】

目的の分子に結合する化合物をスクリーニングするためのマイクロ流体システムであって、

50

i) 前記目的の分子、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインを含むセンサ分子を含有するのに好適な少なくとも1つのレザーバーであって、前記化学発光ドナードメインと前記アクセプタードメインとの距離および相対配向は、候補化合物の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内であり、前記センサ分子は前記デバイスに固定されない、少なくとも1つのレザーバーと、

i i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスと、

i i i) 前記センサ分子、前記候補化合物、および前記化学発光ドナードメインの基質を、前記デバイスにおいて混合するための手段と、

i v) 前記センサ分子への前記候補化合物の結合を検出するための反応チャンバと、

v) 電気光学感知デバイスと、

を備え、

アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、候補化合物がセンサ分子に結合すると変化する、システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中の1つ以上の検体の検出および／または試料の分類のための方法およびシステムに関する。具体的には、本発明は、検体をリアルタイムで検出するために使用することができ、マイクロ流体デバイスを通じて、それぞれが1つ以上の検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含む1つ以上の種類のセンサ分子を流動させることに依存する、方法およびシステムに関し、ここで、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である。

【背景技術】

【0002】

生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)は、オワンクラゲおよびウミシイタケ等の海洋生物に天然に存在する(Morin and Hastings, 1971)。BRETは、励起状態のドナーから基底状態のアクセプターへのエネルギーの非放射移動である、フェルスター共鳴エネルギー移動(RET)の一形態である。2つの広く使用されるBRETの原理、すなわち、BRET¹およびBRET²がある。いずれも、エネルギードナーとしてウミシイタケルシフェラーゼ(RLuc)を使用する。BRET¹では、基質は、天然のセレンテラジン(CLZ)またはセレンテラジンh(CLZh)である。RLucおよび黄色蛍光タンパク質(YFP)は、それぞれ、エネルギーのドナーおよびアクセプターであり、475nmでピークドナー放出および535nmでピークアクセプター放出をもたらす。BRET²では、YFPがGFP²で置き換えられ、修飾CLZ基質、すなわちセレンテラジン-400aまたは(CLZ400a)が使用される。ピークドナー放出およびアクセプター放出は、それぞれ、395nmおよび515nmにシフトする(Dacres et al., 2009a, b; Pflieger and Eidne, 2006)。第3の形態のBRET、すなわちBRET³は、最近開発された。これは、CLZhを基質として、RLuc8をエネルギードナーとして、mOrangeをアクセプターとして使用し、改善されたスペクトル分解能をもたらした(De et al., 2009)。

【0003】

RETは、アッセイ規模、アッセイ条件、およびプレート内の異なるウェルにわたるシグナル減衰の変動に起因する、光出力における揺らぎによってもたらされるデータの変動性を排除し得る、レシオメトリック技法である。RETに基づく反応は、均質的であり、概して、固相の結合を伴わずに溶液中で起こる。これは、分離を伴うことなく、液体、気体、および微粒子といった異なる形態の検体の検出を可能にする。固相結合の回避は、表面プラズモン共鳴(SPR)(Fang et al., 2005)等の多数の表面に基づく技法で用いられる表面再生プロセスを排除し、速い反応速度と併せて、オンラインで

10

20

30

40

50

の監視に使用することを可能にする。

【0004】

しかしながら、現在のところ、BRETの使用は、高度な検出機器を使用する研究所に限定されている。マイクロ流体技術は、化学、生物学、医学、感知、および材料を含む、多数の分野で注目を集めている。従来技術に勝るそれらの利点には、試薬消費の低減、高速な反応速度、短い分析時間、ならびに自動化および量産に適していることが挙げられる (Holden and Cremer, 2005)。

【0005】

マイクロ流体技術において相当な研究および開発がなされている。例としては、蛍光光収集による統合型バイオチップ設計 (EP 2 221 606 号)、ラマン分光法を用いたオンチップバイオセンシング (WO 2 009 / 0 2 0 4 7 9 号)、表面プラズモン共鳴技術を用いてGPCRリガンド結合を検出するためのバイオセンシングデバイス (WO 2 009 / 0 1 8 4 6 7 号)、反射体として鏡を用いた光検出チップ (US 2 0 1 1 / 0 0 3 7 0 7 7 号およびUS 2 0 0 8 0 8 5 5 5 2 号)、カートリッジ形式のアッセイデバイス (WO 2 009 / 0 4 4 0 8 8 号)、化学発光に基づくマイクロ流体バイオチップ (US 2 002 / 0 1 2 3 0 5 9 号) 等が挙げられる。これらのデバイスの多くは、複数の構成要素の組み込みに起因してチップ当たりの費用が高いこと、表面再生が必要であり試薬反応が遅いためにリアルタイムでの監視を実行できないこと、検出感度が制限されること、またはシグナルドリフトという不都合を有する。

【0006】

さらに、電子嗅覚および電子味覚の分野には相当な背景技術があり、これは、検体の検出および／または試料の分類のために、気体状または液体の試料を多数の固体センサと接触させる。電子嗅覚および味覚は、センサの選択性の制限、感度の悪さ、センサの飽和および遅い再生、ならびに経時的なセンサドリフトに起因する性能の悪さに悩まされている。

【0007】

したがって、検体を検出し、含有する検体に基づいて試料を分類する方法、具体的には、リアルタイムで向上した感度で実行することができ、感知表面を再生する必要性のために休止時間に悩まされることがなく、センサドリフトの複雑な作用に耐える、方法に対する必要性が存在する。検出システムに電気光学的に接続された多数の生物学的に誘導されたセンサを展開する多重チャネルのマイクロ流体システムは、これらの問題に対する新規な解決策を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】EP 2 221 606 号

【特許文献2】WO 2 009 / 0 2 0 4 7 9 号

【特許文献3】WO 2 009 / 0 1 8 4 6 7 号

【特許文献4】US 2 0 1 1 / 0 0 3 7 0 7 7 号

【特許文献5】US 2 0 0 8 0 8 5 5 5 2 号

【特許文献6】WO 2 009 / 0 4 4 0 8 8 号

【特許文献7】US 2 002 / 0 1 2 3 0 5 9 号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Morin and Hastings, 1971

【非特許文献2】Dacres et al., 2009a

【非特許文献3】Dacres et al., 2009b

【非特許文献4】Pfleger and Eidne, 2006

【非特許文献5】De et al., 2009

【非特許文献6】Fang et al., 2005

【非特許文献7】Holden and Cremer, 2005

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らは、試料中の検体を検出する改善された方法を特定した。

【0011】

一態様において、本発明は、試料中の検体を検出する方法を提供し、この方法は、

i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスを通じて、

a) 試料、

b) 検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含むセンサ分子であって、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である、センサ分子、

c) 化学発光ドナーの基質、を流動させることと、

ii) センサ分子、試料、および基質を、デバイスにおいて混合することと、

iii) 電気光学感知デバイスを使用して、化学発光ドナーによる基質の修飾を検出することと、を含み、

アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、検体がセンサ分子に結合すると変化する。

【0012】

好ましい実施形態において、センサ分子は、デバイスに固定されない。

【0013】

さらなる好ましい実施形態において、本方法は、検体をリアルタイムで検出するために使用することができる。

【0014】

別の好ましい実施形態において、センサ分子および基質は、異なるマイクロチャネルを通じてデバイスに進入する。代替的な実施形態において、センサ分子および基質は、同じマイクロチャネルを通じてデバイスに進入するが、しかしながら、この実施形態では、センサ分子および基質を、マイクロチャネルに進入する前に、直前（例えば、10秒、より好ましくは1秒、またはそれ未満）に混合することが好ましい。

【0015】

好ましい実施形態において、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとのフェルスター距離は、少なくとも5.6nm、または少なくとも6nmである。別の好ましい実施形態において、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとのフェルスター距離は、約5.6nm～約10nm、または約6nm～約10nmである。

【0016】

さらなる好ましい実施形態において、センサ分子に結合するかまたはそこから解放される検体は、BRET比の変化をもたらす、これは、最大観測BRET比の15%以上、20%以上、30%以上、35%以上、約15%～約50%、または約15%～約40%である。15%以上のBRET比の変化は、検体検出のシグナル対ノイズ比を増加させる。これは、任意の所与のサンプリング時間でより優れた検出限界をもたらす、検体の濃度レベルのより正確な符号化をもたらす。あるいは、固定の検出限界では、BRET比におけるより大きな変化は、シグナル統合時間の短縮、およびしたがってより高速な検出を促進する。

【0017】

さらなる好ましい実施形態において、電気光学感知デバイスによって検出される量子収率は、約8%未満、または約5%未満、または約2%未満である。

【0018】

別の好ましい実施形態において、アクセプタードメインは、約50nm～約150nmのストークスシフトを有する。ある実施形態において、アクセプタードメインは、約10

10

20

30

40

50

0 nmのストークスシフトを有する。

【0019】

本発明の方法の利点は、時間分解能が高いことである。したがって、好ましい実施形態において、本方法は、約1秒～約100秒の範囲内で実行される。

【0020】

試料は、マイクロ流体デバイスを通じて流動することができる任意の形態であり得る。例としては、液体、気体、エマルジョン、または懸濁液が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。ある実施形態において、試料は、気体で事前平衡化されている液体である。

【0021】

一実施形態において、懸濁液は、無細胞組成物であるか、またはそれを含む。代替的な実施形態において、懸濁液は、細胞を含む。

【0022】

ある実施形態において、マイクロ流体デバイスを通る流量は、約1 μ l/時間～約10 ml/時間、または1 μ l/時間～約1 ml/時間、または1 μ l/時間～約1.5 ml/時間、または約20 μ l/時間～約0.5 ml/時間であり、好ましい流量は、約200 μ l/時間～約1 ml/時間である。

【0023】

好ましい実施形態において、試料、センサ分子、および基質を含むマイクロチャネルの部分の流量および長さは、試料、センサ分子、および基質が、少なくとも約5秒、少なくとも約10秒、少なくとも約15秒、少なくとも約20秒、約5秒～約50秒、または約10秒～約30秒間、その部分内に存在するようなものである。

【0024】

一実施形態において、例えば、センサ分子がG共役型タンパク質受容体等のタンパク質受容体を含む場合、ステップii)後のセンサ分子の濃度は、約1 nM～約10 μ Mまたは約1 nM～約1 μ Mである。別の実施形態において、例えば、センサ分子が切断可能なペプチド由来または周辺質結合タンパク質を含む場合、ステップii)後のセンサ分子の濃度は、約0.1 μ M～約10 μ Mである。

【0025】

ある実施形態において、マイクロ流体デバイスを通じた流動は、連続流動、バッチ流動、またはストップ流動である。

【0026】

試料、センサ分子、および基質は、機械的、動電的、音響的、または他の好適な手段を用いて、能動的に混合され得る。好ましい実施形態において、混合は、試料、センサ分子、および基質を含むマイクロチャネルを通る流動の方向に垂直な寸法全体にわたる拡散によって達成される。例えば、試料、センサ分子、および基質の効率的な混合($\geq 20\%$)は、便宜的に、主に受動的拡散(非乱流)プロセスによって達成され得る。典型的な条件には、1時間当たりおおよそ1,000マイクロリットルを上回らない流量、おおよそ10 mm以上の共通マイクロチャネル長、および積み重ねた入力の高さが、共通チャネルにおいて互いに接触して流動する際におおよそ200マイクロメートル以下(流動方向に対して垂直方向に測定される)であることが挙げられる。

【0027】

試料、センサ分子、および基質は、必ずしも限定されないが、ポンプ、減圧、水圧、吸引、動電、化学浸透、毛管力、音響、電磁気、圧電のうちの1つ以上といった任意の好適な手段によって、マイクロ流体デバイスを通じて流動され得る。ポンプ機序は、コンパクトな小型化されたミクロン寸法のポンプで実現され得る。好ましい実施形態において、試料、センサ分子、および基質は、吸引(陰圧)によって、例えば、シリンジポンプを吸い込みモードで使用して、マイクロ流体デバイスを通じて流動される。

【0028】

ある実施形態において、各マイクロチャネルは、約1 μ m²～約1 mm²の断面積を有

10

20

30

40

50

する。

【0029】

さらなる実施形態において、試料、センサ分子、および基質のためのマイクロチャネルは、それぞれが、幅300 μ m以上で高さ60 μ m以上、幅600 μ m以上で高さ30 μ m以上、または幅1200 μ m以上で高さ15 μ m以上である。ある実施形態において、高さは、約1mmまたは約0.5mmを上回らない。別の実施形態において、高さは、約15 μ m～約1mmまたは約15 μ m～約0.5mmである。さらなる実施形態において、幅は、約1.5mmを上回らない。なおもさらなる実施形態において、幅は約300 μ m～約1.5mmまたは約300 μ m～約1.2mmである。

【0030】

基質、センサ分子、および試料のための入力マイクロチャネルの長さは、可能な限り短く、好ましくは10mm未満、より好ましくは5mm未満である。

【0031】

基質、センサ分子、および試料を混合および反応させることができる共通マイクロチャネルの長さは、5mm～100mm、または10mm～100mm、好ましくは20mm～50mmであり得、線形、蛇形、または直線曲線形状の任意の好適な組み合わせであり得る。代替的な実施形態において、共通マイクロチャネルは、全面的に分注され得、センサ分子、基質、および試料は、能動的混合ありまたはなしで、反応チャンバに直接導入され得る。

【0032】

さらなる実施形態において、ステップiii)は、約1pL（すなわち、ピコリットルまたは1兆分の1リットル）～約200 μ Lの容積を有する反応チャンバで行われ、好ましい容積は0.5 μ L～約8 μ L、または0.5 μ L～約2 μ Lである。

【0033】

さらなる別の実施形態において、ステップiii)は、電気光学感知デバイスからの少なくとも1つのシグナルを処理して、検体が試料中に不在であるか存在するかを判定し、存在する場合は、試料中の検体の濃度を任意に判定することを含む。

【0034】

ある実施形態において、検体に結合するドメインはタンパク質（ペプチドであり得る）または核酸である。好ましい実施形態において、このドメインはタンパク質である。ある実施形態において、タンパク質は、1つ以上の検体（リガンド）に結合する、天然のタンパク質であるか、または検体（リガンド）結合活性を保持するタンパク質の変異体である。例としては、受容体、臭気物質結合タンパク質、フェロモン結合タンパク質、酵素、リガンド担体、または細菌周辺質結合タンパク質が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。ある実施形態において、受容体は、嗅覚受容体または味覚受容体等のGタンパク質共役型受容体である。さらなる実施形態において、嗅覚受容体または味覚受容体は、線形動物もしくは脊椎動物に由来するか、またはそれらの突然変異体である。

【0035】

ある実施形態において、化学発光ドナードメインは、生物発光タンパク質である。例としては、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、または β -グルコシダーゼが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。ルシフェラーゼの例には、ウミシイタケルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、腔腸動物ルシフェラーゼ、北アメリカツチボタルルシフェラーゼ、コメツキムシルシフェラーゼ、レイルロードワームルシフェラーゼ、細菌ルシフェラーゼ、ガウシアルシフェラーゼ、エクオリン、ヒカリキノコバエルシフェラーゼ、あるいはそれらのいずれか1つの生物学的に活性な変異体もしくはフラグメント、またはそれらの2つ以上のキメラが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましい実施形態において、ウミシイタケルシフェラーゼ変異体は、RLuc2またはRLuc8である。

【0036】

ある実施形態において、基質は、ルシフェリン（甲虫ルシフェリン等）、カルシウム、セレンテラジン、またはセレンテラジンの誘導体もしくは類似体である。

【0037】

好ましい実施形態において、アクセプタードメインは、蛍光性アクセプタードメインである。

【0038】

さらなる実施形態において、蛍光性アクセプタードメインは、タンパク質である。例としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）、GFPの青色蛍光変異体（BFP）、GFPのシアン蛍光変異体（CFP）、GFPの黄色蛍光変異体（YFP）、高感度GFP（EGFP）、高感度CFP（ECFP）、高感度YFP（EYFP）、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP（dEGFP）、不安定化ECFP（dECFP）、不安定化EYFP（dEYFP）、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-dimer2、t-dimer2（12）、mRFP1、ポキロポリン（pocilloporin）、ウミシイタケGFP、Monster GFP、paGFP、Kaedeタンパク質、もしくはフィコビリタンパク質、またはこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0039】

代替的な実施形態において、蛍光性アクセプタードメインは、非タンパク質である。例としては、Alexa Fluor色素、Bodipy色素、Cy色素、フルオレセイン、ダンシル、ウンベリフェロン、蛍光性ミクロスフェア、発光性ミクロスフェア、蛍光性ナノ結晶、マリーナブルー、カスケードブルー、カスケードイエロー、パシフィックブルー、オレゴングリーン、テトラメチルローダミン、ローダミン、テキサスレッド、希土類元素キレート、またはこれらの任意の組み合わせもしくは誘導体が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0040】

ある実施形態において、本方法は、生物発光タンパク質の補因子を提供することをさらに含む。補因子の例には、ATP、マグネシウム、酸素、FMNH₂、カルシウム、またはこれらのいずれか2つ以上の組み合わせが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0041】

好ましい実施形態において、

i) 生物発光タンパク質は、ルシフェラーゼまたは生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントである、および／あるいは

ii) 基質は、ルシフェリン、セレンテラジン、またはセレンテラジンの誘導体もしくは類似体である、および／あるいは

iii) アクセプタードメインは、緑色蛍光タンパク質（GFP）、Venus、mOrange、またはこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントである。

【0042】

さらなる好ましい実施形態において、

i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼであり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、

ii) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ2であり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、

iii) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ8であり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、

iv) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ2であり、アクセプタードメインはVenusであり、基質はセレンテラジンである、

v) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ8であり、アクセプタードメインは

10

20

30

40

50

Venusであり、基質はセレンテラジンである、

v i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ8、6-535であり、アクセプタードメインはmOrangeであり、基質はセレンテラジンである、または

v i i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ8であり、アクセプタードメインはmOrangeであり、基質はセレンテラジンである。

【0043】

より好ましくは、

i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼであり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、

i i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ2であり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、

i i i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ8であり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、

iv) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ8、6-535であり、アクセプタードメインはmOrangeであり、基質はセレンテラジンである、または

v) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ8であり、アクセプタードメインはmOrangeであり、基質はセレンテラジンである。

【0044】

さらにより好ましくは、

i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼであり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、

i i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ2であり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、または

i i i) ルシフェラーゼはウミシイタケルシフェラーゼ8であり、アクセプタードメインはGFP²であり、基質はセレンテラジン400aである、

【0045】

ある実施形態において、本方法は、同じマイクロ流体デバイスを使用して、例えば、図14bおよび14cに示されるデバイスを使用して、2つ以上の異なる検体を同時または順次に検出することを含む。

【0046】

ある実施形態において、マイクロ流体デバイスは、

a) それぞれがセンサ分子、基質、および試料用である3つの入力マイクロチャネル、または

b) 一方が基質用で、他方がセンサ分子および試料の事前混合物用である、2つの入力マイクロチャネル、または

c) 一方がセンサ分子用で、他方が基質および試料の事前混合物用である、2つの入力マイクロチャネル、の1つ以上のセットを備える。

【0047】

さらなる実施形態において、少なくとも1つのマイクロチャネルは、少なくとも1つの他のマイクロチャネルとは異なる容積を有する反応チャンバを備える。

【0048】

別の実施形態において、少なくとも1つのマイクロチャネルは、同じかまたは異なる容積の2つ以上の反応チャンバを備える。

【0049】

好ましい実施形態において、電気光学感知デバイスは、重複または非重複波長を検出し得る少なくとも2つの異なる波長チャネルを備える。代替的な実施形態において、電気光学感知デバイスは、単一の波長チャネルを備え、この実施形態では、ドナーがアクセプターからの放出を消光する。

【0050】

ある実施形態において、電気光学感知デバイスは、ファイバ束または液体ライトガイド

を備える。ある実施形態において、ファイバ束または液体ライトガイドの直径は、約1 mm～約10 mm、または約1 mm～約6 mmである。ある実施形態において、電気光学感知デバイスは、シャッターボックスをさらに備える。

【0051】

ある実施形態において、電気光学感知デバイスは、二分岐型ライトガイドを備え、ダイクロックブロックを有さない。

【0052】

好ましい実施形態において、センサ分子は、無細胞抽出液で存在する。

【0053】

代替的な実施形態において、センサ分子は、細胞によって発現され（例えば、細胞の表面上に存在するか、または細胞によって分泌される）、細胞懸濁液として提供され、この場合細胞は無傷である。

10

【0054】

本方法は、細胞を選別するために使用することができる。したがって、ある実施形態において、検体は細胞の表面上に曝露され、本方法は、検体を含む細胞を、検体を欠く試料中の細胞とは異なるマイクロチャネルを通じて転向させること、ならびに検体を含む細胞を収集することおよび／または検体を欠く細胞を収集することをさらに含み、ここで、両方の細胞型が収集される場合、それらは、別個の容器に収集される。

【0055】

別の態様において、本発明は、試料中の検体を検出するためのマイクロ流体システムを提供し、本システムは、

20

i) 検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含むセンサ分子を含有する（または含む）のに好適な少なくとも1つのレザーバーであって、化学発光ドナードメインおよびアクセプタードメインの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である、少なくとも1つのレザーバーと、

ii) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスと、

iii) センサ分子、試料、および化学発光ドナードメインの基質を、デバイスにおいて混合するための手段と、

iv) センサ分子への検体の結合を検出するための反応チャンバと、

30

v) 電気光学感知デバイスと、を備え、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、検体がセンサ分子に結合すると変化する。

【0056】

好ましい実施形態において、センサ分子は、マイクロ流体デバイスに固定されない。

【0057】

さらなる好ましい実施形態において、本システムは、検体をリアルタイムで検出するために使用することができる。

【0058】

別の好ましい実施形態において、センサ分子および基質は、異なるマイクロチャネルを通じてデバイスに進入する。

40

【0059】

さらなる好ましい実施形態において、マイクロ流体デバイスは、少なくとも2つの入力マイクロチャネルを備え、ここで、入力マイクロチャネルのうちの1つは、センサ分子をデバイスに流動させるためのものである。

【0060】

当業者には理解されるように、本発明の方法に関連する好ましい実施形態のそれぞれは、本発明のシステムおよび／または本システムがどのように動作し得るかにもまた関連する。

【0061】

50

ある実施形態において、電気光学感知デバイスは、少なくとも2つの異なる波長チャンネルを備える。

【0062】

特に好ましい実施形態において、電気光学感知デバイスは、2つの異なる波長チャンネルを同時に、または高速で連続して、検出することができる。例えば、電気光学感知デバイスは、2つの異なる波長チャンネルを1秒未満以内に検出することができる。

【0063】

さらなる実施形態において、マイクロ流体デバイスは、2つ以上の検体の検出を可能にするように設計される。ある実施形態において、このデバイスは、それぞれが異なるセンサ分子をデバイスに流動させるための別個のマイクロチャンネルを備える。

10

【0064】

ある実施形態において、混合は、反応チャンバで起こる。

【0065】

本発明は、試料を分類するためにも使用することができる。この目的では、試料中のどの検体（複数可）が、実際に1つ以上のセンサ分子に結合するかが既に判明していることは必須ではない。したがって、別の態様において、本発明は、試料を分類する方法を提供し、この方法は、

i) 1つ以上のマイクロチャンネルを備えるマイクロ流体デバイスを通じて、

a) 試料、

b) 1つ以上の検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含むセンサ分子であって、化学発光ドナードメインおよびアクセプタードメインの距離および相対配向は、検体（複数可）の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である、センサ分子、

20

c) 化学発光ドナーの基質、を流動させることと、

ii) センサ分子、試料、および基質を、デバイスにおいて混合することと、

iii) 電気光学感知デバイスを使用して、化学発光ドナーによる基質の修飾を検出することと、

iv) 電気光学感知デバイスからの少なくとも1つのシグナルを処理し、電気光学応答パターンを、1つ以上の目的の試料の1つ以上の所定の特徴と相関させることと、

v) 応答パターンの相関性に基づいて試料を分類することであって、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、1つ以上の検体がセンサ分子に結合すると変化することと、を含む。

30

【0066】

好ましい実施形態において、上述の方法は、それぞれが異なる検体（検体（analyte）の異なるセットであり得る）または検体の範囲に結合する2つ以上の異なるセンサ分子を含み、ステップv)は、検体または検体の範囲のそれぞれの存在、不在、または濃度に基づいて試料を分類することを含む。

【0067】

ある実施形態において、検体のうちの1つ以上は、未知である。

【0068】

さらなる実施形態において、本方法は、試料をリアルタイムで分類するために使用することができる。

40

【0069】

別の実施形態において、センサ分子は、デバイスに固定されない。

【0070】

なおもさらなる実施形態において、センサ分子および基質は、異なるマイクロチャンネルを通じてデバイスに進入する、

【0071】

試料を分類するためのマイクロ流体システムもまた提供され、このシステムは、

i) 1つ以上の検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合す

50

るドメインを含むセンサ分子を含有する（または含む）のに好適な少なくとも1つのレーザーであって、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である、少なくとも1つのレーザーと、

i i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスと、

i i i) センサ分子、試料、および化学発光ドナードメインの基質を、デバイスにおいて混合するための手段と、

i v) センサ分子への検体の結合を検出するための反応チャンバと、

v) 電気光学感知デバイスと、を備え、

アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、1つ以上の検体がセンサ分子に結合すると変化する。

10

【0072】

ある実施形態において、本システムは、それぞれが異なる検体（検体（a n l a y t e））の異なるセット、または検体の範囲であり得る）に結合する、2つ以上の異なるセンサ分子を含む。

【0073】

ある実施形態において、本システムは、それぞれが異なる部位および／または異なる親和性レベルで同じ検体に結合する、2つ以上の異なるセンサ分子を含む。

【0074】

別の実施形態において、検体のうちの1つ以上、または検体の範囲が、未知である。

20

【0075】

さらなる実施形態において、本システムは、試料をリアルタイムで分類するために使用することができる。

【0076】

ある実施形態において、センサ分子は、デバイスに固定されない。

【0077】

さらなる実施形態において、センサ分子および基質は、異なるマイクロチャネルを通じてデバイスに進入する。

【0078】

別の実施形態において、マイクロ流体デバイスは、少なくとも2つの入力マイクロチャネルを備え、ここで、入力マイクロチャネルのうちの1つは、センサ分子をデバイスに流動させるためのものである。

30

【0079】

さらなる態様において、本発明は、目的の分子に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、

i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスを通じて、

a) 候補化合物、

b) 目的の分子、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインを含むセンサ分子であって、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの距離および相対配向は、候補化合物の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である、センサ分子、

40

c) 化学発光ドナーの基質、を流動させることと、

i i) センサ分子、候補化合物、および基質を、デバイスにおいて混合することと、

i v) 電気光学感知デバイスを使用して、化学発光ドナーによる基質の修飾を検出することと、

v) 電気光学感知デバイスからの少なくとも1つのシグナルを処理して、候補化合物がセンサ分子に結合するかどうかを判定することと、

v i) 化合物がセンサ分子に結合する場合、それを選択することと、を含み、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、候補化合物がセンサ分子に結合すると変化する。

50

【0080】

好ましい実施形態において、本方法は、センサ分子への候補化合物の結合をリアルタイムで検出するために使用することができる。

【0081】

さらなる好ましい実施形態において、センサ分子は、デバイスに固定されない。

【0082】

別の好ましい実施形態において、センサ分子および基質は、異なるマイクロチャネルを通じてデバイスに進入する。

【0083】

好ましい実施形態において、本方法は、候補化合物が目的の分子の結合ドメインに結合し、センサ分子の他のドメインには結合しないことを確認することをさらに含む。当業者には理解されるように、これは、目的の分子をカラムで用いて候補化合物を捕捉すること、競合的結合アッセイといった、当該技術分野における種々の技術のうちのいずれかを用いて行われ、続いて候補化合物を目的の分子とともにインキュベートすることが、目的の分子の移動を変化させるかどうかについてゲルクロマトグラフィー等を使用して判定することができる。

10

【0084】

候補化合物および目的の分子は、同じ種類の物質であり得、例えば、いずれも、核酸、タンパク質（ペプチドを含む）、または小分子であり得る。一実施形態において、目的の分子は、限定されないが、受容体、臭気物質結合タンパク質、フェロモン結合タンパク質、酵素、リガンド担体、または細菌周辺質結合タンパク質等のタンパク質である。目的の分子は、天然に存在するまたはその突然変異体／変異体であり得る。

20

【0085】

さらなる態様において、本発明は、目的の分子に結合する化合物をスクリーニングするためのマイクロ流体システムを提供し、このシステムは、

i) 目的の分子、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインを含むセンサ分子を含有する（または含む）のに好適な少なくとも1つのレザーバーであって、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの距離および相対配向は、候補化合物の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である、少なくとも1つのレザーバーと、

30

ii) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスと、

iii) センサ分子、候補化合物、および化学発光ドナードメインの基質を、デバイスにおいて混合するための手段と、

iv) センサ分子への候補化合物の結合を検出するための反応チャンバと、

v) 電気光学感知デバイスと、を備え、アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、候補化合物がセンサ分子に結合すると変化する。

【0086】

好ましい実施形態において、本システムは、センサ分子への候補化合物の結合をリアルタイムで検出するために使用することができる。

40

【0087】

さらなる好ましい実施形態において、センサ分子は、デバイスに固定されない。

【0088】

別の好ましい実施形態において、センサ分子および基質は、異なるマイクロチャネルを通じてデバイスに進入する。

【0089】

さらなる実施形態において、マイクロ流体デバイスは、少なくとも2つの入力マイクロチャネルを備え、ここで、入力マイクロチャネルのうちの1つは、センサ分子をデバイスに流動させるためのものである。

【0090】

50

本発明者らまた、発光が弱いというBRET2の特性に悩まされることのない、ハイブリッドBRET (BRET^H) 検出システムも特定した。したがって、さらなる態様において、本発明は、試料中の検体を検出する方法を提供し、この方法は、

i) 試料を、セレンテラジンの存在下で、

a) 検体に結合するドメイン、

b) ウミシイタケルシフェラーゼ、および

c) 緑色蛍光タンパク質2を含む、センサ分子と接触させることと、

ii) 生物発光タンパク質とアクセプター分子との間の生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) が修飾されたかどうかを判定することと、を含み、アクセプター分子に対する生物発光タンパク質の空間位置および／または双極子配向は、検体がドメインに結合すると変化する。

10

【0091】

当然ながら、上述の方法は、マイクロ流体デバイスを使用する本発明の方法において容易に使用することができる。

【0092】

さらなる態様において、本発明は、1つ以上の検体、ウミシイタケルシフェラーゼ、および緑色蛍光タンパク質2に結合するドメインを含む、単離されたセンサ分子を提供する。

【0093】

本発明者らは、2-ペンタノンに結合するポリペプチドを特定しており、したがって、これらのポリペプチドを、この化合物の検出に使用することができる。

20

【0094】

したがって、さらなる態様において、本発明は、試料中の2-ペンタノンを検出する方法を提供し、この方法は、

i) 試料を、2-ペンタノンに結合する、線虫str-112 (配列番号41) もしくはstr-113 (配列番号42) であるポリペプチド、またはその変異体と接触させることと、

ii) ポリペプチドのうちのいずれかが2-ペンタノンに結合したかどうかを検出することと、を含む。

【0095】

当業者には理解されるように、新しいリガンド／ポリペプチド結合対を特定した後に構成することができる、非常に多くの異なるアッセイが存在する。一実施形態において、本発明の方法は、試料中の2-ペンタノンを検出するために使用される。

30

【0096】

ある実施形態において、str-113の変異体は、str-114／str-113融合体 (配列番号43) である。

【0097】

ある実施形態において、ポリペプチドは、検出可能に標識化される。このような検出可能に標識化されたポリペプチドの例には、配列番号13、14、18、27、28、および30として提供されるものが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0098】

2-ペンタノンは、細菌によって生成され、したがって、上述の方法は、例えば、細菌感染または汚染を検出するために使用することができる。

【0099】

このように、さらなる実施形態において、本発明は、本発明の方法を使用して2-ペンタノンを検出することを含む、試料中の細菌を検出する方法を提供する。

【0100】

ある実施形態において、細菌は、大腸菌等のエシェリキア属である。

【0101】

本明細書のいずれの実施形態も、別途具体的に示されない限り、必要な変更を加えて、

50

任意の他の実施形態に適用されるものとする。

【0102】

本発明は、例示のみを目的とする本明細書に記載される特定の実施形態によって範囲が制限されるものではない。機能的に同等な生成物、組成物、および方法は、本明細書に記載されるように、当然ながら本発明の範囲内に含まれる。

【0103】

本明細書全体を通じて、別途具体的に示されるか、内容により別途必要とされない限り、単一のステップ、問題の組成物、ステップの群、または問題の組成物の群は、1つおよび複数の（すなわち、1つ以上の）これらのステップ、問題の組成物、ステップの群、または問題の組成物の群を包含するものとする。

10

【0104】

本発明を、以下の比限定的な実施例および添付の図面への参照により、以下に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】マイクロ流体チップ（マイクロチップ）およびBRET検出システムを示す、特許請求される方法を実行するための一般的な配設。DM＝ダイクロイックミラー、BP＝バンドパスフィルタ（波長中心nm、幅nm）。

【図2】（A）2単位のトロンビンの添加ありおよびなしで5 μ Mの天然セレンテラジンをGFP²-RG-RLuc融合タンパク質に添加した際のハイブリッドBRETシステムのスペクトル変化、ならびに（B）精製されたHisタグ化BRETタンパク質のSDS-PAGE分析によって監視した、GFP²-RG-RLuc融合タンパク質センサ分子のトロンピン切断。1レーン当たり2.5 μ gのタンパク質を充填した。左から右へ；30℃で90分間54 nMのトロンピンとともにインキュベートした後の分子マーカ（KDa）、RLuc、GFP²、GFP²-RG-RLuc、GFP²-RG-RLuc；GFP²-RG-RLucは、トロンピンを室温で10分間2単位のヒルジンとともに事前インキュベートしたことを除き、前のレーンと同じ条件。

20

【図3】5 μ Mの天然のセレンテラジンの添加した際、1 μ Mの融合タンパク質のトロンピン切断（平均±標準偏差、n=3）後の正規化したBRET^H比における変化；54 nMのトロンピンまたは2単位のヒルジンでの事前処理（10分間、室温）後の54 nMのトロンピンによる処理（90分間、30℃）で処理した後のGFP²-RG-RLuc。対照は、1 μ MのRLucおよびGFP²タンパク質からなり、 $p \leq 0.001$ は、高い有意差を示し、 $p = 0.33$ は、変化が有意でないことを示す。

30

【図4】オンチップ検出の実験的構成。（a）ハイブリッドBRET反応の略図、ならびに（bおよびc）BRETシグナル検出のためのマイクロ流体チップシステム（Clz＝天然のセレンテラジン、DM＝ダイクロイックミラー、BP＝バンドパス、PMT＝光電子倍增管）。

【図5】セレンテラジン基質を添加したときのGFP²-RG-RLucトロンピンセンサタンパク質の生物発光強度（AU）、および図4bに標識付けしたY分岐点からの距離xの関数としてのBRET^H比。記号+および▽は、それぞれ、RLucおよびGFP²チャンネルの生物発光バックグラウンドを表す。Oおよび×は、それぞれ、RLucおよびGFP²チャンネルの生物発光強度を表す。◆は、BRET比を表す。融合タンパク質の濃度は、3.0 μ Mであった。天然のセレンテラジン濃度は、58.6 μ Mであった；各水溶液の流量は、20 μ l／時間であった；20倍の対物レンズを使用した；GFP²およびRLucチャンネルのフィルタのバンドパスは、それぞれ、515 nm～555 nmおよび430 nm～455 nmである；200ミリ秒の内部ゲート時間をデータ取得に使用した。

40

【図6】水溶液流の合計流量（a）およびトロンピンセンサ濃度（b）の関数としてのBRET^H比である。（a）トロンピンセンサタンパク質の濃度は、3.0 μ Mであり、天然のセレンテラジンの濃度は58.6 μ Mであった；（b）天然のセレンテラジンの濃度

50

は $58.6 \mu\text{M}$ であった；各水溶液の流量は、 $20 \mu\text{l}$ / 時間であった；20 倍の対物レンズを使用した；GFP² および RLuc チャネルのフィルタのバンドパスは、それぞれ、 $515 \text{ nm} \sim 555 \text{ nm}$ および $430 \text{ nm} \sim 455 \text{ nm}$ である；200 ミリ秒の内部ゲート時間をデータ取得に使用した。

【図 7】マイクロ流体およびマイクロプレート形式での BRET^H トロンビンセンサの校正曲線（平均±標準偏差、 $n=5$ ）。すべてのマイクロ流体測定は、 $x=2.1 \text{ mm}$ で取得した。○および□は、それぞれ、マイクロチップおよびマイクロプレートの測定に関するデータを表す。中央のグラフは、低いトロンビン濃度でのデータを示し、一方で差し込み図は、対応する全範囲測定を示す。線は、線形回帰であり、これらは、マイクロチップデータでは $y=0.835x+1.019$ ($R^2=0.996$) であり、マイクロプレートデータでは $y=0.1797x+1.001$ ($R^2=0.995$) である。マイクロチップ法については、融合タンパク質濃度は $3.0 \mu\text{M}$ であり、天然のセレンテラジン濃度は $58.6 \mu\text{M}$ であり、各水溶液流量は $20 \mu\text{l}$ / 時間であった。マイクロプレート法では、融合タンパク質および天然のセレンテラジン濃度は、それぞれ、 $1 \mu\text{M}$ および $5 \mu\text{M}$ であった。

10

【図 8】受動的混合設計の例（a）線形接触領域を有する Y 型、（b）狭い蛇形、（c）広い蛇形、（d）螺旋、（e）寸法変動およびバッフルを有する Y 型チャネル、および（f）狭い蛇形接触領域を有する 3 つの注入口。

【図 9】本発明のチップおよびオンチップ光学検出システムの特定の例の略図。PMT—光電子倍增管。PDMS—ポリジメチルシロキサンチップマトリックス。

20

【図 10】試料データは、GFP²—RG—RLuc トロンビンセンサの BRET² 比の変化によるトロンビンの検出を示す。a. トロンビンが存在しない状態での GFP（緑色—上）およびウミシイタケルシフェラーゼ（青色—下）のチャネル放出強度。b. 270 pM のトロンビンとともにセンサをインキュベートした後の GFP（緑色—下）およびウミシイタケルシフェラーゼ（青色—上）チャネルの放出強度。c. トロンビンなしおよび 270 pM のトロンビンの条件での BRET² 比。

【図 11】図 9 のマイクロ流体デバイスで GFP²—RG—RLuc トロンビンセンサを使用した、BRET² 測定によるトロンビン検出の感度（青色線）と、市販入手可能なプレートリーダー機器の結果（赤色線）との直接比較。

【図 12】トロンビンバイオセンサ（ $1 \mu\text{M}$ ）と、トロンビン（ 540 nM ）およびセレンテラジン 400 a 基質（ $12.5 \mu\text{M}$ ）を含有する調製物とを混合したときの、注入口が 2 つのマイクロ流体デバイスを用いて測定した BRET² 比。

30

【図 13】本発明のシステムのサブシステムの例。

【図 14】単一および複数のセンサのセンサチップ設計の例。

【図 15】3 つのマイクロ流体流動が接触するときの受動的または拡散に基づく試薬混合の領域の例。

【図 16】電気光学検出システムの例。

【図 17】2 つの BRET 光学検出素子の設計（a）両凸マイクロレンズは、反応チャンバの底部で反応チャンバ内部の多数の BRET 点光源から蛍光を収集し、多重モードの光ファイバ（コア $200 \mu\text{m}$ ）に光を集中させるように機能し、（b）平凸マイクロレンズもまた、反応チャンバの底部で機能する。しかしながら、上部に非球面マイクロミラー（フェルール上に微小機械加工されたもの）により、BRET 点光源の上部からの蛍光を収集し、マイクロレンズにコリメートする。（a）と同様に、平凸マイクロレンズは、次いで、蛍光を光ファイバのコアに集中させる。

40

【図 18】RLuc² および GFP² に融合された ODR-10 受容体構築物における共鳴エネルギー移動の原理。GFP² は、ODR-10 の 3 つ目の細胞内ループに挿入され、RLuc² は C 末端に挿入される（OGOR²）。ジアセチル結合により、OGOR² バイオセンサの構造的変化がもたらされ、BRET² 構成成分間の距離の増加または双極子モーメントの配向の変化がもたらされる。Clz 400 a = セレンテラジン 400 a 基質。

50

【図19】 $5\text{ }\mu\text{M}$ のC1z400aを 20 nM のセンサに添加したときのOGORおよびOGOR2センサの生物発光強度。

【図20】 $12.5\text{ }\mu\text{M}$ のC1z400aと $1\text{ }\mu\text{M}$ のセンサとのオンチップ混合の際のOGORおよびOGOR2センサの生物発光強度。

【図21】水中で $1\text{ }\mu\text{M}$ のジアセチルとともに、または水のみをの対照とともにインキュベートした後の、96ウェルプレートのウェルにおけるOGOR2からのBRET²シグナル（平均±標準偏差、 $n=3$ ）。

【図22】マイクロウェルプレート形式でのOGOR2のBRET²シグナルのジアセチル濃度応答曲線。

【図23】PBS中 10 fM のジアセチルまたは対照としてPBSのみとともにインキュベートした後、OGOR2シグナルのオンチップマイクロ流体アッセイで検出されたBRET²シグナルの変化（平均±標準偏差、 $n=3$ ）。

【図24】オンチップ（マイクロ流体）アッセイ測定によるOGOR2用量応答。

【図25】ある流量範囲にわたってOGOR2をオンチップ接触させたときに、リアルタイムマイクロ流体測定を使用して検出されたBRET²シグナルの変化の平均。PBS中 1 fM のジアセチルまたはPBSのみ、ならびに $12.5\text{ }\mu\text{M}$ のC1z400a基質（4つの異なる流量でBRET²比の平均±標準偏差）。

【図26】OGOR2（ 290 nM ）をPBS中 1 fM のジアセチル溶液および $12.5\text{ }\mu\text{M}$ のセレンテラジン400aと接触させたときに、注入口が3つのマイクロ流体デバイスを用いて異なる共通流量で測定されたBRET²比。

【図27】BRET²構成成分であるGFP²およびRLuc2に融合したMBP受容体構築物におけるBRETの原理。マルトース結合により、BRET²タグ化MBP受容体の構造的変化がもたらされ、BRET²構成成分をより近接させ、RLuc2からGFP²へのエネルギー移動効率の増加をもたらす。C1z400a=セレンテラジン400a基質。

【図28】GFP²-MBP-RLuc2センサのBRET²比に対する種々の糖類 0.1 mM の影響。BRET²比（平均±標準偏差、 $n=3$ ）は、 $16.7\text{ }\mu\text{M}$ のセレンテラジン400aを $1\text{ }\mu\text{M}$ のGFP²-MBP-RLuc2またはW140A突然変異体（斜線の棒）に添加した後、水（灰色の棒）または 0.1 mM の表示される糖類とともに 28°C で30分間インキュベートした後に、記録した。BRET²比を、水での応答によって正規化した。 $**P<0.01$ および $P^*<0.05$ 。

【図29】 $16.67\text{ }\mu\text{M}$ のセレンテラジン400aを添加した際、 0.1 mM マルトースに対する $1\text{ }\mu\text{M}$ のGFP²-MBP-RLuc2の応答時間（分、平均±標準偏差、 $n=3$ ）。任意の期間マルトースとともにインキュベートした後のBRET²応答を、同じ期間水とともにインキュベートした後のBRET²応答で正規化した。

【図30】（A）FRET対BRET²。 $16.67\text{ }\mu\text{M}$ のセレンテラジン400aを添加した際の $1\text{ }\mu\text{M}$ のGFP²-MBP-RLuc2融合タンパク質のBRET²応答（平均±標準偏差、 $n=11$ ）のマルトース濃度依存性を、FLIPmal-2 μ （ $530/485\text{ nm}$ 比）のFRET応答（平均±標準偏差、 $n=3$ ）と比較したもの。後者の用量-応答曲線は、Fehr et al.（2002）によって提示されたデータからの再プロットであった。データをlog [アゴニスト] 対応答に適合させた。BRET2は $\text{EC}_{50}=0.4\text{ }\mu\text{M}$ であり、FRETでは $\text{EC}_{50}=3.2\text{ }\mu\text{M}$ である。（B）マイクロ流体チップとマイクロプレートアッセイを使用するものとを対比したマルトースに関するBRET²に基づくMBPアッセイの比較。

【図31】インライン光ファイバスイッチなし（A）およびあり（B）のマイクロ流体チップシステムからデータを収集するための実験的構成。BP-バンドパス、PMT-光電子増倍器；NA-開口数。

【図32】光学スイッチなし（A）およびあり（B）で3回の実行にわたり収集されたリアルタイムRLuc/C1z400a生物発光シグナル。

【図33】光学スイッチありおよびなしでのRLuc/C1z400aおよびGFPチャ

10

20

30

40

50

ネルに関する平均生物発光シグナルの比較。

【図34】液体ライトガイドを通じて光検出器に接続された、直径を増加させたBRET反応チャンバ ($\theta = 4\text{ mm}$ 、 $h = 2\text{ mm}$) の配設を示す例。

【図35】狭い口径と広い口径のBRET検出チャンバ／光学システムの性能の比較。いずれの場合も、BRET放出は、マイクロ流体チャンネルを通じて流動するOGOR2センサの1/100希釈物から測定する。(a)狭い口径のシステム(チャンバ寸法 $\theta = 2\text{ mm}$ 、 $h = 2\text{ mm}$ ；ファイバコア径 $= 1\text{ mm}$ 、 $NA = 0.48$)。(b)広い口径のシステム(チャンバ寸法 $\theta = 4\text{ mm}$ 、 $h = 2\text{ mm}$ 、ライトガイドコア径 $= 5\text{ mm}$ 、 $NA = 0.59$)。

【図36】高度に希釈したOGOR2センサを使用し、より広い直径のBRET反応チャンバ(4 mm)および広い口径の液体ライトガイドに基づくより効率的な光捕捉システムを用いた、 $1\text{ }\mu\text{ M}$ のジアセチルの検出の実証。(a)100倍センサ希釈。BRET²比のジアセチル依存性低減 $= 13.7\%$ 、および(b)50倍のセンサ希釈、BRET²比のジアセチル依存性低減 $= 14.7\%$ 。エラーバーは、3回の実験($N = 3$)の標準偏差を表す。

【図37】二分岐型ライトガイドを使用し、ダイクロイックブロックを用いない単一のマイクロ流体チャンネルおよびBRET光収集システムの例。フィルタを有する二分岐型ライトガイドの追加のセットおよび光検出器の対を、1つ以上の追加のマイクロ流体チャンネルおよび／またはBRET反応チャンバに対応させるために、追加してもよい。

【図38】多重チャンネル測定を促進するシャッターボックスを有する光学構造

【図39】二分岐型ライトガイドまたはダイクロイックブロックを用いて検出されたBRETシグナルの強度の比較。a、b：二分岐型ライトガイド、反応チャンバ寸法 $\theta = 4\text{ mm}$ ； $h = 1\text{ mm}$ 、反射する蓋ありおよびなし。c、d：ダイクロイックブロックを有するライトガイド、反応チャンバ寸法 $\theta = 4\text{ mm}$ ； $h = 2\text{ mm}$ (すなわち、a、bの二倍の大きさ)。すべてのパネルは、 $t = 0$ で流動を開始した後、時間とともにシグナルの増加を示す。パネルaおよびcは青色チャンネルであり、パネルbおよびdは緑色チャンネルである。

【図40】シャッターボックスからのBRET出力を測定するのに好適な多分岐型ライトガイドの配設。

【図41】単一のダイクロイックブロックに合流する多分岐型ライトガイドと、2つの別個の色フィルタに分岐する二分岐型ライトガイドとの比較。相対光強度は、青色(RLuc；1、3)および緑色(GFP；2、4)チャンネルで収集した。1、2：図38および40のように、入力異なるマイクロ流体チャンネルに割り当てられ、出力が最適化されたダイクロイックフィルタを介してPMT対に向けられる、多分岐型ライトガイド。3、4：図37のように、出力異なるスペクトルチャンネルに割り当てられる二分岐型ライトガイド。

【図42】真空光電子倍增管技術を使用する超低レベルの光の光検出器の例。出典Hamamatsu。

【図43】固体技術を用いて実装される極度に低い光レベルの光検出器の例。寸法はmm単位である。出典：Hamamatsu。

【図44】2つの異なる流量で動作する注入口が3つのマイクロ流体デバイスにおける層流および拡散的混合の直接可視化。3つの水溶液入力のうちの2つが、青色または赤色の食品着色料で着色されている。デバイスは、吸い込みモードで動作する単一のシリンジポンプを用いて操作した。流動の方向：右から左。

【図45】垂直方向に積み重なった流れに基づく受動的混合の例示的な設計。チャンネルの幅は、 $600\text{ }\mu\text{ m}$ ～最大 2 mm であり、厚さは $20\text{ }\mu\text{ m}$ ～ $60\text{ }\mu\text{ m}$ である。長さは、 20 mm ～ 100 mm で柔軟であり、角度は 45 度である(これは、 0° ～おおよそ 170° 付近まで広範囲に変動し得るか、または実際にはマイクロ流体チップの面に対する角度であり得る)。

【図46】BRET比測定の比較。エラーバーは標準偏差を反映する($n = 3$)。

【図47】多重検出のためのマイクロ流体チップ設計の例。上部の注入口は、基質用に設計され、一方で底部の3つの注入口は、センサ1、試料、およびセンサ2を導入するために使用される。

【図48】並列検出のためのマイクロ流体チップ設計の例。流動の方向は、下から上である。流量は、 $150\mu\text{l}/\text{時間}$ および $1500\mu\text{l}/\text{時間}$ であった。赤色の食用色素を、基質注入口から導入し、青色色素をセンサ注入口から導入した。試料注入口には食用着色料を使用しなかった。

【図49】吸い込みモードで単一の吸引ポンプによって操作される注入口が3つのマイクロ流体デバイス。吸引モードのポンプは、デバイスの排出口で陰圧を発生させる。試料、センサ、および基質流は、共通チャンネル（蛇形配設として示される）に吸い込まれ、受動的に混合される。BRET反応チャンバは、排出口の直前に位置付けられる。ここで使用するポンプは、シリンジポンプであり、多様なポンピング方法もまた、利用可能である。

【図50】吸い込みモードで機能するシリンジポンプを使用した、並列の独立した操作のための構造。4つの別個のシリンジを使用して、4つのセンサチャンネルを独立して並列に操作する例。これは、種々の異なる要件を満たすために異なる流量でセンサチャンネルを操作することを可能にする。

【図51】a. 多分岐型ライトガイドおよび最適化されたダイクロイックブロックを有する、吸引モードで動作するオンチップトロンビンセンサからのRLucおよびGFPシグナル。反応チャンバ $\theta = 2\text{mm}$ 、 $H = 1\text{mm}$ 。b. 「a」からのBRET²シグナル。c. 同じ直径、および同等の滞留時間に基づいて変動する高さのチャンバに対する予測シグナルの実証。

【図52】マイクロ流体形式で達成される特異的なマルトース検出。0.1mMのマルトース、グルコース、およびスクロースに対するBRET²-MBPセンサのBRET²応答の比較。

【図53】N末端にGFP²およびC末端にRLuc2を有するBRET²トロンビンセンサを、プラスミンの κ -カゼイン標的配列：XKZX（式中、Z=K、Y、V、またはE）を模倣するように修飾した。

【図54】5 μM セレンテラジンの存在下でGFP²-FL₁-RLuc2センサを用いて、PBS、牛乳c）およびd）またはオレンジジュース（aおよびb）の種々の希釈物において生成されたBRET²シグナル強度および比。

【図55】5 μM のセレンテラジンAの存在下でGFP²-FL₁-RLuc2センサを用いて、未希釈全乳において生成されたBRET²シグナルの経時変化。a. 強度、b. BRET²比。

【図56】トロンビン切断緩衝液または（a）血清（b）オレンジジュースもしくは（c）牛乳の種々の希釈物における、GTR2タンパク質の生物発光強度（GFP²チャンネル-515nmバンドパス30nm）。

【図57】トロンビン切断緩衝液または（a）血清（b）オレンジジュースもしくは（c）牛乳の種々の希釈物における、GTR2タンパク質のBRET²比。

【図58】GTR2を使用した、トロンビン切断緩衝液、希釈した牛乳、オレンジジュース、または血清におけるトロンビンプロテアーゼ活性（2単位）の検出。絶対BRET²比は試料およびその希釈物に応じて変動するため、結果を正規化されたBRET²比として表す。血清の1/10希釈物における効果の不在は、血清の調製に使用したヘパリンによって生成された残留活性化抗トロンビンIIIによる、添加したトロンビンの不活性化に起因する可能性があることに留意されたい。

【図59】気体-液体分離実験のための標本ホルダー

【図60】時間=0で送風機を始動した後、酸素除去されたSASS2400試料流体への酸素取り込みの経時変化。

【図61】時間=0で送風機を始動した後のSASS2400試料流体へのフェノール取り込みの経時変化。相対フェノール濃度は任意の単位を使用して示される。

【図62】3方向L型ポートの空気圧で動作するボール弁。これは、能動的なサンプリン

10

20

30

40

50

グ中に、S A S S 2 4 0 0 空気流への揮発性ヘッドスペースの急速な (≤ 1 秒) 切り替えを可能にする。

【図 6 3】空気取り込みの急速な切り替えのための 3 方向弁での S A S S 2 4 0 0 試験のための構成を示す略図。

【図 6 4】S t r 1 1 2 (A)、S t r 1 1 4 / 1 1 3 (B)、および S t r 1 1 3 (C) の選択性。1 μ M の臭気物質または水 (灰色の棒) に対する S t r 1 1 2 (平均土標準偏差、 $n=3$)、S t r 1 1 4 / 1 1 3 (平均土標準偏差、 $n=14$)、および S t r 1 1 3 (平均土標準偏差、 $n=6$) の B R E T 2 応答。* * * * $P < 0.0001$ 、* * $P < 0.001$ 、および * $P < 0.05$ 。

【図 6 5】2-ペンタノンに対する B R E T タグ化 S G S R-1 1 2 (A) および S G S R-1 1 4 / 1 1 3 (B) 線形動物嗅覚受容体の B R E T 応答。

【図 6 6】ジアセチルおよび 2-ペンタノンに対する B R E T タグ化 (A) S t r 1 1 4 / 1 1 3 線形動物嗅覚受容体、ならびに (B) 1-ヘキサノールに対する S t r-1 1 3 線形動物嗅覚受容体の B R E T 応答。

【図 6 7】G M R B R E T² に基づくセンサを用いた 1 μ M のマルトースのリアルタイムの連続的なオンチップ検出。A) 100 μ L / 時間の入力量で時間とともに変化するチャンネルの発光性、B) 100 μ L / 時間の入力で時間とともに変化する B R E T² 比。C) 200 μ L / 時間の入力量で時間とともに変化するチャンネルの発光性、D) 200 μ L / 時間の入力量で時間とともに変化する B R E T² 比。E) 100 μ L / 時間で 200 ~ 250 秒から平均化した、水対照と 1 μ M マルトースとの間の B R E T² 比の比較。F) 200 μ L / 時間で 200 ~ 250 秒から平均化した、水対照と 1 μ M マルトースとの間の B R E T² 比の比較。

【発明を実施するための形態】

【0106】

配列表の説明

配列番号 1 — O G O R 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 2 — O G O R 2 融合タンパク質。

配列番号 3 — G F P²-M B P-R L u c 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 4 — G F P²-M B P-R L u c 2 融合タンパク質。

配列番号 5 — G F P²-M B P-R L u c 2 W 1 4 0 A 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 6 — G F P²-M B P-R L u c 2 W 1 4 0 A 融合タンパク質。

配列番号 7 ~ 12 — オリゴヌクレオチドプライマー。

配列番号 13 — G F P²-s t r-1 1 2 S G S R-R L u c 融合タンパク質。

配列番号 14 — G F P²-s t r-1 1 3 S G S R-R L u c 融合タンパク質。

配列番号 15 — G F P²-s t r-1 1 4 S G S R-R L u c 融合タンパク質。

配列番号 16 — G F P²-s t r-1 1 5 S G S R-R L u c 融合タンパク質。

配列番号 17 — G F P²-s t r-1 1 6 S G S R-R L u c 融合タンパク質。

配列番号 18 — G F P²-s t r-1 1 4 / 1 1 3 S G S R-R L u c 融合タンパク質。

配列番号 19 — G F P²-s t r-1 1 2 S G S R-R L u c 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 20 — G F P²-s t r-1 1 3 S G S R-R L u c 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 21 — G F P²-s t r-1 1 4 S G S R-R L u c 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 22 — G F P²-s t r-1 1 5 S G S R-R L u c 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号 23 — G F P²-s t r-1 1 6 S G S R-R L u c 融合タンパク質をコ

10

20

30

40

50

ードするヌクレオチド配列。

配列番号24 — GFP²-str-114/113 SGSR-RLuc 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号25 — GFP²-OGOR-RLuc 2 融合タンパク質。

配列番号26 — GFP²-OGOR 突然変異体-RLuc 2 融合タンパク質。

配列番号27 — GFP²-str-112 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質。

配列番号28 — GFP²-str-113 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質。

配列番号29 — GFP²-str-114 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質。

配列番号30 — GFP²-str-114/113 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質。

10

配列番号31 — GFP²-str-115 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質。

配列番号32 — GFP²-str-116 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質。

配列番号33 — GFP²-OGOR-RLuc 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号34 — GFP²-OGOR 突然変異体-RLuc 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号35 — GFP²-str-112 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号36 — GFP²-str-113 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

20

配列番号37 — GFP²-str-114 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号38 — GFP²-str-114/113 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号39 — GFP²-str-115 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号40 — GFP²-str-116 SGSR-RLuc 2 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

配列番号41 — 線虫str-112。

配列番号42 — 線虫str-113。

30

配列番号43 — 線虫str-114/113 キメラタンパク質。

配列番号44 — 線虫str-112をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号45 — 線虫str-113をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号46 — 線虫str-114/113 キメラタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム。

【0107】

一般技術および定義

別途具体的に定義されない限り、本明細書に使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者（例えば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、および生化学の）によって広く理解されているものと同じ意味を有するものとする。

40

【0108】

別途示されない限り、本発明に用いられる組み換えタンパク質、細胞培養、および免疫学的技法は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような技法は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B

50

. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)、およびF. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present)、Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、およびJ. E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (including all updates until present)等の文献に記載および説明されている。

10

【0109】

「および／または」という用語、例えば、「Xおよび／またはY」とは、「XおよびY」または「XまたはY」のいずれかを意味することを理解されたく、両方の意味またはいずれかの意味に対する明示的な支持を提供するものとする。

【0110】

内容により別途提示されない限り、センサ分子および基質といった用語の単数形での言及は、明らかに複数形もまた意味する。例えば、論理的には、単一の分子ではなく多数の個々のセンサ分子がデバイスを通じて流動するであろう。

20

【0111】

本明細書に使用される際、約という用語は、そうでないことが示されない限り、指定された値の+/-20%、より好ましくは+/-10%、なおもより好ましくは+/-5%を指す。

【0112】

本明細書全体を通じて、「含む (comprise)」、または「含む (comprises)」もしくは「含んでいる (comprising)」という用語は、記載の要素、整数、もしくはステップ、または要素、整数、もしくはステップの群の包含を意味するが、任意の他の要素、整数、もしくはステップ、または要素、整数、もしくはステップの群の除外を意味するものではないことが理解されよう。

30

【0113】

検出／分類／スクリーニングシステム

本発明は、試料中の検体を検出する方法に関し、この方法は、

i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスを通じて、

a) 試料、

b) 検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメインを含むセンサ分子であって、化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である、センサ分子、

40

c) 化学発光ドナーの基質、を流動させることと、

ii) センサ分子、試料、および基質を、デバイスにおいて混合することと、iii) 電気光学感知デバイスを使用して、化学発光ドナーによる基質の修飾を検出することと、を含み、

アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、検体がセンサ分子に結合すると変化する。

【0114】

本発明はまた、本発明の方法を実行するためのマイクロ流体システムに関し、このシステムは、

i) 検体、化学発光ドナードメイン、およびアクセプタードメインに結合するドメイン

50

を含むセンサ分子を含有する（または含む）のに好適な少なくとも1つのレーザーバーであって、化学発光ドナードメインおよびアクセプタードメインの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である、少なくとも1つのレーザーバーと、

i i) 1つ以上のマイクロチャネルを備えるマイクロ流体デバイスと、

i i i) センサ分子、試料、および化学発光ドナードメインの基質を、デバイスにおいて混合するための手段と、

i v) センサ分子への検体の結合を検出するための反応チャンバと、

v) 電気光学感知デバイスと、を備え、

アクセプタードメインに対する化学発光ドナードメインの空間位置および／または双極子配向は、検体がセンサ分子に結合すると変化する。

10

【0115】

当業者であれば、本発明の方法およびシステムは、試料中の検体の存在または不在を検出するために使用することができ、存在する場合には、検体の濃度を判定するためにも使用することができることを理解するであろう。

【0116】

本発明は、特に、センサ分子がデバイスに固定される方法およびシステムと比較した場合に、先行技術よりも優れた多数の利点を有する。第1に、デバイスを再生（リセット）する必要がない。第2に、本発明の方法およびシステムではシグナルのドリフトがより少ない。第3に、デバイスを、センサ分子が固定される場合よりも多く再使用することができるため、費用が低減される。第4に、本発明は、センサ分子の表面積および密度に起因して、固定型構成に伴うシグナルの弱さの問題を回避する。第5に、現在の技術は、体積に基づく検出技術であり、センサ分子を表面に付着させる必要がある表面プラズモン共鳴等の表面に基づく技術ではない。センサー検体の反応は、いっそう急速に発生し、それによって、能動制御なしですら分析時間を低減する。

20

【0117】

さらに、BRETは、外部光源によりドナーを励起する必要がないため、蛍光に基づく技術よりも優れた複数の利点を有する。BRETは、ドナー部分の自己蛍光、光散乱、光退色、および／もしくは光異性化、または細胞への光損傷に悩まされない。BRETアッセイにおける外部光源の不在は、非常に弱いバックグラウンドおよび結果として検出感度の増加をもたらす。例えば、BRETは、トロロビンに触媒されるタンパク質分解切断を監視するためのFRETよりも50倍感度が高い(Dacres et al., 2009b)。

30

【0118】

試料を分類するための本発明の方法の使用に関して、センサ分子、より具体的にはセンサ分子のセットを、特定の亜集団を代表する物質（検体）のパターンを検出するために使用することができる。一例として、本方法は、ビール、ワイン、チーズまたは他の消耗品の種類、熟成度、品質等を分類するために使用することができる。本方法は、食品、飲料、香水、香料等の試料に、甘味、苦味、旨味特性、例えばカプサイシンもしくはヒドロキシ- α -サンショオール(hydroxy- α -sansonol)と関連する「辛さ」、例えばメントールと関連する「清涼感」、および／または好適なセンサ分子を単離もしくは組み換えることができる任意の嗅覚香等といった、感覚刺激特性の分類または定量化を行うために使用することができる。本方法はまた、化学的特徴、例えば、ヘッドスペース、呼吸、汗、尿、他の生体液の試料に基づくヒト、動物、または植物の健康、栄養、または疾患状態に基づいて、広範な種類の他の試料を分類するためにも使用することができる。本方法の他の用途は、爆発物または爆発物関連成分、毒性工業化学物質、化学もしくは生物兵器剤、または病原微生物の存在といった毒性または有害性に基づいて、試料を分類することである。本方法はまた、仕様への適合性、または任意の化学物質の群（複数可）のレベルの存在、不在を含む、工業的プロセスを監視するために使用することができる。本方法はまた、リアルタイムまたはバッチモードのいずれかで、環境試料を分類し、例

40

50

えば、空気質、不快臭もしくは毒性化学物質の存在もしくはレベル、または、同様に、天然もしくは水道水設備、下水設備、または地下水の品質を判定するか、あるいは土壌または岩盤と接触した流体を分類するために使用することができる。

【0119】

試料の分類は、通常、区別しようとする試料のすべての分類を表すかまたは包含する訓練試料セットに対する電気光学応答パターンに基づいて、はっきりと異なる機能または分類子を生成することによって行われる。これは、主成分分析、線形判別分析、段階的判別分析等の多変量統計アプローチを用いて日常的に達成され得る。あるいは、多様な種類の機械学習アプローチを用いてもよく、その一例は、サポートベクターマシンである。類似のアプローチは、ベイジアンネットワークを使用するか、または人工神経ネットワークを訓練して、このような試験セットの試料間の判別を行うことである。1つの実行可能なアプローチは、したがって、電気光学応答パターンを試験または未知の試料（複数可）から捕捉し、それらをリアルタイムで処理し、それらを訓練試料セットにより取得した保存されたパターンと比較し、最良の一致に従ってそれらを既知の分類に割り当てるか、または類似のパターンが以前に観測されていない場合はそれらを新規の分類（複数可）に割り当てることである。分類方法については、実際の検体（複数可）が既知であることは必須ではなく、単純にセンサ分子（またはセンサ分子の群）が、異なる分類の試料では異なるパターンのシグナルを再現可能に生成し、これにより、ユーザが分析されている試料（複数可）を分類することが可能となる。

10

【0120】

感度に関しては、マイクロモル、ナノモル、フェムトモル、アトモル、またはさらにより低い程度の検体の濃度が、検出可能である。ある実施形態において、本発明の方法は、本方法を同じ試薬濃度を用いてマイクロウェルプレートで実行した場合よりも、少なくとも5倍、もしくは少なくとも10倍、もしくは5倍～1,000倍、もしくは5倍～100倍、もしくは5倍～50倍、もしくは5倍～20倍、またはおおよびいくつかの状況では、最大100～1,000倍感度が高い。

20

【0121】

本発明は、検体をリアルタイムで検出するのに特に有用である。本明細書に使用される際、「リアルタイム」という用語は、ある特定の状態が、実質的に同時に別の形態（例えば、ディスプレイ上の画像または処理されたデータによるグラフ）で示されることを意味する。そのような場合において、「リアルタイム」は、データ処理に必要な時間の分、実際のイベントから遅れる。そのような時間差は、実質的に無視できる場合、「リアルタイム」の範囲内に含まれる。そのような時間差は、典型的には、限定することなく、10秒以内であり、好ましくは1秒以内であり得る。好ましい実施形態において、本発明の方法は、約1秒～約100秒の範囲内で行われる。

30

【0122】

本明細書に使用される際、「フェルスター距離」とは、エネルギー移動が（平均で）50%の効率である、ドナーとアクセプターとの間の距離である。フェルスター距離（ R_0 ）は、アクセプターの不在下でのドナーの量子収率、溶液の屈折率、各ドメインの双極子角度配向、およびドナーとアクセプターのスペクトル重複積分（spectral overlap integral）を含む、多数の要因に依存する。

40

【0123】

本明細書に使用される際、「量子収率」は、元のエネルギー供与の最終放出の尺度を指す。

【0124】

本明細書に使用される際、「ストークスシフト」は、吸収のバンド最大値の位置と、同じ電子遷移の放出スペクトルとの間の波長の差である。

【0125】

ある実施形態において、本発明は、デバイスにおいて、検体の濃度の増加（例えば、チップでの検体（analyte）の合成を通じて）または減少（例えば、チップでの検

50

体 (an alyte) の分解もしくは修飾) を分析するために使用される。典型的に、これは、デバイス上の 2 つの異なる地点、例えば、検体がそこを流れて流動する第 1 および第 2 の反応チャンバで、基質の修飾を検出する必要がある。したがって、ある実施形態において、センサ分子から解放される検体は、BRET 比の変化をもたらす、これは、最大観測 BRET 比の 15% 以上、20% 以上、30% 以上、35% 以上、約 15% ~ 約 50%、または約 15% ~ 約 40% である。

【0126】

さらなる実施形態において、センサ分子は、リガンドに結合した入力マイクロチャネルに進入し得、検出される検体 (例えば、触媒酵素) がリガンドを切断および/または修飾し、結果として修飾されたリガンドがセンサ分子から解放される (もはやそれに結合しない) ようになる。

10

【0127】

本発明の方法およびシステムにおける BRET 感知は、マイクロ流体デバイスで実現される。一構成において、本システムは、(1) 試料送達、(2) 試薬の保管および取り扱い、(3) マイクロ流体チップおよび充填システム、(4) 場合によっては温度制御、(5) 光収集のための電気光学システム、(6) 電気光学検出システム、(7) データの取得および処理、ならびに (8) ソフトウェアおよび組み込み制御システムを含む、複数のモジュールを備える (図 13)。

【0128】

試料送達

20

「試料」は、検出される検出される検体を含むことが既知であるかもしくは疑われる、または特定の物質、物質のセット、もしくは組成物が不在であることが予測されるか、もしくは必要とされる、任意の物質または組成物であり得る。試料の例には、空気、液体、および生物学的材料が挙げられる。試料は、環境もしくは供給源から直接入手され得るか、または本発明の方法を実行する前に好適な手順によって少なくとも部分的に精製され得る。

【0129】

試料は、マイクロ流体デバイスを通じて流動することができる任意の形態であり得る。例としては、液体、気体、エマルジョン、または懸濁液が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。ある実施形態において、試料は、気体で事前平衡化されている液体である。懸濁液の例には、油中水、水中油、および液体中の気体が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。

30

【0130】

より具体的な実施形態において、気体の濃度、検体の可溶性および分配計数、ならびに液相の組成に基づいて、気相から液相への検体の急速な質量移動が起こり得るように、目的の位置からの周囲空気もしくは他の気体、または目的の任意の物体もしくは試料からのヘッドスペースを、水または水溶液と緊密に接触させる。液体の体積に対して、大きな面積で気体-液体の界面を生成する任意の方法が、好適である可能性がある。例となる方法には、濡壁サイクロン、ミスティング、またはバブリングシステムが挙げられる。SASS 2400 濡壁サイクロンは、空気から水相への揮発物質の分離を加速させるための好適なデバイスの具体的な例である。好ましくは、本方法は、多量の空気を少量の液体と接触させ、それによって多量の気相のサンプリングを可能にし、濃縮ステップを提供する。SASS 2400 の公開されている仕様に基づく、標準的な温度および圧力で、1 分当たり 1 体積の水または水溶液を、40,000 体積の気体と接触させることが可能である。使用される機器の寸法および動作特性に応じて、より低いかまたは高い気体-液体比のサンプリングが可能である。

40

【0131】

一実施形態において、懸濁液は、無細胞抽出液であるか、またはそれを含む。代替的な実施形態において、懸濁液は、細胞を含む。

【0132】

50

試料（ならびにセンサ分子および基質）は、必ずしも限定されないが、ポンプ、減圧、水圧、吸引、動電、化学浸透、毛管力、音響、電磁気、圧電等のうちの1つ以上といった任意の好適な手段によって、マイクロ流体デバイスを通じて流動され得る。ポンプ機序は、その用途のためのコンパクトな小型化されたミクロン寸法のポンプで実現され得る。粒子、有機液滴といった残屑を試料から濾過して除去するための事前調節デバイス、ならびに／または試料の温度、湿度、流量、および体積といったいくつかの基本的な試料パラメータを測定する状態監視デバイスが存在してもよい。

【0133】

試薬の保管および取り扱い

複数の試薬（BRET試薬、洗浄DI水、基質等）の保管のための使い捨ての格納式液体保管システムを使用することができる。このデバイスは、研究室で事前充填し、操作の際に感知デバイスに挿入することができる。

10

【0134】

マイクロ流体デバイスおよび充填システム

マイクロ流体デバイス（当該技術分野においてチップまたは「ラボオンチップ」とも称される）は、断面がおおよそ10～50 μm （マイクロメートル）から最大おおよそ100～1000 μm に寸法調整され、おおよそ1mm～おおよそ20cmの直線寸法を有する通常は平坦基板上またはその中に形成されるチャンバおよび流路内の流体試薬を操作することによって、化学反応もしくは生化学反応または分析を実行する。マイクロ流体デバイスは、流体反応物質が、入力レザーバーからデバイスを通り排出ポートまでの連続流動として、または動作時にデバイスの流路およびチャンバを実質的に充填する流体アリコートの半連続流動としてのいずれかで、デバイスの流路およびチャンバを通じて流動するときに、それらを操作し得る。あるいは、マイクロ流体デバイスは、デバイスの寸法よりもおおよそ1桁以上小さい長さを有することを特徴とする別個かつはっきりと異なる微液滴として、流体試薬を操作し得る。

20

【0135】

マイクロ流体デバイスは、チップ充填システムに挿入されると、すべての試料および試薬送達口との接続を維持することができる。この充填システムは、温度制御および光学的構成要素の一部を形成し得る。単一から複数の反応器が、チップに組み込まれ得る（図14）。3つの試薬（試料、センサ分子、および基質）は、チップにポンプ注入され、混合領域で混合され得る。代替的な構成では、一方が基質用で他方がセンサ分子および試料の事前混合物用である、2つの入力マイクロチャンネルがある。さらなる構成では、一方がセンサ分子用で、他方が基質および試料の事前混合物用である、2つの入力マイクロチャンネルがある。

30

【0136】

混合された試薬は、BRET反応を受け、生成物が、連続的に検出チャンバにポンプで送られた後に廃棄物排出口から収集される（図15）。

【0137】

本明細書に使用される際、「混合する」という用語またはその変化形は、検体（複数可）、センサ分子、および基質が、拡散（例えば、直線（層）流）および／または何らかの能動的混合手段によってであるかにかかわらず、任意の手段により接触することを意味する。したがって、一実施形態において、「混合の手段」は、直線（層）流での受動的拡散であり得る。この実施形態では、完全な混合は達成されないものの、本発明者らは、本発明の方法が適正に機能するのに十分な程度の混合が起こることを見出した。ある実施形態において、拡散混合は、試料、センサ分子、および基質を含むマイクロチャンネルの少なくとも20%が、これらの構成成分の均質な混合物を有することをもたらす。

40

【0138】

少なくとも2つのマイクロチャンネルが合流して共通マイクロチャンネルを形成する角度は、 0° ～おおよそ 170° 近くで変動し得るか、または実際にはマイクロ流体チップ（デバイス）の面に対する角度であり得る。

50

【0139】

本明細書に使用される際、「共通マイクロチャネル」という用語またはその変化形は、試料、センサ分子、および基質を含む、マイクロチャネルまたはその部分を指す。

【0140】

本明細書に使用される際、「入力マイクロチャネル」という用語またはその変化形は、試料、センサ分子、もしくは基質等の特定の試薬、または試薬の組み合わせが、そこを通してマイクロ流体デバイスに進入する、マイクロチャネルを指す。

【0141】

少なくともいくつかの実施形態において、層流領域の存在に起因して、混合手段は、好ましくは、反応物質の接触を強化するための混合領域に実装される。混合手段には、受動的混合（図8および図44）、および／または音響混合器（例えば、WO2006/105616号に記載される）によるもの等の能動的混合を挙げることができる。他の混合技術を、WO2003/015923号に記載のものといった目的で実装してもよい。

【0142】

本明細書に使用される際、「センサ分子、試料、および基質を、デバイスにおいて混合する」という用語およびその変化形は、センサ分子、試料、および基質をデバイスのレーザバーにおいて混合すること、センサ分子、試料、および基質をデバイスのマイクロチャネル内に流入する管において混合すること、センサ分子、試料、および基質をデバイスのマイクロチャネルにおいて混合すること、もしくはセンサ分子、試料、および基質を反応チャンバにおいて混合すること、またはこれらの組み合わせもしくはこれらの2つ以上を包含する。好ましい実施形態において、センサ分子、試料、および基質は、マイクロチャネルにおいて混合される。好ましくは、センサ分子および試料は、マイクロチャネルで混合されず、マイクロチャネルに進入する前に、直前（例えば、10秒、より好ましくは1秒、またはそれ未満）に混合される。

【0143】

ある実施形態において、混合ステップは、センサ分子、基質、および検体が、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%均質な混合物を形成することをもたらす。上に示されるように、能動的混合は、任意の所与の流量およびチャネル設計で、より優れたレベルの均質性をもたらすが、これは、本発明

【0144】

本発明の方法は、同じマイクロ流体デバイスを使用して、例えば、図14bおよび14cに示されるデバイスを使用して、2つ以上の異なる検体を同時または順次に検出するために使用することができる。ある実施形態において、異なるセンサ分子は、異なるマイクロチャネルを使用してデバイスに流入する。便宜上、分析される試料が、各検体で同じ場合、デバイスへ試料が入る単一の流動が存在し得、これが、次いで、枝分かれし、異なるセンサ分子を含む他のチャネルに合流する（図14bおよび14cを参照されたい）。センサ分子のそれぞれに対する基質が同じ場合にも、同じことが適用される。当業者であれば、分析される試料の数、各標的検体を検出するために必要なセンサ分子の数、および異なるセンサ分子が使用されていることを踏まえて対応する基質の必要数に応じて、マイクロチャネルの好適な構成を容易に設計することができる。

【0145】

マイクロ流体デバイスは、必要とされる化学的適合性および機械的強度の特徴を有する任意の材料から作製され得る。そのような物質の例には、シリコン、ガラス（例えば、熔融シリカ、熔融石英、ホウケイ酸塩、または異なる添加剤を有する任意の種類のガラス）、ポリジメチルシロキサン、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート、ポリメチルメタクリレート、ポリウレタン、ポリ塩化ビニル、ポリスチレンポリスルホン、ポリカーボネート、ポリメチルペンテン、ポリプロピレン、aフッ化ポリビニリジン（a polyvinylidene fluoride）、ポリシリコン、ポリテトラフルオロエチレン

、ポリスルホン、アクリロニトリルブタジエンスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリブタジエン、ポリ（ブチレンテレフタレート）、ポリ（エーテルスルホン）、ポリ（エーテルエーテルケトン）、ポリ（エチレングリコール）、スチレンーアクリロニトリル樹脂、ポリ（トリメチレンテレフタレート）、ポリビニルブチラール、ポリフッ化ビニリデン、ポリ（ビニルピロリドン）、環状オレフィンーコポリマー、およびこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0146】

デバイス（チップ）は、単層および多層ソフトリソグラフィー（MSL）技術、ならびに／または犠牲層封入法（例えば、Unger et al.（2000）、WO01/01025号を参照されたい）といった当該技術分野における標準的な技術を使用して、構築することができる。マイクロ流体デバイスを製造するさらなる方法には、マイクロマシニング、マイクロミリング、レーザーに基づくマシニング、化学エッチング、（強）反応性イオンエッチング、インプリンティング技術が挙げられる。これらの技術は、マイクロデバイスの大量生産のための熱エンボス加工および／または射出成形技術と併せて使用することができる。製造技術には広範な先行技術が存在する。これらのうちのいくつかは、US5,858,195号、US5,126,022号、US4,891,120号、US4,908,112号、US5,750,015号、US5,580,523号、US5,571,410号、US5,885,470号、US6,793,753号にも記載されている。独立型構造は、チャンネルの幅および高さに関して非常に薄いかまたは非常に厚い壁部を有するように作製することができる。チャンネルの壁部、ならびに上部および底部は、すべてが異なる厚さであってもよく、同じ材料または異なる材料もしくは材料の組み合わせ、例えばガラス、シリコン、およびPDMS等の生体適合性材料から作製され得る。密封チャンネルまたはチャンバは、全体がPDMS等の生体適合性材料から作製されてもよい。

【0147】

本発明に有用なデバイスは、1つ以上のチャンネルおよび／または反応チャンバを有し得る。例えば、デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のチャンネルを備え得る。さらに、デバイスは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の反応チャンバを備え得る。

【0148】

反応チャンバおよびマイクロチャンネルは、限定されないが、円筒形、長方形、半球、または台形等、当該技術分野で既知の任意の好適な形状であり得る。

【0149】

ある実施形態において、デバイスが、1つを上回る反応を行うことができる場合、チャンネル設計は、各構成成分が、図47に提供される左右対称な平行チャンネルレイアウト等、同じ長さ、寸法、および構成を有するチャンネルを通じて流動するようなものである。

【0150】

別の実施形態において、マイクロチャンネルの機能および反応チャンバの機能は、中で混合が起こり、そこから光が収集される、単一の一体型マイクロ流体素子によって達成され得る。

【0151】

マイクロ流体デバイスは、典型的に、1つ以上の反応チャンバの容積が、約1 p l（すなわち、ピコリットルまたは1兆分の1リットル）～約200 μ lである。しかしながら、約0.01 n l（すなわち、ナノリットルまたは10億分の1リットル）～約100 n l、または約0.01 n l～10 n lの反応チャンバの容積が、ある特定の用途においては有利であり得る。いくつかの実施形態は、各反応チャンバの容積が、約0.20 n l～約5 n lである場合に、最適に機能し得る。追加の実施形態は、各反応チャンバの容積が、約0.25 n l～約2 n lである。さらなる実施形態において、反応チャンバ（複数可）は、約1 μ l～約12 μ lの容積を有する。他の可能性のある反応チャンバの容積を、必要に応じて用いることができる。

【0152】

好ましい実施形態において、反応チャンバは、短いというよりは幅が広い。一例において、反応チャンバは、約 $1\text{ mm}^2 \sim 1\text{ cm}^2$ の断面積を有し、約 5 mm を上回らない高さを有する。

【0153】

いくつかの状況では、1つを上回る寸法および形状の反応チャンバを使用することが望ましい場合がある。例えば、本発明者らは、より大きな反応チャンバが、しばしば、標的検体を含有する試料を提示する際により遅い応答時間（BRET比がピークに達するまでの時間）、および検体を除去する際により長いオフタイムをかけて、より多くの光を生成し、より放出の弱いセンサ分子の検出を可能にすることを観察した。したがって、異なるチャンネルは、センサ分子と検体または検体のセットとの特定の組み合わせの感度、精度、および時間の動力学を適合させるために、異なる寸法の反応チャンバを備え得る。センサチャンネル毎に1つを上回る反応チャンバを実装することも可能であり、いくつかの場合にはそれが望ましいこともある。これにより、より高い発光性および定量的精度（大型チャンバ）、ならびにより高い時間分解能（より小さなチャンバ）で、試料をほぼ同時に検出することが可能となる。これは、大型およびそれよりも小さなチャンバを、検出器へのそれら固有の光路に光スイッチまたは同等物を介して取り付けるか、またはそれぞれを別個の固体光検出器に取り付けることによって容易に達成され得る。

10

【0154】

マイクロチャンネルの寸法は、デバイスの具体的な用途に基づいて選択され得る。したがって、マイクロチャンネルの幅は、例えば、約 $0.1\text{ mm} \sim 10\text{ mm}$ の範囲に及び得る。いくつかの実施形態において、マイクロチャンネルの幅は、約 $0.5\text{ mm} \sim 5\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態において、マイクロチャンネルの幅は、約 $1\text{ mm} \sim 4\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態において、マイクロチャンネルの幅は、約 2.5 mm である。マイクロチャンネルの奥行きまたは高さもまた、デバイスの特定の用途に基づいて選択され得る。したがって、マイクロチャンネルの奥行きは、例えば、約 $5\text{ }\mu\text{m} \sim 2000\text{ }\mu\text{m}$ の範囲に及び得る。いくつかの実施形態において、マイクロチャンネルの奥行きは、約 $100\text{ }\mu\text{m} \sim 1000\text{ }\mu\text{m}$ である。いくつかの実施形態において、マイクロチャンネルの奥行きは、約 $250\text{ }\mu\text{m} \sim 750\text{ }\mu\text{m}$ である。いくつかの実施形態において、マイクロチャンネルの奥行きは、約 $560\text{ }\mu\text{m}$ である。別の実施形態において、各マイクロチャンネルは、約 $1\text{ }\mu\text{m}^2 \sim 1\text{ mm}^2$ の断面積を有する。

20

30

【0155】

当業者には理解されるように、デバイスは、関連する構成成分をデバイスを通じて流動させることができる、好適な注入および排出ポートを有するであろう。

【0156】

当業者であれば、マイクロ流体デバイスを通じた流動は、マイクロチャンネルの寸法、流体の粘度、ならびに利用される検出および方法を含むがこれらに限定されない、種々の要因に依存することを十分に理解している。したがって、試料（センサ分子および基質）は、約 $1\text{ }\mu\text{l} / \text{時間} \sim 10\text{ ml} / \text{時間}$ の流量で、チップマイクロチャンネルを通じて流動し得る。いくつかの実施形態において、試料（センサ分子および基質）は、約 $1\text{ }\mu\text{l} / \text{時間} \sim 100\text{ }\mu\text{l} / \text{時間}$ 、約 $5\text{ }\mu\text{l} / \text{時間} \sim 200\text{ }\mu\text{l} / \text{時間}$ 、約 $7.5\text{ }\mu\text{l} / \text{時間} \sim 500\text{ }\mu\text{l} / \text{時間}$ 、または約 $10\text{ }\mu\text{l} / \text{時間} \sim 1\text{ ml} / \text{時間}$ の流量で、デバイスマイクロチャンネルを通じて流動し得る。

40

【0157】

一実施形態において、デバイスは、例えば、同じ源（試料）中の異なる検体を感知するための複数の反応チャンバを備える。異なる検体を検出するためには異なるセンサ分子を使用する必要がある可能性が高いことから、いくつかの事例においては、異なる、好ましくは並列のチャンネルの流量を変更することが望ましい場合がある。この点に関して、個々の流量は、個々のセンサ分子の感度を最適化するように設定され得る。

【0158】

50

一実施形態において、複数の反応チャンバを備えるデバイスにおいて、各反応チャンバへのおよびそこからの流量は、別個の手段によって制御され、例えば、別個の吸引ポンプが、各反応チャンバへのおよびそこからの流量を制御する。この構成により、複数のセンサチャンネルを互いに独立して、異なり得る流量、および結果として異なる速度と感度とのバランスで、同時に操作することが可能になる。

【0159】

マイクロ流体チャンネルの表面は、ウシ血清アルブミン、希釈した哺乳動物血清、魚皮ゼラチン、無脂肪乳タンパク質の0.1～5% (w/v) 水溶液といった好適な試薬溶液への曝露、および／またはTween-20等の非イオン性界面活性剤溶液の使用、または酵母ミクロソームの懸濁液の使用によって、不動態化され得る。

10

【0160】

試薬（試料、センサ分子、基質）がデバイスを通じた後、デバイスは、適切な流体、例えば、緩衝液等の洗浄流体を、マイクロチャンネルを通じて流動させることによって洗浄され得る。これにより、デバイスを再使用することができる。したがって、いくつかの実施形態において、本方法は、検体を検出した後に、緩衝液等の流体を、マイクロデバイスを通じて流動させるステップをさらに含む。マイクロデバイスを通じて流動される流体の量は、任意の量であり得、チップの大きさに基づき得る。いくつかの実施形態において、洗浄流体の量は、デバイスのマイクロチャンネルの総容積の約0.5倍～約10倍である。一実施形態において、洗浄流体の量は、デバイスのマイクロチャンネルの総容積の約1.5倍～約2.5倍である。

20

【0161】

温度制御

存在する場合、このモジュールは、試薬保管では1～8℃、好ましくは2～4℃、ならびにBRET反応では20～37℃、好ましくは25～28℃の所望される温度を維持するために使用される。BRET温度制御は、充填機序および電気光学収集デバイスに組み込まれてもよい。具体的には、それらは、制御機能のために局所抵抗加熱またはペルチェ素子冷却を用いる技術に従って構築される。例えば、熱的に制御されるプロセッサを、ベースラインよりも高い局所加熱によって制御される作動装置を有する、ペルチェ素子等の温度制御されたヒートシンクまたは冷却素子によってベースライン温度に維持することができる。あるいは、冷却は、小型ヒートポンプを使用して提供されてもよい。局所加熱は、好ましくは、例えば、50、25、15、または10V未満の低電圧によって有利に制御される、および1～2W未満の低電力抵抗加熱器によって提供され得る。

30

【0162】

光収集のための電気光学システム

本明細書に使用される「シグナル」という用語は、吸収の変化として測定される発光を指す。いくつかの実施形態において、シグナルは、「放出される光」であり、シグナルを検出するステップは、1つ以上の光検出器による特定の波長の光の光子の検出である。例となる光検出器には、光電子倍增管(PMT)、フォトダイオード、アバランシェフォトダイオード、シリコンもしくは他の固体光電子増倍器(http://en.wikipedia.org/wiki/Silicon_photomultiplier)、またはCCDカメラが挙げられ、これらは、冷却することができる。好ましくは、光検出器は、10%以上、より好ましくは30%以上、および最も好ましくは50%以上の光子検出効率を有する。好ましくは、これらの効率は、光学スペクトルの青色および緑色のバンドで機能する。検出器は、さらに、検出される光を特定の波長（複数可）または特定の波長範囲に制限する手段を備える。これは、例えば、フィルタホイール、もしくはフィルタスライド、もしくはモノクロメータ、もしくはダイクロイックミラー、またはこれらのデバイスの2つ以上の組み合わせに任意で載置される好適なフィルタであり得る。

40

【0163】

電気光学システムは、主に、光ファイバおよび光学スイッチからなり得る（図16）。光ファイバは、ファイバ束または液体ライトガイドで置き換えることができる。約10μ

50

m～約3000 μmのコア径を有するファイバは、充填システムに固定され得る。ファイバ束または液体ライトガイドについては、コア径は、0.5 mm～10 mmの範囲内であり得る。ファイバの平面端部は、反応チャンバのすぐ下に位置付けられ得、各ファイバが特定のチャンバから光を収集する。反応チャンバと一体化することが可能な2つのBRET電気光学検出素子を設計してもよい（図17を参照されたい）。球状マイクロレンズを反応チャンバに組み込んで、BRET光を光ファイバのコアに集中させるのを補助してもよい。

【0164】

別の実施形態において、光ファイバ／液体ライトガイドシステムは、各チャンバからの光が検出器に中継されるように、レンズとミラーのセットで置き換えることができる。多重チャンネルシステムの切り替えは、機械的チョッパまたは他の切り替え機序によって実現され得る。

10

【0165】

収集されるBRETシグナルをさらに増加させるために、平面または非球面ミラーを、反応チャンバの上部に設置してもよい（図17b）。この場合、上部に放出されるBRET光の大部分が、反射して光ファイバへと戻ることになる。多重チャンネル検出については、光学スイッチを使用して、すべてのチャンネルから光を収集することができる。この要素のための材料は、ポリジメチルシロキサン、環状オレフィンコポリマー（COC）等、優れた光学、化学特性を有する、ガラスまたはポリマー材料であり得る。BRET反応チャンバは、試料の送達および混合のために、上で設計されたマイクロ流体ネットワークに接続される。

20

【0166】

デジタル光子集積

超低レベルの光の検出には、暗電流を排除するために、高感度な光電子倍增管（PMT）およびデジタルシグナル処理装置が必要である。図42は、PMT、光子計数装置、USB計数装置という3つの装置から構成される、本発明で使用するための例示的なシステムを図示する。H10721P-210は、可視波長で高い感度を提供する超バイアルカリ光電面を有する電流出力型PMTである。光感受性領域は、直径8 mmの円形である。光子が超バイアルカリ光電面に達すると、光電子が生成される。光電子は、電子の数が各段階で指数関数的に増加する一連のカスケード電極構造に向かって加速する。最終段階で、PMTは、生成された電子の合計を光電子のパルスまたは電流として出力する。

30

【0167】

暗電流は、入射光の不在下で、PMTから現れる電流出力として定義される。いわゆる「暗電流パルス」を識別および排除することにより、暗電流を最小限に抑えることが可能である。この例では、シグナル処理装置（C9744光子計数装置）を使用して、暗電流パルスを排除する。この装置は、ユーザ設定閾値の実装を可能にし、その結果、閾値よりも高い振幅を有するパルスのみが出力に送信される。残りのパルスは、出力シグナルからフィルタ除去される。この装置では、分別基準を通過するパルスは、5 Vデジタルシグナルパルスに変換され、出力端末に送信される。

40

【0168】

C8855-01は、不感時間なしにデジタルシグナルパルスを計数するように設計されたUSBインターフェースの計数装置である。C9744光子計数装置で生成されるシグナルは、計数装置に入力され、結果が、USB接続でPCに送信される。

【0169】

光学検出システム

検出は、デバイスに組み込まれるか、またはデバイスとは別個であるが検出されるデバイスの領域と連携されている、検出器を使用することによって達成され得る。

【0170】

光学検出システムは、各BRET反応チャンバを含む、各マイクロ流体チャンネルから光出力の試料抽出を行う。各マイクロ流体チャンネルは、専用の光検出器を備え得る。例えば

50

、単一のBRET反応チャンバの光学出力の一部分は、青色バンドパスフィルタを通じてチャンネルに入り得、残りは緑色バンドパスフィルタ（または使用されるBRETの種類に応じて他の好適なバンドパス特徴部）を通じてチャンネルに入り得る。これらのフィルタからの光は、光ファイバ、光ファイバ束、または液体ライトガイドを用いて別個の光電子倍增器に向けられる。あるいは、シリコンまたは他の高感度な固体光電子倍增器を、各マイクロ流体チャンネルおよびBRET反応チャンバから光の放出を直接試料抽出できるように、バンドパスフィルタに近接近して設置してもよい。別の実施形態において、非球面レンズまたは非球面レンズのセットを、光ファイバ、光ファイバ束、または液体ライトガイドの端部に設置して、PMTに進入する前に出力ビームをコリメートし、したがって、光線がPMTの感受性領域の外側に逸れることによる光学的損失を低減することができる。好ましい実施形態において、バンドパスフィルタを、マイクロ流体チップの対向する側面にそれと密着させて設置し、固体光電子倍增器または他の光検出器を、マイクロ流体チャンネルのそれぞれにおけるバンドパスフィルタの両方と密着させて設置する。各マイクロ流体チャンネルに専用の検出システムを提供する利点は、光学システムの複雑性を最小化し、各マイクロ流体チャンネルがポーリングサイクルの大半において光学的に無変化である切り替え不感時間に起因するものを含む光子損失の可能性を最小化することである。

10

【0171】

あるいは、各マイクロ流体チャンネルは、1つ以上の共有の光検出器によって順にポーリングされてもよい。

【0172】

20

一実施形態において、検出システムは、マイクロ流体チャンネルのそれぞれから光ファイバまたはライトガイドを介して光を受容し、単一の光ファイバまたはライトガイドを介してこれらの入力のそれぞれの光シグナルを連続的に出力する、光学的または光学機械的切り替えデバイスからなり得る。チャンバからチャンバへの切り替え時間は、ナノ秒～数秒（例えば、2または3秒）の範囲内、好ましくは10～500ミリ秒以下の範囲内であり得る。光学切り替えデバイスの出力が衝突し、ダイクロイックミラー等の光検出器が、光を、それぞれBRETドナーおよびアクセプターの放出に対応する2つの波長範囲、ならびにこれらの波長範囲のそれぞれの光を同時に検出するための2つの光子倍增管に分ける（図16）。場合によっては、ダイクロイックブロックは、BRETドナーおよびアクセプターの放出スペクトルに調整されたバンドパスフィルタによって増大されてもよい。

30

【0173】

代替的な実施形態において、シャッターボックスが、光学スイッチの代わりに用いられてもよい。そのような配設において、シャッターボックスの出力は、多対一の多分岐型ライトガイドであり得、これは、すべての光学チャンネルの出力を単一のライトガイドに制限し、これが光を光検出器へと導く。この配設において、シャッターは、各単一のマイクロ流体チャンネルからの光が、連続的に光検出器に移るように、操作される。切り替えシステムの潜在的な利点は、費用、重量、および電力を抑えながら、より少数の光検出器によってより多数のマイクロ流体チャンネルの光学出力の試料抽出を行うことが可能となることである。

【0174】

40

別の実施形態において、対をなす固体光検出器の動作特徴は、それらのピーク光子検出効率（PDE）が、BRETドナーおよびアクセプターのピーク放出に選択的または半選択的となるように選択することができる。この場合、スペクトルフィルタおよびダイクロイックブロックを省略し、BRET比の生成を固体光検出器の種類が異なる固有の差スペクトル感度に頼ることが可能である。

【0175】

データの取得および処理

計数／ゲート対時間に関するドナーおよびアクセプターのBRETシグナルを、好適なソフトウェアによって収集する。BRET比は、アクセプターチャンネルから収集された光と、ドナーチャンネルから収集された光との比率に基づいて計算される。BRET比は、セ

50

ンサ分子および基質の流動比が一定にとどまり、検出される検体がBRETチャンバにならない場合、一定となるはずである。しかしながら、検体の存在下では、BRET比は、反応チャンバ内の試薬の量に対応して変化するであろう。

【0176】

ソフトウェアおよび埋め込み型制御システム

好ましくは、本システムは、異なる化学試料の応答パターンの特徴を学習し、区別することができる、訓練可能なデータ処理および出力ソフトウェアアルゴリズムを含む。ソフトウェアは、ベースラインのBRET比、試料に曝露したときの定常状態のBRET比、および経時的なBRET比の変化の種々の特徴といった、各マイクロ流体チャネルからのシグナルの顕著な特徴を捕捉する。各チャネルからのこれらの特徴は、主成分分析、線形判別分析、段階的判別分析、サポートベクターマシン等の機械学習アルゴリズム、ベイジアンネットワーク分析、または神経ネットワークアルゴリズムといった種々の判別アルゴリズムに入力され、以前に学習済みの試料分類の結果と比較される。暫定的な試料分析または分類が、好ましくは、GUIおよび／または音響的出力を通じて、操作者に提供される。あるいは、各チャネルにおけるシグナル強度は、操作者が、応答パターンを、以前に認識するように訓練したものと一致させることができるように、視覚的および／または音響的に出力されてもよい。

10

【0177】

一実施形態において、GUIソフトウェアは、サンプリングサブシステムの速度および濃度の比率、マイクロ流体チャネルの流量、洗浄およびパージサイクルのタイミング、ポンプ、任意の能動的混合の速度および強度、光検出器システムの感度および集積時間、試薬レザーバーおよび反応チャンバの温度、ならびにデータの取得および処理のあらゆる側面といった、すべてのデバイス内構成要素を制御するために使用される。場合によっては、これらの機能の多くが、埋め込み型マイクロコントローラによって実行され得る。一部またはすべての機能が、ラップトップもしくはタブレットコンピュータまたは同等のデバイスで実行されてもよい。

20

【0178】

化学発光共鳴エネルギー移動

化学発光は、化学反応の結果として、制限された熱（発光）の放出を伴うエネルギーの放出である。「化学発光」という用語は、酵素の活性に依存する生物発光を包含して本明細書に使用される。

30

【0179】

本明細書に使用される際、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）とは、生物発光タンパク質ドナーとアクセプター分子との間の非放射性エネルギー移動に基づく近接性アッセイである。

【0180】

本明細書に使用される際、「空間位置」という用語は、検体がセンサ分子に結合するかまたはそこから解放される結果として変化する、アクセプター分子に対するドナーの3次元の位置付けを指す。

【0181】

本明細書に使用される際、「双極子配向」とは、3次元空間におけるその配向に対する、ドナーおよび／またはアクセプター分子のいずれかに関連する双極子モーメントの3次元空間における方向を指す。双極子モーメントは、分子に対する電荷の変動の結果である。

40

【0182】

BRETを例として用いると、ある実施形態において、生物発光タンパク質とアクセプター分子との間に起こるエネルギー移動は、特定の波長を選択する光学フィルタ（一方がアクセプター分子の放出用で、他方が生物発光タンパク質の放出用）を使用して測定された放出から計算された比率として提示される（等式1を参照されたい）。

$$E_a / E_d = \text{BRET比} \quad (1)$$

50

式中、 E_a は、アクセプター分子の放出強度（放出光は、アクセプターの放出に適合された特定のフィルタを用いて選択される）として定義され、 E_d は、生物発光タンパク質放出強度（放出光は、生物発光タンパク質の放出に適合された特定のフィルタを用いて選択される）として定義される。

【0183】

光学フィルタが、BRETに好適な波長判別を可能にする任意の種類のフィルタであり得ることが、当業者には理解されるはずである。例えば、本発明に従って使用される光学フィルタは、干渉フィルタ、ロングパスフィルタ、ショートパスフィルタ等であり得る。フィルタを通る波長の強度（通常、1秒当たりの計数（CPS）または相対発光単位（RLU））は、光電子倍增管（PMT）、カスケードフォトダイオード、フォトダイオードアレイを含むフォトダイオード、または電荷結合素子（CCD）カメラ等の感受性カメラのいずれかを使用して定量化され得る。続いて、定量化されたシグナルを使用して、BRET比を計算し、エネルギー移動効率を表す。BRET比は、アクセプター放出の強度が増加するにつれて、増加する。

10

【0184】

一般に、アクセプター放出強度とドナー放出強度との比率が判定され（等式1を参照されたい）、これは、エネルギー移動効率を反映する任意の単位で表される数である。この比率は、エネルギー移動効率が増加するにつれて、増加する（Xu et al., 1999を参照されたい）。

【0185】

エネルギー移動効率はまた、ドナー放出強度とアクセプター放出強度との反比を使用して表してもよい（等式2を参照されたい）。この場合、比率は、エネルギー移動効率が増加するにつれて、減少する。この計算を行う前に、放出強度を、バックグラウンド光および基質の自己発光の存在について補正する。この補正は、概して、適切な波長で測定された放出強度を、基質を含有するが、生物発光タンパク質、アクセプター分子、または本発明のポリペプチドを含有しない対照試料から差し引くことによって行われる。

20

$$E_d / E_a = \text{BRET比} \quad (2)$$

式中、 E_a および E_d は、上述のように定義される。

【0186】

生物発光タンパク質およびアクセプター分子の放出の光強度はまた、蛍光光度計等のモノクロメータに基づく機器、電荷結合素子（CCD）カメラ、またはダイオードアレイ検出器を使用して定量化することができる。蛍光光度計を使用して、放出スキャンは、基質の添加後に生物発光タンパク質およびアクセプター分子の両方の放出ピークが検出されるように、行われる。ピーク下面積は、相対的な光強度を表し、これは、上に概説されるように、比率の計算に使用される。同じ試料から生物発光タンパク質およびアクセプター分子の光を測定することができる任意の機器を使用して、本発明のBRETシステムを監視してもよい。

30

【0187】

代替的な実施形態において、アクセプター分子の放出のみが、BRETの効果的な検出および／または定量化に好適である。この場合、エネルギー移動効率は、アクセプター放出強度のみを用いて表される。エネルギー移動を測定するために、いずれの比率計算も行うことなくアクセプター放出強度を使用できることが、当業者には容易に明らかとなろう。これは、理想的には、アクセプター分子が、生物発光タンパク質から移動した光を吸収する場合にのみ光を放出することになるという事実起因する。この場合、1つのみの光フィルタが必要である。

40

【0188】

関連する実施形態において、生物発光タンパク質の放出のみが、BRETの効果的な検出および／または定量化に好適である。この場合、エネルギー移動効率は、生物発光タンパク質の放出強度のみを用いて計算される。エネルギー移動を測定するために、いずれの比率計算も行うことなくドナー放出強度を使用できることが、当業者には容易に明らかと

50

なろう。これは、アクセプター分子が、生物発光タンパク質から移動した光を吸収するため、生物発光タンパク質からの検出可能な放出には対応する減少が存在するという事実に起因する。この場合、1つのみの光フィルタが必要である。

【0189】

代替的な実施形態において、エネルギー移動効率は、測定に1つの光学フィルタのみを必要とするレシオメトリック測定を用いて表される。この場合、適切な光学フィルタを用いてドナーまたはアクセプターの光強度を判定し、試料の別の測定は、いずれのフィルタも用いることなく行われる（オープンスペクトルの強度）。この後者の測定では、（すべての波長の）合計光出力を定量化する。比率計算は、次いで、等式3または4のいずれかを使用して行われる。等式3については、アクセプター用の光学フィルタのみが必要である。等式4については、ドナー用の光学フィルタのみが必要である。

$$E_a / (E_o - E_a) = \text{BRET比または} = (E_o - E_a) / E_a \quad (3)$$

$$(E_o - E_d) / E_d = \text{BRET比または} = E_d / (E_o - E_d) \quad (4)$$

式中、 E_a および E_d は、上述のように定義され、 E_o は、すべての波長を合わせた放出強度として定義される（オープンスペクトル）。

【0190】

さらなる等式が、等式1～4から導出され得ることが、当業者には容易に明らかなはずである。例えば、1つのそのような導出は、生物発光タンパク質および／またはアクセプター分子の放出波長で存在するバックグラウンド光の補正を伴う。

【0191】

BRETアッセイを行う際、光放出は、BRETCountを使用して各ウェルから判定することができる。BRETCount機器は、改変型TopCountであり、ここで、TopCountは、Packard Instrument (Meriden, CT) から販売されているマイクロタイタープレートシンチレーションおよび発光計数器である。バックグラウンドノイズを排除するために同時に2つの光電子倍增管(PMT)を利用する従来の計数器とは異なり、TopCountは、ノイズ低減に単一PMT技術および時間分解パルス計数を利用して、標準的な不透明マイクロタイタープレートでの計数を可能にする。不透明マイクロタイタープレートの使用により、光学的クロストークをごくわずかなレベルまで低減することができる。TopCountには、1、2、6、および12個の検出器(PMT)を含む種々の形式があり、それぞれ、1、2、6、または12個の試料の同時読み取りを可能にする。BRETCountの他に、他の市販の機器で、BRETを行うことができる：Victor 2 (Wallac, Finland (Perkin Elmer Life Sciences)) およびFusion (Packard Instrument, Meriden)。BRETは、少なくともアクセプター分子の放出、および好ましくは2つまたはそれ以上の波長（アクセプター分子および生物発光タンパク質）を検出することができる読み取り器を使用して行うことができる。

【0192】

化学発光

非酵素的化学発光は、触媒の存在下での有機色素と酸化剤との間の化学反応の結果である。化学発光放出は、化学的に誘導される励起状態の有機色素からのエネルギーとして生じ、基底状態へと減衰する。化学発光放出の期間および強度は、主に、反応溶液中に存在する化学試薬の割合に依存する。

【0193】

本明細書に使用される際、「生物発光タンパク質」という用語は、好適な基質に作用して、発光を生成することができる任意のタンパク質を指す。

【0194】

生物発光タンパク質は、基質を活性化された生成物に変換する酵素であり、この生成物は、次いで、緩和するとエネルギーを放出することが、当該技術分野で理解される。活性化された生成物（基質に対する生物発光タンパク質の活性によって生成される）は、生物発光タンパク質が生成し、アクセプター分子へと移動する発光の源である。

【0195】

本発明に利用することができる多数の異なる生物発光タンパク質が存在する（例えば、表1を参照されたい）。発光系は既知であり、細菌、原生動物、腔腸動物、軟体動物、魚類、ヤスデ、ハエ、菌類、蠕虫、甲殻類、および甲虫、特に、ピロフォラス（*Pyrophorus*）属のコメツキムシ、ならびにフォティナス（*Photinus*）属、フォティリス（*Photuris*）属、およびルキオラ（*Luciola*）属のホタルを含む、多数の発光性生物から単離されている。生物発光を示すさらなる生物は、WO00/024878号、WO99/049019号、およびViviani（2002）に列挙されている。

【0196】

1つの非常によく知られた例としては、特異的な生化学物質であるルシフェリン（天然に存在するフルオロフォア）がルシフェラーゼ活性を有する酵素によって酸化される、エネルギー生成化学反応を触媒するルシフェラーゼとして知られるタンパク質のクラスである（Hastings, 1996）。細菌、藻類、菌類、昆虫類、魚類、および他の海洋形態を含む、原核生物および真核生物の両方の非常に多様な生物が、この様式で光エネルギーを放出し得、それぞれが、他の生物のものとは化学的に異なる特異的なルシフェラーゼ活性およびルシフェリンを有する。ルシフェリンルシフェラーゼ系は、形態、化学的性質、および機能が、非常に多様である。ルシフェラーゼ活性を有する生物発光タンパク質は、従って、種々の源から、または種々の手段によって、入手可能である。ルシフェラーゼ活性を有する生物発光タンパク質の例は、US5,229,285号、同第5,219,737号、同第5,843,746号、同第5,196,524号、および同第5,670,356号に見出すことができる。最も広く使用されているルシフェラーゼのうちの2つは、(i) ウミシイタケルシフェラーゼ（ウミシイタケ由来）、35kDaのタンパク質であり、基質としてセレンテラジンを使用し、480nmで光を放出する（Lorenz et al., 1991）；および(ii) ホタルルシフェラーゼ（フォティナス・ピラリス（*Photinus pyralis*）由来）、61kDaのタンパク質であり、基質としてルシフェリンを使用し、560nmで光を放出する（de Wet et al., 1987）である。

【0197】

ガウシアルシフェラーゼ（ガウシア・プリンセプス（*Gaussia princeps*）由来）は、生化学アッセイで使用されている（Verhaegen et al., 2002）。ガウシアルシフェラーゼは、急速な反応でセレンテラジンを酸化させ、470nmで明るい発光をもたらす、20kDaのタンパク質である。

【0198】

本発明に有用なルシフェラーゼはまた、ヒカリキノコバエ（*Anachnoca*）種（WO2007/019634号）からも特徴付けられている。これらの酵素は、大きさが約59kDaであり、放出スペクトルが青色スペクトル部分の範囲内に入る、発光反応を触媒するATP依存性ルシフェラーゼである。

【0199】

天然に存在する生物発光タンパク質の生物学的に活性な変異体またはフラグメントは、当業者によって容易に生成され得る。本発明に有用なそのような変異体の3つの例は、Rluc2（Loening et al., 2006）、Rluc8（Loening et al., 2006）、およびRluc8.6-535（Loening et al., 2007）であり、これらは、それぞれ、ウミシイタケルシフェラーゼの変異体である。さらなる好ましい実施形態において、BRET化学発光ドナーの配列は、天然のウミシイタケルシフェラーゼセンサを組み込んだセンサ分子よりも高い熱安定性を有するように選択される。Rluc2またはRluc8は、好適な選択肢の便宜的な例であり、これらは、結果として、天然のウミシイタケルシフェラーゼ配列を組み込んだセンサよりも5倍以上または10倍以上高い発光性を呈する。このような強化された発光性は、より低い検出チャンバの容量および／またはより速いオンチップ流量の使用を、検出チャンバ容

10

20

30

40

50

量と流量との任意の所与の組み合わせでの時間分解能の改善と同時にを可能にするため、大きな利点を有する。あるいは、これは、任意の所与の時間分解能に関してより経済的な試薬の使用を可能にする。

【表 1 - 1】

例示的な生物発光タンパク質。

種	名称	生物	分子 量 kDa x 10 ⁻³	放出(nm)	基質の例
昆虫	FFluc	フォティナス・ピラリス(北アメリカホタル)	約 61	560	D-(-)-2-(6'-ヒドロキシベンゾチアゾリル)- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸、HBTTCA(C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂)(ルシフェリン)
昆虫	FFluc	ルキオラ・クルキアタ(Luciola cruciata)(ゲンジボタル)		560～590(多数の突然変異体)	ルシフェリン
昆虫		フェンゴディド・ビートル(Phengodid beetle)(レイルロードワーム)			
昆虫		ヒカリキノコバエ種			ルシフェリン
昆虫		オルフェリア・フルトニー(Orphelia fultoni)(北アメリカグローワーム)			
昆虫	Cluc	ピロフォラス・プラギオファタマス(plagiophthalmus)(コメツキムシ)		546、560、578、および 593	ルシフェリン
クラゲ	エクオリン	エクオレア(Aequorea)	44.9	460～470	セレンテラジン
ウミシイタケ(Sea pansy)	Rluc	レニラ・レニフォルミス(Renilla reniformis)	36	480	セレンテラジン
ウミシイタケ(修飾)	Rluc8	レニラ・レニフォルミス(修飾)	36	487(ピーク)	セレンテラジン/ディープブルーC
ウミシイタケ(修飾)	Rluc2	レニラ・レニフォルミス(修飾)M185V/Q235A	36	480	セレンテラジン

10

20

30

40

【表 1 - 2】

ウミシイタケ (修飾)	Rluc8.6 -535	レニラ・レニフォルミ ス(修飾)	36	535	セレンテラジン
ウミシイタケ	Rmluc	レニラ・ムレレイ (<i>Renilla mullerei</i>)	36.1	約 480	セレンテラジン
ウミシイタケ		レニラ・ケリカー (<i>Renilla kollikeri</i>)			
甲殻類(エビ)	Vluc	ワルグラ・ヒルゲンド ルフイ(<i>Vargula hilgendorffii</i>)	約 62	約 460	セレンテラジン *
甲殻類		シュプリジナ (<i>Cypridina</i>)(ウミホタ ル)	75	460	セレンテラジン **
過鞭毛藻類 (<i>Dinofagellate</i>) (海藻)		ゴニオラクス・ポリエ ドラ(<i>Gonyaulax polyedra</i>)	130	約 475	テトラピロール
軟体動物		ラチア(<i>Latia</i>)(淡水カ サガイ(fresh water limpet))	170	500	エノールギ酸塩、テ ルペン、アルデヒド
ヒドロイド		オベリア・ビスクスピ ダタ(<i>Obelia biscuspidata</i>)	約 20	約 470	セレンテラジン
エビ		オキヒメヒオドシエ ビ(<i>Oplophorus gracilorostris</i>)	31	462	セレンテラジン
その他	Ptluc	ウミエラ(<i>Ptilosarcus</i>)		約 490	セレンテラジン
	Gluc	ガウシア	約 20	約 475	セレンテラジン
	Plluc	プレウロマンマ (<i>Pleuromamma</i>)	22.6	約 475	セレンテラジン

10

20

30

【0200】

本明細書に使用される際、「生物学的に活性なフラグメント」とは、本明細書に記載されるポリペプチドの一部分であり、これは、全長ポリペプチドの定義される活性を維持する。本明細書に使用される際、「生物学的に活性な変異体」とは、天然に存在する分子および／または定義された分子とは1つ以上のアミノ酸が異なるが、生物学的に活性なフラグメントに関して上に定義されたもの等、定義された活性を維持する、分子である。生物学的に活性な変異体は、典型的に、天然に存在する分子および／または定義された分子に、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、およびさらにより好ましくは少なくとも99%同一である。

40

【0201】

本発明に利用することができる代替的な非ルシフェラーゼ生物発光タンパク質は、好適な基質に作用して発光シグナルを生成することができる任意の酵素である。そのような酵素の具体的な例は、β-ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ

50

、アルカリホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、および β -グルコシダーゼである。これらの酵素の合成発光性基質は、当該技術分野で周知であり、Tropix Inc. (Bedford, MA, USA) 等の企業から市販入手可能である。

【0202】

本発明に有用なペルオキシダーゼの例は、Hushpulian et al. (2007) によって記載されている。

【0203】

好ましい実施形態において、低分子量の生物発光タンパク質を使用して、立体障害に起因する相互作用の阻害を防止する。生物発光タンパク質は、好ましくは、単一のポリペプチド鎖からなる。さらに、生物発光タンパク質は、好ましくは、オリゴマーまたは凝集体を形成しない。生物発光タンパク質であるウミシイタケルシフェラーゼ、ガウシアルシフェラーゼ、およびホタルルシフェラーゼは、これらの基準のすべてまたは大部分を満たす。

【0204】

基質

本明細書に使用される際、「基質」という用語は、化学発光ドナーと併せて使用して、発光を生成または吸収させることができる任意の分子を指す。基質の選択は、化学発光ドナーによって生成される光の波長および強度に影響を及ぼし得る。

【0205】

広く知られている基質は、刺胞動物、橈脚動物、毛顎動物 (Chaetognath)、有櫛動物、十脚類エビ、アミ類エビ、放散虫類、および一部の魚分類群に発生するセレンテラジンである (Greer and Szalay, 2002)。例えば、ウミシイタケルシフェラーゼについては、418~512 nmの光放出をもたらすセレンテラジン類似体/誘導体を利用可能である (Inouye et al., 1997)。セレンテラジン類似体/誘導体 (400A、DeepBlueC) は、ウミシイタケルシフェラーゼでは、400 nmで光を放出することが説明されている (WO 01/46691号)。セレンテラジン類似体/誘導体の他の例は、EnduRenおよびViviRenである。

【0206】

本明細書に使用される際、「ルシフェリン」という用語は、生物発光が可能な生物で見られる、光を放出する生物学的色素のクラスを指し、これは、酵素ルシフェラーゼの存在下で酸化されて、オキシルシフェリンおよび光の形態でエネルギーを生成する。ルシフェリンまたは2-(6-ヒドロキシベンゾチアゾール-2-イル)-2-チアゾリン-4-カルボン酸が、ホタルのフォティナス・ピラリスから初めて単離された。それ以来、多数の異なる生物、主に海洋生物、例えば魚類およびイカから、種々の形態のルシフェリンが発見され、研究されてきたが、多くは、陸上生物、例えば、蠕虫、甲虫、および種々の他の昆虫類において特定されている (Day et al., 2004; Viviani, 2002)。

【0207】

ルシフェリンには少なくとも5つの一般的な型があり、これらは、それぞれが化学的に異なり、広範な異なる補因子を利用する化学的および構造的に異なるルシフェラーゼによって触媒される。1つ目は、ホタルルシフェリンというホタルルシフェラーゼの基質であり、触媒作用にATPを必要とする (EC 1.13.12.7)。2つ目は、細菌ルシフェリンであり、一部のイカおよび魚にも見出され、長鎖アルデヒドおよび還元型リン酸リボフラビンからなる。細菌ルシフェラーゼは、FMN-H依存性である。3つ目は、過鞭毛藻類ルシフェリンであり、夜間の海洋のリン光に関与する生物である過鞭毛藻類 (海洋性プランクトン) に見出されるテトラピロールクロフィル誘導体である。過鞭毛藻類ルシフェラーゼは、過鞭毛藻類ルシフェリンの酸化を触媒し、3つの同一で触媒的に活性なドメインからなる。4つ目は、イミダゾロピラジンヴァルグリンであり、これは、ある特定の貝虫類および深海魚、例えば、イサリビガマアンコウ (Porichthys) に見られる。最後は、セレンテラジン (coelenterazine) (イミダゾールピ

10

20

30

40

50

ラジン (imidazolpyrazine)) であり、放散虫類、有櫛動物、刺胞動物、イカ、橈脚動物、毛顎動物、魚類、およびエビに見られる、タンパク質エクオリンの光放出物質である。

【0208】

アクセプター分子

本明細書に使用される際、「蛍光性アクセプタードメイン」という用語（本明細書において「アクセプター分子」とも称される）は、化学発光ドナー活性の結果として放出されたエネルギーを受け取り、光エネルギーとして再放出することができる、任意の化合物を指す。本発明に利用することができる多数の異なるアクセプター分子が存在する。アクセプター分子は、タンパク質であってもよく、または非タンパク質性であってもよい。タンパク質であるアクセプター分子の例としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、GFPの青色蛍光変異体 (BFP)、GFPのシアン蛍光変異体 (CFP)、GFPの黄色蛍光変異体 (YFP)、高感度GFP (EGFP)、高感度CFP (ECFP)、高感度YFP (EYFP)、GFPS65T、Emerald、Venus、mOrange、Topaz、GFPuv、不安定化EGFP (dEGFP)、不安定化ECFP (dECFP)、不安定化EYFP (dEYFP)、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、t-dimer2、t-dimer2 (12)、mRFP1、ポキロポリン (pocilloporin)、ウミシイタケGFP、Monster GFP、pAGFP、Kaedeタンパク質、もしくはフィコビリタンパク質、またはこれらのいずれか1つの生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質ではないアクセプター分子の例としては、Alexa Fluor色素、Bodipy色素、Cy色素、フルオレセイン、ダンシル、ウンベリフェロン、蛍光性ミクロスフェア、発光性ミクロスフェア、蛍光性ナノ結晶、マリーナブルー、カスケードブルー、カスケードイエロー、パシフィックブルー、オレゴングリーン、テトラメチルローダミン、ローダミン、テキサスレッド、希土類元素キレート、またはこれらの任意の組み合わせもしくは誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0209】

1つの非常によく知られた例は、クラゲのオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質、ならびに分子生物学の適用、例えば、突然変異生成およびキメラタンパク質技術により生じる多数の他の変異体 (GFP) を含む、フルオロフォアである (Tsien, 1998)。GFPは、それらの発色団の独特の成分に基づいて分類され、各クラスは、異なる励起および放出波長を有する：クラス1、中性フェノールとアニオン性フェノラートとの野生型混合物：クラス2、フェノラートアニオン：クラス3、中性フェノール：クラス4、積み重なったs電子系を有するフェノラートアニオン：クラス5、インドール：クラス6、イミダゾール：およびクラス7、フェニル。

【0210】

突然変異されている天然に存在するアクセプター分子 (変異体) もまた、本発明に有用であり得る。BRETに好適な組み換え系の一例は、媒介タンパク質 (複数可) (この場合、Gタンパク質共役型受容体) の不在下において単独では互いにそれほど直接的に相互作用しない、ウミシイタケルシフェラーゼとGFPの高感度黄色突然変異体 (EYFP) との対である (Xu et al., 1999)。

【0211】

別の実施形態において、アクセプター分子は、蛍光性ナノ結晶である。ナノ結晶、または「量子ドット」は、光分解耐性、明るさの改善、非毒性、および複数のプロセスを同時に監視することを可能にする寸法依存性の狭い放出スペクトルを含む、蛍光標識として有機分子を上回る複数の利点を有する。さらに、ナノ結晶の吸収スペクトルは、最初のピークを連続的に上回り、すべての寸法、およびしたがってすべての色が、単一の励起波長により励起されることを可能にする。

【0212】

蛍光性ナノ結晶は、種々の方法でタンパク質に結合、または「生体共役 (biocoupling)」

j u g a t e d)」させることができる。例えば、「量子ドット」の表面キャップを、ジヒドロリポ酸（DH L A）または両親媒性ポリマーのいずれかに由来するカルボキシレート基を用いて負に荷電させることができる。タンパク質を、直接、または組み換えタンパク質に融合された正に荷電したロイシンジッパーペプチドからなる架橋を介してのいずれかで、静電的にDH L A－ナノ結晶に共役させることができる。後者は、意図される標的に対する特異性により一次抗体に結合する。あるいは、抗体、ストレプトアビジン、または他のタンパク質は、従来のカルボジイミド化学によって、ナノ結晶のポリアクリル酸キャップに共有結合される。

【0213】

セレン化カドミウム、硫化カドミウム、ヒ化インジウム、およびリン化インジウムを含む、ナノ結晶を生成するためのコロイド法がある。これらの量子ドットは、量子ドットの体積内に100～100,000個程度の原子を含有し得、直径は10～50個の原子である。一部の量子ドットは、一方の材料がもう一方に埋め込まれ、大きなバンドギャップを有する小さな領域である。これらは、いわゆるコアシェル構造、例えば、コアがCd S eでありシェルがZ n Sであるもの、またはオルモシルと称されるシリカの特殊な形態に由来するものであり得る。ドットが大きいほど、その蛍光スペクトルは赤く（低エネルギーに）なる。逆に、小さいドットほど、青い（高エネルギーの）光を放出する。色合いは、量子ドットのエネルギーレベルに直接関連する。定量的に言うと、蛍光の光のエネルギー（およびしたがって色）を決定するバンドギャップエネルギーは、量子ドットの寸法の二乗に反比例する。大きな量子ドットほど、より狭い間隔のより高いエネルギーレベルを有する。これは、量子ドットが低いエネルギーを含有する光子、すなわち、スペクトルの赤色末端に近いものを吸収することを可能にする。

【0214】

代替的な実施形態において、アクセプター分子は、蛍光性ミクロスフェアである。これらは、典型的に、ポリマーから作製され、種々の試薬に共役させることができるポリマーマトリックスに組み込まれた蛍光性分子（例えば、フルオレセインG F PまたはY F P）を含有する。蛍光性ミクロスフェアは、内部または表面を標識化することができる。内部標識化により、典型的には狭い蛍光放出スペクトルを有する非常に明るく安定した粒子が生成される。内部標識化すると、表面の基は、リガンド（例えば、タンパク質）をビーズの表面に共役させるために利用可能なままとなる。内部標識化したビーズは、それらが光退色に対して高い耐性を示すため、画像化用途で広く使用される。

【0215】

カルボキシレート修飾蛍光性ミクロスフェアは、1－エチル－3－（3－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（E D A C）等の水溶性カルボジイミド試薬を使用したタンパク質の共有結合に好適である。硫酸塩蛍光性ミクロスフェアは、比較的疎水性であり、ほぼすべてのタンパク質に受動的かつほぼ不可逆的に吸着する。アルデヒド－硫酸塩蛍光性ミクロスフェアは、表面アルデヒド基を付加し、タンパク質と反応するように修飾されている、硫酸塩ミクロスフェアである。

【0216】

別の実施形態において、アクセプター分子は、発光性ミクロスフェアである。これらは、典型的に、ポリマーから作製され、種々の試薬に共役させることができる、ポリマーマトリックスに組み込まれた発光性分子（例えば、ユーロピウムまたは白金の複合体）を含有する。

【0217】

本発明に有用な非蛍光性アクセプタードメインの例には、D A B C Y L [4－（（4－（ジメチルアミノ）フェニル）アゾ）安息香酸]、D A B S Y L（ジメチルアミノアズスルホン酸）、金および銀等の金属ナノ粒子、ラックホール消光剤（l a c k h o l e q u e n c h e r）（B H Q）、およびQ X L消光剤といった、消光剤が挙げられる。

【0218】

化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの対

10

20

30

40

50

本明細書に使用される際、「化学発光ドナードメインとアクセプタードメインとの距離および相対配向は、検体の存在下および／または不在下で、フェルスター距離の±50%以内である」という用語は、 R_0 の±50%以内で実行され得る、安定状態のRET測定値を指す。この語句は、10～90%の範囲内の化学発光ドナードメインからアクセプタードメインへの発光エネルギー移動効率を包含する。これらの距離限界を超えると、距離の推定は依然として可能であるが、不確かさが増加する。

【0219】

好適な対合を判定する際に考慮すべき基準は、ドナーのものと比較したアクセプター分子の相対放出／蛍光スペクトルである。ドナーの放出スペクトルは、ドナー発光放出からの光エネルギーが、2つの分子が適正に近接し互いに対して適正な配向にある場合に、アクセプター分子を励起し、それによってアクセプター分子の蛍光を促進することができるように、アクセプター分子の吸収スペクトルと重複する必要がある。例えば、観察可能な放出スペクトルピークに基づいて、ウミシイタケルシフェラーゼ／EGFPの対合は、ウミシイタケルシフェラーゼ／EYFPの対合ほど良好でないことが実証されている (Xu, 1999; Wang, et al. (1997) in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*, eds. Hastings et al. (Wiley, New York), pp. 419–422)。可能性のある対合を研究するために、選択された生物発光タンパク質およびアクセプター分子を含有するタンパク質融合体 (例えば) を調製し、適切な基質の存在下で試験する。

【0220】

ドナーおよびアクセプター分子が、誤って互いと結合しないこともまた確認する必要がある。これは、例えば、同じ細胞において、生物発光タンパク質およびアクセプター分子を別個に共発現させ、次いで、RETが生じるかを判定するために発光スペクトルを監視することによって達成され得る。これは、例えば、Xu et al. (1999)の方法を用いて達成することができる。選択された生物発光タンパク質およびアクセプター分子は、RETがほとんど観察されないか、または全く観察されない場合、好適なRET対を形成する。

【0221】

ドナー放出は、基質に対する修飾によって操作することができる。ルシフェラーゼの場合、基質はセレンテラジンである。ドナー放出を変化させることの背後にある論理的根拠は、ドナー放出とアクセプター放出との間の分解能を改善することである。元のRETシステムは、ウミシイタケルシフェラーゼをドナーとして、EYFP (またはTopaz) をアクセプターとして、そしてセレンテラジンh誘導体を基質として使用する。これらの構成成分は、RETアッセイにおいて組み合わせた場合、生物発光タンパク質については475～480 nmの範囲で、アクセプター分子については525～530 nmの範囲で光を生成し、45～55 nmのスペクトル分解能が得られる。

【0222】

残念ながら、ウミシイタケルシフェラーゼでは、実質的にGFP放出と重複する広い放出ピークが生成され、これが、システムのシグナル対ノイズの低下に寄与する。c o e l 4 0 0 a をウミシイタケルシフェラーゼの基質として使用する本発明の1つのRETシステムは、ドナーとアクセプターとの放出波長間に広範なスペクトル分解能をもたらす (–105 nm)。c o e l 4 0 0 a を用いるとウミシイタケルシフェラーゼは390～400 nmで光を生成し、この範囲内で光を吸収して505～508 nmで光を再放出するGFPが調製された。ウミシイタケルシフェラーゼとGFP放出との間のこのスペクトル分解能の増加により、このRETシステムは、本発明のポリペプチドの構造における小さな変化を監視するための優れた生物学的ツールをもたらす。これは、ドナーとアクセプターとの間の波長の差がおおよそ51 nmである、セレンテラジンh誘導体およびEYFPを使用する以前に記載されたシステムを上回る著しい改善である。

【0223】

ウミシイタケルシフェラーゼ活性の結果として、種々の波長で光を生成する（野生型セレンテラジンによって生成されるものとは異なる）、c o e l 4 0 0 aを含む種々のセレンテラジン誘導体が当該技術分野で既知である。当業者であれば、ドナーの光放出ピークが変化したため、この波長で光を吸収するアクセプター分子を選択し、それによって効率的なエネルギー移動を可能にすることが必要であることを理解するであろう。これは、例えば、G F Pクラス4を、クラス3または1のG F Pとなるように、変化させることによって行うことができる。ドナーの光放出とアクセプターの光吸収ピークとの間のスペクトル重複は、中でも、効率的なエネルギー移動の条件の1つである。クラス3および1のG F Pは、4 0 0 n mで光を吸収し、5 0 5 ~ 5 1 1 n mで再放出することが既知である。これは、おおよそ1 1 1 n mのドナーとアクセプターの放出波長の差をもたらす。

10

【0 2 2 4】

さらなる生物発光タンパク質とアクセプター分子との対の例を、表2に提供する。

【0 2 2 5】センサ分子

本明細書に使用される際、「センサ分子」という用語は、任意の分子、2つ以上の共有結合または非共有結合で結合した分子複合体、またはドナーとアクセプターとの間のR E Tを可能にするように少なくともある段階で緊密に結合した2つ以上の分子を指す。さらに、存在する場合、ドメインを形成する2つ以上の別個の分子は、中間分子を介して結合されてもよい。一例において、センサ分子は、タンパク質複合体であり得、ここで、この複合体の各サブユニットは非共有結合で結合し、アクセプターおよびドメインは、タンパク質複合体の同じかまたは異なるサブユニット上にあり得る。別の例において、センサ分子は、一方がアクセプターで標識化され、他方がドナーで標識化される、2つの別個の核酸鎖であり、その結果、対象（検体）へのハイブリダイゼーションにより、ドナーとアクセプターがR E Tをもたらすのに十分に近接することになる。この例において、センサ分子は、検体に結合する際に形成されることが考えることができる。

20

【表 2 - 1】

例示的なBRETの生物発光タンパク質とアクセプター分子との対

<u>BDP</u>	<u>基質</u>	<u>基質波長(ピーク)</u>	<u>蛍光アクセプター分子</u>	<u>アクセプターの波長(励起/放出)</u>
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	Venus	515/528nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	mOrange	548/562nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	EYFP/Topaz	514/527nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	mCitrine	516/529nm
Rluc Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	YPet	517/530nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	フルオレセイン	495/519nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	アクリジンイエロー	470/550nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	ナイルレッド	485/525nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	R-フィコエリトリン	480/578
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	レッド 613	480/613
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	TruRed	490/695
RLuc8.6-5.35	天然セレンテラジン	535nm	mOrange	548/562nm
Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	Venus	515/528nm
Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	mOrange	548/528nm
Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	EYFP/Topaz	514/527nm
Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	mCitrine	516/529nm
Rluc2 Rluc8	天然セレンテラジン	470nm	YPet	517/530nm

10

20

30

40

【表 2 - 2】

Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	フルオレセイン	490/525nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	アクリジンイエロー	470/550nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	ナイルレッド	485/525nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	R-フィコエリトリン	480/578
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	レッド 613	480/613
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン <i>h</i>	470nm	TruRed	490/695
RLuc8.6-5.35	セレンテラジン <i>h</i>	535nm	mOrange	548/562nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	GFP2	396/508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	GFP10	400/510nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	野生型 GFP	396(475)/508nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	TagBFP	402/457nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	セルリアン /mCFP	433/475nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	ECFP/CyPet	434/477nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	Y66W	436/485nm
Rluc Rluc2	セレンテラジン 400a	400nm	dKeima-Red	440/616nm

10

20

30

40

【表 2 - 3】

Rluc8				
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	mKeima-Red	440/620nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	Quin-2	365/490nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400a	400nm	パシフィックブ ルー	403/551nm
Rluc Rluc2 Rluc8	セレンテラジン 400	400nm	ダンシクロリド (Dansylchloride)	380/475nm
ホタルルシフ ェラーゼ	ルシフェリン	560nm	シアニン Cy3	575/605nm
ホタルルシフ ェラーゼ	ルシフェリン	560nm	テキサスレッド	590/615
ホタルルシフ ェラーゼ	ルシフェリン	560nm	TurboRed	553/574nm
ホタルルシフ ェラーゼ	ルシフェリン	560nm	tdTomato	554/581nm
ホタルルシフ ェラーゼ	ルシフェリン	560nm	TagRFP	555/584nm
ホタルルシフ ェラーゼ	ルシフェリン	560nm	DsRed	557/592nm
ホタルルシフ ェラーゼ	ルシフェリン	560nm	mRFP1	584/607nm
ホタルルシフ ェラーゼ	ルシフェリン	560nm	mCherry	587/610nm

【0226】

検体（または候補化合物）に結合するドメインはいずれも、それが、ドナーおよびアクセプターと適切に結合し得る限り、どのような分子でもある。

【0227】

ある実施形態において、検体に結合するドメインは、タンパク質または核酸である。好ましい実施形態において、このドメインはタンパク質である。ある実施形態において、タンパク質は、1つ以上の検体（リガンド）に結合する天然のタンパク質であるか、または検体（リガンド）結合活性を保持するタンパク質の変異体である。例としては、受容体、臭気物質結合タンパク質、フェロモン結合タンパク質、酵素（例えば、プロテアーゼ、オキシダーゼ、フィターゼ、キチナーゼ、インベルターゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシレナーゼ（xylenase）、キナーゼ、ホスファターゼ、エロンガーゼ、トランスフェラーゼ、デサチュラーゼ）、リガンド担体、または細菌周辺質結合タンパク質が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。ある実施形態において、受容体は、嗅覚受容体ま

たは味覚受容体（例えば、D o t y, 2012に記載されるものといった甘味、苦味、または旨味受容体）等のGタンパク質共役型受容体である。さらなる実施形態において、嗅覚受容体または味覚受容体は、線形動物もしくは脊椎動物に由来するか、またはそれらの突然変異体である。

【0228】

一実施形態において、センサ分子は、無細胞組成物として提供される。本明細書に使用される際、「無細胞組成物」とは、あるとしてもごくわずかな無傷細胞を含有し、センサ分子を構成する、単離組成物を指す。無細胞組成物の例には、単離および／または組み換えセンサ分子（タンパク質等）を含有する細胞（酵母細胞等）抽出液および組成物が挙げられる。細胞から無細胞組成物を調製する方法は、当該技術分野で周知であり、W O 2 0 1 0 / 0 8 5 8 4 4号に記載される。ある特定の実施形態において、センサ分子は、細胞または無細胞抽出液で、リボソーム調製物等の脂質二重層に埋め込まれる。

10

【0229】

Gタンパク質共役型受容体

本明細書に使用される際、別途示されない限り、「Gタンパク質共役型受容体」という用語は、Gタンパク質を通じてシグナル伝達を行う7回膜貫通受容体を指す。

この受容体は、単一のサブユニットであってもよく、または2つ以上の受容体サブユニットであってもよい。2つ以上の受容体サブユニットが存在する場合、それらは、同じであるか、異なるか、またはそれらの組み合わせ（例えば、一方のサブユニットが2つと、もう一方のサブユニットが1つ）であり得る。さらに、別途指示または暗示されない限り、「Gタンパク質共役型受容体」および「Gタンパク質共役型受容体のサブユニット」という用語、またはそれらの変化形は、互換的に使用される。

20

【0230】

本明細書に使用される際、「嗅覚受容体」、「嗅受容体」、「OR」という用語、またはそれらの変化形は、生物の細胞中に存在する場合、化学感覚的知覚に關与するポリペプチドを指す。ある実施形態において、細胞は、ニューロンである。さらに、「嗅覚受容体」または「嗅受容体」とは、臭気物質リガンドに結合するか、または臭気物質リガンドに結合するタンパク質複合体の一部を形成し、生理学的応答をもたらす、ポリペプチドを指す。

【0231】

本明細書に使用される際、「の一部を形成する」という用語は、生物発光タンパク質またはアクセプター分子が、Gタンパク質共役受容体またはそのサブユニットの特定の領域内に位置付けられていることを意味する。この用語にはまた、生物発光タンパク質および／またはアクセプター分子が、Gタンパク質共役型受容体に付着または結合するが、連続的なアミノ酸鎖を形成しない可能性も含まれる。一実施形態において、生物発光タンパク質またはアクセプター分子は、Gタンパク質共役型受容体の特定の領域を完全に置き換える。別の実施形態において、Gタンパク質共役型受容体の特定の領域の一部が置き換えられるが、すべては置き換えられない。さらなる別の実施形態において、Gタンパク質共役型受容体の特定の領域のいずれも、置き換えられない。当業者には理解されるように、生物発光タンパク質またはアクセプター分子は、それが、ポリペプチドのGタンパク質共役型受容体部分が検体に結合してアクセプター分子に対する生物発光タンパク質の位置および／または双極子配向に空間的变化をもたらすことができないように挿入されることはない。

30

40

【0232】

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は、7回膜貫通受容体、7TM受容体、蛇形受容体、ヘリックス受容体、およびGタンパク質結合型受容体（GPLR）としても知られている。GPCRは、細胞外で分子を感知し、内部シグナル伝達経路、および最終的には細胞応答を活性化させる、膜貫通受容体の大きなタンパク質ファミリーである。これらの受容体に結合し、活性化するリガンドには、光感受性化合物、臭気物質、フェロモン、ホルモン、および神経伝達物質が挙げられ、これは、小分子から、ペプチド、大型タンパク

50

質まで、寸法が多様である。GPCRは、多数の疾患に関与しているが、すべての現代の医薬品のうち約半数の標的でもある。GPCRは、配列の相同性および機能的類似性に基づいて、少なくとも5つの分類に分けることができる：

- クラスA ロドプシン様、
- クラスB セクレチン様、
- クラスC 代謝調節型／フェロモン、
- クラスD 真菌性フェロモン、および
- クラスE cAMP受容体。

【0233】

クラスAのロドプシン様受容体には：アミン受容体：アセチルコリン、 α アドレナリン受容体、 β アドレナリン受容体、ドーパミン、ヒスタミン、セロトニン、オクトパミン、および微量アミン；ペプチド受容体：アンジオテンシン、ボンベシン、ブラジキニン、C5aアナフィラトキシン、Fmet-leu-phe、APJ様、インターロイキン-8、ケモカイン受容体（C-Cケモカイン、C-X-Cケモカイン、BONZO受容体（CXCR6）、C-X3-Cケモカイン、およびXCケモカイン）、CCR受容体、エンドセリン受容体、メラノコルチン受容体、神経ペプチドY受容体、ニューロテンシン受容体、オピオイド受容体、ソマトスタチン受容体、タキキニン受容体、（物質P（NK1）、物質K（NK2）、ニューロメジンK（NK3）、タキキニン様1、およびタキキニン様2）、バソプレシン様受容体（バソプレシン、オキシトシン、およびコノプレシン）、ガラニン様受容体（ガラニン、アラトスタチン、およびGPCR54）、プロテイナーゼ活性化様受容体（例えば、トロンビン）、オレキシン&神経ペプチドFF、ウロテンシンII受容体、アドレノメジュリン（G10D）受容体、GPR37／エンドセリンB様受容体、ケモカイン受容体様受容体、およびニューロメジンU受容体；ホルモンタンパク質受容体：卵胞刺激ホルモン、ルトロピンー絨毛性ゴナドトロピンホルモン、チロトロピン、およびゴナドトロピン；オプシン（ロドプシン）受容体；嗅受容体；プロスタノイド受容体：プロスタグランジン、プロスタサイクリン、およびトロンボキサン；ヌクレオチド様受容体：アデノシンおよびプリン受容体；カンナビス受容体；血小板活性化因子受容体；ゴナドトロピン放出ホルモン受容体；チロトロピン放出ホルモンおよび分泌促進因子受容体：チロトロピン放出ホルモン、成長ホルモン分泌促進因子、および成長ホルモン分泌促進因子様；メラトニン受容体；ウイルス受容体；リゾスフィンゴ脂質およびLPA（EDG）受容体；ロイコトリエンB4受容体：ロイコトリエンB4受容体BLT1およびロイコトリエンB4受容体BLT2；ならびにクラスAのオーファン／他の受容体：血小板ADPおよびKIO1受容体、SREB、Mas癌原遺伝子、RDC1、ORPH、LGR様（ホルモン受容体）、GPR、GPR45様、システニルロイコトリエン、Mas関連受容体（MRG）、ならびにGP40様受容体が挙げられる。

【0234】

GPCRのクラスB（セクレチン受容体ファミリー）には、ポリペプチドホルモンの受容体（カルシトニン、コルチコトロピン放出因子、胃抑制ペプチド、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1、-2、成長ホルモン放出ホルモン、副甲状腺ホルモン、PACAP、セクレチン、血管作用性腸管ポリペプチド、利尿ホルモン、EMR1、ラトロフィリン）、原形質膜で細胞間相互作用を媒介すると見られる分子（脳特異的血管新生阻害因子（BAI））、ならびにストレス応答および寿命を調節するショウジョウバタエンパク質（メトセラ（Methuselah）様タンパク質）が挙げられる。

【0235】

クラスCの代謝調節型グルタミン酸／フェロモン受容体には、代謝調節型グルタミン酸、代謝調節型グルタミン酸I群、代謝調節型グルタミン酸II群、代謝調節型グルタミン酸III群、代謝調節型グルタミン酸その他、細胞外カルシウム感知、推定上のフェロモン受容体、GABA-B、GABA-Bサブタイプ1、GABA-Bサブタイプ2、およびオーファンGPCRC5受容体が挙げられる。

【0236】

10

20

30

40

50

本発明に有用なセンサ分子は、Gタンパク質共役型受容体を含み得、これは、細胞に発現する際、受容体のN末端が細胞外にあり、C末端が細胞内にある。当業者であれば、膜貫通タンパク質の配向を検出するための好適な技術を理解している。そのような技術には、結晶学、NMR研究、モデリング研究、ならびに顕微鏡技術、例えば、光学または電子顕微鏡標本の界面活性剤透過化対照と組み合わせた免疫標識、2つのポリペプチドのフラグメント相補性タグ化等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0237】

好ましい実施形態において、Gタンパク質共役型受容体は、クラスAのGPCRである。さらなる好ましい実施形態において、クラスA（ロドプシン様）GPCRは、嗅覚受容体、ドーパミン受容体、ムスカリン受容体、またはアドレナリン作動性受容体であり、より好ましくは嗅覚受容体である。嗅覚受容体は、細胞に発現する際に、受容体のN末端が細胞外にあり、C末端が細胞内にある限り、いずれの源に由来するものであってもよい。例としては、脊索動物受容体、線形動物受容体、またはそれらのいずれか1つの生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。脊索動物受容体の例には、哺乳動物受容体、鳥類受容体、および魚類受容体が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、嗅覚受容体は、線形動物受容体、またはその生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントである。ある実施形態において、線形動物受容体は、線虫受容体、またはその生物学的に活性な変異体もしくはフラグメントである。本発明のポリペプチドを生成するために使用され得る、および／または本発明の方法で使用され得る、嗅覚受容体は、Buck and Axel (1991)、Robertson (1998 and 2001)、Aloni et al. (2006)、Feldmesser (2006)、Olender et al. (2004a and b)、Glusman et al. (2000a, 2000b and 2001)、Fuchs et al. (2001)、Pilpel and Lancet (1999)、Sharon et al. (1998)、Zozulya et al. (2001)、Niimura and Nei (2003)、Lander et al. (2001)、Zhang and Firestein (2002)、Young et al. (2002)、およびFredriksson and Schioth (2005)に記載される。さらに、嗅覚受容体の包括的な一覧は、SenseLabのウェブサイト (<http://senselab.med.yale.edu>) から入手可能である。

【0238】

他の実施形態において、GPCRは、クラスBまたはクラスCの受容体であり、これらの2つの実施形態のうちではクラスCがより好ましい。

【0239】

特に好ましい実施形態において、Gタンパク質共役型受容体は、7回膜貫通ドメインを含む。

【0240】

生物発光タンパク質は、Gタンパク質共役型受容体（または本発明のポリペプチド）の1、3、5つ目の非膜貫通ループ（ドメイン）またはC末端の一部を形成し得る。アクセプター分子もまた、Gタンパク質共役型受容体（または本発明のポリペプチド）の1、3、5つ目の非膜貫通ループ（ドメイン）またはC末端の一部を形成し得る。これらの領域のそれぞれは、Gタンパク質共役型受容体が細胞に発現しそこに存在する際、細胞内にある。

【0241】

アクセプター分子は、同じ分子の一部（すなわち、同じ単一のポリペプチド鎖）であるとき、生物発光タンパク質と同じ領域内には存在し得ないが、アクセプター分子は、Gタンパク質共役型受容体が二量体またはより高度な多量体として存在する場合、生物発光タンパク質と同等の領域内にあり得る。例えば、生物発光タンパク質は、受容体の1つのサブユニットのC末端の一部を形成し得、アクセプター分子は、受容体の別のサブユニット

のC末端の一部を形成し得る。この例において、標識が結合されるサブユニットは、同じかまたは異なり得、例えば、2つのサブユニットが、1つが生物発光タンパク質で標識化され、他方がアクセプター分子で標識化されることを除き、同一であってもよい。

【0242】

一実施形態において、生物発光タンパク質は、GPCRサブユニットの3つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、アクセプター分子は、5つ目の非膜貫通ループの一部を形成する。代替的な実施形態において、アクセプター分子は、GPCRサブユニットの3つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質は、5つ目の非膜貫通ループの一部を形成する。

【0243】

別の実施形態において、生物発光タンパク質は、GPCRサブユニットの1つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、アクセプター分子は、3つ目の非膜貫通ループの一部を形成する。別の実施形態において、アクセプター分子は、GPCRサブユニットの1つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質は、3つ目の非膜貫通ループの一部を形成する。

【0244】

好ましい実施形態において、生物発光タンパク質は、GPCRサブユニットの5つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、アクセプター分子は、C末端の一部を形成する。代替的な実施形態において、アクセプター分子は、GPCRサブユニットの5つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質は、C末端の一部を形成する。

【0245】

別の実施形態において、Gタンパク質共役型受容体は、少なくとも2つのサブユニットを含み、ここで、生物発光タンパク質は、第1のサブユニットの3つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、アクセプター分子は、第2のサブユニットの5つ目の非膜貫通ループの一部を形成する。代替的な実施形態において、アクセプター分子は、第1のサブユニットの3つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質は、第2のサブユニットの5つ目の非膜貫通ループを形成する。

【0246】

別の実施形態において、Gタンパク質共役型受容体は、少なくとも2つのサブユニットを含み、ここで、生物発光タンパク質は、第1のサブユニットの1つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、アクセプター分子は、第2のサブユニットの3つ目の非膜貫通ループの一部を形成する。別の実施形態において、アクセプター分子は、第1のサブユニットの1つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質は、第2のサブユニットの3つ目の非膜貫通ループを形成する。

【0247】

別の実施形態において、Gタンパク質共役型受容体は、少なくとも2つのサブユニットを含み、ここで、生物発光タンパク質は、第1のサブユニットの5つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、アクセプター分子は、第2のサブユニットのC末端の一部を形成する。代替的な実施形態において、アクセプター分子は、第1のサブユニットの5つ目の非膜貫通ループの一部を形成し、生物発光タンパク質は、第2のサブユニットのC末端の一部を形成する。

【0248】

別の実施形態において、Gタンパク質共役型受容体は、少なくとも2つのサブユニットを含み、ドナーおよびアクセプター分子は、それぞれ、第1および第2のサブユニットの同じ部位にある。

【0249】

ある実施形態において、生物発光タンパク質またはアクセプター分子は、5つ目の膜貫通ドメインの2番目のアミノ酸の後、かつ6つ目の膜貫通ドメインの開始前の2つ目のアミノ酸の前に位置する。別の実施形態において、生物発光タンパク質またはアクセプター分子は、5つ目の膜貫通ドメインの後、アミノ酸8付近の後ろ、または5つ目の膜貫通ド

10

20

30

40

50

メインの後、アミノ酸 22 付近の後ろに位置する。さらなる実施形態において、生物発光タンパク質またはアクセプター分子は、6 つ目の膜貫通ドメインから約 10 または 12 個のアミノ酸の前に挿入される。最も好ましくは、生物発光タンパク質またはアクセプター分子は、3 つ目の非膜貫通ループ（ドメイン）の中央に位置する。

【0250】

C 末端に関しては、天然の C 末端の約 5 ～ 25 個のアミノ酸が、7 つ目の膜貫通ドメインに残ることが好ましい。好ましくは、生物発光タンパク質またはアクセプター分子は、7 つ目の膜貫通部分の後、約 16 または 20 個のアミノ酸の後に挿入される。

【0251】

1 つ目の非膜貫通ループ（ドメイン）における生物発光タンパク質またはアクセプター分子の位置については、前記標識を、1 つ目の膜貫通ドメインの末端から約 2 個のアミノ酸の後、かつ 2 つ目の膜貫通ドメインの開始から約 2 個のアミノ酸の前に挿入することが好ましい。最も好ましくは、生物発光タンパク質またはアクセプター分子は、1 つ目の非膜貫通ループ（ドメイン）の中央に位置する。

【0252】

さらなる実施形態において、生物発光タンパク質は、G タンパク質共役型受容体（または本発明のポリペプチド）の N 末端、2、4、または 6 つ目の非膜貫通ループ（ドメイン）の一部を形成し得る。アクセプター分子もまた、G タンパク質共役型受容体（または本発明のポリペプチド）の N 末端、2、4、または 6 つ目の非膜貫通ループ（ドメイン）の一部を形成し得るが、それは、同じ分子の一部である場合、生物発光タンパク質と同じ領域内にある可能性はない。これらの領域のそれぞれは、G タンパク質共役型受容体が細胞に発現しそこに存在するとき、細胞外にある。

【0253】

GPCR は、2 つ以上の異なる GPCR の非天然のキメラであり得る。具体的には、これにより、1 つの受容体の部分が、常に、検出される化合物に応じて多様な GPCR の他の部分が挿入されるキメラで存在する、形質導入カセットの生成を可能にする。

【0254】

一実施形態において、サブユニットは、第 1 の G タンパク質共役型受容体サブユニットの N 末端および 1 つ目の膜貫通ドメインの少なくとも大部分、第 2 の G タンパク質共役型受容体サブユニットの 1 つ目の非膜貫通ループの少なくとも大部分から 5 つ目の膜貫通ドメインの少なくとも大部分まで、ならびに第 1 の G タンパク質共役型受容体サブユニットの 5 つ目の非膜貫通ループの少なくとも大部分から C 末端まで、を含む。

【0255】

別の実施形態において、サブユニットは、第 1 の G タンパク質共役型受容体サブユニットの N 末端から 5 つ目の膜貫通ドメインの少なくとも大部分まで、および第 2 の G タンパク質共役型受容体サブユニットの 5 つ目の非膜貫通ループの少なくとも大部分から C 末端まで、を含む。

【0256】

本明細書に使用される際、G タンパク質共役型受容体の指定部分（ドメイン）の「少なくとも大部分」という用語は、指定領域の少なくとも 51 %、より好ましくは少なくとも 75 %、およびさらにより好ましくは少なくとも 90 % を指す。

【0257】

当業者であれば、G タンパク質共役型の N 末端、膜貫通ドメイン、非膜貫通ループ（ドメイン）、および C 末端を容易に判定することができる。例えば、種々の生物情報学アプローチを用いて、タンパク質における膜貫通ドメインの位置およびトポロジーを、そのアミノ酸配列および G タンパク質共役型受容体の既知の膜貫通ドメインとの類似性に基づいて、判定することができる。アライメントおよびアミノ酸配列比較は、例えば、BLAST プログラムまたは CLUSTAL W プログラムを使用して、当該技術分野で日常的に行われている。既知の膜貫通ドメイン含有タンパク質とのアライメントに基づいて、当業者であれば、膜貫通ドメインの位置を予測することが可能であり、さらに、一部の膜貫通

タンパク質の3次元構造が既知であり、例えば、7回膜貫通Gタンパク質共役型ロドプシン光受容体構造が、X線結晶学によって解析されている。そのような3D構造の分析および比較に基づいて、他の膜タンパク質における膜貫通ドメインの位置およびトポロジーを予測することが可能であり得る。また、タンパク質における膜貫通ドメインの位置およびトポロジーを予測するために利用可能な多数のプログラムがある。例えば、膜貫通タンパク質のセグメントを予測するTMpred (Hofmann and Stoffel, 1993); 膜タンパク質のトポロジーを予測するTopPred (von Heijne et al., 1992); 単一または複数の配列から2次構造PREDATOR (Freshman and Argos, 1997); 多重アライメントを行った配列からタンパク質の膜貫通領域を予測するTMAPP (Persson and Argos, 1994); および単一の配列から膜貫通領域を予測するALOM2 (Klien et al., 1984) のうちの1つまたは組み合わせを使用することができる。

10

【0258】

標準的な命名法に従って、膜貫通ドメインおよび非膜貫通ループ（ドメイン）の番号付けは、ポリペプチドのN末端に関して行う。

【0259】

2-ベンタノンに結合する線虫の変異体str-112（配列番号41）および／またはstr-113（配列番号42）には、str-112（配列番号41）および／またはstr-113（配列番号42）に少なくとも90%同一な分子、str-112（配列番号41）および／またはstr-113（配列番号42）に少なくとも90%同一な生物学的に活性なフラグメント、ならびにstr-114/113（配列番号43）等それらの融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。当業者であれば、同一性を判定する際、配列番号13、14、18、27、28、および30におけるアクセプターおよびドナー等、標識を含むタンパク質の部分は、好ましくは無視されることを理解するであろう。

20

【0260】

核酸

一実施形態において、ドメイン（または目的の分子）は核酸である。当業者には理解されるように、核酸結合に依存する多数の検出システムがあり、これは本発明の方法で使用するために適合される。

30

【0261】

分子標識（MB）は、均質溶液中の特定の核酸を検出するのに有用なプローブの構築において広く研究されている。MBは、ステムアンドループ構造を有し、5'および3'末端においてBRET構成成分で標識化される、単一の標準的な核酸配列からなる。5'および3'末端の近接性は、エネルギー移動を発生させる。標的DNA配列は、プローブ核酸配列とハイブリダイズして、BRET構成成分を引き離し、BRET比の減少をもたらす。フルオロフォア-アクセプター対の組み合わせが研究されているが、この方法は、核酸の自己蛍光を引き起こし得る励起源が必要であるという欠点がある。フルオロフォアを生物発光タンパク質と置き換えることにより、この問題が克服される。

【0262】

別の例において、アクセプターおよびドナーは、それぞれが同じ標的核酸配列の別の部分に相補的な2つの異なるアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合し得る。標的配列の異なる部分は、標的核酸配列内で近接して位置する。BRET構成成分は、標的核酸とのハイブリダイゼーションにより近接近し、BRET比の増加をもたらす。

40

【0263】

さらなる例において、標的核酸の不在下で、アクセプターおよびドナーで標識化された相補的オリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイズすることにより、エネルギー移動がもたらされる。標的核酸の存在下では、標的およびドナーで標識化されたものは、アクセプタータンパク質とのハイブリダイズをめぐって競合し、したがって、BRET比を低下させる。BRET比の減少は、試料中に存在する総核酸量と相関性がある。

50

【0264】

使用

本発明を使用して、揮発性および不揮発性の有機小分子、巨大分子、ならびに生物学的粒子および細胞を含む、広範な種類の検体の存在もしくは不在または濃度を検出することができる。本発明は、Gタンパク質共役型および他の受容体、結合タンパク質、酵素、ペプチド、ならびに核酸分子を含む、化学発光伝達システムに機能的に連結させることができる、ほとんどすべての生物学的認識要素と適合性がある。本発明のマイクロ流体方法の使用例は、Li and Lin (2009)、Mark et al. (2010)、Theberge et al. (2010)、Mohammed and Desmulliez (2011)、Esch et al. (2011)、Yeo et al. (2011)、Noh et al. (2011)、およびGodin et al. (2008)に記載されている。

10

【0265】

特に好ましい実施形態において、検体は臭気物質である。典型的に、臭気物質は、少なくとも1つの生物の化学感覚的嗅覚受容体によって検出され得る揮発性の有機もしくは無機化合物または無機ガスであろう。これらには、アミンおよび／またはスルフヒドリル (sulphydryl) 含有化合物、カルボン酸、アルコール、アルデヒド、アルカン、アルケン、芳香族化合物、エステル、テルペンまたはテルペン誘導体、エーテル、CO₂等、ならびにこれらの特徴の組み合わせを有する化合物が含まれ得る。

20

【0266】

臭気物質は、ヒトにとって価値があるかまたは興味深い、何らかの生物学的もしくは化学的状态を示し得る。そのような提示には次のものが含まれ得る：

- ・食品および飲料、医薬品、または関連材料の感覚的な訴え、品質、または安全性。
- ・ヒトまたは動物の健康、栄養、または運動状態。
- ・病原体を含む有害物質の存在または不在。
- ・工業的プロセスの進行または状態。
- ・環境の汚染または状態。
- ・香水、香料、または他の化粧品の感覚的訴え、品質、または安全性。

【0267】

特に好ましい実施形態において、検体は、ドナーまたはアクセプタードメインに結合しない。

30

【0268】

別の実施形態において、本方法は、センサ分子に結合する化合物のスクリーニングに使用することができる。当業者であれば、これにより、例えば、創薬および／または開発での本発明の使用が可能となることを理解するであろう。より具体的には、検体が結合するドメインが、可能性のある治療法の標的である。したがって、この実施形態において、検体が結合するドメインは、アドレナリン作動性受容体、セロトニン受容体、ドーパミン受容体、代謝調節型／グルタミン酸受容体、GABA受容体、鋤鼻受容体、味覚受容体、またはセクレチン様受容体等であるが、これらに限定されない、臨床的に重要な分子であることが好ましい。

40

【0269】

別の例として、本発明の方法は、超高温 (UHT) 処理乳等の牛乳の腐敗を検出するために使用することができる。この例では、センサ分子は、少なくとも部分的に牛乳の腐敗をもたらす、細菌プロテアーゼによって切断される分子であり得る。例えば、センサ分子は、化学発光ドナードメインおよびアクセプタードメインで標識化されたプロテアーゼ (複数可) によって切断される、κ-カゼイン等の乳タンパク質の領域を含み得る。

【0270】

当業者であれば理解するように、本発明は、多重化することもできる。このシステムでは、異なる化合物に結合する2つ以上の異なるセンサ分子が提供される。各異なるセンサ分子には、異なるドナーおよび／またはアクセプター分子が含まれ、その結果、異なる波

50

長で放出して、異なる標的化合物の検出および定量化が可能となる。

【0271】

実施例

実施例1 トロンビン切断アッセイのためのマイクロ流体システムにおけるハイブリッドBRETシステムの実施

材料および方法

BRETシステム

BRET¹ およびBRET² 技術の組み合わせを使用し、これを、本明細書ではハイブリッドBRETと称した。具体的には、天然のセレンテラジン基質とともにRLucを生物発光ドナーとして使用し、GFP² をアクセプター分子として使用した。ドナーおよびアクセプターを、トロンビン切断部位を含有するペプチド配列(LQGS L V P R ↓ G S L Q (R G))によって連結させ(GFP² -RG-RLuc)、大腸菌に発現させた。切断部位のトロンビン切断は、ハイブリッドBRETシグナルに変化をもたらした。BRETシステムの機序を、図1Aに示す。

【0272】

材料

GFP² -RG-RLuc バイオセンサを、既報(Dacres et al. 2009a)のように発現させ、精製した。精製した融合タンパク質を、トロンビン切断緩衝液(10mM Tris (pH8.0)、100mM NaCl、1mM EDTA)中に入れた。マイクロ流体に基づくアッセイに使用した天然のセレンテラジン基質(Biosynth)の最終濃度は、58.6 μMであり、プレートリーダーに基づくアッセイでは5 μMであった。1単位(U) / μlのトロンビンプロテアーゼ(Amersham Biosciences)溶液を、1倍リン酸緩衝食塩水(PBS)中に調製した。

【0273】

マイクロ流体チップの製造および実験的構成

同時二重放出ハイブリッドBRET測定を、SpectraMax M2 蛍光光度計(Molecular Devices)を用いたマイクロプレート、および以下に記載のマイクロ流体装置の両方において、実行した。BRET構築物のスペクトルスキャンは、5 μMの天然のセレンテラジン基質を1 μMのバイオセンサに添加した後、発光スキャンモードを用いて400~650 nmで記録した。

【0274】

マイクロチップBRET測定のために、幅70 μmで高さ50 μmの単純なY型マイクロチャンネルマイクロチップ(図1B)を、標準的なフォトリソグラフィーを用いてポリジメチルシロキサン(PDMS)から作製した。チップの設計は、市販の描画パッケージ(Adobe Illustrator CS4)で完成させ、設計パターンを、透明マスク(5,080 dpi, Allardice)に印刷した。マイクロ流体デバイスのマスターパターンを、laminarドライフィルムレジスト(Shipley 5038)を用いて作製した。複数のレジスト層を、113℃で、研磨したステンレス鋼の基質に積層加工した。チャンネルを、20 mJ / cm²で動作するコリメートUV源(λ = 350~450 nm)および透明フィルムマスクを使用してリソグラフィーによりパターン形成した。露光した後、試験パターンを、20% Na₂CO₃ 溶液で現像した。

【0275】

レジストのパターンを、続いて、100 nmのNiをまずスパッタリング蒸着した後、150 μmの厚さに電気メッキすることによりニッケルシムとして複製した。次いで、10 / 1 (w / w) の比率のPDMSと硬化剤を、シム上に注ぎ、脱気し、75℃で一晩乾燥させた。デバイスを切断し、シムを剥離し、次いで、10分間空気プラズマに晒した。次いで、PDMSを即座にスライドガラスで密封し、75℃で3時間乾燥させた後、PDMSはガラスの表面に強く接着し、PDMSガラスマイクロチップはすぐに使用可能な状態となった。

【0276】

マイクロ流体測定のためのセットアップの略図を、図1Cに示す。neMESYS高圧ポンプシステム(Cetoni, Germany)を使用して、50 μ l容量の2つのSGEシリンジ(Supelco)からマイクロチップに流体をポンプ注入した。いずれの流れの流量も、20 μ l/時間であった。マイクロチップを、可視化および測定のために顕微鏡(Nikon Eclipse TE2000-U)のステージに設置した。サファイアレーザー(488nm、Coherent)を使用して検出スポットの位置付けを行った。放出された生物発光を、20倍対物レンズ(Plan Fluor, Nikon)で収集した。GFP²については515nm~555nm、RLucについては430nm~455nmのバンドパスフィルタ(Nikon)を、2つのチャンネルに使用した。縮小レンズ(Nikon C-0.45x)を使用して、各チャンネルから放出された光を、光電子倍增管(Hamamatsu H7421)に集めた。積分時間は、各チャンネルの光のデータ取得については200ミリ秒であった。測定位置は、入力チャンネルの最初の合流地点(x=0)で始まる主要チャンネルからマイクロチップの端部まで多様であった。

【0277】

トロンピンアッセイ

種々の濃度のトロンピンを、精製したGFT²-RG-RLucバイオセンサに添加し、30℃で90分間インキュベートした。トロンピン切断の程度を測定するために、インキュベーション後の試料混合物および天然のCLZ溶液を、別個のシリンジから2つの注入チャンネルにポンプ注入し、主要チャンネルを通して流動させた。2つの流れ間の拡散が、界面でBRET反応を誘導した。酵母由来の組み換えヒルジン(Sigma)を、プロテアーゼアッセイの前に、室温で10分間トロンピンとともにインキュベートした。

【0278】

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

GFT²-RG-RLucバイオセンサの完全なトロンピン切断を確認するために、SDS-PAGE分析を実行した。タンパク質(2.5 μ g)を、MOPS泳動緩衝液(NuPAGE, Invitrogen)を有する12%Bis-Trisゲル中、SDSゲル電気泳動用の1倍試料ローディング緩衝液(Invitrogen)中に希釈した。バンドを、Fast Stain(商標)(Fisher)で染色した後、可視化した。

【0279】

データ分析

マイクロプレート分光計を使用して、ハイブリッドBRET比を、500nmおよび470nmで測定した生物発光放出の比率として計算した。マイクロチップシステムを使用して、ハイブリッドBRET比を、長波長放出(515nm~555nm)と短波長放出(430nm~455nm)との比率として計算した(Pfleger and Eidne, 2006)。2つの異なる検出システム間の比較を可能にするために、ハイブリッドBRET比を、同じ測定システムでトロンピンを添加しなかったBRET比の倍数として表すことによって、正規化した。すべてのデータは、平均±標準偏差(SD)として報告する。対応のない両側t検定を、Graphpad prism(Windows用バージョン5.00、Graphpad Software, San Diego, California, USA)を用いて行った。統計学的有意性は、 $p < 0.05$ として定義する。

【0280】

結果

BRETスペクトルおよび比率に対するトロンピンの影響

トロンピン処理の前のトロンピンバイオセンサの生物発光スペクトルは、RLuc放出を表す470nmでのピークおよびGFP²放出を表す500nmでのピークを有する二峰性であった(図2A)。これは、励起状態の天然のセレンテラジンからGFP²へのエネルギー移動を示す。トロンピン切断後、スペクトルの緑色成分が低減され、トロンピンバイオセンサのトロンピン切断が、ドナーとアクセプターとの間のエネルギー移動の効率を低下させたことを示した。

【0281】

S D S - P A G E (図2B)により、トロンビン処理の後、融合タンパク質は、H i s タグ化G F P²および非タグ化R L u cに対応する32.4 K D aおよび36.4 K D aの分子量を有する2つの成分に切断されたことを確認した(レーン5、図2B)。B R E T バイオセンサをヒルジンとともに事前インキュベートすることにより、トロンビン特異性を示す2つの成分の形成を阻害した(レーン6)。

【0282】

バイオセンサ切断に対するトロンビンの影響を、B R E T^H比における変化を用いて定量化した。トロンビン切断後、B R E T^H比は、おおよそ32%、 1.11 ± 0.06 から 0.75 ± 0.04 に、有意に($P=0.0009$)低下した。トロンビン切断後の 0.79 ± 0.05 のハイブリッドB R E T比は、R L u cおよびG F P²を $1 \mu M$ ずつ混合することによって得たものと有意に異なるものではなかった($P=0.3309$)(図3、対照)。ヒルジンの事前添加は、トロンビンに誘導される 1.08 ± 0.14 のB R E T^H比の低減を阻止した。これは、トロンビンなしで測定した比率と有意に異なるものではなかった($P=0.7663$)。

【0283】

オンチップB R E T測定

B R E T バイオセンサを検出するための流動条件を最適化するために、一連の実験を行って、異なる位置、流量、およびバイオセンサ濃度でのB R E T発光性を画像化および定量化した(図5)。融合タンパク質および基質の2つの流体流が最初に接触する段階では、拡散層は狭く、少量の液体のみが生物発光を放出した(データは示されない)。生物発光の強度もまた低かった(約457)が、バックグラウンド(約2.3)よりは有意に高かった。 $x=1 \sim 5 \text{ mm}$ では、生物発光強度は、ほぼ一定に留まったが、 $x=7 \text{ mm}$ では有意な増加があった。この増加は、領域における混合の増加を反映し得る。生物発光の強度にかかわらず、B R E T^H比は、全測定領域を通してほぼ一定(約5.2)に留まった。オンチップ測定をベンチマーク評価するために、B R E T比を、市販のB R E T検出機器を用いて測定したマイクロプレートデータと比較した。B R E T比の相対的变化、すなわち、トロンビンを用いて測定したB R E T比となしで測定したものと、マイクロチップおよびマイクロプレートの測定間で非常に一定している($\pm 4\%$ 以内)。

【0284】

B R E T^H比に対する流量およびバイオセンサ濃度を変化させることの影響もまた、調査した(図6)。流量依存性を、2つの位置 $x=0$ および 4.9 mm で測定した(図6a)。 $x=0$ では、B R E T^H比はまた、研究した流量、すなわち $20 \sim 60 \mu l / \text{時間}$ の範囲内で、一定であった($\pm 1.1\%$ 以内)。 $x=4.9 \text{ mm}$ では、流動条件における変化に起因して、わずかに大きなB R E T比の変動があった($\pm 2\%$ の範囲内)。しかしながら、2つの測定位置の間の全体的な不確かさは、 $\pm 5\%$ 以内であった。図6bは、バイオセンサ濃度の関数として、ハイブリッドB R E T比を示す。低いタンパク質濃度の不確かさは、比較的高かった(例えば、 $1.49 \mu M$ のバイオセンサ濃度で標準偏差 $=7.7\%$)が、平均B R E T^H比の全体的な変動は、バイオセンサ濃度でのもの、すなわち、 2.7% の標準偏差よりも低かった。異なる測定条件下でのB R E T^H比の変動が小さいことは、B R E T^H反応の完全性が、生物発光が測定できる限り、定量化に重要ではないことを意味するため、重要な発見である。より完全な混合によりシステムの発光度が増加することが予測されるが、我々のデータは、それが、B R E T^H比への影響をほとんど有さないことを示す。これは、少なくともこの研究で考慮されるトロンビン濃度のレベルに関して、B R E Tに基づく検出のためのマイクロ流体デバイスの設計要件を単純化する可能性がある。

【0285】

トロンビン濃度の影響

$x=2.1 \text{ mm}$ で固定した測定(図5)で $20 \mu l / \text{時間}$ の流量およびバイオセンサ濃度 $2.972 \mu M$ を使用して(図6)、マイクロチップおよびマイクロプレートシステム

を、ある範囲のトロンビン濃度（図7）を用いたトロンビンの測定に関して比較した。BRET^H比は、マイクロ流体測定では0.24 nMおよびマイクロプレート測定では2.7 nMまで、トロンビン濃度の増加により線形変化した。より高い濃度では、BRET比の変化は、トロンビンの飽和のためあまり顕著ではない。低トロンビン濃度領域では、較正は、R²値が0.995を上回る、線形であった。較正の勾配の比較により、マイクロ流体法が、マイクロプレート法の4.7倍、トロンビン濃度の変化に対して高感度であった。トロンビンの検出限界は、マイクロプレートに基づく技術を使用した310 pMと比較して、マイクロチップに基づく技術では27 pMである。マイクロチップに基づくBRET^Hシステムは、BRET²およびBRET¹のマイクロプレートに基づくアッセイで計算されたそれぞれ15 pMおよび53 pMの値の中間の検出限界を有する（Dacre et al., 2009a）。

10

【0286】

結論

生物発光共鳴エネルギー移動方法は、流体相トロンビン感受性バイオセンサを用いて、流動形式で初めて実証された。使用したBRET^H技術は、測定可能な発光性によるBRET²構成成分の試験を可能にする、BRET¹とBRET²との組み合わせである。BRET反応および検出を、マイクロチップにおけるY型マイクロチャネルネットワークで行った。実験により、測定位置、流量、およびバイオセンサ濃度の影響を定量化した。これらの要因は、両方の光学チャネルにおける生物発光強度に影響を及ぼしたが、BRET^H比には影響を及ぼさなかった。マイクロチップに基づく技術は、市販の機器を用いて測定される同等のマイクロプレートに基づく技術と比較して、改善されたトロンビン検出感度を示した。トロンビンの検出限界は、マイクロプレートに基づく技術を使用した310 pMと比較して、マイクロチップに基づく技術では27 pMであった。

20

【0287】

実施例2—マイクロ流体システムにおけるBRET²の実施

BRET²システムにおいて、セレンテラジン400a（CLZ400A）基質とともにウミシイタケルシフェラーゼ（RLuc）を光子ドナーとして使用し、GFP²をアクセプター分子として使用した。BRET²の発光はBRET¹・⁵のものよりも100倍小さいため、BRET²反応は、最も高い生物発光シグナルを生成するために最適な温度、検出チャンバ寸法、流量、および濃度での効果的な混合を要する。したがって、このシステムを使用して、異なる混合機序（図8）、反応チャンバ設計、および反応条件を評価する。

30

【0288】

3つの混合要素を有するY型マイクロチャネルを有し、マイクロチャネルに長方形の断面（幅200 μmおよび高さ30 μm）を有するPDMSチップ（図8）を使用して、BRET²アッセイを監視した。異なる直径および高さを有する検出チャンバを、マイクロチャネルの端部に位置付けた。放出される生物発光を、検出チャンバの下に位置付けられる多重モードの光ファイバによって収集した。放出は、ダイクロイックブロックによって分けられ、ドナーの放出バンド（430 nm～455 nm）およびアクセプターの放出バンド（515 nm～555 nm）に対応する2つのバンドパスフィルタを通った後、2つの対応する光電子倍增管（Hamamatsu H7421）に入る。

40

【0289】

本方法は、タンパク質溶液をY型チャネルの一方の注入口に流動させ、セレンテラジン400a基質をチャネルのもう一方の注入口に流動させることを伴う。

【0290】

本方法は、タンパク質流動と基質流動を、好適な流量で、受動的混合要素によって効果的に混合することを要する。

【0291】

本方法は、混合要素、チャンバ寸法、タンパク質および基質の濃度、流量、温度等を変動させることによって、可能な限り高い生物発光シグナルを収集することを目的とする。

50

結果として、最適なマイクロ流体混合チップ設計および反応条件が得られ、他のBRETアッセイに変換される。

【0292】

効率を高めるために、大きな光検出チャンバに一体化された流体チップを使用する。光ファイバをチャンバの下に位置付けることによって、BRET²反応により放出される光を収集し、検出サブシステムに伝送する(図9)。このアプローチは、最小限の消失およびしたがって高感度を確実にし、2つの波長で放出レベルにおける微細な変化を同時に捕捉することを可能にする。

【0293】

発明者らは、モデルプロテアーゼ(トロンビン)を検出することができるセンサタンパク質を用いて検出感度を試験した。結果は、市販入手可能なマイクロプレートリーダーと比較して、BRET²検出感度に5倍の改善を示した。これらの試験において、検出限界が20 pM未満であったこともまた確認した。

【0294】

図10は、感度試験からの試料データを示す。GFPおよびRLucの放出計数を、それぞれ、緑色(第1のパネルの上の線、第2のパネルの下の線)および青色の線(第1のパネルの下、第2のパネルの上の線)で示す。未加工データを、トロンビンなしのブランクおよび270 pMのトロンビンを用いた条件について示す。放出レベル間の比率(BRET²比: GFP/RLuc)は、270 pMのトロンビンを用いたセンサの消化に応じて、おおよそ10倍の変化を示す。

【0295】

図11は、トロンビン濃度を0~270 pMに変化させた際のセンサの応答を示す。この図はまた、同じ実験を市販利用可能な機器で繰り返した際の結果も示す。感度(スロープ)は、マイクロ流体システムでは5倍高い。計算した検出限界は、20 pMである。

【0296】

BRET²比を、センサタンパク質(1 μM)をトロンビン(540 nM)および基質(12.5 μM)を用いた調製物と混合した後、2注入口のマイクロ流体デバイスで測定した。センサタンパク質(1 μM)を基質(12.5 μM)と混合することによって、対照実験を行った。BRET²シグナルにおけるおおよそ75%の減少が、50 μL/時間の入力流量で、オンチップ反応に関して測定された(図12)。

【0297】

実施例3—マイクロ流体システムにおけるBRET²に基づく臭気物質センサの性能

BRET²システムは、FRET(WO2010/085844号)または標準的なBRETと比較して、GPCRにおいてリガンドに誘導される分子転位を測定するのにより好適である。これは、好ましいGPCR構築物において6.8 nm間隔のBRET対(Dacres et al., 2010 and 2011)が、BRET²のドナーとアクセプターとの組み合わせのフェルスター距離に良く一致するためである。しかしながら、1つのトレードオフは、BRET²化学を用いた際、RLucドナーの量子収率が低いことである。これは、検出に利用可能な光子がより少ないことをもたらす。RLuc2および8突然変異の使用は、BRET²システムの量子収率を改善することが示されているが(De et al., 2007)、BRET²システムのフェルスター距離への影響は最小限である(図1)。本発明者らは、臭気物質アッセイの感度を損なうことなく光子収率を増加させる目的で、OGORセンサにおけるRLucをRLuc2またはRLuc8と置き換えた。図18は、RLuc2を組み込んだOGOR2を用いたジアセチル検出のための伝達スキームを示す。

【0298】

材料および方法

タグ化線虫嗅覚受容体を組み込んだBRET²-GPCRセンサの構築

キメラBRET²タグ化嗅覚受容体は、線虫嗅覚受容体の3つ目の細胞内ループ(IC3)およびC末端にBRET²構成成分が、IC3には緑色蛍光タンパク質GFP²、お

10

20

30

40

50

よびタンパク質（OGOR）のC末端にはウミシイタケルシフェラーゼRLucとともに、挿入されている。部位特異的突然変異生成を用いることにより、RLuc 2突然変異を、pYES-DEST-52 OGOR配列に導入した。プライマー1および2（表3）を使用して、突然変異C124Aを導入し、プライマー対3および4を使用して、M185V突然変異を導入して、OGOR 2と称される構築物を作製した（図18、配列番号1、配列番号2）。

【表3】

RLuc 2突然変異を導入するためのプライマー。C124AおよびM185V、pYES-DEST52-OGOR配列へ。

	プライマー名	配列
1	C124A	CACGACTGGGGCGCCGCCCTGGCCTTCCACTAC (配列番号7)
2	C124A アンチセンス	GTAGTGGAAGGCCAGGGCGGCGCCCCAGTCGTG (配列番号8)
3	M185V	CTTCTTCGTGGAGACCGTGCTGCCCAGCAAGATC (配列番号9)
4	M185V アンチセンス	GATCTTGCTGGGCAGCACGGTCTCCACGAAGAAG (配列番号10)

【0299】

OGOR 2 試料調製物

酵母コロニーを、2%グルコースを補充した10mLのSCMM-U（出芽酵母最少培地、200mL当たりの組成物：1.34gの酵母抽出物（アミノ酸なし）および0.38gの酵母補充培地（ウラシルなし））に接種し、28℃で一晩インキュベートした。一晚培養物のアリコートを使用して、2%ラフィノースおよび2%ガラクトースを補充して0.4の最終OD₆₀₀にしたSCMM-Uを接種し、200rpmで振盪させながら15℃でさらに72時間インキュベートした。

【0300】

細胞培養物を、4℃で5分間1500xgで遠心分離した。細胞を、1mLの滅菌水中に再懸濁させ、10,000xgで1分間遠心分離した。細胞を、4mLのリン酸緩衝溶液（PBS）中に再懸濁させた。細胞を、フレンチプレス（～18000psi）によって溶解させ、細胞残屑を15000xg（4℃）で15分間の遠心分離によって除去した。これに続いて、上清部分を、4℃で1時間、40,000rpm（Beckman Coulter L-80 ultra-centrifuge）で遠心分離した。上清を傾瀉し、膜ペレットを1mLのPBS中に再懸濁させ、4℃で48時間保管した。

【0301】

ジアセチルアッセイ

すべてのリガンド溶液を、水中に直接調製した。OGOR濃度は、GFP²強度を510nmで用いて正規化した。アッセイは、リン酸緩衝食塩水中100μLの総体積で96ウェルプレート（Perkin-Elmer）において行った。OGORを、Topseal-A（商標）（Packard）で密封したウェルにおいて、各リガンドとともに28℃で45分間インキュベートした。

【0302】

プレートリーダー測定

インキュベーションの後、セレンテラジン400a基質（Biosynth）を、5μMの最終濃度まで添加した。同時二重放出BRET²測定は、RLuc/C1z400a放出フィルタ（410nmバンドパス80nm）およびGFP²放出フィルタ（515nmバンドパス30nm）を含むBRET²放出フィルタセットを使用して、0.5秒の積分時間で2つのチャンネルについて、それぞれ、増進を3300および4095に設定し、

POLARstar OPTIMAマイクロプレートリーダー (BMG LabTech) で記録した。

【0303】

エンドポイントオンチップマイクロ流体測定

エンドポイントマイクロ流体アッセイを、光学検出チャンバを搭載する2つの注入口を有するマイクロ流体混合デバイスにおいて、オンチップで行った。セレンテラジン400a基質 (Biosynth) を、最終濃度12.5 μ Mに調製し、第1の注入口に導入した。OGORおよびOGOR2膜ペレットを、1mLのPBS中に再懸濁させ、必要に応じて希釈し、28℃で45分間、1aM~1 μ Mの範囲の濃度でジアセチル溶液とともにインキュベートした。調製物を、第2の注入口に導入した。オンチップ混合を、各注入口の入力流量400 μ l/時間で開始した。BRET²測定を、一方がRLuc/C1z400a放出フィルタ (410nmバンドパス80nm) を装備し、他方がGFP²放出フィルタ (515nmバンドパス30nm) を装備した2つの光電子倍增管を使用して記録した。光学出力を、オンチップ光学検出チャンバに沿ったコア径1mmの光ファイバを使用して収集した。

10

【0304】

リアルタイムオンチップマイクロ流体測定

オンチップリアルタイム測定を、光学検出チャンバを搭載した、3つの注入口のマイクロ流体混合デバイスで行った。第1の注入口を使用して、PBS中、12.5 μ Mの最終濃度となるように調製したセレンテラジン400a基質 (Biosynth) を導入した。第2の注入口は、PBS中1fMの最終濃度となるように希釈したジアセチル (2, 3-ブタンジオン)、または対照としてPBSのみを含んだ。第3の注入口を使用して、1mLのPBS中に上述の膜ペレットを再懸濁させ、必要に応じてさらに希釈することによって調製したセンサタンパク質懸濁液を導入した。オンチップ混合を、50~400 μ l/時間の範囲の入力流量を用いて開始した。BRET²測定を、一方がRLuc/C1z400a放出フィルタ (410nmバンドパス80nm) を装備し、他方がGFP²放出フィルタ (515nmバンドパス30nm) を装備した2つの光電子倍增管を使用して記録した。光学出力を、オンチップ光学検出チャンバに沿ったコア径1mmの光ファイバを使用して収集した。

20

【0305】

分析

BRET²シグナルを、515nmでの放出強度と410nmでのものの比として計算した。すべてのデータは、文中に記載の通り平均±標準偏差 (SD) または平均±平均の標準誤差 (SEM) として表す。曲線を、データの正規化後、Windows用Graphpad Prismバージョン5.03を用いて複合法面を有するlog [アゴニスト] 対応答曲線に適合させた。対応のない両側t検定を、Graphpad prismで行った。統計学的有意性は、 $p < 0.05$ として定義した。

30

【0306】

結果

強度

40

RLuc2突然変異をOGORに導入することにより、生物発光強度が、OGORでの 1766 ± 125 RLUからOGOR2での 272886 ± 26754 RLUへとおよそ約150倍増加した (図19)。OGORのこの突然変異体形態は、したがって、マイクロ流体チップ上でOGOR2による臭気物質結合のBRET²検出を促進する能力を示した。この予測を、オンチップ測定によって確認した。RLuc2突然変異により、生物発光強度が、 6.45 ± 2.9 RLUから 809.74 ± 116 RLUにおおよそ約126倍増加した (図20)。

【0307】

マルチウェルプレートにおけるOGOR2による臭気物質結合の実証

1 μ MのジアセチルをマイクロプレートのウェルにおいてOGOR2を含有する膜調節

50

物に添加した際、 $BRET^2$ シグナルに21.4%の減少があった(図21)。ジアセチルに誘導される $BRET^2$ シグナルの変化は、対照の水への応答とは有意に異なる($P=0.0136$)。ジアセチルに応答したシグナルの変化率は、天然のRLucを組み込んだ元のOGORセンサ(32%)で見られたものよりも小さい。しかしながら、ブランク測定における変動は小さく、OGORに対する $1.0 \pm 13.5\%$ ($n=4$)と比較して、OGOR2センサでは $1.0 \pm 7.0\%$ ($n=3$)であった。したがって、OGOR2センサは、検出限界はブランクシグナル $\pm 3 \times S.D$ として計算されるため、より低いジアセチル濃度を検出することができる可能性がある。

【0308】

ジアセチルに対するOGOR2の応答(図22)は、線形範囲で用量依存性である(10^{-18} から 10^{-12} Mまで6対数単位に及ぶ(図22))。計算された EC_{50} 値は、11.4 aMジアセチルである。これは、マイクロウェルでのOGOR応答よりも2桁低く、ジアセチルに対する感度の向上を示唆する。

【0309】

マイクロ流体エンドポイントアッセイを使用した、OGOR2によるジアセチル結合の検出

10 fMのジアセチルを、OGOR2を含有する懸濁液とともにインキュベートした後、マイクロ流体オンチップ測定は、 $BRET^2$ シグナルにおける36.9%の減少を示した(図23)。 $BRET^2$ シグナルにおける減少は、プレートリーダーを使用して行った同等の測定よりも1.5倍大きかった(図21)。これは、OGORファミリーのバイオセンサを用いたマイクロ流体測定が、厳密にはプレートリーダー測定よりもより感受性である可能性があることを示す。

【0310】

OGOR2の濃度依存性応答は、 10^{-18} から 10^{-16} Mの2対数単位に及ぶ(図24)。計算された EC_{50} 値は、おおよそ約10 aMジアセチルである。このレベルは、プレートリーダー測定と良好に一致する(図22)。

【0311】

マイクロ流体デバイスを用いたOGOR2による臭気物質結合のリアルタイムオンチップ検出

リアルタイムオンチップ測定は、50、100、200、および300 μl /時間(図25および26)の入力流量で1 fMのジアセチルを290 nMのタンパク質および12.5 μM の基質とオンチップで混合した後、 $BRET^2$ 比に27.4%の減少を示した。

【0312】

実施例4—マイクロ流体システムにおける $BRET^2$ に基づく周辺質結合タンパク質センサの性能

周辺質結合タンパク質(PBP)は、細菌に見られる、大型の多様な可溶性タンパク質ファミリーを形成する。PBPは、数例挙げると、炭水化物、アミノ酸、および神経伝達物質、金属およびイオンを含む、広範な化学的に異なる種に結合する(Medintzet al., 2006)。PBPは、一次配列では無関係であるが、それらは、すべて、一般に「ハエジゴク」機序と称される大きなリガンド誘導型立体配座転位を受ける(Sharff et al., 1992 and 1993; Spurlino et al., 1991)。

【0313】

MBPのFRETタグ化NおよびC末端間の測定距離6.93 nm(Park et al., 2009)は、GPCR内の測定距離と類似の規模であり、BRETが、FRETと比較して、この範囲の距離を測定するための優れた選択肢であり得ることを示唆する。マイクロ流体チップ上でのPBPによるリガンド結合の測定は、安全対策、食品および飲料の品質管理、環境および健康管理を含む、広範な適用分野での包括的な変換プラットフォームをもたらし得る。発明者らは、MBPが、PBPスーパーファミリーの良く特徴付けられたメンバーであり、すべてのPBPの代表となり得るため、この概念の初期試験と

10

20

30

40

50

してこれを選択した。周辺質タンパク質MBPによるマルトース結合のためのBRET²変換機序を、図27に示す。このセンサは、類似の構造を有するすべてのPBPおよび／またはMBPへのリガンドの結合機序の概念実証である。マルトースに対するMBPに基づくバイオセンサの親和性は、MBPドメインの標的化した突然変異によって変化させることができることが周知である。類似のアプローチは、他のPBPに適応可能である。

【0314】

材料および方法

BRETタンパク質の構築

RLuc2を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させ、pGEM(登録商標)ーTEasyベクター(Promega, Australia)にクローニングした。これにより、増幅された遺伝子の下流へのBstBI部位の導入、および増幅された遺伝子のすぐ上流へのXhoI制限部位の導入をもたらした。DNAのシーケンシングにより、正確なアンプリコン配列を確認した。アンプリコンを、pRSET-GFP²-FL1-RLuc(Dacres et al., 2010)のBstBIおよびXhoI部位に挿入し、RLucを置き換えてpRSET-GFP²-FL1-RLuc2を得た。

【0315】

MBPを増幅させ、pGEM(登録商標)ーTEasyベクターにライゲーションした。このプロセス中に、BstBI部位を、増幅した遺伝子の下流に挿入し、PstI部位を上流に挿入した。MBPを、pRSET-GFP²-FL1-RLuc2のPstIおよびBstBI部位に制限クローニングし、FL1配列をMBPと置き換えて、pRSET-GFP²-MBP-RLuc2を得た。

【0316】

W140突然変異を、プライマーC1(CAGATGTCCGCTTTCGCGTATGCCGTGCGTAC)(配列番号11)およびC2(GTACGCACGGGCATACGCGAAAGCGGACATCTG)(配列番号12)を使用して、部位特異的突然変異生成(Stratagene)により、pRSET-GFP²-MBP-RLuc2に導入した。BRET²タグ化MBP受容体のヌクレオチド5およびアミノ酸配列は、配列番号3~6)として提供される。

【0317】

BRET²タンパク質の発現および精製

タンパク質を、大腸菌株BL21-DE3(Novagen)に発現させた。一晚培養物を、37℃、200rpmで、100μg/mLアンプリコンおよび2%グルコースを含有するLB(10gトリプトン、5g酵母抽出物、5g NaCl(pH7.4))において単一コロニーから成長させた。発現を、100μg/mLアンプリコンを含有する500mLのLBを0.1のA₆₀₀まで接種し、37℃(200rpm)で3.5時間インキュベートした後、22℃(200rpm)で一晩インキュベートすることによって、誘導した。細胞を、接種24時間後に採取した。

【0318】

タンパク質の精製のために、細胞を、4335xg(4℃)で15分間の遠心分離によって採取し、平衡緩衝液(50mMリン酸ナトリウム緩衝液、300mM NaCl、pH7.0)中に再懸濁させた。細胞懸濁液を、約22000psiの圧力でホモジナイザー(Avestin emulsiflex C3(ATA Scientific, Australia))に通し、可溶性タンパク質部分を、15000xg(4℃)で15分間の遠心分離によって単離した。タンパク質を、提供された指示にしたがって、コバルト親和性クロマトグラフィーを用いて精製した(BD Talon(BD Biosciences, Clontech, Australia))。精製されたタンパク質を150mMイミダゾールで溶出した後、試料を、セルロース膜(12,000分子量カットオフ(Sigma))を使用して50mM Tris(pH8)、100mM NaCl、および1mM EDTAに対して透析した。500μLのタンパク質アリコート、ドラ

イアイス上で瞬間凍結させ、 -80°C で保管した。タンパク質濃度を、 280 nm の吸光度で判定し、Gill and von Hippel (1989)の方法に従って計算した。

【0319】

スペクトルのスキャン

すべてのスペクトルのスキャンは、SpectraMax M2プレートリーディング蛍光光度計 (Molecular Devices, Australia) で記録した。反応は、96ウェルプレート (Perkin-Elmer, Australia) において行った。BRET²構築物の生物発光スキャンは、 $360\sim 650\text{ nm}$ を 20 nm 間隔でスキャンする発光スキャンモードを用いて記録した。

10

【0320】

エンドポイントオンチップマイクロ流体測定

オンチップ測定は、2つの注入口、受動的マイクロ混合器、および一体型光学検出チャンバを有するマイクロ流体混合器で行った。BRET²測定は、一方がRLuc/C1z400a放出フィルタ (410 nm バンドパス 80 nm) を備え、他方がGFP²放出フィルタ (515 nm バンドパス 30 nm) を備える、2つの光電子倍增管を使用して記録した。光学放出を、オンチップ光学検出チャンバからダイクロイックミラーに沿ったコア径 1 mm の光ファイバを使用して収集した。

【0321】

リアルタイムオンチップマイクロ流体測定

20

リアルタイムオンチップ測定を、3つの注入口、受動的マイクロ混合器、および一体型光学検出チャンバを有するマイクロ流体混合器で行った。BRET²測定は、一方がRLuc/C1z400a放出フィルタ (410 nm バンドパス 80 nm) を備え、他方がGFP²放出フィルタ (515 nm バンドパス 30 nm) を備える、2つの光電子倍增管を使用して記録した。光学放出を、オンチップ光学検出チャンバからダイクロイックミラーに沿ったコア径 1 mm の光ファイバを使用して収集した。

【0322】

BRETタンパク質アッセイ

$1\text{ }\mu\text{M}$ の精製タンパク質を、すべてのエネルギー移動アッセイに使用した (最終体積 $100\text{ }\mu\text{L}$)。 $1\text{ }\mu\text{M}$ の精製タンパク質は、タンパク質をリン酸緩衝溶液 (PBS、 $0.058\text{ M Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $0.017\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ 、 0.068 M NaCl (pH 7.4)) 中に希釈することによって調製した。精製タンパク質を、二重脱イオン水または水に溶解した糖とともに 28°C で30分間インキュベートした。インキュベーションの後、 $16.67\text{ }\mu\text{M}$ のセレンテラジン400aを添加し、シグナルを即座に記録した。

30

【0323】

オンチップBRETタンパク質アッセイ

オンチップアッセイのために、 $1\text{ }\mu\text{M}$ の精製タンパク質を、 1 mM のマルトース溶液とともに 28°C で40分間インキュベートした。次いで、調製物を、オンチップで $5\text{ }\mu\text{M}$ のセレンテラジン400aと混合し、光学シグナルを検出チャンバから記録した。対照実験を、タンパク質調製物を水とともにインキュベートし、同じ条件下でチップ上で混合することによって行った。結果を比較して、マルトースの添加後のBRET²シグナルの変化率を判定し、マルトースの感度の判定するよう拡張した。

40

【0324】

リアルタイムオンチップBRETタンパク質アッセイ

リアルタイムアッセイのために、タンパク質調製物、マルトース、および基質を、同時にチップ上で混合した。 $1\text{ }\mu\text{M}$ の精製タンパク質を、 1 mM のマルトース溶液および $5\text{ }\mu\text{M}$ のセレンテラジン400a基質溶液と混合した。光学シグナルを、検出チャンバから記録した。オンチップ反応時間は、流量を変動させることによって制御した。BRET²シグナルにおける変化を、異なる反応時間で測定し、結果を、水を用いた対照実験と比較した。

50

【0325】

BRET比の判定

BRET比を、最大アクセプター放出強度と最大ドナー放出強度との比として計算した。

【0326】

マルトースのリアルタイムオンチップ検出

2つの流入チャンネルおよび18mmの長さの蛇形共通チャンネルを有するY型チップを使用した。共通チャンネルの断面寸法は、0.2mm×0.035mmであった。BRET反応チャンバは、 $\theta = 4\text{mm}$ および $H = 1\text{mm}$ であった。チャンバの上部表面にミラーはなかった。光を捕捉し、流入部を有する二分岐型ライトガイド（胴体部径6mmおよびNA = 0.59）を用いて標準的なダイクロイック検出器に移した。PMTゲート時間は、500ミリ秒であった。共通チャンネルにおいて1時間当たり200 μL および400 μL の2つの異なる流量を試験した。

【0327】

流入部Aは、1 μM のマルトースおよび31.25 μM のClz400a基質、または陰性対照の場合は31.25 μM のClz400a基質のみを含有するように調製した。流入部Bは、1 μM のGMRセンサを含有した。AおよびBを、100 μL /時間または200 μL /時間の入力流量で、Y型マイクロ流体チップの別個のアームにポンプ注入して、それぞれ200 μL /時間または400 μL /時間の共通チャンネル流量を得た。合計滞留時間は、前者の場合ではおおよそ230秒、後者の場合では115秒と推定した。BRET²比を、流動開始後200～250秒で収集した平均データにおいて判定した。

【0328】

データ分析

すべてのデータ分析は、GraphPad Prismを用いて行った（Windows用バージョン5、Graphpad Software, San Diego, California, USA）。すべてのデータは、別途文中に記載されない限り、平均±標準偏差（SD）として報告する。対応のない両側t検定を、Graphpad prismを使用して行う。統計学的有意性は、 $p < 0.05$ として定義する。

【0329】

結果

MBP BRET比によるマルトース検出—プレートリーダーアッセイ

BRETタグ化MBPタンパク質の選択性を、単糖類、二糖類、および三糖類を含む、種々の糖に対する応答を試験することによって判定した（図28）。マルトース（ $P = 0.001$ ）およびマルトトリオース（ $P = 0.02$ ）のみが、BRETタグ化MBPからのBRETシグナルに有意な（ $P < 0.05$ ）変化をもたらした。BRETバイオセンサは、グルコース、フルクトース、スクロース、またはラフィノースには応答しなかった。Fehr et al.（2002）は、FRETバイオセンサが、マルトースおよび種々のマルトースオリゴ糖類を検出することができたが、 α -1,4-グルコシド結合を含有しないいずれのペントース類、ヘキソース類、糖アルコール類、二糖類、または三糖類も特異的に認識しなかったことを示した。BRET比における変化の振幅は、マルトース鎖の長さが2単位（マルトース）から3（マルトトリオース）に増加するにつれ29.65%から17.03%へと低下した（図28）。これは、電子常磁性（electroparamagnetic）共鳴（EPR）研究（Hall et al., 1997）およびFRET測定（Fehr et al., 2002）によって示されるように、より大きな α -1,4-オリゴマルトシド鎖の存在下での閉鎖運動の低減と一致する。BRET²応答の相対寸法と文献に報告されたFRET応答（Fehr et al., 2002）のものとの比較は、BRET構成成分とFRET構成成分との置換により、バイオセンサの動的範囲が増加し、FRETの約12%（Fehr et al., 2002）と比較して、BRETでは29.65 $\pm$ 1.11%のシグナル変化をもたらし得ることを示した。発明者らは、フェルスター距離における類似性に基づいて、従来のBRET¹のシ

グナル変化が、FRETのものと同程度であると予測する。

【0330】

W140A突然変異体をGFP²-MBP-RLuc²に導入することにより、マルトースに対するBRET²応答を消失させた(図28)。水またはマルトースのいずれかに対するBRET²応答間に、有意差は観察されなかった($P=0.63$)。W140A突然変異体は、マルトースに対して100mMよりも高い解離定数を有し、以前には、酵母へのマルトースの取り込みの監視に適用した際のFRETタグ化MBPの対照として使用されていた(Fehr et al., 2002)。W140A突然変異体のマルトースに対する応答の欠如は、GFP²-MBP-RLuc²のBRET²比に対するマルトースの影響が、マルトースとBRET構成成分自体との間の直接的な相互作用に起因するものではないことを示す。これらの結果により、BRET²に基づくマイクロ流体チップアッセイにおけるGFP²-MBP-RLUC²(GMR)および類似のセンサの好適性の可能性が確認される。

10

【0331】

応答時間

BRET²応答は、インキュベーション時間を30分まで増加させるにつれて増加し、この時点で応答が最大に達した(図29)。30分間を、さらなるアッセイに使用した。現在のマイクロプレートアッセイ形式では、BRET²応答をリアルタイムで記録することはできないが、リアルタイムマルトースアッセイを、マイクロ流体チップ形式を用いて行うことができる。

20

【0332】

感度

BRET²タグ化MBPバイオセンサは、 3.71×10^{-7} MのEC₅₀で、 1×10^{-8} M~ 3.16×10^{-6} Mの範囲の3対数単位に及ぶ異なる濃度のマルトースを定量化することができた(図30a)。FRETタグ化MBP受容体の応答は、 3.24μ MのEC₅₀で、 $0.26 \sim 21.12 \mu$ Mの範囲の2対数単位にわたってのみ線形であった。

【0333】

オンチップアッセイ測定

感度アッセイを、L 18mmの蛇形共通チャネルを有する2つの流入部のマイクロ流体混合デバイス(図8b)で行った。BRET反応チャンバは、ミラーを有さず、 $\theta=4$ mmおよびH=1 mmであった。6mm胴体部およびNA=0.59の二分岐型ライトガイドを使用した。 1μ MのGMRセンサを、 $10^{-9} \sim 10^{-3}$ Mの範囲の濃度で、マルトースとともに28℃で40分間インキュベートした。インキュベートした試料および 31.25μ MのClz400a基質を、それぞれ、 400μ l/時間の入力流量で、チップにポンプ注入した。ライトガイドの胴体部末端を、BRET反応チャンバからのシグナルの収集に使用した。ライトガイドの2つの分岐部を、2つのPMTの前の2セットのフィルタブロック(青色は410/80、緑色は515/30)に向けた。BRET²シグナルを、各濃度で測定した。実験を、同じバッチのGMRセンサを使用して3日間毎日反復した。全3日にわたり、試験する各濃度に対して1つずつ、9つのチップを使用した。オンチップ検出のlog濃度応答曲線は、EC₅₀= 2.2×10^{-7} Mであった以前のプレートに基づく測定のものと同様に効果的に同一であった(図30b)。

30

40

【0334】

糖類のグルコースおよびスクロースよりもマルトースに対するセンサの特異性を、チップにおいて調査した。放出の振幅は、RLuc/Clz400aシグナルが10000~25000計数/ゲート(500ミリ秒)の範囲およびGFP²シグナルが2000~10000計数/ゲート(500ミリ秒)の範囲と高かった。検体の不在化において、BRET²比は、0.225であった。マルトースの結合(図52)は、BRET²比における大きな変化をもたらし、平均BRET²比が0.1mMマルトースでは0.35であり、糖なしの対照よりも52%増加した。グルコースおよびスクロースでの反応は、それぞ

50

れ、BRET²比における7および15%の増加をもたらし、マルトースに対するBRET²に基づくセンサが、マイクロ流体形式で維持されることを確認した。

【0335】

マルトースのリアルタイムオンチップ検出

発明者らは、プロテアーゼおよび揮発性物質の検出について以前に示したように、本発明は、試料を、チップ上でセンサおよび基質と混合することができ、その結果、全体的な検出反応は、チップ上における連続流動形式で行うことができる。発明者らは、これが、OGOR2センサおよびジアセチルを使用した、試料、センサ、およびセレンテラジン400A基質の3つの入力（図26）、ならびにトロンピンでは3つの入力（例えば、図51を参照されたい）で機能することを実証した。発明者らは、これを拡張し、同じプロセスが、BRETに基づくマルトースセンサで機能することを示す。この場合、便宜上、発明者らはさらに、2つの入力マイクロ流体チップを使用した。セレンテラジン基質およびマルトースを含有する試料溶液（またはマルトースなしの陰性対照）を事前混合して一方の入力部にポンプ注入し、GMRセンサ溶液を他方の入力部にポンプ注入した。

【0336】

シグナルは、両方の流量で流動を開始したおおよそ40秒後に検出されたが、より速い流量（1時間当たり200μLの入力）の場合には、より迅速に安定化した（60秒対おおよそ130秒）（図67）。合計した発光性は強力であり、100μl/時間ではRluc/C1z400aで1000~1500計数/ゲートおよびGFP²で6000~7000計数/ゲート、または200μl/時間ではRluc/C1z400aで2000~3000計数/ゲートおよびGFP²で7000~9000計数/ゲートが容易に検出された。

【0337】

安定化された後、1μMのマルトースは、いずれの流量でも容易に対照と区別され（図64）、遅い方の流動ではBRET²比に20%の変化がもたらされ、速い方の流動では27%の変化が示された。

【0338】

実施例5—光ファイバスイッチありおよびなしでの生物発光シグナル収集の比較

本発明において使用するための機器の非常に好ましい要件の1つは、多重化である、すなわち、機器は、ほぼ同時に複数の検体を検出することができなければならない（すなわち、1つの検体と次のものとの間の時間遅延が非常に小さい）。機器の費用および空間、ならびに重量を低減するために、光ファイバスイッチを使用して、多重化を可能にすることができる。ある実施形態において、複数の入力光ファイバは、少なくとも6つの検出チャンバからの生物発光シグナルを同時に収集する。次いで、光学スイッチは、1つの特定の入力ファイバを、シグナルを分割およびバンドパスさせる2つの光電子倍增管（PMT）に接続した単一の出力ファイバに、短期間（数百ミリ秒）接続する。同じ方式で、次の入力ファイバのスイッチを入れる。現在の例では、入力ファイバ間のスイッチ切り替えに50ミリ秒かかる。光学スイッチ切り替えにより、必然的に収集したシグナルに光学的損失が生じる。したがって、この実験は、光学スイッチを通じたシグナルの収集が可能であるかどうかを確認し、光学スイッチ切り替えによるシグナル損失の量を計算するために行われた。

【0339】

実験的構成

実験的設定を図31に示す。図31Aは、光学スイッチなしの構成を示す。単一のファイバを、マイクロ流体チップの光学検出チャンバの下に並ぶように操作した。ファイバを、次いで、光学ブロックに直接接続させる。図31Bは、光学スイッチありの構成を示す。Leonil1×9molのファイバの光学スイッチを使用した。9つの入力は、サブミニチュアA（SMA）コネクタで終端処理され、一方で出力ファイバは、フェールコネクタ（FC）により終端処理されている。ステンレス板を、SMAレセプタクルのアレイを含有するように機械加工して、底部からの光ファイバの接続を可能にした。板の上部

に、ファイバの先端と揃った光学チャンバを有するマイクロ流体チップを置いた。この実験では、1つの入力ファイバを使用した。出力ファイバを、次いで、光学ブロックに接続した。

【0340】

材料および方法

エンドポイントマイクロ流体アッセイを、光学検出チャンバを搭載する2つの注入口を有するマイクロ流体混合デバイスにおいて、オンチップで行った。セレンテラジン400a基質(Biosynth)を、最終濃度12.5μMのTE緩衝液(10mM Tris(pH8.0)、100mM NaCl、1mM EDTA)に調製し、第1の注入口に導入した。GTR膜タンパク質を、TE緩衝液(10mM Tris(pH8.0)、100mM NaCl、1mM EDTA)中に、1μMの濃度で希釈した。調製したGTR溶液を、第2の注入口に導入した。オンチップ混合を、各注入口の入力流量400μl/時間で開始した。BRET2測定を、一方がRLuc/C1z400a放出フィルタ(410nmバンドパス80nm)を備え、他方がGFP2放出フィルタ(515nmバンドパス30nm)を備える2つの光電子倍增管を用いて記録した。光学出力を、いずれの場合についても図31にある1つの単一入力ファイバを用いて収集した。ゲート時間は500ミリ秒であった。

10

【0341】

結果

図32は、3回の実行について、光学スイッチ切り替えなしおよびありで収集したRLuc/C1z400チャンネルにおけるリアルタイム生物発光シグナルを示す。GFPもまた、類似の挙動を示す(データは示されない)。これらの結果から、生物発光シグナルが、光学スイッチを無事に通過したことが確認される。損失に関しては、図33は、RLuc/C1z400aおよびGFPチャンネルの両方において、光学スイッチなしおよびありで収集した発光シグナルを比較する。RLuc/C1z400aチャンネルの光学スイッチによる損失は、40%であったが、GFPチャンネルでは28%であった。

20

【0342】

実施例6—全体的なシステム発光性および光子検出効率の最適化

本発明の重要な特徴の1つは、非常に低いレベルの検体を、経済的試薬使用でリアルタイムに検出するその能力である。これを達成する鍵の1つは、センサ溶液の単位体積当たり最大数の光子を生成することである。RLuc2突然変異等の改良を組み込むことにより、これを助ける。光学検出システムにおける光子損失の最小化もまた、重要である。高い光子検出効率は、応答時間、試薬の経済性、およびシグナル対ノイズ比の望ましい組み合わせを可能にする。BRET反応チャンバおよび共通チャンネルの容積を増加させることにより、利用可能な光シグナルが増加する傾向にあり、これは、シグナル対ノイズ比を改善するが、システムの時間分解能を低減させる。その他のものは同じままデバイスにおける流量を増加させることにより、デバイスの時間分解能を改善させるが、試薬の経済性およびシグナル対ノイズ比が低下する。光学検出システムにおける損失の最小化もまた重要である。多数の代替的な実験的構成を展開し、光子検出効率を改善した。

30

【0343】

実験的構成

2つの注入口、受動的混合要素、および検出チャンバを有する、図31Aに示されるものに類似のマイクロ流体チップを用いて、オンチップ測定を行った。アルミニウムミラーを、反応チャンバの上部に設置して、BRETシグナルを増強させた。一方がRLuc/C1z400a放出フィルタ(410nmバンドパス80nm)を備え、他方がGFP²放出フィルタ(515nmバンドパス30nm)を備える2つの光電子増幅管を使用して、BRET放出を記録した。

40

【0344】

多数の変化形を、元の構成と比較した(図31A)。反応チャンバの直径を、元の直径2mmから4mmに増加させた(図34A)。反応チャンバの高さを、1~2mmで変動

50

させた。直径0.4～1.0 mmの単一の光ファイバ（図31A）を、ダイクロイックブロックに入るコア径5 mmでNA=0.59の液体ライトガイドもしくは光ファイバ束（図34A）、または胴体部のコア径6 mm、分岐部のコア径4 mmの二分岐型ライトガイド（図37）、または胴体部のコア径8 mmで分岐部のコア径4 mmの多分岐型ライトガイド（図38および40）と置き換えた。

【0345】

材料および方法

4日目に、OGOR2センサ溶液を、ストック溶液から高希釈比（100および50倍）でPBS中に調製した。Clz400aを、31.25 μ MでPBS中に調製した。ジアセチルが含まれた場合は、1 μ Mの最終濃度でOGOR2センサ溶液に添加した。対照実験については、DI水のみを添加した。ジアセチルなしおよびありのセンサ管を、いずれも28℃で30分間インキュベートした。

【0346】

結果

ファイバ径1.0 mmの元のシステムと、単一のコア5 mmの液体ライトガイドを用いた改変型システムとの間で、光収集を比較した（図35）。100倍希釈のセンサでは、元のシステムは、高いノイズレベルを有し、RLuc2およびGFP²のいずれのシグナルも、ノイズと区別できなかった。対照的に、液体ライトガイドを使用することにより、バックグラウンドノイズレベルが有意に低下し、システムを作動させたおおよそ50秒後までに、両方の放出チャンネルをノイズとはっきり区別することができた。最大シグナルレベルは、試薬のポンプ注入を開始したおおよそ200秒後までに達成された。新しい方の構成は、BRET反応チャンバの容積が元のものよりも4倍大きいため、この条件ではシグナルの飽和まで最大100秒長くかかることに留意されたい。いずれにせよ、ベースラインとの区別は50秒までに検出することができる。類似の結果が、50倍の希釈比で観察された（結果は示されない）。改良したシステムでは、50倍および100倍希釈でOGOR2を使用して検体を検出することが可能であった（図36）。

【0347】

各マイクロ流体チャンネルが専用の光検出器を有する場合、各マイクロ流体チャンネルが二分岐型ライトガイドと接合され、それが1対の光電子倍增器または同等の検出器に光をチャンネル伝達する（図37）に示されるもの等のスキームが、好適な配設である。この配設をダイクロイックブロックと比較することにより、これが、その他の条件が同等である場合、より良好な光子検出効率およびシグナル対ノイズ特性を有し得ることが示される（図39）。

【0348】

ライトガイド（コア径 $\geq$ 1.0 mm）を光ファイバ（コア径 $\leq$ 1.0）の代わりに用いる場合、異なるマイクロ流体チャンネル間での光学検出システムの時間領域切り替えに好適な光学スイッチを得ることは困難である。この場合、シャッターボックスを使用することができる。好適な光学的構成の例は、図38に示される。多チャンネルのチップから収集された光がシャッターボックスに集められ、出力は、多分岐型ファイバ束を介して光学検出器にチャンネル伝達される。シャッターは、多分岐型ファイバ束の入力側に位置付けられ、チャンネル配列および監視期間のソフトウェア選択が可能である。

【0349】

好適な多分岐型ライトガイドの配設を、図40に示す。この配設とチャンネル特異的二分岐型ライトガイド（図37）とを比較して得られた結果は、ダイクロイックファイバが、二分岐型ライトガイドと比較して、GFPチャンネルにおいては8倍高いシグナル、およびRLucチャンネルにおいては6.6倍高いシグナルをもたらすことを示す（図41）。BRET²比は、ダイクロイックフィルタでは4.67 $\pm$ 0.07であり、二分岐型配設では3.85 $\pm$ 0.25であった。

【0350】

実施例7—好適な弁および固体に基づく光検出器の例

10

20

30

40

50

多種多様な真空に基づくセンサおよび固体センサが市販入手可能であり、これらは、BRET反応により生成される光を測定するためにマイクロ流体チップと接合され得る。図42は、従来の真空管を使用した高い計数効率、高い増幅率、低い暗ノイズ集合率を図示する。図43は、固体技術を使用して実装された、高い光子検出効率、高い増幅率、低い暗ノイズ集合率を図示する。これらの2つのアプローチには多数の変異体を利用可能である。

【0351】

実施例8—マイクロ流体チップにおける拡散的混合の実験的および理論的最適化

層流条件が、本発明で使用される典型的な寸法のマイクロ流体チップに關与し得る。この場合、混合は、主に拡散によって生じ、完了を達成するために低い流量および長い滞留時間を要し得る。低い流量は、検体（複数可）の最初の検出までの時間がそうでない場合よりも結果として遅くなるため、望ましくない。この制限は、例えば、より複雑なマイクロ流体の幾何形状および／もしくは拍動流、ならびに／または微小機械的混合、ならびに／または音響的および／もしくは動電的手段を使用して、乱流混合を強制的に行うことによって、克服することができる。これらの方法のすべては、実行可能ではあるが、追加の工学的複雑性および費用を伴う可能性がある。したがって、発明者らは、層流環境において拡散的混合を強化することができる単純な受動的設計の特徴を研究した。

【0352】

実験的構成

色素を用いた研究のため、発明者らは、注入口が3つのマイクロ流体ネットワークを使用した（図44）。トロンビン検出実験では、Y型形状を有する、注入口が2つのマイクロ流体ネットワークを使用した（図31a）。BRET反応チャンバ（示されない）は、直径2mmまたは4mmのいずれかであった。すべてのマイクロチャネルの寸法は、幅200μmで深さ35μmであった。元の（並列型）構成では、チャネルはそれらの垂直方向の（35μm）側面に沿って互いが接触しており、長さがおおよそ28mmの蛇形混合領域を有して製造されていた（図44）。改良された（パンケーキ状積層）構成（図45）では、2つの入力チャネルは、深さ30μmで幅600μmであり、互いに積み重ねられており、それらの水平方向（600μm）の側面を介して接触して、幅600μmで深さ60μmの線形共通チャネルを形成していた。共通チャネルの長さは、20mmであった。

【0353】

色素実験のために、食用色素の溶液を、1時間当たり30～300μLの流量で単一のポンプを吸い込みモードで使用して、3つの入力マイクロチャネルから汲み出した。トロンビン感知実験のために、12.5μMのセレンテラジンA基質を使用し、これは、試験濃度のトロンビンと事前混合し、Y型マイクロチャネルの一方のアームにポンプ注入した。既述（Dacres et al., 2009b）のように調製した1μMのBRET²に基づくトロンビンバイオセンサを、マイクロチャネルの他方のアームにポンプ注入した。入力チャネル流量は、1時間当たり50～400μLで変動させた。検出限界を、1時間当たり50μLの入力試薬流量で、BRET²比における変化をはっきりと識別することができた最も低いトロンビン濃度として略式的に推定した。

【0354】

結果

図44に示されるように、並列型の構成を使用すると、流動は、2.35秒の滞留時間に対応する高流量（共通チャネル流量＝300μL時間）では層流であり、観察可能な混合がほとんどないか、または全くない。流動は、23.5秒の滞留時間に対応する低流量（共通チャネル流量＝1時間当たり30μL）では層流のままであったが、この期間に大幅な拡散的混合が検出され得る。

【0355】

滞留時間の計算

i) 1時間および3つの入力ネットワーク当たり300μlの吸い込み流量について：

蛇形領域の容積は、 $0.2\text{ mm} \times 0.035\text{ mm} \times 28\text{ mm} = 0.196\text{ }\mu\text{L}$ である。
 共通チャネルの流量は、1時間当たり $300\text{ }\mu\text{L}$ である。

$0.196 / 300 = 6.53 \times 10^{-4}$ 時間 = 2.352 秒。

i i) 1時間当たり $30\text{ }\mu\text{L}$ の入力流量については：
 滞留時間は、10倍長い、すなわち、 23.52 秒である。

i i i) 並列型積層では：
 蛇形領域の容積は、 $0.2\text{ mm} \times 0.035\text{ mm} \times 28\text{ mm} = 0.196\text{ }\mu\text{L}$ である。
 共通チャネルの流量は、1時間当たり $100\text{ }\mu\text{L}$ である。

$0.196 / 100 = 1.96 \times 10^{-3}$ 時間 = 7.056 秒である。

BRET反応チャンバの容積 ($\pi 1^2 \times 1\text{ mm}^3$) = $3.14\text{ }\mu\text{L}$

流量は1時間当たり $100\text{ }\mu\text{L}$ である。 $3.14 / 100 = 1$ 時間当たり $0.0314 = 113$ 秒

合計滞留時間は、 120 秒である。

i v) パンケーキ状積層では：
 チャネルの容積は、 $0.6\text{ mm} \times 0.06 \times 20\text{ mm} = 0.72\text{ }\mu\text{L}$ である。チャネルの流量は、1時間当たり $100\text{ }\mu\text{L}$ である。

$0.72 / 100 = 7.2 \times 10^{-3}$ 時間 = 25.92 秒

BRET反応チャンバの容積 ($\pi 2^2 \times 1\text{ mm}^3$) = $12.6\text{ }\mu\text{L}$

流量は1時間当たり $100\text{ }\mu\text{L}$ である。 $12.6 / 100 = 1$ 時間当たり $0.126 = 452$ 秒。

合計滞留時間は、 478 秒または7分58秒である。

【0356】

トロンビンアッセイは、検体およびセンサのいずれも低い拡散係数を有する巨大分子であるため、またトロンビン ($k_{cat} = 85\text{ s}^{-1}$) はシグナルが検出可能となる前にタンパク質分解切断により非常に多くのセンサを処理する必要がある、これに時間がかかるため、不十分な混合には非常に敏感である。

【0357】

従来の並列型ネットワークを各入力アームで1時間当たり $50\text{ }\mu\text{L}$ の流量で使用する、リアルタイム (120 秒) で観察可能な最も低いトロンビン濃度は 540 nM であった。パンケーキ状積層ネットワークを同じ流量 (478 秒の滞留時間) 使用した場合、 27 nM のトロンビンが容易に検出可能であった (図46)。トロンビンは、試験した最も低い濃度である 14 nM に至るまで検出可能であった。滞留時間を4倍差に調整すると、パンケーキ状積層については、より低い濃度のトロンビンの検出に少なくとも10倍の便益がある。

【0358】

発明者らは、この改善がパンケーキ状積層構造での改善された拡散的混合に起因すると考える。したがって、マイクロ流体チャネルの長さ (並列型の例では 28 mm であり、パンケーキ状積層の例では 20 mm) を、これらの異なる構成で混合を完了するために必要な理論的距離と比較した。

【0359】

完全な拡散的混合に必要な距離の計算

L: チャネルの長さ (mm)

Q: 体積流量 ($\mu\text{L} / \text{時間}$) または ($\text{mm}^3 / \text{秒}$)

$Q = 200\text{ }\mu\text{L} / \text{時間} = 200\text{ mm}^3 / \text{時間} = 0.055\text{ mm}^3 / \text{秒}$

D: 拡散係数 (トロンビンの) $D = 4.16 \times 10^{-5}\text{ mm}^2 / \text{秒}$

U: チャネルにおける平均速度 ($\text{mm} / \text{秒}$) = $Q / \text{幅} \times \text{高さ}$ (チャネルの断面積)

X: 期間 t に移動する拡散的距離は、 $X^2 = t D$ により推算する。

【0360】

混合を完了させるためのX値は、チャネルの構成に依存する。入力チャネルが2つの構造であるとする、並列型設計では、Xは共通チャネル幅の半分であり、パンケーキ状積

10

20

30

40

50

層設計では、Xはチャンネルの高さの半分である。

【0361】

完全な混合のための滞留時間 $= L / U = X^2 / D = > Q X^2 / \text{幅} \times \text{高さ} \times D$

【0362】

したがって：

1. 現在の（並列型）設計では：

H（チャンネルの高さ） $= 34 \mu\text{m} = 0.034 \text{mm}$ 、および

W（チャンネルの幅） $= 200 \mu\text{m} = 0.2 \text{mm}$

【0363】

$L \quad Q W^2 / 4 W H D = 0.055 \text{mm}^3 / \text{秒} \times 0.04 \text{mm}^2 / 4 \times 0.2 \text{mm} \times 0.034 \text{mm} \times 4.16 \quad 10^{-5} \text{mm}^2 / \text{秒} = 1944 \text{mm}$ 10

【0364】

2. 現在の（パンケーキ状積層）設計では：

H（チャンネルの高さ） $= 60 \mu\text{m} = 0.060 \text{mm}$ 、および

W（チャンネルの幅） $= 600 \mu\text{m} = 0.6 \text{mm}$

【0365】

$L \quad Q H^2 / 4 W H D = 0.055 \text{mm}^3 / \text{秒} \times 3.6 \quad 10^{-3} \text{mm}^2 / 4 \times 0.6 \text{mm} \times 0.06 \text{mm} \times 4.16 \quad 10^{-5} \text{mm}^2 / \text{秒} = 33 \text{mm}$

【0366】

3. 最適化された（パンケーキ状積層）設計では：

H（チャンネルの高さ） $= 14 \mu\text{m} = 14 \times 10^{-3} \text{mm}$ および

W（チャンネルの幅） $= 1200 \mu\text{m} = 1.2 \text{mm}$

【0367】

$L \quad Q H^2 / 4 W H D = 0.055 \text{mm}^3 / \text{秒} \times 196 \quad 10^{-6} \text{mm}^2 / 4 \times 1.2 \text{mm} \times 14 \quad 10^{-3} \text{mm} \times 4.16 \quad 10^{-5} \text{mm}^2 / \text{秒} = 3.9 \text{mm}$

【0368】

したがって、並列型積層は、完全な混合に必要とされる 1944mm 中 28mm （すなわち 1.4% ）のみを提供するが、試験したパンケーキ状積層配設は、完全な混合に必要とされる 33mm 中 20 （すなわち 61% ）を提供した。計算は、小規模な追加の変更を行うことで、拡散的混合を、 7.7mm 以内、すなわち現在の設計で利用可能な長さの 40% 未満で完了するように配設することが実現可能であろうことを示す。 30

【0369】

実施例9—マイクロ流体ネットワーク設計およびポンプ注入配設に対する改善

共通ポートに接続される複数の試薬入力チャンネルの長さが例えば図14のように多様であるマイクロ流体ネットワークは、背圧の差が長い方のチャンネルの流動を阻止し、すべての流動を短い方のチャンネルを通して行う傾向があるため、信頼性が低かった（結果は示されない）。これらの設計はまた、同様の理由から、気泡による遮断の影響を非常に受けやすい。したがって、発明者らは、多重チャンネルデバイスの信頼性を改善するために、多数の異なる設計特徴およびポンプ注入配設を試験した。

【0370】

対合型対称マイクロ流体センサの実験的構成

一例（図47）において、発明者らは、2つの異なるセンサを使用して2つの同時の反応を行うために、左右対称な平行チャンネルレイアウトを有するネットワークを設計した。この配設は、任意の偶数のセンサチャンネルが得られるように再現することができる。

【0371】

結果

発明者らは、2つの流量で食用着色色素を使用してチップ上の流体流動を実証した（図48）。拡散的混合は、 $150 \mu\text{l} / \text{時間}$ の流量では大部分が完了したが、 $1500 \mu\text{l} / \text{時間}$ では入力流は大部分が分離したままであった。

【0372】

流動は連続的であり、ネットワークの両方のアームにわたってすら、遮断は、非対称設計でのものよりも低い頻度で発生した。いずれにせよ、この設計は、気泡または他の障害物が2つの平行なアームのうちの1つに詰まる場合には、依然として遮断または不規則な流動を被りやすい。したがって、発明者らは、試料および試薬にマイクロ流体ネットワークを通過させるための他のアプローチを調査した。

【0373】

各共通チャネルが、いずれの他の共通チャネルとも共有されない、それ専用の圧力源（複数可）を有することが望ましい。これは、何らかの理由によりネットワーク内に背圧の変動が存在する場合、流動を異なる共通チャネルに転向することが不可能であることを意味する。残念ながら、陽圧モードで動作している場合、この原理の観察は、各共通チャネルが、センサ、基質、および試料に1つずつの3つの専用ポンプを必要とし、複雑で、高費用な可能性のある工学的要件を有するシステムをもたらすことを意味するであろう。的確かつ優れた代替法は、吸引（陰圧）モードで動作する単一の専用ポンプを使用して、試薬を個別の共通チャネルに流すことである。これは、図49に示されるように、1つの共通チャネルに単一のポンプを要するだけである。吸気圧力によって駆動されるネットワークの層流の品質は、図44に示されるように一定であり、信頼性がある。最悪の場合、1つの共通チャネルまたはそこに繋がるマイクロ流体チャネルにおける遮断または部分的閉塞は、そのセンサチャネルにのみ影響を及ぼす。

【0374】

各共通マイクロ流体チャネルに（およびしたがって、各異なるセンサに）専用の圧力源を提供することの副次的利点は、それが、複数のセンサチャネルを、可能性として異なる流量で、および結果としては異なる速度と感度のバランスで、互いに独立して同時に操作することを可能にすることである（図50）。これは、例えば、多様な異なる検出限界および時間定数を得るために、2つ以上のチャネルが同じセンサを異なる流量で使用することを可能にする。別の選択肢は、異なるセンサを有する複数のチャネルを、各センサに関して最適化された異なる流量で操作することである。この極端な例は、GPCRに基づく揮発性センサおよびプロテアーゼセンサ等、完全に異なるセンサの種類を、同じかまたは異なる試料とともに、同じチップに平行して流し、2つの反応クラスの非常に異なる反応動態に関して流量を調整することであろう。本明細書に記載されるように、吸気ポンプを使用して、チップ上で異なる種類または希釈率の試料または基質化学的性質の使用を補助することも可能である。

【0375】

吸引モードの使用は、ネットワークの注入口側において単純な使い捨てカートリッジで試薬を提供するという概念と完全に適合する。カートリッジの交換は、同じ基本的なハードウェアを使用して、用途および標的の単純かつ迅速な切り替えを可能にするであろう。さらなる利点は、試料間、または検体検出後にポンプ注入デバイスを消毒する必要性が、吸引モードでは最小化されることである。

【0376】

発明者らは、実施例6からの好ましい光の収集および検出構成を、この実施例の好ましい吸引モードのポンプ注入および実施例2からのBRET²に基づくトロンピンセンサとともに組み込む、追加の実験を行った。この実験では、寸法が0.2 mm×0.035 mm×2.8 mmの蛇形共通チャネルを有する、単純なY型マイクロ流体ネットワークを使用した。BRET反応チャンバは、 $\theta = 2\text{ mm}$ および高さ1 mmであり、3.14 μL の容積であった。反応チャンバを、4つに分岐した光ファイバ束のうちの1つに入れ、そこから専用のダイクロイックフィルタおよび2つのPMTによる同時二重波長測定のために直径25.4 mm（1インチ）の光学ブロックに入れた。チップに緩衝液で前処理を行い、50 μL の入力レザーバーに、50 μL の1 μM GTTRトロンピンセンサおよび50 μL の12.5 μM セレンテラジン400 a基質を充填した。流動は、排出口で陰圧（吸引モード）を用いて、200 μL /時間=0.055 μL /秒の共通チャネル流量で開始した。これらの条件下では、BRET反応チャンバの滞留時間は、57秒であった。

【0377】

図51に示されるように、始動が完了した後、システムは、両方の光学チャンネルにおいて、優れたシグナル対ノイズ比で非常に強力なシグナルを生成した（図10aと比較して）。シグナルが生じる速度および直径2mmのチャンバのBRET反応チャンバ滞留時間に基づいて、300μmというチャンバの最低限の高さが、依然としてバックグラウンドよりも高い測定可能なシグナルをもたらすであろうと推定する（図51c）。指定の流量では、これは、およそ20秒の反応混合物集積時間に相当するであろう。4mmというチャンバの直径は、同じシグナル強度および反応混合物集積時間を維持しながら、チャンバの高さを75μmまで低減することができる可能性がある。

【0378】

実施例10—UHT乳のプラスミン腐敗を予測する予言的实施例を含む、飲料および他の流体への本発明の適用の実施例

背景

本発明は、水溶液に分かれる揮発性化学物質を含む、水または水溶液中に溶解する任意の検体に容易に適用可能である。牛乳、果汁、他の飲料、および血清を含む体液を含む、水性の液体中に既に存在する検体は、検体の測定前に、気体と液体の事前分離を必要としないため、検出に特に適している。

【0379】

この分野での用途の単純な例には、UHT乳の腐敗の予測が挙げられる。UHT処理によって殺滅された細菌からのプロテアーゼは、保管時に全乳UHT乳および脱脂UHT乳において、増加した粘度、ゲル化、および苦味をもたらし、それによって保存可能期間の短縮をもたらす得る。具体的には、UHT乳においてこれらの問題を引き起こすのは、プラスミンによるカゼインのタンパク質分解である。プロテアーゼの検出に広く使用されているアッセイは、低速であり、周囲温度で6〜9か月保管した後にUHT乳の腐敗をもたらす得る非常に低いレベルのプロテアーゼを検出するには感受性が不十分である。本発明は、UHT乳中のそのような非常に低いレベルのプラスミンを、優れた感度でリアルタイムで測定することができる。これは、商業環境でのインライン監視にも適用可能であろう。これにより、製品の保存可能期間の推定が可能になり、パッケージ化前の追加的処理のあらゆる必要性が特定されるであろう。トロンビンおよびカスパーゼプロテアーゼに関する以前のBRET²センサに基づいて、標的ペプチド配列、好ましくはリジン-X（X＝リジン、チロシン、バリン、またはグルタミン酸）をBRETドナーとアクセプターとの間のリンカーに組み込むことによって、牛乳中のプラスミン活性を検出するためのバイオセンサを構築することができた（図53）。このセンサは、本発明の農場および工場内での使用に好適な形態に組み込まれる。しかしながら、取り扱いが容易なそのようなセンサがなかったため、トロンビンを検出するものを含むいくつかの既存のセンサを使用して、牛乳中、または実際にはオレンジジュースおよび哺乳動物血清といった他の商業的もしくは医療的に重要な流体中のプロテアーゼを検出するために本方法を使用することの実行可能性を実証した。

【0380】

方法

一実験において、5μMセレンテラジンAとともにPBS中、または高脂肪な「Canberra Milk」ブランド牛乳、「Just Juice」再構成オレンジジュース、および哺乳動物の血液もしくは血清の種々の希釈物中に1/125（すなわち、0.5μM）希釈した、Dacres et al.（2012）によって記載のGFP²-FL₁-RLuc2構築物を使用した。

【0381】

別の実験では、発明者らは、RLucをRLuc2で置き換えた実施例1および2に記載のGTR-BRET²に基づくトロンビンセンサ（GFP²-RG-RLuc2（GTR2））、すなわち、5μMセレンテラジンAとともに、トロンビン切断緩衝液中、または牛乳、オレンジジュース、もしくは血清の種々の希釈物中に1/100（0.5μM

10

20

30

40

50

）希釈したDacres et al.（2012）によって記載の構築物を使用した。牛乳、オレンジジュース、または血清の種々の希釈物中でのGTR2のトロンビン切断は、試料を2単位の外因性トロンビンでスパイクして内因性プロテアーゼを刺激することによって評価した。血清は、哺乳動物のヘパリン化（250 IU/ml）血液試料から調製した。血清を調製するために、血液試料を室温で30分間放置し、次いで、15分間1,000～2,000×gで遠心分離した。上清を血清と称する。血清試料は、処理の間2～8℃で維持した。すべての実験は、マイクロウェルプレートにおいて100μLの最終体積で行われ、BRET²シグナルは、前述のようにPolarstar Optimaマイクロプレートリーダー（BMG Labtech）で読み取った。

【0382】

10

結果

GFP²-FL₁-RLuc2を使用した予備的結果は、BRET²化学が、PBSで1/10希釈した全乳およびオレンジジュースの水溶液環境で良好に機能することを示した（図54）。図55は、全乳におけるGFP²-FL₁-RLuc2のBRET²シグナルの時間依存性減衰を示す。

【0383】

GTR2を用いた結果は、BRET²化学がまた、トロンビン切断緩衝液中に1/10希釈した場合、血清において機能することを示す（図56および57）。生物発光活性は、トロンビンアッセイ緩衝液単独への再懸濁と比較して、トロンビンアッセイ緩衝液中の血清では1/500、オレンジでは1/50、および牛乳では1/10に希釈した場合、完全に回復した（図56）。BRET²比は、緩衝液中の1/1000希釈物を除き、すべての血清希釈物で緩衝液と比較して高かった（図57a）。オレンジジュースに再懸濁した場合、BRET²比は、緩衝液中に1/10希釈した場合、緩衝液単独と比較して高かったが、他のすべての希釈物で一定の値であった（図57b）。未希釈牛乳に再懸濁したGTR2のみが、他のすべての牛乳希釈物と比較して、緩衝液単独中に再懸濁した場合よりも高いBRET²比をもたらした（図57c）。

20

【0384】

トロンビン活性が、牛乳およびオレンジジュースの1/10希釈物中に検出された（図58）。血清では、緩衝液中の血清試料の1/100希釈物が、トロンビン活性をもたらした。トロンビン活性をもたらしたすべての希釈物が、トロンビンの添加なしの試料と比較して、BRET²比に有意な変化（P<0.0001）をもたらした。緩衝液中に1/1000希釈した血清、1/100希釈したオレンジジュース、および1/100希釈した牛乳におけるトロンビン活性は、トロンビン切断緩衝液において生成されたものとの有意差がない（P>0.25）BRET²シグナルの変化をもたらした。

30

【0385】

実施例11—濡壁サイクロンを用いた揮発物質の気液移動の実証

本発明の利点の1つは、揮発性の検体の検出に適用できることである。しかしながら、センサを、水溶液中に溶解または懸濁する必要があるため、揮発性の検体を、それらがセンサとの接触に利用可能となる前に、気相から水溶液中に分離させる必要がある。発明者らは、揮発性の化学物質を、本発明と適合性がある形式で空気から液体に移行させることの実行可能性を実証することを試みた。液体中の気体のバブリングまたはミスティングを含む、空気または標的ヘッドスペースを水性試料液と平衡するためにすぐに使用可能な多数の方法が存在する。しかしながら、発明者らは、好適な装置が市販利用可能であるため、濡壁サイクロンを選択してこの概念を実証した。

40

【0386】

初回試験のための実験的構成

初回試験は、SASS2400濡壁サイクロン（Research International）を使用して達成した。内部送風機は、40L/分で空気を吸い込み、それを1mLの水で平衡させる。蒸発を補うために、試料レベルを監視し、1300mLのレーザーから脱イオン水を補充する。

50

【0387】

試料化合物を、1. 7～2 mLのエッペンドルフ管に入れた。アルミニウム管の80 mm部分に孔を開け、SASS2400の注入ポートに管を載置した（図59と同様）。これらの試験のサンプリング時間は、送風機の始動および試料液の充填時間を含んだ。

【0388】

方法

各試験に対して2回の連続した実施を行い、総体積2 mLの試料を得た。試験は、窒素ならびにアセトアルデヒドおよびフェノールを散布することにより酸素除去した脱イオン水中への酸素の再吸収の時間動態に従って行った。酸素濃度を、酸素電極で測定した。SASS2400試料流体中の揮発物質の濃度を、液体またはガスクロマトグラフィーによって、標準物質と比較して推定した。

10

【0389】

結果

サンプラーの濡壁動作は、試料流体の大部分を試料空気流に曝露させ、これは、窒素散布した試料の再酸素化に非常に有効であった（図60）。この装置で測定され得る最も早い時点では、酸素による80%飽和が約7秒以内に達成され、このプロセスは、60秒未満で完了した。

【0390】

測定した最も早い時点で、フェノールがSASS2400試料中に検出され（図61）、60秒の最後のサンプリング時点まで、時間とともにおおそ線形様式で蓄積を続けた。

20

【0391】

このプロトコルを使用して、アセトアルデヒドで得られた結果は、サンプリング時間が長くなるにつれて濃度が減少し、信頼できないものであった。発明者らは、これが、アセトアルデヒドの高い揮発性、および試料レザーバーから急速に脱気する傾向によるものと考えた。

【0392】

改良した装置構成

早い時点での実験の時間分解能を改善するために、発明者らは、SASS2400の送風機が適切な速度となり、試料チャンバが充填された後（これには最大約12秒、通常は約9秒かかる）、入力気流の急速な方向転換ができるように、装置を改良した。

30

【0393】

SASS2400の送風機は、デバイスの周囲から空気を吸い込むように設計される。狭いかまたは必要以上の長さの配管を通る空気流を制限することは、設計された40 L/分の空気流に影響を及ぼし得、空気路の切り替えは、サンプリング時間が一定となるように迅速である必要がある（図63）。ソレノイド弁またはバタフライ弁は、空気流に対するそれらの影響のため、理想的ではないとみなした。3方向L型ポートの空気圧で動作するボール弁（BLS3L6B）を選択して、空気取り込みを、室内空気から室内空気に加えて揮発性標本へと、急速に切り替えることを可能にした（図60）。弁を、空気流の狭窄を最小限にするために1インチのBSP取付具で接続し、これは、3方向弁であるため、必要とされる追加の配管が最小限であり、弁をSASS2400の空気注入口のすぐ近くに載置することができた。弁を、6バールの空気供給部に接続された複動式ソレノイドおよび12ソレノイド（ENS1275）によって駆動させた。

40

【0394】

マイクロコントローラ回路により、ソレノイド弁の動作を制御した。動作時間は、プログラム可能であり、15秒に設定した。SASS2400にはマイクロコントローラの同期に利用可能なデジタル出力がなく、そのためSASS2400の試験サイクルの開始時に作動される手動の押しボタンによってトリガした。3方向弁の応答は、1秒未満であった。

【0395】

50

すべての試験は、揮発性試料の性質のため、排気フードにおいて行った。SASS2400に吸い込まれる標本の濃度は排気フードにおける任意の空気流変化により多様であり得たため、標本を3方向弁の注入口の付近に単純に設置することは不可能であった。1+1/4インチのpvcタケノコ継手(barb fitting)を、ソレノイドの標本注入口側に取り付けた(図62)。2mlのセーフロック円錐管を載置するための孔を、PVC継手の下側にソレノイドから最も遠い端部から20mm内側に開けた。この地点での空気流は、SASS2400の送風機のため40L/秒で一定しているはずである。試験する標本を、蓋を取った1.7~2mlのセーフロック円錐管に入れた。円錐管は、各試験の開始時に上部縁まで充填した。一定の表面積を空気流に曝露することにより、各試験サイクル内で蒸発速度が確実に一定となるはずである。

10

【0396】

改良した試験手順

すべての実験は、排気フードにおいて行った。ガウン、手袋、靴カバー、およびフルフェイスマスクを含む、個人保護装置を使用した。

【0397】

電源を入れ、コンピュータ接続を確立した後、SASS2400を、20秒間試料曝露なしで室内空気のみを取り込んで実行するように設定して、システムを洗浄した。ソレノイドおよび弁は、この段階では作動していなかった。ソレノイドおよびその制御回路の電源を入れ、ソレノイド弁の複数の動作を実行させて、気圧が確実に弁の迅速な動作に適したものとなるようにした。

20

【0398】

SASSは、試験実行の期間がプログラムされていた。これは、サンプリングに加えてさらに15秒間の初回送風機始動に所望される曝露時間であり、その間に、3方向空気取り込み弁を、標本から離して切り替えた。

【0399】

清浄な8mLの試料瓶を、サンプラーの手前の収集位置に設置した。0.6mLの脱イオン水を、試験後の試料を取る準備ができた新しい2mlの試料バイアルに入れた。温度、湿度、および気圧を記録した。

【0400】

清浄な2mLのセーフロック管から蓋を取り除いた。フェノール標本を、セーフロック管に入れ、それを可能な限り縁部の近くまで充填した後、管を載置穴に入れた。液体標本については、管をその載置部に入れ、次いで、標本を充填した。液体が標本管の縁部まで充填されることを確実にし、その結果一定な液体の表面領域が空気流に曝露されるように、注意を払った。

30

【0401】

SASS2400およびソレノイドの遅延トリガを、同時に作動させた。15秒後に、標本をSASS2400の空気取り込みに切り替えた。サンプリング時間の最後に、送風機の電源を切り、試料を、20秒間SASS2400の手前の8mlの収集瓶にポンプで入れて、試料のすべてが試料瓶に移動したことを確実にした。

【0402】

各試験サイクルの終了時に、SASS2400を、20秒間内部蠕動ポンプを起動して1mLの試験試料をSASS2400の前に取り付けられた8ml瓶に移動させるようにプログラムした。0.8mLの試料を、収集瓶から分析バイアルに移し、さらに0.6mLの脱イオン水を使用してバイアルを充填した後、それを密封して分析に送った。試験は、5秒~600秒のサンプリング時間で、アセトアルデヒドおよびフェノールについて行い、クロマトグラフィー分析に送った。

40

【0403】

新しい手順を使用した結果

$\theta = 6\text{ mm}$ の表面積で 1グラムのフェノール試料に15秒間だけ曝露した後、SASS2400試料中の平均フェノール濃度は、 $7.7\text{ }\mu\text{g/mL}$ (すなわち、8ppm

50

w/v)であった。フェノールは、20℃で蒸気圧 $=0.474 \times 10^{-4}$ 大気を有する高度に揮発性の化合物の例である。たった数秒曝露した後ですら、試料バイアル中のアセトアルデヒドは、オフスケール(すなわち、 $>> \text{mg/L}$)となり、アセトアルデヒドの水への非常に急速な分離を示す。これらの揮発性有機化合物の急速な取り込みおよび平衡は、オンチップマイクロ流体検出の前の濡壁サイクロンの気体-液体移動モジュールとしての実行可能性を示す。

【0404】

実施例12-開発した追加のGPCR揮発性センサ

発明者らは、RLucまたはRLuc2およびGFP²ドメインを、線虫由来のodr-10ジアセチル受容体の配列に挿入することによるBRET²に基づくジアセチルセンサの構築について既に説明した。このセンサを、出芽酵母において発現させ、粗製膜懸濁液を調製し、プレートに基づくアッセイにおいて、また上述の実施例3に記載のマイクロ流体形式においても、ジアセチルに対する鋭敏な感度および選択性で応答することを実証した。しかしながら、記載のように、本発明の利点の1つは、複数のマイクロ流体センサチャンネルを、複数の個々の検体を検出するために、適切なセンサ選択により、同時に操作して、複合試料の化学的特徴を得ることができることである。これを可能にするためには、異なる特異性を有する多数の適合可能な揮発性センサを誘導することが必要である。発明者らは、したがって、新規なBRET²に基づくセンサの設計の開始点として、線虫由来の5つの追加の推定上の化学受容体cDNAを選択した。発明者らはまた、天然の配列からは容易に利用可能でない新規なリガンド特異性を有する可能性のある、天然の受容体の合成分子ハイブリッドであるセンサを誘導することの実行可能性を実証するために、str-113およびstr-114のキメラを構築した。

【0405】

SGSRは、それぞれ、3つ目の細胞内ループおよびC末端にBRET²のタグであるGFP²およびRLucまたはRLuc2を用いた、線虫str-112、str-113、str-114、str-115、str-116、およびstr-114/113のキメラである。STRタンパク質の3つ目の細胞内ループの位置を、「The Biology Workbench」(膜貫通セグメントの予測のためのウェブを基盤とするツール<http://seqtool.sdsc.edu>)からのアルゴリズム「TMAP」を使用して予測した。これらを、SGSR-112、SGSR-113、SGSR-114/113、SGSR-114、SGSR-115、およびSGSR-116と命名した。

【0406】

BRET²タグ化線虫str嗅覚受容体の設計および構築の方法。

化学的に合成したSGSR-112以外は、SGSR発現カセットを設計し、複数の制限部位に関連する遺伝子特異的PCRプライマーに導入することによって作製した。それらの部位を含有するPCR産物を、TOPO PCRベクター(Invitrogen)にクローニングし、次いで、対応する制限酵素(RE)で消化させ、発現カセットにライゲーションした。それらがカセットによって使用される1つ以上のRE部位を有した場合、特定の遺伝子に適合するようにいくつかの改変を行った。

【0407】

strフラグメント1のRE部位は、NcoI(5')およびBspEI(3')であり、GFP²ではBspEIおよびSalIであり、strフラグメント2では、EcoRIがstr-116フラグメント2を切断するためSalIおよびKpnI/EcoRIであり、ウミシイタケルシフェラーゼではKpnI/EcoRIおよびNotIであった。

【0408】

SGSR-114/113キメラは、線虫SGSR-113を修飾することによって構築した(str-113の第1のフラグメントである113-1を、カセットにおいて制限部位NcoIおよびBspEIを用いて、対応するフラグメントstr-114、st

r-114-1と置き換えることによって)。Str114-1は、その最初の240個のアミノ酸に対応する、最初の720個のstr-114ヌクレオチドを含有し、5'末端にNcoIおよび3'末端にBspEIの制限部位を組み込むプライマーを使用する忠実性の高いPCRによって増幅した。

【0409】

すべての構築物は、制限消化およびDNAシーケンシングによりエラーがないことを確認した。

【0410】

GFP² Rluc標識化したSGSR-112、SGSR-113、SGSR-114、SGSR-115、SGSR-116、およびSGSR-114/113受容体のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号13~18として提供し、一方に対応するオープンリーディングフレームは、それぞれ、配列番号19~24として提供する。

10

【0411】

追加の6つのセンサによる結果。

すべてのSGSR酵母膜調製物は、15℃で72時間ガラクトースを誘導した後に強力なGFP²およびBRET²シグナルを有し、そのすべてが、LB培地単独と比較して、OP50大腸菌（線虫の食料供給源）で調整した培地に曝露した際、BRET²に変化を示した。発明者らは、多数の特異的揮発性物質（1-ヘキサノール、1-ブタノール、ブタン-2、3-ジオン、3-ヒドロキシブタノン、2-ペンタノン、および2-ノアノンを含む）を、LBで成長するOP50細菌のヘッドスペースのGC-MS分析に基づくさらなる試験に選択した。揮発性リガンドである2-ペンタノンの試験は、これらのセンサのうちの3つ、SGSR-112、SGSR-113、およびSGSR-114/113に陽性であった（図64）。非修飾親GPCRを用いた研究に基づく事前のリガンドの情報なしに、揮発性リガンドが（または実際にはどのようなリガンドでも）、BRETに基づくGPCRセンサに対して特定されたのは、これが初めてである。これは、一般的には受容体を、また具体的には線虫の化学受容体を、脱オーファン化するためのBRETシステムの有用性の証明である。

20

【0412】

濃度-応答特性（図65）は、EC₅₀がピコモル範囲にある可能性が高いことを示す。これにより、新規な揮発性センサの設計、脱オーファン化、および特徴付けのプロセスの実施を低減させるだけでなく、少なくともSGSR-112の場合には、親の天然の受容体を脱オーファン化させる実行可能な方法も実証し、ほぼ20年間で初めてこれが達成された。

30

【0413】

BRET²タグ化SGSR-114/113およびSGSR-113センサは、アルコールおよびケトンを含む広範囲の揮発性リガンドに応答した（図64）。発明者らは、SGSR-114/113には6つの揮発性リガンドを特定し、SGSR-113には4つを特定した。2-ペンタノンに対するSGSR-112の応答は、 1.5×10^{-10} M（1.3 ppt）のEC₅₀で、 1×10^{-14} M~ 1×10^{-5} Mの9対数単位にわたって線形であった（図65）。この広い濃度依存性は、これもまた9対数単位にわたり直線であり、また全生物の応答であった、BRET²タグ化ODR-10と一致する。

40

【0414】

発明者らは、そのリガンドの2つである2-ペンタノンおよびジアセチルに対するSGSR-114/113の感受性、ならびに1-ヘキサノールに対するSGSR-113の感受性をインビトロで定量化した（図66）。BRET²タグ化Str114/113受容体は、1000兆分の1（pM未満）のレベルのジアセチルおよび10億分の1（nM）のレベルの2-ペンタノンを検出することができ、Str-113受容体は、10億分の1（nM）のレベルの1-ヘキサノールを検出することができる。これらは、本発明での使用に有用な準広範なセンサであろう。

【0415】

50

R L u c 2を有するB R E T² タグ化線虫嗅覚受容体の構築

プレートに基づくアッセイで達成した5つの追加の天然および1つのキメラB R E T² タグ化センサの脱オーファン化に続いて、発明者らは、それらのそれぞれに、R L u c 2突然変異を組み込んだ。これは、上述のように、R L u c 2がより明るく、したがってマイクロ流体規模での実際の使用に必須であることが示されていたため、必要であった。

【0416】

B R E T² 構成成分を、線虫嗅覚受容体の3つ目の細胞内ループ(I C 3)およびC末端に、タンパク質のI C 3には緑色蛍光タンパク質G F P²、およびC末端にはウミシイタケルシフェラーゼR L u cとともに、挿入した。部位特異的突然変異生成を用いて、R L u c 2突然変異を、p Y E S - D E S T - 5 2 B R E T² タグ化嗅覚受容体配列に導入した。プライマー1および2(表3)を使用して、突然変異C 1 2 4 Aを導入し、プライマー対3および4を使用して、M 1 8 5 V突然変異を導入した。R L u c 2突然変異を、O G O R、S t r - 1 1 2、S t r - 1 1 3、S t r - 1 1 4、S t r - 1 1 4 / 1 1 3、S t r - 1 1 5、およびS t r - 1 1 6、ならびにジアセチルに対する不応答性が以前に既に示されている、S e n g u p t a e t a l. (1996)によって特定された元のo d r - 1 0突然変異(H 1 1 0 Y)を含有する、O G O R突然変異体と称される追加のモデル受容体に基づくセンサのすべてに導入した。

10

【0417】

G F P² R l u c 2 標識化O G O R、O G O R突然変異体、S G S R - 1 1 2、S G S R - 1 1 3、S G S R - 1 1 4、S G S R - 1 1 4 / 1 1 3 S G S R - 1 1 5、およびS G S R - 1 1 6、および受容体のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号25~32として提供し、一方で対応するオープンリーディングフレームは、それぞれ配列番号33~40として提供する。

20

【0418】

当業者であれば、多数の変化形および／または修正が、広く記載される本発明の精神または範囲から逸脱することなく、特定の実施形態に示される本発明になされてもよいことを理解するであろう。本実施形態は、したがって、あらゆる点で例示として見なされ、制限として見なされるものではない。

【0419】

本出願は、2012年4月16日に出願されたU S 6 1 / 6 2 4, 8 9 9号、2013年4月12日に出願されたA U 2 0 1 3 2 0 4 3 3 2号の優先権を主張し、これらのいずれの全内容も、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0420】

本明細書に記載および／または参照されるすべての出版物は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0421】

本明細書に含まれている文書、法令、材料、デバイス、品目等に関するいずれの論議も、単に本発明の内容を提供するためのものである。これらの内容のいずれかまたはすべてが、従来技術の基盤の一部をなすこと、または本出願の各特許請求の範囲の優先日より前に存在していたとして本発明に関する分野における一般的知識であったという承認として捉えられるべきではない。

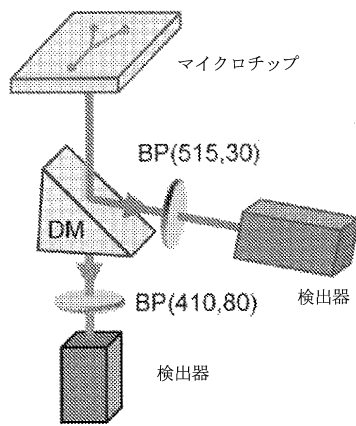
40

[参考文献]

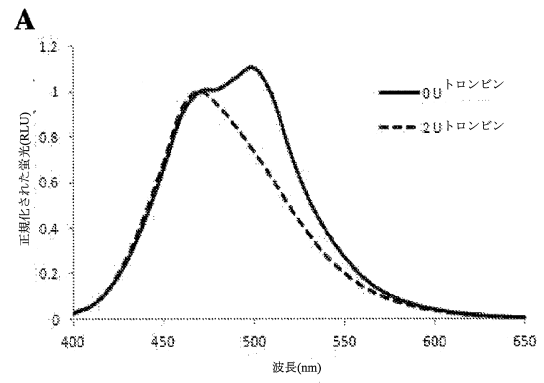
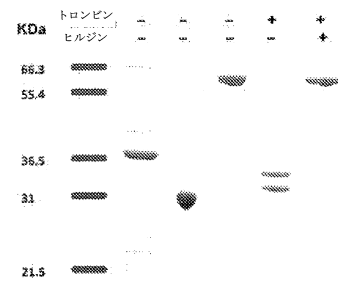
- Aloni et al. (2006) *Genome Biol.* 7:R88.
- Buck and Axel *Cell* (1991) 65:175-187.
- Dacres et al. (2009a) *Anal. Biochem.* 385:194-202.
- Dacres et al. (2009b) *Biosensors and Bioelectronics* 24:1164-1170.
- Dacres et al. (2010) *Anal. Chem.* 82:432-435.
- Dacres et al. (2011) *Biosens. Bioelectron* 29:119-124.
- Dacres et al. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:625-629. 10
- Day et al. (2004) *Luminescence* 19:8-20.
- De et al. (2007) *Cancer Res.* 67:7175-7183.
- De et al. (2009) *FASEB Journal* 23:2702-2709.
- de Wet et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 2987:725-737.
- Doty (2012) *Gustation. Wiley Interdisciplinary Reviews - Cognitive Science*, 3:29-46.
- Esch et al. (2011) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13:55-72.
- Fang et al. (2005) *Anal. Chem.* 77:6528-6534.
- Fehr et al. (2002) *PNAS* 99:9846-9851. 20
- Feldmesser et al. (2006) *BMC Genomics*. 7:121.
- Fredriksson and Schioth (2005) *Mol. Pharmacol*, 67, 1414-1425.
- Frishman and Argos (1997) *Proteins* 27:329-335.
- Fuchs et al. (2001) *Human Genetics* 108:1-13.
- Gill and von Hippel (1989) *Anal. Biochem.* 182:319-326.
- Glusman et al. (2000a) *Mammalian Genome* 11:1016-1023
- Glusman et al. (2000b) *Genomics* 63:227-245.
- Glusman et al. (2001) *Genome Res.* 11:685-702.
- Godin et al. (2008) *J. Biophotonics* 1:355-376. 30
- Greer and Szalay (2002) *Luminescence* 17:43-74.
- Hall et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:17610-17614.
- Hastings (1996) *Gene* 173:5-11.
- Hofmann and Stoffel (1993) *Biol. Chem.* 374:166.
- Holden and Cremer (2005) *Annu. Rev. Phys. Chem.* 56:369-387.
- Hushpulian et al. (2007) *Biotransformation* 25:2-4.
- Inouye et al. (1997) *Biochem. J.* 233:349-353.
- Klein et al. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 787:221-226
- Lander et al. (2001) *Nature* 409:860-921. 40
- Li and Lin (2008) *Anal Bioanl. Chem.* 555-567.
- Loening et al. (2006) *Protein Eng. Des. Sel.* 19:391-400.

- Loening et al. (2007) *Nature Methods* 4:641–643.
- Lorenz et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4438–4442.
- Mark et al. (2010) *Chem. Soc. Rev.* 39:1153–1182.
- Medintz et al. (2006) *Curr. Opin. Biotech.* 17:17–27.
- Mohammed and Desmulliez (2011) *Lab. Chip.* 11:569–595.
- Morin and Hastings (1971) *J. Cell. Physiol.* 77:313–318.
- Nimura and Nei (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12235–12240. 10
- Noh et al. (2011) *Top. Curr. Chem.* 304:117–52.
- Olender et al. (2004a) *Genet Mol Res.* 3:545–53.
- Olender et al. (2004b) *Genomics*. 83:361–72.
- Park et al. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388:560–564.
- Persson and Argos (1994) *J. Mol. Biol.* 237:182–192.
- Pflegger and Eidne (2006) *Nature Methods* 3:165–174.
- Pilpel and Lancet (1999) *Protein Science* 8:969–77.
- Robertson (1998) *Genome Research* 8:449–463. 20
- Robertson (2001) *Chem Senses* 26:151–159.
- Sengupta et al. (1996) *Cell* 84:899–909.
- Sharff et al. (1992) *Biochemistry* 31:10657–10663.
- Sharff et al. (1993) *Biochemistry* 32:10553–10559.
- Sharon et al. (1998) *Ann N Y Acad Sci.* 30;855:182–93
- Spurlino et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:5202–5219.
- Theberge et al. (2010) *Angew. Chem Int. Ed* 49:5846–5868.
- Tsien (1998) *Ann. Rev. Biochem.* 63:509–544.
- Unger et al. (2000) *Science* 288:113–116. 30
- Verhaegen et al. (2002) *Anal. Chem.* 74:4378–4385
- Viviani (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1833–1850.
- von Heijne (1992) *J. Mol. Biol.* 225:487–494.
- Xu et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:151–156.
- Yeo et al. (2011) *Small* 1:12–48.
- Young et al. (2002) *J. Human Mol. Genet.* 11:535–4.
- Zhang and Firestein (2002) *Nat. Neurosci.* 5:81.
- Zozulya et al. (2001) *Genome Biol.* 2:0018. 1–0018. 12.

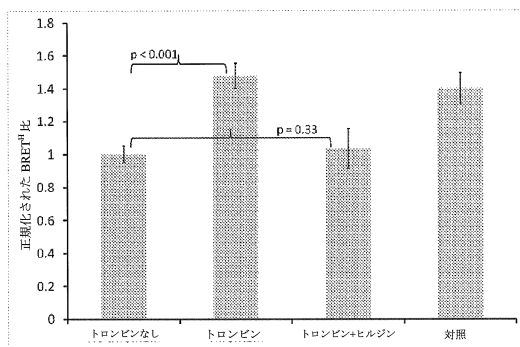
【図 1】



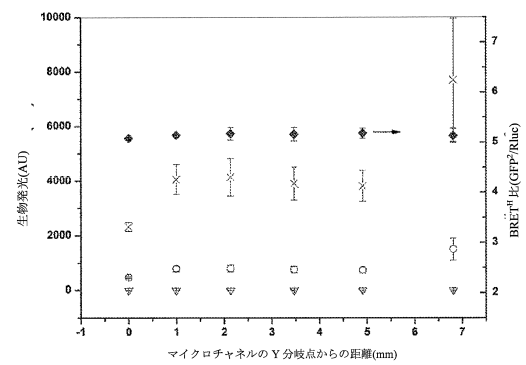
【図 2】

**B**

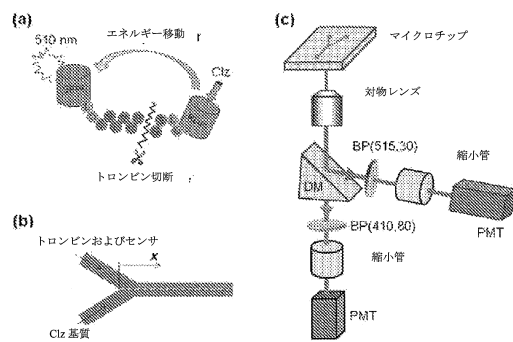
【図 3】



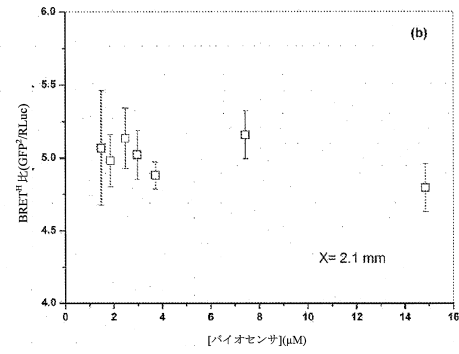
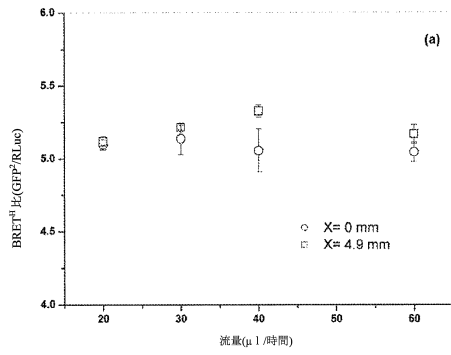
【図 5】



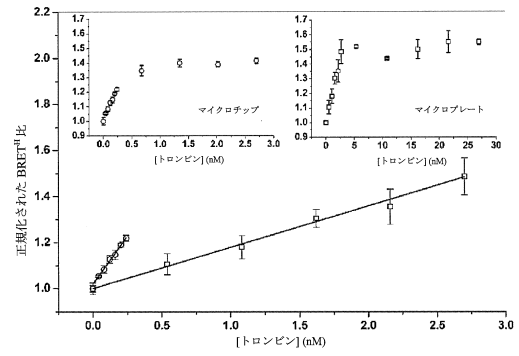
【図 4】



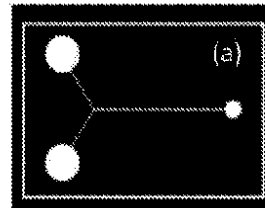
【図 6】



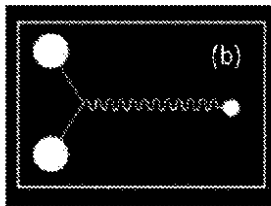
【図 7】



【図 8 (a)】



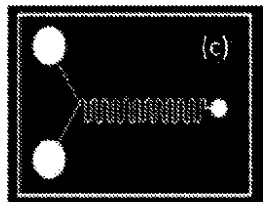
【図 8 (b)】



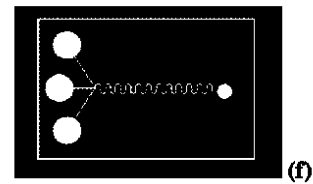
【図 8 (e)】



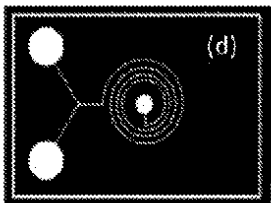
【図 8 (c)】



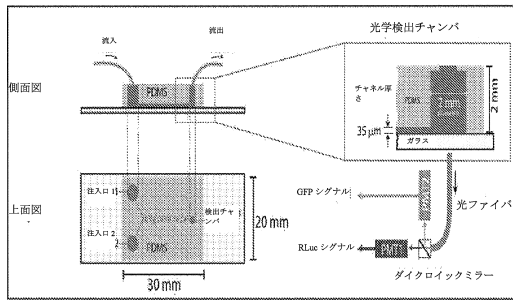
【図 8 (f)】



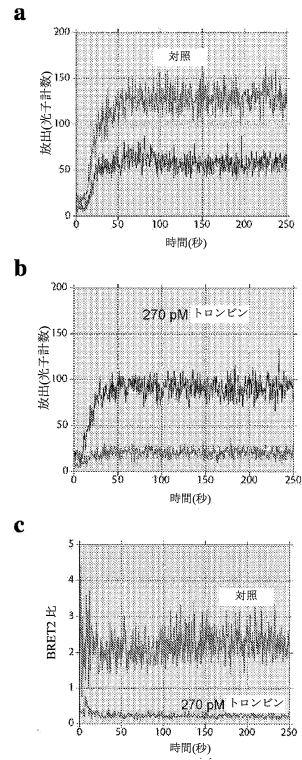
【図 8 (d)】



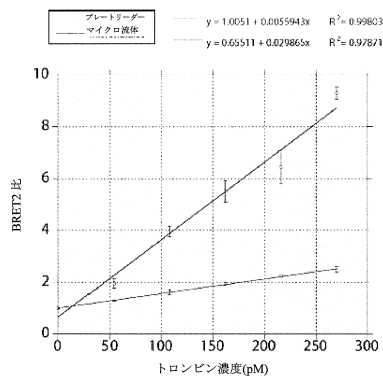
【図 9】



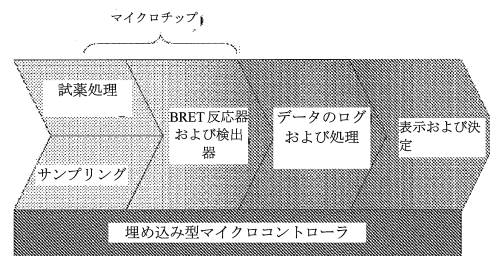
【図 10】



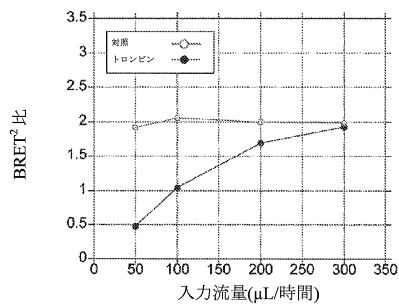
【図 11】



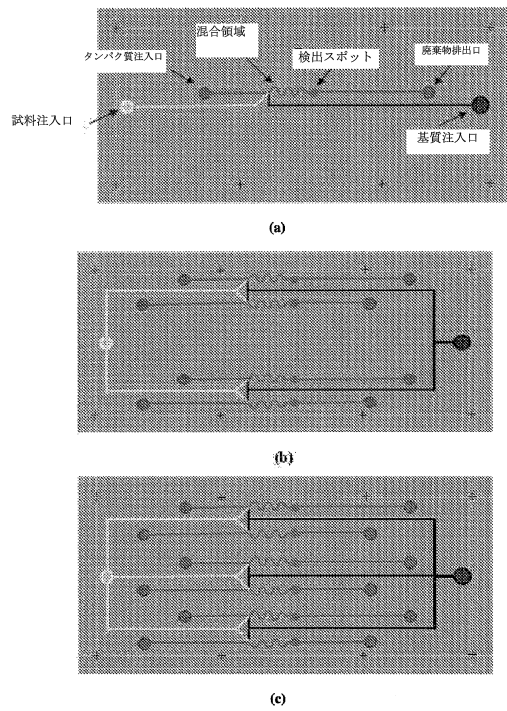
【図 13】



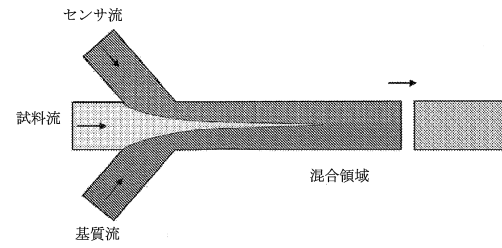
【図 12】



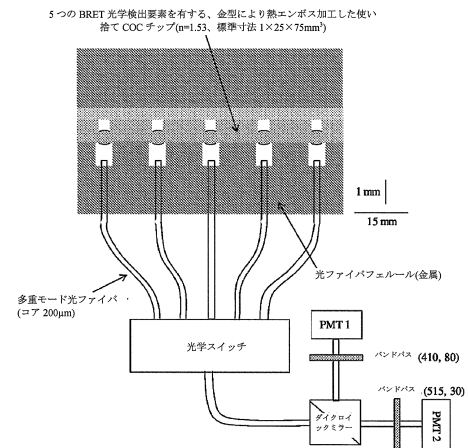
【図 14】



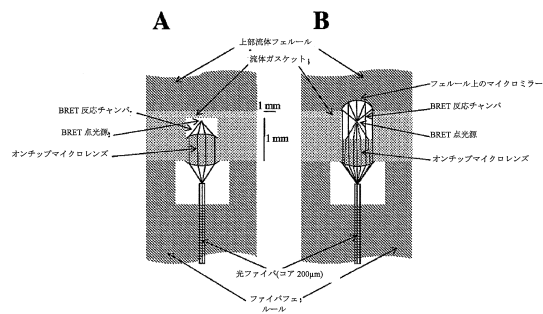
【図 15】



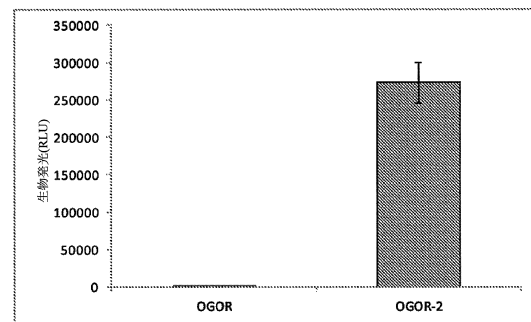
【図 16】



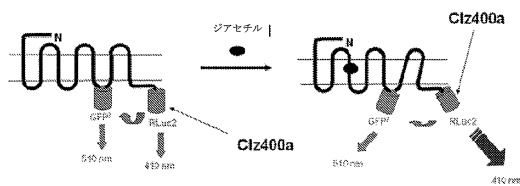
【図 17】



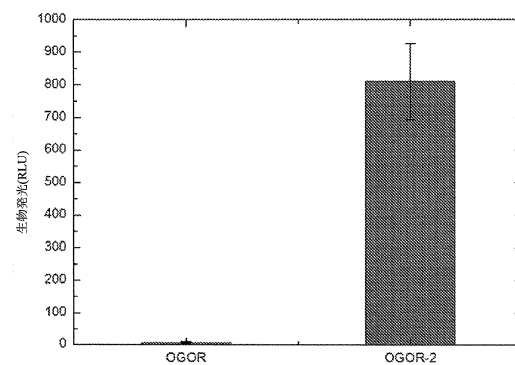
【図 19】



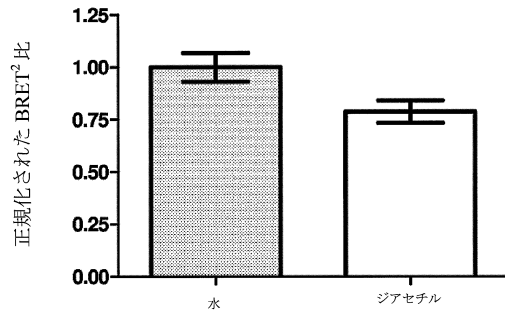
【図 18】



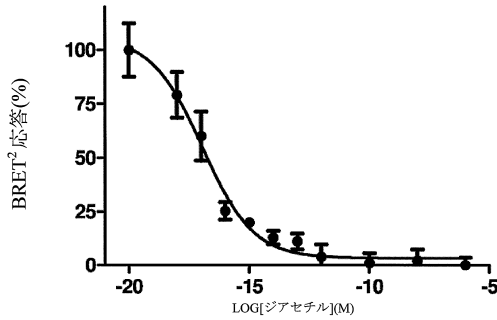
【図 20】



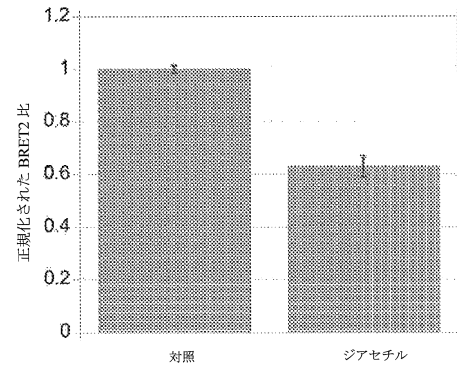
【図 2 1】



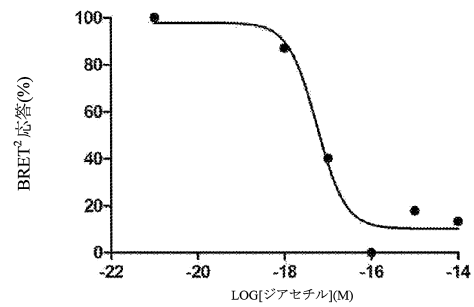
【図 2 2】



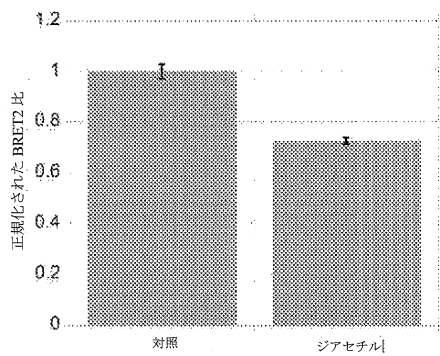
【図 2 3】



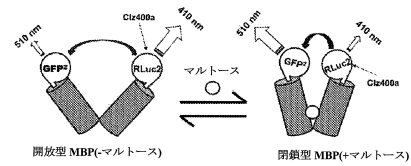
【図 2 4】



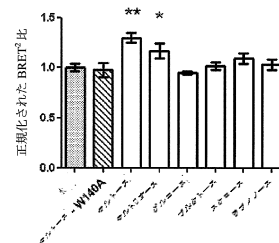
【図 2 5】



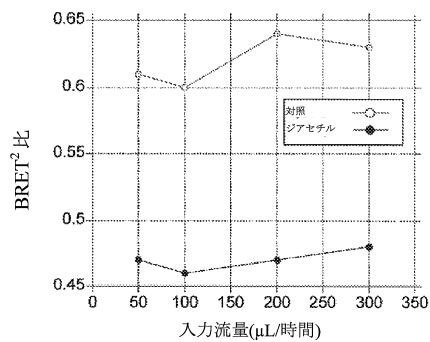
【図 2 7】



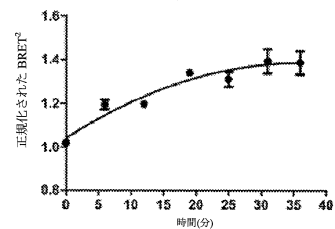
【図 2 8】



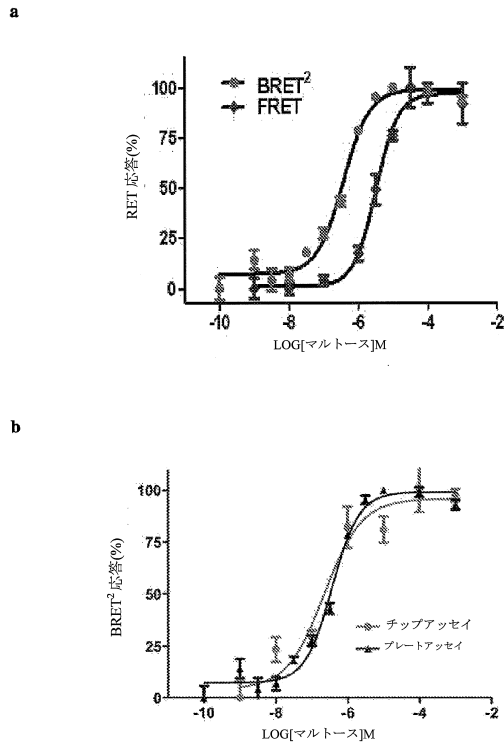
【図 2 6】



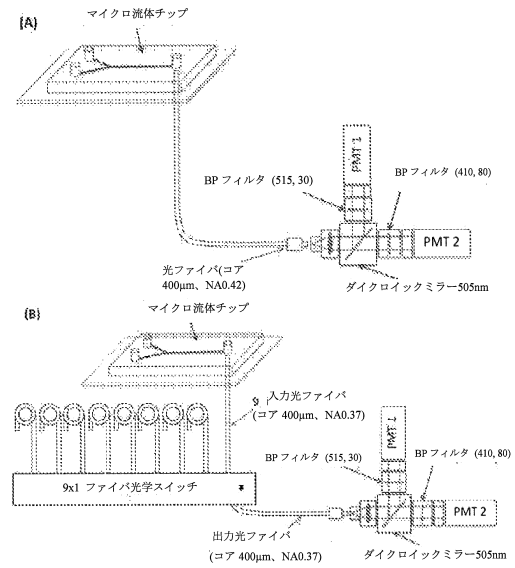
【図 2 9】



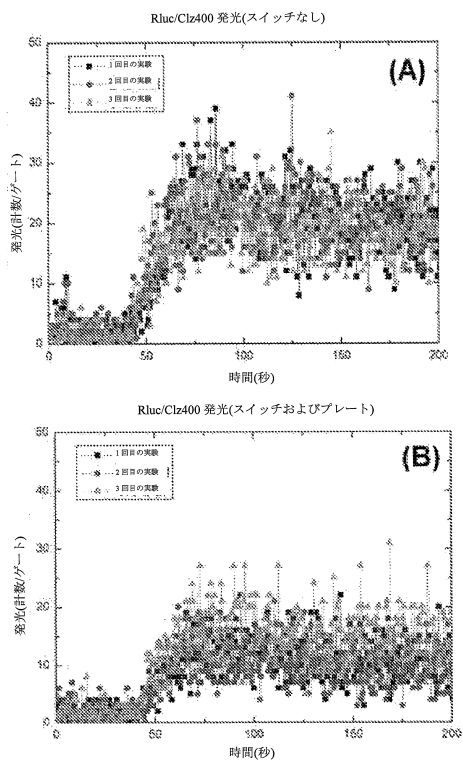
【図 30】



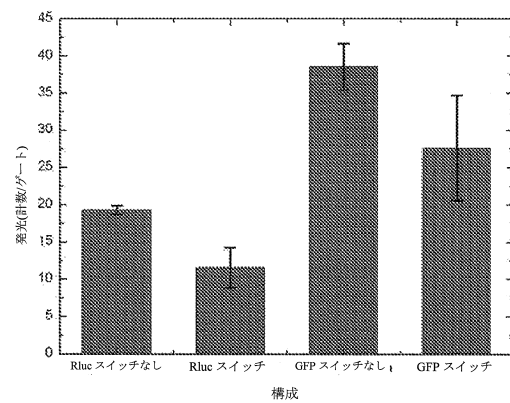
【図 31】



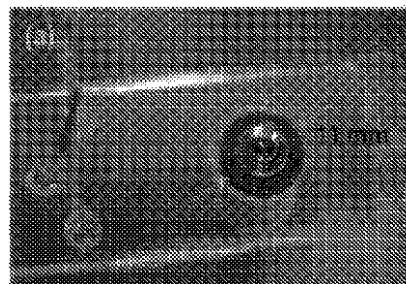
【図 32】



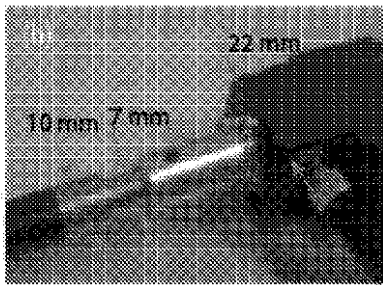
【図 33】



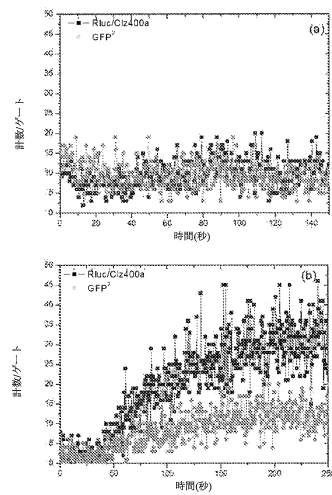
【図 34 (a)】



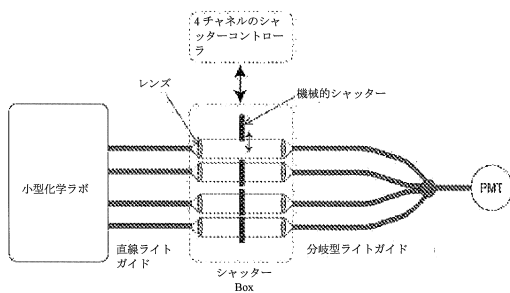
【図 3 4 (b)】



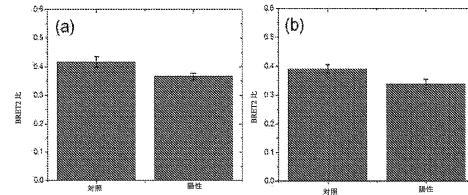
【図 3 5】



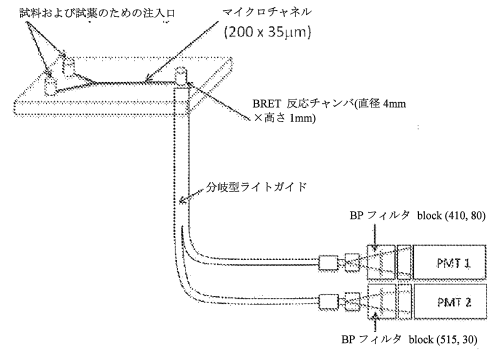
【図 3 8】



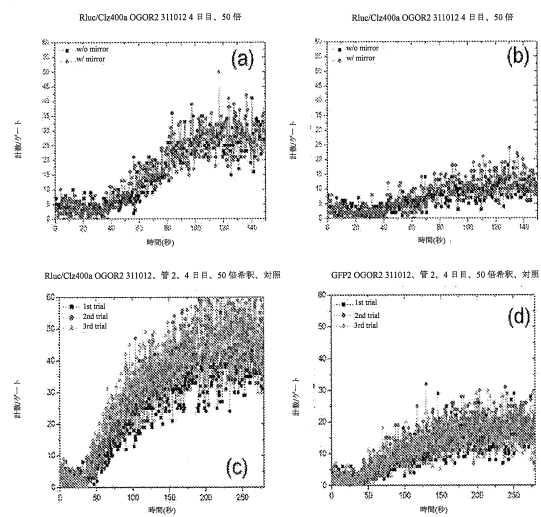
【図 3 6】



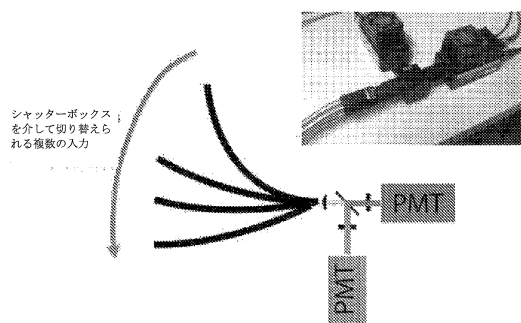
【図 3 7】



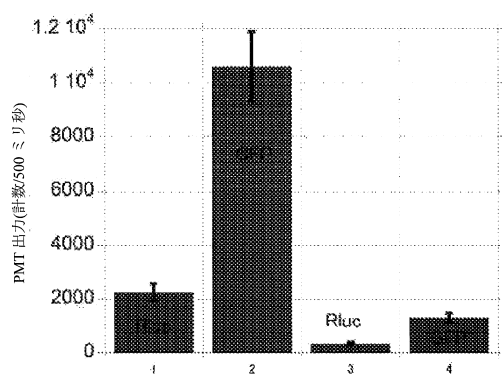
【図 3 9】



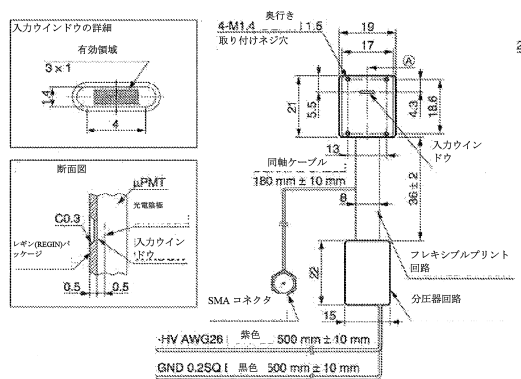
【図 40】



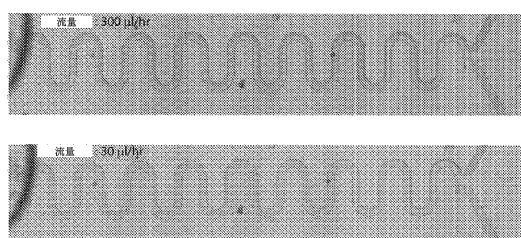
【図 4 1】



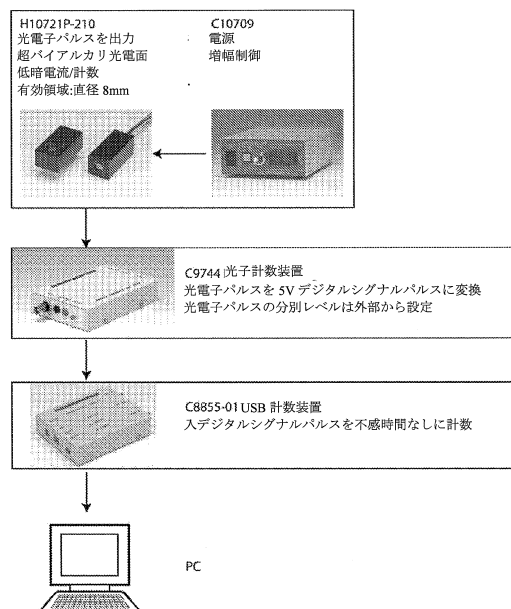
【图 4 3】



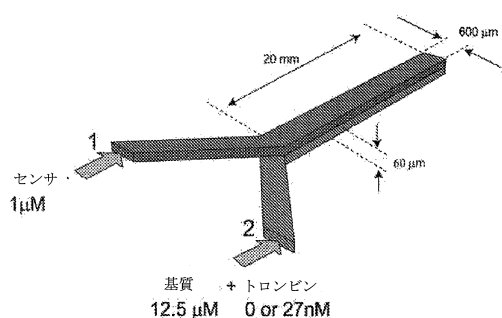
【図 4 4】



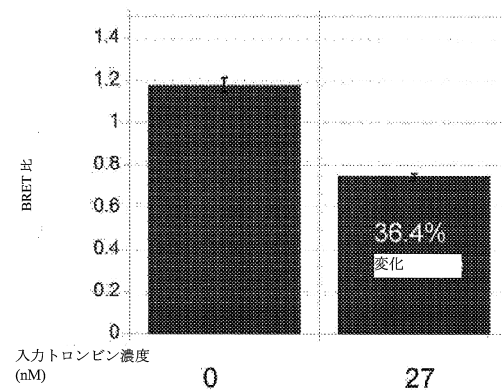
【図 4 2】



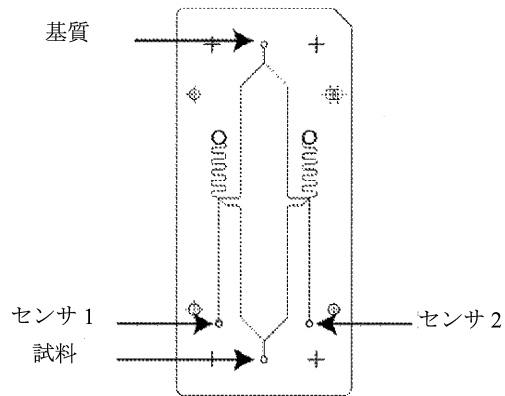
【図 4 5】



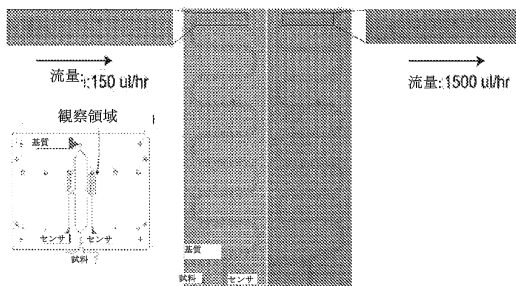
【图 4 6】



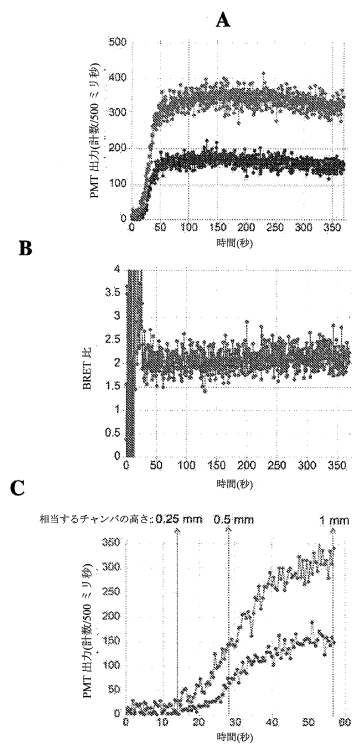
【図 4 7】



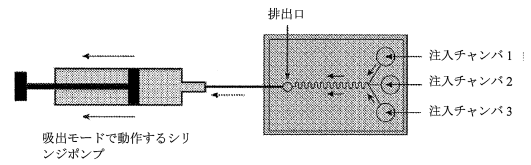
【図 4 8】



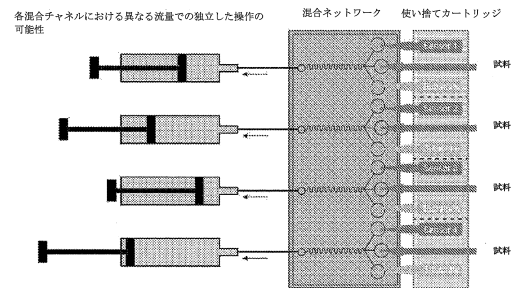
【図 5 1】



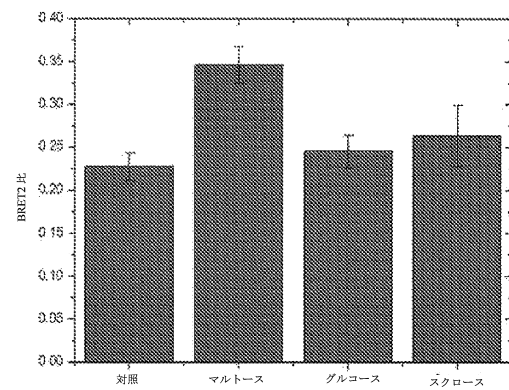
【図 4 9】



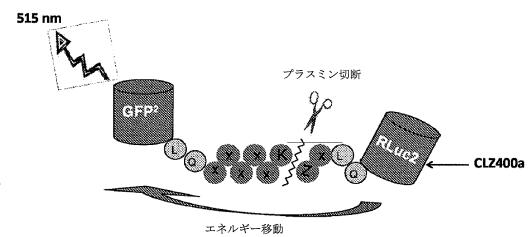
【図 5 0】



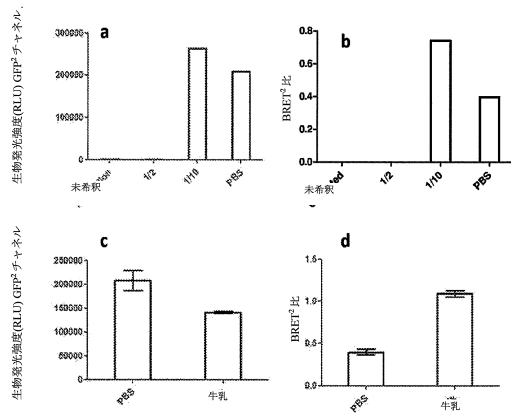
【図 5 2】



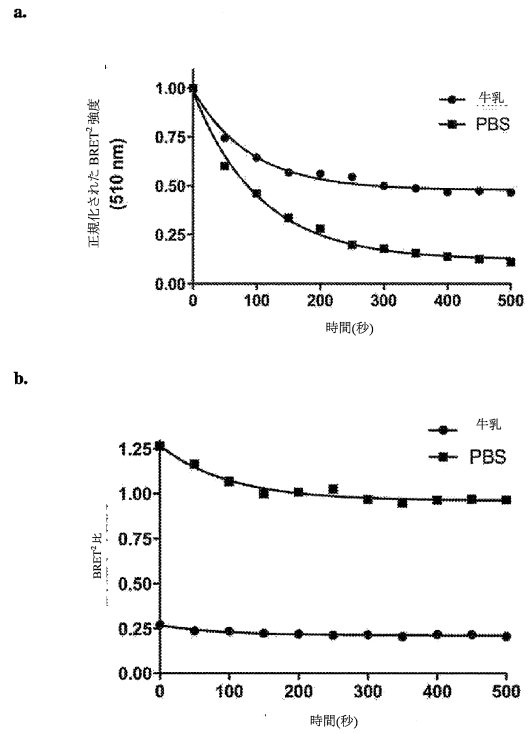
【図 5 3】



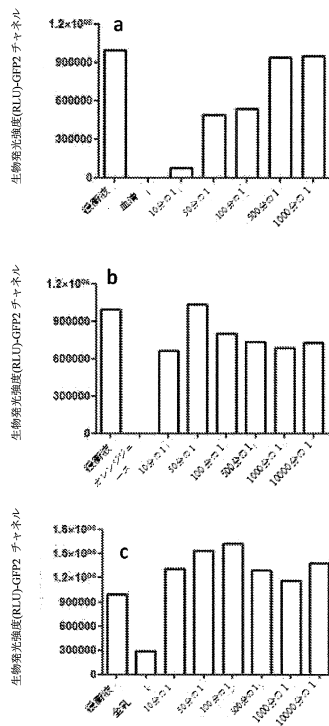
【図 5 4】



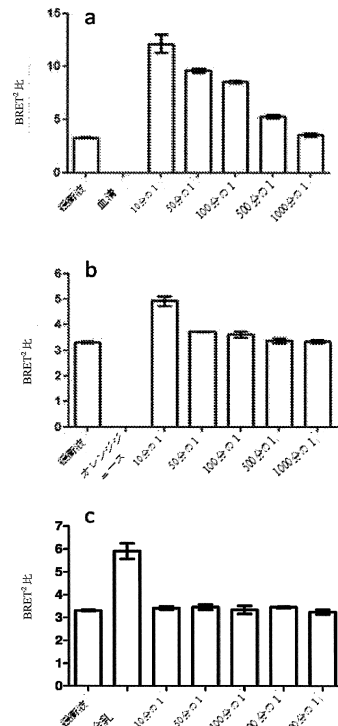
【図 5 5】



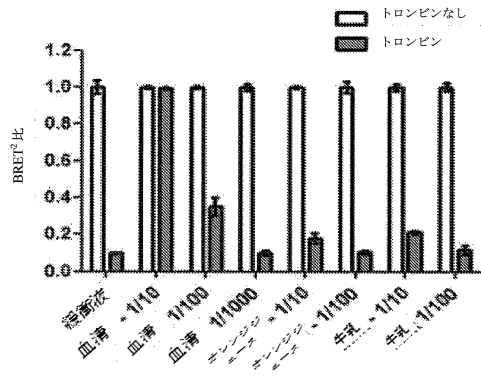
【図 5 6】



【図 5 7】



【図 5 8】



【図 5 9】

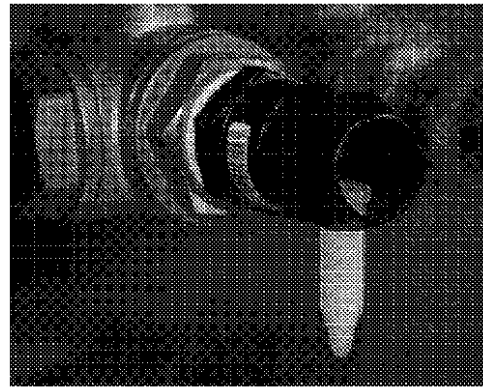
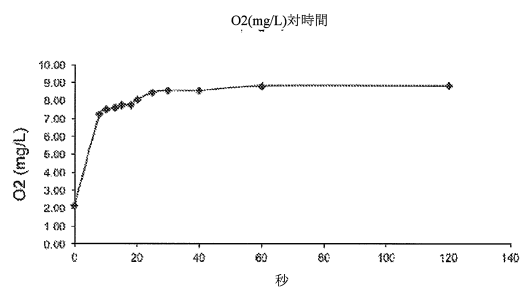
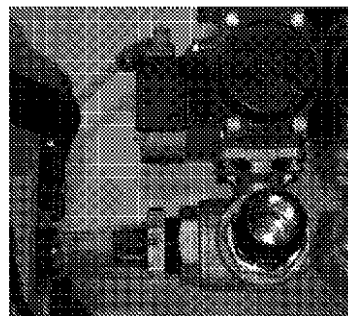


Figure 59

【図 6 0】



【図 6 2】



【図 6 1】

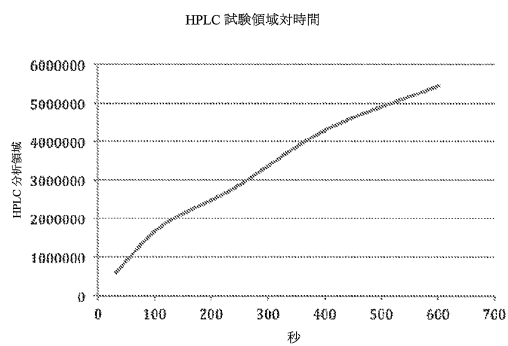
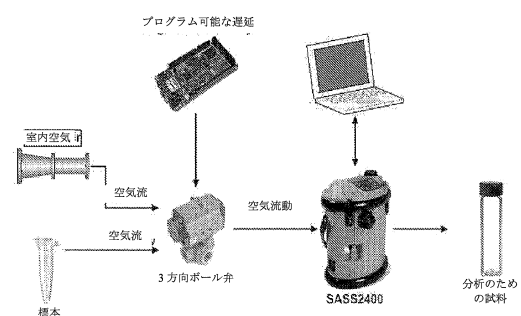
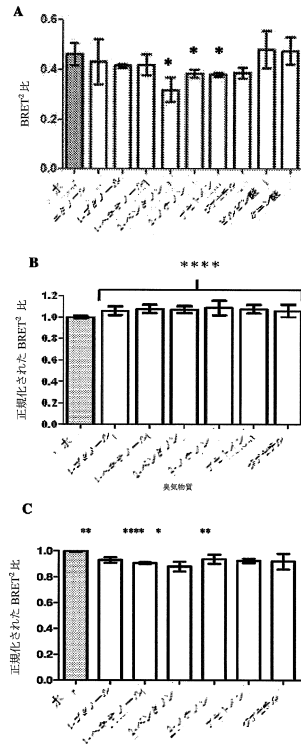


Figure 62

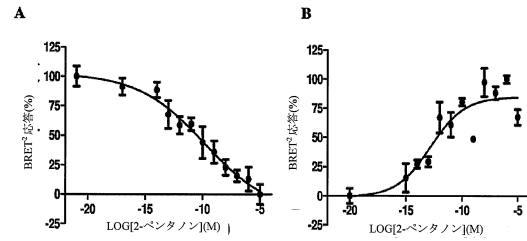
【図 6 3】



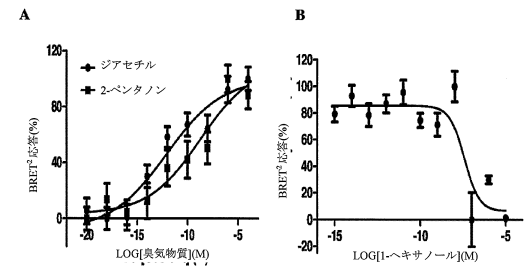
【図 6 4】



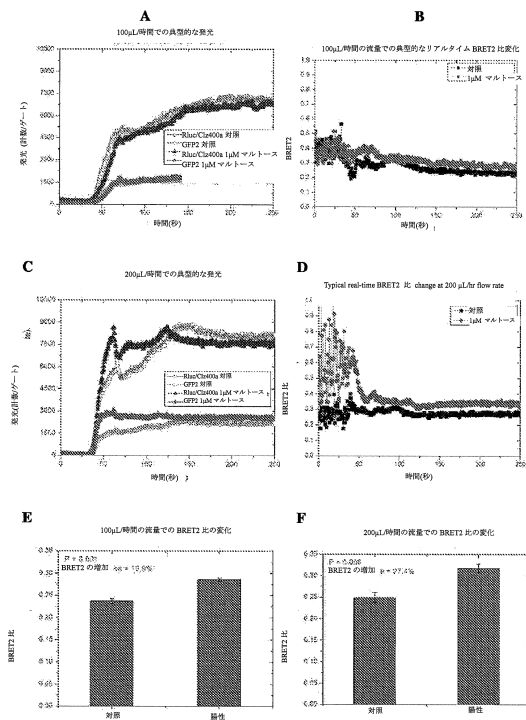
【図 6 5】



【図 6 6】



【図 6 7】



【配列表】

0006430366000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 37/00 1 0 1

(74)代理人 100089037

弁理士 渡邊 隆

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 スティーブン・チャールズ・トロウエル

オーストラリア・2903・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・オックスレイ・ファレ
リー・クロース・3

(72)発明者 ヘレン・ダクレス

オーストラリア・2904・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・モナーシュ・クライヴ
・スティーラー・アヴェニュー・8/170

(72)発明者 ナム・カオ・ホアイ・レ

ベトナム・ティン・ラム・ドン・タン・フォー・バオ・ロック・フォン・2・グエン・タイ・ホッ
ク・74

(72)発明者 ムラート・ジェル

オーストラリア・3143・ヴィクトリア・アーマデール・アーマデール・ストリート・12/2
6

(72)発明者 ヨンガン・ジュウ

オーストラリア・3194・ヴィクトリア・メントーン・ネイブルズ・ロード・20

(72)発明者 ナン・ウー

中華人民共和国・リャオニン・シェンヤン・シティー・ヘーピン・ディストリクト・ワンフ・ロー
ド・ユグアン・レーン・ナンバー・19-342

審査官 伊藤 裕美

(56)参考文献 国際公開第2010/085844 (WO, A1)

米国特許出願公開第2011/0071045 (US, A1)

米国特許出願公開第2003/0170915 (US, A1)

特表2005-506541 (JP, A)

特開2008-180677 (JP, A)

米国特許第06949377 (US, B2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 21/75-21/83

C 1 2 Q 1/00-1/68

C 1 2 M 1/34

G 0 1 N 33/00-33/98

G 0 1 N 35/00