

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4491071号  
(P4491071)

(45) 発行日 平成22年6月30日(2010.6.30)

(24) 登録日 平成22年4月9日(2010.4.9)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 21/76	(2006.01)	GO 1 N 21/76
GO 1 N 27/30	(2006.01)	GO 1 N 27/30 B
GO 1 N 27/327	(2006.01)	GO 1 N 27/30 351
GO 1 N 27/416	(2006.01)	GO 1 N 27/46 U
GO 1 N 33/536	(2006.01)	GO 1 N 33/536 D

請求項の数 28 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-514984
(86) (22) 出願日	平成9年9月17日(1997.9.17)
(65) 公表番号	特表2001-503856 (P2001-503856A)
(43) 公表日	平成13年3月21日(2001.3.21)
(86) 國際出願番号	PCT/US1997/016942
(87) 國際公開番号	W01998/012539
(87) 國際公開日	平成10年3月26日(1998.3.26)
審査請求日	平成16年9月16日(2004.9.16)
審判番号	不服2008-356 (P2008-356/J1)
審判請求日	平成20年1月7日(2008.1.7)
(31) 優先権主張番号	08/715, 163
(32) 優先日	平成8年9月17日(1996.9.17)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	508007628 メソ スケール テクノロジーズ、エルエルシー
	アメリカ合衆国 19805 デラウェア州 、 ウィルミントン、 センター ロード 1013
(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
(74) 代理人	100140556 弁理士 新村 守男
(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 晴夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多重アレイの多重特異的な電気化学発光試験

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

その上に複数の結合ドメインを含む第1の支持体を有する測定カセットであって、当該結合ドメインは、1つまたはそれ以上の作用電極上にあり、かつ、当該第1の支持体表面の凹部、くぼみまたは穴に位置し、ただし、当該凹部、くぼみまたは穴は少なくとも2つの別々の結合ドメインを含み、

当該作用電極は、有機ポリマーマトリックスとその中に分散された多数のカーボンナノチューブを含有する複合体を含み、当該作用電極は、結合試薬を含有する結合ドメインを有し、当該結合試薬は当該作用電極に固定化され、および当該多数のカーボンナノチューブは複合体から露出している、

測定カセット。

## 【請求項 2】

その上に複数の作用電極、および少なくとも1つの測定セルを有する第1の支持体を含む測定カセットであって、当該作用電極は、マスクによって画定される少なくとも1つの当該測定セル内に少なくとも2つの結合ドメインを有し、

当該作用電極は、有機ポリマーマトリックスとその中に分散された多数のカーボンナノチューブを含有する複合体を含み、当該作用電極は、結合試薬を含有する結合ドメインを有し、当該結合試薬は当該作用電極に固定化され、および当該多数のカーボンナノチューブは複合体から露出している、

測定カセット。

## 【請求項 3】

凹部、くぼみまたは穴を画定するマスクをさらに含む、請求の範囲第1項記載の測定力セット。

## 【請求項 4】

第1の支持体上に複数の結合ドメインを画定するマスクをさらに含む、請求の範囲第1項記載の測定力セット。

## 【請求項 5】

マスクが疎水性であって結合ドメインが親水性であるか、またはその逆である、請求の範囲第3項または第4項に記載の測定力セット。

## 【請求項 6】

1つまたはそれ以上の試料および／または1つまたはそれ以上の試薬を結合ドメインに送達するためのチャネルをさらに含む、請求の範囲第1項から第5項のいずれか一項に記載の測定力セット。

10

## 【請求項 7】

第1の支持体に取り付けられた第2の支持体であって、その間に複数のウェルおよび／または複数の流体チャネルを提供する第2の支持体をさらに含む、請求の範囲第1項から第6項のいずれか一項に記載の測定力セット。

## 【請求項 8】

第2の支持体は、複数の開口部を有し、それによって、第1の支持体に取り付けられたときに複数のウェルを形成する、請求の範囲第7項記載の測定力セット。

20

## 【請求項 9】

光は、第1の支持体、第2の支持体またはその両方によって検出される、請求の範囲第7項記載の測定力セット。

## 【請求項 10】

少なくとも第1の支持体の一部が透明である、請求の範囲第1項または第2項に記載の測定力セット。

## 【請求項 11】

少なくとも第2の支持体の一部が透明である、請求の範囲第7項記載の測定力セット。

## 【請求項 12】

第1の支持体表面は、ウェルを有するマルチウェルプレートを形成する、請求の範囲第1項から第1項のいずれか一項に記載の測定力セット。

30

## 【請求項 13】

結合ドメインはウェルの底に近接する、請求の範囲第1項記載の測定力セット。

## 【請求項 14】

マルチウェルプレートは、96ウェルまたは386ウェルのプレートである、請求の範囲第1項または第1項に記載の測定力セット。

## 【請求項 15】

結合ドメインは、測定を実施するための試薬をさらに含む、請求の範囲第1項から第1項のいずれか一項に記載の測定力セット。

## 【請求項 16】

40

試薬は乾燥状態で保存される、請求の範囲第1項記載の測定力セット。

## 【請求項 17】

試薬は湿潤状態で保存される、請求の範囲第1項記載の測定力セット。

## 【請求項 18】

結合ドメインは、電気化学発光標識物をさらに含む、請求の範囲第1項から第1項のいずれか一項に記載の測定力セット。

## 【請求項 19】

結合ドメインは、金属ガルテニウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、白金、パラジウム、モリブデン、テクネチウムおよびタンゲステンよりなる群から選択される金属含有有機化合物からなる電気化学発光標識物をさらに含む、請求の範囲第1項から

50

第17項のいずれか一項に記載の測定力セット。

【請求項20】

電極は、個々にアドレスが可能な電極を含む、請求の範囲第1項から第19項のいずれか一項に記載の測定力セット。

【請求項21】

電極に電気的に接続された電気接点をさらに含む、請求の範囲第1項から第20項のいずれか一項に記載の測定力セット。

【請求項22】

第1の1セットの電極に電気エネルギーを供給することができる第1の1セットの電気接点、および第2の1セットの電極に電気エネルギーを供給することができる第2の1セットの電気接点を含む、請求の範囲第21項記載の測定力セット。 10

【請求項23】

電極は、0.001~10mmの幅である、請求の範囲第1項から第22項のいずれか一項に記載の測定力セット。

【請求項24】

1つまたはそれ以上の容器中に、請求の範囲第1項から第23項のいずれか一項に記載の測定力セットおよび1つまたはそれ以上の試薬を含むキット。

【請求項25】

光検出器および請求の範囲第1項から第23項のいずれか一項に記載の測定力セットを含む装置。 20

【請求項26】

電極に電気エネルギーを供給することができる電気コネクターをさらに含む、請求の範囲第25項記載の装置。

【請求項27】

第1の1セットの電極に電気エネルギーを供給することができる第1の1セットの電気コネクター、および第2の1セットの電極に電気エネルギーを供給することができる第2の1セットの電気コネクターをさらに含む、請求の範囲第25項記載の装置。

【請求項28】

光検出器は、複数の結合ドメインから放出されたECLシグナルを走査することができる、請求の範囲第25項記載の装置。 30

【発明の詳細な説明】

1. 緒言

本発明は、電気化学発光 (electrochemiluminescence) に基づく試験のためのパターン付けした多重アレイの多重特異的な表面 (PMAMS)、さらにはPMAMSの製造法と使用法を提供する。

2. 発明の背景

2.1. 診断用測定法

迅速で感度の高い診断技術に対する強い経済的なニーズが存在する。診断技術は、医療、研究、農業、獣医学、および工業市場などの種々の経済的市場において重要である。感度、必要時間、使用の簡便さ、頑丈さ、またはコストを改良すれば、これまでいずれの技術でも市場ニーズに応えることのできなかった、全く新規な診断市場を開発することができるであろう。高感度を有する診断技術もあるが、市場ニーズに応えるには高価過ぎる。また他の技術は、費用効果が高くても、種々の市場にとって頑丈さが足りない。これらの品質を組合せることのできる新規な診断技術は、診断薬事業において顕著な進歩であり好機である。 40

診断応用では多くの異なる分析技術が使用されている。これらの技術は、放射性標識、酵素結合免疫測定法、化学比色法、蛍光標識、化学発光標識、および電気化学発光標識を含む。これらの各技術は、異なる診断市場における有用性を規定し限定する、感度レベル、使用の簡便さ、頑丈さ、迅速さおよびコストの独特的の組合せを有する。これらの差は、部分的には、各技術に本래的な物理的制約によるものである。例えば放射性標識は、この標 50

識物自体が崩壊するため、本質的に頑丈ではなく、そして生じる放射性廃棄物の処分は、多くの応用にとって経済的、安全上および環境的なコストを生み出す。

今日使用されている多くの高感度診断技術は、第一に、試験を実施するのに熟練した技術者を必要とするため、市場が限定されている。例えば今日使用されている電気化学発光法は、熟練技術者を必要とするだけでなく、洗浄の繰り返しや準備段階を必要とする。このため、コストと廃棄物処分の必要な両方が高まる。試験法を単純にし、同時に試験当たりのコストを低下させる新規な診断法は、新規な市場を開発する上にも、既存の市場の性能を改善する上にも非常に重要で有用となるであろう。

## 2.2. 電気化学発光測定法

電気化学発光（「ECL」）は、電気的に励起した分子種が、光子を放射する現象である（例えば、リーランド（Leland）とパウエル（Powell）、1990, J. Electrochem. Soc. 137 (10) : 3127 - 3131を参照のこと）。ECLが誘導される分子種はECL標識物と呼ばれ、本明細書においてはTAGとも呼ぶ。一般に使用されるECL標識は、例えば金属がRu含有およびOs含有有機金属化合物〔例えば、バード（Bard）ら（米国特許第5,238,808号）により開示されている、Ru(2,2'-ビピリジン)<sub>3</sub><sup>2+</sup>残基（「Rubbyp」とも呼ばれる）〕を含む第VIII族の貴金属由来の有機金属化合物を含む。「TAG1」および「Rubbyp」はまた、Ru(2,2'-ビピリジン)<sub>3</sub><sup>2+</sup>残基の誘導体を意味する。ECLに基づく検出系の基本は、光子を放射させるためにECL標識物を励起させる電位が必要なことである。ある電位波形が、電極表面（典型的には金属表面）と対電極にわたるECL測定溶液に適用される（例えば、米国特許第5,068,088号、5,093,268号、5,061,445号、5,238,808号、5,147,806号、5,247,243号、5,296,191号、5,310,687号、5,221,605号を参照のこと）。ECLは、作用電極から受けた電気エネルギーにより開始される一連の化学反応の結果として、励起状態に上げられる。TAGのECLを上げる分子（例えば、シュウ酸塩またはより好ましくはトリプロピルアミン）が、有利に提供される（例えば、米国特許第5,310,678号を参照）。

ECL反応中のTAGの励起は典型的には、電極の表面へのTAG分子の拡散が関与する。電極によるTAG分子の励起機構は、溶液中の電気化学的メディエーター（ハアパッカ（Haapakka）、1982, Anal. Chim. Acta, 141: 263）と電極上でTAG分子を提示するビーズの捕捉（PCT公報出願WO90/05301とWO92/14139）の使用が関与する。あるいはECLは、例えば非特異的吸着（ズー（Xu）ら、1994, ラングミュア（Langmuir），10: 2409 - 2414）、L-B膜への取り込み（ザング（Zhang）ら、1988, J. Phys. Chem., 92: 5566）、自己集合单層への取り込み（オーベン（Obeng）ら、1991, ラングミュア（Langmuir），7: 195）、および厚い（マイクロメーター）膜への取り込み（ルーベン斯坦（Rubenstein）ら、1981, J. Am. Chem. Soc., 102: 6641）により、作用電極の表面に直接吸着されたTAGから観察されている（米国特許第5,324,457号）。同様にズー（Xu）ら（PCT公報出願WO96/06946）は、DNA鎖に挿入されたTAG分子から、このような鎖がアルカンチオール酸塩の自己集合单層上に固定化されたアルミニウム中心との相互作用により金電極上に吸着される時、ECLを観察している。

当該分野で公知の種々の装置が、ECL反応を行い検出するのに利用可能である。例えば、ジャン（Zhang）ら（米国特許第5,324,457号）は、ECLを行うための電気化学的セルにおいて使用するための電極の例を開示している。レヴァンティス（Levantis）ら（米国特許第5,093,268号）は、ECL反応を実施するのに使用するための電気化学的セルを開示している。カミン（Kamin）ら（米国特許第5,147,806号）は、電位制御装置を含む、ECL反応を行い検出するための装置を開示している。ゾスキ（Zoski）ら（米国特許第5,061,445号）は、ECL反応を誘導するための電位波形線図、デジタルからアナログへの変換器、制御装置、電子制御装置にフィードバ

10

20

30

40

50

ック情報を提供するため作用電極で E C L 反応により発生する電流を検出するための、検出装置および方法を含む、 E C L 反応を行い検出するための装置を開示している。

### 2.3. 工業用の E C L 測定法

E C L 標識物により発生する光は、診断法におけるレポーターシグナルとして使用することができる（バード（Bard）ら、米国特許第5,221,605号）。例えばあるE C L 標識物は、抗体または核酸プローブのような結合物質に共有結合することができる。このE C L 標識 / 結合物質複合体は、種々の物質の測定のために使用することができる（バード（Bard）ら、米国特許第5,238,808号）。測定法におけるE C L の使用は、例えばナイト（Knight）ら、1994, Analyst, 119: 879-890の総説にまとめられている。簡単に説明すると、E C L 法は、比較的低濃度で試料中に存在する目的的アナライトを試料の容量中で検出する方法として使用される。

現在までのところ、全ての工業用のE C L 反応は、センチメートルのスケールの電極表面で行われている。センチメートルスケールの電極は、より大きな電極から生じるE C L シグナルの増強された大きさと、各測定に必要な全試料容量を低く抑える必要性との間で比較検討されている。しかし、センチメートルスケールの電極でさえ、多くの測定に必要とされる感度を達成できない。この問題を克服するために、全ての工業用のE C L 系は、コーティングした磁性ビーズを使用してE C L アナライトまたは試薬を捕捉することにより感度をさらに増強している。こうしてビーズは作用電極近くに移動して感度が増強される。

しかし、現在利用可能な技術は多くの限界（主に、コストと複雑さ）を有し、処分可能なカートリッジを使用する低成本の測定法での使用、ならびに複数の測定を同時に行う高処理システムでの使用が限定される。

レベンティス（Leventis）ら（米国特許第5,093,268号）は、各アナライトについて異なるE C L 標識物を使用することにより、2つ以上の異なるアナライトを同時に測定する方法を提案している（1回の測定で、各異なるアナライトに対して、異なる波長で光子を放射する）。しかし、この技術は、例えば、異なる波長で放射する有効なE C L 標識物が十分な数だけ利用できること、および各E C L 標識について化学的条件を最適化する必要があることにより、制限されている。これらの実用上の制約により、このような多重波長、多重アナライトE C L 検出系の工業化が妨げられている。

E C L 測定を行うための市販の方法はまた、電極を含むアッセイセルを、例えば米国特許第5,147,806号により開示されているように、希酸、希塩基、界面活性剤溶液などの使用を含む多くの方法の1つにより洗浄する必要がある。

### 2.4. 発明の目的

従って本発明の目的は、E C L 測定を行うための新規で費用効果が高くかつ処分可能な電極を提供することである。

本発明のさらなる目的は、逐次または同時に複数のE C L 測定を行うための、新規で費用効果が高いシステムを提供することであり、かつ好適な実施態様において、正確性の改善のために組み込まれた対照標準物質を提供することである。

本発明のさらなる目的は、これもまた処分可能な、複数の同時または逐次E C L 測定を行うのに適した1つまたはそれ以上の支持体からなるカセットを提供することである。

本発明のさらに別の関連する目的は、生物学的試料中の目的のアナライトに関する個々の測定を行う時間とコストを低減することである。

本発明のなおさらには別の関連する目的は、単一の生物学的試料中の複数の目的のアナライトについて複数の同時測定を行うための方法と装置を提供することである。

### 3. 発明の要約

本発明は、支持体に固定化されている1つまたはそれ以上の結合ドメインからなるE C L 反応および測定を行うためのカセットに関する。この支持体は、電気化学発光を発生させるための電極として作用する。あるいは1つまたはそれ以上の電極が追加の支持体の上にあり、この電極は、E C L を発生するように第1の支持体に近付けてもよい。このカセットは、1つまたはそれ以上の電極または1つまたはそれ以上の電極 / 対電極対を有しても

10

20

30

40

50

良い。このカセットはまた、第1の支持体に近接して配置されてその間に試料含有手段を提供することができるように、および／または電極として機能するように、第2の支持体を含んでもよい。結合ドメインは、支持体表面状にパターン付けされて、目的のアナライトまたは試薬を結合するように作成される。

本発明はさらに、処分可能なフォーマットでの使用に適した新規の処分可能な電極に関する。これらの電極は、グラッシーカーボン、カーボンブラックまたはカーボン（黒鉛）ナノチューブのような炭素の種々のフォーマットを含んでもよい。

本発明はさらに、複合電極、すなわち2つ以上の材料からなる電極に関する。これらの電極は、処分可能なフォーマットでの使用に適するようにするために、性能、コストおよび加工性を制御するように作成することができる。

本発明はさらに、粒子が結合試薬の固体支持体として使用される測定法に関する。この粒子は、沈殿により多孔性電極上に捕捉され検出される。粒子を用いてあらかじめ作成された導電性フィルターに基づくキットが記載される。

本発明はさらに、2つまたはそれ以上のECLシグナルを分離するのに使用することができる電極に関する。

本発明はさらに、支持体またはカセット操作手段、電気化学発光を引き起こすのに有効な制御された電位波形をかけるように適合させた電位制御手段、試料からの電気化学発光を検出するための光子検出手段、および試料操作手段を提供する、試料の電気化学発光を測定するための装置に関する。

本発明はさらに、カセットの複数の結合ドメインを、複数の目的のアナライトを含有する試料にECL測定条件下で接触させて、次に引き起こされる電気化学発光を検出または測定するのに有効な電位波形をかけるために、試料中の電気化学発光を測定するためのカセットの使用法に関する。

本発明はまた、同時に複数の電気化学発光反応を測定するのに適したカセット、その上に複数のドメインが固定化されている支持体表面、および化学反応を行うECL測定の実施のための測定用媒体を含む成分からなるキットを提供する。

本発明はまた、迅速な処分可能な電気化学発光測定法である。市販のECL測定法は、作用電極と対電極を有するフローセルを使用して行われる。本明細書に記載の処分可能な電極は、キャリーオーバーを排除するのに洗浄および／または清掃を必要とせず、永久的なフローセル電極のように均一な電極表面を再生する。

本発明はまた、多孔性電極の使用により反応速度の上昇を与える。測定結果を迅速に発生させたために、フォーマット化されたおよび／または多孔性の処分可能な電極が使用される。処分可能な電極を用いる測定結果は、1時間未満で得られる。好適な実施態様において、処分可能な電極からのECL測定結果は、30分未満で得られ、15分未満で得られる場合もある。最も好適な実施態様において、測定結果は5分未満または最も有利な場合には1分未満で得られる。本発明の多重測定フォーマットでは、このような時間またはそれより短い時間で2つ以上のECL測定結果が得られる。迅速な処分可能なECLシステムのためのキットが開示される。

さらに本発明は、携帯用のECL診断装置を提供する。携帯用のECL診断のためのカートリッジまたはキットは、新規の処分可能な電極と試薬パックを使用する。ECL測定法のためのPMAAMSと電極は、携帯用のECL装置リーダーで使用するためのキットとしてパッケージングされてもよい。そのようなキットやECL装置リーダーは、短時間に測定結果を得るために使用される。測定結果は、前記の非常に短い時間で得られる。

#### 4. 図面の説明

図1は、電極上に複数の結合ドメインが存在する本発明のカセットを例示する。

図1Aは、複数の結合ドメイン14が支持体10上に存在し、複数の対応する電極16が支持体12上に存在しているため、支持体の接近により、電極が各結合ドメインに近接するように配置される、本発明のカセットを形成する2つの支持体を例示する。

図2は、支持体26上の複数の結合ドメイン30が、各単一の電極32に近接しているため、支持体26と28の接近により、各対電極38が各結合ドメイン30に近接するよう

10

20

30

40

50

に配置される、本発明のカセットを形成する2つの支持体を例示する。

図3は、複数の結合ドメイン48が、支持体44上でこれらに近接する電極と対電極の対を有する、本発明のカセットを形成する2つの支持体を例示する。支持体46は、場合により支持体44に近接して配置されて、このため、支持体46が結合ドメイン48と電極50に近接する試料含有手段を提供してもよい。

図4は、支持体60上の複数の結合ドメイン64が、アナライトを含有することが疑われる試料と接触される、本発明のカセットを形成する2つの支持体を例示する。支持体62は、目的のアナライトを検出または測定するための反応媒体を含有する領域66を有しているため、支持体60と支持体62の接近により、結合ドメイン64と領域66が相互に接觸する。

図5Aは、多重アレイの多重特異的な結合表面のためにパターン付けされた結合ドメインの平面図を例示する。幾何学图形の三角形、四角形および円形は、異なるアナライトに特異的な結合ドメインを表す。結合ドメインは、疎水性であっても親水性であってもよい。周囲の表面は、結合ドメインからの結合試薬またはアナライトの拡散を少なくするために、結合ドメインの反対の性質（親水性または疎水性）を有していてよい。

図5Bは、別々の結合ドメインに結合試薬および/またはアナライトを送達するための微量流体ガイド(microfluidic guide)の平面図を例示する。各ドットは、微量流体ガイド(例えば、毛細管)の断面図を例示する。

図5Cは、微量流体ガイドの側面図を例示しており、パターン付けされた結合ドメインの多重アレイに結合試薬および/またはアナライトを送達するための、合わせたまたは整列させた微量流体ガイドの接近を示す。各微量流体ガイドは、別々の結合ドメインに異なる結合試薬を送達してもよい。

図6Aは、パターン付けした多重アレイの多重特異的な結合ドメインを有する表面との、合わせた電極の多重アレイの接近を例示する。取り外し可能な電極保護バリアが、電極アレイと結合表面アレイとの間に示される。全体の組立品は、複数のECL反応を実施するためのカセットからなる。

図6Bは、合わせたまたは整列させた、アドレスが可能な作用電極と対電極のアレイの接近を例示する。電極は、結合ドメインと相補的な形であっても他の形(例えば、相互にかみ合う形)であってもよい。

図7は、合わせたまたは整列させた、アドレスが可能な作用電極と対電極、および相補的な結合表面の、接近したアレイの側面図を例示しており、ここで、導電性ポリマーが電極の表面から、電極アレイと結合ドメインの間の間隙を横切って成長して、試料のECL標識周囲の電位の場を拡大してECL反応の効率を増大させる。

図8は、合わせたまたは整列させた、アドレスが可能な作用電極と対電極、および相補的な結合表面の、接近したアレイの側面図を例示しており、ここで導電性粒子が両方の成分の間に散在して電位の場を拡大する。試料のECL標識の周囲の電位の場を拡大することにより、ECL反応の効率は増強される。導電性粒子は、容易な操作が可能になるよう磁気を帯びていてもよい。

図9は、合わせたまたは整列させた、アドレスが可能な作用電極と対電極、および相補的な結合表面の、接近したアレイの側面図を例示しており、ここで電極は、電極表面と結合ドメインとの間の間隙中に伸びる微細な突起を有して、これにより試料のECL標識の周囲の電位の場を拡大してECL反応の効率を増大させる。

図10は、合わせたまたは整列させた、アドレスが可能な作用電極と対電極、および相補的な結合表面の、接近したアレイの側面図を例示しており、ここでこれらの表面は、平行ではないが、代わりに相補的な形で一方を他方に適合させている。

図11は、その上に、カセットの形で単一の電極と結合表面組立品を提供する金属層を有する支持体の側面図を例示する。金属層上に自己組立单層(self-assembled monolayers)(「SAM」)のアレイがパターン付けられている。

図12は、カセットの形で単一の電極と結合表面組立品を提供する金属層をその上に有する支持体の側面図を例示する。金属層上にSAMのアレイがパターン付けられており、導

電性微粒子がパターン付けされたS A Mの間の散在が示され、これにより、試料のE C L標識の周囲の電位の場を拡大して、E C L反応の効率を増大させる。

図13は、カセットの形で単一の電極と結合表面組立品を提供する金属層をその上に有する支持体の側面図を例示する。金属層上に自己組立単層すなわちS A Mのアレイがパターン付けられており、試料のE C L標識の周囲の電位の場を拡大してE C L反応の効率を増大させるように、E C L標識からの導電性ポリマーおよび/または纖維の成長が例示される。

図14は、コンピュータにより制御される電極対のアレイを有する支持体の線図である。

図15は、電極対のアレイを有する支持体の線図である。

図16は、電極対のアレイを有する支持体、および各電極対のエネルギー補給を制御するためのコンピュータシステムの線図である。10

図17は、電極対のアレイを有する支持体、および各電極対のエネルギー補給を制御するための、複数の電位供給源とマルチプレクサーを有するコンピュータシステムの線図である。

図18は、電極対のアレイを有する支持体、および各電極対のエネルギー補給を制御するための、複数の切り替え電位供給源を有するコンピュータシステムの線図である。

図19(a)~(e)は、いくつかの代替の電極-対電極の対の組合せの平面図である。

図20は、サンドイッチ測定法が完了した支持体を例示する。

図21は、支持体上の2つの逆のP M A M S表面を例示する。

図22Aは、微量流体ガイド(2201)と小纖維マット(2200)のアレイを例示する。20

図22Bは、小纖維マット(2303)上の結合ドメイン(2202)を例示する。

図23Aは、真空濾過により小纖維マットを形成するための装置を例示する。

図23Bは、濾過膜(2303)上の小纖維マット(2304)を例示する。

図24は、小纖維マットを製造するためのローラーの使用を例示する。

図25は、上層が測定のために使用される結合ドメインを有する、多層小纖維マットの略図を示す。

図26は、非特異的な結合を増強する残基で誘導体化した小纖維の略図を示しており、生物学的および非生物学的いくつかの種が表面に結合する。

図27は、非特異的な結合を増強する残基で誘導体化した小纖維の略図を示しており、誘導体化した小纖維に結合したいくつかの種を示し、いくつかの種はさらにリガンドに結合している。30

図28は、小纖維に共有結合したいくつかの種を例示しており、いくつかの種は、さらに追加の物質に結合する。

図29は、マット上またはマット内の光の供給源の位置に依存して、光を通過させるか、および/または光を吸収するか、および/または光を散乱することができる光学フィルターとしての、多層小纖維マットの使用を例示する。

図30Aは、炭素小纖維マット電極上の電気化学的測定からの周期的ボルタンモグラムを例示する。

図30Bは、金箔電極上の電気化学的測定からの周期的ボルタンモグラムを例示する。40

図31は、マットの厚さの関数としての小纖維マットの電気化学的性質と、走査速度を比較する。

図32は、小纖維上の非特異的な結合は、タンパク質溶液中の小纖維の濃度が上昇するに従い、一般に上昇することを例示するプロットを示す。

図33は、界面活性剤の使用により、E C L-T A G 1標識タンパク質と炭素小纖維との間の非特異的な結合を低減させることができることを証明する。

図34は、電気化学的性質および小纖維マット電極上のE C Lを測定するのに使用される、実験的セルの平面略図を示す。

図35は、電極として小纖維マットおよび1000pMのT A G 1(実線)溶液を使用して得られたE C Lシグナル、および測定緩衝液からのシグナル(T A G 1なし)(点線)を50

示す。

図36は、支持される電極の2つのアレイが、パターン付けされた誘電層により分離されている、2つの表面のP M A M S装置の略図を示す。

図37は、一方の支持体上に複数の結合ドメイン(3702)を、そしてもう一方の支持体上に電極と対電極を有する装置を例示する。

図38は、結合ドメインが、対電極上に支持された別個の物体の表面に提示されている、カセットを示す。

図39は、作用電極および対電極と接触するゲルを示す。

図40は、作用電極および対電極と接触するE C L標識ゲルからの、E C L強度と周期的ボルタンモグラムを示す。  
10

図41は、作用電極および対電極と接触する非E C L標識ゲルからの、E C L強度と周期的ボルタンモグラムを示す。

図42は、E C Lに使用される2つの表面のカセットの略図を示す。

図43は、小纖維マットが、マットに吸着した抗体-T A G 1のE C Lのための電極として使用することができることを証明する。

図44Aは、電極に固定化されたT A G 1標識タンパク質のE C L強度を示す。

図44Bは、コーティングされた電極の周期的ボルタンモグラムを示す。

図45Aは、固定化E C L-T A G 1標識タンパク質からのE C Lシグナルの準可逆的反復発生を示す。

図45Bは、コーティングの部分的保存を示す、コーティングされた電極の周期的ボルタンモグラムを示す。  
20

図46Aは、固定化E C L-T A G 1標識タンパク質からのE C Lシグナルの不可逆的発生を示す。

図46Bは、コーティングの実質的な消失を示す、コーティングされた電極の周期的ボルタンモグラムを示す。

図47は、多重アレイのE C L装置と、E C Lシグナルの発生および分析のためのコントローラー手段を有するマイクロプロセッサーを示す。

図48は、ストレプトアビジン被覆ダイナルビーズ(Dynal beads)上のサンドイッチ複合体の形成、小纖維マット電極上のビーズの捕捉、およびE C Lによる結合複合体の検出を含む、A F P免疫測定法の用量応答を示す。  
30

図49は、ストレプトアビジン被覆シリカ粒子上のサンドイッチ複合体の形成、小纖維マット電極上の粒子の捕捉、およびE C Lによる結合複合体の検出を含む、A F P免疫測定法の用量応答を示す。

図50は、表面上への結合試薬の固定化のためのS A Mの使用を説明する略図である。

図51は、金電極上のアルカンチオール酸塩のストレプトアビジン被覆S A M上のサンドイッチ複合体の形成、およびE C Lによる結合複合体の検出を含む、A F P免疫測定法の用量応答を示す。

図52は、「2表面」測定法中の作用電極へのT A G残基の提示を例示する。

図53は、ストレプトアビジン被覆、酸化、E V A-小纖維複合体上のサンドイッチ複合体の形成、およびE C Lによる結合複合体の検出を含む、A F P免疫測定法の用量応答を示す。  
40

図54は、ストレプトアビジン被覆、酸化、E V A-小纖維複合体上の核酸サンドイッチ複合体の形成、およびE C Lによる結合複合体の検出を含む、核酸ハイブリダイゼーション測定法の用量応答を示す。

図55は、T A G 1標識オリゴヌクレオチドへのビオチン標識オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、ストレプトアビジン被覆小纖維複合体上の核酸サンドイッチ複合体の形成、およびE C Lによる結合複合体の検出を含む、D N A測定法の用量応答を示す。

図56は、ナイロン膜上のストレプトアビジン被覆U T F M上のサンドイッチ複合体の形成、およびE C Lによる結合複合体の検出を含む、A F P免疫測定法の用量応答を示す。

図57は、金被覆ナイロン膜上に形成されたストレプトアビジン被覆U T F M上のサンド  
50

イッヂ複合体の形成、およびECLによる結合複合体の検出を含む、AFP免疫測定法の用法応答を示す。

図58は、1つまたはそれ以上の成分についての電気化学電位がシフトしているECLシグナルを例示する。

図59は、試料の1つまたはそれ以上の成分についてのECL電位の強度が、試料の他の成分のECLシグナルに比較して低下しているECLシグナルを例示する。

図60は、ECL測定緩衝液である試料のECLトレースを示す。

図61は、AFPを含有する試料のECLトレースを示す。

図62は、AFP測定法のAFPの濃度(IU/ml)の関数としてのECLシグナル(S-B、ECLシグナル(S)とバックグランドシグナル(B)との差)のプロットを示す。

ECL介在AFP測定は、結合試薬の支持体としてのおよび作用電極としての、プラズマ処理小纖維-ポリマー複合体を使用して行なった。

図63は、AFP測定法のAFPの濃度(IU/ml)の関数としてのECLシグナル(S-B、ECLシグナル(S)とバックグランドシグナル(B)との差)のプロットを示す。

ECL介在AFP測定は、結合試薬の支持体としてのおよび作用電極としての、プラズマ処理小纖維-ポリマー複合体を使用して行なった。

図64は、AFP測定法のAFPの濃度(IU/ml)の関数としてのECLシグナル(S-B、ECLシグナル(S)とバックグランドシグナル(B)との差)のプロットを示す。

ECL介在AFP測定は、結合試薬の支持体としてのおよび作用電極としての、プラズマ処理小纖維-ポリマー複合体(15重量%の小纖維)を使用して行なった。

図65は、AFP測定法のAFPの濃度(IU/ml)の関数としてのECLシグナル(S-B、ECLシグナル(S)とバックグランドシグナル(B)との差)のプロットを示す。

ECL介在AFP測定は、結合試薬の支持体としてのおよび作用電極としての、プラズマ処理小纖維-ポリマー複合体を使用して行なった。

図66は、AFP測定法のAFPの濃度(IU/ml)の関数としてのECLシグナル(S-B、ECLシグナル(S)とバックグランドシグナル(B)との差)のプロットを示す。

ECL介在AFP測定は、結合試薬の支持体としてのおよび作用電極としての、プラズマ処理小纖維-ポリマー複合体を使用して行なった。

図67は、AFP測定法のAFPの濃度(IU/ml)の関数としてのECLシグナル(S-B、ECLシグナル(S)とバックグランドシグナル(B)との差)のプロットを示す。

ECL介在AFP測定は、乾燥試薬を使用しつつ洗浄工程無しで行なった。

図68は、本発明の好適な実施態様に従う測定セルの略図を示す。

図69は、本発明の好適な実施態様に従う測定系の略図を示す。

##### 5. 発明の詳細な説明

従って本発明は、広い意味で、複数の電気化学発光測定を実施するためのカセットを含む。このカセットは、1つまたはそれ以上の目的のアナライトと特異的に結合することができる複数の結合ドメインを、その上有する支持体より形成される。結合ドメインは、支持体上に、パターン付けされた、多重アレイの多重特異的な表面(「PMAMS」)として作成される。PMAMSは、例えば、実施できる測定の密度の大きな上昇、および迅速にまたは同時に複数の異なる測定を実施することを可能にしたことにより、既知のECL測定法からの有意な改良を提供する。

カセットは、結合ドメインに結合したECL標識試薬からの光のECL放出を選択的に引き起こし、複数の電極を含んでもよい。図47は、ハウジング4717を含むカセット4700、カセット4718中の電極への電気的接続、波形生成器またはポテンショスタット4719、PMAMS4720から放出されるECLをイメージングするためのCCDカメラ、波形生成器を制御するためのマイクロコンピューターを使用し、かつカメラ4721により受け取られる画像を解析する、多重アレイのECL装置を示す。

図1に示される本発明の実施態様において、カセット180は、支持体物質182上に導電性物質181を含む作用電極を含む。複数の結合ドメイン(すなわち、PMAMS183)はまた、試料と試薬を導入するための手段(流体チャネル184)と対電極185を

10

20

30

40

50

含む。参照電極 186 も含有されてもよい。

別の実施態様において、複数の結合ドメインで ECL シグナルを同時に発生するために複数の作用電極が使用される。本実施態様において、各結合ドメインからの ECL シグナルは、光イメージング装置を使用せずに同定される。

本発明のいくつかの実施態様において、規定量または前もって決められた量の 1 つまたはそれ以上の試薬を表面上に再現可能に固定化することが望ましい。固定化は、試薬が表面上に結合している任意の方法に広く適用され、これらの方法は：共有化学結合；非特異的吸着；表面上の試薬の乾燥；静電相互作用；疎水性および／または親水性相互作用；液体またはゲル中の封じ込めまたは巻き込み；生物特異的結合（例えば、リガンド／受容体相互作用またはオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション）；金属／リガンド結合；キレート化、および／またはポリマー中の巻き込み、を含むがこれらに限定されない。10

表面上に固定化される試薬の量は、いくつかの方法で前もって決めることができる。例えば、表面上の試薬の量は、試薬が存在する、1 つまたはそれ以上の容量および／または面積要素により規定することができる。また、表面上に固定化される試薬の個々の分子の数により規定することもできる。試薬の量は、所定の領域の特定の試薬の密度によって規定することができる。試薬の量は、表面の全面積に関して、または表面上に存在する他の試薬の量に対しての、特定の試薬を有する表面の百分率として規定することができる。試薬の量はまた、測定が目的の特異性を達成するのに十分な ECL 強度を与えるために、特定の表面上に存在する必要のある試薬の量として定義することができる。具体例では、金表面の 1 cm<sup>2</sup> の面積がアルカンチオールの単層でコーティングされていてもよい。20

試薬はまた、コーティングされた表面上に再現可能に固定化されていてもよい。コーティングは、いくつかの試薬の固定化を増強するのに役立ち、および／または他の試薬の固定化を低減または妨害するのに役立つことがある。表面は完全にコーティングされるか、または表面は部分的にコーティング（すなわち、パターン付けされたコーティング）することができる。コーティングは、組成が均一であるか、または異なる組成の要素を含有してもよい。具体例において、コーティングは、ある領域では免疫グロブリン G を共有化学結合により固定化し、他の領域ではその固定化を防止する、パターン付けされた単層フィルムであってよい。

コーティングはまた、後の工程またはプロセスにおいて表面上に固定化される 1 つまたはそれ以上の試薬の量を前もって決めるのにも役立つ。あるいは、特定試薬の量は、沈積される試薬の量を制限することにより制御することができる。30

定量的に再現可能な方法で固定化された試薬（またはコーティング）を有する表面であれば、試料からの ECL シグナルを再現可能かつ定量的に測定する能力が得られ、こうして較正が可能になる。

概して、本発明のカセットを使用して実施される測定は、複数の別々の結合ドメインの使用が有効な測定である。例えば、このようなカセットの使用により、広い範囲の目的のアナライトの迅速および／または同時の検出または測定が可能になる。好適な実施態様において、本発明の測定法はまた、ECL 標識試薬、アナライトまたは結合表面の使用が有効な測定法である。本発明の ECL 測定は、複数の結合ドメインを、目的のアナライトを含有することが疑われる試料と接触させて、結合した ECL 標識物からの ECL 発光を引き起こすことを含んでなり、ここで ECL 標識物は、アナライト上にあるか、またはアナライトの競合物質上にある、または複数の結合ドメインの上にある。40

本発明は、（a）電極上に固定化された 1 つまたはそれ以上の結合ドメインを接触させ（接触は、ECL 標識物に標識された分子を含む試料と行われる）、（b）結合ドメインで ECL を引き起こすのに有効な電位波形を適用して、そして（c）ECL を測定または検出することを含んでなる、目的のアナライトを検出または測定するための ECL 測定法を提供する。

試料という用語は、広い意味で使用される。これは、本発明の方法で使用される、ある量の任意の物質を含む。非限定例によりこれは、目的のアナライトを含有する測定される物質の一部、前処理したかまたは調製したその一部、または本発明の方法で使用されるある50

量の試薬を含む。

本発明はまた、(a) 1つまたはそれ以上の支持体の表面に固定化されている、1つまたはそれ以上の結合ドメインを接触させて(ここで接触は、電気化学発光標識物に結合した分子からなる試料と行われる)；(b)電極を前記1つまたはそれ以上の複数の結合ドメインに接近させて；(c)前記1つまたはそれ以上の複数の結合ドメインにECLを引き起こすのに有効な電位波形を適用して；そしてECLを検出または測定することからなる、目的のアナライトを検出または測定するためのECL測定法を提供する。

別の実施態様において、本発明は、(a)(i) 1つまたはそれ以上の支持体の表面に固定化されており、そして(ii)複数の電極と対電極の対と共に、これらと接近させて、間を空けて整列している1つまたはそれ以上の結合ドメインを、電気化学発光標識に結合した分子からなる試料と接触させて；(b)電極と対電極を、前記結合ドメインに接近させて；(c)前記結合ドメインに電気化学発光を引き起こすのに有効な電位波形を適用して；そして(d)電気化学発光を検出または測定するための、ECL測定法を提供する。

本発明は、多成分の液体試料のある容量中の、試料中に種々の濃度で存在するかもしれない目的の複数のアナライトを検出する方法を提供する。

概して、複数のアナライトは、 $10^{-3}$ モル濃度未満で多成分試料から検出することができる。好ましくは、複数のアナライトは、多成分試料から $10^{-12}$ モル濃度未満で検出することができる。

本発明は、不均一系測定法、すなわち、結合した標識試薬を電気化学エネルギーに暴露する前に、複数の非標識試薬が複数の結合標識試薬から分離される測定法、および均一系測定法、すなわち、複数の非結合標識試薬と結合標識試薬が、一緒に電気化学エネルギーに暴露される測定法として実施することができる、多成分試料からの検出法を提供する。

本発明の測定において、特定のアナライトを検出するために使用される電磁線は、PAMS内の結合ドメインのパターンに対応するパターンの1つまたはそれ以上の特徴としてその位置および/または配置を同定することにより、他のアナライトに対応する電磁線から識別可能である。

本発明の均一系測定において、電磁線は、非結合試薬に比較した結合標識試薬により放出される電磁線の量の増加または減少として結合標識試薬により放出される、あるいはPAMS内の結合ドメインのパターンに対応するパターンの1つまたはそれ以上の特徴に空間的に対応する、光源から放出される電磁線の検出より、測定される。

図20に示される本発明の方法の具体例において、サンドイッチ測定法は、特定のアナライト(A<sub>n</sub>)の結合に特異的な複数の結合ドメイン(BD)をその表面上に有する支持体(5)上で行われる。アナライトを含有することが疑われる試料が結合ドメインに適用されると、アナライトは結合ドメインに結合する。アナライト(A<sub>n</sub>)を選択的に結合するのに適切で、かつECL残基(TAG)で標識されてAb-TAGを形成する抗体(Ab)は、次に結合ドメイン上のアナライトに適用される。過剰の未結合Ab-TAGを結合ドメインから洗浄後、電気化学発光を引き起こすのに適切な電位波形を電極によりTAGに適用して(示していない)、結合ドメイン上の任意のTAGからのECL発光を引き起こす。ECLシグナルは、光検出手段により検出されて、デジタルコンピュータ手段により記録される。

本発明のさらなる実施態様、特徴および変法は、後述のように提供される。

### 5.1. 結合表面の作成

本発明をさらに理解するために、支持体上の結合ドメインの作成をさらに詳細に説明する。複数のアナライトに特異的な、表面上の結合ドメインのパターン付けされたアレイは、本明細書ではパターン付けした多重アレイの多重特異的な表面またはPAMSと呼ばれる。PAMSは、例えば、自己組立単層(「SAM」)のパターン付けにより、支持体上に作成される(ファーガソン(Ferguson)ら, 1993, *Macromolecules* 26(22): 5870-5875; プライム(Prime)ら, 1991, *Science* 252: 1164-1167; ライビニス(Laibinis)ら, 1989, *Science* 245: 845-847; クマール(Kumar)ら, 1984, *Langmuir* 50

10(5) : 1498 - 1511; バイン (Bain) ら, 1989, *Angew. Chem. 101*: 522 - 528)。表面パターン付け法はまた、物理的エッチング (例えば、ミクロ機械加工) (アボット (Abbott) ら, 1992, *Science 257*: 1380 - 1382; アボット, 1994, *Chem. Mater. 6* (5): 596 - 602)、ミクロ石版術 (microlithography) (ライビニス (Laibinis) ら, 1989, *Science 245*: 845 - 847)、光活性化化学の使用による表面への化学基の結合 (サンドバーグ (Sundberg) ら, 1995, *J. Am. Chem. Soc. 117* (49): 12050 - 12057)、および微小型押し法 (micro-stamping techniques) (クマール (Kumar) ら, 1994, *Langmuir 10* (5): 1498 - 1511; クマールら, 1993, *Appl. Phys. Lett. 63* (14): 2002 - 2004) の使用を含む。その他の表面パターン付け法は、流体または粒子の空間的に制御された分散のための方法 (例えば、マイクロペン沈積 (micropen deposition) (例えば、X-Y 平行移動を使用する表面上に送達するための微量流体ガイドを使用して) )、毛細管充填 (キム (Kim) ら, 1995, *Nature 376*: 581)、インクジェット法 (Ink-Jet technology)、またはシリンジディスペンサーを含む。これらの方法の組合せを使用して複雑な表面パターンを提供することができる。図 5 A において、異なる結合特異性が、単一の支持体上に存在してもよいことを示す、単に説明目的で幾何学図形 602 として表される形非依存性結合ドメインを有する支持体 600 が示される。結合ドメイン間の表面 604 は、結合試薬の沈積物を閉じこめて結合ドメインを形成するために、疎水性であるか、あるいは親水性であってよい。結合ドメインおよび / または結合ドメイン間の表面は、非特異的結合に対して交互に感受性であるか耐性であり、および / またはこれらは共有または非共有相互作用により結合試薬の付加に対して交互に感受性または耐性でもよい。疎水性相互作用による非特異的結合が、表面に結合化学種を結合させる所望の付加方法でない場合、偶発的な非特異的結合が起こるのを防止するために、洗浄剤を添加してもよい。

結合ドメインは、このドメインの幾何学形状に依存して、大体 0.1  $\mu\text{m}$  ~ 10 mm の幅または直径または最も大きな寸法である。表面は、例えば、ECL 測定溶液に暴露される特異的な結合成分を有するように、選択的に誘導体化される。さらには、結合ドメインでの非特異的相互作用は、別々の結合ドメインの暴露された表面上にポリエチレングリコールのような残基を導入することにより、特異的結合残基を維持しながら低下する (プライム (Prime) ら, 1993, *J. Chem. Soc. 115*: 10714 - 10721; プライムら, 1991, *Science 252*: 1164 - 1167; パレ - グロスデマンゲ (Pale-Grosdemange) ら, 1991, *J. Am. Chem. Soc. 113*: 12 - 20)。

PMAMS は、大体 2 ~ 10<sup>8</sup> の結合ドメインを含有してよい。好ましくは、結合ドメインの数は、50 ~ 500 である。さらに他の実施態様において、結合ドメインの数は、25 ~ 100 である。さらに別の実施態様において、結合ドメインの数は 2 ~ 20 である。支持体は、ガラス、プラスチック、セラミック、ポリマー材料、エラストマー材料、金属、合金、複合箔 (composite foils)、半導体、絶縁体、ケイ素および / または積層材料 (layered materials) などを含むが、これらに限定されない、種々の材料であってよい。誘導体化エラストマー支持体は、例えば、ファーガソン (Ferguson) ら, 1993, *Macromolecules 26*: 5870 - 5875; ファーガソンら, 1991, *Science 253*: 776 - 778; ショウドハリー (Chaudhury) ら, 1992, *Science 255*: 1230 - 1232) に記載されているように作成することができる。

PMAMS がその上に作成される支持体の表面は、種々の材料、例えば、網、フェルト、繊維材料、ゲル、固体 (例えば、金属から形成される)、エラストマーなどを含有してもよい。支持体表面は、種々の構造的、化学的および / または光学的性質を有してもよい。例えば、表面は、剛性または可撓性、扁平であるかまたは変形しており、透明、半透明、部分的にまたは完全に反射するかまたは不透明であってよく、そして複合性、異なる性質

の領域を有してもよく、そして 2 つ以上の材料の複合体であってもよい。表面は、パターン付けした表面の結合領域、および / または 1 つまたはそれ以上の表面上で本発明の触媒作用が起こるパターン付けした領域、および / または 1 つまたはそれ以上の表面上の電極のアドレスが可能なアレイを有してもよい。支持体の表面は、平面状、球状、立方体状、および円筒状を含む、任意の適切な形に形作ることができる。具体例において、P M A M S を有する支持体は、ディップスティックである。

P M A M S を有する支持体は、炭素、例えば、粒状炭素、黒鉛、グラッシーカーボンまたはカーボンブラックを含有するか、または 1 つまたはそれ以上の炭素纖維を含有してもよい。これらの纖維は、無定形または黒鉛炭素であってよい。

P M A M S を有する支持体は、「炭素小纖維」、「カーボンナノチューブ (carbon nanotubes)」、「カーボンチュブル (carbon tubules)」、「小纖維」および「バッキーチューブ (buckeytubes)」を含有してもよく、これらの用語はすべて、広いクラスの炭素材料を記載するのに使用される (エム・エス・ドレセルハウス (Dresselhaus,M.S.) ; ジー・ドレセルハウス (Dresselhaus,G.) ; ピー・シー・エクルンド (Eklund,P.C.) ; 「フラー・レンとカーボンナノチューブの科学 (Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes)」、アカデミックプレス (Academic Press)、サンジエゴ、カリホルニア州、1996、を参照されたい。これは参考のため本明細書に組み込まれる)。我々は本出願を通して、この広い範囲の炭素ベースの材料を包含するために「小纖維」および「炭素小纖維」という用語を使用する。

米国特許第 4,663,230 号、5,165,909 号、および 5,171,560 号に開示されるような個々の炭素小纖維は特に有利である。これらは、約 3.5 nm ~ 70 nm の範囲の直径と、直径の 10<sup>2</sup> 倍より大きい長さ、順序付けられた炭素原子の多くの本質的に連続的な層の外部領域および明確な内部コア領域を有してもよい。単に例示目的で述べると、炭素小纖維の典型的な直径は、約 7 ~ 25 nm の間であり、そして典型的な範囲の長さは、1 μm ~ 10 μm であってよい。炭素小纖維はまた、炭素原子の単一の層を有してもよい。

炭素材料は、凝集体を形成するように製造してもよい。米国特許第 5,110,693 号とその引用文献に開示されるように、2 つまたはそれ以上の個々の炭素小纖維は、もつれた小纖維の微視的凝集体を形成する。これらの凝集体は、5 nm ~ 数 cm の範囲の寸法を有してよい。単に説明目的で述べると、微視的凝集体の 1 つの型 (「綿菓子 (cotton candy)」または C C ) は、5 nm ~ 20 μm の範囲の直径と、0.1 μm ~ 1000 μm の範囲の長さを有する、もつれた纖維の紡錘または棒に似ている。再び例示目的で述べると、小纖維の微視的凝集体の別の型 (「鳥の巣 (birds nest)」、または B N ) は、0.1 μm ~ 1000 μm の範囲の直径を有するほぼ球形であってもよい。各型のさらに大きな凝集体 ( C C および / または B N ) または各々の混合物が形成されることもある (下記を参照のこと)。

支持体に使用することができる小纖維は、個々の小纖維、1 つまたはそれ以上の小纖維の凝集体、1 つまたはそれ以上の小纖維の懸濁液、小纖維の分散液、小纖維と他の材料 (例えば、油、パラフィン、蝋、ポリマー、ゲル、プラスチック、接着剤、エポキシド、テフロン、金属、有機液体、有機固体、酸、塩基、セラミック、ガラス、ゴム、エラストマー、生体分子および媒体など) との混合物、並びにこれらの組合せを含むが、これらに限定されない。

小纖維は、ある場合には磁性であり、別の場合には磁性でない。小纖維が磁性または非磁性に作られる程度は、小纖維を製造するために使用されるプロセスにより制御される。そのようなプロセスの例は、米国特許第 4,663,230 号、5,165,909 号、および 5,171,560 号に開示されている。P M A M S は、上述の支持体の上、中、またはこれに接近させて配置される。

P M A M S は、異なる型の表面結合基から生成することができる。これらが結合する表面上の单層を形成するのに使用することができる自己組立单層は、アルカンチオール (金および他の金属に結合する)、アルキルトリクロロシラン (例えば、ケイ素 / 二酸化ケイ素

10

20

30

40

50

に結合する)、アルカンカルボン酸(例えば、酸化アルミニウムに結合する)、並びにこれらの組合せを含むが、これらに限定されない。この単層は最初に形成され、次に結合化学種が結合試薬を付加するのに使用される。自己組立後の誘導体化により、さらにピンホールまたは欠陥の少ない、支持体表面上の単層のより完全な二次元結晶性パッキングが生成する。単層は、自己組立の前にまたは後に、結合試薬により誘導体化することができる。単層における規則的な欠陥は望ましく、そして単層または支持体表面の自己組立の前の誘導体化により得ることができる。結合試薬上の誘導体基(例えば、暴露される結合基)が立体的に大きいなら、暴露される末端で密にパッキングされた表面を作り出すが、金属表面に規則的な間隙を作り出す。このことは、電荷が、これらの規則的な間隙を通って、試料溶液と接触している部分に結合したE C L 標識残基まで流れさせるのに有用である。  
10 不完全な単層の作成法は、当該分野で公知である。不完全な単層の作成のためのその他の方法は、結合試薬の希釈溶液からの単層の形成、完了前の単層形成反応の停止、照射(例えば、イオン性粒子)、光試薬または化学試薬によるより完全な単層に損傷を与えることを含むが、これらに限定されない。1つの実施態様において、再び型押しに墨入れすることなく反復型押し操作を行うと、ある範囲の欠陥のある単層が得られる(ウィルバー(Wilbur)ら, 1995, Langmuir, 11: 825)。

P M A M S は、マトリックスの表面上で生成することができる。マトリックスは、非常に導電性の高い、例えば、金属電極または導電性ポリマーフィルムであるか; またはマトリックスは、絶縁体であるか; またはマトリックスは、半導体および/または中程度の導電性の材料であってよい。マトリックス材料は、イオン導電体または多孔性材料であってよい。このような多孔性材料は、支持体材料および/または導電性材料および/またはフィルター材料および/またはチャネリング材料(例えば、流体、イオン性分子種の通過を可能にする)として利用することができる。  
20

多孔性材料は、さらなる材料と組合せてよい。例えば、さらなる多孔性材料、導電性材料、半導体材料、チャネリング構造および/または溶液(例えば、イオン性流体)と共に多孔性材料から複合構造を組み立てることができる。このような複合体は、積層構造、サンドイッチ構造、および/または分散した複合体であってよい。金属電極上に支持された多孔性材料である、固体マトリックスを使用することができる。あるいは、多孔性材料は、導電性材料、半導体材料、または半導体材料と導電性材料の組合せたものの間にサンドイッチされる。1つまたはそれ以上の結合ドメインは、多孔性材料の1つの連続するスラブ上に封じ込めるか、および/または各々1つまたはそれ以上の結合ドメインを有する支持体上の複数の別々の物体に配置してもよい。多孔性材料(例えば、ゲル)の表面は、平面状、半球上であっても、または任意の規則的な若しくは不規則な形をとってもよく、および/または種々の物理的な性質(例えば、エラストマー性、剛性、低密度、高密度、密度の勾配、乾燥、湿潤など)および/または光学的性質(例えば、透明、半透明、不透明、反射性、屈折性など)および/または電気的性質(例えば、導電性、半導体性、絶縁性、可変導電性、例えば、湿潤対乾燥など)を有してもよい。多孔性材料は、2つ以上の材料の複合体でもよい。  
30

チャネルのパターンは、マトリックス中に形成されてよい。多孔性材料層は、厚さ5ミクロン~2000ミクロンであってよい。多孔性材料層はまた、2mmより厚い場合もある。孔は、部分的および/または材料全体に拡大しているか、または孔の網の一部であってよい。これらの孔は、50~10000μmの広い範囲の寸法を有してよい。好適な実施態様において、この材料は、200~500の範囲の寸法のいくつかの孔と、0.5μm~100μmの範囲の寸法のいくつかの孔を有する。  
40

材料の多孔度は、材料全体で一定であるか、または材料の位置の関数として増大または減少していくてもよい。材料は、無秩序におよび/またはランダムに分配された異なるサイズの種々の孔を有してもよい。

例えば、材料は、生物の細胞のように大きな物体を通過させるのに十分なほど大きいいくつかの孔、タンパク質または抗体のような大きな生物学的媒体を通過させることのできるいくつかの孔、有機低分子(分子量<1000)のみを通過させることのできるいくつか  
50

の孔、および／またはこれらの組合せを有してよい。

材料の多孔度は、1つまたはそれ以上の分子、液体、固体、エマルション、懸濁液、気体、ゲルおよび／または分散液が、材料の中に、材料の中で、および／または材料を通り抜けて拡散することができる程度であってよい。材料の多孔度は、生物学的媒体が、材料の中に、材料の中で、および／または材料を通り抜けて（能動的にまたは受動的に）拡散することができるか、あるいは何らかの手段により強制的にこれを起こすことのできる程度である。生物学的媒体の例は、全血、分画血液、血漿、血清、尿；タンパク質、抗体またはその断片、細胞、細胞より小さい粒子、ウイルス、核酸、抗原、リポタンパク質、リポサッカリド、脂質、糖タンパク質、炭水化物、ペプチド、ホルモンまたは薬剤の溶液を含むが、これらに限定されない。多孔性材料は、生物学的媒体が、1つまたはそれ以上の層を通過できるが、その他の層は通過できないような、異なる多孔度の1つまたはそれ以上の層を有してもよい。

多孔性材料はまた、イオン性分子種の流れによる電流を維持することができる。さらに詳細には、多孔性材料は、多孔性の水膨潤性ゲル、例えば、ポリアクリルアミドまたは寒天である。種々のその他のゲル組成物も利用可能である（例えば、ディー・エス・ソーン（Soane,D.S.）の「バイオテクノロジーへのポリマー応用（Polymer Applications for Biotechnology）」；ディー・エス・ソーン編；サイモンとシュスター（Simon & Schuster）：エングルウッド・クリフス（Englewood Cliffs）、ニュージャージー州、1992年、または「医学および薬学におけるヒドロゲル（Hydrogels in Medicine and Pharmacy）」第I巻～III巻；エヌ・エイ・ペッパス（Peppas,N.A.）編；シーアールシー出版（CRC Press）；ボカレイトン（Boca Raton）、フロリダ州、1987年を参照のこと）。結合ドメインは、共有および非共有結合によりマトリックスに結合させることができる。（この主題に関する多くの総説および本が書かれている；数例をあげれば、ジェイ・タンピオン（Tampion J.）およびエム・ディー・タンピオン（Tampion M.D.）の「固定化細胞：原理と応用（Immobilized Cells:Principles and Applications）」ケンブリッジ大学出版（Cambridge University Press）：ニューヨーク州、1987年；「固相生化学：分析および合成の侧面（Solid Phase Biochemistry:Analytical and Synthetic Aspects）」、ダブリュー・エイチ・スカウテン（Scouten,W.H.）編、ジョンワイリーとサンズ（John Wiley and Sons）：ニューヨーク州、1983年；「酵素学の方法、固定化酵素および細胞（Methods in Enzymology,Immobilized Enzymes and Cells）」、パートB、ケイ・モスバッハ（Mosbach,K.）編、エルゼビア・アプライド・サイエンス（Elsevier Applied Science）：ロンドン、1988年；「酵素学の方法、固定化酵素および細胞（Methods in Enzymology,Immobilized Enzymes and Cells）」、パートC、ケイ・モスバッハ（Mosbach,K.）編、エルゼビア応用科学（Elsevier Applied Science）：ロンドン、1987年；「酵素学の方法、固定化酵素および細胞（Methods in Enzymology,Immobilized Enzymes and Cells）」、パートC、ケイ・モスバッハ（Mosbach,K.）編、エルゼビア・アプライド・サイエンス（Elsevier Applied Science）：ロンドン、1987年；また、「医学および薬学におけるヒドロゲル（Hydrogels in Medicine and Pharmacy）」、上記文献も参照のこと）。例えば、タンパク質はポリアクリルアミドとN-アクリロイルスクシンイミドの架橋コポリマーに、タンパク質の溶液による処理によって結合させることができる。結合ドメインはまた、重合またはゲル化の前の工程において多孔性マトリックス中に組み込むことができる。1つの実施態様において、結合ドメインは、種々のカップリング化学種を使用することにより、架橋していないポリマーに結合することができる。次にこのポリマーを架橋させることができる（例えば、アミド結合、ジスルフィド、エポキシドへの求核攻撃などを含む化学種を使用して）（例えば、ポラック（Pollack）ら、1980, J. Am. Chem. Soc. 102 (20) : 6324 - 36を参照のこと）。結合ドメインは、モノマー分子種に結合することができ、次にこれは重合の間にポリマー鎖に組み込まれる（オー・アダルステインソン（Adalsteinsson,O.）, 1979, J. Mol. Catal. 6 (3) : 199 - 225を参照のこと）。さらに別の実施態様において、結合ドメインは、重合／ゲル化の間に孔に結合ドメインを捕捉することにより、または多

10

20

30

40

50

孔性マトリックスおよび／またはフィルム中への結合ドメインの浸透により、ゲル中に取り込まれてもよい。さらに、結合ドメインは、例えば、疎水性および／またはイオン性相互作用により引き起こされる非特異的な吸着により、多孔性マトリックス（例えば、ポリマーゲルおよびフィルム）の表面上に吸着されてもよい。架橋または結合剤として、有利にはビオチンが使用される。アビジン、ストレプトアビジンまたは他のビオチン結合物質も結合ドメイン中に取り込むことができる。

P M A M S は、種々の孔サイズおよび溶媒含量を有する多孔性材料（例えば、ゲル）上に生成することができる。例えば、種々の孔サイズのポリアクリルアミドゲルは、アクリルアミドの濃度と架橋の程度を変化させることにより調製することができる。

アナライトよりも小さな孔サイズを有するP M A M S 上では、結合反応は実質的にゲルの表面上で起こる。この場合、ゲルによる濾過および／または電気泳動を利用して、ゲルの表面でアナライトを濃縮し、結合反応の速度を調節する（例えば、速度を増大させる）ことができる。速度を高めると迅速な測定（例えば、結果が出るまで短時間）において有利であり、短い時間で高感度が得られる。

アナライトよりも大きな孔サイズのP M A M S では、結合反応は、大量のゲルの中と同様に表面上で起こりうる。この場合に、濾過および／または電気泳動を利用して、結合の速度を増大させて、表面から未結合種を除去することができる。

ゲル上に形成されるP M A M S は、湿潤状態で保存しても、および／または乾燥状態で保存して測定の間に再構成してもよい。E C L 測定法に必要な試薬は、保存の前にゲルに組み込まれるか（ゲル中への浸透またはゲルの形成中の取り込みにより）、および／またはこれらは測定中に添加してもよい。

P M A M S のパターン付けした結合ドメインは、液体のマトリックス中に各結合ドメインを含有する液滴または微小液滴の基質への適用により、生成することができる。次に液体の凝固および／またはゲル化は、種々の公知の方法（重合、架橋、ゲル化遷移点以下の冷却、加熱）により引き起こすことができる。凝固またはゲル化を引き起こす物質がこの液滴に含まれているため、適用後のある時点で、この液滴は凝固および／またはゲル化する。次の処理（例えば、光、放射線および／または酸化還元電位への暴露）を利用して凝固および／またはゲル化を起こしてもよい。その他の実施態様において、このような液滴または微小液滴は、スラリー、重合前混合物、粒子群、および／または実質的に固体の液滴であってよい。さらに気相析出（vapor phase deposition）を利用することができる。

パターン付けはまた、各々1つまたはそれ以上の結合ドメインを含有するマトリックスの積層構造を形成することにより、達成することができる。例えば、抗体に結合（標準的化学による）したアガロースを容器に注ぎ入れて、冷却することによりゲル化させた。次に他の抗体を含有する次の層を最初の層上に注ぎ入れて、ゲル化させた。この積層構造の横断面は、複数の別々の結合ドメインを提示する連続表面を与える。このような横断面を積み重ねて、もう1つの横断面を切断してさらに高密度の結合ドメインを有するP M A M S 表面を作り出すことができる。あるいは、所定の結合要素を含有するマトリックスの線を相互に接近させて作るか、かつ／あるいは積み重ねる。このような構造はまた、横断面で切断して、P M A M S 表面として使用することができる。

パターン付けはまた、分離を達成するいくつかのマトリックスの能力を利用することにより達成することができる。例えば、核酸プローブの混合物を、ポリアクリルアミドラバ中での電気泳動により分離して、複数の別々の結合ドメインを提示する表面を生成することができるであろう。

微量流体ガイド（microfluidic guide）も、支持体上のP M A M S 結合ドメインを作成するのに使用することができる。微量流体ガイドの部分的な一覧は、中空毛細管、マトリックス（例えば、多孔性または溶媒膨潤性媒体）から作られたか、および／またはマトリックスで充填された毛細管、薄膜または液滴を支持することができる固体支持体を含む。毛細管は固体であってよく、そして試薬は毛細管の外表面に沿って流れ、試薬流体リザーバーは、P M A M S 表面と接触させられる多孔性マトリックス先端に露出してもよい。例えば、試薬リザーバーは、所定の多孔性マトリックス先端が、何回も試薬（例えば、単層お

10

20

30

40

50

および / または結合試薬などを形成するためのアルカンチオール ) を再現可能に沈積することができるよう、連続的にまたは周期的に再充填される。さらに、この先端の多孔度を変化させると、表面への試薬の流れを制御することができる。異なるかまたは同一の結合試薬は、複数の毛細管中に存在してもよく、および / または多数の別別の結合物質は、所定の毛細管中に存在してもよい。毛細管を P M A M S ( 例えは、パターン付けした S A M ) 表面と接触させて、そのため、ある領域が結合試薬に暴露されて、別々の結合ドメインが作り出される。各々異なる微量流体ガイド中に存在する異なる結合試薬は、同時に流体ガイドアレイから、必要に応じて金属表面、 S A M などに送達される。微量流体ガイドはまた、支持体表面への適用の前に、微小型押しに目的の分子を補充するために使用することができる。例えば、個々の微量流体ガイドは、支持体の表面への吸着を促進して P M A M S を形成する残基 ( 例えは、炭化水素リンカー上の遊離チオールであり、これは金への吸着を促進する ) に結合した、異なる結合試薬を適用するために使用することができる。すなわち、例えは、微量流体ガイドの使用により異なる特異性の抗体を充填した微小型押しは、金表面上の目的の領域にこのような抗体を適用して、 P M A M S の別々の結合ドメインを形成するために使用することができる。

微量流体ガイドはまた、小さなオリフィスを通って液滴の放出による流体の微小液滴を送達するミクロプリント装置 ( 例えは、インクジェットプリンタ ( Ink-Jet printer ) ) の使用に関する。これらの装置の放出液滴は、加熱、静電荷、および / またはピエゾ装置からの圧力などの異なる機構により引き起こされる。2つ以上の液体のパターン付けは、多数のオリフィスおよび / または1つのオリフィスおよび適切なバルブ調節の使用により達成することができる。

P M A M S の1つの作成方法において、微量流体ガイドを使用して、表面上の別々の領域に、目的の結合試薬を含有する液滴を直接 ( 好ましくは同時に ) 送達して別々の結合ドメインを形成する。結合試薬は、これが適用される表面上の化学基と結合する化学官能基を含有してもよい。別の変法において、液滴中の結合試薬は、表面に非特異的に吸着または結合される ( 例えは、表面上で乾燥する ) 。

あるいは、表面上に沈積した液滴は、マトリックスを形成することができる試薬を含有してもよい。このマトリックスは、固体、ポリマーまたはゲルであってよい。マトリックスの形成は、溶媒の留去によってもよい。モノマー分子種の重合でもよい。前もって形成されたポリマーの架橋でもよい。温度の調節 ( 例えは、冷却および / または加熱 ) でもよい。他の方法でもよい。例えは、ポリマー分子種を冷却遷移 ( cooling transition ) により、またはゲル化を起こす試薬の添加により冷却してもよい。固体マトリックスの形成は、光 ( または他の放射線 ) 、凝固またはゲル化を誘導する試薬の添加、冷却または加熱による、電極での反応性分子種 ( 基質を含む ) の生成により誘導することができる。さらに、表面は、マトリックス形成 ( 例えは、ゲル化または重合 ) を開始することができる触媒を含有してもよい。

好適な方法において、適用した流体またはゲルの拡散を防止するために、パターン付けした親水性 / 疎水性領域を使用することができる。このような流体またはゲルは、支持体の表面に結合して P M A M S の結合ドメインを形成する結合試薬を含有してもよい。この場合、このような親水性 / 疎水性境界の使用は、別々の領域に生成した結合ドメインを閉じこめる助けとなる。あるいは、流体は、表面上にマトリックスを形成することができる試薬を含有し、そして結合試薬は、表面上に沈積されるとき規定される領域内に含有される。例えは、親水性 / 疎水性境界の助けは、液滴を規定される領域に閉じこめるために使用することができる。さらに、親水性または疎水性領域のいずれかは、マトリックスに組み込まれて ( 例えは、共有または非共有結合して ) 、基質へのマトリックスのより安定な接着を可能にする基を提示することができる ( イタヤ ( Itaya ) とバード ( Bard ) , 1978 , A n a l . C h e m . 50 ( 11 ) : 1487 - 1489 ) 。別の方法において、適用される流体またはゲルは、目的のアナライトを含有する試料であり、この試料を作成した P M A M S に適用する。1つの好適な例において、親水性溶液を含有する毛細管を使用して溶液を別々の領域に沈積して、疎水性領域に囲まれた親水性ドメインを作り出すこと

10

20

30

40

50

ができる。あるいは、親水性領域に囲まれた疎水性結合ドメインを、結合試薬あるいはアナライトを含有する疎水性流体と共に使用することができる。疎水性および親水性とは、相互について、および／または適用される試料についての、すなわち、結合ドメインに適用される流体あるいはゲル試料の拡散または湿潤が制御されるための、相対的な用語である。さらに、微量流体アレイからの制御された溶液の沈積は、物理的表面の特徴（例えば、表面上のウェルまたはチャネル）を使用して達成することができる。微量流体ガイドは、カセットに含まれ、またはさらに好ましくは、使用の前に支持体に特異的な試薬を適用するのに使用することができる。

多数の型押しを使用して、同じ支持体表面に 2 つ以上の結合化学種を適用することができるか、および／または親水性および疎水性結合ドメインの両方を有する表面を作り出すことができる。例えば、親水性結合ドメインを位置 1 に、そして疎水性結合ドメインを位置 2 に必要とする領域は、以下の通り作成することができる。最初の親水性型押しは、位置 1 に円盤を、そして位置 2 により大きな環を有するように作られる。第 2 の疎水性型押しは、位置 2 に型押し 1 により残される環状単層の内側に適合する円盤を有するように作られる。最後に、表面を単層成分の疎水性溶液で洗浄する。

詳細には、P M A M S は、ミクロコンタクトプリンティング、すなわち、型押しにより生成する。こうして適用された単層は、表面結合基から構成され、これは、例えば、金表面については、アルカン( ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> )スペーサーを有するチオール基が好適である。スペーサー基は、結合基 A に結合（好ましくは共有結合）される。「A」は、例えば、アビジン、ストレプトアビジンまたはビオチン、あるいは利用可能な相補的結合パートナーの「B」との任意の他の適切な結合試薬であってよい。A : B 結合は、共有または非共有であってよく、使用可能な当該分野で公知のいくつかの結合化学種は、例えば、バード (Bard) ら (米国特許第 5,221,605 号および 5,310,687 号) により開示されている。「B」はさらに、抗体、抗原、核酸、薬剤、または試験すべき試料中の目的の 1 つまたはそれ以上のアナライトに結合することができる結合ドメインを形成するために適切な他の物質のような、結合試薬に結合している。B はまた、E C L T A G または標識物に結合していてもよい。結合基 B は、異なる結合表面特異性を有する複数の「B」試薬を、単層「A」結合上に配置することができる、毛細管または微量流体ガイドアレイ（図 5 A ~ 5 C ）により S A M に送達することができる。A と B はまた、単層に結合する前に結合することができる。図 5 A では、考察したように単に例示の目的で幾何学図形 602 として、異なる結合特異性が、单一支持体 600 上に存在しうることを示すために、形に非依存性の結合ドメインが表される。図 5 B は、微量流体ガイド（例えば、毛細管）アレイ 606 の平面図を提供する。ドット 610 は、横断面のガイドである。図 5 C は、微量流体ガイドアレイ 608 の側面図を提供する。上部と底部から出ている線は、個々の微量流体ガイド 610 である。下面の幾何学図形 612 は、個々の毛細管からの結合試薬の送達により形成される特異的な結合ドメインを表す。

例として、上述の最初の型押し後、露出した表面（例えば、金）領域は、結合化学種 A を含まず、上記最初の単層と反対の親水性／疎水性である、第 2 のアルカンチオールと反応することができる。このように、特異的結合ドメインは表面上に作成される。

1 つの目的のアナライトに特異的な結合試薬を各結合ドメインに使用することができるか、または多数の目的のアナライトに特異的に結合する結合試薬を使用することができる。さらに別の変法において、支持体表面は、上記図 5 A に示されるように、異なる結合化学種および／または結合残基を有する物質（例えば、結合試薬、E C L 標識、S A M ）により何度も型押しすることができる。

パターン付けした結合試薬は、安定であるか、および／または頑丈な化学基（例えば、これらが受ける条件に耐えて残る基）であってよく、これが後であまり安定でないかまたは強い結合基に結合する。P M A M S 表面の作成における各工程の条件を最適化するために、および／または P M A M S 表面の製造法を単純化するために、多数の結合の仕方を利用することができる。例えば、最初の P M A M S 表面は、一般的な方法で組み立てて、次に異なる P M A M S 表面を作り出すために修飾してもよい。別の例において、一般的な P M

10

20

30

40

50

A M S 表面を、それ自体が P M A M S 表面上の特定領域（例えば、結合ドメイン）に向ける結合ドメインを含有する結合試薬の溶液混合物と反応させることができる。例えば、各々異なるオリゴ（ヌクレオチド）配列を提示する結合ドメインのパターンを表面に結合する。次にこの表面を、各々表面上の配列に相補的なオリゴ（ヌクレオチド）配列に結合している、二次結合試薬の混合物を含有する溶液で処理する。このように、これらの二次結合要素のパターン付けを達成することができる。好ましくは、オリゴ（ヌクレオチド）配列は、6～30量体のDNAである。あるセットの6～30量体配列は、実質的に同様な配列相補性を有するため、ハイブリダイゼーションのおよその結合定数は、所定のセット内で同様であり、相補性の低い配列とは識別可能に異なっている。別の実施態様において、二次結合要素はタンパク質（例えば、抗体）である。

10

下記セクション5.13に記載されるように、表面上に適用された試薬または試料の湿潤または拡散を阻害するための記載された方法はまた、P M A M S の作成（および/または試料の適用）においても使用することができる。適用される電位（例えば、電極/対電極の対から）を使用して、試薬および/または試料の沈積および/または拡散をさらに制御することができる（例えば、アボット（Abbott）ら，1994，Langmuir 10（5）：1493-1497を参照のこと）。

P M A M S 結合試薬は、炭素（例えば、粒状炭素、カーボンブラック、カーボンフェルト、グラッシャーカーボンおよび/または黒鉛）を含有する材料上に存在してもよい。ある実施態様においてこれらはまた、炭素纖維（例えば、炭素纖維または炭素小纖維）に存在する。結合試薬は、1つまたはそれ以上の小纖維の凝集体に存在してもよい。多くの実施態様において、P M A M S 結合試薬は、これらの炭素材料の懸濁液、炭素材料と他の材料との混合物並びにその組合せに存在してもよい。

20

P M A M S 結合試薬は、支持体上にまたは支持体内にまたはこれに接近して存在する複数の個々の小纖維および/または小纖維の凝集体に存在してもよい。1つの例において、結合試薬は、分散した個々の小纖維または小纖維凝集体に存在する。これらの小纖維または小纖維の凝集体は、支持体上の別々のドメイン中に間を空けて配置することができ、そして本出願で定義される結合ドメインを構成することができる。

別の例において、個々のこのような結合ドメインまたは複数のこのような結合ドメインは、支持体の間の空いた別々の領域内に存在する。非限定的な例として、個々のこのような結合ドメインまたは結合ドメインの集合は、支持体の凹部、くぼみおよび/または穴に存在してもよい。さらに別の例において、個々の結合ドメインまたは複数のドメインは、支持体の表面上に局在化している、水、ゲル、エラストマー、プラスチック、油などの液滴に存在してもよい。また別の例において、個々の結合ドメインは、異なる結合試薬および/または結合試薬/小纖維全体に対して異なる結合親和性を有するコーティング（パターン付けされていてもよい）により、支持体上に局在化してもよい。

30

結合ドメインは、複数の個々の小纖維上に配置されるか、および/または小纖維の凝集体は、1つまたはそれ以上の微量流体ガイド（例えば、毛細管）により支持体上に作成することができる。異なるかまたは同一の結合試薬は、複数の微量流体ガイドの中または上に存在するか、および/または多数の別々の結合試薬が、所定の微量流体ガイドの中または上に存在してもよい。毛細管は、支持体と接触（スポット付け）させるか、および/または、微量流体ガイドおよび/または表面をもう一方に対して走査または移動させながら（すなわち、字を書くときのペン様の方法）、試薬を送達することができる。微量流体ガイドは、小纖維上に存在する結合試薬を支持体に送達して、別々の結合ドメインを作り出すように、支持体のある領域が小纖維結合試薬複合体に暴露されるようにしてよい。好適な面において、各々異なる微量流体ガイドに存在する異なる結合試薬は、ガイドアレイから同時に支持体に送達される。1つの例において、結合試薬および/またはこれらが局在化される小纖維は、支持体の表面への結合（例えば、共有または非共有相互作用）を形成する化学官能基により誘導体化される。いくつかの実施態様において、結合試薬と小纖維は、表面に非特異的に結合するか、または吸着される。さらに別の面において、小纖維上に局在化される結合試薬は、支持体の表面の凹部、くぼみおよび/または穴に送達するこ

40

50

とができる。別の例において、結合試薬は、ある結合試薬または結合試薬／小纖維全体に対してより強いかまたは弱い結合親和性を有するため、他の結合試薬と間を空けて別々に局在化される試薬のドメインを作り出す、材料でコーティングされている表面に送達される。

結合試薬は、磁性の 1 つまたはそれ以上の個々の小纖維または小纖維の凝集体上に局在化される。このような場合、磁性支持体は、磁性小纖維上に局在化した結合試薬を支持体に引きつけることができる。

支持体は、磁性でない領域に囲まれている、磁性であるいくつかの別々の領域を含有することができる。磁性小纖維上に局在化される結合試薬は、支持体の磁性領域上に局在化することができる。1つの例において、支持体は、かつ磁性でない領域に囲まれている、磁性である1つまたはそれ以上の領域を含有してよく、磁性領域の磁界の強さは調節するか、または切り替えることができる。この面において、このような調節された、または切り替え可能な磁界の使用は、支持体の表面から小纖維上に局在化される結合試薬を付加または放出する際に助けとなり、このため、前記ドメインを攪拌または混合するのに役立つ。大体  $2 \sim 10^8$  の結合ドメインが存在し、好ましくは  $25 \sim 500$  ドメインが存在する。

結合ドメインは、作用電極および／または対電極上に存在することができる。

異なる型の P M A M S 、支持体、および電極並びにそれらの配置について本明細書に記載される異なる実施態様はまた、相互の組合せで実施することができる。

P M A M S 支持体は、後の使用のために保存（例えば、保護表面コーティング、表面の乾燥、真空下または不活性雰囲気下の頑丈な包装、冷蔵および関連方法）することができる。

## 5.2. 結合試薬

本発明の結合ドメインは、少なくとも1つの目的のアナライト（リガンド）に特異的に結合する結合試薬を含有するように作成される。別々の結合ドメイン内の結合試薬は、結合ドメインが目的の結合特異性を有するように選択される。結合試薬は、目的のアナライトを特異的に結合することができるか、またはできることが推定されることが当該分野で公知の任意の分子の中から選択することができる。目的のアナライトは、下記セクション 5.10 の「実施することができる E C L 測定法」に記載されるものの中から選択することができる。すなわち、結合試薬は、受容体、受容体のリガンド、抗体またはその結合部分（例えば、F a b、（F a b）' 2）、タンパク質またはその断片、核酸、オリゴヌクレオチド、糖タンパク質、多糖、抗原、エピトープ、細胞および細胞成分、細胞内粒子、炭水化物残基、酵素、酵素基質、レクチン、プロテインA、プロテインG、有機化合物、有機金属化合物、ウイルス、ブリオン、ウイロイド、脂質、脂肪酸、リポ多糖、ペプチド、細胞内代謝物、ホルモン、薬剤、トランキライザー、バルビツール酸、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖類、非生物学的ポリマー、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ポリマー樹脂のような有機結合化合物、リポタンパク質、サイトカイン、リンホカイン、ホルモン、合成ポリマー、有機および無機分子などを含むが、これらに限定されない。核酸とオリゴヌクレオチドは、D N A 、R N A および／またはオリゴヌクレオチド類似体を意味し、これらには、修飾塩基または修飾糖を含有するオリゴヌクレオチド、ホスホジエステル結合以外の基本骨格化学種を含有するオリゴヌクレオチド（例えば、ピー・イー・ニールセン（Nielsen, P.E.）（1995）Annals Rev. Biophysics. Biomol. Street. 24 167-183を参照のこと）、および／または他の分子への結合（共有または非共有）を形成するのに使用することができる化学基を提示するように合成または修飾されているオリゴヌクレオチドを含むが、これらに限定されない（ここで、我々は核酸またはオリゴ（ヌクレオチド）を2つまたはそれ以上の核酸塩基および／または核酸塩基の誘導体を含有するとして定義している）。

本発明の P M A M S は、異なる結合ドメインにより目的の異なるアナライトの結合を与えるために、相互に同一であり、かつ他の結合ドメインに含まれる結合試薬とは特異性の異なる結合試薬を含有する、少なくとも1つの結合ドメインからなる、複数の別々の結合ドメインを有してもよい。例として、このような P M A M S は、甲状腺刺激ホルモン（T S

10

20

30

40

50

H)に対する抗体を含有する結合ドメイン、C型肝炎ウイルス(HCV)にハイブリダイズするオリゴを含有する結合ドメイン、HIVにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有する結合ドメイン、HIVタンパク質または糖タンパク質に対する抗体を含有する結合ドメイン、前立腺特異抗原(PSA)に対する抗体を含有する結合ドメイン、およびB型肝炎ウイルス(HBV)に対する抗体を含有する結合ドメイン、または前記の任意の部分集合からなる。

PMAMSは、単一の結合ドメインが多数の目的のアナライトに結合することができるよう、結合特異性の異なる結合試薬をその中に含有する、少なくとも1つの結合ドメインからなる、複数の結合ドメインを有してよい。例として、このようなPMAMSは、T細胞抗原受容体に対する抗体とCD4のようなT細胞表面抗原に対する抗体の両方を含有する、結合ドメインからなる。

PMAMSは、(i)相互に同一であり、かつ他の結合ドメインに含まれる少なくとも1つの結合試薬とは特異性の異なる結合試薬を含有する、少なくとも1つの結合ドメイン；および(ii)結合特異性が異なる結合試薬をその中に含有する少なくとも1つの結合ドメインからなる、複数の別々の結合ドメインを有してよい。例として、(a)単一の本体(例えば、T細胞抗原受容体、例えば、-T細胞抗原受容体または-T細胞抗原受容体に対する抗体)の結合試薬を含有するため、この少なくとも1つの結合ドメインが、このT細胞抗原受容体を発現する全ての細胞に結合することができる、少なくとも1つの結合ドメイン；および(b)2つの異なる結合試薬、例えば、T細胞抗原受容体に対する抗体とCD4に対する抗体を含有するため、その少なくとも1つの結合ドメインが、そのT細胞抗原受容体を発現するCD4<sup>+</sup>Tリンパ球(すなわち、Tリンパ球の部分集団)に結合することができる、少なくとも1つの結合ドメインを有するPMAMSが製造される。

別の実施態様において、少なくとも1つの結合ドメインは、異なる分子であるが同じ結合特異性を有する結合試薬(例えば、上皮成長因子と上皮成長因子受容体に対する抗体のような結合試薬)を含有する。

複数の結合試薬は、これらの試薬が、異なっており、異なる結合特異性を有するとしても、同じアナライトを認識するように、選択することができる(別の実施態様においては、異なるアナライトが認識される)。例えば、アナライトが、多くの結合残基を有するアナライト(例えば、異なる細胞表面抗原を有する細胞)である場合は、異なる結合残基に結合する異なる結合試薬は、同じアナライトを認識するであろう。別の例として、単一細胞上の異なる細胞表面抗原に対する抗体は同じ細胞を認識するであろう。さらに別の例として、単一抗原の異なるエピトープに対する抗体は、その抗原を認識するための結合試薬として使用することができる。

複数の結合試薬は、複数の結合ドメイン(このような結合ドメインは、同じアナライトを認識するが異なる親和性を有する)が形成されるように、選択することができる。このようなPMAMSの使用は、広範囲の濃度(例えば、高親和性結合ドメインは、より低い親和性結合ドメインを飽和しない条件下でアナライトで飽和される)にわたってアナライトの検出を可能にする。

なおさらなる実施態様において、目的の單一アナライトに特異的に結合する結合試薬のみが、1つまたはそれ以上の結合ドメインに存在する。あるいは、2つ以上の目的のアナライトに特異的に結合する結合試薬は、1つまたはそれ以上の結合ドメインに存在する(例えば、交差反応性抗体)。特定の設計において、あるクラス(例えば、同様の特徴を有する)のアナライトに結合する結合試薬を使用することができる。

結合ドメインはまた、目的の標準的アナライトに特異的で、内部標準として利用される結合試薬を含有するPMAMS中に組み込むことができる(例えば、結合試薬が結合するアナライトの明確な量を含有する試料と接触させることのできる結合ドメイン)。同じアナライトに特異的な結合試薬を含有する多数の結合ドメインはまた、分析結果の統計的平均化が可能になるように、PMAMS中に組み込むことができる。結合試薬は、同じアナライトに特異的であるだけでなく、同一であり、このため、アナライト上の同じ結合残基を

10

20

30

40

50

認識する。すなわち、E C Lの読みを变量について照合し、正確度を改善するために統計的に平均化することができるよう、同じ結合残基に特異的に結合する複数の結合ドメイン（例えば、2～10<sup>8</sup>個の範囲内の）を作成することができる。P M A M S上の複数の結合ドメインは、単一の支持体上の、対照のアナライトまたは目的のアナライト、あるいは両方に特異的であってもよい。

別の例として、1つまたはそれ以上の別々の結合ドメインは、既知の初期濃度数のE C L標識物で作成することができる。組み込まれたE C L層は、例えば、標識物の分解および温度効果をモニターするための対照として役立つ。

基質（この基質は、目的のアナライトである）に対して特異的な酵素である結合試薬を使用することができ、そして基質上のこの酵素反応の産物は、レポーター物質（検出可能な物質）、例えば、E C L反応を引き起こす産物、蛍光分子、適切な酵素との接触により色を変化する基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼの発色性基質）などである。このような実施態様の例において、結合試薬として使用される酵素は、グルコースデヒドロゲナーゼ（G D H）であり、これは、試料中のグルコースを検出または測定するために使用することができる。E C L標識物は、G D Hを含有する結合ドメイン内、またはその近くに位置する。N A D Hは、グルコースへの酵素の作用により産生し、N A D HはE C L標識と反応して、E C Lを促進することができる（マーティン（Martin）ら，1993，Anal. Chim. Acta 281：475）。

バックグラウンド結合を増大させる結合試薬（すなわち、目的のアナライトだけでなく試料中の他のアナライト上に存在する結合残基にも結合する）を含有する結合ドメインを、電気化学発光の検出または測定の間のシグナル対ノイズ比を増大させるために使用することができる。例として、目的のアナライトが特異的な細胞の部分集団（例えば、C D 4<sup>+</sup>細胞）であり、かつ試料が患者からの細胞を含有する液体試料（例えば、血液）である場合、シアル酸に対する抗体を試料中の実質的に全ての細胞に対するバックグラウンド結合を増大させる結合試薬として使用し（シアル酸は、実質的に全ての細胞表面糖タンパク質の成分であるため）、そしてその細胞の部分集団に対して特異的な細胞表面糖タンパク質に対する抗体（例えば、C D 4に対する抗体）を結合試薬（シアル酸に対する抗体を含有する結合ドメインと同じかまたは異なる結合ドメイン中の）として使用することができる。

### 5.3. 電位波形

E C Lセルの電極および対電極にかけられる電位波形（電位／時間の変化）は、E C L反応を引き起こすのに十分なものである必要がある。この電位波形は通常、第1の電位で開始して、着実に第2の電位に移行し、第1の電位を通過して第3の電位に移行し、再度第1の電位に戻す、一定の掃引電位の形である。例えば、波形は、-0.5～0.5ボルトの範囲の第1の電位で開始し、1～2.5ボルトに上げて、第1の電位を通過して、0.0～-1ボルトの範囲の第3の電位に移行してもよい。別の例として、より単純な波形で、電位を0.0～+3.5～0.0に変更することができる。電位波形は、線形傾斜路、階段関数、および／またはその他の関数を組み込むことができる。電位波形は、電位が1つの電位に固定されて留まる時間を組み込むことができる。適用される電位は、1つまたはそれ以上の参照電極に対して制御されるか、または参照電極を使用しなくてもよい。さらに、負電位を使用することができる。従って、本発明のカセットからのE C L発光を誘導するために使用される電位は、E C Lラベルに対する最適なE C Lシグナル強度と特異性、および測定媒体について、容易に選択されるであろう。

いくつかの適用において、電位は、好ましくは結合ドメインから放出される光が測定されるにつれ変化する。このことは、結合ドメインに光を放出させるのに必要な電場の閾値を決定するために特に重要である。この場合、結合ドメインに適用される電位は、光を放出するのに必要な閾値以下であると考えられる値で開始して、最初の測定が放出される光により行われる。光が測定されなければ、または光が、前もって決めた閾値以下であるならば、電極対間に適用される電位は、コンピュータ制御電位供給源によるなどして、コンピュータ制御下で増大させて、もう一度光測定を行う。このプロセスは、前もって決めた適

10

20

30

40

50

切な量の光が受けられるまで、反復することができる。このように、適用される電位は、測定シグナルとして使用することができる。

電位波形は、A C 成分を含有してもよい。このような波形の使用は、（例えば、電位入力と周波数が異なるシグナルをフィルターで除くことにより）E C L シグナルの検出においてより良好なシグナル対ノイズ比を可能にする。

例えば、米国特許第 5,324,457 号および 5,068,088 号に開示されるような、電位および電流の設定に詳しい普通の技術者であれば、E C L 発光を引き起こすための最適な操作電位および掃引電位を容易に選択することができるであろう。

E C L を生成するために要する電位は、作用電極が半導体であるか、または光に応答して電流を生成する別の残基を含有するならば、作用電極表面の発光により生成することができる。

#### 5.4. アドレスが可能な電極およびその使用法

複数の電極 / 対電極の対をアドレスするために多くの方法を使用することができる。このような方法のいくつかを図 14 ~ 18 に例示する。これらの図面に例として 4 つの電極 / 対電極の対 101、102、103、104、および典型的にはデジタルコンピュータであり、かつ検出手段により検出される E C L を処理するために使用されるのと同じコンピュータである波形発生器が示される。

図 14において、各電極 / 対電極の対 101 ~ 104 は、波形発生器に接続される線の対により個々にアドレスされている。例として、線 105、106 は、電極 / 対電極の対 101 にアクセスしている。適切な波形は、種々の電極 / 対電極の対に接続されている任意の 1 つまたはそれ以上の線の対に、任意の所定の時間に適用することができる。

電極対をアドレスするのに要する接続部の数を低減するために、図 14 の直接接続概略図の代替法が提供される。例えば、いくつかのまたは全ての電極に電気的エネルギーを与えるための、行と列のアクセス概略図が図 15 に例示されている。この概略図において、複数の電極 / 対電極の対の各行の 1 つの電極 201、202 は、支持体 200 上の共通の導電体 205 に接続されており、複数の電極 / 対電極の対の各行の対電極の各々は、支持体 200 上の導電体 207、208 に接続されている。導電体 205、206 は、支持体 200 の縁で各々接続部 C1、C2 に接続し、そして導電体 207、208 は、各々接続部 R1、R2 に接続する。これらの各接続部は、次に、別々の線により波形発生器に接続されている。この結果、図 15 の構成において、必要な接続部および波形発生器からのシグナル線の数は、8 から 4 に減少した。

各電極対の迅速で一連のエネルギー付与を可能にするために、コンピュータ制御切り替え装置は有益である。図 16 の構成は、第 1 のマルチブレクサー 310 に接続した複数の電極を示している。複数の対電極は第 2 のマルチブレクサー 320 に接続している。第 1 のマルチブレクサーはまた、典型的には後述される時間変動電位を供給する、電位供給源 330 の第 1 の極にも接続されている。第 2 のマルチブレクサーも、電位供給源の第 2 の極にも接続されている。各マルチブレクサーに電気的に接続され、ラッチ 340 に接続されている線 A0 ~ A3 のアドレスを使用して、コンピュータプロセッサー 350 は、任意のまたは全ての第 1 電極を電位供給源の第 1 の極に、任意のまたは全ての第 2 の電極を電位供給源の第 2 の極に選択的に接続するために、マルチブレクサーを管理することができる。

図 17 に示されるように、複数の電位供給源が、各電極への別々のセットのマルチブレクサーにより接続されている。第 1 の電位または電位の範囲が特定の電極対で必要であれば、その電位を提供する電位供給源 430 につながったマルチブレクサー 410、420 が、典型的にはラッチ 340 により、コンピュータプロセッサー 350 にアドレスされて、こうして問題の電極対にその特定の電位供給源を接続する。別々の電極対に異なる電位または電位の範囲が必要であるならば、異なる電位供給源 460 につながったマルチブレクサー 440、450 がコンピュータプロセッサーによりアドレスされて、こうして電位供給源が、つながったマルチブレクサー 440、450 により、電極対に接続される。

この実施態様の電極アレイが、独立に駆動可能な電極対の少なくとも一部を有するならば

10

20

30

40

50

、図14または15に示されるように、例えば、1つの電極対は、1つの電位供給源により駆動することができ、一方もう1つの電極対は同時に別の電位供給源で駆動される。あるいは、図17の2つの電位供給源は、両方のセットのマルチブレーカーと並列に接続された単一の電位供給源で置換されて、同じ電位供給源から2つの電極対が駆動可能であってもよい。

図17に示される各電位供給源の二重のセットのマルチブレーカーの代わりに、図18に示されるように複数の電位供給源520、530を提供することができる。これらの電位供給源は、コンピュータ制御電気スイッチ510または1セットのマルチブレーカー310、320に対するスイッチにより接続することができる。図18に示されるように、コンピュータは、特定の電位供給源をマルチブレーカーに接続するようにスイッチ510を管理し、また、選択される電位供給源を目的の特定の電極対に接続するようにマルチブレーカーを管理する（これらのアドレス線A0～A3にシグナルを送ることにより）。

あるいは、任意の実施態様において各電極対に適用される電位を変化させることができる。これは、複数の異なる結合ドメインを有するカセットが使用されるときには特に有益である。このようなカセットは、異なる結合ドメインで異なる範囲の適用電位を必要とするかもしれない。各電極に適用される電位を変化させることのできるいくつかの異なる実施態様が企図される。

有利には、コンピュータ制御電位供給源が使用される。コンピュータ制御電位供給源は、コンピュータによりアドレスを行って供給すべき特定の電位を選択することができるものである。あるいは、前もって決めた時間にわたり、特定の範囲の電位を順に適用するようにプログラムすることができる。このようなシステムにおいて、コンピュータに接続されるアドレス線および電位供給源は、コンピュータが、エネルギーを与えるべき電極対に適用される特定の電位を生成するように電位供給源をプログラムすることを可能にする。

複数の電極対をアドレスするためのさらなる方法も使用することができる。例えば、そこに適用される電位を検知するように、複数の参照電極を、各複数の電極と対電極の対に接近させて配置することができる。このように、電位波形のさらなる制御を維持することができる。

図36は、本発明の別の実施態様を示している；電極のアレイ（3600、3601）は、絶縁体3604中の間隙のパターン（例えば、穴3605を開けたプラスチックのシート）により分離される各々2つの表面（3602、3603）上に支持されている。各電極は、複数の間隙を横切ってもよい。各表面上の1つの電極間に電位が適用されるならば、電流は、両方の電極に接触している間隙を通過できるだけであり、このため、発生する任意の電気化学すなわちECLの位置を限定することになる。図に示される好適な実施態様において、電極（3600、3601）は、支持体上の線のアレイである。この2つの表面上の2セットの電極は、相互に垂直に向いている。絶縁シートの間隙は、各表面からの電極の交差部分にのみ位置する。

この実施態様は、導電性の低い導線を必要とする電極を個々にアドレスするには有利である。

別の実施態様において、絶縁体3604は省かれ、表面は2つの表面の間に狭い間隙のみが存在するように、非常に接近させて配置される。この実施態様において、各表面上の電極間に適用される電位は、優先的に電極の交差部分で電流を通過させ（すなわち、電極間の距離が最小である場合）、このため、発生する任意の電気化学すなわちECLの位置を限定することになる。

### 5.5. 光の検出

引き起こされたECL発光により生成される光は、本発明の装置に隣接して置かれる適切な光検出器により検出される。光検出器は、例えば、フィルム、光電子増倍管、フォトダイオード、アバランシェフォトダイオード、電荷結合素子（「CCD」）あるいは他の光検出器またはカメラであってよい。光検出器は、順に発光を検出するための単一の検出器であっても、または放出光の単一または多数の波長での同時放出を検出し空間的に解像するため複数の検出器であってもよい。放出され検出される光は、可視光であっても、ま

10

20

30

40

50

たは赤外線または紫外線のような非可視光として放出されてもよい。検出器は、静置型であってもまたは移動可能であってもよい。放出される光または他の放射線は、カセットの結合表面の上、またはこれに隣接して位置する、レンズ、鏡および光ファイバーのガイドまたは光コンジット（単一の、多数の、固定の、または移動可能な）により、検出器に導くことができるか、あるいは検出器は光を直接受けることができる。さらに、支持体、P M A M S および電極表面自体を利用して、光の伝搬をガイドするか、または可能にすることができる。

P M A M S は、各検出器が、1つの結合ドメインからの光のみを受けるように、光検出器のアレイの表面上に形成することができる。光検出器のアレイは、C C Dチップであってよく、そして結合ドメインは、半導体装置の表面に結合されていてもよい（標準的なカッピングリング化学種を使用して）。

結合ドメイン上、または近くの第2の表面上に沈積される液滴は、放出される光を管理または制御するためのマイクロレンズとして使用することができる。あるいは、光検出器は、カセットの前に直接向けることができる；そして、放物面反射装置またはレンズのような種々の光焦点調整装置を、任意の複数の結合ドメインからの光を検出器に向けるために光コンジットの代わりに利用することができる。少なくとも2つの別々の結合ドメインから放出される光は、同時にまたは順に測定することができる。

熱ドリフト、装置の老化、または光検出器に固有の電気的ノイズによるエラーは、光測定装置と測定される結合ドメインの間の「チョッパー」手段により制御することができる。

チョッパーは、光の通過を可能にする溝穴または切り抜き部を有する回転円盤のような、当業者には周知の普通の機械的なチョッパーの任意のものであってよい。あるいは光は、L C Dシャッター、L C Dシャッターのアレイ、固体光弁などによりチョップすることができます。あるいはL C Dシャッターの平面アレイ、または光学計算の分野で公知の固体光弁を使用することができる。これらの装置は、好ましくはカセットの面と、光コンジット（単数または複数）または結合ドメインからの光を光検出器に向ける光焦点調整装置との間に配置される。ある実施態様において、シャッターは、各結合ドメインの上に配置される。L C Dシャッターまたは光弁を使用するとき、シャッターは、異なる光放出結合ドメインについて異なるチョッピング速度を同時に提供するために、異なる周波数で調節することができる。この方法を使用して、複数の異なる光シグナルを重ね合わせて、単一の検出器により同時に測定することができる。次に光検出器に電気的に接続した電子帯通過フィルターを使用して、電気的な単一シグナルを、各々複数の個々の光成分の1つに対応する、いくつかの電気的成分に分離することができる。上記のように、または当該分野で公知の他の機構を使用して、光をチョップすることにより、A C光波形が作り出され、これでD Cノイズ成分を電子的に取り除くことが可能になる。

また、E C Lシグナルは、試薬の消耗によるシグナル変調を修正するため、標準試薬で前に測定した結果と比較して較正することができる。

#### 5.6. E C Lシグナルの解析

所定の結合ドメインから発生するシグナルは、ある範囲の値を有しており、これらの値は、「アナログ」シグナルを提供する定量測定と相關している。別の方法において、各ドメインから、アナライトが存在するかまたは存在しないかのいずれかを示す「デジタル」シグナルが得られる。

統計解析は、両方の方法について使用され、そして定量的な結果を提供するために複数のデジタルシグナルを変換するのに特に有用である。しかしいくつかのアナライトは、閾値濃度を示すデジタルの存在／非存在のシグナルを必要とする。「アナログ」および／または「デジタル」フォーマットは、別々にまたは組合せて利用することができる。他の統計的方法をP M A M Sで利用することができる。例えば、表面上のP M A M Sの濃度勾配を作ることが可能である（ショウドハリー（Chaudhury）ら，1992，S c i e n c e 256：1539-1541）。この方法は、濃度勾配にわたる結合の統計解析により濃度を決定するのに使用される。濃度勾配を有するP M A M Sの多数の線形アレイは、非常に多数の異なる特異的結合試薬により生成することができる。濃度勾配は、異なる

10

20

30

40

50

濃度の結合試薬を提示する、別々の結合ドメインよりなつていてよい。

カセットの結合表面上の対照測定システムの存在もまた、シグナル変動（例えば、カセットおよび他の成分の、分解、揺らぎ、老化、温度シフト、電気回路のノイズおよび光検出装置のノイズなど）に関して対照に対する各解析の均一性を確保するために重要である。例えば、同じアナライトについての多数の重複する結合ドメイン（同じアナライトに特異的な、同一の結合試薬または異なる結合試薬を含有する）を使用することができる。別の例において、既知濃度のアナライトを使用するか、またはP M A M Sの対照ドメインを既知量のE C L 標識に共有結合させるか、または溶液中の既知量のE C L 標識を使用する。本発明により実施される測定により、迅速かつ効率的に大量のデータを集め、そしてこれらを、例えば、臨床情報または研究情報の集合よりなるデータベースの形で保存することができる。集められるデータはまた、迅速な法医学的または個人的な同定に使用することができる。例えば、ヒトD N A試料に暴露されるときに複数の核酸プローブを使用すると、臨床試料または研究試料を同定するために容易に使用することができる、署名（signature）のD N A フィンガープリントに使用することができる。

#### 5.7.マルチアレイのための電極の作成

電極は、大体0.001~10mmの幅または直径であつてよい。電極対の好適な範囲では、0.01~1mmの大きさ（幅または直径または電極対の形状に依存して最も広い寸法）である。

好ましくは、電極は、透明金属フィルムまたは半導体（例えば、各々、金またはインジウム-酸化スズ）のような適切な導電性材料から、当該分野で周知のように、例えば、液晶ディスプレイなどの組立のように、組み立てられる。カセットの組立た形において、例えば、薄膜または湿潤表面のように、第1支持体と第2支持体の間に、分析用試料を含有するのに十分な空間が残る。

電極は、例えば粒状炭素、カーボンブラック、カーボンフェルト、グラッシャーカーボン、炭素繊維、炭素小繊維および/または上記の凝集体を含有する材料から組み立てることができる。

1つまたはそれ以上の個々の小繊維および/または1つまたはそれ以上の小繊維の凝集体は、より大きな凝集体を形成するために加工することができる（米国特許第5,124,075号）。この大きな凝集体は、マットまたは網である。以後、「小繊維マット」という用語は、小繊維がもつれているかまたは絡み合っているマットまたはアミノを説明するのに使用される。小繊維マットは典型的には50~400M<sup>2</sup>/グラムの間の表面積を有する。

例として、小繊維マットは、分析用および/または分取用の電気化学において、作用電極、対電極または参照電極として使用することができる。1つの例において、小繊維マットは、電気化学発光（E C L）用の電極として使用される。

P M A M Sの結合ドメインは、小繊維マットにより支持されてよい。本発明のP M A M Sは、複数の別々の結合ドメインを有し、この内2つまたはそれ以上は、相互に同一であつても、または異なつてもよい。小繊維マットは、1つまたはそれ以上の結合ドメインを支持する。

1つまたはそれ以上の微量流体ガイドを使用して、小繊維マット上に複数の結合ドメインを作成することができる。異なるかまたは同一の結合試薬が、複数の微量流体ガイドに存在しても、および/または多数の別々の結合試薬が微量流体ガイドに存在してもよい。

図22Aおよび22Bにおいて、複数の微量流体ガイド2201（好ましくはアレイ内）は、小繊維マット2200の領域に、目的の結合試薬を含有する液滴を（好ましくは同時に）送達するために使用して、別々の結合ドメイン2202を形成する。結合試薬は、小繊維マット上に存在する残基との結合する。結合試薬は、マットに非特異的に吸着しても、または表面上で乾燥してもよい。

目的の結合試薬は、マットに吸引濾過を適用しながら、小繊維マットに送達される。この場合に、吸引濾過は、結合試薬を全く引かないか、少しあるは全ての結合試薬をマット中にまたはマットを通して吸引し、そうすることで、パターン付けプロセス中のマットの表

10

20

30

40

50

面上の結合試薬の横への拡散の量を低下させる。

小纖維マットは、懸濁液の液体が通り抜けることのできる基質（例えば、フィルター）上に炭素小纖維の懸濁液を圧縮することにより、作成される。小纖維マットを形成するのに使用することができるフィルターの例は、濾紙、ポリマー性（例えば、ナイロン）膜から形成されるフィルター、金属マイクロメッシュ、セラミックフィルター、ガラスフィルター、エラストマーフィルター、ガラス纖維フィルターおよび／またはこのようなフィルター材料の2つまたはそれ以上の組合せを含む。濾過の分野の当業者であれば、これらの材料が、固体の懸濁液の濾過に適した多くの可能な材料の一例にすぎないことを認識するであろう。

図23Aおよび23Bは、小纖維マットが、吸引濾過により作成される実施態様を例示する。炭素小纖維の分散液および／または懸濁液2301を、場合によりフィルター膜2303および／またはフィルター支持体2302を取りつけたフィルター2300を使用して濾過する。懸濁液は、例えばフィルターフラスコ2306によって、真空供給源2305によりフィルターに適用される吸引を使用して濾過される。小纖維マット2304は、フィルター膜2303および／またはフィルター支持体2302のいずれかまたは両方の上に集まる。小纖維マット2304は、フィルター膜2303と共にまたは膜なしに、フィルターから除去することができる。

別の実施態様において、小纖維の懸濁液は、圧力の使用によりフィルターを通過させられる。1つの例において、懸濁液の上の空気および／または液体の閉じこめられた層をピストンで圧縮することにより、小纖維の閉じこめられた懸濁液上に圧力がかけられる。具体例において、小纖維の懸濁液は、シリンジ内に閉じこめられ、ピストンがシリンジプランジャーであり、そしてフィルターは、使い捨てのシリンジフィルターである（多くのこのようなフィルターは、当業者には周知である）。

小纖維の懸濁液は、毛細管作用によりフィルターを通過させられるか、またはフィルター中へのまたはフィルターを通っての懸濁液の吸上作用により濾過される。

別の実施態様において、個々の小纖維または小纖維の凝集体は、マット中に共有結合で架橋結合される。露光されると重合する光感受性残基で誘導体化した小纖維に、光を照射する。

別の実施態様において、個々の小纖維または小纖維の凝集体は、基質上に噴霧される。これは電子噴霧を使用することにより可能である。

フィルターは、その孔に小纖維を捕捉するために使用して、フィルターが支持体として作用する複合マットを形成することができる。図24において、小纖維マット2400は、供給源2402により2つの大きなローラー2403の間に送達される小纖維のスラリー2401を通過させることにより作成することができる。紙またはポリマーシートの作成において見い出されるプロセスに類似している、このプロセスにおいて、ローラーは、懸濁液から液体を絞り出して、小纖維の大きな連続したマットが生成して、ここから小さなマットを切り出すことができる。

小纖維マットは、自立構造（例えば、支持されていない）であるか、または支持されている。

濾過の速度は、マットにおける目的の性質を達成するために変化させることができる。例えば、変化させうる性質は、構造の均一性または非均一性、小纖維または小纖維の凝集体のもつれの程度、厚み、マットの多孔度、および／またはこれらの組合せを含む。

炭素小纖維の懸濁液は閉じこめられて、小纖維が懸濁している液体は除去される。1つの例において、小纖維が懸濁している液体は蒸発除去させられる。別の例において、液体は加熱により除去される。さらに別の例において、懸濁液は遠心分離にかけられて、生じた液体（例えば、上清）は除去される。別の例において、液体は吸引により除去される。

懸濁液は、上述の1つまたはそれ以上のフィルター上に置かれて、懸濁液を蒸発により乾燥させる。懸濁液は、加熱またはオープンで加熱乾燥して乾燥させるか、または液体は、凍結および液体の抽出により除去することができる。さらに別の例において、液体は、ポンプで排気して除去される。当業者には周知の多くの他の方法が、懸濁液から液体を除去

10

20

30

40

50

するために利用可能である。

濾過により小纖維マットを形成するのに適した小纖維の懸濁液は、1つまたはそれ以上の炭素小纖維を適切な液体、半固体またはゲルに分散させることにより形成することができる。適切な液体の例は、水、エタノール、メタノール、ヘキサン、塩化メチレン、緩衝液、界面活性剤、有機溶媒、生物学的媒体を含有する溶液（例えば、タンパク質、抗体またはその断片、抗原、リポタンパク質、リポサッカリド、脂質、糖タンパク質、炭水化物、ペプチド、ホルモンまたは薬剤、低分子の溶液、ポリマー前駆体、酸または塩基の溶液、油および／またはこれらの組合せ）を含むが、これらに限定されない。

小纖維の懸濁液は、音波破碎により、炭素小纖維を水性溶液に分散させることにより調製することができる。別の実施態様において、界面活性剤および／または洗浄剤を添加してもよい。

小纖維マットは、大体0.01μm～10,000μmの間の厚みを有してよい。

好適な実施態様において、小纖維マットは、1μm～100μmの間の厚みを有する。特に好適な実施態様において、小纖維マットは、幅または直径が10mm～200mmの範囲である。

小纖維マットは、懸濁液から残った残渣物質を除去するために、繰り返し洗浄し再濾過することができる。

濾過または蒸発により作成される小纖維マットは、加熱（例えば、オーブン内で）して、濾過により除去されない懸濁液からの残渣の液体を除去する。

連続濾過工程を使用して、1つまたはそれ以上の別々の層からなる小纖維のマットを形成することができる。層は、多孔度、密度、厚み、個々の小纖維および／または小纖維の微視的凝集体の粒度分布、型、小纖維凝集体の数および／またはサイズ、小纖維の化学的誘導体化（下記を参照のこと）、および／または小纖維に結合している他の物質の存在を含むが、これらに限定されない、いくつかの性質により区別することができる。

図25の多層小纖維マット2500は、連続濾過工程により作成される。未処理の小纖維の0.5μm～100μmの厚さの層2501が第1の層を形成し；ポリ-（エチレングリコール）のような残基を組み込み、タンパク質および他の分子の吸着に抵抗する、小纖維の0.5～10μmの厚さの層2502が第2の層を形成し；1つまたはそれ以上の結合ドメイン（上記を参照のこと）を組み込む、0.5～5μmの厚さの層2503が第3の層を形成する。結合ドメインは、1つまたはそれ以上の抗体2504を含有し、この抗体がアナライト2505に結合しうる。この抗体／アナライト複合体は、標識抗体に結合することができる。標識物は、ECL標識物であってよい。他の実施態様において、標識物は、本出願の他の部分で記載される、1つまたはそれ以上の複数の標識物であってよい。このような多層マットは、自立構造であるか、または上述の複数の可能な支持体の1つの上に支持されていてもよい。

層の組合せが存在し、いくつかのまたは全ての層が異なる多層マットが形成されてよい。小纖維マットを形成するのに使用されるフィルター、小纖維、および／または小纖維マットは、コーティングされていてもよい。特定の実施態様において、コーティングは金属である。これらのコーティングは、ある部分がコーティングされ、その他の部分がコーティングされないように、パターン付けしてもよい。1つの例において、コーティングは電着により適用される。別の例において、コーティングは無電解メッキにより適用される。金属沈着の別 の方法（例えば、熱または電子線沈着またはスパッタリング）も使用できる。フィルターは、金属でコーティングされ、そして小纖維は、前記金属と結合を形成する化学官能基で誘導体化される。フィルターは、金属スクリーンまたは金属シートである。

小纖維マットは、平板であるかまたは変形され、規則的であるかまたは不規則であり、円形、楕円形、長方形、または多くの形の1つ、剛性または可撓性、透明、半透明、部分的にまたは完全に不透明であってよく、かつ複合性または異なる個々のまたは複合性の領域を有してもよい。

マットは、円盤状であるか、またはシートから取られる断片であってよい。

複数の小纖維マットは、好ましくは同時に、かつ好ましくは1つのアレイに組み立てるこ

10

20

30

40

50

とができる。1つの例において、微量流体ガイドのアレイは、上述のように、支持体上に複数の小纖維マットを形成する。別の例において、フィルターのアレイまたはパターン付けしたフィルター（例えば、異なる多孔度の領域を有する）が、小纖維マットのアレイを作成するのに使用される。

穴のアレイを有するマスク（例えば、スクリーン）が、フィルターまたは支持体のある部分を覆うために使用され、複数の別々の小纖維マットが濾過および／または蒸発のいずれかにより同時に作られる。

小纖維マットは、0.1～3.0グラム/cm<sup>2</sup>の密度を有してよい。マットは、可変的な密度を有してもよい。例えば、機械的な力または圧力を、異なる時間にマットに適用して、密度を増大または減少させることができる。

小纖維マットは孔を有してもよい。これらの孔は、部分的におよび／またはマット全体に拡張されてもよく、または孔の網の一部であってもよい。これらの孔は、大体50～1000μmの範囲の寸法を有してよい。好適な実施態様において、小纖維物質は、200～500の範囲の寸法の孔を有する。マットの多孔度は、他の因子の中でも、マットの密度に依存するようである。

マットの多孔性はマット全体で一定であるか、またはマット内の位置の関数として増加または減少する。小纖維マットは、不規則におよび／またはランダムに分散した異なるサイズの広範囲の多孔を有する。

小纖維マットは異なる多孔性の明確な領域を含有する。例えば、小纖維マットは、それらが異なる多孔性を有する1つまたはそれ以上の層を有する。小纖維マットは、マット全体の異なる多孔性のカラムを有してもよい。

マットの多孔性は、異なるサイズ、形、組成、または組合せを有する、炭素小纖維の凝集物の異なる量を含有させることにより変化させてもよい。具体例において、マットはCC小纖維（前述）およびBN小纖維（前述）、または異なる組合せである各小纖維から作成される。例えば、小纖維マットのある孔は生物細胞のような大きな物体を通過させるのに充分なほど大きく、ある孔はタンパク質または抗体の大きさの生物学的媒体を通過させることができ、ある孔は小さな（<1000分子量）有機分子のみを通過させることができ、および／またはこれらの組合せである。

マットの多孔性は、1つまたはそれ以上の分子、液体、固体、エマルジョン、懸濁物、気体、ゲルおよび／または分散物が、マット中に、この内部、および／またはこれを通過するようなものである。小纖維マットの多孔性は、生物学的媒体がマット内、この内部、および／またはこれを通過して分散する（能動的にまたは受動的に）か、または何らかの手段で強制されるようなものである。生物学的媒体の例としては、分画した血液、血漿、血清、尿、タンパク質溶液、抗体またはその断片、細胞、細胞内粒子、ウイルス、核酸、抗原、リポタンパク質、リポ多糖、脂質、糖タンパク質、炭水化物、ペプチド、ホルモンまたは薬剤があるが、これらに限定されない。小纖維マットは、物質が1つまたはそれ以上の層を通過し、他の層は通過しないように、多孔性の異なる1つまたはそれ以上の層を含有してもよい。

小纖維マットは、別の物質によりまたはその上で支持される。例えば、支持体物質は、金属、プラスチック、ポリマー、エラストマー、ゲル、紙、セラミック、ガラス、液体、蠍、油、パラフィン、有機固体、炭素、またはこれらの2つまたはそれ以上の混合物であってよい。物質は固体または液体である。固体の場合は、1つまたは複数の穴または孔を有する。具体例では、支持体は金属メッシュ、ナイロン濾過膜または濾紙がある。支持体は、導電体、半導体および／または絶縁体でもよい。小纖維マットは、マットの導電性を上げるために別の物質、例えば金属の薄い線維、破片、または球を含有してもよい。別の例では、小纖維マットは、小纖維単独で得られるものとは異なる多孔性を作成するために、種々のサイズ、形および密度の炭素、ガラスおよび／または金属線維を含有してよい。別の面において、マットは磁気ビーズ（例えば、ダイナル（DYNAL）ビーズ）を含有する。後の例で、ビーズはマットの多孔性を変化させるのに有用であるか、またはそれ自身が結合ドメインを固定化するための支持体として使用される。

10

20

30

40

50

米国特許第5,304,326号および5,098,771号に開示の実施態様では、小纖維は別の物質に分散される。例えば、小纖維は、油、蠅、パラフィン、プラスチック(例えば、ABS、ポリスチレン、ポリエチレン、アクリロニトリルなど)、セラミックス、テフロン、ポリマー、エラストマー、ゲル、および/またはこれらの組合せ中に分散される。他の物質中の小纖維の分散物は、成形、圧縮、二次成形、注型、遠心分離、編み込み、および/または投入により、所望の形および/または型に成形される。

他の炭素材料(例えば、粒状炭素、炭素纖維、グラフィチック炭素、バックミンスター・フラー・レン、フラー・レン、またはこれらの組合せ)が、別の物質中に分散される。これらは、他の物質をこれらに結合するのに使用することができる化学的官能基で誘導体化することができる。材料は共有結合によりこれらの官能基に結合されるか、または非共有結合的に吸着される。

炭素小纖維は、その表面に共有結合した化学官能基を用いて作成される。国際特許公報第90/14221号に記載のように、これらの官能基は、COOH、OH、NH<sub>2</sub>、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)・エステル、ポリ-(エチレングリコール)、チオール、アルキル((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>)基、および/またはこれらの組合せがあるが、これらに限定されない。これらおよび他の化学官能基が、小纖維の表面に他の物質を結合させるのに利用できる。

ある化学官能基(例えば、COOH、NH<sub>2</sub>、SH、NHS・エステル)が、小纖維に他の小分子を結合させるのに利用できる。このような化学的官能基と小分子の複数の可能な組合せがある。

多くの実施態様においてNHS・エステル基は、求核性化学官能基が、天然のおよび/または化学的修飾により、生体分子上および/またはその中に存在する。適当な生体分子の例には、アミノ酸、タンパク質およびその断片、抗体、抗体の結合性断片、酵素、核酸、およびこれらの組合せがあるが、これらに限定されない。これは多くの可能な方法の1つであり、本明細書に記載の例および他の類似の物質および/または生体分子に一般的に適用できる。好適な実施態様において、ECLに使用される試薬は、NHS・エステル基を介して小纖維に結合してよい。

ECL測定法に使用できる抗体は、共有結合(例えば、NHS・エステルとの反応)により、適当なリンカー(上記)により、非特異結合により、および/またはこれらの組合せにより、1つまたはそれ以上の小纖維または小纖維マットに結合することができる。小纖維に結合したNHS・エステルに共有結合により、小纖維または小纖維マットに、核酸および/または細胞を結合することができる。

小纖維および/または小纖維マットへの物質の非特異結合の程度を調節することが好ましいことがある。非限定例として、タンパク質、抗体、抗体の断片、細胞、細胞内粒子、ウイルス、血清および/または1つまたはそれ以上のその成分、ECL標識物(例えば、Ru<sup>111</sup>(bpy)3およびRu<sup>111</sup>(bpy)3誘導)、シュウ酸塩、トリアルキルアミン、Ag、アナライトおよび/またはこれらの組合せの非特異結合吸着を低下または防止することが好ましい。別の例では、生体分子の結合を増強させることが好ましい。

非特異結合を低下または防止する1つまたはそれ以上の化学残基が、炭素含有電極(例えば、カーボンブラック)または1つまたはそれ以上の小纖維、1つまたはそれ以上の小纖維凝集物別の材料中の小纖維の分散物および/または小纖維マットの中、上または近傍に存在してもよい。このような残基、例えばPEG残基および/または荷電残基(例えば、リン酸塩、アンモニウムイオン)が、電極に結合してもよい。

支持体、電極および/または結合ドメインに使用される物質は、非特異結合を低下させるために、界面活性剤で処理される。例えば、小纖維または小纖維マットは、当業者に公知の界面活性剤および/または洗浄剤で処理される(例えば、ツイーンシリーズ、トリトン、スパン、ブリジ(Brij))。小纖維または小纖維マットは、界面活性剤および/または洗浄剤の溶液で洗浄、浸漬、インキュベーション、音波処理、またはこれらの組合せ処理を行われる。PEGおよびPEGと同様の挙動を示す分子(例えば、オリゴ糖または多糖、他の親水性オリゴマーまたはポリマー)(「ポリエチレングリコールの化学:生体工学

10

20

30

40

50

および生体医学的応用 (Polyethylene glycol chemistry:Biotechnical and biomedical applications)」、ジェイ・エム・ハリス (Harris,J.M.) 編、1992、プレヌムプレス (Prenum Press) の溶液を、界面活性剤および／または洗浄剤の代わりにおよび／またはこれとともに使用することができる。

前記したようなある物質の好ましくない非特異吸着は、競合的非特異吸着により阻止される。この競合的結合種は、ウシ血清アルブミン (BSA) 免疫グロブリンG (IgG) でもよい。

ECL-TAGの非特異結合は、TAGの化学修飾により低下させることができる。例えば、親水性を上昇させて（例えば、親水性結合、極性結合、水素結合、および／または荷電官能基を、Ru(bpy)<sub>3</sub>中のビピリジルリガンドに付加することにより）、こうして他の表面へのTAGの非特異結合を低下させるように、修飾してもよい。  
10

炭素含有材料（例えば、カーボンブラック、小纖維、小纖維マットおよび／または別の材料に分散された炭素）に生体分子または他の媒体を固定化することが好適であり得る。抗体、抗体の断片、タンパク質、酵素、酵素基質、インヒビター、補助因子、抗原、ハブテン、リポタンパク質、リポ糖、細胞、細胞成分、細胞受容体、ウイルス、核酸、抗原、脂質、糖タンパク質、炭水化物、ペプチド、アミノ酸、ホルモン、タンパク質結合リガンド、薬剤、および／またはこれらの組合せを結合させてもよい。エラストマー、ゲル、コーティング、ECL標識物、酸化還元活性種（例えば、トリプロピルアミン、シュウ酸塩）、無機物質、キレート化剤、リンカーなどの物質（但し、これらに限定されない）を、小纖維に結合させることが好ましい。  
20

1つまたはそれ以上のすなわち複数の種を、小纖維または小纖維マットの表面に非特異的に結合（例えば、吸着）してもよい。

生体分子または他の媒体を、非特異的吸着により小纖維または小纖維マットに結合することができる。特定の小纖維についての非特異的吸着の程度は、それぞれの性質により決定される。小纖維上に存在するある化学官能基または生体分子は、非特異結合を低下または上昇させることができる。タンパク質の表面上の疎水性および／または親水性斑点の存在は、小纖維または小纖維マットへのタンパク質の非特異結合を上昇または低下させる。親水性および／または疎水性斑点は、調節された場所での非特異結合を調節するのに使用される。

炭素はアルキル (CH<sub>2</sub>)鎖および／またはカルボン酸基で誘導体化して、生体分子または媒体もしくは他の物質の非特異結合を上昇させることができる。  
30

図26は、単一の小纖維の場合の前記実施態様の略図である。小纖維2600はアルキル鎖2601により誘導体化される。生体分子2602、2603、および2604は、アルキル鎖に非特異的に結合する。ポリマー／エラストマー2605もまた結合する。

誘導体化していない小纖維、小纖維凝集物および／または小纖維マットは、非特異結合により生体分子、生物学的媒体、および他の物質の固定化に使用される。

ECL-TAGは、支持体および／または電極に選択的に結合するように使用できる荷電残基を含有する。例えば、正味の陰性荷電を有する誘導体化したECL-TAGは、より還元性の電位の電極には親和性が比較的小さく、電極電位がより酸化性になると電極に対する親和性が大きくなる。電極に対するECL標識および／または結合試薬の親和性は、調節できるように作成される。この調節は、結合の動力学の改善または洗浄工程の効率の改善のために使用される。  
40

図28では、共有結合により分子（生物学的または非生物学的）が小纖維に結合される。NHS-エステル化学官能基を有する小纖維2800は、生体分子または生物学的媒体2802、2803に対する共有結合2801を形成する。これらの生物学的媒体はNHS-エステル基との反応により共有結合を形成するためにアミノ基を使用する。当業者は、分子のカプリング剤としてのNHS-エステル基の一般性を認識し、固定化を達成するための適切な生体分子および適切な反応条件を選択することができる。

一対の残基および／または分子「M1」と「S1」（このうち1つまたはそれ以上は小纖維に結合している）は、共通の親和性または結合能力を示す。M1/S1は、抗体／抗原  
50

、抗体／ハプテン、酵素／基質、酵素／補助因子、酵素／インヒビター、レクチン／炭水化物、受容体／ホルモン、受容体／エフェクター、核酸／核酸、タンパク質／核酸、ウイルス／リガンド、細胞／細胞受容体などであってよい。「結合対」M1／S1の多くの組合せは、所望の結合を達成するための組合せの選択を可能にする。M1とS1のいずれかまたは両方が、1つまたはそれ以上の小纖維に結合してもよい。

図27と28は、本例で可能な多くの可能な配置の一部を例示する。図27では、アルキル鎖2701で非特異的に誘導体化された小纖維2700は、別の分子2703に対して共通の親和性または結合能力を有する分子2702に結合する。分子2703はまた、別の分子2704に結合している。阻止分子2705は、非特異的に小纖維に吸着される。分子2709に対して親和性を有するリガンド2708を有する阻止ポリマー2706および／またはポリマー2707は、非特異的に吸着される。

図28では、小纖維2800は2801を介して、生体分子2802と2803、およびリンカーモル2804に共有結合している。リンカーモル2804は、別の生体分子2805に対して共通の親和性または結合能力を有する。生体分子2803は、別のリンカーモル2806に対して共通の親和性または結合能力を有し、これは2807に共有結合している。結合パートナー2809に対して特異的なリガンド2812を有するポリマー2808は、小纖維に共有結合している。阻止分子（例えば、BSA）2811および阻止ポリマー2810は、共有結合している。

小纖維は、ビオチンおよび／またはビオチン化リンカーモルにより誘導体化され、アビジンおよび／またはストレプトアビジンがこのリンカーモルに結合してもよい。アビジンおよび／またはストレプトアビジンは、小纖維に結合し、ビオチン化抗体および／またはタンパク質が結合してもよい。アビジンおよび／またはストレプトアビジンは、非特異結合、共有結合、別のもしくは同じカプリング対、またはこれらの組合せにより、小纖維上に固定化されてよい。「結合対」としての（ストレプト）アビジンおよびビオチンの使用は、生体分子または生物学的媒体を他の物質に結合するために広く応用されている方法であり、当業者に公知である（スピンケ（Spinke）ら、1993、Langmuir 9: 1821）。

結合対は、モノクローナル抗体とこの抗体に結合する抗原であってよい。

複数の結合対（例えば、M1／S1／M2）が形成されてよい。M1はモノクローナル抗体、S1はM1に対する抗原、そしてM2はS1に結合する抗体である。この複合体は、抗体／抗原／抗体「サンドイッチ」複合体（そのような抗体は、モノクローナル抗体であってもでなくてもよい）でもよい。M2はECL活性標識物（前述）、蛍光標識物、放射性標識物、酵素標識物、および／またはこれらの組合せでもよい。

M1は、金属、金属イオン、または有機金属化合物（「キレート化剤」）と複合体を形成する残基であり、S1はM1と複合体を形成する金属、金属イオン、または有機金属化合物（「キレート物質」）であり、そしてM2はM1／S1複合体に結合する生体分子上の残基であってよい（ゲルショーン（Gershon）とキルコ（Khilko）、1995、Journal of Immunological Methods、7371）。

表面上の電極に電流を分配するための金属性電極パターンと導電性成分の作成は、当該分野で公知の方法により行われる（例えば、レベンティス（Leventis）ら、米国特許第5,189,549号を参照）。透明な表面上の金属フィルムの作成は、液晶ディスプレイを製造するために使用されており、本発明の電極の作成に容易に適用できる。ハネコ（Haneko）、1987、液晶テレビディスプレイ、液晶ディスプレイの原理と応用（Liquid Crystal TV Displays, Principles and Applications of Liquified Crystal Displays）、ケティーケー・サイエンティフックパブリッシャーズ（KTK Scientific Publishers）、トーキョー、ディー・レイデルパブリシング（D.Reidel Publishing）。透明電極表面もまた、例えばディミラ（DiMilla）らの方法（1994、J. Am. Chem. Soc. 116(5): 2225-2226）に従って作成できる。0.5nmのチタンと5nmの金を透明な基板（ガラスまたはプラスチック）の上に沈積させる。ディミラ（DiMilla）らの方法（前述）により作成した薄い金の層を用いて、クマール（Kumar）の方法により透明

10

20

30

40

50

な電気的構造を作成する。透明性を維持しながら、電流運搬性の改良のために導電性層の厚さを増加させるようにこの方法を修飾することが好ましく、これは当業者に公知である。そのような方法は、P M A M S の別々の結合ドメインに整列または近傍にある電極表面の作成に使用される。

さらにフィルムおよび/または単層は、ジャン (Zhang) とバード (Bard) の教示するような絶縁残基 (例えば、アルキル鎖) を用いるより、電極表面から E C L 標識物への電位の移動を促進する残基となる。例えば、広範な共役系のパイ軌道重複は電子移動に使用される。このようなパイ軌道電子移動は、ポリ・ピロール又は他の結合環または2重結合構造により提供される。

オリゴヌクレオチドは、電子移動を調節するために使用される。例えば、2本鎖 D N A 中の重複パイ結合は、電子移動速度を増加させるために使用される。電極表面に結合したオリゴヌクレオチドは、結合ドメイン中の結合物質として使用される。相補的なオリゴヌクレオチド配列に結合すると、整然とした重複パイ結合を有する2重結合が形成される。具体例において、第1のまたは第2の固定化 (例えば、支持体への共有結合) されたオリゴヌクレオチドが E C L 標識される。別の実施態様において、第1のオリゴヌクレオチドに相補的な第2のオリゴヌクレオチドまたは部分的に相補的なオリゴヌクレオチド配列が E C L 標識する。第2のオリゴヌクレオチドに相補的なまたは部分的に相補的な三次オリゴヌクレオチドが標識される (例えば、サンドイッチ測定法)。分岐したオリゴヌクレオチド鎖も使用することができる。種々のオリゴヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチド模倣物が使用できる (例えば、修飾塩基、および/または例えば窒素及び/もしくはイオウを有する修飾骨格を有するオリゴヌクレオチド)。差別的試験を行ってもよい。オリゴヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチド複合体中のパイ重複の安定性の変動は、電子移動により追跡できる。パイ結合で安定した E C L 標識 2重らせんオリゴヌクレオチド対から生成するシグナル (例えば、発生する E C L 光および/またはインピーダンス測定) は、より不規則な1本鎖オリゴヌクレオチドからのシグナルまたは予測されるシグナルに対して相關付けられる。完全に相補的な E C L 標識 2本鎖オリゴヌクレオチドと部分的に相補的な E C L 標識 2本鎖オリゴヌクレオチドの間の E C L シグナルは相關し得る。さらに複数オリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド複合体が利用できる。例えば、三重らせんが利用できる。

電子移動速度の変化は、E C L 検出並びに電子的手段を用いて測定される。E C L 標識物は、オリゴヌクレオチド鎖に共有結合するか、および/または非共有結合的に会合 (例えば、挿入) してよい。D N A から電極への電子移動に対する小さい抵抗を確保するために、D N A はリンカーを使わずに (例えば、5'チオール化D N A または金) または短い (< 10 原子) リンカーを用いて電極に結合されてよい。電極から D N A 鎖に効率的に電子を運搬できる結合鎖が使用される (例えば、ポリアセチレン鎖)。

場合により単層またはフィルムの少なくとも1つの成分が電位の移動を促進する、混合単層および/またはフィルムが使用される。あるいは、電位の移動を促進する分子または粒子が、単層またはフィルムに吸着される。前記の例として、電極表面に吸着するかおよび/またはそれに近いパイ共役単層および/または導電性微粒子が、使用される。パターン付けされた規則的な間隙が単層および/もしくはフィルム中で形成される。E C L 標識物が次に結合される長鎖アルカンチオール (すなわち、絶縁性) からなる規則的な実質的に直角の S A M 中の間隙の調節パターンを用いて、E C L 標識物に付加される有効な電位が調節される。例えば図11は、金属層1204を有する1つの支持体1202から形成されるカセット1200、S A M パターン1206およびS A M パターンの間の間隙1208を示す。

E C L 標識タンパク質は、単層表面に非共有結合してもよい。E C L 標識タンパク質は、メチルが末端にあるアルカンチオールで誘導体化した金表面に吸着してもよい。金表面は、作用電極または対電極として作用する。図11~13に記載のように、複数の結合ドメインが1つの支持体に導入されてよい。好適な実施態様では、結合ドメインは標識および/または非標識タンパク質および/または核酸および/または細胞および/または化学的

10

20

30

40

50

分子種を含有する。

あるいは、単層の成分の長さ（例えば、アルカンチオール単層中のアルカン鎖の長さ）を変えて、単層の予測される表面の有効電位を調節できる。

広い意味でアルカンチオールは、1炭素～100炭素の長さの炭素鎖を有してもよい。好適な実施態様において、アルカンチオールの炭素の長さは、2～24炭素を含有する。アルカンチオールの炭素鎖の長さは、2～18炭素である。炭素鎖の長さは7～11炭素である。このようなアルカンチオールは、測定媒体に暴露された種々の頭部の基（例えば、メチル基、水酸基、アミン、カルボン酸、オリゴ（エチレングリコール）、リン酸基、ホスホリル基、ビオチン、ニトリロ三酢酸、グルタチオン、エポキシド、ジニトロフェニル、および／またはNHS-エステル）を含有する。他の頭部の基には、組換え融合蛋白の精製と固定化に通常使用されるリガンドがある（例えば、サッセンフェルト（Sassenfeld）、1990、TIBTECH 8:88-93）。結合ドメインは、種々の密度の結合試薬を得るために、種々の程度に誘導体化される。例えば、異なる密度の活性化可能な化学種が使用されるか、および／または種々の程度に誘導体化が行われる。所望の結合密度を作成するために、種々の化学が使用される。活性化可能な基および／または結合試薬の密度を調節するために、種々の単層を使用してもよい。結合基の密度は、ECLシグナル対ノイズ比を最適化するために調節される。他の結合ドメインからの他のECL光シグナルに関して（そのECL光シグナルが順番にまたは同時に、および／または光検出手段で検出されようが）、電気化学的光シグナルの強度を最適化するために、結合ドメイン内の結合部位の総数が調節される。

PMAMS内の結合ドメインに関連するECL標識物を1回またはそれ以上活性化するために、電位波形が適用される。複数のECL光シグナルを生成するために、ECL標識物が結合した同じアルカンチオール誘導体化表面に、ECL光生成を活性化するのに充分な電位が複数回適用される。電位は、ECLを可逆的に生成するのに充分なだけ適用される。電位は、ECLを擬可逆的に生成するように適用される。電位波形の擬可逆シリーズにおいて、その中でECL標識物が会合（例えば、結合）する結合ドメインは、化学的および／または物理的に改変されてよい。適用される電位波形シリーズは、不可逆性のECL光生成を与える。

さらに、単層の成分を放出するのに充分な電位が適用される。電極表面上の容量が小さい単層成分を放出することが好ましい（例えば、電極表面上の他の支持体またはプレート）。こうして単層が破壊されると、効率的に励起されていない一部のECL標識物さえ電極表面で励起されて電気化学発光シグナルが生成し、ECL標識物は小さな容量に限定され、電極からの拡散が制限される。ある電位の単層破壊の程度を調節するために、種々の単層組成が使用される。強い成分間親和性を有する成分を有する単層は、単層破壊に対してより耐性がある。長いアルカン鎖チオールは、短いアルカン鎖チオールより、有効に破壊に耐える。鎖の長さを変えることにより、所望の安定性が達成される。

ECLシグナルを調節するために、PMAMS内の結合ドメインの修飾を行ってもよい。複数のECLシグナルを生成するために、一連の電位波形が適用される。上記複数のECLシグナルは、追加のおよび／またはより良い結果を得るために使用される。ECLシグナルの変化速度の統計解析では、1つまたはそれ以上の結合ドメインの全体の質に関連付けられる。さらに上記複数のECLシグナルは、例えばあるシリーズのうちのあるECLシグナルをフィルターして、シグナル対ノイズ比を上げるのに使用される。さらに複数電位波形パルスは、非特異結合による好ましくないシグナルの調節を低下させるために使用される。ある荷電分子種の非特異結合を防ぐために電位が加えられる。さらに、あるアナライトまたは目的の化学分子種の結合ドメインの近くの局在化を促進するために、電位が加えられる。加えられるブイ電位波形が大きな過電位（例えば、ECLの生成に必要な以上の高い電位）を与える。電位波形シリーズのまたは単一の電位波形パルスのECLシグナルを調節するために、過電位が加えられる。さらに、ECL反応動力学および／または結合電位を化学的および／または物理的に調節するために、過電位が使用される。さらに、電極の性質および／または電子的性質に関する情報を評価および／または関連付けおよ

10

20

30

40

50

び／または外挿するために、当業者に公知の 1 つまたはそれ以上の電位波形および／または他の電子的プローブが使用される。

好ましくは、電極と接触する追加の導電性手段を用いて、作用電極表面積を拡大することにより、ECL 反応の効率を上昇させられる。導電性物質または導電性粒子の電極の突起部分または延長部分（例えば、ワイヤーまたは針電極）は、電界がより密接に ECL 標識に近づくように、電極表面積を増加させるのに使用してもよい。あるいは、電極構造のへこみまたは穴は同じ目的に役立つ。

特に、図 12 に示すように、ECL 標識物の周りの電界の絶対値が増加するように、導電性粒子は電極表面の間隙を埋めるかおよび／または支持体または単層をカバーする。これらの導電性粒子は、電極表面積を拡大し、従って ECL 反応の効率を増加させる。図 12 10 は、金属層 1304 上のパターン付けした SAM 1306 を有する支持体 1302 を有するカセット 1300 を示し、SAM パターンの間の間隙を埋める導電性微粒子（例えば、図 11 の 1208）を示し、および金属表面上に拡大していることを示す。磁性導電性粒子については、磁石または磁界を、粒子を表面に引きつけるために使用できる。導電性粒子はまた、電極表面と 2 つの近接した支持体を有する PMAMS の結合ドメインの間の電位を拡大するために使用することもできる。図 8 では、カセット 900 は、多重アレイの電極を有する第 1 の支持体 902 から構成され、第 2 の支持体 904 は、PMAMS を有する。導電性微粒子 906 は、電位を結合ドメイン上の ECL 標識物に拡大するために、反対の表面の間に位置する（データは示していない）。

あるいは、導電性ポリマーは、図 13 に示す SAM の ECL 標識物の周りの電位の拡大を促進するために、電極表面上の露出した間隙から成長する。図 13 は、パターン付けした SAM 表面 1406 上に金属層 1404 を有する支持体 1402 を有するカセット 1400 を示す。導電性ポリマー 1408 は、多重アレイの電極（示していない）により提供される電界を、SAM 表面上の結合ドメイン（示していない）に拡大するために、SAM 表面上で成長する。導電性ポリマーはまた、前述のように図 7 に示す 2 つの近接する支持体の電極表面と PMAMS の間の電位を拡大するために使用される。図 7 では、カセット 800 は、近接する支持体 802 と 804 からなる。導電性ポリマー 806 は、結合ドメイン（示していない）上の ECL 標識物に向けて電位を拡大するために、反対の表面の間で成長する。

図 9 は、複数電極アレイを有する第 1 の支持体 1002 を有する形成されるカセット 1000 を例示し、第 2 の支持体 1004 は PMAMS 結合表面を有し、ここで作用電極の導電性突起部分（1006）（例えば、細いワイヤーまたは他の突起部分）は、PMAMS 結合ドメイン中の ECL 標識物の周りの電界を拡大する。

電極対は、種々の構成で作成される。最も簡単な構成（本明細書の添付図面に記載されている）は、非導電性の平らな表面上の金属および／または金属酸化物フィルムおよび／または半導体フィルムで作成される。これらの電極対の電極は、好ましくはこれらの間の比較的一定の幅の領域を規定し、こうして比較的一定の電界を提供する。

電極の他の構成が提供される。これらの構成のいくつかは、図 19 (a) ~ (e) に示される。図 19 (a) は、互いにかみ合った櫛様の電極対を示す。この構造では、各電極は、導電体から伸びる複数の指を有し、櫛様構造を形成している。電極と対電極の対は、結合ドメインに隣接して位置するか、または結合ドメインが電極と対電極の間に位置してもよい。図 19 (b) は、1 対の同心円電極（1 つは環状で 1 つは半環状である）を示す。図 19 (c) は、その直線的な端が互いに向かい合っている 2 つの半環状電極を示す。図 19 (d) は、1 対の長方形の電極を示す。図 19 (e) は、相補的な反対に曲がった表面を有してその間に波形の間隙を形成している互いにかみ合った 1 対の電極を示す。

電極／対電極対はまた、整列のための PMAMS 結合表面上の形に相補的な特異的な形に作成されてもよい。形の例を図 6B に示す。電極対 714 - 720 を有する支持体 712 を示す。電極対は例えば、環状 714、互いにかみ合う 716、三角にかみ合う 718、または複数の電極が互いにかみ合う 720 でもよい。

前記した図 14 ~ 19 に示す実施態様において、電極対は 1 つの支持体の上に位置する。

10

20

30

40

50

あるいは、図 2 に示すように電極対は第 1 および第 2 の反対の支持体上に位置する。

#### 5.8. カセット

カセットは、本発明の 1 つまたはそれ以上の支持体を含有する。カセットは、複数の結合ドメインおよび 1 つまたはそれ以上の作用電極を含有してもよい。

図 2 は、支持体 26 上の複数の結合ドメイン 30 のそれぞれが複数の電極 32 の異なる 1 つに隣接しているカセットを示す。対電極 38 は、第 2 の支持体 28 上で形成される。ECL 測定は、前述のように試料を結合ドメイン 30 の上に置き、次に支持体 26 と 28 を一緒に動かして対電極 38 が結合ドメイン 30 のそれぞれに隣接するようにして、前述のように導線 34 を介して波形発生手段により ECL 反応を開始させ、ECL シグナルを光検出手段 40、ワイヤー 41、およびデジタルコンピューター手段 42 を用いて検出し記録する。

図 3 は、複数の結合ドメイン 48 のそれぞれが、支持体 44 上で複数の電極 / これに隣接する対電極対 50 の異なる 1 つを有するカセットを示す。支持体 46 は、支持体 46 が、複数の結合ドメイン 48 と複数の電極 50 に隣接する試料封じ込め手段を形成するように、隨時支持体 44 に隣接して置かれる。すなわち、ECL 反応は、電気的接続 52 を介して波形発生手段 54 により開始させ、ECL シグナルを光検出手段 56 を用いて検出し、デジタルコンピューター手段 58 を用いて記録する。

図 21 に示す 1 つまたはそれ以上の支持体を含有するカセットが提供され、各対の支持体は、結合ドメインを含有する第 1 の支持体 1501 の表面が、第 2 の支持体 1502 の上に結合ドメインを含有する表面に向かい合うように位置し、ここで各表面は電極 1504 と結合ドメイン 1506 を含有し；そのため、第 1 の支持体上の各結合ドメインが第 2 の支持体上の電極に向かい合いこれと整列し、第 2 の支持体の各結合ドメインは第 1 の支持体上の電極と向かい合いこれと整列する。

図 4 は、ECL 電極が隨時提供されるカセットを例示する。支持体 60 上の結合ドメイン 64 を、アナライトを含有することが疑われる試料と接触させる。支持体 62 上の領域 66 は、目的のアナライトを検出もしくは測定するためまたは目的の反応を実施するための反応媒体を含有する。支持体 60 と支持体 62 は、一緒に近づけ、そのため結合ドメイン 64 と領域 66 は接触し、アナライトまたは反応生成物の存在は、レポーター系（例えば、フォト検出手段 68 により検出される光学的、化学発光もしくは蛍光シグナル）により測定され、疑似コンピューター手段 70 により分析される。

好適な実施態様において、本発明のカセットまたは装置は、複数の別々の結合ドメイン上への試料送達のための手段からなる（例えば、米国特許第 5,147,806 号の図 1 の要素 1；米国特許第 5,068,088 号の図 1 の要素 1 を参照のこと；いずれもその全體が引用により本明細書に組み込まれる）。試料送達の手段は、静置型であってもまたは移動可能であってもよく、かつ 1 つまたはそれ以上の入口、穴、孔、チャネル、パイプ、微量流体ガイド（例えば、毛細管）、チューブ、スピゴットなどを含むが、これらに限定されない当該分野で公知の任意のものであってよい。流体は、例えば、ポンプ、ピペット、シリンジ、落下流、毛細管作用、吸上作用、電気泳動、圧力、真空などの種々の周知の方法により、システムを移動することができる。流体移動の手段は、カセット上に配置しても、または分離したユニット上に配置してもよい。試料は、全ての結合ドメイン上に一緒に置くことができる。あるいは、試料は、支持体上の P M A M S へ直接流体試料を送達するための自動ピッターにより支持体上に載せるか、または結合表面へ後から直接送達するためのカセットまたはカセットホルダー内のリザーバー中に入れることができる。

支持体は、ガラス、プラスチック、セラミック、重合性材料、エラストマー材料、金属、炭素または炭素含有材料、合金、複合箔、ケイ素および / または積層材料を含む材料から調製することができるが、これらに限定されない。支持体は、非常に多様な構造的、化学的および / または光学的性質を有してよい。これらは、剛性または可撓性であり、平面であるかまたは変形しており、透明、半透明、部分的にまたは完全に反射性または不透明であってよく、そして複合性、異なる性質を有する領域を有してよく、2 つ以上の材料の複合材料であってよい。

10

20

30

40

50

測定を実施するための試薬は、カセット上で、かつ／または分離した容器中で保存することができる。試薬は、乾燥および／または湿潤状態で保存することができる。1つの実施態様において、カセット内の乾燥試薬は、試験試料の添加により再水和される。ECL測定を行うための試薬にはECLの共作同物質(coreactants)(例えばTPA)、緩衝液、保存剤、添加剤、賦形剤、炭水化物、タンパク質、洗浄剤、ポリマー、塩、生体分子、無機化合物、脂質などが含まれる。別々の実施態様において、試薬は、移動可能なローラーまたはピストンからの圧力により破裂開封される「ブリストーパック」中の溶液で保存される。カセットは、測定の終了後の廃棄物区画または液体廃棄物の保存用のスポンジを含有してよい。1つの実施態様において、カセットは、試験すべき生物学的試料の調製用の装置を含む。血液から細胞を除去するためのフィルターを含んでもよい。別の例において、カセットは、試料の計量用の精密毛細管のような装置を含んでもよい。

支持体上の、複数の結合ドメインおよび複数の電極／対電極は、典型的には機械的手段、例えば、ガイドポスト、整列ピン、ヒンジ(各支持体間の)またはガイドエッジにより、登録された相互に近い位置に置かれる。光学ガイド手段は、支持体上に画定された光学ガイドマークを利用する支持体と電子的手段の両方の位置決めに使用することができる。電気的または磁気的登録手段を使用する他のシステムも利用可能である。

カセットの支持体は、ECL反応を引き起こす必要が生じるまで、電極対が試料に接触するのを保護するように配列することができる。例えば、電極は、取り外し可能な電極保護手段のような種々の機械的手段を使用することにより、電極の試料との接触が必要となるまで、結合ドメイン表面から分離して維持することができる。

本発明のカセットまたは装置は、参照電極、例えば、Ag/AgClまたは飽和カロメル電極(SCE)からなる。

支持体は、クリップ、接着剤、リベット、ピンまたは任意の他の適切な機械的保持機構により結合させることができる。これらはまた、液体試料の表面張力により、または2つの支持体の反対側に取り外し可能に置かれた圧縮手段により結合させることができる。

カセットはまた、例えば、結合ドメインと電極の交互の層、または結合表面と電極表面の両方を单一支持体上に含んでなる多数の支持体を有する、3つ以上の支持体を含んでなってもよい。これは、ECL分析セルの三次元アレイを形成する。カセットの前記の全ての成分は、場合により結合ドメイン間のいくつかの領域を除いて透明である。例えば、多数の透明結合表面、電極表面、および支持体を積み重ねることができる。

第1および第2の支持体は、平面状でかつその間に試料保持容量を規定するように向かい合わせることができる。あるいは、第1および第2の支持体層は、2つの支持体およびその任意の他の成分の形が一致するならば、球形、立方体、円筒形を含む他の適切な形に構成させることができる。例えば、図10は、2つの隣接する非平面状支持体1102および1104から形成されるカセット1100を示している。各支持体は、形態がもう一方に対して相補的な表面を有する。いずれかの支持体も、PMAMS表面または多数の電極アレイまたはその両方を有してよい。支持体の一方または両方が、もう一方の支持体の形に一致するように、エラストマー性であってよい。支持体またはカセットはまた、プレカット(precut)型に作成されても、または回転ディスペンサーから適切な長さに提供してもよい。カセットは、試料保持容量のような試料受容手段および試料分配溝、チャネル、くぼみなどをさらに含んでもよい。

図37は、マトリックス(3703)の中および／または上の結合ドメイン(3702)が表面(3701)上に提示されているカセットを示す。作用電極(3704)および対電極(3705)を支持する第2の表面(3700)は、結合ドメインが作用電極にかなり近づくように置かれる。結合ドメインに結合したECL標識から光生成をもたらす条件下で、光はいずれかの表面または両方の表面から検出することができる。光検出器のアレイ(3706、例えば、CCDアレイ、増強CCDアレイ、またはアバランシェフォトダイオードアレイ)は、同時に各結合ドメインからの複数の光シグナルを測定するのに使用される。光検出器アレイは、結合ドメインから生成する光を撮像する。レンズ、反射器および／または光学ガイドを利用して撮像を増強することができる。他の例において、光検

10

20

30

40

50

出器（例えば、光検出ピクセル）のゾーンまたは領域から検出される光は、結合ドメインに相関する。画像分析を使用して、検出される光の結合ドメインとの相関を促進することができる。1つの好ましい実施態様において、表面は、エラストマー性すなわち柔軟であり、このため、電極表面と密接な接触を作ることができる。結合ドメインは、対電極から作用電極にイオン電流を運ぶことができるポリマーに結合している。さらに好ましい実施態様において、この物体は、対電極から作用電極にイオン電流を運ぶことができる水膨潤性ポリマーである。

図38は、結合ドメイン（3805、3806、3807）が、対電極（3800）上に支持される別々の物体（3808、3809、3810）の表面上に提示されるカセットを示している。作用電極（3801）は、この物体の表面に接近して置かれる。結合ドメインに結合したTAG標識した基からECLを導く条件下で、光は、いずれかまたは両方の電極（もし一方または両方の電極が透明または半透明であれば）を通して、かつ／または側面から検出することができる。光検出器のアレイ（3802）は、各結合ドメインからの複数の光シグナルを同時に測定するのに使用される。この物体は、エラストマー性であるか、かつ／または柔軟であり、このため、作用電極と密接な接触を形成することができる。この物体は、対電極から作用電極にイオン電流を運ぶことができるポリマーであってよい。この物体は、対電極から作用電極にイオン電流を運ぶことができる水膨潤性ポリマーであってよい。

1つまたはそれ以上の結合ドメインを含有する透明支持体を、炭素電極（例えば、小纖維マット電極またはカーボンブラックまたはカーボンフェルトからなる電極）に接触させる。試薬は、支持体／結合ドメインと小纖維マットの間を、またはマットを通って結合ドメインに流れることができる。光は、結合ドメインから、透明支持体を通って検出器まで通過することができる。

別の好適な実施態様において、電極は、電極の有効表面積が増大するように、光学的に半透明または透明な炭素（例えば、小纖維）の層でコーティングされる。

本発明のPMAMS支持体および／またはカセットは、キットとして包装することが有利である。キットは、測定物、対照などを含む、ECL反応を実施するための、本発明により調製される1つまたはそれ以上のPMAMS支持体からなる。対照試薬、ECL測定用および較正用試薬などを含む試薬は、場合によりキットに含まれる。複数の異なるアナライトイに特異的な複数の結合試薬を含有する試薬混合物が含まれてもよい。

#### 5.9. ECL反応を行うための装置

1つの実施態様において、支持体上のPMAMS、およびこれを含有するカセットは、PMAMS結合ドメイン上に1つまたはそれ以上の試験試料を適用するための手段、および複数のECL反応を開始させるための手段を含有する装置中に挿入されるように設計される。このような装置は、支持体またはカセットに基づいて複数のECL測定を行うために、本発明により適切に変更された従来型の装置から得ることができる。本発明は、上述のセクションに記載されたPMAMSの各具体的な実施態様を使用して、ECL測定を行うために適合させた種々の装置を提供する。ECL反応を行うための装置は、ゾスキ（Zoski）ら（米国特許第5,061,445号）により開示されている。必要とされる変更は、支持体および／またはカセットの操作、多数の試料送達、電圧波形の供給源による多数の電極のアドレス呼び出しおよび多数のECLシグナルの獲得および処理のための手段を含む。

本発明の例示的装置の要素は図6Aに示される。このような装置700は、上部および下部支持体702、704、および電極ガード710からなる。上部支持体は、複数の電極／対電極の対（図示していない）を有する。下部支持体は、結合ドメイン706を有する。この装置は、カセットから電極ガードを取り外し、結合ドメインに結合したアナライトイと接触させるように電極／対電極を配置することができる。試薬または流体の流路空間708は、結合ドメインを有する支持体の隣にある。この装置はまた、同一または個々の決められた電圧波形を、複数の各電極／対電極の対に同時に順に送って、カセット内のECL反応を引き起こし、次に放出されるECL放射を光子検出器（例えば、光検出手段

10

20

30

40

50

)により測定することができる。装置はさらに、支持体および／またはカセット、またはその周囲の温度を維持し、ECL反応条件を最適化するために必要に応じて温度を調整するための温度制御手段を含んでもよい。温度制御手段は、好ましくは加熱および冷却手段、例えば、電気抵抗性発熱体、冷却ファン、冷凍手段、および加熱もしくは冷却の任意の他の適切な供給源である。温度制御手段はまた、温度センサー、例えば、サーモスタットまたは熱電対装置、および検出される温度変化に応答して加熱または冷却手段のスイッチを入れるかまたは切るための手段をも含む。

この装置はまた、ECL反応を行うため、1つまたはそれ以上の支持体またはカセットを保持、移動および操作するための手段を提供する。装置はさらに、カセットについて上述したように、PMAAMS結合ドメイン上に試料を載せるための、静置型または移動可能な試料送達手段を含んでもよい。

装置はまた、カセットの別々にアドレス呼び出し可能な電極接続部のアレイを、電子的電圧波形発生手段、例えば、ポテンシオスタットに電気的に接続することができる電極接触手段を含んでもよい(例えば米国特許第5,068,088号の図5を参照のこと)。波形発生手段は、順にまたは同時に、カセット内の複数のECL反応を独立に引き起こすための、シグナルを送達する。

ECL測定の間、作用電極と対電極の間のイオン電流は、イオンにより導電性になった液体(例えばイオン性塩を含有する水)を通って、このような液体の薄膜を通って、かつ／またはイオンにより導電性の固体マトリックスを通って流れることができる。

すなわち、試料中の電気化学発光を測定するための装置は、少なくとも1つの試料を保持するための複数のセル(ここで、セルは、1つまたはそれ以上の電極と1つまたはそれ以上の対電極から形成することができる)、および複数の別々の結合ドメインからなる第1の支持体を含んでもよい。電極と対電極は、第1の支持体の表面上に、または第2の支持体(ここで、第2の支持体は、第1の支持体上の結合ドメインに非常に接近している)の表面上に提供することができる。電極と対電極は対で存在してもよい。セルはさらに、作用電極に近い電圧を検出するための複数の検出電極を含んでもよい。カセットはさらに、参照電極を含有するセルを含んでもよい。

装置はさらに、例えば、1つまたはそれ以上の検出手段により、カセット内で行われるECL反応を検出することができる光検出手段を含んでもよい。このような検出手段は、単に例として、光検出手段のアレイに接続された、または放出されるとECLシグナルのアレイを走査することができる单一の光検出手段に接続された電極アレイに合い、これと隣接する位置に置かれる光ファイバーチャネルのアレイを含む。

装置は、場合により、装置の種々の部品の機能を制御するために、デジタルコンピュータまたはマイクロプロセッサーを含んでもよい。

装置はまた、シグナル処理手段も含む。1つの実施態様において、かつ単に例として、シグナル処理手段は、各ECL測定の結果の移動、記録、分析および／または表示のためのデジタルコンピュータを含む。

あるいは、装置は、例えば、結合表面上にわたって順にECLを引き起こすために、1つまたはそれ以上の電極／対電極の対を走査するための、電極移行手段を含む。

PMAAMSの平行アレイにおいてサイズ排除フィルターを使用することができる。

### 5.10. 実施することができるECL測定法

本発明で使用されるECL標識物は、当該分野で公知のECL標識物から選択される(前記セクション2.2、および米国特許第5,310,687号を参照)。ECL標識物は例えば、金属含有有機化合物からなり、ここで金属は、ルテニウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、白金、パラジウム、モリブデン、テクネチウムおよびタンゲステンよりなる群から選択される。ECL TAG試薬を調製するのに適した結合化学は公知であり、例えばバード(Bard)ら(米国特許第5,310,687号および第5,221,605号)により開示されている。結合試薬へのECL標識物の結合手段は、共有結合および／または非共有結合でもよい。ECL標識物は結合試薬に非共有結合(例えば、疎水性作用またはイオン性相互作用)をしてもよい。非共有結合の他の例では、ECL

10

20

30

40

50

標識物が（共有結合または非共有結合で）複合体に結合し、次にこれが非共有結合で結合試薬に結合する。より具体的な例は、Ru(bpy)<sub>3</sub>がリンカーを介してNi(II)-トリニトリロ三酢酸錯体に共有結合することであろう。この分子は、複数のヒスチジンを含有するペプチド配列などの結合試薬に結合する。他の受容体リガンド対は、当該分野で公知であり、同様に使用することができる（サセンフェルト（Sassenfeld）、1990、TIBTECH 8:88-93）。さらに、分岐ネットワーク（例えば、炭化水素リンカーを介して）として構成されている複数の有機金属化合物（例えば、Ru-含有）を含有するECL標識物が使用できる。ECLが可能な複数の有機金属化合物残基を含有するこのような分岐ネットワークは、ECL標識される分子上で1回または複数の位置で結合してもよい。別の実施態様において、化合物は、ポリマー鎖の長さに沿う複数の位置で結合する有機金属基を有する線状ポリマーである（例えば、線状、分岐または環状ポリマー）。

当該分野で公知の種々の追加ECL測定フォーマットで、複数の結合ドメインを使用することができる。定量測定では、既知量のECL標識試薬が使用され、測定されるECLの量は、存在するアナライトの量を計算するために既知の標準物質に対する関係を計算する。当業者に公知の方法で前進（forward）、後退（reverse）、競合およびサンドイッチ測定法を行うことができる。競合測定法では例えば、ある量の多成分液体試料中の目的のアナライトの定量は以下のように行われる。結合表面を、同時に（a）結合ドメイン上に存在する結合試薬への結合において、目的のアナライトと競合することができる既知量のECL標識リガンド、および（b）目的のアナライトを含有することが疑われる試料と接触させ、ここでこの接触は、目的のアナライトとリガンドが結合試薬に対して競合して結合できる適切な条件下で行われる。試料中にアナライトが存在すると、結合ドメインに結合する競合性のECL標識リガンドの量が減少し、このため得られるECLの量が（試料中にアナライトが存在しない場合に比較して）減少する。得られる結合ドメイン中のECLの反応を開始させ、放出される光の量を定量的に測定し、こうして試料中に存在するアナライトの量を定量する。あるいは、試料を結合表面と接触させ、次に結合表面をECL標識リガンドに接触させてもよく、次にECL標識リガンドは、PMAMS表面上で試料からのあらかじめ結合したアナライトと競合し、あらかじめ結合したアナライトの一部を置換する。別の実施態様では、ECL標識した物質／分子を含有するように試料を処理し、標準量の非標識アナライトを結合表面と接触させ、次にまたは同時に結合表面を試料と接触させて競合測定を行う。

サンドイッチ測定法では、ECL標識リガンドは、目的のアナライト上の2つの結合残基に特異的に結合する結合パートナーである。すなわち、PMAMSの結合ドメイン中の結合試薬に特異的に結合するアナライトが試料中に存在すると、ECL標識結合パートナーに結合した、試料からのアナライトに結合した、結合ドメイン上の結合試薬から構成される「サンドイッチ」が形成される。別の競合サンドイッチ測定法では、アナライト自身のコピーが多重アレイ結合表面の結合ドメインに結合し、次に試料と接触される。次に試料を結合表面と接触させる。ECL標識した結合パートナー（これはアナライトに特異的に結合する）は、測定溶液中に遊離のアナライト（試料から）が存在しない場合は、アナライトに結合するが、測定溶液中に遊離のアナライト（試料から）が存在する場合は競合的に阻害されるであろう。

別の実施態様において、連続的標識が行われる。例えば、サンドイッチ測定法の具体例では、結合ドメインに結合したアナライトは、アナライトの複数のECL標識した結合パートナーと順に接触される。ECL測定と隨時洗浄工程が、各異なる結合パートナーと接触させる間に行われる。こうしてアナライトの複数の異なる結合分子のECL測定が行われる（例えば、CD8<sup>+</sup>、a, b T細胞抗原受容体陽性T細胞）。あるいは、それぞれが区別可能な波長で発光する複数のECL標識物が、アナライト上の異なる残基に特異的な異なる結合試薬にそれぞれ結合する。さらに、アナライトの異なる結合残基に特異的な異なる結合試薬にそれぞれ結合した区別可能なレポーター手段（例えば、ECL標識物、蛍光標識物および酵素結合標識物）を用いて、例えばCD4<sup>+</sup>、a, b T細胞抗原受容体

10

20

30

40

50

- 陽性細胞を C D 8<sup>+</sup>、 a , b T 細胞抗原受容体 - 陽性細胞と区別することができる。好適な実施態様において、結合ドメインは、標識タンパク質および / または核酸および / または細胞および / または化学的分子種を含有する。このような標識成分（例えば、 E C L 標識物）は、作成の間、測定開始の前、測定中および / または測定の終了時に添加される。例えば、複数の標識成分は種々の時間に添加され、連続的読みとりが行われる。このような読み値は累積情報を与える。別の実施態様において、 P M A M S の結合ドメインは何回も再使用できる。ある測定の終了後、 P M A M S 表面の 1 つまたはそれ以上の結合ドメインの活性を再活性化させる条件下で表面を洗浄してもよい。例えば、ある結合反応は反応溶液のイオン強度を変えることにより逆転することができる。あるいは熱を用いて、結合複合体を解離させてもよい。本質的に自己再生能を有する結合ドメインもある。触媒性（例えば、酵素）官能基を含有する結合ドメインは、 1 回以上使用される。結合ドメインは順に使用され、こうしてバイオセンサーに応用することができる。

さらに、多重アレイ多重特異的パターン付け表面に結合した結合試薬が、 E C L 標識されるように、測定法をフォーマット化してもよい。試料中の目的のアナライトに結合すると、 E C L 標識シグナルは定量的に変化する。例えば、この表面に結合した E C L 標識結合試薬は、細胞表面上のアナライト（例えば、 および T 細胞抗原受容体抗原、または C D 4 もしくは C D 8 抗原）に特異的であってよい。細胞の混合物に暴露すると、表面に結合した細胞は、多重アレイ多重特異的パターン付け表面の接近した電極表面が E C L 標識した結合試薬を励起する能力を立体的に妨害し、こうして E C L シグナルを下方に変化させる。

均一および不均一測定法を行うことができる。不均一測定法では、非結合標識試薬を結合した標識試薬から分離（例えば、洗浄工程により）し、次に結合または非結合標識試薬を電位に暴露する。均一測定法では、非結合標識試薬および結合標識試薬が一緒に、電位に暴露される。均一測定法では、結合標識試薬により放出されるシグナルの強度またはスペクトル特性は、非結合標識試薬により放出されるシグナルの強度より大きいかまたは小さい。この強度の差を測定することにより、各結合および非結合成分の有無を測定することができる。

結合試薬をアナライトまたはその競合物およびその結合パートナーに接触させ所望の工程が終了すると、次に E C L 標識物を確実に E C L 誘導性の環境に置く。適切な E C L 測定媒体は当該分野で公知である。そのような測定媒体は、 E C L 標識物の E C L を促進する分子（シウ酸、 N A D H 、および最も好ましくはトリプロピルアミンがあるが、これらに限定されない）を含有することが有利である。このような「プロモーター」分子は溶液中で遊離状態で提供されるか、または P M A M S 表面、表面上の単層、結合ドメイン、電極表面、結合試薬および / または E C L 標識物などにあらかじめ結合させるかもしくはこの表面上で産生させることにより（例えば、化学反応の生成物として）提供される。接触工程から得られる結合ドメインに結合した E C L 標識物の周りの媒体が E C L 誘導性の場合は、媒体を変化させる必要はない。あるいは、 E C L 誘導性の媒体を提供するように調整または置換をすることができる。電極または対電極は、すでに結合ドメインのすぐ近傍にあるか、または結合ドメインに接近させるかもしくは接触させて、電位波形を適用し、 E C L を検出または測定する。

本発明の好適な実施態様において、結合試薬をアナライトもしくはその競合物およびその任意の結合パートナーに接触させる上記工程は、電極または対電極の非存在下で行い、すなわち試料が電極または対電極に接触しないようにする。これらの接触工程後、電極および対電極を、結合ドメインに結合した E C L 標識物の充分近くに持ってきて、 E C L 反応を開始させる。

P M A M S を有する支持体は、核酸鎖の配列決定に使用してもよい。例えば、複数の結合ドメインを有する P M A M S は、異なる結合ドメイン中の結合試薬として、既知のヌクレオチド配列の異なるオリゴヌクレオチドを用いて作成することができる。すなわち、異なる結合ドメインは、異なる既知のヌクレオチド配列の結合試薬を含有する。配列決定されるオリゴヌクレオチドの断片のオリゴヌクレオチド鎖は、次に P M A M S 結合ドメインに

10

20

30

40

50

結合（ハイブリダイズ）させる。配列決定される核酸は E C L 標識される。P M A M S 上で結合測定法を行い、P M A M S 上の別々の結合ドメインからの E C L シグナルの分布を用いて、オリゴヌクレオチド鎖の配列を決定する。

上記方法は、短いオリゴヌクレオチドが、別の核酸分子中のその相補的なまたは実質的に相補的な配列にハイブリダイズする能力に基づく（例えば、ストレゾスカ（Strezoska）ら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1089-1093；バインズ（Bains）、1992、Bio/Technology 10: 757-58 を参照。これらは参考のため本明細書に引用される）。ハイブリダイゼーションの成功のためには所望の程度の配列相補性の程度が必要であるように、条件が選択される。あらかじめ配列の決定されたプローブへの、配列が未知の D N A 分子のハイブリダイゼーションにより、D N A 分子中の相補的な配列の存在が検出される。この方法は好ましくは、ハイブリダイゼーション反応が結合ドメインに結合したオリゴヌクレオチドプローブと溶液中の試料 D N A で行われるように行う。

P M A M S はまた、目的の機能（例えば、結合または触媒）を有する新規分子または複合体を単離、スクリーニング、および／または選択するのに利用できる。P M A M S は、治療のために化合物および／または鉛化合物を単離するのに使用してもよい。本発明の方法を用いて、種々の化学種の組合せにより合成される複数のペプチド、核酸、ウイルスベクター、またはポリマーを含有する P M A M S を作成することができる。このような多種類の P M A M S 処理した支持体は、例えば E C L 標識細胞受容体への結合の迅速なスクリーニングに利用できる。1つの方法では、鉛結合ペプチド配列を単離するために、多様な関連のないペプチド配列を有する第1の P M A M S を用いる。次に第1の P M A M S 上の目的の分子（例えば、細胞受容体）に結合性を示すものと関係のある配列のペプチドを有する P M A M S を使用する。このプロセスは、目的の結合特性を有するペプチドが見いだされるまで繰り返す。

目的のアナライトは、例えば試料中に存在する全細胞、細胞内粒子、ウイルス、プリオン、ウイロイド、核酸、タンパク質、抗原、リポ蛋白、リポ多糖、脂質、糖タンパク質、炭水化物残基、セルロース誘導体、抗体またはその断片、ペプチド、ホルモン、薬剤、細胞または細胞成分、有機化合物、非生物学的ポリマー、合成有機分子、有機金属化合物、または無機分子がある。

試料は、例えば固体、エマルジョン、懸濁物、液体または気体から得られてもよい。さらに、試料は、例えば体液または組織、水、食物、血液、血清、血漿、尿、便、組織、唾液、油、有機溶媒または空気から得られてもよい。試料は還元剤または酸化剤を含有してもよい。

以下の物質に特異的な結合試薬を、本発明の結合表面の結合ドメインに導入することにより、本発明により以下の物質を検出または測定するための測定を行ってもよい：アルブミン、アルカリ性ホスファターゼ、a l t / S G P T、アンモニア、アミラーゼ、A S T / S G O P、総ビリルビン、血液尿素窒素、カルシウム、二酸化炭素、塩素、総コレステロール、クレアチニン、G G T、グルコース、H D L コレステロール、鉄、L D H、マグネシウム、リン、カリウム、総タンパク質、ナトリウム、トリグリセリド、尿酸、耽溺薬物、ホルモン、心血管系調節物質、腫瘍マーカー、感染症抗原、アレイ誘発性抗原、免疫タンパク質、サイトカイン、貧血／代謝マーカー、カルバマゼピン、ジゴキシン、ゲンタマイシン、リチウム、フェノバルビタール、フェニトイン、プロカインアミド、キニジン、テオフィリン、トブラマイシン、バルプロ酸、バンコマイシン、アンフェタミン、抗うつ剤、バルビタール酸、ベンゾジアゼピン、カナビノイド、コカイン、L S D、メタドン、メタクアロン、アヘン、フェニリジン、フロポキシフェン、エタノール、サリチル酸、アセトアミノフェン、エストラジオール、プロゲステロン、テストステロン、h C G / b h C G、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、プロラクチン、甲状腺ホルモン（例えば、甲状腺刺激ホルモン、T 4、T U P、総 T 3、遊離 T 4、遊離 T 3）、コルチゾール、クレアチニンキナーゼ - M B、総クレアチニンキナーゼ、P T、A P T T / P T T、L D I S O s、クレアチニンキナーゼ I S O s、ミオグロビン、ミオ軽鎖、トロポニン I、トロ

10

20

30

40

50

ポニンT、クラミジア、淋菌、ヘルペスウイルス、ライム病、エプスタインバーウイルス、IgE、風疹-G、風疹-M、CMV-G、CMV-M、トキソ-G、トキソ-M、HBsAg (B型肝炎表面抗原)、HIV1、HIV2、抗-HBc、抗-HBs、HCV、抗-HAV IgM、抗-HBc IgM、抗-HAV、HBsAg、抗-HBcAg、TB、前立腺特異抗原、CEA、AFP、PAP、CA125、CA15-3、CA19-9、b2-マイクログロブリン、ヘモグロビン、赤血球、HBcAb、HTLV、ALT、STS-梅毒、ABO血液型抗原および他の血液型抗原、サイトメガロウイルス、フェリチン、B-12、葉酸、グリコシリ化ヘモグロビン、アンフェタミン、抗うつ剤および他の向精神薬。

異なる結合ドメインでのECLの測定は、順にまたは同時に行われる。

10

細胞表面タンパク質である目的のアナライトに特異的なPMAMSは、まず細胞を含有する試料に暴露され、ここで試料中の細胞を計測することが好ましい。好適な実施態様において、既知の容量の試料および/または希釈した試料は、少なくとも1つの細胞表面抗原に特異的な複数の結合ドメインを有するPMAMSに暴露される。結合した細胞は、次にECL標識物に結合した第2の結合基を結合させることにより定量できる。これは、広範囲の型の細胞と相互作用することができる基(例えば、細胞膜に挿入できる疎水性基もしくは細胞表面の糖に対するレクチンに結合したECL標識物)である。ECL標識物は、細胞表面抗体に対する第2の抗体に結合される。より具体的な実施態様において、同じドメインに結合した数種類の型の細胞が、複数のECL標識物で標識した第2抗体を用いることにより区別できる。細胞表面上のあるアナライトに特異的な別々の結合ドメインの数が、試料中に存在する結合性の細胞の平均数より多いことを確認することが好ましい。次に統計的方法を用いて、試料容量当たりの細胞の数を求める。この方法は、例えばウイルスのような他の粒子(ここで、結合試薬はウイルスの抗原を認識する)を計測するに使用することもできる。ドメインは細胞のサイズに比較して小さくすることができ、こうして各ドメインについてデジタルシグナルが得られ、次にこれを統計的方法を用いてドメインの合計に対して解析することができる。ドメインは細胞の大きさに比較して大きく、従って細胞はドメインに結合することができる。この場合、各ドメインからのシグナルのレベルは、試料の容量当たりの細胞の数を与えるように較正することができる。光検出器のアレイ(例えば、CCDカメラまたはアバランシュフォトダイオードアレイ)を用いる画像解析により、細胞を計測し、細胞の形態を測定することができる。

20

本発明は好ましくは、また5~15分間で1000ECL反応の速度でECL反応を行う方法(例えば、測定法)を与える。

30

### 5.11.他の分析方法および/またはECLとともに使用されるPMAMS

ECLベースの前記方法は、他の測定法とともに使用することができる(例えば、触媒反応や他の化学反応が起きるドメインとして)。本発明の別々の結合ドメインは、他の測定法(例えば、電解質測定のような臨床化学的化学物質測定法、臨床酵素測定、血液タンパク質測定、グルコース、尿およびクレアチニン測定など)で使用することができる。ECL測定法と組合せるかまたは本発明のPMAMSとともに単独で使用される他の測定法には、化学発光ベースの標識、蛍光ベースの測定法、酵素結合測定系、電気化学測定法(例えば、ヒックマン(Hickman)ら、1991、Science 252:688-691を参照)、および/または共鳴検出(例えば、表面プラズモンおよび音響法)測定系がある。

40

液滴のアレイの中に複数の異なる化学物質を有する、液滴を有するPMAS支持体を使用することができる。各液滴は、異なる結合試薬および/または異なる化学物質を含有してもよい(すなわち、この反応媒体)。例えば、疎水性表面領域に囲まれた親水性表面結合ドメイン上にあり、液滴は親水性してもよい。液滴は、表面を覆う疎水性溶液により保護される。測定される親水性溶液は、疎水性領域に囲まれた親水性結合ドメインを有する第2のPMAMS上に沈積される。2つの表面は決められた近傍に来て、反対の表面の親水性ドメインと接触し、スペクトル解析を行って化学的測定の反応生成物を検出する。

小繊維マットは、疎水性および/または親水性ドメインに囲まれた複数の不連続な疎水性

50

および／または親水性ドメインがあるように、パターン付けされる。結合試薬を含有する水溶液の液滴が親水性領域上にのって、周りの疎水性領域に閉じこめられる。これらの液滴は、例えば小纖維、小纖維の凝集物、結合試薬、E C L 試薬、測定試薬、界面活性剤、P E G、洗浄剤、例として前述した複数の生物学的分子、および／またはこれらの組合せを含有してもよい。

第1のP M A M S を覆う疎水性溶液は、上面の親水性液滴の一部のみが環境に暴露されるように、調節して除去する（例えば、蒸発、はじき）。光学化学反応のために測定される親水性溶液は次に、P M A M S 表面に暴露され、親水性の微小液滴と測定される溶液を混合し、分析（例えば、スペクトル）を行う。

P M A M S 結合ドメインはまた、プレフィルターまたはフィルターとして使用される。例えば細胞特異的なP M A M S は、ある場合にはある型の細胞のフィルターとして単独で、およびサイズ排除フィルターとともに使用できる。得られるアナライト溶液は次に、細胞内顆粒物質（例えば、ウイルス）に特異的なP M A M S に暴露される。顆粒細胞内P M A M S および／またはサイズ排除フィルターを用いて、小分子（例えば、タンパク質、小さな化学的物質）アナライト溶液を形成させる。非特異的なアナライト相互作用を低下させるために、連続的P M A M S 測定系を使用して、アナライト溶液を順に精製する。

支持体、電極および／または結合ドメインに使用される材料の光学的不透明度は、所望の性質を得るように変化させることができる。このような材料は、材料の厚さ、組成および／または光学密度により、半透明、透明もしくは実質的に不透明であってよい。

小纖維マットの光学不透明度は、マットの厚さが増加すると増加する。非常に薄いマットは実質的に透明である。厚いマットは、実質的に不透明である。ある場合には、0.01  $\mu\text{m}$ ～0.5  $\mu\text{m}$ の範囲の厚さのマットは実質的に透明である。他の例では、20  $\mu\text{m}$ を超える厚さのマットは実質的に不透明である。0.5  $\mu\text{m}$ ～20  $\mu\text{m}$ の間の厚さのマットは中間の不透明度を有し、これは小纖維マットの厚さが増加すると増加する。マットの具体的な厚さは、マット中に分散される材料の組成、密度、誘導体化、層の数、型および量、および／またはこれらの組合せに依存する。これはまた、使用される光の波長に依存する。ある材料がある厚さで実質的に透明であり、別の厚さでは実質的に不透明であるなら、その材料のある深さから放出される光は通過するが、別の（例えば、より深い）深さから放出される光は、材料に実質的に吸収されるかまたは分散される。1つの例では、ある材料は種々の不透明度により、光学フィルターとして使用することが可能である。

小纖維マットのある深さから放出される光は、実質的にマットを通過し、小纖維マットの近傍または表面に置いた検出器で観察することができる。別の深さから放出される光は、吸収されるかおよび／またはマットにより分散され、マットの近傍または表面に置いた検出器で観察することができない。小纖維マット（および／または、光学的に類似の材料）のこの性質は、E C L 測定法において結合試薬および非結合試薬を区別するのに使用することができる。

ある試薬は、多孔性材料中で充分な深さまで拡散（能動的または受動的）されるか、はじかれるか、圧力により押されて、これらの試薬からの光の放出はマットにより実質的にまたは完全に吸収されるかまたは拡散される。1つの例では、小纖維マットは、マットの表面またはその近傍で、ある試薬が通過し、ある試薬が捕捉され、および／またはある試薬が非常に薄い層に結合する、物理的および光学的フィルターの両方として作用する。1つまたはそれ以上の結合ドメインに結合した試薬および／または1つまたはそれ以上の結合ドメインに結合した分子種（これらのドメインは、小纖維マットの表面のいずれかに位置するか、またはP M A M S 上のマットの表面の近くの層に位置する）は、マット内もしくはマットを介して拡散したり、引っ張られたりするのを妨害される。試薬がマットの表面の非常に薄い層にのみ結合するように、試薬および／または他の溶液は、小纖維マットの表面を流れるか、懸濁されるかおよび／または離れている。試薬は、1つまたはそれ以上の方向に、マットを介して1回またはそれ以上洗浄される。試薬は、小纖維マット、1つまたはそれ以上の結合ドメイン、1つまたはそれ以上の結合ドメインに結合した他のもしくは同じ試薬に結合してもよく、マット内に混入、マットを通過してもよく、またはこれ

10

20

30

40

50

らの組合せでもよい。

支持体および／または電極に使用される多孔性材料は、上層が結合ドメインを有し、マット内の別の層が結合ドメインを有さない2つ以上の層を有してもよい。ある例では、小纖維マット（図29に模式図として示す）、上層2900は充分厚く、この層の下の層2901、2902から発生する光の通過を妨害する。この上層に結合した光源2904、2905から発生する光2903は、マットの表面またはその近傍に位置する検出器2906により検出することができる。下層2901、2902中の光源2907、2908、2909から発生する光は、いずれかの層またはすべての層により吸収されるかおよび／または拡散され、検出器2906、2910により検出することができない。

マットを作成する前に、小纖維および／または小纖維凝集物の特定のサイズ、型、派生物を選択するのに、前濾過工程が使用される。小纖維の懸濁物を濾過するのに使用されるフィルター物質は、1つのまたは多くの孔を有する小纖維のマットである。

多孔性材料（例えば、小纖維マット）は、結合ドメインのための支持体、ECLもしくは他の電気化学的応用に使用される電極、試薬の送達を調節するために使用されるフィルター、および／または種々の程度に光を伝搬、吸収および／または拡散することができる光学フィルターとして作用することができる。

### 5.12. エレクトロクロミックECLディスプレーパネル

本発明はまた、平面パネルディスプレーに使用される単離された電気化学的ピクセルの製造を提供する。電気的にアドレスされた時に隣接ピクセルに対して限定された作用（すなわち、限定クロストーク）を有するピクセルを作成するために、エレクトロクロミックおよび電気化学発光ベースの平面パネルディスプレーで使用するために、リトグラフ法が提唱されている（米国特許第5,189,549号を参照）。そのようなクロストークを減少させるためのリトグラフ法の限界は、電解質材料が、露光された時に導電率を変化することができなければならないことである。光誘導性の導電率調節が可能な材料を使用することなく、ピクセル間のクロストークを低下させ、こうして広範囲の異なる溶液、ゲルまたはフィルムの使用を可能にすることが、本発明の特徴である。

ピクセルの活性領域である2つの電極表面は、サンドイッチ型で互いに向かい合っている2つの表面上にある。電極表面は、例えば相補的なエレクトロクロミックな材料でコーティングされる。クロストークを減少させるために、異なる電極対の間に非導電性領域を有する電極表面の間（すなわち、ピクセル要素の間）に、導電性電解性フィルムを置く。コーティングされた電極表面が親水性の場合は、電極の周りの表面の領域は疎水性にされ（例えば、マスクを介する型押しまたは沈積）、親水性導電性液滴を第1の表面上の電極にのせ（例えば、流体アレイにより）、次に第2の表面をロボットで整列させ、第1の表面と接触させ、こうして電極がそろう。こうして電解性液滴は、ピクセルの間に導電性材料を入れることなく1つのピクセル内に拘束される。ピクセルの電極対は、同じ表面上で近接して並ぶ。コーティングされた電極が親水性の場合は、両方の電極を含む領域は、親水性電極の周りで疎水性環を形成するように作成される（例えば、マスクの打ち出し法または沈積法により）。前述の2つの実施態様で記載した液滴は、疎水性溶液を用いて安定化される。溶液の粘度は、液滴アレイの安定性を上げるために上げられる。親水性と疎水性が逆転する。他の実施態様では、電極対の間またはその上のフィルムの安定性および／または導電性（例えば、導電性ポリマー）を上げるために、重合可能な溶液を含有する。さらに、ピクセル間のクロストークを制限するために、構造的特徴を利用する。例えば、電極ピクセル対に限界を規定することができる環形の型押し突起を有する弹性打ち出し（例えば、ポリ（ジメチルシロキサン））を使用して、フィルム間の電解溶液、ゲル、またはピクセルを単離する。あるいは並んだ電極ピクセル対を、上記電極のウェル内に置いたある表面、電解溶液、ゲルまたはフィルム上の電気的絶縁性ウェル様構造中に入れ、全表面を覆うかまたはコーティングして、各ピクセルの電解成分を単離または封じこめる。

### 5.13. 他の化学反応に使用されるPMAMS

本発明のPMAMSはまた、ECLと組合せずに化学反応を行うのに使用できる。例えば、前記セクション5.11に記載した方法および非ECL測定法が利用できる。

10

20

30

40

50

試料中の目的のアナライトを検出または測定するためにカセットが提供され、該カセットは、(a)別々の結合ドメインの少なくとも一部は他の結合ドメインとは異なる結合特異性を有し、複数の別々の結合ドメインのそれぞれは親水性でありそして疎水性領域に囲まれている、少なくとも1つの結合表面を形成するため、その表面上の複数の別々の結合ドメインを有する第2の支持体、および(b)測定表面を形成するためにその上で化学的測定法を行うのに適した反応媒体からなる複数の親水性ドメインを有する第2の支持体(ここで、複数の別々の結合ドメインと複数の反応媒体は、接触させることができ、その結果各結合ドメイン上に存在する分析される試料は反応媒体と接触されて、目的のアナライトが検出または測定される)からなる。あるいは、結合ドメインは疎水性であり、第2の支持体は、反応媒体を含有する複数の疎水性ドメインを有する。

本発明は、試料中の目的のアナライトを検出または測定するための方法を提供し、該方法は、(a)検出または測定すべきアナライトを含有する試料の液滴を、支持体表面上の複数の別々の結合ドメインにのせて、この複数の別々の結合ドメインは、他の結合ドメイン内に封じ込められた結合試薬と特異性が互いに同一である結合試薬、かつこれとは異なる結合試薬を含有する少なくとも1つの結合ドメインからなり、各別々の結合ドメインは、疎水性であるかまたは親水性であることを特徴とするが、但し各結合ドメインの周りの支持体表面の領域は、試料中の1つまたはそれ以上の目的のアナライトが結合ドメインに結合できるようにするために、(i)結合ドメインが親水性なら疎水性であり、そして(ii)結合ドメインが疎水性なら親水性であり、(b)第1の支持体上の液滴を、化学的測定法を行うのに適した反応媒体からなる複数の別々の親水性ドメインをその上に有する第2の支持体の表面に接触させ、そして

(c)結合ドメインに結合した目的のアナライトの存在を測定する、ことからなる。

また試料中の目的のアナライトを検出または測定するための方法が提供され、この方法は、(a)検出または測定すべきアナライトを含有する試料の液滴を、支持体表面上の複数の別々の結合ドメインにのせて、この複数の別々の結合ドメインは、他の結合ドメイン内に封じ込められた結合試薬と特異性が互いに同一である結合試薬、かつこれとは異なる結合試薬を含有する少なくとも1つの結合ドメインからなり、各別々の結合ドメインは、疎水性であるかまたは親水性であることを特徴とするが、但し各結合ドメインの周りの支持体表面の領域は、試料中の1つまたはそれ以上の目的のアナライトが結合ドメインに結合できるようにするために、(i)結合ドメインが親水性なら疎水性であり、そして(ii)結合ドメインが疎水性なら親水性であり、

(b)試料の液滴上に反応媒体の液滴をのせ、そして

(c)結合ドメインに結合した目的のアナライトの存在を測定する、ことからなる。

本発明のこの面の1つの具体例においてそれぞれが、基質として化学反応の順に中間体を使用する異なる酵素を取り込んで有する結合ドメインは、P M A M S表面上に位置し、そのため、次の酵素の基質となるある酵素反応の生成物は、反応経路中の次に酵素の方に流れる。本発明はまた、前記方法を用いて、自己組立単層上の酵素の大量固定化(例えば、工業的応用のために)を提供する。

例えば、片面または両面に酵素が固定化されたシートは、溶液容量に対する高表面積比を達成するために重ねられる。あるいは、そのような固定化酵素は、多孔性材料に結合される。さらに、そのような固定化酵素は、ディップスティック、化学反応物質、試験管または毛細管の壁面、またはインキュベーター・チャンバーのような容器の壁面上でもよい。

本発明の別の面において、前述したような非E C L測定法がP M A M S類似体上で行われ、P M A M S類似体は、非E C L反応を行うための別々のドメインを含有し、別々のドメインは必ずしも結合試薬を取り込んでおらず、従って必ずしも結合ドメインではないという点で、該P M A M S類似体は前記P M A M Sとは異なる。このようなP M A M S類似体は、反応を行うための別々のドメインを有し、別々のドメインに適用される液体の分散および/または拡散を阻害するように作成される。ある実施態様において、反応媒体および/または試料を別々のドメインに封じこめるのを助けるために、ドメインは支持体表面上の周りの領域に対して疎水性または親水性である。分散または拡散を阻害するために、ウ

エルの使用、フェルトもしくは多孔性材料上の反応媒体または試料の沈積、ゲル、フィルムなどの上の反応媒体または試料の沈積または乾燥が行われる。このような各別々のドメインの直径または幅は1mm未満、好ましくは50nm～1mmの範囲であり、最も好ましくは1ミクロン～1mmの範囲である。同じであるかまたは異なる反応媒体は、各別々のドメインに沈積されてから試料が適用されるか、または反応媒体の沈積の前に試料の適用が行われる。

非ECL測定法を行うためのPAMS類似体の使用の好適な面において、複数の別々のドメイン上に反応媒体の液滴をのせ、好ましくは微量液体ガイドのアレイから同時に送達され、次に同時に、安定性を向上させるかおよび/または液滴を保護するために、より粘性の高い溶液（例えば、油）を反応媒体の上にのせるか、あるいは別々のドメインの間にのせ、次に、各別々のドメインに別々に適用するか、または大量に、ドメインを含有するPAMS類似体の全表面を液体試料に暴露することにより、検出または測定されるアナライトを含有する試料を各ドメインに適用する。結合ドメイン内で生じる反応を進行させ、当該分野で公知のものから選択されるレポーターおよび検出系を用いて、結果を観察する。

#### 5.14. 多孔性電極上の粒子の捕捉を用いるECL測定法

本発明は、複合体が形成される電気化学発光結合測定法の実施方法を含む。この複合体は少なくとも、粒子と電気化学発光が可能な標識化合物とを含む。複合体はまた、ヤング・エイチ・ジェイ (Yang H.J.) ら、Biotechnology, 12, (1994), 193-194に記載のECL測定法で使用されるリガンドも含む。本方法は、(a) 複合体を形成する工程と；(b) 濾過して多孔性導電性電極上に複合体を採取する工程と；(c) 電極に電位を加えることにより発光するように、採取した複合体中の標識化合物を誘導する工程と；そして、(d) 電極から放出された発光を検出する工程とを、含む。

電気化学発光結合測定法を実施するためのさらに別の方法において、電気化学発光測定法の成分と複合体を形成することができる粒子をまず、多孔性導電性電極上に採取する。次に、目的のアナライトを含有する試料を、多孔性導電性電極上の複数のドメインに通し、電極上で採取された粒子上で複合体を形成する。次に標識化合物を誘導して、電極に電位を加えることにより発光させ、放出された発光を検出して、目的のアナライトの存在を測定する。好適な実施態様において、その中に取り込まれる粒子を用いてあらかじめ導電性電極を調製し、使用時に、目的のアナライトを含有する試料を電極に通して複合体を形成させる。

本発明は、複数の目的のアナライトの複数の電気化学発光結合測定を実施するための方法に適合することができる。このような測定法において、少なくとも粒子と標識化合物を含む複合体が形成され、これらは、各々が多孔性導電性電極を含む複数の不連続なドメイン上に採取される。すでに記載したように、標識化合物の粒子および同時に他の測定成分は、溶液中で複合体を形成し、次にドメイン上で採取されるか、またはドメインはまず粒子を含有し、試料を電極に通すことにより標識化合物および同時に他の測定成分と複合体を形成してもよい。

本発明は、高処理量測定プロセシングの標準物質フォーマット（例えば、96ウェルプレートまたは384ウェルプレート）で使用されるように適合させることができる。

好適な実施態様において粒子は、測定法で内部標準として作用することができる発光分子種を含有してもよい。その発光は、測定法を較正するために測定することができる。

本発明は、粒子が、結合試薬の固相支持体として使用される結合測定法を含む。粒子という用語は、そのサイズ、形または組成に何の制限もないことを意味する。粒子は、濾過により多孔性電極上で捕捉され、アナライトの存在は、粒子上の結合複合体中に存在するECL-標識物からのECLの励起により検出される。

粒子ベースの測定法は結合能力が高いため、ECL測定法で使用されている（例えば、PCT公開出願WO90/05301およびWO92/14139を参照）。これらはまた、溶液中の結合で観察される反応速度に近い速度で結合が起きることを可能にする。

磁性を利用して金属表面の磁性粒子を捕捉するシステムを用いた、高感度で正確な測定法

10

20

30

40

50

が実施されている（PCT公開出願WO92/14139；ディーバー・ディー・アール（Deaver,D.R.）、Nature 377, (1995) 758-760；ヤング・エイチ・ジェイ（Yang H.J.）ら、Biotechnology, 12, (1994), 193-194を参照）。この捕捉法は、標識粒子が励起されるように、粒子を電極の近くに置く。この技術は、多くの分野で非常に成功している。しかしこれは、いくつかの限界（主にコストと複雑さ）があり、処分可能なカートリッジを用いる低成本測定法ではその使用が限定される。

多孔性電極を介する濾過により粒子を捕捉するシステムは、粒子ベースの測定法の高い結合能力と優れた反応速度を利用する。これはまた、流体工学を単純化し、多種類の安価で非磁性の市販の粒子を使用でき、かつ安価で多孔性の炭素ベースの電極を使用することができる。これはまた、粒子に結合した標識物のECL励起の効率を改善することができる。多孔性電極は、非多孔性電極（例えば、金属フィルム）よりはるかに有効な表面積を有する。電極が、多孔性でかつ纖維性の材料からなる小纖維マットなら、小纖維は、例えば粒子の大部分を包むかまたは交差して置くことにより、接触してもよい。

本発明は、ECLによるアナライトの検出のための粒子を捕捉する多孔性電極を含有するカセットを含む。カセットは、ECL-不活性なフィルター上に支持される炭素小纖維の薄いECL-活性層からなる作用電極を含有してもよい（炭素小纖維の詳細な説明については、セクション5.1とここに引用されている文献を参照。小纖維マットの詳細についてセクション5.7を参照）。カセット内の別のチャンバーは、ストレプトアビジン被覆粒子と乾燥した結合試薬（例えば、ビオチン標識捕捉試薬とECL-標識検出試薬）を含有する。カセットはまた、粒子を含有するチャンバーに液体試料を導入する手段、濾過により作用電極上の粒子を捕捉する手段、対電極および参照電極を提供する。本発明はまた、カセットでECL測定法を実施するための関連システム（例えば、ホウジング、カセット中の電極への電気的接続、波形発生器またはポテンショスタット、PAMASから放出されるECLをイメージングするための電荷結合素子（CCD）カメラ、および波形発生器を制御しカメラ4721により受け取られる画像を解析するためのマイクロコンピューター）を含む。

粒子が濾過により捕捉される粒子ベースの測定法のための作用電極のいくつかの好適な実施態様がある。この電極が形成される材料は、適切な電気化学電位が加えられる時、その近傍にあるECL標識物からECLを励起することができなければならない。電極が多孔性の場合は、孔のサイズは、電極中へまたはこれを介して非結合試薬の濾過を可能にするのに充分なだけ大きいが、粒子を捕捉するのに充分なだけ小さくなければならない。

好ましくは作用電極は、導電性フィルターからなる。導電性フィルターは例えば、ECLを励起することができる多孔性炭素、粒状炭素の凝集物から、黒鉛炭素、炭素小纖維および/または多孔性金属から、形成されてよい。電極は、非導電性多孔性材料（例えば金、白金および/または黒鉛纖維のマットのようなECL-活性材料で被覆された、市販のポリマーベースの濾過膜）から構成されてよい。電極は複数の層を有してもよい。1つの実施態様において、ECL-活性電極材料の薄膜は、より厚いECL-不活性（しかし、導電性）材料上に沈積される。「活性」および「不活性」という用語は、ECL標識物からECLを励起するための電極の相対的効率を意味し、この特徴は、具体的な応用でECLを開始させるのに使用されるECL標識物の構造および条件の両方に依存する。導電性のECL-不活性層は、活性層の全表面に沿った電気的接触を確実にするが、活性層を通して濾過した非結合ECL標識試薬からのECLの励起を防止する。好適な実施態様において、ECL-活性層は、炭素小纖維の薄いマットであり、ECL-不活性支持体はステンレスの濾紙である。

非共有結合および/または共有結合反応により粒子上に結合試薬を固定化する多くの方法が、当該分野で公知である。例えば粒子をストレプトアビジンで被覆し、次に特異的結合試薬を、ストレプトアビジン-ビオチン相互作用を使用して捕捉する。

本発明での使用に適した広範囲の粒子が市販されている。これらには、他のタイプの粒子ベースの測定法で普通に使用されるビーズ、例えば、磁性、ポリプロピレン、およびラテ

10

20

30

40

50

ツクス粒子、固相支持体で典型的に使用される粒子（ポリスチレンおよびポリアクリルアミド粒子）、およびクロマトグラフィーへの応用で典型的に使用される粒子（例えば、シリカ、アルミナ、ポリアクリルアミド、ポリスチレン）が含まれる。粒子はまた、炭素小纖維のような纖維であってもよい。

その表面に多様な官能基を有する材料が利用できる。このため、広範囲の固定化化学の使用が可能になる。ある測定法では、アナライト自身が粒子として作用することもある。例えば、特異的細胞表面抗原を有する細胞の測定（または、細胞集団中の細胞表面マーカーの量を定量するための測定）は、細胞を、抗原に対するECL-標識抗体で処理し、次に多孔性電極上に細胞を濾過することにより行われる。

本発明は、多くの異なる結合測定法（セクション5.10に記載のものを含む）を実施するため使用できる。これらには、競合およびサンドイッチフォーマットの、免疫測定法および核酸ハイブリダイゼーション測定法がある。これらの測定法の多くは、電極の近傍の標識アナライトまたは結合試薬を検出する。必要な場合は穏やかに混合して懸濁液中の粒子上で結合試薬を実施することは、結合反応の反応速度が特に好適であるため、有利である（これらは、均一系反応の速度に近い）。

あるいは、粒子を電極上に沈積させ、捕捉された粒子中に試料を流すことにより、結合反応が行われる。結合ドメインを有する粒子は、セクション5.1に記載の多くの方法により、パターン付けされたアレイ（すなわち、PMAMS）上に沈積することができる。

ある実施態様において、粒子は96ウェルプレートのパターンに対応するアレイ中で、電極上に沈積される。この粒子/電極固定物は、マスク中の孔が沈積された粒子のパターンと整列するように、電極に押しつけられる。孔の壁は、ウェルの壁を画定する。電極と粒子はウェルの底および結合試薬を画定する。好ましいキットは、業界の標準を満足する任意の数の孔を有する（例えば、高処理量スクリーニングのための96または384の孔）。

結合試薬を有する粒子は、電極上の複数のゾーンに沈積してもよい。同じ結合試薬を有する粒子を有する2つまたはそれ以上のゾーンがあってもよい。異なる結合試薬を有する2つまたはそれ以上のゾーンがあってもよい。

流体ガイドにより試料を1つまたはそれ以上のゾーンに送るか、または一回の工程ですべてのゾーンに一気に加えてよい。

あるいは、粒子を電極の表面に均一に沈積（すなわち、パターン付けしたアレイではない）し、孔を有する固定物を、電極の活性領域を画定するために電極に押しつけてよい。1つまたはそれ以上の内部標準を含めることができ、しばしば好ましいことがある。シグナルを内部標準が発生するシグナルと比較すると、測定の実施において測定カセットの製造の変動を補償することができる。内部標準として色素を粒子内に取り込んでもよい。蛍光色素を取り込んだ粒子は市販されており、その一部は誘導してECLを放出させることができる。特定のECL標識物と異なる色素（例えば、そのスペクトル特性、そこからECLが放出される電気化学電位、および/またはそのECL寿命により）は、特定のECL標識物と内部標準からECLの同時測定を可能にする。異なるスペクトル特性を有するECL放出は、フィルター、格子、および/または規定されたスペクトル窓内の光の測定を可能にする当該分野で公知の他の技術を使用して区別することができる。

粒子を使用して、1つまたはそれ以上のアナライトの1つまたはそれ以上の測定を同時に実施するためのPMAMSを調製することができる。例えば、各懸濁物が固定化された捕捉試薬を有する粒子を含む、粒子の複数の懸濁物を調製することができる。PMAMSは、懸濁物の微小液滴を、例えばセクション5.1に記載の方法により、作用電極上の画定された領域に添加することにより形成される。

カセットは、ECL測定を実施するために1つだけの結合ドメインを有してもよい。この場合、ECLの強度は、単一光検出器を使用して定量してもよい。光の強度を既知濃度のアナライトから得られたものと比較すると、アナライトの定量が可能になる。使用される光検出装置は、フォトダイオード、光増幅管およびアバランシュフォトダイオードを含む。

10

20

30

40

50

カセットは、複数の結合ドメインを含有してもよい。放出された光は、イメージングして各結合ドメインで発生するシグナルを分離することができる。イメージングは、CCDカメラのような光検出器のアレイを用いて行われる（セクション5.5を参照）。密に充填された結合ドメインの間のクロストークは、結合ドメインのアレイ上にレンズのアレイを置くことにより排除することができる。

あるいは、検出器のアレイで測定される強度の数学的分析は、このようなクロストークを補償することができる。

### 5.15. 電極上のPMAMSを用いるECL測定法

本発明は、電極の表面上に直接形成されるPMAMSを含有するカセットを包含する。カセットは、支持体材料上の薄い金属フィルムを含む作用電極を含有する。複数の結合ドメイン（すなわち、PMAMS）が、金属フィルムの表面上に存在する。カセットはまた、電極の表面に流体試料と試薬を導入するための手段、および作用電極でのECLの電気化学的励起を可能にする電極を含む。作用電極での電気化学電位のより良好な制御のために、参照電極もまた含まれる。ECL測定を実施するための装置は、ハウジング、カセット中の電極への電気的接続、波形発生器またはポテンショスタットからなるカセット、PMAMSから放出されたECLをイメージングするためのCCDカメラ、および波形発生器を制御しカメラが受けた画像を解析するためのマイクロコンピューターを含むカセットを含む。

作用電極上で直接PMAMSを形成することは、以前のECLシステムに対していくつかの利点を有する：作用電極と結合測定法のための固相支持体を1つのユニットに組合せると、製造と処分可能なフォーマットにおけるECL測定法の実施とが大幅に単純化され、処分可能な測定法が低コストで作成される。複数のECL標識物を使用することなく、複数の測定法が実施できる。複数の測定法の各々からのECLの励起は、1つの作用電極/対電極の対に電位を加えることにより同時に進行することができる（結合ドメインのすべては、同じ作用電極の表面に位置している）。PMAMSの支持体として金属表面を使用すると、充分進歩した技術（例えば、金属上の自己集合单層（SAM）の形成とパターン付け）の使用が可能である。

作用電極は、金属（例えば、金および白金）、金属酸化物導電体、および半導体（例えば、ITO）、炭素（例えば、黒鉛、カーボンブラック、炭素小纖維）、および導電性有機ポリマー（例えば、ポリチオフェン）を含む広範囲の材料から作成される。電極は、異なる材料の複合体でもよい。

ある実施態様において作用電極は、基板上の薄い（5 nm ~ 10,000 nm）膜である。蒸着、重合、スパッタリング、化学的蒸着、およびメッキを含む技術によるこのようなフィルムの調製は、当該分野で公知である。好適な実施態様において作用電極は、基板上に蒸着した金の薄膜である。薄膜電極のための基板の性質は、測定系の要件により選択することができる。基板は、固体でもよく、電極を介する試料の濾過または電極に沿った試料の毛細管移動が好ましい場合は、基板は多孔性材料（例えば、濾過膜）でもよい。

結合試薬は、非特異吸着により電極表面に直接固定化されるか、または電極の表面の化学的官能基への共有結合により固定化される。電極の表面に化学的官能基を導入する1つの方法は、薄膜の電子沈積または電子重合である。別のアプローチは、自己集合单層（SAM）の調製である。電極材料上で調製できるSAMの例は、金の上の有機チオール、およびITOの上の有機シラン（セクション5.1を参照）の单層を含む。図50に示すように、SAMは、分子A-L-B 5032を電極5033の表面と反応させることにより調製され、ここでAは、電極への分子の結合に関与する官能基であり、Lは結合鎖であり、そしてBは、表面への結合試薬5034の結合のために使用される官能基である。あるいは、Bは結合試薬でもよい。

好適な実施態様において、SAMは、末端が官能基化されたアルカンチオール（HS-（CH<sub>2</sub>）<sub>n</sub>-B）を、基板上に沈積した金の薄膜と反応させることにより形成される。多様な官能基（B）を有するアルカンチオールが調製でき、多様な固定化化学の利用が可能である。例えば、基Bがカルボン酸基を含むなら、アミノ基を含有する結合試薬は、N-ヒ

10

20

30

40

50

ドロキシスクシンイミド (NHS) の存在下でエチル - 3 - ジアミノプロピルカルボジイミド (EDC) で SAM を活性化した後に、SAM と反応させて固定化することができる。あるいは官能基 B はメチル基でもよく、結合試薬は非特異的な疎水性相互作用により固定化されるか、または官能基 B がビオチン残基を含むなら、ストレプトアビジン、または共有結合もしくはビオチン - ストレプトアビジン相互作用によりストレプトアビジンに結合した他の試薬は、その表面に固定化される。

結合試薬の固定化のための多くの他の化学が当該分野で公知であり、かつ使用可能である。ある場合には、表面に固定化された結合試薬の密度を調節するために、または表面の好みの性質（例えば、非特異結合に対する耐性）を維持するために、電極表面の官能基 B の密度を調節することが好みのこともある。ある官能基 B の表面密度の調節は、表面の B の所望の濃度と混合した SAM を產生するために決定された比率で、電極表面を、モノマー A - L - B と A - L - C を含有する混合物で処理することにより達成される。官能基 C は、結合試薬 B を結合するために使用される固定化化学に対して耐性であるように選択され、非特異結合の低下した表面を產生するような他の好みの性質を有してもよい。

電極の表面上の PMAMS の形成は、(i) 写真平板固定化；(ii) 微小接触印刷；および(iii) マイクロキャピラリーアレイまたはインクジェット印刷の使用による表面への結合試薬の液滴の調節添加、とを含む、種々の方法により行われる（セクション 5.1 の考察を参照）。結合ドメインで修飾された表面上の領域をよりよく画定するために、パターン付けした SAM を使用することができる。例えば、微小接触印刷を使用して、金表面上に円形の領域をパターン付けして、末端がカルボン酸のアルカンチオールから形成した親水性 SAM を提供することができる。次に残りの金表面に、末端がメチルのアルカンチオールを反応させて、疎水性 SAM を与えることができる。NHS の存在下で EDC により表面を活性化した後、各々が異なる抗体を含有する液滴を親水性の円に添加する。円の外側の表面の疎水性のために、液滴は疎水性領域に閉じこめられ、こうして固定化された結合ドメインの領域の注意深い調節が可能になる。

電極上に固定化された PMAMS を使用して行われる測定法のタイプには、セクション 5.10 に記載のものが含まれる。これらの測定法の多く（例えば、競合的およびサンドイッチフォーマットの、免疫測定法および核酸ハイブリダイゼーション測定法）は、結合試薬、ECL - 活性基（標識）で標識されたアナライトの電極表面への結合の検出に依存する。SAM の表面の標識された試薬から放出されるシグナルの強度は、ECL を励起するために使用される電位波形の性質に強く影響される。例えば、金上のアルカンチオール酸塩の SAM は、良好な電気絶縁体であるが、電極表面での強い酸化または還元電位は、単層中に乱れを引き起こすことによりフィルムの絶縁性を低下させる。SAM に乱れを引き起こさない電位での ECL の励起は、電子がトンネル作用により単層を通過することが必要である。SAM に乱れを導入する電位を加えることにより、はるかに強度の強いシグナルが達成され、こうして電極への電流の妨害が低下する。これらの電位は、ECL の励起の前または実施中に適用することができる。あるいは SAM は、乱れた単層を与える当該分野で公知の条件を使用して形成してもよい。単層の導電性はまた、電子の移動を促進する単層中に成分を含めることにより増加させることができる（例えば、結合基 L へのバイ共役系の導入）。導電性の高い SAM の形成は、セクション 5.7 でより詳細に考察する。

ある場合には、SAM に乱れを導入しない電位の使用が有利である。これらの条件下で、溶液中の非結合の標識試薬からの結合標識試薬の区別は、距離への電子トンネル作用の強い依存性のために最大になり、こうして洗浄工程の必要性が排除される。表面の ECL 標識物は、溶液中の ECL 標識物よりはるかに強いシグナルを与えるであろう。ECL は、結合から生じる SAM と ECL 標識物との導電性の変化により調節することができる。核酸ハイブリダイゼーション測定法を実施するためのこのアプローチの使用は、セクション 5.7 に記載される。

本発明のカセットは、1 つの ECL 測定を実施するための 1 つだけの結合ドメインを含有してもよい。光の強度を既知濃度のアナライトから得られたものと比較することにより、

10

20

30

40

50

アナライトの定量が可能になる。使用される光検出装置には、フォトダイオード、光増幅管およびアバランシュフォトダイオードがある。カセットはまた、複数の結合ドメインを含有してもよい。このようなカセットから放出された光は、各結合ドメインで生成したシグナルを分離するためにイメージングされなければならない。イメージングは、CCDカメラのような光検出器のアレイにより行われる（セクション5.5を参照）。密に充填された結合ドメインの間のクロストークは、結合ドメインのアレイ上にレンズのアレイを置くか、あるいはいくつかの結合ドメインからのシグナルの強度の数学的分析により排除することができる。

#### 5.16. 多孔性基板上のPMAAMSを用いるECL測定法

図37は、マトリックス3703の中および/またはその上の結合ドメイン3702が表面3701に提示されるカセットを示す。結合ドメイン上の結合反応の完了後、結合ドメインが作用電極のすぐ近傍にくるように、作用電極3704と対電極3705を支持する第2の表面3700を位置させる。結合ドメインに結合したECL標識物からの発光は、片面または両方の表面から検出される。我我は、このECLの配置を「2表面」ECL測定法と呼ぶ。

図38は、結合ドメイン3805、3806、3807が、対電極3800上に支持されたマトリックスの表面に提示されているカセットを示す。結合ドメイン上の結合反応の完了後、作用電極3801をマトリックスの表面のすぐ近傍に位置させる。結合ドメインに結合したECL標識物からの発光は、もし電極の一方または両方が透明かまたは半透明なら、片面または両方の電極から、および/または横から検出される。

本発明はまた、PMAAMSを含有するカセットを使用するECL測定法を実施するための装置を包含する。図38に記載のカセットを使用するECL測定法を実施するための装置は、電極に電気的接続をするための手段、電極の電位を制御するための手段、マトリックスを作用電極のすぐ近傍に動かすための手段、およびECLの励起中に放出された光をイメージングするための手段を含む。

この2表面法は、従来のECL方法に対していくつかの利点を有する。複数のECL標識物を使用することなく、複数の測定が便利に実施できる。複数の測定の各々からのECLの励起は、1つの作用電極/対電極の対に電位を加えることにより（すべての結合ドメインは、同じ作用電極の近傍に位置している）同時に実施することができる。結合反応の間、物理的バリアー（これはECLの励起の前に除去される）により作用電極は保護することができ、このため、その電子化学的性能を変化させる電極表面の汚染を防ぐことができる。サンドイッチ免疫測定法の場合について図55に示すように、マトリックス5200に固定化された一次抗体5201に結合したアナライト5202への、ECL標識試薬5203の結合により、標識5204が電極表面5205に最適に提示される（すなわち、標識物と電極の表面の間の最少の有機物質、例えばタンパク質、核酸、または結合基）。マトリックスは、例えば電気泳動および/またはマトリックスを介する濾過により、試料の成分の濃縮および/または分離のために使用される。マトリックスは乾燥または部分的に水和された型の測定試薬の保存のための媒体として使用される。マトリックスの表面は、作用電極と等角で接触して置くことができる。

PMAAMSは好ましくは、以下の性質の1つまたは両方を有するマトリックス内および/または上に形成される。マトリックスは、作用電極と対電極の間にイオン電流を流すことができ、従って電気化学回路を完成することができる。マトリックスは好ましくは、作用電極と密着することができ、例えばマトリックスはエラストマー性および/または柔軟性である。これらの性質を有する材料は当該分野で公知であり、例えば濾過膜および水膨潤性ポリマー性ゲルなどの多孔性材料を含む。本発明のある実施態様において、例えば作用電極で励起された光がマトリックスを介して検出されるなら、マトリックスは透明であることが好ましい。

PMAAMSは、異なる孔径と溶媒含量を有する多孔性材料（例えば、ゲル）上で形成することができる。例えば、孔径の異なるポリアクリルアミドゲルは、アクリルアミドの濃度と架橋の程度を変えることにより作成することができる。

10

20

30

40

50

アナライトより小さい孔径を有するマトリックスでは、結合反応は実質的にゲルの表面で起きる。この場合、ゲルを介する濾過および／または電気泳動を使用して、ゲルの表面でアナライトを濃縮し、結合反応の動力学を調節（例えば、速度を増加）することができる。速度の速い方が迅速測定法では有利であり、短時間で感度が上昇する。

アナライトより大きい孔径を有するマトリックスでは、結合反応はゲルの表面ならびに本体で起きる。この場合、濾過および／または電気泳動を使用して、結合の動力学を上昇させ、ならびに非結合分子種を表面から除去することができる。

ゲル上に形成されるP M A M Sは湿潤状態で保存されるか、および／または乾燥状態で保存して測定時に復元することができる。E C L測定に必要な試薬は、ゲルの形成中にゲル中に浸透させるかまたは取り込むことにより、保存前にゲル内に取り込むことができるか、および／または測定時に加えることができる。

共有結合および非共有結合によるマトリックスへの結合ドメインの固定化は、当該分野で公知である。種々のマトリックス材料への結合ドメインの固定化法のいくつかの例が、セクション5.1に詳述されている。セクション5.1はまた、マトリックス上の結合ドメインをパターン付けしてP M A M Sを形成する方法を詳細に記載する。これらのパターン付け法は以下を含む：i)写真平板的固定化；ii)マトリックスの表面へ微小液滴のパターン付けした適用；iii)液体型のマトリックス中の結合ドメインを含有する液滴または微小液滴の基板への適用と、次に架橋、重合、ゲル転移以下の冷却などを含む既知の技術を使用して液体の固化および／またはゲル化をして、マトリックス材料からなる基板上に明確な液滴を与える（こうして各固化した液滴は異なる結合ドメインからなる）；iv)マトリックスを使用して、例えばポリアクリルアミドスラブで電気泳動して分離を行う；そしてv)1つまたはそれ以上の結合ドメインを含有するマトリックスの層構造を形成。

作用電極は好ましくは、適切な電気化学電位が加えられる時、表面のすぐ近傍でE C L標識物からE C Lを励起することができる電極材料から作成される。ある実施態様において、光は、作用電極および／または対電極を介してP M A M Sの表面から検出される。これらの場合に、透明または半透明電極材料を使用することが有利である。これらの電極材料は当該分野で公知である。例としては、インジウム酸化スズでできたフィルムならびに非常に薄い（< 30 nm）金の薄膜がある。あるいは、試料から作用電極を保護することが有利なことがある。試料をP M A M Sとインキュベーションの間、電極上の物理的バリアーはこれを保護し得る。次にP M A M Sを電極のすぐ近傍に置く前に、物理的バリアーを除去する。

### 5.17. 複合電極上のP M A M Sを用いるE C L測定法

本発明の好適な実施態様において、電極は、多数の炭素小纖維をその中に分散して含有するポリマーの複合体である。好ましくは複合体は多孔性である。

測定を実施するための好適な装置は、その中に分散した炭素小纖維と、測定法の成分に結合することができる試薬を含有する1つまたはそれ以上の結合ドメインとを含有するマトリックスを、第1の成分として含む。

電気化学発光によるアナライトの検出のための装置は、その中に分散された多数の導電性粒子を有するマトリックスと、結合電気化学発光測定法の成分に結合することができる試薬を含有する結合ドメインとの複合体からなる電極を含んでよい。好ましくはマトリックスはポリマーであり、導電性粒子は炭素である。導電性粒子は好ましくは炭素纖維であり、炭素纖維または炭素小纖維である時最も良好な結果が得られる。

複数のアナライトの検出に使用される装置はまた、本発明に包含される。そのような装置において、電極は、その中に分散された多数の導電性粒子を含有するマトリックスと、電極の表面に支持された、各ドメインが結合電気化学発光測定法の成分に結合することができる試薬を含有する複数の結合ドメインとからなる。

ポリマーと分散された炭素小纖維を含む電極の性質は、複合体を種々の化学的および物理的工程（例えば、酸化、プラズマへの暴露、および1つまたはそれ以上の官能基の添加により電極を誘導体化することができる試薬への暴露）に付することにより修飾される。後者の方法においてポリマーが誘導体化されるか、またはその中に含有される小纖維が誘導

10

20

30

40

50

体化されるか、または両方が誘導体化される。好ましくは複合体は、修飾するために、該複合体に存在する電気化学発光化合物で電気化学発光が起きる電位を変更するのに充分な時間、化学的または物理的処理に付される。また、その上の所望の官能基を露出するよう電極を修飾することにより、ポリマーとその中に分散された多数の炭素小纖維を含む電極の性質を修飾することも本発明に包含する。本発明はまた、電気化学発光が起きる電位を変えるために化学的または物理的処理により修飾されている電極も含む。

本発明は、2つ以上の材料からなる電極（すなわち、複合電極）の表面に直接形成されるP M A M Sを含有するカセットを包含する。このようなカセットのいくつかの成分は、前記した。

複合電極は、支持体マトリックス中に含浸された導電性および/または電気化学的に活性な粒子からなってもよい。例えばマトリックスは、油、ロウ、パラフィン、プラスチック、セラミック、テフロン、ポリマー、エラストマー、ゲルおよび/またはこれらの組合せからなってもよい。複合電極の製造に使用することができる市販のポリマーのいくつかの例には、E V A、ポリエチレン（P E）、ポリスチレン（P S）、およびA B Sがあるが、これらに限定されない。

マトリックスは、特定の応用についての設計の要求を満たすように選択される。材料は、特定のタイプの固定化化学について適切なものでよく、特定のタイプの測定法において高い特異的シグナルおよび/または低いバックグラウンドシグナルを与え、および/または材料は好ましい物理的性質（例えば、可撓性、強度、化学的耐性）を有する。

複合電極は、マトリックスと組合せた時に導電性の複合体を与える任意の粒子を使用して形成することができる。粒子は、炭素、例えば粒状炭素、カーボンブラック、炭素纖維、カーボンフェルトおよび好ましくは炭素小纖維である（セクション5.1と5.7）。

マトリックスのための2つ以上のタイプの粒子および/または2つ以上のタイプの材料を含有する複合体が使用できる。例えば、複合電極は、導電性とE C L活性を付与するために1つのタイプの粒子を含有し、結合ドメインの支持体として別のタイプの粒子を含有してもよい。

好適な実施態様において、複合電極は、炭素粒子とマトリックスの混合物からなっていてもよい。具体的な好適な実施態様では、複合電極は、炭素小纖維とポリマーからなる。米国特許第5.304.326号と第5.098.771号は、小纖維を含浸させたポリマー複合体を記載している。

小纖維-ポリマー複合電極は、プラスチック材料と部品の製造の分野で公知の技術により製造することができる。例えば、平板電極は、プレスシートまたは小纖維複合体の押出しひルムから切断することができる。流体の移動または反応チャンバーのウェルのために複雑な形または表面の特徴（例えば、くぼみまたはチャネル）を有する電極は、射出成型により形成される。

複合電極は、固体または多孔性でもよい。多孔性複合体は、多孔性プラスチック材料（例えば、濾過膜）を製造するための技術を使用して形成される。多孔性複合電極を通して濾過すると、電極の表面に固定化された結合ドメインへの結合反応の動力学が改善される。結合試薬は、修飾されていない複合電極上で固定化される。例えば、結合試薬は、マトリックス上におよび/または導電性粒子上に、非特異的吸着により固定化される。マトリックスおよび導電性粒子上に存在する官能基は、試薬の固定化のために使用することができる。これらの試薬は、結合試薬として働き、および/または表面の性質（例えば、湿潤性または非特異結合に対する耐性）を変える試薬として働く。マトリックスとして使用される材料上の試薬の共有結合および非共有結合固定化法は、当該分野で公知である（セクション5.1を参照）。

ある実施態様において、炭素粒子は、0.1~99.9重量%の複合体を含む。ある実施態様において、炭素粒子は0.5~50重量%の複合体を含む。好適な実施態様において、炭素粒子は1~30重量%の複合体を含む。特定の好適な実施態様において、炭素粒子は、2~20重量%の複合体を含む。

複合体中の炭素小纖維の使用は特に有利である。小纖維の導電性と高いアスペクト比が、

10

20

30

40

50

複合体中の低重量パーセントの炭素で高導電性を有する複合体の調製が可能になる（同じパーセントで存在する、小纖維以外の炭素粒子を含有する複合体と比較して）。炭素の量が多いと複合体の構造および／または加工性が影響を受けることがあるため、高導電性を有しているが炭素の量が少ない複合体は有利である。炭素小纖維を含有する複合体はまた、その大きな外表面積のために、高い結合能力を有する。小纖維を露出させるために複合体を処理（例えば、化学的手段またはプラズマへの暴露により）すると、結合能力を効果的に変化させて、これを増加させる。ここで欠乏能力とは、材料のある幾何面積当たりに固定化される試薬の量を意味する（例えば、材料cm<sup>2</sup>当たりのタンパク質のナノグラム）。幾何面積とは、材料の大きさにより画定される材料の面積を意味する（例えば、1 cm × 1 cmの大きさを有する材料の四角い片は、幾何面積 1 cm<sup>2</sup>を有する）。多くの材料の制限の 10 1つは、結合能力が材料の幾何面積により制限されることである。例えば、平滑で平面的な表面（例えば、金属の表面）が使用されるなら、その平滑で平面的な表面の幾何面積にわたって分布した試薬の密に充填された単層の結合能力を超える、試薬（例えば、タンパク質、核酸、結合試薬）の結合能力を得ることは不可能かも知れない。露出した小纖維を有する複合体の使用は、この制限を克服する。小纖維を露出させると、複合体の表面に複数の突出した小纖維（各々が広い表面積を有する）を生みだし、試薬の結合に使用可能な小纖維の総表面積が、複合体の幾何面積を大幅に超えることができる。ある実施態様において、そのような複合体上の試薬の結合能力は、複合体の幾何面積にわたって分布した試薬の密に充填された単層のそれの1倍を超えることができる。別の実施態様において、そのような複合体上の試薬の結合能力は、複合体の幾何面積にわたって分布した試薬の密に充填された単層のそれの2倍を超えることができる。好適な実施態様において、そのような複合体上の試薬の結合能力は、複合体の幾何面積にわたって分布した試薬の密に充填された単層のそれの10倍を超えることができる。別の好適な実施態様において、そのような複合体上の試薬の結合能力は、複合体の幾何面積にわたって分布した試薬の密に充填された単層のそれの1000倍を超えることができる。  
 ある実施態様において、炭素小纖維を含有する複合体は、複合体をマトリックスを障害するかも知れない（もしマトリックスのみが処理されたなら）ある溶媒、温度、試薬およびプロセスによる障害に対して耐性であり得る。この障害に対する耐性は、加工において有利である。例えば、複合体の誘導体化のためにある方法を使用することが可能である（例えば、マトリックスのみを溶解するが、複合体として一緒に存在する時マトリックスまたは小纖維をかなり溶解する溶媒が必要な方法）。  
 複合電極は、化学的または物理的処理により修飾して、結合試薬の固定化を改善することができる。表面は、試薬の固定化のための官能基を導入するために処理される。使用される方法には、電磁放射、イオン化放射、プラズマまたは化学的試薬（例えば、酸化剤、親電子剤、求核剤、還元剤、強酸、および強塩基および／またはこれらの組合せ）への暴露を含む（セクション5.18を参照）。  
 1つの特に興味深い実施態様は、そのような複合電極の修飾、およびより広くはマトリックス（例えばポリマー）とその中に分散された1つまたはそれ以上の小纖維および／または小纖維構造体を含む複合材料（電極に限定されない）の、プラズマを用いる処理による修飾である。この処理は、処理の間にプラズマと接触する、小纖維、小纖維構造体および／またはマトリックスの表面特性を変えるために行われる。これは、処理された小纖維複合体は、必要に応じて官能基化または改変されることを意味する。本明細書に記載の教示により、当業者は、公知のプラズマ処理技術（さらなる発明または過剰な実験をすることなく）を、そのような複合材料の処理に適合させ利用することができるであろう。すなわちこの処理は、適当な反応容器中で適当な圧力かつ他の条件で、かつ適当な時間、プラズマを生成させ、それを複合材料と接触させ、そして修飾の所望の種類と程度を達成することができる。酸素、アンモニア、ヘリウムまたは他の化学的に活性なまたは不活性な気体に基づくプラズマを使用することができる。その性質に依存して、修飾された組成物は、電極（既に記載したもの）または他の応用に使用することができる。  
 プラズマを生成するために使用される他の気体には、アルゴン、水、窒素、エチレン、四 50

フッ化炭素、六フッ化イオウ、パーカルオロエチレン、フルオロホルム、ジフルオロ-ジクロロメタン、ブロモトリフルオロメタン、クロロトリフルオロメタン、などがある。プラズマは、単一の気体または2つまたはそれ以上の気体の混合物から生成されてもよい。複合材料を2つ以上の気体に暴露することが有利なことがある。また複合材料を、複数回連続してプラズマに暴露することが有利なこともある。プラズマを生成するために使用される条件、そのような処理の持続時間、およびそのような連続的処理の間の時間を変えて、材料のある変更を行うことができる。連続的処理の間に、複合材料を処理（例えば、材料を物質で被覆し、材料の表面を洗浄するなど）することもできる。

複合材料のプラズマ処理は、いくつかの変化を達成する。例えば、ポリマーとその中に分散された複数の炭素小纖維を含む複合材料は、プラズマに暴露することができる。プラズマに暴露するとポリマーがエッティングされ複合体の表面で炭素小纖維が露出され、露出した炭素小纖維の表面積が増加する（例えば、露出した小纖維の表面積が、複合体の幾何表面積より大きくなる）。プラズマに暴露すると、小纖維またはポリマーに化学的官能基が導入される。これらの官能基は、試薬の固定化のために使用される。

プラズマを使用して、試薬を複合材料に結合してもよい。例えば、複合材料を、試薬を含有する溶液（例えば、界面活性剤、ポリ芳香族分子、疎水性分子、荷電分子など）に暴露すると、試薬のある量が複合材料を被覆する。試薬で被覆された複合材料は次に、プラズマに暴露することができる。プラズマに暴露すると、試薬が複合材料に結合する。別の例では、生物学的分子（例えば、タンパク質、核酸など）で被覆された複合材料をプラズマに暴露する。プラズマに暴露すると、生物学的分子が複合材料に結合する。別の例では、複合材料を1つまたはそれ以上の所望の試薬を特異的に結合する試薬（例えば、アフィニティクロマトグラフィー樹脂、生体特異的リガンドを有するポリマー）で被覆し、プラズマに暴露する。プラズマに暴露すると、試薬が複合材料に結合する。

複合材料に結合した試薬は、複合体上で他の試薬を固定化するために使用することができる。例えば複合材料に結合した疎水性試薬は、複合体へのタンパク質の吸着を増強することができる。アフィニティクロマトグラフィー樹脂、生体特異的ポリマー、タンパク質などは、複合材料への生体分子の固定化を増強することができる（例えば、生体特異的および/または非特異的に）。

プラズマはまた、複合材料上の試薬の重合を誘導するために使用することもできる。プラズマで誘導された重合の生成物を使用して、次に複合材料へ試薬を固定化する。例えば、モノマー前駆体を複合材料上に被覆することができる。プラズマに暴露すると、モノマー前駆体の一部またはすべての結合および/または重合を誘導する。別の例では、モノマーを含むプラズマで複合体を処理することにより、複合材料上にポリマーを被覆することができる。別の例では、複合体をプラズマに暴露して、モノマーまたはポリマーで複合材料を被覆し、その結果重合開始分子種を複合体上で生成し、次に複合体をモノマーで処理することができる。

結合試薬をマトリックスと粒子の両方の上に固定化すると有利であるか、または結合試薬を成分の1つのみ（すなわち、マトリックスまたは粒子）に固定化すると有利である。例えば、EVA（コポリマーまたはエチレンおよび酢酸ビニル）中の小纖維からなる複合電極を、クロム酸と硫酸の混合物で処理して、電極上にカルボン酸基を導入してもよい。次にこれらのカルボン酸基を使用して、アミド結合を形成してアミンを含有する結合試薬を固定化する。あるいは、EVA中の小纖維の複合体を水酸化ナトリウムで処理することができる。この場合、小纖維は修飾されないが、ヒドロキシル基はポリマー上に露出される。これらの水酸化物基は次に、求核試薬を含有する結合試薬を固定化するために使用することができる。

複合体の修飾により他の有用な性質が得られる。マトリックスおよび/または粒子を修飾すると、高い結合能力を有する複合電極が得られる。複合電極への親水性基の導入により、マトリックスが水和され、薄い水膨潤性ゲル層が形成される。試薬は、そのようなゲル層内に固定化され、平板な固体の表面を同じ幾何表面積で占めることができるより多くの試薬が固定化される。マトリックスの部分的分解は、導電性粒子の露出表面積を増加させ

10

20

30

40

50

、特に粒子が溶液中に延長できる纖維である時、導電性粒子上に直接結合試薬が固定化されるための表面積の大きい電極が得られる。

複合体表面を修飾すると、ECLに必要な電気化学電位がシフトすることがある。複合電極を修飾すると、ECL標識物からのECLの励起に必要な過電位が低下または上昇し、このためいくつかのシグナル（例えば、アナライトからのシグナルおよびバックグラウンドシグナル）の分離が可能になる。

複合電極の表面上のPMAMSの形成は、写真平板固定化、微小接触印刷、および/またはマイクロキャピラリーアレイまたはインクジェット印刷の使用による、表面への結合試薬の液滴の調節添加を含む、種々の方法により行われる（セクション5.1を参照）。あるいは、複合電極の表面は、マスクと接触させて置くことにより、明確な領域に分類される。

本発明は、ECL測定法で使用するための処分可能なマルチウェルプレート（本明細書では、以後「ECLプレート」と呼ぶ）を包含する。ある実施態様において、ECLプレートは、導電性複合体をマルチウェルマイクロタイタープレートの形に成形（圧縮、成形、または形成）して製造される。別の実施態様において、材料のシートを通る穴のアレイを含むマスクが形成される。次にこのようなマスクは、電極に対してシールされる（電極は好ましくは、導電性複合体または小纖維マットである；小纖維マットの調製は、セクション5.7、セクション5.18、および本明細書に引用された文献中に詳述されている）。次にマスク中の穴は、マスクを含む壁と電極を含む底によりウェルを画定するであろう。マスクと電極は、あらかじめ組み立てた処分可能なカセットとしてユーザーに提供されるか、またはキットの個々の処分可能な成分として提供される。あるいは、電極のみが処分可能である。電極は固体および/または多孔性でもよい。多孔性電極の場合は、試薬を電極を介して濾過することにより結合反応が行われる（結合測定法で使用されるマルチウェル濾過マニホールド「ドットプロット」は当該分野で公知である）。ECLプレートの異なる実施態様において、マスク中の複数の穴（前記実施態様に記載）は、複数の各電極に対してシールされ、その結果各ウェルおよび/またはウェルの群中の電極は個々に探索される。

ECLプレートは、好ましくはマルチウェルマイクロタイタープレートについて使用される標準的な型で成形される。これらの標準的フォーマットは当該分野で公知であり、24、96、および384ウェルプレートがあるが、これらに限定されない。標準的フォーマットの使用は、マイクロタイタープレート上で結合反応を実施するための市販の装置の組み込みを可能にする（例えば、プレートの移動、プレートの洗浄、および/または試料の添加のための装置）。本発明は、ECLプレートの電極からECLを励起し、抽出ウェルから放出されたECLを定量するための装置を包含する。

ECLプレートは、1つまたはそれ以上のアナライトについての固定化結合試薬とともに、最終ユーザーに提供される。あるいはユーザーは、ECLプレートと、結合試薬の固定化に必要な試薬（そのような結合試薬がユーザーにより提供される時）とを含むキットを提供される。

複合電極は、ECLを使用しない測定法で使用してもよい。これらは、蛍光、化学発光、またはELISA型のフォーマットに基づく測定法のための固相結合支持体として使用されてよい。これらは、電流測定、または電位測定電気化学検出に基づく測定法のための固相結合支持体として使用されてもよい。

#### 5.16. 多孔性電極上のPMAMSを用いるECL測定法

本発明の電極は、複数の炭素小纖維のマットを含有してもよい。このようなマットは、電気化学発光測定法で使用するための電極としてよく機能することがわかっている。

マットは広くは、複数の炭素小纖維と、測定試薬を含有する少なくとも1つのドメインとを含む。本発明のある実施態様において、マットは、異なる導電性の2つまたはそれ以上の層、誘導体化されたかまたはされていない炭素小纖維の2つまたはそれ以上の層、または誘導体化されたかまたはされていない小纖維の組合せ、異なる光学的不透明性の小纖維の2つまたはそれ以上の層、または異なる孔径の小纖維の2つまたはそれ以上の層を含ん

10

20

30

40

50

でよい。

好ましくはこれらのマットは、電気化学発光測定法の電極として使用される。電極は、支持体と、多数の炭素小纖維を含む小纖維マットと、マットと電気的に接触するための手段とを含む。電極は、電気化学発光測定法の成分に結合することができる試薬を含有する結合ドメインを含有してもよい。

本発明は、このような測定法で使用される電極を作成するためのキットを包含する。このキットは、支持体、小纖維マット、およびマットと電気的に接触するための手段とを含む。小纖維マットは、結合ドメインを含有してもよい。

電極は、導電性または多孔性であり、好ましくは導電性かつ多孔性であり、例えば金属被覆多孔性材料からなる。電極は、ステンレスの纖維メッシュでもよい。

電気化学発光測定法で使用される電極の支持体として使用される小纖維マットは、いくつかの異なる方法で調製される。そのような方法の1つでは、小纖維は、その表面に固定化された結合試薬で製造される。これらの小纖維は、媒体中に分散される。次にこれらは、溶液から濾過されて小纖維マットを生成する。

あるいは小纖維マットは、媒体に小纖維を分散し、媒体から小纖維を濾過してマットを調製し、最後に小纖維マットを誘導体化して、その上に結合試薬を固定化するための小纖維マットを調製することにより、調製される。

本発明は広い意味で、目的のアナライトの電気化学発光結合測定法を実施するための方法を包含する。本法は、(a)導電性ポリマーからなる電極と；(b)結合電気化学発光測定法の成分に結合することができる試薬を含有する結合ドメインとからなる。

本発明の方法は、生物学的試料中の複数の目的のアナライトの電気化学発光結合測定を実施するために使用することができる。この方法は、(a)目的のアナライトと電気化学発光が可能な標識化合物とを含有する試料を、電気化学発光測定法の成分に結合することができる試薬を含有する結合ドメインを含有する多数の炭素小纖維を含む電極に接触させる工程と；(b)その上に電圧をかけて、発光するように電極上の標識化合物を誘導する工程と；そして(d)放出された発光を検出する工程とを、含む。

あるいは、この方法は、(a)複数の目的のアナライトと電気化学発光が可能な標識化合物とを含有する試料を、各々が電気化学発光測定法の成分に結合することができる試薬を含有するドメインを含有する小纖維マットを含む複数の電極ゾーンに接触させる工程と；(b)発光するように小纖維マット上に採取した標識化合物を誘導する工程と；そして(c)放出された発光を測定する工程とを、含む。

本発明はまた、多孔性電極を含有するカセットを包含する。カセットは、多孔性材料により支持される炭素小纖維の多孔性マットから構成される作用電極を含有する。1つまたはそれ以上の結合ドメインは、作用電極の表面上に存在する。

多孔性電極は、炭素（例えば、黒鉛炭素、グラッシャーカーボン、または炭素纖維）を含んでよく、特に好適な実施態様では炭素小纖維を含む。P M A M S の結合ドメインは、小纖維マットにより支持されてよい（セクション5.7を参照）。マットは、複数の別個の結合ドメインを支持し、その任意の2つまたはそれ以上の別個のドメインは、互いに同じであるか、またはすべてが互いに異なる。あるいは小纖維マットは、1つの結合ドメインを支持してもよい。

炭素小纖維は、共有結合でまたは物理的吸着でその表面に結合した化学的官能基を用いて調製される。これらのおよび他の官能基は、小纖維の表面に他の材料を結合させるのに使用できる。例えば、E C L 測定法で使用される抗体は、1つまたはそれ以上の纖維または小纖維マットに結合することができる。

小纖維マットは、誘導体化されていない小纖維、誘導体化された小纖維、または2つまたはそれ以上の異なるタイプの小纖維の混合物を含有する单一の層でもよい。小纖維マットは2つまたはそれ以上の層を有してもよい。1つまたはそれ以上の他の層に接触しているかまたはそのすぐ近傍にある、1つまたはそれ以上の明確な層から構成される小纖維のマットを形成するのに、連続的濾過工程が使用されてよい。例えば、2層の小纖維マットは、誘導体化されていない小纖維の層と生物学的分子で誘導体化された小纖維の層を含有し

10

20

30

40

50

てもよい。ある多層マットにおいて、層の間に重複または混合があつてよい。

小纖維マットに由来するECLシグナルは、マットの組成に依存することがある。例えば、誘導体化されていない小纖維のマットと比較して、誘導体化された小纖維のマットでECLを引き起こすには、異なる電気化学電位が必要である。電気化学電位のこの差は、測定の1つまたはそれ以上の成分に特異的であるかまたはこれに限定される。誘導体化された小纖維から構成されるマットは、バックグランドECLシグナルが観察される電気化学電位を、特定の分子種からのECL（すなわち、測定の必要な測定法の成分からのシグナル）が観察される電気化学電位とは異なる電気化学電位にシフトさせ、こうして、特異的なシグナルとバックグランドシグナルの分離を向上させる。

ある能力を有する小纖維マットを調製するのに、異なるタイプの小纖維を使用してもよい。誘導体化されていない小纖維の層と誘導体化された小纖維の層から構成されるマットでは、誘導体化されていない小纖維の層は、電気的導電体と誘導体化された小纖維の間の電気的接続を提供し、また物理的強度を提供する。誘導体化された小纖維の層は、測定の実施に必要な1つまたはそれ以上の反応物を含有する。別の実施態様において、マットは、他のシグナルの較正のための内部標準として作用する分子で誘導体化された1つまたはそれ以上の小纖維を含有してもよい。マットはまた、ECL不活性な小纖維の層を含有し、この不活性な層は、ECL活性な小纖維の層の物理的支持を提供する。

別の材料、例えば濾過膜のような多孔性材料上に小纖維マットを支持することは有用なことがある。小纖維マットは、その表面を通して小纖維の懸濁物を濾過することにより、膜上に形成することができる。多層マットは、異なるタイプの小纖維を連続的に濾過することにより調製することができる。

非導電性膜上に支持される小纖維マットへの電気的接続は、1つまたはそれ以上の導電性成分（例えば、ワイヤー、金属メッシュまたは金属環）を、小纖維マットの表面に接触させるか、または導電性成分（例えば、金属ピンのアレイ）を小纖維マット中にまたはこれを通して挿入する。

小纖維マットを支持するのに使用される濾過膜は、導電性であつてよい。導電性フィルターの例には、金属被覆ポリマー膜、導電性ポリマー膜、金属メッシュ、カーボンペーパー、カーボンフェルト、多孔性金属フィルム、焼結金属フィルター、金属纖維フィルターおよび/または金属纖維ペーパーがある。

金属被覆ポリマー膜は、これらを、熱蒸着、電子ビーム蒸着、スパッタリング、化学的蒸着またはメッキにより、1つまたはそれ以上の金属で被覆することにより調製できる。好適な実施態様において、ポリマ性濾過膜は、熱蒸着により金で被覆される。

濾過膜が濾過により小纖維を効率的に捕捉しない場合、濾過効率的を改善するための方法が使用される。フィルターの表面および/または内部例に金属を沈積することにより、膜の有効孔径を減少させることができる。濾過膜は、適切なサイズの材料で栓をするかまたは閉塞することができる（すなわち、フィルターエイドを使用することができる）。小纖維とフィルターの間の結合を誘導するように、フィルターを化学的に処理することができる。結合は、共有結合、ファンデルワールス力、水素結合、電荷/電荷相互作用、または疎水性親水性相互作用、または生体特異的結合（タンパク質/リガンド、抗体/抗原など）の方法によりよる。フィルムブイは、他の機構（例えば、懸濁される液体の蒸発による、フィルターの表面への沈積）により捕捉することができる。

小纖維マットを支持するフィルターは、ECLの電極として作用することができる。例には、金、白金、炭素、および/またはインジウム酸化スズ（ITO）のまたはこれで被覆されたフィルターを含む。このような実施態様において、支持体と小纖維の両方とも、観察されたECLシグナルに寄与する。ある実施態様においては、小纖維マットを支持するフィルターは、ECLの電極として作用しない。このような小纖維マットは、小纖維マットの支持と電気的接続性を与える。このようなフィルターは小纖維マットの支持と導電性を提供するが、バックグランドECLシグナルを含む観察されたECLシグナルには寄与しない。

小纖維マットはまた、非多孔性材料上で支持される。小纖維マットは、ECL電極として

10

20

30

40

50

作用することができる材料（例えば、金箔、白金箔、導電性複合体またはITO）上に支持されてよい。小纖維マットは、ECL電極として作用しない材料（例えば、ステンレス、ニッケルまたは非導電性材料）上に支持されてよい。

PMAMSは、小纖維マット上で調製できる。PMAMSを形成するのに必要な試薬は、前記のような微量流体ガイドによりあらかじめ形成された小纖維マットの空間的に別個の領域に送達される。例えば、微量流体ガイドのアレイ（G1、G2、...Gn）は、ストレプトアビジン被覆小纖維からなるマットの空間的に別個の領域に、ビオチン化抗体（A1、A2、...An）を送達するために使用することができる。誘導体化された小纖維は、捕捉される場所で微量流体ガイドにより（例えば、濾過または蒸着により）支持体の空間的に別個の領域に送達される。例えば、微量流体ガイドのアレイ（G1、G2、...Gn）は、金被覆した限外濾過膜の空間的に別個の領域に、抗体（A1、A2、...An）に共有結合した小纖維（F1、F2、...Fn）を送達するために使用することができる。その別の方法において、フィルターがメッシュのワイヤーの間のスペースにより露出される時はいつも、小纖維がフィルター上に沈積するように、小纖維の懸濁物を、濾過膜に接触した物理的マスク（例えば、ワイヤーメッシュ）を通して濾過してもよい。小纖維マットに固定化されたPMAMSを使用して実施できる測定法のタイプには、セクション5.10に記載のものがある。小纖維マットは多孔性であるため、試薬を小纖維マットを通して流し、ある場合には下の支持体を通して流して、測定を実施することができる。小纖維マット中の穴のサイズは小さい（例えば、10~10000nm）ため、マットを通して試薬を流すと試薬は効率的に混合される。これにより、結合領域の表面への物質移動速度が改善されて、免疫測定を実施するのに必要な時間が短縮される。毛管作用により試料をマット内に入れるかまたはマットを通すことにより行われる測定も、同様に反応速度を上昇させるのに有効である。あるいは小纖維マットは試料中に含浸させてよい。小纖維マットはまた、生物学的試料から好ましくない材料を除去するためのフィルターとして作用することができる。

小纖維マット電極は、ECLを使用しない測定法で使用してもよい。これらは、蛍光、化学発光、またはELISA型のフォーマットに基づく測定法のための、固相結合支持体として使用してもよい。これらは、電流測定または電位測定電気化学検出に基づく測定法のための電極および/または固相結合支持体として使用されてよい。

#### 5.19. シグナル対バックグランドを上昇させるための方法

電気化学発光測定法中の電気化学発光分子種に由来する2つまたはそれ以上のシグナルが、電気化学発光が起きる電気化学電位が異なる少なくとも2つのゾーンを有する電極で測定を行うことにより、分離できることも現在発見されている。この方法により、バックランド電気化学発光からシグナルを分離することができ、従って測定法の性能が有意に改善される。

測定法中の電気化学発光分子種に由来する2つまたはそれ以上のシグナルを分離するための別の方法では、電気化学発光分子種の1つの電気化学発光を選択的に調節する試薬を測定中に含める。例えば、分子種の1つからの電気化学発光を消滅させる試薬を加えることができる。

電気化学発光分子種に由来する2つまたはそれ以上のシグナルを分離するための別の方法では、測定法中の1つまたはそれ以上の分子種から電気化学発光を生成するのに不活性な1つのゾーンを含む電極を使用して測定を実施することを含む。

異なる電気化学電位でそれぞれ標識物とバックランドの電気化学発光を誘導する電極で測定を実施することにより、バックランドシグナルを測定の所望のシグナルから区別することができる。同様に、同じ電気化学発光化合物で標識した2つまたはそれ以上の分子種々からのシグナルは、異なる電位で各標識物から電気化学発光を誘導する電極で、互いに区別することができる。これらの改良された方法は、複合電極（好ましくは炭素からなるもの）上で行われ、化学的または物理的処理により修飾して電気化学発光が起きる電気化学電位が変化したものにより、最適の結果が得られる。

本発明は、目的のアナライトの電気化学発光結合測定を実施するための方法であって、（

10

20

30

40

50

a ) 目的のアナライトと電気化学発光が可能な標識化合物とを含有する試料を、電気化学発光測定法の成分に結合することができる試薬を含有する結合ドメインを含有する多数の炭素小纖維（炭素小纖維は、電気化学発光測定法において少なくとも1つの分子種の電気化学発光が起きる電気化学電位を変更するように、化学的または物理的処理により修飾されている）を含む電極に接触させる工程と；（b）電極に電位を適用することにより発光するように、電極で標識化合物を誘導する工程と；そして（c）放出された発光を検出する工程とを、含む方法を包含する。

研究者や臨床家の要求は、測定法の検出限界を下げ、測定法の感度を上げ、かつこれらの測定法の実施速度を上げることである。

これらの要求を満たすために決定的に重要なパラメータは、シグナル対バックグラウンド比の最適化である。ここでは、シグナル対バックグラウンド比（S / B）は、測定したい試料（例えば、アナライト）の成分からのシグナルと、測定したくない試料（例えば、汚染物質）の成分からのシグナルの比であると規定する。S / B 比の最適化では一般に、測定の必要な成分からのシグナルを最大にし、バックグラウンドシグナルを最小にする。

標識分子種からのシグナルを上げるための種々の方法が当該分野で公知である。例えば、米国特許第4,652,333号では、蛍光または熒光原子または蛍光標識物で標識した粒子を、測定を行う前に濃縮することができる。

バックグラウンドシグナルを低下させるための種々の方法が当該分野で公知である。試料の汚染物質、結合しないアナライト、結合しない標識分子種、または他の成分を除去するために、洗浄工程が使用されている。

1つまたはそれ以上のシグナルの検出が最適化されるように、2つまたはそれ以上のシグナルを分離することが有利である。

図58は、1つまたはそれ以上の成分の電気化学発光シグナルの電気化学電位がシフトされる方法を例示する。図58Aでは、試料の2つの成分（AとB）のECLシグナルが、同様の電気化学電位で現れる。従ってこれらは分離が難しい。図58Bは、異なる電気化学電位に現れる2つの成分（A' と B' ）のECLシグナルを示す。成分B' のECLシグナルの電位は、異なる電位にシフトしており、成分A' と B' のECLシグナルは容易に分離される。

図58に例示される電気化学電位の選択的シフトは、電極の近傍の1つまたはそれ以上の標識物からECLが放出される電気化学電位に従って、作用電極の材料を選択することにより行われる。あるいは、試料の1つまたはそれ以上の成分のECLシグナルの電気化学電位が変化するように、材料を化学的または物理的処理により修飾してもよい。

電極の1つの領域が、別の領域とは異なる電気化学電位でECL標識を励起するように、電極は、異なる電気化学的性質を有する2つまたはそれ以上の領域を有してもよい。電極は、層1は、試料からの1つまたはそれ以上のアナライトとECL標識物に結合する結合試薬に誘導体化され、層2は逆に、誘導体化されていない、2層の小纖維でもよい。これはアナライトに結合しないが、バックグラウンドECLシグナルを与える試料の他の成分と相互作用することができる。誘導体化の結果として、層1は層2とは異なる電気化学的性質を有する。層1に結合した標識分子からのECLシグナルは、層2由来のバックグラウンドECLシグナルより高い電気化学電位で現れる。

別の実施態様において、電気化学的性質（例えば、標識物からECLを誘発する電気化学電位および/または試料中の1つまたはそれ以上の成分のECLシグナルの強度）を変化させる化合物を、試料に加えることができる。

図59は、2つまたはそれ以上のシグナルを分離するための別の方法の略図である。試料の1つまたはそれ以上の成分のECLシグナルの強度は、試料の他の成分のECLシグナルの強度に対して低下している。図59では、2つの成分（AとB）は、同様の電気化学電位で現れるECLシグナルを有する。図59Bでは、成分B' のECLシグナルの強度の値は、成分A' のECLシグナルの強度に比較して小さくなっている。

図59に例示するECLシグナルの強度の選択的变化は、試料の1つまたはそれ以上の成分のECLシグナルを消失させる材料を加えることにより行われる。あるいは作用電極は

10

20

30

40

50

、異なる電気化学的性質を有する2つまたはそれ以上の領域を有してもよく、例えば電極は、ECLを引き起こすことができる1つまたはそれ以上の領域(R1)('ECL活性')およびECLを引き起こすことができない1つまたはそれ以上の領域(R2)('ECL不活性')を有してもよい。領域R1に結合した試料の成分(A1)は、適切な電気化学電位の存在下でECLシグナルを与えるが、R2に結合した試料の成分(B2)はECLシグナルを与えない。

'ECL不活性'という用語は、電極または異なる電極の他の領域からのECLシグナルより実質的に小さい、ゼロでないECLシグナルを生成する電極の領域を説明することができる。ある物質は、ある条件下(例えば、緩衝液またはあるECL標識物の存在下)ではECL活性であり、異なる条件下ではECL不活性であることがある。

電極は、ECL活性である小纖維と、ECL不活性である支持体から構成されることができる。この実施態様において、小纖維と電気化学的に接触している試料の成分は、正しい電気化学電位が適用されるとECLシグナルを放出する。これに対して、ECL不活性な支持体と電気化学的に接触しており小纖維とは接触していない試料の成分は、電気化学電位が適用してもECLシグナルを与えない。

電極の光学的不透明性は、試料の1つまたはそれ以上の成分からのECLシグナルの検出を選択的に防止するために使用することができる(セクション5.11と図29を参照)。

電極は、試料の1つまたはそれ以上の成分についてECL活性であり、他の成分についてECL不活性化があることがある。

別の実施態様において、試料の1つまたはそれ以上の成分(An)は、ECL活性な電極と電気化学的に接触しており、試料の1つまたはそれ以上の成分(Bn)は、ECL電極と電気化学的に接触していないくともよく、すなわち電極と充分な近傍にはない。電極に適当な電気化学電位が適用されると、成分AnからECLシグナルが発生し、成分Bnからは発生しない。電極は、アナライトAnの1つまたはそれ以上の結合ドメインを有する多孔性のECL活性層と、多孔性のECL不活性層から構成されてよい。試料をこの電極で濾過すると、あるアナライトAnはECL活性層に結合し、非結合成分はECL不活性化層に捕捉される。電極に電位が適用されると、結合成分AはECL活性層に結合しており他の成分には結合しておらず、これらはECL不活性層中に存在するため、結合成分AについてECLが引き起こされる。本発明をさらに以下の例で説明するが、これらは決して本発明の範囲を限定するものではない。

### 5.20. 音波処理を利用するECL測定法

結合反応が試薬の間で起こる多くの診断システムにおいて、試薬の混合を改善すると、反応の速度を上昇させることができる。遅い混合速度が、しばしば診断試験の完了までの進行速度を最終的に制限する。試薬の間の結合反応が起こる診断測定法の例は、免疫測定法、DNA-プローブ測定法、臨床化学試験、受容体-リガンド結合測定法などを含む。結合速度論の遅い速度は、溶液中の試薬と固体上に存在する試薬の間の結合反応を使用する測定法を行う上で、特に制限的な制約をかけている。音波処理は、溶液中の試薬の混合、および固体の表面またはその付近に位置する試薬への溶液中の試薬の大量輸送を改善する。実験により、測定試薬の音波処理が、固相支持体を使用する結合測定を行うのに必要な時間を劇的に短縮させることを証明されている。音波処理は、約100Hzと10MHzの間の振動数を有する振動を包含するものと定義される。音波処理の振動数(f<sub>s</sub>)は、下記の範囲に細分することができる: 低振動数音波処理(100Hz < f<sub>s</sub> < 5KHz)、超音波処理(5KHz < f<sub>s</sub> < 1MHz)、および極超音波処理(1MHz < f<sub>s</sub> < 10MHz)。振動の振幅は、以下の範囲に細分することができる: 低振幅音波処理(< 1μm)、中振幅音波処理(1~10μm)および高振幅音波処理(> 10μm)。

音波処理により達成される混合の改善により、終点測定と反応速度測定の両方に、容易で有用な適用が可能になる。終点測定では、目的のアナライトの濃度または量は、結合反応が完了に近づいたときにどれだけ多くの結合が起こったかを測定することにより求められる。我々は、結合反応の過程での音波処理が、結合反応が完了に近づくのに必要な時間を

10

20

30

40

50

短縮させることを見いだした。反応速度測定では、目的のアナライトの濃度または量は、結合反応の速度を測定することにより求められる。同様に、結合反応の過程での音波処理が、結合反応の速度を上昇させることが見い出された。結合反応が速いほど、従来可能であったよりもはるかに短い時間で測定可能なシグナルが得られる。本発明は、ある種の反応の速度を非常に加速するため、このような反応を利用する測定法が、わずかおよそ数分で、しばしば3分以内で完了しうる。

固体支持体上の大量輸送制限結合反応の速度は、可溶性試薬の濃度と、固体支持体へのこの試薬の大量輸送の大量輸送係数の両方の関数であろう。従って、反応速度測定の間に適用される音波処理の量、速度、および型は、慎重に制御され、かつ正確に再現可能であることが特に重要である。大量輸送係数の変動は、他の点では同一の試験で反応速度の変動を引き起こしがちであり、結果として不正確または全く役に立たない結果を与える。測定セルおよび／または固相支持体に構造的に結合した音波処理装置の使用により、迅速で、定量的で、高感度で、再現性のある反応速度測定を行うことができる。

作用電極上に位置する捕捉抗体を使用するECLサンドイッチ免疫測定法では、たとえ固体支持体表面への大量輸送を増大させるためにボルテックス混合を使用した場合でさえ、結合反応は完了までに1／2時間以上かかりうることが見い出された。この時間スケールはまた、ELISAやRIAのような他の高感度固相結合測定法にも典型的である。我々は予想外にも、試薬の音波処理が、これらの結合反応の完了に必要な時間をおよそ数分まで短縮することを見いだした。本発明の装置と方法は、免疫測定法に限定されるものではなく、広範な結合相互作用（例えば、核酸ハイブリダイゼーション、抗原-抗体、受容体-リガンド、酵素-基質など）に有用であろう。

音波処理はまた、固相支持体が複数の結合ドメインを有しており、かつ該結合ドメインのそれぞれが固相支持体上の異なる位置に存在するシステムで、有利に使用される。この場合正確かつ再現性ある結果を得るためにには、試料が充分に混合されて、試料の全ての部分が全ての結合ドメインに暴露されることが必要である。大量輸送を効率的にすることにより、音波処理がこのプロセスを可能にする。

また、固相支持体が多数の結合ドメインを有しており、該結合ドメインのいくつかまたは全てが異なるアナライトに特異的であるシステムにも有利に使用される。正確かつ再現性ある結果を得るためにには、試料の全ての部分が支持体上の全ての結合ドメインに暴露されることが必要である（例えば、試料のある部分が、適正に混合されず、そのため試料の該部分に含まれるアナライトに特異的な結合ドメインを有する結合表面の領域に暴露されないならば、偽「陰性」の結果が得られるだろう）。

本発明の装置は、実験セルがECLの励起の間音波処理される時、TAG1とECL共反応物トリプロピルアミン（TPA）を含有する溶液により生成するECLシグナルの3倍を超える上昇を提供する。本発明は、従って、ECL標識とECL共反応物の感度の高いECL検出に適用することができる。

音波処理は、固体の表面への試薬の大量輸送の速度を上昇させるだけでなく、表面からの試薬、生成物、副生物、混入物などの大量輸送の速度も上昇させる。音波処理は、置換反応（例えば、結合試薬に結合した標識アナライトの試料中に存在する未標識アナライトによる置換）の速度を上昇させるために使用することができる。音波処理はまた、固相支持体上の目的としない混入物の脱着の速度を上昇させる（すなわち、特定の測定法において発生する干渉や非特異結合の量を減少させる）ために使用することができる。さらに、音波処理は、保護コーティングなどのような望ましい材料の吸着の速度を上昇させ、そして保護コーティングなどのような消耗したか、さもなければ望ましくない材料の脱着の速度を上昇させうる。音波処理は、表面上についた粒子状混入物、例えば、細胞膜または粒子状試薬を再懸濁するために使用することができる。

音波処理はまた、試料調製工程にも使用することができる。例えば、音波処理は、生物学的組織細胞、微生物、ウイルス粒子などのような物質の成分を反応媒体中に放出させるために、物質を破壊するのに使用することができる。好ましくは、該試料調製は、その場（in situ）で、測定セル、例えばECLセルで行われる。

10

20

30

40

50

さらにまた、音波処理は、2つまたはそれ以上の溶液を均質に混合するのに要する時間、固体を溶液に溶解するのに要する時間、および乾燥した物質に水を加えて元に戻すのに要する時間を短縮するために使用することができる。音波処理はまた、薄い毛管を通る流体流の速度を上昇させるのに有用である。

処理音波は、種々の機械的および電気機械的装置により発生させることができる。このような装置は、偏心取付カムつきの電気モーター、電磁スピーカー、水晶発振器、振り子装置などを含む。本発明に特に適した振動数と振幅で処理音波を発生させるための好ましい装置は、圧電性物質を使用する。圧電性物質は、一般に安価で、普通に入手可能であり、軽量であり、そして広範囲の振動数と振幅にわたり処理音波を誘発することができる。便利なことに、圧電性音波処理装置は、通常サイズが小さく、そのため卓上および携帯可能な装置として特に有用になっている。最も有利なことに、圧電性装置は、非常に少量の電力で操作することができる。本発明の音波処理装置は、10ワット未満の電力消費の圧電性装置により効率的に音波処理され、そして特定の装置は、約0.25ワットを消費する圧電性装置により機能する。好ましい圧電性装置は、ピストン・マス装置である。

さらに測定物質を含有するセルへの処理音波発生器からの音波処理工エネルギーの構造的結合は、顕著に効率的な設計であることが発見された。最も有効な構造的結合は、例えば、セルへの処理音波発生器の直接結合、または処理音波発生器と測定セルの間に固体連続が得られるような処理音波発生器の結合による、ソリッド接点であることが証明された。音波処理工エネルギーを測定セルまたは測定セル内の固相支持体に特異的に伝達することにより、全装置を誘導して音波処理するのに比べてはるかに少ないエネルギーですむ。処理音波発生器を注意深く配置すると、測定セルの内容物のエネルギーの方向を絞ることが可能になり、測定系の他の要素による減衰の作用が減少する。構造的結合は、可逆的である（例えば、処理音波発生器とセルは、何回もつないだり切ったりされるように設計されてもよい）か、または永続する結合を示してもよい。

音波処理工エネルギーの構造的結合が、多くの異なる型の配置により達成することができる事を理解されたい。音波処理工エネルギーの構造的結合は、具体的には（a）処理音波発生器と測定媒体または結合表面の間の固体界面を通しての；または（b）測定媒体または結合表面に処理音波発生器から直接の、音波処理工エネルギーの伝達を包含する。

本発明の装置において音波処理工エネルギーの構造的結合を正確に制御することができることは、本発明の重要な利点である。このような構造的結合機作の制御は、装置の構成要素の製造および同組立の正確な制御を通して容易に実行される。構造的結合機作の各構成要素（例えば、処理音波発生器、振動板など）は剛性材料から構成されてよいため、各構成要素は、正確な許容度まで製造することができる。同様に、構造的結合の機作は、実質的に同一の処理音波伝達性を有する多数の装置の作成を可能にする正確で厳密な組立に適している。

本発明は、免疫測定法、核酸ハイブリダイゼーション測定法、受容体・リガンド結合測定法などのような結合測定システムに一般に適用可能である。結合反応が電極付近で起こる測定法では、電極自体の音波処理が、測定反応速度の上昇に特に有益な作用を有することが明らかになった。

図68は、本発明の実施態様による測定セル68010の詳細な横断面図を例示する。測定セル68010は、基部68011、振動板68013、および処理音波発生器68016からなる。基部68011は、空洞68017と開口68014を画定するような形になっており、そして好ましくは剛性材料である。あるいは、基部68011は、可撓性材料からなる（例えば、基部68011は、可撓性プラスチック容器またはブリストーパックからなる）。光学検出法を使用する測定形式（例えば、ECL、蛍光、化学発光）では、基部68011は、好ましくはアクリルなどのような透明材料であり、これによって空洞68017内に生成する光を基部68011に結合した検出器（示していない）により検出することができる。

振動板68013は、結合試薬のような試薬68015のための固相支持体であり、そして好ましくは材料の薄膜またはシートからなる。詳細には、振動板68013は好ましく

10

20

30

40

50

は小纖維ポリマー複合材料である。記載のように振動板 68013 は、開口 68014 で基部 68011 に結合している。好ましくは、振動板 68013 は、開口 68014 を覆う基部 68011 と共にシールを形成する。

処理音波発生器 68016 は、振動板 68013 を音波処理するための装置である。好ましくは、処理音波発生器 68016 は、圧電性音波処理装置である。発生器 68016 は、好ましくは電気制御回路などのような処理音波発生器制御器（示していない）により制御される。処理音波発生器 68016 は、音波エネルギーを効率よく振動板 68013 および試薬 68012 に伝達するように、振動板に構造的に結合している。

操作において、試薬 68012 は空洞 68017 中に導入される。処理音波発生器 68016 はエネルギーを受けて、振動板 68013 を音波処理する。振動板 68013 は、処理音波エネルギーを空洞 68017 に伝導し、次にそこに含まれる試薬 68012 に伝導する。音波処理が、試薬 68012 の混合を引き起こし、試薬 68012 間の反応の速度を上げる。音波処理はまた、振動板 68013 上の結合試薬 68015 への、および同試薬からの、試薬、生成物、副生物などの大量輸送の速度を上昇させて、そのため、固相支持体での結合反応の速度を上げる。あるいは、結合試薬 68015 を省略してもよい。

別の実施態様では、非固体結合材料（示していない）を発生器 68016 と振動板 68013 の間に置いた。この結合材料は液体でも気体でもよい。結合材料は、可撓性プラスチック膜のような密閉容器内に保持されてもよい。別の実施態様では、結合材料は一体ピストン構造からなってもよい。処理音波発生器 68016 からの音波処理工エネルギーは、一体ピストン構造を介して振動板 68013 に構造的に結合している。さらに別の実施態様では、試薬 68015 が振動板の表面から省略されて、空洞 68017 の表面上に配置される。

器具 690101 を含む使い捨てカートリッジ 69090 において ECL 測定を行うための測定システム 690100 は図 69 に例示される。カートリッジ 69090 は、基部 69091、振動板 69092、対電極 69093、反応エンクロージャー 69094、試料ポート 69095、リード線 69096、および参照電極 69099 を含む。器具 690100 は、カートリッジ容器 690108、光検出器および / またはイメージング装置 690102、電気コネクター 690103、作用電極と対電極の間に電位または電流を適用するための電気エネルギーの供給源 690104；音波処理装置 690105；音波処理装置 690105 を駆動するための電気エネルギーの供給源 690106；および器具の制御、測定データ集積、および測定データ解析用のマイクロプロセッサ 690107 を含む。

振動板 69092 は、結合試薬のような試薬 69097A のための導電性固相支持体であり、かつ作用電極として機能する。好適な実施態様では、振動板 69092 は小纖維 - ポリマー複合電極であり、そして試薬 69097A はそこに固定化された抗体、核酸、受容体などのような結合試薬からなる。特に好適な実施態様では、種々のアラライトに対して特異的な結合試薬は、振動板 69092 上の結合ドメイン中にパターン付けされる。基部 69091 は、好ましくはアクリルなどの剛性で透明な材料であり、これによってエンクロージャ 69094 内で起きる ECL 反応により生成する光を、検出器 69012 により検出することができる。基部 69091 は、反応エンクロージャ 69094 と試料ポート 69095 を画定するような形である。振動板 69092 は、好ましくは基部 69091 に密閉される。

リード線 69096 は、振動板 69092 および対電極 69093 への電気結合を提供する電気接点である。好ましくは、振動板 69092 は、装置 690105 から基部 69091 への音波処理工エネルギーの伝達が最小になるように取り付けられる。あるいは、振動板 69092 は、振動板 69092 が装置 690105 から基部 69091 へ、そしてそこから反応エンクロージャ 69094 の全表面へ音波処理工エネルギーを伝達するように取り付けてよい。

好ましくは、反応エンクロージャ 69094 は、基部 69091 の内表面により部分的に画定される。あるいは、反応エンクロージャ 69094 は、基部 69091 に結合する透

10

20

30

40

50

明材料から作られた分離したエンクロージャからなる。

対電極 69093 は、好ましくは金属のような導電性材料である。参照電極 69099 は、好ましくは Ag / AgCl 参照電極である。電極 69093 と 69099 は基部 69091 内に配置して、リード線 69096 に結合し、そして試薬 69098 との電気接点にあるように適合させる。場合により、参照電極 69098 は省略してもよい。開口 69095 は好ましくは、毛細管のような小さい管（示していない）を介する試料物質（例えば、試薬 69098）の挿入のために適合させる。

器具 690101 の内表面は、カートリッジ 69090 とその構成要素を、容器 690108 とその対応品の構成要素（音波処理装置 690105、電気接続 690103 および検出器 690102 を含む）と受容してかつ配置すべく適合させる。好ましくは、検出器 690102 は、作用電極で ECL 反応中に放出される光をイメージングすることができる検出器のアレイ（例えば、CCD カメラまたは感光性半導体素子アレイ）である。検出器 690102 は、光電子増倍管、感光性半導体素子などのような単一検出器であってもよい。器具 690101 へのカートリッジ 69090 の挿入により、検出器 690102 がエンクロージャ 69094 内に生成する光の多くを検出する位置に来るよう、検出器 690102 を基部 69090 と整列させる。

音波処理装置 690105 は、反応エンクロージャ 69094 に含まれる試薬 69098 に音波処理工エネルギーを伝達する振動板 69092 を音波処理するための装置である。器具 690101 へのカートリッジ 69090 の挿入により、好ましくは装置 690105 を振動板 69092 と接触させるように、装置 690105 を振動板 69092 の中心と整列させる。器具 690101 へのカートリッジ 69090 の挿入の電極 69092 への音波処理装置 690105 の構造的な結合を引き起こす。音波処理装置 690105 は、ピストンを含んでよい圧電性音波処理装置であるのが好ましい。好ましくは音波処理装置 690105 は、カートリッジ 69090 を器具 690101 中に挿入するときに振動板 69092 と接触させることができるように可動性である。

容器 690108 へのカートリッジ 69090 の挿入の際、リード線 69096 を電気接続 690103 に結合する。電気エネルギーの供給源 690104 は、マイクロプロセッサ 690107 による制御に適合した制御可能な電位または電流供給源であってよい。あるいは、カートリッジ 69090 が参照電極を含むならば、電源 690104 は好ましくはポテンシオスタットである。

制御されたエネルギー供給源 69016 は、好ましくは音波処理装置 690105 の操作の制御のための、従来の制御可能な電気回路駆動装置である。電源 690106 の操作は、マイクロプロセッサ 690107 により制御される。マイクロプロセッサ 690107 は、ソフトウェアでプログラムされたマイクロプロセッサ、マイクロコントローラなどのような従来のプロセッサ装置である。マイクロプロセッサ 69017 は、検出器 690102 の操作およびエネルギー供給源 690104 と 690106 の操作を制御し、そして電源 690104 からの電位および / または電流データと共に検出器 690102 からの強度データを受け取る。好ましくは、マイクロプロセッサ 690107 は、さらに測定データを処理して、対応する出力をユーザーおよび / または別の装置に提供することができる。

操作において、試薬 69098 を含む試料は、試料流入ポート 69095 を介して反応エンクロージャ 69094 に導入される。ECL 測定を行うために必要な試薬は、すでに試料に加えられている。該試薬は、ECL 共試薬 (coreagents)（例えば、トリプロピルアミン）、ECL 残基（例えば、Ru(II)(bpy)3 または誘導体（好ましくはアナライトまたはアナライトの結合パートナー、ブロッキング剤（例えば、BSA）、緩衝化剤、賦形剤、添加剤および保存剤に結合している）を含む。好適な実施態様では、カートリッジは、試薬 69097B として示される測定を行うのに必要ないつかまたは全ての試薬と共にあらかじめ保存される。特に好適な実施態様では、試薬 69097B は、反応エンクロージャ 69094 内で乾燥した形態で保存される。

測定を行うために、カートリッジ 69090 は器具 690101 に入れて、音波処理装置

10

20

30

40

50

690105は振動板69092に構造的に結合させ、そして装置690105は電源690106により活性化して振動板69092を音波処理する。次に音波処理工エネルギーを振動板69092を通じて試薬69098に伝達する。振動板69092の取付によつては、音波処理工エネルギーを基部69091に伝達し、そしてこれがこのようなエネルギーを反応エンクロージャ69094に伝導し、こうして試薬69098に伝導するようである。

音波処理は、試薬69098と試薬69097Bの混合を引き起こすことにより、構成要素試薬69098および/または69097Bの間の反応の速度を上げ、そして振動板69092への、および振動板からの試薬69098および/または69097Bの大量輸送の速度を上げる。装置690105からの音波処理工エネルギーは、支持体69092への試薬69098および/または69097Bの大量輸送の速度を顕著に上昇させ、それによって試薬69097Aと、試薬69097Bと69098の構成要素の間の結合反応の速度を上昇させ、そしてECL測定を行うのに必要な時間を短縮させる。電源69014によりコネクター690103とリード線690106を介して、電気エネルギーを振動板69092および電極69093に適用して、反応物69097A、69097Bおよび/または69098中の電気化学発光性残基を発光させる。ECL反応により生成する光は、音波処理装置690105を操作しながら、またはその後に測定する（または像にする）ことができる。

マイクロプロセッサ690107は、電源690104と690106の操作を制御し、電源690104からの電位および/または電流データと共に検出器690102からの強度データを受け取る。マイクロプロセッサ690107は、受け取ったデータを解析し、かつ保存してもよく、そして好ましくはユーザーまたは別の装置（示していない）に供給するために対応する出力を生成する。好ましくは、データ収集の完了時、マイクロプロセッサ690107は、カートリッジ69090を器具690101から取り出すようにユーザーに通知する。マイクロプロセッサ690107からこのような通知を受け取るかあるいは測定データ収集の完了を決定したら、カートリッジ69090を装置690101から取り出して、適切に処置するかまたは再利用する。

別のシステム690100の実施態様では、振動板69092に結合したリード線69096の一部を省略して、電気接続を電源690104と音波処理装置690105の間に加える。従って、対応するコネクター690103の接続も省略することができる。この実施態様では、音波処理装置690105は、振動板69092への電気的補正として機能する。カートリッジ69090を器具690101に挿入すると、電気エネルギーが音波処理装置690105を通して振動板69092を介して試薬69098に供給される。このような電気エネルギーの適用は、音波処理工エネルギーの適用と同時であっても同時でなくてもよい。

別の実施態様では、振動板69092および/またはエンクロージャ69094は試薬などで前もって被覆される。電極69092の音波処理は、このような試薬の解放を引き起こすことにより、試薬をエンクロージャ69094内の試薬69098と混合させる。

さらに別の実施態様では、乾燥試薬69097Bは反応エンクロージャ69094に前もって保存され、液体試薬69098を反応エンクロージャ69094に導入して乾燥試薬69097Bと直接接触させる。音波処理装置690105の活性化により、乾燥試薬69097Bと液体試薬69098は、音波処理工エネルギーが存在しないときに比べて有意に速い速度で混合される。混合した試薬は、例えば、相互におよび/または固相支持体69092上の試薬と反応するか、またはここで別の試薬を加えて、また混合してもよい。異なる実施態様では、試薬69097Bは省略される。

反応エンクロージャ69094の内表面は、測定を妨害する物質で被覆されうる。この妨害物質は、混入物、細胞破碎物、非特異的に結合した試薬、反応副生物などを含む。本発明のさらに別の実施態様では、音波処理装置690105が活性化されて、音波処理工エネルギーがこのような物質を音波処理して解放するか、または表面での大量輸送の速度の上昇を引き起こすことによって、エンクロージャ69094の内表面から妨害物質を除去す

10

20

30

40

50

る。例えば、ECL測定は、ECLの励起のための電極を適正に調製するために結合反応の前および/または後に装置690105の活性化を伴うクリーニングサイクルを使用してもよい。これらのクリーニングサイクルは、反応エンクロージャ69094への、このような妨害物質を解放するのを助けるクリーニング溶液の添加を伴ってもよい。

さらに別の実施態様では、音波処理装置690105と電源690106が器具690101から省略されて、振動板69092がさらに音波処理装置様装置690105を含む。さらに、電源690104は電源690106の機能を組み込んでいる。振動板69092の音波処理装置を活性化するための電源690104からの電力は、コネクター690103とリード線69096を介して伝導される。

連続的または断続的なECL測定では、結合反応の速度は連続的なまたは断続な間隔で測定される。このプロセスの説明は、米国特許第5,527,710号(ナカムリ(Nacamurlli)ら)に見い出される。本発明は、このような測定における結合反応の速度を上昇させるよう作用し、そしてまた正確で再現性ある速度測定を与えるための再現性ある混合を提供する。音波処理も、このような測定中で連続的であるかまたは断続的であってよい。結合反応の速度を求めるための連続的または断続的測定の利点は、単一点ECL測定に比較して感度と精度の上昇を提供することである。

## 6. 例

これらの例において使用した全ての炭素小纖維は、ハイパーイオンカタリシス社(Hyperion Catalysis Incorporated)、ロット番号166-39-1から得られたCC小纖維である。これらの小纖維は、直径約3.5nm~70nmの範囲であり、長さは直径の10倍以上であり、炭素原子の多層の外側領域と別個の内部コア領域を含んでいた。

### 6.1. 微量型押しによるMAB PMAMS表面の作成

厚さ1~2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、角アレイパターンで公知の方法に従って作成する。シルガード(SYLGARD)シリコーンエラストマー184(ポリ(ジメチルシロキサン);ダウコーニング(Dow Corning)から入手できる)と対応するシルガード(SYLGARD)184硬化剤の10:1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(SYLGARD)184を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弾性型押しは、エタノール性溶液(1~10mM)中の親水性OHが末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHに暴露して「墨入れ」を行い、整列した金表面にロボットでピンレジスター接触させ、除去する。に基板を、疎水性CH<sub>3</sub>が末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>(エタノール中1~10mM)の溶液で数秒間(例えば、2~10秒間)洗浄する(クマール(Kumar)ら、前述、およびプライム(Prime)ら、Science 252:1164-7)。得られる表面を次に、窒素流中で静かに乾燥させる。親水性溶液を含有する毛細管アレイを次に、整列した表面にロボットでピンレジスター接触させ毛細管をSH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHドメインで整列させる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的で、アミド結合を介して親水性ドメイン上の反応性OH基に共有結合することができるモノクローナル抗体(MAB)を含有する。

### 6.2. 微量型押しによるMABおよび核酸PMAMS表面の作成

厚さ1~2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、角アレイパターンで公知の方法に従って作成する。シルガード(SYLGARD)シリコーンエラストマー184と対応するシルガード(SYLGARD)184硬化剤の10:1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(SYLGARD)184を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弾性型押しは、エタノール性溶液(1~10mM)中の親水性OHが末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHに暴露して「墨入れ」を行い、整列した金表面にロボットでピンレジスター接触させ、除去する。次に基板を、疎水性CH<sub>3</sub>が末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>(エタノール中1~10mM)の溶液で数秒間(例えば、2~10秒間)洗浄する(クマール(Kumar)ら、前述、およびプライム(Prime)ら、Science 252:1164-7)。得られる表面を次に、窒素流中で静かに乾燥させる。親水性溶液を含有す

10

20

30

40

50

る毛細管アレイを次に、整列した表面にロボットでピンレジスター接触させ毛細管を  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11} - (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ドメインで整列させる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的で、アミド結合を介して親水性ドメイン上の反応性OH基に共有結合することができる抗体または修飾核酸を含有する。

#### 6.3. エッチングによるPMAMS表面の作成

きれいな金表面を、エタノール性溶液(1~10mM)中の親水性OHが末端にあるアルカンチオール、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11} - (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ に暴露させる(プライム(Prime)ら、Science 252: 1164-7)。先が細くとがった器具を線状に並べたものを、並べた金表面とロボットで光学レジスター接触させ、線状アレイを使用して、表面のX方向とY方向にエッチングして、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11} - (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ドメインの二次元の格子アレイを作成する。次に基板を、疎水性 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11} - (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ (エタノール中1~10mM)の溶液で数秒間(例えば、2~10秒間)洗浄する。得られる表面を次に、窒素流中で静かに乾燥させる。親水性溶液を含有する毛細管アレイを次に、整列した表面にロボットでピンレジスター接触させ毛細管を  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11} - (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ドメインで整列させる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的で、親水性ドメイン上の反応性OH基に共有結合することができる抗体または核酸を含有する。

#### 6.4. PMAMS表面上でのサンドイッチ測定法

パターン付けされた多重特異的アレイの一次抗体を表面に結合して含有する実質的に透明の、透明PMAMS表面を前述のように作成する。支持体、電極アッセイ、モノログ(monoalogues)表面の使用が透明であるとして選択される。次にPMAMS表面を、測定すべき目的のアナライトを含有することが疑われる溶液試料に暴露する。次に試料を洗浄して、抗体の結合したアナライトを表面に残す。次にPMAMS表面を、表面に結合したアナライトに特異的な第2ECL標識抗体を含有する溶液に暴露する。次にこの溶液をPMAMS表面から洗浄して、アナライトが存在するドメインに結合したECL標識第2抗体を残す。

汚染作用を避けるために、試料と電極表面との早すぎる接触を防ぐため、取り外し可能なバリアーにより電極アッセイを保護する。次にこのバリアーをはずして、測定緩衝液で濡れた電極アレイを、PMAMS表面と並べて接触させる。電極アレイを、電位波形発生器に接続して、作用電極/対電極対に電位をかける。次に放出される光をCCDで読み、シグナルをマイクロプロセッサーに送り、ここでシグナルを所望の読み出し型に変換する。読み値を、既知量の目的のアナライトの形の対照を用いて得られる読み値と比較して、アナライトの実際の量を計算する。

#### 6.5. 第1および第2PMAMS表面上での測定

パターン付けされた多重特異的アレイの第1抗体を表面に結合して含有する、透明PMAMS表面を前述のように作成する。次にPMAMS表面を、測定すべき目的のアナライトを含有することが疑われる溶液試料に暴露する。次に試料を洗浄して、抗体の結合したアナライトを表面に残す。

ECL標識物で標識した複数の第2抗体のパターン付けされた微小液滴が上にある、疎水性/親水性パターンが交互に存在する、保護カバーの下の第2のPMAMSが提供される。

第1のPMAMSと位置の合っている第2のPMAMSを保護するバリアーを取り外し、微小液滴を、第1抗体の位置に合わせる。第2PMAMSを取り外し、電極アレイを第1のPMAMS表面と整列させて接触させる。電極アレイを、電位波形発生器に接続して、作用電極/対電極対に電位をかける。次に放出される光を光電子増倍管で読み、シグナルをマイクロプロセッサーに送り、ここでシグナルを所望の読み出し型に変換する。

読み値を、既知量の目的のアナライトの形の対照を用いて得られる読み値と比較して、アナライトの実際の量を計算する。

#### 6.6. PMAMS表面での核酸測定

パターン付けされた多重特異的アレイの1本鎖核酸プローブを表面に結合して含有する、

10

20

30

40

50

透明 P M A M S 表面を前述のように作成する。プローブは、目的の核酸アナライトの 5' 領域に相補的である。次に P M A M S 表面を、測定すべき目的のハイブリダイズ可能な核酸アナライトを含有することが疑われる溶液試料に暴露する（試料は、あらかじめ変性させておく、すなわち、目的のアナライトを 1 本鎖にしておく）。次に試料を洗浄して、ハイブリダイズしたアナライトを表面に残す。次に P M A M S 表面を、表面に結合した核酸アナライトの 3' 末端に特異的な第 2 E C L 標識核酸プローブを含有する溶液に暴露する。次にこの溶液を P M A M S 表面から洗浄して、アナライトが存在するドメインに結合した E C L 標識核酸プローブを表面に残す。

第 1 の P M A M S と位置の合っている第 2 の P M A M S を保護するバリアーを取り外し、微小液滴を、第 1 の P M A M S 上の第 1 抗体結合ドメインの位置に合わせる。第 2 P M A M S を取り外し、電極アレイを第 1 の P M A M S 表面と整列させて接触させる。  
10

電極アレイを、電位波形発生器に接続して、作用電極 / 対電極対に電位をかける。次に放出される光を C C D で読み、シグナルをマイクロプロセッサーに送り、ここでシグナルを所望の読み出し型に変換する。

読み値を、既知量の目的のアナライトの形の対照を用いて得られる読み値と比較して、アナライトの実際の量を計算する。

#### 6.7. 光電増幅検出器を用いる P M A M S 表面での競合的測定

目的のアナライトに特異的な、パターン付けされた多重特異的アレイの一次抗体を表面に結合して含有する、透明 P M A M S 表面を前述のように作成する。次に P M A M S 表面を、目的のアナライトを含有することが疑われる試料と、抗体への結合に関して目的のアナライトと競合する既知の E C L 標識分子を含有する試料の混合物である溶液試料に暴露する。試料を洗浄して、抗体の結合したアナライトおよび / または標識した競合的結合物を表面に結合して残す。  
20

汚染作用を避けるために、試料と電極表面との接触を防ぐため、取り外し可能なバリアーにより電極アレイを保護する。次にこのバリアーをはずして、測定緩衝液で濡れた電極アレイを、P M A M S 表面と並べて接触させる。電極アレイを、電位波形発生器に接続して、作用電極 / 対電極対に電位をかける。次に放出される光を光電増幅管で読み、シグナルをマイクロプロセッサーに送り、ここでシグナルを所望の読み出し型に変換する。

読み値を、既知量の目的のアナライトの形の対照を用いて得られる読み値と比較して、アナライトの実際の量を計算する。  
30

#### 6.8. C C D 検出器を用いる P M A M S 表面での競合的測定

パターン付けされた多重特異的アレイの第 1 抗体を表面に結合して含有する、透明 P M A M S 表面を前述のように作成する。次に P M A M S 表面を、測定すべき目的のアナライトを含有することが疑われる溶液試料に暴露する。次に試料を洗浄して、抗体の結合したアナライトを表面に残す。

目的のアナライトと競合する複数の既知の E C L 標識分子のパターン付けされた微小液滴が上にある、疎水性 / 親水性パターンが交互に存在する、保護カバーの下の第 2 の P M A M S が提供される。

第 1 の P M A M S と位置の合っている第 2 の P M A M S を保護するバリアーを取り外し、微小液滴を、第 1 の P M A M S 上の第 1 抗体結合ドメインの位置に合わせる。第 2 P M A M S を取り外し、電極アレイを P M A M S 表面と整列させて接触させる。電極アレイを、電位波形発生器に接続して、作用電極 / 対電極対に電位をかける。次に放出される光を C C D で読み、シグナルをマイクロプロセッサーに送り、ここでシグナルを所望の読み出し型に変換する。  
40

読み値を、既知量の目的のアナライトの形の対照を用いて得られる読み値と比較して、アナライトの実際の量を計算する。

#### 6.9. S H ( C H<sub>2</sub> )<sub>10</sub> - ( O C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> )<sub>6</sub> C H<sub>3</sub> アルカンチオールを用いる微量微小型押しによる M A B P M A M S 表面の作成

厚さ 1 ~ 2 ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、角アレイパターンで公知の方法に従って作成する。シルガード ( S Y L G A R D ) シリコーンエラストマー  
50

184(ポリ(ジメチルシロキサン)；ダウコーニング(Dow Corning)から入手できる)と対応するシルガード(SYLGARD)184硬化剤の10:1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(SYLGARD)184を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、エタノール性溶液(1~10mM)中の親水性OHが末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OHに暴露して「墨入れ」を行い、整列した金表面にロボットでピンレジスター接触させ、除去する。次に基板を、疎水性CH<sub>3</sub>が末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>(エタノール中1~10mM)の溶液で数秒間(例えば、2~10秒間)洗浄する(クマール(Kumar)ら、前述)。次に得られる表面を、窒素流中で静かに乾燥させる。次に親水性溶液を含有する毛細管アレイを、整列した表面にロボットでピンレジスター接触させ毛細管をSH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OHドメインで整列させて、特異的抗体を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的で、親水性ドメイン上の反応性OH基に共有結合することができるモノクローナル抗体(MAB)を含有する。

#### 6.10. SH(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>アルカンチオールを用いる微量微小型押しによるMABと核酸PMAMS表面の作成

厚さ1~2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、角アレイパターンで公知の方法に従って作成する。シルガード(SYLGARD)シリコーンエラストマー184と対応するシルガード(SYLGARD)184硬化剤の10:1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(SYLGARD)184を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、エタノール性溶液(1~10mM)中の親水性OHが末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OHに暴露して「墨入れ」を行い、整列した金表面にロボットでピンレジスター接触させ、除去する。次に基板を、疎水性CH<sub>3</sub>が末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>(エタノール中1~10mM)の溶液で数秒間(例えば、2~10秒間)洗浄する(クマール(Kumar)ら、前述)。次に得られる表面を、窒素流中で静かに乾燥させる。次に親水性溶液を含有する毛細管アレイを、整列した表面にロボットでピンレジスター接触させ毛細管をSH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OHドメインで整列させて、特異的抗体を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的で、アミド結合を介して親水性ドメイン上の反応性OH基に共有結合することができるモノクローナル抗体または修飾核酸を含有する。

#### 6.11. ストレプトアビジン-ビオチンリンカーを用いるPMAMS表面の作成

厚さ1~2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、角アレイパターンで公知の方法に従って作成する。シルガード(SYLGARD)シリコーンエラストマー184と対応するシルガード(SYLGARD)184硬化剤の10:1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(SYLGARD)184を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、メルカプトウンデカノールと1,2-メルカプト(8-ビオチニアミド-3,6-ジオキサオクチル)ドデカンアミドの混合物(ここで、ビオチン化チオールのモル分率は0.1である)に暴露して「墨入れ」を行う(スピンケ(Spinke)ら、1993、Langmuir 9:1821-5およびスピンケ(Spinke)ら、1993、J. Chem. Phys. 99(9):7012-9を参照)。次に基板を、疎水性CH<sub>3</sub>が末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>アルカンチオール(エタノール中1~10mM)の溶液で数秒間(例えば、2~10秒間)洗浄する(クマール(Kumar)ら、前述)。次に得られる表面を、窒素流中で静かに乾燥させる。次に各毛細管中にストレプトアビジンの溶液を含有する毛細管アレイを、整列した表面にロボットでピンレジスター接触させる。毛細管アレイ中の各毛細管を整列させて、ビオチン化ドメインと接触させ、毛細管アレイを除去し、表面を洗浄する。次に複数のビオチン化抗体とビオチン化核酸溶液を含有する第2の毛細管アレイを、整列した表面にロボットでピンレジスター接触させて、各ドメイン上に特異的抗体と核酸を入れる。

#### 6.12. MAB単一表面の作成

ケイ素表面上の金の上の交互にあわさった作用電極/対電極対の電極アレイを、当該分野

10

20

30

40

50

で公知の方法により作成する（例えば、クマール（Kumar）ら、前述、を参照）。この例では、電極アレイと別々の結合ドメインアレイは、支持体の同じ表面に存在する。厚さ1～2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、作用電極のパターンで公知の方法に従って作成する。シリガード（SYL GARD）シリコーンエラストマー-184（ポリ（ジメチルシロキサン）（PDMS）；ダウコーニング（Dow Corning）から入手できる）と対応するシリガード（SYL GARD）184硬化剤の10：1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシリガード（SYL GARD）184を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弾性型押しは、エタノール性溶液（1～10mM）中の親水性OHが末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>- (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHに暴露して「墨入れ」を行い、電極アレイ表面上の整列した作用電極にロボットでピンレジスター接触させ、除去する。次に親水性溶液を含有する毛細管アレイを、電極アレイ表面上のSH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>- (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHドメインを有する毛細管を整列させて、ロボットでピンレジスター接触させて、特異的抗体を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的で、アミド結合を介して親水性ドメイン上の反応性OH基に共有結合することができるモノクローナル抗体を含有する。

#### 6.13. MAB 単一表面で行われる測定

6.12に記載の支持体（前述）を作成する。それぞれが作用電極／対電極の範囲を限定する環としてパターン付けしたフォトレジストマスターから、前述のようにPDMS型押しを作成する。電極アレイ表面を、分析される試料に暴露し、ECL標識第2抗体の混合物で洗浄し、次にトリプロピルアミンを含有する測定緩衝液溶液で洗浄する。次にPDMS型押しを整列させ、レジスター接触させてPDMS型押しの管を整列させ、各電極対の上の測定緩衝液の各容量成分を限定および規定する。電極対に過電位をかけて、表面から単層を放出させて、作用電極をECL標識第2抗体に暴露する。次に透明PDMSから放出される光を光電増幅管で読み、シグナルをマイクロプロセッサーに送り、ここでシグナルを所望の読み出し型に変換する。

読み値を、既知量の目的のアナライトの形の対照を用いて得られる読み値と比較して、アナライトの実際の量を計算する。

#### 6.14. 作用電極および対電極を有する単一表面の作成

ケイ素支持体上の金の上の交互にあわさった電極の間の、結合ドメインを有する交互にあわさった作用および対金電極対の電極アレイを、当該分野で公知の方法により作成する（例えば、クマール（Kumar）ら、前述、を参照）。この例では、電極アレイと別々の結合ドメインアレイは、支持体の同じ表面に存在する。厚さ1～2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、交互にあわさった電極対の間の結合ドメインのパターンで公知の方法に従って作成する。シリガード（SYL GARD）シリコーンエラストマー-184（ポリ（ジメチルシロキサン）（PDMS）；ダウコーニング（Dow Corning）から入手できる）と対応するシリガード（SYL GARD）184硬化剤の10：1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシリガード（SYL GARD）184を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弾性型押しは、エタノール性溶液（1～10mM）中の親水性OHが末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>- (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHに暴露して「墨入れ」を行い、電極アレイ表面上の整列した金結合ドメインにロボットでピンレジスター接触させ、除去する。次に親水性溶液を含有する毛細管アレイを、電極アレイ表面上のSH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>- (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHドメインを有する毛細管を整列させて、ロボットでピンレジスター接触させて、特異的抗体を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的で、アミド結合を介して親水性ドメイン上の反応性OH基に共有結合することができる抗体を含有する。

#### 6.15. 作用電極および対電極を有する単一表面上で行われる測定法

前記6.14に記載の支持体表面を記載した方法（前述）により作成する。作成された表面を、分析される試料に暴露し、ECL標識第2抗体の混合物で洗浄し、次にトリプロピルアミンを含有する測定緩衝液で洗浄する。電極アレイを、電位波形発生器に接続し、作用電極／対電極対に電位をかける。次に放出される光を光電子増倍管で読み、シグナルを

マイクロプロセッサーに送り、ここでシグナルを所望の読み出し型に変換する。読み値を、既知量の目的のアナライトの形の対照を用いて得られる読み値と比較して、アナライトの実際の量を計算する。

#### 6.16. 対電極を有する表面の作成

厚さ1~2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、角アレイパターンで公知の方法に従って作成する。シルガード(SYLGARD)シリコーンエラストマー184と対応するシルガード(SYLGARD)184硬化剤の10:1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(SYLGARD)184を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弾性型押しは、エタノール性溶液(1~10mM)中の親水性OHが末端にあるアルカンチオール、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHに暴露して「墨入れ」を行い、金表面上の整列したパターン付け対電極と角結合ドメインにロボットでピンレジスター接触させ、除去する。パターン付けした金表面は、結合ドメインを限定するアドレスが可能な環対電極から構成される。各単層結合ドメインについて、各金対電極と各金表面の間に間隙すなわち分離スペースが存在する。次に結合試薬溶液を含有する毛細管アレイを、SH(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OHドメインを有する毛細管を示す表面を、ロボットでピンレジスター接触させて、特異的抗体または核酸を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的で、親水性ドメイン上の反応性OH基に共有結合することができる抗体または核酸を含有する。

#### 6.17. 異なる表面に作用電極および対電極を有する単一の表面上で行われる測定

例6.16に記載した支持体表面を分析すべき試料溶液に暴露させる。次に支持体表面を洗浄し、異なる特異性を有する複数のECL標識MABまたはECL標識核酸を含有する溶液に暴露し、次にトリプロピルアミンを含有する測定緩衝液で洗浄する。セクション6.16に記載のように支持体上の別々の結合ドメイン/対電極領域に対応するアレイ中に各作用電極を有する透明なアドレスが可能な作用電極アレイを作成する。2つの支持体を測定緩衝液で濡らし、ロボットでレジスターで整列したコンフォーマル接触を行う。電極アレイを、電位波形発生器に接続して、作用電極/対電極対に電位をかけ、2つの支持体の間に電界を発生させる。次に透明の作用電極から放出される光をCCDで読み、シグナルをマイクロプロセッサーに送り、ここでシグナルを所望の読み出し型に変換する。

読み値を、既知量の目的のアナライトの形の対照を用いて得られる読み値と比較して、アナライトの実際の量を計算する。

#### 6.18. 真空濾過によるCC(分散)小纖維マットの作成

0.1%w/w CC小纖維/脱イオン水を混合して、1mg/ml溶液を有するCC小纖維の水性スラリーを作成した。スラリー中に400ワットの音波ホーンを10分~1時間沈めて、CC小纖維をスラリーに分散させた(大きなミクロンサイズの凝集物は、小さな凝集物または個別の線維に分散される)。分散の程度は、光学顕微鏡で追跡した。

ナイロンの濾過膜(孔径0.47μm、直径25mm)を、直径25mmのガラス濾過器に入れた。分散した小纖維スラリーを、吸引濾過により膜/フィルター装置を通して濾過した(図23A)。スラリーのアリコート(5ml)を20mlの脱イオン水で希釈し、次に膜/フィルター装置で濾過する。約0.25~0.3g/ccの平均的なマットについて、約100μmのマットは6つのアリコートが必要であった。

分散物のすべての水がマットから除去されるまで吸引濾過を続けた(肉眼で判定)。濾過膜から直接マットを(手で)はがした。

オープン中で60度で10~15分間マットを乾燥した。使用のためにマットを切断し、穴をあけたか、または切片にした。

#### 6.19. 蒸発による金属メッシュ支持体上の小纖維マットの作成

0.1%w/w CC小纖維/脱イオン水を混合して、1mg小纖維/ml溶液を有するCC小纖維の水性スラリーを調製した。スラリー中に400ワットの音波ホーンを10分~1時間沈めて、CC小纖維をスラリーに分散させた(大きなミクロンサイズの凝集物は、小さな凝集物または個別の線維に分散される)。分散の程度は、光学顕微鏡で追跡した。

ステンレスメッシュの1cm<sup>2</sup>切片(400カウント)を、直径25mmの紙フィルターに入

10

20

30

40

50

れる。スラリーの5mlのアリコートを、スクローン／フィルター紙組合せ物の表面にピペットでのせた。スラリー中の水を室温と圧力、または加熱オーブン中で蒸発させた。小纖維マットが乾燥したら、アリコートをさらに加えた。濾紙から1つのユニットとして小纖維とスクリーンをはがした。

使用のためにマットを切断し、穴をあけたか、または切片にした。

#### 6.20. NHS-エステル官能基を有する小纖維上のアビジンの固定化

COOHで誘導体化した小纖維（ハイペリオンキャタリスト社（Hyperion Catalysts Inc.）から提供された）を、絶えず攪拌しながらジオキサン水溶液に～10mg/mlで懸濁した。20倍モル過剰のN-ヒドロキシスクシンイミドを加え、溶解させた。次に、20倍モル過剰のエチル-ジアミノ-プロピル-カルボジイミド（EDAC）を加え、混合物を室温で2時間攪拌した。  
10

攪拌後、上清を吸引し、固体を無水ジオキサンで3回、無水メタノールで1回洗浄し、0.45μmのポリスルホン膜で濾過した。濾過物をさらにメタノールで洗浄し、ガラスバイアル中に入れて、重量の減少が観察されなくなるまで真空で引いた。

10.4mgのNHS-エステル小纖維をPBS-1（約70mMリン酸塩、150mMNaCl）（オリゲン（ORIGEN）試薬402-130-01、pH7.8、イゲン社（IGEN, Inc.））で洗浄した。洗浄した小纖維を2.3mlのアビジン溶液に懸濁した（8.3mgアビジン/ml PBS-1）。

フラスコを絶えず回転させて懸濁物を室温で1.5時間置いた。

1.5時間後、懸濁物を4で16時間保存し、次に室温に戻し、PBS-1で洗浄し、PBS-1中で4で懸濁物として保存した。  
20

#### 6.21. 炭素小纖維上のモノクローナル（抗AFP）の固定化

炭素小纖維をNHS-エステルで官能基化して、例6.20に記載のように作成した。

14mgの小纖維-NHS-エステルを500mlのPBS-1緩衝液と混合した。

混合物が粘性のスラリーになるまで、20分間音波処理した。さらに500mlのPBS-1緩衝液を加えた。

80mlのPBS-1中全部で1.6mgの抗AFP（アルファフェトプロテイン）抗体を、上記スラリーに加えた。室温で2.5時間反応させた。

6mlのPBS-1緩衝液を加え、反応混合物を4で5分間遠心分離した。この操作を9回繰り返した。  
30

最後の洗浄後、上清を除去し、小纖維-抗AFP生成物を4で保存した。

#### 6.22. 小纖維マットのサイクリックボルタングラム：小纖維マットと金箔電極との比較

0.5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中の6mM Fe<sup>3+</sup>/<sup>2+</sup>(CN)<sub>6</sub>のサイクリックボルタングラムを測定した。図30Aにおいて、CC（分散した）の未処理の小纖維マットのCVは、10、25および50mV/秒での測定値は0.10mA/cmであった。例6.18に記載のようにマットを作成した。図30Bにおいて、金箔電極について測定したCVは、10、25および50mV/秒で0.05mA/cmであった。すべての電位は、Ag/AgClに対する電位である。

#### 6.23. 小纖維マット電極の電気化学的性質：陽極ピーク電流とマットの厚さの比較

同じ面積（0.20cm<sup>2</sup>）であるが異なる厚さの小纖維マットについて、0.5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中の6mM Fe<sup>3+</sup>/<sup>2+</sup>(CN)<sub>6</sub>のサイクリックボルタングラムを測定した。陽極ピーク電流（図31）は、24μm～425μmの範囲内でマットの厚さの増加とともに増加した。各厚さについての陽極ピーク電流もまた、走査速度の増加とともに増加した（10mV/秒～150mV/秒の範囲）。厚さの関数としての陽極ピーク電流の増加速度もまた、厚さとともに増加した。厚さ24μmの小纖維マットは、金箔電極と同等の挙動を示した。  
40

#### 6.24. 小纖維へのタンパク質の非特異結合

炭素小纖維（CC）へのタンパク質の非特異結合を以下のように測定した：（i）Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>（「TAG1」）標識タンパク質の溶液を、平衡に達するまで既知量の炭素小纖維に暴露した；（ii）標識タンパク質/小纖維溶液を遠心分離し、上清を採取し、  
50

そして(iii)上清中に残存している標識タンパク質の量を電気化学発光(ECL)を用いて測定した。

図32に示す曲線を作成するために、3 μg/mlの誘導体化TAG1に結合した抗CEA抗体(誘導体化TAG1-ECL標識物に結合した癌胎児性抗原に対する抗体)を、0.1Mのリン酸カリウム(pH7)中の連続希釈CC(未処理)小纖維に加えた。20分間ボルテックス混合した後、遠心分離により小纖維を除去した。上清中に残存するタンパク質(非結合)の量を測定するECL測定は、オリゲン(ORIGEN)測定緩衝液で5倍希釈した反応混合物上清のアリコートについてオリゲン(ORIGEN)アナライザで行った。高濃度の炭素小纖維が存在する時に、(小纖維に暴露しなかった反応混合物の物体についてのECLシグナルに対する)ECLシグナルの低下は、誘導体TAG1で標識したタンパク質の結合の増加により得られた。

#### 6.25.洗浄剤/界面活性剤による小纖維へのタンパク質の非特異結合の減少

例6.2.4に記載の方法を使用して、小纖維へのタンパク質結合に及ぼす界面活性剤の影響を調べた。誘導体化TAG1/小纖維混合物に結合した抗CEAにトリトンX-100を加え、溶液を20分間インキュベートし、管を遠心分離し、オリゲン(ORIGEN)測定緩衝液で5倍希釈した上清のアリコートをECLで分析した。結果を下記表と図33に示す。

チューブNo.	[T-X100] ppm	ピーク強度	Prot-TAG1 μg/ml	[GF] ppm
19	1674	1611	2.65	52
18	837	1634	2.65	52
17	418	1697	2.65	52
16	209	1583	2.65	52
15	105	1772	2.65	52
14	52	1463	2.65	52
13	26	627	2.65	52
12	13	23	2.65	52

トリトンX-100対誘導体化したTAG1で標識したタンパク質溶液のECL強度をプロットして得られた曲線を図33に示す。大きい電気化学的シグナルは、上清中の誘導体化-TAG1-標識タンパク質が多いことに対応し、小纖維に結合した誘導体化-TAG1-標識タンパク質が少ないことを示す。10ppm~100ppmまでの濃度のトリトンX-100は、結合の程度を減少させ、100~2000ppmの濃度は、結合の程度をさらに低下させることはなかった。

#### 6.26.小纖維マット電極による溶液中の遊離TAGのECL

例6.18のように作成した小纖維マットを、図34に示す「小纖維セル」固定具の作用電極ホルダー3401の取り付け部3403に取り付けた。ホルダー3401を、電気化学的セル区画3400の底にはめた。3M Ag/AgCl参照電極(サイプラス(Cyprus) #EE008)を、参照セルホール3402を介して電気化学的セル区画に取り付けた。セルに測定緩衝液(イゲン(IGEN) #402-005-01、ロット番号#5298)を充填し、PMTホルダー3404に取り付けた。イージーアンドジー(EG&G)、パークモデル175ユニバーサルプログラマーとイージーアンドジー(EG&G)、モデル175ポテンショスタット/ガルバノスタットを使用して、100mV/秒で電位を0V~+3Vで掃引した。パシフィックインストルメンツ(Pacific INstruments)モデル126光度計により900Vの電位をかけたハママツ(Hamamatsu)R5600U-01により測定した。HEMスナップマスター(HEM Snap-Master)により駆動したCIO-DAS-1601A/Dボードにより、アナログデータをデジタル化した。小纖維セルの水分を切り、瞬間的に1000pMのTAG1(イゲン(IGEN) #402-004-C, ロット#4297)で洗浄し、1000pMのTAG1を充填した。測定緩衝液のように電位を掃引した

10

20

30

40

50

。図35は、測定緩衝液3501と1000pM TAG1 3502についてのECLトレース(24.0±0.2°Cで測定した)を示す。暗補正ECLピーク面積は、測定緩衝液については22.10nAで、1000pM TAG1については46.40nAであった。

#### 6.27. 小纖維マット電極による加えた標識抗体のECL

例6.18に記載の方法で未処理のCC-分散小纖維から0.0035インチの厚さの小纖維マットを作成した。次に乾燥したマットを3mmの円盤にパンチし、支持体の上にのせた。この実験で使用した支持体は、スクリーン印刷した導電性金インクによりパターン付けした0.030インチのポリエステルシートから作成した。この導電性金インクは対電極、参照電極を形成し、作用電極および他の電極の導線を提供した。炭素含有導電性両面テープ(アドヒーシブズリサーチ(Adhesives Research))を使用して、各パターン付け支持体に2つのマット円盤を取り付けた。取り付け後、誘導体化TAG1に結合した脱イオン水中10μg/mlの抗TSH抗体水溶液(Ru-THSモノ1:2 26JUN95、イゲン(IGEN))0.5μl、または脱イオン水中10μg/mlのTAG1誘導体化しない抗TSH捕捉抗体抗体水溶液(THSポリ26JUN95、イゲン(IGEN))円盤にスポットし、乾燥させた。乾燥後、マットをイゲン(IGEN)測定緩衝液に浸した。支持体上の浸したマットを、イゲン(IGEN)オリゲン(ORIGEN)1.5ベースの装置に入れ、0~4500mVまで500mV/秒の走査速度を用いて、ECLを読んだ。図43は、マット4301を含有するTAG1-抗体からと、マット4302を含有するTAG1化していない捕捉抗体からのピークECLシグナルを比較する。

#### 6.28. サンドイッチ測定法のための小纖維マット電極を用いるECL

前述のように抗AFP捕捉抗体をフィルター上に固定化した。抗AFP小纖維を脱イオン水(dI)で洗浄し、1mg/mlの濃度で再懸濁した。例6.18に記載のように真空濾過を使用して4層の小纖維マットを作成した。未処理CC分散小纖維3mgに2mgの抗AFP小纖維を加え、混合物をdI中で総量20mlに希釈した。希釈した混合物を0.45μmナイロンフィルターで濾過した。次にこの最初のマット層の後に、それぞれ5mgの未処理CC分散小纖維で構成される2つのコア層が続く。次にマットのコアに、最初の層と同じ混合フィルター層をのせた。こうして、上部と下部に~40%抗AFP小纖維と、コア内に~100%未処理小纖維のマットが得られた。この混合マットを真空下で空気乾燥し、3mmの円盤にパンチした。次にこれらの円盤を、例6.27に記載のように支持体にのせた。乾燥し支持体にのせた抗AFPマットを、AFPカリブレーターA、C、およびF(イゲン社(IGEN, Inc.))に浸し、実験台で室温で15分間インキュベートした。インキュベーション後、支持した電極をdI流で10秒間洗浄し、次にけばのないワイプでプロットして乾燥した。次に小纖維マットを、誘導体化TAG1イゲン社(IGEN, Inc.)で標識した抗体に血液グルタチオン-S-トランスフェラーゼ抗AFPに浸し、実験台で室温で15分間インキュベートした。インキュベーション後、支持した電極をdI流で洗浄し、ワイプで乾燥した。次に、小纖維マットをイゲン(IGEN)測定緩衝液に浸し、例6.27に記載のように読んだ。

#### 6.29. ポリアクリルアミド表面上のTAG1標識アビジンのECL検出

アクリルアミド、ビス-アクリルアミド、およびN-アクリロイル-N'-ビオチニル-3,6-ジオキサオクタン-1,9-ジアミン(ビオチンはトリ(エチレングリコール)リンカーを介してアクリルアミド残基に結合している)を、公知の方法(過硫酸アンモニアとTEMEDで開始する)を用いて、共有結合したビオチンを含有する架橋ポリアクリルアミドゲルを調製した。この実験で、3つのモノマー種の濃度は、それぞれ2.6M、0.065M、および0.023Mであった(アクリルアミドとビス-アクリルアミドのこれらの濃度により、孔径がほとんどのタンパク質より小さいゲルが得られることが報告されている)。約0.7mmの距離で離して固定した2つのガラスプレートの間にモノマーを含有する溶液の重合により、同じ厚さのスラブゲルが生成した。重合反応終了後、ゲルをPBSに浸して4回交換して、取り込まれていないビオチンを洗い流した。PBS中50μg/mlの濃度のタンパク質を含有する溶液中でゲルを20分間浸すことにより、誘導体化TAG1で標識されたアビジン(ここで、アビジンは、NSBの低い修飾アビジンで

10

20

30

40

50

ある Neutral Avi d i n を意味し、この実験に使用した)が、ゲルの表面に結合した。ゲルを E C L 測定緩衝液(200 mMリン酸ナトリウム、100 mMトリプロピルアミン、0.02% (w/v) ツイーン20、pH 7.2)に浸して4回交換して、過剰の T A G 1 標識アビジンを洗い流した。図39に示すように、ゲル(3900)を、ガラス支持体(3903)にパターン付けした金の作用電極(3901)と対電極(3902)に接触させた。2つの電極の間で500 mV/秒の速度で0.0~3.0 Vまでそして0.0 Vまでもどる電位勾配をつけて、E C L 光シグナルを得て、これをゲルの上に置いた P M T (3904)で測定した(図40)。ビオチン含有アクリルアミド誘導体を含まないで調製したゲルは、E C L シグナルを示さなかった(図41)。ビオチン含有ポリマーについて得られるこのシグナルは、ゲルの表面にほぼ完全に近いタンパク質の単層が存在することを示した。

#### 6.3.0. ポリアクリルアミド表面での E C L サンドイッチ免疫測定

例6.29のように、共有結合したビオチンを含有する架橋ポリアクリルアミドゲルを調製した。ストレプトアビジンをゲルの表面に吸着させて、ビオチン標識分子種を捕捉することができる結合ドメインを形成させる。表面を、トリプロピルアミン、未知濃度のアナライト、アナライトに対するビオチン標識抗体、およびアナライトに対する異なる E C L T A G 1 標識抗体を含有する溶液で処理する。アナライトが存在すると、アナライトと2つの抗体の複合体が形成され、これは次に、ストレプトアビジン表面に捕捉される。表面に存在する第2抗体に結合した E C L 標識物を、例6.29に記載のように測定する。

#### 6.3.1. 電極上に支持されたポリアクリルアミド表面上の多重 E C L サンドイッチ免疫測定

厚さ1~2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、アレイ中に並んだ環状のへこみのパターンが得られるように、公知の方法に従って作成する。シルガード(S Y L G A R D)シリコーンエラストマー184と対応するシルガード(S Y L G A R D)184硬化剤の10:1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(S Y L G A R D)を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弾性型押しは、エタノール中の水酸基末端チオール、HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-OH(1~10 mM)に暴露して、整列した金の基板と接触させ、除去する。次に基板を、チオールHS-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>(エタノール中1~10 mM)の溶液で数秒間洗浄する。次に得られる表面を、エタノールで洗浄し、窒素流中で乾燥させる。ジオキサン中に塩化アクロイルヒトリエチルアミンを含有する溶液で表面を処理すると、ヒドロキシル末端ドメインがアクリル酸基で官能基化される。次にアクリルアミド、ビス-アクリルアミド、N-アクリロイルスクシンイミド、アゾ-ビス-シアノバレリン酸、およびアミノ基を提示する抗体の混合物を含有する毛細管アレイを、整列した表面に接触させ、毛細管をアクリル酸が末端にあるドメインで整列させて、特異的抗体を含有するプレポリマー溶液を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的な抗体を含有する。パターン付けしたプレポリマーの液滴を紫外線に暴露すると、表面上でそれぞれ結合ドメインを示す基板上の架橋ゲルが生成する。トリプロピルアミンとE C L-T A G 1 標識第2抗体を含有する緩衝溶液中の、ゲル表面上の1つまたはそれ以上の結合ドメインで結合することができるアナライトの混合物で基板を処理して、測定を行う。次に金電極(4232)上のポリアクリルアミド液滴(4203)上の結合ドメイン(4200、4201、4202)を、図42A-Bに記載のように、ITO作用電極(4204)に接近させる。各結合ドメインから放出される光をCCDカメラ(4205)で定量し、試料溶液に含有させた内部標準の結合ドメインと比較する。

#### 6.3.2. 電極上に支持されたポリアクリルアミド表面上の多重 E C L 競合免疫測定

厚さ1~2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、アレイ中に並んだ環状のへこみのパターンが得られるように、公知の方法に従って作成する。シルガード(S Y L G A R D)シリコーンエラストマー184と対応するシルガード(S Y L G A R D)184硬化剤の10:1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(S Y L G A R D)を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弾性型押しは

10

20

30

40

50

、エタノール中の水酸基末端チオール、HS - (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub> - (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> - OH (1 ~ 10 mM) に暴露して、整列した金の基板と接触させ、除去する。次に基板を、チオールHS - (CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub> - CH<sub>3</sub> (エタノール中1 ~ 10 mM) の溶液で数秒間洗浄する。次に得られる表面を、エタノールで洗浄し、窒素流中で乾燥させる。ジオキサン中に塩化アクリロイルとトリエチルアミンを含有する溶液で表面を処理すると、ヒドロキシル末端ドメインがアクリル酸基で官能基化される。次にアクリルアミド、ビス・アクリルアミド、N - アクリロイルスクシンイミド、アゾ・ビス・シアノバレリン酸、および抗体の混合物を含有する毛細管アレイを、整列した表面に接触させ、毛細管をアクリル酸が末端にあるドメインで整列させて、特異的抗体を含有するプレポリマー溶液を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的な抗体を含有する。パターン付けしたプレポリマーの液滴を紫外線に暴露すると、表面上でそれぞれ結合ドメインを示す基板上の架橋ゲルが生成する。トリプロピルアミンとアナライトのECL - TAG 1 標識類似体を含有する緩衝溶液中の、ゲル表面上の1つまたはそれ以上の結合ドメインで結合することができるアナライトの混合物で基板を処理して、測定を行う（すなわち、結合ドメインに対して、ECL - TAG 1 で標識したアナライトおよび標識していないアナライトの競合を起こさせる）。次に金電極(4232)上のポリアクリルアミド液滴(4203)上の結合ドメイン(4200、4201、4202)を、図42に記載のように、ITO作用電極(4204)に接近させる。各結合ドメインから放出される光をCCDカメラ(4205)で定量し、試料溶液に含有させた内部標準の結合ドメインと比較する。

#### 6.3.3. 電極上に支持されたポリアクリルアミド表面上のセルの結合に対する多重ECL測定

厚さ1 ~ 2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、アレイ中に並んだ環状のへこみのパターンが得られるように、公知の方法に従って作成する。シルガード(SYLGARD)シリコーンエラストマー184と対応するシルガード(SYLGARD)184硬化剤の10 : 1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード(SYLGARD)を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、エタノール中の水酸基末端チオール、HS - (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub> - (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> - OH (1 ~ 10 mM) に暴露して、整列した金基板と接触させ、除去する。次に基板を、チオールHS - (CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub> - CH<sub>3</sub> (エタノール中1 ~ 10 mM) の溶液で数秒間洗浄する。次に得られる表面を、エタノールで洗浄し、窒素流中で乾燥させる。ジオキサン中に塩化アクリロイルとトリエチルアミンを含有する溶液で表面を処理すると、ヒドロキシル末端ドメインがアクリル酸基で官能基化される。次にアクリルアミド、ビス・アクリルアミド、N - アクリロイルスクシンイミド、アゾ・ビス・シアノバレリン酸、および細胞表面に対する抗体の混合物を含有する毛細管アレイを、整列した表面に接触させ、毛細管をアクリル酸が末端にあるドメインで整列させて、プレポリマー溶液を各ドメインに入れる。パターン付けしたプレポリマーの液滴を紫外線に暴露すると、表面上でそれぞれ結合ドメインを示す基板上の架橋ゲルが生成する。結合ドメインをまず細胞の懸濁物で処理して、次にトリプロピルアミンとECL - TAG 1 標識第2抗体および/またはアナライトに特異的な他の結合試薬を含有する緩衝溶液中の、ゲル表面に結合した1つまたはそれ以上のセルに結合することができる結合試薬の混合物で基板を処理して、測定を行う。次に金電極(4232)上のポリアクリルアミド液滴(4203)上の結合ドメイン(4200、4201、4202)を、図42に記載のように、ITO作用電極(4204)に接近させる。各結合ドメインから放出される光をCCDカメラ(4205)で定量し、試料溶液に含有させた内部標準の結合ドメインと比較する。

#### 6.3.4. 電極上に支持されたポリアクリルアミド表面上のセルへのアナライトの結合の多重ECL測定

厚さ1 ~ 2ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、アレイ中に並んだ環状のへこみのパターンが得られるように、公知の方法に従って作成する。シルガード(SYLGARD)シリコーンエラストマー184と対応するシルガード(SYLGARD)184硬化剤の10 : 1混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード

10

20

30

40

50

ド ( S Y L G A R D ) を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、エタノール中の水酸基末端チオール、HS - ( CH<sub>2</sub> )<sub>11</sub> - ( OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )<sub>6</sub> - OH ( 1 ~ 10 mM ) に暴露して、整列した金の基板と接触させ、除去する。次に基板を、チオール HS - ( CH<sub>2</sub> )<sub>10</sub> - CH<sub>3</sub> ( エタノール中 1 ~ 10 mM ) の溶液で数秒間洗浄する。次に得られる表面を、エタノールで洗浄し、窒素流中で乾燥させる。ジオキサン中に塩化アクリロイルとトリエチルアミンを含有する溶液で表面を処理すると、ヒドロキシル末端ドメインがアクリル酸基で官能基化される。次にアクリルアミド、ビス - アクリルアミド、N - アクリロイルスクシンイミド、アゾ - ビス - シアノバレリン酸、および細胞の混合物を含有する毛細管アレイを、整列した表面に接触させ、毛細管をアクリル酸が末端にあるドメインで整列させて、各細胞型を含有するプレポリマー溶液を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、異なるアナライトに結合する異なる表面構造を有する細胞を含有する。パターン付けしたプレポリマーの液滴を紫外線に暴露すると、表面上でそれぞれ結合ドメインを示す基板上の架橋ゲルが生成する。トリプロピルアミンと E C L - T A G 標識抗体および / またはアナライトに特異的な他の結合試薬を含有する緩衝溶液中の、ゲル表面上の 1 つまたはそれ以上の結合ドメインで結合することができるアナライトの混合物を含有する試料でゲルを処理して、測定を行う。次に金電極 ( 4 2 3 2 ) 上のポリアクリルアミド液滴 ( 4 2 0 3 ) 上の結合ドメイン ( 4 2 0 0, 4 2 0 1, 4 2 0 2 ) を、図 4 2 に記載のように、I T O 作用電極 ( 4 2 0 4 ) に接近させる。各結合ドメインから放出される光を C C D カメラ ( 4 2 0 5 ) で定量し、試料溶液に含有させた内部標準の結合ドメインと比較する。

#### 6.3.5. 電極上に支持されたポリアクリルアミド表面上の多重 E C L 競合ハイブリダイゼーション測定

厚さ 1 ~ 2 ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、アレイ中に並んだ環状のへこみのパターンが得られるように、公知の方法に従って作成する。シルガード ( S Y L G A R D ) シリコーンエラストマー 184 と対応するシルガード ( S Y L G A R D ) 184 硬化剤の 10 : 1 混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシルガード ( S Y L G A R D ) を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、エタノール中の水酸基末端チオール、HS - ( CH<sub>2</sub> )<sub>11</sub> - ( OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )<sub>6</sub> - OH ( 1 ~ 10 mM ) に暴露して、整列した金の基板と接触させ、除去する。次に基板を、チオール HS - ( CH<sub>2</sub> )<sub>10</sub> - CH<sub>3</sub> ( エタノール中 1 ~ 10 mM ) の溶液で数秒間洗浄する。次に得られる表面を、エタノールで洗浄し、窒素流中で乾燥させる。ジオキサン中に塩化アクリロイルとトリエチルアミンを含有する溶液で表面を処理すると、ヒドロキシル末端ドメインがアクリル酸基で官能基化される。次にアクリルアミド、ビス - アクリルアミド、N - アクリロイルスクシンイミド、アゾ - ビス - シアノバレリン酸、およびアミノ酸で官能基化した核酸プローブの混合物を含有する毛細管アレイを、整列した表面に接触させ、毛細管をアクリル酸が末端にあるドメインで整列させて、特異的プローブを含有するプレポリマー溶液を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的の核酸配列に特異的なプローブを含有する。パターン付けしたプレポリマーの液滴を紫外線に暴露すると、表面上でそれぞれ結合ドメインを示す基板上の架橋ゲルが生成する。トリプロピルアミンと表面への結合について目的のアナライトと競合することができる E C L - T A G 1 標識配列を含有する緩衝溶液中の、ゲル表面上の 1 つまたはそれ以上の結合ドメインで結合することができる配列を含有する試料混合物で基板を処理して、測定を行う。次に金電極 ( 4 2 3 2 ) 上のポリアクリルアミド液滴 ( 4 2 0 3 ) 上の結合ドメイン ( 4 2 0 0, 4 2 0 1, 4 2 0 2 ) を、図 4 2 に記載のように、I T O 作用電極 ( 4 2 0 4 ) に接近させる。各結合ドメインから放出される光を C C D カメラ ( 4 2 0 5 ) で定量し、試料溶液に含有させた内部標準の結合ドメインと比較する。

#### 6.3.6. 電極上に支持されたポリアクリルアミド表面上の多重 E C L ハイブリダイゼーションサンドイッチ測定

厚さ 1 ~ 2 ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、アレイ中に並んだ環状のへこみのパターンが得られるように、公知の方法に従って作成する。シルガード (

10

20

30

40

50

S Y L G A R D ) シリコーンエラストマー 184 と対応するシリガード ( S Y L G A R D ) 184 硬化剤の 10 : 1 混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシリガード ( S Y L G A R D ) を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、エタノール中の水酸基末端チオール、HS - ( CH<sub>2</sub> )<sub>11</sub> - ( OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )<sub>6</sub> - OH ( 1 ~ 10 mM ) に暴露して、整列した金の基板と接触させ、除去する。次に基板を、チオール HS - ( CH<sub>2</sub> )<sub>10</sub> - CH<sub>3</sub> ( エタノール中 1 ~ 10 mM ) の溶液で数秒間洗浄する。次に得られる表面を、エタノールで洗浄し、窒素流中で乾燥させる。ジオキサン中に塩化アクリロイルとトリエチルアミンを含有する溶液で表面を処理すると、ヒドロキシル末端ドメインがアクリル酸基で官能基化される。次にアクリルアミド、ビス - アクリルアミド、N - アクリロイルスクシンイミド、アゾ - ビス - シアノバレリン酸、およびアミノ基で官能基化した核酸プローブの混合物を含有する毛細管アレイを、整列した表面に接触させ、毛細管をアクリル酸が末端にあるドメインで整列させて、特異的プローブを含有するプレポリマー溶液を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的の核酸配列に特異的なプローブを含有する。パターン付けしたプレポリマーの液滴を紫外線に暴露すると、表面上でそれぞれ結合ドメインを示す基板上の架橋ゲルが生成する。トリプロピルアミンと表面結合プローブに相補的でない配列でアナライトに結合することができる E C L - T A G 1 標識配列を含有する緩衝溶液中の、ゲル表面上の 1 つまたはそれ以上の結合ドメインで結合することができる配列を含有する試料混合物で基板を処理して、測定を行う。次に金電極 ( 4232 ) 上のポリアクリルアミド液滴 ( 4203 ) 上の結合ドメイン ( 4200, 4201, 4202 ) を、図 42 に記載のように、ITO 作用電極 ( 4204 ) に接近させる。各結合ドメインから放出される光を CCD カメラ ( 4205 ) で定量し、試料溶液に含有させた内部標準の結合ドメインと比較する。

#### 6.3.7. 電極上に支持されたポリアクリルアミド表面上の異なる型の多重測定

厚さ 1 ~ 2 ミクロンの感光および現像したフォトレジストマスターを、アレイ中に並んだ環状のヘコミのパターンが得られるように、公知の方法に従って作成する。シリガード ( S Y L G A R D ) シリコーンエラストマー 184 と対応するシリガード ( S Y L G A R D ) 184 硬化剤の 10 : 1 混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシリガード ( S Y L G A R D ) を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、エタノール中の水酸基末端チオール、HS - ( CH<sub>2</sub> )<sub>11</sub> - ( OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )<sub>6</sub> - OH ( 1 ~ 10 mM ) に暴露して、整列した金の基板と接触させ、除去する。次に基板を、チオール HS - ( CH<sub>2</sub> )<sub>10</sub> - CH<sub>3</sub> ( エタノール中 1 ~ 10 mM ) の溶液で数秒間洗浄する。次に得られる表面を、エタノールで洗浄し、窒素流中で乾燥させる。ジオキサン中に塩化アクリロイルとトリエチルアミンを含有する溶液で表面を処理すると、ヒドロキシル末端ドメインがアクリル酸基で官能基化される。次にアクリルアミド、ビス - アクリルアミド、N - アクリロイルスクシンイミド、アゾ - ビス - シアノバレリン酸、および例 6.31 ~ 6.36 に記載の任意の結合試薬の混合物を含有する毛細管アレイを、整列した表面に接触させ、毛細管をアクリル酸が末端にあるドメインで整列させて、特異的プローブを含有するプレポリマー溶液を各ドメインに入れる。毛細管アレイ中の各毛細管は、目的のアナライトに特異的な結合ドメインを含有する。パターン付けしたプレポリマーの液滴を紫外線に暴露すると、表面上でそれぞれ結合ドメインを示す基板上の架橋ゲルが生成する。トリプロピルアミンと結合ドメインへの結合についてアナライトと競合するアナライトの E C L - T A G 1 標識類似体および / または目的のアナライトに対する E C L - T A G 1 標識第 2 結合試薬を含有する緩衝溶液中の、ゲル表面上の 1 つまたはそれ以上の結合ドメインで結合することができるアナライトを含有する試料混合物で基板を処理して、測定を行う。次に金電極 ( 4232 ) 上のポリアクリルアミド液滴 ( 4203 ) 上の結合ドメイン ( 4200, 4201, 4202 ) を、図 42 に記載のように、ITO 作用電極 ( 4204 ) に接近させる。各結合ドメインから放出される光を CCD カメラ ( 4205 ) で定量し、試料溶液に含有させた内部標準の結合ドメインと比較する。

#### 6.3.8. 高度に可逆性の E C L

多結晶性金電極 ( バイオ - アナリティカルサービス ( Bio-Analytical Services ) )

10

20

30

40

50

ら購入、 $2\text{ mm}^2$  )を、 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ と $0.03\text{ }\mu\text{m}$ のアルミナスラリーで連続して手で磨き、次に $1:3\text{ H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ で化学的エッティングし、そして $\text{Ag/AgCl}$ に対して $-0.2\text{ V} \sim 1.7\text{ V}$ の間で希硫酸中で電気化学的サイクリングできれいにした。次にきれいな電極を、エタノールに溶解したオクチルチオール( $\text{C}_8\text{SH}$ )の希薄溶液に一晩浸した。 $\text{C}_8\text{SH}$ 修飾電極を、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS、 $0.15\text{ M NaCl/0.1 M NaPi}$ 、 $\text{pH 7.2}$ )に溶解した $20\text{ }\mu\text{l}$ のTAG1標識ウシ血清アルブミン(BSA)で覆い、10分間インキュベーション後表面を同じ緩衝液で充分洗浄した。

ECLは、 $\text{Ag/AgCl}$ 参照電極、白金線対電極およびイージーアンドジー(EG&G)ボテンシオスタットを有する3電極セル中で行った。光の強度は、底に置いたパシフィックインストルメンツ(Pacific INstruments)光度計とハママツ(Hamamatsu)光電子増倍管で測定した。タンパク質を吸着した電極を、 $0.1\text{ M TPA}$ と $0.2\text{ M}$ リン酸塩( $\text{pH 7.2}$ )の溶液に浸した。電極電位を図44Aに示すように、 $0.0\text{ V}$ と $1.2\text{ V}$ の間にサイクルをさせると、高度に可逆性のECL応答(前進および後退走査と実質的に同じ強度)が観察され、ECLプロセスの可逆性と電極上でのチオールとタンパク質層の安定性を示していた。

PMTや光度計を使用せずに、ECLの場合と同じ装置を使用してサイクリックボルタン実験を行った。実験では、 $\text{C}_8\text{SH}$ で覆った電極(タンパク質なし)を $1\text{ mM}$ フェリシアン化カリウムの溶液(PBS中)に入れ、電極を $+0.5\text{ V} \sim 1.2\text{ V}$ そして逆に走査し、 $+0.5\text{ V} \sim -0.3\text{ V}$ でもう一度走査した。 $+0.5\text{ V} \sim -0.3\text{ V}$ の間のボルタングラムでは容量性電流のみでフェリシアン化物中のチオール/Auのサイクリックボルタングラムは、多量のファラデー電流を示し、 $1.5\text{ V}$ でのチオール単層の少なくとも部分的な脱着を示した(図44B)。

#### 6.39. 擬可逆性ECL

電極修飾とタンパク質吸着を、前述のように行なった。ECL実験では、電位を $0.0\text{ V}$ と $1.5\text{ V}$ の間で走査し、対応する光の強度を記録した。図45Aに示すように、同じサイクルの前進と後退走査の間では、異なるサイクルの間と同様に、ECLの喪失があった。 $1.5\text{ V}$ で酸化した後のフェリシアン化物中のチオール/Auのサイクリックボルタングラムは、多量のファラデー電流を示し、 $1.5\text{ V}$ でのチオール単層の少なくとも部分的な脱着を示した(図45B)。

#### 6.40. 可逆性ECL

これらの実験では、電極修飾とタンパク質吸着を例6.38に記載のように行なった。ECLを測定するために、電極電位を $2.0\text{ V}$ までそして逆方向に $0.0\text{ V}$ まで走査した。前進走査で強い光が観察された(例6.38の可逆性条件下で観察されたものより強い光)が、図46Aに示すように逆走査でバックグラウンドまで低下した。 $2.0\text{ V}$ で酸化した後のフェリシアン化物中の修飾電極のサイクリックボルタングラムは、チオール単層のほとんどが脱着していることを示した(図46B)。

#### 6.41. パターン付け金電極上に固定化された第1抗体を用いるECLサンドイッチ免疫測定

この例では、前立腺特異抗原(PSA)に対する抗体が、PSAの免疫測定法で使用するためのパターン付け金電極上に固定化される。

厚さ $1 \sim 2\text{ }\mu\text{m}$ の感光および現像したフォトレジストマスターを、 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 平方の斑点(ここでフォトレジストが除去される)を有するケイ素支持体上のフォトレジストの層が得られるように、公知の方法に従って作成する。シリガード(SYLGARD)シリコーンエラストマー184と対応する硬化剤の $10:1$ 混合物をマスターの上に注ぎ、硬化させる。重合したシリガード(SYLGARD)を注意深くシリコンマスターから除去する。得られる弹性型押しは、エタノール中の水酸基末端チオール、 $\text{HS-}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6-\text{OH}$ およびニトリロ三酢酸(NTA)末端-チオール $\text{HS-}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{O}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ を含有する溶液に暴露して、「墨入れ」を行う。「墨入れ」を行った型押しは、金の基板と接触させ、除去して $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ SAMを形成させる。基板を、エタノール中にヒドロキシルを末端に有するチオールのみを含有する溶液で数秒間洗浄して、型押し構造以外の領

10

20

30

40

50

域へのタンパク質の非特異結合を防止する。次に得られる表面を、エタノールで洗浄し、窒素流中で乾燥させる。NiCl<sub>2</sub>の溶液で表面を処理し、次に抗PSAマウスモノクローナル抗体とペプチド(His)<sub>6</sub>の結合部位を提示する融合蛋白を含有する溶液で処理すると、調節された方法で表面に融合蛋白が固定化される。この方法は、表面上の固定化されたタンパク質の再現性のあるあらかじめ決められた量を与える。表面上のタンパク質の配置は、融合蛋白の一次構造中の(His)<sub>6</sub>配列の位置により調節される。固定化されたタンパク質の絶対量は、型押しされたSAM中のNEA末端チオールとヒドロキシリ端チオールの比、および型押しされた構造の表面積により調節される。PSAの較正曲線は、血清中に既知量のPSAを含有する溶液を調製することにより測定される(1fM~1μMの範囲の濃度)。前述のように作成される多くの表面をPSA較正標準物質で処理し、次に最適濃度でPSAに対する第2抗体(TAG1の誘導体で標識されている)を含有する溶液で処理される。0.1MTPAと0.2Mリン酸塩(pH7.2)を含有する溶液に表面を浸して、金表面の電位を0.5V/秒の速度で0.0~2.0Vの間でサイクルした時放出される光のピーク強度を測定することにより、較正曲線が測定される。試料の血清中のPSAの未知濃度の測定は、PSAの濃度は、較正曲線に対する参照によりピークECLシグナルから計算される以外は、同じ方法により行われる。

#### 6.4.2. ストレプトアビジンで被覆したエロシル-200(Aerosil-200)シリカ粒子の調製

12nmの粒度と175~220m<sup>2</sup>/gの反応性表面積を有するヒュームドシリカであるエロシル-200(デグッサ社(Degussa Corporation)、アクロン、オハイオ州、米国)は、NHSエステル基を導入するために化学修飾した。この修飾は3工程を含む:i)3-アミノプロピルトリメトキシシランとの反応により粒子の表面にアミノ基を導入した。エロシル-200(155.5mg)は、5mlのトルエン中で3-アミノプロピルトリメトキシシラン(513mg)と合わせて、1時間還流した。シリカ粒子は4mlのトルエンで2回、4mlのメタノールで3回および4mlのジクロロメタンで3回洗浄した。各洗浄は、懸濁液の遠心分離と、これに続く新鮮溶媒へのペレットの再懸濁からなっていた；ii)アミノ基を無水コハク酸と反応させて、カルボン酸基を表面に導入した。55.2mgの洗浄した粒子を3mlの無水DMFに再懸濁した。無水コハク酸(102mg)とトリエチルアミン(0.025ml)を加えて、懸濁液を16時間攪拌した。さらに無水コハク酸(50mg)を加えて、反応をさらに3時間進行させた。粒子をDMFで2回、メタノールで1回、およびジクロロメタンで2回洗浄して、過剰の試薬を除去した；そしてiii)表面上のカルボン酸基を、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)およびエチル-3-ジアミノプロピルカルボジイミド(EDC)との反応により、NHSエステルとして活性化した。粒子(25.1mg)を3mlの塩化メチレンに再懸濁した。NHS(64mg)とEDC(110mg)を加えて、次にこの懸濁液を3時間攪拌した。次に粒子をジクロロメタンで3回洗浄して、真空下で乾燥した。

活性化シリカ粒子を、ストレプトアビジンと、活性化粒子の表面上のNHSエステルとの反応により、このタンパク質で被覆した。リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)(pH7.85)中に0.750mgのストレプトアビジンを含有する溶液に、粒子(~1.5mg)を加えた。反応を16時間進行させた。次に粒子をPBSと水で洗浄して、PBSに再懸濁して、0.1mg/mlの濃度で粒子を含有するストック懸濁液を得た。

#### 6.4.3. 粒子ベースのECL測定法に使用するためのステンレス製濾紙の支持体上の小纖維マットの形成

プローブソニケーター(ブランソン・ウルトラソニック社(Branson Ultrasonic Corp.)、ダンベリー、コネチカット州、米国)を用いて、CC小纖維の懸濁液(0.2%トリトンX-100水溶液中0.1mg/ml)を15分間超音波処理して、小纖維インクを形成した。穏やかに吸引して懸濁液をステンレス製濾紙の円盤(GA-4、バエカルトファイバーテクノロジーズ(Baekart Fibre Technologies))上の直径1/8"の円形領域上に濾過した。この方法により形成されるマットの厚さは、約1μm/mlの加えた小纖維インクであった。

10

20

30

40

50

#### 6.4.4. 小纖維マット上に捕捉されたストレプトアビジンで被覆したビーズを使用する A F P の粒子ベースの E C L 測定法

A F P 測定は以下の工程を使用して行った： i ) 懸濁液中のビーズの表面でのサンドイッチ免疫複合体の形成； ii ) ステンレス製濾紙上に支持した小纖維マットへのビーズの濾過；および iii ) 酸化電位に対して小纖維電極を走査することによる、免疫複合体中の T A G 1 標識抗体からの E C L の検出。本測定は、A F P 測定キット（ベーリンガー - マンハイム（Boehringer-Mannheim））を使用して行った。この測定キットは、エレクシス・システム（E lecsys System）（ベーリンガー - マンハイム）（磁界の適用により白金電極上に磁性ビーズを捕捉するシステム）を使用する E C L に基づく測定法のために設計されている。測定キットは、以下のストック溶液を含有した：ストレプトアビジンで被覆した磁性ビーズ（M - 280、ダイナル社（Dynal Inc.））を含有する懸濁液、ビオチン標識捕捉抗体（R - 1）、T A G 1 標識二次抗体（R - 2）、および血清を模倣するように設計したマトリックスに溶解したA F P を含有する一連の較正物質。

本測定法用の検量線を求めるために、ストレプトアビジンで被覆したビーズのストック懸濁液（～0.012mgのビーズを含有する0.017ml）をプラスチック管中でR - 1（0.017ml）、R - 2（0.017ml）、およびA F P 較正物質（0.010ml）を含有するストック溶液と合わせた。この管をボルテックス混合し、次に室温で30分間穏やかに振盪した。次に穏やかに吸引して、例6.4.3に記載したように形成した小纖維マット（マット厚さ=0.030mm）上に懸濁液を濾過した。マットをE C L 測定緩衝液（イゲン社（IGEN, Inc.））で洗浄した。次に例6.2.6に記載したようにE C L を測定した。各較正物質は三重測定で測定した。図4.8は、A F P の濃度の関数としての、バックグラウンド補正したE C L シグナルを示す。

#### 6.4.5. 小纖維マット上に捕捉されたストレプトアビジンで被覆したシリカビーズを使用する A F P の粒子ベースの E C L 測定法

ストレプトアビジンで被覆したシリカ粒子（エロシル - 200、例6.4.2に記載したように調製）を、A F P 測定キットと共に供給される磁性ビーズの代わりに使用した他は、例6.4.4に記載したようにA F P 測定を行った。本測定法用の検量線を求めるために、ストレプトアビジンで被覆したエロシル - 200のストック懸濁液（0.001mgの粒子を含有する0.010ml）をプラスチック管中でR - 1（0.017ml）、R - 2（0.017ml）、およびA F P 較正物質（0.010ml）を含有するストック溶液と合わせた。この管をボルテックス混合し、次に室温で30分間穏やかに振盪した。次に穏やかに吸引して例6.4.3に記載したように形成した小纖維マット（マット厚さ=40mm）上に懸濁液を濾過した。マットをE C L 測定緩衝液（イゲン社（IGEN, Inc.））で洗浄した。次に例6.2.6に記載したようにE C L を測定した。各較正物質は三重測定で測定した。図4.9は、A F P の濃度の関数としてバックグラウンド補正したE C L シグナルを示す。

#### 6.4.6. 小纖維マット電極上に捕捉された蛍光染料標識ラテックスビーズから放出される E C L

この例では、ビーズに取り込まれた蛍光染料が、ビーズベースのE C L 測定法における内部標準として使用できることを示す実験を記載する。3つの型の蛍光ビーズをポリサイエンシーズ社（Polysciences Inc.）から購入した。ビーズは、取り込まれた染料の励起および発光波長が異なっていた： i ) カタログ # 17685（ $l_{ex} = 273\text{nm}$ 、 $l_{em} = 340\text{nm}$ ）。 ii ) カタログ # 19392（ $l_{ex} = 530\text{nm}$ 、 $l_{em} = 590\text{nm}$ ）。 iii ) カタログ # 17797（ $l_{ex} = 641\text{nm}$ 、 $l_{em} = 740\text{nm}$ ）。小纖維マットは、例6.4.3に記載したように調製した。蛍光ビーズ（0.010mg）は、穏やかに吸引してマットに濾過した。マットをE C L 測定緩衝液（イゲン社（IGEN, Inc.））で洗浄して、例6.2.6に記載したようにE C L を測定した。各ビーズは三重測定で試験した。3つ全てのビーズがこれらの条件下でE C L を放出した。ポリサイエンス（Polyscience）カタログ # 17685、19392、および17797ビーズについて測定した平均積分E C L シグナルは、それぞれ0.7nA·s、6.0nA·s、および2.3nA·sであった。

10

20

30

40

50

#### 6.47. 金電極上に捕捉抗体を固定化するためのビオチン - ストレプトアビジン捕捉を使用する A F P の E C L サンドイッチ免疫測定法

この例では、免疫測定法に使用するために、アルファ - フェトプロテイン ( A F P ) に対する抗体を金電極上に固定化する。

スライドガラス ( 1 cm × 1 cm × 0 . 0 6 cm ) の一方の面を熱蒸着により金薄膜で被覆した。接着層として 3 nm の Ti および次に 1 0 0 nm の Au ( 9 9 . 9 9 % ) の蒸着により金フィルムが形成された。 1 mM の濃度でメルカブトウンデカン酸を含有するエタノール溶液中で約 1 0 時間にわたってスライドをインキュベートして、金フィルム上に自己集合単層 ( S A M ) が形成された。 S A M の表面に提示されるカルボン酸基は、それぞれ 0 . 2 M と 5 0 mM の濃度で 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド ( E D C ) と N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) を含有する 0 . 0 5 ml の水溶液で 1 0 分間処理して活性化した。次に表面を水で簡単に洗浄した。表面を、リン酸緩衝化生理食塩水 ( P B S ) 中に 0 . 3 mg/ml の濃度でストレプトアビジンを含有する 0 . 0 5 ml の溶液で処理して、活性化表面にストレプトアビジンを固定化した。表面は、 1 M のエタノールアミンを含有する 0 . 0 8 ml の水溶液 ( p H 8 . 5 ) をブロックした。 3 0 分間のインキュベーション後、チップを H B S / p 2 0 ( 1 0 mM H E P E S 、 0 . 1 5 M N a C l 、 0 . 0 0 5 % ツイーン 2 0 、 p H 7 . 4 ) で洗浄した。

A F P 測定キット ( ベーリンガー - マンハイム ) は、ビオチン標識一次抗体のストック溶液 ( 0 . 0 0 7 mg/ml ) 、 T A G 1 標識二次抗体のストック溶液 ( 0 . 0 1 2 mg/ml ) 、およびヒト血清を模倣するように設計した人工マトリックス中の 5 つの較正物質溶液からなる。測定条件はこれらの試薬に最適化されていなかった。 A F P 測定を行うために、 0 . 0 2 0 ml の一次抗体ストック、 0 . 0 2 0 ml の二次抗体ストック、および 0 . 0 2 0 ml の較正物質溶液を合わせて、ストレプトアビジンで被覆したスライドに添加した。溶液は表面上で 2 0 分間インキュベートした。次に表面を H B S / p 2 0 ( 1 0 mM H E P E S 、 0 . 1 5 M N a C l 、 0 . 0 0 5 % ツイーン 2 0 、 p H 7 . 4 ) で洗浄した。

以下の手順によりスライドの表面で E C L を測定した：スライドを電気化学セルに入れた。このセルは、電気化学的に励起した金表面の面積 ( 0 . 1 3 cm<sup>2</sup> ) を画定する O リングを含んでいた。セルはまた、 P t 対電極と A g / A g C l 参照電極、ならびに金フィルムに電気的に接触させる手段を含んでいた。セルは、光電子増倍管 ( P M T ) の下に画定された位置に保持され、 E C L 放出の再現性ある検出を可能にした。 E C L を励起させるために、電極を測定緩衝液 ( 0 . 1 M トリプロピルアミン、 0 . 2 M リン酸ナトリウム、 0 . 0 2 % ( w / v ) ツイーン - 2 0 、 p H 7 . 2 ) に浸漬して、金表面の電位を 0 . 2 V/s の速度で 0 V ~ 2 V ( 対 A g / A g C l ) に傾斜させた。 P M T で生成した光電流は、走査の時間にわたって積分されて nA · s の単位で E C L シグナルを与えた。

図 5 1 は、溶液中の A F P の濃度に対する E C L シグナルのプロットを示す。

#### 6.48. 金電極に固定化したプローブへの核酸のハイブリダイゼーションの検出

この例で使用されるオリゴヌクレオチドは以下のように定義される：

S C 1 . 2 : 5 ' c a g t t g t g t g c c a c c t a c a a 3 ' C<sub>6</sub>  
ジスルフィドモディファイアー

S C 2 . 3 : 5 ' t t g t a g g t g g c a c a c a a c t g 3 ' C<sub>3</sub>  
アミノモディファイアー

S C 4 . 1 : 5 ' T A G 1 - g a a - a a t - g t g - c t g - a c c - g g a - c a t - g a a - a a t - g a g 3 '

オリゴヌクレオチドはオリゴエトセトラ社 ( Oligos Etc. Inc. ) から購入した。 S C 2 . 3 は、 N H S エステルを与える T A G 1 の誘導体 ( N H S - T A G 、イゲン社 ( IGEN, Inc . ) ) と反応させて T A G 1 で標識した。 0 . 1 0 0 ml の P B S ( p H 7 . 4 ) 中の S C 2 . 3 ( 1 3 0 nmol ) を、 T A G - N H S - エステルの 0 . 5 mg バイアル中の 0 . 4 0 0 ml の D M S O と合わせた。この溶液を混合して暗所で室温で一晩インキュベートした。一晩のインキュベーション後、標識反応物を 1 . 3 8 0 ml の脱イオン水で希釈した。 5 M の塩化ナトリウムを含有する水溶液 ( 0 . 1 2 0 ml ) を加え、次に 0 . 1 2 0 ml の無水エタ

10

20

30

40

50

ノールを加えた。次にこの溶液を -70 で少なくとも 1 時間インキュベートして、生成物を沈殿させた。標識オリゴヌクレオチドを 5000 × g で 10 で 10 分間遠心分離した。生じたペレットを 0.25 ml の 70% (v/v) エタノール水溶液で 2 回洗浄した。洗浄したペレットを真空下で乾燥して、暗所で -20 で保存した。SC4.1 オリゴヌクレオチドの製造業者は、TAG1 のホスホラミジト誘導体との反応により、オリゴヌクレオチド合成中に TAG1 でプローブを標識した (イゲン社 (IGEN, Inc.))。

スライドガラス (1 cm × 1 cm × 0.06 cm) の一方の面を熱蒸着により金薄膜で被覆した。接着層として 4 nm の Ti および次に 200 nm の Au (99.99%) の熱蒸着により金フィルムが形成された。プラスチックのブロックにあけられた穴に対して O リングでスライドを密閉して、金フィルムの上にウェルを形成した。O リングは、溶液に接触している金フィルムの面積 (0.25 cm<sup>2</sup>) を画定した。オリゴヌクレオチド SC1.2 は、各ウェルに、0.010 mg のオリゴヌクレオチドを含有する 0.050 ml の溶液 (10 mM 酢酸アンモニウム、pH 6.0 中) を加えることにより金フィルムの表面上に固定化された。固定化は、暗所のデシケーター中で一晩進行させ、この間にオリゴヌクレオチドを含有する溶液を蒸発乾固した。次に脱イオン水で数回洗浄して過剰の試薬を除去した。

金スライドの表面上のオリゴヌクレオチドのプレハイブリダイゼーションは、SSC 溶液の成分 (1×)、デンハルト (Denhardts) 溶液の成分 (1×)、酵母 tRNA (0.100 mg/ml)、および超音波処理したニシン精子 DNA (0.050 mg/ml) を含有する 0.050 ml の添加により行なった。次にこのスライドを室温で 30 分間激しく振盪した。

プレハイブリダイゼーション工程の後、スライドを SSC で洗浄して、(1 × 10<sup>12</sup>) 分子の TAG1 標識 SC2.3 (表面上に固定化された配列に相補的なオリゴヌクレオチド)、または TAG1 標識 SC4.1 (非特異結合を試験するために陰性対照として使用される非相補的プローブ) を含有する較正溶液とハイブリダイズさせた。TAG1 標識プローブは、プレハイブリダイゼーションに使用される 0.050 ml の溶液中の溶液として適用した。ハイブリダイゼーションは、激しく攪拌しながら室温で 2 時間進行させた。次に金スライドは、0.1% (w/v) SDS を含有する 1 × SSC で 3 回洗浄し、同じ緩衝液と共に室温で 30 分間インキュベートして、ECL 測定緩衝液 (イゲン社 (IGEN, Inc.)) で灌いだ。ECL は、例 6.47 に記載した金フィルムの表面から励起させた。ECL はまた、TAG1 標識プローブに暴露されなかった表面からも励起させることにより、バックグラウンドシグナルの大きさを測定した。相補的プローブからのバックグラウンド補正したシグナルの値は、3.3 × 10<sup>3</sup> nA · s であったが、これは、TAG1 標識プローブが表面にハイブリダイズして ECL により検出することができたことを示している。非相補的プローブからのバックグラウンド補正したシグナルの値は、-2.2 × 10<sup>1</sup> nA · s であったが、これは、非相補的プローブの結合が特異的であり、かつ非特異的結合が小さいことを示している。

#### 6.49. 小纖維と EVA を含有する複合電極のシートの調製

小纖維とポリマーとを配合して、配合した材料をシートに圧縮成形して複合電極を調製した。小纖維は、180 摂氏度の温度と 100 r.p.m. の速度で二軸スクリュー計量ヘッドを有するブラベンダー・プラスチコーダー (Brabender Plasticorder) を使用して、EVA 中に配合した。9.45 グラムの小纖維は、25.55 グラムの EVA (クオンタム化学 (Quantum Chemical)、ミクロテン (Microthene)、FS-532) とドライブレンドした。ブレンドした材料は、1 分間で混合ヘッドに加えて、材料を融解させた。混合をさらに 5 分間続けて、次に複合体を混合ヘッドから取り出して冷却した。電極として使用される複合体のシートを調製するために、2 グラム片の配合材料を組み立てて、2 枚の磨きステンレス製の板 (三重めっきしたフェロタイプ板、テスライト社 (Testrite Company)) の間にサンドイッチにして、この組立品を液圧プレス (カーバー (Carver)) で 180 摂氏度に設定した熱板の間に入れた。材料が加熱されるのを待って、複合体を 10000 ポンドの全圧で平らなシートにプレスした。次にプレスから組立品を取り出し、室温まで冷却した。組立品を分離して、20 ミルの公称厚さの平らな円盤を取り出した。

#### 6.50. クロム酸による小纖維 - ポリマー複合体の酸化

10

20

30

40

50

炭素小纖維（27重量%）とビニル酢酸エチルとの複合体（小纖維-EVA）と、炭素小纖維とポリエチレンとの複合体（小纖維-PE）を使用した。複合体は、約1mm厚さの3"円盤として入手した。小纖維-EVAと小纖維-PE複合体の両方とも、室温で1時間、クロム酸を含有する溶液（CrO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>OおよびH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、（29/42/29；w/w/w））に円盤を浮かべることにより酸化した。クロム酸溶液との反応後、酸化された複合体を脱イオン水で4～5回洗浄して、脱イオン水に少なくとも5分間浸漬して空气中で1時間乾燥した。

#### 6.5.1. 硫酸と硝酸の混合液による小纖維-ポリマー複合体の誘導体化

EVAと炭素小纖維の複合体（3"直径の平らな円盤の形態の）は、1:1比の硫酸と硝酸の混合液（12ml）で3時間処理した。処理した複合体は水で洗浄した。水（150ml）と水酸化アンモニウム（30%、150ml）の混合液中の処理した複合体に、亜ジチオニ酸ナトリウム（10グラム）を加えた。反応混合液を2時間還流した。この複合体を水で充分に洗浄した。

#### 6.5.2. 露出ヒドロキシル基を有する小纖維複合電極の調製

複合体の表面および表面近くのアセテート基の加水分解により、小纖維-EVA複合体上のヒドロキシル基を露出させた。複合材料（EVA中27重量%のCC小纖維）の円盤（直径3"、厚さ0.01"）を100mlのNaOHの2M溶液に室温で17～20時間浸漬した。この処理により、複合体の両側のヒドロキシル基が露出する。複合体を水とメタノールで洗浄して、次に空气中で乾燥させた。

#### 6.5.3. 酸化した小纖維-ポリマー複合体へのストレプトアビジンの固定化

EVA-小纖維複合体は、例6.5.0に記載したように、または酸素プラズマへの暴露により酸化した。酸化した3"円盤複合体は、真空ポンプ下で1時間乾燥して、0.1M EDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）と0.1M N-ヒドロキシスクシンイミドを含有する25mlのジクロロメタンに一晩（振盪しながら）浸漬した。NHS活性化複合体はジクロロメタン、メタノール、脱イオン水およびメタノールで洗浄して、次に室温で乾燥させた。

ストレプトアビジンの固定化のため、NHS活性化複合体を脱イオン水で濯ぎ、NHS-エステル活性化表面が下に向くように6mlのストレプトアビジン溶液に浮かべた。ストレプトアビジン溶液は、0.7mg/mlの濃度にPBS-1（0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム、pH=7.8）中で調製した。複合体はストレプトアビジン溶液中で3時間振盪して、0.1%トリトンを含有する20mlのPBS-1中で30分間（1回）および20mlのPBS-1中で30分間（5回）振盪して洗浄した。このストレプトアビジン添加EVA複合体はPBS-1中で4で保存した。

#### 6.5.4. S M C C 活性化による小纖維-ポリマー複合体へのタンパク質の固定化

硝酸と硫酸の混合液で（例6.5.1のように）処理したEVA-小纖維複合体の3"直径の円盤は、15mlのリン酸ナトリウム緩衝液（0.1M、pH7.5）を入れた。スルホスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC、10mg）を加えて、反応混合液を室温で3時間インキュベートした。反応を停止させ、複合体はリン酸ナトリウム緩衝液で洗浄した。0.1Mリン酸ナトリウム、20mM EDTA、pH7.5（300ml）中のストレプトアビジン（4.5mg）の溶液に、トラウト試薬（Traut's reagent）（19.8ml、2.8mg/ml）を加えた。反応混合液を室温で1時間30分間インキュベートした。このスルフヒドリル標識ストレプトアビジンは、PD-10（ファルマシア（Pharmacia））使い捨てサイズ排除カラム（3.5ml画分で集めた）を使用して精製した。SMCC処理複合体（1インチ、EVA CC複合体のニトロ化/還元により得られた）をスルフヒドリル標識ストレプトアビジンを含有する溶液（3.5ml）に入れて、振盪しながら4で一晩インキュベートした。生じたストレプトアビジンで被覆した複合体は、1%トリトンX-100を含有する0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.5中で振盪して洗浄（5×20分）した。

#### 6.5.5. 露出ヒドロキシル基を提示する複合電極へのストレプトアビジンの固定化

表面および表面近くにヒドロキシル基を示す小纖維-EVA複合体にストレプトアビジン

10

20

30

40

50

を固定化した。カルボニルジイミダゾール( C D I )によるヒドロキシル基の活性化によりタンパク質を固定化した。(例 6 . 5 2 に記載した手順により) N a O H で処理してヒドロキシル基を露出させた小纖維 - E V A 複合電極を真空中で乾燥した。乾燥複合体は、乾燥ガラスジャーの中の 5 0 m l の無水塩化メチレンに浸漬した。この溶液に 1 0 0 m g ( 0 . 6 m m o l ) の 1 , 1 ' - カルボニルジイミダゾール( C D I )を加えて、ジャーを室温で 1 時間穏やかに振動させた。次に複合体を塩化メチレンとメタノールで洗浄し、次に空气中で乾燥させた。 C D I 活性化複合体は 3 / 1 6 " の円盤に(穴あけ器を使用して)切り出した(総計 9 6 個)。各円盤を 9 6 ウェルマイクロタイプレートのウェルの底に入れた。ストレプトアビジン( 0 . 2 M 重炭酸ナトリウム中の 1 0 0 m l の 0 . 1 m g / m l 溶液、p H 8 . 5 )を次に各ウェルに加えた。固定化は、4 で 1 8 ~ 2 0 時間進行させた。 1 0 0 m l ずつの 5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 5 に浸漬して円盤を 3 回洗浄して、使用するまで 1 0 0 m l の 5 0 m M リン酸ナトリウム( p H 7 . 2 )中で保存した。

#### 6 . 5 6 . E V A と小纖維の複合電極上の A F P の測定法

(例 6 . 5 3 に記載したように調製した)ストレプトアビジンを固定化した E V A - 小纖維複合電極を使用して、 A F P 測定を行った。測定は、測定の前に 1 % B S A 溶液( 0 . 1 M リン酸ナトリウム中の 1 % B S A および 0 . 3 % ツイーン 2 0 、 p H = 6 . 8 )でプレブロックして、 0 . 1 M リン酸ナトリウム中の 0 . 3 % ツイーン 2 0 、 p H 6 . 8 で濯いだ 9 6 ウェルプレート中で行った。 3 / 1 6 " の直径の 4 8 個の円盤を 3 " 直径の E V A - S A 複合体から打ち抜いて、処理した表面を有する 9 6 ウェルプレートに入れた。 5 0 マイクロリットルのビオチン化 A F P 抗体を、複合体を含むウェルに加えた。次にプレートを室温で 3 0 分間振盪した。複合体を 0 . 1 m l の P B S - 1 で 2 回すすぎ、室温で 0 . 0 5 m l の較正物質と 0 . 0 5 m l の T A G 1 標識抗体の混合物と共に 1 時間振盪した。反応の終わりに、複合体を 0 . 1 5 0 m l の E C L 測定緩衝液で濯いで、 E C L を測定するまでタンパク質緩衝液( 3 % B S A 、 3 % ツイーン 2 0 、 2 5 m M 塩化ナトリウムおよび 0 . 1 M リン酸ナトリウム、 p H = 7 . 3 )中に保存した。我々は 0 . 5 6 ~ 7 9 5 0 I U / m l の範囲の 8 種の A F P 較正物質を使用した。各較正物質は、 6 回反復で測定した。

図 5 3 に結果を示す。

#### 6 . 5 7 . E V A と小纖維の複合電極を使用する T S H の E C L 測定法

測定は、 E V A - 小纖維複合体(例 6 . 5 5 に記載したように調製)の 3 / 1 6 " 直径のストレプトアビジンで被覆した円盤を使用して行った。測定試薬は、 T S H 測定キット(イゲン社( IGEN, Inc. ) )の一部であり、そしてそれぞれ緩衝液( T S H 測定希釈液)に溶解したビオチン標識抗 T S H 抗体と T A G 1 標識抗 T S H 抗体を含んでいた。円盤は、 9 6 ウェルマイクロタイプレートの個々のウェルに入れた。ビオチン標識抗体( 0 . 0 5 m g 、 0 . 0 1 2 m g / m l )を各ウェルに加えて、 3 7 で 3 0 分間プレートを穏やかに振盪した。 T S H 測定希釈液で円盤を洗浄後、 T A G 1 標識抗体( 0 . 0 2 5 m l 、 6 0 0 n g / m l )と種々の量の T S H を含有する溶液を加えて、 3 7 でプレートをさらに 6 0 分間振盪した。円盤は、 T S H 測定希釈液で洗浄して、 E C L による分析まで、同希釈液中に保存した。

#### 6 . 5 8 . 小纖維 - ポリマー複合体上の D N A ハイブリダイゼーション測定

この例では、 D N A 配列の測定を記載する。本測定は、ストレプトアビジンで被覆した複合電極上のサンドイッチ複合体の形成を伴い、この電極は、ビオチン標識捕捉プローブ( S C 5 )、アナライト( S C 3 . 1 )および T A G 1 標識プローブ( S C 4 . 1 )を含む。 S C 3 . 1 と S C 4 . 1 は、例 6 . 4 8 に記載されている。 S C 5 は、オリゴエトセトラ社( Oligos Etc. Inc. )から購入し、そして配列 5 ' - c a g t t g t g t g c c a c c t a c a a g c a t t a c g g a c t a g t c a t g g t t c a c a g a g g - 3 ' - ビオチンを有する。酸化小纖維 - E V A 複合体は、例 6 . 5 3 に記載したように E D C と N H S で活性化した。プラスチックのブロックにあけられた穴に対して O リングで円盤を密閉して、複合体の 3 / 8 " 円盤の上にウェルを画定した。 O リングは、ウェルに入っている溶液と接触している複合体の面積( 0 . 2 5 c m 2 )を画定した。ストレプトアビジンは、 0 . 0 5 m l のストレプトアビジンの 0 . 5 m g / m l

10

20

30

40

50

溶液 (P B S 中) を各ウェルに加えることにより、円盤上に固定化した。装置を振盪しながら反応は室温で3時間進行させた。円盤は、P B Sで2回、0.10% (w / v) トリトンX-100を含有するP B Sで1回およびP B Sでさらに2回洗浄した。

ビオチン標識オリゴを捕捉するために、我々は、0.05mlのE C L測定緩衝液 (イゲン社 (IGEN, Inc.)) 中の $10^{13}$ 分子のS C 5を加えて、激しく振盪しながら室温で2時間インキュベートした。過剰なS C 5は、P B S、0.10% (w / v) トリトンX-100を含有するP B S、およびE C L測定緩衝液で洗浄して除去した。次にE C L測定緩衝液中のS C 4.1 (0.025ml中 $10^{12}$ 分子) とS C 3.1 (0.02ml中の種々の量) を加えた。ハイブリダイゼーション反応は4時間進行させた。次に過剰の試薬は、P B S、0.10% (w / v) トリトンX-100を含有するP B S、およびE C L測定緩衝液で洗浄して除去した。次に円盤をE C L装置に入れて、E C Lシグナルを測定した。図54は、S C 3.1の量の関数としてE C Lシグナルを示す。

#### 6.59. 小纖維複合電極の表面積の測定法

複合電極の表面から突き出る小纖維の量は、二重層静電容量の測定から推定することができる。電極は、直径0.25インチの複合体の円盤を打ち抜いて、電気塗料で銅線を取り付けて1つの表面に電気的に接触させて調製した。任意のむき出しの銅線はエポキシ中に密閉した。電極を使用して、-0.2V対A g / A g C 1と+0.8V対A g / A g C 1の間のいくつかの電位の走査速度 (例えば、5、10および25mV/秒) で、アルゴンをバージした0.5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中のサイクリックボルタングラム (cyclic voltammograms) を記録した。二重層荷電電流 I<sub>d1</sub>は、サイクリックボルタングラムの広く平らな領域、典型的には+0.25V対A g / A g C 1で測定した。走査速度に対するI<sub>d1</sub>でのプロットの傾きは、二重層静電容量 C<sub>d1</sub>としてとられる。10 μF/cm<sup>2</sup>の小纖維表面積の平均値、および200M<sup>2</sup>/グラムの小纖維表面積を使用して、電解質に露出される小纖維の量を推定することができる。

#### 6.60. N H S エステル官能基化小纖維の調製

N-ヒドロキシスクシンイミド (N H S) (0.35g) と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (E D C) (0.60mg) を、25mlのジオキサン中に220mgのカルボキシル化小纖維 (ハイパーイオン触媒社 (Hyperion Catalysts Inc.)) を含有する懸濁液に加えて、この混合物を音波処理 (ソニファイア (Sonifier) 250、ブランソン・ウルトラソニックス (Branson Ultrasonics)) して、室温で一晩攪拌した。反応は、焼結ガラスロートで小纖維からの反応物の真空濾過により停止させた。小纖維をジオキサン (3 × 15ml) およびメタノール (充分に) で洗浄し、次に真空下で乾燥して、220mgのN H Sエステル活性化小纖維を得た。

#### 6.61. N H S エステル小纖維へのストレプトアビジンの結合

N H Sエステル修飾小纖維 (2.1mg、例6.60に記載したように調製) を、400 μl P B S - 1 緩衝液 (0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム、p H = 7.8) 中で最も低い出力設定で5分間音波処理 (ソニファイア (Sonifier) 250、ブランソン・ウルトラソニックス (Branson Ultrasonics)) した。ストレプトアビジンの溶液 (150 μl P B S - 1 中 2.4mg) を分散小纖維懸濁液と混合して、混合物 (650 μl) を室温で3時間穏やかに振盪した。小纖維は、多数回サイクルの反復遠心分離、および以下の緩衝液 (1%トリトンX-100を含有する0.1Mリン酸ナトリウム (1回)、P B S - 1 (2回)、0.1%トリトンX-100を含有する0.1Mリン酸ナトリウム (1回)、およびP B S - 1 (4回)) を連続して使用する再懸濁により洗浄した。ストレプトアビジン添加小纖維をP B S - 1 中で4で保存した。

#### 6.62. ナイロン膜フィルター上の極薄小纖維マット (U T F M) の製作

C C 小纖維のストック懸濁液 (水中1mg/ml) をトリトンX-100の水溶液 (0.2% (w / v)) に希釈して、C C 小纖維を0.1mg/mlの濃度で含有する水性懸濁液を調製した。30%のデューティサイクルを使用し、かつ出力制御を3の値に設定して5分間音波処理して、プローブソニケーター (ソニファイア (Sonifier) 250、ブランソン・ウルトラソニックス (Branson Ultrasonics)) でC C 小纖維を微細に分散した。次に4m

10

20

30

40

50

Iの懸濁液をトリトンX-100の水溶液で40mlの容量まで希釈して、音波処理した懸濁液の0.01mlの濃度までさらに希釈した。

真空濾過によりナイロン膜(孔径0.45mm、直径47mm)上にUTFMを調製した(小纖維マットの濾過用の装置の一例に関する図24を参照のこと)。約26インチのHgの真空を使用して4つのあ4mlずつのアリコートで、微細に分散した小纖維をナイロン膜上に濾過した。膜上に濾過されずに残る液体が痕跡量になるまで(目視観察による)、真空濾過を続けた。次にマットを濾過装置から取り出し、2片の新しい乾燥した濾紙の間に圧縮して、60で約10~15分間オーブンで平らに乾燥させた。

使用する容量は、異なる面積および/または厚さの電極に応じて見積もることができた。

#### 6.6.3. 二層極薄小纖維マット電極上の核酸ハイブリダイゼーション測定法

10

例6.6.1に記載したように、分散したCC炭素小纖維上にストレプトアビジンを共有結合で固定化した。全部で100μgの小纖維を、BSA 1mg/ml(w/v)の濃度で含有する溶液に懸濁して、小纖維の占有されていない部位をブロックした。次にブロックした小纖維を遠心分離して1mlの脱イオン水に再懸濁した。5分間音波処理(ソニファイア-250、プランソン・ウルトラソニックス)して、この懸濁液を再分散した。

例6.6.2に記載したように極薄小纖維マット(UTFM)を調製した。UTFMを調製後、例6.6.2に使用したものと同じ条件下で第1層へ17μlのストレプトアビジン-小纖維の懸濁液を濾過して、第2層を形成した。

DNAハイブリダイゼーション測定を行うために、我々は、相補的「TAG付けした」オリゴヌクレオチド(28塩基対、TAG1-NHSエステルで末端標識されている)とハイブリダイズさせた「捕捉」オリゴヌクレオチド(28塩基対、5'位でビオチン化されている)を使用した。本測定は以下の工程により用意した:i)種々の濃度のビオチン標識オリゴと一定の過剰な(10<sup>12</sup>分子)TAG1標識オリゴを含有する較正物質溶液を調製;ii)50μm/secの流速で極薄小纖維マット(1溶液当たり1つのUTFM)により較正物質溶液(50μl)を濾過して、小纖維マット中のストレプトアビジン被覆小纖維へビオチン化複合体を捕捉;iii)50μlのECL測定緩衝液(イゲン社)によりUTFMを洗浄し未結合試薬を除去、そしてiv)UTFM(および結合したオリゴヌクレオチド複合体)を測定セルに移して(図34)ECLを測定。図55は、本測定が、TAG1標識オリゴヌクレオチドを高感度で測定して、広いダイナミックレンジにわたって線形の応答を与えたことを示す。

20

#### 6.6.4. 二層極薄小纖維マット電極上のAFPのサンドイッチ免疫測定法

30

例6.6.1に記載したように、ストレプトアビジンで被覆した(かつBSAでブロックした)小纖維の懸濁液を調製した。懸濁液をECL測定緩衝液(イゲン社)に希釈して、7mg/mlの小纖維のストック懸濁液を得た。溶液を氷水浴に入れて(ストレプトアビジンの変性を防ぐため)、20%のデューティサイクルを使用し、かつ出力制御を1.5の値に設定して、5分間音波処理(ソニファイア-250、プランソン・ウルトラソニックス)して小纖維を再分散した。

真空濾過装置を使用して、ナイロン濾過膜(0.45mm孔径)上に二層UTFM電極を調製した。濾過装置は膜上に1/8"直径の面積を画定し、これにより濾過が起きた。誘導体化していない0.01mg/mlの小纖維を含有する87.5μlの微細に分散した懸濁液(例6.6.2に記載したように調製)を(吸引して)濾過して、誘導体化していない小纖維の層を形成した。誘導体化していない小纖維の層に、ストレプトアビジンで被覆した小纖維の50μlのストック懸濁液を濾過して、第2層を形成した。

40

ビオチン化AFP抗体の50μlのストック溶液、TAG1標識AFP抗体の50μlのストック溶液、および既知濃度のAFPを含有する10μlのいくつかのストック溶液の1つを合わせて、AFP測定試薬(エレクシス(Elecsys)、ベーリンガー・マンハイム)を濾過の前に混合した。合わせた溶液は次に、5インチのHgの真空圧を使用して制御された流速で、吸引して濾過した。各試料は濾過するのに30~50分かかった。次にマットを150μlのECL測定緩衝液(イゲン社)で洗浄し、取り出して乾燥させた。マットは測定セル(図34)に移して、ECLを測定した。図56は、較正物質溶液における

50

る AFP の濃度の関数としての ECL シグナルを示す。

#### 6.6.5. 非導電性濾過膜上の金の導電性フィルムの形成

ワットマン (Whatman) のナイロン膜フィルター (0.45  $\mu\text{m}$  孔径) は、バルザース MED 010 ミニデポジションシステム (Balzers MED 010 Minideposition System) を使用してスパッタリングした金で被覆した。沈積は、アルゴンプラズマ ( $5 \times 10^{-2}$  mbar の圧力で) と 100 mA の放電電流を使用して行った。

#### 6.6.6. 金で被覆したナイロン濾過膜上に形成した極薄小纖維マット電極上の AFP のサンドイッチ免疫測定法

例 6.6.1 に記載したように、ストレプトアビジンで被覆した (かつ BSA でブロックした) 小纖維の懸濁液を調製した。懸濁液を ECL 測定緩衝液 (イゲン社) に希釈して、28 mg/ml の小纖維の濃度のストック懸濁液を得た。溶液を氷水浴に入れて (ストレプトアビジンの変性を防ぐため)、20% のデューティサイクルを使用し、かつ出力制御を 1.5 に設定して、5 分間音波処理 (ソニファイア -250、ブランソン・ウルトラソニックス) して小纖維を再分散した。

導電性の Au で被覆したナイロン濾過膜 (100 nm 金フィルム、例 6.6.5 に記載したように調製) から全部で 36 個の 5/16" 直径の円盤を打ち抜き、(穴あけ器を使用して) 切り取って 5/16" 直径の円盤を形成した。円盤は、96 個もの試料を制御された真空圧下で一度に濾過することが可能な多重試料濾過装置のウェルに入れた。この装置により、試料を各円盤上の 3/16" 直径の円形領域に濾過する。ストレプトアビジンで被覆した小纖維の 82.5  $\mu\text{l}$  のストック溶液を (26 インチの Hg の真空を使用して) 円盤上に濾過して、単層 UTM を形成した。ビオチン化 AFP 抗体の 50  $\mu\text{l}$  のストック溶液、TAG1 標識 AFP 抗体の 50  $\mu\text{l}$  のストック溶液、および既知濃度の AFP を含有する 10  $\mu\text{l}$  のいくつかのストック溶液の 1 つを合わせることにより、AFP 測定試薬 (エレクシス (Elecys)、ベーリンガー - マンハイム) を濾過の前に混合した。合わせた溶液は次に、5 インチの Hg の真空圧を使用して制御された流速で、吸引して濾過した。各試料は濾過するのに 30 分かかった。次にマットを 150  $\mu\text{l}$  の測定緩衝液で洗浄し、次いで取り出して、3.0% BSA、3.0% ツイーン -20、25 mM NaCl、および 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を含有するタンパク質緩衝液中で保存した。マットは測定セル (図 34) に移して、ECL を測定した。図 57 は、較正物質溶液における AFP の濃度の関数としての ECL シグナルを示す。

#### 6.6.7. 2 つの異なる電極上の AFP 測定 : シグナルとバックグラウンドのボルタントリックな分解能

2 つの複合電極上で AFP 測定法を開発した。27 重量% の CC 小纖維を含有するエチレン酢酸ビニル (EVA) コポリマーから両方の電極を調製した。1 つの電極 (「加水分解 EVA」電極) は、水酸化カリウムで処理し、CDI で活性化し、そしてストレプトアビジンに暴露した (例 6.5.5 のように)。もう一方の電極 (「クロム酸 EVA」電極) は、クロム酸で処理し、NHS と EDC で処理してストレプトアビジンに暴露した (例 6.5.3 のように)。

ビオチン標識抗 AFP 抗体、TAG1 標識抗 AFP 抗体および AFP を含有するサンドイッチ複合体を、例 6.5.6 に記載した手順によりこの 2 つの電極の 3/16" の円盤上に捕捉した。

各電極は、電極の活性面積 (1/8" 直径) を画定するガスケット (内径 1/8"、外径 7/8"、および厚さ 0.017") を用いて ECL 試験セル (図 34) 中に設置した。試験セルは、3 電極電気化学セルと、作用電極、と平行な光学窓を含む黒いデルリン (Delrin) の本体からなっていた。電極は、3 M Ag/AgCl 参照電極、白金メッシュ対電極、および作用電極としての小纖維 - EVA 複合体であった。試験セルを、約 1 ml の測定緩衝液で充填し、光を通さない箱に入れて、試作品の電気ヒーターで約 33° に加熱した。試験セルの光学窓は、PMT の前方に置き、箱を閉じた。いくつかの光電流範囲 (すなわち、10 nA/V、30 nA/V、100 nA/V、300 nA/V、および 1000 nA/V) を使用して、1 秒時定数フィルターによりアナログモードで作動するパシフィックインストルメン

10

20

30

40

50

ツ (Pacific Instruments) モデル 126 光度計を用いて、900V で PMT に電源を供給した。電気化学セルは、イージーアンドジー (EG&G) パークモデル 175 (PARC Model 175) ユニバーサルプログラマー (Universal Programmer) とイージーアンドジー (EG&G) パークモデル 173 (PARC Model 173) ポテンショスタット / ガルバノスタットにより制御した。3M Ag / AgCl に対して 0V で 100s 遅延後、電位は、100mV/s で 0V ( $E_0$ ) から、-0.8V の下限 ( $E_1$ ) に、2.3V の上限 ( $E_2$ ) に、および 0V の終止電位 ( $E_3$ ) に掃引した。電流範囲は 1mA/V に設定した。試験セルの周囲の大気温度は、コールパーマー (Cole Parmer) サーミスタ温度計とプローブを用いて測定した。全てのアナログデータ (温度、光、適用電位、および電流) は、ピラミッド (Pyramid) 1000MHz ペンティアム (Pentium) コンピュータで HEM データ社 (HEM Data Corp.) の ウィンドウズ J (Windows J) 用のスナップ - マスター (Snap-Master) により制御した、コンピュータボード社 (Computer Boards Inc.) CIO - DAS 1602 / 16 A / D ボードにより 10Hz でデジタル化した。生データから、適用電位に対する ECL とボルタンメトリック電流のプロットを作成して、最大陽極電流、ECL ピーク電位 (ECL ピークでの適用電位)、平均 ECL 暗電流 (出発電位と 0.5V の間の平均光)、および暗補正積分 ECL (所定の電位範囲にわたる平均 ECL と平均暗 ECL の間の差の全てを、所定電位範囲の継続時間 (秒) により掛け算した) を含むいくつかのデータを計算した。AEP 測定由来のボルタンメトリーは、使用される電極に依存する。加水分解 EVA における AEP 測定についてのボルタングラムは、1.4V で開始し約 1.8V で陽極ピークを有する不可逆性酸化波からなる。最大陽極電流は、2.3V で発生する。-0.8V と 1.4V の間ではほとんど電流は流れなかった。クロム酸処理 EVA 由来のボルタングラムは、0.7V で開始しいくつかの不確定の陽極ピーク (約 1.1、1.5、および 2.0V) と 2.3V で最大陽極電流を有する、非常に広い不可逆酸化波からなる。-0.8 と 0.7V の間ではほとんど電流は流れなかった。

加水分解 EVA では、高電位側に少量のテーリングを有するピークからなる痕跡 ECL が生じた。ピーク電位は、ブランクシグナルの 1.85V からアナライトシグナルの 1.75V へとわずかにシフトした。クロム酸処理 EVA では 2 つの接近したピークが生じたが、これらは両方ともアナライト濃度に比例した。これらのピークは、約 1.6V と約 1.25V にあった。低アナライト濃度では、1.6V のピークが優勢であるが、高アナライト濃度では 1.25V のピークが優勢であった。クロム酸処理は、ピーク - ピーク分解能を約 100mV (加水分解 EVA) から約 350mV に増大させた。このピークシフトは、アナライトに感受性の高いことが示された第 1 のピークを分析し、かつ分析に使用されるブランクシグナルの量を減少させるのに充分であった。

同様な実験において、我々は、AEP 較正物質 1 (主として ECL 測定緩衝液、図 60) と AEP 較正物質 3 (図 61) の痕跡 ECL を比較した。図 60 において、測定緩衝液に対応する ECL シグナルは、1.5V で最大のピークとして出現する。図 61 においても、測定緩衝液の ECL シグナルは 1.5V にあるが；1.0V の追加のピークは、TAG 1 標識相補抗体を含むサンドイッチ複合体中のアナライト由来のシグナルに対応する。

6.6.8. 小纖維 - EVA 複合体の押出しシートの調製

我々は、270g のカーボンナノチューブ (HCl Fibrils)、40 C C 等級) と 730g のエチル酢酸ビニル (EVA、クオンタム・ミクロテン (Quantum Microthene) FE530) をヘンシェル・ラブ (Henschel lab) ミキサー内で 2 分間混合した。ナノチューブ - EVA 混合物は、密閉ホッパーに真空移送し、180° でバス (Buss) PR46 ニーダーで配合して、バス (Buss) クロスヘッドペレット製造機に供給した。ペレットはガラ (Gala) 乾燥機で乾燥した。このプロセスにより、27 重量 % の小纖維を含有する複合体が得られた。

押出しの前に、配合ナノチューブ - EVA 複合体のペレットを、80° で少なくとも 12 時間乾燥した。乾燥したペレットを、ブランダー PL2000 プラスチコーダー (Brabender PL2000 Plasti-Corder) (2:1 圧縮比スクリューと 6" フレックスリップダイ (flex-lip die) を取り付けた 3/4" 25:1 L / D 単一スクリュー押出し機) 中に不

足供給した。押出し機の3つの加熱ゾーンとダイの温度は245であった。押出し機の出力ダイから、ナノチューブ-EVA複合体の連続リボン(~15cm幅、~1mm厚さ)を製造して、無視できる引落率で周囲温度でコンベヤーベルト上に集めた。以後の全ての実験には、コンベヤーベルトに接触しなかった複合体の表面を使用した。

6.6.9. ECL免疫測定用の小纖維複合体を化学修飾するための酸素プラズマの使用  
 炭素小纖維とEVAの複合体(27重量%小纖維)を酸素( $O_2$ )ガスから生成したプラズマに暴露した。複合体を2000Wで10分間(20kW分)プラズマに暴露した。N-ヒドロキシスクシンイミド-エステル官能基(NHS-エステル)を導入するために、プラズマ処理した小纖維-EVA複合体(126cm<sup>2</sup>)を、無水塩化メチレン(50ml)中で室温で2時間、N-ヒドロキシスクシンイミド(700mg、アルドリッヂ(Aldrich)13067-2から)および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(1.6g、アルドリッヂ(Aldrich)16146-2から)と反応させ、次にメタノールと水で灌いで、アルゴンガス流を吹きつけ乾燥した。NHS-エステル誘導体化複合体を、PBS-1緩衝液(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム、pH=7.8、50ml)中で室温で4時間、ストレプトアビシン(5mg、ピアース(Pierce)21125から)と共にインキュベートした。次に複合体をPBS-1中の1%トリトンX-100で30分間振盪しながら洗浄し、PBS-1で30分間3回各回振盪しながら洗浄した。

6.7.0. 小纖維複合体を化学修飾するための酸素プラズマ(40kW分)と次のN<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>プラズマ(4:1、120kW分)の使用

炭素小纖維とEVAの複合体(123cm<sup>2</sup>)(27重量%小纖維)を最初に酸素( $O_2$ )ガスから生成したプラズマに暴露した。複合体は、2000Wで20分間(40kW分)プラズマに暴露した。次に複合体をアンモニア(NH<sub>3</sub>)ガスと窒素(N<sub>2</sub>)ガスの混合物(それぞれ4:1比のガス)から生成したプラズマに暴露した。複合体を、このプラズマに2000Wで60分間(120kW分)暴露した。マレイミド官能基を形成するために、プラズマ処理小纖維EVA複合体を、PBS-1(50ml)中で振盪しながら室温で3時間、スルホ-SMCC(Sulfo-SMCC)(35mg、ピアース(Pierce):22322から)と共にインキュベートした。次に複合体を水(10分振盪しながら60ml)で1回およびPBS-1で3回(各回10分振盪しながら60ml)洗浄した。

活性化複合体上へ固定化用のIgGを調製するために、ジチオトレイイトール(5mg、シグマ(Sigma)D-9779から)を抗AFP-IgG溶液(ベーリンガー・マンハイムから)(50μl PBS-1緩衝液中5.5mg)に加えた。この混合物を室温で30分間インキュベートした(混合するために回転させながら)。この手順により、IgG上のチオール基が暴露(「IgG-(SH)<sub>n</sub>」)した。「IgG-(SH)<sub>n</sub>」を、カラムクロマトグラフィーにより精製して、次に20mM EDTA-PBS-1緩衝液に希釈した。

マレイミド活性化複合体(60cm<sup>2</sup>)は、精製した「IgG-(SH)<sub>n</sub>」溶液(30mlの20mM EDTA-PBS-1緩衝液中の5.5mg「IgG-(SH)<sub>n</sub>」)と共に室温で2.5時間インキュベートした。複合体は1%トリトンX-100(60ml)で20分間振盪しながら1回、およびPBS-1で20分間3回各回振盪しながら洗浄した。抗AFP-IgG複合体をPBS-1中で保存した。

AFP測定は、抗AFP-IgG複合体上で行った。96ウェルプレートをBSAでプレ被覆した。複合体の個々の円盤(3/16"直径)は、金属穴あけ器で打ち抜いた。各円盤は、TAG1標識IgG(100μl)を含有する溶液と、既知量のAFPを含有する試料(20μl)と共に室温で60分間インキュベートした。インキュベーション後円盤を、PBS-1(200μl)で3回灌いで、BSA測定希釈液(100μl)中で保存した。図62は、AFPを含有する試料とAFPを含有しない試料(バックグラウンド試料)のECLシグナルの間の差の10gのプロットを、試料中のAFP濃度の10gの関数として示す。

6.7.1. 水/アルゴンプラズマ中で酸化した複合体電極へのタンパク質の吸着

小纖維-EVA複合電極(例6.6.8に記載したように調製)を、アドバンスト・プラズ

10

20

30

40

50

マ・システムズ (Advanced Plasma Systems) シリーズ C プラズマ反応器 (1 時間、 2000 W、 300 mtorr) 中で水飽和アルゴンから生成したプラズマで処理した。複合体 (~ 80 cm<sup>2</sup>) は、 100 mM リン酸中 0.2 mg/ml の濃度で抗 AFP モノクローナル (ベーリンガー - マンハイム) を含有する 20 ml の溶液 (pH 7.5) に入れて、室温で 2 時間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。複合体を 100 mM リン酸 (pH 7.5) で洗浄して、同じ溶液中で -4° で保存した。放射性標識を使用して、円盤に吸着した抗体の量を求めるとき、2.9 pmol であった。

これらの円盤で AFP のサンドイッチ免疫測定を行った。 AFP を含有する試料 (20 μl) を、 12 μg/ml の濃度で TAG1 標識二次抗体 (ベーリンガー - マンハイム) を含有する 50 μl の溶液と合わせた。表面をこの混合物で処理して、次にリン酸緩衝液で洗浄した。複合電極をトリプロピルアミンを含有する溶液 (測定緩衝液、イゲン (IGEN)) と接触させ、複合電極の電位を 0 V ~ -0.8 V ~ 2.3 V (Ag / AgCl に対して) まで、0.1 V/s の走査速度で走査して、 ECL を測定した。既知量の AFP を含む試料について観察された ECL シグナルを、図 6.3 に示す。

#### 6.7.2.15 重量%の小纖維を含有する小纖維 - EVA 複合電極を使用する AFP 測定法

27 重量%の小纖維を含有する小纖維 - EVA 複合体のペレットを、追加の EVA と配合して、15 重量%の小纖維を含有する小纖維 - EVA 複合体を製造した。この複合体を、例 6.6.8 に記載したものと類似した手順により押し出してシートにした。複合体をアルゴン / 水プラズマで処理して、例 6.7.1 に記載したように抗 AFP 抗体で被覆した。放射性標識した抗体を使用する試験では、わずか 15 重量%の小纖維を含有するこれらの複合体が、27 重量%の小纖維を含有する他の複合体 (2.9 pmol、例 6.7.1 を参照のこと) よりも多くの抗体 (3.13 pmol) を吸着することが示された。例 6.7.1 に記載したように AFP 測定において抗体で被覆した複合体を使用した。既知量の AFP を含有する試料について観察された ECL シグナルを図 6.4 に示す。わずか 15 重量%の小纖維を含有する複合体は、27 重量%の小纖維を含有する複合体 (図 6.3、例 6.7.1) よりもわずかに高い ECL シグナルを与えた (図 6.4)。

#### 6.7.3. プラズマ酸化した複合体上のオクタデシルアミンのプラズマグラフトした層へのタンパク質の吸着

小纖維 - EVA 複合体 (例 6.6.8 に記載したように調製) を、クロロホルム中に 1 mg/ml の濃度でオクタデシルアミンを含有する溶液中に 2 時間浸漬した。複合体を空气中で乾燥した (乾燥工程の間複合体のシートを平らに保つために端におもりを載せた)。次に複合体を、アドバンスト・プラズマ・システムズ (Advanced Plasma Systems) シリーズ C プラズマ反応器 (1 時間、 2000 W、 300 mtorr) 中で酸素プラズマで処理した。次に複合体を、5 mM リン酸 (pH 7.5) 中にアビジンを含有する溶液 (1.25 mg/ml) 中に浸漬して、アビジンで被覆した。過剰のアビジンは、リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄して除去した。<sup>125</sup>I 標識ストレプトアビジンと、<sup>125</sup>I およびビオチン標識ウサギ IgG を使用する放射性同位体実験により、我々は 30 ~ 43 pmol のストレプトアビジンを固定化し、ストレプトアビジンが > 2.2 pmol のビオチン標識抗体を結合できたことを証明した。

AFP のサンドイッチ免疫測定をこれらの円盤で行った。表面をビオチン標識抗 AFP 抗体を含有する 100 μl の溶液 (7 μg/ml、ベーリンガー - マンハイム) で 30 分間振盪しながら処理して、次にリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄した。20 μl の試料を、TAG1 標識二次抗体 (ベーリンガー - マンハイム) を 12 μg/ml の濃度で含有する 100 μl の溶液と合わせた。表面をこの混合物で 60 分間振盪しながら処理し、次に測定緩衝液 (イゲン) で洗浄した。複合電極をトリプロピルアミンを含有する溶液 (測定緩衝液、イゲン) と接触させ、0.1 V/s の走査速度で 0 V ~ -0.8 V ~ 2.3 V (Ag / AgCl に対して) まで複合電極の電位を走査して、 ECL を行った。既知量の AFP を含む試料について観察された ECL シグナルを図 6.5 に示す。

#### 6.7.4. プラズマ処理複合体上にグラフトした官能基へのタンパク質の結合

10

20

30

40

50

小纖維 - EVA複合体（例6.68に記載したように調製）は、アドバンスト・プラズマ・システムズ（Advanced Plasma Systems）シリーズCプラズマ反応器（1000W、3分、300mTORR）中でアルゴンプラズマで処理した。複合体を反応器から取り出して、直ぐに4%（w/v）のアクリル酸（蒸留）またはアリルアミンを含有する無酸素水溶液に入れた。複合体をこれらの溶液中で30で3時間インキュベートして、次に水で充分に洗浄して、空気中で乾燥した。例6.69に記載したものと類似した方法によりNHSエステルとしてカルボン酸基を活性化して、グラフトおよび/または重合したアクリル酸残基によりストレプトアビシンを固定化した。例6.70に記載したのもと類似した方法により、複合体上にマレイミド基を導入した後、グラフトおよび/または重合したアリルアミン残基によりチオール標識ストレプトアビシンを固定化した。我々は、これらの複合体はビオチン標識試薬に結合でき、ECL標識からECLを励起することができるることを証明した。我々は、ビオチンとTAG1基で標識した過剰のウサギIgGで材料を処理した後、複合電極由来のECLを測定した。結合IgGからのECLを、複合電極をトリプロピルアミンを含有する溶液（測定緩衝液、イゲン）と接触させ、0.1V/sの走査速度で0V~-0.8V~2.3V（Ar/ArClに対して）まで複合電極の電位を走査して、生成した。アクリル酸とアリルアミンで処理した複合体により、それぞれ203nAsおよび123nAsの積分PMT電流が得られた。

#### 6.75. ECL免疫測定のための小纖維複合体にアビシンを結合させるためのプラズマの使用

プラズマを使用して、アビシンを複合材料の表面に融合させた。融合は、最初に小纖維-EVA複合体のブロック（例6.68）を0.5mg/mlのアビシン溶液に3時間浸漬して行った。60mlのPBS-1を3回取り替えて洗浄後、複合体を空気乾燥し、ストリップに切断して、ArまたはO<sub>2</sub>プラズマのいずれかで600ワットで5分間（3000W分）処理した。これらの実験は、シリーズBプラズマ反応器（エイピーエス・テクノロジーズ（APS Technologies）で行った。

複合体のプラズマ処理後、5/16"円盤を打ち抜いて、ビオチン化<sup>125</sup>I-IgGの結合を使用する放射性標識実験により、固定化された活性アビシンの量を測定した。アビシンがその表面に結合した複合体は、0.255pmol（Arプラズマ処理）および1.899pmol（酸素プラズマ処理）のIgGを結合した。

ビオチン化-TAG1-IgG（BTI）を使用する結合測定も行った。BTIを41nMの濃度で使用して、結合した量をECLにより定量した。O<sub>2</sub>プラズマ融合アビシンの場合に、4μMのd-ビオチンを、BTIとのインキュベーションの前に、いくつかのチップと共に1時間インキュベートした。これは、ビオチンとアビシンの間の相互作用に帰因する結合量を評価するために行った。測定したECL:ArプラズマおよびO<sub>2</sub>プラズマのシグナルは、それぞれ10424nA秒および8179nA秒であった。

#### 6.76. 親和性マトリックスを小纖維複合体に結合するためのプラズマの使用

ビオチンを担持するアクリルビーズ（125mg）（シグマ（Sigma）#B-3272、ロット#57F4034）を微細に粉碎した。この粉末を約20mlの脱イオン水に懸濁して、ボルテクサー（vortexer）で充分に混合した。懸濁液を取り出し、0.45ミクロンフィルター（ゲルマンサイエンシーズ（Gelman Sciences）#4598）により濾過した。濾過した懸濁液を小纖維-EVA複合体（27重量%の小纖維、例6.68を参照のこと）のいくつかの5/16"直径の円盤上で乾燥した。

いくつかの円盤をO<sub>2</sub>プラズマで10000W分プラズマ処理した；他はO<sub>2</sub>で12000W分プラズマ処理した。プラズマ処理後、円盤をPBS-1中で10分間3回洗浄し、次にPBS-1で3回濯いですべての未結合断片を除去した。

洗浄後、誘導体化した複合体を、0.2mg/mlのストレプトアビシンと共に室温で2時間インキュベートし、濯いでPBS-1緩衝液中で保存した。ストレプトアビシンで被覆した複合体の円盤（直径3/16"）を打ち抜いて、96ウェルプレートのウェルに入れた。ビオチン化抗AFP抗体を含有する溶液を各ウェルに加えた。円盤は、振盪しながら30分間インキュベートし、次にPBS-1緩衝液で洗浄した。100μlのTAG1標識

10

20

30

40

50

抗 A F P 抗体と  $20 \mu l$  の既知濃度の A F P を含有する試料をウェルに加えて、室温で振盪しながら 1 時間インキュベートした。次に円盤を測定緩衝液で 3 回濯いで、例 6 . 7 1 に記載したように E C L を測定した。図 6 6 は、試料中の A F P の濃度の関数としての E C L シグナルの  $10^g$  のプロットを示す。

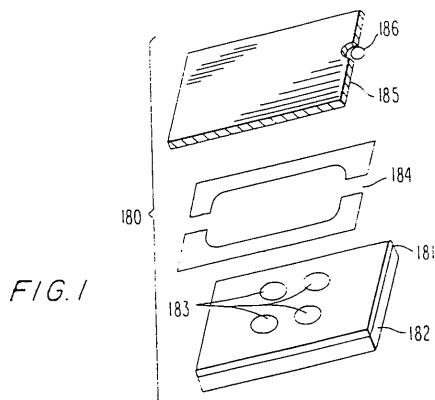
#### 6 . 7 7 . 乾燥試薬を使用し洗浄工程を必要としない E C L ベースの結合測定法

小纖維 - E V A 複合体（例 6 . 6 8 に記載したように調製）は酸素プラズマ中で酸化して、ストレプトアビジンで被覆した（例 6 . 6 9 に記載したように）。複合電極を  $5 / 16$  " 直径の円盤に切断して、この円盤を、円盤の一方の表面が溶液に接触して配置されたホルダーに入れた。円盤を、攪拌しながら 1 時間、ビオチン標識抗 A F P 抗体を含有する  $100 \mu l$  の溶液（ $7 . 5 \mu g/ml$ 、ベーリンガー - マンハイム）で処理し、次にリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄した。次に以下の溶液：T A G 1 標識抗 A F P 抗体（ $12 \mu g/ml$ 、ベーリンガー - マンハイム）、リン酸（ $200 \text{ mM}$ ）、トリプロピルアミン（ $200 \text{ mM}$ ）、ウシ胎児血清（ $2\%$ ）、ショ糖（ $2\%$ ）、クロロアセトアミド（ $0 . 1\%$ ）、およびトリトン X - 100（ $0 . 02\%$ ）（p H  $7 . 6$ ）の添加および凍結乾燥により、測定に必要な他の試薬を表面上で乾燥した。A F P 測定は、 $95 \mu l$  の試料を円盤の表面上の乾燥した試薬に加えて、振盪しながら 1 時間インキュベートして行った。E C L は、複合電極の上の溶液に対電極と参照電極を挿入して、 $4 . 8 V/s$  の走査速度で対電極の電位を  $0 V \sim -0 . 8 V \sim 2 . 3 V$  まで走査して、励起させた。図 6 7 は、既知量の A F P を含有する溶液について光電子増倍管で測定した E C L シグナルを示す。

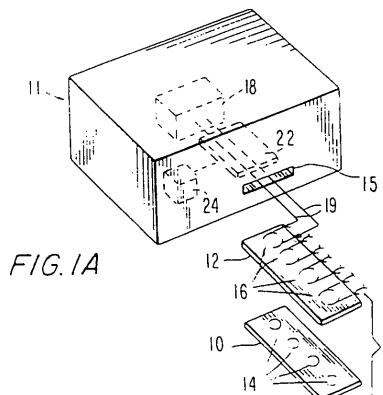
#### 7 . 参考文献の引用

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施態様によって範囲が限定されるものではない。実際に前記説明と添付図面から、当業者にとって、本明細書に記載されるものに加えて本発明の種々の変形態様が明らかであろう。このような変形態様は、本請求の範囲に含むものと解釈される。種々の刊行物が本明細書に引用されており、これらの開示はその全体が参考により組み込まれる。

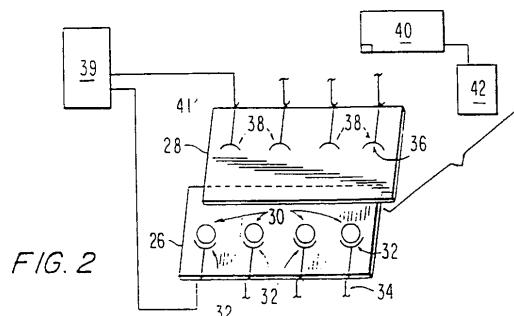
【図 1】



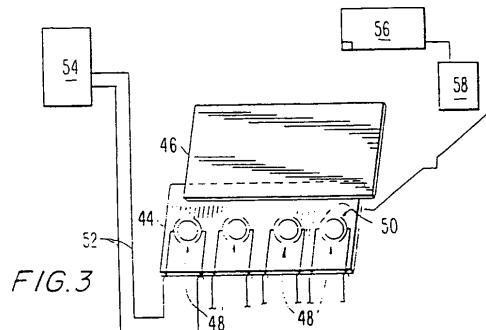
【図 1 A】



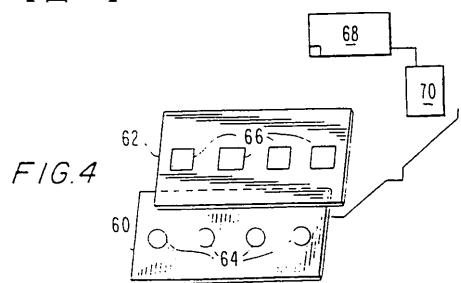
【図 2】



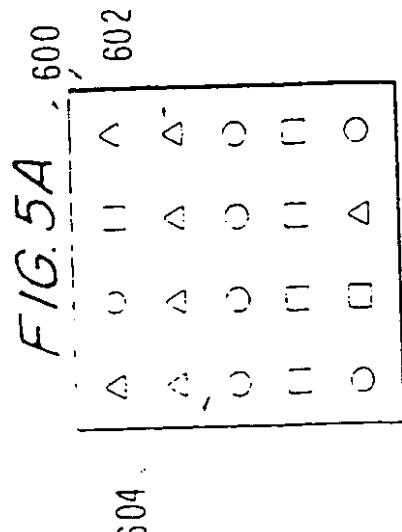
【図 3】



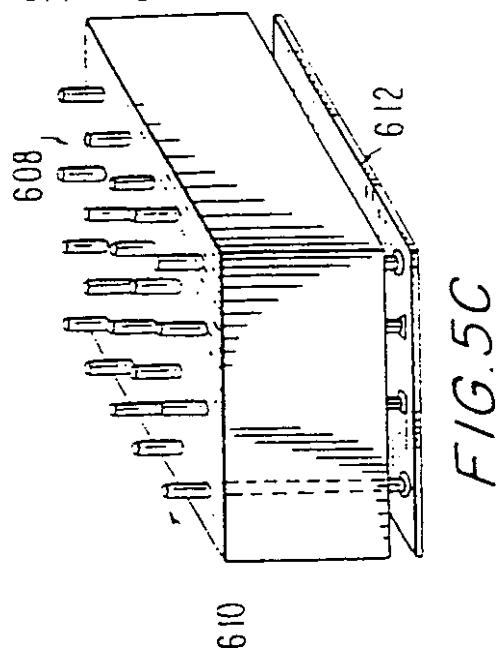
【図4】



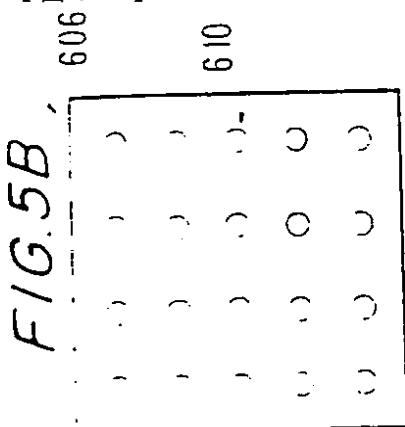
【図5 A】



【図5 C】



【図5 B】



【図6 A】

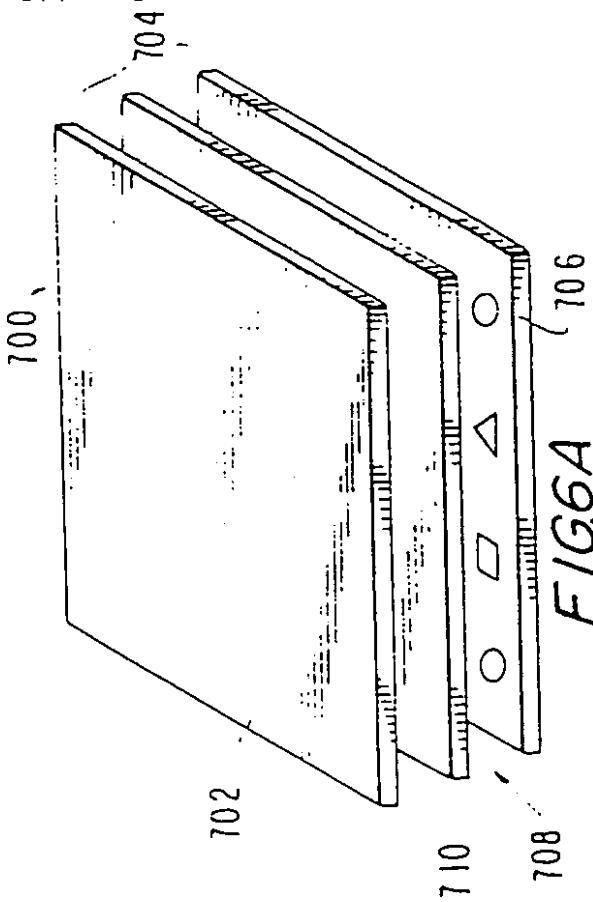
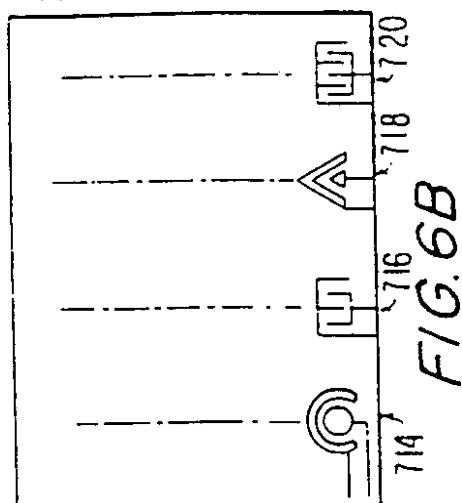
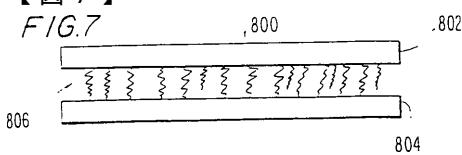


FIG.6A

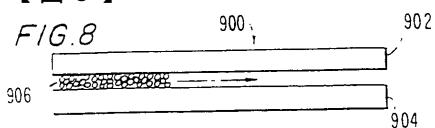
### 【図 6 B】



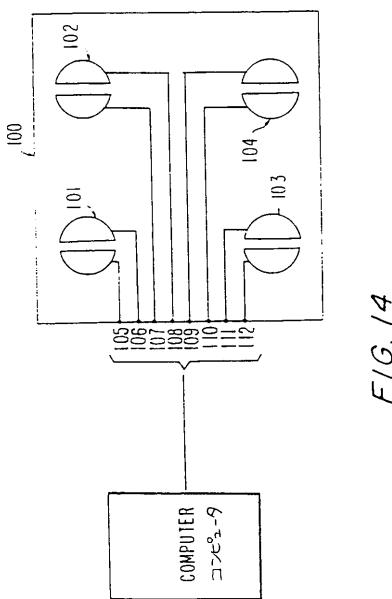
【 図 7 】



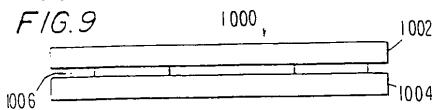
【図8】



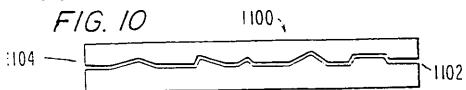
【図14】



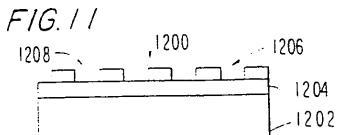
【 义 9 】



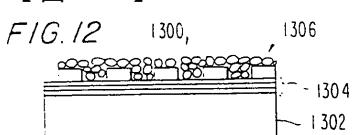
【図10】



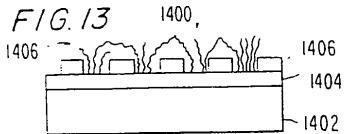
【 図 1 1 】



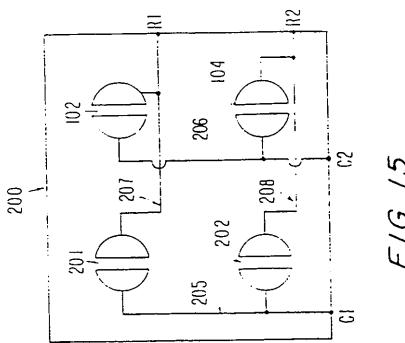
【図12】



【 図 1 3 】



【 図 15 】



【図16】

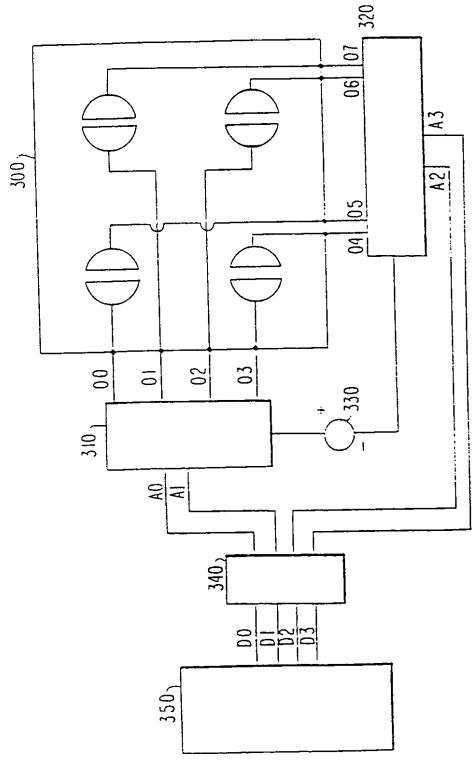


FIG. 16

【図17】

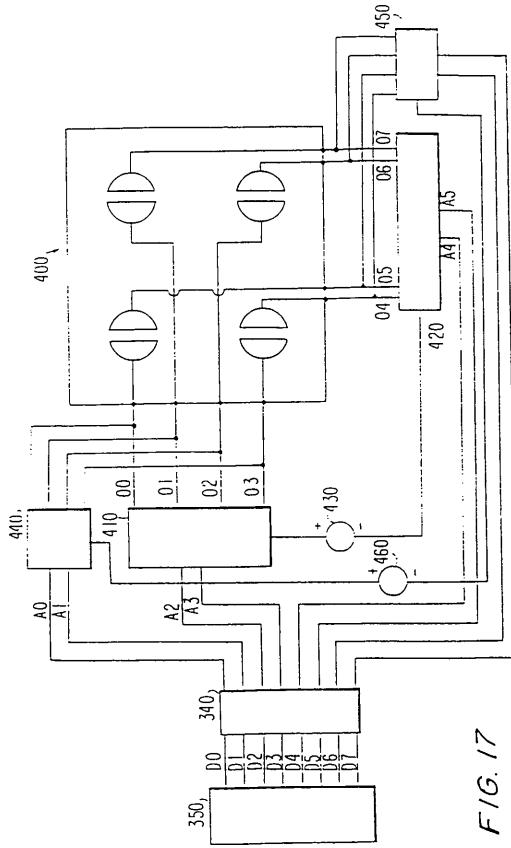


FIG. 17

【図18】

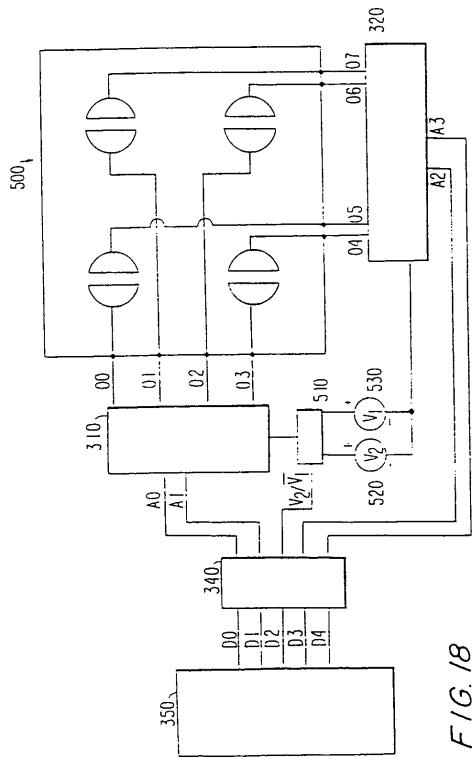


FIG. 18

【図19 a】



FIG. 19a

【図19 b】



FIG. 19b

【図19 c】

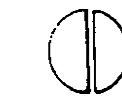


FIG. 19c

【図19 d】



FIG. 19d

【図 19e】

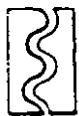


FIG. 19e

【図 20】

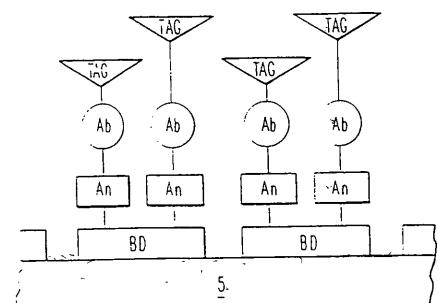


FIG. 20

【図 21】

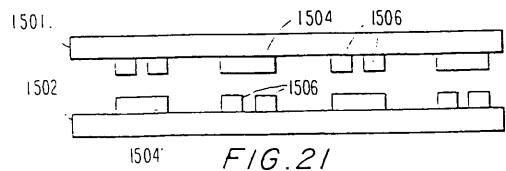


FIG. 21

【図 23 A】

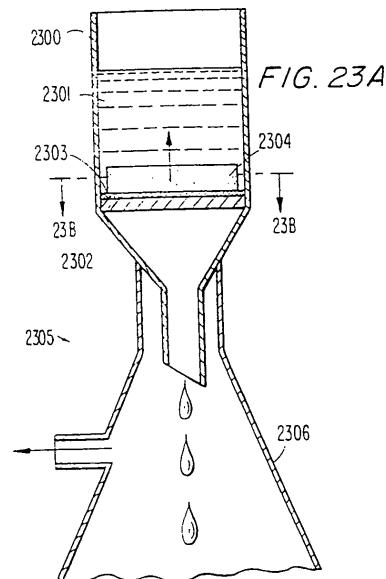


FIG. 23A

【図 22 A】

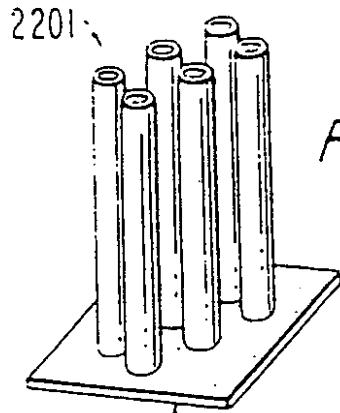
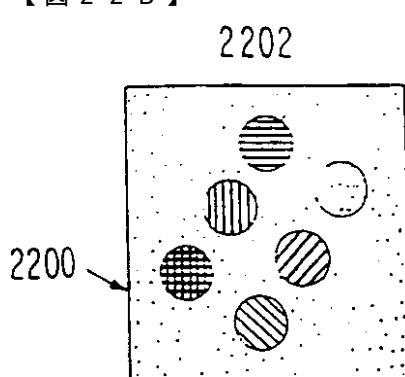


FIG. 22A

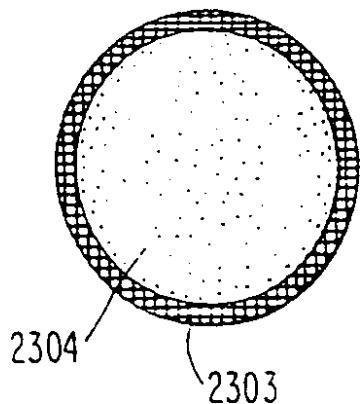
【図 22 B】



2202

【図 23 B】

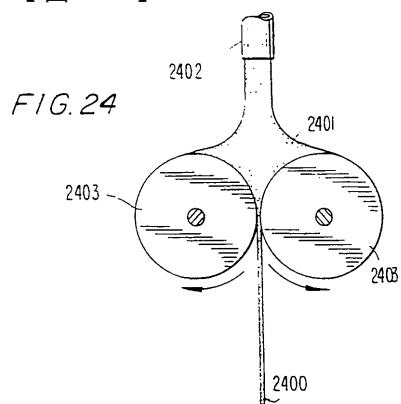
FIG. 23B



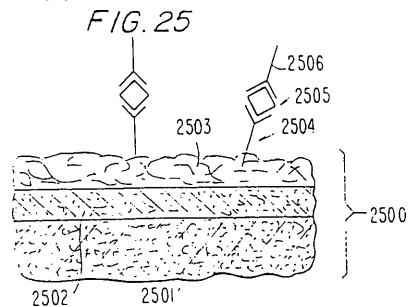
2304

2303

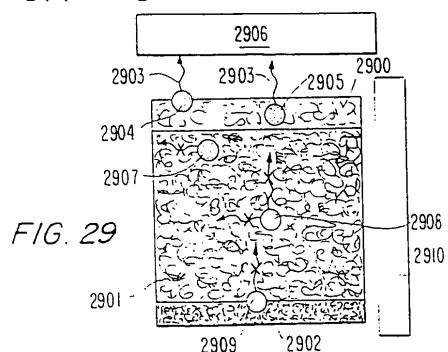
【図24】



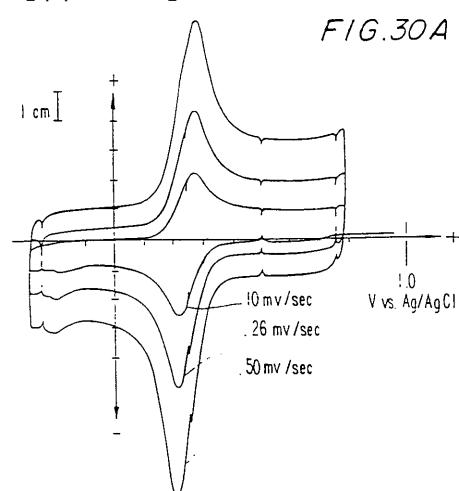
【図25】



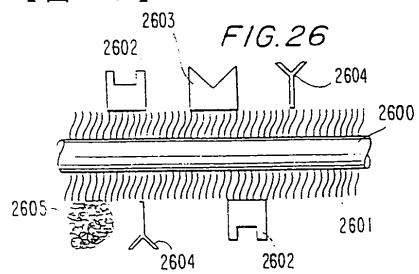
【図29】



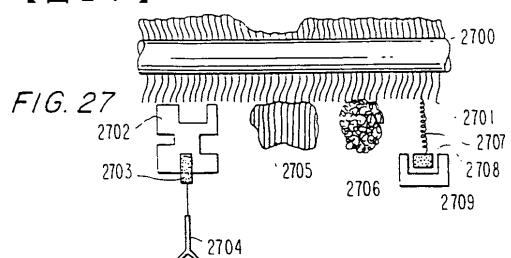
【図30A】



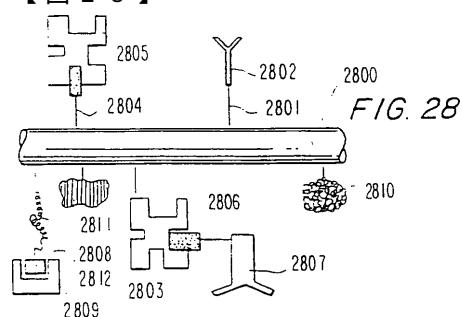
【図26】



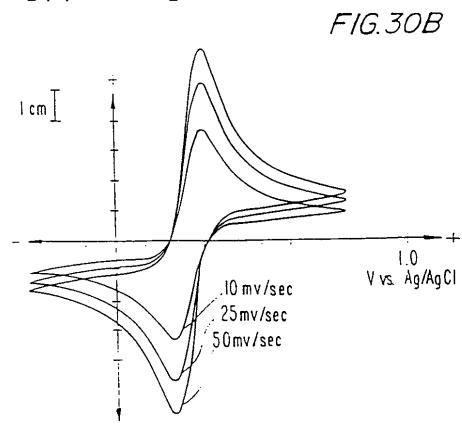
【図27】



【図28】

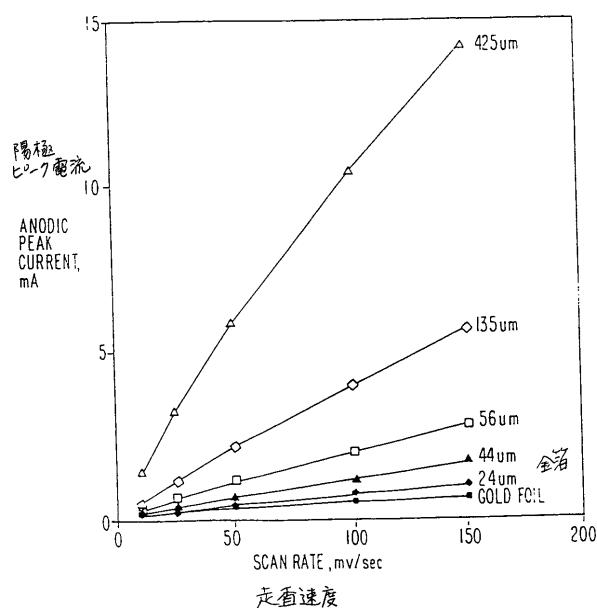


【図30B】



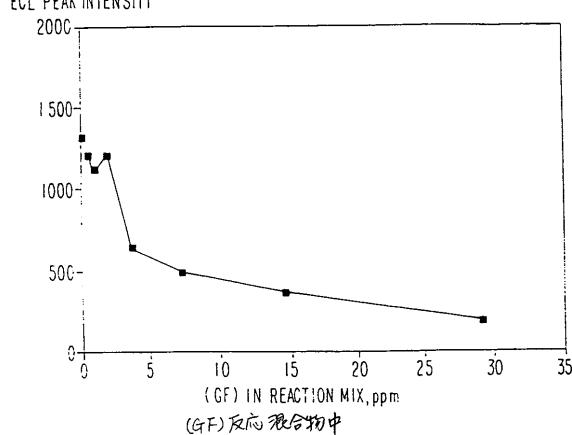
【図 3 1】

FIG. 31

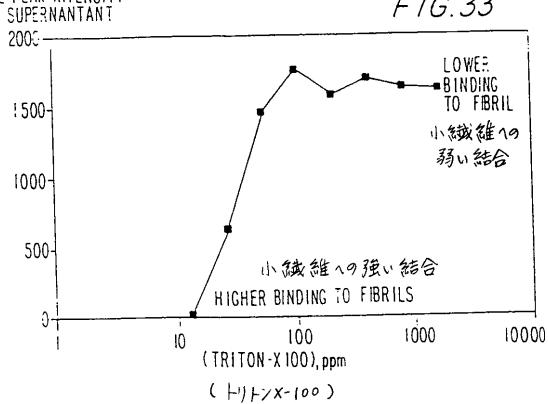


【図 3 2】

FIG. 32

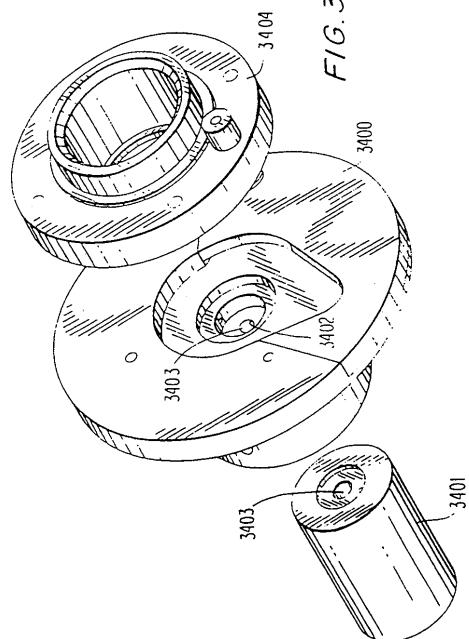


【図 3 3】

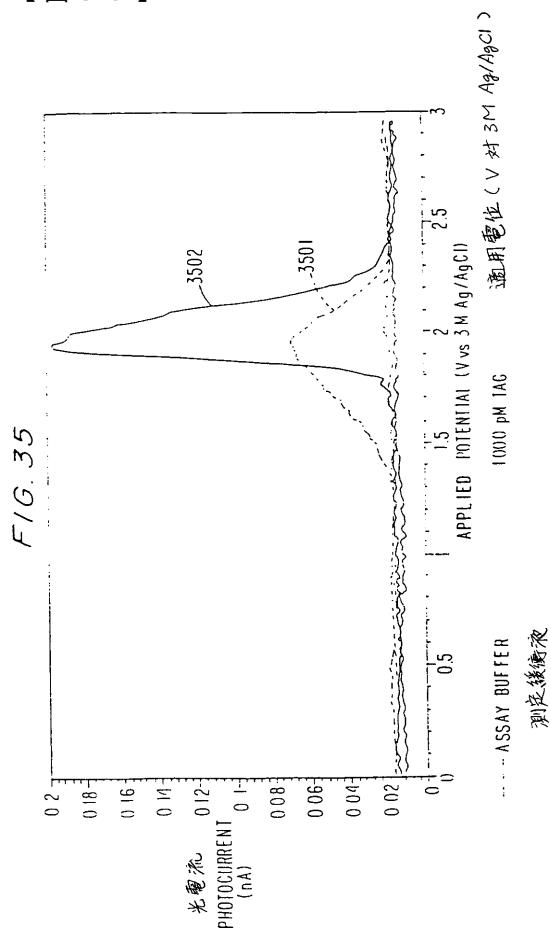
ECL PEAK INTENSITY  
OF SUPERNANTANT

【図 3 4】

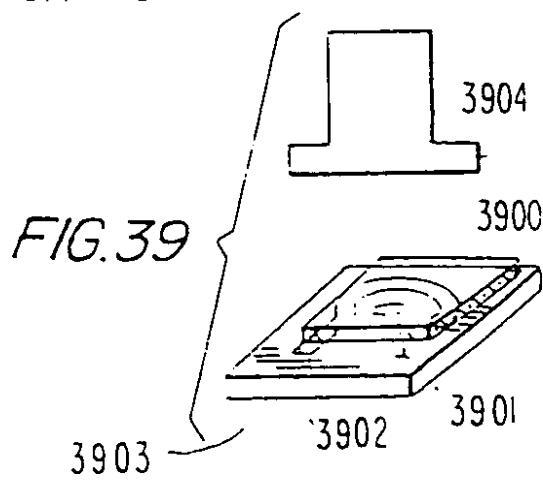
FIG. 34



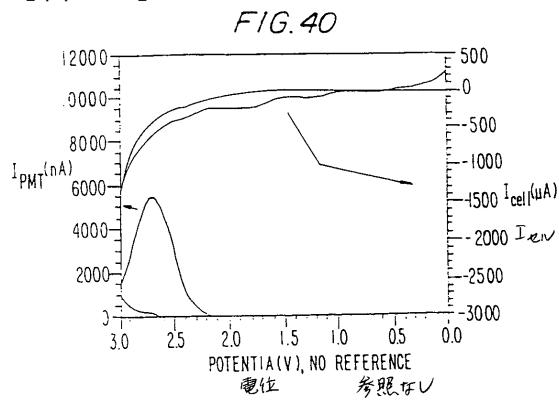
【図35】



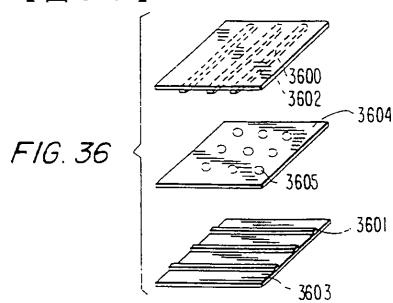
【図39】



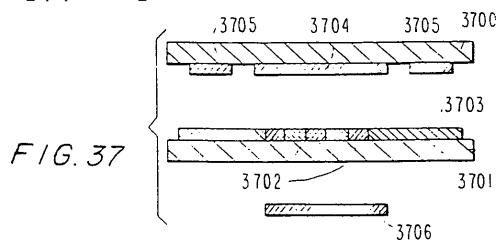
【図40】



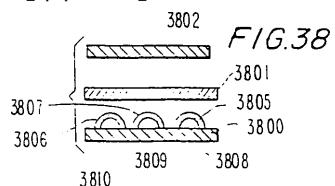
【図36】



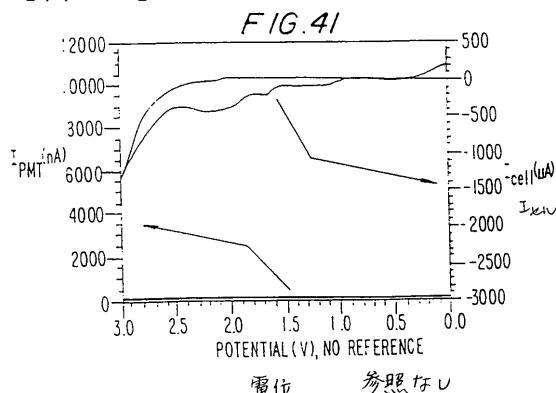
【図37】



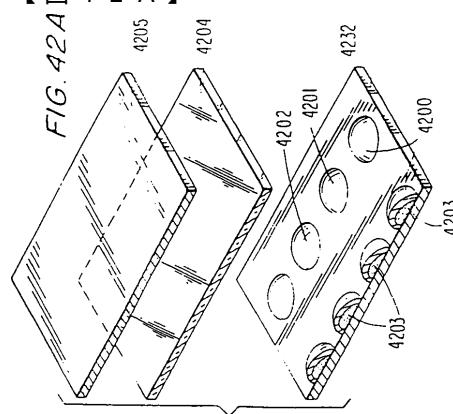
【図38】



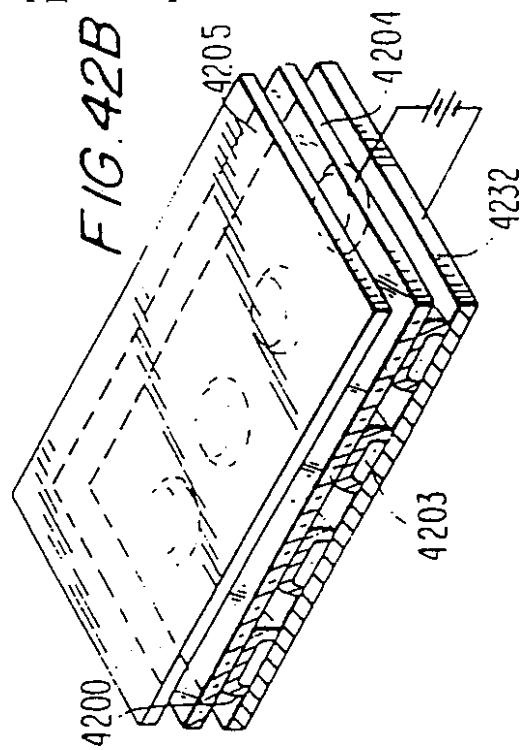
【図41】



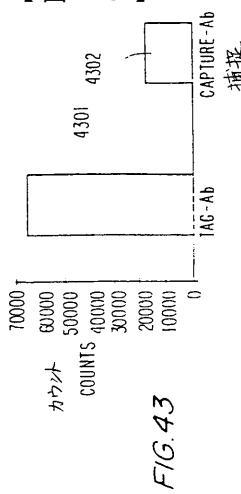
【図42A】



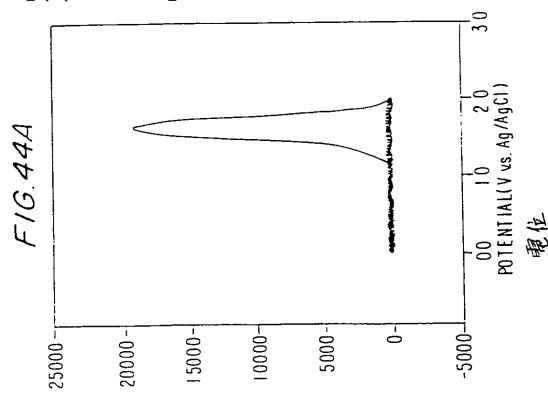
【図 4 2 B】



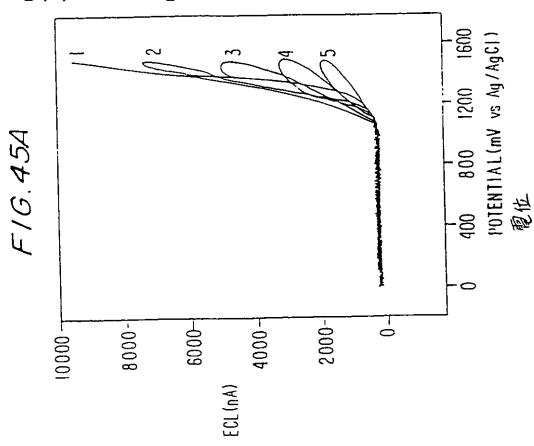
【図 4 3】



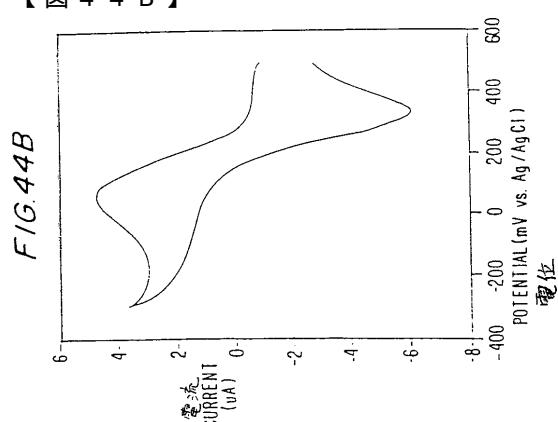
【図 4 4 A】



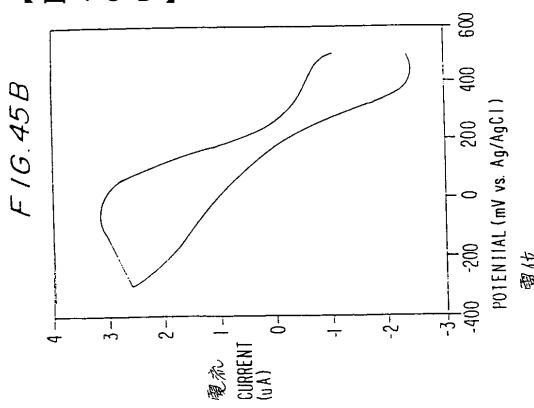
【図 4 5 A】



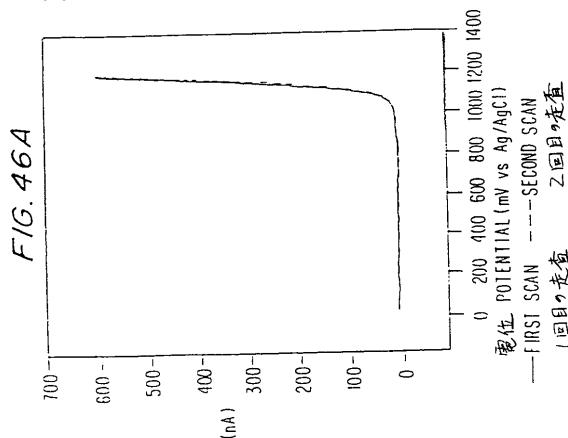
【図 4 4 B】



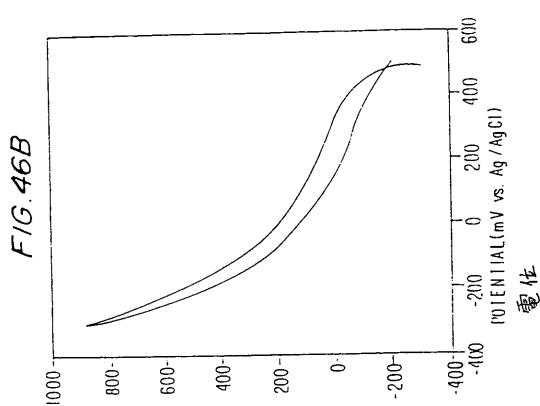
【図 4 5 B】



【図 4 6 A】

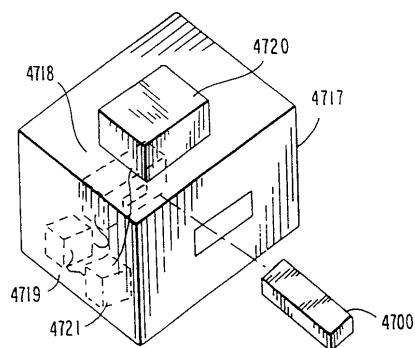


【図 4 6 B】

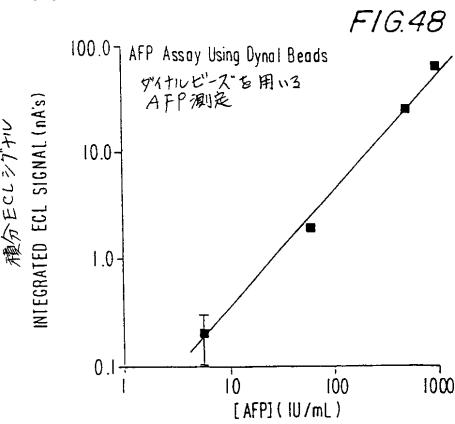


【図 4 7】

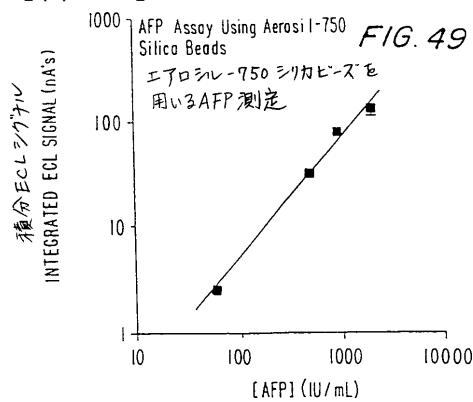
FIG. 47



【図 4 8】

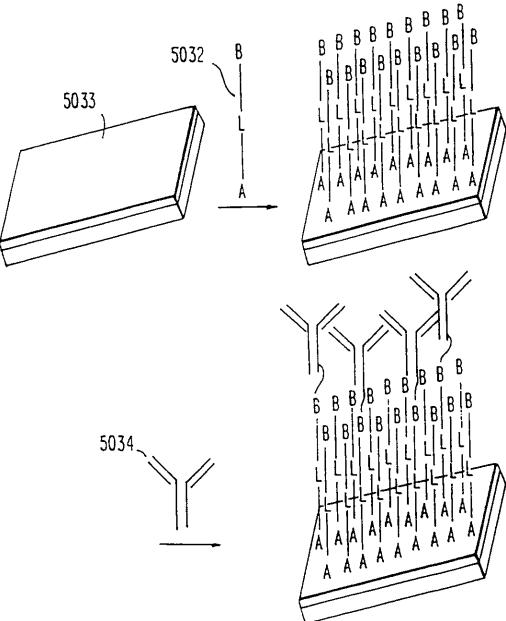


【図 4 9】



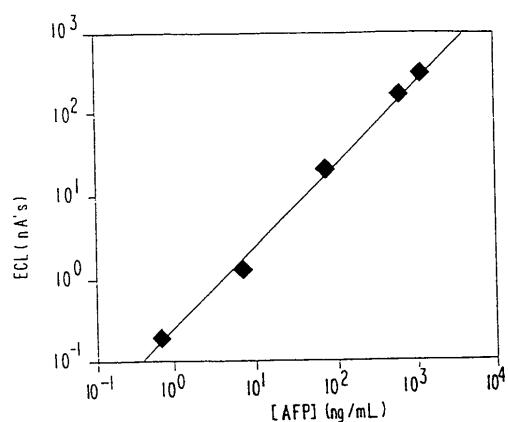
【図 5 0】

FIG. 50



【図 5 1】

FIG. 51



【図 5 2】

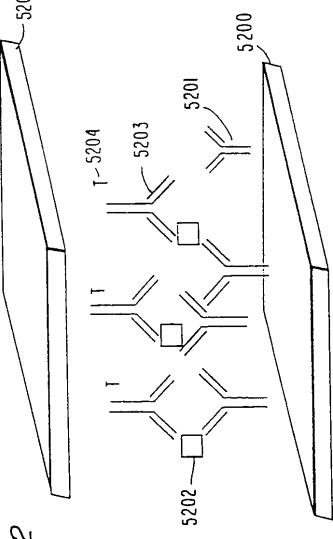
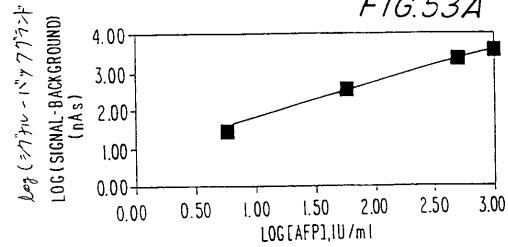


FIG. 52

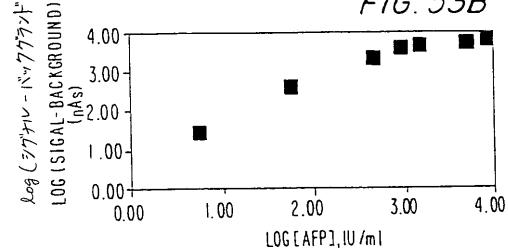
【図 5 3 A】

FIG. 53A



【図 5 3 B】

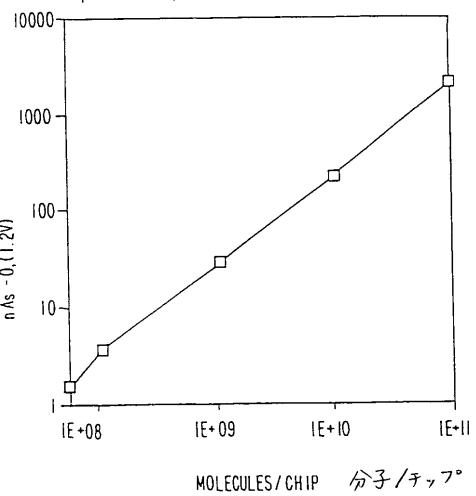
FIG. 53B



【図 5 4】

試料-標識物サンドイッチの  
SA-バイオオリゴ表面捕捉を用いる測定

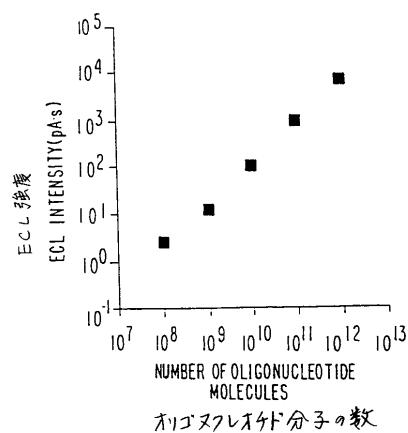
Assay with SA-bio oligo surface capture of sample-label sandwich FIG. 54



—□—SC3.1 IN SANDWICH  
サンドイッチ中のSC3.1

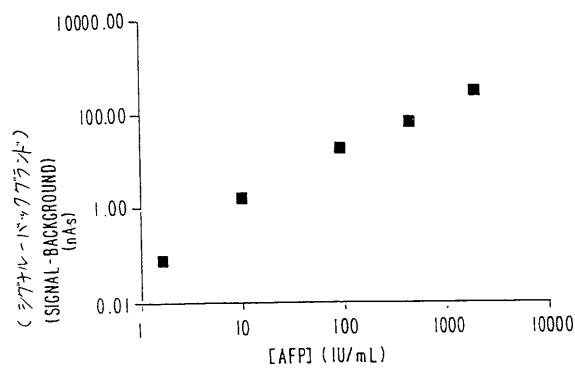
【図 5 5】

FIG. 55



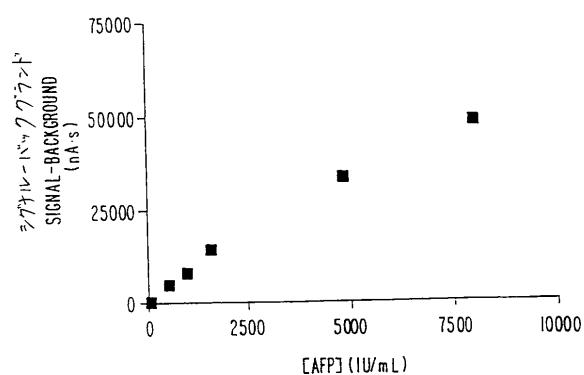
【図 5 6】

FIG. 56



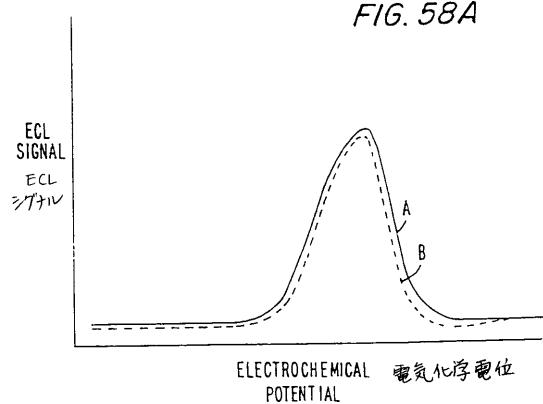
【図 5 7】

FIG. 57



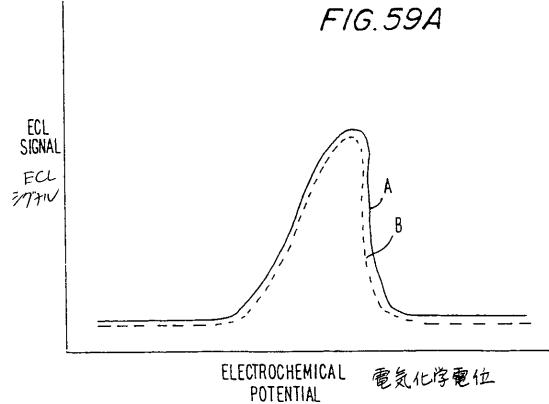
【図 5 8 A】

FIG. 58A



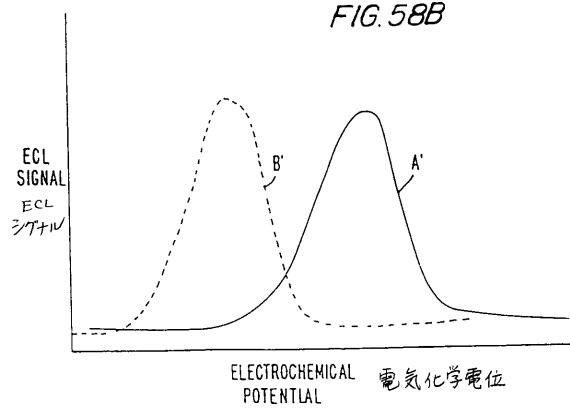
【図 5 9 A】

FIG. 59A



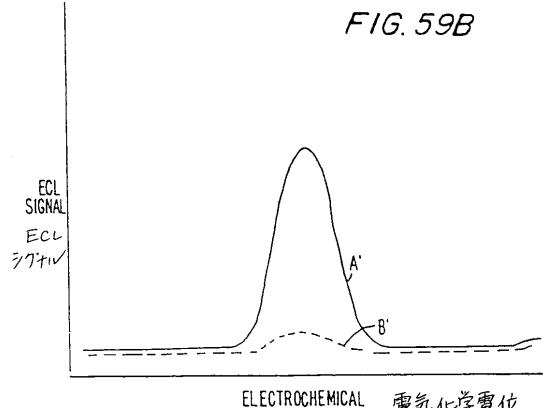
【図 5 8 B】

FIG. 58B



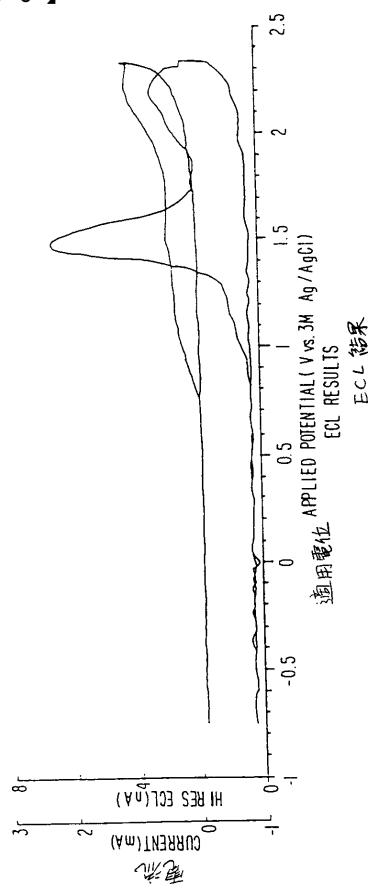
【図 5 9 B】

FIG. 59B



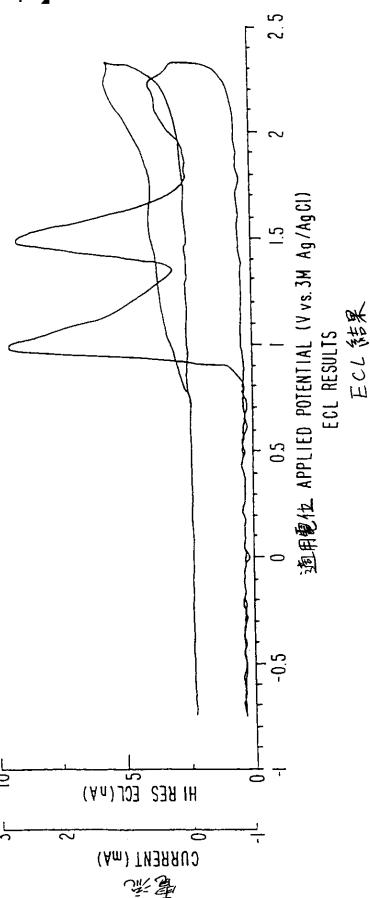
【図 6 0】

FIG. 60



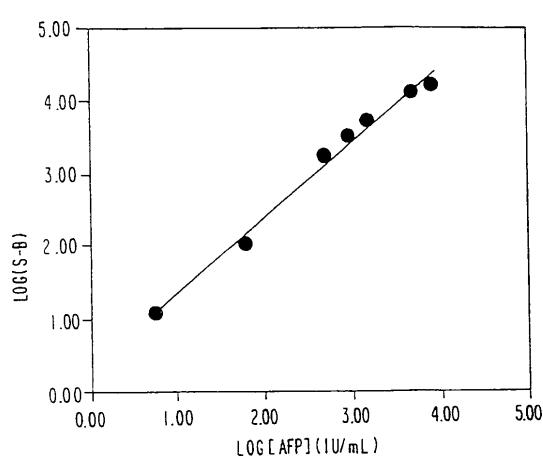
【図 6 1】

FIG. 61



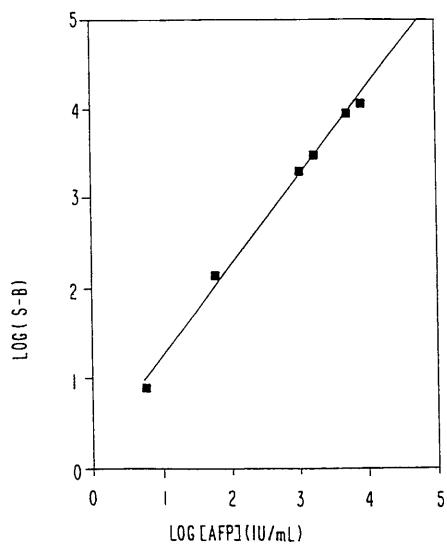
【図 6 2】

FIG. 62



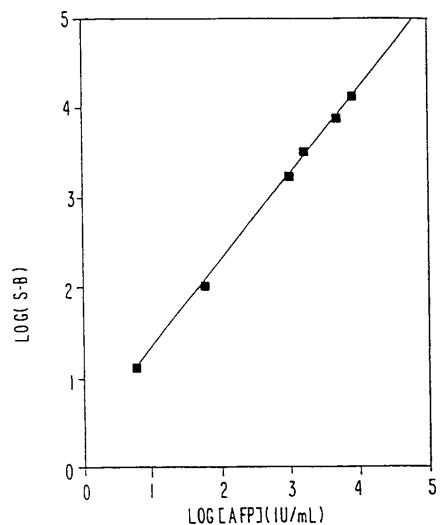
【図 6 3】

FIG. 63



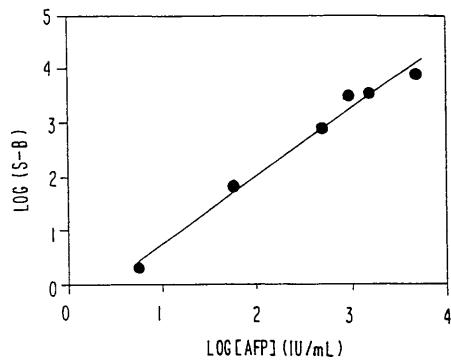
【図 6 4】

FIG.64



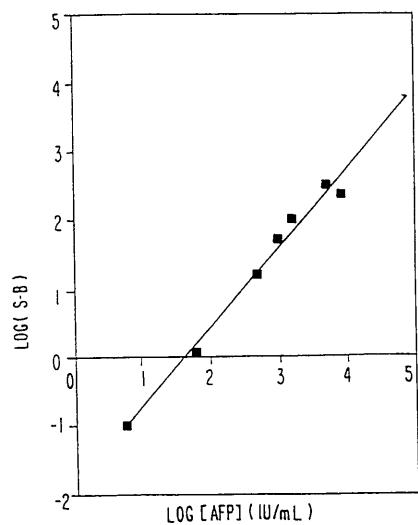
【図 6 5】

FIG.65



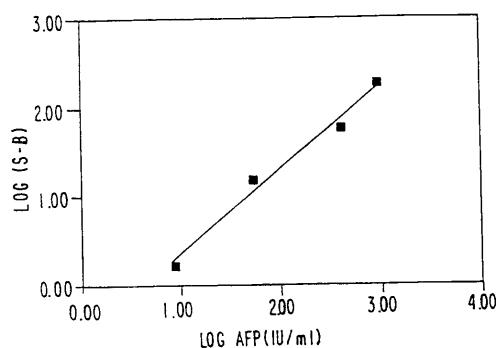
【図 6 6】

FIG.66



【図 6 7】

FIG.67



【図 6.8】

【図69】

FIG. 68

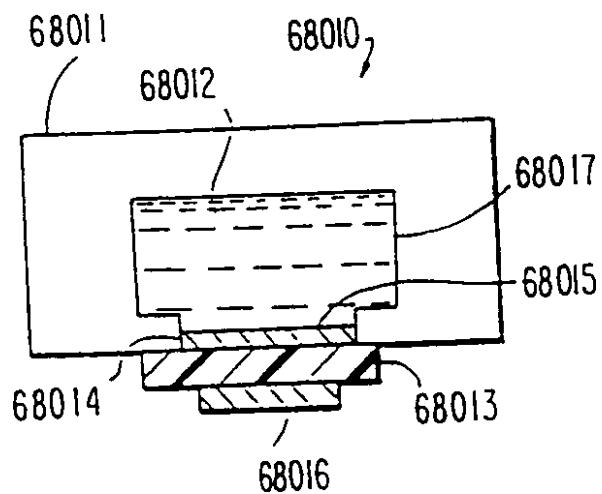
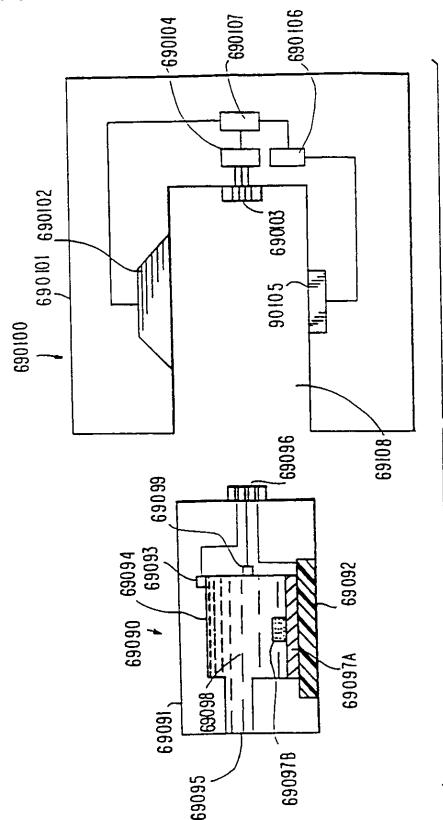


FIG. 69



## フロントページの続き

(51) Int.CI. F I  
**G 0 1 N 33/566 (2006.01)** G 0 1 N 33/566

- (72) 発明者 ヴォルシュタドター, ヤコブ, エヌ.  
 アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーランド州ロックビル, ゲイブル リッジテラス 9 9 0 5, ア  
 パートメント ディ
- (72) 発明者 ウィルバー, ジェームズ  
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 4 メリーランド州ジャーマンタウン, スピニングフィール ドライブ  
 1 3 6 3 6
- (72) 発明者 シガル, ジョージ  
 アメリカ合衆国 2 0 8 5 3 メリーランド州ロックビル, トレイルウェイ ドライブ 5 3 3 3
- (72) 発明者 マーチン, マーク  
 アメリカ合衆国 2 0 8 5 2 メリーランド州ロックビル, オールド ファーム コート 6 5 1 6
- (72) 発明者 グォ, リアン ホン  
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ガイザースバーグ, ウエスト サイド ドライブ 3  
 3 9, アパートメント 2 0 1
- (72) 発明者 フィスチャー, アラン  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ, アントリムストリート 8 0
- (72) 発明者 ルランド, ジョン  
 アメリカ合衆国 2 0 9 0 5 メリーランド州シルバー スプリング, アムバーレイ テラス 1 4  
 2 3 6
- (72) 発明者 ピラドー, マーク, エイ.  
 アメリカ合衆国 2 1 7 7 1 メリーランド州マウント エアリイ, ハイボロコート 4 6 0 5
- (72) 発明者 ヘルムズ, ラリー, アール.  
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 4 メリーランド州ジャーマンタウン, コッティッジ ガーデン ドライ  
 ブ 1 8 0 3 6, アパートメント 1 0 3
- (72) 発明者 ダーバリ, ラミン  
 アメリカ合衆国 0 2 1 5 4 マサチューセッツ州ウォルサム, スターンズ ヒル ロード 1 6 0  
 3

## 合議体

審判長 秋月 美紀子

審判官 竹中 靖典

審判官 郡山 順

- (56) 参考文献 特開平 5 - 1 8 9 7 1 (JP, A)  
 特開平 6 - 2 5 2 0 5 6 (JP, A)  
 特開平 5 - 5 0 3 7 2 3 (JP, A)  
 特開平 2 - 2 7 6 8 3 9 (JP, A)  
 国際公開第 9 6 / 1 8 0 5 (WO, A 1)

## (58) 調査した分野(Int.CI., DB名)

G01N33/48-98

G01N27/30, G01N27/46