



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102346187 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 08

(21) 申请号 201110209179. 8

(22) 申请日 2011. 07. 22

(30) 优先权数据

2010-166413 2010. 07. 23 JP

2011-151092 2011. 07. 07 JP

(71) 申请人 爱科来株式会社

地址 日本京都府

(72) 发明人 大沼直嗣 高木美佳子

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int. Cl.

G01N 33/566 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 18 页

(54) 发明名称

靶标的检测方法、背景的上升抑制方法和检测装置

(57) 摘要

提供精度优良的靶标的检测方法、背景上升抑制方法和检测装置。所述靶标的检测方法如下：使用固定于载体且可与靶标结合的第 1 靶标结合物、以及负载标记物且可与上述靶标结合的第 2 靶标结合物；并且，在第 1 容器中，使试样、所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物反应，形成所述试样中的所述靶标、所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物的复合体；接着，将所述复合体从所述第 1 容器移动到第 2 容器中，然后在所述第 2 容器中，通过检测所述标记物来检测所述复合体。

1. 一种靶标的检测方法,其特征在于,使用被固定于载体的第 1 靶标结合物和被标记物标记的第 2 靶标结合物,并且包括如下工序:

复合体形成工序,在第 1 容器中,使靶标、所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物反应,形成所述靶标、所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物的复合体;

复合体移动工序,将所述复合体从所述第 1 容器移动到第 2 容器中;和

复合体检测工序,在所述第 2 容器中,通过检测所述标记物来检测所述复合体。

2. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其中,所述复合体检测工序为如下工序:在所述第 2 容器中,使可检测所述标记物的检测试剂与所述复合体反应,通过检测所述反应来检测所述标记物。

3. 如权利要求 1 所述的检测方法,其包括,在所述复合体形成工序之后从所述第 1 容器中除去所述游离的第 2 靶标结合物的除去工序,

在所述除去工序之前和之后的至少一种情况下,实施所述复合体移动工序。

4. 根据权利要求 3 所述的检测方法,其中,所述除去工序包括清洗所述复合体的清洗工序。

5. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其中,所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物为选自由抗原、抗体和核酸组成的组中的至少一种。

6. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其中,所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物为抗体。

7. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其中,所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物为选自由生物素、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、蛋白质、肽、糖链、脂质、激素、配体和受体组成的组中的至少一种。

8. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其中,所述载体为选自由磁性粒子、乳胶粒子、金属胶粒、聚合物粒子和玻璃粒子组成的组中的至少一种。

9. 根据权利要求 2 所述的检测方法,其中,所述标记物为酶,所述检测试剂为所述酶的底物。

10. 一种靶标检测中的背景的上升抑制方法,其特征在于,使用被固定于载体的第 1 靶标结合物和被标记物标记的第 2 靶标结合物,并且包括如下工序:

复合体形成工序,在第 1 容器中,使靶标、所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物反应,形成所述靶标、所述第 1 靶标结合物和所述第 2 靶标结合物的复合体;

复合体移动工序,将所述复合体从所述第 1 容器移动到第 2 容器中;和

复合体检测工序,在所述第 2 容器中,通过检测所述标记物来检测所述复合体。

11. 根据权利要求 10 所述的背景的上升抑制方法,其中,所述复合体检测工序为如下工序:在所述第 2 容器中,使可检测所述标记物的检测试剂与所述复合体反应,通过检测所述反应来检测所述标记物。

12. 一种检测装置,其特征在于,用于权利要求 1 所述的靶标的检测方法,

具有第 1 容器、第 2 容器、移动单元和检测单元,

所述第 1 容器为权利要求 1 所述的所述第 1 容器,

所述第 2 容器为权利要求 1 所述的所述第 2 容器,

所述移动单元为用于将所述复合体从所述第 1 容器移动到所述第 2 容器中的单元,

所述检测单元为在所述复合体检测工序中检测所述标记物的单元。

靶标的检测方法、背景的上升抑制方法和检测装置

[0001] 本申请要求 2010 年 7 月 23 日提出的日本申请特愿 2010-166413 为基础的优先权，将其公开的所有内容援引于此。

技术领域

[0002] 本发明涉及靶标的检测方法、背景的上升抑制方法和检测装置。

背景技术

[0003] 以往，作为定性或定量地分析试样中的靶标的方法，广泛利用结合测定 (binding assay) 法。上述结合测定法，例如是使用可与靶标结合的 2 种结合物的方法。上述结合物，例如通常为靶标的抗体。该方法中，一种抗体固定于磁性粒子等载体（以下称为“固定抗体”），另一种抗体结合酶等标记物（以下称为“标记抗体”）。并且，在反应体系中，使上述靶标、上述固定抗体和上述标记抗体反应。由此，上述固定抗体和上述标记抗体分别与上述靶标结合，形成它们的复合体。但是，在上述反应体系中，含有未参与上述复合体的形成的未反应的游离的上述标记抗体。在此，通过 B (Bond) / F (Free) 分离，将上述反应体系中的、含有上述标记抗体的上述复合体和游离的上述未反应的上述标记抗体分离。由此，能够不受游离的上述未反应的上述标记抗体的影响地检测到上述复合体中的上述标记抗体的信号。由于上述复合体中的上述标记抗体的量与上述复合体中的上述靶标存在相关关系，因而能够由上述信号分析上述靶标（例如，日本特开平 8-29424 号公报）。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于，提供精度优良的靶标的检测方法、背景的上升抑制方法和检测装置。

[0005] 本发明的靶标的检测方法，其特征在于，使用被固定于载体的第 1 靶标结合物和被标记物标记的第 2 靶标结合物，并且包括如下工序：复合体形成工序，在第 1 容器中，使靶标、上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物反应，形成上述靶标、上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物的复合体；复合体移动工序，将上述复合体从上述第 1 容器移动到第 2 容器中；和复合体检测工序，在上述第 2 容器中，通过检测上述标记物来检测上述复合体。

[0006] 本发明的靶标的检测中的背景的上升抑制方法，其特征在于，使用被固定于载体的第 1 靶标结合物和被标记物标记的第 2 靶标结合物，并且包括如下工序：复合体形成工序，在第 1 容器中，使靶标、上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物反应，形成上述靶标、上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物的复合体；复合体移动工序，将上述复合体从上述第 1 容器移动到第 2 容器中；和复合体检测工序，在上述第 2 容器中，通过检测上述标记物来检测上述复合体。

[0007] 本发明的检测装置，其特征在于，用于上述本发明的靶标的检测方法，具有第 1 容器、第 2 容器、移动单元和检测单元，上述第 1 容器为上述本发明的靶标的检测方法中的上述第 1 容器，上述第 2 容器为上述本发明的靶标的检测方法中的上述第 2 容器，上述移动单

元为将上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中的单元,上述检测单元为在上述复合体检测工序中检测上述标记物的单元。

[0008] 在前述现有的上述结合测定法中,被标记的上述结合物与上述靶标以外的物质非特异性结合时,产生起因于上述非特异性结合的信号。因此,例如,背景上升,分析精度降低。因此,抑制起因于上述非特异性结合的信号的产生,是在分析精度方面重要的课题。这样的问题,认为其原因在于,例如上述标记抗体对上述磁性粒子等上述载体的非特异性结合。在此,为了抑制对上述载体的非特异性结合,在上述结合测定法中,例如尝试了将上述载体的表面用牛血清清蛋白、酪蛋白和明胶等封闭剂(blocking agent)进行处理的方法、向上述反应体系中添加表面活性剂、使用除去了 Fc 区的抗体等。但是,即使通过这些方法,仍然存在由于未反应的上述标记抗体的影响而得不到充分的分析精度的问题。近年来,从要求更高精度的观点出发,也期望确立抑制未反应的上述标记抗体的影响、更进一步提高分析精度的方法。另外,该问题不受抗体限制,对于可与靶标结合的其他结合物而言,也同样存在结合测定法中的问题。

[0009] 本发明人等经过深入研究,结果查明了:标记后的上述结合物中未参与上述复合体形成的未反应的上述标记结合物,非特异性地吸附于容器,由此上述分析精度降低。即,非特异性地吸附于上述容器的上述未反应的标记结合物,与上述复合体中的上述标记结合物同样被检测到,因此背景上升,分析精度降低。因此发现,如果从上述复合体的形成中使用的容器将形成的上述复合体转移至其他的容器中,并在上述其他的容器中检测上述标记结合物,则不受非特异性地吸附于上述复合体形成中使用的上述容器的上述标记结合物的影响。因此,根据本发明,例如,能够抑制起因于未参与上述复合体形成、且吸附于上述容器的上述标记结合物的信号的产生,从而能够抑制背景的上升。因此,根据本发明,例如,能够通过检测上述标记结合物而高精度地检测上述靶标。本发明的方法,在例如医学和生化学等的研究、临床医疗、食品和环境等的检查中非常有用。

具体实施方式

[0010] < 靶标的检测方法 >

[0011] 如上所述,本发明的检测方法,其特征在于,使用被固定于载体的第 1 靶标结合物和被标记物标记的第 2 靶标结合物,并且包括如下工序:复合体形成工序,在第 1 容器中,使靶标、上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物反应,形成上述靶标、上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物的复合体;复合体移动工序,将上述复合体从上述第 1 容器移动到第 2 容器中;和复合体检测工序,在上述第 2 容器中,通过检测上述标记物来检测上述复合体。

[0012] 以下,将上述被固定于载体的上述第 1 靶标结合物称为第 1 固定物,将上述被标记物标记的上述第 2 靶标结合物称为第 2 标记物。

[0013] 本发明中,也将未参与上述复合体的形成的上述第 2 靶标结合物称为“未反应的第 2 靶标结合物”。将未吸附于上述第 1 容器的上述未反应的第 2 靶标结合物称为“游离的第 2 靶标结合物”,将吸附于上述第 1 容器的上述未反应的第 2 靶标结合物称为“吸附的第 2 靶标结合物”。

[0014] 本发明的靶标的检测方法,其特征在于,将在上述第 1 容器中形成的上述复合体

移动到新的上述第 2 容器中,并在上述第 2 容器中检测上述标记物,对于其他工序没有任何限制。

[0015] 在本发明的检测方法中,上述复合体检测工序,例如优选为如下工序:在上述第 2 容器中,使可检测上述标记物的检测试剂与上述复合体反应,通过检测上述反应来检测上述标记物。

[0016] 上述第 1 容器和上述第 2 容器的形状没有特别的限制。上述各容器,例如,只要在上复合体形成工序和上述复合体检测工序中分别可以使各成分共存即可。上述容器,例如,可以为管状的容器,也可以为在基板上形成的腔(室)。上述管状的容器,例如,可以是有底的容器,也可以是无底的容器。上述有底管状的容器,可以列举例如:微管、试管、比色皿、取样杯等。上述无底管状的容器,可以列举例如微量移液管用尖管等。上述腔,可以列举例如在基板上形成的凹部,具体而言,可以列举例如:孔板的孔、在微型全分析系统(μ TAS)、微型芯片等的设备上形成的腔等。上述设备中,上述腔,例如,可以与流路连接,也可以是上述流路的一部分。

[0017] 上述容器的材质没有特别的限制。上述材质,可以列举例如:无机聚合物和有机聚合物等聚合物材料。上述无机聚合物,可以列举例如:合成石英玻璃、熔融氧化硅、硼硅酸玻璃等。上述有机聚合物,可以列举例如:聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、聚四氟乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、环烯烃聚合物、聚碳酸酯、聚二甲基硅氧烷、聚乳酸、聚醚醚酮、聚对苯二甲酸乙二醇酯等。

[0018] 上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物,只要分别可与上述靶标结合即可,没有特别的限制。上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物,可以列举例如抗体、抗原和核酸等,优选为抗体。上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物的种类,例如,可以相同,也可以不同。上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物,例如,优选与上述靶标的不同部位结合,上述两者为抗体时,例如,分别优选以上述靶标的不同部位作为表位(epitope)。

[0019] 上述抗体,只要可与上述靶标结合即可,没有特别的限制。上述抗体的种类没有特别的限制,可以列举例如:IgG、IgA、IgM、IgD、IgE 和 IgY 等免疫球蛋白分子、以及它们的 Fab、Fab'、F(ab')₂、重链可变区域(V_H)、轻链可变区域(V_L)等抗体片段等。上述抗体,可以是来源于例如人、以及小鼠、兔子、牛、猪、马、绵羊和山羊等非人哺乳类,鸡等鸟类等动物种的抗体。上述抗体,例如,可以由来源于上述动物种的血清通过现有公知的方法制作,也可以使用市售的抗体。上述抗体,例如,可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体。以下,本发明中的“抗体”,若无特殊说明,则也包括抗体片段的含义。

[0020] 上述抗原,只要可与上述靶标结合即可,没有特别的限制。上述第 1 靶标结合物为抗原时,上述靶标可以列举例如上述抗原的抗体和抗体片段等。

[0021] 上述核酸,只要可与上述靶标结合,则没有特别的限制。上述核酸的种类没有特别的限制,可以列举例如 DNA 和 RNA 等。

[0022] 如上所述,上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物,只要可与上述靶标结合,则其组合没有任何限制。以下示出组合的具体例子,但本发明不限于这些例子。上述靶标为抗原时,例如,上述两个结合物分别为上述靶标(抗原)的抗体,上述靶标为抗体时,上述两个结合物中的一个为上述靶标(抗体)所结合的抗原,另一个为可与上述靶标(抗体)结合的抗体。另外,上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物,例如,两者为上述核酸,并

且一个为上述核酸,另一个为上述靶标的抗原或抗体。

[0023] 上述第 1 靶标结合物,如上所述只要可与上述靶标结合即可,此外可列举例如选自由生物素、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、蛋白质、肽、糖链、脂质、激素、配体和受体组成的组中的至少一种。例如,上述靶标为生物素时,上述第 1 靶标结合物为抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素,上述靶标为抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素时,上述第 1 靶标结合物为生物素。

[0024] 固定上述第 1 靶标结合物的上述载体,没有特别的限制,例如,只要可固定上述第 1 靶标结合物即可。上述载体,可以列举例如不溶于液体的反应体系、且可回收的载体。具体而言,可以列举例如:粒子、海绵、网状结构物、膜等。上述粒子,可以列举例如:磁性粒子、乳胶粒子、金胶粒和铂胶粒等金属胶粒、聚甲基丙烯酸甲酯粒子和聚乳酸粒子等聚合物粒子、玻璃粒子、氧化铝粒子、硅胶粒子、活性炭等。上述粒子的平均粒径没有特别的限制,例如,可以根据粒子的种类等适当设定。上述载体,除了上述的粒子等之外,还可以列举例如 DNA、链状聚合物、树枝状聚合物等。

[0025] 在上述载体上固定上述第 1 靶标结合物的方法没有特别的限制,可以采用现有公知的方法。上述第 1 靶标结合物,例如,可以直接地固定在上述载体上,也可以间接地固定在上述载体上。在后一情况下,将上述载体与上述第 1 靶标结合物结合的连接子,可以列举例如抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、生物素、戊二醛和清蛋白等。具体而言,例如可以通过抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、和生物素而固定到上述载体上。此时,例如,可以使上述抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素结合在上述载体上,并使上述生物素结合在上述第 1 靶标结合物上。通过上述抗生物素蛋白或抗生蛋白链素与上述生物素的结合,能够将上述第 1 靶标结合物固定在上述载体上。

[0026] 标记上述第 2 靶标结合物的上述标记物,没有特别的限制。上述标记物,例如,可是是单独检测的物质,也可以是可通过与上述检测试剂反应而进行检测的物质。上述标记物,可以列举例如:酶、吖啶酯、鲁米诺等化学发光物质、异硫氰酸荧光素酯 (FITC) 等荧光物质、DNA 等。上述酶没有特别的限定,可以列举例如:碱性磷酸酶、过氧化物酶、 β -D- 牛乳糖苷酶等。

[0027] 利用上述标记物标记上述第 2 靶标结合物的方法,例如可以采用现有公知的方法,没有特别的限制。

[0028] 本发明的目的在于,抑制未参与上述复合体的形成、且吸附于上述容器的未反应的上述第 2 标记物的影响,上述靶标没有特别的限制。作为上述靶标,可以例示例如:病原体、生体成分、环境激素、食品中的致敏物质、农药等。作为具体例子,可以列举例如:A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、腺病毒、RS 病毒、冠状病毒、星状病毒、诺如病毒、麻疹病毒、轮状病毒、人免疫缺陷病毒 (HIV)、人 T 细胞白血病病毒 (HTLV-1)、B 型肝炎病毒 (HBV)、C 型肝炎病毒 (HCV)、疱疹病毒、支原体、苍白密螺旋体、沙眼衣原体、结核菌、大肠菌群、A 族溶血性链球菌、B 族溶血性链球菌、肺炎球菌、葡萄球菌、MRSA、军团菌、肠出血性大肠菌 O157、Vero 细胞毒素、沙门氏菌、艰难梭菌和幽门螺杆菌等病原体抗原,CRP、HBs、HBc、HBe、前列腺特异抗原 (PSA)、肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌红蛋白、D- 二聚体、便中血红蛋白、血红蛋白 A1c 和 IgE 抗体等诊断标志物,人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 和 黄体形成激素 (LH)、胰岛素、C- 肽等激素,甲状腺素、氢化可的松、雌二醇等类固醇激素,双酚 A、壬基苯酚

和 4-辛基苯酚等环境激素,小麦、荞麦、花生、鸡蛋、虾、蟹和乳等中所含的过敏原、核酸等。

[0029] 适合本发明的靶标的检测方法的试样,没有特别的限制。上述试样的具体例子,可以列举全血、血清、血浆、汗、尿、鼻腔吸引液、鼻腔清洗液、鼻拭子、鼻涕、咽拭子、含漱液、唾液、细胞和粪便等生体试样,海、湖沼和河川等的水、土壤以及食品等。上述试样,例如,可以是使用了溶剂的、它们的提取物、溶解物、分散物和悬浮物等。上述溶剂没有特别的限制,可以列举例如水、生理盐水和缓冲液等。上述缓冲液没有特别的限制,可以列举例如 Tris 缓冲液(三羟甲基氨基甲烷缓冲液)、磷酸缓冲液、醋酸缓冲液和硼酸缓冲液等。上述溶剂,例如可以进一步含有表面活性剂、稳定剂和抑菌剂等。

[0030] 下面,具体说明本发明的检测方法的实施方式。但是,本发明的检测方法不受以下实施方式的限制。

[0031] (实施方式 1)

[0032] 本实施方式的检测方法,包括上述复合体形成工序、上述复合体移动工序和上述复合体检测工序。

[0033] 上述复合体形成工序,首先,在上述第 1 容器中,使上述试样、上述第 1 固定物和上述第 2 标记物反应,形成上述靶标、上述第 1 固定物和上述第 2 标记物的复合体。形成上述复合体的反应体系,例如优选液体的反应体系(反应液)。

[0034] 在上述复合体形成工序中,上述试样、上述第 1 固定物和上述第 2 标记物,例如只要最终在上述第 1 容器中共存即可。上述第 1 固定物和上述第 2 标记物,例如可以在使用时添加到上述第 1 容器中。此时,上述第 1 固定物、上述第 2 标记物和上述试样的添加顺序没有特别的限制。具体而言,例如,可以分别单独地添加,也可以同时添加任意 2 种,还可以同时添加 3 种。上述第 1 固定物和上述第 2 标记物中的任意一个或两个,例如,可以预先配置在上述第 1 容器内。

[0035] 在将上述第 1 固定物和上述第 2 标记物添加到上述第 1 容器中时,例如,可以分别与溶剂混合后添加。上述溶剂没有特别的限制,例如可以列举上述的溶剂。

[0036] 上述复合体的形成条件没有特别的限制。作为具体例子,例如,优选将上述试样、上述第 1 固定物和上述第 2 标记物在温度 2 ~ 60°C、时间 1 ~ 60 分钟的条件下游育,更优选在温度 20 ~ 40°C、时间 5 ~ 15 分钟的条件下游育。

[0037] 接着,上述复合体移动工序,将上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中。如上所述,本发明人等发现,使上述试样、上述第 1 固定物和上述第 2 标记物反应的容器非特异性地吸附上述第 2 标记物,因此分析精度降低。因此,通过如上地将上述复合体从实施上述复合体形成工序的上述第 1 容器转移到新的上述第 2 容器中,能够避免上述第 2 标记物向上述第 1 容器的非特异性吸附对分析精度的影响。

[0038] 上述移动方法没有特别的限制,可以根据上述载体的种类适当确定。例如,可以通过将上述复合体从上述第 1 容器吸引并排出到上述第 2 容器中而使其移动。另外,上述载体为磁性粒子时,例如,可以使用磁铁等具有磁力的磁性体使其移动,在上述载体为 DNA 时,例如,可以通过电泳使其移动。上述移动,例如,可以使用后述的移动单元。

[0039] 然后,上述复合体检测工序,在上述第 2 容器中检测上述标记物。通过检测上述标记物,能够检测上述复合体,结果能够检测参与了上述复合体的形成的上述靶标。

[0040] 上述标记物的检测,例如,可以适当采用与上述标记物对应的方法。

[0041] 上述标记物为可单独检测的物质时,例如,检测上述标记物的信号。具体而言,例如,可以将上述标记物的发色和荧光等以信号的形式检测出来。上述信号,例如,其强度可以以透过率、吸光度、反射率、发光强度、荧光强度等的形式测定。上述检测条件没有特别的限制,例如,可以根据上述标记物的种类等进行设定。上述标记物为上述荧光物质时,例如,可以对含有上述复合体的反应体系照射紫外线,将其激发光以信号的形式检测出来。上述标记物的检测,例如,可以在上述第 2 容器中进行,也可以在将含有上述复合体的反应体系从上述第 2 容器转移到新的测定容器中后进行检测。上述检测,例如,可以使用后述的检测单元。

[0042] 上述标记物为可通过与检测试剂的反应进行检测的物质时,例如,使可检测上述标记物的检测试剂与上述复合体反应,并检测上述检测试剂的反应。

[0043] 上述反应,具体而言是上述检测试剂与上述复合体中的上述第 2 标记物的反应。通过检测该反应,能够检测上述复合体,结果能够检测参与了上述复合体的形成的上述靶标。

[0044] 上述反应的检测方法没有特别的限制,例如,可以适当采用与上述标记物对应的方法。上述标记物为酶时,例如,检测通过上述酶与上述检测试剂的反应而生成的生成物质的信号、或者由于上述酶与上述检测试剂的反应而消失的上述检测试剂的信号。具体而言,例如,可以将上述生成物质的发色和荧光等以信号形式检测出来,或者可以将由于上述反应而消失的上述检测试剂的发色和荧光以信号的形式检测出来。上述信号的强度,例如,可以以透过率、吸光度、反射率、荧光强度等形式测定。上述检测条件没有特别的限制,例如,可以根据上述酶和上述检测试剂的种类等进行设定。上述标记物为上述化学发光物质时,例如,检测上述化学发光物质的信号。具体而言,例如,可以将上述生成物质的发光和荧光等以信号的形式检测出来。上述信号,例如,其强度可以以发光强度、荧光强度等形式测定。上述标记物为 DNA 时,例如,检测通过上述 DNA 与上述检测试剂的反应而生成的生成物质的信号。具体而言,例如,可以将上述生成物质的发光和荧光等以信号的形式检测出来。上述信号,例如,其强度可以以发光强度、荧光强度等形式测定。

[0045] 上述检测试剂的的反应的检测,例如,可以在上述第 2 容器中进行,也可以在将上述反应的反应体系从上述第 2 容器转移到新的测定容器中后进行检测。上述检测,例如,可以使用后述的检测单元。

[0046] 上述检测试剂,例如,只要可检测上述标记物即可,可以根据上述标记物适当设定。上述检测试剂没有特别的限制,可以列举通过上述反应而生成产生信号的生成物质的底物、或者由于上述反应而信号消失的底物等。上述标记物为上述酶时,上述检测试剂例如可以根据上述酶的种类适当设定,作为具体例子,可以列举例如:4-甲基伞形酮磷酸酯(4-MUP)、5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯(BCIP)、2,2-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、二氨基联苯胺(DAB)、4-甲基伞形酮- β -D-半乳糖苷(4-MUG)、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''- β -D-半乳吡喃糖基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMGPD)等。上述标记物为上述化学发光物质时,上述检测试剂,例如可以根据上述化学发光物质的种类适当设定,作为具体例子,例如可以列举过氧化氢等。上述标记物为 DNA 时,上述检测试剂,可以列举例如 3,4,5-三甲氧基苯甲酰甲醛(TMPG)等。

[0047] 在上述复合体检测工序中,上述检测试剂的上述反应例如通过使上述复合体和上述检测试剂最终在上述第 2 容器中共存地进行。上述检测试剂,例如,可以在使用时添加到上述第 2 容器中,也可以预先配置在上述第 2 容器内。前一个情况下,上述复合体和上述检测试剂的添加顺序没有特别的限制。具体而言,例如,可以分别单独添加,也可以同时添加两者。

[0048] 上述检测试剂的反应条件没有特别的限制,例如,可以根据上述标记物的种类适当设定。上述标记物为上述酶时,例如优选在温度 2 ~ 60℃、时间 1 ~ 60 分钟的条件下游育上述复合体和上述检测试剂,更优选在温度 20 ~ 40℃、时间 5 ~ 15 分钟的条件下游育。

[0049] (实施方式 2)

[0050] 本实施方式的检测方法,除了上述复合体形成工序、上述复合体移动工序和上述复合体检测工序之外,还包括除去工序。具体而言,是在上述复合体形成工序之后包括上述除去工序,且在上述除去工序后实施上述复合体移动工序的方式。本实施方式如果没有特殊说明,则与上述实施方式 1 同样进行。

[0051] 本实施方式中,与上述实施方式 1 同样,在上述第 1 容器中形成上述复合体后,将上述游离第 2 标记物从上述第 1 容器除去。上述游离第 2 标记物,例如,如上所述,是指未参与上述复合体的形成、且未吸附于上述第 1 容器的上述第 2 标记物。

[0052] 上述游离的第 2 标记物,例如,可以将上述游离第 2 标记物与上述复合体分离而从上述第 1 容器除去。上述游离第 2 标记物的分离方法和除去方法没有特别的限制,例如,可以根据使用的载体的种类等采用现有公知的方法。上述载体为磁性粒子时,例如,可以在捕捉上述复合体的状态下除去含有上述游离第 2 标记物的反应体系的液体成分。具体而言,例如,可以使用磁铁等上述磁性体捕捉上述复合体,并使用吸排单元除去上述液体成分。使用上述磁性体时,例如,通过使上述磁性体接近上述容器的外壁,能够隔着上述外壁捕捉上述复合体,通过将上述磁性体远离上述外壁,能够释放隔着上述外壁捕捉的上述复合体。捕捉上述复合体时,优选使上述磁性体与上述容器的外壁接触。上述载体为乳胶粒子、金属胶粒、聚合物粒子和玻璃粒子时,例如,可以使上述复合体沉降,从而将含有上述游离第 2 标记物的反应体系的液体成分(上清)除去。具体而言,例如,可以通过离心等使上述复合体沉降,并使用上述吸排单元除去上述液体成分。在后面叙述上述吸排单元。这样,例如,通过除去上述液体成分,能够除去上述液体成分内存在的、未反应的上述游离第 2 标记物。

[0053] 然后,在上述除去工序后,与上述实施方式 1 同样地进行上述复合体移动工序和上述复合体检测工序。例如,可以在上述除去工序中除去上述液体成分后,向上述第 1 容器中添加溶剂,将上述溶剂和捕捉的上述复合体混合,并将该混合液移动到上述第 2 容器中。

[0054] 另外,上述载体为磁性粒子时,例如,通过磁铁等上述磁性体捕捉上述复合体,并通过使上述磁性体移动,能够将上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中。此时,上述第 1 容器和上述第 2 容器例如优选通过流路连通。这样的设备可以例示上述的 μ TAS 等。上述设备,例如,将上述磁性体配置在上述设备的外侧,通过使上述磁性体接近上述第 1 容器的外壁来捕捉上述复合体,进而将上述磁性体从上述第 1 容器的外壁经上述流路的外壁移动到上述第 2 容器的外壁。由此,能够将上述复合体从上述第 1 容器通过上述流路移动到上述第 2 容器中。

[0055] 另外,在上述载体为 DNA 时,例如,可以通过电泳移动上述复合体。此时,上述第 1

容器和上述第 2 容器,例如优选通过上述流路连通,更优选上述流路内的、在流动方向远离的 2 处区域为上述第 1 容器(第 1 室)和上述第 2 容器(第 2 室)。这样的设备可以例示上述的 μ TAS 等。上述设备,例如,在上述第 1 容器和上述第 2 容器之间外加电压,通过电泳能够移动上述复合体。

[0056] (实施方式 3)

[0057] 上述实施方式 2 的上述除去工序,例如,可以在上述复合体移动工序之后、上述复合体检测工序之前进行。本实施方式的检测方法包括上述复合体形成工序、上述复合体移动工序、上述除去工序和上述复合体检测工序,是在上述复合体移动工序之后包括上述除去工序,且在上述除去工序后实施上述复合体检测工序的方式。本实施方式如果没有特别说明,则与上述实施方式 1 和 2 同样地进行。

[0058] 本实施方式中,与上述实施方式 1 同样,在上述第 1 容器中形成上述复合体,并使上述复合体移动到上述第 2 容器中。然后,与上述实施方式 2 同样,将上述复合体与未参与上述复合体的形成的上述游离第 2 标记物分离,并将上述游离第 2 标记物从上述第 2 容器除去。然后,在上述除去工序后与上述实施方式 1 同样地进行上述复合体检测工序。

[0059] (实施方式 4)

[0060] 本实施方式的检测方法包括上述复合体形成工序、上述除去工序、上述复合体移动工序和上述复合体检测工序,上述除去工序还包括清洗上述复合体的清洗工序。本实施方式如果没有特别说明,则与上述实施方式 2 和 3 同样地进行。

[0061] 在本实施方式中,上述除去工序可以在上述复合体形成工序之后、上述复合体移动工序之前进行,也可以在上述复合体移动工序之后、上述复合体检测工序之前进行。另外,可以在上述复合体形成工序之后且上述复合体移动工序之前、以及上述复合体移动工序之后且上述复合体检测工序之前这两种情况下,进行上述除去工序。

[0062] 本实施方式中,首先,与上述实施方式 2 同样,在上述第 1 容器中形成上述复合体后,在捕捉上述复合体的状态下,除去含有上述游离的第 2 标记物的反应体系的液体成分。

[0063] 然后,清洗上述复合体。上述清洗方法没有特别的限制,例如,可以根据使用的载体的种类等采用现有公知的方法。上述复合体的清洗例如可以在上述第 1 容器内进行。具体而言,例如,释放上述复合体的捕捉,并在上述第 1 容器内利用清洗液清洗上述复合体。此时,例如,可以在释放上述复合体的捕捉之前向上述第 1 容器内添加上述清洗液,也可以在释放上述复合体的捕捉之后向上述第 1 容器内添加上述清洗液。另外,可以在在保持捕捉上述复合体的状态下,在上述第 1 容器内清洗上述复合体。然后,例如与上述同样,在捕捉上述复合体的状态下除去上述第 1 容器内的上述清洗液。由此,例如,能够除去与上述复合体非特异性结合的上述游离第 2 标记物,从而能进行精度更优良的分析。

[0064] 上述清洗工序,例如,可以进行 1 次,也可以反复进行多次。

[0065] 上述清洗液没有特别的限制,可以列举例如水、生理盐水和缓冲液等。上述缓冲液,可以列举例如上述的缓冲液。上述清洗液,可以添加例如表面活性剂、稳定剂、抑菌剂等。

[0066] 然后,在上述除去工序后与上述实施方式 2 同样地进行上述复合体移动工序和上述复合体检测工序。

[0067] 另外,本实施方式中,与上述实施方式 3 同样地进行上述复合体形成工序、上述复

合体移动工序、上述除去工序和上述复合体检测工序,在上述除去工序中,如上所述,可以进行清洗工序。此时,上述复合体的清洗例如可以在上述第 2 容器内进行。

[0068] < 背景的上升抑制方法 >

[0069] 本发明的靶标的检测中的背景的上升抑制方法,如上所述,其特征在于,使用被固定于载体的第 1 靶标结合物和被标记物标记的第 2 靶标结合物,并且包括如下工序:复合体形成工序,在第 1 容器中,使靶标、上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物反应,形成上述靶标、上述第 1 靶标结合物和上述第 2 靶标结合物的复合体;复合体移动工序,将上述复合体从上述第 1 容器移动到第 2 容器中;和复合体检测工序,在上述第 2 容器中,通过检测上述标记物来检测上述复合体。

[0070] 本发明中,上述背景,例如,是指附加在上述复合体中的上述第 2 标记物上的上述标记物以外的因素、例如未参与上述复合体形成的未反应的上述游离第 2 标记物中的由上述标记物引起的检测值。因此,在本发明中,背景的上升抑制,例如,是指抑制上述因素的检测、抑制或降低由上述因素引起的检测值的上升。

[0071] 本发明的背景上升抑制方法,例如,与上述本发明的检测方法相同,具体而言,例如,各工序和其条件等全都与上述本发明的检测方法相同。

[0072] 本发明的背景的上升抑制方法中,上述复合体检测工序优选为如下工序:在上述第 2 容器中,使可检测上述标记物的检测试剂与上述复合体反应,通过检测上述反应来检测上述标记物。

[0073] < 检测装置 >

[0074] 本发明的检测装置,如上所述,其特征在于,用于上述本发明的靶标的检测方法,具有第 1 容器、第 2 容器、移动单元和检测单元,上述第 1 容器为上述本发明的靶标的检测方法中的上述第 1 容器,上述第 2 容器为上述本发明的靶标的检测方法中的上述第 2 容器,上述移动单元为将上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中的单元,上述检测单元为在上述复合体检测工序中检测上述标记物的单元。本发明的检测装置中,上述检测单元优选为在上述复合体检测工序中检测上述检测试剂的上述反应的单元。

[0075] 本发明的检测装置,其特征在于,具有上述第 1 容器、上述第 2 容器、上述移动单元和上述检测单元,并用于上述本发明的检测方法,其他构成没有任何限制。

[0076] 上述第 1 容器和上述第 2 容器,例如,与上述本发明的检测方法中所述的上述第 1 容器和上述第 2 容器相同。

[0077] 本发明的检测装置中,上述第 1 容器和上述第 2 容器,例如,可以是预先安装在上述检测装置上的构成部件,也可以是能在使用时安装且在使用后拆卸的可拆卸的构成部件。

[0078] 上述移动单元没有特别的限制,例如,只要是能将上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中的单元即可。上述移动单元,例如,可以是吸排单元和移动控制单元。

[0079] 上述吸排单元,例如,只要是能将上述复合体从上述第 1 容器内吸引并排出到上述第 2 容器内的单元即可。上述吸排单元,例如,优选为具备可以减压和加压的压力控制单元和管状部件,且上述压力控制单元与上述管状部件连接的单元。上述压力控制单元,可以列举例如:吸液管、活塞、泵、抽吸器、加压泵、减压泵等。上述管状部件,可以列举例如:注射器、管、喷嘴、尖管等。上述吸排单元,例如,还可以具备废液槽,具体而言,可以使上述废

液槽与上述管状部件连接。

[0080] 上述移动控制单元,例如,可以是控制上述吸排单元中的上述管状部件的移动的单元,也可以是控制上述第 1 容器和上述第 2 容器的移动的单元,另外,也可以是分别控制上述管状部件、上述第 1 容器和上述第 2 容器的移动的单元。

[0081] 上述移动控制单元为控制上述管状部件的移动的单元时,可以如下移动上述复合体。上述移动控制单元,例如,可控制上述管状部件沿其轴方向的移动(例如上下移动)和沿与上述轴方向垂直的面方向的移动(例如前后和左右移动)。此时,例如,在将上述管状部件配置在上述第 1 容器的上方后,使上述管状部件向下方移动,从而使其前端插入到上述第 1 容器内。然后,通过上述吸排单元从上述管状部件的前端吸引上述第 1 容器内的上述复合体,然后再次使上述管状部件向上述第 1 容器的上方移动。接着,使上述管状部件沿着上述面方向移动,在配置到上述第 2 容器的上方后,使上述管状部件向下方移动,从而使其前端插入到上述第 2 容器内。然后,通过上述吸排单元从上述管状部件的前端将上述复合体排出到上述第 2 容器内,然后再次使上述管状部件向上述第 2 容器的上方移动。这样,能够将上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中。

[0082] 另外,上述移动控制单元为控制上述管状部件的移动、以及上述第 1 容器和上述第 2 容器的移动的单元时,可以如下移动上述复合体。上述移动控制单元,例如,可控制上述管状部件沿其轴方向移动,并且可控制上述容器沿与该轴方向垂直的面方向移动。此时,首先,使上述第 1 容器沿上述面方向移动,将上述第 1 容器配置在上述管状部件的下方。然后,与上述同样地使上述管状部件向下方移动,从而使其前端插入到上述第 1 容器内,在吸引上述复合体后,使上述管状部件再次向上述第 1 容器的上方移动。接着,使上述第 1 容器和上述第 2 容器沿上述面方向移动,将上述第 2 容器配置在上述管状部件的下方。然后,与上述同样地使上述管状部件向下方移动,从而使其前端插入到上述第 2 容器内,在排出上述复合体后,使上述管状部件再次向上述第 2 容器的上方移动。这样,能够使上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中。此时,本发明的检测装置,例如,优选具有可安装上述第 1 容器和上述第 2 容器的转台,且通过上述移动控制单元使上述转台旋转。

[0083] 上述移动单元例如可以是电泳单元。上述电泳单元,例如,只要是将上述复合体从上述第 1 容器电泳到上述第 2 容器中的单元即可。此时,上述第 1 容器和上述第 2 容器,例如优选通过流路连通,更优选流路内的、在流动方向远离的两处区域为上述第 1 容器(第 1 室)和上述第 2 容器(第 2 室)。作为这样的设备,可以例示上述的 μ TAS 等。上述第 1 容器、上述第 2 容器和上述流路,例如优选具有含有电泳剂的电泳液。上述电泳单元,例如,优选具备至少两个电极和向上述电极之间外加电压的外加电压单元。上述电极优选分别配置在上述第 1 容器和上述第 2 容器上。上述电极的材质,可以列举例如不锈钢、铂、金等。上述外加电压单元,例如优选具备电压器、以及连接上述电极和上述电压器的电线等。通过利用上述外加电压单元在上述第 1 容器和上述第 2 容器之间外加电压,能够利用电泳将上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中。

[0084] 上述移动单元,例如可以是上述磁性体和移动控制单元。上述磁性体,例如,只要具有磁力即可,可以列举磁铁等。上述移动控制单元,例如,可以是控制上述磁性体的移动的单元,也可以是控制上述第 1 容器和上述第 2 容器的移动的单元,另外,也可以是分别控制上述磁性体、上述第 1 容器和上述第 2 容器的移动的单元。

[0085] 上述移动控制单元为控制上述磁性体的移动的单元时,例如,可以如下移动上述复合体。上述移动控制单元,例如,可控制上述磁性体接近上述第 1 容器的外壁和上述第 2 容器的外壁的移动、以及远离上述第 1 容器的外壁和上述第 2 容器的外壁的移动。上述移动控制单元,例如,可控制上述磁性体从上述第 1 容器向上述第 2 容器的方向的移动。具体而言,例如,在上述第 1 容器和上述第 2 容器通过上述流路连接时,可控制上述磁性体从上述第 1 容器的外壁沿着上述流路的外壁向上述第 2 容器移动。此时,例如,通过使上述磁性体接近上述第 1 容器的外壁,捕捉上述第 1 容器内的上述复合体。接着,使上述磁性体例如沿着上述流路方向移动到上述第 2 容器的外壁。然后,通过使上述磁性体远离上述第 2 容器的外壁,释放上述第 2 容器内的上述复合体。这样,能够将上述复合体从上述第 1 容器移动到上述第 2 容器中。

[0086] 上述检测单元没有特别的限制,只要是可检测上述标记物的单元即可。上述检测单元,例如,可以根据上述标记物的种类等适当设定。在本发明中,上述标记物例如为可单独检测的物质时,可检测上述标记物例如是指可检测由上述标记物产生的信号。另外,上述标记物例如为可通过与检测试剂的反应进行检测的物质时,可检测上述标记物例如是指使可检测上述标记物的检测试剂与上述复合体反应、且可检测由上述复合体中的上述标记物和上述检测试剂的反应产生的信号。上述检测单元,具体而言,可以列举例如包含光源部、受光部等的检测器。上述检测器,例如,由上述光源部对测定对象物照射特定波长的光,并以信号的形式使透过光或反射光等被上述受光部接收。上述光源部,可以列举例如发光二极管(LED)和半导体激光二极管(LD)等。上述受光部,可以列举例如光电二极管、光电倍增管(photomultiplier)和 CCD 图像传感器等。

[0087] 另外,本发明的检测装置还可以具有运算部。上述运算部,例如,能够根据通过上述检测单元检测的信号计算其强度。具体而言,例如,根据由上述检测单元中的上述受光部接收的光,能够计算上述信号强度,即计算例如透过率、吸光度、反射率、发光强度、荧光强度等。

[0088] 本发明的检测装置,例如,可以具备控制由上述光源部照射的光的波长等的控制单元等。上述检测装置,例如,还可以具备 CPU、存储器、键盘和触摸屏等输入单元、以及显示器和打印机等输出单元。

[0089] 实施例

[0090] 接着,通过以下的实施例具体地说明本发明,但本发明不受这些实施例的限制。

[0091] [实施例 1]

[0092] 本例中,以不含靶标的生理盐水作为试样,使用抗体固定磁性粒子进行荧光酶免疫测定。

[0093] (1) 抗体固定磁性粒子的制作

[0094] 作为第 1 抗体,使用抗人黄体形成激素(LH)抗体(Medix 公司制),作为磁珠,使用 Dynabeads(注册商标)MyOne Tosylactivated(商品名,Dynal 公司制)。然后,根据上述磁珠的后附说明,将上述第 1 抗体固定在上述磁珠上,然后实施封闭处理。这样,制成抗体固定磁性粒子。

[0095] (2) 酶标记抗体的制作

[0096] 作为第 2 抗体,使用抗人黄体形成激素(LH)抗体(Fitzgerald 公司制),作为标记

物,使用碱性磷酸酶(商品名 Alkaline Phosphatase labeling kit-SH,同仁化学研究所公司制)。然后,根据上述碱性磷酸酶的后附说明书,将上述第 2 抗体用上述碱性磷酸酶标记。这样,制成酶标记抗体。

[0097] (3) 试剂的制备

[0098] 将上述抗体固定磁性粒子以达到 0.5mg/mL 的方式与下述组成的缓冲液 1(pH7.4)混合,制备粒子溶液。另外,将上述酶标记抗体以达到 0.7 μg/mL 的方式与下述组成的缓冲液 2(pH7.4)混合,制备标记抗体溶液。

[0099] (缓冲液 1 的组成)

[0100] 50mmol/L Tris

[0101] 150mmol/L NaCl

[0102] 0.1w/v% BSA

[0103] 0.05w/v% NaN_3

[0104] (缓冲液 2 的组成)

[0105]

50mmol/L	Tris
150mmol/L	NaCl
0.1w/v%	BSA
0.05w/v%	NaN_3
0.025mmol/L	ZnCl_2
1mmol/L	MgCl_2

[0106] (4) 荧光测定

[0107] 向第 1 管(容量 1.5mL、Cat. No. /MCT-150-L-C、Axygen 公司)中添加上述试样(生理盐水)50 μL 和上述标记抗体溶液 50 μL 并进行混合,在 37°C 下孵育 5 分钟。进而向上述第 1 管中添加上述粒子溶液 50 μL 而使其悬浮,在 37°C 下孵育 5 分钟。接着,从上述第 1 管的外部利用磁铁捕捉上述磁性粒子,在该状态下除去上述第 1 管内的上清。然后,向上述第 1 管中添加下述组成的清洗液(pH7.4)500 μL,之后使上述磁铁远离上述第 1 管,使捕捉的上述磁性粒子在上述清洗液中悬浮,由此在上述第 1 管内清洗上述磁性粒子。清洗后,在与上述同样地捕捉上述磁性粒子的状态下,除去上述第 1 管内的上述清洗液。将该清洗处理和上述清洗液的除去处理反复进行总计 2 次。然后,向上述第 1 管中再次添加上述清洗液 500 μL,使捕捉的上述磁性粒子悬浮后将该全部量的悬浮液转移到新的第 2 管(容量 1.5mL、Cat. No. /MCT-150-L-C、Axygen 公司)中。然后,与上述同样地捕捉上述磁性粒子,并在该状态下除去上述第 2 管内的上清。向上述第 2 管中添加含有 4-甲基伞形酮磷酸酯的下述组成的底物溶液(pH9.6)500 μL,在 37°C 下使其反应 10 分钟。与上述同样地捕捉上述磁性粒子,并在该状态下回收上述第 2 管内的反应液。将回收的上述反应液转移到测定容器中,添加 2mol/L 氢氧化钠溶液 50 μL,使反应停止。然后,以激发波长 365nm、检测波长 450nm 测定上述反应液中生成的 4-甲基伞形酮的荧光强度。上述荧光强度的测定值以上述底物溶液的荧光强度为 0 进行校正。进行该测定 5 次,计算出上述荧光强度的平均值。

[0108] (清洗液的组成)

[0109] 50mmol/L Tris

[0110] 150mmol/L NaCl

[0111] 0.05w/v% Tween20(注册商标)

[0112] 0.05w/v% NaN_3

[0113] (底物溶液的组成)

[0114] 600mmol/L 2-EAE

[0115] 0.6mmol/L 4-甲基伞形酮磷酸酯(4-MUP)

[0116] 0.5w/v% 果糖

[0117] 0.09w/v% NaN_3

[0118] [比较例 1]

[0119] 本例中,不将上述悬浮液转移到上述第 2 管中,而在上述第 1 管中使作为上述标记物的酶与底物反应,除此之外,与上述实施例 1 同样地操作,进行荧光强度的测定。具体而言,在上述第 1 管中进行上述磁性粒子的清洗后,再次向上述第 1 管内添加清洗液 500 μL ,使捕捉的上述磁性粒子悬浮,除去上清。然后,向上述第 1 管内添加上述底物溶液并使其反应,将回收的反应液转移到测定容器中,反应停止后,测定上述反应液的荧光强度。

[0120] 下述表 1 中示出了上述实施例 1 和上述比较例 1 的反应液的上述荧光强度的平均值。本例中,如上所述,作为试样,使用不含靶标的生理盐水。因此,上述平均值越低,越显示出能够抑制对靶标以外的非特异性吸附为原因的、荧光强度的增加、即背景的增加。如下述表 1 所示,上述比较例 1 的反应液的平均值超过了 1000,与此相对,上述实施例 1 的反应液的平均值为小于 0 的检测限。由此可知,通过在新的第 2 管中、而不是在添加了上述标记抗体的第 1 管中使作为上述标记物的酶与底物反应,能够避免上述标记抗体向上述第 1 管的非特异性吸附所带来的影响,从而能够抑制背景的上升。

[0121] (表 1)

荧光强度的平均值

[0122]	实施例 1	-68
	比较例 1	1080

[0123] [实施例 2]

[0124] 本例中,以不含靶标的生理盐水作为试样,使用抗生蛋白链菌素固定磁性粒子和生物素结合抗体进行荧光酶免疫测定。

[0125] (1) 抗生蛋白链菌素固定磁性粒子的制作

[0126] 作为磁珠,使用 Dynabeads(注册商标) MyOne Streptavidin T1(商品名、Dyna1 公司制)。然后,根据上述磁珠的后附说明,使用 BSA 对上述磁珠实施封闭处理。这样,制成抗生蛋白链菌素固定磁性粒子。

[0127] (2) 生物素结合抗体的制作

[0128] 作为第 1 抗体,使用抗人黄体形成激素(LH)抗体(Medix 公司制)。然后,使用 Biotin labeling kit-SH(同仁化学研究所公司制),根据后附说明,使生物素与上述第 1 抗体结合。这样,制成生物素结合抗体。

[0129] (3) 试剂的制备

[0130] 将上述抗生蛋白链菌素固定磁性粒子以达到 0.5mg/mL 的方式与上述缓冲液 1 混合,制备粒子溶液。将上述生物素结合抗体以达到 1 μg/mL 的方式与上述缓冲液 1 混合,制备生物素结合抗体溶液。另外,与上述实施例 1 同样地制备上述标记抗体溶液。

[0131] (4) 荧光测定

[0132] 向上述第 1 管中添加上述试样(生理盐水)和上述标记抗体溶液、进而添加上述生物素结合抗体溶液 50 μL 并进行混合,在 37°C 下孵育 5 分钟,除此之外,与上述实施例 1 同样地操作,计算荧光强度的平均值。

[0133] [比较例 2]

[0134] 本例中,不将上述悬浮液转移到上述第 2 管中,而在上述第 1 管中使作为上述标记物的酶与底物反应,除此之外,与上述实施例 2 同样地操作,计算荧光强度的平均值。具体而言,在上述第 1 管中进行上述磁性粒子的清洗后,再次向上述第 1 管内添加清洗液 500 μL,使捕捉的上述磁性粒子悬浮,除去上清。然后,向上述第 1 管内添加上述底物溶液并使其反应,将回收的反应液转移到测定容器内,反应停止后,测定上述反应液的荧光强度。

[0135] 下述表 2 中示出了上述实施例 2 和上述比较例 2 的反应液的上述荧光强度的平均值。如下述表 2 所示,上述比较例 2 的反应液的平均值超过了 1600,与此相对,上述实施例 2 的反应液的平均值为小于 0 的检测限。由此可知,通过在新的第 2 管中、而不是在添加了上述标记抗体的第 1 管中使作为上述标记物的酶与底物反应,能够避免上述标记抗体向上述第 1 管的非特异性吸附所带来的影响,从而能够抑制背景的上升。

[0136] (表 2)

荧光强度的平均值

[0137]	实施例 2	-36
	比较例 2	1602

[0138] [实施例 3]

[0139] 本例中,使用下述组成的缓冲液 3(pH7.4)代替上述生理盐水作为上述试样,除此之外,与上述实施例 2 同样地操作,进行荧光酶免疫测定。

[0140] (缓冲液 3 的组成)

[0141] 50mmol/L Tris

[0142] 150mmol/L NaCl

[0143] 0.05w/v% BSA

[0144] 0.05w/v% NaN₃

[0145] [比较例 3-1]

[0146] 本例中,不将上述悬浮液转移到上述第 2 管中,而在上述第 1 管中使作为上述标记物的酶与底物反应,除此之外,与上述实施例 3 同样地操作,计算荧光强度的平均值。

[0147] [比较例 3-2]

[0148] 本例中,使用低吸附性管(商品名 A.150MPC, K. K. Ashisuto 制)作为上述第 1 管,除此之外,与上述比较例 3-1 同样地操作,计算荧光强度的平均值。

[0149] [比较例 3-3]

[0150] 本例中,使用低吸附性管(商品名 Protein LoBind tube,艾本德公司制)作为上述第 1 管,除此之外,与上述比较例 3-1 同样地操作,计算荧光强度的平均值。

[0151] [比较例 3-4]

[0152] 本例中,使用低吸附性管(商品名 BioPure tube,艾本德公司制)作为上述第 1 管,除此之外,与上述比较例 3-1 同样地操作,计算荧光强度的平均值。

[0153] 下述表 3 中示出了上述实施例 3 和比较例 3-1 ~ 3-4 的反应液的上述荧光强度的平均值。如下述表 3 所示,上述比较例 3-1 ~ 3-4 的反应液的平均值超过了 300,与此相对,上述实施例 3 的反应液的平均值小于 150。由此可知,通过在新的第 2 管中、而不是在添加了上述标记抗体的第 1 管中使作为上述标记物的酶与底物反应,能够避免上述标记抗体向上述第 1 管的非特异性吸附所带来的影响,从而能够抑制背景的上升。

[0154] (表 3)

<u>荧光强度的平均值</u>	
	实施例 3
	142
[0155]	比较例 3-1
	354
	比较例 3-2
	524
	比较例 3-3
	510
	比较例 3-4
	545

[0156] [实施例 4]

[0157] 本例中,作为第 1 抗体,使用抗人胰岛素抗体(Roche 公司制),作为第 2 抗体,使用抗人胰岛素抗体(Roche 公司制),使上述粒子溶液的上述抗体固定磁性粒子浓度为 0.3mg/mL,使上述标记抗体溶液的上述酶标记抗体浓度为 1 μ g/mL。并且,使上述第 1 管中的各溶液的添加量为上述试样(生理盐水)20 μ L、上述标记抗体溶液 100 μ L 和上述粒子溶液 100 μ L,且使清洗次数为 1 次,除此之外,与上述实施例 1 同样地操作,进行荧光酶免疫测定。

[0158] [比较例 4]

[0159] 本例中,在上述第 1 管中清洗上述磁性粒子后,除去上清,进而向上述第 1 管中添加上述实施例 1 的上述底物溶液并进行悬浮。然后,在刚添加上述底物溶液之后,将全部量的上述混合液从上述第 1 管转移到新的第 2 管(1.5mL、Cat. No. /MCT-150-L-C、Axygen 公司)中,在 37°C 下使其反应 10 分钟,除此之外,与上述实施例 4 同样地操作,计算荧光强度的平均值。

[0160] 下述表 4 中示出了上述实施例 4 和比较例 4 的反应液的上述荧光强度的平均值。如下述表 4 所示,上述比较例 4 的反应液的平均值超过了 7000,与此相对,上述实施例 4 的反应液的平均值小于 2000。由此表明,与在上述第 1 管中使上述磁性粒子与上述底物共存后将其混合液移动到上述第 2 管中相比,通过在将上述磁性粒子从上述第 1 管移动到上述第 2 管中后、在上述第 2 管中使上述磁性粒子与作为检测试剂的上述底物共存并检测上述标记物,能够抑制背景的上升。根据这些结果,认为上述比较例 4 的背景的上升的主要原因

是吸附于第 1 管的、未反应的标记抗体与上述底物的反应。

[0161] (表 4)

荧光强度的平均值

[0162]	实施例 4	1911
	比较例 4	7452

[0163] [实施例 5]

[0164] 本例中,使用下述的添加人胰岛素的试样和未添加人胰岛素的试样,作为第 1 抗体,使用抗人胰岛素抗体 (Roche 公司制),作为第 2 抗体,使用抗人胰岛素抗体 (Roche 公司制),使上述粒子溶液的上述抗体固定磁性粒子浓度为 0.3mg/mL,使上述标记抗体溶液的上述酶标记抗体浓度为 1 μg/mL。并且,使上述第 1 管中的上述标记抗体溶液和上述粒子溶液的添加量分别为 100 μL,且使测定次数为 3 次,除此之外,与上述实施例 1 同样地操作,进行荧光酶免疫测定。

[0165] 上述试样使用如下试样:在下述组成的缓冲液 4 (pH7.4) 中以达到 0.5 μIU/mL 的方式添加人胰岛素 (商品名 Insulin Human recombinant, Cat. No. 30-AI51) 而得到的试样和未添加人胰岛素 (0 μIU/mL) 的试样。

[0166] (缓冲液 4 的组成)

[0167]	100mmol/L	Tris
[0168]	0.1w/v%	BSA
[0169]	0.5w/v%	果糖
[0170]	0.1w/v%	NaN ₃

[0171] [比较例 5]

[0172] 本例中,不将上述悬浮液转移到上述第 2 管中,而在上述第 1 管中使作为上述标记物的酶与底物反应,除此之外,与上述实施例 5 同样地操作,计算荧光强度的平均值。

[0173] 下述表 5 示出了上述实施例 5 和比较例 5 的反应液的上述荧光强度的平均值。如下述表 5 所示,关于未添加胰岛素的试样,上述比较例 5 的反应液的平均值超过了 1000,与此相对,上述实施例 5 的反应液的平均值小于 20。另外,关于添加了作为靶标的胰岛素的、胰岛素浓度为 0.5 μIU/mL 的试样,上述比较例 5 的反应液的平均值超过了 5000,与此相对,上述实施例 5 的反应液的平均值小于 2000。由此表明,即使在上述试样含有靶标的情况下,通过在将上述磁性粒子从上述第 1 管移动到上述第 2 管中后、在上述第 2 管中使上述磁性粒子与作为检测试剂的上述底物共存并检测上述标记物,从而也能够抑制背景的上升。

[0174] (表 5)

胰岛素浓度 (μIU/mL)

	<u>0</u>	<u>0.5</u>
[0175]	实施例 5	13
	比较例 5	1706
		1765
		5797

[0176] [实施例 6]

[0177] 本例中,使用含有人胰岛素的下述试样,将上述复合体移动到第 2 管中后进行 B/F

分离,并进行荧光酶免疫测定。

[0178] (1) 抗体固定磁性粒子的制作

[0179] 作为第 1 抗体,使用抗人胰岛素抗体 (Roche 公司制),除此之外,与上述实施例 1 同样地操作,制作抗体固定磁性粒子。

[0180] (2) 酶标记抗体的制作

[0181] 作为第 2 抗体,使用抗人胰岛素抗体 (Roche 公司制),除此之外,与上述实施例 1 同样地操作,制作酶标记抗体。

[0182] (3) 试剂的制备

[0183] 将上述抗体固定磁性粒子以达到 0.3mg/mL 的方式与上述缓冲液 1 混合,制备粒子溶液。另外,将上述酶标记抗体以达到 1 μ g/mL 的方式与上述缓冲液 2 混合,制备上述标记抗体溶液。

[0184] (4) 试样的制备

[0185] 上述试样使用如下试样:向上述缓冲液 4 (pH7.4) 中以达到 0.5 μ IU/mL 的方式添加人胰岛素 (商品名 Insulin Human recombinant, Cat. No. 30-AI51) 而得到的试样。

[0186] (5) 荧光测定

[0187] 向第 1 管 (容量 1.5mL、Cat. No. /MCT-150-L-C、Axygen 公司) 中添加上述试样 50 μ L 和上述标记抗体溶液 100 μ L 并进行混合,在 37°C 下孵育 5 分钟。进而向上述第 1 管中添加上述粒子溶液 100 μ L 而悬浮,在 37°C 下孵育 5 分钟。接着,将全部量的悬浮液转移到新的第 2 管 (容量 1.5mL、Cat. No. /MCT-150-L-C、Axygen 公司) 中。然后,在从上述第 2 管的外部利用磁铁捕捉上述磁性粒子的状态下,除去上述第 2 管内的上清。向上述第 2 管中添加上述清洗液 (pH7.4) 500 μ L,并使捕捉的上述磁性粒子在上述清洗液中悬浮,由此在上述第 2 管内清洗上述磁性粒子。清洗后,在与上述同样地捕捉上述磁性粒子的状态下,除去上述第 2 管内的上述清洗液。将该清洗处理和上述清洗液的除去处理反复进行总计 2 次。向上述第 2 管中添加含有 4-甲基伞形酮磷酸酯的上述底物溶液 (pH9.6) 500 μ L,在 37°C 下使其反应 10 分钟。在与上述同样地捕捉上述磁性粒子的状态下,回收上述第 2 管内的反应液。将回收的上述反应液转移到测定容器中,添加 2mol/L 氢氧化钠溶液 50 μ L,使反应停止。然后,以激发波长 365nm、检测波长 450nm 测定上述反应液中生成的 4-甲基伞形酮的荧光强度。上述荧光强度的测定值以上述底物溶液的荧光强度为 0 进行校正。进行该测定 3 次,计算出上述荧光强度的平均值。

[0188] [比较例 6]

[0189] 本例中,不将上述悬浮液转移到上述第 2 管中,而在上述第 1 管中使作为上述标记物的酶与底物反应,除此之外,与上述实施例 6 同样地操作,计算荧光强度的平均值。

[0190] 下述表 6 示出了上述实施例 6 和比较例 6 的反应液的上述荧光强度的平均值。如下述表 6 所示,上述比较例 6 的反应液的平均值超过了 400,与此相对应,上述实施例 6 的反应液的平均值小于 100。由此表明,通过在将上述磁性粒子从上述第 1 管移动到上述第 2 管中后、在上述第 2 管中使上述磁性粒子与作为检测试剂的上述底物共存并检测上述标记物,从而能够抑制背景的上升。这些结果表明,即使在 B/F 分离前将上述复合体移动到第 2 管中,也能够抑制认为主要由吸附于第 1 管的、未反应的标记抗体与上述底物的反应产生的信号。

[0191] (表 6)

荧光强度的平均值

[0192]	实施例 6	95
	比较例 6	419

[0193] 本发明可以在不脱离其精髓或关键特征的前提下以其它形式实施。本发明中的各实施方式仅为例示,并不限定本发明。在权利要求的含义和等价物范围内的各种变化包含在本发明中。