



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 949**

51 Int. Cl.:

G01N 33/537 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02714427 .8**

96 Fecha de presentación : **03.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1376126**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54

Título: **Electroforesis con marcador de ADN bicatenario.**

30

Prioridad: **04.04.2001 JP 2001-106077**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.01.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.01.2011

73

Titular/es:
WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, Ltd.
1-2, Doshomachi 3-chome
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 540-8605, JP

72

Inventor/es: **Nakamura, Kenji;**
Kawabata, Tomohisa y
Satomura, Shinji

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 349 949 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Descripción

Campo Técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para separar sustancias utilizando electroforesis y un procedimiento para medir la diana de medición separada por dicho procedimiento de separación.

Técnica Antecedente

En un Microsistema de Análisis Total (μ -TAS; Laboratorio en una microplaca) que se supone que es un medio de análisis de nueva generación, una serie de análisis químicos y bioquímicos tales como extracción de un componente diana para su análisis de una muestra biológica (etapa de extracción), análisis del componente usando una reacción química/bioquímica (etapa analítica), así como un procesamiento posterior para su separación (etapa de separación) y detección (etapa de detección), se realizan todos en un analizador extremadamente pequeño integrado en una microplaca, de varios cm a varias decenas de cm en un lado. Como procedimientos de separación para este sistema, se han reconocido ampliamente los procedimientos siguientes. La electroforesis capilar utiliza una diferencia de la carga de sustancias en un alto campo eléctrico, en el que se prepara un capilar (tubo fino), de 1 mm o menos de diámetro interior, con un compuesto polimérico, teflón o sílice como material fácilmente aplicable sobre un sustrato para un procesamiento fino. La cromatografía en columna capilar utiliza una diferencia de interacción entre un soporte de columna y una sustancia usando un capilar similar.

Entre ellos, la electroforesis capilar tiene características que, puesto que el área de superficie capilar es considerablemente grande respecto al volumen interior del capilar, la generación de calor de Joule por aplicación de alto voltaje se bloquea eficazmente y proporciona mayor resolución en un periodo de tiempo corto que la electroforesis convencional. Por lo tanto, la electroforesis capilar se ha considerado como un procedimiento adecuado para μ -TAS puesto que se permite la separación en una longitud de separación relativamente corta.

Particularmente, en los últimos años, se ha desarrollado una técnica de separación, la denominada electroforesis en microplaca capilar, como uno de los procedimientos electroforéticos capilares para μ -TAS, en la que se genera un capilar en una microplaca de varios cm a varias decenas de cm en un lado por medio de una técnica de procesamiento fina tal como fotolitografía [J. Chromatogr. (1992) 593, 253-258, Manz, A. y col., Anal. Chem. (1992) 64, 1926-1932, Harrison, D. J. y col.; Anal. Chem. (1994) 66, 3472-3476, Jacobson, S. C. y col., Science (1993) 261, 895-897, Harrison, D. J. y col., Anal. Chem. (1993) 65, 2637-2642, Effenhauser, C. S. y col.].

En el procedimiento electroforético en microplaca capilar mencionado anteriormente, sin

embargo, existe una limitación en la longitud del capilar para la separación y la longitud para la separación se acorta mucho en comparación con la de la electroforesis capilar convencional. Por lo tanto, se vuelve un problema que la capacidad de separación sea insuficiente para moléculas relativamente grandes tales como ácidos nucleicos, polipéptidos y proteínas, aunque es suficiente para sustancias de bajo peso molecular enormemente influenciadas por una carga eléctrica intramolecular.

Para resolver esta cuestión, se ha desarrollado un procedimiento de separación usando un polímero que tiene un efecto de tamiz molecular, por ejemplo, hidroxietilcelulosa y poliacrilamida como aditivo añadido en el capilar [Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 11348-11352, Woolly, A. T. y Mathies, R. A., Anal. Chem. (1996) 68, 720-723, Jacobson, S. C. y Ramsey, J. M., Anal. Chem. (1997) 69, 2181-2186, Woolley, A. T., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 11348-11352, Woolley, A. T. y Mathies, R. A.; Anal. Chem. (1994) 66, 2949-2953, Effenhauser, C.S., y col.; Anal. Chem (1995) 67, 3676-3680] y etcétera]. En las circunstancias actuales, sin embargo, la separación de polipéptidos o proteínas es todavía insuficiente incluso de acuerdo con estos procedimientos.

También se propone como otro procedimiento para separar proteínas el uso de un polímero de acrilamida que tenga un efecto de tamiz molecular como agente de envasado de capilar en presencia de dodecilsulfato sódico [SDS-PAGE: Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 5372-5377, Yao, S., y col.]. En este procedimiento, sin embargo, puesto que las proteínas tienen que desnaturalizarse con dodecilsulfato sódico, es difícil separarlas al tiempo que mantengan sus propias actividades tales como la actividad de unión específica.

Para resolver estos problemas se ha descrito el procedimiento siguiente (Patente Japonesa Nº 3.070.418; WO 98/512371). Se permite que un componente diana para análisis reaccione con 2 especies de sustancias, teniendo una de ellas una afinidad específica hacia la diana y uniéndose a una sustancia cargada, y teniendo otra una afinidad específica hacia la diana y uniéndose a un marcador detectable, para formar un complejo que comprende estos 3 componentes (sustancia que tiene una afinidad específica hacia la diana y se une a una sustancia cargada-componente diana para análisis-sustancia que tiene una afinidad específica hacia la diana y se une a un marcador detectable). El complejo se separa de la sustancia que tiene una afinidad específica hacia la diana y se une a un marcador detectable no implicado en la formación del complejo mediante un procedimiento de separación eléctrico (B/F) que utiliza la diferencia de carga entre la sustancia cargada contenida en el complejo y la sustancia que tiene una afinidad específica hacia la diana y que se une a un marcador detectable no implicada en la formación del complejo.

En este procedimiento, sin embargo, es necesario que la sustancia cargada que mejora

la capacidad de separación y el marcador para su detección hayan estado cada uno siempre unidos a un tipo diferente de sustancia que tiene una afinidad específica hacia la diana. Como desventaja adicional, también es necesario ajustar la cantidad del marcador detectable que se une a una sustancia capaz de unirse específicamente al componente diana, puesto que la carga de la sustancia capaz de unirse específicamente al componente diana y de unirse al marcador detectable se modifica para disminuir la precisión de separación y ensanchar el pico de separación.

Además, se conocen procedimientos de inmunoensayo basados en separación electroforética (capilar) de los documentos US 5.570.680, US 6.103.537, EP-A-0815942, EP-A-0755941 y US 5.137.609; se conocen procedimientos de inmunoensayo basados en HPLC de los documentos EP-A-0357869 y EP-A-1061370; y se conocen procedimientos de inmunoensayo basados en exclusión en gel o cromatografía de afinidad del documento US 5.981.171.

En vista del estado de la técnica mencionado anteriormente, la invención pretende proporcionar un procedimiento para separar una diana de medición utilizando electroforesis de forma eficaz con gran sensibilidad y en un periodo de tiempo corto, y un procedimiento para medir la diana de medición separada por el procedimiento de separación.

Divulgación de la Invención

La invención se realizó para resolver los problemas mencionados anteriormente y está relacionada con lo siguiente:

(1) Un procedimiento para la separación de una diana de medición por electroforesis que comprende usar una sustancia a la que está unida una cadena de ácido nucleico bicatenaria marcada con un marcador, en el que dicha sustancia que tiene una afinidad por dicha diana de medición tiene una propiedad de unión por la diana de medición basada en la interacción entre "antígeno" y "anticuerpo", "cadena de azúcar" y "lectina", "enzima" e "inhibidor", "proteína" y "cadena peptídica" o "receptor" y "ligando".

(2) Dicho procedimiento de separación por electroforesis que comprende formar un complejo que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) a partir de una muestra que contiene una diana de medición, una sustancia a la que está unida una cadena de ácido nucleico y que tiene una afinidad hacia la diana de medición (en lo sucesivo abreviada a veces como cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico y separar dicho complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación de dicho complejo y, si es necesario, del marcador por electroforesis.

(3) Dicho procedimiento de separación por electroforesis que comprende poner mutuamente en contacto una muestra que contiene una diana de medición, una sustancia a la que está unida una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia la diana de medición (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico, y separar el complejo resultante que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación de dicho complejo y, si es necesario, del marcador por electroforesis.

(4) Dicho procedimiento de separación por electroforesis que comprende formar un complejo que comprende la diana de medición-(dos o más especies de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) de una muestra que contiene una diana de medición, dos o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad hacia la diana de medición y sitios de unión mutuamente diferentes con la diana de medición, y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico, y separar dicho complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación de dicho complejo y, si es necesario, del marcador por electroforesis.

(5) Dicho procedimiento de separación por electroforesis que comprende poner mutuamente en contacto una muestra que tiene una diana de medición, dos o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad hacia la diana de medición y sitios de unión mutuamente diferentes con la diana de medición, y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico, y separar el complejo resultante que comprende la diana de medición-(dos o más especies de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación dicho complejo y, si es necesario, del marcador por electroforesis.

(6) Dicho procedimiento de separación por electroforesis que comprende formar [1] un complejo de la diana de medición A_1 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ -marcador, [2] un complejo de la diana de medición A_2 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión de $B_{A_1:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ -marcador, [3] un complejo de la diana de medición A_3 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$ -marcador, ..., [n-1] un complejo de la diana de medición A_{n-1} -cadena de ácido

nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ -marcador, y [n] un complejo de la diana A_n -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$,
5 cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n} -marcador de (a) una muestra que contiene n tipos mutuamente diferentes de dianas de medición A_1 , A_2 , A_3 , ... A_{n-1} y A_n , (b) (1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todas las dianas de medición de A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), (2) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todas las dianas de medición de A_2 a A_n excepto por A_1 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), (3) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todas las dianas de medición de A_3 a A_n excepto por A_1 y A_2 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$), ..., (n-1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia las dianas de medición A_{n-1} y A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$), y (n) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad sólo hacia la diana de medición A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}) y (c) un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico y después separar los complejos respectivos [1] a [n] de complejos de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión respectivas de (1) a (n) y los marcadores no implicados en la formación de dichos complejos y, si es necesario, de los marcadores por electroforesis.
10
15
20
25
30
35

por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$) y (n) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad sólo hacia la diana de medición A_n , excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}), y (c) un marcador capaz de marcar dicha cadena

5 ácido nucleico, y separar el resultante [1] un complejo de la diana de medición A_1 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ -marcador, [2] un complejo de la diana de medición A_2 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ -marcador, [3] un complejo de la diana de medición A_3 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$,

10 cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$ -marcador, ..., [n-1] un complejo de la diana de medición A_{n-1} -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión

15 $B_{A_{n-1}:A_n}$ -marcador, y [n] un complejo de la diana de medición A_n -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n} -marcador de complejos de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión (1) a (n) respectivas y los marcadores no implicados en la

20 formación de dichos complejos y, si es necesario, de los marcadores por electroforesis.

(8) Dicho procedimiento de separación por electroforesis que comprende formar dos o más especies de complejos que comprenden dianas de medición específicas-cadenas de ácido nucleico-sustancias de unión que tienen afinidad sólo por dichas dianas de medición específicas-marcador de una muestra que contiene 2 o más tipos de dianas de medición, 2

25 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad sólo por una de las diana de medición (en lo sucesivo abreviadas a veces como cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico, y después separar dichos complejos de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador específica no implicada

30 en la formación de dichos complejos y, si es necesario, del marcador, respectivamente, por electroforesis.

(9) Dicho procedimiento de separación por electroforesis que comprende poner mutuamente en contacto una muestra que contiene 2 o más tipos de dianas de medición, 2

35 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen

afinidad sólo por una cualquiera de las dianas de medición deseadas (cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico y separar las resultantes 2 o más especies de complejos que comprenden dianas de medición específicas-cadenas de ácido nucleico-sustancias de unión que tienen afinidad sólo por dichas dianas de medición específicas-marcador de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación de dichos complejos y, si es necesario, del marcador, respectivamente, por electroforesis.

Los presentes inventores trabajaron diligentemente para estudiar la búsqueda de un procedimiento de separación de una diana de medición eficazmente con gran sensibilidad en un periodo de tiempo corto utilizando electroforesis, particularmente electroforesis capilar. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que cuando una diana de medición, una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad por la diana de medición y un marcador forman un complejo de la diana de medición-la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad por la diana de medición-el marcador, dicho complejo, es decir, el complejo que contiene la diana de medición, puede separarse eficazmente en un periodo de tiempo corto y, además, la diana de medición en una muestra puede medirse con gran sensibilidad en un periodo de tiempo corto, y además la sensibilidad de detección puede controlarse libremente. Por lo tanto, se completó la invención.

20 Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 muestra esquemáticamente el principio y un aparato de electroforesis capilar.

La Figura 2 muestra esquemáticamente el procedimiento de separación 1 de la invención, es decir, el principio en un caso que usa 1 especie de cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión para una diana de medición.

25 La Figura 3 muestra esquemáticamente el procedimiento de separación 2 de la invención, es decir, el principio en un caso que usa 2 o más especies de cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión para una diana de medición.

La Figura 4 muestra esquemáticamente el procedimiento de separación 3 de la invención, es decir, el principio en un caso que usa al menos 1 especie de sustancia que tiene afinidad por todos de 2 o más tipos de dianas de medición.

30 La Figura 5 muestra esquemáticamente el procedimiento de separación 4-a de la invención, es decir, el principio de cómo variar el número de cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas a unir con 2 o más tipos de dianas de medición, respectivamente.

35 La Figura 6 muestra esquemáticamente el procedimiento de separación 4-b de la invención,

es decir, el principio de cómo variar el tamaño (longitud de cadena) de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas a unir a 2 o más tipos de dianas de medición, respectivamente.

La Figura 7 muestra esquemáticamente un aparato electroforético usado en el Ejemplo Comparativo 1.

5

La Figura 8 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para una mezcla de Muestra 1 y Muestra 5 (que contiene un complejo de anticuerpo Fab' de WA2 marcado con YS5-anticuerpo Fab' de A4-4 marcado con YS8-AFP-anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488 y un anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488 libre) obtenido en el Ejemplo Comparativo 1.

10

La Figura 9 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 5 (que sólo contiene anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488) obtenido en el Ejemplo Comparativo 1.

La Figura 10 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 1 (que contiene el anticuerpo WA2 de 227 pb) obtenido en el Ejemplo 1.

15

La Figura 11 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 2 (que contiene el anticuerpo A4-4 de 160 pb) obtenido en el Ejemplo 1.

20

La Figura 12 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para una mezcla de Muestra 1 y Muestra 3 (que contiene el anticuerpo WA2 de 227 pb y un complejo de anticuerpo WA2 de 227 pb-AFP) obtenido en el Ejemplo 1.

La Figura 13 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 4 (que contiene un complejo de anticuerpo A4-4 de 160 pb-AFP) obtenido en el Ejemplo 1.

25

La Figura 14 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 5 (que contiene el anticuerpo WA2 de 227 pb y el anticuerpo A4-4 de 160 pb) obtenido en el Ejemplo 1.

La Figura 15 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para una mezcla de Muestra 6 y Muestra 5 (que contiene un complejo de anticuerpo WA2 de 227 pb-anticuerpo A4-4 de 160 pb-AFP y un anticuerpo WA2 de 227 pb libre y un anticuerpo A4-4 de 160 pb libre) obtenido en el Ejemplo 1.

30

La Figura 16 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis para la Muestra 1 (que contiene el anticuerpo WAC1 de 250 pb) sobre el de (cromatograma

35

electroforético capilar) la Muestra 2 (que contiene un complejo de anticuerpo WAC1 de 250 pb-CEA) obtenido en el Ejemplo 2.

5 La Figura 17 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis para la Muestra 3 (que contiene el anticuerpo WAC1 de 500 pb) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la Muestra 4 (que contiene un complejo de anticuerpo WAC1 de 500 pb-CEA) obtenido en el Ejemplo 2.

10 La Figura 18 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis para la Muestra 5 (que contiene el anticuerpo WAC2 de 500 pb) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la Muestra 6 (que contiene un complejo de anticuerpo WAC2 de 500 pb-CEA) obtenido en el Ejemplo 2.

La Figura 19 muestra esquemáticamente un modo de marcaje para el anticuerpo Cy160A4-4 obtenido en el Ejemplo 3.

15 La Figura 20 muestra esquemáticamente un modo de marcaje para el anticuerpo Cy(3)160A4-4 obtenido en el Ejemplo 3.

La Figura 21 muestra esquemáticamente un modo de marcaje para el anticuerpo CySA250A4-4 obtenido en el Ejemplo 3.

20 La Figura 22 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de la electroforesis para la Muestra 1 (que contiene el anticuerpo Cy160bpA4-4) obtenido en el Ejemplo 3.

La Figura 23 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de la electroforesis para la Muestra 2 (que contiene un complejo de anticuerpo Cy160bpA4-4-AFP) obtenido en el Ejemplo 3.

25 La Figura 24 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis para la Muestra 3 (que contiene el anticuerpo Cy(3)160bpA4-4) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la Muestra 4 (que contiene un complejo de anticuerpo Cy(3)160bpA4-4-AFP) obtenido en el Ejemplo 3.

30 La Figura 25 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis para la Muestra 5 (que contiene el anticuerpo CySA250bpA4-4) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la Muestra 6 (que contiene un complejo de anticuerpo CySA250bpA4-4-AFP) obtenido en el Ejemplo 3.

35 Mejor Modo de Realizar la Invención

El procedimiento de separación de una diana de medición en la invención se caracteriza por el uso de una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición y a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria marcada con un marcador.

5 En otras palabras, una diana de medición se convierte finalmente, usando una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición y a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria marcada con un marcador, en un complejo que comprende la diana, la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición y a la que se une una cadena de ácido nucleico (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y el marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico. Más específicamente, se forma finalmente un complejo [diana de medición-complejo de (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador)]
10 que comprende (a) una diana de medición, (b) una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición y a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico. Después, este complejo se separa de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador y, si es necesario, del marcador.
15

La cadena de ácido nucleico usada en la invención tiene restos de nucleótidos como unidades básicas, que comprenden bases de purina o bases de piridina, pentosa como porción de azúcar y fosfatos. Los nucleótidos respectivos se unen y se polimerizan en los carbonos 3' y 5' de la porción de azúcar a través del enlace diéster de los fosfatos para formar una cadena polinucleotídica, es decir, ADN, en el que la porción de azúcar es desoxirribosa. La cadena de ácido nucleico es bicatenaria.
20

La cadena de ácido nucleico usada en la invención puede prepararse de una forma convencional por sí misma, por ejemplo, síntesis química, un procedimiento para extracción y purificación de la cadena de ácido nucleico de las células obtenidas de microorganismos, insectos, animales, plantas, etc., un procedimiento que use las células mencionadas anteriormente en las que se ha introducido un vector génico adecuado tal como un plásmido, fago, cósmido, etc., en cuyo procedimiento las células se cultivan y el vector multiplicado se extrae y se purifica, y un procedimiento que utiliza una técnica de amplificación génica tal como PCR (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, etc.). Por lo tanto, la cadena de ácido nucleico resultante se escinde por descomposición química o con una enzima de escisión de ácido nucleico tal como enzimas de restricción y, después se purifica opcionalmente para formar una cadena de ácido nucleico de la longitud deseada.
25
30

La longitud de la cadena de ácido nucleico usada puede ser habitualmente de 1 pb a 1000 kpb, preferentemente de 5 pb a 100 kpb, más preferentemente de 10 pb a 50 kpb, siempre
35

que pueda conseguirse el propósito de la invención.

La cadena de ácido nucleico usada en la invención puede modificarse apropiadamente con una adecuada dentro del ámbito de conseguir el propósito de la invención.

5 La sustancia que tiene afinidad por la diana de medición usada en la invención incluye las que tienen una propiedad capaz de unirse a la diana de medición dependiendo de la interacción entre proteínas, entre proteína y sustancia química o entre sustancias químicas, es decir, las que se unen basándose en la interacción entre “antígeno” y “anticuerpo”, “cadena de azúcar” y “lectina”, “enzima” e “inhibidor”, “proteína” y “cadena peptídica” o “receptor” y “ligando” (como se define en las reivindicaciones). Cuando una de las sustancias en las parejas 10 mencionadas anteriormente es la diana de medición, la otra es la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición. Por ejemplo, cuando la diana de medición es un antígeno, la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición es un anticuerpo y cuando la diana de medición es un anticuerpo la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición es un antígeno (aplicándose lo mismo a las otras parejas anteriores).

15 Más específicamente, dicha sustancia incluye, por ejemplo, cadenas peptídicas (por ejemplo, péptido C, angiotensina I, etc.), proteínas (por ejemplo, inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), β_2 -microglobulina, albúmina, sus productos de degradación, proteínas del suero tales como ferritina, proteínas enzimáticas tales como amilasa, fosfatasa alcalina, γ -glutamyl-transferasa, etc.; proteínas o péptidos o antígenos glicosilo procedentes de microorganismos, bacterias tales como bacilos tuberculosos, pneumococos, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria meningitidis*, gonococos, estafilocos, estreptococos, bacterias intestinales, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, etc., virus tales como virus de la rubéola, virus herpes, virus de la hepatitis, virus ATL, virus del SIDA, virus de la gripe, adenovirus, enterovirus, poliovirus, virus EB, HAV, 20 HBV, HCV, VIH, HTLV, etc., hongos tales como *Candida*, *Cryptococcus*, etc., espiroquetas tales como leptospira, *Treponema pallidum*, etc., clamidias, micoplasmas y similares; una diversidad de alergenos causantes de alergias tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, etc., que proceden de, por ejemplo, polvo doméstico, ácaros tales como *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, etc., polen de cedro japonés, de ciprés japonés, *Paspalum*, 30 ambrosía común, *Phleum pratense*, *Anthoxanthum odoratum*, centeno, etc., animales tales como gato, perro, cangrejo, etc., alimentos tales como arroz, clara de huevo, etc., hongos, insectos, maderas, fármacos, productos químicos y similares; lípidos tales como lipoproteínas, etc., proteasas tales como tripsina, plasmina, serinaproteasa, etc., antígenos de proteínas marcadoras tumorales tales como AFP, PSA, CEA, PGI, PGII, etc., cadenas de azúcares (por ejemplo, cadenas de azúcares de antígenos glicosilo (carbohidratos) marcadores tumorales 35

tales como CA19-9, PIVKAll, CA125, cadena de azúcar poseída por una sustancia que contiene una cadena de azúcar especial producida por células cancerosas, por ejemplo, antígeno glicosilo ABO, etc.), lectinas (por ejemplo, concanavalina A, lectina de *Lens esculenta*, lectina de *Phaseolus vulgaris*, lectina de estramonio, lectina de germen de trigo, etc.), fosfolípidos (por ejemplo, cardiolipina, etc.), lipopolisacáridos (por ejemplo, endotoxina, etc.), sustancias químicas (por ejemplo, hormonas tales como PTH, T3, T4, TSH, insulina, LH, FSH, prolactina, etc., hormonas ambientales tales como tributiltina, nonilfenol, 4-octil-fenol, ftalato de di-n-butilo, ftalato de dicitclohexilo, benzofenona, octacloroestireno, ftalato de di-2-etilhexilo, etc.), receptores (por ejemplo, receptores de estrógenos, THS, etc.), ligandos (por ejemplo, estrógeno, TSH, etc.) y anticuerpos contra los mismos. A este respecto, los anticuerpos usados en la invención también incluyen fragmentos Fab o F(ab')₂ como productos de degradación producidos por degradación con una enzima proteolítica (proteinasas) tal como papaína o pepsina, o por degradación química.

En la invención, la unión de una cadena de ácido nucleico a una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición puede realizarse utilizando los grupos funcionales respectivos de la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición y de la cadena de ácido nucleico directamente o a través de un engarce [por ejemplo, sulfo-succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)butirato (Sulfo-SMPB), sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), *N*-(ϵ -maleimido-caproiloxi)succinimida (EMCS), etc.]. La unión puede realizarse de una forma convencional usada habitualmente en este campo, por ejemplo, un procedimiento de marcaje conocido por sí mismo utilizado en EIA, RIA, FIA o hibridación conocidas por sí mismas [por ejemplo, Ikagaku Jikken Koza (Experimental Manual in Medical Chemistry), vol. 8, editado por Yuichi Yamamura, Primera Edición, Nakayama Shoten, 1971; Zusetu (Illustrative Description) Fluorescent Antibodies, Akira Kawao, Primera Edición, Soft Science, 1983; Enzyme Immunoassay, Eiji Ishikawa, Tadashi Kawai, Kiyoshi Miyai, 3ª Edición, Igaku-Shoin, 1987; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, etc.] o en un procedimiento convencional que utiliza la reacción de avidina (o estreptavidina) con biotina. Después de la introducción preliminar de un grupo funcional reactivo con la cadena de ácido nucleico, la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición puede unirse a la cadena de ácido nucleico en la que se ha introducido el grupo funcional reactivo en el procedimiento de unión mencionado anteriormente. La introducción de un grupo funcional reactivo en la cadena de ácido nucleico puede realizarse de acuerdo con un procedimiento conocido por sí mismo incluyendo, por ejemplo, un procedimiento para introducir un grupo funcional reactivo por unión del grupo trifosfato 5' localizado en el extremo terminal del ácido nucleico con un compuesto que

tiene un grupo funcional reactivo (por ejemplo, un compuesto que tiene un grupo amino tal como *N*-tri-fluoroacetilaminoalquilamina, un compuesto que tiene un grupo tiol tal como cistamina, un compuesto que tiene biotina tal como *N*-biotinilaminoalquilamina, un compuesto que tiene un grupo maleimido tal como maleimidoalquilamina, etc.) en la formación de un enlace fosfoamidita usando un agente de condensación, por ejemplo, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSC), etc. [Nucleic Acid Res. (1988) 16, 3671, Chu, B. C., y col.]; un procedimiento para introducir un grupo funcional reactivo por unión al grupo 3'-hidroxilo localizado en el extremo terminal del ácido nucleico con un compuesto que tiene un grupo funcional reactivo (por ejemplo, un compuesto que tiene un grupo amino tal como ácido *N*-trifluoroacetilaminoalquilcarboxílico, un compuesto que tiene biotina tal como ácido *N*-biotinilaminoalquil-carboxílico, un compuesto que tiene un grupo maleimido tal como ácido maleimidoalquilcarboxílico, etc.) en la formación de un enlace éster usando un agente de condensación, por ejemplo, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSC), etc., o por reacción del grupo 3' hidroxilo con ésteres activos del compuesto que tienen un grupo funcional reactivo directamente [Nucleic Acid Res. (1986) 14, 6115 Jabloski, y col.]; un procedimiento para la introducción de un engarce reactivo con amino en un fragmento escindido por enzima de restricción en el extremo terminal, del que sobresale una base que contiene amino (adenina, citosina) como una cadena sencilla [Chemistry of Proteins and Crosslinking, Shan S. Wong, (1991) Publicado por CRC Press]; un procedimiento para incorporación de un monómero de nucleótido que tiene un grupo funcional reactivo en un fragmento escindido por enzima de restricción que forma un extremo sobresaliente de cadena sencilla con una enzima que corta en romo (ADN polimerasa de T4, enzima de corte en romo de ADN, etc.) (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, etc.); un procedimiento para utilizar hibridación, en el que se introduce un grupo funcional reactivo en el extremo 5' de un oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria para la porción monocatenaria de un fragmento escindido por enzima de restricción que forma un extremo sobresaliente de cadena sencilla para hibridar en el extremo sobresaliente de cadena sencilla del fragmento escindido por enzima de restricción (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, etc.); un procedimiento que utiliza PCR, en el que un cebador de PCR en el que se ha introducido un grupo funcional reactivo en el extremo 5' se usa en la PCR para dar como producto de PCR una cadena de ácido nucleico en la que un grupo funcional reactivo se ha introducido en el extremo 5' (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, etc.). Por lo tanto, puede introducirse un grupo funcional reactivo en el extremo terminal de ácidos nucleicos.

Cuando se usa un ácido nucleico monocatenario, la cadena de ácido nucleico en la que se ha introducido un grupo funcional reactivo también puede prepararse de acuerdo con un procedimiento para hibridar con el ácido nucleico monocatenario un oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria al extremo 5' de la cadena de ácido nucleico y un grupo funcional reactivo introducido en el extremo 5' (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, etc.). El grupo funcional reactivo mencionado anteriormente incluye, por ejemplo, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo isotiocianato, un grupo avidina, un grupo biotina, un grupo carboxilo, un grupo cetona, un grupo maleimido, un grupo éster activo, un grupo haluro de ácido sulfónico, un grupo haluro de ácido carboxílico, un grupo amino, un grupo ácido sulfónico, un grupo piridilditio, un grupo aldehído y similares.

Cuando el número de cadenas de ácido nucleico a unir a la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición es desigual, el número de cadenas de ácido nucleico existentes en el complejo formado se vuelve desigual para hacer la separación del complejo inespecífica. Por lo tanto, es preferible unificar el número de cadenas de ácido nucleico a unir con la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición. En el mismo sentido, es apropiado para el número de sustancias que tienen afinidad por la diana de medición que se unen a una molécula de la cadena de ácido nucleico que sea de una molécula.

En el procedimiento de unión mencionado anteriormente, cuando la cadena de ácido nucleico tiene un grupo funcional en ambos extremos con el que puede unirse una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición, la cadena de ácido nucleico puede escindirse de forma preliminar enzimática o químicamente de modo que se introduzca el grupo funcional reactivo en un extremo, y después permitir que se una a la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición. Como alternativa, se permite que la cadena de ácido nucleico se una a la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición para dar el intermedio al que se une la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición en ambos extremos, y la cadena de ácido nucleico que se une al intermedio se escinde enzimática o químicamente para dar el producto en el que la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición se une en un extremo del ácido nucleico.

Como el marcador usado en la invención, pueden usarse los capaces de marcar una cadena de ácido nucleico usados convencionalmente en este campo, por ejemplo, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo de fluorescencia (FIA), hibridación y similares. Dicha sustancia incluye, por ejemplo, enzimas tales como fosfatasa alcalina (ALP), β -galactosidasa (β -Gal), peroxidasa (POD), microperoxidasa, glucosa oxidasa (GOD), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), ácido málico deshidrogenasa,

luciferasa, etc.; colorantes tales como Azul Brillante de Coomassie R250, naranja de metilo, etc.; isótopos radiactivos tales como ^{99m}Tc , ^{131}I , ^{125}I , ^{14}C , ^3H , ^{12}P , ^{35}S , etc.; fluoresceína, rodamina, dansilo, fluorescamina, coumalina, naftilamina o sus derivados; colorantes fluorescentes de tierras raras [una combinación de metal de tierras raras, por ejemplo, samario (Sm), europio (Eu), terbio (Tb) o disprosio (Dy), con un compuesto quelado, por ejemplo, 4,4'-bis(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexadion-6''-il)clorosulfo-*o*-terfenilo (BHHCT), ácido 4,7-bis(clorosulfonyl)-1,10-fenantrolin-2,9-dicarboxílico (BCPDA), ácido β -naftiltrifluoroacético (β -NTA), etc.]; sustancias fluorescentes tales como colorante fluorescente de unión a ácido nucleico; sustancias luminiscentes tales como luciferina, isoluminol, luminol, bis(2,4,6,-trifluorofenil)oxalato, etc.; sustancias absorbentes UV tales como fenol, naftol, antraceno o sus derivados; sustancias que tienen una propiedad de agente de marcaje de espín, ejemplificadas por compuestos que tienen un grupo oxilo tales como 4-amino-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxilo, 3-amino-2,2,5,5-tetrametil-pirrolidin-1-oxilo, 2,6-di-*t*-butil- α -(3,5-di-*t*-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-iliden)-*p*-toliloxi, etc.

El colorante fluorescente mencionado anteriormente que se une a un ácido nucleico emite una fluorescencia intensa dependiendo de la unión a la cadena de ácido nucleico. Dicho colorante fluorescente de unión a ácido nucleico incluye, por ejemplo, los denominados colorantes intercalantes que se intercalan entre las bases de la cadena de ácido nucleico [por ejemplo, colorantes de acridina tales como naranja de acridina, compuestos de etidio tales como bromuro de etidio, homodímero de etidio 1 (EthD-1), homodímero de etidio 2 (EthD-2), monoazida de bromuro de etidio (EMA), dihidroetidio, etc., compuestos de yoduro tales como yoduro de propidio, yoduro de hexidio, etc., 7-amino-actinomicina D (7-AAD), colorantes de dímero de cianina tales como POPO-1, BOBO-1, YOYO-1, TOTO-1, JOJO-1, POPO-3, LOLO-1, BOBO-3, YOYO-3, TOTO-3, etc. (todas son marcas comerciales de Molecular Probe); colorantes de monómero de cianina tales como PO-PRO-1, BO-PRO-1, YO-PRO-1, TO-PRO-1, JO-PRO-1, PO-PRO-3, LO-PRO-1, BO-PRO-3, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, etc. (todas son marcas comerciales de Molecular Probe); colorantes SYTOX tales como SYBR Oro, SYBR Verde I y SYBR Verde II, SYTOX Verde, SYTOX Azul, SYTOX Naranja, etc. (todas son marcas comerciales de Molecular Probe)]; los que se unen a un grupo minoritario de doble hélice de ADN [por ejemplo, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI: nombres comerciales de Molecular Probe), pentahidrato(bis-benzimida) (Hoechst 33258: nombres comerciales de Molecular Probe), triclorhidrato (Hoechst 33342: nombres comerciales de Molecular Probe), colorante de bisbenzimidazoles (Hoechst 34580: nombres comerciales de Molecular Probe), etc.]; los que se unen específicamente a la secuencia de adenina-timina (A-T) [por ejemplo, colorantes de acridina, tales como 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), bis-(6-cloro-2-metoxi-9-

acridinil)espermina (homodímero de acridina), etc.; por ejemplo, hidroxiestilbamidina, etc.] y similares.

Un procedimiento de marcaje de la cadena de ácido nucleico con un marcador puede realizarse de la misma forma que en la unión de la cadena de ácido nucleico a la sustancia que
5 tiene afinidad por la diana de medición, como se ha mencionado anteriormente.

El uso de un colorante fluorescente que se une a un ácido nucleico como marcador puede realizarse de la forma siguiente.

De acuerdo con una forma convencional (por ejemplo, un procedimiento como se describe en Handbook of Fluorescent Probe and Research Chemicals, 7ª edición, Capítulo 8; Molecular Probe Inc.), el marcador se pone en contacto con una cadena de ácido nucleico
10 (incluyendo la cadena de ácido nucleico en una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y una diana de medición) en una solución como agua o un tampón usado habitualmente en este campo de hibridación o inmunoensayo, por ejemplo, tampón tris, tampón fosfato, tampón Veronal, tampón borato, tampón de Good, tampón SSC, tampón TBE, tampón TAE, etc., a una
15 temperatura adecuada durante un periodo de tiempo adecuado.

En el procedimiento mencionado anteriormente, el contacto de la cadena de ácido nucleico (incluyendo la cadena de ácido nucleico contenida en la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con
20 afinidad de unión y la diana de medición) con el marcador puede realizarse disolviendo o dispersando o suspendiendo la cadena de ácido nucleico, una muestra que contiene la diana de medición, la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión, el marcador, el complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y el marcador, etc., directamente en agua o un tampón como se ha mencionado anteriormente o por disolución o
25 dispersión o suspensión de los componentes respectivos en agua o un tampón como se ha mencionado anteriormente para dar productos líquidos, seguido de mezcla de los mismos para ponerlos en contacto entre sí.

En la realización del procedimiento de marcaje de la cadena de ácido nucleico con un marcador de la invención, el marcador puede unirse directamente a la cadena de ácido nucleico
30 o a través de un engarce [por ejemplo, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, EMCS, etc.] o un ácido nucleico (que sea diferente de la cadena de ácido nucleico a marcar, acoplada (unida) a la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición; en lo sucesivo abreviado como cadena de ácido nucleico de engarce), péptido, proteína, azúcar y similares (en lo sucesivo abreviados como sustancia de engarce).

35 Cuando la cadena de ácido nucleico se une al marcador a través de una sustancia de

engarce, la unión de la cadena de ácido nucleico a la sustancia de engarce o la unión de la sustancia de engarce al marcador puede realizarse de la misma forma que en la unión de la cadena de ácido nucleico a la sustancia que tiene afinidad por la diana de medición o en el marcaje de la cadena de ácido nucleico con el marcador. En la realización del marcaje de la

5 cadena de ácido nucleico con el marcador por medio de una sustancia de engarce, una sustancia de engarce marcada de forma preliminar con el marcador puede unirse a la cadena de ácido nucleico o, como alternativa, la sustancia de engarce puede unirse a la cadena de ácido nucleico, seguido de enlace con el marcador, o se permite que la cadena de ácido nucleico, la sustancia de engarce y el marcador se unan todos a la vez.

10 Además, el marcaje de la cadena de ácido nucleico con el marcador puede realizarse antes, o al mismo tiempo que, o después de la formación del complejo de la diana de medición- (la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-el marcador) de acuerdo con el marcador a usar, como se menciona a continuación. No existe limitación para este marcaje.

Aunque es difícil definir en general la concentración del marcador a usar porque

15 depende de la clase del marcador, la concentración en una mezcla líquida para hacer que la cadena de ácido nucleico (incluyendo la cadena de ácido nucleico contenida en la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y la diana de medición) contacte con el marcador es habitualmente de 1 fM o más, preferentemente de 1 pM o más, más preferentemente de 1 pM a

20 1 M, preferentemente además de 1 nM a 1 M, y particularmente de 1 μ M a 1 M.

En particular, cuando se usa un colorante fluorescente de unión a ácido nucleico como marcador, la concentración en una mezcla líquida para hacer que la cadena de ácido nucleico (incluyendo la cadena de ácido nucleico contenida en la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión

25 y la diana de medición) contacte con el marcador es habitualmente de un 1 fM o más, preferentemente de un 1 pM a 1 M, más preferentemente además de 1 nM a 1 M.

Cuando se usa una muestra tal como suero que contiene una gran cantidad de sustancias coexistentes (por ejemplo, proteínas, etc.), capaces de unirse al colorante fluorescente de unión a ácido nucleico, aparte de la diana de medición, es apropiado usar un

30 marcador distinto del colorante fluorescente de unión a ácido nucleico de entre los marcadores mencionados anteriormente para evitar un aumento del fondo y una disminución de la intensidad de señal causada por asociación del colorante fluorescente de unión a ácido nucleico con las sustancias coexistentes.

A este respecto, cuando se usa una diana de medición algo purificada, en otras

35 palabras, cuando la muestra, además de la diana de medición, no contiene una gran cantidad

de sustancias coexistentes (por ejemplo, proteínas, etc.) a las que se une el colorante fluorescente de unión a ácido nucleico, es preferible usar el colorante fluorescente de unión a ácido nucleico por las razones siguientes.

5 Puesto que el colorante fluorescente de unión a ácido nucleico puede actuar marcando una cadena de ácido nucleico a una proporción determinada (marcándola habitualmente a una proporción de 1 molécula por cada 5 a 6 bases), es posible aumentar la cantidad de marcaje (eficacia de marcaje) más que en el uso del marcador convencional. Por lo tanto, puede aumentarse la sensibilidad de medición (detección). Además, la cantidad del colorante fluorescente de unión a ácido nucleico para marcar una cadena de ácido nucleico puede
10 ajustarse fácilmente variando la longitud de la cadena de ácido nucleico y la sensibilidad de medición (detección) puede controlarse opcionalmente. Por ejemplo, cuando la diana de medición está en una concentración elevada, es posible mantener la sensibilidad de medición (detección) a bajo nivel usando una cadena de ácido nucleico de longitud corta para reducir la cantidad del colorante fluorescente de unión a ácido nucleico para marcar una cadena de ácido
15 nucleico. Por otro lado, cuando la diana de medición está en una baja concentración, es posible aumentar la sensibilidad de medición (detección) usando una cadena de ácido nucleico de longitud larga para aumentar la cantidad del colorante fluorescente de unión a ácido nucleico para marcar una cadena de ácido nucleico. Por lo tanto, se hace posible ampliar el intervalo dinámico de medición.

20 En un procedimiento para marcar una cadena de ácido nucleico con un marcador, es preferible unir la cadena de ácido nucleico al marcador a través de una sustancia de engarce. Particularmente, se prefiere unir la cadena de ácido nucleico a la sustancia de engarce marcada de forma preliminar con el marcador.

25 Cuando la cantidad de marcador usado en el marcaje de la cadena de ácido nucleico no es uniforme, la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión marcada con el marcador produce un pico ancho en la electroforesis, provocando una disminución de la sensibilidad. En el procedimiento mencionado anteriormente, es posible marcar la cadena de ácido nucleico mediante una cantidad uniforme del marcador. Particularmente, cuando se usa la sustancia de engarce marcada de forma preliminar con el marcador, es más preferible porque la
30 cantidad del marcador usado en el marcaje de la sustancia de engarce puede ajustarse fácilmente en el transcurso de la preparación de la sustancia de engarce marcada.

35 Por ejemplo, se une biotina a una cadena de ácido nucleico y después a avidina (o estreptavidina) marcada de forma preliminar con un marcador. Por lo tanto, la cadena de ácido nucleico puede marcarse fácilmente bajo el control de la cantidad del marcador. En otro caso, por ejemplo, la biotina se une primero a una cadena de ácido nucleico y después a una

sustancia de engarce (por ejemplo, cadena de ácido nucleico de engarce, etc.) marcada con un marcador de forma preliminar, unida a biotina por medio de avidina (o estreptavidina). Por lo tanto, la cadena de ácido nucleico puede marcarse fácilmente bajo el control de la cantidad del marcador. Además, puesto que una molécula de avidina (o estreptavidina) puede hacer que se unan 4 moléculas de biotina, es posible hacer que se unan 3 moléculas de la sustancia de engarce marcada para aumentar la sensibilidad de medición (detección).

Para formar un complejo de la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador), una muestra que contiene la diana de medición se pone mutuamente en contacto con una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia la diana de medición (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico. Por último, se forma un complejo que comprende (a) la diana de medición y (b) un complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico [la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador)]. No existen limitaciones siempre que pueda producirse dicho complejo.

En concreto, se ejemplifican los procedimientos siguientes. (1) De acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente, en primer lugar, la cadena de ácido nucleico contenida en una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia la diana de medición se marca con un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico para formar un complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y el marcador (la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador). Posteriormente, este complejo se mezcla con una muestra que contiene la diana de medición, por ejemplo, en agua o un tampón (por ejemplo, tampón Tris, tampón fosfato, tampón Veronal, tampón borato, tampón de Good, tampón SSC, tampón TBE, tampón TAE, etc., usados en el campo de hibridación, inmunoensayo, etc.). Por lo tanto, se forma un complejo que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador). (2) Una muestra que contiene la diana de medición, una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y un marcador se mezclan y se ponen en contacto todos a la vez en agua o un tampón como se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, se forma un complejo que comprende la diana de medición (la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador). Como alternativa, (3) en primer lugar, una muestra que contiene la diana de medición se pone mutuamente en contacto con una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión en agua o tampón como se ha mencionado anteriormente, para formar un complejo de diana de medición-cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión. Después, la cadena de ácido nucleico en el complejo resultante de diana de medición-cadena

de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión se marca con un marcador para dar un complejo que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador).

5 En los procedimientos mencionados anteriormente, una muestra que contiene la diana de medición, una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión, un marcador, un complejo de cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador, etc., pueden disolverse, dispersarse o suspenderse en agua o un tampón, como se ha mencionado anteriormente, para ponerse mutuamente en contacto. Como alternativa, pueden disolverse, dispersarse o suspenderse respectivamente en agua o un tampón como se ha mencionado
10 anteriormente, para dar los productos líquidos respectivos, que después se mezclan para ponerse mutuamente en contacto.

En los procedimientos mencionados anteriormente, cuando la muestra que contiene la diana de medición es líquida, no es necesario disolverla, dispersarla o suspenderla en agua o un tampón como se ha mencionado anteriormente.

15 En el procedimiento mencionado anteriormente (1) para formar un complejo de la diana de medición y el complejo de cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador, es difícil definir en general la concentración del último complejo, debido a que es variable dependiendo del límite de detección de la diana de medición. Sin embargo, es deseable mantener el complejo a una concentración superior a aquella a la que el complejo puede unirse
20 completamente a la concentración de la diana de medición de la concentración correspondiente al límite de detección definido en la mezcla de reacción. La concentración en la mezcla de reacción es preferentemente de 2 veces o más la concentración a la que el complejo puede unirse completamente con la diana de medición de la concentración correspondiente a la concentración del límite de detección definido, más preferentemente de 5 veces o más. En el
25 procedimiento mencionado anteriormente (2) para la formación de un complejo que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) y en el procedimiento mencionado anteriormente (3) para formación de un complejo de la diana de medición-la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión, es difícil definir en general la concentración de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión porque
30 es variable dependiendo del límite de detección de la diana de medición. Sin embargo, es deseable mantener la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión a una concentración superior a aquella a la que la sustancia puede unirse completamente a la diana de medición de la concentración correspondiente a la concentración del límite de detección definido en la mezcla de reacción. La concentración en la mezcla de reacción es
35 preferentemente de 2 veces o más la concentración a la que el complejo puede unirse

completamente a la diana de medición de la concentración correspondiente a la concentración del límite de detección definido, más preferentemente de 5 veces o más. La concentración del marcador a usar en los procedimientos (2) y (3) puede definirse como se menciona en el procedimiento para marcar la cadena de ácido nucleico- sustancia con afinidad de unión con un
5 marcador.

Es difícil en general definir el pH y la temperatura para formar un complejo de la diana de medición-la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador), puesto que dependen de las propiedades de la diana de medición o de la cadena de ácido nucleico-
10 sustancia con afinidad de unión. Sin embargo, siempre que no alteren la formación de los complejos, la formación puede realizarse habitualmente a un pH de 2 a 10, preferentemente a un pH de 5 a 9 y, habitualmente, a una temperatura de 0 a 90°C, preferentemente de 20 a 80°C. La reacción puede realizarse durante un periodo de unos pocos segundos a varias horas en respuesta a las propiedades respectivas de la diana de medición y la cadena de ácido nucleico-
15 sustancia con afinidad de unión, puesto que el tiempo de reacción necesario para la formación del complejo varía dependiendo de sus propiedades.

Una muestra a la que es aplicable la invención puede ejemplificarse por lo siguiente: muestras de origen biológico incluyendo fluido corporal tal como suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, linfa, etc., excreciones tales como orina, heces, etc.,
20 expectoración, material purulento, exfoliación dérmica, etc., muestras ambientales tales como alimentos, bebidas, agua corriente, agua de mar, agua de lagos y marismas, agua de río, agua de residuos industriales, lavados de semiconductores, lavados después de lavado de instrumental médico, etc., y sus productos procesados reconstituidos por disolución en agua o un tampón usado habitualmente en el presente campo, por ejemplo, tampón Tris, tampón
25 fosfato, tampón Veronal, tampón borato, tampón de Good, etc.

Por lo tanto, el complejo resultante que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) se separa de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación de dicho complejo y, si es necesario, del marcador. En esta separación, puede aplicarse un
30 procedimiento convencional usado en el presente campo, denominado procedimiento de separación B/F, por ejemplo, una separación eléctrica utilizando electricidad tal como electroforesis (por ejemplo, enfoque isoléctrico, electroforesis en SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis de acrilamida), dielectroforesis, etc., análisis en columna (por ejemplo, análisis en columna de filtración en gel, análisis en columna de
35 intercambio iónico, análisis en columna de afinidad), análisis espectrométrico de masas y

similares. En particular, puede usarse preferentemente un procedimiento usado en la separación de proteínas o ácidos nucleicos, por ejemplo, una separación eléctrica incluyendo electroforesis tal como enfoque isoeléctrico, electroforesis en SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en acrilamida, etc., o dielectroforesis. Más particularmente, es preferible usar electroforesis capilar o dielectroforesis puesto que puede realizarse en una condición de refrigeración eficaz y a alto voltaje con gran eficacia de separación.

El complejo que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) se separa generalmente de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación de dicho complejo y, si es necesario, del marcador en el procedimiento de separación que se ha mencionado anteriormente. Cuando se usa un colorante fluorescente de unión a ácido nucleico como marcador, el colorante tiene una propiedad tal que se convierte en un estado detectable (emisión de fluorescencia intensa) sólo cuando marca una cadena de ácido nucleico. Puesto que el colorante fluorescente de unión ácido nucleico libre no está implicado en la formación del complejo, no influye en la medición deseada y no altera la medición de la diana de medición, cuando el colorante fluorescente de unión ácido nucleico se usa como marcador, no es necesario separar la diana de medición-(el ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) del marcador (colorante fluorescente de unión ácido nucleico). De forma similar, cuando el complejo que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) se forma de acuerdo con el procedimiento que se ha mencionado anteriormente (1), es decir, cuando en primer lugar, se forma un complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y el marcador y, después, se pone en contacto con la diana de medición para formar el complejo que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador), después de la formación del complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador, el marcador libre se separa y se retira de antemano, y después el complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador que no contiene marcador libre puede ponerse en contacto con la diana de medición. En tal caso, no es necesario separar respectivamente la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) y el marcador. Por consiguiente, en tal caso, es suficiente separar respectivamente el complejo que comprende la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) y la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación del complejo.

En la invención, pueden utilizarse todos los aparatos de separación, fuentes de energía eléctrica para migración (electroforesis), tampones, cargas, una diversidad de reactivos tales como soluciones de procesamiento, etc., usados convencionalmente en un procedimiento de separación

basado en electroforesis como se menciona anteriormente. La concentración de estos materiales puede seleccionarse opcionalmente de acuerdo con el procedimiento conocido por sí mismo. Las condiciones de la separación (por ejemplo, pH, temperatura, voltaje aplicado, tiempo y etcétera) pueden seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el procedimiento conocido por sí mismo.

5 Cuando el procedimiento de la invención se lleva a cabo en un μ -TAS, es particularmente de preferencia llevar a cabo la separación por medio de electroforesis en microplaca capilar o dielectroforesis.

10 La electroforesis en microplaca capilar es una técnica para realizar electroforesis en un capilar de 100 μ m o menos de diámetro de sección transversal proporcionado en un sustrato de microplaca. En este procedimiento, las sustancias de una muestra pueden separarse basándose en la diferencia del grado de migración causada por aplicación de cierto voltaje en el interior del capilar, dependiendo de la diferencia de su propia carga eléctrica. El aparato usado en este procedimiento tiene básicamente la estructura que se muestra en la Figura 1, equipado con una estructura capilar en forma de cruz realizada mediante una técnica de procesamiento fina, y un depósito en el extremo del capilar para cargar un tampón o muestra.

15 La electroforesis en microplaca capilar se realiza para la separación de sustancias de acuerdo con los procedimientos siguientes.

(1) Un tampón de migración (electroforesis) se envasa en un capilar y, después, se aplica una muestra en un depósito de muestra.

20 (2) Posteriormente, se aplica cierto voltaje, por ejemplo, como se muestra en la introducción de una muestra en la Figura 1 y, como resultado, una muestra migra desde el depósito de muestra en la dirección de la flecha (las flechas laterales). (3) Después, el voltaje aplicado se convierte en un voltaje de separación de muestra, por ejemplo, como se muestra en la Figura 1 (la flecha vertical) y, por lo tanto, sólo una muestra existente en la parte de cruce del capilar se introduce en un capilar para su separación. La sustancia se separa en una posición opcional en el capilar para su separación dependiendo de la diferencia del grado de migración de la sustancia.

25 A este respecto, en el interior del capilar, un polímero que tiene un efecto de tamiz molecular se envasa como carga junto con un tampón de migración (electroforesis). Por lo tanto, además de la diferencia de carga, la diferencia de tamaño de una sustancia contribuye a la diferencia del grado de migración para permitir una separación más eficaz.

30 No existe ninguna limitación particular para la calidad del material de capilar usado en la invención siempre que se haya usado convencionalmente en el presente campo. En concreto, dicho material incluye, por ejemplo, compuestos de sílice tales como vidrio, cuarzo, silicona, etc. y polímeros sintéticos tales como polimetilmetacrilato, polimetilsiloxano, cloruro de polivinilo,

35

poliuretano, poliestireno, polisulfona, policarbonato, politetra-fluoroetileno, etc. No existe ninguna limitación particular en el diámetro interior y longitud siempre que la diana de medición pueda separarse. El diámetro interior es habitualmente de 1 a 1.000 μm , preferentemente de 1 a 200 μm , más preferentemente de 1 a 100 μm . La longitud es habitualmente de 0,1 mm a 100 cm, preferentemente de 0,1 mm a 20 cm, más preferentemente de 0,1 mm a 10 cm.

No existe ninguna limitación particular para el polímero (carga) envasado en el capilar siempre que se haya usado de forma convencional en el presente campo. En concreto, dicho polímero incluye, por ejemplo, poliéteres tales como óxido de polietileno (polietilenglicol), óxido de polipropileno, etc.; polialquileniminas tales como polietilenimina, etc.; polímeros poliacrílicos tales como ácido poliacrílico, éster de poliacrilato, metilpoliacrilato, etc.; polímeros de poliamida tales como poliacrilamida, polimetacrilamida, etc.; polímeros de tipo ácido polimetacrílico tales como ácido polimetacrílico, éster de polimetacrilato, metilpolimetacrilato, etc.; polímeros de tipo polivinilo tales como acetato de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidona, etc.; polímeros hidroxilo solubles en agua tales como pululano, elsinano, xantano, dextrano, goma guar, etc.; celulosa soluble en agua tal como metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidoxipropilcelulosa, etc.; y sus derivados y copolímeros, que contienen múltiples clases de unidades de monómeros constituyendo sus polímeros. La carga puede usarse en solitario o en combinación de dos o más miembros.

El peso molecular de la carga, como se ha mencionado anteriormente, es habitualmente de 500 Da a 6.000 kDa, preferentemente de 1 a 1.000 kDa, más preferentemente de 100 a 1.000 kDa.

La concentración de la carga usada, como se ha mencionado anteriormente, se selecciona opcionalmente dentro del intervalo empleado habitualmente en el presente campo, es decir, habitualmente del 0,01 al 40% (p/v), preferentemente del 0,01 al 20% (p/v), más preferentemente del 0,01 al 10% (p/v).

Cuando la carga mencionada anteriormente se añade a un tampón de migración (electroforesis), la viscosidad del tampón es habitualmente de 2 a 1.000 centipoises, preferentemente de 5 a 200 centipoises, más preferentemente de 10 a 100 centipoises.

No existe ninguna limitación particular para el tampón de migración siempre que se haya usado habitualmente en el presente campo. En concreto, dicho tampón incluye los usados en el campo de la hibridación, inmunoensayo, etc., por ejemplo, tampón Tris, tampón fosfato, tampón Veronal, tampón borato, tampón de Good, tampón SSC, tampón TBE, tampón TAE, etc. Estos tampones pueden usarse habitualmente en una concentración de 0,1 mM a 10 M, preferentemente de 1 mM a 5 M, más preferentemente de 5 mM a 1 M. El pH del tampón puede estar en cualquier intervalo en el que la separación de sustancias no vea afectada

perjudicialmente y es habitualmente de 2 a 13, preferentemente de 4 a 11, más preferentemente de 5 a 9.

5 El voltaje aplicado puede seleccionarse del intervalo empleado habitualmente en el presente campo, habitualmente de 5 a 2.000 V/cm², preferentemente de 10 a 1.000 V/cm², más preferentemente de 50 a 500 V/cm².

El modo de realizar la invención se describe en lo siguiente.

[Procedimiento de Separación 1]

10 Un ejemplo de uso de una especie de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión por una diana de medición se muestra esquemáticamente en la Figura 2 (el ejemplo no es parte de la invención).

15 En primer lugar, una muestra que contiene una diana de medición, una especie de una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia la diana de medición (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico forman un complejo de la diana de medición-[la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador], seguido de separación electroforética de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación de dicho complejo y, si es necesario, del marcador.

20 La diana de medición separable en el procedimiento mencionado anteriormente incluye aquellas cuyo pI tiene habitualmente una diferencia de 0,1 o más, preferentemente de 0,5 o más, más preferentemente 1,0 o más, del valor de pH del tampón usado en la separación electroforética.

No existe ninguna limitación particular para el tamaño (peso molecular) de la diana de medición, pero habitualmente es de 100 Da o más, preferentemente de 300 Da a 2.000 kDa, más preferentemente de 500 Da a 1.000 kDa.

25 Respecto al procedimiento mencionado anteriormente, los artículos siguientes son como se han descrito anteriormente: una cadena de ácido nucleico; una sustancia que tiene una afinidad por la diana de medición; un marcador; una muestra que contiene la diana de medición; un procedimiento para unir una cadena de ácido nucleico a una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición; un procedimiento para marcar una cadena de ácido nucleico con un
30 marcador; y un procedimiento para formar una muestra que contiene una diana de medición, una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia la diana de medición (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico en un complejo de la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador).

35 Respecto al procedimiento mencionado anteriormente, como un procedimiento para

separar el complejo resultante de la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador) de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación del complejo y, si es necesario, del marcador, puede aplicarse cualquier tipo de los denominados procedimientos de separación B/F usados habitualmente en el presente campo, como se ha mencionado anteriormente. Particularmente, se usa generalmente un procedimiento electroforético usado en la separación de proteínas o ácidos nucleicos y se prefiere electroforesis capilar (en microplaca) o dielectroforesis. Los aparatos de separación, fuentes de energía eléctrica para migración, tampones, cargas, una diversidad de reactivos tales como soluciones de procesamiento, su concentración en el uso, la calidad de un material para el capilar, las condiciones de separación (por ejemplo, pH, temperatura, voltaje aplicado, tiempo y etcétera) son los mismos que se han mencionado anteriormente.

[Procedimiento de Separación 2]

En el procedimiento de la invención, se usa una especie de una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión en combinación con una o más especies de otras cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión. Es decir, el uso de 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión mejora la capacidad de separación de la diana de medición. Un ejemplo de uso de 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión para una diana de medición se muestra esquemáticamente en la Figura 3 (no parte de la invención).

En primer lugar, una muestra que contiene una diana de medición, 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por la diana de medición y, respectivamente, sitios de unión diferentes para la diana de medición, y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico, forman un complejo de la diana de medición-[2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcador], seguido de separación electroforética del complejo de 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcadores no implicadas en la formación de dicho complejo y, si es necesario, del marcador.

Entre las dianas de medición mencionadas anteriormente, la diana separada en el procedimiento descrito anteriormente tiene 2 o más sitios de unión mutuamente diferentes a los que pueden unirse 2 o más especies diferentes de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión.

Las cadenas de ácido nucleico unidas a 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión que se usan en el procedimiento descrito anteriormente son como se ha mencionado anteriormente. La longitud de las cadenas de ácido

nucleico respectivas puede ser igual o diferente, permitiendo la separación del complejo de la diana de medición-[2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcador] de 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcadores no implicadas en la formación de dicho complejo y, si es necesario, del marcador. Más específicamente, la relación entre la cadena de ácido nucleico en el complejo formado y esas 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión se representa por (la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo – la longitud de cadena de ácido nucleico de la cadena de ácido nucleico más larga-sustancia con afinidad de unión entre 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión)/(la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo) = X, y el valor X está habitualmente en el intervalo de $0 < X < 1$, preferentemente $0,001 \leq X < 1$, más preferentemente $0,01 \leq X < 1$, más preferentemente $0,1 \leq X < 1$ y particularmente $0,5 \leq X < 1$.

Como 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por la diana de medición y, respectivamente, sitios de unión diferentes para la diana de medición, 2 o más especies de sustancias que tienen sitios de unión respectivamente diferentes para la diana de medición pueden seleccionarse de las sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por la diana de medición.

En el procedimiento mencionado anteriormente, en general se marcan todas las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión con un marcador, pero es suficiente marcar al menos una especie de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión con un marcador. Las otras especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión pueden marcarse o no con un marcador.

En tal caso, el complejo formado finalmente de la diana de medición-(2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcador) puede representarse por (la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) $1 - m$ [donde 1 indica un número entero de 0 o más, m indica un número entero de 1 o más y $1 + m$ es 2 o más].

A este respecto, en el procedimiento mencionado anteriormente, pueden usarse 1 ó 2 o más especies de los marcadores.

Respecto al procedimiento mencionado anteriormente, los artículos siguientes son los mismos que se han descrito anteriormente: un marcador; una muestra que contiene la diana de medición; un procedimiento para unir una cadena de ácido nucleico a una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición; un procedimiento para marcar una cadena de ácido nucleico

con un marcador; y un procedimiento para formar una muestra que contiene una diana de medición, 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por la diana de medición y, respectivamente, sitios de unión diferentes para la diana de medición (2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico en un complejo de la diana de medición-(2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcadores).

Respecto al procedimiento mencionado anteriormente, como un procedimiento de separación del complejo resultante de la diana de medición-(2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcadores) de 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcadores no implicadas en la formación del complejo y, si es necesario, del marcador, puede aplicarse cualquier tipo de los denominados procedimientos de separación B/F usado habitualmente en el presente campo, como se ha mencionado anteriormente. Particularmente, se usa generalmente un procedimiento electroforético usado en la separación de proteínas o ácidos nucleicos y se prefiere electroforesis capilar (en microplaca) o dielectroforesis. El aparato de separación, fuentes de energía eléctrica para migración, tampones, cargas, una diversidad de reactivos, su concentración en el uso, la calidad de un material para el capilar, las condiciones de separación (por ejemplo, pH, temperatura, voltaje aplicado, tiempo y etcétera) son los mismos que se han mencionado anteriormente.

En el procedimiento de la invención, una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad por la diana de medición y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico pueden unirse respectivamente a 2 o más especies de las dianas de medición de modo que tengan cadenas de ácido nucleico que tenga una longitud diferente entre sí y den 2 o más especies de complejos de la diana de medición-cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador. Por lo tanto, se hace posible separar 2 o más especies de los complejos respectivamente de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación de los complejos y, si es necesario, del marcador. En otras palabras, pueden separarse múltiples dianas de medición al mismo tiempo.

El procedimiento mencionado anteriormente puede clasificarse en líneas generales en 2 tipos dependiendo de las propiedades de la sustancia usada que tiene afinidad por la diana de medición, es decir, un procedimiento en el que se usa al menos una especie de sustancia que tiene una afinidad por todos los 2 o más tipos de dianas de medición, y un procedimiento en el que se usan 2 o más especies de sustancias que tienen afinidad por sólo un tipo de 2 o más tipos de dianas de medición.

[Procedimiento de Separación 3]

En primer lugar, se usa un procedimiento en el que al menos una especie de sustancia que tiene afinidad por todos de 2 o más tipos de las dianas de medición y se muestra esquemáticamente en la Figura 4 (no parte de la invención).

5 El procedimiento comprende formar primero (a) una muestra que contiene n tipos mutuamente diferentes (en los que n es un número entero de 2 o más) de dianas de medición A_1 , A_2 , A_3 , ... A_{n-1} y A_n , (b) (1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todos de n tipos de dianas de medición de A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), (2) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene una afinidad hacia todas las dianas de medición de A_2 a A_n excepto por A_1 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), (3) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todas las dianas de medición de A_3 a A_n excepto por A_1 y A_2 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$), ..., (n-1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia las dianas A_{n-1} y A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$), y (n) es una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad sólo hacia la diana A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}), y (c) un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico en [1] un complejo de la diana de medición A_1 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ -marcador, [2] un complejo de la diana de medición A_2 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ -marcador, [3] un complejo de la diana de medición A_3 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$ -marcador, ..., [n-1] un complejo de la diana de medición A_{n-1} -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ -marcador y [n] un complejo de la diana A_n -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n} -marcador y, después, separar mutuamente los complejos respectivos de [1] a [n] de los complejos de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión respectivas de (1) a (n) y los marcadores no implicados en la formación de dichos complejos y, si es necesario, de los marcadores.

Los n tipos de las dianas de medición separados en el procedimiento mencionado anteriormente significan que entre las dianas de medición mencionadas anteriormente todas las dianas de medición de 1 a n tienen al menos un sitio de unión que es común a todas las dianas de medición de 1 a n y al que es capaz de unirse una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión. Además, entre ellas, también se hace referencia a lo siguiente: las dianas de medición 2 a n tienen un sitio de unión que es común a las dianas de medición 2 a n distinto de la diana de medición 1, y al que es capaz de unirse una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión (el sitio de unión no contenido en la diana 1 o el contenido en la diana 1 pero estando inhibida por algún factor la unión de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión); ... las dianas de medición de $n-1$ a n tienen un sitio de unión que es común a las dianas de medición $n-1$ a n distinto de la diana de medición 1 a $n-2$, y al que puede unirse una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión (el sitio de unión no contenido en las dianas de medición 1 a $n-2$ o el contenido en las dianas de medición 1 a $n-2$ pero estando inhibida por algún factor la unión de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión); y la diana de medición n tiene un sitio de unión que está contenido sólo en la diana de medición n y al que puede unirse una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión (el sitio de unión no contenido en ninguna de las dianas de medición 1 a $n-1$ o el contenido en las dianas de medición 1 a $n-1$ pero estando inhibida por algún factor la unión de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión). En el procedimiento mencionado anteriormente, la expresión "contenido pero estando inhibida por algún factor la unión de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión" significa, por ejemplo, que la estructura del sitio de unión no está modificada pero que la unión de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión al sitio de unión en la diana de medición se inhibe por la estructura vecina (por ejemplo, cadena de azúcar, etc.) o que una sustancia determinada (por ejemplo, lectina) que se acopla (se une) a la vecina del sitio de unión está inhibiendo la unión de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión al sitio de unión en la diana de medición.

En el procedimiento mencionado anteriormente, cuando sólo se usa una especie de la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad por todos los n tipos de dianas de medición de A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), en otras palabras, cuando entre una diversidad de los complejos separados existe un complejo al que sólo se une una especie de las cadenas de ácido nucleico-sustancias de unión, es preferible para las dianas de medición mencionadas anteriormente que el pI en al menos una de las dianas de medición contenida en el complejo tenga una diferencia de 0,1 o más, preferentemente de 0,5 o más, más preferentemente de 1,0 o más, del pH del tampón usado en la separación electroforética.

El procedimiento mencionado anteriormente es útil en la medición de una molécula que contiene 2 o más especies de sustancias que tienen la misma acción o una molécula que contiene 2 o más especies de sustancias que tienen una estructura similar pero acciones mutuamente diferentes, tales como isozimas, isoformas, hormonas, etc., y que tiene las propiedades que se han mencionado anteriormente. Dicha molécula se selecciona de, por ejemplo, enzimas tales como amilasa (por ejemplo, tipo pancreático, tipo glándula salivar, tipo X, etc.), fosfatasa alcalina (por ejemplo, hepática, osteoide, placentaria, de intestino delgado, etc.), fosfatasa ácida (por ejemplo, PAP, etc.), γ -glutamil transferasa (por ejemplo, renal, pancreática, hepática, etc.), lipasa (por ejemplo, pancreática, gástrica, etc.), creatina quinasa (por ejemplo, CK-1, CK-2, mCK, etc.), ácido láctico deshidrogenasa (por ejemplo, de LDH1 a LDH5, etc.), ácido glutámico-ácido oxaloacético transaminasa (por ejemplo, ASTm, ASTs, etc.), ácido glutámico-ácido pirúvico transaminasa (por ejemplo, ALTm, ALTs, etc.), colinoesterasa (por ejemplo, de ChE1 a ChE5, etc.), leucina aminopeptidasa (por ejemplo, C-LAP, AA, CAP, etc.), renina, proteína quinasa, tirosina quinasa y similares; sustancias fisiológicamente activas tales como hormonas esteroideas, gonadotropina coriónica humana (familia hCG), prolactina, hormona estimulante del tiroides (familia TSH), hormona luteinizante (familia LH) y similares; antígenos relacionados con el cáncer tales como antígeno prostático específico (familia PSA), α^2 -macroglobulina, antígeno carcinoembrionario (por ejemplo, CEA, NCA, NCA-2, NFA, etc.), α -fetoproteína (por ejemplo, de L1 a L3, etc.) y similares.

El número n de los n tipos de las dianas de medición en el procedimiento mencionado anteriormente es habitualmente de 2 o más, preferentemente de 2 a 10, más preferentemente de 2 a 5.

La cadena de ácido nucleico en una diversidad de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión que se usa en el procedimiento mencionado anteriormente es como se ha mencionado anteriormente. Las cadenas de ácido nucleico respectivas pueden ser iguales o diferentes entre sí en su longitud, que puede seleccionarse apropiadamente de modo que los complejos [1] a [n] puedan separarse respectivamente de los complejos (1) a (n) de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión y el marcador no implicados en la formación de los primeros complejos y, si es necesario, del marcador. Más específicamente, por ejemplo, cuando se sea separar n tipos de las dianas de medición con p especies (donde p es un número entero igual a o superior a n) de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión, la relación entre la cadena de ácido nucleico en n tipos de los complejos respectivos y la de p tipos de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión respectivas puede representarse por las fórmulas siguientes. (1) (Entre n especies de los complejos y p especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión, la

suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) es la mayor – la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición)/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) es la mayor; (2) la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición – la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 3ª posición)/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición; ...; y (n+p-1) [la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p-1 – la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p (más pequeña)]/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p-1. En estas fórmulas, el valor resultante (X) está habitualmente en el intervalo de $0 < X < 1$, preferentemente de $0,001 \leq X < 1$, más preferentemente $0,01 \leq X < 1$, más preferentemente $0,1 \leq X < 1$ y particularmente $0,5 \leq X < 1$.

En el procedimiento mencionado anteriormente, no es necesario considerar la condición que se ha mencionado anteriormente de separación de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión libres respectivas debido a que la separación es innecesaria.

Como la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene una afinidad por la diana de medición, pueden elegirse apropiadamente al menos n miembros de las sustancias de entre las sustancias mencionadas anteriormente a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por la diana, de la forma siguiente: (1) entre n tipos de las dianas de medición, una sustancia que tiene afinidad por todas las dianas de medición de 1 a n (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A1:A_n}$), (2) una sustancia que tiene

una afinidad hacia las dianas de medición 2 a n excepto por la diana de medición 1 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), ..., (n-1) una sustancia que tiene afinidad hacia las dianas de medición de n-1 a n excepto por las dianas de medición 1 a n-2 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$), y (n) es una sustancia que tiene afinidad hacia la diana de medición n excepto por las dianas de medición 1 a n-1 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}).

La cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ..., cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$, y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n} , usada en el procedimiento mencionado anteriormente puede usarse en solitario o en combinación con 2 o más especies.

En el procedimiento mencionado anteriormente, al menos una especie de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión contenidas en el complejo de [1] a [n] puede marcarse con un marcador para realizar la medición deseada. Aunque otras cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión pueden marcarse o no marcarse, es de preferencia marcar las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$) para todos los n tipos de las dianas de medición con un marcador y, en general, marcar todas las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión con un marcador.

El marcador usado en el procedimiento mencionado anteriormente puede usarse en solitario o en combinación con 2 o más especies. Por ejemplo, las especies del marcador a usar pueden variarse de acuerdo con las propiedades de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas. Por lo tanto, el marcador en 2 o más especies de los complejos de la diana de medición específica-cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica-el marcador puede variarse. Por consiguiente, se hace posible distinguir fácilmente el complejo formado, es decir, las especies de la diana de medición.

Respecto al procedimiento mencionado anteriormente, los artículos siguientes son iguales a los que se han descrito anteriormente: un marcador; una muestra que contiene la diana de medición; un procedimiento para unir una cadena de ácido nucleico a una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición; un procedimiento para marcar una cadena de ácido nucleico con un marcador; y un procedimiento para formar el complejo.

En el procedimiento mencionado anteriormente, los n tipos resultantes de los complejos [1] a [n] {[1] complejo de diana de medición A_1 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ -marcador; [2] complejo de diana de medición A_2 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de

unión $B_{A_2:A_n}$ -marcador; [3] complejo de diana de medición A_3 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$ -marcador; ...; [n-1] complejo de diana de medición A_{n-1} -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ -marcador; y [n] complejo de diana de medición A_n -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ...; cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n} -marcador} se separan de 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión-marcadores y, si es necesario, del marcador. En esta separación, un procedimiento convencional usado en el presente campo, denominado procedimiento de separación B/F, puede aplicarse de la misma forma que se ha mencionado anteriormente. Particularmente, se usa generalmente un procedimiento electroforético usado en la separación de proteínas o ácidos nucleicos y se prefiere electroforesis capilar (en microplaca). Los aparatos de separación, fuentes de energía eléctrica para migración, tampones, cargas, una diversidad de reactivos tales como soluciones de procesamiento, su concentración en el uso, la calidad de un material para el capilar, las condiciones de separación (por ejemplo, pH, temperatura, voltaje aplicado, tiempo y etcétera) son los mismos que se han mencionado anteriormente.

[Procedimiento de Separación 4]

A continuación se explicará un procedimiento para usar 2 o más especies de sustancias que tengan una afinidad por sólo uno de 2 o más tipos de las dianas de medición.

En este procedimiento, una muestra que contiene 2 o más tipos de dianas de medición, 2 o más especies de sustancias que tienen afinidad por sólo uno de 2 o más tipos de las dianas de medición y a las que se une un ácido nucleico (en lo sucesivo abreviada a veces como cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico forma 2 o más especies de complejos de las dianas de medición específicas-cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores que después se separan respectivamente de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica-marcador no implicada en la formación de los complejos y, si es necesario, del marcador por electroforesis.

El procedimiento de separación mencionado anteriormente se basa en la diferencia de migración electroforética en 2 o más especies de complejos de las dianas de medición

específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores. Los procedimientos para diferenciar la migración electroforética entre 2 o más especies de los complejos pueden clasificarse en líneas generales en 2 categorías, es decir, (1) un procedimiento para proporcionar una diferencia en el número de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas a unir a 2 o más tipos de las dianas de medición y (2) un procedimiento para proporcionar una diferencia en el tamaño (longitud de cadena) de la cadena de ácido nucleico contenida en las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas a unir a 2 o más especies de las dianas de medición.

En el procedimiento mencionado anteriormente, los marcadores, la muestra que contiene dianas de medición, el procedimiento para unir una cadena de ácido nucleico a una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición, el procedimiento para marcar la cadena de ácido nucleico con un marcador y el procedimiento para formar el complejo son los mismos que se han mencionado anteriormente.

[Procedimiento de Separación 4-a]

En primer lugar, un procedimiento para proporcionar una diferencia en el número de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas a unir a 2 o más tipos de dianas de medición se muestra esquemáticamente en la Figura 5 (no parte de la invención).

En primer lugar, una muestra que contiene 2 o más tipos de dianas de medición cuyo número de sitios de unión a sustancias que tienen afinidad sólo por las dianas de medición respectivas es diferente, 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por sólo una de las dianas deseadas (cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico, forman 2 o más especies de complejos de las dianas específicas-cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores, que después se separan respectivamente de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores no implicadas en la formación de los complejos y, si es necesario, del marcador por electroforesis.

Como 2 o más tipos de las dianas de medición separadas en el procedimiento mencionado anteriormente, entre las dianas de medición que se han mencionado anteriormente y moléculas que contienen 2 o más especies de sustancias que tienen la misma acción o moléculas que contienen 2 o más especies de sustancias que tienen una estructura similar pero acciones mutuamente diferentes como isozimas, isoformas, hormonas, etc., se incluyen aquellas para la que existe una sustancia que tiene afinidad sólo por las dianas de medición respectivas y cuyo número de cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión a unir a 2 o más de las dianas de medición respectivas es diferente. Cuando existe un complejo al

que se une sólo una especie de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica en una diversidad de los complejos separados, es deseable para las dianas de medición mencionadas anteriormente que el pI en al menos la diana de medición contenida en el complejo tenga una diferencia de 0,1 o más, preferentemente de 0,5 o más, más preferentemente de 1,0 o más del pH, del tampón usado en la separación electroforética.

En el procedimiento mencionado anteriormente, el número de 2 o más tipos de las dianas de medición puede ser habitualmente de 2 o más, preferentemente de 2 a 10, y más preferentemente de 2 a 5, aunque no existe una limitación particular.

Dos o más especies de las cadenas de ácido nucleico en la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica que se usan en el procedimiento mencionado anteriormente son como se han mencionado anteriormente. Las cadenas de ácido nucleico respectivas pueden ser iguales o diferentes entre sí en su longitud, que puede seleccionarse apropiadamente de modo que 2 o más especies de los complejos de las dianas de medición específicas-cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores puedan separarse de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica-marcador no implicada en la formación de los complejos y, si es necesario, del marcador. En esta operación, se usa generalmente la cadena de ácido nucleico de la misma longitud de cadena. Más específicamente, por ejemplo, cuando n tipos de dianas de medición se separan con p especies (p tiene el mismo significado que se ha mencionado anteriormente) de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas, la relación entre la cadena de ácido nucleico contenida en n especies de los complejos formados y la contenida en p especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas respectivas usadas puede representarse mediante lo siguiente. (1) (Entre n especies de los complejos y p especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas, la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) es la mayor – la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición)/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena acoplada (unida) es la mayor; (2) (la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición – la suma total de la longitud de la

cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 3ª posición)/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición; ...; y (n+p-1) [la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p-1 – la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p (más pequeña)]/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p-1. En estas formulas, el valor resultante (X) está habitualmente en el intervalo de $0 < X < 1$, preferentemente $0,001 \leq X < 1$, más preferentemente $0,01 \leq X < 1$, más preferentemente $0,1 \leq X < 1$ y particularmente $0,5 \leq X < 1$.

En el procedimiento mencionado anteriormente, no es necesario considera la condición que se ha mencionado anteriormente de separación de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas libres respectivas porque la separación es innecesaria.

Como las sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene una afinidad por la diana de medición específica, las que tienen una afinidad sólo por la diana específica deseada separada pueden seleccionarse apropiadamente de entre las sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen una afinidad por la diana de medición, como se ha mencionado anteriormente.

En el procedimiento mencionado anteriormente, el número de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas a unir a la diana de medición específica no es necesario que sea sólo de una como mínimo y pueden usarse 2 o más especies.

Cuando se usan 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas, en general se marcan todas con un marcador, pero es suficiente marcar al menos una especie de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas con un marcador. Las otras especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas puede marcarse o no con un marcador.

En el procedimiento mencionado anteriormente, el marcador puede usarse en solitario o en combinación con 2 o más especies. Por ejemplo, las clases del marcador pueden variarse de

acuerdo con las propiedades de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica. En tal caso, puesto que las clases de los marcadores son mutuamente diferentes entre los complejos de las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores, es posible distinguir fácilmente los complejos formados, es decir, las clases de dianas de medición.

En el procedimiento mencionado anteriormente, los marcadores, la muestra que contiene dianas de medición, el procedimiento para unir una cadena de ácido nucleico a una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición, el procedimiento para marcar la cadena de ácido nucleico con un marcador y el procedimiento para formar el complejo son los mismos que se han mencionado anteriormente.

En el procedimiento mencionado anteriormente, que da como resultado por lo tanto que 2 o más especies de los complejos de las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores se separen respectivamente de 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores y, si es necesario, del marcador. En esta separación, un procedimiento convencional usado en este campo, denominado procedimiento de separación B/F, puede aplicarse de la misma forma que se ha mencionado anteriormente. Particularmente, se usa generalmente un procedimiento electroforético usado en la separación de proteínas o ácidos nucleicos y se prefiere electroforesis capilar (en microplaca). Los aparatos de separación, fuentes de energía eléctrica para migración, tampones, cargas, una diversidad de reactivos tales como soluciones de procesamiento, su concentración en el uso, la calidad de un material para el capilar, las condiciones de separación (por ejemplo, pH, temperatura, voltaje aplicado, tiempo y etc.) son los mismos que se han mencionado anteriormente.

[Procedimiento de Separación 4-b]

A continuación, un procedimiento para proporcionar una diferencia en la longitud de la cadena de ácido nucleico de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas a unir a 2 o más tipos de dianas de medición se muestra esquemáticamente en la Figura 6 (no parte de la invención)

En primer lugar, una muestra que contiene 2 o más tipos de dianas de medición, 2 o más especies de sustancias a las que se unen cadenas de ácidos nucleicos de una longitud respectivamente diferente y que tienen afinidad por sólo un tipo de las dianas de medición deseadas (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico, forman 2 o más especies de complejos de las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores, en los que la longitud del ácido nucleico en la cadena de ácido

nucleico-sustancia con afinidad de unión específica es diferente. Después, los complejos se separan respectivamente de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores no implicadas en la formación de los complejos, y si es necesario, del marcador por electroforesis.

5 Como 2 o más tipos de las dianas de medición separadas en el procedimiento mencionado anteriormente, de forma similar, se incluyen las dianas de medición que se han mencionado anteriormente, es decir, las moléculas que contienen 2 o más especies de sustancias que tienen la misma acción o moléculas que contienen 2 o más especies de sustancias que tienen una estructura similar pero acciones mutuamente diferentes tales como
10 isozimas, isoformas, hormonas, etc. Cuando existe un complejo al que se une sólo una especie de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica en una diversidad de los complejos separados, es deseable para las dianas de medición mencionadas anteriormente que el pI en al menos la diana de medición contenida en el complejo tenga la diferencia de 0,1 o más, preferentemente de 0,5 o más, más preferentemente de 1,0 o más, del pH del tampón
15 usado en separación electroforética.

 En el procedimiento mencionado anteriormente, el número de 2 o más tipos de dianas de medición puede ser habitualmente de 2 o más, preferentemente de 2 a 10 y más preferentemente de 2 a 5, aunque no existe una limitación particular.

 Como la cadena de nucleico en 2 o más especies de sustancias a las que se unen
20 cadenas de ácido nucleico de una longitud respectivamente diferente y que tienen una afinidad por sólo un tipo de las dianas de medición deseadas (las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas) que se usan en el procedimiento mencionado anteriormente, la longitud de la cadena de ácido nucleico puede diseñarse de modo que 2 o más especies de complejos de las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con
25 afinidad de unión específicas-marcadores, en las que la longitud de ácido nucleico respectiva es diferente en las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas que se unen mutuamente, pueden separarse de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica-marcador no implicada en la formación de los complejos y, si es necesario, del marcador. No existe ninguna limitación particular para la separación. Más específicamente, por
30 ejemplo, cuando n tipos de dianas de medición se separan con p especies (p tiene el mismo significado que se ha mencionado anteriormente) de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas, la relación entre la cadena de ácido nucleico contenida en n especies de los complejos formados y la contenida en p especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas respectivas usadas puede representarse
35 por lo siguiente. (1) (Entre n especies de los complejos y p especies de las cadenas de ácido

nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas, la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) es la mayor – la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición)/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) es la mayor; (2) (la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico específica-sustancia con afinidad de unión cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición – la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 3ª posición)/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la 2ª posición; ...; y (n+p-1) [la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p-1 – la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p (más pequeña)]/la suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico en el complejo o la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica cuya suma total de la longitud de la cadena de ácido nucleico acoplada (unida) ocupa la posición n+p-1. En estas formulas, el valor resultante (X) está habitualmente en el intervalo de $0 < X < 1$, preferentemente $0,001 \leq X < 1$, más preferentemente $0,01 \leq X < 1$, más preferentemente $0,1 \leq X < 1$ y particularmente $0,5 \leq X < 1$.

En el procedimiento mencionado anteriormente, no es necesario considerar la condición que se ha mencionado anteriormente de separación de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas libres respectivas debido a que la separación es innecesaria.

Como las sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por la diana de medición específica, las que tienen una afinidad sólo por la diana específica deseada separada pueden seleccionarse apropiadamente de entre las sustancias a

las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por la diana de medición como se ha mencionado anteriormente.

5 En el procedimiento mencionado anteriormente, el número de las cadenas de ácido nucleico específicas-sustancias con afinidad de unión a unir a la diana de medición específica no es necesario que sea individual y pueden usarse 2 o más especies.

10 Cuando se usan 2 o más especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas, en general se marcan todas con un marcador pero es suficiente marcar al menos una especie de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas con un marcador. Las otras especies de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas pueden marcarse o no con un marcador.

15 En el procedimiento mencionado anteriormente, el marcador puede usarse solo o en una combinación de 2 o más especies. Por ejemplo, las clases del marcador pueden variarse de acuerdo con las propiedades de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica. En tal caso, puesto que las clases de los marcadores son mutuamente diferentes entre los complejos de las dianas de medición específicas-cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores, es posible distinguir fácilmente los complejos formados, es decir, los tipos de dianas de medición.

20 En el procedimiento mencionado anteriormente, los marcadores, la muestra que contiene dianas de medición, el procedimiento para unir una cadena de ácido nucleico a una sustancia que tiene una afinidad por la diana de medición, el procedimiento para marcar la cadena de ácido nucleico con un marcador y el procedimiento para formar el complejo son los mismos que se han mencionado anteriormente.

25 En el procedimiento mencionado anteriormente, que da como resultado por lo tanto que 2 o más especies de los complejos de las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores, en las que la longitud de la cadena de ácido nucleico es diferente entre sí, se separen respectivamente de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores y, si es necesario, del marcador por electroforesis. En esta separación, un procedimiento convencional usado en el presente campo, denominado procedimiento de separación B/F, puede aplicarse de la misma forma que se ha mencionado anteriormente. Particularmente, se usa generalmente un procedimiento electroforético usado en la separación de proteínas o ácidos nucleicos y se prefiere electroforesis capilar (en microplaca). Los aparatos de separación, fuentes de energía eléctrica para migración, tampones, cargas, una diversidad de reactivos tales como soluciones de procesamiento, su concentración en el uso, la calidad de un material para el capilar, las condiciones de separación (por ejemplo, pH, temperatura, voltaje aplicado, tiempo y etc.) son

30

35

los mismos que se han mencionado anteriormente.

Estos procedimientos de separación 1, 2, 3, 4, 4-a y 4-b mencionados anteriormente pueden realizarse en una combinación de 2 o más procedimientos.

5 En los procedimientos de separación de la invención (como se definen en las reivindicaciones) usando un complejo de cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión (específica)-marcador junto con una sustancia libre que tiene una afinidad por la diana de medición y que no se une ni a la cadena de ácido nucleico ni a un marcador (sustancia con afinidad de unión libre), se puede permitir que forme un complejo que comprenda la sustancia con afinidad de unión libre, la diana de medición y la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión (específica)-marcador, un denominado complejo tipo sándwich {un complejo de la sustancia con afinidad de unión libre-la diana de medición-[la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión (específica)-marcador]}.

15 Como la sustancia con afinidad de unión libre usada de tal forma, las mismas sustancias que se han mencionado anteriormente que tienen afinidad por la diana de medición se ejemplifican y, por ejemplo, los anticuerpos contra las dianas de medición que se han mencionado anteriormente, lectinas y similares pueden usarse de forma preferente. La formación del complejo de la sustancia con afinidad de unión libre-la diana de medición-[la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión (específica)-marcador] puede realizarse en la misma forma que en la formación del complejo de la diana de medición-(la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador).

20 La diana de medición separada por el procedimiento de separación de la invención puede determinarse mediante un procedimiento de medición que se corresponda con las propiedades del marcador contenido en el complejo que contiene la diana de medición. Por lo tanto, la cantidad de la diana de medición contenida en una muestra puede determinarse basándose en la presencia de la diana de medición en la muestra o la cantidad del marcador resultante.

25 En resumen, el complejo que comprende la diana de medición, la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene una afinidad por la diana de medición (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico [complejo de la diana de medición-(cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador)] se separa de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación del complejo y, si es necesario, del marcador de acuerdo con el procedimiento de separación de la invención. El complejo resultante puede medirse por un procedimiento de medición que se corresponda con las propiedades del marcador contenido en el en complejo. Por lo tanto, la cantidad de diana de medición contenida

en una muestra puede determinarse con gran sensibilidad y en un periodo de tiempo corto basándose en la presencia de la diana de medición en la muestra o la cantidad del marcador resultante.

5 Lo siguiente sirve para ilustrar en detalle los casos en los que se utilizan el procedimiento de separación 1, el procedimiento de separación 2, el procedimiento de separación 3, el procedimiento de separación 4, el procedimiento de separación 4-a y el procedimiento de separación 4-b.

[Procedimiento de Medición 1]

10 En primer lugar, a partir de una muestra que contiene una diana de medición, una especie de una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene una afinidad por la diana de medición (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico, un complejo de la diana de medición-[la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador] se prepara y se separa de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la
15 formación del complejo y, si es necesario, del marcador de acuerdo con el procedimiento de separación 1 de la invención. Por lo tanto, la presencia de la diana de medición en la muestra puede determinarse por medición del complejo por un procedimiento que se corresponda con las propiedades del marcador contenido en el complejo. Además, la cantidad de la diana de medición en la muestra puede determinarse basándose en la cantidad del marcador obtenido de
20 este modo.

[Procedimiento de Medición 2]

25 En primer lugar, a partir de una muestra que contiene una diana de medición, 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por la diana de medición y, respectivamente, un sitio de unión diferente y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico, complejos de la diana de medición-[2 o más especies de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcadores] se preparan y se separan de las 2 o más especies de cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicadas en la formación de los complejos y, si es necesario, del marcador de acuerdo con el procedimiento de separación 2 de la invención. Por lo tanto, la presencia de la
30 diana de medición en la muestra puede determinarse por medición del complejo mediante un procedimiento que se corresponda con las propiedades del marcador contenido en el complejo. Además, la cantidad de diana de medición en la muestra puede determinarse basándose en la cantidad del marcador obtenido de este modo.

[Procedimiento de Medición 3]

35 En primer lugar, a partir de (a) una muestra que contiene n tipos mutuamente diferentes

de dianas de medición $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{n-1}$ y A_n , (b) (1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todas las dianas de medición de A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), (2) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todas las dianas de medición de A_2 a A_n excepto por A_1 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), (3) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todas las dianas de medición de A_3 a A_n excepto por A_1 y A_2 (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$), ..., (n-1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia las dianas de medición de A_{n-1} y A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$), y (n) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico que tiene afinidad sólo hacia la diana de medición A_n , excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}), y (c) un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico, [1] un complejo de la diana de medición A_1 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ -marcador, [2] un complejo de la diana de medición A_2 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ -marcador, [3] un complejo de la diana de medición A_3 -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$ -marcador, ..., [n-1] un complejo de la diana de medición A_{n-1} -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ -marcador, y [n] un complejo de la diana de medición A_n -cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ y cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión B_{A_n} -marcador se preparan y después se separan de los complejos de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión respectivos de (1) a (n) y el marcador no implicados en la formación de estos complejos [1] a [n] y, si es necesario, de los marcadores de acuerdo con el procedimiento de separación 3 de la invención. Por lo tanto, la presencia de n tipos de las dianas de medición $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{n-1}$ y A_n mutuamente diferentes contenidos en la muestra puede determinarse por medición de los complejos respectivos mediante un procedimiento que se corresponda con las propiedades del marcador contenido en los complejos [1] a [n] respectivos. Además, la cantidad de la diana de medición en la muestra también puede determinarse basándose en la cantidad del marcador obtenido de este modo.

[Procedimiento de Medición 4]

A partir de una muestra que contiene 2 o más tipos de dianas de medición, 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por sólo una de las dianas de medición deseadas (cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico, 2 o más especies de complejos que comprenden las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-el marcador se preparan y se separan de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores no implicados en la formación de los complejos y si es necesario del marcador de acuerdo con el procedimiento de separación 4 de la invención. Por lo tanto, la presencia de 2 o más tipos de las dianas de medición en la muestra pueden determinarse por medición de 2 o más especies de los complejos que comprenden las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-el marcador por un procedimiento que se corresponda con las propiedades del marcador contenido en los complejos respectivos. Además, la cantidad de la diana de medición en la muestra puede determinarse basándose en la cantidad de marcador obtenido de este modo.

[Procedimiento de Medición 4-a]

A partir de una muestra que contiene 2 o más tipos de dianas de medición en la que el número de sitios de unión para las sustancias que tienen afinidad por las dianas de medición es diferente, 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico y que tienen afinidad por sólo una de las dianas de medición deseadas (cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico, 2 o más especies de complejos que comprenden las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-el marcador, en las que el número de cadenas de ácido nucleico-sustancias de unión específicas que se unen mutuamente es diferente, se preparan y se separan respectivamente de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas- marcadores no implicadas en la formación de los complejos y, si es necesario, del marcador de acuerdo con el procedimiento de separación 4-a de la invención. Por lo tanto, la presencia de 2 o más tipos de dianas de medición en las que el número de sitios de unión capaces de unirse a una sustancia que tiene una afinidad sólo por las dianas de medición respectivas en la muestra es diferente, las cadenas de ácido nucleico específicas-sustancias de unión que se unen mutuamente es diferente, puede determinarse por medición de 2 o más especies de los complejos que comprenden las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-el marcador, donde el número de la cadena de ácido nucleico

específica-sustancias de unión que se unen mutuamente es diferente, por un procedimiento que se corresponda con las propiedades del marcador contenido en los complejos respectivos. Además, la cantidad de diana de medición en la muestra puede determinarse basándose en la cantidad del marcador obtenido de este modo.

5 [Procedimiento de Medición 4-b]

10 En primer lugar, a partir de una muestra que contiene 2 o más tipos de dianas de medición, 2 o más especies de sustancias a las que se unen cadenas de ácido nucleico de una longitud respectivamente diferente y que tienen afinidad por un solo tipo de las dianas de medición deseadas (cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas) y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico, 2 o más especies de complejos de las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores en los que la longitud del ácido nucleico en la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica es diferente, se preparan y respectivamente se separan de las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-marcadores no implicadas en la formación de estos complejos y, si es necesario, del marcador de acuerdo con el procedimiento de separación 4-b de la invención. Por lo tanto, la presencia de 15 2 o más tipos de dianas de medición en la muestra puede determinarse respectivamente por medición de 2 o más especies de los complejos que comprenden las dianas de medición específicas-las cadenas de ácido nucleico-sustancias con afinidad de unión específicas-el 20 marcador, en los que la longitud del ácido nucleico en la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión específica que se unen respectivamente es diferente, por un procedimiento que se corresponde con las propiedades del marcador contenido en los complejos respectivos. Además, la cantidad de la diana de medición en la muestra puede determinarse basándose en la cantidad del marcador obtenido de este modo.

25 En el procedimiento mencionado anteriormente, al determinar la cantidad de diana de medición en una muestra basándose en la cantidad del marcador del complejo resultante, por ejemplo, se usa otra muestra que contiene la diana de medición a una concentración conocida en las mismas condiciones de medición que se han mencionado anteriormente para preparar una curva de calibración que muestra una relación entre la cantidad de la diana de medición 30 obtenida de este modo y la del marcador en el complejo. A esta curva de calibración se adapta el valor medido del marcador obtenido por medición de una muestra que contiene la diana de medición para determinar la cantidad de la diana de medición deseada.

35 Además, es posible calcular la cantidad relativa de la diana de medición contenida en una muestra por adición de una sustancia detectable como patrón interno a una concentración conocida a una muestra, seguida de comparación de la cantidad de la sustancia añadida como

patrón interno con la del marcador contenido en el complejo. De tal forma, se ha posible corregir el error entre los aparatos electroforéticos.

En el procedimiento mencionado anteriormente, como sustancia detectable, se usa en general cadenas de ácido nucleico marcadas con un marcador como se ha mencionado anteriormente.

En el procedimiento de la invención, puede conseguirse la medición del marcador contenido en una diversidad de complejos separados de acuerdo con una forma convencional que responda al tipo de marcador usado. Por ejemplo, cuando la propiedad del marcador depende de una actividad enzimática, la medición puede realizarse de una forma convencional de EIA o hibridación como se describe en, por ejemplo, "Enzyme Immunoassay" Protein, Nucleic Acid and Enzyme, Volumen Suplementario 31, Editado por Tsunehiro Kitagawa, Toshio Nambara, Akio Tuji y Eiji Ishikawa, páginas 51-63, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Publicado el 10 de septiembre de 1987. Cuando el marcador es un material radiactivo, puede detectarse de acuerdo con una forma convencional de RIA o hibridación usando un detector adecuado tal como un contador GM de tipo baño, contador de escintilación líquida, contador de escintilación tipo pocillo, etc. que responda a la clase e intensidad de la radiación emitida por el material radiactivo [véase: Ikagaku Jikken Koza (Experimental Manual in Medical Chemistry), vol. 8, Editado por Yuichi Yamamura, Primera edición, Nakayama Shoten, 1971; Seikagaku Jikkenn Koza (Experimental Manual in Biochemistry), 2, Experimental Procedure for Tracer, Último Volumen, Akihiro Takemura, Tasuku Honjo, páginas 501-525, Tokyo Kagaku Dojin, Publicado el 25 de febrero de 1977]. Cuando la propiedad del marcador depende de fluorescencia, la medición puede realizarse de una forma convencional de FIA o hibridación usando un detector tal como un fluorofotómetro o un microscopio láser confocal como se describe en Zusetu (Illustrative Description) Fluorescent Antibodies, Akira Kawao, Primera Edición, Soft Science, 1983; Seikagaku Jikkenn Koza (Experimental Manual in Biochemistry), 2, Chemistry of Nucleic Acid III, Mineo Saneyoshi, páginas 299-318, Tokyo Kagaku Dojin, Publicado el 15 de diciembre de 1977. Cuando la propiedad del marcador depende de luminiscencia, la medición puede realizarse de una forma convencional usando un detector tal como un contador de fotones de acuerdo con un procedimiento como se describe en, por ejemplo, "Enzyme Immunoassay" Protein, Nucleic Acid and Enzyme, Volumen Suplementario 31, Editado por Tsunehiro Kitagawa, Toshio Nambara, Akio Tuji, y Eiji Ishikawa, páginas 252-263, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Publicado el 10 de septiembre de 1987. Además, cuando la propiedad es de absorbancia en una región ultravioleta, la detección puede realizarse de una forma convencional usando un detector tal como un espectrofotómetro. Cuando la propiedad es de coloración, la detección puede realizarse de una forma convencional usando un detector tal como un espectrofotómetro

o microscopio. Además, cuando el analito tiene una propiedad de espín, la detección puede realizarse de una forma convencional usando un detector tal como un aparato de resonancia de espín electrónico de acuerdo con un procedimiento descrito como se describe en, por ejemplo, "Enzyme Immunoassay" Protein, Nucleic Acid y Enzyme, Volumen Suplementario 31, Editado por Tsunehiro Kitagawa, Toshio Nambara, Akio Tuji, y Eiji Ishikawa, páginas 264-271, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Publicado el 10 de septiembre de 1987.

El procedimiento de medición en la invención puede realizarse de acuerdo con los procedimientos conocidos por sí mismos mencionados anteriormente usando reactivos seleccionados apropiadamente de una forma convencional por sí misma, excepto la utilización del procedimiento de separación de la invención.

En el procedimiento de medición de la invención, los procedimientos de medición 1, 2, 3, 4, 4-a y 4-b mencionados anteriormente pueden usarse en una combinación de 2 o más.

En la realización del procedimiento de separación y del procedimiento de medición de la invención, cuando existe una posibilidad de existencia de una nucleasa o nucleasas tales como ADNasa, ARNasa, etc., es apropiado añadir un inhibidor de nucleasas tal como bis(2-aminoetiléter)tetraacetato de etilenglicol (EGTA), tetraacetato de etilendiamina (EDTA), heparina y similar a un líquido que contiene una cadena de ácido nucleico (incluyendo la cadena de ácido nucleico contenida en una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y una diana de medición, o un complejo que comprende una cadena de ácido nucleico, una diana de medición y un marcador).

En resumen, cuando la cadena de ácido nucleico (incluyendo la cadena de ácido nucleico contenida en una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y una diana de medición) se pone en contacto con otra sustancia [por ejemplo, cuando la cadena de ácido nucleico (incluyendo la cadena de ácido nucleico contenida en una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y una diana de medición) se pone en contacto con una muestra que contiene una diana de medición o cuando la cadena de ácido nucleico se pone en contacto con una sustancia que tiene afinidad por la diana de medición, o cuando la cadena de ácido nucleico (incluyendo la cadena de ácido nucleico contenida en una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) se marca con un marcador, o cuando la cadena de ácido nucleico forma un complejo con una diana de medición y un marcador y etc.] o cuando un complejo de una cadena de ácido nucleico, diana de medición y marcador se separa de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión-marcador no implicada en la formación del complejo y,

si es necesario, del marcador, es apropiado añadir un inhibidor como se ha mencionado anteriormente a un líquido que contiene la cadena de ácido nucleico (incluyendo la cadena de ácido nucleico contenida en una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión o un complejo de una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y una diana de medición, o un complejo que comprende una cadena de ácido nucleico, una diana de medición y un marcador) o un líquido que se pone en contacto con la cadena de ácido nucleico para llevar a cabo el contacto en presencia del inhibidor.

Los reactivos, etc. usados para realizar la presente invención pueden formularse en un kit de medición electroforética de una diana o dianas de modo que el procedimiento de la invención mencionado anteriormente pueda realizarse con éxito.

En concreto, el kit de medición de una diana o dianas de la invención comprende una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene una afinidad por la diana de medición y un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico. La realización preferida o ejemplos de los componentes respectivos son como se han mencionado anteriormente.

En el kit de la invención, es particularmente ventajoso marcar una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad por la diana de medición de antemano con un marcador capaz de marcar la cadena de ácido nucleico, puesto que puede omitirse la etapa de marcaje de la sustancia con el marcador.

El kit mencionado anteriormente puede usarse en una combinación con un aparato electroforético, particularmente, un aparato electroforético capilar.

La invención se explicará más específicamente mediante los siguientes Ejemplos y Ejemplos Comparativos, que no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo Comparativo 1

Detección de AFP usando electroforesis en microplaca capilar en un procedimiento convencional

[Diana de medición (antígeno)]

α -Fetoproteína (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[Anticuerpos]

Usando 3 tipos de anticuerpos anti-AFP, WA2, A4-4 y WA1 (todos disponibles en Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), que reconocen respectivamente diferentes epítopes de AFP, los anticuerpos usados en el presente ejemplo se prepararon de la forma siguiente.

- Anticuerpo Fab' de WA2 marcado con YS5: Usando el anticuerpo anti-AFP WA2, se preparó un fragmento Fab' del anticuerpo anti-AFP al que se había unido una cadena peptídica (YS5) que tenía 5 restos tirosina sulfatados (anticuerpo Fab' de WA2 marcado

con YS5) de acuerdo con el procedimiento que se describe en la Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N° 301995/1997.

- Anticuerpo Fab' de A4-4 marcado con YS8: De la misma forma que se ha mencionado anteriormente, usando el anticuerpo anti-AFP A4-4, se preparó un fragmento Fab' del anticuerpo anti-AFP al que se había unido una cadena peptídica (YS8) que tenía 8 restos tirosina sulfatados (anticuerpo Fab' de A4-4 marcado con YS8) de acuerdo con el procedimiento que se describe en la Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N° 301995/1997.
- Anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488: Se procesó el anticuerpo anti-AFP WA1 de forma convencional para dar un fragmento Fab' en el que se introdujo una sustancia fluorescente Alexa488 (Molecular Probes, Inc.) en el grupo amino de forma convencional para dar un fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP marcado con Alexa488 (anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488).

[Muestras]

Se permitió que una diversidad de anticuerpos específicos descritos en la Tabla 1 reaccionaran como una mezcla con AFP en una concentración especificada y se disolvieron en un tampón ACES [ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES) 50 mM pH 7,5] para usarlos como muestras. Cuando las muestras se sometieron a electroforesis, se diluyeron 10 veces con un tampón usado en electroforesis. Además, cuando se usaron las múltiples muestras como mezcla en electroforesis, las muestras respectivas se mezclaron y se diluyeron inmediatamente antes de aplicarse en la electroforesis.

Tabla 1

Muestra N°	Anticuerpo YS5 11,3 µM	Anticuerpo YS8 11,3 µM	AFP 11,3 µM	Anticuerpo Alexa488 11,3 µM	Punto isoeléctrico
1	+	+	+	+	mancha de $5,2 \pm 0,5$
2	+	-	+	+	mancha de $4,9 \pm 0,3$
3	-	+	+	+	mancha de $4,5 \pm 0,2$
4	-	-	+	+	mancha de aproximadamente 4,5
5	-	-	-	+	mancha de aproximadamente 7,35

[Condiciones de electroforesis]

Como un aparato electroforético, un aparato electroforético capilar "Hitachi SV1100 Cosmo AI" (un producto de Hitachi Chemical Co., Ltd.). Como microplaca capilar, se usó un kit i-

chip para analizar una longitud de cadena de ADN (Hitachi Chemical Co., Ltd.) suministrado por Hitachi SV1100 Microchip Electrophoretic Apparatus Cosmo AI.

En la realización de la electroforesis, un tampón electroforético como se menciona a continuación se cargó en una microplaca capilar en la que se introdujo una muestra. Después, se aplicó un voltaje específico al mismo para comenzar la electroforesis usando una fuente de energía especialmente encargada para electroforesis (Apple Electronics).

La Figura 7 muestra un dibujo esquemático del aparato electroforético usado.

- Introducción de una muestra: 40 segundos
- Separación de la muestra: 120 segundos
- Voltaje aplicado: como se muestra en la Figura 7

En esta operación, la detección se realizó inmediatamente desde el inicio de la separación de muestra con un lapso de tiempo por medición por medio de fotomultiplicación de fluorescencia excitada con una lámpara de xenón de la intensidad de fluorescencia en la parte separada 3 cm del punto de cruce con el capilar usando un microscopio de fluorescencia (BX-50; KS Olympus Co., Ltd.).

- Tampón electroforético: tampón Tris borato 50 mM (pH 8,0).

[Resultados]

La Figura 8 muestra los resultados de electroforesis (cromatograma electroforético en microplaca capilar) en una mezcla de Muestra 1 y Muestra 5 (que contiene un complejo de anticuerpo Fab' de WA2 marcado con YS5-anticuerpo Fab' de A4-4 marcado con YS8-AFP-anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488 y un anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488 libre). La Figura 9 muestra el resultado de la Muestra 5 (que contiene sólo anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488).

Como es evidente a partir de la Figura 8 y Figura 9 se descubrió que cuando se usaba Muestra 1 + Muestra 5, se reconocían dos picos, es decir, un pico ancho de tiempo de retención retardado correspondiente al anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488 libre y un pico de tiempo de retención corto correspondiente al complejo de anticuerpo Fab' de WA2 marcado con YS5-anticuerpo Fab' de A4-4 marcado con YS8-AFP-anticuerpo Fab' de WA1 marcado con Alexa488, pero su separación era insuficiente debido a que los dos picos se superponían a mitad de los picos.

Además, cuando se usaba Muestra 2 + Muestra 5, Muestra 3 + Muestra 5, y Muestra 4 + Muestra 5, el complejo tampoco podía separarse de forma distintiva del anticuerpo libre.

Además, la concentración del tampón electroforético se cambiaba a Tris-borato 5 mM (pH 8,0) para disminuir la concentración de agente tamponante y la detección se realizó de la misma forma. El pico del complejo y el pico del anticuerpo libre, sin embargo, no estaban

suficientemente separados y por consiguiente este procedimiento de separación se juzgó prácticamente insuficiente.

Ejemplo 1

Separación y detección de proteínas por electroforesis en microplaca capilar usando ADN

5 [Diana de medición (Antígeno)]

De la misma forma que en el Ejemplo Comparativo 1, se usó AFP como diana de medición.

[Anticuerpos]

10 Un fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP al que se unía ADN se preparó de acuerdo con el procedimiento que se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

ADN aminado terminal purificado

←Reacción con Engarce Sulfo-SMPB

←Eliminación de Engarce sin reaccionar por filtración en gel

←Reacción con fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP

(Fragmento de ADN de 227 pb: Fab' de anticuerpo anti-AFP WA2)

(Fragmento de ADN de 160 pb: Fab' de anticuerpo anti-AFP A4-4)

←Purificación de ADN-anticuerpo por una columna de DEAE

ADN-anticuerpo

15 En resumen, fragmentos de ADN de 160 pb y 227 pb en los que se había introducido un grupo NH₂ en el extremo 5' se purificaron de una forma convencional y el grupo NH₂ introducido en estos fragmentos de ADN se dejó que reaccionara con el grupo succinimido de un engarce de sulfosuccinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)butirato (Sulfo-SMPB) (engarce que tiene un grupo succinimido y un grupo maleimido; Pierce chemical Co.) de una forma convencional. El producto se aplicó a filtración en gel para eliminar los engarces sin reaccionar, dando fragmentos de ADN (160 pb y 227 pb) que se habían unido respectivamente al engarce. Por lo tanto, se dejó que el fragmento de ADN de 227 pb de unión a engarce resultante reaccionara con un fragmento Fab' del anticuerpo anti-AFP WA2 que se había preparado a partir de un anticuerpo anti-AFP WA2 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) de antemano. Además, el fragmento de ADN de 160 pb de unión a engarce preparado de forma similar se dejó que reaccionara con un fragmento Fab' que se había preparado a partir del anticuerpo anti-AFP A4-4 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los productos respectivos se purificaron con una columna de DEAE para dar un

20

25 fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP WA2 que se unía al fragmento de ADN de 227 pb (anticuerpo 227WA2) y un fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP A4-4 que se unía al

fragmento de ADN de 160 pb (anticuerpo 160A4-4), respectivamente.

[Muestras]

Una diversidad de anticuerpos específicos se mezclaron y reaccionaron con AFP a una concentración especificada como se describe en la Tabla 3 en un tampón ACES [ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES) 50 mM, pH 7,5] para usarlos como muestras como soluciones.

Para llevar a cabo la electroforesis, las muestras respectivas se diluyeron 10 veces con un tampón electroforético que contenía 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Además, cuando se usaron múltiples muestras como mezcla en electroforesis, las muestras respectivas se mezclaron y se diluyeron con dicho tampón inmediatamente antes de aplicarlas a la electroforesis. Como patrones internos, se añadió un ADN bicatenario de 100 pb a la muestra a 31 nM y/o se añadió un ADN bicatenario de 800 pb a 3,9 nM. Además, como controles, se añadió a la muestra un fragmento de ADN de 160 pb que no se unía a ningún anticuerpo a 194 nM y/o se añadió un fragmento de ADN de 227 pb a 136 nM. En este procedimiento, el patrón interno y el control se mezclaron con la muestra inmediatamente antes de aplicarlos a la electroforesis.

Tabla 3

Muestra N°	Anticuerpo 227WA2 15 nM	Anticuerpo 160A4-4 20 nM	AFP 20 nM
1	+	-	-
2	-	+	-
3	+	-	+
4	-	+	+
5	+	+	-
6	+	+	+

[Condiciones de electroforesis]

Se usó el mismo aparato electroforético y microplaca capilar que en el Ejemplo Comparativo 1.

- Introducción de una muestra: 40 segundos
- Separación de la muestra: 180 segundos
- Voltaje aplicado: el mismo que en el Ejemplo Comparativo 1

En esta operación, la detección se realizó inmediatamente desde el inicio de la separación de muestra con un lapso de tiempo por medición por una lámpara de xenón LED-fotodiodo de la intensidad de fluorescencia en la parte separada 3 cm del punto de cruce con el capilar usando un microscopio de fluorescencia (BX-50; KS Olympus Co.,

Ltd.).

- Tampón electroforético: un tampón unido a un kit i-chip para análisis de una longitud de ADN (Hitachi Chemical Co., Ltd.) suministrado por Hitachi SV1100 Microchip Electrophoretic Apparatus Cosmo AI.

5 [Resultados]

10 La Figura 10 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 1 (que contiene un anticuerpo WA2 de 227 pb). La Figura 11 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 2 (que contiene un anticuerpo A4-4 de 160 pb). La Figura 12 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para una mezcla de Muestra 1 y Muestra 3 (que contiene un anticuerpo WA2 de 227 pb libre y un complejo de anticuerpo WA2 de 227 pb-AFP). La Figura 13 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 4 (que contienen un complejo de anticuerpo A4-4 de 160 pb-AFP). La Figura 14 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para la Muestra 5 (que contiene un anticuerpo WA2 de 227 pb y un anticuerpo A4-4 de 160 pb). La Figura 15 muestra el resultado (cromatograma electroforético en microplaca capilar) de electroforesis para una mezcla de Muestra 6 y Muestra 5 (que contiene un complejo de anticuerpo WA2 de 227 pb-anticuerpo A4-4 de 160 pb-AFP y un anticuerpo WA2 de 227 pb libre y un anticuerpo A4-4 de 160 pb libre).

20 A partir de los resultados que se muestran en la Figura 10 y en la Figura 12, se entiende que la unión de AFP al anticuerpo 227WA2 (formación del complejo) prolonga el tiempo de retención en comparación con el del anticuerpo 227WA2 en solitario. Y a partir de los resultados que se muestran en la Figura 13 y en la Figura 14, se entiende que la unión de AFP al anticuerpo 160A4-4 prolonga el tiempo de retención en comparación con el del anticuerpo 160A4-4 en solitario. A partir de los hechos anteriores, se entiende que, en el procedimiento de separación de la invención, la formación de un complejo que comprende una diana de medición, una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y un marcador permite una separación eficaz de dicho complejo de un complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y el marcador no implicado en la formación de dicho complejo en un periodo de tiempo corto, formándose dicho complejo por unión a la diana de medición de una sustancia (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) que tiene una afinidad por la diana de medición y está marcada con un marcador y unida a una cadena de ácido nucleico.

30 Como se observa en la Figura 12 y la Figura 13, se entiende que el complejo de anticuerpo A4-4 de 160 pb-AFP y el complejo de anticuerpo WA2 de 227 pb-AFP son diferentes
35 en su tiempo de retención. En otras palabras, se entiende que la variación de la longitud de la

cadena de ácido nucleico permite un control opcional del tiempo de retención del complejo formado. Además, como para 2 o más tipos de dianas de medición, el tiempo de retención de un complejo que contiene 2 o más tipos de dianas de medición puede variarse por unión a longitudes de cadenas de ácido nucleico respectivamente diferentes. También se entiende, por consiguiente, que pueden medirse 2 o más tipos de dianas de medición al mismo tiempo.

Además, como se observa a partir de los resultados de la Figura 14 y de la Figura 15, un complejo formado a partir de 3 componentes, es decir, AFP, anticuerpo A4-4 de 160 pb y anticuerpo WA2 de 227 pb, tiene un tiempo de retención más retardante que el complejo de A4-4 de 160 pb y AFP (Figura 13) o de WA2 de 227 pb y AFP (Figura 12). En otras palabras, se entiende que los complejos pueden separarse con mayor exactitud. Es decir, se entiende que la unión de múltiples sustancias de afinidad, que se unen a cadenas de ácido nucleico, a la diana de medición permite una mejora adicional de la resolución.

Ejemplo 2

Separación y detección de proteínas por electroforesis en microplaca capilar usando ADN [Diana de medición (Antígeno)]

Antígeno carcinoembrionario (CEA) (CosmoBio Co., Ltd.)

[Anticuerpos]

Un fragmento de Fab' de anticuerpo anti-CEA al que se ha unido ADN se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento que en la Tabla 2 del Ejemplo 1, excepto por que se usó engarce de *N*-(ϵ -maleimidocaproiloxi)succinimida (EMCS) en lugar del engarce Sulfo-SMPB en la reacción de la Tabla 2 del Ejemplo 1.

En resumen, fragmentos de ADN de 250 pb y 500 pb en los que se había introducido un grupo NH₂ en el extremo 5' se purificaron de una forma convencional y el grupo NH₂ introducido en estos fragmentos de ADN se dejó que reaccionara con el grupo succinimido de un engarce de *N*-(ϵ -maleimido-caproiloxi)succinimida (EMCS) (engarce que tiene un grupo succinimido y un grupo maleimido; Pierce chemical Co.) de una forma convencional. El producto se aplicó a filtración en gel para eliminar el engarce sin reaccionar, dando fragmentos de ADN (250 pb y 500 pb) a los que se había unido el engarce, respectivamente. Por lo tanto, se dejó que los fragmento de ADN de 250 pb y 500 pb que se unían al engarce resultantes reaccionaran con un fragmento Fab' de anticuerpo anti-CEA WAC1 que se había preparado a partir de un anticuerpo anti-CEA WAC1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) de antemano. Además, el fragmento de ADN de 500 pb de unión a engarce preparado de forma similar se dejó que reaccionara con un fragmento Fab' que se había preparado a partir de un anticuerpo anti-CEA WAC2 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los productos respectivos se purificaron con una columna de DEAE

para dar un fragmento Fab' de anticuerpo anti-CEA WAC1 que se unía al fragmento de ADN 250 pb (anticuerpo 250bpWAC1), un fragmento Fab' de anticuerpo anti-CEA WAC1 que se unía al fragmento de ADN de 500 pb (anticuerpo 500bpWAC1) y un fragmento de Fab' del anticuerpo anti-CEA WAC2 que se unía al fragmento de ADN 500 pb (anticuerpo 500bpWAC2), respectivamente.

5

[Muestras]

Se mezclaron una diversidad de anticuerpos específicos y reaccionaron con CEA a una concentración especificada como se describe en la Tabla 4 en un tampón ACES [ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico 50 mM (ACES), pH 7,5] para usarlos como muestras como soluciones.

10

Al aplicar las muestras a la electroforesis, se añadió a la muestra como patrones internos un ADN bicatenario a 50 pb a 251 nM y/o un ADN bicatenario de 10380 pb a 0,61 nM. Además, como controles, se añadió a la muestra un fragmento de ADN de 250 pb que no se unía a ningún anticuerpo a 75 nM y/o se añadió un fragmento de ADN de 500 pb a 45 nM. En este procedimiento, el patrón interno y el control se mezclaron con la muestra inmediatamente antes de aplicarlos a la electroforesis.

15

Tabla 4

Muestra N°	Anticuerpo 250bpWAC1 2,1 nM	Anticuerpo 500bpWAC1 1,4 nM	Anticuerpo 500bpWAC2 4,5 nM	CEA 300 nM
1	+	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	-
4	-	+	-	+
5	-	-	+	-
6	-	-	+	+

[Condiciones electroforéticas]

Un aparato electroforético en microplaca capilar "Agilent 2100" (Agilent Technologies Inc.) se usó como aparato electroforético. Se usó como analizador un analizador "7500DNA Lab Chip™ kit" (Agilent Technologies Inc.).

20

El análisis se realizó de acuerdo con el manual de instrucciones para su uso unido al kit.

En este producto, se usó un colorante intercalante como marcador en el gel envasado en una microplaca capilar para realizar la electroforesis.

25

[Resultados]

La Figura 16 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis de la Muestra 1 (que contiene anticuerpo 250bpWAC1) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la Muestra 2 (que contiene un complejo de anticuerpo 250bpWAC1-CEA). La Figura 17 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis de la Muestra 3 (que contiene anticuerpo 500bpWAC1) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la Muestra 4 (que contiene un complejo de anticuerpo 500bpWAC1-CEA). La Figura 18 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis para la Muestra 5 (que contiene el anticuerpo 500bpWAC2) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la Muestra 6 (que contiene un complejo de anticuerpo 500bpWAC2-CEA).

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 16 a la Figura 18, se entiende que la unión de CEA el anticuerpo (formación del complejo) prolonga el tiempo de retención en comparación con la del anticuerpo en solitario. A partir de los resultados que se muestran en la Figura 17 y Figura 18, se entiende también que la separación es posible de forma similar para clases diferentes de anticuerpos. Además, puede entenderse a partir de la comparación con el Ejemplo 1 que también es posible la separación para diferentes dianas de medición.

De los hechos anteriores se entiende que, en el procedimiento de separación de la invención, la formación de un complejo que comprende una diana de medición, una cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y un marcador permite una separación eficaz de dicho complejo de un complejo de la cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión y el marcador no implicada en la formación de dicho complejo dentro de un periodo de tiempo corto, estando dicho complejo formado por unión a la diana de medición de una sustancia (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión) que se ha unido a una cadena de ácido nucleico marcada con un marcador y que tiene afinidad hacia la diana de medición.

Ejemplo 3

Separación y detección de proteínas dependiendo de una diferencia de procedimiento de marcaje

[Diana de medición (antígeno)]

α -Fetoproteína (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[Anticuerpos]

Usando un anticuerpo anti-AFP A4-4 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), se prepararon los anticuerpos marcados respectivos mediante procedimientos de marcaje diferentes como se muestran a continuación.

- Preparación de Fab' de anti-AFP A4-4 marcado con Cy5

Usando un cebador 1 (ACTTTTTATATGAGGAGGGCTG) en el que se había introducido un marcador Cy5 en el extremo 5' y un cebador 2 (ATCTATGACTGTACGCCACTGTCCCTAG) en el que se había introducido un grupo NH₂ en el extremo 5' de una forma convencional, se realizó una reacción de PCR en un λADN como molde. Por lo tanto, se preparó un fragmento de ADN de 160 pb que tenía Cy5 en un extremo y el grupo NH₂ en el otro extremo.

Usando un fragmento de ADN de 160 pb y los mismos reactivos de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2, se preparó un fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP A4-4 (anticuerpo Cy160A4-4) al que se unió un fragmento de ADN de 160 pb marcado con una molécula de Cy5 por medio de un engarce EMCS.

La Figura 19 muestra esquemáticamente un modo de marcaje del anticuerpo Cy160A4-4 resultante.

- Preparación de Fab' de anti-AFP A4-4 marcado con Cy5 por medio de estreptavidina

Usando un cebador 1 (ACTTTTTATATGAGGAGGGCTG) en el que se había introducido biotina en el extremo 5' y un cebador 2 (ATCTATGACTGTACGCCACTGTCCCTAG) en el que se había introducido un grupo NH₂ en el extremo 5' de una forma convencional, se realizó una reacción de PCR en un λADN como molde. Por lo tanto, se preparó un fragmento de ADN de 160 pb que tenía biotina en un extremo y el grupo NH₂ en el otro extremo.

Usando este fragmento de ADN de 160 pb y los mismos reactivos de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2, se preparó un fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP A4-4 (anticuerpo b-160A4-4) al que se unió un fragmento de ADN de 160 pb biotinilado en el extremo por medio de un engarce EMCS.

Además, se sintetizó un oligonucleótido de una forma convencional. Usando este oligonucleótido, se preparó un fragmento de ADN de 21 pb (cadena de ácido nucleico de engarce) (AATCTTC CGAGTTTGCTAGGC) (fragmento de ADN de 21 pb marcado con Cy5) que tenía biotina en el extremo 5' y se marcó con Cy5 en el extremo 3'.

Se realizó la reacción de biotina-avidina a una proporción molecular de anticuerpo b-160A4-4:Estreptavidina = 1:20. La eliminación de la estreptavidina restante sin reaccionar usando una columna de Sepharose S-400 (Amersham Pharmacia Biotech, Co.) proporcionó un anticuerpo b-160A4-4 que se unía a estreptavidina. Después, se dejó que el anticuerpo b-160A4-4 de unión a estreptavidina reaccionara con una cantidad 20 equimolar del fragmento de ADN de 21 pb marcado con Cy5 y la mezcla de reacción se purificó por medio de una columna de Sepharose S-400 (Amersham Pharmacia Biotech, Co.) para dar un anticuerpo b-160A4-4 de unión a estreptavidina (anticuerpo Cy(3)160A4-4) en el que se introdujeron 3 moléculas de fragmento de ADN de 21 pb marcado con Cy5.

La Figura 20 muestra esquemáticamente una forma de marcaje del anticuerpo Cy(3)160A4-4 resultante.

• Preparación de Fab' de anti-AFP A4-4 al que se une una estreptavidina marcada con Cy5.

5 Usando un cebador 3 (GCCTAGCAAACCTCGGAAGATT) en el que se había introducido biotina en el extremo 5' y un cebador 2 (ATCTATGACTGTACGCCACTGTCCCTAG) en el que se había introducido un grupo NH₂ en el extremo 5' de una forma convencional, se realizó una reacción de PCR en un λADN como molde. Por lo tanto, se preparó un fragmento de ADN de 250 pb que tenía biotina en un extremo y el grupo NH₂ en el otro extremo.

10 Usando este fragmento de ADN de 250 pb y los mismos reactivos de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2, se preparó un fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP A4-4 al que se unió un fragmento de ADN de 250 pb biotinilado en el extremo (anticuerpo b-250A4-4) por medio de un engarce EMCS.

15 Además, se marcó estreptavidina con Cy5 de una forma convencional usando un kit de colorante monofuncional Cy5 FluoroLink™ (Amersham Pharmacia Biotech, Co.) de acuerdo con el manual de instrucciones para su uso unido al kit para dar una estreptavidina marcada con Cy5.

20 Se llevó a cabo una reacción de biotina-avidina a una proporción molecular de anticuerpo b-250A4-4:estreptavidina marcada con Cy5 = 1:20. La mezcla de reacción se purificó usando una columna de Sepharose S-400 (Amersham Pharmacia Biotech, Co.) para dar un anticuerpo b-250A4-4 de unión a estreptavidina marcado con Cy5 (anticuerpo CySA250A4-4).

La Figura 21 muestra esquemáticamente una forma de marcaje del anticuerpo CySA250A4-4 resultante.

[Muestras]

25 Una diversidad de anticuerpos específicos se mezclaron y se hicieron reaccionar con AFP a una concentración especificada como se describe en la Tabla 5 en un tampón ACES [ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES) 50 mM, pH 7,5] para usarlos como muestras como soluciones.

Tabla 5

Muestra Nº	Anticuerpo CY160A4-4 10 nM	Anticuerpo Cy(3)160A4-4 10 nM	Anticuerpo CySA250A4-4 10 nM	AFP 100 nM
1	+	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	-
4	-	+	-	+

5	-	-	+	-
6	-	-	+	+

[Condiciones electroforéticas]

Se usó un aparato electroforético en microplaca capilar “Agilent 2100” (Agilent Technologies Inc.) como aparato electroforético. Se usó como analizador un analizador “7500DNA Lab Chip™ kit” (Agilent Technologies Inc.).

5 El análisis se realizó de acuerdo con el manual de instrucciones para su uso unido al kit.

En este ejemplo, no se usó colorante intercalante como mezcla en el gel envasado en una microplaca capilar para llevar a cabo la electroforesis.

[Resultados]

10 La Figura 22 muestra el resultado (cromatograma electroforético capilar) de electroforesis realizada para la Muestra 1 (que contiene anticuerpo Cy160bpA4-4), y la Figura 23 muestra el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis realizada para la Muestra 2 (que contiene un complejo de anticuerpo Cy160bpA4-4-AFP). La Figura 24 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis para la Muestra 3 (que contiene anticuerpo A4-4 de 160 pb con Cy(3)) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la

15 Muestra 4 (que contiene un complejo de anticuerpo A4-4 de 160 pb con Cy(3)-AFP). La Figura 25 muestra un cromatograma electroforético en microplaca capilar obtenido poniendo el resultado (cromatograma electroforético capilar) de la electroforesis para la Muestra 5 (que contiene anticuerpo CySA250bpA4-4) sobre el de (cromatograma electroforético capilar) la

20 Muestra 6 (que contiene un complejo de anticuerpo CySA250bpA4-4-AFP).

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 22 y en la Figura 23, se entiende que, cuando la cadena de ácido nucleico se marca directamente con Cy5, la unión de AFP al anticuerpo (formación del complejo) prolonga el tiempo de retención en comparación con el del anticuerpo en solitario. A partir de los resultados que se muestran en la Figura 24 y la Figura 25,

25 también se entiende que, cuando se une una cadena de ácido nucleico de engarce marcada con Cy5 a una cadena de ácido nucleico por medio de estreptavidina (Figura 24) o cuando se une una estreptavidina marcada con Cy5 a una cadena de ácido nucleico (Figura 25) la unión de AFP al anticuerpo (formación del complejo) prolonga el tiempo de retención en cualquiera de los casos en comparación con el del anticuerpo en solitario.

30 Esto significa que la separación es posiblemente similar aun cuando la forma de marcaje del ácido nucleico sea diferente.

Aplicabilidad Industrial

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención proporciona un procedimiento para separar una diana de medición por electroforesis, particularmente electroforesis capilar, de forma eficaz con gran sensibilidad en un periodo de tiempo corto. De acuerdo con la invención, puede separarse eficazmente un complejo que contiene una diana de medición en un periodo de tiempo corto y además una diana de medición contenida en una muestra puede determinarse con gran sensibilidad en un periodo de tiempo corto. Además, la sensibilidad de detección puede controlarse libremente.

Hasta ahora, existen algunos ejemplos de separación de ácidos nucleicos por electroforesis capilar pero no se ha descrito ningún ejemplo de separación satisfactoria de proteínas nativas. La razón que se asume es que las proteínas compuestas por 20 clases de aminoácidos tienen estructuras estéricas complicadas en comparación con la de los ácidos nucleicos sencillos compuestos por 4 clases de nucleótidos y, por lo tanto, no puede conseguirse un efecto de tamiz molecular eficaz para las proteínas.

En la invención, una diana de medición, por ejemplo, proteína nativa, que era difícil de separar mediante una electroforesis convencional, podía separarse eficazmente con éxito por primera vez en un periodo de tiempo corto.

Por lo tanto, la invención hace época.

LISTA DE SECUENCIAS

20

<110> Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

<120> Electroforesis

25

<130> Electroforesis

<140>

<141>

30

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

35

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<400> 1

5 acttttata tgaggagggc tg 22

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<400> 2

atctatgact gtacgccact gtcctag 28

15 <210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <400> 3

aatcttccga gtttgctagg c 21

<210> 4

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<400> 4

30 gcctagcaaa ctcggaagat t 21

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la separación de una diana de medición por electroforesis que comprende usar una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria marcada con un marcador, en el que dicha sustancia que tiene afinidad por dicha diana de medición tiene una propiedad de unión por la diana de medición basada en la interacción entre “antígeno” y “anticuerpo”, “cadena de azúcar” y “lectina”, “enzima” e “inhibidor”, “proteína” y “cadena peptídica” o “receptor” y “ligando”.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:
formar un complejo 1 que comprende la a) diana de medición, b) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia la diana de medición (la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión) y c) un marcador de una muestra que contiene una diana de medición, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y
separar dicho complejo 1 de un complejo 2 de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y el marcador no implicado en la formación de dicho complejo 1 y, si es necesario, del marcador por electroforesis.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:
poner mutuamente en contacto a) una muestra que contiene una diana de medición, b) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia la diana de medición (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión) y c) un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y
separar el complejo 1 resultante que comprende la diana de medición, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y el marcador de un complejo 2 de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y el marcador no implicado en la formación de dicho complejo 1 y, si es necesario, del marcador por electroforesis.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la muestra que contiene la diana de medición, la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia la diana de medición (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión) y el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria se ponen

en contacto todos al mismo tiempo.

5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el marcador capaz de marcar una cadena de ácido nucleico bicatenaria se pone en contacto con la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y después el producto se pone en contacto con la diana de medición.
6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión se pone en contacto con la diana de medición y después el producto se pone en contacto con el marcador capaz de marcar una cadena de ácido nucleico bicatenaria.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:
formar un complejo 1 que comprende a) una diana de medición, b) dos o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad hacia la diana de medición y sitios de unión mutuamente diferentes para la diana de medición (dos o más especies de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión) y c) un marcador de una muestra que contiene una diana de medición, dos o más especies de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y separar dicho complejo 1 de un complejo 2 de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y el marcador no implicado en la formación de dicho complejo 1 y, si es necesario, del marcador por electroforesis.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:
poner mutuamente en contacto a) una muestra que contiene una diana de medición, b) dos o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad hacia la diana de medición y sitios de unión mutuamente diferentes para la diana de medición (dos o más especies de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión) y c) un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y separar el complejo 1 resultante que comprende la diana de medición, las dos o más especies de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y el marcador de un complejo 2 de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión y el marcador no implicado en la formación de dicho complejo 1 y, si es necesario, del marcador por electroforesis.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la muestra que contiene la diana de medición y dos o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad hacia la diana de medición y sitios de unión mutuamente diferentes para la diana de medición se ponen en contacto todos al mismo tiempo.

5

10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria se pone en contacto con dos o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad hacia la diana de medición y sitios de unión mutuamente diferentes para la diana de medición y después el producto se pone en contacto con la diana de medición.

10

11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dos o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad hacia la diana de medición y sitios de unión mutuamente diferentes para la diana de medición se ponen en contacto con la diana de medición, y después el producto se pone en contacto con el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico.

15

12. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:

formar [1] un complejo de una diana de medición A_1 , una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ y un marcador, [2] un complejo de una diana de medición A_2 , una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ y un marcador, [3] un complejo de una diana de medición A_3 , una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, y un marcador, ..., [n-1] un complejo de una diana de medición A_{n-1} , una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ..., una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ y un marcador, y [n] un complejo de una diana de medición A_n , una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$, una cadena de ácido nucleico

20

25

30

35

bicatenaria-sustancia con afinidad de unión B_{A_n} y un marcador de (a) una muestra que contiene n tipos mutuamente diferentes de diana de medición $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{n-1}$ y A_n para su medición, (b) (1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria que tiene afinidad hacia todos los tipos de la diana de medición A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), (2) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico y que tiene afinidad hacia todos los tipos de la diana de medición A_2 a A_n excepto por A_1 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), (3) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de la diana de medición A_3 a A_n excepto por A_1 y A_2 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$), ..., (n-1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia la diana de medición A_{n-1} y A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico-sustancia con afinidad de unión $B_{n-1:A_n}$), y (n) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad sólo hacia la diana de medición A_n , excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}), y (c) un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y, después, separar los complejos respectivos [1] a [n] de complejos de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancias con afinidad de unión (1) a (n) respectivos y los marcadores no implicados en la formación de dichos complejos [1] a [n] y, si es necesario, de los marcadores por electroforesis.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que n es de 2 a 10.

14. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:
 poner mutuamente en contacto (a) una muestra que contiene n tipos mutuamente diferentes de diana de medición $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{n-1}$ y A_n , (b)(1) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todas las dianas de medición A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), (2) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de la diana de medición A_2 a A_n excepto por A_1 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), (3) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de la diana de medición A_3 a A_n excepto por A_1 y A_2 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$), ..., (n-1) una sustancia a la que se une

una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia las dianas de medición A_{n-1} y A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{n-1:A_n}$), y (n) una sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad sólo hacia la diana de medición A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}), y (c) un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y separar el resultante [1] complejo de diana de medición A_1 , cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$ y marcador resultante, [2] complejo de la diana de medición A_2 , la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$ y el marcador, [3] complejo de la diana de medición A_3 , la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, y el marcador, ..., [n-1] complejo de la diana de medición A_{n-1} , la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ..., la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$ y el marcador, y [n] un complejo de la diana de medición A_n la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$, ... la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_{n-1}:A_n}$, la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión B_{A_n} y el marcador de complejos de las cadenas de ácido nucleico bicatenarias-sustancias con afinidad de unión (1) a (n) respectivos y los marcadores no implicados en la formación de dichos complejos [1] a [n] y, si es necesario, de los marcadores por electroforesis.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que (a) la muestra que contiene n tipos mutuamente diferentes de diana de medición A_1 , A_2 , A_3 , ... A_{n-1} y A_n (b)(1) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de dianas de medición A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), (2) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de diana de medición A_2 a A_n excepto por A_1 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), (3) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de diana

- de medición A_3 a A_n excepto por A_1 y A_2 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$), ..., (n-1) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia las dianas de medición A_{n-1} y A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{n-1:A_n}$), y (n) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad sólo hacia la diana de medición A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}), y (c) el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria, se ponen todos en contacto al mismo tiempo.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que (b)(1) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de la diana de medición A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), (2) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de diana de medición A_2 a A_n excepto por A_1 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), (3) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de diana de medición A_3 a A_n excepto por A_1 y A_2 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$), ..., (n-1) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia las dianas de medición A_{n-1} y A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{n-1:A_n}$), y (n) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad sólo hacia la diana de medición A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}), se pone en contacto con (c) el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y, después, el producto se pone en contacto con (a) la muestra que contiene n tipos mutuamente diferentes de diana de medición $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{n-1}$ y A_n .
17. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que (a) la muestra que contiene n tipos mutuamente diferentes de diana de medición $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{n-1}$ y A_n se pone en contacto con (b)(1) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de diana de medición A_1 a A_n (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_1:A_n}$), (2) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia todos los tipos de diana de medición A_2 a A_n excepto por A_1 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_2:A_n}$), (3) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia

5 todos los tipos de diana de medición A_3 a A_n excepto por A_1 y A_2 (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{A_3:A_n}$), ..., (n-1) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad hacia las dianas de medición A_{n-1} y A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-2} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión $B_{n-1:A_n}$), y (n) la sustancia a la que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tiene afinidad sólo hacia la diana de medición A_n excepto por todas de A_1 a A_{n-1} (cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión B_{A_n}), y después, el producto se pone en contacto con (c) el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria .

10 18. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende:
formar 2 o más especies de complejo 1 que comprende a) un tipo específico de diana de medición, b) una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia de unión que tiene afinidad sólo por dicho tipo específico de diana de medición y c) el marcador de una muestra que contiene 2 o más tipos de diana de medición, 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad sólo por uno de los tipos de diana de medición deseados (cadenas de ácido nucleico bicatenarias-sustancias con afinidad de unión específicas) y un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y, después, separar dicho complejo 1 de un complejo 2 de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión específica y el marcador no implicado en la formación de dicho complejo 1 y, si es necesario, del marcador, respectivamente, por electroforesis.

20 19. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:
poner mutuamente en contacto (a) una muestra que contiene 2 o más tipos de diana de medición, b) 2 o mas especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad sólo hacia un tipo cualquiera de los tipos de diana de medición deseados (cadenas de ácido nucleico bicatenarias-sustancias con afinidad de unión específicas) y c) un marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y
30 separar las resultantes 2 o más especies de complejo 1 que comprende un tipo específico de diana de medición, una cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia de unión que tienen afinidad sólo por dicha diana de medición específica y un marcador, de un complejo 2 de la cadena de ácido nucleico bicatenaria-sustancia con afinidad de unión específica y el marcador no implicado en la formación de dicho complejo 1 y, si es necesario, del
35 marcador, respectivamente, por electroforesis.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la muestra que contiene 2 o más tipos de diana de medición, 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad sólo por un tipo cualquiera de los tipos de diana de medición deseados y el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria
5 ponen en contacto todos al mismo tiempo.
21. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que 2 o más especies de sustancias a las que se une una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad sólo por un tipo cualquiera de los tipos de diana de medición se ponen en contacto con el marcador capaz de
10 marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria y después el producto se pone en contacto con la muestra que contiene 2 o más tipos de diana de medición.
22. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la muestra que contiene 2 o más tipos de diana de medición se pone en contacto con 2 o más especies de sustancias a las que se une
15 una cadena de ácido nucleico bicatenaria y que tienen afinidad sólo por un tipo cualquiera de los tipos deseados de diana de medición y, después, el producto se pone en contacto con el marcador capaz de marcar dicha cadena de ácido nucleico bicatenaria.
23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en el que cada uno
20 de los 2 o más tipos de diana de medición tienen un número diferente de sitios capaces de unirse a una sustancia que tiene afinidad sólo por la misma .
24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en el que el ácido nucleico bicatenario que se une a cada una de 2 o más especies de las sustancias que tienen
25 afinidad sólo por un tipo cualquiera de los tipos de diana de medición es de un tamaño diferente.
25. El procedimiento de la reivindicación 1, que es adecuado para la medición de 1 o más tipos de diana de medición a una muestra y que comprende medir el complejo o complejos separados por el procedimiento que se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a
30 24.
26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que la electroforesis es electroforesis capilar.

Fig. 1

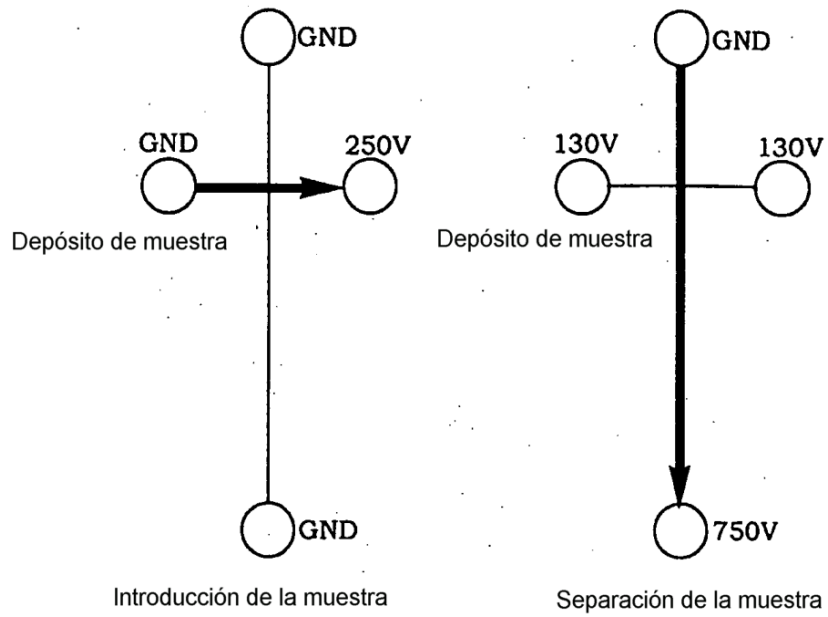


Fig. 2

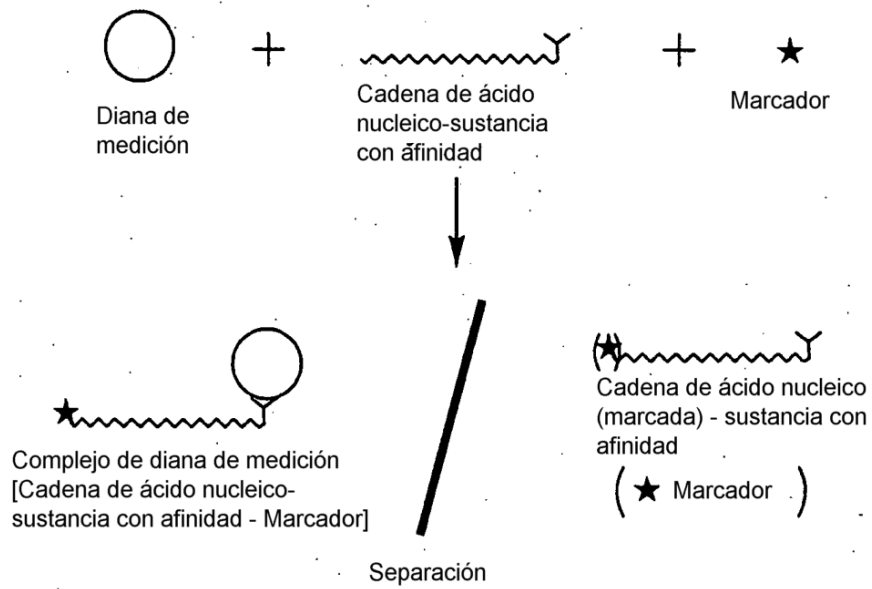


Fig. 3

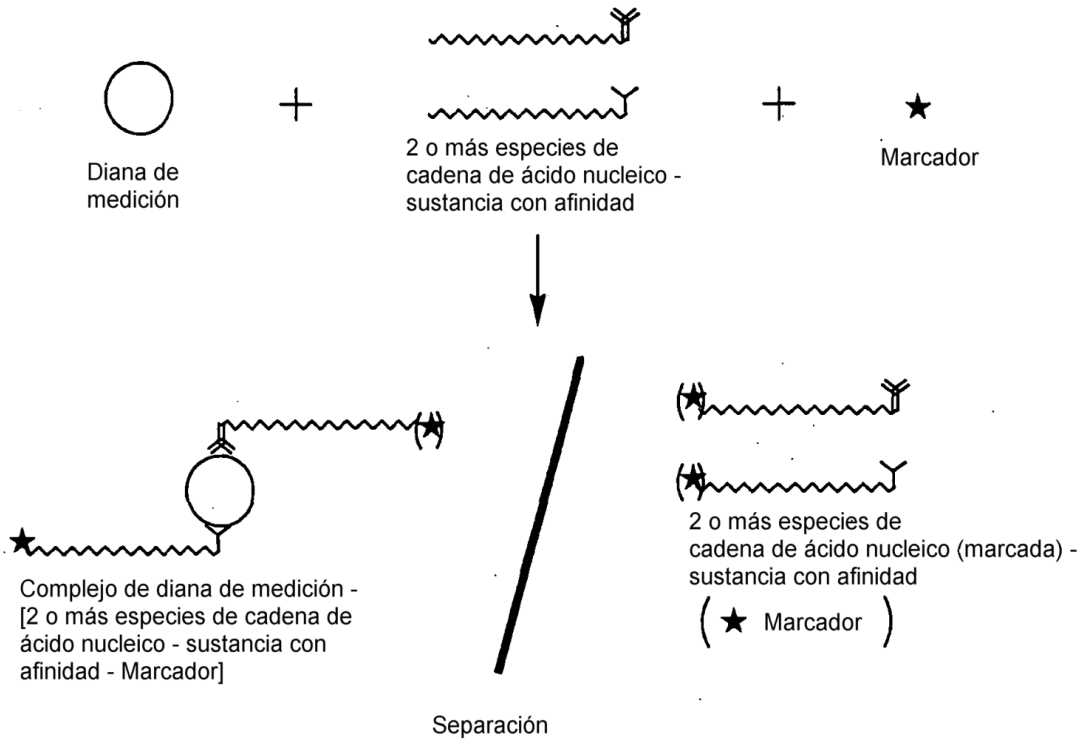


Fig. 4

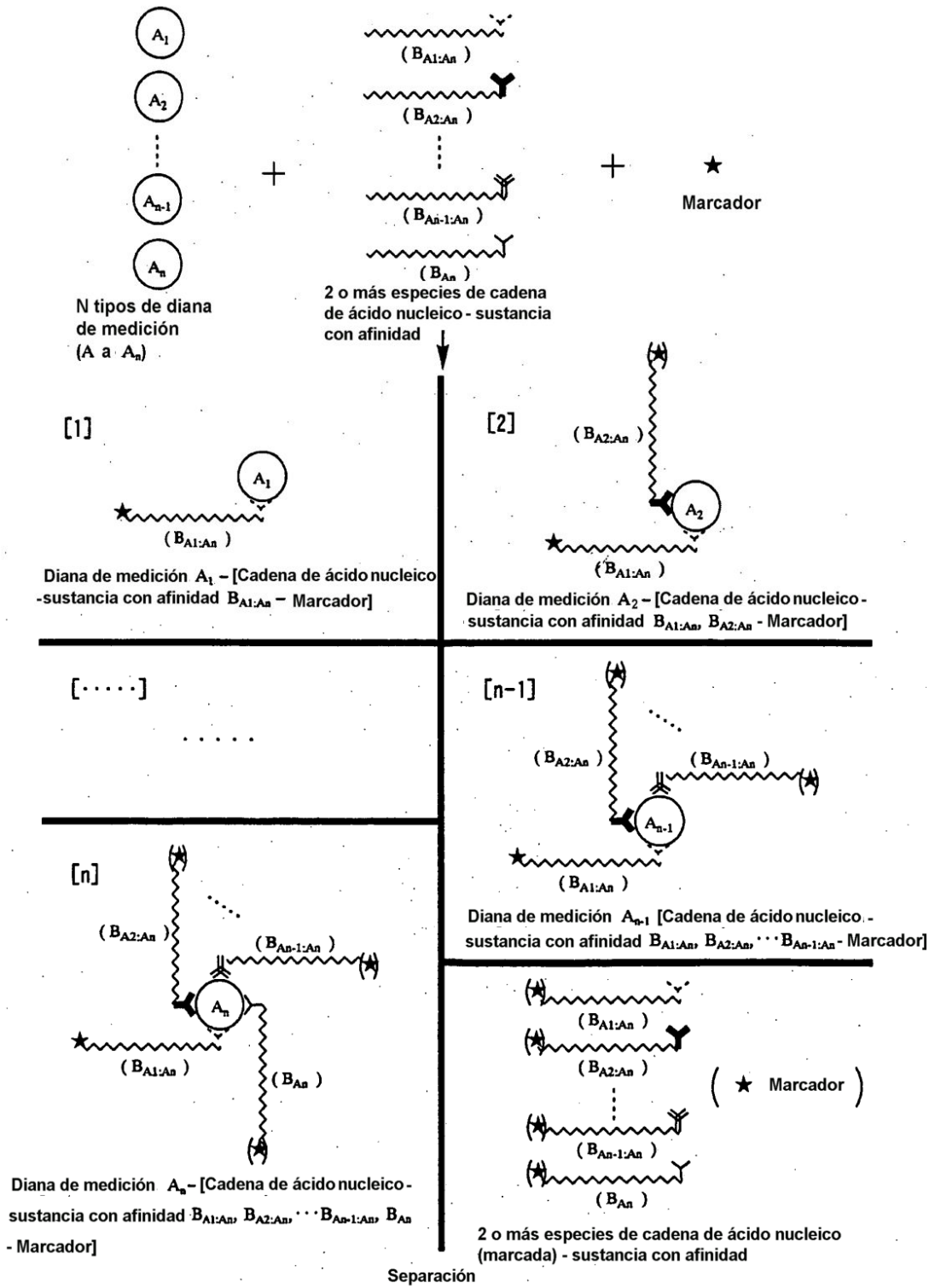


Fig. 5

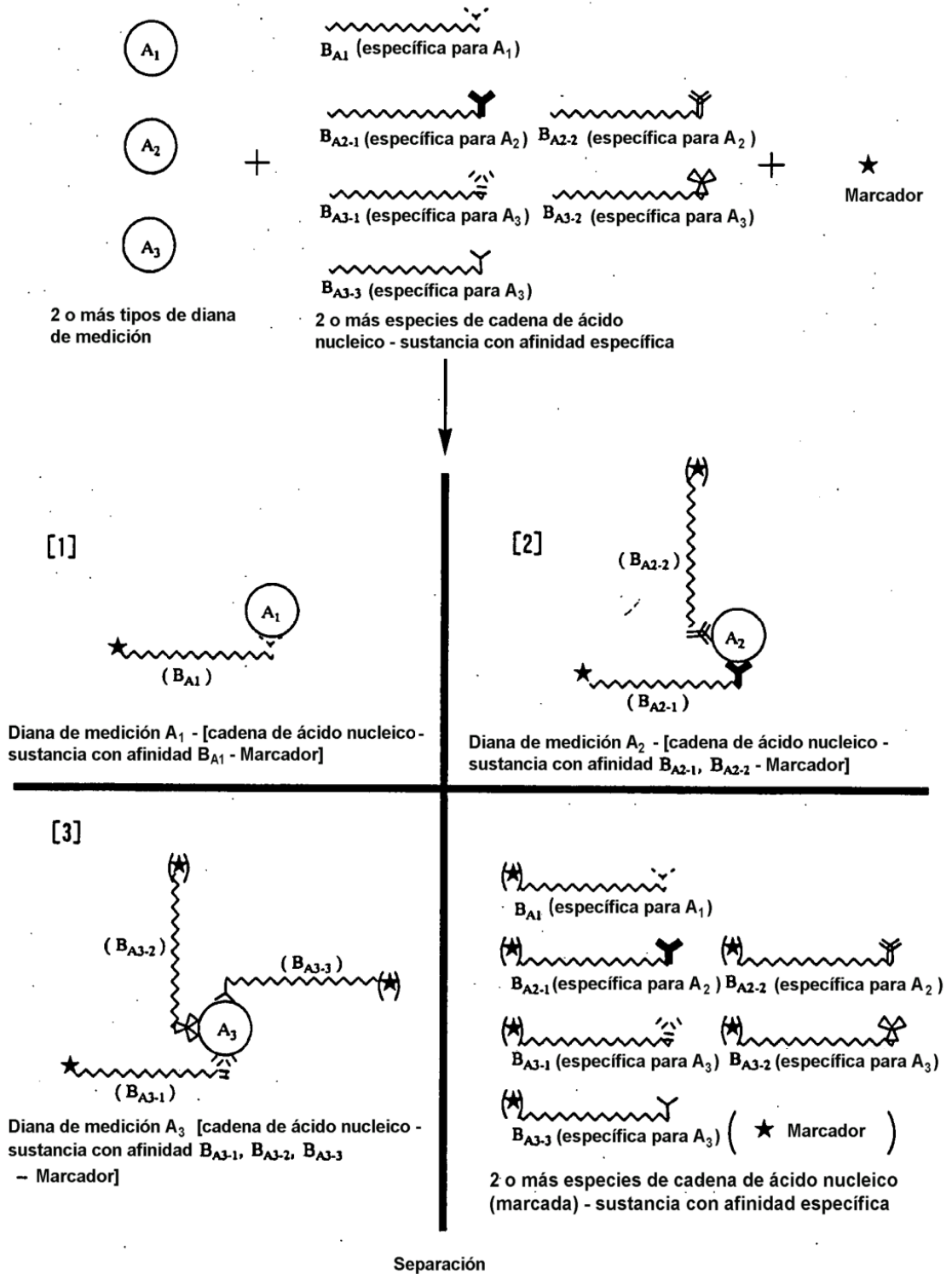


Fig. 6

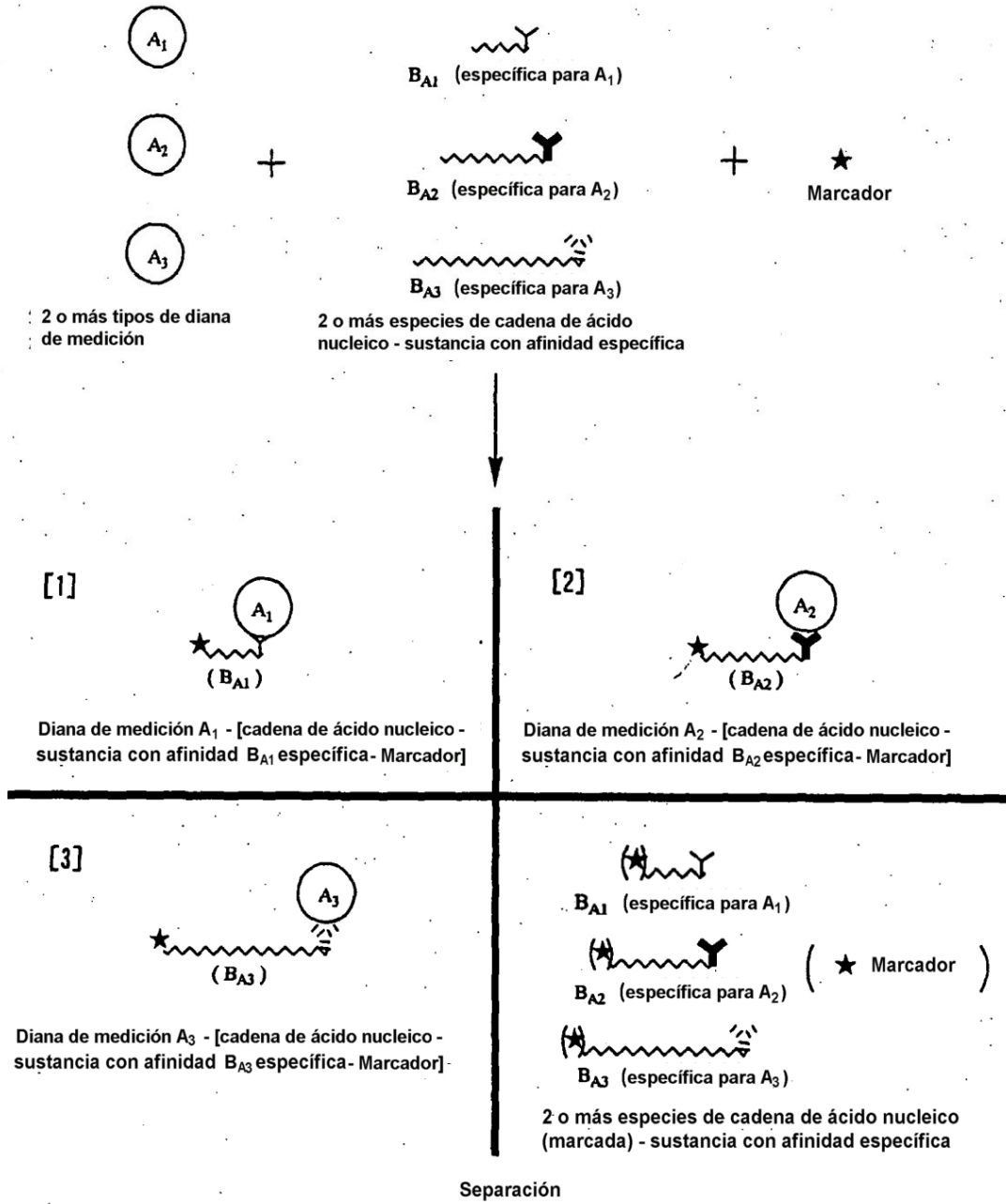


Fig. 7

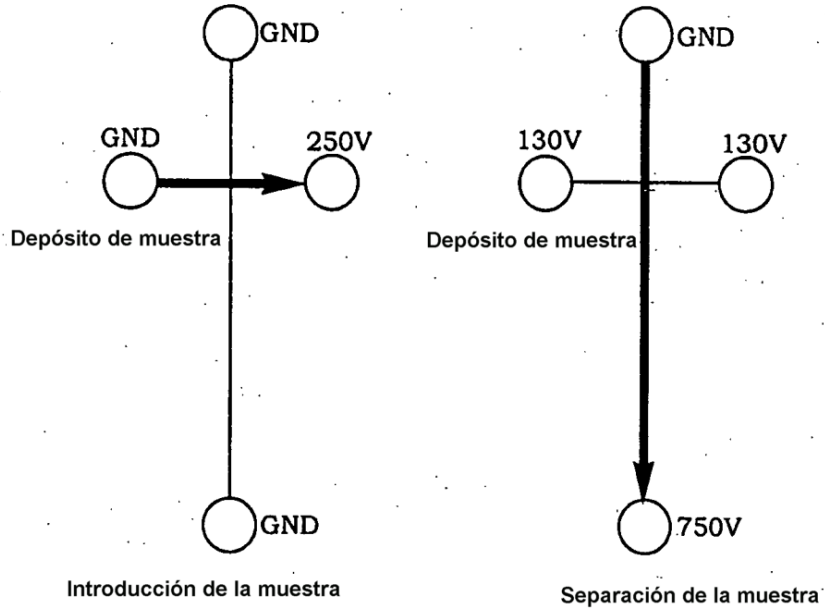


Fig. 8

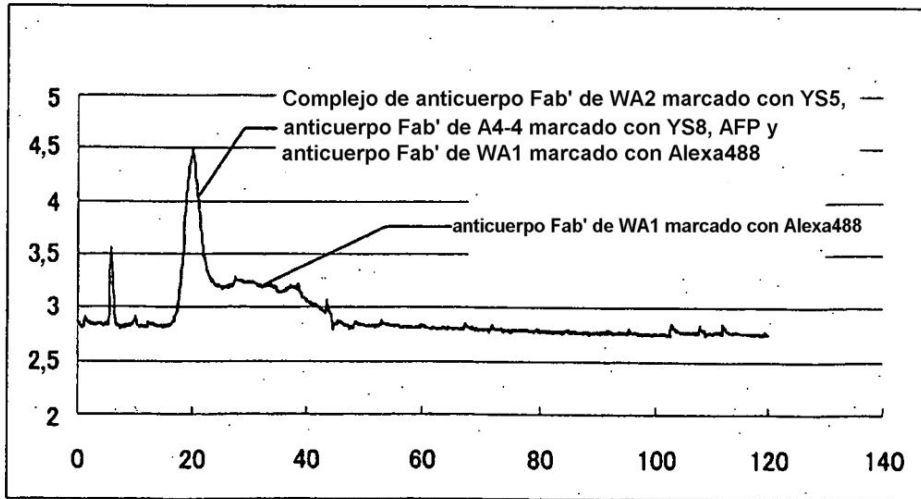


Fig. 9

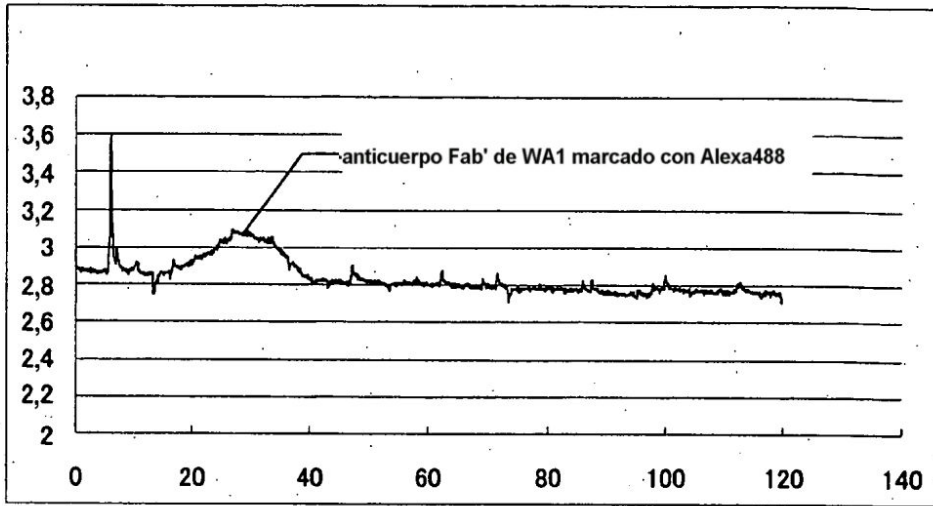


Fig. 10

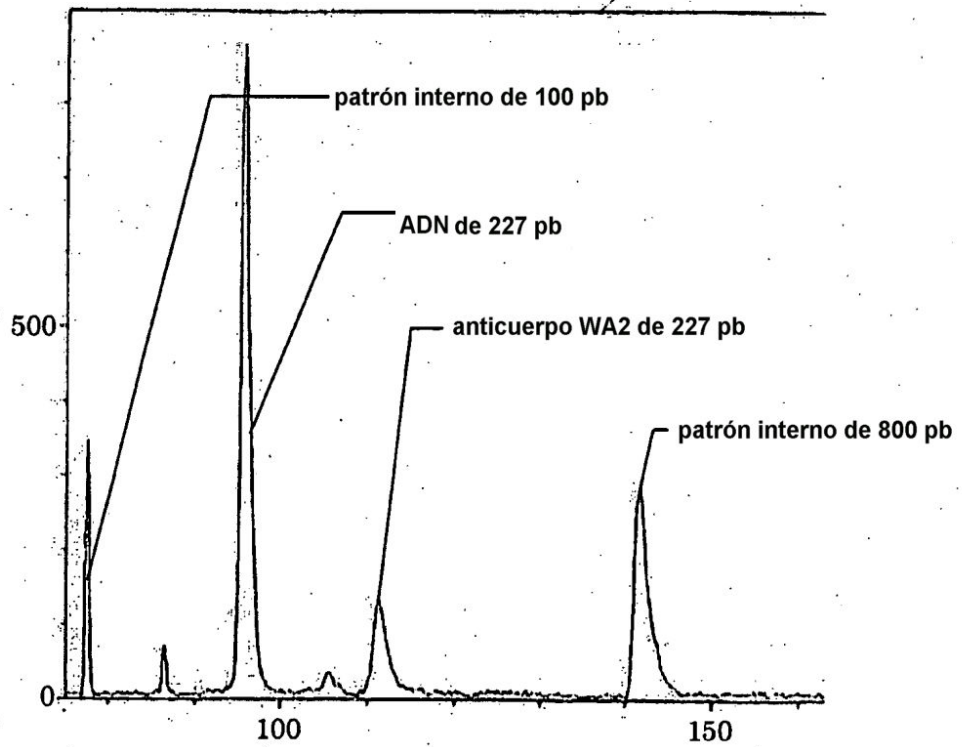


Fig. 11

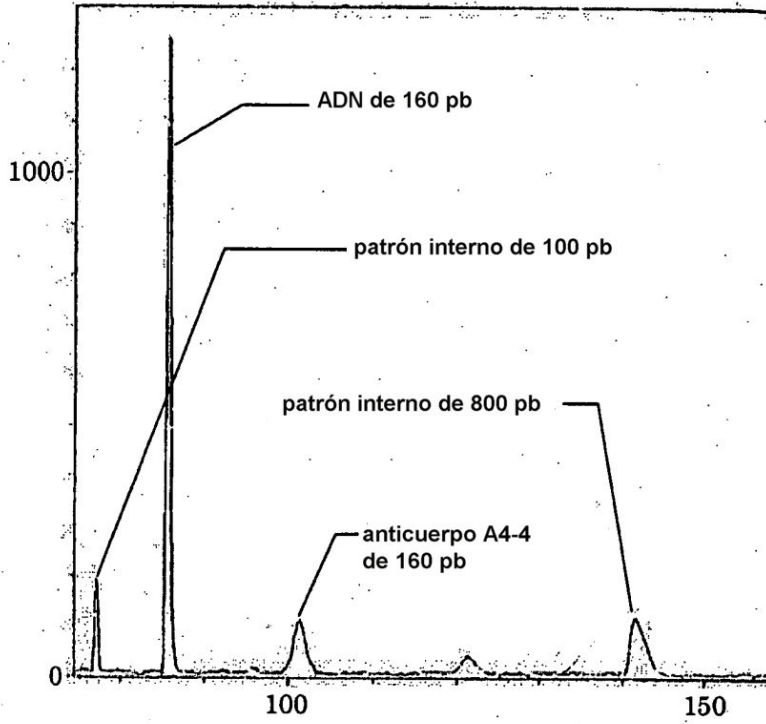


Fig. 12

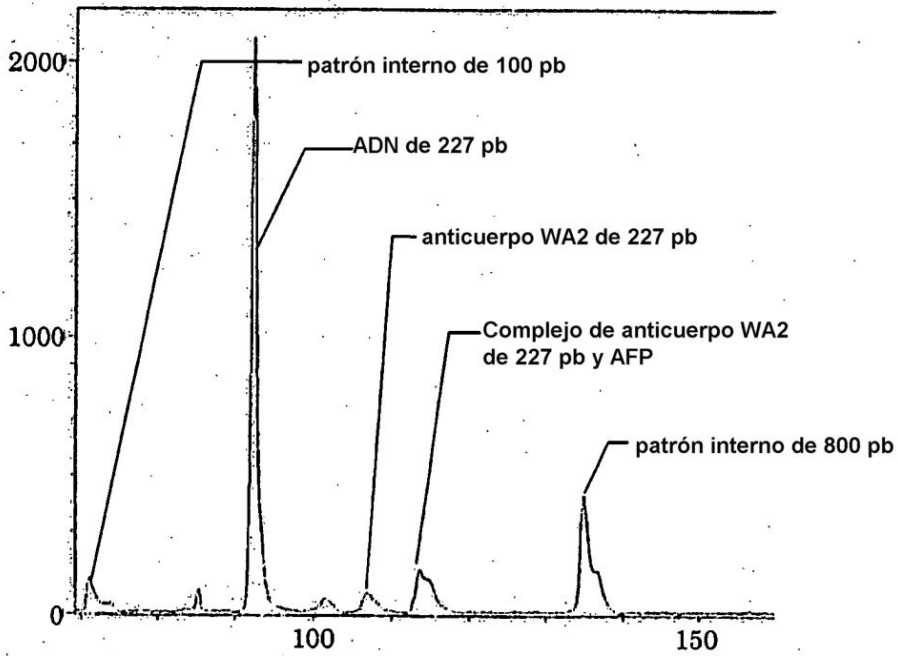


Fig. 13

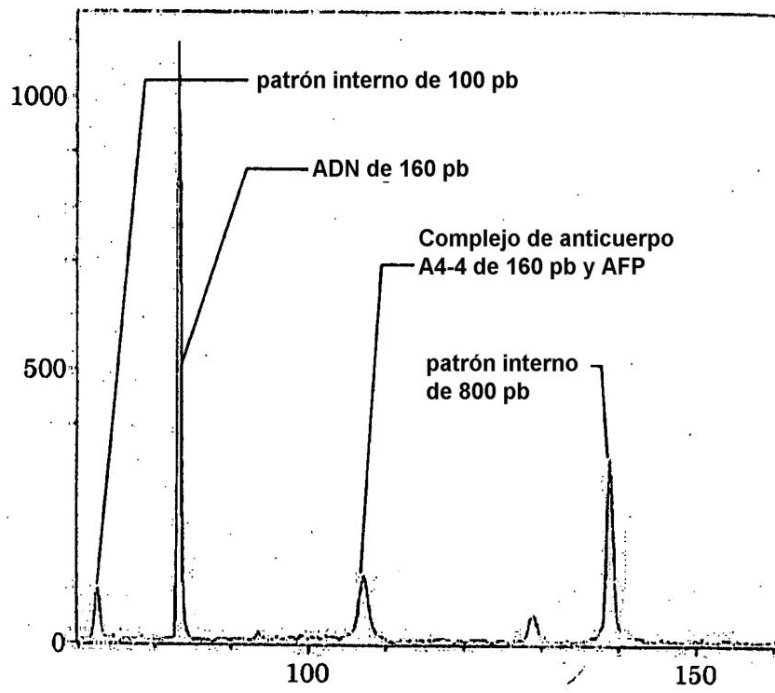


Fig. 14

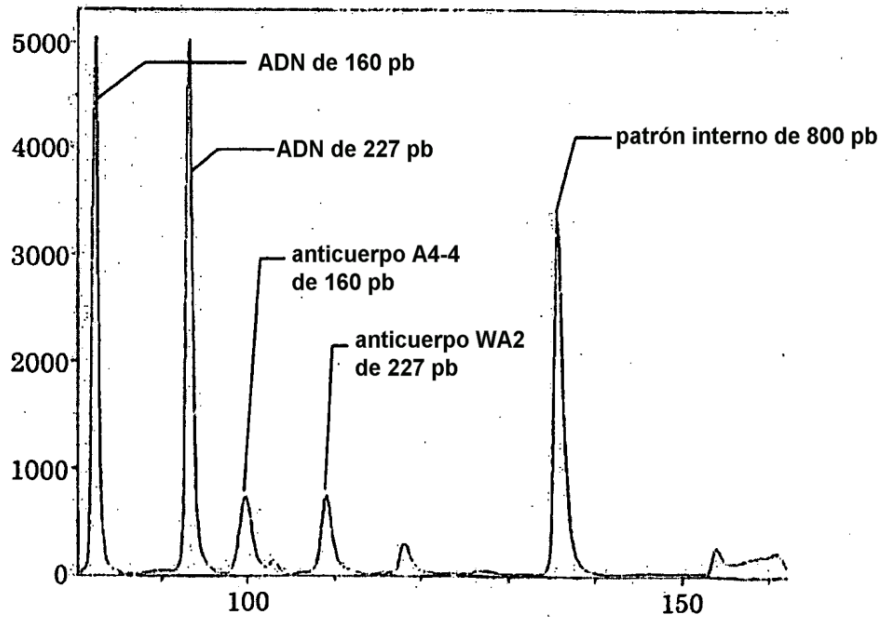


Fig. 15

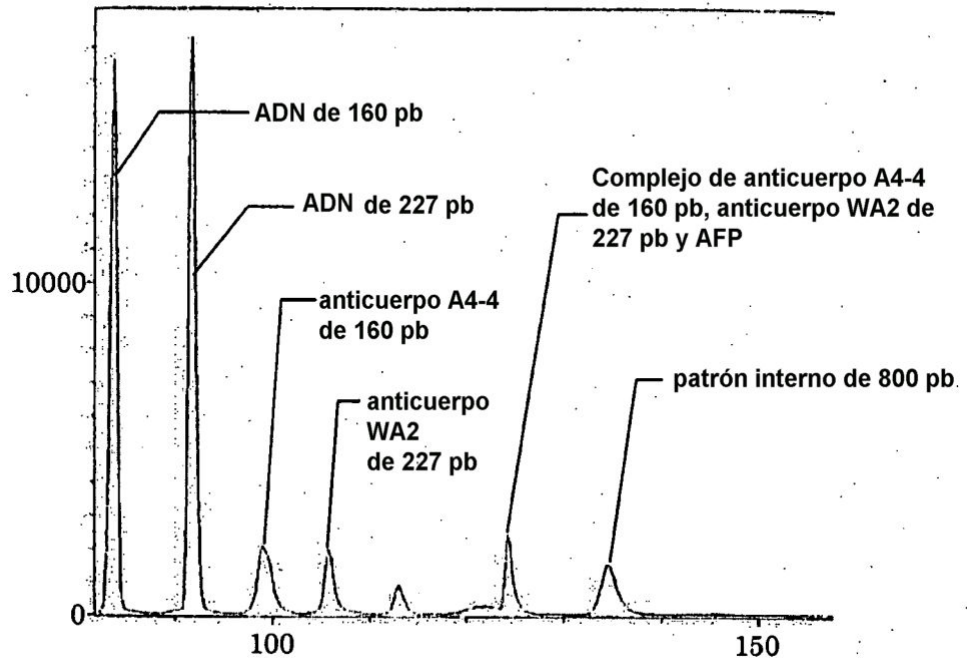


Fig. 16

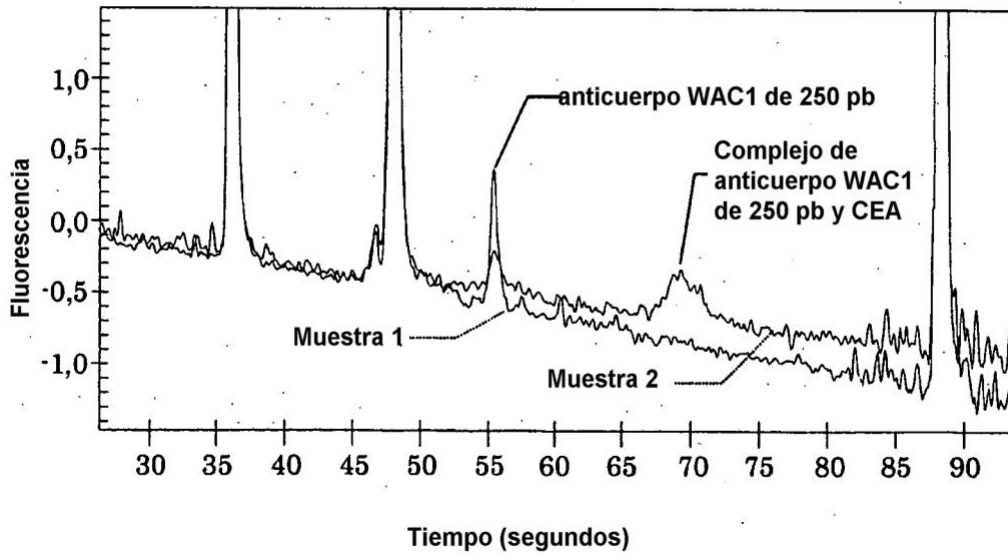


Fig. 17

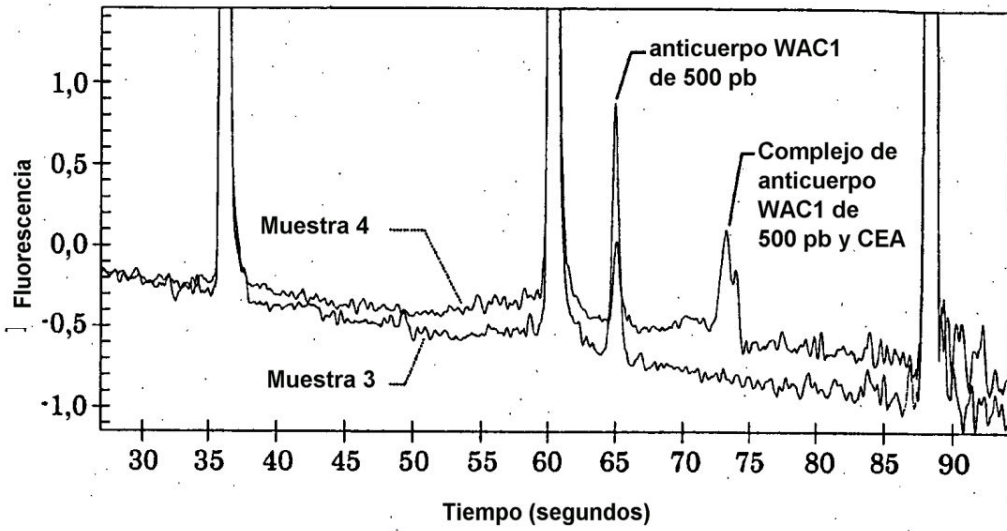


Fig. 18

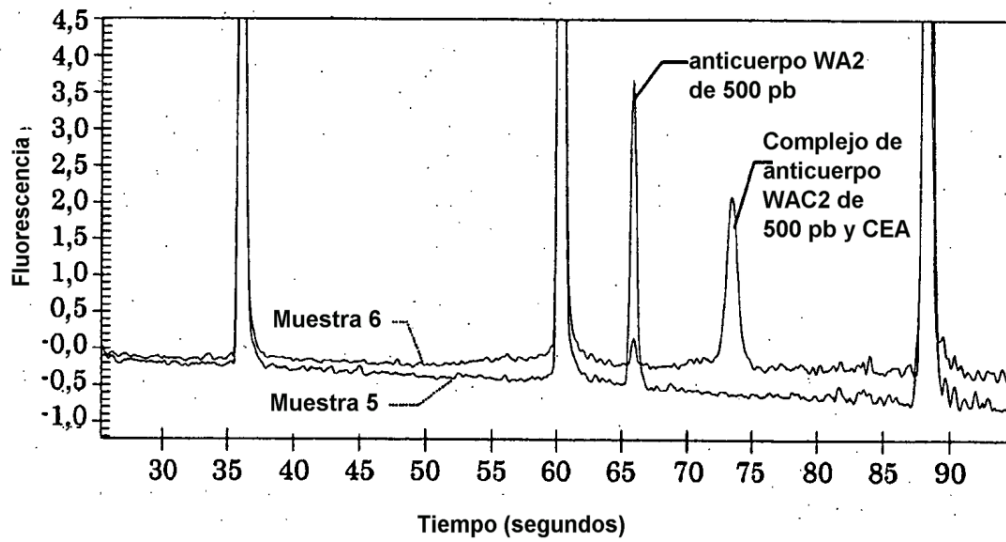


Fig. 19

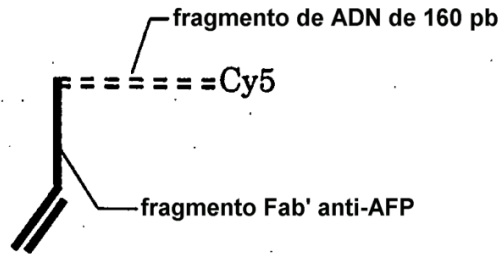


Fig. 20

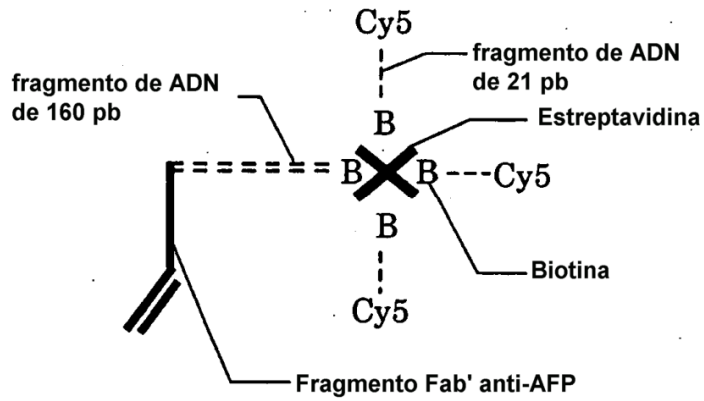


Fig. 21

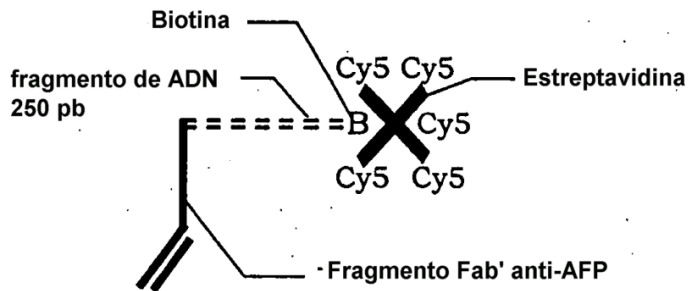


Fig. 22

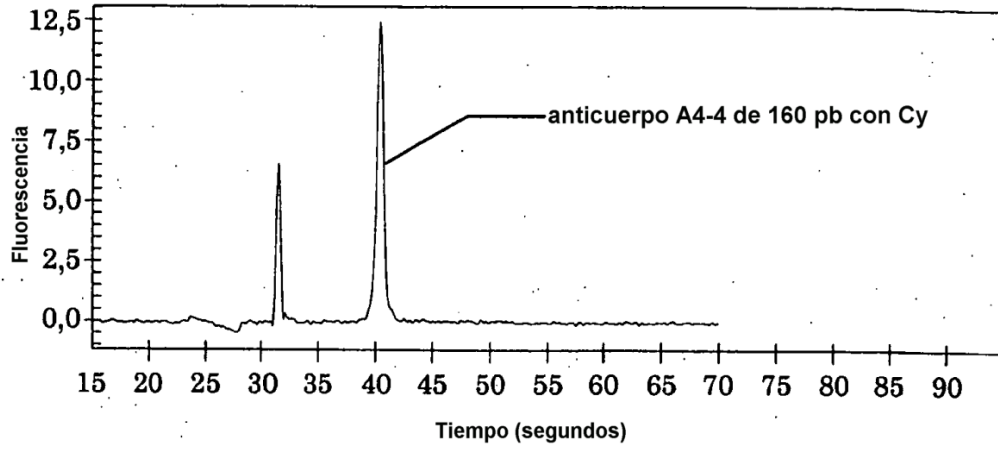


Fig. 23

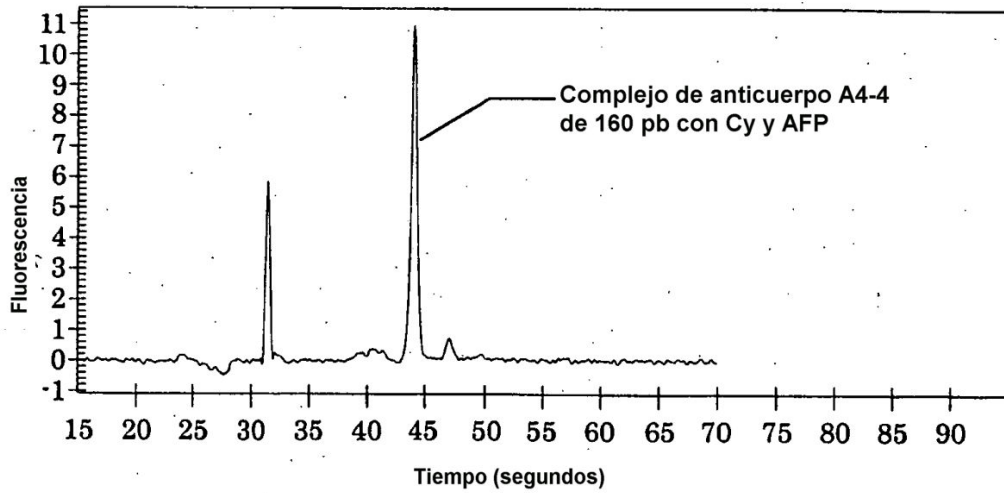


Fig. 24

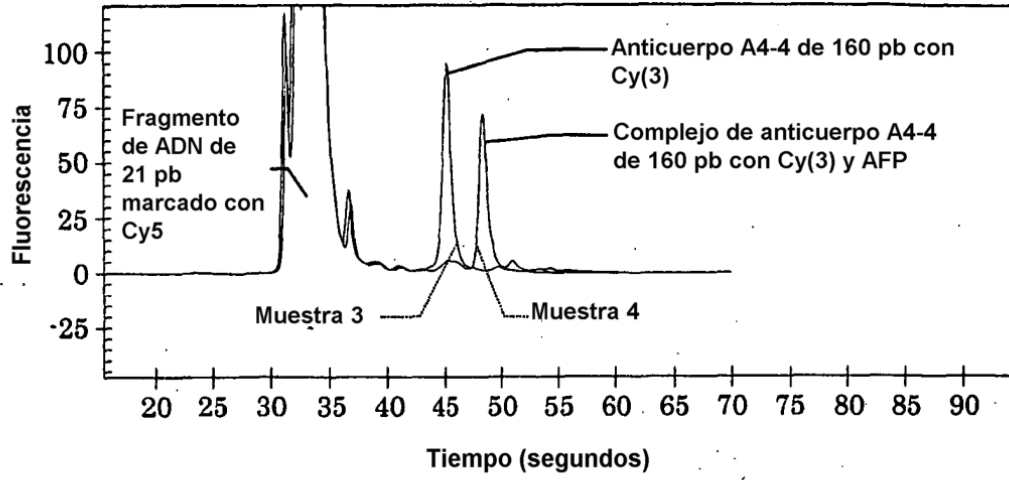


Fig. 25

