



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119678042 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 21

(21) 申请号 202380058304.0

土屋裕辉 中村乃理子

(22) 申请日 2023.07.24

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务
所(普通合伙) 11277

(30) 优先权数据

专利代理师 刘新宇 张文慧

2022-127552 2022.08.10 JP

2022-137093 2022.08.30 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2025.02.07

G01N 33/53 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 15/0205 (2024.01)

PCT/JP2023/026962 2023.07.24

G01N 15/04 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

G01N 30/88 (2006.01)

W02024/034371 JA 2024.02.15

G01N 33/48 (2006.01)

(71) 申请人 株式会社岛津制作所

G01N 33/483 (2006.01)

地址 日本

G01N 33/543 (2006.01)

申请人 国立大学法人东京大学

G01N 33/552 (2006.01)

(72) 发明人 青木健吾 小田龙太郎 太田诚一

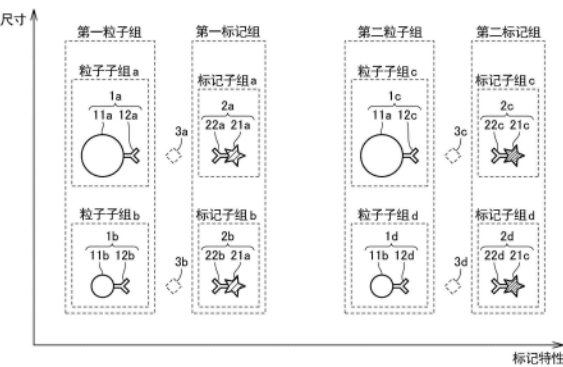
权利要求书4页 说明书24页 附图11页

(54) 发明名称

测定方法

(57) 摘要

第一标记组的标记(2a、2b)和第二标记组的标记(2c、2d)具有彼此不同的标记特性。在各粒子组中,多个粒子子组(a~d)的粒子尺寸彼此不同。测定方法还包括以下步骤:使试样、粒子(1a~1d)以及标记(2a~2d)混合;使标记(2a~2d)及标记(2a~2d)与生物分子特异性结合;基于粒子尺寸来将各个粒子分离;检测标记的标记特性;以及基于粒子尺寸和标记特性来判定与粒子进行了结合的生物分子的种类。



1. 一种测定方法,是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法,所述测定方法包括以下步骤:

准备属于第一粒子组的粒子和属于第二粒子组的粒子;以及

准备属于与所述第一粒子组对应的第一标记组的标记和属于与所述第二粒子组对应的第二标记组的标记,

所述第一标记组的标记和所述第二标记组的标记具有彼此不同的标记特性,

所述第一粒子组的粒子与所述第一标记组的标记经由生物分子进行结合,

所述第二粒子组的粒子与所述第二标记组的标记经由生物分子进行结合,

各所述粒子组包含多个粒子子组,

在各所述粒子组中,多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同,

所述第一粒子组的多个粒子子组的粒子和所述第二粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第一结合部,

所述测定方法还包括以下步骤:

使所述试样、所述第一粒子组的粒子及所述第二粒子组的粒子、以及所述第一标记组的标记及所述第二标记组的标记混合;

使生物分子与所述第一粒子组的粒子及所述第二粒子组的粒子以及所述第一标记组的标记及所述第二标记组的标记特异性结合;

基于粒子尺寸来将所述第一粒子组的粒子和所述第二粒子组的粒子中的各个粒子分离;

检测经由生物分子来与基于粒子尺寸分离出的所述第一粒子组的粒子及所述第二粒子组的粒子中的各个粒子进行了结合的标记的标记特性;以及

基于粒子尺寸和标记特性,来判定与所述第一粒子组的粒子及所述第二粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

2. 根据权利要求1所述的测定方法,其中,

还包括以下步骤:基于判定所述生物分子的种类所得到的结果,来测量每个种类的生物分子的量。

3. 根据权利要求2所述的生物分子的测定方法,其中,

还包括以下步骤:基于每个种类的生物分子的量,来诊断疾病、或者判定治疗效果。

4. 根据权利要求1~3中的任一项所述的测定方法,其中,

各所述粒子组的粒子还包含粒子主体,

各所述标记组的标记包含标记部以及与生物分子特异性结合的第二结合部。

5. 根据权利要求4所述的测定方法,其中,

标记部包含荧光物质、放射性同位素以及表示规定的吸光度的物质中的至少一者。

6. 根据权利要求4所述的测定方法,其中,

生物分子包含蛋白质,

第一结合部包含与所述蛋白质结合的抗体,

第二结合部包含同所述蛋白质中的与第一结合部的结合部位不同的部位结合的抗体。

7. 根据权利要求1~3中的任一项所述的测定方法,其中,

生物分子包含核酸和代谢物中的至少一者。

8. 根据权利要求1~3中的任一项所述的测定方法,其中,
各所述粒子组的粒子包含无机材料和树脂材料中的至少一者。
9. 根据权利要求8所述的测定方法,其中,
所述无机材料包含金和二氧化硅中的至少一者。
10. 根据权利要求8所述的测定方法,其中,
所述树脂材料包括聚苯乙烯。
11. 根据权利要求1~3中的任一项所述的测定方法,其中,
所述分离的步骤包括以下步骤:使用离心场流分级法即离心FFF法、非对称流场流分级法即AF4法以及尺寸排阻色谱法中的至少一者,基于粒子尺寸来分离粒子。
12. 根据权利要求1~3中的任一项所述的测定方法,其中,
在检测所述标记特性的步骤中,使用多波长荧光检测器或多个荧光检测器。
13. 根据权利要求12所述的测定方法,其中,
检测所述标记特性的步骤包括以下步骤:向混合于载体中的各所述粒子组的粒子照射激发光,
准备所述粒子的步骤包括以下步骤:准备各所述粒子组的粒子和所述载体,
准备各所述粒子组的粒子和所述载体的步骤包括以下步骤:准备各所述粒子组的粒子的折射率与所述载体的折射率之差为规定的数值以下的各所述粒子组的粒子和所述载体。
14. 根据权利要求1~3中的任一项所述的测定方法,其中,
检测所述标记特性的步骤还包括以下步骤:对与所述第一粒子组的粒子及所述第二粒子组的粒子中的各个粒子结合的标记的标记特性的检测值进行校正。
15. 根据权利要求14所述的测定方法,其中,
所述校正的步骤包括以下步骤:
准备与各所述粒子组的多个粒子子组中的各个粒子子组的粒子尺寸对应的尺寸的第一校正用粒子;
对于各粒子尺寸,检测没有结合标记部的状态下的所述第一校正用粒子的标记特性;
以及
对于各粒子尺寸,基于所述第一校正用粒子的标记特性的检测值,来对与所述第一粒子组的粒子及所述第二粒子组的粒子结合的标记部的标记特性的检测值进行校正。
16. 根据权利要求15所述的测定方法,其中,
检测所述第一校正用粒子的标记特性的步骤包括以下步骤:
对于各粒子尺寸,针对包含第一结合部的所述第一校正用粒子在结合了生物分子及第二结合部的状态下检测标记特性。
17. 根据权利要求14所述的测定方法,其中,
所述检测的步骤包括以下步骤:
针对具有与各所述粒子组的多个粒子子组中的各个粒子子组的粒子尺寸彼此不同的粒子尺寸的第二校正用粒子,检测没有结合标记部的状态下的标记特性,
所述校正的步骤包括以下步骤:
基于所述第二校正用粒子的标记特性的检测值,来对与所述第一粒子组的粒子及所述第二粒子组的粒子结合的标记的标记特性的检测值进行校正。

18. 根据权利要求17所述的测定方法, 其中,

基于所述第二校正用粒子的标记特性的检测值进行校正的步骤包括以下步骤:

使用基于所述第二校正用粒子的标记特性的峰面积计算出的校正系数, 来对与所述第一粒子组的粒子及所述第二粒子组的粒子结合的标记特性的检测结果进行校正。

19. 一种测定方法, 是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法, 所述测定方法包括以下步骤:

准备属于第三粒子组的粒子和属于第四粒子组的粒子; 以及

准备属于与所述第三粒子组对应的第三标记组的标记和属于与所述第四粒子组对应的第四标记组的标记,

属于所述第三粒子组的粒子和所述第四粒子组的粒子具有彼此不同的粒子特性,

所述第三粒子组的粒子与所述第三标记组的标记经由生物分子进行结合,

所述第四粒子组的粒子与所述第四标记组的标记经由生物分子进行结合,

各所述粒子组包含多个粒子子组,

在各所述粒子组中, 多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同,

所述第三粒子组的多个粒子子组的粒子和所述第四粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第三结合部,

所述测定方法还包括以下步骤:

使所述试样、所述第三粒子组的粒子及所述第四粒子组的粒子、以及所述第三标记组的标记及所述第四标记组的标记混合;

使生物分子与所述第三粒子组的粒子及所述第四粒子组的粒子以及所述第三标记组的标记及所述第四标记组的标记特异性结合;

基于粒子尺寸来将所述第三粒子组的粒子和所述第四粒子组的粒子中的各个粒子分离;

针对基于粒子尺寸分离出的所述第三粒子组的粒子和所述第四粒子组的粒子中的各个粒子, 检测粒子特性和经由生物分子进行了结合的标记的标记特性; 以及

基于粒子尺寸、粒子特性以及标记特性, 来判定与所述第三粒子组的粒子及所述第四粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

20. 根据权利要求19所述的测定方法, 其中,

所述粒子特性包含荧光光谱的图案、放射性光谱的图案以及吸光度光谱的图案中的至少一者。

21. 根据权利要求19或20所述的测定方法, 其中,

在所述检测的步骤中, 针对所述第三粒子组的粒子和所述第四粒子组的粒子中的各个粒子, 能够判别粒子特性的检测值和标记特性的检测值。

22. 根据权利要求19或20所述的测定方法, 其中,

所述第三标记组的标记特性的检测值与所述第四标记组的标记特性的检测值同等。

23. 一种测定方法, 是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法, 所述测定方法包括以下步骤:

准备属于第一粒子组的粒子; 以及

准备属于与所述第一粒子组对应的第一标记组的标记,

所述第一粒子组的粒子和所述第一标记组的标记经由生物分子进行结合，
所述第一粒子组包含多个粒子子组，
在所述第一粒子组中，多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同，
所述第一粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第一结合部，

所述测定方法还包括以下步骤：

通过将所述试样与所述第一粒子组的粒子及所述第一标记组的标记混合，来使所述第一粒子组的粒子及所述第一标记组的标记与生物分子特异性结合；

基于粒子尺寸来将所述第一粒子组的各个粒子分离；

检测经由生物分子来与基于粒子尺寸分离出的所述第一粒子组的各个粒子进行了结合的标记的标记特性；以及

基于粒子尺寸和标记特性，来判定与所述第一粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种测定方法,更特定的是涉及一种生物分子的测定方法。

背景技术

[0002] 以往,作为用于疾病的诊断和/或治疗效果的判定的客观的评价方法,存在测定生物体内的被称为生物标志物的生物分子的方法。其中,将疾病视为多个生物分子的作用的总和、并且基于多个种类的生物标志物的测定结果来进行诊断和/或治疗效果的判定的方法被认为很有前景。

[0003] 作为同时检测多个种类的生物标志物的方法,已知有被称为xMAP(注册商标)的方法。在日本特表2012-533052号公报(专利文献1)中,作为检测生物标志物的方法,公开了作为xMAP之一的Luminex(注册商标)技术。xMAP是使用将两种颜色的荧光色素以规定的浓度组合并密封而成的表现出规定的荧光光谱的磁珠(beads)作为生物标志物的种类的识别库的技术。在xMAP中,构成为该荧光光谱不同的磁珠分别结合种类不同的生物标志物。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特表2012-533052号公报

发明内容

[0007] 发明要解决的问题

[0008] 然而,在xMAP中,需要仅利用荧光光谱来区分磁珠,因此很难辨别表现出相似的荧光光谱的磁珠。因此,增加能够一次性地检测的生物标志物的种类的数量在原理上是有极限的。因此,寻求一种不同于xMAP的能够一次性地检测多个种类的生物标志物的技术。

[0009] 本公开是为了解决所述问题而完成的,其目的在于提供一种一次性地测定多个种类的生物标志物的技术。

[0010] 用于解决问题的方案

[0011] 本公开的第一方式是一种测定方法,是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法,测定方法包括以下步骤:准备属于第一粒子组的粒子和属于第二粒子组的粒子;以及准备属于与第一粒子组对应的第一标记组的标记和属于与第二粒子组对应的第二标记组的标记。第一标记组的标记与第二标记组的标记具有彼此不同的标记特性。第一粒子组的粒子与第一标记组的标记经由生物分子进行结合。第二粒子组的粒子和第二标记组的标记经由生物分子进行结合。各粒子组包含多个粒子子组。在各粒子组中,多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同。第一粒子组的多个粒子子组的粒子和第二粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第一结合部。测定方法还包括以下步骤:使试样、第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子、以及第一标记组的标记及第二标记组的标记混合;使生物分子与第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子以及第一标记组的标记及第二标记组的标记特异性结合;基于粒子尺寸来将第一粒子组的粒子和第二粒子组的粒子

中的各个粒子分离;检测经由生物分子来与基于粒子尺寸分离出的第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子中的各个粒子进行了结合的标记的标记特性;以及基于粒子尺寸和标记特性,来判定与第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

[0012] 本公开的第二方式是一种测定方法,是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法,测定方法包括以下步骤:准备属于第三粒子组的粒子和属于第四粒子组的粒子;以及准备属于与第三粒子组对应的第三标记组的标记和属于与第四粒子组对应的第四标记组的标记。属于第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子具有彼此不同的粒子特性。第三粒子组的粒子与第三标记组的标记经由生物分子进行结合。第四粒子组的粒子与第四标记组的标记经由生物分子进行结合。各粒子组包含多个粒子子组。在各粒子组中,多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同。第三粒子组的多个粒子子组的粒子和第四粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第三结合部。测定方法还包括以下步骤:使试样、第三粒子组的粒子及第四粒子组的粒子、以及第三标记组的标记及第四标记组的标记混合;使生物分子与第三粒子组的粒子及第四粒子组的粒子以及第三标记组的标记及第四标记组的标记特异性结合;基于粒子尺寸来将第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子中的各个粒子分离;针对基于粒子尺寸分离出的第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子中的各个粒子,检测粒子特性和经由生物分子进行了结合的标记的标记特性;以及基于粒子尺寸、粒子特性以及标记特性,来判定与第三粒子组的粒子及第四粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

[0013] 本公开的第三方式是一种测定方法,是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法,测定方法包括以下步骤:准备属于第一粒子组的粒子;以及准备属于与第一粒子组对应的第一标记组的标记。第一粒子组的粒子和第一标记组的标记经由生物分子进行结合。第一粒子组包含多个粒子子组。在第一粒子组中,多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同。第一粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第一结合部。测定方法还包括以下步骤:通过将试样与第一粒子组的粒子及第一标记组的标记混合,来使第一粒子组的粒子及第一标记组的标记与生物分子特异性结合;基于粒子尺寸来将第一粒子组的各个粒子分离;检测经由生物分子来与基于粒子尺寸分离出的第一粒子组的各个粒子进行了结合的标记的标记特性;以及基于粒子尺寸和标记特性,来判定与第一粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

[0014] 发明的效果

[0015] 根据本公开的控制装置,能够提供一次性地测定多个种类的生物分子的技术。

附图说明

[0016] 图1是示出本实施方式所涉及的测定系统的整体结构的图。

[0017] 图2是说明粒子和标记的构造的图。

[0018] 图3是说明粒子组和标记组的图。

[0019] 图4是说明使粒子、生物标志物以及标记结合的方法的图。

[0020] 图5是示出基于粒子尺寸的分离结果的图。

[0021] 图6是示出标记特性的检测结果的图。

[0022] 图7是示出本实施方式所涉及的测定处理的流程图。

- [0023] 图8是示出变形例1所涉及的测定处理的流程图。
- [0024] 图9是说明使用第一校正用粒子进行校正的具体例的图。
- [0025] 图10是说明使用第二校正用粒子进行校正的具体例的图。
- [0026] 图11是说明变形例2所涉及的粒子和标记的构造的图。
- [0027] 图12是说明变形例2所涉及的粒子组和标记组的图。
- [0028] 图13是示出变形例2所涉及的测定处理的流程图。

具体实施方式

[0029] 下面,参照附图来详细说明本发明的实施方式。此外,对图中的相同或相当的部分标注相同的附图标记,且不重复其说明。

[0030] [1.测定系统的结构]

[0031] 图1是说明按照本发明的实施方式的测定系统100的概要的图。

[0032] 参照图1,测定系统100包括控制装置4和测定装置5。

[0033] 测定装置5是用于测定生物标志物的装置。测定装置5包括送液部6、预处理部71、注入部72、分离部8、流路51、52以及检测部9。

[0034] 在测定装置5中,流路51连接于送液部6的下游。送液部6向流路51输送载体(流动相)。送液部6包括用于容纳载体的容器61和用于抽吸容器61中的载体的送液用的泵62。

[0035] 流路51是将送液部6与分离部8连接的流路。在流路51配置有注入部72。

[0036] 注入部72是用于向流路51的载体中注入混合溶液的部。混合溶液是在预处理部71中以试样为基础生成的溶液。由预处理部71生成混合溶液的方法将在后文说明。混合溶液包含用于测定生物标志物的粒子。该粒子包括结合了生物标志物的粒子和没有结合生物标志物的粒子,但在图1的说明中均称为“粒子”。生物标志物结合了具有规定的标记特性(例如荧光)的标记。例如,注入部72可以是自动采样器,也可以是用于用户手动地向流路51注入混合溶液的注入部。

[0037] 分离部8将混合于载体中的粒子(下面也称为“载体中包含的粒子”)根据粒子尺寸进行分离。一般来说,将粒子根据其尺寸进行分离称为“分级”。在一个实施例中,分离部8例如是使用作为FFF(Field Flow Fraction:场流分级)法的一种的、离心FFF法或AF4(Asymmetrical Flow Field Flow Fraction:非对称流场流分级)法的分级装置。

[0038] 离心FFF法是利用离心力使尺寸大的粒子沉降、从而根据离心力和扩散系数的差异对粒子进行分级的方法。如果使用离心FFF法,则能够根据粒子的质量和粒子的大小对粒子进行分级。例如,在粒子为大致球形的情况下,粒子的大小能够用粒子的直径、体积等来表示。离心FFF法由于尺寸分辨率比较高,因此具有能够判别的生物标志物的种类的数量多这样的优点。另外,与AF4法相比,离心FFF法能够得到分级的误差小且再现性高的分级结果。因此,在检测部9中的标记特性的测定结果中,不需要考虑分级的误差的影响。由此,标记特性的测定精度提高,生物标志物的定量精度提高。

[0039] AF4法是基于通过产生垂直于移动方向的力场而产生的层流中的移动速度差来对粒子进行分级的方法。如果使用离心FFF法,则能够根据粒子的大小对粒子进行分级。例如,在粒子为大致球形的情况下,粒子的大小能够用粒子的直径、体积等来表示。另一方面,AF4法具有还能够对小且轻的粒子进行分级这样的优点。由此,能够将为了检测生物标志物而

能够利用的粒子的粒子尺寸设定得小,因此能够判别的生物标志物的种类的数量变多。

[0040] 分离部8也可以是使用尺寸排阻色谱法的分级装置。在尺寸排阻色谱法中,使包含粒子的溶液流过存在许多细孔的柱。然后,利用越小尺寸的粒子由于进入细孔而洗脱时间越慢这一情况来对粒子进行分级。如果使用尺寸排阻色谱法,则能够根据粒子的大小来对粒子进行分级。在粒子为大致球形的情況下,粒子的大小例如能够用粒子的直径、体积等来表示。使用尺寸排阻色谱法的分级装置能够实现比使用FFF(Field Flow Fraction:场流分级)法的分级装置便宜的装置结构。

[0041] 流路52是将分离部8与检测部9连接的流路。从分离部8排出的包含粒子的载体经由流路52被导入到检测部9。

[0042] 检测部9检测经由生物标志物来与根据粒子尺寸分离出的粒子结合的标记的标记特性。在本实施方式中,标记特性只要是能够通过该标记特性来辨别与生物标志物3的种类对应的标记2的种类即可,没有特别限定。在一个实施例中,标记特性是荧光。在这种情况下,检测部9例如包括多波长荧光检测器或多个荧光检测器。多波长荧光检测器是能够在多个激发波长和荧光波长下同时测量的检测器。如果使用多个荧光检测器作为检测部9,则能够高灵敏度地检测荧光,因此标记特性的测定精度提高,生物标志物的定量精度提高。如果使用多波长荧光检测器作为检测部9,能够减少检测器的数量,因此能够降低检测部9所需的成本。在另一实施例中,检测部9是放射线测定器或吸光度计。

[0043] 在检测部9中,可以对每一个粒子进行标记特性的检测,也可以统一检测多个粒子的标记特性。例如,在检测部9中,在构成为测定标记物质的位置处的粒子的数量始终为1个以下的情况下,检测每一个粒子的标记特性。例如,在测定标记物质的位置的流路构成为每次只能一个粒子通过的宽度的情况、或者以载体中的粒子的浓度非常低而在测定位置处只能存在一个分子的方式进行了制备的情况符合这一情形。

[0044] 另一方面,在构成为测定标记物质的位置处的粒子的数量能够为多个的情况下,检测与多个粒子的标记特性的总和对应的检测值。在这种情况下,根据与总和对应的检测值来计算具有什么样的标记特性的粒子被检测到多少个,从而知晓对应的生物标志物的种类和数量。

[0045] 控制装置4控制测定装置5,并解析检测部9的检测结果。控制装置4典型的是计算机,能够通过专用的计算机或通用的个人计算机来实现。

[0046] 控制装置4具备处理器40、存储器41、输入部42以及显示部43。

[0047] 处理器40例如包括CPU(Central Processing Unit:中央处理单元)。处理器40将存储器41中保存的程序展开在RAM等中并执行该程序。

[0048] 存储器41例如包括ROM(Read Only Memory:只读存储器)、RAM(Random Access Memory:随机存取存储器)、非易失性存储器。ROM中保存的程序是描述了测定系统100的处理过程的程序。非易失性存储器将从检测部9发送来的检测结果存储为数据文件。此外,存储器41也可以代替非易失性存储器,或者除了非易失性存储器之外,包括HDD(Hard Disk Drive:硬盘驱动器)和/或SSD(Solid State Drive:固态硬盘)。

[0049] 输入部42是用于输入用户对测定系统100的指示的部。例如,输入部42包括键盘和鼠标等指示设备。

[0050] 显示部43包括液晶显示器等。显示部43显示检测部9的检测结果及其解析结果。

[0051] 控制装置4可以由多个计算机构成。另外,上述的控制装置4的功能的一部分或全部也可以配置在与测定装置5物理分离的电子计算机、服务器等中。例如,控制装置4也可以包括作为专用计算机的系统控制器和经由网络来与该系统控制器连接的通用的个人计算机。

[0052] [2.以往的生物标志物的测定方法]

[0053] 在疾病的诊断和/或治疗效果的判定中,要求客观地评价疾病的有无、疾病的发展速度、症状的强弱等。在这种疾病的客观评价中,测定生物体内的生物标志物并将其作为指标的方法是有用的。特别是,将疾病视为大量的生物分子的相互作用的总和、并且基于多个种类的生物标志物的测定值的集合来进行诊断的方法被认为有效。

[0054] 关于在进行每次特异性地补充一个种类的生物标志物的作业后对所补充的各种类的生物标志物分别进行标记、之后对与各种类的生物标志物对应的标记进行检测的ELISA(Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay:酶联免疫吸附测定)等以往的方法,从检查时间和成本方面来看,难以测定多个种类的生物标志物。

[0055] 另一方面,作为一次性地测定多个种类的生物标志物的方法,有xMAP(注册商标),销售有作为xMAP的一个方式的Luminex(注册商标)等系统。此外,在本说明书中,“一次性地测定多个种类的生物标志物”表示“将多个种类的生物标志物一次性地标记并一次性地测定”。例如,“一次性”是指1次的工序。在xMAP中,用以各种浓度组合的两种颜色的荧光色度对微磁珠进行染色。然后,使用反映磁珠内的荧光色素的浓度的组合模式的荧光光谱作为识别码。

[0056] 在通过xMAP进行的生物标志物的测定实验中,首先,将发出荧光的标记物质结合于与磁珠进行了特异性结合的生物标志物。然后,通过测定磁珠的荧光光谱来测定多个种类的生物标志物。

[0057] 然而,在仅利用磁珠的荧光光谱来区分磁珠的情况下,难以辨别表现出相似的荧光光谱的磁珠。由于这一限制,能够一次性地检测的磁珠、更特定地说表现出不同到能够彼此辨别开的程度的荧光光谱的磁珠为比较少的数量。“不同到能够彼此辨别开的程度的荧光光谱”表示例如各荧光光谱的峰所对应的横轴的位置(波长)以能够彼此区分的程度分离的状态。例如,在如xMAP那样通过与两种颜色的色素的调配比率相应的荧光光谱来区分磁珠的情况下,实际认为磁珠的种类限制在30种左右。由此,从原理上讲,难以进一步增加能够一次性地检测的生物标志物的种类的数量。

[0058] 另一方面,从大量的生物分子可能与疾病有关的观点来看,期望获得更多种类(例如100种)的生物标志物的测定值,以用于疾病的诊断和/或治疗效果的判定。因此,在临床和研究的领域,寻求一种一次性地测定多个种类的生物标志物的技术。

[0059] 鉴于这样的实际情况,在本实施方式所涉及的生物标志物的测定方法中,除了使用荧光等标记特性之外,还使用不同的粒子尺寸的粒子来进行区分,由此能够增加能够识别的生物标志物的种类。由此,能够一次性地测定多个种类的生物标志物。

[0060] [3.实施方式所涉及的测定方法]

[0061] (3-1.粒子和标记的构造)

[0062] 首先,说明在本实施方式所涉及的测定方法中使用的粒子和标记的构造。

[0063] 图2是说明粒子和标记的构造的图。

[0064] 在图2中示出了生物标志物3、以及与生物标志物3结合的粒子1及标记2。

[0065] 在本说明书中,生物标志物3表示作为本实施方式所涉及的测定方法的测定对象的生物分子,该生物分子作为用于定量地掌握疾病的有无、疾病的发展程度、药剂的效果等生物体内的生物学变化的指标。在一个实施例中,生物标志物是蛋白质。生物标志物也可以是核酸和代谢物中的至少一者。核酸也可以包括DNA(Deoxyribonucleic Acid:脱氧核糖核酸)、信使RNA(Ribonucleic Acid:核糖核酸)、长链非编码RNA、或微RNA。

[0066] 粒子1包含粒子主体11以及与生物标志物3特异性结合的第一结合部12。

[0067] 粒子主体11典型的是呈具有规定的直径的球状的形状,但也可以包含在制造过程中产生的收敛于规定的范围内的形状的误差。此外,规定的范围是指例如分离部8能够毫无问题地进行分级的范围。此外,如粒子主体11或粒子1那样用于测定生物试样的球状的物体或者对该球状的物体施加规定的修饰而得到的物体也被本领域技术人员称为“磁珠”。形成粒子主体11的原材料例如包括金或二氧化硅(silica)等无机材料、以及聚苯乙烯等树脂材料中的至少一者。在粒子主体11是由金构成的金粒子的情况下,粒子主体11的直径优选为5nm~500nm之间的规定值。在粒子主体11是由二氧化硅构成的二氧化硅粒子的情况下,粒子主体11的直径优选为10nm~1000nm之间的规定值。

[0068] 下面,也将如上所述的具有纳米级尺寸的金粒子和二氧化硅粒子分别称为“金纳米粒子”和“二氧化硅粒子”。下面,说明在粒子主体11中使用金纳米粒子和二氧化硅纳米粒子的优点。

[0069] 金纳米粒子具有稳定、不易劣化的特征。由此,在保管过程中或测定过程中不易发生经年劣化以及因药品或冲击引起的劣化。由此,在保管过程中或测定过程中粒子尺寸发生变化的可能性也非常低,因此能够提高分析的可靠性。并且,金纳米粒子具有容易进行制造时的尺寸控制这样的特征。由此,能够制作尺寸分布的偏差小的粒子。由此,能够增多能够同时分离的尺寸的数量。由此,在将金纳米粒子用作粒子主体11的情况下,能够增多能够同时检测的生物标志物3的种类的数量。

[0070] 关于二氧化硅粒子,与金相比,二氧化硅的折射率更接近水的折射率,因此与金纳米粒子相比,在检测时可能产生影响的粒子表面处的散射光少。并且,不同于金,对于特定的波长也未表现出高的吸光度。由此,在将二氧化硅纳米粒子用作粒子主体11的情况下,与荧光强度及吸光度有关的测定精度变高。由此,生物标志物3的定量精度变高。

[0071] 作为将使用树脂材料的纳米粒子用作粒子主体11的优点,具有以下方面:销售具有可追溯性且高可靠性的树脂材料制的纳米粒子,能够比较简单地高精度地进行测定。

[0072] 在一个实施例中,粒子主体11是在金制的球状的粒子的表面涂覆二氧化硅而成的。如果使用这样的粒子主体11,则能够一次性地检测多个种类的生物标志物3,并且能够高精度地测量生物标志物的量。

[0073] 此外,粒子1的折射率与载体的折射率之差(以后也称为“折射率差”)优选为规定的数值以下。更特定地说,粒子主体11与载体的折射率之差优选为规定的数值以下。折射率差不限于此,优选为0.1以下,更优选为0.05以下。下面,详细说明折射率差优选为规定的数值以下的理由。

[0074] 在粒子1与载体之间存在折射率差的情况下,导致在由荧光检测器照射激发光时产生了由粒子引起的散射光。在这种情况下,在没有标记2时也会由于该散射光入射到荧光

检测器而导致荧光检测器检测到了信号。为了准确地检测从标记2产生的荧光,优选的是将荧光检测器的检测下限设定为不包含由散射光引起的检测信号的程度。另外,优选的是将该检测下限设定得低至确保诊断所需的灵敏度的程度。因此,优选的是,通过将粒子与载体之间的折射率差设计为规定的数值以下,来将源自粒子1的散射光的量抑制在规定的量以下。由此,能够将荧光的检测下限设定得低,能够提高检测灵敏度。

[0075] 相反,在粒子1与载体之间的折射率差大于规定值的情况下,在照射激发光时产生的源自粒子1的散射光的量也变多。因而,当与该散射光的量相应地提高检测下限时,可能无法以诊断所需的灵敏度来检测标记2。

[0076] 减小粒子1与载体之间的折射率差的第一方法是使用折射率接近粒子1的折射率的载体。第二方法是使用折射率接近载体的折射率的粒子1。第三方法是使粒子1的折射率与载体的折射率彼此接近。

[0077] 在一个实施例中,粒子1的折射率为约1.5,载体的折射率为1.33。该粒子1例如是二氧化硅粒子(折射率1.46),该载体例如是水(折射率1.33)。在本实施例中,第一方法的例子是用折射率1.5的载体替代折射率1.33的载体。第二方法的例子是用折射率1.33的粒子1替代折射率1.5的粒子1。第三方法的例子是用折射率1.4的载体替代折射率1.33的载体,用折射率1.4的粒子1替代折射率1.5的粒子1。上述粒子1和载体的替代还包括将原来的粒子1和载体更换为新的粒子1和载体、以及对原来的粒子1和载体施加变更来使折射率变化。该变更例如包括对原来的粒子1添加涂层、以及对载体添加新的成分来重新制备等。

[0078] 此外,除了折射率差之外,荧光检测器的激发波长、荧光波长、激发波长的带宽、荧光波长的带宽等也会影响上述的源自粒子1的散射光的错误检测的程度。例如,激发波长与荧光波长越接近,则错误检测的可能性越高。因而,优选的是,以激发波长、荧光波长、激发波长的带宽、荧光波长的带宽等也能够降低错误检测的概率从而确保诊断所需的检测灵敏度的方式设计粒子1和标记2并设定荧光检测器。

[0079] 第一结合部12与粒子主体11结合。第一结合部12是粒子1中的用于与规定种类的生物标志物3特异性结合的结合部位。由此,粒子1具有针对生物标志物3的结合特异性。在一个实施例中,在生物标志物3为规定种类的蛋白质的情况下,第一结合部12典型地包含与该规定种类的蛋白质结合的抗体。在这种情况下,该抗体与该规定种类的蛋白质具有通过氢键、库仑力、范德华力等力彼此特异性结合的构造。在另一实施例中,在生物标志物3是具有规定的序列的核酸的情况下,第一结合部12包含具有与作为该规定的序列中的一部分的、第一序列互补的序列的核酸。核酸包含微RNA。在互补序列中,例如在该第一序列与具有该互补序列的核酸之间产生腺嘌呤-尿嘧啶和鸟嘌呤-胞嘧啶的氢键。在又一实施例中,在生物标志物3是规定种类的代谢物的情况下,第一结合部12典型地包含与该规定种类的代谢物的一部分特异性结合的分子。

[0080] 标记2包含标记部21以及与生物标志物3特异性结合的第二结合部22。

[0081] 标记部21是包含用于对生物标志物3所结合的粒子1进行标记的物质(下面也称为“标记物质”)的部。该标记物质表现出规定的标记特性。与不同种类的生物标志物3对应的标记2中的标记部21的标记特性构成为能够彼此区分。由此,能够基于标记物质的标记特性的差异来判别生物标志物3的种类。

[0082] 在一个实施例中,标记物质为荧光物质,标记特性为荧光。荧光也可以被检测为表

示波长与荧光强度之间的关系的关系的荧光光谱、或者其图案(曲线的形状),也可以仅检测针对规定波长的强度。荧光物质通常是1种荧光色素,但也可以混合使用2种以上的荧光色素。作为荧光色素,例如使用一般用于FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorting:荧光激活细胞分选)的色素。作为更具体的例子,也可以使用Alexa Fluor(注册商标)家族中的波长不同的色素、罗丹明、PI(Propidium Iodide:碘化丙啶)等一般用于标记(labeling)的色素。

[0083] 与生物标志物3的种类对应的标记部21的种类中的各种类的荧光光谱例如分别具有表征荧光光谱的荧光波长。表征规定种类的标记部21的荧光光谱的荧光波长例如是该规定种类的标记部21的荧光强度高但其它种类的标记部21的荧光强度非常低的荧光波长。在这种情况下,如果参照针对该波长的荧光强度,则能够判定该规定种类的标记部21的存在与否。

[0084] 更特定地说,优选构成为与生物标志物3的种类对应的标记部21的种类中的各种类的荧光光谱的峰几乎彼此不重叠(参照图6)。具体地说,标记部21被制作为:按标记部21的每个种类,成为峰的顶点的波长充分分离。另外,在规定种类的标记部21的成为峰的顶点的波长下,几乎检测不到其它种类的标记部21的荧光强度。在这种情况下,如果参照针对各种类的标记部21的成为峰的顶点的波长的荧光强度,则能够区分标记部21的种类。

[0085] 在另一实施例中,标记物质为放射性同位素,标记特性为放射线的量。放射线的量也可以被检测为表示波长与放射线的量之间的关系的关系的放射线光谱或其图案(曲线的形状),也可以仅检测针对规定波长的放射线的强度。

[0086] 在又一实施例中,标记物质为表现出规定的吸光度的物质,标记特性为吸光度。吸光度也可以被检测为表示波长与吸光度的量之间的关系的关系的吸光度光谱或其图案(曲线的形状),也可以仅检测针对规定波长的吸光度。此外,在使用表现出规定的吸光度的物质作为标记物质的情况下,由于金对紫色、蓝色的光的吸光度高,因此优选的是粒子主体11的表面由金以外的物质(例如二氧化硅)构成,由此粒子主体11不会对标记物质的检测造成影响。标记物质也可以是表现出能够通过肉眼识别的波长的颜色的物质,标记特性也可以是该颜色。但是,标记物质和标记特性的例子不限于上述,只要与各种类的生物标志物3对应的标记部21能够彼此区分即可。

[0087] 第二结合部22与标记部21结合。第二结合部22是标记2中的用于与规定种类的生物标志物3特异性结合的结合部位。由此,标记2具有针对生物标志物3的结合特异性。此外,第二结合部22结合于生物标志物3中的与第一结合部12的结合部位不同的部位。由此,在粒子1与生物标志物3结合了的状态下,标记2也能够与生物标志物3结合。在一个实施例中,在生物标志物3为规定种类的蛋白质的情况下,第二结合部22典型地包含与该规定种类的蛋白质结合的抗体。在另一实施例中,在生物标志物3为具有规定的序列的核酸的情况下,第二结合部22典型地包含具有与作为该规定的序列中的一部分的、第二序列互补的序列的核酸。此外,该第二序列是与第一结合部12所结合的第一序列不同的序列。在又一实施例中,在生物标志物3为规定种类的代谢物的情况下,第二结合部22典型地与该规定种类的代谢物的除同第一结合部12结合的部位以外的部位进行特异性结合。如上所述,在本实施方式所涉及的测定方法中,无论是属于蛋白质、核酸以及代谢物中的哪一种分类的生物标志物3,都能够设为测定对象。

[0088] 在一个实施例中,第二结合部22在先与标记部21结合了的状态下与生物标志物3特异性结合。但是,第二结合部22也可以构成为:在与标记部21结合之前与生物标志物3特异性结合,之后与标记部21特异性结合。

[0089] 此外,第二结合部22与标记部21之间的结合方式没有特别限定,例如使用利用碳二亚胺反应的酰胺键形成、亲和素-生物素相互作用、或者利用环辛炔-叠氮化物的点击化学。

[0090] (3-2.粒子、生物标志物以及标记的尺寸)

[0091] 在此,进一步说明粒子主体11、第一结合部12、生物标志物3以及标记2的尺寸之间的关系。

[0092] 在本实施方式所涉及的测定方法中,如图3中详细记述的那样,使用不同尺寸的粒子主体11。更具体地说,使用具有能够由分离部8分级的多个尺寸的多个粒子主体11。此外,在本说明书中,物体的“尺寸”是指表示物体的大小和/或质量的值。物体的大小例如能够用外径的最大尺寸(在球状的情况下为直径)和/或体积来表示。在一个实施例中,无论粒子主体11的尺寸如何,粒子主体11的组成都大致同等,粒子主体11的比重也大致同等。在这种情况下,粒子主体11的直径、体积和/或质量彼此相关。

[0093] 另外,优选的是,在具有彼此不同的尺寸的多个粒子主体11中,构成为各尺寸之差相比于第一结合部12的尺寸、生物标志物3的尺寸以及标记2的尺寸而言足够大。此处的尺寸例如是指表示对分离部8中的分级产生影响的尺寸的物理量(例如,外形的最大尺寸、体积和/或质量)。如果像这样构成,无论与粒子主体11结合的第一结合部12、生物标志物3以及标记2各自的种类如何,分离部8都能够基于粒子主体11的尺寸进行分级。

[0094] 同样地,优选的是,在具有彼此不同的尺寸的多个粒子主体11中,构成为具有最小尺寸的粒子主体11的尺寸相比于第一结合部12的尺寸、生物标志物3的尺寸以及标记2的尺寸而言也足够大。如果像这样构成,无论与粒子主体11结合的第一结合部12、生物标志物3以及标记2各自的种类如何,分离部8都能够基于粒子主体11的尺寸进行分级。另外,能够准确地对混合溶液中包含的游离状态的标记2和具有最小尺寸的粒子主体11进行分级。由此,能够消除游离状态的标记2被错误检测为具有最小尺寸的被标记的粒子主体11的可能。

[0095] 其结果是,规定尺寸的粒子主体11结合第一结合部12而形成的粒子1的尺寸与作为基础的粒子主体11的尺寸大致同等。另外,该粒子1结合生物标志物3而形成的复合物(下面也称为“生物标志物复合物”)和该复合物结合标记2而形成的复合物(下面也称为“标记复合物”)的尺寸也相对于作为基础的粒子主体11的尺寸而言大致没有变化。即,作为基础的粒子主体11、粒子1、生物标志物复合物以及标记复合物的尺寸大致同等。鉴于如上所述的实际情况,在本说明书中,将粒子主体11的尺寸和粒子1的尺寸统称为“粒子尺寸”。另外,在粒子1结合生物标志物3而形成了生物标志物复合物的情况下,也将该生物标志物复合物的尺寸称为粒子尺寸。另外,在粒子1结合生物标志物3和标记2而形成了标记复合物的情况下,也将该标记复合物的尺寸称为粒子尺寸。

[0096] 在本说明书中,“粒子尺寸彼此不同”例如表示在不同的粒子群(例如不同的粒子子组)之间粒度分布不重叠。或者,在允许某种程度的重叠的情况下,平均粒径也可以设为不同。除此之外,只要能够通过FFF等粒径分级单元分离属于一个粒子群和另一粒子群的平均粒径的粒子,就可以适当地选择粒子尺寸。

[0097] 根据上述结构,能够经由第一结合部12和第二结合部22来制作包含粒子1的标记复合物。另外,能够基于主要起因于粒子主体11的粒子尺寸和标记部21的标记特性来区分该标记复合物的种类。由此,能够判别标记复合物的对应的生物标志物3的种类。

[0098] (3-3.粒子组和标记组)

[0099] 在本实施方式所涉及的测定方法中,在基于上述粒子尺寸将标记复合物分离之后,基于标记特性来判别该标记复合物。接着,说明由粒子尺寸和标记特性规定的粒子1的集团(组)。

[0100] 图3是说明粒子组和标记组的图。在图3中图示了包含与4个种类的生物标志物3a~3d分别特异性结合的粒子1a~1d和标记2a~2d的组。

[0101] 在本实施方式中,“粒子组”是指与具有特定的标记特性的标记2结合的粒子1的集团。在图3中示出了第一粒子组和第二粒子组。

[0102] 另外,“标记组”是指与规定的粒子组对应的标记2的集团。在图3中示出了与第一粒子组对应的第一标记组以及与第二粒子组对应的第二标记组。第一粒子组的粒子1和第一标记组的标记2经由生物标志物3来结合。第二粒子组的粒子1和第二标记组的标记2经由生物标志物3来结合。

[0103] 第一标记组的标记2(2a、2b)和第二标记组的标记2(2c、2d)具有彼此不同的标记特性。参照图3,第一标记组的标记2包含具有规定的标记特性的标记部21a。第二标记组的标记2包含具有与第一标记组不同的标记特性的标记部21c。

[0104] 第一粒子组和第二粒子组中的各个组(下面也称为“各粒子组”)包含多个粒子子组。

[0105] 各粒子子组包含粒子尺寸相同、并且用具有相同的标记特性的标记2标记的粒子1。参照图3,例如,粒子子组a由具有相同的粒子尺寸、并且用标记2a标记的粒子1a构成。各标记组包含与各粒子组的多个粒子子组对应的多个标记子组。将与粒子子组a对应的、标记2a的集团称为“标记子组”a。另外,将粒子子组a和标记子组a统称为“粒子-标记子组”a。粒子-标记子组的种类的数量与能够判别的生物标志物3的种类的数量对应。

[0106] 各粒子子组的粒子1所结合的生物标志物3的种类彼此不同,因此第一结合部12也彼此不同。各标记子组所结合的生物标志物3的种类彼此不同,因此第二结合部22也彼此不同。换句话说,各粒子子组的粒子1具有第一结合部12,该第一结合部12具有与种类彼此不同的生物标志物3特异性结合的构造。另外,各标记子组的标记2具有第二结合部22,该第二结合部22具有与对应的各粒子组的多个粒子子组的粒子1所特异性结合的生物标志物3特异性结合的构造。参照图3,粒子1a~1d各自包含第一结合部12a~12d。参照图3,标记2a~2d各自包含第二结合部22a~22d。

[0107] 在各粒子组中,多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同。参照图3,在第一粒子组中,粒子子组a的粒子1a的粒子主体11a的直径大于粒子子组b的粒子1b的粒子主体11b的直径。在第二粒子组中,粒子子组c的粒子1c的粒子主体11a的直径大于粒子子组d的粒子1d的粒子主体11b的直径。由此,各粒子组中的粒子子组能够根据粒子尺寸来区分。

[0108] 接着,进一步说明第二粒子组和第二标记组。在第二粒子组的粒子-标记子组c中,粒子尺寸与粒子-标记子组a的粒子尺寸相同,但标记部21的标记特性彼此不同。参照图3,粒子-标记子组c和粒子-标记子组a能够根据标记特性来区分。另外,在第二粒子组的粒子-

标记子组d中,粒子尺寸与粒子-标记子组b的粒子尺寸相同,但标记部21的标记特性彼此不同。由此,粒子-标记子组d和粒子-标记子组b能够根据标记特性来区分。

[0109] 如上所述,对应于与规定种类的生物标志物3对应的粒子-标记子组的标记复合物能够基于粒子尺寸和标记特性来与对应于其它粒子-标记子组的标记复合物辨别开。更特定地说,在该规定的粒子-标记子组和其它粒子-标记子组对应于同一粒子组的情况下,能够以粒子尺寸来进行分离。另外,在该规定的粒子-标记子组及该其它粒子-标记子组对应于不同的粒子组的情况下,能够以标记特性来辨别。由此,生物标志物3的种类能够基于粒子尺寸和标记特性来区分。

[0110] 另外,当然,各粒子组中包含的粒子子组的数量和标记组的数量可以分别为3个以上,同样地,粒子组的数量和各标记组中包含的标记子组的数量也可以分别为3个以上。例如,在各粒子组中的粒子子组的数量为10~20、标记组的数量分别为4~5的情况下,能够一次性地测定40种~100种生物标志物。另外,在各粒子组中的粒子子组的数量为10~20、标记组的数量为约20的情况下,能够一次性地测定约200种~400种生物标志物。像这样,通过组合标记特性的变化和粒子尺寸的变化,能够增加能够一次性地测定的生物标志物的种类的数量。

[0111] 另外,在图3的例子中,形成有将2种模式的粒子尺寸和2种模式的标记特性以矩阵状组合而成的4种模式的粒子-标记子组,当然,粒子尺寸和标记特性不需要一定以矩阵状进行组合。例如,第一粒子组的粒子子组的粒子尺寸的模式与第二粒子组的子组的粒子尺寸的组合也可以不同。但是,在将粒子尺寸的模式和标记特性的模式以矩阵状组合来构成了粒子-标记子组的情况下,具有能够使形成所有的粒子-标记子组所需的粒子尺寸的模式数量和标记特性的模式的数量最小化这样的优点。由此,能够最大限度地利用分离部8的粒子尺寸的分离能力和检测部9的标记特性的检测值的分离能力来构成最大数量的粒子-标记子组。即,能够使能够判别的生物标志物的种类的数量最大。

[0112] (3-4.使粒子、生物标志物以及标记结合的方法)

[0113] 接着,说明在预处理部71中使粒子1、生物标志物3以及标记2结合的方法。在一个实施例中,该方法是由用户手动地使用一般的分子生物学的实验器具来进行的,但也可以由自动预处理装置进行。即,预处理部71也可以是自动预处理装置,还可以是由用户操作的实验器具。

[0114] 图4是说明使粒子、生物标志物以及标记结合的方法的图。

[0115] 首先,用户准备包含作为测定对象的被称为生物标志物的生物分子的试样。试样例如是受验者的尿、血液等源自生物体的检查体。试样可以被预先适当地制备和/或精制。在一个实施例中,试样被收容在微管等通常用于制备生物试样的容器中。

[0116] 接着,用户将粒子1与该试样混合。例如,用户向收容试样的容器中添加将属于各粒子子组的粒子1各包含规定数量的溶液并进行混合,来制作混合溶液。粒子1被制作成能够与作为测定对象的生物标志物3结合。由此,包含在试样中的成为测定对象的生物标志物3与对应的粒子1结合。在一个实施例中,以粒子1的数量充分多于生物标志物3的数量的方式进行混合,以使作为测定对象的生物标志物3的大致全部都能够与粒子1结合。由此,在混合溶液中,作为测定对象的生物标志物3以生物标志物复合物的状态存在。

[0117] 接着,用户进一步将标记2混合到混合溶液中。由此,标记2与形成生物标志物复合

物的生物标志物3特异性结合。在一个实施例中,以标记2的数量充分多于生物标志物3的数量的方式进行混合,以将作为测定对象的生物标志物3的大致全部都被标记。由此,在混合溶液中,作为测定对象的生物标志物3以标记复合物的状态存在。

[0118] 如上所述,将作为测定对象的物质(在此为生物标志物3)夹在与该物质特异性结合的物质(在此为粒子1的第一结合部12和标记2的第二结合部22)之间的标记方法一般被称为夹心法。通过使用夹心法,仅通过添加与多个种类的生物标志物3相应的多个种类的标记2,就能够在1个工序中同时对多个种类的生物标志物3进行特异性标记。

[0119] 通过向测定装置5注入如上述那样制备出的混合溶液,能够在分离部8中根据标记复合物的粒子尺寸进行分离,并在检测部9中检测标记特性。

[0120] 此外,不是测定对象的生物标志物也以游离的状态包含在混合溶液中,但由于尺寸小于粒子尺寸最小的标记复合物,因此在分离部8中能够与作为测定对象的标记复合物相分离。由此,不会影响标记复合物的检测结果。另外,在混合溶液中也包含未结合作为测定对象的生物标志物3和标记2的粒子1,但由于该粒子1未被标记,因此在检测部9中未被检测。因此,不会影响标记复合物的检测结果。

[0121] 接着,说明测定装置5中的基于实际的粒子尺寸的分离结果和标记特性的检测结果。

[0122] (3-5. 基于粒子尺寸的分离结果和标记特性的检测结果)

[0123] 图5是示出基于粒子尺寸的分离结果的图。图5的横轴表示洗脱时间。洗脱时间是指向试样注入部72注入混合溶液之后检测到规定的成分为止的时间。纵轴是表示基线校正后的吸光度的图。参照图5,关于直径7nm、10nm、15nm、45nm、75nm、110nm的粒子1,能够以洗脱时间几乎不重叠的形式检测出。即,能够基于粒子尺寸来分离标记复合物。

[0124] 图6是示出标记特性的检测结果的图。在图6中,横轴表示波长,纵轴表示荧光强度。参照图6,3个荧光光谱能够以能够彼此区分的形式检测出。即,能够基于作为标记特性的荧光光谱来分离标记复合物。

[0125] 根据图5和图6的结果,能够基于粒子尺寸和标记特性来区分粒子-标记子组。由此,能够判别检测到了哪个种类的生物标志物。

[0126] (3-6. 测定处理)

[0127] 接着,说明用于实施实施方式所涉及的测定方法的处理。

[0128] 图7是示出本实施方式所涉及的测定处理的流程图。图7所示的步骤是使用测定系统100来进行的。

[0129] 此外,在图中,“S”作为“STEP”的缩写来使用。

[0130] 在S1中,用户准备属于第一粒子组的粒子1和属于第二粒子组的粒子1。另外,用户准备属于与第一粒子组对应的第一标记组的标记2和属于与第二粒子组对应的第二标记组的标记2。

[0131] 在S2中,用户使用预处理部71将试样、第一粒子组的粒子1以及第二粒子组的粒子1混合,来使生物标志物3与第一粒子组的粒子1及第二粒子组的粒子1特异性结合。

[0132] 在S3中,用户使用预处理部71将在S2中制作出的混合溶液、第一标记组的标记2以及第二标记组的标记2混合,来使第一标记组的标记2及第二标记组的标记2与生物标志物3特异性结合。

[0133] 在S4中,处理器40基于粒子尺寸来将第一粒子组的粒子1和第二粒子组的粒子1分别进行分离。在一个实施例中,处理器40将从注入部72注入的混合溶液导入到分离部8,在分离部8中基于粒子尺寸来分离混合溶液中的标记复合物和粒子1单体。例如,在分离部8是离心FFF的情况下,粒子尺寸小的分子先流出。由此,在混合溶液中的游离状态的标记2流出之后,如包含粒子尺寸最小的粒子1的粒子1单体或标记复合物、包含粒子尺寸第二小的粒子1的粒子1单体或标记复合物、包含粒子尺寸第三小的粒子1的粒子1单体或标记复合物……那样根据粒子尺寸而划分。

[0134] 此外,S2、S3的处理也可以通过由处理器40对进行与上述用户的操作同等的处理的装置(例如自动预处理装置)进行控制来进行。另外,S2、S3也可以以相反的顺序进行,也可以同时进行。具体地说,也可以先将试样和标记2混合来将生物标志物3与标记2结合,之后再混合粒子1来将粒子1与生物标志物3结合。另外,也可以通过将试样、粒子1以及标记2同时混合,来在1个工序中将粒子1及标记2与生物标志物3结合。

[0135] 在S5中,处理器40检测经由生物标志物3来与基于粒子尺寸分离出的第一粒子组的粒子1和第二粒子组的粒子1中的各个粒子结合的标记2的标记特性。例如,在检测部9是多波长荧光检测器或多个荧光检测器的情况下,处理器40对粒子1照射激发光,并检测所产生的荧光的强度。

[0136] 在S6中,处理器40基于粒子尺寸和标记特性,来判定与第一粒子组的粒子1及第二粒子组的粒子1中的各个粒子进行了结合的生物标志物3的种类。

[0137] 在S7中,处理器40基于判定生物标志物3的种类而得到的结果,来测量每个种类的生物标志物3的量。每个种类的生物标志物3的量例如是指试样中的每种生物标志物3的浓度或个数。

[0138] 在S6和S7的一个实施例中,处理器40基于荧光强度,来判定与发出荧光的标记2对应的生物标志物3的种类,并测量每个种类的生物标志物3的量。

[0139] 更详细地说,在按每一个粒子(即,按每一个粒子1单体或标记复合物)检测荧光的情况下,处理器40判别与荧光强度对应的标记2,并判别与标记2对应的生物标志物3的种类。然后,在每次判别生物标志物3的种类时,都将所判别出的生物标志物3的数量相加。由此知晓“在混合溶液中标记复合物所包含的生物标志物3的数量”。在一个实施例中,以粒子1的数量和标记2的数量足以使混合溶液中的所有生物标志物3成为标记复合物的状态的方式进行了制备。由此,认为“在混合溶液中标记复合物所包含的生物标志物3的数量”对应于“试样中包含的生物标志物3的数量”。处理器40能够基于“试样中包含的生物标志物3的数量”和“制作混合溶液之前的试样的总量”来求出“试样中包含的生物标志物3的浓度”。

[0140] 另一方面,在检测部9同时检测多个粒子的荧光的情况下,处理器40根据该多个粒子的荧光光谱的集合体,来计算具有哪种标记特性(例如,针对规定波长的荧光强度)的标记2各包含多少。作为更具体的例子,处理器40判别该多个粒子的荧光光谱的针对规定波长的荧光强度或峰面积,然后判别与标记2对应的生物标志物3的种类和数量。

[0141] 即使在检测部9按每一个粒子检测荧光的情况下,也可以输出将规定范围内的检测结果相加而得到的多个粒子的荧光光谱的集合体。在这种情况下,处理器40与同时检测多个粒子的荧光的情况同样地进行处理。该规定范围是指例如粒子尺寸同等的范围。该粒子尺寸同等的范围例如是基于在分离部8中开始分离处理起的时间预先规定的。

[0142] 在S8中,用户基于每个种类的生物标志物3的量,来诊断疾病、和/或判定治疗效果。例如,基于被认为与规定的疾病及治疗的效果有关的、多个种类的生物标志物3的量的组合,来判定该疾病的有无、疾病的程度、疾病的发展速度、治疗的效果等。此外,也可以通过将该多个种类的生物标志物3的量的组合存储在存储器41中,来自动化成由处理器40进行与上述用户进行的诊断同等的处理。

[0143] 如上所述,根据按照本实施方式的测定方法,能够使用粒子尺寸不同的粒子1和标记特性不同的标记2的组合来区分并检测多个种类的生物标志物3。由此,能够一次性地测定多个种类的生物标志物3。另外,能够基于一次性地测定出的每个种类的生物标志物的量,来诊断疾病或判定治疗效果。即,能够简便地进行基于多个种类的生物标志物的诊断。

[0144] 此外,上面示出了使用粒子尺寸和标记特性来判别生物标志物3的的种类的结构,但是当然也能够仅使用粒子尺寸来判别生物标志物3。例如,通过仅使用图3的第一粒子组和第一标记组,能够判别与第一粒子组的各个子组对应的生物标志物3的种类。在这种情况下,能够判别与粒子尺寸的数量对应的数量的生物标志物3的种类。像这样,能够提供一种基于粒子尺寸的差异来一次性地测定多个种类的生物分子的技术。

[0145] [4.变形例1所涉及的测定方法]

[0146] 在图7的S5中检测的标记特性(例如荧光强度)的检测值(例如峰面积)的大部分是由标记部21引起的。但是,存在包含由标记复合物的其它部分引起的成分的可能性。像这样,由作为测定对象的部分以外的部分的影响引起的检测值成分一般被称为“背景”。在本实施方式所涉及的测定方法中,有时会优选校正背景、特别是占据标记复合物的大部分的粒子主体11对检测值的影响。在本实施方式的变形例1中,说明去除该背景来校正检测值的结构。

[0147] (4-1.包含校正处理的测定处理)

[0148] 接着,说明本实施方式的变形例1所涉及的测定方法。在变形例1所涉及的测定方法中,包含对通过检测标记特性的处理而得到的检测值进行校正的处理。此外,在变形例1中,为了区分校正前的检测值和校正后的检测值,分别称为校正前检测值和校正后检测值。

[0149] 图8是示出变形例1所涉及的测定处理的流程图。图8所示的步骤是使用测定系统100进行的。在图8中,进行S51和S52来代替图7的S5。图8的S1~S4和S6~S8分别对应于图7的S1~S4和S6~S8。在图8中,不重复与图7重复的步骤的说明。

[0150] 在图8的S51中,处理器40检测与粒子1结合的标记2的标记特性,得到校正前检测值。

[0151] 在S52中,处理器40对校正前检测值进行校正,得到校正后检测值。

[0152] 接着,作为S52中的校正的具体方式,说明使用第一校正用粒子的校正方法和使用第二校正用粒子的校正方法。

[0153] (4-2.使用第一校正用粒子的校正方法)

[0154] 作为该校正中的最初的步骤,首先,准备与各粒子组的多个粒子子组各自的粒子尺寸对应的尺寸的第一校正用粒子。标记部21不与第一校正用粒子结合。

[0155] 在一个实施例中,第一校正用粒子是与粒子1同等地对检测值产生影响的粒子,典型的是与粒子1同等的物体。与粒子1同等的物体例如是指尺寸、组成、构造相同的物体。第一校正用粒子包含被认为次于标记部21的对标记特性的检测值的影响比较大的部分即粒

子主体11。第一校正用粒子也可以还包含被认为对标记特性的检测值的影响比较小的第一结合部12。由此,能够进行更准确的校正。

[0156] 在一个实施例中,标记特性为荧光强度,在这种情况下,粒子主体11的表面处的散射光可能会影响标记特性的检测值。更特定地说,散射光的影响视为由散射光引起的峰面积而产生。

[0157] 作为接下来的步骤,检测“未结合标记部21的状态”的第一校正用粒子的标记特性。此外,对于该状态的第一校正用粒子,也可以分别结合作为被认为对标记特性的检测值的影响比较小的部分的生物标志物3和第二结合部22。由此,能够进行考虑到生物标志物3和第二结合部22的影响的、更准确的校正。

[0158] 在一个实施例中,通过与包含作为测定对象的标记复合物的混合试样的测定相同的方法来测定第一校正用粒子。具体地说,第一校正用粒子在从注入部72被导入并在分离部8中根据其尺寸被分离之后,在检测部9中被检测标记特性。

[0159] 作为最后的步骤,对于各粒子尺寸,通过基于第一校正用粒子的标记特性的检测值,来对与第一粒子组的粒子1及第二粒子组的粒子1结合的标记部21的标记特性的校正前检测值进行校正,由此得到校正后检测值。

[0160] 图9是说明使用第一校正用粒子进行校正的具体例的图。在图9的例子中,标记特性为荧光强度。图9的曲线图表示与洗脱时间相应的规定的荧光波长的检测强度。图9的曲线图的横轴表示从注入部72注入后的经过时间。即,该横轴与粒子尺寸相关。纵轴是针对规定的荧光波长 λ_a 的荧光强度。更特定地说,是表征作为测定对象的粒子1a、1b的标记部21a的荧光光谱的荧光波长下的荧光强度。表征标记部21a的荧光光谱的荧光波长是指例如与标记部21a的荧光光谱的峰对应、且在其它粒子的标记部21的荧光光谱中几乎检测不到的荧光波长。

[0161] 在图9中,与未结合标记部21的状态的第一校正用粒子1ar对应地检测出峰面积 S_{ar} 的峰,与未结合标记部21的状态的第一校正用粒子1br对应地检测出峰面积 S_{br} 的峰。此外,第一校正用粒子1ar是与粒子1a同等的物体。第一校正用粒子1br是与粒子1b同等的物体。峰面积 S_{ar} 、 S_{br} 相当于背景。

[0162] 另外,对包含标记部21a和粒子1a的标记复合物以及包含标记部21a和粒子1b的标记复合物检测标记特性的检测结果表示为峰面积 S_a 的峰和峰面积 S_b 的峰。峰面积 S_a 和峰面积 S_b 对应于“校正前检测值”的一例。

[0163] 进行从这样的校正前检测值减去第一校正用粒子1ar的检测值和第一校正用粒子1br的检测值的各个检测值的校正。由此,针对包含粒子1a的标记复合物的校正后的峰面积 S_{ax} 成为 $S_{ax} = S_a - S_{ar}$ 。由此,针对包含粒子1b的标记复合物的校正后的峰面积 S_{bx} 成为 $S_{bx} = S_b - S_{br}$ 。峰面积 S_{ax} 和峰面积 S_{bx} 对应于“校正后检测值”的一例。

[0164] 即,在图9的例子中,能够去除粒子主体11表面处的散射光的影响。由此,校正后的峰面积余下与检测到的标记部21a的数量相关的成分。由此,基于校正后的峰面积对所检测到的标记部21a的数量进行定量的精度得到提高。

[0165] 根据上述内容,通过使用第一校正用粒子来排除校正前检测值中包含的背景数据,由此校正后检测值主要是由标记部21的标记特性引起的。由此,基于校正后检测值来更准确地求出各种类的生物标志物3的数量。因此,本实施方式所涉及的测定方法中的生物标

志物3的定量精度提高。

[0166] 此外,由于第一校正用粒子使用与成为测定对象的粒子1的粒子尺寸同等的粒子尺寸的粒子,因此不会减少成为测定对象的粒子尺寸的数量。由此,能够在将能够判别的生物标志物的种类的数量保持为最大限度的同时校正背景。

[0167] (4-3.校正方法的其它方式)

[0168] 在使用上述第一校正用粒子的校正中,需要与成为测定对象的标记复合物的测定独立地进行第一校正用粒子的测定。接着,说明通过将校正用粒子作为内标添加到成为测定对象的标记复合物中来通过一次的测定进行校正的方法。

[0169] 作为该校正中的最初的步骤,首先,准备具有与各粒子组的多个粒子子组各自的粒子尺寸彼此不同的粒子尺寸的第二校正用粒子。

[0170] 标记部21不与第二校正用粒子结合。在一个实施例中,第二校正用粒子包含尺寸与各粒子组的多个粒子子组各自的粒子主体11的尺寸彼此不同的粒子主体11。

[0171] 作为接下来的步骤,针对第二校正用粒子检测未结合标记部21的状态的标记特性。在一个实施例中,第二校正用粒子在被混合到包含标记复合物的混合试样中之后,从注入部72被导入,该标记复合物包含成为测定对象的粒子1。之后,第二校正用粒子和成为测定对象的标记复合物在被分离部8进行分级之后,在检测部9中分别被检测标记特性。由此,能够一次性地得到第二校正用粒子的检测值和成为测定对象的标记复合物的校正前检测值。

[0172] 作为最后的步骤,针对第一粒子组的粒子1和第二粒子组的粒子1中的各个粒子,通过基于第二校正用粒子的标记特性的检测值来对结合的标记部21的标记特性的校正前检测值进行校正,由此得到校正后检测值。

[0173] 图10是说明使用第二校正用粒子进行校正的具体例的图。在图10的例子中,标记特性为荧光强度。图10的曲线图的横轴表示从注入部72注入后的经过时间。由此,该横轴与粒子尺寸相关。纵轴是规定波长下的荧光强度。更特定地说,图10的上部的曲线图的纵轴是表征粒子1a、1b的标记部21a的荧光光谱的荧光波长 λ_a 下的荧光强度。图10的下部的曲线图的纵轴是表征粒子1c、1d的标记部21c的荧光光谱的荧光波长 λ_c 下的荧光强度。

[0174] 在图10中,示出在除将分别包含作为测定对象的粒子1a~1d的标记复合物注入到测定装置5之外还将第二校正用粒子1r同时注入到测定装置5之后测定出的结果。

[0175] 具体地说,在图10的上部的“针对波长 λ_a 的荧光强度的曲线图”中,与第二校正用粒子1r对应地检测到峰面积 Sr_1 的峰。另外,对包含标记部21a和粒子1a的标记复合物以及包含标记部21a和粒子1b的标记复合物检测标记特性的检测结果显示为峰面积 Sa 的峰和峰面积 Sb 的峰。

[0176] 在图10的下部的“针对波长 λ_c 的荧光强度的曲线图”曲线图中,与第二校正用粒子1r对应地检测到峰面积 Sr_2 的峰。另外,对包含标记部21c和粒子1c的标记复合物以及包含标记部21c和粒子1d的标记复合物检测标记特性的检测结果显示为峰面积 Sc 的峰和峰面积 Sd 的峰。峰面积 $Sa \sim Sd$ 对应于“校正前检测值”的一例。

[0177] 使用基于第二校正用粒子1r的峰面积 Sr_1 、 Sr_2 计算出的校正系数 $Ka \sim Kd$ 来对这样的校正前检测值进行校正。校正系数 Ka 、 Kb 是表示粒子主体11a、11b的峰面积相对于第二校正用粒子的峰面积 Sr_1 发生何种程度的变化的数。校正系数 Kc 、 Kd 是表示粒子主体11a、11b

的峰面积相对于第二校正用粒子的峰面积 $Sr2$ 发生何种程度的变化的数。该校正系数 $Ka \sim Kd$ 是使用米氏 (Mie) 散射模型或瑞利散射模型计算出的。关于该校正系数 $Ka \sim Kd$,也可以使用针对未标记的粒子1预先进行测定并且基于该测定中的检测值决定出的值。由此,能够使用第二校正用粒子1r的峰面积来计算对由粒子尺寸与第二校正用粒子1r的粒子尺寸不同的测定用的粒子引起的峰面积的影响。

[0178] 如果使用如上所述那样计算出的校正系数,则针对包含粒子1a的标记复合物的校正后的峰面积 Sax 成为 $Sax = Sa - Ka \times Sr1$ 。针对包含粒子1b的标记复合物的校正后的峰面积 Sbx 成为 $Sbx = Sb - Kb \times Sr1$ 。针对包含粒子1c的标记复合物的校正后的峰面积 Scx 成为 $Scx = Sc - Kc \times Sr2$ 。针对包含粒子1d的标记复合物的校正后的峰面积 Sdx 成为 $Sdx = Sd - Kd \times Sr2$ 。

[0179] 在图10的例子中,基于成为内标的第二校正用粒子的峰面积来计算规定尺寸的粒子主体11表面处的散射光的影响(背景)。然后,通过排除该背景,由此校正后检测值主要是由标记部的标记特性引起的。由此,能够不花费另外测定背景的成本和时间地提高生物标志物3的定量精度。根据上述内容,如果使用第二校正用粒子,则能够简便地提高生物标志物3的定量精度。

[0180] 此外,上述的校正在图9和图10的峰为多个粒子的标记特性的总和的检测结果的情况和该峰为单个粒子的标记特性的检测结果的情况下都能够进行。

[0181] [5.变形例2]

[0182] 如上所述,在本实施方式所涉及的测定方法中,能够根据粒子尺寸和标记2的标记特性来区分标记复合物并判别生物标志物3。另一方面,也能够通过构成为粒子本身具有特性(粒子特性),由此根据粒子尺寸和粒子特性来区分标记复合物并判别生物标志物3。

[0183] (5-1.变形例2所涉及的粒子和标记的构造)

[0184] 图11是说明变形例2所涉及的粒子和标记的构造的图。变形例2所涉及的粒子和标记具有与实施方式和变形例1所涉及的粒子1和标记2不同的特征,因此在变形例2中称为粒子1z和标记2z。在图11中,仅说明与对实施方式所涉及的粒子和标记的构造进行说明的图2不同的部分。

[0185] 粒子1z包含粒子主体11z以及与生物标志物3特异性结合的第一结合部12z。

[0186] 粒子主体11z具有粒子特性。

[0187] 粒子特性只要是能够通过该粒子特性来区分与生物标志物3的种类对应的粒子1z的种类的特性即可,没有特别限定。在一个实施例中,粒子特性为荧光光谱的图案。荧光光谱的图案是指针对荧光波长的荧光强度的图案,更特定地说,为针对荧光波长的荧光强度的曲线的形状。作为粒子特性的荧光光谱的图案共通表示针对波长的荧光强度的图案共通,不需要针对特定波长的荧光强度的强弱一定相同。此外,在粒子特性为荧光光谱的图案的情况下,形成粒子主体11z的外表面的物质优选为能够着色的物质(例如二氧化硅)。但是,粒子特性可以是放射性光谱的图案和吸光度光谱的图案中的至少一者。在变形例2所涉及的测定方法中,基于这些粒子特性的差异来判别生物标志物3的种类。

[0188] 第一结合部12z与粒子主体11z结合。第一结合部12z是粒子1z中的用于与规定种类的生物标志物3特异性结合的结合部位。

[0189] 标记2z包含标记部21z以及与生物标志物3特异性结合的第二结合部22z。

[0190] 标记部21z是包含用于对生物标志物3所结合的粒子1z进行标记的标记物质的部。

该标记物质表现出规定的标记特性。如后述的那样,标记2z的标记部21z仅表现出粒子1z与生物标志物3进行了结合即可,不需要表现该生物标志物3的种类。由此,标记部21z也可以无论包含该标记部21z的标记2z所结合的生物标志物3的种类如何都是同等的。

[0191] 第二结合部22z与标记部21z结合。第二结合部22z是标记2z中的用于与规定种类的生物标志物3特异性结合的结合部位。

[0192] (5-2. 变形例2所涉及的粒子组和标记组)

[0193] 图12是说明变形例2所涉及的粒子组和标记组的图。图12示出与4个种类的生物标志物3a~3d分别特异性结合的粒子1az~1dz和标记2az~2dz的集合。在图12中,仅说明与对实施方式所涉及的粒子组和标记组进行说明的图3不同的部分。

[0194] 在变形例2中,“粒子组”是指具有特定的粒子特性的粒子1z的集团。在图12中,示出了第三粒子组和第四粒子组。另外,“标记组”是指与规定的粒子组对应的标记2z的集团。在图12中,示出了与第三粒子组对应的第三标记组以及与第四粒子组对应的第四标记组。第三粒子组的粒子1z和第三标记组的标记2z经由生物标志物3来结合。第四粒子组的粒子1z和第四标记组的标记2z经由生物标志物3来结合。

[0195] 第三粒子组的粒子1z和第四粒子组的粒子1z具有彼此不同的粒子特性。参照图12,第三粒子组的粒子1az、1bz包含具有共通的粒子特性的粒子主体11az、11bz。第四粒子组的粒子1cz、1dz包含具有共通的粒子特性的粒子主体11cz、11dz。

[0196] 第三粒子组和第四粒子组中的各个粒子组(下面也称为“各粒子组”)包含多个粒子子组。

[0197] 各粒子子组包含粒子尺寸和粒子特性共通的粒子1z。参照图12,例如粒子子组az由具有相同的粒子尺寸和粒子特性的粒子1az构成。此外,将与粒子子组az对应的标记2az的集团称为“标记子组”az。另外,将粒子子组az和标记子组az统称为“粒子-标记子组”az。粒子-标记子组的数量与能够判别的生物标志物3的种类的数量对应。

[0198] 各粒子子组的粒子1z所结合的生物标志物3的种类彼此不同,因此第一结合部12z也彼此不同。各标记子组所结合的生物标志物3的种类彼此不同,因此第二结合部22z也彼此不同。换句话说,各粒子子组的粒子1z具有与种类彼此不同的生物标志物3结合的第一结合部12z。另外,各标记子组的标记2z具有与种类彼此不同的生物标志物3结合的第二结合部22z。参照图3,粒子1az~1dz各自包含第一结合部12az~12dz。参照图3,标记2az~2dz各自包含第二结合部22az~22dz。此外,变形例2所涉及的第一结合部12z和第二结合部22z与实施方式所涉及的第一结合部12和第二结合部22在分别与相同种类的生物标志物结合的情况下,也可以分别是同等的物质。具体地说,第一结合部12az~12dz与实施方式所涉及的粒子1的第一结合部12a~12d也可以分别是同等的物质(例如具有相同的分子结构的物质)。第二结合部22az~22dz与实施方式所涉及的标记2的第二结合部22a~22d也可以分别是同等的物质(例如具有相同的分子结构的物质)。

[0199] 在各粒子组中,多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同。参照图3,在第三粒子组中,粒子子组az的粒子1az的粒子主体11az的直径大于粒子子组bz的粒子1bz的粒子主体11bz的直径。在第四粒子组中,粒子子组cz的粒子1cz的粒子主体11cz的直径大于粒子子组dz的粒子1dz的粒子主体11dz的直径。由此,各粒子组中的粒子子组能够根据粒子尺寸来区分。此外,在一个实施例中,粒子主体11az的直径与粒子主体11cz的直径同等。另外,粒子主体

11bz的直径与粒子主体11dz的直径同等。

[0200] 接着,进一步说明第四粒子组和第四标记组。在第四粒子组的粒子-标记子组cz中,粒子尺寸与粒子-标记子组az的粒子尺寸共通,但粒子特性彼此不同。由此,粒子-标记子组cz和粒子-标记子组az能够根据粒子特性来区分。另外,在第四粒子组的粒子-标记子组dz中,粒子尺寸与粒子-标记子组bz的粒子尺寸共通,但粒子特性彼此不同。由此,粒子-标记子组dz和粒子-标记子组bz能够根据粒子特性来区分。

[0201] 根据上述内容,针对规定的粒子子组中包含的粒子1z,能够基于粒子尺寸和粒子特性来与其它粒子子组中包含的粒子1z辨别开。更特定地说,在该规定的粒子子组和该其它粒子子组属于同一粒子组的情况下,能够用粒子尺寸来分离。另外,在该规定的粒子子组和该其它粒子子组属于不同的粒子组的情况下,能够用粒子特性来判别。

[0202] 如上所述,在变形例2中,能够基于粒子尺寸和粒子特性来判别规定的粒子子组中包含的粒子1z。由此,能够基于粒子尺寸和粒子特性来判别对应的生物标志物3的种类。由此,不需要根据标记2z的标记特性来判别对应的生物标志物3的种类。具体地说,无论生物标志物3的种类如何,标记2z仅表现出生物标志物3与粒子1z进行了结合即可。

[0203] 由此,在变形例2中,各标记子组的标记2z的标记特性也可以相同。更具体地说,第三标记组的标记特性的检测值与第四标记组的标记特性的检测值也可以是同等的。在图9的例子中,标记部21az和标记部21cz也可以是表示同一检测值的物体,更特定地说,也可以是同一物体。像这样,当所有的标记部同等地构成标记特性时,能够降低准备标记部时的复杂性。

[0204] 但是,针对第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子中的各个粒子,粒子特性的检测值与标记特性的检测值需要能够辨别开。粒子特性和标记特性也可以构成为是相同种类的特性,能够彼此辨别开。例如,粒子特性和标记特性也可以是能够彼此辨别开的荧光光谱。另一方面,粒子特性和标记特性也可以是种类彼此不同的特性(例如,荧光光谱和吸光度光谱),并且通过不同的检测方法或检测器来检测。由此,能够基于检测部9的检测值,来一次性地判定生物标志物3的结合的有无以及生物标志物3的种类。在一个实施例中,第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子各自的荧光光谱构成为不与标记部21az、21cz的标记特性的荧光光谱重叠。

[0205] (5-3. 变形例2所涉及的测定处理)

[0206] 图13是示出变形例2所涉及的测定处理的流程图。图13所示的步骤是使用测定系统100进行的。

[0207] 在S11中,用户准备属于第三粒子组的粒子1z和属于第四粒子组的粒子1z。另外,用户准备属于与第三粒子组对应的第三标记组的标记2z以及属于与第四粒子组对应的第四标记组的标记2z。如上所述,属于第三粒子组的粒子和属于第四粒子组的粒子具有彼此不同的粒子特性。

[0208] 在S12中,用户通过使用预处理部71将试样、第三粒子组的粒子1z以及第四粒子组的粒子1z混合,来使生物标志物3与第三粒子组的粒子1z及第四粒子组的粒子1z特异性结合。

[0209] 在S13中,用户通过使用预处理部71将在S12中制作出的混合溶液、第三标记组的标记2z以及第四标记组的标记2z混合,来使第三标记组的标记2z及第四标记组的标记2z与

生物标志物3特异性结合。

[0210] 在S14中,处理器40基于粒子尺寸来将第三粒子组的粒子1z和第四粒子组的粒子1z中的各个粒子分离。

[0211] 在S15中,处理器40针对基于粒子尺寸分离出的第三粒子组的粒子1z和第四粒子组的粒子1z中的各个粒子,检测粒子特性和经由生物标志物3结合的标记2z的标记特性。例如,在检测部9是多波长荧光检测器或多个荧光检测器的情况下,处理器40照射激发光并检测所产生的荧光光谱的图案。

[0212] 在S16中,处理器40基于粒子尺寸、粒子特性以及标记特性,来判定与第三粒子组的粒子1z及第四粒子组的粒子1z中的各个粒子进行了结合的生物标志物3的种类。

[0213] 在一个实施例中,处理器40基于荧光光谱的图案来判定与各个粒子1z进行了结合的生物标志物3的种类。更具体地说,在作为检测值的荧光光谱的图案中,处理器40首先基于与标记2z对应的峰来判定生物标志物3是否与粒子1z进行了结合。接着,处理器40基于与第三粒子组的粒子1z及第四粒子组的粒子1z各自的粒子特性对应的峰,来判定粒子1z的种类,从而判定对应的生物标志物3的种类。

[0214] S17~S18与图7的S7~S8对应,因此不重复说明。

[0215] 根据变形例2所涉及的测定方法,能够使用粒子尺寸和粒子特性的组合不同的粒子1z来区分并检测多个种类的生物标志物3。由此,能够与实施方式所涉及的测定方法同样地一次性地测定多个种类的生物标志物3。

[0216] [方式]

[0217] 本领域技术人员能够理解的是,上述多个例示的实施方式是以下方式的具体例。

[0218] (第一项) 一个方式所涉及的测定方法是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法,测定方法包括以下步骤:准备属于第一粒子组的粒子和属于第二粒子组的粒子;以及准备属于与第一粒子组对应的第一标记组的标记和属于与第二粒子组对应的第二标记组的标记。

[0219] 第一标记组的标记和第二标记组的标记具有彼此不同的标记特性。第一粒子组的粒子与第一标记组的标记经由生物分子进行结合。第二粒子组的粒子与第二标记组的标记经由生物分子进行结合。各粒子组包含多个粒子子组。在各粒子组中,多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同。第一粒子组的多个粒子子组的粒子和第二粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第一结合部。

[0220] 测定方法还包括以下步骤:使试样、第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子、以及第一标记组的标记及第二标记组的标记混合;使生物分子与第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子以及第一标记组的标记及第二标记组的标记特异性结合;基于粒子尺寸来将第一粒子组的粒子和第二粒子组的粒子中的各个粒子分离;检测经由生物分子来与基于粒子尺寸分离出的第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子中的各个粒子进行了结合的标记的标记特性;以及基于粒子尺寸和标记特性,来判定与第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

[0221] 根据第一项所记载的测定方法,能够提供一种基于粒子尺寸的差异和标记特性的差异来一次性地测定多个种类的生物分子的技术。

[0222] (第二项) 在第一项所述的测定方法中,还包括以下步骤:基于判定生物分子的种

类所得到的结果,来测量每个种类的生物分子的量。

[0223] 根据第二项所记载的测定方法,能够提供一种针对多个种类的生物分子一次性地测定每个种类的生物分子的量的技术。

[0224] (第三项)在第二项所述的测定方法中,还包括以下步骤:基于每个种类的生物分子的量,来诊断疾病、或者判定治疗效果。

[0225] 根据第三项所记载的测定方法,能够基于通过一次性地测定所得到的每个种类的生物分子的量来诊断疾病或判定治疗效果。即,能够简便地进行基于多个种类的生物分子的诊断。

[0226] (第四项)在第一项~第三项中的任一项所述的测定方法中,各粒子组的粒子还包含粒子主体,各标记组的标记包含标记部以及与生物分子特异性结合的第二结合部。

[0227] 根据第四项所记载的测定方法,能够经由第一结合部和第二结合部来制作包含粒子的标记复合物。另外,能够基于主要起因于粒子主体的粒子尺寸和标记部的标记特性来区分该标记复合物的种类。由此,能够判别标记复合物的对应的生物分子的种类。

[0228] (第五项)在第四项所述的测定方法中,标记部包含荧光物质、放射性同位素以及表示规定的吸光度的物质中的至少一者。

[0229] 根据第五项所记载的测定方法,能够基于标记物质的标记特性的差异来判别生物分子的种类。

[0230] (第六项)在第四项或第五项所述的测定方法中,生物分子包含蛋白质,第一结合部包含与蛋白质结合的抗体,第二结合部包含同蛋白质中的与第一结合部的结合部位不同的部位结合的抗体。

[0231] 根据第六项所记载的测定方法,利用抗体的特异性,第一结合部和第二结合部分别能够与作为生物分子的规定种类的蛋白质结合。另外,在粒子与该蛋白质结合了的状态下,标记也能够与该蛋白质结合。

[0232] (第七项)在第一项~第六项中的任一项所述的测定方法中,生物分子包含核酸和代谢物中的至少一者。

[0233] 根据第七项所记载的测定方法,不限于蛋白质,属于核酸和/或代谢物的生物分子也能够设为本实施方式所涉及的测定方法的对象。

[0234] (第八项)在第一项~第七项中的任一项所述的测定方法中,各粒子组的粒子包含无机材料和树脂材料中的至少一者。

[0235] 根据第八项所记载的测定方法,能够增多能够同时检测的生物分子的种类的数量、生物分子的定量精度变高、和/或、能够比较简单地高精度地进行测定。

[0236] (第九项)在第八项所述的测定方法中,无机材料包含金和二氧化硅中的至少一者。

[0237] 根据第九项所记载的测定方法,能够增多能够同时检测的生物分子的种类的数量、和/或、生物分子的定量精度变高。

[0238] (第十项)在第八项所述的测定方法中,树脂材料包括聚苯乙烯。

[0239] 根据第十项所记载的测定方法,市场上销售有具有可追溯性和高可靠性的树脂材料制的纳米粒子,能够比较简单地高精度地进行测定。

[0240] (第十一项)在第一项~第十项所述的测定方法中,分离的步骤包括以下步骤:使

用离心FFF(Field Flow Fraction:场流分级)法、AF4(Asymmetrical Flow Field Flow Fraction:非对称流场流分级)法以及尺寸排阻色谱法中的至少一者,基于粒子尺寸来分离粒子。

[0241] 在第十一项所记载的测定方法中,如果使用离心FFF法,则能够判别的生物分子的种类的数量多,生物分子的定量精度高。如果使用AF4法,则还能够对小且轻的分子进行分级。如果使用尺寸排阻色谱法,则能够实现廉价的装置结构。

[0242] (第十二项)在第一项~第十一项中的任一项所述的测定方法中,在检测标记特性的步骤中,使用多波长荧光检测器或多个荧光检测器。

[0243] 在第十二项所记载的测定方法中,如果使用多个荧光检测器,则能够高灵敏度地检测荧光,因此标记特性的测定精度提高,生物分子的定量精度提高。如果使用多波长荧光检测器,则能够减少检测器的数量,因此能够降低检测部所需的成本。

[0244] (第十三项)第十二项所述的测定方法的检测的步骤包括以下步骤:向混合于载体中的各粒子组的粒子照射激发光。准备粒子的步骤包括以下步骤:准备各粒子组的粒子和载体。准备各粒子组的粒子和载体的步骤包括以下步骤:准备各粒子组的粒子的折射率与载体的折射率之差为规定的数值以下的各粒子组的粒子和载体。

[0245] 根据第十三项所记载的测定方法,能够将源自粒子的散射光的量抑制在规定的量以下。由此,能够将荧光的检测下限设定得低,能够提高检测灵敏度。

[0246] (第十四项)在第一项~第十三项中的任一项所述的测定方法中,检测标记特性的步骤还包括以下步骤:对与第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子中的各个粒子结合的标记的标记特性的检测值进行校正。

[0247] 根据第十四项所记载的测定方法,测定方法中的生物分子的定量精度提高。

[0248] (第十五项)在第十四项所述的测定方法中,校正的步骤包括以下步骤:准备与各粒子组的多个粒子子组中的各个粒子子组的粒子尺寸对应的尺寸的第一校正用粒子;对于各粒子尺寸,检测没有结合标记部的状态下的第一校正用粒子的标记特性;以及对于各粒子尺寸,基于第一校正用粒子的标记特性的检测值,来对与第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子结合的标记部的标记特性的检测值进行校正。

[0249] 根据第十五项所记载的测定方法,能够在将能够判别的生物分子的种类的数量保持为最大限度的同时校正背景。

[0250] (第十六项)在第十五项所述的测定方法中,检测第一校正用粒子的标记特性的步骤包括以下步骤:对于各粒子尺寸,针对包含第一结合部的第一校正用粒子在结合了生物分子及第二结合部的状态下检测标记特性。

[0251] 根据第十六项所记载的测定方法,能够进行考虑到生物分子和第二结合部的影响的、更准确的校正。

[0252] (第十七项)在第十四项所述的测定方法中,检测的步骤包括以下步骤:针对具有与各粒子组的多个粒子子组中的各个粒子子组的粒子尺寸彼此不同的粒子尺寸的第二校正用粒子,检测没有结合标记部的状态下的标记特性,校正的步骤包括以下步骤:基于第二校正用粒子的标记特性的检测值,来对与第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子结合的标记的标记特性的检测值进行校正。

[0253] 根据第十七项所记载的测定方法,能够不花费另外测定背景的成本和时间地提高

生物分子的定量精度。

[0254] (第十八项) 在第十七项所述的测定方法中, 基于第二校正用粒子的标记特性的检测值进行校正的步骤包括以下步骤: 使用基于第二校正用粒子的标记特性的峰面积计算出的校正系数, 来对与第一粒子组的粒子及第二粒子组的粒子结合的标记特性的检测结果进行校正。

[0255] 根据第十八项所记载的测定方法, 能够使用第二校正用粒子的峰面积来计算对由粒子尺寸与第二校正用粒子的粒子尺寸不同的测定用的粒子引起的峰面积的影响。

[0256] (第十九项) 另一方式所涉及的测定方法是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法, 测定方法包括以下步骤: 准备属于第三粒子组的粒子和属于第四粒子组的粒子; 以及准备属于与第三粒子组对应的第三标记组的标记和属于与第四粒子组对应的第四标记组的标记。

[0257] 属于第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子具有彼此不同的粒子特性。第三粒子组的粒子与第三标记组的标记经由生物分子进行结合。第四粒子组的粒子与第四标记组的标记经由生物分子进行结合。各粒子组包含多个粒子子组。在各粒子组中, 多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同。第三粒子组的多个粒子子组的粒子和第四粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第三结合部。

[0258] 测定方法还包括以下步骤: 使试样、第三粒子组的粒子及第四粒子组的粒子、以及第三标记组的标记及第四标记组的标记混合; 使生物分子与第三粒子组的粒子及第四粒子组的粒子以及第三标记组的标记及第四标记组的标记特异性结合; 基于粒子尺寸来将第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子中的各个粒子分离; 针对基于粒子尺寸分离出的第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子中的各个粒子, 检测粒子特性和经由生物分子进行了结合的标记的标记特性; 以及基于粒子尺寸、粒子特性以及标记特性, 来判定与第三粒子组的粒子及第四粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

[0259] 根据第十九项所记载的测定方法, 能够提供一种基于粒子尺寸的差异和粒子特性的差异来一次性地测定多个种类的生物分子的技术。

[0260] (第二十项) 在第十九项所述的测定方法中, 粒子特性包含荧光光谱的图案、放射性光谱的图案以及吸光度光谱的图案中的至少一者。

[0261] 根据第二十项所记载的测定方法, 能够基于这些粒子特性的差异来判别生物分子的种类。

[0262] (第二十一项) 在第十九项或第二十项所述的测定方法中, 在检测的步骤中, 针对第三粒子组的粒子和第四粒子组的粒子中的各个粒子, 能够判别粒子特性的检测值和标记特性的检测值。

[0263] 根据第二十一项所记载的测定方法, 能够基于检测部的检测值来一次性地判定生物分子的结合的有无以及生物分子的种类。

[0264] (第二十二项) 在第十九项~第二十一项中的任一项所述的测定方法中, 第三标记组的标记特性的检测值与第四标记组的标记特性的检测值同等。

[0265] 根据第二十二项所记载的测定方法, 能够降低准备标记部时的复杂性。

[0266] (第二十三项) 又一方式所涉及的测定方法是源自生物试样的试样中包含的生物分子的测定方法, 测定方法包括以下步骤: 准备属于第一粒子组的粒子; 以及准备属于与第

一粒子组对应的第一标记组的标记。

[0267] 第一粒子组的粒子和第一标记组的标记经由生物分子进行结合。第一粒子组包含多个粒子子组。在第一粒子组中,多个粒子子组的粒子尺寸彼此不同。第一粒子组的多个粒子子组的粒子具有与种类彼此不同的生物分子特异性结合的第一结合部。

[0268] 测定方法还包括以下步骤:通过将试样与第一粒子组的粒子及第一标记组的标记混合,来使第一粒子组的粒子及第一标记组的标记与生物分子特异性结合;基于粒子尺寸来将第一粒子组的各个粒子分离;检测经由生物分子来与基于粒子尺寸分离出的第一粒子组的各个粒子进行了结合的标记的标记特性;以及基于粒子尺寸和标记特性,来判定与第一粒子组的粒子进行了结合的生物分子的种类。

[0269] 根据第二十三项所记载的测定方法,能够使不同的粒子尺寸的粒子与试样中包含的多个种类的生物分子中的各个种类的生物分子结合,能够提供一种基于粒子尺寸的差异来一次性地测定多个种类的生物分子的技术。

[0270] 应当认为本次公开的实施方式在所有方面都是例示而非限制性的。本发明的范围由权利要求书表示而不是由上述的说明表示,并且意图包含与权利要求书等同的含义和范围内的所有变更。

[0271] 附图标记说明

[0272] 1、1a~1d、1z、1az~1dz:粒子;1ar、1br:第一校正用粒子;1r:第二校正用粒子;2、2a~2d、2z、2az~2dz:标记;3、3a~3d:生物标志物;4:控制装置;5:测定装置;6:液部;8:分离部;9:检测部;11、11a、11b、11az~11dz:粒子主体;12、12a~12d、12z、12az~1dz:第一结合部;21、21a、21c、21az、21cz:标记部;22、22a~22d:第二结合部;40:处理器;41:存储器;42:输入部;43:显示部;51、52:分析流路;61:容器;62:泵;71:预处理部;72:注入部;100:测定系统。

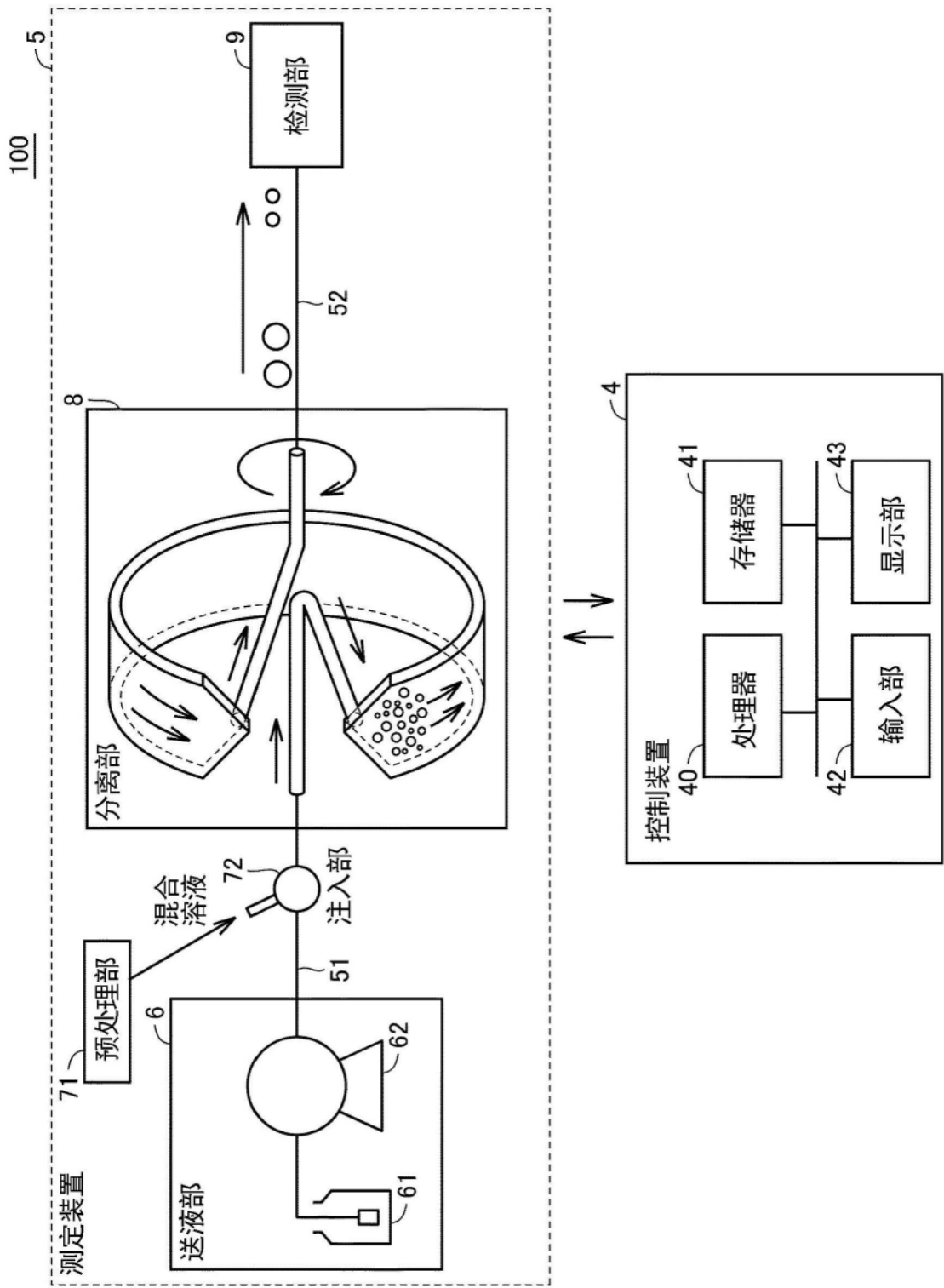


图1

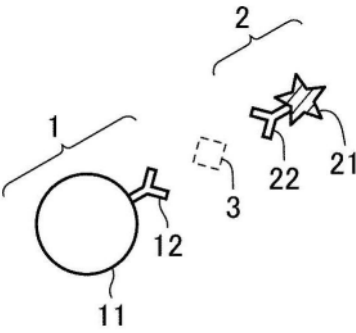


图2

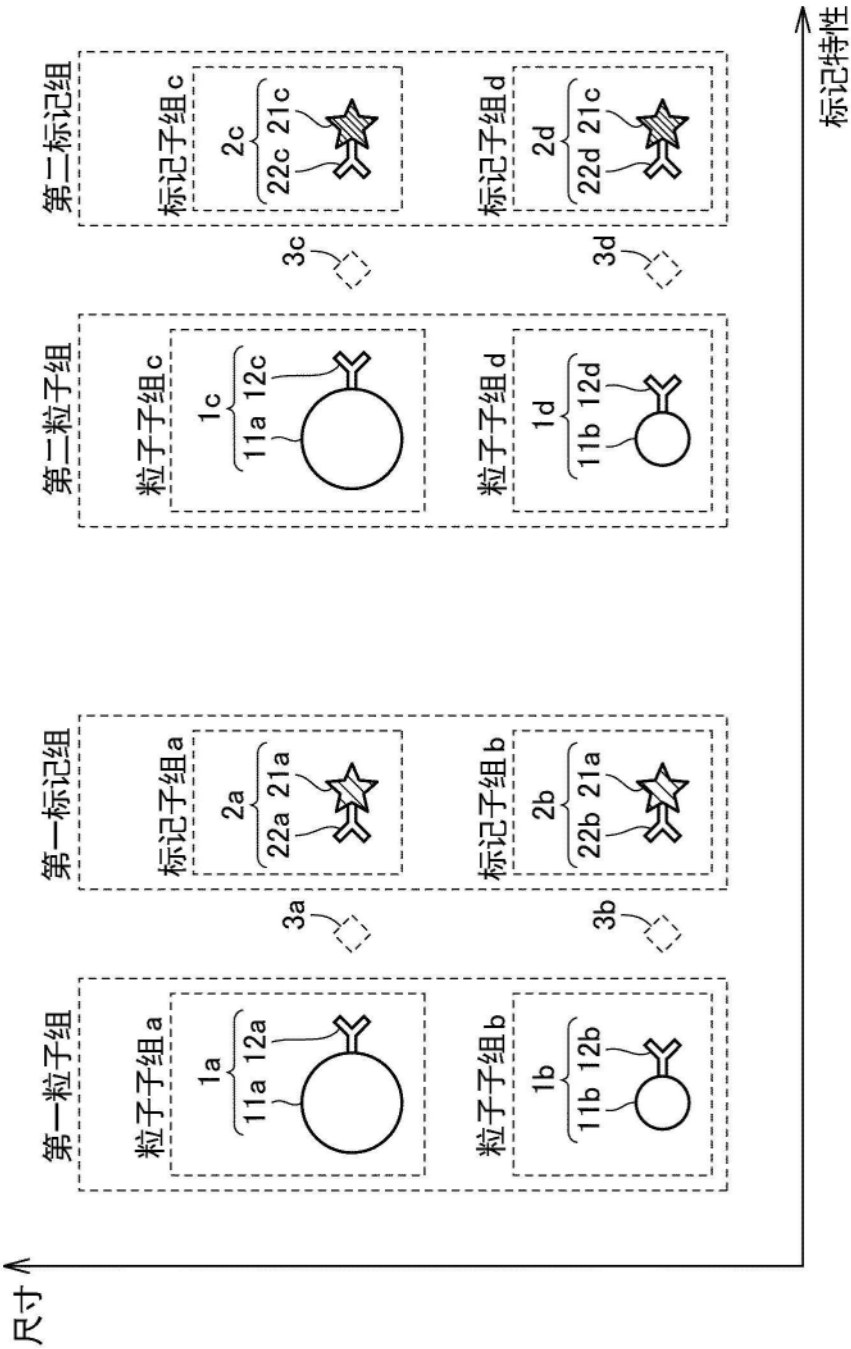


图3

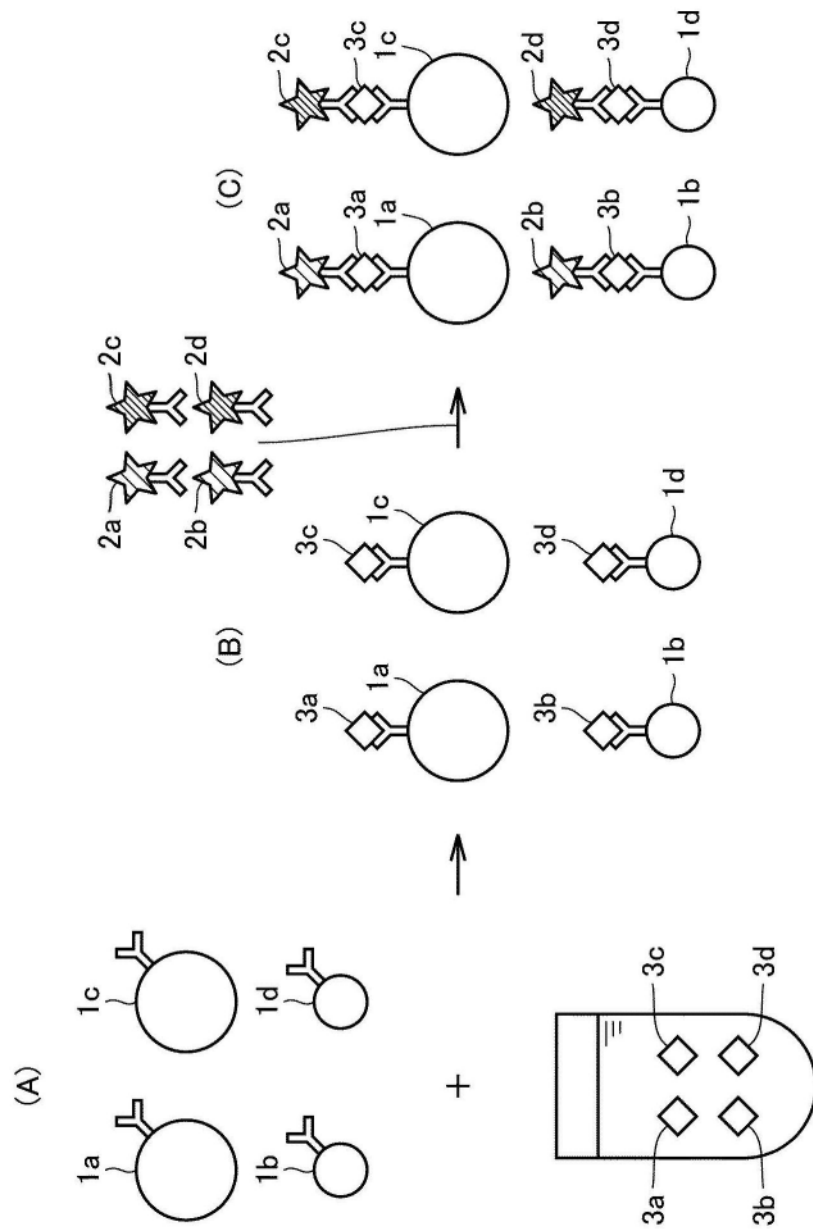


图4

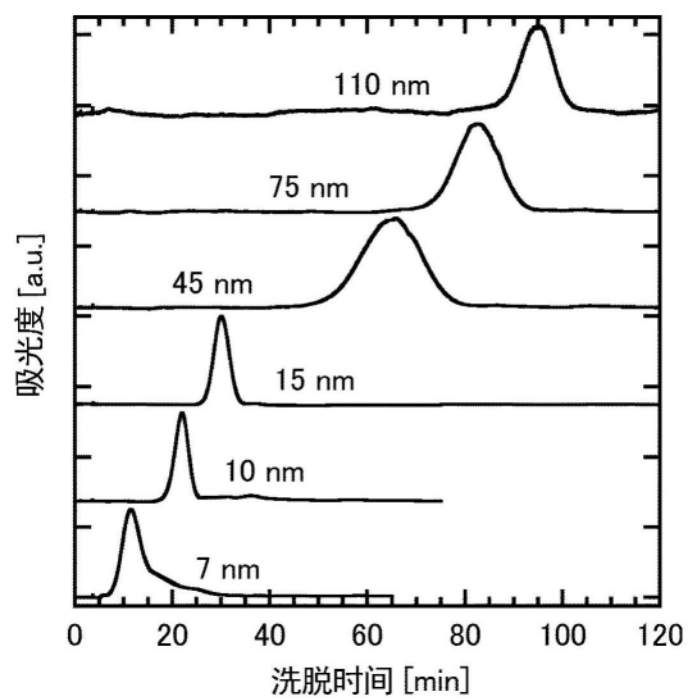


图5

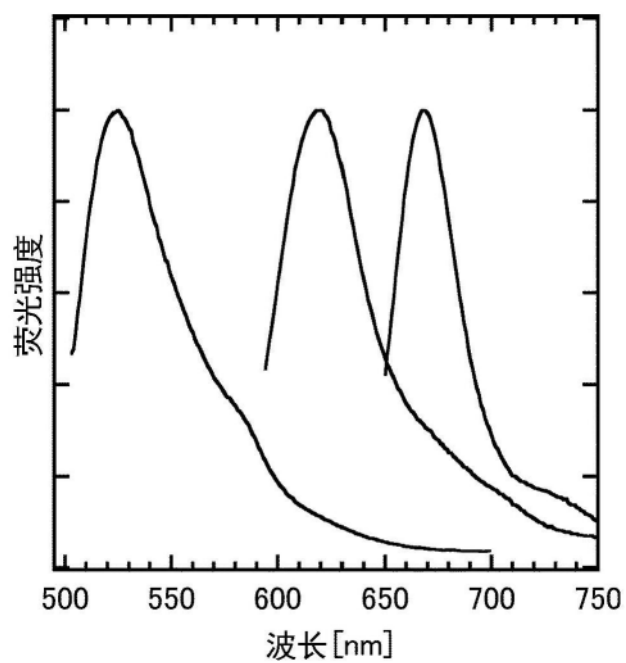


图6

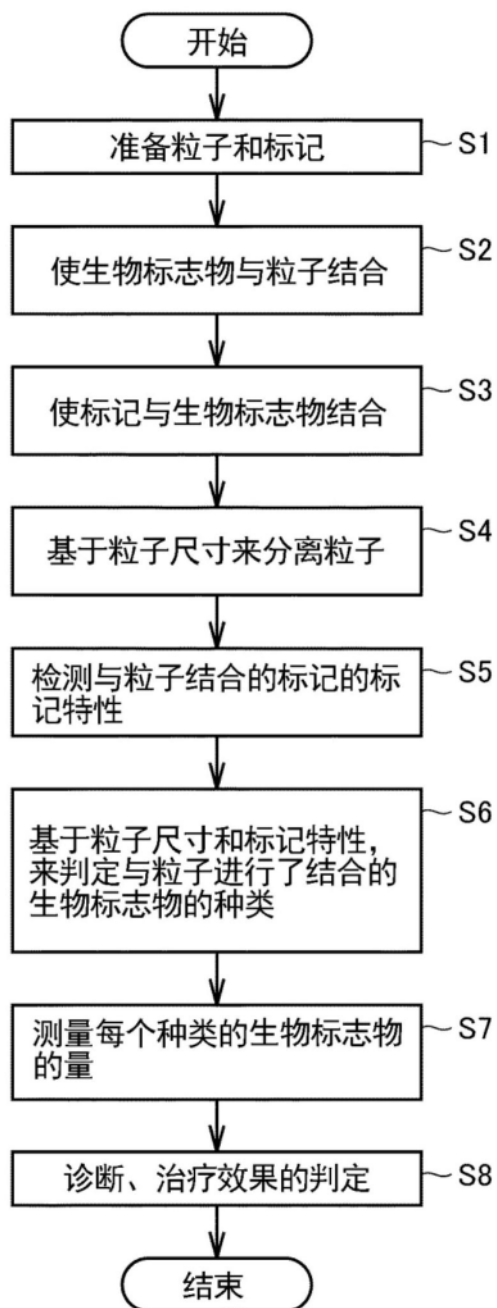


图7

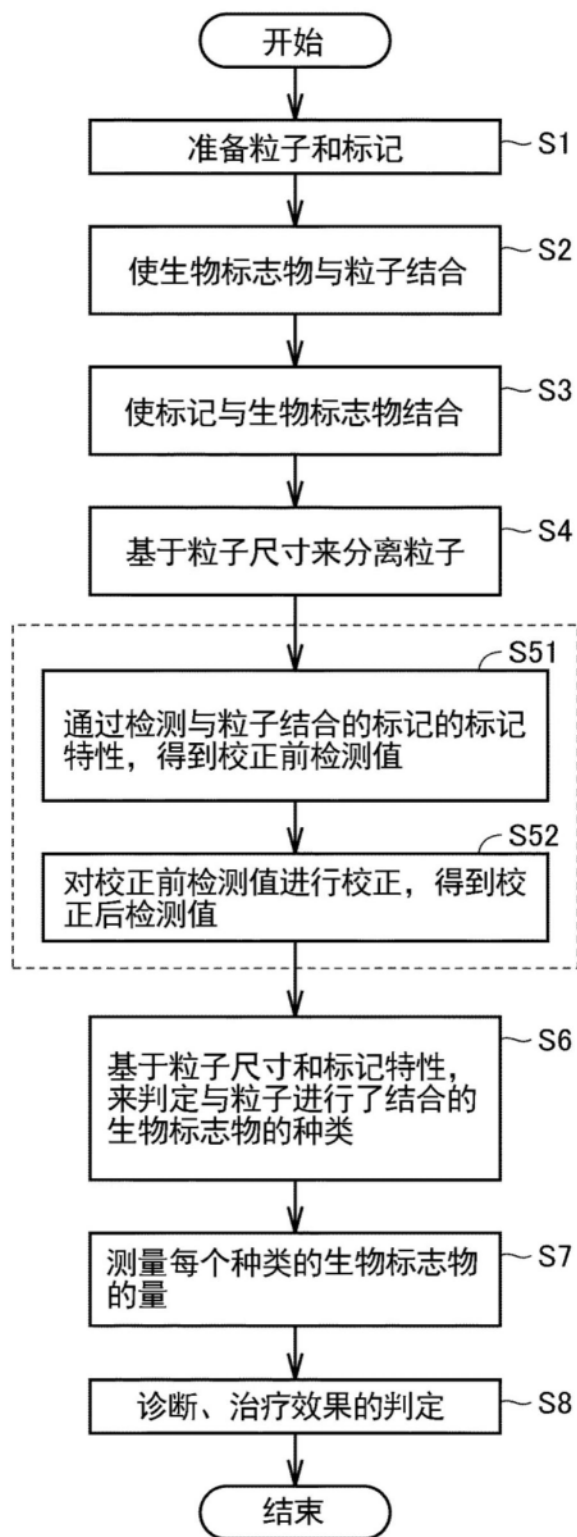


图8

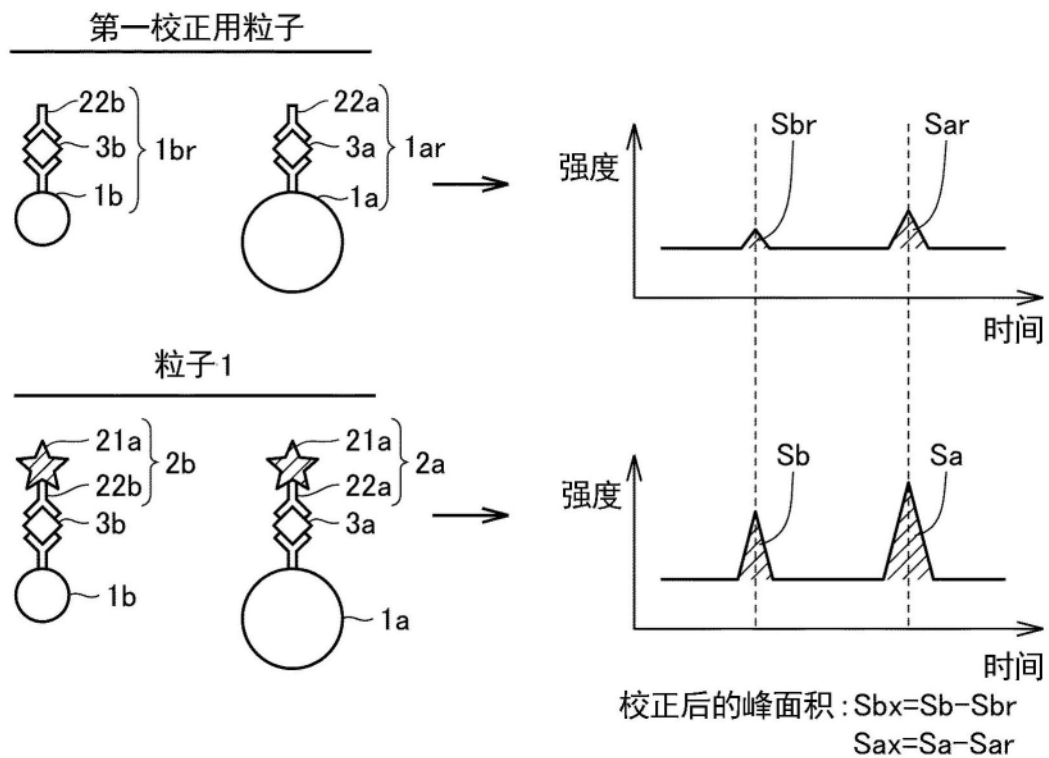


图9

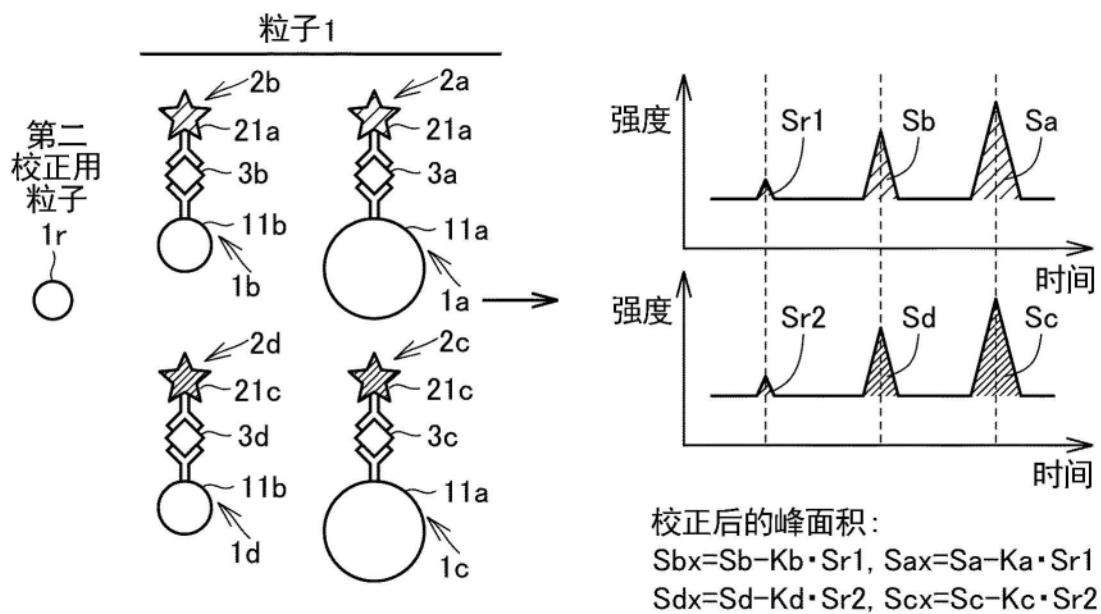


图10

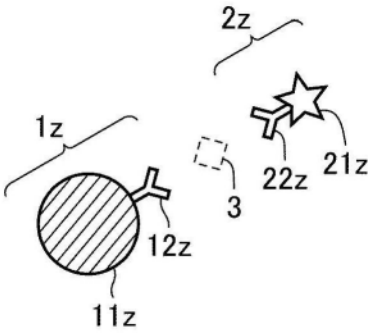


图11

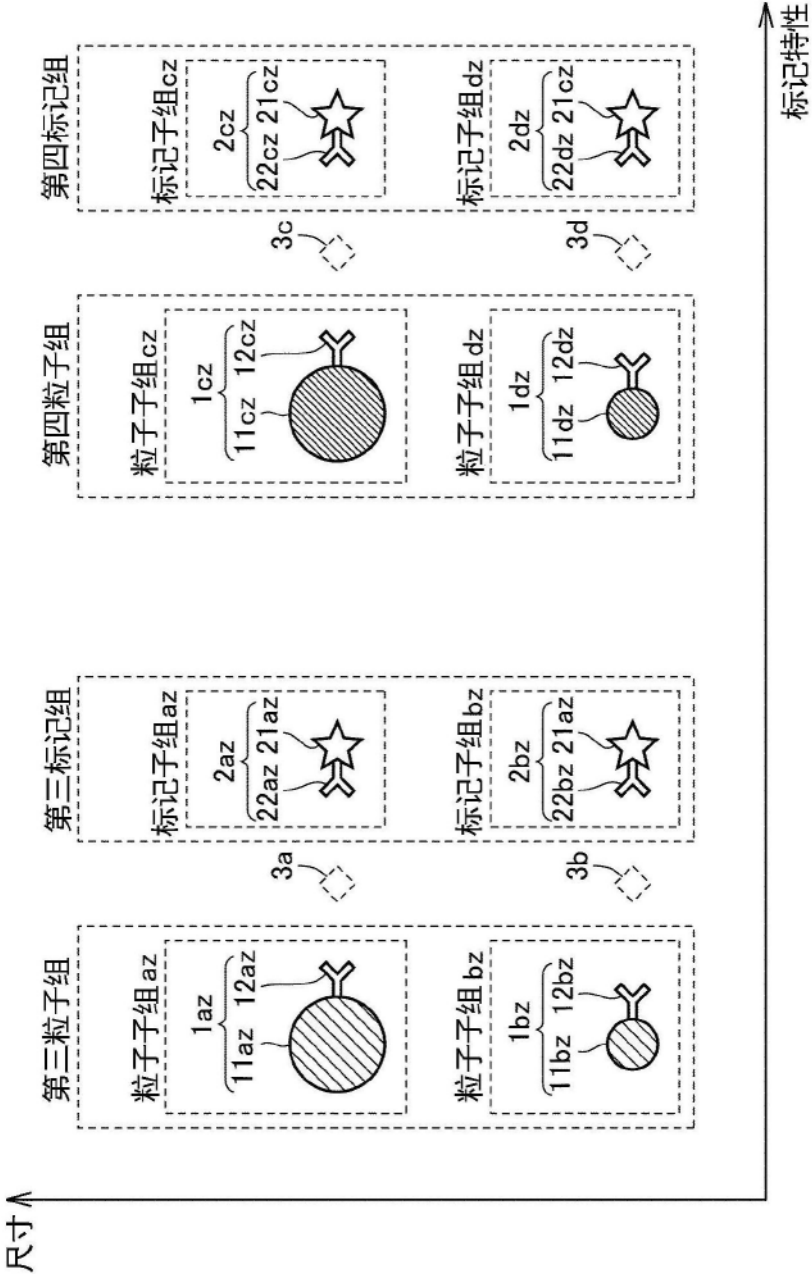


图12

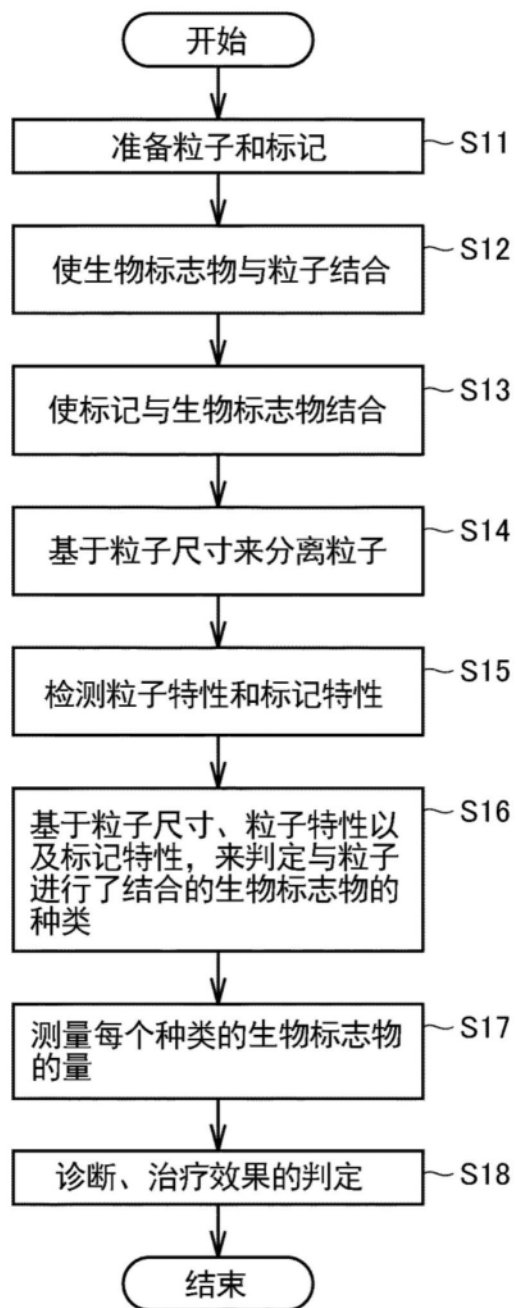


图13