

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 30/90 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02142788.7

[45] 授权公告日 2006 年 7 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1262841C

[22] 申请日 2002.9.16 [21] 申请号 02142788.7

[30] 优先权

[32] 2001.9.14 [33] JP [31] 280359/2001

[71] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 河村达朗 龟井明仁 北胁文久

榎丈纪子

审查员 徐 莉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 魏金玺 孟凡宏

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 4 页

[54] 发明名称

特异结合分析方法

[57] 摘要

为了提供没有前带现象的影响并对试料中的分析物能够准确地进行定性以及定量分析的特异结合分析方法，将含有分析对象物的试料与保持标记材所标记的第 1 特异结合物质的保持部接触，使分析对象物与第 1 特异结合物质相结合，将上述试料与固定了第 2 特异结合物质的第 1 检测部接触，使过剩的分析对象物与第 2 特异结合物质相结合，将上述试料与固定了和上述分析对象物相同或类似的物质的第 2 检测部接触，使上述第 1 特异结合物质与上述物质结合，分别测量第 1 检测部以及第 2 检测部得到的来自上述标记材料的信号 1 以及信号 2，接着根据上述强度求出上述试料中的分析对象物的浓度。

1. 一种特异结合分析方法，其特征在于按工序（A）至（E）的顺序包括以下工序：（A）将含有分析对象物的试料与标记材料所标记的、并与分析对象物特异结合的第1特异结合物质接触，使上述
5 分析对象物与第1特异结合物质相结合而得到标记材料-第1特异结合物质-分析对象物的结合体的工序；（B）将上述试料与固定了与分析对象物特异结合的第2特异结合物质的第1检测部接触，使没有与第1特异结合物质结合的过剩的分析对象物以及上述结合体与
10 第2特异结合物质相结合而固定在第1检测部的工序；（C）将上述试料与固定了和上述分析对象物相同或与和第1特异结合物质结合的分析对象物具有相同抗原决定簇的物质的第2检测部接触，使上述结合体中的第1特异结合物质与上述物质结合，从而将上述结合体固定在第2检测部的工序；（D）分别测量第1检测部以及第2检测部所得到的来自上述标记材料的信号1以及信号2的强度的工序；
15 以及（E）根据上述信号1以及信号2的强度求出上述试料中的分析对象物的浓度从而进行定性或定量分析的工序。

2. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法，其特征在于：在上述工序（E）中，当上述工序（D）得到的信号1的强度，在从上述分析对象物浓度已知的试料预先得到的定量信息中，对应于不同的
20 浓度时，根据上述信号2的强度判定哪一个浓度是真实的，从而确定上述分析对象物的浓度。

3. 根据权利要求1或2所述的特异结合分析方法，其特征在于：根据上述工序（D）得到的信号2的强度判定前带现象。

4. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法，其特征在于：先
25 进行工序（C），将经过工序（A）的上述试料与固定了和上述分析对象物相同或与和第1特异结合物质结合的分析对象物具有相同抗原决定簇的物质的第2检测部接触，使上述结合体中的第1特异结合物质与上述物质结合从而将上述结合体固定在第2检测部，接着进行工序（B），将经过工序（C）的上述试料与固定了第2特异结合
30 物质的第1检测部接触，使没有与第1特异结合物质结合的过剩分析对象物以及上述结合体与第2特异结合物质相结合从而固定在第1检测部。

5 5. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法,其特征在于:首先进行工序(A),将第1检测部以及第2检测部设置在片状的色谱用基体上,使经过工序(A)的上述试料滴入到第1检测部与第2检测部的上游的一侧,在上述基体内借助于毛细管现象的浸透力使上述试料移动到第1检测部与第2检测部,进行工序(B)~(E)。

10 6. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法,其特征在于:将保持标记材料所标记的第1特异结合物质的保持部、第1检测部以及第2检测部设置在片状的色谱用基体上,使上述试料滴入到上述保持部或其上游的一侧,在上述基体内借助于毛细管现象的浸透力使上述试料移动到上述保持部、第1检测部与第2检测部,进行工序(A)~(E)。

7. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法,其特征在于:来自上述标记材料的信号是显示呈色或发光的信号。

15 8. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法,其特征在于:第1特异结合物质和第2特异结合物质中的至少一方是抗体。

9. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法,其特征在于:上述标记材料是金属溶胶、染料溶胶或者含有荧光物质的粒子、或着色乳胶粒子。

20 10. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法,其特征在于:在上述工序(D)中,沿着上述分析对象物的移动方向依次连续地测量上述信号1以及信号2。

25 11. 根据权利要求10所述的特异结合分析方法,其特征在于:在上述工序(D)中,制作表示连续测量的信号1以及信号2与上述分析对象物的移动方向的位置的关系的对应曲线,在上述工序(E)中,根据上述对应曲线进行定性或定量分析。

12. 根据权利要求1所述的特异结合分析方法,其特征在于:在上述工序(E)中,根据从分析对象物浓度已知的试料得到的定量信息、以及上述工序(D)中得到的信号1以及信号2进行上述分析对象物的定量分析。

30 13. 一种特异结合分析装置,其特征在于:它具备片状色谱用基体、设置于上述基体上并固定了与分析对象物特异结合的特异结合物质的第1检测部、设置于上述基体上并固定了与分析对象物相同

或与和第 1 特异结合物质结合的分析对象物具有相同抗原决定簇的物质的第 2 检测部，使含有分析对象物和特异结合物质的试料借助于毛细管现象的渗透力移动到第 1 检测部以及第 2 检测部，并使其发生特异结合反应，通过检测来自上述特异结合反应的信号进行上述分析对象物的定性或定量分析。

5 14. 根据权利要求 13 所述的特异结合分析装置，其特征在于：该装置具有保持部，该保持部设置在上述基体上的第 1 检测部的上游一侧，保持标记材料所标记的特异结合物质，借助于毛细管现象的渗透力使上述试料从上述保持部移动到第 1 检测部以及第 2 检测部。

10 15. 根据权利要求 14 所述的特异结合分析装置，其特征在于：该装置在上述基体上具有设置于上述保持部的上游一侧的试料滴入部，借助于毛细管现象的渗透力使上述试料从上述试料滴入部移动到上述的保持部、第 1 检测部以及第 2 检测部。

15 16. 根据权利要求 13 所述的特异结合分析装置，其特征在于：该装置在上述基体上具有设置于第 1 检测部的上游一侧的试料滴入部，借助于毛细管现象的渗透力使上述试料从上述试料滴入部移动到第 1 检测部以及第 2 检测部。

特异结合分析方法

发明领域

- 5 本发明涉及进行试料中的分析对象物的定性分析或者定量分析的特异结合分析方法。

背景技术

- 近年来，伴随家庭内和地区的医疗条件的充实、以及紧急性较高的临床检查等的增加，即使不是临床检查的专家也迫切希望开发能够
10 迅速简便且准确地实施测量的特异结合分析方法。

作为这样的特异结合分析方法，应用抗原抗体反应的免疫测定、利用受体的受体检验、以及使用互补核酸序列的杂交的核酸探针测定等许多方法已经为人熟知，从其特异性的高度来看，在临床检查等广泛的领域中得到普遍地应用。

- 15 更进一步的方法是一种免疫测定的色谱分析法，例如使液态试料与特异结合物质在不溶化乃至固定化的多孔性载体或微粒子充填型载体构成的基体上接触，通过利用液态试料沿着基体的毛细管现象的渗透力而流出的现象，来分析试料中的分析对象物是否存在（例如，日本国专利第 2504923 号、日本国专利第 2667793 号、特公平 7-78503
20 号、特开平 10-73592 号、以及特开平 8-240591 号等各公报）。

- 具体是，使肉眼或光学等方法能够任意检测的标记材料所标记的特异结合物质与分析对象物进行特异结合反应。然后，使与分析对象物发生特异结合反应的特异结合物质与在基体上固定化的结合剂进行结合，根据固定在基体上的标记量最终分析试料中的分析对象物是否
25 存在。

该色谱分析法，由于基体的载体的表面积较大，因此可以使大量的特异结合物质呈不溶化状态，能够引起特异结合反应的反应分子之间的碰撞频度比液相中的反应的场合大，因此从测量灵敏度以及测量时间上来看是有利的。

- 30 但是，以往的色谱分析法存在被称为“前带(プロゾン; Prozone)现象”的问题。所谓前带现象，是指对来自特异结合反应的信号强度不能一义地决定分析对象物的浓度的现象。

具体地，在试料中过剩地存在分析对象物的场合，与标记的特异结合物质特异结合的分析对象物（标记材料-特异结合物质-分析对象物的结合体）和与标记的特异结合物质没有特异结合的分析对象物单体，会存在于基体上。

5 于是，与标记的特异结合物质特异结合的分析对象物、和分析对象物单体，对在基体上固定化的结合剂，竞争进行特异结合反应。因此，分析对象物单体被结合剂结合，与标记的特异结合物质特异结合的分析对象物，在毛细管现象的渗透力作用下有时会流出。由此，导致被结合剂结合的标记的特异结合物质的量减少，使基于特异结合物质的特异结合反应的信号强度与试料中所含有的分析对象物的量不相对应。

因此，在试料中分析对象物量过剩地存在的场合，由标记量进行特定的分析对象物的量会异常地减少，有些场合不能正确地把握试料中的分析对象物存在与否。

15 对此提出以下确认方法：为了不受前带现象的影响而正确地测量分析对象物，使用稀释的不同浓度的试料，通过多次测量信号的强度，确认分析对象物是否以高浓度存在。但是，这需要许多个反应容器，造成测量工序复杂、分析装置的大型化以及复杂化。

20 在此，本发明的目的在于：提供没有前带的影响、即使使用小型简易的测量装置也能准确地定性以及定量测量试料中的分析对象物的特异结合分析方法以及特异结合分析装置。其中，本发明将标记材料-第1特异结合物质-分析对象物的结合体固定在固定了第2特异结合物质的第1检测部，根据该第1检测部的信号强度进行定量，因此，在特别低的浓度区的测定精度很高。

25 发明内容

本发明涉及一种特异结合分析方法，其特征在于：它包括以下工序：（A）将含有分析对象物的试料与可以检测的标记材料所标记的第1特异结合物质接触，使上述分析对象物与第1特异结合物质相结合而得到标记材料-第1特异结合物质-分析对象物的结合体的工序；（B）30 将上述试料与固定了第2特异结合物质的第1检测部接触，使没有与第1特异结合物质结合的过剩分析对象物以及上述结合体与第2特异结合物质相结合，从而固定在第1检测部的工序；（C）将上述试料与

固定了和上述分析对象物相同或类似的物质的第 2 检测部接触,使上述结合体中的第 1 特异结合物质与上述物质结合,从而将上述结合体固定在第 2 检测部的工序; (D) 分别测量第 1 检测部以及第 2 检测部所得到的来自上述标记材料的信号 1 以及信号 2 的强度的工序; 以及
5 (E) 根据上述信号 1 以及信号 2 的强度求出上述试料中的分析对象物的浓度从而进行定性或定量的工序。

在上述工序 (E) 中, 根据上述工序 (D) 得到的信号 1 的强度而特定上述分析对象物的浓度时, 在导致有 2 个相互不同的浓度 1 以及浓度 2 的情况下, 优选根据上述信号 2 的强度判定浓度 1 以及浓度 2
10 其中之一哪一个真实的来决定上述分析对象物的浓度。

优选根据上述工序 (D) 得到的信号 2 的强度判定前带现象。

理想情况是, 先进行工序 (B), 将经过工序 (A) 的上述试料与固定了第 2 特异结合物质的第 1 检测部接触, 使没有与第 1 特异结合物质结合的过剩分析对象物以及上述结合体与第 2 特异结合物质相结合而固定在第 1 检测部, 接着进行工序 (C), 将经过工序 (B) 的上述试料与固定了和上述分析对象物相同或类似的物质的第 2 检测部接
15 触, 使上述结合体中的第 1 特异结合物质与上述物质结合, 从而将上述结合体固定在第 2 检测部。

又, 也可先进行工序 (C), 将经过工序 (A) 的上述试料与固定了和上述分析对象物相同或类似的物质的第 2 检测部接触, 使上述结合体中的第 1 特异结合物质与上述物质结合从而固定在第 2 检测部, 接着进行工序 (B), 将经过工序 (C) 的上述试料与固定了第 2 特异结合物质的第 1 检测部接触, 使没有与第 1 特异结合物质结合的过剩分析对象物以及上述结合体与第 2 特异结合物质相结合从而固定在第
20 1 检测部。

又, 也可预先进行工序 (A), 将第 1 检测部以及第 2 检测部设置在片状的色谱用基体上, 将经过工序 (A) 的上述试料滴入到第 1 检测部与第 2 检测部的上游一侧, 在上述基体内借助于毛细管现象的浸透力使上述试料移动到第 1 检测部与第 2 检测部, 进行工序 (B) ~ (E)。

又, 也可以将保持可以检测的标记材料所标记的第 1 特异结合物质的保持部、第 1 检测部以及第 2 检测部设置在片状的色谱用基体上, 将上述试料滴入到上述保持部或其上游的一侧, 在上述基体内借助于
30

毛细管现象的渗透力使上述试料移动到上述保持部、第 1 检测部与第 2 检测部，进行工序 (A) ~ (E)。

优选来自上述标记材料的信号是显示呈色、荧光或发光的信号。

第 1 特异结合物质和第 2 特异结合物质中的至少一方是抗体为好。

优选上述标记材料是金属溶胶、染料溶胶或者含有荧光物质的粒子或着色乳胶粒子。

还有，在上述工序 (D) 中，沿着上述分析对象物的移动方向依次连续地测量上述信号 1 以及信号 2 为宜。

在上述工序 (D) 中，制作表示连续测量的信号 1 以及信号 2 与上述分析对象物的移动方向的位置的关系的对应曲线、在上述工序 (E) 中，根据上述对应曲线进行定性或定量为宜。

在上述工序 (E) 中，根据从分析对象物浓度已知的试料得到的定量信息，以及在上述工序 (D) 中得到的信号 1 以及信号 2 进行上述分析对象物的定量为宜。

此外本发明还提供特异结合分析装置，其特征在于：具有片状色谱用基体、设置于上述基体上的固定了特异结合物质的第 1 检测部、设置于上述基体上的固定了与分析对象物相同或类似的物质的第 2 检测部，使含有分析对象物和特异结合物质的试料借助于毛细管现象的渗透力移动到第 1 检测部以及第 2 检测部，并使其产生特异结合反应，通过检测来自上述特异结合反应的信号进行上述分析对象物的定性或定量分析。

再者，理想情况是，上述装置具有设置于上述基体上第 1 检测部的上游一侧的保持部，该保持部保持可以检测的标记材料所标记的特异结合物质，借助于毛细管的渗透力使上述试料从上述保持部移动到第 1 检测部以及第 2 检测部。

又，理想情况是，上述装置除了上述保持部以外，于上述基体上具有设置于上述保持部的上游一侧的试料滴入部，借助于毛细管现象的渗透力使上述试料从上述试料滴入部移动到保持部、第 1 检测部以及第 2 检测部。

上述装置也可以没有上述保持部而是于上述基体上具有设置于第 1 检测部的上游一侧的试料滴入部，借助于毛细管现象的渗透力使上述

试料从上述试料滴入部移动到第 1 检测部以及第 2 检测部。

附图的简要说明

图 1 是有关本发明的特异结合分析方法使用的试验试剂用条带的一种实施形式的示意斜视图。

5 图 2 是表示有关本发明的特异结合分析方法使用的分析装置的一种实施形式的构成的示意图。

图 3 是表示由图 2 所示分析装置检测的条带 1 的第 1 检测部 5 的信号强度的分布状况的示意图。

10 图 4 是表示由图 2 所示分析装置检测的条带 1 的第 2 检测部 6 的信号强度的分布状况的示意图。

图 5 是表示对第 1 检测部 5 照射 650nm 波长的光的场合下, hCG 浓度与信号强度 H_s 的关系的曲线图。

图 6 是表示对第 2 检测部 6 照射 650nm 波长的光的场合下, hCG 浓度与信号强度 H_r 的关系的曲线图。

15 发明的详细说明

首先, 参考附图详细说明有关本发明的特异结合分析方法。

图 1 是作为可用于本发明特异结合分析方法的特异结合分析装置的试验条带的示意斜视图。

20 试验条带 1 是片状的试片, 例如在色谱用试片的面上, 具有使含有分析对象物的试料能够渗透展开的区域基体 2。条带 1 例如由多孔性载体或微粒子充填型载体构成, 该载体借助于毛细管现象使试料能够渗透展开。

此外, 在基体 2 上配置试料滴入部 3、保持部 4、第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6。试料滴入部 3 是设置在基体 2 上的区域, 在此滴入试料。保持部 4 配置在试料滴入部 3 与第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 25 之间, 是滴入的试料流入的区域, 其中装有标记材料所标记的第 1 特异结合物质。第 1 检测部 5 是经由保持部 4 试料流入的区域, 作为结合剂使第 2 特异结合物质固定化。第 2 检测部 6 是接续保持部 4 经由第 1 检测部 5 试料流入的区域, 分析对象物或者其类似物质被固定。

30 在此, 本发明的特异结合分析方法所使用的试料是可预测含有分析对象物的液态的试料。例如, 可以列举出尿、血清、血浆、全血、唾液、泪液、髓液、以及乳头等的分泌液等。另外, 也可以是使粘液、

体组织或细胞等的固体形状、凝胶状或溶胶状物在缓冲液、萃取液或溶解液等液体中悬浮或溶解所得到的试料。

又，本发明的分析对象物，只要存在具有与该分析对象物特异结合的特性的特异结合物质即可，例如，可以列举出作为抗体和抗原而发挥功能的各种蛋白质、多肽、糖蛋白质、多糖类、复合糖脂质、核酸、效应物分子、受体分子、酶以及抑制剂等。更具体地，可以列举出 α -胎盘球蛋白、癌胎儿性抗原（CEA）、CA125、CA19-9等肿瘤标记、 β 2-微球蛋白（ β 2m）、铁蛋白等各种蛋白质、糖蛋白质或复合糖脂质、雌二醇（E2）、雌三醇（E3）、人体绒毛性腺刺激激素（hCG）、黄体形成激素（LH）、人胎盘催乳素（hPL）等各种激素、HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗原、HBc 抗体、HCV 抗体、HIV 抗体等各种病毒相关抗原以及病毒相关抗体、各种变应原以及与此相对应的 IgE 抗体、麻醉性药物、医疗性药物以及它们的代谢产物、与病毒以及肿瘤相关的多核苷酸序列的核酸等。

本发明的特异结合物质只要是对分析对象物能特异结合的物质即可，例如可以列举出抗体、抗原、糖蛋白质、多糖类、复合糖脂质、核酸、效应物分子、受体分子、酶以及抑制剂等。

在本发明中，理想情况是，使用标记材料所标记的上述第 1 特异结合物质和第 2 特异结合物质，标记的上述第 1 特异结合物质和上述第 2 特异结合物质通过分析对象物能够进行结合。然而，从特异性高的观点看，希望第 1 特异结合物质和第 2 特异结合物质中的至少一个是抗体。更优选为单克隆（モノクローナル）抗体。

再者，第 1 特异结合物质和第 2 特异结合物质不一定要使用同样的物质。此外，在分析对象物不具有多个同一的抗原决定簇的场合，第 1 特异结合物质和第 2 特异结合物质使用对不同的抗原决定簇分别具有特异性的物质为好。可是，在分析对象物具有多个同一的抗原决定簇的场合，采用同一的特异结合物质也可以。

还有，在第 2 检测部 6 固定化的物质可以是分析对象物本身，或者是显示与该分析对象物同样的行为的类似物。即，只要是与标记材料所标记的第 1 特异结合物质相结合的物质即可。例如，也可以是具有与和第 1 特异结合物质相结合的分析对象物的抗原决定簇相同的物质。

在本发明使用的标记材料是能够任意检测其存在的物质。例如，不只是在自然状态时肉眼可见的直接标记、或通过使用光学滤光片或者使用附加紫外线等的刺激促进荧光的方法等而容易看到的直接标记，也包括通过添加基质之类的展开试剂能够检测可见信号的间接标记。

5 作为直接标记，可以列举出染料溶胶、金属溶胶、着色乳胶粒子之类的微细着色粒子，以及含有荧光物质的粒子。作为间接标记，可以列举出碱性磷酸酶、辣根过氧化酶等酶类。由于直接标记即使不添加其它试剂也能生成可以检测的信号，因此可以在瞬间得到分析结果，加之牢固且稳定性好，因此优选使用直接标记。

10 以下，关于使用作为试料的尿、作为试料中所含有的分析对象物的 hCG、在第 1 特异结合物质以及第 2 特异结合物质中能参与 hCG 的夹层反应的抗 hCG 单克隆抗体、以及作为标记材料的金胶体的本发明的一个实施方式进行说明。

15 在此，使用金胶体那样的着色粒子的场合，由于着色粒子细小，因此可以使标记集中在较小的区域或容积中，在第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6，用来自第 1 特异结合物质标记材料金胶体的有效反应的信号准确地进行 hCG 的定性和/或定量分析。

20 首先，将进行定量分析或定性分析的试料滴入试料滴入部 3。被滴入的试料借助于毛细管现象在基体 2 上从试料滴入部 3 渗透展开到保持部 4。即，使含有分析对象物的试料与保持部接触，该保持部保持可以检测的标记材料所标记的第 1 特异结合物质，使上述分析对象物与第 1 特异结合物质相结合，得到标记材料-第 1 特异结合物质-分析对象物的结合体（工序 A）。

25 基体 2，如上所述，只要是展开分析对象物以及特异结合物质的场所即可，可以列举出多孔性载体和凝胶载体等。在此，对使用硝酸纤维素的场合进行说明。

30 硝酸纤维素，即使不预先进行增感，也具有与蛋白质固有地结合的能力，因此比纸之类的其它基体材料优异。将抗体之类的特异结合物质直接涂敷于硝酸纤维素上，能够可靠地固定，完全不必进行会妨碍特异结合物质所具有的特异结合能力的化学处理。例如，基体材料是纸的场合，为了固定抗体，需要使用 CNBr、羰基二咪唑（ジミダゾ

-ル)、三苯甲基氯(えんかトレシル)等进行化学结合。

再者,各种大小的气孔尺寸的硝酸纤维素都可以得到,因此可以根据试料流量的必要条件容易地选择基体材料。在使用硝酸纤维素的场合,在该条带的背面粘附(里衬)由塑料等材料构成的片状增强材料等以增加操作上的强度为宜。这通过在增强材料上形成硝酸纤维素薄膜而能容易地制造。

在检测部固定抗体后,将基体封闭,以减少对基体的非特异吸附为宜。封闭可以通过使用蛋白质(例如牛的血清白蛋白或乳蛋白质等)、聚乙烯基醇、乙醇胺或它们的组合进行处理从而能够实现。

保持部4放置作为与分析对象物hCG有免疫学的结合特性的第1特异结合物质的抗hCG单克隆抗体。抗hCG单克隆抗体由作为标记材料的金胶体标记化。

试料尿中含有的分析对象物hCG流入保持部4,与第1特异结合物质进行特异结合,得到标记材料-第1特异结合物质-分析对象物的结合体。即,通过抗hCG单克隆抗体给予分析对象物hCG以金胶体。

在此,第1特异结合物质在干燥状态下置于保持部4为好。例如,对封闭后的基体涂附含有第1特异结合物质的试剂,施行冷冻干燥处理,使保持部4在干燥状态下担载第1特异结合物质。由此,保持部4处于干燥状态时,第1特异结合物质被保持在保持部4,通过液态试料在基体2渗透展开而使基体2被湿润时,第1特异结合物质可以在基体2上自由地移动。

因此,含有具有结合了分析对象物和第1特异结合物质的状态的上述结合体的试料,一边在基体2上渗透展开,一边流入处于基体2上的第1检测部5以及第2检测部6。

在第1检测部5,能与分析对象物hCG结合的第2特异结合物质抗hCG单克隆抗体实质上被固定。例如,在基体由硝酸纤维素构成的场合,将含有上述抗体的试剂涂敷于上述基体可以使上述抗体以物理方式以及化学方式吸附于该基体从而使其固定。该第2特异结合物质抗hCG单克隆抗体即使在湿润状态下也不移动。

在第2检测部6,与第1特异结合物质抗hCG的单克隆抗体相结合的分析对象物(hCG)或者其类似物实质上被固定,它即使在湿润状态下也不移动。

再者，在试验试剂条带之外，将试料事先与第 1 特异结合物质反应后滴入到试料滴入部也可以。在该条带之外与试料反应的第 1 特异结合物质也可以是不与标记材料结合的物质，进一步地，也可以是与生成和基体内的标记的第 1 特异结合物质不同的信号的标记材料结合的物质。在条带之外使标识的第 1 特异结合物质与试料预先反应的场合，也可以在基体 2 上不配置放置第 1 特异结合物质的保持部 4。

到达第 1 检测部 5 的试料中的分析对象物，与第 2 特异结合物质进行特异结合。由此，分析对象物通过第 2 特异结合物质可以固定第 1 检测部 5 上。即，由金胶体标记的第 1 特异结合物质抗 hCG 单克隆抗体，通过分析对象物 hCG 而与固定在第 1 检测部 5 的第 2 特异结合物质抗 hCG 单克隆抗体相结合。

这是使经过工序 (A) 的上述试料与固定了第 2 特异结合物质的第 1 检测部接触，使没有与第 1 特异结合物质结合的过剩的分析对象物与第 2 特异结合物质相结合从而固定在第 1 检测部的工序 (B)。

在此，试料中的 hCG 过剩地存在的场合，与采用金胶体所标记的抗 hCG 单克隆抗体没有特异结合的 hCG、以及与用金胶体标记的抗 hCG 单克隆抗体特异结合的 hCG，在与第 1 检测部 5 的第 2 特异结合物质的特异结合反应中竞争。

其结果，单体的 hCG 与固定在第 1 检测部 5 的特异结合物质优先地反应而结合。然后，采用结合在第 1 检测部 5 的金胶体所标记的抗 hCG 单克隆抗体的量减少，金胶体的有效信号强度降低，第 1 检测部 5 检测的信号强度则不能反映试料中的 hCG 的量。这样，由于过剩地存在分析对象物而导致信号强度不能根据分析对象物的量增加而增加的现象，称为上述的前带现象。

采用到达第 2 检测部 6 的金胶体所标记的第 1 特异结合物质抗 hCG 单克隆抗体内能进一步与分析对象物 hCG 结合的第 1 特异结合物质抗 hCG 单克隆抗体与固定的分析对象物 hCG 进行特异结合，从而被固定第 2 检测部 6。即，金胶体所标记的第 1 特异结合物质抗 hCG 单克隆抗体，通过分析对象物 hCG 而被固定在第 2 检测部 6。

这是使经过工序 (B) 的上述试料与固定了和上述分析对象物相同或者类似的物质的第 2 检测部接触，使上述结合体中的第 1 特异结合物质与上述物质结合从而将上述结合体固定在第 2 检测部的工序 (C)。

在此，即使试料越过第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6，也要使试料继续流动展开为宜。为此，在试料滴入部 3 滴入足够的试料，在第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6，没有参加结合反应的多余的被标记的第 1 特异结合物质由于继续越过检测部的试料流动的作用，从第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 被冲洗出来。因此，也可以在基体 2 的试料展开的末端部设置吸收部。作为吸收部的材料，只要是为了能够冲洗分析对象物以外的试料而具有充分的吸收能力的物质即可，例如，可以列举出玻璃纤维滤纸 GA200（东洋（株）的产品）。

这样设置吸收部时，未反应物随着试料的流动而被冲洗，因此特异结合反应后不必进行未反应物的分离操作，即可以在第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 检测来自特异结合反应的信号。所以，对于本发明的特异结合分析方法，来自分析对象物与特异结合物质的特异结合反应所得到的信号的测量，可以在进行特异结合反应场所的任何地方进行，但理想情况是，在第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6，或在包括第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 的区域检测信号强度的分布状况，并由信号强度的分布状况进行试料中的分析对象物的定性或定量分析。

然后，进行工序（D），即分别检测第 1 检测部以及第 2 检测部所得到的来自上述标记材料的信号 1 以及信号 2 的强度，并进行工序（E），即根据上述信号 1 以及信号 2 的强度求出上述试料中的分析对象物的浓度并进行定性或定量分析。

也可以使用含有已知浓度的分析对象物的试料，通过测量得到信号强度的分布状况与浓度的对应关系，预先作成表示该关系的定量信息，由该定量信息和分析得到的信号强度的分布状况来确定浓度。

图 2 是表示有关本发明的特异结合分析方法中和上述条带 1 一起使用的分析装置的构成的示意图。该分析装置例如具有：第一电极 11、第二电极 12、测量开始检知器 10、解析器 9、光源 7 以及光检测器 8。第一电极 11 和第二电极 12 是测量试料滴入部 3 的导电率的电极。测量开始检知器 10 是从导电率的变化检知试料滴入到试料滴入部 3 的机器，将检知信号送入解析器 9。解析器 9 接收到检知信号以后经过规定的时间时控制载物台 13，沿着 Z 方向扫描整个试验试剂条带 1。进一步控制光源 7，解析光检测器 8 的输出信号。光源 7 是对第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 照射光的机器。光检测器 8 是检测来自第 1 检测部 5

以及第2检测部6的反射光的机器。

关于该分析装置的动作进行说明。首先，在滴入试料之前，检测在干燥状态下的试料滴入部3的导电率以及试料滴入时的湿润状态的试料滴入部3的导电率。由此得到的信息作为测量开始信息，并输入
5 测量开始检知器10。

然后，将含有hCG的试料滴入到试料滴入部3，在试料滴入部3从干燥状态变化成湿润状态时，第一电极11和第二电极12监测的试料滴入部的导电率发生变化。测量开始检知器10通过参照该导电率的变化和测量开始信息可以检知试料被滴入到试料滴入部3。

10 试料向试料滴入部3的滴入在试验试剂条带1装入到分析装置内以后实施为好，但是，将已滴入了试料的试验试剂条带1装入分析装置也可以。

当测量开始检知器10检知试料的滴入时，解析器9控制载物台13，沿着Z方向扫描试验试剂条带1。同时，解析器9控制光源7以及
15 光检测器8，测量伴随扫描的信号强度的变化，得到如图3和图4所示的色谱图。

光源7向含有第1检测部5以及第2检测部6的区域照射规定的波长（例如650nm）的光，光检测器8检知其反射光。检测波长选择适合第1检测部5和第2检测部6的试料以及标记材料的呈色的波长即
20 可。

在此，作为信号，只要是通过有效的标记材料的反应而生成并能检测的信号即可，例如，采用荧光光度计可以测量的荧光、采用发光光度计可以测量的发光、或者在第1检测部5以及第2检测部6用肉眼能判定以及用色差计可以测量的呈色等也可以。此种场合，检测在
25 第1检测部5以及第2检测部6反射的光、第1检测部5以及第2检测部6发生的荧光或发光的强度等。

该信号的检知，是一边使试验试剂条带1与光源7以及光检测器8的位置关系沿着与试料的渗透方向平行即沿着Z方向相对变化，一边连续地实施。也可以使试验试剂条带1或光源7和光检测器8中的某一个与试料的渗透方向平行地移动，使二者都移动也可以。
30

光检测器8将该信号输送到解析器9。解析器9通过解析来自光检测器8的信号，测量信号的强度。解析器9制作所测量的信号强度与

扫描距离构成的对应曲线、即色谱图，并对其解析。

图 3 和图 4 是分别对第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 附近的信号强度的分布状况解析后所描绘的对应曲线（色谱图）的示意图。该色谱图是一边对试料试剂条带 1 或光源 7 扫描，一边将光源 7 发出的光照射在基体 2 上，并由解析器 9 解析光检测器 8 所检测出的反射光而描绘出来的曲线图。该色谱图的纵轴表示第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 附近的信号强度，横轴表示检测部的区域（从试料滴入部 3 起的扫描距离）。

该色谱图的高度 H 是作为基于特异结合反应的信号强度而进行测量的。在此，色谱图的面积 S 也可以表示基于特异结合反应的信号强度。第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 的色谱图高度分别以 H_s 和 H_r 表示，第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 的色谱图面积分别以 S_s 和 S_r 表示。

再有，在此对试验试剂条带 1 或光源 7 进行扫描，连续地测量包括第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 的区域的反射光而得到色谱图。例如，隔着第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6，用直线连接滴入点 3 附近的上游与其反向一侧的下游的信号强度，从第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 的色谱图的最高值的高度减去直线的高度，所求得的高度定为色谱图的高度 H ，又通过将色谱图与直线包围区域的面积表示为色谱图的面积 S ，从第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 的信号强度减去来自本底的信号强度可以得到基于特异结合反应的信号强度。即使试料是全血等着色的物质，也不受来自本底以及杂质的影响，能够对试料中的分析对象物进行定性或定量地分析。

此时，将第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 以外的基体 2 上的任何部位的信号强度作为来自本底的强度也可以，例如，选择第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 附近的信号强度中的最小值也可以。

所谓本底，是不含有分析对象物的试料所显示的行为。例如，第 1 检测部 5 以及第 2 检测部 6 的特异结合物质等的非特异吸附、以及测量呈色信号的场合，试料自身的呈色都影响到本底，使测量精度降低。然而，所谓夹杂物，是试料中含有的分析对象物以外的物质，但在特异结合分析方法中成为问题的夹杂物是在与特异结合物质的结合反应中，显示与分析对象物同样的行为的物质（例如分析对象物的结构类

似物质等)、与分析对象物结合等而妨碍分析对象物与特异结合物质的特异结合反应的物质等。

解析器 9 在存储器(图中未示出)中有定量信息,通过参照分析值 H_s 与 H_r 、或者 S_s 与 S_r 和该定量信息,来特定分析对象物的浓度。

5 以下,根据用图 1 所示的条带以及图 2 所示的分析装置所进行的实施例说明有关本发明的特异结合分析方法,但是本发明并不限于此。

实施例

10 使用图 1 所示的条带 1 以及图 2 所示的分析装置实施本发明的特异结合分析方法。在此,采用解析器 9 由 H_s 以及 H_r 特定分析对象物的浓度。

图 5 表示用 650nm 波长的光照射第 1 检测部 5 的场合下,信号强度 H_s 与 hCG 浓度的关系的曲线图。在 hCG 的浓度实际上为零的控制精度用的对照尿中添加 hCG 后作为试料使用。各个试料的 hCG 的浓度为:
15 0 (IU/L)、10 (IU/L)、30 (IU/L)、50 (IU/L)、100 (IU/L)、300 (IU/L)、500 (IU/L)、1000 (IU/L)、1500 (IU/L)、2000 (IU/L)、3000 (IU/L)、5000 (IU/L)、7500 (IU/L) 或者 10000 (IU/L), 每个浓度测量 2 次或 3 次。

20 从图 5 可知,在试料中的 hCG 浓度为低浓度的场合,几乎所有的分析对象物都与所标记的第 1 特异结合物质结合,并与固定在第 1 检测部 5 的第 2 特异结合物质结合。因此,第 1 检测部 5 所检测的来自于标识材的有效反应的信号强度 H_s , 伴随浓度的增加而增高。在试料中的 hCG 的浓度为高浓度的场合,由于在反应系中过剩地存在与所标记的第 1 特异结合物质没有特异结合的分析对象物,因此与标记的第 1
25 特异结合物质特异结合的分析对象物、和没有与标记的第 1 特异结合物质特异结合的分析对象物进行竞争,与固定在第 1 检测部 5 的第 2 特异结合物质进行特异结合反应,其结果,第 1 检测部 5 所检测的来自于标记材料的有效反应的信号强度 H_s , 伴随浓度的增加而降低。

30 以图 5 的虚线作为校正曲线,可以特定分析对象物的浓度。即,纵轴的信号强度 H_s 显示某一数值时,表示该值的虚线的横轴则相当于浓度。例如,当信号强度 H_s 为 5.0 时,可以特定其浓度为约 1200 (IU/L)。

但是，在此，解析器 9 以图 5 的虚线作为校正曲线进行参照时有时存在多个特定浓度，对应于信号强度的分析对象物的浓度不能一义地确定。在 hCG 浓度有可能显示 6000 (IU/L) 以上的场合，信号强度为 10 时 hCG 的浓度为大约 3500 (IU/L) 或大约 7600 (IU/L) 的任一个，不便区别。这种对应于信号强度 H_s 的分析对象物的浓度不能一义地确定的场合，按照以下那样根据第 2 检测部 6 的色谱图同时求出信号强度 H_r ，同时解析 H_r 和 H_s ，则可以特定浓度。

图 6 是对第 2 检测部 6 用 650nm 波长的光照射的场合下，信号强度 H_r 与 hCG 浓度的关系的曲线。

在 hCG 的浓度实际上为零的控制精度用的对照尿中添加 hCG 后作为试料使用。各种试料的 hCG 的浓度为：0 (IU/L)、10 (IU/L)、30 (IU/L)、50 (IU/L)、100 (IU/L)、300 (IU/L)、500 (IU/L)、1000 (IU/L)、1500 (IU/L)、2000 (IU/L)、3000 (IU/L)、5000 (IU/L)、7500 (IU/L) 或者 10000 (IU/L)，每个浓度测量 2 次或 3 次。

从图 6 可以知道，由于没有与分析对象物结合的标记的第 1 特异结合物质与固定在第 2 检测部的分析对象物或类似物质结合，因此来自标记材料有效反应的信号强度 H_r 随着浓度的增加而降低。亦即，浓度下降、与分析对象物未结合的标记的第 1 特异结合物质存在时，由于它们与固定于第 2 检测部 6 的分析对象物或类似物结合，因此产生来自于标记材料的有效反应的信号强度 H_r 。但是，如果存在浓度高的大量过剩的分析对象物，则实际上所有的标记的第 1 特异结合物质与分析对象物结合，因此即使到达第 2 检测部 6，也不能与固定化的分析对象物或者类似物质结合从而被冲洗流出，所以，来自标识材的有效反应的信号强度 H_r 实际上并不发生。

在此，更严密地说，如本实施例那样，第 1 特异结合物质象抗体那样具有多个结合部位的场合 (IgG 抗体的场合为 2 个部位)，它们各个结合部位的结合状态反映在信号强度上。即，所有的结合部位被分析对象物埋没的第 1 特异结合物质能重新与分析对象物结合的几率极低，因此与固定在第 2 检测部 6 的分析对象物的结合几率也是极低的。但是，即使残留一个与分析对象物可能结合的结合部位时，与固定在第 2 检测部 6 的分析对象物结合的几率会根据残留结合部位的比例而

增加。不管怎样，图 6 的虚线所示的信号强度 H_r 伴随分析对象物的浓度的增加而降低。

以图 6 的虚线和图 5 的虚线作为定量信息，可以象以下那样特定分析对象物的浓度。

- 5 如上所述，只参照图 5 的虚线时，存在多个被特定的浓度，有时不能一义地确定对应于信号强度的分析对象物的浓度。例如，在 hCG 浓度有可能显示 6000 (IU/L) 以上的场合，信号强度 H_s 为 10 时 hCG 浓度为约 3500 (IU/L) 或约 7600 (IU/L) 的任一个，无法区别。但是，通过进一步参照图 6 的虚线则可以特定浓度。即，如果图 6 的信号强度 H_r 为 1.2，则可以由虚线确认浓度为约 3500 (IU/L)，如果信号强度 H_r 为 0.45，则可以由虚线确认浓度是 7600 (IU/L)。

这样，在只根据图 5 的信号强度 H_s 不能一义地确定分析对象物的浓度的场合，由第 2 检测部 6 的色谱图求出信号强度 H_r ，并用 H_r 和 H_s 二者进行解析，可以特定浓度。

- 15 在此，只根据图 6 的 H_r 特定浓度也是可能的，但是对低浓度区，虚线对浓度的斜率较小，由测量的 H_r 特定浓度时的精度比根据图 5 的 H_s 特定浓度时的低。因此， H_r 只是在决定由 H_s 导出的 2 个浓度中哪一个正确时才运用，在浓度特定时仅利用 H_s 为宜。

- 20 此外，为了简单起见，也可以只是在图 6 的 H_r 为规定值以上的场合，才根据图 5 的 H_s 特定浓度。例如，在本实施例的场合，只是在 H_r 为 0.6 以上时才由图 5 的 H_s 特定浓度；当 H_r 为 0.6 以下的场合，如判断发生前带现象，只是限定浓度在 6000 (IU/L) 以上，而不特定浓度，这样较为简单。即， H_r 只是用于前带的判定时，简单而有效。

- 25 再者，在本实施例中，第 2 检测部 6 配置于液态试料从第 1 检测部 5 展开的方向 (Z 方向) 的下游一侧，通过这样的配置使定量精度提高。原因在于：当液体流过固定了抗体等蛋白质的基体中形成紊流，容易发生液体试料只流过基体中特定部分的现象，在下游一侧的检测部的结合程度出现不均匀。由此使重复性降低。由于固定在基体中的蛋白质引起的对液体试料流动的妨碍，是因空间障碍、固定化密度不均而导致的亲水性的不均匀等发生的。对浓度进行特定，即通过确保定量的在第 1 检测部 5 发生的信号的重复性，能够使定量精度提高，因此将定量用检测部配置于上游一侧为宜。

如上所述，以 Hs 以及 Hr 二者作为定量信息进行解析，可以不受所谓的前带现象的影响，能够特定浓度。

再者，在本实施例中，举出了有效利用 Hs 以及 Hr 的实例，同样地有效利用图 3 以及图 4 所示的 Ss 以及 Sr，也能得到同样的效果。即
5 能够用 Ss 定量、用 Sr 实施前带的判定。

如以上说明那样，根据本实施例的特异结合分析方法，即使在发生前带现象的场合，仍然能够简单且迅速地进行试料中的分析对象物的定性或定量分析。

如以上所述，根据本发明，参照基于 2 个部位的检测部发生的特异结合物质的特异结合反应的信号强度的分析值，以及表示与分析对象物的浓度相对应的定量信息，对试料中分析对象物的量进行特定，
10 因此不受前带现象的影响，能够简单且迅速地进行试料中的分析对象物的准确的定性或定量分析。

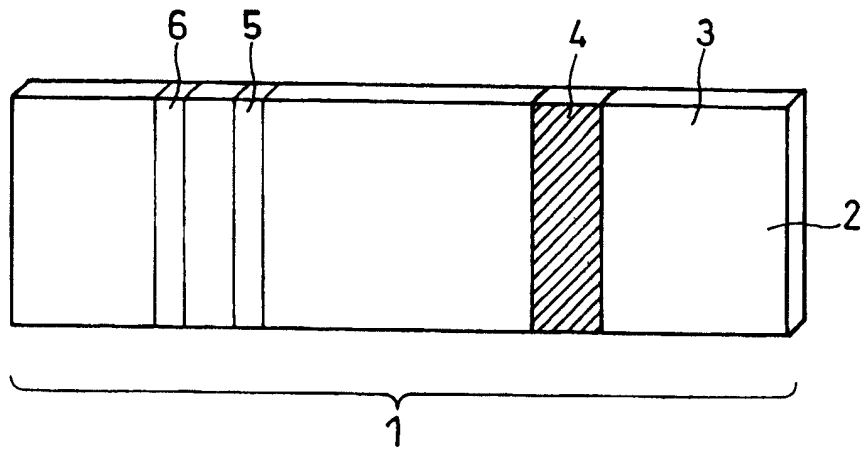


图 1

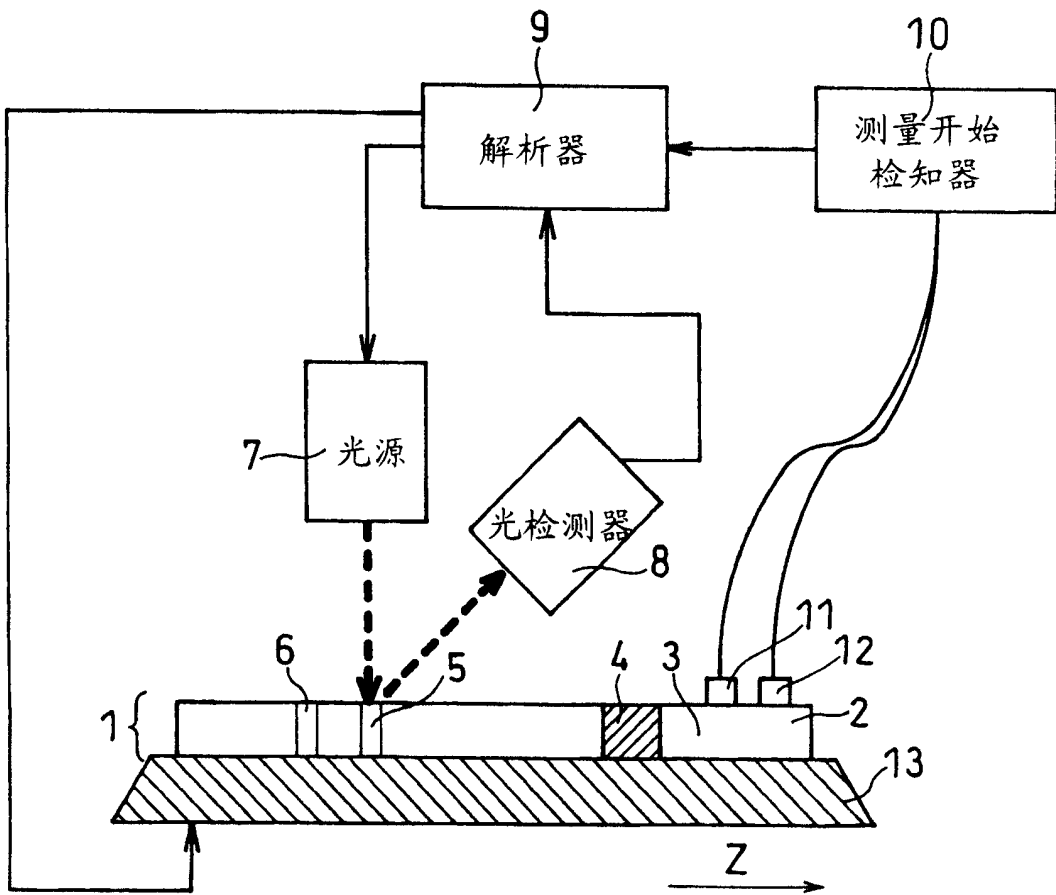


图 2

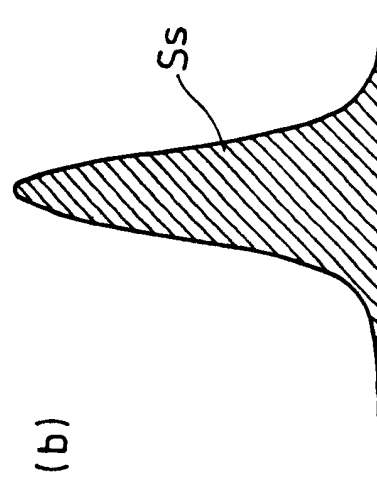
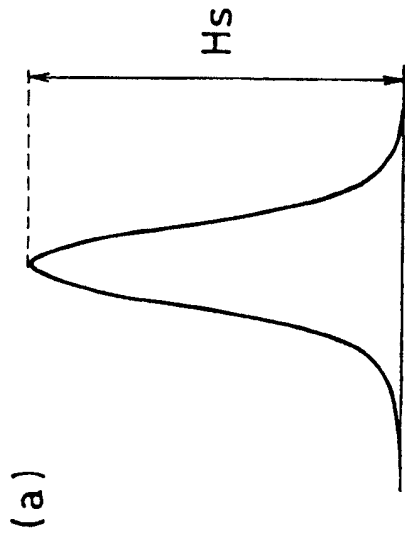


图 4

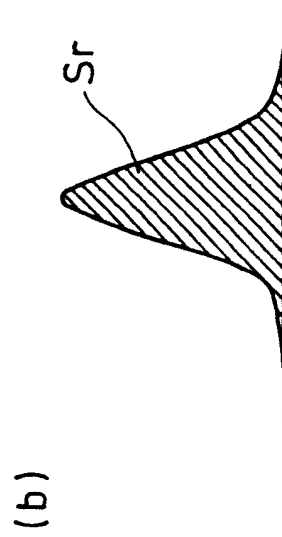
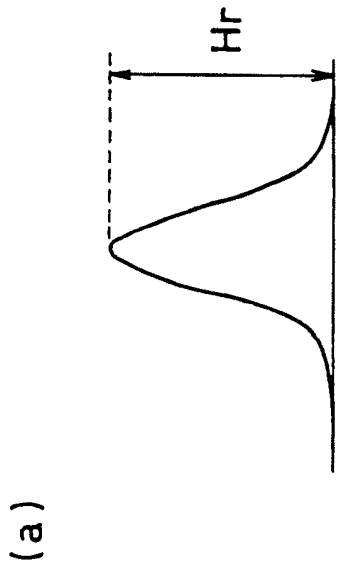


图 3

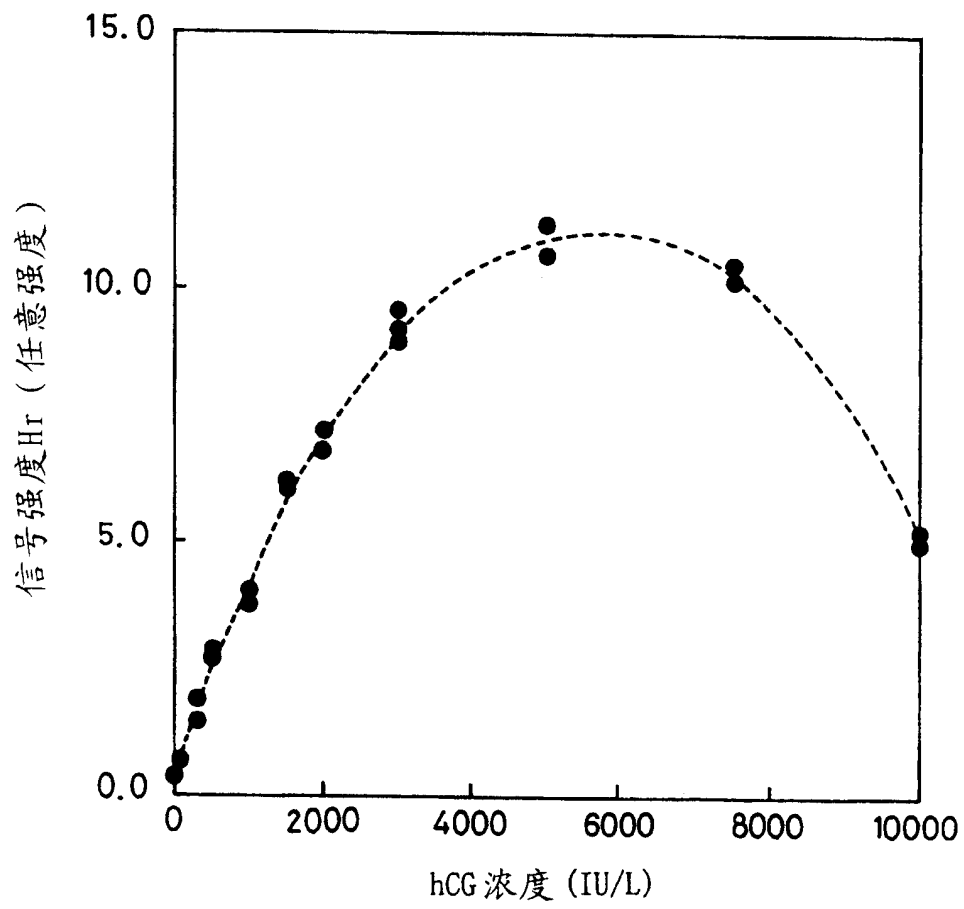


图 5

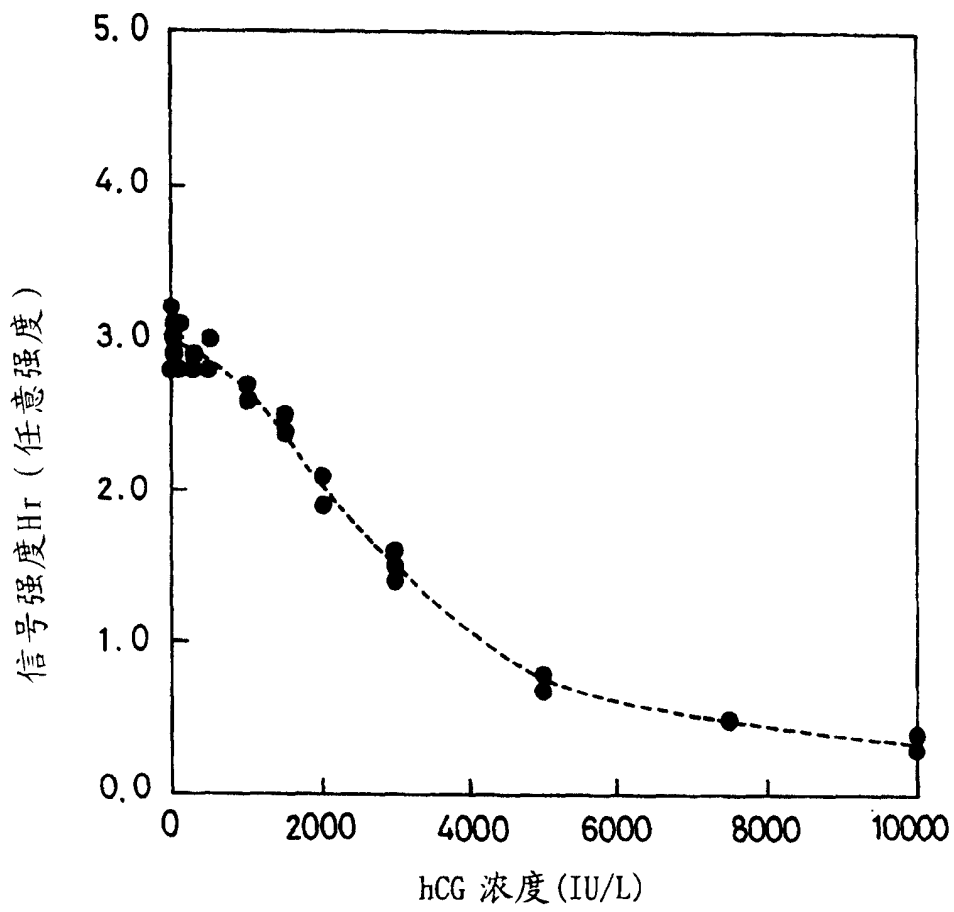


图 6