

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480024753.0

[43] 公开日 2006年10月4日

[11] 公开号 CN 1842708A

[22] 申请日 2004.8.27

[21] 申请号 200480024753.0

[30] 优先权

[32] 2003.8.29 [33] JP [31] 307920/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/012393 2004.8.27

[87] 国际公布 WO2005/022155 日 2005.3.10

[85] 进入国家阶段日期 2006.2.28

[71] 申请人 株式会社东芝

地址 日本东京都

[72] 发明人 内山兼一 大宫可容子 岸本功

平田雅己 江藤英雄 东野一郎

植松育生 葛西晋吾 高濑智裕

本庄勉 杉谷政则

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

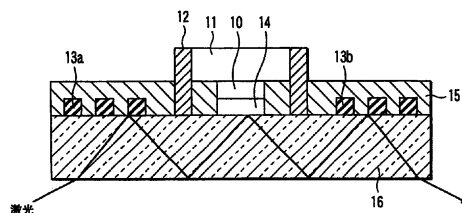
权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 13 页

[54] 发明名称

显色试剂、浓度测定试剂盒、浓度测定方法和在该方法中使用的传感器芯片

[57] 摘要

本发明提供了一种测定待测物质浓度的方法，其可在很短的时间内测定非常少量的测试样品中待测物质的浓度，即使当用于测定的测试样品的量非常少时，也可对该待测物质的浓度进行准确测定。对待测物质浓度进行测定的方法采用传感器芯片，所述传感器芯片具有一个光波导层，以及设置于所述光波导层表面上的抗体固定化层，该方法包括将待测物质和用标记酶标记的酶标抗体固定于传感器芯片的具有固定化抗体的抗体固定化层上，通过使显色试剂与抗体固定化层上的标记酶反应产生显色的酶反应产物，并将所述酶反应产物沉积在抗体固定化层上，使从外面照射到传感器芯片上的光在光波导层与抗体固定化层之间的界面处被全反射，并观察全反射光的物理量。



1. 一种显色试剂，其至少含有一种着色底物和一种标记酶的底物，其中所述显色试剂通过酶反应形成显色并沉淀的酶反应产物。

2. 权利要求1的显色试剂，其中所述着色底物是基于联苯胺的显色试剂，所述标记酶的底物是过氧化物。

3. 权利要求1或2的显色试剂，其用于酶联免疫吸附测定方法。

4. 一种测定待测物质浓度的试剂盒，包括一个在光波导层表面上具有固定了用于捕获待测物质的抗体的抗体固定化层的传感器芯片、标记酶标记的抗体、以及权利要求1、2或3的显色试剂，

其中所述传感器芯片、抗体和显色试剂分别被单独包装并组合在一起。

5. 权利要求4的测定待测物质浓度的试剂盒，其中所述标记酶是过氧化物酶。

6. 权利要求4或5的测定待测物质浓度的试剂盒，其中固定于所述抗体固定化层上的抗体是下列抗体中的任一种：抗胰岛素抗体、抗酪蛋白抗体、抗 β -乳球蛋白抗体、抗卵清蛋白抗体、抗荞麦主要蛋白复合物抗体和抗花生 Arah2 可溶性蛋白抗体。

7. 一种使用传感器芯片测定待测物质浓度的方法，所述传感器芯片具有一个光波导层，以及设置在所述光波导层表面上的抗体固定化层，所述方法包括：

将待测物质和标记酶标记的酶标记的抗体固定于所述传感器芯片的具有固定化抗体的抗体固定化层上；

通过使显色试剂与抗体固定化层上的标记酶反应产生显色的酶反应产物，将所述酶反应产物沉淀于所述抗体固定化层上；

使从外面照射到传感器芯片上的光在光波导层和抗体固定化层之间的界面处被全反射；以及

观察全反射光的物理量。

8. 一种使用传感器芯片测定待测物质浓度的方法，所述传感器

芯片具有一个光波导层，以及在所述光波导层表面上的抗体固定化层，所述方法包括：

将待测物质和标记酶标记的酶标记的抗体固定于传感器芯片的具有固定化抗体的抗体固定化层上，使从外面照射到传感器芯片上的光在光波导层和抗体固定化层之间的界面处被全反射，以观察全反射光的物理量；以及

通过使显色试剂与标记酶反应产生显色的酶反应产物，将所述酶反应产物沉淀于所述抗体固定化层上，并使从外面照射到传感器芯片上的光在光波导层和抗体固定化层之间的界面处被全反射，以观察全反射光的物理量。

9. 权利要求 7 或 8 的测定待测物质浓度的方法，其中在测定中使用的测试样品的体积为 5 μ L 或更小。

10. 权利要求 7 或 8 的测定待测物质浓度的方法，其中使用过氧化物酶作为所述标记酶，并使用至少包括一种基于联苯胺的显色试剂和一种过氧化物的混合物作为显色试剂。

11. 权利要求 7 或 8 的测定待测物质浓度的方法，其中所述抗体固定化层的厚度为 30 到 500nm。

12. 一种传感器芯片，包括一个能够通过全反射在层中传播光的光波导层，和一个在光波导层的使光能够被全反射的表面的至少一部分上形成的抗体固定化层。

13. 权利要求 12 的传感器芯片，其进一步包括疏液性膜，以形成在所述光波导层表面上形成的反应孔，所述疏液性膜具有高于抗体固定化层水平的表面，并具有暴露至少一部分所述抗体固定化层的反应孔。

14. 权利要求 13 的传感器芯片，其进一步包括粘附于所述光波导层表面的构成池的框架元件，所述框架元件具有从疏液性膜凸起并环绕反应孔的顶端。

显色试剂、浓度测定试剂盒、 浓度测定方法和在该方法中使用的传感器芯片

技术领域

本发明涉及一种在酶反应中使用的显色试剂(coloring reagent)、一种浓度测定试剂盒、一种测定待测物质的浓度的方法以及在该方法中使用的传感器芯片(sensor chip)。特别地,本发明涉及一种在酶反应中使用的显色试剂,所述酶反应用于通过利用衰减波(evanescent wave),使用非常少量的样品以高灵敏度和高准确性迅速测定待测物质的浓度,本发明还涉及一种浓度测定试剂盒、一种测定待测物质的浓度的方法以及在该方法中使用的传感器芯片。

背景技术

酶联免疫吸附测定(ELISA)方法已经作为一种通过利用抗原抗体之间的特异性反应而测定微量成分的方法而被特别地应用于临床检测中。

通常称做微孔板(microplate)的具有 96 凹孔(孔)的树脂平板用于 ELISA 方法。例如,在夹心 ELISA 方法中,基于测试物质,将初级抗体固定在每个孔上。在该方法中,将测试样品溶液分散于每个孔中,使固定于平板上的抗体(初级抗体)与测试样品溶液中的待测物质发生反应(此后称为初级反应),随后通过清洗除去含有未反应测试样品的溶液。然后,将酶标记的次级抗体溶液分散到平板的每个孔中,使与次级抗体反应的待测物质与次级抗体发生特异性反应(此后称为次级反应)。除去未反应的次级抗体溶液后,将显色试剂溶液分散于每个孔中,进行酶反应(此后称为酶反应),使酶反应产物显色,并

且通过使用微孔板阅读仪测定来自通过孔的透射光的强度的吸收，由校准曲线测定待测物质的浓度。

例如，胰岛素是一种胰腺 β -细胞分泌的激素，已知其具有降低血糖水平的作用。因此，应测定血液中胰岛素的浓度以诊断糖尿病及识别患者的病理。胰岛素的浓度通过与上面描述相同的使用具有固定有抗胰岛素抗体的凹孔的微孔板的 ELISA 方法测定，所述测定通过将测试样品溶液分散到所述凹孔中，使所述抗胰岛素抗体与测试样品溶液中的胰岛素发生反应来进行。

然而，采用微孔板的 ELISA 需要数十微升到 100 微升的测试样品的量，最少为 5 μ L 或者更多，并且在上述浓度中仅仅每毫升数百皮克的数量级中，其测定灵敏度会降低。此外，当增加进行测定的测试样品量以增加其灵敏度时，反应系统受到测试样品溶液中含有的抗原-抗体反应的抑制物质的增加的量的影响。由于增加测试样品的量会降低测定的灵敏度，其只能保持在大约每毫升数百皮克。

ELISA 的另一个问题是测定花费很长的时间，因为在需要大量测试样品的 ELISA 中，抗原抗体需要更长时间完成反应。例如，初级反应所需的时间通常为数小时，最长可达 24 小时，次级反应和底物反应需要数十分钟。

当从婴儿或较小的动物收集样品时，人们希望测试样品(血液、血浆)的量尽可能少。在 ELISA 中，分配到微孔板的孔中的样品量需要很精确，但是很难精确测定小于 5 μ L 的样品。因此，为了精确的测定，需要使用大于所需的量的测试样品，尽管人们希望以较少的样品量来进行测定。

利用抗原抗体反应的传感器芯片是已知的。图 1 是显示具有光波导(optical waveguide)的传感器芯片构造的示意图。所述传感器芯片包括一个在玻璃基板 16 上形成的由氮化硅膜制成的光波导层 1、

分别设置于光波导层两侧的一对入射侧光栅(grating)13a(衍射光栅)和出射侧光栅 13b, 或者棱镜(未显示), 以及一个在光波导层 1 上形成的抗体固定化层 14。

通过将含有抗原的测试样品溶液与上述传感器芯片中的抗体固定化层 14 接触, 发生抗原抗体反应。通过在抗原抗体反应系统中加入荧光色素标记的抗体溶液, 在所述基板上形成包含抗体/抗原/荧光色素标记的抗体的免疫复合物。测试样品溶液中抗原的量通过下列步骤测定, 包括: 用激光穿透入射侧光栅 13a 进入光波导层 1 发射出衰减波(evanescent wave); 通过衰减波激发光波导层 1 上的抗体固定化层 14 中的荧光色素; 通过采用光接受元件(photo-acceptance element)测定荧光色素发出的荧光强度来分析测试样品溶液中抗原的量(例如, 参见日本公开专利申请(JP-A) No.8-285851)。

衰减波指的是一种位于光波导层和外层之间的界面附近的电磁波, 在该界面处光被全反射。除采用荧光色素标记测试样品的方法之外(参见例如 KOKOKU 公开号为 3-7270 的日本专利申请), 已知的采用衰减波进行测定的方法还包括检测由于测试样品中色素标记的物质(例如色素标记的次级抗体)吸收衰减波而导致的反射光的物理量(physical value)变化的方法。

然而, 在这些常规测定方法中, 当测试样品中待测物质的浓度很低时, 掺入到免疫复合物中的色素或荧光色素量变少, 使测定变得困难。因此, 检测反射光的物理量变化的光接收元件应当高度灵敏, 导致该元件很昂贵, 同时检测反射光的物理量变化的装置也变得复杂而庞大。

发明内容

参照上述现有状况, 本发明的一个目的在于提供一种利用酶反

应测定待测物质浓度的显色试剂、一种测定所述浓度的试剂盒、一种测定所述浓度的方法以及在该方法中使用的传感器芯片，其中5 μ L 或更少的体积非常小的测试样品溶液中的待测物质的浓度可在很短的时间内测定，即使是当所述测试样品的量不准确时，也能以很高的准确性迅速测定。

经过深入研究，本发明的发明人发现，上述目的也可通过在利用酶反应测定光密度的方法中使用当通过酶反应显色时形成酶反应产物沉淀的显色试剂，以及通过测定由沉淀的酶反应产物所造成的光物理量变化来实现。

也就是说，本发明提供了：

(1)一种至少含有一种着色底物和一种标记酶(labeling-enzyme)的底物的显色试剂，所述显色试剂通过酶反应形成显色并沉淀的酶反应产物；

(2)一种测定待测物质的浓度的试剂盒，包括一个在光波导层表面上具有固定了用于捕获待测物质的抗体的抗体固定化层的传感器芯片、标记酶标记的抗体、以及至少含有一种着色底物和一种标记酶的底物的显色试剂，所述显色试剂形成酶反应产物，其通过酶反应显色并沉淀，

其中所述传感器芯片、抗体和显色试剂分别被单独包装并组合在一起；

(3)一种使用传感器芯片测定待测物质的浓度的方法，所述传感器芯片具有一个光波导层，以及设置在所述光波导层表面上的抗体固定化层，所述方法包括：

将待测物质和采用标记酶标记的酶标记的抗体固定于所述传感器芯片的具有固定化抗体的抗体固定化层上；

通过使显色试剂与抗体固定化层上的标记酶反应，制备一种显

色的酶反应产物，将所述酶反应产物沉淀于所述抗体固定化层上；

使从外面照射(impinge)到传感器芯片上的光在光波导层和抗体固定化层之间的界面处被全反射；并且

观察全反射光的物理量；以及

(4)一种传感器芯片，包括一个能够通过全反射在层中传播光的光波导层，和一个在光波导层的使光能够被全反射的表面的至少一部分上形成的抗体固定化层。

附图简述

图 1 是显示传感器芯片的构造的示意图。

图 2 是根据本发明的实施方案的传感器芯片的一个例子的传感器芯片的顶视图。

图 3 是沿着图 2 中III标示的线的剖面图，显示根据本发明的传感器芯片的一个例子。

图 4 是显示制造根据本发明的实施方案的传感器芯片的过程的流程图。

图 5A 显示了制造根据本发明的实施方案的传感器芯片的过程中的一个步骤。

图 5B 显示了制造根据本发明的实施方案的传感器芯片的过程中的下一步骤。

图 5C 显示了制造根据本发明的实施方案的传感器芯片的过程中的下一步骤。

图 5D 是制造根据本发明的实施方案的传感器芯片的过程中的下一步骤。

图 5E 是制造根据本发明的实施方案的传感器芯片的过程中的下一步骤。

图 6 是显示使用根据本发明的实施方案的传感器芯片的测定方法的过程的流程图。

图 7A 描述了使用根据本发明的实施方案的传感器芯片的测定方法的过程中的一个步骤。

图 7B 描述了使用根据本发明的实施方案的传感器芯片的测定方法的过程中的下一步骤。

图 7C 描述了使用根据本发明的实施方案的传感器芯片的测定方法的过程中的下一步骤。

图 7D 描述了使用根据本发明的实施方案的传感器芯片的测定方法的过程中的下一步骤。

图 8 是显示使用本发明的方法的测定结果的曲线图。

图 9 是测定结果曲线图，显示了大鼠胰岛素的测定不依赖于实施例 1 中得到的样品体积。

图 10 是测定结果曲线图，显示了大鼠胰岛素的测定依赖于在实施例 1 中得到的样品体积。

图 11 显示了使用传感器芯片的测定值和实施例 2(大鼠全血)中使用传统的微孔板得到的测定值之间的相关性(校准曲线)。

图 12 显示使用传感器芯片的测定值和实施例 3(大鼠血浆)中使用传统的微孔板得到的测定值之间的相关性(校准曲线)。

图 13 是显示在实施例 4 中得到的酪蛋白的测定结果的曲线图。

图 14 是显示在实施例 5 中得到的 β -乳球蛋白的测定结果的曲线图。

图 15 是显示在实施例 6 中得到的卵清蛋白(ovoalbumin)的测定结果的曲线图。

图 16 是显示在实施例 7 中得到的主要荞麦蛋白复合物的测定结果的曲线图。

图 17 是显示在实施例 8 中得到的含花生 Arah2 的可溶性蛋白的测定结果的曲线图。

图 18 是显示在实施例 9 中得到的人胰岛素的测定结果的曲线图。

数字标记

- 1: 光波导层
- 10: 反应孔
- 11: 池
- 12: 池壁
- 13: 薄膜
- 13a: 入射光侧光栅
- 13b: 出射光侧光栅
- 14: 抗体固定化层
- 14a: 初级抗体
- 15: 疏液性(liquid-repelling)树脂膜
- 16: 基板
- 20: 测试样品溶液
- 20a: 抗原
- 21: 次级抗体溶液
- 21a: 次级抗体
- 22: 显色试剂溶液
- 22a: 显色试剂

实施本发明的最佳方式

下面按照待测物浓度测定试剂盒、作为浓度测定试剂盒的组成元件的显色试剂和传感器芯片、以及使用它们进行浓度测定的方法

的顺序来描述本发明的实施方案。

(浓度测定试剂盒)

本发明用于待测物质的浓度测定试剂盒(此后称为浓度测定试剂盒或简称为试剂盒)构造为使显色试剂通过酶反应显色并沉淀。

本发明的浓度测定试剂盒包括一个提供将待测物质捕获于光波导表面上的抗体固定化层的传感器芯片、用酶标记的抗体原液、以及含有着色底物和标记酶并生成通过酶反应显色并形成沉淀的酶反应产物的显色试剂，这些成分单独包装并组合。

有利地，本发明的浓度测定试剂盒用于夹心(sandwich) ELISA。

待测物质的例子包括血液、血清、血浆、生物样本和食物中所含的蛋白质、肽和基因。它们的具体例子包括但不限于：胰岛素、酪蛋白、 β -乳球蛋白、卵清蛋白、降钙素、C-肽、瘦蛋白(leptin)、 β -2-微球蛋白(β -2-microglobulin)、lethiol-结合蛋白、 α -1-微球蛋白、 α -胎球蛋白、癌胚抗原、肌钙蛋白-I、胰高血糖素样肽、胰岛素样肽、肿瘤生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板生长因子、上皮细胞生长因子、半抗原激素(如皮质醇、三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素)、药物如地高辛和茶碱、感染性物质如细菌和病毒、肝炎抗体和 IgE、以及荞麦的主要蛋白复合物和含有花生 Arah2 的可溶性蛋白。

有利地，本发明可用于测定分子量为 5000 或更大的蛋白质的浓度。特别地，当抗原为胰岛素特别是来源于人、小鼠、大鼠或仓鼠的胰岛素，或者为食物中含有的蛋白质特别是酪蛋白、 β -乳球蛋白、卵清蛋白、荞麦的主要蛋白复合物和含有花生 Arah2 的可溶性蛋白时，本发明尤其适用。

待测物质的浓度没有特别限制，并可直接使用血浆、血清和全血。

在本发明的浓度测定试剂盒的优选实施方案中，通过将下述物质分别包装于单独容器中来提供试剂盒：具有用于将待测物质捕获于光波导表面上的抗体固定化层的传感器芯片、酶如辣根过氧化物酶标记的抗体原液(也含有载体蛋白、表面活性剂和缓冲液)、显色试剂(其中着色底物(例如对联苯胺显色试剂)和用于标记酶的底物(例如过氧化氢)混合在一起)、待测物质的对照物和用于洗涤基板的缓冲生理盐水。

例如，胰岛素测定试剂盒包括一套 8 个具有用于将待测物质捕获于光波导表面上的抗体固定化层的传感器芯片、酶标记的抗胰岛素抗体原液、酶标抗胰岛素抗体的稀释液(缓冲液或者缓冲液与表面活性剂组合的溶液)、显色试剂溶液(其中含有着色底物的试剂和标记酶的底物混合(含有 H_2O_2 的溶液和 TMBZ 溶液))、稀释测试样品的溶液、对照胰岛素(冻干粉)、洗涤液(例如缓冲液和表面活性剂组合的溶液、含表面活性剂的磷酸盐缓冲的生理盐水(PBS)、Tris 缓冲盐水、以及 Good's 缓冲液缓冲的生理盐水)、以及磷酸盐缓冲液。这些成分单独包装并组合。更优选地，如果需要，棉布、暂时放置传感器芯片的平板，带分支的微量移液管(8 个接头(8-connected)移液管)，小钳子和反应培养皿也组合于试剂盒中。胰岛素对照溶液通过将冻干的对照胰岛素溶解于纯化的水中来制备。

(显色试剂)

本发明的显色试剂至少含有一种着色底物和标记酶底物，其主要特征在于产生通过酶反应显色并沉淀的酶反应产物。所述显色试剂溶解于缓冲液中，当需要时用作含表面活性剂和有机溶剂的显色试剂溶液。

本发明的显色试剂的优选实施方案是基于联苯胺

(benzidine-base)的显色试剂,包括作为着色底物的联苯胺和作为标记酶底物的过氧化氢。

优选的基于联苯胺的显色试剂的例子包括 4-氯-1-萘酚、3, 3'-二氨基联苯胺和 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺。从测定灵敏度的角度而言,在这些显色试剂中优选 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(此后缩写为 TMBZ)及其盐酸盐(3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 · 2HCl · 2H₂O)。盐形式的基于联苯胺的显色试剂可直接加入水性介质中,非盐形式的显色试剂可在将其溶解于少量有机溶剂之后加入水性介质中。溶剂可稀释到不影响溶液的性能的程度。这些联苯胺显色试剂可单独使用,也可至少两种以上组合使用。

例如,过氧化物可采用过氧化氢。

尽管用作标记酶的氧化还原酶没有特别限制,它们的例子包括活性酶,例如从辣根、牛奶和白细胞中提取的过氧化物酶和过氧化氢酶。其中特别优选辣根过氧化物酶。

由于可商业购买的用于传统 ELISA 的显色试剂(例如可商业购买的用于 ELISA 的基于联苯胺的显色试剂)几乎不溶于水,将它们溶于含有机溶剂例如甲醇、1-甲基-2-吡咯烷酮或者二甲基亚砜的水性溶液中。然而,在本发明中可对底物的种类和比例、有机溶剂的比例和 pH 进行调节,使酶反应产物沉淀于光波导表面上。

显色试剂溶液按照如下步骤制备。

当基于联苯胺的显色试剂用作着色底物,并且过氧化氢用作标记酶底物时,显色试剂溶液中基于联苯胺的显色试剂和过氧化氢的浓度可根据测定方法和显色的反应条件适当确定。显色试剂溶液中基于联苯胺的试剂的含量通常为 0.1 到 10mmol/L,优选 0.5 到 5mmol/L,同时显色试剂溶液中过氧化氢的含量通常为 0.1 到 10mmol/L,优选 0.5 到 5mmol/L。

作为显色试剂的溶剂的缓冲液的 pH 没有特别限制,只要其位于 3.5 到 7.0 的范围即可,优选 4.5 到 6.0。例如,已知的缓冲溶液,如醋酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、tris 缓冲液和各种 Good's 缓冲液均可采用。缓冲液的特定例子包括邻苯二甲酸氢钾/氢氧化钠缓冲液、柠檬酸二钠/盐酸缓冲液、柠檬酸二氢钾/氢氧化钠缓冲液、琥珀酸/四硼酸钠缓冲液、柠檬酸氢钾/四硼酸钠缓冲液、磷酸二氢钠/柠檬酸缓冲液、醋酸钠/盐酸缓冲液和醋酸/醋酸钠缓冲液。显色试剂溶液中缓冲液的优选浓度为 0.1 到 100mmol/L,特别是 1 到 50mmol/L。

为了制备显色试剂溶液,可直接将基于联苯胺的显色试剂(着色底物)加入到水性介质例如缓冲液中,或者可加入含有以高浓度溶解于另一种溶剂中的基于联苯胺的显色试剂的溶液。尽管本发明的显色试剂溶液通过将过氧化物(标记的酶的底物)加入到上述溶液中获得,但制备显色试剂溶液的方法并不仅限于此。

如果需要,可将帮助并稳定显色的成分例如螯合剂或者三聚磷酸盐加入到显色试剂溶液中。

可利用的表面活性剂没有特别限制,任何阳离子、阴离子、非离子和两性表面活性剂均可采用。其中优选非离子表面活性剂,以保持酶的活性。

非离子表面活性剂的例子包括那些多羟基醇和聚乙二醇种类。多羟基醇型非离子表面活性剂的例子包括脂肪酸甘油酯、脂肪酸山梨聚糖酯、脂肪酸戊赤藓糖醇酯和脂肪酸蔗糖酯。在将环氧乙烷加入到聚乙二醇型非离子表面活性剂时,还可加入在水中保持溶解的范围内的氧化丙稀(propyleneoxide)。

其中,特别优选脂肪酸山梨聚糖酯。用于脂肪酸山梨聚糖酯的脂肪酸包括月桂酸、棕榈酸、硬脂酸和油酸。可从 Atlas Powder

Co.(USA)商购的商品名为 Tween 20、Tween 40、Tween 60 和 Tween 80 的脂肪酸山梨聚糖酯可用作脂肪酸山梨聚糖酯。也可商购商品名为 Tergito 17、Irgasan 和 Monesin 的其它产品。加入到显色试剂溶液中的这些表面活性剂的范围通常为 0.01 到 50mg/mL，优选 0.5 到 10mg/mL。

其它可商购的作为其它用途而不能用于传统 ELISA 的显色试剂可用作本发明的显色试剂。例如，可商购的用于其它免疫化学测定方法例如免疫印迹法的显色试剂(如购自 Roche Diagnostic GmbH 的 BM Blue POD Substrate Precipitating 1-442-066 和购自 MOSS, Inc.的 TMBM Peroxidase Substrate)可作为在膜上固定的显色试剂用于酶联免疫测试法。

(传感器芯片)

本发明的传感器芯片包括一个能通过全反射将光传播到层中的光波导层，和在使光产生全反射的光波导层的至少部分表面上形成的抗体固定化层。优选的传感器芯片包括一个在光波导层的表面上形成的疏液性膜，该膜具有一个高于抗体固定化层水平的表面，并具有暴露至少一部分所述抗体固定化层的反应孔。优选的传感器芯片还包括构成粘附于光波导层表面的池(cell)的框架元件(frame member)，该框架元件具有从疏液性膜凸起并环绕所述反应孔的顶端。

传感器芯片优选包括通过围绕所述抗体固定化层形成池的池壁，并且反应孔形成于所述池中。使用这种传感器芯片，可以高灵敏度以及高准确度分析测试样品溶液中极少量的待测物质。

根据本发明的一个实施方案的传感器芯片显示于图 2 和 3 中。图 2 和 3 中显示的传感器芯片包括一个由硼硅酸盐玻璃制成的基板

16、分别位于基板 16 两侧表面上的入射侧光栅 13a 和出射侧光栅 13b、和一个设置于它们之间的抗体固定化层 14。该传感器芯片还包括围绕所述抗体固定化层 14 的池壁 12 以形成池 11。具有反应孔 10 的疏溶剂树脂膜 15 设置于池 11 的底面上，入射侧光栅 13a、出射侧光栅 13b 和抗体固定化层 14 上的上表面除外。这种传感器芯片与激光振荡器以及接收反射光的光电转换元件组合使用。

抗体固定化层 14 的厚度(从光波导表面到抗体固定化层的抗体表面的距离)优选为 30nm 到 500nm，更优选 100nm 或更少，特别优选 80nm 或更少。

当在反应孔 10 中进行酶反应以形成显色并沉淀于本发明的传感器芯片中的酶反应产物时，小到大约 1 μ L 的测试样品溶液的体积对检测来说就足够了。

通过提供池壁 12，可防止每个装置由于在仪器上进行试剂处理而被腐蚀。框架元件的尺寸和高度、开口的形状以及框架元件的材料可基于使用的方便自由确定，只要池壁 12 构造为不与检测试剂盒中所含的试剂发生反应即可。

形成框架元件的池壁优选由有色树脂制成，例如黑树脂(black resin)。有色树脂的材料没有特别限制，只要它不与试剂及溶剂反应并与其相容，并具有很好的模压性能。基于试剂盒的组成，可选择并使用丙烯酸树脂和 ABS 树脂。

构成池壁 12 的框架元件可采用 UV 固化的粘合剂(UV curable adhesive)直接键合于构成基板 16 的形成光波导层的全反射面的主表面上，从而使开口的一端封闭。为了围绕测试区域，提供池壁 12，使注入反应孔 10 中的试剂溶液例如试剂和测定样品溶液以及清洗液体不会泄露到外面。相应地，由框架元件顶端所限定的到基板表面的高度(厚度)调节为高于疏液性树脂膜 15 的高度。

提供疏液性树脂膜 15，使其覆盖构成基板 16 的全反射面的主表面表面中抗体固定化层 14 的至少一部分，以及除了池壁 12 区域以外的所有剩余部分。优选使用光屏蔽有色树脂如黑色树脂作为疏液性树脂 15，使从基板 16 下面照射的光不会泄露到外面。尽管疏液性树脂没有特别限制，只要它不与试剂盒中的溶剂发生反应并可与其相容，并具有较好的疏液或疏水特性即可，但是优选氟化树脂。

入射侧光栅 13a 和出射侧光栅 13b 优选由氧化钛(TiO_2)、氧化锡(SnO_2)、氧化锌、铈酸锂、砷化镓(GaAs)、氧化铟锡(ITO)和聚酰亚胺制成。

虽然光栅 13a 和 13b 具有引导并使激光照射到传感器的光学功能，但如果可采用其它元件来获取相同的功能，该功能并不总是必要的。其它光学元件例如棱镜也可使用，只要它能实现相同的功能。

抗体固定化层 14 具有例如其中抗体通过交联聚合物固定的结构。在抗体固定化层 14 中使用的交联聚合物的例子包括具有氢键键合功能基团的聚合物，例如光交联(photocross-linking)聚乙烯醇。由于抗体常常是亲水的，所述抗体固定化层也优选为亲水的。

(传感器芯片的制造方法)

制造传感器芯片的过程参照图 4、5A 到 5E 及图 6 进行描述。

S10: 如图 5A 中所示，通过将例如氧化钛通过溅射(sputtering)或者旋涂(spin coating)沉积于由硼硅玻璃制成的基板 16 的表面上形成薄膜。

S11: 随后，如图 5B 所示，通过光蚀刻对薄膜选择性蚀刻，在基板两侧的表面形成入射侧光栅 13a 和出射侧光栅 13b 图案。通过该步骤形成带光栅的厚度为 $1\mu\text{m}$ 的光波导层。

S12: 然后，如图 5C 所示，将疏液性树脂层 15 例如光屏蔽有色

氟化树脂层印制于基板 16 的表面除反应孔 10 和池壁 12 部分以外的部分，以形成氟化树脂膜。

S13: 然后，如图 5D 所示，提供由黑色丙烯酸树脂制成的池壁 12，使其围绕反应孔 10。池壁采用 UV 固化的粘合剂与基板 16 键合以形成池 11。

S14: 随后，在反应孔 10 中形成抗体固定化层 14，如图 5E 中所示。特别地，(1)采用氨基硅烷作为硅烷偶合剂，通过硅烷偶合处理，将基板 16 的表面用氨基修饰；(2)然后将基板表面用戊二醛处理，以通过交联将抗体固定在基板 16 上；以及(3)最后用牛血清白蛋白(BSA)封闭过量的氨基基团，形成抗体固定化层 14。

(测定待测物质的浓度的方法)

使用具有光波导层和在光波导层的表面上形成的抗体固定化层的传感器芯片测定待测物质的浓度的方法包括：通过将测试样品溶液和酶标记抗体溶液滴加到抗体固定化层上、并使抗原抗体反应、将测试样品固定到传感器芯片的抗体固定化层上；将显色试剂溶液滴加到抗体固定化层上，使酶反应产物沉淀到抗体固定化层中；使从外面照射到传感器芯片上的光在光波导层和抗体固定化层之间的界面处被全反射；并观察全反射光的物理量。

换言之，根据本发明的测定浓度的方法包括如下步骤：在由光透射基板制成的光波导层的表面上形成抗体固定化层，其上固定有第一抗体；使用所述抗体固定化层固定待测物质；使酶标次级抗体与待测物质发生反应；以及通过加入显色试剂得到酶反应产物，所述显色试剂基于被固定的待测物质的量而改变所述反应的量。当在酶反应产物存在的区域光被全反射时，与酶反应产物的量相应，在光波导层中传播的全反射光的衰减波的物理量发生变化，例如光强

衰减。待测物质(测试样品)的浓度测定可通过观察酶反应产物存在和不存在两种情况下光的物理量的变化来进行。

当使用含有标记酶底物和着色底物的传统显色试剂溶液时，由于显色后色素是可溶解的，显色后色素扩散到整个显色试剂溶液中。在这种情况下，不能采用到达深度仅为大约离基板表面 $2\mu\text{m}$ 的衰减波来充分测定检测色素的吸收和扩散。

相应地，在本发明的方法中使用在酶反应之后酶反应产物沉淀的显色试剂溶液。由于酶反应产物沉淀于抗体固定化层上，并且衰减波可在抗体固定化层被全反射，所以从光波导层表面到抗体固定化层表面的距离(抗体固定化层的厚度)优选调节到 30 到 500nm，更优选到 100nm 或更少，特别优选到 80nm 或更少。

进行酶反应的温度优选为用于标记抗体的酶反应的最佳温度。例如，当使用过氧化物酶时，所述温度通常为 20 到 50°C 。

在测定中使用的测试样品的量可以是给定量或者更多，以通过利用在光渗透基板表面上的初级反应、次级反应和酶反应后的衰减波探测光波导层附近的信息。即使当在测定中使用测试样品的量不准确，仍可确定待测物质例如胰岛素的浓度。

不仅如同在使用微孔板的传统方法中那样对透射光强度进行测定，而且在本发明的方法中，通过在抗体固定化层中由全反射引起的衰减波的吸收，还可观察反射光的物理量变化。相应地，进行测定所需的表面积很小，能够通过使用 $0.5\mu\text{L}$ 或更少的测试样品，通常通过使用 1.0 到 $5\mu\text{L}$ 的测试样品，以及在合适的条件下通过使用 1.0 到 $2\mu\text{L}$ 的测试样品进行测定。

当在测定中使用的测试样品的量很小时，反应时间可缩短。初级反应在 1 小时内完成，或者在适当的条件下可在 20 分钟内完成，或者在最佳条件下可在 10 分钟内完成，次级反应和酶反应在 20 分

钟内完成，或者在合适的条件下大约 10 分钟内完成。因此，可能将测定待测物质的浓度的全部测定时间减小到 1 小时内，或者在合适的条件下减小到 20 分钟内。

在全反射光的物理量的测定中，仅仅检测全反射光的物理量的变化就足够了。相应地，不仅全反射光的零级光，而且衍射光或者更高级的全反射光例如一级和二级光也可使用适当的现象或方法来观察。

(测定胰岛素的方法)

通过下述方法测定大鼠胰岛素的浓度。

首先，将传感器芯片排列在临时放置芯片的平板上，每种测试样品溶液在传感器芯片的孔(图 2 和 3 中的池 11)的中央滴加 1 μ L，并使样品在室温下反应(初级反应)10 分钟，同时将测试样品保持在池的中央。

然后，使用 8-接头移液管清洗每个传感器芯片的池。

随后，每种通过将酶标记的豚鼠抗大鼠胰岛素溶液和酶标记的豚鼠抗大鼠胰岛素稀释液混合配制成的溶液向每个池中滴加 20 μ L，并使样品在室温下反应(次级反应)10 分钟。

清洗每个芯片的池后，将 25 μ L 的磷酸盐缓冲液滴加到每个芯片的池中。

随后，将次级反应后的芯片放置在浓度测定仪器中，使用通过光波导进行免疫测定的浓度测定仪器来确定通过在每个孔中加入磷酸盐缓冲液得到的初始值。

除去磷酸盐缓冲液，并在每个池中滴加 20 μ L 每种含着色底物和标记酶的底物的显色试剂溶液以进行酶反应。使用浓度测定仪器后将激光照射到传感器芯片上，经过抗体固定化层吸收能量后的激光

的物理量通过用所述浓度测定仪器的硅光电二极管接收光来测定。该测定可随时间变化重复多次，得出时间依赖性(time-dependent)变化。

使用传感器芯片通过夹心 ELISA 的测定方法的机制通过图 6 和 7A 到 7D 在下面更详细地描述。

S20: 如图 7A 所示，在传感器芯片的反应孔 10 的基板 16 表面上形成包括特异性识别作为待测物质如蛋白质或基因的抗原 20a 的初级抗体 14a 的抗体固定化层 14。将含有抗原 20a 的测试样品溶液 20 (1.0 到 5 μ L)滴加到反应孔 10 中的抗体固定化层 14 上。然后，如图 7B 所示，抗原 20a 与初级抗体 14a 结合，形成初级抗体/抗原复合物。

S21: 然后，用含有增强清洗效果的表面活性剂的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗去不含固定在初级抗体 14a 上的抗原 20a 的测试溶液 20。

S22: 然后滴加酶标记的次级抗体溶液 21。可利用的酶标记次级抗体是辣根过氧化物酶标记的次级抗体，其包含于 Tris-HCl 缓冲液(pH6.0 到 9.0，优选 7.0 到 8.0)中，所述缓冲液具有包括体积比为 0.1 到 5%，优选体积比为 0.3 到 1.5%的不含胰岛素的鼠血清、体积比为 0.01 到 1%，优选体积比为 0.05 到 0.1%的 Tween 20 (Atlas Powder Co.生产)、以及 0.1 到 1mol，优选 0.1 到 0.2 mol 的 NaCl 的组成。

当滴加酶标记的次级抗体溶液 21 后，次级抗体 21a 另外在与初级抗体 14a 的结合位点不同的结合位点与抗原 20a 结合，如图 7C 所示。结果，形成由初级抗体/抗原/次级抗体构成的免疫复合物。氧化还原酶例如过氧化物酶可用作在次级抗体 21a 上标记的标记酶。

S23: 随后，使用清洗液例如含表面活性剂的磷酸盐缓冲液再次洗去含没有形成免疫复合物的次级抗体 21a 的次级抗体溶液 21。

S24: 接下来, 将用于洗涤的表面活性剂除去, 并仅仅注入磷酸盐缓冲液来稳定免疫复合物。

S25: 将激光照射到传感器芯片的入射侧光栅 13a, 激光在光波导层中传播以从光波导层的表面产生衰减波。传播的光用光接收元件接收作为出自出射侧光栅 13a 的反射光, 并测定光强度作为对照反射光强度。

S26: 随后, 除去 S24 中注入的磷酸盐缓冲液, 并如图 7D 所示, 在池 11 中滴入显色试剂溶液 22。优选使用的显色试剂溶液 22 含有醋酸、TMBZ、过氧化氢(H_2O_2)和少量的有机溶剂如二甲亚砜。通过标记酶例如过氧化物酶(POD)与作为标记酶(POD)的底物的 H_2O_2 的氧化还原酶反应产生自由基氧原子(O^*)。显色试剂 22a 被所述酶反应产生的自由基氧原子(O^*)氧化, 并且 TMBZ 的 $-NH_2$ 基被氧化成 $=NH$ 基, 产生蓝绿色(bluish-green color)。被氧化的显色试剂不溶解, 并沉淀于抗体固定化层 14 上(基板 16 的表面)。

S27: 随后, 如测量对照反射光强度那样, 将激光照射到传感器芯片上。当所述激光从光发射元件照射到传感器芯片的入射侧光栅 13a 时, 入射的激光通过全反射穿过入射侧光栅 13a 传播到作为光波导层的基板 16 中。当所述激光被全反射时, 在光波导层的表面上产生衰减波。所述衰减波被沉淀的酶反应产物吸收。这种作用使传播的光产生轻微变化。来自出射侧光栅 13b 的反射光被光接收元件感知, 并测定显色后的反射光强度。

S28: 确定 S25 中测定的对照反射光强度与 S27 中显色后的反射光强之间的差异, 并计算测试样品溶液 20 中作为待测物质的抗原 20a 的浓度, 来确定测试样品溶液中的待测物质的浓度。

根据本发明的方法, 显色试剂溶液 22 显色, 同时通过抗体固定化层 14 上的酶反应, 显色试剂 22a 作为酶反应产物沉淀于抗体固定

化层 14 上。接下来，在基板 16 的表面上产生的衰减波能可靠地在光波导层和抗体固定化层之间的界面被吸收。因此，由于可检测到通过光波导层传播的光的非常细微的变化，即使当样品溶液中样品的量非常少，也能进行高度灵敏的测定、分析及定量。

图 8 中显示的曲线图通过使用本发明的方法连续测定反射光强度得出。确定对照反射光强度作为 A 点的值，测定显色后的反射光强度作为 B 点的值，然后计算浓度。因此，不需要通过使用不含抗原的溶液进行对照实验来测定对照反射光的强度。

根据本发明的测定方法，当光在抗体固定化层的沉淀区域被全反射时，测定衰减波的反射光的物理量的变化，来代替传统方法中测定微孔板的孔中的反射光强度。相应地，使用小到 5 μ L 或更少的测试样品，待测物质的浓度可以高灵敏度、高准确度地被迅速测定。此外，即使当用于测定的测试样品的量分布在 1.0 到 5 μ L 的范围时，本发明的方法与传统 ELISA 的相关性也非常好，并且得出的待测物质的浓度具有极好的可重复性。

由于测试样品的量很少，缩短了测定时间。全部测定时间在 1 小时之内，或者在合适的条件下可在 20 分钟之内。

色素的选择性沉淀使得可对色素进行选择性的检测。由于测定几乎不受到非选择性吸附的蛋白质的影响，因此含有多种成分样品如血液可稳定地测定。

在本发明的方法可用于夹心 ELISA 的同时，它还可用于不同于夹心 ELISA 的其它 ELISA。

下面参照实施例对本发明的方法进行更详细地描述，但本发明的方法并不限于这些实施例。

实施例 1

使用图 1 中显示的传感器芯片测定浓度。将抗胰岛素抗体固定在透明玻璃基板上的反应孔 10 中的抗体固定化层 14(直径为 2mm 的圆形中)上。

将大鼠胰岛素溶液(10ng/mL)作为测试样品滴加到抗体固定化层 14 上,其体积在 0.5 到 2 μ L 范围内变化。在室温下进行初级反应 10 分钟后,用磷酸盐缓冲生理盐水(含有 1%的非离子表面活性剂(Tween 20; Atlas Powder Co.生产))洗涤玻璃基板的表面。滴加辣根过氧化物酶标记的次级抗体溶液(含有体积比为 1%的不含胰岛素的鼠血清、体积比为 0.05%的 Atlas Powder Co.生产的 Tween 20, 以及 0.15mol pH7.4 的 NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液),在室温下使样品进行 10 分钟次级反应。次级反应后,用上面描述的缓冲液洗涤反应系统后,接着用 pH6.0 的磷酸缓冲液洗涤以测定作为对照值的对照光强度。测定后,滴加显色试剂溶液(四甲基联苯胺 1.1mmol/L、过氧化氢 1.9mmol/L、体积比为 1%的二甲亚砷、的醋酸缓冲液 80mmol/L, pH4.9),并保持溶液 10 分钟。

随后,通过入射侧光栅将测定激光引入玻璃基板,并使其在抗体固定化层的圆形区域(感光区)的背面被全反射。由于反射光通过出射侧光栅照射到玻璃基板外,使用光接收元件(光电二极管)测定照射强度。在全反射后,响应于全反射过程中照射到感光区中的衰减波的吸收和反射,光通量强度发生变化。相应的,酶反应前的反射光强度与酶反应后的反射光强度之间的比值(此后称为降低率(reduction ratio))与待测物质(胰岛素)的浓度相关。

通过改变测试样品的量得到的测定结果显示于图 9 中。测试样品的量沿着水平轴作图,降低率沿着垂直轴作图。在测试样品的量为 1 μ L 或更多时,降低率几乎不变,这显示即使当在测定中使用的

测试样品的量不准确时,仍可测定胰岛素的浓度,或者说结果不依赖于测试样品的量。

当测试样品的浓度变化时的测定结果显示于图 10。当胰岛素浓度沿着水平轴作图,降低率沿着垂直轴作图时,得到了相关系数(R^2)为 0.998 的近似线性的校准曲线。该校准曲线由线性函数 $y=3.8902x+1.5581$ (其中 x 代表胰岛素的浓度, y 代表降低率)近似地表示。

实施例 2

通过与实施例 1 中相同的方法,使用大鼠全血作为测试样品来测定胰岛素浓度。研究了该结果与传统 ELISA 的结果之间的相关性。结果显示于图 11 中。如图 11 所示,得到了一条相关系数(R^2)为 0.9919 的很好的线性校准曲线。该校准曲线由线性函数 $y=0.9658x+0.1759$ (其中 x 代表通过传统 ELISA 测定的值, y 代表本发明的方法的测定值)近似地表示。

传统 ELISA 测定如下。

在将 95 μ L 包括不含胰岛素的大鼠血清的缓冲液分配到固定有抗体的微孔板中之后,分配 5 μ L 大鼠全血血清或 5 μ L 的对照胰岛素稀释液,其中胰岛素浓度为 0 到 5000pg/mL,并使样品在室温下反应 1 小时。接着,在对孔进行洗涤之后,将过氧化物酶标记的抗体加入到每个孔中,并使样品在室温下反应 1 小时。在对孔进行洗涤之后,加入 100 μ L 显色试剂溶液(H_2O_2 , TMBZ 溶液),并使样品在室温下避光反应 40 分钟。在加入 50 μ L 酶反应终止液使酶反应终止之后,在主波长为 450nm 和次波长为 630nm 下使用微孔板阅读仪测定孔的吸收。

实施例 3

通过与实施例 1 中相同的方法，使用大鼠血浆作为测试样品来测定胰岛素浓度。研究了该结果与实施例 2 中描述的传统 ELISA 结果之间的相关性。结果显示于图 12 中。如图 12 所示，得到了一条相关系数(R^2)为 0.9969、线性良好的校准曲线。该校准曲线可由线性函数 $y=0.8508x+0.195$ (其中 x 代表通过传统 ELISA 测定的值， y 代表本发明的方法测定的值)近似地表示。

实施例 4

通过与实施例 1 中相同的方法，使用 $2\mu\text{L}$ 浓度为 50ng/mL 的酪蛋白抗原溶液作为测试样品，抗酪蛋白抗体作为初级抗体，酶标记抗酪蛋白抗体作为次级抗体，来测定反射光强度的变化。

反射光通过出射侧光栅照射到玻璃基板外；其强度用光接收元件(光电二极管)进行测定；并且获取相对于空白值(45.0%)的具有显著强度的传感器输出信号。结果显示于图 13 中。

实施例 5

通过与实施例 1 中相同的方法来测定反射光强度的变化，但使用 β -乳球蛋白代替实施例 4 中的酪蛋白，抗 β -乳球蛋白抗体作为初级抗体以及酶标记抗 β -乳球蛋白抗体作为次级抗体。相对于空白值的传感器输出信号为 11.70%。结果显示于图 14 中。

实施例 6

通过与实施例 1 中相同的方法来测定反射光强度的变化，但使用卵清蛋白代替实施例 4 中的酪蛋白，抗卵清蛋白抗体作为初级抗体以及酶标记抗卵清蛋白抗体作为次级抗体。相对于空白值的传感

器输出信号为 34.6%。结果显示于图 15 中。

实施例 7

通过与实施例 1 中相同的方法来测定反射光强度的变化，但使用荞麦的主要蛋白复合物代替实施例 4 中的酪蛋白，抗荞麦主要蛋白复合物抗体作为初级抗体以及酶标记抗荞麦主要蛋白复合物抗体作为次级抗体。相对于空白值的传感器输出信号为 30.8%。结果显示于图 16 中。

实施例 8

通过与实施例 1 中相同的方法来测定反射光强度的变化，但使用含花生 Arah2 的可溶性蛋白代替实施例 4 中的酪蛋白，抗花生 Arah2 可溶性蛋白抗体作为初级抗体以及酶标记花生 Arah2 可溶性蛋白抗体作为次级抗体。相对于空白值的传感器输出信号为 27.4%。结果显示于图 17 中。

实施例 9

在实施例 1 中，使用人胰岛素溶液作为测试样品测定了人胰岛素的浓度。结果显示于图 18 中。

当胰岛素浓度沿着水平轴作图，降低率沿着垂直轴作图时，如图 18 所示，得到了一条具有很好的相关系数(R^2)为 0.9908 的线性校准曲线。该校准曲线由线性函数 $y=8.6108x+1.5289$ (其中 x 代表胰岛素的浓度， y 代表降低率)近似地表示。

工业实用性

采用本发明的显色试剂、浓度测定试剂盒和传感器芯片，处于

具有 5 μ L 或更小的相当小体积的测试样品溶液中的待测物质的浓度
可以高灵敏度、高准确度地被迅速测定，并可很好的重复。

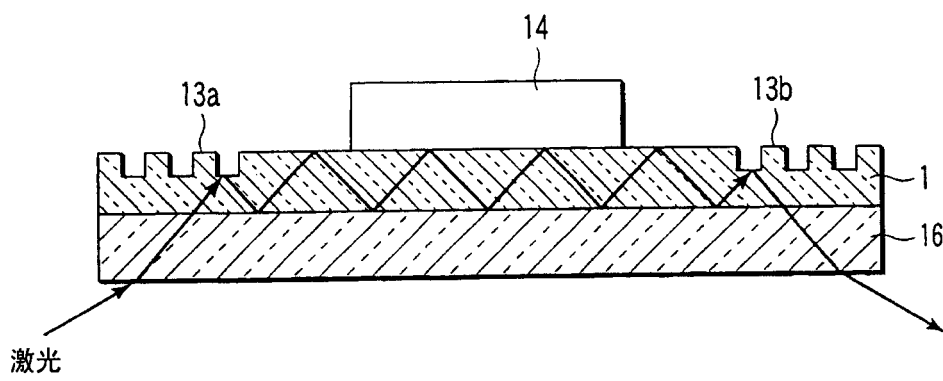


图1

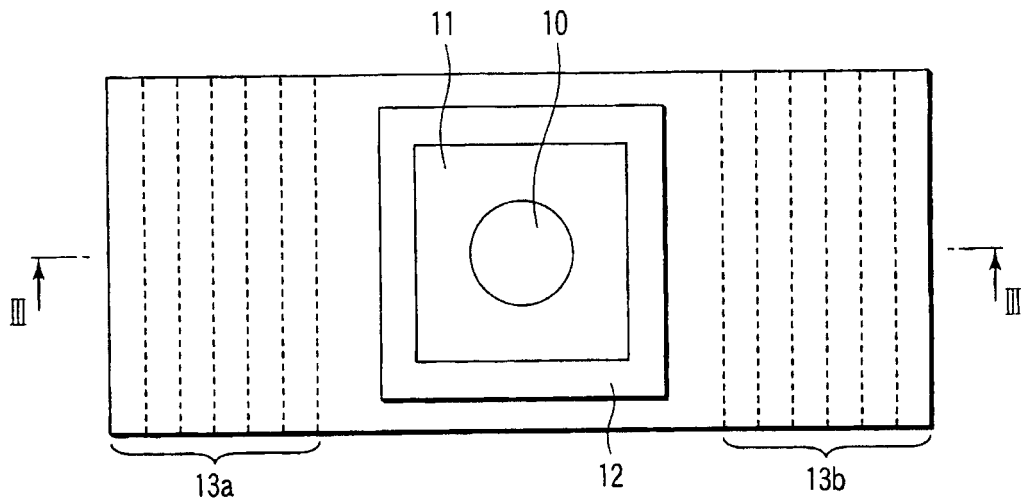


图2

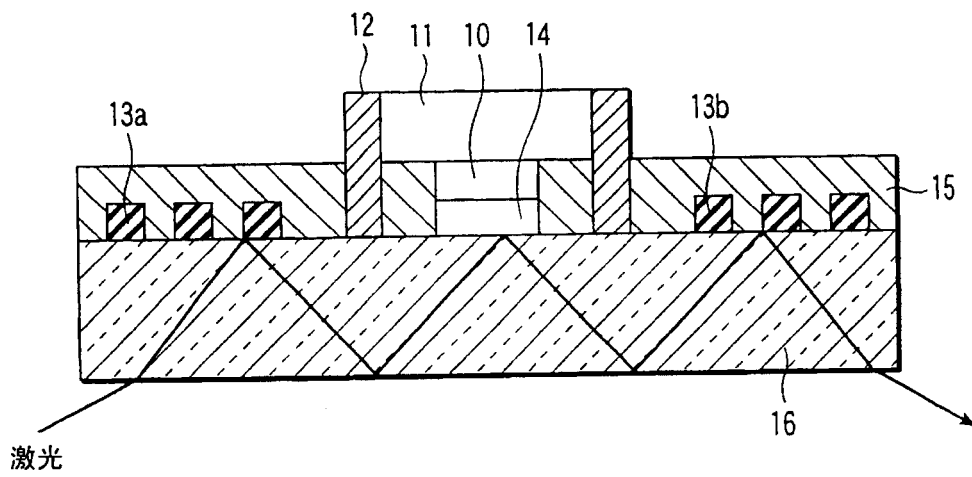


图3

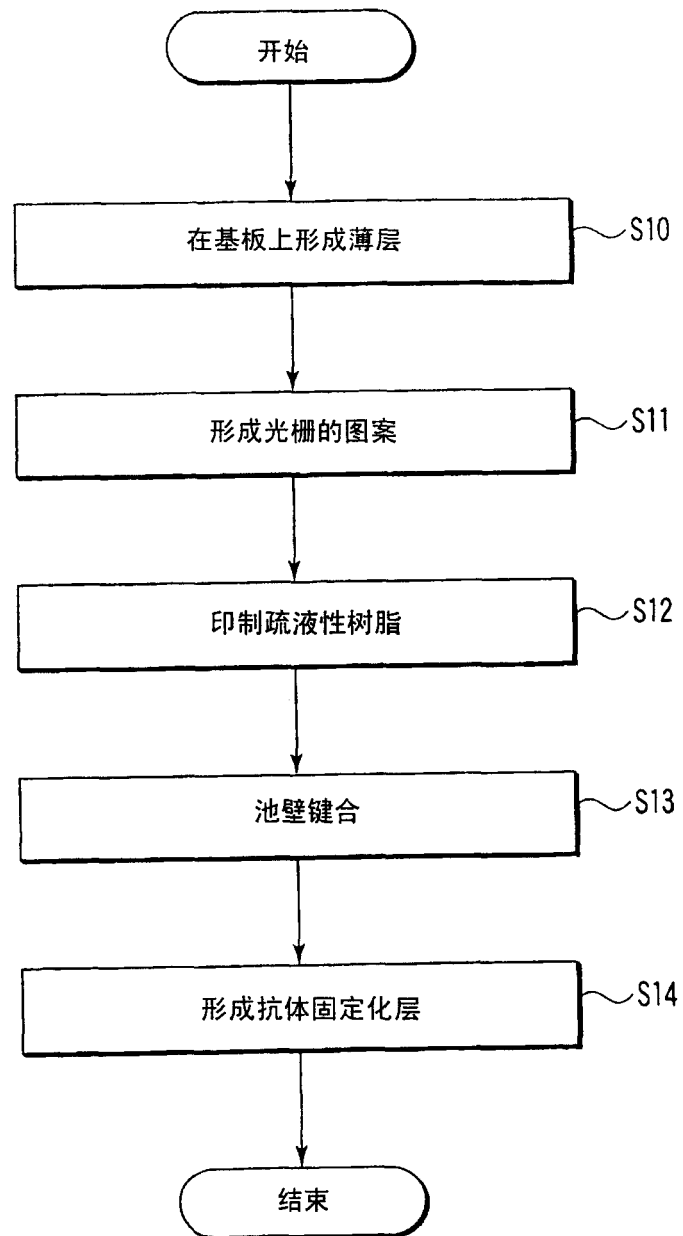


图4

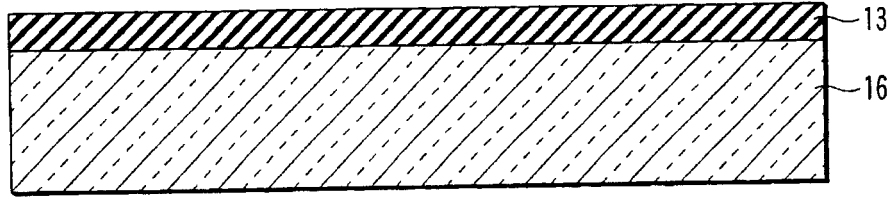


图5A

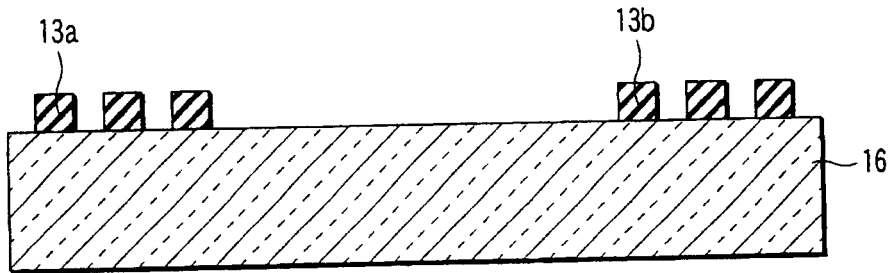


图5B

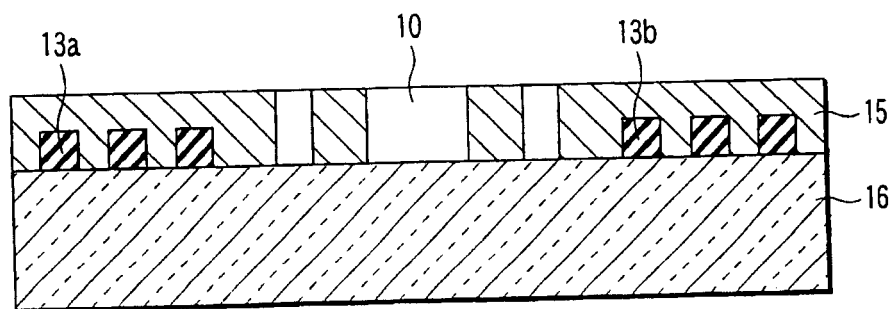


图5C

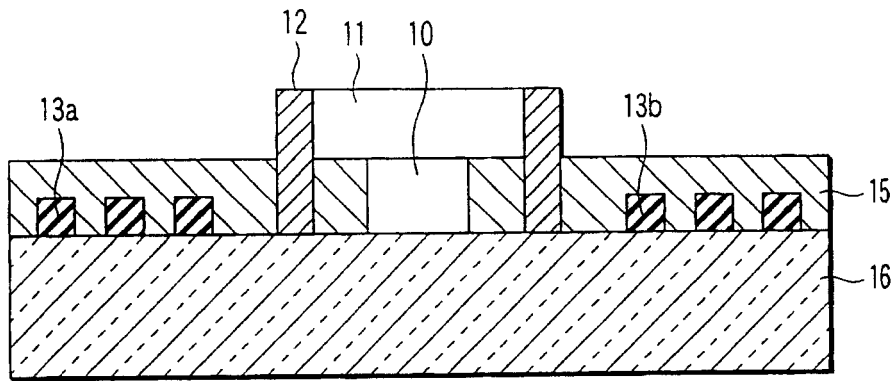


图5D

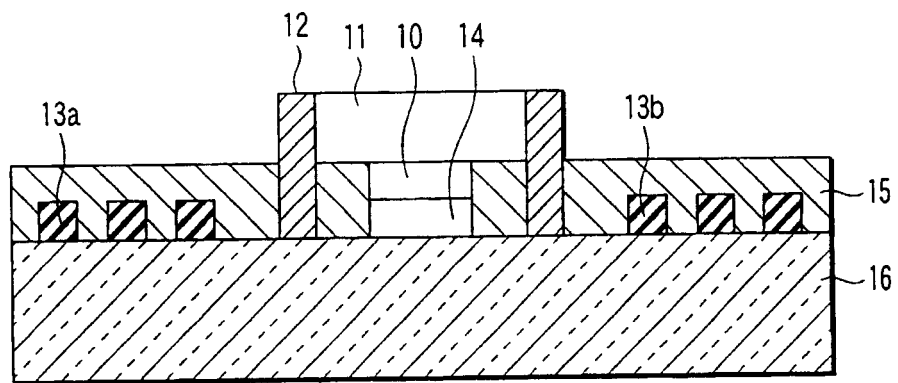


图5E

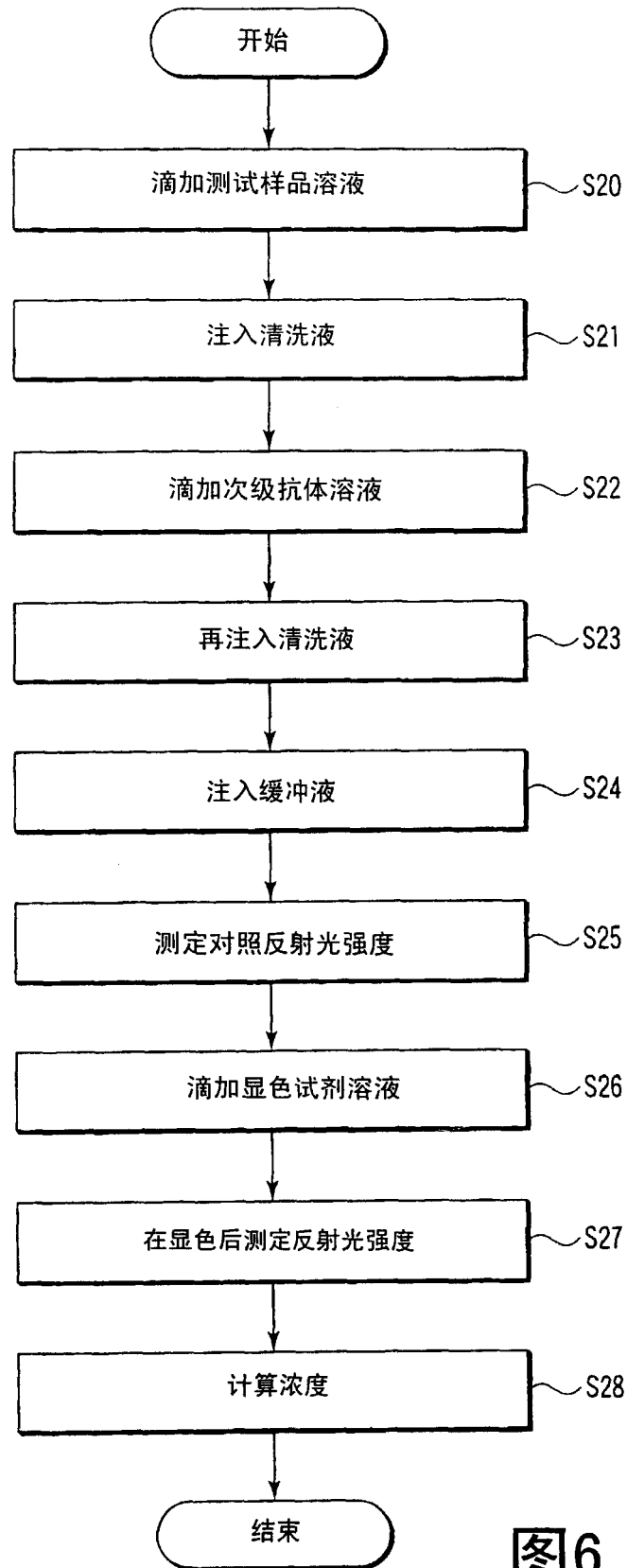


图6

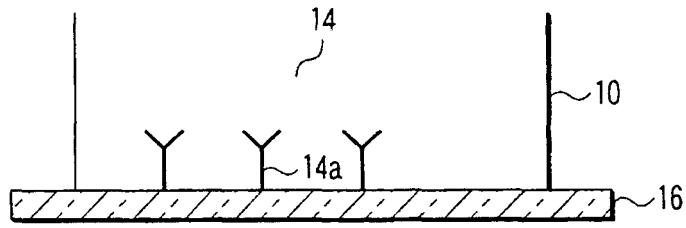


图7A

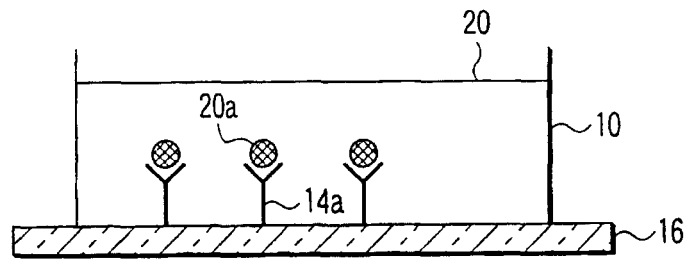


图7B

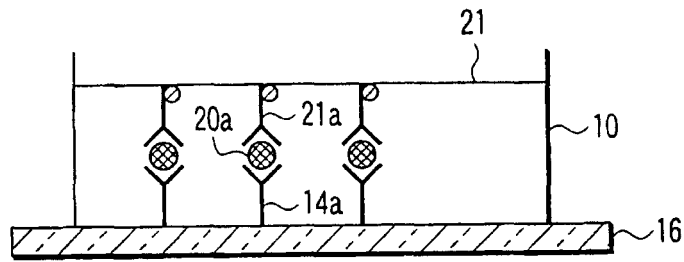


图7C

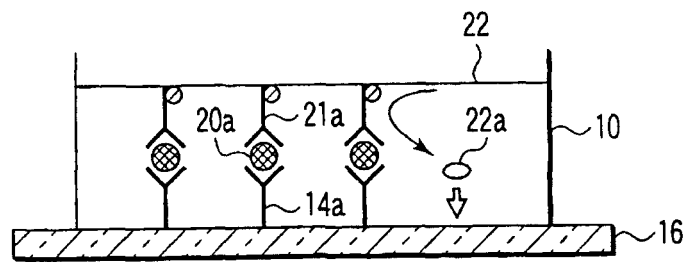


图7D

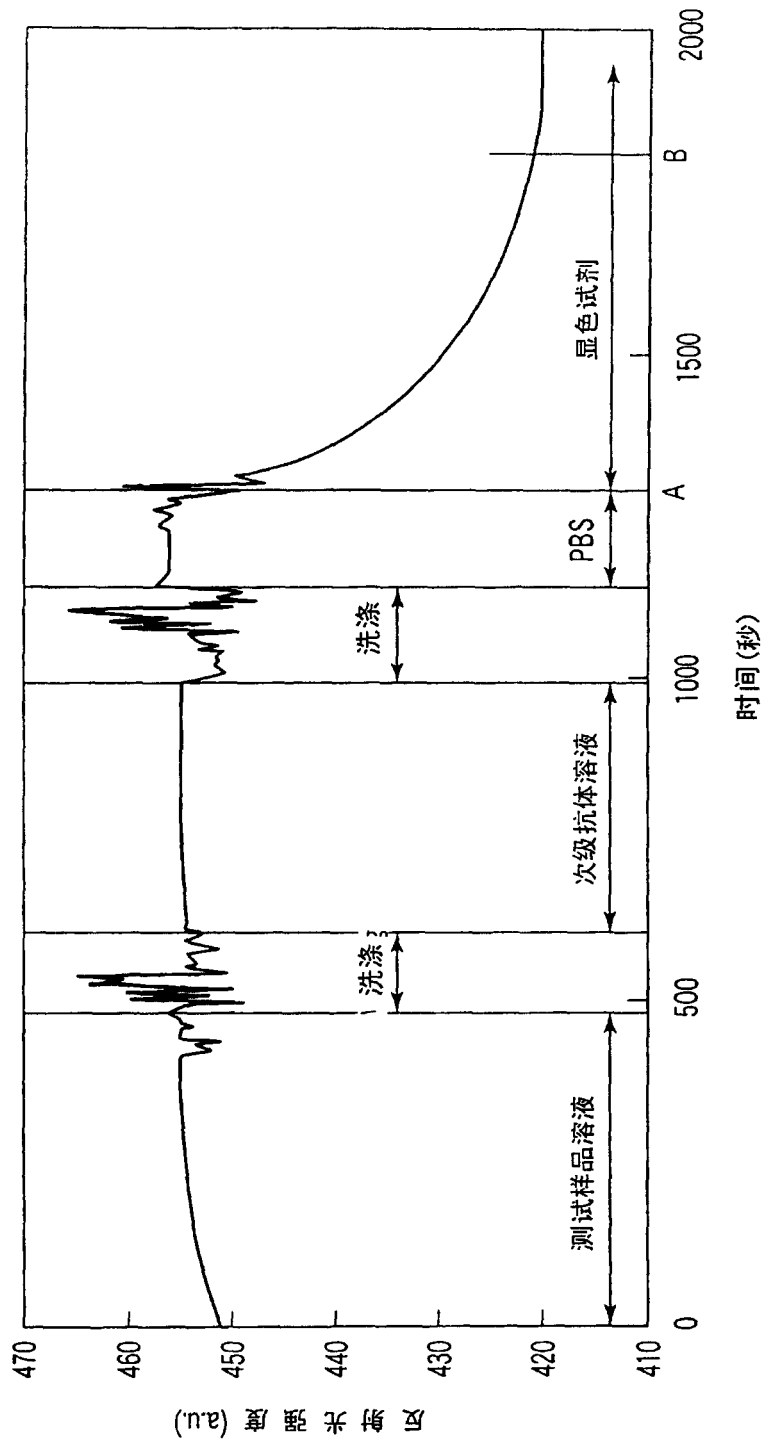


图8

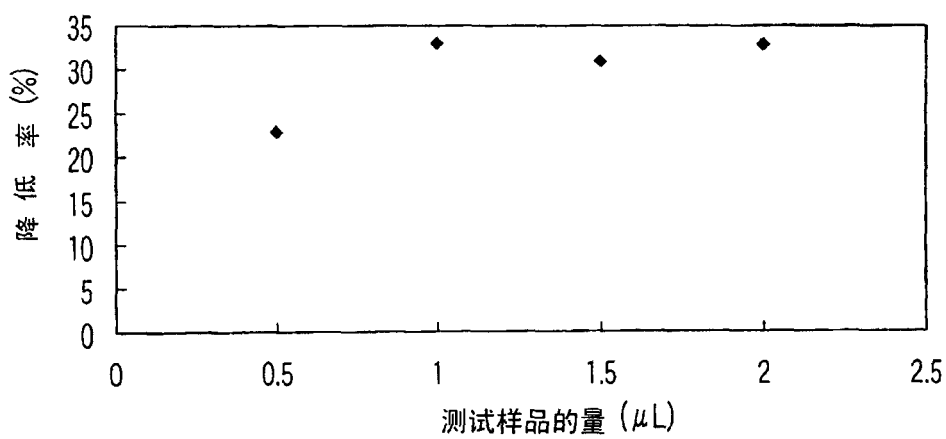


图9

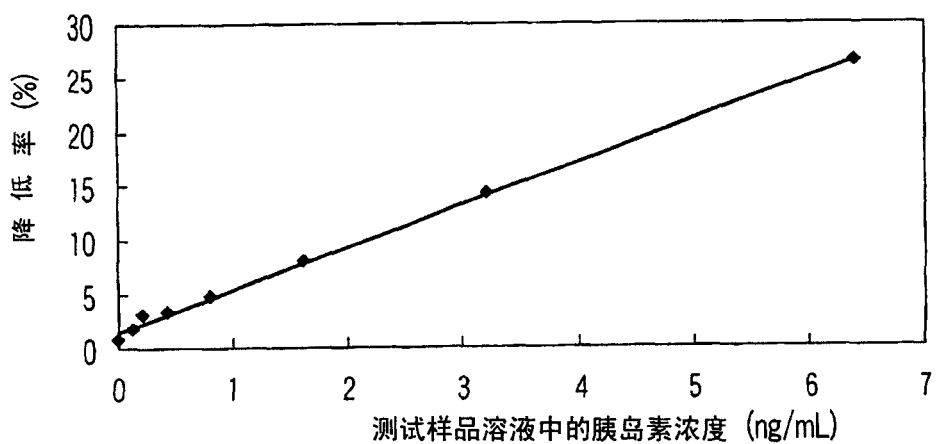


图10

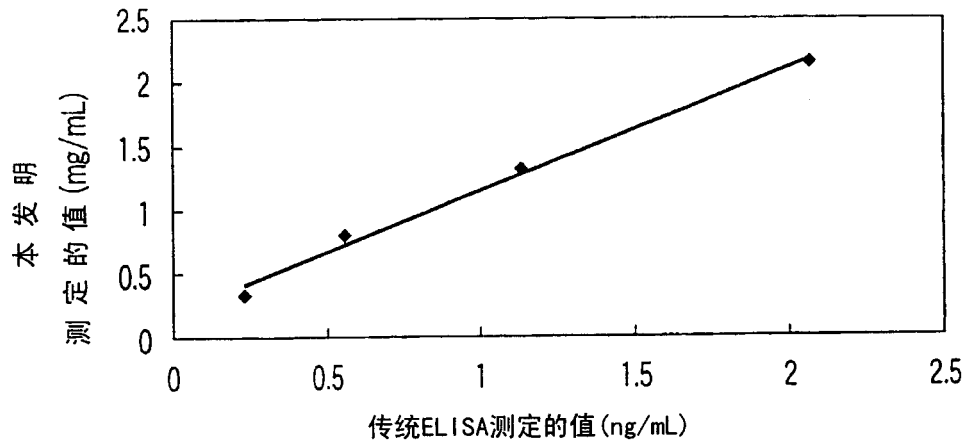


图11

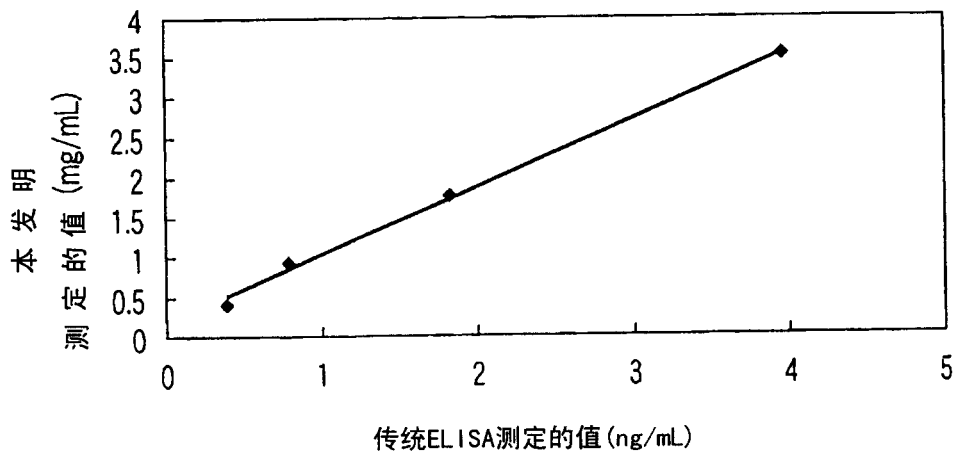


图12

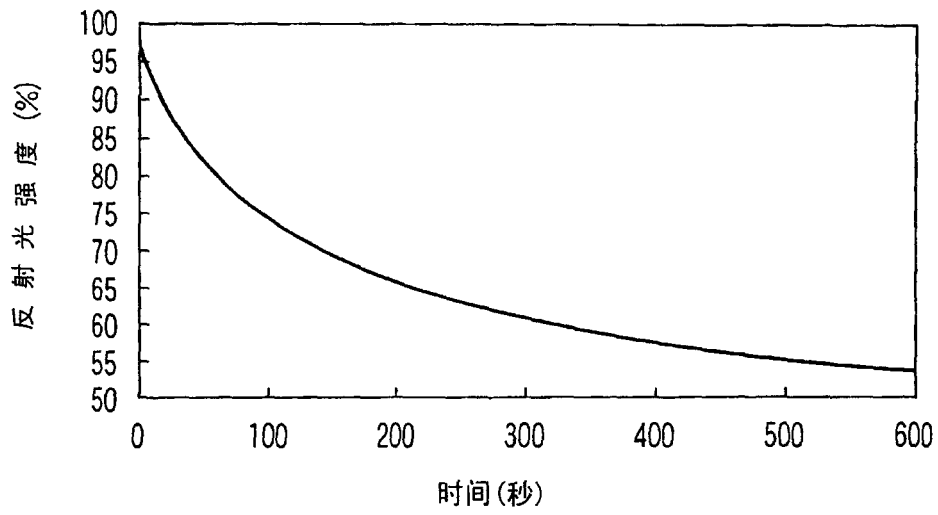


图13

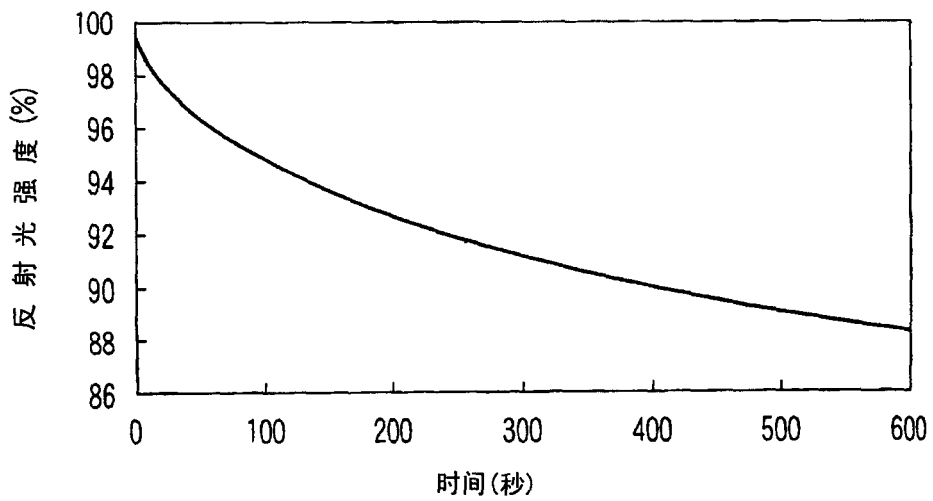


图14

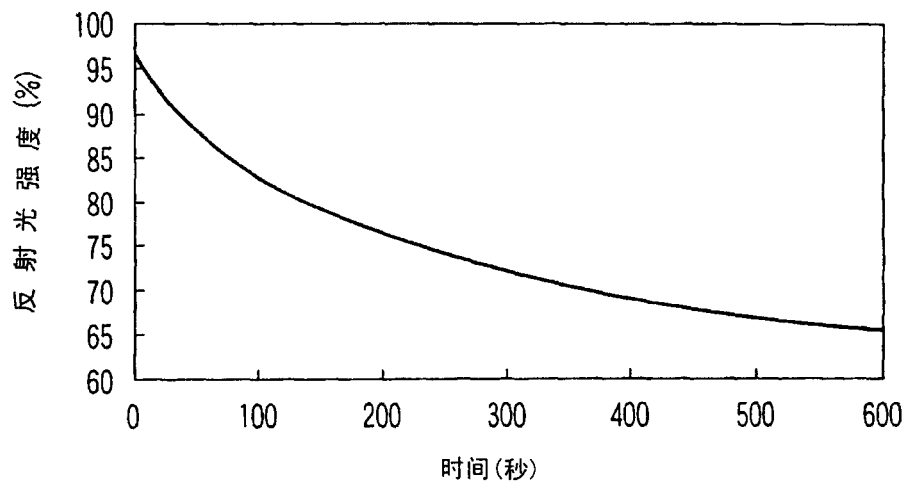


图15

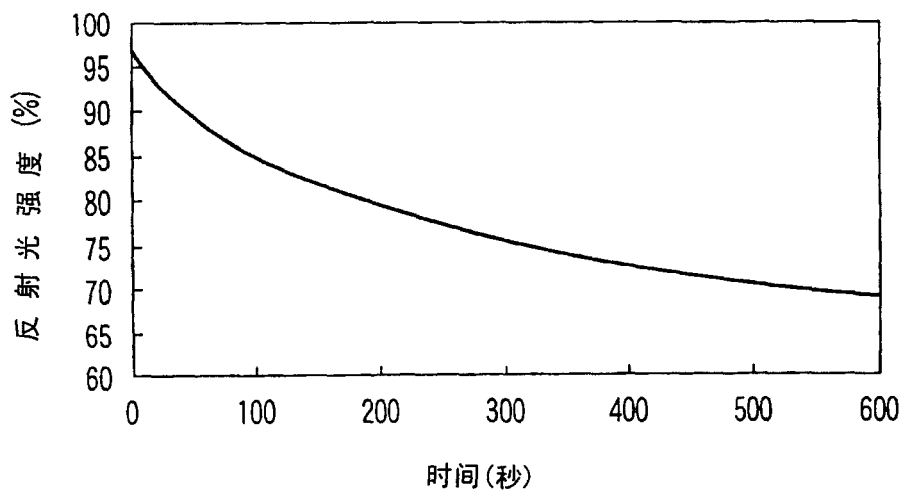


图16

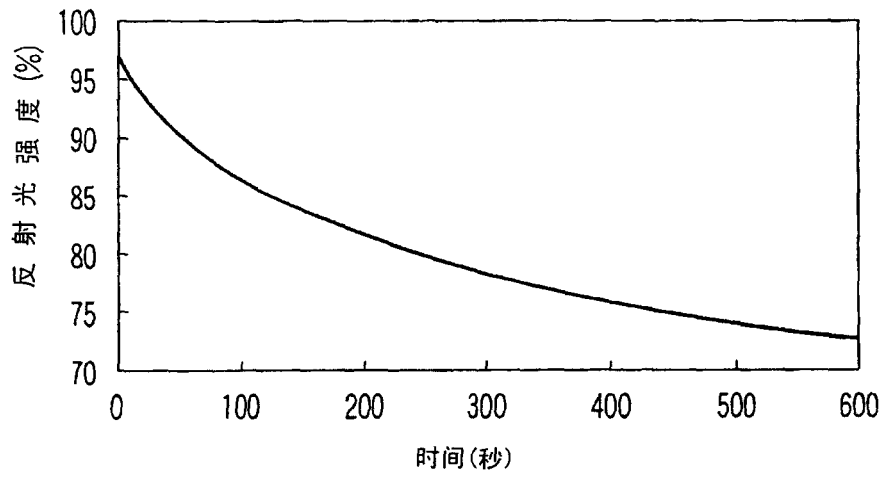


图17

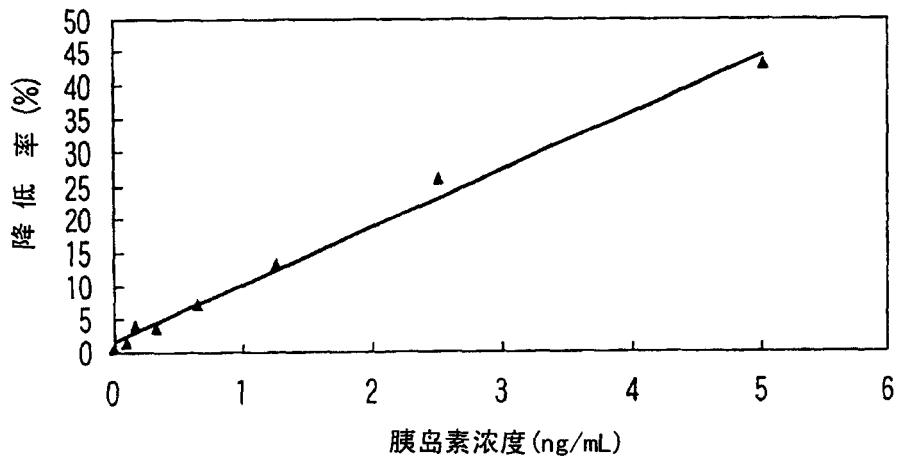


图18

专利名称(译)	显色试剂、浓度测定试剂盒、浓度测定方法和在该方法中使用的传感器芯片		
公开(公告)号	CN1842708A	公开(公告)日	2006-10-04
申请号	CN200480024753.0	申请日	2004-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社东芝		
申请(专利权)人(译)	株式会社东芝		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社东芝		
[标]发明人	内山兼一 大宫可容子 岸本功 平田雅己 江藤英雄 东野一郎 植松育生 葛西晋吾 高濑智裕 本庄勉 杉谷政则		
发明人	内山兼一 大宫可容子 岸本功 平田雅己 江藤英雄 东野一郎 植松育生 葛西晋吾 高濑智裕 本庄勉 杉谷政则		
IPC分类号	G01N33/543 C12M1/00 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/54373 Y10S435/808 Y10S436/805		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2003307920 2003-08-29 JP		
其他公开文献	CN100559182C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种测定待测物质浓度的方法，其可在很短的时间内测定非常少量的测试样品中待测物质的浓度，即使当用于测定的测试样品的量非常少时，也可对该待测物质的浓度进行准确测定。对待测物质浓度进行测定的方法采用传感器芯片，所述传感器芯片具有一个光波导层，以及设置于所述光波导层表面上的抗体固定化层，该方法包括将待测物质和用标记酶标记的酶标抗体固定于传感器芯片的具有固定化抗体的抗体固定化层上，通过使显色试剂与抗体固定化层上的标记酶反应产生显色的酶反应产物，并将所述酶反应产物沉积在抗体固定化层上，使从外面照射到传感器芯片上的光在光波导层与抗体固定化层之间的界面处被全反射，并观察全反射光的物理量。

