

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-517301

(P2004-517301A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 2 5 G
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/543	5 0 1 B
	GO 1 N 33/543	5 2 5 W
	GO 1 N 33/531	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁)

(21) 出願番号	特願2002-519946 (P2002-519946)	(71) 出願人	595023873 カウンスル・オブ・サイエンティフィック ・アンド・インダストリアル・リサーチ インド国ニューデリー-110001, ラ ファイ・マーグ (番地表示なし)
(86) (22) 出願日	平成12年8月16日 (2000.8.16)	(74) 代理人	100077805 弁理士 佐藤 辰彦
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月14日 (2003.2.14)	(74) 代理人	100099690 弁理士 鷲 健志
(86) 国際出願番号	PCT/IN2000/000075	(74) 代理人	100109232 弁理士 本間 賢一
(87) 国際公開番号	W02002/014868	(72) 発明者	ナハール プラディーブ インド国デリー 110 007 モール ロード (番地なし) センター フォー バイオケミカル テクノロジー 最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成14年2月21日 (2002.2.21)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), O A (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, D E, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, T M, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		

(54) 【発明の名称】 迅速に行えるマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定方法

(57) 【要約】

【目的】 迅速な病気診断のため微量の抗原または抗体を分光光度計測により検知する固相酵素免疫検定法の迅速且つ効果的な方法を提供する。

【構成】

マイクロウェーブ照射により活性化されたウェルに抗原または抗体を共有結合により固定し、短時間のマイクロウェーブ照射により遮断剤によりウェルのフリーな表面を遮蔽した後、マイクロウェーブ照射を制御して抗体または抗原を結合する。ついで、マイクロウェーブ照射を制御して接合体の結合を行い、ウェルに色素物質を添加し、分光光度計により吸光度を測定する。かかる方法により約10分でELISAを完了することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法の迅速な方法であって、活性化された固相支持体を用いることを特徴とし、

(a) 活性化された固相支持体を用意する、

(b) 抗原あるいは抗体から選択された生分子を塗布緩衝溶液で希釈し前記固相支持体の活性化されたウェルに充填し、該ウェルをマイクロウェーブ・オープン内に載置して、周波数が 2300 ~ 2500 MHz の範囲で出力が 600 ~ 900 W の範囲のマイクロウェーブを 50 ~ 100 秒間の範囲で照射し、その後適当な洗浄緩衝溶液で洗浄する、

(c) 上記ステップ (b) で得られた生分子を固定したウェルに遮断剤溶液を充填して、マイクロウェーブ・オープン内で周波数が 2300 ~ 2500 MHz の範囲で出力が 600 ~ 800 W の範囲のマイクロウェーブを 5 ~ 20 秒間の範囲で照射して、洗浄緩衝溶液で洗浄することにより前記活性化ウェルのフリー・サイトを遮断する、

(d) 上記ステップ (c) で得られた抗原または抗体を固定したウェルに、対応する抗体または抗原を緩衝溶液で希釈して充填し、周波数が 2300 ~ 2500 MHz の範囲で出力が 50 ~ 200 W の範囲のマイクロウェーブを 90 ~ 200 秒間の範囲で照射し、その後洗浄緩衝溶液で洗浄する、

(e) ステップ (d) で得られた前記ウェルに適当な酵素接合体を適切な緩衝溶液で希釈して充填し、マイクロウェーブ・オープン内で周波数が 2300 ~ 2500 MHz の範囲で出力が 100 ~ 300 W の範囲のマイクロウェーブを 50 ~ 150 秒間の範囲で照射してその後洗浄緩衝溶液で洗浄する、

(f) 上記ステップ (e) で得られたウェルに基質 - 染料 - 緩衝溶液を添加して暗所で 4 ~ 10 分間保管し、その後停止溶液を添加して分光光度計を用い適切な波長で溶液の吸光度を計測する、ステップからなることを特徴とするマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 2】

前記固相支持体は、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、シリカゲル、塩化ビニール、ポリアニリン等からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 3】

前記固相支持体は、ポリスチレンであることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 4】

前記固相支持体の形状は、シート状、プレート状、ビーズまたは極小球体のようなテスト用粒体、テスト用管体、テスト用棒体、テスト用線体、ウェル、ELISA プレート、マイクロウェル・プレートあるいはモジュールから選択することを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 5】

生分子の固定に用いる前記固相支持体は、ハロゲン基、アルデヒド基、アセチル基、エポキシ基、コハク酸アミド基、イソチオシアネート基、アジ化アシル基等からなる群から選択された少なくとも一つの活性基を有することを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 6】

前記固相支持体は、それ自身の一部に活性基を有するか、または公知の化学的方法あるいは光化学的方法あるいは他の知られた方法により活性基が導入されたものであることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 7】

前記抗原は、免疫応答を誘出するか、または誘出する能力を有することを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

前記マイクロウェーブの照射はマイクロウェーブを発生する装置またはチャンバー内で行われ、該装置またはチャンバーは家庭用マイクロウェーブ・オーブン、特別に設計されたマイクロウェーブ・オーブンまたはマイクロウェーブを発生する全ての装置またはチャンバーから選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 9】

抗原の結合、遮断、抗体の結合及び接合体の結合に要する総時間は 195 ~ 470 秒の範囲であることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 10】

前記遮断剤は、ウシ血清アルブミン、スキムミルク粉末、ゼラチンからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。 10

【請求項 11】

前記塗布緩衝溶液は、pH 6.5 から pH 11 の範囲でモル濃度が 0.005 モルから 0.1 モルの範囲の炭酸緩衝溶液またはリン酸緩衝溶液から選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 12】

前記洗浄緩衝溶液は、リン酸緩衝溶液と Tween 20 の混合溶液で、リン酸緩衝溶液は pH 6.5 から pH 11 の範囲でモル濃度が 0.005 モルから 0.1 モルの範囲であり、Tween 20 は 0.05 % から 3 % であることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。 20

【請求項 13】

前記接合体は、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼから選択された酵素と接合した抗体または抗原を有する生分子から選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 14】

前記マイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法は、直接 ELISA、間接 ELISA、サンドウィッチ ELISA 等種々のタイプの ELISA に加えて、放射標識免疫検定法、放射性免疫吸着試験、放射性アレルゲン吸着試験、ピオチン - アヴィジン / ストレプトアヴィジン免疫検定法、免疫プロット法、免疫染色法

及びそれらの混合形態の検定法からなる群から選択された検定法で用いることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。 30

【請求項 15】

(a) ポンプと細管により容器からサンプルあるいは試剤を活性化されたポリスチレン・プレートまたはモジュールに充填する充填チャンバー、

(b) マグネトロンと排気ファンと集中光を備え、抗原の結合、遮断、抗体の結合、抗体酵素接合体の結合のステップをマイクロウェーブの照射により、酵素基質反応を環境温度のもとで、プログラムされた請求項 1 記載の時間で行うための反応チャンバー、

(c) 前記 ELISA プレートまたはモジュールを MELISA の各ステップの後にプログラムされた指示に基づいて自動的に洗浄乾燥する洗浄兼乾燥チャンバー、

(d) 分光光度計を用いて色度検出を行う検出チャンバー、 40

(e) チャンバーからチャンバーへ前記 ELISA プレートまたはモジュールを搬送する搬送架台、

(f) ハードウェア及びソフトウェアにより請求項 1 に記載の MELISA 方法を制御する計算手段からなるマイクロプロセッサ、以上の構成部分からなることを特徴とするマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法に用いる装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明はマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法 (MELISA) を迅速に行う方法に関し、特に、固相酵素免疫検定法のすべての主要なステップが短時間のマイクロウェーブ 50

照射のもとに行われる M E L I S A の迅速且つ効果的な方法に関する。本方法は臨床診断、分子生物学、農業、食品技術、環境科学などの技術分野において有用である。

【 0 0 0 2 】

本発明による固相酵素免疫検定法 (E L I S A) は簡単であり、面倒な処理に費やす時間を省きまたは不要とすることができる。本方法は自動化の可能性を有している。

【 0 0 0 3 】

本発明による方法は、従来の E L I S A が通常数時間から 2 日間に亘る長時間を要するのに反し 1 0 分以下で行えるという有利性を有しており、特に早急な結果が要求される病気診断に有用である。

【 0 0 0 4 】

【従来の技術】

固相酵素免疫検定法 (E L I S A) は、ある種の抗原及び抗体の存在を準定量的または定量的に判定するために用いる極めて感度のよい技術である。E L I S A は動物及び植物の病気診断における有用な手法となっている。更に、他の用途として、モノクローナル抗体の調製中におけるモノクローナル抗体のスクリーニング (参考資料 1)、穀物や土壌及び水等の環境サンプルにおける残留農薬の検出 (参考資料 2 及び 3)、組織培養における細胞死の検知 (参考資料 4) 等がある。E L I S A を行うために、透明性、安価、入手の容易性、必要な形状への成形性、吸着により蛋白質と結合する性質を有している等の理由によりポリスチレンのマイクロ・タイター・プレートが広く用いられている。E L I S A の従来の方法では、ポリスチレン・マイクロタイタープレートのウェル表面に吸着により抗原または抗体を固定化することを基礎としている。これはポリスチレンの表面と生分子との間の共役結合的相互作用がないためである。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、通常、吸着は良い収率を得るためには不十分なプロセスであり、その後の処理において常に規定量通りには進行しない。かかる従来の方法における不十分さを克服するためマイクロ・タイター・プレート上の生分子の共有結合による固定が多くの人によって行われている (参考資料 5)。グラフトされたプラスチック表面に免疫原を共有結合させることが報告されている (参考資料 6)。それにもかかわらず、従来の E L I S A 方法は完了するまで数時間から 2 日間に亘る長い時間を必要としている。この点が吸着あるいは共有結合に基づく種々の E L I S A 方法の主な問題点となっている。緊急医療の場合においても、患者が薬物治療を受ける前に診断のために貴重な時間が失われている。農業においては、E L I S A は穀物や環境サンプルの残留農薬を検知する為に有用である。穀物の輸出やマーケティングが E L I S A 方法のこのような欠陥のために遅延し価値のある外国為替の損失をもたらす。

【 0 0 0 6 】

出願人はマイクロウェーブを用いて E L I S A を迅速に行うことができる新規かつ独特な方法を開発した。1 0 年来マイクロウェーブが免疫組織反応を促進することが知られている (参考資料 7、8、9、1 0 及び 1 8)。しかし、マイクロウェーブ照射によるポリスチレン表面への抗原または抗体の共有結合による固定化はいままで報告されてはいない。事実、光学的濃度を計測して微量の抗原または抗体を検知するために E L I S A のすべての主要な段階においてマイクロウェーブを短時間照射することは先行技術に知られていない。

【 0 0 0 7 】

しかしながら、E L I S A の一段階においてマイクロウェーブ照射を試みた例はある (参考資料 1 0)。この例ではポリスチレン E L I S A プレートにウサギの抗癌胎児性抗原を塗布して 4 で一晚培養し、続いて癌胎児性抗原 (C E A) を培養した。次のステップにおいて酵素標識抗体を添加し、著者は抗原 - 抗体反応に対するマイクロウェーブの影響を研究している。

【 0 0 0 8 】

同著者のもう一つの実験において、E L I S A プレートにマウスの正常な血清を塗布して

10

20

30

40

50

4 で一晚培養し、続いて標識されなていないウサギのマウス免疫グロブリン抗体と共に一晚培養した。次のステップでマウスのペルオキシダーゼ - 坑ペルオキシダーゼ複合体を添加し、最終ステップにおける反応の反応率に対するマイクロウェーブ照射の影響を判定している。

【0009】

第3の実験において、著者等は非特異性マウス血清をプレートに塗布し、続いて馬のビオチンを結合したマウス免疫グロブリンG抗体と培養し、このプレートを用いて続いて起こるビオチン - アビジン複合体の結合に対するマイクロウェーブ照射の影響を研究している。

【0010】

前述したすべての実験においては、マイクロウェーブ照射を行ったサンプルはマイクロウェーブによる励起なしで処理されたものと比較して反応の収率はより小さかった。これらの実験はマイクロウェーブが反応性のかなりの減少をもたらし、全収率はマイクロウェーブ・オープンの外で行われる慣例的手法によるものの略10%~15%に過ぎないことを示している。著者によれば、予防措置として水の熱的負荷(過剰なマイクロウェーブを吸収させるための水の入ったビーカー)とプレート底部の冷却を行ったにもかかわらず、この減少値はマイクロウェーブ照射によってウェルが過度の高温になったことに起因するのではないかとしている。

【0011】

別のELISAの実験(参考資料11)においては、著者等は光ファイバー温度計を使用して温度を40以下に規制している。この場合も200mlの流水による熱的負荷を採用している。一方、ウェル中の溶液はウェル中に挿入されたプラスチック・チップを介して溶液中に静かに吹き込まれる空気により攪拌されている。著者等は実験で2つのステップ、主に、抗体の結合と接合体の結合のステップにおいてのみ各150ワットで6分のマイクロウェーブ照射を行っている。もう一つの実験においては、抗体の結合、抗原の結合及び接合体の結合のステップにおいて、各ステップで45~50%のマイクロウェーブ出力によりそれぞれ15、30、30分の照射を行っている。上記両実験における残りのステップは慣例的な処理により行われている。しかし、上記実験におけるELISA値は慣例的手法よりかなり劣っている。

【0012】

著者等によれば、より長い照射時間はより高い吸光値(ELISA値)をもたらすが時間のゲインはあまりない。事実、30分あるいはそれ以上の照射時間にしても利点はない。あまりにも短い照射時間は吸光値をむしろ低下させ、使用することができない。

【0013】

報告されたマイクロウェーブ照射によるELISAの手法は以下のような欠陥を有する。(1)結果(ELISA値)が従来法よりかなり劣る、(2)時間ゲインはあまりない、同時にマイクロウェーブ・オープンの外で行ったELISAにより得られる結果(ELISA値)と変わらない、(3)処理に水の熱的負荷を要する、(4)冷却システムまたはプレートの底部を冷却する必要がある、(5)マイクロ・タイター・プレートのウェルを攪拌するシステムが必要である、(6)すべてのステップがマイクロウェーブのエネルギーにより行われるわけではなく、報告されたELISA手法は自動化の可能性が少ないかあるいは不可能である。

【0014】

本出願人は上記欠陥の総てを克服した。事実、熱エネルギーであるマイクロウェーブは生分子を活性化も非活性化もする。適切な条件の下でなければ、マイクロウェーブは生分子を部分的または全体的に破壊し、低いあるいは望ましくないELISA値をもたらす。本発明に係る方法において適切な条件が見出され、その多くは報告された手法とは異なり、先行技術にも知られていない。本発明による方法においては、染色ステップを除き総てのステップがマイクロウェーブの励起によって行われる。報告されている公知の手法においては、遮断ステップは非特異性結合を生ずるのでマイクロウェーブ照射は行われぬが、

10

20

30

40

50

出願人は遮断ステップを短時間のマイクロウェーブ照射により行う手法を発明した。報告された手法においては、より長いマイクロウェーブ暴露時間はより高いELISA値をもたらしたが、本発明の方法に於ては材料の破壊あるいは非特異性結合をもたらす。これは報告された方法が水の熱的負荷や冷却システムを用いたために、マイクロウェーブ・エネルギーの多くが吸収され、マイクロウェーブの効果が最小となり従来手法と同様に時間効果だけが意味あるものとなったためである。これに反し、本発明の方法においては、如何なる水の熱的負荷も冷却システムも攪拌システムも必要としない。その上、本発明の方法においては、ELISAに要する時間は略18時間を要する慣例的方法より約200分の1で済む少ない時間で、匹敵するかあるいはより高いELISA値が得られる。それゆえ、自動化の大きな可能性を有しているといえる。

10

【0015】

報告されているELISA方法では、生分子と共有結合による結合を生じないマイクロ・タイター・プレートを用いて行っている。実際、マイクロウェーブは水素結合、疎水性相互作用及びファンデルワールス相互作用のような非共役2次結合による複合に容易に影響することが知られている。

【0016】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の主たる目的は、迅速な病気診断のため微量の抗原または抗体を分光光度計測により検知する固相酵素免疫検定法の迅速且つ効果的な方法を提供するにある。本発明の他の目的は、簡単で再現性のあるしかも付加的な専門性や高価な装置を必要としない技術を提供するにある。更なる他の目的は、自動化の可能性を有し通常人に依存する人的ミスを最小化できる迅速な技術を提供するにある。

20

【0017】**【課題を解決するための手段】**

上記目的を達成し、従来のELISA手法の不利な点を克服する観点から、マイクロウェーブ媒介ELISA(MELISA)の迅速且つ有効な方法を提供する。この方法は以下のステップからなる。(I)マイクロウェーブ照射により活性化された固体表面に抗原または抗体を共有結合により固定する、(II)短時間のマイクロウェーブ照射により遮断剤によりフリーな表面を遮蔽する、(III)マイクロウェーブ照射を制御して抗体または抗原を結合する、(IV)マイクロウェーブ照射を制御して接合体の結合を行う、(V)ウェルに色素物質を添加する、(VI)吸光度の値を記録する。

30

【0018】

マイクロウェーブ媒介ELISA(MELISA)の方法は非常に短い時間(約10分程度)で活性化された表面上で行われ、37で16~18時間行われる従来のELISAと同等の効能を得る。本発明はELISA処理の自動化またはセミ自動化を可能とする潜在力を有する。

【0019】

マイクロウェーブが水素結合、疎水性相互作用及びファンデルワールス相互作用のような非共役2次結合による複合に効果のあることは知られている。この問題を克服するため、出願人は、マイクロタイター・ウェルの表面を使用する前に活性化した。活性化した表面は短時間のマイクロウェーブ暴露で抗原を共役結合により固定する。共役結合により固定化された抗原は、後続するELISAのステップにおいて繰り返される短時間のマイクロウェーブ暴露に抗する十分な安定性を示す。ELISA処理において後続する生分子結合のステップはマイクロウェーブのエネルギーに敏感な非共役結合によるものであるが、これらの問題は各ステップにおけるマイクロウェーブ照射の時間とエネルギーを制御することによって克服される。

40

【0020】

本発明の新規性は、ELISAをプロティナーゼ・リガンドと共役結合を形成することのできる活性化表面上で行うことにある。他の新規性は、マイクロウェーブの媒介により生分子を共役結合による固定することであり、更に望ましくは、抗原または抗体を活性化さ

50

れた表面へ固定する方法ある。更に、E L I S A 処理の各ステップにおける制御されたマイクロウェーブの照射も新しい方法である。

【0021】

本発明に係る方法においては、抗原の結合、遮断、抗体及び接合体の結合のといったE L I S A の総てのステップがマイクロウェーブ照射によって行われ、酵素 - 基質反応のみがマイクロウェーブ・オープンの外で室温で行われる。本発明のE L I S A 処理は非常に迅速であり、従来の方法に匹敵するかそれ以上のE L I S A 値を得る。

【0022】

更なる本発明の新規性は、発明に係るE L I S A 処理が如何なる水の熱負荷も攪拌システムも不要とすることにあり、更に、特別に設計された装置を使用することにより全てまたは一部を自動化できることにある。

10

【0023】

本発明の更なる新規性は、直接E L I S A 、間接E L I S A やサンドウィッチE L I S A のような種々のタイプのE L I S A に加えて放射標識免疫検定法、放射性免疫吸着試験、放射性アレルゲン吸着試験、ビオチン - 、アヴィジン / ストレプトアヴィジン免疫検定法、免疫プロット法、及び免疫染色法等のような他の免疫検定法にも使用することができることにある。

【0024】

【実施例】

本発明は、活性化されたマイクロタイタ - プレート、モジュールあるいはウエルを用いて、マイクロウェーブの暴露によって行う固相酵素免疫検定法の新しい手法を供する。活性化された表面はマイクロウェーブ照射によって抗原を共役結合により固定する。共役結合により固定された抗原は、E L I S A の後続のステップで繰り返し行う必要の短時間のマイクロウェーブ暴露に充分耐えるほど安定している。E L I S A は多くのステップを有する繊細なプロセスからなり、どのステップにおける不適切な条件も全体の結果を阻害することになる。

20

【0025】

本発明に係る方法においては、ポリスチレンのような不活性な固体表面は、乾燥状態において、光活性化化合物を用いて光化学反応によって活性化された。固相支持体の活性化は光活性化化合物を塗布した支持体をUV照射または強い日光に暴露することにより行った。この活性化支持体は、抗体検知例えば赤痢アメーバ症病原菌やアスペルギルス症病原菌の抗体を検知するため、マイクロウェーブ媒介E L I S A (M E L I S A) に供され、また、E L I S A で行う対照テストに供された。処理されない支持体を用いると、マイクロウェーブの短時間照射によって生分子の結合ができない。マイクロウェーブの照射は略2450 M H z の周波数で作動する家庭用マイクロウェーブ・オーブン (B P L - S a n y o 、 I n d i a) の内部で行った。

30

【0026】

公知の処理法 (参考資料12, 13) により赤痢アメーバ症病原菌を培養してアメーバ状抗原を得た。この抗原の蛋白質濃度はL o w r y 等の方法 (参考資料14) により測定すると1.54 m g / m l であった。E L I S A を行う前に、この抗原をウエル当たり1.0 μ g の濃度に希釈してウエルに塗布した。塗布用の緩衝溶液としてp H 7.2で0.01モルのリン酸緩衝溶液 (P B S) を用いた。洗浄緩衝溶液剤として、p H 7.2で0.01モルのリン酸緩衝溶液 (P B S) にトゥイーン系界面活性剤T w e e n 20を0.1%溶解したものを用いた。遮断剤溶液はp H 7.2で0.01モルのP B S に2%のウシ血清アルブミン (B S A) を溶解して作製した。基質溶液はp H 4.5で0.1モルのリン酸クエン酸緩衝溶液に0.043%の過酸化水素と0.067%のo - フェニレンジアミンを加えて調製した。

40

【0027】

赤痢アメーバ症病原菌の高度免疫血清はS a w h n e y 等の方法 (参考資料12) によりニュージーランド産白ラビットを用いて培養した。血清中の抗体のタイターはゲル内拡散

50

法によりチェックした。E L I S Aを行う前に抗体 (+ v e 血清) を希釈し、実験には P B Sを用いて 1 : 3 0 0 に希釈したものをを用いた。

【 0 0 2 8 】

赤痢アメーバ症病原菌抗原の免疫感作処方を与える前に、負の調節血清 (- v e 血清) を得るためラビットの耳の静脈より採血した。1 : 3 0 0 に希釈した負の調節血清 1 0 0 μ l をウェル毎に使用した。西洋ワサビペルオキシダーゼを接合した坑ラビット免疫グロブリン G は冷凍乾燥粉末としてシグマ社より購入した。再構成の後、タイタ - チェックボードにより最適希釈率が 1 : 4 0 0 0 であることが判り実験に供した。

【 0 0 2 9 】

E L I S A は 5 つのステップの手順、即ち、抗原結合、遮断、抗体結合、接合体結合及び染色からなる。M E L I S A の各ステップは従来の E L I S A が行うステップを順次最適に行うものである。対照テストである従来 E L I S A は、活性化されたウェルに抗原を塗布して 4 で一晩放置し、3 7 で 2 時間ウェルを遮断し、続いて抗体及び接合体の結合を 3 7 でそれぞれ 2 時間行い、室温で 5 分間酵素 - 基質反応を行う染色の後、吸光度を計測することによって行われた。本発明の方法においては、E L I S A の第 1 ステップでは、出力 7 0 0 W のマイクロウェーブの照射時間を制御することによりポリスチレン・ウェル・プレートにアメーバ抗原を共有結合により固定した。結合は 1 0 秒間で検知でき、表 1 に示すように照射時間と共に増加した。マイクロウェーブ照射 9 0 秒における抗原の結合は 7 0 秒照射と略同程度となった。従って、抗原固定化の適切なる時間は 7 0 秒といえる。マイクロウェーブ照射を行わない対照実験においては、3 7 で 7 0 秒の時間では 20 抗原のポリスチレン表面への結合は観察できなかった。

【 0 0 3 0 】

M E L I S A の第 2 ステップにおいて、出力 7 0 0 W のマイクロウェーブ・オープン内で 1 0 秒間 2 % の B S A を用いて遮断を行い、活性化表面のフリー表面を遮断した。更に照射時間を増加すると表 2 に示すように非特異性結合が現れる。M E L I S A の第 3 ステップにおいて、1 5 5 W のマイクロウェーブで 1 0 0 秒間、固定抗原と抗体の結合を行った。このステップは重要なステップで過剰な照射時間やマイクロウェーブ出力などの過度な条件では表 3 に示すように非特異性結合を招く。1 5 5 W 出力で 5 0 秒や 1 0 0 秒では非特異性結合は認められない。5 0 秒では極めて低い吸光度しか認められないが、1 0 0 秒間では - v e 血清や + v e 血清の比率が高くなり優良な吸光度となる。1 5 0 秒に時間を 30 増加すると非特異性結合が増加する (表 4 参照) 。

【 0 0 3 1 】

M E L I S A の第 4 ステップにおいて、接合体の結合を出力 1 5 5 W のマイクロウェーブの照射時間を制御して行った。表 6 に示すように 1 0 0 秒で優良な結果が得られる。過剰な照射時間や 7 0 0 W のような高エネルギーなどの過度の条件では表 5 に示すように非特異性結合を招く。各ステップ毎の対照実験がマイクロウェーブ・オープンの外で同一継続時間で行われたが、これら対照実験においては E L I S A 値は無視し得る値か望ましくない値であった。

【 0 0 3 2 】

M E L I S A の各ステップを最適化した後、発明者は生分子に傷害を与えないマイクロウェーブ照射の最適条件により全てのステップを行った。それは、照射 7 0 秒間で活性化ウェルに抗原を固定化し、照射 1 0 秒間で遮断を行い、照射 1 0 0 秒間の抗体結合と照射 1 0 0 秒間の接合体結合を行うことにより達成された。本発明による方法の全てのステップに要した時間は僅か 2 8 0 秒である。一方、従来の E L I S A では約 1 8 時間を要する。 40

【 0 0 3 3 】

赤痢アメーバ症病原菌の抗体を検知する M E L I S A 及び E L I S A を同じ条件下で数回繰り返し行って、その結果は表 7 に示すように高度な再現性のあることが判った。

【 0 0 3 4 】

M E L I S A 方法は、患者の血清から採取したアスペルギルス症病原菌の抗体検知により更に実証された。アスペルギルス症病原菌の抗原は公知の方法 (参考資料 1 6) で静置培 50

養により得た。抗原の蛋白質濃度が 12.5 mg/ml であることは Lowry 等の方法（参考資料 14）により決定した。抗原の免疫反応性はニュージーランド白ラビットで培養した高度免疫血清を用いてチェックした。アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ABPA）の 10 人の患者から血清サンプルを得た。これらの患者は全て公知資料の記載（参考資料 17）にあるような ABPA の臨床的特徴を満たしている。

【0035】

負の調節血清サンプルは、呼吸器系や他の病気に罹っていない明らかに健康体である 10 人の提供者から採取した。貯えられた正及び負の血清は、対照テストである ELISA 用としても採取され、従来の ELISA 及び MELISA の両方において同等であることが判っている。西洋ワサビペルオキシダーゼを接合した坑ヒト免疫グロブリン G は冷凍乾燥粉末としてシグマ社より購入し、再構成を行った後、接合体の最適希釈率は $1:4000$ であることがタイタ-チェックボードにより判った。

10

【0036】

本発明の方法によって検知されたアスペルギルス症病原菌の抗体（患者の血清中に存在する）は従来の ELISA 方法によるものと一致した。（表 8 参照）

種々の実験で得られた結果は次のようにグレード付けされた。

【0037】

優良 = + + + +

良好 = + + +

良 = + +

不良 = +

非検知 = -

20

【0038】

MELISA に要した全時間は 10 分以下である。しかしながら、各ステップに要する時間は生分子によって変わる可能性があり、照射時間及びエネルギーを少し変更するという反応条件の修正により優良な結果が得られる。

【0039】

本発明が提供するマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法（MELISA）の迅速な方法は、活性化された固相支持体を用いて行われ、以下のステップからなる。

30

(a) 活性化された固相支持体を準備する。

(b) 抗原または抗体から選択した生分子を塗布緩衝溶液で希釈し前記固相支持体の活性化されたウェルに充填し、該ウェルをマイクロウェーブ・オープン内に配置して周波数 $2300 \sim 2500 \text{ MHz}$ 、出力 $600 \sim 900 \text{ W}$ のマイクロウェーブを $50 \sim 100$ 秒間ウェルに照射し、その後適当な洗浄緩衝溶液で十分に洗浄する。

(c) ステップ (b) で得られた生分子を固定したウェルに遮断剤溶液を充填しマイクロウェーブ・オープン内で周波数 $2300 \sim 2500 \text{ MHz}$ 、出力 $600 \sim 800 \text{ W}$ のマイクロウェーブを $5 \sim 20$ 秒間ウェルに照射し、その後適当な洗浄緩衝溶液で洗浄することによりウェルの未反応のフリー・サイトを遮断する。(d) ステップ (c) で得られた抗体または抗原を固定したウェルに対応する抗原または抗体を緩衝溶液で希釈して充填し、マイクロウェーブ・オープン内で周波数 $2300 \sim 2500 \text{ MHz}$ 、出力 $50 \sim 200 \text{ W}$ のマイクロウェーブを $90 \sim 200$ 秒間ウェルに照射し、その後洗浄緩衝溶液で洗浄する。

40

(e) ステップ (d) で得られたウェルに適当な酵素-接合体を適切な緩衝溶液で希釈して充填し、マイクロウェーブ・オープン内で周波数 $2300 \sim 2500 \text{ MHz}$ 、出力 $100 \sim 300 \text{ W}$ のマイクロウェーブを $50 \sim 150$ 秒間ウェルに照射し、その後洗浄緩衝溶液で洗浄する。

(f) ステップ (e) で得られたウェルに基質-色素-緩衝溶液を添加して暗所に $4 \sim 10$ 分間保持し、続いて停止溶液を添加して適切な波長の分光光度計を用いて溶液の吸光度を測定する。

【0040】

50

本発明の実施形態に於いては、使用する固相支持体はポリスチレン、ポリエチレン、ガラス、セルローズ、ニトロセルローズ、シリカゲル、塩化ビニール、ポリアニリン等から選択したが、望ましい固相支持体はポリスチレンである。他の実施形態に於ては、固相支持体の形状やサイズは、シート状、板状、ビーズのような粒状、極小球体、試験管、テスト用スティック、テスト用線条、ウエル、E L I S Aプレート、マイクロ・ウエル・プレートまたはモジュールから選択される。

【0041】

本発明の実施形態に於いては、生分子を固定するための固相支持体は共役結合によりリガンド分子と結合する少なくとも一つの活性基を有する支持体より選択され、該活性基はハロゲン化基、アルデヒド基、アセチル基、エポキシ基、琥珀酸アミド基、イソチオシアネート基、アジ化アシル基などから選択される。また、本発明の実施形態に於いては、該活性基は通常の化学反応や光化学反応などの公知の方法により支持体に導入してもよい。本発明の他の実施形態に於いては、光化学反応により固相支持体に活性基を導入する場合、4-フルオロ-3-ニトロアジ化ベンゼン、N-ヒドロキシスクシンイミド4-アジ化ベンゾネート、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド4-アジ化サリチル酸、などから選択された光活性化化合物を使用して乾燥状態で行う。本発明の他の実施形態に於いては、ポリスチレン表面に1-フルオロ-2-ニトロアジ化ベンゼンを塗布し、塗布したポリスチレン支持体を乾燥状態で365nmの紫外線に暴露して活性化する。更に本発明の他の実施形態に於いては、光化学反応の光源として紫外線ランプ、レーザービーム、明るい陽光などから選択する。更に、本発明の実施形態においては、固相支持体を活性化する光化学反応の時間は10秒から10時間の範囲から選択する。

【0042】

本発明の実施形態においては、家庭用マイクロウェーブ・オーブン、特別に設計されたマイクロウェーブ・オーブン、あるいはマイクロウェーブを発生する全ての機器または空間から選択するマイクロウェーブ装置を用いてマイクロウェーブ照射を行う。本発明の好ましい実施形態においては、E L I S Aの第1ステップは、周波数2300~2500MHz、出力600~900Wのマイクロウェーブを50~100秒間照射することにより、活性化されたプレートに抗原または抗体を共役結合させることで行われる。本発明の好ましい実施の形態においては、E L I S Aの第2ステップである遮断ステップは、周波数2300~2500MHz、出力600~800Wのマイクロウェーブを5~20秒間照射することにより行われる。本発明による好ましい実施形態においては、E L I S Aの第3ステップは、周波数2300~2500MHz、出力50~200Wのマイクロウェーブを90~200秒間照射することにより対応する抗体あるいは抗原の結合を行う。本発明の好ましい実施の形態においては、E L I S Aの第4ステップは、周波数2300~2500MHz、出力100~300Wのマイクロウェーブを50~150秒間照射することにより酵素接合体の結合を行う。

【0043】

本発明の好ましい実施形態によれば、抗原の結合、遮断、抗体の結合及び接合体の結合を含む全時間は、慣例的方法では通常10~24時間要するところ、195~470秒間である。

【0044】

本発明の他の実施形態においては、pHが6.5から11の範囲でモル濃度が0.005モルから0.1モルの範囲の、炭酸緩衝溶液やリン酸緩衝溶液のような抗原と相溶性を有する適切な組成の塗布緩衝溶液で抗原を希釈する。本発明の好ましい実施形態においては、使用する洗浄緩衝溶液は、pHが6.5から11の範囲でモル濃度が0.005モルから0.1モルの範囲のリン酸緩衝溶液と0.05%~3%の範囲のトゥイーン系界面活性剤Tween 20との混合溶液である。本発明の好ましい実施形態においては、遮断剤はウシ血清アルブミン、スキムミルク粉末、ゼラチンなどから選択される。

【0045】

本発明の他の実施形態においては、生分子は抗原あるいは抗体より選択され、抗原は免疫

10

20

30

40

50

反応を誘出する能力を有するかまたは誘出する如何なる生分子、微生物または物質でもよい。本発明の好ましい実施の形態においては、抗体は特定の抗原を接種することにより宿主によって生成され、特異的に該抗原と結合する可能性を有する全ての生分子から選択する。更に、好ましい他の実施の形態においては、接合体はペルオキシダーゼまたはアルカリ性ホスファターゼから選択した酵素と接合した抗体または抗原を有する特殊な生分子である。更に本発明の好ましい実施の形態においては、酵素は検定が可能な発色団や蛍光団から選択した標識に替えてもよい。

【0046】

本発明による他の好ましい実施形態に於いては、本発明の方法は、直接ELISA、間接ELISAやサンドウィッチELISAなどのような異なるタイプのELISAのみならず、放射標識免疫検定法、放射性免疫吸着試験、放射性アレルゲン吸着試験、ピオチン-アヴィジン/ストレプトアヴィジン免疫検定法、免疫プロット法、免疫染色法などのような他の免疫検定法にも使用することができる。

10

【0047】

本発明は更にマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法(MELISA)に用いる下記の構成からなる装置を提供する。(a) 適当なポンプを用いた細いチューブにより特定の容器からサンプルあるいは試剤を活性化されたポリスチレン・プレート/モジュールに充填する充填チャンパー、(b) 抗原の結合、遮断、抗体の結合、抗体 酵素接合体の結合など全てのステップをマイクロウェーブ照射のもとで、酵素基質反応をマイクロウェーブの励起なしに環境温度で、予めプログラムされた時間の通り行うマグネトロン及び排気ファンを備える反応チャンパー、(c) ELISAプレートまたはモジュールをMELISA処理の各ステップの後に予めプログラムされた指令に基づき自動的に洗浄乾燥する洗浄兼乾燥チャンパー、(d) 分光光度計を用いて比色検知を行う検知チャンパー、(e) チャンパーからチャンパーへELISAプレートまたはモジュールを搬送するのに用いられる移動架台、(f) 適切なハードウェア及びソフトウェアによりMELISA方法を制御する計算手段を基礎とするマイクロプロセッサ。

20

【0048】

以下に実験例を参照して更に本発明を説明するが、これら実験例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0049】

30

実験 1

固相支持体の活性化

モジュール(12ウェル・ポリスチレン・モジュール、ダイナテック社、USA)のウェルに100 μ lのメタノールに溶解した1 フルオロ 2 ニトロアジ化ベンゼン(FNAB)を1ウェル当たり1.82mg充填し、暗所で適当に乾燥させた。それからFNABを充填したウェルをUVStratalinker2400(Stratagene社、USA)を用いて365nmの紫外線を10分間照射するか、あるいは1時間明るい陽光の下に維持した。次にウェルをメタノールで数回洗浄して非結合物質を除去し室温で乾燥した。このモジュールの活性化ウェルは本発明による方法の抗原または抗体の固定に用いられた。

40

【0050】

実験 2

マイクロウェーブ照射による赤痢アメーバ症病原菌抗原の固定

100 μ lのPBSで赤痢アメーバ症病原菌抗原(1 μ g)を希釈したものをモジュールの活性化ウェルに充填し、周波数約2450MHz、最大出力約700Wで作動する家庭用マイクロウェーブ・オープン(BPL Sanyo, India)の内部で10秒間マイクロウェーブを照射した。照射は最高出力の10にセットし、700W出力のマグネトロンのデューティ・サイクル100%で行った。ウェルは洗浄緩衝溶液で十分に洗浄し非結合抗原を除去した。続くステップは従来方法で行った。このように、遮断剤溶液(200 μ l)による遮断、抗体(100 μ l)の結合、坑ラビット血清グロブミンG 西洋ワ

50

サビペルオキシダーゼ接合体 (100 μ l) の結合は各ステップ2時間ずつ37 で培養することにより行った。各ステップの終了毎にウエルは洗浄緩衝溶液で十分に洗浄した。染色過程は基質溶液100 μ lを用いて行った。ウエルはELISAリーダー (Specyramax 190マイクロプレート分光光度計、モレキュラ・デヴァイス社、USA)を用いて490nmで読取り吸光度を記録した。すべての実験は3対のウエルで行われ、-ve血清を用いて同様の実験も行った。

【0051】

マイクロウェーブを用いた対照実験を未処理のウエルを用いて同様に行った。更なる対照実験として、活性化されたウエルを用いマイクロウェーブ照射と同じ時間37 で抗原を培養する実験も行った。これらの両実験では抗原の固定は認められなかった。

10

【0052】

全ての各実験は抗原結合の時間を30, 50, 70, 90秒と変えて繰り返し行った。抗原結合を最適化するマイクロウェーブ照射時間の結果は表1に示される。

【0053】

実験3

マイクロウェーブ照射を用いた遮断剤によるフリー表面の遮断

上述のモジュールの活性化ウエルにマイクロウェーブを70秒間照射して赤痢アメーバ症病原菌の抗原を固定した。洗浄緩衝溶液で完全に洗浄した後200 μ lの遮断剤溶液をウエルに添加し700Wのマイクロウェーブを10秒間照射した。引き続くステップである抗体の結合及び接合体の結合は、実験2に記載したようにマイクロウェーブ・オープンの外で行い、染色ステップ及び吸光度読取りも実験2と同様に行った。-ve血清を用いて同じような実験も行った。遮断の最適時間を検討するために、2つの異なる実験をマイクロウェーブ暴露時間を40及び60秒と増加させる以外は同じ方法で行った。全ての実験は3対のウエルで行った。マイクロウェーブ照射の下で行う最適遮断時間の結果を表2に示す。

20

【0054】

実験4 高エネルギーレベルのマイクロウェーブ照射による抗体の結合

モジュールの活性化ウエルに700Wのマイクロウェーブを70秒間照射して赤痢アメーバ症病原菌の抗原を固定し、実験3のように700Wのマイクロウェーブを10秒間照射して遮断剤によりフリー表面を遮断した。ウエルに坑アメーバ抗体(100 μ l)を充填し、700Wのマイクロウェーブに10秒間暴露した。洗浄緩衝溶液でウエルを適切に洗浄した後、接合体の結合及び次の染色過程は実験3で行ったのと同様に行った。同様の実験を-ve血清を用いても行った。実験は抗体結合のマイクロウェーブ暴露時間を30、50、70、90秒と変え、他の条件は同じにして繰り返し行われた。全ての実験は3対のウエルによって行った。高エネルギーレベルのマイクロウェーブ照射による抗体結合の結果を表3に示す。

30

【0055】

実験5

低エネルギーレベルのマイクロウェーブ照射による抗体の結合

ここでの抗体の結合の実験は、155Wの低エネルギーレベルで行う以外は、実験4に記載したものと同一の条件で行った。マイクロウェーブの暴露時間は10、15、100、150秒とそれぞれ4組の実験を繰り返し行った。低エネルギーレベルのマイクロウェーブ照射による抗体結合の結果は表4に示す。

40

【0056】

実験6

高エネルギーレベルのマイクロウェーブ照射による接合体の結合

活性化ウエルに700Wのマイクロウェーブを70秒間照射して赤痢アメーバ症病原菌の抗原を固定し、続いて、700Wのマイクロウェーブを10秒間照射して遮断し、実験5のように155Wのマイクロウェーブを100秒間照射して抗体を結合した。坑ラビット血清グロブミンG 西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体100 μ lをウエルに充填し70

50

0 Wのマイクロウェーブを照射した。マイクロウェーブの暴露時間は5、10、15、20秒とそれぞれ4組の実験を他の条件を実験5と同じにして行った。全ての実験は3対のウエルで行った。高エネルギーレベルのマイクロウェーブ照射による接合体結合の結果を表5に示す。

【0057】

実験7

低エネルギーレベルのマイクロウェーブ照射による接合体の結合

ここでの第2抗体-接合体の結合実験は、第2抗体-接合体の結合ステップが155 Wの低エネルギーレベルで行われる以外は、実験6で記載されたものと同様の条件で行われた。マイクロウェーブ暴露時間は4組の実験に対してそれぞれ50、100、120秒間とした。低エネルギーレベルのマイクロウェーブ照射による接合体の結合の結果は表6に示す。

【0058】

実験8

マイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法(MELISA)と固相酵素免疫検定法(ELISA)による赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知

上記実験に記載したように、活性化ウエルに700 Wのマイクロウェーブを70秒間照射して赤痢アメーバ症病原菌の抗原を固定し、続いて、700 Wのマイクロウェーブを10秒間照射して遮断剤により遮断を行い、155 Wのマイクロウェーブを100秒間照射して抗体を結合し、続いて、155 Wのマイクロウェーブを100秒間照射して抗体-接合体の結合を行った。-ve血清を用いて同様の実験も行った。全ての実験は1対のウエルで行われ5回繰り返された。各ステップの終了後は洗浄緩衝溶液により洗浄した。全てのステップをマイクロウェーブの励起なしで行う以外は同じ試剤、基質および緩衝溶液を用いて従来のELISAにより対照実験を行った。このようなELISAは活性化ウエルに抗原を塗布して4で一晚行い、続いて遮断、抗体結合、接合体結合のステップを各ステップ37で2時間行った。染色ステップは発明による方法も従来方法も同じである。マイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法(MELISA)と固相酵素免疫検定法(ELISA)による赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知の結果を表7に示す。

【0059】

実験9

マイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法(MELISA)と固相酵素免疫検定法(ELISA)によるアスペルギルス症病原菌抗体の検知

患者の血清中におけるアスペルギルス症病原菌抗体の検知はマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法(MELISA)と固相酵素免疫検定法(ELISA)により実験8に記載したものと同一の条件で行った。但し、抗原はアスペルギルス症病原菌の抗原であり、抗体は10人の異なる患者の血清から採取した。非特異性抗体を有する対照血清は健康な志願者から採取し、接合体は抗ヒト血清グロブミンGペルオキシダーゼを用いた。全ての実験は1対のウエルで行われた。マイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法(MELISA)と固相酵素免疫検定法(ELISA)によるアスペルギルス症病原菌抗体の検知の結果を表8に示す。

【0060】

第1ステップをMELISAにより行い残りのステップをELISAで行った赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知。

【0061】

MELISA: 第1ステップ、700 Wのマイクロウェーブを表に示す異なる時間照射して抗原を活性化ウエルに固定、対照テストは37で70秒間。

【0062】

ELISA: 第2~第5ステップ、従来例による方法。

【0063】

【表1】

10

20

30

40

時間 (秒)	+ve 血清			-ve 血清			評価
10	0.188	0.196	0.191	0.002	0.004	0.003	++
30	0.208	0.193	0.198	0.005	0.001	0.002	++
50	0.226	0.211	0.214	0.006	0.002	0.004	+++
70	0.363	0.355	0.358	0.005	0.001	0.003	++++
90	0.370	0.360	0.367	0.001	0.003	0.004	++++
対照テスト	0.003	0.001	0.004	0.006	0.004	0.002	-

第1、第2ステップをMELISAにより行い、残りのステップをELISAで行った赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知。 10

【0064】

MELISA：第1ステップ、抗原結合は700Wで70秒間、第2ステップ、遮断は700Wで表に示す種々の時間。

【0065】

ELISA：第3～第5ステップ、従来例による方法。

【0066】

【表2】

時間 (秒)	+ve 血清			-ve 血清			評価
10	0.270	0.288	0.273	0.006	0.005	0.008	++++
40	0.352	0.377	0.367	0.098	0.092	0.094	++
60	0.293	0.290	0.287	0.283	0.270	0.276	-

最初の3ステップをMELISAで行い残りのステップをELISAで行った赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知。

【0067】

MELISA：第1ステップ、抗原結合は700Wで70秒間。第2ステップ、遮断は700Wで10秒間。第3ステップ、抗体結合は700Wで表に示す種々の時間。

【0068】

ELISA：第4及び第5ステップ、従来例による方法。

【0069】

【表3】

時間 (秒)	+ve 血清			-ve 血清			評価
10	0.216	0.203	0.211	0.087	0.123	0.098	+
30	0.392	0.353	0.388	0.100	0.137	0.114	-
50	1.413	1.177	1.213	0.194	0.180	0.194	++
70	1.313	1.253	1.276	1.263	1.279	1.275	-
90	1.287	1.239	1.238	1.288	1.248	1.234	-

最初の3ステップをMELISAで行い残りのステップをELISAで行った赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知。

【0070】

MELISA：第1ステップ、抗原結合は700Wで70秒間。第2ステップ、遮断は700Wで10秒間。第3ステップ、抗体結合は155Wで表に示す種々の時間。

【0071】

ELISA：第4及び第5ステップ、従来例による方法。

【0072】

【表4】

20

30

40

50

時間 (秒)	+ve 血清			-ve 血清			評価
10	0.010	0.014	0.010	0.004	0.003	0.007	-
50	0.079	0.087	0.82	0.003	0.006	0.005	+
100	0.511	0.524	0.530	0.014	0.027	0.020	++++
150	0.256	0.276	0.289	0.218	0.221	0.223	-

最初の4ステップをMELISAで行い最後のステップを従来の方法で行った赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知。

【0073】

MELISA：第1ステップ．抗原結合は700Wで70秒間。第2ステップ．遮断は700Wで10秒間。第3ステップ．抗体結合は155Wで100秒間。第4ステップ．接合体結合は700Wで表に示す種々の時間。第5ステップ．染色は室温で5分間。

【0074】

【表5】

時間 (秒)	+ve 血清			-ve 血清			評価
5	0.147	0.136	0.138	0.032	0.020	0.23	++
10	0.166	0.166	0.168	0.087	0.093	0.85	+
15	0.192	0.171	0.183	0.110	0.119	0.116	-
20	0.388	0.503	0.446	0.312	0.288	0.293	-

最初の4ステップをMELISAで行い最後のステップを従来の方法で行った赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知。

【0075】

MELISA：第1ステップ．抗原結合は700Wで70秒間。第2ステップ．遮断は700Wで10秒間。第3ステップ．抗体結合は155Wで100秒間。第4ステップ．接合体結合は155Wで表に示す種々の時間。

【0076】

第5ステップ．染色は室温で5分間。

【0077】

【表6】

時間 (秒)	+ve 血清			-ve 血清			評価
50	0.205	0.189	0.192	0.021	0.018	0.022	++
100	0.558	0.532	0.543	0.036	0.031	0.032	++++
120	0.145	0.193	0.157	0.023	0.014	0.023	+

赤痢アメーバ症病原菌抗体の検知、MELISAとELISAとの比較。

【0078】

MELISA：第1ステップ．抗原結合は700Wで70秒間。第2ステップ．遮断は700Wで10秒間。第3ステップ．抗体結合は155Wで100秒間。第4ステップ．接合体結合は155Wで100秒間。第5ステップ．染色は室温で5分間。

【0079】

ELISA：第1ステップ．抗原結合は4で一晚。第2ステップ．遮断は37で2時間。第3ステップ．抗体結合は37で2時間。第4ステップ．接合体結合は37で2時間。第5ステップ．染色(発色)は室温で5分間。

【0080】

【表7】

10

20

30

40

No.	+ve 血清				-ve 血清			
	MELISA		ELISA		MELISA		ELISA	
1	0.567	0.556	0.539	0.560	0.036	0.070	0.046	0.040
2	0.531	0.556	0.538	0.534	0.096	0.056	0.064	0.070
3	0.541	0.563	0.549	0.547	0.098	0.053	0.064	0.050
4	0.558	0.545	0.574	0.544	0.052	0.080	0.074	0.110
5	0.557	0.564	0.558	0.540	0.049	0.079	0.056	0.090
評価	再現性あり		再現性あり		再現性あり		再現性あり	

10

アスペルギルス症病原菌抗体の検知、MELISAとELISAとの比較。

【0081】

表7の記載と同じ方法により行った。

【0082】

【表8】

サンプル No.	+ve 血清				-ve 血清			
	MELISA		ELISA		MELISA		ELISA	
1	0.334	0.356	0.339	0.320	0.036	0.070	0.116	0.130
2	0.331	0.356	0.438	0.380	0.096	0.056	0.094	0.110
3	0.351	0.380	0.379	0.410	0.098	0.053	0.164	0.150
4	0.498	0.525	0.574	0.520	0.052	0.080	0.174	0.170
5	0.685	0.664	0.658	0.641	0.049	0.079	0.056	0.080
6	0.367	0.375	0.372	0.390	0.063	0.047	0.093	0.110
7	0.430	0.449	0.412	0.400	0.114	0.131	0.110	0.150
8	0.550	0.560	0.527	0.510	0.090	0.077	0.098	0.100
9	2.204	2.081	1.984	2.300	0.058	0.061	0.073	0.120
10	0.346	0.341	0.327	0.310	0.039	0.037	0.142	0.160
評価	従来方法と同等				非特異性結合が従来方法よりも少ない			

20

30

【0083】

MELISAのための装置

MELISAのための装置は次の構成部品から構成される。

(a) Loading (塗布) チャンバー：適当なポンプと細管を用いてサンプルや試剤を特定の容器から活性化されたポリスチレンプレート/モジュール上に自動的に塗布するためのチャンバーである。

(b) 反応チャンバー：反応チャンバーはマグネトロンと排気ファン及び集中光からなり、マイクロウェーブ照射により行う抗原の結合、遮断、抗体の結合、抗体-酵素接合体の結合のステップと環境温度で行う酵素-基質反応とを予めプログラムされた請求項1に記載された時間で行うためのチャンバーである。

40

(c) 洗浄兼乾燥チャンバー：このチャンバーにおいては、MELISAの各ステップの終了後にプログラムされた指示によりELISAプレートまたはモジュールの洗浄と乾燥を自動的に行う。

(d) 検出チャンバー：このチャンバーは分光光度計を用いて色度検出を行うために使用する。

(e) 移送架台：ELISAプレートまたはモジュールをチャンバーからチャンバーへ移送するために用いられる。

(f) 制御ユニット：適切なハードウェア及びソフトウェアにより請求項1に記載のMELISA方法を制御する計算手段からなるマイクロプロセッサを備える。

50

【 0 0 8 4 】

【本発明の効果】

従来の E L I S A の方法は完了までに数時間から 2 日間を要し、臨床診断に加えて種々の分野で世界的に使用される処理法としては重大な障害である。緊急医療の場合、患者が薬物治療を受ける前に診断の段階で貴重な時間を失ってしまう。それ故に、本発明による短時間 E L I S A 処理法である M E L I S A は、病気の診断、生化学的医療の研究及びその他の関連分野において有益であり有用性がある。本発明の E L I S A 処理法の主たる効果を以下の通りである。

【 0 0 8 5 】

1 . 本発明による方法は現存する従来の E L I S A の方法より極めて迅速である。

10

【 0 0 8 6 】

2 . 本発明による方法が要する総時間は 1 0 分に満たない。このように、本発明による方法は煩わしい処理に費やす時間を不要なものとする。

【 0 0 8 7 】

3 . 本発明による方法は非常に高感度で貴重な抗原または抗体の僅かな量で行える。

【 0 0 8 8 】

4 . 本発明による方法は極めて正確であり、酵素 - 基質反応が溶液中で行うことができ、分光光度計により定量できる。

【 0 0 8 9 】

5 . 本発明による方法は簡単であり、如何なる付加的専門性も付加的試剤も必要としない

20

。 【 0 0 9 0 】

6 . 本発明による方法は費用効果が高く、殆どの研究室に備えられている家庭用マイクロウェーブ・オープン以外には如何なる付加的装置も必要としない。

【 0 0 9 1 】

7 . 本発明による方法は E L I S A の重要な基準である再現性がある。

【 0 0 9 2 】

8 . 本発明による方法によれば非特異性結合は少量であり無視し得る程度である。

【 0 0 9 3 】

9 . 本発明による方法は通常人によって変わる人的エラーを最小限にできる自動化の可能性を有する。

30

【 0 0 9 4 】

1 0 . 本発明による方法は、直接 E L I S A 、間接 E L I S A やサンドウィッチ E L I S A などのような種々のタイプの E L I S A のみならず、放射標識免疫検定法、放射性免疫吸着試験、放射性アレルゲン吸着試験、ピオチン - アヴィジン / ストレプトアヴィジン免疫検定法、免疫プロット法、免疫染色法などのような他の免疫検定法にも適用することができる。

【 0 0 9 5 】

このように、本発明による方法は迅速であり、経済的であり、再現性があり、簡単であり且つ自動化の可能性を有している。本発明による方法は、臨床診断、分子生物学、農業、食品技術、環境科学、生科学的医療研究及びその他の分野で重要性が増大し、人類にとって有益なものである。

40

【 0 0 9 6 】

【参考文献】

1 . Douillard , J . Y . and Hoffman , T . (1 9 8 3) Methods in Enzymology 9 2 , 1 6 8 - 1 7 4 .

2 . Van Emon , J . M . and Lopez - Avila , V . (1 9 9 2) Analytical Chemistry , 6 4 . 7 9 A - 8 8 A .

3 . Linde , D . G . and Goh , K . S . (1 9 9 5) Pesticide Outlook , 1 8 - 2 3

50

4. Salgame, P., Varadhachary, A.S., Primiano, L.L., Finke, J.E., Muller, S. and Monestier, M. (1996) *Nucleic Acids Res.* 25, 680 - 681.
5. Satoh, A., Fukui, S., Yoshino, S., Shinoda, M., Kozima, K. and Matsumoto, I. (1999) *Analytical Biochemistry* 275, 231 - 235.
6. Larsson, P.H., Johansson, S.G.O., Hult, A. and Gothe, S. (1987) *Journal of Immunological Methods* 98, 129 - 135 10
7. Boon, M.E. and Kok, L.K. (1992) *Microwave irradiation in immunostaining*, p.256 - 285. In *Microwave Cookbook of Pathology: The Art of Microscopic Visualisation*. 3rd. Ed. Columbia press Leyden, Leiden
8. Boon, M.E. and Kok, L.K., Moorlag, H.E. and Suurmeijer (1989) *Am. J. Clin. Pathol.* 92: 137 - 143.
9. Chiu, K.Y. and K.W. Chan (1987) *J. Clin. Pathol.* 40:689 - 692. 20
10. Hjerpe, A., Boon, M.E. and Kok, L.P. (1988) *Histochem. J.* 20:388 - 396.
11. Kok, L.P. and Boon, M.E. (1992) *microwave Cookbook for Microscopists: Art and Science of Visualization, Third Edition*. Coulomb Press Leyden: The Netherlands
12. Sawhney, S., Chakravarti, R.N., Jain, P. and Vinayak, V.K. (1980) *trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 16 - 29.
13. Sharma, G.L., Naki, S.R. and Vinayak, V.K. (1984) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sc.* 62:117 - 133. 30
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265
15. Voller, A., Bidwell, D., Barrett, A. *Micropate ELISA and its application*, In *Immunoenzymatic Assay Techniques*. Malvano R. ed. The Hague martinus Nijhoff Publ. 1980, p104 - 115. 40
16. Banerjee, B., Chetty, A., Joshi, A.P. and Sarma, P.U., (1990) *Asian Pacific J Allergy immunol.* 8:13 - 18.
17. Rosenberg, M., Patterson, R., Mintzer, R., Cooper, B.J., Roberts, M. and Harris, K.E. *Ann Intern Med.* (1997), 86:405 - 414.
18. Boon et al, PCT Patent application WO 89/03038 1989 Apr.

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/14868 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543
- (21) International Application Number: PCT/IN00/00075
- (22) International Filing Date: 16 August 2000 (16.08.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (71) Applicant (for all designated States except US): COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH [IN/IN]; Rafi Marg New Delhi 110 001, Maharashtra (IN).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): NAHAR, Pradeep [IN/IN]; Centre for Biochemical Technology, Mall Road, Delhi 110 007, Maharashtra (IN). BORA, Utpal [IN/IN]; Centre for Biochemical Technology, Mall Road, Delhi 110 007, Maharashtra (IN). SHARMA, Gaiinda, Lal [IN/IN]; Centre for Biochemical Technology, Mall Road, Delhi 110 007, Maharashtra (IN).
- (74) Agents: NATARAJ, Guruswamy et al.; Subramaniam, Nataraj & Associates, E 556 Greater Kailash II, New Dehli 110 048, Maharashtra (IN).
- (81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/14868 A1

(54) Title: A RAPID METHOD FOR MICROWAVE MEDIATED ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

(57) Abstract: This invention relates to a rapid and efficient method for carrying out enzyme-linked immunosorbent assay for detection of minute quantities of biomolecules such as antigen, antibody etc. This invention particularly relates to microwave mediated immobilization of antigen or antibody on to the activated surface followed by performing subsequent steps of ELISA by controlled microwave irradiation. The invented procedure has dramatically reduced the total time required for ELISA to less than 10 minutes from hours to days. The invented ELISA procedure is rapid, economical, reproducible and simple and can be automated. The invented procedure is useful for carrying out ELISA in clinical diagnostics, molecular biology, agriculture, sericulture, food technology, environmental science, biomedical research and other related fields.

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

A RAPID METHOD FOR MICROWAVE MEDIATED ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to a rapid method for carrying out microwave mediated ELISA (MELISA). More particularly, this invention relates to a rapid and efficient method for microwave mediated ELISA (MELISA) wherein all the major steps of ELISA can be performed under microwave irradiation in short time. This method is useful in clinical diagnostics, molecular biology, agriculture, food technology, environmental science etc.

The invented ELISA method is simple, time saving and obviates the time consuming cumbersome procedure. This method has the potential for automation.

This method has the advantage over the existing methods for ELISA which take long time usually ranging from several hours to 2 days whereas the invented method takes less than 10 minutes. It is particularly useful for disease diagnosis where quick results are required.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) is a very sensitive technique used for semiquantitative or quantitative determination of the concentration of certain antigens and antibodies. ELISA has become a useful tool in disease diagnosis in both animals and plants. Apart from this, its other applications include screening of monoclonal antibodies during the course of their production (Douillard, J.Y. and Hoffman, T., 1983), pesticide residue detection in crop produce (Van Emon, J.M. and Lopez-Avila, V., 1992) and environmental samples like soil and water (Linde, D.G. and Goh, K.S., 1995), detection of apoptosis in tissue culture etc. (Salgame, P. et al, 1996). Polystyrene microtitre plate is used universally for carrying out ELISA, as it is transparent, cheap, easily available, can be moulded to any desired shape and has a property of binding proteins through adsorption. Conventional methods of ELISA are based on the immobilization of antigen or antibody onto the surface of

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

the wells of a polystyrene microtitre plate through adsorption. This is attributed to the non-covalent interaction between the biomolecule and the polystyrene surface.

However, adsorption is usually too inefficient a process to give good yields and doesn't always proceed in a dose dependent manner. To overcome the inefficiency of conventional methods covalent immobilization of biomolecules onto the microtitre plate has been carried out by many (Sato, A. et al, 1999). Covalent binding of immunogens to grafted plastic surfaces has also been reported (Larsson, P.H. et al, 1987). Despite this, the conventional ELISA method requires very long time varying from several hours to 2 days for completion. This is the main drawback of different ELISA methods, either based on adsorption or covalent binding. In case of medical urgency precious time is lost in diagnosis before the patient could be given medication. In agriculture, ELISA is useful for detecting pesticide residues in crop produce and environmental samples. Export and marketing of crop produce can be delayed as a consequence of this handicap in the ELISA method, which contributes to loss of valuable foreign exchange.

The applicants have developed a novel and unique method whereby ELISA can be carried out rapidly by the use of microwaves. Microwaves are known for accelerating immunohistochemistry for about a decade (Boon, M.E and Kok, L.P., 1992; Boon, M.E. et al, 1989; Boon, M.E. et al, PCT patent application WO 89/ 03038; Chiu, K.Y. and Chan, K.W., 1987; Hjerpe, A. et al, 1988).

Covalent immobilization of antigen or antibody on to a polystyrene surface by microwave irradiation has not been reported so far. In fact, all the major steps of ELISA by microwave irradiation in such a short time to detect minute quantities of antigen or antibody by measuring optical density was not known in the prior art.

However, there are attempts for doing one of the steps of ELISA by microwave irradiation (Hjerpe, A. et al, 1988) where polystyrene ELISA plates were coated first with

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

rabbit anti-carcinoembryonic antigen by incubating over night at 4°C, followed by incubation of the antigen (CEA). In the subsequent step i.e. after the addition of enzyme-linked antibodies the authors studied the effect of microwave irradiation on antigen-antibody reactions.

5 In another experiment by the same authors, ELISA plates were first coated with normal mouse serum by incubating over night at 4°C, followed by overnight incubation with non-labeled rabbit anti-mouse Ig. In the subsequent step they added mouse PAP (peroxidase-antiperoxidase) complexes and determined the effect of microwave irradiation on the reactivity constants of reactions of this last step.

10 In third experiment Hjerpe et.al first coated the plates with non-specific mouse serum followed by incubation with biotinylated horse-anti-mouse IgG. The plates were then used to study the effect of microwaves upon the subsequent binding of biotin-avidin complexes.

The reaction yields in all the above experiments were smaller in samples subjected to microwave irradiation as compared to those processed without microwave stimulation. The experiments showed that the microwaves caused a major loss of reactivity and the total yields were approximately 10% to 15% compared to conventional one that was carried out outside the microwave oven. According to authors, the diminished value in the microwave technique may be due to too high temperatures in the wells, despite the fact that a water load (a beaker of water to absorb excess microwave energy) and chilled bottom plate were taken as a
20 precautionary measure.

In further ELISA experiment authors (Koh and Boon, 1992) used a fiberoptic thermometer to restrict the temperature below 40°C. Here also a water load of 200 ml tap water was taken. Besides, the fluid in the wells was stirred by slowly blowing air through the solution via thin plastic tips, which were inserted into the wells. In an experiment the authors
25 carried out only two steps namely, antibody and conjugate binding steps by microwave

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

irradiation for 6 minutes at 150 watts each.

In another experiment, antibody, antigen and conjugate binding steps were carried out in 15, 30 and 30 minutes respectively using 45-50% microwave power in each step.

Remaining steps in both the experiments were carried out by conventional procedure.

5 But the ELISA values were found to be much less in the above experiments than the conventional method.

According to authors, the longer exposure time gave higher extinction value (ELISA value) but the time gain was not attractive. In fact there was no benefit when exposure time of 30 minutes or more were used. Too short exposure times led to extinction values which, were
10 rather low and could not be used.

The reported methods of ELISA by microwave exposure has several drawbacks such as (1) the results (ELISA value) were much less than the conventional procedure, (2) the time gain was not attractive. It may be possible to get comparable results (ELISA value) by doing the ELISA out side microwave oven in the same time, (3) procedure required water load, (4)
15 it required cooling system or chilled bottom plate, (5) it needed a stirring system in the well of the microtitre plate, (6) not all the steps were carried out by microwave energy and the reported ELISA procedure has little or no potential for automation.

The applicants in the present invention have overcome all the above drawbacks. In fact, like thermal energy microwave can also activate or inactivate a biomolecule. Without
20 proper conditions the microwave may cause partial or total destruction of the biomolecule leading to low or undesirable ELISA value. In the invented procedure proper conditions were found, most of, which are contrary to the reported method, or not known in the prior art. In the invented method all the steps except color development are carried out by microwave stimulation. Blocking step was not carried out by microwave irradiation in the published
25 procedure as it gave nonspecific binding, whereas the applicants have invented a method

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

where blocking step is carried out in short time by microwave irradiation. Longer microwave exposure time gave higher ELISA value in the reported method whereas in the invented procedure, it leads to destruction of material or nonspecific binding. This may be because water load or the cooling system used in the reported method absorbed most of the microwave energy giving minimum microwave effect and a significant effect of time as in the conventional method. In contrast, the invented method does not require any water load, cooling system or stirring system. Moreover, in the invented method about 200 times less (excluding color development step) time requires for ELISA than the conventional one (which takes around 18 hours) with comparable or even better ELISA value. Hence, it also has a great potential for automation.

The reported ELISA was carried out on a microtitre plate that did not bind the biomolecule through covalent linkage. In fact, it is known that the microwaves may readily effect the integrity of the noncovalent secondary bonding, such as hydrogen bonds, hydrophobic interactions and Van der Waal's interaction.

15 **OBJECTS OF THE INVENTION**

The main object of the present invention is to provide a rapid and efficient method for enzyme linked immunosorbent assay to detect minute quantities of antigen or antibody spectrophotometrically for rapid diagnosis of diseases.

Another object of the present invention is to provide a technique, which is simple, reproducible and does not require additional expertise or costly equipment.

Another object of the present invention is to provide a rapid technique, which has the potential for automation and which can minimize human error that usually varies from person to person.

SUMMARY OF THE INVENTION

25 With a view to achieve the objects and overcoming the disadvantage of known ELISA

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

method, a rapid and efficient method is provided for microwave mediated ELISA (MELISA) which comprises the steps of (i) covalent immobilization of the antigen or antibody on to the activated solid surface by microwave irradiation, (ii) blocking the free surface with blocking agent by brief microwave irradiation, (iii) binding of antibody or antigen by controlled microwave irradiation (iv) binding of conjugate by controlled microwave irradiation, (v) adding dye-substrate to the wells and (vi) recording the absorbance value.

Microwave mediated ELISA (MELISA) procedure is carried out on an activated surface in a very short time (around 10 minutes) and with the same efficacy as in the conventional ELISA carried out at 37°C, in 16-18 hours.

This invention has the potential of automation or semi automation of the ELISA procedure.

Microwaves are known to effect the integrity of the noncovalent secondary bonding, such as hydrogen bonds, hydrophobic interactions and Van der Waal's interaction.

To overcome this problem the applicants activates the surface of the microtitre wells prior to use. The activated surface immobilizes the antigen through a covalent bond by a brief microwave exposure. This covalently immobilized antigen is stable enough to withstand repeated but brief microwave exposure, which were needed for performing the subsequent steps of ELISA. Subsequent steps of biomolecule binding in the ELISA procedure are through non covalent binding which are susceptible to microwave energy. These problems are overcome by controlling the time and energy of the microwave irradiation in each step.

Novelty of the present invention is that the ELISA is carried out on to an activated surface capable of forming covalent linkage with the proteinaceous ligand.

Microwave mediated covalent immobilization of biomolecule, more preferably antigen or antibody on to the activated surface is another novelty of this invention.

Controlled microwave irradiation in each step of ELISA procedure is another new

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

approach.

In the invented procedure, all the steps of ELISA such as antigen binding, blocking, antibody and conjugate binding are carried out by microwave irradiation and only enzyme-substrate reaction is performed outside microwave oven at room temperature. The invented procedure of ELISA is very fast with comparable or even better ELISA value than the
5 conventional method.

Another novelty of the present invention is that the invented ELISA procedure does not require any water load or stirring system.

Another novelty of the present invention is that the invented ELISA procedure can be
10 fully or partially automated with the use of a specially designed device.

Another novelty of the present invention is that the invented procedure can be used for other immunoassays like radio immunoassay, radio-immunosorbent test, radio allergosorbent test, biotin- avidin /streptavidin immunoassay, immunoblotting, immunostaining etc. apart from different types of ELISA such as direct ELISA, indirect
15 ELISA, sandwich ELISA and alike.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides a new approach for enzyme linked immunosorbent assay technique on an activated microtitre plate, module or well by microwave exposure. Activated surface immobilizes the antigen through covalent bonding by microwave
20 irradiation. This covalently immobilized antigen is stable enough to withstand repeated but brief microwave exposure, which are needed for performing the subsequent steps of ELISA. ELISA is a multistep and delicate process where improper condition in any step may hamper the whole results.

In the invented procedure inert solid surface such as polystyrene is activated by
25 photochemical reaction in dry condition using a photoactivable compound. Activation of the

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

solid support is made by exposing the support coated with the photoactivable compound to UV radiation or bright sunlight. This activated support is used for microwave mediated ELISA (MELISA) and for control ELISA to detect antibodies, to example *E.histolytica* and *Aspergillus fumigatus*. When untreated support is used it failed to bind the biomolecule in such a short time by microwave irradiation.

Microwave irradiation is performed inside a domestic microwave oven (BPL-Sanyo, India), operating at a frequency of around 2450 MHz.

The amoebic antigen is obtained from the culture of *E.histolytica* as per published procedure (Sawhney, S., et al, 1980; Sharma, G.L, et al, 1984). The protein concentration of the antigens was 1.54 mg per ml as determined by the method of Lowry *et.al.* (Lowry, O.H., et al, 1951). The antigen was diluted before performing ELISA and a concentration of 1.0 μ g per well was used for coating the wells.

Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2, 0.01 M is used as coating buffer.

Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2, 0.01 M together with 0.1% tween 20 is used as washing buffer.

Blocking solution is made by dissolving 2% BSA in 0.01 M PBS, pH 7.2.

Substrate solution is prepared by adding 0.067% of o-phenylenediamine and 0.043% of H₂O₂ in 0.1 M phosphate citrate buffer, pH 4.5).

Hyperimmune sera to *E.histolytica* is raised in Newzealand White rabbits as per the methods of Sawhney *et al* (Sawhney *et. al*, 1980). The antibody titres in the sera are checked by gel-diffusion test.

The antibody (+ve sera) is diluted before performing ELISA and 1:300 dilution in PBS is used for the experiments.

Rabbit is bled through the ear vein before giving the immunization dose of *E.histolytica* antigen to obtain negative control sera (-ve sera). 100 μ l of diluted (1:300) -ve

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

sera is used for each well.

Horse radish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG is purchased from Sigma as lyophilized powder.

After reconstitution, the optimum dilution is found to be 1: 4000 as determined by checkerboard titration, which is used in the experiments.

ELISA is a 5-step procedure, namely antigen binding, blocking, antibody binding, conjugate binding and color development. Each step of MELISA is optimized by carrying out the subsequent steps by conventional ELISA procedure. Conventional ELISA is carried out by overnight coating the activated wells with antigen at 4°C, blocking the wells in 2 hours at 37°C followed by antibody and conjugate binding at 37°C for 2 h each and color development that is enzyme-substrate reaction at room temperature for 5 minutes followed by reading absorbance.

In the invented procedure, the first step of ELISA is performed by covalent immobilization of the amoebic antigen onto the activated polystyrene microwell plate by microwave irradiation at 700 watts in different duration of time. Binding, is detectable even in 10 seconds which increases with the increase in time of irradiation (Table 1). At 90 seconds the antigen binding becomes more or less same as 70 seconds of microwave irradiation. Hence, optimum time for antigen immobilization is taken as 70 seconds. In control experiments carried out for the same duration that is 70 seconds at 37°C, no binding of antigen to the activated polystyrene surface is observed.

In the second step of MELISA, blocking is carried out with 2% BSA in 10 seconds in the microwave oven at a power output of 700 watts to block the free surface of the activated surface. Further increase in irradiation time showed non-specific binding (Table 2.)

In the third step of MELISA, antibody binding to the immobilized antigen is carried out at 155 watts for 100 seconds. This is a crucial step where harsh conditions such as excess

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

time or higher power output leads to nonspecific binding as shown in Table-3. At 155 watts in 50 seconds and 100 seconds, no nonspecific binding is observed. Although the observed OD is very low in 50 seconds, 100 seconds is found to be excellent, giving high ratio of -ve to +ve sera. Increase in time to 150 seconds increases the nonspecific binding (table 4).

5 In the fourth step of MELISA, conjugate binding is carried out by microwave irradiation at 155 watts for different duration of time. Excellent result is obtained in 100 seconds (Table 6). Harsh condition such as excess time or higher energy such as 700 watts leads to nonspecific binding (Table 5).

10 In each step control experiment is carried out by doing the same experiment outside microwave oven for the same duration of time. In all this experiments negligible or undesirable ELISA value (nonspecific binding) is obtained.

After optimizing each step of MELISA, the applicants carried out all the steps with optimized conditions of microwave irradiation without damaging the biomolecules. To achieve it the applicants have immobilized antigen on to the activated well in 70 seconds, 15 blocking in 10 seconds, antibody binding in 100 seconds and conjugate binding at 100 seconds of irradiation. The total time required for all these steps are 280 seconds only by the invented procedure whereas conventional ELISA is done in about 18 hours.

MELISA and ELISA to detect *E.histolytica* antibodies are repeated several times under similar experimental conditions and the results are found to be highly reproducible as 20 shown in Table- 7.

MELISA procedure is further verified by detecting *Aspergillus fumigatus* antibody from patients sera. *A. fumigatus* antigen is obtained from static culture as per published procedure (Banerjee, B., et al, 1990).

25 The protein concentration of the antigens is found to be 12.5 mg per ml as determined by the method of Lowry *et.al.* (Lowry *et.al.*, 1951). Immunoreactivity of the antigen is

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

checked by using hyperimmune serum raised in Newzealand White rabbits.

Sera samples are obtained from 10 patients of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). All these patients fulfill the clinical criteria of ABPA as described earlier (Rosenberg, M., et al, 1997).

5 Negative control sera samples are taken from 10 volunteers who are apparently healthy and do not have any respiratory or other disease.

Pooled positive and negative sera are taken as the controls for ELISA, which are found to be comparable in both MELISA and conventional ELISA.

10 Horse radish peroxidase conjugated with anti-human IgG is purchased from Sigma as lyophilized powder. After reconstitution, the optimum dilution of the conjugate is found to be 1:4000 as determined by checkerboard titration.

A.fumigatus antibody (present in patient sera) detected by the invented method is in agreement with the conventional ELISA procedure (Table.8)

The results obtained in different experiments are given comparative grades as below:

15 Excellent = + + + +
Very good = + + +
Good = + +
Poor = +
Undesirable or no results = -

20 The total time required for MELISA is less than 10 minutes. However, time required in each step may vary depending on the biomolecules where excellent results can be obtained by minor modification of reaction conditions that is minor alternation in duration and energy of irradiation.

25 Accordingly the present invention provides a rapid method for microwave mediated enzyme-linked immunosorbent assay characterized in using an activated solid support

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

wherein the said method comprises:

- (a) providing an activated solid support,
- (b) loading a biomolecule selected from an antigen or antibody by dissolving the said biomolecule in a coating buffer into the activated well of the said solid support and
5 placing the said well inside a microwave oven followed by irradiating the said well with microwaves at a frequency ranging between 2300-2500 MHz with the power output ranging between 600-900 watts for a period ranging from 50-100 seconds followed by washing the well thoroughly with an appropriate washing buffer,
- (c) blocking the free sites of the well with an immobilized biomolecule as obtained from step
10 (b) as above by loading blocking solution into the said well and irradiating it inside the microwave oven at a frequency of from 2300-2500 MHz with a power output ranging between 600-800 watts for a period ranging from 5-20 seconds and washing the said well with an appropriate washing buffer,
- (d) loading the corresponding antibody or antigen dissolved in a buffer into the well
15 immobilized with antigen or antibody as obtained from step (c) above followed by irradiation of said well inside the microwave oven at a frequency of from 2300-2500 MHz with a power output ranging from 50-200 watts for a period ranging from 90-200 seconds followed by washing with washing buffer,
- (e) loading an appropriate enzyme- conjugate dissolved in a suitable buffer into the above
20 said well obtained from step (d) and irradiating the said well inside a microwave oven at a frequency of from 2300-2500 MHz with a power output ranging from 100-300 watts for a period ranging from 50-150 seconds followed by washing with a washing buffer,
- (f) adding a substrate-dye-buffer to the above well as obtained from step (e) as above and
25 keeping it for a period ranging from 4 to 10 minutes in dark followed by addition of stop solution and measuring optical density of the solution by spectrophotometer at a suitable

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

wavelength.

In an embodiment of the present invention the solid support used is selected from the group consisting of materials such as polystyrene, polypropylene, polyethylene, glass, cellulose, nitrocellulose, silicagel, polyvinyl chloride, polyaniline and alike.

5 In an embodiment of the present invention the preferred solid support used is polystyrene.

In yet another embodiment the solid support is selected from any shape, form and size such as sheets, plates, test particles such as beads and microspheres, test tubes, test sticks, test strips, well, ELISA plate, microwell plate or module.

10 In an embodiment of the present invention the solid support used for immobilizing biomolecules is selected from any support having at least one active functional group capable of binding ligand molecules by covalent means.

In yet another embodiment of the present invention the functional group is selected from halide, aldehyde, acetyl, epoxide, succinamide, isothiocyanate, acylazide and alike.

15 In yet another embodiment of the present invention the functional group may be present in the support itself or can be introduced by conventional chemical or photochemical or other methods known to prior art.

In yet another embodiment of the present invention the functional group is introduced on to the solid support by photochemical reaction in dry condition using a photoactivable
20 compound which is selected from 4-fluoro-3-nitroazidobenzene, N-hydroxysulfo-succinimidyl 4-azidobenzoate, N-hydroxysulfo-succinimidyl 4-azidosalicylic acid and alike.

In yet another embodiment of the present invention polystyrene surface is activated by coating with 1-fluoro-2-nitro-azidobenzene and exposing the coated support in dry condition to UV radiation at 365nm.

25 In yet another embodiment of the present invention the light source for photochemical

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

reaction is selected from UV lamp, laser beam, bright sunlight or alike.

In yet another embodiment of the present invention time for photoreaction for activation of solid support is selected from 10 seconds to 10 hours.

In yet another embodiment microwave irradiation is performed in a microwave apparatus selected from domestic microwave oven, specially designed microwave oven or
5 any apparatus or chamber in which microwave is generated and alike.

In yet another preferred embodiment of the invention, the first step of ELISA, is carried out by covalent binding of antigen or antibody onto the activated plate by microwave irradiation at a frequency of from 2300-2500 MHz with the power output ranging between
10 600-900 watts for a short period ranging from 50-100 seconds.

In yet another preferred embodiment of the invention the second step of ELISA, that is the blocking step is carried out by microwave irradiation at a microwave frequency of from 2300-2500 MHz with a power out put ranging between 600-800 watts for a short period ranging from 5-20.

In yet another preferred embodiment of the invention the third step of ELISA, that is
15 corresponding antibody or antigen binding is carried out by microwave irradiation at the microwave frequency of from 2300 to 2500 MHz with power output of from 50 to 200 watts in a period ranging from 90 to 200 seconds.

In yet another preferred embodiment of the invention the fourth step of ELISA, that is
20 enzyme-conjugate binding is carried out by microwave irradiation at the microwave frequency of from 2300 to 2500 MHz with power output of from 100 to 300 watts in a period ranging from 50 to 150 seconds.

In yet another preferred embodiment of the invention the total time for antigen binding, blocking, antibody binding and conjugate binding is ranging from 195 to 470
25 seconds wherein the total time for conventional method usually is ranging from 10 hours to

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

24 hours.

In another embodiment to the present invention, the antigen can be dissolved in a coating buffer of suitable composition having a pH, in the range of from 6.5 to 11 with molarity ranging from 0.005 M to 0.1 M compatible with the antigen such as carbonate
5 buffer, phosphate buffer and alike.

In yet another preferred embodiment of the invention, washing buffer used is a mixture of phosphate buffer having a pH, in the range of from 6.5 to 11, with molarity ranging from 0.005 M to 0.1 M and tween 20 in the range between 0.05% to 3%.

In yet another preferred embodiment of the invention, blocking reagent is selected
10 from bovine serum albumin, skimmed milk powder, gelatin and alike.

In another embodiment to the present invention biomolecule is selected from antigen or antibody. Antigen may be any, biomolecule, microorganism, substance etc. that elicits or has the potential to elicit an immune response.

In yet another preferred embodiment of this invention, antibody is selected from any
15 biomolecules, which is produced by the host in response to inoculation with the specific antigen and has capabilities of binding to the antigen in a specific manner.

In yet another preferred embodiment of this invention, conjugate is a specific biomolecule having antibody or antigen conjugated with an enzyme selected from peroxidase or alkaline phosphatase.

20 In yet another preferred embodiment of this invention, enzyme may be replaced by a label selected from chromophore, fluorophore and alike which facilitates its assay.

In yet another preferred embodiment of this invention, the invented procedure can be used for other immunoassays like radio immunoassay, radio-immunosorbent test, radio allergosorbent test, biotin- avidin/streptavidin immunoassay, immunoblotting, immunostaining etc. apart
25 from different types of ELISA such as direct ELISA, indirect ELISA, sandwich ELISA and

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

alike.

The invention further provides an apparatus for microwave mediated enzyme linked immunosorbent assay (MELISA) comprising (a) a loading chamber, for loading the samples or reagents from a specified bottle from a fine tube by a suitable pump onto the activated polystyrene plate/module automatically; (b) a reaction chamber consisting of magnetron, exhaust fan etc. for carrying out all the steps such as binding of the antigen, blocking, antibody binding and antibody enzyme conjugate binding by microwave irradiation and enzyme substrate reaction without microwave stimulation at ambient temperature in a pre-programmed time; (c) a washing cum drying chamber for washing and drying the said ELISA plate or module automatically by a pre-programmed command after each step of the MELISA procedure; (d) a detection chamber for colorimetric detection with the help of the spectrophotometer; (e) a moving platform is used for carrying the Elisa plate/modules from one chamber to another chamber; (f) a microprocessor based computing means for controlling MELISA method through suitable hardware and software.

This invention is further explained with the help of the following examples and should not be construed to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1**Activation of solid support.**

Wells of a module (12 well polystyrene module, Dynatech, USA) are loaded with 1.82 mg 1-flouro-2-nitro-azidobenzene (FNAB), dissolved in 100µl of methanol per well and dried properly in the dark. FNAB coated wells are then irradiated for 10 min. by UV light at 365 nm in a UV Stratalinker 2400 (Stratagene®, USA) or kept under bright sunlight for 1 h. The wells are then washed several times with methanol to remove the unbound linker and dried at room temperature. These activated wells of the module are used for immobilization of antigens or antibodies in the invented procedure.

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

EXAMPLE 2**Immobilization of *Entamoeba histolytica* antigen by microwave irradiation.**

E. histolytica antigen (1µg) diluted in 100µl PBS is loaded into an activated well of a module and subjected to microwave irradiation for 10 seconds inside a domestic microwave oven (BPL-Sanyo, India), operating at a frequency of around 2450 MHz with a maximum power output of around 700 watts. Irradiation is conducted in the microwave oven with the highest power setting of 10, that is the magnetron duty cycle of 100% of an output power of 700 watts.

The well is thoroughly washed with washing buffer so as to remove the unbound antigen. Subsequent steps are carried out by conventional procedure. Thus, blocking with blocking solution (200µl), antibody (100µl) binding and anti rabbit IgG-horse radish peroxidase conjugate (100 µl) binding are carried out by incubation at 37°C for 2 hours each. The well is washed thoroughly after each step by washing buffer. Color development is done using 100 µl of substrate solution. The well is read at 490 nm in an ELISA Reader (Spectramax 190 microplate spectrophotometer, Molecular Devices Corporation, California 94089) and absorbance values are recorded. All the experiments are performed in triplicate wells. Similar experiments are conducted with -ve sera.

A control experiment using microwaves is carried out in a similar manner using untreated wells. Another control experiment is performed using the activated wells by incubating the antigen at 37°C for the same duration as is done under microwaves. There is no immobilization of antigen in both the control reactions.

The whole experiment is separately repeated by varying the time for antigen binding viz. 30, 50, 70, and 90 seconds each.

The results for optimization of antigen binding time for microwave irradiation are given in Table-1

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

EXAMPLE 3**Blocking of free surface with blocking agent by microwave irradiation.**

E. histolytica antigen is immobilized by microwaves in an activated well of a module in 70 seconds as above. After thorough washing with washing buffer 200 µl of blocking solution is added to the well and irradiated with microwaves at 700 watts for 10 seconds. Subsequent steps of antibody and conjugate binding are done outside microwave oven as described in example 2. Color development and absorbance reading are also done as in example 2.

Similar experiments are conducted with -ve sera.

To check the optimum time for blocking, two different experiments are carried out in a similar manner except the microwave exposure time is increased to 40 and 60 seconds. All the experiments are performed in triplicate wells.

The results for optimization of blocking time under microwave irradiation are given in Table-2.

EXAMPLE 4**Antibody binding by microwave irradiation at high energy level.**

E. histolytica antigen is immobilized onto the activated well of a module by microwaves at 700 watts in 70 seconds followed by blocking of free surface with blocking agent by microwave irradiation at 700 watts for 10 seconds as in example 3. Antiamoebic antibody (100 µl) is loaded into the well. The well is then exposed to microwaves for 10 seconds at 700 watt. After washing the wells properly with washing buffer, binding of conjugate and subsequent color development are carried out as in example 3. Similar experiments are conducted with -ve sera. The experiment is repeated varying the time of microwave exposure at 30, 50, 70 and 90 seconds for binding antibodies, keeping all other conditions similar. All the experiments are performed in triplicate wells.

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

The results for antibody binding by microwave irradiation at high energy level are shown in Table-3.

EXAMPLE 5**Antibody binding by microwave irradiation at low energy level.**

5 The experiments are performed here for antibody binding in the similar conditions as described in example 4, except that the antibody binding step is performed at a low energy level that is at 155 watts. Time of microwave exposure is 10, 50, 100 and 150 seconds respectively for four different sets of experiments.

10 The results for antibody binding by microwave irradiation at low energy level are shown in Table-4.

EXAMPLE 6**Conjugate binding by microwave irradiation at high energy level.**

15 *E. histolytica* antigen is immobilized onto an activated well by microwaves at 700 watts in 70 seconds followed by blocking by microwaves at 700 watts for 10 seconds and antibody binding at 155 watts in 100 seconds as in example 5.

100 µl of anti rabbit IgG-horse radish peroxidase conjugate is loaded into the well and is subjected to microwave irradiation at 700 watts. Time of microwave exposure is 5,10, 15 and 20 seconds respectively for four different sets of experiments keeping all other conditions similar as in example 5. All the experiments are performed in triplicate wells.

20 The results for conjugate binding by microwave irradiation at high energy level are shown in Table-5.

EXAMPLE 7**Conjugate binding by microwave irradiation at low energy level.**

25 The experiments are performed here for second antibody-conjugate binding in the similar conditions as described in example 6, except that the second antibody-conjugate

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

binding step is performed at a low energy level that is at 155 watts. Time of microwave exposure is kept at 50, 100 and 120 seconds respectively for four different sets of experiments.

The results for conjugate binding by microwave irradiation at low energy level are shown in Table-6.

EXAMPLE 8**Detection of *E. histolytica* antibodies by Microwave mediated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MELISA) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

E. histolytica antigen is immobilized onto the activated well by microwaves at 700 watts in 70 seconds, blocked with blocking solution by microwaves at 700 watts for 10 seconds, antibody binding at 155 watts in 100 seconds followed by antibody-conjugate binding at 155 watts in 100 seconds as described in above examples. Similar experiments are conducted with -ve sera. All the experiments are performed in duplicate wells and repeated for 5 times. After each step thorough washing are done by washing buffer.

Conventional ELISA is performed with same reagents, substrate and buffer except that all the steps are carried out without microwave stimulation. Thus, ELISA is carried out by coating the activated wells with antigen overnight at 4°C, followed by blocking, antibody and conjugate binding at 37°C for 2 h each. Color development is same for the invented and the conventional procedure.

The results for the detection of *E. histolytic* antibodies by Microwave mediated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MELISA) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) are presented in the Table-7

EXAMPLE 9

Detection of *A. fumigatus* antibodies by Microwave mediated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MELISA) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

Detection of *A. fumigatus* antibodies in patients sera is carried out by Microwave mediated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MELISA) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method in a similar conditions as described in example 8, except that the antigen is *A. fumigatus*, antibody is from 10 different patients sera, control sera having no specific antibody is from healthy volunteers and the conjugate is anti human IgG-peroxidase. All the experiments are performed in duplicate wells.

The results for the detection of *A. fumigatus* antibodies by Microwave mediated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MELISA) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) are presented in the Table-8

10 **Table 1.** Detection of *E. histolytica* antibodies by carrying out first step by MELISA and remaining steps by ELISA procedure.

MELISA: Step-1. Immobilization of antigen by microwave irradiation at 700 watts onto the activated wells in different times as in the table, control: 37°C, 70 seconds

ELISA: (Step - 2 to 5) Conventional procedure

15

Time (in sec)	+ve sera			-ve sera			Remarks
10	0.188	0.196	0.191	0.002	0.004	0.003	++
30	0.208	0.193	0.198	0.005	0.001	0.002	++
50	0.226	0.211	0.214	0.006	0.002	0.004	+++
70	0.363	0.355	0.358	0.005	0.001	0.003	++++
90	0.370	0.360	0.367	0.001	0.003	0.004	++++
Control	0.003	0.001	0.004	0.006	0.004	0.002	-

Table 2: Detection of *E. histolytica* antibodies by carrying out first two steps by MELISA and remaining steps by ELISA procedure.

20 MELISA: Step-1. Ag binding- 70 seconds, 700 watts. Step-2. Blocking- variable time as in

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

the table, 700 watts. ELISA: (Step - 3 to 5) Conventional procedure.

Time (in sec)	+ve sera			- ve sera			Remarks
10	0.270	0.288	0.273	0.006	0.005	0.008	++++
40	0.352	0.377	0.367	0.098	0.092	0.094	++
60	0.293	0.290	0.287	0.283	0.270	0.276	-

Table 3: Detection of *E. histolytica* antibodies by carrying out first three steps by MELISA and remaining steps by ELISA procedure.

- 5 MELISA: Step-1. Ag binding- 70 seconds, 700 watts. Step-2. Blocking- 10 seconds, 700 watts. Step-3. Antibody binding-variable time as in the table, 700 watts. ELISA: (Step - 4 & 5) Conventional procedure.

Time(in sec)	+ve sera			- ve sera			Remarks
10	0.216	0.203	0.211	0.087	0.123	0.098	+
30	0.392	0.353	0.388	0.100	0.137	0.114	-
50	1.413	1.177	1.213	0.194	0.180	0.194	++
70	1.313	1.253	1.276	1.263	1.279	1.275	-
90	1.287	1.239	1.238	1.288	1.248	1.234	-

Table 4: Detection of *E. histolytica* antibodies by carrying out first three steps by MELISA and remaining steps by ELISA procedure.

- 10 MELISA: Step-1. Ag binding- 70 seconds, 700 watts. Step-2. Blocking- 10 seconds, 700 watts. Step-3. Antibody binding-variable time as in the table, 155 watts. ELISA (Step - 4 to 5): Conventional procedure.

Time (in sec)	+ve sera			- ve sera			Remarks
10	0.010	0.014	0.010	0.004	0.005	0.007	-
50	0.079	0.087	0.82	0.003	0.006	0.005	+
100	0.511	0.524	0.530	0.014	0.027	0.020	++++
150	0.256	0.276	0.289	0.218	0.221	0.223	-

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

Table 5: Detection of *E. histolytica* antibodies by carrying out first four steps by MELISA and last step by conventional procedure.

MELISA: Step-1. Ag binding- 70 seconds, 700 watts. Step-2. Blocking- 10 seconds, 700 watts. Step-3. Antibody binding- 100 seconds, 155 watts. Step-4. Conjugate binding- variable
5 time as in the table, 700 watts. Step - 5. Color development- 5 minutes at room temperature.

Time (in sec)	+ve sera			- ve sera			Remarks
5	0.147	0.136	0.138	0.032	0.020	0.23	++
10	0.166	0.166	0.168	0.087	0.093	0.85	+
15	0.192	0.171	0.183	0.110	0.119	0.116	-
20	0.388	0.503	0.446	0.312	0.288	0.293	-

Table 6: Detection of *E. histolytica* antibodies by carrying out first four steps by MELISA and last step by conventional procedure.

MELISA: Step-1. Ag binding- 70 seconds, 700 watts. Step-2. Blocking- 10 seconds, 700
10 watts. Step-3. Antibody binding- 100 seconds, 155 watts. Step-4. Conjugate binding- variable
time as in the table, 155 watts. Step - 5. Color development- 5 minutes at room temperature.

Time (in sec)	+ve sera			- ve sera			Remarks
50	0.205	0.189	0.192	0.021	0.018	0.022	++
100	0.558	0.532	0.543	0.036	0.031	0.032	++++
120	0.145	0.193	0.157	0.023	0.014	0.023	+

Table 7: Detection of *E. histolytica* antibodies: Comparison of MELISA and ELISA procedures.

15 MELISA: Step-1. Ag binding- 70 seconds, 700 watts. Step-2. Blocking- 10 seconds, 700
watts. Step-3. Antibody binding- 100 seconds, 155 watts. Step-4. Conjugate binding- 100
seconds, 155 watts. Step - 5. Color development- 5 minutes at room temperature.

ELISA: Step-1. Ag binding- overnight at 4°C. Step-2. Blocking- 2h at 37°C. Step-3.
Antibody binding- 2h at 37°C Step-4. Conjugate binding- 2h at 37°C Step - 5. Color

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

development- 5 minutes at room temperature.

Serial No.	+ve sera				-ve sera			
	MELISA		ELISA		MELISA		ELISA	
1	0.567	0.556	0.539	0.560	0.036	0.070	0.046	0.040
2	0.531	0.556	0.538	0.534	0.096	0.056	0.064	0.070
3	0.541	0.563	0.549	0.547	0.098	0.053	0.064	0.050
4	0.558	0.545	0.574	0.544	0.052	0.080	0.074	0.110
5	0.557	0.564	0.558	0.540	0.049	0.079	0.056	0.090
Remarks	Reproducible		Reproducible		Reproducible		Reproducible	

Table 8: Detection of *Aspergillus fumigatus* antibodies: Comparison of MELISA and ELISA procedures. Same procedures are followed as described in Table-7.

Sample No.	+ve sera				-ve sera			
	MELISA		ELISA		MELISA		ELISA	
1	0.334	0.356	0.339	0.320	0.036	0.070	0.116	0.130
2	0.331	0.356	0.438	0.380	0.096	0.056	0.094	0.110
3	0.351	0.380	0.379	0.410	0.098	0.053	0.164	0.150
4	0.498	0.525	0.574	0.520	0.052	0.080	0.174	0.170
5	0.685	0.664	0.658	0.641	0.049	0.079	0.056	0.080
6	0.367	0.375	0.372	0.390	0.063	0.047	0.093	0.110
7	0.430	0.449	0.412	0.400	0.114	0.131	0.110	0.150
8	0.550	0.560	0.527	0.510	0.090	0.077	0.098	0.100
9	2.204	2.081	1.984	2.300	0.058	0.061	0.073	0.120
10	0.346	0.341	0.327	0.310	0.039	0.037	0.142	0.160
Remarks	Comparable				Less non specific binding in MELISA			

5

Apparatus for MELISA

The apparatus for MELISA can be constructed with the following components:

- (a) Loading chamber: It is the chamber for loading the samples or reagents from a specified bottle through a fine tube and a suitable pump onto the activated polystyrene plate/module

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

automatically.

(b) Reaction chamber: Reaction chamber is consisting of magnetron, exhaust fan and a light focus for carrying out the steps of binding of the antigen, blocking, antibody binding and antibody enzyme conjugate binding by microwave irradiation and enzyme substrate reaction at ambient temperature in a pre-programmed time as claimed in claim 1.

(c) Washing cum drying chamber: In this chamber washing and drying of the ELISA plate or module is done automatically by a pre-programmed command after each step of the MELISA procedure ;

(d) Detection chamber: This chamber is used for colorimetric detection with the help of the spectrophotometer;

(e) Moving platform: It is used for carrying the Elisa plate/modules from one chamber to another chamber;

(f) Control unit: It has microprocessor based computing means for controlling MELISA method as claimed in claim 1 through suitable hardware and software.

Advantages of the invention

Conventional methods of ELISA usually take several hours to 2 days for completion, which is the major drawback for a procedure used worldwide in different fields apart from clinical diagnostics. In case of medical urgency precious time is lost in diagnosis before the patient could be given medication. Therefore, a rapid ELISA procedure invented herein (MELISA) will be beneficial and useful for diagnosis of diseases, biomedical research and other related fields. Main advantages of the invented ELISA procedure are:

1. The invented procedure is very fast than the existing methods of ELISA.
2. The total time required in the invented method is less than 10 minutes. Thus it obviates the time consuming cumbersome procedure.
3. The invented procedure is very sensitive and requires minute quantities of precious

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

antigen or antibody.

4. The invented procedure is very accurate as the enzyme-substrate reaction is done in solution and quantified spectrophotometrically.
5. The procedure is simple and does not require any additional expertise or reagent to do it.
- 5 6. The invented procedure is cost effective and does not require any additional equipment except a domestic microwave oven, which is common in most of the laboratories.
7. The invented procedure is reproducible which is an important criterion for ELISA.
8. The procedure gives minimal or negligible non-specific binding.
9. The procedure has the potential for automation, which can minimize human error, which usually varies from person to person.
- 10 10. The invented procedure has the potential for application in other immunoassays like radio immunoassay, radio-immunosorbent test, radio allergosorbent test, biotin-avidin/streptavidin immunoassay, immunoblotting, immunostaining etc. apart from different types of ELISA such as direct ELISA, indirect ELISA, sandwich ELISA and alike.

15 Thus the invented ELISA procedure which is rapid, economical, reproducible, simple and has a potential for automation. It will be beneficial to human kind due to its increasing importance in clinical diagnostics, molecular biology, agriculture, food technology, environmental science, biomedical research and other related fields

20

25

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

References.

1. Douillard, J.Y. and Hoffman, T. (1983) *Methods in Enzymology* **92**, 168-174.
2. Van Emon, J.M. and Lopez-Avila, V. (1992) *Analytical Chemistry*, **64**, 79 A-88A.
3. Linde, D.G. and Goh, K.S. (1995) *Pesticide Outlook*, 18-23
- 5 4. Salgame, P., Varadhachary, A.S, Primiano, L.L., Finke, J.E., Müller, S. and Monestier, M. (1996) *Nucleic Acids Res.* **25**, 680-681.
5. Satoh, A., Fukui, S., Yoshino, S. Shinoda, M., Kozima, K. and Matsumoto, I. (1999) *Analytical Biochemistry* **275**, 231-235.
6. Larsson, P.H., Johansson, S.G.O., Hult, A. and Gothe, S. (1987) *Journal of*
- 10 *Immunological Methods* **98**, 129-135.
7. Boon, M.E and Kok, L.K. (1992) Microwave irradiation in immunostaining, p. 256-285. In *Microwave Cookbook of Pathology: The Art of Microscopic Visualisation*. 3rd. Ed. Columbia press Leyden, Leiden.
8. Boon, M.E., Kok, L.K., Moorlag, H.E. and Suurmeijer (1989). *Am.J.Clin. Pathol.* **92**:137-
- 15 143.
9. Chiu, K.Y. and K.W. Chan. 1987. *J.Clin.Pathol.* **40**:689-692.
10. Hjerpe, A., Boon, M.E. and Kok, L.P. (1988). *Histochem.J.* **20**:388-396.
11. Koh, L.P. and Boon, M.E. (1992) *Microwave Cookbook for Microscopists: Art and Science of Visualization*, Third Edition. Coulomb Press Leyden: The Netherlands
- 20 12. Sawhney, S., Chakravarti, R.N., Jain, P. and Vinayak, V.K. 1980, *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* **74**: 26-29
13. Sharma, G.L, Naik, S.R. and Vinayak, V.K. 1984, *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sc.* **62**: 117-133.
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951, *J.Biol.Chem.* **193**: 265.
- 25 15. Voller A., Bidwell D, Bartett A. Microplate ELISA and its application, In

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

Immunoenzymatic Assay Techniques. Malvano R. ed. The Hague Martinus Nijhoff Publ. 1980, p 104-115.

16. Banerjee, B., Chetty, A., Joshi, A.P., and Sarma, P.U., 1990, *Asian Pacific J Allergy immunol.* 8:13-18).

5 17. Rosenberg, M., Patterson, R., Mintzer, R., Cooper, B.J., Roberts, M. and Harris, K.E., *Am Intern Med* 1997, 86:405-414).

Other References

10

Patent Documents

Apr., 1989 Boon *et al* PCT patent application WO 89/ 03038

15

20

25

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

CLAIMS

1. A rapid method for microwave mediated enzyme-linked immunosorbent assay characterized in using an activated solid support wherein the said method comprises:
- (a) providing an activated solid support,
- 5 (b) loading a biomolecule selected from an antigen or antibody by dissolving the said biomolecule in a coating buffer into the activated well of the said solid support and placing the said well inside a microwave oven followed by irradiating the said well with microwaves at a frequency ranging between 2300-2500 MHz with the power output ranging between 600-900 watts for a period ranging from 50-100 seconds followed by
- 10 washing the well thoroughly with an appropriate washing buffer,
- (c) blocking the free sites of the well with an immobilized biomolecule as obtained from step (b) as above by loading blocking solution into the said well and irradiating it inside the microwave oven at a frequency of from 2300-2500 MHz with a power output ranging between 600-800 watts for a period ranging from 5-20 seconds and washing the said
- 15 well with an appropriate washing buffer,
- (d) loading the corresponding antibody or antigen dissolved in a buffer into the well immobilized with antigen or antibody as obtained from step (c) above followed by irradiation of said well inside the microwave oven at a frequency of from 2300-2500 MHz with a power output ranging from 50-200 watts for a period ranging from 90-200
- 20 seconds followed by washing with washing buffer,
- (e) loading an appropriate enzyme- conjugate dissolved in a suitable buffer into the above said well obtained from step (d) and irradiating the said well inside a microwave oven at a frequency of from 2300-2500 MHz with a power output ranging from 100-300 watts for a period ranging from 50-150 seconds followed by washing with a washing buffer,
- 25 (f) adding a substrate-dye-buffer to the above well as obtained from step (e) as above and

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

keeping it for a period ranging from 4 to 10 minutes in dark followed by addition of stop solution and measuring optical density of the solution by spectrophotometer at a suitable wavelength.

2. A method as claimed in claim 1 wherein the solid support used is selected from the group consisting of polystyrene, polypropylene, polyethylene, glass, cellulose, nitrocellulose, silicagel, polyvinyl chloride, polyaniline and alike.
3. A method as claimed in claim 1 wherein the preferred solid support used is polystyrene.
4. A method as claimed in claim 1 wherein the solid support is selected from any shape, form and size such as sheets, plates, test particles such as beads and microspheres, test tubes, test sticks, test strips, well, ELISA plate, microwell plate or module.
5. A method as claimed in claim 1 wherein the solid support used for immobilizing biomolecules is selected from any support having atleast one active functional group selected from the group consisting of halide, aldehyde, acetyl, epoxide, succinamide, isothiocyanate, acylazide and alike.
6. A method as claimed in claim 1 wherein the functional group may be present in the support itself or can be introduced by conventional chemical or photochemical or other methods known to prior art.
7. A method as claimed in claim 1 wherein antigen either elicits or has the potential to elicit an immune response.
8. A method as claimed in claim 1 wherein microwave irradiation is performed in an apparatus or chamber where microwave can be generated and is selected from domestic microwave oven, specially designed microwave oven or any apparatus or chamber in which microwave is generated.
9. A method as claimed in claim 1 wherein total time for antigen binding, blocking, antibody binding and conjugate binding is ranging from 195 to 470 seconds.

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

10. A method as claimed in claim 1 wherein blocking agent is selected from the group
consists of bovine serum albumin, skimmed milk powder and gelatin.
11. A method as claimed in claim 1 wherein coating buffer is selected from carbonate buffer,
phosphate buffer having a pH, in the range of from 6.5 to 11, with molarity ranging from
5 0.005 M to 0.1 M.
12. A method as claimed in claim 1 wherein washing buffer used is a mixture of phosphate
buffer saline having a pH, in the range of from 6.5 to 11, with molarity ranging from
0.005 M to 0.1 M and tween 20 in the range between 0.05% to 3%.
13. A method as claimed in claim 1 wherein conjugate used is selected from biomolecule
10 having antibody or antigen conjugated with an enzyme selected from peroxidase or
alkaline phosphatase.
14. A method as claimed in claim 1 useful for carrying out assays selected from the group
consisting of radio immunoassay, radio-immunosorbent test, radio allergosorbent test,
biotin- avidin /streptavidin immunoassay, immunoblotting, immunostaining etc. apart
15 from different types of ELISA such as direct ELISA, indirect ELISA, sandwich ELISA
and alike.
15. An apparatus for microwave mediated enzyme linked immunosorbent assay (MELISA)
comprising
(a) a loading chamber, for loading the samples or reagents from a specified bottle through
20 a fine tube and a suitable pump onto the activated polystyrene plate/module
automatically,
(b) a reaction chamber consisting of magnetron, exhaust fan and a light focus for carrying
out the steps of binding of the antigen, blocking, antibody binding and antibody enzyme
conjugate binding by microwave irradiation and enzyme substrate reaction at ambient
25 temperature in a pre-programmed time as claimed in claim 1.

WO 02/14868

PCT/IN00/00075

(c) a washing cum drying chamber for washing and drying the said ELISA plate or module automatically by a pre-programmed command after each step of the MELISA procedure ;

5 (d) a detection chamber for colorimetric detection with the help of the spectrophotometer ;

(e) a moving platform is used for carrying the Elisa plate/modules from one chamber to another chamber ;

10 (f) microprocessor based computing means for controlling MELISA method as claimed in claim 1 through suitable hardware and software.

15

20

【手続補正書】

【提出日】平成14年6月19日(2002.6.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

マイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法の迅速な方法であって、活性化された固相支持体を用いることを特徴とし、

(a)一または複数のウェルを有する固相支持体を活性化された一または複数の活性化されたウェル有する活性化された固相支持体とし、

(b)抗原あるいは抗体から選択された生分子を前記一または複数の活性化されたウェルに充填し、周波数が2300~2500MHzの範囲で出力が600~900Wの範囲のマイクロウェーブを50~100秒間の範囲で照射して前記生分子を一または複数の活性化ウェルに結合し、その後洗浄緩衝溶液で洗浄して生分子を固定する、

(c)遮断剤溶液を充填し、周波数が2300~2500MHzの範囲で出力が600~800Wの範囲のマイクロウェーブを5~20秒間の範囲で照射して、洗浄緩衝溶液で洗浄することにより前記一または複数の活性化ウェルのフリーな表面を遮断する、

(d)周波数が2300~2500MHzの範囲で出力が50~200Wの範囲のマイクロウェーブを90~200秒間の範囲で照射し、ついで洗浄緩衝溶液で洗浄することにより、第2の抗体または抗原と前記固定生分子に結合する、

(e)周波数が2300~2500MHzの範囲で出力が100~300Wの範囲のマイクロウェーブを50~150秒間の範囲で照射してその後洗浄緩衝溶液で洗浄することにより、対応する抗体または抗原を結合された固定生分子に酵素接合体を結合し生成物を形成する、

(f)前記生成物に基質-染料-緩衝溶液を添加して暗所で4~10分間保管し、その後停止溶液を添加して生成物の光学的密度を計測する、ステップからなることを特徴とするマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項2】

前記固相支持体は、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、シリカゲル、塩化ビニール、ポリアニリン等からなる群より選択されることを特徴とする請求項1記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項3】

前記固相支持体は、ポリスチレンであることを特徴とする請求項2記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項4】

前記固相支持体の形状は、シート状、プレート状、ビーズまたは極小球体のようなテスト用粒体、テスト用管体、テスト用棒体、テスト用線体、ウェル、ELISAプレート、マイクロウェル・プレートあるいはモジュールから選択することを特徴とする請求項1記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項5】

前記テスト用粒体は、ビーズまたは微小球体から選択されることを特徴とする請求項4記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項6】

前記固相支持体は、ハロゲン基、アルデヒド基、アセチル基、エポキシ基、コハク酸アミド基、イソチオシアネート基、アジ化アシル基等からなる群から選択された少なくとも一つの活性基を有することを特徴とする請求項1記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 7】

前記固相支持体は、それ自身の一部に活性基を有するか、または公知の化学的方法あるいは光化学的方法により活性基が導入されたものであることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 8】

前記抗原は、免疫応答を誘出するか、または誘出する能力を有することを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 9】

前記マイクロウェーブの照射はマイクロウェーブを発生する装置またはチャンバー内で行われ、該装置またはチャンバーは家庭用マイクロウェーブ・オーブン、特別に設計されたマイクロウェーブ・オーブンまたはマイクロウェーブを発生する全ての装置またはチャンバーから選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 10】

前記抗原の結合、遮断、抗体の結合及び接合体の結合に要する総時間は 195 ~ 470 秒の範囲であることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 11】

前記遮断剤は、ウシ血清アルブミン、スキムミルク粉末、ゼラチンからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 12】

前記ステップ (b) で使用する緩衝溶液は、pH 6.5 から pH 11 の範囲でモル濃度が 0.005 モルから 0.1 モルの範囲の炭酸緩衝溶液またはリン酸緩衝溶液から選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 13】

前記ステップ (c)、(d)、(e) で使用する洗浄緩衝溶液は、リン酸緩衝溶液と Tween 20 の混合溶液で、リン酸緩衝溶液は pH 6.5 から pH 11 の範囲でモル濃度が 0.005 モルから 0.1 モルの範囲であり、Tween 20 は 0.05 % から 3 % であることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 14】

前記酵素接合体は、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼから選択された酵素を有し、接合体は抗体または抗原を有する生分子から選択されることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 15】

前記マイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法は、種々のタイプの ELISA に加えて、放射標識免疫検定法、放射性免疫吸着試験、放射性アレルゲン吸着試験、ビオチン - アヴィジン / ストレプトアヴィジン免疫検定法、免疫プロット法、免疫染色法及びそれらの混合形態の検定法からなる群から選択された検定法で用いることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 16】

前記種々のタイプの ELISA は、直接 ELISA、間接 ELISA、サンドウィッチ ELISA またはそれらの混合 ELISA から選択されることを特徴とする請求項 15 記載のマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法。

【請求項 17】

(a) ポンプと細管により容器からサンプルあるいは試剤を特定の瓶から請求項 1 記載の活性化固相支持体に自動的に充填する充填チャンバー、

(b) マグネトロンと排気ファンと集中光を備え、抗原の結合、遮断、抗体の結合、抗体酵素接合体の結合のステップをマイクロウェーブの照射により、酵素基質反応を環境温度により、プログラムされた請求項 1 記載の時間で行うための反応チャンバー、

(c) 前記固相支持体である ELISA プレートまたはモジュールを MELISA の各ス

トップの後にプログラムされた指示に基づいて自動的に洗浄乾燥する洗浄兼乾燥チャンバー、

(d) 分光光度計を用いて色度検出を行う検出チャンバー、

(e) チャンバーからチャンバーへ前記 E L I S A プレートまたはモジュールを搬送する搬送架台、

(f) ハードウェア及びソフトウェアにより請求項 1 に記載の M E L I S A 方法を制御する計算手段からなるマイクロプロセッサ、以上の構成部分からなることを特徴とするマイクロウェーブ媒介固相酵素免疫検定法に用いる装置。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/JP 00/00075										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	BUDE U ET AL.: "DRASTISCHE VERKUERZUNG VOM INKUBATIONSZEITEN BEI IMMUNHAEMATOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN DURCH EINSATZ VON MIKROWELLENGERAETEN" INFUSIONSTHERAPIE UND TRANSFUSIONSMEDIZIN, BASEL, CH, vol. 22, no. SUPPL. 01, 1995, pages 92-94, XP000985251 ISSN: 1019-8466 the whole document --- -/-	1-14										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention	*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention											
E earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family											
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 10 May 2001	Date of mailing of the international search report 22/05/2001											
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Stricker, J-E											

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 00/00075

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHANG L-Z ET AL: "USE OF MICROWAVES IN IMMUNOENZYME TECHNIQUES" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, US, vol. 39, no. 9, September 1993 (1993-09), page 2021 XP000985131 ISSN: 0009-9147 abstract Paragraph "Materials and Methods"	1-13
Y	MARANI ENRICO: "Microwave applications in neuromorphology and neurochemistry: Safety precautions and techniques." METHODS (ORLANDO), vol. 15, no. 2, June 1998 (1998-06), pages 87-99, XP002166951 ISSN: 1046-2023 abstract page 92, column 2, paragraph 5 Chapter "Neurochemistry" on pages 94-95	1-14
Y	DORP VAN R ET AL: "ELISA INCUBATION TIMES CAN BE REDUCED BY 2.45-GHZ MICROWAVES" JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY IMMUNOLOGY, TREVIOT-KIMPTON PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 34, no. 2, February 1991 (1991-02), pages 87-96, XP000985204 ISSN: 0141-2760 abstract Chapters "Materials and methods" and "Discussion" page 95, column 1, paragraph 3 page 95, column 2, paragraph 4	1-13
Y	DORP VAN R ET AL: "A RAPID ELISA FOR MEASUREMENT OF ANTI-GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE ANTIBODIES USING MICROWAVES" JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY IMMUNOLOGY, TREVIOT-KIMPTON PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 40, no. 3, 1993, pages 135-147, XP000985202 ISSN: 0141-2760 abstract Chapters "Materials and methods" and "Results" page 146, column 1, paragraph 3 -/--	1-13

4

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/JP 00/00075

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 89 03038 A (BOON MATHILDE ELISABETH ;KOK LANBRECHT PIET (NL)) 6 April 1989 (1989-04-06) cited in the application	15
A	page 3, paragraph 1 claims 1,2	1-14
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 07, 31 July 1996 (1996-07-31) & JP 08 082627 A (SUZUKI MOTOR CORP), 26 March 1996 (1996-03-26) abstract	15
Y	EP 0 604 970 A (CEM CORP) 6 July 1994 (1994-07-06) abstract figure 1	15
Y	US 5 304 766 A (BAUDET JEAN-JACQUES ET AL) 19 April 1994 (1994-04-19) abstract figure 1	15
Y	US 5 455 008 A (EARLEY JAMES J ET AL) 3 October 1995 (1995-10-03) abstract column 11, line 11-18 claims 1,9,22 figures 1-9	15

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No.
 PCT/JP 00/00075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8903038 A	06-04-1989	NL 8702338 A	17-04-1989
JP 08082627 A	26-03-1996	NONE	
EP 0604970 A	06-07-1994	US 5420039 A CA 2111383 A JP 6292885 A	30-05-1995 01-07-1994 21-10-1994
US 5304766 A	19-04-1994	FR 2681431 A AT 172027 T AU 649770 B AU 1030792 A CA 2060037 A,C DE 69227208 D DE 69227208 T EP 0496684 A ES 2124722 T JP 2843702 B JP 5190277 A KR 219888 B	19-03-1993 15-10-1998 02-06-1994 30-07-1992 26-07-1992 12-11-1998 27-05-1999 29-07-1992 16-02-1999 06-01-1999 30-07-1993 01-09-1999
US 5455008 A	03-10-1995	WO 9408759 A	28-04-1994

フロントページの続き

- (72)発明者 ボラ ウトバル
インド国デリー 110 007 モール ロード(番地なし) センター フォー バイオケミ
カル テクノロジー
- (72)発明者 シャーマ ガインダ ラル
インド国デリー 110 007 モール ロード(番地なし) センター フォー バイオケミ
カル テクノロジー

专利名称(译)	微波介导的固相酶免疫测定方法可以快速进行		
公开(公告)号	JP2004517301A	公开(公告)日	2004-06-10
申请号	JP2002519946	申请日	2000-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	科学与工业研究理事会		
申请(专利权)人(译)	科学与工业研究理事会		
[标]发明人	ナハールプラディーブ ボラウトパル シャーマガイन्दラル		
发明人	ナハール プラディーブ ボラウトパル シャーマ ガイन्दラル		
IPC分类号	G01N1/44 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N1/44 G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/543.525.G G01N33/543.501.B G01N33/543.525.W G01N33/531.Z		
代理人(译)	佐藤龙彦		
其他公开文献	JP4056875B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

目的提供一种快速有效的固相酶免疫分析方法，通过分光光度法检测痕量抗原或抗体，以快速诊断疾病。[结构] 抗原或抗体被共价固定在通过微波辐射活化的孔中，并且通过微波辐射在短时间内将孔的自由表面用封闭剂屏蔽。加入。然后，控制微波辐射以结合缀合物，将染料物质加入孔中，并通过分光光度计测量吸光度。使用这种方法，可以在大约10分钟内完成ELISA。

時間 (秒)	+ve 血清			-ve 血清			評価
	0.216	0.203	0.211	0.087	0.123	0.098	
10	0.216	0.203	0.211	0.087	0.123	0.098	+
30	0.392	0.353	0.388	0.100	0.137	0.114	.
50	1.413	1.177	1.213	0.194	0.180	0.194	++
70	1.313	1.253	1.276	1.263	1.279	1.275	.
90	1.287	1.239	1.238	1.288	1.248	1.234	.