

(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2014-509735

(P2014-509735A)

(43) 公表日 平成26年4月21日(2014.4.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	2 G O 5 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-558296 (P2013-558296)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月13日 (2012. 3. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月11日 (2013. 11. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2012/072248
 (87) 国際公開番号 W02012/122929
 (87) 国際公開日 平成24年9月20日 (2012. 9. 20)
 (31) 優先権主張番号 201110063893.0
 (32) 優先日 平成23年3月16日 (2011. 3. 16)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 513231225
 ベイジン ユニジャ テクノロジー イン
 コーポレイティド
 中華人民共和国, ベイジン 102600
 , ダーシン ディストリクト, ティアンフ
 アベニュー チャイナ バイオーメディシ
 ン インダストリー パーク ナンバー9
 , タワー 10-208
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気的化学発光免疫測定法

(57) 【要約】

本発明は、被験 Ru (b p y) 標識したタンパク質 - 一次抗体、ビオチン化タンパク質 - 二次抗体、及び被験サンプルの完全な反応；抗原、抗体、及び磁性粒子を含む複合体を形成するためのストレプトアビジンコーティングした磁性粒子の添加；磁性粒子による電極表面への吸着；ジブチルエタノールアミン溶液の添加を用いた、電気化学法により試験する電気化学発光免疫測定法を開示する。本発明は、対応する電気化学発光免疫測定検出キットも開示する。

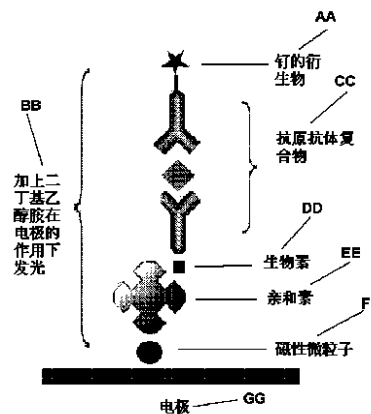


图1 /Fig.1

AA RUTHENIUM DERIVATIVE
 BB ADDING DIBUTYL ETHANOLAMINE AND EMITTING LIGHT BY MEANS OF ELECTRODE
 CC COMPLEX COMPRISING ANTIGEN AND ANTIBODY
 DD BIOTIN
 EE AVIDIN
 FF MAGNETIC PARTICLE
 GG ELECTRODE

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程、

工程 1：被験タンパク質に対するピリジニルテニウム標識した一次抗体、及び被験タンパク質に対するビオチン化した二次抗体を被験サンプルと十分に反応させること、あるいは被験タンパク質に対するピリジニルテニウム標識した抗体、及び被験ビオチン化タンパク質を被験サンプルと十分に反応させる工程、

工程 2：ストレプトアビジンでコーティングした磁性粒子を添加し、抗原、抗体及び磁性粒子を含む複合体を形成するように反応させ、該反応液をフローセルに吸引させ、ここで前記抗原、抗体及び磁性粒子を含む複合体は、磁性粒子を介して電極の表面上に吸着される、工程、

工程 3：ジブチルエタノールアミン溶液を添加し、電圧の印加により E C L 反応を開始させ、光学検出器により走査した光シグナルを回収する工程、

工程 4：濃度勾配の標準溶液を作製し、発光強度の値の変化の対数及び濃度の対数に従って用量反応曲線をプロットし、そして被験サンプル中の被験タンパク質の濃度を計算により得る工程

を含む、電気化学発光免疫測定法。

【請求項 2】

被験サンプルが、血清、尿、及び組織液であることを特徴とする、請求項 1 に記載の電気化学発光免疫測定法。

【請求項 3】

被験タンパク質が、腫瘍マーカータンパク質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の電気化学発光免疫測定法。

【請求項 4】

被験タンパク質が、T3 トリヨードチロニン、ASA 抗精子抗体、トロポニン I、T4 チロキシン、ACA 抗カルジオライピン抗体、CKMB、TSH、AEA 抗子宮内膜抗体、FT3 遊離トリヨードチロニン、AOA 抗卵巣抗体、FT4 遊離チロキシン、ATB 抗トロホプラスト抗体、抗TM 甲状腺ミクロソーム抗体、ZP 抗透明帯抗体、抗TG 抗チオグロブリン抗体、抗HCG 抗体、ヒト胎盤性ラクトゲン、抗TPO 甲状腺ペルオキシダーゼ抗体、HCG、TOX トキソプラズマ抗体、FSH、AFP 胎児性タンパク質、CEA 癌胎児性抗原、PSA 前立腺特異抗原、FPSA 遊離前立腺特異抗原、CMV サイトメガロウイルス抗体、LH 黄体化ホルモン、HSV-1 単純ヘルペスウイルス抗体、PRL プロラクチン、HSV-2 単純ヘルペスウイルス抗体、TES テストステロン、RV ルベラウイルス抗体、PRO プロゲステロン、フェリチン、TOX-Ag トキソプラズマ循環抗原、E2 エストラジオール、CA125、E3 エストリオール、CA153、CA199、HBsAg、NSE ニューロン特異的エノラーゼ、HBsAb、CA50、HBeAg、 α 2ミクログロブリン、HBeAb、コクサッキーウイルス抗体、HBcAb、BGP 骨Glaタンパク質、D-Pyr デオキシピリジノリン、ビタミンD、インスリン、PCIIII IIII型プロコラーゲン、C-ペプチド、IV型コラーゲン、インスリン抗体、LN ラミニン、グルカゴン、HA ヒアルロン酸、GAD-AB グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体、Fn フィブロネクチン、インフルエンザウイルスB、パラインフルエンザウイルス、EBウイルス、麻疹ウイルス、肺炎マイコプラズマ、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、ムンプスウイルス、HCV ウイルス、インフルエンザウイルスA、ヒト免疫不全ウイルス、クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、アデノウイルス、RSV 呼吸器合胞体ウイルス、エコーウイルス、及びプロガストリン放出ペプチド、CYFRA21-1、AFP、APT、CA242、CA724、CA50、f-PSA、t-PSA、遊離 α -hCG、及びSCCAを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の電気化学発光免疫測定法。

【請求項 5】

10

20

30

40

50

被験タンパク質に対するピリジニルテニウム標識した一次抗体、被験タンパク質に対するビオチン化した二次抗体、ストレプトアビジンコーティングした磁性粒子、及びジ-n-ブチルエタノールアミン溶液を含む、電気化学発光免疫測定のためのキット。

【請求項6】

前記キットが、洗浄溶液をさらに含むことを特徴とする、請求項5に記載のキット。

【請求項7】

前記洗浄溶液が、0.05% Tween-20を含む0.05mol/Lリン酸バッファ(pH7.4)であることを特徴とする、請求項6に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本願は、「電気化学発光免疫測定法」と題した2011年3月16日に中国特許庁に出願された中国特許出願第201110063893.0号に基づいて優先権を主張する。この内容は、その全体において参照により組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、免疫学の分野、特に電気化学発光免疫測定法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

20

化学発光免疫測定は、トレーサーシグナルとして標識した発光体を用いることにより確立された非放射性免疫測定であり、高い感度、広い線形範囲、迅速な分析速度、簡便な操作、及び自動化が可能であるという利点を有する。

【0004】

近年、臨床診療に一般に用いられている化学発光免疫試薬は、以下である。

1. アルカリホスファターゼ及びホースラディッシュペルオキシダーゼのルミノールとの反応システム。これの主にならぬ点は、アルカリホスファターゼ及びホースラディッシュペルオキシダーゼの活性が温度変化に非常に影響を受けやすく、実験結果が環境変化に非常に影響を受けやすいことである。

2. アクリジニウムエステル及びこの誘導体のアルカリ溶液中での過酸化水素との発光反応。主にならぬ点は、それが完全な自動化装置上でのみで検出することができる短い発光時間を有するフラッシュ発光であることである。結果の算出のためのモードは複雑であり、実験結果は安定しない。

30

3. ピリジニルテニウム及びトリプロピルアミンの電気化学発光システム。

【0005】

電気化学発光(ECL) 反応は、電極の表面上での電気化学により引き起される特異的な化学発光反応である。抗原-抗体複合体及びピリジニルテニウムの結合体は、トリプロピルアミンの存在下の電気化学により励起され、還元反応が光子放出を引き起し、光電子増倍管によりこれを回収することができる。このプロセスは繰り返し行なわれ、多くの光子を産生し、これは光シグナルを増幅する。電気化学発光分析において一般に用いられる標識は、標識された抗体又は抗原を生産するために、異なる化学的構造を有する抗体又は抗原分子と結合することができるものである。

40

【0006】

ピリジニルテニウムは、水溶性であり、高い安定性を有し、これは効率的で安定的な電気化学発光反応を確実にし、且つバックグラウンドノイズから干渉を回避する。ピリジニルテニウム対免疫グロブリンの結合の分子比が20を超える場合、可溶性及び抗体の免疫学的活性はなおも影響を受けず、分子量は低く、立体障害も少なく、小分子核酸でさえ標識することができる。

【0007】

近年、利用可能な電気化学発光法は、反応物として主にトリプロピルアミン TPA を

50

用いる。トリプロピルアミンの不都合な点は、該反応が緩徐で有り、その濃度が高く、電極材料により大きく影響を受け、発光効率に限界があり、コストも最適でないことである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

発明の概要

本発明の解決すべき技術的課題は、高い発光効率、迅速な反応、及び幅広い適用可能性を有する電気化学発光免疫測定法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の上記の目的を達成するために、本発明は、以下の技術的解決策を提供する。

【0010】

電気化学発光免疫測定法は、以下の工程を含む。

【0011】

工程1：被験タンパク質に対するピリジニルテニウム標識した一次抗体、及び被験タンパク質に対するビオチン化した二次抗体を被験サンプルと十分に反応させる、あるいは被験タンパク質に対するピリジニルテニウム標識した抗体、及び被験ビオチン化タンパク質を被験サンプルと十分に反応させる工程。

【0012】

工程2：ストレプトアビジンでコーティングした磁性粒子を添加し、抗原、抗体及び磁性粒子を含む複合体を形成するように反応させ、該反応液をフローセルに吸引させ、ここで前記抗原、抗体及び磁性粒子を含む複合体は、磁性粒子を介して電極の表面上に吸着される、工程。

【0013】

工程3：ジブチルエタノールアミン溶液を添加し、電圧の印加によりECL反応を開始し、光学検出器により走査される光シグナルを回収する工程。

【0014】

工程4：濃度勾配の標準溶液を作製し、発光強度の値の変化の対数及び濃度の対数に従って用量反応曲線をプロットし、そして被験サンプル中の被験タンパク質の濃度を算出により得る工程。

【0015】

ECLについての基本的な原理は、反応において発光基質及び構成成分が酸化されるために、電極の表面上で電子を失うことである。電子供与体は、 H^+ を失い、強力な還元剤となり、これは発光基質を励起状態に還元し、その後発光基質は光子を放出して基底状態に戻る。このプロセスは、電極の表面上で繰り返し行なわれ、光子は、通常、基質濃度を一定に維持するために、連続的に放出される。

【0016】

トリプロピルアミン(TPA)の不都合な点は、反応が緩徐であり、濃度が高く、電極材料により大きく影響を受けることである。ジブチルエタノールアミンの発光効率は、TPAの発光効率よりも明らかに優れており、白金電極及び金電極上でのこれらの発光強度を比較するダイヤグラムを図5に示す。ジブチルエタノールアミンDBAEは、共反応物として選択され、そしてピリジニルテニウムは、免疫反応又はECL反応による電気化学発光免疫測定のための抗原若しくは抗体、又は核酸を標識するために、本発明において標識として用いられる。

【0017】

本発明のピリジニルテニウムの構造は、以下の通りである。

【0018】

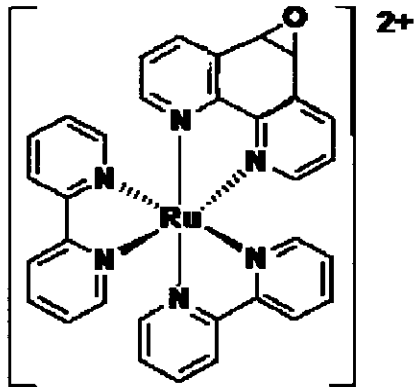
10

20

30

40

【化 1】



10

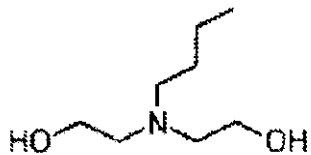
【 0 0 1 9 】

ジブチルエタノールアミンの構造は、以下の通りである。

【 0 0 2 0 】

【化 2】

20



【 0 0 2 1 】

本発明では、ピリジニルテニウムは、抗原又は抗体を標識するための標識として用いられ、免疫反応及びECL反応による電気化学発光免疫測定を行なう。本発明の方法は、化学反応と電気化学反応の二つの部分に分けられる。本発明の実施形態によれば、化学反応の部分は試験管中で行なわれ、電気化学反応の部分はフローセル中で行なわれる。

30

【 0 0 2 2 】

電極の表面上での電気化学により引き起される特異的な化学発光反応のために、Abは電気化学発光試薬であるピリジニルテニウムにより標識され、固相担体は、サンプル中の対応する抗原又は抗体と特定のモードの免疫学的反応により、複合体を形成するために抗原又は抗体でコーティングされる。標識と結合した複合体は、単離の技術により遊離の標識から分離される。被験Ag又はAbは、電極上のピリジニルテニウムの発光強度に従って、定量的に/定性的に決定される。

【 0 0 2 3 】

本発明では、磁性粒子は固相担体として選択される。固相担体の磁性のために、結合した標識から遊離の標識を分離する際に、磁石により引きつけることのみが必要であり、簡便且つ迅速に操作することができる。本発明の特定の実施例では、該固相担体は、2.8 μmの直径を有し、磁性を有するポリスチレン粒子である。

40

【 0 0 2 4 】

実施例として血清サンプル中のTSHを試験するために、本発明の方法において、活性化されたピリジニルテニウムと結合したTSHに対する抗体、及びビオチンと結合したTSH抗体をインキュベートし、被験血清と反応させ、その後ストレプトアビジンでコーティングした磁性粒子を添加し、その結果、ビオチンとアビジンのコンジュゲーションにより、磁性粒子、被験抗原、及びTSH抗体と一緒に連結し、「サンドイッチ」を形成する。

50

【0025】

特定の実施例では、形成されるストレプトアビジンでコーティングしたピリジニルテニウム - 抗体 - 抗原 - ビオチン化抗体 - 磁性粒子の複合体は、蠕動ポンプにより測定フローセルに吸引される。複合体は、作用電極の下に位置する磁石により、磁性粒子を介して電極の表面上に吸着される一方で、遊離のビオチン化抗体、及びピリジニルテニウムと結合した遊離の T S H 抗体を含む遊離の T S H 抗体は、測定セルの外に吐き出される。

【0026】

ジブチルエタノールアミン D B A E は、蠕動ポンプにより添加され、電圧が印加され、E C L 反応が開始される。このプロセスは、電極の表面上で繰り返し行なわれ、多くの光子を産生する。光強度は、光電子倍增管を用いて検出され、これらの光強度は、ピリジニルテニウムの濃度と線形の関係性を有する。これらに基づき、被験サンプル中の T S H の含有量が決定される。

10

【0027】

特定の実施例では、本発明に用いられる固相担体は、2.8 μm の直径を有する磁性ポリスチレン粒子であり、プレート型と比べて、反応面積が、20 ~ 30 倍まで拡張され、吸着効率が高いという特徴を有し；さらに、液相と同様の方法で反応に関与するために液体中で均一な懸濁液が形成され、これは一般的に反応速度を著しく加速する。

【0028】

ストレプトアビジン及びビオチンは、検出の効果を増幅するために用いられる。1分子のストレプトアビジンは、4分子のビオチンと結合することができる。本発明の特定の実施形態では、ストレプトアビジンは、ビオチンと結合することができる一般的な固体担体を形成するために、磁性粒子上に均一に、しっかりとコーティングされる。ストレプトアビジンコーティングした磁性粒子が、ビオチン化抗原又は抗体と接触する場合、該抗原又は抗体は、磁性粒子上に直ちにコーティングされる。結合した状態における抗原又は抗体は、電磁場を用いた磁性により、遊離の状態のものと分離される。これは、簡便且つ迅速で有り、完全な自動化により正確に達成され、一方で標識の再生利用が達成される。加えて、発光時間が長く、強度は高く、発光は容易に検出される。

20

【0029】

タンパク質及びポリペプチド抗原を検出する方法は、主に二重抗体サンドイッチ法及び競合法である。二重抗体サンドイッチ法は、タンパク質高分子抗原の決定に一般的に用いられる。しかしながら、これらが一つのエピトープのみを有する、あるいは分子が小さすぎる場合、一つの抗体と結合後に立体障害のために別の抗体と結合することができないため、一つのエピトープのみを有する小分子ホルモン、薬物等は、二重抗体サンドイッチ法を用いた決定に適さない。

30

【0030】

本発明の方法では、競合阻害法を、小分子抗原、例えば遊離トリヨードチロニン F T 3 を検出するためにさらに用いることができる。競合阻害法の原理は、サンプル中の抗原を、固相抗体と結合する標識した抗原の量と競合させえることである。サンプル中の抗原の含量が高い場合、固相上に結合する標識した抗体の含量は低い。

【0031】

本発明の方法では、ピリジニルテニウムで標識した抗原 - 抗体複合体、ストレプトアビジン及びビオチンのシステム、及びジ - n - ジブチルエタノールアミンが用いられ、免疫反応及び電気化学反応がタンパク質含量の検出を行なうために適用され、これは、高い感度、高い発光効率により特徴付けられ、腫瘍マーカータンパク質及びホルモン等の様々なタンパク質の検出に好適な、重要な非放射性免疫測定法である。

40

【0032】

好ましくは、本発明の方法は、以下の種目：T 3 トリヨードチロニン、A S A 抗精子抗体、トロポニン I、T 4 チロキシン、A C A 抗カルジオライピン抗体、C K M B、T S H、A E A 抗子宮内膜抗体、F T 3 遊離トリヨードチロニン、A O A 抗卵巣抗体、F T 4 遊離チロキシン、A T B 抗トロホプラスト抗体、抗 T M 甲状腺ミクロ

50

ソーム抗体、ZP 抗透明帯抗体、抗TG 抗チオグロブリン抗体、抗HCG抗体、ヒト胎盤性ラクタゲン、抗TPO 甲状腺ペルオキシダーゼ抗体、HCG、TOX トキソプラズマ抗体、FSH、AFP 胎児性タンパク質、CEA 癌胎児性抗原、PSA 前立腺特異抗原、FPSA 遊離前立腺特異抗原、CMV サイトメガロウイルス抗体、LH 黄体化ホルモン、HSV-1 単純ヘルペスウイルス抗体、PRL プロラクチン、HSV-2 単純ヘルペスウイルス抗体、TES テストステロン、RV ルベラウイルス抗体、PRO プロゲステロン、フェリチン、TOX-Ag トキソプラズマ循環抗原、E2 エストラジオール、CA125、E3 エストリオール、CA153、CA199、HBsAg、NSEニューロン特異的エノラーゼ、HBsAb、CA50、HBeAg、₂ミクログロブリン、HBeAb、コクサッキーウイルス抗体、HBcAb、BG 骨Glaタンパク質、D-Pyr デオキシピリジノリン、ビタミンD、インスリン、PCIII III型プロコラーゲン、C-ペプチド、IV型コラーゲン、インスリン抗体、LN ラミニン、グルカゴン、HA ヒアルロン酸、GAD-AB グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体、Fn フィブロネクチン、インフルエンザウイルスB、パラインフルエンザウイルス、EBウイルス、麻疹ウイルス、肺炎マイコプラズマ、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、ムンプスウイルス、HCV ウイルス、インフルエンザウイルスA、HIV ヒト免疫不全ウイルス、クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、アデノウイルス、RSV 呼吸器合胞体ウイルス、エコーウイルス、及びプロガストリン放出ペプチド、CYFRA21-1、AFP、APT、CA242、CA724、CA50、f-PSA、t-PSA、遊離 -hCG、及びSCCAを検出するために用いることができる。

【0033】

ここで、AFP、APTは、原発性肝細胞癌及び胚細胞腫瘍に対するマーカーであり、これは、胚細胞癌、卵巣奇形腫、胃癌、胆道癌、膵臓癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0034】

CEAは、消化管腫瘍に対する幅広いスペクトルを有するマーカーであり、肺癌、乳癌、甲状腺髄様癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0035】

CA242は、膵臓癌、胃癌、結腸癌に対するマーカーであり、他の関連する腫瘍：肝臓癌、食道癌、及び肺癌においても見られる。

【0036】

CA125は、卵巣癌に対するマーカーであり、肺癌、膵臓癌、乳癌、肝臓癌、消化管悪性腫瘍、子宮癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0037】

CA199は、膵臓癌、胆管癌、結腸直腸癌に対するマーカーであり、肝臓癌、胆嚢癌、胆管癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0038】

CA153は、乳癌に対する好ましいマーカーであり、肺癌、卵巣癌、肺癌、結腸直腸癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0039】

CA724は、胃癌に対する最適な腫瘍マーカーであり、様々な検出率で、消化管癌、乳癌、肺癌、卵巣癌等の他の関連する腫瘍においても検出することができる。

【0040】

CA50は、膵臓癌及び結腸直腸癌に対するマーカーであり、胃癌、胆嚢癌、肝臓癌、肺癌、及び乳癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0041】

NSE及びプロガストリン放出ペプチドに主に関連する腫瘍は、小細胞肺癌であり、これらは、他の関連する腫瘍：肺腺癌及び肺大細胞癌においても見られる。

【0042】

10

20

30

40

50

CYFRA21-1に主に関連する腫瘍は、肺扁平上皮細胞癌、子宮頸癌、食道癌であり、これは、膀胱癌、鼻咽癌、卵巣癌、及び消化管癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0043】

f-PSA及びt-PSAに主に関連する腫瘍は、前立腺癌であり、これらは、特定の婦人科腫瘍及び乳癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0044】

遊離-hCGに主に関連する腫瘍は、婦人科腫瘍及び非精原精巣癌であり、これらは、乳房の腫瘍、精原精巣癌、肺癌、肝臓癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0045】

SCCAに主に関連する腫瘍は、頸部の扁平上皮細胞癌であり、これは、肺扁平上皮細胞癌、頭頸部扁平上皮細胞癌、食道癌、及び生殖器扁平上皮細胞癌等の他の関連する腫瘍においても見られる。

【0046】

2-MGは、悪性腫瘍に対する補助的なマーカーであり、慢性リンパ球性白血病、リンパ肉腫、多発性骨髄腫等において特に見られ、肺癌、乳癌、消化管癌及び子宮頸癌においても増加が見られる。

【0047】

本発明はさらに、以下の構成要素：被験タンパク質に対するペリジニルテニウム標識した一次抗体、被験タンパク質に対するビオチン化した二次抗体、ストレプトアビジンコーティングした磁性粒子、及びジ-n-ジブチルエタノールアミン溶液を含む電気化学発光免疫測定のためのキットを提供する。

【0048】

好ましくは、本発明のキットは、さらに洗浄溶液を含む。

【0049】

より好ましくは、該洗浄溶液は、0.05mol/Lリン酸バッファ(pH7.4)中0.05%Tween-20である。pH値が高い場合、光化学反応の発光効率は高い一方で、pH値が低い場合、検出結果は安定する。本発明の発明者らは、洗浄溶液のpH値が7.4である場合、発光が効率的かつ安定的であり、臨床サンプルの決定のための要求を満たすことを見出している。

【0050】

本発明のキットは、抗原及び抗体の量を著しく節約することができる。ジブチルエタノールアミンとペリジニルテニウムとの光化学反応の発光強度は、トリプロピルアミンを用いて生成される発光強度と比べて6倍であり、従って、より多くの光子が光電子倍增管により回収され、その結果キットの感度は高くなる。ごく少量の抗原及び抗体を用いた場合であっても値を検出することができ、その結果、抗体の量を効率的に減少させることができ、そしてキットのコストを10%~30%減少させることができる。

【0051】

先行技術と比べて、本発明の電気化学発光免疫測定法及びキットは、以下の利点を有する。

1. ストレプトアビジン及びビオチンの適用は、感度を増加させ、pg/ml又はpmolのレベルに達し得る。
2. 高い特異性、優れた再現性、CV<5%。
3. 7桁の程度に達する幅広い測定範囲。
4. 毒性のない安定な試薬。
5. 反応時間が短く、且つ測定を20分以内に完了させることができる。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、本発明の電気化学発光免疫測定法の原理の概要図である。

【図2】図2は、本発明の電気化学発光免疫測定法により行なわれる電気化学的検出の概

10

20

30

40

50

要図である。

【図3】図3は、サンドイッチ法の用量反応曲線である。

【図4】図4は、競合法の用量反応曲線である。

【図5】図5は、白金電極及び金電極上でのジブチルエタノールアミン及びトリプロピルアミンの発光強度が比較されるダイヤグラムである。

【発明を実施するための形態】

【0053】

詳細な実施形態

本発明は、電気化学発光免疫測定法を開示する。当業者は、参考のために本明細書の内容を用い、技術的パラメータを適切に改良することにより、達成することができる。具体的には、全ての同様の置換及び修正は、当業者に明らかであり、これらは、全て本発明に含まれるものと見なされる。本発明の方法及び適用は、好ましい実施例により記載され、そして本明細書に記載される本発明及び適用は、本発明の内容、趣旨及び範囲内から逸脱することなく、本発明の技術を達成及び適用するために、関係者により修正され、適切に変更され、あるいは組み合わせることができる。

10

【0054】

当業者による本発明の技術的解決策の優れた理解のために、更に詳細な実施例と併せて本発明を下記に記載する。

【実施例】

【0055】

20

実施例1：本発明によるキットの構成要素

本発明によるキットは、以下の構成要素：

試薬A．電気化学発光試薬であるピリジニルテニウムにより標識した、被験タンパク質に対する一次抗体

試薬B．被験タンパク質に対するビオチン化した二次抗体

試薬C．ストレプトアビジンでコーティングした磁性粒子であって、前記磁性粒子は2.8 μmの直径を有するポリスチレン粒子である、磁性粒子

試薬D．ジブチルエタノールアミン溶液

を含む。

【0056】

30

好ましくは洗浄溶液、より好ましくは0.05 mol/Lリン酸バッファ(pH 7.4)及び0.05% TWEEN-20も含まれ得る。該洗浄溶液は、当業者により作製することができる。

【0057】

使用する場合、本発明のキット中のピリジニルテニウムと結合した抗体、及びビオチンと結合した抗体を、被験サンプルとインキュベートし、反応させた。その後、ストレプトアビジンでコーティングした磁性粒子を添加した。磁性粒子、抗原、及び被験抗体は、ストレプトアビジンとビオチンとの結合を介して一緒に連結し、「サンドイッチ」複合体を形成した。

【0058】

40

該複合体を、作用電極の下に位置する磁石により、磁性粒子を介して、電極の表面上に引きつけた。標識と結合した複合体を、酸化鉄の磁性による電磁場分離を用いて遊離の標識から分離した。その後、ジブチルエタノールアミン DBAEを添加し、電圧を印加し、ECL反応を開始させた。反応構成要素としての、発光基質であるピリジニルテニウム及びジブチルエタノールアミンは、電極の表面上で電子を喪失し、酸化された。電子供与体としてジブチルエタノールアミンは、一つのH⁺を喪失し、強力な還元剤となり、これは、酸化された形態の三価のルテニウムを励起された二価のルテニウムに還元し、後者は従って、光子を放出し、基底状態の発光基質に戻る。このプロセスは、電極の表面上で繰り返し行なわれ、多くの光子を産生する。光強度を、光電子倍增管を用いて検出した。これらの光強度は、ピリジニルテニウムの濃度と線形の関係性を有する。被験Ag又はAbは

50

、電極上のピリジニルテニウムにより発光される光強度に基づいて、定量的 / 定性的に検出された。上記の反応原理の概要図を図 1 に示す。

【 0 0 5 9 】

実施例 2 : 本発明の方法を用いて行われるヒト甲状腺刺激ホルモン T S H の検出

【 0 0 6 0 】

該キットは、以下の構成要素 :

試薬 A . ピリジニルテニウムにより標識した T S H 抗体

試薬 B . T S H に対するビオチン化した二次抗体

試薬 C . ストレプトアビジンでコーティングした磁性粒子

試薬 D . ジブチルエタノールアミン溶液

試薬 E . 洗浄溶液

を含む。

【 0 0 6 1 】

検出のための工程 :

(1) 試薬 A 及び B、並びに被験サンプル血清を試験管に添加し、37 °C で 8 分間、液相条件下で反応させた。

(2) 試薬 C を上記の反応液に添加し、37 °C で 8 分間、液相条件に近い条件下で反応させた。

(3) 二つの工程の反応の完了後、試験管中の反応液をフローセルに導入した。

【 0 0 6 2 】

該フローセルは、電気化学発光のプロセスの間、全ての電気化学発光反応のための場所である。一つの励起電極はフローセルの下部に位置し、二つの検出電極は電極の両側の上部に取り付けられ、光シグナルの回収及び分析を容易にするために、光電子倍增管のための回収ポートが存在する。移動可能な磁石は、磁性粒子の引きつけのためにフローセルの下に取り付けられる。反応液は、蠕動ポンプによりフローセルに送り込まれる。磁性粒子は、磁石の引力により電極上に引きつけられ、他の反応物は、フローセルから流れ出、結合し、標識された抗体から遊離の標識された抗体の分離を達成する。

【 0 0 6 3 】

(4) 試薬 D (ジブチルエタノールアミン溶液) をフローセルに導入し、フローセルを充填した。

【 0 0 6 4 】

(5) 磁石を取り除き、電極に電気を流した。ピリジニルテニウムとジブチルエタノールアミンの電気化学反応を行い、放出された光を光電子倍增管により回収し、光強度を決定した。

【 0 0 6 5 】

フローセル中の反応の概要図を図 2 に示す。

【 0 0 6 6 】

(6) 濃度勾配の標準溶液を作製し、図 3 に示すように発光強度の値の変化の対数及び濃度の対数に従って用量反応曲線をプロットし、そして被験サンプル中の被験タンパク質の濃度を計算により得た。

【 0 0 6 7 】

(7) 電圧を打ち切り、磁性粒子を除去した。試薬 E (洗浄溶液) を添加し、測定フローチャンバーをリンスし、その後次のサンプルを測定した。

【 0 0 6 8 】

用量反応曲線を発光強度の値の変化の対数及び濃度の対数に従ってプロットし、これらは優れた線形の関係であることが見出された。サンプル中の T S H の濃度を、用量反応曲線により推測した。

【 0 0 6 9 】

実施例 3 : 本発明の方法を用いることにより行われる 胎児性タンパク質の検出

ヒト血清、アビジンと結合した磁性粒子、ビオチンと結合した抗体 1、及びピリジニル

10

20

30

40

50

テニウムと結合した抗体 2 を、反応ベッセルに添加した。ベッセルを 37 で 9 ~ 17 分間インキュベートした。磁性による分離を行い、即ち未結合の材料は、洗い流され、そして上述の磁性粒子を含む抗原 - 抗体複合体を含む残った液体を、フローセルに導入した。ジブチルエタノールアミンを添加し、還元反応が電極の存在下で行った。このプロセスの間、光は放出された。光子を、光電子倍増管により捕捉し、コンピューターにより分析及び増幅した。濃度勾配の標準溶液を作製し、発光強度の値の変化の対数及び濃度の対数に従って用量反応曲線をプロットした。結果を算出した。従って、被験血清中の胎児性タンパク質の含量が決定した。

【0070】

実施例 4：本発明の方法を用いることにより行われる癌胎児性抗原の検出

10

該キットは、以下の構成要素：

試薬 A . 癌胎児性抗原に対するピリジニルテニウム標識した抗体

試薬 B . 癌胎児性抗原に対するビオチン化した二次抗体

試薬 C . SA でコーティングした磁性粒子

試薬 D . ジブチルエタノールアミン溶液

試薬 E . 洗浄溶液：0.05 M リン酸バッファ (pH 7.4) 及び 0.05% Tween - 20 を含む。

【0071】

検出のための工程：

20

(1) 試薬 A 及び B、並びに被験サンプル血清を試験管に添加し、37 で 8 分間、液相条件下で反応させた。

(2) 試薬 C を上記の反応液に添加し、37 で 8 分間、液相条件に近い条件下で反応させた。

(3) 二つの工程の反応の完了後、試験管中の反応液をフローセルに導入した。

(4) ジブチルエタノールアミン溶液をフローセルに導入し、フローセルを充填した。

(5) 磁石を取り除き、電極に電気を流した。ピリジニルテニウムとジブチルエタノールアミンの電気化学反応を行い、放出された光を光電子倍増管により回収し、光強度を決定した。

(6) 濃度勾配の標準溶液を作製し、発光強度の値の変化の対数及び濃度の対数に従って用量反応曲線をプロットし、そして被験サンプル中の被験タンパク質の濃度を計算により得た。

30

(7) 反応物を完全にリンスするために洗浄溶液をフローセルに導入し、その後次のサンプルを測定した。

【0072】

実施例 5：競合法を用いた遊離トリヨードチロニン FT 3 の検出

タンパク質及びポリペプチド抗原を検出する方法は、主に二重抗体サンドイッチ法及び競合法である。二重抗体サンドイッチ法は、タンパク質高分子抗原の決定に一般的に用いられる。しかしながら、これらが一つのエピトープのみを有する、あるいは分子が小さすぎる場合、一つの抗体と結合後に立体障害のために別の抗体と結合することができないため、一つのエピトープのみを有する小分子ホルモン、薬物等は、二重抗体サンドイッチ法を用いた決定に適さない。

40

【0073】

本発明の方法では、競合阻害法を、小分子抗原、例えば遊離トリヨードチロニン FT 3 を検出するためにさらに用いることができる。競合阻害法の原理は、サンプル中の抗原を、固相抗体と結合する標識した抗原の量と競合させることである。サンプル中の抗原の含量が多い場合、固相上に結合した標識した抗体の含量は少ない。

【0074】

該キットは以下の構成要素：

試薬 A . ピリジニルテニウムで標識した FT 3 抗原

50

試薬 B . F T 3 抗原に対するビオチン化抗体

試薬 C . S A でコーティングした磁性粒子

試薬 D . ジブチルエタノールアミン溶液

試薬 E . 洗浄溶液 : 0 . 0 5 M リン酸バッファ (p H 7 . 4) 及び 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を含む。

【 0 0 7 5 】

検出のための工程

(1) 試薬 A 及び B、並びに被験サンプル血清を試験管に添加し、37 で 8 分間、液相条件下で反応させた。

(2) 試薬 C を上記の反応液に添加し、37 で 8 分間、液相条件に近い条件下で反応させた。

(3) 二つの工程の反応の完了後、試験管中の反応液をフローセルに導入した。

(4) ジブチルエタノールアミン溶液をフローセルに導入し、フローセルを充填した。

(5) 磁石を取り除き、電極に電気を流した。ピリジニルテニウムとジブチルエタノールアミンの電気化学反応を行い、放出された光を光電子倍增管により回収し、光強度を決定した。

(6) 濃度勾配の標準溶液を作製し、図 4 に示すように発光強度の値の変化の対数及び濃度の対数に従って用量反応曲線をプロットし、そして被験サンプル中の被験タンパク質の濃度を計算により得た。

(7) 反応物を完全にリンスするために洗浄溶液をフローセルに導入し、その後次のサンプルを測定した。

【 0 0 7 6 】

実施例 6 : 本発明による方法の感度及び検出限界の決定

U D E C L 電気化学発光分析装置を用いた。光電子倍增管の高電圧を 9 0 0 v、走査電圧を 0 . 2 ~ 1 . 6 v、走査速度を 1 5 0 m V / 秒となるように設定し、作用電極に P t 電極を用いた。バッファは、0 . 0 5 M リン酸バッファ (p H 7 . 4) 及び 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 であった。溶液の発光シグナルを検出し、本発明による方法の検出限界を決定した。

【 0 0 7 7 】

濃度勾配の標準溶液を作製し、用量反応曲線を発光強度の値の変化の対数及び濃度の対数に従ってプロットし、これらは、優れた線形の関係性を有することが見出された。

【 0 0 7 8 】

アルカリホスファターゼ及びホースラディッシュペルオキシダーゼのルミノールとの反応システム等の化学発光免疫測定法の酵素的検出法の感度は、一般的に 0 . 1 2 m I U / L であり ; 従来の電気化学法の感度の検出範囲は、0 . 0 0 5 ~ 1 0 0 μ I U / m l であり、そして本発明による方法の検出範囲は 0 . 0 0 1 ~ 1 0 0 μ I U / m l である。電気化学発光法の電気化学発光免疫測定法の検出範囲は、E L I S A の検出範囲よりも広い。

【 0 0 7 9 】

本発明により提案される電気化学発光免疫測定法は、実施例に記載され、そして修正、又は適切な改変及び組み合わせは、本発明において開示された技術を達成するために、本発明の内容、趣旨及び範囲内から逸脱することなく、当業者により本発明の電気化学発光免疫測定法がなされることは明らかである。具体的には、全ての同様の置換及び改変は、当業者に明らかであり、これらは、全て本発明の趣旨、範囲及び内容に含まれるものと見なされることは指摘されるべきである。

10

20

30

40

【 図 1 】

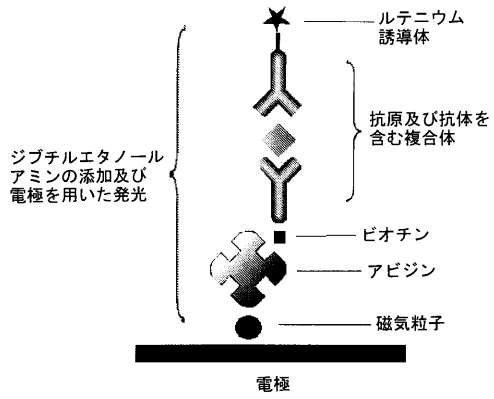


図1

【 図 2 】

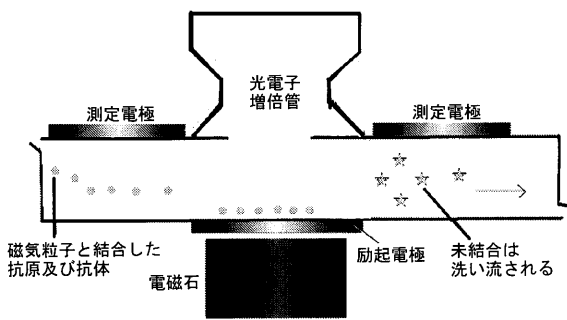


図2

【 図 3 】

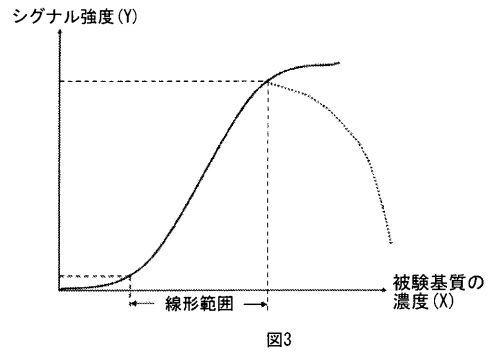


図3

【 図 4 】

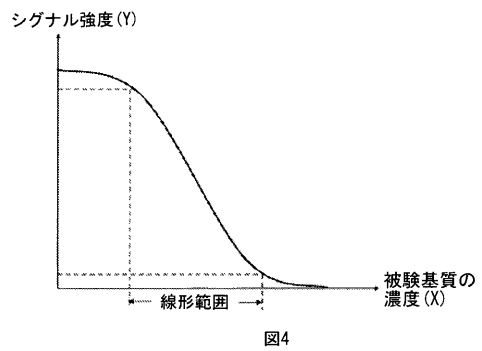


図4

【 図 5 】

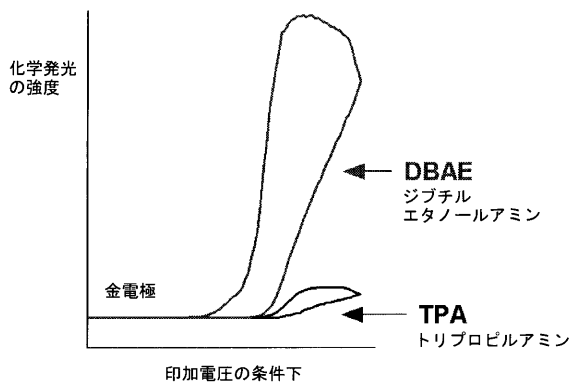


図5

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2012/072248
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See the extra sheet		
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:G01N27, G01N21, G01N33, C12Q1		
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 practicable, search terms used)		
WPI&EPODCO & PAJ & CNKI & CNPAT immuno, pyridine ruthenium, biotin,protein		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN101246125A (UNIV SOUTH CHINA NORMAL) 20 Aug.2008 (20.08.2008) the whole document	1—7
A	US2010/0133118A1 (ADNAVANCETECHNOLOGIES, INC.) 3 Jun.2010 (03.06.2002) the whole document	1—7
A	CN101532916A (TONGFANG ENVIRONMENT CO LTD.) 16 Sep.2009 (16.09.2009) the whole document	1—7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 May 2012 (14.05.2012)		Date of mailing of the international search report 24 May 2012 (24.05.2012)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer BIAN, Xin Telephone No. (86-10)62085677

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/072248

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101246125A	20.08.2008	None	
US2010 / 0133118A1	03.06.2010	WO2010060060 A1	27.05.2010
CN101532961A	16.09.2009	CN101532961B	20.07.2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/072248

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

G01N27 / 26 (2006.01) i

C12Q1 / 68 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2012/072248
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC:G01N27, G01N21, G01N33, C12Q1		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI&EPODCO & PAJ & CNKI & CNPAT 免疫, 吡啶钌, 生物素, 蛋白, immuno, pyridine ruthenium, biotin, protein		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN101246125A (华南师范大学) 20.8 月 2008 (20.08.2008)	1-7
A	US2010 / 0133118A1ADNAVANCETECHNOLOGIES,INC.) 3.6 月 2010 (03.06.2002) 全文	1-7
A	CN101532916A(中国科学院长春应用化学研究所) 16.9 月 2009 (16.09.2009) 全文	1-7
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“I” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 14.5 月 2012 (14.05.2012)		国际检索报告邮寄日期 24.5 月 2012 (24.05.2012)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 边昕 电话号码: (86-10) 62085677

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2012/072248	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101246125A	20.08.2008	无	
US2010 / 0133118A1	03.06.2010	WO2010060060 A1	27.05.2010
CN101532961A	16.09.2009	CN101532961B	20.07.2011

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/072248

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

G01N27 / 26 (2006.01) i

C12Q1 / 68 (2006.01) i

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 33/543 5 0 1 M
 G 0 1 N 21/76

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
 J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R
 O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
 BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H
 U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI
 , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
 UZ, VC, VN

(74)代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977
 弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810
 弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 チン チュン
 中華人民共和国, ベイジン 1 0 2 6 0 0 , ダーシン ディストリクト, ティアンフ アベニュー
 チャイナ バイオ - メディシン インダストリー パーク ナンバー 9 , タワー 1 0 - 2 0 8
 Fターム(参考) 2G054 AA02 AA07 BB05 BB10 CA23 CE02 EA01 FA08 FA12

专利名称(译)	电化学发光免疫分析		
公开(公告)号	JP2014509735A	公开(公告)日	2014-04-21
申请号	JP2013558296	申请日	2012-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	北京统一JA科技股份有限公司雷开球德		
申请(专利权)人(译)	北京Yunija科技股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	チンチュン		
发明人	チン チュン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/553 G01N33/574 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/582 C09B57/10 G01N2458/40		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/53.U G01N33/543.525.E G01N33/553 G01N33/574.A G01N33/543.501.M G01N21/76		
F-TERM分类号	2G054/AA02 2G054/AA07 2G054/BB05 2G054/BB10 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/FA08 2G054/FA12		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	201110063893.0 2011-03-16 CN		
其他公开文献	JP5753282B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了一种电化学发光免疫测定方法，其使用Ru (bpy) 标记的蛋白质 - 第一抗体，待测试的生物素化蛋白质 - 第二抗体和待测样品的完全反应;添加链霉抗生物素蛋白包被的磁性颗粒以形成包含抗原，抗体和磁性颗粒的复合物;通过磁性颗粒吸附到电极表面;加入二丁基乙醇胺溶液;通过电化学方法测试。还公开了相应的电化学发光免疫测定检测试剂盒。

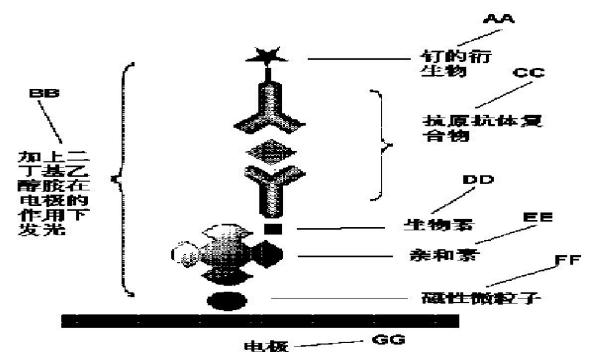


图1 /Fig.1

AA RUTHENIUM DERIVATIVE
BB ADDING DIBUTYL ETHANOLAMINE AND EMITTING LIGHT BY MEANS OF ELECTRODE
CC COMPLEX COMPRISING ANTIGEN AND ANTIBODY
DD BIOTIN
EE AVIDIN
FF MAGNETIC PARTICLE
GG ELECTRODE