

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 506717

(P2003 - 506717A)

(43)公表日 平成15年2月18日 (2003.2.18)

(51)Int.Cl⁷

G 0 1 N 33/543
33/53

識別記号

521

F I

G 0 1 N 33/543
33/53

特コード^{*} (参考)

521

V

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 34数)

(21)出願番号 特願2001 - 515968(P2001 - 515968)

(86)(22)出願日 平成12年7月21日(2000.7.21)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月5日(2002.2.5)

(86)国際出願番号 PCT/SE00/01509

(87)国際公開番号 W001/011363

(87)国際公開日 平成13年2月15日(2001.2.15)

(31)優先権主張番号 9902855 - 7

(32)優先日 平成11年8月6日(1999.8.6)

(33)優先権主張国 スウェーデン(SE)

(31)優先権主張番号 60/148,566

(32)優先日 平成11年8月13日(1999.8.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ファルマシア・ダイアグノステイクス・アー・ベー

スウェーデン国、エス - 751 82・ウブサラ

(72)発明者 カールソン, ヤン

スウェーデン国、エス - 757 17・ウブサラ、
スペツツペーゲン・52

(72)発明者 レーンベリイ, マリア

スウェーデン国、エス - 741 41・クニーブ
スタ、ヘーイアスペーゲン・205

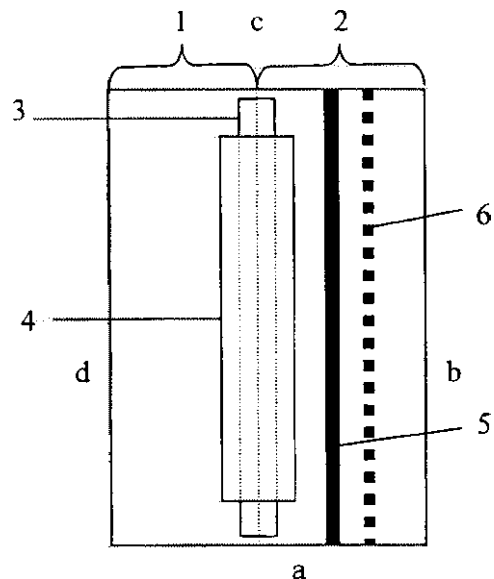
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分析方法及び装置

(57)【要約】

本発明は、分析物を含有しているかまたは含有している疑いがある水性サンプル中の少なくとも2つの分析物を定性的、半定量的または定量的に測定する方法であって、(i) 第一次元に伸びる分離ゾーンと分離ゾーンから離間した平行な関係で第一次元に伸びる検出ゾーンとを含むフローマトリックスを準備し、検出ゾーンに分析物との生体特異的相互作用を介して分析物を捕獲し得る固定化試薬を含ませる段階と、(i i) サンプルを分離ゾーンでまたは分離ゾーンの上流でフローマトリックスに加える段階と、(i i i) 分離ゾーンで分離すべき分析物を分離ゾーンに搬送するために、フローマトリックス中で本質的に水性の第一流体流を第一次元分離ゾーンに沿って生じさせる段階と、(i v) 分離された分析物を検出ゾーンに搬送し分析物を検出ゾーンで固定化試薬によって捕獲するために、第一流体流を中断し、第一次元に実質的に交差するフローマトリックスの第二次元で本質的に水性の第二流体流を検出ゾーンに向かって生じさせる段階と、(v) 検出ゾーンで分析物を測定する段階と、から成る方法に関する。本発明はまた、該方法を実施する装置に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析物を含有しているかまたは含有している疑いがある水性サンプル中の少なくとも2つの分析物を定性的、半定量的または定量的に測定する方法であって、

(i) 第一次元に伸びる分離ゾーンと分離ゾーンから離間した平行な関係で前記第一次元に伸びる検出ゾーンとを含むフローマトリックスを準備し、前記検出ゾーンに前記分析物との生体特異的相互作用を介して前記分析物を捕獲し得る固定化試薬を含ませる段階と、

(ii) 前記サンプルを分離ゾーンでまたは分離ゾーンの上流でフローマトリックスに加える段階と、

(iii) 分離ゾーンで分離すべき分析物を分離ゾーンに搬送するために、フローマトリックス中で本質的に水性の第一流体流を前記第一次元の分離ゾーンに沿って生じさせる段階と、

(iv) 前記分離された分析物を検出ゾーンに搬送し分析物を検出ゾーンで前記固定化試薬によって捕獲するために、前記第一流体流を中断し、前記第一次元に実質的に交差するフローマトリックスの第二次元で本質的に水性の第二流体流を検出ゾーンに向かって生じさせる段階と、

(v) 検出ゾーンで分析物を測定する段階と、
から成る方法。

【請求項2】 前記マトリックス中の前記流体流が毛管力によって促進されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 フローマトリックスが少なくとも実質的に偏平であることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 分離ゾーンと検出ゾーンとが同一平面内に配置されており、前記第一及び第二の流体流が水平流であることを特徴とする請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項5】 分離ゾーンと検出ゾーンとが互いに上下に重なって配置されており、前記第一流体流が水平流であり前記第二流体流がフローマトリックスの深層流であることを特徴とする請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項6】 フローマトリックス中の流体搬送が少なくとも部分的にマトリックス自体の毛管力によって生じることを特徴とする請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】 フローマトリックス中の流体搬送が、フローマトリックスから独立したまたはフローマトリックスに一体的な吸収エレメントによって少なくとも促進されることを特徴とする請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】 アッセイを開始する前にフローマトリックスを本質的に水性の流体によって湿らせることを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】 請求項1に記載の検出段階(v)が前記捕獲分析物を検出可能な試薬と反応させることから成る請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】 検出可能な試薬が免疫化学的試薬であることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】 請求項1に記載の検出段階(v)がマトリックス中の未反応の固定化試薬を検出可能な分析物または検出可能な分析物類似体と反応させることから成る請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】 前記検出可能な試薬、分析物または分析物類似体が検出可能なラベルを含むことを特徴とする請求項9、10または11に記載の方法。

【請求項13】 前記検出可能な試薬、分析物または分析物類似体が第三の流体流によって導入されることを特徴とする請求項9から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】 前記第三の流体流が前記フローマトリックスの1つの側縁から加えられる水平流であることを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記分離ゾーンにおける分離がクロマトグラフィーに基づくことを特徴とする請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】 前記クロマトグラフィーが、イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー及び疎水性相互作用クロマトグラフィーから選択されることを特徴とする請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記分離ゾーンが前記第一方向に分離能力に関する勾配を有することを特徴とする請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】 前記分析物が生体分子のヘテロ形態であることを特徴とする請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】 前記ヘテロ形態が異なる電荷を有していることを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記分析物が糖タンパク質であることを特徴とする請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】 前記フローマトリックスが膜から成ることを特徴とする請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】 前記マトリックスが内部に付着した粒子を含む膜から成ることを特徴とする請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】 前記検出ゾーンが、固定化試薬を含有する少なくとも2つの平行な検出線またはバンドを含むことを特徴とする請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】 検出ゾーンにおける分析物の結合が免疫化学的相互作用によることを特徴とする請求項1から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】 サンプル中の分析物を測定する装置であって、
(i) フローマトリックスの第一次元に離間した平行な関係で伸びる分離ゾーンと検出ゾーンとを有し、検出ゾーンが分析物との生体特異的相互作用によって分析物と結合し得る固定化試薬を含んでいるフローマトリックスと、
(ii) フローマトリックス中で本質的に水性の第一流体流をフローマトリックスの前記第一次元の分離ゾーンに沿って生じさせる手段と、
(iii) 前記第一次元に実質的に交差する前記フローマトリックスの第二次元で本質的に水性の第二流体流を検出ゾーンに向かって生じさせる手段と、
から成り、

分析物含有サンプルが分離ゾーンに導入されると、分析物は分離ゾーンを通る前記第一流体流によって分離ゾーンで分離され、前記第二流体流によって検出ゾーンに搬送され、前記検出ゾーンで分析物が測定用の固定化試薬に結合すること

を特徴とする装置。

【請求項26】 フローマトリックスが毛管力に促進されて流体流を通過させ得ることを特徴とする請求項25に記載の装置。

【請求項27】 フローマトリックスが少なくとも実質的に偏平であることを特徴とする請求項25または26に記載の方法。

【請求項28】 分離ゾーンと検出ゾーンとが同一平面内に配置されており、前記第一及び第二の流体流が水平流であることを特徴とする請求項25、26または27に記載の装置。

【請求項29】 分離ゾーンと検出ゾーンとが互いに上下に重なって配置されており、前記第一流体流が水平流であり、前記第二流体流がフローマトリックスの深層流であることを特徴とする請求項25、26または27に記載の装置。

【請求項30】 分離ゾーンが請求項15から17のいずれか一項に規定のゾーンであることを特徴とする請求項25から29のいずれか一項に記載の装置。

【請求項31】 フローマトリックスが請求項21または22に規定のフローマトリックスであることを特徴とする請求項25から30のいずれか一項に記載の装置。

【請求項32】 検出ゾーンが、固定化試薬を含有する少なくとも2つの平行な検出線またはバンドを含むことを特徴とする請求項25から31のいずれか一項に記載の装置。

【請求項33】 装置がフローマトリックス中に液体吸引を生じさせる手段を含むことを特徴とする請求項25から32のいずれか一項に記載の装置。

【請求項34】 液体吸引を生じさせる前記手段がフローマトリックスの下流末端の吸収性部材から成ることを特徴とする請求項33に記載の装置。

【請求項35】 装置がフローマトリックスに流動液体を供給する手段を含むことを特徴とする請求項25から34のいずれか一項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明はサンプル中の分析物の測定方法及び装置、より特定的には分析物が検出に先立って分離されるような分析物の測定方法及び装置に関する。

【0002】**(発明の背景)**

生体分子はアイソフォームのような複数のヘテロ形態で存在し、ヘテロ形態中の分子構造の小さい変化が分子の作用の大きい変化の原因になり得る。しかしながら、特異的抗体に対する結合に関しては通常は化合物間の競合が生じるので、イムノアッセイのような高い特異性を有する方法を用いたとしてもこのような小さい構造変化を特定的に測定することは難しい。我々の同時係属中の国際出願(PCT)WO99/60402には、このような構造変化が検討され、幾つかのヘテロ形態、例えば最大の正電荷または負電荷を有するヘテロ形態を測定する方法が開示されている。該方法は、サンプル付加ゾーンとその下流の検出ゾーンとを有しているフローマトリックスを使用し、分析物と結合する試薬を検出ゾーンに固定化し、結合した分析物を検出ゾーンで検出する。サンプル付加ゾーンと検出ゾーンとの間に分離ゾーンが設けられている。分離ゾーンで夾雑成分または測定対象でない成分を結合させるかまたは遅滞させ、このような成分が分析物と共に検出ゾーンに到達することを防ぐ。例えば分析物が2つのヘテロ形態の一方である場合、分析物の選択的検出を可能にするために、結合ゾーンで分析物と競合的に結合する測定対象でない他方のヘテロ形態を分離ゾーンに遅滞させる。しかしながら、3つ以上のヘテロ形態が存在する場合も少なくはない。例えば、トランスフェリンは少なくとも9個の異なるアイソフォームとして存在し、アルコール濫用を試験するためには、幾つかのアイソフォーム、主としてジシアロトランスフェリン及びアシアロトランスフェリンを測定することが重要である。複合混合物中の全部のアイソフォームを測定できるようにするために、これまではカラムクロマトグラフィーによってアイソフォームを分離し、次いで測定すべき分析物の濃度に応じて分光光度法またはイムノアッセイ法で検出することによって各画分のアイソフォームの存在を分析することが必要であった。

【0003】

WO99/30145は、サンプル中の核酸、タンパク質、糖質または脂質を定性的に測定するための2次元ゲル電気泳動を開示している。このゲルは分離ゲルと検出ゲルとを含んでおり、分離ゲルの内部スロットにサンプル充填ゾーンが設けられており、1つまたは複数のターゲット分子のプローブが検出ゲルに固定化されている。分離ゲル中で第一次元に電気泳動させて分離した後、ゲルを90度回転させ、ターゲット分子を検出ゾーンに搬送するために第二次元に電気泳動させ、検出ゾーンで固定化プローブに結合したターゲット分子を検出する。WO99/30145は、ヘテロ形態が測定できることを全く示唆していない。また電気泳動システムは一般に、電気泳動システムに追加の検出段階を組込む必要があるときは特に、操作が難しくコストも高い。

【0004】

米国特許US-A-4,469,601は、薄層クロマトグラフィープレートでサンプルを成分列に分離する多次元クロマトグラフィーの方法及びシステムを開示している。これらの成分を次に、成分列に交差する方向で流体をプレートにポンピングすることによって第二の列、即ち、サブ成分列に分離し、サブ成分がこの第二方向で所定の位置を通過するときサブ成分を検出する。しかしながら、薄層クロマトグラフィーは小分子（即ち、低分子量分子）の分離に限定されており、例えばタンパク質のような生体分子を分離することはできない。

【0005】

Pristoupil, T. I., Chromatog. Rev., 12 (1970) 109-125は、クロマトグラフィー及び電気泳動におけるニトロセルロースフィルターの使用を記載している。プレキシガラス室内の水平状態のニトロセルロース膜を用いて水溶液中でクロマトグラフィー処理した。染色用溶液に膜を浸漬させることによってタンパク質を検出し、常用のスプレーまたはサンドイッチ法によって他の物質を検出した。無加工の (i n t a c t) 膜の上では、 10^5 以上のオーダの分子量をもつタンパク質は膜に強固に吸着されるが、ペプチド、アミノ酸及びその他の親水性の低分子量物質は展開溶液の前縁と共に泳動した。電気泳動の場合、タンパク質の高度な吸着を防止するために膜に中性洗

剤を含浸させることが必要であった。また、ウシ血清を吸着させた膜を用いるウサギ抗ウシ血清及び免疫化学的に不活性の正常ウサギ血清のイムノクロマトグラフィーも記載されている。抗原 - 抗体複合体は最初から顕著なスポットを示したが、免疫化学的に不活性のタンパク質は顕著な吸着を生じることなく泳動した。従って、成分の“適正な”クロマトグラフィーは、無加工の（即ち手を加えていない）膜を用いたかまたは抗体がコートされた膜を用いたかではなく、強固な結合が生じたかまたは結合が全く生じなかったかによって得られたと考えられる。

【0006】

従って、生体分子のヘテロ形態を測定することができ、しかも、従来技術の方法及び装置よりも迅速かつ容易にアッセイを実施できるような分析方法及び装置が要望されている。

【0007】

（発明の概要）

従って、本発明の1つの目的は、従来技術の方法の欠点を克服し、複合サンプル中でもアイソフォームのような生体分子のすべてのヘテロ形態を迅速かつ確実に測定することが容易な測定方法を提供することである。本発明の別の目的は、単一のプレート、シートまたはチップ上で実施し得る測定方法を提供することである。本発明の更に別の目的は、本発明方法を実施するための簡単で使い易いプレート、シートまたはチップ型の装置を提供することである。

【0008】

本発明によれば、上記及びその他の目的及び利点は、水性サンプル中の（アイソフォームのような）分析物を、毛管力で促進される流体流を通し得るフローマトリックス、特にクロマトグラフィー膜（例えばイオン交換膜）のような偏平フローマトリックス中で分離する方法によって得られる。本発明の特徴によれば、分離した分析物を測定するために、分離した分析物をフローマトリックスの分離エリアから分離方向に実質的に交差する方向に溶出させ、通常は線またはバンドの形態に反応体が固定化された（例えば、全部の分析物に共通の単一抗体が固定化された）捕獲ゾーンに泳動させ、溶出した分析物を該ゾーンで捕獲する。捕獲ゾーンでは、捕獲した分析物に結合し得る検出試薬を添加することによって分析

物を検出及び測定し得る。検出試薬は例えば、黒色粒子によって標識された抗体のような適宜標識された抗アイソフォーム抗体でもよい。黒色粒子によって標識された抗体の場合、例えば、検出線またはバンドに沿った色の濃淡をスキャナーによって容易に検出し定量し得る。

【0009】

分離段階及び溶出段階で本質的に水性の系を使用する。本文中に使用した“本質的に水性の”という表現は、系が完全に水性であるかまたは1種以上の別の溶媒を約3%以下の少量で含有し得ることを意味する。

【0010】

本質的に水性の系の好ましくは約99%、より好ましくは約99.5%、通常は少なくとも約99.9%が水である。

【0011】

従って、本発明の第一の目的は、分析物を含有しているかまたは含有している疑いがある水性サンプル中の少なくとも2つの分析物を定性的、半定量的または定量的に測定する方法であって、

(i) 第一次元に伸びる分離ゾーンと分離ゾーンから離間した平行な関係で該第一次元に伸びる検出ゾーンとを含むフローマトリックスを準備し、該検出ゾーンに該分析物との生体特異的相互作用を介して該分析物を捕獲し得る固定化試薬を含ませる段階と、

(ii) 該サンプルを分離ゾーンでまたは分離ゾーンの上流でフローマトリックスに加える段階と、

(iii) 分離ゾーンで分離すべき分析物を分離ゾーンに搬送するために、フローマトリックス中で本質的に水性の第一流体流を該第一次元の分離ゾーンに沿って生じさせる段階と、

(iv) 該分離された分析物を検出ゾーンに搬送し分析物を検出ゾーンで該固定化試薬によって捕獲するために、該第一流体流を中断し、該第一次元に実質的に交差するフローマトリックスの第二次元で本質的に水性の第二流体流を検出ゾーンに向かって生じさせる段階と、

(v) 検出ゾーンで分析物を測定する段階と、

から成る方法を提供することである。

【0012】

本発明の別の目的は、サンプル中の分析物を測定する装置であって、
(i) フローマトリックスの第一次元に離間した平行な関係で伸びる分離ゾーンと検出ゾーンとを有し、検出ゾーンが分析物との特異的相互作用によって分析物と結合し得る固定化試薬を含んでいるフローマトリックスと、
(i i) フローマトリックス中で本質的に水性の第一流体流をフローマトリックスの該第一次元の分離ゾーンに沿って生じさせる手段と、
(i i i) 該第一次元に実質的に交差する該フローマトリックスの第二次元で本質的に水性の第二流体流を検出ゾーンに向かって生じさせる手段と、
から成り、

分析物含有サンプルが分離ゾーンに導入されると、分析物は分離ゾーンを通る該第一流体流によって分離ゾーンで分離され、該第二流体流によって検出ゾーンに搬送され、該検出ゾーンで分析物が測定用の固定化試薬に結合することを特徴とする装置を提供することである。

【0013】

好ましくは、フローマトリックスが少なくとも実質的に偏平である。

【0014】

分離ゾーン及び検出ゾーン(互いに一体的でもよくまたは独立の2つの部を互いに接合してもよい)はフローマトリックスの同一平面内に配列されてもよく、または互いに上下に重ねて配置されてもよい。後者の場合、本発明方法の分離段階の実行中に例えば着脱自在な隔壁エレメントによって2つのゾーンが互いに接触することを防止しなければならない。このような隔離エレメントはフィルムなどでよく、上記の処理段階(i v)及び(v)に先立って除去される。

【0015】

(図面の簡単な説明)

図1は、本発明装置の1つの実施態様の概略平面図である。

図2A、2B及び2Cは、各々が本発明方法の異なる段階を示す図1の装置の概略平面図である。

図3は、本発明方法によって分析されたトランスフェリンアイソフォームの検出された濃度曲線を示すグラフである。

図4は、本発明方法による別々の分析によって検出されたトランスフェリンアイソフォームの4つの濃度曲線を合わせて示すグラフである。

【0016】

(発明の詳細な説明)

上述のように、本発明方法は、抗体のような特異的リガンドまたは受容体によって識別できない生体分子のヘテロ形態、即ち、密接に近縁の生体分子分析物を測定するために特に有効である。代表的なヘテロ形態は、タンパク質のアイソフォーム、例えば、異なるグリコシル化形態のタンパク質(糖タンパク質)であり、これらの糖タンパク質では、糖質構造の小さい差異によって異なる等電点、アイソザイムなどをもつアイソフォームが生じる。ヘテロ形態なる用語はまた、特に生体親和性(bioaffine)複合体の種々の形態を包含する。複合体の一方の要素がアイソフォームタンパク質、例えば遊離分子及び抗体結合分子である。2つの化合物が互いにヘテロ形態であるか否かを判定するためにいわゆる阻害試験を使用し得る。被疑アイソフォームの一方または双方とリガンドとを反応させ結果を比較することによって、分子がアイソフォームであるか否かを判定することが可能である。

【0017】

トランスフェリン、FSH、LH及びTSHのような糖タンパク質は多様なアイソフォームが存在する分析物の例であり、アイソフォームの相対的発生率は臨床的に重要であるが、アイソフォームが免疫化学的見地では極めて類似しているので通常はイムノアッセイによって識別することができない。本発明の別の例は、いわゆる心臓マーカー(例えばクレアチニンキナーゼ)であり、これは細胞外媒体中でプロトリシスの分解の結果として異なる電荷をもつ種々のアイソフォームが存在する。

【0018】

トランスフェリン及びそれらの有益なアイソフォームは血液中にかなり高い濃度で存在し、十分な量のサンプルがカラムに加えられるならば、カラム分離後直

接に分光光度法によるオンライン検出によって分析できる (Jeppson, J. - O., Clin. Chem. 39 / 10, 2115 - 2120 (1993))。ホルモンFSH、LH及びTSHのような別の分子は低濃度で存在するので、イムノアッセイ検出が必要である (Wide, L., Acta Endocrinologica 1985, 109: 181 - 189)。

【0019】

本発明方法では、アイソフォームのような分析物の分離を行うために、アイソフォーム含有サンプルを特に膜のような偏平なフローマトリックスに付加し、第一液体流によってフローマトリックスの分離エリアでアイソフォームを分離し、次いで、分離したアイソフォームを第一液体流に交差する第二液体流で溶出させる。その結果として、アイソフォームが分離エリアから除去されて、通常は線またはバンドとして固定化された捕獲用試薬を含む検出エリアに到達し、該試薬によって捕獲される。次いで捕獲されたアイソフォームに検出試薬、例えばアイソフォームに対する標識抗体を加えることによって検出し得る。検出試薬は、上記第二流の方向と同方向、対向方向または交差方向の第三流体流を介して添加し得る。

【0020】

1つの実施態様では(現在ではより好ましい実施態様もある)、分離ゾーン及び検出ゾーンが、互いに上下に重なって配置された独立の2つのフローマトリックス部材に設けられてもよく、これらの部材は、分離された分析物を溶出させて検出ゾーンに搬送する前に除去される着脱自在なフィルムなどによって隔離されていてもよい。

【0021】

このような分析用に設計された膜のような偏平なフローマトリックスは、分離ゾーンと、該分離ゾーンから離間した平行な検出ゾーンとを含み、検出ゾーンは、検出ゾーンに沿って伸びる1つまたは複数の線またはバンドの形態で固定化された捕獲試薬を含んでいる。

【0022】

上記から容易に理解されかつ以後の記載からより十分に理解されるであろうが

、本発明はこれまでに達成することができなかつたようなタンパク質のアイソフォーム及びその他のヘテロ形態を迅速に分析する方法及び装置を提供する。

【0023】

フローマトリックス

フローマトリックス（分離ゾーンと検出ゾーンとを含む）の材料は、いわゆるイムノクロマトグラフィー定量法で従来から使用されている材料と同種の材料でよく、サンプル成分（分析物を含む）と反応体との搬送スペースを形成しているが、勿論、材料が種々の方向の流れを許容するという条件を伴う。マトリックスの内面、即ち、マトリックス中のフローチャネルの表面は、バッファ、血清、血漿、血液、唾液などのような水性媒体がマトリックス中で搬送され得るように十分に親水性でなければならない。この搬送は、毛管力によって、例えばマトリックス自体またはマトリックスに接触した吸収エレメント（例えば、セルロースの吸収パッドなど）のような補助手段に生じる毛管力によって遂行または促進される。任意に、ポンプデバイスで圧力または吸引を作用させることによって毛管流を更に促進してもよい。最小の内側寸法（円形チャネルでは直径として測定される）は、分析物と添加された反応体とがマトリックス中で搬送され得る十分な大きさでなければならない。マトリックスが連通するフローチャネル系を有しているとき、適当なマトリックスは、フローチャネルの最小内側寸法が典型的には0.01 - 1,000 μm 、好ましくは0.4 - 100 μm の範囲の値を有しているマトリックスから選択される。（1,000 μm までという）広い範囲の高い値域に最小寸法を有しているようなフローチャネルは、外的に加えられる圧力/吸引によって流れが駆動される場合に主として使用され得る。

【0024】

現在では、フローマトリックスが通常は約500 μm 未満、例えば約25 μm - 約500 μm の範囲の膜厚、好ましくは約150 μm 未満、例えば約75 μm - 約150 μm の膜厚をもつ膜の形態であるのが好ましい。しかしながら当業界で公知のように、ゲル、または、相互接続チャネルが食刻されたシリコン（またはガラス）のプレートもしくはチップのような別の形態のマトリックスを考察することも可能である。

【0025】

適当なマトリックスはしばしば、ポリマー、例えば、ニトロセルロース、ポリエステル、ポリエーテルスルホン、ナイロン、硝酸/酢酸セルロース、セルロース、再生セルロースから構成される。このような材料から成る膜は緻密な裏面を備える、例えばポリエステルで裏打ちされているのが有利である。

【0026】

フローマトリックス材料の均質性はそのクロマトグラフィー品質に影響を与えるので、これを理論的プレート高さによって表す。理論的プレート高さが低いほど優れた材料である。例えば、本発明に使用する膜は、好ましくは約500 μm 未満、特に約100 μm 未満の理論的プレート高さ(HETP)を有していなければならない。

【0027】

分離ゾーン

分離ゾーンと検出ゾーンとは同一フローマトリックスの一体部分でもよくまたは独立部品の集成でもよい。任意に2つ以上のサブゾーンから成り得る分離ゾーンの基本原理は、イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル濾過(サイズ分離)(例えば、ゲルまたは緻密な膜を使用する)クロマトグラフィー、IMAC(immobilized metal chelate affinity chromatography)のようなアフィニティ(好ましくは、 10^6 未満、特に $10^3 - 10^6$ という中等度の結合定数)クロマトグラフィー、及び、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)のような本質的に水性の系を使用できるということである。

【0028】

分離ゾーンは所望のサンプル成分(分析物及び近縁のヘテロ形態)に対してある程度の結合能力を有しているリガンド/構造を示す。特に特異性、結合強度(アフィニティ)及び動力学(kinetics)に関して本発明の目的に適うリガンドまたは構造の選択は当業者に直ちに明らかであろう。従って分離ゾーンで分離することが可能なリガンドは、電荷を有するリガンド(アニオン性、カチオン性、両性=イオン交換性リガンド)、または、両性/両親媒性、生体親和性、

キレート性、イオウ含有性（いわゆるチオ親和性アフィニティに対しては主としてチオエーテル）のリガンド、または、 - 相互作用に基づくリガンド、疎水性リガンド、などである。生体特異的アフィニティリガンドのうちでは、主として所謂イムノリガンド、即ち抗体及びその抗原結合性フラグメントが注目される。

【0029】

問題のリガンド/構造は製造プロセスでマトリックスに物理的に導入される構造でもよく、または、マトリックスへの共有結合によってもしくは物理的吸着を介して分離ゾーンに固定されてもよい。マトリックスに対するリガンド/構造の固定は、分離に使用されるリガンドと共有結合したか、物理的吸着したかまたは生体特異的結合したポリマーまたは別の置換基を介して行われてもよい。あるいは、所望のタイプのリガンドを提供するポリマー粒子の付着を用いることも可能である。粒子は親水性でも疎水性でもよく、粒子に吸着されるかまたは共有結合した化合物によってリガンド構造が提供される。分離用リガンドをマトリックスに結合させる技術に関しては、例えば、我々の先行国際特許出願（PCT）WO 99/36780、WO 99/36776及びWO 99/36777（これらの特許の記載内容は参照によって本発明に含まれるものとする）を参照し得る。これに関連して、共有結合したリガンドを有する市販の膜、例えば、DEAEセルロースペーパー（ジエチルアミノエチル）（DE 81、Whatman International Ltd, England）が存在することを記載しておく。

【0030】

リガンド密度（置換度）は、所望のアイソクラチック分離が得られるように選択する。任意に、分離ゾーンが種々のリガンド密度を有していてもよく、または、分離方向に沿ったリガンド密度の勾配を有していてもよい。

【0031】

イオン交換官能基の例は、ジエチルアミノエチル（DEAE）、トリメチルヒドロキシプロピル（QA）、第四級アミノエチル（QAE）、第四級アミノメチル（Q）、ジエチル - （2 - ヒドロキシプロピル） - アミノエチル、トリエチル

アミノメチル (TEAE)、トリエチルアミノプロピル (TEAP)、ポリエチレンイミン (PEI) のようなアニオン交換体、及び、メタクリレート、カルボキシメチル (CM)、オルトホスフェート (P)、スルホネート (S)、スルホエチル (SE)、スルホプロピル (SP) のようなカチオン交換体である。

【0032】

リガンドのコーティング後、通常は膜マトリックスの望ましくないバックグラウンドもしくは非特異的吸着作用を実質的に減少させるかまたは除去する洗剤または当業界でそれ自体公知のその他の適当な物質で膜を処理する。

【0033】

分析物含有サンプルはフローマトリック表面に直接添加してもよいが、通常は独立のサンプル塗布膜または該膜に液体接触するパッドに添加される。パッドは縁-縁接触によって膜に接触してもよいが、好ましくはフローマトリックスの頂部に取り付けられる。

【0034】

分離ゾーンにおける分析物の分離条件は使用される分離原理に応じて選択されるが、一般には段階的または連続的に変化するイオン強度のアイソクラチック条件が使用される。また、分離ゾーンからの分析物の交差方向溶出は通常はアイソクラチック条件で行われる。従って、例えばゲル濾過の場合には分離バッファと溶出バッファとが同じでもよいが、イオン交換クロマトグラフィーの場合には分離した分析物を効率的に溶出するために通常は高いイオン強度の溶出バッファを使用する必要がある。

【0035】

検出ゾーン

検出ゾーンにおける分析物捕獲は、生体特異的捕獲、好ましくは免疫化学的捕獲または基特異的捕獲、例えば疎水性基の存在に基づくタンパク質の結合のような種々の原理に基づく。現在では、生体特異的捕獲が好ましく、この場合の結合定数 K は 10^8 よりも大きい値であるのが望ましい。

【0036】

捕獲試薬は、当業界で公知のように、例えば分離ゾーンのリガンドに関して上

述した方法でフローマトリックスの検出部に結合または固定化され得る。

【0037】

上述のように、検出ゾーンは好ましくは連続線またはバンドの形態の捕獲試薬を含む。1つまたは複数の分析物が高濃度で存在する場合、2つまたは場合によってはそれ以上の検出線またバンドを使用することが必要であろう。同様に、検出ゾーンのリガンド密度は種々の分析物の互いの濃度次第で変更し得る。

【0038】

検出ゾーンは勿論、分離が完了する前に分析物が検出ゾーンに拡散しないように分離ゾーンから十分に離間していなければならない。

【0039】

分離ゾーンからの分析物の解放及び検出ゾーンへの搬送が実質的に完全であることが望ましいが、全部の分析物が検出ゾーンで同じ程度に結合するならば検出ゾーンでの結合に関しては必ずしも完全である必要はない。

【0040】

使用されるフローマトリックスのタイプ次第では、分離ゾーンからの溶出流を、適当なデリミッター、例えばワックスデリミッター、レーザー刻設溝、などによって検出ゾーンに案内し得る。

【0041】

分離ゾーンと検出ゾーンとは、異なる材料から成る独立部品であり、組合せフローマトリックスを形成するように接合されてもよい。しかしながら2つのゾーンはまた、当業界でそれ自体公知のように膜またはチップのような一体マトリックスの上に適当な化学的/物理的改質によって設けられてもよい。

【0042】

検出方法及び試薬

検出ゾーンで捕獲された分析物の検出及び定量は種々の方法で行うことができる。捕獲された分析物が酵素的に活性である場合、分析物は適当な基質に対する作用、例えば色の変化によって検出され得る。しかしながら通常は検出可能な試薬を添加する。このような基質または試薬は、(i)フローマトリックスの分離方向に交差する側縁の1つ(通常は長辺)から好ましくは溶出流の対向方向で、

または、(i i) フローマトリックスの分離方向に伸びる側縁の1つ(通常は短辺)から、または、(i i i) パッドもしくはマトリックスの折り畳み可能部分を介して通常は検出ゾーンの近傍でマトリックスの頂部から、マトリックス内の流体流に添加され、基質または試薬が流体流によって検出ゾーンに搬送される。後者の場合、拡散性の検出用試薬を任意にパッドまたは折り畳み可能部分に予め付着させておいてもよい。このような予めの付着及び折り畳み構造は当業界でそれ自体公知である。余剰の基質または試薬はバッファ流によって除去されるであろう。

【0043】

検出可能な試薬は通常は、酵素活性基(例えば基質に作用して発色する)、蛍光発生基、色素原性基、ハプテン、ビオチン、放射性ラベル(オートラジオグラフィ)、粒子などのような分析的に検出可能な基で標識された生体特異的親和性をもつ反応体である。分析的に標識された反応体の常用の形態は標識抗体である。

【0044】

標識抗体は、(i) 捕獲剤が標識抗体と同じ抗原(=分析物)または抗原/ハプテンに対する抗体から成るサンドイッチ法のような非競合法、または、(i i) 限定量の抗分析物抗体に対して分析物と固相结合分析物類似体との競合が生じるような競合法に使用され得る。

【0045】

特に有効な標識基は、粒子、例えば、従来型スキャナーによって直接測定し得る黒色カーボン粒子である。任意に、粒子が蛍光発生基または色素原性基(それぞれ蛍光粒子または有色粒子)のような上述の検出可能基の1つを含む。有用な粒子はしばしば、0.001 - 5 μm の範囲、好ましくは0.05 - 5 μm の範囲の粒度を有している。粒子がコロイド寸法を有しており、いわゆるゾル(即ち、通常は0.001 - 1 μm の範囲の粒度を有する球形粒子の単分散系)でもよい。特に挙げられるのは、金属粒子(例えば金ゾル)、非金属粒子(例えばSiO₂、カーボン、ラテックス及び死亡赤血球と細菌)である。また、非コロイド寸法の粒子も使用されている。これらは多少とも不規則で、多少とも多分散性で

ある（例えば1 μ m未満のカーボン粒子；例えば我々のWO96/22532参照）。

【0046】

粒子が標識基のとき、検出ゾーンで形成される複合体はしばしば、肉眼でまたは光学測定装置（例えば、イメージ解析専用ソフトウェアを含むコンピューターに結合されたCCDカメラまたはレーザースキャナー）によって検出できる。

【0047】

標識基となる粒子に関しては更に、WO88/08534（Unilever）；米国特許US-A-5,120,643（Abbott Labs.）；欧州特許EP-A-284,232（Becton Dickinson）を参照するとよい。

【0048】

本発明は主として、生物サンプル、例えば、血液（血清、血漿、全血）、唾液、涙液、尿、脳脊髄液、汗などに使用される。本発明はまた、発酵溶液、反応混合物、などのような別のサンプルにも使用し得る。

【0049】

代表的実施形態

本発明の理解を容易にするために、本発明の1つの実施形態を添付の図1及び図2A-2Cに基づいて単なる代表例として以下に詳細に説明する。

【0050】

図1は、本発明方法に従ってタンパク質のアイソフォームまたは別のヘテロ形態を分析するために使用し得る膜の概略図である。図示の場合の膜は異なる材料から成る2つの部、即ち、分離部1と検出部2との組合せから成り、双方の部が（図示しない）接着テープ片によって組合せ膜の裏面に接合され、オーバーラップとなる薄膜バンド3によって互いに液体受容的に接触している。この膜バンド3は接着テープ片4によって分離/検出膜に固定されている。分離部は組合せ膜の分離ゾーンを規定している。検出部2は分析物捕獲試薬が線5の形態に固定化された検出ゾーンを有しており、線5の幅は例えば約1mmである。参照符号6は測定範囲を拡大するために追加した任意の検出線を表す。膜の短辺は図1にa_

及びc、長辺はb及びdでそれぞれ示す。

【0051】

膜は図2A - 図2Cに基づいて以下に説明するように使用され得る。膜を湿らせた後、分析すべき2つの分析物（以下の記載では分析物1及び分析物2と呼ぶ）を含有するサンプルを7で分離ゾーン1に加える（図2A）。分離バッファを含まれているパッド8を膜の短辺aに付加し、吸取パッド9を対向する短辺cに付加する。これによって図2Aの矢印方向にバッファ流が生じ、2つの分析物は図2Aに点10（分析物1）及び11（分析物2）で示すように分離される。

【0052】

次に図2Bに示すように、パッド8と9とを取り外し、溶出剤含有パッド12を長辺dに取り付け、吸取パッド13を長辺bに取り付ける。これによって図2Bの矢印方向で溶出剤流が生じ、分離された分析物1及び分析物2が検出ゾーンに搬送され、検出ゾーンでそれぞれ固定化試薬線に沿った位置14及び15で固定化試薬に捕獲される。

【0053】

次に図2Cに示すように、パッド12と13とを取り外し、長辺dは吸取パッド16及び長辺bは標識反応体の溶液または懸濁液を入れた容器17に交換する。これによって標識反応体は矢印の方向に泳動し、図2Cの18及び19で捕獲分析物1及び2に結合する。標識複合体、従って対応する分析物1及び2を次に、検出線に沿ったラベルからのシグナルの強度を読み取り、それぞれの量を算出することによって検出し定量し得る。ラベルがカーボン粒子の場合、測定をスキヤナーによって行うのが有利であろう。

【0054】

上述のように流れを手動操作で開始させかつ停止させる方法は勿論単なる代表例として示しただけであり、例えばいわゆるインプリント液体回路（例えばWO93/10457参照）などのようなより複雑な手段は当業者に容易に明らかであろう。

【0055】

トランスフェリンのアイソフォームの分析に使用される本発明方法の特定実施

例を以下に記載する。

【0056】

実施例1：トランスフェリンのアイソフォームの定量

(i) アニオン交換特性をもつ分離膜の製造

ニトロセルロース膜のシート(3 μ m、ポリエステル裏打ち上のニトロセルロース、Whatman International Ltd, England)を0.03%のポリエチレンイミン(PEI, Sigma, St Louis, MO, USA)の溶液に入れた。混合物を3時間振盪し、次いで膜を0.1%トウイーン20中に30分間維持し、風乾し、次いでプラスチックバッグに入れて+4で保管した。

【0057】

(ii) 検出膜の製造

3mg/mlの抗トランスフェリンモノクローナル抗体をニトロセルロース膜(5 μ m、ポリエステル裏打ち上、Whatman International Ltd, England)のストリップ(29cm \times 4cm)の中央に、2mm間隔を隔てるストリップの長辺に平行な1mm幅の線の形態にスプレーした。スプレー装置(IVEK Linear Striper IVEK Corporation, Vermont, USA)は1 μ l/cmの吐出速度で使用した。膜を室温で乾燥しプラスチックバッグに入れて+4で保管した。

【0058】

(iii) 組合せ膜の製造

分離膜を1.5 \times 5cmに裁断し、検出膜を2つの抗体線が長辺に平行に膜の中央に位置するようにして2 \times 5cmに裁断した。2つの膜を長辺に沿って突き合わせ状態にぴったりと並べ、下面を接着テープで接合した。ニトロセルロース膜片(0.2cm \times 5cm、8 μ m、A99、Schleicher and Schuell, Dassel, Germany)を2つの膜の上面にオーバーラップとして配置した。形成された組合せ分離/検出膜の短辺に0.5cmの未被覆部分が残るようにしてこの膜を1 \times 4cmの自己接着性ポリエステルフィルム(Gelman接着ポリエステルフィルム、3mil)によって固着した。以後

の記載では、組合せ膜の2つの短辺をそれぞれa及びcと呼び、長辺をそれぞれb及びdと呼ぶ(図1参照)。

【0059】

(iv) カーボン粒子コンジュゲート

カーボン粒子懸濁液(予製液): 3gのカーボン粒子(sp 4、Degussa, Germany)を250mlの5mMのホウ酸塩バッファ, pH 8.4に懸濁させ、氷浴に入れて100%振幅及び5+5秒のパルスで4×5分間音波処理した(VibraCell 600W、1.5cmプローブ)。

【0060】

カーボン粒子コンジュゲート: 75 µg/mlの抗トランスフェリンモノクローナル抗体とカーボン懸濁液(250 µg/ml)とを3時間混合した。1%最終濃度に相当するウシ血清アルブミン(BSA)を添加し、粒子を更に30分間混合し、次いで遠心分離によって洗浄し、0.1Mのホウ酸塩バッファ, pH 8.5(1%BSAと0.05%NaN₃とを含有する)に傾瀉し、洗浄用バッファで3.7mgカーボン/mlに希釈した。できあがったカーボン粒子コンジュゲートを洗浄用バッファに入れて+4 で保管した。

【0061】

(v) サンプル材料

テトラシアロトランスフェリン、トリシアロトランスフェリン及びジシアロトランスフェリン: Mono Q(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)上のイオン交換クロマトグラフィーによってトランスフェリンの鉄飽和調製物(Sigma, St Louis, MO, USA)からこれらのイソトランスフェリンを単離した。

【0062】

アジアロトランスフェリン: トランスフェリンの鉄飽和調製物(Sigma, St Louis, MO, USA)をノイラミニダーゼ(Behring ORKD, Germany)によって処理し、次いでMono Q(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)上のイオン交換クロマトグラフィーによってアジアロトランスフェリンを単

離した。

【0063】

種々のアイソフォームを0.2%のBSA、0.1%のウシガンマグロブリン、0.1%のトウイーン20、0.1mMの Fe^{3+} -シトレート、1mMの $NaHCO_3$ 及び0.05%の NaN_3 で2-6.5 μ gトランスフェリン/mlの濃度に希釈した。

【0064】

等電点(pI): Phast System (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) 中で等電点電化泳動を繰り返すことによってそれぞれのアイソフォーム調製物のpIを測定した。アシアロトランスフェリンのpI = 5.66; ジシアロトランスフェリンのpI = 5.56; トリシアロトランスフェリンのpI = 5.46; テトラシアロトランスフェリンのpI = 5.32及びペンタシアロトランスフェリンのpI = 5.21であった。Amersham Pharmacia Calibration Kit, 17-0472-01, 2.5-6.5を校正に使用した。

【0065】

トランスフェリン標準: 上述のように調製したアシアロトランスフェリンを、0.2%のBSA、0.1%のトウイーン20、0.1mMの Fe^{3+} -シトレート、1mMの $NaHCO_3$ 及び0.05%の NaN_3 を含有している20mMのBis-Tris, pH6.37に0.07-16.6 μ gトランスフェリン/mlの濃度まで希釈し、標準として使用した。

【0066】

(vi) 組合せ分離及び免疫化学的定量の標準プロトコル

段階1. 短辺aから短辺cまでの膜の湿潤

溶出バッファを1×3.5×0.5cmのPVAスポンジ(PVA D、60 μ m、Kaneko Ltd, Japan)に添加し、次いでスポンジをパッドの短辺aに沿って配置することによって組合せ膜を湿潤させる。膜の対向短辺cに2×3.5cmのセルロース製吸取パッド(GB 004, Schleicher

r and Schuell)を取り付ける。溶出バッファの前縁がセルロースパッドに到達すると、PVAスポンジを取り外す。以下の分析(a)では溶出バッファは20mMのBis-Tris、0.1%のトウイン20、5mMのNaCl, pH6.12であり、以下の分析(b)では溶出バッファは20mMのBis-Tris、0.1%のトウイン20、15mMのNaCl, pH6.32であった。

【0067】

段階2. サンプル塗布及び短辺aから短辺cまでの溶出

0.5µlのサンプル(2-6.5µg/ml)を短辺aから0.5cm離して分離膜の中央におく。溶出バッファを含浸させたPVAスポンジを付加し、溶出を4分間継続させる。次に、PVAスポンジと吸取パッドとを取り外す。

【0068】

段階3. 長辺d(分離膜)から長辺b(検出膜)への溶出

2×5cmのセルロースパッド(GB 004, Schleicher and Schuell)を長辺b(検出膜)に沿って取り付け、溶出バッファ(20mMのBis-Tris, 200mMのNaCl, 0.1%のトウイン20, pH6.29)を湿潤させた1×5×0.5cmのPVAスポンジ(PVA D、60µm、Kanobo Ltd, Japan)を長辺dに沿って取り付ける。溶出を4分間継続させ、PVAスポンジと吸取パッドとを取り外すことによって流れを停止させる。

【0069】

段階4. カーボン-抗トランスフェリンの反応

2×5cmのセルロース吸取パッド(GB 004, Schleicher and Schuell)を長辺d(分離膜部)に沿って取り付け、次いで長辺bを、カーボン-抗トランスフェリン、40%のトレハロース中に0.25mg/mlのカーボン、1%のトウイン20、1%のウシアルブミン、0.1Mのホウ酸塩バッファ, pH8.5、0.05%のNaN₃と共に容器に入れる。カーボン粒子コンジュゲートを検出線に2分間通し、組合せ膜を容器から取り出し、吸取パッドを除去して組合せ膜を乾燥させる。

【0070】

段階5. 黒化の検出及びトランスフェリン濃度の計算

検出線に沿ってグレースケールを測定するために膜をスキャナー (Agfa Acus II Scanner) に入れる。グレースケールを12ビットのグレースケール分解能 (4096レベル) 及び600ポイントパーインチ (ppi) の光学分解能で読み取る。得られたイメージをデジタル化し、強度値をMicrosoft Excelで処理する。検出線の短辺に沿った強度の平均値 (1mm = 23グレースケール値) を計算し、検出線に沿って4cmのクロマトグラムをグラフ化する。

【0071】

トランスフェリンの濃度を計算するために、アシアロトランスフェリンの希釈系列を使用し、0.5µlのサンプルを分離膜に供給し、次いで直接に溶離する (段階3-5)。それぞれの標準点の最高強度を測定し、カーブフィッティング (曲線適合) プログラム (GraphPad Prism^{RTM} 非線形適合) を用いて標準曲線を作成し、クロマトグラムに対するトランスフェリン濃度を計算し得る。

【0072】

(vi) 分析

(a) アシアロトランスフェリン、ジシアロトランスフェリン、トリシアロトランスフェリン及びテトラシアロトランスフェリンを含有する調製サンプルを上記の標準プロトコルで分析し、得られたシグナル強度曲線を図3に示す。図中、参照符号1は、テトラシアロトランスフェリンのピーク、2はトリシアロトランスフェリン、3はジシアロトランスフェリン、4はアシアロトランスフェリンを表す。

【0073】

(b) (i) アシアロトランスフェリン、(ii) ジシアロ+トリシアロトランスフェリン、(iii) トリシアロ+テトラシアロトランスフェリン、(iv) テトラシアロ+ペンタシアロトランスフェリンをそれぞれ含有する調製サンプルを上記の標準プロトコルに従って分析し、結果を図4に示す。種々のピークは

図の右上隅に特定された成分を示す。図4はまた、ピークの等電点の値を示す。

【0074】

図3及び図4に示すように、本発明方法によれば、サンプル中のアイソフォームの優れた分離及び定量が可能である。例えば図4に示すように0.1 pI単位の分解能が容易に達成される。

【0075】

本発明をその使用実施例に関して記載及び説明したが、本発明の要旨を逸脱することなく種々の変更、修正、置換及び削除が可能であることは当業者に理解されよう。従って本発明は特許請求の範囲に等価の概念を包含すると考えてよい。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明装置の1つの実施態様の概略平面図である。

【図2A】

本発明方法の異なる段階を示す図1の装置の概略平面図である。

【図2B】

本発明方法の異なる段階を示す図1の装置の概略平面図である。

【図2C】

本発明方法の異なる段階を示す図1の装置の概略平面図である。

【図3】

本発明方法によって分析されたトランスフェリンアイソフォームの検出された濃度曲線を示すグラフである。

【図4】

本発明方法による別々の分析によって検出されたトランスフェリンアイソフォームの4つの濃度曲線を合わせて示すグラフである。

【図1】

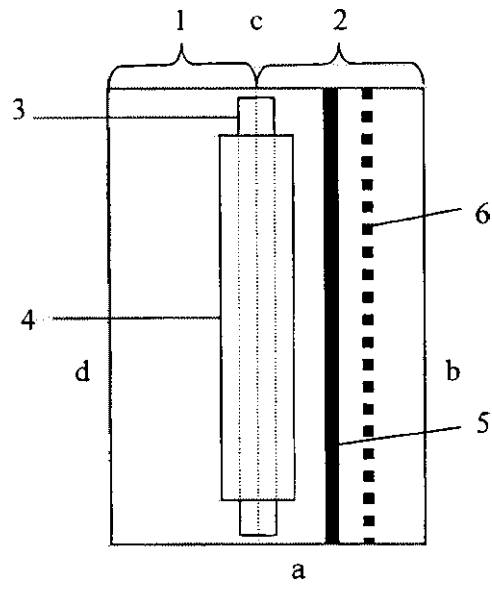


FIG. 1

【図2A】

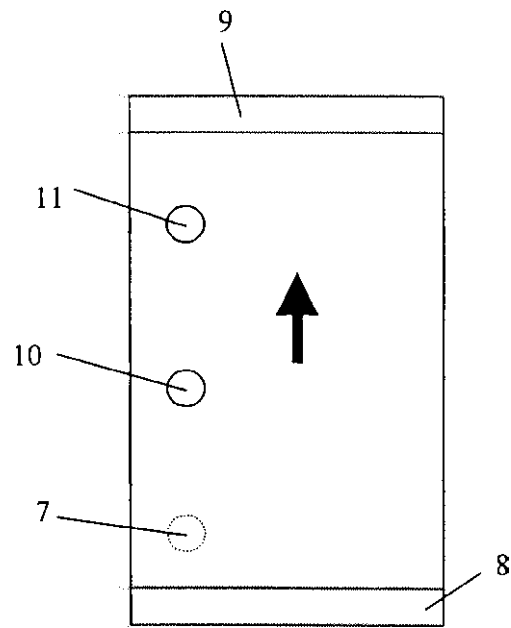


FIG. 2A

【図2B】

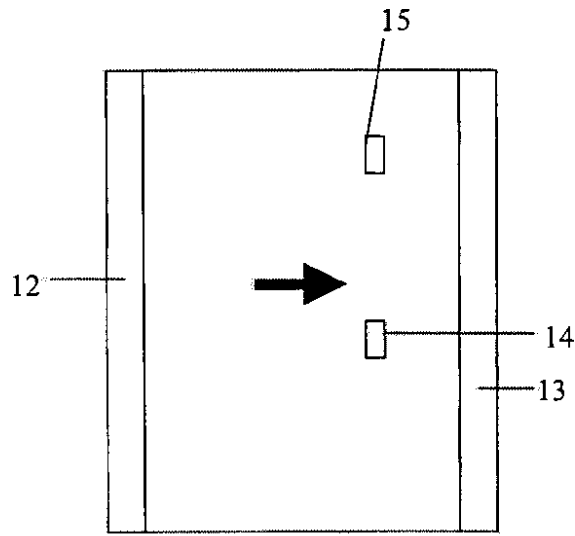


FIG. 2B

【図2C】

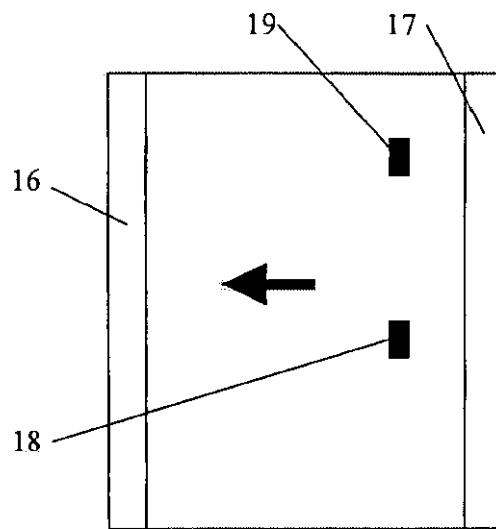


FIG. 2C

【図3】

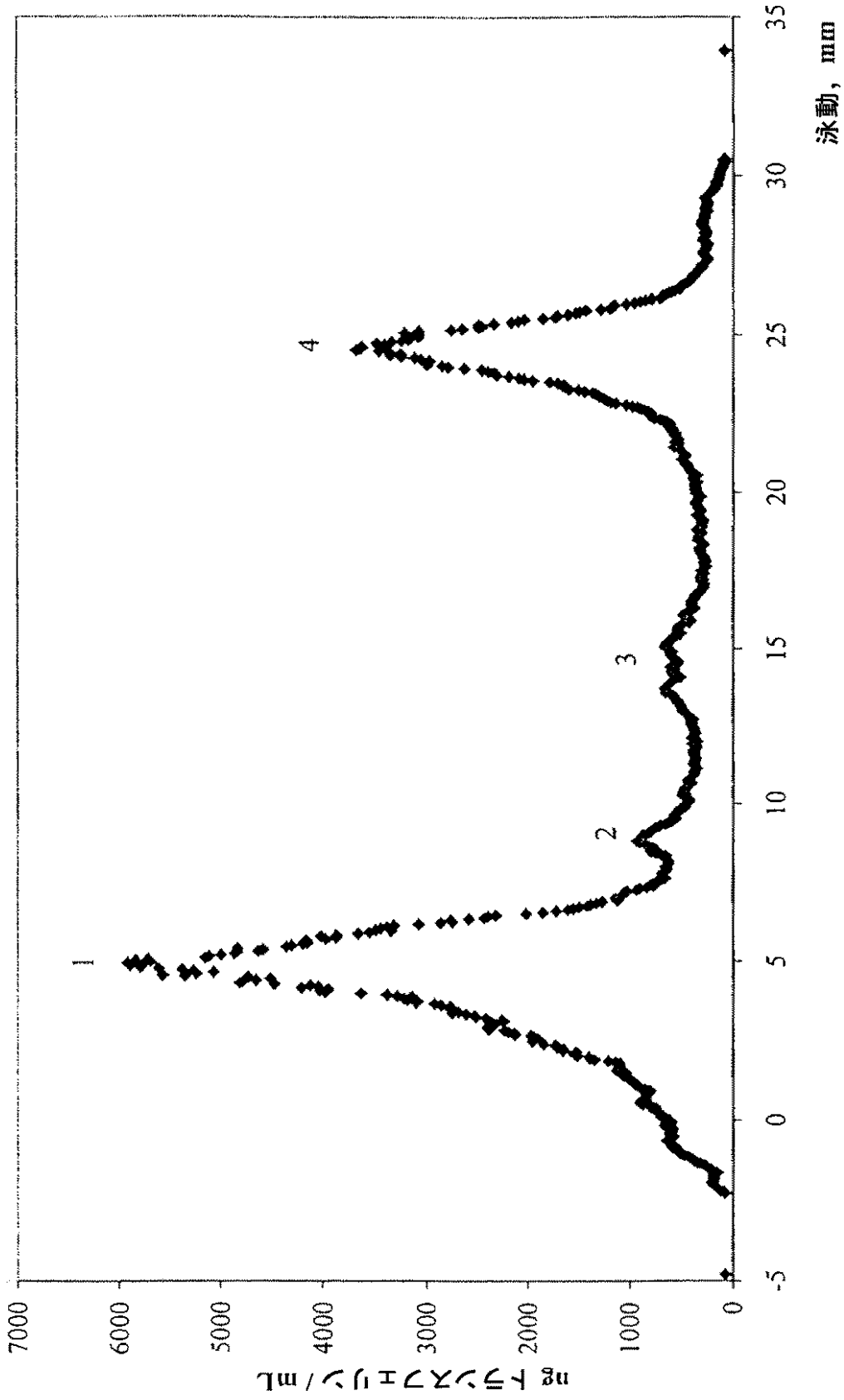


FIG. 3

【図4】

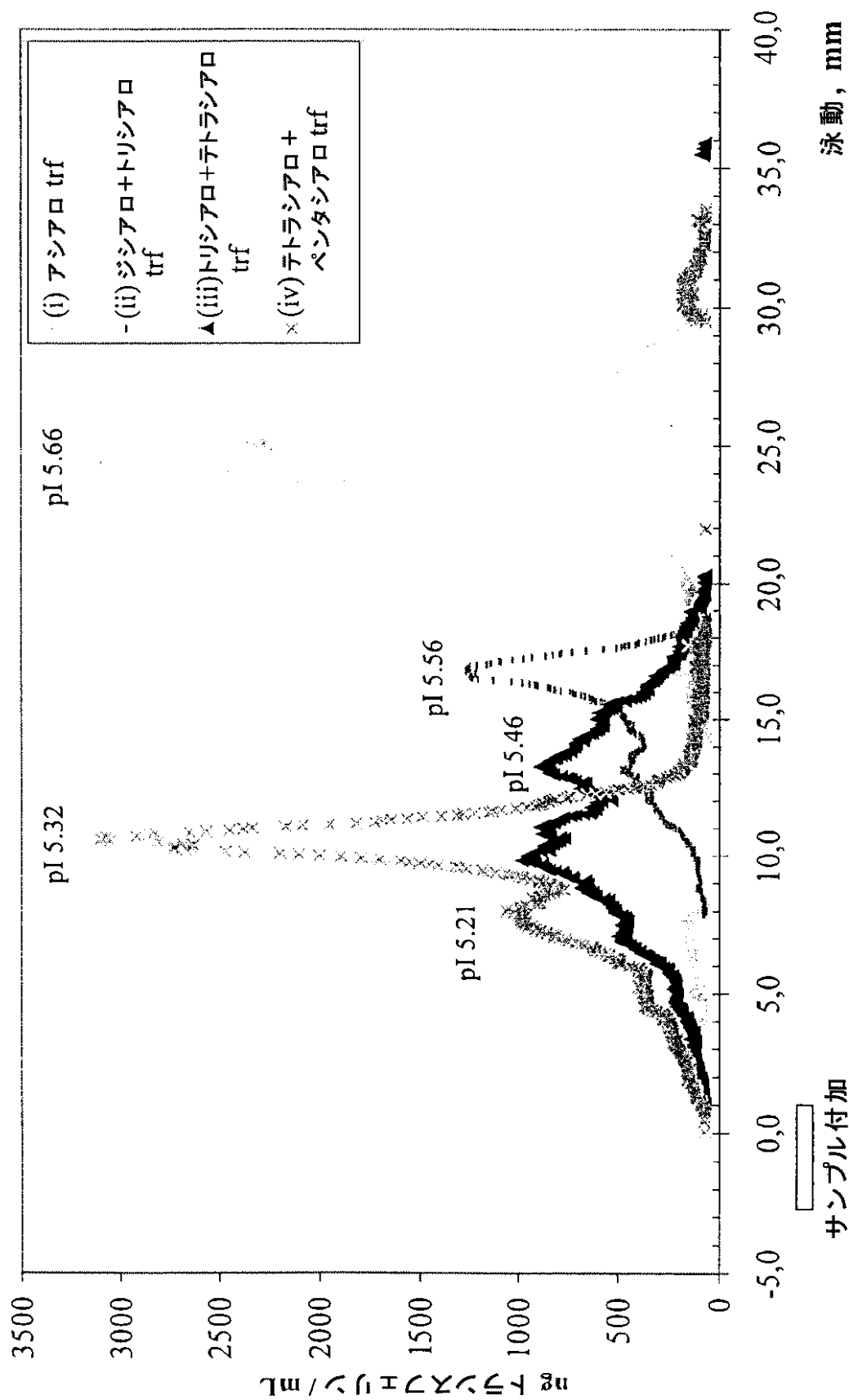


FIG. 4

【国際調査報告】

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 00/01509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/53, G01N 33/561, G01N 27/447 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)		
IPC7: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9930145 A1 (MOSAIC TECHNOLOGIES), 17 July 1999 (17.07.99), abstract, page 3, lines 16-28; page 4, lines 15-20; page 11, lines 10-26; page 13, line 14 - page 15, line 5; page 15, lines 22-27; example 3 --	1-35
A	US 4313906 A (FILIPPI, THOMAS J. ET AL), 2 February 1982 (02.02.82), see abstract --	2,6,15,17,21
A	US 4469601 A (BEAVER, LOIS A. ET AL), 4 Sept 1984 (04.09.84), see abstract --	1-35
<input checked="" 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: "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 "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) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 November 2000		04-12-2000
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Henrik Nilsson/GH Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE 00/01509
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9904267 A2 (CHARM SCIENCES), 28 February 1999 (28.02.99), see abstract -- -----	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/SE 00/01509

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9930145 A1	17/07/99	AU 1804099 A	28/06/99
US 4313906 A	02/02/82	NONE	
US 4469601 A	04/09/84	EP 0169951 A AT 29594 T DE 3277239 D EP 0060709 A,B SE 0060709 T3	05/02/86 15/09/87 00/00/00 22/09/82
WO 9904267 A2	28/02/99	AU 2209799 A AU 8489698 A EP 0998676 A EP 1044360 A US 5985675 A WO 9934191 A	19/07/99 10/02/99 10/05/00 18/10/00 16/11/99 08/07/99

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 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

【要約の続き】

を実施する装置に関する。

专利名称(译)	分析方法和装置		
公开(公告)号	JP2003506717A	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2001515968	申请日	2000-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	关阿尔玛乳木果诊断TAKES阿为主		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚-诊断任务则是基于		
[标]发明人	カールソンヤン レーンベリイマリア		
发明人	カールソン,ヤン レーンベリイ,マリア		
IPC分类号	G01N33/543 G01N30/38 G01N30/52 G01N30/94 G01N30/96 G01N33/53		
CPC分类号	G01N30/94 G01N30/96 G01N2030/388 G01N2030/527 Y10T436/156666		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.V		
优先权	9902855 1999-08-06 SE 60/148566 1999-08-13 US		
其他公开文献	JP4580131B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于定性，半定量或定量测量含有或怀疑含有分析物的水性样品中至少两种分析物的方法，该方法包括：准备一个流动矩阵，该流动矩阵包含一个在一个维度上延伸的分离区域和一个在第一维度上以与分离区域隔开的平行关系延伸的检测区域，并通过与分析物的生物特异性相互作用在检测区域中进行分析 包括能够捕获物质的固定化试剂，(ii) 将样品添加到分离区中或分离区上游的流动基质中，以及 (iii) 将要在分离区中分离的分析物添加到分离区中。沿第一维分离区在流动矩阵中生成基本为水性的第一流体流以进行传输，以及 (iv) 将分离出的分析物传输至检测区 检测区 第一流体流被固定的试剂中断而被捕获，导致在流动矩阵的第二维中的基本上含水的第二流体流，该第二维基本上与第一维向检测区域相交。(v) 测量检测区域中的分析物。本发明还涉及用于实施该方法的设备。

