

(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2006-524815

(P2006-524815A)

(43) 公表日 平成18年11月2日(2006.11.2)

(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 2 1	
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 5 3 A	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 6 G	
	GO 1 N 27/46 3 3 8	
	GO 1 N 27/30 3 5 3 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-507812 (P2006-507812)
 (86) (22) 出願日 平成16年4月21日 (2004. 4. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年12月22日 (2005. 12. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2004/000914
 (87) 国際公開番号 W02004/097419
 (87) 国際公開日 平成16年11月11日 (2004. 11. 11)
 (31) 優先権主張番号 10-2003-0026227
 (32) 優先日 平成15年4月25日 (2003. 4. 25)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

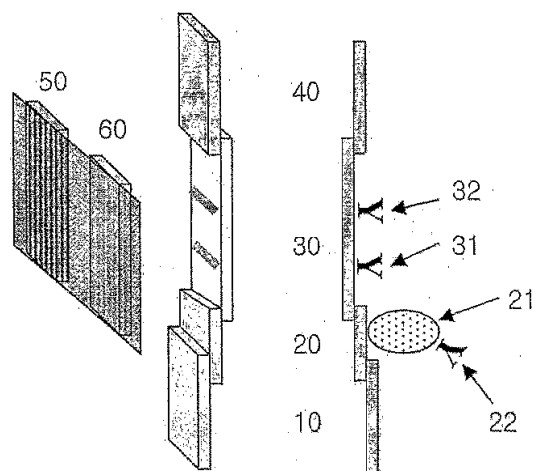
(71) 出願人 502087596
 バイオ デジタル ラボラトリーズ コ
 ーポレーション
 大韓民国 ソウル サンバーク アナム
 ードン 5-カ 1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 バク セー ホワン
 大韓民国 ソウル市 グワンジン-グ グ
 ワンジャン-ドン ククドン 2-チャ
 アパートメント 10-503

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポイントオブケア検査用メンブレンストリップバイオセンサーシステム

(57) 【要約】

本発明は、メンブレンストリップクロマトグラフィー分析システムに、免疫反応と酵素反応の順次的なクロスフロー工程を導入して分析性能を著しく改善させたポイントオブケア検査用(POCT)バイオセンサーに関するものであって、本発明は、試料添加用メンブレンパッド(10)、標識された検出用結合成分を乾燥された状態を含む、標識された検出用結合成分放出用メンブレンパッド(20)、捕獲用結合成分が固定化されている信号発生用メンブレンパッド(30)、縦流溶液吸収用メンブレンパッド(40)、酵素に対する基質溶液供給用メンブレンパッド(50)、横流溶液吸収用メンブレンパッド(60)及び基質溶液を含むメンブレンストリップバイオセンサーシステムに関するものである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、メンブレンストリップバイオセンサーシステムであって、(I)パッド(10)がパッド(20)の端で長さ方向に部分的に重なり固定され、パッド(40)とパッド(20)が信号発生用メンブレンパッド(30)の両端でそれぞれ長さ方向に部分的に重なり固定されている、縦配列パッド群、および、(II)パッド(50)とパッド(60)がそれぞれ信号発生用メンブレンパッド(30)の両側面で部分的に重なり固定されている、横配列パッド群、の二つの群のメンブレンパッドの交差配列を有する、システム：

(a)試料添加用メンブレンパッド(10)；

(b)標識された検出用結合成分を乾燥された状態で含む標識された検出用結合成分放出用メンブレンパッド(20)； 10

(c)捕獲用結合成分が固定化されている信号発生用メンブレンパッド(30)；

(d)縦流溶液吸収用メンブレンパッド(40)；

(e)酵素に対する基質溶液供給用メンブレンパッド(50)；

(f)横流溶液吸収用メンブレンパッド(60)；ならびに

(g)基質溶液。

【請求項 2】

横配列パッド(50)およびパッド(60)が、(I)縦配列パッドと結合された信号発生用メンブレンパッド(30)の両側面で固定されている、または、(II)初めは分離された状態で備えられており縦流反応が完了した後に信号発生用パッドに固定される、請求項1記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。 20

【請求項 3】

縦配列パッドと横配列パッドが分離された状態で備えられており、分離されたプレート上に固定された二つの群が、いずれか1つのプレートを他方のプレートを越えて十字形になるよう移動させることにより交差位置に結合されている、請求項1記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【請求項 4】

電気化学的測定のために電極を信号発生用メンブレンパッド(30)上に直接形成するか、または、別途に作製して信号測定時パッドに結合する、請求項1記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。 30

【請求項 5】

基質溶液が、酵素反応の際、供給を容易にするため、メンブレンパッド(50)の上部の決められた位置に固定される容器内、または、分析システムから分離された容器内に準備される、請求項1記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【請求項 6】

試料添加用メンブレンパッド(10)、検出用結合成分放出用メンブレンパッド(20)、及び基質溶液供給用メンブレンパッド(50)が、ガラス繊維メンブレンであり、信号発生用メンブレンパッド(30)が、ニトロセルロースメンブレンであり、吸収用メンブレンパッド(40)および、パッド(60)が、セルロースメンブレンである、請求項1記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。 40

【請求項 7】

標識された検出用結合成分が、

i) トレーサと検出用結合成分のコンジュゲート、または

ii) 検出用結合成分及びトレーサと検出用結合成分に特異的な2次結合成分のコンジュゲート、を含む、請求項1記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【請求項 8】

検出用結合成分が、分析物質と特異的に反応する抗体、酵素、受容体、またはDNAである、請求項7記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【請求項 9】

トレーサが、西洋ワサビ過酸化酵素、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ 50

、又はアルスロマイセスラモス過酸化酵素であり、基質溶液が酵素に特異な発色性基質成分を含み、信号発生時に酵素 - 基質反応によって信号として肉眼で確認できる変色が現れる、請求項7記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【請求項10】

トレーサが、金コロイドであり、基質溶液は銀化合物を含み、信号発生時に化学触媒反応によって信号として肉眼で確認できる色変化が現れる、請求項7記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【請求項11】

トレーサが西洋ワサビ過酸化酵素、またはアルスロマイセスラモス過酸化酵素であり、基質溶液は酵素に特異なルミノールまたは他の発光用基質成分を含み、信号発生時に酵素 - 基質反応によって信号として光信号が現れる、請求項7記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

10

【請求項12】

トレーサが Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、またはこれらの化合物であり、基質溶液はルミノールまたは他の発光用基質成分を含み、信号発生時に化学触媒反応によって信号として光信号が現れる、請求項7記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【請求項13】

トレーサが、グルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ペニシリンオキシダーゼ、またはコレステロールオキシダーゼであり、基質溶液は酵素に特異な電気化学信号発生用成分を含み、信号発生時に酵素 - 基質反応によって信号として電気伝導度の変化、電流変化または電圧変化が現れる、請求項7記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

20

【請求項14】

捕獲用結合成分が、分析物質、または、結合成分と分析物質間に形成された複合体上に存在する対応物と特異的に反応する、抗体、酵素、受容体、またはDNAである、請求項1記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【請求項15】

縦配列パッド(10)、パッド(20)、パッド(30)および、パッド(40)が、信号検出窓(78)と基質溶液容器破壊針(75)を有するシステムのホルダー下の部分(72)の内部に固定され、横配列パッド(50)およびパッド(60)が試料投入口を備えているホルダーの上の部分(71)の内部にある横配列パッド固定枠(74)上に固定され、枠(74)が上の部分(71)外部にある流れ移動ボタン(73)と連結され、基質溶液を入れてある基質溶液容器(76)が基質溶液供給用メンブレンパッド(50)上に置かれている形でシステムが構成されている、請求項1記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

30

【請求項16】

縦流反応が完了した後に、流れ移動ボタン(73)の自動または手動操作によって横配列パッドが縦配列パッドに十字型に固定されるとき、ホルダーの下の部分(72)に設置された基質溶液容器貫通針(75)によって基質溶液容器(76)が即座に破壊されて横流反応が自動的に進行する、請求項15記載のメンブレンストリップバイオセンサーシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、メンブレンストリップクロマトグラフィー分析システムに、免疫反応と信号発生のための他の反応の順次的なクロスフロー工程を導入して分析性能を著しく改善させたポイントオブケア検査用(point-of-care testing, POCT)バイオセンサーに関するものである。

【背景技術】

【0002】

身体の体液(血液・小便等)に低濃度で存在する疾病指標物質(代謝物質・蛋白質・細胞等)の測定は、一般的に酵素反応と抗原 - 抗体結合のような生物学的反応を利用して行われる。酵素と抗体は、その反応相対物質を選択的に認知する反応特異性が非常に高いだけ

50

でなく反応効率も高いため、高感度で分析物質を測定できる。このような反応特性を利用して診断システムを開発することにより、疾病を早期診断し、病状初期に適切に治療できるようにする方法の開発は非常に重要である。しかし、大部分の診断システムは試薬と機器の取扱いが必要なため、その使用が実験室内のみに制限されるだけでなく、診断遂行のための専門知識もまた要求されていた。

【0003】

近年、免疫分析の一範疇として、ヒトの疾病の病状及び進度に対する予測を可能にするホルモン、蛋白質、そして微生物のような指標物質に対して病原や救急室等のポイントオブケアでの検査だけでなく、家庭でさえも自己診断の必要性が急激に要求されている(参考文献：C. P. Price等, Principles and Practice of Immunoassay, 1997, Page 579-603, Macmillan Reference Ltd., London)。このため、専門知識や複雑な過程を要求せず、使用が簡便で遂行時間が短い免疫分析システムの考案が必要である。このような診断性能は、一般的に細孔性メンブレンを結合蛋白質(例：抗原或いは抗体)の固定化母体として使用する免疫クロマトグラフィー方法により成される(参考文献：R. Chen等, 1987, Clin. Chem. Vol. 33, Page 1521-1525; M. P. A. Laitinen, 1996, Biosens. Bioelectron., Vol. 11, 1207-1214; S. C. Lou等, 1993, Clin. Chem., Vol. 39, 619-624; S. H. Paek等, 1999, Anal. Lett., Vol. 32, 335-360)。分析物質が含まれた試料をメンブレンストリップ下端から吸収させると、細孔を通過した毛細管現象により分析物質は固定化された結合蛋白質層に運搬されて固体表面で抗原と抗体間の結合反応が惹起され、非結合された成分は流体流により分離される。このような原理に基づくメンブレンストリップ免疫クロマトグラフィー技術は、流体の側方流(lateral flow)を利用して反応成分の物質伝達を加速させることにより分析物質の測定迅速性と、単に試料の添加だけで診断遂行が完了する1段階測定の簡便性を提供する。

【0004】

このようなワンステップ診断システムの需要は、近年、妊娠と排卵検査用診断キットの市場規模の急激な成長に良く反映しており、更に今後、インターネットを利用した遠隔診断及び処方体系の構築が予測されるため、成人病等、定期的診断が要求される疾病に対するホームモニターリングシステムがヘルスケアの核心的な要素として要求される見通しにある。しかし、現在の家庭用検査試薬は、大部分が単純な免疫クロマトグラフィー分析と、肉眼で発色有無を確認して定性結果を判読するレベルに留まっているため、定量を要求する指標物質(蛋白質マーカー等)の分析に不適である。定量分析に利用できる既存の方法として金コロイドから発生する発色信号は、既存の光学的信号変換手段を利用して光学密度に変換できるが(参考文献：M. P. A. Laitinen, 1996, Biosens. Bioelectron., Vol. 11, 1207-1214)、実験室で広く使用されている酵素免疫測定法に比べて測定感度が低いという欠点を有する。

【0005】

このようにポイントオブケア診査時の感度が低いという欠点は、蛍光物質や放射線同位元素のように高感度標識物質を利用して克服することができる。実際に、検出抗体を蛍光物質で標識して免疫クロマトグラフィー分析を行い、その定量結果を蛍光検出器で解読する免疫分析システムが開発された(参考文献：U.S. Patent 5753517)。この技術は、高い感度を提供するだけでなく、危害要素がないため、近年救急室等で使用できるポイントオブケア免疫診断機器に応用されている(参考文献：U.S. Patent 6271040 B1)。しかし、蛍光検出設備が相対的に非常に高価で、且つ所持できるくらいの小型化が難しいため、主に病院の臨床検査室や研究室等に制限的に使用されている実情であることから、実験室用酵素免疫測定法と比較すると分析時間が短いこと以外は大きな利点はない。

【0006】

付け加えるならば、実験室用酵素免疫測定法は免疫分析の各工程ごとに免疫複合体を未反応物質から分離させるための洗浄過程を必ず要求しており、更に信号発生のために酵素反応を別途に行わなければならない。よって、このような多段階の複雑な工程は、ポイントオブケア検査時の利用が困難だという問題がある。

【 0 0 0 7 】

本発明は、比較的低いコストで高感度定量が可能な長所を提供する実験室用酵素免疫測定法原理をポイントオブケア検査に適用することにより、ポイントオブケア検査で要求する迅速且つ簡便な分析が可能なだけでなく、試料内の分析物質に対する高感度定量の臨床的要求も満たすことができるメンブレンストリップバイオセンサー技術を提供することを目的とする。

【 発明の開示 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、試料添加用メンブレンパッド(10)、標識された検出用結合成分を乾燥した状態で含む、標識された検出用結合成分放出用メンブレンパッド(20)、捕獲用結合成分が固定化されている信号発生用メンブレンパッド(30)、縦流溶液吸収用メンブレンパッド(40)、酵素に対する基質溶液供給用メンブレンパッド(50)、横流溶液吸収用メンブレンパッド(60)及び基質溶液を含み；

信号発生用メンブレンパッド(30)の縦方向両端に、長さ方向にパッド(40)とパッド(20)が部分的に重なって固定され、パッド(20)の端に長さ方向にパッド(10)が部分的に重なって固定されている縦配列を有すると共に、信号発生時の信号発生用メンブレンパッド(30)の両側面にパッド(50)とパッド(60)が部分的に重なって固定されている横配列を含むメンブレンストリップバイオセンサーシステムに関するものである。

【 0 0 0 9 】

前記の縦に配列されたメンブレンパッドは、既存の免疫クロマトグラフィー法に使用される一般的なものであり、但し横に配列されたメンブレンパッドのみが相違する。このように横に配列されたメンブレンパッドによってメンブレンストリップバイオセンサーシステム上で縦流を利用した反応(例：免疫反応等)と横流を利用した反応(例：酵素反応等)の順次的な遂行が可能になる。

【 0 0 1 0 】

本発明のメンブレンストリップバイオセンサーシステムで横配列パッド(50)及び(60)は、縦配列パッドと結合された信号発生用メンブレンパッド(30)の両側面上に初めから固定されていたり、初めは分離されている状態で備えられていて縦流反応(例：免疫反応等)が完了した後に固定されることにより、横流反応(例：酵素反応等)の遂行に使用される。

【 0 0 1 1 】

前記で縦配列パッドと横配列パッドが分離された状態で備えられている場合、縦配列パッド(10)、(20)、(30)及び(40)を1つの枠に固定させ、横配列パッド(50)及び(60)を他の枠に固定させ、いずれの枠を移動させることにより、パッドを十字型に相互固定させることができる。

【 0 0 1 2 】

具体的に、本発明のメンブレンストリップバイオセンサーシステムは、縦配列パッド(10)、(20)、(30)及び(40)が信号検出窓(78)と基質溶液容器貫通針(75)が備えられたシステムのホルダー(例：プラスチックホルダー)の下の部分(72)の内部に固定され、横配列パッド[(50)及び(60)]が試料投入口を備えたホルダーの上の部分(71)の外部の流れ移動ボタン(73)と連結されたホルダーの上の部分(71)の内部の横配列パッド固定枠(74)に固定され、基質溶液が入っている基質溶液容器(76)が基質溶液供給用メンブレンパッド(50)の上部に固定された形態で製造できる(図7)。

【 0 0 1 3 】

前記のようなシステムは、縦流反応が完了した後に、流れ移動ボタン(73)の自動又は手動操作により横配列パッドが縦配列パッドに十字型に固定される際、ホルダーの下部分(72)に設置された基質溶液容器貫通針(75)によって、基質溶液容器(76)が破壊されて横流反応が自動的に行われるという便利性を提供する。

【 0 0 1 4 】

前記のメンブレンストリップバイオセンサーシステムの作動原理は、次の通りである。先ず、分析物質が含まれている試料を試料投入口(77)に添加すると、縦配列パッドの毛細

10

20

30

40

50

管を通った側流により捕獲抗体が固定化された位置で免疫反応が行われるが、このとき流れ移動ボタン(73)により横配列パッドは上部に固定されて縦配列パッドと接触しない状態(図7, C)に維持され、免疫反応後、流れ移動ボタン(73)が自動又は手動操作によって押されると、横流パッド固定板(74)が垂直下降し縦配列パッド中の信号発生用メンブレンパッド(30)を中心に横配列パッドである(50)と(60)がそれぞれの左右側面に固定され、同時に基質溶液容器貫通針(75)によって酵素基質溶液が入っている容器(76)に穴が開くと共に、パッド(50)に基質が自動的に供給される(図7, D)。このように供給された基質は、横流を形成するようになるため、未反応成分を洗浄する役割をすると共に、免疫反応結合体に含まれた酵素から酵素反応により信号を発生させる。発生された信号は、信号検出窓(78)によって外部から肉眼観察が可能で、また検出装備(例：発色、発光、電気化学検出器)によって酵素反応から発生された信号を測定できる。 10

【0015】

本発明のメンブレンストリップバイオセンサーシステムは、電気化学的測定のために追加的に電極を信号発生用メンブレンパッド(30)上に直接形成したり別に製作して信号測定時に結合する方式で構成できる。

【0016】

前記メンブレンストリップバイオセンサーシステムで、基質溶液は酵素反応を行う際に自動的にメンブレンパッド(50)上に供給されるようにするために、メンブレンパッド(50)上部の決められた位置に固定される基質溶液容器(76)に入っている状態で準備されたり、分析システムから分離された容器に入った状態で準備できる。 20

【0017】

前記パッドに使用できる材料は、各パッドの目的に合うものであればどのような材料でも利用でき、その代表的な例としては、試料添加用メンブレンパッド(10)、標識された検出用結合成分放出用メンブレンパッド(20)及び基質溶液供給用メンブレンパッド(50)はガラス繊維メンブレンを、信号発生用メンブレンパッド(30)はニトロセルロースメンブレンを、そして吸収用メンブレンパッド(40)、(60)はセルロースメンブレンを使用できる。

【0018】

前記で標識された検出用結合成分放出用メンブレンパッド(20)は、少なくとも検出用結合成分と信号発生用標識物質(これは“信号を発生するもの”又は“トレーサー(tracer)”、例えば、酵素、蛍光物質及び放射性同位元素をあらわす。)を含む。 30

【0019】

標識された検出用結合成分放出用メンブレンパッド(20)に、乾燥された状態で含まれる標識された検出用結合成分は、

- i) 標識物質と検出用結合成分のコンジュゲート(conjugate)、又は
 - ii) 検出用結合成分及び標識物質と検出用結合成分に特異に反応する2次結合成分のコンジュゲート
- を含む。

【0020】

前記で検出用結合成分は、分析物質と特異的に反応する物質であり、その例としては抗体、酵素、受容体、DNA等が挙げられる。また、捕獲用結合成分は、分析物質と特異的に反応する物質であり、その成分として抗体、酵素、受容体、又はDNA等が挙げられる。よって、本発明の分析原理とこれを応用したバイオセンサーシステムは、酵素信号発生を利用する免疫センサー、酵素センサー、及びDNAセンサーの製作に適用できる。 40

【0021】

前記の標識物質は、西洋ワサビ過酸化酵素(horseradish peroxidase)、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルスロマイセスラモス過酸化酵素(arthromyces ramosus peroxidase)、グルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ペニシリンオキシダーゼ及びコレステロールオキシダーゼのような酵素；金コロイド粒子；そして Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} のような金属イオン或いはこれらの化合物等であり、前記の基質溶液は発色性成分、光発生成分、電気化学信号発生成分を含んだり、銀化合物等を含み；発色、変色、発光、 50

電気伝導度の変化、電流変化または電圧変化を信号であらわす作用をする。

【0022】

以下にて、標識物質と基質溶液の選択による本発明のメンブレンストリップバイオセンサーシステムの適用を例を挙げて説明する。

【0023】

色検出型光学バイオセンサーは、標識物質として西洋ワサビ過酸化酵素、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、又はアルスロマイセスラモス過酸化酵素を使用することができ、基質溶液は各酵素に特異な発色性基質成分を含み、酵素-基質反応により肉眼で確認できる発色、或いは変色を信号で表わす。また、酵素-基質反応の代案として化学反応を利用することもでき、代表的な例としては、標識物質として金コロイドを使用し、基質溶液は酢酸銀のような銀化合物を含み、金-銀間触媒反応によって前記のような信号を示すことが挙げられる。

10

【0024】

光検出型光学バイオセンサーは、標識物質として西洋ワサビ過酸化酵素、又はアルスロマイセスラモス過酸化酵素を使用することができ、基質溶液は各酵素に特異な発光用基質成分、例えばルミノールを含み、信号発生時に酵素-基質反応により肉眼で確認できる光信号が発生する。また、前記で標識物質である酵素の代替物質として金属イオン、即ち Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、又はこれらの化合物を使用することができる。

【0025】

電気化学バイオセンサーでは、標識物質としてグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ペニシリンオキシダーゼ、又はコレステロールオキシダーゼ等を使用することができ、基質溶液は各酵素に特異な電気化学信号発生用基質成分を含み、信号発生時に酵素-基質反応により電気伝導度の変化、電流変化または電圧変化を信号で表わす。

20

【0026】

次に、本発明のメンブレンストリップバイオセンサーシステムを具体的に免疫分析の例を挙げて説明する。図1に示した例を見ると、流体の順次的クロスフローを利用したメンブレンストリップバイオセンサーシステムは、縦に連結し合った4種類の異なるメンブレンストリップの左右両側にそれぞれ横方向に配列された機能性メンブレンパッドで構成される。縦配列中の最下端には試料添加用ガラス繊維メンブレンパッド(10)が位置し、その上端には検出抗体(22)-酵素(21)コンジュゲートを乾燥状態で含有したセルロースメンブレンパッド(20)が配列されている。このコンジュゲートは、乾燥時に不動状態で存在するが、水溶液と接触すると、すぐに溶解して液状で抗原-抗体反応に関与する。その上側には、捕獲抗体(31)と検出抗体に特異な二次抗体(32)が一定地域にそれぞれ固定化されたニトロセルロースメンブレンパッド(30)が位置し、ここで窮極的に分析物質濃度に比例した信号と分析物質濃度に無関係な補正信号が独立的に各位置から発生する。最も上端には上で列挙したメンブレンパッドの細孔を通して毛細管現象による流体の側方流を持続させるために溶液吸収用セルロースメンブレンパッド(40)が存在する。各メンブレンパッドを部分的に重ねてプラスチックフィルム上に配列した後、両面テープで固定して機能性免疫ストリップを製造する。そして免疫ストリップとは別に、標識物質である酵素に対する基質溶液、又は信号増幅のための水溶液を供給するためのガラス繊維メンブレンパッド(50)がニトロセルロースメンブレンパッド(30)左側に位置し、基質溶液の流れを毛細管現象により持続させるために、基質溶液吸収用セルロースメンブレンパッド(60)が右側に位置している。このような横配列パッドは、初期には免疫ストリップ本体と接触されていないため、免疫反応は単に免疫ストリップによって縦方向にのみ行われ、その後、左右パッドを連結して酵素反応は横方向にのみ行われるように設定する。

30

40

【0027】

メンブレンストリップバイオセンサーシステムの動作原理

前記のように構成されたメンブレンストリップバイオセンサーシステムを利用し、4段階からなる分析物質の測定過程を図2に示した。第一に、分析物質が含有されている試料(例：血清、血漿、全血)に免疫ストリップの下端を浸すと、試料が試料添加パッドを通

50

てシステム内部に吸収され、この水溶液は毛細管現象によりストリップに沿って縦方向に移動する(図2, A)。この水溶液が抗体コンジュゲートが乾燥した状態で蓄積されているガラスメンブレンパッドに到達すると、直ぐにコンジュゲートが溶解し、液状で抗原(即ち、分析物質) - 抗体反応により1次免疫複合体が形成される。この免疫複合体は、上部の信号発生パッドに到達すると固定化された捕獲抗体と再反応して固体表面に捕獲されサンドウィッチ免疫複合体を形成し、未反応物質は溶液の流れによって分離される。第二に、免疫ストリップと横配列パッドを連結する際に、これはパッド固定枠を利用して縦配列パッド、或いは横配列パッドを移動させて行うことができる(図2, B)。第三に、酵素基質溶液を自動、或いは手動で基質溶液供給パッドに添加すると、この溶液は信号発生パッドを通して基質溶液吸収パッドに吸収される横流が発生する(図2, C)。第四に、ニトロセルロースメンブレン上に固定化された捕獲抗体と形成されたサンドウィッチ免疫複合体に含まれた標識物質である酵素に基質が供給されるため、触媒反応により分析物質濃度に比例した信号と同時に補正信号がそれぞれ発生する(図2, D)。この信号は、信号発生源の類型(type)に従って適切な検出器(色検出用、光検出用、電気化学測定用等)を利用すると数値化されて分析物質の濃度を出力できる。

10

20

30

【0028】

本発明で考案した「縦 - 横クロスフローを利用したメンブレンストリップバイオセンサーシステム」の目的は、高感度でポイントオブケア検査が行えるように、免疫クロマトグラフィー分析方法を酵素のような触媒を標識物質として使用する信号発生技術と結び付けることにある。マイクロウェルを固体マトリックスとして使用する一般的な酵素免疫測定法では、抗原 - 抗体反応後、未反応成分を免疫複合体から分離させ、この結合体に含まれた標識物質、即ち酵素に対する基質を添加して触媒反応を行うことにより信号を発生させる。しかし、このような免疫複合体の分離と酵素からの信号発生は、縦方向の流れだけに依存する既存の免疫クロマトグラフィー分析システムでは成し遂げ難かった。万一、免疫複合体が完全に分離する前に酵素基質が既に存在していたり、添加されるのであれば、分析物質の濃度に関係なく非特異信号が発生するためである。そのため、免疫複合体の分離と信号発生の二つの工程は、段階別に完全に順次的に行わなければならない。このような要求条件は、本発明で開発したクロスフロー原理を導入することにより充足されるが、これは免疫ストリップ上で縦流だけで基質供給を到底順次的に区分できなかったことを可能にする画期的な方法である。この場合、別途の洗浄過程や試薬の取扱いが必要ないように自動化が可能であるが、但し試料を添加した後短時間(例：15分)内に分析を完了できるだけでなく、酵素を標識物質として使用するため、高感度分析性能をあらわす。

【0029】

酵素基質溶液の供給のための多様な流路を図3に示した。免疫ストリップ上の信号発生パッドによる横流れ(図3, A)以外に基質溶液供給パッドと吸収パッドを適切に配列することにより、横対角線流れ(図3, B)も誘発させることができる。また、免疫反応を行い、信号発生パッドを除外した免疫ストリップの構成成分を除去した後、基質溶液供給パッドと吸収パッドを縦に配列して基質溶液を多様な縦流を通して供給することもできる(図3, C, D及びE)。多様な方法のうち、多重同時信号発生、及び簡便性を考慮すると横流による酵素基質供給方法が好まれる。

40

【0030】

本発明で開発したポイントオブケア検査用メンブレンストリップバイオセンサーシステムの長所は、他の既の開発されたシステムと比較すると次の通りである。第一に、金コロイドとラテックス粒子等のような発色性標識物質と比較して、酵素は触媒反応により信号を発生し、増幅した効果を提供する。よって、蛍光物質を信号発生源として使用するバイオセンサーのように、分析物質の高感度測定が可能である。第二に、適切な酵素 - 基質反応を利用する場合、酵素から発生した信号を測定する検出器は、蛍光測定機器に比べて相対的に安価だけでなく、所持が可能なくらいに小型化することができる。第三に、分析時に標識物質として使用できる酵素の種類は非常に多様であるため、上で説明したように発色、光、電流、電圧、電気伝導度等、必要に応じて他の信号を発生させることができ

50

る。これは、入手可能な信号検出装置と技術によって酵素をトレーサーとして選択できるという融通性を提供する。

【0031】

色検出型光学バイオセンサー

以上にて説明したようなメンブレンストリップバイオセンサーシステムは、その分析原理の一応用であって、先ず発色信号測定型光学バイオセンサーの製作に利用できる。このようなバイオセンサーは、既存のマイクロウェルを固体マトリックスとして利用する酵素免疫測定法(ELISA)でのように信号発生のための酵素反応をメンブレンストリップ上で独立的に具現することにより高い測定感度を表わすだけでなく、一般的な免疫クロマトグラフィー分析時と同様に速成測定に利用できる。色検出型センサーは、試料内分析物質濃度10に比例してメンブレン上で発生する発色信号の強さを光反射計測法(reflectance photometry)で測定できる。よって比較的敏感な定量手段として既存に使用されていた蛍光測定型システムと比較して低価なだけでなく、信号測定のために小型の信号検出装置を使用することができるため、ポイントオブケア検査のための適用が可能である。

【0032】

色検出型バイオセンサーの分析原理を図4に具体的に示した。上で説明したように、免疫ストリップ下端から分析物質が含有されている試料(例：血液)を縦流によって吸収すると、分析物質は検出抗体-酵素コンジュゲートと反応し、その後、形成された1次免疫複合体は信号パッドに固定されている捕獲抗体により捕獲され、未反応成分は溶液の流れにより分離される(図4, A)。捕獲された検出抗体-酵素コンジュゲート量は分析物質濃度20に比例するため、結局それに比例した信号が発生する。縦流によって分離された過剰のコンジュゲートは、上部の二次抗体によって捕獲される。この位置での信号は、分析物質濃度に関係なく常に一定に維持できるため、調節信号或いは補正信号として利用できる。酵素コンジュゲートからの信号発生のために前記のように横流により酵素基質を供給すると、メンブレン上の捕獲抗体によって捕獲された免疫複合体を除外した残っている全ての成分は除去され、これと同時に捕獲された免疫複合体に含まれた酵素により信号が発生する(図4, B)。メンブレンストリップ上に発生した発色信号の強さは、一定波長の光を照射した後、発色に比例して減少する発射光を光検出器(例：フォトダイオード、電荷結合装置(charge-coupled device)等)で感知して測定する(図4, C)。

【0033】

発色信号の発生のために使用できる酵素は、一般的な酵素免疫測定法時に使用される西洋ワサビ過酸化酵素、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルスロマイセスラモス過酸化酵素等であって、この酵素は触媒反応の結果として発色を表わし、このような目的で利用できる基質が各酵素ごとに様々である。例えば、HRPを使用する場合は、過酸化水素の存在下で発色性基質としてメンブレン上に沈着できるテトラメチルベンジジン(TMB)、ジアミノベンジジン(DAB)、そして4-クロロ-1-ナフトール(4-chloro-1-naphthol, 4C1N)等を使用することができる。それぞれの基質は、最適反応条件が異なるため、バイオセンサーの分析特性、及び要求条件を考慮して適切な基質を選ぶことができる。

【0034】

酵素の標識方法として、上でのように酵素を直接検出抗体と重合して使用方法の他に検出抗体に特異な二次抗体を利用する間接的な方法がある。この場合、免疫ストリップのコンジュゲートパッド上に検出抗体と二次抗体-酵素コンジュゲートを空間的に分離して、それぞれ蓄積させて分析システムを構成できる。分析時、酵素コンジュゲートは信号発生パッドの一定位置に固定化されている捕獲抗体に捕獲された分析物質と検出抗体間の1次免疫複合体を特異に認識して反応する。この方法は、他の分析物質分析時に毎回検出抗体を酵素と重合するという煩わしさを減らすことができるという長所を提供する。また、検出抗体を金コロイドと重合して使用することもできるため、免疫ストリップのコンジュゲートパッドに検出抗体-金コンジュゲートと二次抗体-酵素コンジュゲートを別途の空間に蓄積して使用することができる。この方法をメンブレンストリップバイオセンサーシステムに利用すると、1次縦流により捕獲抗体によって捕獲される分析物質と金コンジ40

ュゲート間の1次免疫複合体の濃度に比例して金コロイドから赤い発色を表わすため、分析の進捗を肉眼で確認できるという長所がある。さらに、金コロイドの表面に一つ以上の検出抗体分子が結合している場合、この分子数に比例して二次抗体 - 酵素コンジュゲートが結合できるため、信号増幅効果を提供することができる。

【0035】

信号発生のための他の方法でストレプトアビジンとビオチン間の結合反応を利用することができ、典型的にストレプトアビジンを検出抗体と重合させ、ビオチンを酵素と重合させて使用する。ストレプトアビジンとビオチン反応は、一般的に抗原 - 抗体反応と比較して親和力が高いため、二次抗体を使用する方法に比べて信号増幅効果を得ることができるという長所がある。分析システム構成時にこのような信号発生方法の変化は、分析時に要求する分析物質の測定下限濃度、測定濃度範囲、分析所要時間、そして経済性等の要求条件に従い選択できる。

10

【0036】

発色信号測定型バイオセンサーの製作時に、信号発生のために酵素反応の代案として金と銀間の触媒反応のような化学反応を利用することもでき、代表的な反応成分として金コロイドと酢酸銀を挙げることができる(参考文献: Patel N等, 1992, Ann. Clin. Biochem. Vol. 29, Page 282-286, Rocks. BF 等, 1991, Ann. Clin. Biochem. Vol. 28, Page 155-159)。既存の免疫クロマトグラフィー方法でのように、検出抗体 - 金コロイドコンジュゲートを信号発生源として使用して免疫ストリップを製作し、先ず1次縦流によって分析物質濃度に比例して金コロイドから発色信号を発生させる。クロスフロー方法を利用して酢酸銀溶液を2次横流として供給すると、捕獲抗体位置に蓄積された金コロイド表面に銀が触媒反応して沈着するため、発色信号を著しく増幅させる。このような効果は、酵素を信号発生源として利用した分析システムと同一なものとして生物素材である酵素を使用せず、単にクロスフロー方法を利用して金発色信号を増幅させることができる酢酸銀のような化学物質を順次的に供給することにより、比較的簡単に高感度分析システムを構成できる。このような方法の導入により、既存の金発色が肉眼で確認できず測定できなかった低濃度の分析物質に対しても分析が可能だという長所を提供する。増幅した発色信号は、酵素を利用した場合と同様に反射光検出方法により測定できる。

20

【0037】

光検出型光学バイオセンサー

30

本発明で開発したメンブレンストリップバイオセンサーシステムの他の応用であって、光検出型光学バイオセンサーの製作に利用できる。このようなバイオセンサーは、上で提示した色検出型バイオセンサーと比較して、それ自体で光信号を発生する標識物質を利用するため光源を必要としないことから、検出器がさらに簡単になりコストが安くなる。測定原理と分析システムの多様性は、前記で説明した色検出型バイオセンサーと同一だが、但し分析物質の濃度に比例した光信号を発生するように適切な標識物質の選定が必要になる。図5に具体的に示したように、標識物質として酵素の一種であるアルスロマイセスラモス過酸化酵素を使用することができるが、この酵素はルミノール(luminol)と反応して最大吸光度427nmで測定できる光を発生する(参考文献: Kim, Pisarev, and Egorov, 1991, Anal. Biochem. Vol. 199, Page 1-6)。このような光信号の強さは、発色時に一般的に使用するHRPからの光信号と比較して約500倍程度さらに敏感である。酵素の代替物質として金属イオン(Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} 等)を使用できるが、これらは酵素より著しく敏感な光信号を発生するだけでなく、コストが安い(参考文献: D. Junsaeck, U. Spohn, 1999, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 14, Page 123-129)。

40

【0038】

酵素や金属イオンを標識物質として利用する光信号発生方法を本発明の核心であるクロスフローシステムに適用できるが、抗原 - 抗体反応のために縦流を進行させた後、基質溶液を供給するために横流を進行させる(図5, A)。このときメンブレンに固定化されている抗体により、捕獲された免疫複合体を除いた未捕獲成分は洗浄され、それと同時に捕獲された免疫複合体に存在する標識物質から光信号が発生する。酵素ARPを標識物質として使

50

用する場合、基質溶液はルミノールと過酸化水素を含有し、そして最適酸性度で調節して使用する。フォトダイオードのような検出器を信号発生パッドに近接させて発生した信号を測定するが(図5, B)、雑音を最少化するために背景光から遮断された状態で測定しなければならない。光検出器によって測定され、電気信号に転換された後、分析物質濃度に対する信号変化を示す検量線によって試料内分析物質の濃度が決定される。

【0039】

光検出型バイオセンサーの製作時に標識物質の抗体分子上の標識方法と分析システム構成方法は、色検出型バイオセンサーの製作のために前記で詳しく説明した方法と同様である。

【0040】

電気化学バイオセンサー

本発明で開発したメンブレンストリップバイオセンサーシステムは、他の応用によって電気化学バイオセンサーの製作に利用できる。このようなバイオセンサーは、基質を分解してイオン濃度、電荷密度、電気化学ポテンシャル等の変化を誘発する酵素を標識物質として利用し、その電気化学的状态変化を信号として測定する(参考文献:M. M. Castillo-Ortega等, 2002, Sensors and Actuators B, Vol 85, Page 19-25; Andrea Pizzariello等, 2001, Talanta, Vol 54, Page 763-772)。このような信号測定のための電気化学検出器は、上で提示した二種類の光学検出器と比較して簡単且つ小型化が可能だけでなく、コストが安いという長所があるが、追加要求事項で電気化学的測定のための電極が免疫ストリップ上に直接成形されたり、或いは別に電極を製作した後信号測定時に免疫ストリップと結合されなければならない(参考文献:J. H. Kim, S. H. Paek, 2000, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 14, Page 907-915)。分析システムの測定原理は、上で説明した光学バイオセンサーと同一であり、但し分析物質の濃度に比例した電気化学信号を発生するように適切な標識物質の選定が必要である。

【0041】

標識物質として使用できる酵素の種類は、電気化学測定方法に従って多様である。例えば、電気伝導度変化を誘導するために酵素の一種であるウレアーゼを使用できるが、この酵素は基質として尿素を分解してアンモニウムイオンとカルボニウムイオンを生成させてイオン濃度を増加させるため、分析物質濃度に比例した電気伝導度の変化が信号として表わされる(図6参照)。他の例として、電流変化を信号で発生するために基質を酸化或いは還元させる酵素、即ちグルコースオキシダーゼ、そしてコレステロールオキシダーゼ等を標識物質として利用し、酵素反応により生成又は消滅する電子密度の増減を電極を通して電流変化として測定する。また他の例として、電気化学ポテンシャルの変化を信号で発生することができるが、このような方法の典型的な応用は、水素イオン濃度(即ち、酸性度)を変化させる酵素(グルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ペニシリンオキシダーゼ等)を標識物質として使用し、その酵素反応の結果をpH電極を通して測定できる(参考文献:Andrea Pizzariello等, 2001, Talanta, Vol 54, Page 763-772)。一方、標識物質としてウレアーゼを利用する場合、この酵素反応から尿素が分解されて生成されるアンモニウムイオン、或いはカルボニウムイオンに対する選択性膜を電極表面に設置して化学ポテンシャルの変化を電気信号として測定することもできる。

【0042】

電気化学バイオセンサーの分析原理は、前記で説明した光学バイオセンサーの場合と同一なもので、図6に例を挙げて表わしたように、免疫ストリップの下端に分析物質が含有されている試料を添加すると、分析物質はコンジュゲートパッドから放出された抗体-酵素コンジュゲートと1次免疫複合体を形成し、これは信号発生パッド上に固定化された捕獲抗体とサンドウィッチ免疫複合体を形成する。このように抗原-抗体反応のための縦流が停止し、横流を開始すると捕獲された免疫複合体を除外した全ての成分は除去され、それと同時に捕獲された免疫複合体に存在する酵素と基質間の反応により電気化学信号が発生する(図6, A)。このような電気化学信号を測定するために既にメンブレン上に存在したり別に製作された適切な電極を利用し(図6, B)、信号対雑音が最大になるようにする(図6

10

20

30

40

50

、C)。また、電気化学分析時に電極の材質と形態、そして大きさ等の測定条件等がバイオセンサーの測定性能を調節するため、センサーの物理化学的変数を信号対雑音の比率に対して最適化しなければならない。

【0043】

以上で説明したように、本発明で創案されたクロスフローを利用したメンブレンストリップバイオセンサーシステムを利用すると、標識物質である酵素の適切な選択によって多様なバイオセンサーが製作できる。過去には、メンブレンストリップを利用した分析システムでは標識物質である酵素から信号を発生するために酵素反応に必要な成分を供給するための方法がなかったため、効果的なバイオセンサーの製作が難しかった。このような問題点は、本発明で開発したクロスフロー方法を利用して解決できる。即ち、クロスフロー方法を利用することにより、酵素基質溶液の供給を自動で簡単に行うことができるようになるだけでなく、同様な原理を応用して酵素の選択に従って多様なバイオセンサーの製作が可能になった。よって、敏感度は高いが、時間が長くかかり、遂行過程が複雑で一般人が使用できなかった既存の酵素免疫測定法(即ち、ELISA)をメンブレンストリップ上で簡便に行うことができるようになった。また、標識物質として蛍光を利用することにより、高価な検出器を要求していた過去のメンブレンストリップバイオセンサーシステムの代案として、本発明によって多様な酵素を信号発生源として使用できるようになることにより、コストが安く小型化が可能な検出器を使用できるようになった。

10

【0044】

発明を実施するための最良の形態

20

次の実施例は、本発明の内容をより具体的に説明し、その有用性を提示するために具体的な例を挙げて記述したものであって、決して本発明を限定するものではない。

【0045】

実施例に使用された材料

実施例のために使用された材料及び購入先は次の通りである。B型肝炎表面抗原(HBsAg)、それに対するポリクロナール抗体(ウサギから生産)とモノクロナール抗体(マウスから生産)、そしてヒト血清アルブミンに対するポリクロナール抗体(ヤギから生産)は、エンザイムインターナショナル(Enzyme international, 米国)社から購入した。心臓トロポニンIと、それに対する抗体であるポリクロナール抗体(ヤギから生産)とモノクロナール抗体(マウスから生産)は、スペクトラル(Spectral, 米国)社から購入した。金コロイド(直径40nm, 0.01%)とセファデックスゲル(sephadex gels)、カゼイン(ナトリウム塩タイプ、牛乳から抽出)、そして牛血清アルブミン(BSA、ヒートショック工程による精製、分画V)とTween20、そしてトリトンX-100とヒト血清アルブミン(HSA)はシグマ(Sigma, 米国)社から供給された。ニトロセルロースメンブレン(細孔の大きさ12 μ m)とガラス繊維メンブレン、そしてセルロースメンブレン(3MM chromatography grade)はミリポア(Millipore, 米国)社とワットマン(Whatman, 米国)社からそれぞれ購入した。ストレプトアビジン(SA)、N-スクシンイミジル-3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート(N-succinimidyl-3-[2-pyridyldithio] propionate, SPDP)、スクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl] cyclohexane-1-carboxylate, SMCC)、ジチオスレイトール(DTT)、そしてN-ヒドロキシスクシンイミジル(NHS)-LC-LC-ビオチン(N-Hydroxysuccinimidyl(NHS)-LC-LC-biotin)は、ピアース(Pierce, 米国)社から購入した。酵素である西洋ワサビ過酸化水素とアルスロマイセスラモス過酸化酵素、そしてウレアーゼはカルバイオケム(calbiochem, 米国)社から購入し、各酵素の基質であるテトラメチルベンジジン(TMB)とルミノール、そして尿素はそれぞれモス(moss, 米国)社とシグマ(sigma, 米国)社から購入した。その他の全ての試薬は、分析用グレードで使用した。

30

40

【0046】

実施例1. 抗体-コロイド金コンジュゲート合成

コンジュゲート合成のために標準の方法に従い多様な反応溶液の酸性度と抗体濃度を試験し、決定した最適条件下でコンジュゲートを製造した(参考文献:S. H. Paek等, 1999,

50

Anal. Lett., Vol. 32, 335-360)。

【0047】

酸性度9.0に調節された金溶液8mLに透析により準備された100 μ g/mLのB型肝炎特定抗体溶液0.8mLを加えた後30分間反応させた。その後、この溶液に10mMリン酸塩緩衝溶液(pH7.4)に溶解させて製造された5%カゼイン溶液(Casein-PB)1mLを追加した後、30分間反応させた。反応液は15,000rpmで45分間遠心分離させた後、上澄を除去した。分離された金沈殿物にカゼイン(Casein-PB)を加えてコンジュゲートの最終体積を0.2mLに調節し、使用時まで4 で保管した。

【0048】

実施例2. 抗体 - 酵素コンジュゲート合成

分析物質特異抗体と酵素間の重合は、クロス - リンカーを使用する化学反応により行われた。抗体を20倍モル過剰濃度のSMCCと4 で4時間反応させた後、過量のSMCCはセファデックスG-15ゲルクロマトグラフィーにより除去され、これを下記のように活性化された酵素と直ぐに重合反応させた。酵素の活性化のために、その蛋白質は5mMのEDTAが含有された反応溶液に溶解され、モル濃度が更に20倍高いSPDPと常温で1時間反応させた。その分子上にスルフヒドリル基を生成させるためにDTT(最終10mM)を反応混合液に添加して37で2時間さらに反応させた。過剰の試薬はセファデックスG-15カラムを利用して除去された。二種類の活性化された反応物質、即ち抗体と酵素はそのモル比が1:10になるように混合され、4 で一晩中反応させた。合成された抗体 - 酵素コンジュゲートの精製は、セファデックスG-100ゲル(1 $\times$ 20cm)で構成されたカラムを利用して行った。反応混合物1mLをカラム内に注入した後、PBSで抽出した。各流出液内の蛋白質はブラッドフォード(Bradford)分析方法によって測定され、コンジュゲート合成及び精製は非還元条件下でSDS-PAGE(7%gel)分析によって確認された。

【0049】

実施例3. 信号発生パッド(抗体固定化)

信号発生パッドの材質は、免疫クロマトグラフィーで広く使用されているニトロセルロース(NC)メンブレンを使用し、製造会社と細孔の大きさにより固定化効率が異なるため、試験を通じて最適な材質を選択使用した。選択されたニトロセルロースメンブレン(細孔の大きさ:12 μ m, Milipore)を使用して抗体を固定化した。固定化方法は物理吸着方法と化学的方法があるが、実験の結果、製作の便利性と再現性を考慮して決められた。抗体固定化は、NCメンブレンストリップ(7 $\times$ 25mm)の予め定められた地点に物理吸着方法によって固定化された。メンブレン上の一定地域(下端から10nm地点)に140mM NaCl(PBS)が含有されたPBで希釈した1mg/ml抗体(1.5 μ L)をマイクロ - ディスペンサー(micro-dispenser)を利用して点形態で加えた後、常温で1時間反応させた。抗体が固定化されたストリップは、0.5%カゼイン - トリス100mM(pH7.6, casein-tris)溶液内に浸けて1時間残余表面処理した後、0.1%トリトンX-100(Triton X-100)を含むトリス緩衝溶液(pH7.6)で3回洗浄し、外気で乾燥した。

【0050】

実施例4. 信号発生パッド(ストレプトアビジン固定化)

抗体の代りにストレプトアビジン(SA)を固定するために、信号発生パッドの材質は、実施例3で説明したようにニトロセルロース(NC)メンブレンを使用した。固定化方法は、ストレプトアビジン(SA)が物理吸着方法に依っては固定化されない特性上、化学的方法を使用した。NCメンブレン(7 $\times$ 25mm)を0.5%グルタルアルデヒド(glutaraldehyde, GA)溶液に浸けて1時間反応させた後、PBSを利用して3回洗浄した。そしてSA(10mg/ml)を下端から1cmの所にマイクロディスペンサーを利用して1 μ L/stripを加えた後、100%の湿度が維持されている箱内に入れて常温で1時間反応させた。次の段階は、実施例3での抗体固定化方法と同様である。

【0051】

実施例5. 色検出用システムの構成

5-1. 免疫ストリップの構成

10

20

30

40

50

分析物質(HBsAg：B型肝炎表面抗原)濃度による信号を肉眼判別したり発色を測定する光学測定用免疫クロマトグラフィー分析システムは、信号発生源として検出抗体 - 金コロイドコンジュゲート(実施例6-1で使用)、又は2次抗体 - HRPコンジュゲートと調合した検出抗体 - 金コロイドコンジュゲート(実施例6-2で使用)を使用して構成された。製造された免疫ストリップシステム(図1参照)は、下端から0.1%(v/v)トリトンX100で処理されたガラス繊維メンブレン(7x20mm)とコンジュゲートが蓄積されているガラス繊維メンブレン(7x5mm)、そして抗体が固定化されたNCメンブレン(7x25mm)と吸収パッドとして利用されるセルロースメンブレン(7x15mm)で構成されている。各メンブレンストリップは、部分的に重なって構成されており、両面テープによってプラスチック固定枠に接着されている。

【0052】

10

5-2. 横配列パッドの構成

横配列パッドの抗体 - HRPコンジュゲートを使用する場合に、HRPから発色信号を発生させるために、横配列パッドは過酸化水素及びTMB溶液を含む酵素基質を供給するためのガラス繊維メンブレン(10x20mm)とクロスフローを誘導するための吸収パッドであるセルロースメンブレン(15x20mm)で構成されている。各メンブレンは、上で説明した免疫ストリップとは別に存在し、分析システムは、横配列パッドが後にNCメンブレンの両側面にそれぞれ接触して酵素反応を誘導するように考案されている(図2参照)。

【0053】

実施例6. 色検出用光学バイオセンサーの用量反応

6-1. 標識物質として金コロイドの使用

20

実施例5で製造された分析システムのHBsAg標準溶液を利用した金発色による用量反応は、スキャン反射率光度測定方法(scanning reflectance photometry)によって求めた。HBsAg標準溶液は、各濃度別に150 μ lずつ異なるマイクロウェルに分注し、各マイクロウェル内に免疫ストリップを垂直に浸け、水溶液を約15分に亘りストリップの内部に吸収させた。抗体が固定化された領域で発色した信号を定量的に決定するためにスキャナ(HP ScanJet 6100C, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, 米国)を利用した。捕捉されたイメージ上の発色部分(図8, A参照)は、イメージ分析プログラム(Multianalyst version 1.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 米国)を利用して発色部分が全て含まれるように選択した後、発色の強さに比例する積分値である光学密度に転換された(図8, C, 金発色信号参照)。

30

【0054】

結果から、光学密度は肉眼で認知された色調に比例し、分析物質濃度に対しても比例するものと観察された。金発色を利用する場合、測定敏感度は約100ng/mLだった。

【0055】

6-2. 標識物質としてHRPの使用

実施例5-1で記述されたように、製造された分析システムからHBsAgに対する濃度応用としてのHRP発色信号は、金色検出方法と同様な方法で測定された。該分析手順は、2次抗体 - HRPコンジュゲートを追加的に使用したことを除いては、金発色信号を発生させるためのものと基本的に同様である。HRP信号発生のために、信号パッド左側と右側にそれぞれ基質供給パッドと吸収パッドを横配列に位置させた後、HRPに対する基質溶液を供給して横方向に3分に亘り流れを進行させた。NCメンブレン上の捕獲抗体により捕獲された免疫複合体を除外した残りの全ての成分は除去され、これと同時に捕獲された免疫複合体に含まれているHRPによって青色の信号が発生する(図8, B参照)。

40

【0056】

発色信号は、金発色信号と同様の手順で光学密度で定量された(図8, C, HRP発色信号参照)。

【0057】

結果から、信号としての光学密度は肉眼で認知された色調に比例し、分析物質濃度に対しても比例するものと観察された。標識物質として酵素を利用した場合の測定敏感度は約1ng/mlであり、これは金発色信号より約100倍程度良い結果だった(図8, C参照)。

50

【 0 0 5 8 】

実施例7. 光検出用システムの構成

7-1. 免疫ストリップの構成

例示として使用される分析物質としては、心筋梗塞を早期診断するために使用されている心臓トロポニンI (cTn I)を使用した。免疫クロマトグラフィー分析システムは、捕獲抗体 - ビオチンコンジュゲート、検出抗体 - 金コロイドコンジュゲートまたは検出抗体 - ARPコンジュゲート、そして実施例4でストレプトアビジン(SA)が固定化されたメンブレンストリップを使用して構成されている。製造された免疫ストリップシステム(図1参照)は、下端から0.1%(v/v)トリトンX100で処理されたガラス繊維メンブレン(7x20mm)とコンジュゲートが蓄積されているガラス繊維メンブレン(7x5mm)、そしてSAが固定化されたNCメンブレン(7x25mm)と吸収パッドとして利用されるセルロースメンブレン(7x15mm)で構成された。各メンブレンストリップは、部分的に重なって構成されており、両面テープによってプラスチックパッド固定枠に接着されている。

10

【 0 0 5 9 】

7-2. 横配列パッドの構成

ストリップ上に含まれているARPによる光信号を発生するために、横配列パッドはルミノール及び過酸化水素を含む酵素基質溶液を供給するためのガラス繊維メンブレン(10x20mm)と吸収パッドであるセルロースメンブレン(15x20mm)を利用して構成されている。横配列パッドの役割は、実施例5-2で既に言及しており、図2にも示している。

20

【 0 0 6 0 】

実施例8. 光検出用バイオセンサーの用量反応

8-1. 標識物質として金コロイドの使用

実施例7-1で製造された分析システムのcTnI標準溶液に対する用量反応としての金発色信号は、スキャン反射率光学測定方法によって求めた。cTnI標準溶液は、各濃度別に150 μ lずつ異なるマイクロウェルに分注され、各マイクロウェル内に免疫ストリップを垂直に浸けて位置させた。次の分析手順は、実施例6-1でのHBsAgに対する手順と同様で、生成された発色信号は既に説明された通り光学密度に転換された(図9の金発色信号参照)。

【 0 0 6 1 】

結果から、光学密度は肉眼で認知された色調に比例し、分析物質濃度についても比例するものと観察された。金発色を利用する場合、測定感度は約1ng/mLだった。

30

【 0 0 6 2 】

8-2. 標識物質としてARPの使用

実施例8-1で記述した通り、金色検出用免疫ストリップと同様に製造された分析システムのcTnI標準溶液を利用したARP光信号による用量反応は、抗体 - 金コロイドコンジュゲート測定の代りに抗体 - ARPコンジュゲート測定を使用したという点と、本発明の重要要素であるクロスフローを使用して酵素から信号を発生させたという点で金色検出と区別される。縦流方法での免疫反応手順は、標識物質として金コロイドを使用した実施例8-1の方法を同様に行った。縦流完了後、信号パッド左側と右側にそれぞれ基質供給パッドと吸収パッドを横配列で位置させた後、ARP(0.2 M carbonate buffer, pH 9.0)に対するルミノール及び過酸化水素を含有する基質溶液を供給して横方向に3分に亘り流れを進行させた。メンブレン上に捕獲された免疫複合体を除いた残っている全ての成分は除去され、これと同時に捕獲された免疫複合体に含まれたARPにより青色の光信号が発生される。光信号を定量的に決定するために光ダイオード(Hamamatsu, 日本)とコンピュータに内蔵されたアナログ - デジタル変換装置(ADCM board, 韓国)を利用した。

40

【 0 0 6 3 】

結果から、光信号による電圧は分析物質濃度に対しても比例するものと測定された(図9、ARP光信号参照)。測定感度は約0.1ng/mLであり、これは金コロイドを標識物質として使用した発色信号より約10倍程度良い結果だった。

【 0 0 6 4 】

実施例9. 電気化学測定用システムの構成

50

分析物質濃度による電気化学信号を測定するための免疫クロマトグラフィー分析システムの構成も、実施例5および7と基本的には同一に構成された。電気化学測定用システムの他の点は、図6で示した通り電極が追加的に要求されるもので、電気化学測定方法を説明するために電気伝導度測定用システムを下記に説明した。

【0065】

9-1. 免疫ストリップの構成

分析物質は、糖尿病の合併症として知られている腎臓病を早期診断するために使用されているヒト血清アルブミン(HSA)を使用した。免疫クロマトグラフィー分析システムは、検出抗体 - ウレアーゼコンジュゲート、そして捕獲抗体が固定化されたNCメンブレンストリップを使用して構成された。免疫ストリップシステム(図1)は、実施例5-1で記述したものと同様な方式で構成された。

10

【0066】

9-2. 横配列パッドの構成

横配列パッドは、ストリップ上に含まれているウレアーゼによる電気伝導度信号を発生するために尿素を含む酵素基質溶液を供給するためのガラス繊維メンブレン(10x20mm)と吸収パッドであるセルロースメンブレン(15x20mm)で構成された。

【0067】

実施例10. 電気化学測定用バイオセンサーの用量反応

実施例9で製造された分析システムのHAS標準溶液に対する用量反応は、電気化学検出装置によって得られた(例：伝導度メーター)。実施例6-2で記述したような分析方法が用いられた。横方向に3分に亘って流れを進行させた後、メンブレン上の捕獲抗体により捕獲された免疫複合体を除外して残った全ての成分は除去され、これと同時に捕獲された免疫複合体に含まれたウレアーゼが尿素を分解してアンモニウムイオンとカルボニウムイオンを生成させたことにより、分析物質濃度に比例した電気伝導度の変化が信号としてあらわれた(図10参照)。このようにして捕獲抗体が固定化された領域で発生される電気伝導度信号を定量的に決定するためにデジタルマルチメーター(日本HITASI社製造)を利用した。

20

【0068】

結果から、電流による電気伝導度は分析物質濃度に対して比例するものと測定され、測定敏感度は約1ng/mLであることが確認された。

【0069】

30

実施例11. 酵素標識方法(Enzyme labeling method)

酵素を利用する免疫分析法(ELISA)には、分析物質に特異に反応する検出抗体に直接酵素を結合して信号を測定する直接測定方式と、信号増幅のために検出抗体はそのまま使用し、その検出抗体を特別に認知する2次抗体に酵素を結合して使用する間接測定方式の二つの測定方式がある。

【0070】

メンブレンストリップ分析システムに酵素を利用した信号増幅技術を導入するために使用されたクロスフローシステムによって、ELISAと同様に二つの方式を共に使用して比較した。直接測定方式はHBsAg(分析物質)に特異な検出抗体に直接酵素であるHRPを結合して使用するものであり、間接測定方式は分析物質に特異な検出抗体を認知する2次抗体にHRPを結合して使用するものである。マウスから生産されたHBsAgを認知するモノクローナル抗体(Mouse Anti-HBsAg Ab)に直接HRPを結合して使用した場合が直接測定方式であり、マウスから生産されたモノクローナル抗体を認知するヤギから生産されたポリクローナル抗体(Goat Anti-mouse IgG Ab)にHRPを結合して使用した場合が間接測定方法であると言える。基本的に直接測定方式を使用する場合は、分析物質が変われば各検出抗体に酵素を結合しなければならないという短所がある。これに反して間接測定方式を使用する場合は、分析物質が変わるとしても酵素コンジュゲートは変える必要がないため、簡便で抗体を追加的に使用することにより信号増幅になるという長所を有している。本例示では、このような二つの測定方式を利用してそれらの分析性能を比較した。

40

【0071】

50

二つの測定方式に対する比較のために、間接測定方式は上で説明された実施例6-2と同様に行い、直接測定方式でコンジュゲート製造は実施例6-1に提示された方法を利用し、但しHBsAgに特異な検出抗体に金の代りにHRPを直接結合して使用したことが相違する。メンブレンストリップ分析システムのHBsAg標準溶液に対する用量反応は、上で説明したように発生された発色信号のスキナ光学測定方法によって求めた(図11, A及びB参照)。

【0072】

直接測定方式と間接測定方式における信号発色の違いはELISA(図11, C参照)と同様に、間接測定方式が約10倍程度良いものとあらわれたが、分析の目的及び要求条件に従って測定方式は変化し得る。

10

【0073】

産業的利用の可能性

本発明は、低いコストで高感度定量が可能な長所を提供する実験室用酵素免疫測定法原理をポイントオブケア検査に適用することにより、ポイントオブケア検査で要求する迅速且つ簡便な分析が可能なだけでなく、試料内の分析物質に対する高感度定量の臨床的要求も満たすことができるメンブレンストリップバイオセンサー技術を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】本発明で考案したメンブレンストリップバイオセンサーシステムの構成成分とその配列を示す模式図。

20

【図2】本発明の主眼点であるメンブレンストリップバイオセンサーシステムのクロスフロークロマトグラフィー分析工程とこれを利用した分析物質の測定原理を示す模式図。Aは、試料の吸収及び溶液の縦流によって誘導された抗原-抗体反応を示し、Bは免疫ストリップと横配列パッドの連結工程を示し、Cは酵素基質溶液の供給工程を示し、Dは信号発生工程を示す。

【図3】クロスフロークロマトグラフィー方法を利用した分析時に可能な酵素基質溶液の多様な供給方法を示す模式図。

【図4】クロスフローを利用した酵素免疫測定法システムに基づく本発明の色検出型光学バイオセンサーの作動原理を示す模式図。Aは、試料添加溶液の縦流による免疫複合体形成を示し、Bは基質溶液の横流による信号発生のための酵素反応を示し、Cは光反射に基づく発色信号の測定を示す。

30

【図5】信号発生を除いては、図4の記述と同様な概念に基づく本発明の光検出型光学バイオセンサーの測定原理を示す。Aは、横流による信号発生のための酵素反応を示し、Bは光信号測定を示す。

【図6】信号発生を除いては、図4の記述と同様な原理を利用する本発明の電気化学バイオセンサーの分析概念を示す。Aは、信号発生のための酵素反応を示し、Bは電極結合工程を示し、Cは電気化学信号(例：電気伝導度の変化)測定を示す。

【図7】クロスフローを利用した酵素免疫測定法を、自動又は手動でできるように考案されたメンブレンストリップクロマトグラフィー分析システムのホルダーを示す模式図。AとBはホルダーの全体的な構成を示し、CとDはホルダーの上の部分と下の部分が結合された状態でのホルダーの断面を示すものであり、Cは分析時に免疫反応のための縦流が進行している間の横及び縦配列パッドの相対的な位置を示し、Dは分析時に酵素反応のための横流が進行している間の横及び縦配列パッドの相対的な位置を示す。

40

【図8】本発明に係る色検出型光学バイオセンサーに関する実施例6において、分析物質(B型肝炎ウィルス抗原)の濃度変化に対するバイオセンサーの応答を図示したものであり、Aは金コロイドを標識物質として使用した実験結果を示しており、Bは酵素であるHRPを標識物質として使用した実験結果を示し、Cは各々の光学密度によって発色信号を表示した用量反応曲線を示したものである。

【図9】実施例7で製造した光検出型メンブレンストリップを利用して、分析物質である心臓トロポニンIの標準溶液に対する金発色信号とARPによる光信号を濃度に対して比較図

50

示したグラフ。

【図 1 0】電気化学バイオセンサーへの応用を例示するために、実施例9で製造した電気化学測定用メンブレンストリップを利用してヒト血清アルブミンの標準溶液に対する電気伝導度信号を図示したグラフ。

【図 1 1】直接酵素標識測定方式と間接測定方式による信号の変化をHBsAg濃度別に比較したものであり、A及びBは各々直接及び間接測定方式でクロスフローを利用するメンブレンストリップバイオセンサーシステムで発色信号を測定した結果であり、Cは酵素免疫測定法(ELISA)を行い吸光度450nmで発色信号を測定した結果。

【符号の説明】

【 0 0 7 5 】

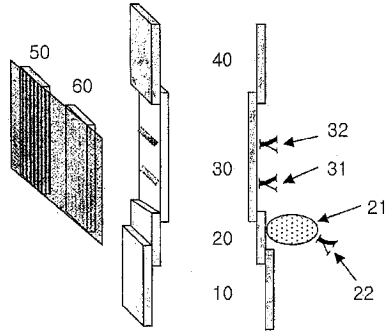
10

- 1 : 分析物質
- 10 : 試料添加用メンブレンパッド
- 20 : 標識された検出用結合成分放出用メンブレンパッド
- 21 : 標識物質
- 22 : 検出抗体
- 30 : 信号発生用メンブレンパッド
- 31 : 捕獲抗体
- 32 : 検出抗体に特異な二次抗体
- 33 : 光源
- 34 : 光検出器
- 35 : 電気化学信号測定用電極
- 40 : 縦流溶液吸収用メンブレンパッド
- 50 : 基質溶液供給用メンブレンパッド
- 60 : 横流溶液吸収用メンブレンパッド
- 71 : ホルダーの上の部分
- 72 : ホルダーの下部分
- 73 : 流れ移動ボタン
- 74 : 横配列パッド固定板
- 75 : 基質溶液容器貫通針
- 76 : 基質溶液容器
- 77 : 試料投入口
- 78 : 信号検出窓

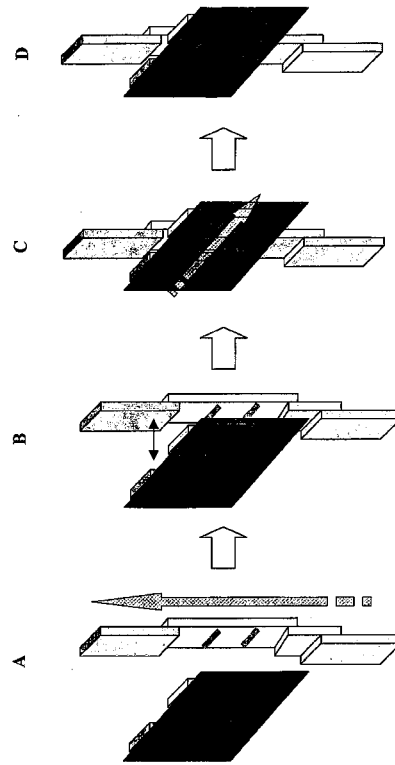
20

30

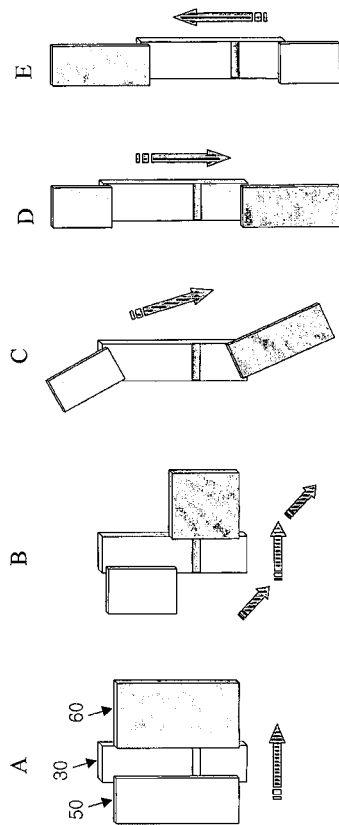
【図 1】



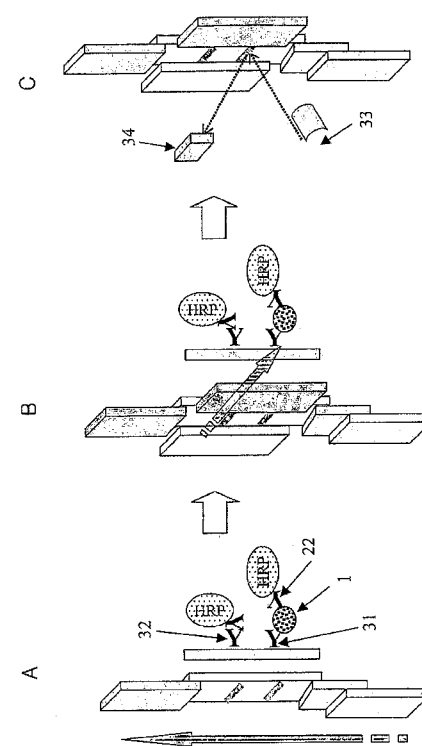
【図 2】



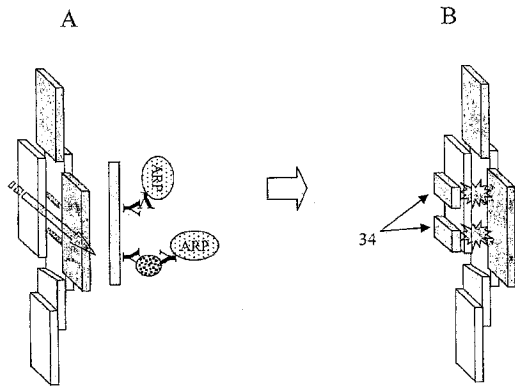
【図 3】



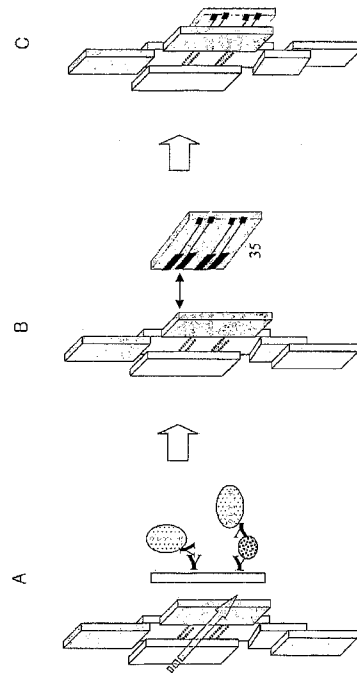
【図 4】



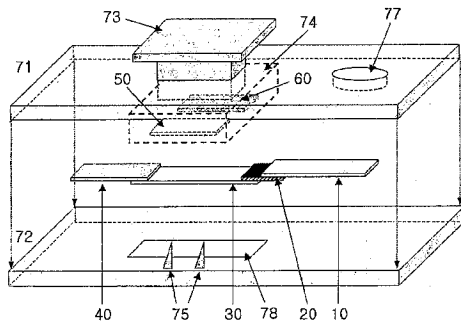
【図 5】



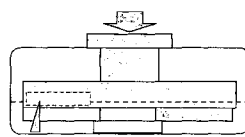
【図 6】



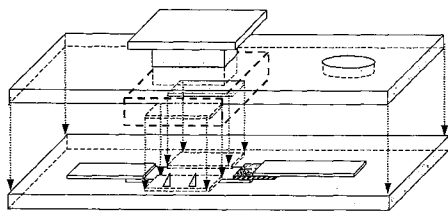
【図 7 A】



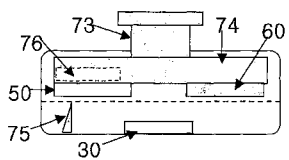
【図 7 D】



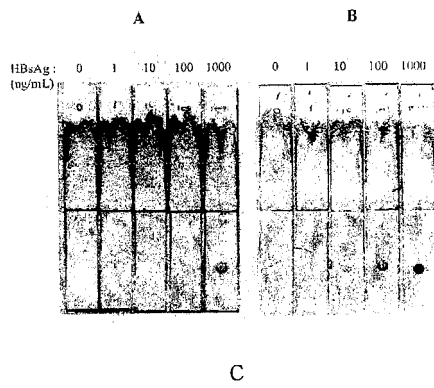
【図 7 B】



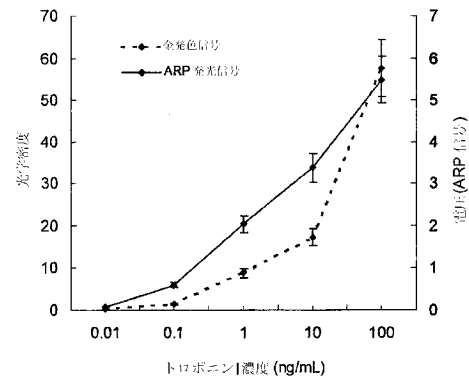
【図 7 C】



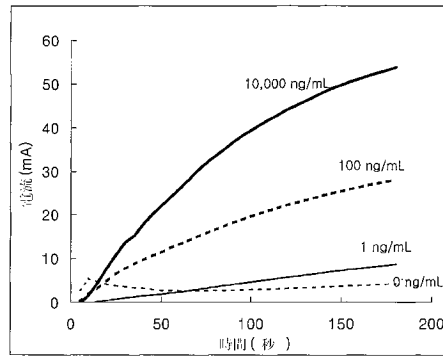
【図 8】



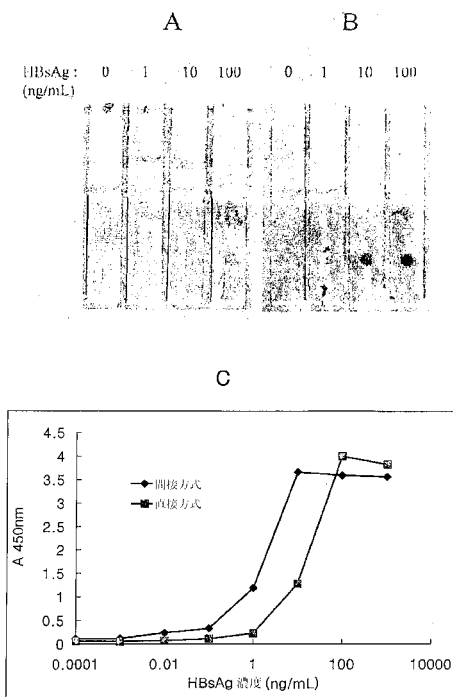
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2004/000914
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7 G01N 33/543, G01N 33/53, C12N 9/02		
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 33/543, G01N 33/558, G01N 33/573, G01N 27/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patent and Applications for Inventions since 1975 Korean Utility Models and Applications for Utility Models since 1975 Japanese Utility Models and Application for Utility Models since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS, NCBI, WPI, USPTO, PAJ, CAPLUS(STN), INSPECT "immunochromatography, membrane, strip, absorb*, absorption, pad, ELISA, (enzyme-linked immunosorbent assay), lateral, flow, substrate, electrochemical, etc."		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US RE37437 E (Dade Behring Marburg, GmbH, DE) 06 Nov 2001 - see the entire document	1-16
A	US 6352862 B1 (Unilever Patent Holdings B.V., NL) 05 Mar 2002 - see the entire document	1-16
A	US 6187598 B1 (Conopco Inc., US) 13 Feb 2001 - see the entire document	1-16
A	US 5723345 A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., JP) 03 Mar 1998 - see the entire document	1-16
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 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 29 JULY 2004 (29.07.2004)		Date of mailing of the international search report 29 JULY 2004 (29.07.2004)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer SHIN, Weon Hye Telephone No. 82-42-481-8155 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2004/000914

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US RE37437 E	06 Nov 2001	HR 940755 A1 EP 186799 A1 DE 3576083 C0 ES 8607556 A1 YU 193685 A JP 7055808 A2	31 Aug 1997 09 Jul 1986 29 Mar 1990 01 Nov 1986 30 Apr 1988 03 Mar 1995
US 6352862 B1	05 Mar 2002	GB 8903627 A0 IT 9052873 U0 DE 9001870 U1 ES 2100869 T3 EP 383619 A1 JP 2703823 B2	05 Apr 1989 16 Feb 1990 13 Jun 1990 01 Jul 1997 22 Aug 1990 26 Jan 1998
US 6187598 B1	13 Feb 2001	none	
US 5723345 A	03 Mar 1998	JP 8075748 A2 EP 690306 A1 CA 2152756 AA	22 Mar 1996 03 Jan 1996 29 Dec 1995

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 27/30 3 5 7

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

(72)発明者 チョー ジョン ホワン

大韓民国 インチェオン市 イェオンスー - ク チェオンハーク - ドン 3 - 1 0 6 3 / 2

(72)発明者 キム ソクハ

大韓民国 ソウル市 ノウエン - グ サンギー - ドン 5 6 - 3 ホンギク ピラ ガ - ドン 1 0 2

专利名称(译)	用于护理点测试的膜带生物传感器系统		
公开(公告)号	JP2006524815A	公开(公告)日	2006-11-02
申请号	JP2006507812	申请日	2004-04-21
[标]申请(专利权)人(译)	BIODIGIT LAB		
申请(专利权)人(译)	生物实验室数字公司		
[标]发明人	パクセーホワン チョージョンホワン キムソクハ		
发明人	パク セー ホワン チョー ジョン ホワン キム ソクハ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N27/416 G01N27/327 G01N33/538 C12N9/02 C12Q1/00 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/558 C12Q1/001 Y10S436/808 Y10S436/81 Y10S436/823		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N27/46.353.A G01N27/46.336.G G01N27/46.338 G01N27/30.353.Z G01N27/30.357		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	1020030026227 2003-04-25 KR		
其他公开文献	JP4546462B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种护理检查 (POCT) 生物传感器, 其通过将免疫反应和酶反应的顺序交叉流动过程引入膜条带色谱分析系统而显著改善分析性能。 , 用于样品添加的膜垫 (10) , 用于释放包含处于干燥状态的标记的检测结合组分的标记的检测结合组分的膜垫 (20) , 用于捕获的捕获结合组分用于向酶提供底物溶液的膜垫 (50) , 用于吸收交叉流动溶液的膜垫 (60) , 以及形成用于产生信号的膜垫 (30) 的基板溶液, 膜垫 (40) 膜条生物传感器系统技术领域本发明涉及膜条生物传感器系统。

