

(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2015-508176

(P2015-508176A)

(43) 公表日 平成27年3月16日(2015.3.16)

(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 0 1 L
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 0 1

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

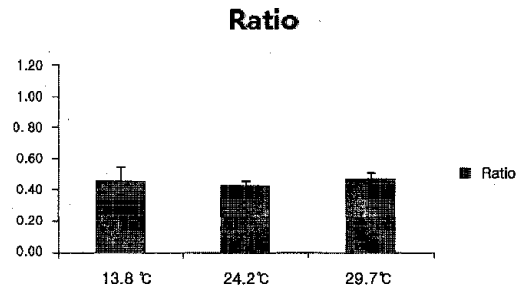
(21) 出願番号	特願2014-558677 (P2014-558677)	(71) 出願人	510146632 ナノエンテック・インコーポレーテッド NanoEnTek, Inc. 韓国、ソウル、グロウダ、グロー3 ドン 235-2、エース ハイエンド タ ワー、12階
(86) (22) 出願日	平成25年2月20日 (2013. 2. 20)	(74) 代理人	100107515 弁理士 廣田 浩一
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月20日 (2014. 8. 20)	(74) 代理人	100107733 弁理士 流 良広
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/001340	(74) 代理人	100115347 弁理士 松田 奈緒子
(87) 国際公開番号	W02013/125855		
(87) 国際公開日	平成25年8月29日 (2013. 8. 29)		
(31) 優先権主張番号	10-2012-0017039		
(32) 優先日	平成24年2月20日 (2012. 2. 20)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な抗原の検出方法及びそれを利用した装置

(57) 【要約】

本発明は、次の段階を含む分析試料内の抗原の検出方法に関するものである：(a) 検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されており、抗原に特異的に結合する検出抗体と分析試料とを接触させる段階；(b) 検出しようとする抗原に特異的に結合する捕獲抗体を段階(a)の結果物に接触させる段階；(c) 検出抗体が特異的に結合するエピトープを含み、固相基質表面に結合されている標準物質に検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されている検出抗体を接触させる段階；(d) 段階(b)の結果物及び段階(c)の結果物の標識から発生するシグナルを測定する段階；及び(e) 測定されたシグナルを分析して、分析試料内の抗原の存否または量を決定する段階。本発明の抗原検出方法は、従来の抗原検出方法に比べて、分析試料の流動及び反応時間を調節することができて、反応感度が向上し、分析試料の濃度または検出反応温度による影響を最小化して、データの安全性、信頼度、及び再現性に優れている。また、本発明の抗原検出方法及び検出装置は、専門的な技術なしでも容易に操作が可能であって、分析試料内の検出抗原



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の段階を含む分析試料内の抗原の検出方法：

(a) 検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されており、前記抗原に特異的に結合する検出抗体と分析試料とを接触させる段階；

(b) 検出しようとする抗原に特異的に結合する捕獲抗体を前記段階 (a) の結果物に接触させる段階；

(c) 前記検出抗体が特異的に結合するエピトープを含み、固相基質表面に結合されている標準物質に前記検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されている検出抗体を接触させる段階；

(d) 前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルを測定する段階；及び

(e) 前記測定されたシグナルを分析して、前記分析試料内の抗原の存否または量を決定する段階；

前記段階 (a) ~ (d)、または前記段階 (b) ~ (d) は、マイクロチャネルが備えられたマイクロチップで実施され、前記シグナル分析は、前記マイクロチャネルによって提供される反応開始領域、試験領域、標準領域、及び反応終了領域でのシグナルを測定して実施される。

【請求項 2】

前記捕獲抗体は、固相基質表面に結合されていることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記捕獲抗体及び標準物質は、反応物の連続した流れが行われる 1 つのマイクロチップの基質表面上に存在することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記マイクロチップのマイクロチャネルは、試験領域及び標準領域を含み、前記試験領域の表面に前記捕獲抗体が結合されており、前記標準領域に前記標準物質が結合されていることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記分析試料は、前記マイクロチップに適用され、前記適用された分析試料は、前記マイクロチャネルに形成された流れを通じて、前記試験領域及び標準領域と接触することを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記分析試料は、前記試験領域及び標準領域を順次に接触するか、または前記標準領域及び試験領域を順次に接触することを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標準物質は、前記抗原と同じ物質または前記エピトープを含む前記抗原の断片であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記測定されたシグナルの分析は、前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率を計算することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記測定されたシグナルの分析は、前記試験領域及び標準領域で測定されたシグナルのエラー率を計算する分析段階をさらに含むことを特徴とする方法であって、前記エラー率は、前記試験領域及び標準領域から一定距離に位置する反応開始領域及び反応終了領域のシグナルを測定して実施され、前記反応開始領域及び反応終了領域から算出したエラー率が 20 % 以上である場合には、前記シグナル分析を再実施し、前記エラー率は、

$$\left[\frac{\text{（反応開始領域のシグナル - 反応終了領域のシグナル）}}{\text{反応開始領域のシグナル}} \right] \times 100$$

10

20

30

40

50

で算出することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記分析試料は、全血、血しょう、血清、体液、または細胞培養上澄み液であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗原は、薬物、毒素、自己抗体、自己抗原、タンパク質、炭水化物、核酸、または癌関連抗原であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗原は、癌関連抗原であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記段階 (a) の分析試料の濃度に対して線形比例的であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記方法が実施される温度の変化に対して影響を受けないことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 15】

前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記方法が実施される温度範囲 10 ~ 30 で同じ値を表わすことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 16】

前記分析試料内の抗原は、濃度 0.0001 ng/ml ~ 4500 ng/ml の範囲であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

次を含む分析試料内の抗原の検出装置：

(a) 分析試料を収容し、反応が行われるマイクロチャンネルが備えられたマイクロチップ；

(b) 前記マイクロチャンネルの一部に形成されており、検出しようとする抗原に特異的に結合する捕獲抗体が表面に結合されている試験領域；及び

(c) 前記マイクロチャンネルの一部に形成されており、検出抗体が特異的に結合するエピトープを含む標準物質が表面に結合されている標準領域。

【請求項 18】

前記装置は、検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されており、前記抗原に特異的に結合する検出抗体をさらに含むことを特徴とする請求項 17 に記載の検出装置。

【請求項 19】

前記装置は、前記標識から発生するシグナルを測定する測定手段をさらに含むことを特徴とする請求項 17 または 18 に記載の検出装置。

【請求項 20】

前記装置は、前記試験領域及び標準領域で測定されたシグナルの強度の比率を計算する分析手段をさらに含むことを特徴とする請求項 19 に記載の検出装置。

【請求項 21】

前記検出装置は、前記試験領域及び標準領域で測定されたシグナルのエラー率を計算する分析手段をさらに含むことを特徴とする装置であって、前記エラー率は、前記試験領域及び標準領域から一定距離に位置する反応開始領域及び反応終了領域のシグナルを測定して実施され、前記反応開始領域及び反応終了領域から算出したエラー率が 20% 以上である場合には、前記シグナル分析を再実施し、前記エラー率は、

$$\left[\frac{(\text{反応開始領域のシグナル} - \text{反応終了領域のシグナル})}{\text{反応開始領域のシグナル}} \right] \times 100$$

で算出することを特徴とする請求項 17 に記載の検出装置。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

前記分析試料は、前記マイクロチップに適用され、前記適用された分析試料は、前記マイクロチャンネルに形成された流れを通じて、前記試験領域及び標準領域と接触することを特徴とする請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 2 3】

前記分析試料は、前記試験領域及び標準領域を順次に接触するか、または前記標準領域及び試験領域を順次に接触することを特徴とする請求項 2 2 に記載の装置。

【請求項 2 4】

前記標準物質は、前記抗原と同じ物質または前記エピトープを含む前記抗原の断片であることを特徴とする請求項 1 7 に記載の装置。

10

【請求項 2 5】

前記分析試料は、全血、血しょう、血清、体液、または細胞培養上澄み液であることを特徴とする請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 2 6】

前記抗原は、薬物、毒素、自己抗体、自己抗原、タンパク質、炭水化物、核酸、または癌関連抗原であることを特徴とする請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 2 7】

前記抗原は、癌関連抗原であることを特徴とする請求項 2 6 に記載の装置。

【請求項 2 8】

前記シグナルの強度の比率値は、前記分析試料の濃度に対して線形比例的であることを特徴とする請求項 2 0 に記載の装置。

20

【請求項 2 9】

前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記装置が作動する温度の変化に対して影響を受けないことを特徴とする請求項 2 0 に記載の装置。

【請求項 3 0】

前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記方法が実施される温度範囲 1 0 ~ 3 0 で同じ値を表わすことを特徴とする請求項 2 0 に記載の装置。

【請求項 3 1】

前記分析試料内の抗原は、濃度 0 . 0 0 0 1 n g / m l ~ 4 5 0 0 n g / m l の範囲であることを特徴とする請求項 1 7 に記載の装置。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規な抗原の検出方法及びそれを利用した装置に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

複雑な試料中の分析対象 (例えば、抗原) を迅速かつ簡単に測定するだけでなく、測定値の信頼度の高い抗原検出方法の開発の重要性が大きくなっている。例えば、病院の応急状況において、臨床診断の要点は、非熟練オペレータが複雑な化学的または免疫化学的分析方法を実施して、患者の状態を迅速かつ正確に測定することである。その検査は、通常、臨床化学者として訓練を受けていない病院のスタッフまたは看護師によって実施される。血液試料を病院の検査室に移送し、分析を実施している現在の臨床診断システムは、迅速な検査結果が要求される場合には不相当である。したがって、分析結果が短時間内に可能であり、病院の診断システムにおいて、検査を実施する職員及び装置が、前記要求に適した測定方法が要求される。

40

【0 0 0 3】

既存の抗原の測定方法として、免疫検査 (i m m u n o a s s a y) が主に利用される。特に、腫瘍標識子の項目を検査するには、ほとんど免疫検査が利用される。免疫検査は

50

、抗原抗体反応を利用した検査であって、測定しようとする物質に選択的に結合する抗体を用いて所望の物質を測定することができる。代表的な免疫検査の種類と原理は、次の通りである。器官別に使う方法と具体的な反応条件において、若干の差はあり得るが、基本原理はほぼ同一である。

【0004】

凝集法 (particle immunoassay) は、抗原と抗体との結合によって凝集反応 (agglutination) が表われることを利用する。ほとんど赤血球やラテックス (latex)、ゼラチン (gelatin) などに抗原や抗体を付着させて、その粒子が反応して凝集を表わすことを測定する。凝集測定は、光の吸収程度を混濁測定法 (turbidimetry) で測定するか、光の散乱程度を比濁法 (nephelometry) で測定することができる。

10

【0005】

酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA) は、抗原と抗体との結合を酵素反応 (enzyme reaction) を用いて測定する。ほとんど測定しようとする物質に結合する抗体に酵素をあらかじめ付着させて、抗原抗体反応を起こす。次いで、結合した酵素に反応する基質を入れれば、酵素反応が起こる。よく利用する酵素としては、アルカリ性リン酸分解酵素 (alkaline phosphatase)、西洋ワサビ過酸化酵素 (horseradish peroxidase)、 β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase) などがある。酵素反応の産物は、ほとんど色を帯びる物質であって、それを分光光度計 (spectrophotometer) で測定する。

20

【0006】

放射免疫測定法は、抗原と抗体との結合を放射性同位元素 (radioisotope) を用いて測定する。放射性同位元素とは、物理的に不安定であって、自然的に崩壊 (radioactive decay) を起こしながら、安定した物質に変わり、その過程で放射線を放出する物質である。測定しようとする物質と同じ物質に放射性同位元素を付着するか、または測定しようとする物質に反応する抗体に放射性同位元素を付着して、抗原抗体反応を起こす。反応終了後、反応物から出る放射線の量を測定して、所望の物質の濃度を計算することができる。多く利用する放射性同位元素は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P などがある。放射免疫測定法は、過去に多く利用されたが、放射性物質を使わなければならない危険があり、化学発光免疫測定法のような方法が開発されながら、使い方が減少する趨勢である。

30

【0007】

蛍光免疫測定法は、抗原と抗体との結合を蛍光反応 (fluorescence) を用いて測定する。蛍光反応とは、蛍光物質が特定波長の光を吸収して、蛍光物質の分子が励起 (excitation) されてから再び元の状態に戻りながら、吸収した光とは異なる波長の光を出す反応を言う。免疫測定に利用する時には、測定しようとする物質と同じ物質に蛍光物質を付着するか、または測定しようとする物質に反応する抗体に蛍光物質を付着して、抗原抗体反応を起こす。反応が起こった後、蛍光反応を起こしうる波長の光を投射すれば、蛍光物質の量に比例して蛍光を出し、その蛍光の量から測定物質の濃度を計算する。

40

【0008】

化学発光免疫測定法は、抗原と抗体との結合を化学発光反応 (chemiluminescence) を用いて測定する。化学発光反応とは、化学発光物質が励起されてから基底状態 (ground state) に戻りながら光を発する現象であって、分子を励起させるエネルギーが光ではない、化学反応であるという点で蛍光と異なる。免疫測定に利用する時には、他の方法と同様に、測定しようとする物質と同じ物質に化学発光物質を付着するか、または測定しようとする物質に反応する抗体に化学発光物質を付着して、抗原抗体反応を起こす。反応が起こった後、必要な化学反応を起こした後、発散される発光の程度を測定して、これより測定物質の濃度を計算する。代表的な発光物質としては、ルミ

50

ノール (l u m i n o l)、イソルミノール (i s o l u m i n o l)、アクリジニウムエステル (a c r i d i n i u m e s t e r) などがある。

【 0 0 0 9 】

本発明で利用しようとする抗原検出方法は、蛍光免疫測定法を基盤としたものであって、従来の蛍光免疫測定法は、試料の濃度及び反応温度によって抗原の測定数値が変わって、データの再現性及び信頼度が落ちる問題点があって、それを改善するための方法として開発された。したがって、本発明者らは、抗原 - 抗体反応を利用した蛍光免疫測定法を基盤として、現場診断が可能であり、分析試料の濃度及び反応温度に関係ない抗原検出システムを確立しようとする。

【 0 0 1 0 】

本明細書の全般に亘って多数の論文及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された論文及び特許文献の開示内容は、その全体として本明細書に参照して挿入されて、本発明が属する技術分野のレベル及び本発明の内容がより明確に説明される。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 1 】

本発明者らは、新規な抗原の検出方法を開発するために鋭意研究した。その結果、本発明者らは、従来の試験領域 (t e s t z o n e) と標準領域 (r e f e r e n c e z o n e) とに互いに異なる検出抗体を結合させて、試験領域にのみ特異的に結合する抗原を検出する方法と異なって、標準領域に検出しようとする抗原と同じエピトープを含む標準物質 (r e f e r e n c e s u b s t a n c e) とを結合させることによって、試験領域と標準領域とに同じ検出抗体を結合させて、より正確に抗原の存在及び量を検出することができる方法を開発した。本発明の検出方法を用いて、従来の抗原検出方法に比べて、分析試料の流動 (f l o w) 及び反応時間を調節して反応感度を向上させ、分析試料の濃度または検出反応温度による影響を最小化して、データの安全性、信頼度、及び再現性が向上することを確認することによって、本発明を完成した。

【 0 0 1 2 】

したがって、本発明の目的は、新規な抗原の検出方法を提供することである。

【 0 0 1 3 】

本発明の他の目的は、新規な抗原の検出装置を提供することである。

【 0 0 1 4 】

本発明の他の目的及び利点は、下記の発明の詳細な説明、特許請求の範囲及び図面によってより明確になる。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 5 】

本発明の一樣態によれば、本発明は、次の段階を含む分析試料内の抗原の検出方法を提供する：

(a) 検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されており、前記抗原に特異的に結合する検出抗体と分析試料とを接触させる段階； (b) 検出しようとする抗原に特異的に結合する捕獲抗体を前記段階 (a) の結果物に接触させる段階； (c) 前記検出抗体が特異的に結合するエピトープを含み、固相基質表面に結合されている標準物質に前記検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されている検出抗体を接触させる段階； (d) 前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルを測定する段階；及び (e) 前記測定されたシグナルを分析して、前記分析試料内の抗原の存否または量を決定する段階。

【 0 0 1 6 】

本発明者らは、新規な抗原の検出方法を開発するために鋭意研究した。その結果、本発明者らは、従来の試験領域と標準領域とに互いに異なる検出抗体を結合させて、試験領域にのみ特異的に結合する抗原を検出する方法と異なって、標準領域に検出しようとする抗原と同じエピトープを含む標準物質とを結合させることによって、試験領域と標準領域と

10

20

30

40

50

に同じ検出抗体を結合させて、より正確に抗原の存在及び量を検出することができる方法を開発した。本発明の検出方法を利用することによって、従来 of 抗原検出方法に比べて、分析試料の流動及び反応時間を調節して反応感度を向上させ、分析試料の濃度または検出反応温度による影響を最小化して、データの安全性、信頼度、及び再現性が向上することを確認した。

【0017】

前記抗原の検出方法は、分析試料内に存在する抗原の存在及び量を測定する方法であって、本発明者らは、従来 of 抗原検出方法で分析試料がヒトの血しょうである場合、i) 標準領域に結合された標準物質が、ヒト由来のペプチドまたはそれと結合可能な物質であることができず、標準物質の選定に限界があり、また、ii) 試験領域と標準領域とに互いに異なる検出抗体を結合させて、それぞれ抗体の抗原に対する親和度 (affinity) によって検出結果が変わり、iii) 分析試料が高濃度である場合、試験領域に結合される検出抗体の飽和度とは無関係に、標準領域の検出抗体は、引き続き一定レベルに標準領域に結合されるので、試験領域の測定シグナル / 標準領域のシグナル強度の比率値が一定でなく、iv) 基本的に抗原 - 抗体反応を利用することによって、付随的に問題になる温度による影響を排除することができないという点に着眼して、それを改善するための抗原の検出方法を開発するために努力した結果、本発明の方法が設計された。

【発明の効果】

【0018】

本発明の特徴及び利点を要約すれば、次の通りである：

(a) 本発明は、新規な抗原検出方法及びそれを利用した抗原検出装置に関するものである。

(b) 本発明の抗原検出方法は、従来 of 試験領域と標準領域とに互いに異なるエピトープを有した物質を結合させて、それと特異的に結合する抗原を検出する方法と異なって、標準領域に検出しようとする抗原と同じエピトープを含む標準物質とを結合させることによって、より正確に抗原の存在及び量を検出することができる。

(c) 従来 of 抗原検出方法を使う場合、抗原濃度が高濃度に行くほど反応性が減少し、反応が飽和されれば、一定レベルでこれ以上のシグナル値が増加しなくなる短所があるが、本発明の抗原検出方法を使う場合には、T/R比率値で試験 (test) 値を測定することによって、このようなフック効果 (hook effect) が来なく、結果的に、検出範囲 (detection range) が増える特徴がある。

(d) また、本発明の検出方法は、従来 of 抗原検出方法に比べて、分析試料の流動及び反応時間を調節することができて、反応感度が向上し、分析試料の濃度または検出反応温度による影響を最小化して、データの安全性、信頼度、及び再現性に優れている。

(e) したがって、本発明の抗原検出方法及び検出装置は、専門的な技術なしでも容易に操作が可能であって、分析試料内の検出抗原の存否及び量を現場診断で即時把握することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、本発明の抗原検出方法を通じて測定されたシグナル測定値が有効であるか否かを検証するために、5個のカートリッジでシグナルを測定した結果である。横軸は、マイクロチャンネル内のシグナル測定領域を一定間隔に分けた区画を意味し、縦軸は、蛍光シグナル強度の数値を意味する。

【図2A】図2Aは、既存の抗原検出方法である Rabbit IgG 標準システムを使って、(i) 分析試料の濃度による試験領域及び標準領域のシグナル強度、及び(ii) 分析試料の濃度による試験領域 / 標準領域のシグナル強度の比率値をそれぞれグラフで表わした図面である。

【図2B】図2Bは、本発明の方法を利用した前立腺特異抗原 (PSA) 標準システムを使って、(i) 分析試料の濃度による試験領域及び標準領域のシグナル強度、及び(ii) 分析試料の濃度による試験領域 / 標準領域のシグナル強度の比率値をそれぞれグラフで

表わした図面である。

【図3A】図3Aは、Rabbit IgG標準システムを使って、(i)測定温度による試験領域及び標準領域のシグナル強度、及び(ii)測定温度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をそれぞれグラフで表わした図面である。

【図3B】図3Bは、前立腺特異抗原(PSA)標準システムを使って、(i)測定温度による試験領域及び標準領域のシグナル強度、及び(ii)測定温度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をそれぞれグラフで表わした図面である。

【図4A】図4Aは、既存の抗原検出方法(Rabbit-Goat anti-Rabbit system)を用いて、(i)測定温度による試験領域及び標準領域のシグナル強度をグラフで表わした図面である。

10

【図4B】図4Bは、既存の抗原検出方法(Rabbit-Goat anti-Rabbit system)を用いて、(ii)測定温度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をグラフで表わした図面である。

【図5A】図5Aは、既存の抗原検出方法(Taq-Mouse anti-Taq system)を用いて、(i)測定温度による試験領域及び標準領域のシグナル強度をグラフで表わした図面である。

【図5B】図5Bは、既存の抗原検出方法(Taq-Mouse anti-Taq system)を用いて、(ii)測定温度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をグラフで表わした図面である。

【図6A】図6Aは、本発明の方法を利用した抗原検出方法(PSA-Mouse anti-PSA system)を用いて、(i)測定温度による試験領域及び標準領域のシグナル強度をグラフで表わした図面である。

20

【図6B】図6Bは、本発明の方法を利用した抗原検出方法(PSA-Mouse anti-PSA system)を用いて、(ii)測定温度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をグラフで表わした図面である。

【図7】図7は、バイオサイト(Biosite)社の抗原検出方法を用いて、測定温度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をグラフで表わした図面である。

【図8】図8は、本発明の方法を利用した前立腺特異抗原(PSA)標準システムを使って、分析試料の濃度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をそれぞれグラフで表わした図面である。

30

【図9A】図9Aは、本発明の方法を利用した前立腺特異抗原(PSA)標準システムを使って、高濃度分析試料の試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をグラフで表わした図面である。

【図9B】図9Bは、既存の抗原検出方法(Rabbit-Goat anti-Rabbit system)を使って、高濃度分析試料の試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値をグラフで表わした図面である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、このような本発明の方法による分析試料内の抗原の測定方法について具体的に説明する：

40

段階(a)：検出抗体と分析試料との接触

まず、検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されており、前記抗原に特異的に結合する検出抗体と分析試料とを接触させる。

【0021】

本発明の方法が使われる分析試料は、あらゆる哺乳動物から由来した有機物質(organic materials)及び人為的に合成された有機分子(organic molecules)を含み、これらに限定されるものではない。前記分析試料は、望ましくは、全血、血しょう、血清、体液、または細胞培養上澄み液である。

【0022】

前記有機分子は、炭素、窒素、酸素及び/または硫黄原子の間に共有結合を有する分子

50

を意味する。有機分子は、一酸化炭素のような小さなサイズの分子から、ポリマー (polymer) のような複雑で大きなサイズの分子から選択可能であり、または、前記有機分子は、グリコシド分子であり得る。

【0023】

本明細書で、用語“抗原”は、本発明の方法を用いて検出可能なあらゆる分子を含む。例えば、前記抗原は、体内に存在する小分子、すなわち、薬物、毒素、自己抗体 (autoantibody)、自己抗原 (autoantigen)、タンパク質、炭水化物、核酸、及び他の分子である。対象 (subject) の血清内に存在することができる抗原は、薬物のみ限定されず、例えば、バルビツール酸塩、三環系抗うつ剤 (tricyclic antidepressants、TCA)、ジギタリス (Digitalis)、癌関連抗原 (例えば、乳房、精巣、脳、肝、大腸、膵臓、胃または肺癌と関連した抗原)、ウイルス抗原 (例えば、HIV、インフルエンザまたは他のウイルスと関連した抗原)、バクテリア抗原 (例えば、全身バクテリア感染)、ホルモン (例えば、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、ヒト成長ホルモン、プロゲステロン、テストステロン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG))、プラズマタンパク質 (例えば、フィブリン分解産物 (FDP)、C-反応性タンパク質 (CRP)、癌胚芽性抗原 (CEA)、 α -フェトタンパク質 (AFP)、癌胚芽性タンパク質)、原生動物抗原 (protozoal antigens)、プラーク抗原 (plaque antigens)、ハプテン (例えば、アンジオテンシン I、バソプレシン、ソマトスタチン、心房性ナトリウム利尿ホルモン (atrial natriuretic hormone)、エンドセリン (endorine)、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH)、カッシニン (kassinin) または他のペプチド)、ステロイド (例えば、コルチゾール) 及びサイトカイン (例えば、インターロイキン - 1、インターフェロン - α 、インターフェロン - β 、インターフェロン - γ 、インターロイキン - 2、インターロイキン - 4、インターロイキン - 6、インターロイキン - 7、インターロイキン - 12、インターロイキン - 15、B7、CD28、または他の免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) メンバー) を含む。

【0024】

前記ウイルス抗原は、公知の多様なウイルス抗原を含み、例えば、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、インフルエンザ、水痘 (varicella)、アデノウイルス、単純疱疹ウイルスタイプ I、単純疱疹ウイルスタイプ II、牛痘 (rinderpest)、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器細胞融合ウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルスタイプ I、ヒト免疫不全ウイルスタイプ II、ピコルナウイルス科、腸内ウイルス、トガウイルス (例えば、アルファウイルス、フラビウイルス、コロナウイルス、狂犬病ウイルス、エボラウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルスタイプ I、ヒト T 細胞白血病ウイルスタイプ II、レンチウイルス、ポリオーマウイルス、バルボウイルス、エプスタイン・バー (Epstein-Barr) ウイルス、ヒトヘルペスウイルス - 6、ヘルペスウイルス 1 または水痘ウイルス) と関連した抗原、または前記ウイルスで生産された抗原を含むが、これらに限定されるものではない。

【0025】

前記バクテリア抗原は、公知の多様なバクテリア抗原を含み、例えば、マイコバクテリアリケッチア (Mycobacteria rickettsia)、マイコプラズマ (Mycoplasma)、ナイセリア種 (Neisseria spp.)、レジオネラ (Legionella)、コレラ菌 (Vibrio cholerae)、連鎖状球菌 (Streptococci)、コリネバクテリアジフテリア (Corynebacteria diphtheriae)、破傷風菌 (Clostridium tetani)、百日咳菌 (Bordetella pertussis)、ヘモフィルス種 (Haemophilus spp.)、クラミジア種 (Chlamydia spp.) または

10

20

30

40

50

毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic Escherichia coli) と関連した抗原、または前記バクテリアで生産された抗原を含むが、これらに限定されるものではない。

【0026】

前記原生動物抗原は、公知の多様な原生動物抗原を含み、例えば、プラスモディア (Plasmodia)、アイメリア (Eimeria)、リーシュマニア (Leishmania) またはトリパノソーマ (Trypanosoma) と関連した抗原、または前記原生動物で生産された抗原を含むが、これらに限定されるものではない。

【0027】

前記癌関連抗原 (cancer-related antigen) は、公知の多様な癌関連抗原を含み、例えば、サバイビン (survivin)、サイクリン D1、Her2/neu、K-ras、キモトリプシノーゲン、XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)、塩基性線維母細胞生長因子 (bFGF)、EGF (Epidermal Growth Factor) 受容体、発癌胚芽性抗原 (CEA)、前立腺特異抗原 (PSA)、 α -フェータンパク質、 α -2-マイクログロブリン、膀胱癌抗原 (BTA)、クロモグラニン A、ニューロン特異エノラーゼ、S-100 タンパク質、TA-90 タンパク質、組織ペプチド抗原 (TPA) 及びヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を含むが、これらに限定されるものではない。望ましくは、前記癌関連抗原は、前立腺特異抗原である。

10

【0028】

前記抗原以外にも、本発明の抗原は、汚染物質、毒素、有毒化学物質、法医学的物質、またはそれと類似した物質を含む。

20

【0029】

本発明の望ましい具現例によれば、前記抗原は、薬物、毒素、自己抗体、自己抗原、タンパク質、炭水化物、核酸、または癌関連抗原であり、より望ましくは、癌関連抗原である。

【0030】

本発明の方法は、2種の形態の抗体、すなわち、検出抗体及び捕獲抗体を利用する。用語“検出抗体”は、前記捕獲抗体によって捕獲された前記抗原または標準物質に結合しうる抗体を意味する。本明細書で、用語“捕獲抗体”は、分析試料で検出しようとする前記抗原に結合しうる抗体を意味する。本発明の方法で利用できる抗体は、分析試料内の抗原を探知するためのものであって、分析試料内の抗原と特異的に結合するヌクレオチド配列のエピトープとを含む。本明細書に利用された抗体は、検出しようとするエピトープ、抗原または抗原断片に結合しうる全体抗体だけではなく、抗体断片 (例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv) を含む。本発明で利用される抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり、望ましくは、モノクローナル抗体である。

30

【0031】

前記抗原に対する抗体は、当業者に通常実施される方法、例えば、融合方法 (Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6: 511-519 (1976))、組換え DNA 方法 (米国特許第 4, 816, 56 号) またはファージ抗体ライブラリー方法 (Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991) 及び Marks et al, J. Mol. Biol., 222: 58, 1-597 (1991)) によって製造可能である。抗体製造に対する一般的な過程は、Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 及び Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991 に詳細に記載されており

40

50

、前記文献は、本明細書に参照として挿入される。

【0032】

前記検出抗体には、検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されている。用語“シグナル”は、検出可能なパラメータ (parameter) を意味し、光学的、電氣的または磁氣的パラメータの流れ、蛍光放射、赤外線放射、紫外線放射、化学発光、光反射も、前記シグナルの吸収程度を含む。検出可能なシグナルを発生させる標識は、化学物質 (例えば、ビオチン)、酵素 (アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びシトクロム P450)、放射能物質 (例えば、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 、及び ^{35}S)、蛍光物質 (例えば、フルオレセイン)、発光物質、化学発光物質 (chemiluminescent)、及び FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) を含むが、これらに限定されるものではない。多様なレーベル及びレーベリング方法は、Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 に記載されている。望ましくは、検出可能なシグナルを発生させる標識として蛍光物質が利用される。

10

【0033】

前記標識は、発散する波長によってそれぞれ異なる蛍光シグナルが観察され、望ましくは、前記標識は、検出抗体に結合された形態で捕獲抗体または標準物質に結合される。前記標識は、公知の多様な蛍光物質を含み、例えば、フルオレセインとその誘導体、ローダミンとその誘導体、フィコエリトリン、ルシファーイエロー、B-ファイトエリスリン、9-アクリジンイソチオシアネート、ルシファーイエロー-VS、4-アセトアミド-4'-イソチオ-シアナトスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸、7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン、スクシンイミジル-ピレンブチレート、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸誘導体、LCTM-Red 640、LCTM-Red 705、PC5、Cy5、Cy5.5、リサミン、イソチオシアネート、エリスロシンイソチオシアネート、ジエチレントリアミンペンタアセテート、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホン酸塩、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート、2-p-トウイジニル-6-ナフタレンスルホネート、3-フェニル-7-イソシアナトクマリン、9-イソチオシアナトアクリジン、アクリジンオレンジ、N-(p-(2-ベンゾオキサゾール)フェニル)マレイミド、ベンゾチアゾール、スチルベン、及びピレンを含むが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0034】

本発明の方法によれば、抗原-特異的検出抗体に結合された標識が放出するシグナルは、蛍光シグナルとして測定されるので、試験領域及び標準領域の両シグナルをそれぞれ測定して、検出しようとする抗原の存否及び量を確認することができる。前記検出抗体及び捕獲抗体は、前記抗原に特異的に結合する親和性 (affinity) を有し、本発明の方法に使われる他の如何なる試薬とも反応しない。

【0035】

段階 (b) : 捕獲抗体及び前記段階 (a) の結果物の接触

40

引き続き、前記段階 (a) の結果物に、検出しようとする抗原に特異的に結合する捕獲抗体を接触させる。すなわち、段階 (a) の結果物を試験領域または標準領域の抗原-特異的捕獲抗体または標準物質に結合させる。

【0036】

本明細書で、用語“捕獲抗体”は、段階 (a) に前述した通りである。

【0037】

本発明の望ましい具現例によれば、前記捕獲抗体は、固相基質表面に結合されており、前記捕獲抗体は、反応物の連続した流れが行われる1つの反応容器の基質表面上に存在し、前記反応容器は、マイクロチャネルを有するマイクロチップである。

【0038】

50

本明細書で、用語“固相基質 (solid substrate)”は、固相支持体 (solid support) または固相 (solid phase) と同じ意味として使われ、非液状物質を意味する。前記固相基質は、望ましくは、前記マイクロチャンネル内に形成させ、例えば、膜 (membrane)、毛细管の一部またはマイクロチャンネル内を流動/接着された小径ビーズ (small diameter beads) として存在することができる。このような形態の公知の物質は、ポリスチレン及びポリプロピレン、ガラス、金属、及びゲルのような炭化水素重合体を含む。前記固相基質は、ディップスティック、マイクロタイプレート、粒子 (例えば、ビーズ)、親和性カラム、及びイムノプロットメンブレン (例えば、ポリビニリデンフロライドメンブレン) 形態であり得る (参照：米国特許第 5, 143, 825 号、第 5, 374, 530 号、第 4, 908, 305 号、及び第 5, 498, 551 号)。

【0039】

本発明の他の望ましい具現例によれば、前記マイクロチップのマイクロチャンネルは、試験領域及び標準領域を含み、前記試験領域の表面に前記捕獲抗体が結合されており、前記標準領域に前記標準物質が結合されている。

【0040】

本明細書で、用語“試験領域”は、前記マイクロチップのマイクロチャンネル内に含まれた区画であって、試験領域の表面には、前記捕獲抗体が結合されており、捕獲抗体には、検出しようとする前記抗原及びその抗原と特異的に結合する検出抗体とが結合する。

【0041】

本明細書で、用語“標準領域”は、前記マイクロチップのマイクロチャンネル内に含まれた区画であって、標準領域の表面には、標準物質が結合されており、標準物質には、検出しようとする前記抗原と特異的に結合する検出抗体とが結合する。

【0042】

本明細書で、用語“標準物質”は、前記検出抗体が結合しうる物質を意味し、本発明の望ましい具現例によれば、前記標準物質は、前記抗原と同じ物質または前記エピトープを含む前記抗原の断片である。

【0043】

前記抗体、抗原または標準物質は、物理的な吸着または化学的な接着によって固相基質に付着可能である。物理的吸着は、適切な緩衝液にある抗体または抗原と固相の材料との間で反応によって行われる。緩衝液としては、リン酸塩緩衝液、トリス塩酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液などである。反応は、4 ~ 37、特に、室温で特定時間前記緩衝液を混合し、保持することによって行われる。化学的付着は、ペプチド付着方法のうち、カルボジイミド法を使うことで実行可能である。さらに他の化学法は、グルタルアルデヒドまたはシアヌリッククロライド (“ペプチド合成法”, マルゼン (Maruzen), 1975 または “酵素免疫測定法”, 共立出版、“プロテイン核酸酵素”, 特別号 31, 1987) のような二価横連結試薬で実行される方法である。

【0044】

本発明の望ましい具現例によれば、前記分析試料は、前記マイクロチップに適用され、前記適用された分析試料は、前記マイクロチャンネルに形成された流れを通じて、前記試験領域及び標準領域と接触する。また、前記分析試料は、前記試験領域及び標準領域を順次に接触するか、または前記標準領域及び試験領域を順次に接触することができる。

【0045】

前述したように、本発明の検出方法は、検出抗体に分析試料を接触させた後、捕獲抗体を接触させると表現されているが、これは、記載の便宜のためのものであり、本発明の検出方法は、i) 前記過程を逆にする場合、すなわち、分析試料を前記捕獲抗体と接触させる段階を優先的に行い、引き続き、分析試料と捕獲抗体の反応結果物を検出抗体と接触させること、及び ii) 分析試料を検出抗体及び捕獲抗体と同時に接触させることを排除することではない。

【0046】

10

20

30

40

50

前記過程のうち、分析試料を前記検出抗体と接触させる段階を優先的に行い、引き続き、分析試料と検出抗体の反応結果物を捕獲抗体と接触させる場合、前記分析試料と検出抗体の反応は、マイクロチップ内、またはマイクロチップ外でなされう。本発明の具体的な一実施例によれば、前記反応は、マイクロチップ外でなされる。

【0047】

段階(c)：標準物質(reference substance)及び検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されている検出抗体の接触

検出抗体及び前記段階(a)の結果物を接触させた後、前記検出抗体が特異的に結合するエピトープを含み、固相基質表面に結合されている標準物質に前記検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されている検出抗体を接触させる。

10

【0048】

本明細書で、用語“エピトープ”は、抗体が結合する抗原の部位を抗原決定部位(antigenic determinant)を意味し、前記標準物質は、1種類以上のエピトープを含むか、同じエピトープを1以上含むうが、前記検出抗体が結合するエピトープは、標準物質上で一回のみ発見されうる配列を選択することが望ましい。

【0049】

段階(d)：シグナルの測定

引き続き、シグナル測定装置を使って、前記段階(b)の結果物及び段階(c)の結果物の標識から発生するシグナルを測定する。前記シグナル測定装置についての詳細な説明は、下記に記載されている。

20

【0050】

段階(e)：シグナルの分析

前記段階(d)で測定されたシグナルを分析して、前記分析試料内の抗原の存否または量を決定する。

【0051】

前記シグナルの量(amount)によって抗原の存否及び量を決定し、用語“量”は、前記シグナルの感度(sensitivity)が測定可能な特定レベル(level)内に含まれることを前提にして、物理的パラメータである前記シグナルの強度(intensity)が増加、減少または保持される程度を意味する。例えば、シグナルの増加が10単位で増加し、シグナルの測定感度が1単位の範囲内にあるならば、シグナル量を測定することができる。前記シグナルの量は、任意の単位で表示することができる。

30

【0052】

前記段階(a)～(d)、または前記段階(b)～(d)は、マイクロチャンネル(microchannel)が備えられたマイクロチップで実施され、前記シグナル分析は、前記マイクロチャンネルによって提供される反応開始領域、試験領域、標準領域、及び反応終了領域でのシグナルを測定して実施される。

【0053】

前記反応開始領域及び反応終了領域のシグナルからエラー率(%)を算出し、エラー率が20%以上である場合には、試験領域及び標準領域シグナルの信頼性を高めるために分析を再実施する。用語“エラー率(error rate)”は、分析試料の粘性または流動性(flow)が一定しておらず、シグナルの分析結果が異なり、分析を実施する実験者の操作未熟によってシグナルの分析結果が異なりうるので、これにより発生する誤差を最小化し、データの信頼性を得るために測定される値である。

40

【0054】

用語“反応開始領域”及び“反応終了領域”は、前記マイクロチップのマイクロチャンネル内に含まれた区画であって、マイクロチャンネル内のシグナル測定領域を一定間隔に分けた区画(0～900)の一部である。

【0055】

前記反応開始領域及び反応終了領域は、抗原の種類によって区画が可変的であり得る。一例によれば、本発明の方法を用いてPSA抗原を検出する実験で、反応開始領域は、全

50

体“0～900”範囲のうち、180～370の区画であり、反応終了領域は、700～880の区画に該当する（図1参照）。

【0056】

マイクロチャンネル内のシグナル測定領域は、反応開始領域、試験領域、標準領域、及び反応終了領域で構成され、各領域でのシグナルをグラフで表わした時、シグナル量は、次のように計算される。グラフで横軸は、マイクロチャンネル内のシグナル測定領域を一定間隔に分けた区画（0～900）に表示され、縦軸は、蛍光シグナルの量（強度）に表示することができる。

【0057】

【数1】

$$\text{試験領域蛍光シグナル} = \int_{X_{tc}-30}^{X_{tc}+30} (X_n - X_b) \cdot \cdot \cdot \quad (\text{数式1})$$

【数2】

$$\text{標準領域蛍光シグナル} = \int_{X_{rc}-30}^{X_{rc}+30} (X_n - X_b) \cdot \cdot \cdot \quad (\text{数式2})$$

（ $X_n = n$ 位置での蛍光シグナル、 $X_{tc} =$ 試験領域中央地点の蛍光シグナル、 $X_{rc} =$ 標準領域中央地点の蛍光シグナル、 $X_b =$ マイクロチャンネル0～900の位置のうち、少なくとも50地点の蛍光シグナル平均値）

【0058】

【数3】

$$\text{反応開始領域の蛍光シグナル} = (\sum_{X_{tc}-(X_{rc}-X_{tc})-30}^{X_{tc}-(X_{rc}-X_{tc})+30} X_n) / 60 \cdot \cdot \cdot \quad (\text{数式3})$$

【数4】

$$\text{反応終了領域の蛍光シグナル} = (\sum_{X_{rc}+(X_{rc}-X_{tc})-30}^{X_{rc}+(X_{rc}-X_{tc})+30} X_n) / 60 \cdot \cdot \cdot \quad (\text{数式4})$$

（ $X_n = n$ 位置での蛍光シグナル、 $X_{tc} =$ 試験領域中央地点の蛍光シグナル、 $X_{rc} =$ 標準領域中央地点の蛍光シグナル）

すなわち、反応開始領域の蛍光シグナルは、 $X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) - 30$ 地点から $X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) + 30$ 地点まで各地点のシグナル平均値であり、反応終了領域の蛍光シグナルは、 $X_{rc} + (X_{rc} - X_{tc}) - 30$ 地点から $X_{rc} + (X_{rc} - X_{tc}) + 30$ 地点まで各地点のシグナル平均値である。

【0059】

前記エラー率は、次のように算出することができる。

【数5】

$$\text{エラー率 (\%)} = [| (\text{反応開始領域のシグナル} - \text{反応終了領域のシグナル}) | / \text{反応開始領域のシグナル}] \times 100 \cdot \cdot \cdot \quad (\text{数式5})$$

【0060】

本発明の望ましい具現例によれば、前記測定されたシグナルの分析は、前記段階（b）の結果物及び段階（c）の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率を計算することで実施する。

【0061】

従来の抗原検出方法は、試験領域に検出しようとする抗原と特異的に結合する物質（本発明での捕獲抗体）とを結合させ、標準領域にヒト由来の抗原が結合することができない外来の物質を結合させて、それぞれの領域で発生するシグナルを測定し、標準領域でのシグナルは、試験領域のシグナルを補正する数値として使われた。同じ濃度の試料であるとしても、試料粘性の差によってマイクロチャンネル内に流れる試料の速度（反応速度）が違って、試験領域のシグナルが異なる。それを補正する方法で同じ濃度である時、低い粘性

の試料がマイクロチャンネル内に迅速に通り返れば、試験領域のシグナルが減少したほど標準領域のシグナルが共に減少し、同じ濃度の高い粘性の試料がマイクロチャンネル内に遅く通り返れば、試験領域のシグナルが増加したほど標準領域のシグナルが共に増加するにつれて、結局は、試料の粘性差なしに同じ比率値を表現して、シグナルの値は異なるが、比率値は実質的に同じ値を有する。用語“実質的に (substantially)”は、試料の粘性差による影響を全く受けない場合、及び試料の粘性に影響を受けるが、その程度が微弱であって、試料の粘性差による影響がないと言える場合も含む意味である。例えば、試験領域及び標準領域のシグナル強度の比率値は、試料の粘性差にも拘らず、その偏差が ± 2.0 であって、ほぼ一定に保持され、これは、前記シグナル強度の比率値が試料の粘性差に実質的に影響を受けないということを意味する。

10

【0062】

しかし、前記方法は、例えば、分析試料がヒトの血清である場合、i) 標準領域に結合された標準物質が、ヒト由来のペプチドまたはそれと結合可能な物質であることができず、標準物質の選定に限界があり、ii) 試験領域と標準領域とに互いに異なる検出抗体を結合させて、それぞれ抗体の抗原に対する親和度によって検出結果が変わり、iii) 分析試料が高濃度である場合、試験領域に結合される検出抗体の飽和度とは無関係に、標準領域の検出抗体は、引き続き一定レベルに標準領域に結合されるので、試験領域の測定シグナル/標準領域のシグナル強度の比率値が一定でなく、iv) 基本的に抗原-抗体反応を利用することによって、付随的に問題になる温度による影響を排除することができないという問題点があった。したがって、本発明者らは、標準物質選定の限界、分析試料の濃度及び温度による影響を最小化させて、データの安全性、信頼度、及び再現性が向上した本発明の方法を開発し、そのうち、本発明の最大の特徴は、分析試料内の抗原の検出において、分析試料の濃度及び温度による影響を最小化させたということにある。

20

【0063】

本発明の他の望ましい具現例によれば、前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記段階 (a) の分析試料の濃度に対して線形比例的である。

【0064】

本発明の他の望ましい具現例によれば、前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記方法が実施される温度の変化に対して実質的に影響を受けない。用語“実質的に”は、温度変化による影響を全く受けない場合、及び温度による影響を受けるが、その程度が微弱であって、温度変化による影響がないと言える場合も含む意味である。例えば、試験領域及び標準領域のシグナル強度の比率値は、温度の変化にも拘らず、その偏差が ± 0.17 であって、ほぼ一定に保持され、これは、前記シグナル強度の比率値が温度変化に実質的に影響を受けないということを意味する。

30

【0065】

本発明の他の望ましい具現例によれば、前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記方法が実施される温度範囲 10 ~ 30 で同じ値を表わす。

40

【0066】

本発明の方法を利用する場合、高濃度の抗原を含んだ試料でも、抗原の定量的検出が可能であり、例えば、 1800 ng/ml 以上の濃度である抗原の検出が可能である。一例によれば、本発明の方法を用いてPSA抗原を検出する場合、PSA濃度が $0.0001 \sim 1500 \text{ ng/ml}$ の範囲である試料では、実験的に測定したT/R比率グラフによってPSA抗原の濃度が分かり、PSA濃度が $1500 \sim 1800 \text{ ng/ml}$ 及び 1800 ng/ml 以上の濃度では、前記実験的に得たグラフの延長線上で抗原の濃度が分かる。他の一例によれば、本発明の方法を用いてPSA濃度が 4000 ng/mL 以上である高濃度検体の測定及び検出が可能である。すなわち、PSA濃度が $0.0001 \sim 4500 \text{ ng/mL}$ の範囲である試料で実験的に測定したT/R比率グラフによってPSA抗原の

50

濃度が分かり、P S A濃度が4 5 0 0 n g / m l以上である濃度では、前記実験的に得たグラフの延長線上で抗原の濃度が分かる。

【0067】

本発明の他の様態によれば、本発明は、次を含む分析試料内の抗原の検出装置を提供する：

(a) 分析試料を収容し、反応が行われるマイクロチャンネルが備えられたマイクロチップ；(b) 前記マイクロチャンネルの一部に形成されており、検出しようとする抗原に特異的に結合する捕獲抗体が表面に結合されている試験領域；及び(c) 前記マイクロチャンネルの一部に形成されており、検出抗体が特異的に結合するエピトープを含む標準物質が表面に結合されている標準領域。

10

【0068】

本発明の方法を利用した検出装置は、抗体の親和度、分析試料の濃度及び検出温度による影響を受けなくて、検出しようとする抗原の量を正確に測定し、専門的な技術なしでも容易に操作が可能であって、標的抗原検出の現場診断が可能である。本発明の抗原検出装置は、前述した本発明の抗原検出方法を利用したものであって、その2つの間に共通した内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるために、その記載を省略する。

【0069】

本発明の装置をそれぞれの構成別に詳細に説明すれば、次の通りである：

構成(a)：マイクロチャンネル(m i c r o c h a n n e l)が備えられたマイクロチップ

20

前記抗原検出装置には、分析試料を収容し、反応が行われるマイクロチップが含まれる。前記マイクロチップ内には、分析試料を収容するためのマイクロチャンネルが備えられており、前記マイクロチャンネルは、多様な深さ(d e p t h)を有しうる。

【0070】

分析試料を収容することができる前記マイクロチップは、1以上のマイクロチャンネルを含み、前記マイクロチャンネルには、それぞれ異なる抗原を検出する捕獲抗体及び標準物質が結合されうる。前記マイクロチャンネルには、反応開始領域、試験領域、標準領域、及び反応終了領域が含まれ、望ましくは、前記各領域は、反応開始領域、試験領域、標準領域、及び反応終了領域の順序で位置する。

【0071】

30

前述した本発明の方法を利用した前記検出装置は、分析試料と捕獲抗体及び検出抗体との反応、及び標準物質と検出抗体との反応などをそれぞれの段階として実施すると表現されているが、これは、記載の便宜のためのものであり、本発明の抗原検出装置は、分析試料をマイクロチップに分周することのみで抗原の存否及び量を測定することができる。したがって、前記マイクロチップは、望ましくは、前記抗原検出方法で使われるi) 試薬、標準物質及び捕獲抗体、またはii) 試薬、標準物質、シグナル発散標識が結合された検出抗体及び捕獲抗体が含まれており、マイクロチャンネル内に分析試料を落とした後、前記マイクロチップを本発明による装置に装着すれば、自動的に検出抗原の存否及び量が測定されるように製作される。したがって、使用が便利であり、現場診断に適するので、専門家だけではなく、一般人も容易に使うことができる。

40

【0072】

前記マイクロチャンネルは、分析試料を注入することができる投入口を含み、分析試料が前記投入口を通じてマイクロチャンネルの内部に流入されれば、マイクロチャンネルを経ながら、検出しようとする抗原を探知(d e t e c t i o n)するか、抗原の量を測定するために、反応試薬などと反応することができる。

【0073】

本発明の具体的な一実施例によれば、検出しようとする抗原の探知のために、蛍光物質などを利用した分析試料のラベリング(l a b e l l i n g)反応または抗原-抗体反応などを利用した分析試料の特異反応(s p e c i f i c r e a c t i o n)などがマイクロチャンネル内でなされうる。すなわち、タンパク質の抗原-抗体特異反応などを用いて

50

、今後センサーなど多様な探知手段を通じて所望の抗原のみを選別的に確認することができる。標識された分析試料は、マイクロチャネルの内部を通過するが、この際、マイクロチャネルの一断面が光学センサーに露出され、それを用いて蛍光シグナルを探知することもできる。

【0074】

構成(b)：試験領域(test zone)

本発明の抗原検出装置において、前記試験領域は、前記マイクロチャネルの一部に形成されており、検出しようとする抗原に特異的に結合する捕獲抗体が表面に結合されているように設計される。

【0075】

構成(c)：標準領域(reference zone)

本発明の抗原検出装置において、前記標準領域は、前記マイクロチャネルの一部に形成されており、検出抗体が特異的に結合するエピトープを含む標準物質が表面に結合されているように設計される。

【0076】

本発明の望ましい具現例によれば、前記装置は、検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されており、前記抗原に特異的に結合する検出抗体をさらに含む。

【0077】

本発明の他の望ましい具現例によれば、前記装置は、前記標識から発生するシグナルを測定する測定手段をさらに含み、または、前記装置は、前記試験領域及び標準領域で測定されたシグナルの強度の比率を計算する分析手段をさらに含む。

【0078】

前記測定手段は、前記検出抗体に結合された標識から発生するシグナルが通過する装置の構成要素を意味し、例えば、光学的要素(optical component)を含む。前記測定手段は、蛍光シグナルを通過させて、シグナル分析手段まで伝達し、部分的に蛍光シグナルを電気的シグナルに変換させることができる。前記測定手段は、本発明による装置と一体化されて存在するか、独立した装置で存在することができる。

【0079】

前記分析手段は、シグナルプロセッサ(signal processor)と同じ意味として使われ、前記試験領域及び標準領域で測定されたシグナルを部分的に変形させるか、シグナルの測定値を補正することができる装置の構成要素を意味する。前記分析手段は、前記光学的要素と同時作用し、蛍光シグナルを電気的シグナルに変換することができる。

【0080】

本発明の方法及び装置は、多様な方式で利用され、例えば、前立腺癌関連抗原を検出する場合、前立腺特異抗原(Prostate Specific Antigen、PSA)を腫瘍標識子として、良性及び悪性の前立腺癌細胞の有無、前立腺癌の再発の有無、危険度、転移有無などの臨床的判断が可能であり、迅速に疾病経過などを報告することができる。また、前立腺癌の治療に使われる薬物の効能評価にも、本発明の方法が利用される。

【実施例】

【0081】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳しく説明する。これら実施例は、単に本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の要旨によって、本発明の範囲が、これら実施例によって制限されないということは、当業者にとって自明である。

【0082】

実施例1：流速(flow rate)補正による検出データ測定

1-1. 本発明の抗原検出方法を利用したPSA検出

本発明で利用した血液試料は、韓国の高麗大学校安山病院診断検査医学科外来検査室に依頼した患者の血液試料を利用し、患者群は、ランダムに選定された。

10

20

30

40

50

【0083】

本発明の方法を利用した検出装置を用いて患者試料内の抗原の量を測定した。前記患者群は、前立腺癌患者であって、前立腺特異的抗原 (Prostate Ap ec i f i c A n t i g e n、P S A) を腫瘍標識子として、患者の血清 (s e r u m) 内に存在する P S A の量を測定した。

【0084】

前立腺特異的抗原 (P S A) は、ほとんど主にヒトの前立腺上皮によって生産される一本鎖 33 k D a 糖タンパク質でヒトの精液中に 0 . 5 ~ 2 . 0 m g / m l の濃度で存在する。前立腺特異抗原は、前立腺の上皮細胞で合成されるタンパク分解酵素で前立腺以外の組織ではほとんど発現されなくて、前立腺癌の選別に利用される有用な腫瘍標識子である。前立腺特異抗原は、前立腺組織には特異的であるが、腫瘍には特異的ではなくて、前立腺肥大症、前立腺炎、前立腺梗塞などでも増加し、前立腺癌の選別検査だけではなく、手術後、再発判定にも有用に利用できる。

10

【0085】

前記患者群で収得した血清試料のうちから、同じ濃度の試料のうち、それぞれ粘性の異なる試料を選別して、本発明を利用した検出装置を利用した抗原測定を実施した。チップ (または、カートリッジ) のサンプル注入 (i n l e t) 部位にサンプル (リボタンパク質リパーゼが存在するか、または存在しない患者血清または血しょう) 30 μ L を落とした。サンプルを落としてから 5 分経過後、チップを本発明による抗原検出装置に挿入した。約 40 秒後に検出装置のディスプレイ画面にサンプル内の前立腺特異抗原の存在程度が定量的に表示され、また、試験領域及び標準領域のシグナル強度値が表示された。

20

【0086】

患者 A より患者 B でのシグナル測定値をそれぞれ測定し、それを用いて試験領域 (T) / 標準領域 (R) のシグナル強度の比率値を算出した (表 1)。各領域のシグナル算出方法は、数式 1 及び数式 2 に表わした。

【0087】

【数 6】

$$\text{試験領域蛍光シグナル} = \int_{X_{tc}-30}^{X_{tc}+30} (X_n - X_b) \dots \quad (\text{数式 1})$$

30

【数 7】

$$\text{標準領域蛍光シグナル} = \int_{X_{rc}-30}^{X_{rc}+30} (X_n - X_b) \dots \quad (\text{数式 2})$$

(X n = n 位置での蛍光シグナル、X t c = 試験領域中央地点の蛍光シグナル、X r c = 標準領域中央地点の蛍光シグナル、X b = マイクロチャンネル 0 ~ 900 の位置のうち、少なくとも 50 地点の蛍光シグナル平均値、0 ~ 900 は、マイクロチャンネル内のシグナル測定領域を一定間隔に分けた区画を意味する)

【0088】

【表 1】

各領域のシグナル及び比率

40

患者群	試験領域 シグナル強度 (T)	標準領域 シグナル強度 (R)	比率 (T/R)
患者 A	500	500	1.0
患者 B	1000	1000	1.0

【0089】

その結果、シグナルの強度のみ比較した時、患者 B のシグナルが高かったが、試験領域と標準領域とのシグナル強度の比率値をそれぞれ算出した結果、両患者の試料内の前立腺特異抗原量は同じであると分析された。

50

【 0 0 9 0 】

前記表 1 の結果と共に、各試験領域と標準領域とのシグナル強度の比率値で発生する標準偏差 (CV、%) 値を算出した (表 2)。分析試料のうち、1つを選択して、5個のカートリッジに同じ分析試料をそれぞれ分周した後、分析を実施した。

【 0 0 9 1 】

【表 2】

—	試験領域 シグナル (T)	標準領域 シグナル (R)	比率 (T/R)
カートリッジ 1	21302	74288	3.487
カートリッジ 2	24603	84160	3.421
カートリッジ 3	26133	93322	3.571
カートリッジ 4	30427	104619	3.438
カートリッジ 5	32557	112542	3.457
標準偏差	16.72	16.36	1.70

10

【 0 0 9 2 】

その結果、試験領域と標準領域とのシグナルは、各分析カートリッジごとに少しずつ差があるが、試験領域シグナル / 標準領域シグナルの比率値 (T/R) は、ほぼ一定に表われた。

20

【 0 0 9 3 】

1 - 2 . 本発明の抗原検出方法の条件確立

本発明の抗原検出方法の目的は、分析試料の流動を調節し、反応時間を調節して、流動反応で見られる短所を除去して、反応感度を最大限高めることなので、このような目的が達成されるか否かと関連した実験を実施した。すなわち、本発明の抗原検出方法を通じて測定されたシグナル測定値が有効であるか否かを検証するために、エラー率分析を実施し、エラー率の算出方法は、数式 3 ないし数式 5 のようである。反応開始領域の蛍光シグナルは、 $X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) - 30$ 地点から $X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) + 30$ 地点まで各地点のシグナル平均値であり、反応終了領域の蛍光シグナルは、 $X_{rc} + (X_{rc} - X_{tc}) - 30$ 地点から $X_{rc} + (X_{rc} - X_{tc}) + 30$ 地点まで各地点のシグナル平均値である。

30

【 0 0 9 4 】

【数 8】

$$\text{反応開始領域の蛍光シグナル} = \left(\sum_{X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) - 30}^{X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) + 30} X_n \right) / 60 \quad \dots \quad (\text{数式 3})$$

【数 9】

$$\text{反応終了領域の蛍光シグナル} = \left(\sum_{X_{rc} + (X_{rc} - X_{tc}) - 30}^{X_{rc} + (X_{rc} - X_{tc}) + 30} X_n \right) / 60 \quad \dots \quad (\text{数式 4})$$

($X_n = n$ 位置での蛍光シグナル、 $X_{tc} =$ 試験領域中央地点の蛍光シグナル、 $X_{rc} =$ 標準領域中央地点の蛍光シグナル)

40

【数 10】

$$\text{エラー率 (\%)} = [| (\text{反応開始領域のシグナル} - \text{反応終了領域のシグナル}) | / \text{反応開始領域のシグナル}] \times 100 \quad \dots \quad (\text{数式 5})$$

それぞれの試料が注入されるマイクロチップ、すなわち、カートリッジ (1 ~ 5) で反応開始領域及び反応終了領域でのシグナルを測定し、前記反応開始領域及び反応終了領域からエラー率を算出した (表 3 及び図 1 参照)。

【 0 0 9 5 】

【表 3】

エラー率測定

-	反応開始領域 シグナル	反応終了領域 シグナル	エラー率 (%)	測定装置表示部
カートリッジ 1	252	263	4.34	正常 (normal)
カートリッジ 2	309	308	0.46	正常 (normal)
カートリッジ 3	530	960	81.23	不适当 (inadequacies)
カートリッジ 4	282	329	16.68	正常 (normal)
カートリッジ 5	250	288	15.47	正常 (normal)

10

【0096】

その結果、カートリッジ 3 の分析試料でエラー率が最も高く測定され、エラー率が 20 % 以上である場合、分析試料の濃度を調整した後、分析を再実施した。

20

【0097】

実施例 2：分析試料の濃度による検出データの比較

本発明の検出方法及び既存の抗原検出方法 (R a b b i t I g G 標準システム) を用いて、分析試料が高濃度である場合の測定結果値の解像度を比較試験を実施した。

【0098】

2 - 1 . 既存の抗原検出方法を利用した P S A 検出

本発明の方法による前立腺特異抗原の検出結果に対する参考値として、下記のように前立腺特異抗原の検出実験を実施した。

【0099】

本発明に利用した試料のうち、非線形区間の高濃度患者試料を選別して、本発明を利用した検出装置を用いて測定を実施した。チップのサンプル注入部位にサンプル (リポタンパク質リパーゼが存在するか、または存在しない患者血清または血しょう) 30 μ L を落とした。サンプルを落としてから 5 分経過後、チップを本発明による抗原検出装置に挿入した。約 40 秒後に検出装置のディスプレイ画面にサンプル内の前立腺特異抗原の存在程度が定量的に表示され、また、試験領域及び標準領域のシグナル強度値が表示された。

30

【0100】

その結果、分析試料の濃度が高くなるほど、試験領域 / 標準領域のシグナル強度の比率の増加する幅が減少することを確認することができた (図 2 A)。

【0101】

2 - 2 . 本発明の方法を利用した P S A 検出

本発明の検出方法を用いて P S A の検出実験を下記のように実施した。

前記実施例 2 - 1 のような実験方法を実施し、同じ試料を使った。

その結果、分析試料の濃度が高くなるほど、試験領域 / 標準領域のシグナル強度の比率も一定に増加して、線形比例的なグラフを表わすことを確認することができた (図 2 B)。

40

【0102】

実施例 3：測定温度による検出データの比較

本発明の検出方法及び既存の抗原検出方法 (R a b b i t I g G 標準システム) を用いて比較試験を実施した。

50

【 0 1 0 3 】

3 - 1 . 既存の抗原検出方法を利用した P S A 検出

本発明の方法による P S A の検出結果に対する参考値として、下記のように P S A の検出実験を実施した。

【 0 1 0 4 】

本発明に利用した試料のうち、線形区間の一濃度の患者試料を使って、それぞれ 1 3 . 8 、 2 4 . 2 、 及び 2 9 . 7 の温度の環境で試験を実施した。チップをそれぞれの温度に合わせてあらかじめセッティングした後、チップのサンプル注入部位にサンプル（リポタンパク質リパーゼが存在するか、または存在しない患者血清または血しょう）3 0 μ L を落とす。サンプルを落としてから 5 分経過後、チップを本発明による抗原検出装置に挿入した。約 4 0 秒後に検出装置のディスプレイ画面にサンプル内の前立腺特異抗原の存在程度が定量的に表示され、また、試験領域及び標準領域のシグナル強度値が表示された。

10

【 0 1 0 5 】

その結果、測定温度が高くなるほど、試験領域 / 標準領域のシグナル強度の比率も共に増加することを確認することができた（図 3 A ）。これにより、抗原 - 抗体反応が温度によって増加することを確認した。

【 0 1 0 6 】

3 - 2 . 本発明の方法を利用した P S A 検出

本発明の検出方法を用いて P S A の検出実験を下記のように実施した。

20

【 0 1 0 7 】

前記実施例 3 - 1 のような実験方法を使い、同じ試料を使って実施した。

【 0 1 0 8 】

その結果、測定温度の変化にも拘らず、試験領域 / 標準領域のシグナル強度の比率がほぼ一定に保持されることを確認することができた（図 3 B ）。

【 0 1 0 9 】

実施例 4 : 同一検体に対する温度による温度変異係数の測定

本発明の検出方法が温度に影響を受けるかを調べるために、下記のように温度による変異係数の測定実験を実施した。前記 R a b b i t I g G 標準システム、T a q I g G 標準システム、本発明の検出方法（P S A 標準システム）及びバイオサイト社（米国登録特許第 6 , 1 9 4 , 2 2 2 号）の抗原検出方法を用いて比較試験を実施した。

30

【 0 1 1 0 】

前記実施例 3 - 1 のような実験方法を使い、同じ試料を使って実施する。

【 0 1 1 1 】

それぞれ 3 種の温度で試験領域及び標準領域のシグナルを測定し、それをグラフ上に表現するために、表現値を算出した。表現値は、次のように計算される。試験領域にのみ特異的に反応する各濃度別の標準物質を使って、標準濃度グラフを描く。そのグラフに相応する関数を本発明に利用された検出装置のコードチップに入力させる。その結果、試験領域に出たシグナルは、それに相応する濃度の表現値を算出させた（表 4 及び表 5 ）。その結果、R a b b i t I g G 標準システム（図 4 A 及び図 4 B、温度による変異係数 3 3 % ）、T a q I g G 標準システム（図 5 A 及び図 5 B、温度による変異係数 3 6 . 9 % ）、及びバイオサイト社の検出方法（図 7、温度による変異係数 3 1 . 0 % ）を利用した時は、測定温度が増加するにつれて、試験領域 / 標準領域のシグナル強度の比率値が増加して、温度変化によって P S A の検出量が変わることを確認することができた。一方、本発明の方法を利用した時、P S A の表現値は、1 3 . 8 、 2 4 . 2 、 及び 2 9 . 7 でそれぞれ 4 . 3 5 、 4 . 0 1 、 及び 4 . 4 5 に測定され、したがって、温度の変化にほとんど影響を受けないことが示された（図 6 A 及び図 6 B、温度による変異係数 5 . 5 % ）。

40

【 0 1 1 2 】

変異係数 = 標準偏差 / 平均値 × 1 0 0 . . . （数式 6 ）

50

【 0 1 1 3 】

【 表 4 】

本発明の検出方法による温度による変異係数の確認

1. Rabbit-Goat anti Rabbit			
温度	13.8°C	24.2°C	29.7°C
テストゾーン (T)	17508	46064.8	54976.6
レファレンスゾーン (R)	47493.8	60212.6	57960.8
比率 (T/R)	0.36	0.78	0.96
比率の表現値	3.25	7.94	10.32
温度による変異係数	33%		
2. Taq-Mouse anti Taq			
温度	13.8°C	24.2°C	29.7°C
テストゾーン (T)	23712.8	42231.4	50583
レファレンスゾーン (R)	43406.2	54236.2	49724.5
比率 (T/R)	0.55	0.78	1.03
比率の表現値	5.27	7.94	11.28
温度による変異係数	36.9%		
3. Rabbit-Goat anti Rabbit			
温度	13.8°C	24.2°C	29.7°C
テストゾーン (T)	25488.4	34305.2	47303.0
レファレンスゾーン (R)	54916.4	79658.4	100845.4
比率 (T/R)	0.46	0.43	0.47
比率の表現値	4.35	4.01	4.45
温度による変異係数	5.5%		

10

20

30

【 0 1 1 4 】

【 表 5 】

バイオサイト社 (Biosite) 分析法による
温度による変異係数の確認

比率 (T/R) の表現値 測定回数	14°C	24.8°C	29.6°C
1	10.1	15.1	19.8
2	9.87	15.3	17.5
3	8.69	14.6	-
4	9.32	13.5	19.9
5	10.7	13.8	17.1
平均	9.736	14.46	18.575
標準偏差	0.765983	0.789303	1.481834
変異係数 (CV%)	7.867533	5.45853	7.977574

40

【 0 1 1 5 】

実施例 5 : 高濃度分析試料の検出データの比較 1

本発明の検出方法及び既存の抗原検出方法 (Rabbit IgG 標準システム) を用

50

いて、分析試料が高濃度である場合の測定結果値の解像度の比較試験を実施した。PSA抗原として、ヒト精液(Bios Pacific, J63000)を利用し、実験方法は、前記実施例2のようである。

【0116】

表6は、本発明の方法を利用した前立腺特異抗原(PSA)標準システムを使って、分析試料の濃度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値を測定した結果を表わしたものである。

【0117】

【表6】

PSA濃度によるシグナル強度の確認

PSA濃度 (ng/ml)	テストゾーン (Tz)	レファレンスゾーン (Rz)	T/R比率
0.45	1385	63039	0.02
5.9	22764	73660	0.31
11.7	26354	48260	0.55
23.4	61881	57307	1.08
46.9	80387	64155	1.25
93.8	85358	47459	1.80
188	127889	51162	2.50
375	156706	42899	3.65
750	168668	29439	5.73
1500	140212	16517	8.49

10

20

【0118】

図8から見られるように、既存のGoat抗Rabbit IgG-Rabbit IgGシステムを利用した場合、分析試料の濃度が高くなるほど、試験領域/標準領域のシグナル強度の比率の増加する幅が減少し、PSA濃度100ng/ml以上ではグラフの傾きが急減して、100ng/ml以上の抗原は定量的分析が不可能であった(図8)。

30

【0119】

しかし、本発明の方法を利用した場合、1500ng/mlの濃度でも、試料の定量的検出が可能であり、図8のグラフを利用する場合、1500ng/ml以上の濃度でも、抗原の検出が可能であることが分かった。

【0120】

実施例6：高濃度分析試料の検出データの比較2

本発明の検出方法及び既存の抗原検出方法(Rabbit IgG標準システム)を用いて、分析試料が高濃度である場合の測定結果値の解像度を比較試験した。PSA高濃度検体として、Beckman Coulter UNICELL DXI 800、Access Hybritech PSAで測定して、8720ng/mlに確認された検体を使い、実験方法は、前記実施例2のようである。

40

【0121】

図9A及び図9Bは、本発明の方法を利用した前立腺特異抗原(PSA)標準システム、及び既存の抗原検出方法(Rabbit IgG標準システム)を用いて、PSAの濃度による試験領域/標準領域のシグナル強度の比率値を測定した結果を表わしたものである。表7は、それぞれの試料でシグナルを2回測定した値を平均して表わしたものである。

【0122】

図9及び表7から見られるように、本発明の方法を利用した場合、4360ng/ml

50

の P S A 抗原の検出 / 測定が可能であったが (図 9 A)、既存の G o a t 抗 R I g G - R I g G システムを利用した場合、抗原の濃度が 2 7 2 . 5 n g / m l 以上である場合、フック効果が表われて、抗原の定量的分析が不可能であった (図 9 B)。

【 0 1 2 3 】

【 表 7 】

PSA濃度によるシグナル強度の確認

PSA濃度 (n g / m l)	本発明の方法 T / R 比率	R a b b i t I g G 標準 システム T / R 比率
0.07	0.00	0.008
0.13	0.01	0.015
0.27	0.01	0.032
0.53	0.02	0.046
1.06	0.04	0.108
2.13	0.08	0.253
4.26	0.14	0.425
8.52	0.25	0.620
17.03	0.41	1.007
34.06	0.73	1.427
68.13	1.05	2.364
136.25	1.32	2.694
272.50	1.69	2.934
545.00	2.09	3.023
1090.00	2.80	2.849
2180.00	3.58	2.434
4360.00	4.09	1.927

10

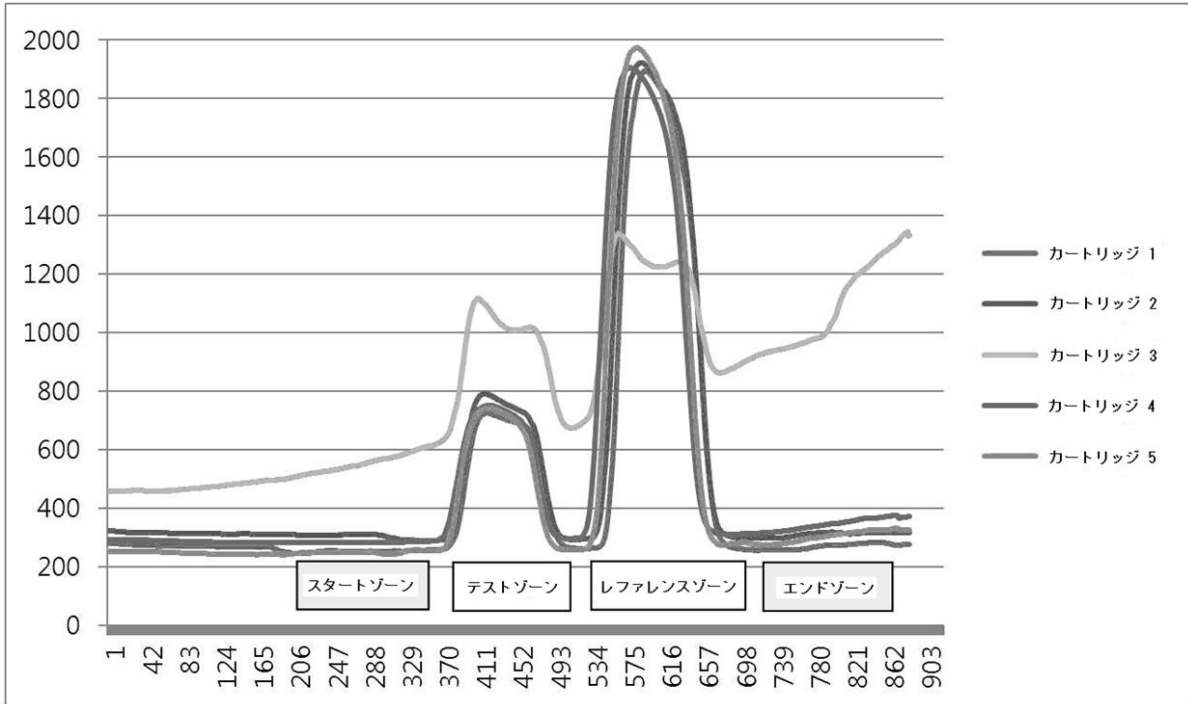
20

30

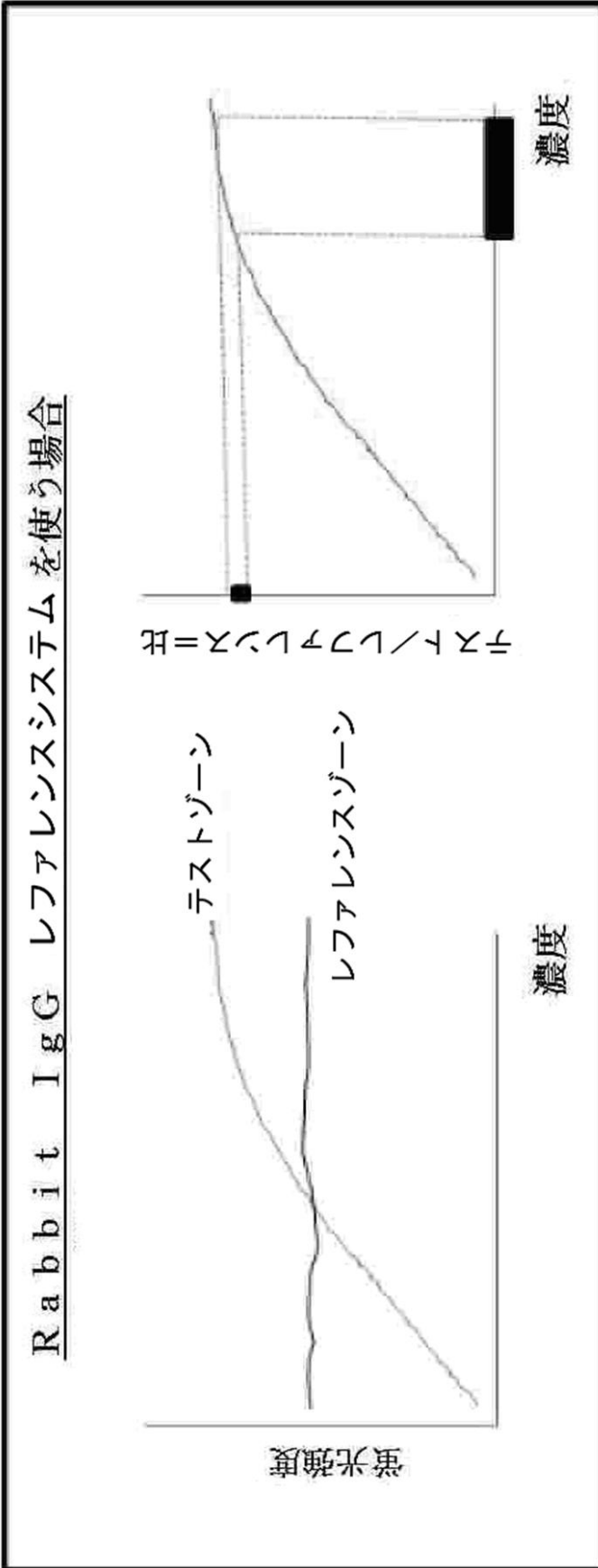
【 0 1 2 4 】

以上、本発明の特定の部分を詳しく記述したので、当業者にとって、このような具体的な技術は、単に望ましい具現例であり、これにより、本発明の範囲が制限されるものではないという点は明白である。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物とによって定義される。

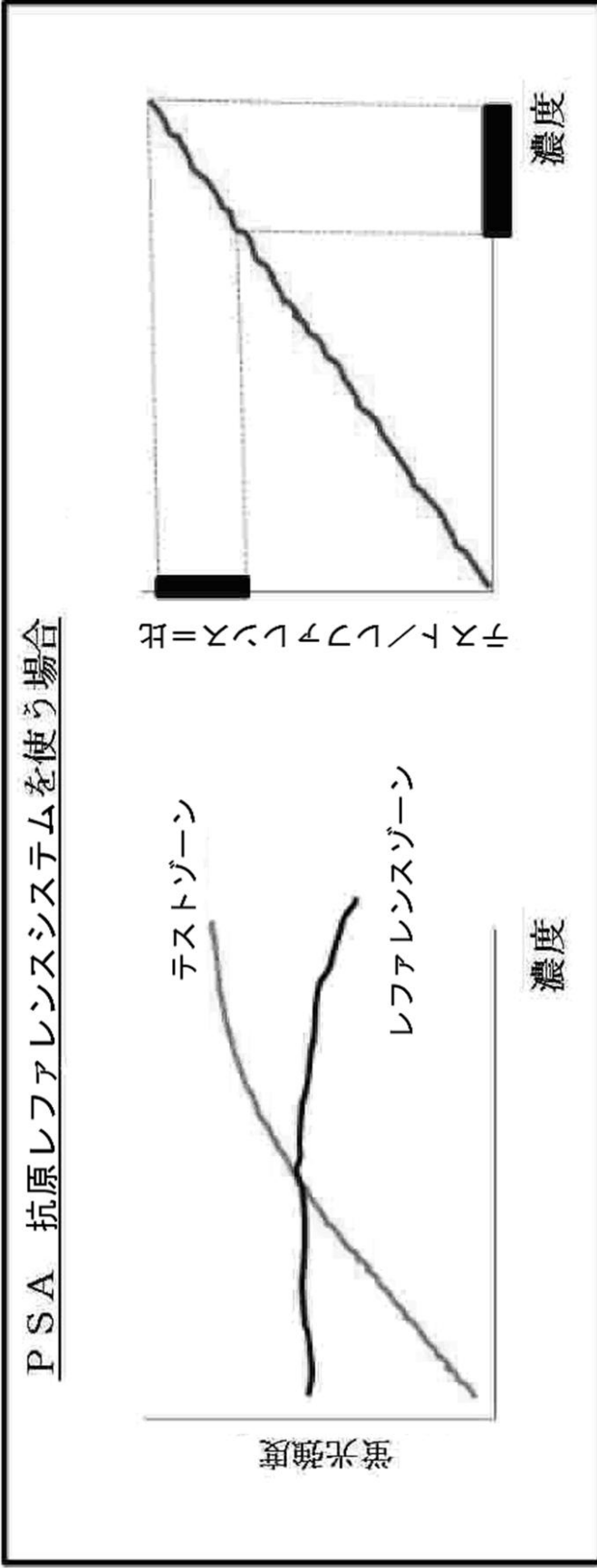
【 図 1 】



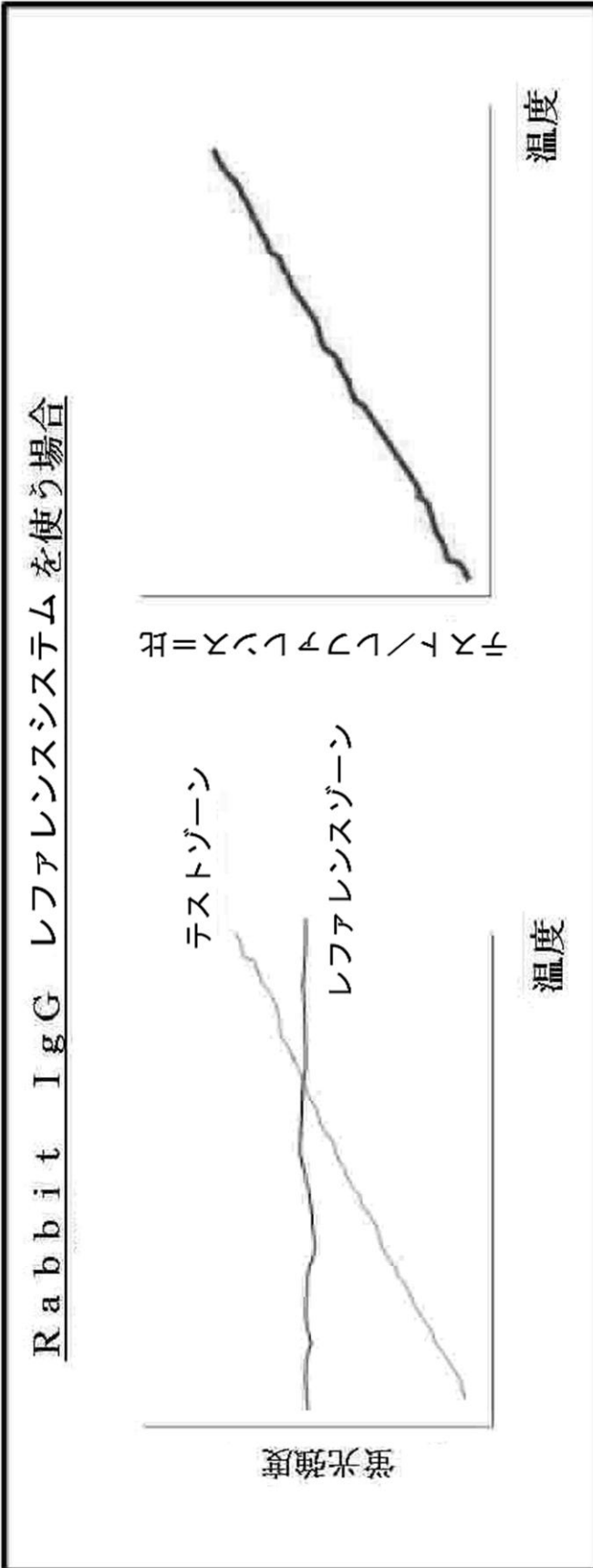
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

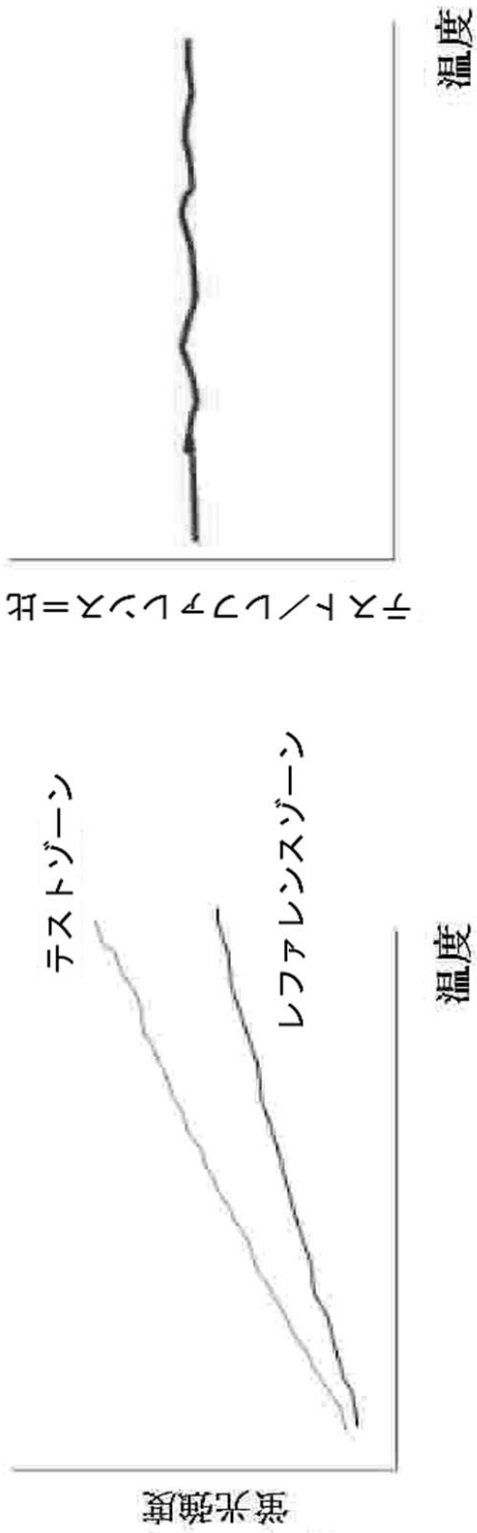


【 図 3 A 】

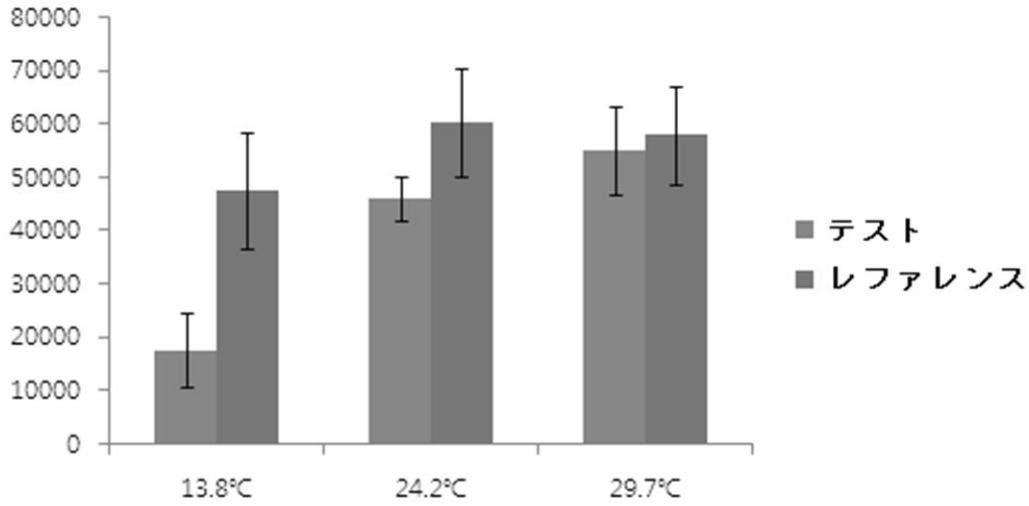


【図 3 B】

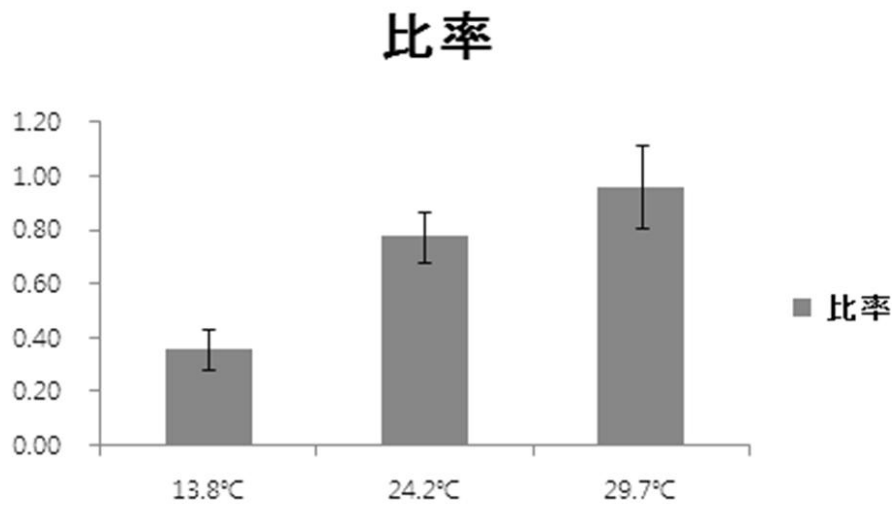
PSA 抗原レファレンスシステムを使う場合



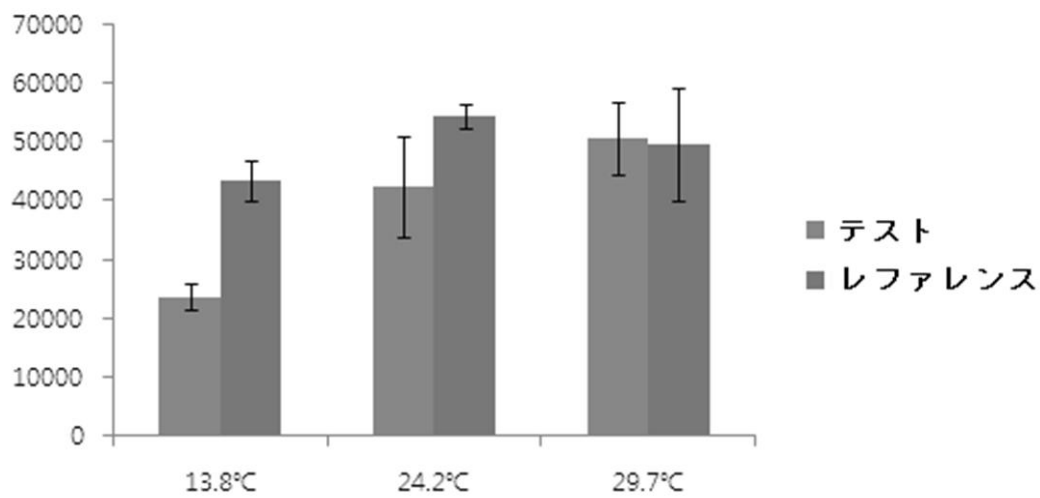
【図 4 A】



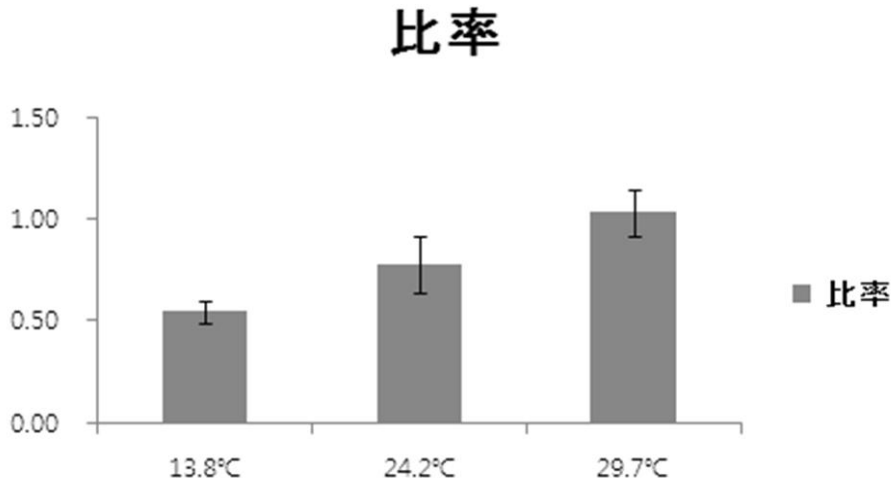
【図 4 B】



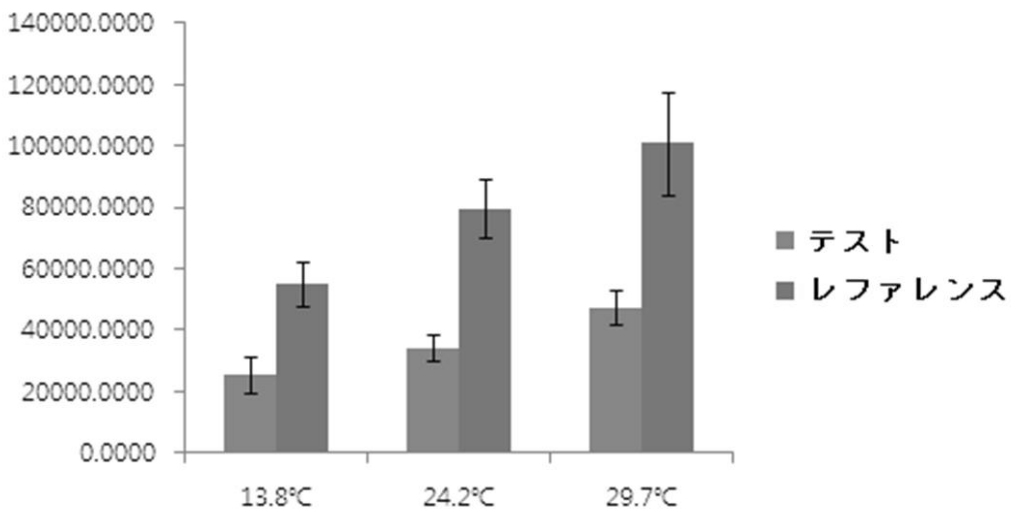
【図 5 A】



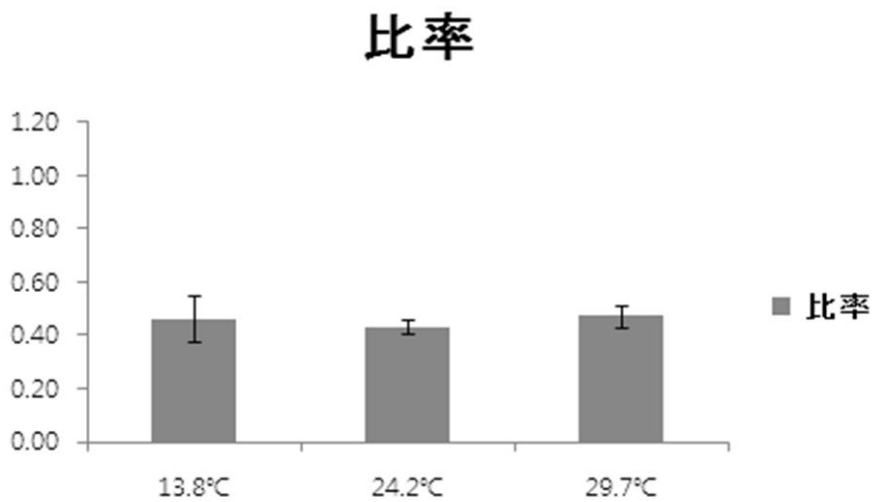
【図 5 B】



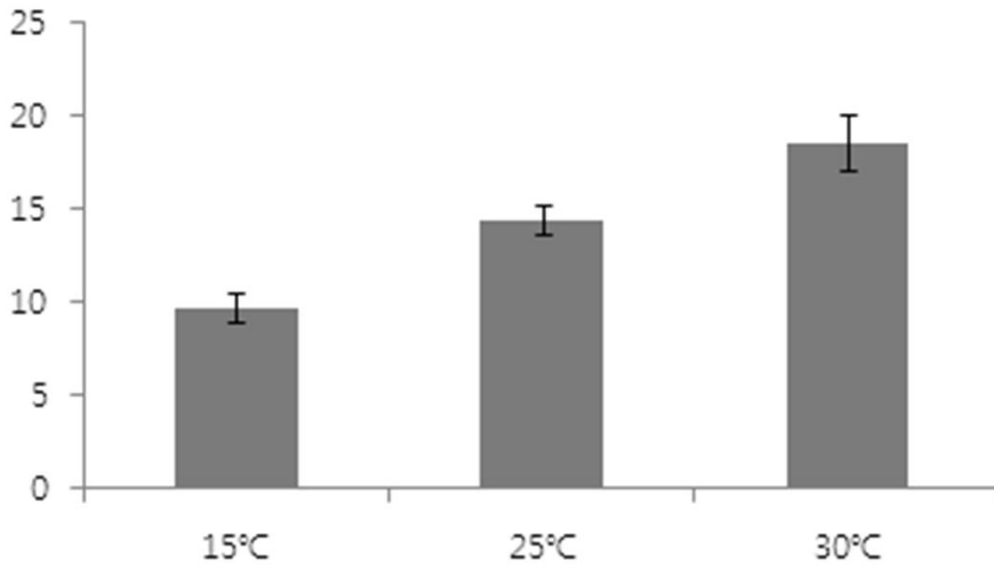
【図 6 A】



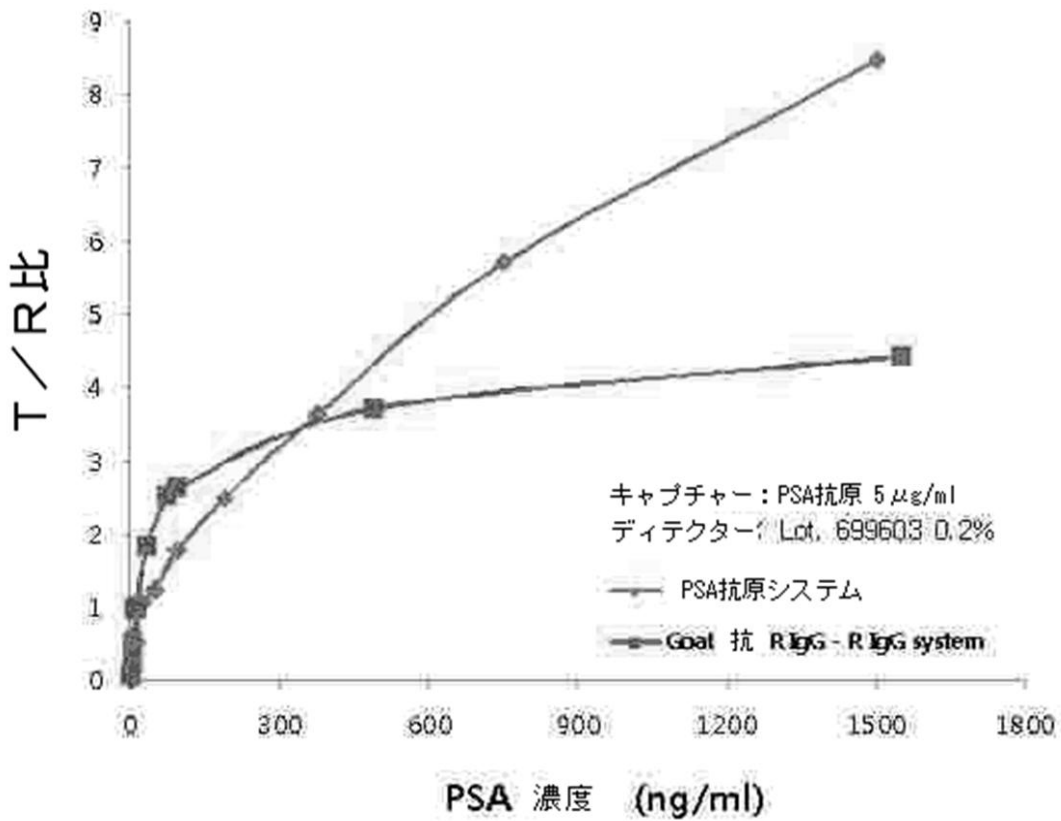
【図 6 B】



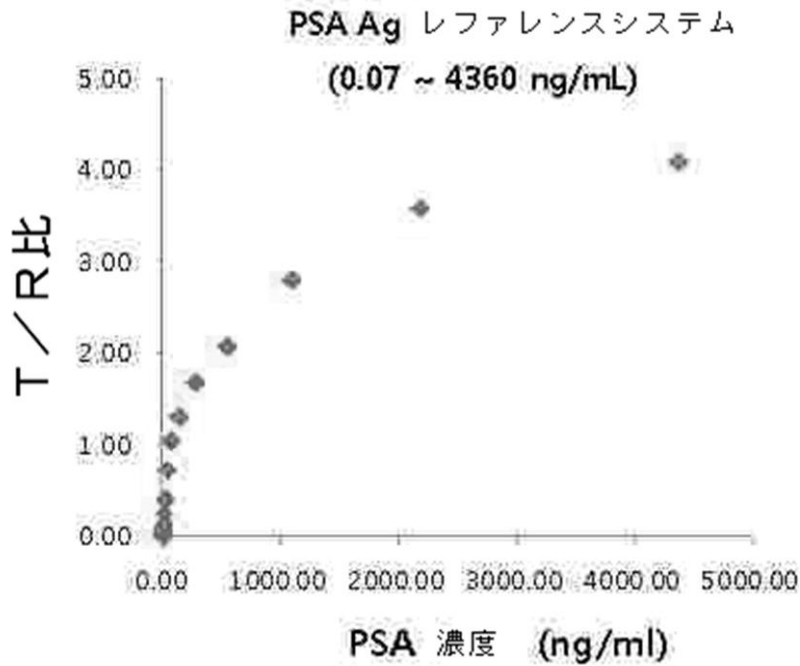
【図7】



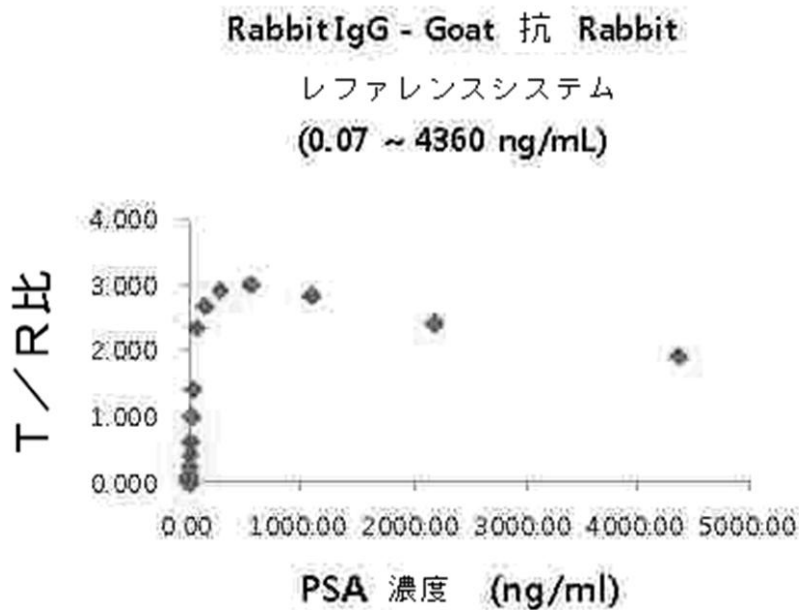
【図8】



【図 9 A】



【図 9 B】



【手続補正書】

【提出日】平成26年8月20日(2014.8.20)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の段階を含む分析試料内の抗原の検出方法：

(a) 検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されており、前記抗原に特異的に結合する検出抗体と分析試料とを接触させる段階；

(b) 検出しようとする抗原に特異的に結合する捕獲抗体を前記段階(a)の結果物に接触させる段階；

(c) 前記検出抗体が特異的に結合するエピトープを含み、固相基質表面に結合されている標準物質に前記検出可能なシグナルを発生させる標識が結合されている検出抗体を接触させる段階；

(d) 前記段階(b)の結果物及び段階(c)の結果物の標識から発生するシグナルを測定する段階；及び

(e) 前記測定されたシグナルを分析して、前記分析試料内の抗原の存否または量を決定する段階；

前記段階(a)～(d)、または前記段階(b)～(d)は、マイクロチャネルが備えられたマイクロチップで実施され、前記シグナル分析は、前記マイクロチャネルによって提供される反応開始領域、試験領域、標準領域、及び反応終了領域でのシグナルを測定して実施される。

【請求項2】

前記捕獲抗体は、固相基質表面に結合されていることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記捕獲抗体及び標準物質は、反応物の連続した流れが行われる1つのマイクロチップの基質表面上に存在することを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記マイクロチップのマイクロチャネルは、試験領域及び標準領域を含み、前記試験領域の表面に前記捕獲抗体が結合されており、前記標準領域に前記標準物質が結合されていることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記分析試料は、前記マイクロチップに適用され、前記適用された分析試料は、前記マイクロチャネルに形成された流れを通じて、前記試験領域及び標準領域と接触することを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記分析試料は、前記試験領域及び標準領域を順次に接触するか、または前記標準領域及び試験領域を順次に接触することを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記標準物質は、前記抗原と同じ物質または前記エピトープを含む前記抗原の断片であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記測定されたシグナルの分析は、前記段階(b)の結果物及び段階(c)の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率を計算することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記測定されたシグナルの分析は、前記試験領域及び標準領域で測定されたシグナルのエラー率を計算する分析段階をさらに含むことを特徴とする方法であって、前記エラー率は、前記試験領域及び標準領域から一定距離に位置する反応開始領域及び反応終了領域のシグナルを測定して実施され、前記反応開始領域及び反応終了領域から算出したエラー率が20%以上である場合には、前記シグナル分析を再実施し、前記エラー率は、

$$\left[\frac{\text{（反応開始領域のシグナル - 反応終了領域のシグナル）}}{\text{反応開始領域のシグナル}} \right] \times 100$$

で算出することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記分析試料は、全血、血しょう、血清、体液、または細胞培養上澄み液であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記抗原は、薬物、毒素、自己抗体、自己抗原、タンパク質、炭水化物、核酸、または癌関連抗原であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記抗原は、癌関連抗原であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記段階 (a) の分析試料の濃度に対して線形比例的であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記方法が実施される温度の変化に対して影響を受けないことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 5】


前記段階 (b) の結果物及び段階 (c) の結果物の標識から発生するシグナルの強度の比率値は、前記方法が実施される温度範囲 1 0 ~ 3 0 で同じ値を表わすことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/001340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/532(2006.01)i, G01N 33/543(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i 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) G01N 33/53; G01N 33/543; G01N 33/532; G01N 33/574 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: test zone, reference zone, antibody, immunoassay, epitope		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2008-0012852 A (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC.) 12 February 2008 See the claims, paragraphs [0029]-[0030], [0053]-[0055] and [0074]-[0078], the examples.	1-31
A	KR 10-2006-0126964 A (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC.) 11 December 2006 See the entire document.	1-31
A	WO 01-13116 A1 (UNILEVER PLC et al.) 22 February 2001 See the entire document.	1-31
A	WO 03-058242 A2 (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC.) 17 July 2003 See the entire document.	1-31
<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: "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 26 JUNE 2013 (26.06.2013)		Date of mailing of the international search report 03 JULY 2013 (03.07.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/001340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0012852 A	12.02.2008	CN 101326440 A	17.12.2008
		CN 101326440 B	24.04.2013
		EP 1875242 A1	09.01.2008
		JP 2008-539424A	13.11.2008
		US 2006-0246601 A1	02.11.2006
		US 7439079 B2	21.10.2008
		WO 2006-118647 A1	09.11.2006
KR 10-2006-0126964 A	11.12.2006	CN 1879019 A	13.12.2006
		CN 1879019 B	17.08.2011
		EP 1685403 A1	02.08.2006
		US 2004-0230352 A1	18.11.2004
		US 2005-0112780 A1	26.05.2005
		US 2007-0124042 A1	31.05.2007
		US 7634334 B2	15.12.2009
		US 7640083 B2	29.12.2009
		US 7781172 B2	24.08.2010
		WO 2005-057214 A1	23.06.2005
WO 01-13116 A1	22.02.2001	AT 269976 T	15.07.2004
		AU 2000-61544 A1	13.03.2001
		AU 2000-61544 B2	23.09.2004
		AU 6154400 A	13.03.2001
		AU 776885 B2	23.09.2004
		CA 2381495 A1	22.02.2001
		DE 60011776 D1	29.07.2004
		EP 1200826 A1	02.05.2002
		EP 1200826 B1	23.06.2004
		JP 2003-522324 A	22.07.2003
		WO 01-13116 A1	22.02.2001
WO 03-058242 A2	17.07.2003	AU 2002-357754 A1	24.07.2003
		AU 2002-365040 A1	24.07.2003
		BR 0215327 A	06.06.2006
		CA 2471462 A1	17.07.2003
		CN 100501406 C	17.06.2009
		CN 1608207 A	20.04.2005
		EP 1459068 A2	22.09.2004
		EP 1459068 B1	18.08.2010
		KR 10-1043888 B1	22.06.2011
		MX PA04006215A	01.11.2004
		RU 2004122925 A	20.04.2005
		TW 587166 A	11.05.2004
		TW 594010 A	21.06.2004
		TW 594010 B	21.06.2004
		US 2003-0119203 A1	26.06.2003
		US 2003-0119204 A1	26.06.2003
US 2003-0124739 A1	03.07.2003		
US 2010-0062543 A1	11.03.2010		


INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2013/001340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 6837171 B1	04.01.2005
		US 7651841 B2	26.01.2010
		US 8137985 B2	20.03.2012
		WO 03-058242 A2	17.07.2003
		WO 03-058242 A3	30.10.2003
		WO 03-058246 A1	17.07.2003

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2013/001340

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/53(2006.01), G01N 33/532(2006.01), G01N 33/543(2006.01), G01N 33/574(2006.01)		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/53; G01N 33/543; G01N 33/532; G01N 33/574 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: test zone, reference zone, antibody, immunoassay, epitope		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2008-0012852 A (킴벌리-클라크 월드와이드, 인크.) 2008.02.12 청구항, 식별번호 [0029]-[0030], [0053]-[0055], [0074]-[0078], 실시예 참조.	1-31
A	KR 10-2006-0126964 A (킴벌리-클라크 월드와이드, 인크.) 2006.12.11 전문참조.	1-31
A	WO 01-13116 A1 (UNILEVER PLC 외 3명) 2001.02.22 전문참조.	1-31
A	WO 03-058242 A2 (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC.) 2003.07.17 전문참조.	1-31
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 06월 26일 (26.06.2013)	국제조사보고서 발송일 2013년 07월 03일 (03.07.2013)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 이미욱 전화번호 82-42-481-5549	

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2013/001340

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일		
KR 10-2008-0012852 A	2008.02.12	CN 101326440 A	2008.12.17		
		CN 101326440 B	2013.04.24		
		EP 1875242 A1	2008.01.09		
		JP 2008-539424A	2008.11.13		
		US 2006-0246601 A1	2006.11.02		
		US 7439079 B2	2008.10.21		
		WO 2006-118647 A1	2006.11.09		
		KR 10-2006-0126964 A	2006.12.11	CN 1879019 A	2006.12.13
CN 1879019 B	2011.08.17				
EP 1685403 A1	2006.08.02				
US 2004-0230352 A1	2004.11.18				
US 2005-0112780 A1	2005.05.26				
US 2007-0124042 A1	2007.05.31				
US 7634334 B2	2009.12.15				
US 7640083 B2	2009.12.29				
US 7781172 B2	2010.08.24				
WO 2005-057214 A1	2005.06.23				
WO 01-13116 A1	2001.02.22			AT 269976 T	2004.07.15
		AU 2000-61544 A1	2001.03.13		
		AU 2000-61544 B2	2004.09.23		
		AU 6154400 A	2001.03.13		
		AU 776885 B2	2004.09.23		
		CA 2381495 A1	2001.02.22		
		DE 60011776 D1	2004.07.29		
		EP 1200826 A1	2002.05.02		
		EP 1200826 B1	2004.06.23		
		JP 2003-522324 A	2003.07.22		
		WO 01-13116 A1	2001.02.22		
		WO 03-058242 A2	2003.07.17	AU 2002-357754 A1	2003.07.24
				AU 2002-365040 A1	2003.07.24
BR 0215327 A	2006.06.06				
CA 2471462 A1	2003.07.17				
CN 100501406 C	2009.06.17				
CN 1608207 A	2005.04.20				
EP 1459068 A2	2004.09.22				
EP 1459068 B1	2010.08.18				
KR 10-1043888 B1	2011.06.22				
MX PA04006215A	2004.11.01				
RU 2004122925 A	2005.04.20				
TW 587166 A	2004.05.11				
TW 594010 A	2004.06.21				
TW 594010 B	2004.06.21				
US 2003-0119203 A1	2003.06.26				
US 2003-0119204 A1	2003.06.26				
US 2003-0124739 A1	2003.07.03				
US 2010-0062543 A1	2010.03.11				

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/001340

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 6837171 B1	2005.01.04
		US 7651841 B2	2010.01.26
		US 8137985 B2	2012.03.20
		WO 03-058242 A2	2003.07.17
		WO 03-058242 A3	2003.10.30
		WO 03-058246 A1	2003.07.17

フロントページの続き

(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, RU, TJ, 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, RO, 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, BN, 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, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, 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, PA, 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

(72) 発明者 チョン・チャンイル

大韓民国 135 - 092 ソウル カンナム - ク ハクトン - ロ 432 ロッテ アパート
103 - 204

(72) 発明者 リ・チャンソプ

大韓民国 425 - 878 キョンギ - ド アンサン - シ ダンウォン - ク チョジ 2 - ロ 4
2 ジュゴン グリーンヴィル アパート 1104 - 305

(72) 発明者 ハン・ジョンク

大韓民国 426 - 816 キョンギ - ド アンサン - シ サンノク - ク チュンジャン - ロ 3
アン - ギル 33 ハニャン アパート 25 - 1301

(72) 発明者 チョン・ジュンシク

大韓民国 412 - 745 キョンギ - ド コヤン - シ トギャン - ク ペギャン - ロ 27 オ
クビットマウル 14 - ダンジ アパート 1403 - 1701

【要約の続き】

の存否及び量を現場診断で即時把握することができる。

专利名称(译)	检测新抗原的方法和使用该方法的装置		
公开(公告)号	JP2015508176A	公开(公告)日	2015-03-16
申请号	JP2014558677	申请日	2013-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	纳米恩科技有限公司 NANOENITEK		
申请(专利权)人(译)	Nanoenteku公司		
[标]发明人	チヨンチャンイル リチャンソプ ハンジョンク チヨンジュンシク		
发明人	チヨン・チャンイル リ・チャンソプ ハン・ジョンク チヨン・ジュンシク		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/543.501.L G01N33/53.D G01N37/00.101		
代理人(译)	广田幸一		
优先权	1020120017039 2012-02-20 KR		
其他公开文献	JP6174052B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供检测分析样品中的抗原的方法，该方法包括：(a) 将分析样品与检测抗体接触，检测抗体与产生可检测信号的标记物组合并与抗原特异性结合；(b) 使捕获抗体与步骤(a)的所得产物接触，所述捕获抗体特异性结合待检测抗原；(c) 将检测抗体与参照物质接触，所述参照物质与固体底物的表面结合，所述参照物质包含检测抗体特异性结合的表位；(d) 测量由步骤(b)的所得产物的标记和步骤(c)的所得产物产生的信号；和(e) 分析测量的信号以确定分析样品中抗原的存在或不存在和量。本发明的检测抗原的方法可以控制分析样品的流动和反应时间，从而提高灵敏度并且使分析样品浓度或检测反应温度的影响最小化，从而提高稳定性，与传统的抗原检测方法相比，数据的可靠性和再现性更高。因此，本发明的用于检测抗原的方法和装置可以在没有专业技能的情况下容易地操作，从而通过现场立即获得分析样品中检测抗原的存在或缺乏和量诊断。

