(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2005-529334
(P2005-529334A)
(43)公表日　平成17年9月29日(2005.9.29)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/53	G01N 33/53	Z	2G054
G01N 21/76	G01N 33/53	N	
G01N 21/78	G01N 21/76		
G01N 37/00	G01N 21/78	C	
	G01N 37/00	102	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 32 頁）

(21)出願番号　特願2004-511828 (P2004-511828)
(86)(22)出願日　平成15年1月14日 (2003.1.14)
(85)翻訳文提出日　平成17年2月7日 (2005.2.7)
(86)国際出願番号　PCT/CN2003/000026
(87)国際公開番号　WO2003/104808
(87)国際公開日　平成15年12月18日 (2003.12.18)
(31)優先権主張番号　02113834.6
(32)優先日　平成14年6月6日 (2002.6.6)
(33)優先権主張国　中国(CN)

(71)出願人　504448922
成都夸常科技有限公司
中国四川省成都市桐梓林中路１号
(74)代理人　100070024
弁理士　松永　宣行
(74)代理人　100125081
弁理士　小合　宗一
(74)代理人　100125092
弁理士　佐藤　玲太郎
(72)発明者　▲ぞう▼　方霖
中国四川省成都市高新区玉林南路６４号１幢４単元１２号
(72)発明者　▲ちぇん▼　春生
中国四川省成都市▲ろん▼舟路６３号１３幢２単元４号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗原抗体反応に基づくプローブ・プレート、テスト・キットおよび使用方法

(57)【要約】
本発明は、Ａ．プローブ抗体およびプローブ抗原の組み合わせと、Ｂ．異なる構造特異的な免疫グロブリンに対するプローブの抗抗体の組み合わせと、Ｃ．異なる構造特異的な免疫グロブリンに対するプローブの抗抗体と、プローブの抗原および／またはプローブの抗体との組み合わせとのうちの少なくとも１つのプローブの組み合わせが直接的または間接的に固定化される、少なくとも１個の反応器を含む生物学的試料のアッセイ用のプローブ・プレートに関する。本発明は、このプローブ・プレートを含むテストキットと、該キットを用いることによって生物学的試料をテストする方法とにも関する。このプローブ・プレートは、前記プローブの組み合わせに対応する異なる標的分子を分析するために使用可能である。このキットを用いることによって、反応器の数と、分析に要する検出時間とが減少する一方、検出の比較可能性が増大する。そこで、このプローブ・プレートは、経済的で、時間を節約し、より効率的であるという利点を有する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１個の反応器を含む生物学的試料のアッセイ用プローブ・プレートであって、前記反応器には、
Ａ．プローブ抗体およびプローブ抗原の組み合わせと、
Ｂ．異なる構造特異性を有する免疫グロブリンに対するプローブ抗抗体の組み合わせと、
Ｃ．異なる構造特異性を有する免疫グロブリンに対するプローブ抗抗体と、プローブ抗原および／またはプローブ抗体との組み合わせとのうちの少なくとも１つが直接的または間接的に固定化される、生物学的試料のアッセイ用プローブ・プレート。
【請求項２】
前記プローブの組み合わせは、プローブのアレイおよび／またはプローブのパターンの形状で前記反応器にランダムでないやり方で固定化される、請求項１に記載のプローブ・プレート。
【請求項３】
バイオチップの形状である、請求項１または２に記載のプローブ・プレート。
【請求項４】
肉眼で同定することができる検出結果を提供する、テスト細片の形状である、請求項１または２に記載のプローブ・プレート。
【請求項５】
請求項１ないし４に記載のいずれかのプローブ・プレートからなる、生物学的試料のテスト用キット。
【請求項６】
前記プローブの組み合わせに対応するリガンドを含むマーカーと、前記リガンドに結合する標識試薬とからなる、請求項５に記載のキット。
【請求項７】
前記リガンドは、抗原および／または抗体との特異的な抗原－抗体反応性または親和性を提供する、請求項６に記載のキット。
【請求項８】
前記マーカーは、
Ａ．標識された特異抗体および標識された特異抗原の組み合わせと、
Ｂ．異なる構造特異性を有する標識された抗抗体の組み合わせと、
Ｃ．種特異性を有する標識された抗抗体と、標識された特異抗体および／または標識された特異抗原との組み合わせと、
Ｄ．構造特異性を有する標識された抗抗体と、標識された特異抗体および／または標識された特異抗原との組み合わせと、
Ｅ．上記の組み合わせから派生するいずれかの組み合わせとのうちの１つのマーカーの組み合わせである、請求項６または７に記載のキット。
【請求項９】
酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、免疫蛍光アッセイ（ＩＦＡ）、化学発光アッセイまたは電気化学発光アッセイのキットである、請求項５ないし８に記載のいずれかのキット。
【請求項１０】
生物学的試料の分析方法であって、
（１）前記生物学的試料を、請求項１ないし４に記載のいずれかのプローブ・プレートの反応器に添加して、反応させること、
（２）任意的に、個別の物質か、部分的な混合物か、完全な混合物かの形態でマーキング試薬を前記反応器に添加すること、および
（３）反応の後で、前記反応器内の結果を分析することを含む、生物学的試料の分析方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般的には、生物学的試料の定性的および／または定量的な分析用のプローブ・プレートに関する。本発明は、具体的には、同一試料中の異なる標的分子、例えば、標的抗体および標的抗原の定性的および／または定量的な組み合わせアッセイ用に用いる反応器を含むプローブ・プレートに関する。前記反応器では、異なるプローブが異なる標的分子を捕捉するために固定化される。マーキングが必要な場合には、異なるマーカーが前記捕捉された標的分子に結合される場合があり、これによって、反応結果が表現される。本発明は、上記のプローブ・プレートを含むテスト・キットと、このプローブ・プレートを生物学的試料の分析に用いる方法とを含む。
【背景技術】
【０００２】
現在のところ、抗体または抗原が基質に固定化された抗体または抗原のプローブ・プレートは、その特異的反応性に基づいて対応する抗原または抗体を検出するために広範に利用される。これらの代表的なキットの３種類は、迅速テスト・キット、ルーティン化したテスト・キットおよびバイオチップ・キットである。
【０００３】
本発明の抗原－抗体反応に基づく迅速テスト・キットは、肉眼で同定可能な検出結果を提供することができる。その反応器は、通常、膜状のマトリックスの細片（ｔｅｓｔ ｓｔｒｉｐ）１個と、抗体プローブまたは抗原プローブのような前記細片上に固定化された材料と、対照ラインと、マーカーとを含む。たいていの場合の検出では、このキットは免疫アフィニティクロマトグラフィーの原理で作用する。そして、これは、固定化された前記抗体プローブまたは抗原プローブに対応する標的抗原または標的抗体を検出するために用いられる。いくつかの場合では、複数の反応器が１個のプローブ・プレートに組み合わされて、前記反応器がそれぞれ抗原または抗体を検出するテスト細片を含む。複数の反応器が組み合わされたこのプローブ・プレートの１つの例は、「ウイルス肝炎の診断および同定用のバイオチップ」という名称の特許文献１に提供されるキットである。複数の迅速検出装置または前記プローブ・プレートと複数の反応器との組み合わせが、それぞれ標的の肝炎ウイルス抗原および抗体を検出するために用いられる場合がある。しかし、これは、本発明の迅速テスト・キットとは違う。特許文献１に記載のキットでは、この迅速テスト・キットの１個の細片（単一の装置）、すなわち、１個の反応器は、前記標的肝炎ウイルス抗原または抗体を検出するだけで、前記標的肝炎ウイルス抗原および抗体を検出しない。
【特許文献１】中国特許出願第００２２６８０７．８号
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
抗原－抗体反応に基づく本発明のルーティン化したテスト・キットは、前記プローブがプローブ・プレートの反応器にランダムに固定化されているという特徴を有する。これらのキットは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）キット、ビオチン－アビジン・アッセイキット（例えば、ビオチン－アビジン－基質（ＢＡＳ）固相標識キット）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）キット、免疫蛍光キット、化学発光キット、電気化学発光キット等を含む。例えば、前記ＥＬＩＳＡキットは、プローブ・プレートと、マーキング・システムとを含む。前記ＥＬＩＳＡプローブ・プレートは、各反応器がマイクロウェルと、該マイクロウェルの内面にランダムに固定化された抗体または抗原とを含む、複数の反応器を有するプラスチックまたはガラスのプレートであるのが常である。前記ＥＬＩＳＡマーキング・システムは、酵素標識抗原か、酵素標識抗体か、酵素標識抗抗体（ａｎｔｉ－ａｎｔｉｂｏｄｙ）かと、基質とを含む。前記キットは、固定化された前記プローブ抗体または抗原に対応する、試料中の標的抗体または標的抗原を検出するために適用される。

【０００５】
前記ルーティン化したテスト・キットでは、反応器における試薬（プローブ分子、標的分子、マーカー等）の間の反応は、間接検出パターン、捕捉法、競合阻害法、２抗体サンドイッチ検出パターンおよび２抗原サンドイッチ検出パターン等のような異なる反応パターンで実行される場合がある。通常は、プローブ・プレートが前記異なる検出パターンに用いられる。
【０００６】
例えば、ＥＬＩＳＡキットでのプローブ・プレートは、前記マーキング・システムでの異なるマーカーに応じた異なる検出パターンで用いられる場合がある。特定の抗原が、抗原でコーティングされた前記プレート上に固定化されて、試料中の標的抗体と反応するとき、マーカーが酵素標識特異抗原の場合には、前記２抗原サンドイッチ検出パターンが採用されるべきであり、あるいは、マーカーが酵素標識抗抗体の場合には、間接検出パターンが用いられるべきである。一方、抗体でコーティングされたプレートについては、試料中の標的抗原と反応する固定化特異抗体では、マーカーが酵素標識特異抗体の場合には、２抗体サンドイッチ検出パターンが用いられてもよい。検出パターンに関係なく、未結合の酵素標識材料を洗浄し、発色用基質を添加し、ＯＤ値を検出した後、定性的または定量的に検出できる。そこで、本発明のＥＬＩＳＡキットおよびその他のルーティン化したテスト・キットは、１個の反応器を用いることによって抗体または抗原のいずれかだけを検出できる。ＢｉｏＭｅｒｉｅｕｘ（フランス）は、抗原と抗体とを同時に検出できるキット（例えば、ＶＩＤＡＳ　ＨＩＶ　ＤＵＯ）を有するが、その反応は、１個の反応器ではなく、２個の反応器でそれぞれ実行される。
【０００７】
本発明では、「ポリペプチドチップ」という用語は、「ペプチドアレイ」、「ペプチドマイクロアレイ」、「ペプチドチップ」、「タンパク質アレイ」または「タンパク質チップ」を指す。現在のところ、抗原－抗体反応に基づくポリペプチドチップは、１個または２個以上の反応器を含み、該反応器では、複数の抗原か複数の抗体かのいずれかが、ランダムではない形式（例えば、番地が標的となる（ａｄｄｒｅｓｓ－ｔａｒｇｅｔｅｄ）形式でプローブとして固定化される。そこで、これらは、プローブとして用いられる複数の抗原または複数の抗体に対応する試料中の複数の抗体か抗原かのいずれかを検出するために用いられる。抗原－抗体反応に基づくバイオチップキットは、特に臨床免疫診断において広範な用途を有する。研究は１０年を超える期間行われてきたが、大規模な応用のための重要な問題がまだ存在する。バイオチップ反応器におけるプローブ、標的およびマーカーの間の反応パターンは、ＥＬＩＳＡ反応器での反応パターン、すなわち、間接検出パターン、捕捉法、競合阻害法、２抗体サンドイッチ検出パターンおよび２抗原サンドイッチ検出パターン等と、ほとんど同一である。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
簡潔には、抗原－抗体反応に基づく本発明のテスト・キットは、抗体または抗原だけが反応器に固定化されるプローブ・プレートからなる。そこで、反応器は、標的抗原か標的抗体かのいずれかを検出するためだけに用いられる場合がある。
【０００９】
発明の内容
１つの実施態様では、本発明は、生物学的試料のアッセイ用のプローブ・プレートを提供する。前記プローブ・プレートは、
Ａ．プローブ抗体およびプローブ抗原の組み合わせと、
Ｂ．異なる構造特異免疫グロブリンに対するプローブ抗抗体の組み合わせと、
Ｃ．異なる構造特異免疫グロブリンに対するプローブ抗抗体と、抗原および／または抗体との組み合わせとのプローブの組み合わせが直接的または間接的に固定化された少なくとも１個の反応器を含む。
【００１０】

前記プローブ・プレートでは、前記プローブの組み合わせが、プローブアレイおよび／またはプローブパターンの形式で前記反応器にランダムでないやり方で固定化される。

【００１１】

前記プローブ・プレートは、肉眼で同定可能な検出結果を提供できる、バイオチップまたはテスト細片の形状をしている。

【００１２】

別の実施態様では、本発明は、生物学的試料アッセイ用キットをも提供する。前記キットは、上記のプローブ・プレートと、前記プローブの組み合わせに対応するリガンドを含む前記マーカーと、該マーカーに結合する標識試薬とを含む。

【００１３】

前記キットでは、前記リガンドは、特異的な抗原－抗体反応性か、それぞれ抗原および／または抗体との親和性かを提供する。

【００１４】

前記キットでは、前記マーカーは、

Ａ．標識された特異的抗体と標識された特異的抗原との組み合わせと、

Ｂ．標識された構造特異的抗抗体の組み合わせと、

Ｃ．標識された種特異的抗抗体と、標識された特異的抗体および／または標識された特異的抗原との組み合わせと、

Ｄ．標識された構造特異的抗抗体と、標識された特異的抗体および／または標識された特異的抗原との組み合わせと、

Ｅ．上記の組み合わせから派生するいずれかの組み合わせとのうちの１つのマーカーの組み合わせである。

【００１５】

前記キットは、酵素結合免疫吸着アッセイ、ラジオイムノアッセイ、化学発光アッセイまたは電気化学発光アッセイのうちの１つのアッセイに基づく。

【００１６】

さらに別の実施態様では、本発明は、生物学的試料を検出する方法を提供する。前記方法は、

（１）請求項１ないし４のいずれか１つのプローブ・プレートに前記生物学的試料を添加し、反応をさせること、

（２）任意的に、個別の物質か、部分的な混合物か、完全な混合物かの形態で、マーキング試薬を前記反応器に添加すること、および

（３）前記反応の後、前記反応器での結果を分析することを含む。

【００１７】

発明の詳細な説明

科学者は、抗原と、該抗原と対をなす抗体との間の特異的な反応性、異なる種の動物から調製された異なる抗抗体に基づく種特異的な反応性、および、免疫グロブリンのタイプまたはサブタイプと、異なるタイプまたはサブタイプの免疫グロブリンかこれらの特徴的なセグメントかを用いることによって調製された異なる抗抗体との異なる反応性に基づく構造特異的な反応性という、抗原－抗体反応性を長い間認識してきた。しかし、この科学的知識は、１個のバイオチップ反応器における異なる標的分子の組み合わせアッセイ（例えば、抗原および抗体の組み合わせアッセイ）には応用されてこなかった。抗原／抗体／抗抗体の間の相互作用を研究するために、発明者はこの知識を実用に供し、前記プローブ・プレートおよびテスト・キットを発明した。この研究の結果の一部は表１に示される。

【００１８】

表１　抗原／抗体／抗抗体の間のクロス・コンタミネーションに関する実験結果

【００１９】

【表１】

反応器Ｎｏ.	プローブ	蛍光マーカー	クロス・コンタミネーション*
１	ＨＢｓ抗原に対するウサギ抗体	ＨＢｓ抗原に対するマウスモノクローナル抗体	－
	ＨＢｓ抗原に対するマウスモノクローナル抗体		－
２	ＨＢｓ抗原に対するウサギ抗体	ヒト抗体に対するヤギ抗体	－
	ＨＢｓ抗原に対するマウスモノクローナル抗体		－
３	ヒトＩｇＭに対する抗体	ＨＢＶに対する精製ヒト抗体	＋
	ヒトＩｇＧに対する抗体		＋
４	ヒトＩｇＭに対する抗体	ＨＢＶに対する精製ヒトＩｇＧ	－
	ヒトＩｇＧに対する抗体		＋
５	ヒトＩｇＭに対する抗体	ＨＢＶに対する精製ヒトＩｇＧ	－
	ＨＢｓ抗原		＋

＊：－は陰性、＋は陽性を意味する。

【００２０】

本発明のプローブ・プレートは、

Ａ．対になるか、あるいは、対にならないプローブ抗体およびプローブ抗原の組み合わせと、

Ｂ．異なる構造特異的免疫グロブリンに対するプローブ抗抗体の組み合わせと、

Ｃ．異なる構造特異的免疫グロブリンに対するプローブ抗抗体と、抗原および／または抗体との組み合わせという、プローブの組み合わせのうちの少なくとも１つが直接的または間接的に固定化される１つまたは２つ以上の反応器によって特徴づけられる。

【００２１】

ＥＬＩＳＡ多重コーティングウェルプレートと、迅速テスト・キットのテスト細片と、単一反応器型または複数反応器型のバイオチップとのような前記「プローブ・プレート」が、キットの主要構成部分で、１個または２個以上の反応器を含む。

【００２２】

単一反応器型チップ、複数反応器型チップの反応ウェルと、ＥＬＩＳＡコーティングプレートのコーティングウェルと、迅速テスト・キットのテスト細片とのような前記「反応器」は、前記プローブが直接的または間接的に固定化され、添加された試料の標的分子と反応して同定可能な反応結果が得られる、境界で画定された連続面または容器を指す。

【００２３】

本発明の「抗体（Ａｂ）」は、天然抗体、特異抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）、遺伝子工学で作成された抗体および抗体断片を含む。「免疫グロブリン（ＩＧ）」は、異なるタイプの免疫グロブリン（ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、

ＩｇＤ）と、異なるサブタイプの免疫グロブリン（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）を含む。「抗原（Ａｇ）」は、直接的または間接的に免疫応答を刺激して抗体および／またはプライミングされたリンパ球を産生し、同時に免疫応答産物（すなわち抗体および／またはプライミングされたリンパ球）に特異的に結合することによって免疫反応を発生させることができる、免疫アッセイで重要な物質を指す。

【００２４】

本発明の抗原は、完全な抗原、ハプテンその他の免疫反応性を有する物質を含む。前記抗原のいくつかの例は、Ａ．免疫反応性を有する植物、動物および微生物の成分（例えば、タンパク質、ペプチド、脂質、多糖類、糖質その他の有機成分と、これらの組み合わせ）と、Ｂ．植物、動物および微生物の代謝産物と、Ｃ．人工抗体と、Ｄ．合成抗原と、Ｅ遺伝子工学で作成された組換え抗原と、Ｆ．医薬または医薬の成分と、Ｇ．抗抗体を調製するために用いられる抗体か、抗抗抗体を調製するために用いられる抗抗体とである。

【００２５】

本発明では、「マーキングされる物質」とは、マーカーと反応する分子を意味する。マーキングされる物質は、標的抗原か、標的抗体か、標的抗原または標的抗体を前記マーカーと連結する介在物かの場合がある。

【００２６】

本発明では、「抗抗体（抗Ａｂ）」は、別の抗体または別の抗抗体を抗原として用いて動物を免疫して調製された抗体を意味する。抗抗体は、抗体に対する抗体、抗抗体に対する抗体、または抗抗抗体に対する抗体等を含む。異なる構造的な特異性を有する免疫グロブリンに対する抗体のプローブ」とは、異なる構造の免疫グロブリンを用いて動物を免疫して調製され、プローブとして用いられる抗体を意味する。

【００２７】

本発明のプローブの組み合わせのいくつかの例は、ＨＢｓ抗原／ＨＣＶ抗原／$ＨＩＶ_{1+2}$抗原／ＨＴＬＶ抗原／梅毒抗原に対する抗体を含む組み合わせ（プローブの組み合わせＡ）と、ＩｇＭに対す抗抗体／ＩｇＧに対する抗抗体を含む組み合わせ（プローブの組み合わせＢ）と、ヒトＩｇＭに対するヤギ抗抗体／ＨＢｓ抗原に対するウサギ抗体／ＨＣＶ抗原を含む組み合わせ（プローブの組み合わせＣ）として示される。より多くの例が「実施例」の項で提示される。

【００２８】

前記プローブ・プレートの反応器では、プローブの組み合わせは、直接的か間接的かのいずれかで固定化される。「間接的な形態」でのプローブの固定化とは、例えば基質に結合した活性分子か、基質に結合されるべき活性化粒子かの介在物を通して反応器にプローブを固定化することを指す。

【００２９】

前記反応器の基質におけるプローブの分布は、ランダムか、あるいは、ランダムでないかのいずれかである。ランダムな分布では、固定化された異なるプローブは、幾何学的に同定できない。一方、「ランダムでない分布」とは、固定化された前記異なるプローブが幾何学的に同定できる分布を意味する。前記ランダムでない分布は、番地で追跡可能な（ａｄｄｒｅｓｓ－ｔｒａｃｅａｂｌｅ）アレイか、認識可能なプローブパターンかを含む。

【００３０】

さらなる実施態様では、本発明のプローブ・プレートは、少なくとも１個の反応器を含むバイオチップで、該バイオチップでは、Ａ．プローブ抗体および抗原の組み合わせと、Ｂ．異なる構造特異的免疫グロブリンに対するプローブ抗抗体の組み合わせと、Ｃ．異なる構造特異性を有する免疫グロブリンに対するプローブ抗抗体と、プローブ抗原および／またはプローブ抗体との組み合わせとのうちの１つのプローブの組み合わせが、番地で追跡可能なアレイまたは禁止期可能なプローブパターンの形態で固定化される。

【００３１】

本発明では、前記バイオチップは、前記プローブ抗体／抗原の組み合わせか、前記プロ

ーブ抗抗体の組み合わせかが固定化された反応器を含む。前者の例は、例えば実施例１に記載の輸血スキャニング・バイオチップのような、Ｍ個のタイプの抗原（Ｍ≧１）と、Ｎ個のタイプの抗体（Ｎ≧１）とがプローブアレイの形態で固定化された反応器を含むバイオチップである。後者の例は、ヒト免疫グロブリンのサブタイプを同定するためのバイオチップである。このバイオチップは、ヒトＩｇＧ１／ＩｇＧ２／ＩｇＧ３／ＩｇＧ４に対するウサギ抗抗体のプローブの組み合わせをプローブアレイの形態で有する反応器を含む。前記ウサギ抗抗体は、ヒトＩｇＧ１／ＩｇＧ２／ＩｇＧ３／ＩｇＧ４の特徴的な断片を用いてそれぞれウサギを免疫することによって調製される。このバイオチップは、蛍光標識ヤギ抗ヒトＩｇＧをマーカーとして用いて、患者のヒト免疫グロブリンサブタイプの定性的または定量的な欠損解析に用いられる場合がある。

【００３２】

本発明のバイオチップでは、前記プローブは、前記反応器の表面に直接的または間接的のいずれかで固定化される場合がある。前記プローブの間接的な固定化は、最初に異なる種類のプローブが別々に活性化粒子上に固定化され、それから、前記プローブと結合した前記活性化粒子が前記バイオチップ反応器のマトリックス上に固定化されて、実行される場合がある。前記プローブが直接的に固定化されるか間接的に固定化されるかは、本発明で説明される異なる標的分子の組み合わせについてのこのプローブ・プレートの検出結果には実質的には影響を与えないであろう。

【００３３】

別の実施態様では、前記プローブ・プレートは、抗原／抗体迅速検出用のテスト細片と、ＩｇＧ／ＩｇＭ迅速検出用のテスト細片と、ＩｇＧ／ＩｇＡ迅速検出用のテスト細片と、抗原／ＩｇＧ／ＩｇＭ迅速検出用のテスト細片等のような、迅速検出用のテスト細片である。

【００３４】

前記プローブ・プレートは、抗原－抗体反応に基づくもので、Ａ．抗原および抗体の組み合わせと、Ｂ．異なる構造特異的な免疫グロブリン（例えば、免疫グロブリンＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭの異なるタイプ、および、免疫グロブリンＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４の異なるサブタイプ）と、Ｃ．異なる種特異的な抗体の組み合わせと、Ｄ．構造特異的免疫グロブリンに対する抗抗体の組み合わせと、Ｅ．異なる構造特異的な免疫グロブリンと、抗原および／または抗体との組み合わせと、Ｆ．これらのいずれかの派生する組み合わせという６種類の異なる標的分子の組み合わせのうちの少なくとも１種類を１個の反応器で検出するために用いられる場合がある。本発明では、「標的分子の組み合わせ」という用語は、上記の６種類の異なる標的分子の組み合わせのうちの１種類を意味する。

【００３５】

本発明のテスト・キットは、マーキングシステムとともに、あるいは、マーキングシステムなしで、本発明のプローブ・プレートを含む。前記キットがマーキングシステムを含むとき、前記プローブ・プレートの反応器の反応結果は、肉眼で、あるいは、光電比色計、光電画像検出器、蛍光検出器、放射免疫検出器、微量磁気検出器等を用いて、前記システムで「マーカー」を検出することによって同定可能である。適切な例は、輸血迅速検出における「酵素標識されたシステム」（ＥＬＩＳＡキット）である。前記キットがマーキングシステムを含むとき、反応結果は、微小電位検出器その他の検出器によって検出される場合がある。

【００３６】

本発明では、「テスト・キット」または「キット」は、１個または２個以上の反応器を有する１個または２個以上のプローブ・プレートを含む、なんらかの定性的および／または定量的な分析における不可欠な消耗品を指す。プローブが固定化され、試料標的分子を捕捉するために用いられる反応器は、前記キットの中核である。

【００３７】

本発明のマーキングシステムは、前記キットの重要な構成部分である。これは、定量的

および／または定性的なアッセイにおけるプローブと標的分子との間の反応の結果を「マーキング」するために用いられる多数の材料を指す。これは、リガンドおよび標識試薬と、任意的に、介在物、標識増幅システム等とを含む。本発明のリガンドは、前記標的分子に対する親和性を付与する単数または複数の分子を指す。前記マーキングシステムの例は、酵素で標識された抗抗体および基質を含む、間接検出パターンでの抗原でコーティングされたマルチウェルプレートを含むＥＬＩＳＡキットである。

【００３８】

前記キットにおけるマーキングシステムは、標的分子のリガンドと、標識試薬と、検出方法のいくつかでは、介在物と、標識増幅システムとを含む。標識増幅システムのいくつかの例は、増幅用の銀塩を用いる金コロイドマーキングシステム、ビオチンおよび／またはアビジンを用いるマーキングシステム等である。

【００３９】

前記キットにおけるマーカーは、上記のＥＬＩＳＡキットの酵素で標識された抗抗体のように、標的分子のリガンドと、これに結合する標識試薬とを含む。マーカーの別の例は、蛍光標識された抗体である。例えば、実施例１２に記載のＥＬＩＳＡキットのマーカーのリガンドは、酵素のみが標識試薬として用いられる、特異抗体および特異抗抗体である。例えば蛍光標識キットでは、マーカーは、蛍光標識抗原、蛍光標識抗体または蛍光標識抗抗体であり、リガンドは抗体、抗原または抗抗体であり、標識試薬は蛍光試薬である。

【００４０】

前記キットのマーキングシステムは、異なるマーキング方法か、同一のマーキング方法での異なる標識試薬かのいずれかが用いられる場合があり、例えば、異なる励起および発光波長を有する２つの蛍光試薬がそれぞれＩｇＧおよびＩｇＭを検出するために用いられる。

【００４１】

前記キットのマーカーのそれぞれは、特異的な抗原－抗体反応性か、抗原および／または抗体への親和性かを有するリガンドを含む。本発明では、抗原および／または抗体に対するリガンドの親和性は、前記抗原および／または抗体に対する前記レーザ誘起蛍光法の特異的な反応性として定義される。この親和的な反応性は、抗原－抗体反応の機構よりもむしろ、ビオチン、アビジン、ＳＰＡ、ＳＰＧ、ソラレン、ジゴキシンと、抗原および／または抗体とのそれぞれの親和性のような親和性の機構に基づく。

【００４２】

本発明では、抗原および抗体の間の「抗原－抗体特異的な反応性」とは、抗原とその対になる抗体との間の特異的な反応性を指すだけでなく、種特異的な反応性および構造特異的な反応性をも指す。前記「種特異的な反応性」とは、抗体と、異なる種の動物から調製された異なる抗抗体との異なる反応性に基づく抗原－抗体反応性を指す。前記「構造特異的な反応性」とは、免疫グロブリンのあるタイプまたはサブタイプと、異なるタイプまたはサブタイプの免疫グロブリンまたはその特徴的なセグメントを用いて調製された異なる抗抗体との異なる反応性に基づく抗原－抗体反応性を指す。抗体とその対となる抗原との間の特異的な反応性の１つの例は、ヒトＨＣＶ抗原と、対をなすヒトＨＣＶ抗体との間のものである。種特異的な反応性の１つの例は、ヒト抗体に対するヤギ抗抗体が、ＨＢｓ抗原に対するヒト抗体とは特異的に反応するが、ＨＢｓ抗原に対するマウスモノクローナル抗体とはほとんど反応しないことである。構造特異的な反応性の１つの例は、ヒト抗ＨＢＶＩｇＧはヒトＩｇＧに対する抗抗体とは著しく反応するが、ヒトＩｇＭに対する抗抗体とは反応しないことである。

【００４３】

前記キットのマーカーのリガンドは、標識された特異抗体、標識された特異抗原および標識された抗抗体のグループから選択されるだけでなく、種特異性を有する標識された抗抗体のグループと、構造特異性を有する標識された抗抗体のグループとからも選択される。前記マーカーは、

Ａ．標識された特異抗体と標識された特異抗原との組み合わせと、

Ｂ．異なる構造特異性を有する標識された抗抗体の組み合わせと、
Ｃ．種特異性を有する標識された抗抗体と、標識された特異抗体および／または標識された特異抗原との組み合わせと、
Ｄ．構造特異性を有する標識された抗抗体と、標識された特異抗体および／または標識された特異抗原との組み合わせと、
Ｅ．上記の組み合わせから派生するいずれかの組み合わせというマーカーの組み合わせのうちの１つであるべきである。

【００４４】

前記マーカーの組み合わせ（標識されたリガンドの種類および数）の選択は、検出されるべき標的分子の種類および数と、選択された検出パターンとに依存する。

【００４５】

テスト・キットが使われるとき、前記マーカーの組み合わせにおける標識された特異抗体および抗原と、標識された種特異的な抗抗体と、標識された構造特異的な抗抗体とは、それぞれ別々に添加されるか、部分的に混合して添加されるか、全てを混合して添加される場合がある。組み合わせＡの例は、ローダミン標識された特異抗原（例えば、ＨＣＶ、ＨＩＶ、ＨＴＬＶ、梅毒に特異的な抗原）と、ローダミン標識された特異抗原（例えば、ＨＢｓに対する抗体）との組み合わせである。組み合わせＢの例は、ローダミン標識された抗ＩｇＭ抗抗体と、ローダミン標識された抗ＩｇＧ抗抗体との組み合わせである。組み合わせＣの例は、ローダミン標識された抗ヒト抗体ヤギ抗抗体と、ローダミン標識されたマウス抗ＨＢｓ抗原モノクローナル抗体との組み合わせである。組み合わせＤの例は、ローダミン標識された抗ＩｇＭ抗抗体と、ローダミン標識されたＨＢｓ抗原との組み合わせである。

【００４６】

前記ポリペプチドチップのキットにおけるマーキングシステムは、特異的反応をマーキングするために、金（銀）標識法、酵素標識法、蛍光標識法、化学発光標識法、電気化学発光法、放射能標識法または磁気標識法という標識方法またはこれらの組み合わせを採用する。前記マーキングシステムでは、異なる標識試薬が１つの標識法に用いられる場合がある。例えば、異なる波長を有する異なる蛍光試薬が、独特なマーカーを形成するために、異なるリガンドに結合する。

【００４７】

本発明のキットのいくつかの例は、以下に示される。これらのキットは、少なくとも１個の上記のプローブの組み合わせが少なくとも１個の反応器でランダムに固定化された、プローブ・プレートを含む。

【００４８】

１）抗原および抗体用のＥＬＩＳＡキット

これは、特異的な抗原および抗体のプローブでランダムにコーティングされたマルチウェルプレートと、酵素標識された特異的な抗原および抗体か、酵素標識された特異抗原と種特異的抗抗体と、基質溶液と、バッファー溶液と、その他の追加の材料とを含む。

【００４９】

２）ＲＩＡキット

特異的な抗原および抗体のプローブでランダムにコーティングされたマルチウェルプレートと、放射性マーキングで標識された特異抗体および抗体か、特異抗原および放射性材料で標識された種特異的抗抗体かと、バッファー溶液とその他の追加の材料とからなる。

【００５０】

３）ＲＩＡキット

特異抗原および抗体のプローブをランダムにコーティングしたマルチウェルプレートと、放射性材料（放射線）で標識された特異抗原および抗体か、放射性材料で標識された種特異的な抗抗体かと、バッファー溶液と、その他の追加の材料とからなる。

【００５１】

４）電気化学発光アッセイキット

これは、特異抗原および抗体のプローブでランダムにコーティングされたマルチウェルプレートと、電気化学発光で標識された特異抗原および抗体か、電気化学発光で標識された特異抗原および種特異的抗抗体かと、バッファー溶液と、その他の追加の材料とからなる。

【００５２】

５）化学発光アッセイキット

これは、特異抗原および抗体のプローブでランダムにコーティングされたマルチウェルプレートと、化学発光で標識された特異的な抗原および抗体か、特異抗原および種特異的抗抗体かと、バッファー溶液と、その他の追加の材料とからなる。

【００５３】

これらの上記のキットは、１つの検出結果が陽性の場合に結果が適性なしと判断されるテストに好ましい。例えば輸血テスト・キットを例にとると、ＨＢＶ、ＨＣＶ、ＨＩＶ、梅毒のうちの１つを検出する結果が陽性のとき、献血者および献血された血液または血漿の袋は、適性なしと判断されるであろう。

【００５４】

本発明の従来のテスト・キットでは、金（銀）、酵素、蛍光、化学発光、電気化学発光、放射線または磁石という標識材料またはこれらの組み合わせのうちの１つが特異的な反応をマーキングするために用いられる場合がある。同一の標識法を用いて、前記標識された材料のリガンドは、同じ標識試薬または異なる標識試薬と対にされる場合がある。前記標識試薬は、放射性材料、酵素、発色基質、ビオチン－アビジン、ＳＰＡ、ＳＰＧ、ソラレン、ジゴキシン、蛍光色素、金（銀）コロイド、希土類化合物発色剤、化学発光試薬、電気化学発光試薬、生物発光試薬、磁性粒子等を含む。

【００５５】

本発明の全てのキットは、

Ａ．抗原および抗体の組み合わせと、

Ｂ．異なるタイプの免疫グロブリンの組み合わせと、

Ｃ．異なるサブタイプの免疫グロブリンの組み合わせと、

Ｄ．抗原と、異なるタイプの免疫グロブリンおよび／または異なるタイプの免疫グロブリンの混合物との組み合わせと、

Ｅ．抗原と、異なるサブタイプの免疫グロブリンおよび／または異なるタイプの免疫グロブリンの混合物との組み合わせと、

Ｆ．これらのいずれかの派生的な組み合わせという６種類の異なる標的分子の組み合わせのうちの１つを検出するために用いられる場合がある。

【００５６】

本発明のキットでは、プローブはプローブ・プレートの反応器の固相基質上に固定化される。本発明の固相基質は、ガラス、プラスチック、ゴム、金属、セルロース膜、スライス、プレート等という単数または複数の材料のようなさまざまな有機、無機、透明または不透明、水を吸収できるか、あるいは、水を吸収できない、堅いか、あるいは、柔らかい材料を含む。本発明のプローブ・プレートの形状は、平たいプレート、細孔のあるプレート、およびさまざまな形状の細片等のようにさまざまな場合がある。本発明のプローブ・プレート上には、特異的な反応を検出するための抗原および抗体のプローブがランダムなやり方で、あるいは、ランダムでないやり方で、固定化される。本発明のプローブ・プレート上に固定化される特異的な抗体または抗原は、ポリペプチド、タンパク質およびその他の抗体または抗原の特性を有する全ての物質を含む、天然または合成の材料の場合がある。製造の際には、さまざまなプローブ（特異抗原および特異抗体）は、前記プローブ・プレートに同時に、あるいは、逐次的に固定化される場合がある。

【００５７】

別の実施態様では、本発明は、

（１）前記プローブ・プレート上の反応器に前記生物学的試料を添加して、例えば３７°Ｃで、１時間反応を起こさせること、

（２）任意的に、標識試薬を前記反応器に別々に添加するか、部分的に混合して添加するか、全て混合して添加すること、および
（３）反応後に前記反応器を測定することを含む、生物学的試料を検出する方法にも向けられる。
【発明の効果】
【００５８】
本発明のキットおよび方法の利点は、同一の反応器が、抗体および抗原のような異なる標的分子、異なるタイプの免疫グロブリン、異なるサブタイプの免疫グロブリン等をテストするために使用できることである。それゆえに、反応器の数と、組み合わせをテストするのに要する時間とが減少する一方で、アッセイの比較の可能性が改善する。本発明のキットは、経済的で、時間が節約でき、効率的である。
【発明を実施するための最良の形態】
【００５９】
以下は、本発明の詳細な実施例である。本発明の実施例１－８に用いられるバイオチップ用の活性化された基質の全てが国内で市販されるか、フランスのＳＥＤＡＣ社によって製造され提供される。
【実施例１】
【００６０】
輸血用バイオチップ・スクリーニングキット（１）
この実施例では、キットは、輸血用スクリーニングバイオチップ・プローブ・プレートと、マーカーと、陰性対照と、陽性対照と、洗浄用バッファー等からなる。前記キットは、ヒトの血清中で、Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原（ＨＢｓ抗原）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）抗体、$ＨＩＶ_{1+2}$抗体および梅毒抗体を検出するために用いられる。
【００６１】
法的に要求される血液スクリーニング事項に従って設計された、前記キットで用いられるプローブの組み合わせは、１種類の抗体と、３種類の抗原とである。選択されるプローブ抗体は、ヒトＨＢｓ抗原に対するウサギ抗体である。選択されたプローブ抗原は、それぞれ、多重エピトープ融合ＨＣＶ抗原、多重エピトープ混合$ＨＩＶ_{1+2}$抗原、および多重エピトープ混合梅毒抗原である。前記プローブは、４Ｘ３のマイクロアレイ（各プローブが３カ所にスポッティングされる）の形態で、基質上に最適化された濃度でそれぞれスポッティングされ、それから、ウシアルブミンが前記基質の残存する表面を不活性化するために用いられる。その後、前記バイオチップ・プローブ・プレートは乾燥され、使用準備が終わる。
【００６２】
前記キットで用いられる検出方法は、間接検出法と、２抗体サンドイッチ検出とを組み合わせた方法である。前記キットで用いられるマーカーの組み合わせは、１種類の標識特異抗体と、１種類の種特異的な標識抗抗体との組み合わせである。前記マーカーの組み合わせでリガンドとして用いられる特異抗体は、ＨＢｓ抗原に対するマウスモノクローナル抗体で、該モノクローナル抗体はＨＢｓ抗原に対するウサギの固定化抗体と、該固定化抗体によって捕捉されたヒトＨＢｓ抗原とともに２抗体サンドイッチ複合体を特異的に形成することができる。前記抗抗体におけるリガンドとして用いられる抗抗体は、ヒト抗体に対するヤギ抗抗体であり、該ヤギ抗抗体は、対になるそれぞれ固定化されたプローブ抗原（ＨＣＶ抗原、$ＨＩＶ_{1+2}$抗原および梅毒抗原）によって捕捉された、ヒトＨＣＶ抗体、$ＨＩＶ_{1+2}$抗体および梅毒抗体には結合できるが、プローブ抗体（ヒトＨＢｓ抗原に対するウサギ抗体）および標識された抗体（ＨＢｓ抗原に対するマウスモノクローナル抗体）には結合できない。この実施例では、ローダミンが標識試薬として用いられ、前記リガンドと結合する。前記リガンドはそれぞれ最適化された条件下でローダミンで標識される。調製された前記マーカーは、混合物の形態または２個の別々のマーカーの形態で、使用準備が終わる。
【００６３】

このチップキットの陰性対照は、ＥＬＩＳＡキットで選択された、ＨＢｓ抗原、ＨＣＶ抗体、$ＨＩＶ_{1+2}$抗体および梅毒抗体について陰性のヒト血清である。前記ＥＬＩＳＡキットで用いられるＥＬＩＳＡプローブ・プレートは、ＨＢｓ抗原に対するウサギ抗体、多重エピトープ融合ＨＣＶ抗原、多重エピトープ混合$ＨＩＶ_{1+2}$抗原または梅毒抗原でそれぞれコーティングされたマルチウェルプレートである。このチップキットの陽性対照は、前記ＥＬＩＳＡキットを用いて選択された、ＨＢｓ抗原陽性血清、ＨＣＶ抗体陽性血清、$ＨＩＶ_{1+2}$抗体陽性血清および梅毒抗体陽性血清の混合物である。

【００６４】

この輸血用バイオチップ・スクリーニングキットは、ヒト血清試料中に存在する可能性があるＨＢｓ抗原、ＨＣＶ抗体、$ＨＩＶ_{1+2}$抗体および梅毒抗体を検出するために用いられる場合がある。この実験におけるヒト血清試料は、１．ＨＢｓ抗原陽性のヒト血清、２．ＨＣＶ抗体陽性のヒト血清、３．$ＨＩＶ_{1+2}$抗体陽性のヒト血清、４．梅毒抗体陽性のヒト血清、５．ＨＢｓ抗原陽性で、かつ、梅毒陽性のヒト血清、６．陰性対照および７．陽性対照である。これらのヒト血清試料は、事前に前記ＥＬＩＳＡキットを用いて検出されている。

【００６５】

前記試料は以下のとおり検出される。前記ヒト血清試料の１つが希釈され、このチップの１つの反応器に添加される。前記反応器での抗原－抗体反応は、３７°Ｃで１時間行われる。それから、未結合の血清成分が前記反応器から除去され、前記反応器は洗浄バッファーで洗浄される。マーカーの組み合わせ（ヒトＨＢｓ抗原に対するマウスモノクローナル抗体と、ヒト抗体に対するローダミン標識ヤギ抗抗体）が、前記反応器内に添加される。マーキング反応は、３７°Ｃで１時間行われる。それから、前記反応器はまずバッファーで洗浄して未結合のマーカーを除去し、つぎに、無水アルコールで洗浄される。最後に、乾燥した前記バイオチップ・プローブ・プレートは、チップスキャナ（ＧＭＳ４１８　アレイスキャナ）を用いてスキャニングされ、解析された。このチップキットを用いた検出結果が表２に示される。

【００６６】

表２　輸血用バイオチップ・スクリーニングキットの検出結果

【００６７】

【表２】

試料	４個のＥＬＩＳＡキットを用いた結果				１個のバイオチップを用いた結果			
	Hbs抗原	HCV	HIV	梅毒	Hbs抗原	HCV	HIV	梅毒
1	+*	—*	—	—	+	—	—	—
2	+	+	—	—	—	+	—	—
3	—	—	+	—	—	—	+	—
4	—	—	—	+	—	—	—	+
5	+	—	—	+	+	—	—	+
陰性対照	—	—	—	—	—	—	—	—
陽性対照	+	+	+	+	+	+	+	+
ブランク	—	—	—	—	—	—	—	—

＊：表１と同じ

【実施例２】

【００６８】

輸血用バイオチップ・スクリーニングキット（２）

この実施例では、キットは、輸血用スクリーニングバイオチップ・プローブ・プレートと、マーカーと、陰性対照と、陽性対照と、洗浄液等とからなる。

【００６９】

このバイオチップキットにおけるバイオチップ・プローブ・プレートは、実施例１の調製方法と同じ方法で調製される。

【００７０】

前記キットで用いられる検出方法の組み合わせは、２抗原サンドイッチ検出および２抗体サンドイッチ検出の組み合わせである。前記キットで用いられるマーカーの組み合わせは、３種類の標識特異抗原と、１種類の標識特異抗体である。前記マーカーの組み合わせにおいてリガンドとして用いられる特異抗体は、ＨＢｓ抗原に対するマウスモノクローナル抗体であり、該モノクローナル抗体は、抗ＨＢｓ抗原固定化ウサギ抗体と、該固定化抗体によって捕捉されたヒトＨＢｓ抗原との２抗体サンドイッチ複合体を特異的に形成することができる。前記マーカーの組み合わせにおいてリガンドとして用いられる３種類の特異抗原は、それぞれ、ＨＣＶ抗原、$ＨＩＶ_{1+2}$抗原および梅毒抗原である。ＨＣＶ抗原は、固定化されたプローブのＨＣＶ抗原と、該プローブのＨＣＶ抗原によって捕捉されたヒト抗ＨＣＶ抗体との２抗原サンドイッチ複合体を特異的に形成することができる。$ＨＩＶ_{1+2}$抗原は、固定化されたプローブの$ＨＩＶ_{1+2}$抗原と、該プローブの$ＨＩＶ_{1+2}$抗原によって捕捉されたヒト抗$ＨＩＶ_{1+2}$抗体との２抗原サンドイッチを特異的に形成することができる。梅毒抗原は、固定化されたプローブの梅毒抗原と、該プローブの梅毒抗原によって捕捉されたヒト抗梅毒抗体との２抗原サンドイッチ複合体を特異的に形成することができる。この実施例では、ローダミンが標識試薬として用いられ、前記リガンドと結合する。前記リガンドは、それぞれ最適化された条件下でローダミンで標識される。調製されたマーカーは、混合物の形態か、２つの別々のマーカーの形態かで使用準備が終わる。

【００７１】

このチップキットの陰性対照および陽性対照は、実施例１のものと同じである。

【００７２】

この輸血用バイオチップ・スクリーニングキットは、ヒトの血清試料中に存在する可能性があるＨＢｓ抗原、ＨＣＶ抗体、$ＨＩＶ_{1+2}$抗体および梅毒抗体を検出するために用いられる場合がある。この実験でのヒト血清試料は、実施例１のものと同じである。この実施例の試料の検出は、実施例１と同じやり方で行われ、検出で得られた結果は、実施例１の表２と同様である。

【実施例３】

【００７３】

ＨＩＶ抗原／抗体を検出するバイオチップキット（１）

この実施例で調製されるキットは、ＨＩＶ抗原およびＨＩＶ抗体を検出するバイオチップ・プローブ・プレートと、マーカーと、陰性対照と、陽性対照と、洗浄液等とからなる。前記キットは、ヒトの血清試料中に存在する可能性がある、ＨＩＶ抗原およびＨＩＶ抗体を検出するために用いられる。

【００７４】

このキットのプローブの組み合わせは、１種類の抗体と１種類の抗原との組み合わせである。選択されたプローブ抗体は、抗ＨＩＶｐ２４マウスモノクローナル抗体で、選択されたプローブ抗原は、ＨＩＶのｇｐ１６０、ｇｐ４１およびｇｐ３６を含む、多重エピトープの混合抗原である。前記プローブは、それぞれ最適化された濃度で２Ｘ３マイクロアレイ形状で基質上にスポッティングされ（各プローブは３カ所にスポッティングされ）、それからウシアルブミンが前記基質の残存する表面をブロックするために用いられる。その後、前記バイオチップ・プローブ・プレートは乾燥され、使用準備が終わる。

【００７５】

本キットで用いられる検出方法の組み合わせは、２抗原サンドイッチ検出と、２抗体サ

ンドイッチ検出との組み合わせである。本キットで用いられるマーカーの組み合わせは、１種類の標識特異抗体と、１種類の標識特異抗原との組み合わせである。前記標識特異抗体におけるリガンドとして用いられる特異抗体は、抗ＨＩＶｐ２４モノクローナル抗体である。この抗ＨＩＶｐ２４モノクローナル抗体は、プローブのＨＩＶ抗原のエピトープに対して向けられるものではなく、２抗体サンドイッチ複合体の形態で前記プローブＨＩＶ抗体によって捕捉された試料のＨＩＶ抗原に対して向けられる。前記標識特異抗原におけるリガンドとして用いられる特異抗原は、特異的なＨＩＶ抗原である。このリガンドのＨＩＶ抗原は、プローブのＨＩＶ抗体とは反応しないが、該プローブのＨＩＶ抗原によって２抗原サンドイッチ複合体の形態で捕捉された試料のＨＩＶ抗体と反応する。この実施例では、ローダミンが標識試薬として用いられ、前記リガンドと結合する。前記リガンドは、それぞれ最適化された条件下でローダミンで標識される。調製されたマーカーは、混合物または２つの別々のマーカーの形態で、使用準備が終わる。

【００７６】

このチップキットの陰性対照は、ＥＬＩＳＡキットを用いて選択されたＨＩＶ抗体および抗原が陰性のヒト血清である。前記ＥＬＩＳＡキットに用いられるＥＬＩＳＡプローブ・プレートは、抗ＨＩＶｐ２４マウスモノクローナル抗体と、ＨＩＶｇｐ１６０、ｇｐ４１およびｇｐ３６を含む多重エピトープ混合抗原とでそれぞれコーティングされたマルチウェルプレートである。このチップキットにおける陽性対照は、前記ＥＬＩＳＡキットを用いて選択された、ＨＩＶ抗体および抗原が陽性のヒト血清である。

【００７７】

このバイオチップキットは、ヒトの血清試料中に存在する可能性があるＨＩＶ抗体およびＨＩＶ抗原をテストするために用いられる場合がある。この実験におけるヒト血清試料は、Ａ．ＨＩＶｐ２４抗原が陽性のヒト血清、Ｂ．ＨＩＶｇｐ１６０、ｇｐ４１およびｇｐ３６抗体が陽性のヒト血清、Ｃ．ＨＩＶ抗原および抗体陽性のヒト血清、Ｄ．陰性対照、Ｅ．陽性対照である。これらのヒト血清試料は、上記のＥＬＩＳＡキットを用いて事前に検出されている。

【００７８】

前記試料は以下のとおり検出される。前記ヒト血清試料の１つが希釈され、このチップの１つの反応器の中に添加される。前記反応器内での抗原－抗体反応は、３７°Ｃで１時間行われる。それから、未結合の血清成分が前記反応器から除去され、前記反応器は洗浄バッファーで洗浄される。その後、前記マーカーの組み合わせが前記反応器に添加される。マーキング反応は３７°Ｃで１時間行われる。そして、前記反応器はまず未結合のマーカーを除去するためにバッファー液で洗浄され、つぎに、無水アルコールで洗浄される。最後に、乾燥したバイオチップ・プローブ・プレートが、チップスキャナ（ＧＭＳ４１８アレイスキャナ）を用いてスキャニングされ、解析される。このチップキットを用いる検出結果は表３に示される。

【００７９】

表３　ＨＩＶ抗原／抗体を検出するバイオチップキットの結果

【００８０】

【表３】

試料	２個のＥＬＩＳＡキットを用いた結果		バイオチップを用いた結果	
	抗体でコーティングされたウェル	抗原でコーティングされたウェル	プローブ抗体のスポット	プローブ抗原のスポット
A	+*	—*	+	—
B	—	+	—	+
C	+	+	+	+
陰性対照	—	—	—	—
陽性対照	++++	++++	++++	++++
ブランク	—	—	—	—

＊：表１と同じ

【実施例４】

【００８１】

ＨＩＶ抗原／抗体を検出するバイオチップキット（２）

この実施例で調製されるキットは、ＨＩＶ抗原およびＨＩＶ抗体を検出するバイオチップ・プローブ・プレートと、マーカーと、陰性対照と、陽性対照と、洗浄バッファー等とからなる。前記キットは、ヒトの血清試料中に存在する可能性があるＨＩＶ抗原およびＨＩＶ抗体を検出するために用いられる。

【００８２】

このバイオチップキットにおけるバイオチップ・プローブ・プレートは、実施例の調製方法と同じ方法で調製される。

【００８３】

本キットで用いられる検出方法は、間接検出法と、２抗体サンドイッチ検出とを組み合わせた方法である。本キットで用いられるマーカーの組み合わせは、１種類の標識特異抗体と、１種類の標識種特異的抗抗体との組み合わせである。前記マーカーの組み合わせにおけるリガンドとして用いられる特異抗体は、マウスの抗ＨＩＶｐ２４モノクローナル抗体で、該モノクローナル抗体は、固定化された抗ＨＩＶｐ２４抗体と、該固定化抗体によって捕捉されたヒトＨＩＶ抗原との２抗体サンドイッチ複合体を特異的に形成することができる。前記抗抗体におけるリガンドとして用いられる抗抗体は、ヒト抗体に対するヤギ抗抗体で、該ヤギ抗抗体は、固定化されたＨＩＶ抗原によって捕捉されたヒトＨＩＶ抗体に結合できるが、プローブの抗体（プローブとして用いられる抗ＨＩＶｐ２４マウスモノクローナル抗体）と、標識抗体（マーカーリガンドとして用いられる抗ＨＢｓ抗原マウスモノクローナル抗体）とには結合できない。この実施例では、ローダミンが標識試薬として用いられ、前記リガンドに結合する。前記リガンドは、それぞれ最適化された条件下でローダミンで標識される。調製されるマーカーは、混合物の形態または２個の別々のマーカーの形態で使用準備が終わる。

【００８４】

このチップキットの陰性対照および陽性対照は、実施例３のものと同じである。

【００８５】

この実験のヒト血清試料は、実施例３のものと同じである。この実施例における前記試料の検出は、実施例１と同じやり方で行われ、得られた検出結果は実施例３の表３と同様である。

【実施例５】

【００８６】

腫瘍関連抗原／抗体のテスト用のバイオチップキット

この実施例において調製されるバイオチップキットは、バイオチップ・プローブ・プレートと、標識された材料と、陰性対照と、陽性対照と、参照材料と、洗浄液等とからなる。本実施例のバイオチップキットは、ヒトの血清試料中に存在する可能性がある腫瘍関連抗原および抗体を検出するために用いられる。

【００８７】

このバイオチップ・プローブ・プレートにおけるプローブの組み合わせは、検出の要件と、利用可能な腫瘍関連抗原／抗体に応じて決定される。この実施例では、プローブの組み合わせは、抗体および抗原の組み合わせである。前記プローブの組み合わせにおける抗原プローブは、合成ポリペプチドのＥＢＶ抗原である。前記プローブの組み合わせにおける抗体プローブは、ＨＣＧホルモン、腫瘍マーカー抗原５０（ＣＡ５０）、糖鎖抗原２４２（ＣＡ２４２）、乳癌特異抗原（ＣＡ１５３）、癌胎児抗原（ＣＥＡ）および卵巣のう腫特異抗原（ＣＡ１２５）のそれぞれに対する６種類のマウス抗体である。最適濃度の前記抗原および抗体のプローブが手動式のスポッタを用いて７ｘ３アレイの形状で（各タイプのプローブについて３カ所のスポット）活性化された基質上にそれぞれ固定化される。スポッティングの後、ウシアルブミンが前記マトリクスの活性化された表面をブロックするために用いられる。それから、前記バイオチップ・プローブ・プレートは乾燥され使用準備が終わる。

【００８８】

本キットで用いられる検出方法の組み合わせは、間接検出法および２抗体サンドイッチ検出の組み合わせである。本キットで用いられるマーカーの組み合わせは、標識種特異的抗抗体と、標識特異抗体との組み合わせである。第１のマーカーは、間接検出法に用いられ、第２のマーカーが２抗体サンドイッチ検出法に用いられる。前記マーカーの組み合わせにおける特異抗体は、ＨＣＧ、ＣＡ５０、ＣＡ２４２、ＣＡ１５３、ＣＥＡおよびＣＡ１２５のそれぞれに対する６種類のマウスモノクローナル抗体であり、該モノクローナル抗体のそれぞれが、固定化された抗体と、その捕捉する試料中の抗原と２抗体サンドイッチ複合体を形成することができる。前記マーカーの組み合わせにおける種特異的抗抗体は、抗ヒトＩｇＡ抗抗体であり、該抗抗体は、固定化されたＥＢＶ抗原によって捕捉されたＥＢＶ抗体に結合できる。この実施例では、ローダミンが標識試薬として用いられ、前記リガンドに結合する。前記リガンドのローダミン化は、それぞれ最適化された条件下で実現される。そして、前記マーカーは混合された形態か、別々の形態かで用いられる場合がある。

【００８９】

このキットの陰性対照は、７個のＥＬＩＳＡキットのそれぞれが、合成ポリペプチドＥＢＶＶＣＡ抗原と、抗ＨＣＧ抗体と、腫瘍マーカー抗原５０（ＣＡ５０）と、糖鎖抗原２４２（ＣＡ２４２）のような多糖類および糖タンパク質に対する抗体と、乳癌特異抗原（ＣＡ１５３）に対する抗体と、癌胎児抗原（ＣＥＡ）に対する抗体と、卵巣のう腫特異抗原（ＣＡ１２５）に対する抗体とのうちの１つでコーティングされたマイクロウェルのプローブ・プレートを含む、ＥＬＩＳＡキットを通して選択された陰性のヒト血清である。このキットの品質制御は、他の定量的なテストを通じて選択された腫瘍の参照試料である。

【００９０】

このバイオチップキットを用いることによって、１つの試料中の腫瘍に関連する１種類の抗体と６種類の抗原とが１個の反応器内で定量的に検出できる。そこで、前記キットは時間および費用の節約という利点がある。

【実施例６】

【００９１】

ＨＢＶ抗体／抗原を検出するバイオチップキット

この実施例におけるバイオチップキットは、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）に関連する抗体および抗原を検出するバイオチップ・プローブ・プレートと、マーカーと、陰性対照と、陽性対照と、洗浄液等とからなる。このキットは、ヒト血清試料中のＢ型肝炎ウイルス

（ＨＢＶ）抗原／抗体の検出用である。

【００９２】

検出目的と利用可能なＨＢＶ関連抗原／抗体とに応じて設計された、本キットで用いられるプローブの組み合わせは、２種類の抗体と３種類の抗原とを含む。プローブの組み合わせのために選択された２種類のプローブ抗体は、それぞれ、抗ヒトＨＢｓ抗原（Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原）マウスモノクローナル抗体と、抗ヒトＨＢｅ抗原（Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原）マウスモノクローナル抗体とである。プローブの組み合わせのために選択された３種類のプローブ抗原は、単離ＨＢｓ抗原（Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原）と、単離ＨＢｃ抗原（Ｂ型肝炎ウイルスコア抗原）と、単離ＨＢｅ抗原（Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原）とである。前記プローブは、５Ｘ３マイクロアレイの形態で最適濃度でそれぞれ基質上にスポッティングされ（各プローブは３カ所にスポッティングされ）、ウシアルブミンが前記基質の残存表面を不活性化するのに用いられる。前記バイオチップ・プローブ・プレートは、乾燥され、使用準備が終わる。

【００９３】

この実施例で調製されるキットは、ヒト血清試料中のＢ型肝炎ウイルス表面抗原、Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原、抗Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原抗体ＩｇＧ、抗Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原抗体ＩｇＭ、抗Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原抗体ＩｇＧ、抗Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原抗体ＩｇＭ、抗Ｂ型肝炎ウイルスｃ抗原ＩｇＧおよび抗Ｂ型肝炎ウイルスｃ抗原抗体ＩｇＭを検出するために用いられるものである。

【００９４】

本キットで用いられる検出方法の組み合わせは、間接検出法と２抗体サンドイッチ検出法との組み合わせである。本キットで用いられるマーカーの組み合わせは、２種類の標識特異抗体と、１種類の標識種特異的抗ＩｇＧ抗体と、１種類の標識種特異的抗ＩｇＭ抗体とを含む組み合わせである。前記マーカーの組み合わせにおいてリガンドとして用いられる２種類の特異抗体は、抗ＨＢｓ抗原マウスモノクローナル抗体と、抗ＨＢｅ抗原マウスモノクローナル抗体とである。リガンドの抗ＨＢｓ抗体は、プローブのＨＢｓ抗原エピトープに対してではなく、２抗体サンドイッチ形態で前記プローブのＨＢｓ抗体によって捕捉された試料のＨＢｓ抗原に対するものである。リガンドのＨＢｅ抗体は、プローブのＨＢｅ抗原エピトープに対してではなく、２抗体サンドイッチ形態でプローブのＨＢｅ抗体によって捕捉された試料のＨＢｅ抗原に対するものである。マーカーの組み合わせでリガンドとして用いられる種特異的な抗ＩｇＧは、抗ヒトＩｇＧヤギ抗体である。前記マーカーの組み合わせでリガンドとして用いられる種特異的抗ＩｇＭ抗体は、抗ヒトＩｇＭヤギ抗体である。これらのヤギ抗抗体は、固定化された抗原プローブによって捕捉されたヒトＩｇＧ抗体およびヒトＩｇＭ抗体とにそれぞれ反応するが、前記プローブの組み合わせにおけるプローブとして、あるいは、前記マーカーの組み合わせにおけるリガンドとして用いられるマウス抗体にはまったく反応しない。この実施例では、ローダミン（励起波長λｅｘ＝５４６ｎｍおよび発光波長λｅｍ＝５７５ｎｍ）が、前記２種類の特異抗体と、ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体とを標識するための標識試薬として用いられる。しかし、Ｃｙ５（励起波長λｅｘ＝６４９ｎｍおよび発光波長λｅｍ＝６７０ｎｍ）は、ヤギ抗ヒトＩｇＭ抗体を標識するための標識試薬として用いられる。前記リガンドは、最適化された条件下で、それぞれローダミンおよびＣｙ５で標識される。

【００９５】

このキットの陰性対照は、ＥＬＩＳＡ法を通じて選択された陰性のヒト血清である。この実施例における陽性対照は、ＥＬＩＳＡ検出を通じて選択された陽性のヒト血清の混合物である。この実験における陽性試料は、それぞれ、１＃．Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原陽性試料、２＃．Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原陽性試料、３＃．抗Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原抗体ＩｇＧ陽性試料、４＃．抗Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原抗体ＩｇＭ陽性試料、５＃．抗Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原抗体ＩｇＧ陽性試料、６＃．抗Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原抗体ＩｇＭ陽性試料、７＃．抗Ｂ型肝炎ウイルスｃ抗原抗体ＩｇＧ陽性試料、８＃．抗Ｂ型肝炎ウイルスｃ抗原抗体ＩｇＭ陽性試料である。これら全ての選択されたヒト血清試料の陽性およ

び陰性の結果は、ＥＬＩＳＡを通じて事前に検査される。

【００９６】

前記試料は以下のとおり検出される。前記ヒト血清試料の１個が希釈され、このチップの１個の反応器に添加される。前記反応機内の抗原－抗体反応は、３７°Ｃで１時間行われる。それから、未結合の結成成分が前記反応器から除去され、該反応器が洗浄バッファーで洗浄される。つぎに、マーカーの組み合わせ（ローダミン標識抗ＨＢｓ抗原マウス抗体、ローダミン標識抗ＨＢｅ抗原マウス抗体、ローダミン標識抗ヒトＩｇＧヤギ抗体およびＣｙ５標識抗ヒトＩｇＭヤギ抗体）が前記反応器内に添加される。マーキング反応は３７°Ｃで１時間行われた。それから、前記反応器は、まず未結合のマーカーを除去するためにバッファー液で洗浄され、つぎに無水アルコールで洗浄される。最後に乾燥されたバイオチップ・プローブ・プレートが、多重波長レーザ共焦点顕微鏡（ＧＭＳ４１８アレイスキャナ）を用いてスキャニングされ、解析される。５４０ｎｍの励起波長が、Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原と、Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原と、抗Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原抗体ＩｇＧと、抗Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原抗体ＩｇＧと、抗Ｂ型肝炎ウイルスｃ抗原抗体ＩｇＧとの検出結果を得るために用いられる。６５０ｎｍの励起波長が、抗Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原抗体ＩｇＭと、抗Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原抗体ＩｇＭと、抗Ｂ型肝炎ウイルスｃ抗原抗体ＩｇＭとを検出するために用いられる（表４）。

【００９７】

表４　ヒト血清試料中のＢ型肝炎ウイルスの検出用のバイオチップキットの結果

【００９８】

【表４】

試料	８個のＥＬＩＳＡキットの結果								バイオチップキットの結果							
	Ａ	Ｂ	Ｃ	Ｄ	Ｅ	Ｆ	Ｇ	Ｈ	Ａ	Ｂ	Ｃ	Ｄ	Ｅ	Ｆ	Ｇ	Ｈ
１＃	＋*	－*	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－
２＃	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－
３＃	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－
４＃	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－
５＃	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－
６＃	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－
７＃	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	－
８＃	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋
陰性対照	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
陽性対照	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
ブランク	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－

*：表１と同じ

【００９９】

表４の注記

Ａ：Ｈｂｓ抗原、Ｂ：ＨＢｅ抗原、Ｃ：ＨｂｓＩｇＧ、Ｄ：ＨｂｓＩｇＭ、Ｅ：ＨｂｅＩｇＧ、Ｆ：ＨｂｅＩｇＭ、Ｇ：ＨｂｃＩｇＧ、Ｈ：ＨＢｃＩｇＭ

【実施例７】

【０１００】

ＨＢＶおよびＨＣＶの抗原／抗体を検出するバイオチップキット

このキットは、ヒトの血清試料中のＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）と、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）を検出するためのものである。

【０１０１】

本実施例では、キットは、バイオチップ・プローブ・プレートと、マーカーと、陰性対照と、陽性対照と、洗浄液等とからなる。

【０１０２】

前記バイオチップ・プローブ・プレートにおけるプローブの組み合わせの選択は、検出の要件と、利用可能な関連する抗原／抗体とに依存する。本実施例では、前記抗体／抗原

の組み合わせは、プローブの組み合わせとして選択される。前記プローブの組み合わせにおける抗体プローブは抗ＨＢｓ抗原ウサギ抗体で、前記プローブの組み合わせにおける抗原プローブはＣ型肝炎ウイルス融合抗原である。前記抗体プローブはヒト血清試料中のＢ型肝炎ウイルス表面抗原を検出するたに用いられ、前記抗原プローブはヒト血清試料中の抗Ｃ型肝炎ウイルス抗体を検出するために用いられる。最適濃度の前記抗原および抗体のプローブが、手動式スポッタを使って、２ｘ３アレイ（各タイプのプローブについて３カ所のスポット）の形態で活性化された基質上にそれぞれ固定化される。それから、ウシアルブミンがマトリックスの表面をブロックするために用いられる。前記バイオチップ・プローブ・プレートは乾燥され、使用準備が終わる。

【０１０３】

このキットにおけるマーカーの組み合わせの選択は、プローブの組み合わせと、用いられる検出方法とに依存するが、該検出方法は、抗原検出についての２抗体サンドイッチ検出法と、抗体検出についての間接検出方法との組み合わせとして選択される。したがって、種特異性を有する標識抗抗体と、標識特異抗体とが、マーカーの組み合わせとして選択される。前記マーカーの組み合わせでは、第１のマーカーは捕捉された抗体の間接的な検出に用いられ、第２のマーカーが捕捉された抗原の２抗体サンドイッチ検出に用いられる。前記マーカーの組み合わせにおける抗体リガンドは、固定化された抗体プローブ（抗ＨＢｓ抗原マウスモノクローナル抗体）と、該抗体プローブに捕捉されたＨＢｓ抗原とともに２抗体サンドイッチ複合体を形成することができる。種特異性を有する抗抗体のリガンドは、抗ヒト免疫グロブリンヤギ抗抗体であり、該ヤギ抗抗体は、前記抗原プローブによって捕捉されたヒト抗ＨＣＶ抗体と結合することができる。前記標識リガンドに結合する標識試薬はローダミンである。

【０１０４】

本実施例で調製されるキットのその他の付属物は、陰性対照、陽性対照および洗浄液である。

【実施例８】

【０１０５】

肝炎ウイルス抗原／抗体を検出するバイオチップキット

本実施例で調製されるこのキットは、バイオチップ・プローブ・プレートと、マーカーと、陰性対照と、陽性対照と、洗浄液等とからなる。このキットは、ことなる肝炎ウイルスに関連する抗体および抗原を検出するためのものである。

【０１０６】

検出目的と、異なる肝炎ウイルスに関連する利用可能な有意義な抗体および抗原とに従って設計された、本キットに用いられるプローブの組み合わせは、１種類の抗体と、５種類の抗原とを含む。前記プローブの組み合わせのために選択されたプローブ抗体は、抗ヒトＨＢｓ抗原（Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原）ウサギモノクローナル抗体である。前記プローブの組み合わせのために選択される５種類のプローブ抗原は、ＨＡＶ抗原（Ａ型肝炎ウイルス抗原）、多重エピトープ融合ＨＣＶ抗原（Ｃ型肝炎ウイルス抗原）、多重エピトープ融合ＨＤＶ抗原（Ｄ型肝炎ウイルス抗原）、多重エピトープ融合ＨＣＧ抗原（Ｇ型肝炎ウイルス抗原）および多重エピトープ融合ＨＥＶ抗原（Ｅ型肝炎ウイルス抗原）である。最適化された濃度の前記プローブは、６Ｘ３マイクロアレイの形態でそれぞれ基質上にスポッティングされ（各プローブが３カ所にスポッティングされ）、ウシアルブミンがマトリックスの残存する表面を不活性化するために用いられる。それから、前記バイオチップ・プローブ・プレートは乾燥され、使用準備が終わる。

【０１０７】

本実施例で調製されるキットは、ヒトの血清試料中のＨＡＶ抗体、ＨＢｓ抗原、ＨＣＶ抗体、ＨＤＶ抗体およびＨＥＶ抗体の検出に用いられる。

【０１０８】

本キットにおいて用いられる検出方法の組み合わせは、間接検出法と、２抗体サンドイッチ検出との組み合わせである。本キットで用いられるマーカーの組み合わせは、１種類

の標識特異抗体と、１種類の種特異的な標識抗抗体とを含む組み合わせである。前記マーカーの組み合わせにおいてリガンドとして用いられる特異抗体は、抗ＨＢｓ抗原ウサギモノクローナル抗体で、該ウサギモノクローナル抗体は、抗ＨＢｓ抗原固定化ウサギ抗体と、該固定化抗体に捕捉されたヒトＨＢｓ抗原とともに２抗体サンドイッチ複合体を特異的に形成することができる。前記抗抗体におけるリガンドとして用いられ抗抗体は、ヒト抗体に対するヤギ抗抗体で、該ヤギ抗抗体は、対となる固定化されたプローブの抗原（ＨＡＶ抗原、ＨＣＶ抗原、ＨＤＶ抗原、ＨＧＶ抗原およびＨＥＶ抗原）によって捕捉されたヒト抗体と結合することができるが、前記ウサギプローブ抗体および標識ウサギ抗体とは結合することができない。本実施例では、ローダミン（励起波長λｅｘ＝５４６ｎｍおよび発光波長λｅｍ＝５７５ｎｍ）が標識試薬として用いられ、前記リガンドに結合する。前記リガンドは、それぞれ最適化された条件下でローダミンと標識される。調製されたマーカーは、混合物の形態か、２つの別々のマーカーの形態かで使用準備が終わる。

【０１０９】

本実施例で調製されるキットの他の付属物は、陰性対照と、陽性対照と、洗浄液等である。

【実施例９】

【０１１０】

輸血スクリーニング用迅速検出キット

本実施例で製造されるキットは、ヒトの血清試料中のＨＢｓ抗原、抗ＨＣＶ抗体、抗ＨＩＶ$_{1+2}$抗体および抗梅毒抗体を迅速に検出するためのものである。そのため、前記キットは、献血者の迅速なスクリーニングに応用可能である。

【０１１１】

このキットは、テスト細片と、洗浄液等とからなる。このキットのテスト細片は、ニトロセルロース膜の細片と、該細片上にある、試料装荷部、マーカー部、プローブ部および品質制御部とからなる。試料装荷領域にはガラス繊維膜がある。

【０１１２】

前記プローブ・プレートにおけるプローブの組み合わせの選択は、例えば中国における輸血法制に従う要件のような検出要件に依存する。本実施例では、抗体／抗原の組み合わせがプローブの組み合わせとして選択されるが、この組み合わせは前記プローブ部に固定化される。前記プローブの組み合わせでは、抗体プローブは抗ＨＢｓ抗原ウサギ抗体であり、抗原プローブは、それぞれ、マウス由来のＨＣＶ融合抗原と、マウス由来のＨＩＶ$_{1+2}$混合抗原と、マウス由来の梅毒抗原である。各タイプのプローブは、前記プローブ部上に検出線の形状で固定化される。

【０１１３】

本実施例で用いられる検出パターンは、抗原検出についての２抗体サンドイッチ検出パターンと、抗体検出についての間接検出パターンとの組み合わせとして選択される。そこで、種特異性を有する標識抗抗体と、標識特異抗体とがマーカーの組み合わせとして選択される。前記マーカーの組み合わせでは、抗体リガンドは抗ＨＢｓ抗原ウサギ抗体で、抗抗体リガンドは抗ヒト免疫グロブリンヤギ抗抗体である。前記リガンドはそれぞれ金コロイドで標識され、混合されて、線状に膜細片上に固定化される。前記マーカー部は、試料装荷部と、プローブ部との間に配置される。本実施例では、ヒトＩｇＧの品質制御線はテスト細片領域に固定化される。

【０１１４】

本実施例におけるヒト血清試料は実施例１のものと同一である。

【０１１５】

献血者の迅速な選択は、患者の臨床診断とは異なる。このキットは、献血者を数分間で一次選択するための用いられる。血漿試料のなんらかの陽性の結果が観察されるとき、その献血者は献血を拒絶されるであろう。その後、適性がある献血者はさらなる検査を受けるであろう。この選択方法は、時間を節約し費用を低減することができる。

【実施例１０】

【０１１６】
本実施例で製造されるキットは、ヒト血清試料中のＨＩＶ抗原の迅速検出用に用いられる場合がある。
【０１１７】
このキットは、ＨＩＶ抗原の迅速検出用テスト細片と、抗体と、洗浄液等とからなる。
【０１１８】
このキットにおけるテスト細片は、ニトロセルロース膜細片と、該膜細片上の試料装荷部と、マーカー部と、プローブ部と、品質制御部とからなる。試料装荷領域にはガラス繊維膜がある。
【０１１９】
本実施例では、抗体／抗原の組み合わせは、プローブの組み合わせとして選択されるが、前記プローブの組み合わせは、前記プローブ部に固定化される。前記プローブの組み合わせでは、抗体プローブは抗ＨＩＶｐ２４マウスモノクローナル抗体で、抗原プローブは、マウス由来のＨＩＶｇｐ１６０、ｇｐ４１およびｇｐ３６の融合タンパク質である。各タイプのプローブは検出線の形状で前記プローブ部上に固定化される。
【０１２０】
本実施例で用いられる検出パターンは、抗原検出についての２抗体サンドイッチ検出パターンと、抗体検出についての２抗原サンドイッチ検出パターンとの組み合わせとして選択される。そこで、標識特異抗原および標識特異抗体とはマーカーの組み合わせとして選択される。前記マーカーの組み合わせでは、抗体リガンドは抗ＨＩＶｐ２４マウスモノクローナル抗体で、抗原リガンドはＨＩＶｇｐ１６０、ｇｐ４１およびｇｐ３６の融合抗原である。前記リガンドは、それぞれ金コロイドで標識され、混合され、最後に前記膜細片上に線状の形状で固定化される。前記マーカー部は、試料装荷部とプローブ部との間に配置される。本実施例では、抗ヒト免疫グロブリン抗抗体の品質制御部は、テスト細片領域に固定化される。
【０１２１】
本実験におけるヒト血清試料は実施例３のものと同一である。
【０１２２】
この迅速検出キットは、検出結果は数分以内に得て肉眼で同定することができるため、時間を節約し、検出費用を低減することができる。
【実施例１１】
【０１２３】
肝炎ウイルス用迅速検出キット
本実施例で製造されるキットは、肝炎が疑われる患者由来の試料中の肝炎ウイルスの迅速同定に用いられる場合がある。
【０１２４】
このキットは、迅速検出用のテスト細片と、洗浄液等とからなる。このキットにおけるテスト細片は、ニトロセルロース膜細片と、該膜細片上にある、試料装荷部、マーカー部、プローブ部および品質制御部とからなる。試料装荷領域にはガラス繊維膜がある。
【０１２５】
本実施例においては、抗体／抗原の組み合わせは、プローブの組み合わせで、該プローブの組み合わせは、前記プローブ部に固定化される。前記プローブの組み合わせでは、抗体プローブは抗ヒトＨＢｓ抗原マウス抗体で、抗原プローブは、それぞれ、ＨＡＶ抗原、ＨＣＶ融合抗原、ＨＤＶ融合抗原、ＨＥＶ融合抗原およびＨＧＶ融合抗原である。最適濃度の各タイプのプローブが検出線の形状でプローブ部上に固定化される（それぞれ６本の検出線を形成する）。前記キットはヒトＩｇＧの品質制御線も含む。
【０１２６】
本実施例で用いられる検出パターンは、抗原検出についての２抗体サンドイッチ検出パターンと、抗体検出についての間接検出パターンとの組み合わせとして選択される。そこで、種特異性を有する標識抗抗体と、標識特異抗体とがマーカーの組み合わせとして選択

される。前記マーカーの組み合わせでは、抗体リガンドは精製された抗ＨＢｓ抗原マウスモノクローナル抗体で、前記種特異的な抗抗体はヤギ抗ヒト抗体抗体である。前記リガンドは、それぞれ金コロイドで標識され、混合されて、線状の形状で、前記膜細片上に固定化される。マーカー部は、前記プローブ部の上に配置される。

【０１２７】

このキットは、ＨＡＶ抗体、Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原、ＨＣＶ抗体、ＨＤＶ抗体、ＨＥＶ抗体およびｈＧＶ抗体を迅速に検出することができる。結果は、肉眼で同定することができる。そのため、前記キットは時間および金を節約することができる。

【実施例１２】

【０１２８】

輸血迅速スクリーニング用ＥＬＩＳＡキットの調製

本実施例では、キットは、輸血関連抗原／抗体でコーティングされたマルチウェルプレートと、マーカーおよび基質と、陰性対照と、陽性対照と、洗浄液等とからなる。

【０１２９】

前記コーティングされたマルチウェルプレートは、９６穴プレートと、ウェルの内面にコーティングされたプローブとを含む。前記プローブ・プレートにおけるプローブの組み合わせの選択は、検出要件、例えば、中国における輸血法制に従う要件に依存する。本実施例では、抗体／抗原の組み合わせがプローブの組み合わせとして選択されるが、該組み合わせは、プローブ部に固定化される。前記プローブの組み合わせでは、抗体プローブは抗ＨＢｓ抗体ウサギ抗体で、抗原プローブは、マウス由来のＨＣＶ融合抗原と、マウス由来の$ＨＩＶ_{1+2}$混合抗原と、マウス由来の梅毒抗原とである。最適濃度のこれらのプローブが最適な配合比で混合される。そして、前記マルチウェルプレートがその内面を前記プローブの混合物でコーティングされ、ウシアルブミンでブロックされ、使用のために乾燥される。

【０１３０】

このチップキットにおける標識システムは、マーカーおよび基質（基質発色液ＡおよびＢ）で構成される。本実施例で用いられる検出パターンは、抗原検出についての２抗体サンドイッチ検出パターンと、抗体検出についての間接検出パターンとの組み合わせとして選択される。そして、種特異性を有する標識抗抗体と標識特異抗体とがマーカーの組み合わせとして選択される。マーカーの組み合わせにおいては、抗体リガンドは抗ＨＢｓ抗原ウサギ抗体であり、該抗体は、ＨＢｓ抗原を捕捉するための固定化されたウサギ抗体プローブとともに２抗体サンドイッチ複合体を形成することができ、前記抗抗体リガンドは、抗ヒト免疫グロブリンヤギ抗抗体で、該抗体は固定化された抗原プローブによって捕捉されたヒト抗体に結合することはできるが、抗ＨＢｓ抗体ウサギ抗体プローブと、標識抗ＨＢｓ抗原マウスモノクローナル抗体とには結合しない。捕捉される抗体は、抗ＨＣＶヒト抗体と、抗$ＨＩＶ_{1+2}$ヒト抗体と、抗梅毒ヒト抗体で、これらはそれぞれＨＣＶ抗原プローブ、$ＨＩＶ_{1+2}$抗原プローブおよび梅毒抗原プローブによって捕捉される。前記リガンドはそれぞれ酵素で標識され、最適濃度および最適配合比で混合される。

【０１３１】

本実施例のキットでの陰性対照および陽性対照は、実施例１のものと同じである。

【０１３２】

このキットは、ヒトの血清試料が標的分子の全てについて陰性であるのか、あるいは、前記標的分子のいずれかについて陽性であるのかを検出するために用いられる場合がある。前記標的分子はＨＢｓ抗原、ＨＣＶ抗体、$ＨＩＶ_{1+2}$抗および梅毒抗体である。献血者の迅速な選択は、患者の臨床的診断とは異なる。このキットは、献血者を数分間で一次選択するために用いられる場合がある。血漿試料のいずれかの結果が陽性のときには、その献血者は献血を拒絶される。このチップキットは、前記標的分子の１つを同定するためには適用できないが、献血者を迅速かつ経済的にスクリーニングすることができるので、臨床的に利点がある。

【０１３３】

本実施例では、３種類の陰性対照と、３種類の陽性対照と、１種類のブランクと、選択された８種類の試料が、このキットによる検出に用いられる。希釈後、ブランクを除くこれらの試料それぞれ１４個のウェルにそれぞれ添加され、前記ウェルにコーティングされたプローブの組み合わせと反応する。反応後、種特異性を有する標識抗抗体と、標識特異抗体とが前記ウェルの全てに添加され、基質液および反応停止液が添加される。結果はＥＬＩＳＡリーダで読み取られ、表５に示される。

【０１３４】

表５　献血者の迅速選択の結果

【０１３５】

【表５】

試料	本ＥＬＩＳＡキットを用いる結果*				本実施例のキットの結果**
	Ｈｂｓ抗原	ＨＣＶ	ＨＩＶ	梅毒	
１	＋	?	?	?	＋
２	-	＋	-	-	＋
３	-	-	＋	-	＋
４	-	-		＋	＋
５	-	-			＋
６	＋	＋	-	-	＋＋
７	-	-	＋	＋	＋＋
８	＋	-	-	-	＋＋
陰性対照	-	-	-	-	-
陽性対照	＋	＋	＋	＋	＋＋＋
ブランク	-	-	-	-	-

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/00026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[7] G01N33/543

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC[7] G01N, C12Q, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese Patent Document (1985~)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPOCOD, PAJ, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A1, 0114425(DIACHIP LIMITED) 01. Mar 2001(01.03.01), entire document	1—10
X	US5,763,158(Robert C. Bohannon) 09. June 1998(09.06.98), entire document	1-10

☒ 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 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
18. April 2003(18.04.03)	08 MAY 2003 (08.05.03)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer Wang, Yi 王弈 Telephone No. 86-10-62093916

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/00026

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN,A, 1351259(YANG,MENGXING), 29. May 2002(29.05.02), entire document	1-3, 10
Y		5-9
P,X	CN, A, 1373365(SHANGHAI JINGTAI BIOTECHNICAL CO., LTD.) 09.October 2002(09.10.02), entire document	1-3,10
P,Y		5-9
X	CN, A, 1184935(SUN, YOUMING), 17. June 1998(17.06.98), entire document	1-2, 4
Y		5-9
X	CN, A, 1098201(PLA NAVY MEDICINAL INSTITUTE) 01. February 1995(01.02.95), entire document	1-2, 4, 10 5-9

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN03/00026

Patent document cited in search report	Publication data	Patent family member (s)	Publication Data
CN, A, 1373365	09.10.02	None	
CN,A. 1184935	17.06.98	None	
CN, A, 1098201	01.02.95	None	
WO, A, 0114425	01.03.01	AU, A, 6735600	19.03.01
CN, A, 1351259	29.05.02	None	
US 5,763,158	09.06.98	None	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN03/00026

A. 主题的分类

IPC[7] G01N33/543

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC[7] G01N，C12Q，C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献（1985～）

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和，如果实际可行的，使用的检索词)

WPI，EPODOC，PAJ，CNPAT

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求编号
X	WO，A1，0114425(DIACHIP LIMITED) 01.3 月 2001(01.03.01)，全文	1—10
X	US5,763,158(Robert C. Bohannon) 09.6 月 1998(09.06.98)，全文	1—10
X	CN，A，1351259(杨梦甦) 29.5 月 2002(29.05.02)，全文	1—3，10
Y		5-9

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型：

"A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

"L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件，为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布的在后文件，它与申请不相抵触，但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

"X" 特别相关的文件，仅仅考虑该文件，权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，权利要求记载的发明不具有创造性

"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
18.4 月 2003(18.04.03)	08. 5月 2003(08.05.03)
国际检索单位名称和邮寄地址 ISA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号： 86-10-62019451	受权官员 王奕章 电话号码：86-10-62093916

PCT/ISA/210 表(第 2 页)(1998 年 7 月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN03/00026

C(续). 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求编号
P,X	CN ,A, 1373365(上海晶泰生物技术有限公司) 09.10 月 2002(09.10.02), 全文	1－3，10
P,Y		5-9
X	CN, A, 1184935(孙有名) 17.6 月 1998(17.06.98), 全文	1－2，4
Y		5-9
X	CN, A, 1098201(中国人民解放军海军医学研究所) 01.2 月 1995(01.02.95), 全文	1－2，4，10
Y		5-9

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00026

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN, A, 1373365	09.10.02	无	
CN, A, 1184935	17.06.98	无	
CN, A, 1098201	01.02.95	无	
CN, A, 1351259	29.05.02	无	
US5,763,158	09.06.98	无	
WO, A, 0114425	01.03.01	AU, A, 6735600	19.03.01

PCT/ISA/210 表(同族专利附件)(1998 年 7 月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(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,PT,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

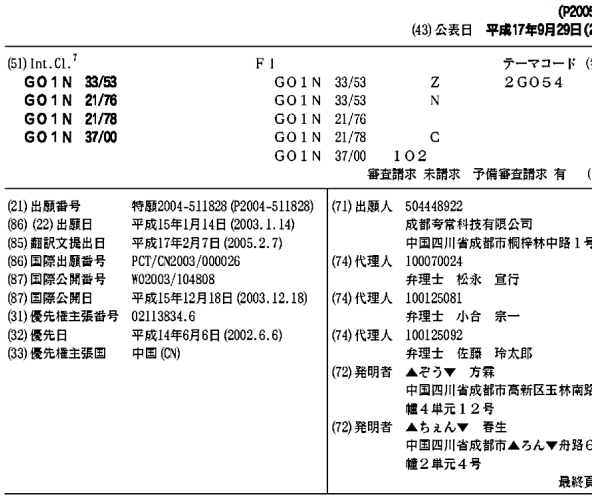
(72)発明者 王 建霞
中国四川省眉山市紗轂行南段６号３幢２単元２号

Ｆターム(参考) 2G054 AA06 AB04 CE02 EA01 EA03

专利名称(译)	基于抗原 - 抗体反应的探针板，测试试剂盒和使用方法		
公开(公告)号	JP2005529334A	公开(公告)日	2005-09-29
申请号	JP2004511828	申请日	2003-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	成都夸常科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	成都夸常科技有限公司		
[标]发明人	ぞう方霖 ちぇん春生 王建霞		
发明人	▲ぞう▼ 方霖 ▲ちぇん▼ 春生 王 建霞		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54366		
FI分类号	G01N33/53.Z G01N33/53.N G01N21/76 G01N21/78.C G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03		
代理人(译)	松永信行 佐藤 玲太郎		
优先权	02113834.6 2002-06-06 CN		
其他公开文献	JP2005529334A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括A.探针抗体和探针抗原的组合，B。针对不同结构特异性免疫球蛋白的探针的抗体组合，C.针对不同结构特异性免疫球蛋白的探针的抗体，探针用于测定包含至少一个反应器的生物样品的探针，其中至少一种抗原和/或探针与抗体的组合中的至少一种的组合直接或间接固定·对于盘子。本发明还涉及包含探针板的测试试剂盒和使用该试剂盒测试生物样品的方法。探针板可用于分析对应于探针组合的不同靶分子。通过使用该试剂盒，减少了分析所需的反应器数量和检测时间，同时提高了检测的可比性。因此，该探针板具有经济，省时和高效的优点。



(P200
(43) 公表日 平成17年9月29日(2

(51) Int.Cl.[7]	F I		テーマコード
G01N 33/53	G01N 33/53	Z	2G054
G01N 21/76	G01N 33/53	N	
G01N 21/78	G01N 21/76		
G01N 37/00	G01N 21/78	C	
	G01N 37/00	102	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (

(21) 出願番号	特願2004-511828 (P2004-511828)
(86) (22) 出願日	平成15年1月14日 (2003.1.14)
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月7日 (2005.2.7)
(86) 国際出願番号	PCT/CN2003/000026
(87) 国際公開番号	WO2003/104808
(87) 国際公開日	平成15年12月18日 (2003.12.18)
(31) 優先権主張番号	02113834.6
(32) 優先日	平成14年6月6日 (2002.6.6)
(33) 優先権主張国	中国 (CN)

(71) 出願人 504448922
成都夸常科技有限公司
中国四川省成都市桐梓林中路１号
(74) 代理人 100070024
弁理士 松永 宣行
(74) 代理人 100125081
弁理士 小合 宗一
(74) 代理人 100125092
弁理士 佐藤 玲太郎
(72) 発明者 ▲ぞう▼ 方霖
中国四川省成都市高新区玉林南路
幢４単元１２号
(72) 発明者 ▲ちぇん▼ 春生
中国四川省成都市▲ろん▼舟路６
幢２単元４号

最終頁