

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 615**

51 Int. Cl.:

G01N 27/416 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2009 E 09722260 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2261648**

54 Título: **Procedimiento de análisis eléctrico**

30 Prioridad:

17.03.2008 JP 2008068257

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.08.2014

73 Titular/es:

**MITSUBISHI CHEMICAL MEDIENCE
CORPORATION (100.0%)
2-8 Shibaura 4-chome Minato-ku
Tokyo 108-8559, JP**

72 Inventor/es:

**IFUKU, YASUO y
MURAI, NAGAMOTO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 484 615 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de análisis eléctrico

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de análisis eléctrico. La expresión "análisis" tal como se usa en el presente documento incluye una detección para evaluar la presencia o la ausencia de una sustancia a analizar, y una medición para determinar de manera cuantitativa o semi-cuantitativa la cantidad de la sustancia a analizar.

Técnica antecedente

10 En los análisis de muestras biológicas tales como pruebas clínicas, se desea un procedimiento de análisis con una alta precisión y sensibilidad de detección, debido a que en muchos casos ha de medirse una cantidad traza de un compuesto. Como un procedimiento de análisis de este tipo, para conseguir una alta sensibilidad de detección se ha intentado no solo un procedimiento que utiliza una interacción específica, tal como una reacción de antígeno-anticuerpo y una reacción de enzima-sustrato, sino también un procedimiento que utiliza una combinación de la misma con un análisis eléctrico.

15 Por ejemplo, la literatura de patente 1 divulga una combinación de inmunocromatografía y un ensayo amperimétrico de tipo de detección de intensidad, y la literatura de patente 2 divulga un biosensor en el que una proteína o una enzima está inmovilizada sobre la puerta de un transistor de efecto de campo o un transistor de electrón único. Estas técnicas de la técnica anterior están caracterizadas por detectar de manera directa un complejo formado sobre el electrodo o la puerta mediante una interacción específica.

20 Además, en la literatura de no patente 1, la literatura de patente 3 y la literatura de patente 4, se divulgan procedimientos que utilizan la deposición o adsorción sobre un sensor causada por una reacción química, en lugar de la utilización de una interacción específica.

La literatura de no patente 1 divulga un procedimiento en el que un ión plata disuelto en un líquido de reacción se reduce para depositar plata sobre un sensor, la plata se reoxida para generar un ión plata, y el cambio electroquímico durante la reoxidación se detecta como un cambio en la intensidad.

25 La literatura de patente 3 divulga un procedimiento para determinar la concentración o cantidad de una sustancia a someter a ensayo en una muestra, usando un anticuerpo marcado en el que está unida colinesterasa como una enzima de marcado y medir la actividad de la colinesterasa, en el que la actividad enzimática se detecta mediante la adsorción y la concentración de un producto de reacción de enzima, tiocolina, sobre un electrodo de metal noble y la amplificación de la señal de intensidad generada mediante desorción por reducción de la tiocolina a partir del electrodo.

30 La literatura de patente 4 divulga un aparato y un procedimiento para determinar la cantidad de producción o la tasa de producción de un compuesto de tiol que es un producto de una reacción cíclica de un anticuerpo marcado con enzima, como la tasa de adsorción sobre un electrodo de oro formado sobre un transistor de efecto de campo de puerta aislada.

35 En estas técnicas de la técnica anterior, cada reacción química y cada detección eléctrica se llevan a cabo bajo condiciones no de flujo.

40 La literatura de patente 5 divulga un biosensor para detectar una molécula implicada en una unión específica de una biomolécula, caracterizado por comprender (i) una parte de reacción para llevar a cabo (a) una reacción de unión específica y (b) una reacción de enzima, (ii) una parte de detección para hacer que reaccione una membrana de material de oxidación-reducción con el producto de reacción de oxidación-reducción generado mediante las reacciones (a) y (b), y (iii) una parte de medición para determinar el cambio en la constante dieléctrica mediante la medición de un cambio en el estado del membrana de material de oxidación-reducción causado por la reacción de la misma con el producto de reacción de oxidación-reducción.

45 En esta técnica de la técnica anterior, no se genera depósito alguno sobre el sensor, en una similar a las que se divulgan en las literaturas de patente 1 y 2.

[literatura de patente 1] publicación de patente no examinada de Japón (Kokai) con N° 2001-153838

[literatura de patente 2] publicación de patente no examinada de Japón (Kokai) con N° 10-260156

[literatura de patente 3] publicación de patente no examinada de Japón (Kokai) con N° 2004-257996

[literatura de patente 4] publicación de patente no examinada de Japón (Kokai) con N° 2007-263914

50 [literatura de patente 5] publicación de patente no examinada de Japón (Kokai) con N° 2005-24483

[literatura de no patente 1] *Analytical chemistry*, (Estados Unidos), 2005, vol. 77, págs. 579-584

Divulgación de la invención**Problemas a resolver por la invención**

A pesar de que se conocen estas técnicas de la técnica anterior, se desea un procedimiento de análisis con una precisión y sensibilidad de detección más alta con el fin de medir una cantidad traza de un compuesto. Bajo las circunstancias de que es conocimiento técnico común que estos procedimientos de la técnica anterior que utilizan la deposición, precipitación o adsorción sobre la parte de detección causada por reacciones químicas en procedimientos de análisis eléctrico deberían llevarse a cabo bajo condiciones no de flujo, desde el punto de vista de promover la deposición y similar, los inventores de la presente invención encontraron que la precisión y sensibilidad de detección pueden mejorarse de manera significativa al llevar a cabo el análisis bajo condiciones de flujo, en contradicción con el conocimiento técnico común.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es la provisión de un procedimiento de análisis con una precisión y sensibilidad de detección más alta que los procedimientos de la técnica anterior.

Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a:

- [1] un procedimiento de análisis caracterizado por comprender las etapas de:
- (a) hacer que reaccione una sustancia a analizar con por lo menos un socio específico que muestra una interacción selectiva con la sustancia, convertir una sustancia soluble en una sustancia insoluble mediante una reacción de insolubilización, en correlación con la cantidad de la sustancia a analizar contenida en una muestra, y depositar la sustancia insoluble sobre una parte de detección, y
- (b) analizar eléctricamente la sustancia insoluble depositada sobre la parte de detección, en el que por lo menos la reacción de insolubilización en la etapa (a) se lleva a cabo bajo condiciones de flujo;
- [2] el procedimiento de [1], en el que el socio específico es una enzima;
- [3] el procedimiento de [1], en el que la etapa (a) comprende:
- (1) formar un complejo que comprende una sustancia a analizar, un socio específico que muestra una interacción selectiva con la sustancia, y una sustancia de marcado, en correlación con la cantidad de la sustancia a analizar contenida en una muestra, y
- (2) convertir una sustancia soluble en una sustancia insoluble mediante una reacción de insolubilización causada de manera directa o indirecta por la sustancia de marcado contenida en el complejo formado, y depositar la sustancia insoluble sobre una parte de detección, en el que por lo menos la etapa (2) se lleva a cabo bajo condiciones de flujo;
- [4] el procedimiento de [3], en el que la sustancia de marcado es una hidrolasa;
- [5] el procedimiento de [4], en el que la hidrolasa es fosfatasa alcalina;
- [6] el procedimiento de [1] a [5], en el que la reacción de insolubilización es una reacción de oxidación-reducción;
- [7] el procedimiento de [1] a [6], en el que la sustancia soluble está seleccionada de entre un ión inorgánico, un ión orgánico, un sustrato de enzima o su producto de reacción, y un colorante;
- [8] el procedimiento de [7], en el que la sustancia soluble es un ión de metal;
- [9] el procedimiento de [8], en el que el ión de metal es un ión plata;
- [10] el procedimiento de [1] a [9], en el que la parte de detección está compuesta de uno cualquiera de un metal, un polímero, carbono, una estructura de nanotubos, grafito o sustancia inorgánica, o una combinación de los mismos;
- [11] el procedimiento de [1] a [10], en el que la parte de detección tiene una o más estructuras tridimensionales que tienen una forma similar a un ángulo agudo;
- [12] el procedimiento de [1] a [11], en el que el socio específico está inmovilizado sobre la parte de detección;
- [13] el procedimiento de [1] a [12], en el que las condiciones de flujo son un flujo forzado o un flujo espontáneo;
- [14] el procedimiento de [1] a [13], en el que el procedimiento de análisis que comprende la etapa de análisis eléctrico es un análisis amperimétrico;

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, puede llevarse a cabo un análisis con una precisión y sensibilidad de detección más alta en comparación con la técnica anterior.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un dibujo que muestra una serie de reacciones utilizando en una realización del procedimiento de análisis de la presente invención.

La figura 2 es una vista en planta que muestra de manera esquemática la parte de electrodo construida en el

Ejemplo 1.

La figura 3 es una vista en planta que muestra de manera esquemática el patrón de máscara usado en la construcción de la parte de electrodo que se muestra en la figura 2.

5 La figura 4 es una vista en perspectiva que muestra de manera esquemática la unidad de biosensor construida en el Ejemplo 1.

La figura 5 es un dibujo que muestra de manera esquemática el procedimiento de producción de la unidad de biosensor que se muestra en la figura 4.

La figura 6 es una vista en planta que muestra de manera esquemática la unidad de biosensor que se muestra en la figura 4.

10 La figura 7 es una vista en sección transversal que muestra de manera esquemática la estructura interna de la unidad de biosensor que se muestra en la figura 4.

La figura 8 es una vista en perspectiva que muestra de manera esquemática el biosensor que se muestra en la figura 4 conectado con un aparato para controlar las condiciones de flujo y un analizador electroquímico.

15 La figura 9 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml).

La figura 10 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 48 U/ml).

La figura 11 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 48 U/ml) en ausencia de un ión plata.

20 La figura 12 es una gráfica que muestra valores de intensidad de oxidación a un potencial eléctrico de +0,138 V obtenidos en mediciones de CV de diversas concentraciones de antígeno HBs (concentraciones de antígeno = 0, 24 y 48 U/ml).

La figura 13 es una gráfica que muestra valores de intensidad de oxidación a un potencial eléctrico de +0,086 V obtenidos en mediciones de CV de diversas concentraciones de glucosa (concentraciones de glucosa = 0, 100, y 200 mg/dl).

25 La figura 14 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de glucosa (concentración de glucosa = 0 mg/dl).

La figura 15 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de glucosa (concentración de glucosa = 200 mg/dl).

30 La figura 16 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de glucosa (concentración de glucosa = 0 mg/dl) bajo condiciones no de flujo.

La figura 17 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de glucosa (concentración de glucosa = 200 mg/dl) bajo condiciones no de flujo.

35 La figura 18 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de glucosa (concentración de glucosa = 200 mg/dl) usando una parte de electrodo en la que no está inmovilizada GOD sobre el electrodo de trabajo.

La figura 19 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs bajo la condición 1 (etapa A / etapa B = flujo / flujo) que se describe en el Ejemplo 3.

40 La figura 20 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs bajo la condición 2 (etapa A / etapa B = flujo / no flujo) que se describe en el Ejemplo 3.

La figura 21 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs bajo la condición 3 (etapa A / etapa B = no flujo / no flujo) que se describe en el Ejemplo 3.

La figura 22 es un dibujo que muestra de manera esquemática la estructura de la tira inmunocromatográfica que tiene una parte de electrodo, construida en el Ejemplo 4.

45 La figura 23 es una vista en planta esquemática de la tira inmunocromatográfica que tiene una parte de electrodo que se muestra en la figura 22.

La figura 24 es una vista en perspectiva (unidades de dimensiones: mm) que muestra de manera esquemática un depósito para aplicar un reactivo, que es un componente de la tira inmunocromatográfica que tiene una parte de electrodo que se muestra en la figura 22.

50 La figura 25 es una vista en planta (unidades de dimensiones: mm) que muestra de manera esquemática el depósito para aplicar un reactivo que se muestra en la figura 24.

La figura 26 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml).

55 La figura 27 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 18 U/ml).

La figura 28 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de CV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 36 U/ml).

60 La figura 29 es una gráfica que muestra valores de intensidad de oxidación a un potencial eléctrico de +0,132 V obtenidos en mediciones de CV de diversas concentraciones de antígeno HBs (concentraciones de antígeno = 0, 24 y 48 U/ml).

La figura 30 es una vista en perspectiva que muestra de manera esquemática el canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo, construido en el Ejemplo 5.

65 La figura 31 es una vista en perspectiva (unidades de dimensiones: mm) que muestra de manera esquemática un depósito para aplicar un reactivo, que es un componente del canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo de carbono que se muestra en la figura 30.

La figura 32 es una vista en planta (unidades de dimensiones: mm) que muestra de manera esquemática el

depósito para aplicar un reactivo que se muestra en la figura 30.

La figura 33 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml), usando el canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo de carbono.

La figura 34 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0,25 U/ml), usando el canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo de carbono.

La figura 35 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 2,5 U/ml), usando el canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo de carbono.

La figura 36 es una gráfica que muestra valores de intensidad de oxidación a un potencial eléctrico de +0,165 V obtenidos en mediciones de DPV de diversas concentraciones de antígeno HBs (concentraciones de antígeno = 0, 0,25 y 2,5 U/ml).

La figura 37 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml), usando una parte de electrodo de carbono a una concentración de NaCl de 0 mmol/l.

La figura 38 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml), usando una parte de electrodo de carbono a una concentración de NaCl de 0,5 mmol/l.

La figura 39 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml), usando una parte de electrodo de carbono a una concentración de NaCl de 1 mmol/l.

La figura 40 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml), usando una parte de electrodo de carbono a una concentración de NaCl de 2 mmol/l.

La figura 41 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 45 U/ml), usando una parte de electrodo de carbono a una concentración de NaCl de 0 mmol/l.

La figura 42 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 45 U/ml), usando una parte de electrodo de carbono a una concentración de NaCl de 0,5 mmol/l.

La figura 43 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 45 U/ml), usando una parte de electrodo de carbono a una concentración de NaCl de 1 mmol/l.

La figura 44 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 45 U/ml), usando una parte de electrodo de carbono a una concentración de NaCl de 2 mmol/l.

La figura 45 es una vista en planta que muestra de manera esquemática la parte de electrodo construida en el Ejemplo 7.

La figura 46 es una micrografía óptica de la parte de electrodo que se muestra en la figura 45.

La figura 47 es una micrografía electrónica de la parte de electrodo que se muestra en la figura 45.

La figura 48 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml), usando la parte de electrodo tridimensionalizada.

La figura 49 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0,7 U/ml), usando la parte de electrodo tridimensionalizada.

La figura 50 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0 U/ml), usando la parte de electrodo plana.

La figura 51 es una gráfica que muestra el resultado de una medición de DPV de antígeno HBs (concentración de antígeno = 0,7 U/ml), usando la parte de electrodo plana.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de análisis que utiliza una interacción selectiva (por ejemplo, una reacción de antígeno-anticuerpo o una reacción de enzima-sustrato) y una reacción de insolubilización (preferentemente una reacción de oxidación-reducción), en el que una sustancia insoluble que se produce finalmente mediante la reacción de insolubilización se deposita (se precipita y se adsorbe, se insolubiliza o se separa) sobre la superficie de una parte de detección, y la sustancia insoluble depositada se analiza (se detecta o se mide) eléctricamente, y caracterizado por que por lo menos la reacción de insolubilización se lleva a cabo bajo condiciones de flujo.

De acuerdo con la interacción selectiva o la reacción de insolubilización que se utiliza, la presente invención incluye, por ejemplo,

(1) un procedimiento en el que una reacción de insolubilización se causa de manera directa o indirecta por una sustancia de marcado capaz de marcar de manera directa o indirecta uno de los socios que están implicadas en una interacción selectiva (al que se hace referencia a veces en lo sucesivo en el presente documento como un procedimiento de análisis de formación de complejos), y

(2) un procedimiento en el que una reacción de insolubilización se causa de manera directa o indirecta por una interacción selectiva *per se* (al que se hace referencia a veces en lo sucesivo en el presente documento como un procedimiento de análisis de utilización de enzima). A este respecto, la clasificación se basa en si se forma o no un complejo mediante la interacción selectiva. Por ejemplo, un procedimiento que utiliza una enzima como una sustancia de marcado se incluye en el procedimiento de análisis de formación de complejos.

La expresión "una reacción de insolubilización se causa de manera directa" tal como se usa en el presente documento quiere decir que la reacción *per se* en la que participa una sustancia de marcado o una interacción selectiva es una reacción de insolubilización, y una sustancia insoluble se genera mediante la reacción. La expresión "una reacción de insolubilización se causa de manera indirecta" tal como se usa en el presente documento quiere decir una sustancia generada mediante la reacción en la que participa una sustancia de marcado o una interacción

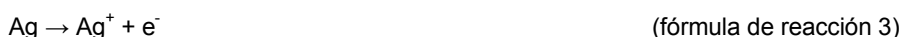
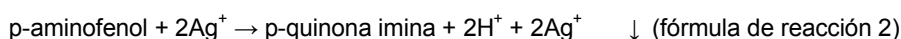
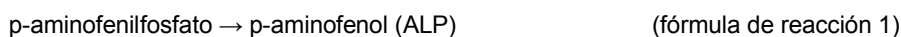
selectiva funciona como un desencadenante, y una sustancia insoluble se genera mediante una reacción de insolubilización que tiene lugar finalmente.

5 En lo sucesivo en el presente documento, se explicará el esbozo de la presente invención, en base al esquema de reacción de la figura 1 que muestra una realización del procedimiento de análisis de formación de complejos de la presente invención, y la presente invención se explicará adicionalmente con detalle.

En el sistema de análisis que se muestra en la figura 1, el antígeno 3 es un analito, una reacción de antígeno-anticuerpo (procedimiento de intercalado) se utiliza como la interacción selectiva, y el anticuerpo marcado con ALP 4 [un anticuerpo que es específico frente al antígeno y está marcado con una enzima tal como fosfatasa alcalina (ALP)] se usa como un reactivo.

10 En este sistema de análisis, la fórmula de reacción 1 que se describe en lo sucesivo se utiliza como la reacción de enzima de la enzima de marcado, y la fórmula de reacción 2 se utiliza como la reacción de insolubilización. En la figura 1, pAPP representa p-aminofenilfosfato, pAP representa p-aminofenol, pQI representa p-quinona imina, y pAPP es un sustrato de ALP. La descripción "(ALP)" en la fórmula de reacción 1 muestra que ALP funciona como un catalizador en la fórmula de reacción 1.

15 Además, como el procedimiento de análisis eléctrico, se usa un análisis amperimétrico que usa una parte de electrodo que tiene un electrodo de trabajo 1, un contraelectrodo y un electrodo de referencia.



20 En el sistema de análisis que se muestra en la figura 1, un anticuerpo 2 específico frente al analito (antígeno) está inmovilizado sobre el electrodo de trabajo 1 que constituye una parte de electrodo amperimétrico, y el electrodo de trabajo funciona como una parte de detección. Cuando una muestra que contiene el analito (antígeno 3) y el anticuerpo marcado con ALP 4 se suministran, a lo largo del sentido de flujo representado por la flecha A, desde el sentido de aguas arriba de la parte de detección al sistema de análisis, un complejo de anticuerpo inmovilizado / antígeno / anticuerpo marcado con ALP se forma sobre la parte de detección. La cantidad de complejo formado está correlacionada con la cantidad del analito contenida en la muestra. Después de la formación del complejo, o de manera simultánea con la formación, se suministra p-aminofenilfosfato (pAPP), un sustrato para la enzima de marcado ALP, desde el sentido de aguas arriba de la parte de detección al sistema de análisis. El pAPP se convierte en p-aminofenol (pAP) (fórmula de reacción 1) y, en presencia de un ión plata (Ag^+ , soluble en agua), se deposita plata (Ag, insoluble en agua) (fórmula de reacción 2) sobre la parte de detección. Debido a que una intensidad discurre desde el electrodo de trabajo hasta el contraelectrodo (fórmula de reacción 3) mediante la reoxidación de la plata depositada sobre la parte de detección (electrodo de trabajo), la cantidad de plata puede determinarse mediante la medición de la intensidad de oxidación. Más en particular, se conecta un potenciómetro con el electrodo de trabajo, el contraelectrodo y el electrodo de referencia, y el potencial eléctrico del electrodo de trabajo se barre con respecto al electrodo de referencia para medir la intensidad de oxidación acompañada por la reoxidación de la plata.

La interacción selectiva que puede usarse en la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando esta sea una interacción en la que uno de los socios que participa en la interacción pueda ser un analito, y una reacción de insolubilización pueda llevarse a cabo de manera directa o indirecta o pueda formarse un complejo, en correlación con la cantidad del analito contenida en una muestra. Los ejemplos típicos de la interacción selectiva incluyen una reacción de antígeno-anticuerpo, una reacción de hibridación de ácido nucleico-ácido nucleico, una reacción de enzima-sustrato, una interacción de ácido nucleico-proteína, una interacción de receptor-ligando, una interacción de proteína-proteína (por ejemplo, una reacción de IgG con proteína A) y una interacción de molécula pequeña-proteína (por ejemplo, una reacción de biotina con avidina). Estas son, en su mayoría, unas interacciones selectivas capaces de formar un complejo (por ejemplo, un inmunocomplejo), pero la reacción de enzima-sustrato puede ser una reacción de insolubilización en correlación con la cantidad del analito contenida en una muestra, o una reacción que desencadena una reacción de insolubilización.

Además de estas interacciones, se conocen diversas combinaciones de una sustancia y su socio específico que muestran la interacción selectiva. Los ejemplos del analito incluyen proteínas (por ejemplo, enzima, anticuerpo / anticuerpo, lectina), péptidos, lípidos, hormonas (hormonas que contienen nitrógeno tales como aminas, derivados de aminoácidos, péptidos y proteínas, y hormonas esteroideas), ácidos nucleicos, cadenas de azúcar (por ejemplo, azúcares, oligosacáridos y polisacáridos), fármacos, colorantes, compuestos de moléculas pequeñas, sustancias orgánicas y sustancias inorgánicas; una fusión de los mismos; moléculas que constituyen un virus o una célula; y glóbulos.

55 Por ejemplo, cuando se utiliza una reacción de antígeno-anticuerpo como la interacción selectiva, la combinación de un analito y su socio específico puede ser una combinación de un antígeno (analito) y un anticuerpo (socio específico) o una combinación de un anticuerpo (analito) y un antígeno (socio específico). Cuando se utiliza una

reacción de enzima-sustrato como la interacción selectiva, la combinación de un analito y su socio específico puede ser una combinación de un sustrato (analito) y una enzima (socio específico) o una combinación de una enzima (analito) y un sustrato (socio específico).

5 Como una muestra que contiene el analito, por ejemplo, puede usarse sangre (sangre completa, plasma, suero), linfa, saliva, orina, heces, sudor, moco, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, secreción nasal, secreción cervical o vaginal, semen, líquido pleural, líquido amniótico, líquido ascítico, líquido en el oído medio, líquido sinovial, aspirado gástrico, o diversos fluidos biológicos tales como extractos u homogeneizados derivados de tejidos o células. Además, puede usarse casi cualquier muestra de líquido, tal como extractos u homogeneizados derivados de alimentos, suelo o plantas, agua fluvial, agua de manantiales termales, agua potable y agua contaminada.

10 En la presente invención, pueden seleccionarse reactivos que incluyen un reactivo de marcado de manera apropiada de acuerdo con la interacción selectiva usada. Por ejemplo, cuando se utiliza una reacción de antígeno-anticuerpo, pueden usarse diversos procedimientos conocidos tales como un procedimiento de intercalado, un procedimiento en dos etapas, un procedimiento de competición y un procedimiento de inhibición. En el procedimiento de intercalado, puede usarse una combinación de un socio inmovilizado y un socio marcado, tal como se muestra en la figura 1. En
15 el procedimiento en dos etapas, puede usarse una combinación de un socio inmovilizado, un socio no marcado y una sustancia marcada que reacciona de manera específica con el socio no marcado, más en particular, un procedimiento que usa un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo marcado, o un procedimiento que usa un anticuerpo biotinilado y una avidina marcada. En el procedimiento de competición, puede usarse una combinación de una sustancia marcada (cantidad conocida) de un analito (competidor) y un socio inmovilizado.

20 La sustancia soluble que puede usarse en la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando esta sea soluble en un disolvente usado en el sistema de análisis antes de que se lleve a cabo una reacción de insolubilización, esta pueda convertirse en una sustancia insoluble en el disolvente mediante la reacción de insolubilización, y la sustancia insoluble generada mediante la reacción de insolubilización pueda analizarse eléctricamente. La expresión "reacción de insolubilización" tal como se usa en el presente documento incluye una
25 reacción en la que una sustancia que tiene una baja solubilidad se genera a partir de una sustancia soluble mediante la "reacción de insolubilización". Las expresiones "soluble" e "insoluble" pueden definirse de manera apropiada de acuerdo con un sistema de disolvente usado en el sistema de análisis. Por ejemplo, cuando se usa un disolvente acuoso, las expresiones "soluble" e "insoluble" quieren decir "soluble en agua" e "insoluble en agua". Cuando se usa un disolvente orgánico, las expresiones "soluble" e "insoluble" quieren decir "soluble en disolvente orgánico" e
30 "insoluble en disolvente orgánico". En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se explicará principalmente de acuerdo con realizaciones que usan un disolvente acuoso (es decir, un sistema en el que una sustancia soluble en agua se convierte en una sustancia insoluble en agua mediante una reacción de insolubilización), pero los expertos en la materia pueden llevar a cabo la presente invención usando un disolvente que no sea agua, al modificar de manera apropiada las realizaciones.

35 La sustancia soluble en agua que puede usarse en la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando esta sea soluble en un disolvente acuoso usado en el sistema de análisis antes de que se lleve a cabo una reacción de insolubilización, y esta pueda convertirse en una sustancia insoluble en el disolvente acuoso mediante la reacción de insolubilización. Los ejemplos de la sustancia soluble en agua incluyen iones inorgánicos (preferentemente iones de metal), iones orgánicos, un sustrato de enzima o su producto de reacción y colorantes.

40 Los ejemplos de los iones de metal incluyen ión antimonio, ión bismuto, ión cobre, ión mercurio, ión plata, ión paladio, ión platino e ión oro. Estos iones de metal son solubles en agua en un disolvente acuoso, y pueden formar complejos de metal (preferentemente iones de complejo de metal), y se depositan como metales mediante una reacción de insolubilización.

45 Como el ión de metal, pueden usarse cationes divalentes tales como ión cobre, ión níquel e ión hierro. Estos cationes divalentes son solubles en agua en un disolvente acuoso, y se depositan como complejos de metal ($MH[Fe(CN)_6]$ (M: catión divalente)) al unirse con un ión $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (por ejemplo, ión $[Fe(CN)_6]^{3-}$ generado mediante la oxidación de ión $[Fe(CN)_6]^{4-}$).

50 Una reacción en la que un ión de metal se reduce y se insolubiliza (se deposita) como un metal es dependiente de su potencial de oxidación-reducción. Cuanto más baja sea la tendencia de ionización, con más facilidad se deposita el metal y, por lo tanto, esta no está limitada a las reacciones anteriores. Además, la facilidad de deposición puede verse considerablemente afectada por la actividad electroquímica del ión en una solución y otros factores (por ejemplo, la temperatura, el pH, la fuerza del ión y la composición del líquido de reacción) y, por lo tanto, la expresión "metal depositado" tal como se usa en el presente documento debería interpretarse de la manera más amplia, y no debería interpretarse de manera restrictiva. Por ejemplo, el grado de la insolubilidad puede controlarse mediante la
55 adición, al sistema de reacción de insolubilización, de un ión capaz de formar una sal insoluble con el ión de metal. Como alternativa, a veces es preferente insolubilizar y depositar el ión de metal como un metal, en ausencia del ión capaz de formar una sal insoluble durante la reacción de insolubilización. La cantidad del ión capaz de formar una sal insoluble contenida en el sistema de reacción de insolubilización puede seleccionarse de manera apropiada por los expertos en la materia. Esta puede ser de 0 a 5 mmol/l, preferentemente de 0 a 2 mmol/l, más preferentemente de 0 a 1 mmol/l, y lo más preferentemente de 0 a 0,5 mmol/l. La sustancia a depositar no está limitada a iones de
60

metal, si bien puede usarse preferentemente cualquier sustancia que satisfaga las condiciones anteriores.

Los ejemplos del colorante que puede usarse como la sustancia soluble en agua incluyen reactivo de Schiff y anilina. El reactivo de Schiff es soluble en agua en un disolvente acuoso. Una molécula de reactivo de Schiff se une con dos moléculas de un grupo aldehído (por ejemplo, grupo aldehído generado por la reducción de un grupo carboxilo) y se deposita como un compuesto de color púrpura rojizo por una reacción de reducción. La anilina es soluble en agua en un disolvente acuoso, y se deposita como polianilina mediante una reacción de oxidación.

Ejemplos adicionales del colorante soluble en agua incluyen 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol (BCI), Azul nitro-tetrazolio cloruro (NBT), e indol, que se depositan por reducción como sustancias insolubles tales como 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo (2BCI), BCI / NBT diformazán e índigo. Estos colorantes pueden generarse a partir de sustratos de enzima apropiados, tal como 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y 3-indoxilfosfato, mediante una reacción de enzima mediante una enzima de marcado (por ejemplo, fosfatasa alcalina; ALP). Es decir, el BCI y el indol son productos de reacción de los sustratos de enzima.

Cuando se usa el sustrato de enzima BCIP, se genera BCI mediante una reacción de enzima en la que está implicada ALP, y se deposita 2BCI por una reacción de reducción. Cuando se usa una mezcla del sustrato de enzima BCIP y el colorante NBT, se genera 2BCI mediante la reacción de enzima de ALP y, al mismo tiempo, se genera NBT diformazán mediante una reacción de reducción y, como resultado, se deposita un complejo del mismo, 2BCI / NBT diformazán. Cuando se usa el sustrato de enzima 3-indoxilfosfato, se genera indol mediante una reacción de enzima de ALP, y se deposita como índigo por una reacción de reducción.

En estas realizaciones, una reacción de enzima en la que está implicada ALP usada como una sustancia de marcado desencadena la reacción de insolubilización subsiguiente y, como resultado, una sustancia soluble en agua se convierte en una sustancia insoluble en agua. La presente invención incluye una realización en la que una sustancia de marcado funciona como un desencadenante y la reacción de insolubilización se causa de manera indirecta, y una realización en la que la reacción de insolubilización se causa de manera directa mediante la sustancia de marcado.

Los ejemplos del sustrato de enzima que puede usarse como la sustancia soluble en agua incluyen, además de pAPP (o sus derivados) tal como se ha descrito en lo que antecede, derivados de éster de tiocolina, tal como acetiltiocolina, propioniltiocolina, succiniltiocolina y butiriltiocolina. Cuando un derivado de éster de tiocolina se usa junto con un ión de metal que se ha descrito en lo que antecede (por ejemplo, oro o plata), el ión de metal se reduce mediante una reacción de enzima usando una enzima de marcado apropiada (por ejemplo, una colinesterasa tal como acetilcolinesterasa o acilcolinesterasa) y se deposita como un metal. Además, se genera tiocolina mediante la reacción de enzima, y el grupo tiol de la tiocolina se une con una parte del metal depositado y, como resultado, el metal también se deposita como un complejo de metal-tiocolina. Además, la tiocolina generada también se deposita mediante unión con un metal que forma un electrodo o un sustrato (por ejemplo, un electrodo de oro o un sustrato de oro) por medio del grupo tiol. Puede usarse una enzima de marcado acetilcolinesterasa para un sustrato de enzima acetiltiocolina o propioniltiocolina, y puede usarse una enzima de marcado acilcolinesterasa para un sustrato de enzima succiniltiocolina o butiriltiocolina.

Además, como la sustancia soluble en agua, pueden usarse sales de arildiazonio tales como R-Ph-N₂BF₄. Cuando se usa una sal de arildiazonio, se genera un radical activo que tiene una alta actividad química mediante una reacción de reducción, y puede unirse con diversas partes de detección, preferentemente una parte de detección fabricada de carbono, grafito o nanotubos de carbono, mediante unión covalente.

Tal como en lo que antecede, se explican la sustancia soluble (en particular, sustancia soluble en agua) que puede usarse en el procedimiento de análisis (incluyendo el procedimiento de análisis de formación de complejos y el procedimiento de análisis de utilización de enzima) de la presente invención. En el procedimiento de análisis de formación de complejos de la presente invención, una sustancia de marcado puede seleccionarse de manera apropiada de acuerdo con la sustancia soluble y el sistema de reacción usado. Por ejemplo, además de hidrolasas tales como ALP o colinesterasas que se han descrito en lo que antecede, pueden usarse transferasas, liasas, ligasas, isomerasas y oxidorreductasas. Los ejemplos de oxidorreductasas incluyen glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa, xantina oxidasa, aminoácido oxidasa, ascorbato oxidasa, acil-CoA oxidasa, colesterol oxidasa, galactosa oxidasa, oxalato oxidasa y sarcosina oxidasa. Estas enzimas no están particularmente limitadas, siempre y cuando estas puedan desencadenar de manera directa o indirecta una reacción de insolubilización (por ejemplo, una reacción de oxidación, una reacción de reducción, una reacción de hidrólisis, una reacción de deshidratación, una polimerización de adición, una polimerización de condensación o una reacción de neutralización), una sustancia soluble se convierta en una sustancia insoluble mediante la reacción de insolubilización, y una reacción de adsorción y / o deposición se cause mediante la deposición, unión y / o precipitación sobre la superficie de un cuerpo sólido. Estas enzimas pueden usarse solas, o como una combinación de dos o más enzimas.

Además de estas enzimas, pueden usarse diversos agentes reductores o agentes oxidantes.

Como la enzima que puede usarse en el procedimiento de análisis de utilización de enzima de la presente invención, puede usarse una enzima en la que, o bien la enzima o bien su sustrato de enzima, es un analito. Por ejemplo, de

entre las enzimas que pueden usarse en el procedimiento de análisis de formación de complejos, pueden seleccionarse una o más enzimas.

El procedimiento de análisis eléctrico usado en la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando una sustancia insoluble depositada sobre la superficie de una parte de detección se analice eléctricamente. La expresión "análisis eléctrico" tal como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, un análisis en el que un cambio en la carga sobre la superficie de una parte de detección se detecta como un cambio en una intensidad, un análisis en el que un cambio en la carga sobre la superficie de una parte de detección se detecta como un cambio en una tensión (potencial eléctrico), y un análisis en el que el cambio se detecta como un cambio en una resistencia eléctrica (o impedancia). Los ejemplos del procedimiento de análisis eléctrico usado en la presente invención incluyen un procedimiento de análisis amperimétrico usando una parte de electrodo que tiene por lo menos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, y un procedimiento de análisis voltamétrico usando un transistor.

En el procedimiento de análisis amperimétrico, un cambio en la carga sobre la superficie de una parte de detección se detecta como un cambio en una intensidad. Una parte de electrodo amperimétrico comprende por lo menos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo sobre un sustrato y, si se desea, puede comprender además un electrodo de referencia. En el procedimiento de análisis amperimétrico, la cantidad de un material activo de electrodo o un material resistente (material aislante) generado cerca de la parte de electrodo se determina mediante la medición de una señal de intensidad que fluye entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo en correlación con la cantidad del material mediante la aplicación de una tensión previamente determinada entre ambos electrodos, o la diferencia en un material activo de electrodo o un material resistente (material aislante) generado cerca de la parte de electrodo se detecta mediante un valor de tensión aplicada entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo.

Por ejemplo, cuando se usa un ión de metal como la sustancia soluble en agua, se aplica una tensión a una parte de detección sobre la que se deposita el metal, con respecto al electrodo de referencia y, como resultado, el metal depositado sobre la parte de detección se reoxida para dar el ión de metal, y el cambio electroquímico sobre la parte de detección puede detectarse como un cambio en una intensidad.

Como un procedimiento que no sea amperimetría para detectar un cambio en una intensidad, por ejemplo, puede usarse voltametría cíclica, voltametría de impulsos diferencial, cronoamperimetría y amperimetría de impulsos diferencial, que se conocen ampliamente.

En el procedimiento de análisis voltamétrico, un cambio en la carga sobre la superficie de una parte de detección se detecta como un cambio en una tensión (potencial). El transistor usado en el procedimiento de análisis voltamétrico es un dispositivo que convierte señales de tensión introducidas en una puerta en señales de intensidad emitidas a partir de un electrodo de fuente o un electrodo de drenador. Cuando se aplica una tensión entre el electrodo de fuente y el electrodo de drenador, las partículas cargadas que existen en el canal formado entre ambos electrodos se mueven a lo largo de un sentido de campo eléctrico entre ambos electrodos, y se emiten como una señal de intensidad a partir del electrodo de fuente o el electrodo de drenador. En el presente caso, la intensidad de la señal de intensidad emitida es proporcional a la densidad de las partículas cargadas. Cuando se aplica una tensión sobre la puerta que se coloca en una posición hacia arriba, hacia el lateral o hacia abajo del canal con un aislante entre los mismos, se cambia la densidad de las partículas cargadas que existe en el canal. Con la ayuda de esta propiedad, puede hacerse que la señal de intensidad varíe mediante el cambio de la tensión de puerta.

Por ejemplo, cuando se usa acetilcolina como la sustancia soluble en agua, un cambio en la carga sobre la parte de detección causado por tiocolina, que se deposita sobre la parte de detección mediante acetilcolinesterasa, puede detectarse como un cambio en una tensión (potencial).

Con respecto a una realización preferente de la parte de detección, cuando la parte de detección es conductora, pueden usarse materiales no conductores tales como metales (por ejemplo, oro, plata, platino, rodio, rutenio, iridio, mercurio y paladio), polímeros (por ejemplo, un polímero de osmio), carbono, una estructura nanotubular (nanotubos de carbono), grafito o sustancias inorgánicas, solos o como una combinación de los mismos. La forma de la estructura fabricada de estos materiales no está particularmente limitada, siempre y cuando la estructura no inhiba la reacción, y pueda ser una forma plana, salientes y depresiones o partículas (por ejemplo, coloide de oro).

Una realización preferente de la estructura nanotubular es una estructura seleccionada de entre el grupo que consiste en nanotubos de carbono, nanotubos de nitruro de boro y nanotubos de óxido de titanio.

La parte de detección puede contener materiales no conductores además de los materiales conductores, siempre y cuando la parte de detección muestre una propiedad conductora. Como materiales no conductores, por ejemplo, puede usarse un vehículo insoluble fabricado de resinas de poliéster.

Otra realización preferente de la parte de detección es un electrodo de puerta de un transistor de efecto de campo o un transistor de electrón único que usa una estructura nanotubular (nanotubos de carbono). Esta estructura nanotubular es preferentemente una estructura seleccionada de entre el grupo que consiste en nanotubos de carbono, nanotubos de nitruro de boro y nanotubos de óxido de titanio.

5 Como aún otra realización preferente de la parte de detección, puede usarse un vehículo poroso tal como una membrana de nitrocelulosa usada en inmunocromatografía, un polímero tal como se describe en el documento WO 2006/038456 o un vehículo insoluble (o partículas insolubles) tal como un vehículo de látex, para aumentar el área superficial de la parte de detección y, además, puede formarse una estructura tridimensional sobre la superficie de la parte de detección usando materiales no conductores tales como polímeros conductores o un vehículo conductor. La estructura tridimensional formada sobre la superficie de la parte de detección puede aumentar de manera significativa el área superficial de la parte de detección y, como resultado, la sensibilidad de detección puede mejorarse.

10 Con respecto a otra forma preferente de la parte de detección, para mejorar la eficiencia de la deposición (precipitación y adsorción, insolubilización o separación) de un producto generado sobre la parte de detección bajo condiciones de flujo, o para evitar la retirada del producto depositado (insolubilizado, separado o precipitado) de la parte de detección a lo largo del sentido de flujo (por ejemplo, hacia el sentido de aguas abajo) bajo una condición de flujo, pueden formarse pocillos, salientes y depresiones, salientes o divisiones sobre la parte de detección. Mediante la formación de estas estructuras sobre la parte de detección, también puede esperarse que la reactividad del producto depositado se mejore. La estructura puede formarse solo sobre la parte de detección, o sobre la parte de electrodo o la unidad de biosensor de tal modo que una parte de la misma exista sobre la parte de detección.

15 Más en particular, es preferente una forma que tiene una o más estructuras tridimensionales que tienen una forma similar a un ángulo agudo. Los ejemplos de la forma incluyen un poliedro, un prisma poligonal, una esfera, un cilindro, un cono y una pirámide, y se prefiere un cono o una pirámide. Por lo menos una estructura tridimensional que tiene una o más partes agudas o salientes puede formarse sobre la parte de detección, y es preferente formar múltiples estructuras tridimensionales sobre la parte de detección. El número y el tamaño de las estructuras tridimensionales, el número de las partes agudas, y la forma y la disposición de las mismas pueden seleccionarse de manera apropiada de acuerdo con las condiciones de medición. Las expresiones "forma similar a un ángulo agudo" y "parte aguda" tal como se usa en el presente documento no están particularmente limitadas, siempre y cuando una parte o la totalidad de la estructura tridimensional formada sobre la parte de detección tenga un efecto de borde. El efecto de borde, que es un efecto bien conocido en un campo técnico tal como la electrodeposición, es el efecto de que las cargas se concentran en bordes agudos. Se considera que un metal depositado (insolubilizado) tal como plata se reioniza activamente para dar un ión de metal mediante este efecto, y que la sensibilidad de detección puede mejorarse.

20 La reacción de interacción selectiva entre un analito y su socio específico se lleva a cabo en el lugar sobre el que está inmovilizado el socio específico. El lugar en el que está inmovilizado el socio específico no está particularmente limitado, siempre y cuando se lleve a cabo la interacción selectiva, y a continuación pueda llevarse a cabo una medición eléctrica. La superficie de la parte de detección es preferente.

25 El procedimiento para inmovilizar el socio específico no está particularmente limitado, y cualquier procedimiento, tal como un procedimiento de inmovilización directa o un procedimiento de inmovilización indirecta, puede usarse de acuerdo con las propiedades de la reacción de interacción selectiva. Por ejemplo, el socio específico puede inmovilizarse de manera directa sobre el sustrato mediante adsorción física o unión covalente, o inmovilizarse de manera indirecta por medio de un separador flexible que tiene un anclaje previamente unido con el sustrato. Por ejemplo, si se usa un metal raro tal como oro como el sustrato, el socio específico puede inmovilizarse sobre el sustrato por medio de una monocapa autoensamblada.

30 Después de la inmovilización del socio específico, la inhibición de reacciones no específicas o la selección o el control de una sustancia permeable puede conseguirse, mediante el tratamiento de la superficie con albúmina de suero bovino, poli(óxido de etileno), u otras moléculas inactivas, o mediante el recubrimiento de la capa inmovilizada con una capa de aditivo.

35 En el procedimiento de análisis de utilización de enzima de la presente invención, se llevan a cabo la etapa de reacción de insolubilización (a), que se basa en la interacción selectiva, y la etapa de análisis eléctrico (b). En el procedimiento de análisis de formación de complejos de la presente invención, se llevan a cabo la etapa de formación de complejos (a1), que se basa en la interacción selectiva, la etapa de reacción de insolubilización (a2), que se basa en una sustancia de marcado contenida en el complejo, y la etapa de análisis eléctrico (b). En general, estas etapas se llevan a cabo en estos órdenes, pero de manera simultánea pueden llevarse a cabo etapas contiguas (o partes de las mismas), siempre y cuando pueda obtenerse una señal eléctrica que esté correlacionada con la cantidad del analito contenida en una muestra. En la presente invención, la reacción de insolubilización en la etapa (a) y, de manera opcional, la etapa de análisis eléctrico, se lleva a cabo bajo condiciones de flujo.

40 La expresión "bajo condiciones de flujo" tal como se usa en el presente documento quiere decir que el suministro de un líquido para reacción nuevo a la interfase de la parte de reacción deseada en el sistema de reacción, y la descarga de un líquido de reacción después de la reacción pueden llevarse a cabo de manera simultánea y continua o intermitente, sucesivamente a través de la totalidad del procedimiento de la etapa. La parte de reacción "bajo condiciones de flujo" es la parte de reacción de insolubilización en la que se lleva a cabo la etapa (a) o la etapa (a2), y, de manera opcional, la parte de detección en la que se lleva a cabo la etapa (b). El flujo no está limitado a un sentido, y puede ser de vaivén, de vibración, o convección en la etapa deseada para proceder con una reacción

deseada.

Por ejemplo, en un procedimiento por lotes, una cantidad previamente determinada de líquido para reacción se suministra de una vez, una reacción deseada se lleva a cabo durante un periodo de tiempo previamente determinado y, después de la reacción, el líquido de reacción se descarga. Por el contrario, en la presente invención, el suministro de un líquido para reacción y la descarga del líquido de reacción proceden de manera simultánea. En la presente invención, es habitual que el suministro y la descarga se lleven a cabo simultáneamente de manera continua a través de la totalidad del procedimiento de una etapa deseada, pero el suministro y la descarga pueden llevarse a cabo simultáneamente de manera intermitente (es decir, con una parada temporal en el suministro y la descarga), siempre y cuando los efectos de la presente invención puedan obtenerse suficientemente.

- 5
- 10 Las condiciones de flujo incluyen un flujo forzado y un flujo espontáneo. Los ejemplos del flujo forzado incluyen flujos causados por procedimientos mecánicos, eléctricos o manuales, tal como bombeo, centrifugado, agitación, sonicación, y aplicación de magnetismo, y flujos que utilizan presión, vacío o vibración causada por presión. Los ejemplos de flujo espontáneo incluyen acción capilar y caída libre. Estos flujos pueden usarse en diversos canales de un flujo microfabricado, flujo lateral, flujo capilar o flujo pasante, o una tira de membrana para inmunocromatografía o similar.
- 15

El caudal bajo condiciones de flujo en la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando la sustancia insoluble generada pueda depositarse sobre la parte de detección, y exista un flujo no nulo (es decir, no se encuentre en el estado estático). El caudal varía de acuerdo con diversas condiciones, por ejemplo, la interacción selectiva o la reacción de insolubilización que se utiliza, la sustancia de marcado, la sustancia soluble, o la sustancia de oxidación-reducción usada, el tamaño del canal de flujo, o el procedimiento de análisis eléctrico usado. No obstante, los expertos en la materia pueden determinar de manera apropiada el caudal, por ejemplo, al llevar a cabo un sencillo experimento preliminar de acuerdo con los procedimientos que se muestran en los Ejemplos que se describen en lo sucesivo, sin experimentación indebida.

- 20
- 25 Tal como se ha descrito previamente en la sección de “problemas a resolver por la invención”, era un conocimiento técnico común en el momento de la presentación de la presente solicitud que diversos procedimientos de la técnica anterior que utilizan la deposición, precipitación o adsorción sobre la parte de detección causada por reacciones químicas se llevan a cabo bajo condiciones no de flujo, desde el punto de vista de promover la deposición y similar. El motivo de porqué la precisión y sensibilidad de detección pueden mejorarse de manera significativa al llevar a cabo la presente invención bajo condiciones de flujo en comparación con unas condiciones no de flujo, en contradicción con el conocimiento técnico común, no está clarificado en este momento, pero los inventores de la presente invención suponen el siguiente mecanismo. A este respecto, la presente invención no está limitada a la especulación.
- 30

Cuando, por ejemplo, un ión plata se usa como la sustancia soluble en agua como la reacción que se muestra en la figura 1, un sustrato de enzima y el ión plata se consumen durante la reacción de oxidación-reducción. Se supone que la sensibilidad se mejora debido a que un sustrato de enzima e ión plata nuevos se suministran bajo condiciones de flujo, en comparación con unas condiciones no de flujo. Además, se supone que la sensibilidad se mejora debido a que un ión plata generado cerca de la parte de detección mediante la reoxidación de la plata depositada para dar ión plata se retira de la misma bajo condiciones de flujo y, de ese modo, la tasa de reacción en la reoxidación de la plata se mejora. Además, se supone que la sensibilidad se mejora de manera sinérgica debido a que ambas reacciones proceden de manera simultánea.

- 35
- 40

Ejemplos

La presente invención se ilustrará adicionalmente a continuación mediante, si bien no está limitada en modo alguno a, los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Medición del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) usando electrodos de oro

- 45 1-1. Construcción de la parte de electrodo y la parte de detección

Se construyó una parte de electrodo que tiene un patrón tal como se muestra en la figura 2, usando un patrón de máscaras tal como se muestra en la figura 3, mediante un procedimiento de bombardeo catódico y un procedimiento de lanzamiento. Una película delgada de oro que tiene un espesor de 50 nm se formó sobre una sustancia aislante 11 fabricada de poli(tereftalato de etileno) (PET), y una tinta de cloruro de plata / plata (fabricada por BAS Inc.) se aplicó sobre una parte de la película delgada de oro para construir un electrodo de referencia 16. Para dividir el área entre la parte de electrodo 12 y una parte de conductor 13, una parte de la parte de conductor se cubrió con una capa aislante 17 para construir la parte de electrodo que tiene un electrodo de trabajo 14, un contraelectrodo 15, y el electrodo de referencia 16. Los extremos opuestos al electrodo de trabajo, el contraelectrodo y el electrodo de referencia funcionan como unos conectores 18. El electrodo de trabajo contenido en la parte de electrodo funciona como una parte de detección.

- 50
- 55

1-2. Construcción de la parte de reacción de interacción y la parte de insolubilización

Una solución acuosa (2 μ l) que contiene un anticuerpo específico frente a un antígeno de superficie de la hepatitis B (antígeno HBs), un anticuerpo monoclonal anti-HBs (IgG; producto de elaboración propia), se colocó sobre el electrodo de trabajo de la parte de electrodo formada sobre el sustrato, y se dejó reposar a 37 °C bajo presión de vapor saturado durante 30 minutos para inmovilizar el anticuerpo sobre el electrodo de trabajo. La solución acuosa se preparó de tal modo que la concentración del anticuerpo se ajustó a 1 mg/ml en un tampón de fosfato de 0,1 mol/l (pH 7,4) que contiene NaCl 0,15 mol/l (a lo que se hace referencia a veces en lo sucesivo en el presente documento como tampón A). El sustrato se secó a 25 °C y una humedad de un 40 % durante una hora, y se secó adicionalmente en un desecador de vacío a temperatura ambiente durante 2 horas. El sustrato secado se sumergió en un tampón Tris 0,1 mol/l (pH 8,0) que contiene un 1 % de caseína (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y NaCl 0,15 mol/l durante 30 minutos mientras que se agitaba, para bloquear la parte con la que no había reaccionado el anticuerpo. El sustrato bloqueado se lavó con agua desalinizada, y se secó. Tomando estas etapas, el anticuerpo monoclonal anti-HBs como una sustancia específica se inmovilizó sobre el electrodo de trabajo (parte de detección) para construir una parte de reacción de interacción y una parte de insolubilización (parte de reacción de oxidación-reducción) sobre el electrodo de trabajo.

1-3. Preparación de solución que contiene anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs (Fab') marcado con fosfatasa alcalina (ALP)

Un anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs (Fab') marcado con ALP se preparó, de acuerdo con el procedimiento de bisagra de maleimida que se describe en "Kokando koso meneki sokutei-hou (Inmunoensayo de enzima ultrasensible), Eiji ISHIKAWA, Japan Scientific Societies Press, 1993", usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs (producto de elaboración propia), ALP (fabricado por Roche), y un reactivo de reticulación (4-[N-maleimidometil]-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo; fabricado por PIERCE). El anticuerpo marcado con enzima resultante [anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs marcado con ALP (Fab')] se disolvió en tampón A y se ajustó a una concentración previamente determinada, para preparar una solución de anticuerpo anti-HBs marcado con ALP.

1-4. Preparación de solución de sustrato que contiene ión plata

Como una solución de sustrato que contiene ión plata, se preparó una solución de dietanolamina de 0,05 mol/l (pH 9,4) que contiene 2 mmol/l de p-aminofenilfosfato (pAPP; fabricado por LKT Laboratories), 0,125 mmol/l de AgNO₃, 0,5 mmol/l de MgSO₄, 0,25 mmol/l MgCl₂, y 0,075 mol/l NaCl.

1-5. Preparación de solución de sustrato sin ión plata (solución de sustrato de pAPP; para experimento de control)

Como una solución de sustrato de pAPP, se preparó una solución de dietanolamina de 0,05 mol/l (pH 9,4) que contiene 2 mmol/l pAPP, 0,5 mmol/l de MgSO₄, 0,25 mmol/l MgCl₂, y 0,075 mol/l NaCl.

1-6. Construcción del canal de flujo y el aparato para controlar las condiciones de flujo

Se construyó una unidad de biosensor tal como se muestra en las figuras 4 a 7. Tal como se muestra en las figuras 4 a 7, una ventana 21 fabricada de una placa de vidrio que tiene dos orificios (aberturas) como una entrada 22 y una salida 23 una solución de reacción, y el sustrato 26 previamente construido que tiene la parte de electrodo 27 sobre la que se inmovilizó el anticuerpo monoclonal anti-HBs 28, se usaron para intercalar una junta 24 fabricada de una cinta de doble cara (espesor = 0,64 mm; fabricada por 3M) que tiene una ranura para el canal de flujo, para construir la unidad de biosensor 31, en la que la parte de electrodo se dispuso en el canal de flujo hueco 25.

En el lado de entrada de la unidad de biosensor 31, tal como se muestra en la figura 8, unos servidores de líquido (reactivo) 34 a 38, una válvula de conmutación 32 (EV100-105; fabricada por GL Sciences Inc.), y una bomba 33 (PERISTALTIC PUMP P-1; fabricada por la antigua Pharmacia) se conectaron por medio de tubos, y un servidor de líquido de cintura 39 se conectó con la salida del canal de flujo. Usando este sistema, cada solución (muestras, reactivos, o tampones) suministrada a partir de los servidores de reactivo puede hacerse pasar a través del canal de flujo a un caudal deseado en el sentido desde la entrada hasta la salida.

1-7. Medición de antígeno HBs mediante analizador electroquímico

La unidad de biosensor construida y el aparato para controlar las condiciones de flujo se usaron para llevar a cabo la medición de antígeno HBs. Tampón A (servidor de reactivo 1) se pasó a través del canal de flujo durante 2 minutos. Después de esto, mediante la conmutación de la válvula de conmutación, una solución de antígeno HBs [preparada mediante dilución de antígeno HBs (recombinante, subtipo adw; producto de elaboración propia) con tampón A hasta una concentración previamente determinada] (servidor de reactivo 2) se pasó a través del canal de flujo durante 30 minutos. La válvula se conmutó para pasar la solución de anticuerpo anti-HBs marcado con ALP (2 μ g/ml) (servidor de reactivo 3) a través del canal de flujo durante 30 minutos. Además, la válvula se conmutó para pasar la solución de sustrato que contiene ión plata (servidor de reactivo 4) o la solución de sustrato de pAPP (servidor de reactivo 5) a través del canal de flujo durante 4 minutos, y se llevaron a cabo mediciones electroquímicas mientras que se mantenían las condiciones de flujo.

Cada medición electroquímica se llevó a cabo, tal como se muestra en la figura 8. Más en particular, los conectores

40 para el electrodo de trabajo, el de referencia y el contraelectrodo se conectaron con un analizador electroquímico 41 (modelo 832A; fabricado por ALS). Se hizo que el potencial eléctrico variara entre -0,15 V y 0,6 V con respecto al electrodo de referencia, mientras que se pasaba la solución de sustrato que contiene ión plata o la solución de sustrato de pAPP a través del canal de flujo, para medir la respuesta electroquímica mediante voltametría cíclica (CV, *cyclic voltammetry*).

1-8. Resultados de las mediciones

(1) Detección de la intensidad de oxidación causada por la presencia de antígeno HBs (compuesto a medir)

El resultado de una medición de CV en la que la concentración de antígeno HBs era de 0 U/ml se muestra en la figura 9, y el resultado de una medición de CV en la que la concentración de antígeno HBs era de 48 U/ml se muestra en la figura 10. La alimentación de líquido al canal de flujo (es decir, condiciones de flujo) se llevó a cabo a un caudal de 360 µl/min a través de la totalidad del procedimiento (desde la alimentación de tampón A durante 2 minutos hasta la medición electroquímica).

Quando la concentración de antígeno HBs era de 48 U/ml (figura 10), como una intensidad de oxidación acompañada por una reacción de oxidación de la plata depositada, una intensidad de oxidación de 5,44 µA se detectó a un potencial eléctrico de +0,138 V (potencial de oxidación) con respecto al electrodo de referencia. Por el contrario, cuando la concentración de antígeno HBs era de 0 U/ml (figura 9), no se detectó intensidad de oxidación similar alguna.

(2) Relación entre la presencia de ión plata y la detección de intensidad de oxidación

En este experimento, se examinó si la presencia o la ausencia de ión plata afectaba o no la deposición de plata. La figura 11 muestra el resultado de una medición de CV que se llevó a cabo bajo las condiciones que las de la figura 10 (concentración de antígeno HBs: 48 U/ml, caudal: 360 µl/min), excepto porque se usó la solución de sustrato de pAPP (es decir, que no contiene ión plata) en lugar de la solución de sustrato que contiene ión plata.

De acuerdo con la comparación de los resultados que se muestran en las figuras 10 y 11, cuando se usó la solución de sustrato que contiene ión plata (figura 10), como una intensidad de oxidación acompañada por una reacción de oxidación de la plata depositada, una intensidad de oxidación de 5,44 µA se detectó a un potencial eléctrico de +0,138 V (potencial de oxidación) con respecto al electrodo de referencia. Por el contrario, cuando se usó la solución de sustrato de pAPP (figura 11), una intensidad de oxidación derivada de p-aminofenol (pAP) como su producto no se detectó con claridad. Se encontró a partir de este resultado que la sensibilidad de detección de antígeno HBs podría mejorarse de manera significativa bajo condiciones de flujo mediante la deposición de plata o similar como un producto de la reacción.

(3) Efecto del caudal sobre la intensidad de oxidación

En este experimento, para examinar el efecto de las condiciones de flujo (caudal), cada intensidad de oxidación a un potencial eléctrico de +0,138 V con respecto al electrodo de referencia se midió cuando el caudal se cambió a 0, 200, 360, y 1260 µl/min. Las mediciones se llevaron a cabo bajo las condiciones que las de la figura 8 (concentración de antígeno HBs: 48 U/ml), excepto por el caudal.

El resultado se muestra en la Tabla 1. Como es evidente a partir de la Tabla 1, se encontró que la reactividad aumentó de manera significativa bajo condiciones de flujo, cuando se compara con las condiciones en las que el caudal fue de 0 µl/min (condiciones no de flujo).

Caudal (µl/min)	Intensidad de oxidación (µA)
0	0,498
200	1,42
360	5,17
1260	3,01

(4) Confirmación de las propiedades cuantitativas

En este experimento, para examinar las propiedades cuantitativas en la medición de antígeno HBs, cada intensidad de oxidación a un potencial eléctrico de +0,138 V con respecto al electrodo de referencia se midió cuando la concentración de antígeno HBs se cambió a 0, 24 y 48 U/ml. La medición se llevó a cabo bajo las condiciones que las de la figura 10 (caudal: 360 µl/min), excepto por la concentración de antígeno HBs.

El resultado se muestra en la figura 12. Como es evidente a partir de la figura 12, la intensidad aumentó de manera dependiente de la concentración de antígeno HBs, y las propiedades cuantitativas se confirmaron.

Ejemplo 2: Medición de glucosa usando glucosa oxidasa (GOD)

2-1. Construcción de la parte de electrodo y la parte de detección

- 5 Una parte de electrodo se construyó de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-1 del Ejemplo 1. El electrodo de trabajo contenido en la parte de electrodo funciona como una parte de detección.

2-2. Construcción de la parte de reacción de interacción y la parte de insolubilización

- 10 Una solución acuosa (2 μ l) que contiene 2000 U/ml GOD (Roche) en tampón A se colocó sobre el electrodo de trabajo de la parte de electrodo, y se dejó reposar a 37 °C bajo presión de vapor saturada durante 30 minutos para inmovilizar el GOD sobre el electrodo de trabajo. Para retirar el disolvente, el sustrato se secó a 25 °C y una humedad de un 40 % durante una hora, y se secó adicionalmente en un desecador de vacío a temperatura ambiente durante 2 horas. El sustrato secado se sumergió en un tampón Tris 0,1 mol/l (pH 8,0) que contiene un 1 % de caseína (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y NaCl 0,15 mol/l durante 30 minutos mientras que se agitaba, para bloquear la parte con la que no había reaccionado el GOD. El sustrato bloqueado se lavó con agua desalinizada, y se secó. Tal como se ha descrito en lo que antecede, el GOD como una sustancia específica se inmovilizó sobre el electrodo de trabajo (parte de detección) para construir una parte de reacción de interacción y una parte de insolubilización sobre el electrodo de trabajo.

2-3. Preparación de solución que contiene ión plata

- 20 Como una solución que contiene ión plata, se preparó una solución acuosa (pH 9,0) que contiene 0,25 mmol/l de AgNO_3 y 1 mmol/l de MgSO_4 .

2-4. Preparación de solución de glucosa

Como una solución de glucosa, se preparó una solución de dietanolamina de 0,1 mol/l (pH 9,8) que contiene MgCl_2 0,5 mmol/l, NaCl 0,15 mol/l, y una concentración previamente determinada de glucosa.

2-5. Construcción del canal de flujo y el aparato para controlar las condiciones de flujo

- 25 Un canal de flujo y un aparato para controlar las condiciones de flujo se construyeron de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-6 del Ejemplo 1, excepto por que se usó el sustrato (que se describe en el artículo 2-2) que tiene la parte de electrodo sobre la que se inmovilizó el GOD, en lugar de la parte de electrodo sobre la que se inmovilizó el anticuerpo monoclonal anti-HBs.

2-6. Medición de glucosa mediante analizador electroquímico

- 30 La unidad de biosensor construida y el aparato para controlar las condiciones de flujo se usaron para llevar a cabo la medición de glucosa. Tampón A (servidor de reactivo 1) se pasó a través del canal de flujo durante 2 minutos. Después de esto, mediante la conmutación de la válvula de conmutación, una solución mixta (servidor de reactivo 2) de la solución que contiene ión plata y la solución de glucosa se pasó a través del canal de flujo a un caudal de 1,26 ml/min durante 5 minutos, y se llevaron a cabo mediciones electroquímicas mientras que se mantenían las condiciones de flujo. Para esta prueba, la solución mixta se preparó inmediatamente antes de la conmutación, mediante el mezclado de la solución que contiene ión plata y la solución de glucosa, que se había ajustado a una concentración previamente determinada, a una relación de 1:1.

- 40 Cada medición electroquímica se llevó a cabo tal como sigue. Los conectores para el electrodo de trabajo, el de referencia y el contraelectrodo se conectaron con un analizador electroquímico (modelo 832A; fabricado por ALS). Se hizo que el potencial eléctrico variara entre -0,15 V y 0,6 V con respecto al electrodo de referencia, mientras que se pasa la solución mixta a través del canal de flujo, para medir la respuesta electroquímica by voltametría cíclica (CV).

2-7. Resultados de las mediciones

(1) Detección de la intensidad de oxidación dependiente de la concentración de glucosa

- 45 La concentración de glucosa contenida en la solución mixta se cambió a 0, 100, y 200 mg/dl y, para cada una, se llevó a cabo una medición de CV. Las intensidades de oxidación acompañadas por una reacción de oxidación de la plata depositada a un potencial eléctrico de +0,086 V con respecto al electrodo de referencia se muestran en la figura 13. De entre estos resultados, el resultado de la medición de CV en la que la concentración de glucosa contenida en la solución mixta fue de 0 mg/dl (es decir, que no contiene glucosa) se muestra en la figura 14, y el resultado de la medición de CV en la que la concentración de glucosa fue de 200 mg/dl se muestra en la figura 15.

De acuerdo con la comparación de las figuras 14 y 15, cuando la concentración de glucosa fue de 200 mg/dl (figura 15), como una intensidad de oxidación acompañada por una reacción de oxidación de la plata depositada, una intensidad de oxidación de 4,24 μA se detectó a un potencial eléctrico de +0,086 V (potencial de oxidación) con respecto al electrodo de referencia. Por el contrario, cuando la concentración de glucosa contenida en la solución mixta fue de 0 mg/dl (figura 14), no se detectó intensidad de oxidación similar alguna. Además, tal como se muestra en la figura 13, las propiedades cuantitativas se confirmaron.

(2) Efecto del caudal sobre la intensidad de oxidación

En este experimento, para examinar el efecto de las condiciones de flujo (caudal), cada intensidad de oxidación se midió cuando el caudal fue de 0 ml/min (en reposo; condiciones no de flujo) y la concentración de glucosa contenida en la solución mixta fue de 0 mg/dl y 200 mg/dl. Una medición de CV se llevó a cabo mientras que se hizo que el potencial eléctrico variara entre -0,15 V y 0,4 V con respecto al electrodo de referencia. El resultado de la medición de CV en la que la concentración de glucosa contenida en la solución mixta fue de 0 mg/dl (sin glucosa) se muestra en la figura 16, y el resultado de la medición de CV en la que la concentración de glucosa fue de 200 mg/dl se muestra en la figura 17. No se detectó cambio alguno en la intensidad de oxidación causada por el cambio en la concentración de glucosa entre las figuras 16 y 17. A partir del resultado que una intensidad de oxidación se detectó bajo condiciones de flujo a una concentración de glucosa de 200 mg/dl tal como se muestra en la figura 15, mientras que no se detectó intensidad de oxidación similar alguna a un caudal de 0 ml/min (en reposo; condiciones no de flujo) (figuras 16 y 17), se encontró que la sensibilidad de medición de la glucosa podría mejorarse de manera significativa bajo condiciones de flujo mediante la deposición de plata o similar como un producto de la reacción.

(3) Confirmación del efecto de una reacción de reducción no específica

En este experimento, para examinar el efecto de una reacción de reducción no específica de ión plata mediante glucosa bajo condiciones de flujo, un biosensor que tiene una parte de electrodo en la que no se inmovilizó GOD sobre el electrodo de trabajo se usó para medir la intensidad de oxidación a una concentración de glucosa de 200 mg/dl bajo las condiciones que se han usado previamente. El resultado de la medición de CV se muestra en la figura 18. Como es evidente a partir de la figura 18, no se detectó intensidad de oxidación alguna derivada de la deposición no específica de plata al caudal usado en este Ejemplo.

Ejemplo 3: Influencia y efecto de las condiciones de flujo en cada etapa

(1) Efecto de las condiciones de flujo sobre la intensidad de oxidación

La influencia y el efecto de la condición de flujo se examinaron en la etapa (A) de convertir una sustancia soluble en una sustancia insoluble mediante una reacción de insolubilización (reacción de oxidación-reducción) y depositar la sustancia insoluble sobre una parte de detección, o en la etapa (B) de analizar eléctricamente la sustancia insoluble depositada sobre la parte de detección. El biosensor y el aparato para controlar las condiciones de flujo construidos en el Ejemplo 1 se usaron para medir el antígeno HBs bajo los siguientes tres tipos de condiciones de flujo.

Tampón A (servidor de reactivo 1) se pasó a través del canal de flujo durante 2 minutos. Después de esto, mediante la conmutación de la válvula de conmutación, la solución de antígeno HBs (concentración de antígeno HBs: 48 U/ml) (servidor de reactivo 2) se pasó a través del canal de flujo durante 30 minutos. La válvula se conmutó para pasar la solución de anticuerpo anti-HBs marcado con ALP (2 $\mu\text{g/ml}$) (servidor de reactivo 3) a través del canal de flujo durante 30 minutos, para formar un complejo del antígeno HBs y el anticuerpo anti-HBs marcado con ALP. Además, la válvula se conmutó para pasar la solución de sustrato que contiene ión plata (servidor de reactivo 4) a través del canal de flujo. Como "condición 1", el caudal se mantuvo a 360 $\mu\text{l/min}$ durante 4 minutos (etapa A: flujo), y una medición electroquímica se llevó a cabo mientras que se mantenían las condiciones de flujo (etapa B: flujo). Como "condición 2", el caudal se mantuvo a 360 $\mu\text{l/min}$ durante 4 minutos (etapa A: flujo), y una medición electroquímica se llevó a cabo después de que el caudal se cambiara a 0 $\mu\text{l/min}$ (parada) (etapa B: no flujo). Como "condición 3" (comparativa), el caudal se cambió a 0 $\mu\text{l/min}$ (parada) y se mantuvo durante 4 minutos (etapa A: no flujo), y una medición electroquímica se llevó a cabo mientras que el caudal se mantuvo a 0 $\mu\text{l/min}$ (parada) (etapa B: no flujo). Cada medición electroquímica se llevó a cabo mientras que se hizo que el potencial eléctrico variara entre -0,15 V y 0,4 V con respecto al electrodo de referencia. Los resultados de la medición de CV bajo las condiciones 1 a 3 se muestran en las figuras 19 a 21, respectivamente.

Como resultado, no se detectó intensidad de oxidación alguna bajo la condición 3 (no flujo / no flujo; figura 21). Una intensidad de oxidación de 0,78 μA se detectó a un potencial eléctrico de +0,137 V con respecto al electrodo de referencia bajo la condición 2 (flujo / no flujo; figura 20), y una intensidad de oxidación de 5,08 μA se detectó bajo la condición 3 (flujo / flujo; figura 19). A partir de estos resultados, se encontró: que era necesario llevar a cabo por lo menos una de las etapas A y B bajo condiciones de flujo; que, a la vista de la comparación de la condición 3 (figura 21) y la condición 2 (figura 20), el antígeno HBs podría detectarse cuando la etapa A de depositar el producto de reacción sobre la parte de detección se llevó a cabo bajo condiciones de flujo; y que, a la vista de la comparación de la condición 1 (figura 19) y la condición 2 (figura 20), la sensibilidad de detección de antígeno HBs podría mejorarse de manera significativa cuando la medición electroquímica en la etapa B se llevó a cabo bajo condiciones de flujo.

Ejemplo 4: Medición de antígeno HBs mediante cromatografía (procedimiento de flujo espontáneo)

4-1. Construcción de la parte de electrodo y la parte de detección

Una parte de electrodo se construyó de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-1 del Ejemplo 1. El electrodo de trabajo contenido en la parte de electrodo funciona como una parte de detección.

5 4-2. Construcción de la parte de reacción de interacción y la parte de insolubilización

Una parte de reacción de interacción y una parte de insolubilización se construyeron sobre el electrodo de trabajo de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-2 del Ejemplo 1.

4-3. Preparación de soluciones de reactivo

10 Cada solución de reactivo se preparó de acuerdo con los procedimientos que se describen en los artículos 1-3 y 1-4 del Ejemplo 1.

4-4. Construcción de la inmunocromatografía

(1) Construcción de la parte de electrodo inmovilizada con un complejo de anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs marcado con ALP / antígeno HBs / anticuerpo monoclonal anti-HBs (complejo de HBs marcado con ALP)

15 La parte de electrodo inmovilizada con anticuerpo monoclonal anti-HBs construida en el artículo 4-2 se sumergió en una solución de antígeno HBs [preparada mediante dilución de antígeno HBs (recombinante, subtipo adw; producto de elaboración propia) con tampón A hasta una concentración previamente determinada] mientras que se agitaba. Después de que esta reacción se llevara a cabo durante 30 minutos, la parte de electrodo se lavó con agua desalinizada, y se secó con aire. La parte de electrodo secada se sumergió en la solución de anticuerpo anti-HBs marcado con ALP (2 µg/ml) mientras que se agitaba. Después de que esta reacción se llevara a cabo durante 30 minutos, la parte de electrodo se lavó con agua desalinizada y se secó con aire para obtener una parte de electrodo inmovilizada con un complejo de HBs marcado con ALP.

(2) Construcción de la inmunocromatografía que tiene una parte de electrodo

25 Una inmunocromatografía que tiene una parte de electrodo se construyó tal como sigue. Tal como se muestra en las figuras 22 y 23, una membrana de nitrocelulosa (Hi-Flow 180 Unbacked; fabricado por MILLIPORE) 51 se cortó a un tamaño de 5 mm X 40 mm, y un depósito para aplicar un reactivo 52, preparado cortando una lámina de caucho de silicona (espesor: 5 mm, lámina SR SR-50; fabricada por Tigers Polymer Corporation) al tamaño tal como se muestra en las figuras 24 y 25, se colocó en un lado de extremo (extremo A) de la membrana. En otro lado de extremo (extremo B) de la membrana, una almohadilla de celulosa (CELLULOSE FIBER SAMPLE PADS; fabricadas por MILLIPORE), cortada a un tamaño de 10 mm X 30 mm como una almohadilla absorbente 53, se unió a la membrana de tal modo que se solapaban entre sí a una anchura de 10 mm. En la cara posterior de la membrana de nitrocelulosa en una posición a 10 mm del extremo B, se dispuso la parte de electrodo inmovilizada con el complejo de HBs marcado con ALP 54 preparado en el artículo (1), en el que el complejo de HBs marcado con ALP 56 se inmovilizó sobre la parte de electrodo 55, de tal modo que la parte de electrodo se puso en contacto con la membrana, para obtener una tira inmunocromatográfica que tiene una parte de electrodo. Mediante el uso de esta tira inmunocromatográfica que tiene una parte de electrodo, pueden medirse eléctricamente reacciones bajo condiciones de flujo espontáneo utilizando la capilaridad en la membrana de nitrocelulosa.

4-5. Medición de antígeno HBs mediante analizador electroquímico

40 El antígeno HBs se midió usando tiras inmunocromatográficas que tienen una parte de electrodo, que se había preparado mediante el cambio de la concentración de antígeno HBs a 0, 18, y 36 U/ml. Al depósito de aplicación de reactivo de cada tira inmunocromatográfica que tiene una parte de electrodo, se añadieron 150 µl de la solución de sustrato que contiene ión plata. Esta solución se transfirió en el sentido hacia el extremo B por capilaridad durante 6 minutos, y se llevaron a cabo mediciones electroquímicas mientras que se mantenía este estatus.

45 Cada medición electroquímica se llevó a cabo tal como sigue. Los conectores para el electrodo de trabajo, el de referencia y el contraelectrodo se conectaron con un analizador electroquímico (modelo 832A; fabricado por ALS). Se hizo que el potencial eléctrico variara entre -0,15 V y 0,4 V con respecto al electrodo de referencia para medir la respuesta electroquímica by voltametría cíclica (CV).

4-6. Resultados de las mediciones

(1) Detección de la intensidad de oxidación causada por la presencia de antígeno HBs

50 Los resultados de mediciones de CV en las que la concentración de antígeno HBs era de 0, 18, y 36 U/ml se muestran en las figuras 26 a 28, respectivamente. No se detectó señal alguna cuando la concentración de antígeno HBs era de 0 U/ml. Una intensidad de oxidación de 4,27 µA se detectó a un potencial eléctrico de +0,132 V con respecto al electrodo de referencia cuando la concentración era de 18 U/ml. Una intensidad de oxidación de 11,2 µA

se detectó a un potencial eléctrico de +0,124 V con respecto al electrodo de referencia cuando la concentración era de 36 U/ml. El resultado de la medición de la intensidad de oxidación a un potencial eléctrico de +0,132 V con respecto al electrodo de referencia se muestra en la figura 29. Como es evidente a partir de la figura 29, la intensidad de oxidación aumentó de manera dependiente de la concentración de antígeno HBs y, por lo tanto, se confirmó que el antígeno HBs podría medirse de manera cuantitativa mediante este procedimiento.

Ejemplo 5: Medición del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) usando electrodos de carbono

5-1. Construcción de la parte de electrodo y la parte de detección

Se construyó una parte de electrodo que tiene un patrón tal como se muestra en la figura 2, usando un patrón de máscaras de acero inoxidable tal como se muestra en la figura 3, mediante un procedimiento de impresión. Una estructura de electrodo se formó mediante la impresión de una pasta de carbono conductora (FTU-20; Asahi Chemical Research Laboratory Co., Ltd.) sobre una sustancia aislante 11 fabricada de poli(tereftalato de etileno) (PET). Una tinta de cloruro de plata / plata (fabricada por BAS Inc.) se aplicó sobre una parte de la estructura de electrodo y se calentó a 120 °C durante 10 minutos para construir una parte de electrodo 12 y un electrodo de referencia 16 (al que se hace referencia a veces en lo sucesivo en el presente documento como la parte de electrodo de carbono). Los extremos opuestos al electrodo de trabajo, el contraelectrodo y el electrodo de referencia funcionan como unos conectores 18. El electrodo de trabajo contenido en la parte de electrodo funciona como una parte de detección.

5-2. Construcción de la parte de reacción de interacción y la parte de insolubilización

Una parte de reacción de interacción y una parte de insolubilización se construyeron de acuerdo con el procedimiento que se describe en el Ejemplo 1-2.

5-3. Preparación de solución que contiene anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs (Fab') marcado con fosfatasa alcalina (ALP)

Una solución que contiene un anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs (Fab') marcado con fosfatasa alcalina (ALP) se preparó, de acuerdo con el procedimiento que se describe en el Ejemplo 1-3.

5-4. Preparación de solución de sustrato que contiene ión plata

Como una solución de sustrato que contiene ión plata, se preparó una solución de dietanolamina de 0,04 mol/l (pH 9,4) que contiene 2 mmol/l de p-aminofenilfosfato (pAPP; fabricado por Universal sensors), 0,125 mmol/l de AgNO_3 , y 1 mmol/l de MgSO_4 .

5-5. Preparación de solución de lavado

Como una solución de lavado, se preparó una solución de dietanolamina de 0,04 mol/l (pH 9,4) que contiene 1 mmol/l de MgSO_4 .

5-6. Construcción del canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo de carbono

Tal como se muestra en la figura 30, se construyó una unidad de flujo capilar que tiene la parte de electrodo.

Tal como se muestra en la figura 30, se dispusieron unas secciones de cinta de doble cara 62 (Scotch ST416; fabricada por 3M) en paralelo sobre el sustrato de PET 11 sobre el que se había formado la parte de electrodo de carbono, y un sustrato de PET 63 se unió al sustrato de PET 11 con las cintas de doble cara para construir un canal de flujo. En una abertura 64a formada en un lado de extremo (extremo A) del canal de flujo, un depósito de aplicación de reactivo 64 fabricado de una lámina de caucho de silicona (espesor: 5 mm, lámina SR SR-50; fabricada por Tigers Polymer Corporation) y que tiene una estructura que se muestra en las figuras 31 y 32 se colocó. En otro lado de extremo (extremo B), una almohadilla de celulosa (CELLULOSE FIBER SAMPLE PADS; fabricadas por MILLIPORE), cortada a un tamaño de 10 mm X 150 mm como una almohadilla absorbente 65, se dispuso sobre el sustrato de tal modo que estaba en contacto inmediato con la salida del canal de flujo, para construir un canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo de carbono.

5-7. Medición de antígeno HBs mediante analizador electroquímico

El canal de flujo capilar construido que tiene una parte de electrodo de carbono se usó para medir un antígeno HBs. Una mezcla preparada mediante la adición de 0,83 μl de la solución de anticuerpo anti-HBs marcado con ALP (120 $\mu\text{g/ml}$) a 49,17 μl de una solución de antígeno (preparada mediante dilución de un antígeno HBs con un suero humano hasta una concentración previamente determinada) se aplicó al canal de flujo desde el extremo A (desde el lado del depósito de aplicación de reactivo). A continuación, 750 μl de la solución de lavado se añadieron al depósito de aplicación de reactivo, y se transfirió en el sentido hacia el extremo B por capilaridad. Una vez que la totalidad de la cantidad de solución de lavado hubo fluido a partir del depósito de reactivo hacia el canal de flujo, 500 μl de la solución de sustrato que contiene ión plata se añadieron al depósito de reactivo. Esta solución se transfirió en el sentido hacia el extremo B por capilaridad durante 2 minutos, y se llevaron a cabo mediciones electroquímicas

mientras que se mantenía este estatus.

Cada medición electroquímica se llevó a cabo tal como sigue. Los conectores para el electrodo de trabajo, el de referencia y el contraelectrodo se conectaron con un analizador electroquímico (modelo 832A; fabricado por ALS). Se hizo que el potencial eléctrico variara entre -0,4 V y 0,4 V con respecto al electrodo de referencia (incremento de potencial: 0,005 V, amplitud: 0,05 V, anchura de impulso: 0,1 segundos, y periodo de impulso: 0,2 segundos) para medir la respuesta electroquímica mediante voltametría de impulsos diferencial (DPV, *differential pulse voltammetry*).

5-8. Resultados de las mediciones

(1) Detección de la intensidad de oxidación causada por la presencia de antígeno HBs

Los resultados de mediciones de DPV en las que la concentración de antígeno HBs era de 0, 0,25 y 2,5 U/ml se muestran en las figuras 33 a 35, respectivamente. A un potencial eléctrico de +0,165 V con respecto al electrodo de referencia, las intensidades de oxidación fueron de 13,74 nA, 38,10 nA, y 218,5 nA cuando las concentraciones de antígeno HBs eran de 0, 0,25 y 2,5 U/ml, respectivamente. Como es evidente a partir de la gráfica de la figura 36, la intensidad de oxidación aumentó de manera dependiente de la concentración de antígeno HBs y, por lo tanto, se confirmó que el antígeno HBs podría medirse de manera cuantitativa mediante este procedimiento.

Ejemplo 6: Medición del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) (efecto de adición de NaCl)

6-1. Construcción de la parte de electrodo y la parte de detección

Una parte de electrodo se construyó de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 5-1 del Ejemplo 5. El electrodo de trabajo contenido en la parte de electrodo funciona como una parte de detección.

6-2. Construcción de la parte de reacción de interacción y la parte de insolubilización

Una parte de reacción de interacción y una parte de insolubilización se construyeron sobre el electrodo de trabajo de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-2 del Ejemplo 1.

6-3. Preparación de solución que contiene anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs (Fab') marcado con fosfatasa alcalina (ALP)

Una solución de reactivo se preparó de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-3 del Ejemplo 1.

6-4. Preparación de solución de sustrato que contiene ión plata

Como soluciones de sustrato que contienen ión plata, se prepararon soluciones que contienen 2 mmol/l de p-aminofenilfosfato (pAPP; fabricado por Universal sensors), 0,125 mmol/l de AgNO₃, 1 mmol/l de MgSO₄, 0,04 mol/l de dietanolamina, y concentraciones previamente determinadas (0, 0,5, 1, 2 mmol/l) de NaCl (pH 9,4).

6-5. Preparación de solución de lavado

Una solución de lavado se preparó de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 5-5 del Ejemplo 5.

6-6. Construcción del canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo de carbono

Un canal de flujo capilar que tiene una parte de electrodo de carbono se construyó de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 5-6 del Ejemplo 5.

6-7. Medición de antígeno HBs mediante analizador electroquímico

El canal de flujo capilar construido que tiene una parte de electrodo de carbono se usó para medir un antígeno HBs. Una mezcla preparada mediante la adición de 0,83 μ l de la solución de anticuerpo anti-HBs marcado con ALP (120 μ g/ml) a 49,17 μ l de una solución de antígeno (preparada mediante dilución de un antígeno HBs con un tampón de fosfato de 0,1 mol/l que contiene 0,1 % BSA hasta una concentración previamente determinada) se aplicó al canal de flujo desde el extremo A (desde el lado del depósito de aplicación de reactivo). A continuación, 750 μ l de la solución de lavado se añadieron al depósito de aplicación de reactivo, y se transfirió en el sentido hacia el extremo B por capilaridad. Una vez que la totalidad de la cantidad de solución de lavado hubo fluido a partir del depósito de reactivo hacia el canal de flujo, 500 μ l de la solución de sustrato que contiene ión plata se añadieron al depósito de reactivo. Esta solución se transfirió en el sentido hacia el extremo B por capilaridad durante 2 minutos, y se llevaron a cabo mediciones electroquímicas mientras que se mantenía este estatus. Cada medición electroquímica se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento y las condiciones que se describen en el artículo 5-7 del Ejemplo 5.

6-8. Resultados de las mediciones

Los resultados de mediciones de DPV en las que la concentración de antígeno HBs era de 0 U/ml se muestran en las figuras 37 a 40. Los resultados de mediciones de DPV en las que la concentración de antígeno HBs era de 45 U/ml se muestran en las figuras 41 a 44.

- 5 Cuando la concentración de antígeno HBs era de 45 U/ml y las concentraciones de NaCl fueron de 0 mmol/l (figura 41), 0,5 mmol/l (figura 42), 1 mmol/l (figura 43), y 2 mmol/l (figura 44), de entre las intensidades de oxidación a unos potenciales eléctricos de +0,05 0V, -0,015 V, +0,036 V, y +0,026 V con respecto al electrodo de referencia, respectivamente, la intensidad de oxidación a una concentración de 0,5 mmol/l era la más alta (1842 nA). Cuando la concentración de antígeno HBs era de 0 U/ml y las concentraciones de NaCl fueron de 0 mmol/l (figura 37), 0,5 mmol/l (figura 38), 1 mmol/l (figura 39), y 2 mmol/l (figura 40), las intensidades de oxidación a unos potenciales eléctricos de +0,030 V, +0,055 V, +0,010 V, y +0,020 V con respecto al electrodo de referencia fueron de 151,8 nA, 286,2 nA, 699,4 nA, y 466,9 nA, respectivamente. Se encontró que la reactividad podría mejorarse mediante la adición de una cantidad apropiada de NaCl.

15 **Ejemplo 7: Confirmación del efecto del cambio en la forma de la superficie de electrodo [Medición del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg)]**

7-1. Construcción de la parte de electrodo y la parte de detección

Una parte de electrodo sobre la que se formó un gran número de estructuras tridimensionales que tienen una forma de pirámide tal como se muestra en las figuras 45 a 47 se construyó sobre un sustrato de poli(ácido láctico) (al que se hace referencia a veces en lo sucesivo en el presente documento como sustrato de estructura tridimensional), y una parte de electrodo y una parte de detección se construyeron sobre el sustrato de estructura tridimensional, usando un patrón de máscaras tal como se muestra en la figura 3, mediante un procedimiento de bombardeo catódico y un procedimiento de lanzamiento. Las estructuras tridimensionales que tienen una forma de pirámide y el sustrato de estructura tridimensional se construyeron por electroformación. A partir de las micrográficas que se muestran en las figuras 46 y 47, las estructuras tridimensionales que tienen una base cuadrada de 135 μm X 135 μm y una altura de 300 μm se dispusieron con regularidad a una densidad de 12,3 pirámides/ mm^2 .

Se explicarán brevemente el procedimiento para construir la parte de electrodo que se ha mencionado en lo que antecede y la parte de detección. Una película delgada de oro que tiene un espesor de 50 nm se formó sobre el sustrato de estructura tridimensional, y una tinta de cloruro de plata / plata (fabricada por BAS Inc.) se aplicó sobre una parte de la película delgada de oro para construir un electrodo de referencia 16. Para dividir el área entre la parte de electrodo 12 y una parte de conductor 13, una parte de la parte de conductor se cubrió con una capa aislante 17 para construir la parte de electrodo que tiene un electrodo de trabajo 14, un contraelectrodo 15, y el electrodo de referencia 16. Los extremos opuestos al electrodo de trabajo, el contraelectrodo y el electrodo de referencia funcionan como unos conectores 18. El electrodo de trabajo contenido en la parte de electrodo funciona como una parte de detección (a la que se hace referencia a veces en lo sucesivo en el presente documento como parte de electrodo tridimensionalizada).

7-2. Construcción de la parte de reacción de interacción y la parte de insolubilización

Una parte de reacción de interacción y una parte de insolubilización se construyeron sobre el electrodo de trabajo de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-2 del Ejemplo 1.

40 7-3. Preparación de solución que contiene anticuerpo policlonal de conejo anti-HBs (Fab') marcado con fosfatasa alcalina (ALP)

Una solución de reactivo se preparó de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-3 del Ejemplo 1.

7-4. Preparación de solución de sustrato que contiene ión plata

45 Como una solución de sustrato que contiene ión plata, se preparó una solución de dietanolamina de 0,04 mol/l (pH 9,4) que contiene 2 mmol/l de p-aminofenilfosfato (pAPP; fabricado por Universal sensors), 0,0625 mmol/l de AgNO_3 , y 1 mmol/l de MgSO_4 .

7-5. Construcción del canal de flujo y el aparato para controlar las condiciones de flujo

Un canal de flujo y un aparato para controlar las condiciones de flujo se construyeron de acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-6 del Ejemplo 1.

50 7-6. Medición de antígeno HBs usando una parte de electrodo tridimensionalizada mediante analizador electroquímico

De acuerdo con el procedimiento que se describe en el artículo 1-7 del Ejemplo 1, un antígeno HBs se midió usando la parte de electrodo tridimensionalizada que se construyó en lo que antecede. Como un control para comparación,

se usó la parte de electrodo sin las estructuras tridimensionales (a la que se hace referencia a veces en lo sucesivo en el presente documento como parte de electrodo plana), construida en el Ejemplo 1. A este respecto, cada medición electroquímica se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento y las condiciones que se describen en el artículo 5-7 del Ejemplo 5.

5 7-7. Resultados de las mediciones

(1) Detección de la intensidad de oxidación causada por la presencia de antígeno HBs (compuesto a medir)

El resultado de una medición de DPV en la que se usó la parte de electrodo tridimensionalizada y la concentración de antígeno HBs era de 0 U/ml se muestra en la figura 48, y el resultado de una medición de DPV en la que la concentración de antígeno HBs era de 0,7 U/ml se muestra en la figura 49. Como un control, el resultado de una medición de DPV en la que se usó la parte de electrodo sin las estructuras tridimensionales (parte de electrodo plana) y la concentración de antígeno HBs era de 0 U/ml se muestra en la figura 50, y el resultado de una medición de DPV en la que la concentración de antígeno HBs era de 0,7 U/ml se muestra en la figura 51. En estas mediciones, la alimentación de líquido al canal de flujo (es decir, condiciones de flujo) se llevó a cabo a un caudal de 360 μ l/min a través de la totalidad del procedimiento (desde la alimentación de tampón A durante 2 minutos hasta la medición electroquímica).

Cuando la concentración de antígeno HBs era de 0,7 U/ml (figura 49), como una intensidad de oxidación acompañada por una reacción de oxidación de la plata depositada, una intensidad de oxidación de 800,7 nA se detectó a un potencial eléctrico de +0,145 V (potencial de oxidación) con respecto al electrodo de referencia. Cuando la concentración de antígeno HBs era de 0 U/ml (figura 48), la intensidad de oxidación fue de 343 nA. Con respecto a la parte de electrodo plana, a pesar de que una intensidad de oxidación se observaba en el Ejemplo 1 cuando la concentración de antígeno HBs era de 48 U/ml, no se detectó intensidad de oxidación alguna similar a las observadas en las mediciones que usan la parte de electrodo tridimensionalizada en ambos casos [0 U/ml (figura 50) y 0,7 U/ml (figura 51)]. Se encontró a partir de estos resultados que la sensibilidad de detección de antígeno HBs podría mejorarse de manera significativa mediante la tridimensionalización de la parte de electrodo.

25 **Susceptibilidad de aplicación industrial**

La presente invención puede aplicarse al análisis de alta sensibilidad, por ejemplo, pruebas clínicas, diagnóstico, análisis alimentario y análisis ambiental.

A pesar de que la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, son posibles diversos cambios y modificaciones obvios para los expertos en la materia sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de análisis **caracterizado por** comprender las etapas de:
 - (a) hacer reaccionar una sustancia a analizar con por lo menos un socio específico que muestra una interacción selectiva con la sustancia, convertir una sustancia soluble en una sustancia insoluble mediante una reacción de insolubilización, en correlación con la cantidad de la sustancia a analizar contenida en una muestra, y depositar la sustancia insoluble sobre una parte de detección, y
 - (b) analizar eléctricamente la sustancia insoluble depositada sobre la parte de detección, en el que por lo menos la reacción de insolubilización en la etapa (a) se lleva a cabo bajo condiciones de flujo.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el socio específico es una enzima.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende:
 - (1) formar un complejo que comprende una sustancia a analizar, un socio específico que muestra una interacción selectiva con la sustancia, y una sustancia de marcado, en correlación con la cantidad de la sustancia a analizar contenida en una muestra, y
 - (2) convertir una sustancia soluble en una sustancia insoluble mediante una reacción de insolubilización causada de manera directa o indirecta por la sustancia de marcado contenida en el complejo formado, y depositar la sustancia insoluble sobre una parte de detección, en el que por lo menos la etapa (2) se lleva a cabo bajo condiciones de flujo.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la sustancia de marcado es una hidrolasa.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la hidrolasa es fosfatasa alcalina.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la reacción de insolubilización es una reacción de oxidación-reducción.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la sustancia soluble está seleccionada de entre un ión inorgánico, un ión orgánico, un sustrato de enzima o su producto de reacción, y un colorante.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la sustancia soluble es un ión de metal.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el ión de metal es un ión plata.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la parte de detección está compuesta de uno cualquiera de entre un metal, un polímero, carbono, una estructura de nanotubos, grafito o una sustancia inorgánica, o una combinación de los mismos.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la parte de detección tiene una o más estructuras tridimensionales que tienen una forma similar a un ángulo agudo.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el socio específico está inmovilizado sobre la parte de detección.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las condiciones de flujo son un flujo forzado o un flujo espontáneo.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el procedimiento de análisis que comprende la etapa de análisis eléctrico es un análisis amperimétrico.

Figura 1

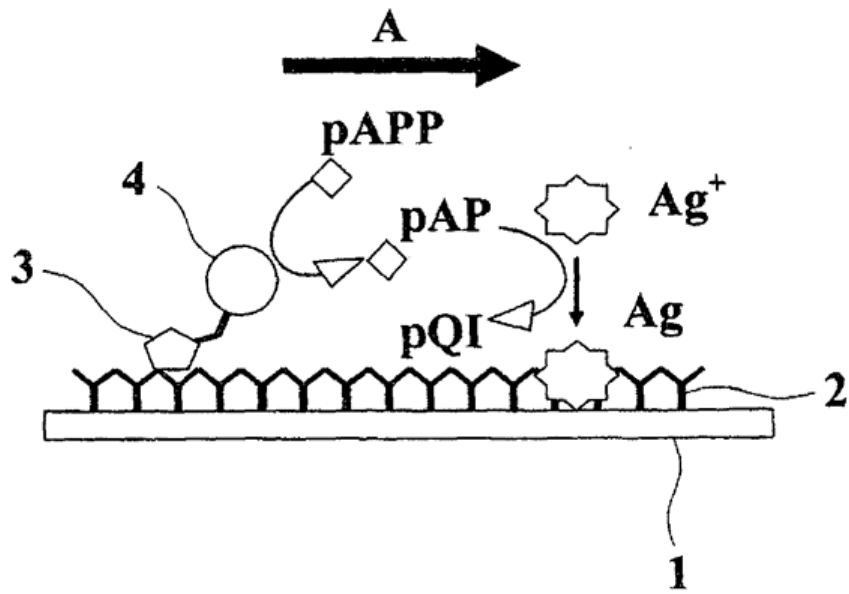


Figura 2

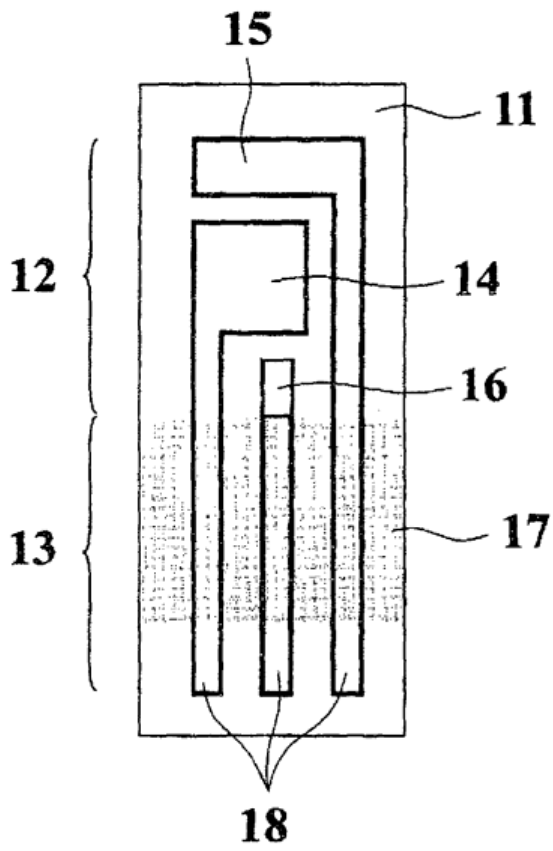


Figura 3



Figura 4

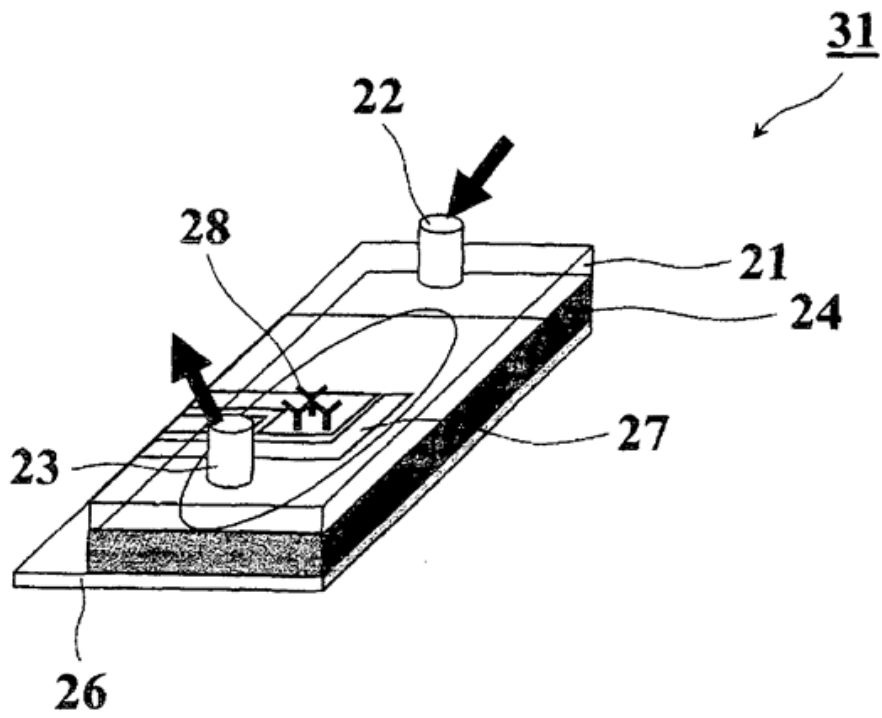


Figura 5

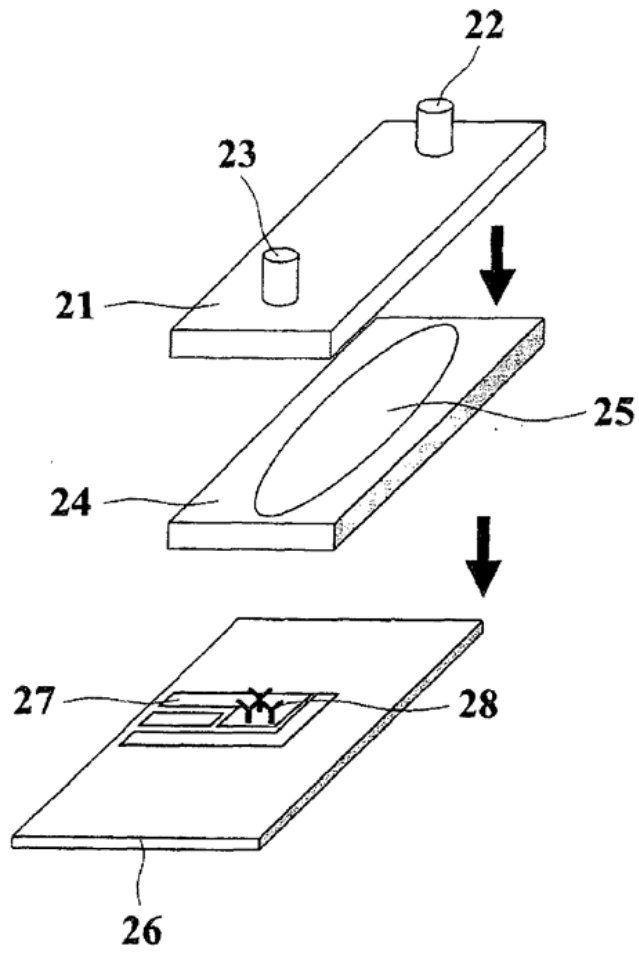


Figura 6

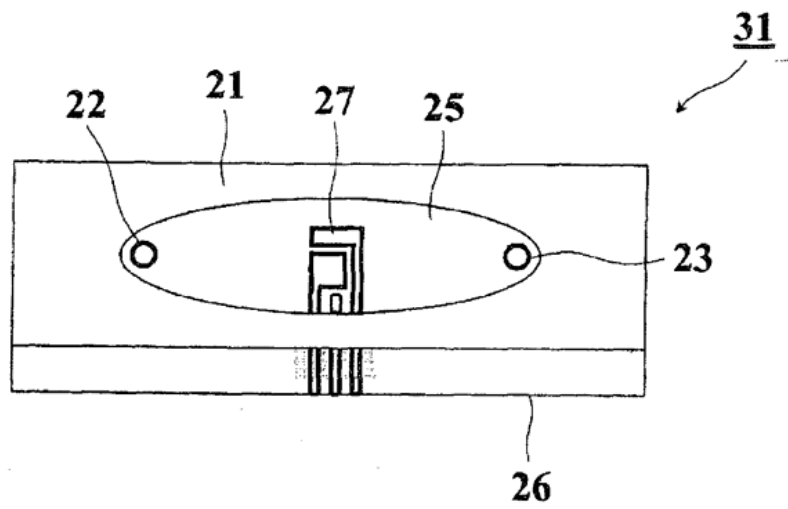


Figura 7

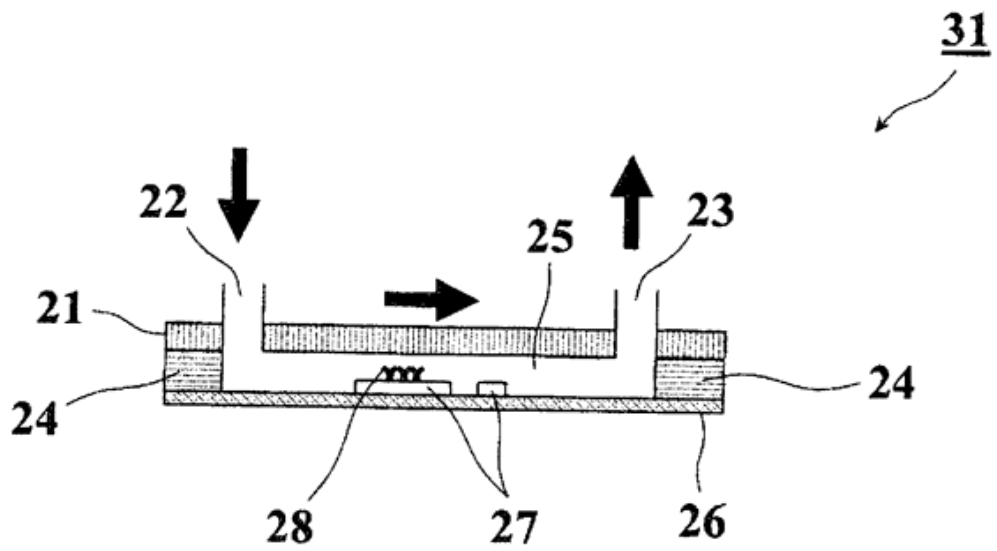


Figura 8

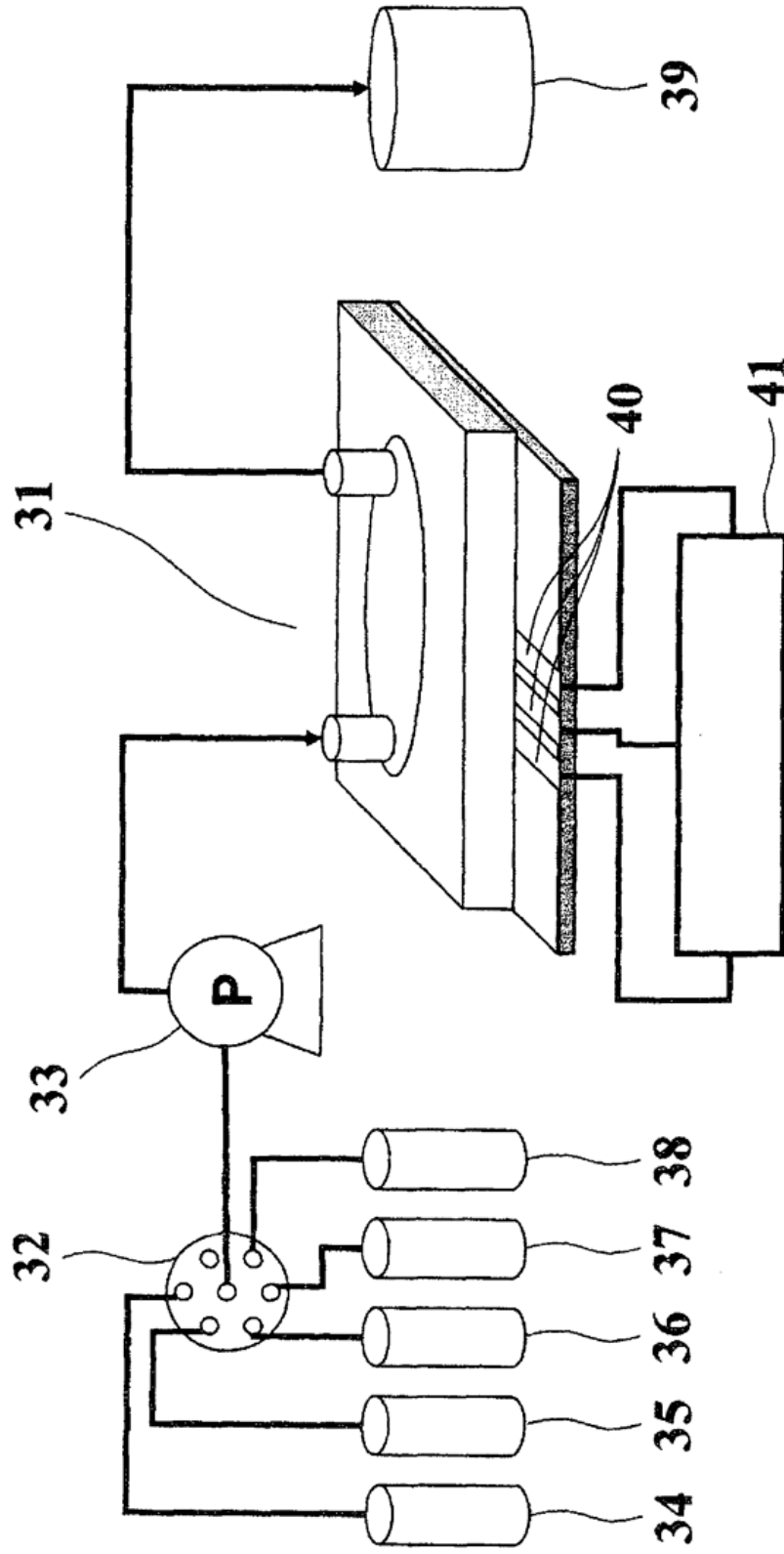


Figura 9

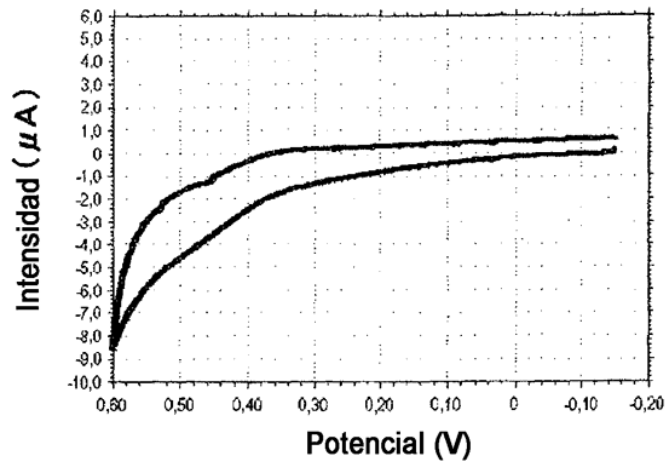


Figura 10

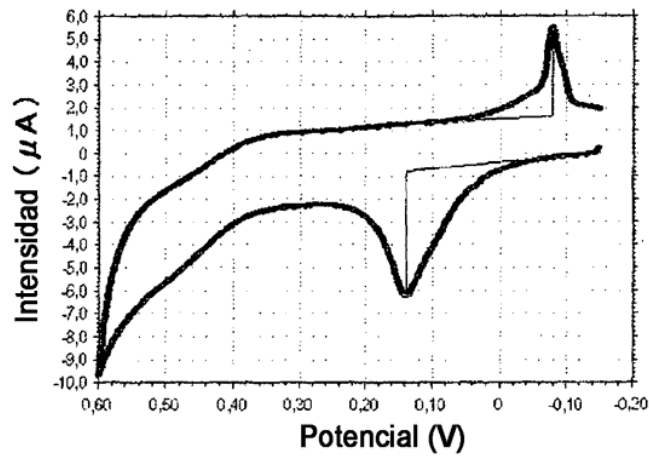


Figura 11

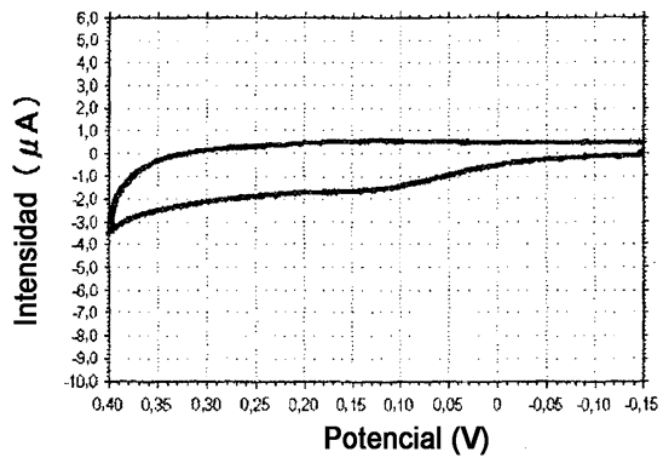


Figura 12

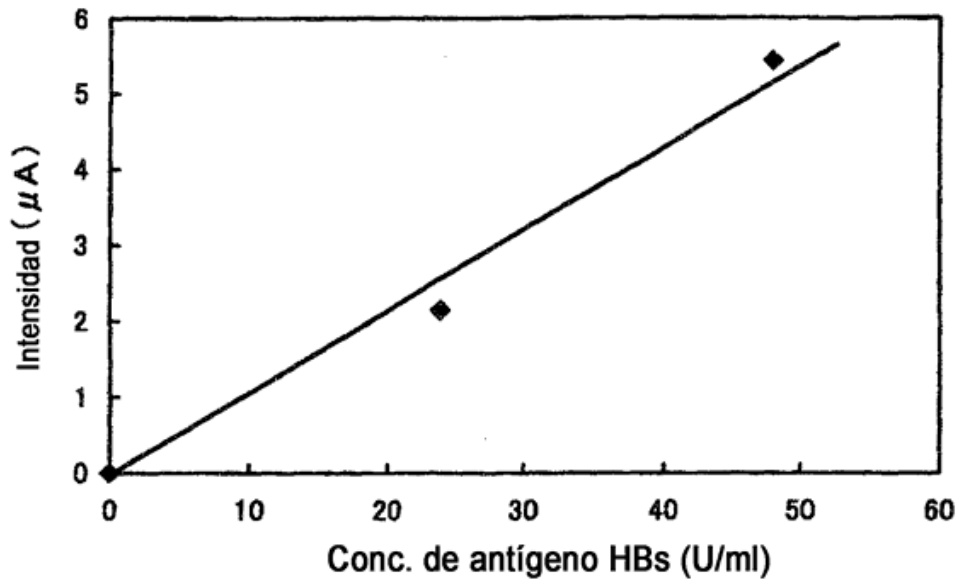


Figura 13

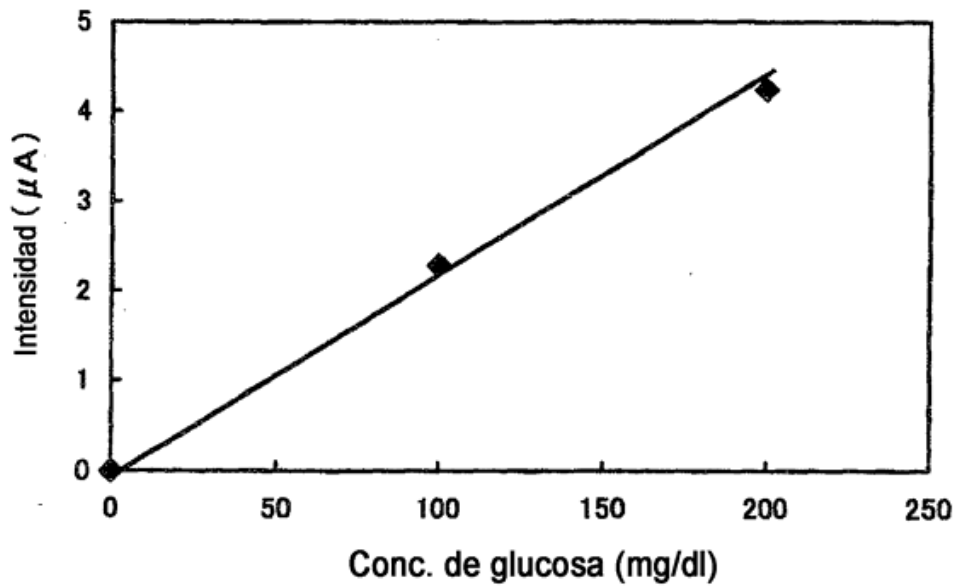


Figura 14

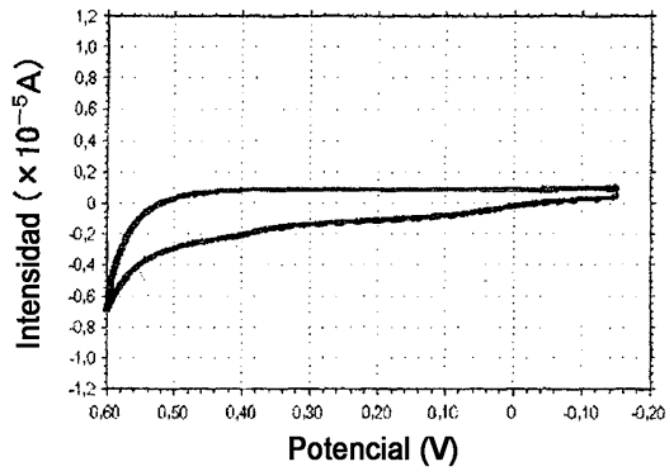


Figura 15

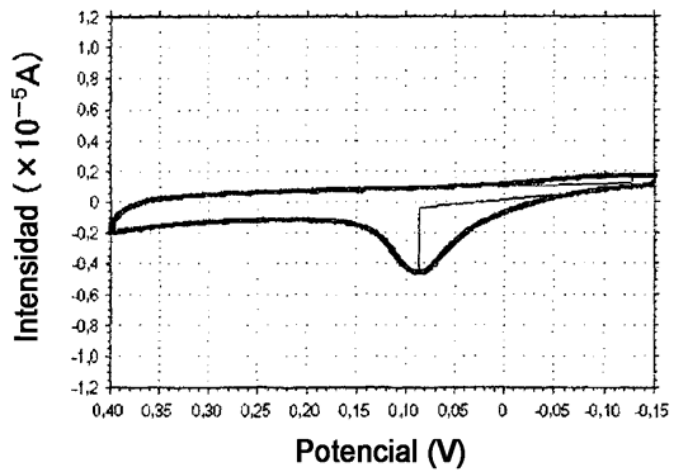


Figura 16

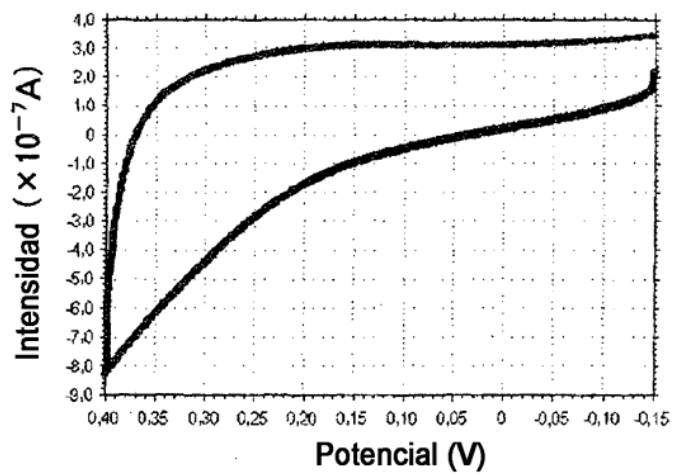


Figura 17

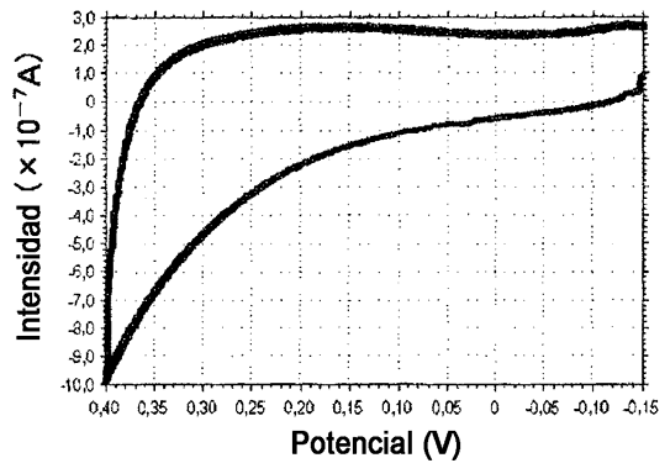


Figura 18

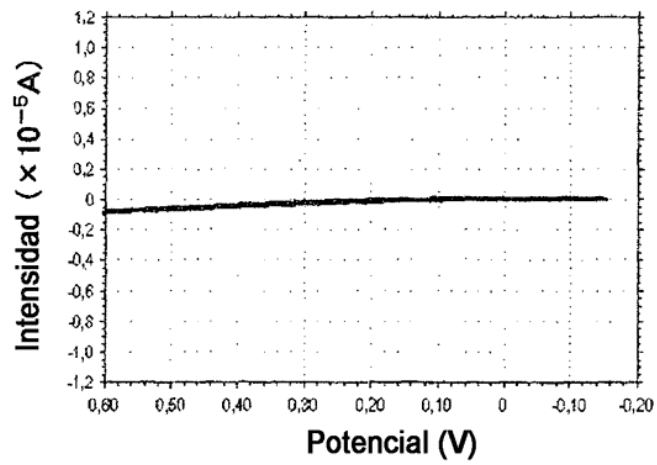


Figura 19

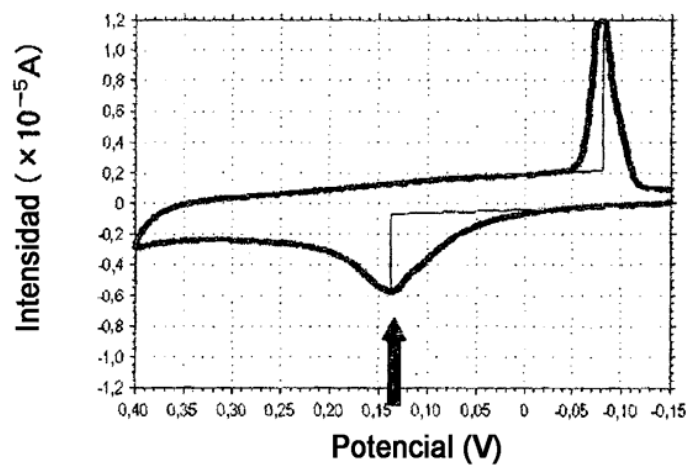


Figura 20

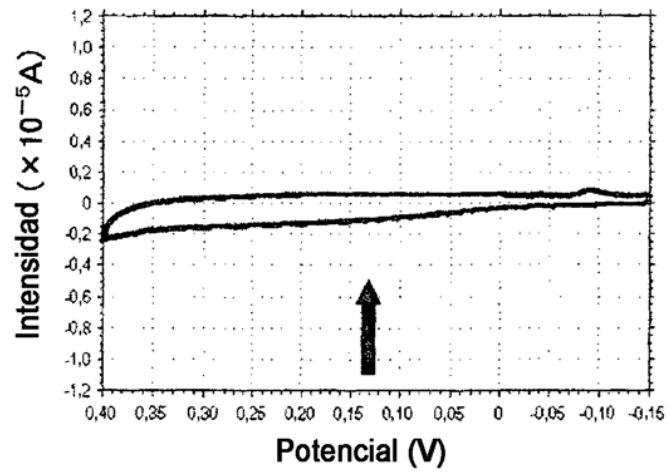


Figura 21

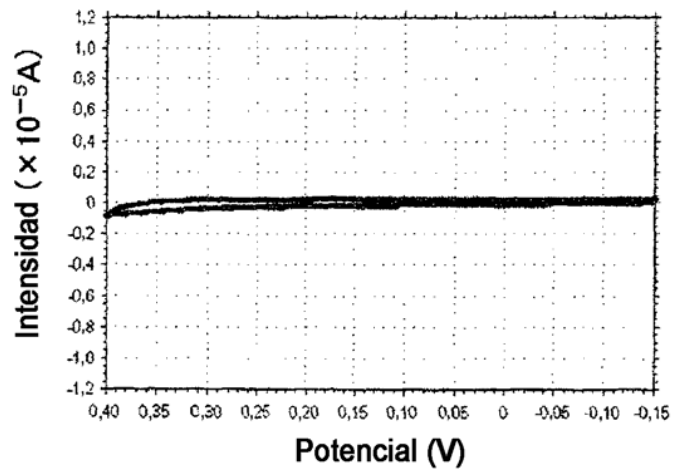


Figura 22

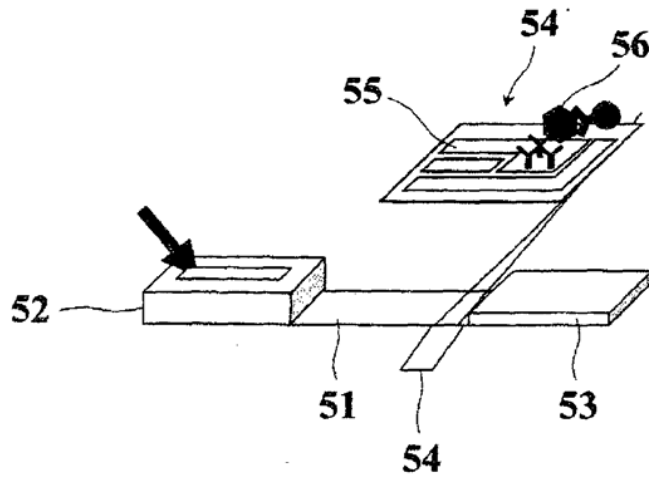


Figura 23

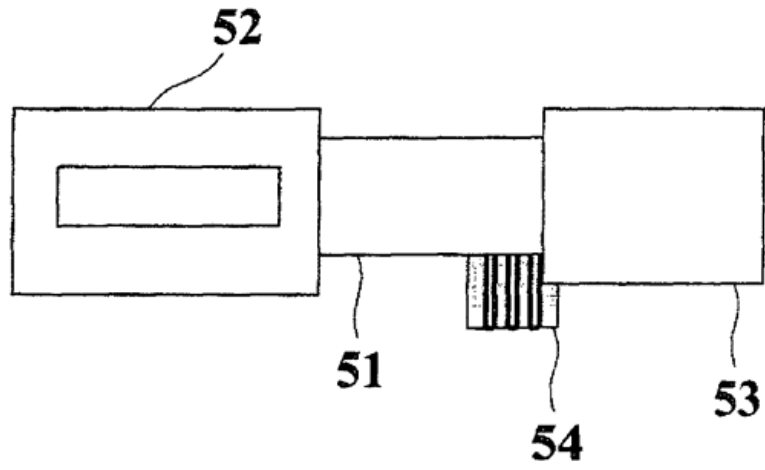


Figura 24

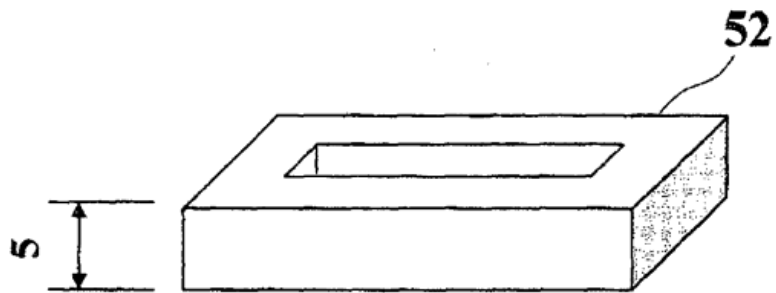


Figura 25

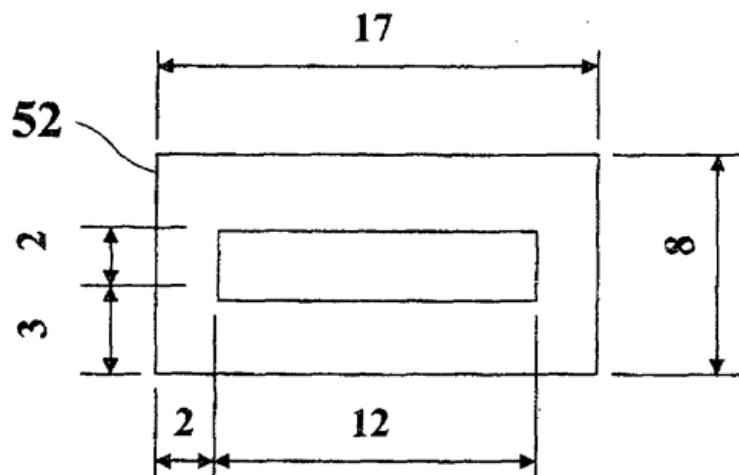


Figura 26

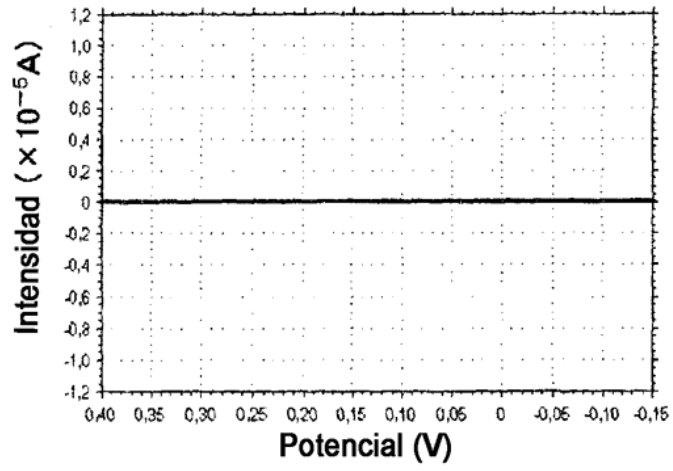


Figura 27

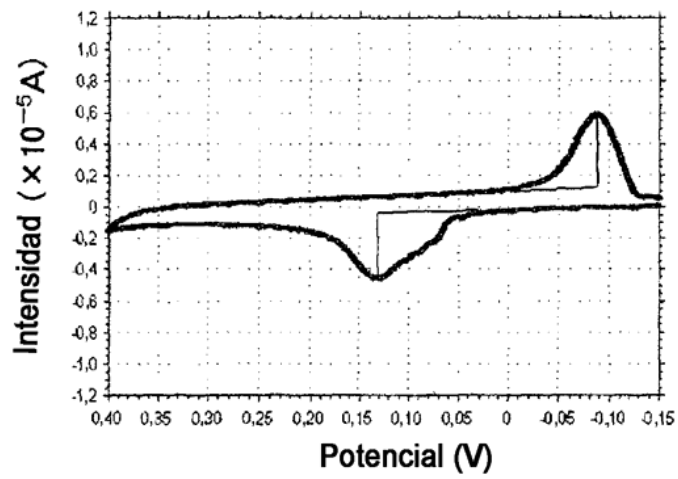


Figura 28

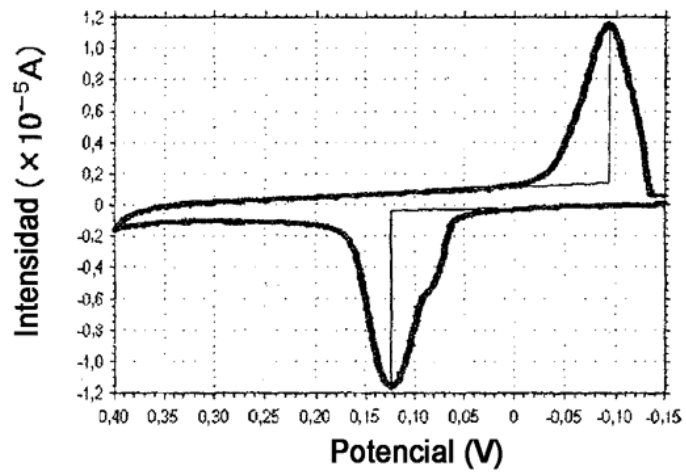


Figura 29

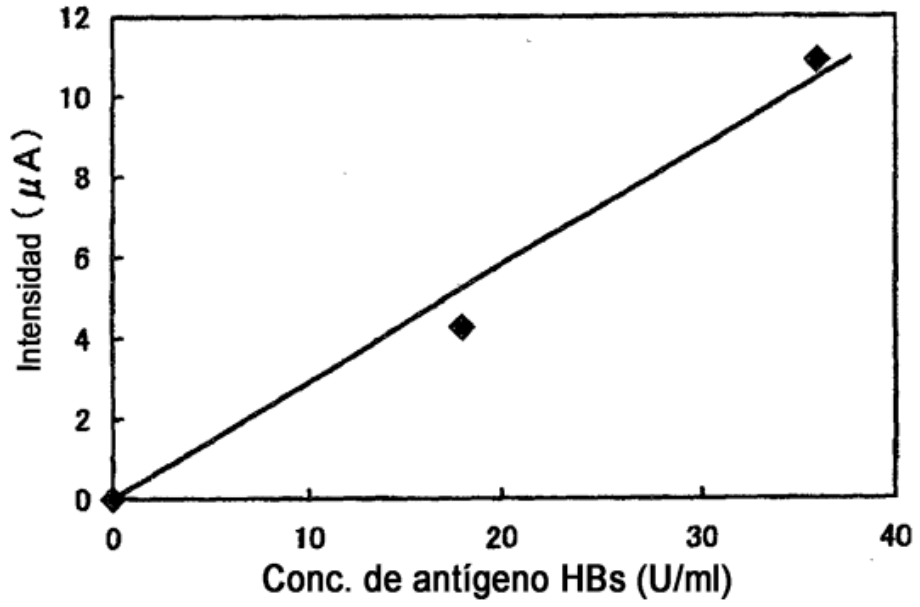


Figura 30

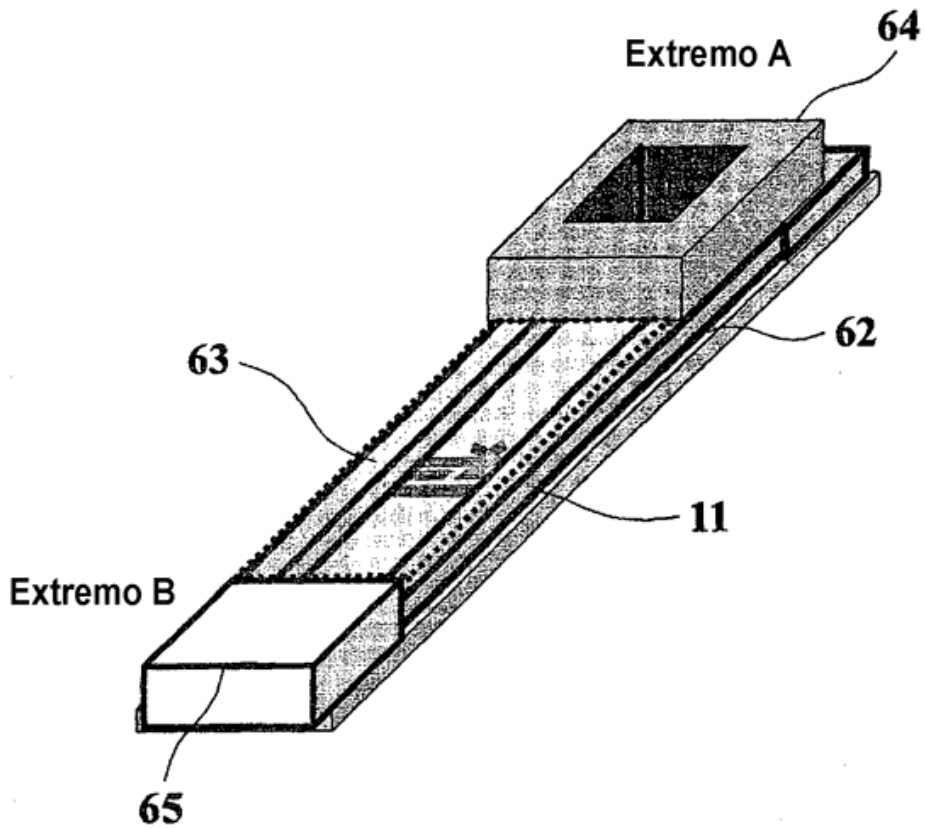


Figura 31

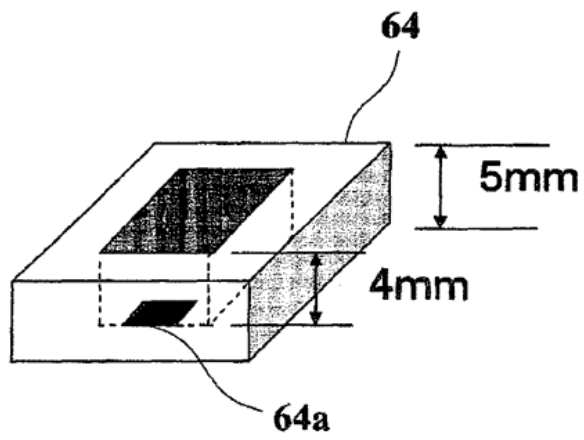


Figura 32

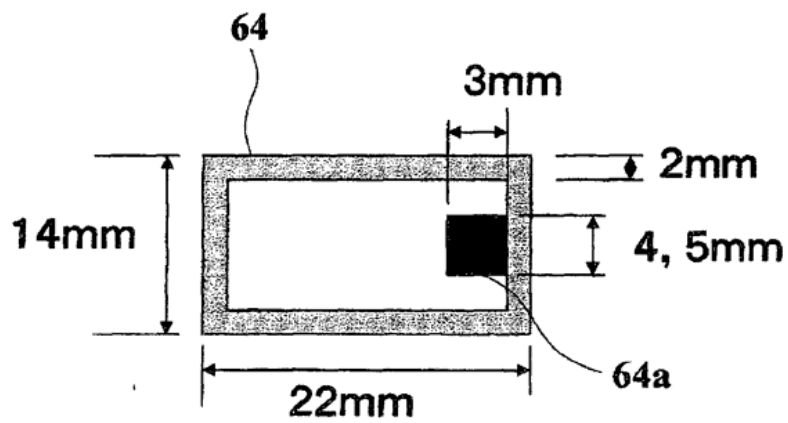


Figura 33

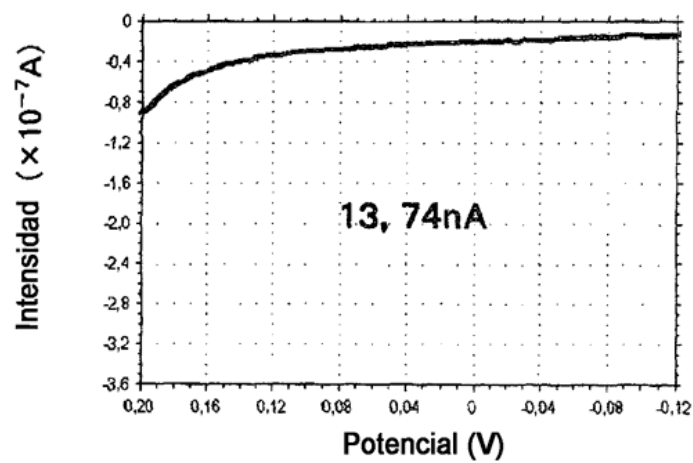


Figura 34

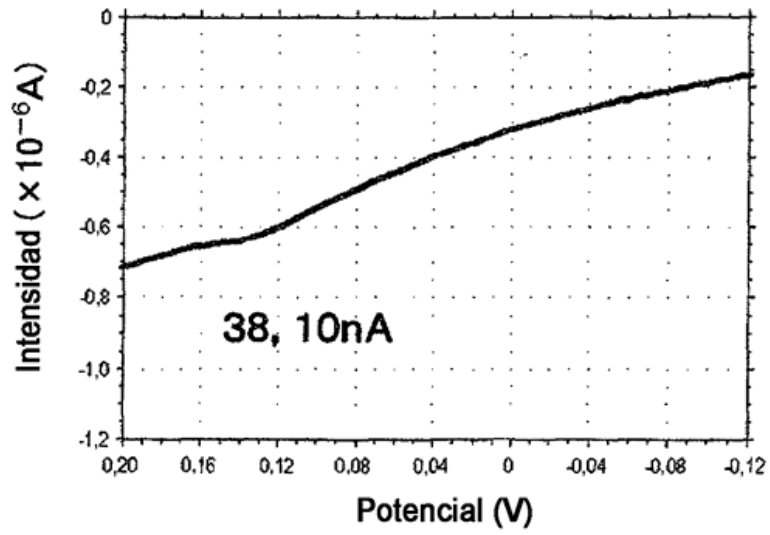


Figura 35

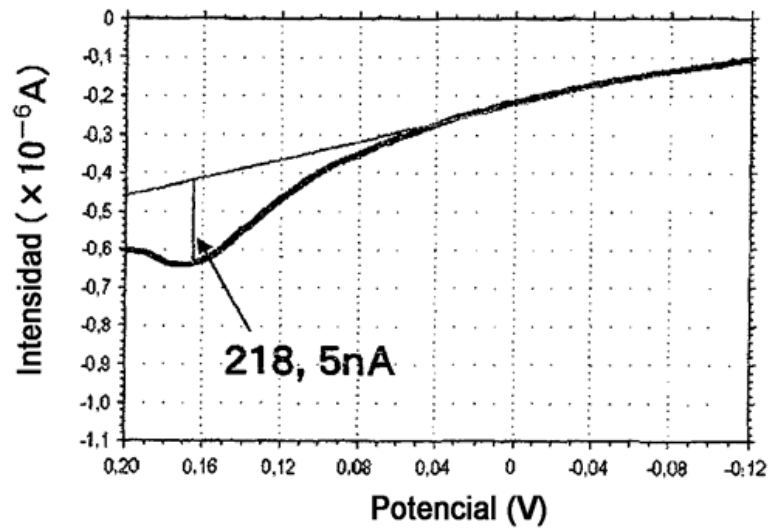


Figura 36

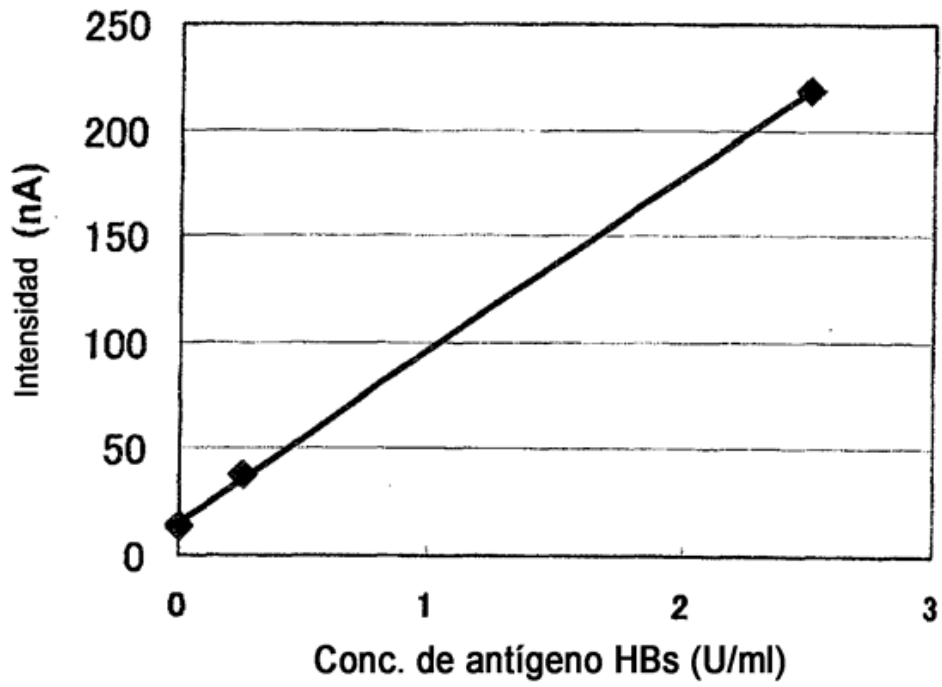


Figura 37

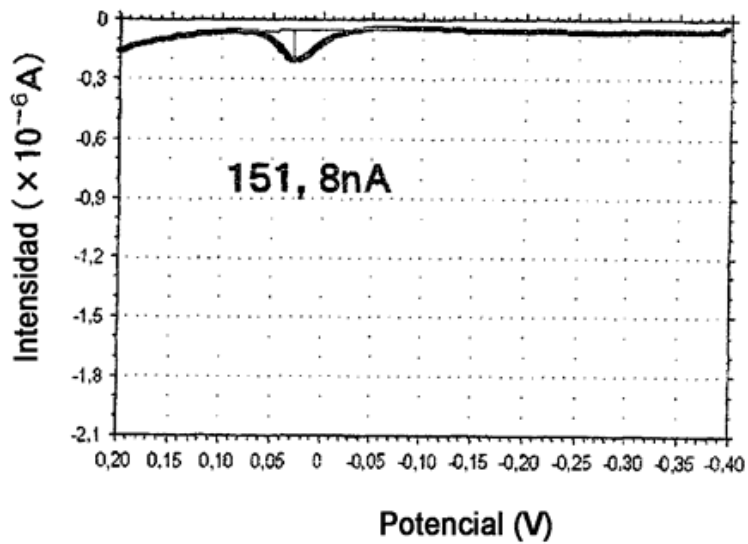


Figura 38

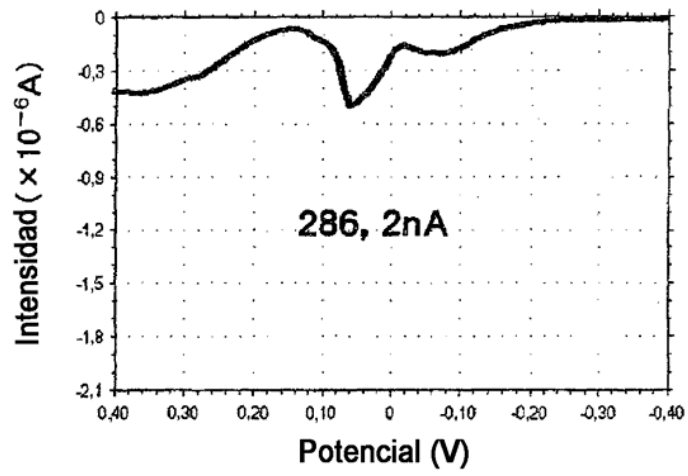


Figura 39

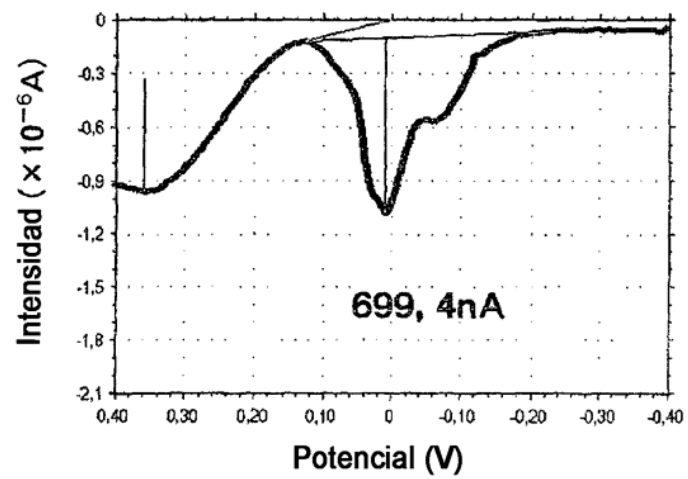


Figura 40

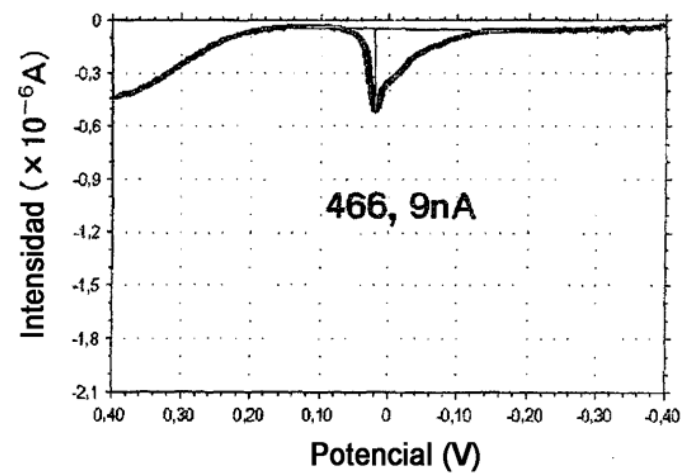


Figura 41

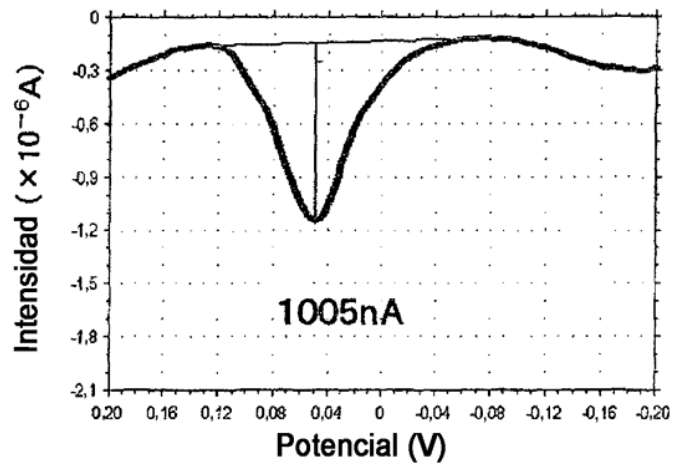


Figura 42

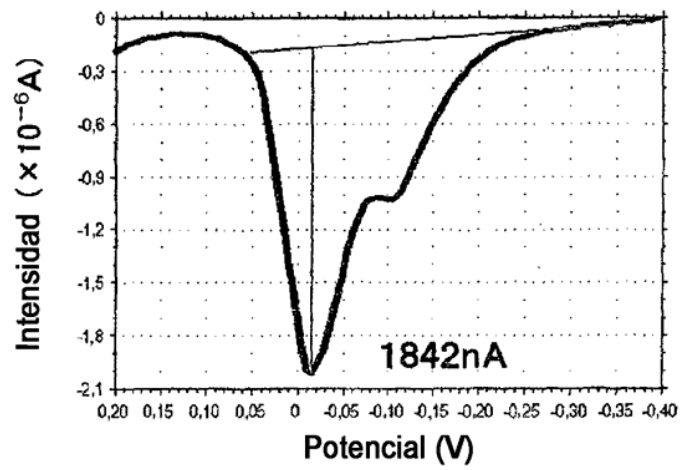


Figura 43

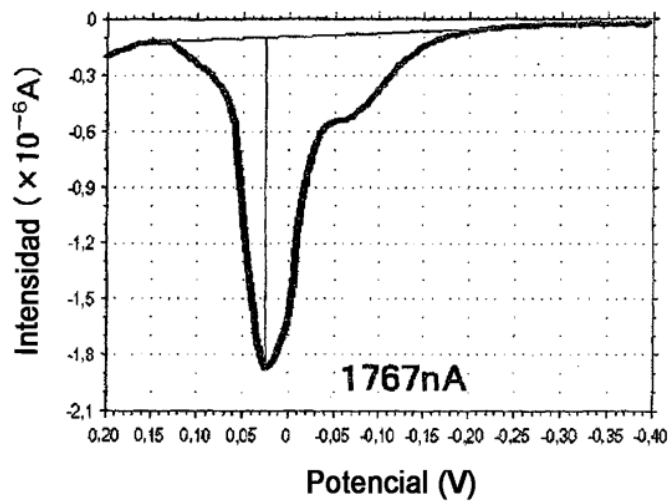


Figura 44

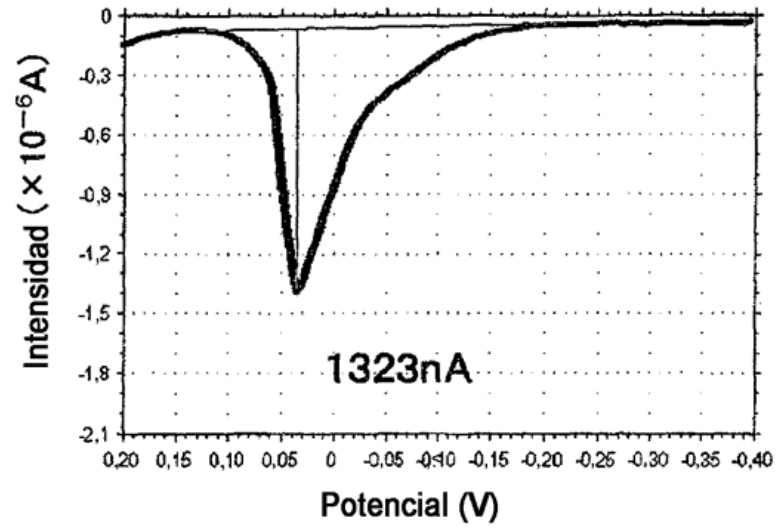


Figura 45

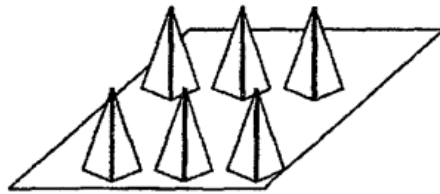


Figura 46

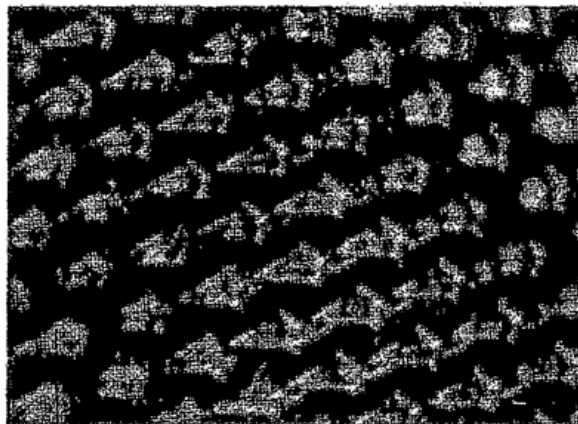


Figura 47

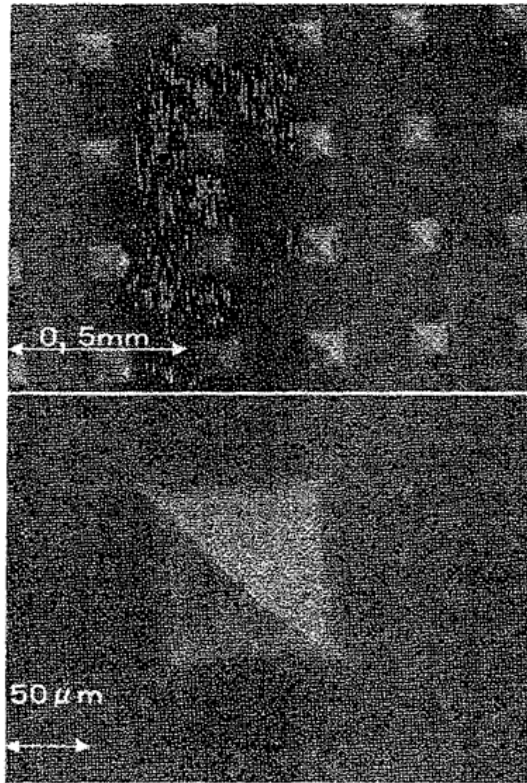


Figura 48

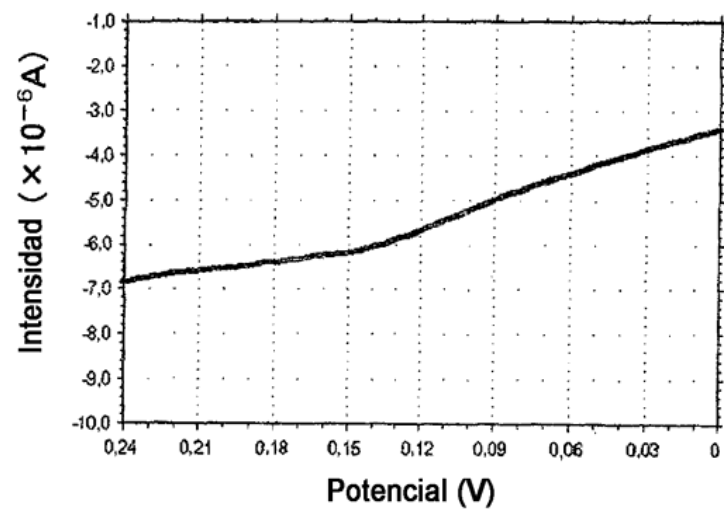


Figura 49

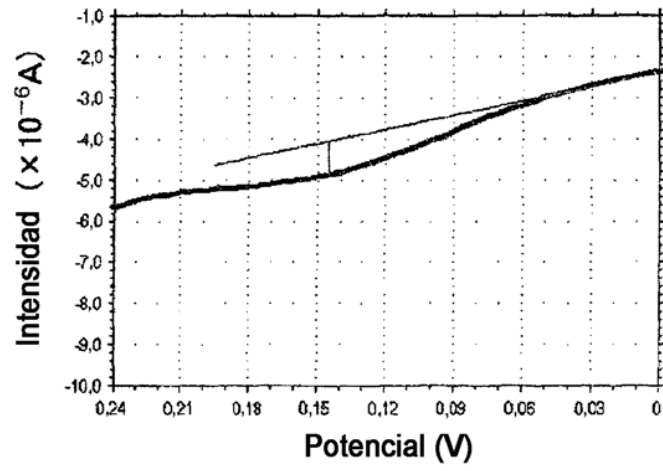


Figura 50

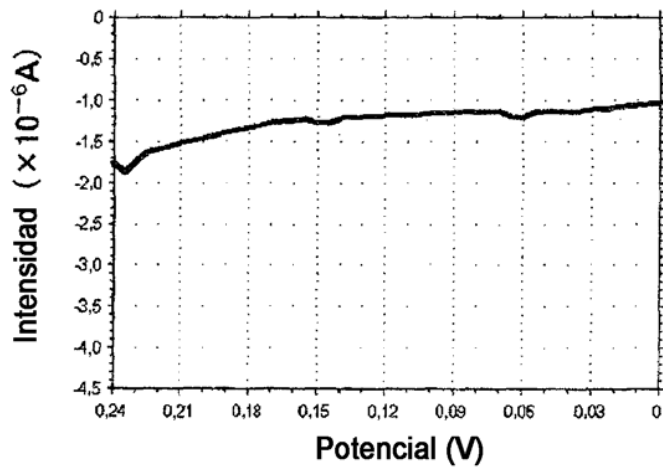


Figura 51

