



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105793707 B

(45)授权公告日 2018.05.08

(21)申请号 201480065040.2
 (22)申请日 2014.12.01
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105793707 A
 (43)申请公布日 2016.07.20
 (30)优先权数据
 2013-247279 2013.11.29 JP
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2016.05.27
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2014/081753 2014.12.01
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02015/080286 JA 2015.06.04
 (73)专利权人 积水医疗株式会社
 地址 日本国东京都
 (72)发明人 西谷公良
 (74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
 公司 11021
 代理人 穆彬

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/576(2006.01)
 (56)对比文件
 CN 103018439 A,2013.04.03,
 CN 103018439 A,2013.04.03,
 CN 103314297 A,2013.09.18,说明书第
 0036-0083段.
 JP H10332699 A,1998.12.18,说明书第
 0009-0012、0024、0026-0052段.
 CN 1826355 A,2006.08.30,
 CN 101526534 A,2009.09.09,全文.
 JP H10332699 A,1998.12.18,说明书第
 0009-0012、0024、0026-0052段.
 Naoko Nakagawa, et al..Rapid
 detection and identification of two
 lineages of influenza B strains with
 monoclonal antibodies..《Journal of
 Virological Methods》.1999,第49卷(第3期),
 第113-120页.

审查员 张绚

权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称
 免疫层析辅助的检测方法
 (57)摘要
 本发明提供一种使用免疫层析测试条的检测方法,所述方法表现出高准确度和灵敏度,同时使“漂白(white streaking)”的发生率最小化。本发明提供一种免疫层析辅助的检测方法,其涉及免疫层析测试条的使用。所述免疫层析测试条具有:(1)具有样品供应部和在所述样品供应部下游的缀合物部的缀合物垫,所述样品供应部用于供应可能包含要检测的物质的样品,所述缀合物部包含其中针对要检测的物质的抗体固定在标记上的缀合物;和(2)具有至少一个检测部的不溶性膜载体,在所述检测部上固定有针对

要检测的物质的抗体。所述检测方法包括(A)向所述样品供应部提供甲醇和可能包含要检测的物质的样品的步骤,和(B)在所述不溶性膜载体上检测作为免疫反应产物的要检测的物质的步骤。

CN 105793707 B

1. 一种使用免疫层析测试条的免疫层析检测方法,所述免疫层析测试条包括:(1)缀合物垫,其具有用于供应可能包含分析物的样品的样品供应部和在所述样品供应部下游侧的缀合物部,所述缀合物部包含其中针对所述分析物的抗体固定在标记上的缀合物,和(2)具有至少一个检测部的不溶性膜支持物,在所述检测部上固定有针对所述分析物的抗体,

所述方法包括下述步骤:

(A) 向所述样品供应部提供甲醇和可能包含所述分析物的样品;和

(B) 在所述不溶性膜支持物上检测作为免疫反应产物的所述分析物,

其中步骤(A)是向所述样品供应部提供预先用包含0.1至20.0% (v/v) 甲醇的样品稀释液稀释的样品的步骤,并且

其中所述分析物是病毒或蛋白。

2. 一种使用免疫层析测试条的免疫层析检测方法,所述免疫层析测试条包括:(1)缀合物垫,其具有用于供应可能包含分析物的样品的样品供应部和在所述样品供应部下游侧的缀合物部,所述缀合物部包含其中针对所述分析物的抗体固定在标记上的缀合物,和(2)具有至少一个检测部的不溶性膜支持物,在所述检测部上固定有针对所述分析物的抗体,

所述方法包括下述步骤:

(A) 向所述样品供应部提供甲醇和可能包含所述分析物的样品;和

(B) 在所述不溶性膜支持物上检测作为免疫反应产物的所述分析物,

其中步骤(A)是用包含0.1至20.0% (v/v) 甲醇的样品稀释液稀释样品并且将稀释的样品提供到所述样品供应部的步骤,并且

其中所述分析物是病毒或蛋白。

3. 一种免疫层析检测试剂盒,其包括:

(a) 允许可能包含分析物的样品展开以检测所述分析物的免疫层析测试条,所述测试条包括:(1)缀合物垫,其具有用于提供可能包含所述分析物的样品的样品供应部,和在所述样品供应部下游侧的缀合物部,所述缀合物部包含其中针对所述分析物的抗体固定在标记上的缀合物,和(2)具有至少一个检测部的不溶性膜支持物,在所述检测部上固定有针对所述分析物的抗体;和

(b) 包含0.1至20.0% (v/v) 甲醇的免疫层析样品稀释液,

其中所述分析物是病毒或蛋白。

4. 根据权利要求3所述的免疫层析检测试剂盒,其中所述分析物是B型流感病毒,并且其中固定在标记上的针对分析物的抗体和固定在检测部上的针对分析物的抗体是抗-B型流感病毒单克隆抗体。

5. 根据权利要求3或4所述的免疫层析检测试剂盒,其中(b)是在pH6.0-10.0的缓冲液中包含0.1-20% (v/v) 甲醇的免疫层析样品稀释液。

6. 下述(b)的免疫层析样品稀释液在制备B型流感病毒检测试剂盒中的应用,所述试剂盒包含下述(a)的免疫层析测试条,其允许可能包含B型流感病毒的样品展开以检测所述病毒:

(a) 免疫层析测试条,其包括:(1)缀合物垫,其具有用于提供可能包含B型流感病毒的样品的样品供应部,和在所述样品供应部下游侧的缀合物部,所述缀合物部包含其中抗-B型流感病毒抗体固定在标记上的缀合物,和(2)具有至少一个检测部的不溶性膜支持物,在

所述检测部上固定有抗-B型流感病毒抗体;和

(b) 包含0.1-20% (v/v) 甲醇的免疫层析样品稀释液。

免疫层析辅助的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析检测方法。本发明还涉及一种用于检测B型流感病毒的方法。

背景技术

[0002] 已知使用免疫层析测试条的检测方法是一种通过抗原-抗体反应检测样品中的分析物(要检测的物质)的方法。免疫层析是一种这样的方法,其包括:将由分析物和其中固定了针对所述分析物的抗体的标记的缀合物(所述标记的缀合物也可以称为缀合物)形成的免疫复合物与移动相(诸如缓冲液)一起经由固定相展开,所述固定相是一种具有检测部的不溶性膜支持物,在所述检测部上固定了针对所述分析物的抗体作为捕获剂,从而检测由所述捕获剂捕获的免疫复合物。胶体金属颗粒,诸如胶体金,和着色的胶乳颗粒,用作标记,并且检测部的着色程度可以用来确定样品中分析物的存在,和在一些情形中,确定样品中的分析物量。

[0003] 免疫层析测试条的典型构造是这样的构造:其具有用于供应样品的样品供应部(以下还称为样品垫),用于放置缀合物的缀合物垫,和检测部,所述检测部具有固定成线形的捕获剂,诸如抗体,并且与不溶性膜载体一起放置,用于通过允许其随着移动相展开而捕获前述免疫复合物,和用于在检测部下游侧吸附经过不溶性膜支持物展开的样品的吸附垫。

[0004] 在具有前述构造的免疫层析测试条的检测部中检测分析物与缀合物之间的复合物的方法包括测量由标记反射的光的强度从而计算吸光度(反射吸收)的方法。反射吸收通过使用在检测部和其两个相邻部分中分析物的检测线处测量的反射光强度的比率而计算。然而,当使用该方法时,由于在检测免疫复合物所在的检测线上游侧和下游侧(特别是下游侧)的附近,反射光强度非特异性增加,测量波形可能受到干扰。当使用包含低浓度分析物的样品并且检测前述复合物时,由于测量波形的干扰而不能画出基线,并且,因此,不能准确检测特异性信号(峰),这可能使得测量本身是不可能的。由于这种测量波形干扰发生的频率和测量波形干扰的程度或水平不是恒定的,测量的再现性降低,并且在每次测量中必须进行适当的测量值的校正(换言之,测量波形的验证)。

[0005] 在使用白色膜的常用免疫层析中,测量波形的干扰在视觉上可以观察为这样的现象:其中在膜上相对应的部分看起来比周围的颜色相对更白,如同该部分被漂白了(所谓的漂白现象;以下还简称为漂白现象或漂白)。

[0006] 尽管不清楚所述漂白现象的原因,但是,当在长时间保存(例如,一年以上)后使用免疫层析测试条时,经常观察到该现象。还不知晓消除此种漂白现象的方法。

[0007] 另一方面,尽管免疫层析已经在大量的快速临床检测(护理点检测)中付诸实际应用并且特别广泛地用于传染病(如流感)的诊断,但是,如使用其他免疫测定(如LTIA)的情形,免疫层析具有对B型流感病毒的低检测灵敏度的问题,并且还不知晓消除该问题的方法。

[0008] 引用列表

[0009] 专利文献

[0010] 专利文件1:WO 2012/043746

[0011] 发明概述

[0012] 技术问题

[0013] 本发明的目的是提供一种能够抑制测试条上所谓的漂白现象的发生的用于更准确的检测的免疫层析检测方法。本发明还有一个目的是提供一种增强检测灵敏度、特别是用于B型流感病毒的检测灵敏度的免疫层析检测方法。

[0014] 问题的解决方案

[0015] 作为解决该问题的深入研究的结果,令人惊讶地,本发明人已经发现,在使用免疫层析测试条的免疫反应中,在测试条上存在甲醇抑制测试条上所谓的漂白现象的发生,并且使得能够有利地进行检测。更令人惊讶地,本发明人发现,甲醇的共存还提高针对B型流感病毒的检测灵敏度,由此完成了本发明。因此,本发明具有下述构成。

[0016] [1]一种使用免疫层析测试条的免疫层析检测方法,所述免疫层析测试条包括:(1)缀合物垫,其具有用于供应可能包含分析物的样品的样品供应部和在所述样品供应部下游侧的缀合物部,所述缀合物部包含其中针对所述分析物的抗体固定在标记上的缀合物,和(2)具有至少一个检测部的不溶性膜支持物,在所述检测部上固定有针对所述分析物的抗体,

[0017] 所述方法包括下述步骤:

[0018] (A)向所述样品供应部提供甲醇和可能包含所述分析物的样品;和

[0019] (B)在所述不溶性膜支持物上检测作为免疫反应产物的所述分析物。

[0020] [2]根据[1]所述的检测方法,其中步骤(A)是向所述样品供应部提供预先用包含甲醇的样品稀释液稀释的样品的步骤。

[0021] [3]根据[1]所述的检测方法,其中步骤(A)是用包含甲醇的样品稀释液稀释样品并且将稀释的样品提供到所述样品供应部的步骤。

[0022] [4]根据[1]-[3]中任一项所述的检测方法,其中所述分析物是B型流感病毒,并且其中固定在标记上的针对分析物的抗体和固定在检测部上的针对分析物的抗体是抗-B型流感病毒单克隆抗体。

[0023] [5]一种免疫层析检测试剂盒,其包括:

[0024] (a)允许可能包含分析物的样品展开以检测所述分析物的免疫层析测试条,所述测试条包括:(1)缀合物垫,其具有用于提供可能包含分析物的样品的样品供应部,和在所述样品供应部下游侧的缀合物部,所述缀合物部包含其中针对所述分析物的抗体固定在标记上的缀合物,和(2)具有至少一个检测部的不溶性膜支持物,在所述检测部上固定有针对所述分析物的抗体;和

[0025] (b)包含甲醇的免疫层析样品稀释液。

[0026] [6]根据[5]所述的免疫层析检测试剂盒,其中所述分析物是B型流感病毒,并且其中固定在标记上的所述针对分析物的抗体和固定在检测部上的所述针对分析物的抗体是抗-B型流感病毒单克隆抗体。

[0027] [7]根据[5]或[6]所述的免疫层析检测试剂盒,其中(b)是包含0.1-20% (v/v)甲

醇的免疫层析样品稀释液。

[0028] [8]根据[5]-[7]中任一项所述的免疫层析检测试剂盒,其中(b)是在pH6.0-10.0的缓冲液中包含0.1-20% (v/v) 甲醇的免疫层析样品稀释液。

[0029] [9]用于检测B型流感病毒的免疫层析样品稀释液,所述样品稀释液包含0.1-20% (v/v) 的甲醇。

[0030] [10]根据[9]所述的样品稀释液,其中所述样品稀释液在pH 6.0-10.0的缓冲液中包含0.1-20% (v/v) 的甲醇。

[0031] [11]下述(b)的免疫层析样品稀释液在制备B型流感病毒检测试剂盒中的应用,所述试剂盒包含下述(a)的免疫层析测试条,其允许可能包含B型流感病毒的样品展开以检测所述病毒:

[0032] (a) 免疫层析测试条,其包括:(1) 缀合物垫,其具有用于提供可能包含B型流感病毒的样品的样品供应部,和在所述样品供应部下游侧的缀合物部,所述缀合物部包含其中抗-B型流感病毒抗体固定在标记上的缀合物,和(2) 具有至少一个检测部的不溶性膜支持物,在所述检测部上固定有抗-B型流感病毒抗体;和

[0033] (b) 包含0.1-20% 甲醇的免疫层析样品稀释液。

[0034] 在本发明中,固定抗体意指所述抗体由标记或不溶性膜支持物物理或化学携带。

[0035] 在本发明中的检测可以在视觉上进行,或通过使用分析装置进行,并且不仅包括定性检测,而且包括定量检测,即,测量可定量的分析物。

[0036] 在本发明中,上游(上游侧)和下游(下游侧)是这样定义的,下游(下游侧)表示提供样品后移动相展开的方向。

[0037] 发明的有利效果

[0038] 本发明使得能够抑制免疫层析测试条的所谓的漂白现象的发生,从而实现准确的测量。在流感病毒的检测中,本发明特别使得能够灵敏检测与低检测灵敏度问题相关的B病毒。

[0039] 附图简述

[0040] [图1]图1是本发明的免疫层析测试条的一个实施方案的示意图。

[0041] [图2]图2是本发明的免疫层析测试条的另一个实施方案的示意图。

[0042] [图3]图3是本发明的免疫层析测试条的另一个实施方案的示意图。

[0043] 实施方案描述

[0044] (免疫层析检测方法)

[0045] 本发明的检测方法特征在于:

[0046] 使用包含至少下述组成元件(1)和(2)的免疫层析测试条:

[0047] (1) 缀合物垫,其具有用于提供可能包含分析物的样品的样品供应部和在所述样品供应部下游侧的缀合物部,所述缀合物部包含其中针对所述分析物的抗体固定在标记上的缀合物,和

[0048] (2) 具有至少一个检测部的不溶性膜支持物,在所述检测部上固定有针对所述分析物的抗体,并且

[0049] 包括下述步骤(A)和(B):

[0050] (A) 向所述样品供应部提供甲醇和可能包含分析物的样品的步骤,和

[0051] (B) 在所述不溶性膜支持物上检测作为免疫反应产物的所述分析物的步骤。

[0052] (向样品供应部添加甲醇)

[0053] 本发明特征在于向免疫层析测试条的样品供应部添加甲醇。甲醇可以以100%的甲醇或以用另一种溶剂稀释的甲醇溶液添加。另一种溶剂优选是水溶性溶剂,并且具体的实例包括纯水、盐水和pH 6.0-10.0的低浓度缓冲液。由于这些水溶性的溶剂就样品稀释液的成分而言常见,如果使用稀释的样品,则优选地将甲醇添加到样品稀释液中,并且与样品一起添加到样品供应部。

[0054] 如果免疫层析测试条设计为试纸类型的而不是侧向流动类型的,则测试条可以浸没在包含甲醇的溶液中而替代添加甲醇。

[0055] 如果用水溶性溶剂稀释甲醇并添加到样品供应部,则水溶性溶剂中的甲醇浓度优选为0.1-20.0% (v/v),更优选为0.5-18.0% (v/v),0.7-16.0% (v/v),1.0-15.0% (v/v),1.5-13.0% (v/v),1.8-12.0% (v/v),2.0-11.0% (v/v),进一步更优选为2.0-10% (v/v)。在一些情形中,浓度还优选为3.0-10.0% (v/v),4.0-10.0% (v/v),或5.0-10.0% (v/v)。

[0056] 由于甲醇是挥发性的,甲醇可以在使用时添加到溶剂中,或者可以使用提前调节到所述浓度并且保存在高度气密性的容器中的包含甲醇的溶剂。

[0057] (样品稀释液)

[0058] 由于样品稀释液用于根据样品中分析物的浓度来稀释样品,因此可以使用任意组成的稀释液,除非所述稀释液显著抑制抗原-抗体反应,或相反地显著加快反应,导致标记的过量聚集,并由此引起差的毛细管展开结果或者使得不可能检测与抗原浓度相对应的抗原-抗体反应的信号。

[0059] 例如,样品稀释液理想地是纯水、盐水或pH 6.0-10.0的低浓度缓冲液。缓冲液更理想地具有6.5-9.5、7.0-9.0和7.5-8.5的pH。

[0060] 缓冲液的实例包括,例如,10-20mmol/L的磷酸缓冲液、10-20mmol/L Tris-HCl缓冲液和10-20mmol/L Bis-Tris缓冲液。为了控制样品在所述条上的展开速率的目的,可以向这些稀释液中添加表面活性剂。

[0061] (添加样品)

[0062] 在本发明中,样品不稀释直接提供给样品供应部或者按需要在用样品稀释液稀释并过滤后提供给样品供应部。

[0063] 可能包含分析物的样品的实例包括主要来源于活体(生物体)的物质,诸如生物流体,和通过从中提取分析物获得的提取液。来源于活体(生物体)的物质的具体实例包括血液,尿液,粪便,鼻分泌物和来源于鼻孔、鼻腔、咽和鼻咽的鼻分泌吸出物,作为痰或拭子样本收集的分泌物,和唾液。具体地,如果分析物是流感病毒,则样品优选是鼻分泌物和来源于鼻孔、鼻腔、咽和鼻咽的鼻分泌吸出物,作为痰或拭子样本收集的分泌物等。

[0064] (分析物)

[0065] 在本发明中,分析物的实例包括病毒和生理学活性物质,如蛋白,其通常可以通过使用抗原-抗体反应测量。

[0066] 例如,病毒包括流感病毒,如A型流感病毒和B型流感病毒,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus),丙型肝炎病毒(hepatitis C virus),和人免疫缺陷病毒,并且蛋白包括,例如,人血红蛋白,乙型肝炎病毒抗体,丙型肝炎病毒抗体,和人免疫缺陷病毒抗体。

具体地,优选使用流感病毒作为分析物,并且更优选地形成下文所述的多个检测部,从而使用A型流感病毒和B型流感病毒作为分析物。尽管尚不清楚原因,但是,特别地,与常规技术相比,本发明使得能够以更高的灵敏度检测B型流感病毒。

[0067] (检测)

[0068] 在不溶性膜支持物上检测作为免疫反应产物的分析物的方法可以是能够检测来源于标记的信号中的任意方法,并且可以是已知的方法。例如,如果标记是胶体金,则可以检测吸光度或反射光强度,并且,如果标记是着色的胶乳,则可以检测着色强度。

[0069] 按照本发明,由于甚至在使用白色不溶性膜的光学检测的情形中抑制所谓的漂白现象的发生,因此获得无干扰的波形,使得能够准确地进行检测和测量。

[0070] (针对分析物的抗体)

[0071] 在本发明中,针对分析物的抗体是能够免疫学特异性结合所述分析物的抗体。针对分析物的抗体固定在标记和下文所述的检测部上。尽管固定在标记和检测部上的抗体可以是相同的,但是,优选地,对于所述标记和检测部使用不同的抗体。通过区分固定在标记上的抗体或抗原与固定在检测部上的抗体,得到的免疫层析测试条能够抑制结合在缀合物上的分析物与检测部的抗体或抗原的反应与结合在缀合物上的分析物与不反应的缀合物的反应之间的竞争,并且能够增加结合在缀合物上的分析物与检测部的抗体之间的反应性,导致所述免疫层析测试条有利的灵敏度。不同的抗体意指类型彼此不同,并且特别指识别不同表位的抗体。

[0072] 优选地,固定在标记和检测部上的抗体是单克隆抗体。通过使用单克隆抗体,能够增加反应的特异性。

[0073] 如果分析物是流感病毒,则固定在标记和检测部上的抗体可以是能够检测所述流感病毒的任意抗体,并且优选地,所述抗体是抗-流感病毒单克隆抗体,如抗-A型流感病毒单克隆抗体和抗-B型流感病毒单克隆抗体。

[0074] 除了这些抗体的完整分子之外,具有抗原-抗体反应活性的抗体功能片段也被认为是本发明的抗体。抗体的功能片段包括通过免疫动物获得的那些和通过使用基因重组技术获得的那些,以及嵌合抗体。抗体的功能片段包括,例如, $F(ab')_2$ 和Fab'。这些功能片段可以通过用蛋白水解酶(例如,胃蛋白酶和木瓜蛋白酶)处理抗体产生。例如,通过使用是功能片段化抗体的 $F(ab')_2$ 作为标记,可以减小具有与标记结合的抗体的缀合物的尺寸,这导致在缀合物垫和不溶性膜支持物中极佳的展开特性。对于一些分析物,通过使用功能片段化的抗体,能够增加反应的特异性。

[0075] (标记)

[0076] 用于标记这些抗体的标记优选是胶体金颗粒、铂胶体颗粒、着色的胶乳颗粒和磁性颗粒,并且特别优选是着色的胶乳颗粒。

[0077] 着色的胶乳颗粒可以通过这样进行制备:例如,按照日本公开专利公布号H06-306108第[0022]段所述的方法,然后按照该文件第[0025]-[0035]段所述的方法,不用乳化剂,通过无皂聚合作用,制备聚苯乙烯系颗粒,并且,也可以使用可从Seradyn公司和Magsphere公司商购的着色的颗粒。在下述描述中,将详细描述使用着色的胶乳颗粒作为标记的情形。

[0078] (缀合物)

[0079] 用于本发明的缀合物是具有在其上固定有与分析物免疫反应的抗体的上文所述的标记。如果分析物是流感病毒,优选地,所述缀合物是具有在其上固定有抗-流感病毒单克隆抗体的着色的胶乳颗粒。

[0080] 抗体典型地通过化学键固定在着色的胶乳颗粒上,并且,在这样的情形中,抗体浓度优选调节至1mg/mL至5mg/mL,并且缓冲液和pH优选是20mmol/L MES缓冲液(pH 5.5-6.5)或50mmol/L硼酸缓冲液(pH 8-9),更优选是20mmol/L MES缓冲液(pH 6.5)。不与着色胶乳颗粒上的抗体结合的区域优选与BSA等结合,以用于封闭。以这种方式产生的着色的胶乳颗粒-标记的抗体分散并保存在存储试剂中,用于抑制变性。对于这种变性抑制剂,使用蛋白(如BSA)、甘油、糖等。

[0081] (样品垫)

[0082] 在本发明中,“样品垫”是起接收样品的样品供应部的作用的部分,并且放置在下文所述的缀合物垫的上游,所述缀合物垫与前述样品垫接触。样品垫可以是吸附液体样品并且允许液体和分析物成分通过的任意材料和形式的。

[0083] 适用于样品垫的材料的具体实例包括,但不限于,玻璃纤维、丙烯酸纤维、亲水性聚乙烯材料、干纸、纸浆、织物等。优选使用玻璃纤维垫。

[0084] 尽管样品垫放置在缀合物垫的上游并且可以与缀合物垫接触,但是样品垫可以被另外赋予缀合物垫的功能。换言之,样品垫也是缀合物垫,并且不必是分开的。在该情形中,同一个垫具有上游侧的样品垫功能和下游侧的缀合物垫的功能,并且这种构造将在与缀合物垫相关的段落中进行描述。

[0085] 如果样品是血液,根据需要,样品垫可以包含常用的封闭试剂、缓冲液成分、凝血剂等,条件是实现本发明的目的并且不影响反应体系。在这一情形中,封闭试剂、缓冲液成分、凝血剂等可以包含在样品垫的至少一部分中,或者可以包含在整个样品垫中。

[0086] (缀合物垫)

[0087] 用于本发明的缀合物垫由垫型多孔材料制成(所述多孔材料能够允许样品在经过样品垫后展开并且能够保留缀合物),并且将缀合物保留在其一部分上或整体上。

[0088] 缀合物垫包含缀合物,并且,例如,如果包含在一部分中,则所述缀合物优选地以与样品展开方向垂直的线形保留。

[0089] 线形的缀合物部的线宽度可以是这样的宽度,以使能够包含检测分析物所需要的缀合物量,并且理想地是3-5mm。

[0090] 缀合物垫堆叠在不溶性膜支持物上,使得其下游末端部分的下表面与下文所述的不溶性膜支持物的上表面接触。缀合物垫堆叠在不溶性膜支持物上,使得其样品供应部的下表面不与不溶性膜支持物的上表面接触,而其缀合物部的下表面与不溶性膜支持物的上表面接触。如果缀合物垫的下表面与不溶性膜支持物的上表面接触,则实现堆叠,并且不需要固定所述表面。缀合物垫的下表面与不溶性膜支持物的上表面之间的接触部分可以是缀合物垫下表面的部分,并且理想地是该下表面的一半以上。缀合物垫的整个下表面与不溶性膜支持物的上表面接触也是理想的。在缀合物垫中,样品中的分析物(流感病毒)与缀合物(其上固定有具有抗-流感病毒单克隆抗体的着色的胶乳颗粒)形成复合物(聚集物)。然后,允许样品展开到与缀合物部的下表面接触放置的不溶性膜支持物中。

[0091] 如果如上文所述,同一个垫具有样品垫功能和上述缀合物垫功能,则缀合物部在

该垫的下游部分形成,而样品供应部在上游部分形成,并且该样品供应部是起样品垫作用的部分。当将可能包含分析物的样品提供到缀合物垫的样品供应部时,样品从上游侧的样品供应部经过没有缀合物的多孔材料部分流到下游侧的缀合物部。

[0092] 关于组成缀合物垫的多孔材料,该垫可以由纸、纤维素混合物的无纺纤维、硝基纤维素、聚酯、丙烯腈共聚物、玻璃、人造丝等制成。特别地,优选由玻璃纤维制成的垫(玻璃纤维垫)。

[0093] (不溶性膜支持物)

[0094] 用于本发明的不溶性膜支持物具有至少一个检测部,在所述检测部上固定有与分析物免疫反应的抗体。与分析物免疫反应的抗体可以通过常规已知的方法固定在不溶性膜支持物上。在侧向流动免疫层析测试条的情形中,固定按下述进行。制备包含预先确定浓度的抗体的溶液之后,通过使用具有能够在水平方向上移动管口同时以恒定速率从管口排出溶液的机制的装置,将所述溶液以线形应用到不溶性膜支持物上,并且干燥,以进行固定。

[0095] 溶液中抗体的浓度优选是0.1-5mg/mL,更优选是0.5-2mg/mL。在侧向流动类型的情形中,可以通过调节装置管口的排出速率而优化固定在不溶性膜支持物上的抗体的量,并且优选的速率是0.5-2 μ L/cm。

[0096] 使用侧向流动免疫层析测试条的测量方法是这样的测量方法,其中由缀合物垫的一部分提供的样品展开,使得样品由于毛细管现象以与不溶性膜支持物平行的方向移动,所述缀合物垫的部分与不溶性支持物接触。

[0097] 包含预先确定浓度的抗体的溶液可以通过将抗体添加到缓冲液中制备。缓冲液的类型可以是常用的缓冲液,诸如磷酸缓冲液、Tis缓冲液和Good's缓冲液。缓冲液优选具有6.0-9.5、更优选6.5-8.5范围内的pH。缓冲液可以进一步包含盐(诸如氯化钠),稳定剂(诸如蔗糖),和防腐剂,以及杀菌剂,诸如ProcIn。盐包括用于调节离子强度所包含的那些,诸如氯化钠,以及为调节缓冲液的pH的目的添加的那些,诸如氢氧化钠。

[0098] 将抗体固定在不溶性膜支持物上后,除了其上固定有抗体的部分之外,不溶性膜支持物可以用溶液或蒸气形式的常用的封闭试剂包被并封闭。

[0099] 可以将常规用于免疫层析测试条的对照捕获剂固定在不溶性膜支持物上。对照捕获剂是确保测定的可靠性的试剂,并且捕获包含在缀合物垫中的对照试剂。例如,如果在缀合物垫中包含标记的KLH作为对照试剂,则抗-KLH抗体等对应于该对照捕获剂。可以按照测定系统的设计而适当地选择固定对照捕获剂的位置。

[0100] 组成用于本发明的不溶性膜支持物的膜可以是常用作免疫层析测试条的不溶性膜支持物的已知的膜。例如,所述膜可以由聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、尼龙、玻璃、多糖(如纤维素和纤维素衍生物)、陶瓷等的纤维制成。具体地,所述膜可以是玻璃纤维滤纸、纤维素滤纸等,可从Sartorius、Millipore、Toyo Roshi、Whatman等商购获得。特别地,优选来自Sartorius的UniSart CN140。通过根据需要进行选择不溶性膜支持物的孔径和结构,可以控制缀合物与样品中的分析物之间的复合物在不溶性膜支持物中的流速。

[0101] (吸附垫)

[0102] 在本发明的免疫层析测试条中,优选地,吸附垫放置在不溶性膜支持物的下游末端部分。吸附垫是具有液体吸收性的部分,其通过吸收在不溶性膜支持物中移动并经过所述不溶性膜支持物的样品而控制所述样品的展开。吸附垫可以是常规用于免疫层析测试条

的已知的吸附垫,并且,例如,可以使用滤纸。优选地,使用Whatman 740-E。

[0103] (免疫层析测试条)

[0104] 本发明的免疫层析测试条包括至少缀合物垫和不溶性膜支持物。所述缀合物垫和不溶性膜支持物堆叠,以使所述缀合物垫的下表面与所述不溶性膜支持物的上表面接触。放置所述缀合物垫,以使所述缀合物垫的缀合物部分的下表面部分地或完全地与所述不溶性膜支持物的上表面接触。如上文所述,优选地,吸附垫放置在所述不溶性膜支持物的下游末端部分。

[0105] 所述免疫层析测试条优选地放置在固相背板上,诸如塑料粘合片上。固相背板由不妨碍样品和缀合物的毛细管流动的材料制成。免疫层析测试条可以用粘合剂固定在固相背板上。在这一情形中,粘合剂成分等也由不妨碍样品和缀合物的毛细管流动的材料制成。为了增加不溶性膜支持物的机械强度并且防止测定过程中的水分蒸发(变干),可以使用聚酯膜等用于层压。考虑到免疫层析测试条的尺寸、添加样品的方法和位置、不溶性膜支持物的检测部形成的位置、信号检测方法等,免疫层析测试条可以在适当的容器(外壳)中保存或安装在适当的容器(外壳)上之后使用,并且所述保存/安装的状态称为“装置”。

[0106] 本发明的免疫层析测试条包括缀合物垫和不溶性膜支持物,并且,取决于测量条件和样品,可以包括另一种试剂或组成元件。例如,另一种试剂可以是防止非特异性反应的封闭剂,并且另一种组成元件可以是用于去除样品中对于测量不需要的成分的第3个垫。

[0107] 图1显示本发明的免疫层析测试条的典型结构的示意图。

[0108] 在将固定有抗体的膜(b)粘附在塑料粘合片(a)上后,放置并安装缀合物垫(d),还放置并安装样品垫(e),以与所述缀合物垫重叠,并且在另一末端放置并安装吸附垫(f)。固定有抗体的膜(b)具有抗-A型流感病毒单克隆抗体(c1)、抗-B型流感病毒单克隆抗体(c2)和对照抗体(c3),它们以线形固定,使得当样品经过时分别出现A-线、B-线和对照线。

[0109] 具有所述结构的免疫层析测试条的实例是Rapid Testa(注册商标)FLUII(由Sekisui Medical有限公司制造)。

[0110] 图2显示这样的结构:其中在具有图1的结构的测试条中,缀合物垫(d)起样品垫(e)的作用。图3显示这样的结构:其中缀合物部(g)在样品垫的小部分上形成。

[0111] 具有所述结构的免疫层析测试条的实例是Rapid Testa(注册商标)color FLU stick(由Sekisui Medical有限公司制造)。

[0112] (试剂盒)

[0113] 本发明的免疫层析检测试剂盒包括至少免疫层析测试条和包含甲醇的免疫层析样品稀释液。

[0114] 尽管已经关于用于是抗原的分析物的夹心型检测描述了本发明,本发明还适用于分析物是抗体和竞争型检测的情形,并且也可以使用凝集素、受体、核酸链替代抗原,只要能够产生对分析物的特异性结合即可。

实施例

[0115] 尽管将利用实施例对本发明进行进行具体描述,但是本发明的范围不限于这些实施例。

[0116] 实施例1(漂白评价测试)

[0117] 通过使用在药品说明书中所述的温度未开封保存两年的免疫层析测试条(由 Sekisui Medical 有限公司制造, Rapid Testa (注册商标) Color FLU Stick, Lot.K1221221077P) 评价漂白。分别向测试条附带的样本-稀释液(Tris 缓冲液(pH 8.5)) 中加入甘油或甲醇,以制备基于总体积包含1%、5%和10%甘油的样本稀释液或包含1%、5%和10%甲醇的样本稀释液。将一组(n=3)免疫层析测试条浸没在每种样本稀释液中,以允许所述样本稀释液在层析仪上展开10分钟。然后,视觉检查每个测试条上漂白的发生。结果显示在表1中。

[0118] 类似地,将测试条浸没在包含1%、5%和10%乙醇的样本稀释液中进行相同测试。结果显示在表2中。

[0119] 表格中的“A线”和“B线”表示其上分别固定抗-A型流感病毒单克隆抗体和抗-B型流感病毒单克隆抗体的部分,并且是当检测每种病毒时形成着色线的部分。“Cont.”表示其上固定对照捕获剂,即抗-KLH抗体的部分,并且当检测缀合物中的KLH时,该部分形成着色的线。基于包括下述的标准评价表格中的评价结果:“-”表示“没有漂白”,“+”表示“非常细和轻微的漂白”,“++”表示“对确定没有影响的水平的细漂白线”,“+++”表示“对确定没有影响的水平的稍粗的漂白线”,并且“++++”表示“对确定有影响的水平的粗漂白线”。这些标记对下述测试是通用的。

[0120] [表1]

[0121]

No.	没有添加剂的样本稀释液			甘油 1%			甘油 5%			甘油 10%			甲醇 1%			甲醇 5%			甲醇 10%		
	A线	B线	Cont.	A线	B线	Cont.	A线	B线	Cont.	A线	B线	Cont.	A线	B线	Cont.	A线	B线	Cont.	A线	B线	Cont.
1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++			
3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-

[0122] [表2]

No.	乙醇 1%			乙醇 5%			乙醇 10%		
	A线	B线	Cont.	A线	B线	Cont.	A线	B线	Cont.
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

[0123] (结果)

[0124] 当将其中没有添加甘油、甲醇和乙醇的样本稀释液的表现视为对照时,使用添加甘油的样本稀释液时以相同的水平发生漂白,而当使用包含5%或10%的甲醇的样本稀释液时,漂白的发生得到显著的抑制。

[0125] 另一方面,当使用包含乙醇的样本稀释液时,没有抑制漂白的发生,并且漂白的程度反而升高。

[0127] 在所有情形中,基于颜色样品得到的“Cont.”的着色强度为2.5-3.75,并且在正常可用的范围内。

[0128] 实施例2(加速测试)

[0129] 将制备后立即得到的免疫层析测试条和在60°C保存10天和20天的免疫层析测试条浸没在包含5%和10%甲醇的样本稀释液中,以允许溶液如实施例1的情形展开10分钟,并且视觉检查漂白的发生。结果显示在表3中。

[0130] [表3]

No	没有添加剂的样本稀释液						添加 5%甲醇						添加 10%甲醇					
	时间 0		60°C 10d		60°C 20d		时间 0		60°C 10d		60°C 20d		时间 0		60°C 10d		60°C 20d	
	A线	B线	A线	B线	A线	B线	A线	B线	A线	B线	A线	B线	A线	B线	A线	B线	A线	B线
1	+++	+++	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
2	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+++	+++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

[0132] d:天数

[0133] (结果)

[0134] 当使用包含5%和10%甲醇的样本稀释液时,在制备后立即使用和和在60°C保存10天和20天后使用的所有免疫层析测试条中观察到漂白发生的抑制和漂白程度的减少。特别是当使用包含10%的甲醇的样本稀释液时,观察到漂白发生的显著抑制。

[0135] 实施例3(A线和B线中着色强度的比较)

[0136] 使用免疫层析测试条比较“A线”以及“B线”中的着色强度。通过将330μL包含5%和10%甲醇的样本稀释液与50μL样本混合而制备样品,所述样本通过以表4和5所述的稀释倍数稀释A型流感和B型流感病毒毒株的灭活病毒抗原而获得(下文在表格中描述流感病毒的各自的类型)。将一组(n=2)测试条浸没在135μL加入了各自的灭活的病毒抗原的样品中,以允许样本稀释液在所述测试条上展开10分钟。然后,基于颜色样品,获得在每种病毒的检测部的着色强度。A型流感病毒和B型流感病毒的结果分别显示在表4和表5中。

[0137] [表4]

[0138]

	No	Conv.	Meth. 5%	Meth. 10%
		A线	A线	A线
A/H1 pdm lot.111026 1/20	1	1.75	2	1.75
	2	2	2	2
A/Brisbane/59/2007 lot.090608 1/100	1	1.5	1.5	1.5
	2	1.5	1.25	1.5
A/Solomon Islands/3/2006 lot.070615 1/20	1	2.25	2.5	2.25
	2	2.25	2.25	2.25

	No	Conv.	Meth. 5%	Meth. 10%
		A线	A线	A线
A/Kykyushu/159/93 lot.110614 1/400	1	1.5	1.5	1.5
	2	1.5	1.5	1.5
A/Uruguay/716/2007 lot.090608 1/100	1	1.25	1.5	1.25
	2	1.5	1.25	1.25
A/Wisconsin/67/2005 lot.070615 1/200	1	1	1.25	1.25
	2	1.25	1.25	1.25

[0139] Conv.:常规的

[0140] Meth.:甲醇

[0141] [表5]

	n	Conv.	Meth. 5%	Meth. 10%
		B线	B线	B线
[0142] B/Lee/40 lot.110610 1/100	1	1.5	1.75	2
	2	1.75	2	2
B/Florida/4/2006 lot.100521 1/50	1	1.5	1.75	2
	2	1.5	1.75	1.75
B/Shanghai/361/2002 lot.050813-1 1/50	1	2.25	2.75	2.75
	2	2.25	2.75	2.75

[0143] Conv.: 常规的

[0144] Meth.: 甲醇

[0145] (结果)

[0146] 当使用灭活的A型流感病毒抗原时, 没有在任一毒株中观察到着色强度变化, 这与向样本稀释液中加入5%和10%甲醇无关。另一方面, 当使用灭活的B型流感病毒抗原时, 观察到由于加入甲醇导致的着色强度增加。

[0147] 工业适用性

[0148] 本发明的免疫层析检测方法可以提供一种准确的检测方法, 而没有测试条所谓的漂白。特别当用于检测B型流感病毒时, 与常规方法相比, 本发明可以提供灵敏度优异的检测方法。

[0149] 附图标记列表

[0150] (a) 塑料粘合片

[0151] (b) 固定有抗体的膜

[0152] (c1) 抗-A型流感病毒单克隆抗体

[0153] (c2) 抗-B型流感病毒单克隆抗体

[0154] (c3) 对照抗体

[0155] (d) 缀合物垫

[0156] (e) 样品垫

[0157] (f) 吸附垫

[0158] (g) 缀合物部

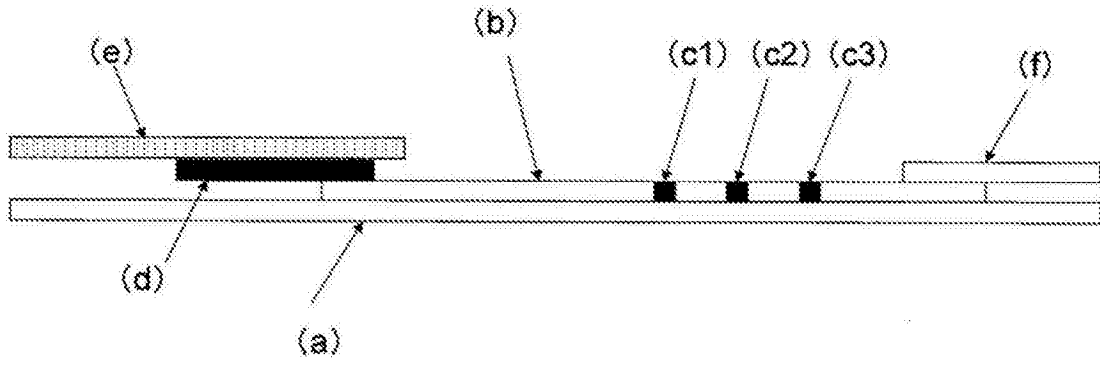


图1

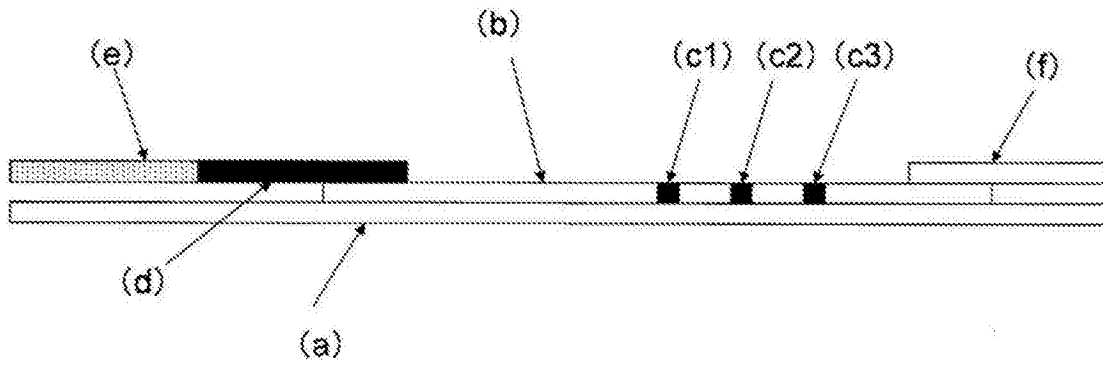


图2

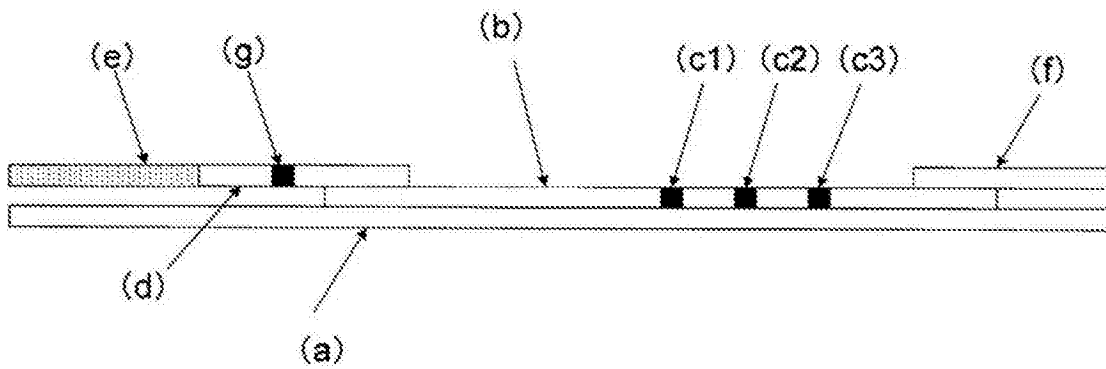


图3

