



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107430120 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201680015629.0

(22)申请日 2016.08.03

(30)优先权数据

2015-160311 2015.08.17 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/072774 2016.08.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/029992 JA 2017.02.23

(71)申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

(72)发明人 落合泰史 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 吴小明

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

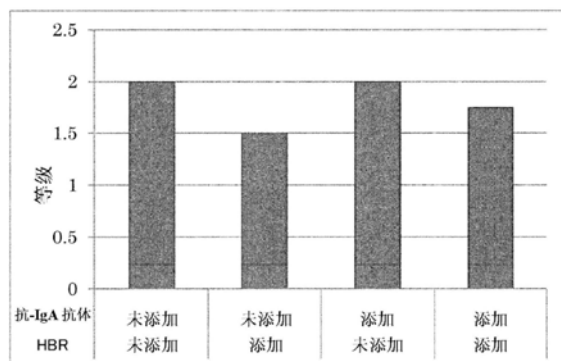
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

免疫检测方法和用于其的测试条

(57)摘要

问题是提供在使用免疫层析的检测方法中抑制粪便特有的非特异性反应的方法以及用于该方法的免疫层析测试条,所述免疫层析在不溶性膜中展开粪便样品从而检测样品中的分析物。本发明提供在抗-IgA抗体的存在下进行免疫层析反应从而检测粪便样品中的分析物而不受非特异性反应影响的方法,以及用于该方法的免疫层析测试条。



1. 一种免疫检测粪便样品中的分析物的方法,其中免疫反应在抗-IgA抗体的存在下进行。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述免疫反应在所述抗-IgA抗体和抗-IgM抗体的存在下进行。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法为使用免疫层析的检测方法,所述免疫层析在不溶性膜中展开所述粪便样品,从而检测所述样品中的所述分析物与缀合物之间的复合物,且其中免疫检测方法包括以下步骤:

(a) 在所述抗-IgA抗体的存在下将所述样品与所述缀合物接触,从而形成所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的复合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上;以及

(b) 在所述不溶性膜中展开所述复合物从而在检测部中检测所述复合物,在所述检测部中固定有与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中上述步骤(a)是这样的步骤:在所述抗-IgA抗体和抗-IgM抗体两者的存在下将所述样品与所述缀合物接触,从而形成所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的所述复合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上。

5. 一种在免疫检测粪便样品中的分析物的方法中抑制非特异性反应的方法,其中免疫反应在抗-IgA抗体的存在下进行。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述免疫反应在所述抗-IgA抗体和抗-IgM抗体的存在下进行。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述方法为在使用免疫层析的检测中抑制非特异性反应的方法,所述免疫层析在不溶性膜中展开粪便样品,从而检测所述样品中的所述分析物与缀合物之间的复合物,且其中免疫检测方法包括以下步骤:

(a) 在所述抗-IgA抗体的存在下将所述样品与所述缀合物接触,从而形成所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的所述复合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上;以及

(b) 在所述不溶性膜中展开所述复合物从而在检测部中检测所述复合物,在所述检测部中固定有与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中上述步骤(a)是这样的步骤:在所述抗-IgA抗体和抗-IgM抗体两者的存在下将所述样品与所述缀合物接触,从而形成所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的所述复合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上。

9. 一种免疫层析测试条,其用于在不溶性膜中展开粪便样品并检测所述样品中的分析物与缀合物之间的复合物,所述测试条具有所述缀合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上,所述测试条包括:

(1) 样品垫,其具有样品供应部和以可洗脱方式保留的抗-IgA抗体;以及

(2) 具有检测部的不溶性膜,在所述检测部上固定有与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原以检测所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的所述复合物。

10. 根据权利要求9所述的测试条,其包括缀合物垫,所述缀合物垫具有以可洗脱方式

保留的所述缀合物。

11. 根据权利要求9或10所述的测试条,其中所述样品垫进一步具有以可洗脱方式保留的抗-IgM抗体。

12. 一种用于粪便样品在免疫反应中的非特异性反应的抑制剂,其包括作为活性成分的抗-IgA抗体。

13. 根据权利要求12所述的非特异性反应的抑制剂,其进一步包括抗-IgM抗体。

免疫检测方法和用于其的测试条

技术领域

[0001] 本发明涉及在由粪便样品(源自粪便的样品)引起的免疫反应中非特异性反应的抑制剂,以及使用该抑制剂的非特异性反应抑制方法和免疫检测方法。

[0002] 特别地,本发明涉及在使用免疫层析的免疫反应中非特异性反应的抑制剂,以及使用该抑制剂的非特异性反应抑制方法、检测方法和免疫层析测试条。

背景技术

[0003] 免疫检测方法得到广泛使用,因为能够以高特异性和灵敏度实现检测。特别地,使用免疫层析的检测方法由于便捷性得到广泛使用。进行检测的样品的实例包括尿、粪便、唾液、血、血浆等,其适于用作临床测试样品并广泛用作可用于诊断的样品。

[0004] 为了通过使用免疫层析检测包含在这些样品中的分析物,必须消除包含在样品中的多种检测干扰物质。干扰物质包括直接干扰经免疫层析的样品展开的物质,即引起用于展开的不溶性膜阻塞的物质,以及尽管在缺少反应物时仍显示颜色反应的物质,即引起所谓的非特异性反应的物质。

[0005] 总的来说,为了消除在不溶性膜中引起阻塞的物质,本领域已知分离该物质的功能分配给样品垫,并且如果全血用作样品,则血分离膜置于样品添加部的下游从而移除血细胞。然而,虽然各种原因是可能的,但这些非特异性反应的原因并不明确,因此目前没有确定对策。

[0006] 通常已知明胶、酪蛋白、牛血清白蛋白、合成聚合物等是用于在抗原-抗体反应中阻断该非特异性反应的试剂,且已知允许这些物质共存于使用免疫层析的反应系统的方法(专利文件1和2)。

[0007] 虽然如上所描述的已知用于消除非特异性反应的影响的多种方法,但是方法对由粪便样品引起的非特异性反应的抑制是否起作用是未知的。

[0008] 专利文件3描述了在使用粪便作为样本的情况下的问题,使用粪便作为样本的方法(诸如ELISA)具有低检测灵敏度,且常常引起非特异性反应,这使得难以判定结果。专利文件3公开了在通过使用免疫层析检测诺如(norovirus)病毒或札幌病毒时通过使用pH 9.0至10.0的样本稀释液抑制非特异性反应的方法,从而解决该问题。但是该方法在处理方面有问题,因为使稀释液成为碱性是必须的,这对于样本稀释液并不常见。

[0009] 引用列表

[0010] 专利文献

[0011] 专利文件1:日本公开专利公开号2003-344406。

[0012] 专利文件2:日本公开专利公开号2002-148266。

[0013] 专利文件3:日本公开专利公开号2004-301684。

[0014] 发明概述

[0015] 技术问题

[0016] 本发明所要解决的问题是提供非特异性反应的抑制剂,其抑制在免疫检测粪便样

品中的分析物的方法中粪便特有的非特异性反应,以及提供使用该抑制剂的非特异性反应抑制方法和免疫检测方法。

[0017] 特别地,问题是在使用在不溶性膜中展开粪便样品从而检测样品中的分析物的免疫层析的方法中提供非特异性反应抑制剂、非特异性反应-抑制方法、免疫检测方法和免疫层析测试条。

[0018] 问题的解决方案

[0019] 虽然免疫检测粪便样品中的分析物时至今通常使用的封闭剂对特定比例的样品起作用,但是本发明人已发现在样品(即粪便样品)中存在独特的非特异性反应的引发物质,其中非特异性反应未被任何封闭剂所抑制。

[0020] 作为探求对抑制该独特引发物质的非特异性反应起作用的物质的结果,本发明人令人惊讶地发现,通过在存在抗-IgA抗体的条件下进行免疫测定反应,非特异性反应能被抑制以防止假阳性反应从而准确地检测分析物,由此完成了本发明。

[0021] 因此,本发明具有以下构成。

[0022] <1>一种免疫检测粪便样品中的分析物的方法,其中免疫反应在抗-IgA抗体的存在下进行。

[0023] <2>根据上述项目<1>所述的方法,其中所述免疫反应在所述抗-IgA抗体和抗-IgM抗体的存在下进行。

[0024] <3>根据上述项目<1>所述的方法,其中所述方法为使用免疫层析的检测方法,所述免疫层析在不溶性膜中展开所述粪便样品,从而检测所述样品中的所述分析物与缀合物之间的复合物,且其中免疫检测方法包括以下步骤:

[0025] (a) 在所述抗-IgA抗体的存在下将所述样品与所述缀合物接触,从而形成所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的复合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上;以及

[0026] (b) 在所述不溶性膜中展开所述复合物从而在检测部中检测所述复合物,在所述检测部中固定有与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原。

[0027] <4>根据上述项目<3>所述的方法,其中上述步骤(a)是这样的步骤:在所述抗-IgA抗体和抗-IgM抗体两者的存在下将所述样品与所述缀合物接触,从而形成所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的所述复合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上。

[0028] <5>一种在免疫检测粪便样品中的分析物的方法中抑制非特异性反应的方法,其中免疫反应在抗-IgA抗体的存在下进行。

[0029] <6>根据上述项目<5>所述的方法,其中所述免疫反应在所述抗-IgA抗体和抗-IgM抗体的存在下进行。

[0030] <7>根据上述项目<5>所述的方法,其中所述方法为在使用免疫层析的检测中抑制非特异性反应的方法,所述免疫层析在不溶性膜中展开粪便样品,从而检测所述样品中的所述分析物与缀合物之间的复合物,且其中免疫检测方法包括以下步骤:

[0031] (a) 在所述抗-IgA抗体的存在下将所述样品与所述缀合物接触,从而形成所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的所述复合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上;以及

[0032] (b) 在所述不溶性膜中展开所述复合物从而在检测部中检测所述复合物,在所述检测部中固定有与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原。

[0033] <8>根据上述项目<7>所述的方法,其中上述步骤(a)是这样的步骤:在所述抗-IgA抗体和抗-IgM抗体两者的存在下将所述样品与所述缀合物接触,从而形成所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的所述复合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上。

[0034] <9>一种免疫层析测试条,其用于在不溶性膜中展开粪便样品并检测所述样品中的分析物与缀合物之间的复合物,所述测试条具有所述缀合物,在所述缀合物中与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上,所述测试条包括:

[0035] (1) 样品垫,其具有样品供应部和以可洗脱方式保留的抗-IgA抗体;以及

[0036] (2) 具有检测部的不溶性膜,在所述检测部上固定有与所述分析物具有免疫反应性的抗体或抗原以检测所述样品中的所述分析物与所述缀合物之间的所述复合物。

[0037] <10>根据上述项目<9>所述的测试条,其包括缀合物垫,所述缀合物垫具有以可洗脱方式保留的所述缀合物。

[0038] <11>根据上述项目<9>或<10>所述的测试条,其中所述样品垫进一步具有以可洗脱方式保留的抗-IgM抗体。

[0039] <12>一种用于粪便样品在免疫反应中的非特异性反应的抑制剂,其包括作为活性成分的抗-IgA抗体。

[0040] <13>根据上述项目<12>所述的非特异性反应的抑制剂,其进一步包括抗-IgM抗体。

[0041] 发明的有利效果

[0042] 通过在抗-IgA抗体的存在下进行免疫反应,由粪便样品引起的非特异性反应能被抑制且样品中的分析物能被准确地检测。特别地,通过使用免疫层析作为免疫反应,能够容易且准确地检测粪便样品中的分析物。

[0043] 附图简述

[0044] [图1]图1是本发明的测试条的示意结构图。

[0045] [图2]图2是在添加本发明的非特异性反应抑制剂时对病毒检测灵敏度的影响的检查结果的图表。

[0046] 实施方案描述

[0047] (抗Ig-A抗体)

[0048] 用于本发明的抗Ig-A抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体,只要抗体能结合粪便样品中非特异性反应的引发物质从而抑制非特异性反应。抗-IgA抗体能根据常规程序制备。除了抗体的整个分子之外,具有抗原-抗体反应活性的抗体的功能片段也被看作本发明中的抗体。抗体的功能片段的实例包括F(ab')₂、Fab'等。这些功能片段能通过经蛋白水解酶(例如,胃蛋白酶或木瓜酶)处理抗体而制备。抗体可在使用前修饰,且可利用通过将聚合化合物结合至抗体所获得的或通过化学修饰所衍生的那些。

[0049] 本发明的抗-IgA抗体可以能够抑制样品中非特异性反应的任何状态存在,并且能添加至以及用于免疫反应系统中。例如,抗体可包含于样品稀释液中,或者在使用免疫层析时,抗体可包含于样品垫、第三垫、缀合物垫和包含检测抗体的不溶性膜中。

[0050] 在包含于不溶性膜中时,抗-IgA抗体理想地位于检测抗体存在的部分(检测部)的下游。在这些之中,抗体特别理想地包含于样品稀释液、样品垫或第三垫中。在样品垫和不溶性膜由同一垫组成以便允许同一垫的不同部分承担样品供应部和检测部的作用时,抗-IgA抗体理想地存在于样品供应部。

[0051] 抗-IgA抗体可以能够抑制非特异性反应的任意量包含于各个装置中,例如,每个装置的含量可为10至10000 μg /测试,优选为10至1000 μg /测试,更加优选为25至500 μg /测试,进一步优选为40至200 μg /测试,且此外优选为40至100 μg /测试。

[0052] 为了以更加完全的方式抑制粪便样品中引起的非特异性反应,除了本发明的抗-IgA抗体之外,与另一非特异性反应抑制剂的组合在不干扰抗-IgA抗体对非特异性反应的作用的范围内也是可用的。该物质的实例包括所谓的市售“封闭剂”和不同于抗-IgA抗体的抗体,例如,抗-IgG抗体、抗-IgM抗体、抗-IgD抗体和抗-IgE抗体。封闭剂作为不影响反应系统的试剂可适当地从以下中选择:NEO PROTEIN SAVER (Toyobo Enzymes)、ImmunoblockTM (DS Pharma Biomedical)、Applie Block (Seikagaku Biobusiness)、SEA BLOCKTM/EIA/WB (East Coast Biologics)、Blocking One (Nacalai Tesque)、牛血清白蛋白(下文称作“BSA”)、Blocking Peptide Fragment (Toyobo Enzymes)、Starting BlockTM (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific)、Smart BlockTM (CANDOR Bioscience)、HeteroBlock (OMEGA Biologicals)等。在这些之中,抗-IgM抗体作为抗体是特别理想的。

[0053] 由于发现存在不能被单独抗-IgA抗体和单独抗-IgM抗体抑制且仅能在允许这两种抗体存在时被抑制的非特异性反应,所以本发明人通过组合这两种抗体首次在广泛抑制引发物质中取得了成功。作为其主要组成试剂的市售抗-IgM抗体的实例包括HBR(异嗜性封闭剂,Scantibodies) (Clinical Chemistry 45:7,942-956,1999)。

[0054] 每个装置中抗-IgM抗体的含量优选为5至500 μg /测试,更加优选为10至250 μg /测试,进一步优选为20至100 μg /测试和40至100 μg /测试。

[0055] (样品)

[0056] 在本发明中,粪便用作样品。粪便可直接用作样品或者适当地经稀释剂稀释并用作样品。适当稀释并过滤的粪便可用作样品。

[0057] (分析物)

[0058] 本发明的分析物可为包含于作为样品的粪便中且通过使用抗原-抗体反应可检测的任何分析物,其实例包括病毒、寄生虫和蛋白。

[0059] 例如,传染性肠胃炎主要由病毒和寄生虫引起,且作为分析物的病毒的实例包括诺如病毒、腺病毒、轮状病毒、札幌病毒、肠病毒等,并且作为分析物的寄生虫的实例包括隐孢子虫、阿米巴性痢疾、贾第鞭毛虫等。

[0060] 此外,作为分析物的病毒的实例包括流感病毒,且作为分析物的蛋白的实例包括人血红蛋白、乙型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体、人免疫缺陷病毒抗体等。

[0061] (免疫检测方法)

[0062] 本发明提供的免疫检测方法可为使用免疫反应的任何检测方法,且其实例包括为颗粒聚集免疫测定法的乳胶浊度免疫测定法(下文称作LTIA法)、为典型标记免疫测定法的ELISA法、使用免疫层析的检测方法等,且在這些之中,使用免疫层析的检测方法是尤其合意的。

[0063] (LTIA法)

[0064] LTIA法是这样的方法:其典型地使用两种或两种以上抗-分析物抗体以便至少一种固定在乳胶上从而通过形成粪便样品中的分析物与乳胶固定的抗体的免疫复合物以及聚集来检测分析物。

[0065] 用于临床检查的LTIA法的试剂通常以第一试剂溶液和第二试剂溶液的形式提供,且在使用时与样品顺序地混合。

[0066] 本发明的抗-IgA抗体可包含于第一试剂溶液和第二试剂溶液的一者或两者中,且理想地包含于至少第一试剂溶液中。在本发明包含抗-IgM抗体时,抗-IgM抗体可包含于第一试剂溶液和第二试剂溶液的一者或两者中,且理想地包含于至少第一试剂溶液中。

[0067] 用于LTIA法的乳胶颗粒在材料、粒径和表面电荷量的方面能适当地选择,从而获得合意的性能(诸如灵敏度的改进)。乳胶颗粒可为适于支持抗-分析物抗体的任何颗粒。例如,颗粒可由聚苯乙烯、苯乙烯-苯乙烯磺酸(盐)共聚物、苯乙烯-异丁烯酸共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物或乙酸乙烯酯-丙烯酸酯共聚物制成。虽然乳胶颗粒的形状不特别限制,但是其平均粒径优选足够大以便由乳胶颗粒表面上的抗体与分析物之间的聚集反应引起的聚集经肉眼可检测或光学上可检测。优选的平均粒径为0.02至1.6 μm ,特别优选为0.03至0.5 μm 。由诸如金属胶体、明胶、脂质体、微囊、二氧化硅、氧化铝、炭黑、金属化合物、金属、陶瓷或磁性材料的材料组成的颗粒可用于代替乳胶颗粒。

[0068] (ELISA法)

[0069] ELISA法是这样的方法:其典型地使用两种抗-分析物抗体以便(a)将样品添加至第一抗-分析物抗体固定在其上的固相(例如,板),从而形成粪便样品中的目标(分析物)和固定的抗体之间的复合物,且(b)通过经标记物质标记的第二抗-分析物抗体形成具有复合物的夹心结构并随后检测。

[0070] 本发明的抗-IgA抗体可包含于用于稀释样品的稀释液中,可预先添加至(a)的固相并以液体形式存在,可添加并随后干燥以便以干燥状态存在直至使用,或者可包含于包含(b)中抗体的溶液中,只要当在固相上进行免疫反应时抗-IgA抗体存在,且在这些情况之中,抗-IgA抗体理想地包含于用于稀释样品的稀释液中。

[0071] 更加特别地,在其上固定有第一抗-分析物抗体的固相(诸如,板)捕获粪便样品中的分析物以形成分析物-抗体复合物。经标记物质标记的第二抗-分析物抗体与分析物-抗体复合物反应以形成夹心结构,从而样品中的分析物能通过用适于标记物质的方法测量标记物质的量而测量。对于用于构成测量试剂(试剂盒)的特定方法,诸如将第一抗-检测目标抗体固定在固相上的方法和用标记物质标记第二抗-分析物抗体的方法,除了本说明书中描述的方法之外可不受限制地使用本领域技术人员所周知的方法。虽然该构造能形成为均相测量系统,但是优选形成多相测量系统。

[0072] (使用免疫层析的检测方法)

[0073] 在使用免疫层析的检测方法中,典型地使用以下测试条。

[0074] 本发明的免疫层析测试条是这样的测试条:其用于在不溶性膜中展开粪便样品从而检测样品中的分析物与缀合物之间的复合物,且测试条具有缀合物,在所述缀合物中与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原被固定在标记上,且具有以下组成部分(1)和(2):

[0075] (1) 样品垫,其具有样品供应部和以可洗脱方式保留的抗-IgA抗体;以及

[0076] (2) 具有检测部的不溶性膜,在所述检测部上固定有与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原以检测样品中的分析物与缀合物之间的复合物。

[0077] 缀合物具有固定在标记上的与反应物具有免疫反应性的抗体或抗原,且对于缀合物的存在形式(存在方式),缀合物可以包含于缀合物垫的状态存在(A型),可在样品垫的一部分中作为缀合物部存在(B型),或者可作为与从测试条分离的样本混合的单独缀合物试剂存在(C型)。

[0078] 下面将描述具有A型存在形式的缀合物的测试条。

[0079] 样品垫、缀合物垫、第三垫和不溶性膜在样品的流向中从上游至下游以该顺序排列,且经排列使得上下层至少部分彼此重叠。图1显示了该排列实例的测试条。

[0080] 在包含分析物的样品供应至该测试条的样品垫时,分析物经样品垫流向在下游侧的缀合物垫。在缀合物垫,分析物和缀合物彼此接触且在形成复合物(聚集体)的同时通过垫。接着,复合物通过与缀合物垫的下表面接触放置的多孔第三垫并展开至不溶性膜。

[0081] 由于不溶性膜具有固定在其一部分上的与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原,所以复合物由于免疫反应被结合并固定在该膜上。经固定的复合物通过检测吸光度或源自缀合物的反射光的方法得到检测。

[0082] 接着将描述具有B型存在形式的缀合物的测试条。

[0083] 与A型测试条的区别在于样品垫和缀合物垫是集成的,即样品供应部和缀合物部形成于样品垫的部分中。

[0084] 样品供应部是供应包含分析物的样品的部分,而缀合物部分是包含缀合物的部分,并且样品供应部位于缀合物部的上游。

[0085] 接着将描述具有C型存在形式的缀合物的测试条。

[0086] 与A型测试条的区别在于不存在缀合物垫而缀合物作为分离的缀合物试剂存在。例如,可包含具有并入过滤器中的缀合物的过滤器片。通过使用该过滤器片并允许样本稀释液通过过滤器片,缀合物和分析物相结合以形成复合物(聚集体)。该复合物能供应至与A型相同的测试条(除了不存在缀合物垫以外),从而检测分析物。

[0087] (样品垫)

[0088] 用于本发明的样品垫具有接受样品的部分(样品供应部)。任何物质和形式是可用的,只要处于模制成垫形状状态的那些能吸附液体样品并允许液体和分析物通过。适于样品垫的材料的部分实例包括,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、编制织物等。优选地,使用玻璃纤维垫。样品垫也能具有后续描述的缀合物垫的功能。为了防止/抑制在固定抗体的膜中的非特异性反应(吸附),样品垫也能包含通常使用的封闭剂。

[0089] (第三垫)

[0090] 取决于样品的性质等,第三垫根据需要可理想地设置且可为任何垫,只要垫能允许样品中的分析物和缀合物之间的复合物通过。特别地,虽然实例包括玻璃纤维、丙烯酸纤维、亲水性聚乙烯材料、干纸、纸浆、编制织物等,垫特别理想地为由聚砜或乙酸钠纤维素组成的多孔构件。

[0091] 本发明的多孔第三垫的孔径在平均孔径上理想地为1至100 μm ,更加理想地为10至100 μm ,仍更加理想地为20至80 μm ,最优选为25至70 μm 。这是因为小于1 μm 的直径引起阻塞,

使得样本自身流动缓慢,而大于100 μm 的直径似乎无法捕获非特异性反应物质。

[0092] (不溶性膜)

[0093] 本发明使用的不溶性膜具有至少一个检测部,与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原固定在检测部上。与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原通过常规已知方法能固定在不溶性膜载体上。对于侧流免疫层析试剂,在制备了包含预定浓度的抗体或抗原的溶液之后,通过使用具有能够在水平方向上移动喷嘴同时从喷嘴以恒定速率排出溶液的机制的装置等,溶液以线性供至不溶性膜载体,并干燥以固定。溶液中抗体或抗原的浓度优选为0.1至5mg/mL,更优选为0.5至2mg/mL。在侧流类型的情况下固定在不溶性膜载体上的抗体或抗原的量能通过调整装置喷嘴的排出速率来优化,且优选为0.5至2 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0094] 使用侧流免疫层析试剂的测量方法是这样的测量方法:其中由于毛细现象,样品以不溶性膜载体的一侧的方向移动。

[0095] 以预定浓度包含抗体或抗原的溶液能通过将抗体或抗原添加至缓冲液来制备。一种缓冲液可为通常使用的缓冲液,诸如磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液和古德氏(Good's)缓冲液。缓冲液的pH优选在6.0至9.5的范围内,更优选为6.5至8.5,进一步优选为7.0至8.0。缓冲液可进一步包含诸如氯化钠的盐、诸如蔗糖的稳定剂和保护剂、以及诸如Proclin(注册商标)的防腐剂。盐包括为了调整离子强度而包含的那些,诸如氯化钠,以及为了调整缓冲液的pH而添加的那些,诸如氢氧化钠。

[0096] 在抗体或抗原固定在不溶性膜上之后,除去抗体或抗原固定的部分,不溶性膜可用呈溶液或蒸气形式的常用封闭剂包覆以进行封闭。

[0097] 通常用于免疫层析试剂的对照捕获试剂可固定在不溶性膜上。对照捕获试剂是保证试验可靠性的试剂且捕获包含在缀合物垫中的对照试剂。例如,如果标记的钥孔虫戚血兰素(下文称作KLH)作为对照试剂包含在缀合物垫中,抗-KLH抗体等对应对照捕获试剂。对照捕获试剂的固定位置能根据试验系统的设计适当地选择。

[0098] 构成本发明中使用的不溶性膜的膜可以是通常用作免疫层析试剂的不溶性膜载体的已知膜。例如,膜可以由聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、尼龙、玻璃、多糖(诸如纤维素和纤维素衍生物)、陶瓷等的纤维组成。特别地,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。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载体的孔径和结构,能够控制缀合物和样品中的分析物之间的复合物在不溶性膜载体中的流动速率。

[0099] 免疫层析测试条优选地设置在固相支持物上,诸如塑料粘合片上。固相支持物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等固定在固相支持物上。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。考虑到免疫层析测试条的尺寸、添加样品的方法和位置、不溶性膜载体的检测部的形成位置、信号检测方法等,免疫层析测试条可以在安装到或装配在合适的容器(外壳)上之后使用,并且该安装/装配的状态称为“装置”。

[0100] (与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原)

[0101] 用于本发明的与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原是能够与分析物结合的抗体或抗原,并且在分析物为病毒或抗原时优选地为抗体或者在分析物为抗体时为抗原。与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原固定在后续描述的标记以及检测部上。虽然固定在标

记和检测部的抗体和抗原可为相同的,但用于标记和用于检测部的抗体或抗原优选地为不同的。

[0102] (标记)

[0103] 对于用于本发明的标记,可以使用通常用于免疫层析测试条的已知标记。例如,标记优选地为胶体金属颗粒,诸如金胶体颗粒和铂胶体颗粒、着色胶乳颗粒、磁性颗粒、荧光颗粒等,并且特别优选地为金胶体颗粒和着色胶乳颗粒。

[0104] (缀合物)

[0105] 用于本发明的缀合物为上述描述的标记,其具有固定在其上的与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原。当诸如病毒作为分析物被检测时,优选地,抗-诸如病毒单克隆抗体固定在金胶体颗粒上。

[0106] 将与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原固定在标记上的方法的实例包括物理吸附、化学结合等,并且固定典型地通过物理吸附实现。

[0107] (其它)

[0108] 取决于测量条件和样品,本发明的免疫层析测试条可以进一步包括其它试剂和成分。

[0109] 例如,其它试剂包括防止非特异性反应的封闭剂。

[0110] 例如,其它成分包括吸附垫,所述吸附垫吸附已穿过/经过不溶性膜的样品以控制样品的展开。

[0111] 本发明的免疫层析测试条可以根据实施例中描述的方法制备,并根据需要进行修改/改变。

[0112] (试剂盒)

[0113] 使用本发明的免疫层析的检测试剂盒可以是含有上述免疫层析测试条的任何试剂盒。检测试剂盒还可以包括检测所需的其它试剂,样品的稀释剂,试管,用于粪便取样的棉签,使用手册,用于安装测试条的外壳等。

[0114] (其它)

[0115] 在本说明书中,术语上游或下游用于表示样品流动方向上的上游侧或下游侧。因此,当本发明的测试条具有以部分重叠的方式从顶部层压的样品垫、缀合物垫、第三垫和不溶性膜时,样品垫在最上游侧且不溶性膜在最下游侧。端垫可以层压在与不溶性膜的下游端部重叠的上侧,并且在这种情况下,端垫在最下游侧。

实施例

[0116] [实施例1]非特异性反应抑制剂的筛选

[0117] 连同封闭剂和通常称为非特异性反应抑制剂的表面活性剂,检查抗-IgA抗体的非特异性反应抑制作用。

[0118] 1.免疫层析测试条的生产

[0119] 1)金胶体标记的抗-诺如病毒单克隆抗体(抗-诺如病毒抗体缀合物)的制备

[0120] (i)金胶体溶液的制备

[0121] 向加热到80℃的5,000mL纯净水中加入5.0%柠檬酸三铵水溶液和5.0%四氯金(III)酸水溶液各10mL,并搅拌反应10分钟。随后,将反应溶液再次加热,35分钟后,在冰水

中冷却以得到平均粒径为50nm的金胶体溶液。将胶体金溶液用RO水调节至局部最大吸收波长处的吸光度为1.00D/mL的平均粒径为50nm的金胶体溶液 (pH 8.5)。

[0122] (ii) 抗-诺如病毒抗体缀合物的制备

[0123] 向20mL上述(i)中获得的金胶体溶液 (pH 8.5) 中加入1.0mL含有50 μ g/mL抗-诺如病毒抗体 (Cosmo Bio) 的2mmol/L硼酸溶液 (pH 8.5) 并搅拌10分钟。随后,加入1.5mL的10% BSA,并进一步搅拌5分钟以制备抗体敏化金胶体溶液。抗体敏化金胶体溶液的离心在10 $^{\circ}$ C下以10,000rpm进行45分钟,然后除去上清液,通过离心沉淀的抗体敏化金胶体用缀合物稀释剂(缀合物稀释缓冲液,SCRIPPS)稀释并收集。将收集的抗体敏化金胶体用含有0.5%酪蛋白的缀合物稀释液稀释至1.50.D./mL的局部最大吸收波长处的吸光度,以制备缀合物垫施用溶液(缀合物垫施用溶液1)。

[0124] 取代10%的BSA,以相同的浓度加入另一种封闭剂BPF (Blocking Peptide Fragment) (由Toyobo Enzymes制造的BPF-301) 或NPS (Neo Protein Saver) (由Toyobo Enzymes制造的NOS-301) 使得以相同的方式制备抗体敏化金胶体溶液(缀合物垫施用溶液2、3)。

[0125] 此外,将表面活性剂Epan U108 (DKS制造)、Epan 485 (由DKS制造)、Pluronic F68 (ADEKA制造) 分别以1%、0.1%、0.05%加入到缀合物垫施用溶液1中,以制备溶液(缀合物垫施用溶液4、5、6)。

[0126] (iii) 用于对照线的金胶体标记的KLH (KLH缀合物) 的制备

[0127] 向上述20mL的1.00D/mL金胶体溶液 (pH 6.1) 中加入1mL的以620 μ g/mL溶解于2mmol/L磷酸盐缓冲液 (pH 6.1) 的KLH (Sigma制造),并在室温下搅拌10分钟。向金胶体和KLH的混合溶液中加入1mL的10%BSA水溶液,并在室温下搅拌5分钟。

[0128] 随后,将混合物在10 $^{\circ}$ C下以11900 \times g离心45分钟。去除上清液后,将1mL上述缀合物稀释液加入到获得的沉淀物中以悬浮缀合物,从而获得KLH缀合物。

[0129] 2) 缀合物垫的制备

[0130] 将上述1)中制备的抗-诺如病毒抗体缀合物垫施用溶液和30D/mL的KLH缀合物各自与1.33%酪蛋白、4%蔗糖溶液 (pH 7.5) 混合以制备缀合物溶液,并使具有恒定体积的玻璃纤维垫 (Millipore) 浸渍有以垫体积计1.13体积份的溶液。通过在干燥炉中在70 $^{\circ}$ C下加热45分钟来干燥垫,以获得缀合物垫。

[0131] 3) 抗-诺如病毒单克隆抗体固定的膜(不溶性膜)的制备

[0132] 使用含有2.5%蔗糖的10mmol/L磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 以0.75mg/mL制备与标记抗体不同表位的抗-诺如病毒抗体 (Cosmo Bio),以获得测试线施用溶液。以相同的方式使用含有2.5%蔗糖的10mmol/L磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 以0.75mg/mL制备抗-KLH抗体(源自兔子),以获得对照线施用溶液。

[0133] 将测试线施用溶液和对照线施用溶液以1mm宽线的形状施加到硝酸纤维素膜(由Sartorius制造),二者之间具有间隔。通过使用免疫层析分配器“XYZ3050”(由BIO DOT制造)进行该施用,施用量设定为1.0 μ L/cm。通过在干燥炉中在70 $^{\circ}$ C下加热45分钟来干燥膜,以制备抗体-固相膜。

[0134] 4) 样品垫的准备

[0135] 制备含有0.5%蔗糖和250mmol/L NaCl的二十(20)mmol/L tris缓冲液 (pH 7.2)

作为样品垫施用溶液(样品垫施用溶液1)。

[0136] 向样品垫施用溶液1中加入1.5mg/mL(90.7mg/测试)的抗-IgA抗体(Cosmo Bio),以制备溶液(样品垫施用溶液2)。

[0137] 向具有恒定体积的玻璃纤维垫(由Lyda11制造)中,以垫计2.58体积份施加样品垫施用溶液1或样品垫施用溶液2,并通过在烘箱中在70°C下加热45分钟进行干燥以获取各样品垫。

[0138] 5) 免疫层析测试条的组装

[0139] 图1显示了本发明的免疫层析测试条的示意结构图。

[0140] 将不溶性膜(b)固定到塑料粘合片(a)上,然后沿着设置并安装在相对侧端部的吸附垫(由Whatman制造)(f)依次设置和安装第三垫(由Pall制造)(g),缀合物垫(d)和样品垫(e)。用具有经抗-诺如病毒抗体敏化的金胶体的缀合物浸渍缀合物垫,并且不溶性膜在垂直于流动方向的线上固定有抗-诺如病毒抗体(c1)和对照试剂(c2),使得测试线在流动方向的上游侧。将垫各自层压并布置,其一部分与上下垫相接触。将包含抗-诺如病毒抗体(c1)的线称为测试线,将包含对照试剂(c2)的线称为对照线。对于第三垫,使用由聚砜制成的平均孔径为20至50 μ m的多孔膜。以这种方式重叠组成部件获得的结构被切割成恒定宽度以产生免疫层析测试条。测试条可以各自安装并装配在专用的塑料外壳中以实现免疫层析测试装置(未示出)的形式。

[0141] 2. 测试程序

[0142] 使用9名正常个体的粪便作为样本(样本均为无诺如病毒,即阴性样本)。将每个样本在含有表面活性剂的20mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.6)中悬浮至0.1g/mL,通过涡旋彻底搅拌,然后以3000rpm离心10分钟,得到上清液,将其用作样品。

[0143] 向上述1中生产的各种测试条滴加120 μ L样品,15分钟后目视观察是否存在假阳性。

[0144] 3. 测试结果

[0145] 观察结果显示于表1中。圆圈表示提供非特异性反应抑制作用的情况,叉号表示不提供作用的情况。当添加市售的封闭剂或表面活性剂时,在每种情况下都未观察到非特异性反应抑制作用,并且观察到假阳性。另一方面,当加入抗-IgA抗体时,非特异性反应被抑制。

[0146] [表1]

[0147]

	缀合物垫 施用溶液编号	样品垫施用 溶液编号	作为非特异性反应抑制剂 候选添加的物质	非特异性反应 抑制作用
测试条1	1	1	BSA	×
测试条2	2	1	BPF	×
测试条3	3	1	NPS	×
测试条4	4	1	BSA, EpanU108	×
测试条5	5	1	BSA, Epan 485	×
测试条6	6	1	BSA, Pluronic F68	×
测试条7	1	2	BSA, 抗-IgA抗体	○

[0148] [实施例2]抗-IgA抗体的非特异性反应抑制作用的证实测试

[0149] 1. 免疫层析测试条的生产

[0150] 通过使用以下(1)至(4)作为样品垫施用溶液且实施例1的缀合物垫施用溶液1作为缀合物垫施用溶液,以与实施例1相同的方式制备测试条。应注意,HBR是具有抗-IgM抗体作为活性成分的非特异性反应抑制剂(Clinical Chemistry 45:7,942-956,1999):

[0151] (1) 实施例1的样品垫施用溶液1;

[0152] (2) 添加0.75mg/mL (45.4 μ g/测试) HBR (由Scantibody制造) 的实施例1的样品垫施用溶液1;

[0153] (3) 添加1.5mg/mL (90.7 μ g/测试) 抗-IgA抗体 (源自山羊) 的实施例1的样品垫施用溶液1;和

[0154] (4) 添加1.5mg/mL (90.7 μ g/测试) 抗-IgA抗体 (源自山羊) 和0.75mg/mL (45.4 μ g/测试) HBR的实施例1的样品垫施用溶液1。

[0155] 2. 测试程序

[0156] 使用42名正常个体的粪便作为样本(样本均为无诺如病毒,即阴性样本)。将每个样本以0.1g/mL悬浮于含有表面活性剂的20mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.6)中,通过涡旋充分搅拌,然后以3000rpm离心10分钟,得到上清液,将其用作样品。

[0157] 向上述1生产的测试条中滴加120 μ L样品,在10、15和30分钟后目视观察是否存在假阳性。根据目视观察结果,通过使用称为“色表”的颜色样品来量化测试线的着色强度。色表上的颜色强度以0.25为增量量化为0至4的值。从着色强度的评价结果评价非特异性反应的强度。

[0158] 评价标准如下:

[0159] ++: 存在强非特异性反应(1.0或以上);

[0160] +: 存在弱非特异性反应(0.25或以上且小于1.0);和

[0161] -: 不存在非特异性反应(0)。

[0162] [表2]

[0163] 表2-1

		样本编号	1	2	3	4	5	6	7
[0164]	(1) 未添加抗-免疫球蛋白抗体	10min	-	-	+	+	-	+	++
		15min	-	+	++	++	-	+	++
		30min	+	+	++	++	+	++	++
(2) 仅添加HBR (抗-IgM抗体)	10min	-	-	-	-	-	-	-	-
	15min	-	+	-	-	-	-	-	-
	30min	+	+	+	-	-	-	-	-
(3) 仅添加抗-IgA抗体	10min	-	-	-	-	-	+	++	
	15min	-	-	-	+	-	+	++	
	30min	-	-	-	+	+	+	++	
(4) 添加HBR和抗-IgA抗体	10min	-	-	-	-	-	-	-	-
	15min	-	-	-	-	-	-	-	-
	30min	-	-	-	-	-	-	-	-

[0165] 表2-2

		样本编号	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
[0166]	(1) 未添加抗-免疫球蛋白抗体	10min	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
		15min	-	-	-	+	++	++	-	+	-	+
		30min	+	+	+	+	++	++	+	++	+	+
(2) 仅添加HBR (抗-IgM抗体)	10min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
(3) 仅添加抗-IgA抗体	10min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	30min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
(4) 添加HBR和抗-IgA抗体	10min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0167] 3. 测试结果

[0168] (1) 非特异性反应抑制作用

[0169] 在42个样本中,即使当没有添加抗-IgA抗体时,在一些样本(即,阴性样本)中也没有观察到非特异性反应(结果未在表中显示)。除了这些阴性样本之外的剩余17个样本是在未加入抗-IgA抗体时发生非特异性反应的样本(假阳性样本)。对于这些假阳性样本(样本编号1至17),当仅添加HBR(主要成分:抗-IgM抗体)时、当仅添加抗-IgA抗体时以及当添加HBR和抗-IgA抗体两者时,检查出非特异性反应抑制作用,结果显示于表2中。

[0170] 对于样本编号1至3,可以看出添加抗-IgA抗体是有效的,而添加HBR不抑制非特异性反应。

[0171] 对于样本编号4至7,可以看出添加HBR具有非特异性反应抑制作用,而添加抗-IgA抗体并不抑制非特异性反应。

- [0172] 对于样本编号8至15,可以看出当添加HBR或抗-IgA抗体时,非特异性反应被抑制。
- [0173] 对于样本编号16和17,可以看出当仅添加HBR或仅添加抗-IgA抗体时未观察到作用,并且仅当两者都添加时非特异性反应被抑制。
- [0174] 综上所述,与市售HBR一样,单独的抗-IgA抗体对于大约70%的假阳性样本是有效的,并且两者的组合能够抑制几乎所有假阳性样本中的非特异性反应。
- [0175] [实施例3]对病毒检测灵敏度的影响的证实测试
- [0176] 检查根据添加抗-IgA抗体的病毒检测灵敏度。还检查了添加市售的非特异性反应抑制剂HBR的情况来作为参考实例。
- [0177] 1. 免疫层析测试条的生产
- [0178] 生产与实施例2相同。
- [0179] 2. 测试程序
- [0180] 将诺如病毒阳性对照用盐水稀释至任意浓度。通过将10 μ L稀释的诺如病毒阳性对照添加到1,000 μ L样本稀释液中来制备样品溶液。
- [0181] 向上述1中所生产的测试条中滴加120 μ L样品溶液,通过使用色表量化并评估15分钟后的测试线中的线强度。
- [0182] 3. 测试结果
- [0183] 结果显示于图2中。在添加了抗-IgA抗体的那些中没有观察到对诺如病毒阳性对照的灵敏度降低。另一方面,在添加了HBR的参考实例中观察到检测灵敏度的降低。
- [0184] 综上所述,发现抗-IgA抗体作为非特异性反应的抑制剂具有非常高的实用性。
- [0185] 工业适用性
- [0186] 通过根据本发明在抗-IgA抗体的存在下进行免疫反应,可以抑制由粪便样品引起的非特异性反应,从而准确地检测样品中的分析物。特别地,通过使用免疫层析作为免疫反应,可以容易且准确地检测粪便样品中的分析物。
- [0187] 此外,与抗-IgM抗体的组合能够以非常高的可能性抑制非特异性反应,而不会导致检测灵敏度降低,从而可以提供非常有用的免疫检测方法。
- [0188] 附图标记列表
- [0189] (a) 塑料粘合片
- [0190] (b) 不溶性膜
- [0191] (c1) 抗-诺如病毒抗体
- [0192] (c2) 对照抗体
- [0193] (d) 缀合物垫
- [0194] (e) 样品垫
- [0195] (f) 吸附垫
- [0196] (g) 第三垫

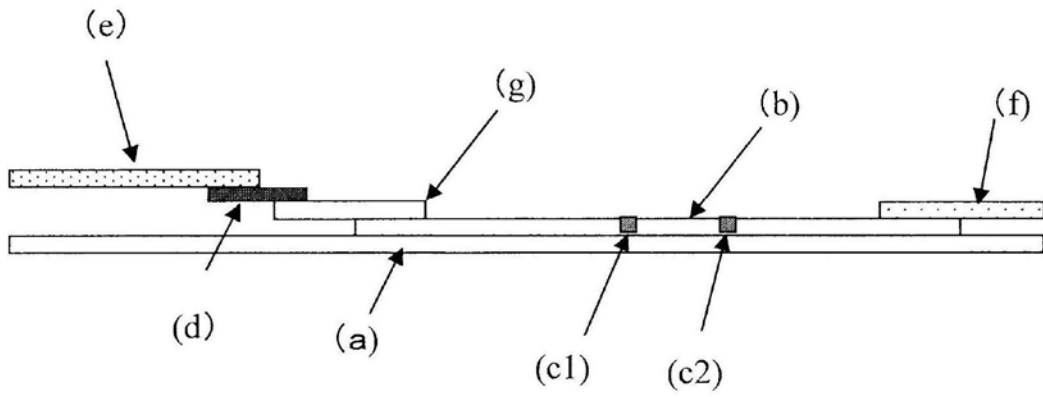


图1

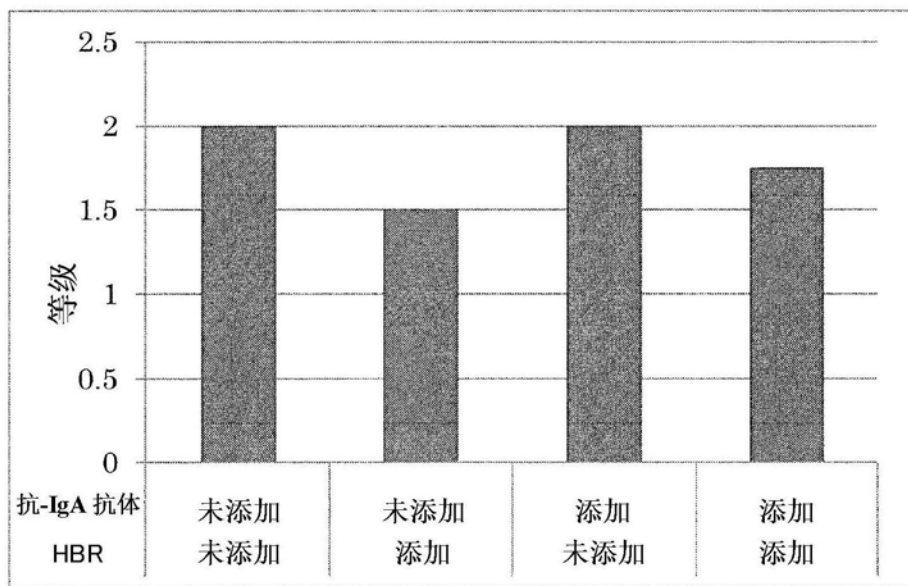


图2

专利名称(译)	免疫检测方法和用于其的测试条		
公开(公告)号	CN107430120A	公开(公告)日	2017-12-01
申请号	CN201680015629.0	申请日	2016-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	落合泰史 西谷公良		
发明人	落合泰史 西谷公良		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/4283 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/54393 G01N33/56983 G01N2333/08 C07K16/42 G01N33/558		
代理人(译)	吴小明		
优先权	2015160311 2015-08-17 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

问题是提供在使用免疫层析的检测方法中抑制粪便特有的非特异性反应的方法以及用于该方法的免疫层析测试条，所述免疫层析在不溶性膜中展开粪便样品从而检测样品中的分析物。本发明提供在抗-IgA抗体的存在下进行免疫层析反应从而检测粪便样品中的分析物而不受非特异性反应影响的方法，以及用于该方法的免疫层析测试条。

