



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107850593 A

(43)申请公布日 2018.03.27

(21)申请号 201680041878.7

(22)申请日 2016.07.15

(30)优先权数据

2015-141968 2015.07.16 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/071078 2016.07.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/010574 JA 2017.01.19

(71)申请人 田中贵金属工业株式会社

地址 日本东京

(72)发明人 加藤佑弥 岩本久彦

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 张苏娜 常海涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

C12Q 1/04(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

权利要求书2页 说明书29页 附图1页

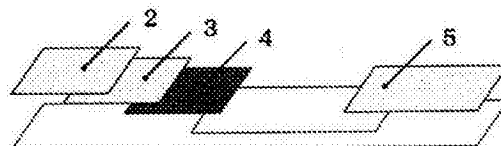
(54)发明名称

免疫测定方法、免疫层析试剂盒

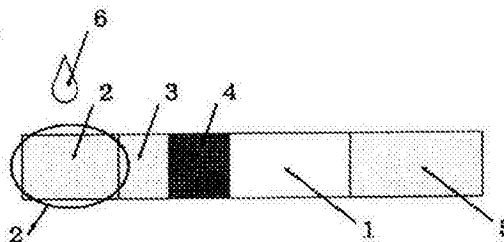
(57)摘要

本发明的目的在于提供一种免疫测定方法，其中，可以在提高检查效率及节省劳动力的同时，在不发生不溶性载体的聚集且不引起非特异性反应的情况下进行展开速度快的高灵敏度的免疫测定。本发明涉及一种免疫测定方法，其利用检查设备进行，在所述方法中，利用提取剂提取检体中的待检测物的抗原，并利用对所述抗原具有结合能力的检测试剂检测所述待检测物，所述提取剂为通过具有选自自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物与亚硝酸盐的接触反应而在所述检查设备上生成的亚硝酸。

(a)



(b)



1. 一种免疫测定方法,其利用检查设备进行,在所述方法中,利用提取剂提取检体中的待检测物的抗原,并利用对所述抗原具有结合能力的检测试剂检测所述待检测物,

所述提取剂为通过具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物与亚硝酸盐的接触反应而在所述检查设备上生成的亚硝酸。

2. 根据权利要求1所述的免疫测定方法,其中,具有环状酯的骨架的杂环化合物为具有1至2个氧原子的5元环化合物。

3. 根据权利要求1所述的免疫测定方法,其中,具有环状酰胺的骨架的杂环化合物以及具有环状酰亚胺的骨架的杂环化合物为具有1至3个N原子的5元环或6元环化合物。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫测定方法,其中,每次测定使用0.1至100 μ mol的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物。

5. 根据权利要求1所述的免疫测定方法,其中,所述检测试剂包含源自于选自兔子、山羊和小鼠的一种以上的动物种类的抗体。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的免疫测定方法,其中,在环状寡糖的存在下进行测定。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的免疫测定方法,其中,所述抗原为多糖体。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的免疫测定方法,其中,所述待检测物为革兰氏阳性菌。

9. 根据权利要求1至7中任一项所述的免疫测定方法,其中,所述待检测物为革兰氏阳性菌及腺病毒。

10. 根据权利要求8或9所述的免疫测定方法,其中,所述革兰氏阳性菌为溶血性链球菌。

11. 一种免疫层析试剂盒,其利用对检体中的待检测物的抗原具有结合能力的检测试剂来检测所述抗原,所述试剂盒由检体稀释液、以及包含试样滴加部、抗原提取部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质和吸收部的免疫层析装置构成,

所述检体稀释液及试样滴加部的至少一者含有亚硝酸盐,抗原提取部含有具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物。

12. 根据权利要求11所述的免疫层析试剂盒,其中,每个试剂盒含有0.1至100 μ mol的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物。

13. 根据权利要求11或12所述的免疫层析试剂盒,其中,所述检测试剂包含源自于选自兔子、山羊和小鼠的一种以上的动物种类的抗体。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的免疫层析试剂盒,其中,所述检体稀释液及试样滴加部的至少一者含有环状寡糖。

15. 根据权利要求11至14中任一项所述的免疫层析试剂盒,其中,所述抗原为多糖体。

16. 根据权利要求11至15中任一项所述的免疫层析试剂盒,其中,所述待检测物为革兰氏阳性菌。

17. 根据权利要求11至15中任一项所述的免疫层析试剂盒,其中,所述待检测物为革兰氏阳性菌及腺病毒。

18. 根据权利要求16或17所述的免疫层析试剂盒,其中,所述革兰氏阳性菌为溶血性链

球菌。

19. 根据权利要求11至18中任一项所述的免疫层析试剂盒,其中,采用金属纳米颗粒载体作为在所述标记物质保持部中使用的标记成分。

免疫测定方法、免疫层析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析试剂盒、该试剂盒所使用的试剂组合物或检体处理液及检测方法,其中所述免疫层析试剂盒作为用于检测试样液中的被检测物(抗原等)(例如革兰氏阳性菌,特别是溶血性链球菌)、进一步同时检测革兰氏阳性菌(特别是溶血性链球菌)和病毒类(特别是腺病毒)这两者的便利的体外诊断试剂盒或便携用诊断装置,其重要性高。特别涉及通过使用特定的试剂组合物来制备溶链菌检查中多糖体的提取所需的亚硝酸,从而无需每次用时制备即可使亚硝酸在检查设备上简便地生成以提高检查效率及检查精度的检查方法。

背景技术

[0002] 近年来,在免疫层析用条带形式的免疫测定中,作为利用抗体具有的特异的反应性来检测试样液中的被检测物(抗原等)的简便的体外诊断试剂盒或便携用诊断装置,通用性日益提高。

[0003] 特别是最近关于基于免疫层析法的简便的检测工具(其用于检查有无感染流感病毒或细菌这样的病原体)也受到关注,已经进行了研究开发。

[0004] 溶血性链球菌(以下也称为“溶链菌。”)的诊断通过以群特异性的多糖体为抗原进行检查来进行。作为多糖体的提取法,已知有使用了酶或噬菌体、盐酸或次氯酸等的方法,但使用亚硝酸的提取法最常见。

[0005] 利用亚硝酸的提取法具有糖多糖体的高提取效率和亚硝酸便宜且容易操作这样的优点,但亚硝酸自身为不稳定而易分解的化合物,因此,具有必须每次在提取前将亚硝酸钠和醋酸等有机酸混合,以制备亚硝酸这样的缺点。

[0006] 另外,在不断地进行诊断的情况下,每次都制备亚硝酸成为医师及检测技师的较大的负担。此外,由于包括混合工序,因而也存在由于试剂的错误混合等所引起的不能进行正确安全的诊断的可能性、由于提取时间的差异所引起的测定再现性降低的问题等。

[0007] 为了克服该问题点,关于用于简化从溶血性链球菌中提取多糖抗原的工序的简便的检查工具也已经进行研究开发。

[0008] 例如,在专利文献1中,提出了一种从生物(特别是链球菌A组或B组)提取多糖抗原的简化的提取方法,其中,使用将以下物质组合而成的试剂盒:a. 渗入测定量的亚硝酸盐并干燥的第一吸收性物质、b. 渗入测定量的中和碱及缓冲液并干燥的第二吸收性物质、c. 测定量的酸的水溶液(参照专利文献1)。

[0009] 另外,在链球菌感染的诊断时,需要首先进行多糖抗原的提取工序,接着使所得到的溶液与免疫测定装置接触并进行抗原的检测工序这样的麻烦的处理工序。因此,包括多糖抗原的提取工序及标记物的测定工序的对试样中的生物简便地进行测定检查的方法以及为此的试剂盒的开发成为课题。

[0010] 例如,在专利文献2中,公开了一种用于检测链球菌科等的微生物/细菌性生物体中特征性的碳水化合物抗原的分析装置及方法。在该侧向流动分析装置中,提供了一种包

括具有以下部分的基材的装置：a. 样品接收区、b. 提取区（提取试剂；固定化或吸收并干燥的酸及亚硝酸盐）、c. 中和剂（中和缓冲剂；TRIS）、d. 检测区（捕捉/检测试剂）（参照专利文献2）。

[0011] 进而，也开发了一种对含有链球菌的多种不同的生物同时进行测定检查的方法以及为此的试剂盒。例如，在专利文献3中，记载了一种对第一生物为革兰氏阳性细菌（例如A、B、F或G组链球菌、肠球菌细菌等）、第二生物为病毒类或革兰氏阴性细菌类等这样的试样中的多种不同的生物种进行测定的方法及试剂盒。

[0012] 其可利用在一个以上的容器内具备以下物质的试剂盒对多种检体同时进行检测：a. 亚硝酸或干燥状态的酸及亚硝酸盐、b. 表面活性剂、c. 与从第一生物得到的第一标记物结合的第一结合试剂、d. 与从第二生物得到的第二标记物结合的第二结合试剂，由此可以实现检查效率的倍增和患者检查所伴随的痛苦的减轻，以及可以适当地组合对多种致病生物有效的治疗剂来进行投药。

[0013] 在此，作为与亚硝酸盐组合使用的酸，记载有无机酸（盐酸、硫酸等）或有机酸（醋酸、柠檬酸），优选为有机酸，更加优选为醋酸，并且使用了醋酸作为实施例（参照专利文献3）。

[0014] 由于溶链菌具有多种血清型，因而利用群特异性的多糖体抗原的检查是常见的。作为从菌体中提取多糖体的方法，已知有利用亚硝酸的提取法。由于亚硝酸为不稳定的化合物，因而需要利用亚硝酸盐和有机酸的用时调整。

[0015] 但是，存在由于亚硝酸盐的调整而使得检查工序增加的问题、此外由于调整时的操作差异或提取时间的差异所引起的测定再现性等的问题。本发明人等通过使免疫层析试剂盒的两种样品垫分别含浸亚硝酸钠及柠檬酸，成功地简化了操作并提高了测定再现性。然而发现，当含浸的柠檬酸的量增加时，会发生非特异性显色，并且提取效率存在问题。

[0016] 溶链菌已知为全年流行的呼吸道感染症的致病菌，不仅在日本而且在欧美也已知是一般性感冒的致病菌。作为诊断的辅助，使用了能够简便且快速诊断的免疫层析诊断试剂盒（市场为约300万次测试/年）。

[0017] 关于用于检测链球菌科等的微生物/细菌性生物体中特征性的碳水化合物抗原的分析装置及方法，有已经上市出售的那些，例如作为免疫层析试剂，有クイックビュー DipStick StrepA (DSファーマバイオメディカル) 及ストレップAテストパック・プラスOBC (三和化学研究所) 等，另外，作为玻片乳胶聚集法试剂，已知有A链霉菌AD“生研” (デンカ生研) 等。

[0018] 对免疫层析试剂的市售品而言，通常为了在检体的试验中判定为阳性，需要在直接法中溶链菌浓度为 1×10^6 CFU/mL以上。因此，在低于 1×10^6 CFU/mL的情况下，尽管为阳性也会判定为阴性，另外，以不溶性载体标记抗体的免疫层析法检查试剂通常与E1A相比灵敏度较低，因此，存在阳性的情况下所观察的线不清晰这样的问题。此外，存在尽管试样液中不存在被检测物（抗原等）也判定为阳性的所谓产生假阳性这样的问题。

[0019] 为了解决这样的问题，提供了一种使展开溶剂中存在糖或水溶性高分子化合物的方法等。例如，在使用结合了抗体的着色乳胶颗粒的膜测定方法中，通过使用在乳胶组合物中添加糖类（例如单糖类、寡糖以及它们的糖醇）及多元醇这样的至少1种聚集抑制剂和蛋白质且同时含有碱性的缓冲剂、且其pH为9.0至9.8的免疫测定用乳胶组合物，由此，可防止

乳胶颗粒的自然聚集,防止比重、粘度、浸透压的上升,从而可以高灵敏度地进行免疫测定(参照专利文献4)。

[0020] 另外,最近提出有一种作为适合糖尿病的诊断的指标被广泛使用的在血中的血红蛋白上结合有糖的糖化血红蛋白、特别是血红蛋白β链的N末端缬氨酸残基被糖化的血红蛋白A1c(称为“HbA1c”)的颗粒免疫层析测定方法,其中,(A)将含有红细胞的测定试样用表面活性剂处理使血红蛋白β链的N末端露出在蛋白质表面,(B)使所得到的试样与处于水不溶性的状态的环状多糖类(例如利用化学键固定于膜等。环状多糖类自身形成聚合物。在多孔性树脂中捏合的状态)接触,接着,(C)使所得到的试样与识别由颗粒标记的血红蛋白的N末端的抗体等接触从而进行检测。

[0021] 如此地,防止了环状多糖类与水接触时,构成环状多糖类的环状寡糖分子或环状多糖分子成为溶解于水中而不扩散的状态,这是抗体彼此聚集而不在膜上展开从而无法准确地测定的原因(参照专利文献5)。

[0022] 进而,提出有一种在使用了膜测定方法的检体的简易的检测方法中,可在保持灵敏度的同时防止假阳性及堵塞的检体试样的过滤方法(参照专利文献6)。

[0023] 然而,对用不溶性载体(金属颗粒、着色乳胶颗粒等)标记抗体的免疫层析法(也称为“颗粒免疫层析法”)而言,有时根据测定试样、测定环境、测定条件依然产生该不溶性载体的聚集而引起非特异性反应,展开速度慢等问题有时无法解决。因此,期望在采用了各种测定试样、测定环境、测定条件的颗粒免疫层析法中,寻求一种不发生不溶性载体的聚集、不会引起非特异性反应、展开速度快的检测试剂。

[0024] 现有技术文献

[0025] 专利文献

[0026] 专利文献1:日本特表平7-503543号公报

[0027] 专利文献2:日本特表2008-509384号公报

[0028] 专利文献3:日本特表2006-518990号公报(日本专利第4667874号公报)

[0029] 专利文献4:日本特开2007-315883号公报

[0030] 专利文献5:日本特开2012-251789号公报

[0031] 专利文献6:日本特开2009-36781号公报

发明内容

[0032] 发明所要解决的课题

[0033] 本发明的目的及课题在于提供一种免疫测定方法、免疫层析检测方法以及免疫层析试剂盒(也称为“免疫层析试剂盒”),在该免疫测定法中,在利用免疫层析法进行(例如)革兰氏阳性菌、特别是溶链菌的检查时,通过使作为不稳定化合物的亚硝酸在检查设备上生成从而进行溶链菌的细胞表面的细胞壁所含的多糖体的提取,可以在提高检查效率及节省劳动力的同时,也能够在不引起不溶性载体的聚集、不引起非特异性反应的情况下进行展开速度快的高灵敏度的免疫测定。

[0034] 另外,可以解决这样的课题,即可以提供一种通过对检体稀释液(也称为“检体处理液”、“展开液”)进行改良,由此,与现有技术相比,展开体系中的阴性检体下的显色降低,阳性检体下的显色提高的免疫层析用检查试剂,也就是说,通过特定的杂环化合物与亚

硝酸盐的接触反应,检查精度(以下也称为“S/N比”)较高的高灵敏度免疫层析用检查试剂。

[0035] 此外,本发明的目的在于提供一种在利用免疫层析法进行细菌检查或同时进行细菌和病毒这两者的检查时,通过对提取剂进行改良,由此,检体中或检查设备中所存在的蛋白质成分不会在展开检查中发生变性/析出(沉淀)的高灵敏度且展开速度快的免疫层析用检查试剂。

[0036] 进而,本发明的目的在于提供一种免疫测定用试剂、免疫测定方法、免疫层析检测方法及免疫层析试剂盒,在利用免疫层析法进行细菌检查或同时进行细菌和病毒这两者的检查时,通过对免疫层析试剂盒的贴合部位的结构进行改良,由此,与现有技术相比,使亚硝酸在检查设备上生成并且迅速且高精度地进行试样(例如采自呼吸道疾病患者的检体,特别是咽拭子、唾液、鼻涕、鼻拭子或痰等)中的微生物或者源自于微生物的抗原或抗体等(例如革兰氏阳性菌、特别是溶血性链球菌等细菌)的提取,从而可以提高检查效率、检查精度以及节省劳动力。

[0037] 进一步详细而言,本发明的目的在于,提供一种可迅速诊断作为呼吸道感染症의 致病菌的A组β溶血性链球菌、或者同时检查并迅速诊断A组β溶血性链球菌和腺病毒这两者的简便且S/N比高的高灵敏度免疫层析用试样提取液(以下也称为“试样稀释液”)、免疫层析用试剂、使用该试剂的免疫层析试剂盒及检查方法。

[0038] 用于解决课题的手段

[0039] 本发明人等通过使检查设备内含浸有亚硝酸盐、以及具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物,从而首次实现了操作性简便且具有高检测灵敏度、特异性的免疫测定方法和免疫层析试剂盒。

[0040] 本发明人等为了利用免疫层析法检查试剂进行细菌检查或者同时进行细菌和病毒这两者的检查,使所用的检体稀释液中含有亚硝酸盐,或者,使位于保持杂环化合物的试剂保持部的试样展开方向上游的其他试剂保持部中含有亚硝酸盐,该杂环化合物具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架。

[0041] 由此,对于保持在检查设备中的属于具有环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺中的任一个的骨架的杂环化合物范畴的各种化合物类,即使作为检体稀释液的展开液的pH条件由于并存的各种有机化合物的影响或生成的亚硝酸而发生变化,检体或检查设备中的蛋白质成分等也会变性、析出并附着在检测部。因此,本发明人等发现,可以提供不会诱发非特异性反应、且不会引起抗体固定金属颗粒的聚集的检查精度(S/N比)高且展开速度快的检查试剂。

[0042] 提供一种通过在环状寡糖的存在下实施本发明的检测体系,由此即使在存在具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物作为试剂成分且产生亚硝酸这样的展开/提取条件下,也不会使提取液及检体中的或者设备中的蛋白质成分等析出从而能够进行检查的免疫测定用试剂、免疫测定方法及免疫层析试剂盒等。

[0043] 作为解决上述课题的具体手段,本发明可以通过下述(1)至(19)所示的免疫层析法所使用的检体处理液、免疫测定用试剂、免疫测定方法、免疫层析检测方法、免疫层析试剂盒、及使用该试剂盒的免疫层析法而实现。

[0044] 作为本发明的免疫测定方法,具有如下特征。

[0045] (1) 本发明的第一特征为一种利用提取剂提取检体中的待检测物的抗原、并利用对上述抗原具有结合能力的检测试剂检测上述待检测物的免疫测定方法,其中,上述提取剂为通过具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物与亚硝酸盐的接触反应而在上述检查设备上生成的亚硝酸。

[0046] (2) 本发明的第二特征为一种免疫测定方法,其特征在于,具有环状酯的骨架的杂环化合物为具有1至2个氧原子的5元环化合物。

[0047] (3) 本发明的第三特征为一种免疫测定方法,其中,具有环状酰胺的骨架的杂环化合物以及具有环状酰亚胺的骨架的杂环化合物为具有1至3个N原子的5元环或6元环化合物。

[0048] (4) 本发明的第四特征为一种免疫测定方法,其中,每次测定使用0.1至100 μmol 的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物。

[0049] (5) 本发明的第五特征为一种免疫测定方法,其中,检测试剂至少包含源自于选自兔子、山羊和小鼠的一种以上的动物种类的抗体。

[0050] (6) 本发明的第六特征为一种免疫测定方法,其中,在环状寡糖的存在下进行测定。

[0051] (7) 本发明的第七特征为一种免疫测定方法,其中,抗原为多糖体。

[0052] (8) 本发明的第八特征为一种免疫测定方法,其中,待检测物为革兰氏阳性菌。

[0053] (9) 本发明的第九特征为一种免疫测定方法,其中,待检测物为革兰氏阳性菌及腺病毒。

[0054] (10) 本发明的第十特征为一种免疫测定方法,其中,革兰氏阳性菌为溶血性链球菌。

[0055] 作为本发明的免疫层析试剂盒,具有如下特征。

[0056] (11) 本发明的第十一特征为一种免疫层析试剂盒,其用于利用对检体中的待检测物的抗原具有结合能力的检测试剂检测上述抗原,所述试剂盒由检体稀释液、以及包含试样滴加部、抗原提取部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质和吸收部的免疫层析装置构成,其特征在于,上述检体稀释液及试样滴加部的至少一者含有亚硝酸盐,抗原提取部含有具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物。

[0057] (12) 本发明的第十二特征为一种免疫层析试剂盒,其中,每个试剂盒含有0.1至100 μmol 的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物。

[0058] (13) 本发明的第十三特征为一种免疫层析试剂盒,其中,检测试剂包含源自于选自兔子、山羊和小鼠的一种以上的动物种类的抗体。

[0059] (14) 本发明的第十四特征为一种免疫层析试剂盒,其中,上述检体稀释液及试样滴加部的至少一者含有环状寡糖。

[0060] (15) 本发明的第十五特征为一种免疫层析试剂盒,其中,抗原为多糖体。

[0061] (16) 本发明的第十六特征为一种免疫层析试剂盒,其中,待检测物为革兰氏阳性菌。

[0062] (17) 本发明的第十七特征为一种免疫层析试剂盒,其中,待检测物为革兰氏阳性菌及腺病毒。

[0063] (18) 本发明的第十八特征为一种免疫层析试剂盒,其中,革兰氏阳性菌为溶血性链球菌。

[0064] (19) 本发明的第十九特征为一种免疫层析试剂盒,其中,使用金属纳米颗粒载体作为标记物质保持部所使用的标记成分。

[0065] 本发明具备如上特征点,由此可以实现课题。

[0066] 发明效果

[0067] 在本发明中,使用预先测定量的亚硝酸化合物与具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物接触混合时生成的亚硝酸,提取革兰氏阳性菌、特别是溶链菌(A组至V组)的菌体的表面细胞壁所存在的群特异性的多糖体,并以该多糖体为抗原进行检查。因此,可以提供一种没有试剂的混合错误及无需每次都制备亚硝酸这样的简便且具有通用性的检查试剂盒及检查方法。

[0068] 即,在每次检查中无需设置使亚硝酸盐与酸性溶液反应的亚硝酸生成工序这样的繁杂的用时制备,而是通过在检查设备上生成亚硝酸以省略检查的繁杂,可以实现检查效率及检查精度提高的检查方法。

[0069] 进一步地,在使用了本发明的免疫层析试剂盒的溶链菌检测体系中,通过使用具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物,从而即使在提取/展开条件下也不会使提取液及检体中的蛋白质成分析出,可以高灵敏度且迅速地进行检查。

[0070] 即,在本发明中,通过使用含有具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物的免疫层析用试样提取液(也称为“检体稀释液”),从而可以提供在展开中不会产生蛋白质的析出、且不会引起抗体固定金属颗粒的聚集的准确且展开速度快的检查试剂。

[0071] 另外,本发明提供一种试剂盒,其中,使用预先测定量的亚硝酸化合物与具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物接触混合时生成的亚硝酸,在提取革兰氏阳性菌、特别是溶链菌(A组至V组)的菌体的表面细胞壁所存在的群特异性的多糖体的同时提取腺病毒所存在的蛋白质,从而可以使用与固定在测试线上的各个抗体结合的标记来同时检查分别得自革兰氏阳性菌和腺病毒(简称为“Adv”)的抗原。

[0072] 此外,本发明实现了这样的作用效果,即,通过在其它试剂保持部(2)中含有环状寡糖,即使在试剂保持部中保持有具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物这样的有机化合物、且在生成亚硝酸的这样的条件下,例如采自呼吸道疾病患者的检体(特别是咽拭子、唾液、鼻涕、鼻拭子或痰等)即试样中的抗原(例如革兰氏阳性菌、特别是溶链菌等细菌、病毒)也不会发生变性或沉淀,可迅速、简便及高灵敏度地判定结果。附图简要说明

[0073] [图1]图1(a)及图1(b)是示出了本发明的免疫层析装置的图。图1(a)示出了免疫层析装置的立体透视图,图1(b)示出了免疫层析装置的平面图。

具体实施方式

[0074] 下面,对本发明详细地进行说明。

[0075] 本发明的实施方式基于以下免疫测定方法或应用它的检测方法:通过这样的抗原-抗体反应形成复合物,该反应为使附上了各种标记的、对于各种检体中的被检测物质即待检测物的抗原具有结合能力的检测试剂(抗体)与上述抗原的反应,并利用各种检测手段对复合物进行确认。作为与抗原最特异性地反应而结合的抗体,可以任意使用与其特异性结合的例如单克隆抗体及多克隆抗体或者其它的公知的抗体。

[0076] 以下,通过使用了层析介质的免疫层析法对本发明的免疫测定方法进行说明,但本发明并不限于免疫层析法。

[0077] 作为标记,可以任意使用酶、显色物质、荧光物质或放射性物质等,只要用于呈现出操作简单、测试时间也短这样的免疫层析法的特色且考虑抗体、抗原的种类进行确定即可。

[0078] 另外,检测手段的特征在于,为了表现操作简单、能以较短的时间判定这样的免疫层析法的特色,具有以目视判定能准确地判定这样的性能,在要求时间、精度等的情况下,可以使其带有分光光度检测、放射线检测等各种检测手段进行检测。

[0079] 依次对用于实施本发明的免疫测定法中可使用的检体稀释液(也称为“检体处理液”)、免疫测定用试剂、免疫测定方法、免疫层析检测方法、免疫层析试剂盒的最佳形态进行说明。

[0080] 本发明中的免疫测定用试剂为在免疫测定时使用的试剂,为使其包含在检体稀释液(也称为“检体处理液”、“检体提取液”)中使用和/或使其包含保持在试样滴加部(2)(也称为试剂保持部(2))中使用的试剂。然而,除此以外也可以使其包含保持在试剂保持部(3)(也称为“抗原提取部(3)”)、标记物质保持部(4)及层析介质(1)中的一个以上的部位。在使该试剂包含在检体稀释液中或者试样滴加部(2)的情况下,具备依次向试剂保持部(3)(抗原提取部)、标记物质保持部(4)、层析介质(1)及吸收部(5)移动及展开的性质。

[0081] 作为本发明中的免疫测定用试剂,在检体稀释液及试剂保持部(2)的至少任一者中单独地或同时地包含亚硝酸化合物。另外,在检体稀释液及试剂保持部(2)的至少任一者中单独地或同时地包含各亚硝酸化合物及环状寡糖。例如,作为该实施方式,可以举出如下形态。

[0082] 若对涉及含有本发明的亚硝酸化合物(简称为“亚化”)、进一步含有环状寡糖(简称为“环寡”)的成分和构成部位的形态详细且具体地进行例示,则可例示如下形态。对检体稀释液(检体处理液)(6)、试样滴加部(2)(试剂保持部(2))中分别含有亚化、亚化及/或环寡的化合物的可能的各实施方式(形态)进行例示。

[0083]	形态	检体稀释液(检体处理液)(6)	试样滴加部(2)
[0084]	1	亚化	无
[0085]	2	无	亚化
[0086]	3	亚化	亚化
[0087]	4	无	亚化、环寡
[0088]	5	亚化	环寡

[0089]	6	环寡	亚化
[0090]	7	亚化、环寡	无
[0091]	8	亚化、环寡	亚化、环寡
[0092]	9	亚化、环寡	亚化
[0093]	10	亚化	亚化、环寡
[0094]	11	环寡	亚化、环寡
[0095]	12	亚化、环寡	环寡

[0096] 可按照如上实施方式(形态)实施本发明。

[0097] 需要说明的是,该试样滴加部(2)(试剂保持部(2))的试剂状态包括溶液状的试剂以及利用冻干等保持在滴加垫中的状态的试剂。

[0098] 若对本发明所用的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物进行说明,则特别地作为其使用量,每次测定(一试剂盒)通常在0.05至100 μmol 的范围内,优选使用0.1至100 μmol ,更优选使用0.1至50 μmol ,进一步优选使用0.1至30 μmol ,最优选在1至15 μmol 的范围内使用。

[0099] 为了有效地产生亚硝酸,对于亚硝酸盐添加催化剂用量~少量的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物即为合理。然而,考虑到亚硝酸的产生状况,或者根据亚硝酸盐的种类,相对于0.05至100 μmol 的上述杂环化合物,亚硝酸盐在通常1 μmol 以上500 μmol 以下,优选在5至200 μmol ,更优选在10至100 μmol 这样范围的值下进行任意调整。

[0100] 特别地,对于亚硝酸,由于其在游离酸的状态下随着浓度的变高而引起自身氧化还原反应,因而通常在低浓度下使用,或者在低温下使亚硝酸盐为酸性而被制造。然而,在本发明中,通过使用催化剂用量~少量的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物,因而与使用了(例如)柠檬酸、醋酸等有机酸的情况相比,即使在常温下,反应也稳定且均一地理想化地进行,并以均一的既定浓度产生亚硝酸。

[0101] 由此可以期待这样的有利结果,即,非特异性显色的抑制、金属颗粒的分散性及稳定性得以确保,结果S/N比提高,目视判定也变得容易。当然,即使不是催化剂用量~少量的这样的量,而是过量地使用,也不会有丝毫障碍,但是不能期望成本效益并且是浪费的。

[0102] 本发明所使用的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物对于亚硝酸盐的具体的作用机理尚不确定,但是据推测,这些杂环化合物发挥了促进亚硝酸盐溶解于展开提取液或检体稀释液所含的水中并分解为亚硝酸和碱的催化作用。

[0103] 本发明中的亚硝酸盐是与特定的有机化合物接触并迅速地生成亚硝酸的物质,只要不会对检查设备上的检查造成不利影响的物质即可,没有特别的限制。例如,可列举出亚硝酸钠、亚硝酸钾、亚硝酸钙、亚硝酸镁、亚硝酸银、亚硝酸锌等,也可以使用这些的混合物。优选地,亚硝酸的碱金属盐是优选的,亚硝酸钠是最优选的。

[0104] 该免疫测定用试剂中所含的亚硝酸盐的含量为1至500 μmol /试验,优选为5至200 μmol /试验,更优选为10至100 μmol /试验。亚硝酸根(NO_2^-)有时以通常约0.5至4 $\mu\text{g/g}$ 的程度等少量包含于加工食品中,其在游离酸的状态下会有不稳定且容易分解的倾向,但是在本发

明的免疫测定方法中,由于是在测定现场产生亚硝酸并在短时间内进行检查的体系,因而可以非常有利地发挥亚硝酸的功能。

[0105] 若亚硝酸盐的含量为小于 $1\mu\text{mol}/\text{试验}$ 这样的较低的值,则由于亚硝酸的产生减少,因而显示出检查精度(S/N比)较低、判定时间延长、检查效率降低的倾向。另一方面,若大于 $500\mu\text{mol}/\text{试验}$,则由于所产生的亚硝酸本身成为高浓度,因而也必须考虑亚硝酸本身的氧化还原反应的问题及展开速度的影响,其结果是,表现出操作、S/N比、检查时间等均不优选的倾向。

[0106] 另外,对于本发明中的免疫测定用试剂所使用的、特别是检体稀释液及试样滴加部的任意一者或两者所使用的环状寡糖,免疫层析试剂盒的每个试剂盒的含量通常为0至 $20\mu\text{mol}/\text{试验}$,优选为0.1至 $5\mu\text{mol}/\text{试验}$,更优选为0.5至 $2\mu\text{mol}/\text{试验}$ 。

[0107] 即使不使用环状寡糖也不妨碍进行检查,但使用的话会显示出S/N比变高的倾向。然而,若为超过 $20\mu\text{mol}/\text{试验}$ 这样的比较高的含量,也没有据此示出S/N比变高这样的倾向,因此建议在约0.1至 $5\mu\text{mol}$ 的适当量下实施。

[0108] 作为本发明所使用的环状寡糖,只要是这样的寡糖即可,其具有D-葡萄糖和/或其衍生物利用 $\alpha(1\rightarrow4)$ 葡糖苷键连接成环状而成的结构,没有特别限定。

[0109] 具体而言,可列举出:环糊精类(例如 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精及羟基烷基化环糊精、磺烷基化环糊精、单氯三嗪基环糊精、团簇环糊精、改性团簇环糊精等(α -、 β -或 γ -)环糊精衍生物)以及约20至50个葡萄糖键合成环状的环状直链淀粉、月桂基化环状直链淀粉、环状直链淀粉的衍生产物即水溶性木聚糖(キシラン)等的环状葡聚糖。可以使用这些环糊精类或环状葡聚糖的混合物。

[0110] 上述当中,优选选自 β -环糊精及 γ -环糊精的至少1种(参照日本特开2012-188573号公报、日本特开2012-251789号公报)。

[0111] 环状寡糖类通常具有其环状结构的外部显示亲水性、其环状结构的内部显示疏水性(亲油性)这样的特异性的结构。源自于上述的特异性的结构,可以使环状寡糖类以包围小于环状结构的内径的亲油性分子的方式将其摄入并复合化。另外,已知即使为大于上述环状结构的内径的分子,只要具有小于环状结构的内径的亲油性部分,就将该部分摄入到环状寡糖类内部并复合化。

[0112] 在本发明中,有机化合物分子中的亲油性部位即烃官能团被摄入到环状寡糖内,可以抑制源自于试样中的被检测物质或其它的活体物质的蛋白质成分、或免疫层析试剂盒中的添加剂等中所含的蛋白质成分和有机化合物形成复合物,并可以抑制由于形成该复合物所引起的非特异性的反应及复合物的析出所导致的展开速度的降低及不展开等展开不良。

[0113] 特别优选本发明的免疫测定用试剂中存在的环状寡糖为 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精及它们的衍生物。

[0114] 作为本发明中的检体(检查试样),优选使用含有具有较厚的肽聚糖层的革兰氏阳性菌的试样。例如,可列举出:葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、杆菌、炭疽菌、蜡样芽胞杆菌、白喉棒状杆菌、利斯特菌、破伤风杆菌、肉毒杆菌及产气荚膜梭菌等。本发明的试剂盒更优选使用含有其中的球菌类即葡萄球菌、链球菌及肺炎球菌的试样,最优选使用链球菌。

[0115] 含有革兰氏阳性菌的试样不仅为唾液、鼻涕、鼻拭子、鼻腔抽吸液、痰、咽拭子、肺

	气泡(亚硝酸)	有	有	稍微有	无	无
[0125]	沉淀(酪蛋白)	有	稍微有	无	无	无

[0126] 由该分析结果可以判断,只要将亚硝酸和通用提取液的可共用的条件设为pH=6.5至7左右就可以应对。这样本发明为了提高抗原提取效率,对从通用提取液的方面考虑的对策和以下所示的试剂盒的构成的方面这两方面的改良进行研究。

[0127] 对于这些问题进一步进行讨论研究,其结果是,在本发明中,作为亚硝酸生成的pH条件且酪蛋白等这样的蛋白质及检体中所含的高粘性蛋白质等不析出的pH条件,pH为低于7.0至6.5,优选为低于7.0至6.6,最优选为低于7.0至6.8。

[0128] 若pH条件为7以上,则亚硝酸的生成减少,抗原的提取效率降低,因而检测灵敏度变低。相反地,若亚硝酸生成所导致的pH条件为小于6.5的酸性条件,虽然抗原的提取效率良好,但酪蛋白等这样的蛋白质及检体中所含的高粘性蛋白质会析出,因而无法进行检测。

[0129] 本发明的免疫层析试剂盒被设计为在中性至弱酸性条件下展开检体以生成亚硝酸。另外,被设计为可用其它的呼吸道感染症中已经使用的提取液进行检查。

[0130] 但是,由于提取液中所含的成分(酪蛋白)在弱酸性条件下析出,因此,存在展开不均匀这样的问题,为了解决该问题,本发明人等进行了加入各种化合物以抑制成分的析出的研究。其结果发现,在检测体系中,通过使(例如)亚硝酸盐含有部中或者检体稀释液中含有环状寡糖,可以抑制成分的析出,并可以提高展开的均匀性。

[0131] 为了适当地实施本发明,可以确认到在本发明中作为生成亚硝酸的条件优选在中性至弱酸性条件(pH=6.8)下展开,这为也可应对以呼吸道感染症中已经使用的提取液进行的检查的设计条件。

[0132] 但是,提取液中所含的成分(酪蛋白)在弱酸性条件下析出,因此存在展开不均匀的问题。为了抑制该成分的析出,对加入各种化合物来抑制成分的析出进行研究,结果发现,通过含有环糊精(CD)特别是代表性的 β -环糊精(β -CD)可以抑制成分的析出,并使展开的均匀性提高,将其发展趋势示于以下。注:BSA表示牛血清白蛋白、PEG表示聚乙二醇(PEG20000)、TH表示海藻糖。

	无添加	BSA	PEG	TH	β -CD	
[0133]	[展开均匀性]	稍微不均匀	不均匀	不均匀	稍微不均匀	均匀

[0134] 这些发展趋势可以确认,在环状寡糖中所包含的各种CD中显示出同样的发展趋势。

[0135] 作为本发明中使用的抗原提取液(即发挥作为试样提取液(检体稀释液)或展开提取液的作用的该提取液)的通用成分,可以使其含有亚硝酸化合物(亚硝酸盐等)、中和碱(氢氧化钠等)或缓冲液(TRIS等)。

[0136] 此外,为了抑制基于生物亲和性的副反应,可以使其含有具有抵消疏水键及电相互作用的效果的物质例如表面活性剂、铵盐、环状寡糖等糖类、pH缓冲剂,进一步为了抑制非特异性反应,可以使其含有各种添加剂,例如用于促进抗原抗体反应或者抑制非特异性反应的蛋白质或高分子化合物等。

[0137] 关于属于该环状寡糖范畴的各种化合物对展开液造成的影响及其行为,本发明人已经进行了分析并完成了验证。(参照日本特开2015-034719号公报)

[0138] 作为提取液体系中使用的化合物,只要是与亚硝酸化合物接触并生成亚硝酸且不在检查设备中存在的蛋白质等变性、析出的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物即可。

[0139] 优选地,使用具有选自由五元环或六元环的环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物。更优选地,使用具有五元环或六元环的环状酯及环状酰亚胺中的至少任一种骨架的杂环化合物。

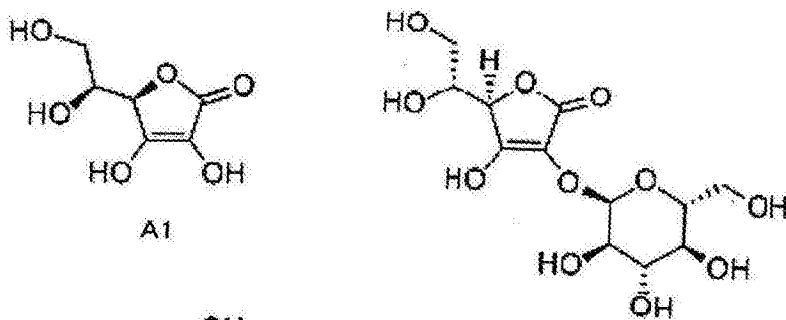
[0140] 作为具有五元环或六元环的环状酯骨架的杂环化合物,可列举出(例如)抗坏血酸(A1)、异抗坏血酸、脱氢乙酸、碳酸亚乙酯、2-O-(α -D-吡喃葡萄糖苷基)-L-抗坏血酸、2,3,7,8-四羟基[1]苯并吡喃并[5,4,3-cde][1]苯并吡喃-5,10-二酮二水合物(A3)等。

[0141] 上述当中,抗坏血酸、2-O-(α -D-吡喃葡萄糖苷基)-L-抗坏血酸(A2)、2,3,7,8-四羟基[1]苯并吡喃并[5,4,3-cde][1]苯并吡喃-5,10-二酮二水合物是最优选的。

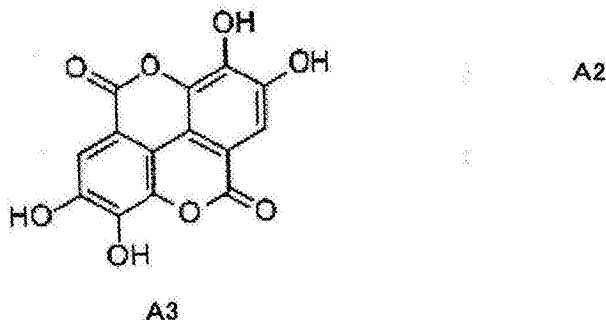
[0142] 在具有环状酯骨架的杂环化合物当中,优选为具有1~2个氧原子的五元环的化合物。

[0143] 若示出具有五元环或六元环的环状酯骨架的杂环化合物的代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0144] [化1]



[0145]



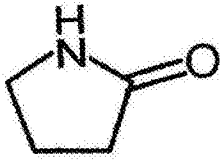
[0146] 作为具有五元环或六元环的环状酰胺骨架的杂环化合物,可列举出(例如) γ -丁内酰胺(B1)、N-羟基- γ -丁内酰胺、 δ -戊内酰胺(B2)、N-羟基- δ -戊内酰胺、以及对其羟基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物等。

[0147] 对于具有环状酰胺骨架的杂环化合物以及具有环状酰亚胺骨架的杂环化合物,具有1~3个N原子的五元环或六元环的化合物是优选的。

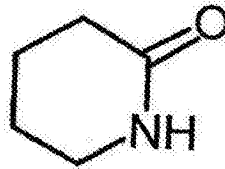
[0148] 若示出具有五元环或六元环的环状酰胺骨架的杂环化合物的代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0149] [化2]

[0150]



B1

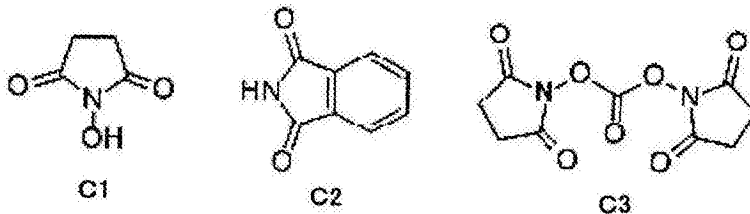


B2

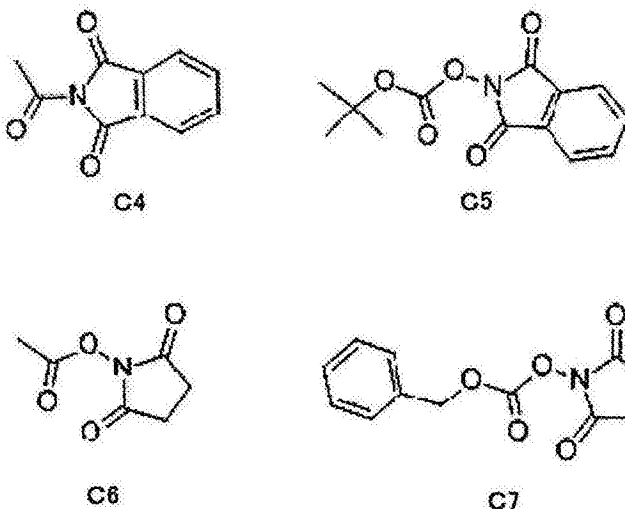
[0151] 在具有五元环或六元环的环状酰胺以及环状酰亚胺的骨架的杂环化合物当中,作为具有五元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物,包括具有1个N作为杂原子的杂环化合物。例如,可列举出N-羟基琥珀酰亚胺(C1)、N-乙酰氧基琥珀酰亚胺、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯、N-苄氧羰基氧基琥珀酰亚胺、N-羟基马来酰亚胺、以及对其羟基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物、邻苯二甲酰亚胺(C2)、N-羟基邻苯二甲酰亚胺、N-乙酰基邻苯二甲酰亚胺(C4)、N-(叔丁氧基羰基氧基)邻苯二甲酰亚胺(C5)、N-羟基六氢邻苯二甲酰亚胺、N,N'-二羟基环己烷四羧酸二酰亚胺、以及对其羟基导入了保护基(同上)而得的化合物、N-甲基马来酰亚胺、N-甲氧基羰基马来酰亚胺、N-马来酰亚胺丁酸、以及对其甲基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物,上述当中,N-羟基琥珀酰亚胺、N-乙酰氧基琥珀酰亚胺(C6)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(C3)、N-苄氧羰基氧基琥珀酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、N-乙酰基邻苯二甲酰亚胺、N-(叔丁氧基羰基氧基)邻苯二甲酰亚胺被认为是最优选的,N-乙酰氧基琥珀酰亚胺(C6)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(C3)是最适当的。

[0152] 若示出具有含有1个N作为杂原子的五元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物的代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0153] [化3]



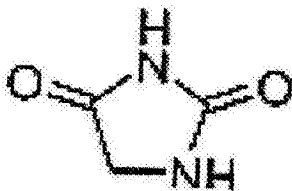
[0154]



[0155] 作为具有含有2个N作为杂原子的五元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物,可列举出具有乙内酰脲骨架的化合物,例如,乙内酰脲(D1)、3-羟基乙内酰脲、1,3-二羟基乙内酰脲、3-羟基-1-甲基乙内酰脲、以及对这些羟基导入了保护基(同上)而得的化合物,上述当中,最优选使用乙内酰脲。

[0156] 若示出具有含有2个N作为杂原子的五元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物的代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0157] [化4]

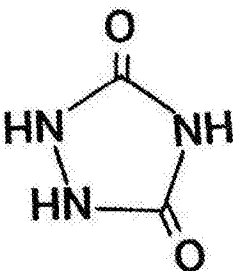


[0158]

D1

[0159] 作为具有含有3个N作为杂原子的五元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物,可列举出1,2,4-三唑烷-3,5-二酮(E1)、4-羟基-1,2,4-三唑烷-3,5-二酮、4-羟基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮、以及对其羟基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物等。若示出具有含有3个N作为杂原子的五元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物的代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0160] [化5]



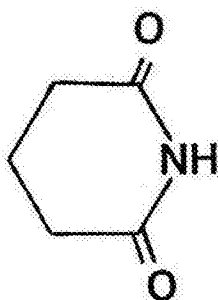
[0161]

E1

[0162] 作为具有六元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物,可列举出具有1个N作为杂原子的化合物,例如,戊二酰亚胺(F1)、N-羟基戊二酰亚胺、N-羟基萘二甲酰亚胺、N,N'-二羟基-1,8,4,5-萘四甲酸二酰亚胺、N-羟基-1,8-十氢化萘二羧酸酰亚胺、N,N'-二羟基-1,8,4,5-十氢化萘四羧酸二酰亚胺、以及对其羟基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物等。上述当中,戊二酰亚胺是最优选的。若示出其代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0163] [化6]

[0164]

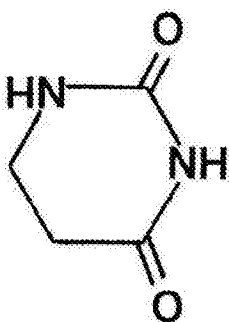


F1

[0165] 作为具有含有2个N作为杂原子的六元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物,可列举出(例如)六氢-1,3-二嗪-2,4-二酮(G1)、六氢-3-羟基-1,3-二嗪-2,4-二酮、六氢-1,3-二羟基-1,3-二嗪-2,4-二酮、六氢-1-羟基-1,3-二嗪-2,4,6-三酮、尿嘧啶、3-羟基-尿嘧啶、以及对其羟基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物等。若示出其代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0166] [化7]

[0167]

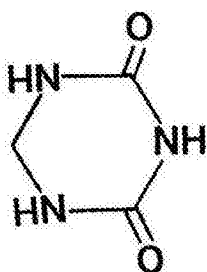


G1

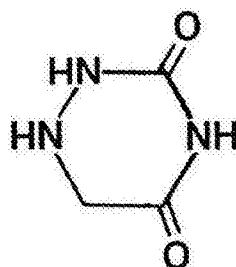
[0168] 作为具有含有3个N作为杂原子的六元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物,可列举出(例如)六氢-1,2,4-三嗪-3,5-二酮(H2)、六氢-4-羟基-1,2,4-三嗪-3,5-二酮、以及对其羟基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物等,另外,可列举出六氢-1,3,5-三嗪-2,6-二酮(H1)、六氢-1-羟基-1,3,5-三嗪-2,6-二酮、六氢-1-羟基-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮、六氢-1,3,5-三羟基-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮、以及对其羟基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物等。若示出其代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0169] [化8]

[0170]



H1

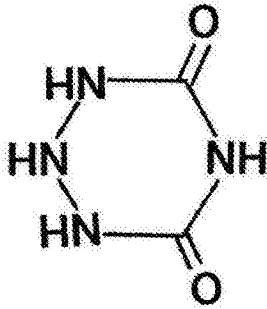


H2

[0171] 作为具有含有4个N作为杂原子的六元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物,可列举

出(例如)六氢-1,2,3,5-四嗪-4,6-二酮(I1)、六氢-5-羟基-1,2,3,5-四嗪-4,6-二酮、以及对其羟基导入了保护基(酰基、磺酰基、硫酸酯基、磷酸酯基等)而得的化合物等。若示出其代表性物质的化学结构式,则可以例示出如下所示的化合物。

[0172] [化9]



[0173]

I1

[0174] 本发明人等使免疫层析试剂盒的2种样品垫分别含浸亚硝酸钠及柠檬酸并进行研究,其结果发现,虽然可以实现操作的简化、测定再现性的提高,但是当含浸的柠檬酸的量增加时,发生非特异性显色,并且提取效率存在问题。为了解决该问题,首先将抗体固定化金胶体、亚硝酸钠与多种有机酸或有机化合物混合以制造金纳米颗粒分散液,对于亚硝酸的生成程度和颗粒的分散性进行目视评价。其结果示于表1。

[0175] 当目视评价亚硝酸气体的生成程度时,可如下所示地进行判别。

[0176] -:通过目视判定无法确认生成。

[0177] +:可以略微地确认生成。

[0178] ++:可以明确地确认生成。

[0179] +++:可以确认大量的生成。

[0180] [表1]

[0181]

	柠檬酸	衣康酸	天冬氨酸	谷氨酸	抗坏血酸	N-羟基琥珀酰亚胺
亚硝酸气体	+++	++	++	++	++	++
Au胶体分散性	聚集	聚集	聚集	聚集	分散	轻微聚集

[0182] 从[表1]的结果可明显看出,当柠檬酸等主要有机酸以一定量以上的方式存在时,过量的有机酸吸附于金胶体,因此,虽然其作用机制尚不清楚,但可知会产生聚集。其中,虽然柠檬酸是具有1个羟基的弱酸,但由于其具有3个羧基,因而具有生成大量亚硝酸气体的优点,另一方面,由于已知其有与金属离子形成螯合配合物的性质,因此,也可以认为,基于其性质,其与金胶体形成配合物从而产生聚集。

[0183] 不管如何,可知与其他有机酸相比,抗坏血酸在生成亚硝酸之后也难以使金胶体聚集。同时可知,对于N-羟基琥珀酰亚胺而言,虽然不像抗坏血酸那样,但是若与其他的有机酸相比,为在生成亚硝酸之后使金胶体轻微聚集的程度,聚集难以发生。

[0184] 根据上述结果,分别使亚硝酸钠含浸到试样滴加部(2)、使柠檬酸及抗坏血酸含浸到试剂保持部(3),并试制了溶链菌检查用的免疫层析试剂盒。使用试制的试剂盒,检查阴性检体(提取液)、阳性检体(灭活抗原 2×10^6 org/mL),并目视评价滴加5分钟后的测试线。其结果示于[表2]。

[0185] [表2]

	柠檬酸	抗坏血酸
[0186] 提取液	-	-
灭活抗原 (2×10^6 org/mL)	+	++

[0187] 从[表2]的结果可明显看出,相比于使用了柠檬酸的体系,使用了抗坏血酸的体系的测试线更深地显色。

[0188] 作为本发明中的保持在有机化合物含有抗原提取部(试剂保持部(3))中的提取液体系中所使用的有机化合物,为与亚硝酸盐发生接触反应并生成亚硝酸的化合物,而且为不使在检查设备中存在的蛋白质等变性、析出的具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物。

[0189] 以摩尔比计,具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物与亚硝酸盐的使用比例在0.05~100:1~500的范围内。

[0190] 对于具有选自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物,每次测定(一试剂盒)优选使用0.1~100 μ mol,更优选使用0.1~50 μ mol,进一步优选使用0.1~30 μ mol,最适宜在1~15 μ mol的范围内使用。对于亚硝酸盐,每次测定(一试剂盒)最优选使用10~100 μ mol。

[0191] 当在本发明中使用环状寡糖时,其可以包含在免疫层析用试样提取液(以下也称为“展开提取液”)或检体稀释液(以下也称为“检体处理液”)中,也可以包含在免疫层析试剂盒中的其它的试剂保持部(2)中,或可以包含在它们两者中,只要可发挥环状寡糖的功能,就可以包含在任何位置,从功能方面考虑,优选包含在展开初期阶段的检体处理液或者展开上游部中。

[0192] 作为用于使用本发明的免疫层析试剂盒检测检体中的革兰氏阳性菌的免疫测定方法,其包括以下工序:(i)将检体与含有缓冲液及表面活性剂的检体稀释液接触混合从而制作检体稀释液混合物的工序、(ii)将检体处理液混合物供给到试样滴加部的工序、(iii)将检体处理液混合物在免疫层析介质上展开,利用通过抗原提取部中存在的有机化合物和亚硝酸化合物的反应而在介质上生成的亚硝酸提取革兰氏阳性菌中的抗原的工序、(iv)在标记物质保持部中标记抗原的工序、及(v)在层析介质上移动并在检测部中检测标记化抗原的工序、(vi)利用吸收部吸收检体处理液混合物的工序。

[0193] 作为可用于本发明的免疫层析用检体稀释液或免疫层析试剂盒的试剂中的非离子性表面活性剂,可列举出:聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯/聚氧丙烯烷基醚、聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯(商品名“Tween”系列)、聚氧乙烯对叔辛基苯基醚(商品名“Triton”系列)、聚氧乙烯对叔壬基苯基醚(商品名“TritonN”系列)、烷基聚葡萄糖苷、脂肪酸二乙醇酰胺、烷基单缩水甘油醚等。另外,也可在不带来不良影响的范围内配合使用非离子性表面活性剂以外的离子性表面活性剂等。

[0194] 特别地,对于本发明的免疫层析试剂盒中的含有机化合物的抗原提取部而言,为了使展开变得均匀需要表面活性剂,但可知通过使其含有表面活性剂会使抗原提取部的保存稳定性变差。

[0195] 为了解决该问题,制作了具有含有多种表面活性剂的抗原提取部的试剂,并进行

严酷的试验(80℃,12小时),结果可知,优选聚氧乙烯对叔辛基苯基醚(商品名“Triton”系列),例如聚氧乙烯(10)-对叔辛基苯基醚(TritonX-100(商品名),HLB=13.5)、“TritonX-114”(商品名)(HLB=12.4)、聚氧乙烯对叔壬基苯基醚(商品名“TritonN”系列)。最优选为聚氧乙烯(10)-对叔辛基苯基醚(TritonX-100(商品名))。

[0196] 作为本发明的检体稀释液或免疫层析用试剂中使用的非离子性表面活性剂的含量,为0.01至10重量%的范围,可以优选使其以0.05至5重量%的范围包含在免疫层析用试剂中。

[0197] 若小于0.01重量%,例如在0.005重量%下,无法进行准确的判定。若小于0.05重量%,则显示出无法抑制非特异性反应并且准确的判定会略微地变得困难的倾向。若为10重量%以上,例如12重量%、18重量%,其为必要以上的浓度,不仅不会给非特异性反应的抑制带来优选的影响,而且在技术上没有意义,不经济并造成浪费。

[0198] 作为本发明的提取展开液、检体处理液等免疫层析用试剂中所使用的盐,作为代表性的盐,可列举出:氯化钠、氯化钾、氯化钙及氯化镁等。优选为氯化钠。

[0199] 作为本发明的提取展开液等免疫层析用试剂中所使用的盐的浓度,通常为1mM至500mM的范围,优选5mM至200mM的范围,更优选10mM至50mM的范围。

[0200] 若浓度低于1mM,例如当低至0.1mM时,则蛋白质的提取作用变得不充分。若为500mM以上,例如当增多至1M、2M时,其为技术上没有意义的量,为必要以上的浓度,不经济并造成浪费。

[0201] 作为本发明的免疫层析用试剂中所使用的盐,可以仅为1种,也可以配合使用2种以上。

[0202] 作为本发明的提取展开液中可使用的缓冲剂,只要为具有以下作用(缓冲作用)的物质即可,即,即使试样的添加或试样的蒸发及稀释导致浓度变化、混入来自外部的一些异物也不产生致命的影响,没有特别的限制。

[0203] 在本发明中,作为缓冲剂,可列举出(例如)磷酸缓冲液(磷酸+磷酸钠)、醋酸缓冲液(醋酸+醋酸钠)、柠檬酸缓冲液(柠檬酸+柠檬酸钠)、硼酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液(三(羟甲基)氨基甲烷+盐酸)、TE缓冲液(Tris+乙二胺四乙酸)、TAE缓冲液(Tris+醋酸+乙二胺四乙酸)、TBE缓冲液(Tris+硼酸+乙二胺四乙酸)或HEPES缓冲液(2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸)、Bicine缓冲液(N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸缓冲剂)等。

[0204] 优选为磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液及醋酸缓冲液等,更优选为Tris-盐酸缓冲液。在本发明的免疫层析检测体系中,只要在不带来不良影响的范围也可使用2种以上的缓冲剂,没有任何限制。

[0205] 作为本发明中使用的缓冲剂的浓度,优选10至500mM的范围,更优选10至300mM的范围,进一步优选30至100mM的范围。若浓度低于10mM,则缓冲作用不充分,蛋白质成分的析出抑制及标记颗粒的聚集抑制也不充分。若为500mM以上,则为必要以上的浓度,不经济并造成浪费。另外,作为缓冲液,最优选制作pH范围7.1至9.8的缓冲液。

[0206] 在本发明的免疫层析用试剂中,添加并使用可抑制基于生物亲和性的副反应或抑制非特异性反应的公知的添加剂,例如用于促进抗原抗体反应或者抑制非特异性反应的蛋白质(例如牛血清白蛋白、明胶及酪蛋白等)、高分子化合物(例如聚乙二醇、甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇及右旋糖苷等)、离子性表面活性剂或聚阴离子(例如右旋糖苷

硫酸、肝素、聚苯乙烯磺酸、硫酸软骨素等)、或抗菌剂等的1种或者2种以上也是可以且有效的,没有任何妨碍。

[0207] 另外,将这些用于促进抗原抗体反应或者抑制非特异性反应的蛋白质、高分子化合物、离子性表面活性剂或聚阴离子或抗菌剂等的1种或者2种以上保持在构成固定相的层析介质上的流动相的移动路径上也是可以且有效的,没有任何妨碍。

[0208] 作为本发明的免疫层析用试剂组合中含有的上述添加剂的浓度,优选0.01至20重量%的范围,更优选0.1至10重量%的范围,进一步优选0.5至5重量%的范围。若小于0.01重量%,则无法抑制非特异性反应并且不能进行准确的判定。若超过20重量%,则为必要以上的浓度,不经济并造成浪费。

[0209] 作为本发明的免疫层析用试剂的使用方法,可以最适当以展开液的形式使用,另外,也可以优选以检体试样的稀释液的形式使用。此外,不限于上述的使用方法,也可以以将免疫层析用试剂的成分设在免疫层析介质上的流动相的移动路径上的形式来使用。

[0210] 在以展开液或稀释液的形式使用的情况下,通常使用水作为溶剂,在其中加入缓冲液、蛋白质、盐及非离子性表面活性剂。加入的顺序没有特别限定,即使同时加入也没问题。在以展开液或稀释液的形式使用的情况下,可以将检测试样(检体)和该液预先进行混合而成的物质供给、滴加到试样滴加部上使其展开,也可以先将试样(检体)供给、滴加到样品垫(试样滴加部)上后,再将展开液供给、滴加到试样滴加部上使其展开。

[0211] 在将本发明的免疫层析用试剂设在免疫层析介质上的流动相的移动路径上使用的情况下,作为其方法,可以设为(例如)以下形态,即,利用使其涂布或含浸于免疫层析装置中的试样滴加部中以后使之干燥的方法使其担载或保持在试样滴加部中。

[0212] 作为将本发明的免疫层析用试剂保持或担载在免疫层析介质上的其它的形态,可以在试样滴加部的端部和吸收部之间的任意的场所设置添加剂(试剂)保持部以成为使其保持在其中的形态。例如也可以设在试样滴加部、标记物质保持部及免疫层析介质上。

[0213] 作为本发明的待检测物,只要为存在或可制造与其特异性结合的(例如以抗原-抗体反应的方式特异性结合的)物质的待检测物即可,没有特别限定。待检测物可以为完全抗原这样的其自身具有抗原性的物质,或也可以为半抗原(不完全抗原)这样的即使其自身不具有抗原性也通过制成化学改性产物从而具有抗原性的物质。只要存在或可制造与这些待检测物特异性结合的物质即可,可以制成单克隆抗体或多克隆抗体。

[0214] 作为本发明的待检测物,为可利用生成的亚硝酸进行提取这样的对待检测物而言特异性的多糖体抗原。若例示,则可以举出具有较厚的肽聚糖层的革兰氏阳性菌,其中,优选球菌类,作为特别优选的物质,可列举出溶链菌抗原等细菌抗原。

[0215] 本发明的优选的检体为鼻涕、鼻拭子、咽拭子或痰。使用本发明的检体稀释液预先对这些检体进行稀释处理,供给到检测设备上进行提取,由此,可以将采自呼吸道疾病患者等的溶链菌抗原作为被检测物质准确地检测。

[0216] 本发明的免疫层析试剂盒为这样的免疫层析试剂盒,其由检体稀释液(检体处理液)和包括试样滴加部、抗原提取部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质及吸收部的免疫层析装置构成,并用于检测试样中的革兰氏阳性菌。

[0217] 在上述免疫层析试剂盒中,使检体稀释液和试样滴加部中的任一者或两者中单独地或同时地含有亚硝酸盐及/或环状寡糖,由此成为含有亚硝酸盐、或亚硝酸盐及环状寡糖

的试剂盒。

[0218] 另外,上述免疫层析试剂盒为具备抗原提取部的免疫层析试剂盒,在该抗原提取部,通过该亚硝酸盐和抗原提取部中所保持的具有选自环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物的接触反应而生成亚硝酸。

[0219] 对该免疫层析试剂盒而言,每免疫层析试剂盒的一个试剂盒可以含有0至20 μ g的环状寡糖。其为这样的免疫层析试剂盒,其中构成该试剂盒的试样滴加部(2)及抗原提取部(3)被配置成位于标记物质保持部(4)的试剂展开方向上游。

[0220] 用于检测检体中的被检测物质的免疫层析试剂盒的结构及操作、检测方法为公知的。

[0221] 可以向现有的免疫层析试剂盒的试样滴加部中滴加使用本发明的检体处理液预先对检体进行稀释处理所得到的检体试样,使其在免疫层析介质上向吸收部的方向展开并在展开中提取检体中的抗原,并利用抗原抗体反应进行检体中的被检测物质的鉴定、定量等的检查。

[0222] 下面,对免疫层析试剂盒进行说明。

[0223] 通常,免疫层析试剂盒由免疫层析装置(也称为“Immuno层析装置”)和试样提取液(6)构成,该免疫层析装置包括层析介质(1)(具有“检测部(判定部)”)、试样滴加部(2)(也称为“样品垫”、“试剂保持部(2)”)、含有机化合物的抗原提取部(3)(也称为“试剂保持部(3)”,或简称为“抗原提取部”)、标记物质保持部(4)、吸收部(5)(也称为“展开速度控制部”)以及衬片(7)。

[0224] 以下,对免疫层析装置进行说明。

[0225] 图1(a)、(b)显示了在合理地实施所谓的免疫层析检测方法(在免疫层析介质上实施本发明的免疫层析用试剂的成分)中,特别是为了提高抗原提取效率而设计的装置的结构。基于该图1(a)、(b)进行说明。

[0226] 图1(a)、(b)所示的装置的结构构成要素由以下部分构成:1:层析介质(1)、2:试剂保持部(2)(也可以总称为样品垫。)、3:试剂保持部(3)(可以总称为含有机化合物的抗原提取部。或者也简称为抗原提取部)、4:标记物质保持部(4)(可以总称为结合垫。)、5:吸收部(5)及7:衬片(7)。本发明中的免疫层析装置具有至少由该1至5的各要素构成的结构。

[0227] 另外,本发明认识到这样的构成要素的排列顺序影响性能,以下述的两点对构成该结构的要素的排列和展开的作用依次进行比较并例示,如下所述:

[0228]	本发明的结构(1)	2	3	4	1	5	展开良好
	比较对象结构(2)	3	2	4	1	5	展开不良

[0229] 若任意地改变该1至5的构成要素的位置,则特别是对展开作用这样的举动造成影响,在它们的构成要素的组合中,本发明的图1(a)、(b)中所示这样的要素组合的展开顺序为最优选的形式,在一些展开性等没有问题的情况下,也可以设为改变构成要素的顺序而成的结构。

[0230] 另一方面,免疫层析装置基本上为由图1(a)、图1(b)所示的构成要素构成的检查工具,但特别是若省略“3:试剂保持部(3)”的要素部分,则此时亚硝酸的用时制备繁琐,妨碍顺利地检查。

[0231] 这样地,本发明人等认识到图1(a)、图1(b)所示的免疫层析装置在检查的性能及检查上的可操作性方面起到特别的功能。

[0232] 试样滴加部(2)及试剂保持部(3)可迅速地吸收试样,由保持力弱、试样快速向反应部移动这样的性质的玻璃滤纸等多孔片材构成。

[0233] 可以在试样滴加部(2)中含有与试剂保持部(3)中所含有的有机化合物反应生成亚硝酸的亚硝酸盐,亚硝酸盐可以包含在检体稀释液中而不是包含在此处,或可以使其包含在它们两者中。为了有效地起作用,只要是含有有机化合物的部位的展开上游部位,就可以含有亚硝酸盐。

[0234] 可以在检体稀释液中含有环状寡糖,环状寡糖也可以包含在试样滴加部(2)而不是包含在此处,或可以使其包含在它们两者中。为了有效地起作用,只要是含有有机化合物的部位的展开上游部位,就可以含有亚硝酸盐。

[0235] 从起到作为抗原提取部的功能的方面考虑,试剂保持部(3)含有由抗坏血酸及/或N-羟基琥珀酰亚胺构成的有机化合物,另外,为了使展开变得均匀,使其含有非离子性表面活性剂TritonX-100(商品名)或TritonX-114(商品名)。保存稳定性也提高了。

[0236] 标记物质保持部(4)是保持通过标记成分标记试剂成分的标记试剂而成的。作为标记成分,包括金属颗粒、乳胶颗粒、酶及荧光化合物等,其中,最优选金属颗粒。上述当中,特别优选金属纳米颗粒载体。作为试剂成分,包括具有识别分析物的能力的颗粒或分子,优选为单克隆抗体或者多克隆抗体或其片段(第二试剂)。

[0237] 所谓金属颗粒,(例如)可任意优选使用金、银、铂、镉、铈及钡这样的贵金属的单颗粒或复合颗粒。特别是金对色相的变化很敏感,最适合。

[0238] 若观察金属颗粒的状态,则平均粒径为1至500nm,优选为10至250nm,更优选为35至100nm左右,另外,优选使用相对于介质以0.0001至0.08重量%、优选0.002至0.06重量%左右的浓度包含的金属颗粒。

[0239] 本发明的金属纳米颗粒是指具有这样的平均粒径的金属纳米直径的各种金属颗粒。在免疫学测定中,考虑该金属粒径、粒度分布及色调等,制成在金属颗粒的表面负载铂颗粒而成的金属复合颗粒,由此可以制成免疫学测定用的标记,可以用于提高作为蛋白质的染色剂的有用性。进而,若使用金属标记扩增剂(其具有与可键合到金属颗粒表面的官能团和抗体可键合的反应基团)这样的所谓的增感剂,则可以提高测定灵敏度。

[0240] 层析介质(1)为在膜载体上制作了检测部的介质。作为膜载体,只要为可以利用毛细管现象吸收试样检体使其移动的物质即可,没有特别限定。例如选自硝基纤维素、醋酸纤维素、尼龙、聚醚砜、聚乙烯醇、聚酯、玻璃纤维、聚烯烃、纤维素及由这些混合纤维构成的人工聚合物构成的组。

[0241] 在检测部中,单克隆抗体或者多克隆抗体或其片段(第一试剂)负载固定于硝基纤维素的片材上。

[0242] 吸收部(5)通用由具有迅速地吸收过量的试样的能力的材料即玻璃纤维、纤维素纤维等构成的滤纸,若使用具有进一步保持吸收的液体不逆流的能力的材料,则更优选(日本特开2012-189346号公报)。

[0243] 衬片(7)为基材。通过在单面涂布粘结剂或贴付胶带而使单面具有粘结性,并在该粘结面上密合设有试样滴加部(2)、抗原提取部(3)、标记物质保持部(4)、具有检测部的层

析介质(1)、以及吸收部(5)的一部分或全部。衬片(7)只要为因粘结剂而相对于试样液具有不透过性、非透湿性这样的物质即可,作为基材没有特别限定。

[0244] 关于检测部所用的检测试剂(第一试剂)及标记试剂所用的检测试剂(第二试剂),其对于检体中的待检测物的抗原具有结合能力。例如,可列举出抗体。当检测试剂为抗体时,检测部所用的检测试剂(第一试剂)及标记试剂所用的检测试剂(第二试剂)的一者或两者可以为单克隆抗体,也可以为多克隆抗体。

[0245] 单克隆抗体及多克隆抗体或者其片段为公知的,容易获得,可以利用公知的方法调整。作为抗体产生动物种类,例如为人、小鼠、大鼠、兔子、山羊及马等。优选为由选自兔子、山羊及小鼠的至少一种以上的动物种类而来的抗体。作为免疫球蛋白,可以为IgG、IgM、IgA、IgE及IgD中的任一者。

[0246] 在本发明的实施例中,记载了使用源自于兔子的抗溶链菌多克隆抗体作为标记试剂所用的试剂成分(第二试剂)的情况、另外使用源自于兔子的抗溶链菌单克隆抗体作为检测部位所用的试剂成分(第一试剂)的情况,但并不限于此。也可以在两者中使用源自于兔子的抗溶链菌多克隆抗体或源自于兔子的抗溶链菌单克隆抗体。

[0247] 下面,对典型的试剂盒构成中的判定的原理进行概括说明:

[0248] 1.将规定量(通常0.1至2mI)的检体稀释液混合物滴加到试样滴加部(2)上,该检体稀释液混合物是将检体(试样)用检体稀释液(6)稀释处理而得到的。若滴加检体稀释液混合物,则检体稀释液混合物迅速被试样滴加部(2)吸收,立即开始移动。另外,试样滴加部(2)中所干燥保持的含有亚硝酸盐、或亚硝酸盐及环糊精的试剂组合物溶解于检体稀释液混合物的水分中,并与检体(试样)一同开始移动。

[0249] 2.溶解含有亚硝酸盐的检体稀释液混合物首先向抗原提取部(3)移动。在此抗原提取部(3)中所干燥保持的有机化合物与溶解在移动的检体稀释液混合物中的亚硝酸盐接触反应并生成亚硝酸。该亚硝酸在检体(试样)中存在溶链菌的情况下提取该菌体表面的多糖体。

[0250] 3.接着,生成含有亚硝酸的检体稀释液混合物向标记物质保持部(4)均匀且顺利地移动。检体稀释液混合物通过此处时,标记物质保持部(4)中所保持的标记试剂(第二试剂)溶解于检体稀释液混合物的水分中,与检体(试样)一同移动。

[0251] 4.接下来,溶解于检体稀释液混合物的水分中的标记试剂通过层析介质(1)上的检测部位。在此,利用检体稀释液混合物中溶解的免疫层析用试剂组合物抑制非特异性结合反应,并利用抗原-抗体的特异性结合反应,在检体稀释液混合物中存在被检测物质(例如多糖体)的情况下,通过检测部位中所负载固定的抗体和标记试剂以夹持为三明治状的方式特异性地反应结合,而使检测部着色。在检体试样中不存在被检测物质(例如多糖体)的情况下,溶解于检体稀释液混合物的水分中的标记试剂即使通过层析介质(1)上的检测部也不引起特异性结合反应,因此,检测部位未着色。

[0252] 5.最后,检体稀释液混合物的水分向吸收部(5)移动。

[0253] 这样可以准确地判定检体(试样)中是否存在被检测物质(例如多糖体)。

[0254] 实施例

[0255] 下面,举出实施例对本发明的有效性进行说明,但本发明并不限于这些实施例。本发明为这样的免疫层析试剂盒,其具有含有亚硝酸钠的试样滴加部(2)以及含有抗坏血

酸(其为属于具有五元环或六元环的环状酯骨架的杂环化合物范畴的代用化合物)的抗原提取部(3),且具有由用于优化提取效率的展开速度控制部件(吸水量80-200mg/cm²)构成的吸收部(5)。

[0256] [实施例1]

[0257] (1)层析介质(1)上的检测部的制作

[0258] 使用由硝基纤维素构成的片材(シボア社制、商品名:HF120、250mm×25mm)作为膜。用含有5质量%的异丙醇的10mM的磷酸缓冲液(pH7.4)将源自于兔子的抗溶链菌单克隆抗体(第一抗体)稀释为1.0mg/mL的浓度,利用抗体涂布机(BioDot公司制)将该稀释的溶液150μL以1mm的宽度涂布在膜上,在50℃下干燥30分钟,在室温下干燥一晚,从而在层析介质(1)上制作了检测部。

[0259] (2)标记物质溶液的制作

[0260] 在金胶体悬浊液(田中贵金属工业公司制:平均粒径40nm)0.5mL中加入用磷酸缓冲液(pH7.4)稀释成0.1mg/mL的浓度的源自于兔子的抗溶链菌多克隆抗体(第二抗体)抗体0.1mL,在室温下静置10分钟。接着,加入含有10质量%的牛血清白蛋白的磷酸缓冲液(pH7.4)0.1mL,充分搅拌后,以8000×g进行离心分离15分钟,除去上清液后,加入含有1质量%的牛血清白蛋白的磷酸缓冲液(pH7.4)0.1mL,制作了标记物质溶液。

[0261] (3)含有亚硝酸钠及环状寡糖的试剂保持部(2)的制作

[0262] 在12×100mm的玻璃纤维结合垫(メルク社制)上涂布包含1mmol的亚硝酸钠的含2μmol的β-环糊精的水溶液0.6mL,冻干,制作了试剂保持部(2)。

[0263] (4)含有抗坏血酸的试剂保持部(3)的制作

[0264] 在12×100mm的玻璃纤维结合垫(メルク社制)上涂布含有50μmol的抗坏血酸的1.7质量%的非离子性表面活性剂Triton-X100水溶液0.6mL,冻干,制作了试剂保持部(3)。

[0265] (5)免疫层析用试验片的制作

[0266] 在上述制作的标记物质溶液200μL中加入100μL的25质量%海藻糖水溶液和80μL的含有5质量%的酪蛋白(最终浓度:1质量%)的磷酸缓冲液(pH9.0),将所得物均匀地添加到12×100mm的玻璃纤维垫(シボア社制)上后,通过真空干燥机干燥,制作了标记物质保持部(4)。接着,自免疫层析展开方向上游以表1所示的顺序(展开方向自右向左),在由衬片制成的基材上贴合用于吸收展开的试样及标记物质的吸收部(5)、上述制作的具有判定部的层析介质(1)、标记物质保持部(4)、试剂保持部(2)、试剂保持部(3)。然后,用剪切机以宽度为5mm的方式进行剪切,制成了免疫层析用试验片。

[0267] (6)检体稀释液的制作

[0268] 对由含有0.5质量%的Tween20、0.6质量%聚乙烯基吡咯烷酮(平均分子量36万)、1质量%的牛血清白蛋白和150mM氯化钠的20mM的Tris缓冲溶液(pH8.0)制成的检体进行稀释,制成了用于添加到免疫层析试验片中并展开的检体稀释液。

[0269] (7)测定

[0270] 使用上述制作的免疫层析用试验片及检体稀释液以下述的方法对检体中的抗原即溶链菌是否存在进行测定。即,将不加入抗原的检体稀释液设为阴性检体试样,另外,将在阴性检体试样中以成为 2×10^6 org/mL的方式加入失活的A组β溶血性链球菌(溶链菌)而成的物质设为阳性检体试样。

[0271] 将均为150 μ L的阴性检体试样、阳性检体试样添加到免疫层析用试验片的展开方向的最上游部,具体而言,实施例1、2中添加到试剂保持部(2)上,比较例1、2中添加到试剂保持部(3)上,比较例3及实施例3中添加到标记物质保持部(4)上,使其展开,15分钟后进行目视判定。将可确认到测试线的红线的情况设为“+”,将可鲜明地确认的情况设为“++”,将可确认到红线但颜色非常淡的情况设为“ \pm ”,将无法确认到红线的情况设为“-”。对展开性的评价而言,将展开液在层析介质上不流动的情况、虽然展开液在层析介质上展开但标记试剂不流动的情况、在层析介质上展开中的液体的前端流动形状产生不均的情况判定为展开不良,将没有不良的情况判定为良好。将结果示于表3。

[0272] 以下述的检查条件下实施。

[0273] 阳性:4 $\times 10^5$ org/mL溶链菌(判定时间8分钟)

[0274] 阴性:展开液(判定时间30分钟)

[0275] [表3]

	贴合顺序* (自展开方向上游)	阳性检体抗原量	展开性判定	判定
[0276]	实施例 1	2 $\times 10^6$ org/mL	良好	+
	实施例 2		良好	+
	比较例 1		不良	
	比较例 2		不良	
	比较例 3		不良	
	实施例 3		良好	+

[0277] 表中,1至5的数字表示:1;层析介质(1)、2;试样保持部(2)、3;试剂保持部(3)、4;标记物质保持部(4)、5;吸收部(5)。

[0278] 由这些结果可知,在实施例1至3中,由于含有抗坏血酸的试剂保持部(3)成为试剂保持部(2)的展开方向下游,因此,试样中的蛋白质成分不受酸的影响,展开性良好。

[0279] 在比较例1至3中,展开性不良。可推测以下理由:在这些例子的情况下,含有抗坏血酸的试剂保持部(3)成为试剂保持部(2)的展开方向上游,因此,试样中的蛋白质成分因酸而析出,产生堵塞等。由上述的试验结果可知,试剂保持部(2)为试剂保持部(3)的展开方向上游为必须条件。

[0280] 同样地,使试剂保持部(3)中含有N-羟基琥珀酰亚胺以代替抗坏血酸,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施,然后,按照相同的目视判定基准进行判定。与实施例1的情况相比,虽然测试线的显色稍微变淡,但是得到了没有较大差异的基本相同的结果。

[0281] 同样地,使试剂保持部(2)中不含亚硝酸钠,而在检体稀释液中加入50 μ mol/test的亚硝酸钾,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施,按照相同的目视判定基准进行判定。得到了与实施例1基本相同的结果。

[0282] 在上述实施例1的免疫层析试剂盒的结构中,记载了使试剂保持部(2)中含有 β -环糊精(以下简称为“ β -CD”)的情况,但是也同样地制作了不含CD的CD无添加的免疫层析试剂盒。

[0283] 此外,添加 γ -环糊精、氨基- β -环糊精(“3A-氨基-3A-脱氧-(2AS,3AS)- β -环糊精水合物”的简称。)、m β -环糊精(“6-0- α -D-麦芽糖基- β -环糊精(分子量1459)”的简称。)以代替 β -CD,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施,并按照相同的目视判定基准进行判

定。得到了与实施例1大同小异的基本相同的结果。将亚硝酸含有部中的各CD保持为 $0.75\mu\text{g}/\text{test}$ 。

[0284] [实施例4至6]

[0285] 将每次试验(test)的亚硝酸钠、环状环糊精及抗坏血酸设为表4记载的各种量,以与实施例1相同的步骤方式实施。关于阳性检体,在每次试验(test)中使用 $150\mu\text{L}$ 的失活溶链菌浓度为 $2\times 10^6\text{org}/\text{mL}$ 的检体。然后,按照相同的目视判定基准进行判定。该判定结果示于表4中。

[0286] [实施例7至10]

[0287] 将每次试验(test)的亚硝酸盐、环状环糊精、抗坏血酸及/或N-羟基琥珀酰亚胺设为表4记载的各种量。

[0288] [实施例7]

[0289] 使试剂保持部(3)中含有属于具有5元环的环状酰亚胺骨架的杂环化合物范畴的代表性化合物N-羟基琥珀酰亚胺以代替抗坏血酸,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施。然后,按照相同的目视判定基准进行判定。其判定结果示于表4中。

[0290] [实施例8]

[0291] 使试剂保持部(2)中不含亚硝酸钠,而是在检体稀释液中加入 $50\mu\text{mol}/\text{test}$ 的亚硝酸钾,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施。然后,按照相同的目视判定基准进行判定。其判定结果示于表4中。

[0292] [实施例9]

[0293] 使试剂保持部(2)中不含 β -环糊精而是保持在检体稀释液中,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施。然后,按照相同的目视判定基准进行判定。其判定结果示于表4中。实施例8及9为使亚硝酸盐或环状寡糖保持在检体稀释液中的形态。

[0294] [实施例10]

[0295] 使试剂保持部(2)中不含 β -环糊精及亚硝酸钠,而是在检体稀释液中加入 $50\mu\text{mol}$ 的亚硝酸钾及 $0.1\mu\text{mol}$ 的 β -环糊精,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施。然后,按照相同的目视判定基准进行判定。其判定结果示于表4中。实施例10为使亚硝酸盐及环状寡糖保持在检体稀释液中的形态。

[0296] [表4]

[0297]

	亚硝酸钠量 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	抗坏血酸量 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	环状寡糖种类和量 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	检体	判定 (N=5)				
实施例 4	50	1	— 0	阳性检体 ^{注1}	++	++	++	++	++
				阴性检体	±	-	±	-	-
实施例 5	10	1	β -CD 0.1	阳性检体 ^{注1}	+	+	+	+	+
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 6	100	1	β -CD 0.02	阳性检体 ^{注1}	++	++	++	++	++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 7	50	0.1 ^{注2}	γ -CD 0.1	阳性检体 ^{注1}	+	+	+	+	+
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 8	50 ^{注3}	1	γ -CD 0.1	阳性检体 ^{注1}	++	++	++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 9	50	4	β -CD ^{注4} 0.1	阳性检体 ^{注1}	+++	++	++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 10	50 ^{注3}	2	β -CD ^{注4} 0.1	阳性检体 ^{注1}	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-

[0298] 注1:关于阳性检体,在每次试验中使用了150 μL 的失活溶链菌浓度为 $2 \times 10^6 \text{org}/\text{mL}$ 的检体。

[0299] 注2:使用了N-羟基琥珀酰亚胺以代替抗坏血酸。

[0300] 注3:使用了亚硝酸钾以代替亚硝酸钠。亚硝酸钾未加入到试剂保持部(2),而是加入到了检体稀释液。

[0301] 注4:环状寡糖未加入到试剂保持部(2),而是加入到了检体稀释液。

[0302] 从表4的结果可以明了,相比于亚硝酸盐及/或环状寡糖加入到了试剂保持部(2)的实施例5至7,在采用亚硝酸盐及/或环状寡糖未加入到试剂保持部(2)而是加入到了检体稀释液中的实施方式的实施例8至10中,其判定结果显著地提高。

[0303] [实施例11至19]

[0304] 使试剂保持部(3)中含有具有各种环状酯骨架、环状酰胺骨架或环状酰亚胺骨架的有机化合物以代替抗坏血酸,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施。然后,按照相同的目视判定基准进行判定。其判定结果示于表5中。另外,使试剂保持部(3)中含有1,2,4-苯三酚以代替抗坏血酸,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施,并按照相同的目视判定基准进行判定。其判定结果示出为比较例4。

[0305] 如该表5所示,由于可以确认属于具有各种环状酯骨架、环状酰胺骨架或环状酰亚胺骨架的杂环化合物范畴的代表性的各种化合物是有效的,因而可以评价具有本发明所限定的三种骨架的全部杂环化合物的有效性。

[0306] [表5]

[0307]

	亚硝酸钠量 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	有机化合物 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	γ -CD 量 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	检体	判定 (N=5)				
实施例 11	50	乙内酰胺	0.1	阳性检体	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 12	50	邻苯二甲酰亚胺	0.1	阳性检体	++++	+++	+++	++++	++++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 13	50	N,N'-二琥珀酰亚胺 基碳酸酯	0.1	阳性检体	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 14	50	2-O-(α -D-吡喃葡萄糖 苷基)-L-抗坏血酸	0.1	阳性检体	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 15	50	N-乙酰基邻苯二甲 酰亚胺	0.1	阳性检体	++++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 16	50	N-(叔丁氧基羰基氧 基)邻苯二甲酰亚胺	0.1	阳性检体	++++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 17	50	N-乙酰氧基琥珀酰 亚胺	0.1	阳性检体	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 18	50	N-苄氧羰基氧基琥 珀酰亚胺	0.1	阳性检体	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 19	50	2,3,7,8-四羟基[1]苯 并吡喃并 [5,4,3-cde][1]苯并 吡喃-5,10-二酮二水 合物 (鞣花酸二水合物)	0.1	阳性检体	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
比较例 4	50	1,2,4-苯三酚	0.1	阳性检体	±	±	±	-	-
				阴性检体	±	-	±	-	-

[0308] 对于具有包含3个N原子的环状酰亚胺骨架的(例如)[化5]所示的化合物,若依照实施例11的实施方式进行实施,则由于可以确认如表5所示的同等的效果,因而可以容易地实现本发明的评价。

[0309] 另外,对于具有6元环的包含1至4个N原子的环状酰亚胺骨架的[化6]至[化9]所示的任一种化合物,若依照实施例11的实施方式进行实施,则由于可以实现亚硝酸的生成,因而可以评价本发明的有用性。

[0310] 特别地,基于本发明人等的发现可知,具有选自自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物在亚硝酸的生成中发挥了同等的作用。

[0311] [实施例20至25]

[0312] 使试样保持部(2)中含有 γ -环糊精以代替 β -环糊精,并使试剂保持部(3)中含有N-乙酰氧基琥珀酰亚胺以代替抗坏血酸,除此以外,以与实施例1相同的步骤方式实施。然后,按照相同的目视判定基准进行判定。其判定结果示于表6中。

[0313] [表6]

[0314]

	亚硝酸钠量 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	有机化合物量 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	γ -CD 量 ($\mu\text{mol}/\text{test}$)	检体	判定 (N=5)				
实施例 20	60	5	0.1	阳性检体	+++	++	++	++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 21	20	5	0.1	阳性检体	+++	++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 22	4	3	0.1	阳性检体	+++	++	++	++	++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 23	4	15	0.1	阳性检体	+++	++	++	+++	++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 24	20	15	0.1	阳性检体	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-
实施例 25	50	30	0.1	阳性检体	+++	+++	+++	+++	+++
				阴性检体	-	-	-	-	-

[0315] 已知腺病毒是症状与溶链菌类似的感染症的致病病原体。可以使用这次的抗坏血酸系同时检查溶链菌和腺病毒(Adv) 这两者的免疫层析试剂盒如下地制作。

[0316] 在层析介质(1)上的判定部的制作中,依照实施例1的方法,在与涂布有源自于兔子的抗溶链菌单克隆抗体(第一抗体)的判定部平行的位置上,同样地制作涂布有源自于小鼠的抗腺病毒单克隆抗体(第一抗体)的判定部以设置多个判定部,以代替涂布有源自于兔子的抗溶链菌单克隆抗体(第一抗体)的判定部,除此以外,以与实施例1相同的方式在层析介质(1)上制作判定部。

[0317] 在标记物质溶液的制作中,按照实施例1的方法,使用了源自于小鼠的抗溶链菌多克隆抗体(第二抗体)及源自于兔子的抗腺病毒多克隆抗体(第二抗体)的混合物以代替源自于兔子的抗溶链菌多克隆抗体(第二抗体),除此以外,以与实施例1相同的方式制作标记物质溶液。

[0318] 对于其他的试剂保持部(2)、试剂保持部(3)、免疫层析用试验片、检体稀释液的制作,以与实施例1相同的方式进行制作。

[0319] 使用如此所制作的免疫层析用试验片及检体稀释液,并分别使亚硝酸钠含浸入样品垫(试剂保持部; (2))以及使抗坏血酸含浸入结合垫(试剂保持部(3)),从而制备了可以同时检查溶链菌和腺病毒(Adv) 这两者的免疫层析试剂盒。使用所制备的试剂盒来检查阴性检体(提取液)、以及作为阳性检体的溶链菌灭活抗原($2 \times 10^6 \text{org}/\text{mL}$)和腺病毒灭活抗原($1 \text{ng}/\text{mL}$),对滴加5分钟后的测试线进行目视评价。其结果示于[表7]中。

[0320] [表7]

	溶链菌测试线	Adv 测试线
提取液	-	-
溶链菌灭活抗原 ($2 \times 10^6 \text{org}/\text{mL}$)	++	-
Adv 灭活抗原($1 \text{ng}/\text{mL}$)	-	+++

[0322] 从[表7]的结果显而易见的是,若使用抗坏血酸来检查阴性检体(提取液)、以及作为阳性检体的溶链菌灭活抗原($2 \times 10^6 \text{org}/\text{mL}$)和腺病毒灭活抗原($1 \text{ng}/\text{mL}$),则腺病毒测试线的显色比溶链菌测试线更深。

[0323] 在进行根据本发明的免疫层析法的溶链菌检查的过程中,优选在每次试验中使用

10至100 μmol 的亚硝酸钠,优选在每次试验中使用0.1至100 μmol 的抗坏血酸、N-羟基丁二酸,更优选使用0.1至50 μmol ,进一步优选使用0.1至30 μmol ,最优选在1至15 μmol 的范围内使用,另外,在添加环状寡糖的情况下,优选每次测定(一试剂盒)使用0.02至0.5 μmol ,若在该范围内使用,则起到了以下的显著的效果:没有蛋白质成分的析出,不产生抗体固定金属颗粒的聚集,展开速度也快,S/N比高,可准确地判定。

[0324] 使用特定的方式对本发明详细地进行说明,对本领域技术人员显而易见的是,可在不脱离本发明的意图和范围的情况下进行各种变更及变形。需要说明的是,本申请基于2015年7月16日所申请的日本专利申请(日本特愿2015-141968),其全文以引用方式并入本文。

[0325] 工业实用性

[0326] 本发明具有可迅速、简便且适当地进行作为呼吸系统感染症之一的革兰氏阳性菌(特别是A组 β 溶血性链球菌)的检查、或者革兰氏阳性菌及腺病毒的同时检查这样优异的优点,因此,具有以下可利用性:不仅是医院、诊所,即使不具有特别的技能的个人也可以以高灵敏度迅速且适当地进行临床检查,从而涉及到感染者的早期诊断及合适治疗。

[0327] 进而,对作为不稳定的化合物的亚硝酸而言,不需要在每次检测时都进行设置使亚硝酸盐与酸性溶液反应的亚硝酸生成工序这样的繁琐的用时制备,因此,不仅提高本发明的免疫层析试剂盒的可操作性、检查效率及检查精度,而且检查的效率化、省力化也提高了,因此明显有助于检查机构相关的工业领域、医疗领域相关的工业领域的发展。

[0328] 符号说明

[0329] 1.层析介质(1)

[0330] 2.试样滴加部(2)(试剂保持部(2))

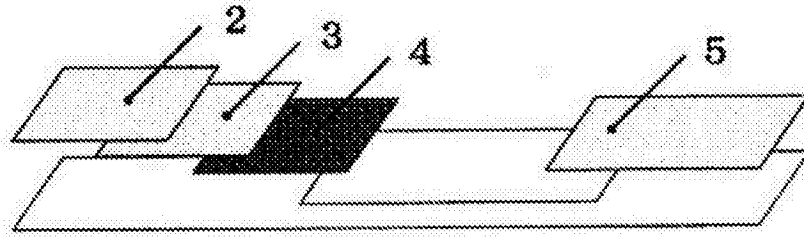
[0331] 3.抗原提取部(3)(试剂保持部(3))

[0332] 4.标记物质保持部(4)

[0333] 5.吸收部(5)

[0334] 6.检体处理液(提取液)(6)

(a)



(b)

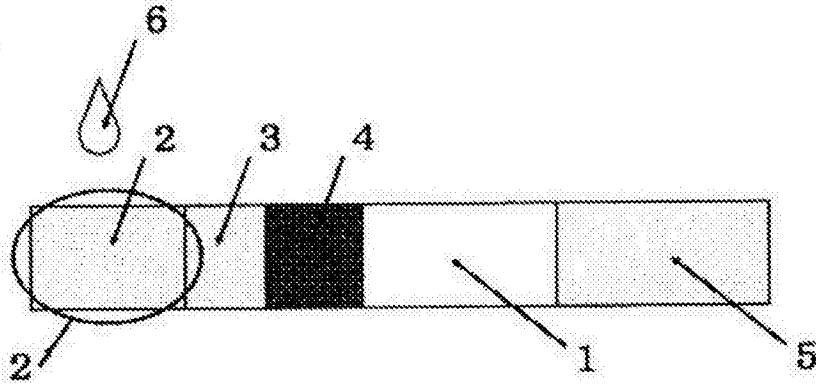


图1

专利名称(译)	免疫测定方法、免疫层析试剂盒		
公开(公告)号	CN107850593A	公开(公告)日	2018-03-27
申请号	CN201680041878.7	申请日	2016-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
[标]发明人	加藤佑弥 岩本久彦		
发明人	加藤佑弥 岩本久彦		
IPC分类号	G01N33/543 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/569 C12M1/34		
CPC分类号	C12M1/34 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 B01L3/5023 G01N33/5308 G01N33/558 G01N33/587 G01N33/56911 G01N33/56983		
代理人(译)	张苏娜 常海涛		
优先权	2015141968 2015-07-16 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种免疫测定方法，其中，可以在提高检查效率及节省劳动力的同时，在不发生不溶性载体的聚集且不引起非特异性反应的情况下进行展开速度快的高灵敏度的免疫测定。本发明涉及一种免疫测定方法，其利用检查设备进行，在所述方法中，利用提取剂提取检体中的待检测物的抗原，并利用对所述抗原具有结合能力的检测试剂检测所述待检测物，所述提取剂为通过具有选自自由环状酯、环状酰胺及环状酰亚胺所组成的组中的至少一种骨架的杂环化合物与亚硝酸盐的接触反应而在所述检查设备上生成的亚硝酸。

