



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108700571 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201780012717.X

(22)申请日 2017.02.22

(30)优先权数据

2016-032418 2016.02.23 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/006676 2017.02.22

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/146118 JA 2017.08.31

(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 铃木启太 望月浩子 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 常海涛 孙微

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

序列表3页 附图1页

按照条约第19条修改的权利要求书1页

(54)发明名称

麦醇溶蛋白检测用免疫层析分析装置、免疫层析分析试剂盒以及免疫层析分析方法

(57)摘要

本发明的课题在于提供一种抑制与食品中的除了麦醇溶蛋白以外的其他抗原发生交叉反应、且使特异性提高的用于检测麦醇溶蛋白的免疫层析分析装置。本发明涉及一种免疫层析分析装置,其包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,所述标记物质保持部及检测部含有识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体。



1. 一种免疫层析分析装置,其用于检测麦醇溶蛋白 (Gliadin),包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,

所述标记物质保持部及检测部含有识别 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin)的抗体。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析分析装置,其中,所述抗体识别存在于所述 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin)的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫层析分析装置,其中,所述标记物质保持部所含有的抗体与所述检测部所含有的抗体是相同的抗体。

4. 一种免疫层析分析试剂盒,其包含权利要求1至3中任一项所述的免疫层析分析装置、以及用于稀释并展开检体的检体稀释液。

5. 一种免疫层析分析方法,其中使用包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部的免疫层析分析装置来检测检体中的麦醇溶蛋白 (Gliadin),所述方法包括以下步骤(1)至(4):

(1) 将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤;

(2) 通过保持在标记物质保持部中的识别 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin)的抗体来识别麦醇溶蛋白 (Gliadin)的步骤;

(3) 使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤;以及

(4) 通过检测部中所含的识别 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin)的抗体来检测所展开的移动相中的麦醇溶蛋白 (Gliadin)的步骤。

麦醇溶蛋白检测用免疫层析分析装置、免疫层析分析试剂盒 以及免疫层析分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测麦醇溶蛋白 (Gliadin) 的免疫层析分析装置、免疫层析分析试剂盒以及免疫层析分析方法。

背景技术

[0002] 近年来,食物过敏的增加已成为重大的社会问题。食物过敏患者不能摄取含有成为过敏原因的物质(过敏原)的食品。对于食品中所含的食物过敏原,食物过敏患者会引起哮喘、皮炎、胃肠功能障碍、过敏性休克之类的各种过敏症状,有时也会有导致严重症状的情况。食物过敏患者有增加的倾向,消费者对于食品安全性的关注度非常高。

[0003] 一直以来,鸡蛋、牛奶、大豆被称为三大食物过敏原,但是近年来已知,在由食物过敏引起的过敏性皮炎患者当中,与三大过敏原相比,对小麦表现出感受性的患者比预想的多。作为小麦过敏的原因物质,可列举出麦醇溶蛋白 (Gliadin)。麦醇溶蛋白 (Gliadin) 是存在于小麦中的糖蛋白的一种,分为 α 、 β 、 γ 、 ω 4种类型。

[0004] 为了防止食物过敏症状的发作,期望对成为过敏原因的食品的摄取进行限制。然而,小麦除了用作面包或面类、面食等主食以外,其还作为各种加工食品的原料而包含,因而对于食品中有无小麦过敏的原因物质,一直以来都需要可简易地进行诊断的方法。

[0005] 近年来,在免疫层析分析用条形的免疫分析中,作为利用抗体所具有的特异性来检测试样液中的抗原的简便的体外诊断试剂盒或便携用诊断装置,其重要性正在提高。食品检查需要在短时间内检查大量的食品试样,免疫层析分析法因其快速性和简便性而是一种通用性高的方法。

[0006] 对于将抗体结合至金纳米粒子以用作标记试剂的免疫层析分析法的检查剂,其价格便宜且操作简便,并且检查也可在短时间内结束,因而被用于检测噪音少的稀薄提取试样中的微量特定成分。

[0007] 迄今为止,作为能够容易地诊断食品中有无小麦过敏的原因物质的方法,已知有利用上述免疫层析分析法的方法。例如,专利文献1中公开了一种方法,其中通过并用了识别小麦麦醇溶蛋白且识别不同表位的两种抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体的免疫层析条,从而检测食品中的小麦麦醇溶蛋白。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本特许第5043073号公报

发明内容

[0011] 发明所要解决的课题

[0012] 然而,食品试样中大量地含有除了麦醇溶蛋白以外的成为噪音的夹杂物,在以往的麦醇溶蛋白检测用的免疫层析分析装置中,观察到了与食品中的除了麦醇溶蛋白以外的

其他抗原发生的交叉反应,对于麦醇溶蛋白的特异性不足。结果,尽管不存在作为检测对象的麦醇溶蛋白,但是仍然发生了观察到麦醇溶蛋白阳性反应的假阳性反应。

[0013] 因此,本发明的课题在于提供一种抑制与食品试样中存在的除了麦醇溶蛋白以外的其他抗原发生交叉反应、且使对于麦醇溶蛋白的特异性比以往更高的用于检测麦醇溶蛋白的免疫层析分析装置、免疫层析分析试剂盒以及使用了它们的免疫层析分析方法。

[0014] 用于解决课题的方法

[0015] 如上所述,麦醇溶蛋白(Gliadin)是存在于小麦中的糖蛋白的一种,分为 α 、 β 、 γ 、 ω 4种类型。本发明人反复进行了深入的研究,结果首次发现:识别这4种麦醇溶蛋白当中的 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体与除了麦醇溶蛋白以外的其他抗原的交叉反应少,能够特异性地检测麦醇溶蛋白。

[0016] 特别是首次发现:识别存在于 α -麦醇溶蛋白的整个氨基酸序列(序列编号1)中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列的抗体能够更加特异性地检测麦醇溶蛋白。

[0017] 此外,首次发现:通过使免疫层析分析装置的标记物质保持部和检测部中所含有的抗体是相同的抗体,可进一步减少假阳性反应的发生。

[0018] 基于上述发现,本发明人完成了本发明。

[0019] 因此,本发明如下所述。

[0020] 1.一种免疫层析分析装置,其用于检测麦醇溶蛋白(Gliadin),包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,

[0021] 所述标记物质保持部及检测部含有识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体。

[0022] 2.根据上述1所述的免疫层析分析装置,其中,所述抗体识别存在于所述 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所表示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列。

[0023] 3.根据上述1或2所述的免疫层析分析装置,其中,所述标记物质保持部所含有的抗体与所述检测部所含有的抗体是相同的抗体。

[0024] 4.一种免疫层析分析试剂盒,其包含上述1至3中任一项所述的免疫层析分析装置、以及用于稀释并展开检体的检体稀释液。

[0025] 5.一种免疫层析分析方法,其中使用包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部的免疫层析分析装置来检测检体中的麦醇溶蛋白(Gliadin),所述方法包括以下步骤(1)至(4):

[0026] (1)将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤;

[0027] (2)通过保持在标记物质保持部中的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体来识别麦醇溶蛋白(Gliadin)的步骤;

[0028] (3)使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤;以及

[0029] (4)通过检测部中所含的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体来检测所展开的移动相中的麦醇溶蛋白(Gliadin)的步骤。

[0030] 发明效果

[0031] 本发明中,在用于检测麦醇溶蛋白(Gliadin)的免疫层析分析装置中,通过使用识别麦醇溶蛋白中特别是 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体,从而抑制了与其他抗原的交叉

反应,能够特异性地检测麦醇溶蛋白。

[0032] 特别是通过使用识别存在于 α -麦醇溶蛋白的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列的抗体,能够更加特异性地检测麦醇溶蛋白。

[0033] 此外,通过使免疫层析分析装置的标记物质保持部和检测部中所含有的抗体是相同的抗体,能够进一步减少假阳性反应的发生。

[0034] 附图简要说明

[0035] [图1]图1是用于说明本发明的一个实施方式的免疫层析分析装置的结构剖面图。

具体实施方式

[0036] 以下,对用于实施本发明的方式进行说明。

[0037] <免疫层析分析装置>

[0038] 本发明的用于检测麦醇溶蛋白(Gliadin)的免疫层析分析装置的特征在于:具备添加检体试样的试样添加部、保持标记物质的标记物质保持部、具有检测麦醇溶蛋白(Gliadin)的检测部的层析介质部、以及吸收通过了检测部后的液体的吸收部,其中,标记物质保持部及检测部含有识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体。

[0039] 在本发明的免疫层析分析装置中使用的抗体是识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体。

[0040] 麦醇溶蛋白(Gliadin)是溶解在70%乙醇中的小麦粉的蛋白质,是分子量或氨基酸组成相似的多种蛋白质的混合物。基于电泳中的迁移率,将麦醇溶蛋白分为 α -、 β -、 γ -、 ω -麦醇溶蛋白这4种类型。

[0041] 此外,在使用了Sephadex G-100柱的凝胶过滤法中,麦醇溶蛋白分成三组。其为分子量约30,000的低分子量麦醇溶蛋白(α -、 β -、 γ -麦醇溶蛋白)、分子量约100,000的高分子量麦醇溶蛋白、以及分子量约70,000的 ω -麦醇溶蛋白。

[0042] 其中,所谓的 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin),是由序列编号1所示的292个氨基酸构成的、分子量约为30,000的低分子量麦醇溶蛋白。

[0043] 在本发明中,通过在免疫层析分析装置中使用识别多种麦醇溶蛋白中特别是上述 α -麦醇溶蛋白的抗体,从而抑制了与除了麦醇溶蛋白以外的其他抗原的交叉反应,能够特异性地检测麦醇溶蛋白。

[0044] 特别是,在识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体当中,优选为识别存在于 α -麦醇溶蛋白的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列的抗体。

[0045] 在这些抗体当中,从大量存在后述的重复序列这样的理由来看,特别优选为识别由序列编号3所示的氨基酸序列的抗体。

[0046] 通过使用识别上述氨基酸序列中的至少一者的抗体,可进一步减少与其他抗原的交叉反应,能够更加特异性地检测麦醇溶蛋白。

[0047] 序列编号2的氨基酸序列(QPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQ)指的是 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列当中从第29号至第49号的氨基酸序列。

[0048] 序列编号3的氨基酸序列(PQQYPQPQPFPSQQPYLQLQPF PQQPFP)指的是 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列当中从第59号至第88号的氨基酸序列。

[0049] 序列编号4的氨基酸序列(PQLPYPQPQSFPQQPYPQQQPQ YLQPQQP)指的是 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列当中从第89号至第118号的氨基酸序列。

[0050] 序列编号5的氨基酸序列(PSSQVSFQQPQQYPSSQVSFQ)指的是 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列当中从第236号至第257号的氨基酸序列。

[0051] 序列编号6(QYPSSQVSFQPSQLNPQAQGS)的氨基酸序列指的是 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列当中从第248号至第268号的氨基酸序列。

[0052] 作为本发明中所使用的抗体,可列举出(例如)多克隆抗体或单克隆抗体。从灵敏度的观点来看,优选单克隆抗体。

[0053] 作为识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体,特别是识别由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列的抗体,可购入并使用在下述实施例中识别上述序列得到确认的XGY06或XGY10(XEMA公司制,商品名:Murine monoclonal antibodies to prolaminsclone No.XGY06、XGY10)等。

[0054] 接下来,参照附图对本发明的免疫层析分析装置的一个实施方式进行说明。需要说明的是,在本说明书中,“固定”表示抗体以不移动的方式配置于膜等载体中,“保持”表示以可以移动的方式配置于膜等载体中或表面上。

[0055] 作为本发明的免疫层析分析装置的一个实施方式,如图1所示,其由试样添加部(1)、标记物质保持部(2)、层析介质部(3)、检测部(4)、吸收部(5)以及背板(6)构成。

[0056] 试样添加部(1)为在免疫层析分析装置中添加检体试样的部位。可以由在试样添加部(1)中检体试样虽然迅速被吸收但是保持力弱、检体试样迅速地移动这样性质的多孔片材构成。作为多孔片材,可列举出(例如)纤维素滤纸、玻璃纤维、聚氨酯、聚醋酸酯、醋酸纤维素、尼龙、以及棉布等。

[0057] 标记物质保持部(2)含有后述的标记物质,该标记物质作为与识别上述 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体结合而得的标记试剂而保持在标记物质保持部(2)中。当检体在标记物质保持部(2)内移动时,上述标记试剂与检体中的麦醇溶蛋白结合。标记物质保持部(2)通常使用玻璃纤维或纤维素的膜。

[0058] 标记物质保持部(2)中的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体(以下也称为第1抗体)的含量通常为 $0.01\mu\text{g}/\text{装置}$ 至 $1.0\mu\text{g}/\text{装置}$,优选为 $0.05\mu\text{g}/\text{装置}$ 至 $0.75\mu\text{g}/\text{装置}$,更优选为 $0.075\mu\text{g}/\text{装置}$ 至 $0.5\mu\text{g}/\text{装置}$ 。

[0059] 另外,每单位面积标记物质保持部(2)的第1抗体的含量通常为 $0.006\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至 $0.42\mu\text{g}/\text{cm}^2$,优选为 $0.01\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至 $0.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为 $0.01\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至 $0.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0060] 免疫层析分析中的检测试剂的标记通常也使用酶等,但是从适合于通过目视来判断被检测物质的存在的观点看,优选使用不溶性载体作为标记物质。通过将识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体(第1抗体)结合至不溶性载体,从而可制备标记化了的检测试剂。需要说明的是,将识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体(第1抗体)结合至不溶性载体的手段可依照公知的方法。

[0061] 作为标记物质的不溶性载体可以使用金、银或铂之类的金属粒子、氧化铁之类的金属氧化物粒子、硫等非金属粒子以及由合成高分子构成的乳胶粒子、或者其他的不溶性

载体。

[0062] 不溶性载体为适合于以视觉方式判定被检测物质的存在的标记物质,优选为有色的以易于利用目视进行判定。金属粒子及金属氧化物粒子本身表现出与粒径相对应的特定的自然色,可以利用其颜色作为标记。

[0063] 从便于检测、难以凝聚、并且难以发生非特异性显色的方面出发,作为标记物质的不溶性载体特别优选为金粒子。金粒子的平均粒径为(例如)10nm至250nm,优选为35nm至120nm。使用由透射型电子显微镜(TEM:日本电子(株)制,JEM-2010)拍摄的投影照片,任意测定100个粒子的投影面积圆当量直径,由其平均值可以计算出平均粒径。

[0064] 每单位面积的标记物质保持部中,标记物质保持部所含的金粒子通常为 $0.006\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至 $0.42\mu\text{g}/\text{cm}^2$,优选为 $0.01\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至 $0.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为 $0.01\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至 $0.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。这是因为,通过设定为上述范围,标记后的粒子在分散的状态下展开,可以在不妨碍抗体的识别部位的情况下实现高灵敏度。

[0065] 层析介质部(3)是本发明的免疫层析分析装置的展开部位。层析介质部(3)是由表现出毛细管现象的微细多孔性物质构成的惰性膜。

[0066] 从与本发明的免疫层析分析装置中所使用的检测试剂、固定化试剂或被检测物质等不具有反应性的观点考虑,并且,从提高本发明效果的观点考虑,优选(例如)硝基纤维素制的膜(以下也称为硝基纤维素膜)、醋酸纤维素制的膜(以下也称为醋酸纤维素膜),更优选为硝基纤维素膜。需要说明的是,也可以使用纤维素类膜、尼龙膜以及多孔塑料布类(聚乙烯、聚丙烯)。

[0067] 作为硝基纤维素膜,其主要含有硝基纤维素即可,可以使用纯品或硝基纤维素混合物等以硝基纤维素为主要材料的膜。

[0068] 硝基纤维素膜还可以进一步含有促进毛细管现象的物质。作为上述物质,优选降低膜表面的表面张力并提供亲水性的物质。

[0069] 例如,优选为糖类、氨基酸衍生物、脂肪酸酯、各种合成表面活性剂或醇等具有两亲介质性作用的物质,其为对被检测物质的移动没有影响、并且对标记物质(例如金胶体粒子等)的显色不带来影响的物质。

[0070] 硝基纤维素膜是多孔性的并且表现出毛细管现象。该毛细管现象的指标可以通过测定吸水速度(吸水时间:capillary flow time)来进行确认。吸水速度会影响检测灵敏度和检测时间。

[0071] 以上述硝基纤维素膜或醋酸纤维素膜为代表的层析介质部(3)的形态及大小没有特别的限制,只要在实际操作方面及反应结果观察方面适合即可。

[0072] 为了进一步简化操作,优选在层析介质部(3)的背面上设置由塑料等构成的支持体。该支持体的性状没有特别的限制,当通过目视判定来进行测定结果的观察时,支持体优选具有与标记物质所带来的颜色不相似的颜色,一般地,支持体优选为无色或白色。

[0073] 检测部(4)形成在上述层析介质部(3)上。也就是说,识别被检测物质的 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体被固定在层析介质部(3)上的任意位置处。第2抗体的固定化可以依照常规方法进行。

[0074] 检测部(4)中的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体(以下也称为第2抗体)的含量通常为 $0.01\mu\text{g}/\text{装置}$ 至 $0.8\mu\text{g}/\text{装置}$,优选为 $0.03\mu\text{g}/\text{装置}$ 至 $0.6\mu\text{g}/\text{装置}$,更优选为 $0.1\mu\text{g}/\text{装置}$ 。

装置至0.5 μg /装置。

[0075] 另外,每单位面积检测部(4)的第2抗体的含量通常为0.025 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,优选为0.05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0076] 另外,为了防止由于在层析介质部(3)上的非特异性吸附导致的分析精度降低,根据需要,可以采用公知的方法对层析介质部(3)进行封闭处理。

[0077] 通常,牛血清白蛋白、脱脂乳、酪蛋白或明胶等蛋白质适用于封闭处理。在该封闭处理之后,根据需要,例如,可以组合聚乙二醇脱水山梨糖醇单月桂酸酯(例如Tween20:和光純薬社制)、聚氧乙烯辛基苯基醚(例如TritonX-100:和光純薬社制)或十二烷基硫酸钠(例如SDS:和光純薬社制)等表面活性剂中的一种或两种以上进行洗净。

[0078] 为了吸收通过了检测部(4)后的检体或展开液等液体,在层析介质部(3)的末端设置了吸收部(5)。在本发明的免疫层析分析装置中,吸收部(5)可以使用(例如)玻璃纤维、纸浆、纤维素纤维等,或者在这些无纺布中含有丙烯酸聚合物等高分子、具有环氧乙烷基团等的亲水性试剂而成的物质。优选为玻璃纤维。通过将玻璃纤维用于吸收部(5),可以大幅减少试样液的液体回流。

[0079] 背板(6)是基材。通过在一个面上涂布粘接剂或者贴附胶带,使得一个面具有粘接性,在该粘接面上紧密接触地设置了试样添加部(1)、标记物质保持部(2)、层析介质部(3)、检测部(4)以及吸收部(5)的一部分或全部。背板(6)只要是通过粘接剂而对试样液具有不透过性、非透湿性的物质即可,作为基材,没有特别的限制。

[0080] 如上所述制作的免疫层析分析装置在制成制品之前通常进行干燥处理。干燥温度(例如)为20至50 $^{\circ}\text{C}$,干燥时间为0.5至1小时。

[0081] 在本发明的免疫层析分析装置中,标记物质保持部及检测部所含有的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体优选为识别存在于 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列的抗体。通过使用识别上述氨基酸序列中的至少一者的抗体,能够进一步减少与其他抗原的交叉反应,能够更加特异性地检测麦醇溶蛋白。

[0082] 另外,标记物质保持部中所含有的抗体(第1抗体)与检测部中所含有的抗体(第2抗体)优选是相同的抗体。通过使第1抗体与第2抗体为相同的抗体,从而可使两种抗体的各种条件(例如温度条件)变得一致。由此,可以抑制单独一方的抗体与抗原的反应性变高或变低等的不一致,另外,通过使抗体所具有的与其他抗原的反应(交叉反应)变得一致,从而可减少各种条件下的假阳性反应的发生。

[0083] 在本发明的免疫层析分析装置中,更优选的是:标记物质保持部及检测部中所含有的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体为识别存在于 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列的抗体,且标记物质保持部所含有的抗体(第1抗体)与检测部所含有的抗体(第2抗体)为相同的抗体。

[0084] 当标记物质保持部所含有的抗体与检测部所含有的抗体是相同抗体、且该抗体是识别由上述序列编号2至6所示的5个氨基酸序列中的至少一个氨基酸序列的抗体时,该抗体识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的氨基酸序列的方式推测为至少以下两种情况。

[0085] (1) 识别在由序列编号2至6所示的5个氨基酸序列中存在的重复序列的一次结构

的情况

[0086] (2) 识别在由序列编号2至6所示的5个氨基酸序列中共有的立体结构的情况

[0087] 以下将说明上述两种方式。

[0088] (1) 识别在由序列编号2至6所示的5个氨基酸序列中存在的重复序列的一次结构的情况

[0089] 在由序列编号2至6所示的5个氨基酸序列中,存在以下所示的重复序列。

[0090] 序列编号3及序列编号4:PQQPYPQ

[0091] 序列编号3及序列编号4:PYPQPQP

[0092] 序列编号3(2处):PQPQFPF

[0093] 序列编号5(2处)及序列编号6:PSSQVSFQ

[0094] 当本发明的抗体识别上述重复的氨基酸序列的一次结构时,据推测,通过使用本发明的免疫层析分析装置进行分析,即使标记物质保持部所含有的抗体与检测部所含有的抗体是相同的抗体,也形成了如下所示的夹心结构,可以对检测对象的麦醇溶蛋白进行检测。

[0095] 也就是说,当使本发明的免疫层析分析装置的标记物质保持部及检测部含有上述抗体时,首先,保持在标记物质保持部中的抗体(第1抗体)与存在于 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)中的上述重复序列中的任一者进行结合。接下来,通过固定于检测部中的上述抗体(第2抗体)与其他位点处存在的相同的重复序列进行结合,该其他位点不同于保持在标记物质保持部中的第1抗体所结合的位点,从而以第1抗体和第2抗体夹着 α -麦醇溶蛋白的方式形成夹心结构,并检测麦醇溶蛋白。

[0096] 在这种情况下,由于上述抗体识别上述重复序列中的任意一者,因而可识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的氨基酸序列的多个位点,可提高麦醇溶蛋白的检测灵敏度且可抑制交叉反应性,因而是优选的。

[0097] 特别地,由于由序列编号3所示的氨基酸序列具有许多重复序列,因而上述抗体优选为识别由序列编号3所示的氨基酸序列的抗体。若为识别由序列编号3所示的氨基酸序列的抗体,则在 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的氨基酸序列当中,可识别更多的位点,能够提高 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的检测灵敏度。

[0098] (2) 识别在由序列编号2至6所示的5个氨基酸序列中共有的立体结构的情况

[0099] 当 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)在由序列编号2至6所示的5个氨基酸序列当中存在氨基酸序列的同源性高的位点时,该氨基酸序列的同源性高的位点彼此间的氨基酸序列的化学性质会极为类似,可得到相同或类似的立体结构。在这种情况下,在 α -麦醇溶蛋白的整个蛋白质立体结构中,存在有多个具有相同或类似立体结构的位点。

[0100] 当本发明的抗体识别这种共有的氨基酸序列的立体结构时,通过使用本发明的免疫层析分析装置进行分析,即使标记物质保持部中所含有的抗体与检测部中所含有的抗体是相同的抗体,也形成了如下所示的夹心结构,可以对检测对象的麦醇溶蛋白进行检测。

[0101] 也就是说,当使本发明的免疫层析分析装置的标记物质保持部及检测部含有上述抗体时,首先,保持在标记物质保持部中的抗体(第1抗体)与存在于 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)中的共有的立体结构中的任一者进行结合。接下来,通过固定于检测部中的上述抗体(第2抗体)与其他位点处所存在的相同的立体结构相结合,该其他位点不同于保持在

标记物质保持部中的第1抗体所结合的位点,从而以第1抗体和第2抗体夹着 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的方式形成夹心结构,并检测麦醇溶蛋白。

[0102] 在这种情况下,由于上述抗体识别多个存在的相同的立体结构,因而可识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的立体结构的多个位点,可提高麦醇溶蛋白的检测灵敏度且可抑制交叉反应性,因而是优选的。

[0103] <免疫层析分析试剂盒>

[0104] 本发明的免疫层析分析试剂盒包含上述免疫层析分析装置、以及用于稀释并展开检体的检体稀释液。

[0105] 在本发明的免疫层析分析试剂盒中,检体稀释液也可以作为展开液使用。检体稀释液中,通常使用水作为溶剂,在其中添加缓冲液、盐及非离子性表面活性剂,进一步可以添加(例如)用于促进抗原抗体反应或抑制非特异性反应的蛋白质、高分子化合物(PVP等)、离子性表面活性剂或聚阴离子、或者抗菌剂、螯合剂等中的1种或2种以上。

[0106] 当将检体稀释液用作展开液时,可以将预先混合了检体和展开液的混合物供给、添加到试样添加部上并使其展开,也可以先将检体供给、添加到试样添加部上,然后再将展开液供给、添加到试样添加部上并使它们展开。

[0107] <免疫层析分析方法>

[0108] 本发明的免疫层析分析方法包含以下的步骤(1)至(4),并使用上述免疫层析分析装置来检测检体所含的被检测物质的麦醇溶蛋白(Gliadin)。

[0109] (1) 将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤;

[0110] (2) 通过保持在标记物质保持部中的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体来识别麦醇溶蛋白(Gliadin)的步骤;

[0111] (3) 使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤;以及

[0112] (4) 通过检测部中所含的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体来检测所展开的移动相中的麦醇溶蛋白(Gliadin)的步骤。

[0113] 以下,对于各步骤进行说明。

[0114] (1) 将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤

[0115] 在步骤(1)中,第一,优选采用检体稀释液在不使测定精度降低的情况下将检体调整或稀释成检体在装置中顺利移动的程度的浓度并作为检体含有液。检体稀释液可以使用上述的那些。

[0116] 第二,将预定量(通常为0.1至2mL)的检体含有液添加到试样添加部(1)上。当添加检体含有液时,检体含有液在试样添加部(1)中开始移动。

[0117] 本发明中使用的检体为可能包含作为被检测物质的麦醇溶蛋白(Gliadin)的检体。例如,可列举出小麦粉、面包、面食、天麸罗等未加工或加工过的使用小麦作为原材料的食品。

[0118] 对于检体试样的制备,除了实施例中记载的方法以外,还可以通过公知的任意方法来进行。对于当检体为食品时的检体试样的制备方法,以下列举出一例来进行说明。

[0119] 1. 通过粉碎机将以小麦作为原材料的食品粉碎为均匀状态或使其为糊状。作为粉碎机,可使用食品切割机(MK-K48;パナソニック社制)或Millser(IFM700G;岩谷産業社制)等。均匀化的目的是因为食品中不均匀地混入有特定原材料的可能性高,因而需要使食品

变为均匀状态。需要说明的是,当食品为液体食品(果汁等)或粉状食品(小麦粉等)时,没有必要时进行均匀化(粉碎)。

[0120] 2.从粉碎后的食品中提取出蛋白质。例如,将38mL检体稀释液加入到2g粉碎后的试样中,并且采用均化器等重复3次提取操作,每次进行30秒,从而从食品中提取出蛋白质。

[0121] 3.对提取液进行离心分离,除去提取液中的大的不溶性成分。使用滤纸将离心分离后的上清液过滤,用检体稀释液对所得的滤液稀释10倍,从而可制备检体试样。

[0122] (2)通过保持在标记物质保持部中的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体来识别麦醇溶蛋白(Gliadin)的步骤

[0123] 步骤(2)为这样的步骤:使在步骤(1)中被添加到试样添加部中的检体含有液向标记物质保持部(2)移动,通过保持在标记物质保持部中的标记物质所结合的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体(第1抗体),从而识别检体中的作为被检测物质的麦醇溶蛋白。标记物质可以使用上述的那些。

[0124] (3)使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤

[0125] 步骤(3)为这样的步骤:在步骤(2)中作为被检测物质的麦醇溶蛋白(Gliadin)在标记物质保持部中被与标记物质结合的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体(第1抗体)识别后,使检体及第1抗体作为移动相在层析介质部上通过。

[0126] (4)通过检测部中所含的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体来检测所展开的移动相中的麦醇溶蛋白(Gliadin)的步骤

[0127] 步骤(4)为这样的步骤:作为移动相而在层析介质部上通过的检体中的麦醇溶蛋白(Gliadin)根据抗原抗体的特异性结合反应,以被保持在(即固定于)检测部的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体(第2抗体)、以及在上述步骤(2)中与标记物质结合的识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体(第1抗体)夹心状地夹持着的方式进行特异性地反应结合,并且使检测部着色。

[0128] 当不存在作为被检测物质的麦醇溶蛋白(Gliadin)时,即使通过了层析介质部上的检测部,溶解于试样的水分中的标记试剂也不会发生特异性结合反应,因而不会使检测部着色。

[0129] 最后,检体含有液的水分向吸收部(5)移动。

[0130] 实施例

[0131] 以下,通过实施例进一步说明本发明,但本发明不限于以下例子。

[0132] <试验例1>

[0133] 在本试验中,准备识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的不同种类的2种抗体,进行试验以确认各抗体是识别存在于 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列的抗体。所使用的抗体是抗体A(XGY06:XEMA社制)和抗体B(XGY10:XEMA社制)这两种。

[0134] 首先,通过作为肽的常规化学合成法的肽固相合成法,制作了具有存在于 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列的肽1至5。

[0135] 肽1:QPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQ(序列编号2)

[0136] 肽2:PQQPYQPQPFPSQQPYLQLQPFPPQPQFP(序列编号3)

[0137] 肽3:PQLPYPQQSFPPQQYPQQPQYLQPQQP (序列编号4)

[0138] 肽4:PSSQVSFQQPQQYPSSQVSFQ (序列编号5)

[0139] 肽5:QYPSSQVSFQPSQLNPQAQGS (序列编号6)

[0140] 将各个肽固定于Nunc Immuno modules (Thermo Fisher Scientific社制, 编号469949) ELISA用96孔板中, 通过采用酶标仪 (BIORAD公司制) 测定吸光度, 从而利用作为常规方法的抗原固相化ELISA来确认与各个肽的反应。

[0141] 将获得了结合有抗体的信号的情况定为+, 将与其他相比而特别强地获得了结合有抗体的信号的情况定为++, 将仅获得了与空白相同程度的信号的情况定为-。结果示于表1中。

[0142] [表1]

[0143] 表1

[0144]

	抗体A	抗体B
肽1 (序列编号2)	+	-
肽2 (序列编号3)	++	+
肽3 (序列编号4)	+	-
肽4 (序列编号5)	-	+
肽5 (序列编号6)	-	+

[0145] 由以上结果可知, 抗体A和抗体B均识别由序列编号2至6 (肽1至5) 所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列。需要说明的是, 可知抗体A和抗体B均识别由序列编号3 (肽2) 所示的氨基酸序列。

[0146] <试验例2>

[0147] 在本试验中, 制作了本发明的免疫层析分析试剂盒, 并将麦醇溶蛋白或包含麦醇溶蛋白的食品作为检体, 进行了麦醇溶蛋白的检测。

[0148] [实施例1]

[0149] 首先, 制作了由检体稀释液以及免疫层析分析装置构成的免疫层析分析试剂盒, 其中该免疫层析分析装置包含试样添加部 (1)、标记物质保持部 (2)、具有检测部 (4) 的层析介质部 (3)、以及吸收部 (5)。

[0150] 使标记物质保持部所含有的抗体与检测部所含有的抗体为相同的抗体, 作为抗体, 使用了上述抗体A (XGY06:XEMA社制)。

[0151] (1) 试样添加部的制作

[0152] 使用由玻璃纤维构成的无纺布 (ミロポア社制, 300mm×30mm) 作为试样添加部。

[0153] (2) 标记物质保持部的制作

[0154] 将0.1mL的采用磷酸缓冲液 (pH7.4) 稀释成0.05mg/mL浓度的抗体A (XGY06:XEMA社制) 添加到0.5mL的金胶体悬浮液 (田中贵金属工业社制, LC40nm) 中, 在室温下静置10分钟。

[0155] 接着, 加入0.1mL的含有1质量%牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸缓冲液 (pH7.4), 进一步在室温下静置10分钟。其后, 在充分搅拌后, 以8000×g进行15分钟离心分离, 除去上清液, 然后添加0.1mL的含有1质量%BSA的磷酸缓冲液 (pH7.4)。通过以上步骤制作了标记物质溶液。

[0156] 将300 μ L的10质量%海藻糖水溶液以及1.8mL蒸馏水加入到300 μ L的上述制作的标记物质溶液中,并将所得的混合液均匀地添加到12mm \times 300mm的玻璃纤维垫(ミポア社制)上,然后采用真空干燥机进行干燥,制作了标记物质保持部。

[0157] (3)层析介质部及检测部的制作

[0158] 使用由硝基纤维素构成的片材(ミポア社制,商品名:HF 120,300mm \times 25mm)作为膜。

[0159] 接着,采用含有5质量%的异丙醇的磷酸缓冲液(pH7.4)将上述抗体A(XGY06:XEMA社制)稀释为1.0mg/mL的浓度而得到溶液,将150 μ L该溶液使用免疫层析用分配器“XYZ3050”(BIODOT公司制)以1mm的宽度和1 μ L/mm的量(每个片材25 μ L)线状涂布到干燥后的膜上的检测部位(检测线)处。

[0160] 另外,为了确认金纳米粒子标记试剂是否展开或金纳米粒子标记试剂的展开速度,在检测部位的下游,将与金纳米粒子标记物质具有广泛亲和性的来自山羊的抗血清用磷酸缓冲液(pH7.4)稀释而得的液体涂布到对照部位(对照线)。此后,在50 $^{\circ}$ C下干燥30分钟,并在室温下干燥一晚,制作了层析介质部及检测部。

[0161] (4)免疫层析分析装置的制作

[0162] 然后,依次将试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、作为用于吸收展开后的试样或标记物质的吸收部的玻璃纤维制无纺布贴合到由背板构成的基材上。然后,采用切割机将宽度切成为5mm,以作为免疫层析分析装置。需要说明的是,使标记物质保持部在试样展开方向上的长度为12mm。

[0163] (5)检体稀释液的制备

[0164] 制备了含有1质量%的非离子性表面活性剂(ナカライテスク社制的NP-40与日油社制的ノニデットMN-811的1:1混合物)的50mM的HEPES缓冲液(pH7.5),并将其作为用于稀释处理检体的检体稀释液。

[0165] (6)测定

[0166] 使用上述制作的免疫层析分析试剂盒,并通过以下方法测定是否存在作为检体中的检测对象的麦醇溶蛋白。

[0167] 将检体设为精制Gliadin(XEMA社制)。用上述检体稀释液进行稀释,使得精制Gliadin成为2ng/mL,制备了检体含有液。

[0168] 将150 μ L的上述制备的检体含有液添加至免疫层析分析装置的试样添加部并使其展开,在15分钟后进行目视判定。将可目视确认到测试线的红线的情况定为“+”,将可清楚地目视确认到测试线的红线的情况定为“++”,将可隐约地目视确认到红线的情况定为“ \pm ”,将无法目视确认到红线的情况定为“-”。结果示于表2中。

[0169] [实施例2]

[0170] 除了标记物质保持部所含有的抗体以及检测部所含有的抗体均使用了抗体B(XGY10:XEMA社制)以外,与实施例1同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。结果示于表2中。

[0171] [实施例3]

[0172] 除了使标记物质保持部所含有的抗体为抗体A(XGY06:XEMA社制)、并且使检测部所含有的抗体为抗体B(XGY10:XEMA社制)以外,与实施例1同样地制作免疫层析分析试剂盒

并进行了测定。结果示于表2中。

[0173] [实施例4]

[0174] 除了使标记物质保持部所含有的抗体为抗体B(XGY10:XEMA社制)、并且使检测部所含有的抗体为抗体A(XGY06:XEMA社制)以外,与实施例1同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。结果示于表2中。

[0175] [表2]

[0176] 表2

[0177]

	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4
标记物质保持部侧	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
检测部侧	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	++	++	+	+

[0178] 试验的结果如下:使用抗体A及抗体B中的任一种抗体都可以检测麦醇溶蛋白。特别地,在标记物质保持部和检测部中使用了相同抗体的实施例1及2中,能够高灵敏度地检测麦醇溶蛋白。

[0179] [实施例5]

[0180] 除了将检体设为小麦粉以外,与实施例1同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。对作为检体的小麦粉进行如下的处理,制备了检体含有液。也就是说,称取0.1g的市售小麦粉(日清製粉社制),向其中加入1mL的70%乙醇,随后,通过离心分离以使不溶成分沉淀,并将该上清液作为小麦粉提取物。用检体稀释液将该提取物稀释100倍,制备了检体含有液。

[0181] 结果示于表3中。

[0182] [实施例6]

[0183] 除了标记物质保持部所含有的抗体与检测部所含有的抗体均使用了抗体B(XGY10:XEMA社制)以外,与实施例5同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。结果示于表3中。

[0184] [实施例7]

[0185] 除了使标记物质保持部所含有的抗体为抗体A(XGY06:XEMA社制)、并且使检测部所含有的抗体为抗体B(XGY10:XEMA社制)以外,与实施例5同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。结果示于表3中。

[0186] [实施例8]

[0187] 除了使标记物质保持部所含有的抗体为抗体B(XGY10:XEMA社制)、并且使检测部所含有的抗体为抗体A(XGY06:XEMA社制)以外,与实施例5同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。结果示于表3中。

[0188] [表3]

[0189] 表3

[0190]

	实施例5	实施例6	实施例7	实施例8
标记物质保持部侧	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B

检测部侧	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	++	++	++	+

[0191] 试验的结果如下：使用抗体A及抗体B中的任一种抗体都可以检测作为检体的小麦粉中的麦醇溶蛋白。

[0192] [实施例9]

[0193] 除了将检体设为面包(フジパン社制,商品名:小麦早餐)以外,与实施例1同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。对作为检体的面包进行如下的处理,制备了检体含有液。也就是说,称取0.1g的市售食用面包,向其中加入1mL的70%乙醇,随后,通过离心分离以使不溶成分沉淀,并将该上清液作为面包提取物。用检体稀释液将该提取物稀释100倍,制备了检体含有液。

[0194] 结果示于表4中。

[0195] [实施例10]

[0196] 除了标记物质保持部所含有的抗体以及检测部所含有的抗体均使用了抗体B(XGY10:XEMA社制)以外,与实施例9同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。结果示于表4中。

[0197] [实施例11]

[0198] 除了使标记物质保持部所含有的抗体为抗体A(XGY06:XEMA社制)、并且使检测部所含有的抗体为抗体B(XGY10:XEMA社制)以外,与实施例9同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。结果示于表4中。

[0199] [实施例12]

[0200] 除了使标记物质保持部所含有的抗体为抗体B(XGY10:XEMA社制)、并且使检测部所含有的抗体为抗体A(XGY06:XEMA社制)以外,与实施例9同样地制作免疫层析分析试剂盒并进行了测定。结果示于表4中。

[0201] [表4]

[0202] 表4

[0203]

	实施例9	实施例10	实施例11	实施例12
标记物质保持部侧	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
检测部侧	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	++	++	+	+

[0204] 试验的结果如下：使用抗体A及抗体B中的任一种抗体都可以检测作为检体的面包中的麦醇溶蛋白。特别地,在标记物质保持部和检测部中使用了相同抗体的实施例9及10中,能够高灵敏度地检测面包(麦醇溶蛋白)。

[0205] <试验例3>

[0206] [实施例13]

[0207] 使用在标记物质保持部及检测部这两者中均含有抗体A(XGY06:XEMA社制)的实施例1(试验例2)的免疫层析分析试剂盒,并以精制玉米蛋白(以下称为精制Zein)、市售荞麦粉、市售菜豆、市售鲑鱼片作为检体,与实施例1同样地进行了测定。需要说明的是,以精制Zein的浓度成为2ng/mL的方式制作了检体含有液。

[0208] 另外,对于荞麦粉、菜豆、鲑鱼片,称取0.1g的市售荞麦粉、菜豆、鲑鱼片,向其中加入1mL的70%乙醇,随后,通过离心分离以使不溶成分沉淀,并将该上清液作为各提取物。用检体稀释液将该提取物稀释100倍,制备了检体含有液。

[0209] 结果示于表5中。

[0210] [比较例1]

[0211] 除了使用市售的麦醇溶蛋白(Gliadin)检测免疫层析试剂盒(日本ハム社制,FASTKIT Slim)以外,与实施例13同样地进行了测定。结果示于表5中。

[0212] [表5]

[0213] 表5

[0214]

	实施例13	比较例1
精制Zein	-	±
荞麦粉	-	±
菜豆	-	+
鲑鱼片	-	+

[0215] 试验的结果如下:在本发明的免疫层析分析试剂盒中,对于精制zein、荞麦粉、菜豆以及鲑鱼片当中的任一种检体,均未观察到交叉反应。另一方面,在比较例1的市售麦醇溶蛋白(Gliadin)检测免疫层析试剂盒中,对于上述任一种检体,均观察到了交叉反应。因此可知,与市售的检测麦醇溶蛋白的免疫层析试剂盒相比,本发明的免疫层析分析试剂盒抑制了对于除了麦醇溶蛋白以外的其他抗原的交叉反应。

[0216] <试验例4>

[0217] 本发明的免疫层析分析试剂盒中,在试验例3中的检体浓度下,对于麦醇溶蛋白以外的数个抗原未观察到交叉反应。因此,在本试验中,对于在试验例3中所使用的检体(精制zein、荞麦粉、菜豆、鲑鱼片),将其浓度变为5000倍,由此关于对除了麦醇溶蛋白以外的其他抗原的交叉反应性,对最优的抗体组合进行了研究。

[0218] [参考例1至4]

[0219] 与试验例3(实施例13)同样地进行了试验,不同之处在于:使作为检体的精制zein在检体含有液中的浓度成为试验例3的浓度的5000倍即10 μ g/mL,并且使标记物质保持部及检测部所含有的抗体的组合成为表6所示的组合。结果示于表6中。

[0220] [表6]

[0221] 表6

[0222]

	参考例1	参考例2	参考例3	参考例4
标记物质保持部侧	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
检测部侧	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	-	-	±	-

[0223] [参考例5至8]

[0224] 与试验例3(实施例13)同样地进行了试验,不同之处在于:对于作为检体的荞麦粉,以浓度成为试验例3(实施例13)的浓度的5000倍的方式制备了检体含有液,并且使标记

物质保持部及检测部所含有的抗体的组合成为表7所示的组合。结果示于表7中。

[0225] [表7]

[0226] 表7

[0227]

	参考例5	参考例6	参考例7	参考例8
标记物质保持部侧	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
检测部侧	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	±	±	+	+

[0228] [参考例9至12]

[0229] 与试验例3(实施例13)同样地进行了试验,不同之处在于:对于作为检体的菜豆,以浓度成为试验例3(实施例13)的浓度的5000倍的方式制备了检体含有液,并且使标记物质保持部及检测部所含有的抗体的组合成为表8所示的组合。结果示于表8中。

[0230] [表8]

[0231] 表8

[0232]

	参考例9	参考例10	参考例11	参考例12
标记物质保持部侧	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
检测部侧	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	-	-	+	+

[0233] [参考例13至16]

[0234] 与试验例3(实施例13)同样地进行了试验,不同之处在于:对于作为检体的鲑鱼片,以浓度成为试验例3(实施例13)的浓度的5000倍的方式制备了检体含有液,并且使标记物质保持部及检测部所含有的抗体的组合成为表9所示的组合。结果示于表9中。

[0235] [表9]

[0236] 表9

[0237]

	参考例13	参考例14	参考例15	参考例16
标记物质保持部侧	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
检测部侧	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	-	-	±	±

[0238] 由参考例1至16的结果可知,与在标记物质保持部侧及检测部侧使用了不同抗体的情况相比,在标记物质保持部侧及检测部侧使用了相同抗体的本发明的免疫层析分析试剂盒难以发生交叉反应。

[0239] 利用特定的实施方式详细地说明了本发明,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,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。此外,本申请基于2016年2月23日提交的日本专利申请(特愿2016-032418),其全文内容以引用方式并入本文。

[0240] 符号的说明

[0241] 1 试样添加部

- [0242] 2 标记物质保持部
- [0243] 3 层析介质部
- [0244] 4 检测部
- [0245] 5 吸收部
- [0246] 6 背板

序列表

<110> 田中贵金属工业株式会社

<120> 麦醇溶蛋白检测用免疫层析分析装置、免疫层析分析试剂盒以及免疫层析分析方法

<130> VI-183663-59-56C

<150> JP2016/032418

<151> 2016-02-23

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 292

<212> PRT

<213> α -gliadin(α -麦醇溶蛋白)

<400> 1

```

Met Lys Thr Phe Leu Ile Leu Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala Thr Thr
1           5           10           15
Ala Thr Thr Ala Val Arg Val Pro Val Pro Gln Leu Gln Pro Gln Asn
           20           25           30
Pro Ser Gln Gln Glu Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu Val Gln Gln Gln
           35           40           45
Gln Phe Leu Gly Gln Gln Gln Pro Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr Pro
           50           55           60
Gln Pro Gln Pro Phe Pro Ser Gln Gln Pro Tyr Leu Gln Leu Gln Leu
65           70           75           80
Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Tyr Ser Gln Pro Gln Pro Phe Arg Pro
           85           90           95
Gln Gln Pro His Pro Gln Pro Gln Pro Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Gln
           100          105          110
Pro Ile Ser Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
           115          120          125
Gln Gln Ile Leu Gln Gln Ile Leu Gln Gln Gln Leu Ile Pro Cys Met
           130          135          140
Asp Val Val Leu Gln Gln His Asn Ile Ala His Gly Ser Ser Gln Val
145           150          155          160
Leu Gln Gln Ser Thr Tyr Gln Leu Leu Gln Gln Leu Cys Cys Gln Gln
           165          170          175
Leu Trp Gln Ile Pro Glu Gln Ser Arg Cys Gln Ala Ile His Asn Val
           180          185          190

```

Val His Ala Ile Ile Leu His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 195 200 205
 Gln Gln Val Gln Gln Gln Pro Ser Ser Gln Val Ser Tyr Gln Gln Pro
 210 215 220
 Gln Gln Gln Tyr Pro Ser Gly Gln Gly Ser Phe Gln Pro Ser Gln Gln
 225 230 235 240
 Asn Pro Gln Ala Gln Gly Phe Val Gln Pro Gln His Leu Pro Gln Leu
 245 250 255
 Glu Glu Ile Arg Asn Leu Ala Leu Gln Thr Leu Pro Ala Met Cys Asn
 260 265 270
 Val Tyr Ile Pro Pro Tyr Cys Ser Thr Thr Ile Ala Pro Phe Gly Ile
 275 280 285
 Phe Gly Thr Asn
 290
 <210> 2
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> α -gliadin(α -麦醇溶蛋白)
 <400> 2
 Gln Pro Gln Asn Pro Ser Gln Gln Gln Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu
 1 5 10 15
 Val Gln Gln Gln Gln
 20
 <210> 3
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> α -gliadin(α -麦醇溶蛋白)
 <400> 3
 Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Phe Pro Ser Gln Gln Pro
 1 5 10 15
 Tyr Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Pro Phe Pro
 20 25 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> α -gliadin(α -麦醇溶蛋白)
 <400> 4
 Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Ser Phe Pro Pro Gln Gln Pro
 1 5 10 15

Tyr Pro Gln Gln Gln Pro Gln Tyr Leu Gln Pro Gln Gln Pro
 20 25 30

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> α -gliadin(α -麦醇溶蛋白)

<400> 5

Pro Ser Ser Gln Val Ser Phe Gln Gln Pro Gln Gln Gln Tyr Pro Ser
 1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Phe Gln
 20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> α -gliadin(α -麦醇溶蛋白)

<400> 6

Gln Tyr Pro Ser Ser Gln Val Ser Phe Gln Pro Ser Gln Leu Asn Pro
 1 5 10 15

Gln Ala Gln Gly Ser
 20

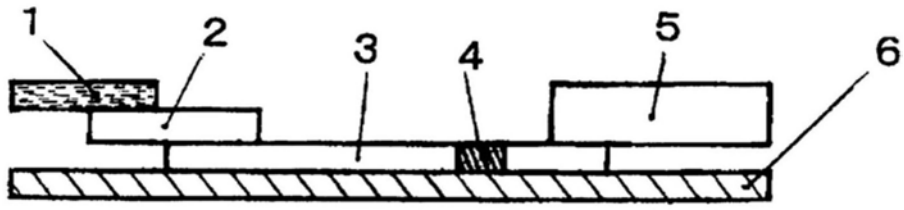


图1

1. (修改后) 一种免疫层析分析装置, 其用于检测麦醇溶蛋白 (Gliadin), 包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,

所述标记物质保持部及检测部含有识别 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin) 的抗体, 并且所述标记物质保持部所含有的抗体与所述检测部所含有的抗体是相同的抗体。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析分析装置, 其中, 所述抗体识别存在于所述 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin) 的整个氨基酸序列中的由序列编号2~6所示的5个氨基酸序列当中的至少一个氨基酸序列。

3. (修改后) 一种免疫层析分析试剂盒, 其包含权利要求1或2所述的免疫层析分析装置、以及用于稀释并展开检体的检体稀释液。

4. (修改后) 一种免疫层析分析方法, 其中使用包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部的免疫层析分析装置来检测检体中的麦醇溶蛋白 (Gliadin), 所述方法包括以下步骤 (1) 至 (4):

(1) 将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤;

(2) 通过保持在标记物质保持部中的识别 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin) 的抗体来识别麦醇溶蛋白 (Gliadin) 的步骤;

(3) 使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤; 以及

(4) 通过检测部中所含的识别 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin) 的抗体来检测所展开的移动相中的麦醇溶蛋白 (Gliadin) 的步骤, 其中所述检测部中所含的识别 α -麦醇溶蛋白 (α -Gliadin) 的抗体与保持在所述标记物质保持部中的抗体相同。

5. (删除)

专利名称(译)	麦醇溶蛋白检测用免疫层析分析装置、免疫层析分析试剂盒以及免疫层析分析方法		
公开(公告)号	CN108700571A	公开(公告)日	2018-10-23
申请号	CN201780012717.X	申请日	2017-02-22
[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	铃木启太 望月浩子 岩本久彦		
发明人	铃木启太 望月浩子 岩本久彦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/558 G01N2333/415		
代理人(译)	常海涛 孙微		
优先权	2016032418 2016-02-23 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的课题在于提供一种抑制与食品中的除了麦醇溶蛋白以外的其他抗原发生交叉反应、且使特异性提高的用于检测麦醇溶蛋白的免疫层析分析装置。本发明涉及一种免疫层析分析装置，其包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部，所述标记物质保持部及检测部含有识别 α -麦醇溶蛋白(α -Gliadin)的抗体。

