



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109313185 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780034669.4

(22)申请日 2017.06.08

(30)优先权数据

2016-115697 2016.06.09 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/021339 2017.06.08

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/213227 JA 2017.12.14

(71)申请人 电化生研株式会社

地址 日本东京

(72)发明人 加藤大介 服部友洋 村松志野

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 玉昌峰 纪秀凤

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 1/10(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

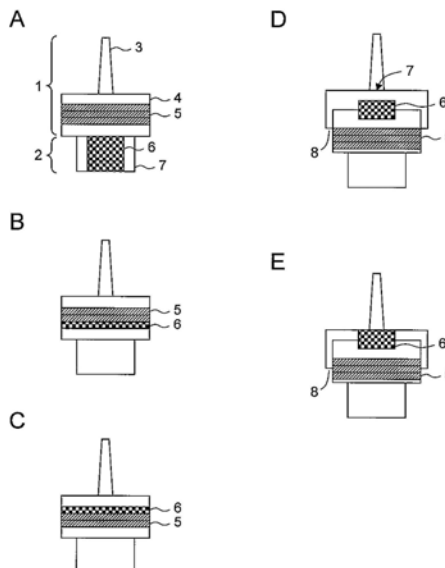
权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

用于提取并测量糖链抗原的免疫色谱试验片及检体添加用设备和使用其的免疫色谱法

(57)摘要

本发明是一种测量糖链抗原的免疫色谱试验法,其目的在于提供能够实现特异性测量糖链抗原的免疫色谱试验片及检体添加用设备和使用该免疫色谱试验片及检体添加用设备的免疫色谱法,是一种在混合检体和亚硝酸盐溶液之后,在过滤工序中执行接触酒石酸来提取检体中的糖链抗原的工序的方法。



1. 一种方法,是测量糖链抗原的免疫色谱试验法,其特征在于,在混合检体和亚硝酸盐溶液之后,在过滤工序中执行接触酒石酸来提取检体中的糖链抗原的工序。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,过滤工序在包括浸渍了酒石酸的多孔材料以及滤器的检体添加用设备中执行。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,在混合检体和亚硝酸盐溶液之后,在与免疫色谱试验片分离的部位执行接触酒石酸的工序之后的中和工序。
4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,在混合检体和亚硝酸盐溶液之后,在免疫色谱试验片上执行接触酒石酸的工序之后的中和工序。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的免疫色谱法测量检体中的糖链抗原的方法,其中,中和试剂是三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的免疫色谱法测量检体中的糖链抗原的方法,其中,糖链抗原是原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。
7. 一种试剂盒,其特征在于,具有:测量糖链抗原的免疫色谱试验片和包括浸渍了酒石酸的多孔材料及滤器的检体添加用设备。
8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中,检体添加用设备进一步包括浸渍了中和试剂的多孔材料。
9. 根据权利要求7或8所述的试剂盒,其中,中和试剂是三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。
10. 根据权利要求7至9中任一项所述的试剂盒,其中,糖链抗原是原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

用于提取并测量糖链抗原的免疫色谱试验片及检体添加用设备和使用其的免疫色谱法

技术领域

[0001] 本发明涉及能够实现在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理的、用于提取并测量糖链抗原的免疫色谱试验片及检体添加用设备和使用该免疫色谱试验片及检体添加用设备的免疫色谱法。

背景技术

[0002] 亚硝酸提取法作为糖链抗原的提取方法广为人知。该方法主要应用于A族β溶血性链球菌、口腔内链球菌等属于链球菌属的微生物的糖链抗原的提取。

[0003] 该亚硝酸提取法是一种混合菌体和亚硝酸水溶液,并使糖链抗原显现的方法,一般的亚硝酸提取法是通过在包含微生物的检体中混合经混合亚硝酸钠水溶液和乙酸、盐酸等酸性溶液而得到的生成亚硝酸的亚硝酸提取液,并使微生物和该亚硝酸反应足够长的时间来实施的。因为上述提取液是强酸性的,所以一般会在反应后添加Tris、氢氧化钠等碱性溶液,并在中和提取液之后进行分析。

[0004] 另外,以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂的大多数,作为快速/简便测量病毒或细菌感染病并确定治疗方针的一个手段而被广泛使用。

[0005] 一般的以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂在使检体悬浮于检体悬浮液之后,通过将该悬浮液供给到免疫色谱试验片而能够快速/简便地进行测量。

[0006] 对此,如在测量A族β溶血性链球菌的糖链抗原时,在即将测量前混合亚硝酸盐溶液和酸性溶液两种液体并调制亚硝酸提取液,并与检体混合。即,在使A族β溶血性链球菌和亚硝酸反应之后,用碱性水溶液中和。将中和后的提取液供给到免疫色谱试验片。

[0007] 因为在该方法中使用的亚硝酸提取液无法长时间保存,所以需要在即将试验前混合/调制亚硝酸盐溶液和酸溶液。并且,因为该亚硝酸提取液pH过低对抗原抗体反应有影响,所以需要中和至一定程度的pH。

[0008] 但是,因为在混合两种液体的工序的基础上又增加了中和的工序,所以与一般的以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂相比较,试剂变得更多,操作也容易变得复杂。因此,在现有的快速诊断试剂中,人们在研究使免疫色谱试验片事先包含中和试剂,由此能够只在混合亚硝酸盐溶液和酸性溶液的操作中进行检体处理。但是,因为与现有的以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂相比较,操作工序依然多,所以存在因混合的液量错误、混合溶液弄错、未混合两种液体就提取等不正确操作而无法正确测量的问题。

[0009] 在上述那种以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂中,在以错误的方法操作的情况下,还存在因其快速性/简便性而导致错误诊断/治疗,并延误治疗,以及对患者产生不利的情况。

[0010] 因此,报告了一种下面的方法,即,事先使免疫色谱试验片包含亚硝酸钠和中和试剂,由此仅在使检体悬浮于乙酸等酸性溶液中并供给到免疫色谱试验片的操作中在免疫色谱试验片上实施亚硝酸提取处理(专利文献1)。

[0011] 但是,因为亚硝酸钠在毒物及剧毒物取缔法中被指定为剧毒物,在消防法中属于危险物质第一类,并且在水质污染防治法中被指定为实施令第二条有害物质,所以是很难处理的药品。在制造上述免疫色谱试验片时,需要在将高浓度的亚硝酸钠水溶液涂敷到免疫色谱试验片的部件后使其干燥的制造工序,该作业伴随有危险。

[0012] 另外,虽然可以考虑使免疫色谱试验片事先包含酸性溶液,而不是亚硝酸钠;但是对于一般作为酸性溶液使用的盐酸、乙酸,与现有的使用预先混合两种液体而得到的亚硝酸提取液进行处理并中和的方法相比较,只表现出了性能明显低劣。虽然还存在使用浸渍了枸橼酸等固体状酸性试剂而不是液体状酸性试剂的免疫色谱试验片的方法(专利文献2),但是存在不具备长期保存的稳定性且会发生非特异性反应等问题。

[0013] 在先技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献1:国际公开W02005/121794号公报

[0016] 专利文献2:日本特表2008-509384号公报。

发明内容

[0017] 发明所要解决的课题

[0018] 本发明的目的在于为了能够更高效地提取糖链抗原而提供一种免疫色谱试验片及检体添加用设备和使用该免疫色谱试验片和检体添加用设备的免疫色谱法,其通过在过滤工序执行糖链抗原的提取工序能够使亚硝酸提取的操作简便化,并且即使与现有的亚硝酸提取法比较也能够在性能上毫不逊色且正确地对糖链抗原进行特异性测量。

[0019] 用于解决课题的手段

[0020] 为了在提取糖链抗原,使用免疫色谱试验片进行测量时,不增加提取所需的工序数,本申请发明人对使用亚硝酸盐和酸性试剂来提取糖链抗原的方法做了仔细研究。发现在使用免疫色谱试验片测量被检物质时,虽然有时事先使用包括过滤器等的检体添加用设备过滤包含被检测物质的样品,但是通过在该设备中提取糖链抗原能够快速/简便地进行测量。另外,当时还研究了使多孔材料在干燥的状态下包含酸性试剂并使该多孔材料包括在设备中。但是发现因为盐酸、乙酸等液体状酸性试剂在干燥状态的多孔材料上挥发并消失,所以在多孔材料上不固定,无法充分进行亚硝酸提取。另外,还发现与用现有的事先混合亚硝酸钠和液体状酸性试剂两种液体后而得到的亚硝酸提取液进行处理后中和的方法相比较,通过使用酒石酸、苹果酸、丙二酸、马来酸、枸橼酸等固体状酸性试剂,即使在干燥状态的多孔材料上酸性试剂也不挥发且固定,能够快速/简便地进行测量,而且能够以毫不逊色的性能进行测量,并且通过特别是使用上述固体状酸性试剂中的酒石酸,能够充分提取抗原,保存性稳定,而且不易发生非特异性反应,并完成了本发明。

[0021] 即,本发明提供一种测量糖链抗原的免疫色谱试验法,其特征在于在混合检体和亚硝酸盐溶液之后,在过滤工序执行与作为固体状酸性试剂的酒石酸接触的工序。

[0022] 本发明如下。

[0023] [1]一种测量糖链抗原的免疫色谱试验法,在混合检体和亚硝酸盐溶液之后,在过滤工序中执行接触酒石酸来提取检体中的糖链抗原的工序。

[0024] [2]根据[1]的方法,其中,过滤工序在包括浸渍了酒石酸的多孔材料以及滤器的

检体添加用设备中执行。

[0025] [3]根据[1]或[2]的方法,其中,在混合检体和亚硝酸盐溶液之后,在与免疫色谱试验片分离的部位执行接触酒石酸的工序之后的中和工序。

[0026] [4]根据[1]或[2]的方法,其中,在混合检体和亚硝酸盐溶液之后,在免疫色谱试验片上执行接触酒石酸的工序之后的中和工序。

[0027] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的免疫色谱法测量检体中的糖链抗原的方法,其中,中和试剂是三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

[0028] [6]根据[1]~[5]中任一项所述的免疫色谱法测量检体中的糖链抗原的方法,其中糖链抗原是原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0029] [7]一种试剂盒,具有测量糖链抗原的免疫色谱试验片和包括浸渍了酒石酸的多孔材料及滤器的检体添加用设备。

[0030] [8]根据[7]的试剂盒,其中,检体添加用设备进一步包括浸渍了中和试剂的多孔材料。

[0031] [9]根据[7]或[8]的试剂盒,其中,中和试剂是三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

[0032] [10]根据[7]~[9]中任一项的试剂盒,其中,糖链抗原是原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0033] 本说明书包括作为本申请的优先权的基础的的日本专利申请第2016-115697号的说明书和/或附图中所记载的内容。

[0034] 发明的效果

[0035] 与用现有的事先混合亚硝酸盐和液体状酸性试剂两种液体而得到的亚硝酸提取液进行处理后进行中和的方法相比较,使用本发明的免疫色谱试验片及检体添加用设备的话,能够快速/简便地进行测量,而且也能够以毫不逊色的性能进行测量。

附图说明

[0036] 图1是示出在过滤工序中用于执行糖链抗原的提取的、过滤用的检体添加用设备的结构的图。

[0037] 图2是示意性示出具有中和试剂区域的免疫色谱试验片(第一例)的结构的图。

[0038] 图3是示意性示出具有中和试剂区域的免疫色谱试验片(第二例)的结构的图。

具体实施方式

[0039] 本发明涉及一种方法,通过在过滤工序中执行糖链抗原的亚硝酸提取处理能够进行简化,并能够快速且正确地测量被检测物质、即糖链抗原。

[0040] 关于本发明的方法,以下通过示出一例更具体的工序来对本发明进行说明。

[0041] (1)将从感染了病毒、细菌等的患者的咽喉或鼻腔等获取的检体悬浮于后述的那种亚硝酸盐溶液中。

[0042] (2)通过过滤单元过滤该亚硝酸盐悬浮液(样品),并在过滤时使用酸性试剂处理并提取糖链抗原。

[0043] (3)将该过滤液滴加到免疫色谱试验片上,通过检测是否存在糖链抗原来测量检体中是否存在被检测物。

[0044] 此工序是一个示例,并不限于此工序。

[0045] 本发明的过滤工序在检体添加用设备中执行。检体添加用设备是免疫色谱试验片之外的附属部件,也能够作为用于进行获取到的检体的亚硝酸处理的容器来使用。用于糖链抗原提取的检体的亚硝酸处理通过将检体与亚硝酸盐混合,并进一步混合酸性试剂来生成亚硝酸。因此,也可以事先在样品添加用设备中加入亚硝酸盐溶液。或者也可以事先将检体与亚硝酸溶液混合,并将混合液加入到检体添加用设备。该设备中包括药瓶、注射器、管等。另外,该设备除了容器之外,还包括在将检体添加供给到免疫色谱试验片时用于过滤检体的过滤单元。检体添加用设备包括容纳检体和亚硝酸盐溶液的容器部分和将容器内的检体添加供给至免疫色谱试验片的部分。后者用于添加供给检体的部分包括具有用于将检体从容器内排出的嘴(开口部)的部分,该部分还能够兼做容器部分的盖。后者用于将检体添加供给至免疫色谱试验片的部分也称为嘴部分或盖部分。另外,当检体添加用设备包括过滤单元时,也可以以后述那样的方式用由包括过滤滤器的滤器外壳构成的嘴部分和容器部分这两种部件来构成检体添加用设备。这时的滤器外壳具有使检体通过滤器的开口部和排出通过了滤器的检体的开口部,在两个开口部之间有滤器。容器可以使用如能够通过施加压力使检体通过滤器的注射器等。

[0046] 亚硝酸处理所需的酸性试剂既可以事先使其包括在检体添加用设备中,也可以在检体的亚硝酸处理时添加。

[0047] 将固体状酸性试剂作为酸性试剂来使用。

[0048] 本发明中所使用的固体状酸性试剂是在常温下为固体状的物质、并具有在高温下不挥发的性质、且不会在免疫色谱试验片上着色的这样的试剂,具体优选在干燥状态下为白色或者在干燥热、氧化下不易着色的试剂。

[0049] 另外,在抗原提取功效的观点中,认为如果使用价数越多的酸则能够以越少的量提取。并且如果是相同价数,则酸离解常数越小的试剂越能够高效地提取抗原。

[0050] 具有这些特性的固体状酸性试剂能够列举出酒石酸、丙二酸、苹果酸、马来酸、枸橼酸等,但是在本发明中具有上述全部特性,且具有与液体状酸性试剂同等的抗原提取功效的固体状酸性试剂只有酒石酸。

[0051] 使酒石酸浸渍到多孔材料且干燥后使用。作为多孔材料可以使用常用的滤纸、玻璃纤维、无纺布等。

[0052] 使多孔材料浸渍酒石酸时,先溶解酒石酸再涂敷并干燥。

[0053] 本发明所使用的酒石酸的使用量、即多孔材料中浸渍的量无特别限定;但是通常免疫色谱试验片的每一片试验片为 $0.01\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ 的程度,优选为 $0.1\mu\text{g}\sim 0.1\text{mg}$ 的程度。最优为根据检体悬浮液的组成、滴加量等选择能够取得效果的最优量。

[0054] 图1示出了包括过滤单元和酒石酸的检体添加用设备的例子,但是本发明的检体添加用设备不限于图1所示的设备,只要是能够容纳检体、并能够将检体添加至免疫色谱试验片的检体添加部位的设备,则可以包括任何形式的设备。图1的检体添加用设备的中,下部分是容纳检体的容器部分,上部分是具有检体添加嘴的容器的盖部分(也称为嘴部分),可以在该盖部分上设置滤器。

[0055] 图1A中作为过滤单元的过滤滤器和包括酒石酸的多孔材料不接触,而是分离,在比过滤滤器更靠上游侧的位置上有包含酒石酸的多孔材料。在这种情况下,包含酒石酸的

多孔材料既可以通过合适的固定单元固定在设备内部、如容器部内部,也可以不固定而是事先加入。或者,也可以在亚硝酸处理时添加至设备中。其中,上游是就在使用检体添加用设备添加检体时的容纳在该设备中的检体流体的流动而言的上游,将设备中远离检体添加嘴的部分称为上游,距离检体添加嘴近的部分称为下游。使用图1A的设备时,将检体加入到设备中的亚硝酸盐溶液中,并通过翻转混合使检体、亚硝酸盐溶液以及多孔材料中的酒石酸接触混合,由此进行检体的亚硝酸处理。另外,也可以事先混合检体和亚硝酸溶液,并通过将混合液添加至设备中的容纳酒石酸的容器中使检体、亚硝酸盐溶液以及多孔材料中的酒石酸接触混合。使获得的混合物通过滤器从嘴部分添加至免疫色谱试验片上。

[0056] 图1B中过滤滤器和包含酒石酸的多孔材料接触并一体化,包含酒石酸的多孔材料设置在滤器的上游侧。可以将包含酒石酸的多孔材料作为由一层或多层滤器构成的过滤滤器的一层组装到该设备中。在图1B所示的设备中,设备的下部的容器包括亚硝酸盐溶液,最初检体与亚硝酸溶液混合。当将混合后的检体添加至免疫色谱试验片时,检体通过包含酒石酸的多孔材料,这时浸渍的酒石酸溶解到检体中。通过检体和酒石酸接触混合来执行检体的亚硝酸处理。该混合物通过滤器从嘴部分被添加至免疫色谱试验片。

[0057] 图1C中过滤滤器和包含酒石酸的多孔材料接触并一体化,包含酒石酸的多孔材料设置在滤器的下游侧。在图1C所示的设备中,设备的下部的容器包括亚硝酸盐溶液,最初检体与亚硝酸溶液混合。当将混合后的检体添加至免疫色谱试验片后,混合后的检体通过滤器,并通过包含酒石酸的多孔材料,此时浸渍的酒石酸溶解到检体中。通过检体与酒石酸接触混合来执行检体的亚硝酸处理。该混合物通过滤器从嘴部分被添加至免疫色谱试验片。

[0058] 图1D中作为过滤单元的过滤滤器和包含酒石酸的多孔材料不接触,而是分离,在比过滤滤器更靠下游侧的位置存在包含酒石酸的多孔材料。在图1D的设备中,可以在滤器和嘴之间设置适当的空间,并且只要在该空间内能容纳包含酒石酸的多孔材料即可。设备的下部的容器包括亚硝酸盐溶液,最初检体与亚硝酸溶液混合。当将混合后的检体添加至免疫色谱试验片时,检体通过滤器,通过在包含酒石酸的多孔材料所在的空间中接触混合酒石酸和检体来执行检体的亚硝酸处理。因为检体临时存储在该空间内,所以能够延长检体和包含酒石酸的多孔材料的接触时间,能够实现检体和酒石酸的充分接触。另外,这时,优选事先设置联络空间部分和设备外侧的气孔。因此,如图1D所示,单独设置嘴部分和安装有滤器的部分即可。当将检体和酒石酸的混合物添加至免疫色谱试验片时,将嘴部分按压到滤器安装部分即可,一旦堵塞气孔则同时通过嘴滴加检体(图1E)。由此可见,通过在过滤单元中加入酒石酸几乎能够同时在一个工序中执行样品与酒石酸的接触混合和过滤。另外,通过使检体添加用设备包括具有加入了酒石酸的过滤单元几乎能够同时在一个工序中执行检体与酒石酸的接触混合、杂质的过滤以及将检体和酒石酸的混合物添加至免疫色谱试验片。其中,“能够在一个工序中执行”的意思指的是在检体的添加这一个操作中,能够连续执行检体、亚硝酸盐溶液和酒石酸的接触混合和过滤、或者检体、亚硝酸盐溶液和酒石酸的接触混合、杂质的过滤、以及将检体、亚硝酸盐溶液和酒石酸的混合物添加至免疫色谱试验片,不需要同时执行这些操作。另外,需要事先加入酒石酸以便在使用之前不遗漏。

[0059] 检体添加用设备的大小无限定,例如,高为数cm,最粗的部分的直径为数cm的程度。包括在设备中的滤器、包含酒石酸的多孔材料、包含中和试剂的多孔材料的大小也无限

定,例如,在为圆形的情况下,直径为数mm~数cm的程度。

[0060] 免疫色谱试验片具备具有固定化有捕捉被检测物质(抗原等)的抗体(抗体1)的检测区域的支承体、具有能够移动的标记抗体(抗体2)的标记体区域、滴加检体的加样垫、吸收展开的检体液的吸收带以及用于将这些部件贴合为一个的底衬片等。

[0061] 本发明的免疫色谱试验片也可以收纳在存储容器内,通过该存储容器,能够防止由如紫外线、空气中的湿气导致的劣化。另外,在使用具有污染性、感染性的检体样品时,通过存储容器能够防止执行分析的试验人员受污染或感染。将比如适当大小的树脂制盒子当做存储容器使用,只要将本发明的装置收纳在该盒子中即可。另外,也可以用树脂制膜等(顶部层压膜)覆盖固定化有抗原或抗体的试验片的表面。有时也会将存储容器和收纳于其中的试验片作为一体称为免疫色谱设备。

[0062] 另外,检测区域的数量以及包括在标记体区域中的标记抗体的种类不限于一个,通过使用与多种被检测物质对应的抗体能够通过使用同一试验片测量出两种以上的抗原。

[0063] 支承体是具有固定化用于捕捉被检测物质(抗原)的抗体的性能的材料,并且具有不妨碍液体沿水平方向通行的性能。优选具有毛细管作用的多孔薄膜,且是能够通过吸收液体以及分散于其中的成分来输送的材料。对构成支承体的材质无特别限定,可举出例如纤维素、硝化纤维素、乙酸纤维素、聚偏二氟乙烯(PVDF)、玻璃纤维、尼龙、聚酮等。其中优选是使用硝化纤维素做成的薄膜。将固定化有抗体的膜称为抗体固定化膜。

[0064] 标记体区域由包括标记抗体的多孔基材形成,基材的材质可以使用常用的玻璃纤维、无纺布等。该基材因为浸渍大量的标记抗体,所以优选是厚度为0.3mm~0.6mm程度的垫片状。浸渍标记抗体并干燥而得到的多孔基材也称为干燥垫片。

[0065] 标记抗体的标记多使用碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶这样的酶、金胶体这样的金属胶体、二氧化硅颗粒、纤维素颗粒、有色聚苯乙烯颗粒以及有色胶乳颗粒等。当使用金属胶体颗粒、着色聚苯乙烯颗粒和着色胶乳颗粒等着色颗粒时,由于会因这些标记试剂凝结而着色,所以测量该颜色。将固定化有抗体的颗粒称为抗体固定化颗粒。

[0066] 检测区域指的是固定化有捕捉被检测物质(抗原)的抗体的支承体的一部分区域。检测区域中至少设置有一个固定化有用于捕捉抗原的抗体的区域。检测区域只要包括在支承体中即可,抗体只要固定化在支承体上即可。

[0067] 加样垫是用于滴加检体的部位,是多孔材料。加样垫是位于免疫色谱试验片的最上游的部位。该材料可以使用常用的滤纸、玻璃纤维、无纺布等。因为大量的检体被用于免疫测量,所以优选是厚度为0.3mm~1mm程度垫片状。检体中也包括将检体悬浮于其他溶液而得到的样品等使用检体调制出的样品。

[0068] 吸收带是用于吸收提供给支承体的在检测区域中与反应无关的成分的部件。该材料可以使用普通的由天然高分子化合物、合成高分子化合物等构成的保水性高的滤纸、海绵等,但是为了促进检体的展开,优选吸水性高的材料。

[0069] 底衬片是用于通过部分重叠来粘贴/固定前述的所有材料、即支承体、加样垫、标记体区域、吸收带的部件。只要能以最合适的间隔配置/固定这些材料,不一定需要底衬片,但是从制造上或使用上的便利性考虑,一般优选使用底衬片。

[0070] 本发明的免疫色谱法装置中还可以存在对照显示区域(部件)。对照显示区域是显示试验正确实施了的部位。例如,对照显示区域存在于检测区域的下游,检体样品通过检测

区域,并在到达了对照显示区域时通过着色等发出信号。在对照显示区域中,既可以固相化与结合了标记载体的抗体结合的物质,也可以在检体到达时固相化颜色发生变化的pH指示剂等试剂。结合了标记载体的抗体是小鼠单克隆抗体的情况下,使用抗小鼠IgG抗体即可。

[0071] 免疫色谱试验片的大小没有限定,例如,是纵向长度为几cm~十几cm、横向长度为几mm~几cm的程度。

[0072] 在上述方式的试验片中,检体通过经加样垫、标记体区域、支承体、检测区域、吸收带的一系列连接而形成的多孔流路。所以,在本方式中,这些全部为检体移动区域。由于各构成材料的材质、形态不同,检体也可能是未浸透至材料内部而只是在表面通行的方式,但在本说明书中定义的检体移动区域不考虑是材料的内部还是材料表面,所以该方式的试验片也包括在本说明书的范围内。

[0073] 在使用本发明的免疫色谱试验片及检体添加用设备提取并测量糖链抗原的情况下,使用亚硝酸盐溶液和酒石酸来生成亚硝酸以提取糖链抗原。因为由于提取糖链抗原溶液是酸性的,如果保持其原样的话会影响抗原抗体反应,所以需要中和酒石酸溶液。在酒石酸溶液的中和中使用中和试剂。既可以使中和试剂包括在免疫色谱试验片上,也可以使其包括在上述的检体添加用设备中。即,中和工序或在免疫色谱试验片上进行,或在检体添加用设备中等的和免疫色谱试验片分离的部位进行。

[0074] 既可以使中和试剂浸渍到加样垫,也可以使其浸渍到支承体,还可以使其浸渍到与支承体不同的无纺布等多孔材料中,并将得到的中和试剂浸渍多孔材料配置到比标记体区域更靠上游的上游位置上。或者,将浸渍了中和试剂的免疫色谱试验片上的区域称为中和试剂区域或碱性试剂区域。

[0075] 具有中和试剂区域的免疫色谱试验片在支承体上从上游开始具有加样垫、中和试剂区域、标记体区域、检测区域以及吸收带。另外,加样垫、中和试剂区域、标记体区域、检测区域以及吸收带在彼此相邻区域之间既可以接触,也可以不接触。并且,中和试剂区域、标记体区域不一定需要浸渍到各自不同的多孔材料中,也可以将多个或所有区域浸渍到同一个多孔材料中。

[0076] 在使中和试剂包括在检体添加用设备的情况下,要使中和试剂浸渍到多孔材料并使其干燥再使用。可以将常用的滤纸、玻璃纤维、无纺布等作为多孔材料使用。只要是将干燥后的包含中和试剂的多孔材料以设置在包含酒石酸的多孔材料的下游的位置的方式包括即可。例如,在图1A所示的检体添加用设备中,将包含中和试剂的多孔材料设置在滤器所存在的部分即可。另外,同样地在图1B所示的检体添加用设备的情况下,将包含中和试剂的多孔材料设置在包含酒石酸的多孔材料的下游中滤器所在的部分即可。在图1C所示的检体添加用设备、图1D所示的检体添加用设备的情况下,包含酒石酸的多孔材料设置在了检体添加用设备的最下游附近。虽然也可以将包含中和试剂的多孔材料设置在嘴处,但是优选设置在免疫色谱试验片上。

[0077] 用于本发明的中和试剂是在常温下呈固体状且在高温下不挥发的物质。

[0078] 用于本发明的优选中和试剂可以举出Tris(三羟甲基氨基甲烷)、氢氧化钠、磷酸氢二钾、枸橼酸三钠、在碱性区域具有缓冲能力的Good缓冲剂。

[0079] 用于本发明的中和试剂的使用量、即在免疫色谱试验片中浸渍的量无特别限定,通常每一个多孔材料、或免疫色谱试验片的每一片试验片为0.01 μ g~1mg的程度,优选0.1 μ

g~0.1mg的程度。最优的是根据使用的中和试剂的种类、检体悬浮液的组成、滴加量等选择能够获得效果的最合适的量。

[0080] 使加样垫或多孔材料浸渍中和试剂时,先溶解中和试剂,再将溶液涂敷到加样垫或多孔材料上,之后使其干燥即可。

[0081] 图2和图3是示出典型的免疫色谱试验片的一种优选形式的图。将图2所示的免疫色谱试验片称为第一例,将图3所示的免疫色谱试验片称为第二例。另外,免疫色谱试验片不限于图2和图3所示的物品。在图2和图3中,9指的是支承体,10指的是标记体区域,11指的是检测区域,12和13指的是加样垫,14指的是吸收带,15指的是底衬片。另外,也可以在整個试验片上粘贴顶部层压膜。

[0082] 图2A和图3A是俯视图,图2B和图3B是切断剖面图。在图2的例子中,在用树脂等制成的底衬片15上分别层压形成有一个检测区域11的支承体9、吸收带14、标记体区域10、加样垫12、13等。并且,如图3所示,吸收带14的一个端部和支承体9的一个端部、支承体9的另一个端部和标记体区域10的一个端部、标记体区域10的另一个端部和加样垫13的一个端部分别重叠在一起,加样垫13的上游部浸渍酒石酸,隔开稍许距离在加样垫的下游部存在浸渍了中和试剂的中和试剂区域。在图2的例子中,在标记体区域10的上游存在中和试剂区域13,这些重叠在一起,由此形成连续的横向流动的流路。在图3所示的试验片中,中和试剂区域13兼为加样垫。即,中和试剂区域在加样垫上。在中和试剂区域的上游还可以进一步有加样垫。

[0083] 另外,在将中和试剂设置于检体添加用设备的情况下,不需要在免疫色谱试验片上设置中和试剂区域。

[0084] 对使用图1A或图1B的检体添加用设备和图2所示的具有中和区域的免疫色谱用试验片测量糖链抗原的方法进行说明。在使用图1A的检体添加用设备的情况下,将检体或使用检体调制的样品与亚硝酸盐溶液接触混合,使检体悬浮于亚硝酸盐溶液中,并添加到检体添加用设备中,由此开始。这时,将5~100 μ L的检体和0.01~2mL的0.1M~8M的亚硝酸盐混合,并添加到检体添加用设备中即可。作为亚硝酸盐可以举出亚硝酸钠、亚硝酸钾等。在使用图1B的检体添加用设备的情况下,在检体添加用设备的容器部分中事先加入有亚硝酸盐溶液,将检体添加至其中。在检体添加用设备的容器部分中事先加入0.01~2mL的0.1M~8M的亚硝酸盐,将5~100 μ L的检体添加至其中即可。

[0085] 当将检体添加用设备中的检体从嘴滴加到免疫色谱用试验片的加样垫12上时,检体通过滤器的同时与包含在多孔材料中的酒石酸接触混合。混合在检体中的亚硝酸盐和酒石酸反应,产生游离的亚硝酸,通过该亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原。将包含提取的糖链抗原的检体添加到免疫色谱试验片。在检体添加用设备中包含中和试剂的情况下,检体在被添加到免疫色谱试验片之前被中和,在免疫色谱试验片上包含中和试剂的情况下,检体在免疫色谱试验片上被中和。

[0086] 在使用包括中和试剂区域的免疫色谱试验片的情况下,包含提供给加样垫12的被检测物质、即糖链抗原的检体通过毛管作用向加样垫12和中和试剂区域13展开,进一步按照标记体区域10、支承体9、吸收带14的顺序依次沿水平方向展开。提取出的糖链抗原和酸性的展开溶液一起展开移动至中和试剂区域13,在中和试剂区域13中包含糖链抗原的酸性的展开溶液的pH被中和并被调整到中性范围。由此,糖链抗原在中性条件下进一步向下游

展开移动。在标记体区域10中在检体样品展开的同时标记抗体被放出到液中并向支承体9展开。当在检体样品中存在糖链抗原的情况下,在支承体9的检测区域11中通过捕捉抗体来对糖链抗原进行特异性捕捉,并且糖链抗原还与标记抗体通过特异性反应形成复合体。由此在检测区域中夹着糖链抗原的夹心抗体诞生,并能够通过检测区域11对标记抗体-糖链抗原复合物进行测量。

[0087] 通过采用了本发明的免疫色谱试验片的方法,因为检体中的糖链抗原的提取是在检体添加用设备中进行的,所以在进行采用了免疫色谱试验片及检体添加用设备的测量之前不需要事先提取检体中的糖链抗原,一步就能够测量出检体中的糖链抗原。

[0088] 在本发明的方法中,成为检体的生物样品无特别限定,可以例举出血清、血浆、血液、尿、便、唾液、组织液、髓液、拭液等体液或其稀释物。在本发明的方法中采用的检体添加用设备因为包括过滤单元,所以优选应用于包括固体物质等并需要过滤的咽喉或鼻腔拭液、咽喉或鼻腔清洗液、鼻腔吸引液、唾液、直肠拭液、便、便悬浊液、角膜拭液等。

[0089] 在采用了本发明的免疫色谱试验片的方法中,成为测量对象的被检测物质是能够使用免疫分析、即利用抗原抗体反应的分析测量的糖链抗原。作为抗原可以例举出通过亚硝酸提取处理来提取的存在于细菌的细胞壁的糖链抗原即多糖体等。也能够测量包括这些物质的原生动植物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等。通过采用了本发明的免疫色谱试验片的方法,能够确认被验体的生物样品中是否包括来自原生动植物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等的糖链抗原,在包括糖链抗原的情况下,能够判断出被验体罹患有由原生动植物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等导致的传染病。例如,能够检测出是否感染了A族 β 溶血性链球菌(*Streptococcus pyogenes*:化脓链球菌)、大肠杆菌、军团菌、弯曲杆菌等。

[0090] 实施例

[0091] 以下基于实施例对本发明进行更为具体的说明。但是,本发明不限于下述实施例。

[0092] 实施例一:现有方法和本发明方法的效果

[0093] 1. 将抗化脓链球菌(A族 β 溶血性链球菌)抗体固定至硝化纤维素膜

[0094] 准备用纯化水稀释抗化脓链球菌抗体至1.0mg/mL得到的液体和抗兔IgG抗体,分别在用PET膜打底的硝化纤维素膜的加样垫侧线状涂敷抗化脓链球菌抗体,在吸收带侧线状涂敷抗兔IgG抗体。之后,在45°C下干燥硝化纤维素膜30分钟,得到抗化脓链球菌抗体固定化膜。在本实施例中将此膜称为“抗体固定化膜”。

[0095] 2. 将抗化脓链球菌抗体固定至有着聚苯乙烯颗粒

[0096] 用纯化水稀释以使抗化脓链球菌抗体为1.0mg/mL,向其中添加着色聚苯乙烯颗粒使着色聚苯乙烯颗粒为0.1%,搅拌后,添加炭化二亚胺使炭化二亚胺为1%,并进一步搅拌。通过离心操作除去上清,并再次使悬浮至50mM Tris (pH9.0)、3%BSA,得到0.04%的抗化脓链球菌抗体结合着色聚苯乙烯颗粒悬浮液。在本实施例中将此颗粒称为“抗体固定化颗粒”。

[0097] 3. 抗化脓链球菌抗体结合着色聚苯乙烯颗粒的涂敷/干燥

[0098] 将预定量的在2中调制的抗体固定化颗粒悬浮液涂敷到无纺布,在45°C下干燥30分钟。在本实施例中将得到的无纺布称为“干燥垫片”。

[0099] 4. 浸渍中和试剂(碱性试剂)的无纺布的制作

[0100] 以2M Tris (Trizma Base) 作为中和试剂(碱性试剂)以15 μ L/cm涂敷到无纺布。涂敷后立刻在45 $^{\circ}$ C下干燥一小时以得到浸渍中和试剂的无纺布。

[0101] 5. 浸渍酸性试剂的无纺布的制作

[0102] 将1M盐酸、1M乙酸、1M丙二酸、1M苹果酸、1M马来酸、1M枸橼酸、1M酒石酸各3.75 μ L作为酸性试剂涂敷到无纺布上。涂敷后立刻在45 $^{\circ}$ C下干燥一小时以得到浸渍酸性试剂的无纺布。

[0103] 6. 化脓链球菌试验片的制作

[0104] 将在1中制作的抗体固定化膜、在3中制作的干燥垫片、在4中制作的浸渍中和试剂(碱性试剂)的无纺布与其他部件(底衬片、吸收带)粘贴并每隔5mm的宽度切断以得到化脓链球菌试验片。另外,在本实施例中,将具有用于将在5中制作的浸渍酸性试剂的无纺布组装到样品过滤滤器的嘴的设备和将浸渍中和试剂(碱性试剂)的无纺布作为加样垫使用的试验片称为“本发明试验设备”和“本发明试验片”。“本发明试验设备”的结构如图1A所示,“本发明试验片”的结构如图2所示。用未涂覆任何物质的无纺布代替在4、5中制作的浸渍酸性试剂和中和试剂(碱性试剂)的无纺布来制作同样的试验片,并作为现有例子来使用。将用于把未涂敷任何物质的无纺布组装到样品过滤滤器的嘴和作为加样垫使用的试验片称为“现有方法试验嘴”、“现有方法试验片”。另外,试验片沿检体的流动从上游开始具备浸渍中和试剂(碱性试剂)的无纺布、干燥垫片(标记体区域)、抗体固定化膜(检测区域)、吸收带。

[0105] 7. 检体

[0106] 培养化脓链球菌,并用生理盐水将培养液调制为菌数为 1.0×10^7 CFU/mL和 0.25×10^7 CFU/mL。

[0107] 另外,将生理盐水作为阴性检体使用。

[0108] 8. 测量

[0109] 将20 μ L的检体悬浮于180 μ L的亚硝酸钠溶液(2M NaNO₂)中,并将其中的75 μ L滴加到本发明试验片。另外,作为现有方法在将检体悬浮于混合亚硝酸钠和盐酸后得到的亚硝酸提取液之后,将50 μ L的用Tris溶液中和的检体悬浮液滴加到现有方法试验片上。5分钟后目视判断固定化了抗化脓链球菌抗体的预定位置上的着色聚苯乙烯颗粒的沉积是否存在及其沉积的程度。该线状沉积程度按照从强到弱的顺序设为+++、++、+,在难以判断的情况下设为 \pm ,在观察不到沉积的情况设为-。

[0110] 另外作为比较例,还实施了作为现有方法的方法、即:在将检体悬浮于事先混合亚硝酸钠和乙酸而得到的亚硝酸提取溶液之后,通过现有方法试验嘴将中和的检体滴加到现有方法试验片。

[0111] 9. 结果

[0112] 表1

	判断结果			
	阴性检体	着色	1.0×10^7 CFU/mL	0.25×10^7 CFU/mL
[0113] 比较例	—	—	+++	++
盐酸	—	—	+	—
乙酸	—	—	+	—
丙二酸	—	+++	+++	±
苹果酸	—	+	+++	±
马来酸	±	—	+++	±
枸橼酸	+	—	+++	++
酒石酸	—	—	+++	++

[0114] 如表1所示,与现有方法相比较,盐酸、乙酸作为酸性试剂化脓链球菌的检测灵敏度显著降低。这是因为由于盐酸和乙酸具有挥发性质,故在制作浸渍酸性试剂的无纺布时的干燥工序中因挥发而涂敷量减少,由此导致无法进行亚硝酸提取处理。

[0115] 另外,因为由于丙二酸、苹果酸、马来酸、枸橼酸、酒石酸均为在常温下以粉末状存在的物质,且没有挥发性,故即使在制造浸渍酸性试剂的无纺布时的干燥工序中涂敷量也不会减少,即使与现有方法相比较,也能够毫不逊色的实现亚硝酸提取处理,所以不存在灵敏度大幅降低的情况。并且与现有方法相比较可以通过比较少的操作来测量。但是丙二酸、苹果酸与亚硝酸反应而使免疫色谱试验片着色,马来酸和枸橼酸发生了非特异性反应。其中,酒石酸不会使免疫色谱试验片着色,即使与现有方法比较在灵敏度/特异性上也均不逊色。

[0116] 实施例二:酸性试剂的涂敷量的研究

[0117] 变更实施例一中的酸性试剂的涂敷量,并对试验结果(表2)进行比较研究。

[0118] 表2

涂敷量 (μ L)	判定结果		
	阴性检体	1.0×10^7 CFU/mL	0.25×10^7 CFU/mL
7.5	—	+++	++
5.625	—	+++	++
[0119] 3.75	—	+++	++
1.875	—	++	+
0.9375	—	+	—
0.4688	—	±	—
0.2344	—	—	—

[0120] 如表2所示,涂敷量在为1.875 μ L以下的涂敷量的情况下灵敏度呈现下降趋势。另

外,即使涂敷3.75 μ L以上也未呈现灵敏度大幅提高的倾向。

[0121] 将本说明书所引用的所有发行物、专利以及专利申请作为参考原封不动引用到本说明书中。

[0122] 附图标记说明

[0123] 1:盖部分;2:容纳检体的容器部分;3:嘴;4:嘴部位;5:滤器(存在一部分是包含中和试剂的多孔材料的情况);6:包含酒石酸的多孔材料;7:临时存储并混合酒石酸和检体的空间;8:排气孔;9:支承体(包括检测区域);10:标记体区域;11:检测区域;12:加样垫;13:中和试剂区域;14:吸收带;15:底衬片。

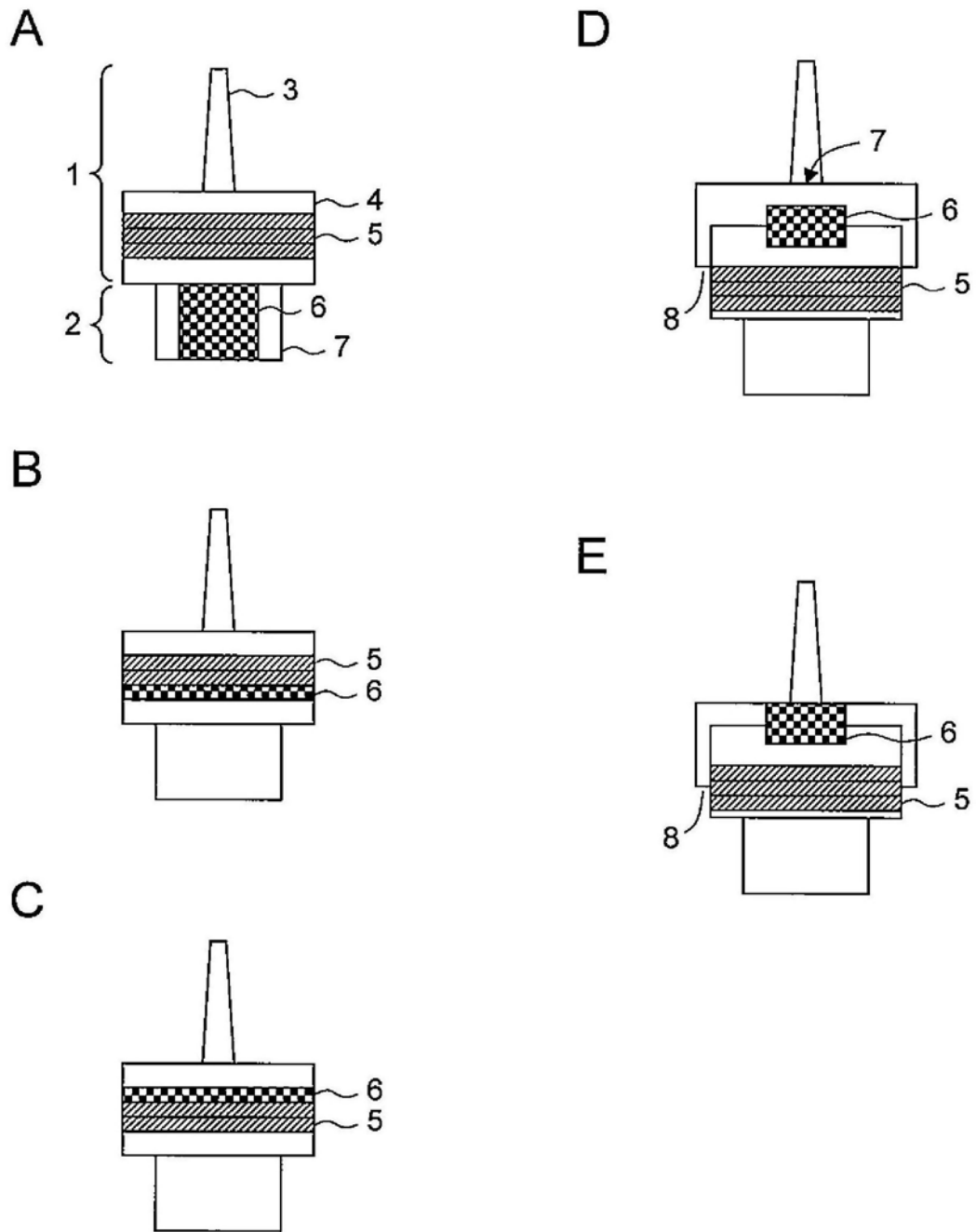


图1

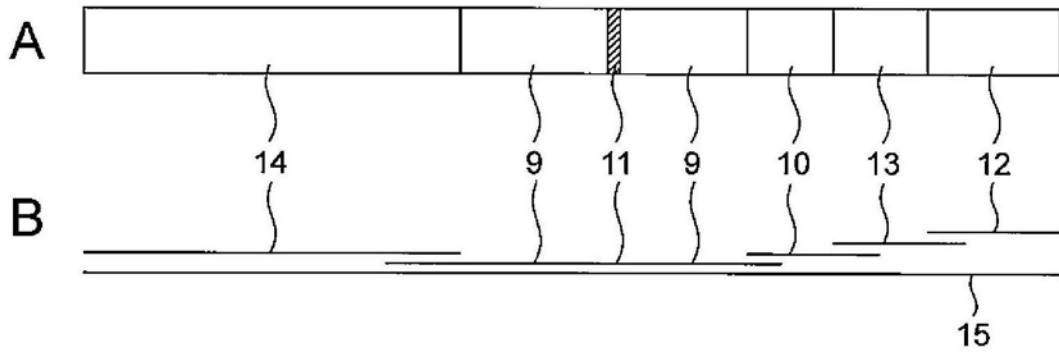


图2

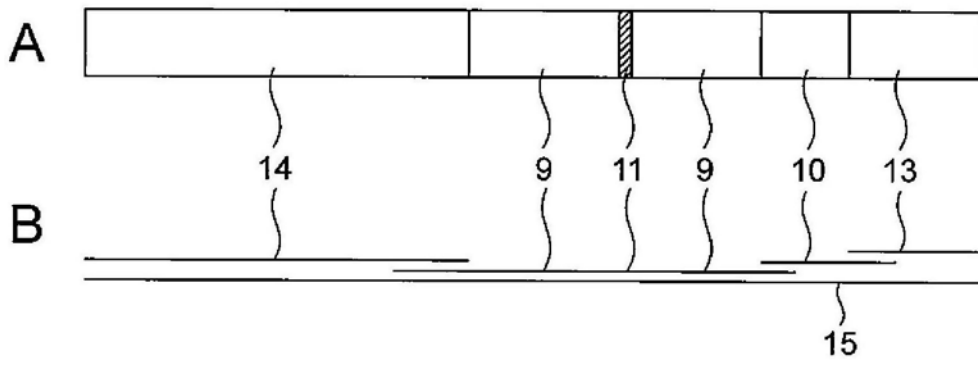


图3

专利名称(译)	用于提取并测量糖链抗原的免疫色谱试验片及检体添加用设备和使用其的免疫色谱法		
公开(公告)号	CN109313185A	公开(公告)日	2019-02-05
申请号	CN201780034669.4	申请日	2017-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
[标]发明人	加藤大介 服部友洋 村松志野		
发明人	加藤大介 服部友洋 村松志野		
IPC分类号	G01N33/543 G01N1/10 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/54386 G01N33/558 G01N2333/005 G01N2333/195 G01N2333/37 G01N2333/44 G01N2400/00 G01N1/10 G01N33/5308 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569		
代理人(译)	纪秀凤		
优先权	2016115697 2016-06-09 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种测量糖链抗原的免疫色谱试验法，其目的在于提供能够实现特异性测量糖链抗原的免疫色谱试验片及检体添加用设备和使用该免疫色谱试验片及检体添加用设备的免疫色谱法，是一种在混合检体和亚硝酸盐溶液之后，在过滤工序中执行接触酒石酸来提取检体中的糖链抗原的工序的方法。

