



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110418963 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201880018199.7

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(22)申请日 2018.03.14

代理人 纪秀凤

(30)优先权数据

2017-049163 2017.03.14 JP

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.12

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/009897 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/168905 JA 2018.09.20

(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 村松志野 服部友洋

权利要求书2页 说明书17页 附图3页

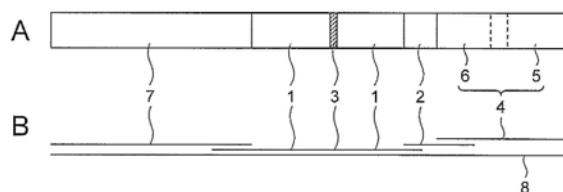
(54)发明名称

用于提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱装置

(57)摘要

提供一种免疫色谱方法和免疫色谱装置,在在免疫色谱试验片上通过亚硝酸提取来提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱法中,通过用充足的时间进行亚硝酸提取处理能够实现足够的灵敏度的测定。免疫色谱装置包括免疫色谱试验片和存放该试验片的容器,并在试验片的样品垫上具有检体添加口,该免疫色谱试验片包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合物,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体的情况下具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体的情

况下具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,其中,(i)该免疫色谱装置具有用于保持添加的检体样本溶液并通过将检体样本溶液在短时间内供给至含浸有所述固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取的较大的检体添加口;(ii)添加口与样品垫之间没有间隙,使得样本不从添加口旁溢。



1. 一种免疫色谱装置,其特征在于,包括免疫色谱试验片和存放所述试验片的容器,并在试验片的样品垫上具有检体添加口,所述免疫色谱试验片用于提取检体中的糖链抗原并进行测定,该免疫色谱试验片包括:

样品垫,用于添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体;

标记体区域,包含有将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体;及

检测区域,对所述糖链抗原的抗体进行了固相化,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,

该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体时具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体时具有含浸有亚硝酸盐的区域,其中,

(i) 所述免疫色谱装置具有用于保持添加的检体样本溶液并通过将检体样本溶液短时间内供给至含浸有所述固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取的较大的检体添加口;

(ii) 添加口与样品垫之间没有间隙,使得样本不从添加口旁溢。

2. 根据权利要求1所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述免疫色谱装置的检体添加口具有 $24\sim 75\text{mm}^2$ 的尺寸。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫由疏水性较高的原材料构成,从而通过使检体样本溶液的展开时间延迟,来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

4. 根据权利要求3所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述疏水性较高的原材料选自由聚乙烯、聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯、人造丝和尼龙构成的组。

5. 根据权利要求1或2所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫由亲水度高的原材料构成,从而通过使检体样本溶液的展开时间延迟,来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

6. 根据权利要求5所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述亲水度较高的原材料为具有厚度的滤纸。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的免疫色谱装置,其特征在于,

通过向所述免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫添加表面活性剂,对检体样本溶液的展开时间进行调节,来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

8. 根据权利要求7所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述表面活性剂选自由聚氧乙 烯辛基苯基醚、聚氧乙 烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧乙 烯烷基醚、胆酸钠、脱氧胆酸、十二烷基硫酸钠和十二烷基苯磺酸钠构成的组。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的免疫色谱装置,其特征在于,

通过向免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫添加具有固定化作用的高分子化合物,对检体样本溶液的展开时间进行调节,来促进亚硝酸盐

和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

10. 根据权利要求9所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述具有固定化作用的高分子化合物为聚乙烯醇或聚L-赖氨酸。

11. 根据权利要求1~10中任一项所述的免疫色谱装置,其特征在于,

含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域存在于样品垫上或涂布有标记体区域的垫上。

12. 根据权利要求1~11中任一项所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述固态酸性试剂选自由丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

13. 根据权利要求1~12中任一项所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述中和试剂为三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

14. 根据权利要求1~13中任一项所述的免疫色谱装置,其特征在于,

所述糖链抗原为原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

15. 一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用权利要求1~14中任一项所述的免疫色谱装置,通过免疫色谱法测定检体中的糖链抗原,所述测定检体中的糖链抗原的方法包括:

当免疫色谱装置具有含浸有固态酸性试剂的区域时,将检体与亚硝酸溶液混合,当免疫色谱装置具有含浸有亚硝酸盐的区域时,将检体与酸性溶液混合,并添加至所述免疫色谱装置的样品垫,

在含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸盐的区域中,通过亚硝酸盐与固态酸性试剂反应产生的亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原,在含浸有中和试剂的区域,包含所述糖链抗原的酸性溶液被中和,

在检测区域中,形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,所述方法通过免疫色谱法促进糖链抗原的提取,并对检体中的糖链抗原进行测定。

## 用于提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种能够在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱装置。

### 背景技术

[0002] 很多以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂被作为快速且简便地测定病毒或细菌感染、并确定治疗方案的一种手段而广泛使用。

[0003] 一般的以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂能够通过将检体悬浮于检体悬浮液后,将该悬浮液供给至免疫色谱试验片来快速且简便地进行测定。

[0004] 为了检测A组β溶血性链球菌(A组β溶链菌)、口腔内链球菌等属于链球菌属的微生物,需要提取糖链抗原,并对糖链抗原进行测定。

[0005] 例如,报告有通过如下操作即可在免疫色谱试验片上进行亚硝酸提取处理的方法:事先使免疫色谱试验片含有亚硝酸钠和中和试剂,将检体悬浮于乙酸等酸性溶液并供给至免疫色谱试验片(专利文献1)。

[0006] 此外,还有如下方法:事先使免疫色谱试验片含有酸性试剂和中和试剂,将检体悬浮于亚硝酸盐并供给至免疫色谱试验片。

[0007] 在免疫色谱法中,有时需要控制免疫色谱试验片中的色谱展开速度,已报告有通过装置形状进行控制、通过贴合位置进行控制、通过使用的原材料(无纺布等材料)进行控制、通过试剂进行控制等形式的免疫色谱法(专利文献2和3)。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:国际专利公开W02005/121794号公报

[0011] 专利文献2:日本特开2005-331471号公报

[0012] 专利文献3:日本特开2005-331463号公报。

### 发明内容

[0013] 发明要解决的课题

[0014] 为了检测A组β溶血性链球菌(A组β溶链菌)、口腔内链球菌等属于链球菌属的微生物,提取糖链抗原并对糖链抗原进行测定。

[0015] 为了提取糖链抗原,需要使用亚硝酸。由于亚硝酸单独使用时不稳定,所以进行亚硝酸提取时,通过将亚硝酸盐溶液与酸溶液(醋酸、柠檬酸和/或酒石酸等)现场混合产生亚硝酸来进行抗原提取。

[0016] 用免疫色谱法检测时,将亚硝酸溶液或酸溶液的任意一方涂布并干燥,编入免疫色谱试验片即可。在这种试剂形态中,与液态试剂相比,不需要试剂的混合操作所以操作简便,另一方面也存在如下课题:试剂混合后,像常规的免疫色谱法那样,如果样本在短时间内展开,则由于亚硝酸提取处理未能充分进行,因此灵敏度不足。

[0017] 在将液态试剂混合进行亚硝酸提取的试剂形态中,通常用1~2分钟提取样本。因此,为了得到与液态形态同等的灵敏度,需要将样本在中和的上游保持1~2分钟。

[0018] 本发明的目的在于提供一种免疫色谱方法和免疫色谱装置,在免疫色谱试验片上通过亚硝酸提取来提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱法中,通过用充足的时间进行亚硝酸提取处理而能够实现足够的灵敏度的测定。

[0019] 用于解决课题的手段

[0020] 本发明的发明人对如下技术做了深入研究:在能够在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理的、用于提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱法中,用充足的时间进行亚硝酸提取处理。

[0021] 由此,发现通过将免疫色谱装置的添加口加大使得能够添加大量的检体,并且通过引入检体不从添加口流出、并对展开速度进行调节的机制能够达成上述目的,最终完成了本发明。即本发明如下所述。

[0022] [1]一种免疫色谱装置,包括免疫色谱试验片和存放该试验片的容器,并在试验片的样品垫上具有检体添加口,该免疫色谱试验片包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体的情况下具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体的情况下具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,其中,

[0023] (i)免疫色谱装置具有保持添加的检体样本溶液并通过将检体样本溶液在短时间内供给至含浸有所述固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取的较大的检体添加口;

[0024] (ii)添加口与样品垫之间没有间隙,使得样本不从添加口旁溢。

[0025] [2]根据[1]的免疫色谱装置,其中,免疫色谱装置的检体添加口具有24~75mm<sup>2</sup>的尺寸。

[0026] [3]根据[1]或[2]的免疫色谱装置,其中,免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫由疏水性较高的原材料构成,从而通过使检体样本溶液的展开时间延迟,来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0027] [4]根据[3]的免疫色谱装置,其中,疏水性较高的原材料选自由聚乙烯、聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯、人造丝和尼龙构成的组。

[0028] [5]根据[1]或[2]的免疫色谱装置,其中,免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫由亲水度较高的原材料构成,从而通过使检体样本溶液的展开时间延迟,来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0029] [6]根据[5]的免疫色谱装置,其中,亲水度较高的原材料为具有厚度的滤纸。

[0030] [7]根据[1]~[6]中任一项的免疫色谱装置,其中,通过向免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫添加表面活性剂,对检体样本溶液的展开时间进行调节,来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0031] [8]根据[7]的免疫色谱装置,其中,表面活性剂选自由聚氧乙烯辛基苯基醚、聚氧

乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚、胆酸钠、脱氧胆酸、十二烷基硫酸钠和十二烷基苯磺酸钠构成的组。

[0032] [9]根据[1]~[8]中任一项的免疫色谱装置,其中,通过向免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫添加具有固定化作用的高分子化合物,对检体样本溶液的展开时间进行调节,来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0033] [10]根据[9]的免疫色谱装置,其中,具有固定化作用的高分子化合物为PVA或PLL。

[0034] [11]根据[1]~[10]中任一项的免疫色谱装置,其中,含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域存在于样品垫上或涂布有标记体区域的垫上。

[0035] [12]根据[1]~[11]中任一项的免疫色谱装置,其中,固态酸性试剂选自由丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

[0036] [13]根据[1]~[12]中任一项的免疫色谱装置,其中,中和试剂为三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

[0037] [14]根据[1]~[13]中任一项的免疫色谱装置,糖链抗原为原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0038] [15]一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用[1]~[14]中任一项的免疫色谱装置,通过免疫色谱法测定检体中的糖链抗原,所述测定检体中的糖链抗原的方法包括:

[0039] 当免疫色谱装置具有含浸有固态酸性试剂的区域时,将检体与亚硝酸溶液混合,当免疫色谱装置具有含浸有亚硝酸盐的区域时,将检体与酸性溶液混合,并添加至所述免疫色谱装置的样品垫,

[0040] 在含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸盐的区域中,通过亚硝酸盐与固态酸性试剂反应产生的亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原,在含浸有中和试剂的区域,包含所述糖链抗原的酸性溶液被中和,

[0041] 在检测区域中形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,所述方法通过上述免疫色谱法促进糖链抗原的提取,并对检体中的糖链抗原进行测定。

[0042] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的日本专利申请第2017-049163号的公开内容。

[0043] 发明的效果

[0044] 使用本发明的免疫色谱装置时,能够对添加样本后的免疫色谱试验片上的检体样本溶液的展开时间进行调节。其结果是,使得通过免疫色谱试验片上所包含的检体处理试剂在试验片上进行的检体处理能够充分地进行。

## 附图说明

[0045] 图1为模式性地示出具有固态酸性试剂区域及中和试剂区域的免疫色谱试验片(一片垫试验片)的构造的图。

[0046] 图2为模式性地示出具有固态酸性试剂区域及中和试剂区域的免疫色谱试验片(两片垫试验片)的构造的图。

[0047] 图3为示出免疫色谱装置的外观的立体图。图3A为添加口9较大的本发明的装置,图3B为添加口9较小的现有的装置。

[0048] 图4为示出免疫色谱装置的外观的俯视图。图4A为添加口9较大的本发明的装置，图4B为添加口9较小的现有的装置。

### 具体实施方式

[0049] 下面对本发明进行详细的说明。

[0050] 本发明涉及一种能简便化地在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理，能够快速并准确地对被检测物质即糖链抗原进行测定的免疫色谱装置。该免疫色谱装置包括免疫色谱试验片和存放该免疫色谱试验片的容器，可将免疫色谱试验片装入免疫色谱装置来制作。该存放容器能够防止例如紫外线或空气中的湿气导致的劣化。此外，当使用有污染性、感染性的检体样本时，存放容器能够防止进行分析的试验者带来污染或感染。例如，使用适当大小的树脂制成的盒子作为存放容器，将本发明的装备收纳于该盒子中即可。此外，可用树脂制成的膜等(顶部层压体)覆盖对抗原或抗体进行了固定化的试验片的表面。

[0051] 免疫色谱试验片具备：具有捕捉被检测物质(抗原等)的抗体(抗体1)被固定化的检测区域的支撑体、具有可移动的标记抗体(抗体2)的标记体区域、添加检体的样品垫、吸收展开后的检体液的吸收带和用于将该些部件贴合为一体的后衬片材等。

[0052] 需要说明的是，检测区域的数量和标记体区域中所包含的标记抗体的种类不限于一个，可以通过使用对应于多个被检测物质的抗体，在同一试验片上对两个以上的抗原进行测定。

[0053] 支撑体为拥有对用于捕捉被检测物质(抗原)的抗体进行固定化的性能的材料，且拥有不妨碍液体在水平方向通行的性能。优选地，为具有毛细管作用的多孔性薄膜(膜)，为能够通过吸收而将液体和分散于其中的成分进行输送的材料。对构成支撑体的材质不做特别限制，例如可列举纤维素、硝基纤维素、纤维素乙酸酯、聚偏二氟乙烯(PVDF)、玻璃纤维、尼龙、聚酮等。其中，更优选为使用硝基纤维素制成的薄膜或膜。对抗体进行了固定化的膜称为抗体固定化膜。

[0054] 标记体区域由包括标记抗体的多孔性基材构成，基材的材质可以使用常用的玻璃纤维(glass fiber)或无纺布等。为了含浸较多的量的标记抗体，该基材优选厚度为0.3mm~0.6mm程度的垫状。含浸有标记抗体并干燥后的多孔性基材也称为干燥垫。

[0055] 对标记抗体的标记较多使用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶等酶、胶体金等胶体金属、二氧化硅颗粒、纤维素颗粒、着色聚苯乙烯颗粒和着色胶乳颗粒等。当使用胶体金属颗粒、着色聚苯乙烯颗粒或着色胶乳颗粒等着色颗粒时，这些标记试剂凝聚后会发生着色，因此对该着色进行测定。对抗体进行了固定化的颗粒称为抗体固定化颗粒。

[0056] 检测区域是指捕捉被检测物质(抗原)的抗体被固定化的支撑体的部分区域。检测区域中，至少设置一个对用于捕捉抗原的抗体进行了固定化的区域。检测区域只要包含于支撑体即可，只要在支撑体上对抗体进行固定化即可。

[0057] 样品垫为用于添加检体的部位，为多孔性材料。样品垫为位于免疫色谱试验片的最上游的部位。该材料可使用常用的滤纸、玻璃纤维、无纺布等。为了在免疫测定中使用较多的量的检体，优选为厚度0.3mm~1mm程度的垫状。检体中还包含将检体悬浮于其他溶液而得到的样本等使用检体制备的样本。

[0058] 吸收带为用于吸收被供给至支撑体且在检测区域未参与反应的成分的部件。该材料可以使用由常规的天然高分子化合物、合成高分子化合物等构成的保水性较高的滤纸、海绵等,为了促进检体的展开,优选吸水性较高的物质。

[0059] 后衬片材为用于将上述的所有材料,即支撑体、样品垫、标记体区域、吸收带等部分重叠地贴附并固定的部件。只要这些材料以最合适的间隔配置并固定即可,虽然不为必须,但从制造上或者使用上的便利性来看,优选常用的后衬片材。

[0060] 本发明的免疫色谱试验片还可存在对照显示区域(部件)。对照显示区域为指示试验准确实施的部位。例如,对照显示区域存在于检测区域的下游,检体样本通过检测区域到达对照显示区域时,通过着色等发出信号。对照显示区域也可固相化有与结合有标记载体的抗体进行结合的物质,还可固相化有当检体到达时颜色发生变化的pH指示剂等试剂。当结合有标记载体的抗体为小鼠单克隆抗体时,使用抗小鼠IgG抗体即可。

[0061] 对免疫色谱试验片的大小不做限制,例如为纵长度为数cm~十几cm、横长度为数mm~数cm的程度。

[0062] 在上述方式的试验片中,检体通过由样品垫、标记体区域、支撑体、检测区域、吸收带等一系列连接形成的多孔性流路。因此,在本方式中,它们全部为检体移动区域。基于各构成材料的材质或方式,也可能为检体不渗透材料内部而通过表面的方式,由于本说明书所定义的检体移动区域不考虑是材料的内部还是表面,所以该方式的试验片也包含于本说明书的范围内。

[0063] 当使用本发明的免疫色谱试验片对检体中的糖链抗原进行测定时,首先需要提取检体中的糖链抗原。糖链抗原的提取通过用亚硝酸对包含糖链抗原的检体进行处理来进行。可以通过将亚硝酸钠等亚硝酸盐与酸混合产生亚硝酸,使用如上所述产生的亚硝酸对包含糖链抗原的检体进行处理即可。提取的抗原通过抗原抗体反应与固相化于免疫色谱试验片上的抗体结合,此时,反应体系中如果残留有亚硝酸则反应体系为强酸性,抗原抗体反应受到阻碍。由此,需要中和反应体系中的亚硝酸。

[0064] 在本发明中,在将亚硝酸盐与酸混合而产生亚硝酸,通过该亚硝酸提取检体中的糖链抗原并将亚硝酸中和后,使糖链抗原与固相化于免疫色谱试验片上的抗体结合,并对糖链抗原进行测定的方法中,作为提取并测定糖链抗原的方法,可以列举以下的方法。在任意一种方法中,亚硝酸对糖链抗原的提取和中和都在免疫色谱试验片上进行。为了在免疫色谱试验片上进行亚硝酸对糖链抗原的提取,只需在免疫色谱试验片上事先含浸酸性试剂或亚硝酸盐即可。为了在免疫色谱试验片上进行中和,只需在免疫色谱试验片上事先含浸中和试剂即可。

[0065] (A) 事先将检体与酸性溶液混合,添加至免疫色谱试验片的含浸有亚硝酸盐和中和试剂的样品垫。混合液到达包含有亚硝酸盐的区域后亚硝酸盐与酸反应,产生亚硝酸,提取出检体中的糖链抗原。糖链抗原的提取液在免疫色谱试验片上的含浸有中和试剂的区域被中和,糖链抗原与固相化于免疫色谱试验片上的抗体结合,可进行检测。在该方法中,作为使用的酸性溶液,可列举乙酸、盐酸、丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸、酒石酸等。

[0066] (B) 事先将检体与亚硝酸盐溶液混合,添加至免疫色谱试验片的含浸有酸性试剂和中和试剂的样品垫,混合液到达包含有酸性试剂的区域后亚硝酸盐与酸反应,产生亚硝酸,提取出检体中的糖链抗原。糖链抗原的提取液在中和免疫色谱试验片上的含浸有中和

试剂的区域被中和,糖链抗原与固相化于免疫色谱试验片上的抗体结合,可进行检测。

[0067] 在用于进行上述(A)或(B)的方法的本发明的免疫色谱试验片中,在相比标记体区域的更上游(检体流动的上游,存在样品垫一侧)即在样品垫内或样品垫与标记体区域之间含浸有酸性试剂或硝酸盐和中和试剂。在样品垫内或样品垫与标记体区域之间含浸有亚硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验片可用于上述(A)方法。在样品垫内或样品垫与标记体区域之间含浸有酸性试剂和中和试剂的免疫色谱试验片可用于上述(B)方法。需要说明的是,作为含浸于免疫色谱试验片的酸性试剂,使用固态酸性试剂。通过该方法,能够不受试验中供给的被检样本的量的影响,准确且特异性地对被检样本中的被检测物质进行测定。

[0068] 所述固态酸性试剂或亚硝酸盐可含浸于样品垫,也可以含浸于样品垫以外的其他由无纺布等多孔性材料构成的垫,将得到的含浸有固态酸性试剂的多孔性材料或含浸有亚硝酸盐的多孔性材料配置于样品垫与标记体区域之间,即标记体区域的上游侧。其中,含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与样品垫或标记体区域可以接触,也可不接触。

[0069] 在本发明中,将含浸有试剂的区域也称为含浸有试剂的垫。

[0070] 所述中和试剂配置于相比含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域的更下游。中和试剂可含浸于样品垫,可含浸于支撑体,也可含浸于支撑体以外的其他由无纺布等多孔性材料构成的垫,将得到的含浸有中和试剂的多孔性材料配置于含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与标记体区域之间。即,在标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进而在该含浸有中和试剂的区域的下游具有含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域。其中,含浸有中和试剂的区域与含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域或标记体区域可以接触,也可不接触。

[0071] 将含浸有固态酸性试剂的区域称为固态酸性试剂区域,将含浸有亚硝酸盐的区域称为亚硝酸盐区域,将含浸有中和试剂的区域称为中和试剂区域或碱性试剂区域。

[0072] 具有固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域和中和试剂区域的免疫色谱试验片中,在支撑体上从上游开始依次具有样品垫、固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域、中和试剂区域、标记体区域、检测区域和吸收带,固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域可位于样品垫上。此外,样品垫、固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域、中和试剂区域、标记体区域、检测区域和吸收带可以相邻的区域彼此接触,也可不接触。进而,固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域、中和试剂区域、标记体区域不必需含浸于各自独立的多孔性材料,也可以多个或所有的区域含浸于同一多孔性材料。

[0073] 本发明所使用的固态酸性试剂在常温下为固态,在高温下不挥发。

[0074] 作为本发明所使用的优选的固态酸性试剂,可以列举丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸、酒石酸。

[0075] 此外,作为本发明所使用的优选的固态酸性试剂,如果使用例如柠檬酸等价数较高的酸则用更少的量即可提取。此外,如果价数相同,则酸解离常数较小的例如马来酸、酒石酸,效率较好。

[0076] 此外,作为本发明所使用的优选的固态酸性试剂,优选为在免疫色谱试验片上不会被着色的试剂,具体来说是在干燥状态下为白色或不易被干燥热量或氧化着色的试剂。

[0077] 作为本发明所使用的亚硝酸盐,可列举亚硝酸钠、亚硝酸钾等。

[0078] 本发明所使用的固态酸性试剂或亚硝酸盐的使用量、即含浸于免疫色谱试验片的

量不做特别限制,通常,免疫色谱试验片的每试验片平均 $0.01\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ 程度,优选为 $0.1\mu\text{g}\sim 0.1\text{mg}$ 程度。可以理解的是,优选地,根据使用的固态酸性试剂或亚硝酸盐的种类、检体悬浮液的组成或添加量等选择能够获得效果的最合适的量。

[0079] 为了将固态酸性试剂或亚硝酸盐含浸于样品垫或多孔性材料,将固态酸性试剂或亚硝酸盐一次性溶解并涂布干燥。

[0080] 本发明所使用的中和试剂在常温下为固态,在高温下不挥发。

[0081] 作为本发明所使用的优选的中和试剂,可以列举Tris碱(三羟甲基氨基甲烷)、氢氧化钠、磷酸氢二钾、柠檬酸三钠、在碱性区域拥有缓冲性能的Good's缓冲剂。

[0082] 本发明所使用的中和试剂的使用量、即含浸于免疫色谱试验片的量不做特别限制,通常,免疫色谱试验片的每试验片平均 $0.01\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ 程度,优选为 $0.1\mu\text{g}\sim 0.1\text{mg}$ 程度。可以理解的是,优选地,根据使用的中和试剂的种类、检体悬浮液的组成或添加量等选择能够获得效果的最合适的量。

[0083] 为了将中和试剂含浸于样品垫或多孔性材料,将中和试剂一次性溶解,并将溶液涂布于样品垫或多孔性材料,之后干燥即可。

[0084] 图1和图2为示出了典型的免疫色谱试验片的一种优选形态的图。图1和图2所示的免疫色谱试验片为含浸有固态酸性试剂和中和试剂的免疫色谱试验片,然而也可含浸硝酸盐来代替固态酸性试剂,此时,为含浸有硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验片。本领域普通技术人员能够适当地设计并制造出含浸有硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验片。需要说明的是,免疫色谱试验片不限于图1和图2所示。图1和图2中,1为支撑体,2为标记体区域,3为检测区域,4为样品垫,7为吸收带,8为后衬片材。此外,在试验片整体之上也可贴附顶部层压体。

[0085] 图1A和图2A为顶视图,图1B和图2B为剖视图。在图1的例子中,由树脂等制成的后衬片材8上分别层叠了形成有一个检测区域3的支撑体1、吸收带7、标记体区域2、样品垫4等。此外,如图1所示,吸收带7的一个端部与支撑体1的一个端部、支撑体1的另一个端部与标记体区域2的一个端部、标记体区域2的另一个端部与样品垫4的一个端部分别重叠,样品垫4的上游部含浸有固态酸性试剂,在稍微离开的样品垫的下游部含浸有中和试剂。将含浸有固态酸性试剂的区域称为固态酸性试剂区域5,将含浸有中和试剂的区域称为中和试剂区域6。在该试验片中,样品垫兼做固态酸性试剂区域5和中和试剂区域6。即,固态酸性试剂区域和中和试剂区域存在于样品垫上。在该试验片中,由于固态酸性试剂区域和中和试剂区域设置为一片的多孔性材料(垫)状,所以有时也称为一片垫试验片。在图2的例子中,在标记体区域2的上游存在固态酸性试剂区域5和/或中和试剂区域6,它们相互重叠,由此形成连续的横向流的流路。在图2所示试验片中,固态酸性试剂区域5兼做样品垫。即,固态酸性试剂区域存在于样品垫上。在该试验片中,由于固态酸性试剂区域和中和试剂区域设置为各自独立的两片多孔性材料(垫)状,因此有时也称为两片垫试验片。固态酸性试剂区域的上游还可存在样品垫。此外,在图2所示试验片中,固态酸性试剂区域5和中和试剂区域6含浸于不同的多孔性材料,但也可像图1的试验片的样品垫那样在相同的多孔性材料(垫)上的上游部设置固态酸性试剂区域5,在下游部设置中和试剂区域6。

[0086] 上述层析试验片被收纳于图3和图4所记载的存放容器,作为免疫色谱装置(图3和图4)使用。图3和图4的存放容器包括下方的容器部分和上方的盖部分。如图3和图4所示,存

放容器上有检体添加口(也称为添加孔)9和判定部10。在将上述层析试验片收纳于存放容器时,能够向样品垫供给检体样本溶液的检体添加口位于样品垫的上部,当向容器的检体添加口添加检体时,检体浸入样品垫。此外,当将层析试验片收纳于存放容器时,判定部位位于检测区域上,能够通过容器的判定部的孔来观察检测区域。

[0087] 本发明的免疫色谱装置,在能够在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱法中,能够用充足的时间进行亚硝酸提取处理。因此,具有以下的结构特征。以下的结构特征是关于检体样本展开速度的调节机制的结构特征。

[0088] (1) 本发明的免疫色谱装置的添加口被加大设置。

[0089] 例如,存放纵长度为5~9cm、优选为7cm,横长度为0.3~0.7cm、优选为0.5cm的免疫色谱试验片的现有的免疫色谱装置(Quick Navi(商标)-Strep A,电化生研株式会社(Denka Seiken Co.,Ltd.))的添加口被设置为具有约3.5mm×约5.5mm(19.25mm<sup>2</sup>)的尺寸的近似矩形的添加口,存放相同尺寸的免疫色谱试验片的本发明的免疫色谱装置的添加口被设置为具有约3.5mm×约11mm(38.5mm<sup>2</sup>)的尺寸的近似矩形的添加口。免疫色谱装置和存放于其中的免疫色谱试验片的大小变为大致类似尺寸,因此在横长度为3cm、纵长度为9cm的免疫色谱装置中,具有近似矩形的3~5mm×8~15mm(24~75mm<sup>2</sup>)的添加口的免疫色谱装置为添加口较大的免疫色谱装置,能起到本发明的免疫色谱装置的效果。添加口的较长的边为与层析试验片的较长的边平行的边,即沿检体样本溶液的流动方向的边。有时将添加口的较长边的长度称作添加口长度,较短的边的长度称作添加口宽度。上述例子为近似矩形的添加口的情况,而添加口的形状可以为三角形或圆形。当用面积表示本发明的免疫色谱装置的添加口的大小时,为24~75mm<sup>2</sup>,优选为35~75mm<sup>2</sup>。

[0090] 在现有的免疫色谱法中,用免疫色谱试验片上设置的检体处理试剂进行检体处理时,由于样本溶液与含浸有检体处理试剂的区域相接的面积较小,因而检体处理能力较弱,并且由于是在将免疫色谱试验片逐渐展开的同时进行检体处理,因此最先展开的样本溶液和之后展开的样本溶液之间会出现检体处理试剂的浓度差。因此,无法可靠地进行检体处理。

[0091] 由于本发明的免疫色谱装置的添加口设置得较大,因此能够一次性地将大量的检体样本溶液在短时间内供给至免疫色谱上的含浸有检体处理试剂的区域、即含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸的区域。其结果是,能够促进免疫色谱试验片上的糖链抗原的提取。能够一次性地供给的检体样本溶液为10μL~200μL。

[0092] 其结果是,不会产生由时间差导致的检体处理试剂的浓度差,因此能够促进免疫色谱上的检体处理可靠且效率良好地进行。

[0093] (2) 在本发明的免疫色谱装置中,按以下方式构成:添加口和位于其下方的样品垫之间没有间隙,使得样本不会从添加口旁溢。

[0094] 本发明的免疫色谱装置的添加口设置得较大,可一次性地供给大量的检体样本溶液。此外,添加口的外轮廓即边缘部分有一定的高度(1~5mm),被供给的检体样本溶液可暂存于添加口内。

[0095] 其结果是,由于检体样本溶液的全部液体需要较长的时间才能被免疫色谱试验片吸收,因此有时会出现样本溶液未被免疫色谱试验片吸收而旁溢到免疫色谱试验片之外的

情况。

[0096] 本发明的免疫色谱装置中,支持样品垫的后衬片材能够按如下方式构成:为使样本不从添加口旁溢,通过用等于或大于添加口的外轮廓尺寸的后衬片材支撑样品垫,通过后衬片材将样品垫朝添加口按压的这种力起作用,使添加口与样品垫之间没有间隙,因此能够防止样本溶液的旁漏。

[0097] 此外,当样品垫的厚度存在差异时,样品垫的厚度较薄的部位容易与添加口之间产生间隙,容易发生样本溶液的旁漏。

[0098] 在本发明中,通过将样品垫的较薄的部位设计为装置的容器的底座较高,较厚的部位设计为底座较低,从而即使当垫的厚度存在差异时,也能以添加口与垫之间没有间隙的方式构成,因此能够防止样本溶液的旁漏。

[0099] 其结果是,能够效率良地进行免疫色谱试验片上的糖链抗原的提取。

[0100] (3)此外,免疫色谱试验片的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或中和试剂等检体处理试剂的垫的制造上所使用的原材料(无纺布)选择疏水性较高的原材料,能够把液体的流动速度、即检体样本溶液在免疫色谱试验片上展开的时间调节为较慢。

[0101] 此时的疏水性较高的原材料例如可列举聚乙烯、聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯、人造丝、尼龙等。

[0102] 作为含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料,可列举下面的多孔性材料:克重为 $10\sim 400\text{g}/\text{m}^2$ ,且厚度为 $0.1\sim 2.0\text{mm}$ 的织物,并且平均每 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的吸水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,且吸水速度为 $1.0\sim 5.0\mu\text{l}/\text{sec}$ ,进一步将 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的碎片以湿润的状态与膜接触并静置5分钟后的保水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,优选地,将 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的碎片以湿润的状态与膜接触并静置5分钟后的液体的扩展面积为 $20\text{mm}^2$ 以下,即具有吸水力较高、保水性(液体的保持力)较高、且液体的释放性较低或释放性持续这三个特性。具体来说,可列举由纤维素的棉纤维制成的滤纸或玻璃纤维制成的玻璃纤维滤纸等。作为这种滤纸,例如可列举东洋滤纸株式会社的No.26-3。此外,使用的滤纸的容量较大,能够对从上游晚于检体到达的酸性溶液充分进行保持。通过使用这种多孔性材料,能够含浸可对亚硝酸盐和酸性试剂反应产生的亚硝酸提取出糖链抗原的检体充分中和的量的中和试剂。此外,由于该垫能够吸收并保持大量的液体,且释放性可以持续,因此残留于免疫色谱试验片的上游的包含亚硝酸的液体即使在判定时间以后展开时也能够具有足够的中和能力,能够抑制酸性溶液到达抗体被固相化的检测区域,其结果是能够抑制非特异性反应,不发生非特异性反应即可检测糖链抗原。另一方面,吸水力较高、保水性较高、释放性较低的玻璃纤维滤纸具体来说可列举东洋滤纸株式会社的GS-25,由于吸水力较高,所以能够含浸更多的中和试剂,由于保水性较高、释水性较低,因此能够防止酸性溶液到达进行了固相化的检测区域。其结果是,当为阴性时,能够抑制非特异性反应,当为阳性时,能够防止判定时间以后的条带显色。

[0103] 含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的“克重”为 $10\sim 400\text{g}/\text{m}^2$ 。其中,“克重”是指布等的平均每单位面积( $1\text{m}^2$ )的重量。克重可根据含浸于该垫的中和试剂的量或组成适当改变。克重在 $30\text{g}/\text{m}^2$ 以下时空隙率较高,含浸有中和试剂时容易断裂,制造免疫色谱时较难处理,因此优选克重为 $50\text{g}/\text{m}^2$ 以上,当克重为 $300\text{g}/\text{m}^2$ 以上时,空隙率较低,在一些中和试剂的组成中,检体不能顺利地渗透原材料,不能与中和试剂混合,因此优选为 $300\text{g}/\text{m}^2$ 以下。最优选克重为 $250\sim 270\text{g}/\text{m}^2$ 。

[0104] 此外,含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的“厚度”以0.1~2.0mm为宜,厚度可根据含浸于该垫的中和试剂的量或组成做适当改变。当厚度在0.4mm以下时,含浸有中和试剂时容易断裂,制造免疫色谱时较难处理,因此厚度优选为0.4~0.8mm,考虑到含浸的中和试剂的量要易于调节、且制造免疫色谱时的易处理性,更优选为0.6mm程度。

[0105] “吸水性”优选为平均每1cm<sup>2</sup>的吸水量为10~100μl/cm<sup>2</sup>,且吸水速度为1.0~5.0μl/sec。吸水量和吸水速度的测定方法如下:在96孔的EIA板的1个格槽中准备200μl的染色后溶液(1%Tween20+红色102号),向其中放入将大小为5×60mm的原材料贴附于后衬片材的试验片,将浸渍于溶液的一方作为试验片的下端,测定溶液到达试验片的上端所需的时间,进而在溶液到达上端后,立即取出试验片,测定残留于格槽的液量。吸水量为200μl减去格槽中剩余的液量后在原材料平均每1cm<sup>2</sup>的面积所分配的液量,吸水速度通过吸水量/到达上端所需的时间求出。作为含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料,优选吸水量较多、吸水速度较慢的原材料。基于固态酸性试剂的浓度和含水量,当吸水量在30μl/cm<sup>2</sup>以下时,有时会出现免疫色谱试验片所需的中和试剂无法完全含浸的情况,因此具体来说,优选为吸水量在30μl/cm<sup>2</sup>以上。含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的吸水速度会对检体中的糖链抗原的提取时间和提取后的试验液的中和时间产生影响。通过固态酸性试剂的原材料或组成调节糖链抗原的提取时间时,在一定程度内可行,但并非完全可行,因此含浸中和试剂的区域所使用的原材料的吸水速度对于糖链抗原的充分提取和中和来说成为重要的因素。具体来说,吸水速度优选为1.0~5.0μl/sec,更优选为吸水速度在2.0μl/sec以下。

[0106] 通过以下方法得到“保水性”:将在含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的1cm<sup>2</sup>的碎片置于膜上,向其中添加70μl的溶液(1%Tween20+红色102号),测定5分钟静置前后的重量。保水性的液量基于添加的溶液的组成(表面活性剂或蛋白质的量)而变化,优选为用1%Tween20溶液进行试验时的保水量为10~100μl/cm<sup>2</sup>,更优选保水量为15μl/cm<sup>2</sup>以上。

[0107] 通过如下方法测定“释放性”:将在含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的1cm<sup>2</sup>的碎片置于膜上,向其中添加70μl的溶液(1%Tween20+红色102号),求出静置5分钟后膜上扩展的液体的面积。面积基于添加的溶液的组成(表面活性剂或蛋白质的量)而变化,用1%Tween20溶液进行试验时的面积为30mm<sup>2</sup>以下,更优选释放性为20mm<sup>2</sup>以下。

[0108] 即,本发明包括以下发明。

[0109] [1]一种免疫色谱试验片,包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将上述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在上述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体的情况下具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体的情况下具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,其中,

[0110] 含浸有中和试剂的区域的原材料为拥有吸收性较高、保水性较高、且释放性较低或释放性可持续这三个特性的滤纸或玻璃纤维滤纸,

[0111] 含浸有中和试剂的区域的较高的吸水性和较高的保水性使得包含上述糖链抗原

的酸性溶液被充分中和,含浸有中和试剂的区域的较低的释放性或持续的释放性抑制剩余的酸性溶液到达检测区域,或者通过充分中和后的试验液持续地在检测区域展开来抑制非特异性反应。

[0112] [2]一种免疫色谱试验片,包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将上述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在上述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在含浸有该中和试剂的区域的下游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体的情况下具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体的情况下具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,其中,

[0113] 含浸有中和试剂的区域的原材料是克重为 $10\sim 400\text{g}/\text{m}^2$ ,且厚度为 $0.1\sim 2.0\text{mm}$ 的织物。

[0114] [3]根据[1]或[2]的免疫色谱试验片,其中,上述织物的平均每 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的吸水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,且吸水速度为 $1.0\sim 5.0\mu\text{l}/\text{sec}$ ,并且将 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的碎片以湿润的状态与检测区域接触并静置5分钟的保水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,将 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的碎片以湿润的状态与膜接触并静置5分钟后的液体的扩展面积为 $20\text{mm}^2$ 以下。

[0115] [4]根据[1]~[3]中任一项的免疫色谱试验片,其中,含浸有中和试剂的区域的较高的吸水性和较高的保水性使包含上述糖链抗原的酸性溶液被充分中和,含浸有中和试剂的区域的释放性的持续力使得剩余的酸性溶液到达检测区域时还保持有足够的中和能力,从而抑制非特异性反应。

[0116] [5]根据[1]~[4]中任一项的免疫色谱试验片,其中,含浸有中和试剂的区域的较高的吸水性和较高的保水性使得包含上述糖链抗原的酸性溶液被充分中和,含浸有中和试剂的区域的较低的释放性抑制剩余的酸性溶液到达检测区域,当为阴性时抑制非特异性反应,当为阳性时防止判定时间以后的条带显色。

[0117] [6]根据[1]~[5]中任一项的免疫色谱试验片,其中,含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域存在于样品垫上或涂布有标记体区域的垫上。

[0118] [7]根据[1]~[6]中任一项的免疫色谱试验片,其中,固态酸性试剂选自由丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

[0119] [8]根据[1]~[7]中任一项的免疫色谱试验片,其中,中和试剂为三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

[0120] [9]根据[1]~[8]中任一项的免疫色谱试验片,其中,糖链抗原为原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0121] [10]一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用[1]~[9]中任一项的免疫色谱试验片,通过免疫色谱法测定检体中的糖链抗原,上述方法包括:

[0122] 当免疫色谱试验片具有含浸有固态酸性试剂的区域时,将检体与亚硝酸溶液混合,当免疫色谱试验片具有含浸有亚硝酸盐的区域时,将检体与酸性溶液混合,并添加至上述免疫色谱试验片的样品垫,

[0123] 在含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸盐的区域中,通过亚硝酸盐与固态酸性试剂反应产生的亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原,在含浸有中和试剂的区域,包

含所述糖链抗原的酸性溶液被中和,

[0124] 在检测区域中,形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,通过上述免疫色谱法,含浸有中和试剂的区域的较高的吸水性和较高的保水性使得包含所述糖链抗原的酸性溶液被充分中和,通过含浸有中和试剂的区域的较低的释放性或者持续的释放性抑制剩余的酸性溶液到达检测区域,或者通过将充分中和后的试验液持续地添加至检测区域来抑制非特异性反应,并对检体中的糖链抗原进行测定。

[0125] 其结果是,能够促进免疫色谱试验片上的糖链抗原的提取。

[0126] 进而,通过向含浸使固态酸性试剂或亚硝酸盐或中和试剂等检体处理试剂含浸的疏水性较高的垫的试剂中添加Triton X-100、Triton X-114等聚氧乙烯辛基苯基醚、Tween 20、Tween 80等聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、Brij-35、Brij-58等聚氧乙烯烷基醚、胆酸钠、脱氧胆酸等具有类固醇骨架的胆酸类、十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠等阴离子类表面活性剂等表面活性剂来控制试剂的疏水度,能够将添加口上的检体处理时间设计为任意的时间。优选地,通过添加表面活性剂,能够停留足够的时间来进行检体处理,且检体样本溶液能够适宜地展开。即能够用固态酸性试剂或亚硝酸盐充分处理检体并提取糖链抗原,并且能在含浸有中和试剂的垫存在的下游展开。

[0127] 此外,也可以不用疏水性较高的垫和表面活性剂进行控制,作为免疫色谱试验片的含浸固态酸性试剂或亚硝酸盐或中和试剂等检体处理试剂的垫的制造所使用的原材料,选择亲水度较高的原材料,将液体的流动速度、即检体样本溶液在免疫色谱试验片上展开的时间调节为较长。作为亲水度较高的原材料,例如可列举具有厚度的滤纸,其厚度为210~580 $\mu\text{m}$ 。

[0128] 进而,为了使样本溶液容易保持在垫上,也可不使用表面活性剂,而使用其他具有固定化作用的高分子化合物(例如,PVA(聚乙烯醇)或PLL(聚L-赖氨酸))。该方法也能够促进免疫色谱试验片上的糖链抗原的提取。

[0129] 在具有上述(1)、(2)、(3)中任意一项的至少一个构造的免疫色谱装置中,能够使添加的检体样本溶液在免疫色谱试验片上展开的时间变长,使向下游的含浸有中和试剂的垫(中和试剂区域)的展开延迟。

[0130] 此外,具有上述(1)、(2)、(3)中任意一项的至少一个构造的免疫色谱装置不仅可作为用于在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理的装置利用,还可作为通过免疫色谱试验片上含浸的试剂在试验片上对检体进行处理的免疫色谱装置来利用。

[0131] 本发明除了用于亚硝酸提取以外,也可用于通过pH或化合物将作为检测目的的待分析物在免疫色谱试剂的测试装置上进行孵育的情况。

[0132] 基于将具有图1的形态的免疫色谱试验片存放到图4的存放容器的免疫色谱装置,阐述本发明的装置的使用方法。以下的使用方法为将检体与亚硝酸溶液混合,利用含浸有固态酸性试剂和中和试剂的免疫色谱法进行测定的方法,而对于将检体与酸性溶液混合,采用含浸有亚硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验法进行测定的方法也可以参考以下的使用方法的说明来进行。

[0133] 通过将检体或使用检体制备的样本与亚硝酸盐溶液接触混合,使检体悬浮于亚硝酸盐溶液,添加至装置的检体添加口进行供给来开始测定。此时,将5~100 $\mu\text{L}$ 的检体与0.01~2mL的0.1M~8M的亚硝酸盐混合,供给至添加口5~200 $\mu\text{L}$ 即可。作为亚硝酸盐,可列举亚

硝酸钠、亚硝酸钾等。

[0134] 供给至添加口9的含有被检测物质即糖链抗原的检体移动至样品垫,通过毛细管作用,向样品垫4上的固态酸性试剂区域5及中和试剂区域6展开,进而依次向标记体区域2、支撑体1、吸收带7以水平方向展开。在固态酸性试剂区域5,与检体混合的亚硝酸盐与固态酸性试剂区域5上的固态酸性试剂反应,产生游离的亚硝酸,在亚硝酸的作用下从检体提取出糖链抗原。提取的糖链抗原与酸性的展开溶液一起向中和试剂区域6移动并展开,在中和试剂区域6中,含糖链抗原的酸性的展开溶液的pH被中和调整至中性区域。其结果是,糖链抗原在中性条件下进一步向下游移动并展开。在标记体区域2中,检体样本展开的同时标记抗体被释放至液体中并向支撑体1展开。当检体样本中存在糖链抗原时,在支撑体1的检测区域3,糖链抗原被捕捉抗体特异性地捕捉,并且糖链抗原还通过特异性反应与标记抗体形成复合体。由此,在检测区域3实现通过糖链抗原的抗体的夹心,能够在检测区域3对标记抗体-糖链抗原复合物进行测定。可以通过免疫色谱装置的判定部观察检测区域。

[0135] 根据使用本发明的免疫色谱试验片的方法,由于检体中的糖链抗原的提取在免疫色谱试验片上进行,因此在使用免疫色谱试验片进行测定之前无需事先提取检体中的糖链抗原,可以通过一步对检体中的糖链抗原进行测定。

[0136] 本发明的编入了干燥后的包含固态酸性试剂或亚硝酸盐的垫的免疫色谱试验片,能够在试剂上高效的进行提取。

[0137] 检体添加口的面积可以与包含固态酸性试剂的垫(固态酸性试剂区域)的面积基本相等。如此一来,更多的样本可瞬间与固态酸性试剂接触。进而,通过进行涂布和含浸的部件使用疏水性较高的无纺布,在样本被添加之后不会立刻向下游的含浸有中和试剂的垫(中和试剂区域)展开。如此一来,样本在检体添加部被保持1~2分钟,能够充分地进行抗原提取。

[0138] 此外,在本发明中,当固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域重叠接触时,设置为在固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域之间夹入有液体不能通过的片材。通过设置片材,能够起到以下三个效果。

[0139] (A) 能够抑制试验片保存时邻接的两个区域中的试剂移动。其结果是,能够防止固态酸性试剂或亚硝酸盐与中和试剂接触产生的反应。其结果是,能够提高试剂的稳定性。

[0140] (B) 此外,在添加与亚硝酸盐或酸性试剂混合而得的检体时,能够防止检体到达固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域之后立刻移动至中和试剂区域,使得糖链抗原的提取不够充分的情况。即,降低包含检体的液体从固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域向中和试剂区域移动的速度,延长包含检体的液体在固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域的停留时间,其结果是,可充分提取糖链抗原,提高测定灵敏度。

[0141] (C) 进而,在添加与亚硝酸盐或酸性试剂混合而得的检体时,能够防止如下情况:检体到达固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域之后立刻向中和试剂区域移动,移动后的包含检体的液体逆流至固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域,使固态酸性试剂或亚硝酸盐的活性下降,提取效率下降。即,暂时防止到达中和试剂区域的包含检体的液体逆流至固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域,防止固态酸性试剂或亚硝酸盐的活性下降,使亚硝酸对糖链抗原的提取处理效率良好地进行,提高测定灵敏度。

[0142] 固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域之间设置的片材的原材料只

要是使液体不能通过的原材料则不做限制,例如可以使用PET(聚对苯二甲酸乙二醇酯)片材、聚乙烯片材等树脂制成的片材。树脂制成的片材也称为树脂制成的膜。

[0143] 片材也可设置为固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域部分接触并重叠。此时,固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域的重叠部分的长度优选尽可能较短,例如5mm以下,优选为3mm以下,进一步优选为2mm以下。

[0144] 此外,也可以按固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域不接触的方式设置片材,且为含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫覆盖于PET片材上的形状。此时,中和区域完全被片材覆盖,在该片材上设置固态酸性试剂区域或亚硝酸区域即可。此时,固态酸性试剂区域或亚硝酸区域内的液体不会直接移动至中和区域,而是在片材上流动后到达中和试剂区域。

[0145] 片材例如可仅设于固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域之间。另一方面,以覆盖免疫色谱试验片的上侧的方式将树脂制成的片材作为顶部层压片材贴附时,顶部层压片材除了覆盖固态酸性试剂区域或亚硝酸区域以外,当固态酸性试剂区域或亚硝酸区域兼做样品垫时,也可以按覆盖样品垫以外的中和试剂区域、标记体区域、支撑体、检测区域、吸收带的方式贴附,只需将固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域贴附于贴附在中和试剂部分的上部的顶部层压片材的上部即可。在图2和图3中示出这种免疫色谱试验片的结构。

[0146] 即本发明包括以下发明。

[0147] [1]一种免疫色谱试验片,包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在所述含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体的情况下具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体的情况下具有含浸有亚硝酸盐的区域,所述免疫色谱试验片用于提取检体中的糖链抗原并进行测定,其中,

[0148] 在含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与含浸有中和试剂的区域之间,夹入树脂制成的片材来抑制两区域间的试剂的移动或检体溶液的移动。

[0149] [2]根据[1]的免疫色谱试验片,其中,样品垫上存在含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域。

[0150] [3]根据[1]或[2]的免疫色谱试验片,其中,以含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与含浸有中和试剂的区域部分接触的方式夹入树脂制成的片材。

[0151] [4]根据[1]或[2]的免疫色谱试验片,其中,以含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与含浸有中和试剂的区域不接触的方式夹入树脂制成的片材。

[0152] [5]根据[2]~[4]中任一项的免疫色谱试验片,其中,免疫色谱试验片上的最上游的样品垫上存在含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域,样品垫以外的区域被树脂制成的片材覆盖,在含浸有中和试剂的区域的上部的树脂制成的片材的上部,存在含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的样品垫。

[0153] [6]根据[1]~[5]中任一项的免疫色谱试验片,其中,固态酸性试剂选自由丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

[0154] [7]根据[1]~[6]中任一项的免疫色谱试验片,其中,中和试剂为三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

[0155] [8]根据[1]~[7]中任一项的免疫色谱试验片,其中,糖链抗原为原生动动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0156] [9]一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用[1]~[8]中任一项的免疫色谱试验片,通过免疫色谱法测定检体中的糖链抗原,所述测定检体中的糖链抗原的方法包括:

[0157] 当免疫色谱装置具有含浸有固态酸性试剂的区域时,将检体与亚硝酸溶液混合,当免疫色谱装置具有含浸有亚硝酸盐的区域时,将检体与酸性溶液混合,并添加至所述免疫色谱装置的样品垫,

[0158] 在含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸盐的区域中,通过亚硝酸盐与固态酸性试剂反应产生的亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原,在含浸有中和试剂的区域,包含所述糖链抗原的酸性溶液被中和,

[0159] 在检测区域中,形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,通过上述免疫色谱法控制免疫色谱试验片上的检体的展开速度或方向,控制使用酸性试剂、亚硝酸盐和中和试剂进行的处理,并对检体中的糖链抗原进行测定。

[0160] 在本发明的方法中,对作为检体的生物样本不做特别限制,可列举血清、血浆、血液、尿、便、唾液、组织液、脊髓液、擦拭液等体液等或其稀释物。

[0161] 在使用本发明的免疫色谱装置的方法中,作为测定对象的被检测物质为可通过利用免疫分析即抗原抗体反应的分析进行测定的糖链抗原。作为抗原,可列举通过亚硝酸提取处理提取的存在于细菌的细胞壁的糖链抗原即多糖等。包含该些物质的原生动动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等也可进行测定。通过使用本发明的免疫色谱试验片的方法,可以确认被检体的生物样本中是否含有来源于原生动动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等的糖链抗原,当含有糖链抗原时,可以判断被检体患有原生动动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等引起的感染病症。例如,能够检测A组B溶血性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌、军团菌、弯曲杆菌等感染的有无。

[0162] 通过以下的实施例具体说明本发明,本发明不限于该些实施例。

[0163] 在以下的实施例中,如无特殊说明,%表示w/v%。

[0164] 实施例1:添加口的大小的研究

[0165] 1、抗*Streptococcus pyogenes* (A组B溶血性链球菌)抗体在硝基纤维素膜(支撑体)上的固定化

[0166] 准备用纯净水将抗*Streptococcus pyogenes*抗体稀释至1.0mg/mL的液体和抗兔IgG抗体,分别在后衬有PET(聚对苯二甲酸乙二醇酯)膜的硝基纤维素膜的样品垫侧线状地涂布抗*Streptococcus pyogenes*抗体,在吸收带侧线状地涂布抗兔IgG抗体。之后,将硝基纤维素膜在45°C下干燥30分钟,得到抗*Streptococcus pyogenes*抗体固定化膜。在本实施例中,将该膜称为“抗体固定化膜”。

[0167] 2、抗*Streptococcus pyogenes*抗体在着色聚苯乙烯颗粒上的固定化

[0168] 用纯净水将抗*Streptococcus pyogenes*抗体稀释至1.0mg/mL,向其中加入着色聚苯乙烯颗粒至0.1%,搅拌后加入碳二亚胺至1%,进一步搅拌。通过离心操作去除上清,再悬浮于50mM Tris (pH9.0)和3%BSA,得到0.04%的结合有抗*Streptococcus pyogenes*抗体

的着色聚苯乙烯颗粒悬浮液。在本实施例中,将该颗粒称为“抗体固定化颗粒”。

[0169] 3、结合有抗Streptococcus pyogenes抗体的着色聚苯乙烯颗粒的涂布和干燥

[0170] 将2中制作的抗体固定化颗粒悬浮液以规定量涂布于无纺布,在45℃下干燥30分钟。在本实施例中,将得到的无纺布称为“干燥垫”。

[0171] 4、中和试剂(碱性试剂)垫的制作

[0172] 作为中和试剂(碱性试剂),将3M Trizma(商标名)碱(Tris碱)和1.5%TritonX100按30μL/cm涂布于滤纸(东洋滤纸株式会社, No.26-3)。

[0173] 5、固态酸性试剂垫的制作

[0174] 作为固态酸性试剂,将1.0M酒石酸、0.5%TritonX100按13μL/cm涂布于无纺布(尤尼吉可株式会社(Unitika Ltd.),Elves)。涂布后立即在45℃下干燥1小时,得到含浸有固态酸性试剂的无纺布。

[0175] 6、Streptococcus pyogenes检测用免疫色谱试验片的制作

[0176] 将1中制作的抗体固定化膜、3中制作的干燥垫、4中制作的中和试剂(碱性试剂)垫、5中制作的固态酸性试剂垫与其他部件(后衬片材、吸收带)贴合后切割成5mm的宽度,作为Streptococcus pyogenes试验片。在本实施例中,将含浸有固态酸性试剂和中和试剂(碱性试剂)的滤纸作为样品垫使用的试验片称为“本发明的免疫色谱试验片”。需要说明的是,免疫色谱试验片中,沿着检体的流动从上游开始依次具备含浸有固态酸性试剂的无纺布、含浸有中和试剂(碱性试剂)的无纺布、干燥垫(标记体区域)、抗体固定化膜(检测区域)、吸收带。

[0177] 7、免疫色谱装置

[0178] 将本发明的免疫色谱试验片分别装入添加口长度为5mm的免疫色谱装置(现有装置)和添加口长度为10mm的免疫色谱装置(添加口加大后的本发明的装置),实施以下试验。

[0179] 8、检体

[0180] 培养Streptococcus pyogenes,使用生理盐水把培养液调制为菌数为 $1.0 \times 10^7$ CFU/mL。

[0181] 此外,作为阴性检体,使用生理盐水。

[0182] 9、测定

[0183] 将20μL检体悬浮于180μL亚硝酸钠溶液(2.0M NaNO<sub>3</sub>、1%Tween20),将其中的75μL添加至本发明的免疫色谱装置的添加口。此外,作为现有方法,将检体悬浮于亚硝酸钠与盐酸混合后的亚硝酸提取液后,将用三羟甲基氨基甲烷溶液中和后的检体悬浮液50μL添加至现有方法的免疫色谱装置(酸性试剂和中和试剂均未固定化)的添加口。5分钟后目测判定对抗Streptococcus pyogenes抗体进行了固定化的规定位置上的着色聚苯乙烯颗粒的沉积的有无和其程度。其线状的沉积的程度按由强到弱依次记为+++、++、+,较难判定时记为±,未确认到沉积时记为-。

[0184] 10、结果

[0185] 【表1】

滴加口长度	重复次数	1min	2min	3min	4min	5min
5mm	N=1	-	±	±	++	++
	N=2	-	±	±	+	++
	N=3	-	±	±	++	++
10.5mm	N=1	±	+	++	+++	+++
	N=2	+	++	++	+++	+++
	N=3	±	+	++	++	+++

[0187] 如表1所示,添加口长度较长为10mm的免疫色谱装置比添加口长度为5mm的免疫色谱装置的测定灵敏度更高。可考虑是亚硝酸处理的抗原提取效率升高的原因。

[0188] 实施例2:表面活性剂的涂布量的研究

[0189] 在实施例1的5的含浸有固态酸性试剂的无纺布的制作中的固态酸性试剂的表面活性剂TritonX100的浓度为0.5%和2.0%的条件下,对试验结果(表2)进行比较研究。

[0190] 【表2】

[0191]

R2添加剂	1min	2min	3min	4min	5min
0.5%Tx100	-	-	+	++	++
2.0%Tx100	-	-	±	+	+

[0192] 从表2的结果可知,表面活性剂浓度较低时测定灵敏度较高。可考虑是亚硝酸处理的抗原提取效率升高的原因。符号说明

[0193] 1…支撑体(包括检测区域);2…标记体区域;3…检测区域;4…样品垫;5…固态酸性试剂区域;6…中和试剂区域;7…吸收带;8…后衬片材;9…装置的添加口;10…装置的判定部。工业上的利用可能性

[0194] 使用本发明的免疫色谱装置可以对A组β溶血性链球菌感染进行高灵敏度的检测。

[0195] 本说明书中所引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用直接并入本说明书。

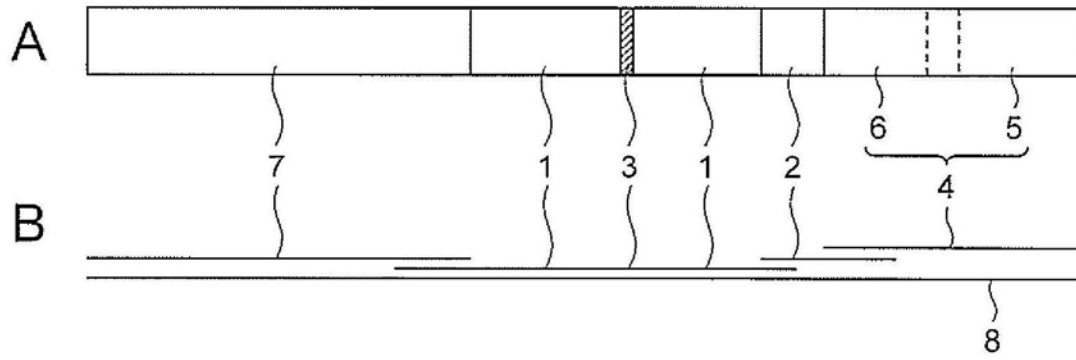


图1

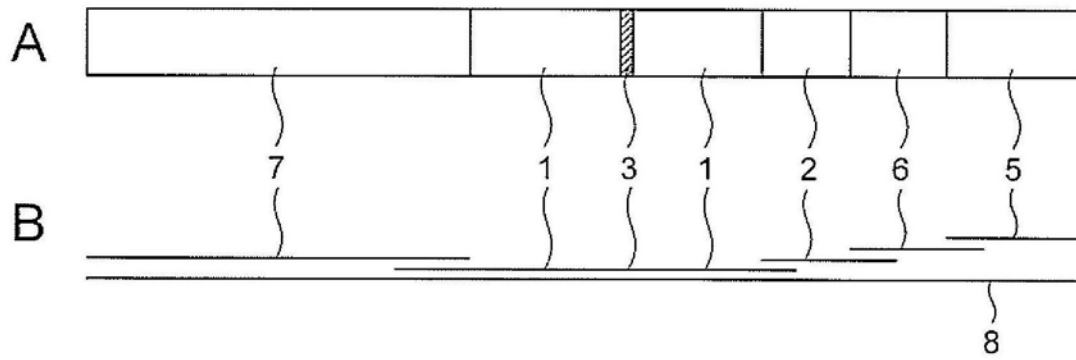
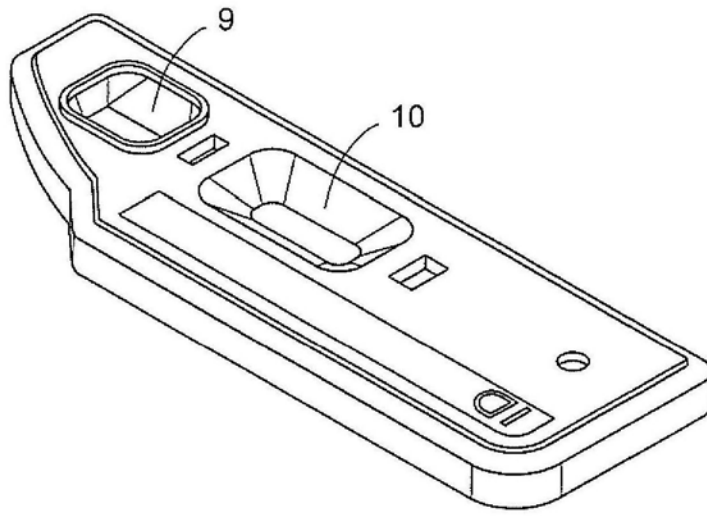


图2

A



B

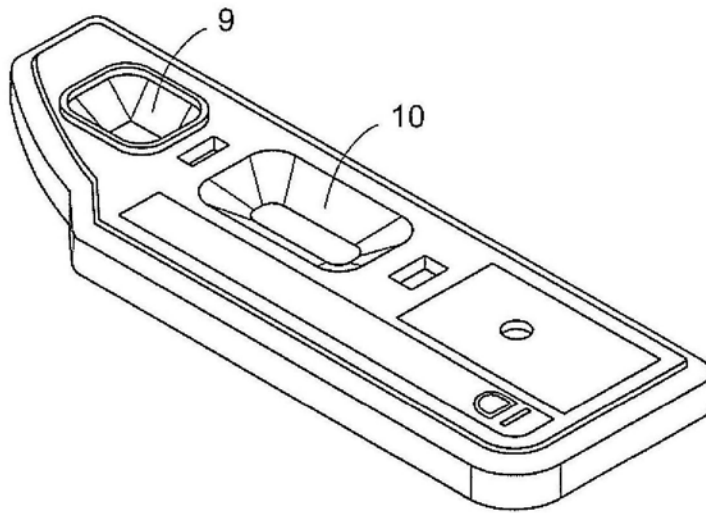
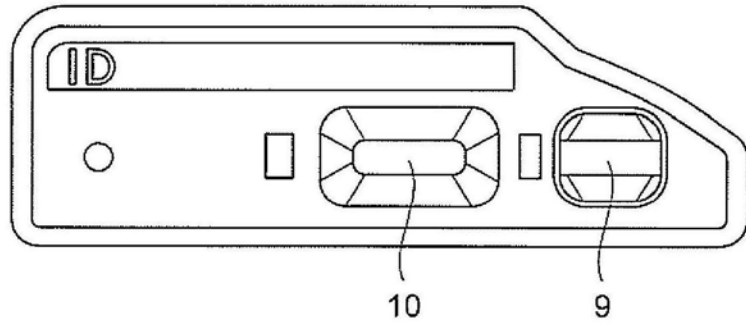


图3

A



B

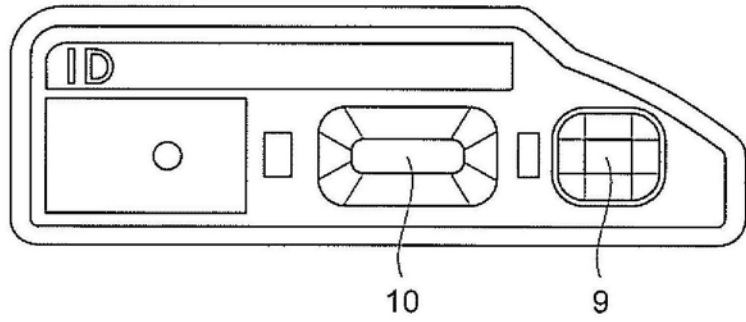


图4

专利名称(译)	用于提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN110418963A</a>	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201880018199.7	申请日	2018-03-14
[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 村松志野 服部友洋		
发明人	加藤大介 村松志野 服部友洋		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	纪秀凤		
优先权	2017049163 2017-03-14 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供一种免疫色谱方法和免疫色谱装置，在在免疫色谱试验片上通过亚硝酸提取来提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱法中，通过用充足的时间进行亚硝酸提取处理能够实现足够的灵敏度的测定。免疫色谱装置包括免疫色谱试验片和存放该试验片的容器，并在试验片的样品垫上具有检体添加口，该免疫色谱试验片包括：添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域，在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体，并对糖链抗原进行测定，该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域，进一步，在该含浸有中和试剂的区域的上游，在使用与亚硝酸盐混合而得的检体的情况下具有含浸有固态酸性试剂的区域，在使用与酸性溶液混合而得的检体的情况下具有含浸有亚硝酸盐的区域，该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原，其中，(i)该免疫色谱装置具有用于保持添加的检体样本溶液并通过将检体样本溶液在短时间内供给至含浸有所述固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取的较大的检体添加口；(ii)添加口与样品垫之间没有间隙，使得样本不从添加口旁溢。

