



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110418964 A

(43)申请公布日 2019. 11. 05

(21)申请号 201880018270.1

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

2017-049213 2017.03.14 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/009901 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/168907 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

(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 纪秀凤

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图1页

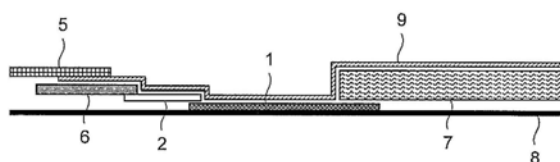
(54)发明名称

可控制检体的展开的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱试验片

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种对免疫色谱试验片上的检体的展开速度和/或方向进行控制并对基于酸性试剂、亚硝酸盐和中和试剂的处理进行适宜地控制的方法或免疫色谱试验片。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，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。



1. 一种免疫色谱试验片,用于提取并测定检体中的糖链抗原,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,

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。

2. 根据权利要求1所述的免疫色谱试验片,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。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫色谱试验片,其中,
所述免疫色谱试验片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有树脂制成的片材。

4. 根据权利要求1或2所述的免疫色谱试验片,其中,
所述免疫色谱试验片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有树脂制成的片材。

5. 根据权利要求2~4中任一项所述的免疫色谱试验片,其中,
在免疫色谱试验片上的最上游存在在样品垫上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,含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的样品垫存在于含浸有中和试剂的区域的上部的树脂制成的片材的上部。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的免疫色谱试验片,其中,
所述固态酸性试剂选自丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的免疫色谱试验片,其中,
所述中和试剂为三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的免疫色谱试验片,其中,
所述糖链抗原为原生动、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

9. 一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用权利要求1~8中任一项所述的免疫色谱试验片,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:

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,并添加至所述免疫色谱试验片的样品垫,

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-标记抗体复合物,所述方法通过免疫色谱法控制免疫色谱试验片上的检体的展开速度和/或方向,控制基于酸性试剂、亚硝酸盐和中和试剂的处理,并对检体中的糖链抗原进行测定。

可控制检体的展开的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱 试验片

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试验片。

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症、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)。此外,还报告有通过层压体使用的PET片材使流速加快进行控制的方法(专利文献4)。

[0008] 在先技术文献

[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

[0013] 专利文献4:日本特开2016-102790号公报。

发明内容

[0014] 发明要解决的课题

[0015] 作为使用免疫色谱试验片对A组β溶血性链球菌(A组β溶链菌)等进行检测的方法,有如下方法:通过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的操作,即可在免疫色谱试验片上进行亚硝酸提取处理的方法,或通过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的操作,即可在免疫色谱试验片上进行亚硝酸提取处理的方法。这些方法所使用的免疫色谱试验片有如下问题:使干燥状态的含浸有酸性试剂或亚硝酸盐

的垫与含浸有中和试剂(碱性试剂)的垫接触并以贴合的状态长期保存时,两种试剂彼此逐渐反应,各自的活性下降。

[0016] 此外,在A组β溶链菌的检测中虽然通过将亚硝酸盐溶液与酸性溶液混合产生的亚硝酸对A组β溶链菌的抗原进行提取,但存在如下问题:当使用干燥状态的含浸有酸性试剂的垫时,检体在短时间内从含浸有酸性试剂的垫向下一个含浸有中和试剂的垫移动,亚硝酸盐与酸性试剂的混合时间较短,没有进行充分的提取,无法得到所需的灵敏度性能。

[0017] 此外,在具有将干燥状态的含浸有酸性试剂的垫与含浸有中和试剂的垫贴合的方式的免疫色谱试验片中,添加检体样本后,一部分检体从含浸有酸性试剂的垫移动至含浸有中和试剂的垫,一旦含浸有酸性试剂的垫与含浸有中和试剂的垫两者成为湿润状态后,中和试剂向含浸有酸性试剂的垫的方向逆流,使酸性试剂的活性下降从而亚硝酸处理对抗原的提取效率良好地实施,有灵敏度下降的风险。

[0018] 为了防止这些问题,而将含浸有酸性试剂的垫与含浸有中和试剂的垫的重叠部分变得过小后(1mm以下),将难以在制造层面进行控制,会有将两个垫重叠时的少量的错位使重叠部分消失的危险,此时,有样本不流动、或流动过慢的问题。

[0019] 此外,也可考虑通过将含浸有酸性试剂的垫与含浸有中和试剂的垫加长,物理性地将酸性试剂与中和试剂之间的距离变大,从而确保长期保存稳定性。然而,与加长的份量对应,需要展开于免疫色谱试验片的检体样本量增加。如果测试所需的样本量增加,则需要更多的亚硝酸盐溶液用于与细分子试管的检体进行混合。此时,检体采集用的棉签所采集的检体被稀释,结果是性能(灵敏度)下降。

[0020] 此外,还可考虑在一片较长的垫上,以扩展后不混合的方式涂布并干燥酸性试剂和中和试剂,并使各试剂的干燥部分不相接。然而,存在如下问题:在长期保存中,空气中的湿度使干燥的试剂溶解并扩展,酸性试剂与中和试剂相接发生中和反应,结果是亚硝酸处理的效率受损。

[0021] 当在免疫色谱试验片上含浸亚硝酸盐来代替酸性试剂时,也会发生上述问题。

[0022] 为解决上述各种问题,本发明的目的在于提供一种对免疫色谱试验片上的检体的展开速度和/或方向进行控制,并对基于酸性试剂、亚硝酸盐和中和试剂的处理进行适宜地控制的方法或免疫色谱试验片。

[0023] 用于解决课题的手段

[0024] 本发明的发明人对如下方法进行了深入研究:对免疫色谱试验片上的检体的展开进行控制,并对基于酸性试剂、亚硝酸盐和中和试剂的处理进行适宜地控制。

[0025] 其结果是发现,通过在含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫与含浸有中和试剂的垫之间夹入PET(聚对苯二甲酸乙二醇酯)片材等树脂制成的片材,尽可能减小含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫与含浸有中和试剂的垫接触的宽度(2mm以下),可提高两种试剂垫的长期保存稳定性。

[0026] 进而发现,通过以下的结构,能够得到充足的检体的抗原提取时间,其结果是能够提高检测灵敏度:以下面的方式设置PET片材,即以含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫与含浸有中和试剂的垫的接触面的宽度变为最小限的方式将PET片材夹入两个垫的重叠部分之间,使含浸有亚硝酸盐的垫与含浸有中和试剂的垫部分接触,从而样本不会立刻向含浸有中和试剂的垫移动,进而检体不易从含浸有中和试剂的垫向含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的

垫逆流。

[0027] 根据这些见解,制作一种如下的免疫色谱试验片:在含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫与含浸有中和试剂的垫之间,以两个垫不接触或者仅少量接触的方式夹入有树脂制成的片材,完成了本发明。

[0028] 即,本发明如下所述。

[0029] [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,

[0030] 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。

[0031] [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。

[0032] [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有树脂制成的片材。

[0033] [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有树脂制成的片材。

[0034] [5]根据[2]~[4]中任一项的免疫色谱试验片,其中,在免疫色谱试验片上的最上游存在在样品垫上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,含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的样品垫存在于含浸有中和试剂的区域的上部的树脂制成的片材的上部。

[0035] [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。

[0036] [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。

[0037] [8]根据[1]~[7]中任一项的免疫色谱试验片,其中,糖链抗原为原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0038] [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,上述方法包括:

[0039] 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,

[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,所述方法通过免疫色谱法

控制免疫色谱试验片上的检体的展开速度和/或方向,控制基于酸性试剂、亚硝酸盐和中和试剂的处理,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2017-049213号的公开内容。

[0043] 发明的效果

[0044] 通过在含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫与含浸有中和试剂的垫之间,以两个垫不接触或者仅少量接触的方式夹入树脂制成的片材,能够提高干燥状态的含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫和含浸有中和试剂的垫在贴合状态下的保存稳定性。进而,检体从含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫移动至含浸有中和试剂的垫的时间变长,或者能够使得检体不会从含浸有中和试剂的垫逆流至含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫,其结果是,通过高效地进行基于亚硝酸的抗原提取从而得到了灵敏度提高的效果。

附图说明

[0045] 图1为模式性地示出具有固态酸性试剂区域和中和试剂区域的免疫色谱试验片(两片垫试验片)的结构图。

[0046] 图2为模式性地示出PET片材贴附于固态酸性试剂区域与中和试剂区域之间的、具有固态酸性试剂区域和中和试剂区域的免疫色谱试验片的结构图。

[0047] 图3为模式性地示出PET片材贴附于固态酸性试剂区域与中和试剂区域之间的、具有固态酸性试剂区域和中和试剂区域的免疫色谱试验片的结构图,为示出了各零件间的距离的图。

具体实施方式

[0048] 以下,对本发明进行详细的说明。

[0049] 本发明涉及一种能简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试验片。

[0050] 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。

[0051] 本发明的免疫色谱试验片也可收容于存放容器内,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,将本发明的装置收纳于该盒子中即可。此外,可以用树脂制成的膜等(PET片材)覆盖对抗原或抗体进行了固定化的试验片的表面。有时将存放容器和收容于其中的试验片一并称为免疫色谱装置。

[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酸则反应体系为酸性,抗原抗体反应受到阻碍。由此,需要中和反应体系中的酸。

[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包含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。混合液到达含浸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。混合液到达含浸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)即在样品垫内含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐,或者在样品垫内含浸有亚硝酸盐的免疫色谱试验片可用于上述(A)方法。此外,在样品垫内含浸有酸性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更上游具有含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域。

[0071] 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。

[0072] 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1.0~5.0 $\mu\text{l}/\text{sec}$,进一步将1 cm/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10~100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$,优选地,将1 cm/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 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。

[0073] 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10~400 g/m^2 。其中,“克重”是指布等的平均每单位面积(1 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 g/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 g/m^2 以上,当克重为300 g/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 g/m^2 以下。最优选克重为250~270 g/m^2 。

[0074] 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0.1~2.0 mm 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0.4 mm 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0.4~0.8 mm ,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0.6 mm 程度。

[0075] “吸水性”优选为平均每1 cm/m^2 的吸水量为10~100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$,且吸水速度为1.0~5.0 $\mu\text{l}/\text{sec}$ 。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200 μl 的染色后溶液(1%Tween20+红色102号),向其中放入将大小为5 \times 60 mm 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200 μl 减去格槽中剩余的液量后在原材料平均每1 cm^2 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30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 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30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 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1.0~5.0 $\mu\text{l}/\text{sec}$,更优选为吸水速度

在 $2.0\mu\text{l}/\text{sec}$ 以下。

[0076] 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 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的碎片置于膜上，向其中添加 $70\mu\text{l}$ 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 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ，更优选保水量为 $15\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 以上。

[0077] 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 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的碎片置于膜上，向其中添加 $70\mu\text{l}$ 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^2 以下，更优选释放性为 20mm^2 以下。

[0078] 即，本发明包括以下发明。

[0079] [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，

[0080] 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，

[0081] 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。

[0082] [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，

[0083] 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。

[0084] [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 20mm^2 以下。

[0085] [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。

[0086] [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。

[0087] [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。

[0088] [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。

[0089] [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。

[0090] [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。

[0091] [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：

[0092] 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，

[0093] 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，

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 对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,优选为选择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能够得到效果的最合适的量。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 对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。可以理解的是,优选为选择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能够得到效果的最合适的量。

[0107] 为了将中和试剂含浸于多孔性材料,将中和试剂一次性溶解,并将溶液涂布于多孔性材料,之后干燥即可。

[0108] 图1为示出了典型的免疫色谱试验片的一种优选方式的图。图1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,然而也可含浸亚硝酸盐来代替固态酸性试剂,此时,为含浸有亚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亚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所示。图1中,1为支撑体,2为标记体区域,3为检测区域,7为吸收带,8为后衬片材。

[0109] 图1A为顶视图,图1B为剖视图。在图1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1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分别设置为两片的多孔性材料(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。

[0110] 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。

[0111] (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。

[0112] (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。

[0113] (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。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 根据图2和图3的方式,对本发明的试验片的使用方法进行阐述。以下的使用方式为将检体与亚硝酸溶液混合,使用含浸有固态酸性试剂和中和试剂的免疫色谱试验片进行测定的方法,而对于将检体与酸性溶液混合,使用含浸有亚硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验片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。

[0119] 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,添加至兼做样品垫的固态酸性试剂区域5进行供给来开始测定。此时,将5~100 μ L的检体与0.01~2mL的0.1M~8M的亚硝酸盐混合,将5~200 μ L供给至兼做样品垫的固态酸性试剂区域5即可。作为亚硝酸盐,可列举亚硝酸钠、亚硝酸钾等。

[0120] 供给至兼做样品垫的固态酸性试剂区域5的作为被检测物质的包含糖链抗原的检体,通过毛细管作用,向兼做样品垫的固态酸性试剂区域5和中和试剂区域6展开。此时,在固态酸性试剂区域5与中和试剂区域6之间,存在PET片材即顶部层压片材。因此,检体从固态酸性试剂区域5向中和试剂区域6的流动受到抑制,并且,能够阻碍暂时进入中和试剂区域6的检体逆流至固态酸性试剂区域5。然后,检体依次向标记体区域2、支撑体1、吸收带7沿水平方向展开。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,在该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展开并移动,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展开并移动。在标记体区域2中,在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中,糖链抗原被捕捉抗体特异性地捕捉,并且糖链抗原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中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。

[0121] 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,可用一步对检体中的糖链抗原进行测定。

[0122] 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。

[0123] 在使用本发明的免疫色谱试验片的方法中,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、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、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、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。

[0124] 本发明的方法不仅限于在免疫色谱试验片含浸有酸性试剂和碱性试剂的情况,也可用于免疫色谱试验片上含浸有多个即两个至n个效果不同且保存中应避免反应的情况。

[0125] 此外,本发明的免疫色谱装置也可将添加口设置得较宽。

[0126] 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以往的免疫色谱装置(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(19.25mm²)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(38.5mm²)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大致尺寸类似,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(24~75mm²)的添加口的免疫色谱装置为添加口较宽的免疫色谱装置,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,即为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。上述的例子为近似矩形的添加口的情况,而添加口的形状也可为三角形或圆形。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24~75mm²,优选为35~75mm²。

[0127] 在以往的免疫色谱法中,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。

[0128] 由于本发明的免疫色谱装置的添加口设置得较宽,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10 μ L~200 μ L。

[0129] 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。

[0130] 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溢出。

[0131] 本发明的免疫色谱装置的添加口设置得较宽,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暂存于添加口内。

[0132] 其结果是,由于检体样本溶液的全部液体被免疫色谱试验片吸收需要较长的时间,因此有时会出现样本溶液未被免疫色谱试验片吸收而溢出免疫色谱试验片之外的情况。

[0133] 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:通过用大于或等于添加口的外轮廓尺寸的后衬片材支撑样品垫,由后衬片材产生将样品垫按压至添加口的力使添加口与样品垫之间没有间隙,使得样本不会从添加口溢出,因此能够防止样本溶液的渗漏。

[0134] 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与添加口之间容易产生间隙,容易发生样本溶液的渗漏。

[0135] 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渗漏。

[0136] 其结果是,能够高效地进行免疫色谱试验片上的糖链抗原的提取。

[0137] 即,本发明包括以下发明。

[0138] [1]一种免疫色谱装置,是在试验片的样品垫上具有检体添加口的免疫色谱装置,包括免疫色谱试验片和存放上述试验片的容器,上述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,上述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,在上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,上述免疫色谱试验片用于提取并测量检体中的糖链抗原,其中,

[0139] (i)上述免疫色谱装置具有较宽的检体添加口,该检体添加口用于通过对添加的检体样本溶液进行保持,并将检体样本溶液短时间内供给至含浸有上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；

[0140] (ii) 添加口与样品垫之间没有间隙，使得样本不会从添加口溢出。

[0141] [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24~75mm²的尺寸。

[0142] [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，通过使检体样本溶液的展开时间延迟，促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0143] [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。

[0144] [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，通过使检体样本溶液的展开时间延迟，促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0145] [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。

[0146] [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，并对检体样本溶液的展开时间进行调节，促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0147] [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。

[0148] [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，并对检体样本溶液的展开时间进行调节，促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0149] [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。

[0150] [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。

[0151] [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。

[0152] [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。

[0153] [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。

[0154] [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，上述方法包括：

[0155] 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，并添加至上述免疫色谱装置的样品垫，

[0156] 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,包含上述糖链抗原的酸性溶液被中和,

[0157] 在检测区域中形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,上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。

[0158] **【实施例】**

[0159] 通过以下的实施例具体说明本发明,本发明不限于这些实施例。

[0160] 在以下的实施例中,如无特殊说明,%表示w/v%。

[0161] A组溶血性链球菌测定用免疫色谱试验片的例子

[0162] 亚硝酸盐(液态试剂) 2.0M亚硝酸钠、1%Tween20

[0163] 固态酸性试剂(含浸于免疫色谱试验片) 1.0M有机酸(酒石酸)、0.2%TritonX100

[0164] 中和试剂(含浸于免疫色谱试验片) 3.0M Tris HCl (pH9.0)、1.5%TritonX100

[0165] 1、抗Streptococcus pyogenes (A组β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,在后衬有PET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°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”。

[0171] 4、中和试剂(碱性试剂)的涂布

[0172] 将上述的中和试剂(碱性试剂)按30μL/cm涂布于滤纸(东洋滤纸;No.26-3)。

[0173] 5、含浸有固态酸性试剂的无纺布的制作

[0174] 将上述的固态酸性试剂按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°C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] 在试纸条的后衬片材上,首先将膜(支撑体)(宽度30mm)贴附于距离下游20mm的部分。

[0177] 在膜的下游贴附用于吸收液体的吸收带。

[0178] 在膜的上游,以与膜之间重叠2mm的方式,贴附涂布有抗体结合胶乳的宽度为10mm的玻璃纤维(C.Pad)。

[0179] 以C.Pad与含浸有中和试剂的垫重叠4mm的方式,贴附含浸有中和试剂的垫。

[0180] 顺着免疫色谱试验片的上部,贴附PET片材即顶部层压片材(60mm)。

[0181] 最后,以顶部层压片材介于之间并且含浸有固态酸性试剂的垫与含浸有中和试剂的垫相接触的方式,把含浸有固态酸性试剂的垫顺着免疫色谱试验片的上游(下端)贴附于含浸有中和试剂的垫之上。

[0182] 将这样制作的免疫色谱试验片的结构示出于图2。此外,在图3中,将模式图与各零件间的距离(mm)一并示出。需要说明的是,在图2和图3中,含浸有固态酸性试剂的垫和含浸有中和试剂的垫虽然表现为在两个垫之间不存在顶部层压片材的部位也不接触而分离,实际上,在没有顶部层压片材的部分两个垫也接触。

[0183] 将在含浸有固态酸性试剂的区域与含浸有中和试剂的区域之间未夹入PET片材的免疫色谱试验片,作为以往技术的免疫色谱试验片使用。

[0184] 将结果示出于表1。表1示出5分钟判定时的显色强度。

[0185] 表1的“在上面”为用以往的方法贴附顶部层压片材的试验片,示出使用在含浸有固态酸性试剂的垫的上部有顶部层压片材的试验片的试验结果。其中,不是含浸有固态酸性试剂的垫的整面被顶部层压片材覆盖,而是该垫的下游部的3mm程度的部分被覆盖。

[0186] 表1中的“在之间”为本发明的试验片,含浸有固态酸性试剂的垫与含浸有中和试剂的垫之间贴附有顶部层压片材。含浸有固态酸性试剂的垫与含浸有中和试剂的垫直接接触的接触面为2mm。

[0187] 如表1所示,使用本发明的试验片进行试验时(“在之间”),1~2管的灵敏度较高。

[0188] 【表1】

		对弱阳性检体成倍稀释						
		强阳性	弱阳性	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵
[0189] 在上面	n=1	+	+	+	+	-	-	-
	n=2	+	+	+	+	-	-	-
在之间	n=1	++	+	+	+	+	±	-
	n=2	+++	+	+	+	+	±	-

[0190] 附图标记说明

[0191] 1…支撑体(包括检测区域);2…标记体区域;3…检测区域;5…固态酸性试剂区域(样品垫);6…中和试剂区域;7…吸收带;8…后衬片材;9…顶部层压片材。

[0192] 工业上的利用可能性

[0193] 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。

[0194] 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。

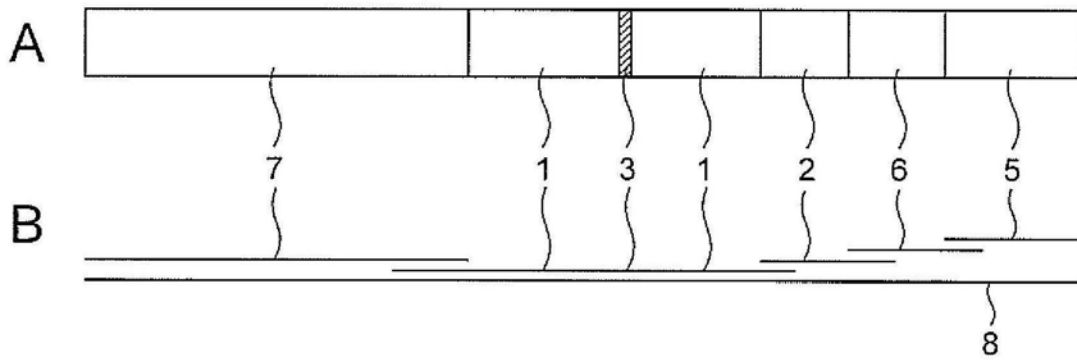


图1

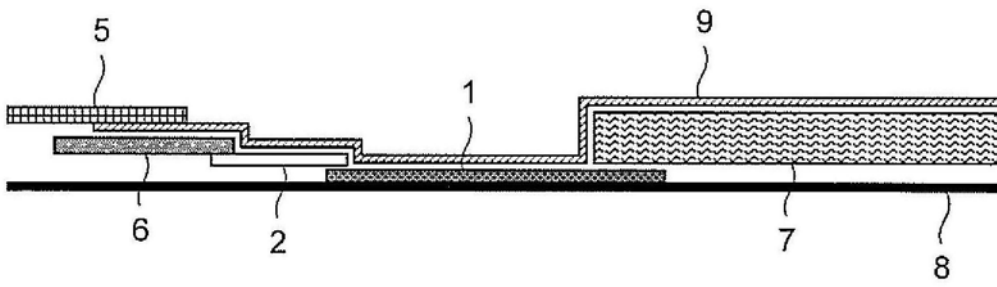


图2

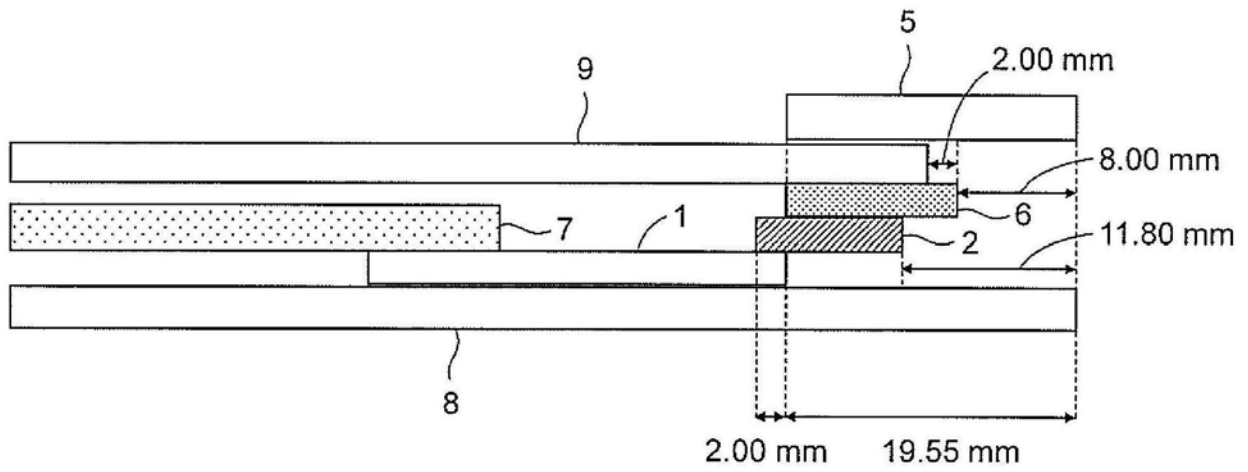


图3

专利名称(译)	可控制检体的展开的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱试验片		
公开(公告)号	CN110418964A	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201880018270.1	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 B01L3/5023 B01L2200/16 B01L2300/0825 G01N33/5308		
代理人(译)	纪秀凤		
优先权	2017049213 2017-03-14 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种对免疫色谱试验片上的检体的展开速度和/或方向进行控制并对基于酸性试剂、亚硝酸盐和中和试剂的处理进行适宜地控制的方法或免疫色谱试验片。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，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。

