



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107709995 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201680031731.X

(22)申请日 2016.06.01

(30)优先权数据

2015-111732 2015.06.01 JP

2015-171163 2015.08.31 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/066310 2016.06.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/194986 JA 2016.12.08

(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 岩本久彦

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 张苏娜 常海涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G07K 14/30(2006.01)

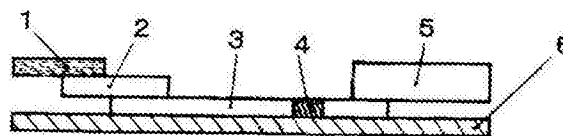
权利要求书1页 说明书20页
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

肺炎支原体检测用免疫层析分析装置

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种可以迅速且简单地以高灵敏度检测肺炎支原体从而更加可靠且迅速地进行肺炎支原体诊断的免疫层析分析装置。本发明涉及一种免疫层析分析装置,其用于检测肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*),该免疫层析分析装置包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,其中,所述标记物质保持部以及检测部含有强烈识别由序列编号2的氨基酸序列构成的肺炎支原体的P30蛋白的结构域III的抗体。



1. 一种免疫层析分析装置,其用于检测肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*),该免疫层析分析装置包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,其中,

所述标记物质保持部及检测部含有强烈识别由序列编号2的氨基酸序列构成的肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析分析装置,其中,所述抗体识别所述结构域111当中的序列编号3的氨基酸序列。

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标记物质为金粒子,并且所述标记物质保持部含有 0.25 至 $0.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的所述金粒子。

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. 根据权利要求4所述的免疫层析分析试剂盒,其中,所述检体稀释液含有至少一种非离子性表面活性剂。

6. 根据权利要求5所述的免疫层析分析试剂盒,其中,所述检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂的50%以上是HLB值为13至18的非离子性表面活性剂。

7. 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以检测检体中的肺炎支原体,所述方法包括以下步骤(1)至(4):

(1) 将经由检体稀释液稀释检体而得到的含有检体的液体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并且强烈识别由序列编号2的氨基酸序列构成的肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体(以下表示为抗体P30(A))来识别肺炎支原体的步骤;

(3) 使所述检体以及抗体P30(A)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抗体P30(A)来检测所展开的移动相中的肺炎支原体的步骤。

肺炎支原体检测用免疫层析分析装置

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测肺炎支原体的免疫层析分析装置、免疫层析分析试剂盒以及其检测方法。

背景技术

[0002] 支原体肺炎是由肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) 引起的呼吸系统感染。肺炎支原体是非典型肺炎的代表性致病菌。支原体肺炎患者的年龄集中在幼儿期、学龄儿童期以及青春期 (5岁至35岁)，初期症状呈现为感冒综合征样的症状 (所谓的感冒样症状)，但是随着时间的推移，咳嗽变强，并且解热后有时也会持续约一个月。

[0003] 常规上已经利用了多种方法以诊断支原体肺炎。例如，采用了使用针对肺炎支原体的抗体的检测方法。在支原体肺炎中，想要在感染初期就判定有无肺炎支原体感染以选择抗生素这样的临床需求较强，通过在操作简便的免疫层析分析法中应用这些方法，从而可以迅速且简单地进行肺炎支原体的检测，并且可以进行支原体肺炎的诊断。

[0004] 作为在免疫层析分析法中使用的免疫层析分析装置的最简单的结构，为试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部相互连接而成的结构。

[0005] 例如，专利文献1公开了使用对肺炎支原体的P1蛋白为特异性的单克隆抗体的免疫层析分析装置。

[0006] 另外，专利文献2公开了使用对肺炎支原体的核糖体蛋白Ribosomal Protein L7/L12为特异性的抗体的免疫层析分析装置。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1：日本特开2013-72663号公报

[0010] 专利文献2：日本特开2014-167439号公报

发明内容

[0011] 发明所要解决的课题

[0012] 然而，在常规使用的利用免疫层析分析装置的诊断方法中，该免疫层析分析装置使用了针对肺炎支原体的抗体，由于对于肺炎支原体的灵敏度并不充分，非特异性的反应也较多，因而作为肺炎支原体感染的诊断方法而言并不是充分的。

[0013] 因此，本发明人进行了深入的研究，结果是：作为与肺炎支原体的P1蛋白相比能够以更高的灵敏度检测出的靶蛋白，本发明人将注意力集中到肺炎支原体的P30蛋白，发现特别是识别P30蛋白的特定部位的抗体可以高灵敏度地检测出肺炎支原体。

[0014] 另外，本发明人发现，通过使用了与肺炎支原体的P30蛋白的特定部位结合的抗体的免疫层析分析装置，可以迅速且简单地以高灵敏度检测出肺炎支原体感染，从而完成了本发明。

[0015] 用于解决课题的方案

[0016] 因此,本发明如下所述。

[0017] 1.一种免疫层析分析装置,其用于检测肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*),该免疫层析分析装置包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,其中,

[0018] 所述标记物质保持部及检测部含有强烈识别由序列编号2的氨基酸序列构成的肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体。

[0019] 2.根据上述1所述的免疫层析分析装置,其中,所述抗体识别所述结构域111当中的序列编号3的氨基酸序列。

[0020] 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标记物质为金粒子,并且所述标记物质保持部含有0.25至0.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的所述金粒子。

[0021] 4.一种免疫层析分析试剂盒,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。

[0022] 5.根据上述4所述的免疫层析分析试剂盒,其中,所述检体稀释液含有至少一种非离子性表面活性剂。

[0023] 6.根据上述5所述的免疫层析分析试剂盒,其中,所述检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂的50%以上是HLB值为13至18的非离子性表面活性剂。

[0024] 7.一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肺炎支原体,所述方法包括以下步骤(1)至(4):

[0025] (1)将经由检体稀释液稀释检体而得的含有检体的液体添加到试样添加部中的步骤;

[0026] (2)通过保持在标记物质保持部中并且强烈识别由序列编号2的氨基酸序列构成的肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体(以下表示为抗体P30(A))来识别肺炎支原体的步骤;

[0027] (3)使所述检体及抗体P30(A)作为移动相在层析介质部中展开的步骤;以及

[0028] (4)通过检测部中所含的抗体P30(A)来检测所展开的移动相中的肺炎支原体的步骤。

[0029] 发明效果

[0030] 根据本发明,通过使用这样的免疫层析分析装置,该免疫层析分析装置使用了与肺炎支原体的P30蛋白的特定部位结合的抗体,可以迅速简单并且高灵敏度地检测出肺炎支原体。也就是说,可以更加可靠且迅速地进行肺炎支原体的诊断。

[0031] 附图简要说明

[0032] [图1]图1是用于说明本发明一个实施方式的免疫层析分析装置的结构剖面图。

[0033] [图2]图2是示出了使用本发明的免疫层析分析装置进行肺炎支原体的检测并测定其显色强度而得的结果的图。

[0034] [图3]图3是示出了使用本发明的免疫层析分析装置进行肺炎支原体的检测并测定其显色强度而得的结果的图。

[0035] [图4]图4是示出了使用本发明的免疫层析分析装置进行肺炎支原体的P30蛋白的检测并测定其显色强度而得的结果的图。

[0036] [图5]图5是示出了在试验例4中,使用抗体P30 (a) 进行以肽1或肽2作为抗原的竞争性抑制ELISA试验并测定其显色强度而得的结果的图。

[0037] [图6]图6是示出了在试验例4中,使用抗体P30 (b) 进行以肽1或肽2作为抗原的竞争性抑制ELISA试验并测定其显色强度而得的结果的图。

具体实施方式

[0038] 以下,对本发明的实施方式进行说明。

[0039] 本发明的用于检测肺炎支原体的免疫层析分析装置的特征在于:具备添加检体的试样添加部、保持标记物质的标记物质保持部、具有检测肺炎支原体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强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体。

[0040] 在本发明的免疫层析分析装置中使用的抗体为强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体(以下也称为“抗体P30 (A)”)。

[0041] 肺炎支原体的P30蛋白指的是由序列编号1所示的274个氨基酸构成的、富有脯氨酸(20.7%)且分子量为29,743的粘附蛋白。

[0042] 另外,序列编号2所示的P30蛋白的结构域111是对应于P30蛋白(序列编号1)当中的氨基酸序列第177号至第274号的区域,并且是富有特定氨基酸重复序列的结构域。在结构域111中的氨基酸重复序列有三种,序列编号3 (PGMAPR) 所示的氨基酸序列存在7处,序列编号4 (PGMPPH) 所示的氨基酸序列存在3处,序列编号5 (PGFPPQ) 所示的氨基酸序列存在3处。

[0043] 据推测,由于本发明中使用的抗体P30 (A) 识别富有该氨基酸重复序列的结构域111,因此通过使用本发明的免疫层析分析装置进行分析,形成了如下所示的夹心结构,显著地提高了检测灵敏度,并显著地发挥其效果。

[0044] 也就是说,在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中含有抗体P30 (A) 的情况下,首先,保持在标记物质保持部中的抗体P30 (A) 与肺炎支原体的P30蛋白当中的结构域111的重复序列的一部分结合。

[0045] 接着,固定于检测部中的抗体P30 (A),通过结合到与保持在标记物质保持部中的抗体P30 (A) 所结合的部位不同的部位上存在的相同重复序列,以由抗体P30 (A) 夹着P30蛋白的方式形成了夹心结构,从而检测肺炎支原体。

[0046] 以这种方式,据推测,由于抗体P30 (A) 识别具有上述重复序列的结构域111,因此可以识别P30蛋白的多个部位,可以提高肺炎支原体的检测灵敏度。

[0047] 优选地,本发明所使用的抗体P30 (A) 优选识别上述结构域111的氨基酸重复序列当中的至少序列编号3 (PGMAPR) 的氨基酸序列。如同下述实施例的结果所示地那样,由于识别上述序列的抗体更加强烈地识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111,因此可以高灵敏度地检测出肺炎支原体。

[0048] 本发明中的抗体P30 (A) 为“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111”的抗体,该抗体可以定义为当进行ELISA试验时450nm处的吸光度为0.2Abs以上的抗体。

[0049] 具体而言,依照以下方案进行ELISA试验。首先,将100 μ L的包含4ng/mL肺炎支原体P30 (以利用大肠杆菌的常规方法将(氨基酸96-274) 表达并纯化而得的蛋白P30Ag) 的50mM

碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 添加到Nunc Immuno modules (Thermo Fisher Scientific公司制, 编号469949) 的ELISA用96孔板中, 并在4℃下培养16小时。16小时后, 除去P30溶液, 采用300 μL的PBST (含0.05% Tween20的PBS) 洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0050] 添加300μL的包含5%BSA的PBST (BSA:オリエンタル酵母社制) 作为封闭液, 并在37℃下培养1小时。随后除去BSA溶液, 并采用300μL的PBST (含0.05% Tween 20的PBS) 洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0051] 将100μL的包含5μg/mL抗肺炎支原体P30抗体 (抗体P30 (A)) 作为一次抗体的50%封闭溶液添加到孔中, 并在37℃下培养1小时。随后除去一次抗体溶液, 并采用300μL的PBST (含0.05% Tween 20的PBS) 洗涤孔三次。

[0052] 将100μL的1mg/mL的Anti Mouse IgG (H+L), Rabbit, IgG Whole, Peroxidase Cojugated (抗小鼠IgG (H+L), 兔, 完全IgG, 过氧化物酶偶联) (“和光純薬社”制, 编号014-17611) 作为二次抗体添加到孔中, 并在37℃下培养1.5小时。随后除去BSA溶液, 并采用300μL的PBST (含0.05% Tween 20的PBS) 洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0053] 将100μL的Sure Blue Reserve TMB微孔过氧化物酶底物 (1-Component) (“KPL社”制, 编号53-00-01) 添加到孔中作为显色底物, 反应15分钟, 再加入100μL的2N硫酸以使反应停止。

[0054] 采用酶标仪 (“B1ORAD社”制) 测定450nm处的吸光度。

[0055] 在上述方法中, 将减去空白 (不加入一次抗体而是加入二次抗体进行显色反应的孔) 的吸光度后的值为0.2Abs以上的抗体作为“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111”的抗体。

[0056] 另外, 本发明中的抗体P30 (A) 是“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111”的抗体具体也可以定义为: 在进行全长的肺炎支原体P30蛋白 (氨基酸1-274: 序列编号1) 或肺炎支原体P30蛋白的氨基酸96-274片段 (将这些蛋白称为蛋白A)、以及结构域111或包含结构域111中氨基酸的三种重复序列 (序列编号3~5) 中的一种以上的结构域111的片段 (将这些蛋白称为蛋白B) 的ELISA法竞争性抑制试验 (竞争性抑制ELISA试验) 时, 在对于蛋白A的抗体反应由于蛋白B的存在而使反应受到抑制的情况下的该抗体。作为竞争性抑制ELISA试验, 也可以通过直接竞争法和间接竞争法中的任一种试验方法来进行定义。

[0057] 如果要举例示出间接竞争法的试验, 则将100μL的包含4ng/mL全长蛋白的肺炎支原体P30 (氨基酸1-274: 序列编号1) 的50mM碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 添加到Nunc Immuno modules (“Thermo Fisher Scientific社”制, 编号469949) ELISA用96孔板中, 并在4℃下培养16小时。16小时后, 除去P30溶液, 并采用300μL的PBST (含0.05% Tween 20的PBS) 洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0058] 添加300μL包含5%BSA的PBST (BSA: “オリエンタル酵母社”制) 作为封闭液, 并在37℃下培养1小时。随后除去BSA溶液, 并采用300μL的PBST (含0.05% Tween 20的PBS) 洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除, 制作了全长蛋白固定孔。

[0059] 接着, 将100μL包含5μg/mL的抗肺炎支原体P30抗体 (抗体P30 (A)) 作为一次抗体的50%封闭溶液添加到全长蛋白固定孔中, 并在37℃下培养1小时。随后除去一次抗体溶液,

并采用300 μ L的PBST(含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。

[0060] 另外,除了只添加上述一次抗体而得的孔之外,另外将包含5 μ g/mL的一次抗体的抗肺炎支原体P30抗体(抗体P30(A))、以及上述一次抗体的40倍量或80倍量的结构域111或含有结构域111中氨基酸的三种重复序列中的一种以上的结构域111的片段的50%封闭溶液100 μ L添加到孔中,并在37 $^{\circ}$ C下培养1小时。随后除去一次抗体溶液,并采用300 μ L的PBST(含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。

[0061] 将100 μ L的1mg/mL的抗小鼠IgG(H+L),兔,完全IgG,过氧化物酶偶联(“和光純薬社”制,编号014-17611)作为二次抗体分别添加到上述制作的2种孔中,并在37 $^{\circ}$ C下培养1.5小时。随后除去BSA溶液,并采用300 μ L的PBST(含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0062] 将100 μ L的Sure Blue Reserve TMB微孔过氧化物酶底物(1-Component)(“KPL社”制,编号53-00-01)添加到孔中作为显色底物,反应15分钟,再加入100 μ L的2N硫酸以使反应停止。

[0063] 采用酶标仪(“B1ORAD社”制)测定450nm处的吸光度。

[0064] 在上述方法中可以确认,相比于只添加一次抗体的孔的吸光度,添加一次抗体以及结构域111或含有结构域111中氨基酸的三种重复序列中的一种以上的结构域111的片段的孔的吸光度减少,并可以确认“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111”。

[0065] 在本发明中,若使用一次抗体的40倍量的结构域111或含有结构域111中氨基酸的三种重复序列中的一种以上的结构域111的片段时的吸光度减少30%以上,或者若使用一次抗体的80倍量的结构域111或含有结构域111中氨基酸的三种重复序列中的一种以上的结构域111的片段时的吸光度减少50%以上,则可以确认更加强烈地识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111。

[0066] 作为本发明所使用的抗体P30(A),可列举出(例如)多克隆抗体或单克隆抗体。从灵敏度的观点出发,优选单克隆抗体。例如,抗体P30(A)可以从“Fucal Research社”购入得到“商品名:MP-P30-3-AB”。

[0067] 接着,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”表示可移动地配置于膜等载体中或表面。

[0068] 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(也称为“样本垫”)(1)、标记物质保持部(也称为“结合垫”)(2)、层析介质部(3)、检测部(4)、吸收部(5)以及背板(6)构成。

[0069] 试样添加部(1)为在免疫层析分析装置中添加含有检体的试样的部位。试样添加部(1)中试样迅速被吸收,可以由具有试样迅速移动这样的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、棉布等。

[0070] 标记物质保持部(2)含有后述的标记物质(标志物质),该标记物质作为与上述抗体P30(A)结合的标记抗体(以下也简称为标记抗体)而保持在标记物质保持部(2)中。当检体在标记物质保持部内移动时,上述标记抗体与检体中的肺炎支原体结合。在标记物质保持部(2)中通常使用玻璃纤维、纤维素等的膜。

[0071] 标记物质保持部中的标记抗体的含量通常为0.06至0.25 μg /装置,优选为0.1至0.2 μg /装置,更优选为0.1至0.15 μg /装置。另外,每单位面积标记物质保持部的标记抗体的含量通常为0.1至0.42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,优选为0.17至0.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为0.17至0.25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0072] 免疫层析分析中的检测试剂的标记通常也使用酶等,但由于适合于通过目视来判定被检测物质的存在,因而优选使用不溶性载体作为标记物质。通过将抗体P30(A)敏化至不溶性载体,可以制备标记化的检测试剂。需要说明的是,可以依照公知的方法将抗体P30(A)敏化至不溶性载体。

[0073] 作为标记物质的不溶性载体可以使用金、银或铂等金属粒子、氧化铁等金属氧化物粒子、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。如上所述,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,并且优选被着色以便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对应于粒径的特定的自然色,可以利用其颜色作为标记。

[0074] 特别地,从易于检测、难以凝聚、并且难以发生非特异性显色的方面出发,金粒子是优选的。金粒子的平均粒径为(例如)10nm至250nm,优选为35nm至120nm。平均粒径可以通过以下方式计算出:使用通过透射电子显微镜(TEM:“日本電子(株)”制,JEM-2010)拍摄的投影照片,任意选择100个粒子并测算这些粒子的投影面积圆当量直径,从其平均值计算出。

[0075] 每单位面积标记物质保持部中,标记物质保持部所含的金粒子通常为0.25至0.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,优选为0.3至0.65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为0.4至0.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。这是因为,通过设定为上述范围,所标记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。

[0076] 层析介质部(3)是层析的展开部位。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。从与层析所使用的检测试剂、固定化试剂或被检测物质等不具有反应性的观点出发,并且,从提高本发明效果的观点出发,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)。

[0077] 作为硝基纤维素膜,其主要含有硝基纤维素即可,可以使用纯产品或硝基纤维素混合品等以硝基纤维素为主要材料的膜。

[0078] 硝基纤维素膜还可以进一步含有促进毛细管现象的物质。作为该物质,优选降低膜表面的表面张力并提供亲水性的物质。优选为(例如)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性作用的物质,即对被检测物质的移动没有影响、并且对标记物质的显色不带来影响的物质。

[0079] 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查时间。

[0080] 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)的形状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。

[0081] 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提供的颜色不相似的颜色,一般地,支持体优选为无色或白色。

[0082] 检测部(4)形成在上述层析介质部(3)上。也就是说,与被检测物质的肺炎支原体结合的上述抗体P30(A)被固定在层析介质部(3)上的任意位置。上述抗体P30(A)的固定化可以依照常规方法进行。

[0083] 检测部(4)中的抗体P30(A)的含量通常为0.1至2.5 μg /装置,优选为0.3至2.0 μg /装置,更优选为0.3至1.0 μg /装置。另外,每单位面积检测部(4)的抗体P30(A)的含量通常为0.04至1.0 g/cm^2 ,优选为0.125至0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为0.125至0.42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0084] 另外,为了防止由于在层析介质部(3)上的非特异性吸附而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。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。该封闭处理之后,根据需要,例如,可以组合Tween20、TritonX-100或SDS等表面活性剂中的一种或两种以上进行洗净。

[0085] 为了吸收通过了检测部(4)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)使用了(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,并且特别优选为玻璃纤维。通过使吸收部(5)由玻璃纤维构成,可以大幅减少试样液的液体回流。

[0086] 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性、非透湿性的物质即可,作为基材,没有特别的限制。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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,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。

[0090] 特别地,检体稀释液优选含有非离子性表面活性剂以从存在于肺炎支原体的细胞粘附器官中的蛋白质复合体(P1、P90、P40、P30)中分离出P30,并使抗P30抗体的抗原识别部位暴露。作为非离子性表面活性剂,可列举出(例如)Triton X-100(商品名,聚乙二醇单对异辛基苯基醚)、Tween20(商品名,聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯)、NP-40(商品名ノニテッド40)、Brij 35,可以添加一种或两种以上。

[0091] 优选地,检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂的50%以上是HLB值为13至18的非离子性表面活性剂。更优选地,检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂的60%以上是HLB值为13至17的非离子性表面活性剂,特别优选地,检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂的100%是HLB值为13至17的非离子性表面活性剂。具体而言,优选以质量比计为1:1的比例含有Triton X-100(HLB值:13.7)以及Tween20(HLB值:16.7)这两种。

[0092] 当使用检体稀释液作为展开液时,可以将预先混合了检体和展开液的混合物供给、滴加到试样添加部上并使其展开,也可以先将检体供给、滴加到试样添加部上,然后再将展开液供给、滴加到试样添加部上并使它们展开。

[0093] 本发明的免疫层析分析方法包含以下的步骤(1)至(4),该方法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肺炎支原体。

[0094] (1) 将经由检体稀释液稀释检体而得的含有检体的液体添加到试样添加部中的步骤;

[0095] (2) 通过保持在标记物质保持部中并且强烈识别由序列编号2的氨基酸序列构成的肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体(以下表示为抗体P30(A))识别肺炎支原体的步骤;

[0096] (3) 使所述检体及抗体P30(A)作为移动相而在层析介质部中展开的步骤;以及

[0097] (4) 通过检测部所含的抗体P30(A)来检测所展开的移动相中的肺炎支原体的步骤。

[0098] 以下对于各步骤进行说明。

[0099] (1) 将经由检体稀释液稀释检体而得的含有检体的液体添加到试样添加部中的步骤

[0100] 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至检体在免疫层析介质中顺利移动的程度的浓度并作为含有检体的液体。检体稀释液可以使用上述的那些。第二,将预定量(通常为0.1至2mL)的含有检体的液体滴加到试样添加部(1)上。当滴加含有检体的液体时,含有检体的液体就在试样添加部(1)中开始移动。

[0101] 本发明中使用的检体可能包含作为被检测物质的肺炎支原体,并且可列举出(例如)生物样品当中的咽拭子、鼻拭子、鼻吸液、鼻洗液、痰液、肺泡灌洗液等,但不限于此。

[0102] (2) 通过保持在标记物质保持部中并且强烈识别由序列编号2的氨基酸序列构成的肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体(以下表示为抗体P30(A))识别肺炎支原体的步骤

[0103] 步骤(2)为这样的步骤:其中,使在步骤(1)中被添加到试样添加部中的含有检体的液体向标记物质保持部(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抗体P30(A),从而识别作为检体中的被检测物质的肺炎支原体的P30蛋白的结构域111。

[0104] 标记物质可以使用上述的那些。上述标记物质所结合的抗体P30(A)识别P30蛋白的结构域111的氨基酸序列当中的上述特定重复序列的一部分并与其结合。

[0105] (3) 使所述检体及抗体P30(A)作为移动相而在层析介质部中展开的步骤

[0106] 步骤(3)为这样的步骤:其中,在步骤(2)中作为被检测物质的肺炎支原体在标记物质保持部中被结合有标记物质的抗体P30(A)识别后,使检体及抗体P30(A)作为移动相并在层析介质部上通过。

[0107] (4) 通过检测部所含的抗体P30(A)来检测所展开的移动相中的肺炎支原体的步骤

[0108] 步骤(4)为这样的步骤:其中,根据抗原抗体的特异性结合反应,作为流动相而在层析介质部上通过的检体中的肺炎支原体以被固定于检测部的抗体P30(A)以及在上述步骤(2)中与标记物质结合的抗体P30(A)夹心状地夹着的方式进行了特异性地反应结合,并

且使检测部显色。

[0109] 在该步骤(4)中,以夹心状地夹着的方式,固定于检测部的抗体P30(A)结合到与保持在标记物质保持部中的抗体P30(A)所结合的部位不同的部位处所存在的相同重复序列上。

[0110] 当不存在作为被检测物质的肺炎支原体时,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,因而不会使检测部显色。

[0111] 最后,含有检体的液体的水分向吸收部(5)移动。

[0112] 实施例

[0113] 以下,通过实施例进一步说明本发明,但本发明不限于以下实施例。

[0114] [试验例1]

[0115] 在本试验中,准备了识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的两种不同的抗体,并研究各个抗体识别P30蛋白的结构域111的哪个部位。所使用的抗体为Fuca1 Research公司的Mp-P30-3-AB(商品名)(以下表示为“抗体P30(a)”)以及Fuca1 Research公司的Mp-P30-9-AB(商品名)(以下表示为“抗体P30(b)”)这2种。通过下述的免疫层析分析法,验证了该抗体P30(a)及抗体P30(b)与肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的哪个部位结合。

[0116] 首先,通过作为肽化学合成法的常规方法的肽固相合成法制作了以下的两种肽,该两种肽包含上述结构域111中的三种氨基酸重复序列(序列编号3至5)中的任何一种。

[0117] 肽1:PGMAPRPGMPHPGMAPR(序列编号6)

[0118] 肽2:PGMAPRPGFPPQPGMAPR(序列编号7)

[0119] 上述肽1为具有序列编号4所示的氨基酸序列(PGMPPH)和序列编号3所示的氨基酸序列(PGMAPR)的肽。上述肽2为具有序列编号5所示的氨基酸序列(PGFPPQ)和序列编号3所示的氨基酸序列(PGMAPR)的肽。

[0120] 可以如下地判定抗体P30(a)或抗体P30(b)与结构域111的哪个部位结合。

[0121] (1) 试样添加部的制作

[0122] 作为试样添加部,使用了由玻璃纤维构成的无纺布(“ミロア社”制:300mm×30mm)。

[0123] (2) 标记物质保持部的制作

[0124] 将0.1mL的经磷酸缓冲液(pH7.4)稀释为0.05mg/mL的浓度的抗体P30(a)(“Fuca1 Research社”制,商品名:Mp-P30-3-AB)添加到0.5mL的金胶体悬浮液(“田中贵金属工业社”制:LC40nm)中,并在室温下静置10分钟。

[0125] 接着,添加0.1mL的含有1质量%的牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲液(pH7.4),并进一步在室温下静置10分钟。其后,在充分搅拌后,在8000×g下进行15分钟的离心分离,除去上清液,然后再添加0.1mL的包含1质量%的BSA的磷酸缓冲液(pH7.4)。通过上述步骤制作了标记物质溶液。

[0126] 将300μL的10质量%的海藻糖水溶液以及1.8mL的蒸馏水加入到300μL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×300mm的玻璃纤维垫(“ミロア社”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。

[0127] (3) 层析介质部及检测部的制作

[0128] 使用由硝基纤维素构成的片材(“ミロア社”制,商品名:HF 120,300mm×25mm)作

为膜。

[0129] 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P30(a)稀释为1.0mg/mL的浓度以得到溶液,将150 μ L该溶液使用免疫层析用分配器“XYZ3050”(“B10DOT社”制)以1mm的宽度和1 μ L/mm的量(每个片材25 μ L)线状涂布到干燥膜上的检测部位(检测线)。

[0130] 另外,为了确认金粒子标记试剂是否展开或金粒子标记试剂的展开速度,在检测部位下游,将与金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℃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。

[0131] (4) 免疫层析分析装置的制作

[0132] 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,并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。

[0133] (5) 检体稀释液

[0134] 制备了50mM的HEPES缓冲溶液(pH7.5),其含有:1质量%的非离子性表面活性剂“ナカラ イテスク社”制NP-40(商品名:ノニデットP-40,HLB值17.7)与“日油社”制商品名ノニデットMN-811(HLB值9.3)的1:1混合物,将该缓冲溶液作为用于稀释处理检体的检体稀释液。

[0135] (6) 测定

[0136] 测定使用含有肺炎支原体、以及肽1或肽2的检体试样并且使用上述制作的免疫层析分析装置时的检测部中的显色强度。在含有肺炎支原体的检体试样中使用了肺炎支原体P30(以利用大肠杆菌的常规方法将(氨基酸96-274)表达、纯化而得的蛋白P30Ag)。采用上述提取液将该P30Ag调整至10pg/mL的目标浓度,进一步制备了肽1或肽2以使肽1或肽2以400ng展开,并将其作为检体试样。

[0137] 将150 μ L的上述检体试样置于免疫层析分析装置的试样添加部上并使其展开,通过密度计测定检测部的着色程度(显色强度)(表中的单位为mAbs)。

[0138] <判定方法>

[0139] 当被肽1抑制而不被肽2抑制时:抗体与序列编号4所示的氨基酸序列(PGMPPH)结合。

[0140] 当不被肽1抑制而被肽2抑制时:抗体与序列编号5所示的氨基酸序列(PGFPPQ)结合。

[0141] 当既被肽1抑制并且也被肽2抑制时:抗体与序列编号3所示的氨基酸序列(PGMAPR)结合。

[0142] 需要说明的是,通过使肽1或肽2连同检体P30Ag一起展开从而被认为产生了抑制的机理如下所述。与检体P30Ag相比,肽1及肽2的分子量要小得多,另外所展开的量也要多得多,因而它们也比P30Ag更早地到达标记物质保持部,并与在该部位保持的抗体结合并向检测部方向展开。然而,与P30Ag相比,肽1及肽2所具有的抗体结合部位要少得多(1至2处),因而已经与抗体结合的状态下的多个上述肽可以与固定于检测部的抗体结合的部位较少

或者不存在,许多肽没有被检测部捕捉而是直接地就流向吸收部,被检测部捕捉并堆积的标记物质减少,由此显色强度降低。另一方面,由于在标记物质保持部中保持的抗体先于P30Ag而与肽1及肽2结合,结合到随后展开的P30Ag上的该抗体的量与不存在肽1或肽2的情况相比较少,因而对于在检测部被捕捉的P30Ag,不与该抗体结合的P30Ag相对地变多,其结果是,由在检测部检测出的P30Ag所引起的显色强度变低,从而产生了抑制作用。

[0143] 在本试验中,对于使用抗体P30 (a) 且不使用上述肽1及肽2中任一者的情况、使用抗体P30 (a) 且使用肽1的情况、以及使用抗体P30 (a) 且使用肽2的情况这三种模式,进行免疫层析分析,所测定的显色强度的结果示于表1中。

[0144] 另外,将抗体P30 (a) 变更为抗体P30 (b) 并进行相同的试验,其结果示于表2中。

[0145] [表1]

[0146] 表1抗体P30 (a)

[0147]

肽	无	肽1	肽2
15分钟后的显色强度 (Abs)	251.3	100.1	96.7

[0148] [表2]

[0149] 表2抗体P30 (b)

[0150]

肽	无	肽1	肽2
15分钟后的显色强度 (Abs)	58.2	60.9	31.3

[0151] 由表1的结果可知,对于抗体P30 (a),与没有肽的情况相比,使用肽1的情况以及使用肽2的情况中任意一种情况下的显色强度均降低,抗体P30 (a) 受到肽1及肽2中的任一者的抑制。因此可知,抗体P30 (a) 识别序列编号3所示的氨基酸序列 (PGMAPR)。

[0152] 另外,由表2的结果可知,对于抗体P30 (b),与没有肽的情况相比,使用肽1的情况下没有观察到显色强度的变化,而在使用肽2的情况下,显色强度降低,抗体P30 (b) 不受肽1的抑制而受到肽2的抑制。因此可知,抗体P30 (b) 识别序列编号5所示的氨基酸序列 (PGFPPQ)。

[0153] [试验例2]

[0154] 在本试验中,为了确认在下述试验例3中制作的本申请发明的免疫层析装置中使用的识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体 (抗体P30 (a)) 是否为“强烈”识别该结构域111的抗体,进行前述段落[0025]至[0030]中记载的ELISA法试验以及前述段落[0032]至[0039]中记载的竞争性抑制ELISA试验。

[0155] 首先,为了确认试验例1中使用的抗体P30 (a) 是否为强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体,依照前述段落[0025]至[0030]中记载的方案进行了ELISA法试验。具体而言,对于抗体P30 (a) 是否是减去空白后的450nm下的吸光度为0.2Abs以上的抗体,如下地进行实验。

[0156] 首先,将100μL包含4ng/mL的肺炎支原体P30 (以利用大肠杆菌的常规方法将(氨基酸96-274) 表达、纯化而得的蛋白质P30Ag) 的50mM碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 添加到Nunc Immuno modules (“Thermo Fisher Scientific社”制,编号469949) ELISA用96孔板中,并在4℃下培养16小时。16小时后,除去P30溶液,并采用300μL的PBST (含0.05% Tween 20的PBS)

洗涤孔三次,残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。添加300 μ L包含5%BSA的PBST (BSA:“オリエンタル酵母社”制)作为封闭液,并在37℃下培养1小时。随后除去BSA溶液,并采用300 μ L的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次,残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0157] 将100 μ L的包含5 μ g/mL的上述抗体P30 (A)作为一次抗体的50%封闭溶液(一次抗体溶液)添加到孔中,并在37℃下培养1小时,然后除去一次抗体溶液,并采用300 μ L的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。

[0158] 将100 μ L的1mg/mL的抗小鼠IgG (H+L),兔,完全IgG,过氧化物酶偶联(“和光純薬社”制,编号014-17611)作为二次抗体添加到孔中,并在37℃下培养1.5小时。随后除去BSA溶液,并采用300 μ L的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次,残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0159] 将100 μ L的Sure Blue Reserve TMB微孔过氧化物酶底物(1-Component) (“KPL社”制,编号53-00-01)作为显色底物添加到孔中,反应15分钟,再加入100 μ L的2N硫酸以使反应停止,然后采用酶标仪 (“B1ORAD社”制)测定450nm下的吸光度。

[0160] 当采用上述方法进行ELISA试验时,可以确认:减去空白(不加入一次抗体而是加入二次抗体进行显色反应的孔)的吸光度后的450nm下的吸光度为0.403Abs,即为0.2Abs以上。也就是说,可以确认抗体P30 (a) “强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111”。

[0161] 随后,为了进一步确认该抗体P30 (a) 是否为“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111”的抗体,依照前述段落[0032]至[0039]中记载的方案进行竞争性抑制ELISA试验(间接竞争法)。具体而言,对于使用抗体P30 (a) 进行竞争性抑制ELISA试验后,结果吸光度是否减少30%以上,如下地进行实验。

[0162] 将100 μ L包含4ng/mL的全长蛋白的肺炎支原体P30 (氨基酸1-274;序列编号1)的50mM碳酸盐缓冲液(pH9.5)添加到Nunc Immuno modules (“Thermo Fisher Scientific社”制,编号469949)ELISA用96孔板中,并在4℃下培养16小时。16小时后,除去P30溶液,并采用300 μ L的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0163] 添加300 μ L的包含5%BSA的PBST (BSA:“オリエンタル酵母社”制)作为封闭液,并在37℃下培养1小时。随后除去BSA溶液,并采用300 μ L的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除,制作了全长蛋白固定孔。

[0164] 接着,将100 μ L包含5 μ g/mL的抗肺炎支原体P30抗体(抗体P30 (a))作为一次抗体的50%封闭溶液添加到全长蛋白固定孔中,并在37℃下培养1小时。随后除去一次抗体溶液,并采用300 μ L的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。

[0165] 另外,除了只添加上述一次抗体而得的孔之外,另外将100 μ L包含5 μ g/mL的作为一次抗体的抗肺炎支原体P30抗体(抗体P30 (a))、以及上述一次抗体P30 (a)的40倍量的试验例1所使用的上述肽1(序列编号6:PGMAPRPGMPPHPGMAPR)或肽2(序列编号7:PGMAPRPGFPPQPGMAPR)的50%封闭溶液添加到孔中,并在37℃下培养1小时。随后除去一次抗体溶液,并采用300 μ L的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。

[0166] 将100 μ L的1mg/mL的抗小鼠IgG (H+L),兔,完全IgG,过氧化物酶偶联(“和光純薬社”制,编号014-17611)作为二次抗体分别添加到上述制作的2种孔中,并在37℃下培养1.5

小时。随后除去BSA溶液,并采用300 μ L的PBST(含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0167] 将100 μ L的Sure Blue Reserve TMB微孔过氧化物酶底物(1-Component) (“KPL社”制,编号53-00-01)作为显色底物添加到孔中,反应15分钟,再加入100 μ L的2N硫酸以使反应停止。

[0168] 采用酶标仪 (“B10RAD社”制)测定450nm下的吸光度。

[0169] 结果可以确认,与只添加一次抗体的孔的吸光度相比,添加了一次抗体和上述肽1或肽2的孔的吸光度减少了30%以上。也就是说,可以确认抗体P30(a) “强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111”。

[0170] [试验例3]

[0171] <本申请发明的免疫层析分析装置的制作>

[0172] [实施例1]

[0173] (1) 试样添加部的制作

[0174] 使用由玻璃纤维构成的无纺布 (“ミポア社”制,300mm $\times$ 30mm)作为试样添加部。

[0175] (2) 标记物质保持部的制作

[0176] 将0.1mL的采用磷酸缓冲液 (pH7.4) 稀释成0.05mg/mL的浓度的抗体P30(a) (“Fucal Research社”,商品名:Mp-P30-3-AB) 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。

[0177] 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 $\times$ 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。

[0178] 将300 μ L的10质量%的海藻糖水溶液以及1.8mL的蒸馏水加入到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。

[0179] (3) 层析介质部及检测部的制作

[0180] 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。

[0181] 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P30(a) 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” (“B10DOT社”制) 以1mm的宽度和1 μ L/mm的量 (每个片材25 μ L) 线状涂布到干燥膜上的检测部位 (检测线)。

[0182] 另外,为了确认金粒子标记试剂是否展开或金粒子标记试剂的展开速度,在检测部位下游,将与金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。

[0183] (4) 免疫层析分析装置的制作

[0184] 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,并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。

[0185] (5) 检体稀释液

[0186] 制备了50mM的HEPES缓冲溶液(pH7.5),其含有:1质量%的非离子性表面活性剂“ナカラ イテスク社”制NP-40(商品名:ノニデットP-40,HLB值17.7)与“日油社”制商品名ノニデットMN-811(HLB值9.3)的1:1混合物,将该缓冲溶液作为用于稀释处理检体的检体稀释液。

[0187] (6) 测定

[0188] 测定使用含有肺炎支原体的检体试样并使用上述制作的免疫层析分析装置时的检测部中的显色强度。含有肺炎支原体的检体试样使用了市售的灭活肺炎支原体(“Meridian社”制,商品名Mycoplasma pneumoniae Antigen (FH))或者肺炎支原体感染者的咽拭子。咽拭子通过使用市售的棉签擦拭咽部而从作为被试验者的2名肺炎支原体感染者分别进行采集。

[0189] 市售的灭活肺炎支原体用上述提取液调整至目标浓度,并将其作为检体试样(表3中记为市售检体)。

[0190] 另外,采集的咽拭子用上述检体稀释液稀释为20倍,并将其作为检体试样(表3中记为被试验者1及被试验者2)。

[0191] 将150 μ L的上述各个检体试样置于免疫层析分析装置的试样添加部上并使其展开,通过密度计测定检测部的着色程度(显色强度)(表中的单位为mAbs)。结果示于表3及图2。

[0192] [比较例1]

[0193] 重复实施例1的操作,不同之处在于:将涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)变更为试验例1中所使用的抗体P30(b) (“Fuca1 Research社”,商品名:Mp-P30-3-AB)。结果示于表3及图2。

[0194] 需要说明的是,为了确认该抗体P30(b)是否“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111”,进行了前述段落[0025]至[0030]中记载的ELISA法试验以及前述段落[0032]至[0039]中记载的竞争性抑制ELISA试验。

[0195] 首先,为了确认抗体P30(b)是否为强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域111的抗体,依照前述段落[0025]至[0030]中记载的方案进行了ELISA法试验。具体而言,对于抗体P30(b)是否是减去了空白后的450nm下的吸光度为0.2Abs以上的抗体,如下地进行实验。

[0196] 将100 μ L包含4ng/mL的肺炎支原体P30(以利用大肠杆菌的常规方法将(氨基酸96-274)表达、纯化而得的蛋白P30Ag)的50mM碳酸盐缓冲液(pH9.5)添加到Nunc Immuno modules(“Thermo Fisher Scientific社”制,编号469949)ELISA用96孔板中,并在4 $^{\circ}$ C下培养16小时。16小时后,除去P30溶液,并采用300 μ L的PBST(含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次,残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。添加300 μ L的包含5%BSA的PBST(BSA:“オリエンタル酵母社”制)作为封闭液,并在37 $^{\circ}$ C下培养1小时。随后除去BSA溶液,并采用300 μ L的PBST(含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次,残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0197] 将100 μ L包含5 μ g/mL的上述抗体P30(b)作为一次抗体的50%封闭溶液添加到孔

中,并在37℃下培养1小时,然后除去一次抗体溶液抗体P30 (b),并采用300μL的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。

[0198] 将100μL的1mg/mL的抗小鼠IgG (H+L),兔,完全IgG,过氧化物酶偶联(“和光純薬社”制,编号014-17611)作为二次抗体添加到孔中,并在37℃下培养1.5小时。随后除去BSA溶液,并采用300μL的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次,残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0199] 将100μL的Sure Blue Reserve TMB微孔过氧化物酶底物(1-Component) (“KPL社”制,编号53-00-01)作为显色底物添加到孔中,反应15分钟,再加入100μL的2N硫酸以使反应停止,然后采用酶标仪 (“BIORAD社”制)测定450nm下的吸光度。

[0200] 当采用上述方法进行ELISA试验时,可以确认:减去空白(不加入一次抗体而是加入二次抗体进行显色反应的孔)的吸光度后的450nm下的吸光度为0.061Abs,即小于0.2Abs。也就是说,可以确认抗体P30 (b)不是“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域III”的抗体。

[0201] 随后,为了进一步确认该抗体P30 (b)是否为“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域III”的抗体,依照前述段落[0032]至[0039]中记载的方案进行竞争性抑制ELISA试验(间接竞争法),对于吸光度是否减少30%以下,如下地进行实验。

[0202] 将100μL包含10ng/mL的全长蛋白的肺炎支原体P30 (氨基酸1-274:序列编号1)的50mM碳酸盐缓冲液 (pH9.5)添加到Nunc Immuno modules (“Thermo Fisher Scientific社”制,编号469949)ELISA用96孔板中,并在4℃下培养16小时。16小时后,除去P30溶液,并采用300μL的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0203] 添加300μL的包含5%BSA的PBST (BSA: “オリエンタル酵母社”制)作为封闭液,并在37℃下培养1小时。随后除去BSA溶液,并采用300μL的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除,制作了全长蛋白固定孔。

[0204] 接着,将100μL包含5μg/mL的抗肺炎支原体P30抗体 (抗体P30 (a))作为一次抗体的50%封闭溶液添加到全长蛋白固定孔中,并在37℃下培养1小时。随后除去一次抗体溶液,并采用300μL的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。

[0205] 另外,除了只添加上述一次抗体而得的孔之外,另外将100μL包含5μg/mL的作为一次抗体的抗肺炎支原体P30抗体 (抗体P30 (b))、以及上述一次抗体P30 (b)的40倍量的试验例1中所使用的肽1 (序列编号6:PGMAPRPGMPPHPGMAPR)或肽2 (序列编号7:PGMAPRPGFPPQPGMAPR)的50%封闭溶液添加到孔中,并在37℃下培养1小时。随后除去一次抗体溶液,并采用300μL的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。

[0206] 将100μL的1mg/mL的抗小鼠IgG (H+L),兔,完全IgG,过氧化物酶偶联(“和光純薬社”制,编号014-17611)作为二次抗体分别添加到上述制作的2种孔中,并在37℃下培养1.5小时。随后除去BSA溶液,并采用300μL的PBST (含0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔三次。残留于孔中的液体通过叩击于纸巾上而去除。

[0207] 将100μL的Sure Blue Reserve TMB微孔过氧化物酶底物(1-Component) (“KPL社”制,编号53-00-01)作为显色底物添加到孔中,反应15分钟,再加入100μL的2N硫酸以使反应停止。

[0208] 采用酶标仪(“BIORAD社”制)测定450nm下的吸光度。

[0209] 结果可以确认,对于添加了一次抗体和上述肽1或肽2的孔的吸光度,与只添加一次抗体的孔的吸光度相比,在肽1中未发现减少,而在肽2中发现只减少约22%,该减少率小于30%。也就是说,可以确认抗体P30(b)不是“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域III”的抗体。

[0210] [比较例2]

[0211] 重复实施例1的操作,不同之处在于:将添加到标记物质保持部的标记物质溶液中的抗体P30(a)以及涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)这两者均变更为上述抗体P30(b)。结果示于表3及图2。

[0212] [比较例3]

[0213] 重复实施例1的操作,不同之处在于:将涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)变更为针对肺炎支原体的P1蛋白的抗体(“Meridian社”制,商品名MAb to Mycoplasma pneumonia P1(cIone B1947M):以下表示为抗体P1(b))。结果示于表3及图2。

[0214] [比较例4]

[0215] 重复实施例1的操作,不同之处在于:将添加到标记物质保持部的标记物质溶液中的抗体P30(a)变更为针对肺炎支原体的P1蛋白的抗体(“Meridian社”制,商品名MAb to Mycoplasma pneumonia P1(cIone B1948M):以下表示为抗体P1(a))。结果示于表3及图2。

[0216] [比较例5]

[0217] 重复实施例1的操作,不同之处在于:将添加到标记物质保持部的标记物质溶液中的抗体P30(a)变更为抗体P1(a),并且将涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)变更为抗体P1(b)。结果示于表3及图2。

[0218] [表3]

[0219] 表3

		实施例 1	比较例 1	比较例 2	比较例 3	比较例 4	比较例 5
标记物质保持部		P30(a)	P30(a)	P30(b)	P30(a)	P1(a)	P1(a)
检测部		P30(a)	P30(b)	P30(b)	P1(b)	P30(a)	P1(b)
[0220] 显色强度 (mAbs)	市售检体	273	79.4	18.9	5.5	6.2	12.3
	被试验者 1	41.8	16.3	8.9	2.5	0	6.1
	被试验者 2	28.7	7.9	6.1	2.6	3	3

[0221] [实施例2]

[0222] 重复实施例1的操作,不同之处在于:将检体稀释液的组成变更为Triton X-100(“和光純薬社”制,商品名,聚乙二醇单对异辛基苯基醚,HLB值:13.7)和Tween20(“和光純薬社”制,商品名,聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯,HLB值:16.7)。结果示于表4及图3。

[0223] [比较例6]

[0224] 重复实施例2的操作,不同之处在于:将涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)变更为抗体P30(b)。结果示于表4及图3。

[0225] [比较例7]

[0226] 重复实施例1的操作,不同之处在于:将添加到标记物质保持部的标记物质溶液中的抗体P30(a)以及涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)这两者均变更为抗体P30(b)。结果示于表4及图3。

[0227] [表4]

[0228] 表4

		实施例 2	比较例 6	比较例 7
标记物质保持部		P30(a)	P30(a)	P30(b)
检测部		P30(a)	P30(b)	P30(b)
显色强度 (mAbs)	市售检体	490	159.2	40.5
	被试验者 1	117	29.8	15.2
	被试验者 2	51.7	13.6	8.9

[0230] [实施例3]

[0231] 重复实施例1的操作,不同之处在于:将检测检体变更为P30蛋白(以利用大肠杆菌的常规方法将(氨基酸96-274)表达、纯化而得的蛋白P30Ag),并将检体稀释液的组成变更为Triton X-100(“和光純薬社”制,商品名,聚乙二醇单对异辛基苯基醚,HLB值:13.7)与Tween20(“和光純薬社”制,商品名,聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯,HLB值:16.7)的1:1混合物。结果示于表5及图4。

[0232] [比较例8]

[0233] 重复实施例3的操作,不同之处在于:将涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)变更为抗体P30(b)。结果示于表5及图4。

[0234] [比较例9]

[0235] 重复实施例3的操作,不同之处在于:将添加到标记物质保持部的标记物质溶液中的抗体P30(a)以及涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)这两者均变更为抗体P30(b)。结果示于表5及图4。

[0236] [比较例10]

[0237] 重复实施例3的操作,不同之处在于:将涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)变更为抗体P1(b)。结果示于表5及图4。

[0238] [比较例11]

[0239] 重复实施例3的操作,不同之处在于:将添加到标记物质保持部的标记物质溶液中的抗体P30(a)变更为抗体P1(a)。结果示于表5及图4。

[0240] [比较例12]

[0241] 重复实施例3的操作,不同之处在于:将添加到标记物质保持部的标记物质溶液中的抗体P30(a)变更为抗体P1(a),并且将涂布于检测部的抗体稀释液中的抗体P30(a)变更为抗体P1(b)。结果示于表5及图4。

[0242] [表5]

[0243] 表5

[0244]

		实施例 3	比较例 8	比较例 9	比较例 10	比较例 11	比较例 12
标记物质保持部		P30(a)	P30(a)	P30(b)	P30(a)	P1(a)	P1(a)
检测部		P30(a)	P30(b)	P30(b)	P1(b)	P30(a)	P1(b)
显色强度 (mAbs)	P30Ag	180	31.8	24.3	0	0	0

[0245] 由以上结果可知,对于使标记物质保持部及检测部这两者均含有强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域III的抗体P30(a)的情况(实施例1至3)而言,与除此以外的情况(比较例1至12)相比,其肺炎支原体或P30蛋白的检测灵敏度显著地较高。

[0246] [试验例4]

[0247] 为了确认试验例2中的抗体P30(a)以及比较例1中的抗体P30(b)是否为“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域III”的抗体,进行了竞争性抑制ELISA试验(间接竞争法)。在本试验中,使用试验例1中所使用的上述肽1或肽2中的任一者作为竞争的结构域III的片段,还将上述肽的浓度如下表6、7所示进行变更($\times 1 \sim \times 640$),然后与试验例2或比较例1所记载的方法同样地进行了竞争性抑制ELISA试验(间接竞争法)。结果示于表6、7中。表6为使用抗体P30(a)作为抗体的结果,表7为使用抗体P30(b)作为抗体的结果。另外,表6的结果示于图5,表7的结果示于图6。

[0248] [表6]

[0249] 表6

[0250]

肽浓度 (与一次抗体 抗 P30(a)抗体 浓度的比率)	显色强度(Abs)				
	竞争蛋白质				对照
	肽 1	显色强度 减少率(%)	肽 2	显色强度 减少率(%)	
0	0.411	—	0.411	—	0.069
×1	0.37	10	0.401	2	—
×10	0.341	17	0.341	17	—
×20	0.322	22	0.29	29	—
×40	0.24	42	0.26	37	—
×80	0.17	59	0.199	52	—
×160	0.134	67	0.172	58	—
×320	0.132	68	0.16	61	—
×640	0.12	71	0.18	56	—

[0251] [表7]

[0252] 表7

[0253]

肽浓度 (与一次抗体 抗 P30(b)抗体 浓度的比率)	显色强度(Abs)			
	竞争蛋白质			对照
	肽 1	肽 2	显色强度 减少率(%)	
0	0.208	0.208	—	0.069
×1	0.226	0.199	4	—
×10	0.256	0.184	12	—
×20	0.228	0.186	11	—
×40	0.232	0.163	22	—
×80	0.237	0.133	36	—
×160	0.223	0.125	40	—
×320	0.23	0.11	47	—
×640	0.225	0.114	45	—

[0254] 由表6及图5的结果可以确认,在使肽浓度为一次抗体抗P30 (a) 抗体浓度的40倍的情况下,与对照相比,孔的吸光度减少了30%以上,即使在80倍量的情况下,也减少了50%以上。需要说明的是,在本试验中还可以确认,由于抗体P30 (a) 受到了肽1及肽2中的任一者的抑制,因而抗体P30 (a) 识别序列编号3所示的氨基酸序列 (PGMAPR)。

[0255] 另外,由表7及图6的结果可以确认,即使在使肽浓度为一次抗体P30 (b) 的量的40

倍的情况下,与对照相比,孔的吸光度只减少了约22%,即小于30%。也就是说,可以确认抗体P30 (b) 不是“强烈识别肺炎支原体的P30蛋白的结构域III”的抗体。需要说明的是,在本试验中还可以确认,由于抗体P30 (b) 不受肽1的抑制而是受到了肽2的抑制,因而抗体P30 (b) 识别序列编号5所示的氨基酸序列 (PGFPPQ)。

[0256] 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显而易见的是,可在不脱离本发明的意图和范围内进行各种变更及变形。此外,本申请基于2015年6月1日提交的日本专利申请 (特愿2015-111732) 以及2015年8月31日提交的日本专利申请 (特愿2015-171163),其全文内容以引用方式并入本文。

[0257] [工业实用性]

[0258] 根据本发明,通过使用这样的免疫层析分析装置,该免疫层析分析装置使用了与肺炎支原体的P30蛋白的特定部位结合的抗体,从而可以迅速简单并且高灵敏度地检测出肺炎支原体,因而可以用于肺炎支原体的早期诊断。

[0259] [符号说明]

[0260] 1试样添加部 (样本垫)

[0261] 2标记物质保持部

[0262] 3层析介质部

[0263] 4检测部

[0264] 5吸收部

[0265] 6背板

SEQUENCE LISTING

<110> 田中贵金属工业株式会社

<120> 肺炎支原体检测用免疫层析分析装置

<130> W520624

<150> JP2015/111732

<151> 2015-06-01

<150> JP2015/171163

<151> 2015-08-31

<160> 7

<170> PatentIn版本 3.5

<210> 1

<211> 274

<212> PRT

<213> 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)

<400> 1

```

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

```

180	185	190
Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly		
195	200	205
Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln		
210	215	220
Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala		
225	230	235
Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly		
245	250	255
Met Gln Pro Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro Gln Pro Gly Phe Pro Pro		
260	265	270

Lys Arg

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)

<400> 2

Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala		
1	5	10
Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly		
20	25	30
Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln		
35	40	45
Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala		
50	55	60
Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly		
65	70	75
Met Gln Pro Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro Gln Pro Gly Phe Pro Pro		
85	90	95

Lys Arg

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 肺炎支原体 P30 (*Mycoplasma pneumoniae* P30)

<400> 3

Pro Gly Met Ala Pro Arg

1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 肺炎支原体 P30 (Mycoplasma pneumoniae P30)

<400> 4

Pro Gly Met Pro Pro His

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> 肺炎支原体 P30 (Mycoplasma pneumoniae P30)

<400> 5

Pro Gly Phe Pro Pro Gln

1 5

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> 肺炎支原体 P30 (Mycoplasma pneumoniae P30)

<400> 6

Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala

1 5 10 15

Pro Arg

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> 肺炎支原体 P30 (Mycoplasma pneumoniae P30)

<400> 7

Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala

1 5 10 15

Pro Arg

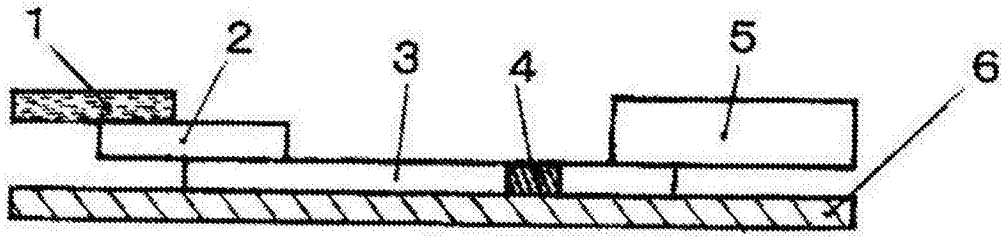


图1

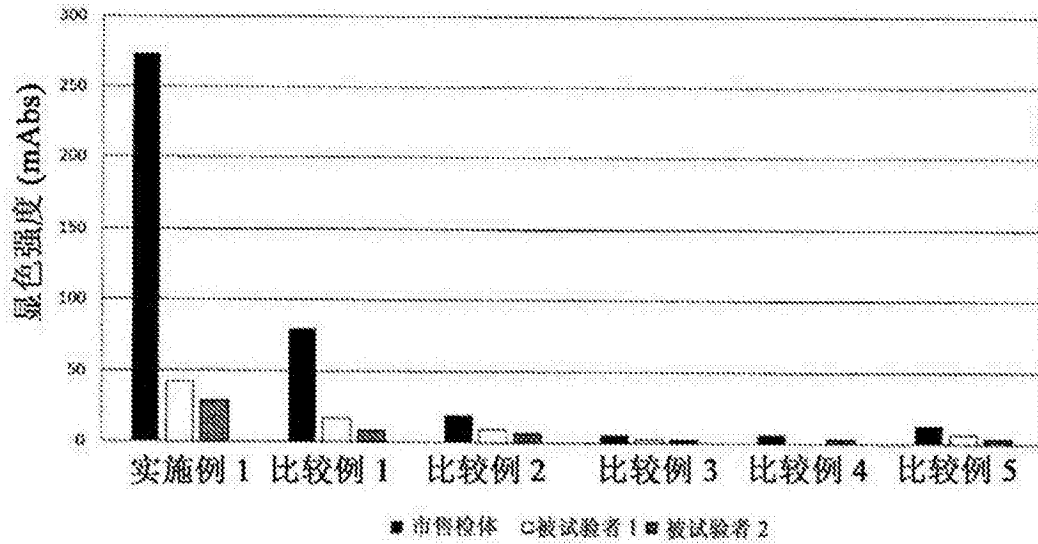


图2

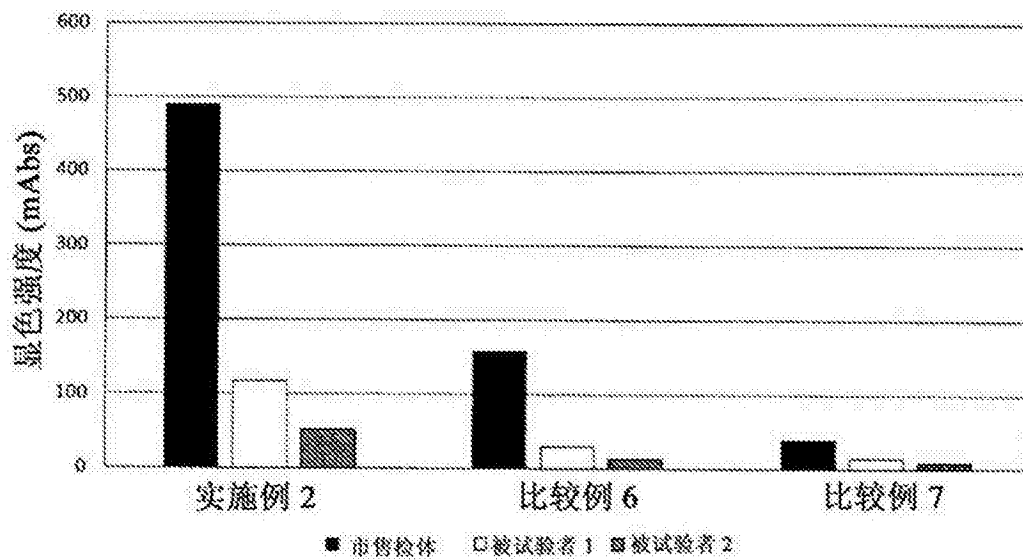


图3

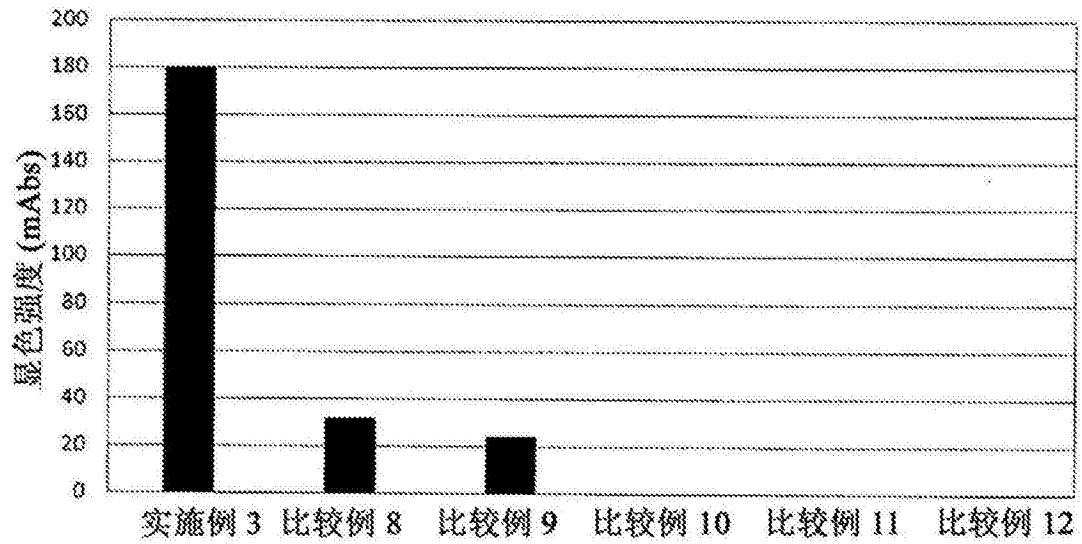


图4

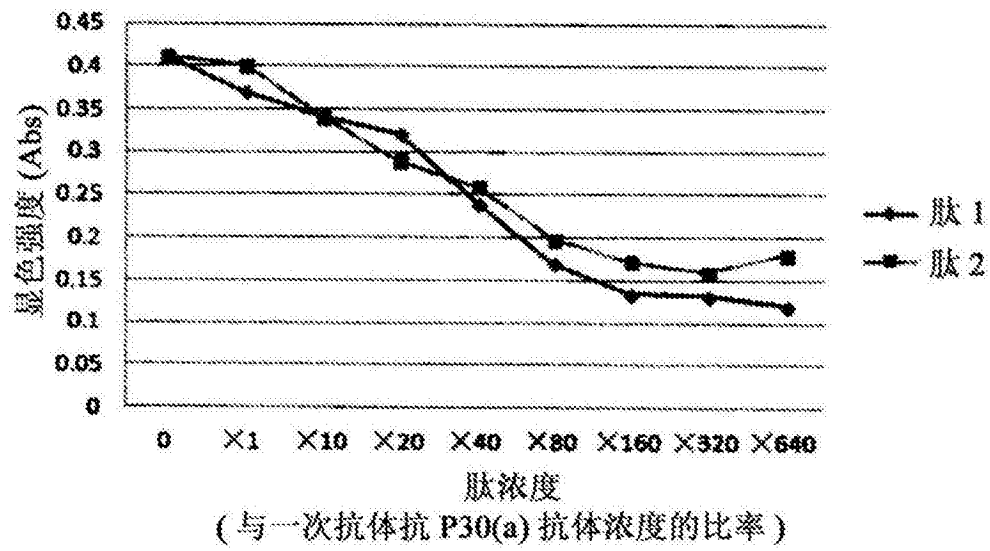


图5

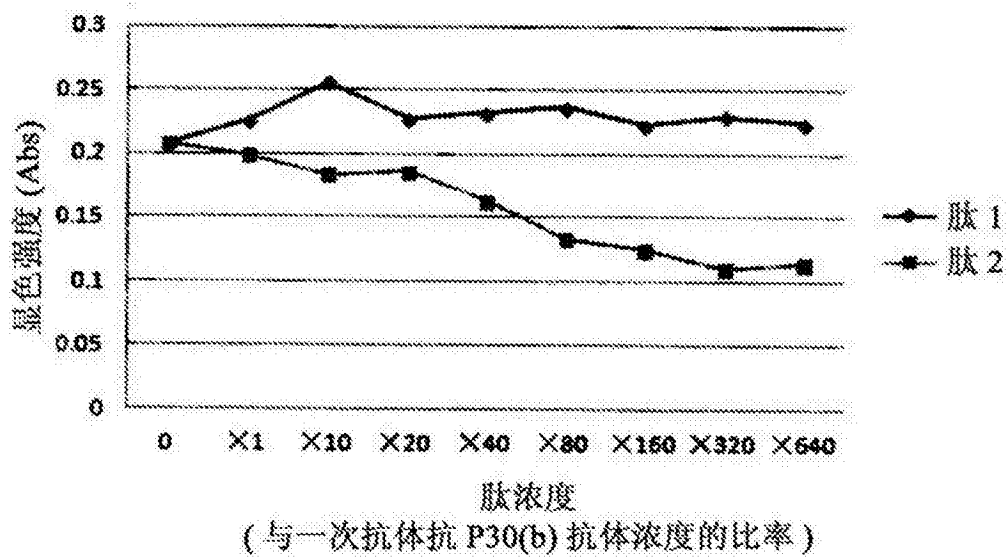


图6

专利名称(译)	肺炎支原体检测用免疫层析分析装置		
公开(公告)号	CN107709995A	公开(公告)日	2018-02-16
申请号	CN201680031731.X	申请日	2016-06-01
[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 岩本久彦		
发明人	铃木启太 岩本久彦		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543 C07K14/30		
CPC分类号	G01N33/56933 C07K14/30 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569		
代理人(译)	张苏娜 常海涛		
优先权	2015111732 2015-06-01 JP 2015171163 2015-08-31 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种可以迅速且简单地以高灵敏度检测肺炎支原体从而更加可靠且迅速地进行肺炎支原体诊断的免疫层析分析装置。本发明涉及一种免疫层析分析装置，其用于检测肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)，该免疫层析分析装置包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部，其中，所述标记物质保持部以及检测部含有强烈识别由序列编号2的氨基酸序列构成的肺炎支原体的P30蛋白的结构域III的抗体。

