



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108139395 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680060111.9

(22)申请日 2016.10.13

(30)优先权数据

2015-204680 2015.10.16 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/080369 2016.10.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/065213 JA 2017.04.20

(71)申请人 东洋纺株式会社

地址 日本国大阪府

(72)发明人 川南裕 辻裕二 米田圭三

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 蒋亭

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

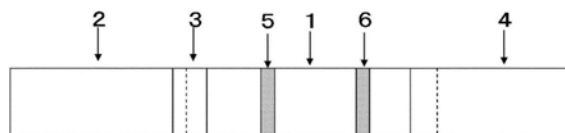
权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

免疫层析试验片

(57)摘要

本发明提供一种不受检测对象物质的浓度影响的包含对照线检测试剂的免疫层析试验片。本发明的免疫层析试验片的特征在于,是用于将生物体试样中的检测对象物质定量的免疫层析试验片,具有:a)结合垫,其浸渗有与所述检测对象物质特异性地结合的检测试剂及对照线检测试剂;以及b)多孔膜垫,其在上游侧固定化有用于捕捉检测对象物质的抗体,并且在下游侧固定化有用于特异性地捕捉对照线检测试剂的抗体。



1. 一种免疫层析试验片,其特征在于,  
是用于将生物体试样中的检测对象物质定量的免疫层析试验片,具有:
  - a) 结合垫,其浸渗有与所述检测对象物质特异性地结合的检测试剂及对照线检测试剂;以及
  - b) 多孔膜垫,其在上游侧固定化有用于捕捉检测对象物质的抗体,并且在下游侧固定化有用于特异性地捕捉对照线检测试剂的抗体。
2. 根据权利要求1所述的免疫层析试验片,其特征在于,  
所述对照线检测试剂包含结合有生物素标记蛋白的检测粒子。
3. 根据权利要求2所述的免疫层析试验片,其特征在于,  
所述蛋白质为微生物来源或动物来源的蛋白质。
4. 根据权利要求3所述的免疫层析试验片,其特征在于,  
所述微生物来源的蛋白质为封闭肽片段。
5. 根据权利要求3所述的免疫层析试验片,其特征在于,  
所述动物来源的蛋白质为牛血清白蛋白或酪蛋白。
6. 根据权利要求1~5中任一项所述的免疫层析试验片,其特征在于,  
用于特异性地捕捉所述对照线检测试剂的抗体为抗生物素抗体。
7. 一种生物体试样中的检测对象物质的定量方法,该定量方法使用权利要求1~6中任一项所述的免疫层析试验片。
8. 一种免疫层析分析试剂盒,其包括权利要求1~6中任一项所述的免疫层析试验片、样品稀释液及分析装置。
9. 一种免疫层析试验片的制造方法,是权利要求1~6中任一项所述的免疫层析试验片的制造方法。

## 免疫层析试验片

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基于免疫层析法的生物体试样中所含的检测对象物质的检测方法、用于检测的试剂盒、该试剂盒的制造方法。

### 背景技术

[0002] 所谓免疫层析法,是如下的免疫测定法,即,从固定化有与检测对象物质特异性地结合的抗体的多孔支撑体的一端,生物体试样借助毛细管现象在多孔支撑体内一边移动一边展开,在该过程中经过标记的检测对象物质与抗体因免疫反应而结合,从而随着时间的推移而集聚,在局部发生显色,由此判定生物体试样中的检测对象物质的有无。

[0003] 作为免疫层析法的优点,可以举出操作简便、能够目视判定等。利用了这些优点的妊娠检查药、流感诊断药等体外诊断药已经在世界上普及,作为POCT(Point Of Care Testing)受到关注(专利文献1)。

[0004] 所谓POCT,是指医疗从业人员在被测者的旁边进行的临床检查。POCT与大型医院的中央检查室等中进行的临床检查不同,可以在当场瞬间地获得检查结果,因此在医疗现场需求日益高涨。

[0005] 以往的免疫层析法通常是目视判定(定性评价),然而近年来,不断开发出通过利用测定显色强度的层析读数仪等装置而将生物体试样中所含的检测对象物质的浓度定量化的技术。

[0006] 作为所述定量化的手法,夹心法是代表性的方法。夹心法中利用检测对象物质中的表位不同的2种抗体。第一抗体作为与金胶体、着色胶乳、荧光粒子等检测粒子发生过敏反应的检测试剂使用。第二抗体作为固定于多孔支撑体的一端的捕捉抗体用于检测线的测定。此外,将与检测抗体特异性结合的抗体固定化于多孔支撑体的另一端而用于对照线的测定。生物体试样中所含的检测对象物质一边从多孔支撑体的一端展开,与检测抗体形成免疫复合物,一边移动,在检测线上与捕捉抗体接触而被捕捉并显色。未与检测对象物质形成免疫复合物的游离的检测试剂在检测线上通过,被对照线的抗体捕捉并显色。通过利用层析读数仪等装置读取这些显色强度,就可以将检测对象物质的浓度定量。

[0007] 以往的免疫层析法中,由于在检测检测线和对照线时使用了共同的检测试剂,因此存在有对照线的显色强度受检测对象物质的浓度的影响而变化的问题。在生物体试样中存在有高浓度的检测对象物质的情况下,大量的检测粒子与检测对象物质形成免疫复合物,在上游侧的检测线处被捕捉,检测线的显色强度提高。另一方面,游离的检测试剂变少,因此存在有对照线的显色强度变低的问题。在生物体试样中存在低浓度的检测对象物质的情况下,由于与检测对象物质形成免疫复合物的检测粒子变少,因此游离的检测粒子在对照线处被大量地捕捉,其结果是,存在有对照线的显色强度提高的问题。

[0008] 在免疫层析法的定量化中,有时为了测定检测试剂向多孔支撑体的流入量而使用对照线,因此在多孔支撑体中展开有一定量的检测试剂的情况下,希望显色强度总是恒定。如果如前所述对照线的显色强度受检测对象物质的浓度的影响而变化,则会对测定精

度造成很大的影响。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本特开2006—67979号公报

## 发明内容

[0012] 发明所要解决的问题

[0013] 本发明的目的在于,鉴于上述的问题,作为不受检测对象物质的浓度影响的检测试剂提供一种对照线检测试剂,由此提供与以往相比高精度的免疫层析分析方法、使用了该分析方法的免疫层析试验片及试剂盒、试剂盒的制造方法。

[0014] 用于解决问题的方法

[0015] 本发明为了解决上述问题进行了深入研究,结果发现,通过作为用于检测对照线的检测试剂,使用包含对照线检测试剂的检测试剂,可以不受生物体试样中的检测对象物质的浓度的影响,使对照线的显色强度稳定化。本发明人进一步基于该见解,完成了包含对照线检测试剂的免疫层析试验片、该试验片的制造方法、使用了该免疫层析试验片的生物体试样中的检测对象物质的定量法等发明。

[0016] 即,代表性的本申请发明如下所示。

[0017] (1)一种免疫层析试验片,其特征在于,是用于将生物体试样中的检测对象物质定量的免疫层析试验片,具有:

[0018] a)结合垫,其被浸渗有与所述检测对象物质特异性地结合的检测试剂及对照线检测试剂;以及

[0019] b)多孔膜垫,在上游侧固定化有用于捕捉检测对象物质的抗体,并且在下游侧固定化有用于特异性地捕捉对照线检测试剂的抗体。

[0020] (2)根据(1)中记载的免疫层析试验片,其特征在于,所述对照线检测试剂包含结合有生物素标记蛋白的检测粒子。

[0021] (3)根据(2)中记载的免疫层析试验片,其特征在于,所述蛋白质为微生物来源或动物来源的蛋白质。

[0022] (4)根据(3)中记载的免疫层析试验片,其特征在于,所述微生物来源的蛋白质为封闭肽片段。

[0023] (5)根据(3)中记载的免疫层析试验片,其特征在于,所述动物来源的蛋白质为牛血清白蛋白或酪蛋白。

[0024] (6)根据(1)~(5)中任一项记载的免疫层析试验片,其特征在于,用于特异性地捕捉所述对照线检测试剂的抗体为抗生物素抗体。

[0025] (7)一种生物体试样中的检测对象物质的定量方法,其使用(1)~(6)中任一项记载的免疫层析试验片。

[0026] (8)一种免疫层析分析试剂盒,其包含(1)~(6)中任一项记载的免疫层析试验片、样品稀释液及分析装置。

[0027] (9)一种免疫层析试验片的制造方法,是(1)~(6)中任一项记载的免疫层析试验片的制造方法。

[0028] 发明效果

[0029] 根据本发明的免疫层析试验片,由于可以不依赖于生物体试样中的检测对象物质的浓度地使对照线的显色强度稳定化,因此可以提供测定精度高的免疫层析试验片。

### 附图说明

[0030] 图1是表示本发明中使用的免疫层析试验片的一例的俯视图。

[0031] 图2是表示本发明中使用的免疫层析试验片的一例的侧视图。

[0032] 图3表示使用本发明的免疫层析试验片测定人绒毛膜促性腺激素(hCG)时的照片。

[0033] 图4表示使用本发明的免疫层析试验片测定人绒毛膜促性腺激素(hCG)时的稀释直线性。

[0034] 图5表示使用以往的免疫层析试验片测定人绒毛膜促性腺激素(hCG)时的照片。

[0035] 图6表示使用以往的免疫层析试验片测定人绒毛膜促性腺激素(hCG)时的稀释直线性。

### 具体实施方式

[0036] 对本发明的免疫层析试验片的一个实施方式进行说明。作为本发明的实施方式,是包含与检测对象物质特异性地结合的检测试剂和对照线检测试剂的免疫层析试验片。

[0037] (对照线检测试剂)

[0038] 本发明中所用的对照线检测试剂是结合有生物素标记蛋白的检测粒子。生物素的标记方法没有特别限制,可以例示出用N-羧基琥珀酰亚胺法结合的方法。作为检测粒子没有特别限制,可以例示出金胶体、胶乳粒子、荧光粒子等。作为生物素标记蛋白与检测粒子的结合方法没有特别限制,可以例示出基于疏水结合的物理吸附、或借助了共价键的结合方法。

[0039] (蛋白质)

[0040] 作为所述生物素标记蛋白中所用的蛋白质的种类没有特别限制,然而优选微生物来源蛋白质、动物来源蛋白质等。更优选的是,作为微生物来源蛋白质优选封闭肽片段,作为动物来源蛋白质优选牛血清白蛋白或酪蛋白。这些蛋白质如果有市售的产品,则可以使用该市售品,也可以另行利用公知的方法制造。分子尺寸也没有特别限制,然而以平均分子量计优选为100kDa以下。一般而言蛋白质的分子尺寸越小,蛋白质与1个检测粒子的结合量就越是增加,因此灵敏度等性能越高。

[0041] (检测粒子)

[0042] 作为所述检测粒子的种类没有特别限制,可以使用显色粒子、荧光粒子。作为显色粒子,可以例示出金属粒子、胶乳粒子等。作为金属粒子,可以例示出金胶体、银胶体、铂胶体等。金属粒子的粒径没有特别限制,然而优选1~100nm的粒径。更优选为20~80nm,进一步优选为40~60nm。作为胶乳粒子,可以例示出包含聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、丙烯酸类聚合物等材质的粒子。胶乳粒子的粒径没有特别限制,然而优选为25~500nm。更优选为50~250nm,进一步优选为80~200nm。作为荧光粒子,没有特别限制,可以例示出包含聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚乙烯基甲苯、二氧化硅等材质的粒子。作为荧光色素,没有特别限制,可以例示出FITC(异硫氰酸荧光素)、罗丹明B衍生物、羟基香豆素等。它们当中,优选

使用通用性高、观察性优异的金胶体、胶乳粒子。

[0043] (N-羟基琥珀酰亚胺法)

[0044] 所述生物素标记蛋白的生物素的标记方法没有特别限定,可以例示出N-羟基琥珀酰亚胺法。通过使用N-羟基琥珀酰亚胺法,可以使生物素的羧基与N-羟基胺系化合物在脱水缩合剂存在下发生缩合反应,选择性地活化,与蛋白质的氨基借助酰胺键进行标记。

[0045] (N-羟基胺系化合物)

[0046] 所述缩合反应中所使用的N-羟基胺系化合物没有特别限制,例如可以举出N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺、2-羟基亚氨基-2-氰基乙酸乙酯、2-羟基亚氨基-2-氰基乙酸酰胺、N-羟基哌啶、N-羟基邻苯二甲酰亚胺、N-羟基咪唑、N-羟基马来酰亚胺等。也可以使用2种以上的这些化合物。其中,N-羟基琥珀酰亚胺(以下有时表述为NHS)由于比较廉价、容易获取或在肽合成领域等中有实效,因此更加优选。

[0047] (脱水缩合剂)

[0048] 作为所述缩合反应中所使用的脱水缩合剂,没有特别限制,例如可以举出1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、1-环己基-(2-吗啉基-4-乙基)-碳二亚胺对甲苯磺酸盐等。其中1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(以下有时表述为EDC·HCl)由于在肽合成领域等中作为通用的水溶性缩合剂有实效,因此更加优选。

[0049] (生物素的导入量)

[0050] 所述生物素标记蛋白中的生物素的导入量可以通过调整蛋白质与生物素的摩尔比来控制。为了提高灵敏度等性能,最好生物素的导入量多。更具体而言,相对于蛋白质的摩尔数而言生物素的摩尔数优选为1.0摩尔倍以上,更优选为5.0摩尔倍以上,进一步优选为10.0摩尔倍以上。由于所述摩尔比为一例,因此可以根据蛋白质的种类、现实的灵敏度适当地进行增减。

[0051] (生物素标记蛋白与检测粒子的结合)

[0052] 作为所述生物素标记蛋白与检测粒子的结合方法,没有特别限制,可以例示出基于疏水结合的物理吸附、或借助共价键的结合方法。在疏水结合中在生物素标记蛋白与检测粒子的表面层中直接地结合,因此优选在生物素标记蛋白的等电点附近的pH处进行处理。在共价键中,结合方法根据检测粒子表面的官能团而不同,然而要举出例子,则在存在于检测粒子的表面的官能团为氨基的情况下,可以使用前述的N-羟基琥珀酰亚胺法进行结合。

[0053] 反应温度没有特别限定。优选的下限为10℃,更优选为20℃以上。优选的上限为50℃,更优选为40℃以下。反应时间根据反应温度而不同,然而优选为1小时以上且24小时以下,更优选为2小时以上且12小时以下。

[0054] 反应液中所含的未反应的N-羟基胺系化合物、脱水缩合剂可以利用过滤、离心分离等从水溶剂中容易地分离。

[0055] (与检测对象物质特异性地结合的检测试剂)

[0056] 与所述检测对象物质特异性地结合的检测试剂是可以与生物体试样中的检测对象物质结合的抗体(以下有时表述为检测抗体)与检测粒子结合后的物质。检测抗体根据检测对象物质的种类而不同,然而如果有市售的产品,则可以使用该市售品,也可以另行利用公知的方法制造。分子尺寸也没有特别限制。

[0057] (用于捕捉检测对象物质的抗体)

[0058] 用于捕捉检测对象物质的抗体(以下有时表述为捕捉抗体)如果有市售的产品,则可以使用该市售品,也可以另行利用公知的方法制造。优选使用捕捉抗体对于检测对象物质的识别部位识别与检测抗体不同的部位的抗体。分子尺寸也没有特别限制。作为用于测定人绒毛膜促性腺激素的捕捉抗体,例如可以举出Anti hCG<sub>1646157</sub>(V-24), Human (Rabbit) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. 公司制)、Anti hCG/Chorionic Gonadotropin, Human (Mouse) (LifeSpan Biosciences, Inc. 公司制)、Anti CGB/hCG $\beta$ , Human (Mouse) (LifeSpan Biosciences, Inc. 公司制)、Anti Chorionic Gonadotropin, Human (Rabbit) (EY Laboratories, Inc. 公司制)、Anti $\beta$ -HCG, Human (Mouse) (Boster Immunoleader 公司制)、Anti CG $\alpha$  ( $\alpha$ HCG), Human (Rabbit) (R&D Systems Inc. 公司制)等。

[0059] (捕捉对照线检测试剂的抗体)

[0060] 所述捕捉对照线检测试剂的抗体具体而言是捕捉生物素的抗体(以下有时表述为抗生物素抗体)。作为抗生物素抗体如果有市售的产品,则可以使用该市售品,也可以另行利用公知的方法制造。分子尺寸也没有特别限制。作为抗生物素抗体,例如可以举出Anti-Biotin antibody (GENETEX, inc. 公司制)、Anti-Biotin, Goat-Poly (Bethyl Laboratories, Inc. 公司制)、IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Biotin(岩井化学药品株式会社制)等。

[0061] (多孔膜垫)

[0062] 通过将所述捕捉抗体固定化于多孔膜垫的上游侧(检测线),将抗生物素抗体固定化于下游侧(对照线),就可以制作出能够在免疫层析法等中使用的多孔膜垫。这些抗体可以容易地固定化于免疫层析法等中通常所使用的多孔膜垫中。作为多孔膜垫的材质没有特别限定,可以举出纤维素、纤维素衍生物、硝酸纤维素、乙酸纤维素、聚氨酯、聚酯、聚乙烯、聚氯乙烯、聚偏二氟乙烯、尼龙。优选由这些材质构成的膜、布帛、纤维状或无纺布状基质等。优选使用纤维素衍生物的膜,更优选使用硝酸纤维素膜。

[0063] 接下来,参照附图对本发明的免疫层析试验片的一例进行说明。图1中,1表示多孔膜垫,2表示样品垫,3表示结合垫,4表示吸收垫,5表示捕捉抗体的固定化部位(检测线),6表示抗生物素抗体的固定化部位(对照线),7表示粘合片。

[0064] 图1的例中,多孔膜垫由宽4mm、长60mm的细长的试验片状的硝酸纤维素制膜制作。在免疫层析试验片的结合垫中浸渗有与检测对象物质特异性地结合的检测试剂和对照线检测试剂。在距离硝酸纤维素膜的层析展开起点侧的末端约10mm的位置形成固定化有捕捉抗体的检测线5。在约15mm的位置形成固定化有抗生物素抗体的对照线6。

[0065] 如图1所示的免疫层析试验片可以通过如下操作来制作,即,将多孔膜垫1贴合于粘合片7的中间的位置,将样品垫2与结合垫3部分重叠地连接在多孔膜垫1的末端上,并且将吸收垫4重叠连接在多孔膜垫1的相反一侧的末端上。

[0066] 作为样品垫2,只要是可以快速地吸收、展开生物体试样的材质的构件即可,没有特别限制,可以举出纤维素制的滤纸、无纺布、或多孔合成树脂制的聚乙烯、聚丙烯等。其中优选滤纸。

[0067] 作为结合垫3,只要是可以将检测试剂以干燥状态保持、并可以随着生物体试样的展开快速地放出检测试剂的材质的构件即可,没有特别限制,可以举出玻璃纤维、纤维素制

的滤纸、聚酯制的无纺布等。其中优选玻璃纤维。

[0068] 作为吸收垫4,只要是可以快速地吸收、保持生物体试样的材质的构件即可,没有特别限定,可以举出纤维素制的滤纸、无纺布、或多孔合成树脂制的聚乙烯、聚丙烯等。其中优选纤维素制的滤纸。

[0069] 此外,也可以将免疫层析试验片收容于适当的塑料制的外壳中,该外壳具有用于向样品垫2、检测线5和对照线6的上方分别注入生物体试样的开口部、用于定量被捕捉到的检测粒子量的开口部。

[0070] (免疫层析试验片的制造方法)

[0071] 本发明的免疫层析试验片的制造方法没有特别限定。例如可以通过在结合垫中将一定量的检测试剂均匀地涂布于带状的玻璃纤维后、在恒温槽内在适当的温度干燥一定时间而制作。捕捉抗体和抗生物素抗体只要分别将一定量以线状涂布于多孔膜垫上即可。作为涂布于膜垫上的方法,没有特别限定,可以使用市售的免疫层析点样仪。捕捉抗体和抗生物素抗体的涂布量没有特别限定,然而优选每10cm线长为 $10\mu\text{l}$ 以下,更优选为 $8\mu\text{l}$ 以下,进一步优选为 $6\mu\text{l}$ 以下。下限优选为 $4\mu\text{l}$ 以上。作为捕捉抗体和抗生物素抗体的浓度没有特别限定,然而优选为 $2.0\sim 0.1\text{mg/ml}$ ,更优选为 $1.8\sim 0.2\text{mg/ml}$ ,进一步优选为 $1.6\sim 0.3\text{mg/ml}$ 。

[0072] 涂布于膜垫上的捕捉抗体和抗生物素抗体可以仅通过干燥而极为容易地固定化。干燥温度没有特别限定,然而优选为 $20^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ ,更优选为 $30\sim 70^{\circ}\text{C}$ ,进一步优选为 $40\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。干燥时间根据干燥温度而不同,然而通常为 $5\sim 120$ 分钟,优选为 $10\sim 60$ 分钟。

[0073] 本发明中,免疫层析分析试剂盒包括以生物体试样的前处理、稀释为目的的样品稀释液、免疫层析试验片及分析装置。

[0074] (使用了免疫层析试验片的检测对象物质的测定方法)

[0075] 使用如上所述的免疫层析试验片进行测定的方法没有特别限定。例如,可以例示出以下的方法。首先,将生物体试样根据需要进行适当的展开溶剂混合而得到能够展开的混合液后,将该混合液向样品垫2上注入(滴下)。该混合液通过样品垫2而向结合垫3展开。在生物体试样溶解浸渗在结合垫3中的检测试剂和对照线试剂的同时,检测对象物质与检测试剂形成免疫复合体而向多孔膜垫展开。其后,借助毛细管现象流向吸收垫4侧。当所述混合液到达多孔膜垫上的检测线5时,所述免疫复合体即被捕捉抗体捕捉并集聚,检测线5显色。包含对照线检测试剂的展开溶剂通过检测线5而到达对照线6。对照线检测试剂在此被抗生物素抗体捕捉并集聚,对照线6显色。其他的展开溶剂最终被吸收垫吸收。通过使用免疫层析读数仪等测定检测线5和对照线6的显色强度,就可以测定检测对象物质的浓度。

[0076] (对照线的显色强度)

[0077] 对照线的显色强度没有特别限制,只要是可以利用目视或免疫层析读数仪检测的范围的显色强度即可。优选为 $10\text{mAbs}\sim 500\text{mAbs}$ ,更优选为 $50\text{mAbs}\sim 450\text{mAbs}$ ,进一步优选为 $100\text{mAbs}\sim 400\text{mAbs}$ 。另外,优选无论检测对象物质的浓度如何,显色强度都恒定,具体而言,显色强度的变动系数(Coefficient of variation)优选显示为20%以下,更优选显示为10%以下,进一步优选显示为5%以下。

[0078] 需要说明的是,变动系数(Coefficient of variation)可以利用下述式1及式2求出。

[0079] 式1

$$[0080] \quad \text{标准偏差} = \sqrt{\frac{(\text{测定值} - \text{平均值})^2 \text{的和}}{\text{数据数}}}$$

[0081] 式2

[0082] 变动系数(%) = 标准偏差/平均值 × 100

[0083] 实施例

[0084] 以下,基于实施例对本发明进行详细说明。本发明不受这些实施例限制。

[0085] [实施例1]

[0086] (hCG检测试剂的配制)

[0087] 向125 $\mu$ l的金胶体液(OD<sub>520</sub>=12)(WRGH1、株式会社Winered Chemical公司制)中加入50 $\mu$ l的10mM Tris-HCl pH9.2,利用涡旋进行搅拌。将市售的抗hCG单克隆抗体(产品名:Anti CGB/hCG $\beta$ ,Human(Mouse)、型号:LS-C196902-100、LifeSpan Biosciences,Inc.公司制)用10mM Tris-HCl配制为0.1mg/ml。将100 $\mu$ l的抗hCG单克隆抗体溶液加入金胶体液中,利用涡旋搅拌后,在室温下静置15分钟。加入200 $\mu$ l的0.3wt%封闭肽片段(东洋纺株式会社制)(以下有时表述为BPF)+1.0wt%PEG20000水溶液(Santa Cruz Biotechnology Inc制)(以下有时表述为PEG),利用涡旋进行搅拌后,在室温下静置15分钟。其后,以7000rpm进行10分钟离心分离,除去上清液。加入200 $\mu$ l的0.3wt%BPF+1.0wt%PEG水溶液,利用涡旋进行搅拌后,在室温下静置15分钟。以7000rpm进行10分钟离心分离,除去上清液。加入1ml的0.3wt%BPF+5.0wt%D(+)-海藻糖(Naclai Tesque株式会社制)水溶液,利用涡旋进行搅拌后,在室温下静置15分钟。

[0088] (对照线检测试剂的配制)

[0089] 将3.15mg的D-生物素(Naclai Tesque株式会社制)用72 $\mu$ l的蒸馏水溶解。另外,将10mg的1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(Naclai Tesque株式会社制)和10mg的N-羟基琥珀酰亚胺(Naclai Tesque株式会社制)溶解于100 $\mu$ l的蒸馏水中。向其中加入D-生物素溶液,在室温下缓慢地搅拌1小时。向所述溶液中加入80 $\mu$ l的3wt%BPF溶液并在室温下静置30分钟,配制出生物素标记BPF溶液。然后,向50 $\mu$ l的金胶体液(OD<sub>520</sub>=12)中加入450 $\mu$ l的10mM Tris-HCl pH9.2,利用涡旋进行搅拌。继而,将15 $\mu$ l的生物素标记BPF溶液加入金胶体液中,利用涡旋进行搅拌后,在室温下静置15分钟。加入200 $\mu$ l的0.3wt%BPF+1.0wt%PEG20000水溶液(Santa Cruz Biotechnology Inc制)(以下有时表述为PEG),利用涡旋进行搅拌后,在室温下静置15分钟。其后,以7000rpm进行10分钟离心分离,除去上清液。加入200 $\mu$ l的0.3wt%BSA+1.0wt%PEG水溶液,利用涡旋进行搅拌后,在室温下静置15分钟。以7000rpm进行10分钟离心分离,除去上清液。加入1ml的0.3wt%BPF+5wt%D(+)-海藻糖(Naclai Tesque株式会社制)水溶液,利用涡旋进行搅拌后,在室温下静置15分钟。

[0090] (hCG检测用多孔膜垫的配制)

[0091] 在距离25mm×150mm的硝酸纤维素膜(商品名:Hi-Flow Plus型HF120(Merck Millipore株式会社制))的一端(上游侧)约10mm的位置作为线宽约1mm的检测线,使用免疫层析点样仪以约1.0 $\mu$ l/cm的涂布量涂布0.5mg/ml的抗hCG单克隆抗体(产品名:Anti Chorionic Gonadotropin,Human(Rabbit)、型号:AT-2601-2、EY Laboratories,Inc.公司制)溶液(50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH7.0+5wt%蔗糖)。然后,在距离硝酸纤维素膜的一端(上游侧)约

15mm的位置作为线宽约1mm的对照线,使用免疫层析点样仪以约 $1.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 的涂布量涂布 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ 的抗生物素单克隆抗体(产品名:Anti-Biotin antibody、型号:GTX44344、GENETEX,inc.公司制)溶液( $50\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}7.0+5\text{wt}\%$ 蔗糖)。其后在 $50^\circ\text{C}$ 干燥30分钟。

[0092] (hCG测定用结合垫的制作)

[0093] 将所述hCG检测试剂与对照线检测试剂的混合液(混合比1:1) $1.0\text{ml}$ 均匀地涂布于 $10\text{mm}\times 150\text{mm}$ 的结合垫(商品名:Sure Wick(Merck Millipore株式会社制))。其后,在干燥器内在室温下减压干燥一夜,制作出浸渗有hCG检测试剂和对照线检测试剂的hCG测定用结合垫。

[0094] (hCG测定用试验片的制作)

[0095] 以免疫层析法中通常所使用的载玻片构成制作出hCG测定用试验片。具体而言将样品垫(商品名:Sure Wick(Merck Millipore株式会社制))、结合垫(商品名:Sure Wick(Merck Millipore株式会社制))、硝酸纤维素膜(商品名:Hi-Flow Plus型HF120(Merck Millipore株式会社制))、吸收垫(商品名:Sure Wick(Merck Millipore株式会社制))串联连结而制作。然后使用裁割机裁割为横宽约 $4\text{mm}$ 、纵长约 $60\text{mm}$ 的试验片状。

[0096] (hCG试样的配制)

[0097] 将市售的hCG抗原用 $50\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}7.2+1.0\text{wt}\%$ BSA+ $0.1\text{wt}\%$ NaN<sub>3</sub>稀释,配制出 $1\text{IU}/\text{L}$ 、 $10\text{IU}/\text{L}$ 、 $100\text{IU}/\text{L}$ 、 $1,000\text{IU}/\text{L}$ 的各hCG试样。

[0098] (hCG的测定)

[0099] 将制作出的hCG测定用试验片设置于水平的台上。然后,用 $40\mu\text{l}$ 移液管采集所配制的4个水平的hCG试样,向样品垫滴下。将滴下样品10分钟后拍摄到的照片表示于图2中。检测线的显色强度依赖于hCG浓度地变高。对照线不受hCG浓度影响,显色强度的变动系数为 $2.15\%$ 。

[0100] (hCG的定量)

[0101] 使用免疫层析读数仪测定出hCG测定用试验片的显色强度。免疫层析读数仪使用了C10060-10(浜松Photonix公司制)。将结果表示于图3中。可以确认检测线依赖于hCG浓度而为直线性的反射吸光度。可以确认对照线不受hCG浓度影响,反射吸光度约为 $300\text{mAbs}$ 。

[0102] [比较例1]

[0103] (hCG检测用多孔膜垫的配制)

[0104] 利用与实施例1相同的方法作为对照线使用点样仪以约 $1.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 的涂布量涂布 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ 的抗IgG多克隆抗体溶液( $50\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}7.2$ )。其后在 $50^\circ\text{C}$ 干燥30分钟而制作出hCG检测用多孔膜垫。

[0105] (hCG测定用结合垫的制作)

[0106] 利用与实施例1相同的方法作为检测试剂仅均匀地涂布了hCG检测试剂(即,没有对照线检测试剂的涂布),制作出hCG测定用结合垫。

[0107] (使用了hCG试验片的hCG的测定)

[0108] 用使用所述制备出的多孔膜垫及结合垫制作的hCG测定用试验片,利用与实施例1相同的方法测定出hCG。将滴下样品10分钟后拍摄到的照片表示于图4中。检测线的显色强度依赖于hCG浓度地变高。对照线随着hCG浓度的增加,显色强度降低。

[0109] (使用了hCG试验片的hCG的定量)

[0110] 使用免疫层析读数仪利用与实施例1相同的方法测定出hCG测定用试验片的显色强度。将结果表示于图5中。检测线的显色强度依赖于hCG浓度地变高。对照线随着hCG浓度的增加,反射吸光度从约200mAbs降低至80mAbs,显色强度的变动系数为30.3%。

[0111] 产业上的可利用性

[0112] 利用本发明,可以提供简便且测定精度高的免疫层析试验片。

[0113] 符号的说明

[0114] 1 多孔膜垫,2 样品垫,3 结合垫,4 吸收垫,5 检测线,6 对照线,7 粘合片。

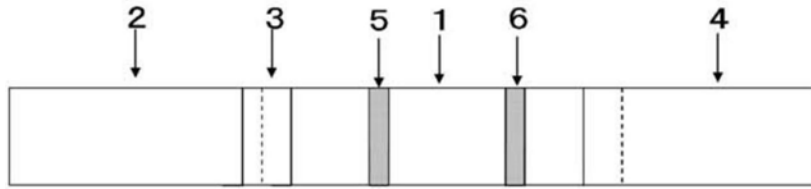


图1

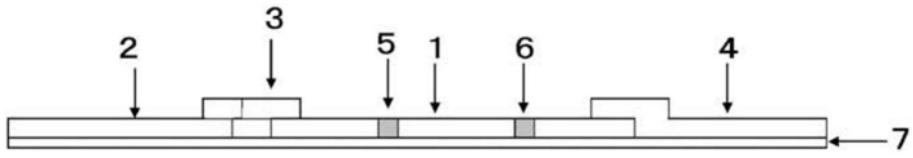


图2

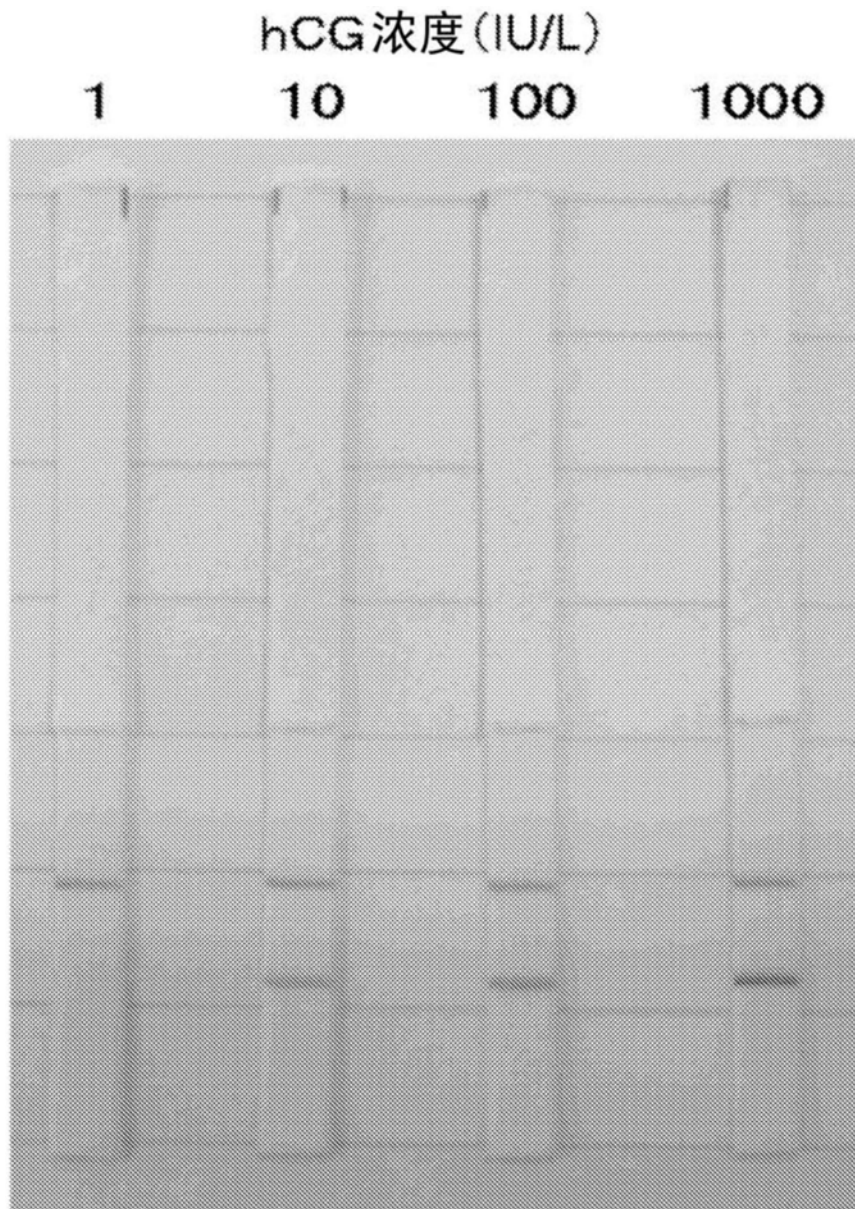
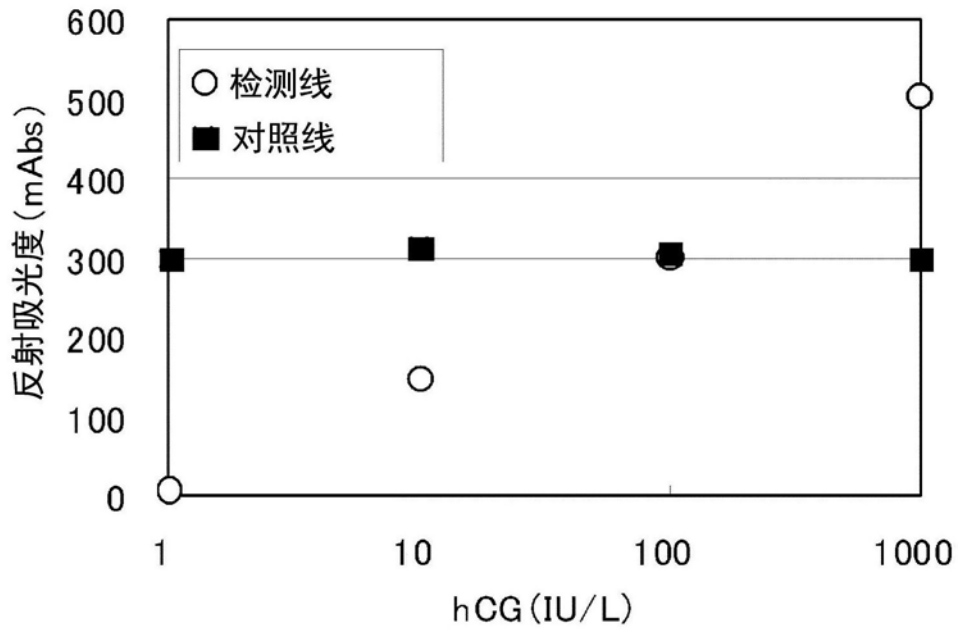


图3



hCG(IU/L)	1	10	100	1000	平均值	标准偏差	变动系数
反射吸光度 (mAbs)	298.6	314.86	307.36	299.68	305.13	6.6	2.15

图4

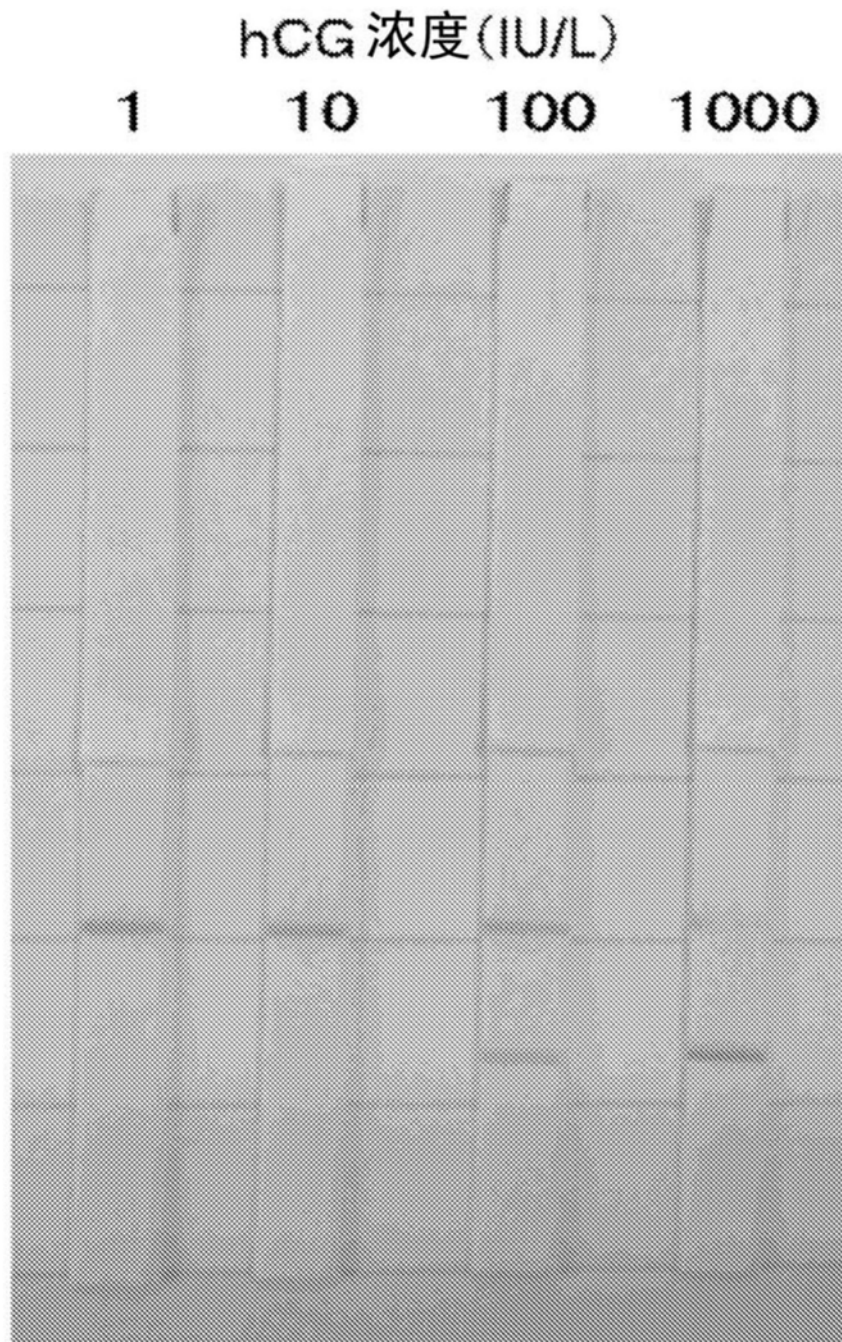
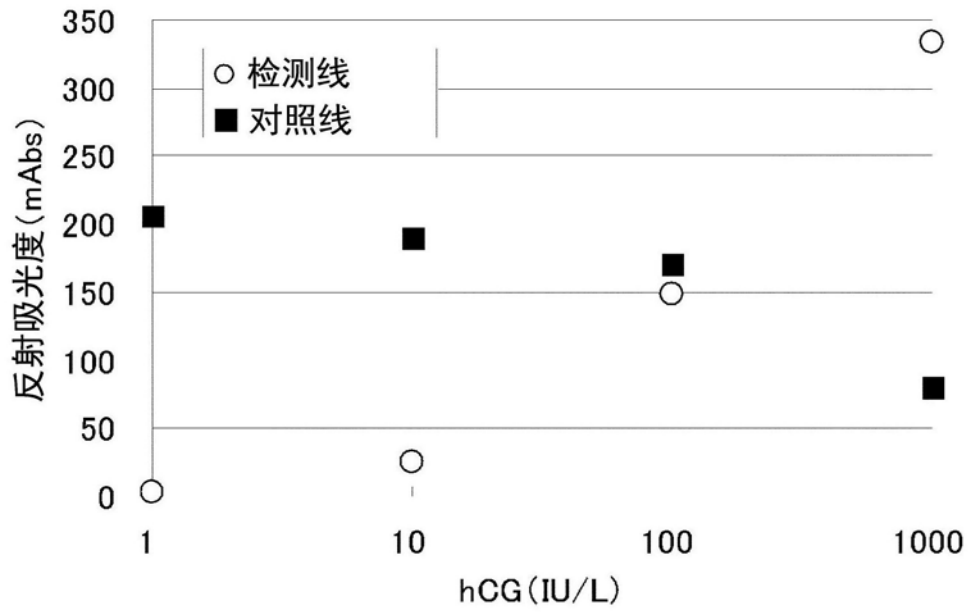


图5



hCG (IU/L)	1	10	100	1000	平均值	标准偏差	变动系数
反射吸光度 (mAbs)	206	190.3	170.9	79.7	161.73	49.0	30.3

图6

专利名称(译)	免疫层析试验片		
公开(公告)号	<a href="#">CN108139395A</a>	公开(公告)日	2018-06-08
申请号	CN201680060111.9	申请日	2016-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	东洋纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	东洋纺株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	东洋纺株式会社		
[标]发明人	川南裕 辻裕二 米田圭三		
发明人	川南裕 辻裕二 米田圭三		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 B01L3/5023 B01L2300/0825 G01N33/558 G01N33/52 G01N33/581 G01N33/76 G01N2333/59		
优先权	2015204680 2015-10-16 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种不受检测对象物质的浓度影响的包含对照线检测试剂的免疫层析试验片。本发明的免疫层析试验片的特征在于，是用于将生物体试样中的检测对象物质定量的免疫层析试验片，具有：a)结合垫，其浸渗有与所述检测对象物质特异性地结合的检测试剂及对照线检测试剂；以及b)多孔膜垫，其在上游侧固定化有用于捕捉检测对象物质的抗体，并且在下游侧固定化有用于特异性地捕捉对照线检测试剂的抗体。

