



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107209179 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201480084630.X

(51) Int.Cl.

(22)申请日 2014.12.16

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.08.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/083236 2014.12.16

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/098177 IA 2016.06.23

(71) 申请人 积水医疗株式会社
地址 日本国东京都

(72)发明人 河野景吾 吉田万友美 山本光章
横川伸也 浅见麻里惠

(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 陆岩

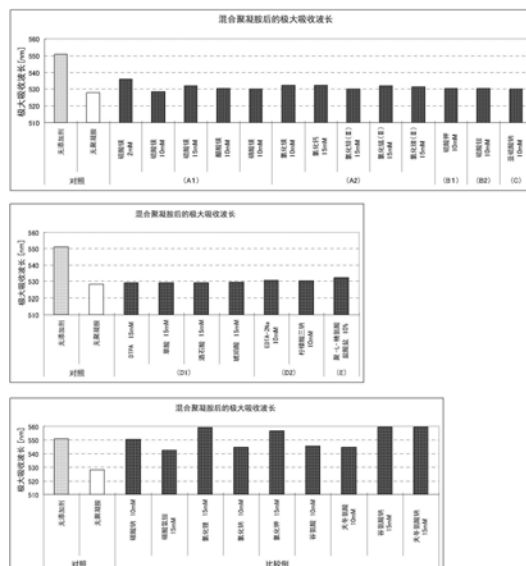
权利要求书1页 说明书18页 附图4页

(54)发明名称

用于检测含红细胞的样品中的对象物的免疫色谱用测试条、及使用该测试条的免疫色谱

(57)摘要

本发明的课题在于,提供一种使用聚凝胺作为红细胞凝集剂、使用胶体金缀合物作为检测试剂时,将全血中的红细胞凝集并分离除去并且不引起胶体金的凝集的免疫色谱用测试条;以及利用免疫色谱的检测方法。本发明人们为了解决上述课题,并非进行聚阴离子的种类、量的选定,而是从完全不同的观点出发,审视了此前的试剂构成本身并对各要素进行了深入研究,结果惊奇地发现,通过使用特定的添加剂,在不基于聚阴离子进行中和的情况下也能够抑制胶体金的凝集。



1. 一种免疫色谱用测试条,其具有以下构成,

(1) 具有由多孔体构成的膜,所述多孔体至少具备样品供给部、展开部和检测部,

在展开部的局部具有缀合物保持部,所述缀合物保持部以能够溶出的方式保持有被胶体金标记的抗检测对象物抗体缀合物,进而在展开部的局部且所述缀合物保持部分的下游侧具有检测部,所述检测部固定有固定化抗体;

(2) 从样品供给部至展开部的缀合物保持部的上游侧中的至少局部,以能够与通过样品供给部而被提供的聚凝胺接触的方式含有添加剂,所述添加剂用于抑制由作为红细胞凝集剂的聚凝胺引起的所述缀合物的凝集。

2. 根据权利要求1所述的测试条,其中,聚凝胺包含于样品供给部。

3. 根据权利要求1或2所述的测试条,其中,所述添加剂包含于缀合物保持部。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的测试条,其中,不含有作为中和剂的聚阴离子,所述聚阴离子用于中和作为红细胞凝集剂的聚凝胺的阳离子。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的测试条,其中,所述添加剂为选自属于(A) 2价金属的盐、(B) 硫酸与金属或镧的盐、(C) 亚硫酸与金属的盐、(D) 羧酸螯合物、(E) 聚碱性氨基酸的化合物中的1种或2种以上的化合物。

6. 一种利用免疫色谱的检测方法,其具有下述工序:

(A) 将样品供给到测试条的样品供给部的工序,

所述测试条具有由多孔体构成的膜,所述多孔体至少具备样品供给部、展开部和检测部,

在展开部的局部具有缀合物保持部,所述缀合物保持部以能够溶出的方式保持有含胶体金的缀合物,所述胶体金固定有针对对象物的抗体,进而在展开部的局部且缀合物保持部分的下游侧具有检测部,所述检测部固定有固定化抗体;

(B) 使聚凝胺与样品在样品供给部或样品供给部的上游接触,使样品中的来自血液的成分凝集的工序;

(C) 将通过(B)工序得到的凝集物从样品中分离除去的工序;

(D) 使通过(C)工序得到的分离除去了凝集物的样品成分与含胶体金的缀合物接触的工序,该工序在具有抑制由聚凝胺引起的所述缀合物的凝集的能力的添加剂的存在下进行;

(E) 在检测部检测通过(D)工序得到的、样品成分中的对象物与缀合物的复合物的工序。

7. 根据权利要求6所述的检测方法,其中,聚凝胺包含于样品供给部。

8. 根据权利要求6或7所述的检测方法,其中,所述添加剂包含于缀合物保持部。

9. 根据权利要求6~8中任一项所述的检测方法,其中,不含有作为中和剂的聚阴离子,所述聚阴离子用于中和作为红细胞凝集剂的聚凝胺的阳离子。

10. 根据权利要求6~9中任一项所述的检测方法,其中,样品为含肝素被检体或含EDTA被检体。

11. 根据权利要求6~10中任一项所述的检测方法,其中,所述添加剂为选自属于(A) 2价金属的盐、(B) 硫酸与金属或镧的盐、(C) 亚硫酸与金属的盐、(D) 羧酸螯合物、(E) 聚碱性氨基酸的化合物中的1种或2种以上的化合物。

用于检测含红细胞的样品中的对象物的免疫色谱用测试条、 及使用该测试条的免疫色谱

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测含红细胞的样品中的对象物的免疫色谱用测试条、及使用该测试条的免疫色谱。更详细而言,涉及:为了即使在以聚阳离子为有效成分的红细胞凝集剂共存在测定体系中时也不会因该红细胞凝集剂的存在导致作为检测试剂的胶体金缀合物发生非特异性凝集而用特定添加剂进行了处理的测试条;以及使用该测试条的免疫色谱。

背景技术

[0002] 近年,在诊所或小规模医院中,“想在患者诊察期间获知检查结果”的需求在增加,正在由以前的委托院外进行检查向即时检查(Point of Care Testing,POCT)转变。随着POCT的普及,已在使用收纳有侧流式免疫色谱用测试条的设备作为体外诊断药。就免疫色谱用测试条而言,不需要在检查时制备试剂,仅通过将血液或尿等被检试样(以下有时称为“样品”)直接滴加到该测试条上等简单操作即能够对样品中的对象物进行检测,对于简便且迅速地分析检测对象物而言是非常有用的。

[0003] 免疫色谱用测试条(以下有时称为“测试条”)通常为具备样品供给部、展开部、检测部的多孔性的膜,其结构如下:针对检测对象物的标记抗体等检测试剂(以下有时称为“缀合物”)以能够溶出、展开的方式保持于展开部的展开起始部位,从而与样品接触后能够通过展开部并到达检测部,进而固定化抗体被固定在展开部的局部,构成检测部。这里,当样品滴加到样品供给部时,样品中的检测对象物与标记抗体特异性结合,形成复合物,该复合物在展开部向着下游方向逐渐展开,进而与固定化抗体结合。因此,通过在抗体固定化部分对由标记抗体、检测对象物和固定化抗体形成的三明治型复合物进行检测,从而能够对检测对象物进行定性或定量分析。构成缀合物的标记物的一例为胶体金粒子,通过胶体金粒子的显色反应能够进行定性检测。进一步地,基于其显色程度,还能够定量地检测样品中的检测对象物。

[0004] 但是,在前述样品为全血时存在如下问题:全血中的红细胞不能在多孔性的膜中移动而将膜孔堵塞,妨碍样品的展开。因此,在以全血为样品的情况下,需要预先从全血中分离除去红细胞,作为这样的方法,已知如下方法:在测定前,通过离心分离使红细胞沉降并除去的方法;在测定前或者测定开始时,通过红细胞分离剂使红细胞凝集并过滤除去的方法。

[0005] 作为前述红细胞分离剂,已知有例如海美溴铵(以聚凝胺的商品名流通。以下有时简称聚凝胺)(专利文献1、2、3)。

[0006] 专利文献1中,作为由合成的水溶性聚合物形成的红细胞凝集剂的一例,而列举了聚凝胺。

[0007] 专利文献2中,记载了一种色谱用玻璃纤维制血细胞分离膜,其含有聚凝胺作为红细胞凝集化物质。并且公开了如下技术:单独聚凝胺的情况下,血液通过血细胞分离膜时伴随有溶血,为了避免该溶血,用PVA被覆前述血细胞分离膜。

[0008] 这样,虽然聚凝胺作为红细胞凝集剂是广泛已知的,但将聚凝胺用于将金属缀合物用作检测试剂的免疫色谱的情况下,存在不仅使全血中的红细胞凝集而且还使金属缀合物凝集的问题(专利文献3)。

[0009] 专利文献3中公开了用于防止这样的金属缀合物的凝集的技术。即,开发了一种免疫色谱分析设备,其中,使作为红细胞分离剂的聚凝胺等聚阳离子结合于色谱载体的上游,在其下游结合有用于中和聚阳离子的聚阴离子。根据该技术,聚阳离子的正电荷被聚阴离子的负电荷中和,因此可以防止含硒的金属缀合物凝集。

[0010] 以往技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:日本特开平3-205563号公报

[0013] 专利文献2:日本特开平5-099918号公报

[0014] 专利文献3:日本特表2002-509254号公报

发明内容

[0015] 发明要解决的课题

[0016] 在以全血为样品,采用聚凝胺作为红细胞凝集剂,采用胶体金缀合物作为检测试剂来实施免疫色谱时,本发明人们尝试按照上述专利文献3公开那样,通过添加用于防止胶体金缀合物凝集的聚阴离子来中和聚凝胺的正电荷。但是,虽然实现了全血中的红细胞的凝集和分离除去,但未能防止胶体金缀合物的凝集。其原因尚不确定,但可能是由于专利文献3的硒缀合物与胶体金缀合物不同、以及聚阴离子的种类等。

[0017] 本发明的课题在于,提供使用聚凝胺作为以聚阳离子为有效成分的红细胞凝集剂且使用胶体金缀合物作为检测试剂时,使血液中的红细胞凝集并分离除去,并且不引起胶体金缀合物的凝集的免疫色谱用测试条;以及提供使用该测试条的免疫色谱。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 本发明人们在研究用于解决上述课题的方法时,不进行引起课题的物质、即聚阳离子的种类或量的选定,而是从完全不同的观点出发,审视此前的试剂构成本身并对各构成要素进行了深入研究,结果惊奇地发现存在一种具有抑制由聚凝胺引起的胶体金缀合物的凝集的能力的添加剂,发现通过使用该添加剂,在不通过聚阴离子来中和聚阳离子的情况下就能抑制胶体金缀合物的凝集,至此完成了本发明。即,本发明具有以下构成。

[0020] [1]一种免疫色谱用测试条,其具有以下构成。

[0021] (1)具有由多孔体构成的膜,所述多孔体至少具备样品供给部、展开部和检测部,

[0022] 在展开部的局部具有缀合物保持部,所述缀合物保持部以能够溶出的方式保持有被胶体金标记的抗检测对象物抗体缀合物,进而在展开部的局部且所述缀合物保持部分的下游侧具有检测部,所述检测部固定有固定化抗体;

[0023] (2)从样品供给部至展开部的缀合物保持部的上游侧中的至少局部,以能够与通过样品供给部而被提供的聚凝胺接触的方式含有添加剂,所述添加剂用于抑制由作为红细胞凝集剂的聚凝胺引起的所述缀合物的凝集。

[0024] [2]根据[1]所述的测试条,其中,聚凝胺包含于样品供给部。

[0025] [3]根据[1]或[2]所述的测试条,其中,前述添加剂包含于缀合物保持部。

[0026] [4]根据[1]～[3]中任一项所述的测试条,其中,不含有作为中和剂的聚阴离子,所述聚阴离子用于中和作为红细胞凝集剂的聚凝胺的阳离子。

[0027] [5]根据[1]～[4]中任一项所述的测试条,其中,前述添加剂为选自属于(A) 2价金属的盐、(B) 硫酸与金属或镅的盐、(C) 亚硫酸与金属的盐、(D) 羧酸螯合物、(E) 聚碱性氨基酸的化合物中的1种或2种以上化合物。

[0028] [6]一种利用免疫色谱的检测方法,其具有下述工序:

[0029] (A) 将样品供给到测试条的样品供给部的工序,

[0030] 所述测试条具有由多孔体构成的膜,所述多孔体至少具备样品供给部、展开部和检测部,

[0031] 在展开部的局部具有缀合物保持部,所述缀合物保持部以能够溶出的方式保持有含胶体金的缀合物,所述胶体金固定有针对对象物的抗体,进而在展开部的局部且缀合物保持部分的下游侧具有检测部,所述检测部固定有固定化抗体;

[0032] (B) 使聚凝胺与样品在样品供给部或样品供给部的上游接触,使样品中的来自血液的成分凝集的工序;

[0033] (C) 将通过(B)工序得到的凝集物从样品中分离除去的工序;

[0034] (D) 使通过(C)工序得到的分离除去了凝集物的样品成分与含胶体金的缀合物接触的工序,该工序在具有抑制由聚凝胺引起的所述缀合物的凝集的能力的添加剂的存在下进行;

[0035] (E) 在检测部检测通过(D)工序得到的、样品成分中的对象物与缀合物的复合物的工序。

[0036] [7]根据[6]所述的检测方法,其中,聚凝胺包含于样品供给部。

[0037] [8]根据[6]或[7]所述的检测方法,其中,前述添加剂包含于缀合物保持部。

[0038] [9]根据[6]～[8]中任一项所述的检测方法,其中,不含有作为中和剂的聚阴离子,所述聚阴离子用于中和作为红细胞凝集剂的聚凝胺的阳离子。

[0039] [10]根据[6]～[9]中任一项所述的检测方法,其中,样品为肝素采血被检体或EDTA采血被检体。

[0040] [11]根据[6]～[10]中任一项所述的检测方法,其中,前述添加剂为选自属于(A) 2价金属的盐、(B) 硫酸与金属或镅的盐、(C) 亚硫酸与金属的盐、(D) 羧酸螯合物、(E) 聚碱性氨基酸的化合物中的1种或2种以上的化合物。

[0041] 发明效果

[0042] 根据本发明,在以聚凝胺为红细胞凝集剂且使用胶体金缀合物作为检测试剂的免疫色谱中,通过使用具有抑制由聚凝胺引起的胶体金缀合物凝集的能力的添加剂,从而可以不使胶体金缀合物凝集而仅使红细胞凝集并将其从样品中分离除去,胶体金缀合物可以发挥本来的作为检测试剂的作用,因此能够准确地检测和测定样品中的检测对象物。并且,由于作为聚阳离子中和剂的聚阴离子的添加并非必要条件,因此可以使试剂构成变得极其简单,另外,还具有如下优点:减少会给免疫反应、检测对象物在试条上的展开等带来无法预期的作用的因素。

附图说明

[0043] 图1是示出聚凝胺溶液与添加有本发明的添加剂候补物质的缀合物液的混合液的极大吸收波长的测定结果的图(实施例1)。

[0044] 图2是本发明的免疫色谱用测试条的结构示意图。

[0045] 图3是示出对使用本发明的添加剂的免疫色谱法和LTIA法进行比较的图(实施例2)。

[0046] 图4是示出对本发明的添加剂处方和以往处方的检测灵敏度进行比较的图(实施例3)。

具体实施方式

[0047] (免疫色谱用测试条)

[0048] 本发明的免疫色谱用测试条是至少具备“样品供给部”、“展开部”、“检测部”的多孔性的膜,具有如下结构:针对检测对象物的标记抗体以能够溶出的方式保持于展开部的展开起始部位,从而与样品接触后能够通过展开部到达检测部,进而固定化抗体被固定在展开部的局部,构成检测部。

[0049] 作为将这些具体化的一例,可以列举如下测试条,所述测试条包括:担当样品供给部的样品垫;以能够溶出的方式保持针对检测对象物的标记抗体且担当展开部的局部的缀合物垫;局部固定有固定化抗体且担当展开部和检测部的多孔性的膜。即,本发明的典型的免疫色谱用测试条具有以下构成。

[0050] (1) 被供给样品的样品垫

[0051] (2) 配置在样品垫的下游且以能够溶出的方式保持有缀合物的缀合物垫,所述缀合物的胶体金表面被第一抗体致敏

[0052] (3) 配置在缀合物垫的下游且固定有第二抗体的多孔性的膜,所述第二抗体与缀合物和检测对象物的复合物结合

[0053] 这里,也存在样品垫、缀合物垫、多孔性的膜分别构成各自的载体的情况、或者2者构成1个载体的情况,只要从上游向下游按照样品垫、缀合物垫、多孔性的膜的顺序来构成,则任一方式均包括在内。

[0054] 除了上述构成以外,免疫色谱用测试条还包括进一步配置安装有吸收垫、3rd垫中的任一种以上的构成。该测试条通常排列在塑料制粘合片之类的固相支承体上。以不妨碍样品的毛细管流动的物质来构成该固相支承体自不必说,当然,将粘接剂的成分也设为不妨碍样品的毛细管流动的物质。需要说明的是,还可以出于提高固定有抗体的多孔性的膜的机械强度、并且防止分析中的水分蒸发(干燥)的目的,进行在测试条上层叠聚酯膜等的加工。

[0055] (红细胞凝集剂)

[0056] 作为本发明中使用的红细胞凝集剂,可以使用公知的聚阳离子性的红细胞凝集剂。其中,优选聚凝胺。聚凝胺的化学名也叫海美溴铵,为被赋予CAS号28728-55-4的1种阳离子性聚合物。

[0057] 在本发明中,聚凝胺为了使作为样品的全血中的红细胞凝集而被使用。作为聚凝胺的使用方式,除了在将样品稀释而成的稀释液中添加聚凝胺或在样品中直接添加聚凝胺的方式以外,还可以使免疫色谱试条的样品供给部(样品垫)预先含有聚凝胺。通过这样的

使用方式,聚凝胺与全血接触而将全血中的红细胞凝集。红细胞凝集物可通过某种过滤而从样品中除去,在免疫色谱试条中,当样品通过构成样品供给部的过滤器时,大部分残留在样品供给部上而被除去。在本发明中,为了在样品供给部除去红细胞凝集物,更切实地减少向展开部的供给,期望并用后述的3rd pad(血细胞分离膜)。

[0058] 聚凝胺的添加量为能够将全血中的红细胞凝集而分离除去以使得全血样品中的检测对象物能够进行所期望的展开的量即可,例如,在预先包含于样品垫中的情况下,优选相对于滴加样品时的样品液量成为0.25%以上的浓度,进而适宜为0.25~2%。从制造样品垫时的观点出发,以在渗入垫中的溶液中的浓度计,优选为0.5%以上,进而适宜为0.5~4%。

[0059] 另外,本发明中不含有专利文献3所述的、用于中和作为红细胞凝集剂的聚凝胺的阳离子的、作为中和剂的聚阴离子,但在不脱离本发明的目的、不影响反应体系的范围内,必要时,也不排除通常使用的聚阴离子的存在。

[0060] (添加剂)

[0061] 在本发明中,出于将全血样品中的红细胞凝集的目的而使用红细胞凝集剂(聚凝胺),但聚凝胺存在不仅使红细胞凝集还使胶体金缀合物凝集的问题。本发明中,为了避免这样的胶体金缀合物凝集而需要使用添加剂。

[0062] 作为本发明中使用的添加剂,只要具有抑制由聚凝胺引起的胶体金缀合物凝集的能力,就可以为任何物质。

[0063] 例如,将具有这样的能力的添加剂添加到含有胶体金缀合物和聚凝胺的溶液中,观测缀合物的凝集抑制减轻效果,从而可以选定本发明的添加剂。更具体而言,该选定方法为如下方法:在胶体金缀合物中预先加入作为选定对象的添加剂溶液,在其中添加聚凝胺溶液,测定极大吸收波长,选定极大吸收波长比无添加剂时小的物质。

[0064] 特别是,在胶体金缀合物和红细胞这2种聚阴离子共存的状态下,能选择性地仅使一方凝集而抑制另一方的凝集,这一事实很令人惊讶。

[0065] 作为通过上述那样的选定方法选择出的添加剂,可以列举选自属于(A)2价金属的盐、(B)硫酸与金属或镧的盐、(C)亚硫酸与金属的盐、(D)羧酸螯合物、(E)聚碱性氨基酸的化合物中的1种或2种以上化合物。

[0066] (A)2价金属的盐

[0067] 2价金属的盐进而可以分类为:(A1)2价金属与酸的盐、(A2)2价金属与卤素元素的盐。这里,作为2价的金属,可以例示镁、钙、镍、锌等。作为酸,可以例示硫酸、硝酸等无机酸,醋酸等有机酸,作为卤素元素,可以例示氯、溴等。这些之中,作为(A1)的具体化合物,硫酸镁、硝酸镁、醋酸镁是适宜的,作为(A2)的具体化合物,氯化镁、氯化钙、氯化锌、氯化锰、氯化镍是适宜的。

[0068] (B)硫酸与金属或镧的盐

[0069] 作为(B1)硫酸与金属的盐,可以列举:硫酸与1价金属的盐或硫酸与2价金属的盐,其中,优选硫酸钾、硫酸镁(与A1重复)。作为(B2)硫酸与镧的盐,优选硫酸铵。

[0070] (C)亚硫酸与金属的盐

[0071] 作为亚硫酸与金属的盐,优选亚硫酸钠。

[0072] (D)羧酸螯合物及其盐

[0073] 羧酸螯合物进而可以分类为：(D1) 二羧酸螯合物、(D2) 三羧酸螯合物、(D3) 四羧酸螯合物、(D4) 五羧酸螯合物。作为 (D1) 二羧酸螯合物，优选草酸、琥珀酸、酒石酸，作为 (D2) 三羧酸螯合物，优选柠檬酸，作为 (D3) 四羧酸螯合物，优选乙二胺四醋酸 (EDTA)，作为 (D4) 五羧酸螯合物，优选二乙基三胺五醋酸 (DTPA)。这些螯合物可以以游离酸或者金属盐的形式来使用。作为以金属盐形式使用时的具体例子，可以列举：柠檬酸三钠、EDTA-2Na 等。另外，除了前述以外，也可以是二醇醚二胺四醋酸 (EGTA) 等对前述化合物的结构的一部分进行修饰、改变而得的化合物。

[0074] (E) 聚碱性氨基酸

[0075] 作为聚碱性氨基酸，可以列举：聚-L-精氨酸，优选以聚-L-精氨酸盐酸盐的形式来使用。在专利文献3中，聚-L-精氨酸盐酸盐是与聚凝胺同样地被归类为具有正电荷的红细胞分离剂的化合物，在与聚凝胺组合时，不仅不会增强由聚凝胺引起的胶体金缀合物的凝集效果，反而会降低该效果，这一点完全出乎意料。

[0076] 该添加剂的添加量只要为可以抑制由聚凝胺引起的胶体金缀合物的凝集的量即可，例如，以在渗入样品垫和/或缀合物垫的溶液中的浓度计，可以列举1~100mmol/L，优选2~50mmol/L、10~50mmol/L。添加剂的种类、和添加量以及浓度可以根据作为目标的对象物质、所需的灵敏度等来适宜设定。

[0077] 作为本发明的特定添加剂的使用方式，要是可以抑制由作为红细胞凝集剂的聚凝胺引起的胶体金缀合物凝集的方式，就可以为任一方式，在免疫色谱用测试条中，以能够与聚凝胺成分接触的方式含浸于从样品供给部至展开部的缀合物固定部位中的至少局部即可。因此，可以仅为样品供给部，此外也可以为样品供给部至展开部的全部部位。

[0078] 在使添加剂包含于样品供给和/或缀合物垫的方式中，除了使液状的添加剂包含于垫中的方式外，还包括使添加剂含浸于垫后进行干燥从而添加剂以干燥状态附着于垫的方式。

[0079] 另外，本发明的特定的添加剂还可以添加在样品稀释液中来使用。

[0080] 在本发明中，如上所述，需要以特定的使用方式来使用添加剂，但这并不妨碍出于其他的目的而使用上述以外的其它添加剂或以上述以外的其它使用方式来使用。例如，自不必说，使样品供给部至展开部的缀合物固定部位含浸本发明的特定添加剂、使展开部的抗体固定化部位含浸上述以外的添加剂的方式当然也包含在本发明的范围内。

[0081] (胶体金)

[0082] 本发明中使用的作为标记物的胶体金要是可以使抗体致敏(固定)而构成缀合物且可以在使其与样品接触而对样品中的对象物(抗原)进行检测的方法中作为标记物来发挥作用的胶体金，就可以为任意一种。

[0083] 作为胶体金，除了胶体金以外，胶体铂也包含在本发明的胶体金中。

[0084] 已知胶体金粒子的粒径会极大地影响检测灵敏度，例如，在保持于免疫色谱用测试条来使用的情况下，作为胶体金粒子的粒径，优选20~60nm，更优选30~50nm，特别优选40nm。上述胶体金可以通过熟知的方法，例如在加热的四氯金(III)酸水溶液中滴加柠檬酸三钠水溶液或柠檬酸三铵水溶液并搅拌来制造。在本说明书，有时也将胶体金称为胶体金粒子，但二者意思相同。

[0085] (抗体对胶体金的致敏)

[0086] 针对检测对象物的抗体向胶体金的固定通常通过物理吸附来进行。此时,抗体浓度优选被调整为1~5 μ g/mL缓冲液的浓度。缓冲液的种类和pH优选为2mmol/L磷酸缓冲液(pH6.5~8)或2~10mmol/L TrisTris-盐酸缓冲液(pH7~9),进一步优选为2~10mmol/L Tris-盐酸缓冲液(pH7~7.5),但也包含其它缓冲液的使用,而并不限于这些。在本说明书中,将上述那样的在胶体金上固定有针对检测对象物的抗体、对照用抗体(或者抗原)的胶体金称为“缀合物”。

[0087] (封闭)

[0088] 对于本发明的缀合物来说,还可以用封闭剂将胶体金表面的未结合抗体的区域封闭。

[0089] 作为胶体金缀合物的封闭剂,通常使用来自生物的成分,作为来自生物的成分,只要来自于生物且具有封闭作用,就可以为任意成分,例如,可以列举动物性蛋白和来自动物性蛋白的肽。具体而言,可以列举:牛血清白蛋白即BSA、来自微生物的Blocking Peptide Fragment (TOYOB0制)、来自丝蛋白(丝胶蛋白的水解物)的NEO PROTEIN SAVER (TOYOB0制)、StartingBlock™ (PBS) Blocking Buffer (PIERCE制)、Stabil Coat™ (SurModics公司制)、Casein。

[0090] 作为来自生物的成分的浓度,根据所使用的成分适宜决定即可。例如,在调整为10D/mL的胶体金溶液中加入抗体液并混合后,在该混合液中以终浓度0.1~10%的范围添加前述来自生物的成分,从而进行封闭,更优选以0.2~5%的范围来使用。

[0091] 此外,还可以将来自非生物的成分和来自生物的成分两者混合后作为胶体金的封闭剂来使用。

[0092] (检测试剂)

[0093] 在本发明中,“检测试剂”具体是指至少含有缀合物的溶液。

[0094] 出于使缀合物保持稳定状态而在与样品混合时促进固定于缀合物的抗体与检测对象物的特异性反应、或者使缀合物迅速且有效地溶解和流动的目的,检测试剂可以含有例如1种以上的稳定化剂、溶解辅助剂等。作为该稳定化剂、溶解辅助剂等,可以列举例如:牛血清白蛋白(BSA)、蔗糖、酪蛋白、氨基酸类等。

[0095] 另外,出于提高检测灵敏度的目的,必要时,检测试剂中可以含有2

[0096] 甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱等公知的增敏剂。

[0097] 进而,必要时,检测试剂中还可以含有作为Ca²⁺离子的螯合剂的EDTA、EGTA等。

[0098] 需要说明的是,在本说明书中,“检测”或“测定”这些用语包括证明检测对象的存在和/或检测对象的定量等地需要最广义地进行解释,任何含义都不作为限定性解释。

[0099] (稀释液)

[0100] 在本发明中,根据样品中的检测对象物的浓度而需要进行样品的稀释时,有时使用稀释液。稀释液只要不会显著阻碍抗原抗体反应或者不会因相反地显著促进反应而使标记物过凝集而导致毛细管现象中的展开不良、或者不会使与抗原浓度相应的抗原抗体反应的信号无法检测,就可以使用任意组成的稀释液。

[0101] 作为具有这样的作用的稀释液,可以列举例如:纯化水;生理盐水;pH6.0~10.0的低浓度缓冲液,例如10~20mmol/L磷酸缓冲液、10~20mmol/L Tris-盐酸缓冲液、10~20mmol/L Bis-Tris缓冲液。另外,出于控制样品在试条上的展开速度的目的,还可以在这

些稀释液中添加表面活性剂。

[0102] 如前所述,在本发明的稀释液中可以预先含有作为红细胞凝集剂的聚凝胺。

[0103] 另外,如前所述,本发明的稀释液中还可以预先含有具有凝集抑制能力的添加剂,所述凝集抑制能力是指抑制聚凝胺对胶体金缀合物的凝集的能力。

[0104] (样品垫)

[0105] 在本发明中,“样品垫”是接受样品的担当样品供给部的部位,只要为在成型为垫的状态下吸收液体的样品并且能够使液体和检测对象物的成分穿过的物质和形态,就可以包括任意垫。

[0106] 如前所述,本发明的样品垫中可以预先含有红细胞凝集剂。这种情况下,可以包含在样品垫中的至少一部分,也可以包含在整个样品垫中。

[0107] 另外,如前所述,本发明的样品垫中还可以预先含有特定的添加剂。这种情况下,可以包含在样品垫中的至少一部分,也可以包含在整个样品垫中。这里,在使本发明的样品垫预先含有红细胞凝集剂和特定的添加剂这两者的情况下,可以使两者包含于样品垫的同一部位,也可以为了不共存而分别包含于不同的部位。另外,还可以使样品垫的整体中预先包含这两者。

[0108] 作为适合于样品垫的材料的具体例子,包括玻璃纤维(glass fiber)、丙烯酸类纤维、亲水性聚乙烯材料、干燥纸、纸浆、织物等,但并不限于这些。适宜使用玻璃纤维制垫。也可以使该样品垫同时具备后述的缀合物垫的功能。另外,在不脱离本发明的目的、不影响反应体系的范围内,必要时,样品垫中还可以含有通常使用的封闭试剂。

[0109] (缀合物垫)

[0110] 在本发明中,“缀合物垫”是指:使与检测对象物特异性反应的检测试剂含浸于适合后述缀合物垫的材料中并干燥而成的垫。缀合物垫具有如下功能:当样品从该缀合物垫通过时,检测试剂和检测对象物形成复合物。该缀合物垫可以以其自身以与抗体固定化膜接触的方式进行配置。或者也可以以下述方式配置:与前述样品垫接触地配置,接收基于毛细管流从样品垫中通过的样品,然后基于毛细管流将该样品移送到另一垫(以下有时称为“3rd Pad”),所述另一垫与缀合物垫中的、异于与前述样品垫的接触面的面相接触。需要说明的是,样品垫、缀合物垫中的一种以上的部位的选择、所选择的部位以何种方式配置于抗体固定化膜是可以适宜地改变的。

[0111] 另外,如前所述,本发明的缀合物垫中还可以预先含有特定的添加剂。这种情况下,可以包含于缀合物垫的、至少包括固定有缀合物的部位的上游在内的一部分,也可以包含于缀合物垫的整体中。

[0112] 作为适合于该缀合物垫的材料,可以列举纸、纤维素混合物、硝酸纤维素、聚酯、丙烯腈共聚物、玻璃纤维或人造纤维之类的无纺纤维,但并非限于这些。适宜使用玻璃纤维制垫。

[0113] 必要时,该缀合物垫中可以含有用于确保免疫色谱的可靠性的“对照试剂”,例如被标记物标记的不与样品成分反应的抗体、被标记物标记的KLH(钥孔虫戚血蓝蛋白)等高抗原性蛋白质等。这些对照试剂是认为样品中不可能存在的成分(物质),可适宜选择。

[0114] (3rd Pad)

[0115] 在本发明中,3rd Pad可以出于如下目的而配置,所述目的为:样品与检测试剂的

反应成分中,能够将检测对象物的检测中不需要的成分除去,从而使反应所需要成分在固定有抗体的不溶性膜上顺利展开。

[0116] 例如,血细胞、不溶性的血细胞破碎物等为检测中不需要的成分,期望被除去。另外,还可以使该3rd Pad同时具有如下额外的效果:在通过抗原抗体反应而生成的凝集物中,将大到不能在抗体固定化膜上移动且不能顺利展开的程度的凝集物预先除去。作为3rd Pad,还包括使液体和检测对象的成分能够穿过的任意物质和形态。

[0117] 作为具体例子,包括玻璃纤维(glass fiber)、丙烯酸类纤维、亲水性聚乙烯材料、干燥纸、纸浆、织物等,但并非限于这些。

[0118] 在本发明中,为了将未仅被前述红细胞凝集剂和样品垫彻底除去的血细胞更切实地分离除去,期望使用血细胞分离膜。

[0119] (抗体向不溶性膜的固定)

[0120] 本发明的免疫色谱试剂中的针对检测对象物的抗体向不溶性膜的固定可以通过熟知的方法来实现。例如,在流通式的情况下,将上述抗体调整为规定浓度,将一定量的该液体以点状或者+等特定符号状涂布在不溶性膜上。另外,此时,为了确保免疫色谱的可靠性,通常将可与缀合物结合的蛋白质或者化合物固定在与针对检测对象物的抗体不同的位置,从而作为“对照线”。另外,也可以将针对前述对照试剂的抗体固定在与针对检测对象物的抗体不同的位置,从而作为“对照线”。

[0121] 在侧流式的情况下如下进行:将上述抗体调整为规定浓度,使用具有能够一边以一定速度从喷嘴吐出该液体一边沿着水平方向移动的机构的装置等,在不溶性膜上涂布为线状。此时,抗体的浓度优选为0.1~5mg/mL,进而优选为0.5~3mg/mL。另外,关于抗体在不溶性膜上的固定量,在流通式的情况下,可以通过调节滴加到不溶性膜上的涂覆量来优化,在侧流式的情况下,可以通过调节从上述装置的喷嘴吐出的速度来优化。特别是,在侧流式的情况下,优选为0.5~2 μ L/cm。需要说明的是,在本发明中,“流通式膜分析”是指样品液等垂直通过不溶性膜而展开的方式,“侧流式膜分析”是指样品液等平行于不溶性膜地移动而展开的方式。

[0122] 另外,在本发明中,关于针对对象物的抗体在不溶性膜上的涂覆位置,在侧流式的情况下,如下地配置即可:使上述检测试剂基于毛细管现象从缀合物垫展开,并依次通过涂覆有各抗体的线。优选以涂覆有针对检测对象物的抗体的线位于上游,而涂覆有对照抗体的线位于其下游的方式来配置。此时,期望各线间的距离为充分的距离以使得能够进行标记物的信号检测。在流通式的情况下,针对对象物的抗体的涂覆位置按照能够进行标记物的信号检测的方式来配置即可。

[0123] 向上述不溶性膜上涂覆的抗体液通常可以使用规定缓冲液来制备。作为该缓冲液的种类,可以列举:磷酸缓冲液、Tris缓冲液、Good's缓冲液等通常使用的缓冲液。缓冲液的pH优选在6.0~9.5的范围,可以根据使用的抗体的性质适宜设定。例如,在后述抗H-FABP单克隆抗体的情况下,可以使用pH7.2的缓冲液。缓冲液中还可以含有NaCl等盐类、蔗糖等稳定剂或保存剂、ProClin等防腐剂等。盐类除了NaCl等那样为了调整离子强度而包含的盐外,还包括氢氧化钠等在缓冲液的pH调整工序中添加的盐。将抗体固定于不溶性膜后,还可以进一步使通常使用的封闭剂以溶液或者蒸气状被覆抗体固定部位以外的位置,从而进行封闭。

[0124] 本说明书中,如上所述,有时将固定有抗体的不溶性膜称为“抗体固定化膜”。

[0125] (不溶性膜)

[0126] 在本发明中,作为不溶性膜(以下有时简单记载为膜),可以使用任意材质的膜。可以列举例如:聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、尼龙类、玻璃、纤维素和纤维素衍生物等多糖类或者陶瓷等,但并非限于这些。具体而言,可以列举Merck&Co., Inc.、东洋滤纸公司、Whatman, Inc.等销售的玻璃纤维滤纸、纤维素滤纸等。另外,通过对该不溶性膜的孔径和结构进行适宜选择,从而能够控制胶体金标记抗体与对象物的免疫复合物在膜中流动的速度。通过控制在膜中的流动速度,从而可以调节结合在固定于膜的上述抗体上的标记抗体量,因此期望考虑到与本发明的免疫色谱用测试条的其它构成材料的组合来优化膜的孔径和结构。

[0127] (吸收垫)

[0128] 在本发明中,吸收垫是指:通过将在不溶性膜中移动、通过的样品吸收而控制样品的展开的具有液体吸收性的部位。在侧流式中,设置在试条构成的最下游即可,在流通式中,例如可以设置在抗体固定化膜的下部。作为该吸收垫,可以使用例如滤纸,但不限于此。优选使用Whatman, Inc.的740-E等。

[0129] (检测器件)

[0130] 本发明的免疫色谱用测试条可以收纳、搭载于考虑了试条的大小、样品的添加方法・位置、抗体固定化膜中的抗体的固定位置、信号的检测方法等的适当容器(壳体)中而使用,将这种被收纳、搭载的状态称为“设备”。

[0131] (其它)

[0132] 在说明书中,有时将“不溶性膜”表述为“固相”,将通过物理或化学方法使抗原、抗体担载于不溶性膜的情况或者担载后的状态表述为“固定”、“固定化”、“固相化”、“致敏”、“吸附”。

[0133] (样品)

[0134] 在本发明的检测方法中,含有检测对象物的“样品”是指含有表面具有很多负电荷的粒子状成分的液体,作为生物样品,可以列举包含红细胞的样品,特别可以列举:全血、通过离心分离等分离出的红细胞、血浆等。

[0135] 另外,血液被检体中还包括如下被检体:采血时,利用添加了EDTA或肝素等抗凝剂的采血管采集的被检体(以下有时简称为含EDTA的被检体、含肝素的被检体等)。

[0136] 根据本发明,还发挥以下效果:免疫色谱法中含EDTA的被检体的测定值比含肝素的被检体的测定值低的问题也被解决,不论被检体的种类如何都能够进行准确的测定。另外,进而,根据本发明的添加剂,还得到检测灵敏度上升的效果。因此,通过将添加剂的浓度、种类选定为所期望的浓度、种类,还能够控制免疫色谱设备的检测灵敏度。

[0137] (检测对象物)

[0138] 作为本发明的检测对象物,可以例示血液(全血)、红细胞、血清、血浆、尿、唾液或咳嗽等生物样品中所存在的物质,例如炎症相关标志物,如CRP(C反应性蛋白)、IgA、IgG、IgM等;凝血和纤溶标志物,如纤维蛋白降解产物(例如D二聚体)、可溶性纤维蛋白、TAT(凝血酶-抗凝血酶复合物)、PIC(纤溶酶-纤溶酶抑制物复合物)等;循环相关的标志物,如氧化LDL、BNP(脑钠肽)、H-FABP(心脏型脂肪酸结合蛋白);代谢相关的标志物,如脂连蛋白;肿瘤

标志物,如CEA(癌胚抗原)、AFP(甲胎蛋白)、CA19-9、CA125、PSA(前列腺特异性抗原);感染相关标记物,如HBV(B型肝炎病毒)、HCV(C型肝炎病毒)、沙眼衣原体、淋病奈瑟氏球菌;变应原特异性IgE(免疫球蛋白E);激素;药物等。在这些中,更优选想要使用全血作为样品的呼声高的D二聚体、CRP、BNP、H-FABP等。

[0139] (本发明中使用的抗体)

[0140] 本发明中使用的针对检测对象物的抗体只要是特异性地与检测对象物反应的抗体,则对制作方法没有任何限定,可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体。通常,产生该抗体的杂交瘤可以依照Kohler和Milstein的方法(参照Nature、第256卷495页(1975年)),使以检测对象物为免疫原而进行了免疫的动物的脾细胞和同种的骨髓瘤细胞(myeloma cells)进行细胞融合来制作。

[0141] 这里,在通过形成所谓的三明治来检测检测对象物的测定法中,在使用的抗体为单克隆抗体的情况下,标记物固定用抗体(第一抗体)和不溶性膜固定用抗体(第二抗体)的关系是:第一抗体的表位为一价时,第二抗体的表位使用与第一抗体不同的表位;第一抗体的表位为多价时,第二抗体的表位与第一抗体可以相同也可以不同。

[0142] 在后述实施例1中,使用抗H-FABP单克隆抗体。本发明中使用的抗H-FABP单克隆抗体的制备方法如下所述,但本发明不受其限定,也可以使用市售的抗H-FABP单克隆抗体。作为市售的抗H-FABP单克隆抗体的例子,可以列举:Hytest公司的clone#5B5、#10E1等;Fitzgerald公司的clone#M79188、#79189等(需要说明的是,为了方便,单克隆抗体有时以产生该抗体的杂交瘤的克隆名来表示。以下相同)。

[0143] (抗H-FABP单克隆抗体的制备例)

[0144] (1) 杂交瘤的制备

[0145] 将溶解于PBS的人纯化H-FABP(Hytest公司制)作为免疫原。将该免疫原与完全弗氏佐剂(和光纯药工业公司制)按照1比1的液量进行舂和乳化,制备成H-FABP浓度0.5mg/mL的乳液,将100 μ L该乳液投与到6周龄的雌BALB/C小鼠的皮下。然后,在2个半月间,将H-FABP浓度0.2mg/mL的乳液100 μ L追加投与3次,第3次的追加投与起10天后,将用PBS溶解的0.2mg/mL的人纯化H-FABP100 μ L投与至皮下。3天后,摘出脾脏、鼠颈部淋巴结和髂骨淋巴结,将得到的脾脏和淋巴结细胞与骨髓瘤细胞SP2/O-Ag14按照6比1的比例混合,在50%聚乙二醇1540(和光纯药工业公司制)存在下进行细胞融合。融合细胞按照以脾脏细胞计为 2.5×10^6 /mL的方式悬浮于HAT培养基,在96孔培养板(CORNING公司制)中各分注0.2mL。将其在5%CO₂培养箱中于37℃进行培养,约1周后,对于杂交瘤逐渐长起来的孔中的培养上清,用ELISA法选择产生与H-FABP反应的抗体的细胞株。具体而言,首先介由山羊抗小鼠IgG(Fc)抗体(JACKSON公司制)将各培养上清中的IgG固定于微孔板(NUNC公司制)后,与H-FABP反应。接下来,与生物素标记抗H-FABP兔多克隆抗体(Proteintech Group公司制)反应,进而与过氧化物酶标记链霉亲和素(PIERCE公司制)反应。然后,加入含有邻苯二胺(东京化成公司制)的过氧化物酶底物溶液而进行显色,加入1.5N硫酸使显色停止后,用酶标仪(Abs.492nm)进行测定,选择对H-FABP显示出高反应性的杂交瘤。对于所选择的杂交瘤,使用有限稀释法进行克隆化,建立了10种产生抗H-FABP单克隆抗体的杂交瘤。

[0146] (2) 单克隆抗体的制备

[0147] 对于在2周前腹腔内注射了姥鲛烷0.5mL的12周龄的雌BALB/C小鼠,以细胞数0.2

$\times 10^5$ 个的量腹腔内投与上述(1)中得到的杂交瘤。约14天后采集腹水,进行离心处理而得到上清。将上清与等量的吸附用缓冲液(3mol/L NaCl-1.5mol/L Glycine-NaOH、pH8.5)混和,然后进行过滤。使该滤液通过已经用吸附用缓冲液平衡化的蛋白A柱(GEHealthcare公司制),使滤液中的抗体吸附到柱上后,用0.1mol/L柠檬酸缓冲液(pH3.0)使抗体从柱中洗脱,从而纯化抗H-FABP单克隆抗体(Clone#87203和Clone#87212)。

[0148] (测定)

[0149] 作为对来自胶体金的信号进行定量的方法,按照公知的方法进行即可,可以测定吸光度或者反射光强度。也可以将该吸光度或反射光强度的变化量外插到已知浓度的样品的标准曲线中来测定对象物的浓度。

[0150] (利用免疫色谱的检测方法)

[0151] 本发明的利用免疫色谱的检测方法为至少具有以下的(A)~(E)工序的方法,典型地,为使用上述免疫色谱用测试条的检测方法。

[0152] (A) 将样品供给到测试条的样品供给部的工序,

[0153] 所述测试条具有由多孔体构成的膜,所述多孔体至少具备样品供给部、展开部和检测部,

[0154] 在展开部的局部以能够溶出的方式保持有被胶体金标记的针对检测对象物的抗体(缀合物),进而在展开部的局部且缀合物保持部分的下游侧具有检测部,所述检测部固定有固定化抗体;

[0155] (B) 使聚凝胺与样品在样品供给部或样品供给部的上游接触,使样品中的来自血液的成分凝集的工序

[0156] (C) 将通过(B)工序得到的凝集物从样品中分离除去的工序

[0157] (D) 使通过(C)工序得到的分离除去了凝集物的样品成分与含胶体金的缀合物接触的工序,该工序在具有抑制由聚凝胺引起的前述缀合物的凝集的能力的添加剂的存在下进行

[0158] (E) 在检测部检测通过(D)工序得到的、样品成分中的对象物与缀合物的复合物的工序

[0159] 实施例

[0160] 接下来,列举实施例来具体说明本发明,但这些例子并不限定本发明的范围。

[0161] (实施例1) 本发明的添加剂的选定方法

[0162] 对聚凝胺溶液与添加有本发明的添加剂候补物质的缀合物液的混合液的吸收波长进行测定,来进行本发明的添加剂的选定。

[0163] 1. 各种溶液、缀合物的制备

[0164] 1) 胶体金标记抗H-FABP单克隆抗体(抗H-FABP抗体缀合物)的制备

[0165] (i) 胶体金溶液的制备

[0166] 在加热到73℃的500mL纯化水中,添加5% (w/v) 柠檬酸三铵水溶液1mL并搅拌混合。接下来,添加5% (w/v) 四氯金(III)水溶液1mL,边搅拌边反应10分钟后,使反应液沸腾。然后,在冰水中冷却,从而制备平均粒径为40nm的胶体金的溶液。对于该平均粒径为40nm的胶体金的溶液,用2mmol/L Tris-盐酸缓冲液(pH7.0)调整为在胶体金的极大吸收波长下的吸光度为10D/mL。

[0167] (ii) 抗H-FABP抗体缀合物的制备

[0168] 在上述10D/mL的胶体金溶液 (pH7.0) 20mL中,添加用2mmol/L Tris-盐酸缓冲液 (pH7.0) 稀释为46.2 μ L/mL的抗H-FABP单克隆抗体 (Clone#87212的F(ab')₂片段) 1mL,在室温下搅拌10分钟。在该胶体金与抗体的混合液中,添加含有0.1% (w/v) 封闭剂 (NEO PROTEIN SAVER: 东洋纺生化公司、No.NPS-301) 的2mmol/L Tris-盐酸缓冲液 (pH7.0) 1mL,在室温下搅拌5分钟。然后,在10℃下以11900 $\times$ g离心45分钟。

[0169] 除去上清后,在得到的沉渣中添加缀合物稀释液 (Conjugate Dilution Buffer: SCRIPPS公司、No.B0221) 1mL,使缀合物悬浮,得到抗H-FABP抗体缀合物。

[0170] (iii) 添加剂水溶液的制备

[0171] 将表1所述的各添加剂溶解于水。按照各自对水的溶解性,调整为1mol/L或0.5mol/L。

[0172] (iv) 试验用悬浮液的制备

[0173] 将上述所制备的添加剂水溶液加入到(ii)中制备的抗H-FABP抗体缀合物中,并按照添加剂达到各种浓度的方式来调整,将该悬浮液作为试验用悬浮液。需要说明的是,将各试验用悬浮液中的添加剂的浓度的组合示于表1。

[0174] (v) 聚凝胺的水溶液

[0175] 将聚凝胺 (Sigma-Aldrich) 溶解于水,制备成0.5%的浓度的水溶液。

[0176] [表1]

[0177]

项目		添加物候补	浓度 (mM)	
(A)2 价金属的盐	(A1) 2 价金属与酸的盐	硫酸镁	2	实施例 1(A1-1a)
			10	实施例 1(A1-1b)
			15	实施例 1(A1-1c)
		硝酸镁	10	实施例 1(A1-2)
		醋酸镁	10	实施例 1(A1-3)
	(A2)2 价金属与卤素的盐	氯化镁	10	实施例 1(A2-1)
		氯化钙	15	实施例 1(A2-2)
		氯化锌 (II)	15	实施例 1(A2-3)
		氯化锰 (II)	15	实施例 1(A2-4)
(B) 硫酸与金属或镧的盐	(B1) 硫酸与金属的盐	硫酸钾	10	实施例 1(B1-1)
		硫酸镁	2~15	实施例 1(B1-2a~c) *与实施例 1(A1-1a~c)重复
	(B2) 硫酸与镧的盐	硫酸铵	10	实施例 1(B2)
(C) 亚硫酸与金属的盐		亚硫酸钠	10	实施例 1(C)
(D) 羧酸螯合物	(D1) 羧酸	DTPA	15	实施例 1(D1-1)
		草酸	15	实施例 1(D1-2)
		酒石酸	15	实施例 1(D1-3)
		琥珀酸	15	实施例 1(D1-4)
	(D2) 与金属的盐	EDTA-2Na	10	实施例 1(D2-1)
		柠檬酸三钠	10	实施例 1(D2-2)
(E) 聚碱性氨基酸		聚-L-精氨酸盐酸盐	(10%)	实施例 1(E)
碳酸盐或碳酸氢盐		碳酸钠	10	比较例 1-1
		碳酸氢铵	15	比较例 1-2
1 价金属与卤素的盐		氯化锂	15	比较例 2-1
		氯化钠	10	比较例 2-2
		氯化钾	15	比较例 2-3
氨基酸	氨基酸	谷氨酸	10	比较例 3-1
		天冬氨酸	10	比较例 3-2
	氨基酸金属盐	谷氨酸钠	15	比较例 3-3
		天冬氨酸钠	15	比较例 3-3
其它		氯化胆碱	10	比较例 4

[0178] 2. 试验方法

[0179] 测定在试验用悬浮液中加入聚凝胺水溶液时的吸收波长。

[0180] 在上述所制备的试验用悬浮液中加入等量的0.5%聚凝胺水溶液。然后,在加入聚凝胺水溶液起1.5分钟后,用分光光度计在400nm~900nm的范围测定吸收波长,由所测定的吸收波长的光谱算出极大吸收波长。如果所得到的极大吸收波长比不添加添加剂时(即,胶体金缀合物存在凝集)的极大吸收波长小,则可以判定为各添加剂具有减轻聚凝胺存在下的凝集反应的效果。进一步地,越接近无聚凝胺时(即,无胶体金缀合物的凝集)的极大吸收波长,则越可以判定为更优选的添加剂。

[0181] 3. 试验结果

[0182] 将各极大吸收波长示于图1。图1所述的添加剂的浓度为表1所示的在试验用悬浮

液中的浓度。以下,在该浓度下来识别、评价各样品。

[0183] 聚凝胺存在下且无添加剂的样品的极大吸收波长为552nm。与此相对地,与无添加剂的样品相比,对于在聚凝胺存在下加入了实施例的添加剂的各样品来说,在所有情况下,极大吸收波长均位于低波长侧且为不存在聚凝胺的样品的极大吸收波长附近的波长。

[0184] 另一方面,在聚凝胺存在下,比较例的化合物的极大吸收波长虽然与无添加剂的样品的极大吸收波长相比为低波长,但是其程度仅为一点点,还存在在聚凝胺存在下极大吸收波长比无添加剂的样品的极大吸收波长长的化合物。

[0185] (实施例2)使用本发明的添加剂的免疫色谱法与LTIA法的比较

[0186] 1. 本发明的免疫色谱设备的制作

[0187] 1) 胶体金标记抗H-FABP单克隆抗体(抗H-FABP抗体缀合物)的制备

[0188] (i) 胶体金溶液的制备

[0189] 使用与上述实施例1的(i)同样地制备的胶体金溶液。

[0190] (ii) 抗H-FABP抗体缀合物的制备

[0191] 使用与上述实施例1的(ii)同样地制备的抗H-FABP抗体缀合物。

[0192] (iii) 对照线用胶体金标记KLH(KLH缀合物)的制备

[0193] 在上述10D/mL的胶体金溶液(pH6.1) 20mL中,添加用2mmol/L磷酸缓冲液(pH6.1)溶解为620 μ g/mL的KLH(西格玛公司制) 1mL,在室温下搅拌10分钟。在该胶体金与KLH的混合液中,添加10%牛血清白蛋白(BSA)水溶液1mL,在室温下搅拌5分钟。然后,在10℃下以11900 $\times$ g离心45分钟。除去上清后,在得到的沉渣中添加上述缀合物稀释液1mL而将缀合物悬浮,从而得到KLH缀合物。

[0194] 2) 缀合物垫的制作

[0195] 在上述1)中制备的抗H-FABP抗体缀合物中,添加作为添加剂的硫酸镁(30mmol/L、50mmol/L)、醋酸镁(30mmol/L、50mmol/L)、硫酸铵(30mmol/L)。需要说明的是,各添加剂的浓度为终浓度。

[0196] 按照含有这些添加剂的抗H-FABP抗体缀合物达到30D/mL、KLH缀合物达到0.750D/mL的方式与分别含有2.5%NEO PROTEIN SAVER、2.4%乳糖的Tris-盐酸缓冲液混合,从而制作缀合物溶液,使一定体积的玻璃纤维制垫(日本Pall Corporation、No.8964)中渗入该垫体积的1.2倍容量。在烘箱内在70℃加热45分钟而使其干燥,从而形成缀合物垫。另外,在根据需要添加增敏剂等添加剂的情况下,在前述缀合物溶液中添加必要量,然后进行同样的操作。

[0197] 另外,独立于上述(A)试验地,将作为添加剂的硫酸镁变更为10mmol/L的浓度,除此以外,使用与上述相同的方法制作缀合物垫。另外,还制作了无添加剂的缀合物垫(以往处方)(B)。

[0198] 3) 抗H-FABP单克隆抗体固定化膜(抗体固定化膜)的制作

[0199] 用含有2.5%蔗糖的10mmol/L磷酸缓冲液(pH7.2)按照抗H-FABP单克隆抗体(Clone#87203)达到3mg/mL的方式进行稀释、制备,另外,为了使对照线显色,用含有2.5%蔗糖的10mmol/L磷酸缓冲液(pH7.2)按照兔抗KLH多克隆抗体(Bethyl公司制)达到0.5mg/mL的方式进行稀释、制备,使用免疫色谱用涂抹器“XYZ3050”(BIO DOT公司)并以达到1 μ L/cm的方式设定,从而在硝酸纤维素膜(Merck公司、HF180、260mm $\times$ 25mm)短边的一端的内侧位

置将上述抗H-FABP单克隆抗体涂布成线状,在与该位置隔着约5mm的间隔的位置将抗KLH多克隆抗体涂布成线状。在烘箱内在70℃干燥45分钟,形成抗体固定化膜。

[0200] 4) 样品垫的制作

[0201] 将玻璃纤维制垫(Lyda11公司)适宜地裁成必要的大小,使其渗入该垫体积的1.15倍容量的含有1%聚凝胺的与缀合物垫相同的缓冲液(或纯化水),在烘箱内在70℃干燥45分钟后作为样品垫来使用。

[0202] 5) 免疫色谱用测试条的制作

[0203] 在塑料制粘合片(a)上贴合上述抗体固定化膜(b),在展开上游部侧按照抗H-FABP抗体(c)、而后是抗KLH抗体(d)的顺序来配置涂布部,进而安装血细胞分离膜(3rd Pad)(e)。然后,配置安装上述2)中制作的缀合物垫(f),进而按照与该缀合物垫重叠的方式配置安装上述4)中制作的样品垫(g),在相反侧的端部配置安装吸收垫(h)。将使各构成要素如此重叠而成的结构物切断,从而制作出免疫色谱用测试条。该测试条在分析时收纳、搭载于塑料性的专用壳体(具有样品添加窗部和检测窗部,图2中未示出),形成免疫色谱测试设备的形态。图2中示出免疫色谱用测试条的构成示意图。

[0204] 6) 基于免疫色谱法的测定

[0205] 将被检体120μL添加到上述制作的免疫色谱测试设备的样品垫窗部,10分钟后,对于测试设备,用免疫色谱读取仪(immunochromato-reader)Rapid PIA(Hamamatsu Photonics公司)来测定抗H-FABP抗体涂布部(检测部)的反射光强度。由反射强度算出H-FABP的浓度。

[0206] 2. 基于LTIA法的测定

[0207] 基于LTIA法的测定使用LTIA法测定用试剂Liblia(注册商标)H-FABP(DS Pharma Biomedical Co.,Ltd.Lot.S1KH06)并通过自动分析装置、日立7170(日立制作所)来进行。需要说明的是,操作按照Liblia H-FABP所附文件和日立7170的操作说明书来进行。得到了利用前述自动分析装置定量了的各被检体的H-FABP浓度。

[0208] 3. 被检体

[0209] 就采血时通过添加有肝素的采血管采集的血浆被检体(在本实施例和以下的实施例中简称为含肝素的被检体)而言,在(A)的试验中使用24个样品,在(B)的试验中使用17个样品,此外,就采血时通过添加有EDTA的采血管采集的血浆被检体(本实施例和以下的实施例中简称为含EDTA的被检体)而言,在(A)的试验中使用22个样品,在(B)的试验中使用29个样品。

[0210] 4. 试验结果

[0211] 对于各被检体,将Y轴设为通过免疫色谱得到的H-FABP浓度、将X轴设为通过LTIA法得到的H-FABP浓度而进行作图,示出各添加剂对2个测定法的相关性带来的影响。将结果示于图3。

[0212] 在以往方法即不添加添加剂的情况下,含EDTA的被检体与含肝素被检体相比来说值变低,与此相对,在添加添加剂时,在任一情况下,含EDTA的被检体与含肝素的被检体的相关性与以往方法的与含肝素的被检体的相关性相比来说均显示出更为接近的相关性。

[0213] 在免疫色谱法中,在以往处方即无添加剂时,含EDTA的被检体与含肝素的被检体相比来说值变低,与此相对,添加有本发明的添加剂的处方在任一情况下如上所述的含

EDTA的被检体的值变低的问题都被解决,含EDTA的被检体、含肝素的被检体在与LTIA法的相关方面均显示出同样的相关性。

[0214] (实施例3)本发明的添加剂处方与以往处方的检测灵敏度的比较

[0215] 1.免疫色谱设备的制作

[0216] 关于上述实施例2的1.的2)缀合物垫的制作方法的(A)中的添加剂,按照通过同样的方法使硫酸镁达到30mmol/L或50mmol/L、醋酸镁达到30mmol/L或50mmol/L、硫酸铵达到30mmol/L的浓度的方式,制作含有各添加剂的缀合物垫和无添加剂的缀合物垫(以往处方)(A)。

[0217] 另外,将硫酸镁变更为10mmol/L或50mmol/L、氯化镁变更为50mmol/L的浓度,除此以外,与上述方法同样地制作含有各添加剂的缀合物垫和无添加剂的缀合物垫(以往处方)(B)。

[0218] 在(A)、(B)中任一情况下,除了缀合物垫的制作方法以外,与实施例2同样地制作出免疫色谱设备。其中,(B)的情况下还制作了不含添加剂和聚凝胺的设备。

[0219] 2.被检体

[0220] 就含肝素的被检体而言,在(A)的试验中使用24个样品,在(B)的试验中使用17个样品(其中,硫酸镁50mmol/L和氯化镁50mmol/L的情况下,仅10个样品),此外,就含EDTA的被检体而言,在(A)的试验中使用22个样品;在(B)的试验中使用29个样品。

[0221] 3.试验方法

[0222] 与实施例2同样地,将被检体120μL添加到上述制作的免疫色谱测试设备的样品垫窗部,10分钟后,对于测试设备,使用免疫色谱读取仪Rapid PIA(Hamamatsu Photonics公司)来测定抗H-FABP抗体涂布部(检测部)的反射光强度。将各被检体的不添加添加剂的设备的反射光强度设为100%,算出与添加了各添加剂的设备的反射光强度之比,求出该比的平均值。

[0223] 4.试验结果

[0224] 将结果示于图4。

[0225] 添加了任一添加剂的设备中,对含EDTA的被检体进行测定时,与无添加剂的设备相比,反射光强度均增加((A):122.1%~128.5%、(B):118.6%~126.9%)。另外,在含肝素的被检体的情况下,在添加了硫酸镁、醋酸镁、硫酸铵的设备中确认到一定的反射光强度的增加((A):102.6%~110.4%、(B):硫酸镁10mmol/L为100.5%、硫酸镁50mmol/L为102.9%)。

[0226] 产业上的可利用性

[0227] 根据本发明,在以聚凝胺为红细胞凝集剂且使用胶体金缀合物作为检测试剂的免疫色谱中,通过使用特定的添加剂,可以不使胶体金凝集,并且可使红细胞凝集而从样品中分离除去,因此能够对样品中的对象物准确地进行检测和测定。另外,由于作为聚凝胺的中和剂的聚阴离子的添加并非必须,因此能够使试剂构成极大地简化。

[0228] 符号说明

[0229] (a)塑料制粘合片

[0230] (b)抗体固定化膜

[0231] (c)抗H-FABP抗体

- [0232] (d) 抗KLH抗体
- [0233] (e) 血细胞分离膜 (3rd Pad)
- [0234] (f) 缀合物垫
- [0235] (g) 样品垫
- [0236] (h) 吸收垫

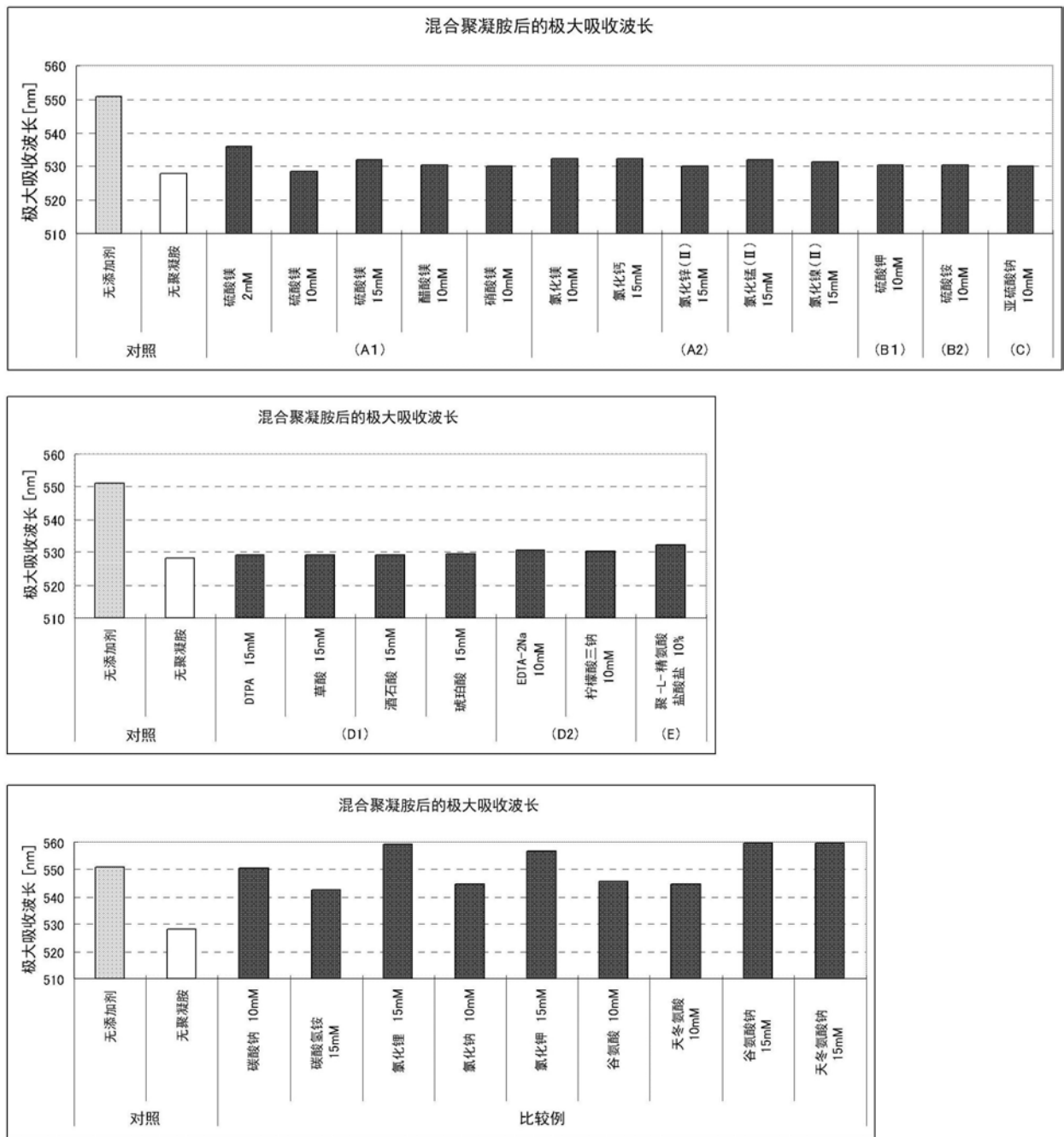


图1

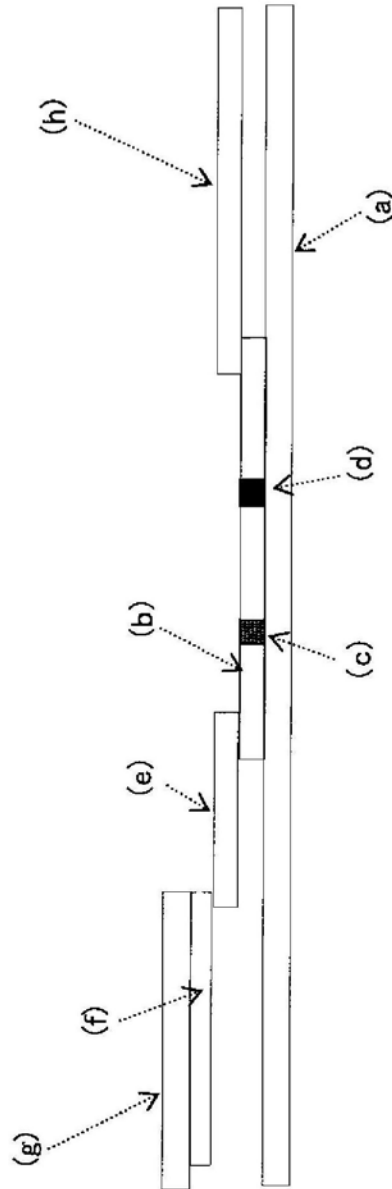


图2

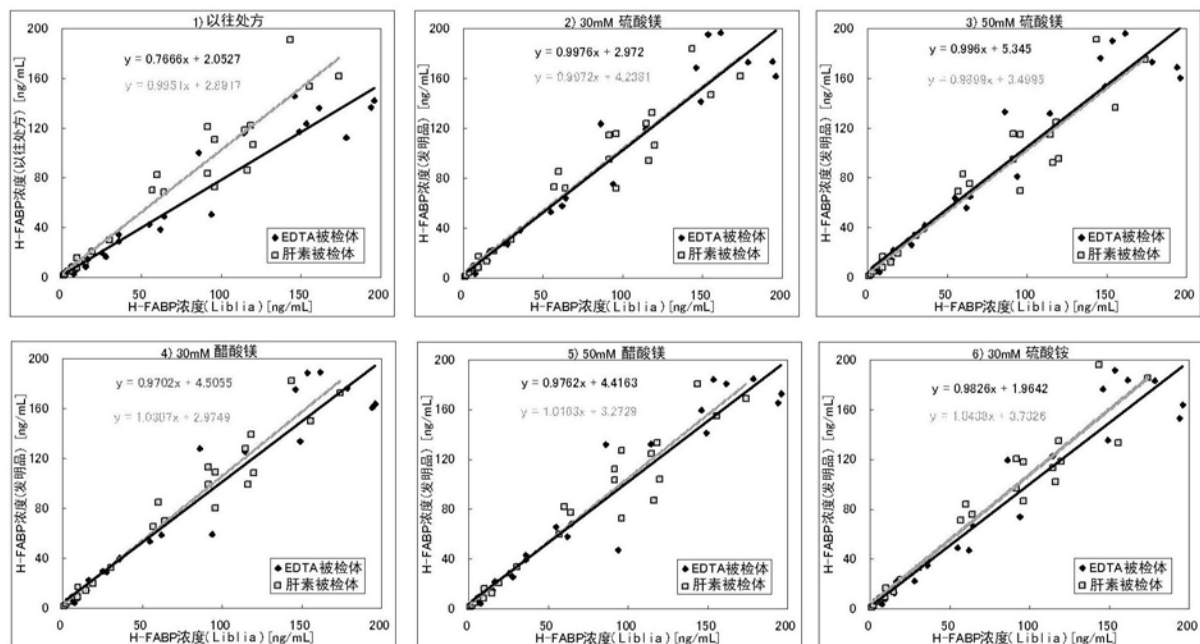


图3A

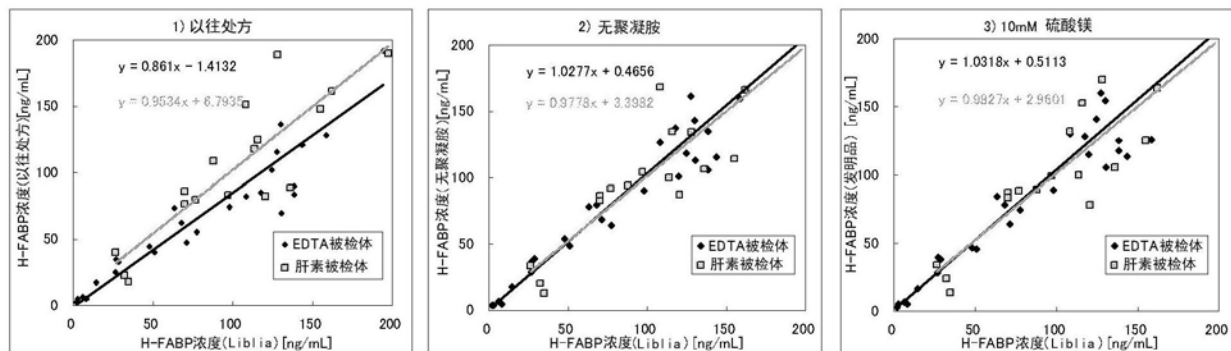


图3B

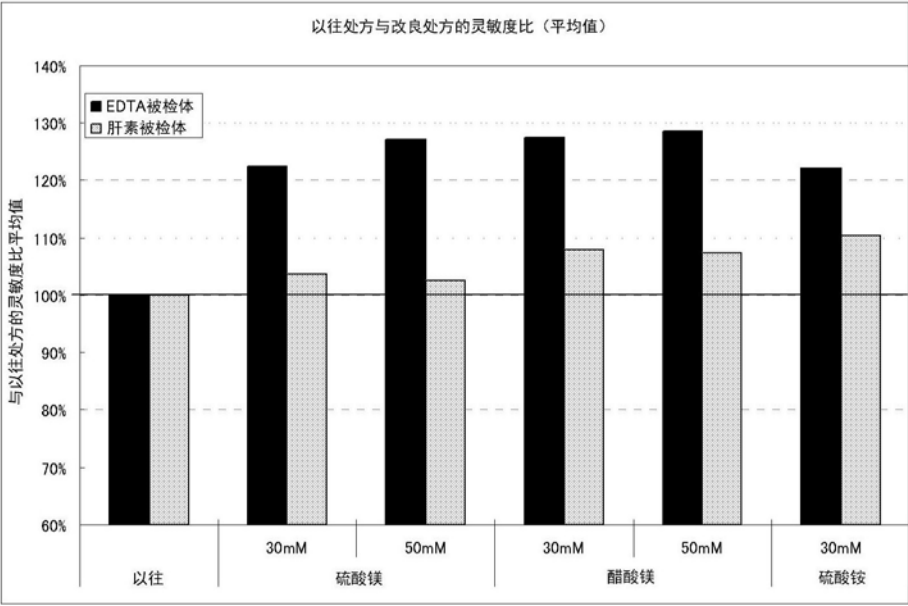


图4A

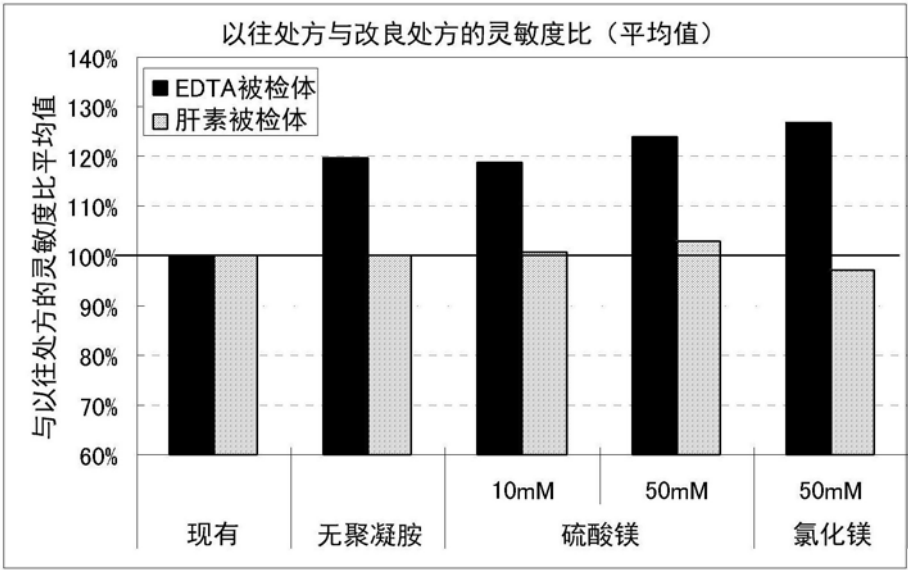


图4B

专利名称(译)	用于检测含红细胞的样品中的对象物的免疫色谱用测试条、及使用该测试条的免疫色谱		
公开(公告)号	CN107209179A	公开(公告)日	2017-09-26
申请号	CN201480084630.X	申请日	2014-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	河野景吾 吉田万友美 山本光章 横川伸也 浅见麻里惠		
发明人	河野景吾 吉田万友美 山本光章 横川伸也 浅见麻里惠		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/54386 G01N33/54393		
代理人(译)	陆岩		
其他公开文献	CN107209179B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的课题在于，提供一种使用聚凝胺作为红细胞凝集剂、使用胶体金缀合物作为检测试剂时，将全血中的红细胞凝集并分离除去并且不引起胶体金的凝集的免疫色谱用测试条；以及利用免疫色谱的检测方法。本发明人们为了解决上述课题，并非进行聚阴离子的种类、量的选定，而是从完全不同的观点出发，审视了此前的试剂构成本身并对各要素进行了深入研究，结果惊奇地发现，通过使用特定的添加剂，在不基于聚阴离子进行中和的情况下也能够抑制胶体金的凝集。

