



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109154605 A

(43)申请公布日 2019.01.04

(21)申请号 201780030159.X

(22)申请日 2017.07.12

(30)优先权数据

2016-138888 2016.07.13 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.11.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/025343 2017.07.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/012517 JA 2018.01.18

(71)申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

(72)发明人 西谷公良 落合泰史

(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 吴小明

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

免疫层析检测方法

(57)摘要

本发明所要解决的问题是提供一种抑制在免疫层析检测方法中粪便特有的非特异性反应的方法,在该免疫层析检测方法中在不溶性膜中展开粪便样品以检测样品中的分析物。已经发现,通过使用在分子中具有两个以上羧基的化合物,可以抑制由粪便样品引起的非特异性反应以准确地检测粪便样品中的分析物。特别地,已经发现,通过将含有在分子中具有两个以上羧基的化合物的样品稀释液用于本发明,对于婴儿的粪便样品可以抑制无法通过常规方法抑制的非特异性反应,从而完成本发明。

1. 一种检测粪便样品中的分析物的免疫层析方法,所述方法包括以下步骤:
在分子中具有两个以上羧基的化合物的存在下进行免疫反应。
2. 一种检测粪便样品中的分析物的免疫层析方法,所述方法包括以下步骤:
(A) 将含有 (i) 在分子中具有两个以上羧基的化合物和 (ii) 缓冲液的样品稀释液以及粪便样品供应到测试条的样品供应部,
所述测试条具有
由多孔体构成的膜,其至少包括样品供应部、展开部和检测部,所述展开部的一部分以可洗脱方式保留有缀合物,所述缀合物含有经标记物质标记的第一抗体,并且所述检测部具有第二抗体,所述第二抗体固定在位于缀合物保留部分的下游侧的所述展开部的一部分中;
(B) 使所述样品中的所述分析物与所述缀合物接触;并且
(C) 检测所述样品中的所述分析物和所述检测部中的所述缀合物之间的复合物。
3. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其中所述粪便样品是婴儿的粪便样品。
4. 一种抑制检测粪便样品中的分析物的免疫层析方法中的非特异性反应的方法,所述方法包括以下步骤:
在分子中具有两个以上羧基的化合物的存在下进行免疫反应。
5. 一种抑制检测粪便样品中的分析物的免疫层析方法中的非特异性反应的方法,所述方法包括以下步骤:
(A) 将含有 (i) 在分子中具有两个以上羧基的化合物和 (ii) 缓冲液的样品稀释液以及粪便样品供应到测试条的样品供应部,
所述测试条具有由多孔体构成的膜,其至少包括样品供应部、展开部和检测部,所述展开部的一部分以可洗脱方式保留有缀合物,所述缀合物含有经标记物质标记的第一抗体,所述检测部具有第二抗体,所述第二抗体固定在位于缀合物保留部分的下游侧的所述展开部的一部分中;
(B) 使所述样品中的所述分析物与所述缀合物接触;并且
(C) 检测所述样品中的所述分析物和所述检测部中的所述缀合物之间的复合物。
6. 根据权利要求4或5所述的方法,其中所述粪便样品是婴儿的粪便样品。
7. 一种用于粪便样品的免疫层析检测试剂盒,所述试剂盒包含:
(1) 免疫层析测试条,所述免疫层析测试条具有由多孔体构成的膜,其至少包括样品供应部、展开部和检测部,所述展开部的一部分以可洗脱方式保留有缀合物,所述缀合物含有经标记物质标记的第一抗体,所述检测部具有第二抗体,所述第二抗体固定在位于缀合物保留部分的下游侧的所述展开部的一部分中;和
(2) 样品稀释液,所述样品稀释液含有在分子中具有两个以上羧基的化合物和缓冲液。
8. 根据权利要求7所述的检测试剂盒,其中所述粪便样品是婴儿的粪便样品。
9. 一种用于免疫测定的婴儿粪便样品稀释液,其含有在分子中具有两个以上羧基的化合物和缓冲液。
10. 一种抑制婴儿粪便样品的免疫测定中的非特异性反应的样品预处理方法,所述方法包括使所述婴儿粪便样品与样品稀释液接触的步骤,所述样品稀释液含有 (i) 在分子中具有两个以上羧基的化合物和 (ii) 缓冲液。

免疫层析检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及在检测粪便样品(源自粪便的样品)的免疫层析方法中抑制非特异性反应的方法,以及该方法中使用的检测试剂盒和样品稀释液。

背景技术

[0002] 使用免疫层析的检测方法由于高特异性和灵敏度以及便捷性而得到广泛使用。应用于该检测方法的样品的实例包括尿、粪便、唾液、血、血浆等,其适于用作临床测试样品并广泛用作可用于诊断的样品。

[0003] 特别地,为了使用粪便作为样品以通过使用免疫层析检测包含在其中的分析物,必须尽可能多地消除直接干扰经免疫层析的样品展开的物质和尽管在缺少分析物时仍如存在分析物一样引起反应(即所谓的非特异性反应)的物质的影响。

[0004] 通常已知明胶、酪蛋白、牛血清白蛋白、合成聚合物等是用于消除非特异性反应的封闭剂,并且已知允许这些试剂共存于使用免疫层析的反应系统的方法(专利文件1和2)。

[0005] 然而,这些试剂实际上对由粪便样品引起的非特异性反应的抑制是否起作用是未知的。

[0006] 专利文件3描述了在使用粪便作为样本的情况下的问题,即使用粪便作为样本的检测(通过ELISA等)导致低灵敏度,并且常常引起非特异性反应,这使得难以判定结果。该文件公开了通过使用pH 9.0至10.0的样本稀释液抑制非特异性反应的方法,以解决该问题并且通过使用免疫层析检测诸如病毒(norovirus)或札幌病毒。但是该方法在处理方面存在问题,因为将样品稀释液制备于碱性一侧是必须的,这对于样本稀释液并不常见。

[0007] 专利文件4公开了通过用含有有机酸(如柠檬酸)和表面活性剂的样本预处理液预处理生物样品来增强免疫反应的检测灵敏度的方法。

[0008] 尽管粪便包括在生物样品长列表中,但是实例中确认的那些是流感患者的鼻涕或咽拭子,并且检测方法不是使用免疫层析的方法。

[0009] 如上所述,在通过使用免疫层析检测粪便样品中的分析物的方法中,尚未建立用于抑制由粪便样品引起的非特异性反应的方法的技术。

[0010] 引用文献列表

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:日本公开专利公开号2003-344406

[0013] 专利文献2:日本公开专利公开号2002-148266

[0014] 专利文献3:日本公开专利公开号2004-301684

[0015] 专利文献4:WO 02/010744

发明内容

[0016] 技术问题

[0017] 本发明所要解决的问题是提供一种抑制在免疫层析检测方法中粪便特有的非特

异性反应的方法,在该免疫层析检测方法中在不溶性膜中展开粪便样品以检测样品中的分析物。

[0018] 问题的解决方案

[0019] 作为解决该问题的深入研究的结果,本发明人已经发现,通过使用在分子中具有两个以上羧基的化合物,可以抑制由粪便样品引起的非特异性反应以准确地检测粪便样品中的分析物。

[0020] 特别地,本发明人已经发现,通过将含有在分子中具有两个以上羧基的化合物的样品稀释液用于本发明,可以抑制对于婴儿的粪便样品无法通过常规方法抑制的非特异性反应,从而完成本发明。

[0021] 因此,本发明具有以下配置。

[0022] <1>一种检测粪便样品中的分析物的免疫层析方法,所述方法包括以下步骤:

[0023] 在分子中具有两个以上羧基的化合物的存在下进行免疫反应。

[0024] <2>一种检测粪便样品中的分析物的免疫层析方法,所述方法包括以下步骤:

[0025] (A) 将含有在分子中具有两个以上羧基的化合物和缓冲液的样品稀释液以及粪便样品供应到测试条的样品供应部,

[0026] 所述测试条具有

[0027] 由多孔体构成的膜,其至少包括样品供应部、展开部和检测部,展开部的一部分以可洗脱方式保留有缀合物,所述缀合物含有经标记物质标记的第一抗体,并且检测部具有第二抗体,该第二抗体固定在位于缀合物保留部分的下游侧的展开部的一部分中;

[0028] (B) 使样品中的分析物与缀合物接触;并且

[0029] (C) 检测样品中的分析物和检测部中的缀合物之间的复合物。

[0030] <3>根据<1>或<2>所述的检测方法,其中粪便样品是婴儿的粪便样品。

[0031] <4>一种抑制检测粪便样品中的分析物的免疫层析方法中的非特异性反应的方法,所述方法包括以下步骤:

[0032] 在分子中具有两个以上羧基的化合物的存在下进行免疫反应。

[0033] <5>一种抑制检测粪便样品中的分析物的免疫层析方法中的非特异性反应的方法,所述方法包括以下步骤:

[0034] (A) 将含有在分子中具有两个以上羧基的化合物和缓冲液的样品稀释液以及粪便样品供应到测试条的样品供应部,

[0035] 所述测试条具有由多孔体构成的膜,其至少包括样品供应部、展开部和检测部,展开部的一部分以可洗脱方式保留有缀合物,所述缀合物含有经标记物质标记的第一抗体,检测部具有第二抗体,该第二抗体固定在位于缀合物保留部分的下游侧的展开部的一部分中;

[0036] (B) 使样品中的分析物与缀合物接触;并且

[0037] (C) 检测样品中的分析物和检测部中的缀合物之间的复合物。

[0038] <6>根据<4>或<5>所述的方法,其中粪便样品是婴儿的粪便样品。

[0039] <7>一种用于粪便样品的免疫层析检测试剂盒,所述试剂盒包含:

[0040] (1) 免疫层析测试条,所述免疫层析测试条具有由多孔体构成的膜,其至少包括样品供应部、展开部和检测部,展开部的一部分以可洗脱方式保留有缀合物,所述缀合物含有

经标记物质标记的第一抗体,检测部具有第二抗体,该第二抗体固定在位于缀合物保留部分的下流侧的展开部的一部分中;和

[0041] (2) 样品稀释液,所述样品稀释液含有在分子中具有两个以上羧基的化合物和缓冲液。

[0042] <8>根据<7>所述的检测试剂盒,其中粪便样品是婴儿的粪便样品。

[0043] <9>一种用于免疫测定的婴儿粪便样品稀释液,其含有在分子中具有两个以上羧基的化合物和缓冲液。

[0044] <10>一种抑制婴儿粪便样品的免疫测定中的非特异性反应的样品预处理方法,所述方法包括使婴儿粪便样品与样品稀释液接触的步骤,所述样品稀释液含有在分子中具有两个以上羧基的化合物和缓冲液。

[0045] 发明的有益效果

[0046] 通过将具有两个以上羧基的化合物用于本发明,可以抑制粪便样品特有的非特异性反应以在使用免疫层析的检测方法中准确地检测样品中的分析物。

[0047] 根据本发明,对于婴儿的粪便样品可以抑制无法通过常规方法抑制的特有非特异性反应,因此,对于不仅在成人样品也在婴儿样品中检测的项目,可以通过使用免疫层析在两种粪便样品中准确地检测分析物。

[0048] 附图的简要说明

[0049] [图1]图1是本发明的测试条的示意结构图。

[0050] 实施方案描述

[0051] (样品)

[0052] 本发明涉及来源于人粪便的样品。尽管预期的人粪便既是成人的粪便又是婴儿的粪便,但是本发明特别地产生了抑制来源于婴儿粪便的非特异性反应的作用。

[0053] 本发明中使用的术语“婴儿”旨在包括所有新生儿、婴儿和儿童(7岁以下)。粪便可以直接用作样品,或者可以在用作样品之前用样品稀释液适当地稀释。在用作样品之前,可以适当地稀释和过滤粪便。样品稀释液有时也称为样本稀释液、样品提取液、样品展开剂等,它们都是同义地使用的。

[0054] (样品稀释液)

[0055] 本发明的样品稀释液至少含有在分子中含有两个以上羧基的化合物,并且优选地还含有缓冲液。在分子中含有两个以上羧基的化合物的实例包括所谓的二羧酸,如草酸(乙二酸)、缩苹果酸(丙二酸)、琥珀酸(丁二酸)、胶酸(戊二酸)、肥酸(己二酸),富马酸((E)-丁-2-烯二酸)、马来酸((Z)-丁-2-烯二酸)、L-谷氨酸和L-天冬氨酸,并且该化合物优选为马来酸、L-天冬氨酸或谷氨酸。

[0056] 在分子中含有三个羧基的化合物的实例包括三羧酸,如乌头酸(2-羧基丙-1-烯三羧酸)、柠檬酸、异柠檬酸、丙三羧酸和苯均三羧酸,并且该化合物优选为柠檬酸。

[0057] 在本发明中,在分子中含有两个以上羧基的化合物可以是如上所述的在分子中含有两个以上羧基的化合物本身,或者可以是该化合物的盐或衍生物。盐的实例包括金属盐如钠盐、钾盐和钙盐,并且衍生物的实例包括酰胺、酯、酸酐等。

[0058] 在本发明的样品稀释液中的在分子中含有两个以上羧基的化合物优选在5mM至300mM的浓度范围内。

[0059] 当羧基的数量是两个时,范围更优选为10mM至300mM,进一步优选为20mM至300mM,更进一步优选为50mM至300mM。另外,范围可以是30mM至300mM、40mM至300mM、60mM至300mM、70mM至300mM、80mM至300mM、90mM至300mM或100mM至300mM。范围还可以是10mM至250mM、10mM至200mM、10mM至150mM或10mM至100mM。

[0060] 当羧基的数量是三个时,范围更优选为5mM至250mM,进一步优选为10mM至250mM,更进一步优选为20mM至250mM。另外,范围可以是30mM至250mM、40mM至250mM、50mM至250mM、60mM至250mM、70mM至250mM、80mM至250mM、90mM至250mM或100mM至250mM。范围还可以是5mM至200mM、5mM至150mM或5mM至100mM。

[0061] 本发明的样品稀释液中含有的缓冲液的实例包括常用的缓冲液如磷酸缓冲液、Tris缓冲液和古德氏(Good's)缓冲液。本发明的样品稀释液可以是含有所述化合物和缓冲液的稀释液,可以是含有所述化合物的缓冲液,或者还可以含有盐(如NaCl)、稳定剂(如蔗糖)和保存剂以及防腐剂(如ProClin(注册商标))。盐包括为了调节离子强度而包含的那些,诸如NaCl,以及为了调节缓冲液的pH而添加的那些,诸如氢氧化钠。本发明的样品稀释液的pH优选地在6.0至9.0的范围内,更优选为6.5至8.0,并且进一步优选为7.0至8.0。

[0062] 本发明的样品稀释液是用于稀释样品的溶液,因此,将粪便样品加入到样品稀释液中以溶解、提取或分散样品用于稀释。因此,典型地,当将样品供应到测试条的样品垫时,已经将样品和样品稀释液混合。然而,另外地,本发明的检测方法还包括将样品直接供应到样品垫或在用除本发明的样品稀释液以外的稀释液稀释后供应到样品垫而同时或随后将本发明的样品稀释液供应到样品垫的情况。

[0063] 本发明的样品稀释液可以抑制免疫测定中的婴儿粪便样品的非特异性反应,并且因此特别地可用作用于免疫测定的婴儿粪便样品的稀释液。

[0064] 免疫测定可以是使用免疫反应的任何检测方法,并且可以是例如乳胶免疫凝集测定(下文中称为LTIA)(其为颗粒凝集免疫测定)、ELISA(其为代表性的标记免疫测定)或使用免疫层析的检测方法,并且在这些之中,使用免疫层析的检测方法是特别合乎需要的。当在LTIA(其为免疫测定)中使用本发明的样品稀释液时,可以用本发明的样品稀释液稀释粪便样品,然后与乳胶试剂混合以检测免疫凝集反应。如果乳胶试剂由含有缓冲液的第一试剂和含有乳胶试剂的第二试剂构成,则本发明的样本稀释液可以用作第一试剂。

[0065] 本发明还提供了用于抑制婴儿粪便样品的非特异性反应的样品预处理方法,所述方法包括使本发明的样品稀释液与婴儿粪便样品接触的步骤。

[0066] (分析物)

[0067] 本发明的分析物可以是包含于用作样品的粪便中并且通过使用抗原-抗体反应可检测的任何分析物,并且其实例包括病毒、寄生虫和蛋白质。

[0068] 例如,传染性胃肠炎主要由病毒和寄生虫引起,并且定义为分析物的病毒的实例包括诸如病毒、腺病毒、轮状病毒、札幌病毒、肠病毒等,并且定义为分析物的寄生虫的实例包括隐孢子虫、阿米巴性痢疾、贾第鞭毛虫等。

[0069] 此外,定义为分析物的病毒的实例包括流感病毒,并且定义为分析物的蛋白质的实例包括人血红蛋白、乙型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体、人免疫缺陷病毒抗体等。

[0070] (免疫层析测试条)

[0071] 本发明的免疫层析测试条是这样的测试条:其用于在不溶性膜中展开粪便样品从

而检测样品中的分析物与缀合物之间的复合物。测试条具有由多孔体构成的膜,其包括(1)样品供应部、(2)展开部和(3)检测部,并且展开部的一部分以可洗脱方式保留有含有经标记物质标记的第一抗体的缀合物,而检测部具有第二抗体,该第二抗体固定在位于缀合物保留部分的下游侧的展开部的一部分中。

[0072] 用于本发明的在分子中含有两个以上羧基的化合物可以是包含在样品稀释液中的形式或者可以是浸渍在构成测试条的垫的一部分中的形式。例如,其可以是样品垫、第三垫、缀合物垫或不溶性膜。备选地,用于本发明的在分子中含有两个以上羧基的化合物可以是浸渍在过滤器片中的形式。

[0073] 缀合物是与分析物具有免疫反应性并且固定在标记上的抗体或抗原,并且对于缀合物的存在形式,缀合物可以以浸渍在缀合物垫(其是除样品垫、第三垫和不溶性膜以外的垫)的状态存在(A型),可以在样品垫的一部分中作为缀合物部存在(B型),或者可以作为从测试条分离的与样本混合的单独缀合物试剂存在(C型)。

[0074] 下面将描述具有A型存在形式的缀合物的测试条。

[0075] 样品垫、缀合物垫、第三垫和不溶性膜在样品的流向中从上游至下游以该顺序布置,并且经布置使得向上或向下(上或下)层至少部分地彼此重叠。图1示出了这样的布置的测试条的实例。

[0076] 当将含有分析物的样品供应至这样的测试条的样品垫时,分析物经样品垫流向在下游侧的缀合物垫。在缀合物垫,分析物和缀合物彼此接触并且在形成复合物(聚集体)的同时通过垫。接着,复合物通过与缀合物垫的下表面接触放置的多孔第三垫并且展开至不溶性膜中。

[0077] 由于不溶性膜具有与分析物具有免疫反应性并且固定在其一部分上的抗体或抗原,所以复合物由于免疫反应而被结合并固定在该膜上。通过检测来源于缀合物的吸光度、反射光、荧光、磁力等的方法检测经固定的复合物。

[0078] 然后将描述具有B型存在形式的缀合物的测试条。

[0079] 与A型测试条的区别在于样品垫和缀合物垫是集成的,即样品供应部和缀合物部分形成于样品垫的多个部分中。

[0080] 样品供应部是向其供应含有分析物的样品的部位,而缀合物部分是含有缀合物的部位,并且样品供应部位位于缀合物部的上游。

[0081] 然后将描述具有C型存在形式的缀合物的测试条。

[0082] 与A型测试条的区别在于不存在缀合物垫并且缀合物作为单独的缀合物试剂存在。例如,可以包含具有合并于过滤器中的缀合物的过滤器片。通过使用这样的过滤器片并且允许样本稀释液和分析物通过其中,缀合物和分析物相结合以形成复合物(聚集体)。该复合物能够供应至与A型相同的测试条(除了不存在缀合物垫以外),从而检测分析物。

[0083] 另外,在缀合物垫或过滤器片中可以包含用于本发明的在分子中含有两个以上羧基的化合物。

[0084] (样品垫)

[0085] 本发明中使用的样品垫是接受样品的部位并且以模制成垫的状态吸收液体样品,并且任何物质和形式是可用的,只要它们能够允许液体和分析物通过即可。适用于样品垫的材料的具体实例包括,但不限于,纤维玻璃(玻璃纤维)、丙烯酸纤维、亲水性聚乙烯材料、

干纸、纸浆、编织织物等。优选地,使用玻璃纤维垫。样品垫还可以具有后续描述的缀合物垫的功能。为了防止/抑制在固定抗体的膜中的非特异性反应(吸附),样品垫也可以含有通常使用的封闭剂。

[0086] 另外,在样品垫中可以包含用于本发明的在分子中含有两个以上羧基的化合物。

[0087] (第三垫)

[0088] 取决于样品的性质等,根据需要可理想地设置第三垫,并且可以是任何垫,只要垫能够允许样品中的分析物和缀合物之间的复合物通过即可。在本发明中,为了防止不溶性膜的阻塞或捕获来源于粪便的非特异性反应物,第三垫理想地是由聚砜或乙酸钠纤维素制成的多孔膜。

[0089] 用于本发明的多孔第三垫的平均孔径例举为1至100 μm 、优选5至80 μm 、更优选10至60 μm 、进一步优选15至55 μm 、特别优选20至50 μm 、并且最优选25至45 μm 。

[0090] 这是因为小于1 μm 的直径引起阻塞,使得样本自身流动缓慢,而大于100 μm 的直径似乎降低了捕获非特异性反应物质的功能。

[0091] 另外,在第三垫中可以包含用于本发明的在分子中含有两个以上羧基的化合物。

[0092] (不溶性膜)

[0093] 本发明中使用的不溶性膜具有至少一个检测部,与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原固定在检测部上。与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原可以通过常规已知方法固定在不溶性膜支持物上。在基于侧流的免疫层析试剂的情况下,在制备了含有预定浓度的抗体或抗原的溶液之后,通过使用具有能够在水平方向上移动喷嘴同时从喷嘴以恒定速率排出溶液的机构的装置等,溶液可以以线型施加到不溶性膜支持物,并且干燥以固定。溶液中抗体或抗原的浓度优选为0.1至5mg/mL,更优选为0.5至2mg。固定在不溶性膜支持物上的抗体或抗原的量在侧流形式的情况下可以通过调节装置的喷嘴的排出速率优化,并且优选为0.5至2 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0094] 使用基于侧流的免疫层析试剂的测量方法是基于这样的展开形式的测量方法:其中由于毛细作用(毛细现象),样品以平行于不溶性膜支持物的方向移动。

[0095] 通过将抗体或抗原添加至缓冲液可以制备含有预定浓度的抗体或抗原的溶液。缓冲液的类型可以是常用的缓冲液如磷酸缓冲液、Tris缓冲液和古德氏缓冲液。缓冲液的pH优选地在6.0至9.5,更优选为6.5至8.5,进一步优选为7.0至8.0的范围内。缓冲液还可以含有盐(如NaCl)、稳定剂(如蔗糖)和保存剂以及防腐剂(如ProClin(注册商标))。盐包括为了调节离子强度而包含的那些,诸如NaCl,以及为了调节缓冲液的pH而添加的那些,诸如氢氧化钠。

[0096] 在抗体或抗原固定在不溶性膜上之后,除了抗体或抗原固定的部位以外,不溶性膜可以用溶液或蒸气形式的常用封闭剂包覆以用于封闭。

[0097] 通常用于免疫层析试剂的对照捕获试剂可以固定在不溶性膜上。对照捕获试剂是确保测定可靠性的试剂,并且捕获包含在缀合物垫中的对照试剂。例如,如果标记的钥孔虫戚血兰素(下文中称为KLH)作为对照试剂包含在缀合物垫中,则抗-KLH抗体等相当于对照捕获试剂。可以根据测定系统的设计适当地选择对照捕获试剂的固定位置。

[0098] 另外,在不溶性膜中可以包含用于本发明的在分子中含有两个以上羧基的化合物。

[0099] 构成本发明中使用的不溶性膜的膜可以是常规用作免疫层析试剂的不溶性膜支持物的已知膜。例如,膜可以由聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、尼龙、玻璃、多糖(如纤维素和纤维素衍生物)、陶瓷等的纤维制成。具体地,膜可以是玻璃纤维滤纸、纤维素滤纸等,可从Sartorius, Millipore, Toyo Roshi, Whatman等商购获得。特别地,来自Sartorius的UniStar CN140是优选的。通过根据需要进行选择不溶性膜支持物的孔径和结构,能够控制缀合物和样品中的分析物之间的复合物在不溶性膜支持物中的流动速率。

[0100] 免疫层析测试条优选地设置在固相支持体如塑料粘合片上。固相支持体由不妨碍样品和缀合物的毛细管流动的材料制成。免疫层析测试条可以用粘合剂等固定到固相支持体上。在这种情况下,粘合剂组分等也由不妨碍样品和缀合物的毛细管流动的材料制成。考虑到免疫层析测试条的尺寸、添加样品的方法和位置、不溶性膜支持物上的检测部的形成位置、信号检测方法等,免疫层析测试条可以在储存于或安装到合适的容器(外壳)之后使用,并且这样的储存/安装状态称为“装置”。

[0101] (与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原)

[0102] 本发明中使用的与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原是能够与分析物结合的抗体或抗原,并且当分析物是病毒或抗原时优选地为抗体或者当分析物是抗体时优选地为抗原。与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原固定在后续描述的标记上以及检测部上。虽然固定在标记上的抗体或抗原以及固定在检测部上的抗体和抗原可以是相同的,但是固定在标记上的抗体或抗原和固定在检测部上的抗体或抗原优选地是不同的。

[0103] (标记)

[0104] 对于本发明中使用的标记,可以使用常规用于免疫层析测试条的已知标记。例如,标记优选地为金属胶体颗粒(如胶体金颗粒和胶体铂颗粒)、着色胶乳颗粒、磁性颗粒、荧光颗粒等,并且特别优选地为胶体金颗粒和着色胶乳颗粒。

[0105] (缀合物)

[0106] 本发明中使用的缀合物是如上描述的标记,其具有固定在其上的与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原。当轮状病毒、腺病毒或诺如病毒作为分析物被检测时,优选地,缀合物是固定在胶体金颗粒上的抗轮状病毒单克隆抗体、抗腺病毒单克隆抗体或抗诺如病毒单克隆抗体。

[0107] 将与分析物具有免疫反应性的抗体或抗原固定在标记上的方法的实例包括物理吸附、化学结合等,并且固定典型地通过物理吸附实现。

[0108] (与另一种非特异性抑制方法的组合使用)

[0109] 取决于测量条件和样品类型,使用本发明的免疫层析测试条的检测方法还可以与另一种非特异性抑制方法组合使用。

[0110] 通过与另一种非特异性抑制方法向组合,可以实施检测方法使得对于婴儿的粪便样品和成人的粪便样品更有效地抑制非特异性。例如,可以同时采用另一种防止非特异性反应的封闭剂。另一种封闭剂可以添加到本发明的样品稀释液中或者可以包含在样品垫、第三垫、不溶性膜或缀合物中。

[0111] 另一种封闭剂可以是具有封闭作用的试剂。

[0112] 由于本发明的样品稀释液尤其对于婴儿粪便样品产生非特异性反应抑制作用,所以与对于成人粪便样品产生非特异性抑制作用的另一种试剂或另一种配置的组合使得不

管样品类型(无论成人还是婴儿),对于相同检查项目能够使用同一类型的免疫层析测试条进行检测。

[0113] 例如,其他配置可以是第三垫。

[0114] (试剂盒)

[0115] 使用本发明的免疫层析的检测试剂盒可以是包含免疫层析测试条和样品稀释液的任何试剂盒。检测试剂盒还可以包含检测所需的其他试剂、试管、用于粪便取样的棉签、使用手册、用于储存测试条的外壳等。

[0116] (其它)

[0117] 在本说明书中,“上游”或“下游”的含义用于意指样品流动方向上的上游侧或下游侧。因此,当本发明的测试条具有以部分重叠的方式从顶部层压的样品垫、缀合物垫、第三垫和不溶性膜时,样品垫在最上游侧并且不溶性膜在最下游侧。端垫可以层压在与不溶性膜的下游端部重叠的上侧,并且在这种情况下,端垫在最下游侧。

实施例

[0118] [实施例1]对向样品稀释液中添加阴离子物质的研究<在轮状病毒和腺病毒测量试剂的情况下>

[0119] 进行对阴离子物质的研究用于搜寻能够抑制非特异性反应的物质。

[0120] 1. 测试材料

[0121] (1) 测试装置

[0122] 制备测试装置,该测试装置包括使用抗轮状病毒抗体和抗腺病毒抗体的免疫层析测试条。

[0123] 图1示出了本发明的免疫层析测试条的示意结构图。

[0124] 将不溶性膜(b)固定到塑料粘合片(a)上,并且沿着布置和安装在相对端部的吸附垫(f)依次布置和安装第三垫(g)、缀合物垫(d)和样品垫(e)。使用经抗腺病毒单克隆抗体敏化的胶体金的缀合物和经抗轮状病毒单克隆抗体敏化的胶体金的缀合物浸渍缀合物垫,并且不溶性膜具有固定在垂直于流动方向的线上的抗腺病毒单克隆抗体、抗轮状病毒单克隆抗体和对照试剂。

[0125] 将垫各自层压并布置,使其一部分与上下垫相接触。包含抗腺病毒单克隆抗体和抗轮状病毒单克隆抗体的线称为测试线(c1,c2),并且包含对照试剂的线称为对照线(c3)。

[0126] 通过以这种方式重叠组成部件获得的结构件被切割成恒定宽度以产生免疫层析测试条。测试条可以各自储存和安装在专用的塑料外壳中以实现免疫层析测试装置的形式(未示出)。

[0127] (2) 样品稀释液

[0128] 通过向磷酸缓冲液(pH 7.6)中加入柠檬酸三钠二水合物(分子中三个羧基)、马来酸(分子中两个羧基)、L-天冬氨酸单钠(分子中两个羧基)、L-谷氨酸单钠(分子中两个羧基)、1-庚烷磺酸钠盐(常规样品稀释液中含有的化合物)或三氯乙酸三钠(分子中一个羧基)至表1所示的添加剂浓度,调节样品稀释液。还制备了不具有添加剂的样品稀释液。

[0129] (3) 样品

[0130] 使用轮状病毒和腺病毒阴性婴儿(三名小于40天的婴儿)的粪便作为样本。在

1.0mL的上述(2)中制备的样品稀释液中,悬浮0.1mg的每种样品,并且将其上清液用作样品。

[0131] 2. 测试方法

[0132] 通过使用称为“比色图表”的颜色样品,评价在将120 μ L样品滴到测试装置上10分钟、20分钟和30分钟后测试线的着色强度。

[0133] 根据比色图表,着色强度以0.25的增量在0至4的评分等级上量化,并且在SS(非常弱)和S(弱)的基础上进一步评估低于0.25的极弱的非特异性反应。从着色强度的评价结果评价非特异性反应的强度。

[0134] 表1下方描述了评价标准。在后面描述的实施例中以相同的方式进行评价。

[0135] 在表1至6中,“Rota”、“Adeno”和“norovirus”分别表示轮状病毒、腺病毒和诺如病毒被定义为检测项目的情况。

[0136] 3. 检测结果

[0137] 结果显示于表1中。如表1所示,当通过使用通过加入柠檬酸三钠二水合物(分子中三个羧基)、马来酸(分子中两个羧基)、L-天冬氨酸单钠(分子中两个羧基)或L-谷氨酸单钠(分子中两个羧基)制备的样品稀释液来检测婴儿粪便中的轮状病毒和腺病毒时,在任何添加剂浓度或所有浓度下都观察到非特异性反应抑制作用。

[0138] 相反地,当使用通过加入三氯乙酸三钠(分子中一个羧基)制备的样品稀释液时,在任何添加剂浓度下都未观察到非特异性反应抑制作用。当使用常规样品稀释液(即含有1-庚烷磺酸钠盐的样品稀释液)时,未观察到非特异性反应抑制作用。

[0139] [表1]

[0140]

添加剂 添加浓度	实施例											
	比较例						实施例					
	1-庚烷磺酸钠		三氯乙酸三钠		柠檬酸三钠二水合物		马来酸		L-天冬氨酸钠		L-谷氨酸钠	
	20mM	1.0%	0.05%	250mM	20mM	250mM	20mM	250mM	20mM	250mM	20mM	250mM
	Rota	Adeno	Rota	Adeno	Rota	Adeno	Rota	Adeno	Rota	Adeno	Rota	Adeno
新生儿 样本A	10min	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	20min	+	++	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	30min	+	++	+/	N	N	N	N	N	N	N	N
新生儿 样本B	10min	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	20min	+	++	+/	N	N	N	N	N	N	N	N
	30min	+	++	+/	N	N	N	N	N	N	N	N
新生儿 样本C	10min	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	20min	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	30min	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N

++: 强的非特异性反应(1.0以上)
 +: 弱的非特异性反应(0.5以上且小于1.0)
 +/-: 极弱的非特异性反应(S、SS至小于0.5)
 N: 无非特异性反应(0)

[0141] [实施例2]对在分子中含有两个以上羧基的化合物向样品稀释液的添加浓度的研究<在轮状病毒和腺病毒测量试剂的情况下>

[0142] 1. 测试材料

[0143] (1) 测试装置

[0144] 与实施例1相同。

[0145] (2) 样品稀释液

[0146] 通过向磷酸缓冲液 (pH 7.6) 加入柠檬酸三钠二水合物至表2所示的添加剂浓度, 调节样品稀释液。还制备了不具有柠檬酸三钠二水合物的样品稀释液。

[0147] (3) 样品

[0148] 与实施例1相同。

[0149] 2. 测试方法

[0150] 与实施例1相同。

[0151] 3. 检测结果

[0152] 结果显示于表2中。根据表2, 与未添加柠檬酸三钠二水合物时相比, 当样品稀释液中柠檬酸三钠二水合物的添加剂浓度在5mM至250mM的范围内时, 能够抑制非特异性反应以检测轮状病毒和腺病毒。特别地, 尽管在检测腺病毒的所有样本中都观察到非特异性反应, 但是通过使用本发明的样品稀释液能够完全抑制非特异性反应。

[0153] [表2]

[0154]

添加剂		柠檬酸三钠二水合物											
		5mM		10mM		20mM		50mM		100mM		250mM	
添加剂浓度	Rota	Adeno		Rota		Adeno		Rota		Adeno		Rota	
		10min	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20min	N	++	+/-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30min	N	++	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10min	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20min	N	++	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30min	+	++	++	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10min	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20min	N	++	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30min	N	++	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

[0155] [实施例3]对向样品稀释液中添加在分子中含有两个以上羧基的化合物的研究<在诺如病毒测量试剂的情况下>

[0156] 1. 测试材料

[0157] (1) 测试装置

[0158] 制备测试装置,该测试装置包括使用抗诺如病毒抗体的免疫层析测试条。

[0159] 将不溶性膜(b)固定到塑料粘合片(a)上,并且沿着布置和安装在相对端部的吸附垫(f)依次布置和安装第三垫(g)、缀合物垫(d)和样品垫(e)。使用经抗诺如病毒单克隆抗

体敏化的胶体金的缀合物浸渍缀合物垫,并且不溶性膜具有固定在垂直于流动方向的线上的抗诺如病毒单克隆抗体和对照试剂。将垫各自层压并布置,使其一部分与上下垫相接触。包含抗诺如病毒单克隆抗体的线称为测试线(c1),并且包含对照试剂的线称为对照线(c3)。

[0160] 通过以这种方式重叠组成部件获得的结构件被切割成恒定宽度以产生免疫层析测试条。测试条可以各自储存和安装在专用的塑料外壳中以实现免疫层析测试装置的形式(未示出)。

[0161] (2) 样品稀释液

[0162] 通过向磷酸缓冲液(pH 7.6)中加入柠檬酸三钠二水合物(分子中三个羧基)、马来酸(分子中两个羧基)、L-天冬氨酸单钠(分子中两个羧基)或L-谷氨酸单钠(分子中两个羧基)至表3所示的添加剂浓度,调节样品稀释液。还制备了不具有添加剂的样品稀释液。

[0163] (3) 样品

[0164] 使用诺如病毒阴性婴儿(三名小于40天的婴儿)的粪便作为样本。在1.0mL的样品稀释液中,悬浮0.1mg的每种样品,并且将其上清液用作样品。

[0165] 2. 测试方法

[0166] 除了将测试线的着色强度的评价时间设定为“10、15和30分钟后”以外,测试方法与实施例1相同。

[0167] 3. 检测结果

[0168] 结果显示于表3中。如表3所示,当通过使用通过加入柠檬酸三钠二水合物(分子中三个羧基)、马来酸(分子中两个羧基)、L-天冬氨酸单钠(分子中两个羧基)或L-谷氨酸单钠(分子中两个羧基)制备的样品稀释液来检测婴儿粪便中的诺如病毒时,在任何添加剂浓度或所有浓度下都观察到非特异性反应抑制作用。

[0169] [表3]

[0170]

	添加剂	-	柠檬酸三钠二水合物		马来酸		L-天冬氨酸单钠		L-谷氨酸单钠	
	添加剂浓度	-	250mM	20mM	250mM	20mM	250mM	20mM	250mM	20mM
		noro	noro	noro	noro	noro	noro	noro	noro	noro
新生儿样本A	10min	+/-	N	N	N	N	N	N	N	N
	15min	+	N	N	N	+/-	N	N	N	N
	30min	+	N	N	+/-	+	+/-	+/-	N	N
新生儿样本B	10min	++	N	N	+/-	++	+/-	+	N	+
	15min	++	N	N	+	++	+/-	+	N	+
	30min	++	+/-	+	+	++	N	++	N	+
新生儿样本C	10min	++	+/-	N	+/-	++	N	+	N	+/-
	15min	++	+/-	+/-	+	++	N	+	N	+
	30min	++	+	+	++	++	N	+	N	+

[0171] [实施例4]对在分子中含有两个以上羧基的化合物向样品稀释液的添加浓度的研究<在诺如病毒测量试剂的情况下>

[0172] 1. 测试材料

[0173] (1) 测试装置

[0174] 制造与实施例3相同的测试装置。

[0175] (2) 样品稀释液

[0176] 通过向磷酸缓冲液 (pH 7.6) 加入柠檬酸三钠二水合物至表4所示的添加剂浓度, 调节样品稀释液。还制备了不具有柠檬酸三钠二水合物的样品稀释液。

[0177] (3) 样品

[0178] 使用诺如病毒阴性婴儿 (三名小于40天的婴儿) 的粪便作为样本。在1.0mL的样品稀释液中, 悬浮0.1mg的每种样品, 并且将其上清液用作样品。

[0179] 2. 测试方法

[0180] 与实施例3相同。

[0181] 3. 检测结果

[0182] 结果显示于表4中。如表4所示, 与未添加柠檬酸三钠二水合物时相比, 当样品稀释液中柠檬酸三钠二水合物的添加剂浓度在5mM至250mM的范围内时, 识别出非特异性反应抑制作用。

[0183] [表4]

	添加剂	柠檬酸三钠二水合物						
	添加剂浓度	-	5mM	10mM	20mM	50mM	100mM	250mM
		noro	noro	noro	noro	noro	noro	noro
[0184] 新生儿样本A	10min	+	N	N	N	N	N	+/-
	15min	++	N	N	N	N	N	+/-
	30min	++	+	N	N	N	N	+/-
新生儿样本B	10min	+	+	N	N	N	N	N
	15min	++	+	+	N	N	N	N
	30min	++	++	+	N	N	N	N
新生儿样本C	10min	++	+	+	N	N	N	N
	15min	++	++	+	N	N	N	N
	30min	++	++	++	N	N	N	N

[0185] [实施例5] 对向样品稀释液中添加在分子中含有两个以上羧基的化合物的研究<在诺如病毒测量试剂和儿童样本的情况下>

[0186] 实施例1至4是使用婴儿 (新生儿) 的粪便作为样本的测试, 并且其确认了对于儿童样本是否也观察到本发明的非特异性反应抑制作用。

[0187] 1. 测试材料

[0188] (1) 测试装置

[0189] 与实施例3相同。

[0190] (2) 样品稀释液

[0191] 通过向磷酸缓冲液 (pH 7.6) 加入柠檬酸三钠二水合物至表5所示的添加剂浓度, 调节样品稀释液。还制备了不具有柠檬酸三钠二水合物的样品稀释液。

[0192] (3) 样品

[0193] 使用诺如病毒阴性儿童 (两岁, 两名儿童) 的粪便作为样本。在1.0mL的样品稀释液中, 悬浮0.1mg的每种样品, 并且将其上清液用作样品。

[0194] 2. 测试方法

[0195] 除了将测试线的着色强度的评价时间设定为“15分钟后”以外，测试方法与实施例1相同。

[0196] 3. 检测结果

[0197] 结果显示于表5中。如表5所示，其确认了通过使用本发明的样本稀释液，在儿童样本中也可以抑制非特异性反应。

[0198] [表5]

	添加剂	柠檬酸三钠二水合物	
	添加剂浓度	-	50mM
		noro	noro
儿童样本1 (2岁)	15min	+	-
儿童样本2 (2岁)	15min	-	-

[0200] [参考例]对向样品稀释液中添加在分子中含有两个以上羧基的化合物的研究<在诺如病毒测量试剂和成人样本的情况下>

[0201] 在实施例1至5中，使用婴儿粪便作为样本以确认本发明的稀释液在免疫层析检测方法中的非特异性抑制作用。因此，研究了是否对成人样本也产生了这种非特异性抑制作用。

[0202] 1. 测试材料

[0203] (1) 测试装置

[0204] 与实施例3相同。

[0205] (2) 样品稀释液

[0206] 通过向磷酸缓冲液 (pH 7.6) 加入柠檬酸三钠二水合物至表6所示的添加剂浓度，调节样品稀释液。还制备了不具有柠檬酸三钠二水合物的样品稀释液。

[0207] (3) 样品

[0208] 使用两名诺如病毒阴性成人的粪便作为样本。在1.0mL的样品稀释液中，悬浮0.1mg的每种样品，并且将其上清液用作样品。

[0209] 2. 测试方法

[0210] 除了将测试线的着色强度的评价时间设定为“10、15和30分钟后”以外，测试方法与实施例1相同。

[0211] 3. 检测结果

[0212] 结果显示于表6中。根据此结果，在成人样本中观察到强的非特异性反应，并且未观察到本发明的样品稀释液的非特异性抑制作用。因此，认为含有羧酸的本发明的样品稀释液的非特异性反应抑制作用是特异性抑制来源于婴儿样本的非特异性反应的作用。

[0213] [表6]

	添加剂	柠檬酸三钠二水合物						
	添加剂浓度	-	5mM	10mM	20mM	50mM	100mM	250mM
		noro	noro	noro	noro	noro	noro	noro
[0214] 成人样本1	10min	++	++	++	++	++	++	++
	15min	++	++	++	++	++	++	++
	30min	++	++	++	++	++	++	++
成人样本2	10min	++	++	++	++	++	++	++
	15min	++	++	++	++	++	++	++
	30min	++	++	++	++	++	++	++

[0215] 工业适用性

[0216] 根据本发明,在抑制粪便特有的非特异性反应的同时可以在免疫层析检测方法中准确地检测来源于粪便的样品中的分析物。特别地,由于本发明有效地抑制婴儿的粪便样品中的非特异性反应,所以通过使用免疫层析可以准确地检测婴儿的粪便样品中的分析物。

[0217] 附图标记清单

[0218] (a) 塑料粘合片

[0219] (b) 不溶性膜

[0220] (c1) 测试线

[0221] (c2) 测试线

[0222] (c3) 对照线

[0223] (d) 缀合物垫

[0224] (e) 样品垫

[0225] (f) 吸收垫

[0226] (g) 第三垫

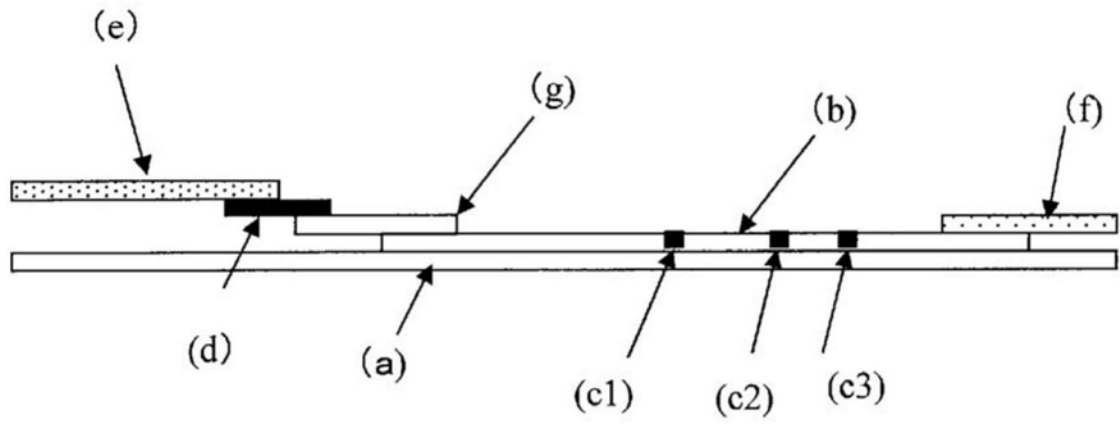


图1

