



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108496082 A

(43)申请公布日 2018.09.04

(21)申请号 201780007291.9

(22)申请日 2017.01.19

(30)优先权数据

2016-010795 2016.01.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/001698 2017.01.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/126593 JA 2017.07.27

(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 加藤伸一 宫田亚纪 伊藤大辅

(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 常海涛 孙微

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/72(2006.01)

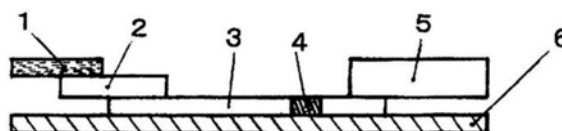
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

层析介质

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种可充分提高保存稳定性的层析介质。本发明涉及一种层析介质,其具有固定有由蛋白质构成的检测物质的检测部,所述检测部中包含三糖以上的多糖类以及碱性氨基酸。



1. 一种层析介质,其用于检测检体中的被检测物质的免疫层析法中,并且具有固定有由蛋白质构成的检测物质的检测部,所述检测部中包含三糖以上的多糖类以及碱性氨基酸。

2. 根据权利要求1所述的层析介质,其中,检测部中所含的所述多糖类为选自由棉子糖、黑曲霉三糖、麦芽三糖、松三糖、麦芽三酮糖、蔗果三糖、蔗果四糖、黑曲霉四糖、水苏糖以及麦芽四糖所组成的组中的至少一种多糖类。

3. 根据权利要求1或2所述的层析介质,其中,检测部中包含5至50nmol的所述多糖类。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的层析介质,其中,检测部中包含5至50nmol的所述碱性氨基酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的层析介质,其中,检测部中所含的所述多糖类与所述碱性氨基酸的摩尔比为1:10至10:1。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的层析介质,其中,检测部包含选自由精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸以及组氨酸所组成的组中的至少一种碱性氨基酸。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的层析介质,其中,检测部包含赖氨酸。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的层析介质,其中,被检测物质为糖蛋白质。

9. 根据权利要求8所述的层析介质,其中,所述糖蛋白质为HbA1c。

10. 一种免疫层析装置,其包含权利要求1至9中任一项所述的层析介质。

11. 一种免疫层析试剂盒,其包含权利要求10所述的免疫层析装置以及检体稀释液。

12. 一种免疫层析分析方法,其使用权利要求11所述的免疫层析试剂盒,并且依次实施下述步骤(1)至(4):

(1) 将检体与检体稀释液一起添加至试样添加部的步骤;

(2) 通过保持在标记物质保持部中的标记物质来识别所述检体中所含的被检测物质的步骤;

(3) 使所述检体以及标记物质作为移动相而在层析介质中展开的步骤;以及

(4) 在检测部中检测展开后的移动相中的被检测物质的步骤。

层析介质

技术领域

[0001] 本发明涉及层析介质、免疫层析装置、免疫层析试剂盒以及免疫层析分析方法。

背景技术

[0002] 近年来,作为利用(例如)抗体所具有的特异反应性来检测试样液中的抗原的简便的体外诊断试剂盒或便携式诊断装置,无需进行检体的前处理的、基于免疫层析法进行的免疫测定的重要性得到提高。特别是,病毒及细菌等的病原体检查试剂盒是在一般的医院或诊所中也被广泛应用的身边的免疫层析装置。

[0003] 作为以往的免疫层析装置的最简单的结构,其为试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质(层析介质部)、以及对流过了检测部的液体进行吸收的吸收部相互连接而成的结构。

[0004] 上述各部位中,在层析介质的检测部中固定有抗体等蛋白质,其与作为检测对象的被检测物质结合。该蛋白质随温度条件或湿度条件而发生变性,导致检测对象的检测灵敏度降低,因而存在无法长时间稳定地保存免疫层析装置这样的问题。因此,关于抑制层析介质的检测部中所含蛋白质的变性以提高保存稳定性的方法,进行了各种研究。

[0005] 例如,专利文献1中公开了一种免疫层析装置,其通过将糖或糖衍生物用于免疫层析装置的检测部等固相中,适度地保持装置内的湿度,从而具有保存稳定性。

[0006] 此外,在非专利文献1中公开了一种免疫层析装置,其通过使层析介质的膜中分别单独地含有甘氨酸或赖氨酸等氨基酸、或者蔗糖或海藻糖等糖,从而提高抗体的保存稳定性,抑制检测灵敏度的降低。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2002/40999号

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:METHODS 22,53-60(2000)“Development of Rapid One-Step Immunochromatographic Assay”

发明内容

[0012] 发明所要解决的课题

[0013] 然而,如上所述的现有技术仍然不能够说其效果是充分的,尚有改良的余地。本发明的目的在于提供充分地提高保存稳定性的层析介质。

[0014] 用于解决课题的方案

[0015] 本发明人为了解决上述课题而进行了详细的研究,结果发现,在用于免疫层析法的免疫层析装置中,通过使层析介质的检测部中含有特定的糖类和碱性氨基酸这两者,从而能够充分地抑制固定于检测部中的作为检测对象的蛋白质的变性,充分地提高保存稳定性,并防止检测物质的活性降低,进一步发现,也能够提高检测物质的活性,由此完成本发

明。

[0016] 即,本发明如下所述。

[0017] 1.一种层析介质,其用于检测检体中的被检测物质的免疫层析法中,并且具有固定有由蛋白质构成的检测物质的检测部,其中所述检测部包含三糖以上的多糖类以及碱性氨基酸。

[0018] 2.根据上述1所述的层析介质,其中,检测部中所含的所述多糖类为选自由棉子糖、黑曲霉三糖(nigerotriose)、麦芽三糖、松三糖、麦芽三酮糖(maltotriulose)、蔗果三糖、蔗果四糖(nystose)、黑曲霉四糖(nigerotetraose)、水苏糖以及麦芽四糖所组成的组中的至少一种多糖类。

[0019] 3.根据上述1或2所述的层析介质,其中,检测部包含5至50nmol的所述多糖类。

[0020] 4.根据上述1至3中任一项所述的层析介质,其中,检测部包含5至50nmol的所述碱性氨基酸。

[0021] 5.根据上述1至4中任一项所述的层析介质,其中,检测部中所含的所述多糖类与所述碱性氨基酸的摩尔比为1:10至10:1。

[0022] 6.根据上述1至5中任一项所述的层析介质,其中,检测部包含选自由精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸以及组氨酸所组成的组中的至少一种碱性氨基酸。

[0023] 7.根据上述1至6中任一项所述的层析介质,其中,检测部包含赖氨酸。

[0024] 8.根据上述1至7中任一项所述的层析介质,其中,被检测物质为糖蛋白质。

[0025] 9.根据上述8所述的层析介质,其中,所述糖蛋白质为HbA1c。

[0026] 10.一种免疫层析装置,其包含上述1至9中任一项所述的层析介质。

[0027] 11.一种免疫层析试剂盒,其包含上述10所述的免疫层析装置以及检体稀释液。

[0028] 12.一种免疫层析分析方法,其使用上述11所述的免疫层析试剂盒,并且依次实施下述步骤(1)至(4):

[0029] (1)将检体与检体稀释液一起添加至试样添加部的步骤;

[0030] (2)通过保持在标记物质保持部中的标记物质来识别所述检体中所含的被检测物质的步骤;

[0031] (3)使所述检体与标记物质作为移动相在层析介质部中展开的步骤;以及

[0032] (4)在检测部中检测展开后的移动相中的被检测物质的步骤。

[0033] 发明效果

[0034] 根据本发明,可以提供一种层析介质,其能够充分地抑制固定于检测部中的作为检测对象的蛋白质的变性,充分地提高保存稳定性,并防止检测物质的活性降低。另外,也能够提高检测物质的活性。

[0035] 附图简要说明

[0036] [图1]图1是用于说明免疫层析装置的结构的面视图。

[0037] [图2]图2是表示在实施例1、2及比较例1、2中检测部的显色值的相对活性的图。

[0038] [图3]图3是表示在实施例3至6及比较例3至10中加湿两天后的检测部的显色值的相对活性的图。

具体实施方式

[0039] 以下,说明用于实施本发明的方式。

[0040] 需要说明的是,在本说明书中,所谓的“固定”是指抗体等以不移动的方式而配置于膜等载体中;所谓的“保持”是指抗体等以可移动的方式而配置于膜等载体当中或表面上。

[0041] 本发明的层析介质具有固定有由蛋白质构成的检测物质的检测部,该层析介质的特征在于:该检测部中含有三糖以上的多糖类以及碱性氨基酸。

[0042] 检测部形成在层析介质上。也就是说,作为与被检测物质结合的检测物质的蛋白质被固定于任意的位置上。

[0043] 据认为,对于本发明的层析介质,通过使其检测部中含有三糖以上的多糖类,作为检测部中的检测物质的蛋白质具有耐湿性,结果,能够抑制蛋白质的变性,提高保存稳定性,并能够防止检测物质的活性降低。

[0044] 另外,在多糖类当中,通过使其为在一分子内具有多个可氢键结合的羟基的三糖以上的糖类,从而相较于单糖或二糖,可得到更高的效果。

[0045] 本发明的层析介质中,通过使其检测部中含有三糖以上的多糖类从而能够提高检测物质的保存稳定性的作用机制尚未确定,但是据认为,这是因为三糖以上的多糖类能维持作为检测物质的蛋白质的氢键网状结构,因而当结合水由于干燥而从作为检测物质的蛋白质解离时,能够防止蛋白质的立体结构被破坏,防止蛋白质的变性,从而提高保存稳定性,并防止活性降低。

[0046] 多糖类只要是三糖以上,则没有特别的限定。例如,可列举出如下的三糖或四糖。

[0047] 作为三糖,可列举出(例如)棉子糖、黑曲霉三糖、麦芽三糖、松三糖、麦芽三酮糖以及蔗果三糖等。

[0048] 作为四糖,可列举出(例如)蔗果四糖、黑曲霉四糖、水苏糖以及麦芽四糖等。

[0049] 本发明中,在多糖类当中,优选三糖或四糖。其中,优选为选自由棉子糖、黑曲霉三糖、麦芽三糖、松三糖、麦芽三酮糖、蔗果三糖、蔗果四糖、黑曲霉四糖、水苏糖以及麦芽四糖所构成的组中的至少一种多糖类。更优选为三糖,而三糖之中更优选为棉子糖。

[0050] 这是因为,通过使用上述的糖,能够抑制被检测物质与检测物质的反应阻碍,适当地维持作为检测物质的蛋白质的氢键网状结构,从而提高保存稳定性,并防止活性降低。三糖以上的多糖类大多是非还原糖,不会因水解而发生官能团转变为氢键性弱的醛或酮,因而能够维持稳固的氢键网状结构。

[0051] 本发明的层析介质的检测部中可含有上述一种糖,也可混合含有两种以上。

[0052] 对于检测部中的多糖类的含量,每个层析介质为(例如)5至50nmol,优选为10至40nmol,更优选为20至30nmol。这是因为,通过使其在上述范围内,能够充分地提高保存稳定性,防止活性降低,并能够更加地抑制被检测物质与检测物质的反应阻碍。

[0053] 另外,对于本发明的层析介质,通过在其检测部中与上述多糖类一起含有碱性氨基酸,检测部中的作为检测物质的蛋白质具有耐湿性,结果能够抑制蛋白质变性,提高保存稳定性,并且能够防止检测物质的活性降低。此外,通过为碱性氨基酸,从而能够得到与其他氨基酸相比更高的效果。

[0054] 本发明的层析介质中,通过在其检测部中含有碱性氨基酸从而能够提高检测物质的保存稳定性的作用机制尚未确定,但是据认为,这是因为碱性氨基酸与作为检测物质的

蛋白质微弱地相互作用,从而能够抑制蛋白质彼此的缔合聚集,能够防止检测物质的活性降低。

[0055] 碱性氨基酸的种类没有特别的限定,例如可列举出:精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸以及组氨酸等。从提高保存稳定性、更加防止活性降低的观点来看,优选使用赖氨酸及精氨酸,最佳使用赖氨酸。本发明的层析介质的检测部中,可含有上述一种碱性氨基酸,也可混合含有两种以上。

[0056] 对于检测部中的碱性氨基酸的含量,每个层析介质为(例如)5至50nmol,优选为10至40nmol,更优选为15至30nmol。这是因为,通过使其在上述范围内,能够更加防止检测物质的活性降低。

[0057] 本发明的层析介质中,检测部含有三糖以上的多糖类以及碱性氨基酸这两者,与分别单独含有的情况相比,显著提高了检测物质的保存稳定性。

[0058] 上述作用机理虽然尚未确定,但推测如下:通过在检测部中含有三糖以上的多糖类以及碱性氨基酸这两者,多糖类形成氢键的网状结构以保持正确的立体结构,并且碱性氨基酸与抗体微弱地相互作用从而抑制抗体彼此凝集,由此长期保持活性。

[0059] 另外据推测,在通过检测物质检测被检测物质时,在不损害由多糖类所带来的保存稳定性的效果的情况下,碱性氨基酸能够适当地解开多糖类与检测物质的缔合,从而也能够抑制被检测物质与检测物质的反应活性降低。

[0060] 以质量(摩尔)比计,检测部中所含的上述多糖类与碱性氨基酸的比率通常为1:10至10:1,优选为1:4至4:1,更优选为4:5至5:4。通过使其为上述范围内,能够使由于含有多糖类及碱性氨基酸这两者所得到的协同效果更为有效。

[0061] 对于固定于本发明层析介质的检测部中的作为检测物质的蛋白质,其只要是与检测对象特异性结合的蛋白质,则没有特别的限定,例如可列举出抗体、抗原及激素等。

[0062] 作为抗体,可列举出(例如)多克隆抗体或单克隆抗体及其片段等。对于单克隆抗体及多克隆抗体或其片段,可使用公知的可购买得到的,或者可由公知的方法来进行制备。

[0063] 对于抗体的固定量,每个层析介质为(例如)0.1至1 μ g,优选为0.2至0.6 μ g,进一步优选为0.3至0.4 μ g。

[0064] 本发明的层析介质能够用作免疫层析装置的展开部位。层析介质为由呈现出毛细管现象的微细多孔性物质所构成的惰性膜。从与免疫层析法中所使用的检测试剂、固定化试剂或被检测物质等没有反应性的观点来看,并且从提高本发明效果的观点来看,优选为(例如)硝基纤维素制的膜(以下有时称为“硝基纤维素膜”)或乙酸纤维素制的膜(以下有时称为“乙酸纤维素膜”),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)。

[0065] 作为硝基纤维素膜,只要主要含有硝基纤维素即可,可以使用以纯品或硝基纤维素混合品等硝基纤维素为主要材料的膜。

[0066] 硝基纤维素膜也可以进一步含有促进毛细管现象的物质。作为该物质,优选降低膜面的表面张力而带来亲水性的物质。

[0067] 例如,优选各种合成表面活性剂或醇类等具有两亲性作用的物质,即对被检测物质在免疫层析介质上的移动没有影响、且不影响金胶体等标记物质的显色的物质。

[0068] 硝基纤维素膜为多孔性,显示毛细管现象。该毛细管现象的指标可通过测定吸水

速度(吸水时间:capillary flow time)来确认。吸水速度影响检测灵敏度和检测时间。

[0069] 由上述的硝基纤维素膜或乙酸钠纤维素膜所代表的层析介质的形态及大小没有特别的限制,只要在实际操作方面及反应结果的观察方面适当即可。

[0070] 另外,为了防止因非特异性吸附使得分析精度降低,根据需要,可以利用公知的方法对本发明的层析介质进行封闭处理。

[0071] 通常,封闭处理适当使用牛血清白蛋白、脱脂乳、酪素或明胶等蛋白质。在该封闭处理后,根据需要,例如也可以使用聚乙二醇脱水山梨醇单月桂酸酯(例如,Tween20:和光純薬社制)、聚氧乙烯辛基苯基醚(例如,TritonX-100:和光純薬社制)或十二烷基硫酸钠(例如,SDS:和光純薬社制)等表面活性剂中的一种或者组合两种以上来进行洗净。

[0072] 另外,本发明的层析介质中的检测部形成在层析介质上。也就是说,与被检测物质特异性结合的上述蛋白质被固定于任何的位置。

[0073] 作为含有被检测物质的检体,没有特别的限制,例如,可列举出生物试样即全血、血清、血浆、尿、唾液、痰、鼻拭子或咽拭子液、脊髓液、羊水、乳头分泌液、泪、汗、来自皮肤的渗液、来自组织或细胞及粪便的提取液等,除此之外,还举出牛乳、蛋、小麦、豆、牛肉、猪肉、鸡肉或含有它们的食品等的提取液等。

[0074] 作为被检测物质,具体而言,例如,可举出癌胚抗原(CEA)、HER2蛋白、前列腺特异抗原(PSA)、CA19-9、 α -甲胎蛋白(AFP)、免疫抑制酸性蛋白(IPA)、CA15-3、CA125、雌激素受体、孕激素受体、便隐血、肌钙蛋白I、肌钙蛋白T、CK-MB、CRP、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、黄体形成素(LH)、促卵泡激素(FSH)、梅毒抗体、流感病毒、人血红蛋白、衣原体抗原、A组B链球菌抗原、HBs抗体、HBs抗原、轮状病毒、腺病毒、白蛋白、或糖化白蛋白及糖化血红蛋白等糖蛋白质等,但不限于这些。

[0075] 其中,作为被检测物质,优选为糖蛋白质,更优选为糖化血红蛋白,特别优选为HbA1c。必须要认识HbA1c抗体在血红蛋白中与葡萄糖结合的状态以及未与葡萄糖结合的状态的微小差异,因而必须要严格地保持其立体结构,因此在被检测物质为HbA1c的情况下,本发明的效果特别有效。

[0076] 作为本发明的免疫层析装置的一个实施方式,如图1所示,除了上述层析介质及检测部以外,通常由试样添加部、标记物质保持部、吸收部以及背板所构成。关于上述各部位的设置顺序,依照试样展开的顺序,依次为试样添加部(1)、标记物质保持部(2)、层析介质(也称为层析介质部)(3)、检测部(4)、吸收部(5)。

[0077] 试样添加部(1)为在免疫层析装置中添加检体试样的部位。试样添加部(1)可由多孔片材构成,该多孔片材具有可迅速地吸收试样、且试样在其中快速移动的性质。作为多孔片材,可列举出(例如)纤维素滤纸、玻璃纤维、聚氨酯、聚乙酸酯、醋酸纤维素、尼龙以及棉布等。

[0078] 标记物质保持部(2)预先含有与和被检测物质结合的抗体结合的后述标记物质。被检测物质在标记物质保持部内移动时与抗体结合而被标记。标记物质保持部(2)例如由玻璃纤维无纺布或纤维素膜等构成。

[0079] 层析介质(3)及检测部(4)使用上述本发明的层析介质。

[0080] 吸收部(5)根据需要而设置于层析介质部(3)的末端,用以吸收通过了检测部(4)的检体或展开液等液体。在本发明的免疫层析装置中,吸收部(5)可使用(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、具有环氧乙烷基等的亲水性试剂而成的材料等。优选为玻璃纤维。通过由玻璃纤维构成吸收部(5),从而能够大幅降低试样液的回流。

[0081] 背板(6)是基材。通过在其单面上涂布粘接剂、或通过粘贴胶带,从而使单面具有粘接性,在该粘接面上密合设置试样添加部(1)、标记物质保持部(2)、层析介质部(3)、及吸收部(5)的一部分或全部。背板(6)只要通过粘接剂从而相对于试样液为不透过性、非透湿性即可,作为基材没有特别限定。

[0082] 另外,本发明中,将检体稀释液与上述免疫层析装置组合,从而能够作为免疫层析试剂盒。

[0083] 检体稀释液也可另外作为展开液使用,但通常使用水作为溶剂,向其中添加缓冲液、盐以及非离子表面活性剂,进一步,也可以添加(例如)用以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、或者杀菌剂、螯合剂等当中的一种或两种以上。

[0084] 在作为展开液使用的情况下,可以预先混合检体和展开液,再将其供给/添加至试样添加部上以使其展开;也可以先将检体供给/添加至试样添加部上,然后再将展开液供给/添加至试样添加部上以使其展开。

[0085] 本发明的免疫层析分析方法依次实施以下的步骤(1)至(4),使用上述免疫层析试剂盒来检测检体中所含的被检测物质。

[0086] (1) 将检体与检体稀释液一起添加至试样添加部的步骤;

[0087] (2) 通过保持在标记物质保持部中的标记物质来识别所述检体中所含的被检测物质的步骤;

[0088] (3) 使所述检体及标记物质作为移动相而在层析介质中展开的步骤;以及

[0089] (4) 在检测部中检测展开后的移动相中的被检测物质的步骤。

[0090] 以下对各步骤进行说明。

[0091] (1) 将检体与检体稀释液一起添加至试样添加部的步骤

[0092] 在步骤(1)中,第1,优选在不使测定精度降低的情况下,利用检体稀释液将检体调整或稀释为在层析介质中顺畅地移动这样程度的浓度,从而制成检体含有液。第2,在试样添加部(1)上以规定量(通常,0.1~2ml)添加上述检体含有液。若添加检体含有液,则检体含有液在试样添加部(1)中开始移动。

[0093] (2) 通过保持在标记物质保持部中的标记物质来识别检体中所含的被检测物质的步骤

[0094] 步骤(2)是这样的步骤:使在步骤(1)中添加于试样添加部中的检体含有液移动至标记物质保持部(2),通过保持在标记物质保持部中的标记物质来识别检体中的被检测物质。

[0095] 标记物质将抗体标记化。免疫层析法中的检测试剂的标记一般来说也使用酶等,但从适于通过目视判定被检测物质的存在的观点出发,优选使用不溶性载体作为标记物质。通过将抗体敏化为不溶性载体,可以制备被标记了的检测试剂。需要说明的是,将抗体敏化为不溶性载体的手段可依照公知的方法。

[0096] 作为标记物质的不溶性载体中可以使用金、银或铂那样的金属粒子、氧化铁那样

的金属氧化物粒子、硫等非金属粒子以及由合成高分子构成的胶乳粒子、或其它。

[0097] 不溶性载体是适于视觉上判定被检测物质的存在的标记物质,为了使目视判定变得容易优选为有色的。金属粒子及金属氧化物粒子其自身呈现出与粒径对应的特定的自然色,可以将该色彩用作标记。

[0098] 作为标记物质的不溶性载体,从检测简便、不易凝集且不易发生非特异性显色的观点来看,特别优选为金粒子。金粒子的平均粒径(例如)为10nm至250nm,优选为35nm至120nm。可通过透射型电子显微镜(TEM:日本电子(株)制,JEM-2010)并使用所拍摄的投影照片,随机测定100个粒子的投影面积圆当量直径,由其平均值算出平均粒径。

[0099] (3) 使检体及标记物质作为移动相而在层析介质中展开的步骤

[0100] 步骤(3)是这样的步骤:在步骤(2)中被检测物质在标记物质保持部中被标记物质识别之后,使检体及标记物质作为移动相在层析介质上通过。

[0101] (4) 在检测部中检测展开后的移动相中的被检测物质的步骤

[0102] 步骤(4)是这样的步骤:在层析介质上作为移动相而通过的检体中的被检测物质通过与作为检测物质的蛋白质的特异性结合反应,从而以被固定于检测部的蛋白质以及标记试剂夹心状夹持的方式进行特异性反应结合,使检测部着色。

[0103] 在不存在被检测物质的情况下,溶解于试样的水分中的标记试剂即使通过层析介质上的检测部也不会发生特异性结合反应,因此检测部不会着色。

[0104] 本发明中,由于检测部含有三糖以上的多糖类以及碱性氨基酸,因而能够充分抑制固定于检测部中的作为检测对象的蛋白质的变性,保存稳定性足够高,从而能够防止检测物质的活性降低。

[0105] 最后,检体含有液的水分移动至吸收部(5)。

[0106] 实施例

[0107] 以下,通过实施例及比较例进一步说明本发明,但本发明不限于下述实施例。

[0108] [实施例1]

[0109] 1. 免疫层析试剂盒的制作

[0110] (1) 层析介质及检测部的制作

[0111] 作为层析介质中所用的膜,使用了由硝基纤维素构成的片材(ミリポア社制,商品名:HF75,300mm×25mm)。

[0112] 接着,采用含有5质量%的异丙醇的磷酸缓冲液(pH7.4),将抗HbA1c单克隆抗体(第一抗体)稀释为1.0mg/ml的浓度,将此溶液150μL以1mm的宽度在经干燥的膜上的检测部(检测线)处涂布300mm。需要说明的是,对于该溶液,准备了赖氨酸浓度为8mmol/L(每个层析介质为20nmol)以及棉子糖浓度为10mmol/L(每个层析介质成为25nmol的浓度)的溶液。

[0113] 另外,为了确认金纳米粒子标记试剂是否展开以及展开速度,在检测部的下游,在对照部位(对照线)涂布由磷酸缓冲液(pH7.4)稀释羊源性抗血清而成的液体,所述羊源性抗血清与金纳米粒子标记物质及被检测物质即动物肉蛋白质等具有广泛亲和性。之后,在50℃下干燥30分钟,在室温下干燥一晚,从而制作了层析介质及检测部。

[0114] (2) 试样添加部的制作

[0115] 作为试样添加部,使用了由玻璃纤维构成的无纺布(ミリポア社制:300mm×30mm)。

[0116] (3) 标记物质保持部的制作

[0117] 在金胶体悬浊液(田中贵金属工业社制:LC40nm) 0.5ml中加入用磷酸缓冲液(pH7.4)稀释为0.05mg/ml的浓度的抗HbA1c单克隆抗体(第二抗体) 0.1ml,在室温下静置10分钟。

[0118] 接着,加入含有1质量%的牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲液(pH7.4) 0.1ml,再在室温下静置10分钟。之后,充分搅拌后,以 $8000\times g$ 进行15分钟离心分离,去除上清液后,加入含有1质量%的BSA的磷酸缓冲液(pH7.4) 0.1ml。按以上顺序制作了标记物质溶液。

[0119] 在15mm \times 300mm的玻璃纤维垫(ニッポア社制)上均匀地添加在上述制作的标记物质溶液300 μ L中加入300 μ L的10质量%海藻糖水溶液和1.8mL的蒸馏水而成的液体后,在真空干燥机中使其干燥,从而制作了标记物质保持部。

[0120] (4) 免疫层析装置的制作

[0121] 接着,使用上述制作的层析介质及检测部、试样添加部、标记物质保持部,制作了图1所示的免疫层析装置。在背板所构成的基材上,依次贴合试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质、用以吸收展开后的试样及标记物质的作为吸收部的玻璃纤维制无纺布。然后,用切断机切成宽度为5mm,作为免疫层析装置。需要说明的是,标记物质保持部及孵育部的试样展开方向的长度分别设定为8mm。

[0122] (5) 检体稀释液

[0123] 制备50mM的HEPES缓冲液(pH7.5),作为对检体进行稀释处理的试剂,其中该HEPES缓冲液包含1质量%的非离子表面活性剂(MN811(商品名,日油株式会社制)与NP-40(商品名,ナカライテスク社制)的1:1混合物)、80mM的氯化钾、20mM的胍盐酸盐、以及0.4重量%的聚乙烯吡咯烷酮(平均分子量36万)。

[0124] 2. 测定

[0125] 将上述制作的免疫层析装置放入至加湿器中,在湿度95%、温度37 $^{\circ}$ C的状态下,放置如表1所记载的时间。之后,分别穿刺健康成年人男性及糖尿病男性患者的指尖以采集血液,采用乳胶凝集法分别测定HbA0及HbA1c的浓度,以HbA1c的浓度成为6.5%的方式,将测定了浓度的上述各个血液试样混合以制作HbA1c检体,用上述检体稀释液将所制作的上述HbA1c检体稀释至100倍以制作检体试样。将所制作的上述检体试样150 μ L负载于免疫层析装置的试样添加部上并使其展开,然后通过密度计(浜松ホトニクス社制,以下相同)测定检测部的着色程度(显色值)。结果示于表1及图2中。表中,所谓的相对活性,是表示当将未放入至加湿器的免疫层析装置(经过时间0)中所测定的显色值作为100%时的显色值的比例。需要说明的是,使用与各实施例、比较例相对应的、HbA1c的浓度为0%而仅由HbA0所构成的检体(阴性检体),测定了显色值,但是全部显示为小于5mAbs的测定值,从而确认没有假阳性。

[0126] [实施例2]

[0127] 重复进行实施例1,不同之处在于:使用“抗流感抗体”代替第一抗体及第二抗体的“抗HbA1c单克隆抗体”,并且将检体试样变更为流感抗原。通过密度计测定检测部的着色程度(显色值)。结果示于表1及图2中。

[0128] [比较例1]

[0129] 重复进行实施例1,不同之处在于:在检测部中,使用“蔗糖”代替“赖氨酸及棉子糖”。需要说明的是,在检测部的制作中,使用蔗糖浓度为10mmol/mL(每个层析介质成为

20nmol的浓度)的溶液,通过密度计测定检测部的着色程度(显色值)。结果示于表2及图2中。

[0130] [比较例2]

[0131] 重复进行实施例2,不同之处在于:在检测部中,使用“蔗糖”代替“赖氨酸及棉子糖”。需要说明的是,在检测部的制作中,使用蔗糖浓度为10mmol/mL(每个层析介质成为20nmol的浓度)的溶液,通过密度计测定检测部的着色程度(显色值)。结果示于表2及图2中。

[0132] [表1]

[0133] 表1

[0134]

	被检测物质	检测部							
实施例 1	HbA1c	赖氨酸:20 nmol 棉子糖:25 nmol	经过时间(小时)	0	1	2	4	8	24
			显色值(mAbs)	59.3	82.7	112.2	102.8	98.7	71.3
			相对活性(%)	100	139	189	173	166	120
实施例 2	流感病毒	赖氨酸:20 nmol 棉子糖:25 nmol	经过时间(小时)	0	1	2	4	8	24
			显色值(mAbs)	51.3	52.3	51.4	46.9	43.8	41.7
			相对活性(%)	100	102	100	91	85	81

[0135] [表2]

[0136] 表2

[0137]

	被检测物质	检测部							
比较例 1	HbA1c	蔗糖:20 nmol	经过时间(小时)	0	1	2	4	8	24
			显色值(mAbs)	191.8	96.8	85.7	91.0	62.5	26.6
			相对活性(%)	100	50	45	47	33	14
比较例 2	流感病毒	蔗糖:20 nmol	经过时间(小时)	0	1	2	4	8	24
			显色值(mAbs)	49.9	41.0	36.6	35.2	30.9	26.6
			相对活性(%)	100	82	73	71	62	53

[0138] 在表1及图2中,实施例1及2中,由于检测部含有作为碱性氨基酸的赖氨酸以及作为三糖的棉子糖,因而在湿度95%、温度37℃这种环境下放置一定时间时,抑制了检测物质的活性降低。另外,在使用了HbA1c作为被检测物质的实施例1中,得到了检测物质活性提高的结果。

[0139] 另一方面,在表2及图2中,在仅含有作为二糖的蔗糖的比较例1及2中,检测物质的活性降低。

[0140] [实施例3]

[0141] 将实施例1中所使用的免疫层析装置在温度为24至26℃、湿度为40至70%的加湿环境下放置2天。检体使用了与实施例1相同的HbA1c,通过密度计分别测定在放置前的免疫层析装置中的检测部的着色程度(显色值)以及在放置两天后的免疫层析装置中的检测部的着色程度(显色值)。其结果示出于表3及图3中。表3中,相对活性表示:当将放置前的免疫层析装置中所测定的显色值定为100%时,在放置2天后的免疫层析装置中所测定的显色值

的比例。

[0142] [实施例4]

[0143] 重复进行实施例3,不同之处在于:如表3所示地变更在实施例3中涂布于免疫层析装置的检测部中的赖氨酸和棉子糖的量。其结果示于表3及图3中。

[0144] [实施例5]

[0145] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的精氨酸和棉子糖。其结果示于表3及图3中。

[0146] [实施例6]

[0147] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的赖氨酸和麦芽四糖。其结果示于表3及图3中。

[0148] [比较例3]

[0149] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的甘氨酸。其结果示于表3及图3中。

[0150] [比较例4]

[0151] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的精氨酸。其结果示于表3及图3中。

[0152] [比较例5]

[0153] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的赖氨酸。其结果示于表3及图3中。

[0154] [比较例6]

[0155] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的甘露醇。其结果示于表3及图3中。

[0156] [比较例7]

[0157] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的蔗糖。其结果示于表3及图3中。

[0158] [比较例8]

[0159] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的棉子糖。其结果示于表3及图3中。

[0160] [比较例9]

[0161] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的麦芽四糖。其结果示于表3及图3中。

[0162] [比较例10]

[0163] 重复进行实施例3,不同之处在于:在实施例3中,对于免疫层析装置的检测部,涂布表3所示量的甘氨酸和棉子糖。其结果示于表3及图3中。

[0164] [表3]

[0165] 表3

	检测部	显色值(mAbs)		相对活性 (%)
		加湿时间		
		第 0 天	第 2 天	
实施例 3	赖氨酸:20 nmol 棉子糖:25 nmol	59.3	56.6	95
实施例 4	赖氨酸:30 nmol 棉子糖:20 nmol	55.4	51.1	92
实施例 5	精氨酸:15 nmol 棉子糖:30 nmol	72.5	55.2	76
[0166] 实施例 6	赖氨酸:20 nmol 麦芽四糖:25 nmol	56.6	31	55
比较例 3	甘氨酸:20 nmol	40.2	18.1	45
比较例 4	精氨酸:20 nmol	122.7	4	3
比较例 5	赖氨酸:20 nmol	110.7	8.2	7
比较例 6	甘露醇:20 nmol	78.7	12	15
比较例 7	蔗糖:20 nmol	191.8	27.8	14
比较例 8	棉子糖:20 nmol	89	29.3	33
比较例 9	麦芽四糖:20 nmol	54.2	22.7	42
比较例 10	甘氨酸:20 nmol 棉子糖:25 nmol	32.3	12.5	39

[0167] 在表3及图3中,对于实施例3至6,由于检测部含有作为碱性氨基酸的赖氨酸或精氨酸、以及三糖以上的多糖类(棉子糖、麦芽四糖),因而能够抑制放置2天时检测物质的活性降低。特别是,在检测部含有赖氨酸及棉子糖这两者的实施例3及4中,大幅抑制了检测物质的活性降低。

[0168] 另一方面,在仅含有作为中性氨基酸的甘氨酸的比较例3、仅含有作为碱性氨基酸的精氨酸或赖氨酸的比较例4及5、仅含有作为单糖的甘露醇或作为二糖的蔗糖的比较例6及7、仅含有作为三糖的棉子糖或作为四糖的麦芽四糖的比较例8及9中,检测物质的活性显著地降低。另外,即使在含有作为中性氨基酸的甘氨酸和作为三糖的棉子糖的比较例10中,检测物质的活性也显著地降低。

[0169] 根据以上结果可知,通过使检测部含有碱性氨基酸以及三糖以上的多糖类这两者,能够大幅地抑制检测物质的活性降低。

[0170] 虽然利用特定的方式对本发明详细地进行了说明,但是对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的情况下进行各种变更及变形。需要说明的是,本申请基于2016年1月22日申请的日本专利申请(日本特愿2016-010795),其全文以引用方式并入本文。

[0171] 符号说明

[0172] 1 试样添加部

[0173] 2 标记物质保持部

[0174] 3 层析介质

[0175] 4 检测部

[0176] 5 吸收部

[0177] 6 背板

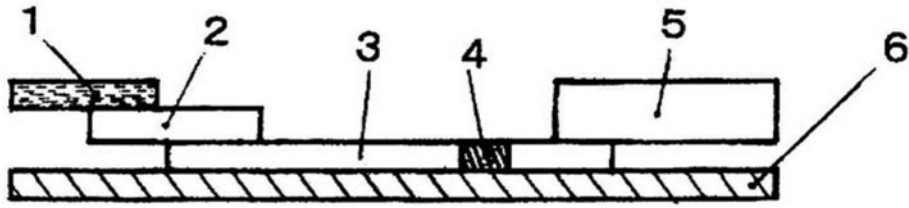


图1

加湿下的活性随时间的变化

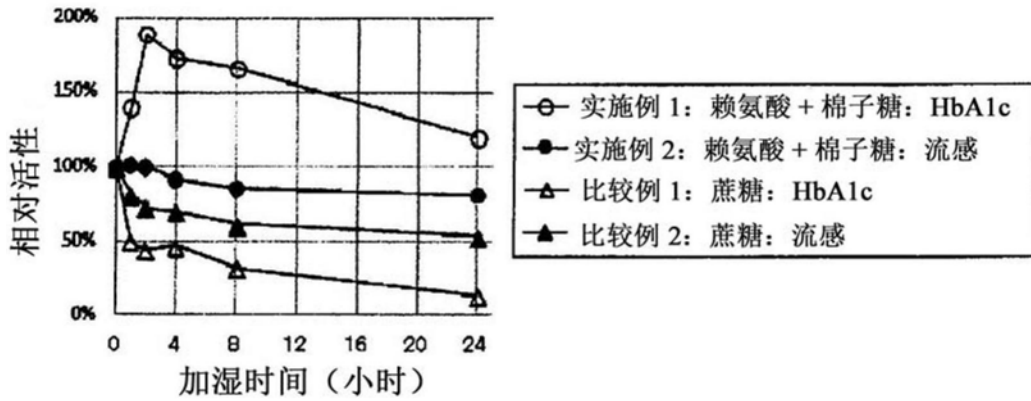


图2

加湿 2 天后的相对活性

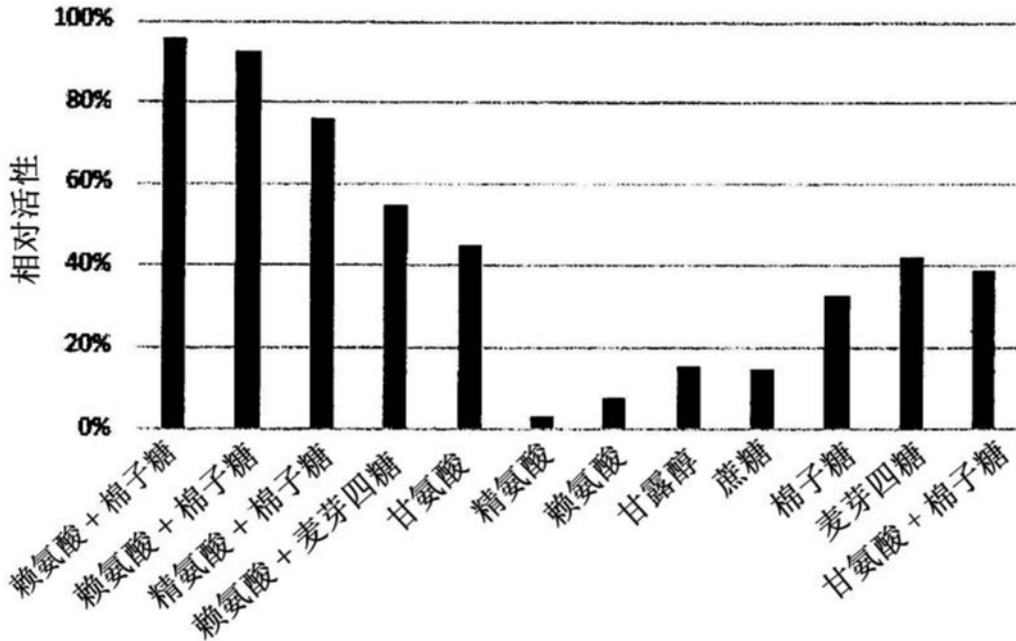


图3

专利名称(译)	层析介质		
公开(公告)号	CN108496082A	公开(公告)日	2018-09-04
申请号	CN201780007291.9	申请日	2017-01-19
[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	加藤伸一 宫田亚纪 伊藤大辅		
发明人	加藤伸一 宫田亚纪 伊藤大辅		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/72		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/558 G01N33/72 G01N33/723		
代理人(译)	常海涛 孙微		
优先权	2016010795 2016-01-22 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种可充分提高保存稳定性的层析介质。本发明涉及一种层析介质，其具有固定有由蛋白质构成的检测物质的检测部，所述检测部中包含三糖以上的多糖类以及碱性氨基酸。

