

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 登録実用新案公報(U)

(11) 実用新案登録番号
実用新案登録第3222251号
(U3222251)

(45) 発行日 令和1年7月25日(2019.7.25)

(24) 登録日 令和1年7月3日(2019.7.3)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 V
GO 1 N 33/574 (2006.01) GO 1 N 33/574 B

評価書の請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号 実願2019-600070 (U2019-600070)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月29日(2017.6.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/090864
 (87) 国際公開番号 W02018/014709
 (87) 国際公開日 平成30年1月25日(2018.1.25)
 (31) 優先権主張番号 201610579801.7
 (32) 優先日 平成28年7月21日(2016.7.21)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(73) 実用新案権者 515050242
 ベイジン ユウアン ホスピタル、キャピタル
 メディカル ユニバーシティ
 Beijing Youan Hospital, Capital Medical University
 中国 ベイジン、フェンタイ ディストリクト、
 ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、
 ナンバー8

(73) 実用新案権者 519022768
 ベイジン インスティテュート オブ ヘパ
 パトロジー
 中国 ベイジン、フェンタイ ディストリクト、
 ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、
 ナンバー8

最終頁に続く

(54) 【考案の名称】 血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】血清試料中の複数種の抗原または抗体の一度の同時検出を短時間内に実現し、検出時間が短く、コストが低く、安定性が良い免疫透析濾過装置を提供する。

【解決手段】免疫透析濾過装置の精密ろ過膜2のマトリックスに少なくとも1つの検出エリアを含み、前記検出エリア内にポジティブコントロール検出サブエリア、血清フコースタンパク質検出サブエリア、およびネガティブコントロール検出サブエリアが設けられ、前記ポジティブコントロール検出サブエリアに - フェトプロテインが固定され、前記血清フコースタンパク質検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、前記ネガティブコントロール検出サブエリアにウシ血清アルブミンが固定され、同一の検出サブエリア内の検出斑上の物質濃度は同じである。

【選択図】 図1

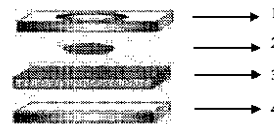


図1

【実用新案登録請求の範囲】

【請求項 1】

- (1) - フェトプロテイン抗原とレンズマメレクチンとを精密ろ過膜に複合するステップと、
 (2) 血清試料を精密ろ過膜に滴下し、試料中のフコシル化 - フェトプロテインを精密ろ過膜上のレンズマメレクチンと結合させるステップと、
 (3) 精密ろ過膜に酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体を滴下し、発色基質を加え、検出結果を得るステップと、
 を含む、ことを特徴とする血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法。

【請求項 2】

ステップ(1)における - フェトプロテイン抗原は原核発現ヒト - フェトプロテイン抗原である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ(3)における酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体である、ことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ(3)における酵素は西洋ワサビペルオキシダーゼである、ことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

- (1) - フェトプロテイン抗原とレンズマメレクチンとを精密ろ過膜に複合するステップと、
 (2) 10 ~ 15 μ L の血清試料を精密ろ過膜に滴下し、試料中のフコシル化 - フェトプロテインと精密ろ過膜上のレンズマメレクチンとを結合させた後、ブロッキング液で洗浄し、非特異的結合物を除去するステップと、
 (3) 精密ろ過膜に酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体を滴下し、3 ~ 5 s インキュベートした後、ブロッキング液で洗浄し、非特異的結合物を除去し、発色基質発色液を添加するステップと、

を含み、
 陽性血清の場合、 - フェトプロテイン抗原およびフコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは青色を示し、陰性血清の場合、 - フェトプロテイン抗原の検出エリアは青色を示し、フコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは発色しない、ことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置であって、前記免疫透析濾過装置の精密ろ過膜のマトリックスは、少なくとも 1 つの検出エリアを含み、前記検出エリア内にポジティブコントロール検出サブエリア、血清フコースタンパク質検出サブエリア、およびネガティブコントロール検出サブエリアが設けられ、前記ポジティブコントロール検出サブエリアに - フェトプロテインが固定され、前記血清フコースタンパク質検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、前記ネガティブコントロール検出サブエリアにウシ血清アルブミンが固定され、同一の検出サブエリア内の検出斑上の物質濃度は同じである、ことを特徴とする免疫透析濾過装置。

【請求項 7】

前記検出サブエリアはそれぞれ少なくとも 1 つの検出斑を含む、ことを特徴とする請求項 6 に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 8】

前記精密ろ過膜のマトリックスは 1 つの検出エリアを有し、前記検出サブエリアはそれぞれ 1 つの検出斑を有し、前記ポジティブコントロール検出サブエリアおよび前記ネガティブコントロール検出サブエリアはそれぞれ 1 つの対照斑を有する、ことを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

前記 - フェトプロテインは原核発現ヒト - フェトプロテインである、ことを特徴とする請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 10】

前記免疫透析濾過装置は、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体および発色基質液を更に含む、ことを特徴とする請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 11】

前記西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体である、ことを特徴とする請求項 10 に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 12】

前記免疫透析濾過装置は、洗浄と希釈用の P B S T および P B S ブロッキング液を更に含む、ことを特徴とする請求項 6 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 13】

請求項 6 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の免疫透析濾過装置の、非診断および / または非治療目的の血清フコースタンパク質の検出における使用。

【考案の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本考案はタンパク質検出の技術分野に関し、特に、血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法および免疫透析濾過装置に関する。

【背景技術】

【0002】

原発性肝癌および肝炎、肝硬変等の良性肝臓疾患が発生した - フェトプロテイン (α l p h a f e t o p r o t e i n 、 A F P) は、その糖鎖構造に大きな違いが存在し、すなわち、良性肝臓疾患と比べ、肝癌が発生した A F P は、そのフコースの指数が非常に高い。フコースは、レンズマメレクチンと結合する特性を有する。A F P は、その (フコシル) のレンズマメレクチンに対する親和力に応じて、A F P - L 1 、 A F P - L 2 、 および A F P - L 3 に分けることができる。そのうち、A F P - L 1 は主に良性肝臓疾患に由来し、A F P - L 2 は主に妊婦に由来し、A F P - L 3 は - フェトプロテインのフコースのグルコシル化形式であり、主に肝細胞癌 (H e p a t o C e l l u l a r C a r c i n o m a 、 H C C) に由来する。2005年、FDAは、A F P - L 3 を原発性肝癌のマーカーの 1 つとすることを正式に承認した。A F P - L 3 は、肝癌の早期診断、鑑別診断、治療効果評価、および予後判定と監視等の面でいずれも高い特異性および感性を有する。

【0003】

フコースはメチル化六炭糖であり、組織および血清等の複数種の糖タンパク質の糖鎖に存在し、タンパク結合フコース (p r o t e i n - b o u n d f u c o s e 、 P - b f) と呼ばれている。A F P 炭水化物鎖にフコース残基が存在し、このような異質体はフコシル化 A F P (F u c A F P) と呼ばれ、重要な理論的意義と臨床応用意義を有し、肝癌診断および予後応用において、1 つの重要な指標とすることができる。

【0004】

従来血清フコースタンパク質の分離方法は、交差親和免疫電気泳動技術、アフィニティープロットティング、アフィニティークロマトグラフィー、「2 部位サンドイッチ」酵素結合免疫吸着法、L i B A S y s 測定装置、 μ T A S W a k o (登録商標) i 3 0 検出システム技術、および熱景生物 (社名) のグリコシル捕獲遠心カラム前処理技術を含む。そのうち、フィットヘムアグルチニン親和免疫電気泳動技術および μ T A S W a k o (登録商標) i 3 0 検出システム技術は、要求が高く、操作が煩雑で、試薬が高価であるため、その普及と応用が制限されている。グリコシル捕獲遠心カラムは、試料処理および検出が別々に行われるため、操作の煩雑さが増える。

【考案の概要】

10

20

30

40

50

【考案が解決しようとする課題】

【0005】

現在のフコースタンパク質分離方法に存在する問題に対し、本考案の目的は、血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法および免疫透析濾過装置を提供することであり、前記方法および免疫透析濾過装置は、生物試料におけるフコシル化 - フェトプロテインの検出に特に適用し、且つ、各種のフコシル化タンパク質に対して汎用性を有する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

この目的を達成するために、本考案は以下の技術案を採用する。

【0007】

第1の態様において、本考案は、

(1) - フェトプロテイン抗原とレンズマメレクチンとを精密ろ過膜に複合するステップと、

(2) 血清試料を精密ろ過膜に滴下し、試料中のフコシル化 - フェトプロテインを精密ろ過膜上のレンズマメレクチンと結合させるステップと、

(3) 精密ろ過膜に酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体を滴下し、発色基質を加え、検出結果を得るステップと、

を含む血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法を提供する。

【0008】

本考案は、精密ろ過膜を使用し、血清試料中の複数種の抗原または抗体の一度の同時検出を短時間内に実現し、その検出過程は3～5minのみで完成できる。タンパク質チップを採用するものと比べ、本考案に係る免疫透析濾過検出方法は、検出時間が短く、コストが低く、安定性が良い等の利点を有する。

【0009】

本考案の免疫透析濾過方法は、捕獲されたタンパク質をニトロセルロース膜に固定し、負の電荷を帯びている抗体とニトロセルロース膜とが疎水作用を起こして高親和力で結合する。且つ、HRPおよび発色基質を用いて反応して青っぽい茶色の安定した生成物を生成することにより、該生成物は長時間安定して存在することができ、時間の経過に従って徐々に弱くなったり消えたりすることがなく、観察結果は時間帯によって誤差を生じることがなく、結果の安定性が良い。更に、本考案の免疫透析濾過方法は、結果のスキャン分析を行う機器が不要で、5min内に目視で結果を観察して判断することができる。また、本考案の免疫透析濾過方法は室温のみで完成でき、保温箱が不要である。

【0010】

本考案に係る免疫透析濾過検出方法は、生物試料中のフコシル化 - フェトプロテインの検出に適用し、且つ、各種のフコシル化タンパク質に対して汎用性を有する。

【0011】

本考案におけるフコシル化 - フェトプロテインとは、 - フェトプロテイン炭水化物鎖にフコース残基が存在する異質体を指す。

【0012】

本考案によれば、ステップ(1)における - フェトプロテイン抗原は原核発現ヒト - フェトプロテイン抗原であり、真核発現 - フェトプロテイン抗原を選択してもよく、ここでは特に限定しない。

【0013】

本考案によれば、ステップ(3)における酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体である。

【0014】

本考案によれば、ステップ(3)における酵素は西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)であり、アルカリホスファターゼ(ALP)であってもよく、酵素の基質発色の実現に用いられる。

【0015】

10

20

30

40

50

本考案によれば、前記血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法は、

(1) - フェトプロテイン抗原とレンズマメレクチンとを精密ろ過膜に複合するステップと、

(2) 10 ~ 15 μ L の血清試料を精密ろ過膜に滴下し、試料中のフコシル化 - フェトプロテインと精密ろ過膜上のレンズマメレクチンとを結合させた後、ブロッキング液で洗浄し、非特異的結合物を除去するステップと、

(3) 精密ろ過膜に酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体を滴下し、3 ~ 5 s インキュベートした後、ブロッキング液で洗浄し、非特異的結合物を除去し、発色基質発色液を添加するステップと、

を含むことができ、

陽性血清の場合、 - フェトプロテイン抗原およびフコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは青色を示し、陰性血清の場合、 - フェトプロテイン抗原の検出エリアは青色を示し、フコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは発色しない。ネガティブコントロールは陽性血清であっても陰性血清であっても発色しない。

【0016】

例示的に、前記免疫透析濾過方法は、具体的に以下のステップを含むことができる。

【0017】

試料の検出：

検出待ちの血清試料を希釈してから精密ろ過膜を含む検出エリアに滴下し、インキュベートした後、PBSTで検出エリアを洗浄し、非特異的結合物を除去し、PBSにより希釈したHRPで標識したAFP抗体を添加し、インキュベートした後、PBSTで洗浄し、非特異的結合物を除去し、HRP基質発色液を添加し、目視で結果を観察する。

【0018】

本考案によれば、前記インキュベートとは、室温で3 ~ 5 s インキュベートすることを意味し、例えば、3 s、3.5 s、4 s、4.5 s または5 s インキュベートする。

【0019】

本考案によれば、前記血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法は、以下のような免疫透析濾過装置内で行うことができるが、これらに限定されない。

【0020】

血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置は精密ろ過膜を含み、精密ろ過膜のマトリックスは、少なくとも1つの検出エリアが設けられ、前記検出エリア内にポジティブコントロール検出サブエリア、血清フコースタンパク質検出サブエリア、およびネガティブコントロール検出サブエリアが設けられ、ポジティブコントロール検出サブエリアに - フェトプロテインが固定され、血清フコースタンパク質検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、ネガティブコントロール検出サブエリアにウシ血清アルブミンが固定され、同一の検出サブエリア内の検出斑上の物質濃度は同じである。検出サブエリアおよび対照エリアはそれぞれ少なくとも1つの検出斑を含み、例えば、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ等であってもよい。

【0021】

本考案における免疫透析濾過装置は、強靱なプラスチック製品、紙の吸水材、およびニトロセルロース膜で構成され、衝撃や衝突に耐えることができ、壊れにくい。

【0022】

本考案において、前記精密ろ過膜のマトリックスは1つの検出エリアを有し、前記検出サブエリアはそれぞれ1つの検出斑を有し、前記ポジティブコントロール検出サブエリアおよびネガティブコントロール検出サブエリアはそれぞれ1つの対照斑を有し、前記 - フェトプロテインは原核発現ヒト - フェトプロテインである。

【0023】

本考案の免疫透析濾過装置は、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体および発色基質液を更に含み、前記西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体であり、前記免疫

10

20

30

40

50

透析濾過装置は、洗浄と希釈用の P B S T および P B S ブロッキング液を更に含む。

【 0 0 2 4 】

本考案は、精密ろ過膜を有する免疫透析濾過装置を採用することが好ましく、タンパク質チップと比べ、検出時間が短く、コストが低く、安定性が良い等の利点を有し、検出過程を 3 ~ 5 m i n にコントロールすることができる。

【 0 0 2 5 】

第 2 の態様において、本考案は、免疫透析濾過装置の精密ろ過膜のマトリックスは、少なくとも 1 つの検出エリアを含み、前記検出エリア内にポジティブコントロール検出サブエリア、血清フコースタンパク質検出サブエリア、およびネガティブコントロール検出サブエリアが設けられ、ポジティブコントロール検出サブエリアに - フェトプロテインが固定され、血清フコースタンパク質検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、ネガティブコントロール検出サブエリアにウシ血清アルブミンが固定され、同一の検出サブエリア内の検出斑上の物質濃度は同じである血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置を更に提供する。

【 0 0 2 6 】

本考案によれば、前記検出サブエリアはそれぞれ少なくとも 1 つの検出斑を含み、例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つ等であってもよい。

【 0 0 2 7 】

本考案によれば、前記精密ろ過膜のマトリックスは 1 つの検出エリアを有し、前記検出サブエリアはそれぞれ 1 つの検出斑を有し、前記ポジティブコントロール検出サブエリアおよびネガティブコントロール検出サブエリアはそれぞれ 1 つの対照斑を有する。

【 0 0 2 8 】

本考案によれば、前記 - フェトプロテインは原核発現ヒト - フェトプロテインである。

【 0 0 2 9 】

本考案によれば、前記免疫透析濾過装置は、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体および発色基質液を更に含む。

【 0 0 3 0 】

本考案によれば、前記西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体である。

【 0 0 3 1 】

本考案によれば、前記免疫透析濾過装置は洗浄と希釈用の P B S T および P B S ブロッキング液を更に含む。

【 0 0 3 2 】

本考案は、免疫透析濾過装置の、非診断および / または非治療目的の血清フコースタンパク質の検出における使用を更に提供する。

【 考案の効果 】

【 0 0 3 3 】

従来の技術案と比べ、本考案は少なくとも以下の有益な効果を有する。

【 0 0 3 4 】

(1) 本考案は、精密ろ過膜を使用することにより、血清試料中の複数種の抗原または抗体の一度の同時検出を短時間内に実現し、本考案に係る免疫透析濾過検出方法は、血清フコースタンパク質を正確に検出ことができ、検出時間が短く、安定性が良く、コストが低い等の利点を有する。

【 0 0 3 5 】

(2) 本考案に係る検出方法および免疫透析濾過装置は、必要な原材料および機器設備のコストが全て大幅に減少し、免疫透析濾過の装置は紙およびプラスチック製品であり、コストが非常に低く、約 1 元人民元であり、実験フローにおける準備、インキュベート、結果のスキャンを行うための機器設備が不要であり、検出コストおよび費用を大幅に低減する。

10

20

30

40

50

【0036】

(3) 本考案の免疫透析濾過方法は時間の面で他の方法と比べ、E L I S A 検出は少なくとも3 hが必要で、タンパク質チップ検出は1.5 hが必要であるが、本考案は3 ~ 5 minのみが必要であり、検出時間は大きく短縮される。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】本考案の免疫透析濾過装置の模式図であり、1は蓋で、2は精密ろ過膜で、3は紙の吸水材で、4はプラスチック基板である。

【図2】本考案の免疫透析濾過方法の結果模式図であり、1~3は陽性結果で、NC膜の上方のポジティブコントロール検出斑は青っぽい茶色の陽性信号を呈し、真ん中のレンズマメレクチン検出斑は青っぽい茶色の陽性信号を呈し、下方のBSA対照斑は発色しない。4~5は陰性結果で、NC膜の上方のポジティブコントロール検出斑は青っぽい茶色の陽性信号を呈し、真ん中のレンズマメレクチン検出斑および下方のBSA対照斑は発色しない。

【図3】免疫透析濾過ニトロセルロース膜を調製する模式図であり、ポジティブコントロール検出サブエリアにAFPが固定され、真ん中の検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、ネガティブコントロール検出サブエリアにBSAが固定される。

【0038】

以下、本考案について更に詳細に説明する。しかし、下記実施例は、本考案の簡単な例に過ぎず、本考案の実用新案登録請求の範囲を代表または制限するものではなく、本考案の保護範囲は実用新案登録請求の範囲を基準にする。

【考案を実施するための形態】

【0039】

以下、図面を参照しながら具体的な実施形態により、本考案の技術案について更に説明する。

【0040】

図1に示すように、本考案における免疫透析濾過装置の構造模式図であり、該免疫透析濾過装置は精密ろ過膜を有し、蓋1、精密ろ過膜2、紙の吸水材3、およびプラスチック基板4が上から下へ順に構成される。組み立ての場合、精密ろ過膜を事前に直径が約1.5 cmの円形に裁断し、紙の吸水材3をプラスチック基板4内に置き、紙の吸水材の上面の中央に予め裁断された精密ろ過膜2を置いた後、蓋1を被せる。

【0041】

本考案に使用される精密ろ過膜はニトロセルロース膜であってもよく、本考案では、GE Healthcare RPN303Bを使用する。紙の吸水材は吸水紙であってもよく、蓋および基板は全てプラスチック製品を使用する。

【0042】

図2に示すように、本考案の免疫透析濾過方法を採用する結果模式図であり、陽性血清の場合(図2における1~3)、ポジティブコントロールおよびフコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは全て青色を示し、陰性血清の場合(図2における4~6)であれば、フコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは発色せず、ポジティブコントロールは青色を示す。陽性血清であっても陰性血清であっても、ネガティブコントロールは全て発色しない。

【0043】

図3は免疫透析濾過ニトロセルロース膜を調製する模式図であり、ポジティブコントロール検出サブエリアにAFPが固定され、真ん中の検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、ネガティブコントロール検出サブエリアにBSAが固定される。

【0044】

本考案をより良好に説明し、本考案の技術案を理解しやすいために、本考案の典型的かつ非限定的な実施例は以下のとおりである。

【0045】

実施例 1 免疫透析濾過装置の調製および使用フロー

実験に使用する試薬および機器：原核発現 A F P（米国 a b c a m 社）、レンズマメレクチン（S i g m a 社）、ニトロセルロース膜（G E H e a l t h c a r e）、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したウサギ由来抗体（米国 a b c a m 社）、H R P 発色基質液（米国 M i l l i p o r e 社）。

【0046】

P B S 処方：塩化ナトリウム（N a C l）8 g、塩化カリウム（K C l）0.2 g、リン酸水素二ナトリウム（N a₂H P O₄）1.44 g、リン酸二水素カリウム（K H₂P O₄）0.24 g であり、pH を 7.4 に調整し、1 L に定容した。

【0047】

P B S T 処方：P B S、1 L + T w e e n - 2 0、1 m L。

【0048】

ニトロセルロース膜（G E H e a l t h c a r e）は、各免疫透析濾過装置に 1 つの検出エリアを含み、それぞれの検出エリアで 1 つの血清を検出することができ、A F P L 3 マーカーを一度に検出した。

【0049】

各検出エリアにおいて、それぞれ 0.5 μ L のネズミ由来の原核発現ヒト A F P（米国 a b c a m 社）とレンズマメレクチン（S i g m a 社）とをニトロセルロース膜に順にスポットし、スポットング濃度は A F P が 0.5 m g / m L であり、レンズマメレクチンが 4 m g / m L である。0.5 μ L の 10 % のウシ血清アルブミン（B S A）を対照斑にスポットングしてネガティブコントロールとした。

【0050】

免疫透析濾過の操作フロー：

調製された免疫透析濾過装置を使用し、健康対照グループおよび肝癌実験グループの動的血清検体における A F P L 3 腫瘍マーカーを検出した。

【0051】

室温条件で、10 μ L の血清試料を免疫透析濾過装置の膜片に滴下し、レンズマメレクチンとフコースの結合の特性を利用し、レンズマメレクチンを血清中のフコースと結合させてレンズマメレクチン抗原複合物を形成した。3 秒後、血清液体浸透性膜片は膜片の下の吸水材に吸水された。

【0052】

10 μ L の P B S T を滴下して洗浄し、非特異的結合を除去し、3 回繰り返した。また、P B S により希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したウサギ由来一次抗体を添加し、ウサギ由来抗体は血清中の A F P 抗原と結合し、レンズマメレクチン - (A F P) フコース - ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗体の複合物を形成した。ウサギ由来抗体は同時に固定膜上のポジティブコントロール A F P と結合し、A F P - ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗体の複合物を形成した。3 秒後、血清液体浸透性膜片は膜片の下の吸水材に吸水された。

【0053】

10 μ L の P B S T を滴下して洗浄し、非特異的結合を除去し、3 回繰り返し、H R P 発色基質を添加し、1 分間遮光し、10 μ L の P B S T を滴下して洗浄した。陽性血清の検出斑は青色を呈した。

【0054】**実施例 2**

調製された免疫透析濾過装置を使用し、健康対照グループおよび肝癌実験グループの動的血清検体における A F P L 3 腫瘍マーカーを検出した。

【0055】

室温条件で、2.5 μ L の血清試料を 4 倍希釈した後、免疫透析濾過装置の膜に滴下し、レンズマメレクチンとフコースの結合の特性を利用し、レンズマメレクチンを血清中のフコースと結合させてレンズマメレクチン抗原複合物を形成した。5 秒後、血清液体浸透性

10

20

30

40

50

膜片は膜片の下の吸水材に吸水された。

【0056】

10 μ L の P B S T を滴下して洗浄し、非特異的結合を除去し、5 回繰り返した。また、P B S により希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したウサギ由来一次抗体を添加し、ウサギ由来抗体は血清中の A F P 抗原と結合し、レンズマメレクチン - (A F P) フコース - ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗体の複合物を形成した。ウサギ由来抗体は同時に固定膜上のポジティブコントロール A F P と結合し、A F P - ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗体の複合物を形成した。5 秒後、血清液体浸透性膜片は膜片の下の吸水材に吸水された。

【0057】

10 μ L の P B S T を滴下して洗浄し、非特異的結合を除去し、5 回繰り返し、H R P 発色基質を添加し、1 分間遮光し、10 μ L の P B S T を滴下して洗浄した。陽性血清の検出斑は青色を呈した。

【0058】

以上から分かるように、本考案は、精密ろ過膜を使用し、血清試料中の複数種の抗原または抗体の一度の同時検出を短時間内に実現し、その検出過程は 3 ~ 5 m i n のみで完成でき、検出時間が短く、コストが低く、安定性が良い等の利点を有する。

【0059】

本考案は、上記実施例によって本考案の詳細な構造的特徴を説明したが、本考案は上記詳細な構造的特徴に限定されるものではなく、すなわち、本考案は上記詳細な構造的特徴に依存して実施しなければならないことを意味するものではないことを、出願人より声明する。当業者であれば、本考案に対するいかなる改良、本考案に使用される部材に対する等価的な置換および補助部材の追加、具体的な方式の選択等は、全て本考案の保護範囲および開示範囲内に含まれることを理解すべきである。

【0060】

以上、本考案の好ましい実施形態を詳細に説明したが、本考案は上記実施形態における具体的な内容に限定されるものではなく、本考案の技術的思想の範囲内で、本考案の技術案に対して様々な簡単な変形を行うことができ、これらの簡単な変形は全て本出願の実用新案登録請求の範囲に属している。

【0061】

なお、上記具体的な実施形態に説明した各具体的な技術的特徴は、矛盾なき限り、いかなる適切な形態で組み合わせることができ、必要がない重複を回避するために、本出願では様々な可能な組み合わせの形態については特に説明しない。

【0062】

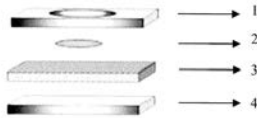
また、本出願の各種の異なる実施形態の間も任意に組み合わせることができ、本出願の思想に違反しない限り、同様に本出願の開示内容と見なすべきである。

10

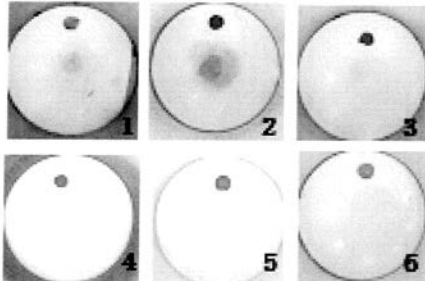
20

30

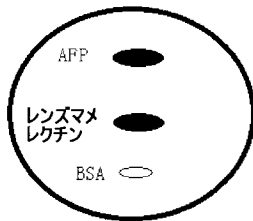
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【手続補正書】

【提出日】平成31年1月23日(2019.1.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【考案の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本考案はタンパク質検出の技術分野に関し、特に、血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置に関する。

【背景技術】

【0002】

原発性肝癌および肝炎、肝硬変等の良性肝臓疾患が発生した α -フェトプロテイン (alpha fetoprotein、AFP) は、その糖鎖構造に大きな違いが存在し、すなわち、良性肝臓疾患と比べ、肝癌が発生した AFP は、そのフコースの指数が非常に高い。フコースは、レンズマメレクチンと結合する特性を有する。AFP は、その (フコシル) のレンズマメレクチンに対する親和力に応じて、AFP-L1、AFP-L2、および AFP-L3 に分けることができる。そのうち、AFP-L1 は主に良性肝臓疾患に由来し、AFP-L2 は主に妊婦に由来し、AFP-L3 は α -フェトプロテインのフコースのグルコシル化形式であり、主に肝細胞癌 (Hepato Cellular Carcinoma、HCC) に由来する。2005年、FDA は、AFP-L3 を原発性肝癌のマーカーの1つとすることを正式に承認した。AFP-L3 は、肝癌の早期診断、鑑別診断、治療効果評価、および予後判定と監視等の面でいずれも高い特異性および感受性を

有する。

【0003】

フコースはメチル化六炭糖であり、組織および血清等の複数種の糖タンパク質の糖鎖に存在し、タンパク結合フコース (protein-bound fucose、P-bf) と呼ばれている。AFP炭水化物鎖にフコース残基が存在し、このような異質体はフコシル化AFP (FucAFP) と呼ばれ、重要な理論的意義と臨床応用意義を有し、肝癌診断および予後応用において、1つの重要な指標とすることができる。

【0004】

従来 of 血清フコースタンパク質の分離方法は、交差親和免疫電気泳動技術、アフィニティーブロッティング、アフィニティークロマトグラフィー、「2部位サンドイッチ」酵素結合免疫吸着法、LiBASys測定装置、μTASWako (登録商標) i30検出システム技術、および熱景生物 (社名) のグリコシル捕獲遠心カラム前処理技術を含む。そのうち、フィットヘムアグルチニン親和免疫電気泳動技術およびμTASWako (登録商標) i30検出システム技術は、要求が高く、操作が煩雑で、試薬が高価であるため、その普及と応用が制限されている。グリコシル捕獲遠心カラムは、試料処理および検出が別々に行われるため、操作の煩雑さが増える。

【考案の概要】

【考案が解決しようとする課題】

【0005】

現在のフコースタンパク質分離方法に存在する問題に対し、本考案の目的は、血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置を提供することであり、前記免疫透析濾過装置は、生物試料におけるフコシル化 - フェトプロテインの検出に特に適用し、且つ、各種のフコシル化タンパク質に対して汎用性を有する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

この目的を達成するために、本考案は以下の技術案を採用する。

【0007】

第1の態様において、本考案は、

- (1) - フェトプロテイン抗原とレンズマメレクチンとを精密ろ過膜に複合するステップと、
 - (2) 血清試料を精密ろ過膜に滴下し、試料中のフコシル化 - フェトプロテインを精密ろ過膜上のレンズマメレクチンと結合させるステップと、
 - (3) 精密ろ過膜に酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体を滴下し、発色基質を加え、検出結果を得るステップと、
- を含む血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法を提供する。

【0008】

本考案は、精密ろ過膜を使用し、血清試料中の複数種の抗原または抗体の一度の同時検出を短時間内に実現し、その検出過程は3~5minのみで完成できる。タンパク質チップを採用するものと比べ、本考案に係る免疫透析濾過検出方法は、検出時間が短く、コストが低く、安定性が良い等の利点を有する。

【0009】

本考案の免疫透析濾過方法は、捕獲されたタンパク質をニトロセルロース膜に固定し、負の電荷を帯びている抗体とニトロセルロース膜とが疎水作用を起こして高親和力で結合する。且つ、HRPおよび発色基質を用いて反応して青っぽい茶色の安定した生成物を生成することにより、該生成物は長時間安定して存在することができ、時間の経過に従って徐々に弱くなったり消えたりすることがなく、観察結果は時間帯によって誤差を生じることがなく、結果の安定性が良い。更に、本考案の免疫透析濾過方法は、結果のスキャン分析を行う機器が不要で、5min内に目視で結果を観察して判断することができる。また、本考案の免疫透析濾過方法は室温のみで完成でき、保温箱が不要である。

【0010】

本考案に係る免疫透析濾過検出方法は、生物試料中のフコシル化 - フェトプロテインの検出に適用し、且つ、各種のフコシル化タンパク質に対して汎用性を有する。

【0011】

本考案におけるフコシル化 - フェトプロテインとは、 - フェトプロテイン炭水化物鎖にフコース残基が存在する異質体を指す。

【0012】

本考案によれば、ステップ(1)における - フェトプロテイン抗原は原核発現ヒト - フェトプロテイン抗原であり、真核発現 - フェトプロテイン抗原を選択してもよく、ここでは特に限定しない。

【0013】

本考案によれば、ステップ(3)における酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体である。

【0014】

本考案によれば、ステップ(3)における酵素は西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)であり、アルカリホスファターゼ(ALP)であってもよく、酵素の基質発色の実現に用いられる。

【0015】

本考案によれば、前記血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法は、

(1) - フェトプロテイン抗原とレンズマメレクチンとを精密ろ過膜に複合するステップと、

(2) 10 ~ 15 μ Lの血清試料を精密ろ過膜に滴下し、試料中のフコシル化 - フェトプロテインと精密ろ過膜上のレンズマメレクチンとを結合させた後、ブロッキング液で洗浄し、非特異的結合物を除去するステップと、

(3) 精密ろ過膜に酵素で標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体を滴下し、3 ~ 5 s インキュベートした後、ブロッキング液で洗浄し、非特異的結合物を除去し、発色基質発色液を添加するステップと、
を含むことができ、

陽性血清の場合、 - フェトプロテイン抗原およびフコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは青色を示し、陰性血清の場合、 - フェトプロテイン抗原の検出エリアは青色を示し、フコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは発色しない。ネガティブコントロールは陽性血清であっても陰性血清であっても発色しない。

【0016】

例示的に、前記免疫透析濾過方法は、具体的に以下のステップを含むことができる。

【0017】

試料の検出：

検出待ちの血清試料を希釈してから精密ろ過膜を含む検出エリアに滴下し、インキュベートした後、PBSTで検出エリアを洗浄し、非特異的結合物を除去し、PBSにより希釈したHRPで標識したAFP抗体を添加し、インキュベートした後、PBSTで洗浄し、非特異的結合物を除去し、HRP基質発色液を添加し、目視で結果を観察する。

【0018】

本考案によれば、前記インキュベートとは、室温で3 ~ 5 s インキュベートすることを意味し、例えば、3 s、3.5 s、4 s、4.5 sまたは5 s インキュベートする。

【0019】

本考案によれば、前記血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過方法は、以下のような免疫透析濾過装置内で行うことができるが、これらに限定されない。

【0020】

血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置は精密ろ過膜を含み、精密ろ過膜のマトリックスは、少なくとも1つの検出エリアが設けられ、前記検出エリア内にポジティブコントロール検出サブエリア、血清フコースタンパク質検出サブエリア、およびネガティブコントロール検出サブエリアが設けられ、ポジティブコントロール検出サブエリアに

- フェトプロテインが固定され、血清フコースタンパク質検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、ネガティブコントロール検出サブエリアにウシ血清アルブミンが固定され、同一の検出サブエリア内の検出斑上の物質濃度は同じである。検出サブエリアおよび対照エリアはそれぞれ少なくとも1つの検出斑を含み、例えば、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ等であってもよい。

【0021】

本考案における免疫透析濾過装置は、強靱なプラスチック製品、紙の吸水材、およびニトロセルロース膜で構成され、衝撃や衝突に耐えることができ、壊れにくい。

【0022】

本考案において、前記精密ろ過膜のマトリックスは1つの検出エリアを有し、前記検出サブエリアはそれぞれ1つの検出斑を有し、前記ポジティブコントロール検出サブエリアおよびネガティブコントロール検出サブエリアはそれぞれ1つの対照斑を有し、前記 - フェトプロテインは原核発現ヒト - フェトプロテインである。

【0023】

本考案の免疫透析濾過装置は、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体および発色基質液を更に含み、前記西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体であり、前記免疫透析濾過装置は、洗浄と希釈用のP B S TおよびP B Sブロッキング液を更に含む。

【0024】

本考案は、精密ろ過膜を有する免疫透析濾過装置を採用することが好ましく、タンパク質チップと比べ、検出時間が短く、コストが低く、安定性が良い等の利点を有し、検出過程を3~5minにコントロールすることができる。

【0025】

第2の態様において、本考案は、免疫透析濾過装置の精密ろ過膜のマトリックスは、少なくとも1つの検出エリアを含み、前記検出エリア内にポジティブコントロール検出サブエリア、血清フコースタンパク質検出サブエリア、およびネガティブコントロール検出サブエリアが設けられ、ポジティブコントロール検出サブエリアに - フェトプロテインが固定され、血清フコースタンパク質検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、ネガティブコントロール検出サブエリアにウシ血清アルブミンが固定され、同一の検出サブエリア内の検出斑上の物質濃度は同じである血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置を更に提供する。

【0026】

本考案によれば、前記検出サブエリアはそれぞれ少なくとも1つの検出斑を含み、例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ等であってもよい。

【0027】

本考案によれば、前記精密ろ過膜のマトリックスは1つの検出エリアを有し、前記検出サブエリアはそれぞれ1つの検出斑を有し、前記ポジティブコントロール検出サブエリアおよびネガティブコントロール検出サブエリアはそれぞれ1つの対照斑を有する。

【0028】

本考案によれば、前記 - フェトプロテインは原核発現ヒト - フェトプロテインである。

【0029】

本考案によれば、前記免疫透析濾過装置は、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体および発色基質液を更に含む。

【0030】

本考案によれば、前記西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体である。

【0031】

本考案によれば、前記免疫透析濾過装置は洗浄と希釈用のP B S TおよびP B Sブロッキング液を更に含む。

【0032】

本考案は、免疫透析濾過装置の、非診断および/または非治療目的の血清フコースタンパク質の検出における使用を更に提供する。

【考案の効果】

【0033】

従来の技術案と比べ、本考案は少なくとも以下の有益な効果を有する。

【0034】

(1) 本考案は、精密ろ過膜を使用することにより、血清試料中の複数種の抗原または抗体の一度の同時検出を短時間内に実現し、本考案に係る免疫透析濾過検出方法は、血清フコースタンパク質を正確に検出することができ、検出時間が短く、安定性が良く、コストが低い等の利点を有する。

【0035】

(2) 本考案に係る免疫透析濾過装置は、必要な原材料および機器設備のコストが全て大幅に減少し、免疫透析濾過の装置は紙およびプラスチック製品であり、コストが非常に低く、約1元人民元であり、実験フローにおける準備、インキュベート、結果のスキャンを行うための機器設備が不要であり、検出コストおよび費用を大幅に低減する。

【0036】

(3) 本考案の免疫透析濾過方法は時間の面で他の方法と比べ、ELISA検出は少なくとも3hが必要で、タンパク質チップ検出は1.5hが必要であるが、本考案は3~5minのみが必要であり、検出時間は大きく短縮される。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】本考案の免疫透析濾過装置の模式図であり、1は蓋で、2は精密ろ過膜で、3は紙の吸水材で、4はプラスチック基板である。

【図2】本考案の免疫透析濾過方法の結果模式図であり、1~3は陽性結果で、NC膜の上方のポジティブコントロール検出斑は青っぽい茶色の陽性信号を呈し、真ん中のレンズマメレクチン検出斑は青っぽい茶色の陽性信号を呈し、下方のBSA対照斑は発色しない。4~5は陰性結果で、NC膜の上方のポジティブコントロール検出斑は青っぽい茶色の陽性信号を呈し、真ん中のレンズマメレクチン検出斑および下方のBSA対照斑は発色しない。

【図3】免疫透析濾過ニトロセルロース膜を調製する模式図であり、ポジティブコントロール検出サブエリアにAFPが固定され、真ん中の検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、ネガティブコントロール検出サブエリアにBSAが固定される。

【0038】

以下、本考案について更に詳細に説明する。しかし、下記実施例は、本考案の簡単な例に過ぎず、本考案の実用新案登録請求の範囲を代表または制限するものではなく、本考案の保護範囲は実用新案登録請求の範囲を基準にする。

【考案を実施するための形態】

【0039】

以下、図面を参照しながら具体的な実施形態により、本考案の技術案について更に説明する。

【0040】

図1に示すように、本考案における免疫透析濾過装置の構造模式図であり、該免疫透析濾過装置は精密ろ過膜を有し、蓋1、精密ろ過膜2、紙の吸水材3、およびプラスチック基板4が上から下へ順に構成される。組み立ての場合、精密ろ過膜を事前に直径が約1.5cmの円形に裁断し、紙の吸水材3をプラスチック基板4内に置き、紙の吸水材の上面の中央に予め裁断された精密ろ過膜2を置いた後、蓋1を被せる。

【0041】

本考案に使用される精密ろ過膜はニトロセルロース膜であってもよく、本考案では、GE Healthcare RPN303Bを使用する。紙の吸水材は吸水紙であってもよ

く、蓋および基板は全てプラスチック製品を使用する。

【0042】

図2に示すように、本考案の免疫透析濾過方法を採用する結果模式図であり、陽性血清の場合（図2における1～3）、ポジティブコントロールおよびフコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは全て青色を示し、陰性血清の場合（図2における4～6）であれば、フコシル化 - フェトプロテインの検出エリアは発色せず、ポジティブコントロールは青色を示す。陽性血清であっても陰性血清であっても、ネガティブコントロールは全て発色しない。

【0043】

図3は免疫透析濾過ニトロセルロース膜を調製する模式図であり、ポジティブコントロール検出サブエリアにAFPが固定され、真ん中の検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、ネガティブコントロール検出サブエリアにBSAが固定される。

【0044】

本考案をより良好に説明し、本考案の技術案を理解しやすいために、本考案の典型的かつ非限定的な実施例は以下のとおりである。

【0045】

実施例1 免疫透析濾過装置の調製および使用フロー

実験に使用する試薬および機器：原核発現AFP（米国abcam社）、レンズマメレクチン（Sigma社）、ニトロセルロース膜（GE Healthcare）、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したウサギ由来抗体（米国abcam社）、HRP発色基質液（米国Millipore社）。

【0046】

PBS処方：塩化ナトリウム（NaCl）8g、塩化カリウム（KCl）0.2g、リン酸水素二ナトリウム（ Na_2HPO_4 ）1.44g、リン酸二水素カリウム（ KH_2PO_4 ）0.24gであり、pHを7.4に調整し、1Lに定容した。

【0047】

PBST処方：PBS、1L + Tween - 20、1mL。

【0048】

ニトロセルロース膜（GE Healthcare）は、各免疫透析濾過装置に1つの検出エリアを含み、それぞれの検出エリアで1つの血清を検出することができ、AFP L3マーカーを一度に検出した。

【0049】

各検出エリアにおいて、それぞれ0.5μLのネズミ由来の原核発現ヒトAFP（米国abcam社）とレンズマメレクチン（Sigma社）とをニトロセルロース膜に順にスポットし、スポット濃度はAFPが0.5mg/mLであり、レンズマメレクチンが4mg/mLである。0.5μLの10%のウシ血清アルブミン（BSA）を対照斑にスポットしてネガティブコントロールとした。

【0050】

免疫透析濾過の操作フロー：

調製された免疫透析濾過装置を使用し、健康対照グループおよび肝癌実験グループの動的血清検体におけるAFP L3腫瘍マーカーを検出した。

【0051】

室温条件で、10μLの血清試料を免疫透析濾過装置の膜片に滴下し、レンズマメレクチンとフコスの結合の特性を利用し、レンズマメレクチンを血清中のフコースと結合させてレンズマメレクチン抗原複合物を形成した。3秒後、血清液体浸透性膜片は膜片の下の吸水材に吸水された。

【0052】

10μLのPBSTを滴下して洗浄し、非特異的結合を除去し、3回繰り返した。また、PBSにより希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したウサギ由来一次抗体を添加し、ウサギ由来抗体は血清中のAFP抗原と結合し、レンズマメレクチン - (AFP)フ

コース - ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗体の複合物を形成した。ウサギ由来抗体は同時に固定膜上のポジティブコントロール A F P と結合し、A F P - ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗体の複合物を形成した。3 秒後、血清液体浸透性膜片は膜片の下の吸水材に吸水された。

【0053】

10 μ L の P B S T を滴下して洗浄し、非特異的結合を除去し、3 回繰り返し、H R P 発色基質を添加し、1 分間遮光し、10 μ L の P B S T を滴下して洗浄した。陽性血清の検出斑は青色を呈した。

【0054】

実施例 2

調製された免疫透析濾過装置を使用し、健康対照グループおよび肝癌実験グループの動的血清検体における A F P L 3 腫瘍マーカーを検出した。

【0055】

室温条件で、2.5 μ L の血清試料を 4 倍希釈した後、免疫透析濾過装置の膜に滴下し、レンズマメレクチンとフコースの結合の特性を利用し、レンズマメレクチンを血清中のフコースと結合させてレンズマメレクチン抗原複合物を形成した。5 秒後、血清液体浸透性膜片は膜片の下の吸水材に吸水された。

【0056】

10 μ L の P B S T を滴下して洗浄し、非特異的結合を除去し、5 回繰り返した。また、P B S により希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したウサギ由来一次抗体を添加し、ウサギ由来抗体は血清中の A F P 抗原と結合し、レンズマメレクチン - (A F P) フコース - ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗体の複合物を形成した。ウサギ由来抗体は同時に固定膜上のポジティブコントロール A F P と結合し、A F P - ウサギ由来西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗体の複合物を形成した。5 秒後、血清液体浸透性膜片は膜片の下の吸水材に吸水された。

【0057】

10 μ L の P B S T を滴下して洗浄し、非特異的結合を除去し、5 回繰り返し、H R P 発色基質を添加し、1 分間遮光し、10 μ L の P B S T を滴下して洗浄した。陽性血清の検出斑は青色を呈した。

【0058】

以上から分かるように、本考案は、精密ろ過膜を使用し、血清試料中の複数種の抗原または抗体の一度の同時検出を短時間内に実現し、その検出過程は 3 ~ 5 m i n のみで完成でき、検出時間が短く、コストが低く、安定性が良い等の利点を有する。

【0059】

本考案は、上記実施例によって本考案の詳細な構造的特徴を説明したが、本考案は上記詳細な構造的特徴に限定されるものではなく、すなわち、本考案は上記詳細な構造的特徴に依存して実施しなければならないことを意味するものではないことを、出願人より声明する。当業者であれば、本考案に対するいかなる改良、本考案に使用される部材に対する等価的な置換および補助部材の追加、具体的な方式の選択等は、全て本考案の保護範囲および開示範囲内に含まれることを理解すべきである。

【0060】

以上、本考案の好ましい実施形態を詳細に説明したが、本考案は上記実施形態における具体的な内容に限定されるものではなく、本考案の技術的思想の範囲内で、本考案の技術案に対して様々な簡単な変形を行うことができ、これらの簡単な変形は全て本出願の実用新案登録請求の範囲に属している。

【0061】

なお、上記具体的な実施形態に説明した各具体的な技術的特徴は、矛盾なき限り、いかなる適切な形態で組み合わせることができ、必要がない重複を回避するために、本出願では様々な可能な組み合わせの形態については特に説明しない。

【0062】

また、本出願の各種の異なる実施形態の間も任意に組み合わせることができ、本出願の思想に違反しない限り、同様に本出願の開示内容と見なすべきである。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 実用新案登録請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【実用新案登録請求の範囲】

【請求項 1】

血清フコースタンパク質を検出する免疫透析濾過装置であって、前記免疫透析濾過装置の精密ろ過膜(2)のマトリックスは、少なくとも1つの検出エリアを含み、前記検出エリア内にポジティブコントロール検出サブエリア、血清フコースタンパク質検出サブエリア、およびネガティブコントロール検出サブエリアが設けられ、前記ポジティブコントロール検出サブエリアに - フェトプロテインが固定され、前記血清フコースタンパク質検出サブエリアにレンズマメレクチンが固定され、前記ネガティブコントロール検出サブエリアにウシ血清アルブミンが固定され、同一の検出サブエリア内の検出斑上の物質濃度は同じである、ことを特徴とする免疫透析濾過装置。

【請求項 2】

前記検出サブエリアはそれぞれ少なくとも1つの検出斑を含む、ことを特徴とする請求項1に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 3】

前記精密ろ過膜(2)のマトリックスは1つの検出エリアを有し、前記検出サブエリアはそれぞれ1つの検出斑を有し、前記ポジティブコントロール検出サブエリアおよび前記ネガティブコントロール検出サブエリアはそれぞれ1つの対照斑を有する、ことを特徴とする請求項1又は2に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 4】

前記 - フェトプロテインは原核発現ヒト - フェトプロテインである、ことを特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 5】

前記免疫透析濾過装置は、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体および発色基質液を更に含む、ことを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 6】

前記西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した - フェトプロテインポリクローナル抗体はウサギ由来抗体である、ことを特徴とする請求項5に記載の免疫透析濾過装置。

【請求項 7】

前記免疫透析濾過装置は、洗浄と希釈用の P B S T および P B S ブロッキング液を更に含む、ことを特徴とする請求項1~6のいずれか1項に記載の免疫透析濾過装置。

フロントページの続き

(73)実用新案権者 519022492

李 寧

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

(73)実用新案権者 519022779

張 愛英

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

(73)実用新案権者 519022780

王 昇啓

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

(73)実用新案権者 519022791

柯 楊

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

(74)代理人 110002664

特許業務法人ナガトアンドパートナーズ

(72)考案者 李 寧

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

(72)考案者 張 愛英

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

(72)考案者 王 昇啓

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

(72)考案者 柯 楊

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

(72)考案者 金 栄華

中国 ベイジン、 フェンタイ ディストリクト、ユアンメン ワイ、ジ トウ ティアオ、 ナ
ンバー 8

专利名称(译)	用于检测血清岩藻糖蛋白的免疫渗滤装置		
公开(公告)号	JP3222251U	公开(公告)日	2019-07-25
申请号	JP2019600070U	申请日	2017-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京谷安讷医院首都医科大学 首都医科大学附属北京佑安医院 李宁 王升启 柯杨		
申请(专利权)人(译)	北京Yuuan医院, 首都医科大学 李 宁		
当前申请(专利权)人(译)	北京Yuuan医院, 首都医科大学 李 宁		
[标]发明人	李 寧 張愛英 柯 楊		
发明人	李 寧 張 愛英 王 昇啓 柯 楊 金 榮華		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N33/68 G01N2800/7028 G01N33/54386 G01N2333/471 G01N2333/4724 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/574.B		
优先权	201610579801.7 2016-07-21 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种免疫渗滤装置，该装置能够在短时间内实现血清样品中多种抗原或抗体的同时检测，检测时间短，成本低，稳定性好。 解决方案：免疫渗滤装置的微滤膜2的基质中包括至少一个检测区域，并且在检测区域中提供阳性对照检测子区域，血清岩藻糖蛋白质检测子区域和阴性对照检测子区域。将β-胎蛋白固定在阳性对照检测分区中，将扁豆凝集素固定在血清岩藻糖蛋白检测分区中，将牛血清白蛋白固定在阴性对照检测分区中，并将其固定在相同的检测分区中。检测点上的物质浓度是相同的。 [选图]图1

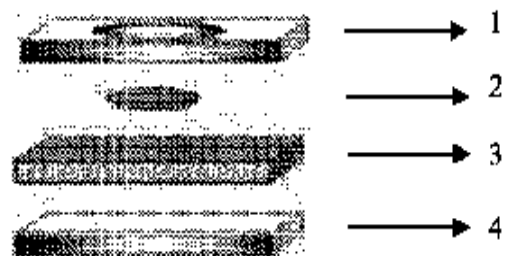


图 1