



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110418965 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201880018271.6

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

2017-049155 2017.03.14 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/009898 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/168906 JA 2018.09.20

(71)申请人 电化生研株式会社

地址 日本东京

(72)发明人 加藤大介 村松志野 服部友洋

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 纪秀凤

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54)发明名称

可防止非特异反应的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱试验片

(57)摘要

提供一种免疫色谱试验片,在在免疫色谱试验片上通过亚硝酸提取来提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱法中,通过使包含亚硝酸的展开液高效且持续地与中和试剂接触来进行中和,从而防止非特异反应。该免疫色谱试验片包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体时具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体时具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,其中,含浸有中和

试剂的区域的原材料是具有吸收性高、保水性高、且释放性低或释放性持续这三种特性的滤纸或玻璃纤维滤纸,通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的低释放性或持续释放性,抑制残留的酸性溶液到达检测区域或使经充分中和的试验液持续向检测区域展开,从而抑制非特异反应。

1. 一种免疫色谱试验片,用于提取并测定检体中的糖链抗原,其特征在于,该免疫色谱试验片包括:

样品垫,用于添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体;

标记体区域,包含有将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体;及

检测区域,对所述糖链抗原的抗体进行了固相化,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,

该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体时具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体时具有含浸有亚硝酸盐的区域,其中,

含浸有中和试剂的区域的原材料是具有吸收性高、保水性高且释放性低或释放性持续这三种特性的滤纸或玻璃纤维滤纸,

通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的低释放性或持续释放性而抑制残留的酸性溶液到达检测区域或使经充分中和的试验液持续向检测区域展开,从而抑制非特异反应。

2. 一种免疫色谱试验片,包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体时具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体时具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,所述免疫色谱试验片的特征在于,

含浸有中和试剂的区域的原材料是克重为 $10\sim 400\text{g}/\text{m}^2$,且厚度为 $0.1\sim 2.0\text{mm}$ 的织物。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫色谱试验片,其特征在于,

所述织物的每 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的吸水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$,且吸水速度为 $1.0\sim 5.0\mu\text{l}/\text{sec}$,进而将 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的片段在润湿状态下与检测区域接触,静置5分钟后,保水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$,将 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的片段在润湿状态下与膜接触,静置5分钟后,溶液扩散面积为 20mm^2 以下。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫色谱试验片,其特征在于,

通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的释放性的持续力,即使残留的酸性溶液到达检测区域时,也通过蓄积充分的中和能力而抑制非特异反应。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的免疫色谱试验片,其特征在于,

通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的低释放性,抑制残留的酸性溶液到达检测区域,在阴性的情况下抑制非特异反应,在阳性的情况下防止判定时间以后的条带显色。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的免疫色谱试验片,其特征在于,

含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域存在于样品垫上或涂布有标记体区域的垫上。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的免疫色谱试验片,其特征在于,

固态酸性试剂选自丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的免疫色谱试验片,其特征在于,

中和试剂是三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的免疫色谱试验片,其特征在于,

糖链抗原是原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

10. 一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用权利要求1~9中任一项所述的免疫色谱试验片,通过免疫色谱法测定检体中的糖链抗原,所述测定检体中的糖链抗原的方法包括:

当免疫色谱试验片具有含浸有固态酸性试剂的区域时,将检体与亚硝酸溶液混合,当免疫色谱试验片具有含浸有亚硝酸盐的区域时,将检体与酸性溶液混合,并添加至所述免疫色谱试验片的样品垫,

在含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸盐的区域中,通过亚硝酸盐与固态酸性试剂反应产生的亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原,在含浸有中和试剂的区域,包含所述糖链抗原的酸性溶液被中和,

在检测区域中,形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,所述方法通过免疫色谱法,通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的低释放性或持续释放性,抑制残留的酸性溶液到达检测区域或使经充分中和的试验液持续向检测区域展开,从而抑制非特异反应,并测定检体中的糖链抗原。

可防止非特异反应的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱 试验片

技术领域

[0001] 本发明涉及一种能够在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱试验片。

背景技术

[0002] 很多以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂被作为快速且简便地测定病毒或细菌感染症、并确定治疗方案的一种手段而广泛使用。

[0003] 一般的以免疫色谱法为原理的快速诊断试剂能够通过将检体悬浮于检体悬浮液后,将该悬浮液供给至免疫色谱试验片来快速且简便地进行测定。

[0004] 为了检测A组β溶血性链球菌(A组β溶链菌)、口腔内链球菌等属于链球菌属的微生物,需要提取糖链抗原,并对糖链抗原进行测定。

[0005] 例如,报告有通过如下操作即可在免疫色谱试验片上进行亚硝酸提取处理的方法:事先使免疫色谱试验片含有亚硝酸钠和中和试剂,将检体悬浮于乙酸等酸性溶液并供给至免疫色谱试验片(专利文献1)。

[0006] 另外,也有使免疫色谱试验片预先包含酸性试剂和中和试剂,将检体悬浮在亚硝酸盐中供给到免疫色谱试验片的方法。

[0007] 目前市售的利用免疫色谱法的A组β溶血性链球菌抗原检测试剂大多是利用下面的方法:在试验刚开始前混合亚硝酸盐溶液和酸溶液这两种液体,产生酸性亚硝酸,由产生的亚硝酸提取抗原用于试验,或者利用将含浸了酸性试剂的垫组装到免疫色谱装置(免疫色谱试验片)中,在免疫色谱试验片上产生亚硝酸,提取抗原的方法。在该方法中,需要中和所产生的酸性亚硝酸,在免疫色谱试验片上事先以干燥状态包含中和试剂,利用该中和试剂中和亚硝酸。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:国际公开W02005/121794号公报。

发明内容

[0011] 发明要解决的课题

[0012] 目前市售的利用免疫色谱法的A组β溶血性链球菌抗原检测试剂大多将亚硝酸盐溶液和酸溶液混合而产生的酸性亚硝酸用于抗原的提取,含有用于抗原提取的亚硝酸的展开液在用免疫色谱试验片上所含的干燥状态的中和试剂中和后,使抗原抗体反应进行测定。但是,在该以往的方法中,存在产生非特异反应的问题。

[0013] 本发明的目的在于提供一种免疫色谱试验片,在在免疫色谱试验片上通过亚硝酸提取来提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱法中,通过使包含亚硝酸的展开液高效且持续地与中和试剂接触来进行中和,从而防止非特异反应。

[0014] 用于解决课题的方案

[0015] 本发明人为了解决在以往的方法中在免疫色谱试验片上通过亚硝酸提取来提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱法中经过一定时间后发生非特异反应的问题点进行了深入研究。

[0016] 本发明人等发现,在以往的方法中,经过一定时间后,中和试剂被残留在免疫色谱试验片的上游的酸全部消耗,免疫色谱试验片上的展开液整体偏酸性,结果发生非特异反应。

[0017] 因此,考虑用免疫色谱试验片上的中和试剂可靠且持续地中和用于亚硝酸提取的酸,或者使残留在免疫色谱试验片的上游的酸停留在上游而不到达发生抗原抗体反应的检测区域。

[0018] 本发明人等发现,作为含浸有中和试剂的区域中使用的多孔性材料,通过使用为克重 $10\sim 400\text{g}/\text{m}^2$ 、且厚度 $0.1\sim 2.0\text{mm}$ 的织物的、吸收性高、保水性高、且可长时间(1小时以上)持续地释放中和剂的原材料,即使在酸经过一定时间后(例如作为判定时间的5分钟以后)一点一点地向测试条的下游展开时,也能够维持充分的中和能力,抑制非特异反应。而且,发现在使用吸收性和保水性高、释放性低的玻璃纤维滤纸的情况下,经过一定时间后,含浸在样品垫中的酸移动到中和垫时,酸从该区域被释放,抑制其到达发生抗原抗体反应的检测区域,结果,阴性的情况下,抑制非特异反应,在最小检测灵敏度附近的阳性检体的情况下,防止在判定时间以后条带显色,从而完成了本发明。

[0019] 即,本发明如下。

[0020] [1]一种免疫色谱试验片,包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将上述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在上述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体时具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体时具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,其中,

[0021] 含浸有中和试剂的区域的原材料是具有吸收性高、保水性高、且释放性低或释放性持续这三种特性的滤纸或玻璃纤维滤纸,

[0022] 通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的低释放性或持续释放性,抑制残留的酸性溶液到达检测区域或使经充分中和的试验液持续向检测区域展开,从而抑制非特异反应。

[0023] [2]一种免疫色谱试验片,包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体时具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体时具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,

[0024] 含浸有中和试剂的区域的原材料是克重为 $10\sim 400\text{g}/\text{m}^2$,且厚度为 $0.1\sim 2.0\text{mm}$ 的

织物。

[0025] [3]根据[1]或[2]所述的免疫色谱试验片,所述织物的每 1cm^2 的吸水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$,且吸水速度为 $1.0\sim 5.0\mu\text{l}/\text{sec}$,进而将 1cm^2 的片段在润湿状态下与检测区域接触,静置5分钟后,保水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$,将 1cm^2 的片段在润湿状态下与膜接触,静置5分钟后,溶液扩散面积为 20mm^2 以下。

[0026] [4]根据[1]至[3]中任一项所述的免疫色谱试验片,通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的释放性持续力,即使残留的酸性溶液到达检测区域时,也通过蓄积充分的中和能力而抑制非特异反应。

[0027] [5]根据[1]至[4]中任一项所述的免疫色谱试验片,通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的低释放性,抑制残留的酸性溶液到达检测区域,在阴性的情况下抑制非特异反应,在阳性的情况下防止判定时间以后的条带显色。

[0028] [6]根据[1]至[5]中任一项所述的免疫色谱试验片,含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域存在于样品垫上或涂布有标记体区域的垫上。

[0029] [7]根据[1]至[6]中任一项所述的免疫色谱试验片,固态酸性试剂选自由丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

[0030] [8]根据[1]至[7]中任一项所述的免疫色谱试验片,中和试剂是三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

[0031] [9]根据[1]至[8]中任一项所述的免疫色谱试验片,糖链抗原为原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0032] [10]一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用[1]~[9]中任一项的免疫色谱试验片,通过免疫色谱法测定检体中的糖链抗原,上述方法包括:

[0033] 当免疫色谱试验片具有含浸有固态酸性试剂的区域时,将检体与亚硝酸溶液混合,当免疫色谱试验片具有含浸有亚硝酸盐的区域时,将检体与酸性溶液混合,并添加至上述免疫色谱试验片的样品垫,

[0034] 在含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸盐的区域中,通过亚硝酸盐与固态酸性试剂反应产生的亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原,在含浸有中和试剂的区域,包含所述糖链抗原的酸性溶液被中和,

[0035] 在检测区域中,形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,所述方法通过免疫色谱法,通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液,并通过含浸有中和试剂的区域的低释放性或持续释放性,抑制残留的酸性溶液到达检测区域或使经充分中和的试验液持续在检测区域展开,从而抑制非特异反应,并测定检体中的糖链抗原。

[0036] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的日本专利申请第2017-049155号的公开内容。

[0037] 发明的效果

[0038] 在本发明的能够在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理的、用于测定A组B溶血性链球菌(A组B溶连菌)抗原的免疫色谱试验片中,将在具有吸水性高、保水性

(液体保持力)高、液体释放性低或持续这三个特性的原材料中含浸中和试剂而得的垫配置在抗原提取部位的下游且标记部位的上游的位置,通过该构造,能够抑制经过时间后的非特异反应。

附图说明

[0039] 图1为模式性地示出具有固态酸性试剂区域和中和试剂区域的免疫色谱试验片(一片垫试验片)的构造的图。

[0040] 图2是示意性地示出具有固态酸性试剂区域及中和试剂区域的免疫色谱试验片(两张垫试验片)的构造的图。

具体实施方式

[0041] 以下,对本发明进行详细的说明。

[0042] 本发明涉及一种能简便化地在免疫色谱试验片上进行糖链抗原的亚硝酸提取处理,能够快速并准确地对被检测物质即糖链抗原进行测定的免疫色谱试验片。

[0043] 免疫色谱试验片具备:具有捕捉被检测物质(抗原等)的抗体(抗体1)被固定化的检测区域的支撑体、具有可移动的标记抗体(抗体2)的标记体区域、添加检体的样品垫、吸收展开后的检体液的吸收带和用于将该些部件贴合为一体的后衬片材等。

[0044] 本发明的免疫色谱试验片也可收容于存放容器内,该存放容器能够防止例如紫外线或空气中的湿气导致的劣化。此外,当使用有污染性、感染性的检体样本时,存放容器能够防止进行分析的试验者带来污染或感染。例如,使用适当大小的树脂制成的盒子作为存放容器,将本发明的装置收纳于该盒子中即可。此外,可以用树脂制成的膜等(顶部层压体)覆盖对抗原或抗体进行了固定化的试验片的表面。有时将存放容器和收容于其中的试验片一并称为免疫色谱装置。

[0045] 需要说明的是,检测区域的数量和标记体区域中所包含的标记抗体的种类不限于一个,可以通过使用对应于多个被检测物质的抗体,在同一试验片上对两个以上的抗原进行测定。

[0046] 支撑体为拥有对用于捕捉被检测物质(抗原)的抗体进行固定化的性能的材料,且拥有不妨碍液体在水平方向通行的性能。优选地,为具有毛细管作用的多孔性薄膜(膜),为能够通过吸收而将液体和分散于其中的成分进行输送的材料。对构成支撑体的材质不做特别限制,例如可列举纤维素、硝基纤维素、纤维素乙酸酯、聚偏二氟乙烯(PVDF)、玻璃纤维、尼龙、聚酮等。其中,更优选为使用硝基纤维素制成的薄膜或膜。将对抗体进行了固定化的膜称为抗体固定化膜。

[0047] 标记体区域由包括标记抗体的多孔性基材构成,基材的材质可以使用常用的玻璃纤维(glass fiber)或无纺布等。为了含浸较多的量的标记抗体,该基材优选厚度为0.3mm~0.6mm程度的垫状。含浸有标记抗体并干燥后的多孔性基材也称为干燥垫。

[0048] 对标记抗体的标记较多使用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶等酶、胶体金等胶体金属、二氧化硅颗粒、纤维素颗粒、着色聚苯乙烯颗粒和着色胶乳颗粒等。当使用胶体金属颗粒、着色聚苯乙烯颗粒或着色胶乳颗粒等着色颗粒时,这些标记试剂凝聚后会发生着色,因此对该着色进行测定。将对抗体进行了固定化的颗粒称为抗体固定化颗粒。

[0049] 检测区域是指捕捉被检测物质(抗原)的抗体被固定化的支撑体的部分区域。检测区域中,至少设置一个对用于捕捉抗原的抗体进行了固定化的区域。检测区域只要包含于支撑体即可,只要在支撑体上对抗体进行固定化即可。

[0050] 样品垫为用于添加检体的部位,为多孔性材料。样品垫为位于免疫色谱试验片的最上游的部位。该材料可使用常用的滤纸、玻璃纤维、无纺布等。为了在免疫测定中使用较多的量的检体,优选为厚度0.3mm~1mm程度的垫状。检体中还包含将检体悬浮于其他溶液而得到的样本等使用检体制备的样本。

[0051] 吸收带为用于吸收被供给至支撑体且在检测区域未参与反应的成分的部件。该材料可以使用由常规的天然高分子化合物、合成高分子化合物等构成的保水性较高的滤纸、海绵等,为了促进检体的展开,优选吸水性较高的物质。

[0052] 后衬片材料为用于将上述的所有材料,即支撑体、样品垫、标记体区域、吸收带等部分重叠地贴附并固定的部件。只要这些材料以最合适的间隔配置并固定即可,虽然不为必须,但从制造上或者使用上的便利性来看,优选常用的后衬片材料。

[0053] 本发明的免疫色谱试验片还可存在对照显示区域(部件)。对照显示区域为指示试验准确实施的部位。例如,对照显示区域存在于检测区域的下游,检体样本通过检测区域到达对照显示区域时,通过着色等发出信号。对照显示区域也可固相化有与结合有标记载体的抗体进行结合的物质,还可固相化有当检体到达时颜色发生变化的pH指示剂等试剂。当结合有标记载体的抗体为小鼠单克隆抗体时,使用抗小鼠IgG抗体即可。

[0054] 对免疫色谱试验片的大小不做限制,例如为纵长度为数cm~十几cm、横长度为数mm~数cm的程度。

[0055] 在上述方式的试验片中,检体通过由样品垫、标记体区域、支撑体、检测区域、吸收带等一系列连接形成的多孔性流路。因此,在本方式中,它们全部为检体移动区域。基于各构成材料的材质或方式,也可能为检体不渗透材料内部而通过表面的方式,由于本说明书所定义的检体移动区域不考虑是材料的内部还是表面,所以该方式的试验片也包含于本说明书的范围内。

[0056] 当使用本发明的免疫色谱试验片对检体中的糖链抗原进行测定时,首先需要提取检体中的糖链抗原。糖链抗原的提取通过用亚硝酸对包含糖链抗原的检体进行处理来进行。可以通过将亚硝酸钠等亚硝酸盐与酸混合产生亚硝酸,使用如上所述产生的亚硝酸对包含糖链抗原的检体进行处理即可。提取的抗原通过抗原抗体反应与固相化于免疫色谱试验片上的抗体结合,此时,反应体系中如果残留有亚硝酸则反应体系为酸性,抗原抗体反应受到阻碍。由此,需要中和反应体系中的亚硝酸。

[0057] 在本发明中,在将亚硝酸盐与酸混合而产生亚硝酸,通过该亚硝酸提取检体中的糖链抗原并将亚硝酸中和后,使糖链抗原与固相化于免疫色谱试验片上的抗体结合,并对糖链抗原进行测定的方法中,作为提取并测定糖链抗原的方法,可以列举以下的方法。在任意一种方法中,亚硝酸对糖链抗原的提取和中和都在免疫色谱试验片上进行。为了在免疫色谱试验片上进行亚硝酸对糖链抗原的提取,只需在免疫色谱试验片上事先含浸酸性试剂或亚硝酸盐即可。为了在免疫色谱试验片上进行中和,只需在免疫色谱试验片上事先含浸中和试剂即可。

[0058] (A) 事先将检体与酸性溶液混合,添加至免疫色谱试验片的含浸有亚硝酸盐和中

和试剂的样品垫,混合液到达含浸有亚硝酸盐的区域后亚硝酸盐与酸反应,产生亚硝酸,提取出检体中的糖链抗原。糖链抗原的提取液在免疫色谱试验片上的含浸有中和试剂的区域被中和,糖链抗原与固相化于免疫色谱试验片上的抗体结合,可进行检测。在该方法中,作为使用的酸性溶液,可列举乙酸、盐酸、丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸、酒石酸等。

[0059] (B) 事先将检体与亚硝酸盐溶液混合,添加至免疫色谱试验片的包含酸性试剂和中和试剂的样品垫,混合液到达包含酸性试剂的区域后亚硝酸盐与酸反应,产生亚硝酸,提取出检体中的糖链抗原。糖链抗原的提取液在免疫色谱试验片上的含浸有中和试剂的区域被中和,糖链抗原与固相化于免疫色谱试验片上的抗体结合,可进行检测。

[0060] 在用于进行上述(A)或(B)的方法的本发明的免疫色谱试验片中,在标记体区域的上游(检体流动的上游且存在样品垫的一侧),即,在样品垫内或样品垫与标记体区域之间含浸有酸性试剂或亚硝酸盐和中和试剂。在样品垫内或样品垫与标记体区域之间含浸有亚硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验片可用于上述(A)的方法。另外,在样品垫内或样品垫与标记体区域之间含浸有酸性试剂和中和试剂的免疫色谱试验片可用于上述(B)的方法。此外,作为酸性试剂,使用固态酸性试剂。通过这些方法,能够不依赖于被检试样的供试验的量而准确、特异性地测定被检试样中的被检测物质。

[0061] 所述固态酸性试剂或亚硝酸盐可含浸于样品垫,也可以含浸于样品垫以外的其他由无纺布等多孔性材料构成的垫,将得到的含浸有固态酸性试剂的多孔性材料或含浸有亚硝酸盐的多孔性材料配置于样品垫与标记体区域之间,即标记体区域的上游侧。其中,含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与样品垫或标记体区域可以接触,也可不接触。

[0062] 在本发明中,将含浸有试剂的区域也称为含浸有试剂的垫。

[0063] 所述中和试剂配置于相比含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域的更下游。中和试剂可以含浸于样品垫,可含浸于支撑体,也可含浸于支撑体以外的其他由无纺布(尼龙等)或织物等多孔性材料构成的垫,将得到的含浸有中和试剂的多孔性材料配置于含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与标记体区域之间。即,在标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进而在该含浸有中和试剂的区域的下游具有含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域。

[0064] 作为含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料,可列举下面的多孔性材料:克重为 $10\sim 400\text{g/m}^2$,且厚度为 $0.1\sim 2.0\text{mm}$ 的织物,并且平均每 1cm^2 的吸水量为 $10\sim 100\mu\text{l/cm}^2$,且吸水速度为 $1.0\sim 5.0\mu\text{l/sec}$,进一步将 1cm^2 的碎片以湿润的状态与膜接触并静置5分钟后的保水量为 $10\sim 100\mu\text{l/cm}^2$,优选地,将 1cm^2 的碎片以湿润的状态与膜接触并静置5分钟后的液体的扩展面积为 20mm^2 以下,即具有吸水力较高、保水性(液体的保持力)较高、且液体的释放性较低或释放性持续这三个特性。具体来说,可列举由纤维素的棉纤维制成的滤纸或玻璃纤维制成的玻璃纤维滤纸等。作为这种滤纸,例如可列举东洋滤纸株式会社的No.26-3。此外,使用的滤纸的容量较大,能够对从上游晚于检体到达的酸性溶液充分进行保持。通过使用这种多孔性材料,能够含浸可对亚硝酸盐和酸性试剂反应产生的亚硝酸提取出糖链抗原的检体充分中和的量的中和试剂。此外,由于该垫能够吸收并保持大量的液体,且释放性可以持续,因此残留于免疫色谱试验片的上游的包含亚硝酸的液体即使在判定时间以后展开时也能够具有足够的中和能力,能够抑制酸性溶液到达抗体被固相化的检测区域,其结果是能够抑制非特异性反应,不发生非特异性反应即可检测糖链

抗原。另一方面,吸水力较高、保水性较高、释放性较低的玻璃纤维滤纸具体来说可列举东洋滤纸株式会社的GS-25,由于吸水力较高,所以能够含浸更多的中和试剂,由于保水性较高、释水性较低,因此能够防止酸性溶液到达进行了固相化的检测区域。其结果是,当为阴性时,能够抑制非特异性反应,当为阳性时,能够防止判定时间以后的条带显色。

[0065] 含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的“克重”为 $10\sim 400\text{g}/\text{m}^2$ 。其中,“克重”是指布等的平均每单位面积(1m^2)的重量。克重可根据含浸于该垫的中和试剂的量或组成适当改变。克重在 $30\text{g}/\text{m}^2$ 以下时空隙率较高,含浸有中和试剂时容易断裂,制造免疫色谱时较难处理,因此优选克重为 $50\text{g}/\text{m}^2$ 以上,当克重为 $300\text{g}/\text{m}^2$ 以上时,空隙率较低,在一些中和试剂的组成中,检体不能顺利地渗透原材料,不能与中和试剂混合,因此优选为 $300\text{g}/\text{m}^2$ 以下。最优选克重为 $250\sim 270\text{g}/\text{m}^2$ 。

[0066] 此外,含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的“厚度”以 $0.1\sim 2.0\text{mm}$ 为宜,厚度可根据含浸于该垫的中和试剂的量或组成做适当改变。当厚度在 0.4mm 以下时,含浸有中和试剂时容易断裂,制造免疫色谱时较难处理,因此厚度优选为 $0.4\sim 0.8\text{mm}$,考虑到含浸的中和试剂的量要易于调节、且制造免疫色谱时的易处理性,更优选为 0.6mm 程度。

[0067] “吸水性”优选为平均每 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的吸水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$,且吸水速度为 $1.0\sim 5.0\mu\text{l}/\text{sec}$ 。吸水量和吸水速度的测定方法如下:在96孔的EIA板的1个格槽中准备 $200\mu\text{l}$ 的染色后溶液($1\%\text{Tween}20$ +红色102号),向其中放入将大小为 $5\times 60\text{mm}$ 的原材料贴附于后衬片材的试验片,将浸渍于溶液的一方作为试验片的下端,测定溶液到达试验片的上端所需的时间,进而在溶液到达上端后,立即取出试验片,测定残留于格槽的液量。吸水量为 $200\mu\text{l}$ 减去格槽中剩余的液量后在原材料平均每 1cm^2 的面积所分配的液量,吸水速度通过吸水量/到达上端所需的时间求出。作为含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料,优选吸水量较多、吸水速度较慢的原材料。基于固态酸性试剂的浓度和含水量,当吸水量在 $30\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 以下时,有时会出现免疫色谱试验片所需的中和试剂无法完全含浸的情况,因此具体来说,优选为吸水量在 $30\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 以上。含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的吸水速度会对检体中的糖链抗原的提取时间和提取后的试验液的中和时间产生影响。通过固态酸性试剂的原材料或组成调节糖链抗原的提取时间时,在一定程度内可行,但并非完全可行,因此含浸中和试剂的区域所使用的原材料的吸水速度对于糖链抗原的充分提取和中和来说成为重要的因素。具体来说,吸水速度优选为 $1.0\sim 5.0\mu\text{l}/\text{sec}$,更优选为吸水速度在 $2.0\mu\text{l}/\text{sec}$ 以下。

[0068] 通过以下方法得到“保水性”:将在含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的碎片置于膜上,向其中添加 $70\mu\text{l}$ 的溶液($1\%\text{Tween}20$ +红色102号),测定5分钟静置前后的重量。保水性的液量基于添加的溶液的组成(表面活性剂或蛋白质的量)而变化,优选为用 $1\%\text{Tween}20$ 溶液进行试验时的保水量为 $10\sim 100\mu\text{l}/\text{cm}^2$,更优选保水量为 $15\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 以上。

[0069] 通过如下方法测定“释放性”:将在含浸中和试剂的区域所使用的多孔性材料的原材料的 $1\text{cm}/\text{m}^2$ 的碎片置于膜上,向其中添加 $70\mu\text{l}$ 的溶液($1\%\text{Tween}20$ +红色102号),求出静置5分钟后膜上扩展的液体的面积。面积基于添加的溶液的组成(表面活性剂或蛋白质的量)而变化,用 $1\%\text{Tween}20$ 溶液进行试验时的面积为 30mm^2 以下,更优选释放性为 20mm^2 以下。

[0070] 在此,含浸有中和试剂的区域与含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域或标记体

区域可以接触,也可以不接触。

[0071] 含浸有固态酸性试剂的区域称为固态酸性试剂区域,含浸有亚硝酸盐的区域称为亚硝酸盐区域,含浸有中和试剂的区域称为中和试剂区域或碱性试剂区域。

[0072] 具有固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域和中和试剂区域的免疫色谱试验片中,在支撑体上从上游开始依次具有样品垫、固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域、中和试剂区域、标记体区域、检测区域和吸收带,固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域可位于样品垫上。此外,样品垫、固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域、中和试剂区域、标记体区域、检测区域和吸收带可以相邻的区域彼此接触,也可不接触。进而,固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域、中和试剂区域、标记体区域不一定要含浸到各自独立的多孔性材料中,多个或所有的区域也可以含浸到同一多孔性材料中。

[0073] 本发明所使用的固态酸性试剂在常温下为固态,在高温下不挥发。

[0074] 作为本发明所使用的优选的固态酸性试剂,可以列举丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸、酒石酸。

[0075] 此外,作为本发明所使用的优选的固态酸性试剂,如果使用例如柠檬酸等价数较高的酸则用更少的量即可提取。此外如果价数相同,则酸解离常数较小的例如马来酸、酒石酸,效率较好。

[0076] 此外,作为本发明所使用的优选的固态酸性试剂,优选为在免疫色谱试验片上不会被着色的试剂,具体来说干燥状态下为白色或不易被干燥热量或氧化着色的试剂。

[0077] 作为本发明所使用的亚硝酸盐,可列举亚硝酸钠、亚硝酸钾等。

[0078] 对本发明所使用的固态酸性试剂或亚硝酸盐的使用量、即含浸于免疫色谱试验片的量不做特别限制,通常,免疫色谱试验片的每试验片平均 $0.01\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ 程度,优选为 $0.1\mu\text{g}\sim 0.1\text{mg}$ 程度。可以理解的是,优选为选择根据使用的固态酸性试剂或亚硝酸盐的种类、检体悬浮液的组成或添加量等能够得到效果的最合适的量。

[0079] 为了将固态酸性试剂或亚硝酸盐含浸于样品垫或多孔性材料,将固态酸性试剂或亚硝酸盐一次性溶解并涂布干燥。

[0080] 本发明所使用的中和试剂在常温下为固态,在高温下不挥发。

[0081] 作为本发明所使用的优选的中和试剂,可以列举Tris碱(三羟甲基氨基甲烷)、氢氧化钠、磷酸氢二钾、柠檬酸三钠、在碱性区域拥有缓冲性能的Good's缓冲剂。

[0082] 对本发明所使用的中和试剂的使用量、即含浸于免疫色谱试验片的量不做特别限制,通常,免疫色谱试验片的每试验片平均为 $0.01\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ 的程度,优选为 $0.1\mu\text{g}\sim 0.1\text{mg}$ 的程度。可以理解的是,优选为选择根据使用的中和试剂的种类、检体悬浮液的组成或添加量等能够得到效果的最合适的量。

[0083] 为了将中和试剂含浸于样品垫或多孔性材料,将中和试剂一次性溶解,并将溶液涂布于样品垫或多孔性材料,之后干燥即可。

[0084] 图1及图2为示出了典型的免疫色谱试验片的一种优选方式的图。图1及图2所示的免疫色谱试验片为含浸有固态酸性试剂和中和试剂的免疫色谱试验片,然而也可含浸亚硝酸盐来代替固态酸性试剂,此时,为含浸有亚硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验片。本领域普通技术人员能够适当地设计并制造出含浸有亚硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验片。需要说明的是,免疫色谱试验片不限于图1及图2所示。图1及图2中,1为支撑体,2为标记体区

域,3为检测区域,4为样品垫,7为吸收带,8为后衬片材。

[0085] 图1A和图2A是俯视图,图1B和图2B是剖视图。在图1的例子中,在由树脂等制成的后衬片材8上分别层叠形成有一个检测区域3的支撑体1、吸收带7、标记体区域2、样品垫4等。并且,如图1所示,吸收带7的一个端部和支撑体1的一个端部、支撑体1的另一个端部和标记体区域2的一个端部、标记体区域2的另一个端部和样品垫4的一个端部分别重叠,在样品垫4的上游部含浸有固态酸性试剂,隔开少许间隔在样品垫的下游部含浸有中和试剂。将含浸有固态酸性试剂的区域称为固态酸性试剂区域5,将含浸有中和试剂的区域称为中和试剂区域6。在该试验片中,样品垫兼作固态酸性试剂区域5和中和试剂区域6。即,在样品垫上存在固态酸性试剂区域和中和试剂区域。在该试验片中,由于将固态酸性试剂区域和中和试剂区域设置成一片多孔性材料(垫)状,因此有时称为一片垫试验片。在图2的例子中,在标记体区域2的上游存在固态酸性试剂区域5和/或中和试剂区域6,它们相互重叠,由此形成连续的横向流的流路。在图2所示试验片中,固态酸性试剂区域5兼做样品垫。即,固态酸性试剂区域存在于样品垫上。在该试验片中,由于固态酸性试剂区域和中和试剂区域分别设置为两片的多孔性材料(垫)状,因此有时也称为两片垫试验片。固态酸性试剂区域的上游还可存在样品垫。

[0086] 根据图1的方式,对本发明的试验片的使用方法进行阐述。以下的使用方式为将检体与亚硝酸溶液混合,使用含浸有固态酸性试剂和中和试剂的免疫色谱试验法进行测定的方法,而对于将检体与酸性溶液混合,使用含浸有亚硝酸盐和中和试剂的免疫色谱试验法进行测定的方法也可以参考以下的使用方法的说明来进行。

[0087] 通过将检体或使用检体制备的样本与亚硝酸盐溶液接触混合,使检体悬浮于亚硝酸盐溶液,添加至样品垫进行供给来开始测定。此时,将5~100 μ L的检体与0.01~2mL的0.1M~8M的亚硝酸盐混合,将5~200 μ L供给至样品垫即可。作为亚硝酸盐,可列举亚硝酸钠、亚硝酸钾等。

[0088] 作为供给到样品垫4的被检测物质的包含糖链抗原的检体通过毛细管作用,向样品垫4上的固态酸性试剂区域5和中和试剂区域6展开,进而依次向标记体区域2、支撑体1、吸收带7沿水平方向展开。在固态酸性试剂区域5,与检体混合的亚硝酸盐与固态酸性试剂区域5上的固态酸性试剂反应,产生游离的亚硝酸,在该亚硝酸的作用下从检体提取出糖链抗原。提取的糖链抗原与酸性的展开溶液一起向中和试剂区域6展开并移动,在中和试剂区域6中,包含糖链抗原的酸性的展开溶液的pH被中和调整至中性区域。其结果是,糖链抗原在中性条件下进一步向下游展开并移动。在标记体区域2中,在检体样本展开的同时标记抗体被释放至液体中并向支撑体1展开。当检体样本中存在糖链抗原时,在支撑体1的检测区域3中,糖链抗原被捕捉抗体特异性地捕捉,并且糖链抗原通过特异性反应与标记抗体形成复合体。由此在检测区域3中实现通过糖链抗原的抗体的夹心,能够在检测区域3对标记抗体-糖链抗原复合物进行测定。

[0089] 根据使用本发明的免疫色谱试验片的方法,由于检体中的糖链抗原的提取在免疫色谱试验片上进行,因此在使用免疫色谱试验片进行测定之前无需事先提取检体中的糖链抗原,可用一步对检体中的糖链抗原进行测定。

[0090] 在本发明的方法中,对作为检体的生物样本不做特别限制,可列举血清、血浆、血液、尿、便、唾液、组织液、脊髓液、擦拭液等体液等或其稀释物。

[0091] 在使用本发明的免疫色谱试验片的方法中,作为测定对象的被检测物质为可通过利用免疫分析即抗原抗体反应的分析进行测定的糖链抗原。作为抗原,可列举通过亚硝酸提取处理提取的存在于细菌的细胞壁的糖链抗原即多糖等。包含该些物质的原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等也可进行测定。通过使用本发明的免疫色谱试验片的方法,可以确认被检体的生物样本中是否含有来源于原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等的糖链抗原,当含有糖链抗原时,可以判断被检体患有原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体、病毒等引起的感染病症。例如,能够检测A组 β 溶血性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌、军团菌、弯曲杆菌等感染的有无。

[0092] 另外,为了使通过亚硝酸盐与酸反应产生的亚硝酸提取糖链抗原后的检体被含浸有中和试剂的垫吸收,较长时间地滞留在该垫内,可靠地进行中和,也可以在标记部位的上游设置具有控制检体样品液在免疫色谱试验片上展开的物性和特性的替代滤纸或玻璃纤维滤纸的部件。即,在本发明中,含浸中和试剂的区域中使用的多孔性材料的原材料可以根据需要进行前处理,另外,为了控制亲水度、疏水度,也可以使中和试剂中含有各种试剂和/或粉末,将所述物性或特性以外的原材料加工为本发明所述的物性或特性的范围内。作为含浸的试剂,可以举出表面活性剂、蛋白质、树脂、化学合成高分子等。作为能够附加与滤纸或玻璃纤维滤纸同样的特征的部件,可以举出尼龙等无纺布。

[0093] 另外,在本发明中,当固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域有重叠接触时,设置为在固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域和中和试剂区域之间夹入不使液体通过的片材。通过设置片材,能够起到以下三个效果。

[0094] (A) 能够抑制保存试验片时试剂在邻接的两个区域移动。其结果,能够防止因固态酸性试剂或亚硝酸盐与中和试剂接触而引起的反应。其结果,能够提高试剂的稳定性。

[0095] (B) 另外,当添加有与亚硝酸盐或酸性试剂混合后的检体时,能够防止由于检体到达固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域,之后立即移动到中和试剂区域而导致的糖链抗原的提取不充分。即,降低包括检体的液体从固态酸性试剂区或亚硝酸盐区域向中和试剂区域移动的速度,延长包括检体的液体在固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域中停留的时间,其结果,充分提取糖链抗原并提高测定灵敏度。

[0096] (C) 进而,在添加了与亚硝酸盐或酸性试剂混合后的检体时,能够防止如下情况:检体到达固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域,之后立即移动到中和试剂区域,包括移动后的检体的液体回流到固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域,使固态酸性试剂或亚硝酸盐的活性降低,提取效率降低。即,防止包含已到达中和试剂区域的检体的液体回流到固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域,防止固态酸性试剂或亚硝酸盐的活性降低,高效地利用亚硝酸进行糖链抗原的提取处理,并提高测定灵敏度。

[0097] 设置于固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域和中和试剂区域之间的片材的原材料只要是不使液体通过的原材料即可,没有限制,例如能够使用PET(聚对苯二甲酸乙二醇酯)片材、聚乙烯片材等树脂制成的片材。树脂制成的片材也称为树脂制成的膜。

[0098] 也可以以固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域部分接触重叠的方式设置片材。在这种情况下,优选尽量缩短固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域的重叠部分的长度,例如为5mm以下,优选为3mm以下,更优选为2mm以下。

[0099] 另外,也可以以固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域与中和试剂区域不接触的方式

设置片材,设置成含浸有酸性试剂或亚硝酸盐的垫覆盖在PET片材上的形状。在这种情况下,中和区域被片材完全覆盖,在该片材上设置固态酸性试剂区域或亚硝酸区域即可。在这种情况下,在固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域内的液体不直接移动到中和区域,而是在流过片材后到达中和试剂区域。

[0100] 例如,片材可以仅设置在固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域和中和试剂区域之间。另一方面,在以覆盖免疫色谱试验片的上侧的方式将树脂制成的片材作为顶层层压片材进行贴付时,只要以覆盖固态酸性试剂区域或亚硝酸区域以外、固态酸性试剂区域或亚硝酸区域兼作样品垫的情况下覆盖样品垫以外的中和试剂区域、标记体区域、支撑体、检测区域、吸收带的方式贴付顶层层压片材,将固态酸性试剂区域或亚硝酸盐区域贴付在贴付于中和试剂部分的上部的顶层层压片材的上部即可。

[0101] 即,本发明包含以下发明。

[0102] [1]一种免疫色谱试验片,包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在该含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体时具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体时具有含浸有亚硝酸盐的区域,该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原,

[0103] 在含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与含浸有中和试剂的区域之间夹入树脂制成的片材,以抑制两区域之间的试剂的移动或检体溶液的移动。

[0104] [2]根据[1]所述的免疫色谱试验片,样品垫上存在含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域。

[0105] [3]根据[1]或[2]所述的免疫色谱试验片,以含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与含浸有中和试剂的区域部分接触的方式夹入树脂制成的片材。

[0106] [4]根据[1]或[2]所述的免疫色谱试验片,以含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域与含浸有中和试剂的区域不接触的方式夹入树脂制成的片材。

[0107] [5]根据[2]至[4]中任一项所述的免疫色谱试验片,在免疫色谱试验片上的最上游存在在样品垫上含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域,样品垫以外的区域被树脂制成的片材覆盖,在含浸有中和试剂的区域的上部的树脂制成的片材的上部存在含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的样品垫。

[0108] [6]根据[1]至[5]中任一项所述的免疫色谱试验片,固态酸性试剂选自由丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

[0109] [7]根据[1]至[6]中任一项所述的免疫色谱试验片,中和试剂为三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

[0110] [8]根据[1]至[7]中任一项所述的免疫色谱试验片,糖链抗原是原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0111] [9]一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用[1]至[8]中任一项所述的免疫色谱试验片,通过免疫色谱法测定检体中的糖链抗原,所述测定检体中的糖链抗原的方法包括:

[0112] 当免疫色谱试验片具有含浸有固态酸性试剂的区域时,将检体与亚硝酸溶液混

合,当免疫色谱试验片具有含浸有亚硝酸盐的区域时,将检体与酸性溶液混合,并添加至所述免疫色谱试验片的样品垫,

[0113] 在含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸盐的区域中,通过亚硝酸盐与固态酸性试剂反应产生的亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原,在含浸有中和试剂的区域,包含所述糖链抗原的酸性溶液被中和,

[0114] 在检测区域中,形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,所述方法通过免疫色谱法,控制检体在免疫色谱试验片上展开的速度和方向,控制基于酸性试剂、亚硝酸盐和中和试剂的处理,并测定检体中的糖链抗原。

[0115] 此外,本发明的免疫色谱装置也可将添加口设置得较宽。

[0116] 例如,存放纵长度为5~9cm、优选为7cm,横长度为0.3~0.7cm、优选为0.5cm的免疫色谱试验片的以往的免疫色谱装置(Quick Navi(商标)-Strep A,电化生研株式会社(Denka Seiken Co.,Ltd.))的添加口被设置为具有约3.5mm×约5.5mm(19.25mm²)的尺寸的近似矩形的添加口,存放相同尺寸的免疫色谱试验片的本发明的免疫色谱装置的添加口被设置为具有约3.5mm×约11mm(38.5mm²)的尺寸的近似矩形的添加口。免疫色谱装置和存放于其中的免疫色谱试验片的大小大致尺寸类似,因此在横长度为3cm、纵长度为9cm的免疫色谱装置中,具有近似矩形的3~5mm×8~15mm(24~75mm²)的添加口的免疫色谱装置为添加口较宽的免疫色谱装置,能起到本发明的免疫色谱装置的效果。添加口的较长的边为与层析试验片的较长的边平行的边,即为沿检体样本溶液的流动方向的边。有时将添加口的较长边的长度称作添加口长度,较短的边的长度称作添加口宽度。上述的例子为近似矩形的添加口的情况,而添加口的形状也可作为三角形或圆形。当用面积表示本发明的免疫色谱装置的添加口的大小时,为24~75mm²,优选为35~75mm²。

[0117] 在以往的免疫色谱法中,用免疫色谱试验片上设置的检体处理试剂进行检体处理时,由于样本溶液与含浸有检体处理试剂的区域相接的面积较小,因而检体处理能力较弱,并且由于是在将免疫色谱试验片逐渐展开的同时进行检体处理,因此最先展开的样本溶液和之后展开的样本溶液之间会出现检体处理试剂的浓度差。因此,无法可靠地进行检体处理。

[0118] 由于本发明的免疫色谱装置的添加口设置得较宽,因此能够一次性地将大量的检体样本溶液在短时间内供给至免疫色谱上的含浸有检体处理试剂的区域、即含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸的区域。其结果是,能够促进免疫色谱试验片上的糖链抗原的提取。能够一次性地供给的检体样本溶液为10μL~200μL。

[0119] 其结果是,不会产生由时间差导致的检体处理试剂的浓度差,因此能够促进免疫色谱上的检体处理可靠且效率良好地进行。

[0120] 在本发明的免疫色谱装置中,按以下方式构成:添加口和位于其下方的样品垫之间没有间隙,使得样本不会从添加口旁溢。

[0121] 本发明的免疫色谱装置的添加口设置得较宽,一次性地供给大量的检体样本溶液。此外,添加口的外轮廓即边缘部分有一定的高度(1~5mm),被供给的检体样本溶液暂存于添加口内。

[0122] 其结果是,由于检体样本溶液的全部液体被免疫色谱试验片吸收需要较长的时间,因此有时会出现样本溶液未被免疫色谱试验片吸收而旁溢到免疫色谱试验片之外的情

况。

[0123] 本发明的免疫色谱装置中,支持样品垫的后衬片材能够按如下方式构成:为使样本不从添加口旁溢,通过用等于或大于添加口的外轮廓尺寸的后衬片材支撑样品垫,通过后衬片材将样品垫朝添加口按压的这种力起作用,使添加口与样品垫之间没有间隙,因此能够防止样本溶液的旁漏。

[0124] 此外,当样品垫的厚度存在差异时,样品垫的厚度较薄的部位容易与添加口之间产生间隙,容易发生样本溶液的旁漏。

[0125] 在本发明中,通过将样品垫的较薄的部位设计为装置的容器的底座较高,较厚的部位设计为底座较低,从而即使当垫的厚度存在差异时,也能以添加口与垫之间没有间隙的方式构成,因此能够防止样本溶液的旁漏。

[0126] 其结果是,能够效率良地进行免疫色谱试验片上的糖链抗原的提取。

[0127] 即,本发明包括以下发明。

[0128] [1]一种免疫色谱装置,包括免疫色谱试验片和存放上述试验片的容器,并在试验片的样品垫上具有检体添加口,上述免疫色谱试验片包括:添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将上述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域,在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,并对糖链抗原进行测定,上述免疫色谱试验片在上述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域,进一步,在上述含浸有中和试剂的区域的上游,在使用与亚硝酸盐混合而得的检体的情况下具有含浸有固态酸性试剂的区域,在使用与酸性溶液混合而得的检体的情况下具有含浸有亚硝酸盐的区域,上述免疫色谱试验片用于提取并测量检体中的糖链抗原,其中,

[0129] (i)上述免疫色谱装置具有用于保持添加的检体样本溶液并通过将检体样本溶液短时间内供给至含浸有上述固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域来促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取的较宽的检体添加口;

[0130] (ii)添加口与样品垫之间没有间隙,使得样本不会从添加口旁溢。

[0131] [2]根据[1]的免疫色谱装置,其中,免疫色谱装置的检体添加口具有 $24\sim 75\text{mm}^2$ 的尺寸。

[0132] [3]根据[1]或[2]的免疫色谱装置,其中,免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫由疏水性较高的原材料构成,通过使检体样本溶液的展开时间延迟,促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0133] [4]根据[3]的免疫色谱装置,其中,疏水性较高的原材料选自聚乙烯、聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯、人造丝和尼龙构成的组。

[0134] [5]根据[1]或[2]的免疫色谱装置,其中,免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫由亲水度较高的原材料构成,通过使检体样本溶液的展开时间延迟,促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0135] [6]根据[5]的免疫色谱装置,其中,亲水度较高的原材料为具有厚度的滤纸。

[0136] [7]根据[1]~[6]中任一项的免疫色谱装置,其中,通过向免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐或者中和试剂的垫添加表面活性剂,并对检体样本溶液的展开时间进行调节,促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0137] [8]根据[7]的免疫色谱装置,其中,表面活性剂选自聚氧乙烯辛基苯基醚、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚、胆酸钠、脱氧胆酸、十二烷基硫酸钠和十二烷基苯磺酸钠构成的组。

[0138] [9]根据[1]~[8]中任一项的免疫色谱装置,其中,通过向免疫色谱试验片上的含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐、或者中和试剂的垫添加具有固定化作用的高分子化合物,并对检体样本溶液的展开时间进行调节,促进亚硝酸盐和固态酸性试剂对糖链抗原的提取。

[0139] [10]根据[9]的免疫色谱装置,其中,具有固定化作用的高分子化合物为PVA或PLL。

[0140] [11]根据[1]~[10]中任一项的免疫色谱装置,其中,含浸有固态酸性试剂或亚硝酸盐的区域存在于样品垫上或涂布有标记体区域的垫上。

[0141] [12]根据[1]~[11]中任一项的免疫色谱装置,其中,固态酸性试剂选自丙二酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸和酒石酸构成的组。

[0142] [13]根据[1]~[12]中任一项的免疫色谱装置,其中,中和试剂为三羟甲基氨基甲烷或氢氧化钠。

[0143] [14]根据[1]~[13]中任一项的免疫色谱装置,糖链抗原为原生动物、真菌、细菌、支原体、立克次体、衣原体或病毒的糖链抗原。

[0144] [15]一种测定检体中的糖链抗原的方法,使用[1]~[14]中任一项的免疫色谱装置,通过免疫色谱法测定检体中的糖链抗原,上述方法包括:

[0145] 当免疫色谱装置具有含浸有固态酸性试剂的区域时,将检体与亚硝酸溶液混合,当免疫色谱装置具有含浸有亚硝酸盐的区域时,将检体与酸性溶液混合,并添加至上述免疫色谱装置的样品垫,

[0146] 在含浸有固态酸性试剂的区域或含浸有亚硝酸盐的区域中,通过亚硝酸盐与固态酸性试剂反应产生的亚硝酸的作用从检体提取出糖链抗原,在含浸有中和试剂的区域,包含上述糖链抗原的酸性溶液被中和,

[0147] 在检测区域中形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体,上述方法通过上述免疫色谱法促进糖链抗原的提取,并对检体中的糖链抗原进行测定。

[0148] **【实施例】**

[0149] 通过以下的实施例具体说明本发明,本发明不限于这些实施例。

[0150] 在以下的实施例中,如无特殊说明,%表示w/v%。

[0151] 实施例1

[0152] 1、抗Streptococcus pyogenes (A组β溶血性链球菌)抗体在硝基纤维素膜(支撑体)上的固定化

[0153] 准备用纯净水将抗Streptococcus pyogenes抗体稀释至1.0mg/mL的液体和抗兔IgG抗体,在后衬有PET膜的硝基纤维素膜的样品垫侧线状地涂布抗Streptococcus pyogenes抗体,在吸收带侧线状地涂布抗兔IgG抗体。之后,将硝基纤维素膜在45℃下干燥30分钟,得到抗Streptococcus pyogenes抗体固定化膜。在本实施例中,将该膜称为“抗体固定化膜”。

[0154] 2、抗Streptococcus pyogenes抗体在着色聚苯乙烯颗粒上的固定化

[0155] 用纯净水将抗Streptococcus pyogenes抗体稀释至1.0mg/mL,向其中加入着色聚苯乙烯颗粒至0.1%,搅拌后加入碳二亚胺至1%,进一步搅拌。通过离心操作去除上清,再悬浮于50mM Tris (pH9.0) 和3%BSA,得到0.04%的结合有抗Streptococcus pyogenes抗体的着色聚苯乙烯颗粒悬浮液。在本实施例中,将该颗粒称为“抗体固定化颗粒”。

[0156] 3、结合有抗Streptococcus pyogenes抗体的着色聚苯乙烯颗粒的涂布和干燥

[0157] 将2中制作的抗体固定化颗粒悬浮液以规定量涂布于无纺布,在45℃下干燥30分钟。在本实施例中,将得到的无纺布称为“干燥垫”。

[0158] 4、中和试剂(碱性试剂)的涂布

[0159] 作为中和试剂(碱性试剂),将3M Trizma(商标名)碱(三碱基(三羟甲基氨基甲烷))、1.5%TritonX100以30μL/cm涂布于表1所示的部件。

[0160] 5、固态酸性试剂含浸无纺布的制作

[0161] 作为固态酸性试剂,将1.0M酒石酸、0.5%TritonX100以13μL/cm涂布于无纺布(尤尼吉可株式会社(Unitika Ltd.)、爱华纸(Elves))。涂布后立即在45℃下干燥1小时,得到固态酸性试剂含浸无纺布。

[0162] 6、Streptococcus pyogenes检测用免疫色谱试验片的制作

[0163] 将1中制作的抗体固定化膜、3中制作的干燥垫、4中制作的中和试剂(碱性试剂)垫、5中制作的固态酸性试剂垫与其他部件(后衬片材、吸收带)贴合并切断成5mm宽,制成Streptococcus pyogenes检测用免疫色谱试验片。将使用固态酸性试剂和中和试剂(碱性试剂)含浸滤纸作为样品垫的试验片在本实施例中称为“本发明免疫色谱试验片”。此外,免疫色谱试验片沿着检体的流动从上游起具备:固态酸性试剂含浸无纺布、中和试剂(碱性试剂)含浸无纺布、干燥垫(标记体区域)、抗体固定化膜(检测区域)、吸收带。

[0164] 7、测定

[0165] 在本发明免疫色谱试验片滴加75μL加入有pH指示剂(酚红)的2M亚硝酸Na溶液作为阴性检体,在5分钟~60分钟后进行判定。

[0166] 结果示于表1。

[0167] 由表1的结果判明,作为涂布中和试剂(碱性试剂)的部件,优选具有以下特性的部件。

[0168] (1) 物性(克重及厚度)

[0169] 克重为10以上~400g/m²,厚度为0.1~2.0mm,优选为克重为50以上300g/m²以下,厚度为0.4~0.8mm,更优选为克重为250g,厚度为0.6mm左右。

[0170] (2) 吸水性

[0171] 具有每1cm²的吸水量为10μl/cm²~100μl/cm²且吸水速度为1.0μl/sec~5μl/sec的吸水性,优选具有吸水量为30μl/cm²以上且吸水速度为2μl/sec以下的吸水性,更优选具有吸水量为30μl/cm²以上且吸水速度为1.5μl/sec以下的吸水性。

[0172] (3) 保水性

[0173] 在润湿状态下与膜接触5分钟后的保水性(每1cm²)为3μl/cm²~100μl/cm²,优选具有15μl/cm²以上的保水性。

[0174] 物性和吸水性在上述范围内即可,保水性和保持性不是必须特性,但优选还具有保水性和保持性。

[0175]

表 1

产品名	制造	商品号	原材料	物性 physical characteristics				特性 Characteristics						总结				
				吸水率				保水性		保持性	检测区域中性 持续时间							
				克重 Weight (g/m ²)	厚度 Thickness (mm)	拉伸强度 Dry Tensile Strength (dyn/50mm)		到达前端时间 (sec) *2-1	吸水量 (μl) *2-2									吸水速度 Mobility (μl/sec) *2-3
Bentise	旭化成	SEI03	铜氨纤维 (cupro) *1	100	0.54	66	29.3	40	188	4.7	62.7	10	25	15min	快	○	△	△
		TA30B		38	0.35	26.1	21	60	75	1.3	25.0	5	30	10min	慢	×	×	×
		SR60		60	0.47	34.4	28.2	60	125	2.1	41.7	2	27	15min	普通	△	×	△
Elfas Nyron		N01130	尼龙		0.61	550	210	120	150	1.3	50.0	3	30	17min	慢	○	×	×
Elves	尤尼吉可	S1003/WDO	PET	100	0.50	400	170	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	30	5min	?	?	×	×
润湿长度 (Wet Length) 滤纸	东洋滤纸	No.26-3	纸	260	0.58			185	197	1.1	65.7	18	15	40min	慢	○	○	○
		No.462	纸	168	0.53			125	165	1.3	55.0	3	20	20min	慢	○	×	○
		GS-25	玻璃纤维	70	0.21			90	100	1.1	33.3	17	15	60min	慢	○	○	○

*1 以再生纤维素（棉）为原料的长纤维无纺布。
*2 将 5mm×60mm 贴付于衬片，将部件立起在 96 孔的 EIA 板的 1 单元添加了 200μl 溶液的单元中，测定了液体到达与浸渍于液的体一端相反侧的一端为止的时间（*2-1）和根据单元中残留的液量的吸水量；200μl 一残留液量（*2-2）。吸水量=吸水量-静置后样品重量-静置前样品重量
*3 使 1cm² 的样品吸收 70μl 的溶液（1%Tween20），置于 3cm² 的膜，经过 5 分钟后，测定静置前后的重量变化
*4 使 1cm² 的样品吸收 70μl 的溶液（1%Tween20+食用红色 102 号），置于 3cm² 的膜，经过 5 分钟后，测定在膜上扩散的液体的面积

[0176] 符号说明

[0177] 1…支撑体(包括检测区域);2…标记体区域;3…检测区域;4…样品垫;5…固态酸性试剂区域;6…中和试剂区域;7…吸收带;8…后衬片材。

[0178] 工业实用性

[0179] 使用本发明的免疫色谱装置能够高灵敏度且准确地检测A组B溶血性链球菌的感染。

[0180] 本说明书中所引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用直接并入本说明书。

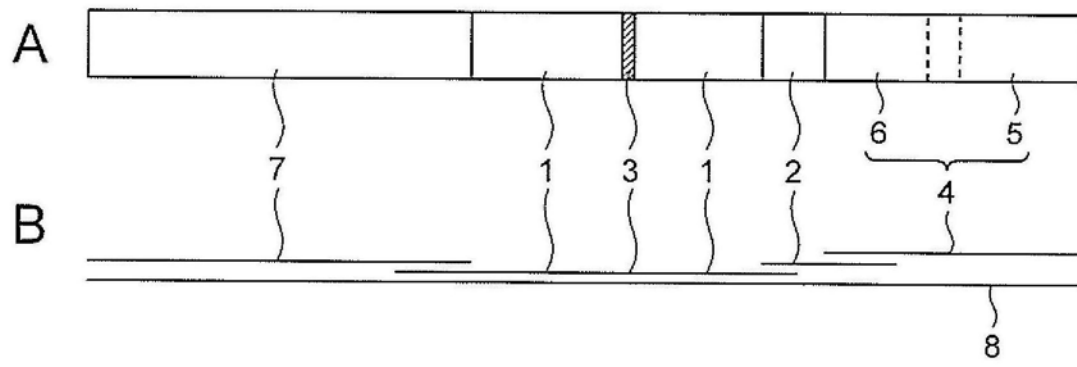


图1

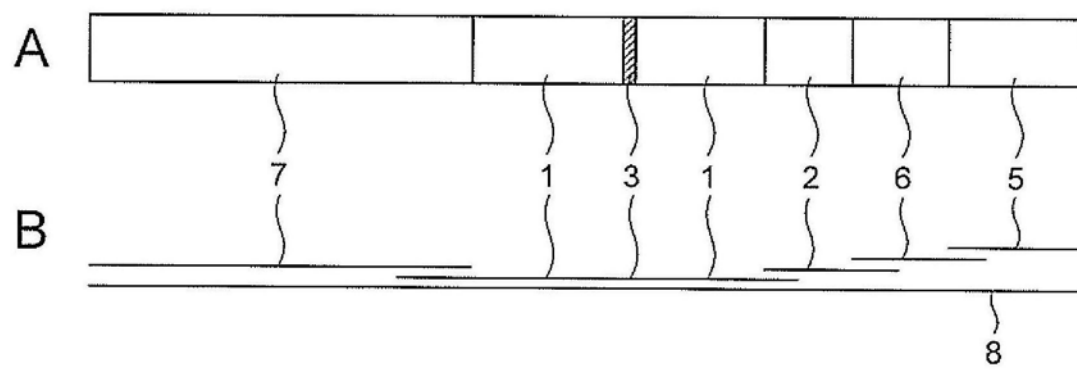


图2

专利名称(译)	可防止非特异反应的、用于提取并测定糖链抗原的免疫色谱试验片		
公开(公告)号	CN110418965A	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201880018271.6	申请日	2018-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
[标]发明人	加藤大介 村松志野 服部友洋		
发明人	加藤大介 村松志野 服部友洋		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/54386		
代理人(译)	纪秀凤		
优先权	2017049155 2017-03-14 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供一种免疫色谱试验片，在在免疫色谱试验片上通过亚硝酸提取来提取糖链抗原并进行测定的免疫色谱法中，通过使包含亚硝酸的展开液高效且持续地与中和试剂接触来进行中和，从而防止非特异反应。该免疫色谱试验片包括：添加与亚硝酸盐或酸性溶液混合而得的检体的样品垫、包含将糖链抗原的抗体标记而得的标记抗体的标记体区域及将所述糖链抗原的抗体进行了固相化的检测区域，在检测区域形成抗体-糖链抗原-标记抗体复合体，并对糖链抗原进行测定，该免疫色谱试验片在所述标记体区域的上游具有含浸有中和试剂的区域，进一步，在该含浸有中和试剂的区域的区域的上游，在使用与亚硝酸盐混合而得的检体时具有含浸有固态酸性试剂的区域，在使用与酸性溶液混合而得的检体时具有含浸有亚硝酸盐的区域，该免疫色谱试验片用于提取并测定检体中的糖链抗原，其中，含浸有中和试剂的区域的原材料是具有吸收性高、保水性高、且释放性低或释放性持续这三种特性的滤纸或玻璃纤维滤纸，通过含浸有中和试剂的区域的高吸水性和高保水性而充分中和包含所述糖链抗原的酸性溶液，并通过含浸有中和试剂的区域的低释放性或持续释放性，抑制残留的酸性溶液到达检测区域或使经充分中和的试验液持续向检测区域展开，从而抑制非特异反应。

