



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108291914 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680069045.1

(22)申请日 2016.11.25

(30)优先权数据

2015-230928 2015.11.26 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/085018 2016.11.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/090744 JA 2017.06.01

(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 铃木启太 岩本久彦 望月浩子

(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 33/569(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

C07K 16/08(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

序列表5页 附图1页

按照条约第19条修改的权利要求书1页

(54)发明名称

水痘带状疱疹病毒检测用免疫层析分析装置

(57)摘要

本发明的目的在于提供特异性地检测水痘带状疱疹病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)的方法。本发明涉及一种用于检测水痘带状疱疹病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)的免疫层析分析装置,其包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E(VZVgE)的氨基酸序列第1-188号的抗体。



1. 一种用于检测水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 的免疫层析分析装置, 其包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,

所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第1-188号的抗体。

2. 一种用于检测水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 的免疫层析分析装置, 其包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,

所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第108-135号的抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫层析分析装置, 其中, 添加至所述试样添加部的试样为包含所述水痘带状疱疹病毒的水疱内容液。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫层析分析装置, 其中, 所述标记物质保持部所含有的标记物质为金纳米粒子, 并且所述标记物质保持部含有0.05至1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的所述金纳米粒子。

5. 一种免疫层析分析试剂盒, 包含权利要求1至4中任一项所述的免疫层析分析装置、以及用于稀释并展开检体的检体稀释液。

6. 根据权利要求5所述的免疫层析分析试剂盒, 其中, 所述检体稀释液含有至少一种非离子性表面活性剂。

7. 一种免疫层析分析方法, 其中使用包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部的免疫层析分析装置来检测检体中的水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV), 所述免疫层析分析装置的所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第1-188号的抗体,

所述方法包括以下步骤 (1) 至 (4):

- (1) 将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤;
- (2) 通过保持在标记物质保持部中的抗体来识别水痘带状疱疹病毒的步骤;
- (3) 使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤; 以及
- (4) 通过检测部中所含的抗体来检测所展开的移动相中的水痘带状疱疹病毒的步骤。

水痘带状疱疹病毒检测用免疫层析分析装置

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测水痘带状疱疹病毒的免疫层析分析装置、免疫层析分析试剂盒以及其检测方法。

背景技术

[0002] 水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 是这样一种病毒,其属于 α -疱疹病毒亚科,并且具有由约125kbp的碱基序列构成的线性双链DNA。

[0003] 该病毒在感染初期对人会引起水痘 (Varicella),并且在治愈后的非活动期会潜伏于神经细胞周围的套细胞中。若由于某种原因使免疫力下降,则潜伏的病毒会再次活化,引起带状疱疹 (Zoster)。免疫抑制状态 (免疫抑制剂的使用、恶性肿瘤、以及免疫缺陷等基础疾病) 的人在VZV感染初期或再次活化的情况下,症状会变得严重,有时可能会是致命的。因此,期望建立用于进行早期治疗的快速诊断方法。

[0004] 专利文献1公开了一种神经疾病的预防或治疗剂,其使用了识别水痘带状疱疹病毒的早期蛋白质IE62、并且与脑源性神经营养因子交叉反应的抗体,从而作为带状疱疹后的神经痛等的预防或治疗手段。

[0005] 专利文献2公开了一种增强DNaseX蛋白功能的内吞作用依赖性DNA摄取抑制剂,并且公开了一种使用人DNaseX作为抗原以间接地预测由水痘带状疱疹病毒等所引起的症状的方法。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本专利第5279504号说明书

[0009] 专利文献2:日本特开2008-253188号公报

发明内容

[0010] 发明所要解决的课题

[0011] 然而,专利文献1中所记载的方法是用于检测由VZV引起的神经痛的原因的方法或者用于治疗该神经痛的方法,并不是用于特异性地检测VZV的方法。另外,即使在专利文献2所记载的方法中,也并没有直接检测VZV本身,该方法是一种使用人DNaseX作为抗原来间接地预测症状的方法。

[0012] 这样,到目前为止,并没有建立起特异性地检测VZV的方法,无法快速地对VZV的感染进行诊断。于是,本发明的课题在于提供一种快速地对VZV的感染进行诊断的方法。

[0013] 用于解决课题的方法

[0014] VZV是糖蛋白,具有水痘带状疱疹病毒糖蛋白E (以下也称为VZVgE),该VZVgE具有捕捉免疫球蛋白G的Fc部位的功能。该VZVgE与其他 α -疱疹病毒 (例如HSV、BHV及FeHV等) 所具有的糖蛋白E (glycoprotein E, gE) 在氨基酸序列方面具有约50%左右的同源性,并且其功能和结构也与各gE类似。

[0015] 作为直接检测VZV的方法,本发明人着眼于上述VZVgE,进行了深入的研究,结果发现,识别VZVgE的某些特定区域的抗体不会与其他 α -疱疹病毒显示出交叉反应,能够特异性地检测VZV。

[0016] 然后发现:通过使用了识别VZVgE的特定区域的抗体的免疫层析分析装置,能够快速且简便地诊断VZV对人的感染,从而完成了本发明。

[0017] 因此,本发明如下所述。

[0018] 1.一种用于检测水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 的免疫层析分析装置,包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,其中,

[0019] 所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第1-188号的抗体。

[0020] 2.一种用于检测水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 的免疫层析分析装置,包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,其中,

[0021] 所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第108-135号的抗体。

[0022] 3.根据上述1或2所述的免疫层析分析装置,其中,添加至所述试样添加部的试样为包含所述水痘带状疱疹病毒的水疱内容液。

[0023] 4.根据上述1至3中任一项所述的免疫层析分析装置,其中,所述标记物质保持部所含有的标记物质为金纳米粒子,并且所述标记物质保持部含有0.05至1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的所述金纳米粒子。

[0024] 5.一种免疫层析分析试剂盒,包含上述1至4中任一项所述的免疫层析分析装置、以及用于稀释并展开检体的检体稀释液。

[0025] 6.根据上述5所述的免疫层析分析试剂盒,其中,所述检体稀释液含有至少一种非离子性表面活性剂。

[0026] 7.一种免疫层析分析方法,其中使用包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部的免疫层析分析装置来检测检体中的水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV),所述免疫层析分析装置的所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第1-188号的抗体,所述方法包括以下步骤(1)至(4):

[0027] (1) 将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤;

[0028] (2) 通过保持在标记物质保持部中的抗体来识别水痘带状疱疹病毒的步骤;

[0029] (3) 使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤;以及

[0030] (4) 通过检测部中所含的抗体来检测所展开的移动相中的水痘带状疱疹病毒的步骤。

[0031] 发明效果

[0032] 本发明为这样的免疫层析分析装置,其使用了与水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 的糖蛋白E (gE) 的特定部位结合的抗体。通过使用本发明的免疫层析分析装置,可以迅速简单且特异性地检测出VZV。也就是说,可以更加可靠且迅速地进行水痘

或带状疱疹的诊断。

[0033] 附图简要说明

[0034] [图1]图1是用于说明本发明一个实施方式的免疫层析分析装置的结构剖面图。

具体实施方式

[0035] 以下,对用于实施本发明的方式进行说明。

[0036] 本发明的用于检测水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 的免疫层析分析装置的特征在于:具备添加检体的试样添加部、保持标记物质的标记物质保持部、具有检测VZV的检测部的层析介质部、以及吸收通过了检测部后的液体的吸收部,其中,标记物质保持部及检测部中的任意一者含有识别VZV的糖蛋白E (以下也称为VZVgE) 的抗体,特别地,标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体。

[0037] 优选地,标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE当中的氨基酸序列第48-135号的抗体。

[0038] 更优选地,标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE当中的氨基酸序列第48-88号、第89-107号以及第108-135号中至少任意一者的抗体。

[0039] 特别更优选地,标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE当中的氨基酸序列第108-135号的抗体。

[0040] 以下,将标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体的情况作为例子来进行说明,但是标记物质保持部及检测部中的至少一者所含有的抗体的优选实施方式如上所述。

[0041] 水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 属于 α -疱疹病毒亚科,是水痘 (varicella) 及带状疱疹 (zoster) 的病原学介质。作为该VZV所具有的糖蛋白之一的水痘带状疱疹病毒糖蛋白E (VZVgE) 由序列编号1所示的623个氨基酸构成,并且由对应于氨基酸序列第1-544号的细胞外结构域 (Extracellular Domain)、对应于氨基酸序列第545-562号的跨膜结构域 (transmembrane domain; TM)、以及对应于氨基酸序列第563-623号的胞质尾区 (Cytoplasmic Tail) 构成 (Jurie K等, Journal of Virology, 1997年1月, 第110-119页)。

[0042] 在本发明所使用的抗体当中,后述的免疫层析分析装置的标记物质保持部及检测部中的至少一者所含有的抗体识别VZVgE的氨基酸序列当中的第1-188号。在此,在本说明书中,对抗体所具有的特定氨基酸序列进行“识别”指的是:与另外其他的氨基酸序列相比,对于该特定的氨基酸序列具有更高的亲和性而结合。

[0043] 如上所述,VZVgE与其他 α -疱疹病毒的gE具有约50%左右的氨基酸序列同源性。在本发明中,通过使用识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体,可以提供在不与同源性高的其他 α -疱疹病毒发生交叉反应的情况下特异性地检测VZV的免疫层析分析装置。

[0044] 在本发明的免疫层析分析装置中,预先使该标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体。也就是说,可以仅使标记物质保持部含有上述抗体,也可以仅使检测部含有上述抗体,还可以使标记物质保持部及检测部这两者均含有上述抗体。

[0045] 其中,优选的是,预先仅使标记物质保持部及检测部中的任意一者含有上述抗体。据认为,由于在标记物质保持部中负载的抗体(以下也称为第一抗体)所识别的VZVgE的部位不同于在检测部中负载的抗体(以下也称为第二抗体)所识别的VZVgE的部位,使得在表位不被抗体结合所掩蔽的情况下,或者在不受到由抗原的立体结构变化所带来的影响等相互作用的情况下,通过形成如下所示的夹心结构,检测灵敏度得以提高。

[0046] 也就是说,首先,标记物质保持部中负载的抗体(第一抗体)与VZVgE的一部分结合。接着,据认为,固定于检测部的抗体(第二抗体)与不同于第一抗体所结合的位点的其他位点相结合,从而以抗体彼此之间夹着VZVgE的方式形成夹心的结构,由此检测VZV。

[0047] (抗体的制作方法)

[0048] 在本说明书中,所谓的“抗体”,包括多克隆抗体或单克隆抗体等天然型抗体、利用基因重组技术制造得到的嵌合抗体、人源化抗体或单链抗体、利用产生人抗体的转基因动物而制造得到的人抗体、通过噬菌体展示而制作的抗体、以及它们的结合性片段。

[0049] 作为产生抗体的动物物种,有人、小鼠、大鼠、兔、山羊及马等。作为免疫球蛋白,可以为IgG、IgM、IgA、IgE和IgD中的任意一者。

[0050] 在一个实施方式中,可以通过已知的常规制造方法来制造作为免疫原的VZVgE肽。也就是说,可以使用以下物质作为免疫原:从含有序列编号1的氨基酸序列的VZV中提取纯化得到的gE蛋白、或者采用基因工程在大肠杆菌等宿主中将所克隆的gE蛋白的基因进行表达后再提取纯化得到的gE蛋白,以及构成gE蛋白的一部分的多肽。

[0051] 单克隆抗体根据常规方法,使采用上述免疫原进行免疫后的小鼠的脾脏细胞与骨髓瘤细胞杂交,选择产生目标抗体的杂交瘤,并取得由该杂交瘤所产生的单克隆抗体[例如参照Kohler和Milstein的方法(Nature 256 (1975) 495-497)]。

[0052] 多克隆抗体通过常规方法,采用上述免疫原将生产动物(例如人、小鼠、大鼠、兔、山羊和马等)免疫,并从所得到的抗血清中分离出目标抗体,由此得到多克隆抗体。

[0053] 产生单克隆抗体的杂交瘤克隆的筛选可以通过 ([例如) 微量滴定板中培养杂交瘤,并通过 ([例如) ELISA等酶免疫测定法来测定在观察到了增殖的孔中的培养上清液对于上述免疫原的反应性。

[0054] 使用培养基(例如,含有10%胎牛血清的DMEM)来培养该杂交瘤,并且可以将该培养液的离心上清液作为单克隆抗体溶液。另外,通过将此杂交瘤注入到来源动物的腹腔中以产生腹水,将所得到的腹水作为单克隆抗体溶液。单克隆抗体优选经过了分离和/或纯化。

[0055] 在识别VZVgE的抗体当中,识别VZVgE的氨基酸序列特定部位的抗体(例如)可以通过以下方式得到:通过使用了与上述VZVgE的氨基酸序列特定部位相对应的蛋白质片段的免疫印迹试验等,从产生识别上述VZVgE的抗体的杂交瘤当中,选择产生这样的抗体的杂交瘤,该抗体对上述VZVgE的氨基酸序列特定部位表现出更强的反应性。

[0056] 例如,特异性地识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体可以通过进行以下的筛选而得到。例如,如在后述实施例中所说明地,可以通过以下方式而得到:通过VZVgE的氨基酸序列第1-188号的蛋白质的片段,从产生识别上述VZVgE的抗体的杂交瘤当中,选择产生这样的抗体的杂交瘤,该抗体对VZVgE的氨基酸序列第1-188号表现出更强的反应性。关于特异性地识别VZVgE的氨基酸序列第48-88号、第89-107号、以及第108-135号的抗体,可以

以同样的方式获得。

[0057] 以上,对于本发明所使用的抗体的制作方法进行了说明,在实施例中进行具体的详细说明。

[0058] (本发明的免疫层析分析装置)

[0059] 接着,参照附图对本发明的免疫层析分析装置的一个实施方式进行说明。需要说明的是,在本说明书中,“固定”表示抗体以不移动的方式配置于膜等载体中。“保持”表示以可以移动的方式配置于膜等载体中或表面上。

[0060] 作为本发明的免疫层析分析装置的一个实施方式,如图1所示,其由试样添加部(1)、标记物质保持部(2)、层析介质部(3)、检测部(4)、吸收部(5)以及背板(6)构成。

[0061] 试样添加部(1)为在免疫层析分析装置中添加含有检体的试样的部位。可以由在试样添加部(1)中试样迅速被吸收、具有检体迅速移动这样性质的多孔片材构成。作为多孔片材,可列举出(例如)纤维素滤纸、玻璃纤维、聚氨酯、聚醋酸酯、醋酸纤维素、尼龙、以及棉布等。

[0062] 标记物质保持部(2)含有后述的标记物质,该标记物质作为与抗体结合而成的标记抗体而保持在标记物质保持部(2)中。如上所述,与标记物质结合的抗体(第一抗体)为识别VZVgE的抗体。

[0063] 当后述检测部中所含的抗体(第二抗体)在识别VZVgE的抗体当中不是识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体时,将与标记物质结合的抗体(第一抗体)设为识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体。当检体在标记物质保持部内移动时,上述标记抗体(第一抗体)与检体中的VZV结合。在标记物质保持部(2)中通常使用玻璃纤维、及纤维素等的膜。

[0064] 标记物质保持部中的抗体(第一抗体)的含量通常为0.03至0.50 μg /装置,优选为0.05至0.4 μg /装置,更优选为0.1至0.3 μg /装置。另外,每单位面积标记物质保持部的抗体(第一抗体)的含量通常为0.05至1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,优选为0.1至0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为0.17至0.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0065] 免疫层析分析中的检测试剂的标记通常也使用酶等,但由于适合于通过目视来判定被检测物质的存在,因而优选使用不溶性载体作为标记物质。通过将抗体敏化至不溶性载体,可以制备标记化了的检测试剂。需要说明的是,可以依照公知的方法将抗体敏化至不溶性载体。

[0066] 作为标记物质的不溶性载体可以使用金、银或铂等金属粒子、氧化铁等金属氧化物粒子、硫等非金属粒子以及由合成高分子构成的乳胶粒子、或者其他的不溶性载体。

[0067] 如上所述,不溶性载体为适合于以视觉方式判定被检测物质的存在的标记物质,优选为有色的以便于利用目视进行判定。金属粒子及金属氧化物粒子本身表现出与粒径相对应的特定的自然色,可以利用其颜色作为标记。

[0068] 特别地,从易于检测、难以凝聚、并且难以发生非特异性显色的方面出发,金纳米粒子是优选的。金纳米粒子的平均粒径为(例如)10nm至250nm,优选为35nm至120nm。平均粒径可以通过以下方式计算出:使用通过透射型电子显微镜(TEM:日本电子(株)制,JEM-2010)拍摄的投影照片,任意选择100个粒子并测算这些粒子的投影面积圆当量直径,从其平均值计算出。

[0069] 每单位面积标记物质保持部中,标记物质保持部所含的金纳米粒子通常为0.025

至 $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$,优选为 0.05 至 $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为 0.1 至 $1.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$,进一步优选为 0.2 至 $0.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。这是因为,通过设定为上述范围,所标记的粒子在分散的状态下展开,可以在不妨碍抗体的识别部位的情况下实现高灵敏度。

[0070] 层析介质部(3)是层析的展开部位。层析介质部(3)是由表现出毛细管现象的微细多孔性物质构成的惰性膜。从与层析所使用的检测试剂、固定化试剂或被检测物质等不具有反应性的观点出发,并且,从提高本发明效果的观点出发,优选(例如)硝基纤维素制的膜(以下也称为“硝基纤维素膜”)、醋酸纤维素制的膜(以下也称为“醋酸纤维素膜”),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(聚乙烯及聚丙烯等)。

[0071] 作为硝基纤维素膜,其主要含有硝基纤维素即可,可以使用纯品或硝基纤维素混合物等以硝基纤维素为主要材料的膜。

[0072] 硝基纤维素膜还可以进一步含有促进毛细管现象的物质。作为该物质,优选降低膜表面的表面张力并提供亲水性的物质。例如,优选为糖类、氨基酸衍生物、脂肪酸酯、各种合成表面活性剂或醇等具有两亲介质性作用的物质,即对被检测物质的移动没有影响、并且对标记物质的显色不带来影响的物质。

[0073] 硝基纤维素膜是多孔性的并且表现出毛细管现象。该毛细管现象的指标可以通过测定吸水速度(吸水时间:capillary flow time)来进行确认。吸水速度会影响检测灵敏度和检测时间。

[0074] 以上述硝基纤维素膜或醋酸纤维素膜为代表的层析介质部(3)的形状及大小没有特别的限制,只要在实际操作方面及反应结果观察方面适合即可。

[0075] 为了进一步简化操作,优选在层析介质部(3)的背面上设置由塑料等构成的支持体。该支持体的性状没有特别的限制,当通过目视判定来进行测定结果的观察时,支持体优选具有与标记物质所提供的颜色不相似的颜色,一般地,支持体优选为无色或白色。

[0076] 检测部(4)形成在上述层析介质部(3)上。也就是说,识别VZV的抗体被固定在层析介质部(3)上的任意位置处。该抗体的固定化可以依照常规方法进行。对于该抗体(第二抗体)而言,在与标记物质结合的抗体(第一抗体)在识别VZVgE的抗体当中不是识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体的情况下,将该检测部中所含的抗体(第二抗体)设为识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体。

[0077] 检测部(4)中的抗体(第二抗体)的含量通常为 0.1 至 $3.0\mu\text{g}/\text{装置}$,优选为 0.3 至 $2.0\mu\text{g}/\text{装置}$,更优选为 0.3 至 $1.0\mu\text{g}/\text{装置}$ 。另外,每单位面积检测部(4)的抗体(第二抗体)的含量通常为 0.04 至 $1.0\text{g}/\text{cm}^2$,优选为 0.125 至 $0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$,更优选为 0.125 至 $0.42\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0078] 另外,为了防止由于在层析介质部(3)上的非特异性吸附而导致的分析精度降低,根据需要,可以采用公知的方法对层析介质部(3)进行封闭处理。通常,牛血清白蛋白、脱脂乳、酪蛋白或明胶等蛋白质适用于封闭处理。该封闭处理之后,根据需要,例如,可以组合Tween20、TritonX-100及SDS等表面活性剂中的一种或两种以上进行洗净。

[0079] 除了上述第二抗体以外,也可以将固定有抗IgG抗体的抗IgG抗体涂布部(对照部位)作为对照而设置于检测部(4)中。该部位作为表现出以下情况的对照而发挥作用:不与抗原反应的标记抗体的标记物质或不与上述第二抗体反应的标记抗体的标记物质与抗IgG抗体在该抗IgG抗体涂布部处发生反应而被固定、并正常地进行展开。

[0080] 为了吸收通过了检测部(4)的检体或展开液等液体,在层析介质部(3)的末端设置了吸收部(5)。在本发明的免疫层析分析装置中,吸收部(5)使用了(例如)玻璃纤维、纸浆、以及纤维素纤维等,或者在这些无纺布中含有丙烯酸聚合物等高分子、具有环氧乙烷基团等的亲水性试剂而成的物质。特别优选为玻璃纤维。通过使吸收部(5)由玻璃纤维构成,可以大幅减少试样液的液体回流。

[0081] 背板(6)是基材。通过在一个面上涂布粘接剂或者贴附胶带,使得一个面具有粘接性,在该粘接面上紧密接触地设置了试样添加部(1)、标记物质保持部(2)、层析介质部(3)、检测部(4)以及吸收部(5)的一部分或全部。背板(6)只要是通过粘接剂而对试样液具有不透性、非透湿性的物质即可,作为基材,没有特别的限制。

[0082] 如上所述制作的免疫层析分析装置在制成制品之前通常进行干燥处理。干燥温度(例如)为20至50℃,干燥时间为0.5至1小时。

[0083] (本发明的免疫层析分析试剂盒)

[0084] 本发明的免疫层析分析试剂盒包含上述免疫层析分析装置、以及用于稀释并展开检体的检体稀释液。

[0085] 在本发明的免疫层析分析试剂盒中,检体稀释液也可以作为展开液使用。通常使用水作为溶剂,在其中添加缓冲液、盐及非离子性表面活性剂,进一步可以添加(例如)用于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、或者抗菌剂、螯合剂等中的1种或2种以上。

[0086] 作为非离子性表面活性剂,可列举出(例如)Triton X-100(商品名,聚乙二醇单对异辛基苯基醚)、Tween20(商品名,聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯)、NP-40(商品名ノニテッド40)、Brij 35以及ノニオンMN-811(日油社制)等,可以添加一种或两种以上。

[0087] 优选地,检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂包含一种以上的HLB值为6至12的非离子性表面活性剂。更优选地,检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂包含一种以上的HLB值为7至11的非离子性表面活性剂。最佳地,检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂包含一种以上的HLB值为8至10的非离子性表面活性剂。

[0088] 作为HLB值为6至12的非离子性表面活性剂,优选使用一个末端为羟基的聚氧化亚烷基醚。一个末端的烷基可以是直链也可以是支链的,并且重复的烷基醚基的烷基部分可以是直链也可以是支链的。

[0089] 另外,检体稀释液所含有的非离子性表面活性剂除了包含一种以上的HLB值为6至12的非离子性表面活性剂以外,还进一步优选包含一种以上的HLB值为13至18的非离子性表面活性剂。

[0090] 作为其混合比,HLB值为13至18的非离子性表面活性剂的总量(B)相对于HLB值为6至12的非离子性表面活性剂的总量(A)的质量比优选为A:B=30:70至70:30。更优选地,以A:B=40:60至60:40的方式使用。

[0091] 或者,在检体稀释液中,为了从检体中提取出被检测物质(VZVgE等),可以使检体稀释液中含有醇等公知的疏水性物质,也可以在收集检体后立即进行添加。通过使检体稀释液中含有上述疏水性物质,或者向检体稀释液中添加上述疏水性物质,使得在稀释检体的同时可以从检体中提取出被检测物质(VZVgE等),从而不仅可以节省事先提取的工夫,而且还可以提高检测灵敏度,因而是优选的。

[0092] 当使用检体稀释液作为展开液时,可以将预先混合了检体和展开液的检体含有液供给、添加到试样添加部上并使其展开,也可以先将检体供给、添加到试样添加部上,然后再将展开液供给、添加到试样添加部上并使它们展开。

[0093] (本发明的免疫层析分析方法)

[0094] 本发明的免疫层析分析方法为包含以下的步骤(1)至(4),并使用上述免疫层析分析装置来检测检体所含的被检测物质的水痘带状疱疹病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)的方法,该免疫层析分析方法包含以下的步骤(1)至(4),其中,免疫层析分析装置的标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E(VZVgE)的氨基酸序列第1-188号的抗体。

[0095] (1)将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤;

[0096] (2)通过保持在标记物质保持部中的抗体来识别水痘带状疱疹病毒的步骤;

[0097] (3)使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤;以及

[0098] (4)通过检测部中所含的抗体来检测所展开的移动相中的水痘带状疱疹病毒的步骤。

[0099] 本发明的免疫层析分析方法所使用的所述免疫层析分析装置中的标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别VZVgE的抗体。特别地,标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体。

[0100] 另外,标记物质保持部及检测部中的至少一者所含有的抗体优选为识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE当中的氨基酸序列第48-135号的抗体。

[0101] 更优选地,标记物质保持部及检测部中的至少一者所含有的抗体为识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE当中的氨基酸序列第48-88号、第89-107号以及第108-135号中的至少任意一者的抗体。

[0102] 特别优选地,标记物质保持部及检测部中的至少一者所含有的抗体为识别由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE当中的氨基酸序列第108-135号的抗体。

[0103] 以下对于各步骤进行说明。

[0104] (1)将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤

[0105] 在步骤(1)中,第一,优选采用检体稀释液在不使测定精度降低的情况下将检体适当地调整或稀释成检体在免疫层析介质中顺利移动的程度的浓度并作为检体含有液。检体稀释液可以使用上述的那些。第二,将预定量(通常为0.1至2mL)的检体含有液添加到试样添加部(1)上。当添加检体含有液时,检体含有液在试样添加部(1)中开始移动。

[0106] 本发明中使用的检体为可能包含作为被检测物质的水痘带状疱疹病毒的检体。具体而言,可列举出通过对感染了水痘带状疱疹病毒的患者的水疱进行穿刺而得的水疱内容液、或者咽拭子等,但不限于这些。

[0107] (2)通过保持在标记物质保持部中的抗体来识别水痘带状疱疹病毒的步骤

[0108] 步骤(2)为这样的步骤:使在步骤(1)中被添加到试样添加部中的检体含有液向标记物质保持部(2)移动,通过保持在标记物质保持部中的标记物质所结合的抗体(第一抗体),从而识别检体中的作为被检测物质的水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E(VZVgE)。

[0109] 标记物质可以使用上述的那些。如上所述,与标记物质结合的抗体(第一抗体)为识别VZVgE的抗体。该抗体识别从试样添加部被展开了的检体中的VZVgE,并进行结合。特别

地,当与标记物质结合的抗体(第一抗体)为前者的识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体时,该抗体识别从试样添加部被展开了的检体中的VZVgE的氨基酸序列第1-188号,并进行结合。

[0110] (3)使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤

[0111] 步骤(3)为这样的步骤:在步骤(2)中作为被检测物质的水痘带状疱疹病毒在标记物质保持部中被结合有标记物质的抗体识别后,使检体及抗体作为移动相在层析介质部上通过。

[0112] (4)通过检测部中所含的抗体来检测所展开的移动相中的水痘带状疱疹病毒

[0113] 步骤(4)为这样的步骤:作为移动相而在层析介质部上通过了的检体中的水痘带状疱疹病毒中的VZVgE,根据抗原抗体的特异性结合反应,以被固定于检测部的抗体以及在上述步骤(2)中与标记物质结合的抗体夹心状地夹持着的方式进行特异性地反应结合,并且使检测部着色。

[0114] 如上所述,该抗体(第二抗体)为识别VZVgE的抗体。当与标记物质结合的抗体(第一抗体)在后者的识别VZVgE的抗体当中不是识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体时,使该检测部中含有识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体。

[0115] 该抗体识别从标记物质保持部被展开了的检体中的VZVgE,并进行结合。特别地,当该抗体(第二抗体)为前者的识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体时,该抗体识别从标记物质保持部被展开了的、结合有第一抗体的VZVgE的氨基酸序列第1-188号,并进行结合捕捉。

[0116] 当仅在标记物质保持部及检测部中的任意一者中含有识别并结合VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体时,固定于检测部的抗体(第二抗体)与跟负载于标记物质保持部的抗体(第一抗体)所结合的位点不同的其他位点相结合,以夹心状的方式夹着被检测物质,并使检测部着色。

[0117] 当不存在作为被检测物质的水痘带状疱疹病毒时,即使通过了层析介质部上的检测部,溶解于试样的水分中的标记试剂也不会发生特异性结合反应,因而不会使检测部着色。

[0118] 最后,检体含有液的水分向吸收部(5)移动。

[0119] 实施例

[0120] 以下,通过实施例进一步说明本发明,但本发明不限于以下例子。

[0121] [试验例1]识别VZVgE的抗体的制作

[0122] 从DDBJ(国立遗传学研究所数据库)获得VZV的gE蛋白(VZVgE)的氨基酸序列(序列编号1)。从上述VZVgE的氨基酸序列确定了作为除了跨膜结构域以外的细胞外区域的序列编号2所示的氨基酸序列(第1-544号),并合成了相对应的基因序列。采用限制性酶EcoRI将作为用于表达His-tag的载体的pET302/NT-His切断之后,作为去磷酸化处理,利用碱性磷酸酶进行处理,与上述基因序列混合,使用DNA连接试剂盒(DNA Ligation Kit)Ver.2(タカラバイオ)进行连接反应。

[0123] 将组装有目标基因的重组VZVgE质粒导入到用于重组蛋白质表达的宿主大肠杆菌(E.coli)BL(DE3)pLysS(Novagen)中。将导入菌在LB琼脂平板培养基中培养,并将所得的菌

落在LB液体培养基中培养。进一步添加1mM IPTG (タカラバイオ) 对重组VZVgE的表达进行诱导之后,回收E.coli。将所回收的菌再次悬浮于增溶性缓冲液[0.5%Triron X-100 (Sigma)、10mM咪唑、20mM磷酸盐以及0.5M NaCl (pH7.4) (Amersham)]中,通过超声波处理进行增溶化之后,使用His trap Kit (Amersham) 对重组VZVgE进行纯化。将该纯化蛋白质用磷酸缓冲生理盐水(以下称为PBS)进行透析,并作为目标的重组VZVgE。

[0124] 将所得的重组VZVgE作为免疫用抗原,制作对于重组VZVgE的单克隆抗体(以下称为抗VZVgE抗体)。单克隆抗体的制作依照常规方法如下进行。将100 μ g的重组VZVgE和等量的adjuvant complete freund (Difco) 混合,然后对小鼠 (BALB/c, 5周龄, 日本SLC) 进行免疫3次,将其脾脏细胞用于细胞融合。在细胞融合中,使用了作为小鼠骨髓瘤细胞的Sp2/0-Ag14细胞 (Shulman等人, Nature, 276, 269-270, 1978)。在细胞的培养中,使用了这样的培养液:向Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) 中添加L-谷氨酰胺0.3mg/ml、青霉素G钾100单位/ml、硫酸链霉素100 μ g/ml、Gentacin 40 μ g/ml (DMEM), 并且以成为10%的方式向其中添加胎牛血清 (JRH)。将免疫小鼠的脾脏细胞与Sp2/0-Ag14细胞混合,向其中添加聚乙二醇 (Polyethylene glycol) 溶液 (Sigma), 从而进行细胞融合。将融合细胞在HAT-DMEM (包含0.1mM次黄嘌呤钠 (sodium hypoxanthine)、0.4 μ M氨喋呤 (aminopterin) 以及0.016mM胸苷 (thymidine) (Gibco) 的加入有血清的DMEM) 中培养,并通过酶联抗体法 (ELISA) 来确认培养上清液中抗体的产生。将抗体产生阳性的细胞在HT-DMEM (包含0.1mM次黄嘌呤钠 (sodium hypoxanthine) 以及0.16mM胸苷的加入有血清的DMEM) 中进行培养,并进一步在加入有血清的DMEM中继续进行培养。

[0125] 将所克隆的细胞腹腔内接种到小鼠 (BALB/c, リタイア, 日本SLC), 该小鼠已被接种了2, 6, 10, 14-四甲基十五烷 (Sigma), 并收集腹水。将该腹水供给至蛋白质G柱, 从而对单克隆抗体进行纯化。

[0126] 最后,得到了识别VZVgE的单克隆抗体产生细胞23个克隆。

[0127] [试验例2]产生识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体的细胞的筛选

[0128] 为了从试验例1所得的识别VZVgE的单克隆抗体产生细胞的23个克隆当中筛选出产生识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体的细胞,进行了以下的实验。

[0129] 通过与试验例1相同的方法,制作了由序列编号1的氨基酸序列构成的VZVgE当中的由氨基酸序列第1-188号构成的重组蛋白,并用于以下的实验。

[0130] 将所制作的0.01mg/ml的VZVgE (氨基酸序列第1-188号) 重组蛋白溶液与添加了10%的2-巯基乙醇的2 $\times$ Tris-Glycine SDS样品缓冲液 (TEFCO公司制) 以等量混合,在100 $^{\circ}$ C下加热10分钟,并供给至SDS-PAGE。SDS-PAGE中,使用レディージェルJ5-20%12孔板 (BIO-RAD公司制), 并依照已知的标准方法进行。通过印迹装置 (BIO-RAD公司制) 将蛋白质从电泳后的凝胶转印至Sequi-Blot PVDF膜 (BIO-RAD公司制)。采用免疫块 (Immunoblock) (DSファーマラボラトリーズ) 将转印后的PVDF膜在室温下封闭1小时。

[0131] 除去封闭液,采用含有0.05%的Tween20 (商品名) 的PBS (以下称为T-PBS) 将PVDF膜洗涤3次10分钟,然后与包含由试验例1中所得到的23个单克隆抗体产生细胞所产生的单克隆抗体的培养上清液一起在室温下孵育1小时。将抗体的浓度分别调节为10 μ g/ml,并且与每泳道为1.0 μ g的VZVgE重组蛋白反应。采用T-PBS将PVDF膜洗涤3次10分钟,然后与用T-PBS稀释为5000倍的碱性磷酸酶标记抗小鼠IgG (SIGMA公司制) 一起在室温下孵育30分钟。

采用T-PBS洗涤3次10分钟,然后与作为显色基质的1-Step™NBT/BCIP (PIERCE公司制)一起对PVDF膜进行孵育,使结合到PVDF膜的抗体变得可见。其结果是,能够从23个单克隆中检测出多个21kDa的条带(相当于VZVgE的氨基酸序列第1-188号)。为了供给至后述的免疫层析分析试验,从该抗体当中任意地选择2种抗体,对产生该抗体的杂交瘤进行克隆,选择该两个独立的克隆,并将它们各自命名为杂交瘤A和B。另外,将杂交瘤A和B各自产生的抗体命名为抗体A和B。两种抗体为识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体。从这两株杂交瘤获得的单克隆抗体的亚类都是IgG1。

[0132] [试验例3]免疫层析分析

[0133] 在本试验中,制作了将在试验例2中得到的抗体A和B用于标记物质保持部及检测部中的任一者而得的免疫层析分析装置,并进行免疫层析分析。

[0134] <免疫层析分析装置的制作>

[0135] (1) 试样添加部的制作

[0136] 使用由玻璃纤维构成的无纺布(ミポア社制,300mm×30mm)作为试样添加部。

[0137] (2) 标记物质保持部的制作

[0138] 将0.1mL的采用磷酸缓冲液(pH7.4)稀释成0.05mg/mL浓度的抗体(抗体A和B中的任意一者)添加到0.5mL的金胶体悬浮液(田中贵金属工业社制,LC40nm)中,在室温下静置10分钟。

[0139] 接着,加入0.1mL的含有1质量%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲液(pH7.4),进一步在室温下静置10分钟。其后,在充分搅拌后,以8000×g进行15分钟离心分离,除去上清液,然后添加0.1mL的含有1质量%BSA的磷酸缓冲液(pH7.4)。通过以上步骤制作了标记物质溶液。

[0140] 将300μL的10质量%海藻糖水溶液以及1.8mL蒸馏水加入到300μL的上述制作的标记物质溶液中,并将所得的混合液均匀地添加到12mm×300mm的玻璃纤维垫(ミポア社制)上,然后采用真空干燥机进行干燥,制作了标记物质保持部。

[0141] (3) 层析介质部及检测部的制作

[0142] 使用由硝基纤维素构成的片材(ミポア社制,商品名:HF 120,300mm×25mm)作为膜。

[0143] 接着,采用含有5质量%的异丙醇的磷酸缓冲液(pH7.4)将抗体(抗体A和B中的任意一者)稀释为1.0mg/mL的浓度而得到溶液,将150μL该溶液使用免疫层析用分配器“XYZ3050”(BIODOT公司制)以1mm的宽度和1μL/mm的量(每个片材25μL)线状涂布到干燥后的膜上的检测部位(检测线)处。

[0144] 另外,为了确认金纳米粒子标记试剂是否展开或金纳米粒子标记试剂的展开速度,在检测部位的下游,将与金纳米粒子标记物质具有广泛亲和性的来自山羊的抗血清用磷酸缓冲液(pH7.4)稀释而得的液体涂布到对照部位。此后,在50℃下干燥30分钟,并在室温下干燥一晚,制作了层析介质部及检测部。

[0145] (4) 免疫层析分析装置的制作

[0146] 然后,依次将试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、作为用于吸收展开后的试样或标记物质的吸收部的玻璃纤维制无纺布贴合到由背板构成的基材上。然后,采用切割机将宽度切成为5mm,作为免疫层析分析装置。需要说明的是,使标记物质保

持部在试样展开方向上的长度为12mm。

[0147] (5) 检体稀释液

[0148] 制备了50mM的HEPES缓冲溶液(pH7.5),其含有:1质量%的非离子性表面活性剂NP-40(ナカライテスク社制,商品名:ノニデットP-40,HLB値17.7)与ノニオンMN-811(日油社制,商品名:ノニオンMN-811,HLB値8.3)的质量比为1:1的混合物,将该缓冲溶液作为用于稀释处理检体的检体稀释液。

[0149] <测定>

[0150] 将在试验例2中制作的0.1mg/ml的VZVgE(氨基酸序列第1-188号)重组蛋白作为抗原,测定使用上述制作的免疫层析分析装置时检测部中的显色强度。采用上述检体稀释液将上述抗原稀释至100倍,作为检体含有液。

[0151] 将150μL的上述各个检体含有液置于免疫层析分析装置的试样添加部上并使其展开,通过目视确认检测部的着色程度(显色强度)。结果示于表1中。

[0152] 需要说明的是,表1中的评价基准如下所述。

[0153] ±:虽然可以确认到显色,但是颜色非常淡。

[0154] ++:可以确认到强烈的显色。

[0155] [表1]

[0156] 表1

		检出部侧	
		抗体 A	抗体 B
[0157] 标记物质 保持部侧	抗体 A	±	++
	抗体 B	++	±

[0158] 从表1的结果可知,通过将识别VZVgE的氨基酸序列第1-188号的抗体用于免疫层析分析装置中,能够检测出VZV。

[0159] [试验例4] 识别VZVgE的氨基酸序列第48-135号的抗体的筛选

[0160] 为了从试验例1中所得的针对VZVgE的单克隆抗体当中筛选出识别VZVgE的氨基酸序列第48-135号的抗体,进行了以下的实验。

[0161] 将0.01mg/ml的VZVgE重组蛋白溶液(CalBioresource公司)与添加了10%的2-巯基乙醇的2×Tris-Glycine SDS样品缓冲液(TEFCO公司制)以等量混合,在100℃下加热10分钟,并供给至SDS-PAGE。SDS-PAGE中,使用レディージェルJ5-20%12孔板(BIO-RAD公司制),并依照已知的标准方法进行。通过印迹装置(BIO-RAD公司制)将蛋白质从电泳后的凝胶转印至Sequi-Blot PVDF膜(BIO-RAD公司制)。采用免疫块(Immunoblock)(DSファーマラボラトリーズ)将转印后的PVDF膜在室温下封闭1小时。

[0162] 除去封闭液,采用含有0.05%的Tween20(商品名)的PBS(以下称为T-PBS)将PVDF膜洗涤3次10分钟,然后与包含由试验例1中所得到的23个单克隆抗体产生细胞所产生的单克隆抗体的培养上清液一起在室温下孵育1小时。将抗体的浓度分别调节为10μg/ml,并且与每泳道为1.0μg的VZVgE重组蛋白反应。采用T-PBS将PVDF膜洗涤3次10分钟,然后与用T-PBS稀释为5000倍的碱性磷酸酶标记抗小鼠IgG(SIGMA公司制)一起在室温下孵育30分钟。采用T-PBS洗涤3次10分钟后,与作为显色基质的1-StepTMNBT/BCIP(PIERCE公司制)一起对

PVDF膜进行孵育,使结合到PVDF膜的抗体变得可见。其结果是,能够从23个单克隆当中检测出6个相当于VZVgE重组蛋白的11kDa的条带(相当于VZVgE的氨基酸序列第48-135号)。对产生该抗体的杂交瘤进行克隆,选择该6个独立的克隆,并将它们各自命名为1、2、3、4、5和6。另外,将杂交瘤1、2、3、4、5和6各自产生的抗体命名为抗体1、2、3、4、5和6。需要说明的是,抗体2对应于试验例2及3中的抗体A,抗体6对应于试验例2及3中的抗体B。从该6株杂交瘤获得的单克隆抗体的亚类都是IgG1。

[0163] [试验例5] 识别VZVgE的氨基酸序列第48-88号、第89-107号、第108-135号的抗体的筛选

[0164] 通过肽的化学合成法的常规方法即肽固相化学合成法,从而合成0.01mg/ml的VZVgE肽片段(序列编号1的氨基酸序列第48-88号、第89-107号、第108-135号),并进行以下实验。将上述各个肽片段与添加了10%的2-巯基乙醇的2×Tris-Glycine SDS样品缓冲液(TEFCO公司制)以等量混合,在100℃下加热10分钟,并供给至SDS-PAGE。SDS-PAGE中,使用レディーゲルJ5-20%12孔板(BIO-RAD公司制),并依照已知的标准方法进行。通过印迹装置(BIO-RAD公司制)将蛋白质从电泳后的凝胶转印至Sequi-Blot PVDF膜(BIO-RAD公司制)。采用免疫块(Immunoblock)(DSファーマラボラトリーズ)将转印后的PVDF膜在室温下封闭1小时。除去封闭液,采用含有0.05%的Tween20(商品名)的PBS(以下称为T-PBS)将PVDF膜洗涤3次10分钟,然后与上述抗体1、2、3、4、5和6一起在室温下孵育1小时。将抗体的浓度分别调节为10μg/ml,并且与每泳道为1.0μg的VZVgE重组蛋白反应。采用T-PBS将PVDF膜洗涤3次10分钟后,与用T-PBS稀释为5000倍的碱性磷酸酶标记抗小鼠IgG(SIGMA公司制)一起在室温下孵育30分钟。采用T-PBS洗涤3次10分钟后,与作为显色基质的1-Step™NBT/BCIP(PIERCE公司制)一起对PVDF膜进行孵育,使结合到PVDF膜的抗体变得可见。将相当于各个VZVgE肽片段(序列编号1的氨基酸序列第48-88号、第89-107号、第108-135号)的条带无法检测到的情况设为-,并将能够检测到的情况设为+,结果示于表2中。

[0165] [表2]

[0166] 表2

	VZVgE 肽片段 氨基酸序列		
	48-88	89-107	108-135
[0167]	抗体 1	+	—
	抗体 2	+	—
	抗体 3	+	—
	抗体 4	—	+
	抗体 5	—	+
	抗体 6	—	+

[0168] 由该结果可知,抗体1~3识别VZVgE的氨基酸序列第48-88号,抗体4和5识别VZVgE的氨基酸序列第108-135号,抗体6识别VZVgE的氨基酸序列第89-107号。

[0169] [试验例6] 免疫层析分析

[0170] 在本试验中,制作了使用在试验例2中得到的抗体1~6中任一者的免疫层析分析装置,并进行免疫层析分析。

[0171] <免疫层析分析装置的制作>

[0172] (1) 试样添加部的制作

[0173] 使用由玻璃纤维构成的无纺布(ミポア社制, 300mm×30mm) 作为试样添加部。

[0174] (2) 标记物质保持部的制作

[0175] 将0.1mL的采用磷酸缓冲液(pH7.4) 稀释成0.05mg/mL浓度的抗体(抗体1~6中的任意一者) 添加到0.5mL的金胶体悬浮液(田中贵金属工业社制, LC40nm) 中, 在室温下静置10分钟。

[0176] 接着, 加入0.1mL的含有1质量%牛血清白蛋白(BSA) 的磷酸缓冲液(pH7.4), 进一步在室温下静置10分钟。其后, 在充分搅拌后, 以8000×g进行15分钟离心分离, 除去上清液, 然后添加0.1mL的含有1质量%BSA的磷酸缓冲液(pH7.4)。通过以上步骤制作了标记物质溶液。

[0177] 将300μL的10质量%的海藻糖水溶液以及1.8mL蒸馏水加入到300μL的上述制作的标记物质溶液中, 并将所得的混合液均匀地添加到12mm×300mm的玻璃纤维垫(ミポア社制) 上, 然后采用真空干燥机进行干燥, 制作了标记物质保持部。

[0178] (3) 层析介质部及检测部的制作

[0179] 使用由硝基纤维素构成的片材(ミポア社制, 商品名: HF 120, 300mm×25mm) 作为膜。

[0180] 接着, 采用含有5质量%的异丙醇的磷酸缓冲液(pH7.4) 将抗体(抗体1~6中的任意一者) 稀释为1.0mg/mL的浓度而得到溶液, 将150μL该溶液使用免疫层析用分配器“XYZ3050”(BIO DOT公司制) 以1mm的宽度和1μL/mm的量(每个片材25μL) 线状涂布到干燥后的膜上的检测部位(检测线) 处。

[0181] 另外, 为了确认金纳米粒子标记试剂是否展开或金纳米粒子标记试剂的展开速度, 在检测部位的下游, 将与金纳米粒子标记物质具有广泛亲和性的来自山羊的抗血清用磷酸缓冲液(pH7.4) 稀释而得的液体涂布到对照部位。此后, 在50℃下干燥30分钟, 并在室温下干燥一晚, 制作了层析介质部及检测部。

[0182] (4) 免疫层析分析装置的制作

[0183] 然后, 依次将试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、作为用于吸收展开后的试样或标记物质的吸收部的玻璃纤维制无纺布贴合到由背板构成的基材上。然后, 采用切割机将宽度切成为5mm, 作为免疫层析分析装置。需要说明的是, 使标记物质保持部在试样展开方向上的长度为12mm。

[0184] (5) 检体稀释液

[0185] 制备了50mM的HEPES缓冲溶液(pH7.5), 其含有: 1质量%的非离子性表面活性剂NP-40(ナカライテスク社制, 商品名: ノニデットP-40, HLB值17.7) 与ノニオンMN-811(日油社制, 商品名: ノニオンMN-811, HLB值8.3) 的质量比为1:1的混合物, 将该缓冲溶液作为用于稀释处理检体的检体稀释液。

[0186] <测定>

[0187] 将0.01mg/mL的VZVgE重组蛋白(CalBio reagent公司) 作为抗原, 测定使用上述制作的免疫层析分析装置时检测部中的显色强度。采用上述检体稀释液将上述抗原稀释至100倍, 作为检体含有液。

[0188] 将150μL的上述各个检体含有液添加到免疫层析分析装置的试样添加部上并使其展开,通过目视确认检测部的着色程度(显色强度)。结果示于表3中。

[0189] 需要说明的是,表3中的评价基准如下所述。

[0190] 一:无法确认到显色;

[0191] 士:虽然可以确认到显色,但是颜色非常淡;

[0192] +:可以确认到显色;

[0193] ++:可以确认到强烈的显色;

[0194] +++:可以确认到非常强烈的显色。

[0195] [表3]

[0196] 表3

		检测部侧					
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
[0197]	No.1	—	士	士	+++	+++	+
	No.2	士	—	士	+++	+++	++
	No.3	士	士	—	++	+++	+
	No.4	+	+++	++	—	士	+
	No.5	+	+++	++	士	—	+
	No.6	士	+	士	+	+	—

[0198] 从表3的结果可知,将识别VZVgE的氨基酸序列第48-135号的抗体用于免疫层析分析装置,能够检测出VZV。特别地,可知在使标记物质保持部和检测部中的任一者含有识别VZVgE的氨基酸序列第108-135号的抗体(抗体4、5)的情况下,能够更加强烈地检测到VZV。

[0199] [试验例7]实际检体的免疫层析分析

[0200] 除了使用VZV感染者的水疱内容液作为含有VZV的检体以外,重复进行试验例6。水疱内容液是通过对作为VZV感染者的被试验者的水疱进行穿刺而收集的。另外,采用上述检体稀释液将所收集的水疱内容液稀释至100倍,作为检体含有液。

[0201] 将150μL的上述各个检体含有液添加至免疫层析分析装置的试样添加部上并使其展开,通过目视确认检测部的着色程度(显色强度)。结果示于表4中。

[0202] 需要说明的是,表4中的评价基准如下所述。

[0203] 一:无法确认到显色;

[0204] 士:虽然可以确认到显色,但是颜色非常淡;

[0205] +:可以确认到显色;

[0206] ++:可以确认到强烈的显色;

[0207] +++:可以确认到非常强烈的显色。

[0208] [表4]

[0209] 表4

		检测部侧						
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	
[0210]	标记物 质保持 部侧	No.1	—	±	±	+++	+++	+
		No.2	±	—	±	+++	+++	++
		No.3	±	±	—	++	+++	+
		No.4	+	+++	++	—	±	+
		No.5	+	+++	++	±	—	+
		No.6	±	+	±	+	+	—

[0211] 即使在将实际检体作为检体的情况下,也能够得到与将VZVgE重组蛋白作为抗原的试验例6相同的结果。

[0212] 利用特定的实施方式详细地说明了本发明,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,可在不脱离本发明的意图和范围内进行各种变更及变形。此外,本申请基于2015年11月26日提交的日本专利申请(特愿2015-230928),其全文内容以引用方式并入本文。

[0213] 符号的说明

[0214] 1 试样添加部

[0215] 2 标记物质保持部

[0216] 3 层析介质部

[0217] 4 检测部

[0218] 5 吸收部

[0219] 6 背板

序列表

- <110> 田中贵金属工业株式会社
 <120> 水痘带状疱疹病毒检测用免疫层析分析装置
 <130> W521077
 <150> JP2015/230928
 <151> 2015-11-26
 <160> 2
 <170> SIP0SequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 623
 <212> PRT
 <213> 水痘带状疱疹病毒 (Varicella zoster virus)
 <400> 1

```

Met Gly Thr Val Asn Lys Pro Val Val Gly Val Leu Met Gly Phe Gly
1           5           10           15
Ile Ile Thr Gly Thr Leu Arg Ile Thr Asn Pro Val Arg Ala Ser Val
          20           25           30
Leu Arg Tyr Asp Asp Phe His Thr Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Asn
          35           40           45
Ser Val Tyr Glu Pro Tyr Tyr His Ser Asp His Ala Glu Ser Ser Trp
          50           55           60
Val Asn Arg Gly Glu Ser Ser Arg Lys Ala Tyr Asp His Asn Ser Pro
65           70           75           80
Tyr Ile Trp Pro Arg Asn Asp Tyr Asp Gly Phe Leu Glu Asn Ala His
          85           90           95
Glu His His Gly Val Tyr Asn Gln Gly Arg Gly Ile Asp Ser Gly Glu
          100          105          110
Arg Leu Met Gln Pro Thr Gln Met Ser Ala Gln Glu Asp Leu Gly Asp
          115          120          125
Asp Thr Gly Ile His Val Ile Pro Thr Leu Asn Gly Asp Asp Arg His
          130          135          140
Lys Ile Val Asn Val Asp Gln Arg Gln Tyr Gly Asp Val Phe Lys Gly
145          150          155          160
Asp Leu Asn Pro Lys Pro Gln Gly Gln Arg Leu Ile Glu Val Ser Val
          165          170          175
Glu Glu Asn His Pro Phe Thr Leu Arg Ala Pro Ile Gln Arg Ile Tyr
          180          185          190
Gly Val Arg Tyr Thr Glu Thr Trp Ser Phe Leu Pro Ser Leu Thr Cys

```

195	200	205
Thr Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ile Gln His Ile Cys Leu Lys His Thr		
210	215	220
Thr Cys Phe Gln Asp Val Val Val Asp Val Asp Cys Ala Glu Asn Thr		
225	230	235
Lys Glu Asp Gln Leu Ala Glu Ile Ser Tyr Arg Phe Gln Gly Lys Lys		240
245	250	255
Glu Ala Asp Gln Pro Trp Ile Val Val Asn Thr Ser Thr Leu Phe Asp		
260	265	270
Glu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Glu Ile Glu Pro Gly Val Leu Lys Val		
275	280	285
Leu Arg Thr Glu Lys Gln Tyr Leu Gly Val Tyr Ile Trp Asn Met Arg		
290	295	300
Gly Ser Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Phe Leu Val Thr Trp Lys		
305	310	315
Gly Asp Glu Lys Thr Arg Asn Pro Thr Pro Ala Val Thr Pro Gln Pro		
325	330	335
Arg Gly Ala Glu Phe His Met Trp Asn Tyr His Ser His Val Phe Ser		
340	345	350
Val Gly Asp Thr Phe Ser Leu Ala Met His Leu Gln Tyr Lys Ile His		
355	360	365
Glu Ala Pro Phe Asp Leu Leu Leu Glu Trp Leu Tyr Val Pro Ile Asp		
370	375	380
Pro Thr Cys Gln Pro Met Arg Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Tyr His Pro		
385	390	395
Asn Ala Pro Gln Cys Leu Ser His Met Asn Ser Gly Cys Thr Phe Thr		
405	410	415
Ser Pro His Leu Ala Gln Arg Val Ala Ser Thr Val Tyr Gln Asn Cys		
420	425	430
Glu His Ala Asp Asn Tyr Thr Ala Tyr Cys Leu Gly Ile Ser His Met		
435	440	445
Glu Pro Ser Phe Gly Leu Ile Leu His Asp Gly Gly Thr Thr Leu Lys		
450	455	460
Phe Val Asp Thr Pro Glu Ser Leu Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Val		
465	470	475
Tyr Phe Asn Gly His Val Glu Ala Val Ala Tyr Thr Val Val Ser Thr		
485	490	495
Val Asp His Phe Val Asn Ala Ile Glu Glu Arg Gly Phe Pro Pro Thr		
500	505	510

Ala Gly Gln Pro Pro Ala Thr Thr Lys Pro Lys Glu Ile Thr Pro Val		
515	520	525
Asn Pro Gly Thr Ser Pro Leu Leu Arg Tyr Ala Ala Trp Thr Gly Gly		
530	535	540
Leu Ala Ala Val Val Leu Leu Cys Leu Val Ile Phe Leu Ile Cys Thr		
545	550	555
Ala Lys Arg Met Arg Val Lys Ala Tyr Arg Val Asp Lys Ser Pro Tyr		
	565	570
		575
Asn Gln Ser Met Tyr Tyr Ala Gly Leu Pro Val Asp Asp Phe Glu Asp		
	580	585
		590
Ser Glu Ser Thr Asp Thr Glu Glu Glu Phe Gly Asn Ala Ile Gly Gly		
	595	600
		605
Ser His Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Val Tyr Ile Asp Lys Thr Arg		
610	615	620
<210> 2		
<211> 544		
<212> PRT		
<213> 水痘带状疱疹病毒 (Varicella zoster virus)		
<400> 2		
Met Gly Thr Val Asn Lys Pro Val Val Gly Val Leu Met Gly Phe Gly		
1	5	10
		15
Ile Ile Thr Gly Thr Leu Arg Ile Thr Asn Pro Val Arg Ala Ser Val		
	20	25
		30
Leu Arg Tyr Asp Asp Phe His Thr Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Asn		
	35	40
		45
Ser Val Tyr Glu Pro Tyr Tyr His Ser Asp His Ala Glu Ser Ser Trp		
50	55	60
Val Asn Arg Gly Glu Ser Ser Arg Lys Ala Tyr Asp His Asn Ser Pro		
65	70	75
		80
Tyr Ile Trp Pro Arg Asn Asp Tyr Asp Gly Phe Leu Glu Asn Ala His		
	85	90
		95
Glu His His Gly Val Tyr Asn Gln Gly Arg Gly Ile Asp Ser Gly Glu		
	100	105
		110
Arg Leu Met Gln Pro Thr Gln Met Ser Ala Gln Glu Asp Leu Gly Asp		
	115	120
		125
Asp Thr Gly Ile His Val Ile Pro Thr Leu Asn Gly Asp Asp Arg His		
130	135	140
Lys Ile Val Asn Val Asp Gln Arg Gln Tyr Gly Asp Val Phe Lys Gly		
145	150	155
		160

Asp	Leu	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Gly	Gln	Arg	Leu	Ile	Glu	Val	Ser	Val
				165			170				175				
Glu	Glu	Asn	His	Pro	Phe	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Ile	Gln	Arg	Ile	Tyr
				180			185				190				
Gly	Val	Arg	Tyr	Thr	Glu	Thr	Trp	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Leu	Thr	Cys
				195			200				205				
Thr	Gly	Asp	Ala	Ala	Pro	Ala	Ile	Gln	His	Ile	Cys	Leu	Lys	His	Thr
				210			215				220				
Thr	Cys	Phe	Gln	Asp	Val	Val	Val	Asp	Val	Asp	Cys	Ala	Glu	Asn	Thr
225				230			235				240				
Lys	Glu	Asp	Gln	Leu	Ala	Glu	Ile	Ser	Tyr	Arg	Phe	Gln	Gly	Lys	Lys
				245			250				255				
Glu	Ala	Asp	Gln	Pro	Trp	Ile	Val	Val	Asn	Thr	Ser	Thr	Leu	Phe	Asp
				260			265				270				
Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Pro	Pro	Glu	Ile	Glu	Pro	Gly	Val	Leu	Lys	Val
				275			280				285				
Leu	Arg	Thr	Glu	Lys	Gln	Tyr	Leu	Gly	Val	Tyr	Ile	Trp	Asn	Met	Arg
290				295			300								
Gly	Ser	Asp	Gly	Thr	Ser	Thr	Tyr	Ala	Thr	Phe	Leu	Val	Thr	Trp	Lys
305				310			315				320				
Gly	Asp	Glu	Lys	Thr	Arg	Asn	Pro	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Pro	Gln	Pro
				325			330				335				
Arg	Gly	Ala	Glu	Phe	His	Met	Trp	Asn	Tyr	His	Ser	His	Val	Phe	Ser
				340			345				350				
Val	Gly	Asp	Thr	Phe	Ser	Leu	Ala	Met	His	Leu	Gln	Tyr	Lys	Ile	His
				355			360				365				
Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Trp	Leu	Tyr	Val	Pro	Ile	Asp
370				375			380								
Pro	Thr	Cys	Gln	Pro	Met	Arg	Leu	Tyr	Ser	Thr	Cys	Leu	Tyr	His	Pro
385				390			395				400				
Asn	Ala	Pro	Gln	Cys	Leu	Ser	His	Met	Asn	Ser	Gly	Cys	Thr	Phe	Thr
				405			410				415				
Ser	Pro	His	Leu	Ala	Gln	Arg	Val	Ala	Ser	Thr	Val	Tyr	Gln	Asn	Cys
				420			425				430				
Glu	His	Ala	Asp	Asn	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Cys	Leu	Gly	Ile	Ser	His	Met
435				440			445								
Glu	Pro	Ser	Phe	Gly	Leu	Ile	Leu	His	Asp	Gly	Gly	Thr	Thr	Leu	Lys
450				455			460								
Phe	Val	Asp	Thr	Pro	Glu	Ser	Leu	Ser	Gly	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Val

465					470					475					480
Tyr	Phe	Asn	Gly	His	Val	Glu	Ala	Val	Ala	Tyr	Thr	Val	Val	Ser	Thr
					485					490					495
Val	Asp	His	Phe	Val	Asn	Ala	Ile	Glu	Glu	Arg	Gly	Phe	Pro	Pro	Thr
					500					505					510
Ala	Gly	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Lys	Glu	Ile	Thr	Pro	Val
					515					520					525
Asn	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Arg	Tyr	Ala	Ala	Trp	Thr	Gly	Gly
					530					535					540

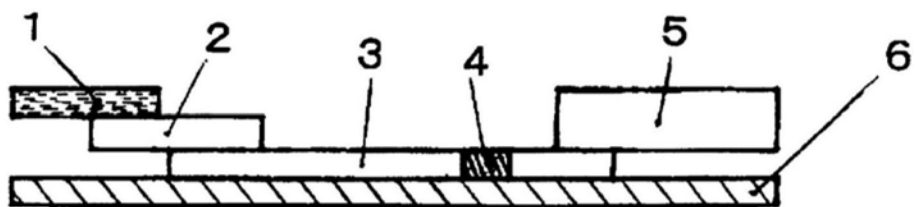


图1

1. 一种用于检测水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 的免疫层析分析装置, 其包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,

所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第1-188号的抗体。

2. 一种用于检测水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 的免疫层析分析装置, 其包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部,

所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第108-135号的抗体。

3. 根据权利要求2所述的免疫层析分析装置, 其中, 所述标记物质保持部及检测部中的任意一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第108-135号的抗体, 另一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第48-88号的抗体。

4. 根据权利要求1至3中任意一项所述的免疫层析分析装置, 其中, 添加至所述试样添加部的试样为包含所述水痘带状疱疹病毒的水疱内容液。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的免疫层析分析装置, 其中, 所述标记物质保持部所含有的标记物质为金胶体粒子, 并且所述标记物质保持部含有0.05至1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的所述金胶体粒子。

6. 一种免疫层析分析试剂盒, 包含权利要求1至5中任一项所述的免疫层析分析装置、以及用于稀释并展开检体的检体稀释液。

7. 根据权利要求6所述的免疫层析分析试剂盒, 其中, 所述检体稀释液含有至少一种非离子性表面活性剂。

8. 一种免疫层析分析方法, 其中使用包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部的免疫层析分析装置来检测检体中的水痘带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV), 所述免疫层析分析装置的所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E (VZVgE) 的氨基酸序列第1-188号的抗体,

所述方法包括以下步骤 (1) 至 (4) :

- (1) 将由检体稀释液稀释检体而得的检体含有液添加到试样添加部中的步骤;
- (2) 通过保持在标记物质保持部中的抗体来识别水痘带状疱疹病毒的步骤;
- (3) 使所述检体及抗体作为移动相在层析介质部中展开的步骤; 以及
- (4) 通过检测部中所含的抗体来检测所展开的移动相中的水痘带状疱疹病毒的步骤。

专利名称(译)	水痘带状疱疹病毒检测用免疫层析分析装置		
公开(公告)号	CN108291914A	公开(公告)日	2018-07-17
申请号	CN201680069045.1	申请日	2016-11-25
[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	铃木启太 岩本久彦 望月浩子		
发明人	铃木启太 岩本久彦 望月浩子		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C07K16/08 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/08 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/6854 G01N2333/04 G01N33/56994 G01N2800/26		
代理人(译)	常海涛 孙微		
优先权	2015230928 2015-11-26 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供特异地检测水痘带状疱疹病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)的方法。本发明涉及一种用于检测水痘带状疱疹病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)的免疫层析分析装置, 其包含试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质部、以及吸收部, 所述标记物质保持部及检测部中的至少一者含有识别由序列编号1的氨基酸序列构成的所述水痘带状疱疹病毒的糖蛋白E(VZVgE)的氨基酸序列第1-188号的抗体。

