



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102066932 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 31

(21) 申请号 200980123859. 9
(22) 申请日 2009. 06. 30
(30) 优先权数据
2008-182630 2008. 07. 14 JP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010. 12. 23
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2009/003010 2009. 06. 30
(87) PCT国际申请的公布数据
W02010/007734 JA 2010. 01. 21
(73) 专利权人 田中贵金属工业株式会社
地址 日本东京
(72) 发明人 伊藤大辅
(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290
代理人 张淑珍 王维玉
(51) Int. Cl.
G01N 33/531 (2006. 01)
G01N 33/543 (2006. 01)
G01N 33/553 (2006. 01)
(56) 对比文件
JP 2007-322310 A, 2007. 12. 13, 权利要求

2、5, 说明书第 [0022]、[0025] 段, 实施例。
JP 2002-148266 A, 2002. 05. 22, 权利要求
1-5, 说明书第 [0001]-[0047] 段。
JP 2003-344406 A, 2003. 12. 03, 权利要求
1-16, 说明书第 [0005]-[0048]、[0079] 段。
JP 2004-301684 A, 2004. 10. 28, 权利要求
3-4, 说明书第 [0012]-[0013]、[0020]-[0023]
段, 实施例 1-6。
JP 2006-145256 A, 2006. 06. 08, 权利要求
1-6, 说明书第 [0001]-[0038] 段。
JP 5-133956 A, 1993. 05. 28, 权利要求书, 实
施例。
US 2006/216695 A1, 2006. 09. 28, 全文。
JP 2008-104450 A, 2008. 05. 08, 全文。
JP 2005-291780 A, 2005. 10. 20, 权利要求
1-14, 说明书第 [0002]-[0027] 段。
JP 10-177028 A, 1998. 06. 30, 权利要求书,
实施例。
DE 4129901 A1, 1993. 03. 11, 全文。

审查员 曲凯

权利要求书1页 说明书12页

(54) 发明名称
免疫色谱法用展开液及使用该展开液的测定
方法

(57) 摘要

本发明提供一种免疫色谱法中使用的准确且高灵敏的展开液, 所述展开液在抑制由样品中所含的被检测物质以外成分的非特异性吸附引起的假阳性反应的同时, 即使对于低浓度的被检测物质, 也能足以检出。本发明涉及一种使用不溶性载体标记检测试剂的免疫色谱法用展开液, 所述展开液包含非离子型表面活性剂以及具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物。

1. 一种使用不溶性载体标记检测试剂的免疫色谱法用展开液在阳性信号放大方面的用途,所述展开液包含 HLB 值为 13-18 的非离子型表面活性剂以及具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物,所述具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的分子量为 1 万 -100 万。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其中,所述具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的分子量为 10 万 -100 万。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中,所述不溶性载体为胶体状金属粒子。

4. 如权利要求 3 所述的用途,其中,所述胶体状金属粒子为胶体状金粒子。

5. 一种免疫色谱法中的样品稀释液在阳性信号放大方面的用途,其中,所述样品稀释液包含 HLB 值为 13-18 的非离子型表面活性剂以及具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物,所述具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的分子量为 1 万 -100 万。

6. 如权利要求 5 所述的用途,其中,所述具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的分子量为 10 万 -100 万。

免疫色谱法用展开液及使用该展开液的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及作为免疫测定方法之一的免疫色谱法中构成流动相的展开液。另外，本发明还涉及使用所述展开液可高灵敏度地检测出生物样品中含有的被检测物质的测定方法。

背景技术

[0002] 在利用抗原和其对应抗体的特异性反应、通过特定的抗原或抗体检测被检测物质的免疫测定法中，将样品中的被检测物质与经敏化处理的、结合于检测用粒子上的抗体或抗原通过免疫反应结合，测定由此产生的检测用粒子凝集状态的凝集法被公认是一种简便的方法，特别是结果可目测判断的特点，使其作为常用的方法。

[0003] 此外，通过标记物质标记的抗体或抗原通过免疫反应与样品中的被检测物质结合，测定处于该结合状态的标记物质等的方法也是已知的，也采用使用放射性同位素作为标记物质的放射性免疫测定法、使用酶作为标记物质的酶免疫测定法、使用荧光物质作为标记物质的荧光免疫测定法等。

[0004] 在以上免疫测定法中，被检测物质与用标记物质标记的抗体等反应的工序、将处于与被检测物质相结合状态的标记物质和未处于结合状态的标记物质的分离工序为必须的。以上工序应用色谱原理，即固定相和与其接触而连续性流动的流动相构成体系实施的方法，称为免疫色谱法。

[0005] 免疫测定的形式中，已知有三明治式或竞争式等，作为典型例子，通过免疫色谱法的三明治式，例如检测样品中的抗原构成被检测物质的情况下，可采用如下操作：

[0006] (1) 将与作为被检测物质的抗原特异性结合的抗体作为固定化试剂，通过将该固定化试剂以特定的形状涂布在色谱介质特定的部位等，在色谱介质的任意位置形成反应部位。

[0007] (2) 另一方面，将与被检测物质特异性结合的抗体作为检测试剂，该检测试剂用酶等标记物质标记，或者该检测试剂用不溶性载体等标记物质敏化，配制标记的检测试剂。

[0008] (3) 构成流动相的展开液与含有被检测物质的样品以及标记的检测试剂一起在作为固定相的色谱介质上展开。

[0009] 通过上述操作，在色谱介质形成的反应部位上，作为被检测物质的抗原通过与固定在反应部位的、作为固定化试剂的抗体结合被捕捉的同时，该抗原与作为标记的检测试剂的抗体发生抗原-抗体反应，其结果在该反应部位上形成固定化试剂（固定化的抗体）-被检测物质（抗原）-检测试剂（标记的抗体）三者的三明治型结合体，样品中存在被检测物质时，由于在反应部位间接地与标记物质结合，因此会出现特定的信号，由此可实现被检测物质的检测。

[0010] 如上的免疫色谱法，由于操作简便、测定时间短，因此广泛应用于临床检查或实验室中的测定试验等。免疫色谱法的标记物质，一般使用酶或不溶性载体，不需要特别的操作，通过将可目测的不溶性载体（胶体状金属粒子或着色胶乳粒子）用作标记物质，可使作

为检测方法的、以简便为特点的免疫色谱法的使用价值进一步提高。

[0011] 但是,将不溶性载体用作标记物质来敏化检测试剂的情况下,标记的检测试剂不发生凝集且在色谱介质上能切实的展开移动并达到反应部位是必不可少的。因此,对于免疫色谱法中的展开液,为了使通过不溶性载体标记的检测试剂的分散状态稳定,可适度添加分散稳定剂。作为如上的分散稳定剂,可使用例如蛋白质、多糖类、表面活性剂等。具体地,例如明胶、酪蛋白、牛血清白蛋白、阿拉伯胶、葡聚糖、淀粉、甲基纤维素、聚赖氨酸、聚脯氨酸、聚乙二醇等。但是,将上述分散稳定剂添加到展开液中时,通常会增大展开液的粘度,以致展开速度低下。展开速度低下不仅会延长测定时间、降低测定结果的重现性,还会因为样品中所含的被检测物质以外成分的非特异性吸附引起假阳性反应的问题。

[0012] 而且,在将不溶性载体用作标记物质的情况下,与将酶用作标记物质的情况相比,具有反应部位检测出的信号弱的问题。在将酶用作标记物质的情况下,在反应部位蓄积由酶反应产生的不溶性物质,因此会出现阳性信号放大,可实现较高灵敏度的测定。而另一方面,在将不溶性载体用作标记物质的情况下,不能得到与反应部位捕捉的不溶性载体的数量相应的阳性信号,特别是使用小体积的不溶性载体时,此问题尤为显著。

[0013] 关于上述问题,已提出如下方案,作为不会增大展开液粘度的分散稳定剂,使用具有含氧原子的极性基团的聚乙烯类水溶性聚合物(例如,参照专利文献1);为防止被检测物质以外成分的非特异性吸附,可向含有被检测物质的试液中添加非离子型表面活性剂或甘氨酸衍生物(例如,参照专利文献2和专利文献3);或使用作为灵敏度增强剂的、含有在侧链上具有磷酸酯甜菜碱结构基团的聚合物(例如,参照专利文献4)等。现有技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献1:特开平5-133956号公报

[0016] 专利文献2:特开2005-291783号公报

[0017] 专利文献3:特开2005-291780号公报

[0018] 专利文献4:特开2003-344413号公报

发明内容

[0019] 但是,作为在抑制由样品中所含的被检测物质以外成分的非特异性吸附引起的假阳性反应的同时,即使对于低浓度的被检测物质也能足以检出的、准确且高灵敏度的免疫色谱法,任一现有技术都无法满足。而且,在充分提高用不溶性载体标记的检测试剂分散状态的情况下,为使不溶性载体之间保持适当的距离,不可能得到在反应部位阳性信号的放大,很难提供高灵敏度的测定方法。

[0020] 通过本发明者们深入的研究发现,用免疫色谱法测定被检测物质时,在乙烯类水溶性聚合物和非离子型表面活性剂存在下,使被检测物质及不溶性载体标记的检测试剂展开,可抑制非特异性反应,同时,即使是低浓度的被检测物质,也能够高灵敏度地检测,从而完成本发明。特别是发现,使用包含非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的聚乙烯类水溶性聚合物的展开液构成流动相,由于在具有含氧原子的极性基团的聚乙烯类水溶性聚合物的存在下,处于适度分散状态的检测试剂与作为结合助剂的表面活性剂相互吸引而结合,使反应部位目测检出的阳性信号放大,可得到现有技术达不到的信噪比(S/N),从而完成本发明。

[0021] 即,本发明涉及一种包含非离子型表面活性剂以及具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的免疫色谱法用展开液。

[0022] 而且,本发明还涉及以上述展开液构成流动相为特征的免疫色谱法。

[0023] 进一步,本发明还涉及一种利用免疫色谱法的检测试剂盒,所述试剂盒包含免疫色谱法中的色谱介质以及上述的本发明的展开液。

[0024] 而且,本发明还涉及一种免疫色谱法中的样品稀释液,所述稀释液包含非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物。

[0025] 本发明更具体的说明如下:

[0026] (1) 一种使用不溶性载体标记检测试剂的免疫色谱法用展开液,所述展开液包含 HLB 值为 13-18 的非离子型表面活性剂以及具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物。

[0027] (2) 如上述 (1) 中所述的展开液,其中,所述不溶性载体为胶体状金属粒子。

[0028] (3) 如上述 (2) 中所述的展开液,其中,所述胶体状金属粒子为胶体状金粒子。

[0029] (4) 一种免疫色谱法,其特征在于,使用如 (1)-(3) 中任一项所述的展开液作为构成流动相的展开液。

[0030] (5) 一种利用免疫色谱法的检测试剂盒,其中,所述试剂盒包含免疫色谱法中的色谱介质以及如上述 (1)-(3) 中任一项所述的展开液。

[0031] (6) 一种免疫色谱法中的样品稀释液,其中,所述样品稀释液包含非离子型表面活性剂以及具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物。

[0032] (7) 如上述 (6) 所述的样品稀释液,其中,所述具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物为具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物。

[0033] (8) 如上述 (6) 或 (7) 所述的样品稀释液,其中,所述非离子型表面活性剂为 HLB 值为 13-18 的非离子型表面活性剂。

[0034] 通过本发明,可提供一种将不溶性载体用作标记物质的免疫色谱法,在抑制由样品中所含的被检测物质以外成分的非特异性吸附引起的假阳性反应的同时,即使对于低浓度的被检测物质,也能够充分检出的准确且高灵敏度的免疫色谱法。特别是,观察到作为流动相的展开液中存在的具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物,提高使用不溶性载体标记的检测试剂分散状态的稳定性,另一方面通过非离子型表面活性剂与不溶性载体之间适当相互吸引而结合而抑制非特异性反应的同时,观察到反应部位的阳性信号放大。由此,可得到现有技术达不到的信噪比 (S/N)。

[0035] 而且,本发明的展开液不但可作为展开液使用,也可作为样品稀释液使用,也可将样品稀释用的稀释液直接作为免疫色谱法用展开液。特别是,被检测物质为流感病毒抗原的情况下,不仅可作为鼻腔或咽擦拭液等的样品稀释液,还可作为含有对病毒抗原具有优良溶解性的被检测物质的样品溶解液使用。

具体实施方式

[0036] 下面更具体地对本发明进行说明。

[0037] 色谱介质

[0038] 本发明免疫色谱法中使用的色谱介质为显示毛细现象的微细多孔材料制成的情

性物质,与使用的检测试剂、固定化试剂、被检测物质等均不反应,只要通过短时间判断具有达到足够灵敏度的展开速度,对其材质无特殊限制。

[0039] 本发明中,作为色谱介质可列举二氧化硅、二氧化钛、氧化锆、氧化铈、氧化铝等陶瓷微粒或有机高分子微粒;聚氨酯、聚酯、聚乙烯、聚氯乙烯、聚偏二氟乙烯、尼龙、硝酸纤维素或醋酸纤维素等纤维素衍生物等构成的纤维状或非纤维状基质、膜、滤纸、玻璃纤维滤纸、布、棉等。微粒本身具有多孔性,而且在填充状态下微粒之间也会产生空隙,从而具备色谱介质的功能。优选纤维素衍生物或尼龙的膜、滤纸、玻璃纤维滤纸等,更优选硝酸纤维素膜以及混合硝酸纤维素酯(硝酸纤维素和醋酸纤维素的混合物)膜、尼龙膜、滤纸。

[0040] 本发明的实施中,对提供的色谱介质的形态及大小没有特别限制,只要适合实际操作及反应结果的观察即可。为了使操作简便,优选在表面形成反应部位的色谱介质的背面,设置塑料等制成的支撑体。对该支撑体的形状没有特别限制,在目测观察测定结果的情况下,优选具有与标记物质产生的颜色不相类似的颜色的支撑体,一般优选为无色或白色的支撑体。

[0041] 反应部位

[0042] 在本发明中使用的色谱介质上,与被检测物质特异性结合的物质(例如作为固定化试剂固定在任意位置的抗体)形成反应部位。作为将固定化试剂固定在色谱介质上的方法,有将固定化试剂与色谱介质通过物理或化学的方法固定在色谱介质上的直接固定化方法;以及固定化试剂与胶乳粒子等微粒通过物理或化学的结合,再将该粒子捕捉固定在色谱介质上的间接固定化方法。

[0043] 作为直接固定化方法,可利用物理吸附,也可通过共价键结合。通常色谱介质为硝酸纤维素膜、混合硝酸纤维素酯膜时,可使用物理吸附。通过共价键活化色谱介质可使用溴化氰、戊二醛、碳二亚胺等,也可用任意的办法。作为间接固定化方法,固定化试剂与不溶性微粒结合后,再固定在色谱介质的方法。不溶性微粒的粒径应选择能被色谱介质捕捉但不会移动的微粒尺寸,优选平均粒径为约 $10\mu\text{m}$ 以下的微粒。作为该微粒,已知有多种微粒可用于抗原抗体反应,本发明中,也可使用这些公知的微粒。例如聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸缩水甘油酯、丙烯醛-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物等通过乳化聚合法得到的有机高分子胶乳粒子等的有机高分子物质微粒;明胶、膨润土、琼脂糖、交联葡聚糖等微粒;硅胶、硅胶-氧化铝、氧化铝等无机氧化物或对无机氧化物进行硅烷偶联处理等导入官能团的无机粒子等。本发明中,从灵敏度调整的简便性出发,优选直接固定化方法。而且,可使用多种方法将固定化试剂固定在色谱介质上。可使用例如微量注射、具有调节泵的笔、喷墨印刷等各种技术。对反应部位的形态没有特别限制,可固定化为圆形的点、与色谱介质展开方向垂直延伸的线、数字、文字或+、-等记号等。

[0044] 将固定化试剂固定后,为防止由非特异性吸附引起的分析精度降低,根据需要,可通过公知的方法对色谱介质进行封闭处理。封闭处理一般使用牛血清白蛋白、脱脂奶粉、酪蛋白、明胶等蛋白质。经过封闭处理后,根据需要,可以使用 Tween 20、Triton X-100、SDS 等表面活性剂中的一种或两种以上组合进行清洗。

[0045] 此外,根据需要,色谱介质中,可由以下部位组成:用于添加含有被检测物质的样品的样品添加部位(样品垫等)、除去样品中血细胞等固体部分的部位(血细胞分离部位等)、用于添加展开液的展开液添加部位、吸收未被反应部位捕捉的被检测物质或展开液的

吸收部位（吸收垫等）、表示测定正常进行的对照部位等。上述部位的构成材料，只要能通过毛细现象使样品液和展开液移动就没有特别限制，一般从硝酸纤维素膜、滤纸、玻璃纤维滤纸等各种多孔性物质中选择适用于该目的的材料，通过毛细管与固定有固定化试剂的色谱介质连接进行装配。

[0046] 标记物质

[0047] 本发明中使用的检测试剂为与被检测物质特异性结合的物质，例如抗体，用标记物质标记得到。免疫色谱法中检测试剂的标记，一般可使用酶等，从适于目测判断被检测物质的存在出发，将不溶性载体用作本发明的标记物质。在本发明中，通过不溶性载体敏化检测试剂，配制成标记的检测试剂。

[0048] 本发明中使用的作为标记物质的不溶性载体，可以使用例如金、银、铂等的胶体状金属粒子；氧化铁等的胶体状金属氧化物粒子；硫磺等的胶体状非金属粒子及合成高分子构成的胶乳粒子等。

[0049] 不溶性载体为适合目测判断被检测物质存在的标记物质，为使目测判断容易，优选有色物质。胶体状金属粒子及胶体状金属氧化物粒子根据自身的粒径会呈现特定的自然色，因此可利用其颜色进行标记。合成高分子构成的胶乳粒子自然状态为白色，因此不能直接作为标记物质使用，通过例如油溶性染料进行染色，特别是对于水性溶剂中的胶乳粒子，通过油溶性染料的油性有机溶剂溶液的乳状液进行染色，可得到所需颜色及所需深浅的标记物质。

[0050] 本发明中作为标记物质使用的胶乳粒子，可通过各种单体的聚合或共聚得到。在此，作为单体可列举：例如苯乙烯、氯苯乙烯、 α -甲基苯乙烯、二乙烯苯、乙烯基甲苯等聚合性不饱和芳烃类；例如（甲基）丙烯酸、衣康酸、马来酸、富马酸等聚合性不饱和羧酸类；例如（甲基）丙烯酸甲酯、（甲基）丙烯酸乙酯、（甲基）丙烯酸正丁酯、（甲基）丙烯酸-2-羟乙酯、（甲基）丙烯酸缩水甘油酯、乙二醇二（甲基）丙烯酸酯、（甲基）丙烯酸三溴苯酯等聚合性不饱和羧酸酯类；（甲基）丙烯腈、（甲基）丙烯醛、（甲基）丙烯酰胺、N-羟甲基-（甲基）丙烯酰胺、亚甲基双（甲基）丙烯酰胺、丁二烯、异戊二烯、醋酸乙烯、乙烯基吡啶、N-乙烯吡咯烷酮、氯乙烯、偏二氯乙烯、溴乙烯等不饱和羧酸酰胺类；聚合性不饱和腈；卤化乙烯类；共轭二烯等。上述单体可根据标记物质所要求的表面特性、比重等适当选择，可单独使用一种或两种以上混合使用。

[0051] 本发明中作为标记物质特别优选胶乳粒子，可列举例如苯乙烯和甲基丙烯酸的共聚物、苯乙烯和衣康酸的共聚物等。作为制备上述共聚物的聚合反应的聚合引发剂，可使用过硫酸盐。作为标记物质的胶乳粒子的平均粒径优选 50-500nm 范围内。

[0052] 另一方面，本发明中作为标记物质使用的胶体状金属粒子及胶体状金属氧化物粒子，可列举例如：胶体状金粒子、胶体状银粒子、胶体状铂粒子、胶体状氧化铁粒子、胶体状氢氧化铝粒子等。特别是，在具有合适粒径的胶体状金粒子和胶体状银粒子中，优选胶体状金粒子显红色、胶体状银粒子显黄色的点。上述胶体状金属粒子的平均粒径为 1-500nm，特别是得到强烈颜色的 10nm-150nm，更优选在 20-100nm 范围内。

[0053] 关于以上不溶性载体，无论是胶乳粒子或胶体状金属粒子，已知其表面带负电荷（例如，参照特开平 5-133956 号公报）。例如，胶体状金属粒子，其表面吸附有来自制造过程中添加的还原剂负离子，从而防止相互凝集，保持分散状态。所以，已知向该状态的胶体

状金属粒子中添加不足以中和表面电荷的低浓度表面活性剂,可得到粒子呈不同程度的链状凝集(特开 2006-58781 号公报)。由此推测,在本发明的免疫色谱法中,向构成流动相的展开液中添加非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物,通过在色谱介质的反应部位上捕捉到的不溶性载体呈不同程度的凝集,从而发现在反应部位观察到阳性信号放大。特别是,可推测有如下可能,胶体状金属粒子通过凝集使在反应部位蓄积的粒子数增加,不仅增加了目测判断的信号量,而且改变了粒子的吸收光谱特性,使反应部位产生明确的阳性信号。由于上述优点,作为本发明的标记物质,优选胶体状贵金属粒子,特别是胶体状金粒子。

[0054] 作为胶体状金属粒子,例如在使用胶体状金粒子的情况下,可使用市售的产品。或者,也可依常规方法,用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备胶体状金粒子。

[0055] 作为本发明中使用的用胶体状金属粒子敏化检测试剂的方法,可使用物理吸附、化学结合等公知方法。例如,胶体状金粒子敏化抗体的检测试剂,是向金粒子为胶体状分散的溶液中加入抗体进行物理吸附后,通过添加牛血清白蛋白溶液封闭未结合抗体的粒子表面制成。

[0056] 实际实施免疫色谱法时,可以将不溶性载体标记的检测试剂分散到构成流动相的展开液中进行应用,或可以使不溶性载体标记的检测试剂存在于构成固定相的色谱介质中的流动相的展开流动路径上(即色谱介质的流动相可应用的顶端和反应部位之间的区域)进行应用。存在于色谱介质上的情况下,优选检测试剂可迅速溶于展开液、并通过毛细作用自由移动,将检测试剂担载。为了使敏化检测试剂的不溶性载体具有良好的再溶解性,在担载部位上,可添加涂布蔗糖、麦芽糖、乳糖等糖类和甘露醇等糖醇,预先涂敷这些物质。通过涂布、干燥等使检测试剂存在于色谱介质上时,可通过涂布、干燥等使检测试剂直接存在于固定有固定化试剂的色谱介质上,也可通过涂布、干燥等,在其他多孔性物质(例如纤维素滤纸、玻璃纤维滤纸、尼龙无纺布等)上形成检测试剂担载材料后,再与固定有固定化试剂的色谱介质通过毛细管连接进行装配。

[0057] 被检测物质

[0058] 作为可通过本发明的方法检测的被检测物质,只要存在特异性结合物质,就没有特别限制,可列举蛋白质、多肽、核酸、糖(特别是糖蛋白质的糖部分、糖脂质的糖部分等)、复合糖等。本发明中所说的“特异性结合”,是指基于生物分子所具有亲和力的结合。作为基于该亲和力的结合,可列举抗原与抗体的结合、糖与凝集素的结合、激素与受体的结合、酶与抑制剂的结合、互补的核酸之间以及核酸与核酸结合蛋白的结合等。因此,被检测物质具有抗原性的情况下,作为与被检测物质特异性结合的物质可列举多克隆抗体或单克隆抗体。另外,被检测物质为糖的情况下,作为与被检测物质特异性结合的物质可列举凝集素蛋白质。作为具体的被检测物质,可列举但不限于,例如癌胚抗原(CEA)、HER2 蛋白、前列腺特异性抗原(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、大便潜血、肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 T、CK-MB、CRP、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、促黄体生成激素(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 β 溶血性链球菌抗原、HBs 抗体、HBs 抗原、轮状病毒、腺病毒、白蛋白、糖化白蛋白等。其中优选通过非离子表面活性剂可溶解的抗原,更优选形成病毒核蛋白这样的自聚体的抗原。

[0059] 作为含有上述被检测物质的样品,可列举例如生物样品,即全血、血清、血浆、尿、唾液、痰、鼻腔或咽擦拭液、脊髓液、羊水、乳头分泌液、泪、汗、皮肤浸出液、组织或细胞以及大便提取物等。根据需要,将上述样品处理为被检测物质与检测物质或固定化试剂容易发生特异性结合反应的状态。处理方法有使用酸、碱、表面活性剂等各种化学药品的化学处理法,以及使用加热、搅拌、超声波等物理处理法,可使用任意一种方法或同时使用两种方法。特别是,利用流感病毒核蛋白(NP)抗原等通常在表面不露出区域、被检测物质与检测试剂或固定化试剂进行结合反应的情况下,优选使用表面活性剂进行处理。作为用于该用途的表面活性剂,考虑到会影响特异性结合反应,例如抗原抗体反应,优选使用非离子型表面活性剂。而且,根据需要,使用能在作为固定相的色谱介质上展开的展开液来稀释上述样品。

[0060] 实际实施免疫色谱法时,对于反应部位样品的应用可以是使样品液在色谱介质上展开,使其进行色谱法移动。该情况下,样品液的展开可以与构成流动相的展开液的展开同时进行,或者,也可以是先将样品液展开,然后再使展开液展开。

[0061] 展开液

[0062] 本发明用的展开液为免疫色谱法中构成流动相的液体,在作为固定相的色谱介质上与含有被检测物质的样品及标记的检测试剂一起移动。

[0063] 而且,本发明的展开液不仅可以作为展开液使用,也可以作为样品稀释液使用,或者可以将样品稀释用的稀释液直接作为免疫色谱法的展开液使用。

[0064] 乙烯类水溶性聚合物

[0065] 本发明中使用的展开液,以包含具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物为特征。作为所述具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物,可列举具有乙烯醇、甲基乙烯基醚、(甲基)丙烯酸、羟烷基(甲基)丙烯酸酯、(甲基)丙烯酰胺、二甲基(甲基)丙烯酰胺、乙烯吡咯烷酮等具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性单体的聚合物;优选具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性单体的聚合物;更优选具有含氧原子的极性基团的非离子型乙烯类水溶性单体的聚合物;进一步优选具有打开非离子型乙烯类水溶性单体的双键后的构造单元的聚合物,所述的非离子型乙烯类水溶性单体具有含氧原子和氮原子的极性基团;特别优选具有打开乙烯吡咯烷酮双键后的构造单元的聚合物。

[0066] 在不破坏发明效果的程度上,这些乙烯类水溶性聚合物也可以是使醋酸乙烯酯、烷基(甲基)丙烯酸酯等其他乙烯类单体以例如50mol%以下、优选30mol%以下、特别优选15mol%以下的比例进行共聚得到的物质。

[0067] 作为这些乙烯类水溶性聚合物的优选具体例,可列举聚乙烯吡咯烷酮、二甲基丙烯酰胺/乙烯吡咯烷酮共聚物(二甲基丙烯酰胺的共聚比例为50mol%以下)、乙烯醇/乙烯吡咯烷酮共聚物(乙烯醇的共聚比例为50mol%以下)、醋酸乙烯酯/乙烯吡咯烷酮共聚物(醋酸乙烯酯的共聚比例为20mol%以下)等。

[0068] 这些乙烯类水溶性聚合物的分子量通常为1万-100万,特别地,优选10万-100万,更优选20万-50万。而且,展开液中该乙烯类水溶性聚合物的浓度优选0.01-5.0重量%,更优选0.1-2.0重量%。

[0069] 非离子型表面活性剂

[0070] 本发明使用的展开液,除含有上述具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物外,还含有非离子型表面活性剂。作为非离子型表面活性剂,可以优选使用HLB值为

10-18、进一步优选 HLB 值为 13-18 的聚氧乙烯类表面活性剂。作为聚氧乙烯类表面活性剂的优选例,可列举聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯(商品名“Tween”系列)、对-t-辛基酚聚氧乙烯醚(商品名“Triton”系列)、对-t-壬基酚聚氧乙烯醚(商品名“Triton N”系列)等,更具体的说,可列举“Tween”系列中特别是 Tween 20(商品名,HLB 值 16.7)、Tween 40(商品名,HLB 值 15.6)、Tween 60(商品名,HLB 值 15.0)、Tween 80(商品名,HLB 值 14.9);“Triton”系列中特别是 Triton X-100(商品名,HLB 值 13.5)、Nonidet P-40(商品名,HLB 值 13.1)、Triton X-102(商品名,HLB 值 14.6)、Triton X-165(商品名,HLB 值 15.8)、Triton X-405(商品名,HLB 值 17.9);“Triton N”系列中特别是 Triton N-101(商品名,HLB 值 13.5)、Triton N-111(商品名,HLB 值 13.8)、Triton N-150(商品名,HLB 值 15.0)等。非离子型表面活性剂可单独或两种以上混合使用。虽然对上述非离子型表面活性剂的含量没有特别限制,但相对于组合物的总重量,非离子型表面活性剂的含量在 0.01-10 重量%的范围内,优选 0.05-5 重量%。

[0071] 本发明中使用的展开液,一般以水作为溶剂,除上述非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物外,优选含有缓冲剂。作为缓冲剂的优选例,可列举磷酸盐、三羟甲基氨基甲烷、Good 氏缓冲液等。另外,作为其他成分,可任选含有牛血清白蛋白(BSA)等的蛋白质成分(含量通常为 0.01 重量%-10 重量%)。

[0072] 作为本发明的一种实施方式,可以预先在构成色谱介质上流动层的展开液中,添加非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物后,使展开液在色谱介质上展开。作为本发明的另一种实施方式,使非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物存在于构成固定相的色谱介质上的流动相的展开流动路径上,即色谱介质的流动相的可应用的顶端和反应部位之间的区域,可通过展开液在形成流动层时溶解而添加。更进一步,作为本发明的另一种实施方式,可以向含有被检测物质的样品中添加非离子型表面活性剂,样品液的展开与包含具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的溶液的展开同时进行、或者样品液的展开先行进行,由此在流动相的展开流动路径上,向构成流动相的展开液中添加非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物。在该情况下,在固定相上流动之前,包含具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的溶液虽然不必一定含有非离子型表面活性剂,但含有该非离子型表面活性剂也可以。

[0073] 下面通过实施例对本发明加以说明,但本发明不仅限于实施例。

[0074] 实施例 1

[0075] 1. 向色谱介质上制备反应部位

[0076] 使用抗体涂布机(BioDot 公司制造),将用含有 5 重量%异丙醇的磷酸缓冲溶液(pH 7.4)稀释为浓度 1.0mg/mL 的抗流感病毒 B 单克隆抗体涂布到 25×2.5cm 的硝酸纤维素膜(millipore 公司制造:HF 120)上,50℃干燥 30 分钟。干燥后,在含有 0.5 重量%的酪蛋白(和光純薬工業社制造)的磷酸缓冲溶液(pH 7.4)200mL 中于 30℃浸泡该硝酸纤维素膜 30 分钟,进行封闭。封闭后,用含有 0.05 重量% Tween 20 的清洗液清洗,室温干燥过夜,向色谱介质上制备反应部位。

[0077] 2. 标记物质溶液的制备

[0078] 向 0.5mL 金胶体悬浊液(田中贵金属工業社制造:平均粒径 40nm)中,加入用磷酸

缓冲溶液 (pH 7.4) 稀释为浓度 0.1mg/mL 的抗流感病毒 B 单克隆抗体 0.1mL, 室温静置 10 分钟。然后, 加入含有 10 重量%牛血清白蛋白的磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 0.1mL, 充分搅拌后, 8000×g 下离心 15 分钟。除去上清液后, 加入含有 1 重量%牛血清白蛋白的磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 0.1mL, 制成标记物质溶液。

[0079] 3. 色谱介质的制备

[0080] 将上述制备的标记物质溶液均匀添加到玻璃纤维制的垫上后, 真空干燥机干燥, 作为检测试剂担载材料。然后, 在由填料片制成的基质上, 贴合上述制备的色谱介质、检测试剂担载材料、用于添加部分样品用的样品垫、以及用于吸收展开的试剂和不溶性载体的吸收垫。最后, 用切割机切成 5mm 的宽度, 制备色谱介质。

[0081] 4. 测定

[0082] 使用上述制备的色谱介质, 通过以下方法测定样品中是否有流感病毒 B 存在。即, 将含有 0.5 重量%的 Tween 20、0.6 重量%的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) K-90 (平均分子量 36 万)、1.0 重量%的牛血清白蛋白和 150mM 氯化钠的 Tris 缓冲液 (pH 8.0) 制成的展开液作为阴性检测样品, 向其中加入灭活处理的流感病毒 B 后的溶液作为阳性检测样品, 将上述检测样品各 150 μ L 分别加载于色谱介质的样品垫上, 并展开, 15 分钟后目测判断。反应部位上检测线的红线可非常明确确认的情况, 记为“+++”; 可明确确认是红线的情况, 记为“++”; 可确认是红线的情况, 记为“+”; 可确认是红线但颜色较浅的情况, 记为“±”; 不可确认是红线的情况, 记为“-”。结果如表 1 所示。

[0083] 比较例 1

[0084] 使用实施例 1 中制备的色谱介质, 作为展开液, 除使用不含有 Tween 20 的展开液以外, 其他与实施例 1 同样测定。结果如表 1 所示。即使 PVP K-90 量为 2 倍, 也可得到同样的结果。

[0085] 比较例 2

[0086] 使用实施例 1 中制备的色谱介质, 作为展开液, 除使用不含有 PVP K-90 的展开液以外, 其他与实施例 1 同样测定。结果如表 1 所示。即使 Tween 20 量为 2 倍, 也可得到同样的结果。

[0087] 比较例 3

[0088] 使用实施例 1 中制备的色谱介质, 作为展开液, 除使用不含有 Tween 20 和 PVP K-90 的展开液以外, 其他与实施例 1 同样测定。结果如表 1 所示。

[0089] 比较例 4

[0090] 使用实施例 1 中制备的色谱介质, 作为展开液, 除使用 0.6 重量%的羧甲基纤维素钠 (CMC·Na) (フルカ社制造: 粘度 400-1000mPa·s, 2%的水溶液, 25°C) 代替 PVP K-90 以外, 其他与实施例 1 同样测定。结果如表 1 所示。

[0091] 实施例 2

[0092] 使用实施例 1 中制备的色谱介质, 作为展开液, 除使用 0.3 重量%的 Triton X-100 代替 Tween 20 以外, 其他与实施例 1 同样测定。结果如表 1 所示。

[0093] 比较例 5

[0094] 使用实施例 1 中制备的色谱介质, 作为展开液, 除使用聚乙二醇 (PEG) (和光純薬工業社制造, 平均分子量 2 万) 代替 PVP K-90、用 0.3 重量%的 Triton X-100 代替 Tween

20 以外,其他与实施例 1 同样测定。结果如表 1 所示。

[0095] 比较例 6

[0096] 使用实施例 1 中制备的色谱介质,作为展开液,除使用 0.3 重量%的胆酸钠代替 Tween 20 以外,其他与实施例 1 同样测定。结果如表 1 所示。

[0097] 实施例 3

[0098] 使用实施例 1 中制备的色谱介质,作为展开液,除使用 0.05 重量%的 Tween 20 及 0.3 重量%的 Triton X-100 代替 0.5 重量%的 Tween 20 以外,其他与实施例 1 同样测定。结果如表 1 所示。

[0099] 表 1

[0100] 有封闭

	水溶性高分子	表面活性剂	来自流感病毒 B 的核蛋白浓度 (ng/mL)				S/N
			0	5	10	50	
实施例 1	PVP	Tween 20	-	+	+	+++	+++
比较例 1	PVP	无	-	-	±	++	++
比较例 2	无	Tween 20	-	-	±	++	++
比较例 3	无	无	-	-	-	+	+
比较例 4	CMC · Na	Tween 20	++	++	++	+++	+
实施例 2	PVP	Triton X-100	-	+	+	+++	+++
比较例 5	PEG	Triton X-100	++	++	++	+++	+
比较例 6	PVP	胆酸钠	-	-	±	+	+
实施例 3	PVP	Tween 20+ Triton X-100	-	+	++	+++	+++

[0102] 将上述实施例 1-3 与比较例 1-3 进行比较表明,在非离子型表面活性剂和作为具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的 PVP 存在下,可高灵敏度的检出来自流感病毒 B 的核蛋白。另一方面,将羧甲基纤维素钠 (CMC · Na) 或聚乙二醇作为水溶性聚合物使用的情况下,发现阴性检测样品也存在非特异性吸附 (比较例 4 和比较例 5)。在离子型表面活性剂胆酸钠与 PVP 共同使用的情况下,不能高敏感度地实现检测 (比较例 6)。即,发现本发明的含有非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的展开液用于免疫色谱法,由此可得到良好的 S/N 值。

[0103] 实施例 4

[0104] 除不进行封闭及清洗处理外,其他与实施例 1 同样制备色谱介质。作为展开液,除用 0.05 重量%的 Tween 20 和 0.3 重量%的 Triton X-100 代替 0.5 重量%的 Tween 20 以外,其他与实施例 1 同样测定。结果如表 2 所示。

[0105] 表 2

[0106] 无封闭

	水溶性高分子	表面活性剂	来自流感病毒 B 的核蛋白浓度 (ng/mL)			
			0	2.5	5	10
实施例 4	PVP	Tween 20+ Triton X-100	-	+	+	++

[0108] 在非离子型表面活性剂和具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的存

在下,即使不对色谱介质进行封闭处理,来自流感病毒 B 的核蛋白的检测也可达到高敏感度地抑制样品中所含的被检测物质以外的成分引起的非特异性吸附。这就意味着,根据本发明,通过简单的操作可得到良好的 S/N 值。

[0109] 实施例 5

[0110] 使用实施例 1 制备的色谱介质,作为展开液,使用各种分子量的 PVP,即 0.6 重量%的 PVP K-30(和光純薬工業社制造,平均分子量 4 万)、0.6 重量%的 PVP K-60(東京化成工業社制造,平均分子量 22 万)、0.6 重量%的 PVP K-90(和光純薬工業社制造,平均分子量 36 万),用 0.05 重量%的 Tween 20 和 0.3 重量%的 Triton X-100 代替 0.5 重量%的 Tween 20,其他与实施例 1 同样测定。结果如表 3 所示。

[0111] 表 3

[0112] 有封闭

	水溶性高分子	表面活性剂	来自流感病毒 B 的核蛋白浓度 (ng/mL)			
			0	5	7.5	10
[0113] 实施例 5	PVP K-30 平均分子量 40000	Tween 20+Triton X-100	-	-	±	+
	PVP K-60 平均分子量 220000	Tween 20+Triton X-100	-	±	+	++
	PVP K-90 平均分子量 360000	Tween 20+Triton X-100	-	+	++	++

[0114] 通过该实施例,本发明中使用的具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的分子量为 10 万-100 万,更优选 20 万-50 万。

[0115] 实施例 6

[0116] 使用实施例 1 制备的色谱介质,作为展开液,使用各种用量(即,0.1 重量%、0.3 重量%、0.6 重量%、1.5 重量%)的 PVP K-90(和光純薬工業社制造,平均分子量 36 万),用 0.05 重量%的 Tween 20 及 0.3 重量%的 Triton X-100 代替 0.5 重量%的 Tween 20,其他与实施例 1 同样测定。结果如表 4 所示。

[0117] 表 4

[0118] 有封闭

[0119]

	水溶性高分子	表面活性剂	来自流感病毒 B 的核蛋白浓度 (ng/mL)			
			0	5	7.5	10
[0120] 实施例 6	PVP K-90 0.1%	Tween 20+Triton X-100	-	-	±	+
	PVP K-90 0.3%	Tween 20+Triton X-100	-	±	+	++
	PVP K-90 0.6%	Tween 20+Triton X-100	-	+	++	++
	PVP K-90 1.5%	Tween 20+Triton X-100	-	+	++	++

[0120] 通过该实施例,本发明中使用的具有含氧原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物的用量为 0.01-5 重量%,更优选 0.1-2 重量%。

[0121] 实施例 7

[0122] 1. 向色谱介质上制备反应部位

[0123] 使用抗体涂布机 (BioDot 公司制造),将用含有 5 重量%异丙醇的磷酸缓冲溶液

(pH 7.4) 稀释为浓度 1.0mg/mL 的抗人血红蛋白抗体涂布到 25×2.5cm 的硝酸纤维素膜 (millipore 公司制造 :HF 120) 上,50℃干燥 30 分钟。干燥后,在含有 0.5 重量%的酪蛋白 (和光純薬工業社制造) 的磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 200mL 中于 30℃浸泡该硝酸纤维素膜 30 分钟,进行封闭。封闭后,用含有 0.05 重量% Tween 20 的清洗液清洗,室温干燥过夜,完成向色谱介质上制备反应部位。

[0124] 2. 标记物质溶液的制备

[0125] 向 0.5mL 金胶体悬浊液 (田中贵金属工業社制造 :平均粒径 40nm) 中,加入用磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 稀释为浓度 0.1mg/mL 的抗人血红蛋白单克隆抗体 0.1mL,室温静置 10 分钟。然后,加入含有 10 重量%牛血清白蛋白的磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 0.1mL,充分搅拌后,8000×g 下离心 15 分钟。除去上清液后,加入含有 1 重量%牛血清白蛋白的磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 0.1mL,制成标记物质溶液。与实施例 1 同样制备的色谱介质。

[0126] 3. 测定

[0127] 用上述制备的色谱介质,通过以下方法测定样品中是否有人血红蛋白存在。即,将含有 0.05 重量%的 Tween 20、0.3 重量% Triton X-100、0.6 重量%的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)K-90 (平均分子量 36 万)、1.0 重量%的牛血清白蛋白和 150mM 氯化钠的 Tris 缓冲液 (pH 8.0) 制成的展开液作为阴性检测样品,向其中加入人血红蛋白后的溶液作为阳性检测样品,将上述检测样品各 150 μL 分别加载于色谱介质的样品垫上,并展开,15 分钟后目测判断。反应部位上检测线的红线可非常明确确认的情况,记为“+++”;可明确确认是红线的情况,记为“++”;可确认是红线的情况,记为“+”;可确认是红线但颜色较浅的情况,记为“±”;不可确认是红线的情况,记为“-”。结果如表 5 所示。

[0128] 表 5

[0129] 有封闭

[0130]

	水溶性高分子	表面活性剂	人血红蛋白浓度 (ng/mL)			
			仅缓冲液	10	50	100
实施例 7	PVP	Tween 20+Triton X-100	-	++	+++	+++

[0131] 采用本发明的展开液的免疫色谱法,不仅可检测来自流感病毒 B 的核蛋白,即使被检测物质为人血红蛋白也可高灵敏度地检测。

[0132] 工业实用性

[0133] 本发明的展开液及使用该展开液的免疫色谱法,由于可高灵敏度地检测生物样品中含有的被检测物质,因此,广泛应用于临床检查等的免疫测定法中。

专利名称(译)	免疫色谱法用展开液及使用该展开液的测定方法		
公开(公告)号	CN102066932B	公开(公告)日	2014-12-31
申请号	CN200980123859.9	申请日	2009-06-30
[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	伊藤大辅		
发明人	伊藤大辅		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/533 Y10T436/107497		
代理人(译)	张淑珍 王维玉		
审查员(译)	曲凯		
优先权	2008182630 2008-07-14 JP		
其他公开文献	CN102066932A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种免疫色谱法中使用的准确且高灵敏的展开液，所述展开液在抑制由样品中所含的被检测物质以外成分的非特异性吸附引起的假阳性反应的同时，即使对于低浓度的被检测物质，也能足以检出。本发明涉及一种使用不溶性载体标记检测试剂的免疫色谱法用展开液，所述展开液包含非离子型表面活性剂以及具有含氧原子和氮原子的极性基团的乙烯类水溶性聚合物。

DE 4129901 A1, 1993.03.11, 全文.

审查员 曲凯

审查员 曲凯