



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102667482 B

(45) 授权公告日 2015.02.18

(21) 申请号 201080052098.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.11.16

G01N 33/548 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/543 (2006.01)

2009-262004 2009.11.17 JP

(56) 对比文件

2010-161866 2010.07.16 JP

WO 2008/084854 A1, 2008.07.17, 说明书实施例 2、13、表 1, 说明书第 19、81 段。

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

US 5266497 A, 1993.11.30, 说明书第 4 栏第 3-31 行。

2012.05.17

WO 2009/123148 A1, 2009.10.08, 全文。

(86) PCT 国际申请的申请数据

CN 1756958 A, 2006.04.05, 全文。

PCT/JP2010/070369 2010.11.16

JP 2008-298785 A, 2008.12.11, 全文。

(87) PCT 国际申请的公布数据

EP 1264181 B1, 2007.06.06, 全文。

W02011/062157 JA 2011.05.26

审查员 周露露

(73) 专利权人 旭化成纤维株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 吉田晓 盐见祥之 松井敏彦

土井雅宪 美村信之 松瀬武志

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所（普通合伙） 11277

代理人 刘新宇 李茂家

权利要求书 1 页 说明书 15 页

(54) 发明名称

有机着色微粒、含有其的诊断药试剂盒以及
体外诊断方法

(57) 摘要

本发明提供一种高灵敏度且可多色显色的免
疫层析试剂盒、以及适合作为该试剂盒的成分的
有机着色微粒。以纤维素作为起始原料调制了
一种有机着色微粒，其特征在于，其平均粒径为
10nm~1000nm，且显色强度为 1.0~5.0。已判明：
将所述有机着色微粒用作免疫层析试剂盒的标记
时，成为比现有技术灵敏度更高的免疫层析试剂
盒。本发明所述的免疫层析试剂盒还可多色显色，
对迅速的诊断来说是有用的。

1. 一种有机着色微粒, 其特征在于, 其平均粒径为 10nm ~ 1000nm, 且显色强度为 1.0 ~ 5.0,

上述有机着色微粒的重量的 10wt% ~ 80wt% 为着色成分,

上述有机着色微粒的重量的 20wt% ~ 90wt% 来自纤维素。

2. 根据权利要求 1 所述的有机着色微粒, 其中, 上述着色成分为染料。

3. 根据权利要求 1 所述的有机着色微粒, 其通过物理吸附结合了配体。

4. 根据权利要求 1 所述的有机着色微粒, 其具有反应性活性基团。

5. 根据权利要求 4 所述的有机着色微粒, 其中, 上述反应性活性基团具有原子数为 3 以上的间隔结构。

6. 根据权利要求 4 所述的有机着色微粒, 其中, 通过共价键在上述反应性活性基团上结合了配体。

7. 一种诊断药试剂盒, 其含有权利要求 1 ~ 6 的任一项所述的有机着色微粒。

8. 根据权利要求 7 所述的诊断药试剂盒, 其为免疫层析试剂盒。

有机着色微粒、含有其的诊断药试剂盒以及体外诊断方法

技术领域

[0001] 本发明涉及来自有机高分子的有机着色微粒以及使用了其的诊断药试剂盒及体外诊断方法。

背景技术

[0002] 从粒径、机械强度、粒径分布、形状、凝聚程度的控制难易度方面考虑,由高分子形成的微粒被利用于各种领域,例如,可列举出调色剂、包装材料的抗粘连剂、绝缘填料、晶体成核剂、层析法用填充剂、研磨剂等。近年来,还应用于免疫诊断试剂用载体、液晶显示器的间隔物(spacer)、分析仪器的校正用标准粒子、多孔膜的检定用标准粒子等用途。

[0003] 由高分子形成的微粒在免疫诊断药用载体用途中的使用量尤为增大,特别是在使用了免疫层析方法的诊断(以下,也称为“免疫层析”。)中的使用量增大。作为主要原因,首先可列举出像妊娠检查试剂那样医务人员以外的普通人也可利用的作为准药品的试剂盒被大量销售,除此之外还有以下背景:作为腺病毒(adeno virus)、轮状病毒(rota virus)、诺如病毒(noro virus)等各种病毒,B型、C型各种肝炎检查,0-157等病原性菌群等各种检查的POCT(即时检验(point-of-care-testing)):医师或其他医疗担当者在患者近旁实施检查并迅速地得到结果)的手段,对该微粒的需求高涨。由于近年来流感的流行,推测今后免疫层析的使用量会激增。另外除了免疫诊断药以外,免疫层析还利用于生物化学分析、遗传学分析等任意的分析反应等各种领域中。

[0004] 免疫层析是指例如如下方法:使被由金属胶体或源于聚苯乙烯的着色胶乳形成的显色微粒标记了的抗体或抗原(配体)选择性地与层析基材上的检查对象物质进行反应,形成复合体并展开;接着,通过预先将抗原或抗体(与前述配体特异性地结合的物质)固定在层析基材上的规定的检测位置并捕捉展开了的复合体,由此使其显色。截止至今进行了多种研究,并确立了简便的检查方法,从减少在医疗现场POCT给医疗从业人员带来的负担这一需要考虑,期望免疫层析试剂盒的进一步高灵敏度化、诊断迅速化。

[0005] 在流感的诊断中,有时在感染初期的阶段时免疫层析不呈阳性,而在翌日检查时变为阳性。为了解决该问题,寻求检查的进一步高灵敏度化。另外,用1个免疫层析试剂盒同时进行A型抗原和B型抗原两者的诊断已日趋普遍。这样地存在多种检体的情况下,若一次检查可同时检查多种检查对象物质,则有利于诊断迅速化,但为了防止误诊,需要提高可视性。因此,优选用检出检查对象物质时的显色颜色对每个检查对象加以区别(多色显色化)。在各种病毒的感染症诊断、食品安全性诊断中,也期望通过1个试剂盒同时进行多种被诊断物的诊断,认为同样的按颜色加以区分是有效的。

[0006] 免疫层析的显色来自标记中使用的物质。在金属胶体的情况下,因对应于其金属种类的等离子体效果而导致显色,因此仅限定为一种颜色。例如,如以下的专利文献1所记载那样地使用金胶体时仅显色为红色。设想同时检查多种项目时,可期待在检测位置上下工夫这种程度的效果,但从可视性、防止误诊的观点考虑,不能说是适合的。

[0007] 另外,在金属胶体的情况下,配体的结合方法一般基于被称为物理吸附的原理。作

为配体的结合方法,通常可列举出物理吸附、化学键合(共价键合)、离子键合、包埋法等。物理吸附是指利用作用于基材(例如,显色微粒)与所结合的材料(例如,配体)之间的疏水性相互作用的结合方法。实际上不仅疏水性相互作用起作用,静电作用、分子间力、其它各种机理也起作用。物理吸附与其它的结合方法相比操作容易,因此从简便性、成本的方面来看是有利的。然而在物理吸附的情况下,有时出现配体的结合部位不固定、或因表面活性剂的存在而导致吸附受阻等问题。另外有时也无法结合充足量的配体。

[0008] 另一方面,如以下的专利文献 2 所公开的那样,在使用聚苯乙烯等胶乳粒子的情况下,通过使由分散染料、油溶染料、颜料形成的显色团包含于微粒后使用,可以按颜色加以区分。另外,一般而言,作为配体的结合方法可以选择物理吸附、化学键合等任意的方法。因此还可回避前述物理吸附的问题。然而,根据专利文献 2 的实施例,对粒子的染色量(amount of dyeing)低至 6wt% 左右,显色的强度变弱。因此,在用于免疫层析的情况下,无法得到明显的显色结果,可信性欠缺。

[0009] 以下的专利文献 3 中公开了将纤维素染色而成的微粒,相对于纤维素微粒量的染料投料量为 20wt% 左右,因此所得到的染色微粒淡。如以下的专利文献 4 那样通过物理吸附或化学键合对其赋予抗体并用于免疫层析,但抗体的结合量不充分,并且微粒本身的显色弱,因此无法得到明显的显色结果。

[0010] 现有专利文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献 1: 日本特公平 7-60159 号公报

[0013] 专利文献 2: 日本专利第 2955405 号说明书

[0014] 专利文献 3: 国际公开 WO2008/084854 小册子

[0015] 专利文献 4: 国际公开 WO2009/123148 小册子

发明内容

[0016] 发明要解决的问题

[0017] 鉴于上述现状,本发明的课题在于:得到显色性高且能按颜色加以区分的有机着色微粒,并使其结合配体而应用于诊断药、特别是免疫层析中,从而达成免疫层析试剂盒的高灵敏度化。

[0018] 用于解决问题的方案

[0019] 本发明人等进行深入研究并反复实验,结果成功地以纤维素为起始原料,得到染色为深色的微粒。更令人震惊的是,发现:将纤维素染色为深色,由此可通过物理吸附来结合配体,进而根据需要导入反应性活性基团,由此可通过共价键来结合配体。而且发现将其作为诊断药用载体应用于免疫层析时可实现免疫层析试剂盒的高灵敏度化,从而完成了本发明。

[0020] 即本发明如下所述。

[0021] [1]一种有机着色微粒,其特征在于,其平均粒径为 10nm~1000nm,且显色强度为 1.0~5.0。

[0022] [2]根据上述[1]所述的有机着色微粒,其中,上述有机着色微粒的重量的 10wt%~80wt% 为着色成分。

- [0023] [3]根据上述[2]所述的有机着色微粒,其中,上述着色成分为染料。
- [0024] [4]根据上述[1]~[3]的任一项所述的有机着色微粒,其中,上述有机着色微粒的重量的20wt%~90wt%来自纤维素。
- [0025] [5]根据上述[1]~[4]的任一项所述的有机着色微粒,其通过物理吸附结合了配体。
- [0026] [6]根据上述[1]~[5]的任一项所述的有机着色微粒,其具有反应性活性基团。
- [0027] [7]根据上述[6]所述的有机着色微粒,其中,上述反应性活性基团具有原子数为3以上的间隔结构。
- [0028] [8]根据上述[6]或[7]所述的有机着色微粒,其中,通过共价键在上述反应性活性基团上结合了配体。
- [0029] [9]一种诊断药试剂盒,其含有上述[1]~[8]的任一项所述的有机着色微粒。
- [0030] [10]根据上述[9]所述的诊断药试剂盒,其为免疫层析试剂盒。
- [0031] [11]一种体外诊断方法,其包括使用上述[1]~[8]的任一项所述的有机着色微粒的工序。
- [0032] [12]根据上述[11]所述的体外诊断方法,其为免疫层析方法。
- [0033] 发明的效果
- [0034] 本发明所述的有机着色微粒与现有技术的胶乳粒子的显色性相比,具有格外显著的优异显色性,且能够吸附抗体等配体,因此可应用于免疫层析,该微粒在选择性并特异性的反应中被捕捉时的显色更加明显化,由此可以提供高灵敏度的免疫层析试剂盒,进而,由于可使显色成为多色,因此对同时测定多种检查对象是有用的。另外,本发明的有机着色微粒除了选择来自染料的物理吸附作为与配体的结合方法之外,还可以选择化学键合等任意方法,因此可应用于各种检查对象物质。因此本发明使误诊少的早期诊断变为可能,并大大地有助于检查的迅速化,大幅扩大免疫层析的适用范围。

具体实施方式

- [0035] <平均粒径>
- [0036] 以下,对本申请发明进行详细地说明。
- [0037] 本发明的有机着色微粒是指平均粒径为10nm~1000nm且显色强度为1.0~5.0的有机着色微粒。平均粒径的优选范围为100nm~900nm,更优选为200nm~800nm。平均粒径超过1000nm时,用于免疫层析试剂盒时的展开慢,不利于评价的迅速化,并且存在以下倾向:在展开膜上变得容易被捕捉,背景本身显色而导致所期待的检出部位的显色变得不明显。特别是对于检测部位而言,由于捕捉试剂的涂布而导致展开膜的孔径变小的情况较多。因此此处存在标记易于被捕捉的倾向,即容易出现假阳性(false-positive)。作为检查试剂盒已变得无法信赖。
- [0038] <显色强度>
- [0039] 本发明的显色强度如下定义:在光路长度10mm、400nm~800nm的范围内使用积分球对有机着色微粒的分散液进行可见光吸光度测定,并减去分散介质的背景成分,从而得到分散基质本身的吸光度曲线,将其最大值(ABS)用分散基质的重量百分数进行折算,算出对应于0.01wt%的值。通过使用积分球,可以降低粒子的散射光的影响,因此可判断所得到

的值可作为微粒的显色程度的指标,该数值越大则显色越明显。本发明的微粒的显色强度为1.0以上,越大越优选。为了增大显色强度,可选择使用显色强的物质作为分散的染料、颜料或增加染色次数等手段。然而,想要使显色强度为5.0以上,使用通常的染料进行数次染色是无法达成的,因此考虑经济性时,显色强度为1.0~5.0,更优选为1.5~5.0,进一步优选为2.0~5.0。显色强度小于1.0时,显色弱,因此用于免疫层析试剂盒时检出部位的可视性差,导致检查结果的可信性受损。

[0040] <有机着色微粒的原材料(材料)>

[0041] 本发明的有机着色微粒的原材料只要是显色强度高、稳定分散的原材料则无特别限定。可应用能够使用染料、颜料实现深色化的原材料,实现深染化且稳固的染色有助于在基于免疫层析的检查时、试剂盒的长期保管时赋予品质稳定化,因此优选。为了达成稳固的染色,例如,可以使用共价键性的反应染料,作为可用反应染料染色的原材料,可列举出来自纤维素的原材料。由来自纤维素的原材料形成的微粒具有大量的羟基,因此不仅可通过共价键保持多个反应性染料,还可在深染化后保持对水等的稳定分散性。因此,作为有机着色微粒的原材料,使用纤维素是适合的,对其种类并无特别限定。可以使用再生纤维素、纯化纤维素、天然纤维素等。还可以使用部分衍生化的纤维素。优选有机着色微粒的重量的20~90wt%来自纤维素。更优选有机着色微粒的重量的20~80wt%来自纤维素。进一步优选为20~70wt%。

[0042] <有机着色微粒的原材料的制造方法>

[0043] 对本发明的有机着色微粒的原材料的制造方法并无特别限定。可使用基于湿式粉碎等的力学方法,进行分级而得到所期望的平均粒径的微粒,但在本发明中,将纤维素溶解在其良溶剂中,并使用混合了水、有机溶剂、氨等的凝固液,由此调制了纤维素微粒。通过使用该方法而得到的纤维素微粒的粒径可利用凝固液的组成进行调整。以下通过具体例进行更详细地说明,但其意图不在于对本发明的有机着色微粒的原材料的制造方法进行限定。

[0044] 首先,将纤维素棉短绒(linter)溶解在纤维素的良溶剂中。本发明中良溶剂使用以公知的方法调制的铜氨溶液。而且作为凝固液主要使用有机溶剂+水+氨混合体系。边搅拌该凝固液,边添加事先调制好的铜氨纤维素溶液来进行凝固。再添加硫酸进行中和、再生,从而可以得到含有目标纤维素微粒的浆料。通过对该浆料进行稀释、纯化、干燥,可得到纤维素微粒分散液、纤维素微粒。

[0045] <着色方法>

[0046] 对本发明的有机着色微粒的原材料的着色方法并无特别限定,可使用采用染料的方法、采用颜料的方法等各种方法。其中,从可提高显色强度的观点出发优选采用染料的方法,可以使用直接染料、含金染料、酸性染料、反应染料、碱性染料、分散染料、硫化染料、植物染料、萘酚染料等各种染色剂。

[0047] 在本发明中使用纤维素微粒作为有机着色微粒时,与纤维的表面积相比,纤维素微粒的表面积显著增大,因此可极大地提升染色量,还可得到有机着色微粒之中的10wt%以上为着色成分的微粒。然而,从显色性和经济性的观点考虑,着色成分优选为有机着色微粒的10wt%~80wt%,更优选为20wt%~80wt%,进一步优选为30wt%~80wt%。进而,在本发明中,为了能够将纤维素微粒染为深色、并使得长期稳定即湿处理牢度(wet colour fastness)优异而期望用共价键进行染色,从这一观点出发,优选选择反应染料。

[0048] 本发明的相对于有机着色微粒的着色成分的比例可通过着色前后的重量变化来算出。本发明中作为着色方法使用染色，且在该过程中，使用离心分离，因此有时无法回收全部的粒子，该情况下由可回收的粒子的重量与染色前的粒子的重量算出着色成分的比例。例如对 1.0g 纤维素微粒进行染色而得到 2.0g 有机着色微粒时为 50wt%。另外，可根据需要，通过对有机着色微粒和着色成分进行分离的操作，例如，通过基于酸、碱处理切断共价键、使微粒溶胀等最佳的清洗操作等将有机微粒和着色成分分离而算出着色成分的比例。

[0049] <配体>

[0050] 本发明的配体是指具有与特定的检查对象物质选择性且特异性地结合的性质的物质。对其种类并无特别限定，例如可列举出抗体、抗原、酶、基因、激素、细胞、核酸、肽、蛋白质等。

[0051] <基于染色的配体的物理吸附>

[0052] 本发明中，仅使用染料将纤维素染色为深色即可实现配体的物理吸附。在仅染色而物理吸附性能不充分的情况下，也可通过与根据需要的纤维素的衍生化进行组合来调整亲水疏水平衡。仅将纤维素染色为深色即可实现配体的物理吸附的理由尚未明确，可考虑为通过染色而使纤维素疏水化。一般而言，对于薄膜等，可通过测定接触角来了解亲水疏水程度，但对于纳米微粒难以测定接触角。因此典型的是在将作为平坦的纤维素的 Cellophane (注册商标) 染色为深色并测定接触角时未染色的纤维素的接触角为 20~30 度左右，与此相对，对于充分地染色的 Cellophane (注册商标)，接触角与染料染色量成比例地达到 40~100 度。通常的染料具有苯、萘、蒽醌、偶氮等疏水性强的结构。本发明中，在纤维的染色条件下通常令人考虑到使大量的染料与纤维素结合的结果，可预测为能够达成可物理吸附抗体的程度的疏水化。在使用蛋白质定量法中普遍的罗氏蛋白质定量法 (lowry method) 对所结合的小鼠 IgG 抗体进行定量时，在如本发明的有机着色微粒那样进行充分染色的情况下，可确认到抗体的结合。另一方面，染色强度过低时，未观察到与未染色粒子的差异，存在抗体结合量低的倾向。

[0053] <基于反应性活性基团的配体的化学键合>

[0054] 本发明中作为配体的结合方法，不仅有物理吸附，还可选择化学键合。一般而言，物理吸附具有操作简便且成本低廉的优点，但被指出可能发生以下那样的问题。例如，配体的结合部位不固定而丧失反应的选择性、因表面活性剂的存在化而导致所结合的配体脱落等。因此为了解决这些问题，有时也可根据状况采取与配体形成共价键的化学键合方式。另外在化学键合方式中，有时可比物理吸附获得更多的配体的结合量。

[0055] <反应性活性基团>

[0056] 本发明的反应性活性基团用于与配体形成共价键。作为反应性活性基团的代表性的例子，可列举出羧基、氨基、醛基、硫醇基、环氧基、羟基等。对种类并无特别限定，优选羧基和氨基。在羧基的情况下，可使用碳二亚胺与配体的氨基形成共价键。有关导入反应性活性基团的时机，可在染色前预先导入，也可在染色后导入。导入的部位可以为有机微粒，也可以导入染料部分。另外，还可将染料的结构的一部分作为反应性活性基团。

[0057] 本发明的反应性活性基团的导入可通过红外分光分析装置进行确认。例如，在羧基的情况下，若为游离酸型则可通过 1730cm^{-1} 前后的吸收进行确认。另外在氨基的情况下，

若为伯氨基则可通过 1600cm^{-1} 前后的吸收进行确认。其中对反应性活性基团的导入量进行定量是非常困难的。这是由于存在大量的染料成分，通过一般的定量方法无法进行定量。本发明中红外分光分析装置仅可判断是否导入。

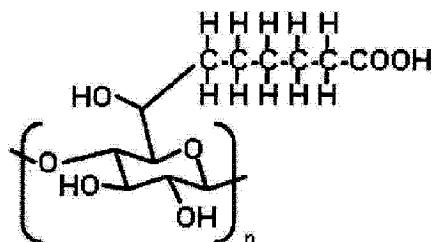
[0058] <间隔结构(spacer structure)>

[0059] 本发明中的反应性活性基团优选具有原子数为 3 以上的间隔结构。本申请发明人等发现：在高度深色化的有机着色微粒上导入反应性活性基团并使其化学键合配体后用于免疫层析时，若具有原子数为 3 以上的间隔结构，则灵敏度进一步提升。其理由还未明确，例如，可认为存在以下可能：由于大量存在的染料的位阻、电荷的影响，导致配体与检查对象物质的选择性的反应受到阻碍。

[0060] 间隔结构是指存在于反应性活性基团与有机着色微粒之间的原子。另外，间隔结构存在支链时则指的是主链的原子数。例如，众所周知的羧甲基纤维素是将纤维素的羟基的一部分取代为羧甲基而得到的。此时的反应性活性基团为羧基，而间隔结构为 $-\text{CH}_2-$ ，即成为原子数为 1 的间隔结构。本发明的实施例中，用以下 4 种方法导入了具有间隔结构的反应性活性基团。将化合物 1~4 的结构分别表示为化合物 1~4。原本羟基的一部分结合有染料，但省略染料。

[0061] <化合物 1>

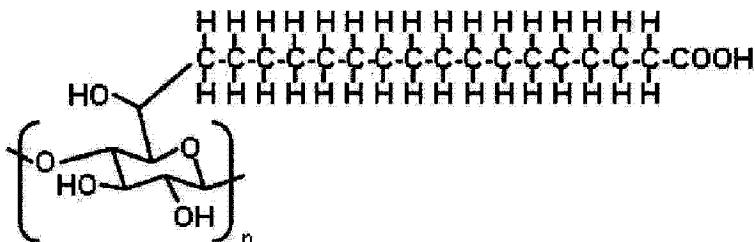
[0062]



[0063] 使染色纤维素微粒与 5-己烯酸反应，从而导入了羧基。主链原子数、即间隔结构的原子数为 5。

[0064] <化合物 2>

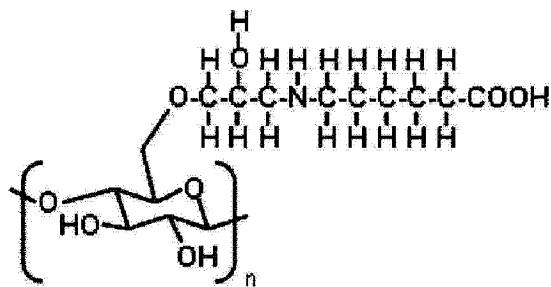
[0065]



[0066] 使染色纤维素微粒与 16-十七碳烯酸反应，从而导入了羧基。主链原子数、即间隔结构的原子数为 16。

[0067] <化合物 3>

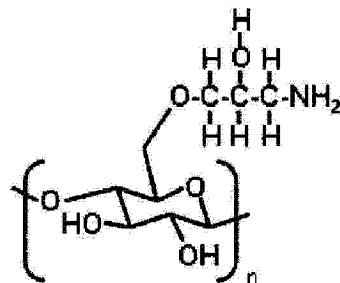
[0068]



[0069] 使染色纤维素微粒与环氧氯丙烷反应,从而导入环氧基,再通过与 6-氨基己酸反应而导入了羧基。主链原子数、即间隔结构的原子数为 9。

[0070] <化合物 4>

[0071]



[0072] 使染色纤维素微粒与环氧氯丙烷反应,从而导入环氧基,再使其与氨反应而导入了伯氨基。主链原子数、即间隔结构的原子数为 3。

[0073] 前述的间隔结构的最大原子数为 16,但也可以是更长的间隔结构。更长的间隔结构可通过改变与染色纤维素微粒反应的化合物来达成,也可以通过使用所导入的反应性活性基团进行再延长来获得。从原理来看也可以导入非常长的间隔结构,但从导入的难易度、成本的观点考虑,优选原子数为 3~100,更优选为 3~50,进一步优选为 3~20。

[0074] <有机着色微粒的分散方法>

[0075] 用上述的着色方法得到的有机着色微粒、即染色纤维素微粒可以直接以分散液的状态、不干涸地(never dry)直接使用,也可以添加各种试剂、表面活性剂、缓冲剂来实现分散液的稳定化。另外还可根据需要通过进行干燥来调制微粒单体或各种浓度的分散液。本发明中,可使染色微粒分散的液体的种类只要是不使微粒溶解或溶胀的液体则无特别限定。可以使用水、各种无机化合物水溶液、醇类、醚类、醛类、酮类、脂肪酸类、胺类、其它有机溶剂。可以使用将各种化合物以任意比例进行混合而成的溶剂,也可以将这些溶剂与存在相溶性的疏水性溶剂混合后使用。

[0076] <粒度分布>

[0077] 本发明的有机着色微粒的粒度分布由以下式(1)求出:

[0078] $CV \text{ 值} = (\text{利用粒度分布测定装置求出的体积粒度分布的标准偏差}) / (\text{利用粒度分布测定装置求出的体积平均中值粒径}) \times 100$
式(1)

[0079] 虽然无特别限定,但如前述所示,粒径过大时,对于免疫层析试剂盒而言,存在可观察到背景显色、假阳性的倾向,因此粒度分布小是适合的,优选 70% 以下。想减小 CV 值时可通过微粒制造条件来进行调整,也可以在染色前、染色后的各阶段通过过滤、离心分离等操作对粒子进行分级。本发明中,鉴于经济性,适合的 CV 值范围为 10%~70%,更优选为

10%~60%，进一步优选为 10%~50%。

[0080] <免疫层析>

[0081] 本发明的有机着色微粒可适用于基于免疫层析方法的免疫测定法。

[0082] 以下，对免疫层析方法的代表例进行说明，但不受其限定，可适用于所有夹心法(sandwich assay)中。免疫层析方法通常是在与作为被检出物质的抗原或抗体特异性地结合的抗体或抗原上预先结合作为标记的、由金属胶体或来自聚苯乙烯的着色胶乳形成的显色微粒。另一方面，在层析基材上的规定部位以线状涂布与抗原或抗体特异性反应的抗体或抗原。在检查时，通过使前述标记-抗体或抗原与作为被检出物质的抗原或抗体接触来形成复合体，并使其在层析基材上展开，但该复合体能够被涂布为线状的初级抗体(primary antibody)捕捉(夹心法)。此时标记物质也被捕捉，因此在规定部位发生显色。由于通过目视可判定被检出物质的有无，因此作为简便的检查方法而在近年来广泛普及。另外不仅是使用抗原或抗体的免疫反应，通过使用与被检出物质发生特异性反应的配体而使各种检查变为可能。除了免疫诊断药以外，免疫层析还可利用于生化学分析，遗传学分析等任意的分析反应等各种领域中。

[0083] 实施例

[0084] 以下，通过实施例对本发明进行具体地说明，但本发明不受这些实施例的限定。

[0085] 首先，对本发明的有机着色微粒或着色微粒分散体的测定方法进行详细地说明。

[0086] 在无特别记载的情况下，全部操作在 25℃ 的环境下实施。

[0087] (1) 粒度(粒径)分布：使用日机装公司制造的 Nanotrac 粒度分布测定装置 UPA-EX150 对纤维素微粒分散体进行了测定。在无特殊记载的情况下，使用水作为分散纤维素微粒的液体，以约 0.1wt% 的纤维素微粒浓度进行测定，累积次数设为 30 次。另外 CV 值为用累积 30 次而得到的体积粒度分布的标准偏差除以体积平均中值粒径而算出的值。

[0088] (2) 显色强度：在日本分光株式会社制造的 JASCO・V-650 上附加积分球单元 ISV-722 后使用，对纤维素微粒以及作为比较例的着色聚苯乙烯胶乳和金胶体的吸光度进行了测定。以 0.01wt%~0.1wt% 的微粒浓度进行了测定。接着，将 400nm~800nm 的可见光范围内的吸光度峰的最大值(ABS)用微粒的重量百分数进行折算，从而求出作为对应于 0.01wt% 的值而算出的值。

[0089] (3) 能否导入反应性活性基团的确认：对导入了反应性活性基团的微粒分散液进行干燥，得到导入了反应性活性基团的微粒。使用铂金埃尔默股份有限公司制造的红外分光分析装置 Spectrum100 利用反射法测定红外吸收光谱，比较导入前后的吸收光谱。在羧基的情况下，可通过游离酸型在 1730cm^{-1} 前后的吸收进行确认，而在氨基的情况下，可通过伯氨基在 1600cm^{-1} 前后的吸收进行确认。

[0090] 另外，为了解开纤维素微粒分散体、染色纤维素微粒分散体的凝聚，使用了 Microfluidics Corporation 制造的油压式超高压均化器 M-110-E/H。此时的处理压力为 50MPa，进行了 10 次通过高压部腔室的操作。

[0091] [实施例 1]

[0092] <微粒的调制>

[0093] 将纤维素棉短绒溶解在铜氨溶液中，接着用水和氨稀释，调制了纤维素浓度为 0.37wt% 的铜氨纤维素溶液。该溶液的铜浓度为 0.13wt%，氨浓度为 1.00wt%。接着，调制了

四氢呋喃浓度 90wt%、水浓度 10wt% 的凝固液。边使用磁力搅拌器缓慢搅拌凝固液 5000g，边添加预先调制好的纤维素浓度 0.37wt% 的铜氨纤维素溶液 500g。继续搅拌 5 秒左右后添加 10wt% 的硫酸 1000g 进行中和、再生，从而得到了含有目标纤维素微粒的浆料 26500g。以 10000rpm 的速度对所得到的浆料进行 10 分钟离心分离。利用倾析取出沉淀物，注入去离子水并进行搅拌，再次进行离心分离。将该操作重复多次直至 pH 达到 6.0~7.0，其后进行基于高压均化器的分散处理，得到了纤维素微粒分散体 150g。予以说明，全部的操作均在 25℃ 的环境下进行。

[0094] <微粒的染色>

[0095] 接着，如前述那样对调制好的纤维素微粒进行染色。在搅拌下添加相对于微粒浓度被调整至 1.0wt% 的纤维素微粒分散体 100g 为 30g 的硫酸钠、1g 的作为反应性染料的 DyStar Japan Ltd. 制造的 Levafix Navy CA Gr. (注册商标) (以下，也称为蓝系 A。)，使用恒温槽升温至 60℃。在升温至 60℃ 后添加碳酸钠 4g，进行 2 小时染色。然后将所得到的粗染色微粒用氢氧化钠 5wt% 水溶液清洗，通过离心分离回收，用纯水水洗后通过离心分离回收。将以上一系列操作作为 1 个周期，总计实施 3 个周期的同样操作，从而得到了染色微粒。染料成分的比例为有机着色微粒的重量的 49%。

[0096] 将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0097] [实施例 2]

[0098] 用同样的操作对实施例 1 所得到的未染色纤维素微粒进行染色，但总计实施 10 个周期，得到了染色微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0099] [实施例 3]

[0100] 对实施例 1 所得到的未染色纤维素微粒，使用作为反应染料的 DyStar Japan Ltd. 制造的 Levafix Rubine CA Gr. (注册商标) (以下，也称为红系 B。) 1g，除此以外，用与实施例 1 同样的方法得到了纤维素微粒和染色纤维素微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0101] [实施例 4]

[0102] 用于凝固的凝固液为四氢呋喃浓度 95wt%、水浓度 5wt%，除此以外，用与实施例 1 同样的方法得到了纤维素微粒和染色纤维素微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0103] [实施例 5]

[0104] 对实施例 4 所得到的未染色纤维素微粒，使用作为反应染料的 DyStar Japan Ltd. 制造的 Levafix Rubine CA Gr. (注册商标) (红系 B) 1g，除此以外，用与实施例 1 同样的方法得到了纤维素微粒和染色纤维素微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0105] [实施例 6]

[0106] 用于凝固的凝固液为丙酮浓度 26.5wt%、氨浓度 0.20wt%、水浓度为 73.3wt%，除此以外，用与实施例 1 同样的方法得到了纤维素微粒和染色纤维素微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0107] [比较例 1]

[0108] 用于凝固的凝固液为四氢呋喃浓度 97wt%、水浓度 3wt%，除此以外，用与实施例 1

同样的方法得到了纤维素微粒和染色纤维素微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0109] [实施例 7]

[0110] 使用 Nihon Millipore K. K. 制造的孔径 0.8μ 的来自硝基纤维素的滤膜对比较例 1 所得到的染色纤维素微粒进行过滤, 采集了滤液。将平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0111] [实施例 8]

[0112] 用与实施例 1 同样的操作对实施例 1 所得到的未染色纤维素微粒进行染色, 但仅进行 1 个周期的染色, 得到了染色微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0113] [实施例 9]

[0114] 对实施例 1 所得到的未染色纤维素微粒, 使用硫酸钠 15g、作为反应染料的 DyStar Japan Ltd. 制造的 Levafix Rubine CA Gr. (注册商标) (红系 B) 0.5g, 除此以外, 用与实施例 1 同样的方法进行染色, 仅进行 1 个周期的染色, 得到了染色微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0115] [比较例 2]

[0116] 对实施例 1 所得到的未染色纤维素微粒, 使用硫酸钠 6g、作为反应性染料的 DyStar Japan Ltd. 制造的 Levafix Navy CA Gr. (注册商标) (蓝系 A) 0.2g, 除此以外, 进行与实施例 8 同样的操作, 得到了染色微粒。将染色后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0117] [比较例 3]

[0118] 对实施例 6 所得到的未染色纤维素微粒, 使用硫酸钠 6g、作为反应性染料的 DyStar Japan Ltd. 制造的 Remazol Black B HI-GRAN. 150 (注册商标) (以下, 也称为蓝系 C) 0.2g, 除此以外, 进行与实施例 8 同样的操作, 得到了染色微粒。将染色前后的平均粒径和显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0119] [比较例 4]

[0120] 作为染色聚苯乙烯胶乳粒子, 测定了 Bangs Laboratories 制造的 DS02B(Primary Blue (注册商标), 平均粒径 $0.47 \mu m$) 的显色强度。将结果示于以下的表 1。

[0121] [比较例 5]

[0122] 将平均粒径为 $0.04 \mu m$ 的金胶体粒子的显色强度的测定结果示于以下的表 1。

[0123] [表 1]

	未着色		着色粒子				
	平均粒径 (nm)	C V值 (%)	平均粒径 (nm)	C V值 (%)	染料	染色量 (%)	显色强度
实施例 1	248	22	372	30	蓝系A	49	2.9
实施例 2	"	"	494	40	蓝系A	72	4.1
实施例 3	"	"	391	31	红系B	53	2.8
实施例 4	484	25	579	43	蓝系A	45	3.2
实施例 5	"	"	590	30	红系B	41	2.6
实施例 6	44	19	62	31	蓝系A	39	3.2
比较例 1	912	32	1105	51	蓝系A	41	3.1
实施例 7	"	"	887	36	"	"	2.8
实施例 8	248	22	269	28	蓝系A	20	1.6
实施例 9	"	"	270	25	红系B	13	1.2
比较例 2	"	"	255	25	蓝系A	9	0.8
比较例 3	44	19	49	23	蓝系C	8	0.6
比较例 4	—	—	470	22			0.4
比较例 5	40	31	—	—			2.2

[0124] [0125] <性能评价 1>

[0126] 使用实施例 1~比较例 5 的染色、着色或显色粒子，制作免疫层析用的试剂盒，实施了性能评价。

[0127] <基于物理吸附的抗体结合染色微粒的调制>

[0128] 将实施例 1~比较例 4 所得到的染色或着色微粒用磷酸缓冲液(以下，称为“PBS”。)稀释调整至固体成分浓度达到 1 重量 %，向 Eppendorf 离心管中采集将所得到的 1 重量 % 染色粒子磷酸缓冲液悬浊液 1ml 与将抗人绒毛膜促性腺激素(以下称为“hCG”)的来自小鼠的单克隆抗体(Medix Biochemica 公司制造的 #5014 抗 hCG 抗体)用 PBS 稀释至 100 μ g/ml 而得到的抗体稀释液 1ml，在室温下震荡 2 小时，使染色粒子与单克隆抗体结合，接着使用以 0.1 重量 % 的浓度含有牛血清白蛋白(以下，称为 BSA。)的 PBS 进行 3 次离心清洗，以最终成为 2ml 的方式进行再分散，从而得到了抗体结合染色微粒的分散液。

[0129] <抗体结合金胶体的调制>

[0130] 使浓度 0.01 重量 % 的氯化金水溶液 200ml 沸腾，向其中添加浓度 1 重量 % 的柠檬酸钠水溶液，进行加热沸腾直至溶液的颜色从浅黄色变为紫色～红色，调制了比较例 5 所示的平均粒径为 0.04 μ m 的金胶体粒子的分散液。接着向所得到的金胶体分散液中添加 50mM 磷酸二氢钾溶液，将 pH 调整至 8，向其中以平均 1mL 金胶体粒子分散液为 10 μ g 的比例添加抗 hCG 的单克隆抗体，并向其 10ml 中添加 0.1ml 浓度 30 重量 % 的 BSA(牛血清白蛋白)，进行离心沉降处理，去除上清液，并使用以 0.1 重量 % 的浓度含有 BSA 的 PBS 通过 3 次离心沉降处理来进行清洗、再分散，从而得到了抗体结合金胶体粒子分散液。

[0131] <层析基材(膜)的调制>

[0132] 在距离市售膜滤器(Millipore Corporation 制造的 HF120, 25mm×300mm)的一侧的端部(以下，将这一侧的端部作为带的下端，另一侧的端部作为带的上端)7mm 的位置使用液体喷射装置以与展开方向垂直即与膜的长边平行的方式喷射印刷了宽度约为 1mm 的检测线用的抗体。更详细而言，作为检测线抗体，使用来自小鼠的抗 h α - 亚基抗体(Medix Biochemica 公司制造的 #6601)，用 PBS 调整至 0.5mg/ml 后，以 1.0 μ L/cm 的量进行了喷雾。另外，同样地在距离下端 12mm 的位置喷射印刷了宽度为 1mm 的控制线用的抗体。更详细而

言,作为控制线抗体,使用来自兔子的抗小鼠抗体(Daco 公司制造的 Z0259),用 PBS 调整至 0.5mg/ml 后,以 $1.0 \mu L/cm$ 的量进行了喷雾。喷雾各抗体后,干燥 1 小时,接着使用包含乳性酪蛋白的硼酸缓冲液进行粘连,使用包含蔗糖的 Tris-HCl 缓冲液进行清洗,在室温下定影一夜,从而调制了层析用膜。

[0133] <制作层析评价样品>

[0134] 按照 $20 \times 300mm$ 滤纸性吸收垫与所得到的、使用了各实施例、比较例记载的染色粒子的层析用膜的从上端起 5mm 之间重叠的方式使长边彼此接触,然后使用切纸机每隔 5mm 宽度进行切断,从而制作了样品。按单纯计算可制成 60 个样品。

[0135] <层析评价>

[0136] 用于展开试验的、含 hCG 的试样如下述那样地调制。

[0137] 用以 1 重量% 的浓度含有 BSA 的 PBS 对 hCG 进行稀释,以含有 hCG 浓度分别为 100、 $10.0mIU/ml$ 的 hCG。在该试样液中浸渍上述所得的 5mm 宽度的试剂盒样品的下端 2mm,使试样液展开。经过 10 分钟后,目视观察膜滤器上的反应部位(标记印刷部)的显色。作为评价基准,检测线处未确认到显色时用(-)表示、确认到显色时用(+)表示、确认到明显的显色时用(++)表示、确认到强显色时用(+++)表示。评价结果示于以下的表 2。

[0138] [表 2]

	染色后			各 hCG 浓度的检测线颜色 (10 分钟)			
	平均粒径 (nm)	染料	显色强度	(mIU/ml)			
				1000	100	10	0
实施例 1	372	蓝系 A	2.9	+++	+++	++	-
实施例 2	494	蓝系 A	4.1	+++	+++	+++	-
实施例 3	391	红系 B	2.8	+++	++	++	-
实施例 4	579	蓝系 A	3.2	+++	++	++	-
实施例 5	590	红系 B	2.6	+++	++	+	-
实施例 6	62	蓝系 A	3.2	++	++	+	-
比较例 1	1105	蓝系 A	3.1	++	++	++	+
实施例 7	887	蓝系 A	2.8	++	++	+	-
实施例 8	269	蓝系 A	1.6	+++	++	+	-
实施例 9	270	红系 B	1.2	++	++	+	-
比较例 2	255	蓝系 A	0.8	+	-	-	-
比较例 3	49	蓝系 C	0.6	-	-	-	-
比较例 4	470	蓝	0.4	++	+	-	-
比较例 5	40	红	2.2	+++	++	+	-

[0140] 在所有的实施例、比较例中,均确认到控制线的显色。hCG 浓度为 $100mIU/ml$ 时,在实施例 1~9 以及比较例 1、4、5 中确认到了检测线的显色。另外,在 hCG 浓度为 $10mIU/ml$ 的低浓度时,在实施例 1~9 以及比较例 1 和比较例 5 中也确认到了检测线的显色。

[0141] 比较例 1 中,特别是在抗原浓度高的一侧,可观察到由背景的显色而导致的表观灵敏度下降的现象。另外可观察到即使试样中没有 hCG 也显色的倾向,即假阳性。在实施例 7 中,使用对比较例 1 的粒子进行过滤后的产物,背景的显色虽然会残留,但变得无法观察到假阳性,因此可认为粒径若过大则会发生假阳性。粒径过大时对诊断药试剂盒是不适合的。实施例 1~9 中未观察到假阳性,因此可以说实施例 1~9 为高灵敏度。

[0142] 另一方面,比较例 2~4 中,染料的显色强度小,因此在 hCG 浓度 $10mIU/ml$ 时无法检出显色。因此可理解为:使用本发明的有机着色微粒时,与聚苯乙烯胶乳相比,灵敏度变高。

[0143] 另外,还可理解在与比较例 5 的金胶体的比较中显示同等或同等以上的灵敏度。即通过使用本发明的有机着色微粒,蓝色系和红色系均可进行高灵敏度的诊断。

[0144] <反应性活性基团的导入>

[0145] 接着对实施例 1 所得到的染色微粒进行羧基、氨基等反应性活性基团的导入。

[0146] [实施例 10]

[0147] 向实施例 1 所得到的蓝色染色微粒分散液的一部分中添加纯水、异丙醇(和光纯药株式会社制造、试剂特级),并进行调整,使分散介质中的异丙醇:水的比为 85:15 且分散介质中的粒子浓度达到 0.50wt%。将所得到的染色纤维素微粒分散液 20g 与转子一同放入试管中,安装玻璃制回流管。边使约 10℃ 的自来水回流来进行冷却,边用水浴加热 30 分钟以使纤维素微粒分散液达到 50℃。其中加热是使用磁力搅拌器边缓慢搅拌边进行的。其后,在搅拌下添加 40wt% 的苛性钠溶液 74mg,再继续搅拌 30 分钟,其后加入氯乙酸钠(和光纯药株式会社制造)216mg。继续搅拌并回流 3 小时,进行羧基的导入。经过 3 小时后,停止利用水浴的加热,用冰水冷却茄型烧瓶,将反应后浆料的温度冷却至 20℃。冷却后边继续搅拌,边添加 10wt% 盐酸 1.0g 使反应后浆料的 pH 为酸性。与微粒的清洗同样地使用离心分离机,多次重复利用倾析 - 去离子水的稀释,将 pH 设为 6.0~7.0,再利用高压均化器进行分散处理,得到羧基化染色微粒分散液。对所得到的分散液的一部分测定平均粒径和显色强度,将其结果示于以下的表 3。

[0148] [实施例 11]

[0149] 向实施例 1 所得到的蓝色染色微粒分散液的一部分中添加纯水、丙酮(和光纯药株式会社制造、试剂特级)并进行调整,使分散介质丙酮:水的比为 1:1 且分散介质中粒子浓度达到 1.0wt%。将所得到的染色纤维素微粒分散液 10.0g 与转子一同放入玻璃制试管中,安装玻璃制回流管。边使约 10℃ 的自来水回流来进行冷却,边用水浴加热 30 分钟以使纤维素微粒分散液达到 40℃。其中加热是使用磁力搅拌器边缓慢搅拌边进行的。其后加入 5-己烯酸(和光纯药株式会社制)705mg、硝酸铈铵(和光纯药株式会社制)677mg、1mol/L 硝酸(和光纯药株式会社制)617ml。在 3 小时之内继续搅拌并回流,进行羧基的导入。反应后的处理与实施例 10 同样地进行,得到了羧基化染色微粒分散液。对所得到的分散液的一部分测定平均粒径和显色强度,将其结果示于以下的表 3。

[0150] [实施例 12]

[0151] 除了用于羧基化而添加的反应剂为 16-十七碳烯酸(和光纯药株式会社制)1654g 以外,用与实施例 11 同样的方法得到了羧基化染色微粒分散液。对所得到的分散液的一部分测定平均粒径和显色强度,将其结果示于以下的表 3。

[0152] [实施例 13]

[0153] 向实施例 1 所得到的蓝色染色微粒分散液的一部分中添加纯水并进行调整,使分散介质中的粒子浓度达到 1.0wt%。将所得到的染色微粒分散液 10.0g 与转子一同放入玻璃制试管中,安装玻璃制回流管。边使约 10℃ 的自来水回流来进行冷却,边用水浴加热 30 分钟以使纤维素微粒分散液达到 35℃。其中加热是使用磁力搅拌器边缓慢搅拌边进行的。其后加入环氧氯丙烷(和光纯药株式会社制)571g,继续搅拌并回流 30 分钟,进行环氧基的导入。其后,将水浴的温度升温至 50℃,添加 6-氨基己酸(和光纯药株式会社制)810g,继续搅拌并回流 1 小时,进行了羧基的导入。反应后的处理与实施例 10 同样地进行,得到了

羧基化染色微粒分散液。对所得到的分散液的一部分测定平均粒径和显色强度,将其结果示于以下的表 3。

[0154] [实施例 14]

[0155] 除了导入环氧基后添加的反应剂为 25wt% 氨水(和光纯药株式会社制)840g 以外,与实施例 13 同样地进行,得到了氨基化染色微粒分散液。对所得到的分散液的一部分测定平均粒径和显色强度,将其结果示于以下的表 3。

[0156] <基于红外分光分析装置的反应性活性基团的确认>

[0157] 将实施例 10~14 所得到的羧基化以及氨基化染色微粒分散液干燥,并调整羧基化以及氨基化染色微粒,通过红外分光分析装置确认反应性活性基团的导入。已确认:羧基化染色微粒在 1730cm^{-1} 前后的吸收增加、氨基化染色微粒在 1600cm^{-1} 前后的吸收增加,成功导入了反应性活性基团。

[0158] [表 3]

	反应性活性基团的种类	间隔结构的原子数	平均粒径(nm)	C V值(%)	显色强度
[0159]	羧基	1	370	3.2	2.8
	羧基	5	375	3.3	2.6
	羧基	16	383	3.8	2.5
	羧基	9	380	3.4	2.6
	氨基	3	374	3.1	2.7

[0160] <性能评价 2>

[0161] 使导入了实施例 10~14 的反应性活性基团的染色微粒与抗体进行化学键合,其后制作免疫层析用的试剂盒,并实施了性能评价。

[0162] <基于化学键合的抗体结合染色微粒的调制 1>

[0163] 使用 2-吗啉乙烷磺酸(和光纯药株式会社制)、苛性钠、纯水调制 pH 为 5.2 且浓度为 50mM 的 2-吗啉乙烷磺酸缓冲液(以下,称为“MES”),再将 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺盐酸盐(和光纯药株式会社制,以下称为碳二亚胺)溶解在 MES 缓冲液中并进行调整,使碳二亚胺浓度达到 20wt%。将实施例 10~13 所得到的羧基化染色微粒使用离心分离机沉降后,再分散至前述 MES 缓冲液中调整浓度以使固体成分浓度达到 1 重量 %,得到了羧基化染色微粒 MES 缓冲液分散体。添加相对于羧基化染色微粒 MES 缓冲液分散体 10g 为 1g 的 20wt% 的碳二亚胺溶液,使用恒温振荡槽在 25 度的环境下反应 1 小时,反应结束后以 10,000rpm 的速度进行 30 分钟的离心分离。利用倾析而取出沉淀物,添加磷酸缓冲液进行搅拌,将碳二亚胺活化染色微粒分散在磷酸缓冲液中。与微粒的清洗同样地使用离心分离机,重复进行 3 次利用倾析 - 磷酸缓冲液的稀释,去除未反应的碳二亚胺。使用所得到的碳二亚胺活化染色微粒,用与基于物理吸附的抗体结合染色微粒的调制同样的步骤调制了基于化学键合的抗体结合染色微粒。

[0164] <基于化学键合的抗体结合染色微粒的调制 2>

[0165] 使用离心分离机使氨基化染色微粒分散液沉降后,再分散至前述磷酸缓冲液中调整浓度以使固体成分浓度达到 1 重量 %,得到了氨基化染色微粒磷酸缓冲液分散体。添加相对于氨基化染色微粒 PBS 缓冲液分散体 10g 为 1g 的 25% 的戊二醛溶液(和光纯药株式会社制),使用恒温振荡槽在 37 度的环境下反应 2 小时,反应结束后以 10,000rpm 的速度进行 30

分钟的离心分离。利用倾析而取出沉淀物,添加磷酸缓冲液进行搅拌,将戊二醛活化染色微粒分散在磷酸缓冲液中。与微粒的清洗同样地使用离心分离机,重复进行3次利用倾析-磷酸缓冲液的稀释,去除未反应的戊二醛。使用所得到的戊二醛活化染色微粒,用与基于物理吸附的抗体结合染色微粒的调制同样的步骤调制了基于化学键合的抗体结合染色微粒。在以0.1重量%的浓度添加牛血清白蛋白之前添加1g甘氨酸,从而去除了未反应的醛。

[0166] <层析评价>

[0167] 以实施例10~14所得到的、基于化学键合的抗体结合染色微粒与由实施例1得到的、基于物理吸附的抗体结合染色微粒作为免疫层析用微粒进行了评价。

[0168] 用与前述同样的步骤,分别以hCG浓度为10、1、0mIU/ml的3个水平进行了评价。评价结果示于以下的表4。

[0169] [表4]

	染色后		抗体结合方法	各hCG浓度的检测线显色(10分钟)			
	平均粒径 (nm)	显色强度		(mIU/ml)			
				10	1	0	
[0170]	372	2.9	物理吸附	++	-	-	
	370	2.8		++	-	-	
	375	2.6	化学键合	++	+	-	
	383	2.5		++	++	-	
	380	2.6	化学键合	++	+	-	
	374	2.7		++	+	-	

[0171] 实施例11~14的基于化学键的抗体结合微粒即使在hCG浓度为1mIU/ml时也可确认到显色。它们的任一个中,具有反应性活性基团的间隔的原子数均为3以上。与此相对,实施例1的基于物理吸附的抗体结合染色微粒以及实施例9的间隔的原子数为1的、基于化学键合的抗体结合微粒在hCG浓度为1mIU/ml时未确认到显色。从这些结果可知,本发明的有机微粒还可通过化学键来负载配体。

[0172] 产业上的可利用性

[0173] 本发明的有机着色微粒作为免疫诊断、免疫层析用的标记是有用的,可适合地用作可迅速评价的高灵敏度的免疫层析试剂盒。