



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102004148 A

(43) 申请公布日 2011.04.06

(21) 申请号 201010264566.7

(22) 申请日 2010.08.27

(30) 优先权数据

2009-199284 2009.08.31 JP

(71) 申请人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县神戸市中央区脇浜海岸通
1 丁目 5 番 1 号

(72) 发明人 狭间俊介 酒井康裕

(74) 专利代理机构 北京市安伦律师事务所
11339

代理人 刘良勇

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

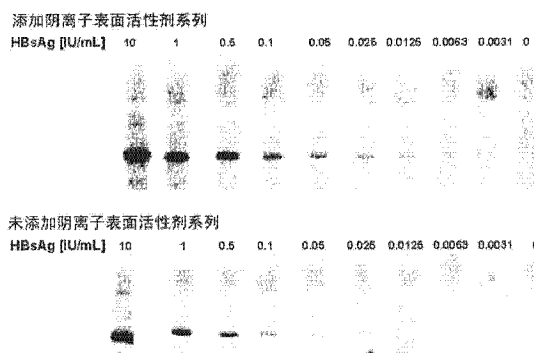
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 5 页

(54) 发明名称

目标物的检测方法及目标物检测用层析试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种通过以下步骤能够高灵敏度地检测出目标物的目标物检测方法，它是一种用层析试验用具检测试样中所含目标物的方法，该层析试验用具具有固定能与目标物结合的捕捉物的检测区，其步骤包括：混合试样和与目标物结合的酶标记物；将所得混合液添加到层析试验用具，用检测区的捕捉物捕捉与酶标记物结合的目标物；在捕捉到目标物的层析试验用具的检测区添加含有阴离子表面活性剂的试剂；使发光底物与通过目标物结合到检测区捕捉物的酶标记物的酶发生反应；及检测发光底物和酶反应所引起的检测区的发光。本发明还提供一种用于检测试样中所含目标物的层析试剂盒。



1. 一种用层析试验用具检测试样中所含目标物的方法,所述层析试验用具具有检测区,所述检测区固定有能与所述目标物结合的捕捉物,所述方法包括:

混合试样和与目标物结合的酶标记物;

将所得混合液添加到所述层析试验用具,用所述检测区的捕捉物捕捉与所述酶标记物结合的目标物;

在捕捉到所述目标物的所述层析试验用具的检测区添加含阴离子表面活性剂的试剂;

使发光底物与通过所述目标物结合到所述检测区的捕捉物的酶标记物的酶发生反应;
及

检测所述发光底物和所述酶反应所引起的所述检测区的发光,以此检出所述试样中所含目标物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、正癸基硫酸钠、月桂醇磺基乙酸酯钠、1-十二烷基磺酸钠、P-辛基苯磺酸、1-辛烷磺酸、1-癸烷磺酸钠、辛烷-1-基硫酸钠、月桂基聚氧乙烯(2)醚硫酸钠。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:用所述层析实验用具展开所述含阴离子表面活性剂的试剂,以此将所述含阴离子表面活性剂的试剂添加到所述层析实验用具的检测区。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述含阴离子表面活性剂的试剂还包括缓冲剂。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述试剂中所含阴离子表面活性剂的浓度为0.0001~0.1重量%。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的方法,其特征在于:所述发光底物为二氧杂环丁烷类。

7. 根据权利要求1-5中任意一项所述的方法,其特征在于:所述酶标记物的酶是碱性磷酸酶。

8. 根据权利要求1-5中任意一项所述的方法,其特征在于:所述捕捉物为抗体,所述酶标记物是酶标记抗体。

9. 根据权利要求1-5中任意一项所述的方法,其特征在于:通过测定所述检测区发光的发光强度,定量所述试样中所含目标物,以此检测所述目标物。

10. 根据权利要求1-5中任意一项所述方法,其特征在于:所述层析试验用具是侧流层析试验用具或穿流层析试验用具。

11. 一种用于检测试样中所含目标物的层析试剂盒,包括:

与目标物结合的酶标记物;

具有检测区的层析试验用具,所述检测区固定有能与目标物结合的捕捉物;

含阴离子表面活性剂的试剂;

通过与所述酶标记物作用而产生发光反应的所述酶标记物的发光底物。

12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其特征在于:所述阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、正癸基硫酸钠、月桂醇磺基乙酸酯钠、1-十二烷基磺酸钠、P-辛基苯磺酸、1-辛烷磺酸、1-癸烷磺酸钠、辛烷-1-基硫酸钠及月桂基聚氧乙烯(2)醚硫

酸钠。

13. 根据权利要求 11 所述的试剂盒,其特征在于:所述含阴离子表面活性剂的试剂还包括缓冲剂。

14. 根据权利要求 11 所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂中所含阴离子表面活性剂的浓度为 0.0001 ~ 0.1 重量%。

15. 根据权利要求 11-14 中任意一项所述的试剂盒,其特征在于:所述发光底物为二氧杂环丁烷类。

16. 根据权利要求 11-14 中任意一项所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标记物的酶是碱性磷酸酶。

17. 根据权利要求 11-14 中任意一项所述的试剂盒,其特征在于:所述捕捉物为抗体,所述酶标记物是酶标记抗体。

18. 根据权利要求 11-14 中任意一项所述的试剂盒,其特征在于:所述层析试验用具是侧流层析试验用具或穿流层析试验用具。

目标物的检测方法及目标物检测用层析试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种目标物的检测方法及目标物检测用试剂盒。

背景技术：

[0002] 现有一种层析法以采自生物的血、血清、咽喉拭液、鼻腔拭液、鼻涕、尿液等样本为试样检测试样中所含目标物。在此方法中，首先，将可与试样中目标物结合的捕捉物固定到层析实验用具的检测区。用此层析实验用具将结合到目标物的标记物和试样混合而成的混合液展开。以此，标记物标记的目标物被捕捉到检测区。此时，在检测区形成标记物-目标物-捕捉物夹层形状的复合物。在使用有色乳胶粒子或金属胶粒子等标记成分的标记物时，当标记物在检测区被捕捉时，检测区会显色。在层析法中通过观察此检测区的显色即可检测出试样中的目标物。

[0003] 然而，使用上述有色乳胶粒子等的层析法，检测灵敏度低，如果试样所含目标物极少的话，很难检出目标物。

[0004] 于是，近年来，有人为高灵敏度地检测目标物，提出了一种在层析法中用荧光物或化学发光物取代有色乳胶粒子作标记成分的方法。

[0005] 比如日本公开专利 JP2002-267671 中记述了一种用荧光物作标记成分的免疫层析法。日本公开专利 H8-5637 中记述了一种用化学发光物吖啶酯作为标记成分的抗体检测法。

[0006] 然而，上述方法还是达不到市场所要求的检测灵敏度。

发明内容：

[0007] 本发明的发明者发现，在利用酶化学发光的层析法中展开目标物和酶标记物的混合液后在检测区添加含阴离子表面活性剂的试剂可以提高发光底物的发光强度，从而完成了本项发明。

[0008] 本发明提供：

[0009] (1) 一种用层析试验用具检测试样中所含目标物的方法，所述层析试验用具具有检测区，所述检测区固定有能与所述目标物结合的捕捉物，所述方法包括：混合试样和与目标物结合的酶标记物；将所得混合液添加到所述层析试验用具，用所述检测区的捕捉物捕捉与所述酶标记物结合的目标物；在捕捉到所述目标物的所述层析试验用具的检测区添加含阴离子表面活性剂的试剂；使发光底物与通过所述目标物结合到所述检测区的捕捉物的酶标记物的酶发生反应；及检测所述发光底物和所述酶反应所引起的所述检测区的发光，以此检出所述试样中所含目标物。

[0010] (2) (1) 所述方法，其中：所述阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、正癸基硫酸钠、月桂醇磺基乙酸酯钠、1-十二烷基磺酸钠、P-辛基苯磺酸、1-辛烷磺酸、1-癸烷磺酸钠、辛烷-1-基硫酸钠 (Sodium octan-1-yl Sulfate)、月桂基聚氧乙烯 (2) 醚硫酸钠 (POE (2) Sodium lauryl ether sulfate)。

[0011] (3) (1) 所述方法, 其中 : 用所述层析实验用具展开所述含阴离子表面活性剂的试剂, 以此将所述含阴离子表面活性剂的试剂添加到所述层析实验用具的检测区。

[0012] (4) (1) 所述方法, 其中 : 所述含阴离子表面活性剂的试剂还包括缓冲剂。

[0013] (5) (1) 所述方法, 其中 : 所述试剂中所含阴离子表面活性剂的浓度为 0.0001 ~ 0.1 重量%。

[0014] (6) (1)-(5) 中任意一项所述方法, 其中 : 所述发光底物为二氧杂环丁烷类。

[0015] (7) (1)-(5) 中任意一项所述方法, 其中 : 所述酶标记物的酶是碱性磷酸酶。

[0016] (8) (1)-(5) 中任意一项所述方法, 其中 : 所述捕捉物为抗体, 所述酶标记物是酶标记抗体。

[0017] (9) (1)-(5) 中任意一项所述方法, 其中 : 通过测定所述检测区发出光的发光强度, 定量所述试样中所含目标物, 以此检测所述目标物。

[0018] (10) (1)-(5) 中任意一项所述方法, 其中 : 所述层析试验用具是侧流层析试验用具或穿流层析试验用具。

[0019] (11) 一种用于检测目标物的层析试剂盒, 包括 : 与目标物结合的酶标记物 ; 具有检测区的层析试验用具, 所述检测区固定有能与目标物结合的捕捉物 ; 含阴离子表面活性剂的试剂 ; 通过与所述酶标记物作用而产生发光反应的所述酶标记物的发光底物。

[0020] (12) (11) 所述试剂盒, 其中 : 所述阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、正癸基硫酸钠、月桂醇磺基乙酸酯钠、1- 十二烷基磺酸钠、P- 辛基苯磺酸、1- 辛烷磺酸、1- 癸烷磺酸钠、辛烷 -1- 基硫酸钠及月桂基聚氧乙烯 (2) 醚硫酸钠。

[0021] (13) (11) 所述试剂盒, 其中 : 所述含阴离子表面活性剂的试剂还包括缓冲剂。

[0022] (14) (11) 所述试剂盒, 其中 : 所述试剂中所含阴离子表面活性剂的浓度为 0.0001 ~ 0.1 重量%。

[0023] (15) (11)-(14) 中任意一项所述试剂盒, 其中 : 所述发光底物为二氧杂环丁烷类。

[0024] (16) (11)-(14) 中任意一项所述试剂盒, 其中 : 所述酶标记物的酶是碱性磷酸酶。

[0025] (17) (11)-(14) 中任意一项所述试剂盒, 其中 : 所述捕捉物为抗体, 所述酶标记物是酶标记抗体。

[0026] (18) (11)-(14) 中任意一项所述试剂盒, 其中 : 所述层析试验用具是侧流层析试验用具或穿流层析试验用具。

[0027] 采取上述 (1) 所述方法, 在利用酶化学发光的层析中可以灵敏地检测出目标物。如上述 (4) 所述, 含有阴离子表面活性剂的试剂还包括缓冲剂, 不仅可以创造一个标记物 - 目标物 - 捕捉物发光的环境, 还可以清洗层析试验用具。此外, 用上述 (11) 的试剂盒在利用酶化学发光的层析中可以灵敏地检测出目标物。又如上述 (13) 所述, 含有阴离子表面活性剂的试剂还包括缓冲剂, 不仅可以创造一个标记物 - 目标物 - 捕捉物发光的环境, 还可以清洗层析试验用具。

附图说明 :

[0028] 图 1 为本发明一实施方式涉及的层析试验用具的 (a) 平面图和 (b) 侧面图。

[0029] 图 2 为收放本发明一实施方式涉及的层析试验用具的收纳器具 10 的斜视图。

[0030] 图 3 为本发明一实施方式涉及的层析试验用具的 (a) 平面图和 (b) X-X 方向截面

图。

[0031] 图 4 为本发明一实施方式涉及的试剂容器的简要结构图。

[0032] 图 5 为实施例 1 的发光检测结果的照片。

[0033] 图 6 为比较例 1 的发光检测结果的照片。

[0034] 图 7 为实施例 2 的发光检测结果的照片。

[0035] 图 8 为实施例 3 的发光检测结果的照片。

[0036] 图 9 为实施例 4 的发光检测结果的照片。

具体实施方式：

[0037] 本实施方式的目标物检测方法是一种用层析试验用具检测试样中所含目标物的方法,该层析试验具有固定与目标物结合的捕捉物的检测区,该方法包括以下步骤:混合试样和与目标物结合的酶标记物;将所得混合液添加到层析试验用具,用检测区的捕捉物捕捉与酶标记物结合的目标物;在捕捉了目标物的层析试验用具的检测区添加含有阴离子表面活性剂的试剂;使发光底物与通过目标物结合到检测区捕捉物的酶标记物的酶发生反应;通过检测检测区因发光底物和酶反应而发出的光来检测试样中所含目标物。在本说明书中,所谓“检测目标物”不仅指判断试样中有无目标物,还包括定量目标物。

[0038] 在混合步骤,混合试样和与目标物结合的酶标记物,制备混合液。当试样中含有目标物时,目标物与酶标记物形成复合物。

[0039] 本实施方式中所使用的试样,只要是有可能含有目标物的液体试样均可,无特别限定。在本实施方式中使用的试样最好是生物试样。具体而言,可以是血液、血清、血浆、胆汁、胃肠分泌液、淋巴液、骨髓液、唾液、鼻涕、尿液、组织提取液、组织匀浆、细胞提取液和细胞匀浆等。

[0040] 试样中所含目标物无特别限定。比如有抗原、抗体、激素、激素受体、凝集素、凝集素结合型糖类、药物或其代谢物、药物受体、核酸及以上各项的片段等。具体而言,如有细菌、原生生物和真菌等细胞、病毒、蛋白质、多糖类等。举例来说有流感病毒、副流感病毒、RS 病毒、肺炎支原体、轮状病毒、杯状病毒、冠状病毒、腺病毒、肠道病毒 (Enterovirus)、疱疹病毒、人免疫缺陷病毒、肝炎病毒等病毒;大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎球菌、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、疟原虫等细胞;消化器官疾病、中枢神经疾病和出血热等各种疾病的病原体、病原体的代谢产物;癌胚抗原和细胞角质蛋白 (CYFRA) 等肿瘤标记物;激素等。

[0041] 与试样中所含目标物形成复合物的酶标记物只要是能与上述目标物特异性结合、且用酶标记的物质即可。当目标物为抗原或抗体时,可以使用能通过抗原抗体反应与该抗原或抗体结合的抗原或抗体作可与目标物特异性结合的物质。此外,比如还可以根据诸如配体-受体结合的生物学亲和性使用可与目标物结合的物质。酶标记物最好是用酶标记的抗体(酶标记抗体)。

[0042] 酶标记物的酶是该技术领域通用的众所周知的酶即可,无特别限制。具体而言,可列举出 d 半乳糖苷酶 (α -galactosidase)、碱性磷酸酶或过氧化酶等,最好是碱性磷酸酶。

[0043] 可以利用众所周知的方法作为用酶标记的方法。比如用碱性磷酸酶标记的方法有戊二醛 (glutaraldehyde) 交联法、高碘酸交联法、马来酰亚胺交联法、碳二亚胺法、活泼酯

法 (active ester method) 等。

[0044] 在捕捉步骤, 将混合步骤获得的混合液添加到层析试验用具, 用检测区的捕捉物捕捉目标物。在此使用的层析试验用具具备检测区。在检测区固定有捕捉试样中所含目标物的捕捉物。因此, 上述混合液中所含目标物和酶标记物的复合物被检测区的捕捉物捕捉。

[0045] 作为层析试验用具比如可以列举出侧流层析试验用具和穿流层析试验用具。

[0046] 在此, 所谓侧流层析法是在包含固定有捕捉物的检测区的层析膜滴样, 使试样与层析膜平行地展开, 以此检测在检测区捕捉到的目标物。另一方面, 穿流层析法指在表面固定有捕捉目标物的捕捉物的层析膜上滴下含有目标物的试样, 让试样与层析膜相对地垂直通过, 以此检测在膜表面捕捉到的目标物。无论在哪种方法中, 捕捉的目标物都是由酶标记物标记, 通过此酶标记物的酶与后述发光底物的反应所产生的发光来检测目标物。

[0047] 固定在检测区的捕捉物只要是能与试样中所含目标物特异性结合的物质即可。此目标物与捕捉物的特异性结合可以是抗原抗体反应的结合, 也可以是配体 - 受体结合等基于生物学亲和性的结合。在此, 当目标物是抗原时, 最好将抗原相对的抗体作为酶标记物或捕捉物使用。特别是作为酶标记物的抗体和作为捕捉物的抗体最好分别识别抗原不同的部位 (表位)。另外, 当目标物是抗体时, 可用与抗体相对的抗原作为捕捉物, 可用能与抗体特异性结合的物质 (抗体) 作为酶标记物。

[0048] 在添加步骤, 在层析试验用具展开混合液后, 在层析试验用具的检测区添加含有阴离子表面活性剂的试剂。通过使检测区含有含阴离子表面活性剂的试剂, 可以提高后述发光底物的发光强度。此添加步骤最好在用固定在检测区的捕捉物捕捉目标物的捕捉步骤之后进行。捕捉目标物后添加含有阴离子表面活性剂的试剂可以使检测区中有含阴离子表面活性剂的试剂, 但避免阴离子表面活性剂从检测区流出。

[0049] 添加含阴离子表面活性剂的试剂的方法无特别限制。比如可以通过在层析试验用具上展开含阴离子表面活性剂的试剂以在检测区添加试剂。也可以在层析试验用具的检测区滴下含阴离子表面活性剂的试剂来将试剂添加在检测区。还可以将展开混合液后的层析试验用具浸入含阴离子表面活性剂的试剂中来向检测区添加试剂。在这些添加含阴离子表面活性剂的试剂的方法中, 以在层析试验用具上展开含阴离子表面活性剂的试剂的方法为最好。特别是当含阴离子表面活性剂的试剂还含有缓冲剂时更好, 因为可以在完善标记物 - 目标物 - 捕捉物发光环境的同时, 还能进行后述层析试验用具的清洗。

[0050] 在此, 也可以在添加步骤前, 还包含清洗捕捉步骤后的层析试验用具的清洗步骤。通过清洗检测区, 可以降低检测后述发光时的背景, 可以更灵敏地检测出试样中所含目标物。清洗方法可以利用众所周知的方法。比如可以通过在层析试验用具展开包含磷酸盐 (PBS)、三羟甲基甲胺基丙磺酸 (TAPS) 等缓冲剂的缓冲液来清洗检测区。还可以将层析试验用具浸入含上述缓冲剂的缓冲液中来清洗检测区。

[0051] 如上所述, 在添加步骤, 也可以通过在层析试验用具展开含阴离子表面活性剂和缓冲剂的试剂同时进行清洗步骤和添加步骤。

[0052] 阴离子表面活性剂只要是该技术领域通用的众所周知的阴离子表面活性剂即可, 无特别限制。具体阴离子表面活性剂可以列举出: 十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、正癸基硫酸钠、月桂醇磺基乙酸酯钠、1- 十二烷基磺酸钠、P- 辛基苯磺酸、1- 辛烷磺酸、1- 癸烷磺酸钠、辛烷 -1- 基硫酸钠 (Sodium octan-1-yl Sulfate) 及月桂基聚氧乙烯 (2) 醚硫

酸钠等。

[0053] 阴离子表面活性剂在上述试剂中的浓度可依阴离子表面活性剂的种类或后述发光反应的条件等适当调整,无特别限制,但以 0.0001 ~ 0.1 重量%为好。当试剂中阴离子表面活性剂的浓度高于 0.0001 重量%时可以提高发光底物的发光强度,并以低于 0.1 重量%的阴离子表面活性剂浓度可以充分提高发光底物的发光强度。

[0054] 在反应步骤,让发光底物和通过目标物在检测区捕捉到的酶标记物的酶发生反应。如此,当上述试样中有目标物时,检测区就会发光。使酶和发光底物发生反应的方法可以通过让酶和发光底物接触的方式进行。比如可以通过在检测区用吸移管等添加发光底物进行反应步骤。

[0055] 发光底物可以适当使用与酶标记物的酶反应而发光的底物。比如发光氨、二氧杂环丁烷(dioxetane)类物质等,最好是二氧杂环丁烷类物质。作为二氧杂环丁烷类物质如有 3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷(AMPPD)(注册商标)、CSPD(注册商标)、CDP-Star(注册商标)等。

[0056] 在检测步骤,通过检测上述反应步骤中检测区的发光,检测出试样中所含目标物。检测发光的方法可以运用 CCD 相机和荧光扫描仪等众所周知的装置。

[0057] 在此,检出发光时可以判断检出了目标物。而且通过测定所检发光的发光强度还可以定量试样中所含目标物。定量目标物时最好使用检量线。测定发光强度的方法可以使用众所周知的装置测定。具体而言,可以用 Typhoon(通用电气医疗集团日本公司制)多功能扫描系统、LAS4000(富士胶片控股株式会社制)发光成像分析系统等。

[0058] 以上就本发明的目标物检测方法进行了说明。下面参照附图,就本实施方式涉及的层析用试剂盒进行说明。

[0059] 图 1 为在第一实施方式涉及的侧流层析法中使用的层析试验用具 1(以下称试验用具 1)的(a)平面图和(b)侧面图。

[0060] 试验用具 1 如图 1 所示,在表面有粘附层的塑料板制衬底 2 上有由人造纤维无纺布构成的加样垫 3、由硝化纤维等多孔物质构成的层析用膜载体 4 和由纤维无纺布构成的吸收垫 5。

[0061] 衬底 2 用于适当配置加样垫 3、层析膜载体 4 和吸收垫 5。除塑料以外,还可以使用纸、玻璃等作为衬底 2。

[0062] 在加样垫 3 添加试样。试样可以使用上述试样。加样垫 3 除人造纤维无纺布外,还可以使用棉、玻璃纤维、纤维素纤维等材质。

[0063] 层析膜载体 4 配置的位置与加样垫 3 接触且有检测区 4A。检测区 4A 上条状固定着可特异性结合目标物的捕捉物。

[0064] 吸收垫 5 配置的位置与层析膜载体 4 接触,用于吸收过剩的试样。吸收垫 5 只要是可以快速吸收并保存液体的材质即可,比如可以使用棉花、纤维素、聚乙烯和聚丙烯等构成的无纺布。

[0065] 下面就使用第一实施方式涉及的层析试验用具 1 检测目标物的方法进行说明。

[0066] 混合试样和酶标记物,制作混合液。此时,如果试样中含有目标物,则目标物与酶标记物结合形成复合物。

[0067] 将制作的混合液加入试验用具 1 的加样垫 3。所加混合液从加样垫 3 向层析膜载

体 4 展开。如果试样中含有目标物,则固定在检测区 4A 的捕捉物捕捉目标物和酶标记物结合形成的复合物。

[0068] 添加混合液静置 1 分钟左右后,在加样垫 3 添加含阴离子表面活性剂的清洗液。所加清洗液在层析膜载体 4 展开,与检测区 4A 接触。

[0069] 添加清洗液静置 1 分钟后,在检测区 4A 添加发光底物。此时,如果检测区 4A 的捕捉物捕捉到复合物,则发光底物与复合物中的酶标记物的酶发生反应,产生发光。

[0070] 添加发光底物后,用发光检测装置(Typhoon(通用电气医疗集团日本公司制))检测发光。通过检测此发光可以检测目标物。还可以测定所检出的发光的强度,用检量线定量目标物。

[0071] 在上述实施方式中,例示了具有加样用的加样垫 3 的结构,但不限于这种结构,也可以采用无加样垫 3 的结构。此时,可以直接在层析膜载体 4 添加试样,展开试样。

[0072] 在上述实施方式中在检测区 4A 添加发光底物,但也可以在加样垫 3 添加并展开发光底物,还可以将发光底物直接添加并展开到层析膜载体 4。

[0073] 在上述实施方式,从含有阴离子表面活性剂的清洗液来说,可以使用含上述阴离子表面活性剂和缓冲剂的试剂作为清洗液。

[0074] 层析膜载体 4 也可以不仅有一个检测区,而有二个以上检测区。层析膜载体 4 还可以有对照区。比如在试样中添加 ALP 标记抗 HBs 抗体,使用在层析膜载体 4 对照区固定有与 ALP 标记抗 HBs 抗体结合的抗小鼠 IgG 抗体的载体作为对照区。

[0075] 在上述实施方式,还可以将试验用具 1 放入在与加样垫 3、层析膜载体 4 和吸收垫 5 相应位置有开口的盒子 10 中。这种结构的试验用具 1 的一例见图 2。

[0076] 如图 2 所示,将试验用具 1 收入盒子 10 可以防止试样从试验用具 1 的各部件漏出,可以卫生地检测试样中所含目标物。而且,盒子 10 上有多个开口,使试样中的液体成分易于蒸发,从而促进试样的展开。

[0077] 在图 2 所示结构中,设在盒 10 与加样垫 3 对应的位置上的开口 11 其开口面积向内侧逐渐变小。采取这种结构,添加到加样垫 3 的试样在开口 11 可以保存一定量,即使试样添加多了,试样也可以逐渐在试验用具 1 上展开,可以不用定期加少量试样。

[0078] 以上就侧流层析试验用具 1 进行了说明,在实施方式中的层析试剂盒还可适用于穿流层析试验用具。

[0079] 下面参照附图,就穿流层析试验用具进行说明。

[0080] 图 3 为第二实施方式涉及的穿流层析法用层析试验用具 31(以下称试验用具 31)的(a)平面图和(b)X-X 截面图。

[0081] 试验用具 31 从下层开始依次有吸收垫 35、层析膜载体 34 和盖 32,由这些部件层叠构成。盖 32 有开口 33,配置在下层的层析膜载体 34 通过此开口 33 露出检测区 34A。

[0082] 吸收垫 35 与层析膜载体 34 接触,用于吸收过剩的试样。吸收垫 35 只要是能快速吸收并保存液体的材质即可,可以使用棉、纤维素、聚乙烯、聚丙烯等构成的无纺布。

[0083] 层析膜载体 34 与盖 32 接触配置,有检测区 34A。检测区 34A 上条状固定着可与目标物特异性结合的捕捉物。

[0084] 下面就在第二实施方式使用穿流层析试验用具 31 检测目标物的方法进行说明。

[0085] 首先,混合试样和酶标记物,制作混合液。此时,如果试样中含有目标物,则目标物

与酶标记物结合形成复合物。将制作的混合液添加到试验用具 31 的开口处 33, 在此状态下, 放置 20 分钟。此时混合液通过层析膜载体 34, 被配置在其下层的吸收垫 35 吸收。当试样中含有目标物时, 固定在层析膜载体 34 的检测区 34A 的捕捉物捕捉目标物与酶标记物的复合物。

[0086] 接着, 将含阴离子表面活性剂的清洗液添加到开口处 33。添加的清洗液与检测区 34A 接触。添加清洗液后, 在检测区 34A 添加发光底物。此时, 检测区 34A 的捕捉物捕捉到复合物的话, 发光底物与复合物中的酶标记物的酶发生反应, 产生发光。

[0087] 添加发光底物后, 用发光检测装置 (Typhoon (通用电气医疗集团日本公司制)) 检测发光。通过检测此发光可以检测目标物。通过测定所检测的发光强度, 使用检量线, 可以定量目标物。

[0088] 本发明的试剂盒可以具有图 4 的装酶标记物的第一试剂容器 41、装含阴离子表面活性剂的试剂的第二试剂容器 42 以及装发光底物的第三试剂容器 43 和图 1、图 2 或图 3 的试验用具。

[0089] 装在第一试剂容器 41 中的酶标记物可以是溶解在缓冲液中的液态, 或是在用时再加入水等液体的、通过冷冻干燥等方式获得的固态。从便利地操作、使用试剂盒观点来说, 酶标记物最好是溶解在缓冲液中的液体形态。

[0090] 第一试剂容器 41 还可以含有前处理用试剂。如此结构, 即使是需要前处理的试样, 也可以同时进行样本的前处理和酶标记。作为前处理用试剂只要是能从上述试剂抽取目标物的试剂即可, 比如可以用含有表面活性剂的缓冲液。

[0091] 装在第二试剂容器 42 的含有阴离子表面活性剂的试剂可以使用含上述检测方法中所述含阴离子表面活性剂的试剂。

[0092] 第三试剂容器 43 中所装的发光底物有可能底物因温度和光而失活。因此保存形态最好是在蔽光容器内冷藏保存 (2 ~ 8℃)。

[0093] 上述试剂盒也可根据要求将其他试剂放在别的试剂容器中。试剂盒还可以根据需要具有稀释一种或几种试剂的一种或几种缓冲液、使用说明书和反应容器等。

[0094] 下面举实施例详细说明本发明, 但本发明不限于此。

[0095] [实施例]

[0096] 实施例 1 : 展开试样后添加阴离子表面活性剂情况下的检测灵敏度

[0097] 就在展开试样后添加阴离子表面活性剂的情况下检测发光灵敏度进行了实验。

[0098] (1) 试验用具的制作

[0099] 用 HBs 抗体制作图 1 所示侧流层析试验用具。

[0100] 用抗体涂敷机 (BioDot 公司产品) 将用磷酸缓冲液 (pH7.0) 稀释到浓度 2mg/mL 的含 HBs 抗体的 HBs 抗体液在由硝酸纤维素膜构成的层析膜载体的检测区涂 1.0mm 宽, 50℃ 下干燥 30 分钟。将干燥后的层析膜载体浸到含有 BSA 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 使 HBs 抗体固定在层析膜载体的检测区。然后, 用磷酸缓冲液 (pH7.0) 冲洗, 40℃ 下干燥 120 分钟, 获得固定有 HBs 抗体的层析膜载体。

[0101] (2) 碱性磷酸酶 (ALP) 标记抗 HBs 抗体液的制作

[0102] 制备了 ALP 标记抗 HBs 抗体液 20 μ L。组成如下 :

[0103] [ALP 标记抗 HBs 抗体液]

[0104]	MES	4.25g/L (pH6.5)
[0105]	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.04g/L
[0106]	氯化钠	1.75g/L
[0107]	BSA	0.20g/L
[0108]	酪蛋白钠	1g/L
[0109]	ALP 标记抗体混合液	3mL/L

[0110] 上述 ALP 标记抗体混合液的制备是用 EMCS (同仁化学研究所制) 将上述 HBs 抗体进行了 ALP 标记。所得 ALP 标记化抗 HBs 抗体在 MES 缓冲液 (pH6.5) 中溶解到浓度为 0.3U/mL, 以此作为 ALP 标记抗体混合液。

[0111] (3) 试样的展开

[0112] 作为目标物使用了 HBs 抗原 (浓度 0.1IU/mL)。

[0113] 混合上述制备的 ALP 标记抗 HBs 抗体液 20 μL 和 HBs 抗原 70 μL (0.1IU/mL), 制备出含 HBs 抗原和 ALP 的复合物的混合液。

[0114] 将制备的混合液在层析试验用具上展开。

[0115] (4) 制备含阴离子表面活性剂的清洗液

[0116] 含阴离子表面活性剂的清洗液用以下组成制备。

[0117] <清洗液的组成>

[0118] 50mM TAPS (pH8.5)

[0119] 3mM MgCl₂ · 6H₂O

[0120] 阴离子表面活性剂 (0.005% 十二烷基苯磺酸钠 (DBS)) 将此清洗液 50 μL 在层析膜载体展开二次进行清洗。

[0121] (5) 发光的检测

[0122] 展开清洗液后, 在层析膜载体的检测区添加发光底物 50 μL。发光底物使用的是 CDP-star (注册商标) (美国应用生物系统公司制)。

[0123] 添加后, 用 Typhoon (通用电气医疗集团日本公司制) 检测发光。关于检测方法, 按照 Typhoon 使用说明书。

[0124] 另外, 按上述同样方法就在 (3) 的步骤中将 HBs 抗原的浓度改为 0IU/mL、0.0031IU/mL、0.0063IU/mL、0.0125IU/mL、0.025IU/mL、0.05IU/mL、0.5IU/mL、1IU/mL、10IU/mL 时的发光进行了检测。

[0125] 为了比较, 还对在上述 (4) 步骤中使用不添加阴离子表面活性剂的清洗液情况下的发光按上述同样步骤进行了检测。

[0126] 比较例 1: 在样本试样中添加阴离子表面活性剂情况下的检测灵敏度

[0127] 就在实施例 1 (4) 的清洗液中不添加阴离子表面活性剂, 在实施例 1 (3) 的混合液中添加阴离子表面活性剂情况下的发光检测灵敏度进行了调查。

[0128] (1) 试验用具的制备

[0129] 与实施例 1 的 (1) 相同。

[0130] (2) 碱性磷酸酶 (ALP) 标记抗 HBs 抗体液的制作

[0131] 与实施例 1 (2) 相同。

[0132] (3) 目标物的展开

[0133] 使用了 HBs 抗原 (浓度 0.1IU/mL) 作目标物。混合 (2) 制备的 ALP 标记抗 HBs 抗体液 20 μ L 和 HBs 抗原 70 μ L, 制备出含 HBs 抗原和 ALP 的复合物的混合液。

[0134] 在此混合液中添加阴离子表面活性剂 DBS, 使其浓度为 0.005%。将添加 DBS 后的混合液在层析试验用具展开。

[0135] (4) 清洗液的制备

[0136] 展开添加了 DBS 的混合液后, 用以下组成调制清洗层析试验用具的清洗液。

[0137] < 清洗液的组成 >

[0138] 50m MTAPS (pH8.5)

[0139] 3mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

[0140] 将此清洗液 50 μ L 在层析试验用具上展开二次。

[0141] (5) 发光的检测

[0142] 进行与实施例 1 (5) 同样的操作。

[0143] 另外, 用同样的方法分别调查将 (3) 添加的 DBS 浓度改为 0%、0.01%、0.025%、0.05% 时的检测灵敏度及将 HBs 抗原浓度改为 0.5IU/mL 时的检测灵敏度。

[0144] [结果]

[0145] 图 5 为实施例 1 发光的检测结果照片。从图 5 可以看出, 在添加了 DBS 的系列中, 可以检测到的目标物的 (HBs 抗原) 的浓度最小值为 0.0063IU/mL。与此相反, 在未添加 DBS 的系列中, 能检测到的目标物浓度最小值为 0.025IU/mL。由此说明展开试样后用添加了阴离子表面活性剂的液体清洗, 发光强度增强, 目标物的检测灵敏度增高。

[0146] 图 6 为比较例 1 发光的检测结果照片。从图 6 可以看出, 在混合液中添加了 DBS 的样本 No. 1 ~ 4、7 ~ 10 与未添加 DBS 的样本 No. 5 或 No. 11 在检测灵敏度上看不出差别。由此说明即使在要展开的试样中添加阴离子表面活性剂, 发光强度也看不出差别, 检测灵敏度没有变化。

[0147] 以上说明, 展开含有目标物和酶标记物的复合物的试样后, 用添加了阴离子表面活性剂的液体清洗可以提高发光强度, 可以提高目标物的检测灵敏度。

[0148] 实施例 2 : 在各种表面活性剂中的检测灵敏度

[0149] 研究了使用各种类型表面活性剂时的检测灵敏度。

[0150] 所用表面活性剂中, 非离子表面活性剂使用了聚氧乙烯月桂醚 (NIKKOL BL-25 : 日光化学株式会社制)、壬基酚聚氧乙烯醚 (NP-40 : Nacalai Tesque 公司制)、聚氧乙烯辛基苯基醚 (Poly oxyethylene octylphenyl ether) (NIKKOL HS-240 : 日光化学株式会社制)、聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物 (ユニール 70DP-950 : 日油制) 及十二烷基麦芽糖苷 (DM : 同仁化学制), 阳离子表面活性剂使用了十四烷基三甲基溴化铵 (MTAB : 和光纯药制), 阴离子表面活性剂使用了十二烷基硫酸钠 (SDS : Nacalai Tesque 公司制), 两性表面活性剂使用了胆酸诱导剂 (CHAPS : 同仁化学制)。

[0151] 方法除在实施例 1 (4) 制备清洗液的步骤中使用上述表面活性剂以外, 其他均以与实施例 1 同样的方法测定。

[0152] [结果]

[0153] 图 7 是使用各种非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂及两性表面活性剂时发光的检测结果照片。

[0154] 从图 7 可以确认,只有添加阴离子表面活性剂 SDS 时发光强度增强。

[0155] 由此说明,只有添加阴离子表面活性剂时发光强度增强,试样中所含目标物的检测灵敏度增高。

[0156] 实施例 3:各种阴离子表面活性剂的检测灵敏度

[0157] 就使用各种阴离子表面活性剂时的检测灵敏度进行了研究。

[0158] 方法除在实施例 1(4) 制备清洗液步骤使用了下述阴离子表面活性剂外,均以与实施例 1 相同的方法进行了测定。

[0159] <所用阴离子表面活性剂>

[0160] 1. 月桂醇磺基乙酸酯钠 (LSA-F)0.01%

[0161] 2. 1-十二烷基磺酸钠 0.01%

[0162] 3. P-辛基苯磺酸 0.01%

[0163] 4. 1-辛烷磺酸 0.01%

[0164] 5. 1-癸烷磺酸 0.01%

[0165] 6. 辛基硫酸钠 0.01%

[0166] 7. 月桂醇聚氧乙烯醚磺酸钠 (SBL-2N-27)0.01%

[0167] 8. 正癸基硫酸钠 0.01%

[0168] 9. 十二烷基硫酸钠 0.01%

[0169] 10. 十二烷基苯磺酸钠 0.01%

[0170] [结果]

[0171] 图 8 为添加上述阴离子表面活性剂情况下发光的检测结果照片。从图 8 可以确认,无论用哪种阴离子表面活性剂发光强度都能增强。由此说明,使用阴离子表面活性剂可以增强发光强度,提高试样中所含目标物的检测灵敏度。

[0172] 实施例 4:不同浓度阴离子表面活性剂的检测灵敏度

[0173] 就使用各种浓度阴离子表面活性剂情况下的检测灵敏度进行了研究。方法除实施例 1(4) 步骤将阴离子表面活性剂浓度调整为 0.001%、0.005%、0.01%、及 0.05% 以外,其他均以与实施例 1 相同的方法进行了检测。

[0174] [结果]

[0175] 图 9 为使用各种浓度阴离子表面活性剂情况下发光的检测结果照片。从图 9 可以确认,随着阴离子表面活性剂浓度从 0.001% 向 0.01% 加大,发光强度越来越强,比较 0.01% 和 0.05%,0.01% 荧光强度更高。由此说明,添加 0.01% 阴离子表面活性剂可以充分增强发光强度,提高试样中所含目标物的检测灵敏度。

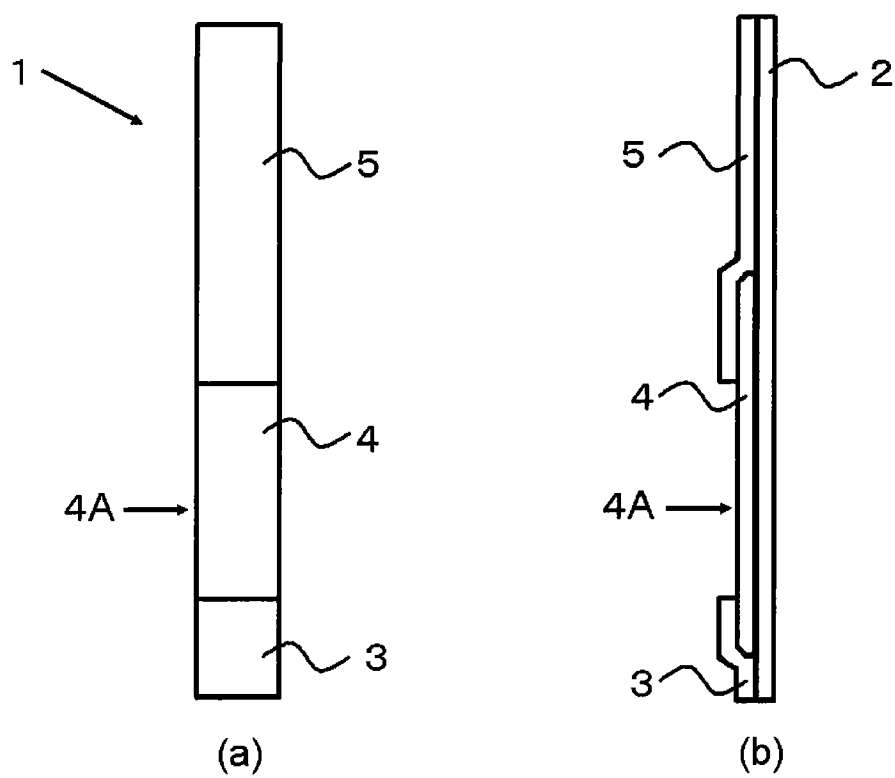


图 1

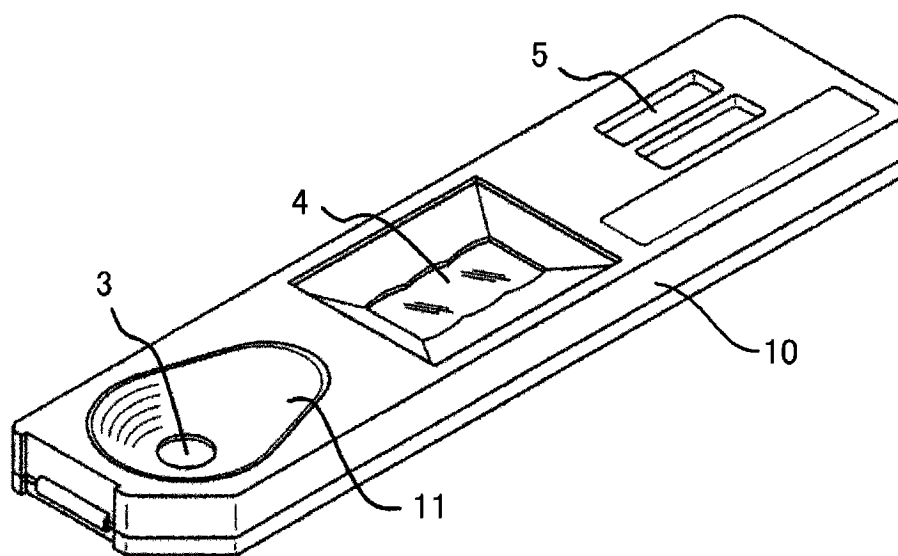


图 2

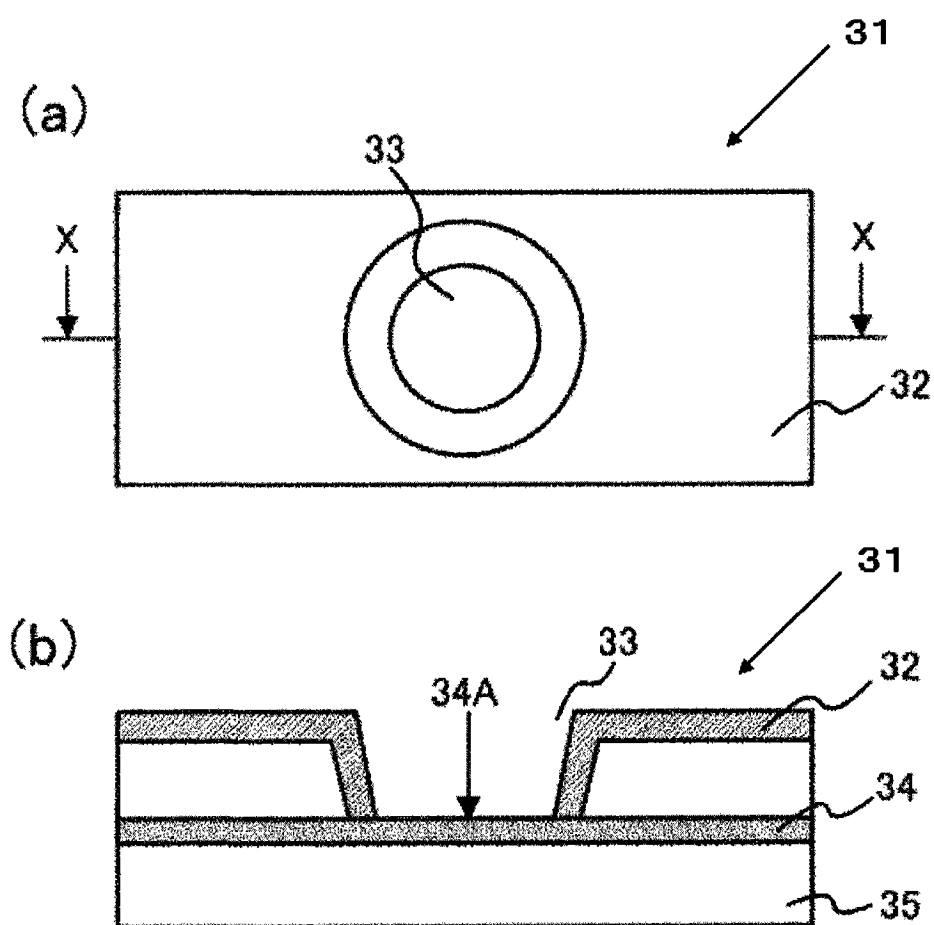


图 3

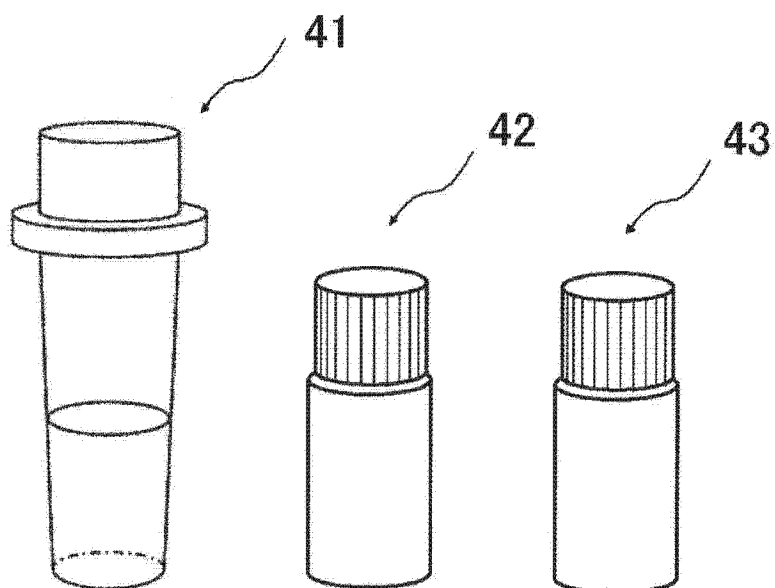
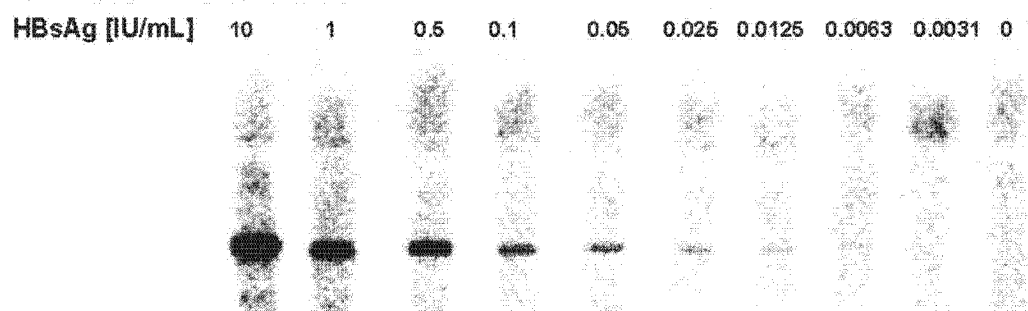


图 4

添加阴离子表面活性剂系列



未添加阴离子表面活性剂系列

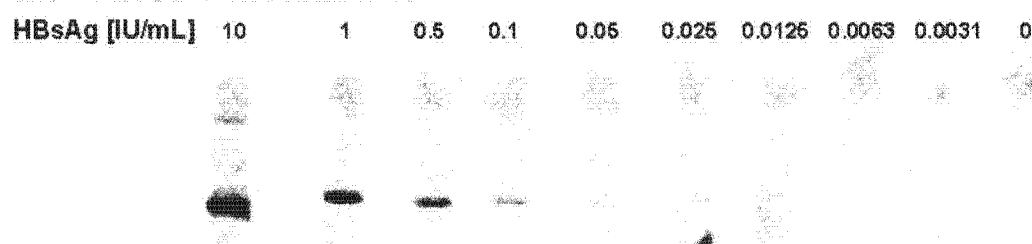
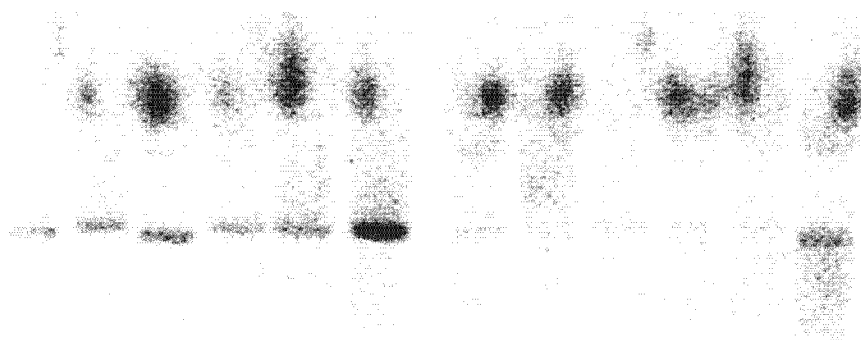


图 5

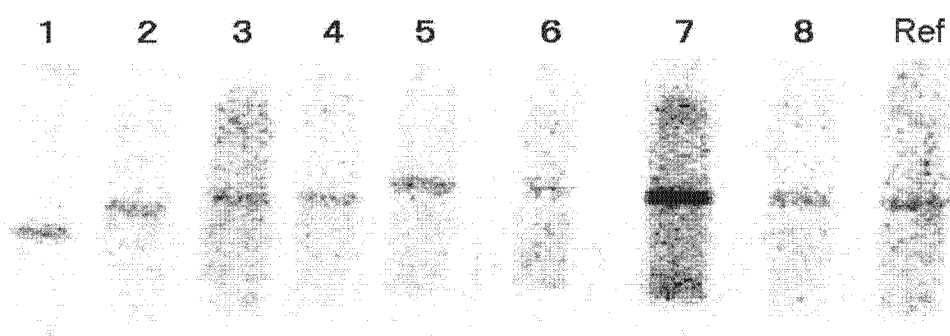
No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
HBsAg (IU/mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
添加到试样的 DBS(%)	0.05	0.025	0.01	0.005	0	0	0.05	0.025	0.01	0.005	0	0
添加到清洗液的 DBS(%)	0	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0	0.005

图 6

各种表面活性剂的效果



No.	构造	性状
1	聚氧乙烯月桂醚	非离子表面活性剂
2	壬基酚聚氧乙烯醚	非离子表面活性剂
3	聚氧乙烯辛基苯基醚	非离子表面活性剂
4	聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物	非离子表面活性剂
5	十二烷基麦芽糖苷	非离子表面活性剂
6	十四烷基三甲基溴化铵	阳离子表面活性剂
7	十二烷基硫酸钠	阴离子表面活性剂
8	胆酸诱导体	两性表面活性剂

·Ref: 未添加表面活性剂

图 7

各阴离子表面活性剂的效果

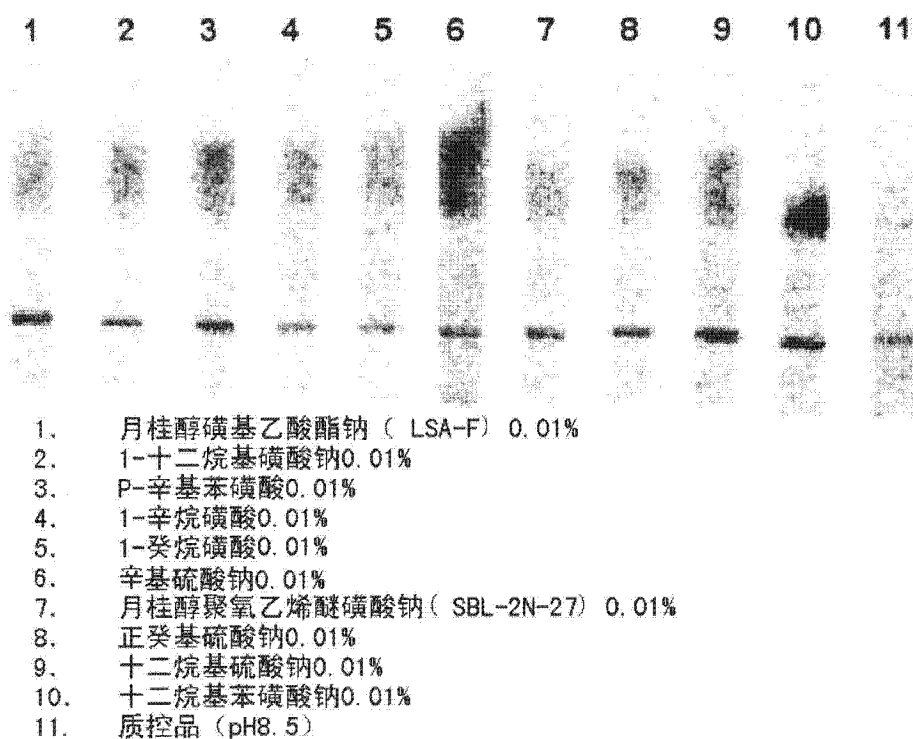


图 8

各种浓度下的表面活性剂的效果

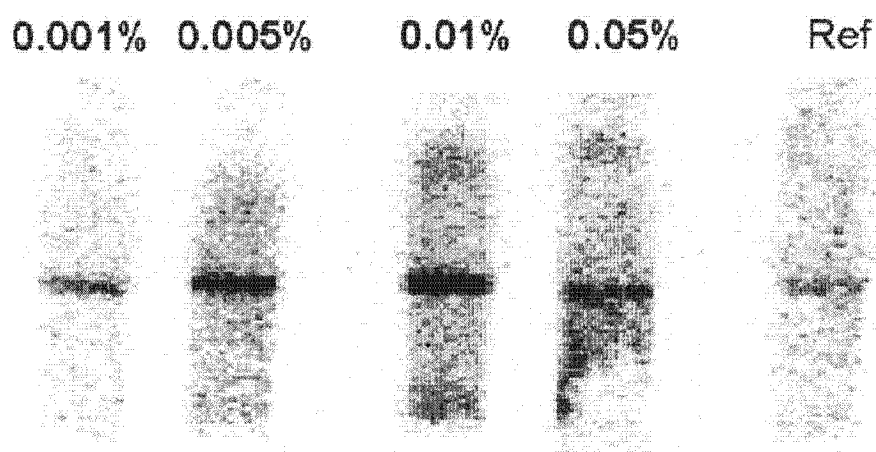


图 9