



(10)授权公告号 CN 107709994 B

(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201680038667.8

(22)申请日 2016.06.29

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107709994 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(30)优先权数据  
2015-131804 2015.06.30 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.12.29

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2016/069343 2016.06.29

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02017/002882 JA 2017.01.05

(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 铃木启太 岩本久彦

(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 张苏娜 常海涛

(51)Int.Cl.  
G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件  
US 2014348858 A1, 2014.11.27,  
US 2004022678 A1, 2004.02.05,  
审查员 陈伟潘

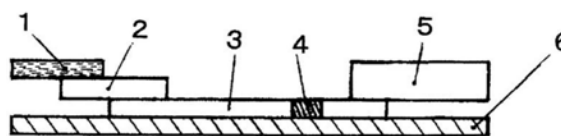
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

层析分析装置及层析分析方法

(57)摘要

本发明提供一种能够在抑制非特异性反应的同时提高被检测物质的检测灵敏度的层析分析装置。本发明涉及一种层析分析装置,其至少包括担载有检测检体中所含的被检测物质的检测部(4)的层析介质部(3),层析介质部(3)具有在支持体上设置膜而成的结构,所述膜的平均膜厚为 $110\mu\text{m}$ 至 $130\mu\text{m}$ ,并且所述膜的展开流速为30至45秒/40mm。



1. 一种层析分析装置,其至少包括层析介质部,该层析介质部担载有检测检体中所含的被检测物质的检测部,

所述层析介质部具有在支持体上设置膜而成的结构,

所述膜的平均膜厚为 $110\mu\text{m}$ 至 $130\mu\text{m}$ ,并且

所述膜的展开流速为30至45秒/40mm,

所述展开流速指的是通过测定沿垂直方向使水在膜上展开40mm的时间而得到的值。

2. 根据权利要求1所述的层析分析装置,其依次包括添加所述检体的试样添加部、保持识别所述检体中所含的被检测物质的标记物质的标记物质保持部、以及所述层析介质部。

3. 根据权利要求1或2所述的层析分析装置,其中,所述膜为硝酸纤维素膜。

4. 根据权利要求1或2所述的层析分析装置,其中,所述检体为选自鼻涕、痰、唾液、鼻拭子、咽拭子、粪便中的至少一种。

5. 根据权利要求1或2所述的层析分析装置,其为免疫层析分析装置。

6. 一种层析分析方法,其至少具有这样的步骤:使用权利要求1至5中任一项所述的层析分析装置,通过所述层析介质部中所担载的检测部从而检测所述检体中所含的被检测物质。

7. 一种层析分析方法,其使用权利要求2所述的层析分析装置并依次进行下述步骤(1)至(4):

(1) 将所述检体添加到试样添加部的步骤;

(2) 通过所述标记物质保持部中所保持的标记物质来识别所述检体中所含的被检测物质的步骤;

(3) 使所述检体及标记物质作为移动相而在层析介质部中展开的步骤;以及

(4) 在检测部检测所展开的移动相中的被检测物质的步骤。

8. 根据权利要求7所述的层析分析方法,其中,所述膜为硝酸纤维素膜。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的层析分析方法,其中,所述检体为选自鼻涕、痰、唾液、鼻拭子、咽拭子、粪便中的至少一种。

10. 根据权利要求6至8中任一项所述的层析分析方法,其中,所述层析分析装置为免疫层析分析装置。

## 层析分析装置及层析分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及层析分析装置及层析分析方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,在不必进行检体的前处理的利用免疫层析法的免疫分析中,作为利用抗体所具有的特异反应性来检测试样液中的抗原的简便的体外诊断试剂盒或便携用诊断装置,其重要性正在提高。特别是,病毒或细菌等的病原体检查试剂盒是在一般医院或临床中广泛使用的身边的免疫层析分析装置。

[0003] 作为常规的免疫层析分析装置的最简单结构,为试样添加部、标记物质保持部、担载有检测部的层析介质部、以及吸收通过了检测部的液体的吸收部相互连接而成的结构。

[0004] 对于这样的免疫层析分析装置,现在为了检测流感病毒这样的微量抗原而需要高灵敏度。

[0005] 因此,常规上采用了增加与标记物质结合的抗体的量等方法。然而,在这样的方法中会有容易发生非特异性反应的问题。需要说明的是,若减少抗体的量,则无法得到足够的灵敏度。

[0006] 因此,例如在专利文献1中提出了使金属离子掩蔽剂共存于反应液中的技术。

[0007] 在专利文献2中公开了在预定位置形成控制线以防止由于含生物材料的溶液的毛细管现象而引起的扩散,并将该含生物材料的溶液滴在控制线附近以将其局部化的技术。

[0008] 然而,在常规的免疫层析分析装置中,无法在抑制非特异性反应的同时还将灵敏度提高到所需水平。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本特开平9-203735号公报

[0012] 专利文献2:日本特开2009-264879号公报

### 发明内容

[0013] 发明所要解决的课题

[0014] 因此,本发明的目的在于提供一种能够在抑制非特异性反应的同时提高被检测物质的检测灵敏度的层析分析装置及层析分析方法。

[0015] 用于解决课题的方案

[0016] 本发明如下所述。

[0017] 1.一种层析分析装置,其至少包括层析介质部,该层析介质部担载有检测检体中所含的被检测物质的检测部,

[0018] 所述层析介质部具有在支持体上设置膜而成的结构,

[0019] 所述膜的平均膜厚为110 $\mu$ m至130 $\mu$ m,并且

[0020] 所述膜的展开流速为30至45秒/40mm。

[0021] 2. 根据上述1所述的层析分析装置,其依次包括添加所述检体的试样添加部、保持识别所述检体中所含的被检测物质的标记物质的标记物质保持部、以及上述层析介质部。

[0022] 3. 根据上述1或2所述的层析分析装置,其中所述膜为硝酸纤维素膜。

[0023] 4. 根据上述1至3中任一项所述的层析分析装置,其中所述检体为选自鼻涕、痰、唾液、鼻拭子、咽拭子、粪便中的至少一种。

[0024] 5. 根据上述1至4中任一项所述的层析分析装置,其为免疫层析分析装置。

[0025] 6. 一种层析分析方法,其至少具有这样的步骤:使用上述1至5中任一项所述的层析分析装置,并通过所述层析介质部中所承载的检测部从而检测所述检体中所含的被检测物质。

[0026] 7. 一种层析分析方法,其中,使用上述2所述的层析分析装置,依次进行下述步骤(1)至(4):

[0027] (1) 将所述检体添加到试样添加部的步骤;

[0028] (2) 通过所述标记物质保持部中所保持的标记物质来识别所述检体中所含的被检测物质的步骤;

[0029] (3) 使所述检体及标记物质作为移动相而在层析介质部中展开的步骤;以及

[0030] (4) 在检测部检测所展开的移动相中的被检测物质的步骤。

[0031] 8. 根据上述7所述的层析分析方法,其中所述膜为硝酸纤维素膜。

[0032] 9. 根据上述6至8中任一项所述的层析分析方法,其中所述检体为选自鼻涕、痰、唾液、鼻拭子、咽拭子、粪便中的至少一种。

[0033] 10. 根据上述6至9中任一项所述的层析分析方法,其中所述层析分析装置为免疫层析分析装置。

[0034] 发明效果

[0035] 根据本发明,由于将层析介质部中的膜的平均膜厚及展开流速设定为特定范围,因而可以最大限度地防止引起检测部中的非特异性反应的物质所带来的不利影响,并且同时也可以提高检测灵敏度。

[0036] 附图简要说明

[0037] [图1]图1是用于说明层析分析装置的结构的一个例子的剖面图。

[0038] [图2]图2是用于说明层析介质部的支持体与膜的结构的一个例子的剖面图。

[0039] [图3]图3是实施例6的层析介质部的横截面的扫描电子显微镜(SEM)照片。

## 具体实施方式

[0040] 在下文中,将更详细地说明用于实施本发明的实施方式。

[0041] 对于本发明的层析分析装置及层析分析方法,只要利用基于生物分子的亲和性的特异性结合即可,没有特别限制。例如,可列举出利用抗原和抗体的结合的免疫层析分析装置及方法、利用核酸的杂交的核酸层析分析装置及方法等,此外,也可以是利用糖与外源凝集素的结合、激素和受体的结合、酶和抑制剂的结合等的层析分析装置及方法。

[0042] 在下文中,将列举本发明所优选的免疫层析分析装置及免疫层析分析方法来进一步说明本发明,但本发明并不限于下述的实施方式。

[0043] 本发明的免疫层析分析装置至少包括承载有检测检体中所含的被检测物质的检

测部的层析介质部,该层析介质部中的膜只要是满足下述说明的平均膜厚及展开流速的膜即可,没有特别的限制,以下,将参照附图并对本发明优选的免疫层析分析装置的一个实施方式说明。

[0044] 如图1所示,本发明的免疫层析分析装置被构成为依次包括:试样添加部(也称为样本垫)(1)、标记物质保持部(也称为结合垫)(2)、层析介质部(3)、检测部(4)、吸收部(5)以及背板(6)。

[0045] 试样添加部(1)为在免疫层析分析装置中添加作为检体的试样的部位。试样添加部(1)只要是用于通常的免疫层析分析装置的材料即可,可以是任何材料。也就是说,在试样添加部(1)中试样迅速被吸收,可以由具有试样迅速移动这样的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、棉布等。

[0046] 标记物质保持部(2)含有后述的标记物质(标志物质),该标记物质与事先结合了被检测物质的抗体相结合。当被检测物质在标记物质保持部内移动时,标记物质与抗体结合,从而进行了标记化。标记物质保持部(2)例如由玻璃纤维无纺布或纤维素膜等制成。

[0047] 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。

[0048] 如图2所示,层析介质部(3)具有在支持体(32)上设置膜(34)而成的结构,本发明中,膜(34)的平均膜厚为110 $\mu\text{m}$ 至130 $\mu\text{m}$ ,并且膜(34)的展开流速为30至45秒/40mm。

[0049] 若膜(34)的平均膜厚小于110 $\mu\text{m}$ ,则膜(34)会从支持体(32)脱落或者容易受损,因而不具有实用性。相反地,若膜(34)的平均膜厚超过130 $\mu\text{m}$ ,则容易发生对于高粘度检体的非特异性反应。

[0050] 对于膜(34)的厚度,例如,可以利用由支持体(32)和膜(34)构成的层析介质部(3)的横截面的扫描电子显微镜照片(例如图3),限定支持体(32)和膜(34)的边界线来测量膜(34)的厚度。

[0051] 另外,也可以这样算出膜(34)的厚度:将层析介质部(3)浸渍在甲醇等有机溶剂中,将膜(34)溶解后而使支持体(32)残留,并采用市售的测微仪或千分表等膜厚测定器测定层析介质部(3)和所残留的支持体(32)各自的膜厚,由溶解前后的膜厚差异来算出膜(34)的厚度。使用这些测定方法测定层析介质部(3)内的多个不同的位置(优选为9至10个位置以上),并算出其平均值作为膜(34)的平均膜厚。

[0052] 为了在更高的灵敏度下抑制非特异性反应,所用的膜(34)的平均膜厚优选为110 $\mu\text{m}$ 至127 $\mu\text{m}$ ,更优选为110 $\mu\text{m}$ 至120 $\mu\text{m}$ ,最优选为114 $\mu\text{m}$ 至117 $\mu\text{m}$ 。另外,只要膜(34)的厚度在110 $\mu\text{m}$ 至132 $\mu\text{m}$ 的范围内,就可以充分发挥本发明的效果因而优选,并且更优选使用110 $\mu\text{m}$ 至122 $\mu\text{m}$ 的膜(34)。

[0053] 若膜(34)的展开流速小于30秒/40mm,则难以获得充分的灵敏度,相反地,若展开流速超过45秒/40mm,则易于发生非特异性反应。

[0054] 膜(34)的更优选的展开流速为35至45秒/40mm。

[0055] 需要说明的是,本发明中的展开流速指的是通过测定沿垂直方向使水在膜上展开40mm的时间而得到的值。

[0056] 通常,若膜(34)的平均膜厚变薄,则膜(34)的平均孔径变小,展开流速变慢。相反

地,若膜(34)的平均膜厚增加,则展开流速变快。在本发明中,与常规技术的层析分析装置相比,在使膜(34)的平均膜厚变薄的同时,还将展开流速设定为快速。通过使膜(34)的平均膜厚变薄,从而使检体中所含的被检测物质与检测部(4)中的抗体之间的接触概率提高,从而可以实现高灵敏度,与此同时,通过使展开流速变快,可以最大限度地防止引起检测部(4)中的非特异性反应的物质所带来的不利影响。

[0057] 需要说明的是,为了使膜(34)的平均膜厚变薄且将展开流速设定为快速,可列举出调整膜(34)的平均孔径的方法,这种平均孔径的调整可以通过(例如)以下方式进行:将构成膜(34)的聚合物溶解于含有有机溶剂的溶液中,再在浇铸成膜时适宜地调整该有机溶剂中所含的水分量。

[0058] 在本发明中,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)硝酸纤维素制的膜(以下有时也称为“硝酸纤维素膜”)、醋酸纤维素制的膜(以下有时也称为“醋酸纤维素膜”),更优选为硝酸纤维素膜。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、聚丙烯)。

[0059] 作为硝酸纤维素膜,其主要含有硝酸纤维素即可,可以使用纯品或硝酸纤维素混合品等以硝酸纤维素为主要材料的膜。

[0060] 硝酸纤维素膜为表现出毛细管现象的膜,可以进一步含有促进毛细管现象的物质。作为该物质,优选为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性作用的物质,即不对免疫层析上的被检测物质的移动造成影响、并且也不对标记物质(例如金颗粒等)的显色造成影响的物质。

[0061] 如上所述,由于本发明中的膜(34)的平均膜厚较薄,因而为了维持这种结构,层析介质部(3)具有在支持体(32)上设置膜(34)而成的结构。

[0062] 作为支持体(32),可列举出由具有水不透过性的塑料等构成的支持体,可列举出(例如)聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚乙烯、聚氨酯制的膜状的支持体。需要说明的是,在通过目视判定来观察测定结果的情况下,支持体(32)优选具有与由标记物质带来的颜色不一样的颜色,并通常优选为无色或白色。

[0063] 支持体(32)的厚度为(例如)50 $\mu\text{m}$ 至130 $\mu\text{m}$ ,优选为80 $\mu\text{m}$ 至120 $\mu\text{m}$ 。

[0064] 以上述的硝酸纤维素膜和醋酸纤维素膜为代表的层析介质部(3)的形态及大小没有特别的限制,只要其在实际操作方面及反应结果的观察方面是合适的即可。

[0065] 检测部(4)形成于上述层析介质部(3)上,也就是说,与被检测物质特异性结合的抗体被固定在任意位置。

[0066] 作为抗体,例如可列举出多克隆抗体或单克隆抗体。单克隆抗体及多克隆抗体或其片段可以是公知的、可获取的、或者可通过公知的方法进行制备。抗体作为固定化试剂而被固定在任意位置上,从而可以形成作为反应部位的检测部(4)。

[0067] 作为将固定化试剂固定于层析介质部(3)的方法,包括:通过物理或化学方法将固定化试剂直接固定化在层析介质部(3)上的方法,以及使固定化试剂物理或化学地结合到微粒,并将该微粒捕捉并固定化在层析介质部(3)上的间接固定化方法。

[0068] 作为直接进行固定化的方法,可以利用物理吸附,也可以通过共价结合进行。在硝

酸纤维素膜的情况下,可以进行物理吸附。在共价结合中,层析介质部(3)的活性化一般使用溴化氰、戊二醛或碳二亚胺等,但也可以使用任意的办法。

[0069] 作为间接进行固定化的方法,包括在使固定化试剂结合到不溶性微粒之后,固定化在层析介质部(3)上的方法。可以将不溶性微粒的粒径选择为虽然被层析介质部(3)捕捉但是不能进行移动的尺寸,并且优选平均粒径为约5 $\mu$ m以下的微粒。

[0070] 作为这些颗粒,已知有各种用于抗原抗体反应的颗粒,在本发明中也可以使用这些公知的颗粒。例如,可列举出聚苯乙烯、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或丙烯醛-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乳胶颗粒等有机高分子物质的微粒;明胶、膨润土、琼脂糖或交联的葡聚糖等微粒;二氧化硅、二氧化硅-氧化铝或氧化铝等无机氧化物、或者采用硅烷偶联处理等将官能团导入到无机氧化物而得的无机颗粒等。

[0071] 在本发明中,从灵敏度调整的容易程度等方面出发,优选直接固定化。另外,在将固定化试剂固定于层析介质部(3)时,可以使用各种方法。例如,可以使用微量注射器、带有调节泵的笔、或喷墨印刷等各种技术。作为反应部位的形态,没有特别的限定,可以作为圆点、相对于层析介质的展开方向而垂直延伸的线、数字、文字或“+”、“-”等记号等而进行固定化。

[0072] 在将固定化试剂固定化之后,为了进一步防止非特异性反应所引起的分析精度的降低,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或SDS等表面活性剂中的一种或两种以上进行洗净。

[0073] 吸收部(5)是为了吸收通过了检测部(4)的检体或展开液等液体而根据需要设置在层析介质部(3)的末端的。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、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,并且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。

[0074] 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)中的一部分或全部。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。

[0075] 本发明的免疫层析分析方法只要至少具有以下步骤即可,没有特别的限制:使用上述免疫层析分析装置,通过层析介质部(3)所搭载的检测部(4)来检测检体中所含的被检测物质,但是优选依次进行下述步骤(1)至(4):

[0076] (1) 将上述检体添加到试样添加部的步骤;

[0077] (2) 通过上述标记物质保持部中所保持的标记物质来识别上述检体中所含的被检测物质的步骤;

[0078] (3) 使上述检体及标记物质作为移动相而在层析介质部中展开的步骤;以及

[0079] (4) 在检测部检测所展开的移动相中的被检测物质的步骤。

[0080] 以下对于各步骤进行说明。

[0081] (1) 将检体添加到试样添加部的步骤

[0082] 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调整或稀释至检体在免疫层析介质部(3)中顺利移动的程度的浓度,并作为含有检体的液体。第二,将预定量(通常为0.1至2mL)的该含有检体的液体滴加到试样添加部(1)上。当滴加含有检体的液体时,含有检体的液体就在试样添加部(1)中开始移动。

[0083] 检体稀释液另外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。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混合物供给、滴加到试样添加部上并使其展开,也可以先将检体供给、滴加到试样添加部上,然后再将展开液供给、滴加到试样添加部上并使它们展开。

[0084] 作为包含被检测物质的检体,可列举出(例如)生物试样,即鼻涕、痰、唾液、鼻拭子、咽拭子、粪便、全血、血清、血浆、尿液、脊髓液、羊水、乳头分泌物、泪、汗、来自皮肤的浸出液、来自组织或细胞及粪便的提取液等,此外牛奶、鸡蛋、小麦、豆类、牛肉、猪肉、鸡肉等或含有它们的食品等的提取液等。

[0085] 上述当中,在本发明中,检体优选为选自鼻涕、痰、唾液、鼻拭子、咽拭子、粪便中的至少一种。也就是说,优选所谓的高粘性检体。已知这样的高粘性检体含有粘蛋白这样的粘性物质,并且这样的粘性物质容易产生非特异性反应。

[0086] 在本发明中,由于如上所述将膜(34)的平均膜厚设定为110 $\mu$ m至130 $\mu$ m、并将膜(34)的展开流速设定为30至45秒/40mm的范围,因而可以使检体中所含的被检测物质与检测部(4)中的抗体的接触概率提高以实现高灵敏度,并且同时,通过将展开流速变快,从而可以使检测部(4)中的高粘性物质的到达延迟以最大限度地防止非特异性反应。

[0087] 作为具体的被检测物质,可列举出(例如)癌胚抗原(CEA)、HER2蛋白、前列腺特异性抗原(PSA)、CA19-9、 $\alpha$ -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、便隐血、肌钙蛋白I、肌钙蛋白T、CK-MB、CRP、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、黄体生成素(LH)、促卵泡激素(FSH)、梅毒抗体、流感病毒、RS病毒、人血红蛋白、衣原体抗原、A组 $\beta$ 溶血性链球菌抗原、HBs抗体、HBs抗原、轮状病毒、腺病毒、白蛋白或糖化白蛋白等,但也不限于这些。

[0088] 优选地,被检测物质采用便隐血、肌钙蛋白I、肌钙蛋白T、CK-MB、CRP、流感病毒、RS病毒、人血红蛋白、衣原体抗原、A组 $\beta$ 溶血性链球菌抗原、HBs抗体、HBs抗原、轮状病毒、腺病毒、白蛋白或糖化白蛋白。

[0089] (2)通过标记物质保持部中所保持的标记物质来识别检体中所含的被检测物质的步骤

[0090] 步骤(2)为这样的步骤:其中,使在步骤(1)中被添加到试样添加部中的含有检体的液体向标记物质保持部(2)移动,通过标记物质保持部中所保持的标记物质从而识别检体中的被检测物质。

[0091] 标记物质将抗体标记化。免疫层析分析方法中的检测试剂的标记通常也使用酶等,但是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。可以通过将抗体敏化至不溶性载体以制备标记化的检测试剂。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。



[0092] 作为标记物质的不溶性载体可以使用金、银或铂等金属颗粒、氧化铁等金属氧化物颗粒、硫等非金属颗粒以及由合成高分子构成的乳胶颗粒、或者其他的不溶性载体。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,并且优选为有色的以便容易地利用目视进行判定。金属颗粒及金属氧化物颗粒本身呈现出对应于粒径的特定的自然色,可以利用其颜色作为标记。

[0093] 特别地,从便于检测、难以凝聚、并且难以发生非特异性显色的方面出发,金颗粒是优选的。金颗粒的平均粒径为(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:使用由透射电子显微镜(TEM:日本电子(株)制,JEM-2010)拍摄的投影照片,任意选择100个颗粒并测算这些颗粒的投影面积圆当量直径,由其平均值计算出。

[0094] (3)使检体及标记物质作为移动相而在层析介质部中展开的步骤

[0095] 步骤(3)为这样的步骤:其中,在步骤(2)中被检测物质在标记物质保持部中被标记物质识别后,使检体及标记物质作为移动相而在层析介质部上通过。

[0096] (4)在检测部检测所展开的移动相中的被检测物质的步骤

[0097] 步骤(4)为这样的步骤:其中,作为移动相而在层析介质部上通过了的检体中的被检测物质通过抗原-抗体的特异性结合反应,以被保持于(即,被担载固定于)检测部的抗体与标记试剂夹心状地夹着的方式进行了特异性地反应结合,使检测部显色。

[0098] 在不存在被检测物质的情况下,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,因而不会使检测部显色。

[0099] 最后,含有检体的液体的水分向吸收部(5)移动。

[0100] 需要说明的是,尽管在上述说明中以免疫层析分析装置及免疫层析分析方法为例进行了说明,但是本发明并不限于上述实施方式,只要其利用基于生物分子的亲和力的特异性结合,均可获得上述实施方式全部的效果。

[0101] 实施例

[0102] 以下,通过实施例进一步说明本发明,但本发明不限于以下实施例。

[0103] (1)试样添加部的制作

[0104] 作为试样添加部,使用了由玻璃纤维构成的无纺布(ミロボア社制:300mm×30mm)。

[0105] (2)标记物质保持部的制作

[0106] 将经磷酸缓冲液(pH7.4)稀释为0.05mg/mL浓度的来自小鼠的抗RS病毒单克隆抗体0.1mL添加到0.5mL的金胶体悬浮液(田中贵金属工业社制:LC40nm)中,并在室温下静置10分钟。

[0107] 接着,添加0.1mL的含有1质量%的牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲液(pH7.4),并进一步在室温下静置10分钟。其后,在充分搅拌后,在8000×g下进行15分钟的离心分离,除去上清液,然后再添加0.1mL的包含1质量%的BSA的磷酸缓冲液(pH7.4)。通过上述步骤制作了标记物质溶液。

[0108] 将300μL的10质量%海藻糖水溶液以及1.8mL的蒸馏水加入到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15mm×300mm的玻璃纤维垫(ミロボア社制)上,然后采用真空干燥机进行干燥,制作了标记物质保持部。

[0109] (3)层析介质部及检测部的制作

[0110] 在聚对苯二甲酸乙二醇酯制的厚度为100μm的支持体上层叠由硝酸纤维素构成、

且具有下表1和表2所示的厚度及展开流速的膜(300mm×25mm),并将所得材料作为层析介质部。关于表1和表2所示的膜的厚度,在后述的免疫层析分析装置制作后(裁切后),通过对来自免疫层析分析装置内的层析介质部的扫描电子显微镜照片的任意3个位置的横截面进行观察,对于每个横截面分别测定任意3个位置的膜厚,由所测定的总共9个位置的膜厚算出层析介质的膜厚的最小值、膜厚的最大值、以及膜厚的平均值(平均膜厚)。

[0111] 然后,采用含有5质量%异丙醇的磷酸缓冲液(pH7.4)将来自小鼠的抗RS病毒单克隆抗体稀释为1.0mg/mL的浓度以得到溶液,将150μL该溶液以1mm的宽度涂布到干燥膜上的检测部位(检测线),为了确认金纳米颗粒标记试剂是否展开或金纳米颗粒标记试剂的展开速度,在检测部位下游,将与金纳米颗粒标记物质等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(对照线)。此后,在50℃下干燥30分钟,并在室温下干燥一晚,从而在层析介质部上制作了检测部。

[0112] (4) 免疫层析分析装置的制作

[0113] 然后,依次将试样添加部、标记物质保持部、担载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8mm。

[0114] (5) 检体稀释液

[0115] 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(日油株式会社制的商品名MN-811与ナカライテスク社制的商品名NP-40的1:1混合物)、80mM的氯化钾、20mM的盐酸胍、以及0.4重量%的聚乙烯吡咯烷酮(平均分子量36万),并将其作为用于稀释处理检体的试剂。

[0116] (6) 测定

[0117] 采用上述检体稀释液将RS病毒阴性的临床实验检体鼻涕稀释成为10%的浓度并作为检体。将120μL的该检体置于免疫层析分析装置的试样添加部上并使其展开,经过15分钟后,通过目视以确认检测部的显色程度,并通过以下的评价基准来评价是否有非特异性反应。

[0118] ++: 确认到了清晰的线。

[0119] +: 确认到了较淡的线。

[0120] -: 未确认到有线。

[0121] 需要说明的是,将采用上述检体稀释液将RS病毒阳性的临床实验检体鼻涕稀释为10%浓度的液体作为检体,重复进行上述测定,并评价灵敏度。对于每个实施方式各进行5次测定,其平均灵敏度的结果示于表1及表2。

[0122] [表1]

[0123] 表1

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6
膜的厚度 最小值( $\mu\text{m}$ )	125	127	121	112	112	110
膜的厚度 最大值( $\mu\text{m}$ )	132	132	129	122	121	118
膜的厚度 平均膜厚( $\mu\text{m}$ )	127	127	126	116	117	114
灵敏度(阳性)	++	++	++	++	++	++
非特异性反应(阴性)	-	-	-	-	-	-
展开流速(秒/40mm)	37	38	33	40	41	39

[0125] [表2]

[0126] 表2

	比较例 1	比较例 2	比较例 3
膜的厚度 最小值( $\mu\text{m}$ )	145	133	125
膜的厚度 最大值( $\mu\text{m}$ )	138	146	131
膜的厚度 平均膜厚( $\mu\text{m}$ )	141	141	127
灵敏度(阳性)	++	++	+
非特异性反应(阴性)	+	+	-
展开流速(秒/40mm)	42	39	54

[0128] 在表1中可知,对于实施例1至6,由于膜的平均膜厚在110 $\mu\text{m}$ 至130 $\mu\text{m}$ 的范围内、且膜的展开流速在30至45秒/40mm的范围内,因而即使是采用了高粘性检体的分析,也不会产生非特异性反应。另外,灵敏度也良好。

[0129] 与此相对,对于表2中的比较例1至2,虽然展开流速在本发明的范围内,但是膜的平均膜厚均超过了本发明所规定的上限,因而发生了非特异性反应。对于比较例3,虽然膜的平均膜厚在本发明的范围内,但是展开流速超过了本发明所规定的上限,因而灵敏度比实施例低。

[0130] 需要说明的是,在只将上述检体稀释液作为检体以重复进行上述试验的情况下,灵敏度及非特异性反应均评价为“-”。

[0131] 此外,对于实施例1至6,在各自重复进行50次测定的情况下,在实施例4至6中未检测出非特异性反应,但是在实施例1至3中检测出1至2次的非特异性反应。

[0132] 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显而易见的是,可在不脱离本发明的意图和范围的情况下进行各种变更及变形。此外,本申请基于2015年6月30日提交的日本专利申请(特愿2015-131804),其全文内容以引用方式并入本文。

[0133] 符号的说明

- 
- |        |    |             |
|--------|----|-------------|
| [0134] | 1  | 试样添加部 (样本垫) |
| [0135] | 2  | 标记物质保持部     |
| [0136] | 3  | 层析介质部       |
| [0137] | 32 | 支持体         |
| [0138] | 34 | 膜           |
| [0139] | 4  | 检测部         |
| [0140] | 5  | 吸收部         |
| [0141] | 6  | 背板          |

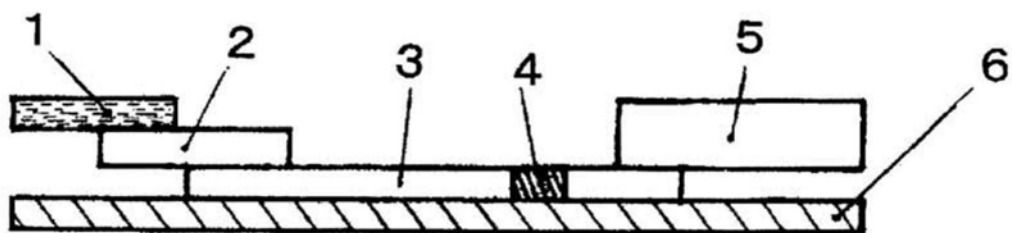


图1

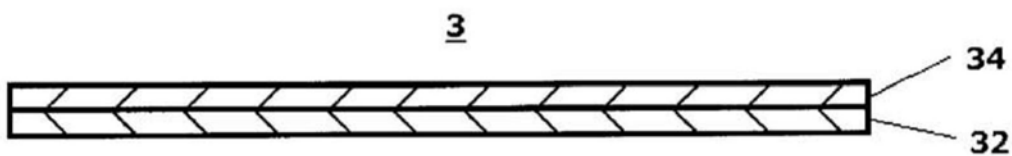


图2

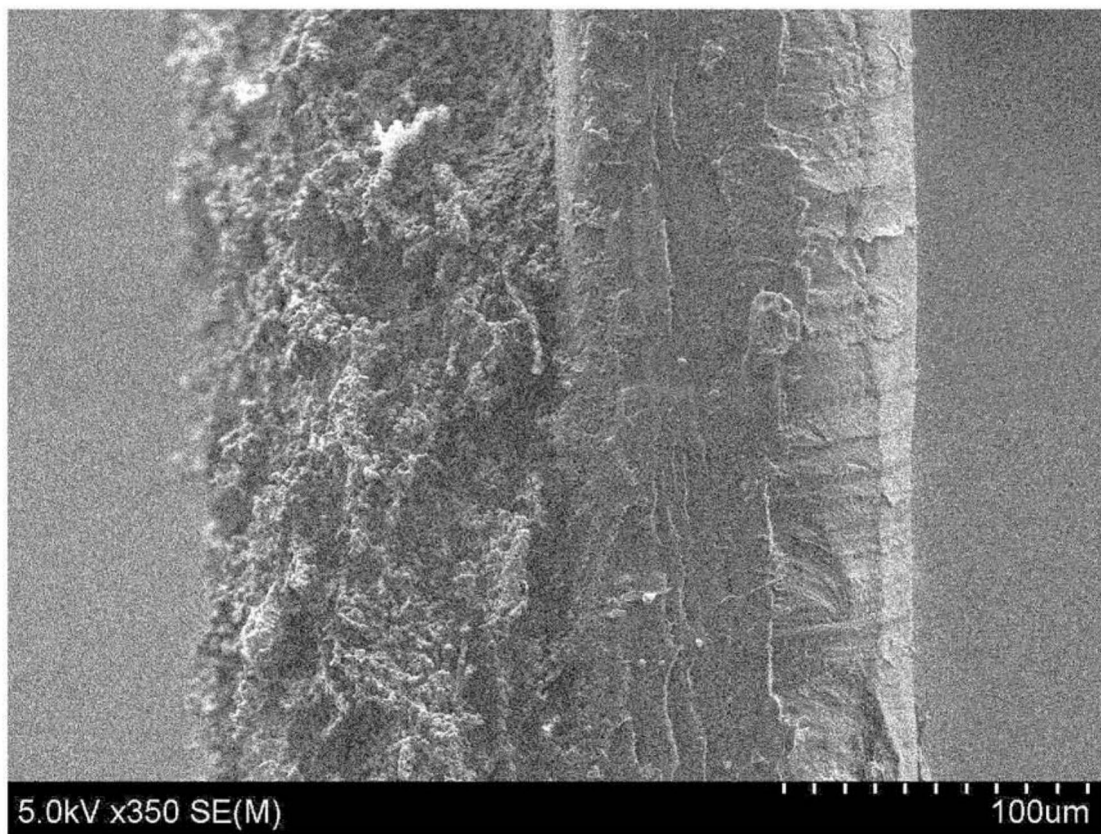


图3