

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 21/64



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98119513. X

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1137382C

[22] 申请日 1998. 9. 17 [21] 申请号 98119513. X

[30] 优先权

[32] 1997. 9. 18 [33] JP [31] 253072/1997

[32] 1997. 9. 18 [33] JP [31] 253074/1997

[71] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本国大阪府

[72] 发明人 冈美和 重藤修行 宫崎仁诚

审查员 胡玉连

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

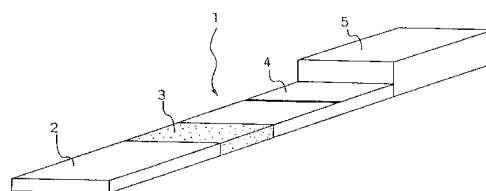
代理人 章鸣玉

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 12 页

[54] 发明名称 免疫色谱装置

[57] 摘要

公开了一种没有可成为检测时的出错要因的本底着色和空白显色、能正确而迅速地测出液体试样中的抗原的免疫色谱装置。该免疫色谱装置在多孔载体至识别部之间设有添加剂浸渍部，在添加剂浸渍部，选自表面活性剂、可溶性铵盐和 pH 缓冲剂的至少一种被导入载体的试样溶出，以可与试样一起在载体内移动的状态被加载。此外，上述标记部被分割成多个。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

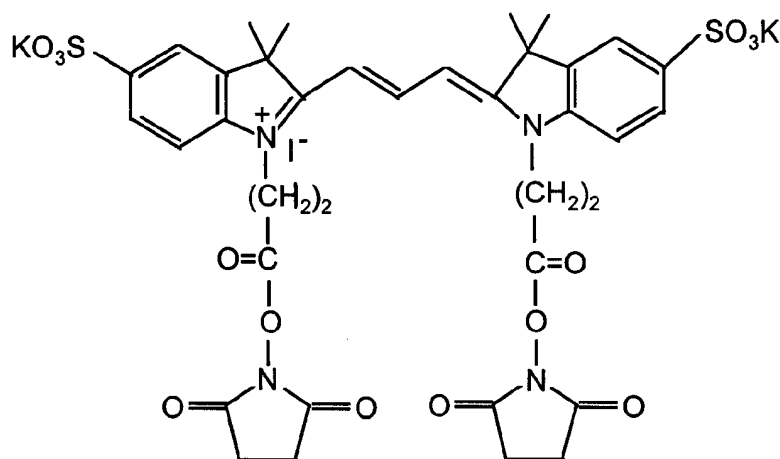
1. 免疫色谱装置, 根据抗原与抗体的特异性结合检测水性试液中的抗原, 具有结合在为检测对象的抗原上的至少二种抗体以及由多孔载体组成的试验片, 所述多孔载体配置有含上述一种抗体的标记部和含另一种抗体的识别部, 标记部和识别部的排列应使导入于试样导入部的试样能经过标记部向识别部移动, 上述一种抗体在化学上被可视化处理, 由导入载体的试液溶出, 以可与试样一起在载体内移动的状态加入于载体的标记部中, 另一种抗体则以不会随着试样的移动而出现位置变化的强度固定在载体的识别部上, 而且, 在上述载体中, 在试样导入部至识别部之间设有添加剂浸渍部, 在添加剂浸渍部中, 选自表面活性剂、可溶性铵盐和 pH 缓冲剂中的至少一种被试样溶出, 以可与试样一起在载体内移动的状态被加载,

其特征在于, 所述标记部分割成多个, 加载在各标记部的标记抗体的种类和/或绝对量互不相同, 加载在靠近识别部一侧的标记抗体的含量比离识别部远的一侧的标记部中所含的标记抗体的量多。

2. 如权利要求 1 所述的免疫色谱装置, 其特征在于, 除试样串行通过多个标记部而到达识别部的流路之外, 还具有经过标记部的一部分或完全不经过标记部而直接到达识别部的流路。

3. 如权利要求 1 所述的免疫色谱装置, 其特征在于, 所述一种抗体与选自金胶体、胶乳粒、有机色素、颜料、金属、金属氧化物和酶中的至少一种结合而可可视化。

4. 如权利要求 1 所述的免疫色谱装置, 其特征在于, 被可视化处理的抗体是被具有下列结构式的花青色素标记的抗体。



5. 如权利要求 1 所述的免疫色谱装置, 其特征在于, 所述表面活性剂是烷基酚醚类非离子型表面活性剂。

-
6. 如权利要求 1 所述的免疫色谱装置, 其特征在于, 所述铵盐是四甲基铵盐。
7. 如权利要求 1 所述的免疫色谱装置, 其特征在于, 在添加剂浸渍部的 pH 缓冲剂的加载量为在将预定体积的试样添加到载体的试样导入部时, 识别部的试样 pH 在 8.0 - 8.5 之间的量。
- 5 8. 如权利要求 1 所述的免疫色谱装置, 其特征在于, 所述 pH 缓冲剂是选自硼酸、2 - (N - 吗啉代) 乙磺酸、三羟甲基氨基甲烷和磷酸中的至少一种。
9. 如权利要求 1 所述的免疫色谱装置, 其特征在于, 在多个标记部之间, 插入了允许试样和标记抗体移动的多孔材料。

免疫色谱装置

5

技术领域

本发明涉及检测水中的微生物和从体液中测出极微量的标记物质的体外诊断药及携带用诊断装置。更具体地说,是为了提高不具有分析设备的小规模的医院或受验者自身可简便且迅速地进行测定的免疫色谱装置的性能。

10

背景技术

从尿、汗、血液等体液中测出极微量的标记物质的体外诊断药对临床诊断、在家医疗的关键作用已为人们所认识。免疫色谱技术是利用抗体所具有的反应特异性的体外诊断药的基础技术。其中,妊娠检测药是已作为一般用医药品而在市场流通的最典型的免疫色谱装置。当女性妊娠时,从胎盘中分泌出人绒毛膜促性腺激素(hCG),该激素随后排泄至尿中。当在妊娠检测器中添加了女性的尿后,通常约3分钟左右即使外行也能简单地识别是妊娠阳性还是阴性。此类免疫色谱装置的代表性结构例如在美国专利 No. 5,602,040 中有揭示。

15

下面就最简单的免疫色谱装置的结构和工作机理,以妊娠检测器为例进行说明。图1是典型的用于免疫色谱装置的多孔载体的结构。从容易将抗体进行固定的角度出发,该多孔载体1最广泛使用的材料是硝基纤维素片材。然而,当整体用硝基纤维素构成时,由于试样流速显著下降,因此,最好仅识别部分用硝基纤维素构成,而其他部分用试样流速更快的玻璃滤纸等构成。在载体一端的试样导入部2用具有能迅速吸收试样、但保留能力弱、试样能迅速流向反应部之类性质的玻璃滤纸等多孔载体构成。当将多孔载体1装在中空的盒中时,将试样导入部2制作得较长,使其一部分从盒中露出,这样,可将尿直接导入试样导入部。或者,当试样导入部也装在盒内时,则可在盒上开个孔,从该孔中往试样导入部添加试样。

20

25

标记部3是通过将吸附在金胶体或着色乳胶上的抗hCG抗体的水溶液浸润玻璃滤纸后冷冻干燥而制得的。识别部4是通过将抗体水溶液以任意的形状滴加在硝基纤维素的片材上后干燥、洗涤而制得的。由于硝基纤维素非常强的非特异吸附特性,抗体被加载在硝基纤维素上。将抗体固定化后,为防止在检测反应时由非特异性吸附所产生的本底显色,例如,可用牛血清白蛋白(BSA)等进行表面处理。该操作称作封闭。在载体另一端的吸液部5为能迅速地吸收过剩的试样,使用了具有优异吸液力和吸液容量的材料玻璃滤纸。

30

将女性的尿作为试样以根据色谱装置的形状而定的量(通常为0.1~2ml)添加到试样导入部2中。试样经过标记部3并通过识别部4而向吸液部5移动。此时,在试样通过标记部3时,加载在标记部的标记抗体溶解在试样的水分中,与试样一起开始移动。然后,溶解的标记抗体通过识别部4。这里,根据抗原与抗体的特异性结合,在阳性的情况下,固定化抗体与标记抗体通过抗原中介而在识别部反应,识别部着

35

色。在阴性的情况下，不发生反应，标记抗体通过识别部而被吸液部吸收。由此，可识别水性试液中是否有抗原。

在上述免疫色谱装置中，在识别部的固定相以外的部分着色（本底）和检测物质不存在的情况下，固定化相的显色（空白）不仅使检测时的 SN 比下降，而且还可成为出错的原因。本底着色的原因是可视化的移动相抗体与多孔载体的疏水性结合。此外，空白显色的原因是带负电荷的移动相抗体与带正电荷的固定相抗体之间的电相互作用。

通常，检测所用的试样中不含具有抵销疏水性结合和电相互作用的效果的物质（如表面活性剂和 pH 缓冲剂等）。因此，在以往的免疫色谱装置中，多少存在本底着色和有时出现空白等问题。这在用有机色素将移动相抗体可视化时可尤其明显地看到。

在上述免疫色谱装置中，通过增加加载在标记部的标记抗体的量和浓度，可提高灵敏度。然而，使用该方法时，标记抗体充分流尽、本底褪色、达到可用肉眼确认而所需的时间增大。即，灵敏度的提高与反应时间的减少互反。而且，当试样中所含的抗原大大过剩时，由于移动相的抗体已全部与抗原反应完了，无法停留在识别部，因此，在表观上产生抗原较少的误差。由于该原因，在免疫色谱法中，本质上存在发生反应的动态范围，通常在妊娠检测器中，反应的动态范围为 50~100,000IU/L。

此外，当构造为试样必须经过标记部后再移动到识别部时，则由于 hCG 在与固定化抗体反应之前，已与标记的抗体反应完了，因此不利于在低浓度进行抗原检测。

发明内容

鉴于上述问题，本发明的目的在于，提供一种可消除能成为检测时出错的原因的本底着色和空白显色并可正确又迅速地测出液体试样中的抗原的免疫色谱装置。

本发明的目的还在于，提供一种既可提高灵敏度又可减少反应时间且具有扩大反应动态范围效果的划时代的免疫色谱装置。

本发明为解决上述问题，提供这样一种免疫色谱装置：免疫色谱装置，根据抗原与抗体的特异性结合检测水性试液中的抗原，具有结合在为检测对象的抗原上的至少二种抗体以及由多孔载体组成的试验片，所述多孔载体配置有含上述一种抗体的标记部和含另一种抗体的识别部，标记部和识别部的排列应使导入于试样导入部的试样能经过标记部向识别部移动，上述一种抗体在化学上被可视化处理，由导入载体的试液溶出，以可与试样一起在载体内移动的状态加入于载体的标记部中，另一种抗体则不会随着试样的移动而出现位置变化的强度固定在载体的识别部上，而且，在上述载体中，在试样导入部至识别部之间设有添加剂浸渍部，在添加剂浸渍部中，选自表面活性剂、可溶性铵盐和 pH 缓冲剂中的至少一种被导入载体的试样溶出，以可与试样一起在载体内移动的状态被加载，其特征在于，所述标记部分割成多个，加载在各标记部的标记抗体的种类和/或绝对量互不相同，加载在靠近识别部一侧的标记抗体的含量比离识别部远的一侧的标记部中所含的标记抗体的量多。

另外,在本发明的上述免疫色谱装置中,除试样串行通过多个标记部而到达识别部的流路之外,还设有从试样导入部起,经过标记部的一部分或完全不经过标记部而直接到达识别部的试样旁通流路。

5

附图说明

图1是以往的免疫色谱装置的试验片的立体图。

图2是本发明的免疫色谱装置中使用的试验片的构造例的立体图。

图3是本发明的免疫色谱装置中使用的试验片的另一构造例的立体图。

图4是实施例中所使用的试验片的纵向剖面图。

10 图5是比较试样中的hCG浓度与在识别部中的吸光度(显色强度)之间关系的图表。

图6是比较试样中的hCG浓度与可测出的最短时间之间关系的图表。

图7是比较试样中的hCG浓度与在识别部中的吸光度之间关系的图表。

图8是比较试样中的hCG浓度与可测出的最短时间之间关系的图表。

15 图9是比较试样中的hCG浓度与在识别部中的吸光度之间关系的图表。

图10是比较试样中的hCG浓度与可测出的最短时间之间关系的图表。

图11是改变在试验片上展开的试液的pH时试样中的hCG浓度与在识别部中的吸光度之间关系的图表。

图12是在另一实施例中使用的试验片的纵向剖面图。

20 图13是在又一实施例中使用的试验片的纵向剖面图。

图14是比较试样中的hCG浓度与在识别部中的吸光度之间关系的图表。

图15比较试样中的hCG浓度与可测出的最短时间之间关系的图表。

图16是比较试样中的hCG浓度与在识别部中的吸光度之间关系的图表。

25

具体实施方式

本发明的免疫色谱装置根据抗原与抗体的特异性结合检测水性试液中的抗原,具有结合在为检测对象的抗原上的至少二种抗体以及由多孔载体组成的试验片,所述多孔载体配置有含上述一种抗体的标记部和含另一种抗体的识别部,标记部和识别部的排列应使导入于试样导入部的试样能经过标记部向识别部移动,上述一种抗体即移动相抗体在化学上被可视化处理,由导入载体的试液溶出,以可与试样一起在载体内移动的状态加入于载体的标记部中,另一种抗体即固定相抗体则以不会随着试样的移动而出现位置变化的强度固定在载体的识别部上。其特征在于,还在上述载体中,在试样导入部至识别部之间设有添加剂浸渍部,在添加剂浸渍部中,选自表面活性剂、可溶性铵盐和pH缓冲剂中的至少一种被试样溶出,以可与试样一起在载体内移动的状态被加载。

30

35

这里,添加剂浸渍部可设在试样导入部与标记部之间或与试样导入部形成一体。通过在试样导入部与识别部之间设置添加剂浸渍部,分析时,表面活性剂、

铵离子或 pH 缓冲剂可在与试样混合的同时进行移动。而且，该试样到达识别部后，被吸液部吸收。添加剂中，表面活性剂可抑制液体试样的表面张力，有助于试样的流动，同时，可对移动相抗体的表面特性进行改性，降低其与多孔载体之间的疏水结合力。其结果，可缩短免疫色谱装置的检测时间，并可抑制本底着色。

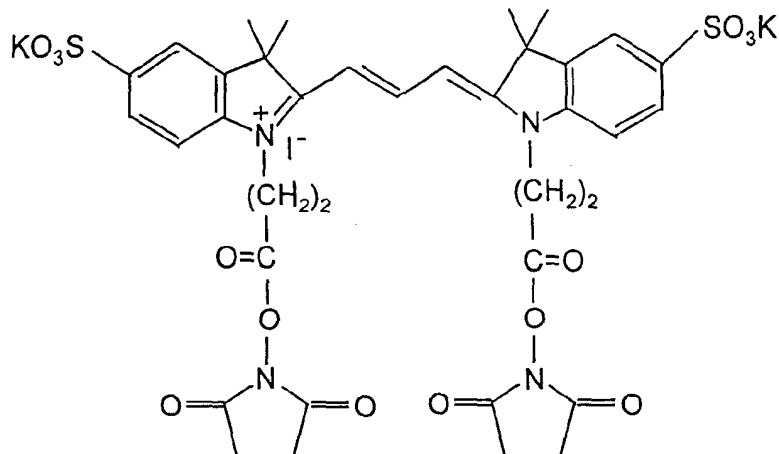
- 5 而铵离子由于是典型的正电荷化合物，具有抵销移动相抗体的负电荷的效果。此外，pH 缓冲剂通过控制导入的试样的 pH，可抵销固定相抗体的正电荷。通过上述添加剂所产生的效果，可抵销移动相抗体与固定相抗体之间的电相互作用，并可消除空白显色。

- 10 在本发明的优选实施方式中，其构造为，标记部被分割成多个，在各标记部之间，将允许试样和标记抗体移动的多孔材料作为间隔物加以填补，试样在分割的标记部流动。此外，在该构造中，可使加载在各标记部的标记抗体的种类和/或绝对量互不相同。

- 15 可将标记部分割成多个，在靠近识别部一侧的标记部即流路的下流侧的标记部加载较大量的标记抗体，在上流侧的标记部加载少量的标记抗体。当为此构造时，首先，在试样中有大量抗原时，在流路下流侧，大量的抗原与大量的标记抗体共存，由此，不会产生抗体不足，可非常快地在反应早期得到浓的显色。此外，在试样中抗原较少时，在上述下流的大量的标记抗体虽不怎样参与反应，但在识别部抗原一面被浓缩，一面被从后面用较长的时间以接近均匀的状态流来的标记抗体显色。即，灵敏度可维持在较高的水平。此时，由于从后面流来的标记抗体的浓度较低，本底仍维持在很低的水平，因此不会影响识别部的显色。根据该构造，由于最佳反应系可分别根据抗原的高、低浓度进行运作，其结果，可扩大灵敏度的动态范围。
- 20

- 此外，由于设置了试样经过标记部的一部分或完全不经过标记部而直接到达识别部的旁通流路，因此，试样的流路分成 2 个系统。即，一个路线是，单纯地从试样导入部经过载体而到达识别部。该路线障碍最少，试样可快速流动。而另一路线由于通过标记部（最好是分割的标记部），在标记部与间隔物之间的界面产生接触阻力，因此，试样的流动被延迟。换言之，在后者的构造中，当导入试样后，首先，实质上仅试样到达识别部，经过一定的时间后，被试样溶出的标记抗体到达识别部。在该延迟时间期间，在识别部，抗原以预先进行了某种程度结合的状态迎接标记抗体与抗原的混合物，因此，即使在仅存在少量抗原的情况下，也可高效率地将其捕捉，从而提高了灵敏度。在该构造中，由于设置了延迟时间，虽然在表观上反应时间增大了，但实际上由于可不增加标记抗体的绝对量而提高灵敏度，因此，本底消失的时间缩短，在总体上反应时间缩短。
- 25
- 30

- 35 在本发明中，化学上可视化的抗体即移动相抗体最好通过与金胶体、胶乳粒、有机色素、颜料、金属、金属氧化物和酶中的任一种或它们的组合结合而进行可视化。下面的结构式表示的花青色素是优选的色素例子。



本发明的免疫色谱装置在抗原为 hCG、LH (黄体化激素) 或 CRP (C 反应蛋白) 时尤其有效。

可在本发明中使用的表面活性剂例子有烷基酚醚类非离子型表面活性剂。优选 Triton 系表面活性剂, 尤其是 Triton X-100。

铵盐的例子有四甲基铵盐, 优选四甲基氯化铵、四甲基溴化铵、四甲基碘化铵等。

添加剂浸渍部中的 pH 缓冲剂的加载量最好在预先在载体的试样导入部中添加了规定体积的试样时, 能使识别部中试样的 pH 在 8.0 - 8.5 的范围内。

pH 缓冲剂最好选自硼酸、2 - (N - 吗啉代) 乙磺酸、三羟甲基氨基甲烷和磷酸。

图 2 是本发明的免疫色谱装置中使用的、由多孔载体组成的试验片的构造例。试验片 10 由多孔载体组成, 其构造为, 试样导入部 11、添加剂浸渍部 12、含经过可视化处理的移动相抗体的标记部 13、具有固定相抗体的固定化部 15 的识别部 14 和吸液部 16 依次排列。

该试验片装在不透过液体的材料的中空容器内。并且, 在容器中设有可从外部肉眼观察载体上的识别部的窗。此外, 为能将试样从外部导入于多孔载体上, 将中空容器的一部分开放或以标记部为中心, 将多孔载体在识别部的相反方向上延长, 露出于中空容器外部, 使其一部分成为试样的导入部。

图 3 是试验片的另一优选的构造例。标记部 13 被分割成 13a、13b 和 13c。另设有添加剂浸渍部, 但图中未标出。

下面对本发明的实施例作详细说明。

实施例 1

25 各部件的制作方法

(1) 识别部的封闭剂和洗涤剂的制作方法

在蒸馏水 1L 中加入三羟甲基氨基甲烷(以下用 Tris 表示) 0.1mol (12.11g)

进行搅拌后, 用 1N 的 HCl 将 pH 调整至 8.2, 作为硝基纤维素的洗涤剂。此外, 在上述洗涤剂中加入脱脂奶 10g, 进行搅拌, 作为硝基纤维素的封闭剂。

(2) 识别部的抗体固定化方法

将厚约 220 μ m (含支承体) 的硝基纤维素膜 (HFM SPHF04020, Milipore 公司产品) 裁切成 0.9cm $\times$ 1.2cm 大小的片材, 作为载体。在该片材上于离试样导入部一侧 0.5cm、离吸液部一侧 0.7cm 的地方涂布抗人绒毛膜促性腺激素的抗 hCG β 抗体 (α -hCG β) 的磷酸缓冲溶液 (以下称 PBS 溶液) (5mg/mL), 在避光状态下于 40 $^{\circ}$ C 干燥 8 小时。干燥后, 将片材浸渍在上述封闭剂中, 使每 30 片片材润含 70ml 封闭剂, 并在 30 $^{\circ}$ C 用振荡器进行摇动, 使抗体封闭。封闭后, 用上述洗涤剂 (70ml/30 片片材) 在 30 $^{\circ}$ C 洗涤 30 分钟, 重复 3 次, 然后在干燥器中干燥一晚。

(3) 添加剂浸渍部的制作方法

在蒸馏水 1L 中加入 Tris 1mol (121.1g) 进行搅拌后, 用 1N HCl 将 pH 调整至 8.2。再加入四甲基氯化铵 (以下称 TMA) 1mol (109.6g) 和 Triton 系表面活性剂 Triton X-100 (以下称 Triton) 10% 水溶液 10mL, 进行搅拌, 制成 pH8.2 的 Tris(1M)-TMA(1M)-Triton(0.1%) 溶液。用该溶液在每张已裁切成 0.9cm $\times$ 6.0cm 大小的玻璃纤维滤纸 (F075-14, Whatman 公司产品) 上浸润 0.36mL 后冷冻干燥。

(4) 标记部的制作方法

a) 在抗 hCG α 抗体 (α -hCG α) PBS 溶液 (10mg/mL) 中缓慢滴加二硫代双(丙酸磺基琥珀酰亚胺酯) (以下称 DTSSP) 的 PBS 溶液 (4.06mg/0.1mL), 在 35 $^{\circ}$ C 搅拌 30 分钟后, 用分子量色谱柱 (Sephadex G25M, Pharmacia 公司产品) 进行凝胶过滤。

b) 凝胶过滤后, 成为抗 hCG α 聚合抗体的 PBS 溶液 (10mg/6ml)。将其在 4 $^{\circ}$ C 进行保存。

c) 往牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 溶液 (110mg/mL) 中加入二硫苏糖醇 (DTT) 77mg, 在室温搅拌 30 分钟后 (最终浓度为 7.7mg/mL), 迅速地用分子量色谱柱 (Sephadex G25M, Pharmacia 公司产品) 进行凝胶过滤。其结果, 得到 SH 基游离的 BSA (总量为 24ml) 溶液。

d) 往上述 SH 基游离的 BSA (总量为 24mL) 中加入在 b) 得到的保存在 4 $^{\circ}$ C 的抗 hCG α 聚合抗体的 PBS 溶液 (10mg/6ml), 在 4 $^{\circ}$ C 搅拌 20 小时。

e) 为除去未反应的 BSA, 用分子量色谱柱 (Sephacryl S300HR, Pharmacia 公司产品) 进行凝胶过滤。得到抗 hCG α 聚合抗体-BSA (总量为 40 - 50mL)。

f) 再缓慢滴加前述结构式表示的花青色素 (以下称 SLIC3) 的 PBS 溶液 (350mg/2mL) 后, 在 4 $^{\circ}$ C 搅拌 20 小时。

g) 为除去未反应的花青色素, 用 50cm 和 150cm 的分子量色谱柱 (Sephadex

G25M, Pharmacia 公司产品)进行凝胶过滤,得到抗 hCG α 聚合抗体-BSA-SLIC3 (总量为 60 - 90mL)。将其称为标记抗体原液。

h) 在标记抗体原液中分别加入 BSA 和蔗糖各 1 %。

i) 将玻璃滤纸 (F075-14, Whatman 公司产品)裁切成 0.9cm $\times$ 5.0cm 大小, 5 将其浸渍在含上述稳定剂的标记抗体原液中, 每片 0.3mL, 然后冷冻干燥。

j) 冷冻干燥后, 在避光干燥状态下保存。

(5) 吸液部的制作方法

将玻璃滤纸 (GF/D, Whatman 公司产品)裁切成 0.9cm $\times$ 2.5cm 大小, 将 6 片叠加后使用。

10

试验片的制作方法

图 4 是本实施例的试验片 20 的构造。图中, 各构件的大小未必正确地表示出来。

分别在整个面上粘贴了 0.9cm $\times$ 5.5cm 大小的两面胶带 (TW-12SD, 15 Nichiban 公司产品) 的大小为 0.9cm $\times$ 5.5cm、厚为 0.5mm 的衬里 (白色的硬质聚氯乙烯板) 21 的表面粘接识别部 26、在其下流侧粘接吸液部 27、在识别部 26 的上流侧粘接标记部 24。此外, 在标记部 24 的上流侧依次粘接 0.9cm $\times$ 0.5cm 大小的玻璃纤维滤纸 (F075-14, Whatman 公司产品) 和添加剂浸渍部 22, 再从标记部 24 至整个添加剂浸渍部 22 的上方装置作为旁路用多孔质体 25 的 0.9cm 20 $\times$ 3.5cm 大小的玻璃纤维滤纸 (F075-14, Whatman 公司产品) 二张。将如此得到的试验片 20 装入中空的盒中。

该试验片 20 中, 添加剂浸渍部 22 的端部一侧兼作试样导入部。将试样按图中箭头 28 所示添加到试验片中后, 试样的流路主要有 2 条, 一条是从添加剂浸渍部 22 开始, 经过玻璃纤维滤纸 23、标记部 24, 到达识别部 26, 为流路 29a, 25 另一条是从旁路用多孔质体 25 开始, 经过或越过标记部 24 的端部, 到达识别部 26, 为流路 29b。图中, 多孔质体 25 的端部与标记部 24 是连接在一起的, 但多孔质体 25 的端部越过标记部直接与识别部 26 连接则更好。

在该构造中, 与通过标记部 24 整体的流路 29a 相比, 经过或越过标记部 24 的端部而到达识别部的流路 29b 的障碍较少, 试样可快速流动。因此, 流路 29a 30 是迟缓的试样流路。由此, 导入试样后, 基本不含标记部抗体的试样首先到达识别部, 经过一定时间后, 被试样溶出的标记抗体到达识别部。在该延迟时间期间, 在识别部, 抗原以预先进行了某种程度结合的状态迎接标记抗体与抗原的混合物, 因此, 即使在仅存在少量抗原的情况下, 也可高效率地将其捕捉。

其结果, 可辨性提高, 灵敏度上升。在该构造中, 由于设置了延迟时间, 虽然 35 在表观上反应时间增大了, 但实际上由于可不增加所加载的标记抗体的绝对量而提高灵敏度, 因此, 本底消失的时间缩短, 在总体上反应时间缩短。

比较例 1

除在图 4 的试验片中, 用与 23 相同的玻璃纤维滤纸代替添加剂浸渍部 22 以及省去了玻璃纤维滤纸 25 之外, 其余与实施例 1 相同。

对使用上述实施例 1 的试验片和比较例 1 的试验片的免疫色谱装置进行了灵敏度、反应时间和可辨性试验。分析对象物为人绒毛膜促性腺激素 (hCG)。测定浓度为 100,000IU/L ~ 0IU/L, 添加到试样导入部的 hCG 溶液量为 0.45mL。此时的反应时间是指将 hCG 溶液添加到试样导入部后至固定化抗体的抗 hCG β 抗体与标记抗体的抗 hCG α 抗体之间通过 hCG 进行反应并开始出现线条的时间。此外, 可辨性的数值是用反射吸光度测定仪 (CS-9300, 岛津制作社产品) 测定在入射光 550nm (SLIC3 的吸收) 的反射光强度而得到的。0 设定为未使用的硝基纤维素, 反射光强度的测定时间在色谱分析结束后 30 分钟以内。

图 5 是用上述吸光度对可辨性进行了比较, 图 6 是对速度进行了比较。此外, 虽然图中未标出, 但当 hCG 浓度为 10,000IU/L 时, 在比较例 1 中, 添加试样后 30 秒钟, 吸光度达到 0.5, 而在本实施例中, 添加试样后 20 秒钟, 吸光度即达到 0.7。这些结果表明, 本发明的免疫色谱装置在灵敏度、速度和可辨性方面均优于比较例 1 中使用的以往的装置。

实施例 2

除在添加剂浸渍部的制作方法中用 Tris(1M)-TMA(1M)溶液代替实施例 1 的 Tris(1M)-TMA(1M)-Triton(0.1 %)溶液之外, 按与实施例 1 相同的方法制作了试验片。

实施例 3

除在添加剂浸渍部的制作方法中用 Tris(1M)-Triton(0.1 %)溶液代替实施例 1 的 Tris(1M)-TMA(1M)-Triton(0.1 %)溶液之外, 按与实施例 1 相同的方法制作了试验片。

比较例 2

除用与 23 相同的玻璃纤维滤纸代替实施例 2 的添加剂浸渍部之外, 制作了与实施例 2 相同的试验片。

对使用了实施例 2、3 和比较例 2 的试验片的免疫色谱装置进行了与实施例 1 同样的试验, 结果见表 7 - 10。此外, 除在添加剂浸渍部的制作方法中用各 pH 的 Tris 溶液代替实施例 1 的 Tris(1M)-TMA(1M)-Triton(0.1 %)溶液之外, 按与实施例 1 相同的方法制作了试验片。这样, 在添加了预定体积的试样后, 使试样的 pH 成为各种值。试样分析时的 pH 与吸光度的关系见图 11。

由于空白显色（0IU/L）的原因是具有负电荷的色素标记抗体与具有正电荷的固定化抗体之间的电结合，因此，当将在试验片上展开的试液的 pH 调整至 8.2 时，即可抵销固定化抗体的正电荷，而若再添加具有正电荷的 TMA 时，则可抵销色素标记抗体的色素的负电荷，从而可消除空白显色（参见图 7）。此外，通过添加表面活性剂，可缩短显色和测出时间（参见图 10）。

实施例 4

除按下面的方法制作了标记部之外，按与实施例 1 相同的方法制作了试验片。标记部的制作方法是：

10 在实施例 1 的标记部的制作方法中，在进行了 a) ~ j) 的处理之后，再进行下面的处理。

k) 将冷冻干燥的标记部浸渍滤纸裁切成 0.9cm × 0.1cm 大小。将其作为标记部 24c。

15 l) 按与上述同样的方法将用 PBS 使标记抗体原液稀释 4 倍后所得的溶液浸润玻璃纤维滤纸，然后冷冻干燥，裁切成 0.9cm × 0.1cm 大小。将它们作为标记部 24a 和 24b。

将标记部 24a、24b、24c 用由同样尺寸的玻璃纤维滤纸（F075-14，Whatman 公司产品）制成的间隔物 30 夹持住后，按图 12 所示排列后加以粘接。

20 实施例 5

如图 13 所示，除不设实施例 4 中的添加剂浸渍部 22 而代之以用玻璃纤维滤纸（F075-14，Whatman 公司产品）加以构成之外，按与实施例 4 同样的方法制作了试验片。

25 首先，显示为证实将标记部分割后产生的效果而进行的比较实验的结果。

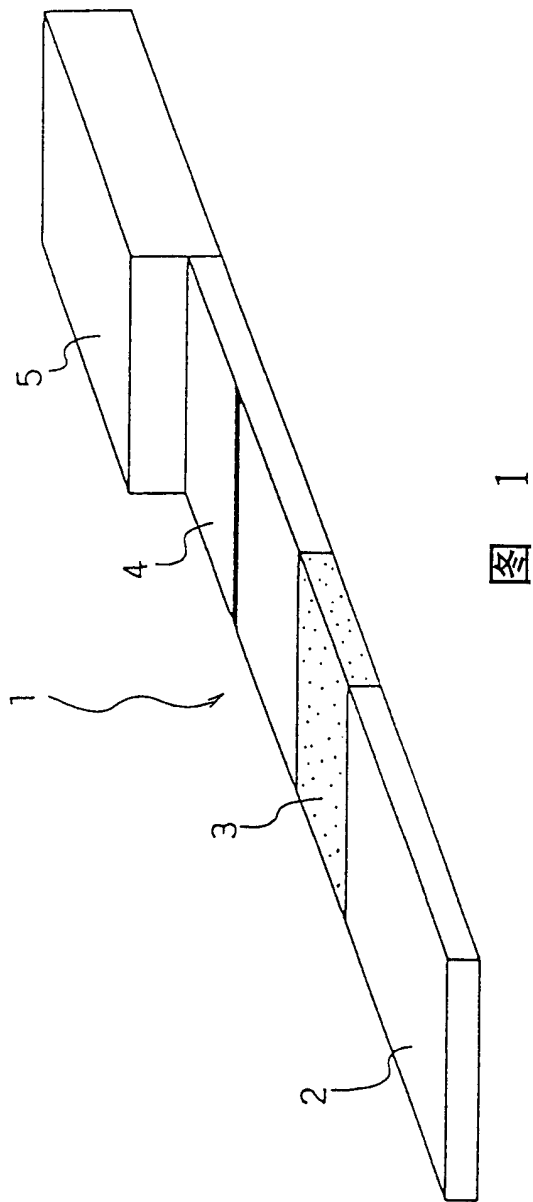
在本实验中使用的是使用实施例 5 的试验片的免疫色谱装置和使用与实施例 5 同样的试验片的比较例的装置，但在使用与实施例 5 同样的试验片的比较例的装置中，除未将标记部分割，而将用于比较例的标记部制作成使其识别部一侧与实施例 5 中的标记部 24c 为同一位置。即，在两者中使用的标记部和加载在标记部的标记抗体的总量是相同的。使用的分析对象物是人绒毛膜促性腺激素（hCG）。此外，反应显色的测定是用反射吸光度测定仪（CS-9300，岛津制作社产品）测定在入射光 550nm（SLIC3 的吸收）的反射光强度。0 设定为未使用的硝基纤维素。将调整至 0、50、1,000、10,000 IU/L 浓度的 hCG 的磷酸缓冲液（PBS）加入到试验片的试样导入部中，将装置在室温（25℃）水平放置后
35 检测反应。

图 14 是添加试样 3 分钟后各 hCG 浓度的吸光度（显色浓度）测定结果，图

15 是添加试样后，将在识别与本底的吸光度之差达到 0.2 而所需的时间作图后得到的曲线图。如图 14 所示，在 hCG 浓度的全域，本实施例的装置显色性高。尤其是在 10,000 IU/L 高浓度范围，在比较例中，显色性下降，出现误差，而在本实施例中，即使在该浓度也能正常显色，提示本发明能提高灵敏度和改善动态范围。而且，如图 15 所示，与比较例相比，显色时间（反应时间）在 hCG 全域也得到了加速。另外，虽然图中未标出，但在 hCG 浓度为 10,000 IU/L 时，在比较例中，添加试样后 30 秒钟，吸光度达到 0.5，而在本实施例中添加试样后 20 秒钟，吸光度即达到 0.7。

- 10 下面说明使用实施例 4、5 和实施例 1 的试验片的色谱装置的比较试验结果。使用的分析对象物是人绒毛膜促性腺激素（hCG）。与上述同样，可辨性是测定在入射光 550nm 的反射光强度。将调整至 0、50、100、1,000、10,000 IU/L 浓度的 hCG 的磷酸缓冲液（PBS）加入到试验片的试样导入部中，将装置在室温（25℃）水平放置。添加试样 3 分钟后各 hCG 浓度的吸光度（显色强度）的比较见图 16。构造为在装入添加剂的同时将标记部分割成多个的实施例 4 与仅采用上述两者中的任一种的实施例 1 和实施例 5 相比，显色强度提高。此外，还可完全消除成为出错要因的在 0 IU/L 的显色。

- 20 如上所述，根据本发明，可完全消除可成为检测时出错要因的本底着色和空白显色。因此，使用本发明的免疫色谱装置，可正确且迅速地测出所有液体试样中的抗原。此外，根据本发明，可在最佳条件下将标记抗体用于反应，并可同时提高检测速度、增加检测灵敏度和扩大检测灵敏度的动态范围。



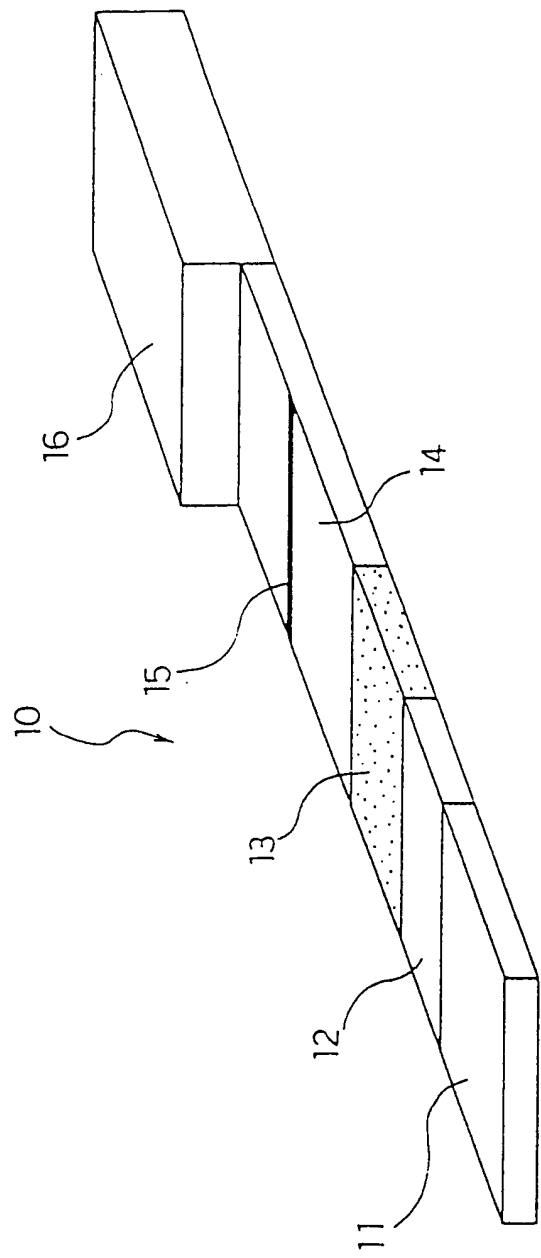


图 2

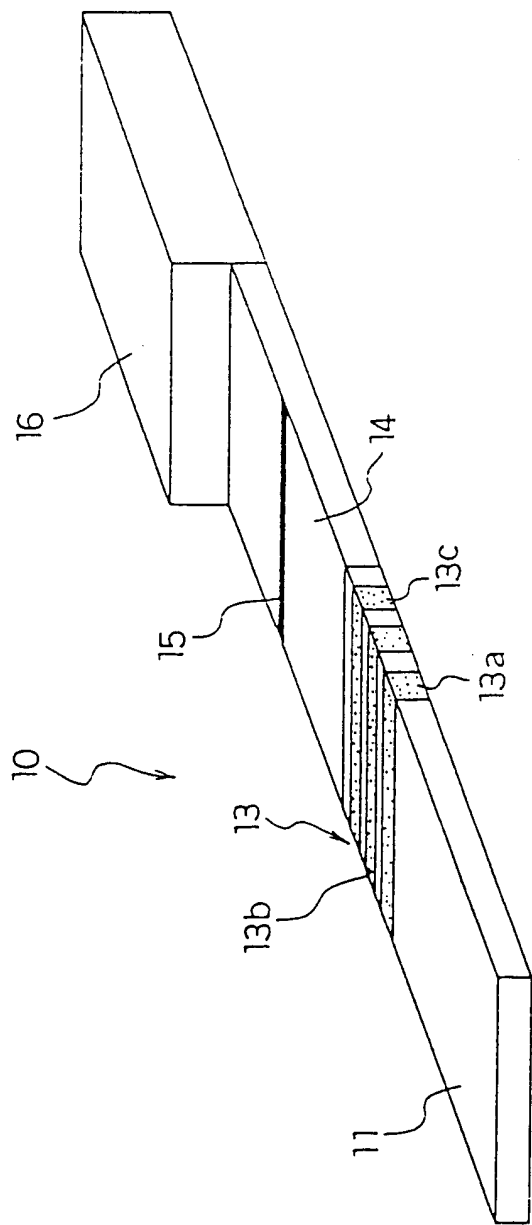


图 3

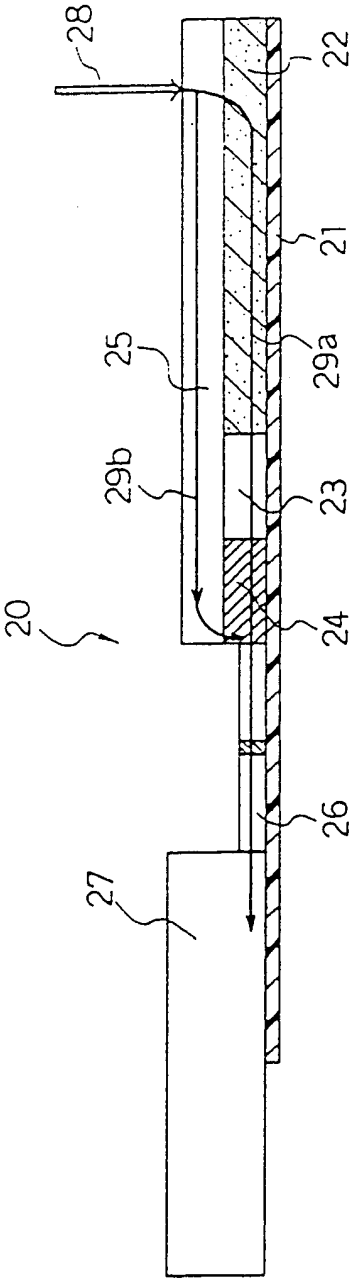


图 4

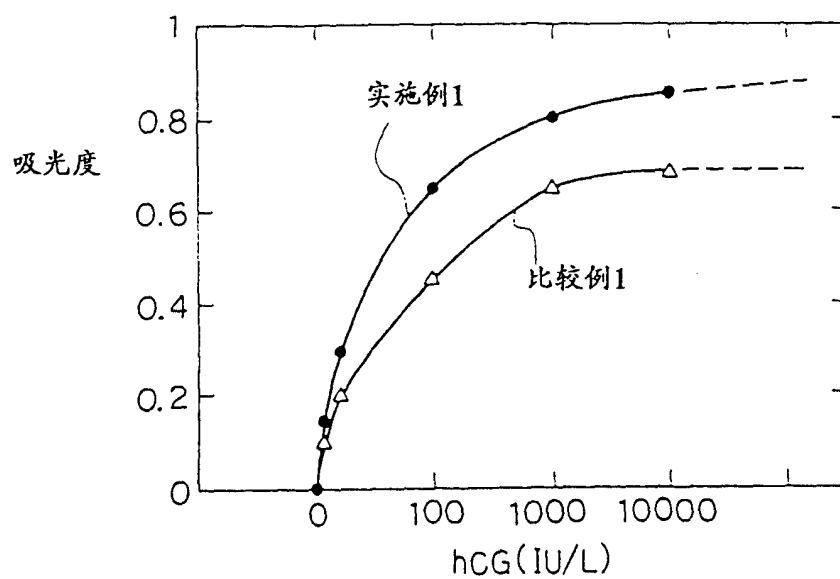


图 5

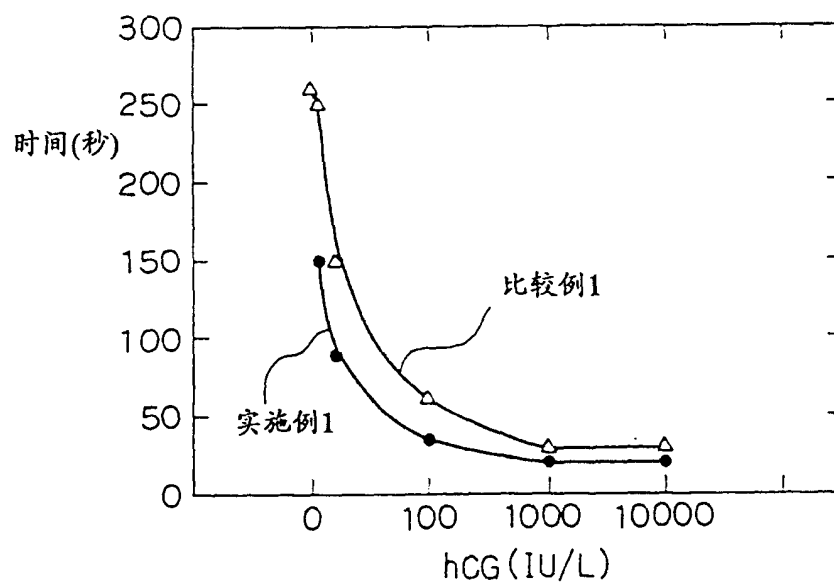


图 6

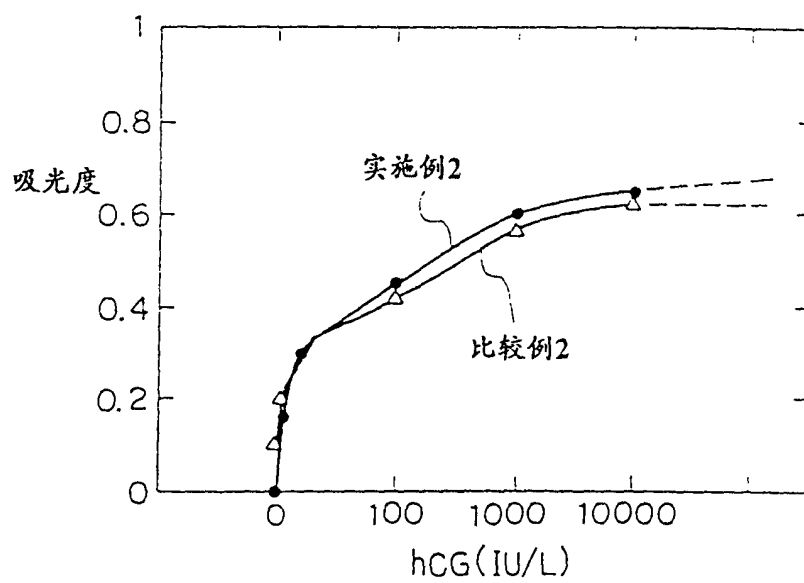


图 7

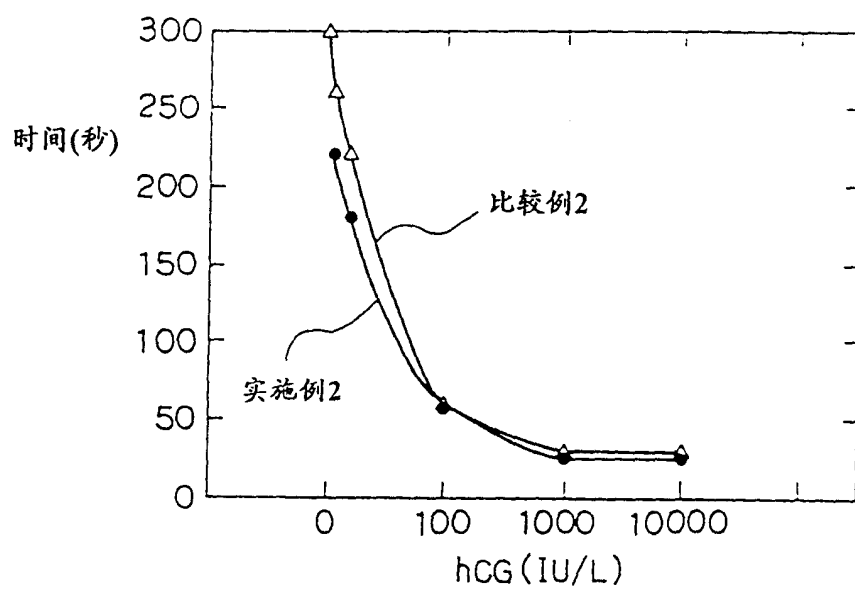


图 8

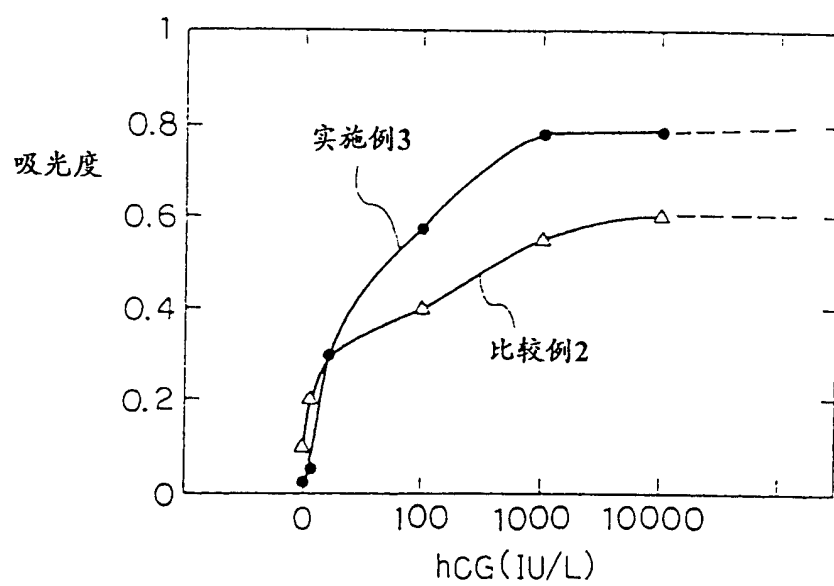


图 9

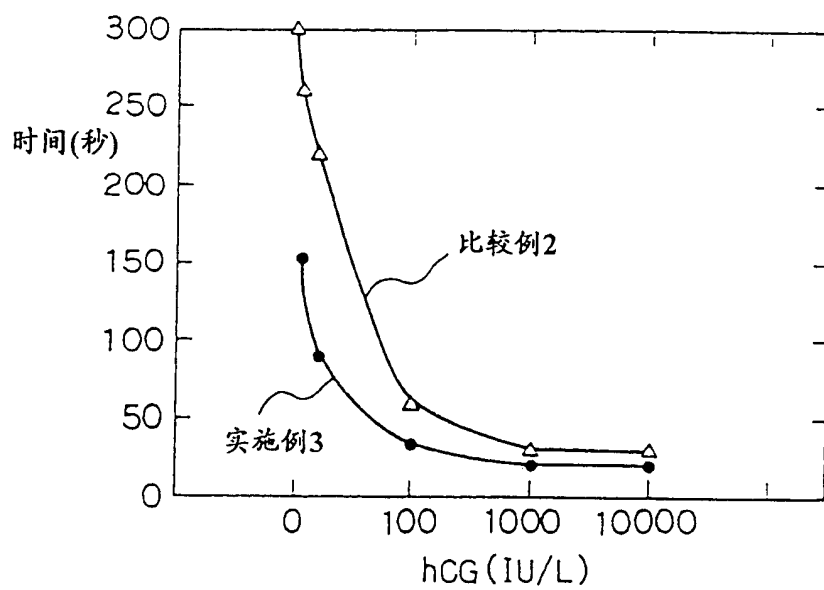


图 10

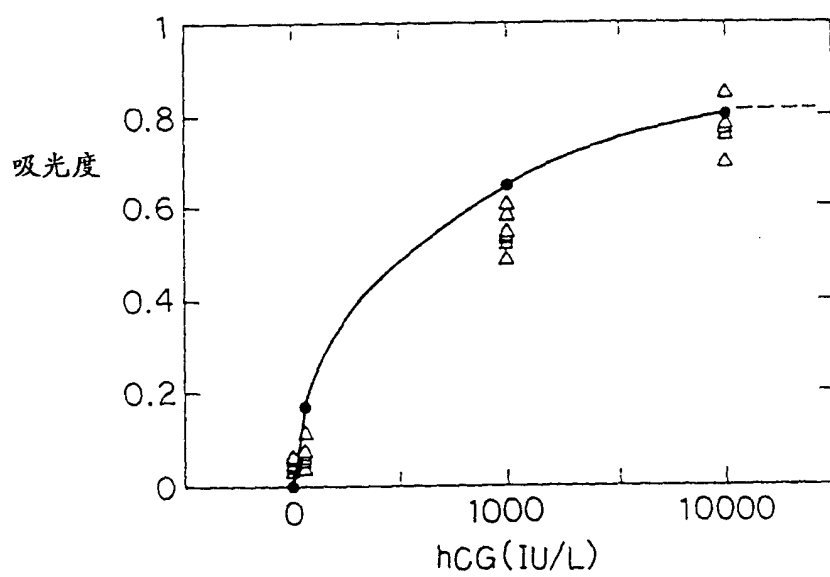


图 11

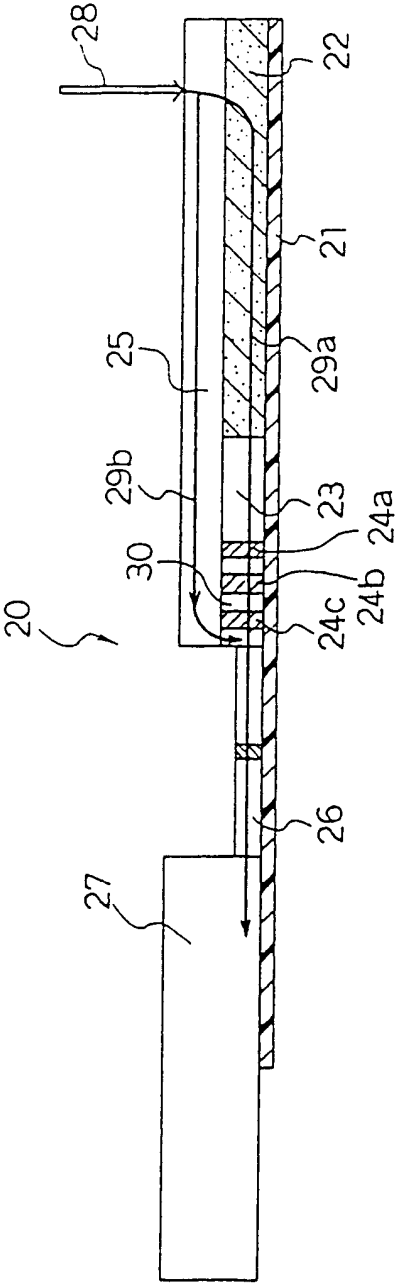


图 12

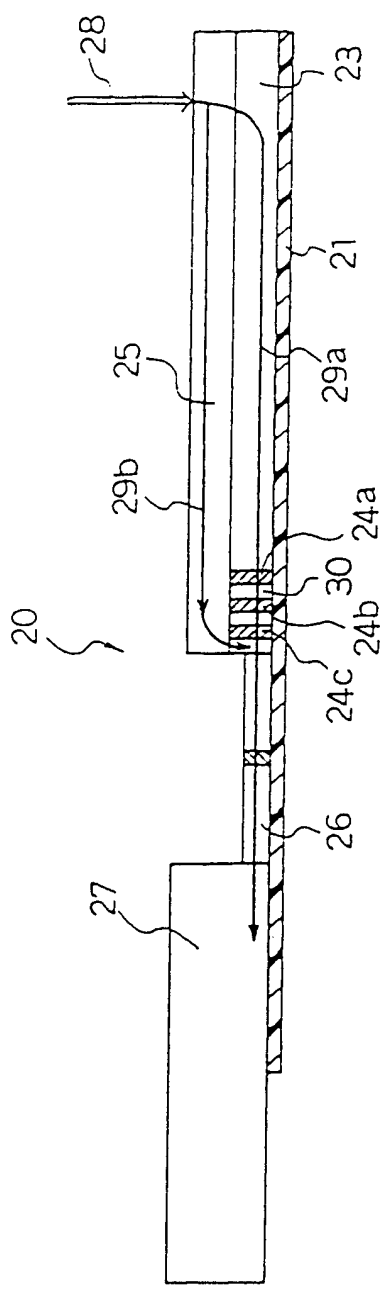


图 13

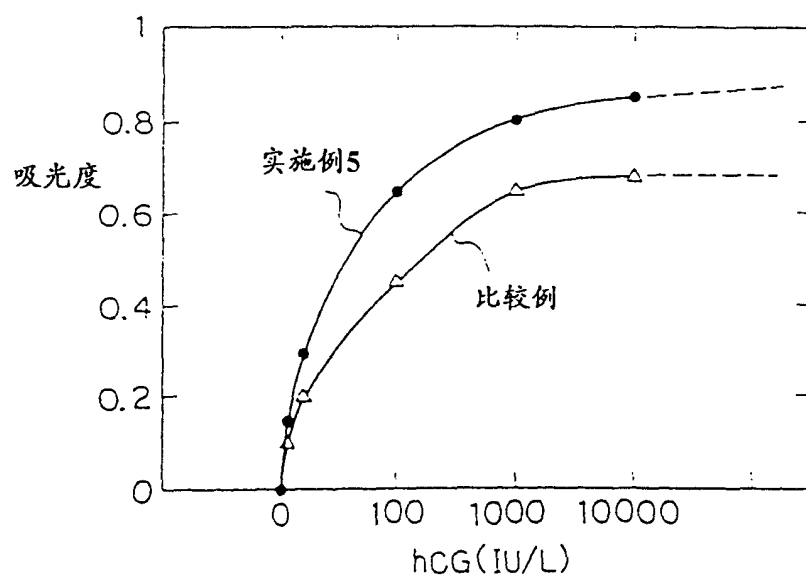


图 14

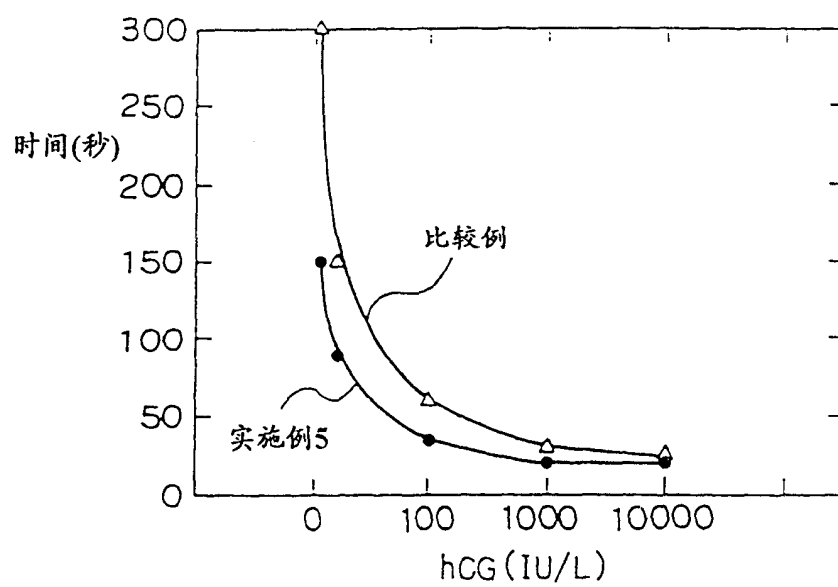


图 15

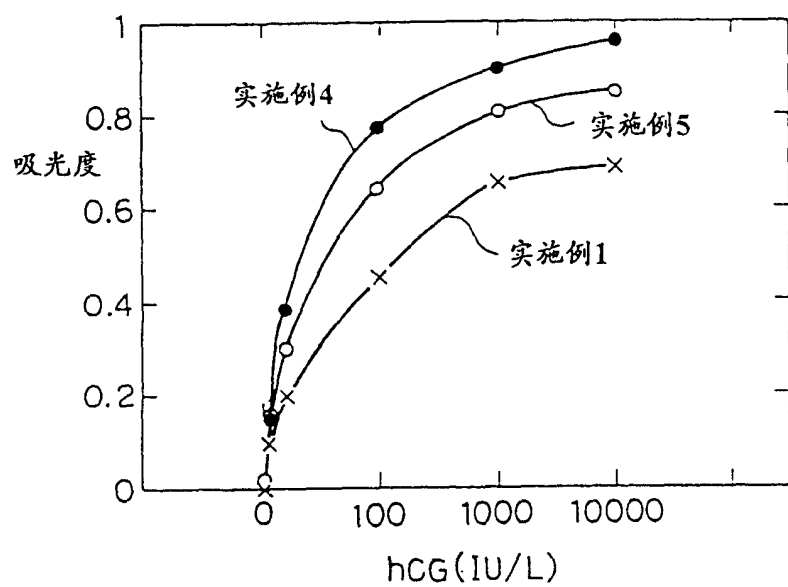


图 16