(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113661393 A
(43)申请公布日 2021.11.16

(21)申请号 202080023336.3

(22)申请日 2020.03.19

(30)优先权数据
2019-055973 2019.03.25 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/012384 2020.03.19

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/196296 JA 2020.10.01

(71)申请人 积水医疗株式会社
地址 日本国东京都

(72)发明人 东加奈子 家治翔平 森田元喜

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 乔献丽 柴云峰

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)

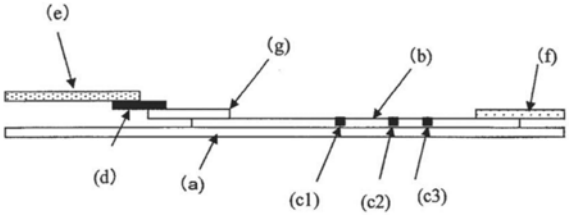
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

免疫层析测定方法和在所述免疫层析测定方法中使用的测试条

(57)摘要

本发明解决的问题是抑制在分析物免疫层析测定方法中有效的非特异性反应。该问题可以通过用于分析物的免疫层析测定方法来解决，该方法包括使用包括以下(1)至(3)的测试条：(1)样品垫，其含有用于施加生物样品的样品施加区，该生物样品可能含有分析物；(2)不溶性膜，其含有至少一个检测区，与分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在所述至少一个检测区上，其中所述不溶性膜含有阳离子物质；(3)缀合物，其含有与分析物具有免疫反应性的结合配偶体，其中该结合配偶体被固定在标记物上。



CN 113661393 A

1.用于分析物的免疫层析测定方法,所述方法包括使用包含以下(1)至(3)的测试条:

(1)样品垫,其含有样品施加区,用于施加可能含有分析物的生物样品;

(2)不溶性膜,其含有至少一个检测区,与所述分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在所述至少一个检测区上,其中所述不溶性膜含有阳离子物质;和

(3)缀合物,其含有与所述分析物具有免疫反应性的结合配偶体,其中所述结合配偶体被固定在标记物上。

2.根据权利要求1所述的免疫层析测定方法,其中所述分析物是呼吸道病毒。

3.根据权利要求1或2所述的免疫层析测定方法,其中所述阳离子物质是阳离子肽或阳离子氨基酸。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的免疫层析测定方法,其特征在于,缀合物包含在在(1)或(2)中的样品施加区与检测区之间的缀合物区中。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的免疫层析测定方法,其中所述阳离子物质以0.05质量%至10质量%的浓度包含在制备所述测试条时待施加至所述检测区的固相抗体施加溶液中。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的免疫层析测定方法,其中所述生物样品是呼吸道分泌物。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的免疫层析测定方法,其中所述分析物是乙型流感病毒。

8.免疫层析测试条,其包括以下(1)至(3):

(1)样品垫,其含有样品施加区,用于施加可能含有分析物的生物样品;

(2)不溶性膜,其含有至少一个检测区,与所述分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在所述至少一个检测区上,其中所述不溶性膜含有阳离子物质;和

(3)缀合物,其含有与所述分析物具有免疫反应性的结合配偶体,其中所述结合配偶体被固定在标记物上。

9.根据权利要求8所述的免疫层析测试条,其中所述分析物是呼吸道病毒。

10.根据权利要求8或9所述的免疫层析测试条,其中所述阳离子物质是阳离子肽或阳离子氨基酸。

11.根据权利要求8至10中任一项所述的免疫层析测试条,其特征在于,所述缀合物包含在在(1)或(2)中的所述样品施加区与所述检测区之间的缀合物区中。

12.根据权利要求8至11中任一项所述的免疫层析测试条,其中所述阳离子物质以0.05质量%至10质量%的浓度包含在制备所述测试条时待施加至所述检测区的固相抗体施加溶液中。

13.根据权利要求8至12任一项所述的免疫层析测试条,其中所述生物样品是呼吸道分泌物。

14.根据权利要求8至13中任一项所述的免疫层析测试条,其中所述分析物是乙型流感病毒。

15.抑制分析物的免疫层析测定方法中非特异性反应的方法,所述方法包括使用包含以下(1)至(3)的测试条:

(1)样品垫,其含有样品施加区,用于施加可能含有分析物的生物样品;

(2)不溶性膜,其含有至少一个检测区,与所述分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在所述至少一个检测区上,其中所述不溶性膜含有阳离子物质;和

(3)缀合物,其含有与所述分析物具有免疫反应性的结合配偶体,其中所述结合配偶体被固定在标记物上。

16.根据权利要求15的抑制非特异性反应的方法,其中所述阳离子物质是阳离子肽或阳离子氨基酸。

免疫层析测定方法和在所述免疫层析测定方法中使用的测试条

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测分析物例如流感病毒的免疫层析测定方法,以及在该方法中使用的测试条。本发明还涉及抑制在用于检测分析物例如流感病毒的免疫层析测定方法中的非特异性反应的方法。

背景技术

[0002] 为早期诊断疾病的目的,在患者所在地实时进行POCT(即时检测,point-of-care testing),以快速获取对诊断和治疗有用的信息。在POCT中,使用与分析物特异反应的结合配偶体广泛进行用于检测引起疾病的分析物的免疫测定法。在这些免疫测定法中,免疫层析因其操作简单而被特别广泛使用。然而,在样本中含有具有交叉抗原性的诸如细菌、病毒和蛋白质的污染物的情况下,这种免疫测定法往往伴随着非特异性反应。这是有问题的,因为这种假阳性反应可能会妨碍准确诊断。

[0003] 为了抑制由于样品中的污染物引起的非特异性反应,已经进行了各种尝试。例如,专利文献1公开了用于免疫层析的试剂组合物,该试剂组合物包含非离子表面活性剂、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸缓冲液和酪蛋白。然而,仅在组合使用这些物质的情况下证明了非特异性反应的抑制。因此,需要即使添加单一物质也能有效抑制由样品中的污染物引起的非特异性反应的技术。

[0004] 引用列表

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:JP-A-2012-37253

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明的目的是提供抑制非特异性反应的免疫层析测定方法,以及在该方法中使用的测试条。

[0009] 问题的解决方案

[0010] 本发明人发现,在用于分析物的免疫层析测定方法中,当该方法具有以下配置时,可以有效地抑制非特异性反应,从而完成了本发明。

[0011] 更具体地说,本发明如下。

[0012] <1>用于分析物的免疫层析测定方法,所述方法包括使用包含以下(1)至(3)的测试条:

[0013] (1)样品垫,其含有样品施加区,用于施加可能含有分析物的生物样品;

[0014] (2)不溶性膜,其含有至少一个检测区,与分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在所述至少一个检测区上,其中所述不溶性膜含有阳离子物质;和

[0015] (3)缀合物,其含有与分析物具有免疫反应性的结合配偶体,其中所述结合配偶体

被固定在标记物上。

[0016] <2>根据<1>所述的免疫层析测定方法，其中分析物是呼吸道病毒。

[0017] <3>根据<1>或<2>所述的免疫层析测定方法，其中所述阳离子物质是阳离子肽或阳离子氨基酸。

[0018] <4>根据<1>至<3>中任一项所述的免疫层析测定方法，其特征在于，缀合物包含在在(1)或(2)中样品施加区与检测区之间提供的缀合物区中。

[0019] <5>根据<1>至<4>中任一项所述的免疫层析测定方法，其中在制备测试条时，阳离子物质以0.05至10质量％的浓度包含在待施加至检测区的固相抗体施加溶液中。

[0020] <6>根据<1>至<5>中任一项所述的免疫层析测定方法，其中生物样品是呼吸道分泌物。

[0021] <7>根据<1>至<6>中任一项所述的免疫层析测定方法，其中所述分析物是乙型流感病毒。

[0022] <8>免疫层析测试条，其包括以下(1)至(3)：

[0023] (1)样品垫，其含有样品施加区，用于施加可能含有分析物的生物样品；

[0024] (2)不溶性膜，其含有至少一个检测区，与分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在所述至少一个检测区上，其中所述不溶性膜含有阳离子物质；和

[0025] (3)缀合物，其含有与分析物具有免疫反应性的结合配偶体，其中所述结合配偶体被固定在标记物上。

[0026] <9>根据<8>所述的免疫层析测试条，其中所述分析物是乙型流感病毒。

[0027] <10>根据<8>或<9>所述的免疫层析测试条，其中所述阳离子物质是阳离子肽或阳离子氨基酸。

[0028] <11>根据<8>至<10>中任一项所述的免疫层析测试条，其特征在于，缀合物包含在在(1)或(2)中样品施加区与检测区之间提供的缀合物区中。

[0029] <12>根据<8>至<11>中任一项所述的免疫层析测试条，其中在制备测试条时，阳离子物质以0.05至10质量％的浓度包含在待施加至检测区的固相抗体施加溶液中。

[0030] <13>根据<8>至<12>中任一项所述的免疫层析测试条，其中所述生物样品是呼吸道分泌物。

[0031] <14>根据<8>至<13>中任一项所述的免疫层析测试条，其中所述分析物是乙型流感病毒。

[0032] <15>抑制分析物的免疫层析测定方法中非特异性反应的方法，所述方法包括使用包含以下(1)至(3)的测试条：

[0033] (1)样品垫，其包含样品施加区，用于施加可能含有分析物的生物样品；

[0034] (2)不溶性膜，其包含至少一个检测区，与分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在所述至少一个检测区上，其中所述不溶性膜含有阳离子物质；和

[0035] (3)缀合物，其含有与分析物具有免疫反应性的结合配偶体，其中所述结合配偶体被固定在标记物上。

[0036] <16>根据<15>所述的抑制非特异性反应的方法，其中所述阳离子物质是阳离子肽或阳离子氨基酸。

[0037] <17>根据<15>或<16>所述的抑制非特异性反应的方法，其中在制备测试条时，阳

离子物质以0.05至10质量%的浓度包含在待施加至检测区的固相抗体施加溶液中。

[0038] <18>根据<15>至<17>中任一项所述的抑制非特异性反应的方法,其中所述生物样品是呼吸道分泌物。

[0039] <19>根据<15>至<18>中任一项所述的抑制非特异性反应的方法,其中所述分析物是乙型流感病毒。

[0040] <20>根据<1>至<7>中任一项所述的免疫层析测定方法,其中所述阳离子物质选自由L-赖氨酸盐酸盐、羟丙基三甲基铵水解大豆蛋白(商品名,Promois WS-HQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造)、椰油二铵羟丙基水解角蛋白(商品名,Promois WK-HCAQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造),以及它们的组合组成的组中。

[0041] <21>根据<8>至<14>中任一项所述的免疫层析测试条,其中所述阳离子物质选自由L-赖氨酸盐酸盐、羟丙基三甲基铵水解大豆蛋白(商品名,Promois WS-HQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造)、椰油二铵羟丙基水解角蛋白(商品名,Promois WK-HCAQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造),以及它们的组合组成的组中。

[0042] <22>根据<16>至<20>中任一项所述的抑制非特异性反应的方法,其中所述阳离子物质选自由L-赖氨酸盐酸盐、羟丙基三甲基铵水解大豆蛋白(商品名,Promois WS-HQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造)、椰油二铵羟丙基水解角蛋白(商品名,Promois WK-HCAQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造),以及它们的组合组成的组中。

[0043] 发明的有益效果

[0044] 通过本发明,可以有效抑制分析物的免疫层析测定中的非特异性反应。

[0045] 附图简述

[0046] [图1]图1是本发明的一个实施方式中使用的测试条的示意图。

[0047] [图2]图2是本发明的一个实施方式中使用的测试条的示意图。

[0048] [图3]图3是图示本发明中产生效果的原因的假设的示意图。

具体实施方式

[0049] (分析物)

[0050] 在本发明中,分析物的例子包括病毒和生理活性物质,例如通常可以使用抗原-抗体反应测量的蛋白质。病毒的例子包括流感病毒如甲型流感病毒和乙型流感病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和人免疫缺陷病毒。蛋白质的例子包括人血红蛋白、乙型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体和人免疫缺陷病毒抗体。

[0051] 本发明的分析物优选为呼吸道病毒。本说明书中的呼吸道病毒是引起呼吸道疾病的病毒。本发明中的呼吸道病毒没有限制,只要是能够使用抗原抗体反应进行检测的病毒,并且呼吸道病毒的例子包括冠状病毒,例如冠状病毒229E、冠状病毒OC43和冠状病毒NL63;流感病毒,例如甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、副流感病毒1、副流感病毒2和副流感病毒3;RS病毒,例如RS病毒A和RS病毒B;腺病毒;鼻病毒;偏肺病毒;巨细胞病毒;和博卡病毒。特别地,分析物优选为流感病毒,更优选为乙型流感病毒。最优选地,在多个位置(例如,两个位置)形成稍后描述的检测区以检测甲型流感病毒和乙型流感病毒。

[0052] 在本说明书中,“呼吸道”是参与呼吸的器官的总称,是指从鼻前庭到肺泡(肺)的器官,包括鼻腔、咽、喉、气管、支气管和细支气管。

[0053] (生物样品)

[0054] 本发明中使用的可能含有分析物的生物样品的例子包括主要源自生物体的物质，例如体液;以及通过从这些物质中提取分析物而制备的提取物。源自生物体的物质的具体例子包括血液、尿液、粪便和呼吸道分泌物。在分析物为呼吸道病毒的情况下，生物样品优选为呼吸道分泌物，例如源自鼻孔、鼻腔、咽部、鼻咽部等的鼻涕;痰;或唾液。源自生物体的物质及其提取物可以直接作为样品使用，或者可以用样品稀释剂适当稀释以提供样品。它们也可以被适当地过滤以提供样品。

[0055] (阳离子物质)

[0056] 在本说明书中，阳离子物质是指当该物质溶解或分散在水中时表现出阳离子特性的物质。阳离子表面活性剂、阳离子脂质、阳离子肽、阳离子氨基酸等可用作阳离子物质。优选使用阳离子肽或阳离子氨基酸。

[0057] 阳离子肽是指在中性条件下，例如在肽溶解或分散在水中的条件下，作为整个分子带正电荷的肽。阳离子肽可以含有大量碱性氨基酸残基(精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)和/或组氨酸(His))作为构成肽的氨基酸残基。更具体地，构成阳离子肽的总氨基酸残基中碱性氨基酸残基的含量为40％或更多，优选50％或更多，更优选60％或更多，再更优选70％或更多，又更优选80％或更多，又更优选90％或更多，又更优选95％或更多，又更优选98％或更多。最优选地，碱性氨基酸残基的含量为100％。在阳离子肽中，酸性氨基酸残基(天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、半胱氨酸(Cys)和/或酪氨酸(Tyr))的含量优选在构成肽的总氨基酸残基中为一定数值或更少。更具体地，总氨基酸残基中酸性氨基酸残基的含量为20％或更少，优选15％或更少，更优选12％或更少，又更优选10％或更少，又更优选8％或更少，又更优选6％或更少，又更优选4％或更少，又更优选2％或更少，又更优选1％或更少。最优选地，酸性氨基酸残基的含量为0％。

[0058] 阳离子肽不受限制，只要它是在中性条件下作为整个肽带正电荷的肽即可。可以使用的阳离子肽的例子包括源自生物体的蛋白质降解产物的阳离子化衍生物;以及聚精氨酸、聚赖氨酸和聚组氨酸，它们是上述碱性氨基酸残基的聚合物。在源自生物体的蛋白质分解物的阳离子化衍生物中，特别优选含有与源自生物体的蛋白质分解物的肽的N末端结合的季铵基的衍生物。又更优选使用羟丙基三甲基铵水解大豆蛋白(商品名，Promois WS-HQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造)或椰油二甲基铵羟丙基水解角蛋白(商品名，Promois WK-HCAQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造)。只要可以获得本发明的效果，可以使用阳离子肽的盐。Promois是注册商标。

[0059] 阳离子氨基酸是指精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)或组氨酸(His)。作为阳离子氨基酸，优选使用L-异构体。只要可以获得本发明的效果，可以使用阳离子氨基酸的盐，例如盐酸盐。特别优选使用L-赖氨酸盐酸盐。

[0060] 这些阳离子物质可以单独使用，也可以组合使用其两种或更多种。作为阳离子物质，优选使用选自由L-赖氨酸盐酸盐、羟丙基三甲基铵水解大豆蛋白(商品名，Promois WS-HQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造)、椰油二甲基铵羟丙基水解角蛋白(商品名Promois WK-HCAQ;由Seiwa Kasei Co,Ltd.制造)组成组的阳离子物质，并且最优选使用其组合。

[0061] 阳离子物质的浓度可以根据阳离子物质和分析物的类型适当调整。例如，从抑制非特异性反应的效果的观点来看，在制备测试条时，以待施加到检测区的固相抗体施加溶

液中的浓度计，阳离子物质的浓度为0.001质量％至10质量％，优选0.01质量％至10质量％，更优选0.02质量％至10质量％，又更优选0.05质量％至10质量％，最优选0.1质量％至10质量％。浓度的上限可以是8质量％、5质量％、3质量％或2质量％。

[0062] (缀合物)

[0063] 缀合物含有与分析物具有免疫反应性的结合配偶体。结合配偶体被固定在标记物上。关于缀合物的存在方式，缀合物可以以浸渍在一垫中的状态，与样品垫、第三垫和不溶性垫分开提供，浸渍缀合物，作为缀合物垫存在(A型)，可以作为样品垫的一部分或不溶性膜的一部分中的缀合物区存在(B型)，或者可以作为与生物样品混合的缀合物试剂单独存在(C型)。

[0064] 作为本发明中使用的标记物，可以使用已知标记物。例如，标记物优选胶体金属颗粒，例如胶体金颗粒或胶体铂颗粒；有色乳胶颗粒；磁性粒子等。标记物特别优选胶体金颗粒。

[0065] 在检测流感病毒的情况下，缀合物优选是其中抗流感病毒单克隆抗体固定在胶体金颗粒上的缀合物。

[0066] 下面描述一测试条，其中缀合物的存在方式为A型。

[0067] 从样品流动方向的上游到下游，依次放置样品垫、缀合物垫、第三垫和不溶性膜。每一层被放置成使得该层的至少一部分与上游/下游层重叠。图1图示了具有这种配置的测试条的例子。

[0068] 当含有分析物的样品被施加到测试条的样品垫上时，分析物经过样品垫流向位于下游的缀合物垫。在缀合物垫中，分析物接触缀合物，并在形成第一复合物(聚集体)的同时穿过该垫。此后，第一复合物穿过放置成与缀合物垫下侧接触的多孔第三垫，随后展开(develop)到不溶性膜中。

[0069] 在不溶性膜部分，固定了与分析物具有免疫反应性的结合配偶体。在此，发生免疫反应使第一复合物结合到与分析物具有免疫反应性的结合配偶体，导致形成固定的第二复合物。然后通过检测源自缀合物的信号例如吸光度、反射光、荧光或磁性的装置来检测固定的第二复合物。

[0070] 下面描述一测试条，其中缀合物的存在方式为B型。

[0071] 与A型测试条的区别在于样品垫或不溶性膜与缀合物垫一体化。图2图示了测试条的例子，其具有其中样品垫的一部分由样品施加区和缀合物区构成的配置。

[0072] 样品施加区是施加含有分析物的样品的区域，并且缀合物区是含有缀合物的区域。样品施加区位于缀合物区的上游。

[0073] 缀合物区形成在样品垫或不溶性膜上，使得缀合物区位于样品施加区的下游。缀合物区优选放置成在垂直于样品展开方向的方向上形成线形，即垂直于连接样品垫中的样品施加区的中心和后文提到的不溶性膜的下游端的中心的线。换言之，线形缀合物区优选放置成在垂直于样品垫和不溶性膜的纵向方向的方向上形成线形。尽管缀合物区可以存在于不溶性膜中，使得缀合物区位于检测区的上游，但优选在样品垫中形成。在这种情况下，样品垫中缀合物区的下游侧不必完全被缀合物区占据，并且缀合物区的下游侧可以具有不含缀合物的多孔材料部分。

[0074] 本领域技术人员可以将缀合物区的位置适当调整到合适的长度。线形缀合物区的

线的中心线优选位于样品垫下游端上游至少3mm处。在本说明书中，缀合物区或检测区的“中心线”是指在垂直于样品垫纵向方向绘制的中心线，而不是在平行于样品垫纵向方向绘制的中心线。

[0075] 施加到样品施加区的含有分析物的样品从上游迁移到下游。在缀合物区，分析物和缀合物形成第一复合物。第一复合物进一步向下游迁移。然后第一复合物与固定在检测区的结合配偶体形成第二复合物，其中结合配偶体与分析物具有免疫反应性。然后通过检测源自缀合物的信号例如吸光度、反射光、荧光或磁性的装置来检测固定到检测区的第二复合物。

[0076] 下面描述一测试条，其中缀合物的存在方式为C型。

[0077] 与A型测试条的不同之处在于没有缀合物垫，缀合物作为单独的缀合物试剂存在。例如，使用具有过滤器的过滤嘴，所述过滤器中含有缀合物。分析物穿过过滤嘴，使缀合物与分析物结合，从而形成第一复合物(聚集体)。通过将得到的第一复合物施加到与A型相同(除了不存在缀合物垫)的测试条上，可以在检测区中形成第二复合物，与分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在该检测区上。然后通过检测源自缀合物的信号例如吸光度、反射光、荧光或磁性的装置来检测固定的第二复合物。

[0078] (与分析物具有免疫反应性的结合配偶体)

[0079] 本发明中使用的与分析物具有免疫反应性的结合配偶体优选是能够与分析物结合的抗体。与分析物具有免疫反应性的结合配偶体被固定到标记物和检测区。

[0080] 在结合配偶体是抗体的情况下，固定到标记物和检测区的抗体可以是相同的，但是对于标记物和检测区优选使用不同的抗体。通过使用与固定到标记物的抗体和固定到检测区的抗体不同的抗体，可以抑制在与缀合物结合的分析物和检测区内的抗体之间的反应同与缀合物结合的分析物和未反应的缀合物之间的反应之间的竞争。此外，可以增加与缀合物结合的分析物和检测区中的抗体之间的反应性。因此，免疫层析测试条可以具有良好的灵敏度。不同的抗体是指抗体的类型不同，即抗体识别的表位不同。固定到标记物和检测区的抗体优选是单克隆抗体。通过使用单克隆抗体，可以提高反应的特异性。

[0081] 除了这些抗体的整个分子之外，具有抗原-抗体反应活性的抗体的功能片段同样被视为本发明中的抗体。抗体的功能片段的例子包括通过动物免疫过程获得的那些、使用基因重组技术获得的那些和嵌合抗体。抗体的功能片段的例子包括$F(ab')_2$和Fab’。这些功能片段可以通过用蛋白酶(例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)处理抗体来产生。

[0082] (样品垫)

[0083] 样品垫层铺在缀合物垫或后述的不溶性膜上，使得样品垫下游端的下侧与缀合物垫或不溶性膜的上侧接触。构成样品垫的多孔材料的例子包括由无纺纤维制成的垫，例如纸、纤维素混合物、硝酸纤维素、聚酯、丙烯腈共聚物、玻璃和人造丝。垫特别优选由玻璃纤维(玻璃纤维垫)制成。

[0084] (第三垫)

[0085] 在A型测试条中，为了去除生物样品中的非特异性反应物质，将第三垫置于缀合物垫和不溶性膜之间。根据样品等的特性，在必要时优选放置第三垫。第三垫不受限制，只要样品中分析物与缀合物的复合物能够穿过第三垫即可。

[0086] (不溶性膜)

[0087] 可用于本发明的不溶性膜含有至少一个检测区，与分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在所述至少一个检测区上。可通过已知方法将与分析物具有免疫反应性的结合配偶体固定在不溶性膜上。例如，制备含有预定浓度的结合配偶体的溶液。此后，使用例如具有能够在水平方向移动同时以恒定速率从喷嘴排出溶液的机构的设备，将溶液施加到不溶性膜以形成线形。通过干燥所施加的溶液，可以将抗体固定到不溶性膜。

[0088] 可以通过向缓冲液中加入结合配偶体来制备含有预定浓度结合配偶体的溶液。缓冲液的种类的例子包括常规使用的缓冲液，例如磷酸盐缓冲液、tris缓冲液和Good's缓冲液。缓冲液具有优选为6.0至9.5的pH范围，更优选为6.5至8.5，又更优选为7.0至8.0。缓冲液还可含有：盐，如氯化钠；稳定剂，如糖；保存剂；和防腐剂(antiseptics)，如ProClin。盐的例子不仅包括为了调节离子强度而添加的那些，例如氯化钠，而且包括为了调节缓冲剂的pH而添加的那些，例如氢氧化钠。

[0089] 在将结合配偶体固定到不溶性膜上之后，可以通过用常规使用的封闭剂的溶液或蒸气包被而将除抗体固定部位以外的部分封闭。

[0090] 不溶性膜上提供的检测区含有阳离子物质。关于在检测区中包含阳离子物质的手段，优选制备含有阳离子物质以及含有预定浓度的结合配偶体的施加溶液，然后将施加溶液施加到不溶性膜上，然后干燥并固定在其上。

[0091] 构成可用于本发明的不溶性膜的膜的例子包括已知的膜，所述膜已常规用作免疫层析测试条的不溶性膜。膜的例子包括由纤维所构成的膜，该纤维由聚乙烯；聚对苯二甲酸；尼龙；玻璃；多糖如纤维素或纤维素衍生物；或陶瓷组成。膜的具体例子包括可从Sartorius、Millipore、Toyo Roshi Kaisha,Ltd.、Whatman等商购获得的玻璃纤维滤纸和硝酸纤维素膜。

[0092] 可用于本发明的免疫层析测试条优选在不溶性膜的下游端设有吸收垫。吸收垫是具有液体吸收能力的部分。吸收垫通过吸收已经迁移/穿过不溶性膜的样品来控制样品的展开。作为吸收垫，可以使用常规用于免疫层析测试条的公知的吸收垫。例如，可以使用滤纸。

[0093] 说明书中的非特异性反应是指检测到源自缀合物的信号，因此判断生物样品为阳性，尽管事实上生物样品中不存在或基本上不存在分析物。

[0094] (免疫层析测试条)

[0095] 在本说明书中，“免疫层析”是指利用诸如纤维素膜的多孔材料的性质的免疫测定法，该性质使测试样本在溶解试剂的同时缓慢地流过(毛细管现象)。在本说明书中，“使用测试条”是指通过使测试条与生物样品接触来检测生物样品中包含的分析物。免疫层析测试条优选放置在固体支持物例如塑料粘合片上。固体支持物由不阻碍样品和缀合物的毛细管流动的物质构成。可以使用粘合剂等将免疫层析测试条固定在固体支持物上。在这种情况下，粘合剂等的组分也由不阻碍样品和缀合物的毛细管流动的物质构成。为增加不溶性膜的机械强度，并防止测定过程中水分蒸发(干燥)，测试条可与聚酯膜等层压。考虑到免疫层析测试条的尺寸、添加样品的方法、添加样品的位置，每个检测区在不溶性膜中形成的位置，信号的检测方法等，免疫层析测试条可以在将测试条储存或安装在适当的容器(外壳)中的状态下使用。在这种状态下储存或安装的测试条被称为“装置”。

[0096] 本发明的免疫层析测定方法可包括以下步骤(A)至(D)：

[0097] (A)使可能含有分析物的生物样品与样品施加区接触；

[0098] (B)使生物样品与缀合物接触以形成第一复合物；

[0099] (C)在含有阳离子物质的检测区中，使第一复合物和与生物样品具有免疫反应性的结合配偶体接触，以形成第二复合物；和

[0100] (D)测量源自缀合物的信号。

[0101] 在本说明书中，免疫层析测定方法是指利用免疫层析的测定方法。

[0102] 适当时，可以通过修改或改变实施例中描述的方法来制备免疫层析测试条。

[0103] 本发明能够产生抑制非特异性反应的效果的原因尚未完全阐明，但可以推断其原因如下。然而，本发明不受以下说明的限制。

[0104] 发明人发现免疫层析测试条在检测区存在阴离子物质时显示出非特异性反应增加，而在检测区存在阳离子物质时显示出非特异性反应受到抑制。因此可以认为，作为诱因的非特异性物质带正电，因此可以通过阳离子物质排斥作为诱因的非特异性物质来抑制非特异性反应(图3)。

[0105] 实施例

[0106] 下面通过实施例具体描述本发明。然而，这些并不限制本发明的范围。在说明中，除非另有说明，“%”表示“质量%”。

[0107] [抗流感病毒单克隆抗体的制备]

[0108] 以下试验中所用的抗甲型流感病毒单克隆抗体和抗乙型流感病毒单克隆抗体是通过使用重组流感核蛋白作为抗原，通过本领域技术人员生产单克隆抗体所常规使用的方法对小鼠进行免疫获得的。

[0109] [测试条制备实施例1]免疫层析测试条的制备

[0110] 1)胶体金颗粒标记的抗流感病毒单克隆抗体(缀合物)的制备

[0111] 制备含有浓度为100μg/mL的抗甲型流感病毒单克隆抗体的PBS和含有浓度为100μg/mL的抗乙型流感病毒单克隆抗体的PBS。向20mL 10D/mL胶体金颗粒溶液中加入1mL各抗体溶液，并将所得混合物在室温下搅拌10分钟。向胶体金颗粒/抗甲型流感病毒单克隆抗体混合物和金胶体颗粒/抗乙型流感病毒单克隆抗体混合物每种中加入2mL 10％牛血清白蛋白(BSA)溶液，将每种得到的混合物搅拌5分钟，然后在10℃以10,000rpm离心45分钟以获得沉淀物(缀合物)。向获得的每种缀合物中加入缀合物稀释缓冲液(由Scripps制造)，并将缀合物悬浮在其中。

[0112] 2)样品垫的制备

[0113] 将上述1)中制备的各缀合物与含有1.33％酪蛋白和4％蔗糖(pH 7.5)的溶液混合到8至200D/mL的浓度，以制备缀合物溶液。用缀合物溶液浸泡具有28mm总长度的玻璃纤维垫，从而形成具有4mm线宽的线。通过在70℃加热30分钟来干燥垫，以提供含有缀合物区的样品垫。

[0114] 3)固定抗流感病毒单克隆抗体的不溶性膜(抗体固定化膜)的制备

[0115] 将浓度分别调整为0.75mg/mL、1.0mg/mL和0.75mg/mL的抗甲型流感病毒单克隆抗体、抗乙型流感病毒单克隆抗体和抗小鼠IgG抗体，与含有预定浓度的各种阳离子物质的磷酸盐缓冲液一起作为固相抗体施加溶液提供，并且将该固相抗体施加溶液施加到硝酸纤维素膜(孔径，8μm)的短侧端，以在垂直于不溶性膜的纵向方向的方向上形成线。此后，将膜在

70℃干燥45分钟以提供抗体固定膜。施加这些线，使得在组装测试条时，抗甲型流感病毒单克隆抗体(c1)、抗乙型流感病毒单克隆抗体(c2)和对照抗体(c3)从上游侧以此顺序排列。

[0116] 4)免疫层析测试条的制备

[0117] 将2)中制备的样品垫层铺在3)中得到的不溶性膜上，制备免疫层析测试条。

[0118] [实施例1]

[0119] 使用在测试条制备实施例1中制备的免疫层析测试条进行甲型流感病毒和乙型流感病毒的检测试验。

[0120] 1.测试方法

[0121] (1)样品

[0122] 来自未感染流感的健康受试者的鼻粘液通过与样品稀释剂混合而被稀释，以提供每种样品备用。

[0123] (2)程序

[0124] 将135μL在(1)中制备的各样品分装到试管中，将免疫层析测试条插入试管中，5、15、30和45分钟后目视判断检测区中抗体固定膜上测试线A和B是否存在显色。

[0125] 2.测试结果

[0126] 测试线B是否存在显色的判断结果如表1和2所示。测试线B指示乙型流感病毒的检测。“添加浓度”表示固相抗体施加溶液中的浓度。

[0127] [表1]

[0128]

编号		1	2	3	4	5	6
添加剂名称		无添加剂	SILK-1000	WJ	WS	WS-HQ	WS-HCAQ
添加剂种类		–	肽	肽	肽	阳离子肽	阳离子肽
添加剂浓度(%)		–	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%
时间（分钟）	5	–	–	–	–	–	–
	15	–	–	–	–	–	–
	30	+	–	+	+	–	–
	45	+	+	+	+	–	–

[0129] [表2]

[0130]

编号		7	8	9	10	11
添加剂名称		WR	WK-H	WK-HCAQ	WG	L 赖氨酸盐酸
添加剂种类		肽	肽	阳离子肽	肽	阳离子氨基酸
添加剂浓度(%)		0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%
时间(分钟)	5	−	−	−	−	−
	15	−	−	−	−	−
	30	+	−	−	+	−
	45	+	+	−	+	−

[0131] 在表1和表2中，“-”表示测试线B没有显色。测试线B指示乙型流感病毒的检测。因此，“-”指示不存在假阳性结果。“+”表示线显色，指示假阳性结果的出现。添加非阳离子肽的所有情况和未添加对照的情况在反应30分钟和/或45分钟后都显示出非特异性反应。相反，添加了阳离子肽或阳离子氨基酸的样品均未显示出非特异性反应。被测样品均未在检测线A中出现非特异性反应。检测线A指示甲型流感病毒的检测。因此表明，向检测区添加阳离子表面活性剂能够防止在乙型流感病毒检测中发生的非特异性反应。

[0132] [实施例2]

[0133] 1.测试方法

[0134] 除了使用不同浓度的不同类型阳离子肽或阳离子氨基酸外，以与实施例1相同的方式进行甲型流感病毒和乙型流感病毒的检测试验。

[0135] 2.测试结果

[0136] 测试线B是否存在显色的判断结果如表3和表4所示。测试线B指示乙型流感病毒的检测。

[0137] [表3]

[0138]

编号		12	13	14	15
添加剂名称		无添加剂	WK-HCAQ		
阳离子物质种类		−	阳离子肽		
阳离子物质浓度(%)		−	0.10%	0.15%	0.20%
时间（分钟）	5	−	−	−	−
	15	−	−	−	−
	30	+	−	−	−
	45	+	−	−	−

[0139] [表4]

[0140]

编号		16	17	18
添加剂名称		L-赖氨酸盐酸盐		
阳离子物质种类		阳离子氨基酸		
阳离子物质浓度(%)		0.10%	0.50%	1%
时间（分钟）	5	–	–	–
	15	–	–	–
	30	–	–	–
	45	–	–	–

[0141] 在表3和表4中，“-”表示测试线B没有显色。测试线B指示乙型流感病毒的检测。因此，“-”指示不存在假阳性结果。“+”表示线显色，指示假阳性结果的出现。在添加了阳离子肽的测量定系统中，即使在将阳离子肽的浓度降低至0.10％的情况下，也可以在乙型流感病毒的检测中发现充分的抑制非特异性反应的效果。在添加了阳离子性氨基酸的测量系统中，即使将阳离子性肽的浓度提高到1％，也可以发现充分的抑制非特异性反应的效果。所测样品均未在甲型流感病毒检测中显示出非特异性反应。

[0142] 工业适用性

[0143] 通过本发明，可以有效抑制免疫层析测定法中的非特异性反应。

[0144] 附图标记列表

[0145] (a)塑料粘合片

[0146] (b)不溶性膜

[0147] (c1)测试线A

[0148] (c2)测试线B

[0149] (c3)对照线

[0150] (d)缀合物垫

[0151] (e)样品垫

[0152] (f)吸收垫

[0153] (g)第三垫

[0154] (h)缀合物区

[0155] (i)膜

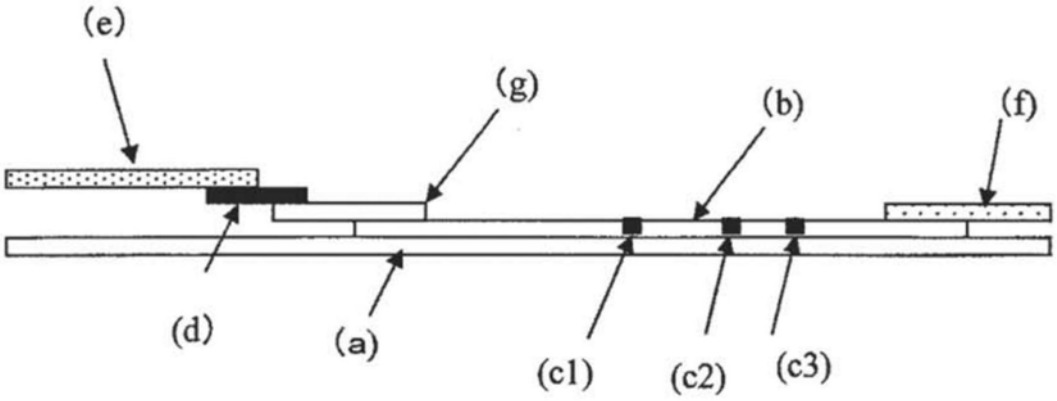


图1

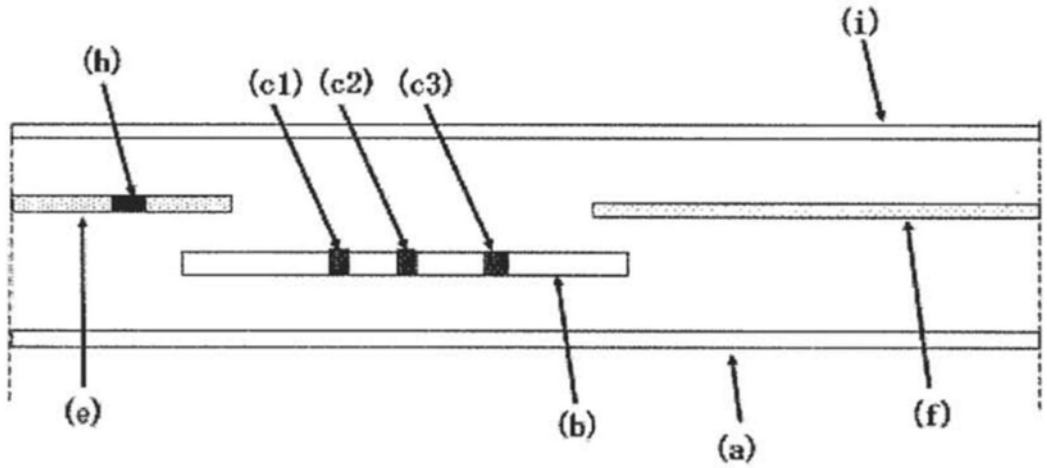


图2

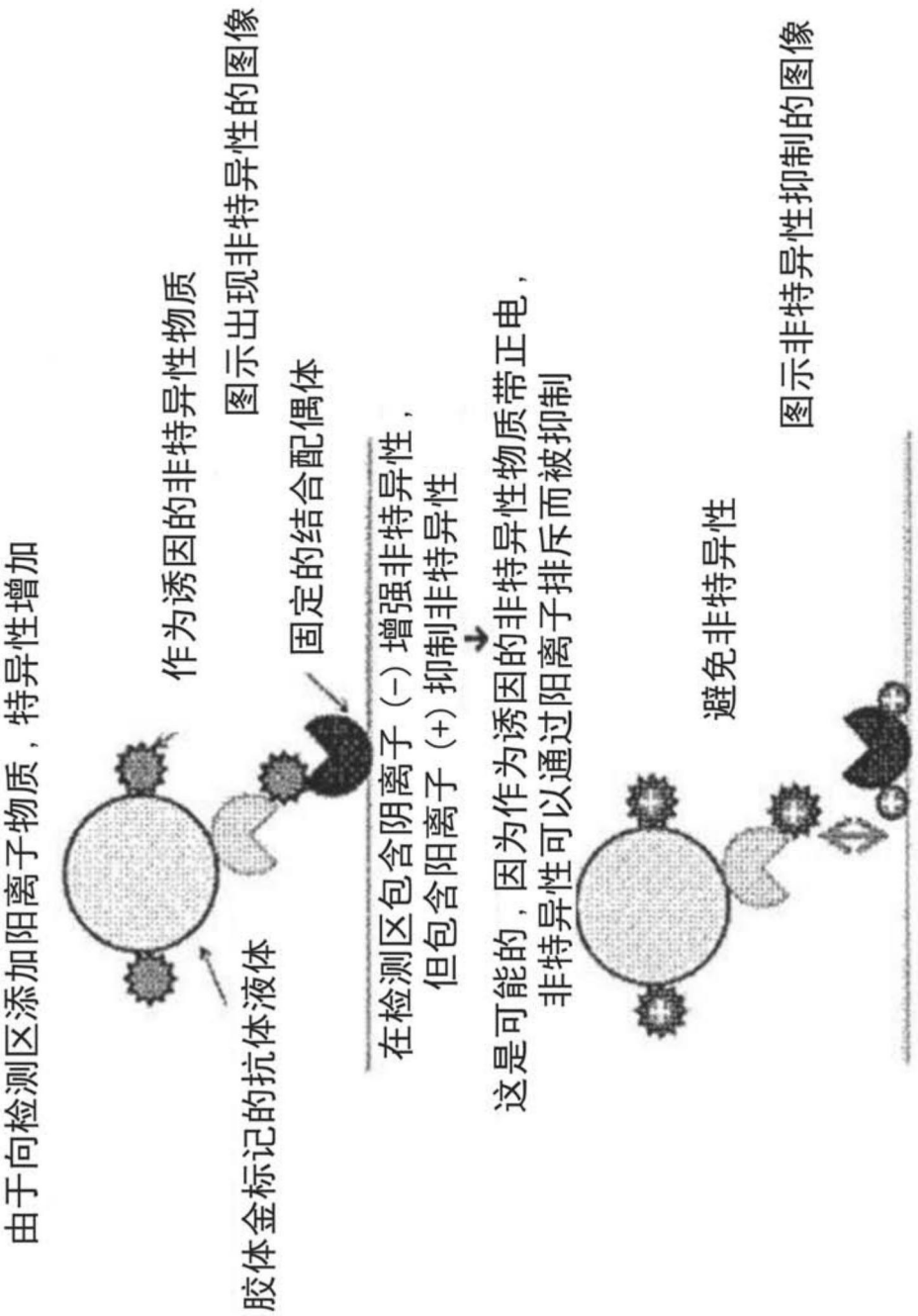

由于向检测区添加阳离子物质，特异性增加
胶体金标记的抗体液体
作为诱因的非特异性物质
图示出现非特异性的图像
固定的结合配偶体
在检测区包含阴离子（-）增强非特异性，
但包含阳离子（+）抑制非特异性
这是可能的，因为作为诱因的非特异性物质带正电，
非特异性可以通过阳离子排斥而被抑制
避免非特异性
图示非特异性抑制的图像

图3