(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118043668 A
(43)申请公布日 2024.05.14

(21)申请号 202280065707.3
(22)申请日 2022.06.10
(30)优先权数据
2021-159997 2021.09.29 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.03.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/023441 2022.06.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/053586 JA 2023.04.06
(71)申请人 富士胶片株式会社
地址 日本东京
(72)发明人 伊藤友希乃
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 王灵菇
(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)

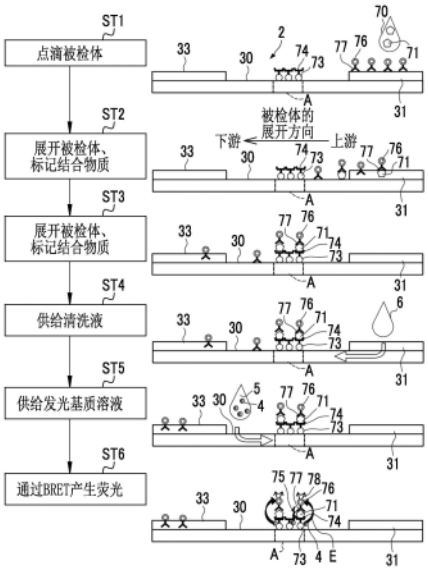
权利要求书2页 说明书20页 附图15页

(54)发明名称

免疫层析试剂盒及检查装置

(57)摘要

本发明涉及一种免疫层析试剂盒及检查装置,免疫层析试剂盒具备:试纸盒,容纳有检查用试纸条,该检查用试纸条具有展开被检体来捕获被检体中所含的被检物质的检查区域;捕获用结合物质,与被检物质特异性结合,并且用发光蛋白质标记且固定于检查区域;标记结合物质,与被检物质特异性结合,并且用荧光物质标记且供给到检查区域;及发光基质,供给到检查区域,并且通过与发光蛋白质进行反应来产生能量,在标记结合物质经由被检物质被捕获用结合物质捕获的状态下,发生能量转移到荧光物质上的生物发光能量共振转移现象。



CN 118043668 A

1.一种免疫层析试剂盒,其具备:

试纸盒,容纳有检查用试纸条,所述检查用试纸条具有展开被检体来捕获所述被检体中所含的被检物质的检查区域;

捕获用结合物质,与所述被检物质特异性结合,并且用发光蛋白质标记且固定于所述检查区域;

标记结合物质,与所述被检物质特异性结合,并且用荧光物质标记且供给到所述检查区域;及

发光基质,供给到所述检查区域,并且通过与所述发光蛋白质进行反应来产生能量,在所述标记结合物质经由所述被检物质被所述捕获用结合物质捕获的状态下,发生所述能量转移到所述荧光物质上的生物发光能量共振转移现象。

2.根据权利要求1所述的免疫层析试剂盒,其中,

所述发光蛋白质为产生蓝色发光的发光蛋白质,所述荧光物质为发出量子产率为0.7以上的绿色荧光的绿色荧光色素或绿色荧光蛋白质。

3.根据权利要求1所述的免疫层析试剂盒,其中,

所述发光蛋白质为产生蓝色发光的蓝色发光蛋白质,所述荧光物质在530nm以上具有峰值波长。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的免疫层析试剂盒,其包括用于收集所述被检体的被检体收集工具。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的免疫层析试剂盒,其包括使用说明书,

所述使用说明书中记载有在将所述被检体及所述标记结合物质供给到所述检查区域之后将所述发光基质供给到所述检查区域的内容的检查顺序。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的免疫层析试剂盒,其中,

在所述检查用试纸条上的所述被检体的供给位置配置有具备所述标记结合物质的标记保持垫。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的免疫层析试剂盒,其在所述试纸盒内具备发光基质溶液保持部,所述发光基质溶液保持部在内部包括含有所述发光基质的发光基质溶液。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的免疫层析试剂盒,其还具备清洗液,

所述清洗液在将所述被检体及所述标记结合物质供给到所述检查区域之后且在将所述发光基质供给到所述检查区域之前供给到所述检查区域,并且清洗非特异性吸附到所述检查区域上的所述标记结合物质。

9.根据权利要求8所述的免疫层析试剂盒,其在所述试纸盒内具备清洗液保持部,所述清洗液保持部在内部包括所述清洗液。

10.一种检查装置,其具备:

装填部,可装卸地装填权利要求1至9中任一项所述的免疫层析试剂盒中的试纸盒;

检测部,检测所述检查区域内的来自所述荧光物质的发光的强度;及

处理器,根据从所述检测部获取到的所述发光的强度来判定所述被检体是阳性还是阴性。

11.根据权利要求10所述的检查装置,其具备将所述发光基质供给到所述检查区域的发光基质供给机构,

所述处理器在将所述被检体及所述标记结合物质供给到所述检查区域之后由所述发光基质供给机构将所述发光基质供给到所述检查区域。

12.根据权利要求11所述的检查装置,其中,

权利要求9所述的免疫层析试剂盒中的试纸盒装填于所述装填部,

所述检查装置还具备将所述清洗液供给到所述检查区域的清洗液供给机构,

所述处理器在将所述被检体及所述标记结合物质供给到所述检查区域之后且在将所述发光基质供给到所述检查区域之前由所述清洗液供给机构将所述清洗液供给到所述检查区域。

13.根据权利要求10至12中任一项所述的检查装置,其中,

所述检测部检测所述检查区域内的来自所述荧光物质的所述发光的强度作为第1发光强度,检测来自所述发光蛋白质的发光的强度作为第2发光强度,

所述处理器从所述检测部获取所述第1发光强度和所述第2发光强度,使用所述第1发光强度除以所述第2发光强度而得的值来进行所述判定。

14.根据权利要求10至12中任一项所述的检查装置,其中,

所述检测部检测所述检查区域内的来自所述荧光物质的所述发光的强度作为第1发光强度,检测存在于来自所述荧光物质的所述发光的峰值波长与来自所述发光蛋白质的发光的峰值波长之间的波长范围内的等发光点处的发光的强度作为第3发光强度,

所述处理器从所述检测部获取所述第1发光强度和所述第3发光强度,使用所述第1发光强度除以所述第3发光强度而得的值来进行所述判定。

免疫层析试剂盒及检查装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析试剂盒及检查装置。

背景技术

[0002] 作为定性或定量测定存在于尿、血液等活体试样中的被检物质的方法,通常使用免疫学测定方法。其中,免疫层析法操作简单且能够在短时间内进行测定,因此便利性高。

[0003] 在免疫层析法中,使用将与被检物质(例如,抗原)特异性结合的抗体(捕获抗体)固定到检查区域的检查用试纸条。作为免疫层析法中使用的测定方法,广泛使用夹层法及竞争法。在夹层法中,在检查用试纸条上展开与抗原特异性结合的被标记的抗体(标记抗体)及被检体,若被检体内含有抗原,则会在检查区域形成捕获抗体-抗原-标记抗体的复合物。然后,通过检测由标记抗体的标记产生的显色等信号来定性或定量测定作为被检物质的抗原。另一方面,在竞争法中,在检查用试纸条上展开被标记的假抗原(标记假抗原)及被检体液,使检查区域的捕获抗体竞争性捕获被检体液中的抗原和标记假抗原。然后,通过检测由检查区域中捕获到的标记假抗原的标记产生的显色等信号来定性或定量测定作为被检物质的抗原。在夹层法中,由标记产生的信号强度随着被检体中的抗原量增加而增加,相对于此,在竞争法中,由标记产生的信号强度随着被检体中的抗原量增加而减小。

[0004] 在如上所述的免疫层析法中,已知一种将发光蛋白质用作标记来检测通过使发光蛋白质和发光基质进行化学反应而产生的由发光蛋白质引起的发光的化学发光免疫层析法(例如,日本特开2015-105858号公报)。在化学发光免疫层析法中,在检查区域固定有捕获抗体的检查用试纸条上展开被检体及用发光蛋白质标记的标记抗体。然后,在检查用试纸条上展开与作为标记的发光蛋白质进行反应而产生光的发光基质。经由检查区域中捕获到的标记抗体来检测捕获到的发光蛋白质和发光基质进行反应而产生的发光,由此定性或定量测定作为被检物质的抗原。

[0005] 并且,日本特表2018-522221号公报中公开了一种使用竞争法的化学发光免疫层析法,其使用在发光蛋白质与荧光物质之间产生的活体发光共振能量转移(BRET:Bioluminescence Resonance Energy Transfer)这一技术。在日本特表2018-522221号公报中,使用在检查区域固定有被标记发光蛋白质的捕获抗体的检查用试纸条,并在检查用试纸条上展开被检体、被标记预先准备的荧光物质的标记假抗原及与发光蛋白质进行反应的发光基质。然后,使捕获抗体竞争性捕获被检体中的抗原和标记假抗原。在检查区域内,当发光蛋白质和荧光物质彼此接近时,发光基质和发光蛋白质进行反应而产生的能量会转移到荧光物质上,产生荧光。在日本特表2018-522221号公报中记载的化学发光免疫层析法中,捕获到的被检体中的抗原的量越增加,检查区域中捕获到的标记假抗原的量越减少,因此通过BRET产生的荧光越减少。在检查区域内,通过检测通过该BRET产生的荧光来定性或定量测定作为被检物质的抗原。

发明内容

[0006] 发明要解决的技术课题

[0007] 在日本特开2015-105858号公报的情况下,在检查试纸条上的包括检查区域的整个区域展开用发光蛋白质标记的标记抗体。其中,一部分标记抗体会通过抗原抗体反应与抗原特异性结合,但剩余的标记抗体的一部分尽管不会与抗原特异性结合,但有时会残留在检查区域的周边。若在检查试纸条上展开发光基质,则不仅是与抗原特异性吸附的标记抗体的标记,作为残留的标记抗体的标记的发光蛋白质也会与发光基质进行反应。若将检查区域的周边区域作为背景,则在背景中也会产生由残留的标记抗体产生的发光。背景中的光信号会成为通过抗原抗体反应产生的光信号的噪声,因此S(Signal(信号))/N(Nois e(噪声))比会下降,导致测定精度下降。

[0008] 在日本特表2018-522221号公报中,发光蛋白质仅固定在检查区域作为捕获抗体的标记。因此,仅在捕获抗体的发光蛋白质和标记抗体的荧光物质彼此接近的检查区域内通过BRET产生荧光,因此不会在不存在捕获抗体的背景中产生荧光。但是,在日本特表2018-522221号公报中使用的竞争法中,在被检体中不存在抗原的状态下与固定到检查区域的捕获抗体结合的标记假抗原的量最大,因此在不存在抗原的状态下信号强度最大,信号强度随着抗原量增加而减小。即,在不存在抗原的状态下信号强度最大,这成为用于测定抗原量的信号强度的基线,但存在基线的信号强度会因各种因素而发生变动的问题。这是因为,在被检体中不存在抗原的状态下与捕获抗体结合的标记假抗原的量会根据由将被检体点滴到检查试纸条上时的势头及点滴的被检体量的多少等引起的流体速度的变动而发生变化。并且,在BRET中,荧光的信号强度会根据发光蛋白质与荧光物质之间的距离而发生变化。因此,若与捕获抗体结合的标记假抗原的结合状态发生变动,则基线也会发生变动。若基线发生变动,则测定精度会下降。尤其,被检体中的抗原量越少,即,被检体中的抗原浓度越低,基线的每次测定时的信号强度的变动对测定精度造成的影响越大。

[0009] 在流感等感染的感染初期,被检体中所含的病毒为极少量,因此要求一种即使被检物质为极少量也能够进行检测的免疫层析试剂盒及检查装置。

[0010] 本发明是鉴于上述情况而完成的,其目的在于,提供一种与以往相比,即使在被检体中的被检物质浓度低的情况下,也能够进行高精度的测定的免疫层析试剂盒及检查装置。

[0011] 用于解决技术课题的手段

[0012] 本发明的免疫层析试剂盒具备:试纸盒,容纳有检查用试纸条,该检查用试纸条具有展开被检体来捕获被检体中所含的被检物质的检查区域;

[0013] 捕获用结合物质,与被检物质特异性结合,并且用发光蛋白质标记且固定于检查区域;

[0014] 标记结合物质,与被检物质特异性结合,并且用荧光物质标记且供给到检查区域;及

[0015] 发光基质,供给到检查区域,并且通过与发光蛋白质进行反应来产生能量,在标记结合物质经由被检物质被捕获用结合物质捕获的状态下,发生能量转移到荧光物质上的生物发光能量共振转移现象。

[0016] 发光蛋白质可以为产生蓝色发光的发光蛋白质,荧光物质可以为发出量子产率为

0.7以上的绿色荧光的绿色荧光色素或绿色荧光蛋白质。

[0017] 发光蛋白质可以为产生蓝色发光的蓝色发光蛋白质,荧光物质可以在530nm以上具有峰值波长。

[0018] 可以包括用于收集被检体的被检体收集工具。

[0019] 可以包括使用说明书,该使用说明书中记载有在将被检体及标记结合物质供给到检查区域之后将发光基质供给到检查区域的内容的检查顺序。

[0020] 可以在检查用试纸条上的被检体的供给位置配置有具备标记结合物质的标记保持垫。

[0021] 可以在试纸盒内具备发光基质溶液保持部,该发光基质溶液保持部在内部包括含有发光基质的基质溶液。

[0022] 可以进一步具备清洗液,该清洗液在将被检体及标记结合物质供给到检查区域之后且在将发光基质供给到检查区域之前供给到检查区域,并且非特异性吸附到清洗检查区域上的标记结合物质。

[0023] 可以在试纸盒内具备清洗液保持部,该清洗液保持部在内部包括清洗液。

[0024] 本发明的检查装置具备:装填部,可装卸地装填本发明的免疫层析试剂盒中的试纸盒;

[0025] 检测部,检测检查区域内的来自荧光物质的发光的强度;及

[0026] 处理器,根据从检测部获取到的发光的强度来判定被检体是阳性还是阴性。

[0027] 本发明的检查装置可以具备将发光基质供给到检查区域的发光基质供给机构,

[0028] 处理器可以在将被检体及标记结合物质供给到检查区域之后由发光基质供给机构将发光基质供给到检查区域。

[0029] 本发明的检查装置可以将在内部具备清洗液保持部的试纸盒装填于装填部,

[0030] 该检查装置可以进一步具备将清洗液供给到检查区域的清洗液供给机构,

[0031] 处理器可以在将被检体及标记抗体供给到检查区域之后且在将发光基质供给到检查区域之前由清洗液供给机构将清洗液供给到检查区域。

[0032] 在本发明的检查装置中,检测部可以检测检查区域内的来自荧光物质的发光的强度(荧光物质的峰值波长处的发光强度)作为第1发光强度,检测来自发光蛋白质的发光的强度(发光蛋白质的峰值波长处的发光强度)作为第2发光强度,处理器可以从检测部获取第1发光强度和第2发光强度,使用第1发光强度除以第2发光强度而得的值来进行判定。

[0033] 在本发明的检查装置中,检测部可以检测检查区域内的来自荧光物质的发光的强度作为第1发光强度,检测存在于来自荧光物质的发光的峰值波长与来自发光蛋白质的发光的峰值波长之间的波长范围内的等发光点处的发光的强度作为第3发光强度,处理器可以从检测部获取第1发光强度和第3发光强度,使用第1发光强度除以第3发光强度而得的值来进行判定。

[0034] 发明效果

[0035] 根据本发明的免疫层析试剂盒及检查装置,与以往相比,即使在被检体中的被检物质浓度低的情况下,也能够进行高精度的测定。

附图说明

[0036] 图1是表示免疫层析试剂盒的整体结构的图。

[0037] 图2是试纸盒的分解立体图。

[0038] 图3是表示免疫层析检查的顺序的图。

[0039] 图4中,图4(a)是说明来自阴性时的检查区域的发光的图,图4(b)是说明来自阳性时的检查区域的发光的图。

[0040] 图5中,图5(a)是表示从阴性时的检查区域检测出的发射光谱的一例的图,图5(b)是表示从阳性时的检查区域检测出的发射光谱的一例的图。

[0041] 图6是表示通过BRET从荧光物质产生的光的发光强度与被检物质浓度之间的关系的图。

[0042] 图7是表示阴性时及阳性时的等发光强度点的图。

[0043] 图8是说明来自未使用BRET的化学发光免疫层析检查(以往技术1)中的检查区域的发光的图。

[0044] 图9涉及到竞争法及使用BRET的化学发光免疫层析检查(以往技术2),图9(a)是说明来自阴性时的检查区域的发光的图,图9(b)是说明来自阳性时的检查区域的发光的图。

[0045] 图10是表示以往技术2中的通过BRET从荧光物质产生的光的发光强度与被检物质浓度之间的关系的图。

[0046] 图11是设计变更例的试纸盒的立体图。

[0047] 图12是设计变更例的试纸盒的分解立体图。

[0048] 图13是设计变更例的试纸盒的侧面剖视图。

[0049] 图14是表示按下第1按压操作部的状态的试纸盒的侧面剖视图。

[0050] 图15是表示除第1按压操作部以外还按下第2按压操作部的状态的试纸盒的侧面剖视图。

[0051] 图16是表示检查装置的立体图。

[0052] 图17是表示检查装置的内部的剖视图。

[0053] 图18是表示检查装置的CPU的处理部的框图。

[0054] 图19是表示检查装置的处理顺序的流程图。

具体实施方式

[0055] 以下,参考附图对本发明的免疫层析试剂盒及检查装置的具体的实施方式进行说明。在各附图中,使用相同符号示出的构成要件表示为相同构成要件。

[0056] 如图1及图2所示,一实施方式的免疫层析试剂盒1具备容纳有检查用试纸条2的试纸盒3、含有发光基质4的发光基质溶液5、清洗液6、被检体收集工具7及使用说明书8。

[0057] 试纸盒3为针对每个被检体使用一个的一次性型,具有细长长方体状的壳体21。壳体21由壳体主体22和盖部件23构成。壳体主体22为细长板状,具备容纳检查用试纸条2的凹部。盖部件23具备被检体滴加口24、发光基质滴加口26及观察窗28。另外,图2中的X方向及Y方向均为沿着水平面的方向,它们彼此正交。X方向为沿着壳体21的短边的方向,Y方向为沿着壳体21的长边的方向。Z方向为沿着铅垂方向的方向,与X方向及Y方向正交。在以下附图中相同。

[0058] 被检体滴加口24为滴加含有被检体的试样液70(参考图3)的圆孔。被检体只要可含被检物质71,则可以为任何物质,并无特别限定。被检体包括免疫层析检查对象个体,尤其包括动物、进而言之人的生物学试样,例如为血液、血清、血浆、脑脊液、眼泪、汗、尿、便、脓、鼻涕、鼻拭子液、咽拭子液、鼻吸出物或痰等,进而为器官、组织、粘膜及皮膚或含有这些的拭子或者动植物本身或它们的干燥体。作为被检物质71,可举出抗原、抗体、蛋白质及低分子化合物等。

[0059] 另外,清洗液6也从被检体滴加口24滴加。

[0060] 发光基质滴加口26为滴加含有发光基质4的发光基质溶液5的圆孔。在此,滴加发光基质溶液5的含义与滴加发光基质4的含义相同。发光基质4待留后述。

[0061] 观察窗28为用于从外部观察检查用试纸条2的检查区域A的矩形形状的开口。观察窗28形成在被检体滴加口24与发光基质滴加口26之间。

[0062] 被检体收集工具7为用于收集被检体的器具,在本例子中,使用用于收集鼻拭子液的拭子。作为被检体收集工具7,可以根据上述被检体具备适当的收集工具。另外,将收集到被检体的拭子浸渍于未图示的展开液(还称为被检体处理液。)中,提取收集到的被检体,制备试样液70(参考图3)。从被检体滴加口24滴加如此得到的含有被检体的试样液70。即,滴加试样液70的含义与滴加被检体的含义相同。

[0063] 使用说明书8中记载有检查用试纸条2、发光基质溶液5、清洗液6及被检体收集工具7等的使用方法及检查顺序等。使用说明书8中记载有将被检体及标记结合物质供给到检查区域A之后将发光基质4供给到检查区域A的内容的检查顺序,检查顺序的细节待留后述。另外,作为与免疫层析试剂盒1装在一起的使用说明书8,除记载有检查顺序本身的册子以外,还可以为记载有用于经由通信线路访问通过以电子数据的形式上传到服务器上来提供的检查顺序书的访问码(URL:Uniform Resource Locator(统一资源定位符)等)的文件。

[0064] 参考图2及图3对试纸盒3的结构及功能进行详细说明。图2是表示试纸盒3的结构的图,图3是表示使用试纸盒3的检查顺序的图。如图2所示,检查用试纸条2整体呈细长矩形板状,具有载体30、标记保持垫31、吸收垫33及背面粘结片34。

[0065] 载体30例如由硝基纤维素膜等多孔不溶性材料形成。载体30的中央附近设置有捕获被检体中所含的被检物质71(参考图3)的检查区域A。检查区域A固定有用发光蛋白质73(参考图3)标记的捕获用结合物质74(参考图3)。

[0066] 捕获用结合物质74为与被检物质71特异性结合的结合物质。例如,在被检物质71为抗原的情况下,捕获用结合物质74为针对该抗原的抗体,在被检物质71为抗体的情况下,捕获用结合物质74为针对抗体的抗原。在被检物质71为蛋白质及低分子化合物等的情况下,捕获用结合物质74为针对蛋白质及低分子化合物等的适体。

[0067] 捕获用结合物质74上标记的发光蛋白质73为与发光基质4进行反应而发光的蛋白质。

[0068] 标记保持垫31安装于与被检体滴加口24对置的载体30的位置。滴加到被检体滴加口24的试样液70被点滴到该标记保持垫31。即,标记保持垫31配置于检查用试纸条2上的被检体的供给位置。

[0069] 标记保持垫31含有用荧光物质76(参考图3)标记的标记结合物质77。标记结合物质77为与被检物质71特异性结合的结合物质。例如,在被检物质71为抗原的情况下,标记结

合物质77为针对该抗原的抗体,在被检物质71为抗体的情况下,标记结合物质77为能够与抗体结合的二次抗体。在被检物质71为蛋白质及低分子化合物等的情况下,标记结合物质77为针对蛋白质及低分子化合物等的适体。

[0070] 捕获用结合物质74和标记结合物质77可以为相同的物质,也可以为不同的物质。例如,在被检物质71为流感A型病毒或其生物标记的情况下,作为捕获用结合物质74及标记结合物质77,可以使用抗流感A型单克隆抗体(Me dix Biochemica公司制,产品名:Anti-Influenza A SPT N-5 7307)。

[0071] 荧光物质76为通过赋予激发能量来产生荧光的荧光色素或荧光蛋白质等。

[0072] 发光蛋白质73和荧光物质76选择发光蛋白质73的发射光谱的波长范围和荧光物质76的激发光谱的波长范围重叠的物质。若发光蛋白质73的发射光谱的波长范围与荧光物质76的激发光谱的波长范围重叠,则有可能会发生能量转移。

[0073] 作为一例,发光蛋白质73为产生蓝色光的发光蛋白质,在该情况下,可以将量子产率为0.7以上的荧光物质76设为发出绿色荧光的绿色荧光色素或绿色荧光蛋白质。在此,蓝色光是指在约430nm～约490nm的波长范围内具有极大发光波长(以下,称为峰值波长)的光,绿色光是指在约490nm～约550nm的波长范围内具有峰值波长的光。并且,优选发光蛋白质73的峰值波长与荧光物质76的峰值波长相差40nm以上。作为一例,在发光蛋白质73为产生蓝色发光的蓝色发光蛋白质的情况下,可以将荧光物质76设为在530nm以上具有峰值波长的荧光色素或荧光蛋白质。峰值波长相隔越远,越容易识别各光的峰,因此优选。例如,在发光蛋白质73在约430nm～约490nm的蓝色光的波长范围内具有峰值波长的情况下,荧光物质76在约640nm～770nm的红色光的波长范围内具有峰值波长等。

[0074] 发光基质4与发光蛋白质73进行反应而被氧化,由此产生能量,从而成为激发状态,并在过渡到基底状态时发光。另一方面,当发光蛋白质73和荧光物质76位于彼此接近的位置时,会发生发光基质4与发光蛋白质73进行反应而产生的能量转移到荧光物质76上的生物发光能量共振转移现象(BRET)。由此,荧光物质76发光。即,荧光物质76被发光基质4与发光蛋白质73进行反应而产生的发光的能量E激发,并从荧光物质76产生荧光。在使用本发明的免疫层析试剂盒1的检查中,通过检测通过该BRET从荧光物质76发出的光来判定被检体是阳性还是阴性。检查顺序的细节待留后述。

[0075] 作为发光蛋白质73、荧光物质76及发光基质4的组合的具体例,可举出作为蓝色发光蛋白质的NanoLuc(注册商标,Promega公司制)、作为绿色荧光蛋白质的mNeongreen(Allele Biotechnology公司制)及Furimazine(Promeg a公司制)的组合。

[0076] 吸收垫33安装于载体30的与安装有标记保持垫31的一端相反的一侧的另一端。与载体30相同地,吸收垫33由多孔材料形成。吸收垫33吸收展开到载体30上的试样液70、清洗液6及发光基质溶液5。

[0077] 背面粘结片34是表面为粘结面的基材,其粘结固定有载体30。

[0078] 清洗液6在将被检体及标记结合物质77供给到检查区域A之后且在将发光基质4供给到检查区域A之前供给到检查区域A。清洗液6清洗非特异性吸附到检查区域A上的标记结合物质77。在此,“非特异性吸附”是指标记结合物质77与被检物质71和捕获用结合物质74的特异性结合无关地吸附到载体上的状态。

[0079] 以下,参考图3对免疫层析检查的顺序进行说明。在此,以被检体含有被检物质71

的情况(即,被检体为阳性的情况)为例进行说明。另外,在图3中,省略了背面粘结片34的图示。

[0080] 首先,如步骤ST1所示,将试样液70点滴到标记保持垫31上。点滴到标记保持垫31上的试样液70中的被检物质71与标记保持垫31的标记结合物质77特异性结合。

[0081] 如步骤ST2所示,试样液70从标记保持垫31渗透到载体30中,并通过毛细管现象被展开到检查区域A侧(下游侧)。到达检查区域A的被检物质71被捕获用结合物质74捕获。由此,经由被检物质71和标记结合物质77,荧光物质76被检查区域A的捕获用结合物质74捕获。

[0082] 如步骤ST3所示,检查区域A中未被捕获的标记结合物质77进一步展开到下游侧的吸收垫33。另外,标记结合物质77的一部分有时会非特异性吸附到载体30上,而不会展开到吸收垫33。

[0083] 接着,如步骤ST4所示,供给清洗液6。清洗液6经由标记保持垫31供给到载体30,并通过毛细管现象被展开到检查区域A侧(下游侧)。通过该清洗液6的展开来清洗非特异性吸附到载体上的标记结合物质77。此时,非特异性吸附到检查区域A上的标记结合物质77与清洗液6一并流向吸收垫33。

[0084] 然后,如步骤ST5所示,供给发光基质溶液5。发光基质溶液5从比检查区域A更靠下游侧供给到载体30,并被展开到检查区域A侧(上游侧)。

[0085] 如步骤ST6所示,到达检查区域A的发光基质溶液5中所含的发光基质4与固定在检查区域A的发光蛋白质73进行反应。会发生通过该反应产生的能量E转移到捕获到的荧光物质76上的BRET,从而从荧光物质76产生荧光78。根据来自检查区域A的发光,能够判定被检体是阳性还是阴性。

[0086] 另外,来自检查区域A的发光由后述的检查装置100(参考图16及图17)中的分光光度计等检测部110检测。

[0087] 在此,参考图4及图5对阳性时及阴性时来自检查区域A的发光分别进行说明。

[0088] 图4是用于分别说明(a)被检体为阴性时来自检查区域A的发光及(b)被检体为阳性时来自检查区域A的发光的示意图。图5中示出(a)阴性时来自检查区域A的发射光谱及(b)阳性时来自检查区域A的发射光谱。另外,作为一例,发光蛋白质73发出的光75设为峰值波长为460nm的蓝色光,荧光物质76发出的荧光设为峰值波长为530nm的绿色光。

[0089] 在被检体为阴性的情况下,被检体不含被检物质71,因此如图4(a)所示,被检物质71不会被检查区域A的捕获用结合物质74捕获,其结果,荧光物质76也不会被捕获。在该状态下,若将发光基质4供给到检查区域A,则发光基质4与发光蛋白质73进行反应,产生发光能量,从而发光。此时,产生发光蛋白质73的光75。在被检体为阴性的情况下,作为一例,可获得图5(a)所示的在460nm具有峰的发射光谱a。图5(a)所示的发射光谱a是光75为具有460nm的峰值波长的蓝色光时的发射光谱的一例。

[0090] 在被检体为阳性的情况下,如图4(b)所示,被检物质71会被检查区域A的捕获用结合物质74捕获,从而会经由被检物质71捕获到荧光物质76。在该状态下,若将发光基质4供给到检查区域A,则发光基质4与发光蛋白质73进行反应,产生发光能量E,通过BRET从荧光物质76产生荧光78。荧光78是峰值波长为530nm的绿色光。另外,即使在阳性的情况下,在检查区域A内,也会存在未捕获到被检物质71的捕获用结合物质74。因此,在未捕获到荧光物

质76的捕获用结合物质74的发光蛋白质73与发光基质4进行了反应的情况下,产生取决于发光蛋白质73的峰值波长460nm的光75,而不会发生BRET。因此,会从检查区域A同时发出荧光78和光75,作为一例,如图5(b)所示,从检查区域A可获得在波长460nm和530nm具有峰的发射光谱b。

[0091] 另外,如图6所示,被检体中的被检物质71越多,即,被检物质71的浓度越大,通过BRET从荧光物质76发出的光的发光强度越大。并且,发光基质4与发光蛋白质73进行反应而从发光基质4产生的光75相对减小。即,在被检体中不存在被检物质71的阴性时,可获得如图5(a)所示在460nm具有峰值波长的光75的发射光谱,随着被检体中的被检物质71量增加,检测出的发射光谱中的460nm峰变小,530nm峰相对变大。

[0092] 另外,在使用后述的检查装置100(参考图16)的情况下,检测如图5所示的发射光谱a或b,获取通过BRET产生的荧光78的发光强度IF(以下,称为第1发光强度IF。)和未发生BRET而发光的光75的发光强度IB(以下,称为第2发光强度IB。),求出第1发光强度IF除以第2发光强度IB而得的值IF/IB(以下,称为发光强度比IF/IB。),能够判定是阳性还是阴性。例如,若发光强度比IF/IB大于预先设定的阈值,则判定为阳性,若为阈值以下,则判定为阴性等。

[0093] 另外,作为判定时使用的发光强度比,也可以使用如图7所示在阴性时的发射光谱a和阳性时的发射光谱b中发光强度不发生变化的等发光点处的发光强度Iiso(以下,称为第3发光强度Iiso),求出通过BRET产生的荧光78的发光强度IF除以等发光点处的发光强度Iiso而得的比IF/Iiso(发光强度比IF/Ii so),判定是阳性还是阴性。例如,若发光强度比IF/Iiso大于预先设定的阈值,则判定为阳性,若为阈值以下,则判定为阴性等。

[0094] 在已叙述的日本特开2015-105858号公报中记载的未使用BRET的化学发光免疫层析法中,如图8所示,检查用试纸条202的检查区域A2固定有未标记的捕获抗体204,作为标记抗体207的标记,使用了发光蛋白质73。在被检体为阳性的情况下,经由被检物质71捕获被标记发光蛋白质73的标记抗体207。在该状态下,将发光基质4供给到检查区域A2,因此发光基质4与发光蛋白质73进行反应,从而发光。此时,发光基质4与发光蛋白质73进行反应,产生发光蛋白质73的峰值波长的光75。在该方法中,若存在非特异性吸附的标记抗体207,则即使在未与被检物质71结合的情况下,作为非特异性吸附的标记抗体207的标记的发光蛋白质73也会与发光基质4进行反应,从而发光。检查区域A2的周边区域内的非特异性吸附的标记抗体207的发光蛋白质73引起的发光会使背景增加,存在S/N比下降,测定精度下降的问题。

[0095] 相对于此,本实施方式的免疫层析试剂盒1具备:试纸盒3,容纳有检查用试纸条2,该检查用试纸条2具有展开被检体来捕获被检体中所含的被检物质71的检查区域A;捕获用结合物质74,用发光蛋白质73标记且固定于检查区域A;标记结合物质77,用荧光物质76标记且供给到检查区域A;及发光基质4。

[0096] 根据该结构,通过发光基质4与发光蛋白质73进行反应而产生的能量E在经由被检物质71捕获到标记结合物质77的状态下转移到荧光物质76上,从而从荧光物质76产生荧光78。该能量转移的BRET这一现象在发光蛋白质73和荧光物质76处于彼此接近的状态(例如,位于10nm左右以下的距离的状态)的情况下发生。因此,在标记结合物质77未捕获到捕获用结合物质74的情况下,发光蛋白质73和荧光物质76并不接近,因此不会发生BRET。因此,即

使标记结合物质77非特异性吸附到检查区域A的周边区域,标记在该非特异性吸附的标记结合物质77上的荧光物质76也不会被激发,从而不会产生荧光。因此,即使产生检查区域A的周边区域内的非特异性吸附的标记结合物质77,背景也不会上升,从而能够进行S/N比高的测定。即,相较于未使用上述BRE T的以往的化学发光免疫层析法,能够通过使用BRET的测定进行判定的本实施方式的免疫层析试剂盒1能够抑制背景,因此测定精度高。检查用试纸条2的检查区域A固定有用发光蛋白质73标记的捕获用结合物质74,仅在该用发光蛋白质73标记的捕获用结合物质74与发光基质4进行反应时产生发光反应。并且,仅在标记结合物质77经由被检物质71被该捕获用结合物质74捕获到时检测通过BRET从荧光物质76发出的荧光78。因此,可抑制检查区域A以外的部分的发光,从而能够抑制背景,能够提高测定精度。

[0097] 并且,在使用已叙述的日本特表2018-522221号公报中记载的竞争法且利用BRET的化学发光免疫层析法中,与本发明的技术相同地,检查用试纸条203的检查区域A3固定有被标记发光蛋白质73的捕获抗体204。在日本特开2015-105858号公报中记载的竞争法中,在检查用试纸条203上与被检体一并展开被标记荧光物质76的标记假抗原72及发光基质4。图9是用于分别说明(a)被检体为阴性时来自检查区域A3的发光及(b)被检体为阳性时来自检查区域A3的发光的示意图。如图9(a)所示,阴性时,标记假抗原72被检查区域A3的捕获抗体204捕获,发光基质4与发光蛋白质73进行反应而产生的发光能量E转移到荧光物质76上,从而从荧光物质76产生荧光78。并且,如图9(b)所示,阳性时,检查区域A3的捕获抗体204竞争性捕获标记假抗原72和被检物质71。被检物质71不具备标记,因此标记捕获到被检物质71的捕获抗体204的发光蛋白质73与发光基质4进行反应而产生的发光能量E不会转移到荧光物质76上,而作为光75发光。因此,在阳性的情况下,通过BRET从荧光物质76发出的荧光78会减少,通过发光蛋白质73与发光基质4进行反应而产生的光75会增加。

[0098] 即,根据竞争法,如图10所示,在被检体中不存在被检物质71的状态下通过BRET从荧光物质76产生的荧光78的发光强度最大,随着被检物质71的量增加(被检物质浓度增加),通过BRET从荧光物质76产生的荧光78的信号强度减小。在被检体中不存在作为被检物质71的抗原的情况下,与捕获抗体204结合的是标记假抗原72。在不存在该被检物质71的情况下,与捕获抗体204结合的抗原的量或结合方式根据伴随被检体量的变动的流体速度的变动及反应温度等而发生变动,其结果,信号强度容易发生变动。存在如下问题:难以分辨被检物质71为极少量的情况与不存在被检物质71的基线之间的差异,导致被检物质71为极少量时的测定精度低。

[0099] 相对于此,在本实施方式的免疫层析试剂盒1中,使用了在检查用试纸条2的检查区域A用捕获用结合物质74和标记结合物质77夹住被检物质71的夹层法。因此,相较于使用竞争法的以往的BRET,被检体中的被检物质量少时的测定精度高。在夹层法中,在不存在被检物质71的情况下,通过BRET从荧光物质产生的荧光的信号强度为零,信号强度会随着被检物质71的量增加而增加(参考图6)。因此,容易检测被检物质71为极少量时的信号强度的变化,被检物质71为极少量时的测定精度高。

[0100] 在本实施方式中,具备清洗液6,其在将被检体及标记结合物质77供给到检查区域A之后且在将发光基质4供给到检查区域A之前供给到检查区域A。通过清洗液6,能够去除非特异性吸附的标记抗体207,因此能够提高测定精度。

[0101] 上述实施方式的免疫层析试剂盒1除具备试纸盒以外,还具备清洗液6及含有发光基质4的发光基质溶液5。然而,在本发明的免疫层析试剂盒中,试纸盒也可以在内部包括发光基质溶液保持部52及清洗液保持部45中的至少一个,而不仅仅是检查用试纸条,该发光基质溶液保持部52在内部包括含有发光基质4的发光基质溶液5,该清洗液保持部45在内部包括清洗液6。

[0102] 接着,对设计变更例的试纸盒10及检查装置100进行说明。另外,对等同于参考图1～4说明的试纸盒3的构成要件标注相同的符号,并省略详细说明。

[0103] 图11及图12所示的设计变更例的试纸盒10具有细长长方体状的壳体11。壳体11由壳体主体12和盖部件13构成。壳体主体12为具有由细长矩形板状的底板和从底板的四个边垂直立设的四个侧板包围的容纳空间的箱。在该壳体主体12的容纳空间内容纳设置有检查区域A的检查用试纸条14。

[0104] 与壳体主体12的底板相同地,盖部件13呈细长矩形板状,发挥覆盖壳体主体12的容纳空间的盖的功能。

[0105] 盖部件13上形成有被检体滴加口17及观察窗18。并且,盖部件13上设置有第1按压操作部19及第2按压操作部20。这些被检体滴加口17、观察窗18、第1按压操作部19及第2按压操作部20一体成型。

[0106] 被检体滴加口17为滴加试样液70的圆孔,呈缘部从表面突出的凸块状。被检体滴加口17形成在盖部件13的中心部。

[0107] 观察窗18为用于从外部观察检查用试纸条14的检查区域A等的矩形形状的开口。观察窗18形成在被检体滴加口17与第2按压操作部20之间。

[0108] 第1按压操作部19设置于盖部件13的Y方向上的一端部。第1按压操作部19在将清洗液6(参考图14)供给到检查用试纸条14上时供使用者进行按压操作。第2按压操作部20设置于与第1按压操作部19相反的一侧的盖部件13的Y方向上的另一端部。第2按压操作部20在将发光基质溶液5(参考图15)供给到检查用试纸条14上时供使用者进行按压操作。

[0109] 检查用试纸条14除具有载体30、标记保持垫31、吸收垫33及背面粘结片34以外,还具有液体输送垫32。在载体30的Y方向上的一端侧除设置有检查区域A以外,还设置有控制区域C。当将从标记保持垫31朝向检查区域A等的方向设为被检体的展开方向(参考图13)时,检查区域A位于比控制区域C更靠展开方向上的上游侧的位置。另外,在图12中,对检查区域A及控制区域C标注了阴影线,但该阴影线是为了便于说明而标注的,并不表示各区域A、C显色。以下图13～图15及图17等也相同。

[0110] 液体输送垫32安装于与设置有检查区域A等的载体30的一端相反的一侧的载体30的另一端。与载体30等相同地,液体输送垫32由多孔材料形成,通过毛细管现象将清洗液6液体输送到载体30。

[0111] 背面粘结片34以及检查用试纸条14载置于形成在壳体主体12的容纳空间内的凸状的支撑台35及36上。支撑台35设置于壳体主体12的中心部。支撑台36设置于试样液70的展开方向上的下游侧的壳体主体12的一端部。支撑台35及36的高度相同。

[0112] 在试样液70的展开方向上的上游侧的壳体主体12的另一端部也形成有凸状的支撑台37。支撑台37的高度与支撑台35及36的高度相同。支撑台37上载置有液体输送垫32。

[0113] 支撑台37上形成有凹状的第1容纳部38。第1容纳部38设置于与液体输送垫32的与

安装于载体30的一端相反的一侧的另一端对置的位置。第1容纳部38中容纳有清洗液保持部45。

[0114] 清洗液保持部45由在一个面上具有开口的容器46和液密地覆盖容器46的开口的密封件47构成。容器46例如由树脂材料形成。在容器46的内部储存有清洗液6。密封件47例如为铝片,容易因利器等而破裂。清洗液保持部45以使密封件47朝向上方的姿势容纳于第1容纳部38,以使密封件47与液体输送垫32的另一端相对。

[0115] 在支撑台36的上部配置有多功能部件49。多功能部件49例如由丙烯酸树脂等透明树脂材料形成。多功能部件49为将第2容纳部50与流路形成部51设置成一体的部件。第2容纳部50为上表面开口的箱,其在内部容纳有发光基质溶液保持部52。流路形成部51为从第2容纳部50的底部沿着Y方向延伸的平板。流路形成部51延伸至标记保持垫31的正前方,覆盖载体30的检查区域A及控制区域C的上部。在载体30与流路形成部51之间隔开了间隔D(参考图13)。间隔D例如在0.01mm～1mm的范围内。如此,通过在载体30与流路形成部51之间隔开间隔D来确保发光基质溶液5的流路。

[0116] 发光基质溶液保持部52由在一个面具有开口的容器53和液密地覆盖容器53的开口的密封件54构成。容器53例如由树脂材料形成。在容器53的内部储存有发光基质溶液5。密封件54例如为铝片,容易因利器等而破裂。发光基质溶液保持部52以使密封件54朝向下方的姿势容纳于第2容纳部50,以使密封件54与检查用试纸条2相对。

[0117] 作为一例,如图13所示,第1按压操作部19上设置有第1破裂突起60。并且,在第2按压操作部20的内表面安装有发光基质溶液保持部52。在第2容纳部50的底部设置有第2破裂突起61及供给口62。第1破裂突起60及第2破裂突起61具有尖锐的前端。

[0118] 作为一例,如图14所示,第1破裂突起60在对第1按压操作部19进行了按压操作的情况下与液体输送垫32的另一端抵接,并朝向清洗液保持部45的密封件47按压液体输送垫32的另一端。通过该第1破裂突起60对液体输送垫32的另一端的按压使密封件47破裂,液体输送垫32的另一端落入容器46内,并浸渍于清洗液6中。清洗液6通过毛细管现象从液体输送垫32的另一端朝向载体30被展开。第1按压操作部19在通过按压操作而被压扁之后也维持被压扁的状态。因此,清洗液6的展开会持续至几乎所有清洗液6被液体输送垫32吸走。

[0119] 作为一例,如图15所示,在对第2按压操作部20进行了按压操作的情况下,发光基质溶液保持部52在第2容纳部50内向下方移动至具有第2破裂突起61的第2容纳部50的底部。然后,通过第2破裂突起61使发光基质溶液保持部52的密封件54破裂。储存在发光基质溶液保持部52中的发光基质溶液5从密封件54的破裂部分流向供给口62,进而流过利用间隔D(参考图13)确保的流路,供给到载体30。

[0120] 控制区域C含有用发光蛋白质73标记的控制用结合物质79。控制用结合物质79与标记结合物质77特异性结合。由此,荧光物质76被控制区域C捕获。标记结合物质77中存在未与被检物质71结合的标记结合物质。这种标记结合物质77在不被检查区域A捕获的情况下到达控制区域C,被控制区域C捕获。在经由标记结合物质77捕获到荧光物质76的情况下,在控制区域C,发光蛋白质73和荧光物质76位于彼此接近的位置。在该状态下,若展开发光基质4,则会在控制区域C发生BRET。根据通过BRET从荧光物质76发出的光,能够确认试样液70充分在载体30上展开而完成试样液70的展开的情况。

[0121] 控制用结合物质79可以为被检物质71本身,也可以为具有被标记结合物质77识别

的部位的化合物。作为具有被标记结合物质77识别的部位的化合物(与标记结合物质77特异性结合的化合物),例如可举出使被检物质71的衍生物与蛋白质结合的化合物等。例如,在被检物质71为流感A型病毒或其生物标记的情况下,作为控制用结合物质79,可以使用抗小鼠IgG抗体(FUJIFI LM Wako Pure Chemical Corporation制,产品名:抗小鼠IgG(H+L)、兔F(ab')2,产品代码:566-70621)。

[0122] 使用上述设计变更例的试纸盒10的免疫层析检查的顺序与参考图3说明的使用试纸盒3的检查的顺序相同。

[0123] 上述设计变更例的试纸盒10在试纸盒10内具备发光基质溶液保持部52,该发光基质溶液保持部52在内部包括含有发光基质4的发光基质溶液5。在免疫层析试剂盒1中,通过将发光基质溶液5设置于试纸盒10内,能够减少从安瓿或小瓶等容器对发光基质溶液5进行计量,并供给到检查区域A等作业。在本试纸盒10中,通过具备第2按压操作部20,并按压第2按压操作部20,能够将发光基质溶液5供给到检查用试纸条14上,因此能够实现简单的检查。

[0124] 试纸盒10在试纸盒10内具备清洗液保持部45,该清洗液保持部45在内部包括清洗液6。在免疫层析试剂盒1中,通过将清洗液6设置于试纸盒10内,能够减少从安瓿或小瓶等容器对发光基质溶液5进行计量,并供给到检查区域A等作业。在本试纸盒10中,通过具备第1按压操作部19,并按压第1按压操作部19,能够将清洗液6供给到检查用试纸条14上,因此能够实现简单的检查。

[0125] 如上所述,上述试纸盒10的第1按压操作部19及第2按压操作部20能够供使用者进行按压操作,根据以下说明的检查装置100,还可以在检查装置100内进行第1按压操作部19及第2按压操作部20的按压。

[0126] 接着,对进行免疫层析检查的检查装置100的结构进行说明。

[0127] 作为一例,如图16及图17所示,检查装置100具备长方体状的框体101。在框体101内设置有装填试纸盒10的L字托盘状的装填部102。

[0128] 在框体101的前表面形成有试纸盒10的装填口103。并且,在框体101的前表面安装有覆盖装填口103的可开闭的盖104。进而,在框体101的前表面配置有检查装置100的电源开关105。

[0129] 在框体101的上表面安装有触摸屏显示器106。触摸屏显示器106受理使用者对免疫层析检查的开始指示(以下,称为检查开始指示)之类的操作指示。并且,触摸屏显示器106显示判定结果之类的信息。

[0130] 使用者打开盖104,使装填口103暴露,并经由装填口103将点滴试样液70之后的试纸盒10装填到装填部102内。然后,使用者关闭盖104,操作触摸屏显示器106,输入检查开始指示。

[0131] 如图17所示,检查装置100在框体101内具备清洗液供给机构107、发光基质供给机构108及检测部110。

[0132] 清洗液供给机构107为用于开始从清洗液保持部45向载体30供给清洗液6的机构。清洗液供给机构107例如使用具备电磁铁和相对于电磁铁可移动的柱塞的螺线管等致动器。例如,通过使柱塞移动,柱塞与第1按压操作部19抵接,从而按压第1按压操作部19。清洗液供给机构107配置于与装填的试纸盒10的第1按压操作部19对置的位置。

[0133] 清洗液供给机构107为通过按压试纸盒10的第1按压操作部19而从外部对第1按压操作部19施加按压力的按压机构。若通过清洗液供给机构107对第1按压操作部19施加按压力,则清洗液6会通过上述作用从清洗液保持部45供给到载体30。

[0134] 发光基质供给机构108为用于开始从发光基质溶液保持部52向载体30供给发光基质溶液5的机构。与清洗液供给机构107相同地,发光基质供给机构108也使用螺线管等致动器。发光基质供给机构108配置于与装填的试纸盒10的第2按压操作部20对置的位置。发光基质供给机构108为通过按压试纸盒10的第2按压操作部20而从外部对第2按压操作部20施加按压力的按压机构。若通过发光基质供给机构108对第2按压操作部20施加按压力,则发光基质4会通过上述作用从发光基质溶液保持部52供给到载体30。

[0135] 检测部110配置于与壳体11的观察窗18对置的位置。检测部110检测来自检查区域A及控制区域C的发光。具体而言,检测部110为能够检测发光蛋白质73与发光基质4进行反应而产生的光75及来自荧光物质76的荧光78的分光光度计。根据分光光度计,能够检测每个波长的光强度。

[0136] 作为一例,如图18所示,检查装置100具备存储装置140、存储器141及CPU(Central Processing Unit(中央处理单元))142。存储装置140、存储器141及CPU142经由总线143彼此连接。存储装置140、存储器141、CPU142及总线143构成计算机。

[0137] 存储装置140例如为硬盘驱动器或固态驱动器。存储器141为供CPU142执行处理的工作存储器。CPU142将存储于存储装置140中的程序加载到存储器141中,并按照程序执行处理。由此,CPU142统一控制检查装置100的各部。

[0138] 存储装置140中存储有运行程序145。运行程序145为用于使计算机发挥本发明的检查装置100的功能的应用程序。另外,存储装置140除存储有运行程序145以外,还存储有识别检查区域A的显色状态所需的信息等。

[0139] 若启动运行程序145,则CPU142与存储器141等协作发挥指示受理部150、清洗液供给机构控制部151、发光基质供给机构控制部152、检测部控制部153、判定部154及显示控制部155的功能。

[0140] 指示受理部150受理经由触摸屏显示器106的使用者的各种操作指示。例如,指示受理部150受理检查开始指示。在受理到检查开始指示的情况下,指示受理部150根据计时器128来管理时间,并在各时刻向清洗液供给机构控制部151、发光基质供给机构控制部152及检测部控制部153输出控制开始触发信号。在指示开始检查之后,在经过规定时间后的时刻t1向清洗液供给机构控制部151输出控制开始触发信号,然后在经过规定时间后的时刻t2向发光基质供给机构控制部152输出控制开始触发信号,进而在随后的时刻t3向检测部控制部153输出控制开始触发信号。由此,在最佳时刻执行清洗液6的供给、发光基质4的供给及光检测。通过控制发光基质供给时刻或从发光基质4的供给至测定为止的时间,能够实现更高精度的测定。

[0141] 清洗液供给机构控制部151运行清洗液供给机构107,控制其按压第1按压操作部19。清洗液供给机构控制部151在将被检体及标记结合物质77供给到检查区域A之后且在将发光基质4供给到检查区域A之前运行清洗液供给机构107,以将清洗液6供给到检查区域A。

[0142] 发光基质供给机构控制部152运行发光基质供给机构108,控制其按压第2按压操作部20。发光基质供给机构控制部152在将被检体及标记结合物质77供给到检查区域A之后

运行发光基质供给机构108,以将发光基质4供给到检查区域A。

[0143] 检测部控制部153控制检测部110的动作。检测部控制部153驱动检测部110来检测来自检查区域A的发光。具体而言,获取包括光75和荧光78的波长范围的发射光谱。检测部110将获取到的发射光谱156输出到判定部154。

[0144] 判定部154根据从检测部110获取到的发射光谱156来判定被检体是阳性还是阴性。判定部154根据通过BRET从荧光物质76产生的荧光78的发光强度来判定被检体是阳性还是阴性。进行判定时,不仅可以使用荧光78的发光强度,而且还可以使用通过不伴有BRET的发光蛋白质73与发光基质4的反应产生的光75的发光强度。判定部154将判定结果157输出到显示控制部155。

[0145] 在此,对判定部154中的更具体处理的一例进行说明。在判定部154中,例如从检测部110获取如图5所示的发射光谱a或b作为发射光谱156。判定部154从发射光谱a或b获取作为通过BRET产生的荧光78的发光强度的第1发光强度IF和作为在未发生BRET的情况下发光的光75的发光强度的第2发光强度IB,求出作为第1发光强度IF除以第2发光强度IB而得的值的发光强度比IF/IB。然后,根据该发光强度比IF/IB来判定是阳性还是阴性。例如,若发光强度比IF/IB大于预先设定的阈值,则判定为阳性,若为阈值以下,则判定为阴性。

[0146] 另外,判定部154也可以从发射光谱a或b获取作为如图7所示在阴性时的发射光谱a和阳性时的发射光谱b中发光强度不发生变化的等发光点处的发光强度的第3发光强度Iiso来代替上述第2发光强度IB,求出作为第1发光强度IF除以第3发光强度Iiso而得的值的发光强度比IF/Iiso,判定是阳性还是阴性。例如,若发光强度比IF/Iiso大于预先设定的阈值,则判定为阳性,若为阈值以下,则判定为阴性。

[0147] 显示控制部155控制触摸屏显示器106上的各种信息的显示。例如,显示控制部155将来自判定部154的判定结果157显示在触摸屏显示器106上。

[0148] 接着,作为一例,参考图19所示的流程图对上述结构的作用进行说明。首先,使用者进行将试样液70点滴到试纸盒10上的点滴工序。然后,操作电源开关105,接通检查装置100的电源,启动运行程序145。若启动运行程序145,则如图18所示,检查装置100的CPU142发挥指示受理部150、清洗液供给机构控制部151、发光基质供给机构控制部152、检测部控制部153、判定部154及显示控制部155的功能。

[0149] 使用者打开盖104,经由装填口103将试纸盒10装填到装填部102内(步骤ST100)。然后,使用者关闭盖104。

[0150] 接着,使用者操作触摸屏显示器106,输入检查开始指示。检查开始指示由指示受理部150受理(步骤ST110)。然后,在从检查开始起的各时刻,从指示受理部150向清洗液供给机构控制部151、发光基质供给机构控制部152及检测部控制部153输出控制信号。

[0151] 首先,以受理到指示的时刻为基准,在时刻t1,在清洗液供给机构控制部151的控制下运行清洗液供给机构107,按压第1按压操作部19。由此,第1按压操作部19被按压,如图14所示,液体输送垫32浸渍于清洗液6中,将清洗液6供给到检查用试纸条14。(步骤ST120)。

[0152] 然后,在从时刻t1起经过规定时间后的时刻t2,在发光基质供给机构控制部152的控制下运行发光基质供给机构108,按压第2按压操作部20。由此,第2按压操作部20被按压,如图15所示,发光基质溶液保持部52被下压,通过第2破裂突起61使发光基质溶液保持部52的密封件54破裂。由此,发光基质溶液5从供给口62流出,供给到检查用试纸条14上(步骤

ST130)。

[0153] 接着,在从时刻t2起再经过规定时间后的时刻t3,在检测部控制部153的控制下驱动检测部110,检测包括荧光物质76的荧光的峰值波长及发光蛋白质73的峰值波长的波长范围的发光强度(发射光谱156)。(步骤ST140)。

[0154] 在判定部154中对发射光谱156进行分析,计算发光强度比,判定是阳性还是阴性(步骤ST150)。该判定结果157从判定部154输出到显示控制部155。

[0155] 在显示控制部155的控制下,将表示判定结果157的消息显示在触摸屏显示器106上(步骤ST160)。由此,结束针对一个试纸盒10的免疫层析检查。

[0156] 如上所述,检查装置100具备:装填部102,可装卸地装填试纸盒10;检测部110,检测检查区域A内的来自荧光物质76的发光的强度;及处理器(在此为CPU142),根据从检测部110获取到的发光的强度来判定被检体是阳性还是阴性。

[0157] 根据上述结构的检查装置100,根据通过BRET从荧光物质76发出的荧光78的发光强度来判定是阳性还是阴性,因此能够获得精度高的测定结果。

[0158] 并且,本实施方式的检查装置100具备将发光基质4供给到检查区域A的发光基质供给机构108,处理器(在此为CPU142)构成为在将被检体及标记结合物质77供给到检查区域A之后由发光基质供给机构108将发光基质4供给到检查区域A。即,在被检体及标记结合物质77特异性结合的状态下将发光基质4供给到检查区域A。发光基质4与发光蛋白质73的发光反应通过发光基质4与发光蛋白质73彼此接触而不可逆地进行,发光强度随着时间经过而下降,因此相较于将发光基质4混合到被检体中预先进行混合及保温的情况,可获得抑制检测来自检查区域A的发光时的发光强度的下降的效果。

[0159] 在本实施方式的检查装置100中,检测作为检查区域A内的来自荧光物质76的发光(荧光78)的强度的第1发光强度IF,并检测从发光蛋白质73发光的光75的强度作为第2发光强度IB,根据发光强度比IF/IB,能够判定是阳性还是阴性。通过使用发光强度比,相较于仅使用第1发光强度IF来进行判定的情况,能够获得高精度的判定结果。

[0160] 并且,在本实施方式的检查装置100中,检测检查区域A内的来自荧光物质76的发光(荧光78)的强度作为第1发光强度IF,并检测存在于来自荧光物质76的发光的峰值波长和通过发光基质4与发光蛋白质73的反应产生的发光的峰值波长之间的波长范围的等发光点处的发光的强度作为第3发光强度Iis o,根据发光强度比IF/Iiso,能够判定是阳性还是阴性。通过使用发光强度比,相较于仅使用第1发光强度IF来进行判定的情况,能够获得高精度的判定结果。

[0161] 在上述实施方式中,作为执行各种处理的处理部(Processing Unit)的硬件结构,可以使用以下所示的各种处理器(Processor)。各种处理器包括通过执行软件(运行程序145)来发挥各种处理部的功能的通用处理器即CPU142,除此之外,还包括FPGA(Field Programmable Gate Array(现场可编程门阵列))等在制造后可变更电路结构的处理器即可编程逻辑器件(Programmable Logic Device:PLD)和/或ASIC(Application Specific Integrated Circuit(专用集成电路))等具有为了执行特定的处理而专门设计的电路结构的处理器即专用电路等。

[0162] 一个处理部可以由这些各种处理器中的一个构成,也可以由相同种类或不同种类的两个以上处理器的组合(例如,多个FPGA的组合和/或CPU与FPGA的组合)构成。并且,也可

以由一个处理器构成多个处理部。

[0163] 作为由一个处理器构成多个处理部的例子,首先,如以客户端及服务器等计算机为代表有如下方式:由一个以上CPU和软件的组合构成一个处理器,并由该处理器发挥多个处理部的功能。其次,如以片上系统(System On Chip:SoC)等为代表有如下方式:使用由一个IC(Integrated Circuit(集成电路))芯片实现包括多个处理部的系统整体的功能的处理器。如此,各种处理部使用一个以上上述各种处理器而构成为硬件结构。

[0164] 进而,作为这些各种处理器的硬件结构,更具体而言,可以使用组合半导体元件等电路元件而成的电路(Circuitry)。

[0165] 另外,在上述中,对使用检查装置100来判定被检体是阳性还是阴性的情况进行了说明。然而,如上所述,从检查区域A发出的颜色根据是阴性还是阳性而发生变化,因此也可以不使用检查装置100而由使用者视觉辨认来自检查区域A的发光来判定是阳性还是阴性。

[0166] 实施例

[0167] 以下,对本发明的技术的实施例及比较例进行说明。将被检物质设为流感A型抗原。实施例1～3的检查用试纸条设为使用夹层法且利用BRET的化学发光免疫层析检查用试纸条。实施例2及实施例3的检查用试纸条相同。

[0168] ＜实施例1＞

[0169] (1)检查用试纸条

[0170] (载体)

[0171] 准备了60mm×300mm的多孔性载体(以下,称为载体)。作为多孔性载体,使用了硝基纤维素膜(带塑料衬里,HiFlow Plus HF135(毛细管流速＝135秒/cm),Millipore公司制)。在距该载体的60mm的长度方向上的一端(以下,称为下游端)15mm的位置沿着300mm的长度方向形成了线状的检查区域。

[0172] (检查区域的形成)

[0173] 通过将捕获用结合物质固定到检查区域,形成了检查区域。

[0174] 作为发光蛋白质,使用了Luciferase(NanoLuc(注册商标):Promega公司制,峰值波长460nm)。作为捕获用结合物质,使用了抗流感A型单克隆抗体(Anti-Influenza ASPTN-5 7307,Medix Biochemica公司制)。制备出含有由用Luciferase标记的抗流感A型单克隆抗体构成的捕获用结合物质的溶液1.5mg/mL。将含有制备出的捕获用结合物质的溶液涂布到检查区域上之后,对载体进行了30分钟干燥。接着,将干燥的载体浸渍于放入含有粘连液(0.5质量%酪蛋白(源自乳,型号030-01505,FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)的50mmol/L的硼酸缓冲液(pH8.5))500mL的槽中,并在该状态下静置了30分钟。然后,取出载体,将载体浸渍于在另一个槽中准备的清洗稳定化液(含有0.5质量%蔗糖及0.05质量%胆酸钠的50mmol/L Tris-HCl(pH7.5)缓冲液)500mL中,并在该状态下静置了30分钟。然后,从液体中取出载体,在25℃的环境下进行了24小时干燥。

[0175] 通过以上工序将捕获抗体固定到检查区域,形成了检查区域。

[0176] (标记保持垫)

[0177] 制作出保持标记结合物质的标记保持垫。

[0178] 准备了切割成5mm×300mm的玻璃纤维垫(GlassFiber Conjugate Pad,Millipore公司制)。

[0179] 作为荧光物质,使用了绿色荧光蛋白质mNeogreen(AlleleBiotechnology公司,峰值波长为517nm),作为标记结合物质(在此为标记抗体),使用了流感A型抗体。用水将流感A型抗体-荧光物质复合物稀释成Tris-HCl缓冲液(pH8.2)的浓度成为20mmol/L,PEG(Mw.20000)的浓度成为0.05质量%,蔗糖的浓度成为5质量%,并且光路长度10mm时的吸光度在506nm处成为0.8,作为抗流感A型片段化抗体-荧光物质复合物涂布液。以针对每个上述垫0.1mL的量均匀地涂布该涂布液,进行了24小时减压干燥。由此,得到保持用荧光物质标记的标记结合物质(在此为标记抗体)的标记保持垫。

[0180] (背面粘结片)

[0181] 准备了60mm×300nm的粘结片(NIPPN TechnoCluster,Inc.制)作为背面粘结片。

[0182] (液体输送垫)

[0183] 将切割成25mm×300mm的玻璃纤维垫(Glass Fiber Conjugate Pad,Milli pore公司制))作为液体输送垫。

[0184] (吸收垫)

[0185] 将切割成长12mm宽10mm的玻璃纤维垫(玻璃滤纸,ADVANTEC CO.,LTD.制)用作吸收垫。

[0186] 使用以上零件,按照以下顺序制作出检查用试纸条。

[0187] 将形成有检查区域的载体粘贴到背面粘结片上。接着,在距载体的60mm的长度方向上的下游端26mm的位置固定了宽3mm的双面胶带(Nitto Denko Corporation)。然后,以双面胶带的下游端与标记保持垫的下游端重叠的方式将标记保持垫固定到载体上。以在载体的与上述下游端相反的上游侧将液体输送垫与载体重叠7mm的方式粘贴了液体输送垫。用闸刀式切割机(CM4000,NIPPN TechnoCluster,Inc.制)与60mm的长度方向平行地将如此制作出的片状部件切割成宽度5mm。

[0188] 由此,得到宽5mm长60mm的60个试纸条。通过在一个试纸条的下游端重叠配置一个吸收垫,作为检查用试纸条。

[0189] (2)展开液

[0190] 准备了以下展开液。

[0191] (基准展开液)

[0192] 制备出含有0.05质量%酪蛋白、0.5质量%Tween(注册商标)40及200mmol/L Tricine缓冲液(pH8.5)的基准展开液。

[0193] (展开液-1)

[0194] 以成为相当于“FUJIDRI-CHEM IMMUNO AG试纸盒FluAB”的附件中记载的流感A病毒抗原的最小检测灵敏度(检测极限)的2倍的抗原量的方式,将模拟阳性被检体(BD Flu Examine Control A+B-(Becton,Dickinson and Company制))混合到基准展开液中,得到展开液-1。

[0195] (展开液-2)

[0196] 以模拟阳性被检体的量(抗原量)成为展开液-1的300倍的方式,将模拟阳性被检体混合到基准试样液中,得到展开液-2。

[0197] (3)发光基质溶液

[0198] 作为发光基质溶液,使用了含有20×10^{-6}M的发光基质的溶液(Furimazine,

Promega公司)。一次检查中使用的发光基质溶液设为100μL。

[0199] (免疫层析检查顺序)

[0200] 1)将试样液点滴到标记保持垫上。

[0201] 2)在点滴试样液后经过10分钟之后,将发光基质溶液供给到多孔性载体。

[0202] 3)在从供给发光基质溶液起20秒后用分光光度计测定来自检查区域的发光。计算来自荧光物质的荧光(峰值波长517nm)的强度和通过发光蛋白质与发光基质的反应产生的发光(峰值波长460nm)的强度的发光强度比(517nm/460nm)。

[0203] 实施了将不含抗原的基准展开液用作被检体液的基准检查、将抗原量少的低浓度抗原的展开液-1用作被检体液的检查1及将抗原量多的高浓度抗原的展开液-2用作被检体液的检查2这三种模式的检查。

[0204] 将使用基准展开液、展开液-1及展开液-2的上述检查分别进行了10次。检查用试纸条的制作及展开液的制备在每次测定时进行。

[0205] <实施例2>

[0206] 在实施例1的标记保持垫的制作中,如下设定了标记抗体的制作方法。

[0207] 作为抗体,使用了抗流感A型单克隆抗体,这一点与实施例1相同。作为荧光物质,使用了荧光抗体标记试剂盒(Thermo-Fisher)的荧光色素(峰值波长525nm)。按照荧光抗体标记试剂盒的顺序用荧光色素标记抗流感A型单克隆抗体,得到用荧光物质标记的标记结合物质(在此为标记抗体)。除此之外,以与实施例1相同的方式制作出实施例2的检查用试纸条。

[0208] 展开液、发光基质溶液及检查顺序与实施例1相同。

[0209] <实施例3>

[0210] 检查用试纸条、展开液及发光基质溶液使用了与实施例1相同的物体。但是,在实施例3中的实施例1的检查顺序中,并入了使用清洗液的清洗工序。在上述检查顺序的1)中点滴被检体液之后,将液体输送垫浸渍于清洗液中,输送了10分钟清洗液。通过该工序,清洗了非特异性吸附的标记抗体。然后,实施了上述检查顺序的2)及3)。将清洗液供给到液体输送垫上,并输送10分钟清洗液。将液体输送垫浸渍于容纳200μL的清洗液的盆中,通过毛细力在载体中展开清洗液。通过该工序,清洗未特异性吸附的(非特异性吸附的)标记抗体之后,进行2)的发光基质溶液的供给及3)的发光强度测定。

[0211] 如上所述,变更了检查顺序,除此之外,进行了与实施例1相同的检查及评价。

[0212] 比较例1及比较例2的检查用试纸条设为使用竞争法且利用BRET的化学发光免疫层析法用试纸条。

[0213] <比较例1>(标记保持垫的制作)

[0214] 制作出保持标记假抗原的标记保持垫。

[0215] (标记假抗原)

[0216] 作为标记假抗原,使用了用荧光物质标记的抗流感A型假抗原。

[0217] 准备了切割成5mm×300mm的玻璃纤维垫(GlassFiber Conjugate Pad,Millipore公司制)。

[0218] 作为荧光物质,使用了绿色荧光蛋白质mNeogreen(峰值波长517nm),作为标记结合物质(在此为标记假抗原),使用了流感A型假抗原。

[0219] 使用20mM的Tris-HCl缓冲液(pH8.2)、5质量%蔗糖及水来稀释用荧光物质标记的抗流感A型假抗原,以光路长度10mm时的吸光度在506nm处成为0.8的方式制备出涂布液。以针对每个上述垫0.1mL的量均匀地涂布该涂布液,得到保持用荧光物质标记的标记假抗原的标记保持垫。除此之外,以与实施例1相同的方式制作出比较例1的检查用试纸条。

[0220] <比较例2>

[0221] 比较例2的检查用试纸条设为未使用BRET的化学发光免疫层析检查用试纸条。

[0222] (1)检查用试纸条

[0223] (检查区域的形成)

[0224] 作为固定到检查区域的捕获用结合物质,使用了被标记发光蛋白质的抗流感A型抗原(标记假抗原)。作为发光蛋白质,使用了Luciferase(NanoLuc(注册商标):Promega公司制,发光波长460nm)。制备出含有由用Lucifera se标记的抗流感A型抗原构成的捕获用结合物质的溶液1.5mg/mL。除此之外,以与实施例1相同的方式在载体上形成了检查区域。

[0225] (标记保持垫)

[0226] 制作出保持标记结合物质(在此为标记抗体)的标记保持垫。

[0227] 准备了切割成5mm×300mm的玻璃纤维垫(GlassFiber Conjugate Pad,Millipore公司制)。

[0228] 作为荧光物质,使用了绿色荧光蛋白质mNeogreen(AlleleBiotechnology公司,峰值波长517nm),作为标记抗体,使用了抗流感A型单克隆抗体(Anti-Influenza ASPTN-57307,Medix Biochemica公司制)。

[0229] 使用20mM Tris-HCl缓冲液(pH8.2)、5质量%蔗糖及水对由用荧光蛋白质标记的抗流感A型单克隆抗体构成的标记抗体的溶液进行稀释,制备成光路长度10mm时的吸光度在506nm处成为0.8。以针对每个上述玻璃纤维垫0.1mL的量均匀地涂布该涂布液,得到保持用荧光物质标记的标记抗体的保持垫。

[0230] 除上述以外,以与实施例1相同的方式制作出比较例2的检查用试纸条。在比较例2的检查用试纸条的检查区域中固定有标记假抗原,未与作为被检物质的抗原结合的标记抗体被标记假抗原捕获。比较例2中,作为被检物质的抗原和标记假抗原与标记抗体竞争性结合。

[0231] 展开液、发光基质溶液及检查顺序与实施例1相同。

[0232] (评价)

[0233] 如下对各实施例及比较例进行了评价。

[0234] 关于基准检查,计算出测定10次而得的发光强度比的平均值。即,计算出通过使用不含抗原的展开液的测定得到的发光强度比R0的平均值R0av。将该平均值R0av作为阴性基准。关于在使用含有低浓度的抗原的展开液-1的检查中得到的发光强度比R1及在使用含有高浓度的抗原的展开液-2的检查中测得的发光强度比R2,以各10次检查中相对于作为阴性基准的R0av存在显著差异的次数如下进行评价,并将结果示于表1。

[0235] A:10次

[0236] B:8～9次

[0237] C:6～7次

[0238] D:5次以下

[0239] [表1]

[0240]

	抗原浓度(高)	抗原浓度(低)
实施例1	A	B
实施例2	A	B
实施例3	A	A
比较例1	A	D
比较例2	A	D

[0241] 如表1所示,当抗原浓度高时,包括比较例在内,在相对于抗原浓度0的所有检查中相对于基准检查的平均值确认到显著差异。另一方面,当抗原浓度低时,在使用适用于实施例1～3的基于夹层法的检查的检查用试纸条的情况下,相较于使用适用于比较例1及2的基于竞争法的检查的检查用试纸条的情况,显然能够再现性良好地进行抗原的检测。并且,由实施例1、3的比较可知,通过在检查顺序中包括清洗工序,即使在抗原浓度低的情况下,也能够可靠地进行被检体的检测。

[0242] 2021年9月29日申请的日本专利申请2021-159997号的发明的全部内容通过参考援用于本说明书中。

[0243] 本说明书中记载的所有文献、专利申请及技术标准可与具体且分别记载通过参考援用各文献、专利申请及技术标准的情况相同程度地通过参考援用于本说明书中。

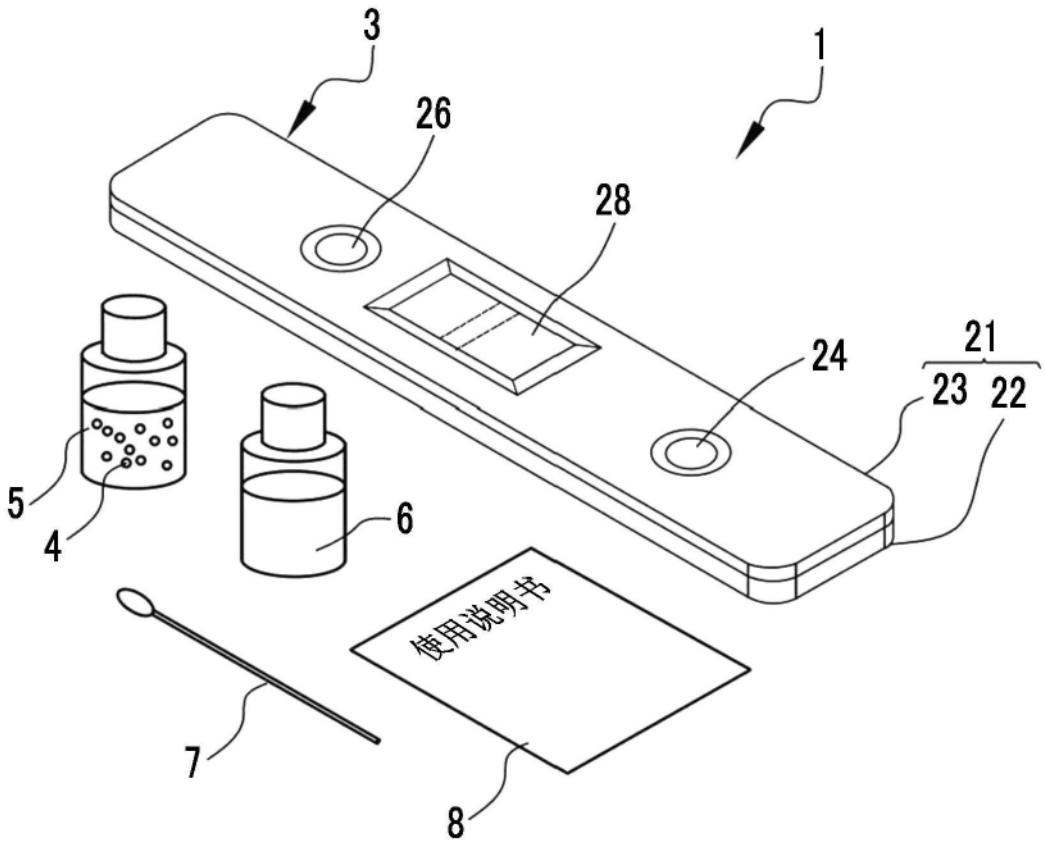


图1

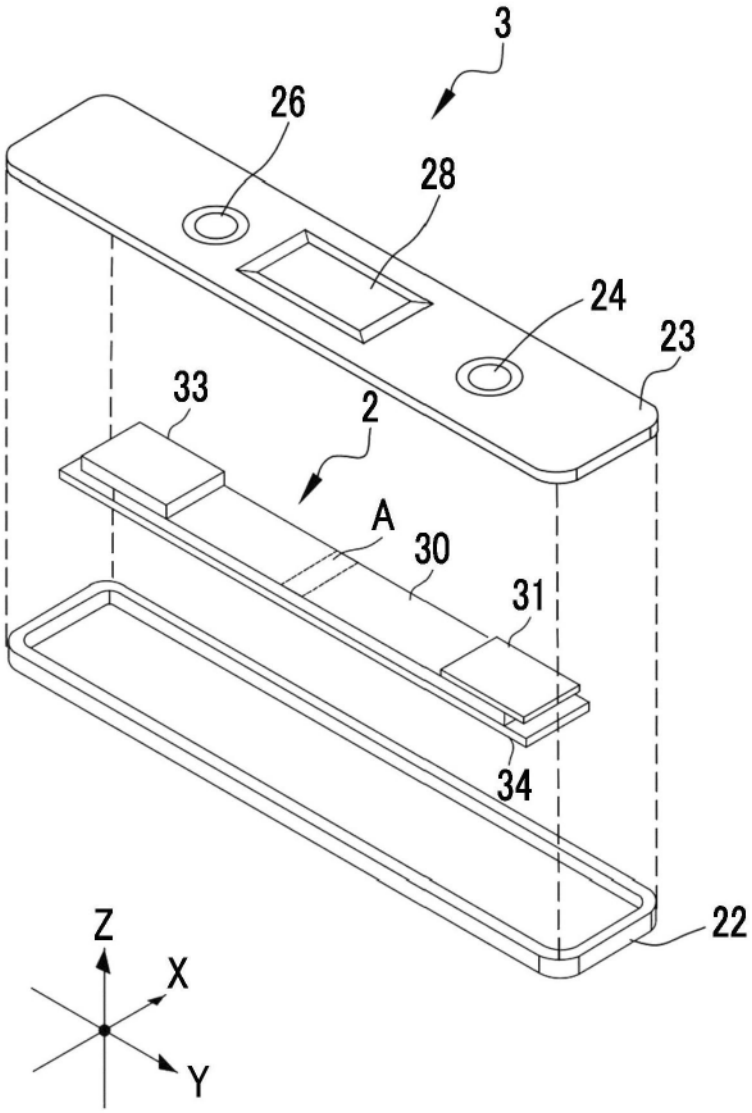


图2

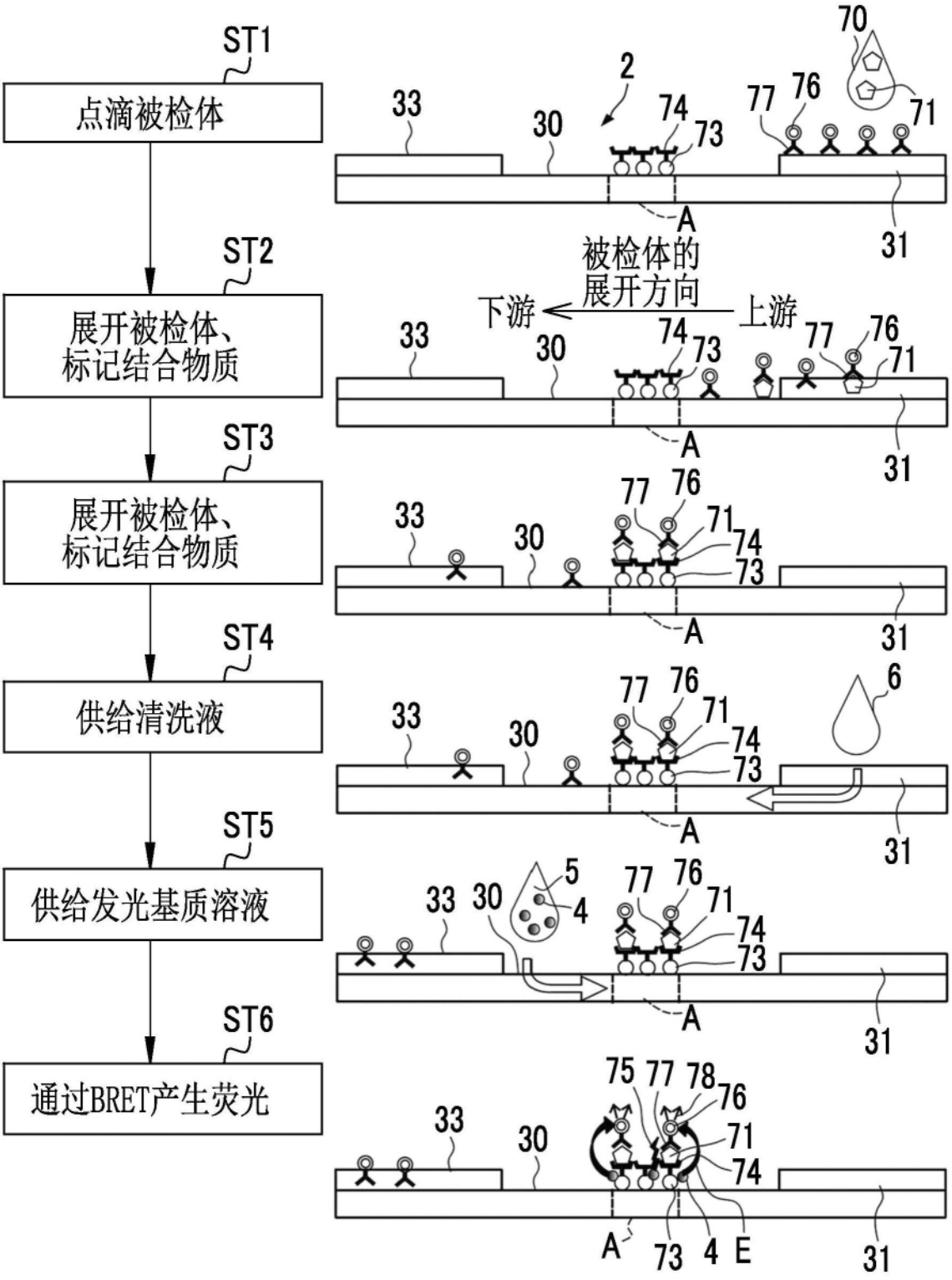

ST1
点滴被检体
ST2
展开被检体、
标记结合物质
ST3
展开被检体、
标记结合物质
ST4
供给清洗液
ST5
供给发光基质溶液
ST6
通过BRET产生荧光
被检体的
展开方向
下游
上游
33
30
2
74
73
77
76
71
70
A
31
6
5
4
75
78
E

图3

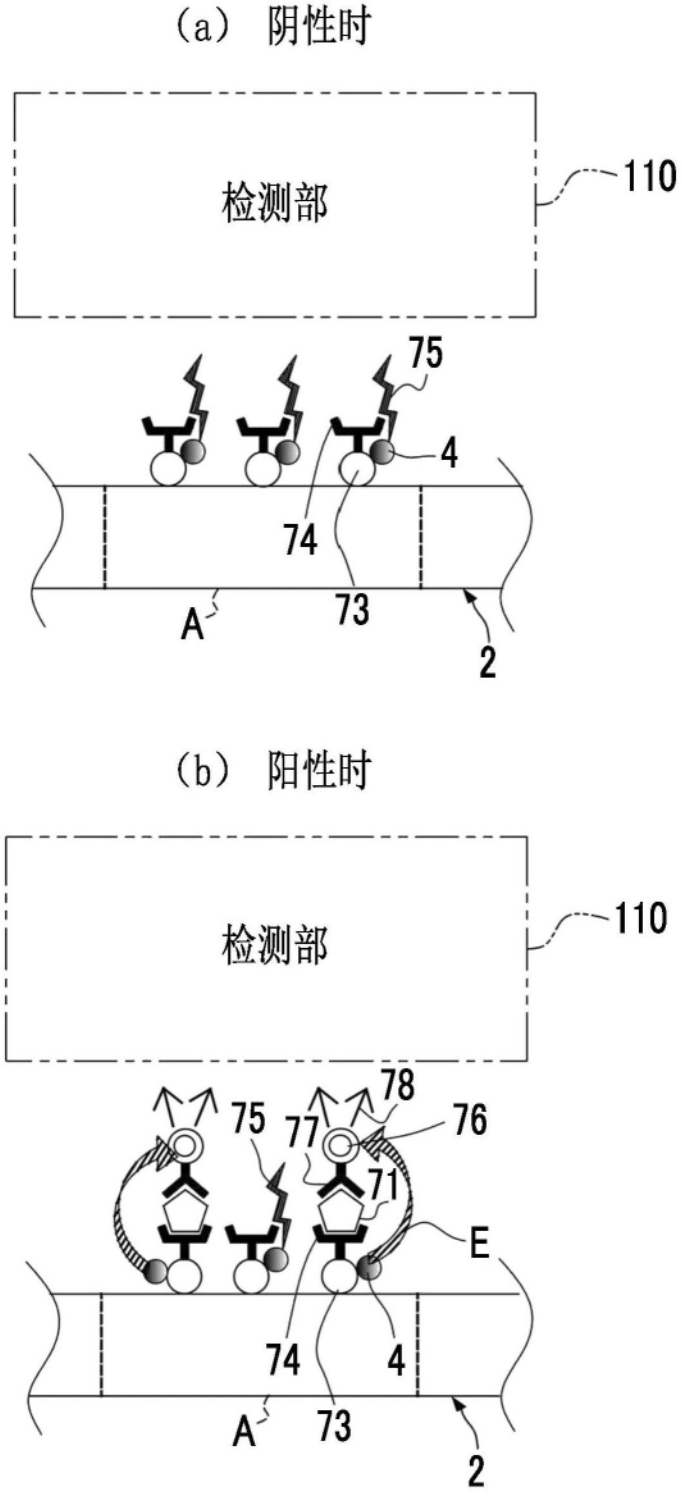


图4

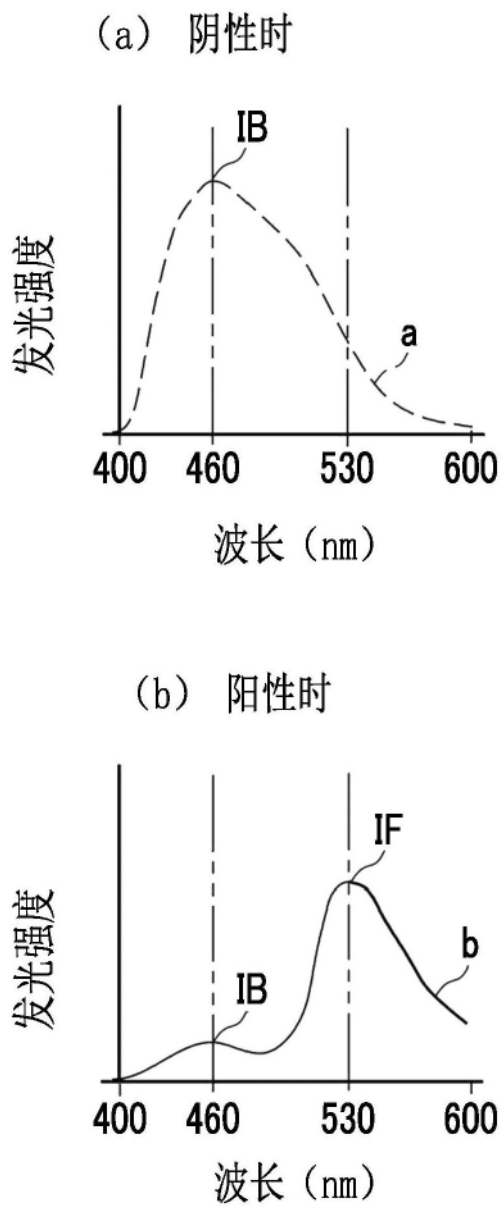

(a) 阴性时
IB
a
发光强度
400
460
530
600
波长（nm）
(b) 阳性时
IF
IB
b
发光强度
400
460
530
600
波长（nm）

图5

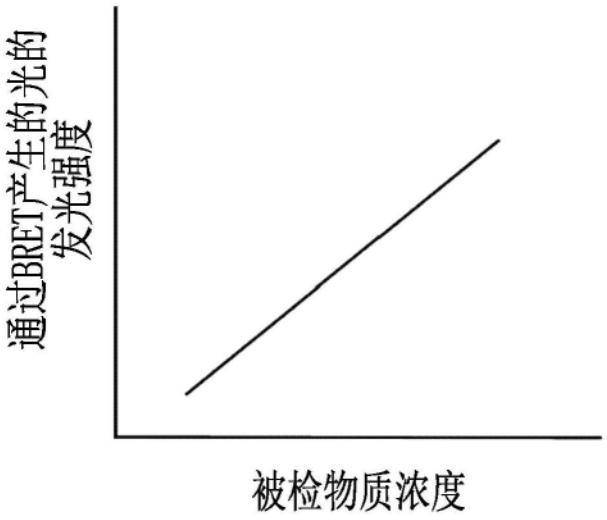


图6

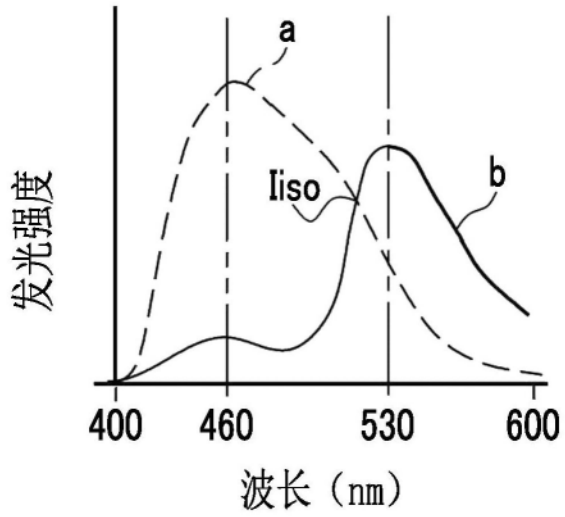
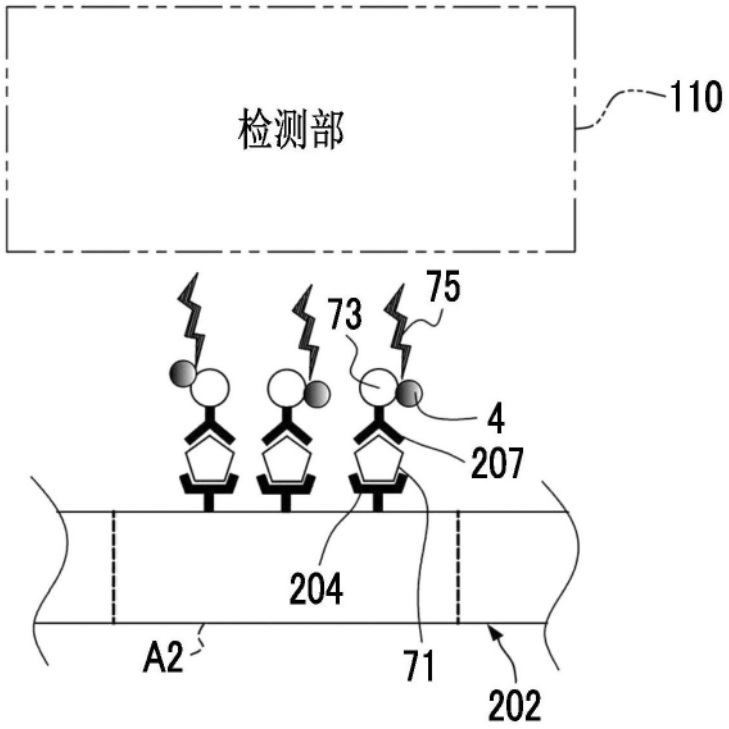
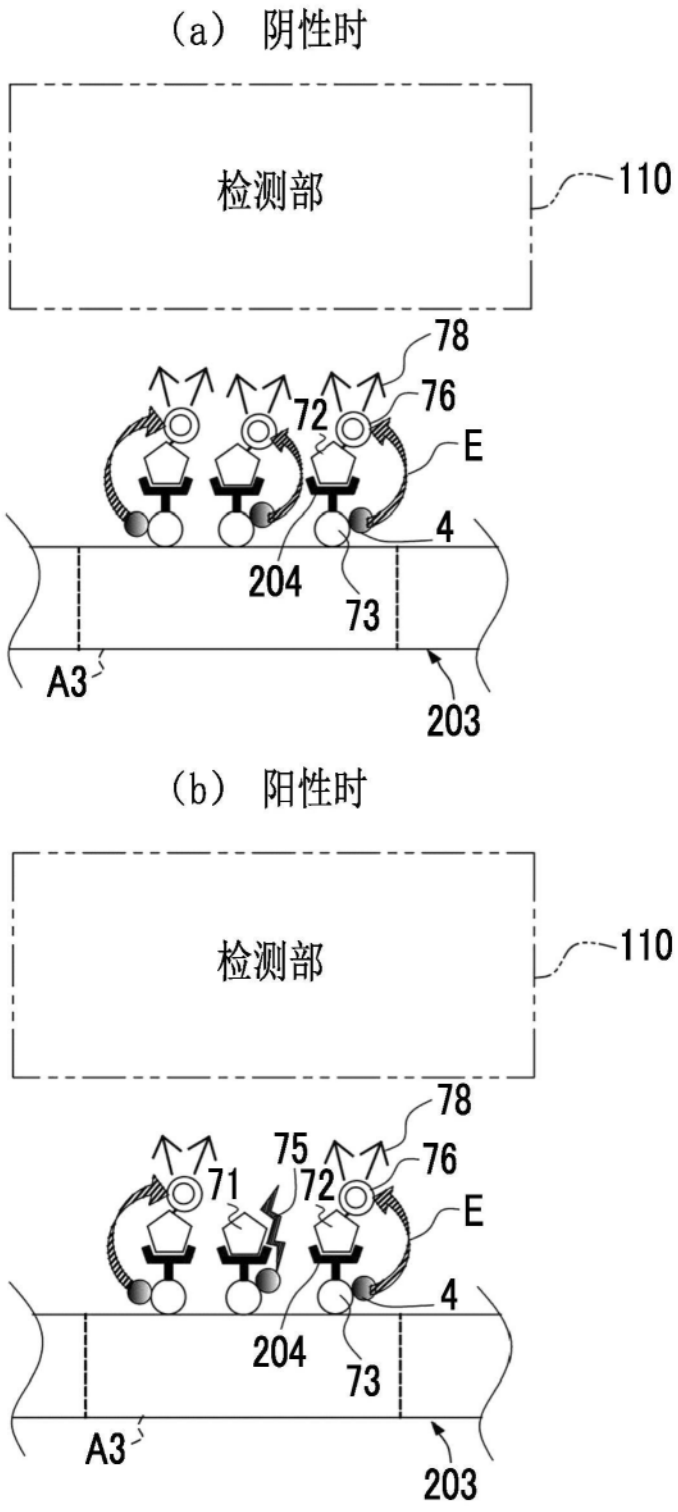


图7



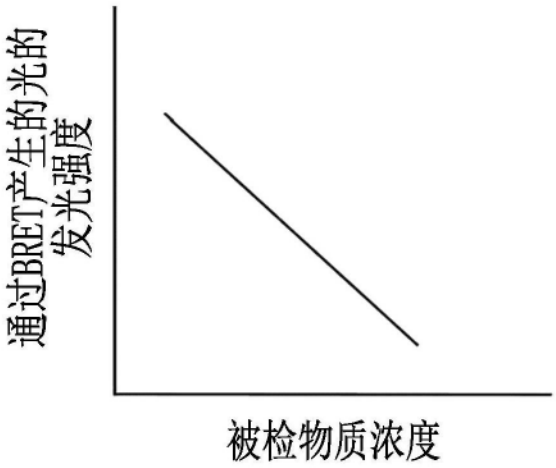
[以往技术1]

图8


(a) 阴性时
检测部
110
78
76
72
E
4
204
73
A3
203
(b) 阳性时
检测部
110
78
75
76
71
72
E
4
204
73
A3
203

[以往技术2]

图9



[以往技术2]

图10

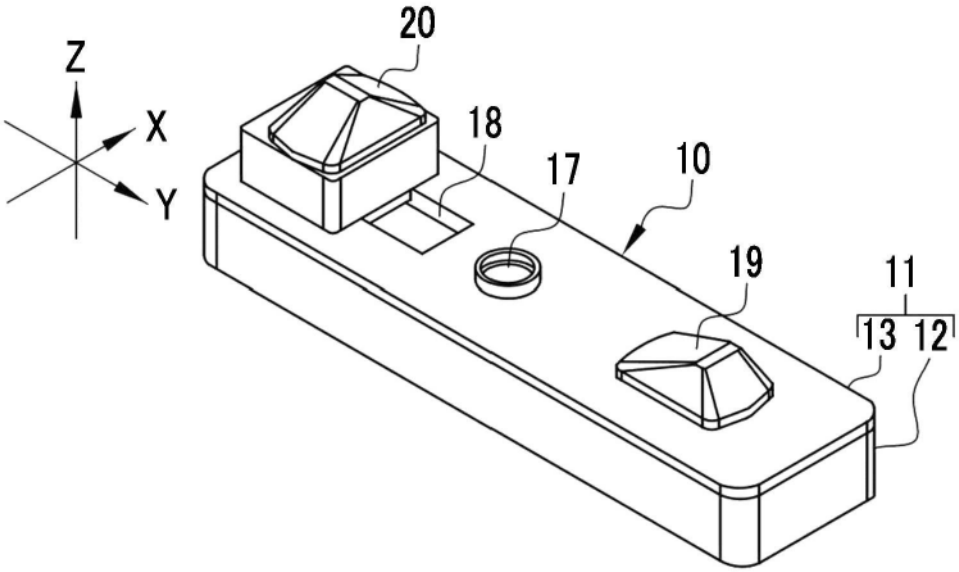


图11

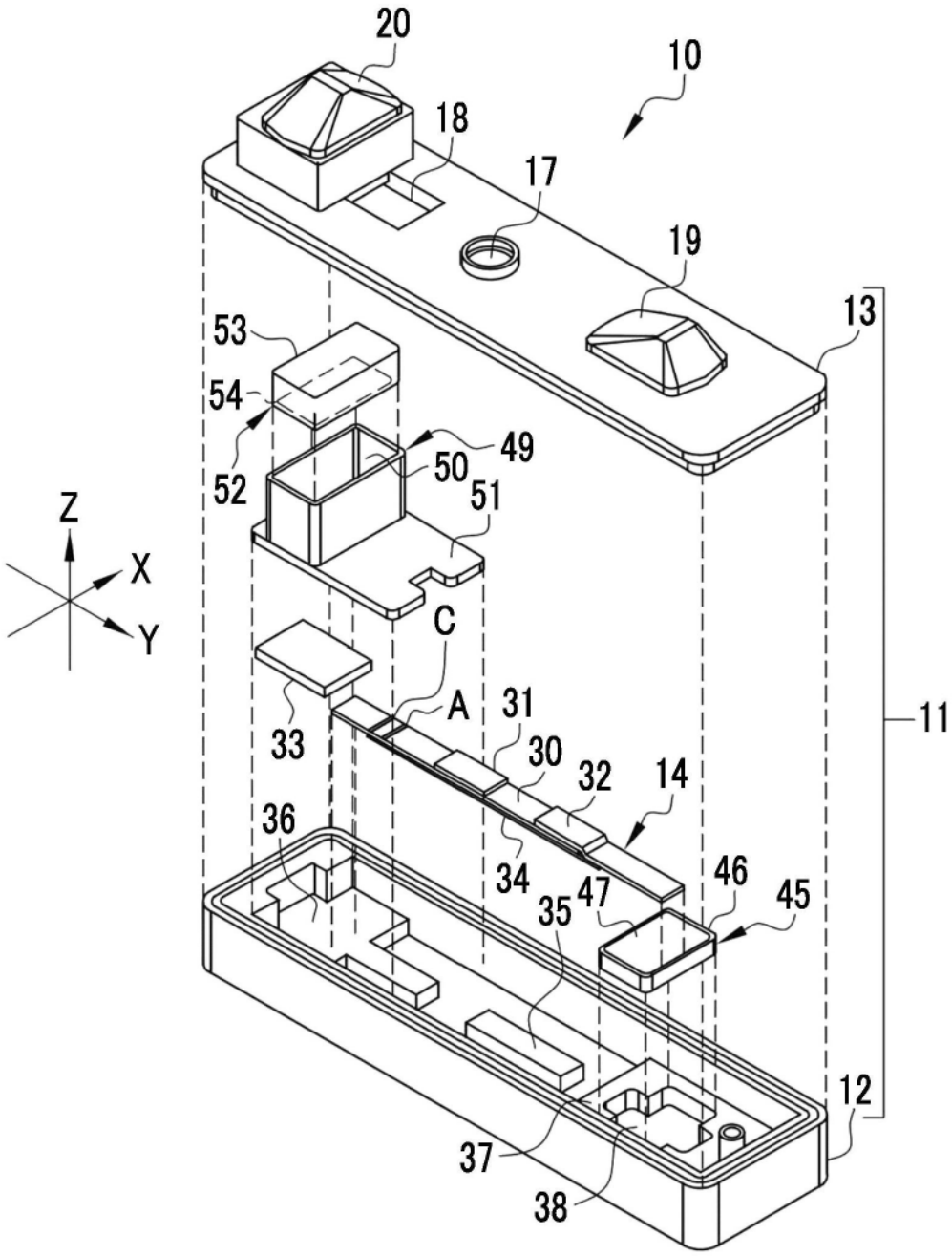

20
10
18
17
19
13
53
54
52
49
50
51
Z
X
Y
C
A
31
33
30
32
14
11
36
34
47
46
45
35
12
37
38

图12

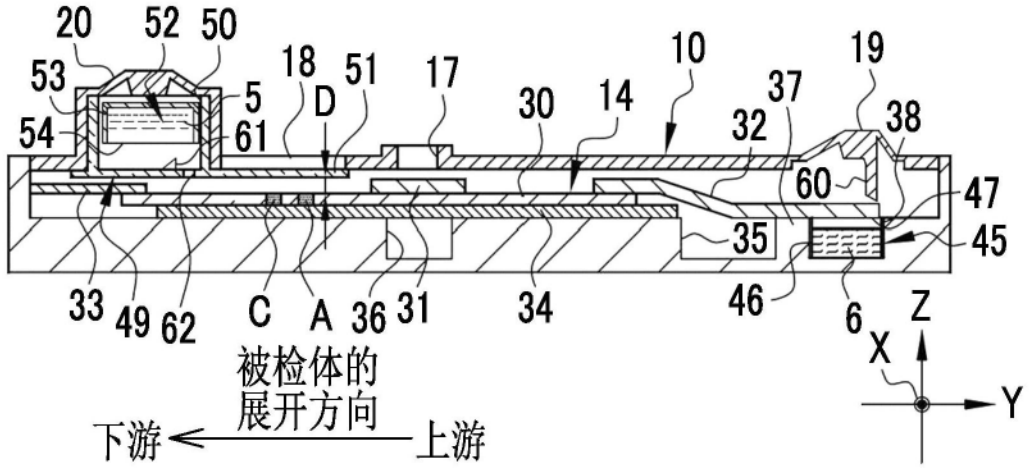

20
52
50
53
18
51
17
10
19
5
D
30
14
37
54
61
32
38
60
47
35
45
33
49
62
C
A
36
31
34
46
6
Z
X
Y
被检体的
展开方向
下游
上游

图13

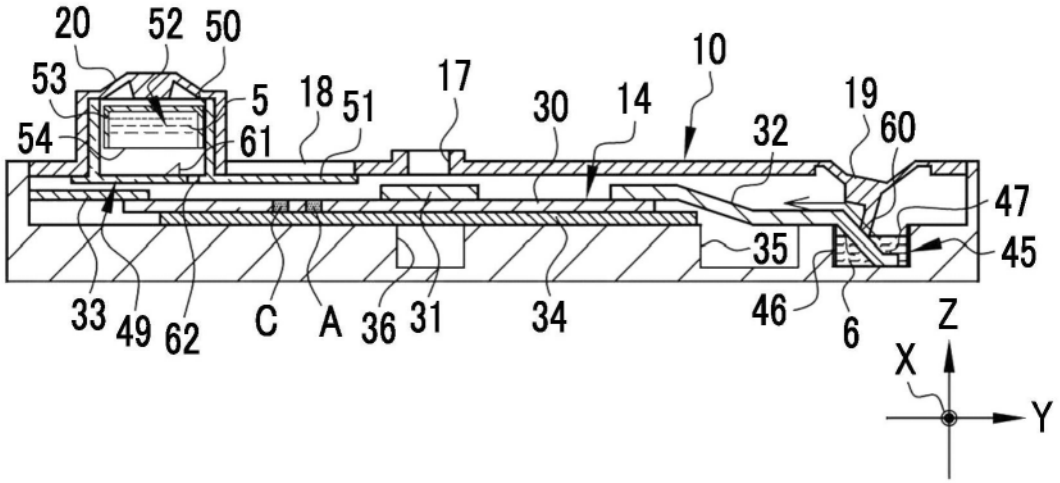

20
52
50
53
5
18
51
17
30
14
10
19
60
54
61
32
47
35
45
33
49
62
C
A
36
31
34
46
6
Z
X
Y

图14

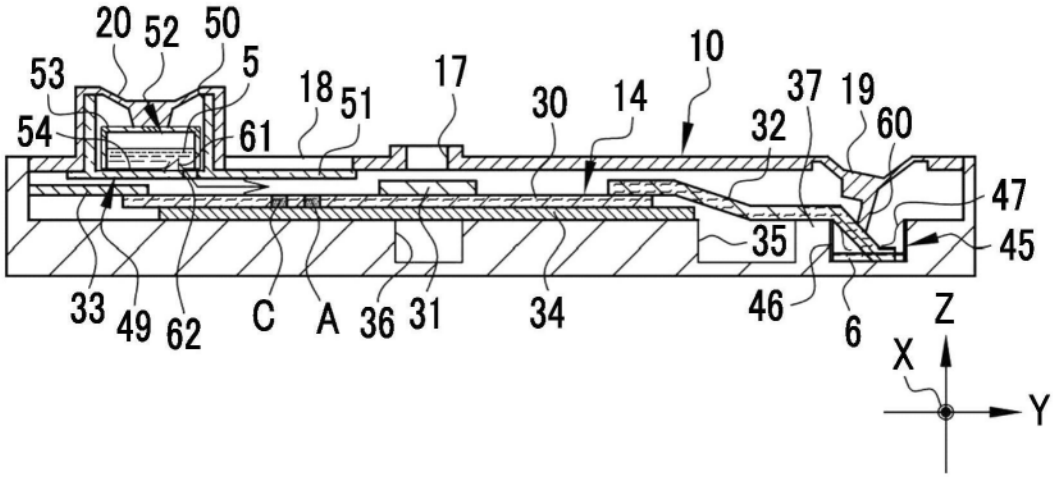

20
52
50
5
53
54
61
18
51
17
30
14
10
37
19
60
32
47
35
45
33
49
62
C
A
36
31
34
46
6
Z
X
Y

图15

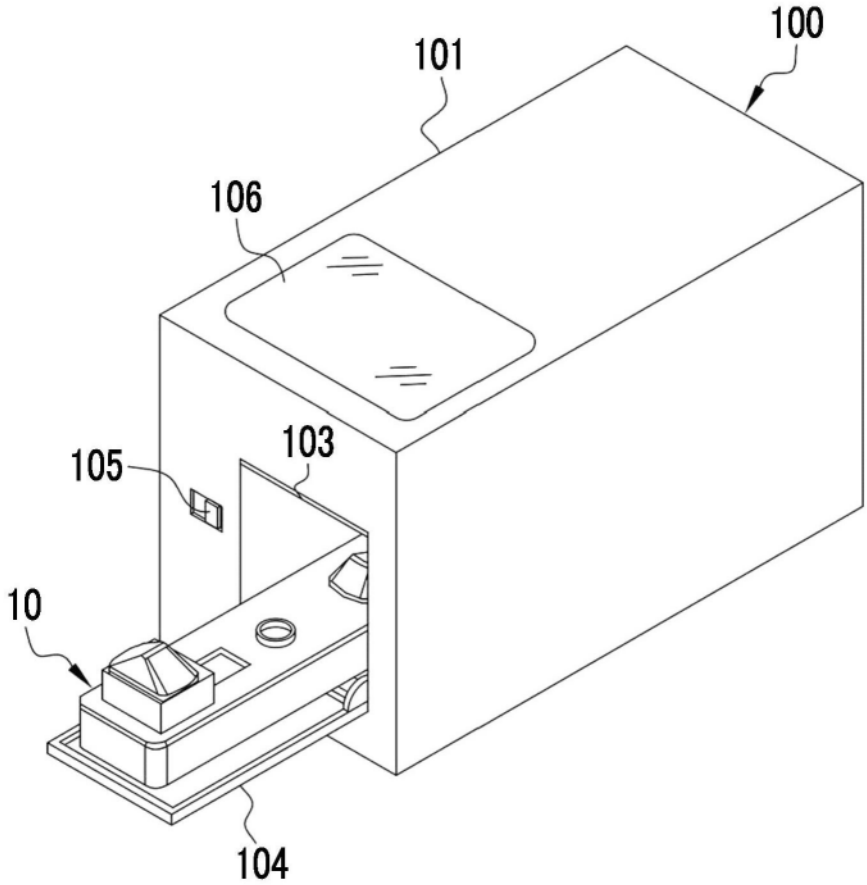

100
101
106
105
103
10
104

图16

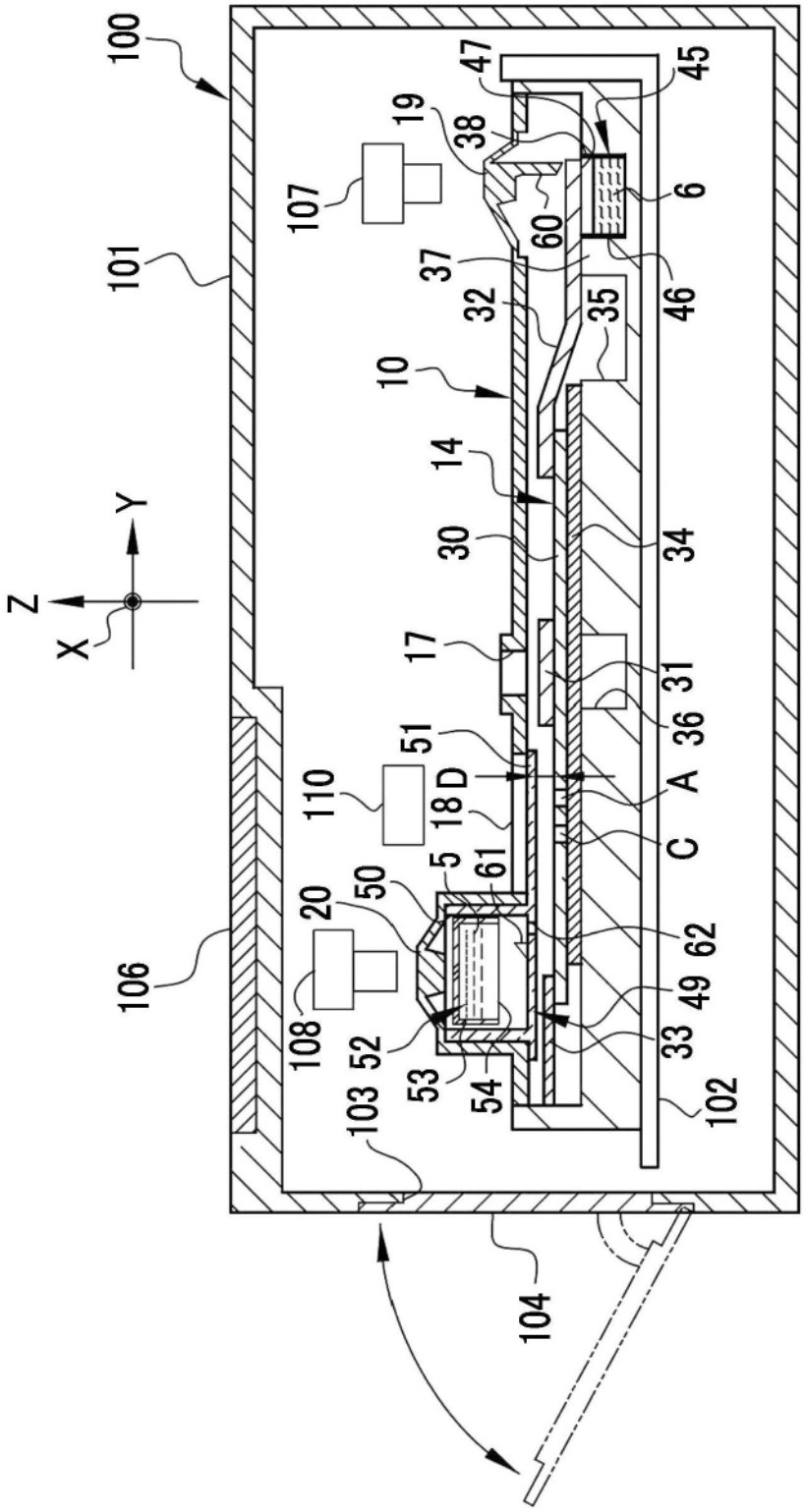

100
101
106
107
110
104
Y
Z
X
47
45
19
38
6
60
37
46
32
35
10
14
30
34
17
31
36
51
D
A
18
C
5
61
20
50
62
49
108
52
33
53
54
103
102

图17

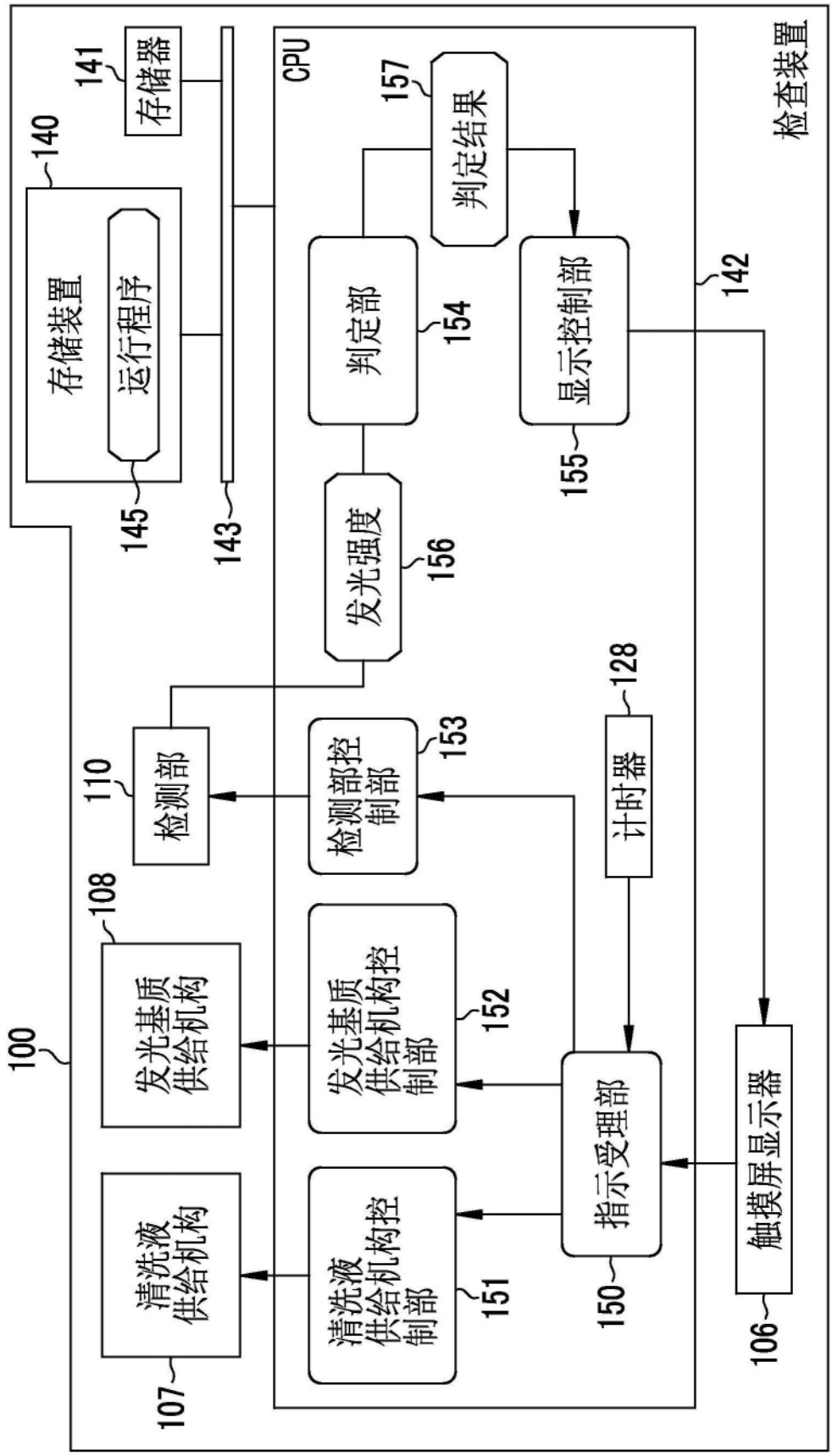

检查装置
CPU
存储装置
运行程序
存储器
判定结果
判定部
显示控制部
发光强度
检测部
检测部控制部
计时器
发光基质供给机构
发光基质供给机构控制部
清洗液供给机构
清洗液供给机构控制部
指示受理部
触摸屏显示器
100
140
141
142
143
145
154
155
156
157
110
153
128
108
152
107
151
150
106

图18

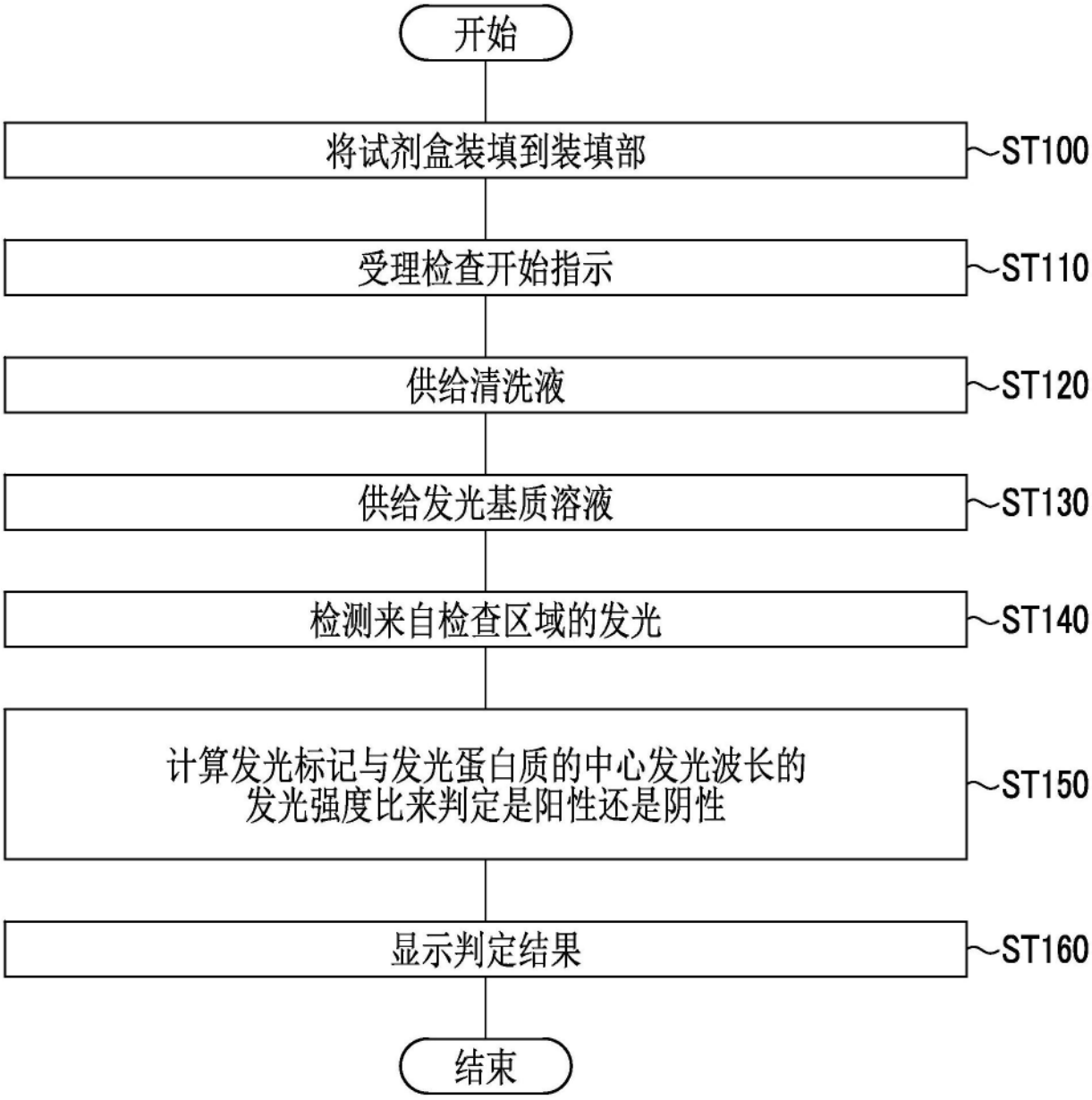

开始
将试剂盒装填到装填部
ST100
受理检查开始指示
ST110
供给清洗液
ST120
供给发光基质溶液
ST130
检测来自检查区域的发光
ST140
计算发光标记与发光蛋白质的中心发光波长的
发光强度比来判定是阳性还是阴性
ST150
显示判定结果
ST160
结束

图19