



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0032057

(51)⁷ G01N 33/543

(13) B

(21) 1-2017-05213

(22) 20/05/2016

(86) PCT/JP2016/064961 20/05/2016

(87) WO 2016/186188 24/11/2016

(30) 2015-103810 21/05/2015 JP

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/05/2018 362A

(73) Denka Company Limited (JP)

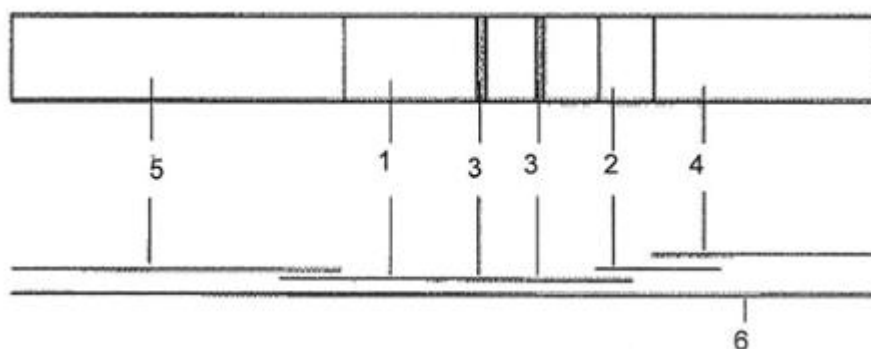
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038338, Japan

(72) KOHIYAMA, Risa (JP); ISHIKAWA, Osamu (JP); SHINOHARA, Yuki (JP);
MIYAZAWA, Takashi (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) QUE THỬ MIỄN DỊCH SẮC KÝ VÀ PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ MIỄN DỊCH SỬ DỤNG QUE THỬ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến que thử miễn dịch sắc ký mà làm giảm ảnh hưởng của chất tác động trong phương pháp sắc ký miễn dịch, có mặt trong mẫu thử, vì vậy cho phép xác định một cách chính xác và rõ ràng chất thử trong mẫu thử bất kể lượng mẫu thử được cung cấp cho thử nghiệm, và đề xuất phương pháp sắc ký miễn dịch sử dụng que thử miễn dịch sắc ký này. Que thử miễn dịch sắc ký bao gồm, theo thứ tự từ dưới lên, vùng nhận mẫu, vùng chất được đánh dấu, vùng phát hiện và dải hấp thụ, trong đó (các) polyme mà trong đó (các) monome vòng kỵ nước có (các) nhóm chức ion được trùng hợp được thấm lên (các) vùng nằm phía trước của vùng chất được đánh dấu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến que thử miễn dịch sắc ký mà làm giảm ảnh hưởng do các chất tác động có trong mẫu thử gây ra, và phương pháp sắc ký miễn dịch sử dụng que thử này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các thử nghiệm lâm sàng, có nhiều thử nghiệm miễn dịch trong đó mẫu thử là mẫu sinh học, và đã biết rằng các chất tác động có mặt trong mẫu sinh học này, ảnh hưởng đến phản ứng giữa phối tử gắn kết với chất thử. Để làm giảm ảnh hưởng của các chất tác động gây ra, việc sử dụng chất hoạt động bề mặt ion có trọng lượng phân tử từ 1000 đến 100000 (Tài liệu sáng chế 1) đã được biết đến.

Ảnh hưởng do các chất tác động gây ra có thể được ghi nhận dưới dạng giả âm hoặc giả dương trong phép chẩn đoán nhanh sử dụng sắc ký miễn dịch làm gốc. Nhiều phép chẩn đoán nhanh sử dụng sắc ký miễn dịch làm gốc được sử dụng rộng rãi làm phương tiện để phát hiện nhanh chóng và đơn giản các bệnh lây nhiễm virus hoặc vi khuẩn, và xác định hướng điều trị. Hiện tượng giả dương hoặc giả âm nêu trên xuất hiện trong chẩn đoán nhanh sử dụng sắc ký miễn dịch làm gốc có thể dẫn tới chọn sai phương pháp điều trị, làm chậm thời gian cho hiệu quả của việc điều trị, và thậm chí có thể dẫn đến tử vong.

Đặc biệt, các giả âm ngăn cản việc chẩn đoán và đưa ra liệu pháp điều trị chính xác, do đó chúng được xem là vấn đề nghiêm trọng. Để hạn chế việc xuất hiện hiện

tượng giả dương và giả âm, một phương pháp đã được nêu ra là xử lý mẫu thử được xử lý bằng chất lỏng xử lý mẫu thử chứa hợp chất có hai hoặc nhiều nhóm sulfat (Tài liệu sáng chế 2).

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP 2005-241415 A

Tài liệu sáng chế 2: JP 2014-149189 A

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Sáng chế đề xuất que thử miễn dịch sắc ký mà làm giảm các ảnh hưởng do các chất tác động gây ra trong phương pháp sắc ký miễn dịch, có trong mẫu thử, theo đó cho phép xác định một cách chính xác và rõ ràng chất thử có trong mẫu thử bất kể lượng mẫu thử được cung cấp cho thử nghiệm, và đề xuất phương pháp sắc ký miễn dịch sử dụng que thử miễn dịch sắc ký này.

Phương tiện giải quyết các vấn đề

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu sâu để phát hiện ra rằng chất thử trong mẫu thử có thể được xác định một cách chính xác và rõ ràng, làm giảm ảnh hưởng do các chất tác động gây ra, bằng cách thấm (các) polyme trong đó (các) monome vòng kỵ nước có (các) nhóm chức ion hóa được, được trùng hợp ở (các) vị trí đặc biệt trong que thử miễn dịch sắc ký, để hoàn thành sáng chế.

Nghĩa là, sáng chế đề xuất que thử miễn dịch sắc ký bao gồm, theo thứ tự từ dưới

lên, vùng lấy mẫu, vùng chất được đánh dấu, vùng phát hiện và dải hấp thụ, trong đó (các) polyme trong đó (các) monome vòng kỵ nước có (các) nhóm chức ion được trùng hợp, được thấm lên (các) vùng nằm phía trước của vùng chất được đánh dấu. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sắc ký miễn dịch bao gồm việc sử dụng que thử miễn dịch sắc ký theo sáng chế.

Hiệu quả của sáng chế

Bằng que thử miễn dịch sắc ký theo sáng chế, ảnh hưởng do các chất tác động gây ra được giảm, cho phép xác định một cách chính xác và rõ ràng chất thử trong mẫu thử bất kể lượng mẫu thử được cung cấp cho thử nghiệm.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ dưới dạng sơ đồ thể hiện cấu tạo của que thử miễn dịch sắc ký điển hình.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến que thử miễn dịch sắc ký mà tránh được hiện tượng tạo ra các giả dương và giả âm, đặc biệt là tránh được việc tạo ra các giả âm, và có thể xác định chính xác chất thử. Trong bản mô tả này, giả dương có nghĩa là tín hiệu dương được tạo ra trong thử nghiệm mặc dù thực tế chất thử không có trong mẫu thử, và giả âm có nghĩa là tín hiệu dương không được tạo ra trong thử nghiệm mặc dù thực tế chất thử có trong mẫu thử. Ví dụ, trong phương pháp miễn dịch sắc ký (phương pháp sắc ký miễn dịch), khi chất thử có mặt trong mẫu thử, phức chất của chất được cố định-chất thử-chất đánh dấu được tạo thành trên vật mang rắn, và tín hiệu của chất đánh dấu từ phức chất này sẽ được tạo ra, trong khi ở giả âm, việc tạo ra tín hiệu được ngăn chặn do

phức chất không được tạo thành hoặc các lý do khác.

Que thử miễn dịch sắc ký bao gồm vùng mang có vùng phát hiện trong đó kháng thể (kháng thể 1) sẽ bắt giữ đích cần xác định (kháng nguyên hoặc các chất tương tự) được cố định, vùng chất được đánh dấu có kháng thể được đánh dấu có thể di động (kháng thể 2), vùng nhận mẫu tại đó mẫu được bổ sung vào theo cách nhỏ giọt, dải hấp thụ để hấp thụ mẫu lỏng di chuyển mở rộng, và tấm mang để gắn các thành phần này với nhau.

Số lượng vùng phát hiện và loại kháng thể được đánh dấu nằm trong vùng chất được đánh dấu không bị giới hạn ở 1. Bằng cách sử dụng kháng thể tương ứng với nhiều đích cần xác định, hai hoặc nhiều loại kháng nguyên có thể được xác định bằng cùng que thử.

Fig.1 thể hiện một phương án được ưu tiên của que thử miễn dịch sắc ký điển hình. Cần chú ý rằng que thử miễn dịch sắc ký không bị giới hạn ở que thử được thể hiện trên Fig.1. Trên Fig.1, số chỉ dẫn 1 chỉ vùng mang, số chỉ dẫn 2 chỉ vùng chất được đánh dấu, số chỉ dẫn 3 chỉ vùng phát hiện, số chỉ dẫn 4 chỉ vùng nhận mẫu, số chỉ dẫn 5 chỉ dải hấp thụ và số chỉ dẫn 6 chỉ tấm mang.

Hình phía trên của Fig.1 là hình chiếu bằng và hình phía dưới là hình chiếu mặt cắt ngang. Trong ví dụ được thể hiện trên các hình này, vùng mang trong đó hai vùng phát hiện được tạo thành, dải hấp thụ, vùng chất được đánh dấu và vùng nhận mẫu, từng vùng được tạo thành ở dạng lớp mỏng trên tấm mang. Như được thể hiện trên hình, một đầu của dải hấp thụ và một đầu của vùng mang, đầu còn lại của vùng mang và một đầu của vùng chất được đánh dấu và đầu còn lại của vùng chất được đánh dấu và một đầu

của vùng nhận mẫu được phủ lên nhau sao cho tạo ra một đường dẫn dòng theo hướng ngang liên tục.

Vùng mang được tạo thành từ vật liệu có thể cố định kháng thể để bắt giữ lại chất thử (kháng nguyên) và có đặc tính không ngăn cản chất lỏng chảy theo hướng nằm ngang. Tốt hơn nếu, vùng mang này là một màng mỏng xốp có hoạt động mao dẫn, và tạo ra từ vật liệu có thể vận chuyển chất lỏng và các thành phần phân tán trong chất lỏng này bằng cách hấp thụ. Vật liệu tạo ra vùng mang không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ bao gồm xenluloza, nitroxenluloza, xenluloza axetat, polyvinyliden diflorua (PVDF), xơ thủy tinh, nylon, polyketon và các vật liệu tương tự. Trong số chúng, màng mỏng làm từ nitroxenluloza được ưu tiên hơn.

Vùng chất được đánh dấu được tạo thành từ vật liệu nền xốp chứa kháng thể được đánh dấu, và xơ thủy tinh, vải không dệt hoặc các chất liệu tương tự thường sử dụng có thể được sử dụng làm chất liệu tạo nên vật liệu nền. Để thấm một lượng lớn kháng thể được đánh dấu, vật liệu nền này tốt hơn nếu ở gia công thành dạng tấm có độ dày khoảng 0,3 mm đến 0,6 mm.

Vùng phát hiện dùng để chỉ một phần của vùng mang trên đó kháng thể bắt giữ chất thử (kháng nguyên) được cố định. Vùng phát hiện có ít nhất một vùng trong đó kháng thể dùng để bắt giữ kháng nguyên được cố định.

Vùng nhận mẫu là vị trí nhận mẫu hoặc mẫu được chuẩn bị sử dụng mẫu thử bằng cách nhỏ giọt, và làm từ vật liệu xốp có đặc tính hấp thụ nước. Xenluloza thường dùng, xơ thủy tinh, vải không dệt hoặc vật liệu tương tự có thể được sử dụng làm vật liệu xốp nêu trên. Để sử dụng một lượng mẫu lớn trong thử nghiệm miễn dịch, vật liệu

tốt hơn nếu được gia công thành dạng tấm có độ dày khoảng 0,3 mm đến 1mm. Vùng nhận mẫu và vùng chất được đánh dấu nêu trên chỉ khác nhau về chức năng và không cần thiết làm từ các vật liệu khác nhau. Nghĩa là, một phần diện tích vật liệu cũng có thể là vật liệu tạo ra vùng nhận mẫu có chức năng của vùng chất được đánh dấu.

Dải hấp thụ là bộ phận để hấp thụ các thành phần được cung cấp cho vùng mang và không được gồm trong phản ứng ở vùng phát hiện. Giấy lọc, bọt biển hoặc vật liệu tương tự có khả năng giữ nước cao được sản xuất từ hợp chất polyme tự nhiên thông thường, polyme tổng hợp hoặc các hợp chất tương tự có thể được sử dụng làm vật liệu tạo thành dải hấp thụ, tuy nhiên để thúc đẩy việc phát hiện mẫu, ưu tiên sử dụng vật liệu có khả năng hấp thụ nước cao.

Tấm mang là bộ phận để lắp và cố định tất cả các bộ phận nêu trên, tức là, vùng mang, vùng nhận mẫu, vùng chất được đánh dấu, và dải hấp thụ có một phần chồng lên nhau. Tấm mang không phải lúc nào cũng cần đến, miễn là các bộ phận nêu trên có thể được bố trí và cố định ở khoảng cách tối ưu, nhưng thường ưu tiên sử dụng tấm mang để việc sản xuất và sử dụng thuận tiện.

Đối với que thử theo phương án được mô tả trên Fig.1, mẫu sẽ đi qua đường dẫn dòng có lỗ được tạo thành bởi một dây kết nối giữa vùng nhận mẫu, vùng chất được đánh dấu, vùng mang, vùng phát hiện, và dải hấp thụ. Do đó, theo một phương án, tất cả chúng đều vùng di chuyển mẫu. Phụ thuộc vào chất lượng và dạng của mỗi vật liệu cấu thành, có thể có chế độ hoạt động trong đó mẫu không thấm vào bên trong của vật liệu mà đi qua mặt phân cách. Tuy nhiên, bất kể vùng di chuyển mẫu như được xác định trong bản mô tả này nằm bên trong hoặc trên mặt phân cách của vật liệu thì que thử hoạt

động trong chế độ này cũng nằm trong phạm vi của bản mô tả này.

Ở que thử miễn dịch sắc ký theo sáng chế, (các) polyme trong đó (các) monome vòng kỵ nước có (các) nhóm chức ion được trùng hợp được thấm lên (các) vùng nằm trước vùng chất được đánh dấu (hướng lên dọc theo dòng chảy của mẫu thử), nghĩa là, trong vùng nhận mẫu hoặc giữa vùng nhận mẫu và vùng chất được đánh dấu. Bằng cách này, chất thử trong mẫu thử có thể được xác định một cách chính xác và rõ ràng, bất kể lượng mẫu thử được cung cấp cho thử nghiệm.

(Các) polyme có thể được thấm vào vùng nhận mẫu, hoặc thấm vào vật liệu xốp không phải vùng nhận mẫu và vật liệu xốp này có thể được bố trí giữa vùng nhận mẫu và vùng chất được đánh dấu.

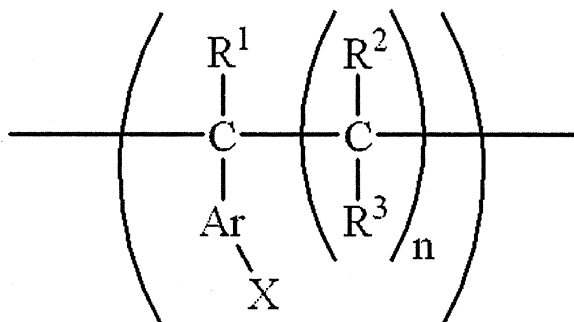
Polyme trong đó (các) monome vòng kỵ nước có (các) nhóm chức ion được trùng hợp có các đặc điểm sau đây.

(Các) nhóm chức ion có thể là (các) nhóm chức anion hoặc (các) nhóm chức cation. Ví dụ được ưu tiên của nhóm chức ion bao gồm nhóm sulfonic và muối của nó, nhóm carboxyl và muối của nó, và amin (amin bậc bốn hoặc tương tự mà được ion hóa trong dung dịch nước). Nhóm sulfonic và muối của nó đặc biệt được ưu tiên.

Ví dụ về vòng kỵ nước bao gồm vòng thơm và vòng xycloalkyl. Vòng kỵ nước có thể là vòng dị vòng chứa (các) nguyên tử oxy, (các) nguyên tử nitơ, (các) nguyên tử lưu huỳnh và/hoặc tương tự, hoặc có thể là vòng ngưng tụ thu được từ sự dung hợp các vòng dị vòng. Vòng thơm được ưu tiên làm vòng kỵ nước. Ví dụ về vòng thơm bao gồm vòng benzen, vòng naphtalen và vòng antraxen. Trong số các vòng này, vòng benzen và vòng naphtalen được ưu tiên, và vòng benzen được ưu tiên nhất.

Ví dụ về polyme được ưu tiên được sử dụng theo sáng chế bao gồm natri polyanethol sulfonat, natri polystyren sulfonat (PS-1, PS-5, PS-50 và PS-100 (tên thương mại, được sản xuất bởi Tosoh Corporation), muối natri của sản phẩm ngưng tụ giữa axit naphtalen sulfonic và formalin, muối natri của sản phẩm ngưng tụ giữa axit sulfonic thơm và formalin (cụ thể hơn là, DISROL (tên thương mại, được sản xuất bởi Nippon Nyukazai Co., Ltd.), DEMOL (tên thương mại, được sản xuất bởi Kao Corporation), POLITY PS-1900 (tên thương mại, được sản xuất bởi Lion Corporation) và POLITY N-100K (tên thương mại, được sản xuất bởi Lion Corporation).

Ví dụ về polyme được ưu tiên sử dụng theo sáng chế bao gồm các polyme chứa (các) đơn vị lặp lại được thể hiện bằng công thức [I] sau đây:



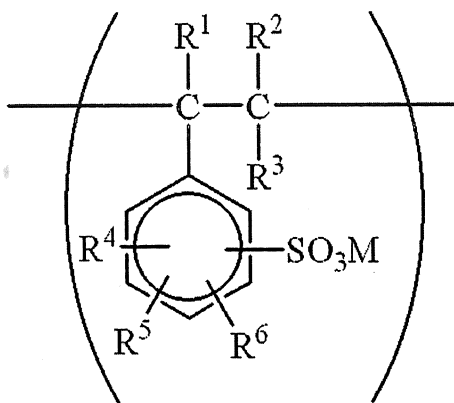
[I]

trong đó Ar là vòng kỵ nước; X là nhóm chức ion; R¹ đến R³ độc lập là hydro hoặc alkyl; n là số nguyên từ 0 đến 10; (các) nguyên tử hydro liên kết với (các) nguyên tử cacbon cấu thành Ar tùy ý được thế bằng (các) phần tử thế mà không tác động xấu đến hiệu quả của sáng chế.

Trong công thức [I] được mô tả ở trên, X và Ar lần lượt là nhóm chức ion được mô tả ở trên và vòng kỵ nước, tương ứng. Ở các trường hợp trong đó R¹ đến R³ là nhóm

alkyl, nhóm alkyl tốt hơn nếu là nhóm alkyl thấp (nghĩa là, mạch ngắn) ($C_1 - C_4$, điều này cũng áp dụng cho phần mô tả dưới đây). Ngoài ra, n tốt hơn nếu từ 0 đến 3. (Các) nguyên tử hydro liên kết với (các) nguyên tử cacbon cấu thành Ar có thể tùy ý được thế bằng (các) phần tử thế mà không tác động xấu đến hiệu quả của sáng chế. Ví dụ về phần tử thế bao gồm nhóm alkyl thấp và nhóm alkoxy thấp.

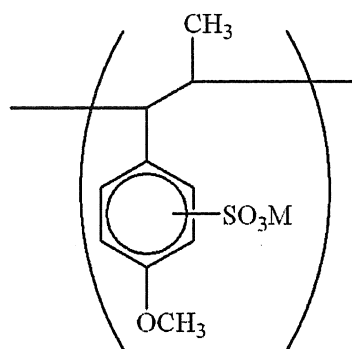
Trong số các đơn vị lặp lại được thể hiện bằng công thức [I], các đơn vị được thể hiện bằng công thức [II] sau đây được ưu tiên:



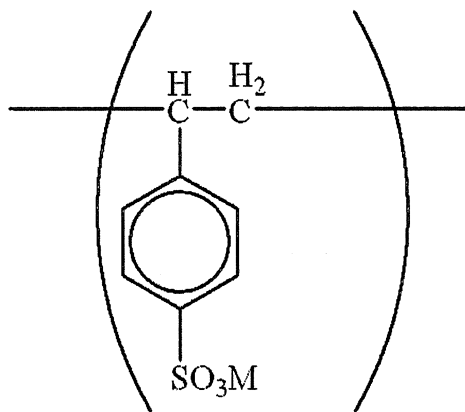
[II]

trong đó M là nguyên tử hoặc nhóm mà trở thành cation hóa trị một trong dung dịch nước, tốt hơn nếu là kim loại kiềm như natri hoặc kali; R^1 đến R^3 độc lập là hydro hoặc alkoxy thấp; và R^4 đến R^6 độc lập là hydro hoặc alkyl thấp.

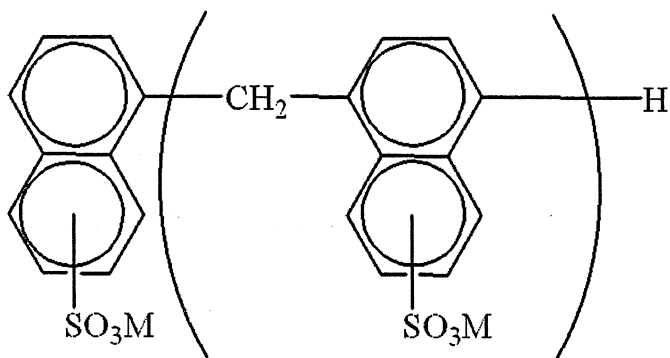
Trong số các đơn vị lặp lại được thể hiện bằng công thức [I] được mô tả ở trên, đặc biệt được ưu tiên là muối của axit anethol sulfonic được thể hiện bằng công thức [III] sau đây, muối của axit styren sulfonic được thể hiện bằng công thức [IV] sau đây, và muối của sản phẩm ngưng tụ giữa axit naphtalen sulfonic và formalin được thể hiện bằng công thức [V] sau đây.



[III]



[IV]



[V]

trong đó ở công thức [III], [IV] và [V], M có nghĩa giống như ở công thức [I], và tốt

hơn nếu là kim loại kiềm như natri hoặc kali.

Trọng lượng phân tử của polyme tốt hơn nếu từ 1000 đến 100000, và tốt hơn nữa nếu từ 1000 đến 60000.

Các đơn vị lặp lại được mô tả ở trên có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc hai hoặc nhiều đơn vị có thể được sử dụng kết hợp với nhau. Mặc dù polyme được sử dụng theo sáng chế tốt hơn nếu chỉ bao gồm (các) đơn vị lặp lại được mô tả ở trên nhưng polyme này có thể chứa (các) đơn vị khác ở mức mà không tác động xấu đến hiệu quả của sáng chế. Hàm lượng của (các) đơn vị trong polyme thường không lớn hơn 20% mol, tốt hơn nếu không lớn hơn 10% mol, tốt hơn nữa nếu không lớn hơn 5% mol.

Lượng (các) polyme được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và thường nằm trong khoảng từ 0,01 μg đến 1 mg, tốt hơn nếu từ 0,1 μg đến 0,1 mg cho một que thử miễn dịch sắc ký. Tuy nhiên, ưu tiên chọn lượng tối ưu để đạt được hiệu quả, phụ thuộc vào loại chất hoạt động bề mặt ion đại phân tử, loại (các) muối vô cơ được sử dụng, thành phần và lượng mẫu thử ở dạng huyền phù được nhỏ vào, và v.v..

Để loại bỏ thêm ảnh hưởng do chất tác động, được ưu tiên thêm (các) muối vô cơ cùng với (các) polyme. Các ví dụ được ưu tiên về muối vô cơ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hợp chất vô cơ tan trong nước bao gồm hợp chất natri, hợp chất kali, hợp chất xesi, hợp chất magie, hợp chất canxi và hợp chất stronti, và hỗn hợp của chúng. Được ưu tiên là natri clorua, kali clorua, lithi clorua, canxi clorua, magie clorua, natri iodua, natri bromua và tương tự. Natri clorua và magie clorua đặc biệt được ưu tiên.

Lượng (các) muối vô cơ được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và thường khoảng từ 0,01 μmol đến 1 mmol, tốt hơn nếu từ 0,1 μmol đến 0,1 mmol với

mỗi một que thử miễn dịch sắc ký. Tuy nhiên, được ưu tiên là chọn lượng thích hợp nhất để đạt được hiệu quả, phụ thuộc vào loại chất hoạt động bề mặt ion đại phân tử, loại (các) muối vô cơ được sử dụng, thành phần và lượng mẫu thử ở dạng huyền phù được nhỏ vào, và v.v..

Dựa trên phương án nêu trên Fig.1, phương pháp sử dụng que thử theo sáng chế sẽ được mô tả. Việc đo được bắt đầu bằng cách đưa mẫu thử hoặc mẫu được chuẩn bị sử dụng mẫu thử lên vùng nhận mẫu. Mẫu thử có thể ở dạng huyền phù được chuẩn bị sơ bộ, hoặc mẫu thử có thể được đưa trực tiếp lên vùng nhận mẫu.

Mẫu thử sau khi đưa vào vùng nhận mẫu sẽ di chuyển mở rộng theo hướng nằm ngang đến vùng chất được đánh dấu, vùng mang và dải hấp thụ thông qua hoạt động mao dẫn. Trong vùng chất được đánh dấu, kháng thể được đánh dấu được giải phóng vào dung dịch và di chuyển mở rộng sang vùng mang cùng với sự di chuyển mở rộng của mẫu. Đối với các trường hợp kháng nguyên có mặt trong mẫu, kháng nguyên được bắt giữ đặc hiệu bằng kháng thể bắt giữ ở vùng phát hiện của vùng mang, và kháng nguyên này cũng tạo thành phức chất bằng phản ứng đặc hiệu với kháng thể được đánh dấu. Bằng cách đó, nhiều lớp kháng thể sẽ được tạo ra thông qua kháng nguyên trong vùng phát hiện, và phức kháng thể được đánh dấu-kháng nguyên có thể được xác định trong vùng phát hiện.

Trong phương pháp sử dụng que thử miễn dịch sắc ký theo sáng chế, mẫu thử tiếp xúc với (các) polyme trong đó (các) monome vòng kỵ nước có (các) nhóm chức ion được trùng hợp, và tốt hơn nếu tiếp xúc với (các) polyme và (các) muối vô cơ, trong khi mẫu thử di chuyển mở rộng từ vùng nhận mẫu đến vùng chất được đánh dấu, sao cho

làm giảm ảnh hưởng của chất tác động có mặt trong mẫu thử.

Thông thường, để tránh các ảnh hưởng của chất tác động có mặt trong mẫu thử, chất thử để làm giảm ảnh hưởng của chất tác động ban đầu được bổ sung vào một môi trường để tạo ra huyền phù thử, và mẫu thử được tạo huyền phù trong môi trường này. Tuy nhiên, do mẫu thử là mẫu sinh học được lấy mẫu bằng tăm bông hoặc các dụng cụ tương tự mà không định lượng nên lượng mẫu thử sẽ biến đổi. Kết quả là, môi trường để tạo huyền phù cho mẫu thử có thể được pha loãng bằng lượng mẫu thử dư và do đó, chất thử để làm giảm ảnh hưởng của chất tác động cũng có thể bị pha loãng vì vậy có thể không thu được hiệu quả thích hợp, đó là vấn đề cần giải quyết. Theo sáng chế, bằng cách sử dụng một bộ phận thấm (các) polyme trong đó (các) monome vòng kỵ nước có (các) nhóm chức ion được trùng hợp, và tốt hơn nếu thấm (các) polyme này cùng với (các) muối vô cơ, bộ phận thấm này được bố trí ban đầu ở vị trí bên trên vùng chất được đánh dấu, và bằng cách luôn luôn sử dụng một lượng mẫu thử cố định cho vùng nhận mẫu, chất thử để làm giảm ảnh hưởng của chất tác động sẽ không bị pha loãng đến mức độ mà làm mất hiệu quả của nó, vì vậy có thể xác định được chính xác và cụ thể.

Mẫu thử được sử dụng phương pháp theo sáng chế không bị hạn chế, và các mẫu sinh học mà theo đó nhan chóng thu được hiệu quả của sáng chế đạt được, nghĩa là, làm giảm ảnh hưởng của chất, sẽ được ưu tiên. Ví dụ được ưu tiên về mẫu thử bao gồm các dịch cơ thể như huyết thanh, huyết tương, máu, nước tiểu, phân, nước bọt, dịch mô, dịch tủy sống và mủ, cũng như dịch pha loãng của chúng. Đặc biệt, mẫu thử có lẫn các chất có nguồn gốc từ màng nhầy trong cơ thể, đờm, nước bọt, mủ trong họng, mủ trong khoang mũi, chất hút ra từ mũi, mủ trong kết mạc góc, mẫu thử phân và các mẫu thử

tương tự sẽ được ưu tiên.

Trong phương pháp sử dụng que thử miễn dịch sắc ký theo sáng chế, chất thử được xác định là kháng nguyên hoặc kháng thể có thể xác định được bằng thử nghiệm miễn dịch, nghĩa là, bằng thử nghiệm sử dụng phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Kháng nguyên này có thể là kháng nguyên bất kỳ miễn là kháng thể kháng nó có thể được tạo ra. Ví dụ về các kháng nguyên bao gồm protein, polysacarit và lipit. Động vật nguyên sinh, nấm, vi khuẩn, mycoplasma, rickettsiae, chlamydiae, virus và các đối tượng khác chứa các kháng nguyên này cũng có thể được xác định.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn bằng các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ sau đây.

Ví dụ 1 và 2, và ví dụ so sánh từ 1 đến 4

Ảnh hưởng của chất tác động có trong nước bọt và hiệu quả làm giảm ảnh hưởng của chất tác động bằng phương pháp thông thường và bằng phương pháp theo sáng chế

1. Cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* trên màng nitroxenluloza

Dung dịch trong đó kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* được pha loãng đến nồng độ 1,0 mg/mL bằng nước tinh khiết, và kháng thể kháng IgG chuột được chuẩn bị. Kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* và kháng thể kháng IgG chuột lần lượt được đưa thẳng lên bề mặt của vùng nhận mẫu và phía hấp thụ của màng nitroxenluloza có bọc màng PET. Sau đó, màng nitroxenluloza này được làm khô ở 45°C trong 30 phút để thu được màng cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*. Trong ví dụ này,

màng này được gọi là “màng cố định kháng thể”.

2. Cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* trên hạt màu polystyren

Kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* được pha loãng bằng nước tinh khiết đến nồng độ 1,0 mg/mL, và hạt màu polystyren được bổ sung vào đó đến nồng độ 0,1%. Sau khi khuấy, carbodiimide được bổ sung đến nồng độ 1%, và hỗn hợp thu được được khuấy thêm. Dịch nổi bề mặt được loại bỏ bằng cách tách ly tâm và được tạo huyền phù lại trong Tris 50 mM (độ pH=9,0), BSA 3% để thu được hạt màu polystyren gắn kết với kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*. Trong ví dụ này, các hạt này được gọi là “hạt cố định kháng thể”.

3. Sử dụng hạt màu polystyren gắn kết kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* và làm khô

Lượng theo quy định (1,0 µg) hạt cố định kháng thể đã chuẩn bị ở phần 2 được sử dụng cho vải không dệt, sợi thủy tinh, và sản phẩm thu được được làm khô ở 45°C trong 30 phút. Trong ví dụ này, vải không dệt cuối cùng thu được được gọi là “tấm khô”.

4. Chuẩn bị vải không dệt thấm các thành phần làm giảm ảnh hưởng của chất tác động

Lượng theo quy định của natri polystyren sulfonat (trọng lượng phân tử: 14000) và NaCl được đưa lên vải không dệt với Tx100, và sản phẩm thu được được làm khô để thu được vải không dệt thấm các thành phần làm giảm ảnh hưởng của chất tác động (đối với mỗi một que thử sử dụng 8 µg natri polystyren sulfonat và 40 µmol NaCl).

5. Sản xuất que thử *Mycoplasma pneumoniae*

Màng cố định kháng thể đã chuẩn bị ở phần 1, tấm khô đã chuẩn bị ở phần 3, và vải không dệt thấm các thành phần làm giảm ảnh hưởng của chất tác động đã chuẩn bị ở phần 4 được gắn vào các thành phần khác (tấm mang và dải hấp thụ) và sản phẩm thu được được cắt với độ rộng 5 mm để tạo ra que thử *Mycoplasma pneumoniae*. Trong ví dụ này, que thử sử dụng vải không dệt thấm các thành phần làm giảm ảnh hưởng của chất tác động làm vùng nhận mẫu được gọi là “que thử theo sáng chế”. Que thử tương tự sử dụng bộ phận không chứa các thành phần làm giảm ảnh hưởng của chất tác động được sử dụng thay cho vải không dệt thấm các thành phần làm giảm ảnh hưởng của chất tác động đã chuẩn bị ở phần 4 được chuẩn bị và được sử dụng trong các ví dụ so sánh. Trong ví dụ này, que thử sử dụng vải không dệt không chứa các thành phần làm giảm ảnh hưởng của chất tác động làm vùng nhận mẫu được gọi là “que thử theo phương pháp thông thường”. Các que thử này bao gồm, theo hướng từ dưới lên theo dòng di chuyển của mẫu thử, vùng nhận mẫu, tấm khô (vùng chất được đánh dấu), màng cố định kháng thể (vùng phát hiện) và dải hấp thụ.

6. Xử lý bằng nước bọt

Tăm bông được đặt trong miệng để tăm bông này hút đầy nước bọt, và dịch thu được được tạo huyền phù trong dung dịch dùng để xử lý mẫu thử (dung dịch tạo huyền phù mẫu Quicknavi; được sản xuất bởi Denka Seiken Co., Ltd.) (mẫu thử đã xử lý bằng nước bọt). Tăm bông được đặt trong miệng để tăm bông này hút đầy nước bọt, và dịch thu được được tạo huyền phù trong dung dịch dùng để xử lý mẫu thử (dung dịch tạo huyền phù mẫu Quicknavi; được sản xuất bởi Denka Seiken Co., Ltd.) chứa natri polystyrenesulfonat (mẫu thử đã xử lý bằng nước bọt phương pháp thông thường).

7. Đo

Kháng nguyên *Mycoplasma pneumoniae* được bổ sung vào dung dịch dùng để xử lý mẫu thử ban đầu, hoặc vào mẫu thử đã xử lý bằng nước bọt và trộn, và mỗi hỗn hợp thu được, với lượng 50 μ L, lần lượt được đưa từng giọt lên que thử theo sáng chế và que thử theo phương pháp thông thường. Mười lăm phút sau, đánh giá bằng mắt thường sự tồn tại của hạt màu polystyren đã lắng ở phía cổ định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* và mức độ lắng. Các trường hợp trong đó mức độ lắng theo một đường được đánh giá là “+”, các trường hợp trong đó khó nhận biết được đánh giá là “±”, và các trường hợp trong đó không quan sát thấy hiện tượng lắng được đánh giá là “-”.

8. Kết quả

Các kết quả được thể hiện ở bảng 1.

[Bảng 1]

Ví dụ		Xử lý bằng nước bọt	Que thử	Kết quả đánh giá
Ví dụ so sánh 1	huyền phù mẫu thử	Không	phương pháp thông thường	+
Ví dụ so sánh 2	huyền phù mẫu thử	Có	phương pháp thông thường	-
Ví dụ 1	huyền phù mẫu thử	Không	sáng chế	+
Ví dụ 2	huyền phù mẫu thử	Có	sáng chế	+
Ví dụ so sánh 3	huyền phù mẫu thử + natri polystyren sulfonat	Không	phương pháp thông thường	+
Ví dụ so sánh 4	huyền phù mẫu thử + natri polystyren sulfonat	Có	phương pháp thông thường	±

Như được thể hiện ở bảng 1, với que thử thông thường (không chứa natri polystyren sulfonat), kết quả đánh giá là “-” (giả âm) cho mẫu thử được xử lý bằng nước

bột do chất tác động có trong nước bột mặc dù thực tế là mẫu thử này chứa kháng nguyên với lượng mà nên được đánh giá là “+” (dương) (các ví dụ so sánh 1 và 2). Ngay cả khi natri polystyren sulfonat được bổ sung vào mẫu thử như được mô tả ở tài liệu sáng chế 1 thì kết quả đánh giá cũng không rõ đối với mẫu thử đã xử lý bằng nước bột (ví dụ so sánh 4). Ngược lại, khi que thử theo sáng chế được sử dụng, thì thu được kết quả đánh giá rất rõ bất kể có tiến hành việc xử lý bằng nước bột hay không (các ví dụ 1 và 2). Ngoài ra, ở ví dụ so sánh 2 trong đó mẫu thử đã xử lý bằng nước bột được sử dụng, không quan sát được hiện tượng lắng của hạt màu polystyren, không chỉ tại vị trí đã cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*, mà còn tại vị trí cố định kháng thể kháng IgG chuột. Mặt khác, khi natri polystyren sulfonat được bổ sung ở hệ lỏng (ví dụ so sánh 4), mà là phương pháp thông thường, thì mặc dù tiếp tục thấy có hiện tượng lắng hạt tại vị trí cố định kháng thể kháng IgG chuột nhưng chỉ quan sát được hiện tượng lắng với mức độ nhỏ tại vị trí cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*. Ngược với các phương pháp thông thường, ở ví dụ 2 trong đó que thử miễn dịch sắc ký theo sáng chế (thấm polystyren sulfonat và muối) được sử dụng, hiện tượng lắng hạt được quan sát thấy rõ tại cả vị trí cố định kháng thể kháng IgG chuột lẫn vị trí cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*, tương ứng. Vì vậy, rõ ràng với phương pháp theo sáng chế, ảnh hưởng của chất tác động có nguồn gốc từ cơ thể sống đến phản ứng kháng nguyên-kháng thể đã được làm giảm một cách hiệu quả khi so với phương pháp thông thường.

Ví dụ 11 đến 17

Loại polyme trong đó monome vòng kị nước có nhóm chức ion được trùng hợp

Theo cùng cách như ở các ví dụ 1 và 2, que thử chứa mỗi chất hoạt động bề mặt có bán trên thị trường (bảng 2) chứa polyme trong đó monome vòng kỵ nước có nhóm chức ion được trùng hợp, ở lượng theo quy định (40 $\mu\text{g}/\text{que thử}$), được chuẩn bị. Sử dụng các que thử này, bằng cùng phương pháp như ở ví dụ 2, hiệu quả làm giảm ảnh hưởng của chất tác động có trong nước bọt được đánh giá. Các kết quả được thể hiện ở bảng 2. Đối với trọng lượng phân tử trung bình của các chất hoạt động bề mặt khác nhau, trọng lượng phân tử trung bình của PS-1 là 10000 đến 30000, PS-5 là 50000 đến 100000, POLITY PS-1900 là 16000, DEMOL NL là 3000 đến 4000, và DEMOL EP là 7000 đến 8000.

[Bảng 2]

	Chất hoạt động bề mặt	Xử lý bằng nước bọt	Que thử	Đánh giá
Ví dụ so sánh 2	không thấm	Có	phương pháp thông thường	-
Ví dụ so sánh 5	không có chất hoạt động bề mặt	Có	một mình muối được nhúng	-
Ví dụ 3	PS-1 (Tosho)	Có	sáng chế	+
Ví dụ 4	PS-5 (Tosho)	Có	sáng chế	+
Ví dụ 5	POLITY N100K (Lion)	Có	sáng chế	+
Ví dụ 6	POLITY PS-1900 (Lion)	Có	sáng chế	+
Ví dụ 7	DEMOL SSL (Kao)	Có	sáng chế	+
Ví dụ 8	DEMOL NL (Kao)	Có	sáng chế	+
Ví dụ 9	DEMOL EP (Kao)	Có	sáng chế	+

Ví dụ 10	natri polyanethol sulfonat	Có	sáng chế	+
----------	----------------------------	----	----------	---

Như được thể hiện ở bảng 2, quan sát thấy rõ ràng là hiệu quả của việc thẩm polyme bất kỳ mặc dù mức độ hiệu quả thay đổi phụ thuộc vào loại polyme.

Ví dụ 3 Loại muối vô cơ

Theo cách giống như ở các ví dụ 1 và 2, que thử chứa chất hoạt động bề mặt có bán trên thị trường PS-1 (TOSOH) chứa polyme trong đó monome vòng kỵ nước có nhóm chức ion được trùng hợp, ở lượng theo quy định (2 µg/que thử), và chứa từng muối vô cơ khác nhau (bảng 3) với lượng theo quy định (4 µmol/que thử), được chuẩn bị.

Theo phương pháp giống như ở ví dụ 2, hiệu quả làm giảm ảnh hưởng của chất tác động trong nước bọt được đánh giá. Các kết quả được thể hiện ở bảng 3.

[Bảng 3]

	Muối vô cơ	Xử lý bằng nước bọt	Que thử	Đánh giá
Ví dụ so sánh 2	không thẩm	Có	phương pháp thông thường	-
Ví dụ 11	NaCl	Có	sáng chế	+
Ví dụ 12	KCl	Có	sáng chế	+
Ví dụ 13	KI	Có	sáng chế	+
Ví dụ 14	MgCl ₂	Có	sáng chế	+
Ví dụ 15	CaCl ₂	Có	sáng chế	+
Ví dụ 16	LiCl	Có	sáng chế	+
Ví dụ 17	NaBr	Có	sáng chế	+

Đã được xác định rằng ảnh hưởng của chất tác động có nguồn gốc từ cơ thể sống đến phản ứng kháng nguyên-kháng thể được giảm bằng cách sử dụng từng muối vô cơ khác nhau cùng với chất hoạt động bề mặt có bán trên thị trường chứa polyme trong đó monome vòng kị nước có nhóm chức ion được trùng hợp. Ngoài ra, hiệu quả làm giảm ảnh hưởng của chất tác động đã xác định được đối với tất cả các muối vô cơ, mặc dù mức độ của hiệu quả làm giảm thay đổi phụ thuộc vào loại muối vô cơ.

Ví dụ 18

Ưu điểm của việc sử dụng polyme trong đó monome vòng kị nước có nhóm chức ion được trùng hợp với muối vô cơ

Theo cách giống như ở các ví dụ 1 và 2, que thử chứa chất hoạt động bề mặt có bán trên thị trường PS-1 (tên thương mại, TOSOH) chứa polyme trong đó monome vòng kị nước có nhóm chức ion được trùng hợp, với lượng theo quy định (bảng 4), và chứa natri clorua với lượng theo quy định (bảng 4), được chuẩn bị. Bằng cùng phương pháp như ở ví dụ 2, hiệu quả làm giảm ảnh hưởng của chất tác động trong nước bọt được đánh giá. Ngoài ra, mức nền (xuất phát từ hạt còn lại trên màng khác với dòng thử, và khả năng quan sát bằng mắt thường giảm) cũng được đánh giá. Các kết quả được thể hiện ở các bảng 4 và 5.

[Bảng 4]

		NaCl ($\mu\text{mol}/\text{que thử}$)			
		0	0,4	4	40
PS-1	0	-	-	-	-
	0,8	$\pm$	+	+	+

(µg/que thử)	8	±	+	+	+
	80	+	+	+	+

* Các kết quả được thể hiện trong khung có viền đậm là các kết quả của ví dụ này.

[Bảng 5]

		NaCl (µmol/que thử)			
		0	0,4	4	40
PS-1 (µg/que thử)	0	thấp	thấp	thấp	thấp
	0,8	thấp	thấp	thấp	thấp
	8	thấp	thấp	thấp	thấp
	80	cao	thấp	thấp	thấp

* Các kết quả được thể hiện trong khung có viền đậm là các kết quả của ví dụ này.

Như được thể hiện ở bảng 4, khi một mình natri polystyrenesulfonat (PS-1) được thêm, thì kết quả đánh giá không rõ ràng ở nồng độ thấp (rõ ở nồng độ cao), trong khi đó bằng cách sử dụng cả natri polystyrenesulfonat và natri clorua, thu được kết quả đánh giá rõ ngay cả đối với các trường hợp trong đó nồng độ natri polystyrenesulfonat thấp. Ngoài ra, ở trường hợp sử dụng một mình natri polystyrenesulfonat, mức nền cao ở nồng độ cao (bảng 5) vì vậy làm giảm khả năng quan sát bằng mắt thường, trong khi ở trường hợp cũng sử dụng natri clorua, mức nền thấp ngay cả ở trường hợp nồng độ natri polystyrenesulfonat cao. Từ đó, có thể thấy rằng tốt hơn là sử dụng cả PS-1 và NaCl khi so với các trường hợp mà sử dụng một trong số các chất này.

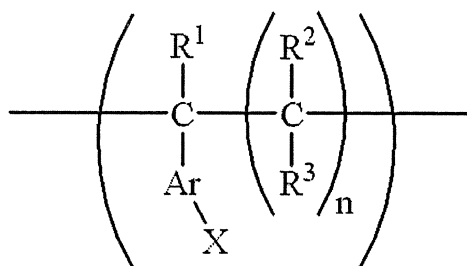
Danh mục các số chỉ dẫn

- 1 vùng mang (chứa vùng phát hiện)

- 2 vùng chất được đánh dấu
- 3 vùng phát hiện
- 4 vùng nhận mẫu
- 5 dải hấp thụ
- 6 tấm mang

Yêu cầu bảo hộ

1. Que thử miễn dịch sắc ký bao gồm, theo thứ tự từ dưới lên, vùng nhận mẫu, vùng chất được đánh dấu, vùng phát hiện và dải hấp thụ, trong đó (các) polyme mà trong đó (các) monome vòng kị nước có (các) nhóm chức ion được trùng hợp được thấm lên (các) vùng nằm phía trước vùng chất được đánh dấu, trong đó (các) muối vô cơ được thấm cùng với (các) polyme.
2. Que thử miễn dịch sắc ký theo điểm 1, trong đó (các) polyme chứa (các) đơn vị lặp lại được thể hiện bằng công thức [I] sau đây:

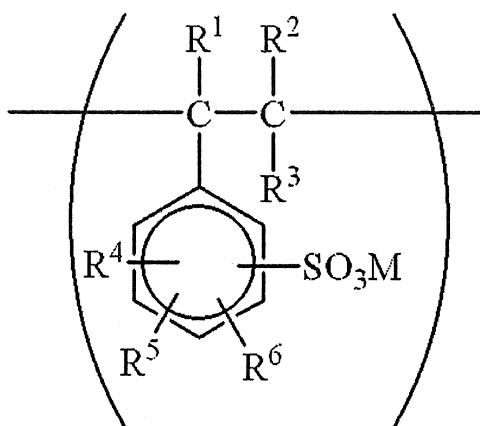


[I]

trong đó Ar thể hiện vòng kị nước; X là nhóm chức ion; R¹ đến R³ độc lập là hydro hoặc alkyl; n là số nguyên từ 0 đến 10; (các) nguyên tử hydro liên kết với (các) nguyên tử cacbon cấu thành Ar tùy ý được thế bằng (các) phần tử thế mà không tác động xấu đến hiệu quả của sáng chế.

3. Que thử miễn dịch sắc ký theo điểm 1 hoặc 2, trong đó (các) monome vòng kị nước là (các) monome thơm.
4. Que thử miễn dịch sắc ký theo điểm 3, trong đó (các) monome thơm chứa vòng benzen.

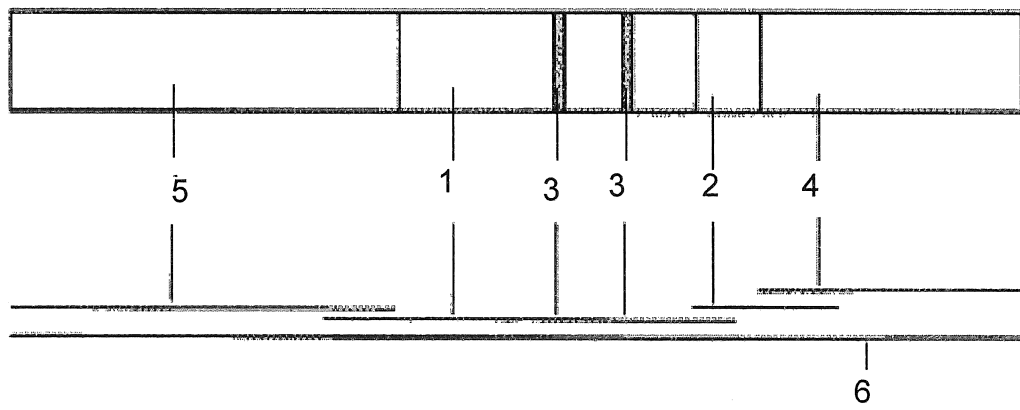
5. Que thử miễn dịch sắc ký theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó (các) nhóm chức ion là nhóm sulfonic hoặc muối của nó, nhóm carboxylic hoặc muối của nó, hoặc amin.
6. Que thử miễn dịch sắc ký theo điểm 5, trong đó (các) nhóm chức ion là nhóm sulfonic hoặc muối của nó.
7. Que thử miễn dịch sắc ký theo điểm 2, trong đó đơn vị lặp lại trong (các) polyme được thể hiện bằng công thức [II] sau đây:



[II]

trong đó M là nguyên tử hoặc nhóm mà trở thành cation hóa trị một ở dung dịch nước; R^1 đến R^3 có cùng ý nghĩa như R^1 đến R^3 ở công thức [I]; và R^4 đến R^6 độc lập là hydro, alkoxy thấp hoặc alkyl thấp.

8. Que thử miễn dịch sắc ký theo điểm 6, trong đó đơn vị lặp lại là muối của axit anethol sulfonic hoặc muối của axit styren sulfonic.
9. Phương pháp sắc ký miễn dịch bao gồm việc sử dụng que thử miễn dịch sắc ký theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

**Fig.1**