



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103069277 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201180026969. 0
 (22) 申请日 2011. 03. 31
 (30) 优先权数据
 2010-082929 2010. 03. 31 JP
 2010-082928 2010. 03. 31 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2012. 11. 30
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2011/058288 2011. 03. 31
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02011/125877 JA 2011. 10. 13
 (83) 生物保藏信息
 FERM BP-11344 2009. 11. 26
 FERM BP-11345 2009. 11. 26
 (73) 专利权人 积水医疗株式会社
 地址 日本国东京都
 (72) 发明人 小林幸司 森田元喜 伊藤佐智子
 (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 张国梁

(51) Int. Cl.
 G01N 33/543(2006. 01)
 G01N 33/53(2006. 01)
 (56) 对比文件
 CN 1401078 A, 2003. 03. 05,
 CN 1401078 A, 2003. 03. 05,
 WO 2009/144894 A1, 2009. 12. 03,
 JP 2004-85425 A, 2004. 03. 18,
 JP 2004-85425 A, 2004. 03. 18,
 JP 8-94618 A, 1996. 04. 12,
 CN 1484032 A, 2004. 03. 24,
 CN 1484032 A, 2004. 03. 24,
 CN 101326440 A, 2008. 12. 17,
 CN 101326440 A, 2008. 12. 17,
 JP 2004-132892 A, 2004. 04. 30,
 JP 2006-38700 A, 2006. 02. 09,
 EP 0724156 A1, 1996. 07. 31,
 CN 1157040 A, 1997. 08. 13,
 CN 1311438 A, 2001. 09. 05,
 审查员 张绚

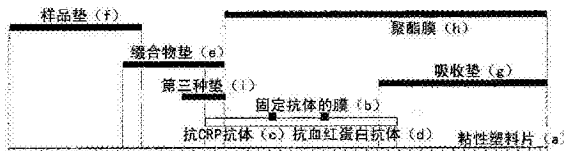
权利要求书2页 说明书19页 附图9页

(54) 发明名称

利用免疫色谱法的测定法、免疫色谱测试条和用于免疫色谱法的测定试剂盒

(57) 摘要

本发明提供利用免疫色谱法的测量方法、免疫色谱测试条和免疫色谱法试剂盒，所述免疫色谱法、免疫色谱测试条和免疫色谱法试剂盒能够与常规方法相比简单的操作精确短期测量血液中的分析物。本发明提供通过免疫色谱法的测量方法，在所述免疫色谱法中，同一样品中的分析物和血红蛋白的浓度通过免疫色谱法来测量，从而利用血红蛋白的测量值对分析物的测量值进行红细胞比容校正，以及提供用于免疫色谱法的测试条和试剂盒。



CN 103069277 B

1. 通过同一免疫色谱法测量同一稀释样品中至少第一分析物和第二分析物的方法,其中所述样品是溶血的血液,和所述样品被稀释 50 至 400 倍,并且稀释至等于或大于所述第一分析物获得最大信号值的浓度的浓度范围,所述方法包括以下步骤 A 至 D:

A. 利用下述 1) 和 2), 通过竞争性免疫色谱法测量样品中第一分析物的步骤:

1) 缀合物, 其中针对所述第一分析物的第一抗体固定于标记物, 和

2) 不溶性膜支持物, 针对所述第一分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物, 其中如果针对所述第一分析物的第一抗体的表位是单价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗体不同, 而如果所述第一抗体的表位是多价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗体相同或所述第一抗体与所述第二抗体相同, 并且其中第一分析物的浓度通过与第一分析物的浓度成反比的检测强度减小的程度获得;

B. 利用下述 5) 和 6), 通过免疫色谱法测量样品中第二分析物的步骤:

5) 缀合物, 其中针对所述第二分析物的第一抗体固定于标记物, 和

6) 不溶性膜支持物, 针对所述第二分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物, 其中如果针对所述第二分析物的第一抗体的表位是单价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗体不同, 而如果所述第一抗体的表位是多价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗体相同或所述第一抗体与所述第二抗体相同;

C. 从步骤 A 获得的第一分析物的测量值获得样品的血细胞比容值的步骤; 和

D. 通过利用步骤 C 获得的血细胞比容值校正步骤 B 获得的第二分析物的测量值的步骤,

其中步骤 A 和 B 是使用相同不溶性膜支持物的步骤,

其中步骤 A 和 B 在相同流动通道中进行, 和

其中第一分析物是血红蛋白。

2. 抗体在制备用于通过同一免疫色谱法测量同一稀释样品中至少第一分析物和第二分析物的方法的试剂盒中的用途, 其中所述样品是溶血的血液, 和所述样品被稀释 50 至 400 倍, 并且稀释至等于或大于所述第一分析物获得最大信号值的浓度的浓度范围, 其中所述抗体为针对所述第一分析物的第一抗体、针对所述第一分析物的第二抗体、针对所述第二分析物的第一抗体和针对所述第二分析物的第二抗体, 其中所述方法包括以下步骤 A 至 D:

A. 利用下述 1) 和 2), 通过竞争性免疫色谱法测量样品中第一分析物的步骤:

1) 缀合物, 其中针对所述第一分析物的第一抗体固定于标记物, 和

2) 不溶性膜支持物, 针对所述第一分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物, 其中如果针对所述第一分析物的第一抗体的表位是单价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗体不同, 而如果所述第一抗体的表位是多价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗体相同或所述第一抗体与所述第二抗体相同, 并且其中第一分析物的浓度通过与第一分析物的浓度成反比的检测强度减小的程度获得;

B. 利用下述 5) 和 6), 通过免疫色谱法测量样品中第二分析物的步骤:

5) 缀合物, 其中针对所述第二分析物的第一抗体固定于标记物, 和

6) 不溶性膜支持物, 针对所述第二分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物, 其中如果针对所述第二分析物的第一抗体的表位是单价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗

体不同,而如果所述第一抗体的表位是多价的,则所述第二抗体的表位与第一抗体相同或所述第一抗体与所述第二抗体相同;

C. 从步骤 A 获得的第一分析物的测量值获得样品的血细胞比容值的步骤;和

D. 通过利用步骤 C 获得的血细胞比容值校正步骤 B 获得的第二分析物的测量值的步骤,

其中步骤 A 和 B 是使用相同不溶性膜支持物的步骤,

其中步骤 A 和 B 在相同流动通道中进行,和

其中第一分析物是血红蛋白。

3. 权利要求 2 的用途,其中所述第二分析物是 C 反应蛋白 (CRP)。

4. 用于通过同一免疫色谱法测量同一稀释样品中至少第一分析物和第二分析物的免疫色谱测试条,其中所述样品中第一分析物被稀释至等于或大于所述第一分析物获得最大信号值的浓度的浓度范围,其中第一分析物的浓度通过与第一分析物的浓度成反比的检测强度减小的程度获得,所述免疫色谱测试条包括以下 E 和 F:

E. 用于测量所述第一分析物的测试条,其包括下述 1) 和 2),

1) 缀合物,其中针对所述第一分析物的第一抗体固定于标记物;和

2) 不溶性膜支持物,针对所述第一分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物,其中如果针对所述第一分析物的第一抗体的表位是单价的,则所述第二抗体的表位与第一抗体不同,而如果所述第一抗体的表位是多价的,则所述第二抗体的表位与第一抗体相同或所述第一抗体与所述第二抗体相同;和

F. 用于测量第二分析物的测试条,其包括下述 5) 和 6),

5) 缀合物,其中针对所述第二分析物的第一抗体固定于标记物;和

6) 不溶性膜支持物,针对所述第二分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物,其中如果针对所述第二分析物的第一抗体的表位是单价的,则所述第二抗体的表位与第一抗体不同,而如果所述第一抗体的表位是多价的,则所述第二抗体的表位与第一抗体相同或所述第一抗体与所述第二抗体相同,其中 E 中 1) 和 F 中 5) 的缀合物包含在相同垫中,以形成缀合物垫,并且其中 E 中 2) 的不溶性膜支持物与 F 中 6) 的不溶性膜支持物相同,其中 E 和 F 置于相同流动通道内,并且其中第二分析物选自由以下组成的组: C 反应蛋白 (CRP)、IgA、IgG、IgM、血纤蛋白降解产物、可溶性血纤蛋白、凝血酶-抗凝血酶复合物、PIC(纤溶酶-纤溶酶抑制剂复合物)、氧化的 LDL、BNP(脑利钠肽)、脂连蛋白、CEA(癌胚抗原)、AFP(α -胎蛋白)、CA19-9、CA125、PSA(前列腺特异性抗原)、HBV(乙型肝炎病毒)、HCV(丙型肝炎病毒)和过敏原特异性 IgE,

其中第一分析物是血红蛋白。

5. 权利要求 4 的免疫色谱测试条,其中所述血纤蛋白降解产物是 D-二聚体。

6. 权利要求 4 或 5 的免疫色谱测试条,还包括以下 G 和 H,其中 E 中 1) 和 F 中 5) 的缀合物包含在垫中以形成缀合物垫并且置于 E 中 2) 和 F 中 6) 的不溶性膜支持物的上游侧,

G. 样品垫,其位于缀合物垫的上游侧并供给以样品,和

H. 吸收垫,其位于 E 中 2) 和 F 中 6) 的不溶性膜支持物的下游侧。

7. 用于免疫色谱法的测定试剂盒,其包括:权利要求 4-6 任一项的免疫色谱测试条;和用于溶血和稀释的稀释溶液。

利用免疫色谱法的测定法、免疫色谱测试条和用于免疫色谱法的测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及通过免疫色谱法测量样品中分析物的测量方法,用于通过免疫色谱法测量样品中分析物的免疫色谱测试条,和用于免疫色谱法的测量试剂盒,其包括免疫色谱测试条和稀释溶液。本发明特别涉及通过使用免疫色谱法测量血红蛋白浓度和源自血液的同一样品中的第二分析物的浓度并使用获自血红蛋白测量值的血细胞比容校正所述第二分析物的测量值的技术。

背景技术

[0002] 在医学领域、医学研究领域等中,必须测量血液中的某些成分(诸如血清清蛋白、免疫球蛋白、肝炎病毒、类风湿因子和C反应蛋白),且为了该目的已经开发和实施了多种测量方法。在这些方法中的常用方法中,免疫学测定成为主流且,在免疫学测定中,对由患者或受试者收集和获得的血液(下文中称为全血)进行离心,以获得上清(血清或血浆),所述上清使用合适的缓冲溶液稀释,并且使用与分析物特异性反应的抗体来检测血清或血浆中的分析物。这样的测定包括作为定性测试的,使用多克隆抗体的,基于单一射线的免疫扩散方法。胶乳凝集免疫测定和免疫浊度法作为代表性的定量测试包括在其中。

[0003] “在检查患者的过程中希望进行多种测试”的需要近期甚至在门诊部和小医院中越来越多,且测试日益作为即时检验(POCT),而非常规转包(subcontract)检验来进行。这样的POCT试剂的代表性实例包括免疫色谱法的侧向流动测试条。由于由血液中分离血浆和血清的操作很麻烦且需要POCT领域的技巧,使用全血的检验是理想的。通过使用免疫色谱法测量全血液样品中分析物的测定公开为,例如,使用装配有血细胞分离膜的测试条的方法以及试剂和试剂盒(专利文献1)。然而,当通过该程序分离的血浆直接用于通过基于夹心式免疫反应原则的免疫色谱法的测量时,如果分析物过量存在,则有问题,即“钩状现象”(也称为“前带现象”)发生并导致数值的明显减小,尽管样品中存在高度浓缩的分析物。因此,全血通常是溶解的和稀释的,以用于测量,由此保持在预定的测量范围内。然而,在这种情况下,分析物的浓度通过血细胞体积稀释并且测量值与血清或血浆样品相比降低,因此,测量值必须通过使用血细胞比容值(红细胞的体积百分比)来校正。利用血细胞比容值(红细胞的体积百分比)校正测量值在下文中也将简称为血细胞比容校正。

[0004] 数值明显减小的问题通常通过统一乘以获自健康个体的平均血细胞比容值的校正系数来进行校正。然而,血细胞比容值在个体之间变化并且其参考值范围在男性中为39-52%,在女性中为35-48%。因此,精确的分析物浓度不能通过利用乘以统一的系数的校正来获得。因此,为了进行精确血细胞比容校正,必须使用通过利用用于测量分析物浓度的同一样品分别测量的血细胞比容值进行校正。

[0005] 血细胞比容值常规通过基于离心法的微量血细胞比容法或通过利用自动化血细胞计数器通过由红细胞数量和平均红细胞体积进行计算来获得。另一方面,报告了另一种利用由全血测量结果转化为在测量血清或血浆情况下的测量值的方法作为转化血液测量

结果的方法,在该方法中,测量全血的血红蛋白浓度(g/L);采用通过使获得的血红蛋白浓度乘以约 3/10 获得的数值作为血细胞比容值(%);并使用血细胞比容值将来自全血的测量结果转化为测量血清或血浆情况下的测量值(专利文献 2)。然而,由于血红蛋白浓度和血细胞比容值必须通过与免疫色谱法测定不同的方法来获得,所以该方法很麻烦,需要时间和成本,并因此不能满足 POCT 领域中测试的需求。

[0006] 因此,需要基于免疫色谱法的同时测量分析物和血红蛋白的方法;然而,由于全血中的血红蛋白浓度正常为数十 g/L 至 200g/L,这是非常高的浓度,需要进行 10,000- 至 100,000- 倍稀释,以用于基于正常夹心式免疫测定原理的测定。在该方法中,需要大量稀释溶液来进行一步式稀释,这导致测量精确性的破坏。利用多步式稀释的方法存在缺乏用于 POCT 领域中测试方法的实用性的问题。为了解决这些问题,需要能够测量的免疫色谱法测定,其中具有至多 50-400 倍的全血的溶血稀释操作。

[0007] 引用列表

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献 1 :公开的 PCT 申请 WO 2010/001598

[0010] 专利文献 2 :日本特开专利公开号 2001-272403

[0011] 发明概述

[0012] 技术问题

[0013] 例如,C 反应蛋白(以下也称为"CRP")的血液浓度在健康个体中等于或小于 3mg/L,在手术后或在急性细菌感染的情形中至多约 35mg/L,且在严重受伤个体中多至约 1000mg/L。另一方面,血红蛋白的血液浓度正常为数十 g/L 至 200g/L,这与 CRP 在浓度上相差约 50-67000 倍,并且对于进行免疫测定的分析物是非常高的浓度。因此,当企图在基于夹心式免疫色谱法原理的测定中测量 CRP 和血红蛋白二者时,样品的稀释比率必须根据分析物而进行相当大的改变并且,因此,样品(处于相同稀释比率的样品)中的测量非常困难。

[0014] 规定免疫测定测量范围的最重要因素包括抗原和抗体之间的亲合力(avidity)和影响其结合反应多种环境因子。这些环境因子包括温度、时间、pH、离子环境、和产生某些效果的试剂诸如表面活性剂和反应促进剂的添加。在同一样品中同时测量 CRP 和血红蛋白的浓度可以原则上通过以下过程来实现:选择具有不同亲合力的抗体和获得合适环境因子从而弥补显著的浓度差距。然而,制备这样的抗体组合和获得所述合适的环境因子并不容易。

[0015] 实际上,当本发明人最初考虑通过夹心式免疫色谱法同时测量 CRP 和血红蛋白时,50- 至 200- 倍稀释足以测量 CRP,而需要 2000- 至 100,000- 倍稀释来测量血红蛋白。因此,不能通过利用同一稀释样品测量 CRP 和血红蛋白。

[0016] 本发明的目的是提供利用同一稀释样品,通过免疫色谱法测量同一样品中分析物和血红蛋白浓度的方法和通过利用血红蛋白的测量值进行分析物测量值血细胞比容校正的方法,以及提供用于在这些方法中使用的免疫色谱测试条和试剂盒。

[0017] 解决问题的方案

[0018] 本发明人已经发现血红蛋白的数量可以通过利用这样的现象通过免疫色谱测试条确定,所述现象是:其中甚至在通过以约 100 倍稀释和溶血获得的样品中,即甚至在样品

中血红蛋白浓度等于或大于获得血红蛋白测量最大信号值时的浓度的范围内（下文中也称为前带现象区），在免疫色谱测试条的不溶性膜支持物上固定的一排抗血红蛋白抗体捕获的胶体金标记物中，反射光强度随着血红蛋白浓度的增加而减小；并且发现 CRP 可以在稀释样品中测量，由此导致本发明的完成。

[0019] “免疫色谱测试条（用于免疫色谱法的测试条）”指至少包括免疫色谱法所需的不溶性膜支持物和有需要时，还包括试剂成分、另外的膜等的那些测试条。

[0020] 本发明包括以下内容。

[0021] (1) 通过免疫色谱法测量至少包含第一分析物的样品的方法，其包括以下步骤 A，其中样品中第一分析物的浓度在等于或大于获得所述第一分析物的最大信号值时的浓度的范围（前带现象区）内测量，

[0022] A. 利用下述 1) 和 2)，通过竞争性免疫色谱法测量样品中第一分析物的步骤：

[0023] 1) 缀合物，其中针对所述第一分析物的第一抗体固定于标记物；和

[0024] 2) 不溶性膜支持物，针对所述第一分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物（如果针对所述第一分析物的第一抗体的表位是单价的，则所述第二抗体的表位与第一抗体不同，而如果所述第一抗体的表位是多价的，则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同）。

[0025] (2) 根据 (1) 的方法，其中步骤 A 还使用下述 3) 和 4) 并且其中 1) 的缀合物包含在垫中，以形成缀合物垫并置于 2) 的不溶性膜支持物的上游侧，

[0026] 3) 样品垫，其位于缀合物垫的上游侧并供给以样品，和

[0027] 4) 吸收垫，其位于 2) 的不溶性膜支持物的下游侧。

[0028] (3) 根据 (1) 或 (2) 的方法，其中所述第一分析物是血红蛋白，且其中所述样品通过对血液进行稀释和溶血以达到等于或大于获得血红蛋白测量的最大信号值时的浓度范围的浓度范围（前带现象区）内来获得。

[0029] (4) 通过免疫色谱法测量至少包含血红蛋白，即所述第一分析物和第二分析物的样品的方法，其包括以下步骤 A 至 D：

[0030] A. 利用下述 1) 和 2)，通过竞争性免疫色谱法测量样品中第一分析物的步骤：

[0031] 1) 缀合物，其中针对所述第一分析物的第一抗体固定于标记物；和

[0032] 2) 不溶性膜支持物，针对所述第一分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物（如果针对所述第一分析物的第一抗体的表位是单价的，则所述第二抗体的表位与第一抗体不同，而如果所述第一抗体的表位是多价的，则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同）；

[0033] B. 利用下述 5) 和 6)，通过免疫色谱法测量样品中第二分析物的步骤：

[0034] 5) 缀合物，其中针对所述第二分析物的第一抗体固定于标记物；和

[0035] 6) 不溶性膜支持物，针对所述第二分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物（如果针对所述第二分析物的第一抗体的表位是单价的，则所述第二抗体的表位与第一抗体不同，而如果所述第一抗体的表位是多价的，则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同）；

[0036] C. 从步骤 A 获得的第一分析物的测量值获得样品的血细胞比容值的步骤；和

[0037] D. 通过利用步骤 C 获得的血细胞比容值校正步骤 B 获得的第二分析物的测量值的

步骤。

[0038] (5) 根据 (4) 的方法,其中步骤 A 和 B 是使用相同不溶性膜支持物的步骤。

[0039] (6) 根据 (5) 的方法,其中步骤 A 和 B 在相同流动通道中进行。

[0040] (7) 根据 (4) 至 (6) 中任一项的方法,其中所述第二分析物是 CRP。

[0041] (8) 用于通过免疫色谱法测量至少包含第一分析物和第二分析物的样品的免疫色谱测试条,所述免疫色谱测试条包括以下 E 和 F:

[0042] E. 用于测量所述第一分析物的测试条,其包括下述 1) 和 2),

[0043] 1) 缀合物,其中针对所述第一分析物的第一抗体固定于标记物;和

[0044] 2) 不溶性膜支持物,针对所述第一分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物(如果针对所述第一分析物的第一抗体的表位是单价的,则所述第二抗体的表位与第一抗体不同,而如果所述第一抗体的表位是多价的,则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同);和

[0045] F. 用于测量第二分析物的测试条,其包括下述 5) 和 6),

[0046] 5) 缀合物,其中针对所述第二分析物的第一抗体固定于标记物;和

[0047] 6) 不溶性膜支持物,针对所述第二分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物(如果针对所述第二分析物的第一抗体的表位是单价的,则所述第二抗体的表位与第一抗体不同,而如果所述第一抗体的表位是多价的,则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同)。

[0048] (9) 根据 (8) 的免疫色谱测试条,其中 E 中 1) 和 F 中 5) 的缀合物包含在相同垫中,以形成缀合物垫,并且其中 E 中 2) 的不溶性膜支持物与 F 中 5) 不溶性膜支持物相同。

[0049] (10) 根据 (9) 的免疫色谱测试条,其中 E 和 F 置于相同流动通道内。

[0050] (11) 根据 (8) 至 (10) 中任一项的免疫色谱测试条,还包括以下 G 和 H,其中 E 中 1) 和 F 中 5) 的缀合物包含在垫中以形成缀合物垫并置于 E 中 2) 和 F 中 6) 的不溶性膜支持物的上游侧,

[0051] G. 样品垫,其位于缀合物垫的上游侧并供给以样品,和

[0052] H. 吸收垫,其位于 E 中 2) 和 F 中 6) 的不溶性膜支持物的下游侧。

[0053] (12) 根据 (8) 至 (11) 中任一项的免疫色谱测试条,其中所述第一分析物是血红蛋白。

[0054] (13) 根据 (12) 的免疫色谱测试条,其中所述第二分析物是 CRP。

[0055] (14) 用于免疫色谱法的测定试剂盒,其包括:根据 (12) 或 (13) 的免疫色谱测试条;和用于血红蛋白溶血和稀释的稀释溶液。

[0056] (15) 通过免疫色谱法测量至少包含第一分析物和第二分析物的样品的方法,其包括以下步骤 A 和 B:

[0057] A. 利用下述 1) 和 2),通过竞争性免疫色谱法测量样品中第一分析物的步骤:

[0058] 1) 缀合物,其中针对所述第一分析物的第一抗体固定于标记物;和

[0059] 2) 不溶性膜支持物,针对所述第一分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物(如果针对所述第一分析物的第一抗体的表位是单价的,则所述第二抗体的表位与第一抗体不同,而如果所述第一抗体的表位是多价的,则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同);和

[0060] B. 利用下述 5) 和 6), 通过免疫色谱法测量样品中第二分析物的步骤,

[0061] 5) 缀合物, 其中针对所述第二分析物的第一抗体固定于标记物; 和

[0062] 6) 不溶性膜支持物, 针对所述第二分析物的第二抗体固定于所述不溶性膜支持物 (如果针对所述第二分析物的第一抗体的表位是单价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗体不同, 而如果所述第一抗体的表位是多价的, 则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同)。

[0063] (16) 根据 (15) 的方法, 其中所述第二分析物是 CRP。

[0064] 对于能够在常规认为不适合于量化的前带现象区内进行测量的原因, 本发明人推测如下。血红蛋白浓度在以约 100 倍稀释和溶血的血液样品中太高, 由此导致不能与抗血红蛋白抗体固定的胶体金 (缀合物) 结合的游离血红蛋白。因此, 发生上述现象, 其归因于当游离血红蛋白与不溶性膜支持物上固定的抗血红蛋白抗体结合时, 它与抗血红蛋白抗体固定的胶体金和血红蛋白的复合物相竞争。

[0065] 发明有利效果

[0066] 根据本发明, 即使在包含高度浓缩的分析物的样品中, 分析物的浓度可以在等于或大于在该分析物测量系统中获得最大信号值的浓度的浓度范围 (前带现象区) 内来测量, 由此相当大地减少稀释样品所需的努力和成本。

[0067] 应用本发明测量血红蛋白容许规定免疫色谱测试条和用于免疫色谱法的测定试剂盒能够通过同一免疫色谱法测量同样品中分析物和血红蛋白的浓度和由血红蛋白的测量值进行分析物测量值的血细胞比容校正并且, 因此, 与常规方式相比, 分析物的精确血液浓度测量可以以简单操作短时间内进行, 由此满足 POCT 领域中的社会需要。

[0068] 附图简述

[0069] [图 1] 图 1 显示免疫色谱测试条的示意性结构。

[0070] [图 2] 图 2 显示实施例 1 的血红蛋白测量的结果。

[0071] [图 3] 图 3 显示实施例 1 的 CRP 测量中的校准曲线。

[0072] [图 4] 图 4 是实施例 1 的来自血红蛋白测量线的反射光强度和血细胞比容值之间关系的图表。

[0073] [图 5] 图 5 是实施例 1 中在无血细胞比容校正条件下利用本发明的免疫色谱测试条获得的 CRP 浓度与利用商购 CRP 测量试剂盒 (由 Sekisui Medical Co., Ltd. (积水医疗株式会社) 制造的 "Nanopia CRP") 获得的 CRP 浓度之间相关性的图表。

[0074] [图 6] 图 6 是实施例 1 中使用血细胞比容校正获得的 CRP 浓度与利用商购 CRP 测量试剂盒 (由 Sekisui Medical Co., Ltd. (积水医疗株式会社) 制造的 "Nanopia CRP") 获得的 CRP 浓度之间相关性的图表。

[0075] [图 7] 图 7 是当通过实施例 1 的免疫色谱测试条获得的 CRP 浓度使用平均血细胞比容值 44% 统一校正时的 CRP 浓度与利用商购 CRP 测量试剂盒 (由 Sekisui Medical Co., Ltd. (积水医疗株式会社) 制造的 "Nanopia CRP") 获得的 CRP 浓度之间相关性的图表。

[0076] [图 8] 图 8 是实施例 2 的来自血红蛋白测量线的反射光强度和血细胞比容值之间关系的图表。

[0077] [图 9] 图 9 显示实施例 2 的 CRP 测量中的校准曲线。

[0078] [图 10] 图 10 是当实施例 2 中不进行 HCT 校正时, 商购 CRP 测量试剂盒 (Nanopia

CRP) 和本发明方法之间相关性的图表。

[0079] [图 11] 图 11 是当实施例 2 中进行 HCT 校正时, 商购 CRP 测量试剂盒 (Nanopia CRP) 和本发明方法之间相关性的图表。

[0080] [图 12] 图 12 是膜的毛细流动时间对 Hb 测量影响图表。

[0081] 实施方案描述

[0082] 将通过以当第二分析物是 CRP 的测量法作为实例, 详细描述作为本发明实施方案之一的具有血细胞比容校正的测量法。在该情形中, 第一分析物是血红蛋白且第二分析物是 CRP。

[0083] 当使用本发明的测量法测量 CRP 时, 血液在同时溶血和稀释至所需浓度后用作样品, 以使得 CRP 和血红蛋白可以通过基于免疫色谱法原理的免疫测定同时测量。

[0084] 本发明测量法中样品中的血红蛋白浓度必须在等于或大于获得血红蛋白测量的最大信号值时浓度的浓度范围 (前带现象区) 内。换言之, 样品中的血红蛋白浓度必须被设定为在等于或大于获得血红蛋白测量的最大信号值时浓度的浓度范围 (前带现象区) 内。特别地, 适合时通过改变稀释倍数, 将样品稀释至等于或大于获得血红蛋白测量的最大信号值时浓度的范围内。因此, 样品中的血红蛋白浓度被设定为等于或大于获得血红蛋白测量的最大信号值时的浓度, 且血红蛋白浓度可以由与血红蛋白浓度成反比的检测强度减小程度而获得。可以进行初步测试, 以预先获得这样的浓度, 即获得血红蛋白测量的最大信号值时的浓度。备选地, 这样的浓度可以通过由样品类型 (患者特征) 和过去的测试结果预测的血红蛋白浓度来预先预测。特别地, 以 50 至 200 倍稀释和溶血的血液样品可以用于通过免疫色谱法同时测量同一样品中的 CRP 和血红蛋白。理想地, 优选设定稀释比率为 100 倍, 因为 CRP 测量范围应该设定为 0.2-20mg/mL。

[0085] 使用本发明测量法的 CRP 测量包括以下步骤: 将稀释和溶血血液样品滴在免疫色谱测试条的样品垫上, 在具有抗血红蛋白抗体, 即固定于不溶性膜支持物的针对血红蛋白的抗体 (针对血红蛋白的第二抗体) 的测量部分 (下文中也称为“血红蛋白测量线”) 上测量血红蛋白浓度, 和由血红蛋白的测量值获得血液样品的血细胞比容值。特别地, 血红蛋白浓度通过使用其中针对血红蛋白的第一抗体固定于标记物的缀合物和其上固定有针对血红蛋白的第二抗体的不溶性膜支持物 (如果针对血红蛋白的第一抗体的表位是单价的, 则所述第二抗体的表位与第一抗体不同, 而如果所述第一抗体的表位是多价的, 则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同) 来测量。血红蛋白浓度可以作为测量值, 由来自具有固定的针对血红蛋白的第二抗体的不溶性膜支持物上的血红蛋白测量线的信号差直接获得或可以由该信号差计算的血红蛋白浓度。根据本发明的测量法, 由于样品中的血红蛋白浓度在等于或大于获得血红蛋白测量的最大信号值时浓度的浓度范围 (前带现象区) 内测量, 血红蛋白浓度由与血红蛋白浓度成反比的吸光度或反射光强度的减小程度来获得。

[0086] 血细胞比容值可以由测量的信号或血红蛋白浓度值差异和由权威方法诸如离心法提供的血细胞比容值之间的相关性表述来计算。

[0087] 尽管免疫色谱测试条可以是仅用于测量血红蛋白的测试条, 但是如果该测试条是制备的容许同时测量 CRP 和血红蛋白的单免疫色谱测试条则更理想。理想的形式是本发明以上 (9) 或 (10) 中所述的免疫色谱测试条。

[0088] 使用本发明的测量法的 CRP 的测量包括以下步骤：将稀释和溶血血液样品滴在免疫色谱测试条的样品垫上，和在具有抗 CRP 抗体，即固定于不溶性膜支持物的针对 CRP 的抗体（针对 CRP 的第二抗体）的测量部分（下文中也称为“CRP 测量线”）上测量 CRP 浓度。特别地，CRP 浓度通过使用其中针对 CRP 的第一抗体固定于标记物的缀合物和其上固定有针对 CRP 的第二抗体的不溶性膜支持物（如果针对 CRP 的第一抗体的表位是单价的，则所述第二抗体的表位与第一抗体不同，而如果所述第一抗体的表位是多价的，则所述第二抗体的表位可以与第一抗体相同或在一些情形中所述第一抗体可以与所述第二抗体相同）来测量。CRP 浓度可以作为测量值，由来自具有固定的针对 CRP 的第二抗体的不溶性膜支持物上的 CRP 测量线的信号差直接获得，或可以是由该信号差计算的 CRP 浓度。

[0089] 将样品滴在免疫色谱测试条的样品垫上可以使用能够滴落一定量的样品如临床检查领域中常用的那些样品的任何程序来进行，并可以使用能够滴落一定量小滴的测量吸管或滴管进行。滴落可以手工进行或可以使用自动操作装置。

[0090] 测量源自标记物的信号的方法可以根据已知技术执行并且，例如，如果标记物是胶体金，则可以测量吸光度和反射光强度。CRP 和血红蛋白的浓度可以通过将吸光度或反射光强度的差异外推至具有已知浓度的样品的标准曲线中来同时计算。

[0091] 使用本发明的测量法的 CRP 的测量包括以下步骤：使用由在测试条的血红蛋白测量线中测量的血红蛋白值计算的血细胞比容值来校正 CRP 测量线中测量的 CRP 浓度。在通过血细胞比容校正计算 CRP 的方法中，计算如通过通常使用下述另一种方法获得的血细胞比容值进行校正的情形来进行。

[0092]

$$\text{校正的CRP测量值} = \frac{\text{未校正的CRP测量值}}{(1 - \text{本发明中算出的血细胞比容值}(\%)/100)}$$

[0093] 由于血红蛋白可以在以 50-400 倍溶血和稀释的样品中，通过利用由与血红蛋白浓度成反比的反射光强度减小程度测量血红蛋白浓度的方法来测量，如果共存的第二分析物可以以 50-400 倍稀释时测量，则同一样品可以用于通过免疫色谱法测量血红蛋白和所述第二分析物。

[0094] 能够进行血细胞比容校正的“第二分析物”指血液（全血）中包含的成分，即除进行血细胞比容校正外，不能获得精确测量值的物质。第二分析物的实例包括：与炎症相关的标记物诸如 C 反应蛋白（CRP）、IgA、IgG 和 IgM；凝结或纤维蛋白溶解标记物诸如血纤蛋白降解产物诸如 D-二聚体、可溶性血纤蛋白、TAT（凝血酶-抗凝血酶复合物）和 PIC（纤溶酶-纤溶酶抑制剂复合物）；心血管相关标记物诸如氧化的 LDL 和 BNP（脑利钠肽）；新陈代谢相关的标记物诸如脂连蛋白；肿瘤标记物诸如 CEA（癌胚抗原）、AFP（α-胎蛋白）、CA19-9、CA125 和 PSA（前列腺特异性抗原）；传染病相关标记物诸如 HBV（乙型肝炎病毒）和 HCV（丙型肝炎病毒）；过敏原特异性 IgE（免疫球蛋白 E）；激素；和药物。

[0095] 将详细描述具有本发明血细胞比容校正机制的用于免疫色谱法的测试条和测定试剂盒。

[0096] （抗体）

[0097] 本发明中使用的针对分析物的抗体可以是与所述分析物特异性反应的任何抗体，

不受制备所述抗体方法的限制,并且以是多克隆抗体或单克隆抗体。例如,如果所述分析物是人 CRP 或人血红蛋白,则抗人 CRP 抗体或抗人血红蛋白抗体可以是与人 CRP 或人血红蛋白特异性反应的任何抗体,不受制备所述抗体方法的限制,并且可以是多克隆抗体或单克隆抗体。生成抗体的杂交瘤一般可以根据 Kohler 和 Milstein 的方法(参见 Nature(自然),卷 256,第 495 页,1975),通过由人 CRP 或人血红蛋白免疫的动物的脾细胞和同源骨髓瘤细胞之间的细胞融合产生。

[0098] 当所用抗体是单克隆抗体时,关于固定于标记物的抗体(第一抗体)和与不溶性膜支持物固定的抗体(第二抗体)之间的关系,如果第一抗体的表位是单价的,则使用与第一抗体不同的第二抗体的表位且,如果第一抗体的表位是多价的,则第二抗体的表位可以是与第一抗体相同的抗体或第一抗体可以是与第二抗体相同的抗体。当使用以约 100 倍稀释和溶血的血液作为样品时,抗体理想地组合,从而使 CRP 浓度可以在 2-20mg/L 的范围测量。例如,在针对 CRP 的抗体的组合中,合乎需要地使用由登记号 FERM BP-11344 的杂交瘤产生的单克隆抗体作为固定于标记物的第一抗体和由登记号 FERM BP-11345 的杂交瘤产生的单克隆抗体作为与不溶性膜支持物固定的第二抗体。备选地,合乎需要地使用本发明人通过稍后描述的试验方法利用人 CRP 等作为抗原产生的两种杂交瘤获得的抗人 CRP 单克隆抗体 #08210 和 #08209 的组合。

[0099] 针对血红蛋白的抗体的组合可以是,例如,本发明人通过使用人血红蛋白免疫小鼠由两种杂交瘤产物获得的抗人血红蛋白单克隆抗体 #69202 和 #69209 的组合,或可以是适合时,由商购抗血红蛋白抗体选择的合适组合。

[0100] (样品垫)

[0101] 术语“样品垫”用于本文中时,指供给了样品的部分并包括能够以垫的形式吸收液体样品并容许样品中的液体成分和分析物通过的任何材料或形状。适合用于样品垫的材料的具体实例包括,但不限于,玻璃纤维、丙烯酸纤维、亲水性聚乙烯材料、干燥的纸、纸浆、织物等。优选使用玻璃纤维垫。样品垫还可以具有稍后描述的缀合物垫的功能。样品垫可以包含封闭试剂,所述封闭试剂普遍用于防止或抑制具有固定的抗体的不溶性膜支持物中的非特异性反应(吸附)。关于封闭试剂,对反应系统无作用的试剂可以适当地选自,例如,NEO PROTEIN SAVER 丝胶蛋白、ImmunoBlock™、Applied Block、SEA BLOCK™/EIA/WB、Blocking One、BSA、封闭肽片段(Blocking Peptide Fragment)、Starting Block™(PBS) 封闭缓冲液(Starting Block™(PBS)Blocking Buffer)、Smart Block™和 HeteroBlock。

[0102] (标记物)

[0103] 通常称为免疫色谱法中的抗体-固定载体的材料可以用于所述标记物。例如,胶体金颗粒、胶体铂颗粒、彩色乳胶颗粒和磁性颗粒是优选的且胶体金是特别优选的。

[0104] 已知胶体金的粒度(颗粒直径)显著影响免疫色谱测试条的灵敏度且本发明中使用的胶体金的粒度优选 20-60nm 且特别优选 30-45nm。胶体金颗粒可以使用普遍已知的方法,例如,通过在加热的四氯金酸盐(III)水溶液中滴入和搅拌柠檬酸三钠水溶液来制备。

[0105] 利用胶体金颗粒的情形将在下文中详细描述。

[0106] (缀合物)

[0107] 在本说明书中,“缀合物”指具有固定的抗体诸如抗 CRP 抗体、抗血红蛋白抗体和对照抗体的标记物。

[0108] (抗体针对标记物的敏化作用)

[0109] 将针对分析物的第一抗体固定于胶体金颗粒,例如,将针对 CRP 或血红蛋白的第一抗体固定于胶体金颗粒,通常通过物理吸附实现。由物理吸附引起的固定在由缓冲溶液组成的系统中进行,且抗体浓度优选以 $1\ \mu\text{g/mL}$ – $5\ \mu\text{g/mL}$ 制备,且缓冲溶液和 pH 优选是 2mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6–7) 或 2mmol/L 硼酸盐缓冲溶液 (pH 8–9) 且更优选是 2mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0)。胶体金颗粒上无结合的抗体的区域优选通过与牛血清清蛋白 (BSA) 等结合来封闭。将这样生成的并且其中第一抗体与标记物,诸如胶体金颗粒固定的缀合物分散和保存在用于抑制变性的保存试剂中。蛋白诸如牛血清清蛋白 (BSA)、甘油、糖等用于该变性抑制剂。

[0110] (检测试剂)

[0111] 在本发明中,“检测试剂”是至少包含所述缀合物的溶液。

[0112] 检测试剂可以包含,例如,一种或多种稳定剂、增溶剂等,以使得缀合物保持在稳定状态,从而促进与所述缀合物固定的抗体和分析物诸如 CRP 和血红蛋白之间的特异性反应或使所述缀合物在与样品混合时迅速有效地溶解和液化。所述稳定剂、增溶剂等可以包括,例如,牛血清清蛋白 (BSA)、蔗糖、酪蛋白和氨基酸。

[0113] 检测试剂可以包含已知的敏化剂诸如为了提高检测灵敏度所需要的 2- 甲基丙烯酰基氧乙基磷酸胆碱。

[0114] 检测试剂可以包含 Ca^{2+} 离子的螯合物诸如 EDTA 和 EGTA。

[0115] 术语“检测”或“测量 / 测定”用于本文中时,必须以最广的含义来解释,其包括验证和 / 或量化所述分析物,例如,CRP 或血红蛋白的存在,并且必须不能以在任何意义上受限的方式来解释。

[0116] (缀合物垫)

[0117] 术语“缀合物垫”用于本文中时,指这样的部分,其包括包含与分析物特异性反应的缀合物的检测试剂,例如,包含这样的缀合物的检测试剂,在所述缀合物中,与 CRP 或血红蛋白特异性反应的抗体固定于标记物,该部分具有当样品通过缀合物垫时容许检测试剂中的缀合物与分析物诸如 CRP 和血红蛋白形成复合物的功能。缀合物垫可以单独地置于与稍后描述的不溶性膜支持物相邻接,或者缀合物垫可以置于与样品垫相接触,从而接受样品通过毛细流动通过样品垫并然后同样通过毛细流动将样品运输至与表面相接触而非与样品垫相接触的另一个垫(下文中称为“第三个垫”)。选择一个或多个缀合物垫部分和如何相对于不溶性膜支持物、样品垫、第三个垫等放置所选部分在适当时可以改变。

[0118] 适合用于缀合物垫的材料包括,但不仅限于,纸、纤维素混合物、硝化纤维、聚酯、丙烯腈共聚物、玻璃纤维、和无纺织物诸如人造丝。优选使用由玻璃纤维制成的无纺织物组成的垫。

[0119] 缀合物垫可以包含“对照试剂”,以确保测定的可靠性,诸如不与分析物成分反应的标记的抗体和高抗原性蛋白诸如标记的 KLH(匙孔血蓝蛋白)。这样的对照试剂是样品中不预期存在的成分(物质)并在适当时是可选择的。缀合物垫可以包含,例如,一种或多种稳定剂、增溶剂等,以使得检测试剂保持在稳定状态,从而促进与分析物诸如 CRP 和血红蛋白的特异性反应或当缀合物与样品接触时使缀合物迅速有效地溶解和液化。所述稳定剂、增溶剂等可以包括,例如,牛血清清蛋白 (BSA)、蔗糖、酪蛋白和氨基酸。特别地,抗 CRP 抗

体可以在存在和缺乏 Ca^{2+} 离子时具有相当不同的反应性并且缀合物垫在适当时,可以包含 Ca^{2+} 离子螯合剂诸如 EDTA 和 EGTA,从而控制该反应性或,相反地,可以添加钙盐诸如 CaCl_2 以增加 Ca^{2+} 离子。

[0120] (第三个垫)

[0121] 在本发明中,可以放置第三个垫,从而将对于测量分析物(例如,CRP 或血红蛋白)不必要的成分从样品或检测试剂中存在的成分中去除,这样对于测量必要的成分可以在不溶性膜支持物中顺畅地前行。例如,溶血血液样品中存在的血细胞、不溶性血细胞碎片等理想地作为对于测量 CRP 和血红蛋白不必要的成分而被去除。所述第三个垫还可以被赋予另外的功能,即初步去除由抗原-抗体反应产生的那些凝集,所述凝集生长至不能移动至不溶性膜支持物和在其中不能顺畅流动的尺寸。所述第三个垫可以包括容许样品中液体成分和分析物通过的任何材料或形状。所述第三个垫的实例包括,但不仅限于,由玻璃纤维、丙烯酸纤维、亲水性聚乙烯材料、干燥的纸、纸浆、织物等制成的垫。优选使用血细胞分离膜或类似的膜。

[0122] (不溶性膜支持物)

[0123] 在本发明中,不溶性膜支持物(下文中也简称为所述膜)可以是常规已知的支持物并可以由任何材料制成。所述膜的材料包括,但不仅限于,聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二酯、尼龙、玻璃、多糖诸如纤维素和纤维素衍生物、或陶瓷。具体实例包括可获自 Millipore, Toyo Roshi, 和 Whatman 的玻璃纤维滤纸和纤维素滤纸。

[0124] 在不溶性膜支持物上,针对分析物的第二抗体固定于测量分析物的部分(测量线)。

[0125] 不溶性膜支持物孔径、构造等的合适选择可以控制其中第一抗体(例如,抗 CRP 抗体)固定于标记物诸如胶体金颗粒的缀合物和分析物(例如,CRP)的免疫复合物流过所述膜的速度。与针对固定于所述膜的分析物的第二抗体结合的标记的抗体的量可以通过控制所述免疫复合物流过所述膜的速度来调节。因此,所述膜的孔径和构造理想地通过考虑与本发明免疫色谱测试条的其他组成材料的相容性来优化。特别地,当分析物是以较高浓度存在于样品中的第一分析物诸如血红蛋白时,血红蛋白通过利用不与缀合物结合的血红蛋白与血红蛋白和缀合物的免疫复合物之间的竞争性反应来测量,在稍后描述的实施例中,该血红蛋白测量中的毛细流动时间优选为 30 秒/cm-60 秒/cm。优选使用由 Millipore 等制造的 HiFlowPlus SHF180。

[0126] (抗体与不溶性膜支持物的固定)

[0127] 可以使用已知的方法作为将针对分析物(例如,CRP 或血红蛋白)的第二抗体固定于不溶性膜支持物的方法。例如,如果免疫色谱测试条具有直流(flow-through)形式(基于直流的),则第二抗体制备为处于预定浓度的溶液,并在将一定量的溶液在一点以某种符号诸如“+”的形状应用于不溶性膜支持物。如果免疫色谱测试条具有侧向流动形式(基于侧向流动的),则将第二抗体制备为处于预定浓度的溶液并利用具有这样的机制的装置将该溶液以线形应用于不溶性膜支持物,所述机制能够在以恒速由喷嘴释放该溶液时水平移动。在该情形中,溶液中的第二抗体浓度优选为 0.1mg/mL-5mg/mL,且更优选为 0.5mg/mL-2mg/mL。不溶性膜支持物上固定的第二抗体量可以通过调节滴在不溶性膜支持物上的溶液量来优化,条件是免疫色谱测试条具有直流形式,并且可以通过调节由装置喷嘴释放

溶液速度来优化,条件是免疫色谱测试条具有侧向流动形式。特别地,在侧向流动形式的情形中,释放速度优选是 $0.5 \mu\text{L}/\text{cm}$ - $2 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。术语“直流形式(基于直流的)”用于本文中时,指这样的形式,其中样品等垂直通过不溶性膜支持物从而流动前进,且术语“侧向流动形式(基于侧向流动的)”指这样的形式,其中样品等与不溶性膜支持物平行地移动从而流动前进。

[0128] 在侧向流动形式的情形中,将针对分析物(例如,CRP 或血红蛋白)的第二抗体应用于不溶性膜支持物的位置可以这样安排,以使得分析物、其中的分析物与缀合物相结合的免疫复合物等与应用的第二抗体中的每一种一起,通过毛细管作用由缀合物垫开始前进并随后通过测量位点(测量线)。例如,如果分析物是血液样品中的 CRP 和血红蛋白,则优选进行这样的排列,以使得具有应用的抗 CRP 抗体的 CRP 测量线位于上游,同时具有应用的抗血红蛋白抗体的血红蛋白测量线位于下游。在该情形中,需要保持各测量线之间足够的距离,以使得可以检测到标记物的信号。在直流形式的情形中,将第二抗体应用于 CRP 或血红蛋白的位置也可以这样安排,以使得可以检测到标记物的信号。

[0129] 应用于不溶性膜支持物的抗体溶液通常可以通过利用预先确定的缓冲溶液制备。所述缓冲溶液的类型可以包括常用的缓冲溶液诸如磷酸盐缓冲溶液、Tris 缓冲溶液和 Good's 缓冲溶液。所述缓冲溶液优选具有在 6.0-9.5,更优选 6.5-8.5,进一步优选 7.0-8.0 范围中的 pH。所述缓冲溶液可以包含盐诸如 NaCl,稳定剂和抗菌剂诸如蔗糖,和防腐剂诸如 ProClin。所述盐包括为了调节离子强度添加的那些盐,诸如 NaCl,以及在调节缓冲溶液 pH 步骤中添加的那些盐,诸如氢氧化钠。

[0130] 当第二抗体固定于不溶性膜支持物后,封闭可以通过利用常用封闭剂,在溶液或蒸汽状态中进行,所述溶液或蒸汽状态在除具有固定的第二抗体的部分以外的部分被覆盖。在本说明书中,如上所述的具有固定的抗体的不溶性膜支持物也称为“固定抗体的膜”。

[0131] (吸收垫)

[0132] 术语“吸收垫”用于本文中时,指吸收已经移动/通过不溶性膜支持物的样品以控制样品流动前进的液体吸收部分。例如,在侧向流动形式中,吸收垫可以提供在免疫色谱测试条的下游端,且在直流形式中,吸收垫可以提供在固定抗体的膜的下面。吸收垫的实例包括,但不仅限于,滤纸。优选使用由 Whatman 制造的 740-E 等。

[0133] (免疫色谱测试条)

[0134] 在本发明中,“免疫色谱测试条”(下文中也称为“测试条”)应该是至少包括具有固定的抗体的不溶性膜支持物的产物,并应该是在需要时包含试剂成分的产物或适当地与其他膜等合适地放置和相适合的产物。其他膜可以是样品垫、缀合物垫、吸收垫等。测试条通常在固相支持物诸如粘性塑料片上形成。固相支持物以及所述粘性成分应该由不阻碍样品毛细流动的材料制成。可以进行使用聚酯膜等的分层,以获得增加固定抗体的膜的机械强度并防止测定过程中水蒸发(干燥)的目的。测试条可以在储存在关于测试条尺寸、应用样品的方式和位置、固定抗体的膜上抗体的固定位置、信号检测方法等合适的容器(外壳)中或装配在其上,并且这样的储存/装配状态称为“装置”。

[0135] (同一测试条)

[0136] 用于测试第一分析物诸如血红蛋白的测试条可以是与用于测试第二分析物诸如 CRP 的同一测试条,或是与其不同的单独的测试条。因此,在同一测试条的情形中,该测试条

由同一缀合物垫组成,所述缀合物垫包含其中针对第一分析物的第一抗体固定于标记物的缀合物和其中针对第二分析物的第一抗体固定于标记物,且具有针对第一分析物的第二抗体和针对第二分析物的第二抗体的同一不溶性膜支持物如上所述进行固定。然而,如果使用不同的单独的测试条,则同一样品通过利用用于测量第一分析物的测试条和用于测量第二分析物的测试条来测量,所述用于测量第一分析物的测试条由包含其中针对第一分析物的第一抗体固定于标记物的缀合物的缀合物垫和具有固定的针对第一分析物第二抗体的不溶性膜支持物组成,所述用于测量第二分析物的测试条由包含其中针对第二分析物的第一抗体固定于标记物的缀合物的缀合物垫和具有固定的针对第二分析物第二抗体的不溶性膜支持物组成。当使用同一测试条时,可以减小尺寸并可以容易地进行测量。另一方面,当使用单独的测试条时,当必要时可以制备多种其他分析物的组合并且认为各测试条更普遍且频繁地使用。甚至当测试条被分开时,测试条可以显然地保存在同一外壳中,以形成一个装置。

[0137] 本发明的免疫色谱测试条优选用于测量 C 反应蛋白 (CRP) (下文中也称为“免疫色谱法 CRP 测定测试条 (用于 CRP 测定的免疫色谱测试条)”)。免疫色谱法 CRP 测定测试条可以是这样的测试条,其至少包括具有固定的抗 CRP 单克隆抗体和抗血红蛋白抗体的膜以及其中抗 CRP 单克隆抗体固定于标记物的缀合物和其中抗血红蛋白抗体固定于标记物的缀合物,并可以根据测量条件和样品包含另一种试剂或组成元件。

[0138] 在本说明书中,“不溶性膜支持物”也称为“固相”并且,容许所述不溶性膜支持物以物理或化学方式支持抗原或抗体或容许所述不溶性膜支持物以物理或化学方式支持抗原或抗体的状态可以表述为“固定”,“固定化”,“固相化”、“敏化”、或“吸附”。

[0139] (样品)

[0140] 在本发明的测量法中待测量的“样品”是血液(全血或溶血的全血)。

[0141] (稀释溶液)

[0142] 本发明中使用的稀释溶液具有短期内对红细胞充分溶血的作用。可以使用任何组合物的稀释溶液,条件是抗原-抗体反应在第二分析物诸如血红蛋白和 CRP 的测量体系中不受到显著抑制或,相反地,不受到显著促进(其由于过量凝集导致由毛细管作用引起的流动前进的缺陷),或不容许根据抗原浓度的抗原-抗体反应信号检测。具有这样的作用的稀释溶液可以是例如,纯水或具有 pH 6.0-10.0 的缓冲溶液。所述缓冲溶液可以优选是 10-20mmol/L 缓冲溶液,例如,10-20mmol/L 磷酸盐缓冲溶液、10-20mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液、或 10-20mmol/L 甘氨酸-HCl 缓冲溶液。可以将表面活性剂加入至这些稀释溶液,由此增加溶血作用并控制样品等在膜中的流动前进速度。特别地,在测量作为第二分析物实例的 CRP 的系统中,如果使用由登记号 FERM BP-11344 的杂交瘤产生的单克隆抗体作为固定于标记物的第一抗体,且使用由登记号 FERM BP-11345 的杂交瘤产生的单克隆抗体作为固定于不溶性膜支持物的第二抗体,则稀释溶液可以包含由通式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{OSO}_3\text{Na}$ ($n = 5-10$) 表示的烷基硫酸钠,从而调节测量范围。合乎需要地添加 0.05-0.3% 己基硫酸钠、辛基硫酸钠等至所述稀释溶液,以获得优选浓度反应曲线。在该情形中,理想的稀释率是 50-200 倍。稀释溶液可以包含 Ca^{2+} 离子螯合剂诸如 EDTA 和 EGTA。

实施例

[0143] 本发明将通过提供测量作为第一分析物的血红蛋白（下文中也称为“Hb”）和作为第二分析物的 CRP 的实例来详细描述；然而，本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0144] 【实施例 1】

[0145] 1) 制备抗 CRP 抗体-敏化的缀合物（其中抗 CRP 单克隆抗体固定于胶体金颗粒的缀合物）和抗血红蛋白抗体-敏化的缀合物（其中抗血红蛋白单克隆抗体固定于胶体金颗粒的缀合物）

[0146] 制备抗 CRP 单克隆抗体（克隆：FERM BP-11344）和抗血红蛋白单克隆抗体（克隆：#69202），以使其具有以下缓冲溶液条件和抗体浓度；将 1mL 各种溶液加入至 20mL 的 10D/ml 胶体金颗粒溶液（粒度：40nm）；并在室温下搅拌混合物 10 分钟。将 2ml 的 10% 牛血清清蛋白（BSA）水溶液加入至各种胶体金颗粒-抗体混合物后，进一步搅拌混合物 5 分钟，并以 10,000rpm，在 10℃ 下离心 45 分钟以获得沉积物（抗 CRP 抗体-敏化的缀合物和抗血红蛋白抗体-敏化的缀合物）。向各种获得的缀合物中添加 1.2mL 缀合物稀释缓冲液（由 Scripps 制造），以悬浮缀合物。各种缀合物的吸光度在最大吸收峰处测量。

[0147] i) FERM BP-11344 (20 μ g/mL), 2mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 pH 7.0

[0148] ii) #69202 (80 μ g/mL), 2mmol/L 硼酸盐缓冲溶液 pH 9.0

[0149] 2) 制备缀合物垫

[0150] 通过将分别处于 200D/ml 和 100D/ml 的在 (1) 中生成的抗 CRP 抗体-敏化的缀合物和抗血红蛋白抗体-敏化的缀合物与包含 1.33% 酪蛋白和 4% 蔗糖的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.5) 进行混合来制备缀合物溶液。使具有一定体积的玻璃纤维垫（由 Pall Corporation (Pall 公司) 制造的 No. 8964）充满 1.2 倍体积（相对于该垫的体积）的缀合物溶液。将该垫在烘箱中以 70℃ 干燥 30 分钟，以获得缀合物垫。如果在需要时加入添加剂诸如敏化剂，则必需的量可以在进行上述操作前加入至所述缀合物溶液。

[0151] 3) 制备具有固定的抗 CRP 抗体和抗血红蛋白抗体的不溶性膜支持物（固定抗体的膜）

[0152] 抗 CRP 单克隆抗体（克隆：FERM BP-11345）和抗血红蛋白单克隆抗体（克隆：#69209）以 1mg/mL 制备为包含 2.5% 蔗糖的 10mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.2)，从而通过利用被设置为处于线形的 0.75 μ L/cm 的免疫色谱法分配器“XYZ3050”（由 BIO DOT 制造），以约 5mm 的间隔，将抗 CRP 单克隆抗体应用于硝化纤维膜（由 Millipore 制造的 SHF180）上短边一个边缘内测的位置处（CRP 测量线）并将抗血红蛋白单克隆抗体应用于外侧上（Hb 测量线）。该膜在烘箱中以 70℃ 干燥 45 分钟，从而获得固定抗体的膜。

[0153] 4) 制备样品垫

[0154] 使切割具有一定体积的玻璃纤维垫（由 Lydall 制造）充满 1.15 倍体积（相对于该垫的体积）的包含 24mmol/L NaCl、0.5% 蔗糖和 30mmol/L 乙二醇四乙酸的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.2)。该垫在烘箱中以 70℃ 干燥 45 分钟，从而获得样品垫。

[0155] 5) 制备测试条

[0156] 在粘性塑料片 (a) 上，放置并结合在 3) 中生成的固定抗体的膜 (b)，以使得抗 CRP 抗体 (c) 的应用部分（CRP 测量线）位于流动进程的上游部分，其后跟随着抗血红蛋白抗体 (d) 的应用部分（Hb 测量线），并且进一步放置由玻璃纤维垫组成的第三种垫 (i)。然后放置 2) 中生成的缀合物垫 (e)，并且放置 4) 中生成的样品垫 (f) 以与缀合物垫重叠，同时将

吸收垫 (g) 置于另一侧的末端。最后,在顶部放置并分层聚酯膜 (h),以覆盖固定抗体的膜和吸收垫。切割如上所述由重叠组成元件形成的结构,以生成免疫色谱测试条。在测定时,将测试条保存在专用塑料外壳(具有在样品垫上形成的样品供应窗和在测量线上形成的测量窗,图 1 中未描述)中/装配于其上,从而实现形成免疫色谱法测试装置。图 1 示意免疫色谱测试条的结构。

[0157] 6) 通过利用竞争性反应的竞争性免疫色谱法进行的血红蛋白测量(前带现象区中血红蛋白的测量)

[0158] 通过利用 EDTA-2Na 真空采血管,由同意进行采血的一名健康个体收集 5mL 血液。通过使用微量血细胞比容法利用所述血液的一部分测量的血细胞比容值是 46%,且验证了该样品在参考值内。使用 0.1% 己基硫酸钠和 10mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.2),对血液样品以 50-400 倍进行溶血和稀释,并且将 120 μ L 各种样品滴至以上 5) 中生成的免疫色谱法测试装置的样品供应窗,从而通过利用免疫色谱法读数器 ICA-1000(由 Hamamatsu Photonics K.K. 制造),在 5 分钟后,测量来自免疫色谱法测试装置检测窗的 Hb 测量线的反射光强度。结果,如图 2 中所示,获得减少剂量-响应曲线,这说明血红蛋白浓度的增加导致通过 Hb 测量线捕获的胶体金颗粒的反射光强度的减小,所述 Hb 测量线具有固定在免疫色谱测试条上的抗血红蛋白抗体。

[0159] 7) 生成 CRP 测量的校准曲线

[0160] 用于 Nanopia(由 Sekisui Medical Co.,Ltd.(积水医疗株式会社)制造)的 CRP 校准器 A 使用 0.1% 己基硫酸钠和 10mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH7.2) 稀释 100 倍,并且将 120 μ L 样品滴至 5) 中生成的免疫色谱法测试装置的样品供应窗,从而通过利用免疫色谱法读数器 ICA-1000(由 Hamamatsu Photonics K.K. 制造),在 5 分钟后,测量来自免疫色谱法测试装置检测窗的 CRP 测量线的反射光强度。图 3 描述 CRP 浓度范围 1.5-420mg/L 内的校准曲线。

[0161] 8) 使用微量血细胞比容法测量血细胞比容值

[0162] 通过利用 EDTA-2Na 真空采血管,由 22 名同意采血的健康个体收集 二十二 (22) 份 5mL 血液样本。各血液样本的一部分通过血细胞比容毛细管(由 Drummond 制造的 CEN02-0019) 来收集,并且在使用专用 pate (CRITOSEAL,由 HELIX 制造的 A422) 密封毛细管底部后,通过血细胞比容离心机(由 KOKUSAN 制造的 H-1200F),以室温,12000rpm 离心毛细管 10 分钟,从而利用与离心相关联的测量板测量血细胞比容值。

[0163] 9) 利用本发明的免疫色谱测试条计算 CRP 和血细胞比容值

[0164] 22 份血液样本的 CRP 浓度和血红蛋白浓度通过利用 5) 中生成的免疫色谱法测试装置来测量。具体地,使用 0.1% 己基硫酸钠和 10mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.2),以 100 倍稀释和溶血 2 μ L 各种血液样本,并将 120 μ L 样品滴至免疫色谱法测试装置的样品供应窗,从而通过利用免疫色谱法读数器 ICA-1000(由 Hamamatsu Photonics K.K. 制造),在 5 分钟后,测量来自免疫色谱法测试装置检测窗的 CRP 测量线和 Hb 测量线的反射光强度。将 CRP 测量线的反射光强度外推至图 3 的校准曲线,以获得 CRP 浓度。图 4 描述 Hb 测量线的反射光强度和 8) 中获得的血细胞比容值之间相关性表达式。使用该相关性表达式,由各种血液样本 Hb 测量线的反射光强度计算血细胞比容值。

[0165] 血细胞比容值 (%) (计算值) = (-0.0788) \times (Hb 测量线的反射光强度) + 68.585

[0166] 10) 通过本发明进行血细胞比容校正

[0167] 根据以下等式,通过 9) 中计算的血细胞比容值,对 9) 中计算的各种血液样本的 CRP 测量值进行血细胞比容校正。

[0168]

$$\text{校正的CRP测量值} = \frac{\text{未校正的CRP测量值}}{(1-\text{算出的血细胞比容值}(\%)/100)}$$

[0169] 11) 验证本发明血细胞比容校正的效果

[0170] 22 份血液样本的血浆中的 CRP 浓度通过利用基于乳胶凝集反应测量原理的商购试剂盒 (由 Sekisui Medical Co., Ltd. (积水医疗株式会社) 制造的 "Nanopia CRP") 来测量。图 5 描述 Nanopia CRP 的 "CRP 测量值" 和 9) 中计算的 CRP 浓度,即 "CRP 测量值 (无 HCT 校正)" 之间的相关性。图 6 描述 Nanopia CRP 的 "CRP 测量值" 和 10) 中计算的血细胞比容 - 校正的 CRP 浓度,即 "CRP 测量值 (具有 HCT 校正,本发明)" 之间的相关性。图 7 描述 Nanopia CRP 的 "CRP 测量值" 和通过使用平均血细胞比容值 (44%) 统一校正 9) 中计算的 CRP 浓度而获得的 CRP 浓度,即 "CRP 测量值 (具有统一 HCT 校正)" 之间的相关性。

[0171] 在不进行血细胞比容校正的 "CRP 测量值 (无 HCT 校正)" 的情形中,相对于通过商购 CRP 测量试剂盒测量的 CRP 测量值的相关性回归方程式的斜率是约 0.73 且 R^2 是约 0.965 (图 5),而在进行本发明的血细胞比容校正的 "CRP 测量值 (具有 HCT 校正)" 的情形中,该斜率是约 1.20 且 R^2 是约 0.989,并且认识到与在乳胶凝集反应中测量的 CRP 测量值的相关性的改善 (图 6)。

[0172] 另一方面,在通过使用平均血细胞比容值进行统一校正所获得的 "CRP 测量值 (具有统一校正)" 的情形中,相关性回归方程式斜率由约 0.73 增加至 1.30 并且,因此, y 轴截距由约 -0.23 变化为约 -0.41 (从零出发) (图 7)。

[0173] 由这些结果,证明 CRP 测量可以通过利用本发明的免疫色谱测试条测量同一样品中的 CRP 和血红蛋白浓度和通过利用样品中血红蛋白测量值和血细胞比容值之间相关性关系进行 CRP 测量值的血细胞比容校正来更精确地进行。

[0174] 测试例 1: 抗人 CRP 单克隆抗体的制备方法

[0175] 除实施例 1 中使用的抗人 CRP 单克隆抗体以外的单克隆抗体的组合通过以下方法获得并用于实施例 2 和 3 中。

[0176] 1) 免疫抗原的制备方法

[0177] 在人 CRP (由 Radioimmunoassay (放射免疫测定) 制造) 和弗氏完全佐剂 (由 Gibco 制造) 以 1 : 1 混合后,利用连接的注射器制备乳剂,并将其用作免疫抗原。Hb 通过阳离子交换色谱法由从志愿者收集的血液的红细胞级分的溶血血液来纯化。在该纯化的 Hb 与弗氏完全佐剂以相同方式 1 : 1 混合后,制备乳剂并将其用作免疫抗原。

[0178] 2) 杂交瘤的免疫和制备方法

[0179] 将免疫抗原注射至 BALB/c 小鼠 (50-100 μ g / 小鼠) 的腹腔内。每两周重复该操作 (免疫) 两次。当开始免疫后经过 5 周时,从通过测试血液收集验证具有较高抗体值的小鼠摘除脾,并利用 50% -PEG1450 (由 Sigma 制造),使用普通程序进行细胞融合。将 SP2/0 用于骨髓瘤细胞。将获得的融合细胞以 2.5×10^6 细胞 / mL (如脾细胞),混悬在包含 HAT、15%

胎牛血清和 10% BM-Condimed H1 杂交瘤克隆增补剂 Hybridoma Cloning Supplement (由 Roche 制造) 的 RPMI1640 培养基中, 并以 0.2mL/孔分配到 96-孔培养板上。细胞在 37°C, 5% CO₂ 的温育箱中温育。

[0180] 3) 筛选产生杂交瘤的单克隆抗体

[0181] 在从细胞融合 7-10 天后, 根据普遍程序 ("Yaku ni tatsu men-ekijikkenho", 由 Kodansha 发表, 1984), 利用培养物上清进行抗原固相 ELISA, 以选择与各抗原高度反应的孔作为阳性孔。阳性孔中的细胞通过 24-孔板继代培养。

[0182] 4) 克隆和单克隆抗体收集

[0183] 通过有限稀释法克隆通过筛选选择的杂交瘤, 以获得各种杂交瘤。为了收集由杂交瘤产生的单克隆抗体, 将杂交瘤以 $0.4-1.3 \times 10^6$ 个细胞的量施用于 8 周龄雄性 BALB/c 小鼠的腹腔中, 所述 BALB/c 小鼠在两周前经历了将 0.5mL pristine 注射至腹腔中。在从施用一周后每第二天收集腹水, 并对其进行离心处理以获得上清。将上清与等份的吸附缓冲溶液 (3mol/L NaCl, 1.5mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液, pH 8.5) 进行混合, 并然后过滤。滤出物通过使用吸附缓冲溶液平衡的蛋白 A 琼脂糖柱, 并用该柱吸附滤出物中的抗体, 然后在 0.1mol/L 柠檬酸盐缓冲溶液 (pH 3.0) 中进行洗脱。洗出液使用 1mol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 9.0) 来中和并使用 PBS 来透析, 从而收集纯化的抗体。在由如上所述获得的杂交瘤产生的单克隆抗体中, 与 CRP 高度反应的两种类型的抗体作为 #08209 和 #08210 用于以下实施例中。

[0184] 【实施例 2】

[0185] 1) 制备抗 CRP 抗体-敏化的缀合物 (其中抗 CRP 单克隆抗体固定于胶体金颗粒的缀合物) 和抗血红蛋白抗体-敏化的缀合物 (其中抗血红蛋白单克隆抗体固定于胶体金颗粒的缀合物)

[0186] 制备抗 CRP 单克隆抗体 (克隆:#08210) 和抗血红蛋白单克隆抗体 (克隆:#69202), 以使其具有以下缓冲溶液条件和抗体浓度。将 CRP 单克隆抗体 (克隆:#08210) 作为 10mL 抗体溶液加入至 200mL 的 10D/ml 胶体金溶液 (粒度:30nm); 将抗血红蛋白单克隆抗体 (克隆:#69202) 作为 10mL 抗体溶液加入至 200mL 的 10D/ml 胶体金溶液 (粒度:40nm); 并在室温下搅拌混合物 10 分钟。将 20ml 的 10% 牛血清清蛋白 (BSA) 水溶液加入至胶体金颗粒-抗体混合物后, 进一步搅拌混合物 5 分钟, 并以 10,000rpm, 在 10°C 下离心 45 分钟以获得沉积物 (抗 CRP 抗体-敏化的缀合物和抗血红蛋白抗体-敏化的缀合物)。向各种获得的缀合物中添加 12mL 缀合物稀释缓冲液 (由 Scripps 制造), 以悬浮缀合物。各种缀合物的吸光度在最大吸收波长处测量。

[0187] i) #08210 (20 μ g/mL), 2mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 pH 7.0

[0188] ii) #69202 (80 μ g/mL), 2mmol/L 硼酸盐缓冲溶液 pH 9.0

[0189] 2) 制备缀合物垫

[0190] 将分别处于 150D/ml 和 100D/ml 的在 (1) 中生成的抗 CRP 抗体-敏化的缀合物和抗血红蛋白抗体-敏化的缀合物与包含 1.33% 酪蛋白和 4% 蔗糖溶液的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.5) 进行混合, 以制备缀合物溶液。使具有一定体积的玻璃纤维垫 (由 Pall Corporation (Pall 公司) 制造的 No. 8964) 充满 1.2 倍体积 (相对于该垫的体积) 的缀合物溶液。将该垫在烘箱中以 70°C 干燥 30 分钟, 以获得缀合物垫。如果在需要

时加入添加剂诸如敏化剂,则必需的量可以在进行上述操作前加入至所述缀合物溶液。

[0191] 3) 制备具有固定的抗CRP抗体和抗血红蛋白抗体的不溶性膜支持物(固定抗体的膜)

[0192] 如实施例1的情形制备所述膜,区别在于使用克隆#08210,而非克隆FERM BP-11344作为抗CRP抗体。

[0193] 4) 制备样品垫

[0194] 如实施例1的情形制备样品垫。

[0195] 5) 制备测试条

[0196] 如实施例1的情形制备测试条,区别在于使用实施例2中3)的固定抗体的膜作为固定抗体的膜。如实施例1的情形,将获得的测试条转化为免疫色谱法测试装置的形式。

[0197] 6) 生成血细胞比容值(HCT值)计算的校准曲线

[0198] 使用用于总血红蛋白测量的认证的实用参考材料(JCCRM 622-1)来制备40.4g/L、80.7g/L、136.7g/L、185.7g/L和273.4g/L血红蛋白参考溶液,并且使用0.01%吐温20和10mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 7.2)将各参考溶液稀释151倍。由所述溶液中每一种,将120 μ L滴至免疫色谱法测试装置的样品供应窗,从而通过利用免疫色谱法读数器ICA-1000(由Hamamatsu Photonics K.K.制造),在5分钟后,测量来自免疫色谱法测试装置检测窗的Hb测量线的反射光强度。生成HCT值计算的校准曲线,其Y轴表示通过各参考溶液的血红蛋白浓度(g/L)乘以2.9/10获得的HCT值(%),且X-轴表示Hb测量线的反射光强度(图8)。

[0199] 7) 生成CRP测量的校准曲线

[0200] 通过使用0mg/L标准制剂稀释用于Nanopia(由Sekisui Medical Co., Ltd.(积水医疗株式会社)制造)的CRP校准器D的420mg/L标准制剂来制备0、3、10、30、60、120、210和420mg/L的稀释系列物。使用0.01%吐温20和10mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 7.2)将各稀释物稀释151倍,并且将120 μ L样品滴至测试装置的样品供应窗,从而通过利用免疫色谱法读数器ICA-1000(由Hamamatsu Photonics K.K.制造),在5分钟后,测量来自免疫色谱法测试装置检测窗的CRP测量线的反射光强度。图9描述CRP浓度范围0-420mg/L内的校准曲线。

[0201] 8) 利用本发明的免疫色谱测试条计算CRP和HCT值

[0202] 利用上述免疫色谱法测试装置进行200份样本的测量。具体地,使用0.01%吐温20和10mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 7.2),以150倍稀释和溶血10 μ L各份血液,并将120 μ L样品滴至免疫色谱法测试装置的样品供应窗,从而通过利用免疫色谱法读数器ICA-1000(由Hamamatsu Photonics K.K.制造),在5分钟后,测量来自免疫色谱法测试装置检测窗的CRP测量线和Hb测量线的反射光强度。

[0203] 将Hb测量线的反射光强度外推至图8的校准曲线,以获得HCT值(%),并将CRP测量线的反射光强度外推至图9的校准曲线,以获得CRP浓度。HCT校正后的CRP浓度使用以下等式计算。

[0204]

$$\text{校正的CRP测量值} = \frac{\text{未校正的CRP测量值}}{(1 - \text{算出的HCT值}(\%)/100)}$$

[0205] 9) 验证本发明 HCT 校正的效果

[0206] 200 份血液样本的血浆中的 CRP 浓度通过利用基于乳胶凝集反应测量原理的商购试剂盒 (由 Sekisui Medical Co., Ltd. (积水医疗株式会社) 制造的 Nanopia CRP) 来测量。

[0207] 图 10 描述 Nanopia CRP 的 "CRP 测量值" 和该实施例的 8) 中计算的 HCT 校正前的 CRP 浓度, 即 "CRP 测量值 (无 HCT 校正)" 之间的相关性。图 11 描述 Nanopia CRP 的 "CRP 测量值" 和该实施例的 8) 中计算的 HCT-校正的 CRP 浓度, 即 "CRP 测量值 (具有 HCT 校正, 本发明)" 之间的相关性。

[0208] 在不进行血细胞比容校正的 "CRP 测量值 (无 HCT 校正)" 的情形中, 相对于商购 CRP 测量试剂盒的相关性回归方程式的斜率是约 0.62 且 R^2 是约 0.930, 而在进行本发明的血细胞比容校正的 "CRP 测量值 (具有 HCT 校正)" 的情形中, 该斜率是约 0.99 且 R^2 是约 0.968, 并且认识到相关性的改善。

[0209] 由这些结果, 证明 CRP 测量可以通过根据本发明利用用于免疫色谱法的试剂测量同一测量样品中的 CRP 和血红蛋白浓度和通过利用样品中血红蛋白测量值和血细胞比容值之间相关性关系进行 CRP 测量值的血细胞比容校正来更精确地进行。

[0210] 【实施例 3】

[0211] 四种类型的免疫色谱法测试装置以与实施例 1 的 1) 至 5) 相同的方式制备, 其区别在于, 当制备 3) 的固定抗体的膜时, 使用克隆 08209 代替使用克隆 FERM BP-11345 作为抗 CRP 抗体, 且所述膜的毛细流动时间改变为 19 秒/cm (SHF75)、30 秒/cm (SHF120)、45 秒/cm (SHF180) 和 60 秒/cm (SHF240)。

[0212] 使用 0.01% 吐温 20 和 10mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.2) 将用于总血红蛋白测量的认证的实用参考材料 [JCCRM 622-1L (80.7g/L), 1mol/L (136.7g/L), 1H185.7g/L)] 稀释 151 倍, 并将 120 μ L 各溶液滴至四种类型的免疫色谱法测试装置的样品供应窗, 从而通过利用免疫色谱法读数器 ICA-1000 (由 Hamamatsu Photonics K.K. 制造), 在 5 分钟后, 测量来自所述装置检测窗的 Hb 测量线的反射光强度。生成 HCT 值计算的校准曲线, 其 Y 轴表示通过各参考溶液的血红蛋白浓度 (g/L) 乘以 2.9/10 获得的 HCT 值 (%), 且 X-轴表示 Hb 测量线的反射光强度 (图 12)。

[0213] 发现所述膜的毛细流动时间减少, 并且由此流动速度增加, 反射光强度的变化相对于 HCT 值的变化而减小。当毛细流动时间减至 19 秒/cm 时, 即使 HCT 值改变, 但是反射光强度几乎不改变。认为产生该结果的原因是本发明的 Hb 测量原理基于不与抗 Hb 抗体结合的游离 Hb 和与胶体金颗粒上的抗 Hb 抗体结合的 Hb 之间的竞争性反应。可能认为, 如果流动速度变得更高, 则游离 Hb 首先达到 Hb 测量线并填充 Hb 测量线上抗 Hb 抗体的全部 Hb 结合位点。由这些结果, 可知所述膜的毛细流动时间优选是 30 秒/cm-60 秒/cm。

[0214] 参考符号列表

[0215] (a) 粘性塑料片

[0216] (b) 固定抗体的膜

[0217] (c) 抗 CRP 抗体

[0218] (d) 抗血红蛋白抗体

[0219] (e) 缀合物垫

- [0220] (f) 样品垫
- [0221] (g) 吸收垫
- [0222] (h) 聚酯膜
- [0223] (i) 第三种垫
- [0224] 保藏的生物材料的说明
- [0225] 登记号
- [0226] FERM BP-11344
- [0227] FERM BP-11345
- [0228] (1)FERM BP-11344(产生 #08202 的杂交瘤)
- [0229] i) 保藏生物材料的保藏机构名称和地址
- [0230] 独立行政法人产业技术综合研究所特许生物保藏中心
- [0231] 日本国茨城县筑波市东 1-1-1 筑波中心 6(邮政编号 :305-8566)
- [0232] ii) i) 中保藏中心机构中生物材料保藏日期
- [0233] 2009 年 11 月 26 日
- [0234] iii) 由 i) 中保藏中心机构分配的保藏登记号
- [0235] FERM BP-11344
- [0236] (2)FERM BP-11345(产生 #08203 的杂交瘤)
- [0237] i) 保藏生物材料的保藏机构名称和地址
- [0238] 独立行政法人产业技术综合研究所特许生物保藏中心
- [0239] 日本国茨城县筑波市东 1-1-1 筑波中心 6(邮政编号 :305-8566)
- [0240] ii) i) 中保藏中心机构中生物材料保藏日期
- [0241] 2009 年 11 月 26 日
- [0242] iii) 由 i) 中保藏中心机构分配的保藏登记号
- [0243] FERM BP-11345

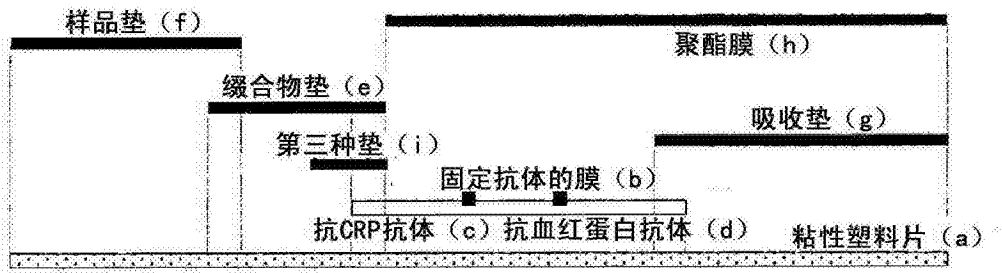


图 1

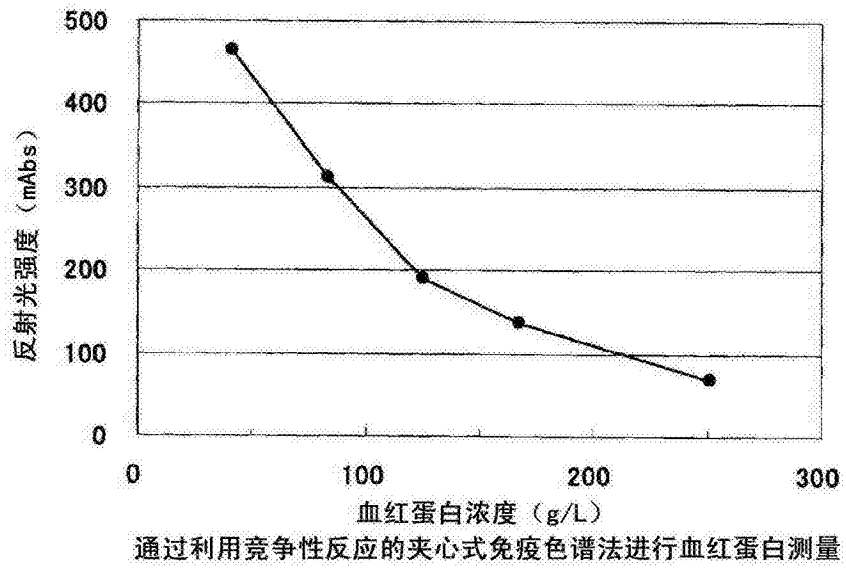


图 2

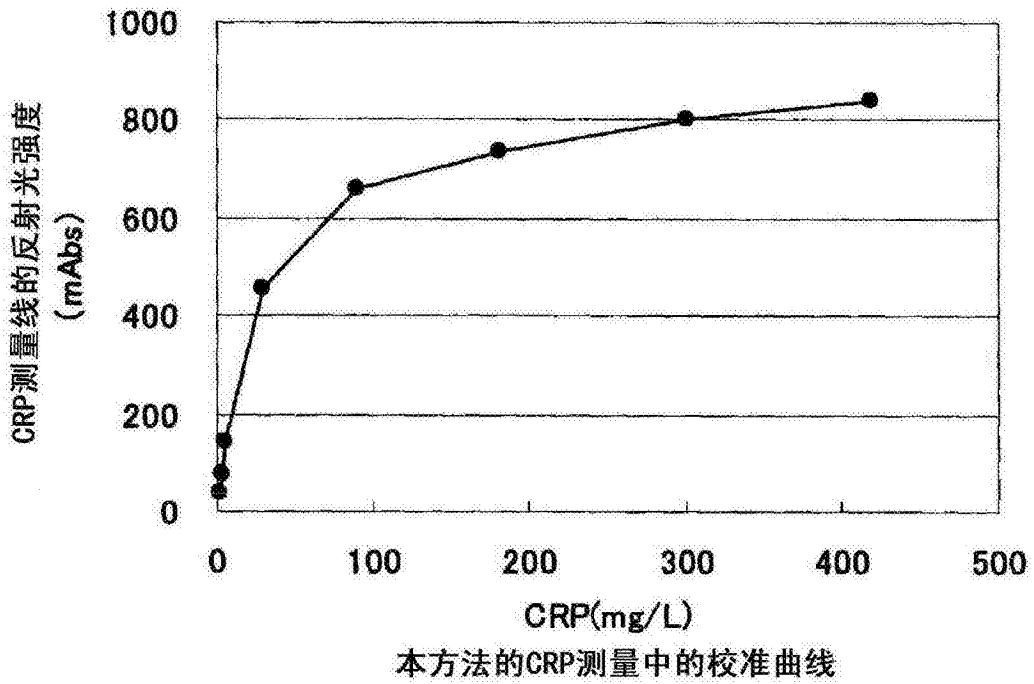


图 3

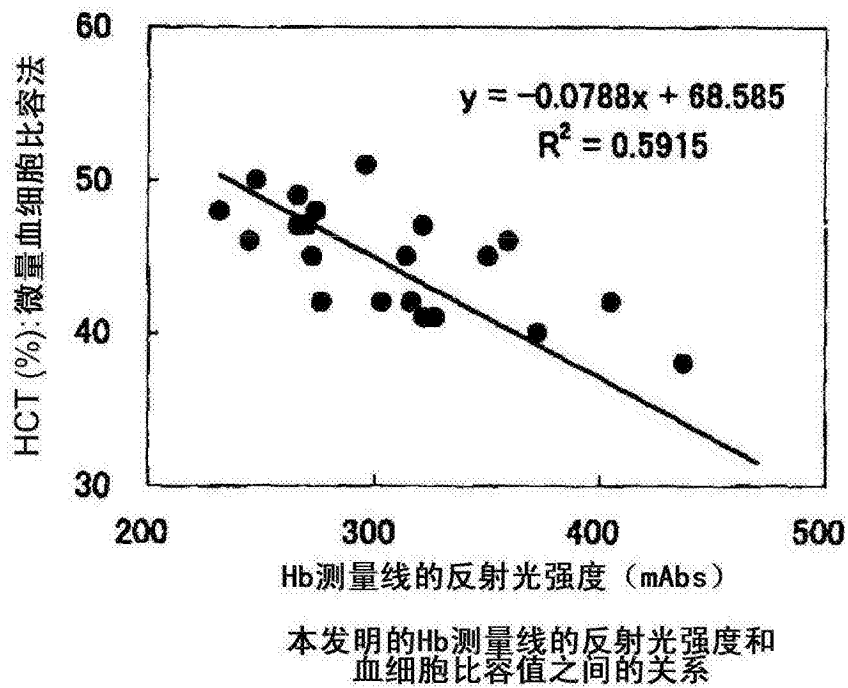


图 4

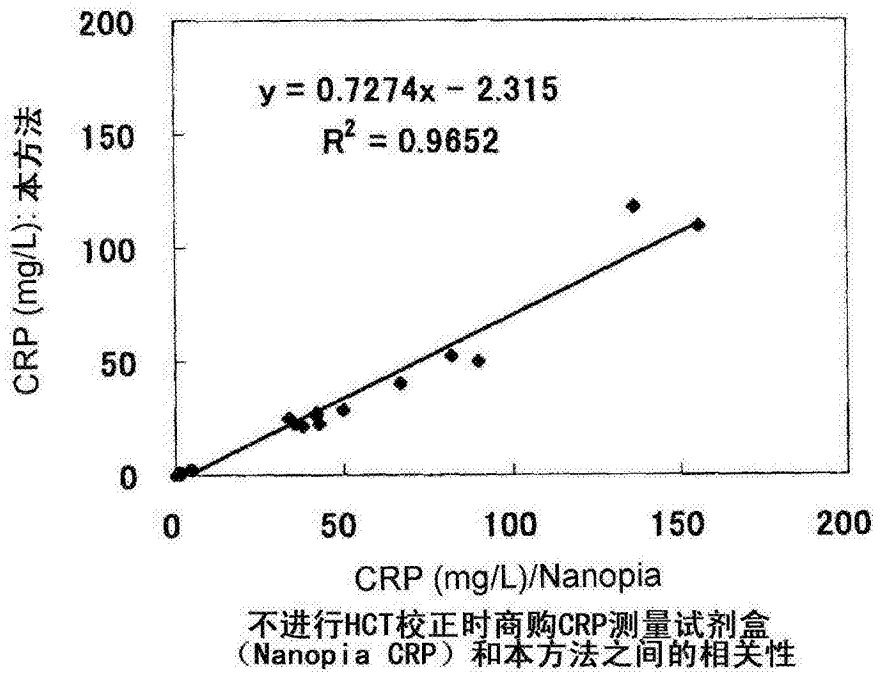


图 5

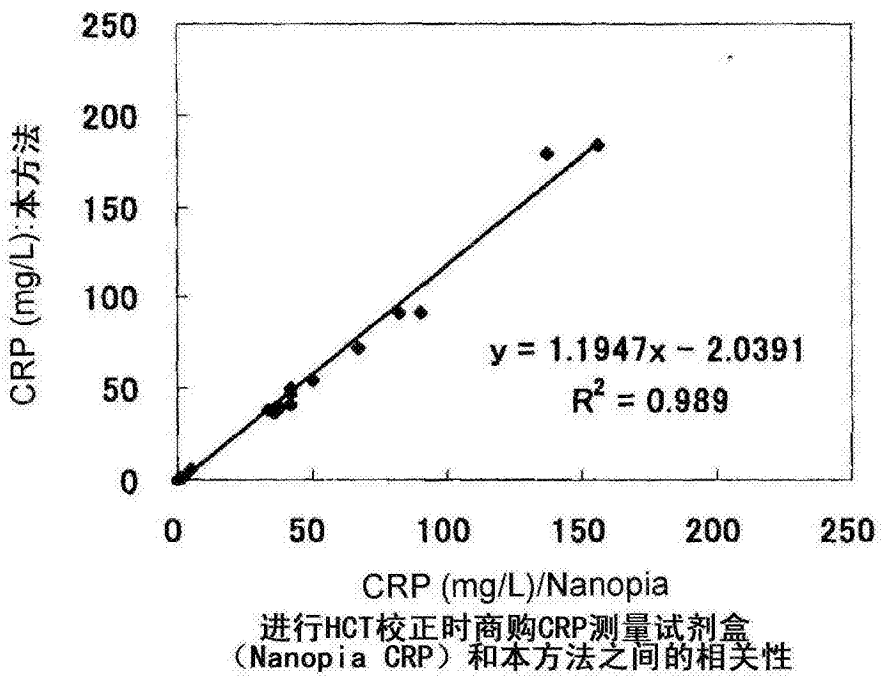
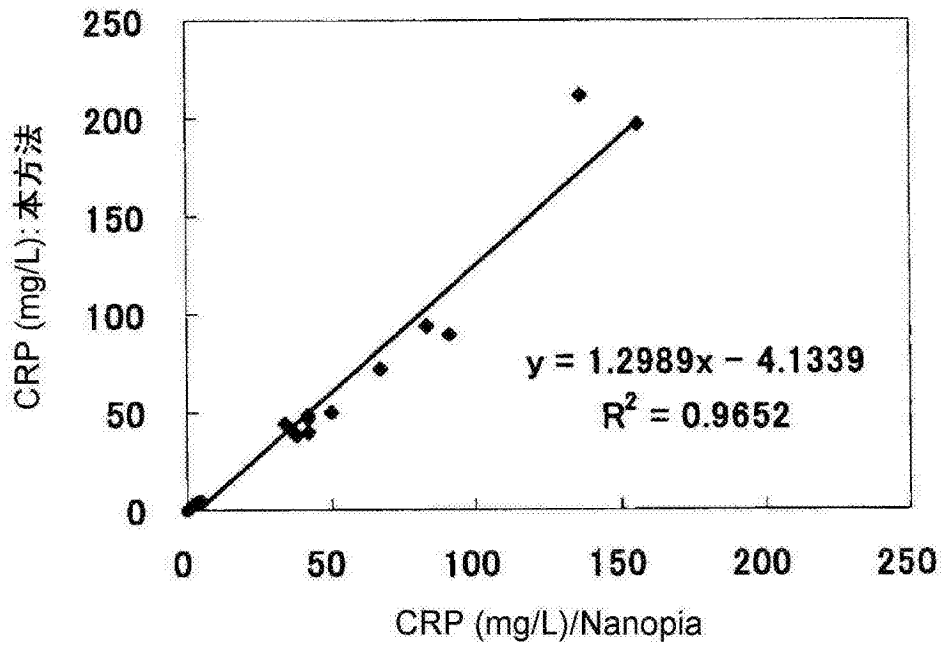
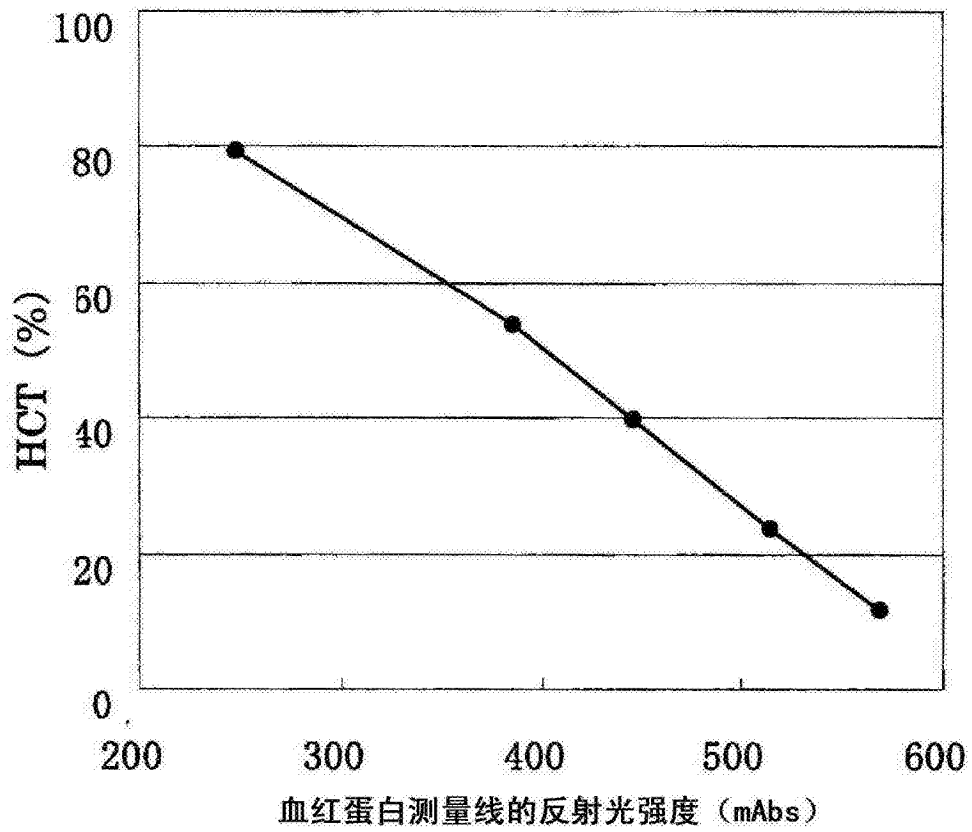


图 6



进行平均HCT (44%) 统一校正时商购CRP测量试剂盒 (Nanopia CRP) 和本方法之间的相关性

图 7



HCT (%) 校准曲线

图 8

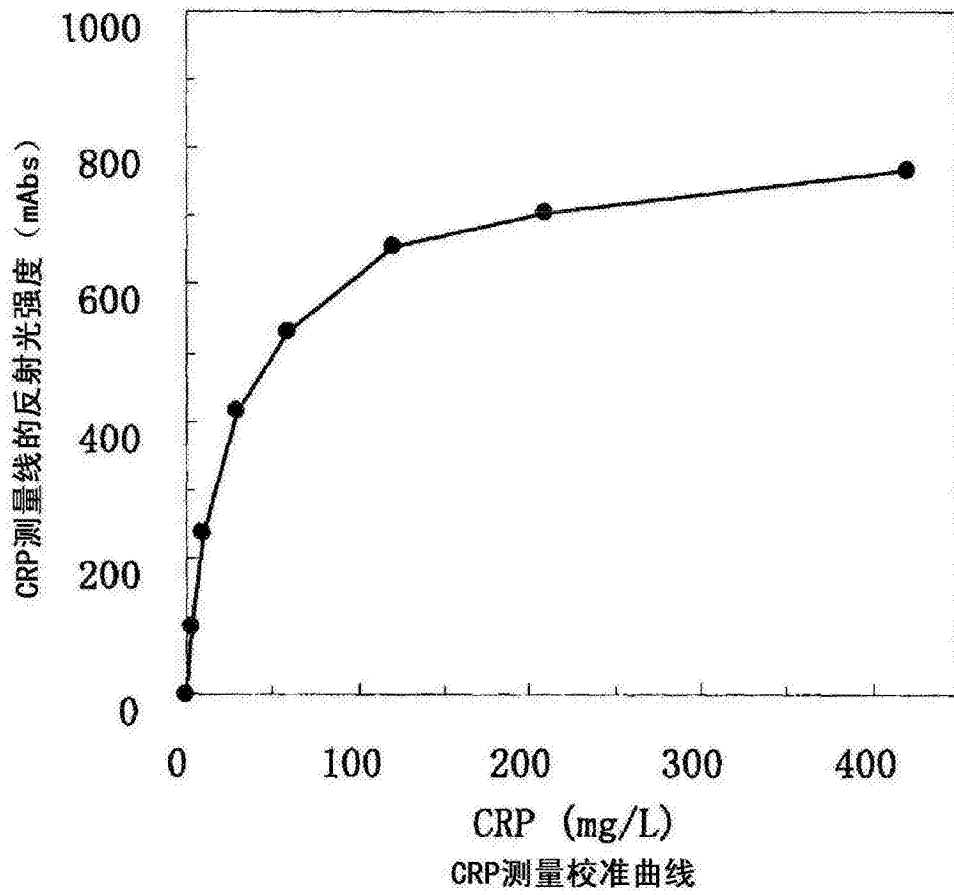


图 9

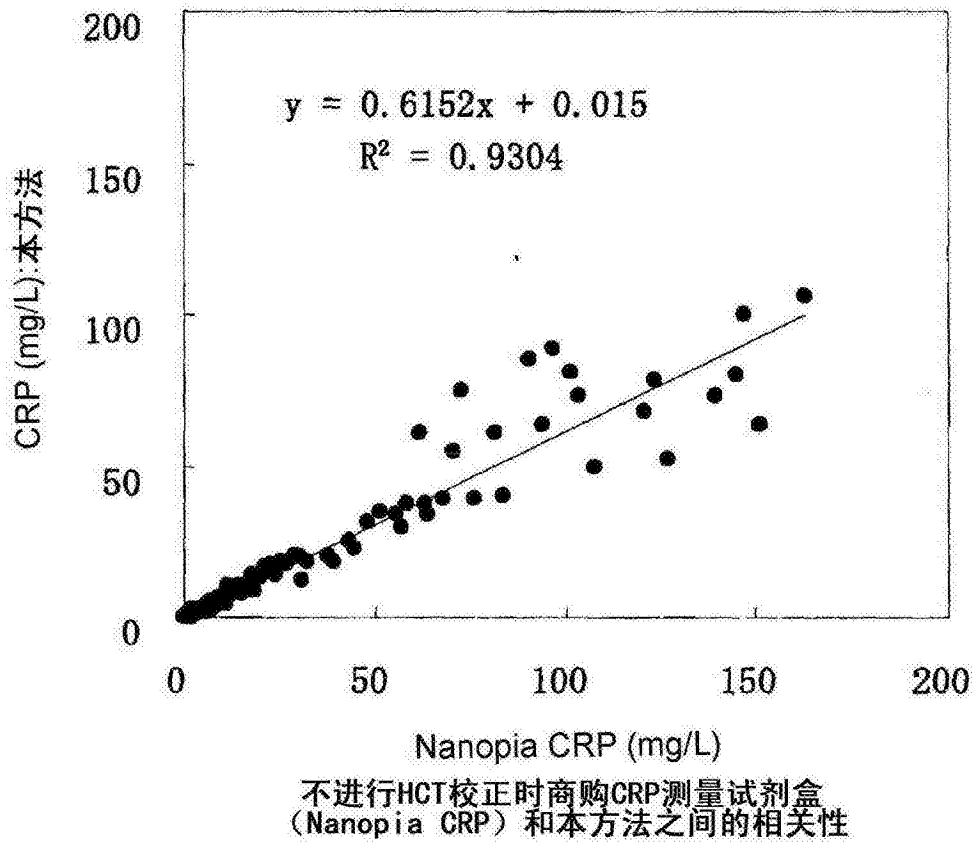


图 10

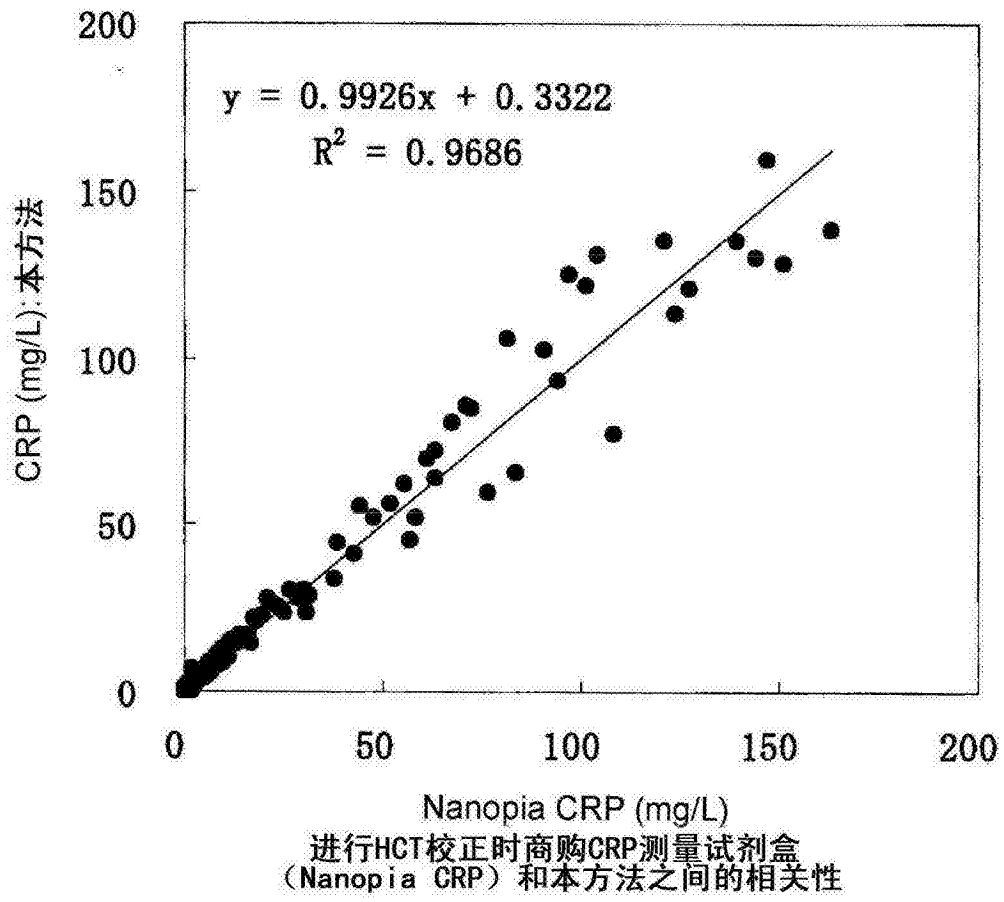


图 11

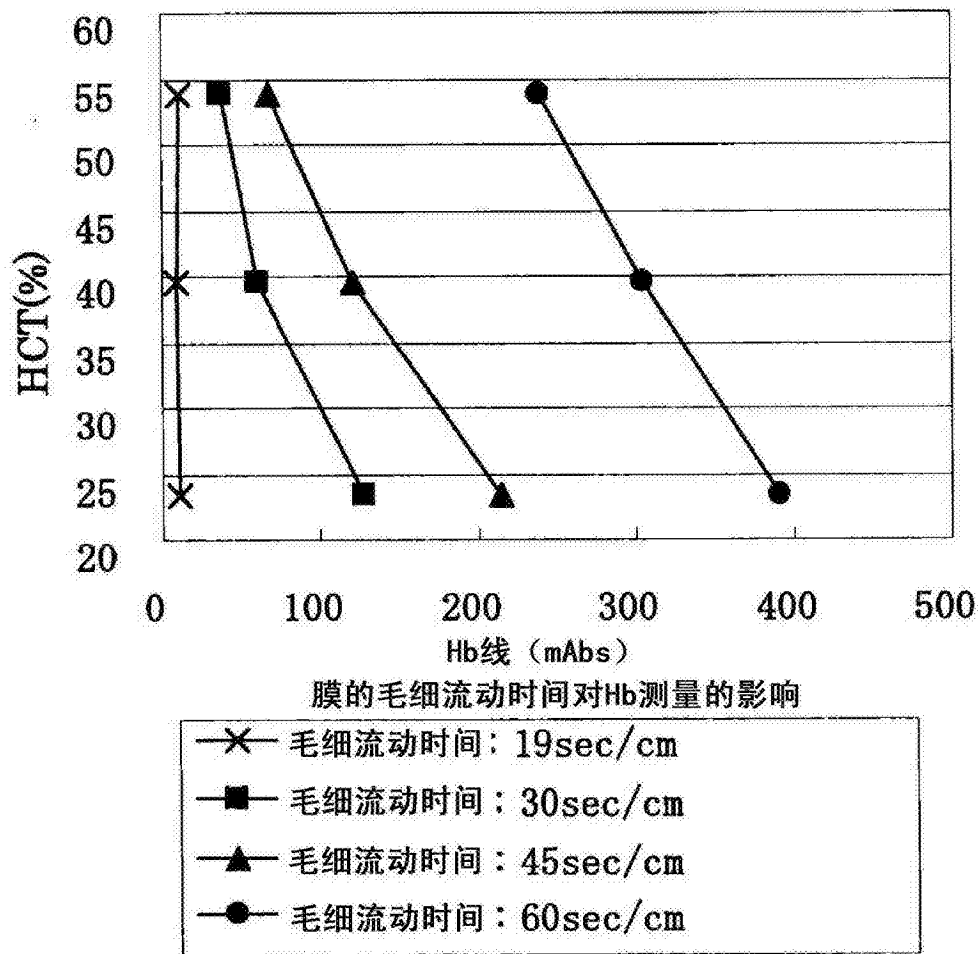


图 12

专利名称(译)	利用免疫色谱法的测定法、免疫色谱测试条和用于免疫色谱法的测定试剂盒		
公开(公告)号	CN103069277B	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201180026969.0	申请日	2011-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	小林幸司 森田元喜 伊藤佐智子		
发明人	小林幸司 森田元喜 伊藤佐智子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/721 G01N2333/4737 G01N2333/805		
代理人(译)	张国梁		
审查员(译)	张绚		
优先权	2010082928 2010-03-31 JP 2010082929 2010-03-31 JP		
其他公开文献	CN103069277A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供利用免疫色谱法的测量方法、免疫色谱测试条和免疫色谱法试剂盒，所述免疫色谱法、免疫色谱测试条和免疫色谱法试剂盒能够以与常规方法相比简单的操作精确短期测量血液中的分析物。本发明提供通过免疫色谱法的测量方法，在所述免疫色谱法中，同一样品中的分析物和血红蛋白的浓度通过免疫色谱法来测量，从而利用血红蛋白的测量值对分析物的测量值进行血细胞比容校正，以及提供用于免疫色谱法的测试条和试剂盒。

