



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107533055 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680023848.3

(22)申请日 2016.02.25

(30)优先权数据

2015-035926 2015.02.25 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/055729 2016.02.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/136918 JA 2016.09.01

(71)申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

(72)发明人 小林幸司 松本拓二 山本光章

(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 陈晓娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页  
序列表3页

(54)发明名称

免疫测定方法以及用于所述方法的测定试剂

(57)摘要

提供在生物样品的待测定物质的免疫学测定中避免血红蛋白的影响的方法。为了解决该问题,在包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的多肽的存在下或在与其具有至少90%的序列同一性的多肽的存在下,使其中疑似存在待测定成分样品与结合所述待测定成分的抗体反应,其中SEQ ID NO:1是来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的热激蛋白(HSP)DnaK的氨基酸序列的第419位氨基酸至第607位氨基酸的序列。

1. 一种用于包含血红蛋白的样品中的分析物的免疫测定方法,所述免疫测定方法包括:在由SEQ ID NO:1所示的来源于大肠杆菌(E.coli)的热激蛋白(HSP)DnaK氨基酸序列的第419位至第607位氨基酸组成的多肽或与所述多肽具有至少90%序列同一性的多肽的存在下,使所述包含血红蛋白的样品中疑似存在的样品中的分析物与结合所述分析物的抗体反应。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述包含血红蛋白的样品中的分析物还在选自HEPES、Bis-Tris、TES和Tris中的一种或多种缓冲成分的存在下与结合所述分析物的抗体反应。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述抗体被固定在不溶载体上。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述不溶载体为乳胶颗粒或金属胶体颗粒。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中采用颗粒凝集测定法。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述抗体为具有彼此不同的识别位点的两种以上单克隆抗体。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中将所述具有彼此不同的识别位点的两种以上单克隆抗体分别固定在乳胶颗粒上,并且其中通过乳胶比浊免疫测定检测所述样品中的分析物。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述样品为尿、全血、血清或血浆。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述分析物为L-FABP(肝脏型脂肪酸结合蛋白)。

10. 一种在利用结合分析物的抗体检测包含血红蛋白的样品中的所述分析物的方法中避免血红蛋白的影响的方法,所述方法包括:

在由SEQ ID NO:1所示的来源于大肠杆菌的热激蛋白(HSP)DnaK氨基酸序列的第419位至第607位氨基酸组成的多肽或与所述多肽具有至少90%序列同一性的多肽的存在下,使疑似包含所述分析物的样品与结合所述分析物的抗体反应。

## 免疫测定方法以及用于所述方法的测定试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及在免疫学测定中避免血红蛋白的影响的方法以及用于其的试剂。

### 背景技术

[0002] 近年来,广泛使用利用免疫反应测定生物样品中的痕量物质的测定方法。免疫学测定方法包括多种方法,如RIA法、EIA法、比浊免疫测定、乳胶凝集法、金属胶体聚集法和免疫色谱法。使用全血作为样品具有以下问题:由于溶血混合到样品中的血细胞成分如血红蛋白和血细胞的膜成分影响光学检测系统,抑制免疫反应,或吸附分析物,由此影响测定。例如,众所周知,在使用氧化还原酶和色素着色体系的免疫学测定中,血红蛋白被测定试剂中的成分等氧化,由此造成血红蛋白自身的吸收波长变化并且导致生物样品中分析物的测定值的误差。在许多情况中,通过使用各种表面活性剂等避免血红蛋白的影响的方法适用于使用氧化还原酶和色素着色体系的免疫学测定。

[0003] 另一方面,认为乳胶比浊免疫测定不受血红蛋白的吸收波长变化影响,因为测定波长为长波长并且不与血红蛋白的吸收波长重叠。然而,实际上,已知在包含血红蛋白的样品的测定中测定值可能与真实值不同。

[0004] 专利文献1记载了一种消除非特异性凝集的方法,所述非特异性凝集被认为归因于天然未变性血红蛋白(血红蛋白A<sub>0</sub>)的存在,所述天然未变性血红蛋白由于净正电荷而被非特异性地吸引在带负电荷的乳胶颗粒上。通过使反应混合物的pH保持为约8.5以上,血红蛋白A<sub>0</sub>的净电荷被中和以抑制由于对乳胶颗粒的静电引力造成的凝集,从而在对全血样品进行的乳胶凝集免疫测定中消除非特异性凝集。

[0005] 在专利文献2中,描述了为了在用于测定来源于活体的样品如血浆中的分析物的免疫学方法中避免血红蛋白的影响,在大环化合物如杯芳烃的存在下进行反应。特别地,在实例中描述了血红蛋白的影响可以通过在杯芳烃的存在下进行乳胶凝集法而避免。

[0006] 引用列表

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本已公开的专利公开第H01-150857号

[0009] 专利文献2:WO 2010/001619

### 发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本发明所要解决的问题为提供在用于生物样品的分析物的免疫学测定方法中避免血红蛋白的影响的方法。

[0012] 问题的解决方案

[0013] [1]一种用于包含血红蛋白的样品中的分析物的免疫测定方法,所述免疫测定方法包括:在由SEQ ID NO:1所示的来源于大肠杆菌(E.coli)的热激蛋白(HSP)DnaK氨基酸序列的第419位至第607位氨基酸组成的多肽或与所述多肽具有至少90%序列同一性的多肽

的存在下,使包含血红蛋白的样品中疑似存在的样品中的分析物与结合所述分析物的抗体反应。

[0014] [2]根据以上第[1]项所述的方法,其中所述包含血红蛋白的样品中的分析物还在选自HEPES、Bis-Tris、TES和Tris中的一种或多种缓冲成分的存在下与结合所述分析物的抗体反应。

[0015] [3]根据以上第[1]或[2]项所述的方法,其中所述抗体被固定在不溶载体上。

[0016] [4]根据以上第[3]项所述的方法,其中所述不溶载体为乳胶颗粒或金属胶体颗粒。

[0017] [5]根据以上第[4]项所述的方法,其中采用颗粒凝集测定法。

[0018] [6]根据以上第[1]至[5]项中任一项所述的方法,其中所述抗体为具有彼此不同的识别位点的两种以上单克隆抗体。

[0019] [7]根据以上第[6]项所述的方法,其中将所述具有彼此不同的识别位点的两种以上单克隆抗体分别固定在乳胶颗粒上,并且其中通过乳胶比浊免疫测定检测样品中的分析物。

[0020] [8]根据以上第[1]至[7]项中任一项所述的方法,其中所述样品为尿、全血、血清或血浆。

[0021] [9]根据以上第[1]至[8]项中任一项所述的方法,其中所述分析物为L-FABP(肝脏型脂肪酸结合蛋白)。

[0022] [10]一种在利用结合分析物的抗体检测包含血红蛋白的样品中的分析物的方法中避免血红蛋白的影响的方法,所述避免血红蛋白影响的方法包括:

[0023] 在由SEQ ID NO:1所示的来源于大肠杆菌的热激蛋白(HSP) DnaK氨基酸序列的第419位至第607位氨基酸组成的多肽或与所述多肽具有至少90%序列同一性的多肽的存在下,使疑似包含所述分析物的样品与结合所述分析物的抗体反应。

[0024] [11]根据以上第[10]项所述的方法,其中所述包含血红蛋白的样品中的分析物还在选自HEPES、Bis-Tris、TES和Tris中的一种或多种缓冲成分的存在下与结合所述分析物的抗体反应。

[0025] [12]根据以上第[10]或[11]项所述的方法,其中所述抗体被固定在不溶载体上。

[0026] [13]根据以上第[12]项所述的方法,其中所述不溶载体为乳胶颗粒或金属胶体颗粒。

[0027] [14]根据以上第[13]项所述的方法,其中采用颗粒凝集测定法。

[0028] [15]根据以上第[10]至[14]项中任一项所述的方法,其中所述抗体为具有彼此不同的识别位点的两种以上单克隆抗体。

[0029] [16]根据以上第[15]项所述的方法,其中将所述具有彼此不同的识别位点的两种以上单克隆抗体分别固定在乳胶颗粒上,并且其中通过乳胶比浊免疫测定检测样品中的分析物。

[0030] [17]根据以上第[10]至[16]项中任一项所述的方法,其中所述样品为尿、全血、血清或血浆。

[0031] [18]根据以上第[10]至[17]项中任一项所述的方法,其中所述分析物为L-FABP(肝脏型脂肪酸结合蛋白)。

[0032] 发明的有益效果

[0033] 根据本发明,可以避免生物样品中血红蛋白的影响,由此即使当样品包含血红蛋白时也可以进行准确测定。本发明提供使得能够准确测定包含血红蛋白的样品中的分析物的免疫测定方法和免疫测定试剂,以及在用于包含血红蛋白的样品中的分析物的免疫测定方法中避免血红蛋白的影响的方法。

## 具体实施方式

[0034] (样品)

[0035] 本发明中使用的生物样品的实例包括尿,血液(全血、血浆或血清),肾、心脏、肝脏的组织等,以及来自所述组织的提取物等。任何样品都是可使用的,只要样品疑似包含分析物即可,包括来源于健康受试者的样品、来源于患者的样品、来源于疑似患有疾病的人的样品等。

[0036] (要测定的物质)

[0037] 根据本发明的进行测定的分析物没有特别限制。

[0038] 以举例的方式,下文将通过使用尿作为样品和肝脏型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)作为分析物来描述本发明。

[0039] (抗L-FABP抗体)

[0040] 对于本发明中使用的抗L-FABP抗体,可以将由器官、细胞、体液等纯化的天然L-FABP制备为免疫原(抗原)。L-FABP主要分布在肝或肾中,由此可以由这些器官等纯化和分离。此外,已知L-FABP在人、小鼠、猪、牛和大鼠中是高度同源的,在氨基酸水平上具有90%以上的同源性,因此例如可以使用小鼠L-FABP作为抗原用于捕获与人L-FABP结合的抗体。

[0041] 可以根据Kelvin等人(J.Biol.Chem.,第263卷,第15762-15768页,1988)等中所述的方法等进行天然L-FABP的纯化。具体地,在使切除的器官匀化后,通过凝胶过滤、阴离子交换层析等将通过超速离心获得的细胞质级分分为小部分,并通过使用分子量或脂肪酸结合活性作为指标选择包含L-FABP的级分,并将其分离和纯化。对所选择的级分进行SDS-聚丙烯酰胺电泳以确认纯化的蛋白质形成单一条带,如果需要的话进行进一步纯化。对于纯化的蛋白质,可以确定氨基酸组成和N端氨基酸序列,并将其与报道的组成和序列进行比较,以确认蛋白质为目标分子种类。

[0042] 用作抗原的L-FABP可以是通过基因工程技术生成的重组蛋白。由于例如(Veerkamp和Maatman,Prog.Lipid Res.,第34卷,第17-52页,1995)已经报道了L-FABP的氨基酸序列和基因序列,因此可以基于这些序列设计引物用于通过PCR(聚合酶链式反应)法由合适的cDNA文库等克隆cDNA。该cDNA可以用于进行基因重组以制备重组L-FABP。此外,L-FABP的片段或具有其部分序列的合成肽等可以根据需要与载体高分子物质(BSA、血蓝蛋白等)结合,并用作抗原。

[0043] 特异性结合L-FABP的抗体可以是抗血清、多克隆抗体、单克隆抗体等中的任一种。

[0044] 抗体优选具有高特异性,例如在抗L-FABP抗体的情况下,理想地,抗体基本上不与H-FABP交叉反应。为了获得具有较高特异性的抗体,有利地使用高度纯化的和高纯度的抗原。当制备抗体时,通过接种如上所述制备的纯化抗原使非人类温血动物免疫。用于免疫的非人类温血动物的实例包括哺乳动物(兔、绵羊、大鼠、小鼠、豚鼠、马、猪等)和鸟类(鸡、鸭、

鹅等)。在兔的情况下,例如,在背部或后足掌部皮下接种在约1mL生理盐水和弗氏完全佐剂中乳化的约100 $\mu$ g至1mg抗原,从第二次开始,佐剂替换为弗氏不完全佐剂,以二至四周的间隔接种抗原三至八次用于免疫,抗体在最终接种后约7至12天产生,并被使用。在小鼠的情况下,通常以约两周的间隔皮下、腹膜内或静脉内接种10至30 $\mu$ g/动物的抗原三至八次用于免疫,以使用在最终接种后的约二至四天产生的抗体。

[0045] 多克隆抗体可以通过收集来自如上所述免疫的动物的血液、分离血清(抗血清)并由所获得的抗血清回收1g级分来制备。例如,多克隆IgG可以通过凭借使用蛋白G柱的亲亲和层析等由抗血清回收1gG级分来制备。

[0046] 单克隆抗体由通过使从免疫动物收集的抗体产生细胞与永生化细胞融合获得的杂交瘤产生。小鼠和大鼠优选用于单克隆抗体的免疫动物。可以根据如下的Kohler和Milstein (Kohler和Milstein, Nature, 第256卷, 第495-887页, 1975)的方法产生杂交瘤。收集来自如上所述免疫的动物的抗体产生细胞(如脾细胞或淋巴结细胞),并使其与合适的永生化细胞融合。例如,骨髓瘤细胞的细胞系(NS1-Ag 4/1、Sp2/0-Ag14等)优选用作永生化细胞。骨髓瘤细胞优选为自身不产生抗体或者免疫球蛋白H或L链的非分泌细胞。骨髓瘤细胞优选具有选择标记物,使得可以在选择培养基中筛选未融合的骨髓瘤细胞和融合的杂交瘤。例如,对于选择标记物,通常使用具有8-氮鸟嘌呤耐受性(次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶缺陷)、胸苷激酶缺陷等的细胞系。通过添加合适的融合促进剂如聚乙二醇来进行细胞融合。细胞融合优选以每个永生化细胞约10个抗体产生细胞的比例进行,并且可以优选地以约 $10^6$ 个细胞/mL的抗体产生细胞的细胞密度进行。

[0047] 适当地稀释进行融合处理的细胞,然后在选择培养基中培养一周至两周。例如,当使用耐受8-氮鸟嘌呤的骨髓瘤细胞时,在HAT(次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷)培养基中培养的未融合的骨髓瘤细胞死亡,在HAT(次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷)培养基中培养的未融合的抗体产生细胞由于有限的分裂周期也死亡;但是,仅融合细胞可以继续分裂并在选择培养基中生存。在选择培养基中培养后,例如,利用固定在固相上的抗原对上清液进行ELISA,以检测目标抗体的存在/不存在,克隆可以通过有限稀释法进行以选择产生识别目标抗原的单克隆抗体的杂交瘤。在选择时,可以选择产生具有期望性质(如抗体效价、抗体种类、亚类、对抗原的亲合性、特异性、表位等)的单克隆抗体的杂交瘤。IgG通常优选作为单克隆抗体种类。

[0048] 将单克隆抗体产生杂交瘤腹膜内植入到与用于免疫的动物相同物种的动物中,经过一定时间后,可以由所述动物收集腹水,以分离目标单克隆抗体。或者,可以在合适的动物细胞培养基中培养杂交瘤,可以由培养液分离单克隆抗体。一旦获得目标杂交瘤,就可以由杂交瘤获得编码单克隆抗体的基因,以通过常用的基因重组技术在合适的宿主(例如蚕等)中表达和产生目标单克隆抗体。例如,可以根据需要按照组合硫酸铵沉淀、凝胶层析、离子交换层析、亲和层析等的通常纯化方法进行抗体的分离和纯化。

[0049] 本发明中使用的抗L-FABP抗体可以是已知抗体或未来开发的抗体。尽管没有特别限制,但是可以使用的市售抗L-FABP抗体包括圣克鲁斯生物技术(Santa Cruz Biotechnology)的C-4(目录号:sc-374537)、F-9(目录号:sc-271591),R&D系统(R&D systems)的328607(目录号:MAB2964),Hycult biotech的L2B10(目录号:HA 2049-1A),Lifespan Biosciences的2G4(目录号:LS-B3001)等。

[0050] 本发明中的“抗体”不仅包括完全的免疫球蛋白分子,还包括本领域中已知的具有抗原结合能力的抗体片段或抗体衍生物,如Fab、Fab<sub>2</sub>、CDR、人源化抗体、多功能抗体和单链抗体(ScFv)。

[0051] (检测)

[0052] 本发明的用于使用抗L-FABP抗体检测L-FABP的方法为免疫学测定方法。更具体地,其实例包括但不限于颗粒免疫凝集测定法如乳胶比浊免疫测定(LTIA)、ELISA、化学发光检测法和免疫色谱(侧流型、流过型)。其中,更优选不包括用于B/F分离的步骤的免疫学测定方法(均相免疫测定法)。

[0053] 应注意,当在本说明书中描述LTIA作为测定方法时,其检测方法可以通过使用任何已知检测方法,如透射光(吸光度)变化的测定、散射光变化的测定和粒径变化的测定来实现。

[0054] 此外,术语“检测”或“测定”必须最广义地解释,包括L-FABP的存在的证明和/或定量,而必须不以限制的方式进行解释。

[0055] (不溶载体)

[0056] 本发明中使用的不溶载体可以是由聚合物基材如聚苯乙烯树脂、无机基材如玻璃、多糖基材如纤维素和琼脂糖等制成的不溶载体,并且在其形状方面没有特别限制,可以根据所采用的测定方法选择任何形状,包括小珠或颗粒状(例如乳胶颗粒、金属胶体颗粒)、平板或片状(例如多孔膜、免疫平板)、管状(例如试管)等。

[0057] 颗粒的实例包括在颗粒免疫凝集测定法中通常使用的主要由聚苯乙烯构成的乳胶颗粒,以及包含苯乙烯-丁二烯共聚物、(甲基)丙烯酸酯聚合物等作为基材的颗粒。由金属胶体、明胶、脂质体、微囊、二氧化硅、氧化铝、炭黑、金属化合物、金属、陶瓷或磁性材料制成的颗粒也是可以使用的。对于本发明中使用的载体颗粒,可以使用同一种材料或两种以上材料。

[0058] 载体颗粒的粒径优选为0.15 $\mu\text{m}$ 至0.45 $\mu\text{m}$ ,更优选0.2 $\mu\text{m}$ 至0.4 $\mu\text{m}$ 。可以组合地使用平均粒径不同的两种以上的载体颗粒。

[0059] 多孔膜可以是已知的膜,并且可以由任何材料制成。多孔膜的材料实例包括但不限于聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二酯、尼龙、玻璃、多糖如纤维素和纤维素衍生物、陶瓷等。具体地,实例包括由密理博(Millipore)、东洋滤纸(Toyo Roshi)、沃特曼(Whatman)等销售的玻璃纤维滤纸、纤维素滤纸等。

[0060] 平板(免疫平板)可以是已知的平板,并且可以由任何材料制成。平板的材料实例包括但不限于合成高分子化合物,如氯乙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯和聚烯烃弹性体,以及玻璃等。

[0061] (抗体固定到不溶载体上)

[0062] 用于将抗L-FABP抗体固定在不溶载体上的方法没有特别限制,可以使用任何已知方法。当将抗L-FABP抗体固定在颗粒上时,这通过使用例如利用混合颗粒和抗体造成的物理吸附的物理吸附法、或利用偶联剂如碳二亚胺使颗粒表面上的羧基或氨基与抗体分子化学结合的化学结合法来实现。抗体分子可以凭借间隔分子固定在颗粒上。此外,在通过使用化学结合法使抗体与另一蛋白质如白蛋白结合之后,蛋白质可以物理地或化学地固定在颗粒上。

[0063] 当将抗L-FABP抗体固定多孔膜上时,抗体可以例如通过将一定量的包含所述抗体的溶液以线、点、特定符号如+的形状涂布至多孔膜来固定化。

[0064] 在本说明书中,“不溶载体”被称为“固相”,使不溶载体能够物理地或化学地支撑抗原或抗体或者使不溶载体能够物理地或化学地支撑抗原或抗体的状态在一些情况下被称为“固定”、“固定化”、“固相化”、“敏化”或“吸附”。

[0065] (标记的抗体)

[0066] 用于标记抗体的标记物质的实例包括例如酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、抗生物素、放射性同位素、胶体金颗粒或着色乳胶颗粒。使标记物质和抗体结合的方法可以是本领域技术人员可用的方法,如戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶基二硫化物法或高碘酸法。标记物质和结合方法都不限于以上描述的那些,可以使用任何已知方法。

[0067] 对于标记的检测,例如,当使用酶如过氧化物酶或碱性磷酸酶作为标记物质时,可以通过使用酶的特定底物(例如,当酶为辣根过氧化物酶时,使用1,2-苯二胺或3,3',5,5'-四甲基联苯胺,或在碱性磷酸酶的情况下使用磷酸对硝基苯酯)测定酶活性,当使用生物素作为标记物质时,至少用与生物素不同的标记物质标记的抗生物素一般与其反应。

[0068] (BPF)

[0069] 由来源于大肠杆菌的热激蛋白(HSP) DnaK氨基酸序列的第419位至第607位氨基酸组成的多肽(也称为封闭肽片段(Blocking Peptide Fragment);下文有时也称为“BPF”)在WO 2005/003155和Polymer Preprints, Japan, 第55卷, 第2期, 5211-5212 (2006)中作为在免疫学测定方法中用于封闭的新物质公开,并且也可商购获得。

[0070] 用于本发明的方法的BPF等可以根据WO 2005/003155的描述制备。或者,可以使用市售产品(由东洋纺株式会社(TOYOB0 Co., Ltd.)制造,目录号:BPF-301)。

[0071] 在测定试剂或试样稀释剂中的浓度方面,本发明的方法等中的BPF的工作浓度优选为0.05%至5% (w/v%),并且例如可以更优选为0.075%至5%,还优选为0.1%至3%。本领域技术人员可以考虑保存的蛋白质的性质和浓度(量)实验确定BPF的最佳浓度。

[0072] 例如,当使用具有约22,000的分子量的BPF-301时,浓度可以优选为0.022mmol/L至2.27mmol/L,更优选0.034mmol/L至2.27mmol/L,还优选0.045mmol/L至1.36mmol/L。

[0073] (使疑似包含L-FABP的样品、抗L-FABP抗体和BPF彼此接触的方法)

[0074] 使疑似包含L-FABP的样品、抗L-FABP抗体和BPF彼此接触的步骤可以通过使用任何方法来实现,只要在使疑似包含L-FABP的样品和BPF彼此接触的步骤之后是使样品与抗L-FABP抗体接触的步骤。

[0075] 例如,使疑似包含L-FABP的样品与抗L-FABP抗体和BPF接触的方法可以是例如将包含具有固定化抗L-FABP抗体的颗粒和BPF的液体试剂与样品混合的方法。另一方法可以是将疑似包含L-FABP的样品供应至BPF浸润的不溶载体(如多孔膜)使得接触发生的方法。本领域技术人员可以考虑测定试剂的构成等适当地完成设定。

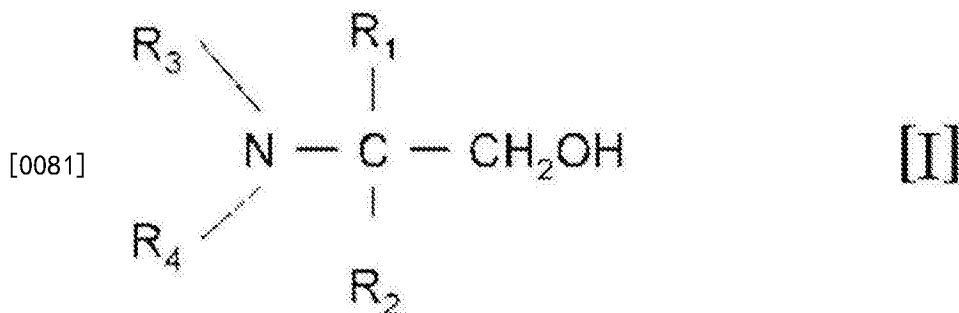
[0076] 此外,在与BPF接触之后或者同时,通过已知的适当方法使样品中的L-FABP与固定在不溶载体上的抗L-FABP抗体接触。

[0077] (缓冲剂)

[0078] 下述通式[1]表示的化合物可以举例作为包含本发明的分子中具有下述[化学式1]表示的基团的化合物或其盐的缓冲剂。

[0079] 通式[1]

[0080] [化学式1]



[0082] 通式[1]中的 $R_1$ 和 $R_2$ 可以彼此相同或不同,并且实例可以包括氢原子、烷基、羟基烷基、二(羟基烷基)烷基、三(羟基烷基)烷基等。上述烷基、羟基烷基、二(羟基烷基)烷基和三(羟基烷基)烷基的实例可以包括在直链或支链上具有1至6的碳数的烷基,并且在直链或支链上具有1至6的碳数的烷基可以具体举例为甲基、乙基、丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0083] 通式[1]中的 $R_3$ 和 $R_4$ 可以彼此相同或不同,并且实例可以包括氢原子、烷基、羟基烷基、二(羟基烷基)烷基、三(羟基烷基)烷基、羧基烷基、二(羧基烷基)烷基、三(羧基烷基)烷基、磺基烷基、二(磺基烷基)烷基、三(磺基烷基)烷基、磺基-羟基-烷基、二(磺基-羟基-烷基)烷基、三(磺基-羟基-烷基)烷基等。

[0084] 在上述烷基、羟基烷基、二(羟基烷基)烷基、三(羟基烷基)烷基、羧基烷基、二(羧基烷基)烷基、三(羧基烷基)烷基、磺基烷基、二(磺基烷基)烷基、三(磺基烷基)烷基、磺基-羟基-烷基、二(磺基-羟基-烷基)烷基和三(磺基-羟基-烷基)烷基中,烷基可以包括例如在直链或支链上具有1至6的碳数的烷基,并且在直链或支链上具有1至6的碳数的烷基可以具体举例为甲基、乙基、丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0085] 通式[1]中的 $R_3$ 和 $R_4$ 的实例还包括其中 $R_3$ 和 $R_4$ 连同氮原子一起形成环状结构以形成经取代或未经取代的哌嗪基、经取代或未经取代的吗啉基或经取代或未经取代的哌啶基,并且经取代的哌嗪基、经取代的吗啉基和经取代的哌啶基中取代基的实例包括烷基、羟基烷基、二(羟基烷基)烷基、三(羟基烷基)烷基、羧基烷基、二(羧基烷基)烷基、三(羧基烷基)烷基、磺基烷基、二(磺基烷基)烷基、三(磺基烷基)烷基、磺基-羟基-烷基、二(磺基-羟基-烷基)烷基和三(磺基-羟基-烷基)烷基等。

[0086] 在上述烷基、羟基烷基、二(羟基烷基)烷基、三(羟基烷基)烷基、羧基烷基、二(羧基烷基)烷基、三(羧基烷基)烷基、磺基烷基、二(磺基烷基)烷基、三(磺基烷基)烷基、磺基-羟基-烷基、二(磺基-羟基-烷基)烷基和三(磺基-羟基-烷基)烷基中,烷基可以包括例如上述在直链或支链上具有1至6的碳数的烷基。

[0087] 具体地,羟基烷基可以举例为羟甲基、2-羟基乙基、2-羟基丙基、2-羟基丁基、2-羟基戊基、2-羟基己基等;二(羟基烷基)烷基可以举例为二(羟基甲基)甲基、二(2-羟基乙基)甲基等;三(羟基烷基)烷基可以举例为三(羟基甲基)甲基、三(2-羟基乙基)甲基等;羧基烷基可以举例为羧甲基、2-羧基乙基等;二(羧基烷基)烷基可以举例为二(羧基甲基)甲基、二(2-羧基乙基)甲基等;并且三(羧基烷基)烷基可以举例为三(羧基甲基)甲基、三(2-羧基乙基)甲基等。

[0088] 具体地,磺基烷基可以举例为磺基甲基、2-磺基乙基等;二(磺基烷基)烷基可以举例为二(磺基甲基)甲基、二(2-磺基乙基)甲基等;三(磺基烷基)烷基可以举例为三(磺基甲基)甲基、三(2-磺基乙基)甲基等;磺基-羟基-烷基可以举例为2-羟基-3-磺基丙基、3-羟基-4-磺基丙基等;二(磺基-羟基-烷基)烷基可以举例为二(2-羟基-3-磺基丙基)甲基、二(3-羟基-4-磺基丙基)甲基等;并且三(磺基-羟基-烷基)烷基可以举例为三(2-羟基-3-磺基丙基)甲基、三(3-羟基-4-磺基丙基)甲基等。

[0089] 本发明中使用的缓冲剂的具体实例包括Bicine (CAS号:150-25-4)、BES (CAS号:10191-18-1)、BisTris (CAS号:6976-37-0)、DIPSO (CAS号:68399-80-4)、HEPES (CAS号:7365-45-9)、HEPPS (CAS号:16052-06-5)、HEPPSO水合物 (CAS号:68399-78-0)、Tricine (CAS号:5704-04-1)、TES (CAS号:7365-44-8)、TAP (CAS号:29915-38-6)、TAPSO (CAS号:68399-81-5)、Bis Tris丙烷 (CAS号:64431-96-5)、Tris盐酸盐 (CAS号:1185-53-1)、Tris碱 (CAS号:77-86-1)、TES钠水合物 (CAS号:70331-82-7)等。特别地,BisTris、HEPES、TES和Tris是优选的。

[0090] (测定试剂盒)

[0091] 根据本发明提供的测定试剂盒的组分没有特别地限制,只要可以免疫学测定L-FABP即可。以下将通过以夹心ELISA、免疫色谱和LTIA作为实例来描述测定试剂盒。

[0092] <夹心ELISA>

[0093] 在夹心ELISA的情况下,测定试剂盒至少包括(a)具有固定于其上的本发明的抗L-FABP抗体的不溶载体和(b)用标记物质标记且具有与L-FABP反应的性质的抗体。在该情况下,不溶载体优选为平板(免疫平板),并且可以适当地选择和使用标记物质。

[0094] 固定在不溶载体上的抗体捕获样品中的L-FABP,并在不溶载体上形成复合物。用标记物质标记的抗体与捕获的L-FABP结合,并与上述复合物形成夹心结构。可以通过用与标记物质对应的方法测定标记物质的量来测定样品中的L-FABP。可以通过使用本领域技术人员已知的方法来实现具体方法,如将抗体固定在不溶载体上的方法和使抗体与标记物质结合的方法,而没有特别限制。尽管在该构成的情况下可以设置均相测定法或异相测定法,但是均相测定法更优选的。

[0095] 例如,可以将BPF例如添加至样品稀释剂或用于抗原-抗体反应的溶液中,由此可以使其与样品中的L-FABP接触。

[0096] <免疫色谱>

[0097] 通过使用测试条来设置典型的免疫色谱,所述测试条沿包含样品的溶液在片状不溶载体(如多孔膜)上展开的方向按顺序配置有“1.样品供应部位”、“2.保持标记抗体的部位(标记抗体保持部位)”和“3.使用于捕获由标记抗体和L-FABP抗体形成的复合物的抗体固定的部位(捕获抗体部位)”,使得样品溶液由于毛细管作用持续移动。在免疫色谱的情况下,测定试剂盒至少包括如上所述的测试条。

[0098] 具体地,当将预定量的包含L-FABP的样品添加至样品供应部位时,样品由于毛细管作用进入标记保持部位,L-FABP和标记抗体结合到一起形成复合物。当通过膜展开的复合物进入捕获抗体部位时,复合物被固定在膜上的抗体(捕获抗体)捕获以形成[捕获抗体]-[L-FABP]-[标记抗体]的三元复合物。可以通过任意方法(例如,在可以可视化的标记如胶体金颗粒的情况下的凝集图像,或在酶的情况下由于添加底物的显色反应)检测标记,

从而检测L-FABP的存在。

[0099] 例如,BPF可以初步被添加至样品稀释剂等中,或可以初步被包含在样品供应部位或标记保持部位中,由此可以使其与样品中的L-FABP接触。

[0100] <乳胶比浊免疫测定>

[0101] 在乳胶比浊免疫测定的情况下,测定试剂盒至少包括具有固定于其上的抗体的乳胶颗粒。对于乳胶比浊免疫测定中使用的抗体,可以使用“具有不同抗原识别位点的两种单克隆抗体”、“多克隆抗体”或“单克隆抗体和多克隆抗体”的任意组合。在该情况下,乳胶颗粒为同时具有固定于其上的抗体和标记物质的不溶载体。

[0102] 可以按照粒径和材料适当地选择用于这些测定试剂的乳胶颗粒,以获得期望的性能,如改善的灵敏度。乳胶颗粒可以是适合于支撑抗体的任何颗粒。例如,颗粒可以包含聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸(盐)共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物、乙酸乙烯酯-丙烯酸酯共聚物等作为基材。尽管乳胶颗粒的形状没有特别限制,但是优选地,平均粒径足够大,足以使得可以用肉眼或者光学地检测由于乳胶颗粒表面上的抗体与L-FABP之间的凝集反应而产生的聚集体。可以使用由诸如金属胶体、明胶、脂质体、微囊、二氧化硅、氧化铝、炭黑、金属化合物、金属、陶瓷或磁性材料等材料制成的颗粒代替乳胶颗粒。

[0103] 在临床检查中使用的用于LT1A的典型测定试剂盒通常以第一试剂和第二试剂的形式提供。可以在第一试剂或第二试剂中包含BPF和具有固定于其上的抗体的乳胶颗粒。尽管通常优选在第二试剂中包含具有固定于其上的抗体的乳胶颗粒,但是可以在第一试剂中包含该颗粒。或者,可以在第一试剂和第二试剂两者中包含乳胶颗粒。

[0104] 为了改善测定灵敏度和抑制非特异性反应,本发明的试剂盒根据需要还包括糖类、蛋白质等。其实例包括促进抗原-抗体反应的组分(高分子化合物,如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、磷脂聚合物等)、蛋白质和肽(白蛋白、酪蛋白等)、氨基酸、糖类(蔗糖、环糊精等)和防腐剂(叠氮化钠、ProClin 300等)。

[0105] 尽管来源于组织(如肝和肾)的天然L-FABP可以在样品测定中用作标准物质(L-FABP标准物质),但是标准物质可以通过基因工程技术产生的重组蛋白。由于例如(Veerkamp和Maatman,Prog.Lipid Res.,第34卷,第17-52页,1995)已经报道了L-FABP的氨基酸序列和基因序列,因此可以基于这些序列设计引物用于通过PCR(聚合酶链式反应)法由合适的cDNA文库等克隆cDNA。该cDNA可以用于通过基因重组技术来制备重组L-FABP。对于标准物质,更优选使用具有稳定结构的重组蛋白。

[0106] 实施例

[0107] 以下将描述本发明的实施例,以更具体地描述本发明;然而,本发明不限于此,并且可以在不脱离本发明的技术思想的范围内不同地应用。

[0108] (固定抗L-FABP抗体的乳胶颗粒混悬液)

[0109] (1) 固定克隆L抗体的乳胶颗粒混悬液的制备

[0110] 向13mL包含0.36mg/mL抗L-FABP抗体克隆L(由CM1C HOLDINGS Co.,Ltd.制造)的20mmol/L Tris缓冲液(pH 8.5)中,添加13mL的平均粒径为0.21 $\mu$ m的1%乳胶颗粒(由积水化学工业株式会社(SEKISUI CHEMICAL CO.,LTD.)制造)混悬液,并在4 $^{\circ}$ C搅拌两小时。在这之后,添加13mL包含0.5%BSA的20mmol/L Tris缓冲液(pH 8.5),并在4 $^{\circ}$ C搅拌一小时。然

后,进行利用5mmol/L MOPS缓冲液(pH 7.0)的透析以获得固定克隆L抗体的乳胶颗粒混悬液。

[0111] (2) 固定克隆1抗体的乳胶颗粒混悬液的制备

[0112] 向8mL包含0.54mg/mL抗L-FABP抗体克隆1(由CMIC HOLDINGS Co.,Ltd.制造)的5mmol/L Tris缓冲液(pH 7.5)中,添加8mL的平均粒径为0.32 $\mu$ m的1%乳胶颗粒(由积水化学工业株式会社(SEKISUI CHEMICAL CO.,LTD.)制造)混悬液,并在4 $^{\circ}$ C搅拌两小时。在这之后,添加8mL包含0.5%BSA的5mmol/L Tris缓冲液(pH 7.5),并在4 $^{\circ}$ C搅拌一小时。然后,进行利用5mmol/L MOPS缓冲液(pH 7.0)的透析以获得固定克隆1抗体的乳胶颗粒混悬液。

[0113] (L-FABP标准物质)

[0114] 通过日本已公开的专利公开第H11-242026号中所述的基因重组来获得L-FABP标准物质。

[0115] (L-FABP基准测定法:基准方法)

[0116] 基于ELISA的体外诊断产品(Renapro(注册商标)L-FABP试验TMB)用于基准方法。

[0117] (第一试剂:也用作标准物质稀释剂)

[0118] 300mmol/L HEPES缓冲液(pH 7.0)

[0119] 各浓度的BPF(由东洋纺株式会社(TOYOB0 Co.,Ltd.)制造,BPF-103)

[0120] 100mmol/L NaCl

[0121] 390mmol/L苯甲脒盐酸盐

[0122] 0.4%Lipidure-BL103

[0123] (第二试剂)

[0124] 5mmol/L MOPS缓冲液(pH 7.0)

[0125] 3.75Abs/mL固定克隆L抗体的乳胶颗粒混悬液<sup>(\*)</sup>

[0126] 1.25Abs/mL固定克隆1抗体的乳胶颗粒混悬液<sup>(\*)</sup>

[0127] (\*) Abs表示在280nm的吸光度。

[0128] (标准溶液)

[0129] 通过使用标准物质稀释剂将L-FABP标准物质调整至期望浓度,并用作标准溶液。

[0130] (冷冻解冻的尿)

[0131] 收集后在-30 $^{\circ}$ C冷冻保存的部分尿仅解冻一次并用于测定。通过基准方法预先测定的冷冻解冻的尿中的L-FABP为10ng/mL。

[0132] (试样)

[0133] 调整Interference Check A Plus(由希森美康株式会社(SYSMEX CORPORATION)制造)以将血红蛋白浓度设定为0至1000mg/dL。将经调整的Interference Check APlus和冷冻解冻的尿等量混合以获得其中血红蛋白以各浓度共存的试样。

[0134] (LT1A的测定条件)

[0135] (1) 分析装置:日立7170自动分析仪(Hitachi 7170 Automatic Analyzer,由日立高新技术公司(Hitachi High-Technologies Corporation)制造)

[0136] (2) 样品量和试剂量:3 $\mu$ L样品,150 $\mu$ L第一试剂,50 $\mu$ L第二试剂

[0137] (3) 反应时间(反应温度):第一试剂5分钟(37 $^{\circ}$ C),第二试剂5分钟(37 $^{\circ}$ C)

[0138] (4) 测光点和测光对象:刚添加第二试剂后与添加后5分钟之间的吸光度变化

[0139] [实施例1至4]通过BPF避免血红蛋白的影响

[0140] 确认通过BPF避免血红蛋白的影响的效果。

[0141] 1. 操作

[0142] (1) 校正曲线的制作

[0143] 采用标准溶液作为样品,通过使用第一试剂和第二试剂测定样品中的L-FABP。从测定的吸光度中减去0ng/mL L-FABP样品的吸光度(空白吸光度)以计算净吸光度。通过以L-FABP浓度为x轴和以净吸光度为y轴绘图来制作校正曲线。

[0144] (2) 实施例1至4

[0145] 通过使用包含表1中浓度的BPF的第一试剂和第二试剂测定试样中的L-FABP。

[0146] [表1]

[0147]

	BPF浓度
实施例1	0.1%
实施例2	0.5%
实施例3	1.0%
实施例4	2.0%

[0148] (3) 对照例

[0149] 通过使用不包含BPF的第一试剂和第二试剂测定样品中的L-FABP。

[0150] 2. 结果

[0151] L-FABP浓度通过使用(1)的校正曲线由实施例1至4和对照例中测定的吸光度计算。将在各血红蛋白浓度计算的测定值除以在0mg/dL的血红蛋白时的测定值以得到表2中所示的比例(%)。

[0152] [表2]

[0153]

		BPF(%)				
		0.0	0.1	0.5	1.0	2.0
Hb (mg/dL)	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	100	146.0	112.5	109.0	103.6	96.6
	200	179.1	122.7	119.9	109.4	100.7
	300	178.6	137.4	135.3	117.0	101.1
	400	257.1	153.8	145.3	120.5	103.2
	500	301.0	178.8	164.1	135.2	113.7

[0154] 判断标准:对100±15%之内的准确度画上阴影

[0155] 当不添加BPF时,在与100mg/dL血红蛋白共存时比例已经接近150%。另一方面,当添加BPF时,比例随BPF的浓度而减少,并且在如表2中所示的阴影部分中变化在15%之内。因此,在100mg/dL的血红蛋白浓度时变化在±15%之内,并且确认可以避免血红蛋白的影响。还确认在200至500mg/dL的血红蛋白浓度,比例随BPF的浓度而减少。

[0156] 对于实施例5至9,通过在以下条件下使用以下材料来进行测定。

[0157] (固定抗L-FABP抗体的乳胶颗粒混悬液)

[0158] (1) 固定克隆L抗体的乳胶颗粒混悬液的制备

[0159] 向13mL包含0.36mg/mL抗L-FABP抗体克隆L(由HOLDINGS Co.,Ltd.制造)的20mmol/L Tris缓冲液(pH 8.5)中,添加13mL的平均粒径0.27 $\mu$ m的1%乳胶颗粒(由积水化学工业株式会社(SEKISUI CHEMICAL CO.,LTD.)制造)混悬液,并在4 $^{\circ}$ C搅拌两小时。在这之后,添加13mL包含0.5%BSA的20mmol/L Tris缓冲液(pH 8.5),并在4 $^{\circ}$ C搅拌一小时。然后,进行利用5mmol/L MOPS缓冲液(pH 7.0)的透析以获得固定克隆L抗体的乳胶颗粒混悬液。

[0160] (2) 固定克隆1抗体的乳胶颗粒混悬液的制备

[0161] 向8mL包含0.54mg/mL抗L-FABP抗体克隆1(由HOLDINGS Co.,Ltd.制造)的5mmol/L Tris缓冲液(pH 7.5)中,添加8mL的平均粒径0.25 $\mu$ m的1%乳胶颗粒(由积水化学工业株式会社(SEKISUI CHEMICAL CO.,LTD.)制造)混悬液,并在4 $^{\circ}$ C搅拌两小时。在这之后,添加8mL包含0.5%BSA的5mmol/L Tris缓冲液(pH 7.5),并在4 $^{\circ}$ C搅拌一小时。然后,进行利用5mmol/L MOPS缓冲液(pH 7.0)的透析以获得固定克隆1抗体的乳胶颗粒混悬液。

[0162] (L-FABP标准物质)

[0163] 通过专利文献1中所述的基因重组来获得L-FABP标准物质。

[0164] (L-FABP基准测定法:基准方法)

[0165] 基于ELISA的体外诊断产品(Renapro(注册商标)L-FABP试验TMB)用于基准方法。

[0166] (第一试剂)

[0167] 300mmol/L缓冲液

[0168] 0.1%BPF(由东洋纺株式会社(TOYOB0 Co.,Ltd.)制造,BPF-103)

[0169] 300mmol/L NaCl

[0170] 390mmol/L苯甲脒盐酸盐

[0171] 0.720%至1.020%Lipidure-BL103

[0172] (第二试剂)

[0173] 5mmol/L MOPS缓冲液(pH 7.0)

[0174] 3.75Abs/mL固定克隆L抗体的乳胶颗粒混悬液<sup>(\*)</sup>

[0175] 1.25Abs/mL固定克隆1抗体的乳胶颗粒混悬液<sup>(\*)</sup>

[0176] (\*) Abs表示在280nm的吸光度。

[0177] (标准物质稀释剂)

[0178] 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)

[0179] 0.1%BPF(由东洋纺株式会社(TOYOB0 Co.,Ltd.)制造,BPF-103)

[0180] (标准溶液)

[0181] 通过使用标准物质稀释剂将L-FABP标准物质调整至期望浓度来制备标准溶液。

[0182] (冷冻解冻的尿)

[0183] 收集后在-30 $^{\circ}$ C冷冻保存的部分尿仅解冻一次并用于测定。

[0184] (LT1A的测定条件)

[0185] (1) 分析装置:日立7170自动分析仪(由日立高新技术公司制造)

[0186] (2) 样品量和试剂量:3 $\mu$ L样品,150 $\mu$ L第一试剂,50 $\mu$ L第二试剂

[0187] (3) 反应时间(反应温度):第一试剂5分钟(37 $^{\circ}$ C),第二试剂5分钟(37 $^{\circ}$ C)

[0188] (4) 测光点和测光对象:刚添加第二试剂后与添加后5分钟之间的吸光度变化

[0189] (5) 测定波长570nm/800nm

[0190] [实施例5至9]避免血红蛋白的影响

[0191] 通过使用表3所示的缓冲液作为第一试剂验证避免血红蛋白的影响的效果。

[0192] 1. 操作

[0193] (1) 试样的调整

[0194] 调整Interference check A plus(由希森美康株式会社(SYSMEX CORPORATION)制造)以将血红蛋白浓度设定为200mg/dL。将经调整的Interference Check A Plus和冷冻解冻的尿等量混合以获得其中血红蛋白以100mg/dL共存的试样。对于具有0mg/dL的血红蛋白浓度的试样,直接使用冷冻解冻的尿。

[0195] (2) 校正曲线的制作

[0196] 采用标准溶液作为样品,通过使用第一试剂和第二试剂测定样品中的L-FABP。从测定的吸光度中减去0ng/mL L-FABP样品的吸光度(空白吸光度)以计算净吸光度。通过以L-FABP浓度为x轴和以净吸光度为y轴绘图来制作校正曲线。

[0197] (3) 实施例5至9

[0198] 通过使用包含表3的缓冲液的第一试剂和第二试剂测定试样中的L-FABP。

[0199] 2. 结果

[0200] L-FABP浓度通过使用(2)的校正曲线由实施例5至9中测定的吸光度计算。将计算的测定值除以在0mg/dL的血红蛋白时的测定值以得到表3中所示的比例(%)。

[0201] [表3]

[0202]

	缓冲液	准确度(%)
实施例5	BisTris pH6.85	110.9
实施例6	HEPES pH7.0	102.1
实施例7	HEPES pH7.5	112.5
实施例8	TES pH7.0	109.1
实施例9	TES pH7.5	106.9

[0203] 对于表3中所示的包含BPF的所有缓冲液,准确度变化在±15%之内,并且确认可以避免血红蛋白的影响。当对包含2.0%浓度的BPF的缓冲液进行相同试验时,任何缓冲液的使用使得能够避免500mg/dL血红蛋白的影响(结果未示出)。

[0204] [实施例10]避免血红蛋白的影响

[0205] 通过使用表4中所示的缓冲液作为第一试剂以及2.5Abs/mL固定克隆L抗体的乳胶颗粒混悬液和2.5Abs/mL固定克隆1抗体的乳胶颗粒混悬液作为第二试剂(Abs表示在280nm的吸光度)验证避免血红蛋白的影响的效果。其他条件与实施例2至9的那些相同。

[0206] 1. 操作

[0207] (1) 试样的调整

[0208] 调整Interference check A plus(由希森美康株式会社(SYSMEX CORPORATION)制造)以将血红蛋白浓度设定为200mg/dL。将经调整的Interference Check A Plus和冷冻解冻的尿等量混合以获得其中血红蛋白以100mg/dL共存的试样。对于具有0mg/dL的血红蛋白浓度的试样,直接使用冷冻解冻的尿。

[0209] (2) 校正曲线的制作

[0210] 采用标准溶液作为样品,通过使用第一试剂和第二试剂测定样品中的L-FABP。从测定的吸光度中减去0ng/mL L-FABP样品的吸光度(空白吸光度)以计算净吸光度。通过以L-FABP浓度为x轴和以净吸光度为y轴绘图来制作校正曲线。

[0211] (3) 实施例10

[0212] 通过使用包含表4的缓冲液的第一试剂和第二试剂测定试样中的L-FABP。

[0213] 2. 结果

[0214] L-FABP浓度通过使用(2)的校正曲线由实施例10中测定的吸光度计算。将计算的测定值除以在0mg/dL的血红蛋白时的测定值以得到表4中所示的比例(%)。

[0215] [表4]

[0216]

	缓冲液	准确度(%)
实施例10	Tris pH7.0	114.3

[0217] 准确度变化在±15%之内,并且确认可以避免血红蛋白的影响。

[0218] 工业实用性

[0219] 根据本发明,可以通过使用BPF避免血红蛋白对LT1A的影响。

## 序列表

- <110> 积水医疗株式会社  
 <120> 免疫测定方法以及用于所述方法的测定试剂  
 <130> 15P00238  
 <150> JP2015-035926  
 <151> 2015-02-25  
 <160> 1  
 <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 <210> 1  
 <211> 638  
 <212> PRT  
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1) .. (638)  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (419) .. (607)  
 <400> 1

```

Met Gly Lys Ile Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Cys Val
1           5           10           15
Ala Ile Met Asp Gly Thr Thr Pro Arg Val Leu Glu Asn Ala Glu Gly
           20           25           30
Asp Arg Thr Thr Pro Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Gln Asp Gly Glu Thr
           35           40           45
Leu Val Gly Gln Pro Ala Lys Arg Gln Ala Val Thr Asn Pro Gln Asn
           50           55           60
Thr Leu Phe Ala Ile Lys Arg Leu Ile Gly Arg Arg Phe Gln Asp Glu
65           70           75           80
Glu Val Gln Arg Asp Val Ser Ile Met Pro Phe Lys Ile Ile Ala Ala
           85           90           95
Asp Asn Gly Asp Ala Trp Val Glu Val Lys Gly Gln Lys Met Ala Pro
           100          105          110
Pro Gln Ile Ser Ala Glu Val Leu Lys Lys Met Lys Lys Thr Ala Glu
           115          120          125
Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Val Thr Glu Ala Val Ile Thr Val Pro Ala
           130          135          140
Tyr Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Arg Ile
  
```

145	150	155	160
Ala Gly Leu Glu Val Lys Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala			
	165	170	175
Leu Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Gly Thr Gly Asn Arg Thr Ile Ala Val			
	180	185	190
Tyr Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Ile Ser Ile Ile Glu Ile Asp			
	195	200	205
Glu Val Asp Gly Glu Lys Thr Phe Glu Val Leu Ala Thr Asn Gly Asp			
	210	215	220
Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Ser Arg Leu Ile Asn Tyr Leu			
225	230	235	240
Val Glu Glu Phe Lys Lys Asp Gln Gly Ile Asp Leu Arg Asn Asp Pro			
	245	250	255
Leu Ala Met Gln Arg Leu Lys Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Ile Glu			
	260	265	270
Leu Ser Ser Ala Gln Gln Thr Asp Val Asn Leu Pro Tyr Ile Thr Ala			
	275	280	285
Asp Ala Thr Gly Pro Lys His Met Asn Ile Lys Val Thr Arg Ala Lys			
	290	295	300
Leu Glu Ser Leu Val Glu Asp Leu Val Asn Arg Ser Ile Glu Pro Leu			
305	310	315	320
Lys Val Ala Leu Gln Asp Ala Gly Leu Ser Val Ser Asp Ile Asp Asp			
	325	330	335
Val Ile Leu Val Gly Gly Gln Thr Arg Met Pro Met Val Gln Lys Lys			
	340	345	350
Val Ala Glu Phe Phe Gly Lys Glu Pro Arg Lys Asp Val Asn Pro Asp			
	355	360	365
Glu Ala Val Ala Ile Gly Ala Ala Val Gln Gly Gly Val Leu Thr Gly			
	370	375	380
Asp Val Lys Asp Val Leu Leu Leu Asp Val Thr Pro Leu Ser Leu Gly			
385	390	395	400
Ile Glu Thr Met Gly Gly Val Met Thr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Thr			
	405	410	415
Thr Ile Pro Thr Lys His Ser Gln Val Phe Ser Thr Ala Glu Asp Asn			
	420	425	430
Gln Ser Ala Val Thr Ile His Val Leu Gln Gly Glu Arg Lys Arg Ala			
	435	440	445
Ala Asp Asn Lys Ser Leu Gly Gln Phe Asn Leu Asp Gly Ile Asn Pro			
	450	455	460

Ala Pro Arg Gly Met Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile Asp Ala			
465	470	475	480
Asp Gly Ile Leu His Val Ser Ala Lys Asp Lys Asn Ser Gly Lys Glu			
	485	490	495
Gln Lys Ile Thr Ile Lys Ala Ser Ser Gly Leu Asn Glu Asp Glu Ile			
	500	505	510
Gln Lys Met Val Arg Asp Ala Glu Ala Asn Ala Glu Ala Asp Arg Lys			
	515	520	525
Phe Glu Glu Leu Val Gln Thr Arg Asn Gln Gly Asp His Leu Leu His			
530	535	540	
Ser Thr Arg Lys Gln Val Glu Glu Ala Gly Asp Lys Leu Pro Ala Asp			
545	550	555	560
Asp Lys Thr Ala Ile Glu Ser Ala Leu Thr Ala Leu Glu Thr Ala Leu			
	565	570	575
Lys Gly Glu Asp Lys Ala Ala Ile Glu Ala Lys Met Gln Glu Leu Ala			
	580	585	590
Gln Val Ser Gln Lys Leu Met Glu Ile Ala Gln Gln Gln His Ala Gln			
	595	600	605
Gln Gln Thr Ala Gly Ala Asp Ala Ser Ala Asn Asn Ala Lys Asp Asp			
610	615	620	
Asp Val Val Asp Ala Glu Phe Glu Glu Val Lys Asp Lys Lys			
625	630	635	

专利名称(译)	免疫测定方法以及用于所述方法的测定试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN107533055A</a>	公开(公告)日	2018-01-02
申请号	CN201680023848.3	申请日	2016-02-25
[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 松本拓二 山本光章		
发明人	小林幸司 松本拓二 山本光章		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/542 G01N33/545		
代理人(译)	陈晓娜		
优先权	2015035926 2015-02-25 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供在生物样品的待测定物质的免疫学测定中避免血红蛋白的影响的方法。为了解决该问题，在包含SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的多肽的存在下或在与其具有至少90%的序列同一性的多肽的存在下，使其中疑似存在待测定成分的样品与结合所述待测定成分的抗体反应，其中SEQ ID NO：1是来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的热激蛋白(HSP)DnaK的氨基酸序列的第419位氨基酸至第607位氨基酸的序列。

