



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103562720 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 05

(21) 申请号 201280015693. 0

代理人 孔青 权陆军

(22) 申请日 2012. 03. 27

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/531 (2006. 01)

2011-070872 2011. 03. 28 JP

G01N 33/543 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 09. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/058001 2012. 03. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/133452 JA 2012. 10. 04

(71) 申请人 三菱化学美迪恩斯株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 庄司庆一 横井宏行

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

权利要求书2页 说明书12页 附图5页

(54) 发明名称

全血检样的免疫测定方法和测定试剂盒

(57) 摘要

本发明提供:在公知的目标物质的测定方法中,可以抑制对测定结果产生负面影响的反应的改良方法。该改良方法包括:准备含有目标物质的检样溶液、第一反应液、和第二反应液;使用具有分注装置的测定装置,将检样溶液和第一反应液依次吸取到分注装置中;然后通过由分注装置中一并喷出,与第二反应液接触,使在第一反应液或第二反应液的至少一方中含有的、与目标物质特异性反应的第一伙伴与目标物质形成复合物;对形成的复合物进行分析。上述改良方法中,检样溶液的比重与第一反应液的比重不同,在检样溶液与第一反应液叠层的状态下被吸取到分注装置中。

1. 目标物质的测定方法,该测定方法是:
准备可能含有目标物质的检样或其处理液、第一反应液、和第二反应液;
使用具有分注装置的测定装置,将上述检样或其处理液、和上述第一反应液按照该顺序或相反顺序依次吸取到分注装置中;
然后由分注装置中一并喷出,与上述第二反应液接触,形成第一伙伴与目标物质的复合物,该第一伙伴含在第一反应液或第二反应液的至少一方中,与目标物质特异性反应;
对形成的上述复合物或来自该复合物的信号进行分析,
上述目标物质的测定方法的特征在于:上述检样或其处理液的比重与上述第一反应液的比重不同;
在检样或其处理液与第一反应液叠层的状态下被吸取到分注装置中。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中,检样为全血。
3. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,第一反应液的比重比检样或其处理液的比重大,将检样或其处理液、和第一反应液按照该顺序吸取到分注装置中。
4. 权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的方法,其中,第一反应液含有选自多元醇类、糖醇类和糖类的至少一种物质。
5. 权利要求 4 所述的方法,其中,第一反应液含有选自乙二醇、丙二醇、二甘醇、甘油、戊糖、己糖、丙糖、丁糖、庚糖、蔗糖、海藻糖、异海藻糖、曲二糖、槐糖、黑曲霉二糖、昆布二糖、麦芽糖、纤维二糖、异麦芽糖、龙胆二糖、乳糖、松二糖、麦芽酮糖、帕拉金糖、异龙胆二糖、甘露二糖、蜜二糖、异蜜二糖、异乳糖、半乳糖、海藻糖、芸香糖、芸香二糖、木二糖、Primellose、低聚糖类、棉子糖、松三糖和麦芽三糖的至少一种物质。
6. 权利要求 4 或 5 所述的方法,其中,权利要求 4 或 5 所述的物质的总量是以 10% 以上且 30% 以下含在第一反应液中。
7. 权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的方法,其中,与目标物质特异性反应的第一伙伴是抗体或抗原。
8. 权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的方法,其中,与目标物质特异性反应的第一伙伴含在第一反应液中,识别与第一伙伴不同的区域、与目标物质特异性反应的第二伙伴含在第二反应液中。
9. 权利要求 8 所述的方法,其中,与目标物质特异性反应的第一伙伴和第二伙伴是用标记物标记的伙伴或固定于固相载体上的伙伴。
10. 权利要求 9 所述的方法,其中,第一反应液中所含的、与目标物质特异性反应的第一伙伴是用标记物标记的伙伴,第二反应液中所含的、与目标物质特异性反应的第二伙伴是固定在固相载体上的伙伴。
11. 权利要求 1 ~ 10 中任一项所述的方法,其中,在第一反应液或第二反应液的至少一方中含有抑制与目标物质形成复合物、与目标物质特异性反应的第三伙伴。
12. 权利要求 11 所述的方法,其中,第一反应液和第二反应液中含有与目标物质特异性反应的上述第三伙伴。
13. 权利要求 11 或 12 所述的方法,其中,与目标物质特异性反应的第三伙伴是抗体或抗原。
14. 权利要求 1 ~ 13 中任一项所述的方法,其中,分注装置是吸头。

15. 目标物质的测定试剂盒,该目标物质的测定试剂盒含有第一反应液和第二反应液,在第一反应液和第二反应液的至少一方中含有与目标物质特异性反应的第一伙伴,在具有分注装置的测定装置中使用,上述测定装置是实施以下步骤的装置:将检样或其处理液和上述第一反应液按照该顺序或相反顺序依次吸取到分注装置内,上述检样或其处理液的比重与上述第一反应液的比重不同。

16. 权利要求 15 所述的测定试剂盒,其中,第一反应液的比重比检样或其处理液的比重大。

全血检样的免疫测定方法和测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及以存在于检样中的目标物质（微量成分等）为对象的测定方法和试剂盒。特别涉及以存在于全血检样中的目标物质（微量成分等）为对象的免疫学分析方法和免疫学分析试剂盒。

背景技术

[0002] 作为存在于生物体试样中的目标物质（微量成分等）的测定方法，大多采用利用抗原抗体反应的免疫学测定方法，已知有放射免疫测定（RIA）、酶联免疫吸附测定（ELISA）等。近年来，样品大多采用血清、血浆，但由于前处理繁琐，人们希望采用直接测定全血的方法。但是，全血检样中除了作为测定对象的微量成分等之外，还较多含有杂质（目标外物质）等，因此大多不能够与使用血清检样或血浆检样的条件同样地进行。另外，为了提高反应精度，如专利文献 1 中的报道，通过在反应中存在反应抑制剂（可与固定于固相或标记物上的抗体竞争的、游离的抗体或其抗体片段），可以避免前带等。这种情况下，在一个测定中混合存在多个反应物质，难以构建测定系统。

[0003] 另外，作为可简便地试验多个检样的手段，已知有各种全自动免疫测定装置，例如可举出如专利文献 2 所示的可同时测定多个的全自动测定装置。记载了：该全自动测定装置是将含有目标物质的检样分注到盒（カートリッジ）中，该盒具有将规定量的检样稀释为所需倍率的稀释槽（希釈ウエル）、使检样中的目标物质与可与其特异性反应的物质进行反应的反应槽、以及含有反应成分等的容纳槽，在该盒上，将检样稀释至所需倍数，使稀释的检样中的目标物质与可与其特异性反应的物质进行反应，测定反应产物的量，由此可以简便地测定检样中所含的、稀释倍率不同的多种目标物质。还记载了：该全自动测定装置具有吸取、喷出机构，利用该机构进行分注操作，进行测定。

[0004] 另一方面，作为以全血检样为对象的测定方法，如专利文献 3 中公开了：为了避免全血检样中所含的成分的影响而使其含有表面活性剂的方法等。

[0005] 但是，使用上述分注装置如全自动测定装置那样依次分注各反应试剂等进行反应的测定方法中，同一检样的血浆和全血的值发生偏离，这种情况尚不被了解，人们对改善这样问题的方法也未有解决方案。

[0006] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1：日本特开 2004-191332 号公报；

专利文献 2：W02001/084152 号公开小册子；

专利文献 3：W02002/073203 号公开小册子。

发明内容

[0007] 发明所要解决的问题

如在后述实施例中进行的具体说明，本发明人在使用含有目标物质的检样或其处理液

(以下称为检样溶液);在正式反应中形成的、形成与目标物质的免疫复合物、与目标物质特异性反应的伙伴[例如抗体(第一反应液中含有用碱性磷酸酶标记的抗体,第二反应液中含有固定于磁性颗粒上的抗体)];可抑制上述免疫复合物的形成、与目标物质特异性反应的游离抗体(添加到第一反应液和第二反应液中)的目标物质的测定方法中,在以全血检样为对象用具有分注装置的全自动酶联免疫测定装置进行测定时发现:在使用该分注装置吸取含目标物质的检样溶液、接着吸取第一反应液时,在正式反应中作为抑制免疫复合物的形成的反应抑制剂而发生反应的抗体是在正式反应之前与全血检样中的目标物质进行反应,因此,同一检样的血浆检样与全血检样的值发生偏离。

[0008] 本发明针对该问题而设,其目的在于提供一种测定方法和试剂盒,它是使用具有分注装置的测定装置,含有目标物质的检样、和与目标物质特异性反应的伙伴实质上在正式反应时才开始反应,从而抑制对测定结果产生负面影响的反应的测定方法和试剂盒。

[0009] 用于解决问题的方法

本发明人针对上述状况反复进行深入探讨,结果发现:在使用具有分注装置的测定装置,使用含有目标物质的检样溶液、第一反应液、和第二反应液的目标物质的测定方法中,使第一反应液和第二反应液的至少一方中含有在正式反应中形成的、形成与目标物质的免疫复合物、与目标物质特异性反应的第一伙伴,通过采用特征在于:在分注装置内的流路中,含有目标物质的检样溶液、和第一反应液以不同的比重存在的方法,可以抑制正式反应前不需要的反应的进行,同一检样的血浆检样和全血检样的值不发生偏离。本发明基于该认识而设,从而完成了使用任何检样均可简便且准确地测定检样中的目标物质的方法。

[0010] 即,本发明涉及以下的发明。

[0011] [1] 目标物质的测定方法,该测定方法是:

准备可能含有目标物质的检样或其处理液、第一反应液、和第二反应液;

使用具有分注装置的测定装置,将上述检样或其处理液、和上述第一反应液按照该顺序或相反顺序依次吸取到分注装置中;

然后由分注装置中一并喷出,与上述第二反应液接触,形成第一伙伴与目标物质的复合物,该第一伙伴含在第一反应液或第二反应液的至少一方中、与目标物质特异性反应;

对形成的上述复合物或来自该复合物的信号进行分析,

上述目标物质的测定方法的特征在于:上述检样或其处理液的比重与上述第一反应液的比重不同;

在检样或其处理液与第一反应液叠层的状态下被吸取到分注装置中。

[0012] [2] [1] 的方法,其中,检样为全血。

[0013] [3] [1] 或 [2] 的方法,其中,第一反应液的比重比检样或其处理液的比重大,将检样或其处理液、和第一反应液按照该顺序吸取到分注装置中。

[0014] [4] [1] ~ [3] 中任一项的方法,其中,第一反应液含有选自多元醇类、糖醇类和糖类的至少一种物质。

[0015] [5] [4] 的方法,其中,第一反应液含有选自乙二醇、丙二醇、二甘醇、甘油、戊糖、己糖、丙糖、丁糖、庚糖、蔗糖、海藻糖、异海藻糖、曲二糖、槐糖、黑曲霉二糖、昆布二糖、麦芽糖、纤维二糖、异麦芽糖、龙胆二糖、乳糖、松二糖、麦芽酮糖、帕拉金糖(异麦芽酮糖)、异龙胆二糖(ゲンチオピウロース)、甘露二糖、蜜二糖、异蜜二糖(メリピウロース)、异乳糖、

半乳糖海葱二糖芸香糖、芸香二糖木二糖、Primellose(プリメロース)、低聚糖类、棉子糖、松三糖和麦芽三糖的至少一种物质。

[0016] [6] [4] 或 [5] 的方法,其中,[4] 或 [5] 的物质的总量是以 10% 以上且 30% 以下含在第一反应液中。

[0017] [7] [1] ~ [6] 中任一项的方法,其中,与目标物质特异性反应的第一伙伴是抗体或抗原。

[0018] [8] [1] ~ [7] 中任一项的方法,其中,与目标物质特异性反应的第一伙伴含在第一反应液中,识别与第一伙伴不同的区域、与目标物质特异性反应的第二伙伴含在第二反应液中。

[0019] [9] [8] 的方法,其中,与目标物质特异性反应的第一伙伴和第二伙伴是用标记物标记的伙伴或固定于固相载体上的伙伴。

[0020] [10] [9] 的方法,其中,第一反应液中所含的、与目标物质特异性反应的第一伙伴是用标记物标记的伙伴,第二反应液中所含的、与目标物质特异性反应的第二伙伴是固定在固相载体上的伙伴。

[0021] [11] [1] ~ [10] 中任一项的方法,其中,在第一反应液或第二反应液的至少一方中含有抑制与目标物质形成复合物、与目标物质特异性反应的第三伙伴。

[0022] [12] [11] 的方法,其中,第一反应液和第二反应液中含有与目标物质特异性反应的上述第三伙伴。

[0023] [13] [11] 或 [12] 的方法,其中,与目标物质特异性反应的第三伙伴是抗体或抗原。

[0024] [14] [1] ~ [13] 中任一项的方法,其中,分注装置是吸头。

[0025] [15] 目标物质的测定试剂盒,该目标物质的测定试剂盒含有第一反应液和第二反应液,在第一反应液和第二反应液的至少一方中含有与目标物质特异性反应的第一伙伴,在具有分注装置的测定装置中使用,上述测定装置是实施以下步骤的装置:将检样或其处理液和上述第一反应液按照该顺序或相反顺序依次吸取到分注装置内,上述检样或其处理液的比重与上述第一反应液的比重不同。

[0026] [16] [15] 的测定试剂盒,其中,第一反应液的比重比检样或其处理液的比重大。

[0027] 以下,在本说明书中,“第一伙伴”和“第二伙伴”以在正式反应中形成的、形成与目标物质的复合物、与目标物质特异性反应的物质的含义使用,“第三伙伴”以在正式反应中形成的、抑制与目标物质的复合物的形成、与目标物质特异性反应的物质的含义使用。

[0028] 发明效果

通过使用本发明的方法,即使使用任何检样均可以简便且准确地测定检样中的目标物质。特别是在使用具有与其它检样不同性质的全血检样时,通常也不会与作为比较对象的血清检样或血浆检样的值发生偏离,可测定目标物质。

附图说明

[0029] 图 1 是模式表示将全血(检样溶液,92)和第一反应液(标记抗体溶液,93)吸取到作为分注装置的吸头(91)内时,吸头内各溶液状态的说明图。(a)是第一反应液不含有糖的情况,(b)是第一反应液含有糖的情况;

图 2 是模式表示实施例中使用的盒的平面图；

图 3 是表示第一试剂（标记抗体试剂）中不含有糖（蔗糖）时得到的全血测定值和血浆测定值的相关性的图表；

图 4 是表示图 3 所示的不含有糖时得到的全血测定值与血浆测定值之比的图表；

图 5 是表示第一试剂（标记抗体试剂）中含有 15% 蔗糖时得到的全血测定值和血浆测定值的相关性的图表；

图 6 是表示图 5 所示的含有 15% 蔗糖时得到的全血测定值和血浆测定值之比的图表。

具体实施方式

[0030] 1. 自动测定装置和测定法

本发明的方法只要是具有分注机构的自动测定装置以及测定法即可，均可使用。分注机构可以是如日本特表平 09-503060 号那样的按照随机访问进行的方法，也可以是如 W02001/084152 号那样的同一操作的方法。测定方法可以采用公知的免疫学测定方法，可举出化学发光酶免疫测定法 (CLEIA) 或免疫比浊测定法等。化学发光酶免疫测定法 (CLEIA) 可以以酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 的形式使用。为了进行高灵敏度的分析方法，常使用夹层 ELISA 法。

[0031] 以下记载了可用于本发明的测定方法和试剂盒的公知的自动测定装置和测定法的一个方案，但并不限于此。

[0032] 测定用的自动测定装置至少具备容纳测定用盒的盒容纳部、向容纳于盒容纳部中的盒中分注试剂和 / 或检样的分注部、以及测定容纳于盒容纳部中的盒上的反应产物的测定部。盒容纳部除了制成可容纳测定用盒的结构之外，可以与常规的盒容纳部同样。

[0033] 上述分注部是根据试剂和 / 或检样的种类或性状，由液体吸取、喷出机构等常规的机构构成。这里，分注包含将试剂和 / 或检样从盒外转移至盒的槽中、以及将试剂和 / 或检样从盒上的一个槽中转移到另外的槽中两种情况。

[0034] 上述测定部根据反应产物的种类或性状，由测光机构等常规机构构成。

[0035] 上述测定用的盒例如可以是将槽组并列设成两排以上形成的盒，或者将槽组配置成 1 排的单数的盒，或者使用多个这些盒。使用多个盒进行测定时，通过并列设置了多个进行一系列免疫反应的机构的装置，形成具有同时并行驱动控制检样的分注、检样的稀释、试剂的分注、B/F 分离和测光等步骤的机构。这样，采用免疫测定法时，使用只进行单一样式的分析步骤的装置，即使分析项目不同也不会使测定所需时间增加较多，可以同时测定多个项目。

[0036] 另外，测定用盒具有：分注检样的分注槽；将规定量的检样稀释为所需倍率的稀释槽；使检样中的目标物质和与其特异性反应的物质进行反应的反应槽；与反应槽对应的、用于 B/F 分离的洗涤槽；用于容纳检样中所含目标物质测定所必需的试剂的试剂容纳槽；用于测定反应产物的量的测定槽等。为了进行光学测定，测定槽可使用测光槽。另外，无需在同一测定用盒上配置所有上述的槽，可结合所使用的装置选择。例如检样中所含的目标物质测定所必需的试剂可以容纳于另外的试剂供给盒中。另外，各槽并不是只用于其目的，例如分注槽可兼做稀释槽，试剂容纳槽可兼做反应槽。各槽的数目可适当配置。

[0037] 反应槽中可以容纳与反应相关的试剂的一部分。试剂容纳槽或反应槽中容纳的试

剂可以是一种,只要容纳的试剂之间不反应,也可以是多种。所容纳的试剂可以是液状(例如溶液或悬浮液),如果可溶解或悬浮于注入到槽中的液体,也可以是固体状。

[0038] 在填充了稀释液、标记物、洗涤液等试剂和/或溶液等时,为了避免杂质的混入或试剂等的蒸发、劣化,测定用盒优选将其上部用铝箔、塑料薄膜等密封。特别是铝箔的密封可以通过自动测定装置的穿孔机构自动且简便地开封,因此优选。另外,将试剂和或溶液等填充于另外的盒中,将其结合使用进行测定时,优选该盒也密封。

[0039] 可在测定用盒上通过印刷、粘贴等附上与检样相关的信息、与分析项目相关的信息、以及记录试剂管理信息等的条形码。通过在盒上附上这样的条形码,如果使用可识别盒的条形码、分析项目可自动选择的自动测定装置,则测定者通过只选择盒,使用一台测定装置即可以简便且高效率地测定任意的分析项目。另外,无需进行如以往的常规自动测定装置所进行的、成为分析项目的误设定的很大的原因的工作表操作,没有失败,可以简便地进行多种分析项目的测定。并且试剂的保管等也简便。

[0040] 组装测定用盒而使用的自动测定装置中,从一个槽中吸取规定量的液体并喷出到另外的槽中的装置;将槽中内容物进行搅拌的装置;进行 B/F 分离的装置;测定反应产物或标记物的量的装置;由反应产物或标记物的量的测定结果计算目标物质的量的装置;调节盒的温度的装置;识别条形码的装置;进行多个盒同时测定的装置等可以使用公知的装置。

[0041] 关于优选方案的一个例子,以下以使用免疫测定法、更具体地说是使用化学发光酶免疫测定法(CLEIA)进行测定的情形为例进行说明。

[0042] 优选方案的盒是组装到对存在于检样中的目标物质进行自动定量的自动测定装置中而使用的自动测定用盒,具有:使目标物质、和与其免疫学特异性反应的物质进行反应的反应槽、用于填充反应中使用的试剂的多个试剂容纳槽、分注检样的分注槽、进行检样稀释的稀释槽、用于进行 B/F 分离的洗涤槽和/或测光槽。如上所述,试剂容纳槽可以兼做反应槽。优选在稀释槽中填充可将规定量的检样稀释为所需倍率的量的稀释液,在多个试剂容纳槽中分别填充用于进行免疫学特异性反应的固相载体、标记的抗原或抗体、用于进行标记物量的测定的试剂等,在洗涤槽中填充用于洗涤免疫复合物的洗涤液来使用。在盒的试剂容纳槽中例如加入结合抗原或抗体的固相载体(致敏固相),可兼做反应槽。

[0043] 固相载体可举出以往在免疫测定中使用的聚苯乙烯珠、磁性颗粒、胶乳等。并且可以不将固相载体加入到槽中,而在槽内壁使抗体或抗原形成固相使用。

[0044] 作为本方案中使用的免疫测定法,从灵敏度方面考虑,优选有利的化学发光酶免疫测定法(CLEIA),固相载体优选磁性颗粒,该磁性颗粒使得化学发光酶免疫测定法(CLEIA)中必须进行的 B/F 分离可通过磁铁简便地进行。该 B/F 分离可用永久磁铁、电磁铁等,由盒外部施加磁场来进行,还可以如日本特开平 11-262678 号公报中所示,通过排列于分注系统的移液管吸头等的吸取、喷出系统一侧的磁铁进行。

[0045] 另外,在其它的试剂容纳槽中加入标记的抗原或抗体,可兼做反应槽。标记物例如可举出:酶、放射性同位素、显色物质、荧光物质、发光物质、各种着色颗粒,在化学发光酶免疫测定法(CLEIA)中,优选使用酶。上述标记酶的例子可举出:碱性磷酸酶、过氧化物酶、半乳糖苷酶、葡糖氧化酶等。标记酶的底物可以使用与各酶对应的底物,例如碱性磷酸酶可使用金刚烷基甲氧基苯基磷酸基二氧杂环丁烷(AMPPD)或 CDP-Star(注册商标),过氧化物酶

可使用鲁米诺 / 过氧化物, 半乳糖苷酶可使用金刚烷基甲氧基苯基 β -D- 半乳糖基二氧杂环丁烷 (AMPGD)。

[0046] 标记物的测定例如在化学发光酶免疫测定法中, 可将免疫复合物与标记酶的底物混合, 然后由测光槽直接或通过光电倍增管等进行。采用酶联免疫法时, 在与酶底物液混合后, 可由测光槽的底部或侧部照射测定波长的测定光, 通过测定透过测光槽的透射光来进行。

[0047] 作为分注部, 优选分注装置内的流路即与试剂和 / 或检样接触的部分可更换。分注装置可举出可容易地吸取、喷出试剂或检样的先端变细的形态, 具体可举出吸头等。通过每次测定时更换该部分, 可以容易地防止对后面测定所使用的盒的污染, 因此优选。

[0048] 2. 本发明的测定法

本发明的测定法可参照公知的自动分析装置或测定法进行。以下对于本发明的主要特征进行详细说明。

[0049] 本发明的测定法基于以下思想: 在使用具有分注装置的测定装置时, 使含有目标物质的检样溶液、和与目标物质特异性反应的伙伴实质上在正式反应时才可以开始反应, 来抑制对测定结果产生负面影响的反应。

[0050] 具体来说, 在使用具有分注装置的测定装置, 使用含目标物质的检样溶液、第一反应液、和第二反应液的目标物质的测定方法中, 在第一反应液和第二反应液的至少一方中含有在正式反应中形成的、形成与目标物质的复合物、与目标物质特异性反应的第一伙伴, 在分注装置的流路中, 使含有目标物质的检样溶液和第一反应液以不同的比重存在。

[0051] 采用常规自动分析装置时, 首先大多是吸取检样。即, 进行通过分注装置 (例如, 吸头) 吸取含有目标物质的检样溶液的第一步, 接着进行用该分注装置吸取第一反应液的第二步骤。这种情况下, 如图 1(a) 所示, 如果检样溶液 (92) 比第一反应液 (93) 的比重重, 例如检样溶液转至吸头 (91) 的壁部, 下沉, 检样溶液与第一反应液的接触面增大, 不希望的反应在正式反应之前即进行。调节检样和第一反应液哪一个的比重, 这可以适当选择, 不过使比重增加较为容易, 因此, 优选使第一反应液的比重增加。通过使第一反应液的比重比检样溶液重, 在分注装置的流路中, 可使第一反应液以实质上不混合的状态叠层于检样溶液的下层, 不希望进行的反应可以在正式反应之前进行, 因此优选。

[0052] 本发明的检样只要是含有目标物质或有含有目标物质可能性的检样即可, 例如可举出全血、血清、血浆、尿等。

[0053] 特别是检样为全血时, 检样溶液的比重通常比常规反应液的大, 因此大多引发对测定有影响的、不希望出现的反应。因此, 增加第一反应液的比重, 这在全血检样时特别优选。另外, 血清检样或血浆检样等通常与常规的稀释液是同等程度的比重, 因此有些场合对测定没有影响, 但实施高灵敏度、高精度的测定时可能出现的问题, 因此对于全血检样以外的检样, 优选使第一反应液的比重比检样溶液重。还有很多情况是同时测定各种种类的检样, 因此优选使第一反应液的比重比检样溶液重。

[0054] 例如, 相对于全血检样溶液的比重, 第一反应液的比重可以有 0.05% ~ 10% 的不同, 优选有 0.1% ~ 7.5%、更优选 0.1% ~ 3% 的不同。比重的测定可以通过公知的比重计等容易地测定。

[0055] 只要可制成检样溶液与第一反应液不同的比重即可, 可以使用任何物质, 但必须

是检样与第一反应液和第二反应液中所含的成分在正式反应时同时混合,且选择对测定没有负面影响的物质。例如优选不破坏血细胞成分的物质。具体来说可举出:多元醇类、糖醇类、糖类。多元醇类可举出:乙二醇、丙二醇、二甘醇,糖醇类可举出甘油。糖类不会对各种检样或反应液的成分有影响,还可提高比重,因此特别优选。糖类可举出单糖类、二糖类、三糖类。单糖类的例子有:戊糖、己糖、丙糖、丁糖、庚糖,二糖类的例子有:蔗糖、海藻糖、异海藻糖、曲二糖、槐糖、黑曲霉二糖、昆布二糖、麦芽糖、纤维二糖、异麦芽糖、龙胆二糖、乳糖、松二糖、麦芽酮糖、帕拉金糖(异麦芽酮糖)、异龙胆二糖(ゲンチオビウロース)、甘露二糖、蜜二糖、异蜜二糖(メリビウロース)、异乳糖、半乳糖、海葱二糖、芸香糖、芸香二糖、木二糖、Primellose(プリメロース),三糖类的例子有:低聚糖类、棉子糖、松三糖、麦芽三糖。其中优选二糖类、三糖类,可特别优选使用蔗糖。另外,适合的使用浓度可以结合各种物质的性质适当设定,例如第一反应液或第二反应液中它们的总量为10%以上~30%以下,优选10%以上~20%以下,更优选10%以上~15%以下。或者,在另一方案中,优选15%以上且30%以下。

[0056] 测定的顺序包含:通过分注装置吸取含有目标物质的检样溶液的第一步骤;进一步通过分注装置吸取第一反应液的第二步骤;将上述检样溶液和上述第一反应液喷出到反应槽中,使其与第二反应液反应的第三步骤;以及测定反应产物的量的第四步骤。第一步骤之前也可以包含:将含有目标物质的检样分注到分注槽中的步骤、或将检样用稀释槽进行稀释的步骤等。在第三步骤和第四步骤之间还可以进一步包含:将结合有与目标物质特异性结合的物质复合物进行B/F分离的步骤等。

[0057] 检样的稀释倍率和填充于稀释槽中的稀释液可根据检样、目标物质、与目标物质特异性反应的物质等的种类适当选择。稀释液可以含有检样前处理所需的试剂,这种情况下,稀释槽中,稀释和前处理同时进行。

[0058] 检样的前处理所需的试剂可举出:酸、碱、有机溶剂、蛋白质改性剂、表面活性剂等。通过添加这些试剂,也可以在检样稀释步骤中进行检样的前处理。使用全血作为检样时,全血中大量含有夹杂物等,因此优选通过添加任意的表面活性剂等进行前处理。这样,通过同时进行检样的稀释和前处理,在使用全血等作为检样时也可以进行简便且精度高的测定,例如可适用于紧急检查或由医生、护士进行的即时检验(POCT)等。

[0059] 本发明的检样溶液是指采集自患者的检样其本身、或者采集自患者的检样用上述稀释液进行稀释和/或前处理的、经制备的检样溶液。

[0060] 本发明的目标物质没有特别限定,只要是存在与该目标物质特异性反应的伙伴即可。例如,目标物质和与其特异性反应的伙伴的组合可举出:抗原和抗体、抗体和抗原、糖链和凝集素等。这样,本发明中的“特异性反应”是指生化学特异性结合,如底物那样,目标物质以及特异性反应的伙伴在其结合前后,物质的化学性质可以发生变化。

[0061] 使目标物质和与其特异性反应的伙伴进行反应的步骤、以及测定反应产物的量的步骤的条件等可以根据目标物质和与其特异性反应的伙伴的组合来适当选择。例如,酶与底物的反应以及反应产物的量的测定可以通过将酶与底物混合,使酶与底物作用,测定反应产物(底物的分解物)的量来进行。另外,抗体与抗原的反应以及反应产物的量的测定可以是将抗体或抗原和与其对应的结合有抗体或抗原的固相载体和标记物混合,形成反应产物(免疫复合物),通过洗涤,从免疫复合物中除去未反应的抗体或抗原以及标记物(B/F

分离),通过免疫复合物的形成来测定与固相结合标记物的量。这样,本发明中,“测定反应产物的量”不仅是直接测定反应产物本身的量,也包含测定与反应产物的量的定量相关的物质的量或信号。可由这样测定的反应产物的量计算检样中的目标物质的量。

[0062] 需要说明的是,复合物通常是指目标物质与特异性反应的伙伴的结合而得到的产物。

[0063] 本发明中,优选目标物质与特异性反应的伙伴的反应为免疫学反应。即,优选与目标物质进行特异性反应的伙伴是抗体或抗原。免疫学反应优选为以下的反应:使检样中的目标物质与免疫学特异性反应的第一伙伴反应,形成第一免疫复合物,使第一免疫复合物和与其免疫学特异性反应的标记的第二伙伴进行反应,形成第二免疫复合物。进一步优选目标物质为抗原,特异性反应的伙伴为抗体。

[0064] 即,本发明的与目标物质特异性反应的伙伴(优选第一伙伴和第二伙伴的组合)是指构成复合物的物质,该复合物产生作为上述目标物质的量测定的信号。

[0065] 本发明中的正式反应是指目标物质、和与该目标物质特异性反应的伙伴发生反应,形成复合物的反应。即,是指目标物质和构成复合物的物质的反应,该复合物产生作为目标物质的量测定的信号。

[0066] 实质上在正式反应时才开始反应是指在对测定结果没有负面影响的程度下,在正式反应前,与该正式反应相关的物质存在于测定系统中,在正式反应开始时,与该正式反应相关的物质相遇,由此开始正式反应。

[0067] 本发明的反应液是与目标物质进行反应的溶液,反应液中可以含有正式反应所需的物质。本发明的反应液至少使用2种以上。

[0068] 与本发明的目标物质特异性反应的伙伴只要包含在第一反应液和第二反应液的至少一方中即可。在使用一种伙伴的情况下特别优选。例如可举出使用1种抗体的胶乳聚集法的情形等。

[0069] 与目标物质特异性反应的第一伙伴也可以包含在第一反应液和第二反应液中。在使用2种以上的伙伴、即,使用第一伙伴和第二伙伴的组合时特别优选。并且,第一反应液中所含的、与目标物质特异性反应的第一伙伴和第二反应液中所含的、与目标物质特异性反应的第二伙伴可以是与目标物质的不同区域反应的物质。例如,可以举出使用2种以上抗体的夹层ELISA法的情形等。

[0070] 与目标物质特异性反应的伙伴可以用标记物标记的伙伴或固定于固相载体上的伙伴。例如可举出:将1种抗体固定在胶乳上使用的胶乳聚集法的情形等。

[0071] 第一反应液中所含的、与目标物质特异性反应的第一伙伴可以用标记物标记的伙伴,第二反应液中所含的、与目标物质特异性反应的第二伙伴可以是固定于固相载体上的伙伴。例如可举出:将一方的抗体固定于磁性颗粒上、将另一方的抗体用标记物标记的夹层ELISA法的情形等。

[0072] 本发明的与目标物质特异性反应的第三伙伴是指抑制复合物形成的物质,该复合物产生作为上述目标物质的量测定的信号。只要是抑制该复合物的形成、但并不是构成该复合物的物质即可,可以是任何物质。例如目标物质为抗原、第一和/或第二伙伴为抗体时,可举出:竞争性抑制该抗原与该抗体结合的物质。竞争性抑制该抗原与该抗体结合的物质可举出:与该抗体实质上具有相同表位的抗体。

[0073] 具体来说,准备与某种抗原具有同一表位的抗体,其中一方固定于磁性颗粒(与目标物质特异性反应的第一伙伴)上,另一方为游离的抗体(与目标物质特异性反应的第三伙伴)的形式,进一步准备进行了检测用标记的、与上述表位不同的抗体(与目标物质特异性反应的第二伙伴),将它们与某种抗原一起供给正式反应时,被固定的抗体和游离抗体发生竞争反应,在最佳测定条件下,固定的抗体与该抗原结合,标记抗体也进一步结合,形成了适合反映目标物质的量的该被固定的抗体与该抗原和该标记抗体的免疫复合物。

[0074] 使用抑制上述复合物形成的第三伙伴的测定法中,正式反应时,与目标物质特异性反应的第一和/或第二伙伴以及与目标物质特异性反应的第三伙伴可以同时与目标物质开始反应,由此目标物质的测定精度提高,因此特别优选。

[0075] 具体来说,第一反应液或第二反应液的至少一方中可以含有第三伙伴,该第三伙伴抑制在正式反应中形成的、与目标物质的复合物的形成,与目标物质特异性反应。另外,第一反应液和第二反应液中也可以含有第三伙伴,该第三伙伴抑制在正式反应中形成的、与目标物质的复合物的形成,与目标物质特异性反应。

[0076] 使用密封的盒等时,由于装置的运动或者吸头可破坏密封的冲击等,有发生内容物飞散或吸取不良,而无法准确吸取反应液的情形。因此,在第一反应液和第二反应液两方中含有抑制正式反应中形成的、与目标物质的复合物的形成、与目标物质特异性反应的第三伙伴,这可以使正式反应时不会发生大的组成变化,因此优选。

[0077] 3. 本发明的试剂盒

本发明的试剂盒可以用于本发明的测定方法。具体来说,含有与含目标物质的检样溶液的比重不同的第一反应液、和第二反应液,在第一反应液和第二反应液的至少一方中含有与目标物质特异性反应的第一伙伴。优选上述第一反应液比上述检样溶液的比重重。

[0078] 4. 本发明的方案举例

本发明的第一方案可举出抗原的免疫学比浊测定方法,该方法是使用具有分注装置的测定装置,使用含目标物质(抗原)的全血检样溶液;第一反应液;含有固定于胶乳上的、与抗原特异性反应的抗体的第二反应液。具体来说,可进行将该检样溶液用分注装置吸取的第一步骤,接着进行将该第一反应液用该分注装置吸取的第二步骤,使该第一反应液叠层于该检样溶液的下层,然后,将该分注装置吸取的该检样溶液和该第一反应液喷出到该第二反应液中,进行正式反应,然后光学测定胶乳的聚集,从而测定抗原量。

[0079] 本发明的第二方案可举出抗原的免疫学比浊测定法,该方法是使用具有分注装置的测定装置,使用含目标物质(抗原)的全血检样溶液;含有抑制在正式反应的免疫复合物的生成、与抗原特异性反应的游离的抗体的第一反应液;和含有固定于胶乳上的、与抗原特异性反应的抗体的第二反应液。具体来说,可进行将该检样溶液用分注装置吸取的第一步骤,接着进行将该第一反应液用该分注装置吸取的第二步骤,使该第一反应液叠加于该检样溶液的下层,然后,将该分注装置吸取的该检样溶液和该第一反应液喷出到该第二反应液中,进行正式反应,然后光学测定胶乳的聚集,从而测定抗原的量。正式反应中,固定抗体和游离抗体与抗原发生竞争反应。

[0080] 本发明的第三方案可举出抗原的夹层 ELISA 法,该方法是使用具有分注装置的测定装置,使用含目标物质(抗原)的全血检样溶液;含有用碱性磷酸酶标记的抗体的第一反应液;和含固定于磁性颗粒上、与抗原特异性反应的抗体的第二反应液。具体来说,可进行

将该检样溶液用分注装置吸取的第一工序,接着进行将该第一反应液用该分注装置吸取的第二工序,使该第一反应液叠层于该检样溶液的下层,然后,将该分注装置吸取的该检样溶液和该第一反应液喷出到该第二反应液中,进行正式反应,然后添加含有底物溶液的第三反应液,测定发光量,从而测定抗原的量。

[0081] 本发明的第四方案可举出抗原的夹层 ELISA 法,该方法是使用具有分注装置的测定装置,使用含目标物质(抗原)的全血检样溶液;含有用碱性磷酸酶标记的抗体、和抑制正式反应中的免疫复合物的生成、与抗原特异性反应的游离的抗体的第一反应液;和含固定于磁性颗粒上、与抗原特异性反应的抗体的第二反应液。具体来说,可进行将该检样溶液用分注装置吸取的第一工序,接着进行将该第一反应液用该分注装置吸取的第二工序,使该第一反应液叠层于该检样溶液的下层,然后,将该分注装置吸取的该检样溶液和该第一反应液喷出到该第二反应液中,进行正式反应,然后添加含有底物溶液的第三反应液,测定发光量,从而测定抗原的量。正式反应中,固定抗体或标记抗体和游离抗体与抗原发生竞争反应。

实施例

[0082] 以下,通过实施例进一步具体说明本发明,但下述实施例只不过是例举本发明,本发明的范围并不受下述实施例的任何限定。只要不偏离本发明的精神,可以进行任何变更、改良或改变,这是本领域技术人员所了解的。

[0083] 实施例 1

C 反应蛋白(CRP)测定试剂的制备

(1) 检样的制备

准备全血检样和血浆检样作为检样。血浆检样是将全血检样在 3000rpm、8℃ 下离心分离 15 分钟,由得到的同一检样制备。

[0084] (2) 磁性颗粒溶液的制备

抗 CRP 单克隆抗体:将 CRP-1(ImmunoProbe 公司制造)在磁性颗粒(2.4 μm)上、在 500mmol/L MES 缓冲液(pH6.0)中致敏,然后用含有 0.02% 表面活性剂的 Tris 缓冲液(0.01mol/L pH8.0)固定,制备结合了抗 CRP 抗体的磁性颗粒。所制备的磁性颗粒悬浮于含有 0.3mg/mL 抗 CRP 单克隆抗体(CRP-1)的 50mmol/L MOPS 缓冲液(pH6.5)中使用,其中。

[0085] (3) 标记抗体溶液的制备

抗 CRP 单克隆抗体:通过马来酰亚胺法使 CRP-4(ImmunoProbe 公司制造)与来自牛的碱性磷酸酶(ALP)结合,制备 ALP 标记的抗 CRP 抗体。制备的标记抗体溶解于含有 15% 蔗糖和 0.3mg/mL 抗 CRP 单克隆抗体(CRP-1)的 20mmol/L MES 缓冲液(pH6.0)中使用。同样地制备不含有蔗糖的溶液作为比较用标记抗体溶液。

[0086] (4) 洗涤液的制备

制备含有 0.05% TritonX-100 和 0.9% NaCl 的 10mmol/L MES 缓冲液(pH6.5)。

[0087] (5) 稀释液的制备

制备含有 1% 牛血清白蛋白(BSA)和 0.3mol/L NaCl 的 0.1mol/L MOPS 缓冲液(pH7.5)。

[0088] (6) 发光底物

发光底物使用 0.4mmol/L CDP-Star 溶液(Applied Biosystems 公司)。

[0089] 上述制备的试剂类封于图 2 所示的由聚丙烯 (PP) 制造的盒中,使用自动化学发光酶免疫测定装置 PATHFAST(三菱化学 Medience 公司制造)进行测定。向该盒的样品槽 (1)、标记抗体容纳槽 (2)、洗涤槽 1(3)、洗涤槽 2(4)、洗涤槽 3(5)、磁性颗粒容纳槽 (7)、稀释液槽 (11)、底物槽 (13) 中填充上述制备例 (1)~(6) 中制备的各试剂和溶液,然后将该试剂容纳槽上部用铝箔密封。填充位置和填充量如下。如无特别记载的槽则为空槽。

[0090] 样品槽 (1)	100 μ L
标记抗体容纳槽 (2)	85 μ L
洗涤槽 1(3)	400 μ L
洗涤槽 2(4)	400 μ L
洗涤槽 3(5)	400 μ L
磁性颗粒容纳槽 (7)	50 μ L
稀释液槽 (11)	100 μ L
底物槽 (13)	140 μ L

实施例 2

自动测定装置的测定顺序

在后述的比较例 1 和实施例 3 中,是使用具备 6 个连续的吸取、喷出机构和 6 个连续的磁性颗粒分离机构的自动测定装置 (PATHFAST),按照本实施例所述的以下步骤,使用实施例 1 中制备的试剂盒,测定检样中的 CRP。

[0091] (1) 将检样以 100 μ L 分注到实施例 1 中制备的盒的样品槽 (1) 中;

(2) 将分注了检样的试剂盒安装于自动测定装置中;

(3) 启动自动测定装置;

(4) 自动测定装置读取粘附于试剂盒上的条形码,识别 CRP 为测定对象;

(5) 将试剂盒上部的密封铝箔用尖锐物穿孔;

(6) 从样品槽 (1) 中吸取 50 μ L 样品,接着由稀释槽 (11) 中吸取 50 μ L 稀释液,全量喷出到空槽 (14) 中。再在空槽 (14) 中反复进行吸取、喷出操作,由此进行第一阶段稀释步骤;

(7) 接着,从槽 (14) 中吸取 50 μ L 样品与稀释液的混合液,从标记抗体容纳槽 (2) 中吸取 50 μ L 标记物,然后在磁性颗粒容纳槽 (7) 中喷出,与磁性颗粒混合,在 37 $^{\circ}$ C 下反应 5 分钟;

(8) 在磁性颗粒容纳槽 (7) 中,通过磁铁分离磁性颗粒;

(9) 将磁性颗粒在洗涤槽 (3) 中洗涤,然后用永久磁铁分离磁性颗粒;

(10) 上述 (9) 的操作也在洗涤槽 (4)、(5) 中进行;

(11) 接着,在底物槽 (13) 中喷出,与 CDP-Star 溶液混合,在 37 $^{\circ}$ C 下进行 1 分钟酶促反应,然后用光电子倍增管 (PMT),由测光槽上部测定发光量。

[0092] 比较例 1

由同一检样形成的全血检样和血浆检样的测定 -1

使用实施例 1 中制备的不含有蔗糖的试剂,按照实施例 2 的方法测定全血检样和血浆检样。血浆检样是将全血检样在 3000rpm、8 $^{\circ}$ C 下离心分离 15 分钟,由所得的同一检样制备。

[0093] 其结果如图 3 和图 4 所示。由图 3 可知,未向测定系统中添加蔗糖时,关于血浆检

样测定值与全血检样测定值的相关性,其斜率为 0.8117,可见约 20% 的偏离。图 4 表示血浆检样测定值与全血检样测定值之比(血浆检样测定值 ÷ 全血检样测定值)的结果。由图 4 可知,原本求出的比应该在 100% 附近,但随着浓度的升高,可见其比增大。

[0094] 这里,在探讨其原因时,对于全血检样,如图 1 之 (a) 所示,可知标记抗体溶液在全血检样间升高,反应开始。在进一步确认比重时,血浆检样和标记抗体溶液的比重几乎没有变化,但全血检样的比重为 $1.053\text{g}/\text{cm}^3$,标记抗体溶液的比重为 $1.014\text{g}/\text{cm}^3$ 。标记抗体溶液比全血检样的比重低约 3.7%,可知有对反应产生较大影响的差异。

[0095] 实施例 3

由同一检样形成的全血检样和血浆检样的测定 -2

由比较例 1 的结果可知:比重不同是原因,因此用蔗糖使标记抗体溶液的比重增加,研究在不会与全血检样混合的条件下是否可以改善。除使用实施例 1 中制备的含蔗糖试剂之外,与比较例 1 同样地进行测定。

[0096] 其结果如图 5 和图 6 所示。由图 5 可知,向测定系统中添加蔗糖时,关于血浆检样测定值与全血检样测定值的相关性,其斜率为 0.9528,与不添加蔗糖的情形相比得到大幅改善。图 6 表示血浆检样测定值与全血检样测定值之比(血浆检样测定值 ÷ 全血检样测定值)的结果。由图 6 可知,可确认所求出的比在 100% 附近变化。

[0097] 由以上可知,通过在测定系统中添加蔗糖来调节比重,全血检样和血浆检样的测定值不发生偏离,可以准确且精度良好地测定。

[0098] 因此,在标记抗体溶液中添加蔗糖、调节比重时,探讨了与全血检样溶液的比重差异有多大的程度为好。

[0099] 其结果,全血检样溶液的比重约为 $1.053\text{g}/\text{cm}^3$ 时,如果在检样溶液中添加终浓度为 5% 的蔗糖,则添加后的检样溶液相对于全血检样溶液的比重变化约低 2.18%,如果添加终浓度为 10% 的蔗糖,则约高 0.96%,如果添加终浓度为 15% 的蔗糖,则约高 1.5 ~ 2.56%,如果添加终浓度为 20% 的蔗糖,则约高 7.5%。于是,进一步探讨可知,如果添加终浓度为 10% 以上的蔗糖,则与上述同样,不会与全血检样混合,可得到血浆检样测定值与全血检样测定值的相关性。

[0100] 产业实用性

根据本发明,可以同时开始正式反应中的反应,因此可以准确且高精度地测定检样中的目标物质。并且与检样的种类无关,均可进行精度高的测定,因此可进行简便且没有误使用的测定,可以说是利用性高的测定方法。

[0101] 以上是根据特定的方案说明本发明,但本领域技术人员应了解的变形或改良包含在本发明的范围内。

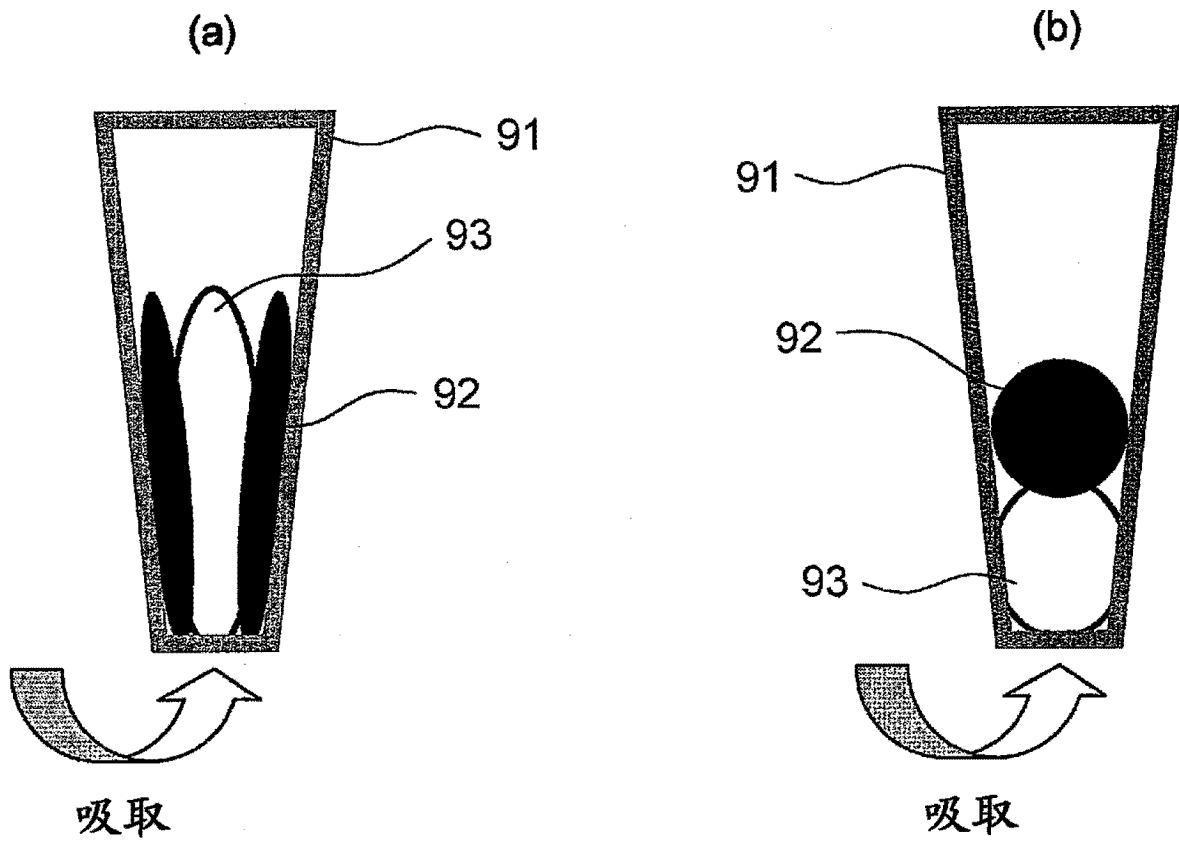


图 1

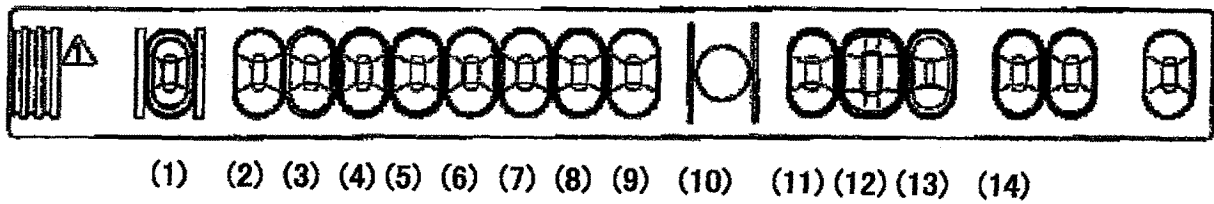


图 2

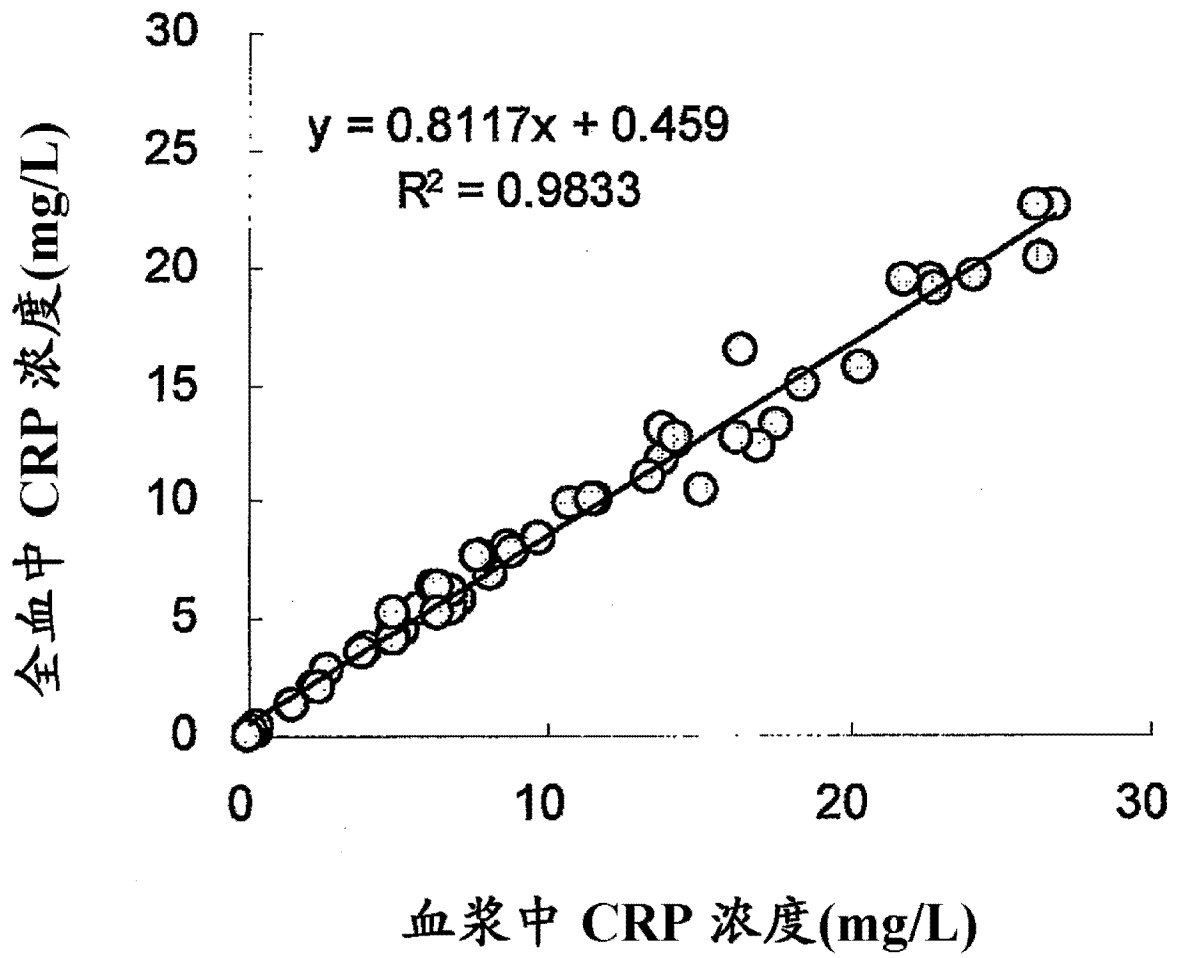


图 3

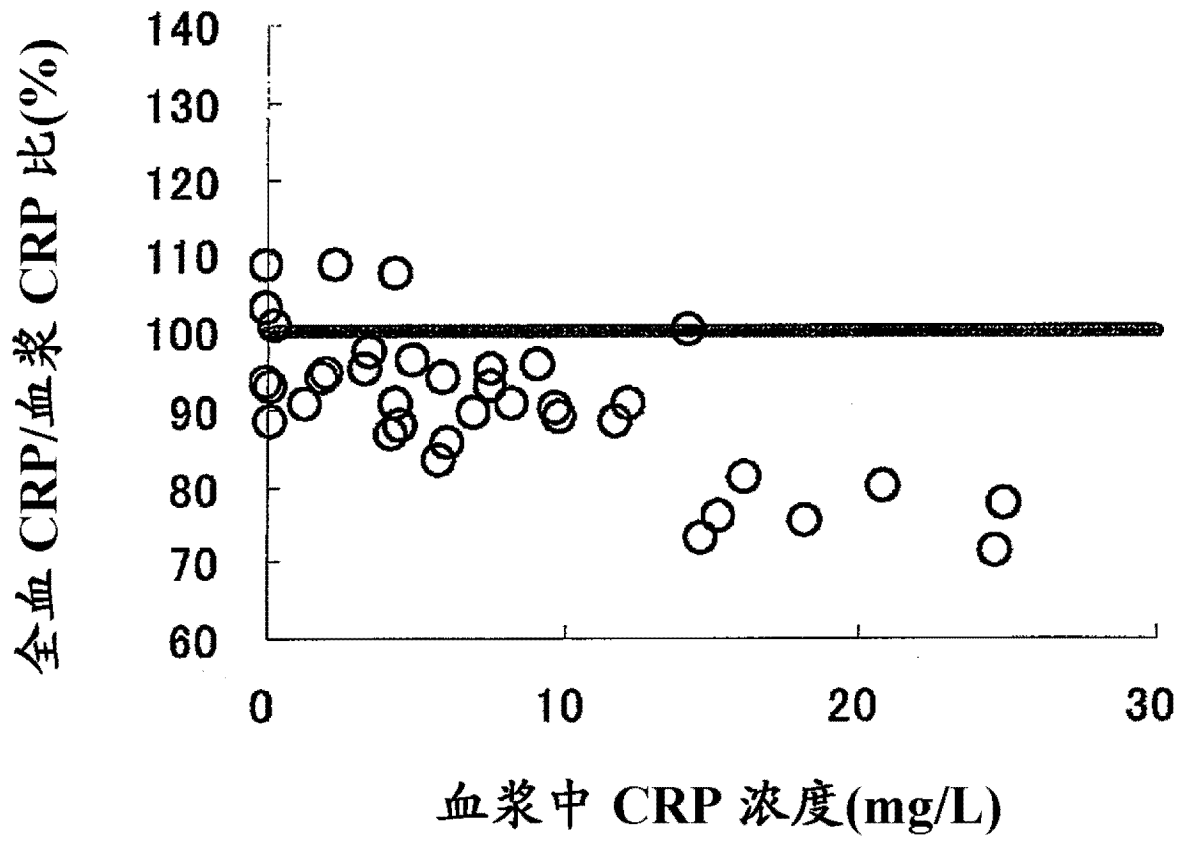


图 4

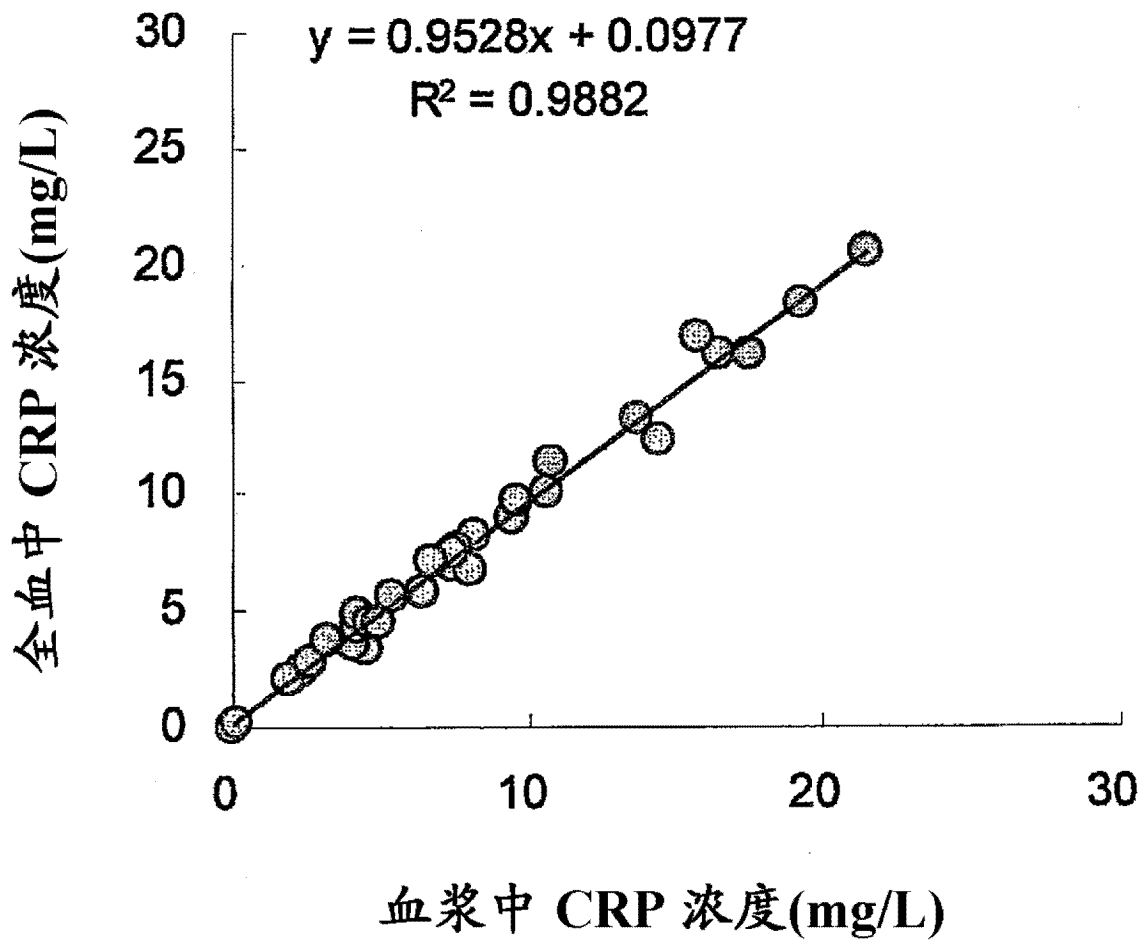


图 5

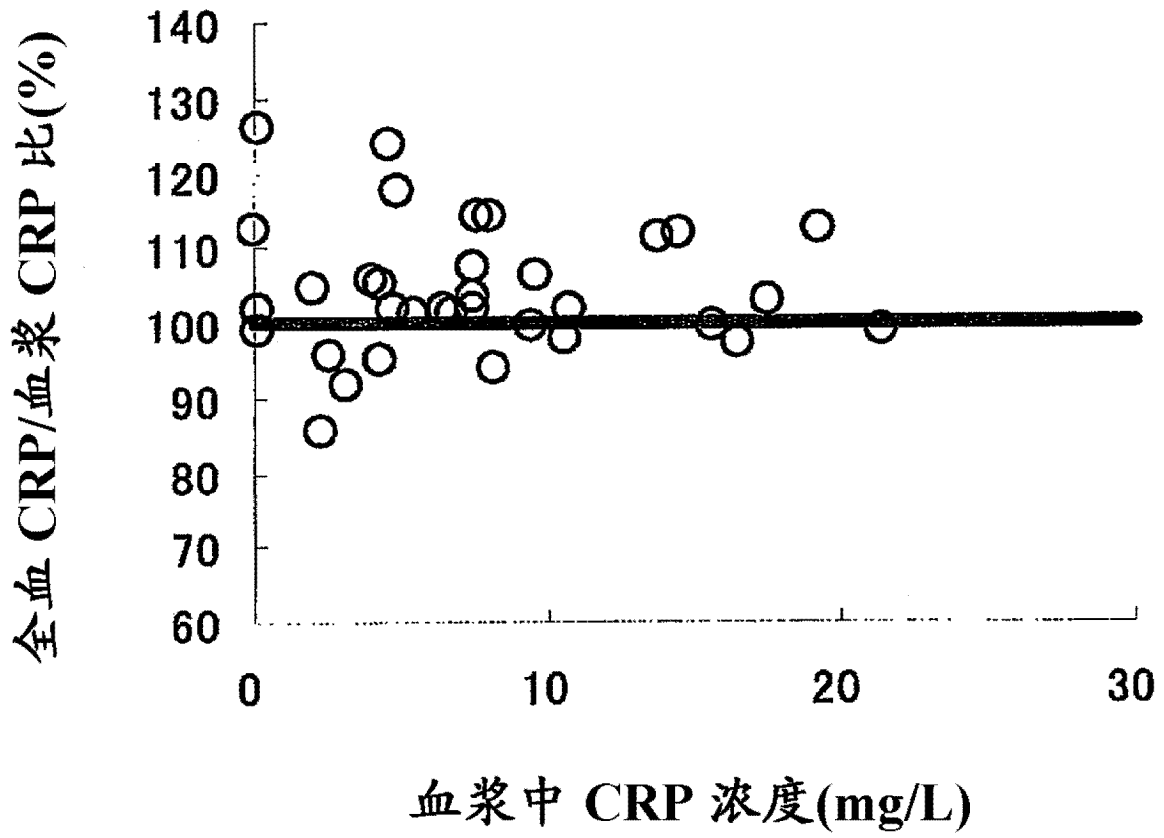


图 6

专利名称(译)	全血检样的免疫测定方法和测定试剂盒		
公开(公告)号	CN103562720A	公开(公告)日	2014-02-05
申请号	CN201280015693.0	申请日	2012-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
[标]发明人	庄司庆一 横井宏行		
发明人	庄司庆一 横井宏行		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N2333/4737 G01N33/5306 G01N33/54333		
代理人(译)	孔青		
优先权	2011070872 2011-03-28 JP		
其他公开文献	CN103562720B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供：在公知的目标物质的测定方法中，可以抑制对测定结果产生负面影响的反应的改良方法。该改良方法包括：准备含有目标物质的检样溶液、第一反应液、和第二反应液；使用具有分注装置的测定装置，将检样溶液和第一反应液依次吸取到分注装置中；然后通过由分注装置中一并喷出，与第二反应液接触，使在第一反应液或第二反应液的至少一方中含有的、与目标物质特异性反应的第一伙伴与目标物质形成复合物；对形成的复合物进行分析。上述改良方法中，检样溶液的比重与第一反应液的比重不同，在检样溶液与第一反应液叠层的状态下被吸取到分注装置中。

