

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01812896.3

[45] 授权公告日 2006年7月12日

[11] 授权公告号 CN 1264016C

[22] 申请日 2001.6.15 [21] 申请号 01812896.3

[30] 优先权

[32] 2000.6.30 [33] JP [31] 198831/00

[86] 国际申请 PCT/JP2001/005115 2001.6.15

[87] 国际公布 WO2002/003068 日 2002.1.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.16

[71] 专利权人 协和梅迪克斯株式会社

地址 日本东京

共同专利权人 爱赐爱儿股份有限公司

[72] 发明人 重信香代子 小栗一人

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 2 页 说明书 14 页

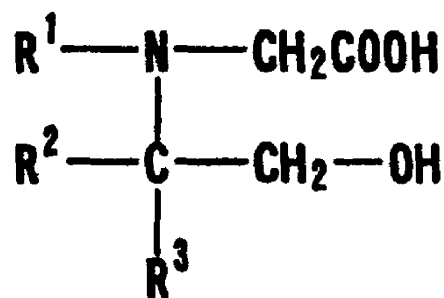
[54] 发明名称

不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药

[57] 摘要

提供抑制与胶乳等不溶性载体粒子凝集反应相关的对测定值有影响的血浆成分的作用，使凝集反应稳定化，使反应液的吸光度稳定，能够得到精确的测定结果的不溶性载体粒子的比浊免疫测定用试药、不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒、用该试剂或试剂盒进行的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法。在蚕豆嘧啶葡糖苷、麦黄酮等分子内含有以下所示基团的化合物的缓冲液存在或不存在的条件下，使不溶性载体粒子负载有抗体或抗原，然后，在上述缓冲液存在的条件下，对抗体或抗原敏感的不溶性载体粒子混悬液和检测体接触，发生免疫凝集反应，通过不溶性载体粒子凝集反应，测定产生的浓度，对检测体中的抗原或抗体进行定量。

[化学式] 见右式，(式中 R^1 ， R^2 ， R^3 相同或不同均可，表示氢原子、羟烷基等)。



1. 不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药，其特征在于含有不溶性载体粒子、以及 N-二（羟乙基）甘氨酸或者麦黄酮缓冲剂中的一种。

2. 权利要求 1 所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药，其特征在于缓冲剂的使用浓度为 5~200mmol/L。

3. 权利要求 1 或 2 所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药，其特征在于不溶性载体粒子的使用浓度为 0.005~5 重量%。

4. 权利要求 1 或 2 所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药，其特征在于不溶性载体粒子是胶乳。

5. 不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于使用不溶性载体粒子、以及 N-二（羟乙基）甘氨酸或者麦黄酮缓冲剂中的一种。

6. 权利要求 5 所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于在缓冲剂存在下，抗体或抗原保持在不溶性载体粒子中，然后进行免疫凝集反应。

7. 权利要求 5 所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于抗体或抗原保持在不溶性载体粒子中后，在缓冲剂存在下，进行免疫凝集反应。

8. 权利要求 5~7 的任一项所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于反应溶液中缓冲剂浓度为 5~200mmol/L。

9. 权利要求 5~7 的任一项所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于反应溶液中不溶性载体粒子浓度为 0.005~5 重量%。

10. 权利要求 5~7 的任一项所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。

11. 不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，其特征在于包括含不溶性载体粒子的混悬液、以及含 N-二（羟乙基）甘氨酸或者麦黄酮缓冲剂的缓冲液。

12. 权利要求 11 所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，其特征在于含缓冲剂的缓冲液中缓冲剂浓度为 5~200mmol/L。

13. 权利要求 11 或 12 所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，其特征在于含不溶性载体粒子的混悬液中不溶性载体粒子的浓度为 0.005~5 重量%。

14. 权利要求 11 或 12 所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。

不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药

技术领域

本发明提供含胶乳(latex)等不溶性载体粒子的比浊免疫测定用试药、用不溶性载体粒子的比浊免疫测定方法和含不溶性载体粒子的比浊免疫测定用试剂盒。更具体来说,提供使吸光度稳定,并且能抑制与反应相关的对测定值有影响的血浆成分的作用的含不溶性载体粒子的比浊免疫测定用试药、用不溶性载体粒子进行的比浊免疫测定方法和含不溶性载体粒子的比浊免疫测定用试剂盒。

技术背景

在临床检查领域,胶乳广泛使用于测定检测体中抗原或抗体的免疫测定法中。例如,特开平 10-253629 号公报中记载了在 pH4.2 的磷酸柠檬酸缓冲液等 pH4.0~6.0 的缓冲液中,将抗原或抗体负载在聚苯乙烯类胶乳粒子中后,置换到 pH8.0 的三(トリス)缓冲液等 pH6.5~9.0 缓冲液中,从而保持高敏感度,抑制前界(prozone)的发生,减少不均,稳定性优良的免疫测定试剂制造方法。

另外,特开平 9-318632 号公报中,记载了将检测体和负载有抗原或抗体的胶乳混悬液混合,向该混合液中添加二元醇,抗原抗体反应使胶乳粒子凝集,测定由此引起的吸光度变化量,即使检测体中含有高浓度的需测定的抗原或抗体时,也无需稀释检测体,直接用原液就可测定的胶乳比浊免疫测定方法。

另外,特开平 7-301632 号公报中,记载了负载有表面有羧基的胶乳粒子和与该粒子共价键合的键合免疫反应体的微粒子,胶乳粒子有直径 0.1~0.6 μm 和有 8~35 平方埃表面羧化的负载微粒子以及含有该微粒子和缓冲液的免疫测定试药。

如上所述，胶乳经常被用于利用胶乳比浊免疫测定法等免疫凝集反应的测定体系中，胶乳混悬液是指通过向其中混入微量的重金属离子等使与反应液中共存的血浆成分反应，使其对抗原或抗体的胶乳载体的吸附性发生变化，或者使抗原或抗体从与结合了抗原或抗体的胶乳上解离，生成游离的抗原或抗体，反应时，因使胶乳凝集程度发生变化，出现灵敏度不稳定的问题。另外，对于没有结合抗原或抗体的胶乳，有表面电荷的羧基或磺酸基会因结合重金属离子，而出现表面电荷变化，灵敏度不稳定的问题。

本发明提供了与胶乳等不溶性载体粒子凝集反应相关，通过抑制对测定值有影响的血浆成分的作用，使凝集反应稳定化，反应液的吸光度稳定化，能得到更精确的测定结果的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药、不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒和用该试药或试剂盒的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法。

本发明者为解决上述课题进行了深入研究，胶乳凝集反应不稳定的血浆成分，即对于血浆中存在的微量多价金属离子，用分子式中含有特定基团的化合物的缓冲液，使胶乳表面的荷电状态稳定化，防止与胶乳结合的抗原或抗体游离，使胶乳凝集反应稳定化，能够得到精确的测定结果，从而可以完成本发明。

发明内容

本发明中，不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药的特征在于含有不溶性载体粒子、以及 N-二(羟乙基)甘氨酸或者麦黄酮缓冲剂中的一种。另外，所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药，其特征不在于缓冲剂的使用浓度为 5~200mmol/L。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药，其特征不在于不溶性载体粒子的使用浓度为 0.005~5 重量%。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药，其特征不在于不溶性载体粒子是胶乳。

本发明还涉及不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于使用不溶性载体粒子、以及 N-二(羟乙基)甘氨酸或者麦黄酮缓冲剂中

的一种。另外，所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于在缓冲剂存在下，抗体或抗原保持在不溶性载体粒子中，然后进行免疫凝集反应。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于抗体或抗原保持在不溶性载体粒子中后，在缓冲剂存在下，进行免疫凝集反应。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于反应液中缓冲剂浓度为 5~200mmol/L。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于反应溶液中不溶性载体粒子浓度为 0.005~5 重量%。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。

而且本发明涉及不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，其特征在于包括含不溶性载体粒子的混悬液、以及含 N-二(羟乙基)甘氨酸或者麦黄酮缓冲剂的缓冲液。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，其特征在于含缓冲剂的缓冲液中缓冲剂浓度为 5~200mmol/L。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，其特征在于含不溶性载体粒子的混悬液中不溶性载体粒子的浓度为 0.005~5 重量%。所述的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。

最佳实施方式

本发明中不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药若是含有不溶性载体粒子、分子内含有[化学式 4]所示基团的化合物或其盐形成的缓冲剂的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药，则没有特别限制。另外，本发明中不溶性载体粒子比浊免疫测定方法若是用含有不溶性载体粒子、分子内含有[化学式 4]所示基团的化合物或其盐形成的缓冲剂的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法，则没有特别限制。这里不溶性载体粒子比浊免疫测定方法是指用不溶性载体粒子进行免疫凝集反应，测定反应后的浓度，对检测体中的抗原或抗体进行定量的方法。而且，本发明中不溶性载体粒子比浊免疫测定试剂盒若是含有不溶性载体粒子的混悬液，分子内含有[化学式 4]所示基团的化合物或其盐形成的

缓冲剂的缓冲液的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒，则没有特别限制。

[化学式 4]



上述作为缓冲剂的化合物是指，能用下述通式[I]表示的化合物，通式[I]中的 R^1, R^2 相同或不同均可，可以列举出氢原子、烷基、羟烷基、二（羟烷基）烷基、三（羟烷基）烷基、羧烷基、二（羧烷基）烷基、三（羧烷基）烷基、取代或无取代氮烷基、取代或无取代氮羰基烷基、取代或无取代烷氧基烷基、硫代烷基、二（硫代烷基）烷基、三（硫代烷基）烷基、硫代-羟基-烷基、二（硫代-羟基-烷基）烷基、三（硫代-羟基-烷基）烷基等。

上述烷基、羟烷基、二（羟烷基）烷基、三（羟烷基）烷基、羧烷基、二（羧烷基）烷基、三（羧烷基）烷基、取代或无取代氮烷基、取代或无取代氮羰基烷基、取代或无取代烷氧基烷基、硫代烷基、二（硫代烷基）烷基、三（硫代烷基）烷基、硫代-羟基-烷基、二（硫代-羟基-烷基）烷基和三（硫代-羟基-烷基）烷基中的烷基可以列举出直链或支链的碳原子数在 1~6 的烷基，该直链或支链的碳数为 1~6 的烷基具体可列举出甲基、乙基、丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基等。

上述的取代氮烷基及取代氮羰基烷基中的取代基团可以列举出烷基、羟烷基、羧烷基、硫代烷基、硫代-羟基-烷基、含氮原子的杂环基。该烷基、羟烷基、羧烷基、硫代烷基、硫代-羟基-烷基中的烷基可以列举出前述的直链或支链的碳原子数目在 1~6 的烷基。上述的含氮原子的杂环基可列举出哌嗪基、吗啉基、哌啶基等。

上述的取代烷氧基烷基中的取代基团可列举出羟基、羧基、磺酸基等。

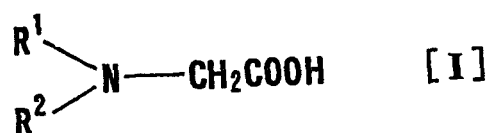
另外，通式[I]中的 R^1, R^2 和氮原子形成环状结构，可列举出取代或无取代的哌嗪基、取代或无取代的吗啉基或者取代或无取代的哌啶

基, 该取代的哌嗪基、取代的吗啉基及取代的哌啶基中的取代基团, 可列举出烷基、羟烷基、二(羟烷基)烷基、三(羟烷基)烷基、羧烷基、二(羧烷基)烷基、三(羧烷基)烷基、取代或无取代氨基烷基、取代或无取代氨基羧基烷基、取代或无取代烷氧基烷基、硫代烷基、二(硫代烷基)烷基、三(硫代烷基)烷基、硫代-羟基-烷基、二(硫代-羟基-烷基)烷基、三(硫代-羟基-烷基)烷基等。

上述的烷基、羟烷基、二(羟烷基)烷基、三(羟烷基)烷基、羧烷基、二(羧烷基)烷基、三(羧烷基)烷基、取代或无取代氨基烷基、取代或无取代氨基羧基烷基、取代或无取代烷氧基烷基、硫代烷基、二(硫代烷基)烷基、三(硫代烷基)烷基、硫代-羟基-烷基、二(硫代-羟基-烷基)烷基和三(硫代-羟基-烷基)烷基中的烷基, 可以列举出前述的直链或支链的碳数在1~6的烷基。

上述的取代氨基烷基及取代氨基羧基烷基中的取代基可以列举出, 前述取代氨基烷基及取代氨基羧基烷基中的取代基。另外, 上述取代烷氧基烷基中的取代基团可以列举出前述取代烷氧基烷基中的取代基。

[化学式 5]



上述的羟烷基可列举出羟甲基、2-羟乙基、2-羟丙基、2-羟丁基、2-羟戊基、2-羟己基等, 二(羟烷基)烷基可列举出二(羟甲基)甲基、二(2-羟乙基)甲基等, 三(羟烷基)烷基可列举出三(羟甲基)甲基、三(2-羟乙基)甲基等, 羧烷基可列举出羧甲基、2-羧乙基等, 二(羧烷基)烷基可列举出二(羧甲基)甲基、二(2-羧乙基)甲基等, 三(羧烷基)烷基可列举出三(羧甲基)甲基、三(2-羧乙基)甲基等。

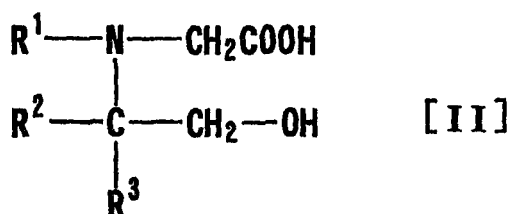
另外, 前述的取代或无取代的氨基烷基可列举出氨基甲基、2-氨基乙基、N-甲氨基甲基、2-(N-甲氨基)乙基等, 取代或无取代氨基羧基烷基可列举

出氨基甲基、2-氨基乙基、N-甲氨基甲基、2-(N-甲氨基)乙基等,取代或无取代烷氧基烷基可列举出甲氧甲基、乙氧甲基、2-甲氧乙基、(羧甲氧基)甲基、(2-羟乙氧基)甲基等,硫代烷基可列举出硫代甲基、2-硫代乙基等,二(硫代烷基)烷基可列举出二(硫代甲基)甲基、二(2-硫代乙基)甲基等,三(硫代烷基)烷基可列举出三(硫代甲基)甲基、三(2-硫代乙基)甲基等,硫代-羟基-烷基可列举出2-羟基-3-硫代丙基、3-羟基-4-硫代丙基等,二(硫代-羟基-烷基)可列举出,二(2-羟基-3-硫代丙基)甲基、二(3-羟基-4-硫代丙基)甲基等,三(硫代-羟基-烷基)可列举出三(2-羟基-3-硫代丙基)甲基、三(3-羟基-4-硫代丙基)甲基等。

另外,通式[I]所示化合物优选为下述通式[II]所表示的化合物,通式[II]中 R^1 、 R^2 、 R^3 相同或不同均可,可列举出氢原子、烷基、羟烷基、二(羟烷基)烷基、三(羟烷基)烷基、羧烷基、二(羧烷基)烷基、三(羧烷基)烷基、取代或无取代氨基烷基、取代或无取代氨基羧基烷基、取代或无取代烷氧基烷基、硫代烷基、二(硫代烷基)烷基、三(硫代烷基)烷基、硫代-羟基-烷基、二(硫代-羟基-烷基)烷基、三(硫代-羟基-烷基)烷基等。作上述的烷基、羟烷基、二(羟烷基)烷基、三(羟烷基)烷基、羧烷基、二(羧烷基)烷基、三(羧烷基)烷基、取代或无取代氨基烷基、取代或无取代氨基羧基烷基、取代或无取代烷氧基烷基、硫代烷基、二(硫代烷基)烷基、三(硫代烷基)烷基、硫代-羟基-烷基、二(硫代-羟基-烷基)烷基和三(硫代-羟基-烷基)烷基分别可列举前述的各基团,其各目的具体例也如前所述。

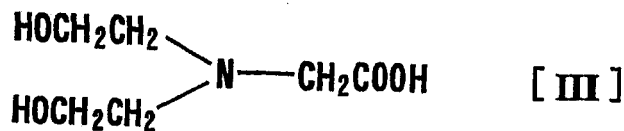
上述的取代氨基烷基、取代氨基羧基烷基和取代烷氧基烷基中的取代基分别可列举前述的各基团,其具体例也如前所述。

[化学式 6]

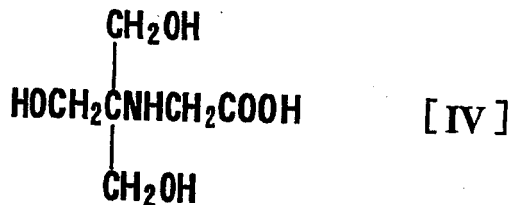


本发明中使用的缓冲剂，具体可列举出已知的优良缓冲剂 N-二(羟乙基)甘氨酸 [N, N-二(2-羟乙基)甘氨酸]、麦黄酮 {N[三(羟甲基)甲基]甘氨酸} 外还有 ADA [N-(2-乙酰胺)亚氨基二乙酸] 等，因为其中下述式 [III] 所表示的 N-二(羟乙基)甘氨酸或式 [IV] 表示的麦黄酮通过不溶性载体粒子凝集反应而稳定，所以是优选。

[化学式 7]



[化学式 8]



上述通式 [I]，特别是通式 [III] 表示的化合物形成的缓冲剂，因为使用浓度为 5~200mmol/L，通过胶乳等不溶性载体粒子凝集反应而稳定，所以是优选。不溶性载体粒子凝集反应时的 pH 对反应的稳定化非常重要，缓冲成分的浓度在 5mmol/L 以上时，保持一定的 pH 比较容易，在 200mmol/L 以下时，不溶性载体粒子的粒子之间不进行抗原抗体反应所致非特异凝集反应。调节含有缓冲成分的缓冲液 pH 值的酸通常除盐酸、硫酸、硝酸外，还可以使用醋酸等有机酸，碱通常可以使用氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化钾、氢氧化铵等。本发明中的缓冲剂除上述缓冲成分外，根据需要也可以含有其他成分。其他成分可以列举出对检测体中脂质有溶化效果的表面活性剂，特别是含有聚氧乙二醇基团的非离子类表面活性剂或其他阴离子类、阳离子类表面活性剂。

本发明中不溶性载体粒子在与上述本发明的缓冲剂合用时，若抑制对测定值有影响的血浆成分的作用，使凝集反应稳定化，任何物质均可。例如可列举出特公昭 58-11575 号公报中所述的公知的有机高

分子物质微粒子、无机氧化物微粒子或者用有机物等处理作为核的这些物质表面的微粒子，具体可列举出如聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、(甲基)丙烯酸树脂、聚甲基甲基丙烯酸酯等合成树脂(胶乳)、硝基纤维素、纤维素、甲基纤维素等纤维素衍生物、金属、陶瓷、玻璃、硅橡胶等无机物。其中，特别是聚苯乙烯类合成高分子优选含有作为供电子成分的丙烯酸类单体或磺酸的单体等共聚和形成的聚苯乙烯类合成高分子。

如上所述，本发明中上述的不溶性载体优选使用聚苯乙烯胶乳等胶乳粒子。使用聚苯乙烯胶乳等表面疏水性强的胶乳时，能使蛋白质或肽的吸附顺利进行。另外，不使用作为乳化剂的表面活性剂，通过皂化自由重合得到的聚苯乙烯胶乳粒子，由于表面的负电荷之间相斥，即使不用表面活性剂，也能够稳定的存在，所以优选使用。根据需要也可以使用其他各种改性的胶乳(例如：羧酸改性胶乳)、磁性胶乳(含磁性粒子的胶乳)等。

进行免疫测定的定量时，通常对不溶性载体粒子大小的均一性，对表面状态的控制、对内部结构等的选择等有极高的要求，这样的适于作为试药的胶乳等不溶性载体粒子可以在市售品种中选择得到。对不溶性载体粒子的形状没有特别的限制，例如可以为球状，球状的粒径为平均粒径在 $0.03 \sim 0.8 \mu\text{m}$ ，特别优选平均粒径在 $0.06 \sim 0.2 \mu\text{m}$ 。另外，对发明中不溶性载体粒子在反应液中的浓度也没有特别限制，例如为 $0.001 \sim 10$ 重量%，优选为 $0.005 \sim 5$ 重量%，更优选为 $0.01 \sim 2$ 重量%的浓度，这样通过不溶性载体粒子凝集反应使稳定化成为可能。

本发明中不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药可以例示使用调整至 $5 \sim 200 \text{mmol/L}$ 含 N-二(羟乙基)甘氨酸、麦黄酮等的缓冲剂，使用浓度调整至 $0.005 \sim 5$ 重量%的胶乳等不溶性载体粒子，不溶性载体粒子负载的抗原或抗体和含有其他成分的试药。另外，试药也可以使用预先负载有抗原或抗体的不溶性载体粒子。

本发明中不溶性载体粒子比浊免疫测定方法可以例举出在 N-二

(羟乙基)甘氨酸、麦黄酮等缓冲剂存在条件下,抗原或抗体通过化学键或物理吸附等作用负载在不溶性载体粒子上,然后进行免疫凝集反应的方法,负载有抗原或抗体的不溶性载体粒子在缓冲剂存在条件下进行免疫凝集反应的方法,这时,缓冲剂可以使用缓冲液,不溶性载体粒子可以使用不溶性载体粒子混悬液。也可使用不溶性载体粒子混悬在缓冲液中的状态。免疫凝集反应时、不溶性载体粒子负载抗原或抗体时,优选缓冲剂浓度在 5~200mmol/L,不溶性载体粒子浓度在 0.005~5 重量%。

本发明的不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒,可以例举出 N-二(羟乙基)甘氨酸、麦黄酮等缓冲剂浓度为 5~200mmol/L 的缓冲液,胶乳等不溶性载体粒子浓度为 0.005~5 重量%的混悬液,不溶性载体粒子负载的抗原或抗体以及含其他任意成分的试药组成的试剂盒。另外,测定用试剂盒中,可以使用预先负载有抗原或抗体的不溶性载体粒子。

以下,列举实施例对本发明进行更详细的说明,本发明的范围不限于此。实施例中的%除特别说明外均表示重量%。

实施例 1

[试药 1 (缓冲液) 的调制]

作为缓冲剂的 N-二(羟乙基)甘氨酸(同仁化学社制) 3.26g 溶解在蒸馏水中,分别添加 0.1g 的表面活性剂(トリトン) X-100、17.5g 的氯化钠、0.01g 的迭氮化钠,20℃条件下测定 pH 的同时添加 1mol/L 的盐酸或氢氧化钠水溶液,调整至 pH8.0,加蒸馏水至全量为 1,000ml。也可用麦黄酮 3.58g(同仁化学社制)、TAPSO{2-羟基-3-[N-三(羟甲基)甲氨基]丙磺酸}(同仁化学社制造)5.18g、POPSO[哌嗪-1,4-二(2-羟基-3-丙磺酸)2 水合物](同仁化学社制)7.97g、TES{2-[N-三(羟甲基)甲氨基]丙磺酸}(同仁化学社制)4.59g 代替 N-二(羟乙基)甘氨酸作为缓冲剂分别溶解在蒸馏水中,同样添加表面活性剂(トリトン) X-100、氯化钠、迭氮化钠,调整至 pH8.0 后,加蒸馏水至全量为 1,000ml。这样,调制成本发明中的含 N-二(羟乙基)甘氨酸或麦黄酮

的 20mmol/L 缓冲液, 比较例为分别含 TAPSO、POPSP0、TES 为 20mmol/L 的缓冲液, 共调制成 5 种缓冲液。

[试药 2 (负载抗体的胶乳混悬液) 的调制]

平均粒径 0.31 μ m 的 10% 聚苯乙烯胶乳混悬液 (协和メデックス社制) 1 容中, 添加 1/60mol/L 的 PBS 溶液 (用 1mol/L 盐酸或氢氧化钠水溶液调整至 pH7.4) 9 容、稀释胶乳, 制成 1% 胶乳混悬液。抗人铁蛋白抗体 (协和メデックス社制造) 为用 1/60mol/L 的 PBS 溶液稀释成蛋白浓度 50 μ g/ml 的负载用抗体液。1% 胶乳混悬液 600 μ l 在 25 $^{\circ}$ C 的温育箱中, 用磁力搅拌机搅拌的同时迅速添加上述抗体液 1200 μ l, 25 $^{\circ}$ C 搅拌 2 小时。然后, 10mmol/L 的甘氨酸缓冲液中添加调制至 BSA (和光纯药社制) 0.6%、表面活性剂 (トリトン) X-100 (sigma 社制造) 0.015% 的封端液 3ml, 25 $^{\circ}$ C 持续搅拌 2 小时。然后, 4 $^{\circ}$ C、15000rpm 条件下离心 1 小时。所得沉淀中添加封端液 4ml, 同样离心, 清洗沉淀, 清洗操作重复 3 次。此沉淀中添加封端液 6ml, 得到负载 0.1% 抗体的胶乳混悬液。

[检测体的调制]

用采血管 (VENOJECT 真空采血管: thermo 社制) 采取人血液后, 放置 2 小时得到上清液 (血清) 作为检测体 1。用 EDTA 采血管 (VENOJECT 真空采血管: thermo 社制) 采取人血液后, 放置 2 小时得到上清液 (血清) 作为检测体 2。用采血管 (VENOJECT 真空采血管: thermo 社制造) 采取人血液后, 向放置 2 小时得到的上清液 (血清) 中添加二乙氨四醋酸二钾 (同仁化学社制) 至 1mg/ml 作为检测体 3。

[用试药 1 和试药 2 绘制标准曲线]

将铁蛋白 (Scripps 社制) 溶解在生理盐水中, 分别调制成浓度为 10.9、21.9、43.8、87.5、175ng/ml 的铁蛋白溶液, 每 10 μ l 添加试药 1 为 140 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 6 分钟后, 添加试药 2 为 150 μ l, 37 $^{\circ}$ C 13 分钟后, 使用日立自动分析装置 7170 型, 用两点法 (测光点 21-39) 在主波长 750nm、副波长 800nm 处测定吸光度变化量, 由此制作标准进线。

[用试药 1 和试药 2 测定铁蛋白的浓度]

与上述制作标准曲线同样，取检测体 1、检测体 2 和检测体 3 各 10 μ l，分别添加试药 1 各 140 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 6 分钟后，添加 150 μ l 调制后立即使用的试药 2，37 $^{\circ}$ C 13 分钟后，使用日立自动分析装置 7170 型用两点法（测光点 21-39）在主波长 750nm、副波长 800nm 处测定吸光度变化量，用上述标准曲线测定各检测体中的铁蛋白浓度。结果如表 1 所示。另外，取代调制后立即使用的试药 1，使用调制后 1 周的试药 1，其他均与上述相同时，其结果如表 2 所示。从表 1 和表 2 可以看出，用 N-二(羟乙基)甘氨酸或麦黄酮做缓冲剂时，测定灵敏度稳定。

表 1

| 缓冲液 (调制后立即使用) | 铁蛋白浓度 (ng/ml) | | |
|------------------|---------------|-------|-------|
| | 检测体 1 | 检测体 2 | 检测体 3 |
| N-二(羟乙基)甘氨酸 | 40 | 39 | 39 |
| 麦黄酮 | 41 | 40 | 41 |
| TAPSO | 39 | 30 | 38 |
| POPSO | 41 | 23 | 40 |
| TES | 41 | 31 | 40 |

表 2

| 缓冲液 (调制 1 周后) | 铁蛋白浓度 (ng/ml) | | |
|------------------|---------------|-------|-------|
| | 检测体 1 | 检测体 2 | 检测体 3 |
| N-二(羟乙基)甘氨酸 | 40 | 39 | 39 |
| 麦黄酮 | 41 | 40 | 41 |
| TAPSO | 41 | 37 | 41 |
| POPSO | 38 | 33 | 42 |
| TES | 42 | 38 | 42 |

实施例 2

[试药 3 (胶乳混悬液) 的调制]

作为缓冲剂的 N-二(羟乙基)甘氨酸 3.26g 溶解在蒸馏水中, 添加 10%胶乳 (粒径 0.087 μ m; 积水化学社制造) 3.3ml 和 0.1g 的迭氮化钠, 20 $^{\circ}$ C 条件下测定 pH 的同时添加 1mol/L 的盐酸或氢氧化钠水溶液, 调整至 pH7.8, 加蒸馏水至全量 1,000ml。代替 N-二(羟乙基)甘氨酸作为缓冲剂而用麦黄酮 3.58g、TAPSO 5.18g、POPSO 7.97g、TES4.59g 分别溶解在蒸馏水中, 同样添加胶乳、迭叠化钠, 调整至 pH7.8 后, 加蒸馏水至全量为 1,000ml。这样, 调制成本发明中的含 N-二(羟乙基)甘氨酸或麦黄酮的 20mmol/L 缓冲液, 比较例为分别含 TAPSO、POPSP0、TES 的 20mmol/L 缓冲液, 调制成 5 种缓冲液。

[试药 4 (抗体溶液) 的调制]

用作为抗原的变性人 HbA1c 对小鼠进行免疫, 将按常规方法得到的抗人 HbA1c 小鼠单克隆抗体用于调制抗体溶液。N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 3.26g 溶解在蒸馏水中, 添加氯化钠 15g, 在 20 $^{\circ}$ C 测定 pH 的同时添加 1mol/L 的盐酸或氢氧化钠水溶液, 调整至 pH7.0, 添加 Tween20 (和光纯药社制) 2g, 添加迭氮化钠 0.1g, 然后添加前述的抗人变性 HbA1c 小鼠单克隆抗体 0.025g (IgG 计算)、抗小鼠 IgG 山羊多克隆抗体 (和光纯药社制) 0.04g (IgG 计算), 加蒸馏水至全量为 1,000ml。另外代替 N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂而用麦黄酮缓冲剂 3.58g、TAPSO 缓冲剂 5.18g、POPSO 缓冲剂 7.97g、TES 缓冲剂 4.59g 分别溶解在蒸馏水中, 同样添加氯化钠, 调整至 pH7.0 后, 与 N-二(羟乙基)甘氨酸同样, 添加 Tween20、迭叠化钠, 然后添加抗人 HbA1c 小鼠单克隆抗体、抗小鼠 IgG 山羊多克隆抗体, 加蒸馏水至全量为 1,000ml。

[检测体的调制]

用 EDTA 采血管 (VENOJECT 真空采血管: thermo 社制) 采取人血液后, 放置 2 小时沉淀, 取血细胞层 10 μ l, 用蒸馏水 1ml 稀释, 作为检测体 4。向此检测体 4 中, 添加 EDTA 采血管上清液的血浆 10 μ l,

调制成血浆混入检测体 5。

[用试药 3 和试药 4 绘制标准曲线]

用东曹自动糖血红蛋白分析仪 HLC-723GHbV 测定 HbA1c 的值，使用分别为 0.0%、4.2%、7.7%、11.3%、14.8% 的各检测体，用日立自动分析装置 7170 型测定吸光度变化量，由此绘制标准曲线。上述吸光度变化量的测定是在 240 μ l 的试药 3 中添加检测体 4 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟后，添加 80 μ l 的试药 4，37 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟后，在主波长 450nm、副波长 800nm 处，用两点法（测光点 16-34）测定吸光度变化量。

[用试药 3 和试药 4 测定 HbA1c 的浓度]

与绘制上述标准曲线同样，将检测体 4 和检测体 5 各 4 μ l，分别添加到调制后立即使用的 240 μ l 试药 3，37 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟后，添加调制 3 日后的试药 4 为 80 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟后，使用日立自动分析装置 7170 型，用两点法（测光点 16-34）、在主波长 450nm、副波长 800nm 处测定吸光度变化量，用上述标准曲线测定各检测体中的 HbA1c 浓度。结果如表 3 所示。另外，取代调制后立即使用的试药 3，用调制 1 周后的试药 3，其他均与上述相同，其结果如表 4 所示。从表 3 和表 4 可以看出，用 N-二(羟乙基)甘氨酸或麦黄酮做缓冲剂时，测定灵敏度稳定。

表 3

| 缓冲液 (调制后立即使用) | HbA1c 值 (%) | |
|------------------|-------------|-------|
| | 检测体 4 | 检测体 5 |
| N-二(羟乙基)甘氨酸 | 6.1 | 6.1 |
| 麦黄酮 | 6.1 | 6.0 |
| TAPSO | 6.1 | 5.4 |
| POPSO | 6.2 | 3.3 |
| TES | 6.1 | 5.3 |

表 4

| 缓冲液 (调制 1 周后) | HbA1c 值 (%) | |
|------------------|-------------|-------|
| | 检测体 4 | 检测体 5 |
| N-二(羟乙基)甘氨酸 | 6.1 | 6.1 |
| 麦黄酮 | 6.1 | 6.0 |
| TAPSO | 6.2 | 5.6 |
| POPSO | 5.9 | 3.1 |
| TES | 6.3 | 5.6 |

通过本发明，抑制与不溶性载体粒子凝集反应相关的对测定值有影响的血浆成分的作用，使凝集反应稳定化、反应液的吸光度稳定化，能够得到精确的测定结果。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 不溶性载体粒子比浊免疫测定用试药 | | |
| 公开(公告)号 | CN1264016C | 公开(公告)日 | 2006-07-12 |
| 申请号 | CN01812896.3 | 申请日 | 2001-06-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 协和梅迪克斯株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 协和梅迪克斯株式会社 爱赐爱儿股份有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 协和梅迪克斯株式会社 爱赐爱儿股份有限公司 | | |
| [标]发明人 | 重信香代子 小栗一人 | | |
| 发明人 | 重信香代子 小栗一人 | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/58 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/54313 G01N33/54393 | | |
| 代理人(译) | 陈昕 | | |
| 优先权 | 2000198831 2000-06-30 JP | | |
| 其他公开文献 | CN1443309A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

提供抑制与胶乳等不溶性载体粒子凝集反应相关的对测定值有影响的血浆成分的作用，使凝集反应稳定化，使反应液的吸光度稳定，能够得到精确的测定结果的不溶性载体粒子的比浊免疫测定用试药、不溶性载体粒子比浊免疫测定用试剂盒、用该试剂或试剂盒进行的不溶性载体粒子比浊免疫测定方法。在蚕豆噻啉葡糖苷、麦黄酮等分子内含有以下所示基团的化合物的缓冲液存在或不存在的条件下，使不溶性载体粒子负载有抗体或抗原，然后，在上述缓冲液存在的条件下，对抗体或抗原敏感的不溶性载体粒子混悬液和检测体接触，发生免疫凝集反应，通过不溶性载体粒子凝集反应，测定产生的浓度，对检测体中的抗原或抗体进行定量。[化学式]：(式中R1，R2，R3相同或不同均可，表示氢原子、羟烷基等)。

