



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103502813 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201280022119.8
 (22)申请日 2012.05.09
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 103502813 A
 (43)申请公布日 2014.01.08
 (30)优先权数据
 2011-104423 2011.05.09 JP
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2013.11.06
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2012/061902 2012.05.09
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02012/153773 JA 2012.11.15
 (73)专利权人 积水医疗株式会社
 地址 日本东京都
 (72)发明人 田久保耕平 海老沼宏幸 深町勇
 武城英明 斋藤康
 (74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
 代理人 金世煜 苗莹

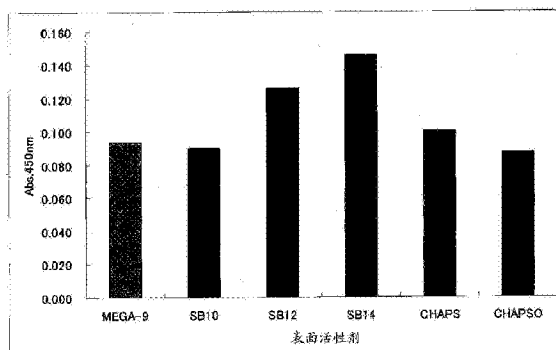
(51)Int.Cl.
 G01N 33/53(2006.01)
 (56)对比文件
 EP 2159577 A1,2010.03.03,
 CN 101975850 A,2011.02.16,
 WO 2010/038719 A1,2010.04.08,
 WO 2009/134852 A1,2009.11.05,
 EP 2256497 A1,2010.12.01,
 CN 1751128 A,2006.03.22,
 Masanao Matsuo 等.Development of an
 Immunoassay for the Quantification of
 Soluble LR11, a Circulating Marker of
 Atherosclerosis.《Clinical Chemistry》
 .2009,第55卷(第10期),
 Yanjuan Zhu 等.LR11, an LDL Receptor
 Gene Family Member, Is a Novel Regulator
 of Smooth Muscle Cell Migration.
 《Circulation Research》.2004,第94卷
 郑延成 等.磺基甜菜碱表面活性剂的合成
 及其性质研究.《长江大学学报(自然科学版)》
 .2010,第7卷(第3期),

审查员 段晓露

权利要求书1页 说明书11页 附图5页

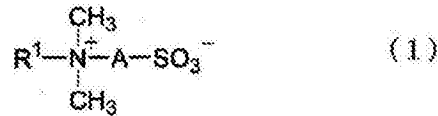
(54)发明名称
 可溶性LR11的免疫学测定方法

(57)摘要
 本发明提供一种无须进行从血清等生物来源试样中将可溶性LR11分离的操作而通过简便且准确的免疫学手段来测定该生物来源试样中可溶性LR11的方法。一种可溶性LR11的免疫学测定方法,其特征在于,该方法是生物来源试样中可溶性LR11的免疫学测定方法,用选自磺基甜菜碱型两性表面活性剂和酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂的一种以上处理该试样。



1. 选自磺基甜菜碱型两性表面活性剂中的一种以上的两性表面活性剂在血液、血浆或血清中的可溶性LR11的免疫学测定用试剂的制造中的应用，

磺基甜菜碱型两性表面活性剂是通式(1)表示的化合物，



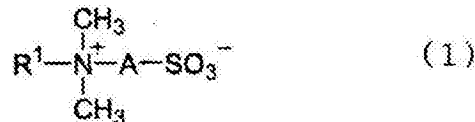
式中，R¹表示碳原子数10~14的烷基或烯基，A表示碳原子数2~5的亚烷基或碳原子数2~5的羟基亚烷基。

2. 根据权利要求1所述的应用，其中，免疫学测定方法包括使用抗原识别部位不同的至少2种抗体形成免疫复合物的工序。

3. 根据权利要求1所述的应用，其中，所述通式(1)的R¹为碳原子数10、12或14的烷基、或者碳原子数10或14的烯基。

4. 一种可溶性LR11免疫学测定用试剂，其特征在于，含有抗可溶性LR11抗体和选自磺基甜菜碱型两性表面活性剂中的一种以上，

磺基甜菜碱型两性表面活性剂为下通式(1)表示的化合物，



式中，R¹表示碳原子数10~14的烷基或烯基，A表示碳原子数2~5的亚烷基或碳原子数2~5的羟基亚烷基。

5. 根据权利要求4所述的免疫学测定用试剂，其中，所述通式(1)的R¹为碳原子数10、12或14的烷基、或者碳原子数10或14的烯基。

6. 一种可溶性LR11的免疫学测定用试剂盒，其包含权利要求4或5所述的免疫学测定用试剂。

可溶性LR11的免疫学测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物来源试样中的可溶性LR11的免疫学测定方法。

背景技术

[0002] LDL receptor relative with 11 ligand-binding repeats(LR11)是LDL受体家族中具有特征性结构的分子量约250kD的LDL受体样蛋白质(专利文献1、非专利文献1),除了膜结合型以外,还存在通过蛋白酶切断的可溶性LR11(非专利文献4)。LR11在正常血管壁细胞中基本没有发现,但是,已有报道可在肥厚内膜的平滑肌细胞中特异性地发现(非专利文献2)。另外报告了伴随培养平滑肌细胞的增殖,LR11的表达量亢进,培养液中分泌有可溶性LR11;在肩袖障碍模型小鼠中,如果使LR11基因发育工程性功能缺失,则因平滑肌细胞的游走和增殖而引起的血管内膜的肥厚受到抑制(非专利文献3)。进一步地,本发明人等发现,动脉硬化性疾病患者血液中可溶性LR11的浓度与健康人相比出现显著的高值,可以将血液中存在可溶性LR11作为新的动脉硬化性疾病的标记而进行利用(非专利文献5,专利文献2)。

[0003] 作为可溶性LR11的测定方法,已知有利用使对LR11具有亲和性的分子伴侣RAP(receptor associated protein)结合而得的不溶性载体,从试样中分离可溶性LR11后,进行SDS-PAGE、免疫印迹(Western Blot),通过抗LR11抗体进行免疫染色的检测方法(非专利文献5、6),但是,以从试样中分离可溶性LR11的工序为代表,操作多而复杂,应用到临床检查等情况下,并非是实用的方法。

[0004] 作为操作简便且实用性的可溶性LR11的测定方法,本发明人等尝试确立使用抗可溶性LR11抗体的免疫学的测定方法,但是在使用血清等生物来源试样作为试样时,可知由于上述试样中存在的不确定的测定干扰物质(以下,简单称为“干扰物质”)的影响,无法准确定量可溶性LR11。

[0005] 因此,本发明人等对于避免干扰物质给免疫学测定方法带来的影响的方法,进行了广泛研究。结果发现,将血清等生物来源试样与N-酰基-N-甲基葡糖胺等特定的表面活性剂进行混合处理,应用该处理后的试样以免疫学测定方法进行测定,则能够避免干扰物质的影响,能够简单且准确地定量试样中的可溶性LR11,对此已经提出专利申请(专利文献3)。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开平9-163988号公报

[0009] 专利文献2:国际公开W02008/155891号小册子

[0010] 专利文献3:国际公开W02009/116268号小册子

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:J.Biol.Chem.1996;271,p24761-24768

[0013] 非专利文献2:Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.1999;19,p2687-2695

- [0014] 非专利文献3:Circ.Res.2004;94;p752-758
- [0015] 非专利文献4:医学的进展,Vol.221, No.13,p1200-1203
- [0016] 非专利文献5:J Clin Invest.2008;118,p2733-2746
- [0017] 非专利文献6:第39届日本动脉硬化化学会总会·学术集会大纲·抄录集,一般标题(海报)189,p264

发明内容

[0018] 但是,专利文献3记载的现有方法(以下,简称为“现有方法”),例如,利用使用了2种抗可溶性LR11抗体的夹心ELISA测定经N-酰基-N-甲基葡糖胺处理的人血清试样的方法中,由于固相化的抗可溶性LR11抗体与可溶性LR11的反应(以下称为“一次反应”)在室温需要一夜时间,因此存在测定会跨越两天的问题。本发明人等尝试缩短上述现有方法中的一次反应的时间,结果伴随一次反应的反应时间缩短,不仅测定的各试样的吸光度降低,而且一部分试样中,伴随反应时间的缩短,吸光度的降低程度与其它试样中的降低程度不同,因此在以现有方法测定的情况与缩短一次反应的反应时间进行测定的情况中,可知试样间的相对关系(可溶性LR11浓度的高低)不同,即,存在现有方法的测定结果与缩短时间的测定结果的相关性降低的情形。

[0019] 因此,本发明的课题在于提供对以现有方法测定的试样间的相对关系不产生影响且缩短了测定时间的、更实用的生物试样中可溶性LR11的免疫学测定方法。

[0020] 本发明人等对上述课题进行了深入研究,发现如果使用经由磺基甜菜碱型或酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂处理的试样进行免疫学测定,则与专利文献3中记载的N-酰基-N-甲基葡糖胺等同样地可避免试样中干扰物质的影响,而且进而即使将一次反应的反应时间缩短至例如室温1小时的情形,也对以现有方法测定的试样间的相对关系没有影响,能够得到依赖于可溶性LR11浓度的测定结果,从而完成本发明。

[0021] 即,本发明提供了可溶性LR11的免疫学测定方法,其特征在于,该方法为生物来源试样中可溶性LR11的免疫学测定方法,用选自磺基甜菜碱型两性表面活性剂和酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂的一种以上处理该试样。

[0022] 另外,本发明提供可溶性LR11免疫学测定用试剂,其特征在于,含有抗可溶性LR11抗体、和选自磺基甜菜碱型两性表面活性剂和酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂中的一种以上。

[0023] 根据本发明的免疫学测定方法以及免疫学测定用试剂,可将抗可溶性LR11抗体与可溶性LR11的反应(例如,固相化的抗可溶性LR11抗体与可溶性LR11的反应)的时间例如从专利文献3记载的一晚大幅缩短至1小时,而且能够在更短的时间内简便、高灵敏度地定量测定生物来源试样例如血液等试样中存在的可溶性LR11的浓度。

附图说明

[0024] 图1:示出了使用专利文献3记载的表面活性剂或者本发明的两性表面活性剂将一次反应的时间设定为16小时来测定可溶性LR11的结果。

[0025] 图2:示出了将一次反应的时间设定为16小时来研究本发明的两性表面活性剂的浓度与测定的试样吸光度的关系的结果。

[0026] 图3:示出了使用专利文献3记载的表面活性剂或本发明的两性表面活性剂将一次反应的时间设定为1小时来测定可溶性LR11的结果。

[0027] 图4:示出了使用专利文献3记载的表面活性剂或本发明的两性表面活性剂将一次反应的时间设定为1小时来测定可溶性LR11的结果(纵轴)与使用专利文献3记载的表面活性剂将一次反应的时间设定为16小时的按照现有方法测定可溶性LR11的结果(横轴)的相关性。

[0028] 图5:示出了使用专利文献3记载的表面活性剂或本发明的两性表面活性剂将一次反应的时间设定为1小时来测定可溶性LR11的结果(纵轴)与使用专利文献3记载的表面活性剂将一次反应的时间设定为16小时的按照现有方法测定可溶性LR11的结果(横轴)的相关性。

具体实施方式

[0029] 本发明的测定方法为生物来源试样中可溶性LR11的免疫学测定方法。此处,作为生物可以是包含人的哺乳动物,例如,可例举为人、猴、马、牛、猪、兔子、大鼠、豚鼠、小鼠等。作为试样,可例举为血液、血浆、血清、脊髓液、尿等体液;例如血管、内脏、肌肉等组织;例如从各组织分离的细胞、白细胞等细胞;以及含有源自上述材料的成分的溶液(稀释的试样液、破碎液、溶解液、提取液等)。

[0030] 本发明中免疫学测定方法只要是利用抗原抗体反应的可溶性LR11的测定方法即可,无特别限制,但是优选包含使用具有不同抗原识别部位的至少2种的抗体形成免疫复合物的工序的测定方法。作为包含使用具有不同抗原识别部位的至少2种的抗体形成免疫复合物的工序的测定方法,可以是后文所述的测定方法,例如可举出夹心ELISA、免疫比浊法(TIA、LTIA(乳胶比浊免疫测定)、免疫色谱法等)。

[0031] 作为抗可溶性LR11抗体,只要是与生物来源试样中可溶性LR11例如由哺乳动物血清纯化而得的可溶性LR11进行反应的抗体,则可以是单克隆抗体、多克隆抗体的任意一种,优选使用单克隆抗体。该抗体可使用公知的方法进行制备。本说明书中,称为“抗可溶性LR11抗体”时,如上述那样,只要是与生物来源试样中可溶性LR11反应的抗体则无特别限制,例如,也可以使用与细胞表面存在的膜结合性LR11反应的抗体或文献等中简单地以“抗LR11抗体”记载的抗体等。

[0032] 制备多克隆抗体时,作为免疫的动物,例如,可以使用小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、山羊、羊、鸡等。抗可溶性LR11抗血清可通过在动物的皮下、皮内、或腹腔等中一次或多次给予抗原后,从采取的血液中制得。进行免疫时,更优选将抗原作为与具有免疫活化作用的补液(佐剂)的混合物来给药,进行免疫。

[0033] 单克隆抗体可根据公知的单克隆抗体制备方法,例如长宗香明、寺田弘共著的《单克隆抗体》广川书店(1990年)或Jame W.Golding的“Monoclonal Antibody”,3rd edition,Academic Press(1996年)进行制备。另外,利用DNA免疫法制备单克隆抗体,例如可参考Nature1992Mar12;356,p152-154或J.Immunol Methods Mar1;249,p147-154进行实施。

[0034] 作为用于抗体制备的抗原,可使用LR11蛋白质或该蛋白质的片段(肽)。上述LR11蛋白质可以从血液、尿、将可溶性LR11分泌到细胞外的细胞(平滑肌细胞或造血器官肿瘤细胞等)等的培养上清液等中根据需要进行纯化等而制得。另外,也可以使用在细胞表面表达

LR11的造血器官肿瘤细胞其自身作为抗原(WO2012/008595)。上述的肽可通过将上述蛋白质经蛋白酶消化、进行纯化等而制得,也可以使用合成肽。作为上述的肽,例如可举出具有专利文献3记载的氨基酸序列的肽等。上述肽的氨基酸序列,可以有1个或多个氨基酸的缺失、取代或添加。

[0035] 利用DNA免疫法制备抗体时,将载有编码LR11蛋白质或该蛋白质片段(肽)的cDNA的载体给与要免疫的动物,在该动物体内使抗原表达,由此进行免疫。作为上述肽,例如可举出具有专利文献3记载的氨基酸序列的肽等,该肽的氨基酸序列可以有1个或多个氨基酸的缺失、取代或添加。

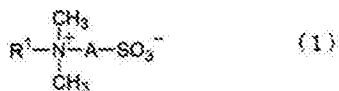
[0036] 另外,为了得到识别LR11的高级结构的单克隆抗体,优选使用插入有人LR11全长基因的载体,但是,也可使用插入有编码上述LR11蛋白质片段(肽)的基因的载体。

[0037] DNA免疫法中,通过将上述载体单独或混合,使用现有公知的多种基因导入法(例如,肌肉注射、电穿孔或基因枪等)的任意一种,对免疫动物(小鼠或大鼠等)进行皮下注射,并导入到源自免疫动物的细胞内进行实施。

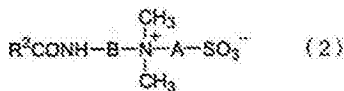
[0038] 使用肽抗原的单克隆抗体的制备方法和利用DNA免疫法制备单克隆抗体的方法可参考专利文献3记载的方法,优选使用该方法。作为这些抗可溶性LR11单克隆抗体的例子,可例举为将专利文献3记载的合成肽对小鼠进行免疫而得到的A2-2-3抗体、利用DNA免疫法而得到的小鼠单克隆抗体M3和M5、利用DNA免疫法而得到的大鼠单克隆抗体R14和R23。

[0039] 本发明的测定方法中,使用以磺基甜菜碱型和酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂中的一种以上进行处理的试样来进行免疫学测定。通过该处理,能够避免干扰试样中可溶性LR11的测定的物质的影响。进而,即使将一次反应的反应时间缩短至例如室温1小时,也对以现有方法测定的试样之间的相对关系没有影响,能够得到依赖于可溶性LR11浓度的测定结果。

[0040] 作为本发明中使用的磺基甜菜碱型和酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂,各自优选为以下通式(1)和(2)表示的化合物。



[0041]



[0042] (式中, R^1 表示碳原子数6~18的烷基或烯基, R^2CO 表示碳原子数6~18的酰基或源自胆酸的酰基,A表示碳原子数2~5的亚烷基或碳原子数2~5的羟基亚烷基,B表示碳原子数1~5的亚烷基)

[0043] 作为 R^1 表示的碳原子数6~18的烷基或烯基,可例举为直链或支链的烷基或烯基,其中优选直链或支链的烷基,更优选为直链的烷基。另外,该烷基或烯基的碳原子数优选为6~14,更优选为8~14,特别优选为10~14。 R^1 表示的烷基或烯基中,特别优选为癸基、十二烷基和十四烷基。

[0044] 作为 R^2CO 表示的碳原子数6~18的酰基,可例举为碳原子数6~18的脂肪族酰基,例如己酰基、辛酰基、癸酰基、十二碳酰基、十四碳酰基、十六碳酰基、十八碳酰基等。另外,作为 R^2CO ,优选为源自胆酸的酰基。

[0045] 作为A表示的碳原子数2~5的亚烷基,可例举为亚乙基、三亚甲基、四亚甲基、五亚甲基,更优选为亚乙基或三亚甲基。作为A表示的碳原子数2~5的羟基亚烷基,可以例举为 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 表示的羟基三亚甲基等。

[0046] 作为B表示的碳原子数1~5的亚烷基,可例举为亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基、五亚甲基。

[0047] 作为通式(1)表示的磺基甜菜碱型两性表面活性剂的市售品,可例举为磺基甜菜碱10(SB10: $R^1=\text{C}_{10}\text{H}_{23}$, $A=-(\text{CH}_2)_3-$),磺基甜菜碱12(SB12: $R^1=\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, $A=-(\text{CH}_2)_3-$),磺基甜菜碱14(SB14: $R^1=\text{C}_{14}\text{H}_{29}$, $A=-(\text{CH}_2)_3-$)(以上均为AMRESCO公司生产)等,在本发明中能很好地使用。另外,作为通式(2)表示的酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂的市售品,可例举为3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸(CHAPS: $R^2\text{CO}=\text{源自胆酸的酰基}$, $A=-(\text{CH}_2)_3-$), $B=-(\text{CH}_2)_3-$),3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]-2-羟基丙磺酸(CHAPS0: $R^2\text{CO}=\text{源自胆酸的酰基}$, $A=-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, $B=-(\text{CH}_2)_3-$)(以上均为同仁化学研究所公司生产)等,在本发明中能很好地使用。

[0048] 作为用选自磺基甜菜碱型和酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂中的一种以上处理生物来源试样的方法,只要在免疫测定前或测定时的试样中存在上述特定的两性表面活性剂即可,优选在免疫测定前与试样进行混合共存。作为与上述试样混合·共存的方法,例如可例示将本发明的两性表面活性剂事先含于试样稀释液,在试样稀释时混合·共存的方法;在含有抗可溶性LR11抗体的试剂中事先含有本发明的两性表面活性剂,在试样中的可溶性LR11与抗可溶性LR11抗体反应时混合·共存的方法(作为具体例,可例举在使用微孔板的夹心ELISA中,在填充有酶标记的抗可溶性LR11抗体溶液的孔中添加无稀释或预先稀释的试样(情形等));事先包含在用于免疫色谱法的样品填料这类投入试样的部件中,试样通过该部件时进行混合·共存的方法。

[0049] 应予说明,本说明书中的“试样稀释液”是指将生物来源试样中可溶性LR11的浓度直接或间接地调整(稀释)到适合于免疫反应的最佳浓度或含量的试液。称为“前处理液”或“第一试剂(液)”等都可以。

[0050] 本发明的两性表面活性剂的使用浓度按照所用测定方法的特性、所用两性表面活性剂的种类、本发明的两性表面活性剂混合·共存时的试样中可溶性LR11浓度与两性表面活性剂的浓度的比例等适当选择即可,例如,作为与含有可溶性LR11的试样混合·共存时的浓度,优选为0.001~10质量%,更优选为0.001~5质量%,进一步优选为0.05~5质量%。所用测定方法为夹心ELISA时,进一步优选为0.1~5质量%,更优选为0.5~5质量%。所用测定方法为LTIA时,进一步优选为0.001~3质量%,更优选为0.05~2质量%。应予说明,对于本领域技术人员而言不必说以上记载为指标在例示的范围以外的浓度使用。用本发明的两性表面活性剂处理生物来源试样时的温度为5~40℃,特别优选为10~30℃。用本发明的两性表面活性剂处理生物来源试样的时间可考虑使用的两性表面活性剂的种类、浓度或温度等条件进行适当设定。用本发明的两性表面活性剂处理生物来源试样时的生物来源试样中的可溶性LR11与抗可溶性LR11抗体的反应时间与现有方法(例如使用N-酰基-N-甲基葡糖胺的专利文献3记载的方法)相比,在短时间内即可,通过本发明的方法,生物来源试样中可溶性LR11的测定时间大幅缩短。

[0051] 另外,配合测定系统的设计(检测灵敏度、反应时间等),可将试样例如稀释到1(原

液)~50倍进行使用。上述稀释可利用含有本发明的两性表面活性剂的试样稀释液进行,也可以利用不含有本发明的两性表面活性剂的缓冲液等进行,但是利用含有本发明的两性表面活性剂的试样稀释液进行稀释较简便。用试样稀释液稀释生物来源试样并测定的情形中,优选稀释到4~30倍。作为试样稀释液的组成,以不损害本发明的效果为限度,是通常免疫学测定方法中使用的组成即可,无特别限制。例如,GOOD缓冲液、磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、碳酸缓冲液、Tris缓冲液等缓冲液(pH也是在常见的免疫学测定方法中使用的范围),NaCl等盐、BSA等蛋白成分、本发明的两性表面活性剂以外的表面活性剂、市售的非特异性反应防止成分等均可使用。

[0052] 使用含有上述特定的两性表面活性剂的试样,利用通常的方法,进行使用了抗可溶性LR11抗体的免疫学测定即可。

[0053] 作为免疫学测定方法,如前文所述,只要是利用抗原抗体反应的可溶性LR11的测定方法即可,无特别限制,但是优选包括使用具有不同抗原识别部位的至少2种抗体形成免疫复合物的工序的测定方法。作为包括使用具有不同抗原识别部位的至少2种抗体形成免疫复合物的工序的测定方法,例如可举出夹心ELISA(酶标记免疫吸附测定法)、免疫比浊法(TIA或LTIA)、免疫色谱法等。由上述例示的实施方式可知,本发明的免疫学测定方法,可以是非均相体系也可以是均相体系。总之,按照用本发明的两性表面活性剂处理的试样与抗可溶性LR11抗体之间进行一次以上抗原抗体反应的方式来进行设计。

[0054] 本说明书中,存在将抗原抗体反应以“一次反应”、“二次反应”的形式进行区别记载的情形,但这只是为了说明存在多个反应步骤等的实施方式而进行的记载,没有以此限定本发明的意图。

[0055] 上述各测定方法中的检测方法,无特别限制,对于夹心ELISA而言,可例举利用了发色底物·发色剂、发光底物·发光剂、荧光底物·荧光剂等的酶免疫分析,发光(化学发光、生物发光)免疫分析,荧光免疫分析等;对于免疫比浊法而言,可例举以吸光度或散射光检测由免疫复合物形成而产生的浊度的方法;对于免疫色谱法而言,可例举使用了金属胶体粒子或着色乳胶粒子的光学检测方法。只要使用以上述特定的两性表面活性剂处理的试样并按照通常的方法进行使用了抗可溶性LR11抗体的免疫学测定,则本领域技术人员容易理解本发明也可适用于免疫染色(免疫印迹)或竞争免疫分析等。

[0056] 对与抗可溶性LR11抗体反应的可溶性LR11进行定量或半定量的评价时,优选与作为标准的LR11进行比较。作为成为标准的LR11,优选使用例如从可溶性LR11浓度已知的血清、平滑肌细胞、成神经细胞株的培养细胞或培养上清液回收的可溶性LR11,源自尿液的可溶性LR11(WO2012/008595)、重组LR11、或抗体制备中作为免疫原使用的合成肽等。

[0057] 如前文所述那样,本发明中术语“定量”,包含所谓的“定量”和“半定量”这两种概念,另外,进一步地,在按照成为临床诊断中患病的判定标准的方式而设定检测灵敏度等情形中,也包含检测可溶性LR11是否存在的所谓的“定性”的概念。

[0058] 在上述免疫学测定中,如果以夹心ELISA为例进行说明,则例如将1种抗可溶性LR11单克隆抗体在适当的缓冲液中固定在不溶性载体上而得到固相化抗体,用酶标记作为第二抗体的与固定于不溶性载体的抗可溶性LR11单克隆抗体的识别部位不同的抗可溶性LR11单克隆抗体,将它们与试样反应,通过测定标记第二抗体的酶的活性,能够测定试样中的可溶性LR11。另外,例如也可以使用生物素标记的抗可溶性LR11单克隆抗体作为第二抗

体,与试样反应后,进一步与酶标记了的亲和素反应,通过测定该标记酶的活性,由此测定试样中的LR11。

[0059] 作为上述中使用的不溶性载体,优选为聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯等各种合成高分子、玻璃、硅、不溶性多糖(交联葡聚糖、多糖)等,这些载体可以以球状、棒状、微粒等形状或者以试管、微孔板等形态进行使用。作为固相化抗体的制备条件,使用球状、棒状、试管、微孔板等形态的载体时的抗体浓度分别为1~10 μ g/mL,使用微粒形态的载体时的抗体浓度为1~10mg/mL。另外,缓冲液优选使用磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、碳酸缓冲液、Tris缓冲液等的pH7~10的中性~碱性的缓冲液并在4 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C敏化1小时~72小时而进行制备。

[0060] 使用的酶标记抗体可通过公知的方法制备。例如,可按照中根等的方法(Nakane P.K et al,J.Histochem Cytochem,22,p1084-1089,1974)或石川等的方法(马来酰亚胺法:“酶免疫测定法第3版”医学书院)等,将未片段化的免疫球蛋白分子保持原样或者根据需要用适当的蛋白酶限制性分解抗体而得到F(ab')₂或Fab'之后,通过用酶进行标记,从而制备酶标记抗体。作为用于标记的酶,例如可举出过氧化酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶等。

[0061] 生物素标记抗体也可以根据公知的方法进行制备,使用市售的生物素化试剂(例如,PIERCE公司生产,Sulfo-NHS-Biotinylation kit)可以更加容易地将其制备。

[0062] 酶标记亲和素也可以根据公知的方法进行制备,也可以使用市售品(例如,PIERCE公司生产,Streptavidin,Horseradish Peroxidase Conjugated)。

[0063] 另外,标记物质为酶的情况下,为了测定其活性可使用底物以及根据需要的发色剂。使用过氧化酶作为酶的情形中,使用过氧化氢作为底物,作为发色剂可以使用邻苯二胺、3,3',5,5'-四甲基联苯胺、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)铵盐等;使用碱性磷酸酶作为酶的情形中,作为底物可以使用对硝基苯基磷酸酯、3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧环乙烷-3,2'-三环-[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸酯:AMPPD等;使用 β -D-半乳糖苷酶作为酶的情形中,作为底物可以使用 β -D-吡喃半乳糖苷、4-甲基伞形酮酰- β -D-吡喃半乳糖苷等;使用葡萄糖氧化酶作为酶的情形中,在过氧化酶共存下作为底物,可以使用 β -D-葡萄糖,作为发色剂可使用过氧化酶的发色剂。

[0064] 免疫比浊法(TIA或LTIA)中,将本发明的两性表面活性剂和处理过的试样与2种抗可溶性LR11抗体(LTIA的情形中固定于乳胶等粒子)依次或者同时反应,如果是免疫色谱法,则使本发明的两性表面活性剂和处理过的试样被固定于膜等的一种抗可溶性LR11抗体捕捉,用由金胶体等金属胶体或着色乳胶标记的另一种抗可溶性LR11抗体进行检测。

[0065] 即使生物来源试样含有干扰血清等的免疫反应等的物质,使用上述的两性表面活性剂处理后,用与可溶性LR11反应的抗体进行免疫学测定,则能够简便且准确地定量上述试样中的可溶性LR11。因此,本发明提供在实施上述免疫学测定时的含有抗可溶性LR11抗体和上述特定的两性表面活性剂的可溶性LR11免疫学测定用试剂。另外,可将抗可溶性LR11抗体和上述特定的两性表面活性剂用于制备可溶性LR11免疫学测定用试剂。

[0066] 该免疫学测定用试剂含有抗可溶性LR11抗体和上述特定的两性表面活性剂,但是,这些成分可以是作为试样稀释液与测定试剂或第一试剂与第二试剂各自分开的状态、或混合的状态。另外,该试剂中,也可以含有用于可溶性LR11检测的任意构成要素,例如缓冲液、稳定化剂、反应容器等。

[0067] 作为免疫学测定用试剂的具体例子,可例举如下。

[0068] 对于夹心ELISA的情形,例如可举出含有本发明的两性表面活性剂的试样稀释液、含有本发明的两性表面活性剂的标记抗体液、以干燥状态含有本发明的两性表面活性剂的固定化有抗可溶性LR11抗体的微孔板。对于LT1A的情形,例如可举出含有本发明的两性表面活性剂但不含有固定化有抗可溶性LR11抗体的乳胶粒子的试液、含有本发明的两性表面活性剂且含有固定化有抗可溶性LR11抗体的乳胶粒子的试液。对于免疫色谱法的情形,例如可举出含有本发明的两性表面活性剂的试样稀释液、使本发明的表面活性剂含浸于样品填料或者含有标记抗体的填料中的免疫层析试纸条(试验片)。

[0069] 另外,作为可溶性LR11免疫学测定用试剂盒,根据使用的测定体系,可将上述免疫学测定用试剂进行适当组合来使用,必要时,也可含有对测定体系的组成必要的其它试剂或随附文书等。

[0070] 实施例

[0071] 以下,通过实施例,对本发明作具体的说明。但是,本发明并不局限于这些实施例。

[0072] 实施例1(本发明的两性表面活性剂的效果确认(夹心ELISA))

[0073] (1)夹心ELISA用微孔板的制备

[0074] 在96孔微孔板(NUNC公司生产)中,向每个孔加入100 μ L用含有150mmol/L氯化钠的20mmol/L磷酸缓冲液(以下称为“PBS”)(pH7.2)稀释为10 μ g/ml的抗可溶性LR11单克隆抗体(M3抗体),室温静置2小时,将M3抗体固化。使用400 μ L含有0.05%吐温20(注册商标)的PBS(以下简称“PBST”)将96孔微孔板清洗后,向每个孔加入200 μ L的10%蔗糖、含有1%BSA的PBST(以下称为“BSA-PBST”),室温封闭2小时。去除孔内的液体后,在干燥器内干燥一夜,与干燥剂一同密封于铝袋,在使用前一直冷藏保存。

[0075] (2)使用夹心ELISA的可溶性LR11测定

[0076] 使用按照成为5.0%的方式分别添加有下述表面活性剂的PBS作为试样稀释液,将人血清(购自TENNESSEE BLOOD SERVICES INC公司,在使用MEGA-9的现有方法中测得的可溶性LR11浓度为3.9ng/mL,以下,将该人血清也称为“试验血清”)稀释11倍作为测定试样液(测定试样液中表面活性剂的浓度是试样稀释液中的浓度的10/11倍浓度)。将各测定试样液以每个孔100 μ L加入到(1)中制备的微孔板,室温静置16小时(如前文所述,将此时的固相化抗可溶性LR11抗体与测定试样中的可溶性LR11的抗原抗体反应称为“一次反应”)。

[0077] <使用的表面活性剂>

[0078] (比较例:N-酰基-N-甲基葡糖胺)

[0079] MEGA-9:目录序号M015、同仁化学研究所公司生产

[0080] (实施例)

[0081] SB10:目录序号D4266、SIGMA-ALDRICH公司生产

[0082] SB12:目录序号A1460、Applichem公司生产

[0083] SB14:目录序号A1162、Applichem公司生产

[0084] CHAPS:目录序号C008、同仁化学研究所公司生产

[0085] CHAPSO:目录序号C020、同仁化学研究所公司生产

[0086] 使用400 μ L的PBST将微孔板各孔清洗3次后,向每个孔添加100 μ L用BSA-PBST稀释到0.4 μ g/mL的生物素标记抗可溶性LR11单克隆抗体(R14抗体,用生物素化试剂(PIERCE公

司生产)进行生物素标记),在室温静置4小时(以下,将此时生物素标记抗可溶性LR11单克隆抗体(R14抗体)与一次反应中捕捉在微孔板上的可溶性LR11之间的反应称为“二次反应”)。使用PBST将微孔板清洗后,向每个孔添加100 μ L用BSA-PBST稀释到0.2 μ g/mL的过氧化酶标记链霉亲和素(PIERCE公司生产),室温静置1小时。再次使用PBST将微孔板清洗,向每个孔添加100 μ L的TMB底物液(0.3mg/mL二盐酸3,3',5,5'-四甲基联苯胺|(SIGMA公司生产)、含有12mmol/L过氧化氢的100mmol/L柠檬酸缓冲液(pH3.7)),室温静置30分钟。接下来,向每个孔添加100 μ L的1.5N硫酸,终止显色,使用酶标仪测定波长450nm的吸光度。

[0087] (3)结果

[0088] 使用SB10、SB12、SB14、CHAPS、CHAPSO中的任一个均可得到与MEGA-9相同的或更强的吸光度(图1,应予说明,图中的吸光度是以试样吸光度减去试剂空白吸光度的净吸光度表示)。通过以上内容可知,本发明的两性表面活性剂,能够避免干扰物质的影响,将生物来源试样中可溶性LR11进行测定。

[0089] 实施例2(本发明的两性表面活性剂的浓度与测定的试样吸光度的关系的研究)

[0090] (1)方法

[0091] 使用将SB10、SB12、SB14、CHAPS和CHAPSO各自按照成为0.04%、0.08%、0.16%、0.31%、0.63%、1.25%、2.5%和5.0%的方式进行添加而得的PBS作为试样稀释液,将试验血清稀释11倍作为测定试样液(测定试样液中各表面活性剂的浓度是试样稀释液中的浓度的10/11倍浓度)。以在室温进行一次反应16小时为代表,通过与实施例1相同的操作测定试样中的可溶性LR11。

[0092] (2)结果

[0093] SB10(□)中,从0.63%附近的浓度开始测定的试样吸光度与试剂空白吸光度之间的差值变得明显,从1.25%附近至5.0%,吸光度基本恒定。

[0094] SB12(◇)中,从0.16%附近的浓度开始测定的试样吸光度与试剂空白吸光度之间的差值变得明显,0.63%附近达到最大吸光度,从0.63%附近至5.0%,吸光度基本恒定。

[0095] SB14(△)中,从0.08%附近的浓度开始测定的试样吸光度与试剂空白吸光度之间的差值变得明显,从1.25%附近至5.0%,吸光度基本恒定。

[0096] CHAPS(■)和CHAPSO(▲)中,从0.63%附近的浓度开始测定的试样吸光度与试剂空白吸光度之间的差值变得明显,从2.5%附近至5.0%,吸光度基本恒定(图2,应予说明,图中的吸光度是以减去试剂空白吸光度之前的吸光度表示)。

[0097] 通过以上内容,可以确认本发明的两性表面活性剂均能够在广大的浓度范围内用于可溶性LR11的免疫学测定。

[0098] 实施例3(本发明的两性表面活性剂的反应时间缩短效果的确认)

[0099] (1)方法

[0100] 根据实施例2的结果,使用将SB10、SB12、SB14、CHAPS、CHAPSO各自按照成为1.5%、0.63%、3.6%、5.0%、5.0%的方式进行添加而得的PBS作为试样稀释液,将试验血清稀释11倍作为测定试样液(测定试样液中各表面活性剂的浓度是试样稀释液中的浓度的10/11倍浓度)。除了将一次反应设定为1小时,将二次反应设定为2小时以外,采用与实施例1相同的方法进行可溶性LR11的测定。作为比较例,使用按照成为5.0%的方式添加MEGA-9而得的PBS作为试样稀释液,进行与上述内容相同的操作,进行可溶性LR11的测定。

[0101] (2)结果

[0102] 使用任意的两性表面活性剂的情形中,都显示比使用MEGA-9的比较例的吸光度大的吸光度。通过以上内容可知,使用本发明的两性表面活性剂,即使一次反应在室温下缩短至1小时的情况下,与使用MEGA-9的现有方法相比,也能够以更高灵敏度检测可溶性LR11(图3,应予说明,图中的吸光度是以试样吸光度减去试剂空白吸光度而得的净吸光度表示)。

[0103] 实施例4(与现有方法的测定结果之间的关系确认-1)

[0104] (1)方法

[0105] 使用将SB10、SB12、SB14各自按照成为1.5%、0.63%、3.6%的方式进行添加而得的PBS作为试样稀释液,将5种人血清(购自TENNESSEE BLOOD SERVICES INC公司,在使用MEGA-9的现有方法中测定的可溶性LR11浓度为3.8ng/mL、3.9ng/mL、5.4ng/mL、8.0ng/mL和9.8ng/mL)稀释11倍作为测定试样液(测定试样液中各表面活性剂的浓度是试样稀释液中的浓度的10/11倍浓度)。将一次反应设定为1小时,将二次反应设置为2小时,除此以外与实施例1相同的方法进行可溶性LR11的测定。

[0106] 作为比较例,使用按照成为5.0%的方式添加MEGA-9而得的PBS作为试样稀释液,以与上述相同的操作进行可溶性LR11的测定。

[0107] 确认实施例和比较例的结果与使用MEGA-9(5.0%)、一次反应为16小时、二次反应为4小时进行测定时的测定值的相关性。

[0108] (2)结果

[0109] 使用MEGA-9(比较例)或本发明的两性表面活性剂在一次反应为1小时、二次反应为2小时的条件下测定可溶性LR11的结果(纵轴)与使用MEGA-9在一次反应为16小时、二次反应为4小时的现有方法中测定的结果(横轴)的相关性如图4所示。应予说明,图中的吸光度是以试样吸光度减去试剂空白吸光度的净吸光度表示。

[0110] 比较例中,在5.0%MEGA-9、一次反应为1小时、二次反应为2小时的条件下(■)下,9.8ng/mL的试样与5.4ng/mL的试样的吸光度,尽管9.8ng/mL的吸光度高,但是其差值较小。8.0ng/mL的试样的吸光度比9.8ng/mL的试样的吸光度高,3.8和3.9ng/mL的试样的吸光度与5.4ng/mL的试样的吸光度相比非常低。

[0111] 与此相对,使用本发明的两性表面活性剂,在一次反应为1小时、二次反应为2小时的条件下测定可溶性LR11时,使用任意的两性表面活性剂(SB10(◇)、SB12(□)、SB14(△))的情形中,测定的各血清试样的吸光度与现有方法测定值的大小顺序一致,为浓度依赖性的结果(图4)。

[0112] 实施例5(与现有方法的测定结果之间的关系确认-2)

[0113] (1)方法

[0114] 使用将CHAPS、CHAPSO各自按照成为5.0%的方式进行添加而得的PBS作为试样稀释液,将6种人血清(购自TENNESSEE BLOOD SERVICES INC公司,在使用MEGA-9的现有方法中测定的可溶性LR11浓度为3.1ng/mL、5.2ng/mL、6.7ng/mL、7.2ng/mL和8.7ng/mL、9.5ng/mL)稀释11倍作为测定试样液(测定试样液中各表面活性剂的浓度是试样稀释液中的浓度的10/11倍浓度)。将一次反应设置为1小时,二次反应设置为2小时,除此以外与实施例1相同的方法进行可溶性LR11的测定。

[0115] 确认实施例的结果与作为比较例的测定值的相关性,比较例的测定值是使用按照成为5.0%的方式添加MEGA-9而得的PBS作为试样稀释液并在一次反应为16小时、二次反应为4小时的条件下进行测定而得到的。

[0116] (2)结果

[0117] 使用MEGA-9(比较例)或本发明的两性表面活性剂在一次反应为1小时、二次反应为2小时的条件下测定可溶性LR11的结果(纵轴)与使用MEGA-9在一次反应为16小时、二次反应为4小时的现有方法中测定的结果(横轴)的相关性如图5所示。应予说明,图中的吸光度是以试样吸光度减去试剂空白吸光度的净吸光度表示。

[0118] 使用本发明的两性表面活性剂在一次反应为1小时、二次反应为2小时的条件下测定可溶性LR11,结果使用任意的两性表面活性剂(CHAPS(◆)、CHAPSO(□))的情形中,测定的各血清试样的吸光度与现有方法测定值的大小顺序均一致,为浓度依赖性的结果(图5)。

[0119] 根据实施例4、5的结果,可以确认使用以本发明的两性表面活性剂处理的试样进行免疫学测定,能够与专利文献3记载的N-酰基-N-甲基葡糖胺等同样地避免试样中的干扰物质的影响,而且进一步即使将一次反应的反应时间缩短至室温1小时,对用现有方法测定的试样间的相对关系也没有影响,能够得到依赖于可溶性LR11浓度的测定结果。

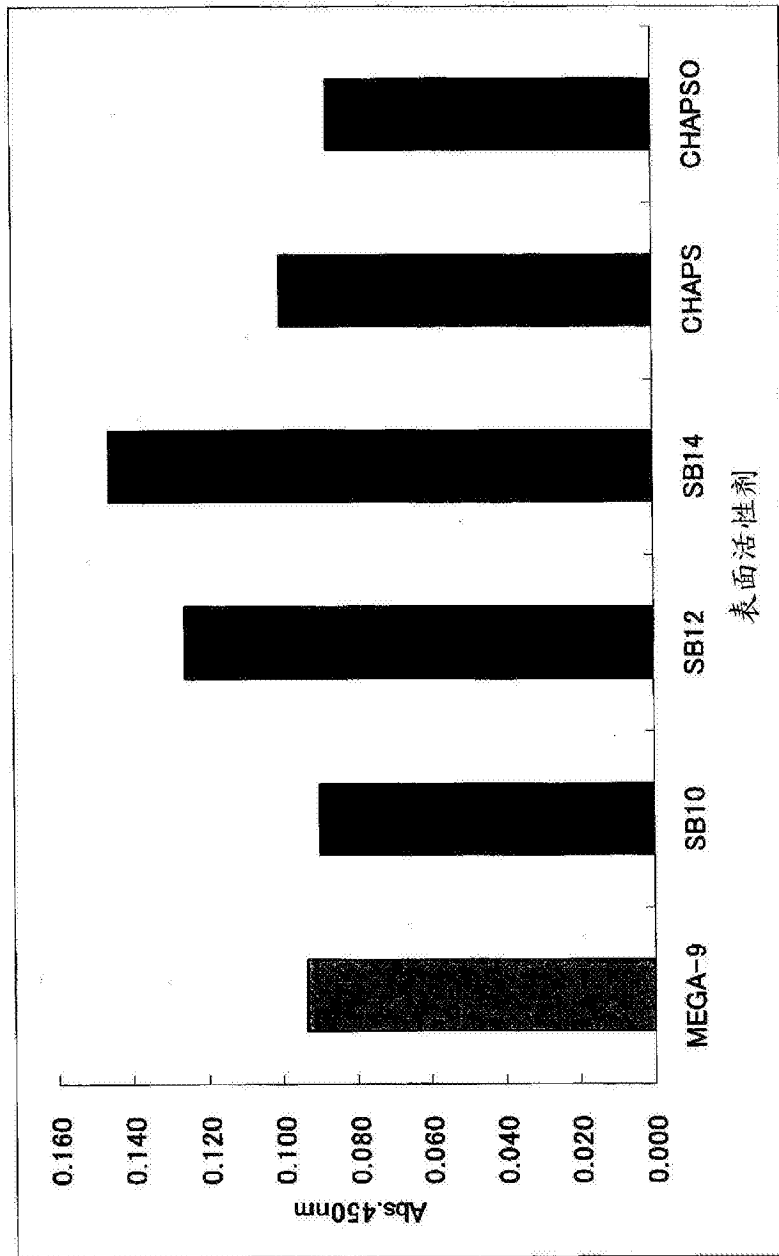


图1

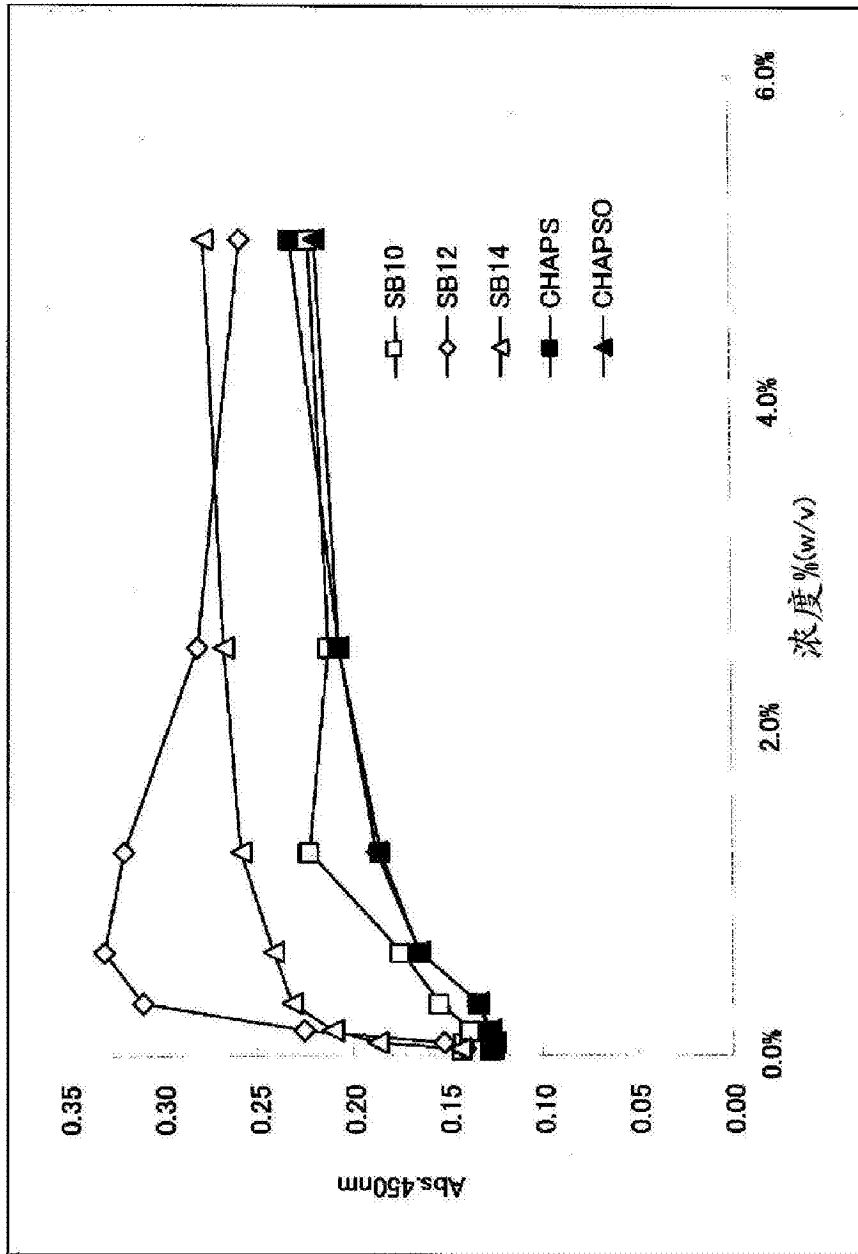


图2

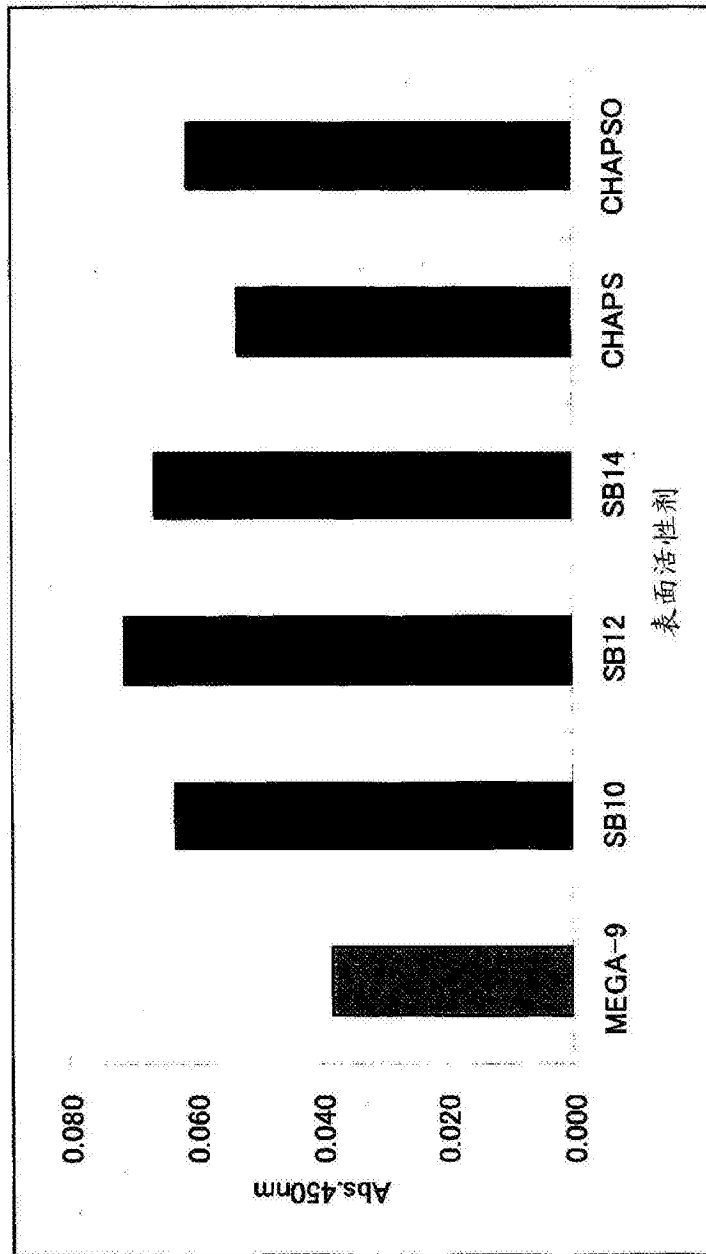


图3

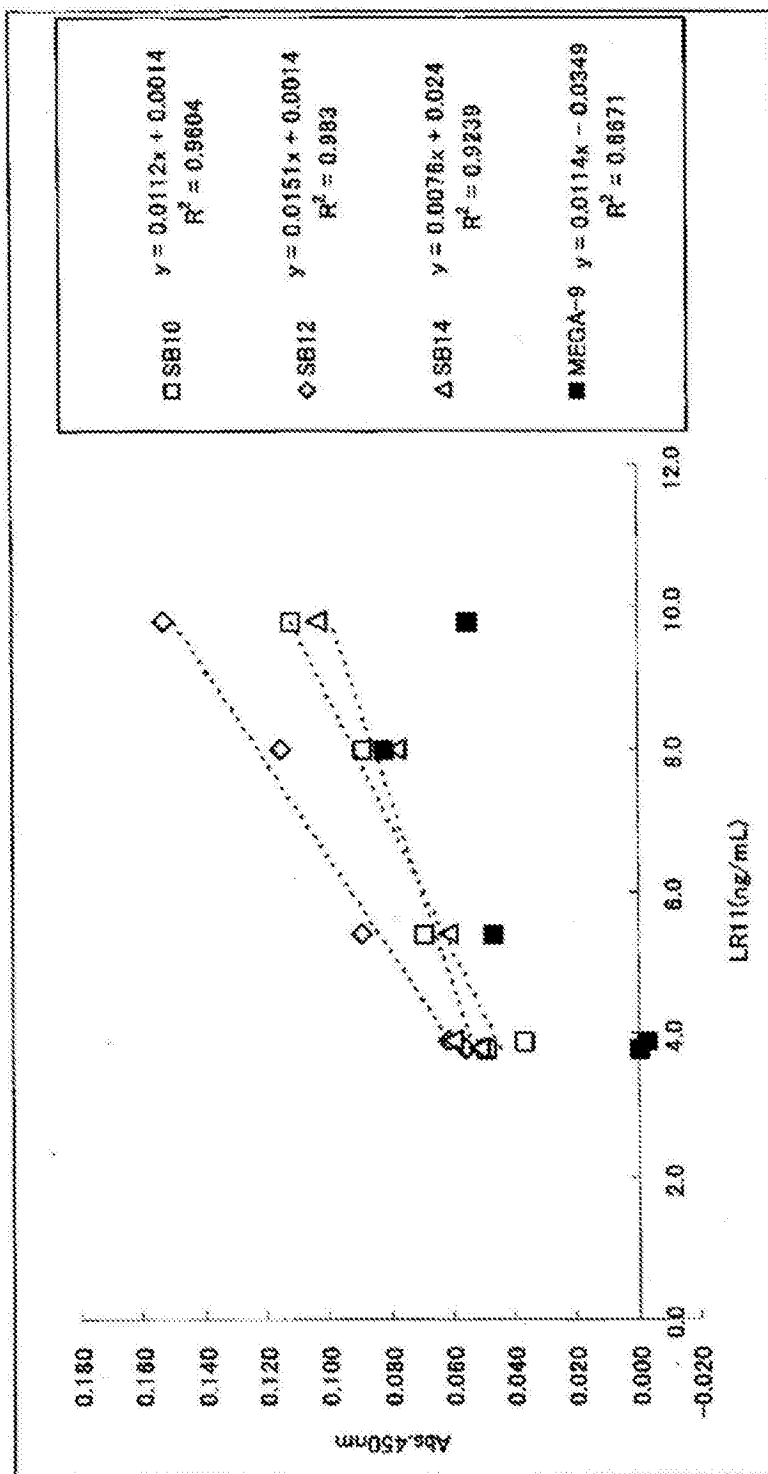


图4

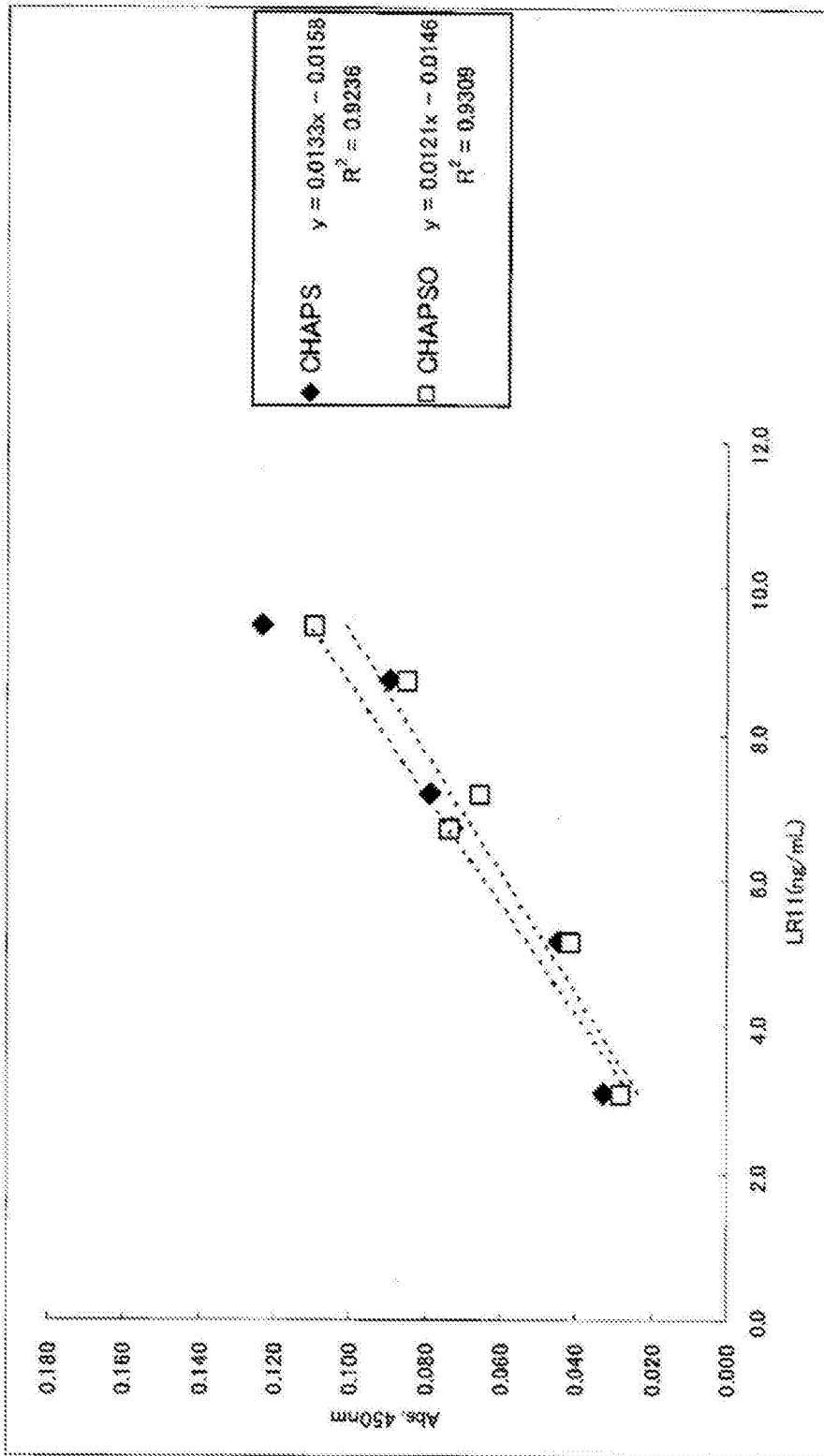


图5

专利名称(译)	可溶性LR11的免疫学测定方法		
公开(公告)号	CN103502813B	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201280022119.8	申请日	2012-05-09
[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	田久保耕平 海老沼宏幸 深町勇 斋藤康		
发明人	田久保耕平 海老沼宏幸 深町勇 武城英明 斋藤康		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/92		
代理人(译)	苗堃		
审查员(译)	段晓露		
优先权	2011104423 2011-05-09 JP		
其他公开文献	CN103502813A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种无须进行从血清等生物来源试样中将可溶性LR11分离的操作而通过简便且准确的免疫学手段来测定该生物来源试样中可溶性LR11的方法。一种可溶性LR11的免疫学测定方法，其特征在于，该方法为生物来源试样中可溶性LR11的免疫学测定方法，用选自磺基甜菜碱型两性表面活性剂和酰胺磺基甜菜碱型两性表面活性剂的一种以上处理该试样。

