



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101978268 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 23

(21) 申请号 200980109240. 2

(22) 申请日 2009. 03. 27

(30) 优先权数据

2008-093001 2008. 03. 31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 09. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/056316 2009. 03. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/123060 JA 2009. 10. 08

(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 原康之 赤峰隆之 吉川胜己

川本道子

(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 朱丹

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5506110 A, 1996. 04. 09,

US 6150504 A, 2000. 12. 21,

US 2003204060 A1, 2003. 10. 30,

CN 1628129 A, 2005. 06. 15,

CN 1191545 A, 1998. 08. 26,

CN 1525977 A, 2004. 09. 01,

CN 1235981 A, 1999. 11. 24,

CN 1339065 A, 2002. 03. 06,

CN 1496993 A, 2004. 05. 19,

Cabrera-Crespo 等. Albumin purification from human placenta. 《Biotechnology and Applied Biochemistry》. 2000, 第 31 卷 (第 2 期),

审查员 寇飞

权利要求书1页 说明书16页 附图1页

(54) 发明名称

纯化血清白蛋白及免疫学测定方法

(57) 摘要

本发明的目的在于提供批次差少的纯化血清白蛋白、及使用该纯化血清白蛋白的反应性高、非特异性反应少的免疫学测定方法。本发明为一种纯化血清白蛋白,在免疫学测定方法中用于封闭剂和/或不溶性载体的悬浮液,其中,以制成1%水溶液时使用光程长为1.0cm的石英池在463nm的波长下测定的吸光度为9.0mAbs以下的组分为主成分。

1. 一种纯化血清白蛋白,在免疫学测定方法中用于封闭剂和 / 或不溶性载体的悬浮液中,其特征在于,以制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度为 9.0mAbs 以下的组分为主成分。

2. 一种免疫学测定试剂,其特征在于,使用以制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度为 9.0mAbs 以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白而得到。

3. 根据权利要求 2 所述的免疫学测定试剂,其以抗梅毒螺旋体抗体作为被测物质。

4. 一种免疫学测定方法,利用了抗原抗体反应,所述抗原抗体反应具有以下工序:在负载有抗原或抗体的胶乳粒子悬浮液中添加样本并反应一定时间的工序,以及反应后通过光学测定或目测观察反应后胶乳粒子上负载的抗原或抗体与样本中的被测物质的抗原抗体反应所引起的凝聚的程度,由此测定样本中的被测物质的工序,

其特征在于,作为对于在所述胶乳粒子上负载有抗原或抗体的材料的封闭剂和 / 或作为所述胶乳粒子的悬浮液,使用以制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度为 9.0mAbs 以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白。

5. 根据权利要求 4 所述的免疫学测定方法,其以抗梅毒螺旋体抗体作为被测物质。

6. 一种用于免疫学测定的固相制备用试剂,其特征在于,以权利要求 1 所述的纯化血清白蛋白为主成分。

7. 根据权利要求 6 所述的固相制备用试剂,所述固相上负载有梅毒螺旋体抗原。

8. 一种纯化血清白蛋白,在免疫学测定方法中用于封闭剂和 / 或不溶性载体的悬浮液中,其特征在于,以按 1mol 计胆红素结合量为 0.9mmol 以下的组分为主成分。

9. 一种免疫学测定试剂,其特征在于,使用以按 1mol 计胆红素结合量为 0.9mmol 以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白而得到。

10. 根据权利要求 9 所述的免疫学测定试剂,其以抗梅毒螺旋体抗体作为被测物质。

11. 一种免疫学测定方法,利用了抗原抗体反应,所述抗原抗体反应具有以下工序:在负载有抗原或抗体的胶乳粒子悬浮液中添加样本并反应一定时间的工序,以及反应后通过光学测定或目测观察反应后胶乳粒子上负载的抗原或抗体与样本中的被测物质的抗原抗体反应所引起的凝聚的程度,由此测定样本中的被测物质的工序,

其特征在于,作为对于在所述胶乳粒子上负载有抗原或抗体的材料的封闭剂和 / 或作为所述胶乳粒子的悬浮液,使用以按 1mol 计胆红素结合量为 0.9mmol 以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白。

12. 根据权利要求 11 所述的免疫学测定方法,其以抗梅毒螺旋体抗体作为被测物质。

13. 一种用于免疫学测定的固相制备用试剂,其特征在于,以权利要求 8 所述的纯化血清白蛋白为主成分。

14. 根据权利要求 13 所述的固相制备用试剂,所述固相上负载有梅毒螺旋体抗原。

## 纯化血清白蛋白及免疫学测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及批次差少的纯化血清白蛋白、及使用该纯化血清白蛋白的反应性高、非特异性反应少的免疫学测定方法。

### 背景技术

[0002] 作为血液、尿等中所含的微量物质的测定方法,采用免疫学测定方法。免疫学测定方法基于抗原抗体反应的特异性强结合,即使从各种物质混合存在的试样中,也能够特异性地、灵敏性良好地测定目标物质。

[0003] 但是,近年来,测定血液中的癌标记物、病毒等抗原、抗细菌或病毒的抗体等极微量成分的需求增高,迫切要求免疫学测定方法具有更高的灵敏性。

[0004] 作为实现免疫学测定方法的高灵敏性的尝试,提出了例如:在测定试剂中添加反应促进剂的方法(专利文献1)、在反应体系中大量添加惰性蛋白的方法(专利文献2)、在不溶性载体上固定抗原或抗体并用免疫学上为惰性的蛋白等进行封闭时通过加热使封闭剂变性的方法(专利文献3)等。

[0005] 但是,专利文献1所述的添加反应促进剂的方法中,存在有时诱发非特异性反应的问题。

[0006] 另一方面,专利文献2、3所述的方法中,通常使用血清来源的白蛋白作为用于防止非特异性反应的封闭剂。但是,血清白蛋白存在由于批次差有时反应性显著差异、或不能充分得到效果的问题。

[0007] 专利文献1:日本特开平4-122858号公报

[0008] 专利文献2:日本特开2000-46828号公报

[0009] 专利文献3:日本特开平10-197530号公报

### 发明内容

[0010] 鉴于上述现状,本发明的目的在于,提供批次差少的纯化血清白蛋白、及使用该纯化血清白蛋白的反应性高、非特异性反应少的免疫学测定方法。

[0011] 本发明之一为一种纯化血清白蛋白,在免疫学测定方法中用于封闭剂和/或不溶性载体的悬浮液,其中,以制成1%水溶液时使用光程长为1.0cm的石英池在463nm的波长下测定的吸光度为9.0mAbs以下的组分为主成分。

[0012] 本发明之二为一种纯化血清白蛋白,在免疫学测定方法中用于封闭剂和/或不溶性载体的悬浮液,其中,以按1mol计胆红素结合量为0.9mmol以下的组分为主成分。

[0013] 以下,详细说明本发明。

[0014] 本发明人等进行了深入研究,结果发现,使用以制成1%水溶液时使用光程长为1.0cm的石英池在463nm的波长下测定的吸光度为9.0mAbs以下的组分、或者按1mol计胆红素结合量为0.9mmol以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白,作为封闭剂和/或不溶性载体的悬浮液时,可以进行几乎没有批次差、反应性高、非特异性反应少的免疫学测定,从

而完成了本发明。

[0015] 关于其理由目前尚未明确。血液中的血清白蛋白通常吸附胆红素（黄色色素成分）、游离脂肪酸等，发挥对它们进行转运的作用。推测以往的血清白蛋白的批次差可能是由于这些吸附物的有无及量比引起的。满足本发明之一、二的条件的组分是吸附物极少的组分，通过使用以该组分为主成分的纯化血清白蛋白，推测可能可以实现反应性高、非特异性反应少的免疫学测定。

[0016] 本发明之一的纯化血清白蛋白，以制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度为 9.0mAbs 以下的组分为主成分。优选以制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度为 8.0mAbs 以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白，更优选以制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度为 7.0mAbs 以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白。

[0017] 血清白蛋白的这样的组分，是胆红素（黄色色素成分、吸收波长 438nm (BSA 结合型胆红素的吸收波长为 463nm)）等的吸附极少的组分，将以这样的组分为主成分的本发明的纯化血清白蛋白用于封闭剂和 / 或不溶性载体的悬浮液时，可以进行几乎没有批次差、反应性高、非特异性反应少的免疫学测定。

[0018] 另外，“作为主成分”是指，优选仅由上述组分构成，但是在不损害本发明的目标效果的范围内可以混入其它组分。

[0019] 容许混入的其它组分的量比因组分而异。127T.U. 下的波长 700nm 下的吸光度变化量可以维持 0.06Abs 以上的比例由表 5 及图 1 求出。

[0020] 例如，在制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度超过 9.0mAbs 且为 13.5mAbs 的组分的情况下，可以混入至总量的 45 重量%左右。

[0021] 例如，在制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度超过 9.0mAbs 且为 20.0mAbs 以下的组分的情况下，可以混入至总量的 15 重量%左右。

[0022] 例如，在制成 1% 水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度超过 9.0mAbs 且为 26.0mAbs 以下的组分的情况下，可以混入至总量的 5 重量%左右。

[0023] 另外，本说明书中，T.U. 是利用密螺旋体 (treponema) 抗体测定试剂盒 Mediace TPLA (积水医疗公司制) 测定的抗密螺旋体抗体效价的单位 TITER UNITS 的简称。测定 WHO 标准品 (梅毒病人血清国际标准品 [第一批国际标准制备品]、1958 年建立) 时，1T.U. = 2mIU。另外，将 10T.U. 以上的作为阳性。

[0024] 本发明之二的纯化血清白蛋白，以按 1mol 计胆红素结合量为 0.9mmol 以下的组分为主成分。优选以按 1mol 计胆红素结合量为 0.8mmol 以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白，更优选以按 1mol 计胆红素结合量为 0.7mmol 以下的组分为主成分的纯化血清白蛋白。在将以血清白蛋白的这样的组分为主成分的本发明的纯化血清白蛋白用于封闭剂和 / 或不溶性载体的悬浮液时，可以进行几乎没有批次差、反应性高、非特异性反应少的免疫学测定。

[0025] 另外，“作为主成分”是指，优选仅由上述组分构成，但是在不损害本发明的目标效果的范围内可以混入其它组分。

[0026] 另外,血清白蛋白的每 1mol 的胆红素结合量,例如可以通过使用了胆红素测定试剂(积水医疗公司制、“Autosera BIL-2”、“AutoseraD-BIL-2”)的偶氮胆红素法进行测定。

[0027] 容许混入的其它组分的量比因组分而异。127T.U. 下的波长 700nm 下的吸光度变化量可以维持 0.06Abs 以上的比例由表 5 及图 1 求出。

[0028] 例如,在以 1mol 计胆红素结合量超过 0.9mmol 且为 1.5mmol 以下的组分的情况下,可以混入至总量的 45 重量%左右。

[0029] 例如,在以 1mol 计胆红素结合量超过 0.9mmol 且为 2.0mmol 以下的组分的情况下,可以混入至总量的 15 重量%左右。

[0030] 例如,在以 1mol 计胆红素结合量超过 0.9mmol 且为 2.7mmol 以下的组分的情况下,可以混入至总量的 5 重量%左右。

[0031] 上述制成 1%水溶液时使用光程长为 1.0cm 的石英池在 463nm 的波长下测定的吸光度为 9.0mAbs 以下的组分、或者以 1mol 计胆红素结合量为 0.9mmol 以下的组分,例如,可以通过在阴离子交换层析纯化中用 150mM 以下的盐浓度的洗脱液洗脱而得到。

[0032] 作为本发明的纯化血清白蛋白的原料的血清白蛋白,为动物血清来源的白蛋白,具体而言,例如优选人、牛、马、羊等大型哺乳动物的血清来源的白蛋白。其中,从廉价且可以大量获得的观点考虑,特别优选牛血清来源的血清白蛋白。

[0033] 另外,上述血清白蛋白,在进行阴离子交换层析纯化前,优选通过 Cohn 法、热休克法等进行粗纯化。

[0034] 上述阴离子交换层析纯化中使用的层析柱的载体没有特别限制,例如,可以举出:弱阴离子性的 DEAE Separose Fast Flow、ANX Separose4Fast Flow、强阴离子性的 Q Separose Fast Flow、Q Sepharose XL 等。

[0035] 上述阴离子交换层析纯化中使用的层析柱的载体的粒径的优选下限为 10  $\mu$ m,优选上限为 200  $\mu$ m。上述层析柱的载体的粒径小于 10  $\mu$ m 时,背压升高,有时不得不使纯化时的流速减缓。上述层析柱的载体的粒径超过 200  $\mu$ m 时,有时分离性能变差。上述层析柱的载体的粒径的更优选下限为 45  $\mu$ m,更优选上限为 165  $\mu$ m。

[0036] 上述阴离子交换层析纯化中使用的层析柱,例如可以使用 HiPrep16/10DEAE FF、HiPrep16/10ANX FF(高分辨率)、HiPrep16/10Q FF(均为 GE Healthcare 公司制)等市售品。

[0037] 上述阴离子交换层析纯化中使血清白蛋白结合到层析柱载体上时使用的缓冲液(以下也称结合液)没有特别限制,例如,可以举出磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液等。

[0038] 上述缓冲液的浓度通常在 5 ~ 150mM 的范围内用。

[0039] 上述缓冲液的 pH 优选为 4 ~ 9、更优选 5 ~ 8。

[0040] 作为上述阴离子交换层析纯化中使用的洗脱液,可以举出盐浓度为 150mM 以下的洗脱液,例如可以举出:在磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液等中添加盐使盐浓度为 150mM 以下的洗脱液。

[0041] 上述盐没有特别限制,例如,可以举出氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)等。

[0042] 上述洗脱液的 pH 优选为 4 ~ 9、更优选 5 ~ 8。

[0043] 其中,通常使用在与结合液相同的缓冲液中添加盐而得到的洗脱液。

[0044] 对利用上述阴离子交换层析的纯化方法的一个优选例进行说明。

[0045] 首先,制备在结合液(例如 50mMTris-HCl 缓冲液(pH7.5))中添加血清白蛋白而得到的溶液。

[0046] 然后,将该溶液添加到用结合液平衡后的阴离子交换层析柱上,在结合液流过的同时使血清白蛋白吸附到阴离子交换层析柱上。

[0047] 然后,流过盐浓度为 150mM 以下的洗脱液将血清白蛋白洗脱,得到纯化血清白蛋白。

[0048] 通过上述阴离子交换层析纯化得到的纯化血清白蛋白,可以进一步通过透析法、凝胶过滤法等进行纯化。

[0049] 本发明的纯化血清白蛋白的批次差极少。

[0050] 如果使用本发明的纯化血清白蛋白作为免疫学测定方法中的封闭剂或不溶性载体的悬浮液,则可以进行反应性高、非特异性反应少的免疫学测定。

[0051] 本发明的另一方面是使用本发明的纯化血清白蛋白而得到的免疫学测定试剂。

[0052] 本发明的另一方面是一种免疫学测定方法,利用了抗原抗体反应,其中,使用本发明的纯化血清白蛋白作为封闭剂和/或不溶性载体的悬浮液。

[0053] 本发明的另一方面是一种用于免疫学测定的固相制备用试剂,其以本发明的纯化血清白蛋白为主成分。

[0054] 本发明的纯化血清白蛋白通过凝胶过滤纯化后的单体,用于进一步提高免疫学测定试剂的反应性。

[0055] 进一步详细说明本发明的免疫学测定方法。

[0056] 作为本发明的免疫学测定方法的对象的被测物质,例如可以举出生物试样中的抗原或抗体。具体可以举出例如:肝炎(乙型、丙型)来源的抗原或抗体、HIV 抗原或抗体、梅毒来源的抗体、甲胎蛋白等癌标记物、胰岛素等激素、内分泌素等。

[0057] 其中,以抗梅毒抗原的抗梅毒螺旋体抗体作为被测物质时特别有效。

[0058] 上述抗梅毒螺旋体抗体测定系统中使用的抗原,可以是菌体破碎物,也可以是纯化物。另外,也可以由一种以上通过基因重组技术人工合成的物质组合而成。

[0059] 本发明的免疫学测定方法没有特别限制,优选使用在不溶性载体上负载有抗原或抗体的材料的方法。

[0060] 上述不溶性载体没有特别限制,例如,可以举出有机高分子粉末、微生物、血细胞、细胞膜片等。其中优选有机高分子粉末。

[0061] 上述有机高分子粉末没有特别限制,例如,可以举出天然高分子粉末、合成高分子粉末等。

[0062] 上述天然高分子粉末没有特别限制,例如,可以举出不溶性琼脂糖、纤维素、不溶性葡聚糖等。

[0063] 上述合成高分子粉末没有特别限制,例如,可以举出: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、乙酸乙酯-丙烯酸酯共聚物等。

[0064] 另外,上述不溶性载体也可以使用表面引入有磺酸、羧基等的非溶性载体。

[0065] 上述不溶性载体特别优选使合成高分子粉末均匀悬浮而得到的胶乳粒子。

[0066] 上述胶乳粒子的粒径没有特别限制, 优选的下限为  $0.05\ \mu\text{m}$ 、优选的上限为  $1.5\ \mu\text{m}$ 。上述胶乳粒子的粒径小于  $0.05\ \mu\text{m}$  时, 凝聚引起的光学变化量小, 有时得不到测定所需的高灵敏度。上述胶乳粒子的粒径超过  $1.5\ \mu\text{m}$  时, 胶乳粒子的凝聚引起的光学变化量超过可测定范围, 有时测定范围变小。上述胶乳粒子的粒径的更优选下限为  $0.1\ \mu\text{m}$ , 更优选上限为  $0.8\ \mu\text{m}$ 。

[0067] 在不溶性载体上负载抗原或抗体的方法没有特别限制, 可以使用利用物理、化学结合进行负载的现有公知的方法。

[0068] 在本发明的免疫学测定方法中, 本发明的纯化血清白蛋白对于在上述不溶性载体(胶乳粒子)上负载有抗原或抗体的材料作为封闭剂使用, 或者作为在上述不溶性载体上负载有抗原或抗体的材料的悬浮液使用。

[0069] 在这样得到的负载有抗原或抗体的胶乳粒子悬浮液中添加样本, 并反应一定时间。通过光学测定或目测观察反应后胶乳粒子上负载的抗原或抗体与样本中的被测物质的抗原抗体反应所引起的凝聚的程度, 由此可以测定样本中的被测物质。

[0070] 上述凝聚程度的光学测定方法没有特别限制, 通过所使用的不溶性载体的粒子的大小、浓度的选择、反应时间的设定, 测定散射光强度、吸收光度、透射光强度等的增减。另外, 也可以组合使用这些方法。

[0071] 进行上述测定时的光的波长优选为  $300\sim 900\text{nm}$ 。

[0072] 上述的光学测定方法中使用的装置, 可以举出能够检测散射光强度、透射光强度、吸光度等的光学设备, 只要是通常使用的生化学自动分析仪则任何一种均可以使用。

[0073] 上述凝聚程度的目测观察方法, 通常可以使用将包含样本和胶乳粒子悬浮液的溶液在判定板上混合, 晃动混合液后, 判断有无凝聚的方法等。另外, 关于凝聚程度的观察, 除了目测的方法以外, 也可以使用用摄像机等拍摄凝聚状态后进行图像处理的方法。

[0074] 根据本发明, 可以提供批次差少的纯化血清白蛋白、及使用了该纯化血清白蛋白的反应性高、非特异性反应少的免疫学测定方法。

## 具体实施方式

[0075] 以下, 举出实施例进一步详细说明本发明的方式, 但本发明不限于这些实施例。

[0076] (实施例 1)

[0077] (1) 纯化血清白蛋白的制备

[0078] 在结合液 (50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5)) 中添加市售的牛血清白蛋白 (Serologicals 公司制、“Cohn Fraction V”、以下也称为“未纯化 BSA”、批次 83), 制备 15% 未纯化 BSA 溶液。

[0079] 将得到的 15% 未纯化 BSA 溶液 5mL 添加到用结合液平衡后的市售的阴离子交换层析柱 (GE Healthcare 公司制、“DEAE Sepharose FF”480mL/“XK50”) 上, 使结合液以 4mL/分钟流过的同时使 BSA 吸附到层析柱上。然后, 在结合液中混合 2M 的氯化钠溶液得到氯化钠浓度为 80mM 的洗脱液, 使该洗脱液以 10mL/分钟的流速流过, 得到以 80mM 盐浓度的洗脱液洗脱的白蛋白组分。另外, 与此不同地, 在结合液中混合 2M 的氯化钠溶液使氯化钠浓度每 1 分钟增加 2mM, 并且以 10mL/分钟的流速流过, 得到在混合开始后 73.3 ~ 74.5 分钟 (盐浓度 69.6 ~ 72.0mM 的组分) 洗脱的白蛋白组分。另外, 关于所得白蛋白组分的盐浓

度,考虑层析柱的容量,表示从层析柱上洗脱的白蛋白溶液中的氯化钠浓度。

[0080] 将所得组分溶液在 100mM 的磷酸缓冲液 (pH7.4) 中透析,制备成 1% 溶液。对所得的纯化血清白蛋白的 1% 溶液,使用标准池 (GL Science 公司制、“S10-UV”、光程长 1.0cm) 测定波长 463nm 下的吸光度,结果分别为 1.3mAbs、5.1mAbs。

[0081] 另外,关于所得的纯化血清白蛋白,通过使用胆红素测定试剂 (积水医疗公司制、“Autosera BIL-2”、“Autosera D-BIL-2”) 的偶氮胆红素法来测定平均 1mol BSA 的胆红素结合量,结果为 0.1mmol、0.5mmol。

[0082] 以下,也将它们分别称为“纯化 BSA(1.3mAbs/0.1mmol)”、“纯化 BSA(5.1mAbs/0.5mmol)”。

[0083] (2) 梅毒螺旋体抗原负载胶乳液的制备

[0084] 将在 100mM 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中以 150  $\mu$ g/mL 的蛋白浓度溶解的梅毒螺旋体抗原液 400  $\mu$ L 添加到平均粒径 0.4  $\mu$ m 的聚苯乙烯胶乳 (固体成分 10(w/v)%、积水化学工业公司制) 100  $\mu$ L 中,在 4°C 搅拌 1 小时。

[0085] 然后,添加纯化 BSA(5.1mAbs/0.5mmol) 溶液 2mL,并搅拌 1 小时。将得到的液体在 10°C 以 13000rpm 离心分离 10 分钟,将所得沉淀物添加到纯化 BSA 溶液 (1.3mAbs/0.1mmol) 4mL 中,使胶乳悬浮,由此制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0086] (实施例 2)

[0087] 在结合液中混合 2M 的氯化钠溶液使氯化钠浓度每 1 分钟增加 2mM,并且以 10mL/分钟的流速流过,得到在混合开始后 87.7 ~ 88.9 分钟 (盐浓度 98.4 ~ 100.8mM 的组分) 洗脱的纯化 BSA(0.9mAbs/0.1mmol) 溶液,除了使用所得纯化 BSA 溶液作为封闭剂以外,与实施例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0088] (实施例 3)

[0089] 在结合液中混合 2M 的氯化钠溶液使氯化钠浓度每 1 分钟增加 2mM,并且以 10mL/分钟的流速流过,得到在混合开始后 102.1 ~ 103.3 分钟 (盐浓度 127.2 ~ 129.6mM 的组分) 洗脱的纯化 BSA(3.3mAbs/0.3mmol) 溶液,除了使用所得纯化 BSA 溶液作为封闭剂以外,与实施例 1 同样地制备被堵螺旋体抗原负载胶乳液。

[0090] (比较例 1)

[0091] 除了将 BSA 溶液在不进行阴离子交换层析纯化的情况下 (以下称为未纯化 BSA) 使用以外,与实施例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0092] 另外,对于未纯化 BSA 的 1% 溶液,与实施例 1 同样测定的波长 463nm 下的吸光度为 9.8mAbs,每 1mol BSA 的胆红素结合量为 1.0mmol。

[0093] (比较例 2)

[0094] 在结合液中混合 2M 的氯化钠溶液使氯化钠浓度每 1 分钟增加 2mM,并且以 10mL/分钟的流速流过,得到在混合开始后 116.5 ~ 117.7 分钟 (盐浓度 156.0 ~ 158.4mM 的组分) 洗脱的纯化 BSA(9.8mAbs/1.0mmol) 溶液,除了使用所得纯化 BSA 溶液作为封闭剂以外,与实施例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0095] (比较例 3)

[0096] 在结合液中混合 2M 的氯化钠溶液使氯化钠浓度每 1 分钟增加 2mM,并且以 10mL/分钟的流速流过,得到在混合开始后 130.9 ~ 132.1 分钟 (盐浓度 184.8 ~ 187.2mM 的组

分)洗脱的纯化 BSA(17.9mAbs/1.9mmol)溶液,除了使用所得纯化 BSA 溶液作为封闭剂以外,与实施例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0097] (比较例 4)

[0098] 在结合液中混合 2M 的氯化钠溶液使氯化钠浓度每 1 分钟增加 2mM,并且以 10mL/分钟流速流过,得到在混合开始后 145.3 ~ 146.5 分钟(盐浓度 213.6 ~ 216.0mM 的组分)洗脱的纯化 BSA(24.9mAbs/2.6mmol)溶液,除了使用所得纯化 BSA 溶液作为封闭剂以外,与实施例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0099] (评价)

[0100] 使用实施例 1 ~ 3、比较例 1 ~ 4 制备的梅毒螺旋体抗原负载胶乳液,通过下述方法进行评价。

[0101] (1) 抗梅毒螺旋体抗体标准液的测定

[0102] 取梅毒阳性标准血清(积水医疗公司制、5 个浓度)15  $\mu$ L 作为抗梅毒螺旋体抗体标准液,在其中混合样本稀释液(在含有 1% BSA 的 100mM 磷酸缓冲液(pH7.4)中添加 0.2(w/v)%的 Lipidure(日油公司制)所得的溶液)150  $\mu$ L,并在 37°C 保持适当时间。在所得溶液中添加梅毒螺旋体抗原负载胶乳液 50  $\mu$ L 并搅拌后,测定约 80 秒至 300 秒之间的波长 700nm 下的吸光度的变化量,作为吸光度变化量( $\Delta$  Abs)。

[0103] 另外,测定使用自动分析装置日立 7170 型。

[0104] 结果如表 1 所示。

[0105]

[表 1]

|       | BSA 的批次 | 封闭剂       |                     |                 | 胶乳悬浮液         |           |                     |                 | 127T. U.下的吸光度变化量 (Abs) |        |
|-------|---------|-----------|---------------------|-----------------|---------------|-----------|---------------------|-----------------|------------------------|--------|
|       |         | 阴离子交换层析纯化 | 吸光度 (A463nm) /1%BSA | 胆红素结合量 /BSA1mol | 氯化钠浓度         | 阴离子交换层析纯化 | 吸光度 (A463nm) /1%BSA | 胆红素结合量 /BSA1mol |                        | 氯化钠浓度  |
| 比较例 1 |         | 无         | 9.8mAbs             | 1.0mmol         | —             | 无         | 9.8mAbs             | 1.0mmol         | —                      | 0.0212 |
| 实施例 1 |         |           | 5.1mAbs             | 0.5mmol         | 69.6-72.0mM   |           |                     |                 |                        | 0.1239 |
| 实施例 2 |         |           | 0.9mAbs             | 0.1mmol         | 98.4-100.8mM  |           |                     |                 |                        | 0.1029 |
| 实施例 3 |         |           | 3.3mAbs             | 0.3mmol         | 127.2-129.6mM |           |                     |                 |                        | 0.0988 |
| 比较例 2 | Lot83   | 有         | 9.8mAbs             | 1.0mmol         | 156.0-158.4mM | 有         | 1.3mAbs             | 0.1mmol         | 0-80mM                 | 0.0593 |
| 比较例 3 |         |           | 17.9mAbs            | 1.9mmol         | 184.8-187.2mM |           |                     |                 |                        | 0.0348 |
| 比较例 4 |         |           | 24.9mAbs            | 2.6mmol         | 213.6-216.0mM |           |                     |                 |                        | 0.0188 |

[0106] (2) 阴性样本测定

[0107] 除了使用生理盐水及阴性样本 1 ~ 10 作为样本以外,与 (1) 同样地求出吸光度变

化量 ( $\Delta$  Abs), 由基于 (1) 的标准品测定结果做成的校准曲线计算抗体效价。结果如表 2 所示。

[0108] [表 2]

[0109]

|         | 比较例 1 | 实施例 1 | 实施例 2 | 实施例 3 | 比较例 2 | 比较例 3 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 生理盐水    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 阴性样本 1  | 4.4   | 1.3   | 1.4   | 0     | 0     | 17.5  |
| 阴性样本 2  | 2.2   | 0     | 0     | 0     | 0     | 10.7  |
| 阴性样本 3  | 11.0  | 0.6   | 3.2   | 3.1   | 3.7   | 40.7  |
| 阴性样本 4  | 7.5   | 0     | 0     | 0     | 0.9   | 11.6  |
| 阴性样本 5  | 5.0   | 0     | 0     | 0.1   | 1.5   | 20.0  |
| 阴性样本 6  | 12.2  | 0.3   | 0.1   | 0     | 1.3   | 16.7  |
| 阴性样本 7  | 7.5   | 0     | 0.2   | 3.5   | 0.8   | 0     |
| 阴性样本 8  | 5.7   | 0     | 0     | 0     | 0.4   | 6.0   |
| 阴性样本 9  | 9.1   | 0     | 0     | 0     | 2.6   | 9.8   |
| 阴性样本 10 | 11.3  | 0     | 0     | 8.4   | 11.3  | 23.3  |

[0110]

(T. U.)

[0111] 由表 1、2 可知, 使用实施例制备的梅毒螺旋体抗原负载胶乳液时, 与使用比较例制备的梅毒螺旋体抗原负载胶乳液时相比, 反应性高, 并且非特异性反应少。

[0112] (实施例 4)

[0113] 准备三种批次的市售牛血清白蛋白 (批次 83、批次 91、批次 77)。对于这三种批次的牛血清白蛋白, 分别与实施例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0114] (比较例 5)

[0115] 除了在未纯化的状态下直接使用三种批次的市售牛血清白蛋白 (批次 83、批次 91、批次 77) 以外, 与比较例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0116] (评价)

[0117] 使用实施例 4、比较例 5 制备的梅毒螺旋体抗原负载胶乳液, 通过下述方法进行评价。

[0118] 取梅毒阳性标准血清 (积水医疗公司制、5 个浓度) 15  $\mu$ L 作为抗梅毒螺旋体抗体标准液, 在其中混合样本稀释液 (在含有 1% BSA 的 100mM 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中添加

0.2(w/v)%的Lipidure(日油公司制)所得的溶液)150 $\mu$ L,并在37 $^{\circ}$ C保持适当时间。在所得溶液中添加梅毒螺旋体抗原负载胶乳液50 $\mu$ L并搅拌后,测定约80秒至300秒之间的波长700nm下的吸光度的变化量,作为吸光度变化量( $\Delta$ Abs)。

[0119] 另外,测定使用自动分析装置日立7170型。

[0120] 结果如表3所示。

[0121]

[表 3]

|       | BSA<br>的批次 | 封闭剂           |                           |                    | 胶乳悬浮液         |                           |                    | 127T. U.下的<br>吸光度变化量 | 标准差    |
|-------|------------|---------------|---------------------------|--------------------|---------------|---------------------------|--------------------|----------------------|--------|
|       |            | 阴离子交换<br>层析纯化 | 吸光度<br>(A463nm)<br>/1%BSA | 胆红素结合量<br>/BSA1mol | 阴离子交换<br>层析纯化 | 吸光度<br>(A463nm)<br>/1%BSA | 胆红素结合量<br>/BSA1mol |                      |        |
| 实施例 4 | Lot83      | 有             | 1.3mAbs                   | 0.1mmol            | 有             | 1.3mAbs                   | 0.1mmol            | 0.2230               | 0.0089 |
|       | Lot91      |               |                           |                    |               |                           |                    | 0.2228               |        |
|       | Lot77      |               |                           |                    |               |                           |                    | 0.2075               |        |
| 比较例 5 | Lot83      | 无             | 9.8mAbs                   | 1.0mmol            | 无             | 9.8mAbs                   | 1.0mmol            | 0.0212               | 0.0250 |
|       | Lot91      |               |                           |                    |               |                           |                    | 0.0709               |        |
|       | Lot77      |               |                           |                    |               |                           |                    | 0.0521               |        |

(Abs)

[0122] 由表 3 可知,使用实施例制备的梅毒螺旋体抗原负载胶乳液时,与使用比较例制备的梅毒螺旋体抗原负载胶乳液时相比,批次差少。

[0123] (实施例 5)

[0124] 将实施例 1 得到的纯化 BSA 溶液 (1.3mAbs/0.1mmol) 浓缩, 添加到市售的凝胶过滤柱 Sephacryl S-200HR (GE Healthcare 公司制) 上, 使用 100mM 的磷酸缓冲液 (pH7.4) 作为洗脱液进行凝胶过滤纯化, 得到仅由其单体组分构成的 BSA, 除了使用所得到的 BSA 以外, 与实施例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0125] (实施例 6)

[0126] 只使用仅由将实施例 1 得到的纯化 BSA 溶液 (1.3mAbs/0.1mmol) 进行凝胶过滤纯化后的单体组分构成的 BSA 作为封闭剂, 并且在梅毒螺旋体抗原负载胶乳液的制备中使用实施例 1 中得到的纯化 BSA (1.3mAbs/0.1mmol) 溶液, 除此以外与实施例 5 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0127] (实施例 7)

[0128] 使用仅由将实施例 1 得到的纯化 BSA 溶液 (1.3mAbs/0.1mmol) 进行凝胶过滤纯化后的单体组分构成的 BSA 作为封闭剂, 并且在梅毒螺旋体抗原负载胶乳液的制备中使用未纯化 BSA 溶液, 除此以外与实施例 5 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0129] (评价)

[0130] 使用实施例 5 ~ 7 制备的梅毒螺旋体抗原负载胶乳液, 通过下述方法进行评价。

[0131] 取梅毒阳性标准血清 (积水医疗公司制、5 个浓度) 15  $\mu$ L 作为抗梅毒螺旋体抗体标准液, 在其中混合样本稀释液 (在含有 1% BSA 的 100mM 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中添加 0.2(w/v) % 的 Lipidure (日油公司制) 所得的溶液) 150  $\mu$ L, 并在 37°C 保持适当时间。在所得溶液中添加梅毒螺旋体抗原负载胶乳液 50  $\mu$ L 并搅拌后, 测定约 80 秒至 300 秒之间的波长 700nm 下的吸光度的变化量, 作为吸光度变化量 ( $\Delta$  Abs)。

[0132] 另外, 测定使用自动分析装置日立 7170 型。

[0133] 结果如表 4 所示。

[0134]

[表 4]

|       | BSA 的批次 | 封闭剂       |                      |                  |        | 胶乳悬浮液     |                      |                  |        | 127T. U. 下的吸光度变化量 |
|-------|---------|-----------|----------------------|------------------|--------|-----------|----------------------|------------------|--------|-------------------|
|       |         | 阴离子交换层析纯化 | 吸光度 (A463nm) / 1%BSA | 胆红素结合量 / BSA1mol | 凝胶过滤纯化 | 阴离子交换层析纯化 | 吸光度 (A463nm) / 1%BSA | 胆红素结合量 / BSA1mol | 凝胶过滤纯化 |                   |
| 实施例 5 | Lot83   | 有         | 1.3mAbs              | 0.1mmol          | 有      | 1.3mAbs   | 0.1mmol              | 有                | 有      | 0.2230            |
| 实施例 6 |         |           |                      |                  |        |           |                      |                  | 无      | 0.1841            |
| 实施例 7 |         |           |                      |                  |        | 无         | 9.8mAbs              | 1.0mmol          | 无      | 无                 |

(Abs)

[0135] 由表 4 可知,通过凝胶过滤纯化使反应性进一步提高。

[0136] (参考例 1 ~ 10)

[0137] 除了使用以表 5 所示的比率混合的 BSA 溶液作为封闭剂以外,与实施例 1 同样地制备梅毒螺旋体抗原负载胶乳液。

[0138] (评价)

[0139] 使用参考例 1 ~ 10 中制备的梅毒螺旋体抗原负载胶乳液,通过下述方法进行评价。

[0140] 取梅毒阳性标准血清(积水医疗公司制、5 个浓度)15  $\mu$  L 作为抗梅毒螺旋体抗体标准液,在其中混合样本稀释液(在含有 1% BSA 的 100mM 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中添加 0.2(w/v) % 的 Lipidure(日油公司制)所得的溶液)150  $\mu$  L,并在 37 $^{\circ}$ C 保持适当时间。在所得溶液中添加梅毒螺旋体抗原负载胶乳液 50  $\mu$  L 并搅拌后,测定约 80 秒至 300 秒之间的波长 700nm 下的吸光度的变化量,作为吸光度变化量 ( $\Delta$  Abs)。

[0141] 另外,测定使用自动分析装置日立 7170 型。

[0142] 结果如表 5 所示。

[0143] 另外,将表 5 的结果以混入 BSA 比率为横轴、以吸光度变化量为纵轴制作的图示于图 1。

[0144]

[表 5]

|        | BSA<br>的批次 | 封闭剂                     |             |                     |             | 混入的 BSA |             |                           | 胶乳悬浮液              |        | 127T. U 下的<br>吸光度变化量 |
|--------|------------|-------------------------|-------------|---------------------|-------------|---------|-------------|---------------------------|--------------------|--------|----------------------|
|        |            | 纯化 BSA(3.3mAbs/0.3mmol) |             | 氯化钠浓度               | 种类          | 氯化钠浓度   | 比率<br>(重量%) | 吸光度<br>(A463nm)<br>/1%BSA | 胆红素结合量<br>/BSA1mol |        |                      |
|        |            | 比率<br>(重量%)             | 氯化钠浓度       |                     |             |         |             |                           |                    |        |                      |
| 参考例 1  | Lot83      | 0                       | 1.0-141.6mM | 3.3mAbs<br>/0.3mmol | 1.0-141.6mM | 100     | 1.3mAbs     | 0.1mmol                   | 0.1285             |        |                      |
| 参考例 2  |            | 85                      |             |                     |             |         |             |                           | 15                 | 0.1091 |                      |
| 参考例 3  |            | 75                      |             |                     |             |         |             |                           |                    |        | 25                   |
| 参考例 4  |            | 65                      |             |                     |             |         |             |                           | 35                 | 0.0774 |                      |
| 参考例 5  |            | 90                      |             |                     |             |         |             |                           |                    |        | 10                   |
| 参考例 6  |            | 80                      |             |                     |             |         |             |                           | 20                 | 0.0465 |                      |
| 参考例 7  |            | 70                      |             |                     |             |         |             |                           |                    |        | 30                   |
| 参考例 8  |            | 95                      |             |                     |             |         |             |                           | 5                  | 0.0632 |                      |
| 参考例 9  |            | 85                      |             |                     |             |         |             |                           |                    |        | 15                   |
| 参考例 10 |            | 75                      |             |                     |             |         |             |                           | 25                 | 0.0162 |                      |

[0145] 产业实用性

[0146] 根据本发明,可以提供批次差少的纯化血清白蛋白、及使用了该纯化血清白蛋白

的反应性高、非特异性反应少的免疫学测定方法。

#### 附图说明

[0147] 图 1 是将表 5 的结果以混入 BSA 比率为横轴、以吸光度变化量为纵轴制作的图。

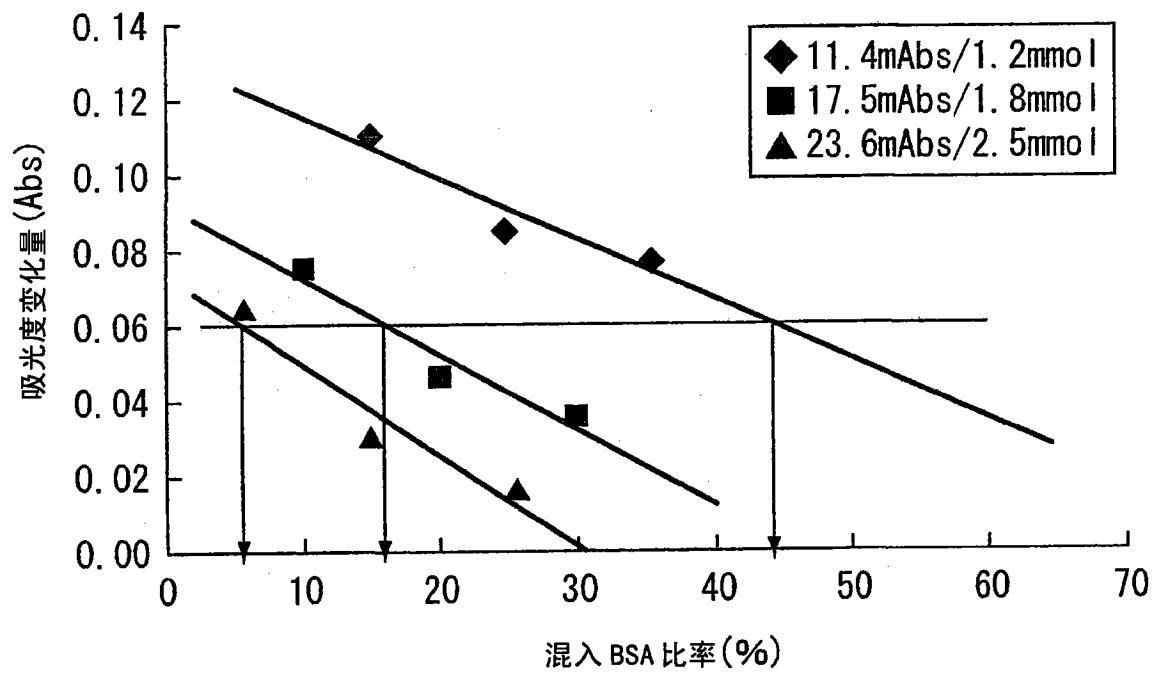


图 1

