



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102405412 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 14

(21) 申请号 200980125714. 2

(22) 申请日 2009. 07. 03

(30) 优先权数据

2008-175816 2008. 07. 04 JP

2008-175817 2008. 07. 04 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 12. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/003097 2009. 07. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/001619 JA 2010. 01. 07

(83) 生物保藏信息

FERM BP-3755 1991. 03. 20

(73) 专利权人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 山本光章 铃木明子

(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 苗堃 赵曦

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 2007-114129 A, 2007. 05. 10,

JP 10-90271 A, 1998. 04. 10,

WO 03107007 2, 2003. 12. 24,

CN 101160317 A, 2008. 04. 09, 全文.

CN 101119958 A, 2008. 02. 06, 全文.

Sang Wook Oh, Jung Dae Moon, Hyo Jin Lim, et al.. Calixarene derivative as a tool for highly sensitive detection and oriented immobilization of proteins in a microarray format through noncovalent molecular interaction. 《The FASEB Journal》. 2005, 第 19 卷 (第 8 期), 1335-1337.

袁泽利, 张奇龙, 朱必学. 新型席夫碱大环化合物的合成. 《有机化学》. 2006, 第 26 卷 (第 11 期), 1590-1593.

谢政, 张炜, 黄鹏程. 芳炔类共轭大环化合物. 《有机化学》. 2002, 第 22 卷 (第 8 期), 543-554.

James J. Christensen, et al.. The Synthesis and Ion Binding of Synthetic Multidentate Macrocyclic Compounds. 《Chemical Reviews》. 1974, 第 74 卷 (第 3 期), 351-384.

审查员 赵晓明

权利要求书1页 说明书16页

(54) 发明名称

免疫学测定的灵敏度增强方法或避免血红蛋白影响的方法

(57) 摘要

本发明提供免疫学测定方法中的增强测定灵敏度的技术以及避免血红蛋白影响的技术。所述免疫学测定中的增强测定灵敏度的方法以及避免血红蛋白影响的方法, 是应用抗原抗体反应测定生物体试样中的测定对象物质的免疫学测定方法, 其特征在于, 在杯芳炔类等大环化合物的存在下进行反应。

CN 102405412 B

1. 一种免疫学测定的避免血红蛋白影响的方法,其是应用抗原抗体反应测定生物体试样中的测定对象物质的胶乳凝集法或金属胶体凝集法,其特征在于,

在大环化合物的存在下进行反应,大环化合物是杯芳烃类,杯芳烃类在反应体系中的最终浓度是 0.005mM ~ 4mM,

避免血红蛋白影响是指避免血红蛋白对免疫学测定的测定值产生影响。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,免疫学测定方法是使用对抗体进行了敏化的不溶性载体的方法。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,测定对象物质是蛋白抗原。

4. 一种免疫学测定用试剂,其是在应用抗原抗体反应测定生物体试样中的测定对象物质的胶乳凝集法或金属胶体凝集法中使用的试剂,其特征在于,

含有以大环化合物为主成分的血红蛋白影响避免剂,大环化合物是杯芳烃类,杯芳烃类在反应体系中的最终浓度是 0.005mM ~ 4mM,

血红蛋白影响避免剂是避免血红蛋白对免疫学测定的测定值产生影响的试剂。

5. 如权利要求 4 所述的免疫学测定用试剂,其中,免疫学测定方法是使用对抗体进行了敏化的不溶性载体的方法。

免疫学测定的灵敏度增强方法或避免血红蛋白影响的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学测定的灵敏度增强方法或避免血红蛋白影响的方法以及用于这些方法的试剂。

背景技术

[0002] 近年,为了测定生物体试样中的微量物质,广泛应用了利用免疫反应的测定方法。作为免疫学测定方法,有 RIA 法、EIA 法、免疫比浊法、胶乳凝集法、金属胶体凝集法、免疫色谱法等多种方法。其中,胶乳凝集法、金属胶体凝集法因为不进行反应液的分离、清洗,所以适合于自动化而被通用。对于免疫学测定,通常,根据测定的生物体试样中的被测定物质浓度而采用不同方法。胶乳凝集法、金属胶体凝集法与免疫比浊法相比,能够进行微量物质的测定,但是不能够如 RIA 法、EIA 法那样进行微量物质的测定。对于任何免疫学测定方法都希望反应体系的微量化、测定时间的缩短,所以使测定灵敏度增强是重要的课题。

[0003] 作为增强测定灵敏度的技术,已知有将聚乙二醇或葡聚糖等水溶性多糖类添加到反应体系中的技术(专利文献 1 和 2)。但是,这些添加剂因为有分子量分布、不是单一化合物,所以存在得不到稳定的灵敏度增强效果等缺点。

[0004] 另外,对于任何免疫学测定方法都存在如下问题,即,除目的抗原抗体反应以外,由于与试样中的各种夹杂物质发生非特异反应而发生凝集、吸附,测定精度下降。尤其是使用血浆等来自生物体的试样,当该试样中含有来自红血球的血红蛋白时,有时血红蛋白对免疫学测定的测定值产生影响。但是,溶血的程度随检测物而不同,所以不能得到正确的测定值,因此需要谋求避免其影响的方法。

[0005] 以往,作为避免血红蛋白的影响的方法,提出了添加表面活性剂的方法(专利文献 3)等。但是,在免疫学测定方法中,添加表面活性剂的方法存在测定灵敏度下降、不能精度良好地测定对象物质的问题。

[0006] 另外,专利文献 4 中记载了,在使用抗人 CRP 兔血清对人血清中的 CRP 进行免疫学测定的方法中,通过添加多元酚,可以抑制因补体成分所致的非特异反应,作为具体例,记载了通过添加 5mM 硫酸杯 [6] 芳烃能够抑制因补体等所导致的非特异反应。但是,在该专利文献 4 中,仅记载了将人血清作为试样、使用抗人 CRP 兔血清测定 CRP 时杯芳烃类对补体影响的作用,但是对于杯芳烃类对灵敏度起怎样的作用、还有对血红蛋白影响的效果完全没有记载。而且,对于使用对抗原的抗体、或抗体的抗原进行了敏化的不溶性载体(例如胶乳粒子)测定作为测定对象的该抗原或该抗体的方法,没有任何记载。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献 1 :日本特开昭 58-047256 号公报

[0010] 专利文献 2 :日本特开昭 59-220646 号公报

[0011] 专利文献 3 :日本特开昭 60-168050 号公报

[0012] 专利文献 4 :日本特开 2000-329764 号公报

发明内容

[0013] 本发明的课题在于提供对测定对象进行免疫学测定中的灵敏度增强方法以及灵敏度得到增强的免疫学测定用试剂。

[0014] 另外,本发明的课题在于提供在使用免疫学测定法测定血浆等来自生物体的试样中的测定对象物质的体系中避免血红蛋白影响的方法。

[0015] 因此,本发明人等对免疫反应中的增强测定灵敏度的方法进行了研究,结果完全意外地发现了,在反应体系中添加杯芳烃类等大环化合物时,如果反应体系中的最终浓度为 5mM 则空白试剂值变得异常,尽管没有观察到测定对象物质的浓度依赖性的测定灵敏度增强,但是当反应体系中的最终浓度为 0.005 ~ 4mM 这样的低浓度时,观察到测定灵敏度的增强,因此即使使用测定对象物质浓度是低浓度的试样,也能够正确地进行测定。另外发现了,当向反应体系中添加大环化合物时,可以避免试样中的血红蛋白的影响,即使测定对象物质浓度是低浓度也能够正确地测定。

[0016] 即,本发明提供一种免疫学测定的灵敏度增强方法或避免血红蛋白影响的方法,其是应用抗原抗体反应测定生物体试样中的测定对象物质的免疫学测定方法,其特征在于,在大环化合物的存在下进行反应。

[0017] 另外,本发明提供一种免疫学测定用试剂,其在应用抗原抗体反应测定试样中的测定对象物质的免疫学测定方法中使用,其特征在于,含有以大环化合物为主成分的灵敏度增强剂或血红蛋白影响避免剂。

[0018] 依照本发明的方法,因为增强了测定对象物质的测定灵敏度,所以即使使用测定对象物质浓度低的试样也可以进行正确的测定。另外,依照本发明的免疫学测定方法,因为可以避免来自生物体的试样中的血红蛋白的影响,所以即使该试样含有血红蛋白,也可以进行正确的测定。另外,因为上述大环化合物(例如杯芳烃类或环糊精等)可以以单一化合物而获得,所以可得到没有批间差异的、稳定的测定精度提高效果。

具体实施方式

[0019] 本发明的方法中的试样,优选生物体试样,特别优选可能存在红血球或来自红血球的血红蛋白的来自生物体的试样。例如,可举出脊髓液、泪液、组织液、血液、血浆、以及血清等。其中,来自血液的试样,即血液、血浆、以及血清等,大多含有血红蛋白,特别有用。

[0020] 在本发明中,作为免疫学测定方法,只要是应用测定对象物质和能够与该对象物质发生抗原抗体反应的物质的抗原抗体反应的免疫学测定方法就没有特别限制。例如,可举出免疫扩散法(SRID法)、免疫比浊法、红血球凝集法、胶乳凝集法或金属胶体凝集法、RIA法、EIA法。其中,胶乳凝集法或金属胶体凝集法,测定灵敏度高、适合于通用的自动分析装置等、也适合自动化,因此优选。特别地,更优选使用对抗体进行了敏化的不溶性载体的方法。

[0021] 作为该不溶性载体,可举出有机高分子粒子、无机物质粒子、红血球等。作为有机高分子粒子,可举出不溶性琼脂糖、纤维素、不溶性葡聚糖等粒子,优选胶乳粒子。作为该胶乳粒子,例如可举出聚苯乙烯、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、苯乙烯-(甲基)丙烯酸缩水甘油酯共聚物、苯乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物、甲基丙烯酸聚合物、丙烯酸聚合物、丙烯腈

丁二烯苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物、聚乙酸乙烯酯丙烯酸酯等粒子。另外,也可以根据需要使用各种改性胶乳(例如,羧酸改性胶乳)等。使用的胶乳粒子的平均粒径,通过测定机器等适当选择 $0.05 \sim 0.50 \mu\text{m}$ 。作为无机物质粒子可举出二氧化硅、氧化铝等。

[0022] 作为本发明的方法中的测定对象物质,只要是免疫学测定方法中测定的物质则没有特别限定,可举出各种物质,例如抗原、半抗原、抗体、激素、药物等。其中,优选将抗原作为测定对象物质,更优选蛋白抗原。具体地说,例如可举出CRP、纤维蛋白和纤维蛋白原分解物、D二聚体、可溶性纤维蛋白(SF)、脂蛋白(a)(Lp(a))、基质金属蛋白酶3(MMP-3)、前列腺特异抗原(PSA)、IgG、IgA、IgM、IgE、IgD、抗链球菌溶血素O、类风湿因子、转铁蛋白、结合珠蛋白、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白、 $\alpha 2$ -巨球蛋白、血液结合素、抗凝血酶-III、 α -甲胎蛋白、CEA(癌胚抗原)、铁蛋白、HBs-Ag(B型肝炎表面抗原)、Anti-HBs(抗B型肝炎表面抗体)、HBe-Ag(B型肝炎e抗原)、Anti-HBe(抗B型肝炎e抗体)、Anti-HBc(抗B型肝炎核心抗体)等。其中,优选CRP、纤维蛋白和纤维蛋白原分解物、D二聚体、SF、Lp(a)、MMP-3、PSA等。但是,并不限定于这些。

[0023] 作为能和上述测定对象物质发生抗原抗体反应的物质(以下,称作免疫反应物质),当测定对象物质是抗原或半抗原等时,则使用其抗体,当测定对象物是抗体时,则使用其抗原。作为免疫反应物质的抗原和抗体可以通过惯用方法制备。另外,抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体中的任何一种,另外,也可以是Fab片段、F(ab')₂片段等。

[0024] 本发明所使用的大环化合物是能够在其分子内孔嵌入金属离子或无机物、有机物等的功能分子。作为该大环化合物,没有特别限定,可以使用各种物质。例如可使用杯芳烃类、环糊精、冠醚等。另外,也可以使用它们的衍生物或修饰物。其中,优选具有容易包合疏水性分子的空孔、具有至少4残基的亲水性官能团的物质。作为该亲水性官能团,可举出羟基、羧基、磺酸基等。作为特别优选的该大环化合物,例如可举出杯芳烃类、环糊精等。

[0025] 杯芳烃类是以苯酚为基本骨架,用亚甲基将3~20分子、优选4~8分子的苯酚聚合成环状的环状低聚物。作为杯芳烃类没有特别限制,可以使用各种物质。例如,可举出杯[4]芳烃、杯[6]芳烃、杯[8]芳烃、杯[4]芳烃磺酸、杯[6]芳烃磺酸、杯[8]芳烃磺酸、杯[4]芳烃乙酸、杯[6]芳烃乙酸、杯[8]芳烃乙酸、杯[4]芳烃羧酸、杯[6]芳烃羧酸、杯[8]芳烃羧酸、杯[4]芳烃胺、杯[6]芳烃胺、杯[8]芳烃胺、它们的盐等。其中,优选杯[6]芳烃磺酸、杯[8]芳烃磺酸、它们的盐。应予说明,杯[6]芳烃对磺酸六钠盐水合物或者杯[8]芳烃对磺酸八钠盐水合物可以使用同仁化学研究所市售的产品等,从容易获得这点看可以优选使用。另外,也可使用以间苯二酚为基本骨架的间苯二酚芳烃、以连苯三酚为基本骨架的连苯三酚芳烃、以吡咯为基本骨架的杯吡咯等。这些杯芳烃类也可以并用2种以上。反应体系中的杯芳烃类的浓度,调整到以最终浓度计优选 $0.005 \sim 4\text{mM}$ 、更优选 $0.005 \sim 3\text{mM}$ 、进一步优选 $0.005 \sim 2.5\text{mM}$ 、特别优选 $0.01 \sim 2\text{mM}$ 来使用。

[0026] 环糊精是多分子的D-葡萄糖通过 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键结合而形成环状结构的环状寡糖的一种,已知有5个以上葡萄糖结合形成的物质。通常使用6到8个葡萄糖结合形成的物质,6个结合形成的物质是 α -环糊精(环己烷直链淀粉)、7个结合形成的物质是 β -环糊精(环庚烷直链淀粉)、8个结合形成的物质是 γ -环糊精(环辛烷直链淀粉),但并不限定于这些。例如,也可以利用上述的各种糊精的修饰物等,可使用环糊精的羟基的氢原子被各种取代基取代而成的环糊精或它们的盐。例如,可举出被烷基取代的烷基化环糊精、被酰

基取代的酰基化环糊精、被羧基烷基取代的羧基烷基化环糊精、被羟基烷基取代的羟基烷基化环糊精、被磺烷基取代的磺烷基化环糊精、或它们的盐。另外,还可举出环糊精的羟基和各种酸进行了酯键结合的环糊精或它们的盐,例如环糊精硫酸酯或它们的盐(钠盐也称作硫酸环糊精)、环糊精磷酸酯或它们的盐等。另外,可举出构成环糊精的葡萄糖的6位羟基和葡萄糖、麦芽糖等糖的羟基脱水缩合而成的分支状环糊精等。

[0027] 这些环糊精之中,可优选使用 β -环糊精。

[0028] 反应体系中的环糊精的浓度优选是1~400mM、特别优选是1~100mM。

[0029] 上述的大环化合物中,优选将杯芳烃类作为主成分。特别是作为测定的灵敏度增强剂使用时,优选使杯芳烃类在反应体系中的最终浓度为0.005~4mM、进一步为0.005~3mM、特别是0.005~2.5mM。另外,作为血红蛋白影响避免剂使用时,优选使杯芳烃类在反应体系中的最终浓度为0.005~3mM、进一步为0.01~2mM。

[0030] 应予说明,在反应体系中,根据需要可以添加聚乙二醇、葡聚糖、明胶、氯化钠、EDTA等惯用的添加剂。

[0031] 上述大环化合物,只要是存在于抗原抗体反应体系中即可,可以在抗原抗体反应前添加到试样中,也可以添加到含有免疫反应物质的试剂中。另外,也可以添加到反应时使用的缓冲液中。

[0032] 吸光度的测定可以用终点法、速率分析法中的任何一种进行。应予说明,本发明的方法并不限于上述方法,可以根据使用的免疫学测定方法进行适当变更后实施,使用的缓冲液、测定条件等也可以适当变更。

[0033] 本发明的方法中使用的试剂是上述方法所使用的试剂,该试剂通过含有以上述大环化合物为主成分的测定灵敏度增强剂或血红蛋白影响避免剂而形成。上述的试剂可以根据免疫学测定方法的种类进行适当设定,另外也可以是由多种构成试剂形成的试剂盒,此时只要是构成试剂中的至少1种含有上述大环化合物即可。

[0034] 作为本发明的免疫学测定方法中的pH,在4.5~9.5,优选在5.5~8.5的范围。为了维持pH,优选使用适当的缓冲剂,例如磷酸缓冲液、TRIS盐酸缓冲液、琥珀酸缓冲液、甘氨酸缓冲液或甘氨酸甘氨酸、MES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)、HEPES(N-2-羟基乙基-哌嗪-N'-乙磺酸)、TES(N-三(羟基甲基)甲基-2-氨基乙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉基)丙磺酸)、PIPES(哌嗪-1,4-二(2-乙磺酸))、DIPSO(3-(N,N'-二(2-羟基乙基)氨基)-2-羟基丙磺酸)、Tricine(三(羟基甲基)甲基甘氨酸)、TAPS(N-三(羟基甲基)甲基-3-氨基丙磺酸)等优良缓冲液。使用浓度是1~500mM、优选是3~300mM。

[0035] 本发明的免疫反应液中也可以含有叠氮化钠、动物血清、 γ -球蛋白或对人IgG或IgM的特异抗体、白蛋白、氯化钠及其它无机盐类、糖类、氨基酸类、EDTA等螯合剂、DTT等SH试剂及表面活性剂等。作为叠氮化钠的浓度,是0.01~1%、优选是0.03~0.3%。动物血清、 γ -球蛋白或特异抗体及白蛋白可使用来自牛、马、猪、羊、兔、人、大鼠等的物质,也可选择它们的改性物或分解物,添加浓度也可以适当选择。氯化钠优选在生理食盐浓度附近。对于其它物质,使用浓度也可以适当选择。

[0036] 实施例

[0037] 以下,根据实施例对本发明作进一步详细说明,但本发明不限于这些实施例。

[0038] 实施例1(可溶性纤维蛋白(SF)的测定)

[0039] (1) 第一试剂的制备

[0040] 将杯 [8] 芳烃对磺酸八钠盐水合物或杯 [6] 芳烃对磺酸六钠盐水合物 (同仁化学研究所公司制) 以 0.01 ~ 10mM (反应体系中的最终浓度为 0.005 ~ 5mM) 的浓度添加到含有 0.4% 牛血清白蛋白以及 0.5M 氯化钠的 30mM TRIS 盐酸缓冲液 (pH8.5) 中制成第一试剂。应予说明, 作为比较例, 使用不含杯芳烃类的第一试剂。

[0041] (2) 第二试剂 (抗可溶性纤维蛋白 (SF) 抗体固定化粒子悬浮液) 的制备

[0042] 将用 20mM TRIS 盐酸缓冲液 (pH7.5) 将抗 SF 单克隆抗体稀释到 0.7mg/mL 从而形成的抗液体、与平均粒径 0.2 μ m 的聚苯乙烯系胶乳 (SEKISUI MEDICAL 公司制) 1% 悬浮液等量地混合, 在 4°C 搅拌 2 小时。进一步等量添加 1% 牛血清白蛋白、搅拌 1 小时后, 通过离心分离收集沉淀部分, 用含有 0.5% 牛血清白蛋白的 5mM MOPS (pH7) 将其悬浮, 制备成第二试剂 (抗 SF 抗体固定化粒子悬浮液)。

[0043] (3) 试样

[0044] 将使凝血酶与精制的纤维蛋白原作用从而制备的酸可溶性 desAABB 纤维蛋白, 按照各自最终浓度 10.3 μ g/mL 添加到人柠檬酸血浆中, 从而制备成可溶性纤维蛋白。应予说明, 空白试剂的测定使用生理盐水。

[0045] (4) 测定

[0046] 在 3 μ L 试样中加入第一试剂 100 μ L, 在 37°C 加温 5 分钟后, 测定在加入第二试剂 100 μ L 搅拌后 1 ~ 5 分钟的主波长 570nm 以及副波长 800nm 处的吸光度变化量。将得到的吸光度值示于表 1 和表 2。

[0047] [表 1]

[0048]

添加剂	比较例	杯 [8] 芳烃对磷酸入钠盐水合物																				
		10mM 5mM	8mM 4mM	6mM 3mM	4mM 2mM	2mM 1mM	1mM 0.5mM	1mM 0.1mM	0.2mM 0.1mM	0.1mM 0.05mM	0.02mM 0.01mM	0.01mM 0.005mM										
第一试剂中的浓度	-																					
反应液中的浓度	-																					
空白试剂	-3.8	198.9	8.1	-5.7	-4.9	-5.9	-3.7	-4.2	-6.0	-2.8	-4.0											
SF浓度 0.0 μg/mL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0											
SF浓度 10.3 μg/mL	28.4	24.7	301.7	392.0	156.1	89.0	72.8	89.3	80.2	36.1	33.3											

(mAbs)

[0049] [表 2]

[0050]

[0054] [表 3]

[0055]

添加剂	比较例	杯 [8] 芳烃对磷酸八钠盐水合物													
		10mM	4mM	2mM	1mM	0.2mM	0.1mM	0.02mM	0.01mM	0.005mM					
第一试剂中的浓度	-														
反应液中的浓度	-														
SF 浓度 0.0 μg/mL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SF 浓度 10.3 μg/mL	28.4	24.7	156.1	89.0	72.8	89.3	80.2	36.1	33.3						
SF 浓度 20.1 μg/mL	56.4	25.7	160.0	101.4	84.9	106.7	103.2	63.0	62.2						

(mAbs)

[0056] [表 4]

[0057]

[0062] (2) 第二试剂 (抗 Lp(a) 抗体固定化粒子悬浮液) 的制备

[0063] 等量添加以 1.4mg/mL 的浓度将单克隆抗体 [由在平成 3 年 3 月 20 日保藏在通商产业省工业技术院微生物工业技术研究所的杂交瘤 28205 (FERM BP-3755) 生产的抗体。以下称作“抗 Lp(a) 单克隆抗体”] 混合至 0.05M 甘氨酸缓冲液 (pH9) 中而成的液体、和平均粒径 0.1 μm 的聚苯乙烯系胶乳 (SEKISUI MEDICAL 公司制) 5% 悬浮液, 在 4°C 搅拌 2 小时, 所述单克隆抗体是以精制人 apo(a) 作为免疫原、通过常规方法从小鼠获得的、通过使用单一种类而使免疫凝集发生的单克隆抗体。通过离心分离除去上清液后, 向沉淀部分加入含 2% 牛血清白蛋白的 0.05M 甘氨酸缓冲液 (pH9), 在 4°C 搅拌过夜。通过离心分离收集沉淀部分, 用含有 2% 牛血清白蛋白的 0.05M 甘氨酸缓冲液 (pH9) 将其悬浮, 制备出抗 Lp(a) 抗体固定化粒子悬浮液。

[0064] (3) 试样

[0065] 使用 Lp(a) 浓度已知的血清。

[0066] (4) Lp(a) 的测定

[0067] 向含有 Lp(a) 的试样液 2.5 μL 中加入第一试剂 100 μL , 在 37°C 加温 5 分钟后, 测定加入第二试剂 100 μL 搅拌后 1 ~ 5 分钟的主波长 570nm 以及副波长 800nm 处的吸光度变化量。将得到的吸光度与 Lp(a) 浓度的关系示于表 5 和 6 中。

[0068] [表 5]

[0069]

添加剂	比较例	杯[8]芳烃对磷酸八钠盐水合物											
		5mM	4mM	3mM	2mM	1mM	0.5mM	0.1mM	0.01mM				
第一试剂中的浓度	-												
反应液中的浓度	-	2.5mM	2mM	1.5mM	1mM	0.5mM	0.05mM	0.005mM					
生理盐水	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lp(a) 浓度 17.5 mg/dL	38.8	44.7	45.1	45.2	44.9	42.7	43.0	39.1					
Lp(a) 浓度 47.1 mg/dL	140.2	159.0	161.8	161.1	163.0	160.5	156.7	142.9					
Lp(a) 浓度 112.5 mg/dL	302.4	369.8	368.8	368.9	369.2	358.0	342.6	311.4					

(mAbs)

[0070] [表 6]

[0071]

添加剂	比较例	杯[6]芳烃对磺酸六钠盐水合物										(mAbs)		
		5mM	4mM	3mM	2mM	1mM	0.5mM	1mM	0.1mM	0.01mM				
第一试剂中的浓度	-													
反应液中的浓度	-	2.5mM	2mM	1.5mM	1mM	0.5mM	1mM	0.05mM	0.005mM					
生理盐水	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lp(a) 浓度 17.5 mg/dL	38.8	48.0	47.2	48.0	48.2	47.6	48.2	43.5	39.9					
Lp(a) 浓度 47.1 mg/dL	140.2	172.1	170.8	172.0	173.5	174.1	173.5	157.6	144.5					
Lp(a) 浓度 112.5 mg/dL	302.4	408.3	409.5	414.7	421.6	406.0	421.6	342.0	318.0					

[0072] 由表 5 和 6 可知,当以反应体系中的最终浓度为 0.005 ~ 2.5mM 的方式添加杯芳烃类时, Lp(a) 的测定灵敏度上升。

[0073] 实施例 4(可溶性纤维蛋白(SF)的测定)

[0074] (1) 第一试剂的制备

[0075] 将 0.01 ~ 6mM(反应体系最终浓度为 0.005 ~ 3mM)的杯[6]芳烃对磺酸六钠盐水合物(同仁化学研究所公司制),以及含有 0.4%牛血清白蛋白、0.5M 氯化钠的 30mM TRIS 盐酸缓冲液(pH8.5)作为第一试剂。应予说明,作为比较例,使用不含杯芳烃类的第一试剂。

[0076] (2) 第二试剂(抗可溶性纤维蛋白(SF)抗体固定化粒子悬浮液)的制备

[0077] 将用 20mM TRIS 盐酸缓冲液(pH7.5)将抗 SF 单克隆抗体稀释成 0.7mg/mL 而得的抗液体、与平均粒径 0.2 μm 的聚苯乙烯系胶乳(SEKISUI MEDICAL 公司制)1%悬浮液等量

混合,在 4℃ 搅拌 2 小时。进一步等量添加 1% 牛血清白蛋白,搅拌 1 小时后,通过离心分离收集沉淀部分,用含有 0.5% 牛血清白蛋白的 5mM MOPS (pH7) 将其悬浮,制备出第二试剂 (抗 SF 抗体固定化粒子悬浮液)。

[0078] (3) 试样

[0079] 作为血红蛋白试样,使用干扰物 (Interference check A plus, Sysmex 公司制) 的溶血血红蛋白,制备成血红蛋白浓度为 0 ~ 500mg/dL 的试样。

[0080] (4) 测定

[0081] 向试样 3 μ L 中加入第一试剂 100 μ L,在 37℃ 加温 5 分钟后,测定加入第二试剂 100 μ L 搅拌后 1 ~ 5 分钟的主波长 570nm 以及副波长 800nm 处的吸光度变化量。将得到的吸光度的测定结果示于表 7。

[0082] [表 7]

[0083]

添加剂	比较例	杯 [6] 芳烃对磺酸六钠盐水合物														
		6mM	4mM	2mM	1mM	0.2mM	0.1mM	0.05mM	0.02mM	0.01mM	0.005mM	0.01mM				
第一试剂中的浓度	-															
反应液中的浓度	-	3mM	2mM	1mM	0.5mM	0.1mM	0.05mM	0.01mM	0.01mM	0.01mM	0.01mM	0.01mM	0.01mM	0.01mM	0.01mM	0.005mM
血红蛋白 0mg/dL	0.8	-1.5	1.9	-1.0	-3.1	-3.0	-3.9	-3.0	-3.0	-3.0	-3.0	-3.0	-3.0	-3.0	-3.0	-3.0
血红蛋白 100mg/dL	2.8	-0.6	4.8	-4.7	-0.2	0.1	-1.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
血红蛋白 200mg/dL	6.8	-2.5	5.0	1.4	1.3	3.9	1.6	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
血红蛋白 300mg/dL	16.5	0.0	7.0	-1.4	2.1	2.7	3.0	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
血红蛋白 400mg/dL	25.8	4.6	5.9	-2.4	1.3	5.7	6.0	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
血红蛋白 500mg/dL	32.0	0.7	1.5	2.8	1.8	6.0	10.5	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

(mAbs)

[0084] 由表 7 可知,作为大环化合物添加杯 [6] 芳烃时,在所研究的反应体系最终浓度为 0.005 ~ 3mM 的范围内,血红蛋白对吸光度测定值的影响被抑制。

[0085] 实施例 5(可溶性纤维蛋白(SF)的测定)

[0086] 除代替实施例 4 的杯 [6] 芳烃对磺酸六钠盐水合物,在第一试剂中以 0.01 ~ 4mM(反应体系最终浓度为 0.005 ~ 2mM)使用杯 [8] 芳烃对磺酸八钠盐水合物(同仁化学研究所社制)以外,与实施例 4 同样地进行测定。将得到的吸光度的测定结果示于表 8。

[0087] [表 8]

[0088]

添加剂	比较例	杯 [8] 芳烃对磷酸八钠盐水合物											
		4mM 2mM	2mM 1mM	1mM 0.5mM	0.2mM 0.1mM	0.1mM 0.05mM	0.02mM 0.01mM	0.01mM 0.005mM					
第一试剂中的浓度	-												
反应液中的浓度	-												
血红蛋白 0mg/dL	0.8	0.5	2.4	-1.7	-3.2	-1.3	0.2	0.1					
血红蛋白 100mg/dL	2.8	0.5	1.8	-1.9	-0.1	0.1	2.3	5.8					
血红蛋白 200mg/dL	6.8	1.1	1.3	-0.8	0.4	2.5	2.2	6.5					
血红蛋白 300mg/dL	16.5	3.8	2.3	-3.6	-0.7	-0.5	5.4	10.1					
血红蛋白 400mg/dL	25.8	7.4	0.5	0.3	1.5	-1.7	8.8	18.4					
血红蛋白 500mg/dL	32.0	10.6	8.1	0.5	1.0	2.6	12.7	23.8					

(mAbs)

[0089] 从表 8 可知,作为大环化合物添加杯 [8] 芳烃时,在所研究的反应体系最终浓度为 0.005 ~ 2mM 的范围内,血红蛋白对吸光度测定值的影响被抑制。

[0090] 实施例 6 (可溶性纤维蛋白 (SF) 的测定)

[0091] 除代替实施例 4 的杯 [6] 芳烃对磷酸六钠盐水合物,在第一试剂中以 10mM 或 40mM (反应体系最终浓度为 5 或 20mM) 使用 β -环糊精以外,与实施例 4 同样地进行测定。将得到的吸光度的测定结果示于表 9。

[0092] [表 9]

[0093]

添加剂	比较例	β -环糊精硫酸盐	
第一试剂中的浓度	-	40mM	10mM
反应液中的浓度	-	20mM	5mM
血红蛋白 0mg/dL	0.8	2.9	1.0
血红蛋白 100mg/dL	2.8	4.2	3.5
血红蛋白 200mg/dL	6.8	3.3	4.6
血红蛋白 300mg/dL	16.5	6.7	9.6
血红蛋白 400mg/dL	25.8	8.3	15.9
血红蛋白 500mg/dL	32.0	9.1	20.7

(mAbs)

[0094] 由表 9 可知,作为大环化合物添加 β -环糊精时,在所研究的反应体系最终浓度为 5 ~ 20mM 的范围内,血红蛋白对吸光度测定值的影响被抑制。

