



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03107250. X

[43] 公开日 2004 年 3 月 17 日

[11] 公开号 CN 1482460A

[22] 申请日 2003.3.19 [21] 申请号 03107250. X

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 19 [33] JP [31] 2002 - 077324

[71] 申请人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 重藤修行

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

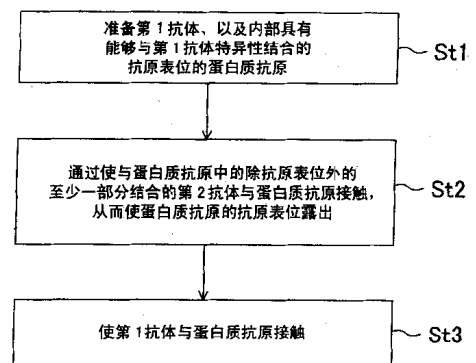
代理人 汪惠民

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 7 页

[54] 发明名称 免疫学的测定方法、所用试验片以及免疫学的测定装置

### [57] 摘要

一种免疫学的测定方法，测定蛋白质抗原，包括：准备第 1 抗体、和内部具有能够与第 1 抗体特异性结合的抗原表位的工序 (a)；通过使与上述蛋白质抗原中的除所述抗原表位以外的至少一部分结合的第 2 抗体与上述蛋白质抗原接触，从而使上述蛋白质抗原的所述抗原表位露出的工序 (b)；以及在上述工序 (b) 后，使上述第 1 抗体与上述蛋白质抗原接触的工序 (c)。



1. 一种免疫学的测定方法，测定蛋白质抗原，其中，包括：
  - 5 准备第1抗体、和内部具有能够与所述第1抗体特异性结合的抗原表位的工序 (a)；

通过使与所述蛋白质抗原中的除所述抗原表位以外的至少一部分结合的第2抗体与所述蛋白质抗原接触，从而使所述蛋白质抗原的所述抗原表位露出的工序 (b)；以及
  - 10 在所述工序 (b) 后，使所述第1抗体与所述蛋白质抗原接触的工序 (c)。
  2. 根据权利要求1所述的免疫学测定方法，其中，所述第2抗体为单克隆抗体。
  3. 根据权利要求1所述的免疫学测定方法，其中，所述第1抗体固定在  
15 固体支持体上。
  4. 根据权利要求3所述的免疫学测定方法，其中，所述固体支持体，为微量滴定板。
  5. 根据权利要求3所述的免疫学测定方法，其中，所述固体支持体，为试片。
  - 20 6. 根据权利要求1所述的免疫学测定方法，其中，所述蛋白质抗原，为血红蛋白Alc。
  7. 一种试验片，用于对蛋白质抗原的免疫学测定，其中，设置：

基材；  
设置于所述基材上的、对能够与位于蛋白质抗原内部的抗原表位结  
25 合的第1抗体进行固定的抗体固定部；  
在所述基材上从所述抗体固定部间隔设置的试样滴下区域；  
在所述基材上位于所述抗体固定部和试样滴下部区域之间并且从所述抗体固定部间隔设置的、浸渍与所述蛋白质抗原中除所述抗原表位外的至少一部分结合的第2抗体的赋予冲击部。
  - 30 8. 一种免疫学测定装置，其中，引入设置有

基材；

设置于所述基材上的、对能够与位于蛋白质抗原内部的抗原表位结合的第1抗体进行固定的抗体固定部；

在所述基材上从所述抗体固定部间隔设置的试样滴下区域；

- 5 在所述基材上位于所述抗体固定部和试样滴下部区域之间并且从所述抗体固定部间隔设置的、浸渍与所述蛋白质抗原中除所述抗原表位外的至少一部分结合的第2抗体的赋予冲击部的试验片，

其特征在于，还设置：在所述试样滴下区域滴下试样的试样滴下部；  
对所述抗体固定部进行光学测定的光学测定部。

## 免疫学的测定方法、所用试验片以及免疫学的测定装置

5

## 技术领域

本发明涉及一种测定抗原尤其是蛋白质抗原的免疫学的测定方法。

## 背景技术

10 抗原抗体反应是指抗体与抗原的特征结构部位（抗原表位）结合的反应。在蛋白质抗原中，所述特征的结构部位（抗原表位），一般由3~4个氨基酸残基构成。识别蛋白质抗原中的任意的3~4个残基的氨基酸序列和立体结构的抗体，对于该蛋白质抗原是特异的。所以，只要不混入氨基酸序列和立体结构完全相同的杂质，抗体就不会发生错误反应。通常，这类错误反应是不可能发生的。通常，抗体，在多数情况下只要识别蛋白质抗原中的任意氨基酸序列和立体结构就可以。

但是，若确实须要识别很小结构差异时，有时对于识别抗原的任意部位的抗体就不起作用。例如，在免疫学测定作为糖蛋白之一的血红蛋白Alc（以下成为HbAlc）时，抗HbAlc抗体，就必须能够识别HbAlc和同时存在的作为非糖蛋白的血红蛋白AO（以下简称为HbAO）之间的差异。但是，该两者的差异仅在于氨基酸β链的N末端上是否结合了果糖。所以，抗HbAlc抗体，必须是结合在含有果糖的氨基酸β链的N末端上的物质。即，对于抗HbAlc抗体的抗原表位，必须是含有HbAlc的果糖的氨基酸β链的N末端部位。作为制备该类抗体的方法，一般是使用在载体蛋白上人为地结合所需抗原表位的人工免疫原。通过该种方式得到的抗体，能够可靠地识别所需的抗原表位。但是，实际上，像HbAlc那样，所需的抗原表位多被埋在蛋白质抗原的内部。所以，只是简单地混合蛋白质抗原和抗体，是不会发生抗原抗体反应的。

25 所以，在以往，为了使埋入蛋白质抗原内部的所需抗原表位露出，而使蛋白质抗原热变性。例如，特公平7-23891号公报，公开了通过使

蛋白质抗原热变性而使所需抗原表位露出并作为试样用于测定的方法。

但是，热变性，作为使蛋白质抗原的所需抗原表位露出的方法是有效的，但控制困难，必须预先进行温度、时间等最适条件的探索作业。另外，根据溶解蛋白质抗原的冲击液的组成不同，其最适条件有可能发生变化。所以，以往的蛋白质抗原的免疫学的测定方法，从整体上来看是非常烦琐的。

### 发明内容

本发明是鉴于所述事情而完成，其目的在于提供一种测定精度和便利性良好的免疫学的测定方法。

本发明的免疫学的测定方法，是测定蛋白质抗原的免疫学测定方法，包括：准备第1抗体、和内部具有能够与所述第1抗体特异性结合的抗原表位的蛋白质抗原的工艺（a）；通过使与所述蛋白质抗原中的除去所述抗原表位的至少一部分结合的第2抗体与所述蛋白质抗原接触，使所述蛋白质抗原的所述抗原表位露出的工艺（b）；以及在工艺（b）之后，使所述第1抗体与所述蛋白质抗原接触的工艺（c）。

根据本发明，能够高精度或简便迅速地测定抗原表位埋入内部的蛋白质。另外，在测定蛋白质抗原的量的同时，还能够测定与第2抗体结合的蛋白质的总量。

所述第2抗体优选为单克隆抗体。

由此，在蛋白质抗原中，第2抗体结合的部位就变得均匀。所以，可以使蛋白质抗原内的抗原表位稳定并露出，从而提高蛋白质抗原的测定精度、检测灵敏度和测定结果的重现性。

所述第1抗体可以固定在固体支持体上。

所述固体支持体可以是微量滴定板。

所述固体支持体可以是试验片。

所述蛋白质抗原为血红蛋白A1c。

本发明的试验片，为用于蛋白质抗原免疫学测定的试验片，包括：基材；设置于所述基材上的、使能够与位于蛋白质抗原内部的抗原表位特异性结合的第1抗体固定的固定部；在所述基材上从所述抗体固定部间

隔设置的试样滴下区域；在所述基材上位于所述抗体固定部和试样滴下区域之间并且从所述抗体固定部间隔设置、使与所述蛋白质抗原中的除去所述抗原表位的至少一部分结合的第2抗体浸渍的赋予冲击部。

5 根据本发明，在试样滴下区域滴下含有要测定的蛋白质（即蛋白质抗原）的试样溶液后，一旦展开试样溶液的溶剂，在赋予冲击部，蛋白质抗原，形成标记物质结合并且抗原表位露出的状态。接着，蛋白质抗原，一旦到达抗体固定部，就停留在抗体固定部。所以，通过对抗体固定部进行光学测定（例如，测定吸光度等），可以算出蛋白质抗原的有无和含量等。

10 本发明的另一免疫学的测定装置，是引入该试验片的免疫学测定装置，该试验片包括：基材；试样滴下区域；在所述基材上从所述试样滴下区域间隔设置的、使能够与位于蛋白质抗原内部的抗原表位特异性结合的第1抗体固定的固定部；在所述基材上位于所述抗体固定部和试样滴下区域之间并且从所述抗体固定部间隔设置、使与所述蛋白质抗原中的  
15 除去所述抗原表位的至少一部分结合的第2抗体浸渍的赋予冲击部，该免疫学的测定装置包括：在所述试样滴下区域上滴下试样的试样滴下部、和对所述抗体固定部进行光学测定的光学测定部。

根据本发明，可以利用试验片对抗原表位埋入内部的蛋白质进行自动化的测定。由此，对于进行抗原表位埋入内部的蛋白质的测定的测定者就不需要特别的技术。所以，可以非常方便地对抗原表位埋入内部的  
20 蛋白质进行测定。

#### 附图说明

图1是表示本发明的实施方式1的免疫学测定方法的流程图。

25 图2是表示本发明的试验片的图。

图3是表示本发明的测定装置的图。

图4是表示HbA1c的抗原表位（果糖—VAL—HTS—LEU—THR—CYS）的化学结构的图。

30 图5是表示在抗HbA1c抗体（F3A7）和游离的HbA1c的结合中，用酶免疫测定法进行胍处理的效果图。

图6是表示在抗HbA1c抗体（F3A7）和游离的HbA1c的结合中，用酶免疫测定法添加辅助抗体（HbM4）的效果图。

图7是表示免疫色谱法中所用的测定系统的概要图。

## 5 具体实施方式

本发明涉及一种测定抗原尤其是蛋白质抗原的免疫学的测定方法。更具体地说，本发明是涉及一种由于所需抗原表位埋入内部而不能与抗体反应的蛋白质抗原发生改变使能够有效地和抗体发生反应，并利用由此所得的蛋白质抗原的免疫学测定方法。

### 10 实施方式1

以下边参照图边对本发明的实施方式进行说明。图1是表示本发明实施方式的免疫学测定方法的流程图。

本发明的免疫学测定方法，是测定蛋白质抗原的免疫学测定方法，如图1所示，包括：准备第1抗体、和内部具有能够与第1抗体特异性结合的抗原表位的蛋白质抗原的工序St1；通过使与蛋白质抗原中除抗原表位外的至少一部分结合的第2抗体与蛋白质抗原接触，从而使蛋白质抗原的抗原表位露出的工序St2；以及在工序St2后，使第1抗体与蛋白质抗原接触的工序St3。

以下对各工序进行详细说明。

20 首先，在工序St1中，准备第1抗体、和在第1抗体中作为抗原而被识别的蛋白质（即蛋白质抗原）。这里，蛋白质抗原与第1抗体之间的组合，是测定者要测定的蛋白质（即，目标蛋白质）与识别它的抗体之间的组合，没有特殊限定。具体的说，蛋白质抗原，是所需的任意蛋白质分析物，代表的有：在医学和诊断学领域可以作为测定对象的精蛋白类、粘  
25 蛋白类、糖蛋白类、球蛋白类、白蛋白类、磷蛋白、组蛋白类、脂蛋白类、色蛋白、核蛋白等。

然后，在工序St2中，通过使与蛋白质抗原中除抗原表位外的至少一部分结合的第2抗体（辅助抗体）与蛋白质抗原接触，从而使蛋白质抗原的抗原表位露出。此时所用的第2抗体，使用给予蛋白质抗原冲击的抗体。  
30 另外，本说明书中所用用语（冲击），是指在蛋白质抗原中使立体结构

产生变化的影响。通过使第2抗体与蛋白质抗原接触，由于埋入蛋白质抗原内部的所需抗原表位露出，因此与所需抗原表位特异性结合的抗体能够接近。所以，蛋白质抗原和抗体就能够发生免疫学反应。

第2抗体（辅助抗体），代表性的为单克隆抗体，可以通过本专业技术人员公知的方法，例如，Koehler和Milstein（Nature 256:495 1975）中记载的杂交瘤技术；Kosbor等，1983，Immunol. Today 4:72以及Cote等，1983（Proc.Natl.Acad.sci.USA，80:2026）中记载的人B细胞杂交瘤技术；以及Cole等，MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY，Alan R Liss Inc.，New York，NY，77—96页[1985]中记载的EBV杂交瘤技术等很容易地进行制备。

这里，对所述的单克隆抗体的调整方法进行简单说明。首先，用选择所需的蛋白质抗原，对适当的动物进行免疫。在获得免疫后，取出动物的脾脏，以适当的条件，使脾脏细胞和活的骨髓肿瘤细胞融合。之后，将所得细胞分离为各个克隆株，对于各个克隆株的上清液，进行与蛋白质抗原结合的抗体的产生试验。然后，通过试验能否促进第1抗体与第1抗体结合的抗原表位之间的结合，对辅助抗体进行调整。另外，在获得免疫时，使蛋白质抗原与例如牛血清白蛋白（BSA）、钥孔血蓝素（KLH）等载体结合，确保抗体的产生。该类载体物质的使用，对于本专业人员是已知的。

产生抗体的技术在该领域是众所周知的。例如，Goding等，MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND PRACTICE（第2版）Acad.Press，N.Y.中记载的技术。

第2抗体（辅助抗体），可以在促进第1抗体和第1抗体结合的抗原表位之间的反应中以足够量和蛋白质抗原混合使用。具体地说，为了促进第1抗体和第1抗体结合的抗原表位之间的反应，优选以第2抗体的分子数与蛋白质抗原的分子数的比为1：10~10：1地混合第2抗体和蛋白质抗原。

另外，第2抗体，根据须要可以使用以该领域中公知的方法通过标记的方法标记的物质。作为标记的例子，可以举出酶标记、色素标记、磁性标记、放射性标记、着色的微粒（金胶质、乳胶等）。

另外，在本实施方式中作为给予蛋白质抗原冲击的材料，使用与在蛋白质抗原中除抗原表位之外的至少一部分结合的第2抗体，例如，可以使用在含有蛋白质抗原的溶液中添加二硫苏糖醇和胍等化学试剂、以及酶等蛋白质抗原等的蛋白质的化学方法；或在含有蛋白质抗原的溶液中进行光照射、超音波处理等的物理方法等。

在所述化学方法中，可以使用适当浓度的被称为chaotropic agent的化学试剂。作为chaotropic agent，作为代表的可以使用胍、尿素、十二烷基硫酸钠、去氧螯合物、胆汁酸盐类、有机溶剂（甲醇、丙醇、乙腈等）、硫氰酸钾、非离子表面活性剂、巯基乙醇、二硫苏糖醇等。该类化学试剂，通常在室温下，即，非加热条件下，使与蛋白质抗原接触。该类化学试剂，为使蛋白质抗原中的所需的抗原表位露出，可以使用足够的浓度。例如，在使用胍时，通常，以约1摩尔浓度以上、优选约3摩尔浓度通过蛋白质抗原接触约5分～数小时，使蛋白质抗原中的所需抗原表位露出。

另外，所述化学方法和物理方法，使在蛋白质抗原中立体结构发生很大变化。另外，所述各方法，有时要在蛋白质抗原的最适温度至显著高温条件下进行。所以蛋白质抗原的活性和立体结构有可能发生显著变化。由此，在后述的工序St3中，抗原抗体的反应与在生物体内环境的抗原反应有可能差异很大。

另一方面，使用本实施方式的与蛋白质抗原中的至少除去抗原表位的一部分结合的第2抗体（辅助抗体）的方法，不会使蛋白质抗原发生变性，但在蛋白质抗原中会使立体结构产生很小的变化。另外，该方法，可以在蛋白质抗原的最适温度附近进行。所以使蛋白质立体结构发生变化的可能性很小。由此，在后述工序St3中，抗原抗体反应与在生物体内环境的抗原抗体反应非常近似，所以可以进一步获得反映生物体内环境的测定结果。

然后，在工艺St3中，使第1抗体和蛋白质抗原接触。此时，在所述工序St2中流出的蛋白质抗原的所需抗原表位上，第1抗体结合。

尤其是在本实施方式的免疫学测定方法中，第1抗体固定在固体支持体上。作为固体支持体，例如可以使用由硝基纤维素制膜、醋酸纤维素

制膜、玻璃制纤维滤纸、无纺布等构成的试验片。另外，作为固体支持体，还可以优选使用微量滴定板。作为微量滴定板，可以是由聚苯乙烯制、聚碳酸酯制、聚丙烯制、硅类、玻璃类、葡聚糖类材料构成的微量滴定板。

- 5           本实施方式的免疫学测定方法，在进行所述工序St1~St3后，通过本专业人员公知的免疫测定法，测定蛋白质抗原。例如，作为免疫测定方法，可以使用酶免疫测定法（ELISA）、荧光免疫测定法（FIA）、免疫比浊法、免疫比漏法、或免疫色谱法等。在所述各免疫测定法中，若使用灵敏度优良的酶免疫测定法、或简便性和迅速性优良的免疫色谱法，  
10          可以进一步提高本实施方式的免疫学测定方法的测定灵敏度或便利性。

        根据本实施方式的免疫学测定方法，例如，可以以高精度或简便迅速地对如HbA1c那样的特征的抗原表位埋入内部的蛋白质进行测定。

        另外，作为给予蛋白质抗原冲击的材料，若使用第2抗体上，可以在测定蛋白质抗原的量的同时，测定第2抗体结合的蛋白质的总量。

## 15           实施方式2

        以下，边参照图边对所述实施方式1的免疫学测定方法中所用的试验片和测定装置进行说明。图2是表示在所述实施方式1的免疫学测定方法中所用的试验片的图，图3是表示在所述实施方式1的免疫学测定方法中所用的测定装置的图。

## 20           试验片

        如图2所示，试验片100由基材101构成，包括：抗体固定部102、赋予冲击部103和试样滴下部104。

- 基材101，由浸渍含有要测定的蛋白质（即蛋白质抗原）的试样溶液的溶剂的材料形成，例如，可以由硝基纤维素制膜、醋酸纤维素制膜、  
25          玻璃纤维滤纸、无纺布等形成。

        在抗体固定部102上，固定识别蛋白质抗原的抗体（即所述实施方式1中的第1抗体）。

        在赋予冲击部103中，含浸给予蛋白质抗原冲击的标记物质（例如，在所述实施方式1中以金胶质标记的第2抗体）。

- 30          试样滴下区域104，是含有要测定的蛋白质（即蛋白质抗原）的试样

溶液滴下的领域。

若在试样滴下区域104上滴下含有要测定的蛋白质（即蛋白质抗原）的试样溶液后，试样溶液的溶剂沿着图2所示箭头A的方向展开，在赋予冲击部103中蛋白质抗原，形成被标记的物质结合并且呈抗原表位露出的状态。接着，蛋白质抗原，一旦到达抗体固定部102就停留在抗体固定部102上。所以，通过光学测定（例如测定吸光度等）抗体固定部102，可以算出蛋白质抗原的有无和含量。

在本实施方式的试验片100上，给予蛋白质抗原冲击的标记物质固定在赋予冲击部103上。具体地说，作为赋予蛋白质抗原冲击的标记物质，可以举出所述实施方式1中以金胶质标记的第2抗体，但并不限于此。例如，可以将上述实施方式1所述的chaotropic agent和在蛋白质抗原上结合但不给予冲击的抗体分别固定在赋予冲击部103上。

#### 测定装置

如图3所示，测定装置200，具有：当插入试验片100时，在插入的试验片100的试样滴下区域104上滴下试样溶液的试样滴下部201、对试验片100的抗体固定部102进行光学测定的光学测定部202、在试样滴下部201和光学测定部202上电连接的控制解析部203。

若试验片100插入测定装置200内时，试验片100被运送到试样滴下部201上，并设置在试样滴下部201内。在试样滴下部201上预先设置分别储存试样溶液和试样溶液的溶剂的槽，试验片100设置在试样滴下部201内，若通过控制解析部203检测时，解析控制部203，对于试样滴下部201进行在试样滴下区域104上能够滴下试样溶液地指示。若在试样滴下区域104上滴下试样溶液时，接着由试样滴下部201向试样滴下区域104上滴下试样溶液的溶剂，试样溶液中含有的试样在试验片100上展开。

接着，一旦经过在控制解析部203上设置的固定时间，试验片101被运送至光学测定部202上并设置在光学测定部202内。之后，对试验片100的抗体固定部102进行光学测定。测定所得的数据输送至控制解析部203中并进行演算、解析等。

根据本发明的测定装置200，可以用试验片100使所述实施方式1的免疫学测定方法的各工序自动化。由此，对于测定者，不须要用于实施所

述实施方式1的免疫学测定方法特别技术。所以，可以非常简便地实施所述实施方式1的免疫学测定方法。

### 实施例

以下列举实施例对本发明进行进一步地详细说明。以下的实施例仅以示例的目的提供，并不对本发明进行限定。

另外，在以下实施例中，作为蛋白质抗原用HbA1c，作为第1抗体用抗HbA1c抗体。另外，作为使抗原表位露出的方法，分别使用胍和第2抗体（辅助抗体），作为测定的基本原理，用酶免疫测定法、免疫色谱法。另外，在以下说明的实施例中称第2抗体为“辅助抗体”。

#### 10 抗HbA1c抗体的制备

以对于HbA<sub>0</sub>特征HbA1c的结构作为抗原表位识别的抗HbA1c抗体的单克隆抗体通过以下的方法制备。

##### 1.小鼠的免疫

制备每1分子小鸡 $\gamma$ -球蛋白（CGG）结合31分子的图4所示化学结构的HbA1c抗原表位（果糖-VAL-HIS-LEU-THR-CYS）的CGG偶联物，由此作为人工免疫原对小鼠进行免疫。对生后约八周龄的小鼠（Balb/c）5只分别腹腔注射100 $\mu$ l的制备的人工免疫原（CGG偶联物·辅料混合）。免疫注射后，对于经过77日的小鼠，从眼静脉采集50~100 $\mu$ l的血液至离心管中。对血清进行离心分离，通过ELISA法进行抗体价的评价，结果发现对于全部的小鼠均产生抗HbA1c抗体。另外，在这里ELISA评价中，作为固相抗原使用了每1分子牛血清白蛋白（BSA）结合2分子的图4所示化学结构的HbA1c抗原表位（果糖-VAL-HIS-LEU-THR-CYS）的BSA偶联物、以及天然的HbA1c。

在所述抗体价的评价中，尤其是对于效价高的小鼠，为了使小鼠的脾脏肥大，进行增大（注射弱免疫原）。免疫原，不添加辅料直接使用以磷酸缓冲液（PBS）稀释CGG偶联物所得的1mg/mL溶液。

##### 2.细胞融合

取出增大后经过3日的小鼠脾脏细胞，通过使用平均分子量1,500的聚乙二醇的常法，与源于小鼠骨髓瘤的细胞系（P3 $\times$ 63-Ag8.653）融合。作为饲养细胞（供给生长因子的细胞）使用相同小鼠的脾脏细胞，在两

个96孔板上以含有15%牛胎仔血清（以下称为FCS）的HAT培养基培养。  
1周后，换上含有15%FCS的新鲜HAT培养基。

### 3.克隆

进行ELISA法的抗体价的测定，选择效价高的上位5孔。然后，稀释  
5 为每孔含有1个细胞的浓度（有限稀释），分别接种在5个96孔微板中。  
作为饲养细胞使用生后5周龄的小鼠（Balb/c）的胸腺细胞，促进初期增  
殖。边增大板的大小边进行培养，适当时候，对于上清液反复进行ELISA  
法的抗体价测定，最终选择对于HbA1c显示高效价并且显示良好增殖的细  
胞组，在200ml中培养至 $5 \times 10^5$ 细胞/mL的浓度。最终选择的细胞，离心  
10 分离上清液，使以 $5 \times 10^5$ 细胞/mL的浓度悬浮在1mL的FSC：二甲基甲酰胺=9：1的溶液中，在使用之前，在 $-80^\circ\text{C}$ 冷冻后移至液氮中长期保存。

在使用时，通过使用蛋白A结合琼脂糖凝胶（farmashia社制）亲和性  
色谱法，从细胞培养上清液中精制单克隆抗体。该单克隆抗体，通过Mouse  
Monoclonal Typing kit（baindeingusaite社制）鉴定，结果确定为IgG，命  
15 名为F3A7。另外，该抗体（F3A7）在抗原表位与BSA结合的BSA偶联物  
以及在板上呈固相的HbA1c结合，但在溶液中与游离状态的HbA1c不结  
合。另外，F3A7对于HbAO无论是固相还是游离基本上都不结合。

#### 辅助抗体的制备

通过以下方式制备能够使HbA1c抗原表位露出的辅助抗体。将调配为  
20 1mg/ml的人血红蛋白作为免疫原对小鼠进行免疫，进行与前述相同的抗  
体价的评价。对于第1次免疫后经过80日的小鼠，与前述相同进行增大免  
疫，并进行细胞融合。融合后的孔选择，以以下的ELISA条件的测定进  
行。

将抗HbA1c抗体（F3A7）调配至0.1mg/ml，以 $200 \mu\text{l}$ /孔接种至96孔  
25 的ELISA板上，在 $4^\circ\text{C}$ 静置1晚并使之固定。以1%BSA PBS、 $200 \mu\text{l}$ /孔封  
闭（室温30分钟），用PBS清洗3次。在该板上以 $50 \mu\text{l}$ /孔加入培养上清  
液后，以 $50 \mu\text{l}$ /孔（总量 $100 \mu\text{l}$ /孔）加入HbA1c的PBS溶液，使最终浓度  
为 $10^{-7}$ 。室温下静置3小时后，用PBS清洗3次。在该板上以 $100 \mu\text{l}$ /孔加  
入调配为4mg/ml的邻苯二胺的磷酸柠檬酸缓冲溶液（PH=5），进行5分  
30 钟的酶反应。用4N的硫酸使反应停止后，用板式读取器（plate reader）

测定492nm处的吸光度。

通过上述的ELISA测定，选择显色的孔，与前述的抗HbA1c抗体的情况相同，进行克隆，得到精制的单克隆抗体。该单克隆抗体，经过Mouse Monoclonal Typing Kit (baideingsaite社制) 鉴定，结果确认为IgM型抗体，命名为H bM4。另外，H bM4与HbAO和HbA1c两者结合。另外，生产HbM4的细胞株于平成15年1月30日寄存在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄存中心（寄存编号FERM BP-8386）。

通过酶免疫测定法对游离的HbA1c的测定

#### 1.利用胍的测定

10 在 $10^{-4}$ M的PBS溶液中加入胍盐酸盐使最终浓度为3M，室温下静置3小时。用PBS对该溶液进行稀释，调配 $10^{-5}$ M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M的HbA1c 一系列稀释溶液。另外，为了比较，也调配了不含胍的同样一系列稀释溶液。

15 将抗HbA1c抗体（F3A7）调配为0.1mg/ml，以 $100\ \mu\text{l}$ /孔接种至96孔的ELISA板上，在 $4^{\circ}\text{C}$ 静置1晚并使之固定。以1%BSA PBS、 $200\ \mu\text{l}$ /孔封闭（室温30分钟），用PBS清洗3次。在该板上以 $100\ \mu\text{l}$ /孔加入上述调配的一系列HbA1c稀释溶液，室温下静置3小时后，用PBS清洗3次。以 $100\ \mu\text{l}$ /孔加入调配为 $0.2\ \mu\text{g/ml}$ 的过氧化物酶标记抗血红蛋白抗体（becct1社制），室温下静置30分钟后，用PBS清洗3次。在该板上以 $100\ \mu\text{l}$ /孔加入  
20 调配为4mg/ml的邻苯二胺的磷酸柠檬酸缓冲溶液（PH=5），进行5分钟的酶反应。用4N的硫酸使反应停止后，用板式读取器（plate reader）测定492nm处的吸光度。其结果如图5所示。如图5所示，发现没有用胍处理的HbA1c仅和 $10^{-7}$ M浓度以上的抗HbA1c抗体（F3A7）反应，相反，用胍处理的HbA1c和 $10^{-9}$ M浓度以上的F3A7反应。由此表示，通过添加胍的化学冲击，HbA1c的抗原表位露出，使能够有效地和抗体反应。  
25

#### 2.利用辅助抗体（HbM4）的测定

调配HbM4的0.02mg/ml的PBS溶液（最终浓度0.01mg/ml），作为辅助抗体使用。HbA1c的稀释系列，与前述相同，使最终浓度为 $10^{-5}\sim 10^{-11}$ M，利用 $2\times 10^{-5}$ M $\sim 2\times 10^{-11}$ M的溶液。用前述相同的方法进行固定，  
30 在封闭的板上，向各个孔中加入HbA1c的稀释系列 $50\ \mu\text{l}$ 和HbM4的溶液 $50$

5  $\mu$ 1, 室温下静置3小时后, 用PBS清洗3次。之后, 用与前述同样的方法, 使和过氧化物酶标记抗血红蛋白抗体进行反应, 以及加入基质的酶反应, 测定492nm处的吸光度。结果如图6所示。如图6所示, 发现在不用辅助抗体时, HbA1c仅和约 $10^{-7}$ M浓度以上的抗HbA1c抗体(F3A7)反应, 相反, 在使用辅助抗体时, HbA1c和 $10^{-9}$ M浓度以上的F3A7反应。由此表示, 通过添加HbM4, 能够有效地使HbA1c的抗原表位露出。

### 通过免疫色谱法对游离HbA1c的测定

#### 1. 利用胍的测定

10 使不具有使抗原表位露出的效果的抗血红蛋白抗体(Hb4-1、另外的制备的)在PH=9的条件下吸附在粒径20nm的金胶质表面, 制备金胶质标记血红蛋白抗体(Au-Hb4-1)。用含有1%的BSA的PH8.2的缓血酸氨缓冲液, 调配含有该标记抗体的溶液, 使520nm处的吸光度为5.0, 分别接种25  $\mu$ 1后, 冷冻干燥, 在使用之前4℃保存。

15 另一方面, 如图7所示, 在PBS溶液中调配抗HbA1c抗体(F3A7), 使浓度为1mg/ml后, 在宽0.5cm、长2.5cm的硝基纤维素膜(milipora社制)上涂敷为线状, 自然干燥, 固定在膜上。

在测定时, 作为试样, 利用与所述酶免疫测定法的情况相同进行胍处理的 $10^{-7}$ M的HbA1c溶液、和用于比较的没有进行胍处理的相同浓度的HbA1c溶液。

20 首先, 将胍处理后的试样25  $\mu$ 1和预先制备并冷冻干燥保存的金胶质标记血红蛋白抗体(Au-Hb4-1)混合。在确认处于冷冻干燥状态的Au-Hb4-1完全溶解后, 在图7的膜的一端添加该溶液。添加的溶液通过毛细管效果展开, 在到达固定F3A7的部分时, 由于金胶质而显色。在添加试样5分钟后, 用扫描密度计(岛津制作所制、CS-9300)测定固定部的25 520nm的吸光度, 结果吸光度的值为0.35。然后, 为了比较, 对没有进行胍处理的HbA1c试样进行同样的展开, 结果, 在固定部部显色。即, 此时固定部的520nm处的吸光度为0.02, 与固定部以外的背景处的吸光度基本相同。

#### 2. 利用辅助抗体的(HbM4)的测定

30 与前述的胍的情况相同, 使辅助抗体HbM4吸附在金胶质的表面, 制

备金胶质标记HbM4 (Au-HbM4)。另外，固定膜，使用与前述相同的固定F3A7的膜。

5 将 $10^{-7}$ M的HbA1c溶液（没有经过特殊处理的普通溶液）25  $\mu$  l和冷冻干燥保存的金胶质标记HbM4 (Au-HbM4)混合，在确认完全溶解后，在固定膜的一端添加该溶液，并使在膜上展开。在HbA1c溶液中尽管没有进行特殊的处理，但是，也可以确认固定部的显色。在添加试样5分钟后的固定部的520nm的吸光度为0.55。在所述Au-Hb4-1情况下，由于在没有处理的HbA1c试样中没有发现显色，所以可知该Au-HbM4不仅具有能够显色的标记抗体的作用，同时还具有使抗原表位露出的功能，是一种很有用的材料。

10 如以上所述，若使用不分明的免疫学测定方法，对于抗原表位埋入其结构内部并且难于测定的蛋白质，也能够很容易地在不使其变性的情况下进行测定。

15 另外，本发明的免疫学测定方法，也能够适用于现有的酶免疫法、凝集法、荧光法、比漏法、免疫色谱法等以往的很多基本测定方法。其中，对于免疫色谱法的适用，由于能够最大程度的发挥免疫色谱法的简便、迅速的特征，所以非常有效。

根据本发明，可以提供一种测定精度、便利性等优良的免疫学测定方法。

20

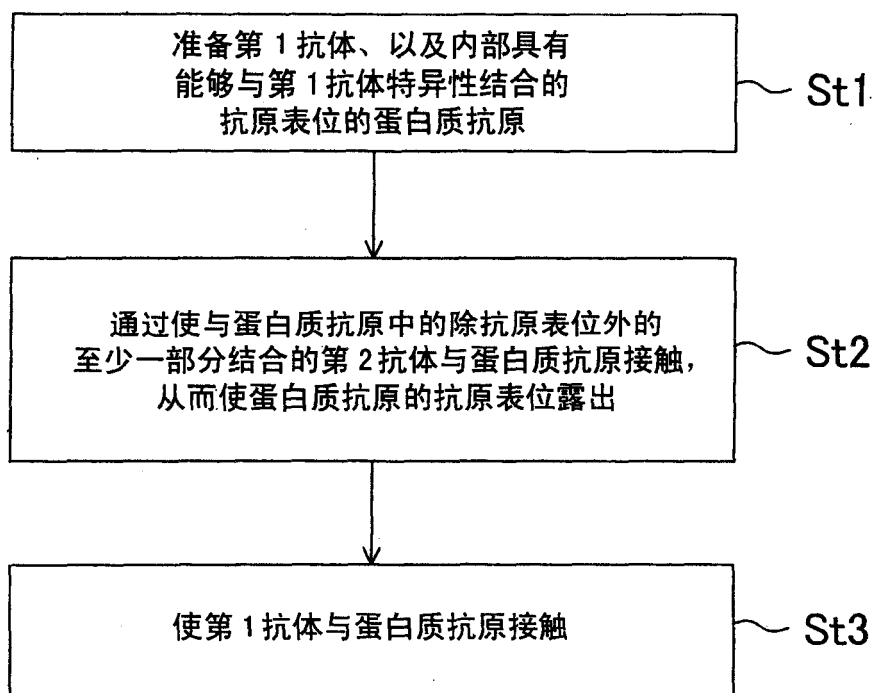


图 1

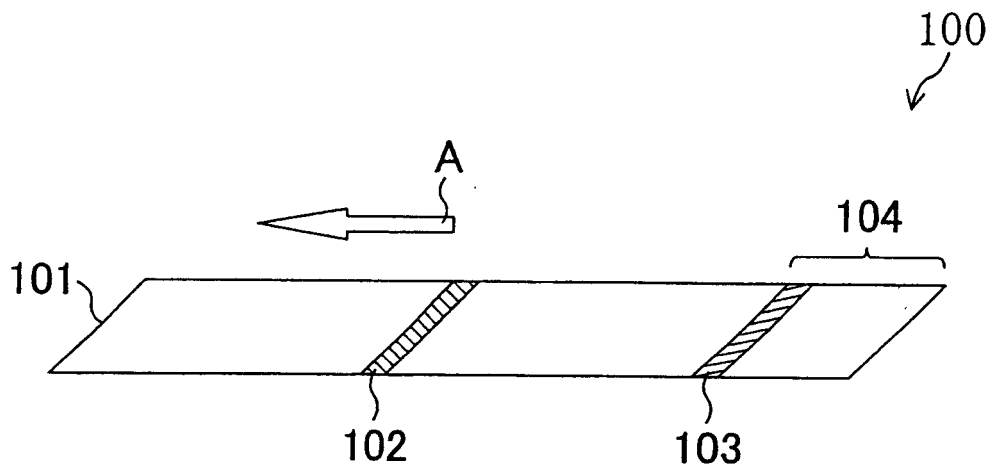


图 2

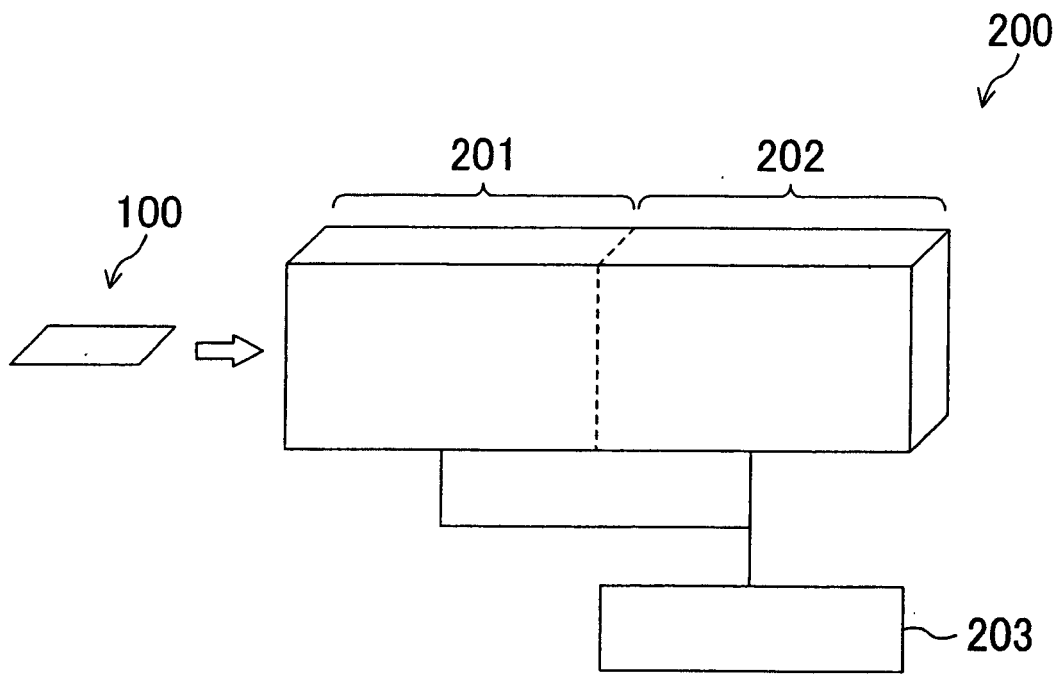
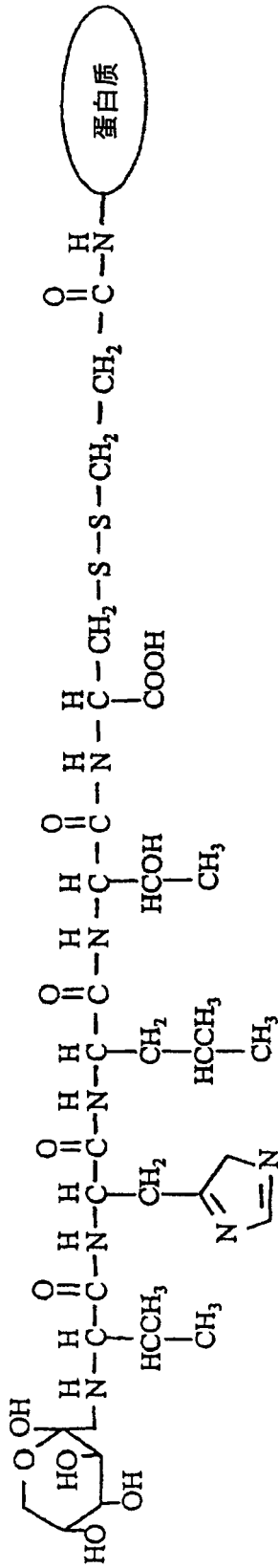
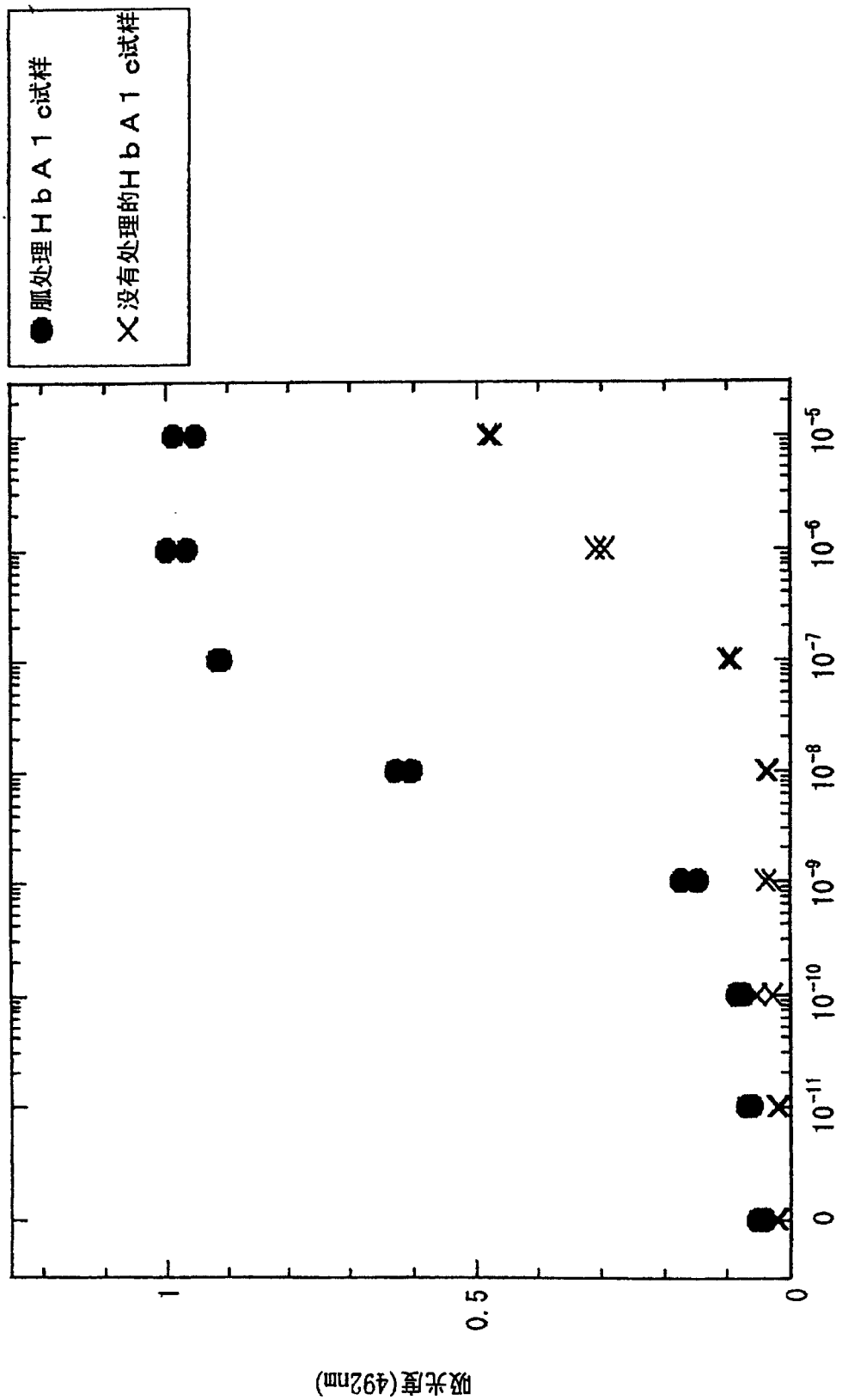


图 3



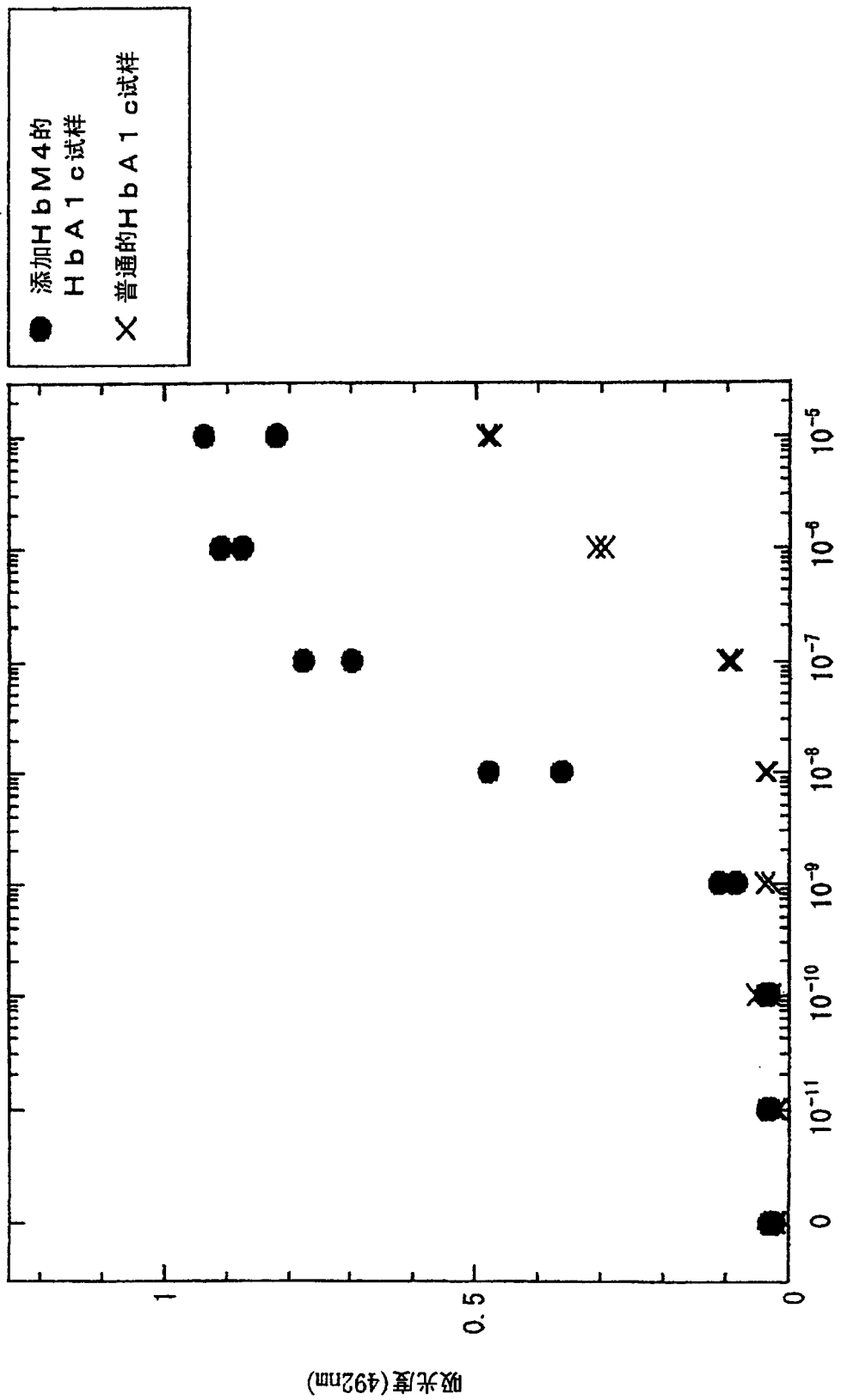
免疫原：蛋白质 = CGG、每 1 分子蛋白质的引入数 = 31  
 固层抗原：蛋白质 = BSA、每 1 分子蛋白质的引入数 = 2

图 4



HbA1c 浓度 (M)

图 5



HbA1c 浓度 (M) 图 6

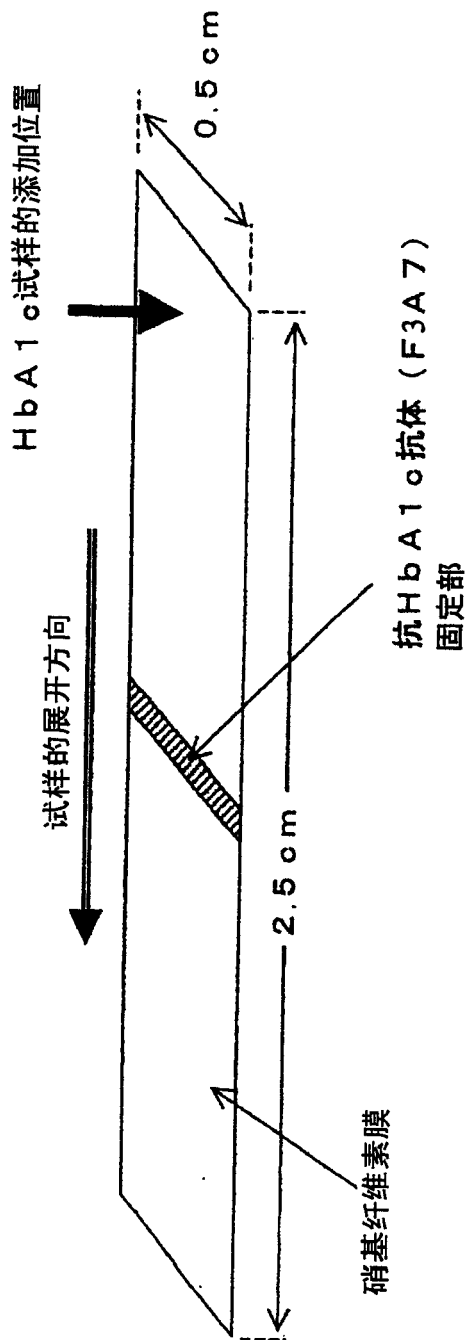


图 7

专利名称(译)	免疫学的测定方法、所用试验片以及免疫学的测定装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN1482460A</a>	公开(公告)日	2004-03-17
申请号	CN03107250.X	申请日	2003-03-19
申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	重藤修行		
发明人	重藤修行		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/72 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/721 G01N33/54306		
优先权	2002077324 2002-03-19 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种免疫学的测定方法，测定蛋白质抗原，包括：准备第1抗体、和内部具有能够与第1抗体特异性结合的抗原表位的工序(a)；通过使与第1抗体特异性结合的抗原表位以外的至少一部分结合的第2抗体与第1抗体接触，从而使第1抗体与蛋白质抗原接触的工序(b)；以及在所述工序(b)后，使第1抗体与蛋白质抗原接触的工序(c)。

