

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780048145.7

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月28日

[11] 公开号 CN 101568834A

[22] 申请日 2007.11.1

[21] 申请号 200780048145.7

[30] 优先权

[32] 2006.11.2 [33] JP [31] 299498/2006

[86] 国际申请 PCT/JP2007/071344 2007.11.1

[87] 国际公布 WO2008/053973 日 2008.5.8

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.25

[71] 申请人 协和梅迪克斯株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 川村瑞穗 富田聪仁

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书4页 说明书33页

[54] 发明名称

待测组分的免疫测定方法

[57] 摘要

本申请描述了免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分的方法，其包括在与该样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下使含血红蛋白样品中的待测组分与能结合该组分的抗体反应；在免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分中抑制血红蛋白的干扰的方法，其包括在不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物存在下使含血红蛋白样品中的待测组分与能结合该组分的抗体反应；含血红蛋白样品中的待测组分的免疫测定试剂，其包括胆汁酸衍生物。

1. 免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分的方法，其包括在与所述样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下使待测组分与能结合所述组分的抗体反应。

2. 根据权利要求1的方法，其包括使含血红蛋白样品中的待测组分进一步在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与能结合所述组分的抗体反应。

3. 根据权利要求1或2的方法，其中免疫测定的方法是夹心法或竞争法。

4. 根据权利要求1或2的方法，其中使组分与能结合所述组分的抗体反应为：

(1) 使所述组分与能结合所述组分的第一抗体和能结合所述组分的标记第二抗体反应，

(2) 使所述组分与标记竞争性物质和既能结合所述组分又能结合所述竞争性物质的抗体反应，或

(3) 使所述组分与竞争性物质和既能结合所述组分又能结合所述竞争性物质的标记抗体反应。

5. 根据权利要求1-4任一项的方法，其中不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物是具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

6. 权利要求1-4任一项的方法，其中不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

7. 权利要求 5 的方法，其中具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵]丙磺酸盐（以下简称为 CHAPS）或 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵]-2-羟基丙磺酸盐（以下简称为 CHAPSO）。

8. 根据权利要求 6 的方法，其中具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 N,N-双(3-D-葡糖酰胺丙基)胆酰胺（以下简称为 BIGCHAP）或 N,N-双(3-D-葡糖酰胺丙基)脱氧胆酰胺（以下简称为脱氧-BIGCHAP）。

9. 根据权利要求 2-8 任一项的方法，其中聚氧乙烯非离子型表面活性剂是聚氧乙烯烷基苯基醚。

10. 根据权利要求 1-9 任一项的方法，其中样品是全血。

11. 根据权利要求 1-10 任一项的方法，其中待测组分是 MxA 蛋白。

12. 含血红蛋白样品中的待测组分的免疫测定试剂，其包括胆汁酸衍生物和选自以下(1)-(3)的成分：

(1)能结合所述组分的第一抗体和能结合所述组分的标记第二抗体；

(2)标记竞争性物质和既能结合所述组分又能结合所述竞争性物质的抗体；以及

(3)竞争性物质和既能结合所述组分又能结合所述竞争性物质的标记抗体。

13. 根据权利要求 12 的试剂，其还包括聚氧乙烯非离子型表面活性剂。

14. 根据权利要求 12 或 13 的试剂，其中胆汁酸衍生物是具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

15. 根据权利要求 12 或 13 的试剂，其中胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

16. 根据权利要求 14 的试剂，其中具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 CHAPS 或 CHAPSO。

17. 根据权利要求 15 的试剂，其中具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 BIGCHAP 或脱氧-BIGCHAP。

18. 根据权利要求 13-17 任一项的试剂，其中聚氧乙烯非离子型表面活性剂是聚氧乙烯烷基苯基醚。

19. 在免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分中抑制血红蛋白干扰的方法，其包括在不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物存在下使含血红蛋白样品中的待测组分与能结合所述组分的抗体反应。

20. 根据权利要求 19 的方法，其中不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物是具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

21. 根据权利要求 19 的方法，其中不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

22. 根据权利要求 20 的方法，其中具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 CHAPS 或 CHAPSO。

23. 根据权利要求 21 的方法，其中具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 BIGCHAP 或脱氧-BIGCHAP。

24. 根据权利要求 19-23 任一项的方法, 其包括使含血红蛋白样品中的待测组分进一步在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与能结合所述组分的抗体反应。

待测组分的免疫测定方法

技术领域

本发明涉及免疫测定含有血红蛋白，免疫测定试剂的样品中的待测组分的方法，以及抑制血红蛋白在免疫测定方法中的干扰的方法。

背景技术

在免疫测定血液中的存在于血细胞，如红细胞和白细胞外的待测组分的方法中，将通过从全血中除去血细胞而制得的血清或血浆用作样品。然而，由于血细胞的去除需要特殊设备，如离心机，并且比较麻烦，因此已经有建议用全血作为样品的测定方法（见专利文献1）。当用全血作为样品时，存在着测量受到样品中因溶血而污染的血细胞组分，如血红蛋白或血细胞膜组分干扰的问题。这些组分影响光学检测系统，抑制免疫反应，并且还吸附待测物质。现在已有一些关于用全血作为样品进行免疫测定的方法的报道，这些方法未伴有溶血避免了这些问题（见专利文献2，3，4和5）。

当测量血细胞中的组成，如细胞内的蛋白质时，必须将血细胞溶解，因此不能使用没有伴有溶血的上述方法。在这种情况下，使用的方法包括用流式细胞术分离感兴趣的血细胞，然后将分离出的细胞溶解，并测量血细胞中的预期组分，但这些方法需要特殊设备进行流式细胞术，并且比较麻烦。

另一方面，作为测量细胞内蛋白质的便利方法的例子，将用表面活性剂制备的全血中的血细胞溶解物作为测量样品免疫测定 MxA 蛋白的方法已有报道（非专利文献1和2）。

[专利文献1] 日本专利申请特开平 No. (JP-A) H10-48214(未审查，

公开的日本专利申请)

[专利文献 2] JP-A (特开平) H06-265554

[专利文献 3] WO 96/04558

[专利文献 4] WO 02/73203

[专利文献 5] JP-A (特开平) 2004-45395

[非专利文献 1] Journal of Interferon Research, (USA), 1992, Vol. 12, No. 2, p.67-74

[非专利文献 2] Pediatric Research, (USA), 1997, Vol. 41, No. 5, p. 647-650

发明内容

[本发明要解决的问题]

本发明的目的是提供免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分，以抑制血红蛋白干扰的方法和试剂，以及在免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分的方法中抑制血红蛋白干扰的方法。

[解决问题的手段]

本发明的发明人发现，在免疫测定样品中的待测组分的方法中，所述组分可以通过在胆汁酸衍生物存在下与能与所述组分结合的抗体反应而精确测量，所述胆汁酸衍生物不同于所述样品中所固有的胆汁酸衍生物，因此完成了本发明。更具体地，本发明涉及以下[1]-[24]。

[1]免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分的方法，其包括在与所述样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下使待测组分与能结合所述组分的抗体反应。

[2] 根据[1]的方法，其包括使含血红蛋白样品中的待测组分进一步在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与能结合所述组分的抗体反应。

[3]根据[1]或[2]的方法，其中免疫测定的方法是夹心法或竞争法。

[4]根据[1]或[2]的方法，其中使组分与能结合所述组分的抗体反应是：

(1) 使所述组分与能结合所述组分的第一抗体和能结合所述组分的标记第二抗体反应，

(2) 使所述组分与标记竞争性物质和既能结合所述组分又能结合所述竞争性物质的抗体反应，或

(3) 使所述组分与竞争性物质和既能结合所述组分又能结合所述竞争性物质的标记抗体反应。

[5]根据[1]-[4]任一项的方法，其中不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物是具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

[6] [1]-[4]任一项的方法，其中不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

[7] [5]的方法，其中具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵]丙磺酸盐（以下简称为 CHAPS）或3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵]-2-羟基丙磺酸盐（以下简称为 CHAPSO）。

[8]根据[6]的方法，其中具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是N,N-双(3-D-葡糖酰胺丙基)胆酰胺（以下简称为 BIGCHAP）或N,N-双(3-D-葡糖酰胺丙基)脱氧胆酰胺（以下简称为脱氧-BIGCHAP）。

[9]根据[2]-[8]任一项的方法，其中聚氧乙烯非离子型表面活性剂是聚氧乙烯烷基苯基醚。

[10]根据[1]-[9]任一项的方法，其中样品是全血。

[11]根据[1]-[10]任一项的方法，其中待测组分是 MxA 蛋白。

[12]含血红蛋白样品中的待测组分的免疫测定试剂，其包括胆汁酸衍生物和选自以下(1)-(3)的组分：

(1)能结合所述组分的第一抗体和能结合所述组分的标记第二抗体；

(2)标记竞争性物质和既能结合所述组分又能结合所述竞争性物质的抗体；以及

(3)竞争性物质和既能结合所述组分又能结合所述竞争性物质的标记抗体。

[13]根据[12]的试剂，还包括聚氧乙烯非离子型表面活性剂。

[14]根据[12]或[13]的试剂，其中胆汁酸衍生物是具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

[15]根据[12]或[13]的试剂，其中胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

[16]根据[14]的试剂，其中具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 CHAPS 或 CHAPSO。

[17]根据[15]的试剂，其中具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 BIGCHAP 或脱氧-BIGCHAP。

[18]根据[13]-[17]任一项的试剂，其中聚氧乙烯非离子型表面活性剂是聚氧乙烯烷基苯基醚。

[19]在免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分中抑制血红蛋白干扰的方法，其包括在不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍

生物存在下使含血红蛋白样品中的待测组分与能结合所述组分的抗体反应。

[20]根据[19]的方法，其中不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物是具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

[21]根据[19]的方法，其中不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

[22]根据[20]的方法，其中具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 CHAPS 或 CHAPSO。

[23]根据[21]的方法，其中具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物是 BIGCHAP 或脱氧-BIGCHAP。

[24]根据[19]-[23]任一项的方法，其包括使含血红蛋白样品中的待测组分进一步在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与能结合所述组分的抗体反应。

[本发明的效果]

本发明提供了使含血红蛋白样品中的待测组分能得以准确测量的免疫测定方法及用于该方法的试剂，还提供了在免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分的方法中抑制血红蛋白干扰的方法。

本发明的最佳实施方式

(1)含血红蛋白的样品

本发明的免疫测定方法中使用的含血红蛋白样品的例子包括含有血红蛋白的样品和怀疑含有血红蛋白的样品。含有血红蛋白的样品和怀疑含有血红蛋白的样品的例子包括全血，由全血制备的含红细胞的血细胞级分，怀疑溶血的血浆或血清，红细胞和添加了血红蛋白的任

意样品。关于全血，可以使用采集自受试者的血液本身和已处理的血液，优选已处理的血液。这样处理的例子包括抗凝处理和溶血处理，这些处理可以组合使用。

在待测组分为血细胞的胞内组分的情况下，全血优选为经溶血处理的血液，尤其优选为经抗凝和溶血两种处理的血液。抗凝处理的例子包括向采集的血液中加入 EDTA，肝素等的处理。溶血处理的例子包括加入表面活性剂或皂苷溶液，与低渗溶液混合，冻融和超声。

(2)待测组分

本发明中的待测组分不受特别限制，只要其是可能含有血红蛋白的样品中的组分即可，组分的例子包括核酸，蛋白质，脂质，维生素和多糖。核酸的例子包括 DNA，RNA，ATP，ADP，AMP 和 cAMP。蛋白质的例子包括酶，激素和各种类型的肽。

本发明中的优选组分包括细胞内含有的物质和细胞内由各种细胞因子，如干扰素诱导产生的蛋白质。

组分的具体例子是细胞质内由 I-型干扰素诱导产生的 MxA 蛋白 (Mol. Cell. Biol., 9, 5062-5072, 1989; J. Virol. 64, 1171-1181, 1990)。

(3)胆汁酸衍生物

本发明中的胆汁酸衍生物是与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物。与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物不受特别限制，只要其是能促成本发明的免疫测定方法和抑制血红蛋白干扰的方法的胆汁酸衍生物即可，优选为具有两性表面活性剂功能或非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物。

具有两性表面活性剂功能的胆汁酸衍生物的例子包括 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵]丙磺酸盐（以下简称为 CHAPS）和 3-[(3-胆酰胺丙基)

二甲铵]-2-羟基丙磺酸盐（以下简称为 CHAPSO）。

具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物的例子包括 N,N-双(3-D-葡糖酰胺丙基)胆酰胺（以下简称为 BIGCHAP）和 N,N-双(3-D-葡糖酰胺丙基)脱氧胆酰胺（以下简称为脱氧-BIGCHAP）。

胆汁酸衍生物显示出抑制血红蛋白在待测组分与能结合该组分的抗体的反应中的干扰的效果，尤其是，优选使用 CHAPS，CHAPSO，BIGCHAP 和脱氧-BIGCHAP。

胆汁酸衍生物以临界胶束浓度（cmc）的 1 至 50 倍的浓度范围使用，尤其优选 cmc 浓度的 1 至 10 倍。在本发明中，胆汁酸衍生物可以单独使用（一种类型），或者可以两种或两种以上类型的胆汁酸衍生物组合的形式使用。

(4)聚氧乙烯非离子型表面活性剂

聚氧乙烯非离子型表面活性剂在本发明的免疫测定方法中起增强测量灵敏度的作用，其优选在免疫反应期间存在。

本发明中的聚氧乙烯非离子型表面活性剂的例子包括聚氧乙烯烷基苯基醚，聚氧乙烯烷基醚和聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯，优选聚氧乙烯烷基苯基醚。聚氧乙烯烷基苯基醚中的烷基的例子包括辛基和壬基。聚氧乙烯烷基苯基醚的具体例子（市场上可以买到的产品）是 Nonidet P-40（聚氧乙烯壬基苯基醚）。

在本发明中，聚氧乙烯非离子型表面活性剂可以单独使用（一种类型），或者可以两种或两种以上类型的聚氧乙烯非离子型表面活性剂组合的形式使用。在本发明的免疫测定方法中，聚氧乙烯非离子型表面活性剂的浓度优选为 0.01%-2.0%，更优选 0.05%-1.8%，尤其优选 0.1%-1.4%。

(5)抗体和标记抗体

本发明的免疫测定方法中所使用的抗体不受特殊限制，只要其为特异性结合待测组分的抗体即可；并且，可以使用多克隆抗体或单克隆抗体，但优选单克隆抗体。此外，本发明中使用的抗体包括抗体片段。具体例子包括除去了Fc部分的抗体片段，如通过将抗体用木瓜蛋白酶处理后得到的Fab，通过胃蛋白酶处理得到的F(ab')₂和通过胃蛋白酶处理及还原处理得到的Fab'。尤其是，优选抗体片段为F(ab')₂。

本发明中所使用的抗体可以通过标准方法用待测组分或其部分作为抗原获得，也可以使用市场上可以买到的产品。

在待测组分是MxA蛋白的情况下，特异性结合MxA蛋白的抗体的例子包括分别由杂交瘤细胞系KM1122, KM1123, KM1124 (FERM BP-4729), KM1125, KM1126, KM1127, KM1128, KM1129, KM1130, KM1131, KM1132 (FERM BP-4730), KM1133, KM1134 和 KM1135 (FERM BP-4731)产生的抗人MxA蛋白单克隆抗体KM1122, KM1123, KM1124, KM1125, KM1126, KM1127, KM1128, KM1129, KM1130, KM1131, KM1132, KM1133, KM1134 和 KM1135, 其在国际公开 No. WO 96/05230 中有描述。

本发明中的标记抗体是可以用于本发明的免疫测定待测组分的方法的抗体，其通过稍后描述的方法用本发明中所使用的抗体和下文所述标记物来产生。

(6)竞争性物质和标记竞争性物质

在本发明中，术语“竞争性物质”是指能与本发明的免疫测定方法中所使用的“能结合待测组分的抗体”结合，与所述组分竞争结合的物质；也包括所述组分本身。“竞争性物质”在用竞争法测量样品中的待测组分时使用。因此，竞争法中所使用的能结合待测组分的抗

体是能结合待测组分，竞争性物质和标记竞争性物质的抗体。当抗体与组分结合形成免疫复合物时，其也与竞争性物质结合形成免疫复合物。

竞争性物质优选为结构上与能结合待测组分的抗体识别的表位相同的物质。另外，关于与能结合待测组分的抗体结合的能力，竞争性物质优选具有与所述组分相当的水平。作为竞争性物质，待测组分本身是优选的。

本发明中的标记竞争性物质是可以用于本发明的免疫测定待测组分的方法的物质，其通过稍后所述方法用上述竞争性物质和稍后所述标记物产生。

(7)免疫测定方法

本发明的免疫测定方法是测量含血红蛋白样品中的待测组分的免疫测定方法，其包括在与该样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物的存在下，使含血红蛋白样品中的组分与能结合该组分的抗体反应。

含血红蛋白样品和与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物的比例优选为 1:1-1:1000，在含血红蛋白样品为全血的情况下，优选 1:2-1:49 的比例，尤其优选 1:4-1:9 的比例。向含血红蛋白样品中加入与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物时，加入期间的温度优选为约 2°C-40°C，测量优选在加入后 24 小时内进行。

免疫测定方法不受特别限制，只要其是基于抗原-抗体反应的方法即可，并且对操作方法，有或无标记物，标记物的类型，载体及有或无 B/F 分离没有限定。

抗原-抗体反应可以是竞争性反应法或非竞争性反应法。

检测方法可以是其中抗原-抗体反应的结果通过凝集等直接检测的非标记法，或其中抗原-抗体反应的结果用标记物检测的标记法，从测量灵敏度的角度出发，尤其优选标记法。

在本发明的免疫测定方法中，可以使用需要 B/F 分离的异相法，或不需要 B/F 分离的均相法。

关于反应相，可以采用所有反应都在液相中完成的液相法，或反应在免疫反应的一部分反应物固定在固相的态中完成的固相法。

测量方法的具体例子包括“Bio Kensayaku Kaihatsu Manual (Biological Diagnostic Agent Development Manual)”, CMC; 由 Ishikawa, E 等人共同编辑的“Koso Meneki Sokuteiho (Enzyme Immunoassay)”第三版, Igaku-Shoin; 和文献 Nippon Rinsho (Japanese Journal of Clinical Medicine), Vol. 53, No. 9 中所述方法。

作为本发明的免疫测定方法的具体例子，下文显示了测量方法 1-4 的方法，但本发明不受其限制。测量方法 1 是为非竞争性反应法的夹心法，测量方法 2 和 3 是其中样品中的待测组分与竞争性物质竞争的竞争法，测量方法 4 是不进行免疫复合物和未包含在免疫复合物中的标记抗体或标记竞争性物质的分离（B/F 分离）的均相法。

测量方法 1

依次进行以下步骤(a)-(e)的方法：

(a) 使含血红蛋白样品中的待测组分在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下，或在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物及聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与特异性结合该组分的第一抗体反应，形成第一抗体与该组分的免疫复合物；

(b)使步骤(a)中产生的免疫复合物在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下, 或在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物及聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与能结合该组分的标记第二抗体反应, 形成第一抗体, 该组分和标记抗体的免疫复合物;

(c)将步骤(b)中形成的免疫复合物与未包含在免疫复合物中的标记抗体分离开来;

(d)测量步骤(b)中产生的免疫复合物中的标记量; 和

(e)根据步骤(d)中测得的免疫复合物中的标记量确定样品中组分的浓度。

第一抗体优选固定在不溶性载体上。步骤(a)和步骤(b)可以依次或同时进行。只要第二抗体可以与已结合第一抗体的组分结合, 第一抗体所识别的组分的位点可以与第二抗体所识别的组分的位点相同或不同, 优选这些位点不同。此外, 如下文所述, 在步骤(e)中, 样品中组分的浓度可以用显示该组分浓度与测得值(由标记产生的信息的量)之间关系的校正曲线来确定, 该校正曲线预先用已知浓度的组分制备。

测量方法 2

依次进行下述步骤(a)-(d)的测量方法:

(a)使含血红蛋白样品中的待测组分和标记竞争性物质在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下, 或在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物及聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与既能结合该组分又能结合该标记竞争性物质的抗体反应, 形成抗体与标记竞争性物质的免疫复合物和抗体与组分的免疫复合物;

(b)将抗体与标记竞争性物质的免疫复合物与未反应的标记竞争性物质分离开来;

(c)测量步骤(a)中形成的抗体与标记竞争性物质的免疫复合物中的标记量; 和

(d)根据步骤(c)中测得的免疫复合物中的标记量确定样品中组分的浓度。

抗体优选固定在不溶性载体上。此外，如下文所述，在步骤(d)中，样品中组分的浓度可以用显示该组分浓度与测得值（由标记产生的信息的量）之间关系的校正曲线来确定，该校正曲线预先用已知浓度的组分制备。

测量方法 3

依次进行下述步骤(a)-(d)的测量方法：

(a)使含血红蛋白样品中的待测组分和竞争性物质在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下，或在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物及聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与通过将标记与既能结合该组分又能结合该竞争性物质的抗体结合产生的标记抗体反应，形成标记抗体与竞争性物质的免疫复合物和标记抗体与该组分的免疫复合物；

(b)将标记抗体与竞争性物质的免疫复合物与未反应的标记抗体和标记抗体与组分的免疫复合物分离开来；

(c)测量标记抗体与竞争性物质的免疫复合物中的标记量；和

(d)根据步骤(c)中测得的免疫复合物中的标记量确定样品中组分的浓度。

竞争性物质优选固定在不溶性载体上。在竞争性物质具有与组分相同的结构的情况下，在步骤(a)中使用固定在不溶性载体上的竞争性物质。此外，如下文所述，在步骤(d)中，样品中组分的浓度可以用显示该组分浓度与测得值（由标记产生的信息的量）之间关系的校正曲线来确定，该校正曲线预先用已知浓度的组分制备。

测量方法 4

包括下述步骤(a)-(c)的测量方法：

(a)使含血红蛋白样品中的待测组分在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下，或在与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物及聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与其中能结合该组分的第一抗体被标记物 1 标记的标记抗体 1 和其中能结合该组分的第二抗体被不同于标记物 1 的标记物 2 标记的标记抗体 2 反应，形成标记抗体 1，组分和标记抗体 2 的免疫复合物；

(b)测量步骤(a)中形成的免疫复合物中标记物 1 和标记物 2 间相互作用的变化的量；和

(c)根据步骤(b)中测得的相互作用的变化的量确定样品中组分的量。

只要第二抗体可以与已结合第一抗体的组分结合，第一抗体所识别的组分的位点可以与第二抗体所识别的组分的位点相同或不同，优选这些位点不同。此外，如下文所述，在步骤(c)中，样品中组分的浓度可以用显示该组分浓度与测得值（由标记产生的信息的量）之间关系的校正曲线来确定，该校正曲线预先用已知浓度的组分制备。

如上文所述，测量方法 1-3 是包括 B/F 分离的异相法。测量方法 1 的步骤(c)和测量方法 2 及 3 的步骤(b)是 B/F 分离的步骤。在抗体或竞争性物质被固定在不溶性载体的情况下，B/F 分离可以很容易地通过先除去反应溶液，然后洗涤不溶性载体来进行。更具体地说，通过在抗原-抗体反应后除去反应溶液，然后用洗涤液洗涤不溶性载体，可以将不溶性载体上形成的免疫复合物与未反应的被标记物（标记抗体和标记竞争性物质）分离开来。

洗涤液的例子包括磷酸盐缓冲盐水（pH 7.2，含 0.15 mol/L 氯化钠的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液；以下称作 PBS），含表面活性剂的 PBS 和下文所述水性介质。所述表面活性剂的例子包括非离子型表面活性剂，如吐温 20。

此外，在测量方法 1 中，当第一抗体被固定在不溶性载体上时，可以在步骤(a)和步骤(b)之间插入洗涤不溶性载体的步骤，以除去未反应的反应物。在这种情况下，步骤(b)变成了使步骤(a)中形成的免疫复合物与能结合组分的标记第二抗体反应，形成第一抗体，组分和标记抗体的免疫复合物的步骤。

在测量方法 2 中，在能结合组分的抗体未固定在不溶性载体上的情况下，在步骤(c)中，使固定有不能结合标记竞争性物质但能结合抗体的结合物质的不溶性载体与免疫复合物反应，产生与该不溶性载体结合的免疫复合物。除去反应溶液后，洗涤不溶性载体，以将免疫复合物与未包含在免疫复合物内的标记竞争性物质分离开来。此外，在固定有不能结合标记竞争性物质但能结合抗体的结合物质的不溶性载体存在下，步骤(a)的形成免疫复合物的反应的进行同时带来了免疫复合物的形成和免疫复合物在不溶性载体上的固定化，先除去反应溶液然后洗涤不溶性载体导致了免疫复合物与未包含在免疫复合物内的标记竞争性物质的分离。不能结合标记竞争性物质但能结合抗体的结合物质的例子包括能结合抗体恒定区的抗体。在组分不是蛋白的情况下，可以在步骤(c)中加入蛋白沉淀剂，如硫酸铵或聚乙二醇，使仅免疫复合物沉淀下来。反应混合物离心后，免疫复合物可以与未包含在免疫复合物内的标记竞争性物质分离。

在测量方法 1 中，在第一抗体未固定在不溶性载体上的情况下，包含在免疫复合物内的标记抗体与未包含在免疫复合物内的标记抗体的分离可以通过在 B/F 分离步骤中加入固定有不能结合标记抗体但能结合第一抗体的结合物质的不溶性载体，然后除去反应溶液，并洗涤不溶性载体来进行。此外，包含在免疫复合物内的标记抗体与未包含在免疫复合物内的标记抗体的分离可以通过在免疫复合物形成的步骤中，在固定有不能结合标记抗体但能结合第一抗体的结合物质的不溶性载体存在下形成免疫复合物，然后除去反应溶液，并洗涤不溶性载体来进行。不能结合标记抗体但能结合第一抗体的结合物质的例子包

括，在用来产生第一抗体的动物品种与用来产生用于标记抗体的抗体（第二抗体）的动物品种不同的情况下，针对用来产生第一抗体的动物品种的免疫球蛋白的抗体；和在第一抗体是具有恒定区的抗体，标记抗体是不具有恒定区的抗体片段，如 Fab 或 $F(ab')_2$ ，或 Fab' 的情况下，能与第一抗体的恒定区特异性结合的抗体。

(8)不溶性载体

固定抗体或竞争性物质的不溶性载体不受限制，只要其可以稳定地容纳抗体或竞争性物质即可。不溶性载体的优选材料的例子包括聚合物材料，如聚苯乙烯，聚碳酸酯，聚乙烯甲苯，聚丙烯，聚乙烯，聚氯乙烯，尼龙，聚甲基丙烯酸酯，明胶，琼脂糖，纤维素，硝化纤维素，醋酸纤维素，醋酸纤维素和聚对苯二甲酸乙二酯，玻璃，陶瓷，磁性颗粒及金属。不溶性载体的优选形式的例子包括管，珠，板，微粒，如胶乳，及棒。例如，每板具有 96 孔的聚苯乙烯微量滴定板是优选的。

(9)抗体或竞争性物质在不溶性载体上的固定化

将抗体或竞争性物质固定在不溶性载体上的方法的例子包括已知方法，如使用物理键的方法，使用化学键的方法，或其组合。物理键的例子包括静电键，氢键和疏水键。化学键的例子包括共价键和配位键。在用聚苯乙烯微量滴定板作为免疫测定方法的不溶性载体的情况下，固定化的方法的例子有向板的孔中加入抗体或竞争性物质的溶液，然后在 4°C - 30°C 孵育 1 小时至 1 天，进行物理吸附。

抗体或竞争性物质可以直接或间接固定在不溶性载体上。间接固定的例子包括一种方法，该方法包括向固定有亲和素的不溶性载体加入生物素化抗体或生物素化竞争性物质，和通过生物素与亲和素之间的特异性结合将抗体或竞争性物质固定至不溶性载体。此外，可以将能与所述抗体特异性结合的抗体或能与所述竞争性物质特异性结合的抗体固定在不溶性载体上，所述抗体或所述竞争性物质可以通过这样

的抗体固定在不溶性载体上。或者，抗体或竞争性物质可以通过共价键经连接体固定在不溶性载体上。

连接体不受限制，只要其可以在抗体或组分的官能团与不溶性载体侧链的官能团之间形成共价键即可。例如，在优选实施方案中，连接体是同时具有可以与抗体或组分的官能团反应的第一反应基团和可以与不溶性载体侧链的官能团反应的第二反应基团的分子。优选第一反应基团与第二反应基团不同。抗体或竞争性物质的官能团和不溶性载体表面上具有的官能团的例子包括羧基，氨基，缩水甘油基，巯基，羟基，酰胺基，亚氨基，N-羟基琥珀酰基和马来酰亚胺基。连接体上的反应基团的例子包括如芳基叠氮，碳二亚胺，酰肼，醛，羟甲基膦，酰亚胺酯，异氰酸酯，马来酰亚胺，N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯，五氟苯基(PFP)酯，补骨脂素，吡啶基二硫化物和乙烯基砷的基团。

(10)抗体或待测组分的标记

标记抗体或待测组分的标记物的例子包括酶，荧光物质，发光物质，放射性同位素，生物素，异羟基洋地黄毒苷(digoxigenin)，含有标签序列的多肽，金属胶体颗粒和有色乳胶颗粒。

酶的例子包括碱性磷酸酶，过氧化物酶，半乳糖苷酶，葡萄糖醛酸糖苷酶(glucuronidase)和萤光素酶。

荧光物质的例子包括荧光素异硫氰酸酯(FITC)和罗丹明B异硫氰酸酯(RITC)。其它荧光物质的例子包括量子点(Science, 281, 2016-2018, 1998)，藻胆蛋白，如藻红蛋白，以及荧光发射蛋白，如绿色荧光蛋白(GFP)，红色荧光蛋白(RFP)，黄色荧光蛋白(YFP)和蓝色荧光蛋白(BFP)。

发光物质的例子包括吖啶鎓(acridinium)及其衍生物，钌络合物和洛粉碱(lophine)。对于钌络合物，优选带有电子供体的电化学发

光化合物（在 Clin. Chem. 37, 9, 1534-1539, 1991 中描述）。

放射性同位素的例子包括 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I 和 ^{131}I 。

含有标签序列的多肽的例子包括 FLAG 肽（FLAG 标签, Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys），多组氨酸（His 标签, His His His His His His），myc 表位肽（myc 标签, Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu）和血凝素表位肽（HA 标签, Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala）。

抗体或待测组分的标记可以通过在抗体或组分的官能团与标记物的官能团之间形成有或无连接体的共价键的反应来完成。官能团的例子包括羧基，氨基，缩水甘油基，巯基，羟基，酰胺基，亚氨基，羟基琥珀酰酯基，马来酰亚胺基和异硫氰酸酯基。可以进行这些官能团之间的缩合反应。

形成不带连接体的键的方法的例子包括使用碳二亚胺化合物，如 EDC 的方法。在这种情况下，可以使用活性酯，如 NHS 或其衍生物。异硫氰酸酯基与氨基之间的缩合反应由于其不需要其它试剂，只要在中性至弱碱性条件下混合即可进行反应，因而是优选的。

连接体不受限制，只要其可以在标记物与抗体之间经其各自的官能团成键即可。例如，在优选实施方案中，连接体是在同一分子内具有可以与抗体的氨基酸残基反应的第一官能团和可以与标记物侧链的官能团反应的第二官能团的分子。优选第一官能团与第二官能团不同。连接体的官能团的例子包括上文所述官能团。

以化学方法制备放射性同位素键的方法的例子包括在 Antibody Immunoconj. Radiopharm., 3, 60, 1990 中描述的方法。

在标记物是酶，亲和素，荧光发射蛋白，藻胆蛋白或多肽，如包

括标签序列的多肽的情况下，可以按下法产生标记抗体：产生含有编码标记物和抗体的融合蛋白的 DNA 的表达载体，将表达载体引入适宜的宿主，并培养宿主（分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning: A Laboratory Manual），第三版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，2001）。编码融合蛋白的 DNA 可以通过使用各自编码抗体和标记物的 DNA 的 PCR 等的克隆，和通过连接酶反应连接各个 DNA 来获得。

在上述(6)的测量方法 4 中描述的均相法中使用的标记物 1 和 2 的例子包括通过与待测组分结合，并藉此靠近来引发相互作用的标记物。这种标记物的例子包括表现出荧光共振能量转移（FRET）的荧光物质。FRET 是第一荧光物质受激发光激发时产生的荧光能量被用作靠近第一荧光物质的第二荧光物质的荧光能量的现象，其发生在两种荧光物质彼此间距离为 1-10 nm 时。表现出 FRET 的荧光物质组合的例子包括其中一种物质的荧光波长谱与另一种物质的激发波长谱有一定重叠的组合。荧光物质的例子包括荧光蛋白，低分子量有机荧光染料和无机化合物。表现出 FRET 的荧光蛋白组合的例子包括 CFP [绿色荧光蛋白（GFP）的黄色突变体]和 YFP [绿色荧光蛋白（GFP）的青色突变体]的组合。低分子量有机荧光染料组合的例子包括 Cy3 和 Cy5 的组合。无机化合物的例子包括量子点（Science, 281, 2016-2018, 1998）。

此外，均相法中标记物组合的例子还包括表现出生物发光共振能量转移（BRET）的产生化学发光的酶和荧光物质的组合。表现出 BRET 的酶和荧光物质的组合的例子包括酶降解其底物时形成的发光波长谱与荧光物质的激发波长谱之间有重叠的组合。组合的例子包括作为酶的 Renilla 萤光素酶（Rluc），作为底物的 Deep Blue C（由 Packard BioScience 公司生产）等，及作为荧光物质的 GFP 的组合。在这种情况下，Rluc 降解底物，产生了波长为 395 nm 的光；GFP 靠近 Rluc 时，GFP 接收了该光的能量，并发射出可以检测的波长为 510 nm 的荧光。

均相法中标记物组合的例子包括其中酶在标记物 1 和标记物 2 互

相靠近，并在某一定向上结合时显现出活性的物质的组合。标记物的组合的例子包括作为标记物 1 的 β -半乳糖苷酶的 $\Delta\alpha$ 亚基和作为标记物 2 的 β -半乳糖苷酶的 $\Delta\omega$ 亚基的组合，及作为标记物 1 的 Rluc 的 N 末端结构域和作为标记物 2 的 Rluc 的 C 末端结构域的组合。

(11)抗原-抗体反应

抗原-抗体反应优选在水性介质中进行。反应温度为，例如， 0°C - 50°C ，优选为 4°C - 40°C 。反应时间优选为 5 分钟至 20 小时。

(12)标记量的测量

测量免疫复合物中的标记量的适宜方法可以根据标记物进行选择。更具体地说，在标记物是色素，即吸收某一波长的光的物质，或者测量由凝集等导致的浊度（吸光度）变化的量的情况下，可以使用分光光度计，多孔板读数器等。在标记物为荧光物质的情况下，可以使用荧光分光光度计，荧光多孔板读数器等。当标记物为发光物质时，可以使用发光光度计，发光多孔板读数器等。在标记物为放射性同位素的情况下，放射性同位素的量可以通过用闪烁计数器， γ -孔计数器等测量放射性来测定。

在标记为酶的情况下，标记的量可以通过测量酶活性来测定。例如，标记的量可以通过使酶的底物与酶反应，然后测量形成的物质来测定。

在酶是过氧化物酶的情况下，过氧化物酶的活性可以通过，例如分光光度计，荧光分光光度计等测量。通过分光光度法测量过氧化物酶活性的方法的例子包括一种方法，该方法包括使过氧化物酶与过氧化氢和氧化色原的组合物，即过氧化物酶的底物反应，及用分光光度计或多孔板读数器测量反应溶液的吸光度。氧化着色色原的例子包括无色型色原（leuco-type chromogen）和氧化偶合色原（oxidative coupling-coloring chromogen）。

无色型色原是在过氧化氢和过氧化物物质，如过氧化物酶存在下自己转化为染料的物质。具体例子包括四甲基联苯胺，邻苯二胺，10-N-羧甲基氨甲酰基-3,7-双(二甲氨基)-10H-吩噻嗪 (CCAP)，10-N-甲基氨甲酰基-3,7-双(二甲氨基)-10H-吩噻嗪 (MCDP)，N-(羧甲基羰基)-4,4'-双(二甲氨基)二苯胺钠盐 (DA-64)，4,4'-双(二甲氨基)二苯胺和双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲氨基苯基]胺 (BCMA)。

氧化偶合着色色原是在过氧化氢和过氧化物物质，如过氧化物酶存在下通过两种化合物的氧化偶合形成染料的物质。两种化合物的组合的例子包括偶合剂和苯胺类化合物 (Trinder 试剂) 的组合，及偶合剂和酚类化合物的组合。偶合剂的例子包括 4-氨基安替吡啉 (4-AA) 和 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒。苯胺类化合物的例子包括 N-(3-磺丙基)苯胺，N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺 (TOOS)，N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺 (MAOS)，N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺 (DAOS)，N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲基苯胺 (TOPS)，N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺 (HDAOS)，N,N-二甲基-3-甲基苯胺，N,N-双(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺，N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺，N-乙基-N-(3-磺丙基)苯胺，N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺，N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺，N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺，N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺，N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)苯胺，N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰乙二胺 (EMSE)，N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙酰基乙二胺和 N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-4-氟-3,5-二甲氧基苯胺 (F-DAOS)。酚类化合物的例子包括苯酚，4-氯苯酚，3-甲基苯酚和 3-羟基-2,4,6-三碘苯甲酸 (HTIB)。

通过荧光分光光度法测量过氧化物酶活性的方法的例子包括一种方法，该方法包括使过氧化物酶与过氧化氢和荧光物质的组合物，即过氧化物酶的底物反应，及用荧光分光光度计，荧光多孔板读数器等

测量产生的荧光的强度。荧光物质的例子包括 4-羟基苯乙酸, 3-(4-羟基苯基)丙酸和香豆素。

通过发光测量法测量过氧化物酶活性的方法的例子包括一种方法, 该方法包括使过氧化物酶与过氧化氢和发光物质的组合物, 即过氧化物酶的底物反应, 及用发光强度计, 发光多孔板读数器等测量产生的冷光的强度。发光物质的例子包括鲁米诺化合物和光泽精化合物。

在酶是碱性磷酸酶的情况下, 碱性磷酸酶活性可以通过, 例如, 发光测量法测量。通过发光测量法测量碱性磷酸酶活性的方法的例子包括一种方法, 该方法包括使碱性磷酸酶与其底物反应, 及用发光强度计, 发光多孔板读数器等测量产生的冷光的发光强度。碱性磷酸酶的底物的例子包括 3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧环丁烷二钠盐 (AMPPD), 2-氯-5-{4-甲氧基螺[1,2-二氧环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]cane]-4-基}苯基磷酸二钠盐 (CDP-StarTM), 3-{4-甲氧基螺[1,2-二氧环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]-4-基}苯基磷酸二钠盐 (CSPDTM) 和[10-甲基-9(10H)-吡啶叉基]苯氧甲基磷酸二钠盐 (LumigenTM APS-5)。

在酶是 β -D-半乳糖苷酶的情况下, β -D-半乳糖苷酶活性可以通过, 例如, 分光光度法 (比色法), 发光测量法或荧光分光光度法测量。通过分光光度法 (比色法) 测量 β -D-半乳糖苷酶活性的方法的例子包括使用邻硝基 phe- β -D-吡喃半乳糖苷的方法。通过发光测量法测量 β -D-半乳糖苷酶活性的方法的例子包括一种方法, 该方法包括使 β -D-半乳糖苷酶与其底物反应, 及通过发光强度计, 发光多孔板读数器等测量反应溶液的发光。 β -D-半乳糖苷酶的底物的例子包括 Galacton-Plus (由 Applied Biosystems 生产) 及其类似物。通过荧光分光光度法测量 β -D-半乳糖苷酶活性的方法的例子包括一种方法, 该方法包括使 β -D-半乳糖苷酶与其底物反应, 及通过荧光分光光度计, 荧光多孔板读数器等测量反应溶液的荧光。 β -D-半乳糖苷酶的底物的例子包括 4-甲基伞形酮- β

基-D-吡喃半乳糖苷。

在酶是萤光素酶的情况下，萤光素酶活性可以通过，例如，发光测量法来测量。通过发光测量法测量萤光素酶活性的方法的例子包括一种方法，该方法包括使萤光素酶与其底物反应，及通过发光强度计，发光多孔板读数器等测量反应溶液的发光。萤光素酶的底物的例子包括萤光素和腔肠素。

在标记物是除荧光物质，发光物质，放射性同位素或酶之外的其它标记物的情况下，可以根据一种方法进行检测，该方法包括：使其中能与标记物特异性结合的物质被荧光物质，发光物质，放射性同位素，酶等标记的被标记物与构成免疫复合物的标记抗体或标记竞争性物质的标记物结合；通过使用上文所述标记能与标记物结合的物质，荧光物质，发光物质，放射性同位素或酶进行测量。能与标记物特异性结合的物质例子包括能与标记物特异性结合的抗体，能与生物素（标记物）特异性结合的物质即亲和素或链亲和素。此外，还可以根据包括以下步骤的方法进行检测：使能与标记物特异性结合的物质，如能与标记物特异性结合的抗体和亲和素或链亲和素与免疫复合物的标记物结合；然后使标记抗体与标记物结合，其中标记抗体通过用荧光物质，发光物质，放射性同位素，酶等标记能与物质结合的抗体来形成，所述物质能与标记物（抗体的例子包括能与抗体的恒定区特异性结合的抗体，和能与亲和素或链亲和素特异性结合的抗体）特异性结合；和通过使用上文所述荧光物质，发光物质，放射性同位素或酶进行测量。

这种检测中所用抗体，能与亲和素或链亲和素或标记物特异性结合的抗体，能与抗体的恒定区特异性结合的抗体，能与亲和素或链亲和素特异性结合的抗体可以是多克隆或单克隆抗体，或其中 Fc 部分已被去除的抗体片段，如 Fab，通过胃蛋白酶处理得到的 $F(ab')_2$ 和通过胃蛋白酶处理及还原处理得到的 Fab'。

(13)待测组分的测定

对于待测组分的测定，必需用标准品，即，已知浓度组分的溶液制备显示组分浓度与测得值（由标记产生的信息的量）之间关系的校正曲线。组分的浓度可以如下法测定：制备校正曲线；用样品进行测量；和将所得测定值与预先产生的校正曲线关联起来。

(14)水性介质及其它共存物质

用于本发明的免疫测定方法的水性介质的例子包括去离子水，蒸馏水和缓冲液，优选缓冲液。用于制备缓冲液的缓冲剂不受特别限制，只要其具有缓冲能力即可。缓冲液的例子包括 pH 为 1-11 的缓冲液，如乳酸盐缓冲液，柠檬酸盐缓冲液，醋酸盐缓冲液，琥珀酸盐缓冲液，邻苯二甲酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液，三乙醇胺缓冲液，二乙醇胺缓冲液，赖氨酸缓冲液，巴比妥酸盐缓冲液，咪唑缓冲液，苹果酸盐缓冲液，草酸盐缓冲液，甘氨酸缓冲液，硼酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液，甘氨酸缓冲液或 Good's 缓冲液。

Good's 缓冲液的例子包括 2-吗啉基乙磺酸 (MES) 缓冲液，双(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷 (Bis-Tris) 缓冲液，三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris) 缓冲液，N-(2-乙酰胺基)亚氨基二乙酸 (ADA) 缓冲液，哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸) (PIPES) 缓冲液，2-[N-(2-乙酰胺基)氨基]乙磺酸 (ACES) 缓冲液，3-吗啉基-2-羟基丙磺酸 (MOPSO) 缓冲液，2-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]乙磺酸 (BES) 缓冲液，3-吗啉基丙磺酸 (MOPS) 缓冲液，2-{N-[三(羟甲基)甲基]氨基}乙磺酸 (TES) 缓冲液，N-(2-羟乙基)-N'-(2-磺乙基)哌嗪 (HEPES) 缓冲液，3-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸 (DIPSO) 缓冲液，2-羟基-3-{[N-三(羟甲基)甲基]氨基}丙磺酸 (TAPSO) 缓冲液，哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙烷-3-磺酸) (POPSO) 缓冲液，N-(2-羟乙基)-N'-(2-羟基-3-磺丙基)哌嗪 (HEPPSO) 缓冲液，N-(2-羟乙基)-N'-(3-磺丙基)哌嗪 (EPPS) 缓冲液，tricine[N-三(羟甲基)甲基甘氨酸]缓冲液，vicine[N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸]缓冲液。

液，3-[N-三(羟甲基)甲基]氨基丙磺酸（TAPS）缓冲液，2-(N-环己基氨基)乙磺酸（CHES）缓冲液，3-(N-环己基氨基)-2-羟基丙磺酸（CAPSO）缓冲液和3-(N-环己基氨基)丙磺酸（CAPS）缓冲液。

缓冲液的浓度不受特别限制，只要其是适于测量的浓度即可，优选为0.001-2.0 mol/L，更优选0.005-1.0 mol/L，尤其优选0.01-0.1 mol/L。

在本发明的免疫测定方法中，金属离子，盐，糖，表面活性剂，防腐剂，蛋白，蛋白稳定剂等可以一起出现。

金属离子的例子包括镁离子，锰离子和锌离子。

盐的例子包括氯化钠和氯化钾。

糖的例子包括甘露醇和山梨醇。

防腐剂的例子包括叠氮钠，抗生素（链霉素，青霉素，庆大霉素等），BioAce，Proclin 300 和 Proxel GXL。

蛋白的例子包括牛血清白蛋白（BSA），胎牛血清（FBS），酪蛋白和 BlockAce（由 Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.生产）。

蛋白稳定剂的例子包括过氧化物酶稳定缓冲液（由 DakoCytomation 生产）。

(15)免疫测定试剂

本发明的免疫测定试剂可以用于本发明的免疫测定方法，其包括上文提及的(3)的胆汁酸衍生物，必要时还包括聚氧乙烯非离子型表面活性剂。本发明的免疫测定试剂的例子包括一种试剂，该试剂包括选自以下(i)-(iii)的组分，(3)的胆汁酸衍生物，必要时还包括聚氧乙烯非

离子型表面活性剂：

- (i)能结合组分的第一抗体和能结合组分的标记第二抗体；
 - (ii)标记竞争性物质和既能结合组分又能结合竞争性物质的抗体；
- 以及
- (iii)竞争性物质和既能结合组分又能结合竞争性物质的标记抗体。

本发明的免疫测定试剂的形式不受特别限制，只要其为促成本发明的免疫测定方法的形式即可。试剂的形式的例子包括液体形式，冻干形式等。在使用冻干形式的试剂的情况下，先将试剂溶解于前述水性介质等之中后，再将试剂用于测量。

关于本发明的免疫测定试剂中所使用的胆汁酸衍生物，能结合组分的抗体，竞争性物质，能结合组分的标记抗体和标记竞争性物质，前述胆汁酸衍生物，前述能结合组分的抗体，前述竞争性物质，前述能结合组分的标记抗体和前述标记竞争性物质可以分别使用。此外，本发明的免疫测定试剂必要时可以包括前述水性介质，前述金属离子，前述盐，前述糖，前述表面活性剂，前述防腐剂，前述蛋白，前述蛋白稳定剂等。

此外，本发明的免疫测定试剂可以试剂盒的形式储存和分发。试剂盒的例子包括由两种试剂组成的试剂盒和由三种试剂组成的试剂盒，构成试剂盒的试剂中的组成可以由本领域技术人员适当选择。例如，通过将胆汁酸衍生物溶解在水性介质中制得的溶液可以作为样品的稀释用溶液组成试剂盒，其可以是构成试剂盒的试剂之一。

(16)抑制样品中的血红蛋白干扰的方法

本发明提供了在免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分的方法中抑制血红蛋白干扰的方法。在免疫测定待测组分的方法中，血红蛋白的干扰可以通过与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物的共存来抑制。与样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物

的共存抑制了样品中血红蛋白的干扰，从而产生了准确的测量。

在下文中，将参照实施例对本发明进行具体描述，其不应被解释为限制本发明的范围。

[实施例 1]

[1]抗 MxA 蛋白单克隆抗体的制备

产生单克隆抗体 KM1124 的杂交瘤细胞系 KM1124 (FERM BP-4729)和产生单克隆抗体 KM1135 的杂交瘤细胞系 KM1135 (FERM BP-4731)各自以 $5-20 \times 10^6$ 细胞/动物的量向经降植烷 (pristane) 处理的 8 周龄雌性裸鼠 (Balb/c) 腹膜内注射。10-21 天后，杂交瘤细胞在小鼠腹水中癌化，收集小鼠腹水。将收集到的腹水以 3000 rpm 离心 5 分钟，以除去固体内容物，收集上清液。通过辛酸沉淀法 (抗体-实验室手册 (Antibodies-A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) 从上清液中纯化单克隆抗体，分别得到单克隆抗体 KM1124 和 KM1135。

KM1124 是能与从人 MxA 蛋白的氨基末端开始计数的第 220-297 个残基中的表位结合的小鼠单克隆抗体，KM1135 是能与从人 MxA 蛋白的氨基末端开始计数的第 10-220 个残基中的表位结合的小鼠单克隆抗体。

[2]重组 MxA 蛋白的制备

用通过在 pET-14b 载体 (由 Novagen, EMD Biosciences 生产) 的 NdeI 和 BamHI 之间插入含有编码人 MxA 蛋白的 cDNA 的 NdeI-BamHI 片段而产生的人 MxA 蛋白表达载体 pET14b-MxA (Nucleic Acids Res., 32, 643-652, 2004) 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 菌株。该转化体表达已加入 N 末端 His 标签的 MxA 蛋白。

将所得转化体接种入 5 mL 含氨苄西林的 LB 培养基中，在 37°C

振荡培养细胞，直至 600 nm 处的光密度（OD₆₀₀）达到 0.5。将该培养液接种入 250 mL 含氨苄西林的 LB 培养基中，在 37°C 振荡培养细胞，直至 600 nm 处的光密度达到 0.3-0.5。向该培养物中加入异丙基硫代半乳糖苷（IPTG），使最终浓度为 0.4 mmol/L，随后再在 37°C 振荡培养 2 小时，之后结束培养。将培养液在 4°C 以 3000 rpm 离心 10 分钟，以收集细菌细胞。在 -80°C 储存细菌细胞，直至制备 MxA 蛋白。

由于 MxA 蛋白以包涵体的形式存在于细菌细胞中，因此将细菌细胞在冰上融化，加入 20 mL 冰冷的结合缓冲液（5 mmol/L 咪唑，0.5 mol/L 氯化钠，20 mmol/L Tris-HCl，pH 7.9），得到悬浮液。将细菌细胞悬浮液超声处理 5 次，每次 30 秒，以使细胞破裂，然后在 4°C 以 4000 rpm 离心 10 分钟。除去上清液，沉淀悬浮在加入的 20 mL 冰冷的结合缓冲液中。同样再次进行超声处理和离心。除去上清液，向沉淀中加入 20 mL 含有 6 mol/L 尿素的结合缓冲液，得到悬浮液。进行类似的超声处理后，混合物在冰上放置 30 分钟，使包涵体溶解，然后在 4°C 以 10,000 rpm 离心 30 分钟。收集上清液，然后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

向所得溶液中加入 0.5 mL Ni-NTA His-Bind 树脂（由 Novagen, EMD Biosciences 生产），然后在 4°C 全部旋转混合 2 小时，使 MxA 蛋白经 His 标签与树脂结合。该混合物在 4°C 以 3000 rpm 离心 2 分钟，以回收树脂。向树脂中加入 10 mL 含有 6 mol/L 尿素的冰冷结合缓冲液后，全部混合物在 4°C 以 3000 rpm 离心 2 分钟，以回收树脂。重复该洗涤操作后，之后向树脂中另加入 10 mL 冰冷的洗涤缓冲液（6 mol/L 尿素，60 mmol/L 咪唑，0.5 mol/L 氯化钠，20 mmol/L Tris-HCl，pH 7.9），全部混合物在 4°C 以 3000 rpm 离心 2 分钟，以回收树脂。

将 10 mL 冰冷的洗脱缓冲液（6 mol/L 尿素，1 mol/L 咪唑，0.5 mol/L 氯化钠，20 mmol/L Tris-HCl，pH 7.9）加入到树脂中，在 4°C 全部旋转混合 2 小时，以从树脂上洗脱 MxA 蛋白。混合物随后在 4°C 以 3000 rpm 离心 2 分钟，收集上清液作为 MxA 蛋白溶液。

[3]抗 MxA 蛋白抗体固定化板的制备

将[1]中制得的抗 MxA 蛋白单克隆抗体 KM1135 用 PBS 稀释至浓度为 5 μ g/mL, 混合物以 100 μ L/孔的量分配在 96 孔微量滴定板(由 Nalge Nunc International 生产)中。将滴定板放置 3 天后, 吸除上清液, 加入 25% BlockAce (由 Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.生产)和 300 μ L PBS, 滴定板在室温下放置过夜, 以进行阻断。除去阻断溶液后, 用 PBS 洗涤。滴定板用真空干燥器干燥 3 天后用作抗 MxA 蛋白单克隆抗体固定化板。

[4]过氧化物酶标记的抗 MxA 蛋白抗体的制备

通过下文所述马来酰亚胺法使[1]中制备的抗 MxA 蛋白单克隆抗体 KM1124 与过氧化物酶(以下简称 POD)结合, 得到 POD 标记抗 MxA 蛋白抗体。

首先, 用 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 8.0)取代含有 2 mg 抗 MxA 蛋白抗体 KM1124 的溶液的溶剂, 加入 0.086 mg 2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐(由 PIERCE 生产)。搅拌混合物, 搅拌后继续在 30 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)平衡的 Sephadex G25(由 Amersham Bioscience 生产)柱(1.5 cm 直径 \times 30 cm)除去反应溶液中未反应的 2-亚氨基硫杂环戊烷, 并收集巯基化 KM1124。

同时, 将摩尔比相当于抗 MxA 蛋白抗体 KM1124 的 5 倍量的 2.5 mg POD(由 TOYOBO 生产, 过氧化物酶 I-C)溶解在 250 μ L 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中。溶液在 30 $^{\circ}$ C 加温 5 分钟, 加入 0.72 mg 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺(由 Nacalai Tesque 生产)中的 N-(6-马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺(EMCS, 由 DOJINDO Laboratories 生产), 搅拌混合物, 反应继续在 30 $^{\circ}$ C 进行 30 分钟。用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)平衡的 Sephadex G25 柱(1.5 cm 直径 \times 30 cm)将反应溶液进行凝胶过滤, 以除去未反应的 EMCS, 并收集马来酰亚胺化 POD。

将以上获得的巯基化抗 MxA 蛋白抗体 KM1124 的溶液与马来酰亚胺化 POD 的溶液混合，在 30°C 反应 1 小时。所得标记抗体用 POD 标记稀释剂（液体组合物）缓冲液[50 mmol/L Bis-Tris（由 DOJINDO Laboratories 生产），0.1% BSA（由 InterGen 生产）]稀释 800 倍。

[5]样品稀释剂的制备

各自制备以下组合物的样品稀释剂：

HEPES (pH 8.0)	0.1 mol/L
表面活性剂	（类型和浓度见表 1）
NaCl	1.5 mol/L
BSA	0.1%
叠氮钠	0.1%

[6]使用夹心酶联免疫吸附法的 MxA 蛋白测定系统的构建

上述[2]中制备的 MxA 蛋白溶液用上述[5]中制备的样品稀释剂稀释成浓度为 0（只有缓冲液），3.2，6.3，12.5，25，50，100 和 200 ng/mL 的 MxA 蛋白溶液，将这些溶液用作测量用样品。

向上述[3]中产生的抗 MxA 蛋白抗体固定化板中加入 100 μ L 测量用样品，然后混合物在室温孵育 1 小时，使测量用样品中的 MxA 蛋白与抗体结合。除去测量用样品后，加入 400 μ L 洗涤液（含 0.05%吐温 20（由 KANTO CHEMICAL 生产）的 PBS），再除去洗涤液，如此重复该洗涤操作 5 次。接着加入 100 μ L [4]中制备的 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体溶液，继续在室温下反应 30 分钟。除去标记抗体，重复进行加入 400 μ L 洗涤液，然后除去洗涤液的洗涤操作 5 次。在暗处加入 100 μ L 含 0.05%四甲基联苯胺和过氧化氢的 POD 的发色底物 TMBBlue（由 Serological 生产），继续在室温反应 10 分钟。加入 100 μ L 0.5 mol/L 硫酸，并在室温孵育 10 分钟，使反应终止。用板读数器测量 450 nm 波

长处的吸光度。结果显示，吸光度随着测量用样品中 MxA 蛋白浓度的增加而增大，这证明了 MxA 蛋白可以被测量。

实际上，在测量血液中的 MxA 蛋白浓度的情况下，以这种方式获得的校正曲线被用来测定血液中的 MxA 蛋白。

[7]使用血液的 MxA 蛋白的加样回收试验

使用用 EDTA·2Na 采血管从两名病毒感染的 MxA 蛋白阳性患者和三名健康个人采集的血液。

将该血液用[5]的样品稀释剂稀释 10 倍，所得样品根据方法[6]测量各样品中的 MxA 蛋白浓度，将测得的浓度定义为未添加 MxA 蛋白样品（以下简称 A）的 MxA 蛋白浓度。

接着，向 9 份这些样品溶液中加入 1 份上述[2]中制备的 500 ng/mL MxA 蛋白溶液，制得的样品根据方法[6]测量各样品中的 MxA 蛋白浓度，将测得的浓度定义为添加 MxA 蛋白样品（以下简称 B）的 MxA 蛋白浓度。按下式计算 MxA 蛋白回收率（%）：

$$\text{MxA 蛋白回收率 (\%)} = (B-A)/50*100 \quad (\text{式 1})$$

理论上，当血红蛋白的干扰被完全抑制时，MxA 蛋白回收率（%）应变成 100%，当血红蛋白干扰出现时，其值将减小。

对比实施例 1

除了将实施例 1 中[5]的组合物去除表面活性剂后的样品稀释剂用作样品稀释剂外，通过与实施例 1 类似的方法进行加样回收试验。

对比实施例 2

通过与实施例 1 类似的方法进行加样回收试验，其中用 0.2% Nonidet P40 作为实施例 1 中[5]的组合物中的表面活性剂。

表 1

表面活性剂	浓度 (%)	MxA 蛋白回收率 (%)					
		阳性 1	阳性 2	阴性 1	阴性 2	阴性 3	平均值
CHAPS	4.9	88.9	96.6	97.5	93.8	88.2	93.0
CHAPSO	5.0	76.3	92.1	100.0	91.4	86.9	89.3
BIGCHAP	2.5	76.7	91.8	103.3	86.6	88.2	89.3
脱氧-BIGCHAP	1.2	70.6	82.9	82.8	81.4	72.5	78.0
不含表面活性剂 (对比实施例 1)	0	70.2	67.0	66.9	75.7	72.8	70.5
Nonidet P-40 (对比实施例 2)	0.2	67.9	75.7	82.6	68.2	67.9	72.5

表 1 显示，测量中胆汁酸衍生物的加入增加了 MxA 蛋白回收率的水平，这表明血红蛋白的干扰被抑制了。

[实施例 2]

对归因于向以上[5]中所述含 4.9% CHAPS 的样品稀释剂组合物中加入了 Nonidet P-40 的灵敏度进行检测。以 0%，0.2%，1%和 1.4%的量向上述[5]的样品稀释剂中加入 Nonidet P-40，制备浓度为 0（仅含缓冲液），3.2，6.3，12.5，25，50，100 和 200 ng/mL 的在上述[2]中制得的 MxA 蛋白的溶液，通过实施例 1 的[6]中所述方法测量吸光度（Abs）。结果见表 2。

表 2

MxA 蛋白 (ng/mL)	加入的 Nonidet P-40 的浓度 (%)			
	0.0	0.2	1.0	1.4
0	0.022	0.022	0.022	0.022
3	0.038	0.041	0.055	0.060
6	0.055	0.061	0.087	0.096
12	0.082	0.093	0.140	0.157
24	0.139	0.158	0.244	0.273
48	0.243	0.274	0.424	0.477
96	0.433	0.496	0.761	0.853
192	0.810	0.915	1.387	1.528

表 2 显示，根据 Nonidet P-40 量的不同，吸光度的增加引起了灵敏度的增加。

[实施例 3]

将用 EDTA·2Na 采血管从两名病毒感染的 MxA 蛋白阳性患者和三名健康个人采集的血液用作样品。

按照与实施例 1 类似的方法测定 MxA 蛋白回收率，除了用含有 4.9% CHAPS 的样品稀释剂，含有 4.9% CHAPS 和 1.4% Nonidet P-40 的样品稀释剂作为样品稀释剂。结果见表 3。

表 3

表面活性剂	MxA 蛋白回收率 (%)					
	阳性 3	阳性 4	阴性 4	阴性 5	阴性 6	平均值
CHAPS	93.9	89.3	96.1	97.5	98.3	95.0
CHAPS+ Nonidet P-40	90.1	83.8	96.1	100.5	104.2	94.9

表 3 显示，加入 Nonidet P-40 时，回收率仍未减少。

工业实用性

本发明提供了免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分的方法，其实现了对血红蛋白干扰的抑制，并适用于临床诊断。

专利名称(译)	待测组分的免疫测定方法		
公开(公告)号	CN101568834A	公开(公告)日	2009-10-28
申请号	CN200780048145.7	申请日	2007-11-01
[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		
当前申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
[标]发明人	川村瑞穗 富田聪仁		
发明人	川村瑞穗 富田聪仁		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/721 C07K16/18 G01N33/68 Y10T436/25125		
代理人(译)	杨青		
优先权	2006299498 2006-11-02 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请描述了免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分的方法，其包括在与该样品中所固有的胆汁酸衍生物不同的胆汁酸衍生物存在下使含血红蛋白样品中的待测组分与能结合该组分的抗体反应；在免疫测定含血红蛋白样品中的待测组分中抑制血红蛋白的干扰的方法，其包括在不同于样品中所固有的胆汁酸衍生物的胆汁酸衍生物存在下使含血红蛋白样品中的待测组分与能结合该组分的抗体反应；含血红蛋白样品中的待测组分的免疫测定试剂，其包括胆汁酸衍生物。

表面活性剂	浓度 (%)	MxA 蛋白回收率 (%)					
		阳性 1	阳性 2	阴性 1	阴性 2	阴性 3	平均值
CHAPS	4.9	88.9	96.6	97.5	93.8	88.2	93.0
CHAPSO	5.0	76.3	92.1	100.0	91.4	86.9	89.3
BIGCHAP	2.5	76.7	91.8	103.3	86.6	88.2	89.3
脱氧-BIGCHAP	1.2	70.6	82.9	82.8	81.4	72.5	78.0
不含表面活性剂 (对比实施例 1)	0	70.2	67.0	66.9	75.7	72.8	70.5
Nonidet P-40 (对比实施例 2)	0.2	67.9	75.7	82.6	68.2	67.9	72.5