



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105122060 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201380070635. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 26

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/48(2006. 01)

2013-005130 2013. 01. 16 JP

G01N 33/545(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 07. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/084905 2013. 12. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/112318 JA 2014. 07. 24

(71) 申请人 富士瑞必欧株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 铁本融 平田稔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 庞立志 刘力

权利要求书1页 说明书7页

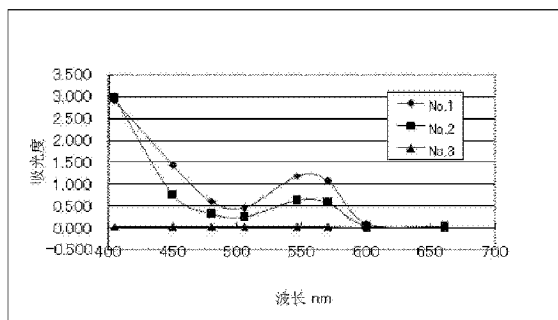
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

样本中的血红蛋白 A1c 的免疫测定方法

(57) 摘要

公开了在未对全血试样进行前处理的情况下,可免疫测定血红蛋白 A1c 的手段。本发明的样本中的血红蛋白 A1c 的免疫测定包括:使胶乳粒子与未实施前处理的全血样本在低渗液中接触,接着使吸附于胶乳粒子上的血红蛋白 A1c 与抗血红蛋白 A1c 抗体接触。免疫测定优选通过凝集法来进行。低渗液是例如以 0. 02~0. 2mol/L 的浓度含有缓冲能力从中性至碱性侧为最大的 Good's 缓冲液的缓冲液。



1. 样本中的血红蛋白 A1c 的免疫测定方法,其包括:使胶乳粒子与未施行前处理的全血样本在低渗液中接触,接着使吸附于胶乳粒子上的血红蛋白 A1c 与抗血红蛋白 A1c 抗体接触。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中,所述免疫测定通过凝集法来进行。

3. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述低渗液是以 0.02 ~ 0.2mol/L 的浓度含有缓冲能力从中性至碱性侧为最大的 Good' s 缓冲液的缓冲液。

样本中的血红蛋白 A1c 的免疫测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及样本中的血红蛋白 A1c 的免疫测定方法。

背景技术

[0002] 血红蛋白 A1c (HbA1c)是具有由 2 条 α 链与 2 条 β 链组成的异源四聚体结构的血红蛋白(Hb),其中 β 链的 N 末端缬氨酸的 α 氨基是进行了非酶学糖基化的糖化血红蛋白。该 HbA1c 的血中含量反映糖尿病的较长期的血糖控制状态。所以,测定 HbA1c 在获知血糖控制状态方面在临床上极具意义,为了监控糖尿病的治疗效果等而进行 HbA1c 的测定。之后,糖尿病的诊断基准自 2010 年 7 月起被修订,评估发现 HbA1c 值在与视网膜病的发病之间具有一定的关系,从而将 HbA1c 6.1% 以上(JDS 值)加入糖尿病的判定基准(非专利文献 1)。进而,自 2012 年 4 月起,为了配合世界标准而从 6.1% 以上(JDS 值)变更为 6.5% 以上(NGSP 值)。

[0003] 近年来,在 HbA1c 测定中,以检查中心为中心,由于 HPLC 法中的大量样本处理的极限,利用自动分析仪的免疫测定法的开发得到发展。继而,还开发了从离心沉降血的血球层中采集血球,并用样本稀释液来制备溶血液的仪器,自动化得到发展。

[0004] 但是,事实上也存在无法进行从而对离心操作或溶血·稀释等前处理敬而远之的设备,若与可以说自动化得到发展的 HPLC 法相比,对免疫法而言,需要前处理的事实仍旧没有改变。例如,即使不进行离心沉降血的稀释溶血,而对全血样本进行稀释溶血来进行测定,在 HbA1c 测定中,红血球中的血红蛋白是测定对象,存在于红血球中,但若在采血后将采血管竖立,则红血球会发生沉降,从而会如血清样品那样,从液面进行采样时会无法采集沉降的红血球。所以,需要在颠倒混和后短时间内进行采样,或者将针头探入管底附近进行采集。此外,已知由于作为 HbA1c 的特异性位点的 β 链 N 末端包埋在蛋白质分子的高级结构中而存在,因此在天然状态下,并不会与 HbA1c 特异性的单克隆抗体反应。所以,据此看来,也需要对 HbA1c 加入改性剂而使蛋白的高级结构发生改变,或者将 β 链 N 末端区域用酶切断使之成为可与抗体反应的状态等的前处理。

[0005] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1:日本专利第 2677753 号

非专利文献

非专利文献 1:糖尿病 53 (6) 450, 2010。

发明内容

[0006] 发明要解决的问题

本发明的目的在于提供在未对全血试样进行前处理的情形下可以免疫测定 HbA1c 的方法。

[0007] 用于解决问题的方法

本申请发明人进行了深入研究, 结果发现: 在使胶乳粒子浮游于低渗透压的缓冲液中的胶乳试剂中, 在未进行前处理的情形下直接添加全血样本, 由此不会受到血红蛋白大幅过量存在的不良影响, 可产生全血样本的溶血以及血红蛋白在胶乳粒子表面的吸附, 在没有溶血处理、改性处理的情形下也可以利用抗 HbA1c 抗体来检测 HbA1c, 从而完成了本申请发明。

[0008] 即, 本发明提供样本中的血红蛋白 A1c 的免疫测定方法, 其包括: 使胶乳粒子与未施行前处理的全血样本在低渗液中接触, 接着使吸附于胶乳粒子上的血红蛋白 A1c 与抗血红蛋白 A1c 抗体接触。

[0009] 发明效果

根据本发明, 例如在使含有胶乳粒子的低渗液与全血样本接触的 1 个步骤中, 可以实现全血的溶血和血红蛋白在胶乳粒子上的吸附这两者。以往的 HbA1c 免疫测定法中需要样本的稀释溶血处理或特别的改性处理, 但根据本发明可以省略这类前处理步骤。特别是通用的自动分析仪中, 也存在仅为了样本稀释和溶血而使用反应槽 (cell) 的例子, 但根据本发明则无此需要, 因而样本处理能力显著提高。除了缩短处理时间之外, 还可减少以往在前处理中所使用的试剂类、试管、芯片等消耗品, 抑制医疗废弃物量和实施成本。

附图说明

[0010] [图 1] 是分别对 HbA1c 标准品溶液 (No. 1)、溶血处理完成的全血溶液 (No. 2)、和血浆溶液 (No. 3) 测定吸光度的结果。考虑分光光度计的性能, 测定由通常使用浓度进行了 2 倍稀释的样品。

[0011] [图 2] 是制备 2 种标准试样而制作的校准曲线。

[0012] [图 3] 是示出血球稀释溶血样品、与未实施前处理的全血样本直接作为全血样品进行测定时的反应过程中的吸光度的变化的图。

[0013] [图 4] 是利用在标准品中以不同浓度加入 γ 球蛋白而制备的标准试样制作的校准曲线。

具体实施方式

[0014] 本发明的方法的特征在于, 在没有前处理的情形下直接使用采血后的全血。“前处理”是指使胶乳粒子与样本接触前对样本实施的处理, 包括溶血处理和蛋白质改性处理。用于防止采血后的血液的溶血的 EDTA 添加或肝素添加不包含在本发明所说的“前处理”中。

[0015] 本发明中所用的低渗液只要是渗透压低至能够使全血溶血程度的水性液体, 则没有特别限定。血液的渗透压为约 280 mOsm/kgH₂O, 因而只要是渗透压充分低于其 (例如 100 mOsm/kgH₂O 以下) 的液体, 则可以用作低渗液。例如, 可以使用纯水作为低渗液, 或者也可以优选使用以适当浓度 (例如 0.02 ~ 0.2 mol/L 左右) 含有从中性至碱性侧缓冲能力为最大的 Good's 缓冲液的低渗透压的缓冲液。作为这种 Good's 缓冲液的具体例, 可举出以下物质, 但并不受它们限定。

BES [N, N- 双 (2- 羟基乙基) -2- 氨基乙磺酸]

MOPS [3- 吗啉代丙磺酸]

TES [N- 三 (羟基甲基) 甲基 -2- 氨基乙磺酸]

HEPES [4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸]
DIPSO [3-[N,N-双(2-羟基乙基)氨基]-2-羟基-1-丙磺酸]
TAPSO [3-(N-三[羟基甲基]甲基氨基)-2-羟基丙磺酸]
POPSO [哌嗪-1,4-双(2-羟基丙磺酸)]
HEPPSO [N-(羟基乙基)哌嗪-N'-2-羟基丙磺酸]
EPPS [3-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]丙磺酸]
Tricine [N-[三(羟基甲基)甲基]甘氨酸]
Bicine [N,N-双(2-羟基乙基)甘氨酸]
TAPS [N-三(羟基甲基)甲基-3-氨基丙磺酸]。

[0016] 本发明中使用的胶乳粒子是未敏化物,即,是未吸附有抗原等蛋白质的胶乳粒子。胶乳粒子自身可使用与公知的HbA1c免疫凝集测定试剂盒中所用者相同的那些。

[0017] 本发明的方法中,使未实施前处理的全血样本与胶乳粒子在低渗液中接触,使血红蛋白(包含通常的血红蛋白和作为糖化血红蛋白的HbA1c)吸附于胶乳粒子表面。在全血样本中,存在与胶乳粒子量相比为过剩量的血红蛋白,但由于通常的血红蛋白与糖化血红蛋白HbA1c之间,在未敏化胶乳上的吸附实质上并没有差别,因而吸附于胶乳粒子表面的HbA1c量变得直接反映HbA1c在存在于全血样本中的总Hb量中所占的比率。使用含有胶乳粒子(粒径50~200nm、浓度0.05~0.2%)的低渗液100~200 μ L的反应体系的情形中,添加1 μ L~2 μ L左右的全血样本即可。使全血样本与胶乳粒子在低渗液中接触的时间,若是上述规模的反应体系,则可以为室温或37 $^{\circ}$ C下1~5分钟左右。以往的HbA1c免疫测定法中所用的抗HbA1c抗体是HbA1c特异性的识别 β 链N末端区域的抗体,但该 β 链N末端区域包埋存在于HbA1c分子的高级结构中,因而为了用抗HbA1c抗体免疫测定HbA1c,通常也需要样本的改性处理。然而,若使HbA1c吸附于胶乳,则由于HbA1c的 β 链N末端区域会露出,因而即使没有特别的改性处理,也能够利用抗HbA1c抗体进行免疫测定。

[0018] 接着,使吸附于胶乳粒子上的HbA1c与抗HbA1c抗体接触,通过免疫测定测定样本中的HbA1c。免疫测定手法自身是该领域中公知的,本发明的方法中可使用任意手法。若基于反应形式对免疫测定法进行分类,则有夹心法、竞争法、凝集法、免疫层析法、蛋白质印迹法等,若以标记进行分类,则有放射免疫测定、荧光免疫测定、酶免疫测定(EIA)、生物素免疫测定等,但它们均包含在本发明所说的“免疫测定”中,可以在本发明的方法中采用。本发明中最优选的免疫测定手法是凝集法,但由于使含有胶乳粒子的低渗液与未实施溶血处理的全血样本接触、使HbA1c吸附于胶乳粒子表面后,将该反应液连同粒子用作样品进行通常的免疫测定,则可以测定HbA1c,因此也可以利用凝集法之外的手法。应予说明,本发明中,术语“测定”包括定性检测、定量、半定量。

[0019] 例如,凝集法中,通过使吸附于胶乳粒子的表面的HbA1c与抗HbA1c抗体接触,利用抗HbA1c抗体经由HbA1c将胶乳粒子结合、凝集,反应液的浊度增加。通过目视确认反应液的混浊,由此可以检测HbA1c的存在(定性检测)。用自动分析仪等光学测定浊度,也可以对HbA1c量进行定量。此时,只要准备HbA1c浓度已知的标准试样进行测定,光学测定各标准试样的浊度,对浊度测定值与HbA1c浓度之间的关系进行描点,制作校准曲线即可。通过将全血样本的测定值与该校准曲线进行匹配,可以求出全血样本中的HbA1c量。

[0020] 通过夹心法测定HbA1c时,只要预先使抗Hb抗体(会与包括HbA1c在内的血红蛋

白整体结合)固定于固相,使含有胶乳粒子的低渗液与全血样本接触后的反应液与固相化抗体反应,洗涤后,与经标记的抗 HbA1c 抗体反应,洗涤后,基于来自标记的信号测定结合于固相的标记抗体即可。也可以将抗 HbA1c 抗体制为固相化抗体使用,将抗 Hb 抗体制为标记抗体使用。测定 HbA1c 浓度已知的标准试样,对信号强度和 HbA1c 浓度的关系进行描点,制作校准曲线,只要将全血样本的测定值与该校准曲线进行匹配,则可以对全血样本中的 HbA1c 量进行定量。

[0021] 作为夹心法的一例,例如在利用横向流动方式的免疫层析法来测定 HbA1c 时,免疫层析器具可以使用如下所述构成的器具。

[0022] 如硝基纤维素膜那样的由多孔性原材料构成的基质通常形成为带状。在该基质上设置固定有抗 HbA1c 单克隆抗体的检测区,在其上游侧(后述的展开液流动方向上的上游侧)设置点样了已标记的抗 Hb 单克隆抗体的标记试剂区。标记试剂区通常由点样了标记抗体的多孔性的垫构成。在基质的上游端设置储藏了展开液的展开液槽。使用酶作为标记时,将点样有标记酶的底物的底物区设置于标记试剂区的上游即可。

[0023] 在测定时,将 HbA1c 吸附于胶乳粒子表面后的反应液连同粒子添加至标记试剂区。若在添加后破坏展开液槽,则展开液会通过基质的毛细管现象向下游流动。展开液依次通过基质区和标记试剂区,基质、标记抗体、以及吸附有血红蛋白的胶乳粒子与展开液一同流向下流。此时,胶乳粒子表面的血红蛋白与标记抗 Hb 抗体通过抗原抗体反应而结合。该免疫复合体若到达检测区,则会经由胶乳粒子表面的血红蛋白之中的 HbA1c 而使标记抗体被检测区的抗 HbA1c 抗体所捕获。由于基质也同时流动,因而捕获了标记抗体的检测区会呈色。该呈色通过目视判定即可。基于呈色的有无可以进行 HbA1c 的定性检测,另外,基于检测区的呈色的强度还可以进行大致的定量。

[0024] 应予说明,免疫层析器具中,也可以将固定于检测区的抗体作为抗 Hb 抗体,将点样于标记试剂区的标记抗体作为抗 HbA1c 抗体。另外,也可以将针对标记物质的抗体点样于上述检测区的附近来设置控制区,以便能够确认标记抗体的展开是否适当地发生。

[0025] 抗 HbA1c 抗体是公知的,使用抗 HbA1c 抗体的 HbA1c 免疫测定试剂盒也市售有各种产品。本发明中,可以使用这种公知的抗 HbA1c 抗体。此外,抗体的制作方法也是周知的常法,因而也可以与未糖化的通常的血红蛋白进行区分而制作能够特异性识别 HbA1c 的抗体来使用。如上所述,由于 HbA1c 特异性位点为 β 链 N 末端区域,因而只要将该 HbA1c 的 β 链 N 末端区域用作免疫原对动物(排除人)进行免疫,在该动物体内诱发针对 HbA1c 的抗体,则可以从该动物的血清中获得针对 HbA1c 的多克隆抗体。此外,由经免疫的动物回收脾细胞,通过常法的杂交瘤法,可以制备会与 HbA1c 特异性结合的抗 HbA1c 单克隆抗体。从免疫测定中的重现性等观点出发,本发明中优选使用抗 HbA1c 单克隆抗体。

[0026] 上述用作免疫原的 HbA1c 的 β 链 N 末端区域的制备方法、以及针对该区域的单克隆抗体的制作方法的具体例在例如专利文献 1(日本专利第 2677753 号)等中有详述,只要是本领域技术人员则可以适宜制备。以下,对其流程进行具体说明。

[0027] 用作免疫原的 HbA1c 的 β 链 N 末端区域可以通过合成相当于血红蛋白 β 链的 N 末端区域的肽,并使作为 N 末端氨基酸残基的缬氨酸的 α 氨基非酶学地结合葡萄糖来制备。供糖化处理的肽的合成可以使用市售的肽合成仪通过常法实施。合成的血红蛋白 β 链 N 末端区域可以为数个残基左右。序列编号 1 中示出人血红蛋白 β 链 N 末端的 5 残基的序

列。将制备后的 N 末端肽溶解于乙酸,在吡啶存在下添加摩尔比 2 倍量的葡萄糖,在室温搅拌约 10 天,由此可以将 N 末端肽糖化。若肽被糖化,则在 HPLC 中的保留时间会变短,因此糖化反应的进行可以通过 HPLC 进行检测。利用 HPLC 的分析条件例如可以为如下所述。

柱:TSKge1、ODS-120A (4.6×250mm、TOSOH 公司制)

仪器:岛津 HPLC 系统

流动相:10% 乙腈 /0.1% 三氟乙酸至 60% 乙腈 /0.1% 三氟乙酸的线性梯度

流速:0.8mL/min

时间:25min

监测器:吸光度 280nm。

[0028] 所得糖化肽(HbA1c 的 β 链 N 末端区域)可以在例如以下的分离条件下进行 HPLC 纯化。

柱:TSKge1、ODS-120A (21.5×300mm、TOSOH 公司制)

流动相:10% 乙腈 /0.1% 三氟乙酸至 60% 乙腈 /0.1% 三氟乙酸的线性梯度

流速:5mL/min

监测器:吸光度 280nm。

[0029] 可以从纯化后的肽中,将在肽化学合成步骤中所添加的半胱氨酸保护基依照常法脱离后,将在上述分离条件(其中进行监测的吸光度可以为 215nm)下再次进行 HPLC 纯化而得的产物用作免疫原。

[0030] 如上所述制造的 HbA1c 的 β 链 N 末端区域为数个残基的大小,因此在用作免疫原时,可以使之与适当的载体蛋白质(例如,甲状腺球蛋白、麻仁球蛋白等)结合,与适当的佐剂(例如,弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂等)混合,对动物(排除人)进行免疫。藉此,如上所述,可在该动物体内诱发针对免疫原的抗体,由该动物回收脾细胞并通过杂交瘤法制备单克隆抗体。

[0031] 对 HbA1c 具有理想的特异性的抗 HbA1c 抗体的筛选,例如,可通过准备固定有通常的血红蛋白的板和固定有 HbA1c 的板,并确认所得的多条抗体对两者的反应性来实施。可将对通常的血红蛋白的结合性为背景程度以下、并且对 HbA1c 的反应性高的抗体优选用作 HbA1c 特异抗体。

[0032] 只要制备适当的标准试样制作校准曲线,则还可以进行 HbA1c 的定量。本发明中使用全血样本,但与血球溶血处理样本相比,全血样本中含有更多血浆。使用这类样本时,校准曲线的制作中,可以使用添加血清、血浆或血浆蛋白质(例如白蛋白、 γ 球蛋白等)、其它生物体蛋白质等适当的物质而制备的 HbA1c 标准试样。这种技术自身是常法,只要是本领域技术人员则可适宜制备适于全血样本的测定的 HbA1c 标准试样来制作校准曲线。

实施例

[0033] 以下,基于实施例更具体地说明本发明。但本发明并不受下述实施例限定。

[0034] 1. 缓冲液所致的溶血的确认

在未实施前处理的全血样本的测定体系中,需要向胶乳试剂(含有胶乳粒子的低渗透压的缓冲液)中添加全血来使红血球的溶血和血红蛋白在胶乳表面上的吸附完成。因此,首先确认使胶乳浮游的缓冲液自身是否具有使红血球溶血的效果。

[0035] 将表 1 所示的溶液分别采集 2mL 至试管中,向其中加入全血 10 μ L,用目视进行溶血的判定。0.15M NaCl 是作为不使溶血产生的溶液而加入研究。

	使用的溶液	结果
1	0.15M NaCl	~
2	市售的试剂盒中所含的样本稀释液	+
3	R1 缓冲液 (胶乳试剂中所用的缓冲液)	+++

2 的组成:
以叠氮化钠为主成分的低渗透压的缓冲液

3 的组成:
以缓冲能力从中性至碱性侧为最大的 Good's 缓冲液为主成分的低渗透压的缓冲液

[0036] 即使是市售的试剂盒所含的样本稀释液中也确认到了溶血,刚采血后的全血中不是明显的溶血。但是,在添加采血 3 小时后的全血的情形中,与 R1 缓冲液之间并无明显的差异。R1 缓冲液中即使是刚采血后的全血也发生了明显溶血。

[0037] 2. 全血样品中的吸光度测定

对于下述样品,用分光光度计 Ubest-V530 (JASCO) 测定吸光度。

[0038] No. 1 :HbA1c 标准品(冻干品、市售)中加入 R1 缓冲液 2mL 复原得到的

No. 2 :将全血 10 μ L 添加至 R1 缓冲液 2mL 进行溶血得到的

No. 3 :将血浆 10 μ L 溶解于 R1 缓冲液 2mL 中得到的

结果示于图 1。全血样本的溶血液确认到血红蛋白浓度为标准品的大约一半。标准品(样品 No. 1)是假定从血球层采集血球进行了溶血的样品,对于全血样本(样品 No. 2),包含血浆的部分,血红蛋白浓度较样品 No. 1 变低。示出血红蛋白色素的吸光度的波长限定于较大致 600nm 为更短波长侧,因而表明为了避免其影响,用于测定胶乳的凝集程度的波长需要使用较其为更长波长侧的波长。

[0039] 3. 利用免疫凝集法从未实施前处理的全血样品检测 HbA1c

使用 HbA1c 标准品(冻干品、市售)制备如下所述的 2 种标准试样(HbA1c 浓度为 0.0%~14.9%),使用日立 7170 自动分析仪利用胶乳凝集法进行测定,制作校准曲线(图 2)。作为 HbA1c 特异抗体,使用在市售试剂盒中也使用的公知的抗 HbA1c 单克隆抗体(参照专利文献 1)。

[0040] 标准试样 1 :

将 HbA1c 标准品用样本稀释液 1mL 复原,将 4.8 μ L 作为样品。

[0041] 标准试样 2 :

将 HbA1c 标准品用样本稀释液 100 μ L 复原,将 12 μ L 作为样品。

[0042] 使用浮游有胶乳粒子的 R1 缓冲液,通过日立 7170 自动分析仪进行全血样品 2 μ L 的测定。将测定信号分别与示于图 2 的 2 种校准曲线匹配,计算全血样品中的 HbA1c 浓度。结果,如表 2 所示算出了浓度。

[表2]

使用的校准曲线	HbA1c浓度
标准试样1	4.63%
标准试样2	4.70%

[0043] 这里,从使用的全血样品的血球层采集血球使之溶血,通过以往方法进行测定时,HbA1c 的浓度算出为 5.2%。对应于制作校准曲线的标准试样的种类,测定值发生了变化,但确认到即使直接对未进行溶血等前处理的全血样品进行免疫测定,也可以得到测定值。只要适当制备标准试样则可进行更准确的测定。

[0044] 4. 利用免疫凝集法从未实施前处理的全血检测 HbA1c 时的反应过程的吸光度变化

对从全血样本的血球层采集血球使之溶血的稀释样品、与未实施前处理的全血样品直接进行免疫测定时的反应过程的吸光度变化示于图 3。

[0045] 在全血样品的测光点 1 处吸光度高表明是溶血途中,在测光点 2 处吸光度变得大致恒定,因而表明溶血快速进行。与稀释样品的反应过程的吸光度变化相比,全血样品的情况中,吸光度整体上是向高的方向平行移动增高的状态。增高的原因被认为是红血球的溶血后的细胞膜等残骸的影响。测定值是通过从 R2 试剂(抗体液)加入的点 16 之后起,至最终点 34 之间的适当区间的吸光度差来求出,因此并没有增加的实质上的影响。

[0046] 5. 在标准品中加入不同浓度的 γ 球蛋白制备 HbA1c 标准试样进行测定而制作的校准曲线

使用 HbA1c 标准品(冻干品、市售),制备如下所述的 4 种标准试样(HbA1c 浓度为 0.0%~14.9%),以 2 μ L 作为样品,使用日立 7170 自动分析仪利用胶乳凝集法进行测定,制作校准曲线。该校准曲线示于图 4。

[0047] 标准试样 3:

将 HbA1c 标准品用 R1 缓冲液 100 μ L 复原得到的。

[0048] 标准试样 4:

将 HbA1c 标准品用含有 γ 球蛋白 1.25mg/mL 的 R1 缓冲液 100 μ L 复原得到的。

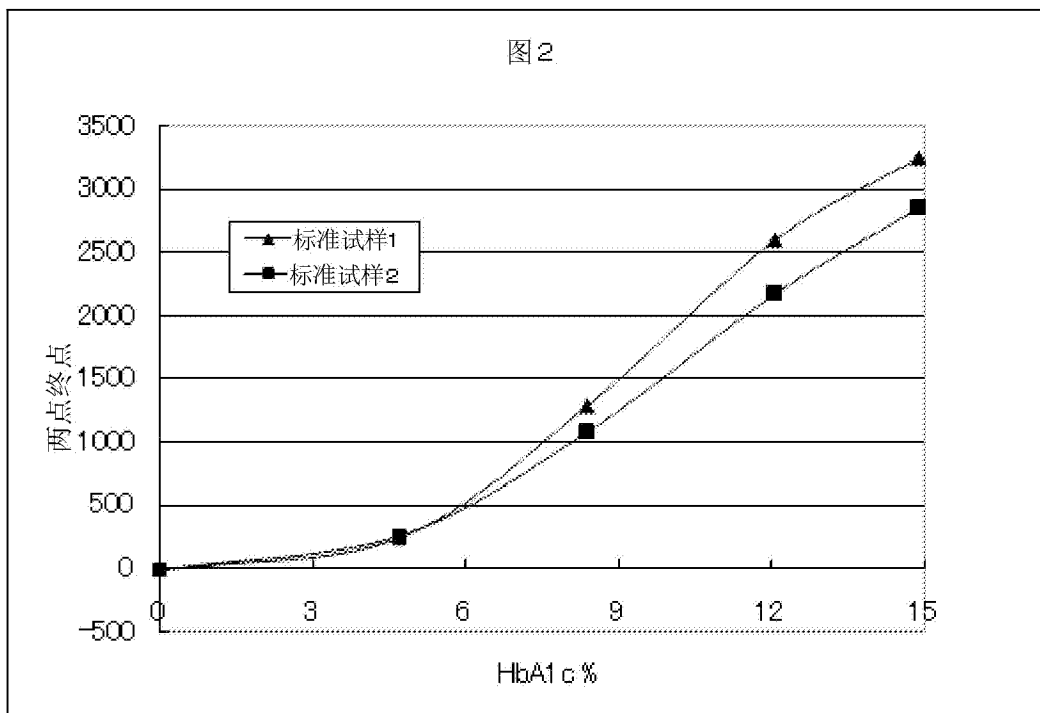
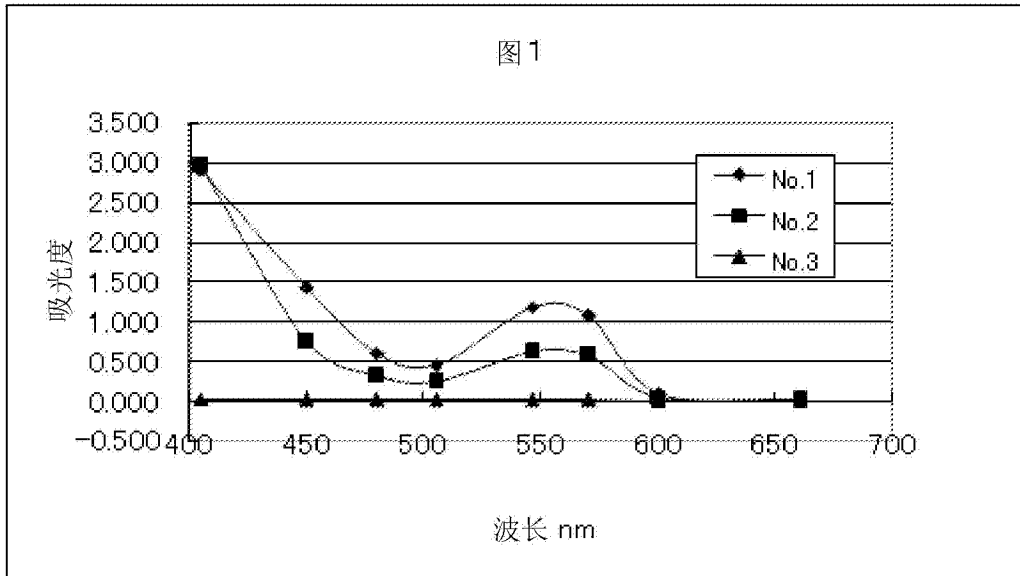
[0049] 标准试样 5:

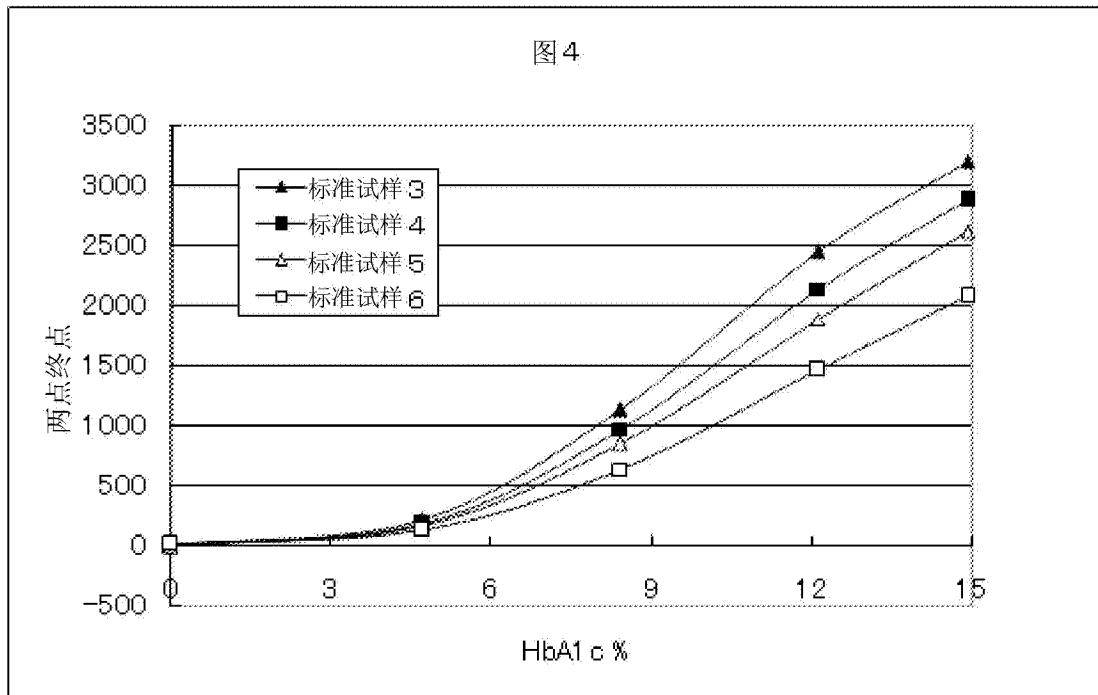
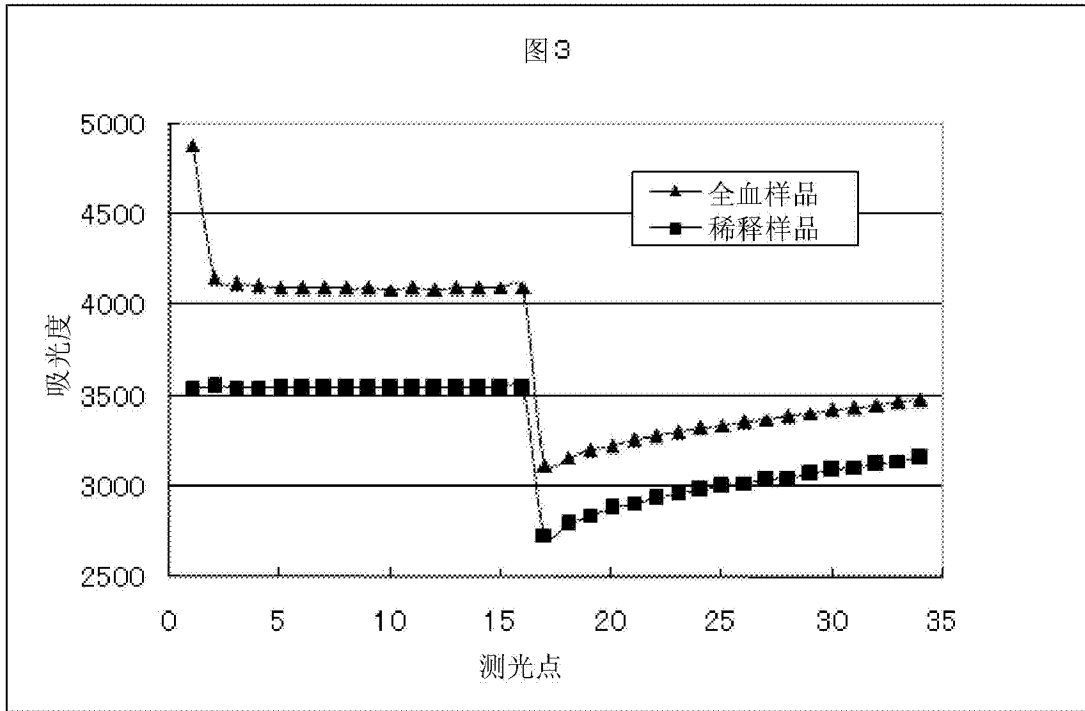
将 HbA1c 标准品用含有 γ 球蛋白 2.5mg/mL 的 R1 缓冲液 100 μ L 复原得到的。

[0050] 标准试样 6:

将 HbA1c 标准品用含有 γ 球蛋白 5mg/mL 的 R1 缓冲液 100 μ L 复原得到的。

[0051] 随着 γ 球蛋白的浓度变高,校准曲线的信号降低。样本的最低可分注样品量根据自动分析仪而不同,因此加入的 γ 球蛋白等的浓度和标准试样的样品量可以根据未实施前处理的全血样品的量(μ L)与胶乳试剂的浓度、试剂量而研究并适宜选择确定最佳值。





专利名称(译)	样本中的血红蛋白A1c的免疫测定方法		
公开(公告)号	CN105122060A	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201380070635.2	申请日	2013-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
[标]发明人	铁本融 平田稔		
发明人	铁本融 平田稔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/721 G01N33/54313 G01N33/54393 G01N33/723		
代理人(译)	庞立志 刘力		
优先权	2013005130 2013-01-16 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了在未对全血试样进行前处理的情况下，可免疫测定血红蛋白A1c的手段。本发明的样本中的血红蛋白A1c的免疫测定包括：使胶乳粒子与未实施前处理的全血样本在低渗液中接触，接着使吸附于胶乳粒子上的血红蛋白A1c与抗血红蛋白A1c抗体接触。免疫测定优选通过凝集法来进行。低渗液是例如以0.02~0.2mol/L的浓度含有缓冲能力从中性至碱性侧为最大的Good's缓冲液的缓冲液。

