

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02804719.2

[45] 授权公告日 2006年5月31日

[11] 授权公告号 CN 1258091C

[22] 申请日 2002.4.26 [21] 申请号 02804719.2

[30] 优先权

[32] 2001.5.18 [33] JP [31] 149938/01

[86] 国际申请 PCT/JP2002/004274 2002.4.26

[87] 国际公布 WO2002/095407 日 2002.11.28

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.8

[71] 专利权人 爱赐爱儿股份有限公司

地址 日本东京

[72] 发明人 樱井正明 高梨直树 冈昌则

平田稔

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书2页 说明书21页 附图5页

[54] 发明名称

免疫测定

[57] 摘要

本发明提供了使用不溶性磁性载体颗粒进行免疫测定的方法，该方法适于节约人力以及在短时间内处理大量样品，同时避免了致敏的不溶性磁性颗粒的稳定性及其制备的困难。测定检验样品中的抗原性物质时，不使用携带抗原性物质特异的抗体的不溶性磁性颗粒，而是提供了基本上不吸附抗体等的不溶性磁性载体颗粒。然后待测定的抗原性物质吸附于不溶性磁性载体颗粒，随后与特异性针对该吸附的抗原性物质的标记抗体进行反应。从而以适合自动化的方式有效测定检验样品中的抗原性物质。

1. 使用不溶性载体颗粒的免疫测定，其包含
 - (i) 使用不含任何吸附的抗原和/或抗体的不溶性磁性载体颗粒，
 - (ii) 将检验样品中的抗原性物质吸附或结合所述的不溶性磁性载体颗粒，
 - (iii) 将从上述(ii)处理得到的不溶性磁性载体颗粒与标记抗体反应，所述标记抗体特异性与固相形式的抗原性物质反应，但不与天然形式的抗原性物质反应，其中所述固相形式的抗原性物质附着于所述的不溶性磁性载体颗粒，所述的天然形式的抗原性物质则存在于液相中，以及
 - (iv) 测定通过所述固相抗原性物质捕获得到的标记抗体上的标记，作为指标。
2. 权利要求1的免疫测定，其中所述的免疫测定包含
 - (A) 将所述检验样品中的抗原性物质吸附或结合所述的不溶性磁性载体颗粒，以及
 - (B) 然后不用洗涤去除所述检验样品，将捕获的抗原性物质与所述的与固相抗原性物质特异反应的抗体进行反应。
3. 权利要求1或2的免疫测定，其中所述的免疫测定包含
 - (a) 将所述的标记抗体与吸附或结合了检验样品中抗原性物质的不溶性磁性载体颗粒进行反应，
 - (b) 然后在磁场作用下，将未反应的标记抗体与不溶性磁性载体颗粒分离，以及
 - (c) 测定通过所述的固相抗原性物质捕获得到的标记抗体上的标记，作为指标。
4. 权利要求1或2中任一项的免疫测定，其中所述的抗体是单克隆抗体。
5. 权利要求1或2中任一项的免疫测定，其中所述的抗体是多克

隆抗体。

6. 权利要求1或2中任一项的免疫测定，其中所述的不溶性磁性载体颗粒选自不溶于水性液体介质、并由有机聚合物材料相和磁性材料相组成的微粒。

7. 权利要求1或2中任一项的免疫测定，其中所述的不溶性磁性载体颗粒选自不仅包含由一种或多种有机聚合物材料组成的表层相、而且包含由一种或多种磁性材料组成的核心相的微粒。

8. 权利要求1或2中任一项的免疫测定，其中所述的不溶性磁性载体颗粒选自其具有(a) 0.01 - 20微米的平均颗粒大小以及(b)由一种或多种磁性材料组成的核心的胶乳颗粒。

9. 权利要求1或2中任一项的免疫测定，其中所述的不溶性磁性载体颗粒选自其具有0.1 - 6微米的平均颗粒大小以及由一种或多种磁性材料组成的核心的胶乳颗粒。

10. 权利要求1或2中任一项的免疫测定，其中所述的免疫测定可利用适合磁性颗粒的临床化学自动分析仪，从分发检验样品到获得测试结果以自动化形式进行。

11. 权利要求1或2中任一项的免疫测定，其中检验样品中的抗原性物质是HbA1c。

免疫测定

发明领域

本发明涉及利用磁性颗粒免疫学测量(免疫测定)流体(例如生物样品)中抗原性物质的方法。

发明背景

近年来在医院、测试中心等地,由于人力短缺、成本削减目的、处理大量样品的需要等,一直尝试各种测试(包括临床检验)的自动化和/或节约大量的测试时间。对于适合自动化的技术,其中利用不溶性磁性载体颗粒对抗原性物质进行定性或定量测定的方法引人注目。利用这种不溶性磁性载体颗粒的目的之一在于,在测定中利用磁场作用容易实现无法避免的B/F分离。

此外,在利用这种不溶性磁性载体颗粒的免疫化学领域,一直使用结合抗原或抗体的不溶性磁性颗粒(致敏的不溶性磁性颗粒),其中该磁性载体携带与待测目标分析物相同的抗原或抗体。就测定流体(检验样品)、例如生物样品中的抗原性物质而言,本领域公知(例如JP, A, 06-160387 (1994)和JP, A, 07-72,155 (1995)所述)其包含以下两个步骤,所述的检验样品与预先吸附和携带能够特异性结合所述抗原性物质或其片段的不溶性磁性颗粒混合,然后测定所述抗原性物质与不溶性磁性颗粒结合的程度,从而检出或定量所述的抗原性物质。

然而,如果将抗体等预先吸附于不溶性磁性颗粒并用于测定,则致敏的不溶性磁性颗粒的稳定性问题不可避免。因此,无论如何努力,仍然存在包括试剂的使用期限(best-before-period)、制备困难等难题。此外,如果长期保存还有另一难题,致敏的不溶性磁性颗粒在其悬浮液中容易沉淀。

为了节约人力或短时间内处理大量样品,引入完全自动化临床检

验的测试仪器等，测试中的B/F分离通常需要进行洗涤处理。为使测定有效和快速，减少几个步骤或者以简单方式进行测定是无法回避的问题。为此目的，近来尝试开发利用不溶性磁性颗粒为载体的免疫测定系统，但在洗涤步骤中难免损失所用的不溶性磁性颗粒。这也引起该载体携带的宝贵抗体等的消耗。因而，使用磁性颗粒的自动化临床检验仪器的缺点在于，由于使用相对大量的磁性颗粒而比通常的免疫测定需要更多的抗体等。还有因多次洗涤而损失颗粒的问题。

发明概述

本发明人通过深入研究成功发现，对于测定检验样品中的抗原性物质，不使用携带可与所述抗原性物质特异性结合的抗体的任何不溶性磁性载体颗粒，而是提供了其上基本不结合所述抗体等的不溶性磁性载体颗粒，所述抗原性物质(待测定的目标分析物)自身可以吸附于所述的不含抗体的不溶性磁性载体颗粒，然后与特异性针对所得吸附于所述颗粒的抗原性物质的标记抗体反应，从而能够以合适的自动化方式有效测定检验样品中的抗原性物质。本发明人因而成功完成了本发明。

更具体而言，本发明的免疫测定包含以下步骤：

提供基本上不含任何抗体等的不溶性磁性载体颗粒，

然后将检验样品中的抗原性物质吸附或结合所述的不溶性磁性载体颗粒，以及

将得到的混合物与可特异性和所述吸附的抗原性物质反应的标记抗体反应，本免疫测定法因而能够选择性测定不溶性磁性载体颗粒上携带的抗原性物质。

为了确保易于定量，本发明优选根据特定测定项目，选择包括生物材料浓度以及不溶性载体颗粒悬浮液的缓冲液浓度在内的条件，以便生物材料中的抗原性物质可与其存在量成比例地吸附于不溶性载体颗粒。

本发明提供：

(1) 使用不溶性载体颗粒的免疫测定，其包含

(i) 使用基本上不含任何吸附的抗原和/或抗体的不溶性磁性载体颗粒,

(ii) 将检验样品中的抗原性物质吸附或结合所述的不溶性磁性载体颗粒,

(iii) 将从上述处理(ii)得到的不溶性磁性载体颗粒与特异性和某些所述的抗原性物质反应的标记抗体反应, 所述抗体特异性与固相形式的抗原性物质反应, 但基本上不与天然形式的抗原性物质反应, 其中所述固相形式的抗原性物质附着于所述的不溶性载体颗粒, 所述的天然形式的抗原性物质则仍然存在于液相中, 以及

(iv) 测定通过所述的固相抗原性物质捕获得到的标记抗体上的标记作为指标。

(2) 根据上述(1)的免疫测定, 其中所述的免疫测定包含

(A) 将所述检验样品中的抗原性物质吸附或结合所述的不溶性磁性载体颗粒, 以及

(B) 然后无需洗涤去除所述的检验样品, 将捕获的抗原性物质与所述固相抗原性物质的特异反应性抗体进行反应;

(3) 根据上述(1)或(2)的免疫测定, 其中所述的免疫测定包含

(a) 将所述的标记抗体与吸附或结合检验样品中抗原性物质的不溶性磁性载体颗粒反应,

(b) 然后在磁场作用下, 将未反应的标记抗体与不溶性磁性载体颗粒分离, 以及

(c) 测定通过固相抗原性物质捕获得到的标记抗体上的标记作为指标。

(4) 根据上述(1)-(3)中任一项的免疫测定, 其中所述的抗体是单克隆抗体;

(5) 根据上述(1)-(3)中任一项的免疫测定, 其中所述的抗体是多克隆抗体;

(6) 权利上述(1)-(5)中任一项的免疫测定, 其中所述的不溶性磁性载体颗粒选自基本上不溶于水性液体介质、并由有机聚合物材

料相和磁性材料相组成的微粒；

(7) 根据上述(1)-(6)中任一项的免疫测定，其中所述不溶性磁性载体颗粒选自不仅包含由一种或多种有机聚合物材料组成的表层相、而且包含由一种或多种磁性材料组成的核心相的微粒；

(8) 根据上述(1)-(7)中任一项的免疫测定，其中所述的不溶性磁性载体颗粒选自其(a)平均颗粒大小0.01 - 20微米以及(b)核心由一种或多种磁性材料组成的胶乳颗粒；

(9) 根据上述(1)-(7)中任一项的免疫测定，其中所述的不溶性磁性载体颗粒选自平均颗粒大小为0.1 - 6微米以及核心由一种或多种磁性材料组成的胶乳颗粒；

(10) 根据上述(1)-(9)中任一项的免疫测定，其中所述的免疫测定可利用适合磁性颗粒的自动化临床检验仪器或临床化学自动分析仪，从分发检验样品到获得测试结果以自动化形式进行；以及

(11) 根据上述(1)-(10)中任一项的免疫测定，其中检验样品中的抗原性物质是HbA1c。

本领域技术人员从以下公开内容显而易见本发明的上述目的及其它目的、特征、优点以及各个方面。然而应当理解，本说明书的描述，包括以下实施本发明的最佳方式、实施例等，是阐述本发明的优选实施方案，并只为说明目的而提供。本领域技术人员应当清楚，根据本说明书以下部分及其它部分公开内容的知识，可能对本发明进行大量的变化和/或改变(或修饰)，而不背离其此处公开的实质和范围。此处引用的所有专利出版物以及参考文献均为了说明目的，其公开内容在此引入供参考。

附图简述

图1 显示在利用标记的抗-HbA1c mAb的HbA1c测定中(包括HbA1c吸附于磁性胶乳颗粒的步骤)，不溶性磁性载体颗粒与所得信号之间颗粒的表面积-信号关系。

图2 显示利用标记的抗-HbA1c mAb的HbA1c测定中(包括HbA1c吸

附于磁性胶乳颗粒的步骤), 所得信号与系统中存在的抗体之间的信号-抗体数量关系。

图3 显示在利用标记的抗-HbA1c mAb的HbA1c测定中(包括HbA1c吸附于磁性胶乳颗粒的步骤), 使用可直接检测的标记的结果。

图4 显示胶乳凝集方法与利用标记的抗-HbA1c mAb的HbA1c测定方法(包括HbA1c吸附于磁性胶乳颗粒的步骤)之间的相关性。

图5 显示使用不同的不溶性磁性载体颗粒, 对利用标记的抗-HbA1c mAb的HbA1c测定(包括HbA1c吸附于磁性胶乳颗粒的步骤)的影响。

实施本发明的最佳方式

在本发明中, 标记的抗体(标记Ab)、特别是标记的单克隆抗体(标记mAb), 有可能选择性地与吸附或附着于不溶性磁性载体的特定抗原性物质反应, 而所述的标记Ab(特别是所述的标记mAb)基本上不与仍存在于液相中的所述的特定抗原性物质反应。因此, 在本发明的一个优选方面, 其有可能将检验样品中的抗原性物质吸附于不溶性载体, 然后与上述免疫测定中的抗所述抗原性物质的mAb反应, 而无需洗涤去除所述的检验样品。

因此, 在本发明的优选实施方案中, 此处所用mAb选自与吸附于不溶性载体颗粒的抗原反应、而基本上不与液相中存在的未吸附(未结合)的抗原性物质反应的mAb, 从而如今有可能基本上排除未吸附(未结合)成分的干扰作用。

(抗原性物质)

本发明的待测的抗原性物质包括能够吸附(或附着)于不溶性磁性载体的任何抗原性物质, 只要有可能制备或获得该特定抗原性物质的至少一种多克隆或单克隆抗体, 而不限于此处确定的抗原性物质范围。然而, 为了便于吸附到不溶性磁性载体, 优先选择生物样品中包含的不少于100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (进一步不少于1 mg/mL)或不少于1% (占总蛋白质重量)的物质。另外, 为了便于制备上述多克隆和/或单克隆抗

体，优选上述抗原性物质应是分子量不低于10,000的物质(例如蛋白质)。

本发明的免疫测定的待测的“抗原性物质”包括可制备或获得针对该目标抗原性物质的至少一种多克隆或单克隆抗体的任何“抗原性物质”。该“抗原性物质”包括各种物质，例如蛋白质、多肽以及利用基因工程技术制备的重组蛋白质。它们可能为免疫测定领域所公知或者是全新的物质。代表性的抗原性物质是HbA1c。

(抗原性物质的特异性抗体)

此处所用术语“与抗原性物质特异性反应的抗体”可涵盖任何多克隆抗体和/或单克隆抗体，及其完整分子或片段和衍生物，包括F(ab')₂、Fab'和Fab片段。制备单克隆抗体的优选技术包括，例如使用杂交瘤细胞的方法(G. Kohler和C. Milstein, *Nature*, 256, pp.495-497 (1975)); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987))等，此外，下列文件或其中引用的文件可能举例说明相关抗体：J. J. Langone等人(ed.)，*Methods in Enzymology*”，卷121 (*Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies*), Academic Press, New York (1986)，其公开内容在此引入供参考。

可以适当地采用Koehler & Milstein (*Nature*, 256, 495-497, 1975)报告的细胞融合技术等制备单克隆抗体。该方法本身是常规方法。因此不需要特别说明；然而该方法需要选择有效产生目标单克隆抗体的杂交瘤细胞。所谓的ELISA (酶联免疫吸附测定)容易处理大量样品，所以经常用来进行这种选择，其中预定抗原固相化于96孔板，然后与杂交瘤细胞培养上清反应，再与酶标抗小鼠免疫球蛋白反应。在抗原固相化的情况下，如果能够组成使抗体在此固相抗原状态下反应的测定系统，则可以接受该选择方法，但某些情况下，经ELISA选择获得的杂交瘤细胞产生的单克隆抗体中存在于测定系统中非反应性的抗体，则该测定系统在液相中进行抗原-抗体相互作用，正如放射

免疫测定(RIA)一样。

尽管本领域公知或常见这种现象，但在使用这样的单克隆抗体时，本发明的免疫测定能够与不溶性载体颗粒上固相化的目标抗原性物质特异性反应，而没有任何由于抗原性物质仍存在于液相中的抑制作用。

代表性的单克隆抗体包括，例如日本专利NO.2,677,753公开的单克隆抗体。特别代表性的单克隆抗体是，例如日本专利NO.2,677,753公开的单克隆抗HbA1c抗体(抗HbA1c mAbs)。

尽管通常使用的抗体是IgG，但也可能包括F(ab')₂、Fab'、Fab等在内的抗体片段，其是来自亲本抗体经过消化酶(例如胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等)处理、有时经过还原剂(例如二硫苏糖醇和巯基乙醇)还原的低级分子。

另外可能使用IgM而非IgG，或者使用来自亲本IgM经过与IgG同样处理的低级分子。此外可能使用识别表位互不相同的两种或多种单克隆抗体的组合。

(抗体的标记)

可利用适当的标志标记此处所用抗体。

标记可能包括酶、酶底物、酶抑制剂、辅基、辅酶、酶前体、脱辅基酶、荧光物质、色素、化学发光化合物、发光物质、颜料物质、磁性物质、金属微粒例如胶体金、放射性物质等。酶可能包括脱氢酶、氧化还原酶例如还原酶和氧化酶；催化功能基团(例如氨基、羧基、甲基、酰基和磷酸基)转移的转移酶；水解各种键(例如酯、糖苷、醚和肽键)的水解酶；裂解酶；异构酶；连接酶等。可能以结合形式使用多种酶进行检测。

例如，也可以利用酶的循环。用于标记的代表性酶包括过氧化物酶，例如辣根过氧化物酶；半乳糖苷酶，例如大肠杆菌(*E. coli*) β -D-半乳糖苷酶；马来酸脱氢酶；葡糖-6-磷酸脱氢酶；葡萄糖氧化酶；葡糖淀粉酶；乙酰胆碱酯酶；过氧化氢酶；碱性磷酸酶，例如牛肠碱性磷酸酶和大肠杆菌碱性磷酸酶等。使用碱性磷酸酶时，通过监测或

检查底物(例如伞形酮衍生物包括4-甲基伞形苯磷酸盐(4-methyl-umbelliphenyl phosphate)、磷酸化苯酚衍生物例如硝基苯基磷酸盐、荧光素衍生物和二氧杂环丁烷(dioxetane)衍生物);利用NADP的酶循环系统等产生的荧光、发光等进行测定。也可能利用荧光素/荧光素酶系统。如果利用过氧化氢发生反应,产生氧,则可以利用电极等进行检测。电极可能是玻璃电极、使用不溶性盐膜的离子电极、液膜型电极、聚合物膜电极等。酶标记可能替换为生物素标记和酶标亲和素(链亲和素)。对于标记,可以使用多种不同类型的标记或标志。在这种情况下,有可能连续、或不连续、和/或同时、或分别进行多种测定。

根据本发明,可以使用酶-试剂组合形成信号,例如辣根过氧化物酶或其它过氧化物酶与选自4-羟基苯乙酸、1,2-苯二胺、四甲基联苯胺等之一的组合; β -D-半乳糖苷酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与选自伞形苯(umbelliferyl)半乳糖苷、硝基苯半乳糖苷等之一的组合等。利用能够酶学形成醌醇(quinone)化合物(例如氢醌、羟基苯醌(hydroxybenzoquinone)和羟基蒽醌);硫醇化合物,例如硫辛酸和谷胱甘肽;苯酚衍生物;二茂铁衍生物等的物质形成信号。

荧光物质和化学发光化合物可能包括异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate);罗丹明(Rhodamine)衍生物,例如罗丹明B异硫氰酸盐和四甲罗丹明异硫氰酸盐;丹磺酰氯(dansyl chloride)(5-(二甲基氨基)-1-萘磺酰氯)、丹磺酰氟(dansyl fluoride)、荧光胺(4-苯基螺[呋喃-2(3H),1'-(3'H)-异苯基呋喃]-3,3'-二酮(4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-(3'H)-isobenzofuran]-3,3'-dione));藻胆蛋白,例如藻青蛋白和藻红蛋白;吖啶翁(acridinium)盐;氨基苯二酰一胍化合物,例如荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白;咪唑;草酸酯;稀土元素例如铕(Eu)、铽(Tb)和钐(Sm)的螯合物;香豆素衍生物,例如7-氨基-4-甲基香豆素等。

抗体和标记的偶联可以通过下列方法进行:物理方法,例如吸附;化学方法,使用偶联剂等或活化的反应物;使用化学相互作用的

偶联方法。可以通过硫醇基与马来酰亚胺基反应、吡啶二硫基与硫醇基反应、氨基与醛基反应等，进行标记。另外，本领域熟练的技术人员可以从公知的方法中适当选择易于实施的方法、技术及其任何变化的方法。偶联剂包括，例如甲醛、戊二醛、己二异氰酸酯、己二异硫氰酸酯、N,N'-聚亚甲基双碘乙酰胺、N,N'-乙烯双马来酰亚胺、乙二醇二琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、双重氮联苯胺、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、N-硫代琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰)-氨基苯甲酸酯、N-琥珀酰亚胺基4-(1-马来酰亚胺苯基)丁酸酯、N-(ϵ -马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺(EMCS)、硫醇亚胺(iminothiolane)、S-乙酰巯基琥珀酸酐、甲基-3-(4'-二硫代吡啶)丙亚胺酯(propionimidate)、甲基-4-巯基-丁酰基乙胺酯(butyrylimidate)、甲基-3-巯基丙亚胺酯、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰巯基乙酸酯等。

(不溶性磁性载体颗粒)

此处所用不溶性磁性载体颗粒优选微粒，其中该微粒基本上不溶于水性液体介质，并包含有机聚合物材料相和磁性材料或物质相。代表性的不溶性磁性载体颗粒为微粒，其均不仅包含由一种或多种有机聚合物材料组成的表层相，也包含由一种或多种磁性材料或物质组成的核心相。所述的不溶性磁性载体颗粒可能包括，例如包含一种或多种选自四氧化三铁(Fe_3O_4)、三氧化二铁($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、各种铁酸盐、金属例如铁、锰、镍、钴和铬、合金例如钴合金、镍合金、锰合金等的微粒；其中包含磁性颗粒的胶乳颗粒、明胶颗粒、脂质体颗粒等。适当地，所述的不溶性磁性载体颗粒包括由胶乳表层包裹磁性材料或物质的核心构成的胶乳颗粒。术语胶乳最初是指橡胶树经切割或受伤渗出的乳状树液，但此处所用胶乳也指水溶液中悬浮或分散不连续微粒的悬浮液或乳剂。此处所用不溶性磁性颗粒优选包括但不限于所述的磁性颗粒核心的表面经过有机物质等进行表面处理的微粒。

进行定量免疫测定时, 这种胶乳颗粒通常要求其颗粒大小均匀性或一致性、其表面状态控制、其内部结构选择等处于高水平。这种适用于检测试剂的高质量胶乳颗粒可以选自商品化供应的产品。可以用来构成上述颗粒的有机聚合物材料可包括但不限于现有技术公开的有机聚合物材料微粒(例如JP, A, 58-11575(1983))。该有机聚合物材料包括, 例如疏水性聚合物, 如聚苯乙烯、聚丙烯腈、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚己酰胺(polycapramide)和聚对苯二甲酸乙二酯; 交联的亲水聚合物, 例如聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、聚(乙烯醇)、聚(2-乙氧基丙烯酸酯)、聚(2-乙氧基甲基丙烯酸酯)、聚(2,3-二丙氧基丙烯酸酯)、聚(2,3-二丙氧基甲基丙烯酸酯)和聚乙二醇甲基丙烯酸酯; 包含大约2-4种每种单体的共聚物等。虽然不特别限于胶乳材料, 优选使用苯乙烯类型胶乳, 例如聚苯乙烯胶乳、丙烯酸类型胶乳等。为便于顺利吸附蛋白质或肽, 优选使用表面疏水性强的胶乳(例如聚苯乙烯胶乳)。根据需要, 也可能使用各种类型的变性胶乳(例如羧酸变性胶乳)。此处所用上述不溶性载体优选包括胶乳, 例如聚苯乙烯胶乳。特别优选的胶乳颗粒是使用非乳化剂通过乳化聚合方法制备的聚苯乙烯颗粒。由于表面上的负电荷彼此相斥, 这种胶乳即使没有任何乳化剂也能稳定存在。商品化供应的代表性不溶性磁性载体颗粒为Dynabeads M-270 Epoxy、Dynabeads M-270 Amine、Dynabeads M-270 Carboxylic Acid、Dynabeads M-270 Tosylactivated、Dynabeads M-450 Epoxy和Dynabeads M-450 Tosylactivated (VERITAS Corporation, Japan)、IMMUTEX-MAG (JSR Corporation, Japan) 以及SMG-11 (Fujikura Kasei Co., Ltd., Japan)。载体颗粒还可得自Bangs Laboratories, Inc.等。

此处所用不溶性磁性载体颗粒的颗粒大小为 $0.01\ \mu\text{m} - 20\ \mu\text{m}$ 。优选颗粒大小 $0.1\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m}$ 的不溶性磁性颗粒。将抗原性物质吸附或结合不溶性磁性颗粒的方法可能包括检验样品中的抗原性物质物理吸附或结合或化学结合。适当地, 这是物理吸附或结合。

为了将检验样品中包含的抗原性物质吸附于胶乳颗粒, 对于悬浮

该胶乳颗粒的缓冲液，可利用基本上等同于将抗原吸附ELISA平板等的方法。某些胶乳颗粒易发生自然聚集。如果这样，考虑到稳定性，优选悬浮于弱碱性甘氨酸缓冲液或硼酸缓冲液。至于胶乳的浓度，优选使用按重量计0.05 - 1%的悬浮液。

(抗原-抗体相互作用)

在本发明中，将检验样品中包含的抗原性物质固相化(或固定化)，然后与可特异性和该固相化的抗原性物质反应的标记Ab反应，以标记在由胶乳等组成的不溶性磁性载体上捕获的抗原性物质。为此使用的水溶液优选包含包含大约0.1 - 0.3%表面活性剂(例如Tween 20)，以防止该抗体吸附于胶乳等组成的不溶性载体。

本发明对于进行反应的容器没有特别限制。有可能使用普通的管状形式容器(试管；例如聚苯乙烯试管)。如果考虑容易同时处理数以千计或数以百计的样品，使用具有复孔的ELISA板、例如96孔ELISA板(NUNC-IMMUNO PLATE等)极为方便。下文将会述及，为了易于利用光学方法测定，优选使用基本透明的容器进行反应。如果使用下文所述自动分析仪，应注意通常在该分析仪的反应器中进行反应。

(测定)

对测定不溶性磁性载体颗粒标记水平的方法没有特别限制。例如，如果定性或半定量测定标记，有可能根据与已知样品浊度水平的比较，目视判断上述不溶性载体颗粒的标记水平。如果定量测定所述的标记，为了简单方便，优选进行光学测量。

对于由胶乳等组成的不溶性磁性载体颗粒上的标记的光学测量方法，可以使用常规已知的方法。

在本发明中，有可能进行检验样品的测量处理；从样品分发处理直到测定结果采集步骤，利用自动化仪器、例如磁性颗粒的临床检验自动分析仪。这种临床检验的自动化仪器(系统)包括ADVIA™(商品名，Bayer)、ARCHITECT™(商品名，Dinabbot)、IMx™(商品名，Dinabbot)、Access™(商品名，Beckmann)、ECLusys™(商品名，Roche Diagnostics)、LUMIPULSE™(商品名，FUJIREBIO)等。这种

仪器已经广泛用于免疫测定系统(利用抗原-抗体相互作用), 只要是这样的仪器, 本发明就可以没有任何限制地采用。这些仪器的特征在于具有如下的优点和有利条件, 包括能够以随机存取方式测定多个对象、测定灵敏度高、可能测定的范围广、能够短时间内完成测定, 由于从分发到获得测定结果的所有步骤均以自动化方式进行, 因而测定精度高, 由于使用独立的反应管而很少污染等。

如果在普通样品中测定抗原, 则在常规的自动化临床检验仪器中使用抗体致敏的磁性颗粒, 其中步骤包含

(a) 第一步反应:

(1) 磁性颗粒与样品中抗原反应, 以及(2) 然后洗涤,

(b) 第二步反应:

(3) 将得到的产物与针对所述抗原的第二抗体反应(使用例如酶或荧光物质等标记作为标志), 以及(4) 然后洗涤, 以及

(c) 第三步反应:

(5) 将得到的产物与所述标志的底物反应, 以及(6) 然后测定。

然而, 根据本发明, 可以如下减少洗涤次数:

(a) 第一步反应:

(1) 磁性颗粒与样品中抗原反应,

(b) 第二步反应:

(2) 将得到的产物与针对所述抗原的第二抗体反应(使用例如酶或荧光物质的标记作为标志), 以及(3) 然后洗涤, 以及

(c) 第三步反应:

(5) 将得到的产物与所述标志的底物反应, 以及(6) 然后测定。

因此本发明能够大大防止颗粒损失。

在光学检测胶乳颗粒聚集的方法中, 必须使用相对大量的颗粒。然而本发明可以检测与颗粒结合的物质数量。因此, 本发明较常用方法可以测定十分之一乃至更少数量的颗粒以及标志标记的抗体。

根据本发明, 有可能避免与常规方法中使用的抗体复合物的制备难题, 其中难题包括制备方法中的困难、在实际使用浓度下的不稳定

性等。因此，本发明只使用单个Ab便改善了物质的稳定性，而且制备批次之间没有差异，从而能够稳定、可靠地制备。只使用mAb可以利用其优点。例如，有可能排除抗体批次之间的差异，并提供高度可靠的质量稳定试剂。

由于本发明的不溶性载体颗粒试剂从未用抗原等致敏，试剂盒极大改善了颗粒批次差异的问题。另外，颗粒不仅包含由磁性材料或物质组成的核心，而且包含由塑料组成的表层，其抗原性物质吸附或结合特性良好。

本发明可以使用的适用于不溶性磁性载体颗粒的测定仪器包括，例如 FUJIREBIO LUMIPULS™ (ALP-AMPPD™)；Beckmann Coulter Access™ (ALP-Lumigen™ PPD)；Beckmann Coulter LUMIWARD™ (ALP-Lumigen™ PPD)；Nippon DPC Corporation "Immulize"™ (ALP-AMPPD™)；Bayer ACS™ (吡啶鎓酯 (acridinium ester))；Ortho Clinical Diagnostics VITROS™ Eci (HRP-Luminol)；Precision System Science Co., Ltd. HiMICO™；Dinabbot ARCHITECT™ (吡啶鎓酯)；Roche Picolumi™ (钆复合物)；Tosoh AIA-600II (ALP-4MUP)等。这些仪器可能还包括利用酶化学发光、钆复合物电化学发光、吡啶鎓酯化学发光等的仪器。

(血红蛋白A1c的测定实施方案)

下文描述了血红蛋白A1c (HbA1c)的测定实施例，作为较好说明本发明免疫测定特征的实施方案，尽管本发明的免疫测定不限于血红蛋白A1c测定。

上述“血红蛋白A1c”是指一种特定类型的糖基化(或糖化)血红蛋白，通过葡萄糖非酶促吸附到血红蛋白(Hb) β -链N端氨基酸残基缬氨酸的 α -氨基而形成。血液血红蛋白A1c的数量反映了糖尿病相对长期的血糖控制状况。因此，为了评价糖血的控制，测定HbA1c临床意义极大(参看例如 Nippon-Rinsho, 48, Special Issue, 315-322 (1990))。

血红蛋白是异四聚体，基本由两条 α -链和两条 β -链组成。血红蛋

白A1c的特征在于两条 β -链之一的N端 α -氨基糖基化。因此，在血红蛋白A1c上有一个特征性反应位点。换句话说，鉴于与血红蛋白A1c特异性mAb的反应性，血红蛋白A1c起一价抗原的作用。

在本发明的免疫测定中，例如为了测定血红蛋白A1c，检验样品（例如通过在全血中加入净化水(purified water)而制备的溶血样品）可以吸附于不溶性磁性载体颗粒（包被胶乳的磁性颗粒），然后与标记的抗血红蛋白A1c mAb反应，选择性标记胶乳层上的血红蛋白A1c。测定所述的选择性标记的标志水平，可以定量测定血红蛋白A1c。

例如，利用本发明的免疫测定同时定量通过HPLC或其它方法测定的血红蛋白A1c百分率已知的标准样品，制作标准曲线。根据该标准曲线，有可能确定未知样品中血红蛋白A1c的%值。

（抗HbA1c的单克隆抗体）

此处所用抗HbA1c mAb包括只要基本上与吸附或固相化的HbA1c反应、基本上不与固相化的HbA0反应的任何抗HbA1c mAb，而没有任何特别限制（优选地，该抗HbA1c mAb另外基本上不与仍存在于液相中的HbA1c或HbA0反应）。使用糖化肽作为免疫原制备mAb时，可以获得这样的单克隆抗体。可以测定与HbA1c和HbA0的反应性，例如按日本专利No. 2,677,753公开的方式。

如日本专利No. 2,677,753所述，按照免疫读板机的标准，本发明优选该所述的抗HbA1c mAb的HbA1c反应性不少于1.0（更优选不少于2.0）。按照该标准，还优选所述的抗-HbA1c mAb的HbA0反应性不多于0.1（更优选不多于0.05）。

本发明优选所述的抗-HbA1c mAb、甚至是10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （或更进一步20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的抗HbA1c mAb在液相中不与非变性HbA1c、HbA0、变性HbA0等反应，但是1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （或更进一步0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）或更少的抗HbA1c mAb在液相中与变性HbA1c反应。

此处将公开本发明测定HbA1c的优选实施方案。

在本发明中，通常将大约1 μl - 20 μl （或2 μl - 5 μl ）溶血的血液溶液分发到各管中，作为检验样品。还可以使用甘氨酸缓冲液等，

按5 - 10倍稀释度稀释检验样品(例如1 mL净化水加入50 μ l全血)), 获得此处实际使用的溶血的血液。

此后, 每管中加入一等份(大约100 - 300 μ l(或150 - 200 μ l))的磁性胶乳颗粒悬浮液(例如0.12 μ m磁性颗粒包被的胶乳悬浮液, 浓度0.2%), 然后37°C静置大约1 - 30分钟(或3 - 20分钟), 以便样品中HbA1c吸附于胶乳。优选如此使用的磁性胶乳颗粒悬浮液是利用甘氨酸缓冲液等稀释磁性胶乳颗粒原液的产物。

然后, 将一等份(大约100 - 300 μ l (或150 - 200 μ l))利用适当标志标记的抗HbA1c mAb (例如小鼠腹水来源的mAb)加入吸附于乳剂的HbA1c中, 使混合物37°C静置(温育)大约2 - 30分钟(或3 - 10分钟), 以便HbA1c与所述的标记的mAb反应。优选最佳设置此处使用的mAb溶液的浓度, 例如根据制备的系列稀释的抗HbA1c mAb。用来稀释的缓冲液可能包括0.05 - 0.1 M甘氨酸缓冲液(GBS: 甘氨酸缓冲盐溶液; pH 8.1 - 8.5, 包含0.15 M NaCl)等。为此使用的缓冲液优选包含大约0.1 - 0.5% (或0.2 - 0.3%)的表面活性剂(例如Tween 20), 以防止胶乳表面上mAb的物理性吸附作用。

在本领域中, 如果将胶乳颗粒用作不溶性磁性载体颗粒, 不容易制备质量完全一致的胶乳试剂(其上携带抗原、抗体等的乳胶), 也不容易保持制品的稳定状态, 防止发生非特异性聚集和沉淀。

相反, 本发明的不溶性磁性载体(胶乳等)未被抗原和抗体致敏, 可以应用商品化供应的本身未致敏的磁性胶乳作为不溶性磁性载体。此外, 并非总是需要抗体是纯品。另外, 由于试剂简单, 有可能保持较高的储存稳定性, 从而还有利于制备。如上所述, 本发明试剂可以简单、容易地制备, 因而如今有可能提供使用高储存稳定性试剂的方法。

在本发明免疫测定的应用中, 通过采纳一般由本领域技术人员在适合每种方法的通用条件和操作的基础上提出的技术思考, 可能构造适于本发明的目标或与其活性基本相同的目标物质的测定系统。

常规技术方法的细节可参看各种综述、教材、书籍等。例如,

Hiroshi Irie (ed.), "Radioimmunoassay", Kodansha Ltd., Japan, 1974; Hiroshi Irie (ed.), "Zoku-Radioimmunoassay" (Radioimmunoassay; Second Edition), Kodansha Ltd., Japan, 1979; Eiji Ishikawa等(ed.), "Koso Meneki Sokuteiho" (Enzyme Immunoassays), Igaku-Shoin Ltd., Japan, 1978; Eiji Ishikawa等(ed.), "Koso Meneki Sokuteiho" (Enzyme Immunoassays) (2nd Edition), Igaku-Shoin Ltd., Japan, 1982; Eiji Ishikawa等(ed.), "Koso Meneki Sokuteiho" (Enzyme Immunoassays) (3rd Edition), Igaku-Shoin Ltd., Japan, 1987; H. V. Vunakis等(ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone 等 (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone等(ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone 等 (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone 等 (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone等(ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone 等(ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek 等 (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone

等 (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991)等; 以及上述文件引用的参考文献, 其公开内容在此引入供参考。

实施例

利用以下只为说明目的而提供的实施例、并参考本发明的特定实施方案具体描述了本发明。尽管为了公开本发明的特定实施方案而提供这些说明性实施例, 但不应认为其限制或约束了此处公开的本发明范围。应当理解, 根据本发明的实质可以实施多种不同的形式。

除非另外说明, 利用本领域普通技术人员熟知或常见的标准方法, 实施或能够实施所有的实施例。

实施例1

颗粒表面积与产生信号之间的关系

溶血血液: 从人收集的血红细胞(5 μl)中加入净化水(500 μl)进行溶血, 将得到的混合物用作检验样品。

生物素标记的抗HbA1c mAb: 将NHS-LC-Biotin (No. 21335; Pierce)用作生物素化试剂。抗HbA1c mAb根据所述生物素化试剂所附说明书进行生物素化。重复透析去除未反应的生物素。所用抗HbA1c mAb公开于专利No. 2, 677, 753 (该单克隆抗体也可以使用血红蛋白A1c (HbA1c)检测试剂"RAPIDIA AUTO HbA1c"(销售商: FUJIREBIO Inc., Japan; 制造商: SRL, Inc., Japan))中包括的抗HbA1c试剂)。

不溶性磁性载体颗粒使用SMG-11 (Fujikura Kasei Co., Ltd., Japan)。该磁性胶乳颗粒制品具有下列物理特性: 颗粒大小(nm):990, 密度:1.58。用水稀释该不溶性磁性载体颗粒, 形成水性稀释系列: 2.5%、0.25%和0.025%。

在100 μl 2.5%水性磁性胶乳颗粒稀释液中, 颗粒数目为 $3.12\text{E}+0.9$, 表面积(m^2)为 $9.59\text{E}-03$; 0.25%稀释液的颗粒数目为 $3.12\text{E}+0.8$, 表面积(m^2)为 $9.59\text{E}-04$; 0.025%稀释液的颗粒数目为

3.12E+0.7, 表面积(m^2)为9.59E-05.

100 μ l水性磁性胶乳颗粒稀释液中加入5 μ l溶血的血液, 混合物于室温静置5分钟, 使其上吸附抗原性物质。然后其中加入50 μ l 0.07 mg/ml 生物素化的抗HbA1c mAb。混合物室温静置5分钟, 用ALP缓冲液(1% BSA、50 mM咪唑、150 mM NaCl、1 mM $MgCl_2$ 、0.1 mM $ZnCl_2$ 、0.05% Tween 20; pH 7.6)洗涤一次, 然后加入100 μ l亲和素-ALP (*5000; DAKO D-365)。

得到的混合物室温静置5分钟, 因使用生物素-亲和素系统而用ALP缓冲液洗涤4次。加入AMPPD (100 μ l, Lumigen PPD; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)以后, 将混合物转到白色平板。10分钟后测定发光量。结果如图1所示。

结果推测该溶血溶液的蛋白质数量为10 μ g。因此可以假定, 如果颗粒浓度为2.5%, 表面积为9.6E-0.3 m^2 , 则蛋白质的数量太少, 在反应期间将发生聚集, 从而不可能测定进入载体中的分析物。使用的颗粒大小为1 μ m时, 表面积值大约9.6E-03 m^2 , 似乎较为适当。

实施例2

抗体数量与信号之间的关系

将5 μ l溶血溶液(按实施例1同样方法制备)加入100 μ l 0.025%水性磁性胶乳颗粒稀释液(使用与实施例1不溶性磁性载体颗粒相同的胶乳制品)中, 使混合物室温静置5分钟, 其中加入一等份生物素化的抗HbA1c mAb (按实施例1相同方法制备, 为0.048 mg/mL (50 μ l, 2.4 μ g)、0.0048 mg/mL (50 μ l, 0.24 μ g)或0.00048 mg/mL (50 μ l, 0.024 μ g))。该混合物室温静置5分钟, 用ALP缓冲液(1% BSA、50 mM咪唑、150 mM NaCl、1 mM $MgCl_2$ 、0.1 mM $ZnCl_2$ 、0.05% Tween 20; pH 7.6)洗涤一次。然后其中加入100 μ l亲和素-ALP(与实施例1相同的试剂)。得到的混合物室温静置5分钟, 因使用生物素-亲和素系统而用ALP缓冲液洗涤4次。然后加入100 μ l AMPPD (与实施例1相同的试剂), 将混合物转到白色平板。10分钟后测定发光量。

结果如图2所示。结果发现抗HbA1c mAb的足够量为大约0.25

μg.

实施例3

利用直接标记的抗体进行测定

为了简化测定、提高可重复性，直接用ALP标记抗HbA1c mAb。

(1) 用异硫氰酸荧光素(FITC; DOJINDO, Japan)标记碱性磷酸酶(ALP; Oriental Yeast, Co., Ltd., Japan)。首先将ALP (10 mg/mL, 100 μl)加入0.1 M NaHCO₃缓冲液(400 μl)中，然后其中加入10 μl FITC溶液(4 mg FITC溶于二甲基甲酰胺(DMF, 1 mL)中(ALP : FITC = 1 : 10)。混合物室温搅拌10分钟，利用PD-10(Pharmacia)回收终产物。使用0.1 M pH 7.5 NaH₂PO₄缓冲液洗脱。回收FITC标记的ALP (1.7 mL)。

将上述制备的FITC标记的ALP (ALP-FITC)马来酰亚胺化。首先利用Centricon 30 (Millipore)将以上回收的ALP-FITC浓缩到500 μl。其后加入10 μl EMCS溶液(N-(ε-马来酰亚胺己酰氧基)-琥珀酰亚胺(EMCS, 6 mg) DMF溶液(1 mL))(ALP-FITC:EMCS = 1 : 20)。混合物室温搅拌30分钟，利用PD-10(Pharmacia)回收终产物。使用包含5 mM 乙二胺四乙酸(EDTA)的0.1 M NaH₂PO₄缓冲液，pH 6.3进行洗脱。回收马来酰亚胺化的ALP-FITC溶液(1.7 mL)。

同时将抗HbA1c mAb (与实施例1所用相同的抗体)转变为SH形式。因此将19.1 mg抗HbA1c mAb (52.4 μl)加入0.1 M NaH₂PO₄, pH 7.5缓冲液中(450 μl)，然后其中加入10 μl AMSA溶液(S-乙酰巯基琥珀酸酐(AMSA, 6 mg) DMF溶液(1 mL))(抗体: AMSA = 1:50)。混合物室温搅拌30分钟，然后其中加入包含50 mM EDTA的1 M Tris缓冲液，pH 7.0 (20 μl)，以及1 M盐酸羟胺溶液，pH 7.0 (20 μl)。混合物室温搅拌15分钟，利用PD-10(Pharmacia)回收终产物。使用包含5 mM EDTA的0.1 M NaH₂PO₄缓冲液，pH 6.3进行洗脱。回收SH形式的抗体(IgG SH, 1.7 mL)。

其后将总量的上述制备的马来酰亚胺化ALP-FITC与总量的上述制备的IgG SH混合。假定混合比为ALP:IgG = 1.5:1(摩尔比)。室温反

应2小时以后，利用Centricon (Millipore)浓缩混合物到500 μl ，通过凝胶过滤(使用的载体: Superose™ 12; Pharmacia)得到ALP标记的抗HbA1c mAb。

(2) 在100 μl 0.025%磁性胶乳颗粒稀释液(与实施例1相同的胶乳稀释液)中加入5 μl 溶血的血液(与实施例1相同的血液样品)。混合物室温静置5分钟，然后其中加入ALP标记的抗HbA1c mAb。抗体加入50 μl 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IgG。还使用利用PBS-Tween稀释的抗体稀释液以及利用包含BSA的缓冲液稀释的另一抗体稀释液，进行比较。混合物室温静置5分钟，然后用PBS-Tween洗涤4次。加入AMPPD (100 μl ，与实施例1相同的试剂)以后，将混合物转到白色平板。15分钟后测定发光量。结果如图3所示。

存在蛋白质时加入抗体，观察到背景下降。由于背景下降，可以预期重复性提高。已经证实信号较之亲和素-ALP提高。图4显示检验血红蛋白A1c (HbA1c)检验试剂“RAPIDIA AUTO HbA1c” (销售商: FUJIREBIO Inc., Japan; 制造商: SRL, Inc., Japan)与本发明胶乳聚集方法之间相关性的结果。证实存在较好的相关性。

实施例4

不溶性磁性载体颗粒差异的比较

使用与实施例3相同的操作与试剂。实施例1-3使用的Fujikura Kasei胶乳颗粒(Fujikura Kasei Co., Ltd., Japan)与VERITAS胶乳颗粒(VERITAS Corporation, Japan)作比较。所用每种磁性颗粒试剂的总表面积设为相同，进行测定。

VERITAS胶乳颗粒的颗粒大小为2.8 μm ，颗粒浓度为4.0E+09颗粒/mL，面积(计算值)为2.46E-11，每次测定的表面积为9.59E-05 m^2 /颗粒(调整到 m^2 需要1 μl)。用水稀释VERITAS胶乳颗粒，形成100倍的稀释液。使用100 μl VERITAS胶乳颗粒稀释液。

在100 μl 每种磁性颗粒悬浮液(表面积: 9.59E-11 m^2)中加入5 μl 溶血的血液，混合物室温静置5分钟。其后将ALP标记的抗HbA1c mAb加入混合物中。抗体加入50 μl 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IgG。混合物室温静置5

分钟，然后用PBS-Tween洗涤4次，其中加入100 μ l AMPPD（与实施例1相同的试剂）。将得到的混合物转到白色平板。15分钟后测定发光量。

结果如图5所示。使用血红蛋白A1c (HbA1c) 检验试剂“RAPIDIA AUTO HbA1c”（销售商：FUJIREBIO Inc., Japan; 制造商：SRL, Inc., Japan) 作为校准物。

工业应用性

本发明的免疫测定可以简单、方便并快速测定检验样品中的抗原性物质，而无需任何麻烦的预处理，从而大大便于对相当大量样品同时进行平行处理。此外，该测定方法适于全自动化仪器的临床检验。因此有可能使测定步骤自动化，并进行批量处理。另外，本发明的优点不仅在于测定本身，也在于试剂的制备。通常，制备磁性胶乳试剂（结合抗原、抗体等的胶乳）时，并不总是容易制备质量相同的试剂。此外，需要防止存储期间聚集和沉淀的知识。胶乳材料的成本一般只占诊断性胶乳试剂费用的小部分，大部分试剂费用是生物材料的费用，以及生物材料包被胶乳颗粒的步骤所需费用。在这方面，根据本发明，所述的不溶性磁性载体（例如胶乳）基本上既不用任何抗原、也不用任何抗体致敏，从而能够将商品化供应的不溶性磁性载体本身不经任何修饰用作检验试剂，而不必重新制备一种“胶乳试剂”。此外，本发明的抗体未必要求是纯化产品，其需要量也大大减少。因而检验试剂的制备更为容易，储存稳定性具有很大优点。

尽管参照某些实施方案及其实施例详细具体描述了本发明，但显然可能以其它形式实施。根据公开内容，应当理解各种修饰和变化也在所附权利要求的实质和范围之内。

图1

溶血血液 溶液指示量	发光强度		
	2.5%	0.25%	0.025%
0	16311	25251	32081
4.3	10518	308713	276822
8	37685	365169	546217
11.3	43753	428078	658164
14.7	40576	457947	768125

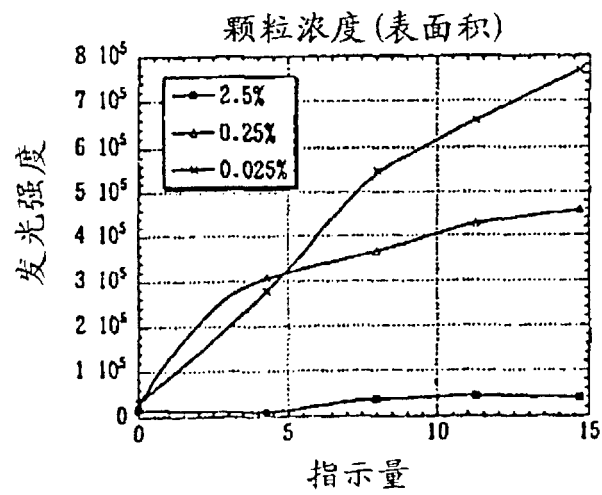


图2

溶血血液 溶液指示量	发光强度		
	2.4ug	0.24ug	0.024ug
0	18036	12178	17818
4.3	75872	63037	52128
8	163465	157811	53243
11.3	215368	226922	66182
14.7	271839	254224	77382

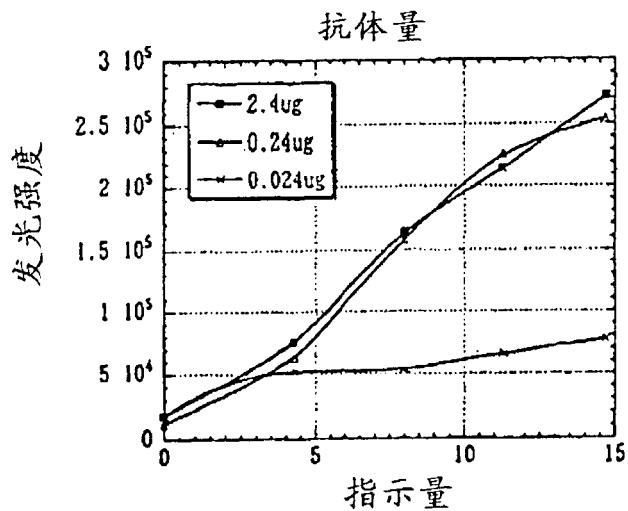


图 3

A1c	PBS	BSA	前值
0.0	46810	5506	12178
4.3	244065	103717	63037
8.0	343033	175070	157811
11.3	414175	243168	226922
14.7	501599	348525	254224

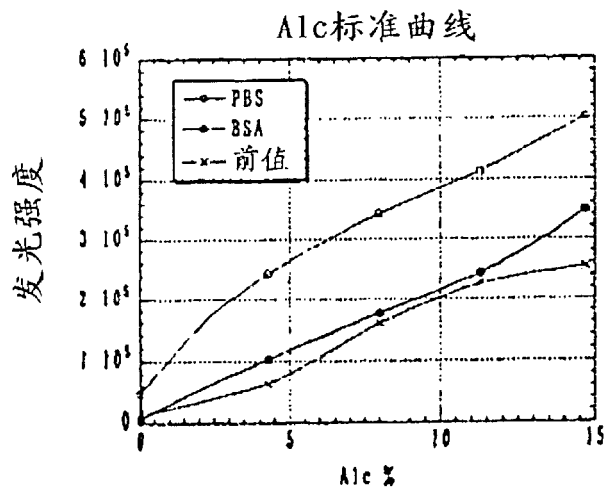


图4

样品	LA	磁性颗粒
1	3.8	3.6
2	4.6	4.4
3	5.5	5.5
4	6.6	6.3
5	7.4	7.3
6	7.6	7.7
7	9.3	9.5

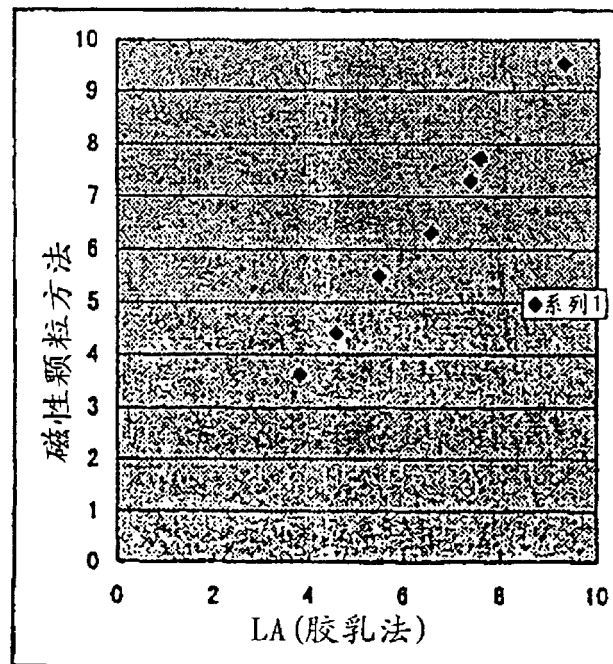
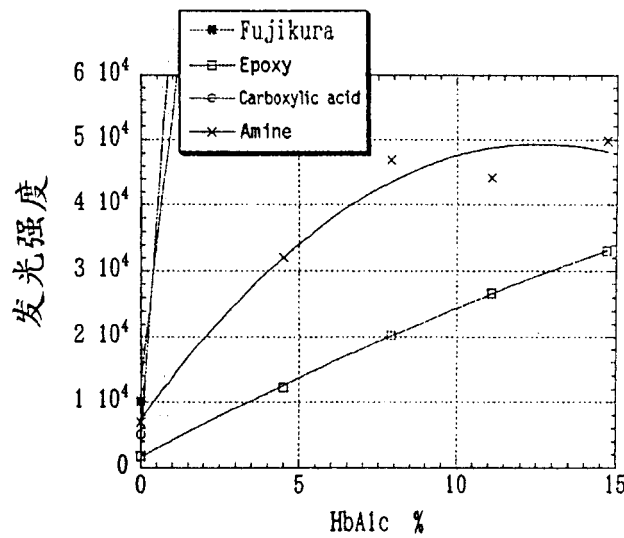
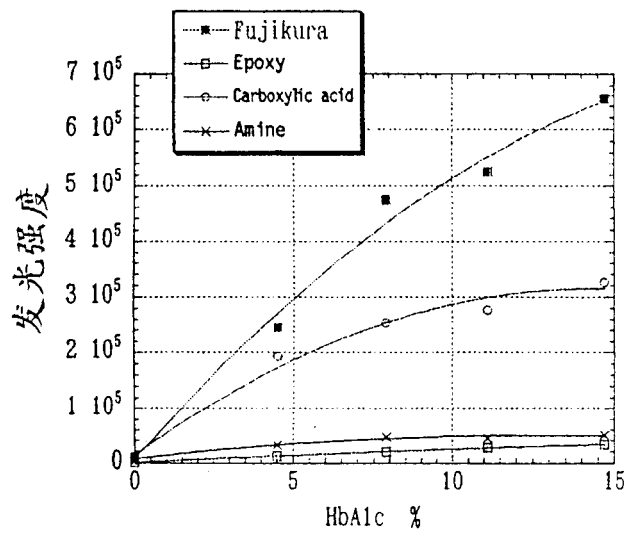


图5

标准	Fujikura	VERITAS		
		Epoxy	Carboxylic acid	Amine
0	10121	1731	5016	6907
4.5	244578	12379	192307	32155
7.9	473523	20169	253398	46913
11.1	525088	26717	277308	44169
14.7	654123	33089	325298	49881



专利名称(译)	免疫测定		
公开(公告)号	CN1258091C	公开(公告)日	2006-05-31
申请号	CN02804719.2	申请日	2002-04-26
申请(专利权)人(译)	爱赐爱儿股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	爱赐爱儿股份有限公司		
[标]发明人	樱井正明 高梨直树 冈昌则 平田稔		
发明人	樱井正明 高梨直树 冈昌则 平田稔		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/553 G01N33/53 G01N33/544		
CPC分类号	G01N33/544 G01N33/54333		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	2001149938 2001-05-18 JP		
其他公开文献	CN1491359A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了使用不溶性磁性载体颗粒进行免疫测定的方法，该方法适于节约人力以及在短时间内处理大量样品，同时避免了致敏的不溶性磁性颗粒的稳定性及其制备的困难。测定检验样品中的抗原性物质时，不使用携带抗原性物质特异的抗体的不溶性磁性颗粒，而是提供了基本上不吸附抗体等的不溶性磁性载体颗粒。然后待测定的抗原性物质吸附于不溶性磁性载体颗粒，随后与特异性针对该吸附的抗原性物质的标记抗体进行反应。从而以适合自动化的方式有效测定检验样品中的抗原性物质。

