

[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 200810183301.7

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 6 月 3 日

[11] 公开号 CN 101446586A

[22] 申请日 2001.12.11

[21] 申请号 200810183301.7

分案原申请号 01804853.6

[30] 优先权

[32] 2000.12.11 [33] JP [31] 376221/2000

[71] 申请人 株式会社三菱化学药得论

地址 日本东京都

[72] 发明人 中原邦彦 泽井时男

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 郭文洁 付磊

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 发明名称

免疫分析试剂和分析方法

[57] 摘要

本发明涉及免疫试剂和免疫方法。概述了免疫分析试剂：该分析试剂是由含有待分析物质抗原或抗体结合生物素形成的缀合物的组合物和含有抗生物素蛋白结合微粒子的组合物构成的，且在上述缀合物中与抗原或抗体结合的生物素量实质上是在没有待分析物质存在的情况下与上述抗生物素蛋白结合微粒子的量不凝集的量。另外概述了免疫分析方法：该方法是使被检测样品和与待分析物质抗原或抗体结合生物素形成的缀合物(抗原或抗体结合生物素的量实质上是在没有待分析物质存在情况下与上述抗生物素蛋白结合微粒子的量不凝集的量)以及抗生物素蛋白微粒子的接触，检测由待分析物质和缀合物形成的免疫复合物以及抗生物素蛋白微粒子的凝集程度的免疫分析方法。上述免疫分析试剂和分析方法不需要使抗体或抗原附载到胶乳粒子上的操

作，没有胶乳粒子的自凝发生，可以正确测定待分析物质，获得与通常致敏胶乳法同等或以上的反应性。

1.胶乳凝集试剂，其包括：含有结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体的第1组合物，和含有结合了抗生物素蛋白的胶乳粒子的第2组合物，其中，一个生物素分子与所述结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体中的所述抗原或抗体结合。

2.权利要求1的试剂，其中，马来酰亚胺生物素用作生物素化剂制备结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体。

3.包括如下步骤的胶乳凝集方法：

(1)使可能含有待分析物质的被检测样品，结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体，以及结合了抗生物素蛋白的胶乳粒子接触的步骤，其中，上述结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体中包含一个生物素分子；以及

(2)通过检测结合了抗生物素蛋白的胶乳粒子与由待分析物质和结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体之间形成的免疫复合物之间的凝集程度，分析待分析物质的步骤。

4.权利要求3的方法，其中，马来酰亚胺生物素用作生物素化剂制备结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体。

5.权利要求3或4的方法，其特征是：使可能含有待分析物质的被检测样品与结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体接触，接下来再与结合了抗生物素蛋白的胶乳粒子接触，其中，上述的结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体中包含一个生物素分子。

6.权利要求3或4的方法，其特征是，使可能含有待分析物质的被检测样品，结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体，以及结合了抗生物素蛋白的胶乳粒子同时接触，其中，上述结合了生物素的、待分析物质的抗原或抗体中包含一个生物素分子。

免疫分析试剂和分析方法

本申请是申请日为2001年12月11日,申请号为01804853.6的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及到免疫分析试剂和分析方法。更详细地讲涉及到通过利用免疫反应的凝集反应的分析试剂和分析方法。本说明书中的上述「分析」包括对分析物质的量进行定量或半定量的「测定」和判断是否存在待分析物质的「检测」两个方面。

背景技术

作为定量分析生物体液微量成分的方法之一,常用利用待分析物质的抗体或抗原的免疫测定方法。作为该免疫测定手段,可以利用对抗原抗体反应生成的免疫复合物进行光学测定的免疫比色(比ろう)法和免疫比浊法,以及利用放射性物质或酶作为标记物的放射免疫分析和酶免疫分析法。近年来为了适应在短时间内可处理多个被检测样品的自动分析仪器的普及,以及要求更高灵敏度,广泛应用利用被检测物质与结合抗体(或抗原)的胶乳粒子反应的胶乳凝集法。所谓的胶乳凝集法是通过检测待分析物质与结合胶乳的抗体(或抗原)反应生成的胶乳粒子的凝集程度测定待分析物质的方法。作为检测该凝集程度的方法有目测观察或使光照射反应液,测定散射光或透射光的方法。光学分析方法可以用于样品中的抗原或抗体的定量。

然而,为了实施上述那样的胶乳凝集法,必须使待分析物质的抗体(或抗原)附载到胶乳粒子上。这样的方法有诸如使抗体(或抗原)和胶乳粒子混合之后使它们结合的物理吸附法,或使抗体(或抗原)和胶乳粒子共价结合的化学结合法。无论哪一种方法,其操作都很烦琐,是胶乳凝集法存在的问题之一。而胶乳凝集法的最大问题是当象上述那样将抗体(或抗原)附载到胶乳粒子上时,由于维持胶乳粒子自身溶液中分散性的电双层的平衡被破坏,所以与抗原抗体反应无关,胶乳粒子自凝。由此不仅丧失了测定的正确性,而且由于胶乳粒

子自身的保存稳定性变成不稳定,随时间变化灵敏度有时高,有时低。另外使待分析物质的抗体(或抗原)附载到胶乳粒子上时,由于抗体(或抗原)吸附胶乳粒子表面,有时使得作为蛋白质的抗体(或抗原)变性了。如果发生这样的变性,由于待分析物质的抗体(或抗原)的反应性发生变化,目的免疫反应不会发生,或发生了目的以外的反应,所以无论出现哪一种情况,都会显著地降低测定结果的可信赖程度。

在以往方法中,为了消除上述问题,进行了诸如通过改进胶乳粒子的成分或制造方法使抗体(或抗原)能够容易附载,抑制自凝的手段等有关方面的各种研究。然而这些研究即便是对胶乳粒子的制造者和供应商有益,但对于接受胶乳粒子供给的人来说也没有参加的余地。虽然想出了使由表面活性剂或多糖类组成的稳定剂在使抗体(或抗原)附载后的胶乳粒子的保存液中共存等办法,但实际情况是没有达到一举解决上述问题的程度。

本发明人为了克服出现在胶乳凝集反应中的上述问题进行了深入研究,结果开发了使待分析物质的抗体(或抗原)不直接附载到胶乳粒子上,而是使胶乳粒子凝集,对其凝集程度进行分析的方法。

本发明正是源于这样的见解。

发明的概述

在一个实施方案中,本发明涉及包括如下(1)和(2)步骤的胶乳凝集方法:

(1)首先使可能含有待分析物质的被检测样品与待分析物质的抗原或抗体结合了1分子生物素的缀合物接触,接下来再与结合了抗生物素蛋白的胶乳粒子接触的步骤;以及

(2)通过检测由待分析物质和缀合物之间形成的免疫复合物以及抗生物素蛋白结合胶乳粒子引起的凝集程度,分析待分析物质的步骤。

本发明涉及到包括

(1)含有待分析物质的抗体或抗原结合了生物素的缀合物的组合物(以下有时也称之为第1组合物)和

(2)含有结合了抗生物素蛋白的微粒子的组合物(以下有时也称之为第2组合物),在上述缀合物中抗原或抗体结合的生物素量是

在没有待分析物质存在的情况下与上述抗生物素蛋白结合微粒子实质上没有凝集的量的免疫分析试剂。

按照本发明的免疫分析试剂的比较理想模式，上述第1组合物中含有的缀合物是抗原或抗体结合了1分子生物素的缀合物。

按照本发明的免疫分析试剂的比较理想模式，上述第2组合物中含有的抗生物素蛋白结合微粒子是结合了抗生物素蛋白的胶乳粒子。

另外本发明包括如下(1)和(2)步骤的免疫分析方法：

(1)可能含有待分析物质的被检测样品和待分析物质抗原或抗体结合了生物素的缀合物(其中抗原或抗体结合的生物素量是在没有待分析物质存在的情况下与上述抗生物素蛋白结合微粒子实质上没有凝集的量)和结合了抗生物素蛋白微粒子接触的步骤；

(2)通过检测待分析物质和缀合物之间形成的免疫复合物以及抗生物素蛋白结合微粒子引起的凝集程度，分析待分析物质的步骤。

按照本发明的免疫分析试剂的理想模式，缀合物是抗原或抗体结合1分子生物素的缀合物。

按照本发明的免疫分析方法的比较理想模式，最初使可能含有待分析物质的被检测样品和待分析物质抗原或抗体结合1分子生物素的缀合物接触，然后继续与抗生物素蛋白结合微粒子接触，或是同时使可能含有待分析物质的被检测样品和待分析物质抗原或抗体结合1分子生物素的缀合物、抗生物素蛋白结合微粒子接触。

按照本发明的免疫分析方法的更理想模式，抗生物素蛋白结合微粒子是结合了抗生物素蛋白的胶乳粒子。

附图的简单说明

图1是表示使用实施例1中制备的本发明2液体体系分析用试剂时和使用比较例1和2制备的SF抗体致敏胶乳时的吸光度变化量的比较图。

实施发明的最好模式

本发明中使用的第1组合物中含有的缀合物是待分析物质抗原或抗体上结合了特定量生物素的缀合物。在本发明中，作为上述缀合物，使用上述抗原或抗体结合生物素的缀合物，其中结合的生物素量是在

没有待分析物质存在的情况下与上述抗生物素蛋白结合微粒子实质上没有凝集的量（理想的是1分子生物素）。

例如作为上述缀合物，制备待分析物质抗原或抗体上结合了2分子生物素的缀合物，如果使该缀合物与抗生物素蛋白结合微粒子共存，由于即使不存在待分析物质，抗生物素蛋白也可与生物素特异结合，所以形成以抗生物素蛋白结合微粒子、缀合物和抗生物素蛋白结合微粒子顺序连接的复合物，发生自凝。

在本说明书中，所谓「没有待分析物质存在的情况下，与抗生物素蛋白结合微粒子实质上没有凝集的量」的生物素意思是指在不存在待分析物质情况下，使待分析物质抗原或抗体结合生物素的缀合物与抗生物素蛋白结合微粒子共存时，实质上不发生自凝的生物素量。而「实质上不凝集」指的是实施该方法时，不会给分析结果带来影响。

就象先前叙述的那样，抗原或抗体结合了2分子生物素的缀合物在上述条件下发生自凝。因此在本发明中使用的缀合物中抗原或抗体结合的生物素量不要超过2个分子，最好是1个分子。

本发明中使用的缀合物可以根据众所周知的方法制备，例如，通过使用生物素化试剂，使1分子或1分子以上生物素（优选1分子）通过化学方式结合于抗原或抗体，或是使1分子或1分子以上生物素（优选1分子）通过物理方式吸附于抗原或抗体上，然后继续将没有与抗原或抗体结合或吸附的残存生物素除去后，通过用缓冲液稀释到最适浓度可以得到本发明中使用的缀合物。通过将得到的缀合物在没有待分析物质存在的情况下与抗生物素蛋白结合微粒子共存，分析实质上是否发生自凝，可以判断结合于抗原或抗体的生物素量是否是「在没有待分析物质存在的情况下实质上没有与抗生物素蛋白结合微粒子凝集的量」。

将上述稀释液可以直接或添加适当添加剂（例如，众所周知的稳定剂）之后作为第1组合物使用。或者将上述稀释液直接冷冻干燥或添加适当添加剂（例如，众所周知的稳定剂）之后进行冷冻干燥，作成粉末状的第1组合物。作为上述的稳定剂如无机盐（例如氯化钠或叠氮化钠）、蛋白质（例如牛血清白蛋白）或氯化胆碱。

在上述缀合物中，与生物素结合的抗原或抗体只要是分别引起待分析物质和抗原抗体反应的抗原或抗体，并没有特别限定，作为抗体

(包括单克隆抗体和多克隆抗体)可以使用免疫球蛋白本身,或抗体片段[例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv]。在使单克隆抗体与生物素结合时,有时使用在待分析物质抗原的不同部位结合2种以上的单克隆抗体、以及当抗原识别部位有2个以上时有时使用1种单克隆抗体。

本发明中使用的第2组合物中含有的抗生物素蛋白结合微粒子是通过使多个抗生物素蛋白分子结合于无机物或有机物微粒子后制备的微粒子。作为微粒子可以使用有机高分子微粒子,例如聚乙烯、苯乙烯-2-甲基丙烯酸共聚物、苯乙烯-缩水甘油基(甲基)丙烯酸酯共聚物、或苯乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物等胶乳等微粒子的胶乳粒子。

上述微粒子的平均粒径也没有特别限定,0.01~1.0 μ m比较理想,特别在胶乳粒子的情况,根据待分析物质的检测浓度和使用的测定仪器可以在0.05~1.0 μ m(最好是0.05~0.5 μ m)范围内进行适当选择。

作为抗生物素蛋白可以使用能够与生物素特异紧密结合的任意的抗生物素蛋白,例如卵清抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白,或通过基因操作得到的抗生物素蛋白(即重组抗生物素蛋白)等。

作为制备上述抗生物素蛋白结合微粒子的方法可以使用诸如将肽合成试剂(例如水溶性碳二亚胺)添加到微粒子(例如胶乳粒子)后,加入抗生物素蛋白,进行搅拌、离心之后,使其分散于水中的方法。这样得到的抗生物素蛋白结合微粒子(特别是抗生物素蛋白结合胶乳粒子)溶液可以用维持分散性的缓冲液进行稀释,该稀释液可以直接或加入适当添加剂(例如众所周知的稳定剂)之后作为第2组合物使用。或者将上述稀释液直接冷冻干燥或添加适当添加剂(例如,众所周知的稳定剂)之后进行冷冻干燥,作成粉末状的第2组合物。

能够维持抗生物素蛋白结合微粒子(特别是抗生物素蛋白结合胶乳粒子)分散性的缓冲液可以通过在通常的缓冲液[例如,10mmol/L(pH7.0)磷酸缓冲液]中添加分散剂(例如吐温20等)制备。作为第2组合物用的上述稳定剂可以使用在第1组合物中列举的稳定剂。

可以将上述方法制备的第1组合物和第2组合物作成例如含有上述缀合物的液体状或粉末状的第1试剂和作为含有上述抗生物素蛋白结合微粒子的液体状或粉末状的第2试剂。而粉末状组合物在使用

前可以通过适当缓冲液液状化后使用。

在本发明的免疫分析方法中，通过使（1）可能含有待分析物质的被检测样品与（2）待分析物质抗原或抗体结合生物素的缀合物[其中结合于抗原或抗体的生物素量在没有待分析物质存在的情况下，实质上没有与抗生物素蛋白结合微粒子凝集的量（最好是结合1个分子生物素）]和（3）与抗生物素蛋白结合微粒子接触，检测由待分析物质和缀合物之间形成的免疫复合物，以及抗生物素蛋白结合微粒子引起的凝集程度，可以分析被检测样品中的待分析物质。本发明的上述免疫分析试剂是适用于实施本发明免疫分析方法的试剂。

上述的被检测样品（1）与缀合物（2）和抗生物素蛋白结合微粒子（3）的接触也可以同时进行，或者使上述的被检测样品（1）与缀合物（2）先接触，然后再与抗生物素蛋白结合微粒子（3），接触也可以。当被检测样品中含有待分析物质时，通过上述被检测样品（1）与缀合物（2）的接触，发生抗原抗体反应之后，形成免疫复合物，另一方面通过缀合物（2）与抗生物素蛋白结合微粒子（3）接触，引起生物素-抗生物素蛋白反应，形成生物素-抗生物素蛋白复合物。例如，通过上述被检测样品（1）与缀合物（2）的接触，发生抗原抗体反应之后，形成免疫复合物，接下来该免疫复合物的生物素与抗生物素蛋白结合微粒子的抗生物素蛋白通过生物素-抗生物素蛋白反应结合。形成了上述免疫复合物的待分析物质通过与另外的缀合物（2）接触，形成另一个免疫复合物，由于该免疫复合物又可以与抗生物素蛋白结合微粒子结合，所以发生凝集。另外在上述抗生物素蛋白结合微粒子中也存在很多抗生物素蛋白分子，由于这些抗生物素蛋白也会引起与上述同样的生物素-抗生物素蛋白反应和抗原抗体反应，所以从这一方面看也会发生凝集。

作为检测凝集程度的方法可以利用以往众所周知的玻板凝集法或微滴板凝集法，利用光学方法检测胶乳粒子的凝集程度时，例如可以使用测定散射光、吸光度或透光度的以往众所周知的光学仪器，理想的测定波长是300~800nm。检测凝集程度的方法根据众所周知的方法，通过使用的胶乳粒子的大小、胶乳浓度的选择、抗原抗体反应时间、生物素-抗生物素蛋白反应时间等的设定，可以测定散射光、吸光度或透射光强度的增加或减少程度，或者通过它们的组合进行检

测。

在本发明的免疫分析方法中存在于抗原抗体反应的反应体系中的抗体或抗原浓度、缀合物中含有的生物素量、或抗生物素蛋白结合微粒子的量可以根据被检测样品的种类和待分析物质的种类适当地变更。例如血清（被检测样品）中的 IgG（待分析物质）浓度由于必须要达到 50mg/mL 的测定范围，所以要根据其测定范围设定使用量，而弹性蛋白酶 1（待分析物质）等测定范围到 50ng/mL，所以要根据其测定范围设定使用量。

在本发明的免疫分析方法中通过使被检测样品和结合了生物素的缀合物接触引起的抗原抗体反应的条件与通常免疫分析方法中的条件一样。在本发明的免疫分析方法中，由于实施在与实施上述抗原抗体反应体系相同的体系内通过使生物素缀合物与抗生物素蛋白结合微粒子接触引起生物素 - 抗生物素蛋白反应，所以必须要创造适于生物素 - 抗生物素蛋白反应的条件。

作为抗原抗体反应和生物素 - 抗生物素蛋白，可以根据待分析物质的种类适宜选择各种缓冲液。该缓冲液优选具有不会使待分析物质失活，也不会抑制抗原抗体反应和生物素 - 抗生物素蛋白反应的离子浓度或 pH。例如可使用，グッド缓冲液、甘氨酸缓冲液或 Tris 缓冲液。抗原抗体反应和生物素 - 抗生物素蛋白反应的 pH，优选为 5 ~ 10，更优选为 6 ~ 8。反应温度优选 0 ~ 50℃，更优选 20 ~ 40℃。反应时间可适宜选择。

成为本发明分析方法对象的被检测样品只要是可能含有作为待分析物质的抗原或抗体的样品，没有特别限定，例如来自一般用于临床诊断的体液，如血液、血清、血浆、或尿、或实验样品等。

本发明分析方法的待分析物质也可以是利用一般抗原抗体反应可进行分析的物质（特别是生理活性物质），没有特别限定。作为待分析物质的代表性例子，如蛋白质和脂质，再详细地讲如各种抗原、抗体、受体、或酶等。具体讲如 C 反应性蛋白质（CRP）、类风湿因子、铁蛋白、 β -2 微球蛋白、 α -胎甲球蛋白（AFP）、抗链球菌溶血素 O 抗体、IgE、梅毒螺旋体抗体、抗梅毒脂质抗原抗体、B 型肝炎病毒（HBS 抗体、HBS 抗原、HBc 抗体、HBe 抗体）D 二聚体、纤维蛋白和纤维蛋白原分解产物（FDP）、可溶性纤维蛋白（Soluble

fibrin:SF)、纤维蛋白溶酶和 $\alpha 2$ -纤维蛋白溶酶抑制剂复合物(PPI)、前列腺特异抗原(PSA)、弹性蛋白酶 1、弹性蛋白酶 XDP、凝血调节蛋白、抗 DNA 抗体等。

实施例

以下通过实施例对本发明进行具体说明,但本发明不限于这些实施例。

实施例 1: 可溶性纤维蛋白的测定

(1) 可溶性纤维蛋白抗体结合生物素溶液的制备

作为抗可溶性纤维蛋白(SF)的单克隆抗体使用由 WO95/12617 号公报记载的杂交瘤 FM No.43-1 分泌的单克隆抗体 FM No.43-1。上述杂交瘤从 1993 年 10 月 27 日国内保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心[(旧)工业技术院生命工学工业技术研究所(地址:305-8566 日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)],从 1994 年 10 月 27 日开始转移至国际保藏。国际保藏号(接在国际保藏号[]内是国内保藏号)是 FERM BP-4846[FERM P-13925]。

具体讲按照与 WO95/12617 号公报实施例 2(b)记载的方法同样的方法制备抗可溶性纤维蛋白(SF)的单克隆抗体腹水,利用硫酸铵进行粗纯化后,用离子交换树脂(DEAE)处理,向经胃蛋白酶消化得到的 $F(ab')_2$ 中加入 2-巯基乙胺,制备 Fab' 抗体片段。将这样得到的抗体以 2.5mg/mL 的浓度溶解于 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.1),然后向该溶液添加马来酰亚胺(フナコシ公司生产)0.6mg,于室温下致敏一昼夜。然后通过 G25superpharin 进行凝胶过滤,回收 Fab' 抗体与生物素的缀合物,将该缀合物以 0.05mg/mL 的量添加到 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH6.5),作为 SF 抗体结合生物素溶液。

(2) 抗生物素蛋白胶乳悬浮液的制备

向 0.1mL 10% 化学结合胶乳(粒径:0.3 μ m)中添加水溶性碳二亚胺(Water-suluble carbodimide:WSC),静置 10 分钟后,添加链霉抗生物素蛋白 0.8mg/mL,搅拌 1 小时。将该混合物离心,得到的沉淀中加入 0.5mL 蒸馏水,进行搅拌,得到 2% 抗生物素蛋白胶乳分

散液。该分散液用 10mmol/L-MOPS 悬浮液 (pH7.0) 稀释之后作成 0.5% 抗生物素蛋白胶乳悬浮液。

(3) SF 抗原分析用试剂

本实施例的人 SF 抗原分析用试剂是由上述 (1) 的 SF 抗体结合生物素溶液组成的第 1 试剂和上述 (2) 的抗生物素蛋白胶乳悬浮液组成的第 2 试剂构成的 2 液体系统试剂。

(4) 标准 SF 抗原液

使凝血酶作用于市售的纤维蛋白原 (XIII 因子フリー: カピ公司生产), 得到的凝血块用醋酸溶解, 添加到血浆中之后制备 SF 抗原。使用含有浓度为 0 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL、或 80 μ g/mL 的该抗原的人血浆。

(5) 分析方法

将上述 (1) 的 SF 抗体结合生物素溶液 130 μ l 与上述 (4) 的标准 SF 抗原液 3 μ l 混合, 于 37 $^{\circ}$ C 保持 5 分钟后, 添加上述 (2) 的抗生物素蛋白胶乳悬浮液 130 μ l, 进行搅拌, 测定添加之后经历 10 分钟的在 600nm 的吸光度。将该 10 分钟吸光度变化量作为吸光度变化量 (Δ Abs)。使用自动分析仪器 LPIA-S500 进行测定。结果如图 1 所示。

比较例 1

(1) 抗体以物理方式吸附于胶乳

将实施例 1(1) 制备的抗 SF 单克隆抗体 F(ab')₂ 片段以 0.5mg/mL 的浓度溶解于 10mmol/L-Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 中, 制备抗体液 5mL, 然后向该 5mL 抗体液添加 5mL 平均粒径为 0.3 μ m 的聚苯乙烯胶乳[固体成分 = 5% (W/V); 日本合成橡胶公司]之后, 于室温搅拌 30 分钟。

向上述混合物中添加含有 0.3% (W/V) 牛血清蛋白 (BSA) 的 100mmol/L-Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 于室温搅拌 60 分钟后, 用 20,000rpm 对上述混合物进行离心分离。

向得到的沉淀中添加含有 0.05%NaN₃ 的 10mmol/L-Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 10mL, 制备比较用抗 SF 抗体致敏胶乳试剂。

(2) SF 的测定

将 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.5) 130 μ l 与上述实施例 1 (4) 制备的标准 SF 抗原液 3 μ l 混合, 于 37 $^{\circ}$ C 保持 5 分钟后, 添加比较例 1 (1) 中制备的抗 SF 抗体致敏胶乳试剂 130 μ l, 进行搅拌, 测定添加之后经历 10 分钟的 600nm 的吸光度。结果如图 1 所示。

比较例 2

(1) 将实施例 1 (1) 制备的 SF 抗体结合生物素溶液以 0.5mg/mL 的浓度溶解在 10mmol/L-MOPS 缓冲液 (pH7.0), 然后向该溶液中以 1% 浓度加入实施例 1 (2) 中使用的抗生物素蛋白胶乳, 于室温搅拌 30 分钟, 制备 SF 抗体致敏胶乳。将这样得到的 SF 抗体致敏胶乳用 10mmol/L-MOPS 缓冲液 (pH7.0) 稀释, 作成 0.5% SF 抗体致敏胶乳悬浮液, 作为比较用抗 SF 抗体致敏胶乳试剂。

(2) 将 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.5) 130 μ l 与实施例 1 (4) 制备的标准 SF 抗原液 3 μ l 混合, 5 分钟后, 添加比较例 2 (1) 制备的抗 SF 抗体致敏胶乳试剂 130 μ l, 搅拌, 测定添加之后经历 10 分钟过程的 600nm 的吸光度。结果如图 1 所示。

在图 1 中, ■ 是使用比较例 1 制备的抗 SF 抗体致敏胶乳试剂时的结果, ◆ 是使用比较例 2 制备的抗 SF 抗体致敏胶乳试剂时的结果, ● 和 ○ 是在上述实施例 1 (5) 的操作中的分别使用本发明的 2 种液体体系分析用试剂时的结果, ● 是 SF 抗体结合生物素浓度为 0.0250mg/mL 的结果, ○ 是 SF 抗体结合生物素浓度为 0.05mg/mL 的结果。而 ▲ 是在上述实施例 1 (5) 的存在中没有 SF 抗体结合生物素存在下 (即 SF 抗体结合生物素浓度为 0.00mg/mL) 的结果。

就象图 1 所表明的那样, 如果使用由 SF 抗体结合生物素溶液组成的第 1 试剂和由抗生物素蛋白胶乳悬浮液组成的第 2 试剂这两种试剂构成的 2 液体体系的本发明分析用试剂, 可以获得与以往使用通常胶乳的方法 (比较例 1) 同等或以上的反应性。另外使用本发明的分析用试剂, 由于与预先将生物素化抗体结合于抗生物素蛋白胶乳的方法 (比较例 2) 相比, 看不到自凝, 所以 SF 抗原不存在时 (0 浓度) 的吸光度变化量表现出低的值。这在提高测定灵敏度上也起到了极其重要的效果。

产业上利用的可能性

本发明不需要为了使抗体或抗原附载到胶乳粒子等微粒子的烦琐操作。另外看不到胶乳粒子的自凝发生，使保存的稳定性提高。另外与以往技术不同，在将待分析物质的抗体或抗原附载到胶乳时，由于没有发生因吸附于胶乳表面蛋白质变性的现象，所以针对待分析物质的反应性不会发生变化，待分析物质的正确测定成为可能。另外在根据免疫凝集反应对待分析物质的测定中，与使用通常抗体(或抗原)致敏胶乳(物理吸附法)的方法相比，吸光度值上升，灵敏度提高。另外与预先将生物素化抗体结合于抗生物素蛋白胶乳的方法相比，本发明方法空白值变低，低值处的精度提高，即使在高值处本发明方法也可以获得在比较例以上的反应性。本发明的分析试剂适于用作自动分析仪器用的分析试剂。

以上按照特定模式对本发明进行了说明，但本领域技术人员自明的变形和改良也都包括在本发明的范围内。

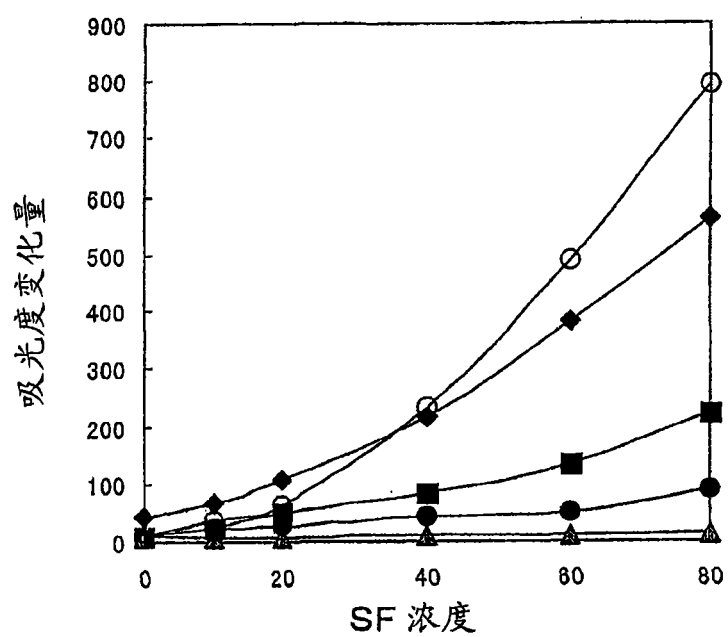


图 1

专利名称(译)	免疫分析试剂和分析方法		
公开(公告)号	CN101446586A	公开(公告)日	2009-06-03
申请号	CN200810183301.7	申请日	2001-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三菱化学药得论		
申请(专利权)人(译)	株式会社三菱化学药得论		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社三菱化学药得论		
[标]发明人	中原邦彦 泽井时男		
发明人	中原邦彦 泽井时男		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/535 G01N33/54333		
代理人(译)	郭文洁 付磊		
优先权	2000376221 2000-12-11 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫试剂和免疫方法。概述了免疫分析试剂：该分析试剂是由含有待分析物质抗原或抗体结合生物素形成的缀合物的组合物和含有抗生物素蛋白结合微粒子的组合物构成的，且在上述缀合物中与抗原或抗体结合的生物素量实质上是在没有待分析物质存在的情况下与上述抗生物素蛋白结合微粒子的凝集量。另外概述了免疫分析方法：该方法是使被检测样品和与待分析物质抗原或抗体结合生物素形成的缀合物(抗原或抗体结合生物素的量实质上是在没有待分析物质存在情况下与上述抗生物素蛋白结合微粒子的凝集量)以及抗生物素蛋白微粒子的接触，检测由待分析物质和缀合物形成的免疫复合物以及抗生物素蛋白微粒子的凝集程度的免疫分析方法。上述免疫分析试剂和分析方法不需要使抗体或抗原附载到胶乳粒子上的操作，没有胶乳粒子的自凝发生，可以正确测定待分析物质，获得与通常致敏胶乳法同等或以上的反应性。

