



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105122062 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201480011899. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 18

G01N 33/531(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/545(2006. 01)

2013-040337 2013. 03. 01 JP

G01N 33/72(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/053686 2014. 02. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/132833 JA 2014. 09. 04

(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9页

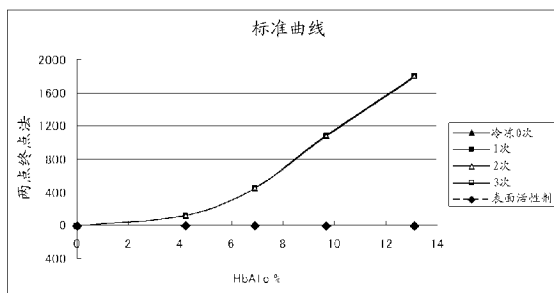
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

未致敏胶乳试剂的劣化防止方法

(57) 摘要

公开了良好地维持免疫测定试剂盒中的胶乳试剂的分散状态,防止由于温度变化所导致的凝集沉淀的产生而保护试剂不会形成测定性能的劣化的,即使对于少量分注胶乳试剂的方式的免疫凝集测定试剂盒也可以适用的新型手段。本发明的免疫测定试剂,其在溶剂中含有未致敏的胶乳颗粒和三甲基甘氨酸。试剂中的三甲基甘氨酸浓度优选为5~10w/v%。该试剂例如可以优选用作血红蛋白A1c的免疫测定试剂。



1. 免疫测定试剂,其在溶剂中含有未致敏的胶乳颗粒和三甲基甘氨酸。
2. 根据权利要求 1 所述的试剂,其中,试剂中的三甲基甘氨酸浓度为 5 ~ 30w/v%。
3. 根据权利要求 1 所述的试剂,其中,试剂中的三甲基甘氨酸浓度为 5 ~ 10w/v%。
4. 根据权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的试剂,其为利用凝集法的免疫测定试剂。
5. 根据权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的试剂,其为血红蛋白 A1c 的免疫测定试剂。
6. 免疫测定试剂的劣化防止方法,其包括使三甲基甘氨酸共存于含有未致敏胶乳颗粒的免疫测定试剂中。
 7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中,试剂中的三甲基甘氨酸浓度为 5 ~ 30w/v%。
 8. 根据权利要求 6 所述的方法,其中,试剂中的三甲基甘氨酸浓度为 5 ~ 10w/v%。
 9. 根据权利要求 6 ~ 8 中任一项所述的方法,其中,所述免疫测定试剂为利用凝集法的免疫测定试剂。
 10. 根据权利要求 6 ~ 9 中任一项所述的方法,其中,所述免疫测定为血红蛋白 A1c 的免疫测定试剂。

未致敏胶乳试剂的劣化防止方法

技术领域

[0001] 本发明涉及防止使用了未致敏胶乳的免疫测定试剂的性能的劣化的方法。

背景技术

[0002] 免疫测定试剂盒中的所谓胶乳试剂中,通常预先使与测定目标物质特异性反应的抗体或者与测定目标抗体反应的抗原物质固相化、担载于胶乳表面。为了提高这种胶乳试剂的保存稳定性,添加糖类和/或表面活性剂,尝试冷冻干燥(专利文献1、2)。根据这种手法,能够实现胶乳试剂的稳定保存。但是,利用进行这种冷冻干燥的手法时,在使用前需要胶乳液的复原处理,对于用户而言,方便性不好。

[0003] 若考虑到用户的方便性则理想的是可以直接使用的液态的胶乳试剂。作为不需要使用前的复原处理的液态的胶乳试剂,为了冷冻劣化保护,通常添加有糖类、表面活性剂等。但是,经固相化的抗原、抗体蛋白自胶乳表面剥离的问题没有得到完全解决,仍然存在即使冷冻也没有问题的胶乳试剂。

[0004] 使用了未致敏胶乳的血红蛋白 A1c 的免疫测定试剂的情况下,胶乳液的冷冻保护对策主要通过全面实施保管运输时的温度管理来进行,胶乳试剂量也有 20mL 以上的容量,因此过去冷冻所导致的试剂的劣化实质上没有成为问题。

[0005] 但是近年在一般医院利用诊断等待的时间,在诊断之前实施采血、检查,使该结果反映到诊断的尝试得到广泛进行。这种现场使用的是用小型的专用仪器测定的试剂,试剂也将一试验份提前小份分注到盒(cartridge)内。该试剂量为 0.1mL 左右。利用标准品得到的标准曲线预先作为数据存储在,因此若试剂的反应性变化则测定值变化,比以往更严格要求试剂的性能稳定性。如此若试剂量减少则容易受到运输时的温度变化,有可能损害试剂的性能。例如若在将产品冷藏运输时由于向低温侧变动而变得过冷,则少量分注的试剂在短时间内冷冻的可能性升高。实际上对于使用了未致敏胶乳的血红蛋白 A1c 的免疫凝集测定试剂盒而言实质上产生下述事例:小份分注的胶乳试剂在冷藏运输中被过度冷却,胶乳液冷冻,作为其结果,产生胶乳的凝集沉淀,不能作为试剂使用。因此近年胶乳试剂的冷冻劣化保护成为紧急问题。

[0006] 专利文献 2 中记载了将未致敏胶乳冷冻干燥时添加的防冻剂,列举了分子量大的多糖类、PVP、Tween20 等表面活性剂的名称。

[0007] 专利文献 3 提供,通过使用某种胺化合物,在不产生载体颗粒的自然凝集的情形下促进基于特异反应的凝集的凝集测定用试剂和测定方法,该胺化合物包含甜菜碱盐酸盐。但是,若观察其实施例示出的数据则可知,将甜菜碱盐酸盐加入到 150mM 致敏胶乳的情况与未添加的对照进行比较,对于 4℃、3 天静置后的上清液而言,添加甜菜碱时成绩良好的在 3 个项目中仅为 2 个项目,搅拌后在 3 个项目中仅为 1 个项目,并不能说明通过添加甜菜碱而维持了致敏胶乳的分散状态,防止了自然凝集等所导致的沉降。也并未说明通过添加甜菜碱而防止了冷冻所导致的凝集。

[0008] 虽然技术领域与免疫测定试剂盒不同,但是已知通过向喷墨油墨的组合物中加入

甜菜碱来防止冷冻·解冻所导致的油墨的凝集沉淀(专利文献4)。但是,对于胶乳试剂而言,尚未知晓为了实现冷冻劣化保护而将甜菜碱添加到胶乳液来使用的例子。

[0009] 现有技术文献

专利文献

专利文献1:日本特开平11-258241号公报

专利文献2:日本特开昭61-222531号公报

专利文献3:国际公开公报W02007/074860

专利文献4:日本特开2001-271013号公报。

发明内容

[0010] 发明要解决的问题

本发明的目的在于,提供良好地维持免疫测定试剂盒中的胶乳试剂的分散状态,防止温度变化所导致的凝集沉淀的产生而保护试剂不会发生测定性能的劣化的,即使对于少量分注胶乳试剂的方式的免疫凝集测定试剂盒也可以适用的新方法。

[0011] 用于解决问题的方法

作为向胶乳试剂加入作为冷冻保护剂的物质,如上所述已知糖类、表面活性剂。但是,使用未致敏胶乳的血红蛋白A1c的免疫测定试剂中,将试样中的血红蛋白稀释而成的样品加入到胶乳试剂,由此使血红蛋白A1c物理吸附于胶乳表面。这种免疫测定试剂的情况下,作为冷冻保护剂,不能使用阻碍物理吸附的表面活性剂。进而,极其少量封入到盒中的胶乳试剂,虽然取决于其结构,但是需要在微小结构内自由流动。即存在下述问题:若由于添加物而使胶乳试剂的粘性升高、流动性变差,则对试剂的性能造成影响。因此,也难以使用分子量大的物质。

[0012] 本申请发明人等基于以上进行深入研究,结果发现,通过向胶乳试剂添加适当量的甜菜碱(三甲基甘氨酸),即使经过冷冻·解冻之后,也可以防止胶乳颗粒的凝集沉淀而维持作为免疫测定试剂的性能,从而完成了本申请发明。

[0013] 即,本发明提供一种免疫测定试剂,其在溶剂中含有未致敏的胶乳颗粒和三甲基甘氨酸。另外,本发明提供一种免疫测定试剂的劣化防止方法,其包括使三甲基甘氨酸共存于含有未致敏胶乳颗粒的免疫测定试剂中。

[0014] 发明的效果

通过本发明,提供防止胶乳试剂的冷冻·解冻所导致的性能劣化的新方法。根据本发明,即使胶乳试剂冷冻也不会产生凝集,可以维持作为免疫测定试剂的性能,因此即使在运输时的温度管理差的地区,也能够性能不劣化地进行运输。甜菜碱为低分子的物质,即使以数%的浓度使用,也不会如糖类那样提高试剂的粘性,因此即使适用于试剂量少的盒式的免疫测定试剂盒,也不会造成由于流动性降低所导致的不良影响。另外,不会如表面活性剂那样阻碍测定对象蛋白质在未致敏胶乳颗粒上的吸附。

附图说明

[0015] 图1为表示对添加有甜菜碱6w/v%的胶乳试剂R1实施0次~6次的冷冻解冻处理时的信号的数值的变化的图。

[0016] 图2为使用添加有甜菜碱6w/v%的胶乳试剂R1(冷冻解冻0次~3次)、测定HbA1c标准品的信号而制成的标准曲线。也同时示出使用添加作为表面活性剂的Tween 20来替代甜菜碱的R1试剂(冷冻解冻1次)同样地制成的标准曲线。

具体实施方式

[0017] 本发明的免疫测定试剂,为胶乳颗粒漂浮于溶剂中的形态的试剂(胶乳试剂),其特征在于,使用未致敏的颗粒作为胶乳颗粒,以及含有甜菜碱。

[0018] “未致敏”指的是抗原或抗体等蛋白质没有实质上担载于胶乳颗粒表面的状态。作为利用胶乳凝集法的免疫测定方法之一,已知胶乳试剂使用未致敏的胶乳颗粒的手法(日本专利第2677753号)。该手法中,通过使未致敏胶乳颗粒与检样试样接触,使测定对象蛋白质吸附于颗粒表面,使其与对象蛋白质的抗体反应,产生颗粒的凝集,通过反应液的浊度测定对象蛋白质的量。本发明可以优选适用于利用这种手法的免疫测定法。需要说明的是,本发明中,“测定”这一用语包含定性的检测、定量、半定量。

[0019] 胶乳颗粒自身可以使用与公知的免疫凝集测定试剂盒中使用的胶乳颗粒相同的胶乳颗粒。具体而言,胶乳颗粒的平均粒径可以为0.04~0.8 μm 左右、例如0.08~0.2 μm 左右。对胶乳的材质没有特别限定,但是优选使用聚苯乙烯胶乳等苯乙烯系胶乳、丙烯酸系胶乳等。使用表面的疏水性强的胶乳(例如聚苯乙烯胶乳)在使检样试样中的测定对象蛋白质的吸附顺利进行方面优选。进而,可以根据需要使用各种改性胶乳(例如羧酸改性胶乳)、磁性胶乳(内包有磁性颗粒的胶乳)等。

[0020] 溶剂可以是在利用胶乳凝集法的免疫测定试剂盒的胶乳试剂中通常用作使胶乳漂浮的液体的缓冲液。例如可以使用甘氨酸缓冲液、硼酸缓冲液、Good缓冲液等,但是不限于此。试剂中的胶乳浓度通常为0.05~0.5w/v%左右。

[0021] 本发明中使用的甜菜碱指的是三甲基甘氨酸(N,N,N-trimethylglycine)。为了在含有未致敏胶乳的溶剂中含有三甲基甘氨酸,可以将三甲基甘氨酸的酸酐、水合物或盐添加到溶剂中。作为三甲基甘氨酸的盐的具体例,可列举出盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐等,但是不限于此。

[0022] 免疫测定试剂中的甜菜碱的含量优选为5~30w/v%,例如可以为5~25w/v%、5~20w/v%、5~10w/v%、5.5~8.5w/v%、或5.5~7.5w/v%。通过在胶乳试剂中含有甜菜碱,抑制由于试剂的运输中、储藏中的温度变化(例如由于过度冷所导致的冷冻以及此后的融解)而产生的胶乳颗粒的凝集沉淀的产生,可以防止作为免疫测定试剂的性能的劣化。若甜菜碱浓度处于5~30w/v%的范围,则对于冷冻·解冻0次和1次而言,信号检出值没有差异,得到冷冻劣化防止效果。甜菜碱浓度不足5w/v%时,若重复冷冻·解冻则存在信号检出值升高的倾向,难以得到正确的测定值。另一方面,若甜菜碱浓度超过8.5w/v%则存在由于重复冷冻·解冻而信号检出值稍微降低的倾向,但是冷冻·解冻0次的信号检出值也降低,若按照比率评价由于冷冻·解冻的次数所导致的降低则确认任意一浓度都大致相同。也就是说,对于超过8.5w/v%的浓度而言,仅测定信号的绝对值进一步降低,得不到防止性能劣化的效果自身,劣化防止的效果不会进一步升高。因此,虽然没有特别限定,但是甜菜碱的使用浓度为8.5w/v%以下例如7.5w/v%以下为宜。但是胶乳试剂中含有的甜菜碱的最合适浓度可以根据胶乳的种类或浓度、缓冲液的种类而变化,因此可以适当研究最合适的甜菜

碱浓度。例如若试剂中的胶乳浓度升高则信号检出值升高,因此在以升高的浓度使用甜菜碱的情况下,以升高胶乳浓度为宜。

[0023] 作为利用未致敏的胶乳试剂的免疫测定法的具体例,可列举出血红蛋白 A1c(HbA1c) 的免疫测定方法。HbA1c 为在具有由 2 根 α 链和 2 根 β 链组成的异源四聚体结构的血红蛋白(Hb)中, β 链的 N 末端缬氨酸的 α 氨基非酶学糖基化而成的糖化血红蛋白,近年作为糖尿病的判定基准,使用 HbA1c。区别没有糖化的 Hb 和 HbA1c 进行免疫测定的情况下,使用作为 HbA1c 特异性区域的 β 链 N 末端区域的抗体。该 β 链 N 末端区域埋没、存在于 HbA1c 分子的高级结构中,若在胶乳表面吸附 HbA1c 则 HbA1c 的 β 链 N 末端区域露出,因此即使没有特别的变性处理,也能够进行利用抗 HbA1c 抗体的免疫测定。使用未致敏胶乳试剂的市售的 HbA1c 免疫测定试剂盒是利用这种原理的试剂盒。本发明的试剂例如可以优选适用于这种 HbA1c 免疫测定试剂盒。

[0024] 使用了本发明的免疫测定试剂的利用凝集法的 HbA1c 的免疫测定,除了未致敏胶乳试剂含有甜菜碱之外,可以如通常那样使用上述市售的 HbA1c 免疫测定试剂盒进行。以下具体说明测定的步骤,首先通过使本发明的试剂与血液等检样试样接触,在胶乳颗粒表面吸附血红蛋白(包含通常的血红蛋白和作为糖化血红蛋白的 HbA1c)。检样无需变性处理,但是可以根据需要实施稀释溶血处理、离心处理等前处理。接着使吸附于胶乳颗粒上的 HbA1c 与抗 HbA1c 抗体接触。通过抗 HbA1c 抗体介由 HbA1c 而使胶乳颗粒结合、凝集,因此反应液的浊度增加。通过肉眼确认反应液的浊度,可以检测 HbA1c 的存在(定性地检测)。或者通过自动分析仪等光学测定浊度,也可以定量 HbA1c 量。后者的情况下,可以预先准备 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,绘制浊度测定值与 HbA1c 浓度的关系制成标准曲线。通过将检样的测定值适用于该标准曲线,可以求出检样中的 HbA1c 量。

[0025] 不过吸附于胶乳颗粒上的 HbA1c 也可以与胶乳颗粒一起用作免疫测定的样品,因此也可以通过凝集法以外的免疫测定法来测定胶乳颗粒上的 HbA1c。免疫测定的方法自身在该领域中周知,若基于反应形式分类则有三明治法、竞争法、凝集法、免疫层析法、蛋白印迹法等,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,它们都包含于本发明中所称的“免疫测定”。

[0026] 例如通过三明治法测定 HbA1c 的情况下,可以预先将抗 Hb 抗体(与包含 HbA1c 的全部血红蛋白结合)固定化于固相,使得本发明的免疫测定试剂与检样接触了的反应液与固相化抗体反应,洗涤后,与标记了的抗 HbA1c 抗体反应,洗涤后,基于源自标记的信号测定与固相结合标记的抗体。也可以使用抗 HbA1c 抗体作为固相化抗体、使用抗 Hb 抗体作为标记抗体。测定 HbA1c 浓度已知的标准试样,绘制信号强度与 HbA1c 浓度的关系制成标准曲线,若将检样的测定值适用于该标准曲线,则可以将检样中的 HbA1c 量定量。

[0027] 作为三明治法的一例,例如在用侧向流动方式的免疫层析测定 HbA1c 的情况下,免疫层析仪器可以使用以下构成的仪器。

[0028] 由硝基纤维素膜等多孔性原材料形成的基质通常形成为带状。在该基质上设置固相化了抗 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的上游侧)设置点样标记了的抗 Hb 单克隆抗体的标记试剂区。标记试剂区通常通过点样了标记抗体的多孔性的垫(pad)构成。在基质的上游端设置储藏展开液的展开液槽。使用酶作为标记的

情况下,可以将点样了标记酶的底物的底物区设置于标记试剂区的上游。

[0029] 测定时,可以将 HbA1c 吸附于胶乳颗粒表面之后的反应液与颗粒一起添加到标记试剂区。添加后若弄破展开液槽则展开液利用基质的毛细管现象而向下游流动。展开液依次通过底物区和标记试剂区,底物、标记抗体和吸附了血红蛋白的胶乳颗粒与展开液一起流到下游。此时胶乳颗粒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。若该免疫复合体到达检测区则通过胶乳颗粒表面的血红蛋白中的 HbA1c,标记抗体被检测区的抗 HbA1c 抗体捕获。由于底物也同时流过,因此捕获了标记抗体的检测区显色。可以通过肉眼判定该显色。基于显色的有无能够进行 HbA1c 的定性检测,除此之外基于检测区的显色的强度也能够进行大致定量。

[0030] 需要说明的是,免疫层析仪器中,也可以使固相化于检测区的抗体为抗 Hb 抗体、使点样于标记试剂带的标记抗体为抗 HbA1c 抗体。另外,也可以将标记物质的抗体点样于上述检测区的邻接处、设置对照区,从而可以确认是否适当产生标记抗体的展开。

[0031] 抗 HbA1c 抗体是公知的,使用了抗 HbA1c 抗体的 HbA1c 免疫测定试剂盒也有各种市售品。本发明中,可以使用这种公知的抗 HbA1c 抗体。另外,抗体的制作方法也是周知的常规方法,因此可以与没有糖化的通常的血红蛋白进行区别而制作能够特异性识别 HbA1c 的抗体来使用。如上所述,HbA1c 特异性部位为 β 链 N 末端区域,因此若使用该 HbA1c 的 β 链 N 末端区域作为免疫原,将动物(人除外)免疫,在该动物体内诱发针对 HbA1c 的抗体,则可以由该动物的血清得到针对 HbA1c 的多克隆抗体。另外,由所免疫的动物回收脾细胞,通过常规方法的杂交瘤法,可以制备 HbA1c 特异性结合的抗 HbA1c 单克隆抗体。从免疫测定中的再现性等观点考虑,优选使用抗 HbA1c 单克隆抗体。

[0032] 作为上述免疫原使用的 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例如在日本专利第 2677753 号等中详细说明,若为本领域技术人员则可以适当制备。以下对其工艺进行具体说明。

[0033] 作为免疫原使用的 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 氨基与葡萄糖非酶学结合来制备。实施糖化处理的肽的合成可以使用市售的肽合成机通过常规方法实施。所合成的血红蛋白 β 链 N 末端区域可以为数个残基左右。序列编号 1 示出了人血红蛋白 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,室温下搅拌约 10 天,由此可以将 N 末端肽糖化。若肽被糖化则 HPLC 中的保留时间缩短,因此糖化反应的进行可以通过 HPLC 检查。利用 HPLC 的分析条件如以下所述。

色谱柱 :TSKge1、ODS-120A(4.6×250mm、东ソー社制)

仪器 :岛津 HPLC 系统

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

流速 :0.8mL/分钟

时间 :25 分钟

检测器 :吸光度 280nm。

[0034] 所得到的糖化肽(HbA1c 的 β 链 N 末端区域)例如可以在以下的分离条件下进行 HPLC 纯化。

色谱柱 :TSKge1、ODS-120A(21.5×300mm、东ソー社制)

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

流速 :5mL/ 分钟

检测器 :吸光度 280nm。

[0035] 由纯化后的肽通过常规方法脱离在肽化学合成步骤中附加的半胱氨酸保护基团后,在上述分离条件(但是检测的吸光度以 215nm 为宜)下再次进行 HPLC 纯化,所得到的纯化物可以用作免疫原。

[0036] 如上所述制造的 HbA1c 的 β 链 N 末端区域为数个残基的尺寸,因此用作免疫原的情况下,可以与适当的载体蛋白(例如甲状腺球蛋白、麻仁球蛋白等)结合,与适当的佐剂(例如完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂等)混合而免疫于动物(人除外)。由此如上所述可以在该动物体内诱发针对免疫原的抗体,可以由该动物回收脾细胞,通过杂交瘤法制备单克隆抗体。

[0037] 具有相对于 HbA1c 的优选特异性的抗 HbA1c 抗体的筛选可以如下实施:准备固相化了通常的血红蛋白的板和固相化了 HbA1c 的板,确认所得到的多列抗体对两者的反应性,由此实施上述筛选。对通常的血红蛋白的结合性为背景程度以下、并且对 HbA1c 的反应性高的抗体可以优选用作 HbA1c 特异性抗体。

[0038] 以上作为测定对象物,以 HbA1c 作为例子说明了本发明的免疫测定试剂的使用方法,但是只要是能够使用未致敏胶乳颗粒进行免疫测定的物质,则本发明的免疫测定试剂可以用于任意物质的测定。

实施例

[0039] 以下基于实施例对本发明进行更具体的说明。但是本发明不被下述实施例限定。

[0040] <研究 1>

将公知的 HbA1c 免疫测定试剂盒中含有的未致敏胶乳试剂(以下 R1 试剂)和抗 HbA1c 抗体液(以下 R2 试剂)分别约 5mL 分注到 10mL 管。将管在 -20°C 的冷库保存一夜,使得 R1 试剂和 R2 试剂冷冻。将它们在室温下放置、解冻,肉眼确认试剂的状态。

[0041] 对于 R1 试剂而言,胶乳产生白色的凝集沉淀,沉淀后的液体变为透明。作为免疫测定试剂,明显是不能使用的状态。另一方面,R2 试剂没有外观上的变化。因此,将冷冻·解冻 0 次的 R2 试剂和冷冻·解冻 1 次的 R2 试剂与冷冻·解冻 0 次的 R1 试剂一起安装于日立 7170 自动分析仪,测定 HbA1c 标准品描绘标准曲线,结果标准曲线一致。由此确认抗体液即使经过冷冻解冻,也不会对测定性能造成影响。因此,对于胶乳试剂,进行保护不会形成冷冻所导致的劣化的研究。

[0042] <研究 2>

向 R1 试剂在 3w/v% ~ 10w/v% 的范围每 1% 加入甜菜碱(三甲基甘氨酸),调查冷冻·解冻的影响。将加入有各浓度甜菜碱的 R1 试剂 3 等分,一根在 4°C 下保存。另两根与研究 1 同样地保存于 -20°C 的冷库一夜,次日通过室温放置进行解冻。没有胶乳凝集沉淀的情况,但是在管的底部,白色的胶乳浓度升高,因此轻轻颠倒混合。两根中一根在 4°C 下保存,剩余的一根在 -20°C 下保存一夜。次日室温下解冻,轻轻颠倒混合。

[0043] 将冷冻·解冻 0 次、1 次、2 次的 R1 试剂并排安装于日立 7170 自动分析仪,对于 HbA1c 标准品在副波长 800nm/ 主波长 660nm 下进行测定,描绘标准曲线。各标准品的两点

终点法 (2 point end) 的信号如表 1 所示。

[0044] [表 1]

甜菜碱浓度	冷冻·解冻 次数	信号(两点终点法)				
		STD 0	STD L	STD M1	STD M2	STD H
3w/v%	0次	-9	135	546	1357	2290
	1次	21	377	1148	2316	3304
	2次	23	409	1214	2325	3223
4w/v%	0次	-10	131	511	1246	2096
	1次	9	182	633	1474	2458
	2次	12	197	677	1548	2553
5w/v%	0次	-10	123	478	1161	1959
	1次	-4	126	467	1140	1957
	2次	2	140	511	1218	2046
6w/v%	0次	-7	119	459	1115	1865
	1次	-10	118	450	1080	1840
	2次	-5	124	463	1101	1872
7w/v%	0次	-11	115	436	1030	1734
	1次	-6	114	433	1026	1735
	2次	-6	108	407	980	1687
8w/v%	0次	-7	110	404	953	1608
	1次	-10	108	401	950	1611
	2次	-6	105	387	929	1577
9w/v%	0次	-9	103	381	885	1487
	1次	-8	105	380	901	1496
	2次	-9	98	361	851	1454
10w/v%	0次	-8	97	356	825	1381
	1次	-11	98	356	825	1391
	2次	-8	93	339	796	1358

[0045] 确认到甜菜碱浓度为 6w/v% 左右时,即使重复冷冻解冻、信号的数值也稳定。若甜菜碱浓度降低则存在由于冷冻解冻的重复而信号升高的倾向,另外若甜菜碱浓度升高则观察到由于冷冻解冻的重复而信号降低的倾向。

[0046] <研究 3>

通过研究 2 的结果,认为加入到 R1 试剂的甜菜碱的浓度为 6w/v% 左右是合适的。因此,制备添加有甜菜碱 6w/v% 或 7w/v% 的 R1 试剂,分割为各 7 根,1 根在 4℃ 下保存。剩余 6 根在 -20℃ 下保存一夜,次日取出全部根数,在室温下解冻,轻轻颠倒混合,将 1 根转移到 4℃,剩下的在 -20℃ 下保存一夜。重复此操作,准备冷冻·解冻次数为 0 次~6 次的 R1 试剂。将这些 R1 试剂和 R2 试剂安装于日立 7170 自动分析仪,描绘标准曲线。

[0047] 图 1 表示在胶乳试剂 R1 加入 6w/v% 甜菜碱时直至冷冻·解冻次数 6 次为止的标准曲线的信号的变化。直至冷冻·解冻 3 次为止,没有观察到特别大的变化,但是冷冻·解冻第 4 次以后观察到信号的降低。7w/v% 甜菜碱的情况也为同样的结果。

[0048] 图 2 重叠示出添加有 6w/v% 甜菜碱的 R1 试剂的直至冷冻·解冻 3 次为止的标准

曲线。由于信号几乎没有变化,判明即使胶乳试剂万一冷冻,只要解冻来使用,则与没有经过冷冻·解冻的 R1 试剂同样地进行反应。即,满足严格要求的试剂的稳定性。添加有 7w/v% 甜菜碱的 R1 试剂也得到同样的结果。

[0049] < 研究 4 >

在公知的 HbA1c 免疫测定试剂盒中含有的未致敏胶乳试剂同等品 (R1 试剂) 中以达到 5% ~ 25% 的方式添加甜菜碱。由于胶乳浓度因添加甜菜碱而降低,因此加入胶乳原液进行调整。将该添加有甜菜碱的未致敏胶乳试剂的一部分在 -20℃ 下放置 2 夜后,室温下放置解冻。该解冻后,将颠倒混合的 R1 试剂和冷藏保存的 R1 试剂并排安装于日立 7170 自动分析仪,描绘标准曲线。需要说明的是,抗 HbA1c 抗体液 (R2 试剂) 使用敏化剂的量稍微增加的抗体液。

[0050] 表 2 示出副波长 800nm/ 主波长 660nm 下的各标准品的两点终点法的信号。没有观察到 R1 试剂的冷冻的有无时的差异。另外,描绘标准曲线进行对照的测定,结果测定值也恒定。

[0051] [表 2]

添加甜菜碱	5%		10%		15%		20%		25%	
	无	有	无	有	无	有	无	有	无	有
STD (A1c%)										
0	-8	-13	-12	-14	-14	-16	-16	-18	-19	-21
4.2	214	219	176	178	142	143	116	117	87	84
6.9	801	807	624	618	480	488	369	375	274	268
9.7	1941	1961	1446	1451	1081	1085	813	807	583	568
13.3	3385	3417	2521	2524	1869	1878	1380	1396	985	966
测定值										
CTL Low	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
CTL High	10.0	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.2	10.1	10.3

[0052] 表 3 制备 R1 试剂的胶乳浓度增量 50% 的样品来使用,除此之外与表 2 的研究同样地进行。通过提高胶乳浓度,标准品的两点终点法的信号大幅升高,也没有观察到由于冷冻的有无所导致的差异。添加 5% 甜菜碱时,由于超过了所设定的 ABS,因而没有绘制标准曲线,但是绘制标准曲线时,对照的测定值也是恒定的。

[0053] [表 3]

添加甜菜碱	5%		10%		15%		20%		25%	
	无	有	无	有	无	有	无	有	无	有
STD (A1c%)										
0	-31	-29	-33	-38	-33	-37	-38	-42	-45	-47
4.2	459	464	369	369	302	299	238	231	183	178
6.9	2004	2030	1454	1454	1084	1079	799	778	573	565
9.7	5406	5431	3822	3785	2676	2654	1850	1802	1257	1248
13.3	7918	8047	6101	6197	4485	4462	3162	3092	2138	2093
测定值										
CTL Low			6.0	6.0	6.0	5.9	6.0	6.0	5.9	6.0
CTL High			10.0	10.1	10.1	10.0	10.1	10.1	10.1	10.1

[0054] < 比较例 >

制备在胶乳试剂 R1 添加 0.1v/v% 作为表面活性剂的 Tween 20 来替代甜菜碱的样品。将加入有表面活性剂的 R1 试剂采集于管, 将其在 -20℃ 下保存一夜, 次日室温下解冻。若肉眼观察则没有发现胶乳的凝集沉淀。因此, 使用加入有表面活性剂的 R1 试剂利用日立 7170 描绘标准曲线。其结果与研究 3 的结果汇总示于图 2。由于完全没有反应性, 因此可知由于表面活性剂而阻碍 HbA1c 在胶乳表面的物理吸附。

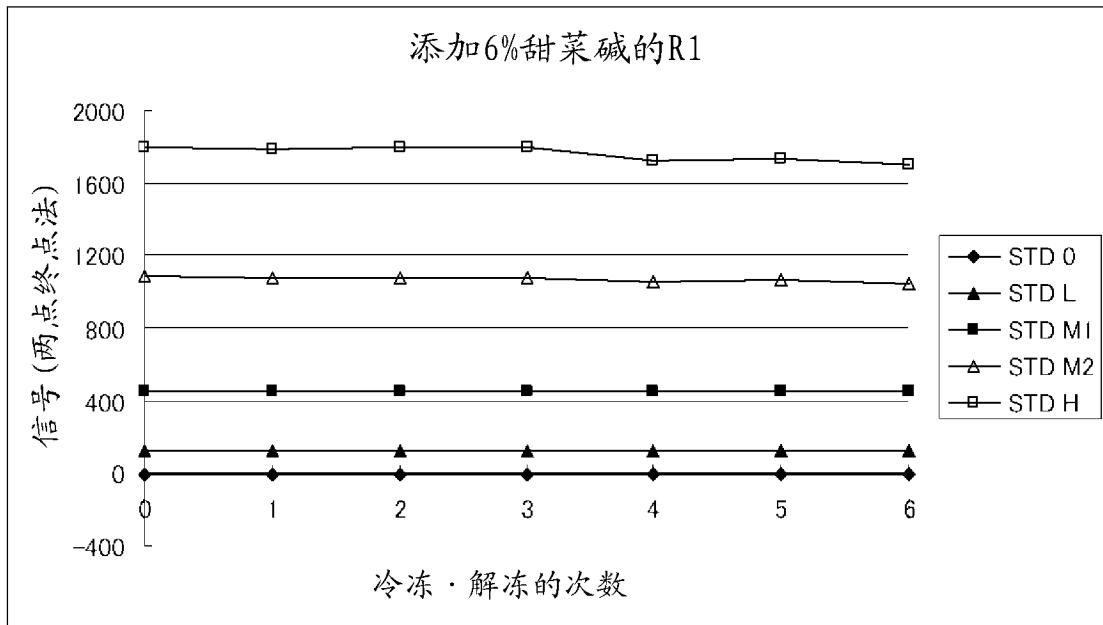


图 1

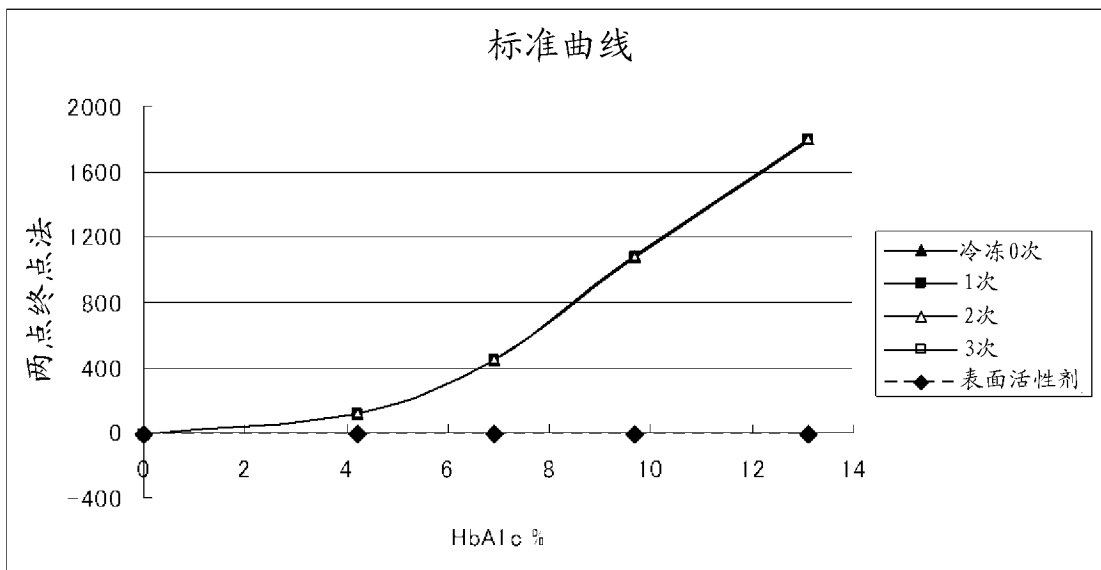


图 2

专利名称(译)	未致敏胶乳试剂的劣化防止方法		
公开(公告)号	CN105122062A	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201480011899.5	申请日	2014-02-18
[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	G01N33/531 G01N33/545 G01N33/72		
CPC分类号	G01N33/72 G01N33/531 G01N33/723 G01N33/5306		
代理人(译)	庞立志 刘力		
优先权	2013040337 2013-03-01 JP		
其他公开文献	CN105122062B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了良好地维持免疫测定试剂盒中的胶乳试剂的分散状态，防止由于温度变化所导致的凝集沉淀的产生而保护试剂不会形成测定性能的劣化的，即使对于少量分注胶乳试剂的方式的免疫凝集测定试剂盒也可以适用的新型手段。本发明的免疫测定试剂，其在溶剂中含有未致敏的胶乳颗粒和三甲基甘氨酸。试剂中的三甲基甘氨酸浓度优选为5~10w/v%。该试剂例如可以优选用作血红蛋白A1c的免疫测定试剂。

