



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109477832 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780046303.9

(22)申请日 2017.09.05

(30)优先权数据

2016-173835 2016.09.06 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/031869 2017.09.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/047792 JA 2018.03.15

(71)申请人 富士瑞必欧株式会社

地址 日本国东京都新宿区西新宿二丁目1  
番1号

(72)发明人 山本纮辅 北村由之 八木慎太郎

青柳克己

(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理  
有限公司 11444

代理人 龚敏 王刚

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

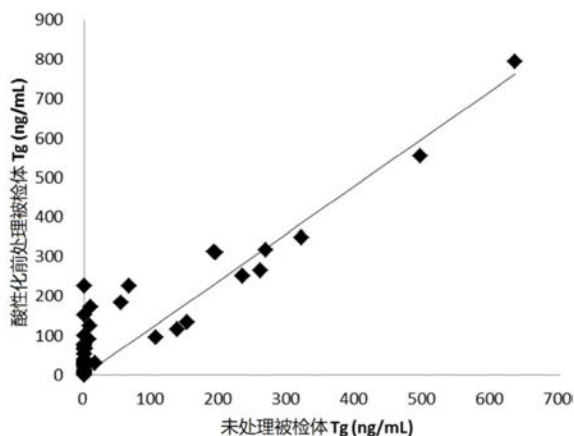
权利要求书1页 说明书14页 附图4页

(54)发明名称

甲状腺球蛋白的测定方法及测定试剂

(57)摘要

本发明公开一种甲状腺球蛋白的测定方法及测定试剂,其不受抗甲状腺球蛋白抗体的干扰的影响,可通过单独检查更准确地测定甲状腺球蛋白量。甲状腺球蛋白的测定方法包含前处理工序,所述前处理工序将从生物体中分离的试样和含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液进行混合,通过免疫分析测定从生物体中分离的试样中的甲状腺球蛋白。甲状腺球蛋白的免疫分析用试剂具备含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液。



1. 一种通过免疫分析测定从生物体中分离的试样中的甲状腺球蛋白的方法,其包含前处理工序,所述前处理工序将从生物体中分离的试样和含有表面活性剂及酸性化剂中的一种或两者的前处理液进行混合。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,  
所述前处理液含有酸性化剂,前处理工序中的酸性化剂的终浓度超过0.05N且为0.5N以下。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,  
所述前处理液含有表面活性剂,该表面活性剂为阴离子型表面活性剂。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,  
所述前处理工序在加热条件下进行。

5. 一种甲状腺球蛋白的免疫分析用试剂,其具备含有表面活性剂及酸性化剂中的一种或两者的前处理液。

## 甲状腺球蛋白的测定方法及测定试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种甲状腺球蛋白的测定方法及测定试剂。

### 背景技术

[0002] 甲状腺球蛋白(Tg)为仅由甲状腺滤泡细胞制造的分子量66万的糖蛋白。生物合成的Tg被释放至滤泡腔。在该过程中,通过过氧化物酶的作用而碘分子与Tg分子中的酪氨酸基结合,进行甲状腺激素的合成。滤泡腔的Tg再次被摄入滤泡细胞,在滤泡细胞内被分解,引起甲状腺激素的释放。另外,该过程通过促甲状腺激素(TSH)的作用而被活化。因此,在正常时,Tg本身向血液中的释放仅极少发生,Tg的血中释放表示甲状腺的某些异常。因此,Tg的脏器特异性高,在甲状腺疾病中为非常有用的标记物。特别是,血中Tg被作为了解甲状腺分化癌的手术评价、及有无术后复发或转移的标记物使用。此外,在突眼性甲状腺肿的治疗效果、缓解指标、先天性甲状腺功能减退症的类型的确定或鉴别、治疗监测等中也是有用的。另外,也暗示通过与影像诊断组合进行结节性甲状腺瘤的术前诊断、或鉴别良性甲状腺疾病与恶性肿瘤的可能性。

[0003] 但是,被检者为抗甲状腺球蛋白抗体(TgAb)阳性的情况下,即使实际上为高Tg值,也存在由于测定上的问题而显示低值的情况。例如,在甲状腺癌中,患者的20~30%为TgAb阳性,因此有必要在Tg测定时同时测定TgAb。另外,在TgAb阳性的桥本病中,难以准确地测定Tg的量,同样地,在观察到TgAb阳性的其它自体免疫性疾病(突眼性甲状腺肿)中,也有可能不能准确地测定Tg的量。

现有技术文献

非专利文献

[0004] 非专利文献1:Spencer CA,Takeuchi M and Kazarosyan M:Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays.,Clin Chem,42,164—173(1996)

### 发明内容

发明所要解决的技术问题

[0005] 如果对于如上所述的TgAb阳性的患者也能准确地测量Tg的量,则有可能可以广泛利用于甲状腺疾病的治疗监测。本发明的目的在于,提供一种甲状腺球蛋白的测定方法及测定试剂,所述测定方法不受抗甲状腺球蛋白抗体的干扰的影响,可通过单独检查更准确地测定甲状腺球蛋白量。

用于解决问题的技术方案

[0006] 本发明人等为了实现上述目的而进行了深入研究,结果发现,在测定生物体试样中的甲状腺球蛋白时,通过在将所述生物体试样供于免疫反应之前设置前处理工序,从而不受抗甲状腺球蛋白抗体的影响,可得到更准确的甲状腺球蛋白测定值,从而完成了本发明,其中,所述前处理工序将含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液进行混合。

[0007] 本发明的构成如下所述。

(1) 一种通过免疫分析测定从生物体中分离的试样中的甲状腺球蛋白的方法,其包含前处理工序,所述前处理工序将从生物体中分离的试样和含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液进行混合。

(2) 根据(1)所述的方法,其中,所述前处理液含有酸性化剂,前处理工序中的酸性化剂的终浓度超过0.05N且为0.5N以下。

(3) 根据(1)所述的方法,其中,所述前处理液含有表面活性剂,该表面活性剂为阴离子型表面活性剂。

(4) 根据(3)所述的方法,其中,所述前处理工序在加热条件下进行。

(5) 一种甲状腺球蛋白的免疫分析用试剂,其具备含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液。

发明效果

[0008] 根据本发明,可以提供一种Tg的测定方法及测定试剂,其即使在含有抗甲状腺球蛋白抗体(TgAb)的生物体试样中,也使甲状腺球蛋白(Tg)从TgAb游离并降低相互作用的影响,从而可更准确地测定试样中所含的Tg量。

## 附图说明

[0009] 图1是比较了酸性化前处理样品和未处理样品的Tg测定结果的图。

图2是比较了酸性化前处理样品和未处理样品的Tg测定结果的图。

图3是对于在酸性化前处理样品和未处理样品中可看到Tg测定结果背离的血清被检体,将进行了酸性化的样品和未处理的样品供于凝胶过滤柱的色谱图。

图4是对于在酸性化前处理样品和未处理样品中在Tg测定结果上没有看到差异的血清被检体,将进行了酸性化的样品和未处理的样品供于凝胶过滤柱的色谱图。

图5是表示酸性化前处理液的酸浓度与被检体的Tg测定值的相关性的图。

图6是比较了SDS前处理样品和未处理样品的Tg测定结果的图。

图7是比较了SDS前处理样品和未处理样品的Tg测定结果的图。

## 具体实施方式

[0010] 本说明书中所记载的“%”的浓度只要没有特殊说明则表示重量/体积(w/v)的浓度。

[0011] <甲状腺球蛋白的测定方法>

本发明中所测定的甲状腺球蛋白(Tg)为源自任意的动物的Tg,优选为源自哺乳动物(例如人、猴子、黑猩猩等灵长类;小鼠、大鼠、兔等啮齿类;狗、猫等宠物;猪、牛等家畜;马、绵羊等驯化动物)的Tg,更优选为源自灵长类的Tg,特别优选为源自人的Tg。

[0012] 1. 前处理工序

本发明的方法为通过使生物体试样和抗体反应、即免疫反应而测定存在于生物体试样中的Tg的方法,其特征在于,包含在免疫反应(反应工序)之前将生物体试样和前处理液进行混合的前处理工序。通过前处理工序,可以形成使Tg从自身抗体(TgAb)等游离的状态。前处理液可以含有表面活性剂及酸性化剂中的任一者,也可以含有两者。优选前处理液含有

表面活性剂或酸性化剂中的任一者。

[0013] 在所述前处理工序中进行混合的生物体试样和前处理液的体积比优选设为1:10~10:1,特别优选设为1:5~5:1,进一步优选设为1:3~3:1。本发明中所使用的生物体试样只要是可能含有Tg的试样,就没有特别限定,可举出例如:血清、血浆、全血、尿、便、口腔粘膜、咽粘膜、肠道粘膜及活检试样(例如甲状腺细针抽吸细胞学检查(Fine needle aspiration:FNA)试样、肠道试样、肝脏试样)。优选生物体试样为血清或血浆。

[0014] 作为所述前处理液中所含的表面活性剂,阴离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂、两性表面活性剂、非离子型表面活性剂中的任一者均可使用,特别优选阴离子型表面活性剂。作为阴离子型表面活性剂,可以优选使用十二烷基硫酸钠(SDS)、N-月桂酰肌氨酸、十二烷基硫酸锂、十二烷基苯磺酸钠、脱氧胆酸等,特别可以优选使用SDS。表面活性剂的浓度需要为足以使Tg从TgAb等游离的浓度。使用SDS的情况下,作为与生物体试样混合而成的混合液的前处理时的浓度,优选设为0.1~12.5%,特别优选设为0.25~10%,进一步优选设为0.5~7.5%。通过将SDS的浓度设为0.1~10%而发挥使Tg充分地游离、同时不易产生SDS的析出等效果。

[0015] 将前处理液中所含的主要的表面活性剂设为阴离子型表面活性剂的情况下,在前处理后,为了减轻带于反应体系的阴离子表面活性剂的影响,可以添加含有阳离子型表面活性剂、两性表面活性剂、非离子型表面活性剂中的一种或多种的中和液。

[0016] 作为所述前处理液中所含的酸性化剂,可以优选使用盐酸、硫酸、醋酸等。使用酸性化剂的情况下,前处理液的酸的当量度以前处理时的浓度计优选设为超过0.05N且0.5N以下、特别为0.1N以上且0.4N以下。通过将酸的当量度设为超过0.05N且0.5N以下,充分地得到前处理的效果,且可以将对后段的反应工序的影响最小化。

[0017] 在前处理中使用酸性化剂的情况下,优选以在与生物体试样的混合时不产生沉淀的方式添加阳离子型表面活性剂。作为阳离子型表面活性剂,特别优选在同一分子中具有碳原子数10个以上的一条链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表面活性剂。作为这种表面活性剂的实例,可举出:癸基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十四烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基氯化铵(C16TAC)、癸基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氯化十二烷基吡啶鎓、氯化十四烷基吡啶鎓、氯化十六烷基吡啶鎓等。阳离子表面活性剂的添加量以与被检体的混合时的浓度计优选为0.1%以上且15%以下,进一步优选0.5%~10%。

[0018] 在含有酸性化剂的前处理液中,除上述阳离子型表面活性剂之外,可以进一步含有非离子型表面活性剂等其它表面活性剂。通过其它表面活性剂的添加,可以进一步以高灵敏度检测Tg。

[0019] 在前处理液中,可以进一步使用还原剂。作为还原剂,2-(二乙基氨基)乙硫醇盐酸盐(DEAET)、三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)、二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇等现有的还原剂均使用,从溶液中的稳定性的理由出发,特别优选使用DEAET、TCEP。作为还原剂的浓度,以与生物体试样的混合液的终浓度计优选设为0.5~100mM,特别优选设为1.0~50mM,进一步优选设为2.0~20mM。

[0020] 前处理液可以根据需要含有尿素、硫脲等其它蛋白变性剂。变性剂的浓度以处理时浓度计优选0.1M以上,进一步优选0.5M以上且低于4M。另外,在前处理液中,为了增强处

理效果,可以添加单糖类、二糖类、柠檬酸、及柠檬酸盐类的任一种、或将它们组合而添加。进而,在前处理液中,可以含有EDTA等螯合剂。

[0021] 就前处理工序而言,优选在将生物体试样和前处理液进行混合之后,进一步进行加热。特别是在前处理液中使用表面活性剂的情况下,为了提高其效果,优选进行加热。加热温度优选设为35~95℃,特别优选设为50~90℃,进一步优选设为70~85℃。另外,加热时间优选设为1分钟以上,特别优选设为3分钟以上,进一步优选设为5分钟以上。加热时间没有特别的上限,通常为60分钟以下、特别为30分钟以下的加热时间即可。

## [0022] 2. 反应工序

本发明的方法的上述前处理工序中得到的生物体试样混合液接着被供于免疫分析的反应工序。在反应工序中,使生物体试样混合液与缓冲液混合,使混合液中的抗原与针对Tg的抗体反应。需要说明的是,Tg的免疫分析本身的各种方法为公知的,也可以采用能够定量Tg的任一种免疫分析。

[0023] 作为所述缓冲液,可举出例如以MES缓冲液、磷酸缓冲液、Tris缓冲液、碳酸缓冲液为基础的缓冲液,特别可以优选使用以磷酸缓冲液为基础的缓冲液。在使用含有表面活性剂的溶液作为前处理液的情况下,为了吸收未反应的表面活性剂,例如优选使用:含有与与前处理后的混合液混合时的终浓度计为0.01~10.0%、特别为0.05~5.0%左右的BSA、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)葡聚糖硫酸钠等水溶性高分子的缓冲液。

另外,在使用含有酸性化剂的溶液作为前处理液的情况下,优选使用含有碱剂、或可缓和前处理液的酸的影响的具有缓冲能力的缓冲液。前处理工序的混合液和缓冲液的混合以体积比计优选设为1:10~10:1,特别优选设为1:5~5:1,进一步优选设为1:3~3:1。

[0024] 本发明的方法中所使用的针对Tg的抗体为将Tg的氨基酸序列的至少一部分作为表位来识别的抗体。针对Tg的抗体没有特别限定,识别已知的表位的抗体均可以使用,优选针对Tg的抗体为识别Tg特异性表位(特别是人Tg特异性表位)的抗体。

[0025] 针对Tg的抗体可以为多克隆抗体或单克隆抗体中的任一种。针对Tg的抗体也可以为免疫球蛋白(例如IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、IgY)的任一种同种型。针对Tg的抗体另外可以为全长抗体。全长抗体是指:包含分别含有可变区及恒定区的重链及轻链的抗体(例如含有2个Fab部分及Fc部分的抗体)。针对Tg的抗体另外可以为源自这种全长抗体的抗体片段。抗体片段为全长抗体的一部分,可举出例如恒定区缺失抗体(例如F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv)。针对Tg的抗体另外可以为单链抗体等改造抗体。

[0026] 针对Tg的抗体可以使用以往公知的方法而制作。例如,针对Tg的抗体可以将上述的表位用作抗原而制作。另外,市售有识别如上所述的表位的多种针对Tg的抗体,因此,也可以使用这种市售品。

[0027] 针对Tg的抗体可以固相化于固相。本说明书中,有时将固相化于固相的抗体简称为固相化抗体。作为固相,可举出例如可收容或搭载液相的固相(例如板、薄膜、试管等支撑体及孔板、微流路、玻璃毛细管、纳米柱、独石柱等容器)、以及可悬浮或分散于液相中的固相(例如粒子等固相载体)。作为固相的材料,可举出例如玻璃、塑料、金属、及碳。作为固相的材料,另外可以使用非磁性材料、或磁性材料,从操作的简便性等观点出发,优选磁性材料。固相优选为固相载体,更优选为磁性固相载体,进一步更优选为磁性粒子。作为抗体的固相化方法,可以利用以往公知的方法。作为这种方法,可举出例如:物理的吸附法、共价键

法、利用亲和性物质(例如生物素、链霉亲和素)的方法、及离子键法。在特定的实施方式中,针对Tg的抗体为固相化于固相的抗体,优选为固相化于磁性的固相的抗体,更优选为固相化于磁性粒子的抗体。

[0028] 就反应工序而言,可以将前处理工序的混合液和缓冲液混合之后,与进行了固相化的抗体接触,另外,也可以在缓冲液中预先放入例如固相化于粒子的抗体而制成粒子液,将所述混合液和粒子液进行混合。反应工序可以如例如免疫凝集法或竞争法那样仅以一次反应工序来实施,也可以如夹心法那样设置二次反应工序。需要说明的是,设置二次反应工序的情况下,可以在一次反应工序和二次反应工序之间设置用于除去未反应成分的清洗工序。

[0029] 针对Tg的抗体可以用标记物质进行标记化。本说明书中,有时将用标记物质进行了标记化的抗体简称为标记化抗体。作为标记物质,可举出例如:酶(例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、 $\beta$ 半乳糖苷酶)、亲和性物质(例如链霉亲和素、生物素)、荧光物质或蛋白质(例如荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白)、发光或吸光物质(例如荧光素、水母蛋白、吖啶鎓、钆)、放射性物质(例如 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ )。另外,在本发明的方法中设置二次反应的情况下,用于二次反应的抗体也可以用这种标记物质进行标记化。

[0030] 在特定的实施方式中,本发明的方法包含其它抗体作为用于二次反应的抗体,所述其它抗体针对Tg、且识别与针对Tg的抗体不同的表位。这种其它抗体所识别的表位的详细情况与上述的关于针对Tg的抗体而详述的表位同样(其中,并用的情况下,表位的种类不同)。针对Tg的抗体所识别的表位与针对Tg的其它抗体所识别的表位的组合没有特别限定。例如,在利用夹心法的情况下优选应用这种其它抗体。

### [0031] 3. 检测工序

在一抗或二抗使用了标记的情况下,通过适于所使用的标记的方法、例如使用酶标记的情况下添加酶的底物而检测。例如,将碱性磷酸酶(ALP)用作标记抗体的情况下,可以设为将3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷·2钠盐(AMPPD)用作酶底物的化学发光酶免疫分析法(CLEIA)的体系。

[0032] 本发明的方法为使用针对Tg的抗体的免疫分析。作为这种免疫分析,可举出例如直接竞争法、间接竞争法、及夹心法。另外,作为这种免疫分析,可举出:化学发光酶免疫分析法(CLEIA)、化学发光免疫分析(CLIA)、免疫比浊法(TIA)、酶免疫分析法(EIA)(例如直接竞争ELISA、间接竞争ELISA、及夹心ELISA)、放射免疫分析(RIA)、胶乳凝集反应法、荧光免疫分析(FIA)、及免疫色谱法。这些免疫分析本身为公知的,没必要在此详细地叙述,分别简单地进行说明。

[0033] 直接竞争法为如下方法:将针对待测定的靶抗原(本发明中为Tg)的抗体固相化于固相(关于固相及固相化,如上所述),在用于防止非特异吸附的封闭处理(用血清白蛋白等蛋白质溶液处理固相)后,使该抗体和含有所述靶抗原的被检试样(本发明中为如上所述进行了前处理工序的生物体试样)和一定量的标记后的抗原(标记如上所述)反应,清洗后,对与固相结合标记进行定量。由于被检试样中的抗原和标记抗原与抗体竞争地结合,因此,被检试样中的抗原量越多,与固相结合标记的量越少。制作各种已知浓度的抗原标准液,分别固相化于固相而测定标记量(根据标记的性质而测定吸光度、发光强度、荧光强度等,

以下相同),制作以抗原浓度为横轴、以标记量为纵轴的标准曲线。对未知的被检试样,通过测定标记量并将所测定的标记量代入标准曲线,可以测定未知的被检试样中的抗原量。直接竞争法本身在该领域中为公知的,例如记载于US20150166678A1。

[0034] 在间接竞争法中,将靶抗原(本发明中为Tg)固相化于固相(关于固相及固相化,如上所述)。接着,在固相的封闭处理后,将含有靶抗原的被检试样(本发明中为如上所述进行了前处理工序的生物体试样)和一定量的抗靶抗原抗体进行混合,使其与所述固相化抗原反应。清洗后,对与固相结合的有关抗靶抗原抗体进行定量。其可以通过使针对所述抗靶抗原抗体的标记的二抗(标记如上所述)反应、清洗后测定标记量而进行。制作各种已知浓度的抗原标准液,分别固相化于固相而测定标记量,制作标准曲线。对未知的被检试样,通过测定标记量并将所测定的标记量代入标准曲线,可以测定未知的被检试样中的抗原量。需要说明的是,也可以不使用标记二抗,而使用标记的一抗。间接竞争法本身在该领域中为公知的,例如记载于上述的US20150166678A1。

[0035] 夹心法为如下方法:将抗靶抗原抗体固相化于固相(关于固相及固相化,如上所述),在封闭处理后,使含有靶抗原的被检试样(本发明中为如上述那样进行了前处理工序的生物体试样)反应,清洗后,使针对靶抗原的标记的二抗(标记如上所述)反应,清洗后,对与固相结合的标记进行定量。制作各种已知浓度的抗原标准液,分别测定固相化于固相的标记量,制作标准曲线。对未知的被检试样,通过测定标记量并将所测定的标记量代入标准曲线,可以测定未知的被检试样中的抗原量。夹心法本身在该领域中为公知的,例如记载于US20150309016A1。

[0036] 上述的各种免疫分析中,化学发光酶免疫分析法(CLEIA)、化学发光免疫分析(CLIA)、酶免疫分析法(EIA)、放射免疫分析(RIA)、荧光免疫分析(FIA)为基于在进行上述的直接竞争法、间接竞争法、夹心法等时使用的标记种类而进行分类的免疫分析。化学发光酶免疫分析法(CLEIA)为使用酶(例如上述的碱性磷酸酶)作为标记、使用产生化学发光性化合物的底物(例如上述的AMPPD)作为底物的免疫分析。酶免疫分析法(EIA)为使用酶(例如上述的过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶等)作为标记的免疫分析。作为各酶的底物,使用可通过吸光度测定等而定量的化合物。例如,在过氧化物酶的情况下,使用1,2-亚苯基二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)等,在碱性磷酸酶的情况下,使用对硝基苯基磷酸酯(pNPP)等,在 $\beta$ -半乳糖苷酶的情况下,使用MG:4-甲基伞形基半乳糖苷、NG:硝基苯基半乳糖苷等,在荧光素酶的情况下,使用荧光素等。放射免疫分析(RIA)为使用放射性物质作为标记的方法,作为放射性物质,如上所述可举出 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 等放射性元素。荧光免疫分析(FIA)为使用荧光物质或荧光蛋白作为标记的方法,作为荧光物质或荧光蛋白,如上所述可举出荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白等。使用这些标记的免疫分析本身在该领域中为公知的,例如记载于US8039223B或US20150309016A1。

[0037] 免疫比浊法(TIA)为利用了因通过待测定的靶抗原(本发明中,为Tg)和针对该抗原的抗体的抗原抗体反应而生成的抗原抗体复合物而浊度增大的现象的免疫分析。在抗靶抗原抗体溶液中添加各种已知浓度的抗原,分别测定浊度,制作标准曲线。对未知的被检试样,同样地测定浊度,将所测定的浊度代入标准曲线,由此可以测定未知的被检试样中的抗原量。免疫比浊法本身为公知的,例如记载于US20140186238A1。胶乳凝集法与免疫比浊法

类似,为使用表面固定有抗靶抗原抗体的胶乳粒子的悬浮液取代免疫比浊法中的抗体溶液的方法。免疫比浊法及胶乳凝集法本身在该领域中为公知的,例如记载于US820,398B。

[0038] 免疫色谱法为在由滤纸、纤维素薄膜、玻璃纤维、无纺布等多孔性材料形成的基体(也称为基质或条板)上进行上述的夹心法或竞争法的方法。例如,利用夹心法的免疫色谱法的情况下,将固定化有抗靶抗原抗体的检测区域设置于上述基体上,将含有靶抗原的被检试样(本发明中为如上述那样进行了前处理工序的生物体试样)添加于基体,从上游侧使展开液流动而使靶抗原移动至检测区域,将其固定化在检测区域。将固定化的靶抗原用标记的二抗夹在中间,对被固定化在检测区域的标记进行检测,由此检测被检试样中的靶抗原。通过将含有标记二抗的标记区域形成于检测区域的更上游侧,靶抗原和标记二抗的结合体被固定化在检测区域。在标记为酶的情况下,含有酶的底物的底物区域也设置于检测区域的更上游侧。在竞争法的情况下,例如将靶抗原固定化在检测区域,可以使被检试样中的靶抗原和固定化在检测区域的靶抗原竞争。在检测区域的更上游侧设置标记抗体区域,使被检试样中的靶抗原和标记抗体反应,通过在检测区域固定化未反应的标记抗体并对标记进行检测或定量,可以检测或定量被检试样中的靶抗原。免疫色谱法本身在该领域中为公知的,例如记载于US6210898B。

[0039] <Tg的测定试剂>

本发明的Tg的测定试剂为可实现上述的Tg的测定方法的测定试剂。本发明的测定试剂的特征在于,除通常的免疫分析中所使用的构成之外,包含含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液作为构成成分。

[0040] 本发明的试剂在相互隔离的形态或组合物的形态中含有各构成成分。具体而言,各构成成分可以以分别收容于不同的容器(例如管、板)的形态提供,也可以以一部分构成成分为组合物的形态(例如同一溶液中)提供。或者,本发明的试剂可以以器件的形态提供。具体而言,可以以构成成分全部收容于器件中的形态提供。或者,也可以是构成成分的一部分以收容于器件中的形态提供,剩余的部分以不收容于器件中的形态(例如收容于不同的容器的形态)提供。该情况下,没有收容于器件中的构成成分可以在测定靶物质时通过注入于器件中而被使用。

[0041] 在优选的实施方式中,本发明的试剂可以具有与应采用的免疫分析的种类相应的构成。例如,采用夹心法的情况下,本发明的试剂可以含有:作为必须的构成成分的i) 前处理液、ii) 针对Tg的抗体、iii) 缓冲液、以及作为任意的构成成分的iv) 针对Tg的其它抗体、v) 标记物质、vi) 稀释液、及根据需要的vii) 与标记物质反应的底物。ii) 及iii) 的构成成分可以包含在同一溶液中。iv) 的构成成分也可以用v) 标记物质进行标记化。优选针对Tg的抗体可以固相化于磁性粒子。

#### 实施例

[0042] <实施例1酸性化前处理的效果确认试验(ELISA法)>

##### (1) 抗甲状腺球蛋白抗体板的制作

在聚苯乙烯制96孔微孔板(Nunc社制)上,以100 $\mu$ L/孔分注含有5 $\mu$ g/mL的抗Tg小鼠抗体5F9(AbD Serotec社制)的抗体稀释液(0.1M碳酸氢钠、0.1M氯化钠、pH9.6),在4 $^{\circ}$ C下进行一夜孵育。用PBS将微孔板清洗3次,接着,以200 $\mu$ L/孔分注封闭液(含有1.0%BSA、3%蔗糖、0.05%ProClin(注册商标)300的PBS),在室温下进行2小时孵育。除去封闭液之后,将板进

行真空干燥,制成抗Tg抗体板。

[0043] (2) 被检体前处理

对甲状腺相关疾病患者的血清被检体45例,将各50 $\mu$ L与酸性化前处理液(2.5M尿素、0.42M盐酸、0.08M柠檬酸水合物、2.5%麦芽糖、10.0%CTAB、4.9%TritonX-100(商品名))50 $\mu$ L进行混合,在37 $^{\circ}$ C下加热6分钟。接着,加入缓冲液(500mMTris-HCl、200mMNaCl、EDTA3Na、10.0%BSA、50 $\mu$ g/mL小鼠IgG、pH9.2)100 $\mu$ L,作为酸性化前处理样品。

[0044] 对同一被检体,另外将各50 $\mu$ L添加于混合有酸性化前处理液50 $\mu$ L和缓冲液100 $\mu$ L的混合液(中和液)150 $\mu$ L,作为未处理样品。

[0045] 用TgAb阴性血清稀释已知浓度的纯化人Tg(BBI solutions社制),制备0、10、50、200、400ng/mL的标准液。对各标准液,也用与上述同样的方法制备酸性化前处理样品和未处理样品。

[0046] (3) 被检体中的Tg测定

将各酸性化前处理样品和各未处理样品分注于抗Tg抗体板各150 $\mu$ L,在室温下孵育1小时(一次反应)。用清洗液(0.05%Tween20/PBS)清洗5次之后,以100 $\mu$ L/孔分注将生物素化抗Tg抗体5E6(AbD Serotec社制)用二次反应液(24mM磷酸二氢钾、76mM磷酸氢二钾、1.0%BSA、1.0%PVP、0.05%酪蛋白钠、0.05%Tween20、0.05%氯化钠、20mMEDTA2Na、0.1%ProClin300(注册商标)、pH7.0)稀释成2 $\mu$ g/mL的二抗液,在室温下反应1小时(二次反应)。用清洗液清洗5次之后,以100 $\mu$ L/孔分注用二次反应液稀释成10000倍的HRP标记链霉亲和素(Roche社制)液,在室温下反应30分钟。用清洗液清洗5次之后,以100 $\mu$ L/孔分注TMB底物液(Nacalai Tesque社制),在室温下静置于暗处15分钟。以100 $\mu$ L/孔分注1N硫酸使反应停止,测定各孔的450nm/630nm的吸光度。各被检体的Tg测定值基于分别使用酸性化前处理标准液、未处理标准液而制作的标准曲线而算出。与0ng/mL的标准液相比显示低的吸光度的被检体全部设为0ng/mL。

[0047] 另外,使用“LUMIPULSE(注册商标)TgAb”(Fujirebio社制)测定各被检体的TgAb值。

[0048] (4) 结果

将各被检体及标准液的酸性化前处理样品和未处理样品的测定结果示于表1。另外,将酸性化前处理被检体和未处理被检体的测定值的整体的相关性示于图1,将吸光度特别低的区域的相关性示于图2。特别是有以下倾向:TgAb值高的未处理被检体显示低于0ng/mL的吸光度,但通过前处理而吸光度上升。暗示以往不能进行Tg测定的被检体变得能进行测定。

[0049] [表1-1]

		TgAb (IU/mL)	吸光度		测定值 (ng/mL)		处理/ 未处理
			未处理	处理	未处理	处理	
被检体 No.	1	14.8	1.4779	1.1566	267.7	318.0	1.19
	2	11.1	0.9113	0.5524	152.0	134.9	0.89
	3	12.0	0.6820	0.4254	105.2	96.4	0.92
	4	12.4	1.3089	0.9375	233.2	251.6	1.08
	6	1213.1	0.1030	0.8597	0	228.0	-
	7	86.7	1.7345	1.2558	320.0	348.0	1.09
	8	213.4	0.2431	0.2044	15.7	29.4	1.88
	9	262.8	0.2006	0.4107	7.0	91.9	13.13
	10	1651.4	0.0554	0.2281	0	36.6	-
	11	20.4	3.2788	2.7310	635.2	795.1	1.25
	12	23.9	2.5948	1.9382	495.6	554.8	1.12
	13	120.7	1.4408	0.9863	260.1	266.4	1.02
	14	89.1	1.1165	1.1293	193.9	309.7	1.60
	16	165.6	0.0771	0.1996	0	28.0	-
	17	325.1	0.0990	0.2829	0	53.2	-
	18	9853.5	0.0220	0.1438	0	11.1	-
	19	713.2	0.0706	0.2803	0	52.4	-
	20	602.1	0.1115	0.3229	0	65.3	-
	21	1770.8	0.0207	0.0867	0	0	-
	22	1514.5	0.0173	0.1127	0	1.6	-
	23	518.0	0.0521	0.1882	0	24.5	-
	24	3510.8	0.0493	0.2161	0	33.0	-
	25	336.8	0.0539	0.1253	0	5.5	-
	26	392.6	0.0649	0.2165	0	33.1	-
	27	871.8	0.4888	0.8581	65.8	227.5	3.46
	28	318.6	0.8411	0.4918	137.7	116.5	0.85
	29	400.8	0.0541	0.1333	0	7.9	-
	30	8675.7	0.0371	0.2004	0	28.2	-
	31	854.7	0.0613	0.2357	0	38.9	-
	32	325.2	0.0345	0.1705	0	19.2	-
	33	84.3	0.0837	0.1841	0	23.3	-
	34	230.9	0.0587	0.3643	0	77.9	-
	35	265.0	0.1731	0.3243	1.4	65.8	47.38
	36	182.8	0.0989	0.2046	0	29.5	-
	37	597.6	0.0959	0.3199	0	64.4	-
	38	513.3	0.1239	0.4359	0	99.6	-
	39	502.9	0.1642	0.3493	0	73.3	-
	40	442.5	0.0542	0.6125	0	153.1	-
	41	162.1	1.1045	1.1371	191.5	312.1	1.63

[0050] [表1-2]

		TgAb (IU/mL)	吸光度		测定值 (ng/mL)		处理 /
			未处理	处理	未处理	处理	未处理
	42	389.0	0.2067	0.5186	8.2	124.6	15.12
	43	456.9	0.1563	0.3656	0	78.3	—
	44	3854.7	0.1133	0.3264	0	66.4	—
	45	488.9	0.2112	0.6735	9.2	171.6	18.72
	46	198.1	0.4351	0.7113	54.9	183.0	3.34
	47	249.6	0.0858	0.0561	0	0	—
标准液 (ng/mL)	0	—	0.1060	0.0670	—	—	—
	10	—	0.2060	0.1230	—	—	—
	50	—	0.4530	0.2940	—	—	—
	200	—	1.2220	0.8590	—	—	—
	400	—	2.1000	1.4030	—	—	—

[0051] <实施例2酸性化前处理被检体的凝胶过滤试验>

对实施例1中通过前处理而测定值增加的No.6的被检体和通过前处理而在测定值上没有变化的No.13的被检体,制备未处理样品、酸性化前处理样品,进行凝胶过滤色谱。

[0052] 就未处理样品而言,将各被检体100 $\mu$ L与中和液300 $\mu$ L混合而制备。就酸性化前处理样品而言,将各被检体100 $\mu$ L和酸性化前处理液100 $\mu$ L进行混合,在37 $^{\circ}$ C下加热6分钟后,添加缓冲液200 $\mu$ L而制备。用0.45 $\mu$ m孔的过滤器过滤这些样品后,将250 $\mu$ L通入凝胶过滤柱。

[0053] 分离条件

柱:Superose610/30(商品名)

分离缓冲液:PBS,0.08%CHAPS,0.05%Tween20(商品名),1mM EDTA2Na,pH7.4

流速:0.5mL/分钟

回收范围:4mL~24mL(0.5mL/级分)

[0054] 对回收的各级分,不进行再次的前处理,用与实施例1同样的ELISA法进行Tg测定。

[0055] 同时,对蛋白分子量标记物(GE社制、含有甲状腺球蛋白),也在相同条件下供于凝胶过滤,测定UV吸收。

[0056] 将No.6的被检体的各级分的测定结果示于图3,将No.13的被检体的各级分的测定结果示于图4。对No.6的被检体,关于未处理样品,在与Tg相比高分子的区域出现微量的Tg测定值的峰,与此相对,酸性化前处理样品在与Tg相同分子量的区域出现Tg测定值的峰。另一方面,就No.13的被检体而言,未处理样品及酸性化前处理样品均在与Tg相同分子量的区域出现Tg测定值的峰。可以认为,酸性化处理样品因酸的影响而信号降低。这些结果暗示,就通过前处理而测定值增加的No.6的被检体的未处理样品而言,甲状腺球蛋白与TgAb等形成复合体并高分子化,在Tg测定体系中的反应性降低,与此相对,通过酸性化前处理,Tg从复合体游离,在Tg测定体系中的反应性也提高。

[0057] <实施例3酸性化剂的最适浓度>

研究了用于酸性化前处理的酸性化剂的最适浓度。对于TgAb阳性且TgAb对Tg测定值的影响(干扰)比较弱的No.13、No.16的被检体、TgAb阳性且TgAb的干扰比较强的No.19、No.44的被检体、及TgAb阴性的No.25、No.30的被检体的共计6个被检体,将各50 $\mu$ L和除了含有盐酸2N、1N、0.8N、0.6N、0.4N、0.2N、0.1N、0.05N、0.025N、0N以外与实施例1的酸性化前处理液

同样地制备的酸性化前处理液50 $\mu$ L混合,在37 $^{\circ}$ C下加热6分钟。接着,加入与上述盐酸等量的氢氧化钠溶液100 $\mu$ L并进行中和。在中和后的溶液中添加与实施例1同样的二次反应液200 $\mu$ L,作为酸性化前处理样品。对各酸性化前处理样品,供于与实施例1同样的ELISA法,得到450nm/630nm的吸光度数据。

[0058] 将各样品的吸光度数据示于表2及图5。就TgAb阴性的被检体及TgAb的竞争弱的被检体而言,可看到随着前处理液的酸性化剂浓度升高而吸光度降低的倾向。认为其主要原因是,因酸的影响而产生Tg的变性、以及因在中和时产生的盐的影响而抑制抗原抗体反应。但是,关于TgAb的竞争强的2个被检体,在酸性化剂的浓度高的区域中,虽然吸光度变低,但是在酸性化剂浓度为0.1N的条件下,与没有酸性化剂的状态相比吸光度升高。另外,在酸性化剂浓度超过0.05N的条件下,显示与TgAb的影响小的其它被检体同等的吸光度,且在酸性化剂浓度的上升的同时显示与其它被检体同样的吸光度的降低。另一方面,酸性化剂浓度超过0.5N时,吸光度会降低至空白附近,Tg测定整体上变得困难。

[0059] 由以上可知:为了能够与其它被检体同样地测定TgAb的干扰强的被检体,酸性化前处理液的酸性化剂以前处理时浓度计优选设为超过0.05N且0.5N以下,特别优选设为0.1N以上且0.4N以下。

[0060] [表2]

前处理时	TgAb(+)				TgAb(-)	
	自身抗体 (+) 干扰弱		自身抗体 (+) 干扰强		无自身抗体	
HCl 浓度 (N)	No.13	No.16	No.19	No.44	No.25	No.30
1	0.042	0.047	0.028	0.031	0.027	0.030
0.5	0.261	0.319	0.308	0.276	0.280	0.292
0.4	0.425	0.426	0.399	0.349	0.426	0.417
0.3	0.539	0.503	0.488	0.460	0.505	0.530
0.2	0.589	0.573	0.527	0.485	0.603	0.557
0.1	0.729	0.602	0.588	0.565	0.757	0.715
0.05	0.883	0.711	0.245	0.364	0.923	0.907
0.025	1.242	1.083	0.368	0.508	1.371	1.450
0.0125	1.256	1.089	0.366	0.492	1.412	1.418
0	1.274	1.131	0.377	0.519	1.478	1.455

[0061] <实施例4 SDS前处理的效果确认试验(ELISA法)>

对甲状腺相关疾病患者的血清被检体51例,将各50 $\mu$ L与SDS前处理液(347mM SDS、2mM EDTA2Na、10mM Tris-HCl、pH7.2)100 $\mu$ L进行混合,在1000rpm的振荡条件下于80 $^{\circ}$ C加热5分钟。接着,用中和液(1.2%Cl6TAC、4%CHAPS、2.9%Tween20(商品名))稀释4倍,在室温下孵育30分钟后,在15 $^{\circ}$ C、12000rpm的条件下离心分离15分钟,将得到的上清液作为SDS前处理样品。同时,对同一被检体,使用PBS100 $\mu$ L取代前处理液,不进行加热,除此之外,进行与上述SDS前处理同样的处理,将得到的样品作为未处理样品。用TgAb阴性血清稀释已知浓度的纯化人Tg(BBI solutions社制),制备0、6、30、60、300、600、2400、4800ng/mL的标准液。对各标准液,也用与上述同样的方法制备SDS前处理样品和未处理样品。

[0062] 将SDS前处理样品及未处理被检体各100 $\mu$ L与缓冲液(50mM Tris、150mM NaCl、1mM EDTA2Na、6.0%BSA、0.05%ProClin300(注册商标)、pH7.2) 100 $\mu$ L分别混合之后,分注于用与实施例1同样的方法制备的抗Tg抗体板各150 $\mu$ L。在室温下孵育2小时。用清洗液(0.05% Tween20(商品名)/PBS)清洗5次之后,以100 $\mu$ L/孔分注于将生物素化抗Tg抗体5E6(AbD Serotec社制)用二次反应液(24mM磷酸二氢钾、76mM磷酸氢二钾、1.0%BSA、1.0%PVP、0.05%酪蛋白钠、0.05% Tween20(商品名)、0.05%氯化钠、20mM EDTA2Na、0.1% ProClin300(注册商标)、pH7.0)稀释成2 $\mu$ g/mL的二抗液,在室温下反应1小时(二次反应)。用清洗液清洗5次之后,以100 $\mu$ L/孔分注于用二次反应液稀释成10000倍的HRP标记链霉亲和素(Roche社制)液,在室温下反应30分钟。用清洗液清洗5次之后,分注TMB底物液(Nacalai Tesque社制) 100 $\mu$ L/孔,在室温下静置于暗处15分钟。以100 $\mu$ L/孔分注1N硫酸使反应停止,测定各孔的450nm/630nm的吸光度。各被检体的Tg测定值基于分别使用酸性化前处理标准液、未处理标准液而制作的标准曲线算出。与0ng/mL的标准液相比显示低的吸光度的被检体全部设为0ng/mL。

另外,用LUMIPULSE(注册商标) TgAb(Fujirebio社制)测定各被检体的TgAb值。

[0063] 将各被检体及标准液的SDS前处理样品和未处理样品的测定结果示于表3。另外,将酸性化前处理被检体和未处理被检体的测定值的整体的相关性示于图6,将吸光度特别低的区域的相关性示于图7。暗示:特别是TgAb值高的未处理被检体中显示0ng/mL附近的吸光度的被检体多,但通过前处理,这些的吸光度上升,假性低值得以改善。

[0064] [表3-1]

	TgAb (IU/mL)	吸光度		测定值		处理/	
		未处理	前处理	未处理	前处理	未处理	
被检体 No.	51		0.2890	0.1881	200.4	288.3	1.44
	52	11.1	0.1743	0.1076	118.5	154.2	1.30
	53	12.0	0.1117	0.0766	73.8	102.5	1.39
	54	12.4	0.3025	0.1923	210.1	295.3	1.41
	55	14.9	0.0959	0.0569	62.5	69.7	1.11
	56	1213.1	0.0493	0.1440	29.2	214.8	7.35
	57	86.7	0.7445	0.2949	525.8	466.3	0.89
	58	213.4	0.0720	0.0383	45.4	38.7	0.85
	59	262.8	0.0526	0.0529	31.6	63.0	2.00
	60	1651.4	0.0247	0.0331	11.6	30.0	2.58
	61	20.4	1.9906	1.1809	1415.9	1943.0	1.37
	62	23.9	0.8271	0.5108	584.8	826.2	1.41
	63	120.7	0.3743	0.1723	261.4	262.0	1.00
	64	89.1	0.4362	0.2232	305.6	346.8	1.14
	65	49.3	0.8454	0.3472	597.9	553.5	0.93
	66	165.6	0.0322	0.0348	17.0	32.8	1.93
	67	325.1	0.0358	0.0412	19.6	43.5	2.22
	68	9853.5	0.0156	0.0190	5.1	6.5	1.26
	69	713.2	0.0339	0.0465	18.2	52.3	2.87
	70	602.1	0.0784	0.0562	50.0	68.5	1.37
	71	1770.8	0.0174	0.0192	6.4	6.8	1.06
	72	1514.5	0.0177	0.0191	6.6	6.7	1.00
	73	518.0	0.0307	0.0355	15.9	34.0	2.13
	74	3510.8	0.0301	0.0350	15.5	33.2	2.14
	75	336.8	0.0239	0.0239	11.1	14.7	1.32
	76	392.6	0.0242	0.0285	11.3	22.3	1.98
	77	871.8	0.2129	0.1504	146.1	225.5	1.54
	78	318.6	0.3055	0.1171	212.2	170.0	0.80
	79	400.8	0.0334	0.0330	17.9	29.8	1.67
	80	8675.7	0.0301	0.0321	15.5	28.3	1.83
	81	854.7	0.0435	0.0423	25.1	45.3	1.81
	82	325.2	0.0224	0.0321	10.0	28.3	2.83
	83	84.3	0.0327	0.0313	17.4	27.0	1.56
	84	230.9	0.0224	0.0433	10.0	47.0	4.70
	85	265.0	0.0832	0.0556	53.4	67.5	1.26
	86	182.8	0.0568	0.0468	34.6	52.8	1.53
	87	597.6	0.0511	0.0648	30.5	82.8	2.72
	88	513.3	0.0575	0.0622	35.1	78.5	2.24

[0065] [表3-2]

		TgAb (IU/mL)	吸光度		测定值		处理/
			未处理	前处理	未处理	前处理	未处理
	89	502.9	0.0845	0.0569	54.4	69.7	1.28
	90	442.5	0.0477	0.1000	28.1	141.5	5.04
	91	162.1	0.3261	0.1711	226.9	260.0	1.15
	92	389.0	0.0611	0.0649	37.6	83.0	2.20
	93	456.9	0.0838	0.0662	53.9	85.2	1.58
	94	3854.7	0.0527	0.0347	31.6	32.7	1.03
	95	488.9	0.1014	0.1443	66.4	215.3	3.24
	96	198.1	0.2452	0.1325	169.1	195.7	1.16
	97	249.6	0.0257	0.0187	12.4	6.0	0.49
	98	301.8	0.0321	0.0339	16.9	31.3	1.85
	99	1228.9	0.0172	0.0218	6.3	11.2	1.78
	100	356.9	0.0311	0.0172	16.2	3.5	0.22
	101	229.0	0.0513	0.0524	30.6	62.2	2.03
标准液 (ng/mL)	0	—	0.0225	0.0176	—	—	—
	6	—	0.0285	0.0242	—	—	—
	30	—	0.0651	0.0362	—	—	—
	60	—	0.0915	0.0546	—	—	—
	300	—	0.3824	0.2001	—	—	—
	600	—	0.8843	0.4082	—	—	—
	2400	—	2.2429	1.2609	—	—	—
	4800	—	2.8909	1.9778	—	—	—

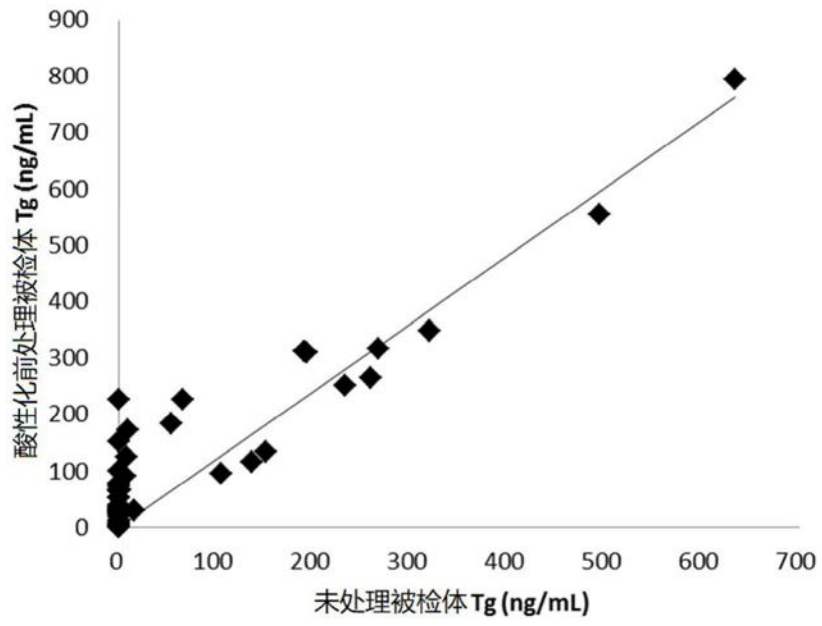


图1

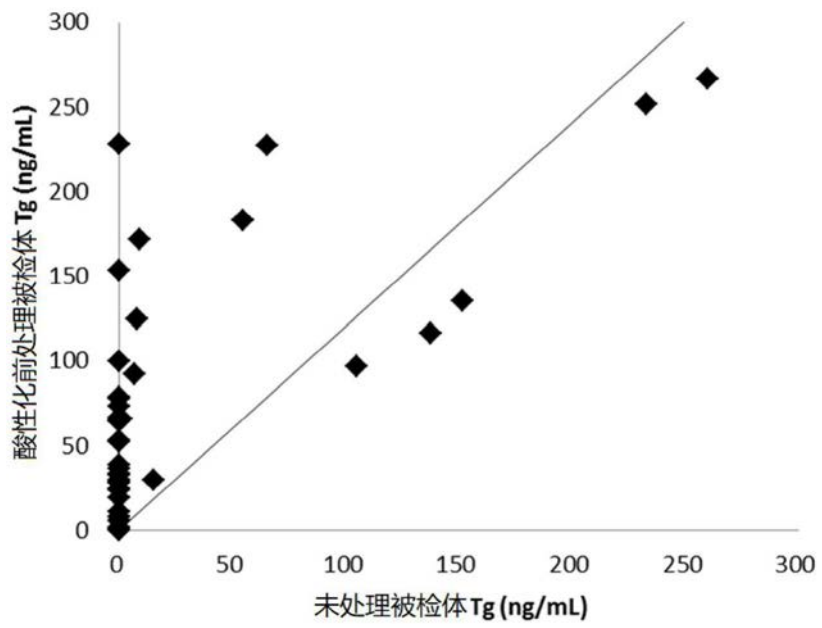


图2

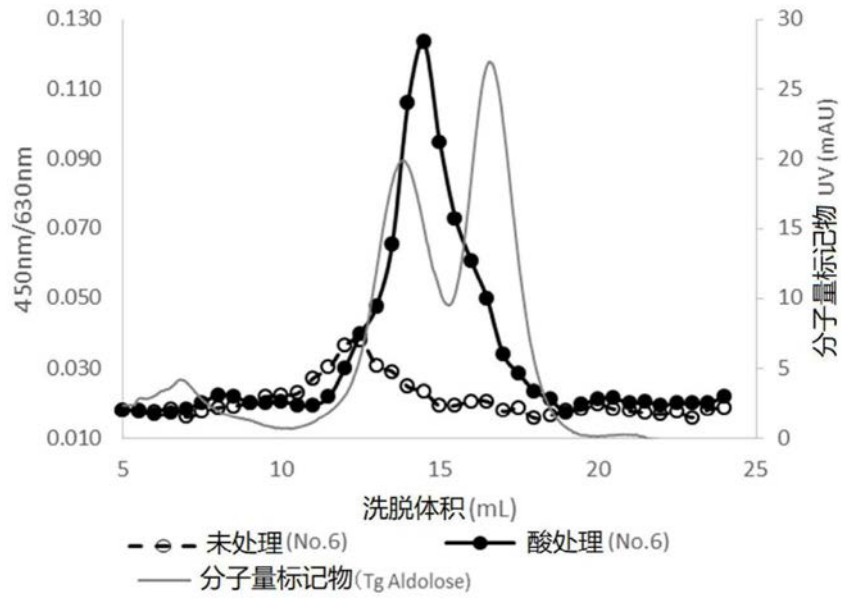


图3

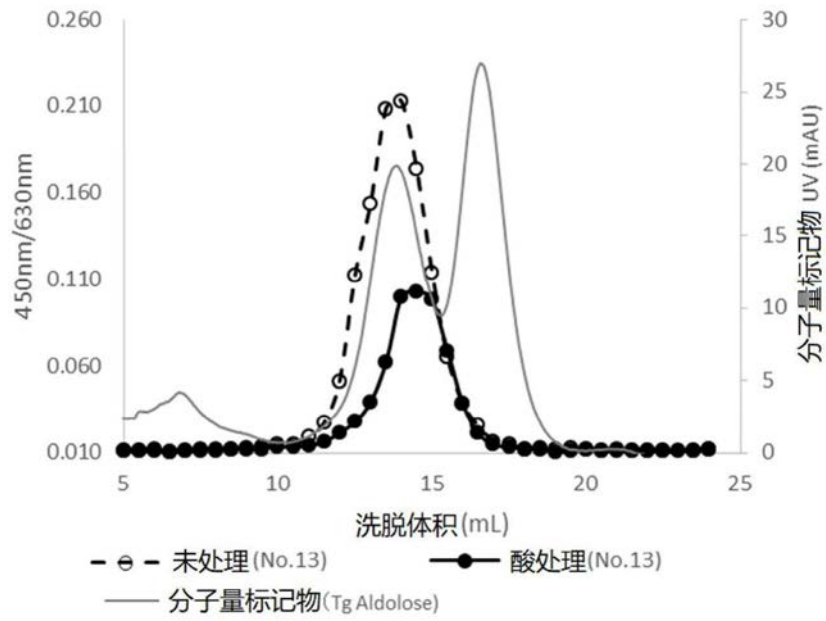


图4

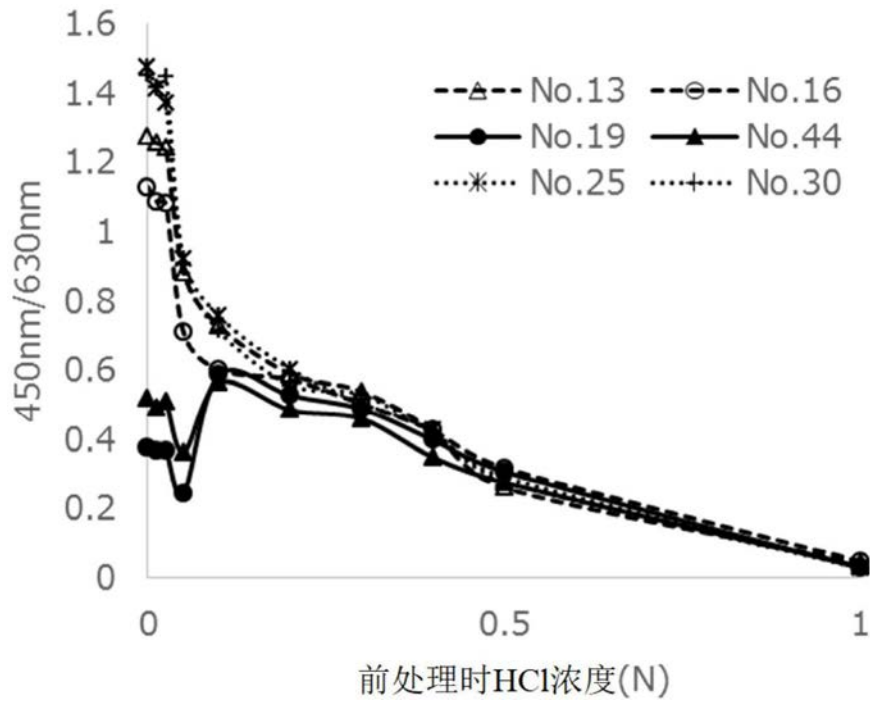


图5

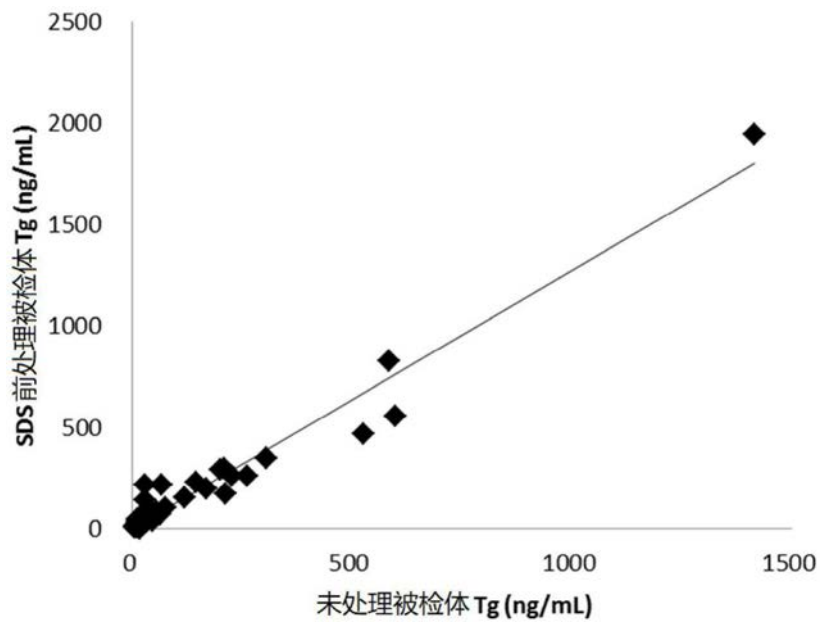


图6

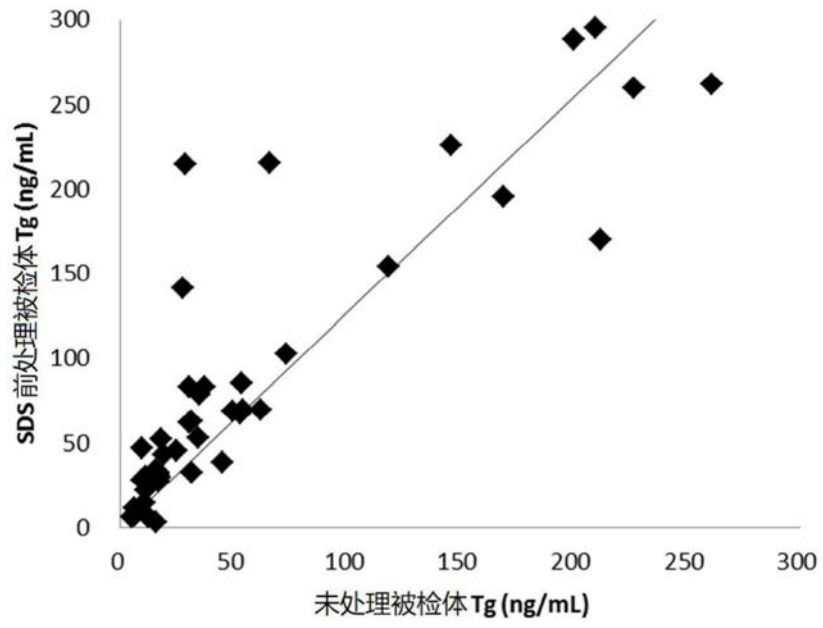


图7

专利名称(译)	甲状腺球蛋白的测定方法及测定试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN109477832A</a>	公开(公告)日	2019-03-15
申请号	CN201780046303.9	申请日	2017-09-05
[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	山本纮辅 北村由之 八木慎太郎 青柳克己		
发明人	山本纮辅 北村由之 八木慎太郎 青柳克己		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/78 G01N33/84 G01N2800/046		
代理人(译)	龚敏 王刚		
优先权	2016173835 2016-09-06 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开一种甲状腺球蛋白的测定方法及测定试剂，其不受抗甲状腺球蛋白抗体的干扰的影响，可通过单独检查更准确地测定甲状腺球蛋白量。甲状腺球蛋白的测定方法包含前处理工序，所述前处理工序将从生物体中分离的试样和含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液进行混合，通过免疫分析测定从生物体中分离的试样中的甲状腺球蛋白。甲状腺球蛋白的免疫分析用试剂具备含有表面活性剂及酸性化剂中的任一种或两者的前处理液。

