



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102203611 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 28

(21) 申请号 200980142407. 5
 (22) 申请日 2009. 07. 16
 (30) 优先权数据
 2008-272270 2008. 10. 22 JP
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2011. 04. 19
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/JP2009/062865 2009. 07. 16
 (87) PCT申请的公布数据
 W02010/047163 JA 2010. 04. 29
 (71) 申请人 爱芙乐赛制药株式会社
 地址 日本大阪府
 (72) 发明人 田中睦
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 卢曼 高旭轶

(51) Int. Cl.
G01N 33/543 (2006. 01)
G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

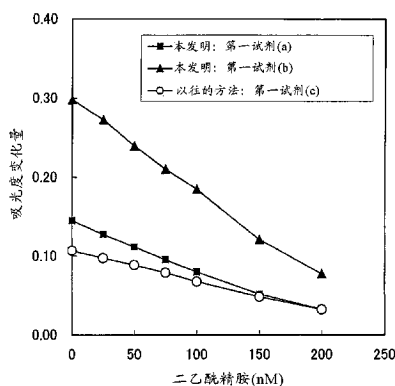
(54) 发明名称

免疫学测定方法和测定用试剂盒

(57) 摘要

本发明的测定样本中的被测定物的方法, 该方法包括:(a) 将包含该被测定物的样本、具有复数个与该被测定物特异地结合的物质复合体、和在不溶性载体上结合有该被测定物或该被测定物的类似物的微小粒子混合的工序; 以及 (b) 在由该工序 (a) 得到的该混合液中, 测定该微小粒子的凝集反应的工序。根据本发明的方法, 例如, 通过不是以单体形式使用抗体, 而是以复数个抗体的复合体形式使用, 从而测定灵敏度提高, 因而可进行低浓度区域内的测定。

二乙酰精胺校正曲线



1. 测定样本中的被测定物的方法,该方法包括:
 - (a) 将包含该被测定物的样本、具有复数个与该被测定物特异地结合的物质复合体、和在不溶性载体上结合有该被测定物或该被测定物的类似物的微小粒子混合的工序;以及
 - (b) 在由该工序(a)得到的该混合液中,测定该微小粒子的凝集反应的工序。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述复合体是结合有复数个抗所述被测定物的抗体的物质。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述被测定物是半抗原,而且所述被测定物的类似物是半抗原结合蛋白。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中,所述被测定物的类似物是,可识别且结合与所述被测定物特异地结合的物质,即是(i)具有该被测定物的位点的物质、(ii)具有该位点的物质的结构类似物,或(iii)结合有复数个具有该位点的物质或该结构类似物的物质。
5. 根据权利要求1~4所述的方法,其中,所述不溶性载体是乳胶或胶体金。
6. 测定用试剂盒,该试剂盒包括:
 - 第一试剂,其包含具有复数个与被测定物特异地结合的物质复合体;和
 - 第二试剂,其包含在不溶性载体上结合有被测定物或该被测定物的类似物的微小粒子。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中,所述复合体是结合有复数个抗所述被测定物的抗体的物质。

免疫学测定方法和测定用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及使用结合有物质的微小粒子的免疫学测定方法。尤其涉及主要在工业、环境和临床检查领域中的、利用了抗原抗体反应的微量成分的免疫学测定方法以及免疫学测定用试剂盒。

背景技术

[0002] 近年来,在临床检查等各种检查中,正谋求自动化和测定时间的缩短。作为这样的检查方法,利用免疫反应的测定方法正在被广泛使用来用于测定生物试料中的物质。作为免疫学测定方法,有放射免疫测定(RIA)法、酶免疫测定(EIA)法、比浊免疫测定法、乳胶凝集法、胶体金凝集法、免疫色谱法等多种方法。其中,乳胶凝集法或胶体金凝集法由于可在无需反应液的分离、洗涤操作的均相体系中测定,所以适于测定的自动化和在短时间内的测定。尤其是胶体金粒子为5nm~100nm的大小,其小于乳胶粒子,因而可用于更微量物质的测定(专利文献1和2)。

[0003] 这些测定方法中的主反应成分是结合了与被测定物特异地反应(例如结合)的物质的乳胶粒子或胶体金粒子等微小粒子。当与结合在微小粒子上的被测定物特异地反应的物质具有复数个与被测定物特异地反应的部位时,通过使与结合在微小粒子上的被测定物特异地反应的物质与被测定物反应,从而使微小粒子发生凝集,由该凝集程度算出被测定物的浓度。

[0004] 但是,当与结合在微小粒子上的被测定物特异地反应的物质与被测定物特异地反应的部位只有一处时,即使该物质与被测定物反应,也只是在其一处发生反应(例如结合),因而不发生微小粒子的凝集。因此,利用竞争法来测定被测定物,所述竞争法即通过使具有复数个与被测定物反应的部位的竞争体(competitor)在测定体系中共存,而使微粒发生凝集,测定依赖于被测定物浓度的凝集程度。

[0005] 或者,示出如下方法:在通过使乳胶粒子或胶体金粒子等微小粒子(该微小粒子结合有复数个被测定物或被测定物的类似物)和物质(该物质是与被测定物特异地结合的物质)反应而发生凝集的反应体系中,通过共存被测定物,从而抑制其凝集反应,通过测定该抑制的程度来测定被测定物的方法(非专利文献1)。在该方法中,当以单体形式使用抗体作为与被测定物特异地结合的物质时,由于被测定物、或者结合有复数个半抗原的乳胶粒子或胶体金粒子与抗体的结合而发生的凝集不充分,有时得不到实用的测定灵敏度。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开2005-283250号公报

[0009] 专利文献2:日本特开2004-325192号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:山田满广,医疗和检查机器及试剂(医療と検査機器・試薬),19卷,4号,523-528页,1996年

发明内容

[0012] 发明要解决的课题

[0013] 本发明的目的在于提供一种测定方法和测定用试剂盒,所述方法为利用使用微小粒子的以往的反应体系的测定方法,即,在通过使乳胶粒子或胶体金粒子(该乳胶粒子或胶体金粒子结合有复数个被测定物或被测定物的类似物)与物质(该物质是与被测定物特异地结合的物质)反应来发生凝集的反应体系中,通过共存被测定物来抑制其凝集反应,并测定该抑制的程度的被测定物的测定方法,其中,使其测定灵敏度提高,而且可在更宽的浓度区域内测定被测定物。

[0014] 解决课题的手段

[0015] 本发明发现在上述测定方法中,不以单体形式使用与被测定物特异地结合的物质、而是使用结合有复数个该特异地结合的事物的复合体,从而显著促进与结合有复数个被测定物或被测定物的类似物的微小粒子的凝集反应,被测定物的测定灵敏度显著上升,从而完成了本发明。即,本发明是基于如下现象的测定方法:使上述复合体、结合有复数个被测定物或被测定物的类似物的微小粒子、和样本中的被测定物在反应液中共存来使凝集反应发生,以依赖于源自样本的被测定物的浓度的方式抑制凝集反应。

[0016] 本发明提供测定样本中的被测定物的方法,该方法包括

[0017] (a) 将含有该被测定物的样本、具有复数个与该被测定物特异地结合的事物的复合体、和在不溶性载体上结合有该被测定物或该被测定物的类似物的微小粒子混合的工序;和

[0018] (b) 在由该工序(a)得到的该混合液中,测定该微小粒子的凝集反应的工序。

[0019] 本发明还提供测定用试剂盒,该试剂盒包括

[0020] 第一试剂,其包含具有复数个与被测定物特异地结合的事物的复合体;和

[0021] 第二试剂,其包含在不溶性载体上结合有该被测定物或该被测定物的类似物的微小粒子。

[0022] 在一个实施方式中,上述复合体是结合有复数个抗上述被测定物的抗体的物质。

[0023] 在另一实施方式中,上述被测定物是半抗原,而且上述被测定物的类似物是半抗原结合蛋白。

[0024] 在又一实施方式中,上述被测定物的类似物是可识别并且结合与上述被测定物特异地结合的事物的物质,其为(i)具有该被测定物的位点的物质、(ii)具有该位点的物质的结构类似物、或(iii)结合有复数个具有该位点的物质或该结构类似物的物质。

[0025] 在再一实施方式中,上述不溶性载体为乳胶或胶体金。

[0026] 发明效果

[0027] 根据本发明,不以单体形式使用与被测定物特异地结合的物质,而是使用结合有复数个该物质的复合体,因而显著促进与结合有复数个被测定物或被测定物的类似物的微小粒子(乳胶粒子、胶体金粒子等)的凝集反应,被测定物的测定灵敏度显著上升。因此,现有技术无法测定的在低浓度区域内的测定成为可能,可在更宽浓度区域内测定被测定物。

[0028] 此外,在以往的方法中,当凝集反应没有进展时向反应液中添加凝集促进剂(例如聚乙二醇、硫酸软骨素),因而有这样的问题:反应液的粘度增加而难于处理,并且影响

重现性。与此相对,在本发明的方法中,即使不添加凝集促进剂,凝集也充分进行,因而处理及重现性良好。

附图说明

[0029] 图 1 为表示在二乙酰精胺测定 1 中,使用第一试剂 (a)、(b) 和 (c) 时的二乙酰精胺浓度与吸光度变化量的关系的图 (实施例 7)。

[0030] 图 2 为表示在二乙酰精胺测定 2 中,使用第一试剂 (d) 和 (e) 时的二乙酰精胺浓度与吸光度变化量的关系的图 (实施例 10)。

具体实施方式

[0031] (样本)

[0032] 在本发明中,作为包含供测定的被测定物的样本,可列举血液、血浆、血清、尿、粪便(悬浊液)、脑脊液、腹水等生物试料;从环境中得到的样品或其提取物等。

[0033] (被测定物)

[0034] 被测定物只要是与该被测定物特异地结合的物质可以存在、或者可制造这样的物质,则没有特别限制。作为被测定物,可列举例如白蛋白、血红蛋白、血红蛋白 A1c、肌红蛋白、转铁蛋白、乳铁蛋白、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C、铁蛋白、 α -胎蛋白、癌胚抗原、CA19-9、前列腺特异抗原、C 反应蛋白(CRP)、纤维素降解产物(FDP)、胃蛋白酶原 I 和 II、胶原等蛋白质;高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白等脂质蛋白;脱氧核糖核酸、核糖核酸等核酸;碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、脂肪酶、淀粉酶等酶;IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 等免疫球蛋白;乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、幽门螺杆菌、抗它们的抗体等与传染病相关的抗原和抗体;精胺、亚精胺、腐胺、二乙酰精胺等多胺、以及生理活性物质;氟哌啶醇、溴哌利多等药物;性激素等激素等。

[0035] (与被测定物特异地结合的物质复合体)

[0036] 作为与被测定物特异地结合的物质(下面有时称为“特异结合物质”),可列举可在利用免疫反应的免疫学测定方法中使用的抗体或抗原。例如,可列举抗体或抗原、受体、凝集素、脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)等具有结合亲和性的物质。从可特异地识别被测定物且易于识别下面详述的与不溶性载体结合的被测定物或其类似物这点考虑,优选多克隆抗体或单克隆抗体。

[0037] 特异结合物质的复合体(下面有时简称为“复合体”)只要是具有复数个特异结合物质的单体的复合体即可。作为复合体,可列举例如单体之间通过接头等化学结合而成的复合体;介由可特异地结合复数个特异结合物质的载体结合而成的复合体;以及,利用化学修饰对特异结合物质附上生物素等标签,介由与该标签特异地结合的物质而形成复合体的复合体。这里,复数个表示多于 1 个,是指根据复合体的结合方式,存在 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个或更多个特异结合物质的单体。

[0038] 特异结合物质的单体之间的结合,是利用被测定物或其一部分中存在的氨基、羧基或硫醇基等官能团,使被测定物或其一部分与载体直接或介由结合剂化学结合的结合,根据被测定物或其一部分的结构,已知有多种结合(生化学实验法 11 酶免疫测定法(エンザイムイムノアツセイ),P. Tijssen 著,石川荣治编,252 页,1989 年,东京化学同人)。作

为用于形成化学结合的试剂,可列举酰化剂、烷化剂等。优选的是,通过活化羧基而得到的N-羟基琥珀酰亚胺酯、在弱碱条件下使用的马来酰亚胺类等。

[0039] 可通过使特异结合物质生物素化,使其与同生物素特异地结合的物质(例如亲和素、链霉亲和素(streptoavidin)、中性链亲和素(neutravidin))结合而形成复合体。

[0040] 作为可特异地结合复数个特异结合物质的载体,可列举例如:与特异结合物质特异地结合的抗体;结合了复数个通过锚钩(anchor)等化学结合有该抗体的物质的物质;该抗体生物素化,使其与亲和素、链霉亲和素、中性链亲和素等特异地结合而成的物质等。

[0041] (被测定物的类似物)

[0042] 被测定物的类似物只要是与特异结合物质特异地结合的物质即可。被测定物的类似物为可识别并且结合与被测定物特异地结合的物质,其为(i)具有该被测定物的位点的物质、(ii)具有该位点的物质的结构类似物、或(iii)结合了复数个具有该位点的物质或该结构类似物的物质。当被测定物为半抗原时,被测定物的类似物例如为半抗原结合蛋白。

[0043] 此外,可在与下面详述的不溶性载体不同的载体上结合复数个被测定物或其类似物。作为这样的载体,可以从各种动物来源的白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺球蛋白、纤维蛋白原、酶等中适当地选择。在本发明中,优选牛血清白蛋白(BSA)。优选每1分子载体,结合有4~40左右的被测定物或其类似物。被测定物或其类似物与这些载体的结合可通过本领域技术人员常用的方法来制造。作为所述方法,与上述特异结合物质的单体之间的结合相同。被测定物的类似物可与不溶性载体结合。

[0044] (微小粒子)

[0045] 在本发明中,用于结合被测定物或其类似物的不溶性载体只要是可用于免疫测定试剂的微小粒子即可。优选乳胶和金属胶体。金属胶体的情况下,从容易利用这点考虑通常优选胶体金。胶体金粒子可使用市售的胶体金粒子,或也可使用本领域技术人员利用常用的方法(例如,用柠檬酸钠还原氯金酸的方法)制得的胶体金粒子。胶体金粒子的粒径通常在10nm~100nm的范围,优选在30nm~60nm的范围。

[0046] 对于本发明的方法中所用的结合有上述特异结合物质的微小粒子(下面有时称为“结合微小粒子”)而言,例如,当使用胶体金粒子作为微小粒子时,可按照如下方法制备:相对于胶体金粒子溶液(540nm处的吸光度为约2.0)1L,通常添加0.1mg~100mg、优选1mg~10mg的被测定物或被测定物的类似物,在冷藏或室温下搅拌5分钟~24小时。接着,用牛血清白蛋白等封闭,进行离心分离,从而可得到目标结合微小粒子(这时为结合胶体金粒子)。使所得结合微小粒子分散在缓冲液中使其成为测定所需的浓度。缓冲液的pH优选为5~9,浓度优选为1~100mM。作为缓冲液,优选使用例如磷酸缓冲液、Tris盐酸缓冲液、琥珀酸缓冲液、或者甘氨酸甘氨酸、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)、HEPES(2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸)、TES(N-三(羟基甲基)甲基-2-氨基乙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)、PIPES(哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸))、Bis-Tris(双(2-羟基乙基)亚氨基三(羟基甲基)甲烷)等良好的缓冲液。

[0047] 根据需要,缓冲液可含有糖和糖醇、叠氮化钠、白蛋白、氯化钠等盐类、防腐剂等添加物。作为糖和糖醇,可列举葡萄糖、甘露糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、山梨糖醇等,其浓度优选为0.01~10w/v%。作为白蛋白,优选牛血清白蛋白(BSA),其浓度优选为0.001~

1w/v%。作为防腐剂,优选叠氮化钠,其浓度优选为 0.01 ~ 0.5w/v%。作为其他的添加物,可列举吐温 20、聚乙二醇月桂基醚、5- 溴水杨酸、水杨酸钠、安息香酸钠、苯磺酸钠、苯酚、百里酚等。

[0048] (被测定物的测定方法)

[0049] 本发明的样本中的被测定物的测定方法包括:

[0050] (a) 将包含该被测定物的样本、具有复数个与该被测定物特异地结合的物质(即特异结合物质)的复合体、以及在不溶性载体上结合有该被测定物或该被测定物的类似物的微小粒子(下面有时称为“结合微小粒子”)混合的工序;和

[0051] (b) 在由该工序(a)得到的该混合液中,测定该微小粒子的凝集反应的工序。

[0052] 在该方法中,当被测定物在包含复合体和结合微小粒子的反应液中共存时,复合体的特异结合物质与结合微小粒子上的被测定物或其类似物的反应(例如结合)所引起的凝集反应,以依赖于样本中所含的被测定物浓度的方式被抑制,因此,机械地测定该抑制的程度。

[0053] 在被测定物与复合体的结合反应、以及结合微小粒子的凝集反应中,反应温度、pH、缓冲液的种类、共存的盐的种类和浓度、其他共存物质等反应条件与以往的免疫学反应相同,可以由本领域技术人员适当确定。例如,正如通常进行的那样,为了促进反应,可向反应体系中添加聚乙二醇、聚乙烯醇、葡聚糖、硫酸软骨素钠等水溶性高分子。

[0054] 本发明的方法例如可如下进行:作为第 1 反应,将包含被测定物的样本或用缓冲液等将该样本适当稀释而得的稀释液等、与结合有复数个特异结合物质的复合体混合。接着,作为第 2 反应,向该混合液中添加结合微小粒子并混合。在第 1 反应中未与被测定物或其类似物结合的复合体的特异结合物质,通过在所述第 2 反应中与结合微小粒子上的被测定物或其类似物结合,从而介由复合体发生结合微小粒子的凝集反应。所述凝集反应依赖于与结合微小粒子结合的复合体的量,因此,变得依赖于在第 1 反应中未与被测定物结合的复合体的量。即,依赖于第 1 反应的样本中的被测定物的量,第 2 反应的凝集反应减少。

[0055] 或者,就本发明的测定方法而言,首先,将包含被测定物的样本或用缓冲液等将该样本稀释而得的稀释液与结合微小粒子混合,接着,可向所述混合液中添加并混合结合有复数个特异结合物质的复合体。由于复合体的添加而发生的凝集反应,被来自反应液中共存的样本的被测定物竞争性地抑制,因此通过测定凝集反应所引起的吸光度变化,则可测定被测定物的浓度。

[0056] 当使用胶体金作为结合微小粒子时,测定由该凝集反应引起的规定波长处的吸光度变化。通过将测定结果适用到预先制成的表示胶体金凝集反应的吸光度变化与被测定物量的关系的校正曲线,从而可容易地求出样本中被测定物的量。此外,还可进行定性和半定量,即,若吸光度变化不足一定值则判定为阴性,若在一定值以上则判定为阳性。

[0057] 当使用胶体金时,反应开始后的吸光度变化可采用单波长测定、也可采用双波长测定。当为双波长测定时,测定波长是第一波长 610nm ~ 800nm、优选 630nm ~ 750nm,以及第二波长 360nm ~ 580nm、优选 500nm ~ 550nm。当为单波长测定时,可以使用上述双波长测定时的第一波长或第二波长的任一波长区域的波长来测定。本发明的方法中,吸光度变化是指通过如下两种测定而得到的值,任一种都可以:

[0058] (1) 反应开始后以适当的间隔测定反应液的吸光度两次,将其差作为吸光度变化;

或

[0059] (2) 反应开始后连续地测定反应液的吸光度,将每单位时间的吸光度变化率(有时使用其最大变化率)作为吸光度变化。

[0060] 在上述测定中,可利用分光光度计、酶标仪、生物化学自动分析装置等。尤其是,通过将本发明的方法应用于使用生物化学自动分析装置的测定,可在短时间内测定多数样本。

[0061] (测定用试剂盒)

[0062] 根据本发明,提供用于本发明的方法中的测定用试剂盒。所述试剂盒包含第一试剂和第二试剂,所述第一试剂包含具有复数个可与被测定物特异地结合的物质复合体;所述第二试剂包含在不溶性载体上结合有被测定物或被测定物的类似物的微小粒子。

[0063] 上述试剂以何种形态提供均可,优选以分别独立地密封包装的形态提供。上述试剂盒还可以包含:校正曲线制作用的被测定物的标准品、用于在使用时溶解各物质以制备适当浓度的溶液的缓冲液、使用说明书等。

[0064] 实施例

[0065] 下面,基于实施例进一步具体地说明本发明,但是本发明不受它们的限制。

[0066] (实施例 1:胶体金液的制备)

[0067] 一边搅拌一边向 95℃ 的蒸馏水 1L 中加入 10w/v% 氯金酸溶液 2mL,1 分钟后,加入 2w/v% 柠檬酸钠溶液 10mL,进一步搅拌 20 分钟后,冷却至 30℃。冷却后,用 0.1w/v% 碳酸钾调节至 pH 7.1。

[0068] (实施例 2:二乙酰精胺结合胶体金试剂的制备)

[0069] 用包含 0.25w/v% 叠氮化钠的 10mM HEPES(pH7.1) 将二乙酰精胺结合 BSA(株式会社トランスジェニツク) 稀释为 5mg/mL 的浓度。将 100mL 该液体加入到由上述实施例 1 制备的约 1L 胶体金液中并在室温下搅拌 2 小时。进一步添加包含 5.46w/v% 甘露醇、0.5w/v% BSA、和 0.05w/v% 叠氮化钠的 10mM HEPES(pH7.1) 110mL,在室温下搅拌 1 小时,在 8000 转下离心分离 40 分钟,去除上清。接着,向所得残渣中加入包含 3w/v% 甘露醇、0.1w/v% BSA、和 0.05w/v% 叠氮化钠的 5mM HEPES(pH7.5) (A 溶液) 约 1L,使胶体金粒子分散,然后在 8000 转下离心分离 40 分钟,去除上清。进一步地,向残渣中加入 A 溶液以使胶体金粒子分散,使总量为 70mL,制成二乙酰精胺结合胶体金溶液。

[0070] 接着,向二乙酰精胺结合胶体金溶液 70mL 中添加 A 溶液 280mL,制备二乙酰精胺结合胶体金试剂。

[0071] (实施例 3:抗二乙酰精胺抗体-抗小鼠 IgG 抗体复合体的制备)

[0072] 将抗二乙酰精胺抗体(株式会社トランスジェニツク)和抗小鼠 IgG 抗体(抗体产品,Reagents for Immunology and Services 公司)按照摩尔浓度比 2:1 混合,制成抗二乙酰精胺抗体-抗小鼠 IgG 抗体复合体。

[0073] (实施例 4:抗小鼠 IgG 抗体结合亲和素的制备)

[0074] 使用生物素标记试剂盒-SH(Dojindo Molecular Technologies, Inc.) 将抗小鼠 IgG 抗体生物素化。将生物素化 IgG 抗体与亲和素按照摩尔浓度比 4:1 混合,制成抗小鼠 IgG 抗体结合亲和素。

[0075] (实施例 5:抗二乙酰精胺抗体-抗小鼠 IgG 抗体结合亲和素复合体的制备)

[0076] 将由上述实施例 3 制备的抗小鼠 IgG 抗体结合亲和素和抗二乙酰精胺抗体按照摩尔浓度比 1 : 4 混合,制成抗二乙酰精胺抗体 - 抗小鼠 IgG 抗体结合亲和素复合体。

[0077] (实施例 6 :二乙酰精胺测定 1 用第一试剂的制备)

[0078] 向包含 1.0w/v%氯化钠、0.5w/v% EDTA、2.5w/v%聚乙二醇和 0.35w/v%聚氧乙炔月桂基醚的 0.2M PIPES(pH6.5)的溶液(B溶液)中,添加由上述实施例 3 制备的抗二乙酰精胺抗体 - 抗小鼠 IgG 抗体复合体,使其为 4.94×10^{-12} 摩尔 /mL(抗二乙酰精胺抗体含量 :1.48 μ g/mL 试剂),制成二乙酰精胺测定 1 用第一试剂 (a)。

[0079] 另外地,向 B 溶液中添加由上述实施例 5 制备的抗二乙酰精胺抗体 - 抗小鼠 IgG 抗体结合亲和素复合体,使其为 2.47×10^{-12} 摩尔 /mL(抗二乙酰精胺抗体含量 :1.48 μ g/mL 试剂),制成二乙酰精胺测定 1 用第一试剂 (b)。

[0080] 作为对照,以单体形式向 B 溶液中添加抗二乙酰精胺抗体,使得与上述第一试剂 (a) 和 (b) 为相同的浓度 (1.48 μ g/mL 试剂),制成二乙酰精胺测定 1 用第一试剂 (c)。

[0081] (实施例 7 :二乙酰精胺测定 1)

[0082] 本实施例中,使用由上述实施例 6 制备的二乙酰精胺测定 1 用的第一试剂 (a)、(b) 和 (c) 3 种作为第一试剂,使用由上述实施例 2 制备的二乙酰精胺结合胶体金试剂作为第二试剂。将二乙酰精胺溶解在包含 3.0w/v% BSA 和 1.0w/v%氯化钠的 Bis-Tris(pH7.4)中,以使分别为 0、25、50、75、100、150 和 200nM,制备含有二乙酰精胺的试料。向各含有二乙酰精胺的试料 10 μ L 中,添加第一试剂 160 μ L,在 37°C 下加热约 5 分钟,然后加入第二试剂 80 μ L,使其在 37°C 下反应,利用日立 7070 自动分析装置,作为在波长 546nm 和 660nm 处的测光点 (photometric point),测定 18 至 31 点中的吸光度变化量。图 1 和表 1 中表示二乙酰精胺浓度和吸光度变化量的关系。

[0083] [表 1]

二乙酰精胺 (nM)	第一试剂		
	(a)	(b)	(c)
0	0.1455	0.2980	0.1068
25	0.1279	0.2724	0.0975
50	0.1118	0.2392	0.0887
75	0.0954	0.2102	0.0788
100	0.0798	0.1849	0.0674
150	0.0515	0.1213	0.0480
200	0.0320	0.0774	0.0320

[0084]

[0085] 如图 1 和表 1 所示,依赖于作为被测定物的二乙酰精胺的浓度,由凝集反应引起的吸光度变化量发生变化。即,二乙酰精胺的浓度越高,则吸光度变化量变得越少。可知在包含等量的抗体的各第一试剂中,与以往的以单体形式含有抗体的第一试剂 (c) 相比,使用以复合体的形态含有抗体的第一试剂 (a) 和 (b) 时,其吸光度变化量较大,能够高灵敏度地测定二乙酰精胺的低浓度区域。由此可知,当将试样中的作为被测定物的二乙酰精胺量作为凝集反应的吸光度变化量来测定时,通过使用结合有复数个抗体的复合体,即使在低浓度区域内也能以高灵敏度测定,因此,更宽浓度区域的测定是可能的。

[0086] (实施例 8 :抗二乙酰精胺抗体 - 亲和素复合体的制备)

[0087] 使用生物素标记试剂盒-SH将抗二乙酰精胺抗体生物素化。将生物素化抗二乙酰精胺抗体与亲和素按照摩尔浓度比4:1混合,制成抗小鼠IgG抗体结合亲和素。

[0088] (实施例9:二乙酰精胺测定2用第一试剂的制备)

[0089] 向包含1.0w/v%氯化钠、0.2w/v%BSA、2.5w/v%聚乙二醇和0.35w/v%聚氧乙烯月桂基醚的0.2M Bis-Tris(pH6.5)的溶液(C溶液)中,添加由上述实施例8制备的抗二乙酰精胺抗体-生物素复合物,使其为 2.96×10^{-12} 摩尔/mL(抗二乙酰精胺抗体含量:0.888 μ g/mL试剂),制成二乙酰精胺测定2用第一试剂(d)。

[0090] 作为对照,向C溶液中添加抗二乙酰精胺抗体,使得与上述第一试剂(d)为相同的浓度(0.888 μ g/mL试剂),制成二乙酰精胺测定2用第一试剂(e)。

[0091] (实施例10:二乙酰精胺测定2)

[0092] 在本实施例中,使用由上述实施例9制备的二乙酰精胺测定2用的第一试剂(d)和(e)两种作为第一试剂,使用由上述实施例2制备的二乙酰精胺结合胶体金试剂作为第二试剂。将二乙酰精胺溶解在包含3.0w/v%BSA和1.0w/v%氯化钠的Bis-Tris(pH7.4)中,使得分别为0、50、100、200、300、400和500nM,制成含有二乙酰精胺的试料。向各含有二乙酰精胺的试料10 μ L中,添加第一试剂160 μ L,在37 $^{\circ}$ C下加热约5分钟,然后加入第二试剂80 μ L,使其在37 $^{\circ}$ C下反应,利用日立7070自动分析装置,作为在波长546nm和660nm处的测光点,测定18至31点中的吸光度变化量。图2和表2中表示二乙酰精胺浓度和吸光度变化量的关系。

[0093] [表2]

二乙酰精胺 (nM)	第一试剂	
	(d)	(e)
0	0.7204	0.0169
10	0.6930	0.0170
50	0.5203	0.0161
100	0.3364	0.0136
200	0.1600	0.0123
300	0.1052	0.0128
400	0.0792	0.0129
500	0.0656	0.0121

[0094] 如图2和表2所示,当使用以单体形式含有抗二乙酰精胺抗体的第一试剂(e)时,几乎不发生凝集反应,由凝集反应引起的吸光度变化量未依赖于二乙酰精胺的浓度而变化,因而不能进行浓度测定。与此相对,当使用以与第一试剂(e)相同的抗体量含有抗二乙酰精胺抗体-亲和素复合体的第一试剂(d)时,发生凝集反应,由凝集反应引起的吸光度变化量依赖于作为被测定物的二乙酰精胺的浓度而变化。如上所述,通过以复合体的形态使用抗体,从而可促进凝集反应,而且在被测定物的存在下,以依赖于其浓度的方式发生凝集反应的抑制。由此可知,通过使用结合有复数个抗体的复合物,从而即使在低浓度区域内也能以高灵敏度测定,因此,更宽浓度区域的测定是可能的。

[0096] 工业适用性

[0097] 在本发明的方法中,不是以单体形式使用与被测定物特异地结合的物质(例如抗

体),而是以具有复数个与被测定物特异地结合的物质复合体形式使用,从而可显著促进与结合有复数个被测定物或其类似物的乳胶粒子或胶体金粒子的凝集反应,被测定物的测定灵敏度显著上升。因此,根据本发明的方法,可进行不能通过现有技术测定的在低浓度区域内的测定。

[0098] 本发明的方法由于不需要使用凝集促进剂,因而操作性和重现性优异。此外,由于不需要进行 B/F 分离,因而也非常适于自动化,例如可利用在临床检查领域普及的自动分析装置。因此,适用于在工业、环境和临床检查领域中的、利用了抗原抗体反应的微量成分的免疫学测定方法。

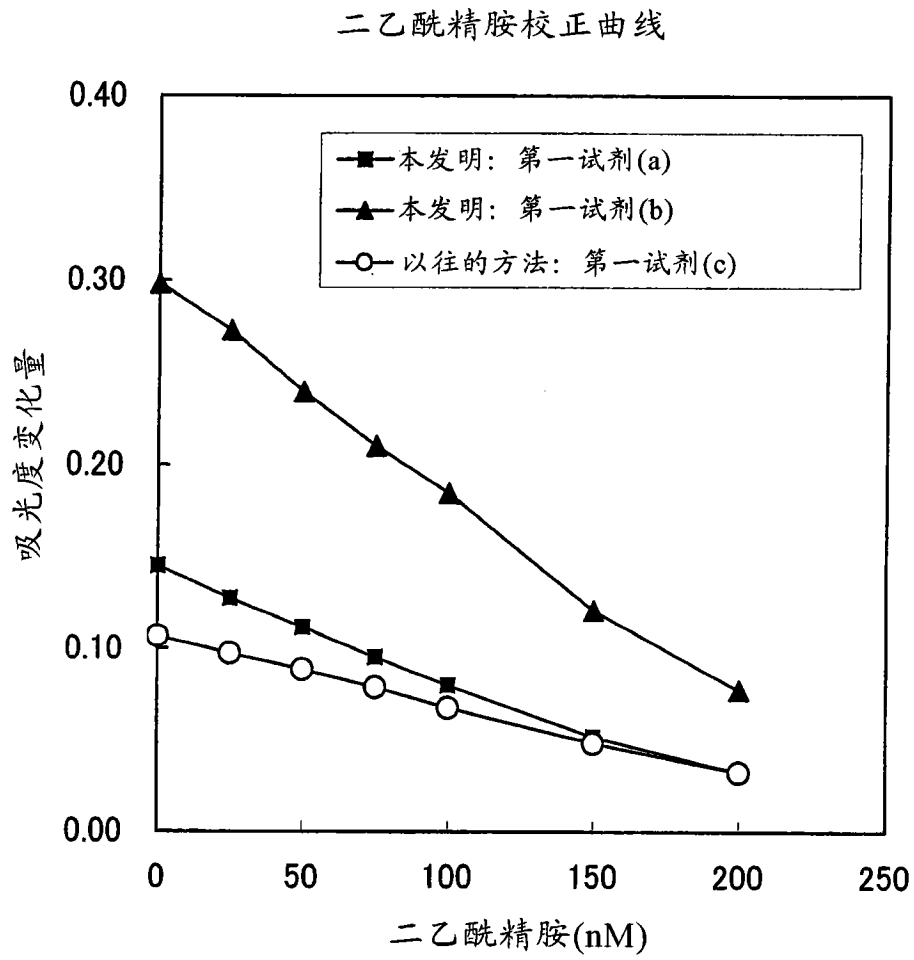


图 1

二乙酰精胺校正曲线

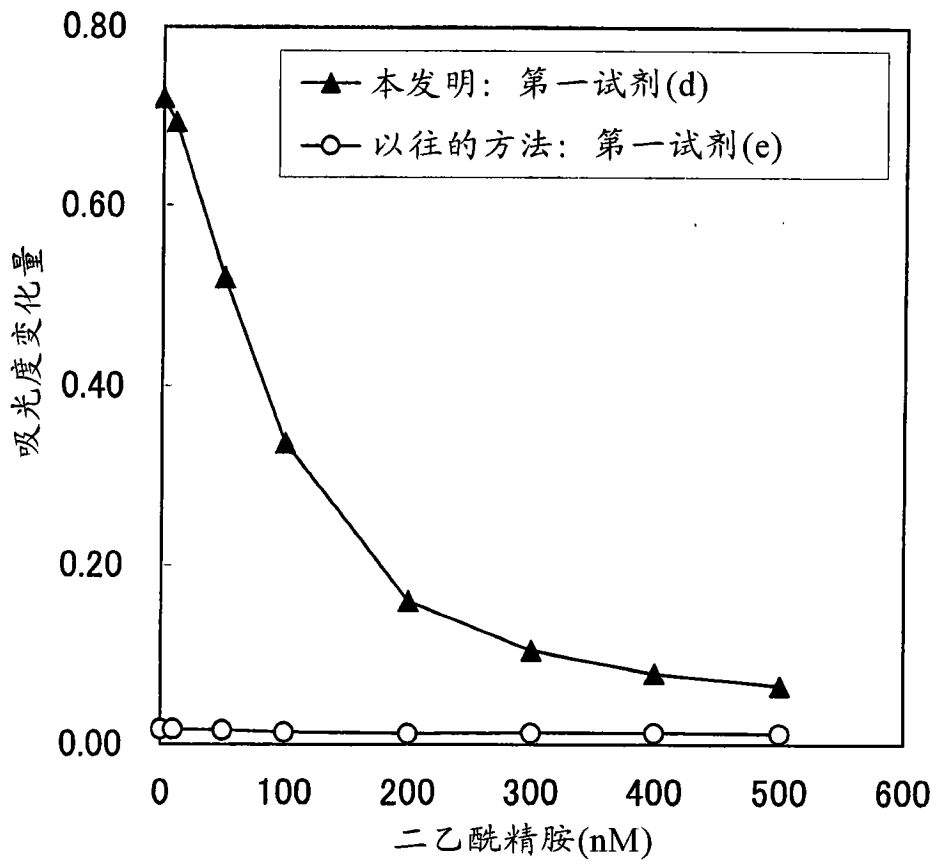


图 2

专利名称(译)	免疫学测定方法和测定用试剂盒		
公开(公告)号	CN102203611A	公开(公告)日	2011-09-28
申请号	CN200980142407.5	申请日	2009-07-16
[标]发明人	田中睦		
发明人	田中睦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/54326		
代理人(译)	卢曼		
优先权	2008272270 2008-10-22 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的测定样本中的被测定物的方法，该方法包括：(a)将包含该被测定物的样本、具有复数个与该被测定物特异地结合的物质复合体、和在不溶性载体上结合有该被测定物或该被测定物的类似物的微小粒子混合的工序；以及(b)在由该工序(a)得到的该混合液中，测定该微小粒子的凝集反应的工序。根据本发明的方法，例如，通过不是以单体形式使用抗体，而是以复数个抗体的复合体形式使用，从而测定灵敏度提高，因而可进行低浓度区域内的测定。

