



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108700581 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201780014062.X

(22)申请日 2017.02.28

(30)优先权数据

2016-037300 2016.02.29 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/007744 2017.02.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/150516 JA 2017.09.08

(71)申请人 富士胶片株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 笠置典之 知久浩之

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 庞东成 张志楠

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书24页 附图2页

(54)发明名称

用于定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒及定量生物试样中的测定对象物质的方法

(57)摘要

本发明的课题在于提供一种能够避免存在于血液中的抗血清白蛋白抗体等抗体的影响,而以高精度定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒及方法。根据本发明,提供一种试剂盒,其包含:标记粒子,包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质和第一封闭剂;及基板,包含检测区域,所述检测区域包含与上述测定对象物质或者上述第一结合物质中的任一者具有结合性的第二结合物质和第二封闭剂,所述试剂盒中,上述第一封闭剂和上述第二封闭剂彼此互不相同。

1. 一种试剂盒,其用于定量生物试样中的测定对象物质,所述试剂盒包含:
标记粒子,该标记粒子具有第一结合物质和第一封闭剂,该第一结合物质与测定对象物质具有结合性;及
基板,该基板包含检测区域,所述检测区域具有第二结合物质和第二封闭剂,该第二结合物质与所述测定对象物质或者所述第一结合物质中的任一者具有结合性,
所述试剂盒中,
所述第一封闭剂和所述第二封闭剂彼此互不相同。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中,
所述第一封闭剂和所述第二封闭剂为彼此互不相同的蛋白质。
3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其中,
所述第一封闭剂为白蛋白及球蛋白中的一者,所述第二封闭剂为白蛋白及球蛋白中的另一者。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其中,
所述第一封闭剂为球蛋白,所述第二封闭剂为白蛋白。
5. 根据权利要求3或4所述的试剂盒,其中,
所述白蛋白为牛血清白蛋白。
6. 根据权利要求3至5中任一项所述的试剂盒,其中,
所述球蛋白为除与所述测定对象物质具有结合性的免疫球蛋白以外的免疫球蛋白。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的试剂盒,其中,
所述标记粒子为荧光粒子,所述检测区域位于金膜上。
8. 一种定量生物试样中的测定对象物质的方法,所述方法包含:
反应工序,使生物试样与标记粒子进行反应,所述标记粒子具有第一结合物质和第一封闭剂,该第一结合物质与测定对象物质具有结合性;及
测定对象物质相关标记信息获取工序,使在所述反应工序中获得的反应产物与基板接触,在基板上捕捉标记粒子,获取与所述测定对象物质的量相关的标记信息,所述基板包含检测区域,所述检测区域具有第二结合物质和第二封闭剂,该第二结合物质与所述测定对象物质或所述第一结合物质中的任一者具有结合性,
所述第一封闭剂和所述第二封闭剂彼此互不相同。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中,
所述第一封闭剂和所述第二封闭剂为彼此互不相同的蛋白质。
10. 根据权利要求8或9所述的方法,其中,
所述第一封闭剂为白蛋白及球蛋白中的一者,所述第二封闭剂为白蛋白及球蛋白中的另一者。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中,
所述第一封闭剂为球蛋白,所述第二封闭剂为白蛋白。
12. 根据权利要求10或11所述的方法,其中,
所述白蛋白为牛血清白蛋白。
13. 根据权利要求10至12中任一项所述的方法,其中,
所述球蛋白为除与所述测定对象物质具有结合性的免疫球蛋白以外的免疫球蛋白。

14. 根据权利要求8至13中任一项所述的方法, 其中,
所述标记粒子为荧光粒子, 所述检测区域位于金膜上。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其通过利用表面等离激元激发的荧光检测, 获取与测定对象物质的量相关的标记信息。

用于定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒及定量生物试样中的测定对象物质的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒及定量生物试样中的测定对象物质的方法。

背景技术

[0002] 作为用于定量生物试样中所包含的蛋白质、酶或无机化合物等测定对象物质的高灵敏度且容易的测定法,广泛地利用荧光检测法。荧光检测法为如下方法:检测对认为包含通过特定波长的光被激发而发出荧光的测定对象物质的试样照射上述特定波长的激发光时发出的荧光,由此确认测定对象物质的存在。在测定对象物质不是荧光体的情况下,使利用荧光色素标记与测定对象物质特异性结合的物质而得的物质与试样接触,之后以与上述相同的方式,检测照射激发光时发出的荧光,由此能够确认测定对象物质的存在。

[0003] 在上述荧光检测法中,已知为了提高检测的灵敏度而利用由等离激元共振产生的电场增强的效果的方法。该方法中,为了产生等离激元共振,准备在透明的支撑体上的规定区域设置有金属膜的传感器芯片。然后,从支撑体中的与金属膜形成面相反的一面侧以全反射角度以上的角度对支撑体与金属膜的界面射入激发光。通过照射该激发光而在金属膜产生表面等离激元,通过由该表面等离激元的产生而引起的电场增强作用,荧光得到增强,从而信号/干扰比(S/N比)有所提高。利用表面等离激元激发的荧光检测法(表面等离激元荧光:Surface Plasmon Fluorescence,以下,称为“SPF法”)相较于利用落射激发的荧光检测法(以下,称为“落射荧光法”),可获得约10倍的信号增强度,从而能够以高灵敏度进行测定。

[0004] 在如上述那样的测定对象物质的定量中,已知使用白蛋白来作为封闭剂。在专利文献1中记载有一种免疫染色方法,其通过使用了荧光纳米粒子的免疫染色对固定于利用含氨基硅烷偶联剂进行了处理的基材玻璃的表面的病理组织中的抗原进行检测,所述免疫染色方法的特征在于,包含:对固定于利用含氨基硅烷偶联剂进行了处理的基材玻璃的表面的病理组织添加封闭剂的工序;将与抗原进行反应的抗体添加到上述病理组织中的工序;添加具有能够与含氨基硅烷偶联剂中的氨基进行反应的官能团的化合物(1),并在室温下静放规定时间的工序;及添加具有与抗体进行反应而能够结合的官能团的荧光纳米粒子的工序,且作为封闭剂的一例,记载有血清白蛋白。在专利文献2中记载有将水分散型高分子粒子设为载体,并在载体的表面具有针对被检物质的特异性结合物质和非特异性吸附的封闭剂的特异性结合体,且作为非特异性吸附的封闭剂的一例,记载有牛血清白蛋白。

[0005] 以往技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特开2014-235081号公报

[0008] 专利文献2:日本特开2001-21563号公报

发明内容

[0009] 发明要解决的技术课题

[0010] 如上所述,作为能够通过简单的测定方法以高灵敏度进行测定的方法,已知有利用表面等离激元激发的荧光检测法,但测定精度不够理想。即,为了始终以高精度定量测定对象物质,希望有一种再现性更高的简单的测定方法。

[0011] 本发明待解决的课题在于,提供一种能够避免存在于血液中的抗血清白蛋白抗体等抗体的影响,而以高精度定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒及方法。

[0012] 用于解决技术课题的手段

[0013] 为了解决上述问题,本发明人等进行深入研究的结果,发现了使用标记粒子及基板定量生物试样中的测定对象物质,由此能够解决上述问题,所述标记粒子包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质和第一封闭剂,所述基板包含检测区域,所述检测区域包含与上述测定对象物质或者上述第一结合物质中的任一者具有结合性的第二结合物质和与第一封闭剂不同的第二封闭剂。本发明是根据这些见解而完成的。即,根据本发明,提供以下发明。

[0014] (1) 一种试剂盒,其用于定量生物试样中的测定对象物质,所述试剂盒包含:

[0015] 标记粒子,包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质和第一封闭剂;及

[0016] 基板,包含检测区域,所述检测区域包含与上述测定对象物质或者上述第一结合物质中的任一者具有结合性的第二结合物质和第二封闭剂,

[0017] 所述试剂盒中,

[0018] 上述第一封闭剂和上述第二封闭剂彼此互不相同。

[0019] (2) 根据(1)所述的试剂盒,其中,上述第一封闭剂和上述第二封闭剂为彼此互不相同的蛋白质。

[0020] (3) 根据(1)或(2)所述的试剂盒,其中,上述第一封闭剂为白蛋白及球蛋白中的一者,上述第二封闭剂为白蛋白及球蛋白中的另一者。

[0021] (4) 根据(3)所述的试剂盒,其中,上述第一封闭剂为球蛋白,上述第二封闭剂为白蛋白。

[0022] (5) 根据(3)或(4)所述的试剂盒,其中,上述白蛋白为牛血清白蛋白。

[0023] (6) 根据(3)至(5)中任一项所述的试剂盒,其中,上述球蛋白为除与上述测定对象物质具有结合性的免疫球蛋白以外的免疫球蛋白。

[0024] (7) 根据(1)至(6)中任一项所述的试剂盒,其中,上述标记粒子为荧光粒子,上述检测区域位于金膜上。

[0025] (8) 一种方法,其为定量生物试样中的测定对象物质的方法,所述方法包含:

[0026] 反应工序,使生物试样与标记粒子进行反应,所述标记粒子包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质和第一封闭剂;及

[0027] 测定对象物质相关标记信息获取工序,使在上述反应工序中获得的反应产物与基板接触,在基板上捕捉标记粒子,获取与上述测定对象物质的量相关的标记信息,所述基板包含检测区域,所述检测区域包含与上述测定对象物质或上述第一结合物质中的任一者具有结合性的第二结合物质和第二封闭剂,

[0028] 上述第一封闭剂和上述第二封闭剂彼此互不相同。

[0029] (9) 根据 (8) 所述的方法, 其中, 上述第一封闭剂和上述第二封闭剂为彼此互不相同的蛋白质。

[0030] (10) 根据 (8) 或 (9) 所述的方法, 其中, 上述第一封闭剂为白蛋白及球蛋白中的一者, 上述第二封闭剂为白蛋白及球蛋白中的另一者。

[0031] (11) 根据 (10) 所述的方法, 其中, 上述第一封闭剂为球蛋白, 上述第二封闭剂为白蛋白。

[0032] (12) 根据 (10) 或 (11) 所述的方法, 其中, 上述白蛋白为牛血清白蛋白。

[0033] (13) 根据 (10) 至 (12) 中任一项所述的方法, 其中, 上述球蛋白为除与上述测定对象物质具有结合性的免疫球蛋白以外的免疫球蛋白。

[0034] (14) 根据 (8) 至 (13) 中任一项所述的方法, 其中, 上述标记粒子为荧光粒子, 上述检测区域位于金膜上。

[0035] (15) 根据 (14) 所述的方法, 其通过利用表面等离子激元激发的荧光检测, 获取与测定对象物质的量相关的标记信息。

[0036] 发明效果

[0037] 根据本发明的试剂盒及方法, 能够以高精度定量生物试样中的测定对象物质。

附图说明

[0038] 图1表示本发明的试剂盒中所包含的传感器芯片的示意图。

[0039] 图2表示本发明的试剂盒中所包含的传感器芯片的分解图。

具体实施方式

[0040] 以下, 对本发明进行进一步详细说明。

[0041] [用于定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒]

[0042] 本发明的用于定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒包含: 标记粒子, 与测定对象物质具有结合性的第一结合物质和第一封闭剂; 及基板, 包含检测区域, 所述检测区域包含与上述测定对象物质或者上述第一结合物质中的任一者具有结合性的第二结合物质和第二封闭剂, 上述第一封闭剂和上述第二封闭剂彼此互不相同。

[0043] 鉴于进一步改善测定精度的问题, 在本发明中, 作为标记粒子上的封闭剂 (第一封闭剂) 及基板的检测区域上的封闭剂 (第二封闭剂), 分别使用彼此互不相同的封闭剂, 由此能够提供一种测定精度高的定量试剂盒及定量方法。即, 在本发明中, 通过第一封闭剂及第二封闭剂彼此互不相同, 能够避免有可能存在于生物试样中的抗体成分的影响, 由此实现了测定精度的提高。例如, 在使用牛血清白蛋白 (BSA) 来作为第一封闭剂及第二封闭剂的情况下, 若抗BSA抗体存在于生物试样中, 则基板的检测区域和标记粒子经由抗BSA抗体而结合, 从而无法进行准确的定量, 但是通过采用本发明的结构, 能够避免如上述那样的经由抗BSA抗体的结合。

[0044] (生物试样)

[0045] 作为生物试样, 只要是有可能包含测定对象物质的试样, 则并无特别限定, 例如, 能够举出生物试样、尤其动物 (例如, 人、狗、猫等) 的体液 (例如, 血液、血清、血浆、脊髓液、

泪液、汗、尿、脓、鼻涕、或咳痰)或者排泄物(例如,粪便)、器官、组织、粘膜、皮肤等。

[0046] (测定对象物质)

[0047] 作为测定对象物质,并无特别限定,但是例如可举出胆汁酸、皮质醇、胆固醇、蛋白质等。

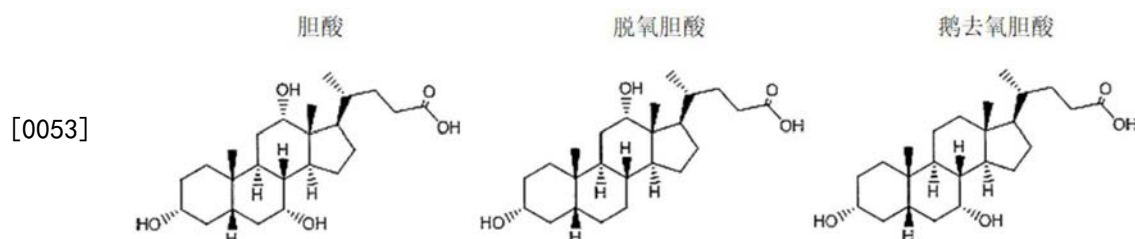
[0048] 胆汁酸为在哺乳类胆汁中存在的类固醇衍生物中具有胆烷酸骨架的化合物的统称,作为典型的例子,可举出胆酸、脱氧胆酸及鹅去氧胆酸。

[0049] 胆汁酸的主要作用为在消化道内促进胶束的形成,以使更加容易吸收膳食脂肪。将在肝脏中生物合成的物质称为初级胆汁酸。并且,一部分在肠道中受到由微生物引起的转换,其代谢物被称为次级胆汁酸。胆汁酸通常与甘氨酸、牛磺酸相结合,它们被称为结合胆汁酸(胆汁盐)。

[0050] 关于测定狗及猫中的血清胆汁酸浓度的迅速且简单的方法,被认为是反映肝细胞功能及肠肝门静脉循环的高灵敏度且特异性检查。在与血清胆汁酸相关的研究中,尤其,在显示因临床症状不明确而无法解释的高肝酶活性但没有黄疸的狗和猫中,为了检测需要临床确诊的肝胆道系统疾病,示出血清胆汁酸的有用性。并且,在先天性门静脉循环分流的诊断中,为了提高诊断率,推荐空腹时及饭后的胆汁酸定量。胆汁酸浓度的值高时,怀疑急性肝炎、慢性肝病、胆汁淤积、肠内细菌过量繁殖、门静脉分流(portosystemic shunt;PSS)等,另一方面,胆汁酸浓度的值低时,怀疑肠吸收不良。

[0051] 这种胆汁酸以结构稍微不同的化合物的集合体的形式存在,具体而言,存在10种化合物,但是在狗及猫的情况下,作为胆汁酸,由胆酸、脱氧胆酸及鹅去氧胆酸这3种占大致100%。例如,若用平均值表示狗的血液中的3种结构不同的胆汁酸的比率,则成为胆酸:脱氧胆酸:鹅去氧胆酸=74%:20%:6%的比例(日本兽医学杂志:The Japanese journal of veterinary science,52(2)1990)。以下,示出胆酸、脱氧胆酸及鹅去氧胆酸的结构。

[0052] [化学式1]



[0054] (第一结合物质)

[0055] 本发明中所使用的第一结合物质为与测定对象物质具有结合性的物质。作为第一结合物质,能够使用抗原、抗体或者它们的复合物,但是并不限于这些。优选第一结合物质为抗体。在第一结合物质为抗体的情况下,作为与测定对象物质具有结合性的抗体,例如,能够使用由通过该测定对象物质被免疫的动物的血清制备的抗血清、从抗血清提纯的免疫球蛋白组分、通过使用通过该测定对象物质被免疫的动物的脾脏细胞进行细胞融合而获得的单克隆抗体、或者它们的片段[例如, $F(ab')_2$ 、Fab、Fab' 或Fv]等。关于这些抗体的制备,能够通过常规方法来进行。而且,关于该抗体,可以是如嵌合抗体等的情况那样施加了修饰的抗体,并且即便是市售的抗体,也能够使用通过公知的方法由动物血清或培养上清液制备的抗体。

[0056] 例如,在测定对象物质为胆汁酸的情况下,作为第一结合物质,使用与胆汁酸具有

结合性的(优选特异性识别胆汁酸的)抗胆汁酸抗体。在胆汁酸中包含胆酸、脱氧胆酸及鹅去氧胆酸,因此在本发明中,作为第一结合物质,能够制作抗胆酸抗体、抗脱氧胆酸抗体及抗鹅去氧胆酸抗体,并使用上述3种抗体。

[0057] 作为抗胆酸、抗脱氧胆酸抗体及抗鹅去氧胆酸抗体的具体的制作方法,例如,以下举例对抗胆酸的制作方法来进行说明。

[0058] 能够混合胆酸、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,以下简称为BSA)及缩合剂来制作胆酸·BSA结合体。将结合体用作小鼠免疫致敏抗原,并对于小鼠背部皮下进行多次免疫。在该情况下,能够适当地选择完全佐剂(弗氏完全佐剂(Complete Freund's Adjuvant):CFA)和/或不完全佐剂(弗氏不完全佐剂(Incomplete Freund's Adjuvant):IFA)并与免疫致敏抗原进行混合而使用。所谓完全佐剂,为刺激免疫的物质,是石蜡与ARLACEL的混合物。所谓不完全佐剂,是指在完全佐剂中添加杀灭的分枝杆菌或结核菌的死菌,并进一步增强抗原性的佐剂。在几个星期中适当进行数次免疫致敏之后从小鼠进行采血并实施抗体效价的测定。在观察到抗体效价的充分的上升的情况下向腹腔内施用抗原,数日后摘除脾脏。通过使以这种方式从免疫小鼠摘除的脾脏细胞与突变株骨髓瘤细胞(骨髓瘤)融合,能够制作具备抗体产生能力的融合细胞。从该融合细胞中仅选择针对目标抗原的抗体产生细胞,进而为了只增殖该细胞株而进行有限稀释。能够进行稀释后的细胞的培养(克隆)。将如此获得的融合细胞株注射到小鼠的腹腔内,并通过增殖腹水型抗体产生细胞,能够在腹水中产生单克隆抗体,回收这些抗体,由此能够获得目标抗体。

[0059] 在测定对象物质为皮质醇的情况下,作为第一结合物质,能够使用与皮质醇具有结合性的(优选特异性识别皮质醇的)抗皮质醇抗体。关于抗皮质醇抗体的制造,能够按照上述抗胆酸抗体的制作方法进行。

[0060] (标记粒子)

[0061] 作为在本发明中所使用的标记粒子,能够使用通常能用于免疫反应中的具有标记的粒子。作为标记粒子,能够使用通常能用于免疫反应中的通过荧光而着色的荧光粒子、或者还能够使用利用酶标记的粒子等。

[0062] 作为荧光粒子,有使用了苯乙烯、甲基丙烯酸、(甲基)丙烯酸缩水甘油酯、丁二烯、氯乙烯、醋酸乙烯酯丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸苯酯或甲基丙烯酸丁酯等单体的高分子、或使用了2种以上的单体的共聚物等合成高分子粉末,优选为使它们均匀地悬浮而得的乳胶。并且,可举出其他有机高分子粉末、无机物质粉末、微生物、血细胞、细胞膜片或脂质体等。

[0063] 在使用乳胶粒子来作为标记粒子的情况下,作为乳胶的材质的具体例,可举出聚苯乙烯、苯乙烯-丙烯酸共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、苯乙烯-(甲基)丙烯酸缩水甘油酯共聚物、苯乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物、甲基丙烯酸聚合物、丙烯酸聚合物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物及聚醋酸乙烯酯丙烯酸酯等。作为乳胶,优选为至少包含苯乙烯来作为单体的共聚物,尤其优选为苯乙烯与丙烯酸或甲基丙烯酸的共聚物。乳胶的制作方法并无特别限定,能够通过任意的聚合方法来制作。其中,若抗体标记时存在表面活性剂,则抗体固定化变得困难,因此关于乳胶的制作,优选通过无乳化剂乳化聚合、即不使用表面活性剂等乳化剂的乳化聚合来进行。

[0064] 在通过聚合而获得的乳胶本身为荧光性的情况下,能够直接用作荧光乳胶粒子。

在通过聚合而获得的乳胶为非荧光性的情况下,能够通过向乳胶中添加荧光物质(荧光色素等)来制作荧光乳胶粒子。即,荧光乳胶粒子能够通过向包含水及水溶性有机溶剂的乳胶粒子的溶液中添加荧光色素并进行搅拌等来制造。

[0065] 还能够将含有荧光色素的脂质体、微胶囊等用作荧光粒子。关于荧光显色,只要吸收并激发紫外光等,并在恢复到基底状态时释放,则并无特别限制,例如,能够使用黄绿色(激发波长505nm/释放波长515nm,以下相同)、蓝色(350~356nm/415~440nm)、红色(535~580nm/575~605nm)、橙色(540nm/560nm)、红橙色(565nm/580nm)、深红色(625nm/645nm)、暗红色(660nm/680nm)等荧光显色。关于发出这些荧光的荧光粒子,例如,能够从Thermo Fisher公司获得,在Thermo Fisher公司以FluoSpheres(注册商标)的商品名称市售。

[0066] 标记粒子的平均粒径根据粒子的材质、定量测定对象物质的浓度范围、测定设备等而不同,但是优选为0.001~10 μ m(更优选为0.001~1 μ m)的范围。

[0067] (平均粒径的测定方法)

[0068] 标记粒子的平均粒径能够通过市售的粒度分布计等来测量。作为粒度分布的测定法,已知有光学显微镜法、共焦激光显微镜法、电子显微镜法、原子力显微镜法、静态光散射法、激光衍射法、动态光散射法、离心沉降法、电脉冲测量法、色谱法、超声衰减法等,市售与各自的原理对应的装置。

[0069] 从粒径范围及测定的容易度考虑,在本发明中优选使用动态光散射法。作为使用了动态光散射的市售的测定装置,可举出Nanotracer UPA(NIKKISO CO.,LTD.)、动态光散射式粒度分布测定装置LB-550(HORIBA,Ltd.)、浓缩系统(concentrated-system)粒度分析仪FPAR-1000(OTSUKA ELECTRONICS Co.,LTD)、ZETA SIZER Nano series(纳米)(Malvern公司)等,在本发明中,作为在25℃的测定温度下测定出的中值粒径($d=50$)的值而求出。

[0070] (利用第一结合物质进行的标记粒子的修饰)

[0071] 作为将第一结合物质固定于标记粒子的方法,例如,记载于日本特开2000-206115号公报、Thermo Fisher公司FluoSpheres(注册商标)聚苯乙烯微球F8813中所附的协议等中,能够使用任何制备免疫凝集反应试剂的公知的方法。并且,作为将作为结合物质的抗体固定于粒子的原理,还能够采用物理吸附及通过共价键进行的化学键合中的任一原理。作为覆盖在将抗体固定于粒子之后未被抗体所包覆的粒子表面的封闭剂(即,第一封闭剂),例如能够使用白蛋白(BSA等)、脱脂牛奶、酪蛋白、源自大豆的成分、源自鱼的成分或聚乙二醇等、以及包含上述物质或性质与上述物质相同的物质的市售的免疫反应封闭剂。根据需要,这些封闭剂还能够实施通过热、酸/碱等而进行的部分改性等预处理。而且,作为第一封闭剂,还能够使用与测定对象物质不具有结合性的抗体(球蛋白)、或者不用于测试区域的蛋白质(蛋白质A(Protein A)、蛋白质G(Protein G))等。

[0072] 以下,例示将抗体固定于粒子的具体的方法。在以粒子的固体成分浓度成为0.1~10质量%的方式进行分散的液中,添加调整为0.01~20mg/mL的浓度的抗体溶液,并进行混合。在温度为4~50℃的条件下持续搅拌5分钟~48小时。接着,通过离心分离或其他方法来分离粒子和溶液,并充分地去除溶液中所包含的未与粒子结合的抗体。之后,反复进行0~10次通过缓冲液清洗粒子的操作。混合粒子和抗体,实施使抗体结合于粒子的操作之后,优选使用不参与抗原抗体反应的成分、优选为蛋白质、更优选为球蛋白,白蛋白、Block Ace(注册商标)、脱脂牛奶及酪蛋白等封闭剂,保护粒子表面的未结合有抗体的部分。

[0073] 将抗原、抗体等固定于粒子时,能够根据需要添加稳定剂。所谓稳定剂,只要是蔗糖、多糖类等合成高分子或者天然高分子等、稳定抗原、抗体的稳定剂,则并无特别限制,还能够使用Immunoassay Stabilizer(Advanced Biotechnologies Inc (ABI公司))等的市售的稳定剂。

[0074] 具有第一结合物质的标记粒子包含于本发明的试剂盒中,且优选为包含于作为试剂盒的一部分的容器中、例如杯中的方式。在该情况下,将生物试样注入包含标记粒子的容器中并进行混合、搅拌,由此能够使生物试样中的测定对象物质和第一结合物质结合。

[0075] (基板)

[0076] 在本发明中,为了实现高灵敏度的测定,优选采用进行后述表面等离子激元荧光(SPF)检测的测定法。作为该情况下的基板,优选使用在表面具有金属膜的基板。作为构成金属膜的金属,只要能够产生表面等离子激元共振,则并无特别限定。可优选举出金、银、铜、铝或铂等自由电子金属,尤其优选金。在使用金的情况下,后述检测区域位于金膜上。上述金属能够单独使用或组合使用。并且,考虑对上述基板的附着性,可以在基板与由金属形成的层之间设置由铬等形成的夹层。金属膜的膜厚是任意的,但是例如优选为1nm以上且500nm以下,尤其优选为10nm以上且200nm以下。若超过500nm,则无法充分地检测介质的表面等离子激元现象。并且,在设置由铬等形成的夹层的情况下,该夹层的厚度优选为0.1nm以上且10nm以下。

[0077] 金属膜的形成通过常规方法来进行即可,例如,能够通过溅射法、蒸镀法、离子电镀法、电镀法、或者无电解电镀法等进行,但是为了设置基板材质和金属膜的混合层来提高金属膜的密合性,优选通过溅射法制作金属膜。在该情况下,基板材质和金属膜的混合层的厚度只要能够确保足够的密合性,则并无特别限制,但是优选为10nm以下。

[0078] 金属膜优选配置于基板上。在此,所谓“配置于基板上”,除了包含金属膜配置成与基板上直接接触的情况,还包含金属膜配置成不与基板直接接触而隔着其他层的情况。作为本发明中能够使用的基板的材质,例如,能够使用作为一般光学玻璃的一一种的BK7(硼硅酸盐玻璃)等光学玻璃、或者由合成树脂、具体而言聚甲基丙烯酸甲酯、聚对苯二甲酸乙二酯、聚碳酸酯或环烯烃聚合物等相对于激光为透明的材料形成的玻璃。这种基板优选为相对于偏振光不显示各向异性且加工性优异的材料。

[0079] 作为用于SPF检测的基板的优选方式,能够举出在聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)上蒸镀金膜而得的基板等。

[0080] 基板具备检测区域,所述检测区域包含与测定对象物质或第一结合物质中的任一者具有结合性的第二结合物质。

[0081] (第二结合物质)

[0082] 第二结合物质为与测定对象物质具有结合性的物质,或与第一结合物质具有结合性的物质。在通过夹心法(Sandwich assay)进行定量的情况下,作为第二结合物质,能够使用与测定对象物质具有结合性的物质。在通过竞争法进行定量的情况下,作为第二结合物质,能够使用与第一结合物质具有结合性的物质。在本发明中,优选通过竞争法进行定量,作为第二结合物质,优选使用与第一结合物质具有结合性的物质。

[0083] 作为第二结合物质,并无特别限定,但是作为优选的例子,可举出抗原、抗体或它们的复合物,但是优选为抗原,作为第二结合物质,尤其优选使用测定对象物质(其为与第

一结合物质具有结合性的物质)。

[0084] 作为第二结合物质,在使用测定对象物质的情况下,第二结合物质优选为测定对象物质与载体的结合体。所谓载体,是指能够与测定对象物质的多个分子结合的物质。作为优选的载体的一例,可举出蛋白质等,其中,具体而言,能够举出牛血清白蛋白等。

[0085] 在测定对象物质为胆汁酸的情况下,第二结合物质尤其优选包含胆酸和/或胆酸·白蛋白结合体、脱氧胆酸和/或脱氧胆酸·白蛋白结合体、以及鹅去氧胆酸和/或鹅去氧胆酸·白蛋白结合体。并且,在测定对象物质为皮质醇的情况下,第二结合物质优选为皮质醇·白蛋白结合体。

[0086] (将第二结合物质固定于基板的方法)

[0087] 关于将第二结合物质固定于基板的方法,例如,记载于由Nunc公司所提供的Tech Notes Vol.2-12等中,能够使用任何制备一般ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay:酶联免疫吸附法) 试剂的公知的方法。并且,可以通过在基板上配置自组织单分子膜(SAM:Self-Assembled Monolayer(自组装单层膜))等而实施表面修饰,作为将第二结合物质固定于基板的方法,还能够采用利用了物理吸附的方法及利用了通过共价键进行的化学键合的方法中的任一方法。作为覆盖将第二结合物质固定于基板之后未被第二结合物质所包覆的基板表面的封闭剂(第二封闭剂),能够使用公知的物质、例如牛血清白蛋白(BSA)、球蛋白、脱脂牛奶、酪蛋白、源自大豆的成分、源自鱼的成分或聚乙二醇等、以及包含上述物质或性质与上述物质相同的物质的市售的免疫反应应用封闭剂等。根据需要,这些封闭剂还能够实施通过热、酸/碱等而进行的部分改性等预处理。

[0088] (检测区域<测试区域>)

[0089] 本发明能够在基板上设置检测生物试样中有无测定对象物质的测试区域。在该测试区域中,例如能够通过捕获作为测定对象物质的抗原,检测与抗原结合的标记量并进行定量来定量抗原。或者,能够通过如下方法来定量抗原:仅使得与抗原结合的标记无法结合,只捕获未与抗原结合的标记,并算出与抗原结合的标记量。该检测方法称为竞争法,但是在此,对与竞争法相关的基板进行说明。

[0090] 优选在基板的测试区域具有与存在于标记粒子上的结合物质(例如,抗体)进行反应的位置。作为本发明的优选的一方式,优选在基板的测试区域上具有存在于生物试样中的抗原的方式。在该情况下,使抗原和BSA在缩合剂的存在下进行反应,而制作抗原·BSA结合体,将该结合体吸附于测试区域上,由此能够制作测试区域。作为测定对象物质的抗原-BSA结合体能够通过如下方法来结合于基板上的测试区域:溶解于缓冲液,并点加到基板上,放置一定时间之后,吸出上清液,并进行干燥等。

[0091] (参考区域<控制区域>)

[0092] 在本发明中,为了尽可能地抑制测定环境、尤其是测定温度的影响,在基板上具有控制区域,用控制区域的信息对测试区域的信息进行标准化,由此能够将环境依赖性抑制为非常低。作为控制区域,优选设计成不依赖于存在于所使用的生物试样中的测定对象物质的量,而能够与所有标记结合。优选具有与标记粒子上所存在的所有抗体相互作用的抗体。通过如此设计,用控制区域的信息对测试区域的信息进行标准化,由此即使在例如低温环境下生物试样的流动、反应速度受到影响的情况下,也能够通过标准化消除该影响,并能够获得始终高精度且不受测定环境影响的结果。

[0093] 作为存在于控制区域中的优选的抗体,若具有识别存在于标记粒子上的结合物质(例如,抗体)的功能,且该抗体源自小鼠,则优选为抗小鼠抗体,若标记粒子上的抗体源自山羊,则优选为抗山羊抗体。这些控制区域上的抗体能够通过如下方法来结合于基板:溶解于缓冲液,并点加到基板上,放置一定时间之后,抽吸上清液,并进行干燥等。

[0094] (封闭剂)

[0095] 例如,在竞争法中,存在除了对不包含测定对象物质且呈阴性的生物试样起反应以外,还对包含测定对象物质且呈阳性的生物试样起反应而呈阴性的生物试样,解决高值偏差的问题被认为是一种课题。虽然显示这种假阴性的原因尚不明确,但认为其原因之一应该是通过未被抗体覆盖的标记粒子表面和检测区域(测试区域)的非特异性相互作用而存在原来不希望结合的标记粒子。并且,即使在与存在于测试区域上的物质相同的物质存在于标记粒子表面上的情况下,游离的抗体等存在于生物试样中时,该抗体与存在于测试区域上的物质和标记粒子表面上的物质中的两者均结合,由此即使在测定包含测定对象物质且呈阳性的生物试样的情况下有时也检测为阴性。

[0096] 通常,为了抑制对固相表面(例如标记粒子表面、基板的金膜表面)的非特异性吸附,使用利用BSA的封闭,但是在某种特定的生物试样中存在与BSA进行反应的抗BSA抗体的情况下,以在标记粒子上的BSA与基板上的BSA之间进行交联的方式进行反应,从而有时会引起高值偏差。

[0097] 在本发明中,通过设为第一封闭剂和第二封闭剂为彼此互不相同的封闭剂来解决上述问题。

[0098] 优选第一封闭剂和第二封闭剂为彼此互不相同的蛋白质。关于第一封闭剂和第二封闭剂的具体例,如本说明书中的上述内容。优选第一封闭剂为白蛋白及球蛋白中的一者,且第二封闭剂为白蛋白及球蛋白中的另一者。更优选第一封闭剂为球蛋白(更优选为除与测定对象物质具有结合性的免疫球蛋白以外的免疫球蛋白),且第二封闭剂为白蛋白(更优选为牛血清白蛋白)。

[0099] 作为除了与测定对象物质具有结合性的免疫球蛋白以外的免疫球蛋白,具体而言,能够使用由通过与测定对象物质不同的抗原被免疫的动物的血清制备的抗血清、从抗血清提纯的免疫球蛋白组分、通过使用通过该测定对象物质被免疫的动物的脾脏细胞进行细胞融合而获得的单克隆抗体、或者它们的片段[例如, $F(ab')_2$ 、Fab、Fab' 或Fv]等。关于这些抗体的制备,能够通过常规方法来进行。而且,关于该抗体,可以是如嵌合抗体等的情况那样施加了修饰的抗体,并且即便是市售的抗体,也能够使用通过公知的方法由动物血清或培养上清液制备的抗体。在本发明中,作为第一封闭剂,尤其优选使用抗CRP(C反应性蛋白)抗体的方式。

[0100] (抗体)

[0101] 在本发明中,抗体能够与其动物种类、亚类等无关地使用。例如,在本发明中能够使用的抗体为源自小鼠、大鼠、仓鼠、山羊、兔子、绵羊、牛、鸡等能够引起免疫反应的生物体的抗体,具体而言,为小鼠IgG、小鼠IgM、大鼠IgG、大鼠IgM、仓鼠IgG、仓鼠IgM、兔子IgG、兔子IgM、山羊IgG、山羊IgM、绵羊IgG、绵羊IgM、牛IgG、牛IgM、鸡IgY等,多克隆或单克隆均能够使用。片段化抗体为衍生自具有至少1个抗原结合位点的完整抗体的分子,具体而言为Fab、 $F(ab')_2$ 等。这些片段化抗体为通过酶或化学处理、或者利用基因工程学方法而获得的分

子。

[0102] (试剂盒的其他要件)

[0103] 本发明的试剂盒用于测定测定对象物质方法,在测定对象物质为胆汁酸的情况下,为胆汁酸测定诊断用试剂盒,在测定对象物质为皮质醇的情况下,为皮质醇测定诊断用试剂盒。在本发明中为包含传感器芯片的试剂盒,该传感器芯片包含实施测定对象物质的测定时固定有第二结合物质的基板和保持荧光粒子等标记粒子的部件,但也可以包含表面等离激元激发装置及荧光测定设备等用于测定对象物质的测定的各种设备或装置。而且,作为试剂盒要件,可以包括包含已知量的测定对象物质的试样、操作说明书等。

[0104] [定量生物试样中的测定对象物质的方法]

[0105] 本发明的定量生物试样中的测定对象物质的方法包含:

[0106] 反应工序,使生物试样与标记粒子进行反应,所述标记粒子包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质和第一封闭剂;及

[0107] 测定对象物质相关标记信息获取工序,使在上述反应工序中获得的反应产物与基板接触,在基板上捕捉标记粒子,获取与上述测定对象物质的量相关的标记信息,所述基板包含检测区域,所述检测区域包含与上述测定对象物质或上述第一结合物质中的任一者具有结合性的第二结合物质和第二封闭剂,

[0108] 第一封闭剂和第二封闭剂彼此互不相同。

[0109] 本发明中,通过获取与测定对象位置的量相关的标记信息的测定对象物质相关标记信息获取工序,定量测定对象物质。

[0110] 关于本发明中的定量,只要是测定对象物质的量的测定,则以最广泛的概念来解释。作为测定方法的具体实施方式,可举出竞争法及夹心法,但是优选竞争法。

[0111] 作为竞争法的一例,以下对定量胆汁酸的情况进行说明。在定量除胆汁酸以外的物质的情况下,也能够以相同的方式实施。

[0112] 在竞争法中,首先,使包含胆汁酸的生物试样及抗胆汁酸抗体标记荧光粒子与固定有胆汁酸/白蛋白比为7以上且14以下的胆汁酸·白蛋白结合体的胆汁酸免疫测定用基板接触。在该生物试样中不存在胆汁酸的情况下,通过抗胆汁酸抗体标记荧光粒子和基板上的胆汁酸(即,胆汁酸·白蛋白结合体中的胆汁酸),在基板上引起抗原抗体反应。另一方面,在生物试样中存在胆汁酸的情况下,在生物试样中的胆汁酸与抗胆汁酸抗体标记荧光粒子之间引起抗原抗体反应,阻碍抗胆汁酸抗体标记荧光粒子与基板上的胆汁酸(即,胆汁酸·白蛋白结合体中的胆汁酸)之间的抗原抗体反应。在上述反应结束之后,去除未与基板上的白蛋白结合的抗胆汁酸抗体标记荧光粒子。接着,通过检测基板上的免疫复合物(即,抗胆汁酸抗体标记荧光粒子和基板上的胆汁酸·白蛋白结合体中的胆汁酸的复合物)的形成程度来作为荧光强度,能够测定生物试样中的胆汁酸的浓度等。

[0113] 竞争法中的荧光的测定方式能够采用酶标仪测定或者流量测定中的任一测定,例如,能够通过以下方法来进行测定。预先,准备多个胆汁酸浓度不同且胆汁酸量是已知的试样,并预先混合该试样及抗胆汁酸抗体标记荧光粒子。使该混合液与固定有胆汁酸·白蛋白结合体的区域接触。在混合液与结合体以特定的时间间隔接触的期间,测定来自固定有胆汁酸·白蛋白结合体的区域的荧光信号来作为多个荧光信号。根据该多个荧光信号,在各胆汁酸浓度下,求出荧光量的时间变化(斜率)。将该时间变化绘制为Y轴,且将胆汁酸浓

度绘制为X轴,使用最小二乘法等适当的拟合方法,获取胆汁酸浓度相对于荧光量的时间变化的关系式。根据如此获取的关系式,并利用使用了作为检查目标的生物试样的荧光量的时间变化的结果,能够定量生物试样中所包含的胆汁酸量。

[0114] 该胆汁酸量的定量优选在短时间内进行。具体而言,优选在10分以内进行,更优选8分以内,进一步优选在6分以内进行。优选在该定量时间中包含如下时间,即利用使用最小二乘法等适当的拟合方法预先获取的荧光量的时间变化和胆汁酸浓度的关系式,使试样及抗胆汁酸抗体标记荧光粒子与固定有胆汁酸·白蛋白结合体的检测区域接触之后,根据使用了作为检查目标的生物试样的荧光量的时间变化的结果,换算生物试样中所包含的胆汁酸量的时间。

[0115] 在夹心法中,并无特别限定,但是例如能够通过以下顺序来测定测定对象物质。使有可能包含测定对象物质的生物试样和包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质的荧光粒子在基板接触。在生物试样中存在测定对象物质的情况下,在测定对象物质、荧光粒子及基板之间产生结合反应(抗原抗体反应等)。其结果,在生物试样中存在测定对象物质的情况下,形成由与基板结合的第二结合物质、测定对象物质及具有第一结合物质的荧光粒子组成的免疫复合物。在夹心法中,在第二结合物质、测定对象物质及具有第一结合物质的荧光粒子的反应结束之后,去除未形成上述免疫复合物的、具有第一结合物质的荧光粒子,并进行清洗。接着,检测免疫复合物的形成程度来作为荧光强度,由此能够测定测定对象物质的浓度等。另外,荧光强度与测定对象物质的浓度具有、正相关关系。

[0116] (流路)

[0117] 本发明的优选的方式中,能够将混合有可能包含测定对象物质的生物试样和具有第一结合物质的标记粒子而得的混合液应用于基板上,并展开在流路上。所谓流路,只要是使生物试样和具有第一结合物质的标记粒子流下至检测区域的通道,则并无特别限制。作为优选的流路的方式,存在点加包含具有第一结合物质的标记粒子的生物试样液的点加口、作为检测区域的金属膜及超越金属膜的流路,且具有生物试样能够在金属膜上通过的结构。优选为,能够相对于金属膜,在与点加口相反的一侧设置抽吸口。

[0118] (表面等离子激元荧光测定)

[0119] 作为本发明中的荧光等标记的检测方法,并无特别限定,但是例如优选使用能够检测荧光强度的设备、具体而言使用酶标仪或用于进行利用表面等离子激元激发的荧光检测(SPF)的生物传感器等来检测荧光强度。优选,能够通过利用表面等离子激元共振的荧光检测来获取与测定对象物质的量相关的标记信息。

[0120] 另外,荧光的测定方式可以是酶标仪测定,也可以是流量测定。利用表面等离子激元激发的荧光检测法(SPF法)较利用落射激发的荧光检测法(落射荧光法),能够以高灵敏度进行测定。

[0121] 作为表面等离子激元荧光(SPF)生物传感器,例如能够使用如日本特开2008-249361号公报中记载那样的传感器,所述传感器具备:光波导,由透射规定波长的激发光的材料形成;金属膜,形成于该光波导的一表面上;光源,产生光束;光学系统,使上述光束通过光波导,并以产生表面等离子激元的入射角射入于上述光波导与金属膜的界面;及荧光检测机构,检测通过由利用上述表面等离子激元被增强的渐逝波激发而产生的荧光。

[0122] 本发明的利用使用了荧光粒子的表面等离子激元激发的荧光检测(SPF)系统优选为

检测依赖于固定于基板上的金属膜上的测定对象物质的量的来自荧光物质的荧光的测定方法,且例如为与所谓的乳胶凝集法不同的方法,所述乳胶凝集法为检测光学透明度随着溶液中的反应的进行的变化来作为浊度的方法。关于乳胶凝集法,乳胶试剂中的抗体致敏乳胶和生物试样中的抗原通过抗体反应而结合,并进行凝集。为该凝集块随着时间而增大,根据向该凝集块照射近红外光而获得的每单位时间的吸光度变化,定量抗原浓度的方法。在本发明中,与乳胶凝集法相比,能够提供一种非常简单的测定对象物质的检测方法。

[0123] (标准化)

[0124] 进而,本发明的方法可以是如下方法,该方法包含:

[0125] 标记粒子相关标记信息获取工序,获取与标记粒子的量相关的标记信息;及

[0126] 标准化工序,通过在标记粒子相关标记信息获取工序中获取的标记信息,对在获取与测定对象物质的量相关的标记信息的测定对象物质相关标记信息获取工序中获取的标记信息进行标准化。

[0127] 在此,测定使含有生物试样和包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质的标记粒子的混合液与具有检测区域(测试区域)和参考区域(控制区域)的基板接触并在检测区域和参考区域上产生表面等离子激元而被释放的荧光的强度的工序中,测定基于在检测区域上产生的表面等离子激元的荧光的强度的工序为获取与测定对象物质的量相关的标记信息的测定对象物质相关标记信息获取工序,测定基于在参考区域上产生的表面等离子激元的荧光的强度的工序为标记粒子相关标记信息获取工序。求出在该2个工序中获取的荧光强度在单位时间内的增加速度来作为荧光信号值的变化率,检测区域的信号值的变化率除以参考区域的信号值的变化率的工序为标准化工序。

[0128] 通过以下的实施例,对本发明进行进一步具体的说明,但是本发明不受实施例的限定。

[0129] 实施例

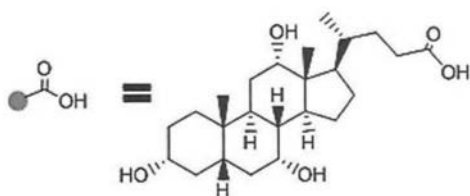
[0130] 实施例1:

[0131] (1)胆汁酸·牛血清白蛋白结合体的制备

[0132] (1-1)胆酸·牛血清白蛋白结合体的制备

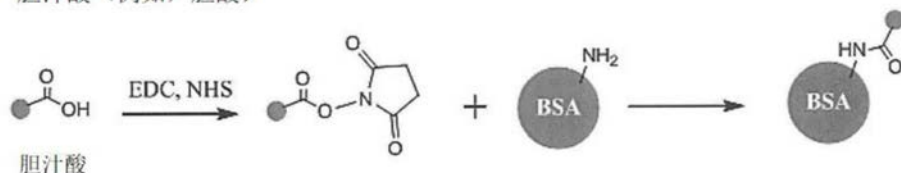
[0133] 向超级脱水二甲基甲酰胺(以下,标记为DMF。Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)1.2mL中添加胆酸(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)50mg、N-羟基琥珀酰亚胺(以下,标记为NHS。Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)67mg及1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(以下,标记为EDC。Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)110mg并进行混合,对胆酸进行了活性酯化。将该经活性酯化的胆酸滴加于溶解有作为白蛋白的1种的牛血清白蛋白(以下,标记为BSA。Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)322mg的磷酸缓冲液(以下,标记为PBS。Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)65mL的水溶液中并进行了反应。反应结束之后,使用乙腈(以下,标记为ACN。Wako Pure Chemical Industries, Ltd.制造)/水的比率为1/3的溶液1L并通过透析对反应溶液进行了提纯。在最后进行冷冻干燥,获得了白色的固体。

[0134] [化学式2]



[0135]

胆汁酸（例如，胆酸）



[0136] (1-2) 脱氧胆酸 • BSA结合体的制备

[0137] 向超级脱水DMF1.2mL中添加脱氧胆酸(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造) 50mg、NHS 67mg及EDC 110mg并进行混合,对脱氧胆酸进行了活性酯化。将该经活性酯化的脱氧胆酸滴加于溶解有BSA 322mg的PBS 65mL的水溶液中,并进行了反应。反应结束之后,使用ACN/水的比率为1/3的溶液1L并通过透析对反应溶液进行了提纯。最后进行冷冻干燥,获得了白色的固体。

[0138] (1-3) 鹅去氧胆酸 • BSA结合体的制备

[0139] 向超级脱水DMF1.2mL中添加鹅去氧胆酸(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造) 50mg、NHS 67mg及EDC 110mg并进行混合,对鹅去氧胆酸进行了活性酯化。将该经活性酯化的鹅去氧胆酸滴加于溶解有BSA 322mg的PBS 65mL的水溶液中,并进行了反应。在反应结束之后,使用ACN/水的比率为1/3的溶液1L并通过透析对反应溶液进行了提纯。最后进行冷冻干燥,获得了白色的固体。

[0140] (2) 利用MALDI-TOF-MS (基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱) 的胆汁酸/BSA标记摩尔比 (结合体的胆汁酸/白蛋白比) 的测定

[0141] (测定步骤)

[0142] 将在(1-1)至(1-3)中制备的结合体溶解于0.1质量%三氟乙酸(TFA):ACN的比率为2/1的溶液中,并调整为1mg/mL的浓度。混合该溶液1μL和基质(SA;芥子酸(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造)) 4μL,并在金板上以1μL点加了4个点。在自然干燥之后,将金板插入MALDI-TOF-MS装置(Applied Bio Systems公司的产品Voyager)中,每个点累计900个镜头,并获取了成为质量信息的数据(N=4)。使用该数据,采用与胆汁酸 • BSA结合体对应的峰值的、峰值强度的最大值的50%强度处的分子量中心值来作为BSA结合体的峰值,并将从该峰值垂直下垂的位置视作胆汁酸 • BSA结合体的分子量,取N=4的平均值,以(胆汁酸 • BSA结合体的分子量-天然(native)BSA的分子量)/胆汁酸的分子量(例如,在胆酸的情况下为408-18=390)计算出胆汁酸相对于BSA的结合数。将所获得的结合体的胆汁酸/BSA比示于表1中。

[0143] [表1]

[0144]

结合体	胆汁酸 • BSA结合体	胆汁酸/BSA摩尔比
结合体-1	胆酸 • BSA	13

结合体-2	脱氧胆酸 • BSA	13
结合体-3	鹅去氧胆酸 • BSA	13

[0145] (3) 产生相对于胆酸的抗体、相对于脱氧胆酸的抗体、或相对于鹅去氧胆酸的抗体的杂交瘤的制作、以及抗体产生

[0146] (3-1) 免疫原

[0147] 使用了在上述制作的各2mg胆酸 • BSA结合体、脱氧胆酸 • BSA结合体及鹅去氧胆酸 • BSA结合体来作为小鼠免疫致敏的免疫原。

[0148] (3-2) 杂交瘤的制备

[0149] 作为小鼠免疫致敏的免疫原,使用了胆酸 • BSA结合体。

[0150] 将第一次免疫设为100 μ g/只的量,将第2次以后的免疫设为50 μ g/只的量,在小鼠背部皮下施用胆酸 • BSA结合体并进行了免疫。在免疫中,第一次施用与完全佐剂(CFA)混合而得的乳剂,在第2次~第4次的免疫中施用了与不完全佐剂(IFA)混合而得的乳剂。以2周间隔进行了4次免疫。另外,第3次、第4次免疫的第二周进行采血,使用采血清100 μ L并通过ELISA测定来进行了抗体效价的测定。确认抗体效价为目标值,将第4次免疫起2周后的免疫作为最终免疫,用磷酸缓冲液(PBS,Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造,pH7.1~7.3)1mL稀释溶解作为抗原的结合体,以施用于小鼠的腹腔内的形式进行。施用3天后摘除了小鼠的脾脏。

[0151] 以7:1的细胞数的比例混合从小鼠摘除的脾脏细胞和突变株骨髓瘤细胞(骨髓瘤:P3-X63-Ag8-U1)之后,添加聚乙二醇(PEG),在离心分离后漂浮于培养基(RPMI-1640(罗斯威尔帕克纪念研究所培养基:Roswell Park Memorial Institute Medium)+10质量%胎牛血清(Fetal Bovine Serum:FBS))。将该漂浮的脾脏细胞接种到96孔板,以使细胞数量成为 1.0×10^5 (细胞/孔)。第二天,添加HAT培养基(次黄嘌呤 • 氨基蝶呤 • 胸苷培养基),用抗体测定系统的ELISA对所增殖的杂交瘤的培养上清液进行了筛选。用PBS稀释作为测定用抗原的胆酸 • BSA结合体以使成为500ng/mL,添加到ELISA的杯中并静置,将测定用抗原固定于杯的底部,并去除了上清液。作为针对成为测定对象的脾脏细胞所产生的抗体的二次抗体,使用了抗小鼠IgG HRP标记抗体。IgG表示免疫球蛋白G,HRP表示辣根过氧化物酶。使用24孔板培养根据ELISA的结果呈阳性的孔,采集了各1mL的培养上清液。用相同的抗体测定系统的ELISA再次进行了二次筛选。在细胞融合时的同一个孔中,选择ELISA信号高的前6个孔而放入小瓶中。

[0152] 使用包含10质量%的FBS的基础培养基RPMI1640,对每一个小瓶中的细胞进行有限稀释而制备了稀释物。用移液管向6个96孔板的每一个孔中添加了一滴稀释物。通过显微镜对每一个孔进行观察,确认到每一个孔中的细胞为单细胞。培养3周之后,以与上述相同的方式,通过抗体测定系统的ELISA对增殖的杂交瘤的培养上清液进行了筛选。选择ELISA信号高的前10个孔,结束了杂交瘤的制备。关于所获得的抗体的亚类的确定,使用了Isotyping kit(Roche公司制造)。

[0153] (3-3) 利用小鼠腹水法的抗体的产生

[0154] 进一步以相同的方式,对所选择的10个孔的细胞进行ELISA筛选,对于信号高的前1个孔的细胞,通过小鼠腹水法(使用2只小鼠)制作了抗体。将所获得的抗体称为抗胆酸抗体-1。

[0155] (3-4) 针对月脱氧胆酸的抗体及针对鹅去氧胆酸的抗体的制备

[0156] 针对脱氧胆酸的抗体及针对鹅去氧胆酸的抗体的制备也以与上述相同的方式进行。将所获得抗体分别称为抗脱氧胆酸抗体-1及抗鹅去氧胆酸抗体-1。

[0157] (3-5) 抗体的亚类和抗体产生量

[0158] 将在上述制备的抗体的亚类和抗体产生量示于表2中。

[0159] [表2]

[0160] 亚类和产生抗体量

[0161]	抗体	亚类	利用小鼠腹水法的抗体产生量 (2 只小鼠)
	抗胆酸抗体-1	IgG1	10. 0mg
	抗脱氧胆酸抗体-1	IgG1	28. 7mg
	抗鹅去氧胆酸抗体-1	IgG1	30. 4mg

[0162] (4) 抗小鼠抗体的制作

[0163] 准备源自小鼠的球蛋白 (LAMPIRE Biological Laboratories公司制造, 目录编号 7404302, 小鼠 γ -球蛋白盐析法 (Mouse Gamma Globulin Salt Fractionation), 500mg), 通过第1次施用与完全弗氏佐剂 (CFA) 混合而得的乳剂, 且在第2次~第4次的免疫中施用与不完全佐剂 (IFA) 混合而得的乳剂的方法, 对于对山羊的免疫致敏 (皮下免疫) 以2周间隔进行了4次免疫。然后, 进行ELISA测定并确认抗体效价的上升之后, 进行全血采集, 通过离心分离获得了抗血清。然后, 通过ProteinA柱 (Thermo scientific公司制造的Pierce ProteinA Columns, 目录编号为20356) 进行提纯, 从而获取了目标抗小鼠抗体。

[0164] (5) 抗CRP抗体的制作

[0165] 准备rCRP抗原 (重组CRP: 由Oriental Yeast Co., Ltd. 制造, 产品编号47191000, 5mg), 通过第1次施用与完全佐剂 (CFA) 混合而得的乳剂, 且在第2次~第4次的免疫中施用与不完全佐剂 (IFA) 混合而得的乳剂的方法, 对于对小鼠的免疫致敏 (皮下免疫) 以2周间隔进行了4次免疫。然后, 进行ELISA测定并确认抗体效价的上升之后, 进行全血采集, 通过离心分离获得了抗血清。然后, 通过ProteinA柱 (Thermo scientific公司制造的Pierce ProteinA Columns, 目录编号为20356) 进行提纯, 从而获取了目标抗CRP抗体-1。

[0166] (6) 用抗胆汁酸抗体标记的荧光粒子的制备

[0167] (6-1) 用抗CRP抗体-1封闭的荧光粒子1的制备

[0168] 以如下方式制备了用抗CRP抗体-1封闭的荧光粒子

[0169] 在2质量% (固体成分浓度) 荧光乳胶粒子水溶液 (Invitrogen公司制造, 平均粒径 200nm) 357 μ L中, 添加50mmol/L的MES (2-吗啉乙磺酸 (2-Morpholinoethanesulfonic acid)) 缓冲液 (pH6.0) 溶液282 μ L, 并添加5mg/mL的抗胆酸抗体-1 (在上述制作的) 5.3 μ L、5mg/mL的抗脱氧胆酸抗体-1 (在上述制作的) 5.3 μ L、5mg/mL的抗鹅去氧胆酸抗体-1 (在上述制作的) 6.9 μ L及5mg/mL的抗CRP抗体-1 (在上述制作的) 75.5 μ L, 在室温下搅拌了15分钟。然后, 添加10mg/mL的EDC水溶液7.5 μ L, 在室温下搅拌了1.5小时。添加2mol/L的甘氨酸 (Glycine) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造) 水溶液37.5 μ L并搅拌15分钟之后, 进行离心分离 (15,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15分), 使荧光乳胶粒子沉淀, rpm表示每分钟转速

(revolution per minute), 为 $1\text{rpm}=1\text{min}^{-1}$ 。然后, 去除上清液, 添加PBS (pH7.4) 750 μL , 通过超声波清洗机使荧光乳胶粒子再分散。再次进行离心分离 (15,000rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 15分) 并去除上清液之后, 添加PBS (pH7.4) 750 μL , 使荧光乳胶粒子再分散, 由此制备了结合有3种抗胆汁酸抗体和抗CRP抗体的荧光粒子1的1质量%溶液。

[0170] (6-2) 用BSA封闭的荧光粒子2的制备

[0171] 以如下方式制备了用BSA封闭的荧光粒子。

[0172] 在2质量% (固体成分浓度) 荧光乳胶粒子水溶液 (Invitrogen公司制造, 平均粒径200nm) 357 μL 中, 添加50mmol/L的MES缓冲液 (pH6.0) 溶液282 μL , 并添加5mg/mL的抗胆酸抗体-1 (在上述制作的) 51.2 μL 、5mg/mL的抗脱氧胆酸抗体-1 (在上述制作的) 66.6 μL 及5mg/mL的抗鹅去氧胆酸抗体-1 (在上述制作的) 83.4 μL , 在室温下搅拌了15分钟。然后, 添加10mg/mL的EDC水溶液7.5 μL , 在室温下搅拌了1.5小时。添加2mol/L的甘氨酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造) 水溶液37.5 μL 并搅拌15分钟之后, 进行离心分离 (15,000rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 15分), 使荧光乳胶粒子沉淀, rpm表示每分钟转速 (revolution per minute), 为 $1\text{rpm}=1\text{min}^{-1}$ 。然后, 去除上清液, 添加PBS溶液 (pH7.4) 750 μL , 通过超声波清洗机使荧光乳胶粒子再分散。再次进行离心分离 (15,000rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 15分) 并去除上清液之后, 添加包含1质量%BSA的PBS (pH7.4) 750 μL , 使荧光乳胶粒子再分散, 由此制备了用BSA封闭的荧光粒子2的1质量%溶液。

[0173] (7) 基板的制作

[0174] 准备了聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 的基板 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD. 制造, ACRYPET (注册商标) VH)。通过磁控溅射法, 在检测区域和参考区域这两处, 分别以单面宽度成为4mm, 且长度成为3mm的方式制作厚度为45nm的金膜, 并将其用作用于构成基板的芯片。在该芯片的检测区域的金膜表面上, 点加以含有比率 (以质量比计为1:1:1) 包含结合体-1、结合体-2及结合体-3的液 (浓度: 在50mmol/L的MES缓冲液 (pH6、150mmol/L NaCl) 中为50 $\mu\text{g/mL}$) 及包含作为封闭剂的BSA (150mg) 的液, 并进行干燥, 从而制作了多个固定有3种结合体的基板1。并且, 在各基板的参考区域中, 点加包含在 (4) 中制作的抗小鼠抗体的液 (浓度: 在50mmol/L的MES缓冲液 (pH6、150mmol/L NaCl) 中为50 $\mu\text{g/mL}$), 并进行了干燥。并且, 还以相同的方式制作了使用了抗CRP抗体-1 (150mg) 作为封闭剂的基板。

[0175] 在将如此制备的3种多个基板用作传感器芯片的流路之前, 使用预先制备的清洗用溶液 (包含0.05质量%Tween20 (聚氧乙烯 (20) 脱水山梨糖醇单月桂酸酯, Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造) 的PBS (pH7.4)) 300 μL , 反复清洗了3次。

[0176] (8) 流路型传感器芯片的制作

[0177] 以成为日本特开2010-190880号公报的第2实施方式的构成的方式, 制作了流路型传感器芯片。将其示意图示于图1及图2。图1为传感器芯片1的示意图, 图2为传感器芯片1的分解图。传感器芯片1由上部部件2、中间部件3及基板4构成。在上部部件2设置有第一容器5及第二容器6。另外, 将第一容器5及第二容器6统称为容器组7。在基板4上形成有流路10, 在流路10上形成有检测区域8及参考区域9。

[0178] (9) 利用大型机器 (现有的胆汁酸测定试剂) 的测定

[0179] 在免疫测定中, 通过作为由本领域技术人员广泛使用的大型机器的日立自动分析装置7170, 根据操作说明书, 测定胆汁酸的量为已知的试样, 获得了胆汁酸的测定值。

[0180] (10) 使用了荧光粒子的胆汁酸的免疫测定

[0181] 在25℃的环境下进行了实验准备。在其2小时之后,在包含在(6-1)及(6-2)中制备的荧光粒子1或荧光粒子2的杯中,预先经10分钟对在(9)中测定出的胆汁酸的量为已知的试样一边进行搅拌一边进行了混合。接着,分别点加在密封有在(7)中制作的基板1的流路型传感器芯片。点加之后,一边进行泵抽吸一边使混合液以10μL/分的速度流下,并与固定有胆汁酸・BSA结合体的金膜表面上接触之后持续1.5分钟而测定了荧光强度。求出在各基板中获得的检测区域和参考区域各自的荧光强度在单位时间内的增加速度来作为荧光信号值,并将检测区域的信号值除以参考区域的信号值,由此进行了标准化。并且,准备胆汁酸浓度为0的试样,并以相同的方式,进行荧光信号值的标准化,并由没有胆汁酸的试样进行了信号值的标准化。

[0182] (11) 校准曲线的制作

[0183] 通过求出对于在(10)中求出的胆汁酸的量为已知的试样进行标准化而得的荧光信号值与在(9)中求出的利用大型机器的测定值的对应关系,对于使用了在(1-1)至(1-3)中制备的、胆汁酸・BSA结合体-1~3的基板,分别制作了校准曲线。

[0184] (12) 胆汁酸的量为未知的试样的测定结果

[0185] 从KITAYAMA LABES CO.,LTD.获得狗的血清1~4,并以如表3所示的荧光粒子和基板的组合分别进行实验,使用在(11)中制作的校准曲线获得了胆汁酸的测定值。并且,关于上述血清1~4,使用大型机器求出了胆汁酸的测定值。

[0186] 以大型机器的测定值为基准,通过以下的计算公式1计算测定值从该值偏离了多少,并将结果汇总于表3中。

[0187] 与大型机器的偏差幅度%的计算公式

[0188] [数式1]

[0189] (计算公式1)

$$[0190] \quad \frac{\left| (\text{大型机器 胆汁酸测定值}) - (\text{本发明 胆汁酸测定值}) \right|}{(\text{大型机器 胆汁酸测定值})} \times 100$$

[0191] [表3]

[0192]

受检体	荧光粒子的种类	荧光乳胶粒子的封闭剂	基板的封闭剂	大型机器胆汁酸测定值	本发明胆汁酸测定值	与大型机器的偏差幅度	备注
1	1	抗 CRP 抗体	BSA	12.00	12.06	0.5%	实施例 1
2	1	抗 CRP 抗体	BSA	10.00	10.03	0.3%	实施例 2
3	1	抗 CRP 抗体	BSA	20.00	20.06	0.3%	实施例 3
4	1	抗 CRP 抗体	BSA	25.00	25.20	0.8%	实施例 4
5	1	抗 CRP 抗体	BSA	50.00	50.50	1.0%	实施例 5
6	1	抗 CRP 抗体	BSA	15.09	15.00	0.6%	实施例 6
7	1	抗 CRP 抗体	BSA	80.55	80.00	0.7%	实施例 7
8	1	抗 CRP 抗体	BSA	30.03	30.00	0.1%	实施例 8
1	2	BSA	BSA	12.00	12.07	0.6%	比较例 1
2	2	BSA	BSA	12.00	12.02	0.2%	比较例 2
3	2	BSA	BSA	10.00	14.50	45%	比较例 3
4	2	BSA	BSA	20.00	22.00	11%	比较例 4
5	2	BSA	BSA	8.00	8.07	0.9%	比较例 5
6	2	BSA	BSA	60.00	60.25	0.4%	比较例 6
7	2	BSA	BSA	14.00	18.27	31%	比较例 7
8	2	BSA	BSA	50.00	50.60	1.2%	比较例 8
1	2	BSA	抗 CRP 抗体	12.00	11.98	0.2%	实施例 9
2	2	BSA	抗 CRP 抗体	12.00	12.01	0.1%	实施例 10
3	2	BSA	抗 CRP 抗体	10.00	10.09	0.9%	实施例 11
4	2	BSA	抗 CRP 抗体	20.00	20.11	0.5%	实施例 12
5	2	BSA	抗 CRP 抗体	8.00	8.05	0.6%	实施例 13
6	2	BSA	抗 CRP 抗体	60.00	60.14	0.2%	实施例 14
7	2	BSA	抗 CRP 抗体	14.00	14.14	1.0%	实施例 15
8	2	BSA	抗 CRP 抗体	50.00	50.32	0.6%	实施例 16

[0193] 根据表3的结果可知,在基板上的金膜(固相)上的封闭剂与具有标记的粒子上的封闭剂不同的情况下,在所有受检体中,能够以正常的值进行测定,并确认到本发明的效果。

[0194] 实施例2:

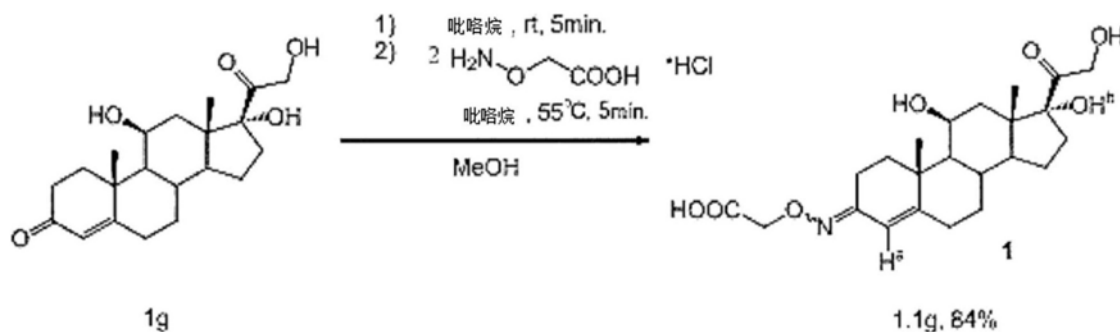
[0195] (1) 皮质醇的衍生物的合成

[0196] 根据文献(STEROIDS,1974,Jan.49-64),使皮质醇烯胺(enamine)化,并与羟基胺

衍生物进行反应,由此进行了皮质醇的甾衍生物-1的合成。

[0197] [化学式3]

[0198]

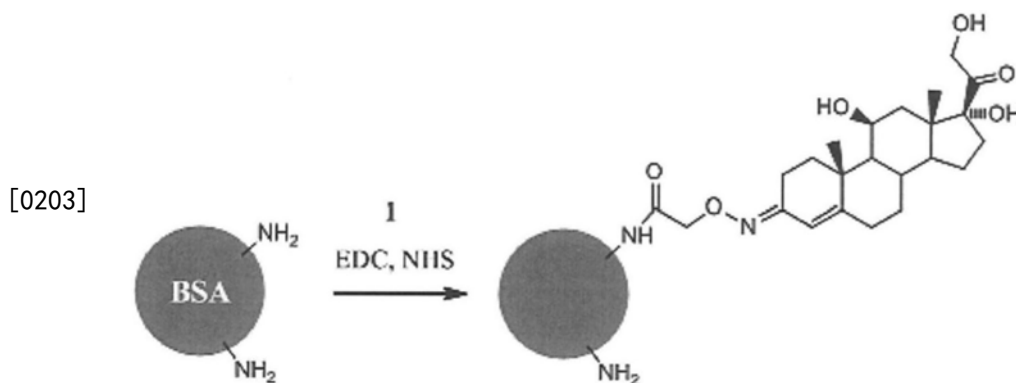


[0199] 对皮质醇(1g)的甲醇悬浮液滴加1当量的吡咯烷,在室温下搅拌了5分钟。在反应系统中产生烯胺,溶液变成了红色。然后,若再添加1当量的吡咯烷及羟基胺衍生物(NH₂-O-CH₂-COOH)(0.35g),则进行脱色,在55℃的反应温度下进行了搅拌、腓化。反应顺利进行,从而获得了皮质醇的甾衍生物-1(1.1g:84%)。

[0200] (2) 皮质醇-BSA结合体的制备

[0201] 使用在上述合成的皮质醇的甾衍生物-1,并以以下方法制备了皮质醇-BSA结合体-1。

[0202] [化学式4]



[0204] 使用甾衍生物-1(50mg,115μmol)、过量的NHS及WSC(水溶性碳化二亚胺:water soluble carbodiimide),对干燥DMF进行了活性酯化。然后,滴加到BSA(193mg)的PBS溶液中。反应结束后,在乙腈/水=1/1(含有0.1%TFA)溶液中(5L)对反应溶液进行了透析提纯。最后,进行冷冻干燥,从而获得了皮质醇-BSA结合体-1的白色固体。

[0205] (3) 皮质醇与BSA的摩尔比的测定

[0206] 将在(2)中制备的皮质醇-BSA结合体-1溶解于0.1质量%TFA:乙腈=2/1的溶液中,并调整为1mg/mL的浓度。混合该溶液1μL和基质(SA;芥子酸)4μL,并在金板上点加了1μL×4。在自然干燥之后,将金板插入MALDI-TOF-MS装置(Applied Bio Systems公司的产品Voyager)中,每个点累计900个镜头,并获取了成为质量信息的数据(N=4)。使用该数据,采用与皮质醇-BSA结合体-1对应的峰值的、峰值强度的最大值的50%强度处的分子量中心值来作为BSA结合体的峰值,并将该峰值垂直下垂的位置视作皮质醇-BSA结合体-1的分子量,取N=4的平均值,以(皮质醇-BSA结合体-1的分子量-天然BSA的分子量)/皮质醇的分子量(例如,在皮质醇的情况下为435-18=417)计算出皮质醇相对于BSA的结合数。将所获

得的结合体的皮质醇/BSA比示于表4中。

[0207] [表4]

[0208]

皮质醇-BSA结合体	皮质醇/BSA摩尔比
皮质醇-BSA结合体-1	11

[0209] (4) 抗体产生杂交瘤及皮质醇单克隆抗体-1的制作

[0210] 作为免疫致敏的抗原,使用了皮质醇-BSA结合体-1。使用皮质醇-BSA结合体-1来作为小鼠免疫致敏抗原,将第1次免疫设为100 μ g/只的量,将第2次以后的免疫设为50 μ g/只的量,经数次,在小鼠背部皮下施用结合体并进行了免疫。在该免疫中,第1次施用与完全佐剂(CFA)混合而得的乳剂,在第2次~第4次的免疫中施用了与不完全佐剂(IFA)混合而得的乳剂。以2周间隔进行了4次免疫。另外,第3次、第4次免疫的第二周进行采血,对于采血血清100 μ L通过ELISA测定实施了抗体效价的测定。确认抗体效价为目标值,将第4次免疫起2周后的免疫作为最终免疫,用磷酸缓冲液(PBS,Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造,pH7.1~7.3)1mL稀释溶解作为抗原的结合体,以施用于小鼠的腹腔内的形式进行。施用3天后摘除了小鼠的脾脏。。

[0211] 以7:1的比例混合从小鼠摘除的脾脏细胞和突变株骨髓瘤细胞(骨髓瘤:P3-X63-Ag8-U1)之后,添加聚乙二醇(PEG),在离心分离后漂浮于培养基(RPMI-1640+10质量% FBS)。将该漂浮的脾脏细胞接种到96孔板,以使细胞数量成为 1.0×10^5 (细胞/孔)。第二天,添加HAT培养基,用抗体测定系统的ELISA对所增殖的杂交瘤的培养上清液进行了筛选。用PBS溶液稀释测定用抗原以使成为500ng/mL,添加到ELISA的杯中并静置,将测定用抗原固定于杯的底部,并去除了上清液。作为针对成为测定对象的脾脏细胞所产生的抗体的二次抗体,使用了抗小鼠IgG HRP(辣根过氧化物酶:horseradish peroxidase)标记抗体。使用24孔板培养根据ELISA的结果呈阳性的孔,采集了各1mL的培养上清液。用相同的抗体测定系统的ELISA再次进行了二次筛选。在细胞融合时的同一个孔中,选择ELISA信号高的上位的前6个孔而放入小瓶中。

[0212] 使用包含10质量%的胎牛血清(Fetal Bovine Serum:FBS)的基础培养基RPMI1640(罗斯威尔帕克纪念研究所培养基:Roswell Park Memorial Institute Medium),对每一个小瓶中的细胞进行有限稀释,用移液管向6个96孔板的每一个孔中添加了一滴,通过显微镜对每一个孔进行观察,确认到每一个孔中的细胞为单细胞。培养3周之后,以与上述相同的方式,通过抗体测定系统的ELISA对增殖的杂交瘤的培养上清液进行了筛选。选择ELISA信号高的前10个孔,结束了杂交瘤的制备。关于所获得的抗体的亚类的确定,使用了Isotyping kit(Roche公司制造)。

[0213] 进一步以相同的方式,对所选择的15个孔的细胞进行ELISA筛选,对于信号高的前1个孔的细胞,通过小鼠腹水法(使用2只小鼠)制作了抗体。

[0214] 将在上述制备的抗体的亚类和抗体产生量示于表5中。

[0215] [表5]

[0216] 杂交瘤细胞和产生抗体量

[0217]

抗体	亚类	利用小鼠腹水法的抗体产生量 (2 只小鼠)
皮质醇单克隆抗体-1	IgG1	10.0mg

[0218] (5) 抗小鼠抗体-1的制作

[0219] 准备源自小鼠的球蛋白 (LAMPIRE Biological Laboratories 公司制造, 目录编号 7404302, 小鼠 γ -球蛋白盐析法 (Mouse Gamma Globulin Salt Fractionation), 500mg), 通过第1次施用与完全弗氏佐剂 (CFA) 混合而得的乳剂, 且在第2次~第4次的免疫中施用与不完全弗氏佐剂 (IFA) 混合而得的乳剂的方法, 对于对兔子的免疫致敏 (皮下免疫) 以2周间隔进行了4次免疫。然后, 进行ELISA测定并确认抗体效价的上升之后, 进行全血采集, 通过离心分离获得了抗血清。然后, 通过ProteinA柱 (Thermo scientific 公司制造的Pierce ProteinA Columns, 目录编号为20356) 进行提纯, 从而获取了目标抗小鼠抗体-1。

[0220] (6) 抗CRP抗体-1的制作

[0221] 准备rCRP抗原 (重组CRP: 由Oriental Yeast Co., Ltd. 制造, 产品编号47191000, 5mg), 通过第1次施用与完全佐剂 (CFA) 混合而得的乳剂, 且在第2次~第4次的免疫中施用与不完全佐剂 (IFA) 混合而得的乳剂的方法, 对于对小鼠的免疫致敏 (皮下免疫) 以2周间隔进行了4次免疫。然后, 进行ELISA测定并确认抗体效价的上升之后, 进行全血采集, 通过离心分离获得了抗血清。然后, 通过ProteinA柱 (Thermo scientific 公司制造的Pierce ProteinA Columns, 目录编号为20356) 进行提纯, 从而获取了目标抗CRP抗体-1。

[0222] (7) 荧光粒子的制备

[0223] (7-1) 用抗CRP抗体-1封闭的荧光粒子-1的制备

[0224] 以如下方式制备了用抗CRP抗体-1封闭的荧光粒子。

[0225] 在2质量% (固体成分浓度) 荧光乳胶粒子水溶液 (Invitrogen 公司制造, 平均粒径 200nm) 357 μ L 中, 添加50mM的MES缓冲液 (pH6.0) 溶液282 μ L, 并添加在上述 (4) 中制备的5mg/mL的皮质醇单克隆抗体-1的溶液15 μ L及5mg/mL的CRP抗体-1的溶液75.5 μ L, 在室温下搅拌了15分钟。然后, 添加10mg/mL的1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 水溶液7.5 μ L, 在室温下搅拌了1.5小时。添加2mol/L的甘氨酸 (Glycine: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造) 水溶液37.5 μ L并搅拌15分钟之后, 进行离心分离 (15,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15分), 使荧光乳胶粒子沉淀。然后, 去除上清液, 添加PBS溶液 (pH7.4) 750 μ L, 通过超声波清洗机使荧光乳胶粒子再分散。再次进行离心分离 (15,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15分) 并去除上清液之后, 添加PBS (pH7.4) 750 μ L, 使荧光乳胶粒子再分散, 由此制备了用抗CRP抗体封闭的抗皮质醇抗体结合荧光乳胶粒子 (荧光粒子-1) 的1质量%溶液。

[0226] (7-2) 用BSA封闭的荧光粒子-2的制备

[0227] 以如下方式制备了用作比较例的用BSA封闭的荧光粒子。

[0228] 在2质量% (固体成分浓度) 荧光乳胶粒子水溶液 (Invitrogen 公司制造, 平均粒径 200nm) 357 μ L 中, 添加50mM的MES缓冲液 (pH6.0) 溶液282 μ L, 并添加在上述 (4) 中制备的5mg/mL的皮质醇单克隆抗体-1的溶液15 μ L及5mg/mL的BSA的溶液150 μ L, 在室温下搅拌了15分钟。然后, 添加10mg/mL的EDC水溶液7.5 μ L, 在室温下搅拌了1.5小时。添加2mol/L的甘氨酸 (Glycine: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造) 水溶液37.5 μ L并搅拌15分钟之后,

进行离心分离(15,000rpm,4℃,15分),使荧光乳胶粒子沉淀。然后,去除上清液,添加PBS溶液(pH7.4)750μL,通过超声波清洗机使荧光乳胶粒子再分散。再次进行离心分离(15,000rpm,4℃,15分)并去除上清液之后,添加包含1质量%BSA的PBS(pH7.4)溶液750μL,使荧光乳胶粒子再分散,由此制备了用抗BSA抗体封闭的3种抗皮质醇抗体结合荧光乳胶粒子(荧光粒子-2)的1质量%溶液。

[0229] (8)流路型传感器芯片的制作

[0230] 准备聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)的基板(MITSUBISHI RAYON CO.,LTD.制造,ACRYPET VH),通过磁控溅射法,在检测区域和参考区域这两处,分别以单面宽度成为4mm,且长度成为3mm的方式制作厚度为45nm的金膜,并制作了用于构成基板的芯片。在该芯片的检测区域的金膜表面上,点加包含在(2)中制备的皮质醇-BSA结合体-1(浓度:在50mM的MES缓冲液(pH6、150mM NaCl)中为50μg/mL)及作为封闭剂的BSA(2mg)的液,并进行干燥,由此制作了多个基板1。并且,在各基板的参考区域中,点加包含在(5)中制作的抗小鼠抗体-1的液(浓度:50μg/mL in 50mM MES缓冲液pH6,150mM NaCl)(浓度:在50mM的MES缓冲液(pH6、150mM NaCl)中为50μg/mL),并进行了干燥。并且,还以相同的方式制作了使用了作为封闭剂的抗CRP抗体-1(2mg)的基板。

[0231] 然后,以与实施例1相同的方式,将基板进行清洗,并密封在流路中而制作了流路型传感器芯片。将其示意图示于图1及图2中。

[0232] (9)利用大型机器(现有的皮质醇测定试剂)的测定

[0233] 在免疫测定中,通过作为由本领域技术人员广泛使用的大型机器的Siemens AG制造的IMMULYZE1000,根据操作说明书,测定皮质醇的量为已知的试样,获得了皮质醇的测定值。

[0234] (10)使用了荧光粒子的皮质醇的免疫测定

[0235] 在25℃的环境下进行了实验准备,其2小时之后,在包含在(7-1)中制备的乳胶粒子-1或(7-2)中制备的乳胶粒子-2的杯中,分别预先经10分钟对在(9)中测定出的皮质醇的量为已知的试样一边进行搅拌一边进行了混合。接着,分别点加到密封有在(8)中制作的基板1的流路型传感器芯片。点加之后,一边进行泵抽吸一边使混合液以10μL/min的速度流下,并与固定有皮质醇-BSA结合体-1的金膜表面上接触之后持续1.5分钟而测定了荧光强度。求出在各基板中获得的检测区域和参考区域各自的荧光强度在单位时间内的增加速度来作为荧光信号值,并将检测区域的信号值除以参考区域的信号值,由此进行了标准化。并且,准备皮质醇浓度为0的试样,并以相同的方式,进行荧光信号值的标准化,并由不包含皮质醇的试样进行了信号值的标准化。

[0236] (11)校准曲线的制作

[0237] 通过求出对于在(10)中求出的皮质醇的量为已知的试样进行标准化而得的荧光信号值与在(9)中求出的利用大型机器的测定值的对应关系,对于使用了在(2)中制备的、皮质醇-BSA结合体-1的基板,分别制作了校准曲线。

[0238] (12)皮质醇量为未知的试样的测定结果

[0239] 从KITAYAMA LABES CO.,LTD.获得作为受检体的狗的血清1~8,并以如表4所示的荧光粒子和基板的组合分别进行实验,求出了使用在(11)中求出的校准曲线获得的皮质醇的测定值和使用大型机器获得的皮质醇的测定值。

[0240] 以大型机器的测定值为基准,通过以下的计算公式2计算测定值从该值偏离了多少,并将结果汇总于表6中。

[0241] 与大型机器的偏差幅度%的计算公式

[0242] [数式2]

[0243] (计算公式2)

[0244]

$$\frac{(\text{大型机器 皮质醇测定值}) - (\text{本发明 皮质醇测定值})}{(\text{大型机器 皮质醇测定值})} \times 100$$

[0245] [表6]

[0246]

受检体	荧光粒子的种类	荧光乳胶粒子的封闭剂	基板的封闭剂	大型机器皮质醇测定值	本发明皮质醇测定值	与大型机器的偏差幅度	备注
1	1	抗 CRP 抗体	BSA	20.00	19.86	0.7%	实施例 1
2	1	抗 CRP 抗体	BSA	25.00	24.86	0.6%	实施例 2
3	1	抗 CRP 抗体	BSA	10.00	9.98	0.2%	实施例 3
4	1	抗 CRP 抗体	BSA	20.00	19.96	0.2%	实施例 4
5	1	抗 CRP 抗体	BSA	8.00	8.11	1.4%	实施例 5
6	1	抗 CRP 抗体	BSA	16.00	16.04	0.3%	实施例 6
7	1	抗 CRP 抗体	BSA	12.00	12.10	0.8%	实施例 7
8	1	抗 CRP 抗体	BSA	15.00	15.07	0.5%	实施例 8
1	2	BSA	BSA	8.00	8.42	5.3%	比较例 1
2	2	BSA	BSA	17.00	17.10	0.6%	比较例 2
3	2	BSA	BSA	11.00	18.15	65%	比较例 3
4	2	BSA	BSA	8.00	10.00	25%	比较例 4
5	2	BSA	BSA	4.00	4.02	0.4%	比较例 5
6	2	BSA	BSA	25.00	25.17	0.7%	比较例 6
7	2	BSA	BSA	20.00	28.90	45%	比较例 7
8	2	BSA	BSA	12.26	12.00	2.1%	比较例 8
1	2	BSA	抗 CRP 抗体	8.00	8.14	1.8%	实施例 9
2	2	BSA	抗 CRP 抗体	17.00	17.05	0.3%	实施例 10
3	2	BSA	抗 CRP 抗体	11.00	11.12	1.1%	实施例 11
4	2	BSA	抗 CRP 抗体	8.00	8.13	1.6%	实施例 12
5	2	BSA	抗 CRP 抗体	4.00	4.05	1.3%	实施例 13
6	2	BSA	抗 CRP 抗体	25.00	24.89	0.4%	实施例 14
7	2	BSA	抗 CRP 抗体	20.00	20.21	1.1%	实施例 15
8	2	BSA	抗 CRP 抗体	12.26	12.31	0.4%	实施例 16

[0247] 根据表6的结果可知,在基板上的金膜(固相)上的封闭剂与具有标记的粒子上的封闭剂不同的情况下,在所有受检体中,能够以正常的值进行测定,并确认到本发明的效果。

[0248] 符号说明

[0249] 1-传感器芯片,2-上部部件,3-中间部件,4-基板,5-第一容器,6-第二容器,7-容器组,8-检测区域,9-参考区域,10-流路。

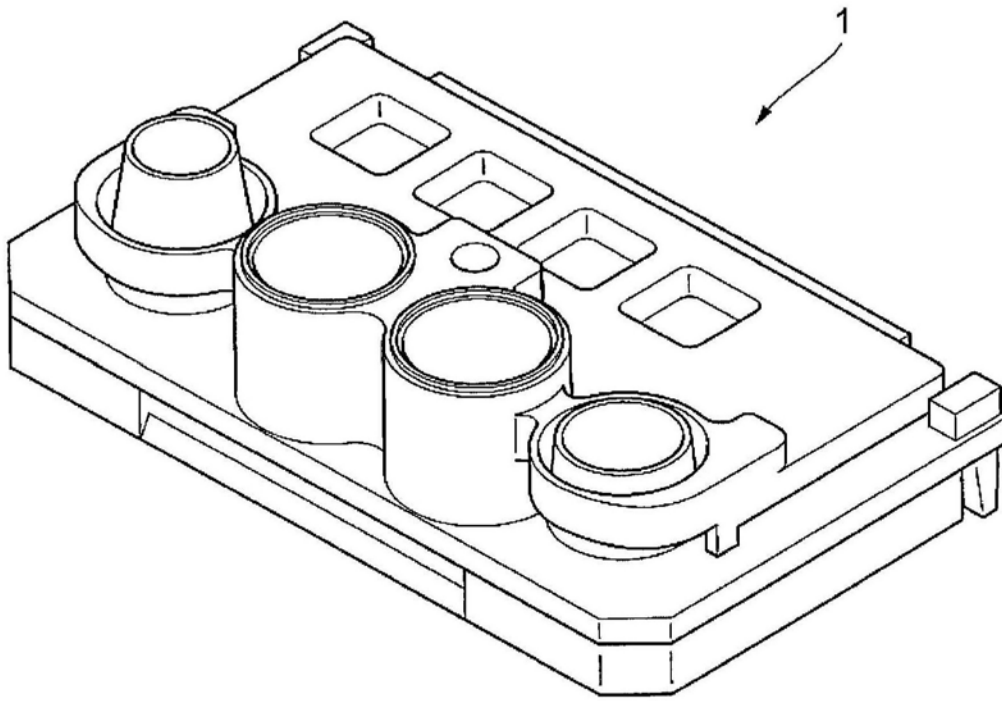


图1

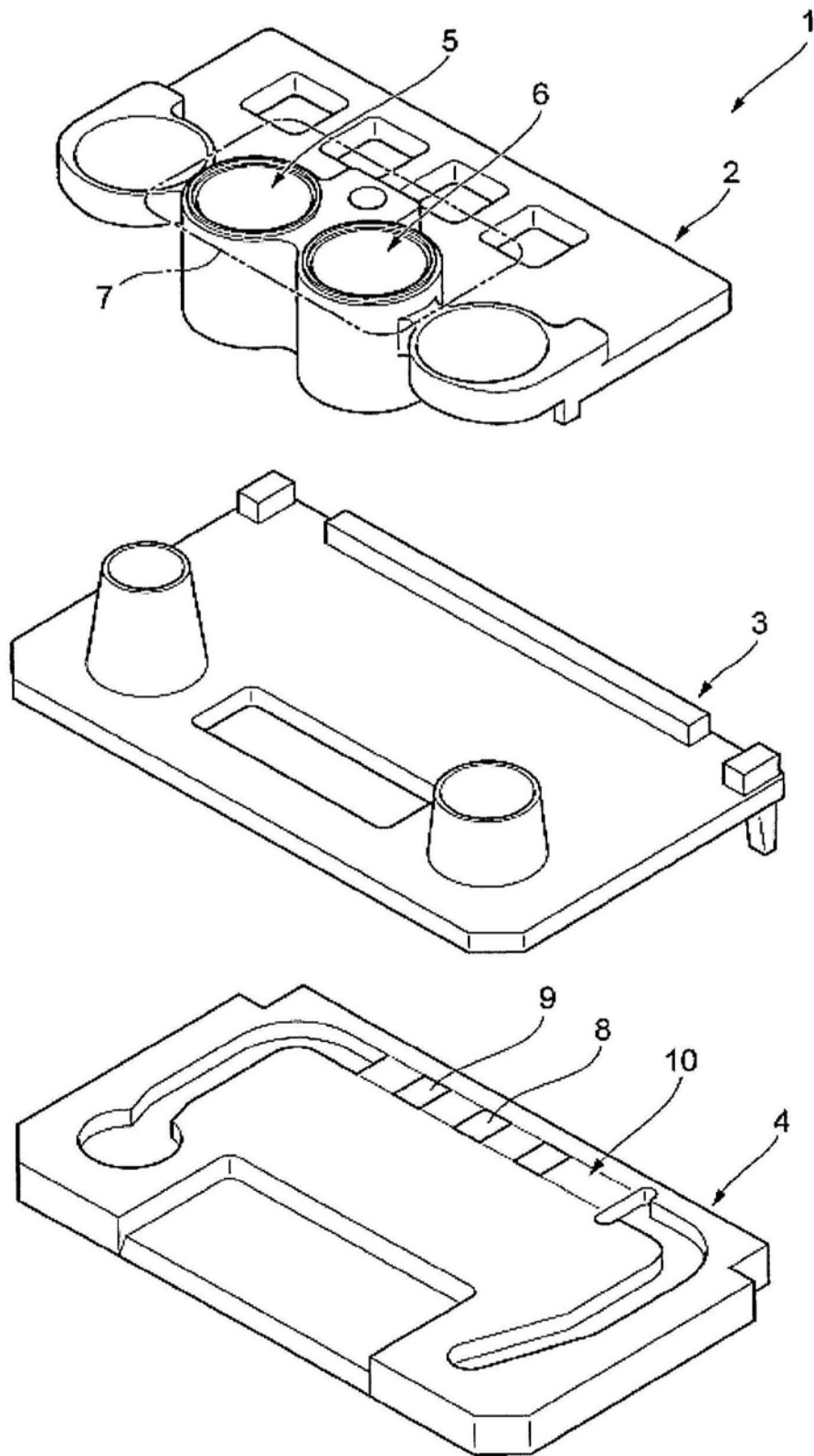


图2

专利名称(译)	用于定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒及定量生物试样中的测定对象物质的方法		
公开(公告)号	CN108700581A	公开(公告)日	2018-10-23
申请号	CN201780014062.X	申请日	2017-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
[标]发明人	笠置典之 知久浩之		
发明人	笠置典之 知久浩之		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/553 G01N21/64 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/64 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/553 G01N21/6428 G01N21/6486 G01N2021/6439		
代理人(译)	张志楠		
优先权	2016037300 2016-02-29 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的课题在于提供一种能够避免存在于血液中的抗血清白蛋白抗体等抗体的影响，而以高精度定量生物试样中的测定对象物质的试剂盒及方法。根据本发明，提供一种试剂盒，其包含：标记粒子，包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质和第一封闭剂；及基板，包含检测区域，所述检测区域包含与上述测定对象物质或者上述第一结合物质中的任一者具有结合性的第二结合物质和第二封闭剂，所述试剂盒中，上述第一封闭剂和上述第二封闭剂彼此互不相同。

