

[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 200710086392.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
B01J 13/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 9 月 17 日

[11] 公开号 CN 101266244A

[22] 申请日 2007.3.15

[21] 申请号 200710086392.8

[71] 申请人 爱芙乐赛制药株式会社

地址 日本大阪府大阪市

[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
代理人 孙秀武 李平英

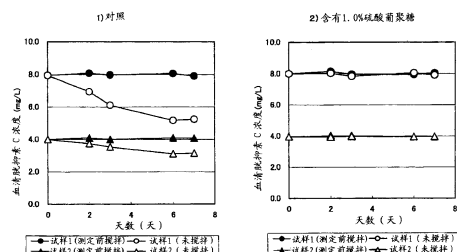
权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 2 页

[54] 发明名称

结合反应性物质的微小粒子的沉降抑制方法
及含其的试剂

[57] 摘要

本发明提供通过抑制结合反应性物质的微小粒子在分散液中的沉降使分散液中的结合反应性物质的微小粒子浓度保持均匀的方法。本发明提供结合有具有反应性的物质的微小粒子的沉降抑制方法。该方法包括在该微小粒子的分散液中使选自聚阴离子及其盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇和丙三醇中的至少 1 种共存的工序。



1. 一种结合有具有反应性的物质的微小粒子的沉降抑制方法，该方法包括在该微小粒子的分散液中使选自聚阴离子及其盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇和丙三醇中的至少1种共存的工序。

2. 权利要求1的方法，其中，在所述分散液中含有0.3~5质量%的所述聚阴离子及其盐、0.1~5质量%的所述葡聚糖、0.1~5质量%的所述环糊精、0.3~5质量%的所述聚乙二醇或5~40质量%的所述丙三醇。

3. 权利要求1或2的方法，其中，所述聚阴离子或其盐为具有硫酸基的水溶性高分子化合物。

4. 权利要求3的方法，其中，所述聚阴离子为硫酸葡聚糖或肝素。

5. 权利要求1~4任一项所述的方法，其中，所述结合有具有反应性的物质的微小粒子是结合有抗体或抗原的胶体金粒子。

6. 一种试剂，该试剂含有结合有具有反应性的物质的微小粒子和选自聚阴离子及其盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇和丙三醇中的至少1种化合物，抑制该微小粒子的沉降。

7. 权利要求6的试剂，在所述试剂中含有0.3~5质量%的所述聚阴离子及其盐、0.1~5质量%的所述葡聚糖、0.1~5质量%的所述环糊精、0.5~5质量%的所述聚乙二醇或5~40质量%的所述丙三醇。

8. 权利要求6或7的试剂，所述聚阴离子或其盐是具有硫酸基的水溶性高分子化合物。

9. 权利要求8的试剂，所述聚阴离子为硫酸葡聚糖或肝素。

10. 权利要求6~9任一项所述的试剂，其中所述结合有具有反应性的物质的微小粒子是结合有抗体或抗原的胶体金粒子。

11. 一种试剂盒，该试剂盒含有权利要求6~10任一项所述的试剂。

12. 一种自动化免疫测定方法，该方法包括将权利要求6~10任一项所述的试剂与试样混合的工序。

结合反应性物质的微小粒子的沉降抑制方法及 含其的试剂

技术领域

本发明涉及结合有抗体或抗原等具有反应性的物质的微小粒子（以下，称为结合反应性物质的微小粒子）的沉降抑制方法以及使用了该结合反应性物质的微小粒子的免疫测定用试剂。特别是涉及主要在临床检查领域中在利用了抗原抗体反应的免疫学测定中使用的结合反应性物质的微小粒子的沉降抑制方法以及使用了该结合反应性物质的微小粒子的免疫测定用试剂。

背景技术

近年来，对于临床检查等各种检查而言，从自动化和缩短测定时间的观点出发，广泛使用利用免疫反应测定生物试样中的物质的方法。作为该免疫测定方法，可以举出RIA法、EIA法、免疫比浊法、胶乳凝集法、胶体金凝集法、免疫色谱法等。其中，胶乳凝集法、胶体金凝集法等使用了结合有具有反应性的物质的微小粒子（结合反应性物质的微小粒子）的方法不需要进行反应液的分离、洗涤操作，因此特别适用于测定的自动化以及缩短时间。

但是，这些胶乳凝集法、胶体金凝集法由于结合反应性物质的微小粒子易于沉降，因此在使用时或测定时必须经常搅拌以使得该微小粒子的浓度均匀，具有易于产生测定误差的问题。

例如，在上述方法中使用的试剂通常由2种试剂构成，即主要含有辅助试样的稀释、试样在主反应前的前处理和主反应的成分的第一试剂；含有作为主要参与反应的主成分的结合反应性物质的微小粒子的第二试剂。使用自动化分析装置时，首先将试样和第一试剂分注到反应池中，经过一段时间后在反应池中分注第二试剂，从而将试样、第一试剂和第二试剂三者混合，得到最终反应液，进行测定。此时，即便将含有结合反应性物质的微小粒子试剂（第二试剂）放置在分析装置中，也需要每隔一定时间搅拌第二试剂，使浓度变得均匀。

以往一直都没有进行抑制这种结合反应性物质的微小粒子的沉降

的研究。对于上述第一试剂、第二试剂和最终反应液的组成而言，仅是为了提高微小粒子反应性的稳定性、促进反应而进行了改良（例如专利文献1和2）。

在专利文献1中，作为使致敏金属胶体的反应性稳定化的方法，记载了使含有致敏金属胶体的溶液含有选自从钙离子和镁离子及钡离子中选择的金属离子、硫酸葡聚糖、胆酸、脱氧胆酸、黄尿酸或它们的盐中的1种或2种以上。

在专利文献2中，记载了在使结合有测定对象物质的抗体（或抗原）的胶体金粒子与测定物质反应的溶液（最终反应液）中，含有0.4~2.5（W/W）%的平均分子量约为20,000以上的聚阴离子或其盐作为反应促进剂。

专利文献1：日本特开平11-101799号公报

专利文献2：日本特开平6-213891号公报

发明内容

因此，为了减小测定值的误差，需求一种抑制结合反应性物质的微小粒子的沉降、长期且稳定地保持试剂或反应液中的浓度的技术。特别是在自动分子装置中，在放置试剂后，如果疏于搅拌操作则有可能产生测定误差、导致临床判断错误，因此开发结合反应性物质的微小粒子在溶液中的沉降抑制方法以及使用了方法的测定试剂非常重要。

因此，本发明的目的在于提供抑制结合反应性物质的微小粒子在分散液中该微小粒子沉降的方法。本发明的目的还在于，提供在静置保存后或放置在自动免疫分析装置中后不需要再次通过搅拌操作使其分散的、测定误差小的试剂。

本发明人为了达成上述课题而进行了深入研究，结果发现：在结合反应性物质的微小粒子的分散液中，通过使选自聚阴离子及其盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇、丙三醇中的至少1种化合物共存，可以抑制结合反应性物质的微小粒子的沉降、可以长期且稳定地保持分散液中的结合反应性物质的微小粒子的浓度，进而完成本发明。

本发明提供结合有具有反应性的物质的微小粒子的沉降抑制方法，该方法包括在该微小粒子的分散液中共存有选自聚阴离子及其

盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇、丙三醇中的至少1种化合物的工序。

对于1个实施方式而言，在上述分散液中含有0.3~5质量%的上述聚阴离子或其盐、0.1~5质量%的上述葡聚糖、0.1~5质量%的上述环糊精、0.3~5质量%的上述聚乙二醇、或5~40质量%的上述丙三醇。

在其他实施方式中，上述聚阴离子及其盐是具有硫酸基的水溶性高分子化合物。

在其他实施方式中，上述聚阴离子是硫酸葡聚糖或肝素。

在其他实施方式中，上述结合有具有反应性的物质的微小粒子是结合有抗体或抗原的胶体金粒子。

本发明的试剂含有结合有具有反应性的物质的微小粒子、以及选自聚阴离子及其盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇、丙三醇中至少1种的化合物，抑制该微小粒子的沉降。

对于1个实施方式而言，在上述试剂中含有0.3~5质量%的上述聚阴离子或其盐、0.3~5质量%的上述葡聚糖、0.1~5质量%的上述环糊精、0.5~5质量%的上述聚乙二醇、或5~40质量%的上述丙三醇。

在其他实施方式中，上述聚阴离子及其盐是具有硫酸基的水溶性高分子化合物。

在其他实施方式中，上述聚阴离子是硫酸葡聚糖或肝素。

在其他实施方式中，上述结合有具有反应性的物质的微小粒子是结合有抗体或抗原的胶体金粒子。

本发明的试剂盒含有上述试剂。

本发明的自动化免疫测定方法包括将上述试剂与试样混合的工序。

通过本发明，可以抑制结合反应性物质的微小粒子的沉降。因此，可以提供该微小粒子的沉降被抑制的试剂。该试剂由于该微小粒子的浓度可以被长期且均匀地保持，因此使用该试剂进行免疫测定时，即便不在每次测定时搅拌该试剂，也可以将结合反应性物质的微小粒子等量地分注到最终反应液中，因此可以得到误差小的稳定的测定值。

具体地说，当将含有结合反应性物质的微小粒子的试剂放置在自动分析装置中长期地连续测定时或者隔一段时间测定时，不需要以往所必需的在每次测定时或每隔一段时间搅拌该含微小粒子试剂使分散

液中的浓度变得均匀的操作,即可得到经过长时间误差也很小的正确的测定值。

由此,在不需要对于测定者来说是一个很大负担的繁琐的搅拌操作的同时,还可以防止由于疏于搅拌操作所产生的测定误差和由此导致的临床判断错误。

附图说明

图1为显示特定血清胱抑素C浓度测定值的经时变化的曲线图。

图2为显示特定铁蛋白浓度测定值的经时变化的曲线图。

具体实施方式

1. 结合反应性物质的微小粒子的沉降抑制方法

本发明的结合反应性物质的微小粒子的沉降抑制方法包括使该微小粒子的分散液中共存有选自聚阴离子及其盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇、丙三醇中的至少1种化合物的工序。

在本发明的方法中使用的结合反应性物质的微小粒子是可以作为免疫测定试剂使用的微小粒子,优选为胶乳粒子和金属胶体粒子。作为金属胶体粒子,一般胶体金粒子易于使用,因此优选。胶体金粒子可以使用市售品,也可以是实验者通过通常使用的方法、例如利用柠檬酸钠将氯金酸还原的方法配制而成。胶体金粒子的粒径通常为5 nm ~ 100 nm,优选为30 nm ~ 60 nm的范围。

对于结合在上述微小粒子上的物质而言,只要是特异性结合在测定对象物质上的物质即可利用。例如可以举出抗体、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。

在本发明的方法中,使用聚阴离子及其盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇或者丙三醇。在本说明书中,将这些化合物称为沉降抑制物质。沉降抑制物质可以单独使用,也可以组合2种以上使用。

作为上述沉降抑制物质之一的聚阴离子,可以举出硫酸葡聚糖、肝素、聚苯乙烯磺酸、透明质酸和硫酸软骨素。作为聚阴离子的盐,可以举出葡聚糖硫酸钠、肝素钠等。在聚阴离子及其盐中,从沉降抑制效果高的观点出发,优选使用具有硫酸基的水溶性高分子化合物。

这种化合物例如有硫酸葡聚糖、肝素、葡聚糖硫酸钠和肝素钠。

本发明的方法在上述结合反应性物质的微小粒子的分散液中使上述沉降抑制物质共存。作为使其共存的方法没有特别限定。例如可以在结合反应性物质的微小粒子的分散液中加入沉降抑制物质，可以在沉降抑制物质、或者在利用分散介质将沉降抑制物质稀释后的稀释液中，加入结合反应性物质的微小粒子，还可以将结合反应性物质的微小粒子与沉降抑制物质混合并将该混合物加入到分散介质中。需要说明的是，分散介质没有特别限定，可以使用水或者使用了后述缓冲剂的缓冲液等。

本发明的方法中，分散液中的结合反应性物质的微小粒子浓度可以是在该领域中通常采用的浓度。

在本发明的方法中，共存于分散液中的沉降抑制物质的浓度根据沉降抑制物质的种类而适当设定。例如，为聚阴离子或其盐时，优选为0.3~5质量%、更优选为0.5~2质量%、进一步优选为0.7~1.1质量%。为葡聚糖或环糊精时，优选为0.1~5质量%、更优选为0.2~1.8质量%、进一步优选为0.5~1.5质量%。为聚乙二醇时，优选为0.3~5质量%、更优选为0.5~3质量%。为丙三醇时，优选为5~40质量%、更优选为10~35质量%。

根据本发明的方法，通过在结合反应性物质的微小粒子的分散液中共存沉降抑制物质，可以抑制结合反应性物质的微小粒子的沉降。因此，通过使用该方法，可以在分散液中长期、稳定地保持该微小粒子。

2. 含有结合反应性物质的微小粒子和沉降抑制物质的试剂

本发明的试剂含有上述结合反应性物质的微小粒子和上述沉降抑制物质，根据需要还含有缓冲剂、糖、糖醇、白蛋白、氯化钠、防腐剂及其他添加剂。该试剂由于抑制了结合反应性物质的微小粒子的沉降，因此长期地使该微小粒子的浓度保持均匀。本发明的试剂通常为液体状，作为使用了结合反应性物质的微小粒子的试剂、特别是在该领域中通常使用的免疫测定用试剂的第二试剂使用。

本发明试剂中的结合反应性物质的微小粒子的浓度和沉降抑制物质的浓度没有特别限定。从提高抑制结合反应性物质的微小粒子沉降的观点出发，优选为上述方法中所采用的浓度范围。

作为本发明试剂中所含的缓冲剂，可以举出磷酸缓冲液；Tris-盐酸缓冲液；琥珀酸缓冲液；双甘肽、MES（2-（N-吗啉代）乙磺酸）、HEPES（N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸）、TES（N-三（羟甲基）甲基-2-氨基乙磺酸）、MOPS（3-（N-吗啉代）丙磺酸）、PIPES（哌嗪-1,4-二（2-乙磺酸））、Bis-Tris（二（2-羟乙基）亚氨基三（羟甲基）甲烷）等的 Good 缓冲液等。优选含有上述缓冲剂使试剂中的 pH 达到 5~9 或者浓度达到 1~100 mM。

作为本发明试剂中所含有的糖和糖醇，可以举出葡萄糖、甘露糖、砂糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇等。上述糖或糖醇在试剂中的浓度优选为 0.01~10 质量%。

作为本发明试剂中可以含有的白蛋白，可以举出牛血清白蛋白（BSA）等。白蛋白在试剂中的浓度优选为 0.001~1 质量%。

作为本发明试剂中可以含有的防腐剂，可以举出叠氮化钠等。防腐剂在试剂中的浓度优选为 0.01~0.5 质量%。

作为本发明试剂中可以含有的其他添加剂，可以举出吐温 20、聚乙二醇月桂基醚、5-溴水杨酸钠、水杨酸钠、安息香酸钠、苯磺酸钠、苯酚、麝香草酚等。

本发明的试剂如上所述，由于结合反应性物质的微小粒子的沉降被抑制，因此该微小粒子的浓度长期地保持均匀。因此，例如当使用该试剂进行免疫测定时，即便在每次测定时不搅拌该试剂，也可以将结合反应性物质的微小粒子等量地分注到最终反应液中，可以得到误差小的稳定的测定值。

3. 试剂盒

本发明的试剂盒包含含有上述结合反应性物质的微小粒子和沉降抑制物质的试剂（本发明的试剂）。该试剂盒例如可以用在使用了胶乳凝集法、胶体金凝集法等免疫测定、特别是自动化免疫测定中。

本发明的试剂盒作为免疫测定用试剂盒使用时，该试剂盒通常可以由以下物质构成：含有辅助试样的稀释、试样在免疫反应前的前处理和免疫反应的成分等的第一试剂，本发明的试剂（第二试剂）以及根据需要制作标准曲线用的测定对象物质的标准品。

本发明的试剂盒可以根据结合在本发明试剂中微小粒子上的反应性物质，将试样中的各种物质作为测定对象。作为可以成为测定对象

的物质（测定对象物质），例如可以举出白蛋白、血红蛋白、血红蛋白 Alc、肌红蛋白、铁传递蛋白、乳铁传递蛋白、血清胱抑素 C、铁蛋白、 α -胎蛋白、癌胚抗原、CA19-9、前列腺特异抗原、C 反应性蛋白质（CRP）、纤维素分解产物（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、超低密度脂蛋白等脂蛋白；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；B 型肝炎病毒、C 型肝炎病毒、人免疫不全病毒、幽门螺旋杆菌以及与它们的抗体等导致的感染症相关的抗原或抗体；氟哌啶醇、溴哌利多等药物；性激素等激素等。

作为含有供测定的测定对象物质的试样，可以举出血液、血浆、血清、尿、粪便（悬浊液）、骨髓液、腹水等生物试样，从环境中获得的样品或其提取物等。

4. 自动化免疫测定方法

本发明的自动化免疫测定方法使用本发明的试剂进行。该自动化免疫测定方法由于在试剂中结合反应性物质的微小粒子的沉降被抑制、其浓度长期地保持均匀，因此即便在每次测定时不搅拌该试剂，也可以将结合反应性物质的微小粒子等量地分注到最终反应液中，可以得到误差小的稳定的测定值。

本发明的自动化免疫测定方法，具体地说，将试样、第一试剂和本发明的试剂（第二试剂）放置在自动分析装置中，在试样中依次自动混合第一试剂和第二试剂，从而进行。第一试剂和第二试剂的比例可以适当设定。本发明的试剂（第二试剂）优选稀释 2~9 倍、更优选稀释 3~5 倍。

本发明的自动化免疫测定方法在长期间地连续测定时或者隔一定期间测定时，也不需要以往所必须的在每次测定时或每隔一定期间搅拌该含微小粒子试剂使溶液中的浓度均匀的操作，即可得到经长期误差也很小的、正确的测定值。

实施例

以下根据实施例进一步具体地说明本发明，但本发明并不限于此。在以下实施例中，只要没有特别说明，%均表示质量/容量%

(W/V%)。

实施例 1: 胶体金液的配制

在 1L 95℃ 的蒸馏水中一边搅拌一边加入 2 mL 10% 的氯金酸溶液, 1 分钟后加入 10 mL 2% 柠檬酸钠溶液, 再搅拌 20 分钟, 之后冷却到 30℃。冷却后, 用 0.1% 碳酸钙将 pH 调整到 7.1。

实施例 2: 血清胱抑素 C 测定用第一试剂的配制

在含有 5% 氯化钠、0.2% EDTA、0.2% 烷基苯基二磺酸钠盐、0.35% 聚氧乙烯月桂基醚的 0.5 M Bis-Tris (pH 6.7) 溶液中加入 1.0~2.5% 左右的聚乙二醇作为反应促进剂, 制成血清胱抑素 C 测定用第一试剂。

实施例 3: 结合抗血清胱抑素 C 抗体的胶体金试剂 (第二试剂) 的配制

用含有 0.05% 叠氮化钠的 10 mM HEPES (pH 7.1) 稀释抗血清胱抑素 C 抗体 (ダコ・ジャパン株式会社), 使浓度达到 50 µg/ml。将 100 mL 该抗血清胱抑素 C 抗体溶液加入到约 1L 在实施例 1 中配制的胶体金液中, 在冷藏的状态下搅拌 2 小时。进而, 添加 110 mL 含有 5.46% 甘露醇、0.5% BSA 和 0.05% 叠氮化钠的 10 mM HEPES (pH 7.1), 在 37℃ 下搅拌 90 分钟。接着, 以 8000 转离心分离 40 分钟, 除去上清后, 再加入约 1L 的含有 3% 甘露醇、0.1% BSA 和 0.05% 叠氮化钠的 5 mM HEPES (pH 7.5) (A 溶液), 使结合抗体的胶体金分散。进而, 在 8000 转离心分离 40 分钟, 除去上清, 使抗体致敏胶体金分散在 A 溶液中, 使总量达到 210 mL, 得到结合抗血清胱抑素 C 抗体的胶体金试剂 (第二试剂)。

实施例 4: 丙三醇或聚乙二醇的添加效果探讨

(1) 血清胱抑素 C 浓度约为 8 mg/L 的试样 (试样 1) 的测定

在结合抗血清胱抑素 C 抗体的胶体金试剂 (第二试剂) 中加入丙三醇, 使丙三醇含量达到 33%, 配制含有丙三醇的第二试剂。

在日立 7070 自动分析装置中分别放置血清胱抑素 C 浓度约为 8 mg/L 的试样 (试样 1)、在实施例 2 中配制的第一试剂和上述含有丙三醇的第二试剂, 在以下条件下测定放置时的吸光度变化量。

(测定条件)

在 3 µL 试样 1 中分注 240 µL 第一试剂, 在 37℃ 下加热约 5 分钟, 接着分注 60 µL 含有丙三醇的第二试剂, 在 37℃ 下反应。之后, 在主

波长 546 nm 和副波长 660 nm 下进行从测光点 18 到 31 的两点测定，测定两点间的吸光度变化量。需要说明的是，吸光度变化量是在分注上述第二试剂时，分别对未搅拌的情况（未搅拌吸光度变化量）和预先搅拌过的情况（搅拌吸光度变化量）进行测定的。

测定后，经过 1 天后，与上述同样地操作，测定经过 1 天后的吸光度变化量（未搅拌吸光度变化量和搅拌吸光度变化量）。

由所得的放置时和经过 1 天后的未搅拌吸光度变化量以及搅拌吸光度变化量，计算各个测定值之差。结果示于表 1 中。

另外，除了使用含有 2% 聚乙二醇（PEG）的第二试剂（含有 PEG 的第二试剂）、含有 33% 丙三醇和 2% PEG 的第二试剂（含有混合物的第二试剂）或直接使用第二试剂来代替含有丙三醇的第二试剂之外，与上述同样地操作，测定吸光度变化量，计算测定值之差。结果一并示于表 1 中。

表 1

试样	第二试剂		吸光度变化量 (Δ 吸光度)	
	含有成分	条件	放置时	1 天后
试样 1: (血清胱抑素 C: 8mg/L)	含有 33% 丙三醇	测定前搅拌 ^{*1}	0.7870	0.8028
		未搅拌	0.7870	0.7814
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0214
	含有 2.0%PEG	测定前搅拌 ^{*1}	0.7704	0.7905
		未搅拌	0.7704	0.7648
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0257
	含有 33% 丙三醇和 2.0%PEG	测定前搅拌 ^{*1}	0.7991	0.8135
		未搅拌	0.7991	0.8061
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0074
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	0.8384	0.8487
		未搅拌	0.8384	0.7674
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0813

*1...测定前搅拌第二试剂

(2) 血清胱抑素 C 浓度约为 4 mg/L 的试样 (试样 2) 的测定

除了使用血清胱抑素 C 浓度约为 4 mg/L 的试样 (试样 2) 代替试样 1 之外, 与上述 (1) 同样地操作, 计算测定值之差。结果示于表 2 中。

表 2

试样	第二试剂		吸光度变化量 (Δ 吸光度)	
	含有成分	条件	放置时	1 天后
试样 2: (血清胱抑素 C: 4mg/L)	含有 33% 丙三醇	测定前搅拌 ^{*1}	0.5359	0.5525
		未搅拌	0.5359	0.5296
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0229
	含有 2.0%PEG	测定前搅拌 ^{*1}	0.5493	0.5723
		未搅拌	0.5493	0.5415
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0308
	含有 33% 丙三醇和 2.0%PEG	测定前搅拌 ^{*1}	0.5577	0.5676
		未搅拌	0.5577	0.5676
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0000
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	0.5763	0.5934
		未搅拌	0.5763	0.5278
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0656

*1...测定前搅拌第二试剂

(3) 血清胱抑素 C 浓度约为 1 mg/L 的试样 (试样 3) 的测定

除了使用血清胱抑素 C 浓度约为 1 mg/L 的试样 (试样 3) 代替试样 1 之外, 与上述 (1) 同样地操作, 计算测定值之差。结果示于表 3 中。

表 3

试样	第二试剂		吸光度变化量 (Δ 吸光度)	
	含有成分	条件	放置时	1 天后
试样 3: (血清胱 抑素 C: 1mg/L)	含有 33% 丙三醇	测定前搅拌 ^{*1}	0.1185	0.1245
		未搅拌	0.1185	0.1173
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0072
	含有 2.0%PEG	测定前搅拌 ^{*1}	0.1247	0.1296
		未搅拌	0.1247	0.1166
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0130
	含有 33% 丙三醇和 2.0%PEG	测定前搅拌 ^{*1}	0.1227	0.1281
		未搅拌	0.1227	0.1279
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0002
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	0.1218	0.1268
		未搅拌	0.1218	0.1088
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0180

*1...测定前搅拌第二试剂

由上述表 1~3 的结果可知, 在第二试剂中加有沉降抑制物质(丙三醇、聚乙二醇或丙三醇与聚乙二醇的混合物)时, 与不加沉降抑制物质时相比, 经过 1 天后的测定值差别很小。不加沉降抑制物质时, 如果经过 1 天, 则结合抗体的胶体金粒子由于重力而沉降, 因此试剂液上层部分的浓度变稀。因而, 如果在测定前不进行搅拌, 则在自动分析装置中试剂会从浓度稀的上层区域被分注到反应池中, 因此直接参与反应的结合抗体的胶体金粒子量减少, 吸光度变化量大幅度增加。因而, 在静置 1 天后, 如果比较测定前搅拌了结合抗体的胶体金试剂的情况和未搅拌情况的吸光度变化量, 无论是否测定相同试样,

都有很大差别。

由此可知，通过在结合抗体的胶体金试剂中添加丙三醇和/或聚乙二醇，可以抑制静置保存时结合抗体的胶体金粒子的沉降、可以保持结合抗体的胶体金试剂的均匀性。

实施例 5：葡聚糖或葡聚糖硫酸钠的添加效果探讨

(1) 血清胱抑素 C 浓度约为 8 mg/L 的试样（试样 1）的测定

在结合抗血清胱抑素 C 的抗体的胶体金试剂（第二试剂）中加入葡聚糖，使其含量达到 1%，配制含有葡聚糖的第二试剂。

除了使用含有葡聚糖的第二试剂代替含有丙三醇的第二试剂、测定放置时经过 3 天后的吸光度变化量代替放置时经过 1 天后的吸光度变化量之外，与实施例 4 的 (1) 同样地操作，测定吸光度变化量，求出测定值之差。结果示于表 4 中。

另外，除了使用含有 1% 葡聚糖硫酸钠的第二试剂（含有葡聚糖硫酸钠的第二试剂）或直接使用第二试剂来代替含有葡聚糖的第二试剂之外，与上述同样地操作，测定吸光度变化量，计算测定值之差。结果一并示于表 4 中。

表 4

试样	第二试剂		吸光度变化量 (Δ 吸光度)	
	含有成分	条件	放置时	3 天后
试样 1: (血清胱抑素 C: 8mg/L)	含有 1.0% 葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	0.9040	0.9112
		未搅拌	0.9040	0.8856
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0256
	含有 1.0% 硫酸葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	0.9368	0.9433
		未搅拌	0.9368	0.9445
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	-0.0012
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	0.9374	0.9458
		未搅拌	0.9374	0.9088
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0370

*1...测定前搅拌第二试剂

(2) 血清胱抑素 C 浓度约为 4 mg/L 的试样 (试样 2) 的测定

除了使用血清胱抑素 C 浓度约为 4 mg/L 的试样 (试样 2) 代替试样 1 之外, 与上述实施例 5 的 (1) 同样地操作, 计算测定值之差。结果示于表 5 中。

表 5

试样	第二试剂		吸光度变化量 (Δ 吸光度)	
	含有成分	条件	放置时	3 天后
试样 2: (血清胱抑素 C: 4mg/L)	含有 1.0% 葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	0.5247	0.5367
		未搅拌	0.5247	0.5173
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0194
	含有 1.0% 硫酸葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	0.5784	0.5864
		未搅拌	0.5784	0.5821
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0043
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	0.5716	0.5837
		未搅拌	0.5716	0.5535
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0302

*1...测定前搅拌第二试剂

由上述表 4 和 5 的结果可知,在第二试剂中加有沉降抑制物质(葡聚糖或葡聚糖硫酸钠)时,与不加沉降抑制物质时相比,经过 3 天后的测定值的差别很小。由此可知,通过在结合抗体的胶体金试剂中添加沉降抑制物质(葡聚糖或葡聚糖硫酸钠),可以抑制静置保存时结合抗体的胶体金粒子的沉降、可以保持结合抗体的胶体金试剂的均匀性。

实施例 6: 肝素钠的添加效果探讨

(1) 血清胱抑素 C 浓度约为 8 mg/L 的试样(试样 1)的测定

在结合抗血清胱抑素 C 的抗体的胶体金试剂(第二液)中加入肝素钠,使肝素钠含量达到 1%,配制含有肝素的第二试剂。

除了使用含有肝素的第二试剂代替含有丙三醇的第二试剂、测定放置时经过 2 天后的吸光度变化量代替放置时经过 1 天后的吸光度变化量之外,与实施例 4 的(1)同样地操作,测定吸光度变化量,求出

测定值之差。结果示于表 6 中。

表 6

试样	第二试剂		吸光度变化量 (Δ 吸光度)	
	含有成分	条件	放置时	2 天后
试样 1: (血清胱 抑素 C: 8mg/L)	含有 1.0% 肝素	测定前搅拌 ^{*1}	0.8382	0.8369
		未搅拌	0.8382	0.8163
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0206
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	0.8330	0.8607
		未搅拌	0.8330	0.7642
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0965

*1...测定前搅拌第二试剂

(2) 血清胱抑素 C 浓度约为 4 mg/L 的试样 (试样 2) 的测定

除了使用血清胱抑素 C 浓度约为 4 mg/L 的试样 (试样 2) 代替试样 1 之外, 与上述实施例 6 的 (1) 同样地操作, 计算测定值之差。结果示于表 7 中。

表 7

试样	第二试剂		吸光度变化量 (Δ 吸光度)	
	含有成分	条件	放置时	2 天后
试样 2: (血清胱抑素 C: 4mg/L)	含有 1.0% 肝素	测定前搅拌 ^{*1}	0.5156	0.5078
		未搅拌	0.5156	0.5083
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	-0.0005
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	0.5109	0.5156
		未搅拌	0.5109	0.4607
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0.0000	0.0549

*1...测定前搅拌第二试剂

由上述表 6 和 7 的结果可知,在第二试剂中加有沉降抑制物质(肝素钠)时,与不加沉降抑制物质时相比,经过 2 天后的测定值的差别很小。由此可知,通过在结合抗体的胶体金试剂中添加沉降抑制物质(肝素钠),可以抑制静置保存时结合抗体的胶体金粒子的沉降、可以保持结合抗体的胶体金试剂的均匀性。

实施例 7: 葡聚糖硫酸钠的添加效果探讨(经时变化)

(1) 血清胱抑素 C 浓度约为 8 mg/L 的试样(试样 1)的测定

在结合抗血清胱抑素 C 的抗体的胶体金试剂(第二试剂)中加入葡聚糖硫酸钠,使葡聚糖硫酸钠含量达到 1%,配制含有葡聚糖硫酸钠的第二试剂。

除了使用含有葡聚糖的第二试剂代替含有丙三醇的第二试剂、测定放置时经过 2 天后、3 天后、6 天后和 7 天后的吸光度变化量代替放置时经过 1 天后的吸光度变化量之外,与实施例 4 的(1)同样地操作,测定吸光度变化量。由所得的吸光度变化量、使用通过已知浓度的标准液制作的标准曲线计算血清胱抑素 C 浓度。结果示于表 8 和图 1 中。

表 8

试样	第二试剂		血清胱抑素 C 浓度的测定值 (mg/L)				
	含有成分	条件	放置时	2 天后	3 天后	6 天后	7 天后
试样 1: (血清胱 抑素 C: 8mg/L)	含有 1.0% 硫酸 葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	7.99	8.14	7.96	7.94	8.05
		未搅拌	7.99	8.02	7.84	8.05	7.91
		测定值之差 (搅拌 - 未搅 拌)	0.00	0.12	0.12	-0.11	0.14
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	7.95	8.08	7.98	8.06	7.91
		未搅拌	7.95	6.95	6.11	5.19	5.26
		测定值之差 (搅拌 - 未搅 拌)	0.00	1.13	1.87	2.87	2.65

*1...测定前搅拌第二试剂

(2) 血清胱抑素 C 浓度约为 4 mg/L 的试样 (试样 2) 的测定

除了使用血清胱抑素 C 浓度约为 4 mg/L 的试样 (试样 2) 代替试样 1 之外, 与上述实施例 7 的 (1) 同样地操作, 测定吸光度变化量, 求出血清胱抑素 C 浓度。结果示于表 9 和图 1 中。

表 9

试样	第二试剂		血清胱抑素 C 浓度的测定值 (mg/L)				
	含有成分	条件	放置时	2天后	3天后	6天后	7天后
试样 2: (血清胱 抑素 C: 4mg/L)	含有 1.0% 硫酸 葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	3.96	4.03	4.02	3.96	3.96
		未搅拌	3.96	3.94	3.97	3.96	3.97
		测定值之差 (搅拌 - 未搅 拌)	0.00	0.09	0.05	0.00	-0.01
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	4.00	4.09	4.00	4.09	4.07
		未搅拌	4.00	3.75	3.54	3.12	3.16
		测定值之差 (搅拌 - 未搅 拌)	0.00	0.34	0.46	0.97	0.91

*1...测定前搅拌第二试剂

由上述表 8 和 9 以及图 1 的结果可知, 在第二试剂中加有沉降抑制物质(葡聚糖硫酸钠)时, 即便不进行特别地搅拌, 与搅拌后的测定值相比也无变化, 直至 7 日后都可以得到稳定的测定值。相反, 不加入沉降抑制物质时, 如果不在测定前进行搅拌使结合抗体的胶体金粒子浓度均匀, 则结合抗体的胶体金粒子会慢慢沉降, 试剂上部的结合抗体的胶体金粒子浓度变稀, 从而分注到反应体系中的结合抗体的胶体金粒子量减少、随着天数的增加测定值降低。

由此可知, 通过在结合抗体的胶体金试剂中添加沉降抑制物质(葡聚糖硫酸钠), 可以抑制结合抗体的胶体金粒子的沉降、可以使结合抗体的胶体金粒子浓度在试剂中长期地保持均匀。因而, 在静置在自动分析装置上的状态下不进行搅拌, 也可以得到稳定的测定值。

实施例 9: 铁蛋白测定用第一试剂的配制

在含有 5%氯化钠、0.2% EDTA 和 0.35%聚氧乙烯月桂基醚的 0.5 M PIPES (pH 6.5) 溶液中加入 1.5 ~ 2.0%左右的聚乙二醇作为反应促进剂, 制作铁蛋白测定用第一试剂。

实施例 10: 结合抗铁蛋白抗体的胶体金试剂(铁蛋白测定用第二试剂)的配制

用含有 0.05%叠氮化钠的 10 mM HEPES (pH 7.1) 稀释抗铁蛋白抗体 (ダコ・ジヤパン株式会社), 使浓度达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 。将 100 mL 该溶液加入到约 1L 在实施例 1 中配制的胶体金液中, 在冷藏条件下搅拌 2 小时。进而, 加入 110 mL 含有 5.46%甘露醇、0.5% BSA 和 0.05%叠氮化钠的 10 mM HEPES (pH 7.1), 在 37℃下搅拌 90 分钟。接着, 以 8000 转离心分离 40 分钟, 除去上清后, 再加入约 1L 的含有 3%甘露醇、0.1% BSA 和 0.05%叠氮化钠的 5 mM HEPES (pH 7.5) (A 溶液), 使结合抗体的胶体金分散。进而, 在 8000 转离心分离 40 分钟, 除去上清, 使抗体致敏胶体金分散在 A 溶液中, 使总量达到 280 mL, 得到结合抗铁蛋白抗体的胶体金试剂。

实施例 11: 葡聚糖硫酸钠的添加效果探讨

(1) 铁蛋白浓度约为 760 ng/L 的试样 (试样 4) 的测定

在结合抗铁蛋白抗体的胶体金试剂 (第二试剂) 中加入葡聚糖硫酸钠, 使葡聚糖硫酸钠含量达到 0.2%, 配制含有 0.2%硫酸葡聚糖的第二试剂。

在日立 7070 自动分析装置中放置铁蛋白浓度约为 760 ng/L 的试样 (试样 4)、在实施例 9 中配制的第一试剂和上述含有 0.2%硫酸葡聚糖的第二试剂, 在以下条件下测定放置时的吸光度变化量。

(测定条件)

在 10 μL 试样 4 中分注 160 μL 第一试剂, 在 37℃下加热约 5 分钟, 接着分注 80 μL 含有 0.2%硫酸葡聚糖的第二试剂, 在 37℃下反应。之后, 在主波长 505 nm 和副波长 700 nm 下进行从测光点 18 到 31 的两点测定, 测定两点间的吸光度变化量。需要说明的是, 吸光度变化量是在分注上述第二试剂时, 分别对未搅拌的情况 (未搅拌吸光度变化量) 和预先搅拌过的情况 (搅拌吸光度变化量) 进行测定的。

与上述同样地操作, 测定从测定当天开始经过 2 天后、4 天后和 7 天后的吸光度变化量 (未搅拌吸光度变化量和搅拌吸光度变化量)。

由得到的放置时、经过 2 天后、经过 4 天后和经过 7 天后的未搅拌吸光度变化量以及搅拌吸光度变化量, 使用通过已知浓度的标准液制作的标准曲线计算铁蛋白浓度。结果示于表 10 中。

另外, 除了使用含有 1.0%硫酸葡聚糖的第二试剂、含有 2.0%硫酸葡聚糖的第二试剂或直接使用第二试剂来代替含有 0.2%硫酸葡聚糖的

第二试剂之外，与上述同样地操作，测定吸光度变化量，计算铁蛋白浓度。结果一并示于表 10 中。需要说明的是，使用含有 2.0%硫酸葡聚糖时和直接使用第二试剂时（对照）的铁蛋白浓度一并示于图 2 中。

表 10

试样	第二试剂		铁蛋白浓度的测定值 (ng/mL)			
	含有成分	条件	放置 时	2 天 后	4 天 后	7 天 后
试样 4: (铁蛋白: 760 ng/mL)	含有 0.2% 硫酸葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	753	779	776	778
		未搅拌	753	744	720	698
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0	35	56	80
	含有 1.0% 硫酸葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	762	769	764	769
		未搅拌	762	774	760	763
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0	-5	4	6
	含有 2.0% 硫酸葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	760	758	732	709
		未搅拌	760	742	722	706
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0	16	10	3
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	757	777	774	779
		未搅拌	757	716	689	640
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0	61	85	139

*1...测定前搅拌第二试剂

(2) 铁蛋白浓度约为 520 ng/mL 的试样 (试样 5) 的测定

除了使用铁蛋白浓度约为 520 ng/mL 的试样 (试样 5) 代替试样 1 之外, 与上述实施例 11 的 (1) 同样地操作, 测定吸光度变化量, 求出铁蛋白浓度。结果示于表 11 中。需要说明的是, 使用含有 2.0% 硫酸葡聚糖时和直接使用第二试剂时 (对照) 的铁蛋白浓度一并示于图 2 中。

表 11

试样	第二试剂		铁蛋白浓度的测定值 (ng/mL)			
	含有成分	条件	放置 时	2 天 后	4 天 后	7 天 后
试样 5: (铁蛋白: 520 ng/mL)	含有 0.2% 硫酸葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	514	528	527	529
		未搅拌	514	511	494	477
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0	17	33	52
	含有 1.0% 硫酸葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	523	530	526	529
		未搅拌	523	530	524	525
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0	0	2	4
	含有 2.0% 硫酸葡聚糖	测定前搅拌 ^{*1}	522	526	503	490
		未搅拌	522	519	505	490
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0	7	-2	0
	不含 (对照)	测定前搅拌 ^{*1}	513	533	526	533
		未搅拌	513	491	462	437
		测定值之差 (搅拌 - 未搅拌)	0	42	64	96

*1...测定前搅拌第二试剂

由上述表 10、11 以及图 2 的结果可知，在第二试剂中加有沉降抑制物质（葡聚糖硫酸钠）时，与不加入沉降抑制物质时相比，在经过 2 天后、经过 4 天后和经过 7 天后的测定值差别很小。特别是使用含有 1.0% 葡聚糖硫酸钠的第二试剂和含有 2.0% 葡聚糖硫酸钠的第二试剂时，即便经过 7 天后，经过搅拌时的测定值与在测定前未搅拌结合抗体的胶体金试剂时的测定值完全没有差别。不添加沉降抑制物质时，如果不在测定前进行搅拌使结合抗体的胶体金粒子浓度均匀，则结合抗体的胶体金粒子会慢慢沉降，试剂上部的结合抗体的胶体金粒子浓度变稀，从而分注到反应体系中的结合抗体的胶体金粒子量减少、随着天数的增加测定值降低。

由此可知，通过在结合抗体的胶体金试剂中添加沉降抑制物质（葡聚糖硫酸钠），可以抑制结合抗体的胶体金粒子的沉降、可以使结合抗体的胶体金粒子浓度在试剂中长期地保持均匀。因而，在静置在自动分析装置上的状态下不进行搅拌，也可以得到稳定的测定值。

产业实用性

根据本发明可以抑制结合反应性物质的微小粒子的沉降。因此，可以提供该微小粒子的沉降被抑制的试剂。该试剂可以将该微小粒子的浓度长期地保持均匀。因而，使用该试剂进行免疫测定时，即便不搅拌该试剂也可以将结合反应性物质的微小粒子等量地分注到最终反应液中，因此可以得到误差小的稳定的测定值。由此，在不需要对于测定者是个较大负担的繁琐的搅拌操作的同时，还可以防止由于疏于搅拌操作所产生的测定误差和由此导致的临床判断错误。该试剂和含有该试剂的试剂盒对于自动化免疫装置特别有用。

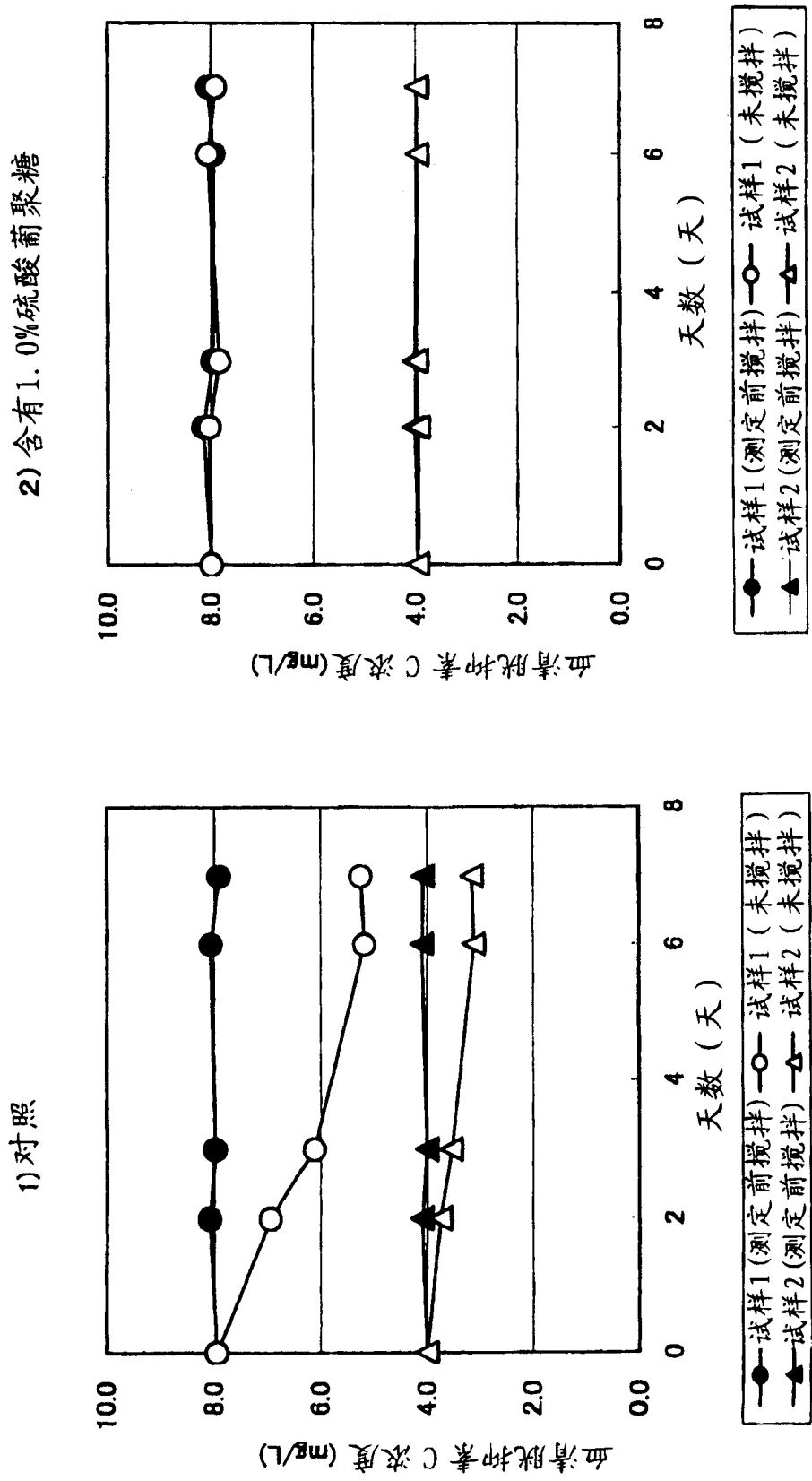
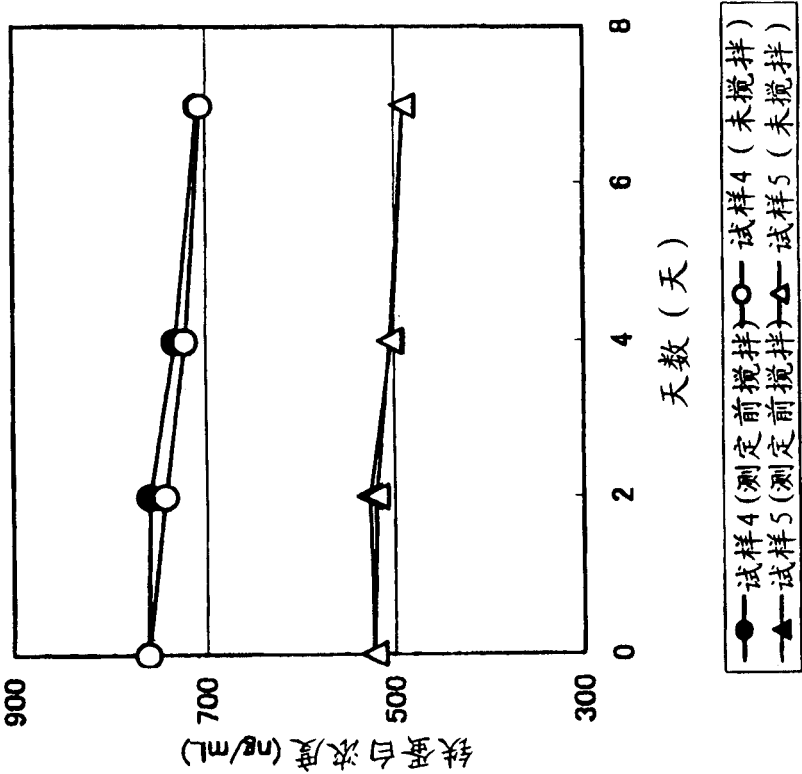


图 1

2) 含有2.0%硫酸葡萄糖



1) 对照

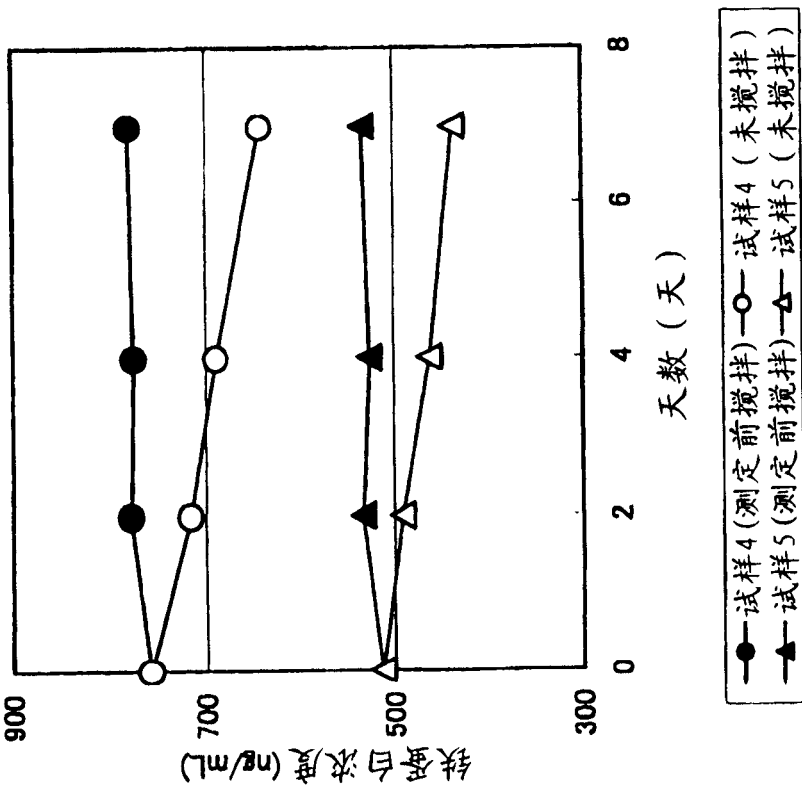


图 2

专利名称(译)	结合反应性物质的微小粒子的沉降抑制方法及含其的试剂		
公开(公告)号	CN101266244A	公开(公告)日	2008-09-17
申请号	CN200710086392.8	申请日	2007-03-15
[标]发明人	田中睦		
发明人	田中睦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 B01J13/00 G01N33/543 G01N33/553		
代理人(译)	孙秀武 李平英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供通过抑制结合反应性物质的微小粒子在分散液中的沉降使分散液中的结合反应性物质的微小粒子浓度保持均匀的方法。本发明提供结合有具有反应性的物质的微小粒子的沉降抑制方法。该方法包括在该微小粒子的分散液中使选自聚阴离子及其盐、葡聚糖、环糊精、聚乙二醇和丙三醇中的至少1种共存的工序。

