



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102187221 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 14

(21) 申请号 200980132851. 9

代理人 庞立志 高旭轶

(22) 申请日 2009. 08. 24

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

*G01N 33/531* (2006. 01)

2008-214513 2008. 08. 22 JP

*G01N 33/53* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 02. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/064729 2009. 08. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02010/021399 JA 2010. 02. 25

(71) 申请人 电化生研株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 皆川康纪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂

(57) 摘要

本发明公开了利用简便的方法抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对容器的吸附而提高半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定精度的方法。本发明还提供含有非离子型表面活性剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂、包含该吸附抑制剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定试剂以及半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定试剂盒。另外,本发明提供抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的吸附的方法,其包含在非离子型表面活性剂的存在下使含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的试剂与测定仪器接触。所述非离子型表面活性剂优选为聚氧乙烯型表面活性剂。或者,所述所述非离子型表面活性剂优选具有苯氧基结构,更优选具有苄基苯氧基结构。

1. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂, 其含有非离子型表面活性剂。
2. 如权利要求 1 所述的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂, 其中, 所述非离子型表面活性剂为聚氧乙烯型表面活性剂。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂, 其中, 所述非离子型表面活性剂具有苯氧基结构。
4. 如权利要求 3 所述的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂, 其中, 所述非离子型表面活性剂具有苄基苯氧基结构。
5. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定试剂, 其含有权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂。
6. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定试剂盒, 其含有权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂。
7. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的吸附抑制方法, 其包含在非离子型表面活性剂的存在下使含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的试样与测定仪器接触。
8. 如权利要求 7 所述的吸附抑制方法, 其中, 所述非离子型表面活性剂为聚氧乙烯型表面活性剂。
9. 如权利要求 7 或 8 所述的吸附抑制方法, 其中, 所述非离子型表面活性剂具有苯氧基结构。
10. 如权利要求 9 所述的吸附抑制方法, 其中, 所述非离子型表面活性剂具有苄基苯氧基结构。
11. 如权利要求 7 ~ 10 中任一项所述的吸附抑制方法, 其中, 所述非离子型表面活性剂的存在量为 0.001 ~ 10w/v%。
12. 如权利要求 11 所述的吸附抑制方法, 其中, 所述非离子型表面活性剂的存在量为 0.01 ~ 5w/v%。
13. 如权利要求 7 ~ 12 中任一项所述的吸附抑制方法, 其中, 所述测定仪器为塑料制容器。
14. 试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法, 其包含通过权利要求 7 ~ 13 中任一项所述的吸附抑制方法抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对所述测定仪器的吸附的工序。
15. 如权利要求 14 所述的测定方法, 其通过免疫测定法进行。

## 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂以及半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的吸附抑制方法。

### 背景技术

[0002] 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 作为半胱氨酸蛋白酶而由全身的有核细胞产生。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族,是分子量 13kD 的碱性低分子蛋白质。在临床检查中作为代替肌酐的肾功能的指标而受到关注(参照非专利文献 1)。在临床检查中,为了一次性处理多个检测物,利用自动化的准确的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的定量手段。

[0003] 作为半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的定量方法,已知使用结合了抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 抗体的胶乳,以胶乳凝集比浊法测定可见光的吸收或散射的方法(参照专利文献 1)、或以酶标法进行测定的方法(参照专利文献 2)等。

[0004] 另外,已知有肾脏疾病的检查方法,其特征在于,通过测定排泄至尿中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的浓度以及作为内源性清除物质的肌酐的浓度,计算出半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度与肌酐浓度之比,并使用上述比(参照专利文献 3)。

[0005] 专利文献 4 中记载了使用了免疫反应测定用前带现象抑制剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的定量方法,其特征在于,使用 1 种或 2 种以上硫酸酯盐系以及磺酸盐系的阴离子性表面活性剂。

[0006] 有人指出半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 因其物性而较易吸附于塑料或玻璃等容器。自动分析装置中大多使用市售的塑料容器,在临床的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定中,认为防止半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于塑料容器导致的测定精度下降是重要的。作为抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于容器的方法,虽可考虑对容器本身进行表面处理的方法,但是需要进行了表面处理的专用容器,存在成本变高的问题。

[0007] 因此,需要可通过简单的操作准确地进行自动测定的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的定量方法,目前正在寻求通过简便的方法抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对容器的吸附的手段。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献 1:日本特开 2000-193662 号公报

[0011] 专利文献 2:日本专利第 03342819 号公报

[0012] 专利文献 3:日本专利第 03398372 号公报

[0013] 专利文献 4:日本特开 2003-149244 号公报

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献:斎藤憲祐、“第 13 回生物試料分析科学学会大会 シスタチン C の測定と臨床学的意義”、[online]、平成 15 年 3 月 14 日、[平成 20 年 2 月 8 日检索]、网址 <URL :

<http://www.higo.ne.jp/anal-bio-sci13/NewFiles/saitou.html>>

## 发明内容

[0016] 发明要解决的课题

[0017] 本发明的目的在于提供通过简便的方法抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对容器的吸附的手段,并提高半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定精度。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 本发明人等经过深入研究,结果发现,非离子型表面活性剂具有抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附在塑料容器上的效果,从而完成了本发明。

[0020] 即,本发明提供含有非离子型表面活性剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂。另外,本发明还提供含有上述本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定试剂。进而,本发明提供含有上述本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定试剂盒。进而,本发明提供半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的吸附抑制方法,包含在非离子型表面活性剂的存在下使含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的试样与测定仪器接触。进而,本发明根据上述本发明的吸附抑制方法,提供试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法,包含抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对所述测定仪器的吸附的工序。

[0021] 根据本发明,可以通过使非离子型表面活性剂共存于测定体系内的简便方法,有效地抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对塑料容器等测定仪器的吸附。在同时处理多个检测体的临床检查中,通常,可以通过使用了塑料制的测定容器的自动测定系统进行被测定物的测定,根据本发明,通过此类自动测定系统测定半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 时,也可以通过容易的操作测定准确的值,因而在临床应用上非常有用。

## 具体实施方式

[0022] “半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂”,是指抑制溶液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于测定仪器的试剂。该吸附抑制剂可特别优选用于抑制对塑料制的仪器的吸附。需要说明的是,在本发明中,“测定仪器”,是指在用于测定半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的一系列操作中可使用的各种仪器类,也包含例如与自动分析装置中所含的检测物试样接触的部件。具体而言,例如可以举出板、杯等容器、移液管、吸嘴等,但不限于此。另外,在本发明中,提及“塑料制的仪器”时,除了仪器整体是由塑料构成的仪器以外,也包含仅与含半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的试剂接触的表面由塑料构成的仪器。例如,“塑料制容器”广泛包含至少容器内壁是由塑料构成的容器。“塑料”没有特殊限定,是指一直以来用于实验仪器类的聚丙烯或聚苯乙烯等合成树脂。

[0023] 作为本发明中可用的非离子型表面活性剂,例如可举出:仲醇乙氧基化物、聚氧乙烯枯基苯基醚、对异辛基聚氧乙烯苯酚甲醛聚合物、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯多环苯基醚、聚氧乙烯烷基亚丙基二胺、壬基苯酚乙氧基化物、辛基苯基醚、聚氧乙烯辛基苯基醚、聚氧乙烯衍生物、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯氧丙烯嵌段聚合物、月桂醇烷基化物、聚氧乙烯月桂醚、聚氧乙烯单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯、聚氧乙烯二苯乙基醚、聚氧乙烯失水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单棕榈

酸酯、聚氧乙烯十八烷基胺、聚氧乙烯十八烷基醚、聚氧乙烯壬基苯基醚、聚氧乙烯油醚、聚甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯苄基苯基醚、聚氧乙烯三苄基苯基醚等聚氧乙烯型、或脂肪族磷酸酯等磷酸酯型、烷基醇酰胺等酰胺型非离子型表面活性剂,但不限于此。非离子型表面活性剂可以仅为一种也可以是两种以上的混合物。如下列实施例具体所示,向含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的试样中添加非离子型表面活性剂时,可以降低半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于塑料仪器的量。离子型表面活性剂则得不到这种效果(参照比较例)。

[0024] 即使在非离子型表面活性剂中,在聚苯乙烯型的表面活性剂的情况下,由于试样中半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于容器器壁的量特别少,因此更优选。另外,还优选具有苯氧基结构作为亲油基的非离子型表面活性剂。其中,作为本发明所用的非离子型表面活性剂,最优选具有聚氧乙烯苄基苯基醚或聚氧乙烯三苄基苯基醚等苄基苯氧基结构作为亲油基的非离子型表面活性剂。在此,苄基苯氧基结构是指  $\text{Ph-CH}_2\text{-Ph-O-}$  结构,Ph 为苯基,苯基或  $\text{CH}_2$  基的氢 H 的一部分可以被卤素或烷基等取代基取代。

[0025] 非离子型表面活性剂的 HLB 值 (Hydrophile-Lipophile Balance 值) 优选为 11 ~ 16,特别地,更优选为 12.5 ~ 15。当 HLB 值在该范围时,抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对测定仪器的吸附的效果高。

[0026] 表面活性剂采用苄基苯氧基结构时,可以特别有效地抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的吸附的原因尚不确定,但据认为是位于直链状的亲油基中的苄基苯氧基结构部分与半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 或测定仪器的亲油性部位相互缠绕,而抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于测定仪器。

[0027] 本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂可以只由非离子型表面活性剂构成,另外,也可以是非离子型表面活性剂溶解于缓冲液中的形态。缓冲液没有特殊限定,只要对半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定体系没有不良影响就可以使用任一种缓冲液。作为这样的缓冲液,例如可以使用 Good 缓冲液、Tris 缓冲液、磷酸系缓冲液、碳酸系缓冲液、乙酸系缓冲液、甘氨酸缓冲液等。作为 Good 缓冲液,可适宜地使用 MES、Bis-Tris、ADA、Bis-Tris 丙烷、PIPES、ACES、氯化胆胺、BES、MOPS、TES、HEPES、HEPPS、Tricine、甘氨酸酰胺、Bicine、TAPS、CHES、CAPS 等。另外,半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂也可以包含稳定剂、螯合剂等公知的添加剂。作为添加剂的具体例,可以举出牛血清白蛋白或酪蛋白等稳定剂、EDTA 等螯合剂等,但不限于上述。

[0028] 本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂可以添加在含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的溶液中使用。作为含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的溶液,可以举出从活体中分离的检测物试样、或用于制作定量半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 所需的标准曲线的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 标准溶液等。作为从活体分离的试样,例如可以举出:血液、血清、血浆、尿、粪便、唾液、组织液、脊髓液、棉拭液或上述液体的稀释物。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂的使用量可以对应于溶液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 含量而适当选择,来自活体的试样中的含量通常在 0.01 ~ 100mg/L 左右的范围内,标准曲线的制作通常也使用该浓度范围的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 标准溶液进行。因此,作为半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂的使用量,优选适合 0.01 ~ 100mg/L 的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的量,具体而言,以非离子型表面活性剂的最终浓度(使用多个表面活性剂时是其合计浓度)计,优选为 0.001 ~ 10w/v%,更优选为 0.01 ~ 5w/v%。

[0029] 添加了半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂的试样也可以适宜地用于公知的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定方法的任一种。向试样中添加本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂时,由于能够有效抑制试样中半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于塑料制容器等仪器,因此,可以准确测定试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C。

[0030] 作为半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法,已知有使用了针对半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的抗体的免疫测定(例如参照专利文献 1~4 以及非专利文献 1)。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 是公知的蛋白质,针对半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的抗体也已知。另外,免疫测定方法本身也是周知的常用方法,其所用的试剂类或试剂盒也有市售。本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂可以与这样的市售的测定试剂或试剂盒组合提供。即,本发明也提供包含半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂的测定试剂或试剂盒。需要说明的是,在此,“测定试剂”除检测物稀释液、抗体稀释液、清洗液、酶液、基质液等以外,还包含上述半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 标准溶液。在半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 标准溶液中添加本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂时,由于可以准确测定标准溶液中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C,因此可以制作准确的标准曲线。

[0031] 如上所述,通过使用含有非离子型表面活性剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附抑制剂,可以抑制活体试样等试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于测定仪器。即,本发明还提供半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的吸附抑制方法,其包含在非离子型表面活性剂的存在下使含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的试样与测定仪器接触。在此,“吸附抑制方法”意指抑制试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 吸附于塑料制容器等测定仪器。该吸附抑制方法中所用的非离子型表面活性剂、其存在浓度、含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的试样的条件与吸附抑制剂中所述的条件相同。

[0032] 另外,本发明还提供试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定方法,其包含通过上述半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的吸附抑制方法抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对测定仪器的吸附的工序。该测定方法优选通过免疫测定法进行。通过使用上述吸附抑制方法,可以提高半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定精度,准确测定试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C。实施吸附抑制方法的工序优选在将试样与测定板等测定容器接触之前进行,例如,优选在制备供测定的试样的工序中混合试样与非离子型表面活性剂。需要说明的是,在本发明中,“测定”一词包含“检出”、“定量”、“半定量”。

[0033] 试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的测定本身也可以使用公知的任何一种方法。例如,使用了针对半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的抗体的免疫测定是公知的(例如参照专利文献 1~4 及非专利文献 1),可以采用此类公知的方法。但是,由于免疫测定方法本身如上所述是众所周知的,因此,不限于上述公知的方法,也可适用任何一种免疫测定方法。即,基于反应形式进行分类时,有夹心法、竞争法、凝集法、免疫色谱法等,基于标识进行分类,有酶免疫分析、放射免疫分析、荧光免疫分析、化学发光免疫分析等,上述任一种都包含在本发明中所说的“免疫测定”中,可以作为所述免疫测定法采用。另外,如上所述,半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 是公知的蛋白质,抗半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 抗体也是公知的,还由于存在市售品,因此容易获得。另外,通过基因工程学手法制备公知的蛋白质的方法、针对公知的蛋白质的多克隆抗体及单克隆抗体等抗体及抗原结合性片段(Fab 片段及 F(ab')<sub>2</sub> 片段之类的维持针对对应抗原的结合性的抗体片段)的制备方法也都是该领域中众所周知的常用

方法,只要是本领域技术人员,就可以容易地制备针对半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的抗体或其抗原结合性片段。

[0034] 作为本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定方法中所用的试样,优选从活体分离出的试样,例如可以举出:血液、血清、血浆、尿、粪便、唾液、组织液、脊髓液、棉拭液或它们的稀释物。在本发明的测定方法中,特别优选使用血液、血清及血浆等来源于血液的体液、以及来源于血液的体液的稀释物。

[0035] 下述实施例中采用免疫凝集法。下面,对免疫凝集法进行说明,但并不意欲将本发明的范围限定于免疫凝集法。

[0036] 免疫凝集法是基于由抗原抗体反应产生的反应液的浊度或吸光度之类的光学性质的变化,检出或定量被检试样中的抗原或抗体的方法。免疫凝集法包含免疫比浊法以及免疫散射比浊法(散射比浊法)。在免疫凝集法中可使用金胶体或胶乳粒子之类的致敏粒子。在免疫凝集法中,检测物中的抗原和致敏粒子的抗体发生抗原抗体反应、或是检测物中的抗体和致敏粒子的抗原发生抗原抗体反应,利用溶液的浊度或吸光度等光学性质的变化测定被测物质(本发明中为半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C)。使用胶乳粒子的免疫凝集法也称为胶乳凝集法。在免疫凝集法中,可以使用抗血清代替致敏粒子。

[0037] 采用免疫凝集法作为本发明的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定方法时,反应液中的致敏粒子的浓度通常为 0.01 ~ 0.5% 左右,反应温度通常在 1 ~ 55°C,优选 35 ~ 40°C 下 1 分钟 ~ 10 分钟左右。反应介质没有特殊限定,可以使用甘氨酸缓冲液或 Good 缓冲液等各种缓冲液。

[0038] 试样中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的浓度可以测定反应溶液的浊度或吸光度,基于变化的大小(端点法)或变化的速度(速率法)算出。端点法是基于反应开始前和开始后一段时间测定的浊度或吸光度的变化的大小的方法,速率法是基于反应开始前和开始后经时性地测定的浊度或吸光度的变化的大小的方法。免疫凝集法可以通过手动进行也可以使用公知的自动分析装置。

[0039] 实施例

[0040] 下面基于实施例对本发明进行更具体说明。但是,本发明不限于下述实施例。

[0041] (样品溶液的制备)

[0042] 在 50mM Hepes 缓冲液(pH7.5)中添加下述各种表面活性剂以成为 0.1(w/v)%,将所得溶液作为基础液,向各基础液中添加半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 抗原以使浓度为约 1mg/L,作为制备样品溶液。

[0043] 将制备样品溶液转移至两台新的日立自动分析用样品杯中,将一个作为“转移 0 次试样”。将另一个样品液转移至新的样品杯中,通过用涡旋充分搅拌,使之与杯充分接触。将该操作再重复一次,进行共计 2 次转移。将该样品溶液作为“转移 2 次试样”。另外,作为比较例,制备在基础液中不含有表面活性剂的样品溶液,与实施例相同地进行吸光度变化量的测定。

[0044] (使用材料)

[0045] 非离子型表面活性剂 A:Emulgen 707(花王公司制造、以聚氧乙烯烷基醚为主体)、HLB 值 12.1

[0046] 非离子型表面活性剂 B:Emulgen A-90(花王公司制造、以聚氧乙烯二苯乙烯化苯

基醚为主体)、HLB 值 14.5

[0047] 非离子型表面活性剂 C:Emulgen B-66(花王公司制造、以聚氧乙烯三苄基苯基醚为主体)、HLB 值 13.2

[0048] 非离子型表面活性剂 D:Tween80(Sigma 公司制造、以聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯为主体)、HLB 值 15.0

[0049] 阴离子型表面活性剂 A:PS-1(东曹公司制造、以聚苯乙烯磺酸钠为主体)

[0050] 阴离子型表面活性剂 B:Pelex NBL(花王、以烷基萘磺酸钠为主体)

[0051] 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 抗原:重组人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(DAKO 公司制造)

[0052] (测定用试剂)

[0053] 第 1 试剂:含有 100mM Tris 缓冲液、pH8.5、500mM 氯化钠。

[0054] 第 2 试剂:抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 抗体致敏胶乳悬浮液。

[0055] 测定方法:通过日立 7180 型自动分析装置(日立制作所制造,参照 <http://www.hitachi-hitec.com/science/medical/7180.html>),以端点法进行自动测定。

[0056] (利用自动分析装置的测定)

[0057] 使用前述半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 测定用试剂对各样品的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度进行测定。向 3 μL 前述制备样品溶液中添加 230 μL 第 1 试剂,将该混合液在 37℃ 下搅拌混合后,放置 5 分钟,然后添加 50 μL 第 2 试剂,进一步在 37±0.1℃ 下搅拌混合。作为 546nm 的吸光度变化量而对约 5 分钟的凝集反应进行测定,并进行半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度的比较。在同一条件下测定浓度事先已知的试样,利用半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度和吸光度变化量的关系制作出标准曲线。吸光度变化量的测定、标准曲线的制作以及定量值的计算使用自动分析装置的附属软件进行。

[0058] 按照下面的计算式计算吸附率,按照判定标准评价各研究材料中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的吸附抑制能力。

[0059] 吸附率 [%] = (转移 2 次样品溶液的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度 / 转移 0 次样品溶液的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 浓度 - 1) × 100

[0060] 判定标准

[0061] ◎ (优良):吸附率的绝对值在 1% 以下

[0062] ○ (良):吸附率的绝对值在 10% 以下

[0063] × (差):吸附率的绝对值超过 10%

[0064] [表 1]

[0065]

	表面活性剂的种类	表面活性剂的主成分 Q内为表面活性剂的最终 浓度	转移处理前后的半胱氨酸 蛋白酶抑制剂 C 浓度 (mg/L)		转移前后的 半胱氨酸蛋 白酶抑制剂 吸附率(%)	判定
			0次(前)A	2次(后)B	(B/A-1)×100	
比较例1	无	Hepes Buffer(50mM)	0.935	0.695	-25.7	×
实施例1	非离子型表面活性 剂A	聚氧乙烯烷基醚(0.1%)	0.998	1.015	1.7	○
实施例2	非离子型表面活性 剂B	聚氧乙烯二苯乙烯化苯 基醚(0.1%)	0.943	0.950	0.7	◎
实施例3	非离子型表面活性 剂C	聚氧乙烯三苄苯基醚 (0.1%)	0.954	0.954	0.0	◎
实施例4	非离子型表面活性 剂D	聚氧乙烯失水山梨糖醇 单油酸酯(0.1%)	0.953	0.936	-1.8	○
比较例2	阴离子型表面活性 剂A	聚苯乙烯磺酸钠(0.1%)	0.898	0.703	-21.7	×
比较例3	阴离子型表面活性 剂B	烷基萘磺酸钠(0.1%)	0.695	0.444	-36.1	×

[0066] 注1:吸附率的数值是绝对值越小,吸附量越少。

[0067] (考察)

[0068] 通过使用非离子型表面活性剂,可以简便地抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂C对样品杯的吸附。由此,显示可以使用自动分析装置以简单的操作准确地进行半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的定量。

专利名称(译)	半胱氨酸蛋白酶抑制剂C吸附抑制剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN102187221A</a>	公开(公告)日	2011-09-14
申请号	CN200980132851.9	申请日	2009-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
[标]发明人	皆川康纪		
发明人	皆川康纪		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/8139 G01N33/54393		
代理人(译)	庞立志		
优先权	2008214513 2008-08-22 JP		
其他公开文献	CN102187221B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了利用简便的方法抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂C对容器的吸附而提高半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的测定精度的方法。本发明还提供含有非离子型表面活性剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂C吸附抑制剂、包含该吸附抑制剂的半胱氨酸蛋白酶抑制剂C测定试剂以及半胱氨酸蛋白酶抑制剂C测定试剂盒。另外，本发明提供抑制半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的吸附的方法，其包含在非离子型表面活性剂的存在下使含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的试剂与测定仪器接触。所述非离子型表面活性剂优选为聚氧乙烯型表面活性剂。或者，所述所述非离子型表面活性剂优选具有苯氧基结构，更优选具有苄基苯氧基结构。

	表面活性剂的种类	表面活性剂的主成分 (O)内为表面活性剂的最终 浓度	转移处理前后的半胱氨酸 蛋白酶抑制剂 C 浓度 (mg/L)		转移前后的 半胱氨酸蛋 白酶抑制剂 吸附率(%) (B/A-1)×100	判定
			0次前A	2次后B		
比较例1	无	Hepes Buffer(50mM)	0.935	0.695	-25.7	×
实施例1	非离子型表面活性 剂 A	聚氧乙烯烷基醚(0.1%)	0.998	1.015	1.7	○
实施例2	非离子型表面活性 剂 B	聚氧乙烯二苯乙炔化苯 基醚(0.1%)	0.943	0.950	0.7	◎
实施例3	非离子型表面活性 剂 C	聚氧乙烯三苄基苯基醚 (0.1%)	0.954	0.954	0.0	◎
实施例4	非离子型表面活性 剂 D	聚氧乙烯失水山梨糖醇 单油酸酯(0.1%)	0.953	0.936	-1.8	○
比较例2	阴离子型表面活性 剂 A	聚苯乙烯磺酸钠(0.1%)	0.898	0.703	-21.7	×
比较例3	阴离子型表面活性 剂 B	烷基苯磺酸钠(0.1%)	0.695	0.444	-36.1	×