



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112969922 A

(43) 申请公布日 2021.06.15

(21) 申请号 201980073261.7

(22) 申请日 2019.11.08

(30) 优先权数据

2018-211559 2018.11.09 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/043799 2019.11.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/096029 JA 2020.05.14

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

(72) 发明人 吉田忠晃 水庭千寻 北原慎一郎

高桥弘至

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 宋明 张莹

(51) Int.Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

用于防止自动分析装置的免疫测定中的异常检测的方法,及免疫测定试剂

(57) 摘要

本发明提供了一种在使用自动分析装置的免疫测定中抑制出现异常检测值并以良好的再现性进行测量的方法,无论使用的反应比色皿是一次性型还是可重复使用型的,以及使用的光学检测方法是测量透射光还是散射光。本发明还提供了一种用于所述方法的免疫测定试剂。用于增强测量再现性并抑制出现异常检测值的方法的特征在于:在免疫测定试剂中包含重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

1. 在用自动分析装置光学检测样本中的分析物与免疫测定试剂之间的反应时防止出现异常检测值并提高测量再现性的方法,其中免疫测定试剂含有重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述聚乙二醇类是选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇和聚甘油组成的组中的至少一种。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在反应体系中所述聚乙二醇类的浓度为0.05-0.5%。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述聚乙二醇类是聚乙二醇。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述免疫测定试剂是用于胶乳浊度免疫测定的试剂。

6. 用于使用自动分析装置光学检测样本中的分析物与免疫测定试剂之间的反应的方法,其中免疫测定试剂含有重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

7. 根据权利要求6所述的方法,所述聚乙二醇类是选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇和聚甘油组成的组中的至少一种。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其中在反应体系中所述聚乙二醇类的浓度为0.05-0.5%。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的方法,其中所述聚乙二醇类是聚乙二醇。

10. 根据权利要求6至9中任一项所述的方法,其中所述免疫测定试剂是用于胶乳浊度免疫测定的试剂。

11. 用于使用自动分析装置的光学检测方法的免疫测定试剂,所述试剂包含重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

12. 根据权利要求11所述的免疫测定试剂,所述聚乙二醇类是选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇和聚甘油组成的组中的至少一种。

13. 根据权利要求11或12所述的免疫测定试剂,其中所述试剂被调节使得在反应体系中所述聚乙二醇类的浓度为0.05-0.5%。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的免疫测定试剂,其中所述聚乙二醇类是聚乙二醇。

15. 根据权利要求11至14中任一项所述的免疫测定试剂,其中所述免疫测定试剂是用于胶乳浊度免疫测定的试剂。

16. 根据权利要求15所述的免疫测定试剂,其中所述试剂包含含有缓冲液的第一试剂,以及含有胶乳的第二试剂,其中第一或第二试剂中的一种或两种含有重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

17. 一种免疫测定试剂盒,其包含权利要求11至16中任一项所述的免疫测定试剂。

用于防止自动分析装置的免疫测定中的异常检测的方法,及 免疫测定试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于在使用自动分析装置的免疫测定中,防止光学检测由免疫反应引起的浊度变化时出现的异常检测,从而提高测量再现性的方法,以及用于所述方法的免疫测定试剂。特别地,本发明涉及在使用自动分析装置的胶乳凝集免疫测定中防止这种异常检测,从而提高测量再现性的方法,以及用于所述方法的免疫测定试剂。

背景技术

[0002] 在临床测定中,测量样本中含有的分析物的浓度,并将测量值用于早期检测疾病或判定治疗效果。如今,自动分析装置广泛用于临床测定中,以便在短时间内准确地测量大量样本。利用自动分析装置测量分析物浓度的广泛使用的方法包括将样本和用于自动分析的试剂混合,并光学检测单位时间内分析物的浓度依赖性变化。透射光或散射光通常用于光学检测。

[0003] 用于自动分析的试剂包括,例如,基于胶乳免疫凝集测定(也称为胶乳浊度免疫测定,下文中有时称为LTIA)原理的试剂。LTIA是这样一种测量方法,其使用例如偶联有针对分析物的抗体的免疫测定颗粒(下文中有时称为抗体偶联的免疫测定颗粒),并例如通过光学方法(例如,测量透射光的浊度方法或测量散射光的散射比浊法(nephelometric method))检测由分析物(其为抗原)与抗体偶联的免疫测定颗粒的抗体之间通过抗原抗体反应的结合而导致的抗体偶联的免疫测定颗粒的凝集引起的浊度变化。

[0004] 目前使用的大多数自动分析装置通过将样本和试剂在透明塑料或玻璃容器(称为反应比色皿)中在光照下混合,并以规则的时间间隔检测透射光或散射光的光学变化进行检测。这种反应比色皿包括将在测量后被处理掉的一次性型比色皿,以及在测量后清洁并重复使用的可重复使用型比色皿。在使用自动分析装置的测量中,在任一类型中妨碍光学检测的异常检测的成因是已知的,从而降低了测量的准确性和再现性。成因包括粘附在反应比色皿上的气泡或污垢,试剂混合不良(溶液不均匀)等。

[0005] 如本文所用,“异常检测(检测中的异常)”包括在通过连续测量样本执行的同时再现性测试中,检测到与其他测量值明显偏离的测量值的情况,以及由于偏离值的影响,同时再现性测试的CV值(变异系数)超过10%的情况。在这种情况的实例中,在具有已知浓度的样本的测量中,测量到的浓度与已知浓度的比例(下文中称为准确性)落在80-120%的范围以外,或甚至测量值的准确性被极大地影响并落在50-150%的范围以外。

[0006] 引文列表

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本专利公开号2013-140035

[0009] 专利文献2:日本专利公开号2013-068443

[0010] 专利文献3:日本专利公开号2003-226893

[0011] 专利文献4:国际公开号W02011/065573小册子

[0012] 专利文献5:日本专利公开号S58-047256

[0013] 专利文献6:日本专利公开号2003-066047

发明内容

[0014] 技术问题

[0015] 例如,专利文献1报道了使用含有表面活性剂的免疫测定试剂作为防止粘附到一次性型反应比色皿的气泡产生的方法。该文献公开了一种涉及在存在非离子聚氧乙烯表面活性剂存在下进行反应和/或测量,从而防止气泡附着在干燥的比色皿的侧表面上的方法。

[0016] 然而,当在免疫测定系统中存在表面活性剂时,表面活性剂根据类型,能抑制抗原-抗体反应,或者将已通过抗原-抗体反应形成的聚集体解离。因此,即使选择了合适的表面活性剂,仍然可能降低测量灵敏度。此外,表面活性剂有时能以复杂的方式引起对免疫测定系统的干扰,例如分析物本身的结构变化,与分析物形成复合物,非特异性吸附在抗体偶联胶乳颗粒上,以及从胶乳颗粒中将抗体和阻断蛋白质脱离。

[0017] 例如,专利文献2提出了一种自动分析装置,其对测定部分的状态,包括可重复使用型反应比色皿的污垢执行周期性和自动检查,从而提高测量数据的准确性。

[0018] 例如,专利文献3提出了反应比色皿清洁溶液,其含有特定有机溶剂,用于特别是在使用LTIA试剂之后从反应比色皿中去除污垢。

[0019] 例如,专利文献4提出了一种防止试剂混合不良(溶液不均匀)的方法。该方法包括将硅树脂消泡剂添加到免疫测定试剂中,并且可以提高使用不同的搅拌/混合过程的各种自动分析装置的测量准确性。

[0020] 另一方面,已知在LTIA试剂中使用PEG(聚乙二醇)产生促进抗体偶联的免疫测定颗粒凝集的作用,从而强化信号,如例如在专利文献5和专利文献6中所公开的那样。专利文献5教导使用PEG可以增加透射光或散射光强度的变化率(促进凝集),从而强化信号并实现高度灵敏、高度准确的测量,并且还教导效果随着聚乙二醇的平均分子量的增加而增加。实际上,在专利文献5的工作实例中,使用平均分子量为1540(PEG 1540)或4000(PEG 4000)的PEG与对照(没有PEG)之间的效果没有显著差异。另一方面,使用平均分子量不小于6000的PEG产生高效果,并且在所有其他实施例中使用PEG 6000。专利文献6还教导了平均分子量为6000的PEG 6000广泛用于促进免疫凝集反应和高灵敏度测量。因此,在免疫凝集测定中,PEG的使用限于使用具有相对高的分子量的PEG而目的在于增加灵敏度,从而实现高度敏感、高度准确的测量。

[0021] 然而,担心的是,如专利文献5和6中所公开的具有相对高的平均分子量为6000的PEG,其较强的灵敏度增强作用能够影响测量值。此外,专利文献5和专利文献6的测量方法是手动方法,并且这些文献未提及在使用自动分析装置测量时对异常检测的预防及提高测量再现性。

[0022] 从前述内容中可以理解,在使用自动分析装置的免疫测定中,检测中的一些异常性或反常仍然难以避免,并且上述技术不能完全解决测量再现性的问题。

[0023] 鉴于上述目前的情况,本发明的一个目的是提供一种用于在使用自动分析装置的免疫测定中防止出现异常检测并以良好再现性进行测量的方法,无论使用的反应比色皿是一次性型的还是可重复使用型的,以及使用的光学检测方法是测量透射光还是散射光,并

提供用于该方法的免疫测定试剂。

[0024] 解决问题的方法

[0025] 本发明人通过深入研究发现,在免疫测定试剂中使用具有特定平均分子量(如下所述的重均分子量)的聚乙二醇类(“聚乙二醇”有时称为“PEG”,“聚乙二醇类”有时称为“PEG类”),不会导致测量灵敏度的改变,并且可以防止异常检测并增强测量的再现性。

[0026] 因此,本发明涉及以下项目(1)至(17)。

[0027] (1)在用自动分析装置光学检测样本中的分析物与免疫测定试剂之间的反应时防止出现异常检测值并提高测量再现性的方法,其中免疫测定试剂含有重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

[0028] (2)根据项目(1)所述的方法,其中所述聚乙二醇类是选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇和聚甘油组成的组中的至少一种。

[0029] (3)根据项目(1)或(2)所述的方法,其中在反应体系中所述聚乙二醇类的浓度为0.05-0.5%。

[0030] (4)根据项目(1)至(3)中任一项所述的方法,其中所述聚乙二醇类是聚乙二醇。

[0031] (5)根据项目(1)至(4)中任一项所述的方法,其中所述免疫测定试剂是用于胶乳浊度免疫测定的试剂。

[0032] (6)用自动分析装置光学检测样本中的分析物与免疫测定试剂之间的反应的方法,其中免疫测定试剂含有重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

[0033] (7)根据项目(6)所述的方法,所述聚乙二醇类是选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇和聚甘油组成的组中的至少一种。

[0034] (8)根据项目(6)或(7)所述的方法,其中在反应体系中所述聚乙二醇类的浓度为0.05-0.5%。

[0035] (9)根据项目(6)至(8)中任一项所述的方法,其中所述聚乙二醇类是聚乙二醇。

[0036] (10)根据项目(6)至(9)中任一项所述的方法,其中所述免疫测定试剂是用于胶乳浊度免疫测定的试剂。

[0037] (11)用于使用自动分析装置的光学检测方法的免疫测定试剂,所述试剂包含重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

[0038] (12)根据项目(11)所述的免疫测定试剂,所述聚乙二醇类是选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇和聚甘油组成的组中的至少一种。

[0039] (13)根据项目(11)或(12)所述的免疫测定试剂,其中所述试剂被调节使得在反应体系中所述聚乙二醇类的浓度为0.05-0.5%。

[0040] (14)根据项目(11)至(13)中任一项所述的免疫测定试剂,其中所述聚乙二醇类是聚乙二醇。

[0041] (15)根据项目(11)至(14)中任一项所述的免疫测定试剂,其中所述免疫测定试剂是用于胶乳浊度免疫测定的试剂。

[0042] (16)根据项目(15)所述的免疫测定试剂,其中所述试剂包含含有缓冲液的第一试剂,以及含有胶乳的第二试剂,其中第一或第二试剂中的一种或两种含有重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

[0043] (17)一种免疫测定试剂盒,其包含项目(11)至(16)中任一项所述的免疫测定试

剂。

[0044] 上述方法 (1) 至 (10) 也可以如下表示。

[0045] (18) 在用自动分析装置光学检测样本中的分析物与免疫测定试剂之间的反应时防止出现异常检测值并提高测量再现性的方法,所述方法包括在重均分子量为300至3000的聚乙二醇类存在下,使标本中的分析物与免疫测定试剂接触的步骤。

[0046] (19) 根据项目 (18) 所述的方法,其中所述聚乙二醇类是选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇和聚甘油组成的组中的至少一种。

[0047] (20) 根据项目 (18) 或 (19) 所述的方法,其中在反应体系中所述聚乙二醇类的浓度为0.05-0.5%。

[0048] (21) 根据项目 (18) 至 (20) 中任一项所述的方法,其中所述聚乙二醇类是聚乙二醇。

[0049] (22) 根据项目 (18) 至 (21) 中任一项所述的方法,其中所述免疫测定试剂是用于胶乳浊度免疫测定的试剂。

[0050] (23) 用自动分析装置光学检测样本中的分析物与免疫测定试剂之间的反应的方法,所述方法包括在重均分子量为300至3000的聚乙二醇类存在下,使标本中的分析物与免疫测定试剂接触的步骤。

[0051] (24) 根据项目 (23) 所述的方法,所述聚乙二醇类是选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇和聚甘油组成的组中的至少一种。

[0052] (25) 根据项目 (23) 或 (24) 所述的方法,其中在反应体系中所述聚乙二醇类的浓度为0.05-0.5%。

[0053] (26) 根据项目 (23) 至 (25) 中任一项所述的方法,其中所述聚乙二醇类是聚乙二醇。

[0054] (27) 根据项目 (23) 至 (26) 中任一项所述的方法,其中所述免疫测定试剂是用于胶乳浊度免疫测定的试剂。

[0055] 发明的有益效果

[0056] 根据本发明,通过在用于自动分析装置的免疫测定试剂中使用具有特定平均分子量的PEG类,可以提供防止出现异常检测并增强测量再现性而不导致测量灵敏度降低的方法。因此,可以提高自动分析装置中的免疫测定的准确性和再现性。

附图说明

[0057] 图1显示了典型PEG类的化学结构:(i) 聚乙二醇;(ii) 聚丙二醇;(iii) 聚丁二醇;(iv) 聚氧乙烯聚氧丙烯二醇;(v) 聚甘油。

具体实施方式

[0058] 现在将描述本发明。在以下描述中,除非另有说明,否则PEG类的含量百分比以质量计(W/V%)。

[0059] (免疫测定试剂)

[0060] 除了主要反应组分之外,根据本发明的免疫测定试剂(试剂溶液)含有特定重均分子量的下述PEG类。

[0061] 免疫测定试剂可含有缓冲液,例如乙酸盐缓冲液,柠檬酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液,Tris缓冲液,甘氨酸缓冲液,硼酸盐缓冲液,碳酸盐缓冲液,Good's缓冲液,或其钠、钾或钙盐,作为用于缓冲或调节样品的pH、离子强度、渗透压等的组分。免疫测定试剂还可含有聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮或磷脂聚合物作为促进凝集的组分。此外,免疫测定试剂可以单独或以两种或以上的组合含有作为用于控制凝集的组分的常用材料,例如蛋白质、氨基酸、糖、金属盐、表面活性剂、还原物质、离液物质(chaotropic substance)等。

[0062] 本发明涉及一种用自动分析装置光学检测样本中的分析物与免疫测定试剂之间的反应的方法,或防止在所述光学检测方法中出现异常检测,并提高测量再现性的方法。因此,本发明涉及这样的方法,其包括在具有特定重均分子量的PEG类存在下,使样本中的分析物与免疫测定试剂接触的步骤。

[0063] (免疫测定颗粒)

[0064] 用于本发明的免疫测定颗粒可以是任何已知的颗粒,只要它们可以支持对目标组分特异的偶联配偶体即可。使用聚合物材料如聚苯乙烯的胶乳颗粒可以被优选使用;然而,取决于用于支持对分析物特异的偶联配偶体的方法,根据本发明,也可以将诸如金属胶体、二氧化硅或碳的无机颗粒用作免疫测定颗粒。

[0065] 考虑到所用的光学测量方法(例如,测量透射光的浊度方法或测量散射光的散射比浊法),免疫测定颗粒的尺寸可以适当地选自0.05-1 μ m,从而可以获得预期的测量灵敏度,测量范围等。在自动分析装置的光学检测中,通常使用0.1-0.4 μ m的平均粒径;然而,免疫测定颗粒的尺寸不限于该范围。

[0066] 免疫测定颗粒的平均粒径可以例如通过粒度分析仪或透射电子显微镜图像来确定。根据使用的免疫测定颗粒的粒径和整个测量系统的设计,试剂中的免疫测定颗粒的浓度可适当地选自例如0.0001mg/ml至10mg/ml。

[0067] 当在本发明中使用胶乳颗粒作为免疫测定颗粒时,对构成胶乳颗粒的合成聚合物没有特别限制。可用聚合物的实例包括聚苯乙烯、苯乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物、聚甲基丙烯酸、聚丙烯酸、聚衣康酸和苯乙烯-亲水性羧基单体共聚物,例如苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、苯乙烯-丙烯酸共聚物或苯乙烯-衣康酸共聚物。其中,优选苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、苯乙烯-衣康酸共聚物、苯乙烯和苯乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物,特别优选苯乙烯和苯乙烯-(甲基)丙烯酸共聚物。

[0068] 苯乙烯磺酸盐的盐的实例包括,并且不限于钠盐、钾盐、锂盐和铵盐。这些盐可以单独使用或以两种或以上的组合使用。其中,特别优选苯乙烯磺酸钠。

[0069] 甲基丙烯酸、丙烯酸、衣康酸、马来酸、富马酸等可作用于本发明的亲水性羧基单体。其中,优选甲基丙烯酸和丙烯酸。

[0070] (测定样本)

[0071] 用于本发明的包含分析物的样本的实例包括人或动物的血液、血清、血浆、培养上清液、尿液、脊髓液、唾液、汗液和腹水,以及来自细胞或组织的提取物。

[0072] 本发明的免疫测定试剂可用于测量在测定样本中含有的各种物质(分析物)。这些分析物包括蛋白质、肽、氨基酸、脂质、碳水化合物、核酸、半抗原等。对分析物没有特别限制,只要理论上可测量即可。分析物的具体实例可包括CRP(C反应蛋白)、Lp(a)、MMP-3(基质金属蛋白酶3)、抗CCP(环状瓜氨酸化肽)抗体、抗磷脂抗体、RPR、IV型胶原蛋白、PSA、BNP(脑

利钠肽 (brain natriuretic peptide))、NT-proBNP、胰岛素、微量白蛋白、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cystatin) C、RF (类风湿因子)、CA-RF、KL-6、PIVKA-II、FDP、D-二聚体、SF (可溶性纤维蛋白)、TAT (凝血酶-抗凝血酶III复合物)、PIC、PAI、因子XIII、胃蛋白酶原I、胃蛋白酶原II、苯妥英 (phenytoin)、苯巴比妥、卡马西平 (carbamazepine)、丙戊酸、茶碱等。

[0073] 本发明的免疫测定试剂由单一试剂溶液,或多种(即两种或以上)试剂溶液组成。多种试剂溶液可包括例如由缓冲溶液组成的试剂溶液,以及含有抗体偶联的颗粒的试剂溶液,所述缓冲溶液例如用于将分析物调节至适合于测量的浓度或用于调节抗原-抗体反应的环境。本发明的PEG类可以包含在构成免疫测定试剂的所有试剂溶液中,或者选择性地包含在其中一种试剂溶液中。在使用胶乳颗粒的免疫测定试剂的情况下,示例性的试剂包含含有缓冲液的第一试剂和含有胶乳的第二试剂,并且所述试剂中的一种或两种含有重均分子量为300至3000的聚乙二醇类。

[0074] 包含免疫测定试剂的本发明的试剂盒可包括测量所需的其它组分,例如清洗液、样本稀释剂、样本萃取液、采样移液管、标准制剂、说明手册等。

[0075] (PEG类)

[0076] 对于本发明的PEG类没有特别限制,只要它具有防止异常检测的效果即可。典型的PEG类如下(参见图1)。

[0077] • 聚乙二醇 (i)

[0078] • 聚丙二醇 (ii)

[0079] • 聚丁二醇 (iii)

[0080] • 聚氧乙烯聚氧丙烯二醇 (iv)

[0081] • 聚甘油 (v)

[0082] 在图中,m和n各自表示重复的结构,并且可以各自是满足下述重均分子量范围的任何值。当聚乙烯链和聚丙烯链共同存在时,它们可以随机分布。优选使用聚乙二醇 (PEG),但也可以使用上述材料的任何混合物。

[0083] 这些PEG类可以通过以下商业产品举例说明。聚乙二醇的实例包括聚乙二醇 (Kishida Chemical)、ADEKA PEG (Adeka) 和PEG (三洋化成工业)。聚丙二醇的实例包括UNIOL (注册商标) D (NOF) 和Newpole (注册商标) PP (三洋化成工业)。聚丁二醇的一个实例是UNIOL (注册商标) PB (NOF)。聚氧乙烯聚氧丙烯二醇的实例包括Emulgen (注册商标) PP-290 (花王)、PRONON (注册商标) (NOF)、ADEKA (注册商标) Pulronic L/P/F (ADEKA) 和Newpole (注册商标) PE (三洋化成工业)。聚甘油的一个实例是POLYGLYCERIN (阪本药品工业)。

[0084] 如以下实施例详细描述,预防异常检测的效果由PEG类的重均分子量决定。

[0085] 根据本发明的PEG类的重均分子量优选不大于3000,因为如果太高,则增强灵敏度的效果高,导致测量值本身的显著变化。上限优选为3000以下,更优选为2800以下,甚至更优选2500以下,最优选2100以下。

[0086] 另一方面,PEG类的重均分子量优选不小于300,因为如果太低,则不会产生明显的异常检测预防效果。下限优选为300以上,更优选为400以上,甚至更优选1000以上,最优选1900以上。

[0087] 因此,用于本发明的PEG类的重均分子量的范围是可以发挥PEG类的灵敏度增强效果和异常检测预防效果两者的范围,所述范围是由本发明发现的。根据本发明的PEG类的重

均分子量的范围优选为300至3000,更优选为400至2500,甚至更优选为400至2100,最优选地为1900至2100。

[0088] 用于本发明的PEG类在测定反应体系中的浓度可以是确保预期的异常检测预防效果的浓度。通常,与重均分子量一样,当浓度太高时,灵敏度增强效果高。因此,浓度优选不大于5%,更优选不大于1.0%,甚至更优选不大于0.5%。另一方面,当浓度太低时,异常检测预防效果低。因此,浓度优选不小于0.005%,更优选不小于0.01%,甚至更优选不小于0.05%。浓度的范围优选不小于0.005%且不大于5%,更优选不小于0.001%且不大于1.0%,甚至更优选不小于0.05%且不大于0.5%。

[0089] 当将PEG类预先添加到本发明的测定试剂时,可以以使得反应体系中的浓度成为落入上述范围内的量进行添加。

[0090] 通过以下方法测量并计算本发明的PEG类的“重均分子量”。

[0091] 重均分子量测量方法:使用尺寸排阻色谱装置(由Tosoh Corporation制造的高速GPC装置:ECO SEC HLC-8320GPC,柱:TSKgel Super Multiporehz-H(4.6mm I.D.×15cm×1),柱温:40.0℃,洗脱液流速:0.2mL/min,校准曲线样品:PstQuick MP-H),对样品溶液(样品浓度:1.0g/L),其为每种类型的PEG水溶液(5%) 20μL和980μL四氢呋喃的混合物进行色谱分析。色谱分析进行三次,并且将重均分子量(Mw)的三个测量值的平均值作为“重均分子量”。

[0092] 对于由Kishida Chemical Co.,Ltd.制造的以下实验例中使用的PEG产品,将制造商声明的平均分子量及其通过上述测量方法测定的重均分子量如下示出:PEG200(产品代码编号010-62905,平均分子量190-210,重均分子量401);PEG400(产品代码编号010-62925,平均分子量380-420,重均分子量562);PEG1000(产品代码编号010-62945,平均分子量950-1050,重均分子量1033);PEG2000(产品代码编号010-62965,平均分子量1800-2200,重均分子量2072);PEG4000(产品代码编号010-62975,平均分子量2700-3400,重均分子量3400);PEG6000(产品代码编号010-62985,平均分子量7400-9000,重均分子量10736);和PEG20000(产品代码编号020-63005,平均分子量18000-25000,重均分子量23555)。

[0093] 为聚合物化合物的PEG类具有分子量分布较宽的特征。因此,用于本发明的PEG类必需的仅是重均分子量的测量值落在300至3000的范围内。对含有具有不同重均分子量的两种或更多种PEG类的混合物的免疫测定试剂而言,如果PEG混合物的重均分子量落在300至3000的范围内,则所述免疫测定试剂落入本发明的范围内。例如,当将重均分子量为300至3000的PEG类加入到含有重均分子量不小于2072的PEG类的试剂中时,如果PEG类的混合物的重均分子量落在300至3000的范围内,则所述试剂落入本发明的范围内。

[0094] 实施例

[0095] 以下实施例更详细地说明了本发明,并且不应解释为限制本发明的范围。

[0096] [实施例1]

[0097] 1.用于测量D-二聚体的胶乳凝集免疫测定试剂的制备

[0098] (第一试剂的制备)

[0099] (1)根据本发明的试剂

[0100] 将五百(500)mM氯化钠,0.4%BSA和0.052%ProClin 300溶解在30mM Tris缓冲液(pH8.5)中。将PEG200(重均分子量401),PEG400(重均分子量562),PEG1000(重均分子量

1033) 和PEG2000 (重均分子量2072) (PEG由Kishida Chemical Co.,Ltd.制造) 加入到该溶液中,加入的量使得最终浓度为0.05%和0.5%,从而分别制备根据本发明的试剂1,2,3和4。

[0101] (2) 对照试剂

[0102] 将五百 (500) mM氯化钠,0.4%BSA和0.052%ProClin 300溶解在30mM Tris缓冲液 (pH8.5) 中,以制备不含PEG的对照试剂1。

[0103] 将PEG4000 (重均分子量3400),PEG6000 (重均分子量10736) 和PEG20000 (重均分子量23555) (PEG由Kishida Chemical Co.,Ltd.制造) 加入到对照试剂1中,加入的量使得最终浓度为0.05%和0.5%,从而分别制备了对照试剂2,3和4。

[0104] (第二试剂的制备)

[0105] 将含有平均粒径为120nm的胶乳颗粒的三 (3) 毫升的5%胶乳悬浮液加入到含有3.2mg/ml抗D-二聚体单克隆抗体03204的3mL 20mM Tris缓冲液 (pH8.5) 中,并将混合物在4℃下搅拌2小时。此后,向混合物中加入含有2.0%牛血清白蛋白的6mL 20mM Tris缓冲液 (pH8.5),并将混合物在4℃下搅拌1小时。对所得液体进行离心分离,并将沉淀重新悬浮在5mM MOPS缓冲液 (pH7.0) 中,使得在600nm波长处的吸光度变为3.00D,从而制备了第二试剂。

[0106] 2. 测量用于测量D-二聚体的胶乳凝集免疫测定试剂的同时再现性

[0107] (1) 用Hitachi 7180自动分析仪 (可重复使用型反应比色皿,检测透射光) 测量

[0108] (i) 测量方法

[0109] 将九点六 (9.6) μ l的D-二聚体浓度为0.0,1.0,3.0,15,30和60 μ g/mL的每种校准品加入到80 μ l的第一试剂中,并将混合物搅拌然后在37℃加热5分钟。此后,将80 μ l第二试剂加入到第一试剂中,并在37℃下以570nm的主波长和800nm的第二波长测量5分钟的吸光度的变化。从D-二聚体浓度为0.0,1.0,3.0,15,30和60 μ g/mL的校准品的六个测量值制作校准曲线。在已知浓度为0.33 μ g/mL的D-二聚体样品 (柠檬酸钠血浆) 上依次测量10次,并计算变异系数,确定每个测量值的准确性和同时再现性。

[0110] 表1

自动分析仪	Hitachi 7180 自动分析仪						
试剂名称	对照试剂 1	对照试剂 2		对照试剂 3		对照试剂 4	
PEG的种类	无	PEG4000		PEG6000		PEG20000	
重均分子量	-	3400		10736		23755	
添加浓度	0%	0.05%	0.5%	0.05%	0.5%	0.05%	0.5%
10个连续测量值 (μ g/mL)	0.26	0.33	0.26	0.27	0.27	0.24	0.19
	0.21	0.36	0.36	0.23	0.26	0.23	0.20
	0.17	0.33	0.33	0.28	0.35	0.31	0.30
	0.19	0.28	0.26	0.28	0.19	0.22	0.35
	0.18	0.24	0.22	0.32	0.22	0.21	0.27
	0.32	0.31	0.22	0.30	0.27	0.25	0.27
	0.29	0.30	0.29	0.28	0.31	0.24	0.20
	0.24	0.32	0.25	0.22	0.30	0.35	0.27
	0.31	0.33	0.28	0.35	0.24	0.32	0.29
	0.33	0.28	0.26	0.28	0.28	0.30	0.26
平均值	0.25	0.31	0.27	0.28	0.27	0.27	0.26
标准偏差	0.06	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05
变异系数(%)	24.0%	9.7%	14.8%	14.3%	18.5%	18.5%	19.2%

[0111]

[0112]

自动分析仪	Hitachi 7180 自动分析仪							
试剂名称	发明试剂 1		发明试剂 2		发明试剂 3		发明试剂 4	
PEG的种类	PEG200		PEG400		PEG1000		PEG2000	
重均分子量	401		562		1033		2072	
添加浓度	0.05%	0.5%	0.05%	0.5%	0.05%	0.5%	0.05%	0.5%
10个连续测量值 ($\mu\text{g/mL}$)	0.39	0.30	0.30	0.31	0.32	0.31	0.36	0.32
	0.32	0.30	0.35	0.35	0.31	0.30	0.33	0.32
	0.32	0.37	0.30	0.33	0.28	0.31	0.36	0.29
	0.33	0.38	0.30	0.33	0.30	0.31	0.36	0.29
	0.35	0.31	0.34	0.33	0.32	0.31	0.33	0.31
	0.30	0.35	0.31	0.33	0.31	0.30	0.28	0.32
	0.35	0.31	0.28	0.33	0.30	0.33	0.31	0.29
	0.37	0.30	0.30	0.31	0.31	0.30	0.30	0.35
	0.33	0.35	0.30	0.32	0.35	0.29	0.33	0.34
	0.30	0.34	0.32	0.31	0.28	0.34	0.35	0.34
平均值	0.34	0.33	0.31	0.33	0.31	0.31	0.33	0.32
标准偏差	0.02	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02
变异系数(%)	5.9%	9.1%	6.5%	3.0%	6.5%	6.5%	9.1%	6.3%

[0113] (ii) 测量结果

[0114] 表1显示了在Hitachi 7180自动分析仪中进行并使用不同浓度的不同类型PEG时的同时再现性的测量结果。使用的自动分析仪是使用可重复使用型反应比色皿并检测透射光的类型。在表1中,以灰色阴影显示在已知浓度为 $0.33\mu\text{g/mL}$ 的D-二聚体样品中,准确性落到80-120%的范围以外的那些测量值(测量值不大于 $0.26\mu\text{g/mL}$,不小于 $0.40\mu\text{g/mL}$),以及不小于10%的那些变异系数值。

[0115] 测量结果表明,在不含PEG的对照试剂1的情况下,有6个测量值的准确性落在80-120%范围以外,并且变异系数差到24.0%。在对照试剂2的情况下并且含有0.05%的PEG4000时,变异系数小于10%,有一个测量值的准确性落在80-120%范围以外。当对照试剂2含有0.5%的PEG4000时,有6个测量值的准确性落在80-120%范围以外,并且变异系数差到14.8%。类似地,在对照试剂3和4的情况下,有2-6个测量值的准确性落在80-120%范围以外,并且变异系数差到14.3至19.2%。

[0116] 另一方面,在本发明的试剂1-4的情况下,没有准确性落在80-120%范围以外的测量值,并且变异系数小于10%。因此,测量数据验证了以0.05-0.5%的浓度使用PEG200-2000(重均分子量为300至3000)增强了测量的准确性和再现性。

[0117] (2) 用Coapresta 3000自动分析仪测量(一次性型反应比色皿,检测透射光)

[0118] (i) 测量方法

[0119] 将D-二聚体浓度为0.0,1.0,3.0,15,30和 $60\mu\text{g/mL}$ 的每种校准品二十点零($20.0\mu\text{L}$)加入到 $100\mu\text{L}$ 的第一试剂中,将混合物搅拌然后在 37°C 加热5分钟。此后,将 $100\mu\text{L}$ 第二试剂加入到第一试剂中,并在 37°C 下以570nm的波长测量2分钟吸光度的变化。从D-二聚体浓度为0.0,1.0,3.0,15,30和 $60\mu\text{g/mL}$ 的校准品的六个测量值制作校准曲线。在已知浓度为 $0.55\mu\text{g/mL}$ 的D-二聚体样品(柠檬酸钠血浆)上依次测量10次,并计算变异系数,并确定每个测量值的同时再现性和准确性。

[0120] 表2

自动分析仪	Coapresta 3000		
试剂名称	对照试剂 1	发明试剂 4	
PEG的种类	无	PEG2000	
重均分子量	—	2072	
添加浓度	0%	0.05%	0.5%
10个连续测量值 ($\mu\text{g/mL}$)	1.02	0.52	0.58
	0.56	0.52	0.57
	0.52	0.56	0.55
	0.55	0.56	0.58
	0.55	0.57	0.54
	0.54	0.57	0.52
	0.52	0.51	0.53
	0.53	0.55	0.54
	0.56	0.55	0.54
	0.55	0.52	0.55
平均值	0.59	0.54	0.55
标准偏差	0.15	0.02	0.02
变异系数(%)	25.8%	4.1%	3.4%

[0121]

[0122] (ii) 测量结果

[0123] 表2显示了在Coapresta 3000自动分析仪中进行并使用浓度为0.05%和0.5%的PEG2000(根据本发明的试剂4)和使用对照试剂1的测量结果。使用的自动分析仪是使用一次性型反应比色皿并检测透射光的类型。在表2中,以灰色阴影显示在已知浓度为 $0.55\mu\text{g/mL}$ 的D-二聚体样品中,准确性落在80-120%的范围以外的测量值(测量值不大于 $0.44\mu\text{g/mL}$ 或不小于 $0.66\mu\text{g/mL}$),以及不小于10%的变异系数值。在对照试剂1的情况下,有一个测量值的准确性落在80%至120%的范围以外且是185%,其可以被视为异常检测值。由于该值的影响,变异系数差到25.8%。

[0124] 另一方面,在本发明的试剂4的情况下,没有准确性落在80%至120%的范围以外的测量值,并且变异系数好到3.4%和4.1%。

[0125] 因此,测量数据验证了在使用一次性反应比色皿的自动分析装置的情况下,根据本发明的PEG的使用也产生了防止检测中的异常性的效果,并且可以提高测量的再现性。

[0126] 工业实用性

[0127] 根据本发明,通过在用于自动分析装置的免疫测定试剂中使用具有特定重均分子量的PEG类,从而可以提供一种可以抑制出现异常检测并增强测量再现性,而不会导致测量灵敏度的降低的自动分析方法,无论使用的反应比色皿是一次性型还是可重复使用型的,以及使用的光学检测方法是测量透射光还是散射光。因此,可以提高自动分析装置中免疫

测定的准确性和再现性。

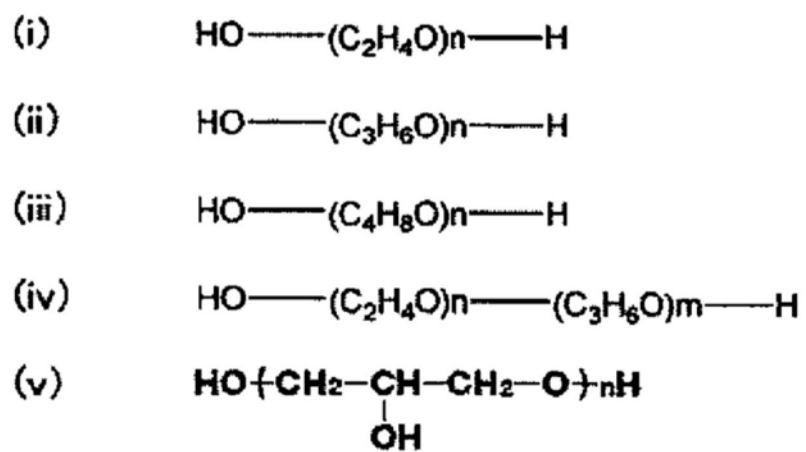


图1