



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103380377 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201280010188. 7

(22) 申请日 2012. 02. 24

(30) 优先权数据

2011-039625 2011. 02. 25 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 08. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/054541 2012. 02. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/115221 JA 2012. 08. 30

(73) 专利权人 美迪恩斯生命科技株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 冈村佳和

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 庞立志 孟慧岚

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2001006683 A1, 2001. 07. 05,

US 6248869 B1, 2001. 06. 19,

CN 101566634 A, 2009. 10. 28,

JP 2002502979 A, 2002. 01. 29,

WO 9633415 A1, 1996. 10. 24,

审查员 周洋

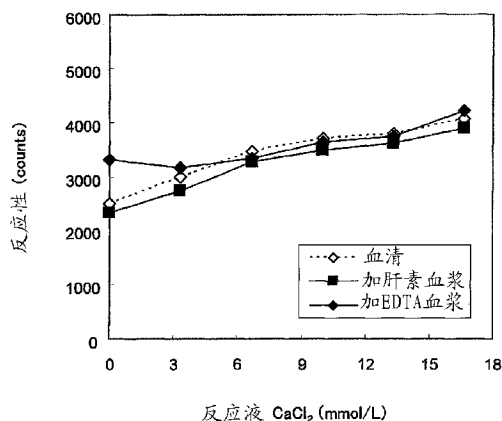
权利要求书1页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

心肌肌钙蛋白的测定方法

(57) 摘要

本发明公开了在 4mmol/L 以上的 2 价阳离子的存在下进行心肌肌钙蛋白和与其特异性地结合的抗体的免疫复合体的形成的、免疫学测定生物体试样中的心肌肌钙蛋白的方法、和包含与心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体、以及含有高浓度 2 价阳离子的缓冲液的心肌肌钙蛋白测定试剂盒。通过该方法或试剂盒, 不论样本种类如何, 均可不受样本中干扰物质的影响而得到稳定且高精度的测定值。



1. 使背离减少的方法, 该背离是在生物体试样中的心肌肌钙蛋白的免疫学测定中, 使用添加有 EDTA 作为抗凝剂的血液试样时的测定值与使用其之外的血液试样时的测定值之间的背离, 该方法的特征在于, 在 4 mmol/L 以上的 2 价阳离子的存在下, 进行心肌肌钙蛋白和与其特异性地结合的抗体的免疫复合体的形成。

2. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 前述 2 价阳离子为钙离子或镁离子。

3. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 在样本稀释液和 / 或抗体溶液中含有前述 2 价阳离子。

4. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 使与心肌肌钙蛋白特异性地结合的第一抗体和第二抗体接触, 并对通过抗原抗体反应形成的免疫复合体进行测定。

5. 权利要求 4 所述的方法, 其中, 前述第一抗体和前述第二抗体是识别不同的表位的抗体。

6. 心肌肌钙蛋白测定试剂盒, 其包含: 用于测定心肌肌钙蛋白的方法的与该心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体、以及含有高浓度 2 价阳离子的缓冲液, 其中, 作为所述抗体与心肌肌钙蛋白的免疫复合体形成时的浓度, 所述缓冲液中的 2 价阳离子的浓度为 4 mmol/L 以上; 所述测定心肌肌钙蛋白的方法是免疫学测定生物体试样中的心肌肌钙蛋白的方法, 该方法的特征在于, 在 4mmol/L 以上的 2 价阳离子的存在下, 进行心肌肌钙蛋白和与其特异性地结合的抗体的免疫复合体的形成。

7. 心肌肌钙蛋白测定试剂盒, 其包含: 用于权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的方法的与该心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体、以及含有高浓度 2 价阳离子的缓冲液, 其中, 作为所述抗体与心肌肌钙蛋白的免疫复合体形成时的浓度, 所述缓冲液中的 2 价阳离子的浓度为 4 mmol/L 以上。

心肌肌钙蛋白的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及样本中的心肌肌钙蛋白的高精度的测定方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 已知肌钙蛋白是包含 3 种蛋白：肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 T 和肌钙蛋白 C 的肌原纤维蛋白复合体，通过肌球蛋白和肌动蛋白的相互作用，有助于对钙离子所致的肌肉收缩进行调节。具体地，冲动达到肌肉的运动终板的标准，从而产生动作电位，传导至肌质网。于是，钙离子被释放至细胞溶胶，并与肌钙蛋白 C 结合。这使得肌钙蛋白 I 和肌钙蛋白 C 的相互作用强化，由此引起肌钙蛋白 I、T、C 复合体的构型变化，使得可通过肌动蛋白-肌球蛋白的相互作用进行肌肉收缩运动。

[0003] 心肌受到不可逆损伤时，释放的心肌肌钙蛋白会出现在血流中。在血液中，心肌肌钙蛋白 I、心肌肌钙蛋白 C 和心肌肌钙蛋白 T 这 3 种亚基形成由其单独，或者由 2 种或 3 种不同的亚基构成的复合体（心肌肌钙蛋白）而存在。

[0004] 为了评价各种心肌肌钙蛋白，通常使用血液试样（血清、血浆或全血）。但是，该选择可根据使用的方法而有所限制。这是由于已知例如，血清是不适于用于快速评价心肌肌钙蛋白的方法的生物学试样，或者全血难以实施定量试验的缘故。在使用加肝素血浆或加肝素全血来实施的免疫学测定中，即便是所用方法的性能非常高的情形，也时常得到缺乏可靠性的结果。通常，在血浆中的心肌肌钙蛋白浓度不太高时，会遭遇该问题（非专利文献 1）。实际上，已知血液试样中肝素的存在会在各种免疫学测定的过程中造成干扰，从而给测定结果带来影响，由此可对医生的临床诊断造成掩饰。

[0005] 作为抗凝剂，也常使用 EDTA 采血管，但对于加 EDTA 血浆或加 EDTA 全血，也能造成可靠性不高的结果。通常，血浆中的心肌肌钙蛋白 I 在钙离子的存在下，与心肌肌钙蛋白 C、心肌肌钙蛋白 T 形成复合体。但是，在 EDTA 的存在下，由于钙离子被螯合，因而含有心肌肌钙蛋白 I 的复合体被分解。因此，已知加 EDTA 血浆或加 EDTA 全血中，心肌肌钙蛋白 I 的血中存在形式的改变会对免疫学测定造成影响（非专利文献 2）。

[0006] 迄今为止，关于心肌肌钙蛋白试验中避免样本中干扰物质的影响的方法，公开有一种免疫学测定方法，其特征在于，在溴化己二甲铵（聚凝胺）的存在下，对含有肝素的生物学试样实施该方法（专利文献 1）。所以是避免来源于肝素的干扰的方法，对于 EDTA 并未提及。

[0007] 此外，还公开了对心肌肌钙蛋白添加 2 价阳离子，由此对心肌肌钙蛋白复合体的稳定化有效（专利文献 2、专利文献 3、专利文献 4）。

[0008] 例如，专利文献 2 中，作为肌钙蛋白复合体的稳定组合物的缓冲液，列举了含有 $100 \mu\text{mol/L} \sim 100\text{mmol/L}$ 的氯化钙或氯化镁浓度的组合物，作为优选的组合物，公开了含有 2mmol/L 氯化钙的实施方式（[0013] 段）。但是，专利文献 2 中，关于肌钙蛋白试验时反应液中（即，免疫复合体形成时）的氯化钙或氯化镁，并未记载浓度，因此，对于必需在心肌肌钙蛋白的免疫学测定的反应液中维持高浓度，以及在低浓度（例如， 2mmol/L ）下根据样本

的种类有时得不到正确值的情况既无暗示也无记载。

[0009] 专利文献 3 记载了作为经稳定化的肌钙蛋白 I 的优选组合物,氯化钙或氯化镁的浓度为 0.01mmol/L ~ 10mmol/L。此外,实施例 14 中还公开了,在进行抗原抗体反应前向血清或血浆添加氯化钙以使最终浓度为 6mmol/L,将所得溶液在室温孵育 2 小时后,在 4℃ 孵育一夜,接着,将孵育后的样品用无金属试验缓冲液以稀释倍数 2 至最大稀释倍数 256 进行稀释的步骤。即,使得反应液中存在约 3mmol/L 以下的氯化钙。但是,对于必需在心肌肌钙蛋白的免疫学测定的反应液中维持高浓度,以及在低浓度(例如,约 3mmol/L)下根据样本的种类有时得不到正确值的情况既无暗示也无记载。应予说明,专利文献 3 的实施例中使用的肌钙蛋白试验缓冲液中的氯化钙浓度为 2mmol/L (例如,实施例 10 ~ 12)。

[0010] 专利文献 4 公开了,作为制备肌钙蛋白复合体时的缓冲液,钙离子和镁离子的浓度并不重要,但优选应为约 20 μ mol/L ~ 约 20mmol/L,钙和 / 或镁的代表量为约 2 ~ 5mmol/L。此外,虽然并不明确,但实施例 1 和实施例 2 中记载了在复合体制备用反应液中还含有其它钙盐,以提供每 1 升为约 225 毫克的氯化钙或 1 ~ 3mmol/L 钙离子。但是,专利文献 4 中,关于肌钙蛋白试验时反应液中的氯化钙或氯化镁,并未记载浓度,对于必需在心肌肌钙蛋白的免疫学测定的反应液中维持高浓度,以及在低浓度(例如,3mmol/L)下根据样本的种类有时得不到正确值的情况既无暗示也无记载。

[0011] 这样,专利文献 2、专利文献 3、专利文献 4 公开的是为了使含有肌钙蛋白复合体的试样稳定化,氯化钙或氯化镁通常是以约 1 ~ 6mmol/L 的浓度添加,而并不是使免疫反应中测定值的可靠性提高。

[0012] 现有技术文献

[0013] 专利文献

[0014] 专利文献 1 :日本特表 2002-502979 号公报

[0015] 专利文献 2 :日本特开平 9-21804 号公报

[0016] 专利文献 3 :日本特表平 11-505605 号公报

[0017] 专利文献 4 :日本特表 2002-508839 号公报

[0018] 非专利文献

[0019] 非专利文献 1 :P. O. Collison et al., Ann. Clin. Biochem., (1995), 32, pp. 454-458

[0020] 非专利文献 2 :Morijana. N et al., Biotechnol. Appl. Biochem. (2001), 33, 107-115。

发明内容

[0021] 发明要解决的问题

[0022] 在后述实施例中也有详述,本发明人尝试了通过免疫学手法对生物体试样中的心肌肌钙蛋白进行测定,结果发现,由该生物体试样制备的测定用样本的种类不同导致测定值产生差异。

[0023] 本发明的目的在于提供 :在检测生物体试样中的心肌肌钙蛋白时,无论使用不同血液凝固抑制剂所致的全血、血清、血浆等样本的种类如何,均可不受样本中干扰物质的影响而获得稳定且高精度的测定值的测定方法和试剂盒。

[0024] 用于解决问题的方法

[0025] 本发明人鉴于上述情况反复进行深入研究, 结果发现, 在免疫学测定生物体试样中的心肌肌钙蛋白的方法中, 通过在反应液中添加有高浓度 2 价阳离子的条件下对该心肌肌钙蛋白进行测定, 不论样本的种类如何, 均可不受样本中干扰物质的影响而获得稳定且高精度的测定值, 从而完成了本发明。

[0026] 所以, 本发明涉及:

[0027] (1) 测定心肌肌钙蛋白的方法, 其是免疫学测定生物体试样中的心肌肌钙蛋白的方法, 其特征在于, 在 4mmol/L 以上的 2 价阳离子的存在下, 进行心肌肌钙蛋白和与其特异性地结合的抗体的免疫复合体的形成;

[0028] (2) 使背离减少的方法, 该背离是在生物体试样中的心肌肌钙蛋白的免疫学测定中, 使用添加有 EDTA 作为抗凝剂的血液试样时的测定值与使用其之外的血液试样时的测定值的背离, 该方法的特征在于, 在 2 价阳离子的存在下, 进行心肌肌钙蛋白和与其特异性地结合的抗体的免疫复合体的形成;

[0029] (3) (1) 或 (2) 的方法, 其中, 前述 2 价阳离子为钙离子或镁离子;

[0030] (4) (1) ~ (3) 中任一项的方法, 其中, 在样本稀释液和 / 或抗体溶液中含有前述 2 价阳离子;

[0031] (5) (1) ~ (4) 中任一项的方法, 其中, 使与心肌肌钙蛋白特异性地结合的第一抗体和第二抗体接触, 并对通过抗原抗体反应形成的免疫复合体进行测定;

[0032] (6) (5) 的方法, 其中, 前述第一抗体和前述第二抗体是识别不同的表位的抗体;

[0033] (7) 心肌肌钙蛋白测定试剂盒, 其包含: 用于 (1) ~ (6) 中任一项的方法的与该心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体、以及含有高浓度 2 价阳离子的缓冲液。

[0034] 发明效果

[0035] 通过使用本发明的方法和药物试剂盒, 不论样本的种类如何, 均可不受样本中干扰物质的影响而对生物体试样中的心肌肌钙蛋白进行稳定且高精度的测定。

附图说明

[0036] [图 1] 是表示对于获自同一健康人的血清、加肝素血浆、加 EDTA 血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本, 使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体, 和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 71 ~ 116 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体, 在氯化钙浓度为 0mmol/L、3.3mmol/L、6.7mmol/L、10.0mmol/L、13.3mmol/L、16.7mmol/L 的条件下, 测定各样本得到的结果的图。

[0037] [图 2] 是表示对于获自同一健康人的血清、加肝素血浆、加 EDTA 血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本, 使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体, 和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 71 ~ 116 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体, 在氯化镁浓度为 0mmol/L、3.3mmol/L、6.7mmol/L、10.0mmol/L、13.3mmol/L、16.7mmol/L 的条件下, 测定各样本得到的结果的图。

[0038] [图 3] 是表示对于获自同一健康人的加肝素血浆、加 EDTA 血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本, 使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体, 和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 21 ~ 30 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体, 在氯化

镁浓度为 0mmol/L、10.0mmol/L、16.7mmol/L 的条件下,测定各样本得到的结果的图。

[0039] [图4] 是表示对于获自同一健康人的加肝素血浆、加EDTA血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本,使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体,和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 24 ~ 40 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体,在氯化镁浓度为 0mmol/L、10.0mmol/L、16.7mmol/L 的条件下,测定各样本得到的结果的图。

[0040] [图5] 是表示对于获自同一健康人的加肝素血浆、加EDTA血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本,使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体,和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 71 ~ 116 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体,在氯化镁浓度为 0mmol/L、10.0mmol/L、16.7mmol/L 的条件下,测定各样本得到的结果的图。

[0041] [图6] 是表示对于获自同一健康人的加肝素血浆、加EDTA血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本,使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体,和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 163 ~ 209 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体,在氯化镁浓度为 0mmol/L、10.0mmol/L、16.7mmol/L 的条件下,测定各样本得到的结果的图。

[0042] [图7] 是表示对于获自同一健康人的加肝素血浆、加EDTA血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本,使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体,和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 175 ~ 190 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体,在氯化镁浓度为 0mmol/L、10.0mmol/L、16.7mmol/L 的条件下,测定各样本得到的结果的图。

[0043] [图8] 是表示对于获自同一健康人的加肝素血浆、加EDTA血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本,使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体,和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 24 ~ 40 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体,在氯化钙浓度为 0mmol/L、6.7mmol/L、10mmol/L 的条件下,测定各样本得到的结果的图。

[0044] [图9] 是表示对于获自同一健康人的加肝素血浆、加EDTA血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本,使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体,和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 71 ~ 116 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体,在氯化钙浓度为 0mmol/L、6.7mmol/L、10mmol/L 的条件下,测定各样本得到的结果的图。

[0045] [图10] 是表示对于获自同一健康人的加肝素血浆、加EDTA血浆中添加有心肌肌钙蛋白 I 而成的样本,使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 41 ~ 49 位的氨基酸序列的抗体作为第一抗体,和使用识别心肌肌钙蛋白 I 的 163 ~ 209 位的氨基酸序列的抗体作为第二抗体,在氯化钙浓度为 0mmol/L、6.7mmol/L、10mmol/L 的条件下,测定各样本得到的结果的图。

具体实施方式

[0046] 本发明中的生物体试样是指由人等采集的有可能含有心肌肌钙蛋白的试样。作为生物体试样,可举出全血、血清、血浆等血液试样等。对于采集生物体试样的对象没有限定,只要期望对心肌肌钙蛋白进行测定,优选为疑似患有心肌梗塞、心力衰竭等心肌疾病的患者。

[0047] 作为可在本发明中使用的样本,只要是可由前述生物体试样制备的测定用试样即可,例如,以血液试样为对象时,可举出使用血液凝固抑制剂得到的全血、血清、血浆等样本。作为血液凝固抑制剂,可使用例如:肝素、EDTA、柠檬酸等。它们可优选在从人等测定对象进行采血时预先添加于采血管等来使用。

[0048] 对于本发明中作为对象的心肌肌钙蛋白,可举出:游离型的心脏型肌钙蛋白 I (有时简称为 cTnI 或 I)或心脏型肌钙蛋白 T (有时简称为 cTnT 或 T)或心脏型肌钙蛋白 C (有时简称为 cTnC 或 C)、和它们的二聚体(IT、IC 或 TC)的形态、或它们的三聚体(ITC)的形态。本说明书中若无特别说明,则心肌肌钙蛋白是指前述任一形态的总称,心肌肌钙蛋白复合体是指前述二聚体或前述三聚体的总称。

[0049] 本发明中可使用的免疫学测定方法可以是使用心肌肌钙蛋白的特异性抗体的公知方法。可举出例如:免疫比浊法(TIA)、酶免疫测定法(EIA)、放射免疫测定法(RIA)、胶乳凝集反应法、荧光免疫测定法、免疫层析法等。具体地,是在反应液中形成样本中的心肌肌钙蛋白和该心肌肌钙蛋白的特异性抗体的免疫复合体,通过适宜地检测该形成所产生的信号,来检测该心肌肌钙蛋白的存在的方法。可以根据测定系统来决定使用的抗体,但在高灵敏度地进行定量测定时,可以选择使用 2 种以上抗体的夹心免疫学测定法(夹心免疫试验)。夹心免疫学测定法的方法可以用 1 个以上阶段(2 个阶段、3 个阶段等)来实施。

[0050] 例如,以生物体试样中所含的心肌肌钙蛋白作为被检物质,对其进行测定时,可通过如下进行:将如前所述由该生物体试样制备的样本进一步用样本稀释液制备为测定用样本,并和担载有与心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体(第一抗体)的不溶性载体、以及经标记物质标记化的与第一抗体不同的与心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体(第二抗体)混合,形成免疫复合体,通过洗涤除去未反应的抗体和心肌肌钙蛋白(B/F 分离),然后测定与不溶性载体结合的标记物质的量。

[0051] 上述不溶性载体可以使用本领域通常使用的不溶性载体。作为不溶性载体的材料,可举出例如:胶乳、橡胶、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、苯乙烯-甲基丙烯酸酯共聚物、聚甲基丙烯酸缩水甘油酯、丙烯醛-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物、聚偏氟乙烯(PVDF)、有机硅等聚合物材料;琼脂糖;明胶;红血球;硅胶、玻璃、惰性氧化铝、磁性体等无机材料等。可将它们的 1 种或 2 种以上组合。

[0052] 此外,作为不溶性载体的形状,可举出微量滴定板、试管、珠、粒子、纳米粒子等。作为粒子,可举出:磁性粒子、聚苯乙烯胶乳之类的疏水性粒子、粒子表面具有氨基、羧基等亲水基团的共聚胶乳粒子、红血球、明胶粒子等。其中,从实现快速简便的 B/F 分离的观点出发,特别优选磁性粒子,具体地,可优选使用例如:包含四氧化三铁(Fe_3O_4)、三氧化二铁(Fe_2O_3)、各种铁素体、铁、锰、镍、钴、铬等金属、钴、镍、锰等的合金的微粒等的磁性粒子。此外,可优选使用将这些磁性粒子以包含于聚苯乙烯等高分子的胶乳、明胶、脂质体等的内部的形式来制备、或者固定于表面而得的粒子。

[0053] 使第一抗体固定化于这些不溶性载体的方法是本领域中公知的。该固定化可以通过例如物理吸附法、共价结合法、离子结合法、它们的组合等来进行。

[0054] 标记物质只要是通常的免疫学测定方法中能够使用的标记物质则没有特别限定,可举出例如:酶、荧光物质、放射性同位素、不溶性粒状物质等。作为该标记用的酶,可举出:碱性磷酸酶、过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、酪氨酸酶、酸性磷酸酶等。作为荧光物质,可举出:异硫氰酸荧光素(FITC)、绿色荧光蛋白(GFP)、萤光素等。作为放射性同位素,可举出: ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等。

[0055] 此外,当标记物质为酶时,通过使用针对该酶的底物进行发光、荧光或显色反

应,可以测定标记物质。例如,在酶为碱性磷酸酶时,作为底物,可使用:CDP-star(注册商标)(4-氯-3-(甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠)、CSPD(注册商标)(3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠)、AMPPD(注册商标)(金刚烷基甲氧基苯基磷酰基二氧杂环丁烷)、APS-5等化学发光底物;4-甲基伞形酮磷酸酯(4-methylumbelliferylphosphate)等荧光底物;对硝基苯基磷酸酯、BCIP(5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸)、NBT(4-硝基四氮唑蓝氯化物)、INT(碘硝基四唑)等显色底物。

[0056] 本发明中使用的与心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体只要是将心肌肌钙蛋白的氨基酸序列识别为表位的单克隆抗体或多克隆抗体则没有特别限定,可举出例如:识别心肌肌钙蛋白 I 的 13~22 位、15~25 位、18~22 位、16~20 位、18~28 位、21~30 位、22~31 位、23~29 位、24~40 位、25~35 位、25~40 位、26~35 位、27~32 位、27~39 位、27~40 位、27~73 位、30~100 位、31~34 位、41~49 位、41~56 位、56~61 位、71~116 位、80~110 位、83~93 位、85~92 位、85~95 位、87~91 位、88~94 位、117~126 位、122~139 位、130~145 位、137~148 位、143~152 位、148~158 位、163~209 位、163~210 位、169~178 位、175~190 位、186~192 位、或 190~196 位的氨基酸序列的抗体。优选可举出识别心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸序列 21~30 位、24~40 位、41~49 位、71~116 位、163~209 位、175~190 位的抗体。

[0057] 这些抗体可以根据公知的方法,例如,以从人心脏纯化得到的肌钙蛋白 I 或肌钙蛋白复合体、体外制作的重组的肌钙蛋白 I 等作为抗原,对动物进行免疫来制作,进而还可确定表位。表位不仅意指抗体所识别的最少的区域,也意指鉴定为抗体可识别的区域的部分。此外,也可以是能够通过公知方法制备的 Fab 等抗体片段。此外,这些抗体可由 Hytest 公司、MedixBiochemica 公司、Meridian Life science 公司、DAKO 公司、Fitzgerald 公司、Biospecific 公司等适宜购入。

[0058] 本发明的测定中使用 2 种抗体时,只要能够与生物体试样中的心肌肌钙蛋白形成免疫复合体则没有限定,优选第一抗体与第二抗体所识别的表位不同。此外,单克隆抗体与多克隆抗体可以适宜组合使用。此外,第一抗体和第二抗体各自并不限于 1 种,可以并用 2 种以上。

[0059] 可以进行本发明中的 2 价阳离子的添加,以使在上述免疫学测定法中,在心肌肌钙蛋白和与该心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体的至少第一次免疫复合体的形成时(反应液中)存在该 2 价阳离子。具体地,可以在免疫复合体形成时(反应液中)的同时添加,也可以在复合体形成前(前述抗体与含心肌肌钙蛋白的样本接触之前)添加于样本中。

[0060] 此外,所添加的 2 价阳离子溶解于公知的缓冲液而配制为溶液。缓冲剂等可以单独制备,也可以在样本的前处理、或反应时和所需的公知物质一起制备。如前所述,2 价阳离子由于只要至少在免疫复合体形成时(反应液中)添加即可,因而可以含有于能够在那时存在的缓冲液等中。能够在免疫复合体形成时存在的缓冲液等能够根据所使用的测定方法或装置而适宜设定,可举出例如:样本稀释液、或抗体溶液(抗体固相粒子液或标记抗体液等)等。此外,也可以添加于多个缓冲液中。

[0061] 作为本发明中的 2 价阳离子,可举出钙离子、镁离子。该离子只要是以能够在反应

液中作为离子存在的方式进行供给,则可以以任意形态添加,优选为盐。具体可举出:氯化钙、氯化镁。

[0062] 作为本发明中的 2 价阳离子的浓度,前述免疫复合体形成时的浓度可以从下述范围中适宜组合选择:4mmol/L 以上、优选 5mmol/L 以上、更优选 6mmol/L 以上、更优选 8mmol/L 以上、更优选 10mmol/L 以上、更优选 12mmol/L 以上、更优选 15mmol/L 以上,并且 500mmol/L 以下、优选 100mmol/L 以下、更优选 50mmol/L 以下、进一步优选 20mmol/L 以下。本发明中,不论生物体试样中的 2 价阳离子存在与否,均预先使反应液中的 2 价阳离子按照上述浓度范围存在。应予说明,若使反应液中的 2 价阳离子浓度过高,则抗原抗体反应受到抑制(阻碍),不能精度良好地进行目标的测定,因而需要注意。此外,依照本发明,为了与样本种类无关而稳定且高精度地对生物体试样中的心肌肌钙蛋白进行测定,根据样本所含的心肌肌钙蛋白的量或所使用的 2 价阳离子来决定要添加的浓度是设计的范围。

[0063] 本发明中的 2 价阳离子的前述浓度与以往方法中心肌肌钙蛋白的免疫学测定的反应液中所含的 2 价阳离子的浓度相比,为高浓度。如以往方法所示,在免疫复合体形成时不含 2 价阳离子、或者即使含有也是低浓度的情形中,如后述实施例的具体实验数据所示,在使用了添加有作为抗凝剂的 EDTA 的血液试样(例如,加 EDTA 血浆、加 EDTA 全血、特别是加 EDTA 血浆)时的测定值、与使用了其之外的血液试样(例如,血清、加肝素血浆、加柠檬酸血浆、全血)时的测定值之间会产生背离。另一方面,在免疫复合体形成时存在高浓度的 2 价阳离子的情形中,测定值的差异变小、或变得实质上一致。这一次,本发明人首次发现的基于有无 EDTA 添加的样本种类的不同所产生的这种行为的差异,是即使使用表位不同的多种单克隆抗体也可共同确认到的现象(参照后述实施例 3 和 4),而并不是特别的单克隆抗体所特有的现象。

[0064] 如后述实施例所示,准备添加有 EDTA 的血液试样和其之外的血液试样,在多种不同浓度的 2 价阳离子的存在下,测定各血液试样中的心肌肌钙蛋白量,把握两试样的测定值一致的 2 价阳离子的浓度范围,由此可以容易地确定本发明中的 2 价阳离子的浓度。即,本发明中的 2 价阳离子的浓度可以从使采用添加有作为抗凝剂的 EDTA 的血液试样时的测定值、与采用其之外的血液试样时的测定值一致的浓度范围中进行选择。

[0065] 本发明的试剂盒可以用于实施本发明的方法,其包含:与心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体、和含有 2 价阳离子的缓冲液。

[0066] 与心肌肌钙蛋白特异性地结合的抗体可以使用前述公知的抗体,也可以使用单克隆抗体或多克隆抗体中的任一者。此外,作为保持对心肌肌钙蛋白的特异性结合能力的抗体断片,例如, Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv,也可以用于试剂盒。

[0067] 进而,前述抗体可以以其原本的状态用于试剂盒,也可以基于所利用的免疫学方法,以适于该方法的形态,例如,若利用胶乳凝集免疫测定法,则以固定于胶乳载体的状态;若采用利用磁性粒子等的高灵敏度测定法,则以固定于磁性粒子的状态;若为免疫层析色谱法等利用基板的方法,则以固定于基板的状态;若需要利用标记物质(例如,酶、荧光物质、化学发光物质、放射性同位素、生物素、抗生物素蛋白)的标记,则以进行了标记的状态,用于试剂盒。

[0068] 作为含有前述 2 价阳离子的缓冲液,可以参照前述,例如是用氯化钙、氯化镁等盐制备的溶液。优选可以制备为样本稀释液。

[0069] 此外,本发明的试剂盒中还可以含有:记载有使用本发明试剂盒的免疫学测定方法的实施步骤相关的说明、试剂盒自身的保存·操作等相关的注意事项等的操作说明书。

实施例

[0070] 以下,通过实施例对本发明进行具体说明,但它们并不限定本发明的范围。

[0071] 《实施例 1:心肌肌钙蛋白测定用试剂的制作和测定方法》

[0072] 实施例 1-1:心肌肌钙蛋白测定用试剂的制作和被检试样的制备

[0073] 作为心肌肌钙蛋白的测定用试剂,制作心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 测定用的试剂。

[0074] · 第一抗体溶液:使用了在磁性粒子(JSR 公司)上结合有将 cTnI 的氨基酸序列 41 ~ 49 位作为表位识别的抗体(19C7:Hytest 公司)的磁性粒子溶液。

[0075] · 第二抗体溶液:使用了将 cTnI 的氨基酸序列 71 ~ 116 位作为表位识别的抗体(DAKO 公司)通过马来酰亚胺法进行了碱性磷酸酶(ALP)标记的标记抗体溶液。

[0076] · 发光底物溶液:使用了 CDP-star (アプラインドバイオシステム公司制)。

[0077] · 样本稀释液:使用了含有 0.1mol/L Tris·HCl (8.2)、0.1% BSA、0.15mol/L NaCl、氯化钙或氯化镁的缓冲液。

[0078] · B/F 洗涤液:使用了含有 0.01mol/L MOPS (7.5)、0.15mol/L NaCl、0.05% Triton X-100 的缓冲液。

[0079] 接着将这些溶液以装载于后述自动免疫测定装置中的方式封入该自动免疫测定装置的自动测定用筒芯(cartridge)中。

[0080] 被检试样是在从健康人获得的血清、加肝素血浆、加 EDTA 血浆中以达到约 0.7ng/mL 的方式添加心肌肌钙蛋白复合体(I-T-C) (Hytest 公司)来制作。

[0081] 实施例 1-2:心肌肌钙蛋白测定用试剂的测定方法

[0082] 心肌肌钙蛋白的测定中,使用了能够自动地进行与日本专利第 3115501 号公报等中所公开相同的使用磁性粒子的免疫测定的自动免疫测定装置。该装置可以在配设作为液体的抽吸·排出线路的尖端(tip)内通过磁力有效地进行 B/F 分离,并显示出高洗涤效率。该装置的测定步骤如下所述。

[0083] 应予说明,检测是将由光电倍增管(PMT)检测出的化学发光底物的发光读数作为测定结果。

[0084] 利用自动免疫测定装置的测定

[0085] 向自动测定用筒芯填充试样、试样稀释液、磁性粒子溶液(担载有第一抗体)、B/F 分离用的洗涤液、第二抗体溶液、底物溶液等,并设定装置。

[0086] 以下,依照通常的运转方法来进行各操作。

[0087] (1) 将使用稀释液调整为任意稀释倍率的试样溶液、磁性粒子溶液、和第二抗体溶液混合,使之进行抗原抗体反应,生成免疫复合物。

[0088] (2) 进行 B/F 分离以除去未反应的物质。首先,通过设置作为液体抽吸线路的尖端抽吸反应液,使磁铁与尖端外壁面接触来捕集磁性粒子。接着,在磁性粒子吸附保持于尖端内壁面的状态下排出溶液进行分离,然后抽吸·排出填充于其他反应容器的 B/F 分离用的洗涤液来进行洗涤。

[0089] (3) 使磁铁从前述尖端的外壁面脱离,在消除磁力影响后,抽吸·排出底物溶液,使

吸附保持于尖端内壁面的磁性粒子分散,进行酶反应。

[0090] (4) 通过 PMT 测定发光量。

[0091] 《实施例 2:反应液中氯化钙或氯化镁的添加造成的对心肌肌钙蛋白反应性的影响》

[0092] 将氯化钙或氯化镁以在反应液中达到各浓度(0、3.3、6.7、10.0、13.3、16.7mmol/L)的方式添加于试样稀释液中,除此之外按照实施例 1 来进行。

[0093] 氯化钙的结果示于图 1,氯化镁的结果示于图 2。由该结果可知,氯化钙或氯化镁的添加是以往使用的低浓度时,在血清和加肝素血浆与加 EDTA 血浆中,心肌肌钙蛋白的反应性不同。进而确认到,通过氯化钙添加 6.7mmol/L 以上、氯化镁添加 13.3mmol/L 以上,使得血清和加肝素血浆与加 EDTA 血浆的心肌肌钙蛋白的反应性一致。

[0094] 由以上可知,通过将高浓度的氯化钙或氯化镁添加至反应液中,任意被检试样均可相同地稳定地测定心肌肌钙蛋白。此外,对于心肌肌钙蛋白复合体(I-T-C),认为在加 EDTA 血浆中由于钙离子发生螯合化,因而复合体发生分解。对于血清和加肝素血浆,尽管心肌肌钙蛋白复合体(I-T-C)是未被分解的状态,由于通过提高反应液中的 2 价阳离子浓度来使之与加 EDTA 血浆的反应性一致,因而认为这里得到的结果是意料之外的结果。已知钙离子会与心肌肌钙蛋白 C 结合,但其结合位点存在多个。因此,心肌肌钙蛋白 I、心肌肌钙蛋白 T 和心肌肌钙蛋白 C 的相互作用认为是通过钙离子浓度而使结合状态发生改变。对于本发明的效果,可考虑下述可能性:通过过量地添加 2 价阳离子,使得心肌肌钙蛋白复合体的分子结构发生变化,从而改变为可获得与游离型心肌肌钙蛋白 I 相同的结构。

[0095] 《实施例 3:酶标记抗体不同时反应液中的氯化镁添加造成的对心肌肌钙蛋白反应性的影响》

[0096] 除了将第二抗体溶液改变为以下抗体,以及添加于反应液的氯化镁浓度以外,按照实施例 1 的方法来进行。作为第二抗体溶液,分别制作了将心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸序列 21 ~ 30 位(MedixBiochemica 公司)、24 ~ 40 位(Biospecific 公司)、71 ~ 116 位(DAKO 公司)、163 ~ 209 位(DAKO 公司)、175 ~ 190 位(MedixBiochemica 公司)作为表位识别的 5 种抗体溶液。对于添加于反应液的氯化镁浓度,以 0、10、16.7mmol/L 来实施。

[0097] 作为第二抗体溶液,使用了以心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸序列 21 ~ 30 位、24 ~ 40 位、71 ~ 116 位、163 ~ 209 位、175 ~ 190 位作为表位的抗体的结果分别示于图 3、图 4、图 5、图 6、图 7。应予说明,图 2 和图 5 是相同抗体的组合结果。该结果确认到,即使在使用与实施例 2 抗原识别部位不同的第二抗体溶液时,也可以与实施例 2 的组合相同地,通过使氯化镁浓度为 10mmol/L 以上,来使血清和加肝素血浆与加 EDTA 血浆的心肌肌钙蛋白的反应性一致。

[0098] 《实施例 4:酶标记抗体不同时反应液中的氯化钙添加造成的对心肌肌钙蛋白反应性的影响》

[0099] 除了将第二抗体溶液改变为以下抗体,以及添加于反应液的氯化钙浓度以外,按照实施例 1 来进行。作为第二抗体溶液,分别制作了将心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸序列 24 ~ 40 位、71 ~ 116 位、163 ~ 209 位作为表位识别的 3 种抗体溶液。对于添加于反应液的氯化钙浓度,以 0、6.7、10mmol/L 来实施。

[0100] 作为第二抗体溶液,使用了以心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸序列 24 ~ 40 位、71 ~ 116

位、163 ~ 209 位作为表位的抗体的结果分别示于图 8、图 9、图 10。应予说明,图 1 和图 9 是相同抗体的组合结果。该结果确认到,即使在使用与实施例 2 抗原识别部位不同的第二抗体溶液时,也可以与实施例 2 的组合相同地,通过使氯化钙浓度为 6.7mmol/L 以上,来使血清和加肝素血浆与加 EDTA 血浆的心肌肌钙蛋白的反应性一致。

[0101] 实施例 3 和实施例 4 的结果暗示,反应液中的 2 价阳离子的添加并不是特定于心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸序列 21 ~ 30 位、24 ~ 40 位、71 ~ 116 位、163 ~ 209 位、175 ~ 190 位中的任一者的结构变化所造成的。所以,推测是通过与以往所认为的 2 价阳离子的添加引起的心肌肌钙蛋白复合体的稳定化不同的作用,高浓度的 2 价阳离子的添加可以使血清和加肝素血浆与加 EDTA 血浆的心肌肌钙蛋白的反应性一致。

[0102] 产业实用性

[0103] 在检测心肌肌钙蛋白时,不论样本的种类如何,本发明均可不受样本中干扰物质的影响而稳定且高精度地得到测定结果。心肌肌钙蛋白可用作心肌梗塞等心肌障碍的指标,因而需要简便·迅速地测定,不仅在检查室而且在 POCT 领域等中也能测定。例如,以血液试样为对象时,由于用于采集该试样的容器多种多样,因而无论所得样本的种类如何,均可稳定且高精度地获得测定结果的本发明特别有用。

[0104] 以上,根据特定的方式说明了本发明,但本领域技术人员显而易见的变形、改良也包含在本发明的范围内。

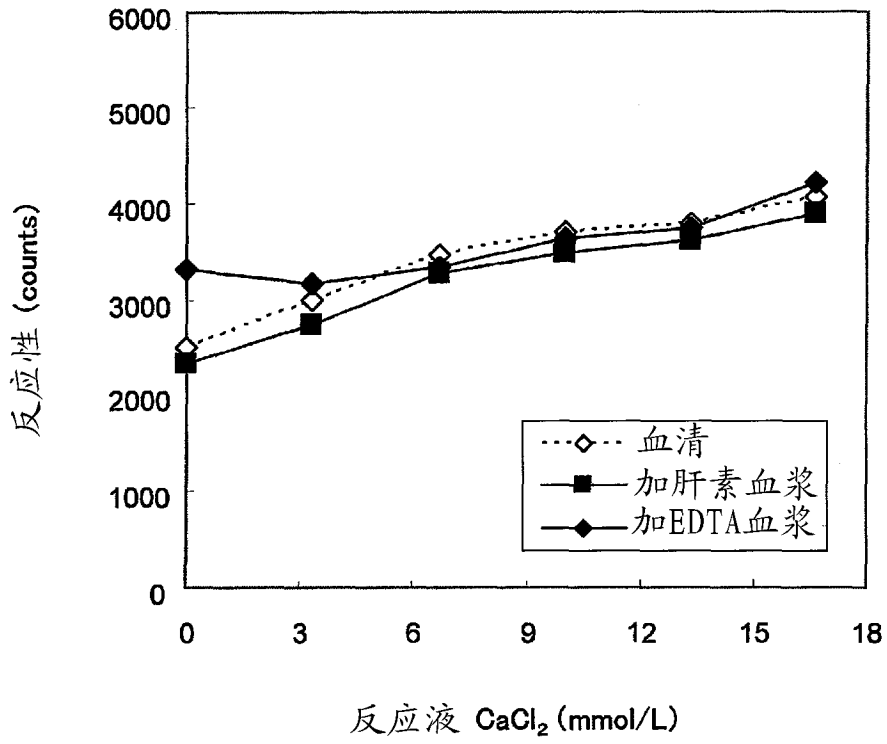


图 1

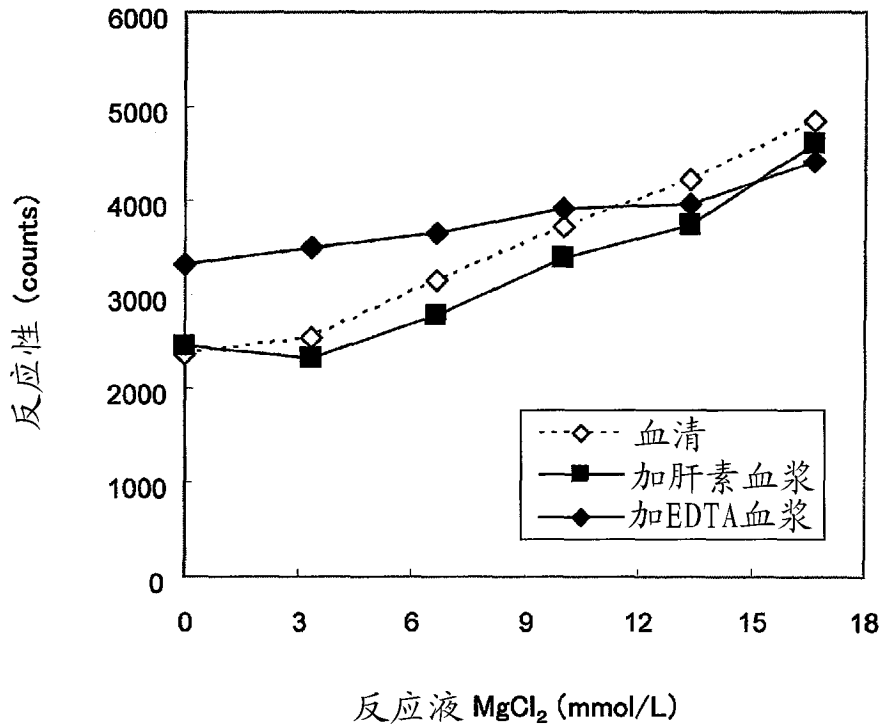


图 2

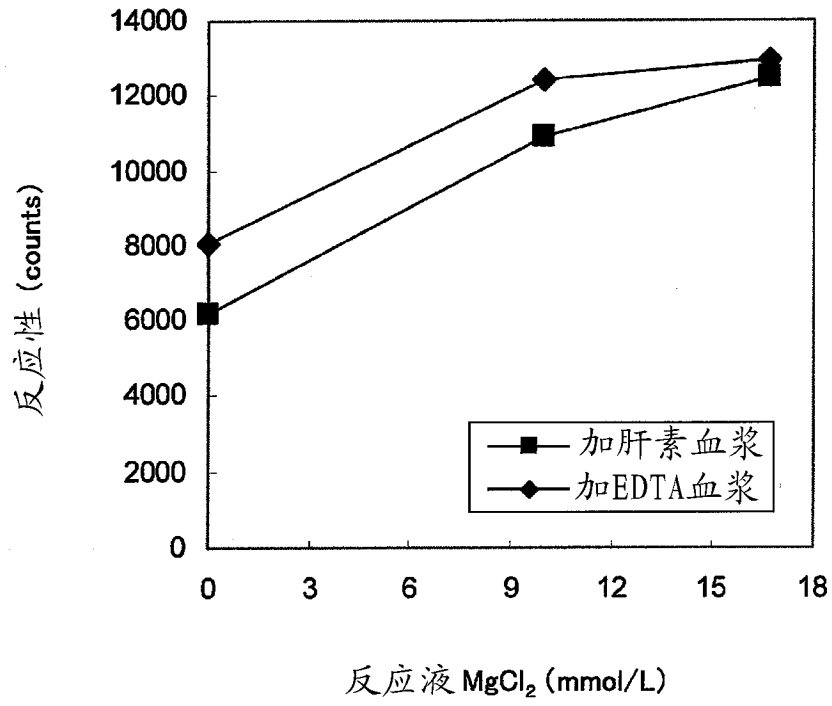


图 3

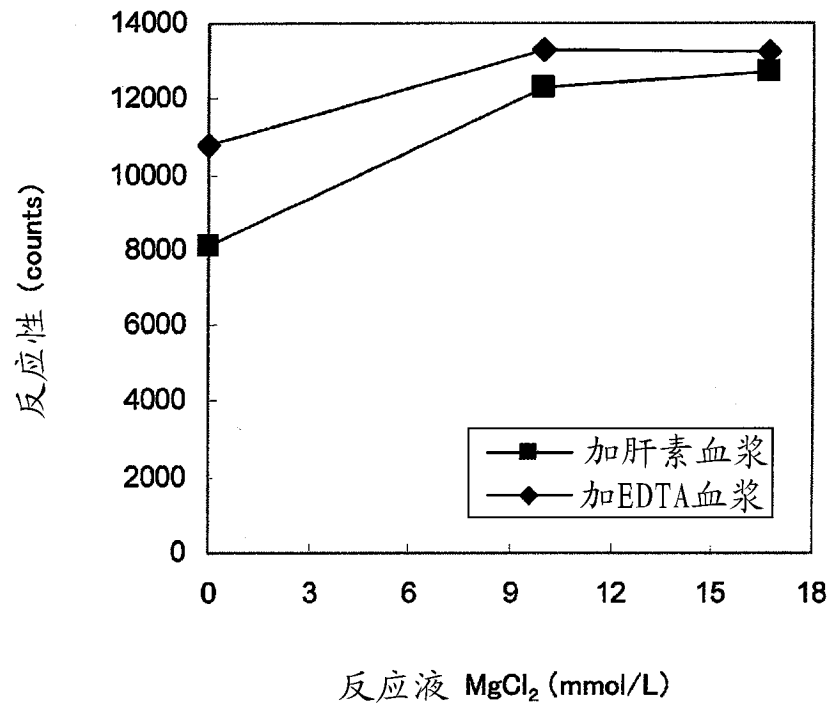


图 4

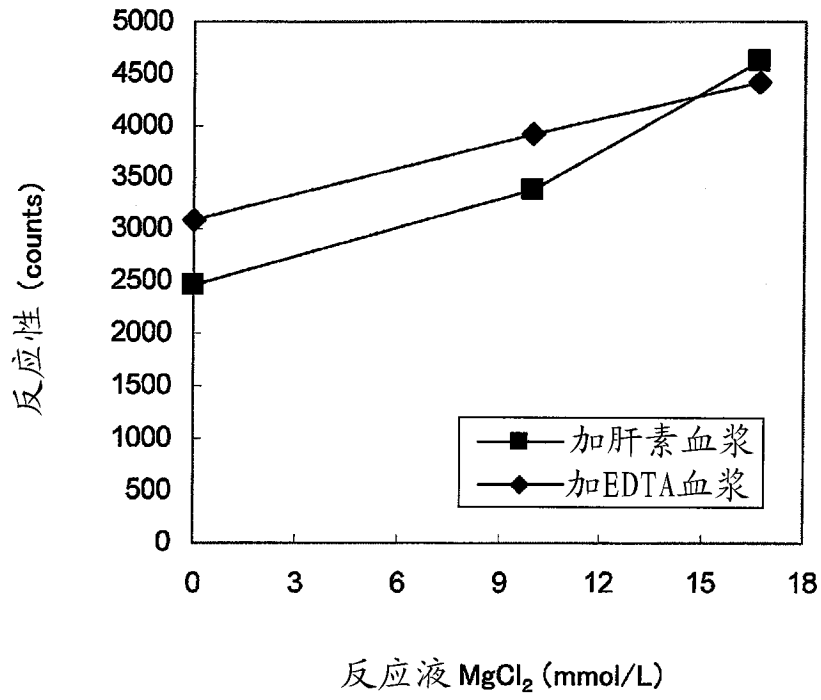


图 5

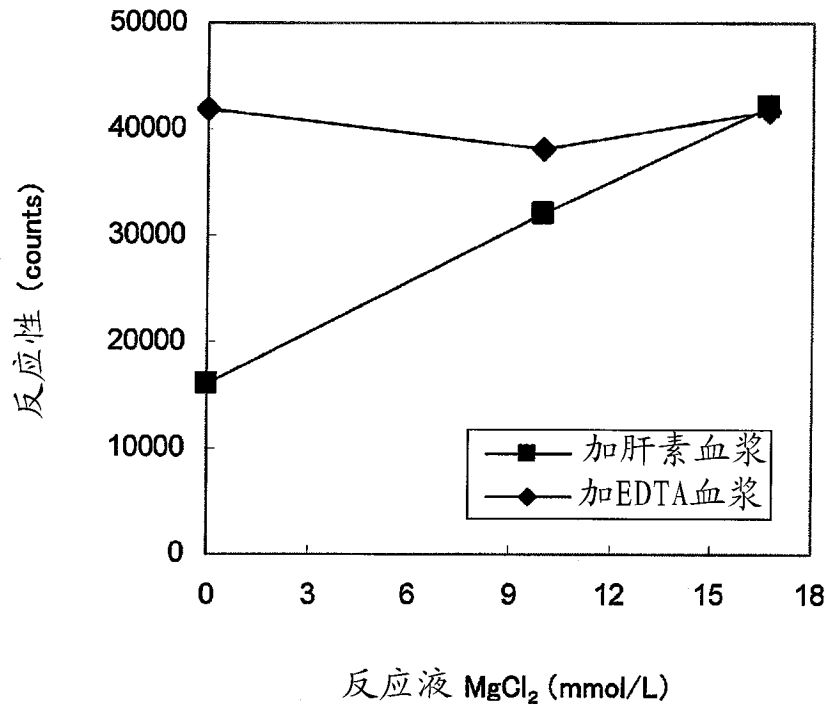


图 6

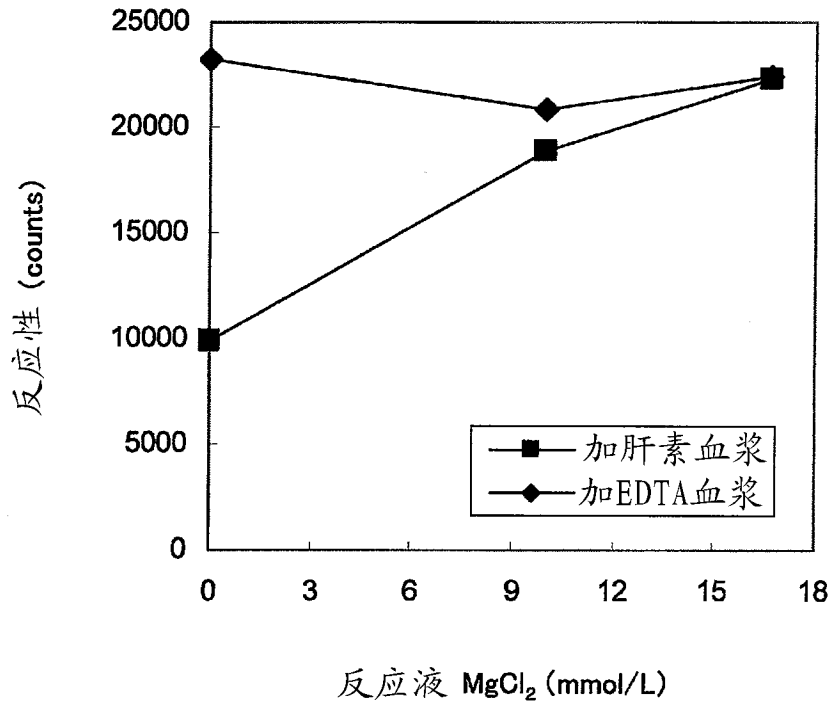


图 7

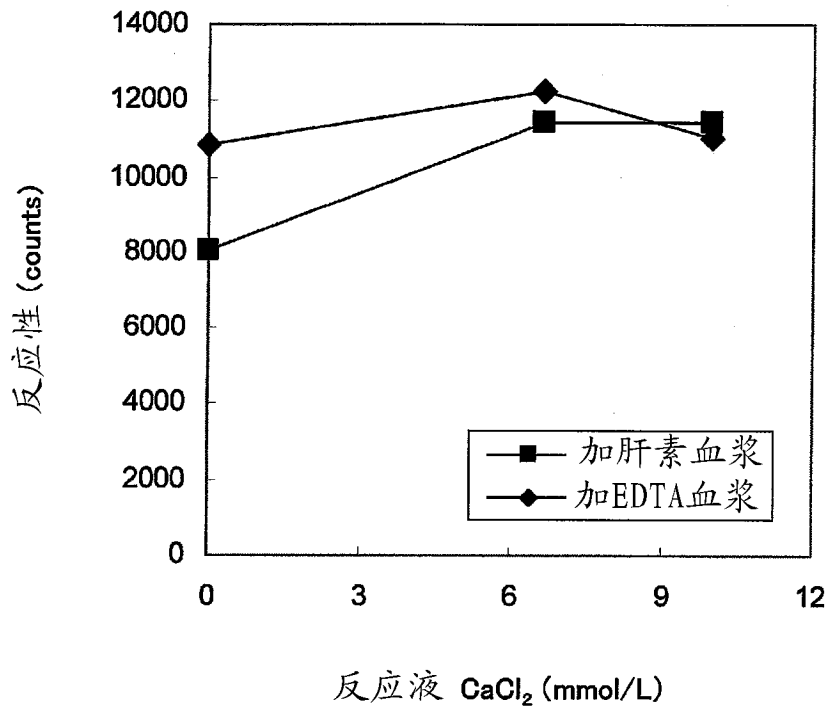


图 8

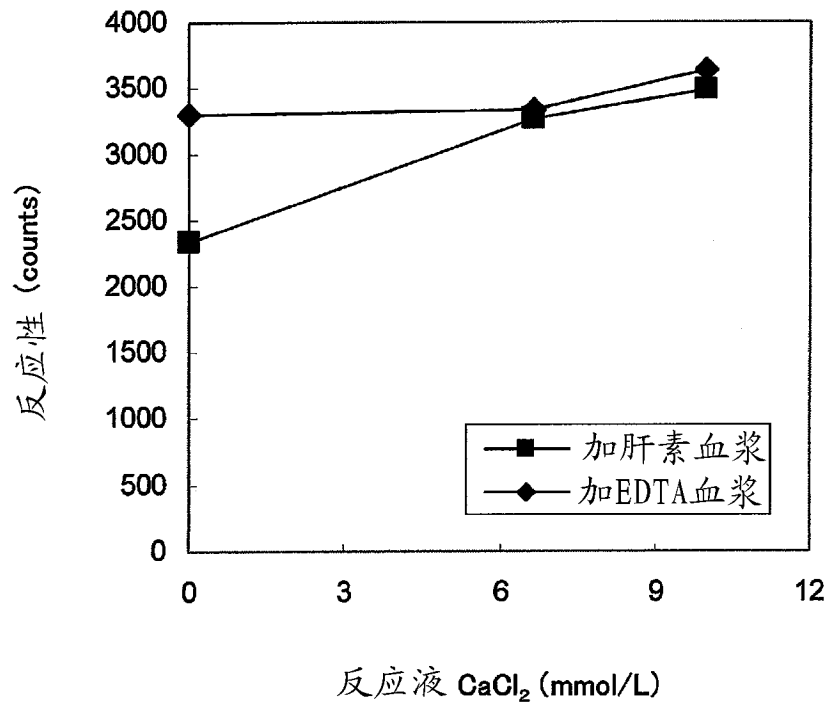


图 9

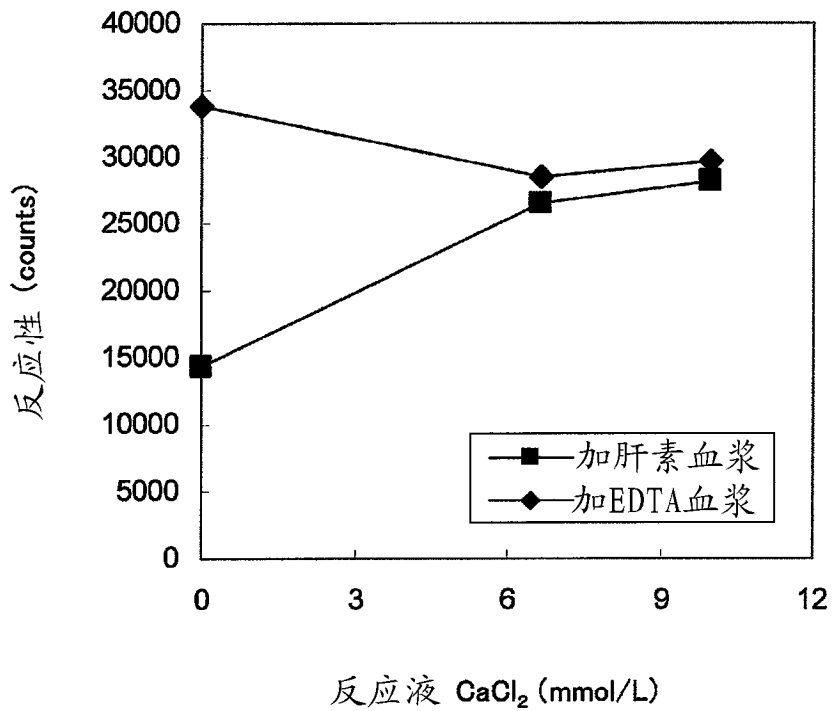


图 10

专利名称(译)	心肌肌钙蛋白的测定方法		
公开(公告)号	CN103380377B	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201280010188.7	申请日	2012-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	美迪恩斯生命科技株式会社		
[标]发明人	冈村佳和		
发明人	冈村佳和		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N2333/4712 G01N33/68		
代理人(译)	庞立志		
审查员(译)	周洋		
优先权	2011039625 2011-02-25 JP		
其他公开文献	CN103380377A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了在4mmol/L以上的2价阳离子的存在下进行心肌肌钙蛋白和与其特异地结合的抗体的免疫复合体的形成的、免疫学测定生物体试样中的心肌肌钙蛋白的方法、和包含与心肌肌钙蛋白特异地结合的抗体、以及含有高浓度2价阳离子的缓冲液的心肌肌钙蛋白测定试剂盒。通过该方法或试剂盒，不论样本种类如何，均可不受样本中干扰物质的影响而得到稳定且高精度的测定值。

