



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104034882 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410235359. 7

G01N 33/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 10. 27

G01N 33/543 (2006. 01)

(30) 优先权数据

2009-250639 2009. 10. 30 JP

(62) 分案原申请数据

201080059603. 9 2010. 10. 27

(71) 申请人 协和梅迪克斯株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 川村瑞穗

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书26页

(54) 发明名称

用于测定样本中的待测定成分的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及用于测定样本中的待测定成分的方法和试剂盒。具体而言,本发明提供了用于测定样本中的待测成分的方法,从而在样本中包含的待测成分例如抗原时能够不受反应温度等的影响而被准确测定。用于测定待测成分的方法的特征在于包含:在脂肪酸烷醇酰胺存在下,将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应;然后与标记的第二抗体进行反应以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到能够与所述待测成分相结合的第二抗体上;以及测量这样形成的免疫复合物中标记物的量。在前述测定方法中使用用于测定样本中的待测成分的测定试剂盒。

1. 一种用于测量待测成分的方法,其中所述方法包含将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应;然后在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与标记的第二抗体进行反应,以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;以及测量形成的免疫复合物中标记物的量。

2. 权利要求1的方法,其中聚氧乙烯非离子型表面活性剂是选自聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚和乙二胺聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物的聚氧乙烯非离子型表面活性剂。

3. 权利要求1或2的方法,其中添加胆汁酸衍生物,并且将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应。

4. 权利要求3的方法,其中胆汁酸衍生物是具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物。

5. 权利要求4的方法,其中具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物是3-[(3-胆酰胺丙基)二甲胺基]丙磺酸盐或3-[(3-胆酰胺丙基)二甲胺基]-2-羟基丙磺酸盐。

6. 权利要求3的方法,其中胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物。

7. 权利要求6的方法,其中具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物是N,N-双(3-葡萄糖酰胺丙基)胆酰胺或N,N-双(3-D-葡萄糖酰胺丙基)脱氧胆酰胺。

8. 权利要求1至7任一项的测量方法,其中将第一抗体固定化在不溶性载体上。

9. 权利要求1至8任一项的方法,其中样本是全血。

10. 权利要求1至9任一项的方法,其中待测成分是MxA蛋白。

11. 一种用于测量样本中的待测成分的试剂盒,其中所述试剂盒包含:第一试剂,其包含与待测成分相结合的第一抗体;以及第二试剂,其包含标记的第二抗体和聚氧乙烯非离子型表面活性剂,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上。

12. 权利要求11的试剂盒,其中聚氧乙烯非离子型表面活性剂是选自聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚和乙二胺聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物的聚氧乙烯非离子型表面活性剂。

13. 权利要求11或12的试剂盒,其中第一试剂还包含胆汁酸衍生物。

14. 权利要求13的试剂盒,其中胆汁酸衍生物是具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物。

15. 权利要求14的试剂盒,其中具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物是3-[(3-胆酰胺丙基)二甲胺基]丙磺酸盐或3-[(3-胆酰胺丙基)二甲胺基]-2-羟基丙磺酸盐。

16. 权利要求13的试剂盒,其中胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物。

17. 权利要求16的试剂盒,其中具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物是N,N-双(3-葡萄糖酰胺丙基)胆酰胺或N,N-双(3-D-葡萄糖酰胺丙基)脱氧胆酰胺。

18. 权利要求11至17任一项的试剂盒,其中第一抗体被固定化在不溶性载体上。

19. 权利要求11至18任一项的试剂盒,其中样本是全血。

20. 权利要求 11 至 19 任一项的试剂盒,其中待测成分是 MxA 蛋白。

## 用于测定样本中的待测定成分的方法和试剂盒

[0001] 本申请是国际申请日为 2010 年 10 月 27 日、国际申请号为 PCT/JP2010/069027 的 PCT 申请于 2012 年 6 月 27 日进入中国国家阶段、申请号为 201080059603.9、发明名称为“用于测定样本中的待测定成分的方法和试剂盒”申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及用于测定样本中的待测成分的方法和试剂盒。

### 背景技术

[0003] 免疫测量方法正被用于测量样本中成分的方法。免疫测量方法包括许多方法，例如 RIA 方法（放射免疫测定法）、EIA 方法（酶免疫测定法）、CLIA 方法（化学发光免疫测定法）、CLEIA 方法（化学发光酶免疫测定法）、LA 方法（乳胶凝集法）、TIA 方法（免疫透射比浊测定法）和免疫层析方法。在这些测定法中，当通过免疫技术执行测量时，利用了样本中的成分（或抗体）与针对它的抗体（或抗原）之间的抗原-抗体反应。此外，在这些免疫测定法中，通过将测量具有已知浓度的标准材料所获得的数值（吸光度）与它们的相应测量值（浓度）之间的关系作于图上，事先制作校准曲线（标准曲线），并获得样本中目标成分的测定值。可以大量制备并且原材料容易获得的重组抗原，通常被用于在这些测定法中使用的标准材料。

[0004] 然而，重组抗原的免疫反应性不一定与天然抗原、即样本中的成分匹配，并且取决于测定期间使用的缓冲液和添加剂，反应性也可能不同。具体来说，当抗原-抗体反应期间的反应温度改变时，两者反应性的差异变得明显，这引起了由于温度而使测定值产生变动的问题（参见专利文献 1 和 2）。

[0005] MxA 蛋白是由 I 型干扰素（干扰素  $\alpha/\beta$ ）所诱导的一系列蛋白中的一种蛋白，其分子量为 78kDa，属于发动蛋白 (Dynammin) 超家族，具有 GTPase 活性，并表达在白细胞、特别是单核细胞的胞质中。关于其功能，由于抑制病毒增殖，已知它具有抗病毒效应，并且据称它在病毒感染的早期阶段参与生物体抗病毒状态的建立（参见非专利文献 1 至 4）。

[0006] 在几种动物物种中发现的 MxA 蛋白在其氨基酸末端中具有特征性氨基酸序列。N-端 G 结构域是抗病毒作用和作为 GTPase 的活性所必需的部分，C-端区域富含  $\alpha$ -螺旋结构并具有亮氨酸拉链结构。已报道这两个部分发生分子内相互反应，或通过分子内相互结合引起自身聚集（参见非专利文献 5）。

[0007] [ 现有技术文献 ]

[0008] [ 专利文献 ]

[0009] [ 专利文献 1 ] 特开 2008-101924 号公报

[0010] [ 专利文献 2 ] W02006/073073

[0011] [ 非专利文献 ]

[0012] [ 非专利文献 1 ] J. Interferon Res. , vol. 7, p. 331-343 (1987).

[0013] [ 非专利文献 2 ] Mol. Cell. Biol. , vol. 9, p. 5062-5072 (1989).

[0014] [非专利文献 3] J. Virol., vol. 64, p. 1171-1181 (1990).

[0015] [非专利文献 4] Traffic, vol. 3, p. 710-717 (2002).

[0016] [非专利文献 5] J. Biological Chem., vol. 273, p. 28365-28370 (1998).

[0017] 发明概述

[0018] [本发明待解决的问题]

[0019] 本发明的目的是提供用于测量样本中的待测成分的方法和试剂盒,由此可以不受反应温度等的影响准确执行样本中的待测成分、例如抗原的测量。

[0020] [解决问题的手段]

[0021] 为了解决所述问题,本发明人进行了锐意研究,并且发现,在样本中的待测成分的免疫测定中,通过在脂肪酸烷醇酰胺存在下将样本中的待测成分与结合所述待测成分相的第一抗体进行反应,使得有可能不受反应温度等的影响进行准确测量。此外,本发明人还发现,在样本中的待测成分的免疫测定中,通过将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应,然后将待测成分在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与标记的第二抗体进行反应,使得有可能不受反应温度等的影响进行准确测量,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;并且本发明人完成了本发明。更具体来说,本发明涉及下列 [1] 至 [28]:

[0022] [1] 一种用于测量待测成分的方法,其中所述方法包含在脂肪酸烷醇酰胺存在下,将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应;然后与标记的第二抗体进行反应以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;以及测量形成的免疫复合物中标记物的量;

[0023] [2] [1] 的方法,其中将标记的第二抗体在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下进行反应;

[0024] [3] 一种用于测量待测成分的方法,其中所述方法包含将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应;然后在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与标记的第二抗体进行反应,以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;以及测量形成的免疫复合物中标记物的量;

[0025] [4] [1] 或 [2] 的方法,其中脂肪酸烷醇酰胺是脂肪酸二乙醇酰胺;

[0026] [5] [2] 或 [3] 的方法,其中聚氧乙烯非离子型表面活性剂是选自聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚和乙二胺聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物的聚氧乙烯非离子型表面活性剂;

[0027] [6] [2] 的方法,其中脂肪酸烷醇酰胺是脂肪酸二乙醇酰胺,并且聚氧乙烯非离子型表面活性剂是选自聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚和乙二胺聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物的聚氧乙烯非离子型表面活性剂;

[0028] [7] [1] 至 [6] 任一项的方法,其中添加胆汁酸衍生物,并且将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应;

[0029] [8] [7] 的方法,其中胆汁酸衍生物是具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物;

[0030] [9] [8] 的方法,其中具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物是 3-[ (3-胆

酰胺丙基)二甲铵基]丙磺酸盐或 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵基]-2-羟基丙磺酸盐;

[0031] [10][7] 的方法,其中胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物;

[0032] [11][10] 的方法,其中具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物是 N,N-双(3-葡萄糖酰胺丙基)胆酰胺或 N,N-双(3-D-葡萄糖酰胺丙基)脱氧胆酰胺;

[0033] [12][1] 至 [11] 任一项的测量方法,其中将第一抗体固定化在不溶性载体上;

[0034] [13][1] 至 [12] 任一项的方法,其中样本是全血;

[0035] [14][1] 至 [13] 任一项的方法,其中待测成分是 MxA 蛋白;

[0036] [15] 一种用于测量样本中的待测成分的试剂盒,其中所述试剂盒包含:第一试剂,其包含与待测成分相结合的第一抗体和脂肪酸烷醇酰胺;以及包含标记的第二抗体的第二试剂,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;

[0037] [16][15] 的试剂盒,其中第二试剂还包含聚氧乙烯非离子型表面活性剂;

[0038] [17] 一种用于测量样本中的待测成分的试剂盒,其中所述试剂盒包含:第一试剂,其包含与待测成分相结合的第一抗体;以及第二试剂,其包含标记的第二抗体和聚氧乙烯非离子型表面活性剂,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;

[0039] [18][15] 或 [16] 的试剂盒,其中脂肪酸烷醇酰胺是脂肪酸二乙醇酰胺;

[0040] [19][16] 或 [17] 的试剂盒,其中聚氧乙烯非离子型表面活性剂是选自聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚和乙二胺聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物的聚氧乙烯非离子型表面活性剂;

[0041] [20][16] 的试剂盒,其中脂肪酸烷醇酰胺是脂肪酸二乙醇酰胺,并且聚氧乙烯非离子型表面活性剂是选自聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚和乙二胺聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物的聚氧乙烯非离子型表面活性剂;

[0042] [21][15] 至 [20] 任一项的试剂盒,其中第一试剂还包含胆汁酸衍生物;

[0043] [22][21] 的试剂盒,其中胆汁酸衍生物是具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物;

[0044] [23][22] 的试剂盒,其中具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物是 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵基]丙磺酸盐或 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵基]-2-羟基丙磺酸盐;

[0045] [24][21] 的试剂盒,其中胆汁酸衍生物是具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物;

[0046] [25][24] 的试剂盒,其中具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物是 N,N-双(3-葡萄糖酰胺丙基)胆酰胺或 N,N-双(3-D-葡萄糖酰胺丙基)脱氧胆酰胺;

[0047] [26][15] 至 [25] 任一项的试剂盒,其中第一抗体被固定化在不溶性载体上;

[0048] [27][15] 至 [26] 任一项的试剂盒,其中样本是全血;并且

[0049] [28][15] 至 [27] 任一项的试剂盒,其中待测成分是 MxA 蛋白。

[0050] [本发明的效果]

[0051] 本发明提供了用于测量样本中的待测成分的方法和试剂盒,其允许不受反应温度等的影响进行准确测量。

[0052] 执行本发明的方式

**[0053] (1) 样本**

**[0054]** 对于在本发明中使用的样本没有特别限制,只要它是允许由本发明进行测量的样本即可,其实例包括全血(血液)、血细胞、血清、血浆、脊髓液、尿液、组织和培养的细胞。全血包括将血浆与从全血获得的血细胞级份相混合的样本。全血可以是原样从对象收集的血液,或者它可以是在对收集到的血液进行处理后获得的血液,并且处理过的血液是优选的。处理的实例包括抗凝处理和溶血处理,并且可以将这些处理进行组合。

**[0055]** 当成分(测量对象)是血细胞的细胞内成分时,优选将经历溶血处理的血液作为全血,经历抗凝和溶血两种处理的血液是特别优选的。抗凝处理的实例包括向收集到的血液加入EDTA、肝素等的处理。溶血处理的实例包括添加表面活性剂或皂角苷溶液、与低渗溶液混合、冻融、超声处理等。

**[0056] (2) 待测成分**

**[0057]** 对本发明中的待测成分没有特别限制,只要它是能够由本发明进行测量的待测成分即可,其实例包括核酸、蛋白质、脂类、维生素和多糖。核酸的实例包括DNA、RNA、ATP、ADP、AMP和环AMP。蛋白质的实例包括酶、激素和各种肽。

**[0058]** 本发明中的适合的待测成分包括细胞中包含的物质和代谢物,优选为由各种细胞因子例如干扰素在细胞中诱导的蛋白质等。待测成分的具体实例是MxA蛋白,其由I型干扰素在胞质中诱导(参见前面提到的非专利文献2至3)。

**[0059] (3) 脂肪酸烷醇酰胺**

**[0060]** 本发明的脂肪酸烷醇酰胺的实例包括脂肪酸二乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸N-甲基乙醇酰胺、脂肪酸单异丙醇酰胺和脂肪酸二异丙醇酰胺,并且脂肪酸二乙醇酰胺是优选的。脂肪酸二乙醇酰胺的实例包括月桂酸二乙醇酰胺、羊蜡酸二乙醇酰胺、辛酸二乙醇酰胺、癸酸二乙醇酰胺、肉豆蔻酸二乙醇酰胺、棕榈酸二乙醇酰胺、硬脂酸二乙醇酰胺、异硬脂酸二乙醇酰胺、油酸二乙醇酰胺、亚油酸二乙醇酰胺、辛基癸酸二乙醇酰胺、椰子油脂肪酸二乙醇酰胺、椰子脂肪酸二乙醇酰胺、牛油脂肪酸二乙醇酰胺、烷基烷醇酰胺和棕榈仁油脂肪酸二乙醇酰胺。其中,油酸二乙醇酰胺、椰子脂肪酸二乙醇酰胺和棕榈仁油脂肪酸二乙醇酰胺是优选的。油酸二乙醇酰胺的具体实例(市售品)包括Stafoam D0和Stafoam DOS(上述产品由日油社制造);椰子脂肪酸二乙醇酰胺的具体实例(市售品)包括Stafoam F、Stafoam DFC和Stafoam DF4(上述产品由日油社制造);棕榈仁油脂肪酸二乙醇酰胺的具体实例(市售品)包括Aminon PK-02S和Aminon PK-03S(上述产品由花王社制造)。

**[0061]** 对脂肪酸烷醇酰胺在抗原-抗体反应中的浓度没有特别限制,只要它是能够执行本发明的测量方法的浓度即可,并且为例如0.1%至1.4%。在本发明中,脂肪酸烷醇酰胺可以单独(一种)或以两种以上的组合使用。

**[0062] (4) 聚氧乙烯非离子型表面活性剂**

**[0063]** 对本发明中的聚氧乙烯非离子型表面活性剂没有特别限制,只要它能够使本发明的测量方法执行即可,其实例包括聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物(在后文中写成POE·POP共聚物)、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚(在后文中写成POE·POP烷基醚)、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基苯基醚(在后文中写成POE·POP烷基苯基醚)、聚氧乙烯聚环苯基醚(在后文中写成POE聚环苯基醚)、聚氧乙烯聚氧丙烯聚环苯基醚(在后文中写成POE·POP聚环苯基醚)或乙二胺聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物(在后文中写成乙二胺POE·POP缩合物)。POE·POP共聚

物、POE • POP 烷基醚和乙二胺 POE • POP 缩合物是优选的, POE • POP 共聚物是特别优选的。

[0064] POE • POP 共聚物可以是嵌段共聚物或无规共聚物。POE • POP 共聚物的具体实例(市售品)包括 Pronon102、Pronon104、Pronon201、Pronon202B、Pronon204、Pronon208、Pronon403(上述产品由日油社制造)、Emulgen PP-230、Emulgen PP-250、Emulgen PP-290(上述产品由花王社制造)、Pluronic L-101、Pluronic L-103、Pluronic L-121、Pluronic L-122 和 Pluronic F-108(上述产品由旭电化工业社制造)。

[0065] POE • POP 烷基醚的具体实例(市售品)包括 Unilube50MB-168、Unilube75DE-25、Unilube75DE-3800、Unilube MT-0620B(上述产品由日油社制造)、Unisafe PKA-5015、Unisafe PKA-5016(上述产品由日油社制造)、EMALEX DAPE-220、EMALEX DAPE-230(上述产品由 Nihon Emulsion Co., Ltd. 制造)、Noigen XL-400 和 Noigen XL-1000F(上述产品由第一工业制药社制造)。

[0066] POE • POP 烷基苯基醚的具体实例(市售品)包括 Emulgen L40(由花王社制造)、Dispanol KP189-40 和 Dispanol KP189R-40(上述产品由日油社制造)。

[0067] POE 聚环苯基醚的具体实例(市售品)包括 Newcol1714、Newcol707、Newcol2609、Newcol2614(上述产品由日本乳化剂社制造)、Emulgen A-60、Emulgen A-90、Emulgen B-66(上述产品由花王社制造)、BLAUNON DSP-9、BLAUNON DSP-12.5、BLAUNON TSP-5 和 BLAUNON TSP-16(上述产品由青木油脂社制造)。

[0068] POE • POP 聚环苯基醚的具体实例(市售品)包括 Newcol2616F、Newcol1710-F、Newcol2608F、Newcol707-F(上述产品由日本乳化剂社制造)、Newkalgen CP-160 和 Newkalgen GP-120(上述产品由竹本油脂社制造)。

[0069] 乙二胺 POE • POP 缩合物的具体实例(市售品)包括乙二胺 P040E040(由日油社制造)和 Pluronic TR-704(由旭电化工业社制造)。

[0070] 对聚氧乙烯非离子型表面活性剂在本发明的测量方法中的浓度没有特别限制,只要它是能够执行本发明的测量方法的浓度即可,并且它是例如 0.01% 至 1%, 优选为 0.05% 至 0.2%。在本发明中,聚氧乙烯非离子型表面活性剂可以单独(一种)或以两种以上的组合使用。

[0071] (5) 胆汁酸衍生物

[0072] 对本发明中的胆汁酸衍生物没有特别限制,只要它能够执行本发明的测量即可,其实例包括具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物和具有非离子型表面活性剂作用的胆汁酸衍生物。具有两性离子表面活性剂作用的胆汁酸衍生物的实例包括 3-[ (3-胆酰胺丙基)二甲铵基]丙磺酸(在后文中缩写为 CHAPS) 和 3-[ (3-胆酰胺丙基)二甲铵基]-2-羟基丙磺酸(在后文中缩写为 CHAPSO)。

[0073] 具有非离子型表面活性剂功能的胆汁酸衍生物的实例包括 N,N-双(3-D-葡萄糖酰胺丙基)胆酰胺(在后文中缩写为 BIGCHAP) 和 N,N-双(3-D-葡萄糖酰胺丙基)脱氧胆酰胺(在后文中缩写为脱氧-BIGCHAP)。

[0074] 胆汁酸衍生物在本发明的测量方法中的使用浓度在 1 至 50 倍临界胶束浓度(cmc)的范围内,具体来说,1 至 10 倍 cmc 浓度是优选的。在本发明中,胆汁酸衍生物可以单独(一种)或以两种以上的组合使用。

[0075] (6) 抗体和标记的抗体

[0076] 对本发明中的抗体没有特别限制,只要它们是与待测成分特异性结合的抗体即可,并且尽管多克隆抗体和单克隆抗体两者都可以使用,但优选为单克隆抗体。此外,在本发明中使用的抗体可以是Fc部分被移除的抗体片段,例如通过抗体的木瓜蛋白酶处理而获得的Fab、通过抗体的胃蛋白酶处理而获得的 $F(ab')_2$ 以及通过抗体的胃蛋白酶处理和还原处理而获得的Fab'。作为抗体片段, $F(ab')_2$ 是优选的。

[0077] 本发明中的抗体可以使用待测成分或与其表位相对应的肽作为抗原,通过标准方法来获得,并且它也可以商购。

[0078] 在待测成分时MxA蛋白的情况下,与MxA蛋白特异性结合的抗体的实例包括分别由杂交瘤细胞系KM1122、KM1123、KM1124(FERM BP-4729)、KM1125、KM1126、KM1127、KM1128、KM1129、KM1130、KM1131、KM1132(FERM BP-4730)、KM1133、KM1134和KM1135(FERM BP-4731)产生的抗人类MxA蛋白单克隆抗体KM1122、KM1123、KM1124、KM1125、KM1126、KM1127、KM1128、KM1129、KM1130、KM1131、KM1132、KM1133、KM1134和KM1135,其描述在国际公布W096/05230号中。

[0079] 本发明中的标记的抗体是可在本发明的测量方法中使用,并且可以通过后面描述的方法,使用前面提到的抗体和下面描述的标记物质产生的抗体。

#### [0080] (7) 测量方法

[0081] 本发明的测量方法是用于测量待测成分的方法,所述方法包含在脂肪酸烷醇酰胺存在下,将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应;然后与标记的第二抗体进行反应以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;并且测量形成的免疫复合物中标记物的量。此外,本发明的测量方法是用于测量待测成分的方法,所述方法包含将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应;然后在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与标记的第二抗体进行反应,以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;并且测量形成的免疫复合物中标记物的量。本发明的测量方法的具体实施方案如下所述。

[0082] (1) 一种方法,其包含:在脂肪酸烷醇酰胺存在下,将待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应(第一反应步骤);然后与标记的第二抗体进行反应(第二反应步骤),以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;以及测量形成的免疫复合物中标记物的量(检测步骤)。

[0083] (2) 一种方法,其包含:将待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应(第一反应步骤);然后在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下,与标记的第二抗体进行反应(第二反应步骤),以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;以及测量形成的免疫复合物中标记物的量(检测步骤)。

[0084] (3) 一种方法,其包含:在脂肪酸烷醇酰胺存在下将待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应(第一反应步骤);然后在聚氧乙烯非离子型表面活性剂存在下与标记的第二抗体进行反应(第二反应步骤),以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上;以及测量

形成的免疫复合物中标记物的量（检测步骤）。

[0085] 在上面提到的（1）至（3）中，第一反应步骤可以在添加胆汁酸衍生物下执行。

[0086] 在上面提到的（1）至（3）中，在第一反应步骤中形成待测成分与第一抗体的免疫复合物。在第二反应步骤中，标记的第二抗体与第一反应步骤中形成的第一抗体与待测成分的免疫复合物反应，并形成第一抗体、待测成分与标记的第二抗体的免疫复合物。在检测步骤中，测量在第二反应步骤中形成的第一抗体、待测成分与标记的第二抗体的免疫复合物中标记物的量。可以通过使用作为具有已知浓度的待测成分的标准材料来执行类似测量，产生显示出浓度与源自于标记物的信息的量之间的关系的校准曲线，并将检测步骤中测定的标记物的量与产生的校准曲线相关联，来确定所用样本中待测成分的浓度。

[0087] 标准材料可以从生物样品制备，它也可以使用通过遗传重组方法生产的重组抗原来制备。标准材料可以采取任何形式，例如溶液形式或冷冻干燥形式，并且取决于形式，它可以在使用时将其溶解在下面所述的水性介质等中之后使用。此外，当制备标准材料时，可以使用下面描述的水性介质、金属离子、盐、糖、表面活性剂、蛋白、蛋白稳定剂等。

[0088] 在上面提到的（1）和（3）的测量方法中，可以通过预先将样本与脂肪酸烷醇酰胺混合、或将样本与脂肪酸烷醇酰胺和胆汁酸衍生物混合，对样本进行预处理，然后将预处理的样本与第一抗体进行反应。在上面提到的（2）的测量方法中，可以通过预先将样本与胆汁酸衍生物混合，对样本进行预处理，然后将预处理的样本与第一抗体进行反应。

[0089] 本发明的测量方法可以适用于干化学或溶液中的反应。对第一反应步骤和第二反应步骤中的反应温度没有特别限制，只要它是能够执行本发明的测量方法的反应温度即可，并且是例如 0℃ 至 50℃，优选为 4℃ 至 40℃。对反应时间没有特别限制，只要它是能够执行本发明的测量方法的反应时间即可，并可以是例如 1 分钟至 72 小时，优选为 5 分钟至 20 小时。

[0090] 在第一反应步骤与第二反应步骤之间可以设置或不设置清洗步骤，并优选设置清洗步骤。此外，在第二反应步骤与检测步骤之间可以设置或不设置清洗步骤，并优选设置清洗步骤。第一抗体可以被固定化（不动化）或可以不被固定化（不动化）在不溶性载体上，并且它优选被固定化（不动化）。如果第一抗体被固定化（不动化）在不溶性载体上，在第一反应步骤后清洗不溶性载体，能够将第一反应步骤中形成的第一抗体与待测成分的免疫复合物与未反应的成分（源自于样本的成分、过量的第一抗体等）分离开。同样地，在第二反应步骤后清洗不溶性载体，能够将第二反应步骤中形成的第一抗体、待测成分与标记的第二抗体的免疫复合物与未反应成分（过量的标记的第二抗体等）分离开。清洗溶液的实例包括磷酸盐缓冲盐水 [含有 0.15mol/L 氯化钠的 10mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH7.2（在后文中称为 PBS）]、含有表面活性剂的 PBS 以及下面描述的水性介质。表面活性剂的实例包括非离子型表面活性剂例如 Tween20。

[0091] 对不溶性载体没有特别限制，只要它能够固定化（不动化）第一抗体并能够执行抗原-抗体反应和检测反应即可。用于不溶性载体的优选材料的实例包括聚合物材料例如聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚乙烯基甲苯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、明胶、琼脂糖、纤维素、硝酸纤维素、醋酸纤维素、乙酰纤维素和聚对苯二甲酸乙二酯；玻璃；陶瓷；磁性粒子和金属。不溶性载体的优选形状的实例包括管、珠子、板、微粒例如胶乳、棒等，优选的是每块板具有 96 个孔的聚苯乙烯微量滴定板等。

[0092] 将第一抗体固定化（不动化）于不溶性载体的方法包括已知方法，例如使用物理键的方法、使用化学键的方法或其组合。物理键的实例包括静电键、氢键和疏水键。化学键的实例包括共价键和配位键。当使用聚苯乙烯微量滴定板作为不溶性载体时，实例包括向板的孔加入第一抗体的溶液、然后在 4°C 至 30°C 下温育 1 小时至 1 天以进行物理吸附的固定方法。

[0093] 第一抗体可以被直接或间接固定化（不动化）在不溶性载体上。间接固定化（不动化）的实例包括向固定有亲和素的不溶性载体添加生物素化第一抗体的溶液、并将第一抗体通过生物素与亲和素之间的特异性结合固定在不溶性载体上的方法。此外，可以将与第一抗体特异性结合的抗体固定在不溶性载体上，并可以通过该抗体将第一抗体固定在不溶性载体上。或者，可以将第一抗体经接头通过共价键固定在不溶性载体上。接头是例如能够与第一抗体上的官能团和不溶性载体表面上的官能团两者共价结合的分子。优选的是在同一分子内带有能够与第一抗体的官能团反应的第一反应性基团和能够与不溶性载体表面上的官能团反应的第二反应性基团的分子，其中特别优选的是第一反应性基团和第二反应性基团是不同基团的分子。第一抗体的官能团和不溶性载体表面上的官能团的实例包括羧基、氨基、缩水甘油基、巯基、羟基、酰胺基、亚氨基、N-羟基琥珀酰基和马来酰亚胺基。接头上的反应性基团的实例包括基团例如芳基叠氮化物、碳二亚胺、酰肼、醛、羟甲基膦、酰亚胺酯、异氰酸酯、马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）酯、五氟苯基（PFP）酯、补骨脂、吡啶基二硫化物和乙烯砜。

[0094] 当第一抗体不被固定化（不动化）在不溶性载体上时，可以将第一反应步骤后的反应溶液流过其上固定化（不动化）有能够与第一抗体反应的物质的不溶性载体，然后通过清洗不溶性载体将包含第一抗体和待测成分的免疫复合物与未反应的成分（源自于样本的成分、过量的第一抗体等）分离开。可以通过与前面提到的用于将第一抗体固定化（不动化）于不溶性载体的方法类似的方法，将能够与第一抗体反应的物质固定化（不动化）在不溶性载体上。

[0095] 用于标记第二抗体的标记物质的实例包括酶、荧光物质、发光物质、放射性同位素、生物素、洋地黄毒甙、含有标签序列的多肽、金属胶体粒子和着色乳胶粒子。酶的实例包括碱性磷酸酶、过氧化物酶、半乳糖苷酶、葡萄糖苷酸酶和萤光素酶。荧光物质的实例包括荧光素异硫氰酸酯（FITC）和罗丹明 B-异硫氰酸酯（RITC）。其他荧光物质的实例包括量子点（*Science*, 281, 2016–2018, 1998）、藻胆蛋白类例如藻红蛋白，以及发射荧光的蛋白例如绿色荧光蛋白（GFP）、红色荧光蛋白（RFP）、黄色荧光蛋白（YFP）和蓝色荧光蛋白（BFP）。发光物质的实例包括吖啶及其衍生物、钆络合化合物和洛粉碱。对于钆络合化合物来说，优选的是在 *Clin. Chem.* 37, 9, 1534–1539, 1991 中描述的与电子供体一起电化学发光的化合物。放射性同位素的实例包括  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$  和  $^{131}\text{I}$ 。

[0096] 含有标签序列的多肽的实例包括 FLAG 肽（FLAG 标签，Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys）、聚组氨酸（His 标签，His His His His His His）、myc 表位肽（myc 标签，Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu）和凝血素表位肽（HA 标签，Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala）。

[0097] 可以通过在第二抗体的官能团与标记物质的官能团之间使用或不使用接头进行形成共价键的反应，来执行第二抗体的标记。官能团的实例包括羧基、氨基、缩水甘油基、巯

基、羟基、酰胺基、亚氨基、羟基琥珀酰酯基、马来酰亚胺基和异硫氰酸酯基。可以在这些官能团之间执行缩合反应。

[0098] 不使用接头的连接方法的实例包括使用碳二亚胺化合物例如 EDC 的方法。在这种情形中,可以使用活性酯例如 NHS 或其衍生物。优选的是异硫氰酸酯基团与氨基之间的缩合反应,因为它不需其他试剂,并且通过在中性至弱碱性条件下进行混合而简单进行。

[0099] 接头的实例包括具有与第二抗体的官能团反应的官能团和与标记物质的官能团反应的官能团两者的分子。接头优选为在同一分子内具有与第二抗体的氨基酸残基反应的第一官能团和与标记物质的官能团反应的第二官能团的分子。其中特别优选的是第一官能团是与第二官能团不同的基团的分子。接头的官能团的实例包括上面描述的官能团。

[0100] 用于化学连接放射性同位素的方法的实例,包括在文献 (Antibody Immunoconj. Radiopharm., 3, 60, 1990) 中描述的方法。

[0101] 在标记物质是多肽例如酶、亲和素、发射荧光的蛋白、藻胆蛋白和含有标签序列的多肽的情形中,可以按照已知的遗传重组技术 (《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001), 通过产生含有标记物质与抗体的融合蛋白的编码 DNA 的表达载体, 将表达载体导入适合的宿主并对宿主进行培养, 来进行生产。可以通过使用 PCR 等克隆各种编码抗体的 DNA 和编码标记物质的 DNA, 并通过连接酶反应将每个 DNA 连接, 来获得编码融合蛋白的 DNA。

[0102] 在检测步骤中, 测量在第二反应步骤中形成的第一抗体、待测成分与标记的第二抗体的免疫复合物中标记物的量。可以根据用于测量标记物量的标记物质来选择适合的方法。在标记物质是着色物质、即吸收某种波长的光的物质的情形中, 可以使用分光光度计、多孔板读板器等。在标记物质是荧光物质的情形中, 可以使用荧光分光光度计、荧光多孔板读板器等。当标记物质是发光物质时, 可以使用发光光度计、发光多孔板读板器等。在标记物质是放射性同位素的情形中, 可以通过使用闪烁计数器、 $\gamma$ -孔计数器等测量放射活性来测定放射性同位素的量。

[0103] 在标记物是酶的情形中, 测量标记物的量意味着测量酶活性。可以通过将酶的底物与酶进行反应并测量形成的产物, 来测量标记物的量。在酶是过氧化物酶的情形中, 可以通过例如吸光度方法、荧光方法、发光方法来测量过氧化物酶活性。通过吸光度方法测量过氧化物酶活性的方法的实例, 包括将过氧化物酶与过氧化物酶底物组合过氧化氢和氧化性着色发色团进行反应并使用分光光度计、多孔板读板器等来测量反应溶液的吸光度的方法。氧化性着色发色团的实例包括隐色体类型的发色团和氧化偶联产色的发色团。

[0104] 隐色体类型的发色团是在过氧化氢和过氧化物物质例如过氧化物酶存在下自身转变成染料物质。其具体实例包括四甲基联苯胺、邻苯二胺、10-N-羧甲基氨基甲酰基-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪 (CCAP)、10-N-甲基氨基甲酰基-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪 (MCDP)、N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-双(二甲基氨基)二苯胺钠盐 (DA-64)、4,4'-双(二甲基氨基)二苯胺和双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲基氨基苯基]胺 (BCMA)。

[0105] 氧化偶联产色的发色团是在过氧化氢和过氧化物物质例如过氧化物酶存在下通过两种化合物的氧化偶联形成染料物质。两种化合物的组合的实例包括成色剂与苯胺化合物的组合 (Trinder 试剂)、以及成色剂与苯酚化合物的组合。成色剂的实例包括 4-氮

基安替比林 (4-AA) 和 3- 甲基 -2- 苯并噻唑啉酮脒。苯胺化合物的实例包括 N-(3- 磺丙基) 苯胺、N- 乙基 -N-(2- 羟基 -3- 磺丙基) -3- 甲基苯胺 (TOOS)、N- 乙基 -N-(2- 羟基 -3- 磺丙基) -3, 5- 二甲基苯胺 (MAOS)、N- 乙基 -N-(2- 羟基 -3- 磺丙基) -3, 5- 二甲氧基苯胺 (DAOS)、N- 乙基 -N-(3- 磺丙基) -3- 甲基苯胺 (TOPS)、N-(2- 羟基 -3- 磺丙基) -3, 5- 二甲氧基苯胺 (HDAOS)、N, N- 二甲基 -3- 甲基苯胺、N, N- 二 (3- 磺丙基) -3, 5- 二甲氧基苯胺、N- 乙基 -N-(3- 磺丙基) -3- 甲氧基苯胺、N- 乙基 -N-(3- 磺丙基) 苯胺、N- 乙基 -N-(3- 磺丙基) -3, 5- 二甲氧基苯胺、N-(3- 磺丙基) -3, 5- 二甲氧基苯胺、N- 乙基 -N-(3- 磺丙基) -3, 5- 二甲基苯胺、N- 乙基 -N-(2- 羟基 -3- 磺丙基) -3- 甲氧基苯胺、N- 乙基 -N-(2- 羟基 -3- 磺丙基) 苯胺、N- 乙基 -N-(3- 甲基苯基) -N' - 琥珀酰基乙二胺 (EMSE)、N- 乙基 -N-(3- 甲基苯基) -N' - 乙酰基乙二胺和 N- 乙基 -N-(2- 羟基 -3- 磺丙基) -4- 氟 -3, 5- 二甲氧基苯胺 (F-DAOS)。苯酚化合物的实例包括苯酚、4- 氯苯酚、3- 甲酚和 3- 羟基 -2, 4, 6- 三碘苯甲酸 (HTIB)。

[0106] 通过荧光方法测量过氧化物酶活性的方法的实例, 包括将过氧化物酶与过氧化物酶底物组合过氧化氢和荧光物质进行反应并使用荧光分光光度计、荧光多孔板读板器等来测量产生的荧光强度的方法。荧光物质的实例包括 4- 羟基苯基乙酸、3-(4- 羟基苯基) 丙酸和香豆素。

[0107] 通过发光方法测量过氧化物酶活性的方法的实例, 包括将过氧化物酶与过氧化物酶的底物组合过氧化氢和发光物质进行反应并使用发光强度计、发光多孔板读板器等来测量产生的发光强度的方法。发光物质的实例包括鲁米诺化合物和光泽精化合物。

[0108] 在酶是碱性磷酸酶的情形中, 可以通过例如发光方法来测量碱性磷酸酶活性。通过发光方法测量碱性磷酸酶活性的方法的实例, 包括将碱性磷酸酶与其底物进行反应, 并使用发光强度计、发光多孔板读板器等来测量产生的发光强度的方法。碱性磷酸酶的底物的实例包括 3-(2' - 螺金刚烷) -4- 甲氧基 -4-(3' - 磷酸氧基) 苯基 -1, 2- 二氧杂环丁烷二钠盐 (AMPPD)、2- 氯 -5-{4- 甲氧基螺 [1, 2- 二氧杂环丁烷 -3, 2' -(5' - 氯) 三环 [3. 3. 1. 13, 7] 癸烷] -4- 基} 苯基磷酸二钠盐 (CDP-Star<sup>TM</sup>)、3-{4- 甲氧基螺 [1, 2- 二氧杂环丁烷 -3, 2' -(5' - 氯) 三环 [3. 3. 1. 13, 7] 癸] -4- 基} 苯基磷酸二钠盐 (CSPD<sup>TM</sup>) 和 [10- 甲基 -9(10H) - 亚吡啶基] 苯氧基甲基磷酸二钠盐 (Lumigen<sup>TM</sup> APS-5)。

[0109] 在酶是  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶的情形中, 可以通过例如吸光度方法 (比色方法)、发光方法或荧光方法来测量  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶活性。通过吸光度方法 (比色方法) 测量  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶活性的方法的实例, 包括使用邻硝基苯基 - $\beta$ -D- 吡喃半乳糖苷的方法。通过发光方法测量  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶活性的方法的实例, 包括将  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶与其底物进行反应并使用发光强度计、发光多孔板读板器等来测量反应溶液的发光的方法。 $\beta$ -D- 半乳糖苷酶的底物的实例包括 Galacton-Plus (由 Applied Biosystems 制造) 及其类似物。通过荧光方法测量  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶的方法的实例, 包括将  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶与其底物进行反应并使用荧光分光光度计、荧光多孔板读板器等来测量反应溶液的荧光的方法。 $\beta$ -D- 半乳糖苷酶的底物的实例包括 4- 甲基伞形酮基 - $\beta$ -D- 吡喃半乳糖苷。

[0110] 在酶是萤光素酶的情形中, 可以通过例如发光方法来测量萤光素酶活性。通过发光方法测量萤光素酶活性的方法的实例, 包括将萤光素酶与其底物进行反应并使用发光强度计、发光多孔板读板器等来测量反应溶液的发光的方法。萤光素酶底物的实例包括萤光

素和腔肠素。

[0111] 当标记物质是荧光物质、发光物质、放射性同位素或酶之外的物质（被称为物质 A）时，标记的物质 B 是与物质 A 特异性结合并用荧光物质、发光物质、放射性同位素、酶等标记的物质（物质 B），将其与在第二反应步骤中形成的第一抗体、待测成分与标记的第二抗体（即用物质 A 标记的第二抗体）的免疫复合物进行反应，以形成第一抗体、待测成分、标记的第二抗体（即用物质 A 标记的第二抗体）与标记的物质 B 的免疫复合物；然后通过用上面提到的方法测量该形成的免疫复合物中标记物的量，来测量样本中的待测成分。物质 B 的实例包括针对物质 A 的抗体、亲和素（当物质 A 是生物素时）、链亲合素（当物质 A 是生物素时）和生物素（当物质 A 是亲和素或链亲合素时）。针对物质 A 的抗体可以是抗体片段，抗体片段的实例包括上面提到的 Fab、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fab'。

[0112] 同时，本发明的测量方法 (1) 和 (2) 的第一反应步骤也可应用于竞争方法。具体来说，可以提出下面的实施方案作为竞争方法的实例：

[0113] (4) 一种方法，其包含：在脂肪酸烷醇酰胺存在下，将待测成分与标记物结合于竞争性物质上的标记的竞争性物质和结合待测成分和标记的竞争性物质两者的抗体进行反应（竞争性反应步骤）；并测量形成的标记的竞争性物质与抗体的免疫复合物中标记物的量（检测步骤）。

[0114] (5) 一种方法，其包含：在脂肪酸烷醇酰胺存在下，将待测成分与竞争性物质和标记的抗体进行反应，其中标记物被结合于与待测成分和竞争性物质两者相结合的抗体（竞争性反应步骤）；并测量形成的竞争性物质与标记抗体的免疫复合物中标记物的量（检测步骤）。

[0115] 竞争性反应步骤可以在添加胆汁酸衍生物下执行。在竞争性反应步骤与检测步骤之间可以设置或不设置清洗步骤，并优选设置清洗步骤。清洗步骤的实例包括在上面提到的测定方法 (1) 至 (3) 中的清洗步骤。

[0116] 在上面提到的 (4) 的方法中，与待测成分和标记的竞争性物质两者相结合的抗体可以被或不被固定化（不动化）在不溶性载体上，并且它优选被固定化（不动化）。此外，在上面提到的 (5) 的方法中，竞争性物质可以被或不被固定化（不动化）在不溶性载体上，并且它优选被固定化（不动化）。

[0117] 竞争性反应步骤可以在存在或不存在水性介质下执行，并优选在存在水性介质下执行。水性介质的实例包括下面描述的水性介质等。在这里，竞争性物质是指能够与“结合待测成分的抗体”结合并且其结合与待测成分是竞争性的物质，包括待测成分本身。当通过竞争方法测量样本中的待测成分时，使用竞争性物质。因此，在竞争方法中使用的与待测成分结合的抗体，是与待测成分和竞争性物质结合的抗体，并且尽管它通过与待测成分结合而形成免疫复合物，但它也通过与竞争性物质结合而形成免疫复合物。

[0118] 竞争性物质优选为具有与结合于所述成分的抗体所识别的表位一致的结构物质。此外，优选竞争性物质对结合于待测成分的抗体的结合强度，与所述成分对抗体的结合强度相当。待测成分自身优选作为竞争性物质。可以使用竞争性物质和前面提到的标记物质，通过与用于前面提到的标记的第二抗体相似的方法来制备标记的竞争性物质。

[0119] 在本发明中使用的水性介质的实例包括去离子水、蒸馏水和缓冲液，优选为缓冲液。对用于制备缓冲液的缓冲剂没有特别限制，只要它具有缓冲能力即可。缓冲剂的实例包

括具有 pH1 至 11 的缓冲剂,例如乳酸缓冲剂、柠檬酸缓冲剂、乙酸缓冲剂、琥珀酸缓冲剂、邻苯二甲酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、三乙醇胺缓冲剂、二乙醇胺缓冲剂、赖氨酸缓冲剂、巴比妥酸缓冲剂、咪唑缓冲剂、苹果酸缓冲剂、草酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、硼酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂或 Good' s 缓冲剂。

[0120] Good' s 缓冲剂的实例包括 2- 吗啉乙磺酸 (MES) 缓冲剂、双 (2- 羟基乙基) 亚氨基三 (羟基甲基) 甲烷 (Bis-Tris) 缓冲剂、三 (羟基甲基) 氨基甲烷 (Tris) 缓冲剂、N-(2- 乙酰胺基) 亚氨基二乙酸 (ADA) 缓冲剂、哌嗪 -N, N' - 双 (2- 乙磺酸) (PIPES) 缓冲剂、2-[N-(2- 乙酰胺基) 氨基] 乙磺酸 (ACES) 缓冲剂、3- 吗啉 -2- 羟基丙磺酸 (MOPSO) 缓冲剂、2-[N, N- 双 (2- 羟基乙基) 氨基] 乙磺酸 (BES) 缓冲剂、3- 吗啉丙磺酸 (MOPS) 缓冲剂、2-{N-[三 (羟基甲基) 甲基] 氨基} 乙磺酸 (TES) 缓冲剂、N-(2- 羟基乙基) -N' -(2- 磺乙基) 哌嗪 (HEPES) 缓冲剂、3-[N, N- 双 (2- 羟基乙基) 氨基] -2- 羟基丙磺酸 (DIPSO) 缓冲剂、2- 羟基 -3- {[N- 三 (羟基甲基) 甲基] 氨基} 丙磺酸 (TAPSO) 缓冲剂、哌嗪 -N, N' - 双 (2- 羟基丙 -3- 磺酸) (POPSO) 缓冲剂、N-(2- 羟基乙基) -N' -(2- 羟基 -3- 磺丙基) 哌嗪 (HEPPSO) 缓冲剂、N-(2- 羟基乙基) -N' -(3- 磺丙基) 哌嗪 (EPPS) 缓冲剂、tricine [N- 三 (羟基甲基) 甲基甘氨酸] 缓冲剂、vicine [N, N- 双 (2- 羟基乙基) 甘氨酸] 缓冲剂、3-[N- 三 (羟基甲基) 甲基] 氨基丙磺酸 (TAPS) 缓冲剂、2-(N- 环己基氨基) 乙磺酸 (CHES) 缓冲剂、3-(N- 环己基氨基) -2- 羟基丙磺酸 (CAPSO) 缓冲剂和 3-(N- 环己基氨基) 丙磺酸 (CAPS) 缓冲剂。

[0121] 对缓冲液的浓度没有特别限制,只要它是适合于测量的浓度即可,并优选为 0.001 至 2.0mol/L,更优选为 0.005 至 1.0mol/L,特别优选为 0.01 至 0.1mol/L。

[0122] 在本发明的测量方法中,可以共同存在金属离子、盐、糖、防腐剂、蛋白质、蛋白稳定剂等。金属离子的实例包括镁离子、锰离子和锌离子。盐的实例包括氯化钠和氯化钾。糖的实例包括甘露糖醇和山梨糖醇。防腐剂的实例包括叠氮化钠、抗生素 (链霉素、青霉素、庆大霉素等)、BioAce、Proclin300 和 Proxel GXL。蛋白质的实例包括牛血清白蛋白 (BSA)、胎牛血清 (FBS)、酪蛋白和 BlockAce (由 Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. 制造)。蛋白稳定剂的实例包括过氧化物酶稳定化缓冲液 (Peroxidase Stabilizing Buffer, 由 DakoCytomation 制造)。

[0123] (8) 用于测量的试剂盒

[0124] 本发明的用于测量的试剂盒是用于免疫测量样本中的待测成分的试剂盒,并且可用于本发明的测量方法。

[0125] 本发明的测量用试剂盒是包含如下物质的测量用试剂盒:包含与待测成分相结合的第一抗体和脂肪酸烷醇酰胺的第一试剂;以及包含标记的第二抗体的第二试剂,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上。此外,本发明的测量用试剂盒是包含如下物质的测量用试剂盒:包含与待测成分相结合的第一抗体的第一试剂;以及包含标记的第二抗体和聚氧乙烯非离子型表面活性剂的第二试剂,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上。本发明的测量用试剂盒的具体实施方案如下所示。

[0126] (1) 一种用于测量样本中的待测成分的试剂盒,其包含:包含与待测成分相结合的第一抗体和脂肪酸烷醇酰胺的第一试剂;以及包含标记的第二抗体的第二试剂,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上。

[0127] (2) 一种用于测量样本中的待测成分的试剂盒,其包含:包含与待测成分相结合的第一抗体的第一试剂;以及包含标记的第二抗体和聚氧乙烯非离子型表面活性剂的第二试剂,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上。

[0128] (3) 一种用于测量样本中的待测成分的试剂盒,其包含:包含与待测成分相结合的第一抗体和脂肪酸烷醇酰胺的第一试剂;以及包含标记的第二抗体和聚氧乙烯非离子型表面活性剂的第二试剂,其中标记物被结合到与所述待测成分相结合的第二抗体上。

[0129] 第一试剂可以含有胆汁酸衍生物。

[0130] 在上面提到的(1)和(3)的试剂盒中,第一试剂可以采取将包含脂肪酸烷醇酰胺的试剂[第一试剂(A)]与包含与待测成分相结合的第一抗体的试剂[第一试剂(B)]分开储存的形式。在上面提到的(1)和(3)的试剂盒中,当第一试剂中包含胆汁酸衍生物时,第一试剂可以采取将包含脂肪酸烷醇酰胺和胆汁酸衍生物的试剂[第一试剂(A)]与包含与待测成分相结合的第一抗体的试剂[第一试剂(B)]分开储存的形式。在上面提到的(2)的试剂盒中,当第一试剂中包含胆汁酸衍生物时,第一试剂可以采取将包含胆汁酸衍生物的试剂[第一试剂(A)]与包含与待测成分相结合的第一抗体的试剂[第一试剂(B)]分开储存的形式。在这里,第一试剂(A)可以用作样本预处理溶液。

[0131] 本发明的试剂盒的形式可以是任何形式,例如溶液形式或冷冻干燥形式。本发明的试剂盒的各第一抗体、标记的第二抗体、脂肪酸烷醇酰胺、聚氧乙烯非离子型表面活性剂和胆汁酸衍生物的实例,包括上文提到的那些。此外,如果需要,本发明的试剂盒可以包括前面提到的水性介质、金属离子、盐、糖、防腐剂、蛋白质、蛋白稳定剂等。

[0132] 在下文中,将参考实施例对本发明进行具体描述,所述实施例不应被解释为限制本发明的范围。

[0133] [实施例 1]

[0134] [1] 抗 MxA 蛋白单克隆抗体的制备

[0135] 如下所述,制备了两种类型的具有不同表位的抗人类 MxA 蛋白单克隆抗体 KM1124(W096/05230)和 KM1135(W096/05230)。KM1124 是与人类 MxA 蛋白从氨基端算起 220 至 297 位残基中存在的表位相结合的小鼠单克隆抗体,KM1135 是与人类 MxA 蛋白从氨基端算起 10 至 220 位残基中存在的表位相结合的小鼠单克隆抗体。

[0136] 将产生单克隆抗体 KM1124 的杂交瘤细胞系 KM1124(FERM BP-4729)和产生单克隆抗体 KM1135 的杂交瘤细胞系 KM1135(FERM BP-4731),以 5 至  $20 \times 10^6$  个细胞/动物的量分别腹膜内注射到降植烷处理过的 8 周龄雌性裸小鼠(Balb/c)中。在 10 至 21 天后,杂交瘤细胞系在腹水中成瘤,并从蓄积腹水液的小鼠收集腹水液。将收集的腹水液以 3000rpm 离心 5 分钟以除去固形物,并收集上清液。将从这些上清液通过辛酸沉淀方法(《抗体实验指南》(Antibodies-A Laboratory Manual),Cold Spring Harbor Laboratory,1988)纯化的单克隆抗体,用于免疫测量 MxA 蛋白的方法中。

[0137] [2] 重组 MxA 蛋白的制备

[0138] 使用通过在 pET-14b 载体(由 Novagen,EMD Biosciences 制造)的 NdeI 和 BamHI 之间插入含有编码人类 MxA 蛋白的 cDNA(基于 Genbank 中登记为 BC032602 的核苷酸序列制备)的 NdeI-BamHI 片段而产生的人类 MxA 蛋白表达载体 pET14b-MxA,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)pLysS 株。该转化体表达 N-端添加有 His 标签的 MxA 蛋白。

[0139] 将获得的转化体接种在 5mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中,在 37°C 下执行振摇培养,直到 600nm 处的光密度 (OD600) 达到 0.5。将该培养液接种到 250mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中,并在 37°C 下执行振摇培养,直到 600nm 处的光密度达到 0.3 至 0.5。向该培养液加入终浓度为 0.4mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG),并将培养在 37°C 振摇下继续执行 2 小时。将获得的培养液在 4°C 以 3000rpm 离心 10 分钟,以收集细菌细胞。在 MxA 蛋白制备之前将细菌细胞储存在 -80°C。

[0140] 由于 MxA 蛋白以包含体形式存在于细菌细胞中,因此将细菌细胞在冰上融化,并加入 20mL 冰冷的结合缓冲液 (5mmol/L 咪唑,0.5mol/L 氯化钠,20mmol/L Tris-HCl,pH7.9) 以得到悬液。对细菌细胞悬液进行 5 次 30 秒的超声处理以破碎细胞,然后在 4°C 以 4000rpm 离心 10 分钟。除去上清液,并将沉淀悬浮在 20mL 添加的冰冷的结合缓冲液中。同样地再次执行超声处理和离心。除去上清液,向沉淀加入 20mL 含有 6mol/L 尿素的结合缓冲液,以得到悬液。在同样的超声处理后,将混合物留置冰上 30 分钟以溶解包含体,然后在 4°C 以 10,000rpm 离心 30 分钟。收集上清液,然后通过 0.45- $\mu$ m 过滤器过滤。

[0141] 向获得的溶液加入 0.5mL Ni-NTA His • Bind 树脂 (由 Novagen, EMD Biosciences 制造),然后在 4°C 旋转 2 小时下整体混合,使 MxA 蛋白通过 His 标签与树脂结合。将该混合物在 4°C 以 3000rpm 离心 2 分钟以回收树脂。在向树脂添加 10mL 冰冷的含 6mol/L 尿素的结合缓冲液后,整体在 4°C 以 3000rpm 离心 2 分钟以回收树脂。在重复该清洗操作后,进一步向树脂添加 10mL 冰冷的清洗缓冲液 (6mol/L 尿素,60mmol/L 咪唑,0.5mol/L 氯化钠,20mmol/L Tris-HCl, pH7.9),并整体在 4°C 以 3000rpm 离心 2 分钟以回收树脂。

[0142] 向树脂添加 10mL 冰冷的洗脱缓冲液 (6mol/L 尿素,1mol/L 咪唑,0.5mol/L 氯化钠,20mmol/L Tris-HCl,pH7.9),在 4°C 旋转 2 小时下整体混合,以从树脂洗脱 MxA 蛋白。将该含有树脂的混合物在 4°C 以 3000rpm 离心 2 分钟,并收集上清 MxA 蛋白溶液。使用收集到的 MxA 蛋白溶液来制备测量 MxA 蛋白的标准溶液。

[0143] [3] 天然 MxA 蛋白的制备

[0144] 将黏附性人类成胶质细胞瘤来源的细胞系 T98G (购自 DS Pharma Biomedical Co., Ltd., J. Cell. Physiol., 99, 43-54, 1979),在添加了用 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 非必需氨基酸 (由 Invitrogen 制造) 和 1mmol/L 丙酮酸钠 (由 Invitrogen 制造) 增补的 10mL E-MEM 培养基 (由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造) 的 10-mL 细胞培养瓶中,使用二氧化碳气体培养箱 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 培养 2 至 3 天,直到达到合生。当细胞变得合生时,将细胞转移到 150-cm<sup>2</sup> 培养瓶并进行同样的培养。当细胞在 150-cm<sup>2</sup> 培养瓶中变得合生时,通过吸取除去培养基,并使用 PBS (-) (既不含钙也不含镁的磷酸缓冲液) 清洗细胞,然后通过添加 0.02% EDTA 进行清洗。接下来,在通过添加 0.25% 胰蛋白酶溶液除去细胞后,通过添加等量培养基终止胰蛋白酶的作用。收集细胞并在 25°C 下离心 (1,400rpm) 三次。对细胞数量进行计数,将细胞以约 1x10<sup>5</sup> 个细胞 /mL 悬浮在含有新鲜培养基的 150-cm<sup>2</sup> 培养瓶中,并加入干扰素  $\alpha$  A 蛋白 (Funakoshi) 以获得 2,000U/mL 的干扰素  $\alpha$  A 蛋白溶液。使用二氧化碳气体培养箱将细胞培养 24 小时,通过吸取除去培养基,使用 PBS (-) 清洗细胞,然后通过添加 0.02% EDTA 进行清洗。接下来,在通过添加 0.25% 胰蛋白酶溶液除去细胞后,通过添加等量培养基终止胰蛋白酶的作用。收集细胞并在 25°C 下离心 (1,400rpm) 三次。。除去上清液,加入 0.5mL 低渗缓冲液 (10mmol/L HEPES, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L KCl) 并

将细胞悬浮,收集溶液并将其储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 直至使用。

[0145] [4] 抗 MxA 蛋白抗体固定化板的制备

[0146] 将 [1] 中制备的抗 MxA 蛋白单克隆抗体 KM1135 用含有 100mmol/L 氯化钠的 100mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.5) 稀释至  $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度,并将混合物以  $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$  分配到 96 孔微量滴定板 (由 Nalge Nunc International 制造) 中。在将板放置 3 天后,通过吸取除去上清液,在每个孔中分配  $300\ \mu\text{L}$  含有 1% BlockAce (由大日本制药社制造) 和 50mmol/L 氯化钠的 pH7.2 的磷酸缓冲液,并通过将板放置过夜在室温下进行阻断。在除去阻断溶液后,使用 PBS 进行清洗。在使用真空干燥器干燥三天后,将板用作抗 MxA 蛋白单克隆抗体固定化板。

[0147] [5] 过氧化物酶标记的抗 MxA 蛋白抗体的制备

[0148] 通过如下所述的马来酰亚胺方法,使 [1] 中制备的抗 MxA 蛋白单克隆抗体 KM1124 与过氧化物酶 (在后文中缩写为 POD) 结合,以得到 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体。

[0149] 首先,将含有 2mg [1] 中制备的 KM1124 的磷酸缓冲液用 0.1mol/L 硼酸缓冲液 (pH8.0) 替换,并使用 Amicon 搅拌式超滤装置 (由 Millipore 制造) 将其浓缩至 1mL 体积。向浓缩溶液加入  $40\ \mu\text{L}$  含有 2.15mg/mL 2-亚氨基硫烷盐酸盐 (由 Pierce 制造) 的 0.1mol/L 硼酸缓冲液 (pH8.0),并在搅拌后在  $30^{\circ}\text{C}$  执行 30 分钟温育。在上面提到的反应中,2-亚氨基硫烷盐酸盐以相对于 KM112450 倍的摩尔比率使用。使用以增补了 5mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA $\cdot$ 2Na) 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0) 平衡的 Sephadex G25 (由 Amersham Bioscience 制造) 柱 (1.5-cm 直径 x30cm),对反应过的溶液进行凝胶过滤,以除去未反应的 2-亚氨基硫烷盐酸盐,并收集巯基化的 KM1124。使用 Amicon 搅拌式超滤装置将收集到的溶液浓缩至 5mL 体积。

[0150] 另一方面,将相当于 KM1124 的 5 倍摩尔比率的 2.5mg POD (由东洋纺织社制造,过氧化物酶 I-C) 溶解在  $250\ \mu\text{L}$  0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中。在将该溶液在  $30^{\circ}\text{C}$  加温 5 分钟后,加入  $36\ \mu\text{L}$  的 20mg/mL N-(6-马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺 (EMCS,由同仁化学研究所社制造) 在 N,N-二甲基甲酰胺 (由 Nacalai Tesque 制造) 中的溶液并搅拌,在  $30^{\circ}\text{C}$  进行 30 分钟温育。在上面提到的反应中,EMCS 以相对于 POD40 倍的摩尔比率使用。使用以 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0) 平衡的 Sephadex G25 柱 (1.5-cm 直径 x30cm) 对反应过的溶液进行凝胶过滤,以除去未反应的 EMCS,并收集马来酰亚胺化的 POD。使用 Amicon 搅拌式超滤装置将收集到的溶液浓缩。

[0151] 将如上所述获得的巯基化的 KM1124 的溶液和马来酰亚胺化的 POD 的溶液混合,使用 Amicon 搅拌式超滤装置将其浓缩至 2mL 体积,然后在  $30^{\circ}\text{C}$  执行 1 小时温育。将获得的标记的抗体储存在  $-80^{\circ}\text{C}$  直至使用。

[0152] [6] 样本稀释液和标准溶液的制备

[0153] 制备了具有下列组成的样本稀释液。

[0154]

HEPES (由同仁化学研究所社制造) (pH 8.0)	0.1 mol/L
CHAPS (由同仁化学研究所社制造)	4.9%
表面活性剂 (类型和浓度描述在表 1 中)	
氯化钠	1.5 mol/L
BSA (由 InterGen 制造)	0.1%
叠氮化钠	0.1%

[0155] 将在上述 [2] 中制备的重组 MxA 蛋白溶液用上述样本稀释液稀释,以制备 0 (只含样本稀释液)、0.375、0.75、1.5、3、6、12 和 24ng/mL 每种浓度的 MxA 蛋白溶液,并将这些溶液用作标准溶液。

[0156] [7] 校准曲线的产生

[0157] 向在上述 [4] 中产生的抗 MxA 蛋白抗体 (KM1135) 固定化板加入 100  $\mu$  L 在 [6] 中产生的标准溶液并温育 1 小时,使 MxA 蛋白与抗体结合。在除去反应溶液后,将添加 400  $\mu$  L 清洗溶液 [含 0.05% Tween20 (由关东化学社制造) 的 PBS] 然后除去它的清洗操作执行 5 次。接下来,将在 [5] 中产生的 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体 (KM1124) 用 POD 标记的抗体稀释液 (液体组合物) 缓冲液 [50mmol/L Bis-Tris (由同仁化学研究所社制造), 0.1% BSA (由 InterGen 制造), 0.01% 4-氨基安替比林 (4-AA; 由埼玉化成社制造), 0.035% Proclin300 (由 Sigma 制造) 和 0.1% Nonidet P40] 稀释 800 倍,加入 100  $\mu$  L 该溶液并执行 30 分钟的温育。除去反应溶液,将添加 400  $\mu$  L 上面提到的清洗溶液清洗板然后除去清洗溶液的清洗操作执行 5 次。在暗处加入 100  $\mu$  L 含 0.05% 四甲基联苯胺和过氧化氢的 POD 产色底物 TMBblue (由 Serological 制造),并在室温执行 10 分钟的温育。通过加入 100  $\mu$  L 0.5mol/L 硫酸并在室温温育 10 分钟来终止反应。使用读板器在 450nm 波长处测量吸光度。通过一系列这样的操作,产生了显示出 MxA 蛋白浓度与吸光度之间的关系的校准曲线。

[0158] 接下来,使用培养的细胞或全血样品代替上面提到的标准溶液作为样本执行类似操作。获得每个样本的测量值,并将获得的测定值与事先产生的校准曲线相关联,以确定每个样本中的 MxA 蛋白浓度。

[0159] [8] 检测 MxA 蛋白测量中测定值的变动 -1 (一次反应)

[0160] 将在上述 [3] 中使用的黏附性人类成胶质细胞瘤来源的细胞系 T98G 用干扰素刺激以诱导 MxA 蛋白,并获得天然 MxA 蛋白。通过将获得的天然 MxA 蛋白的反应性与重组 MxA 蛋白的反应性进行比较,检测了抗体针对重组 MxA 蛋白的反应性与抗体针对天然 MxA 蛋白的反应性的差异。

[0161] 使用 [6] 的样本稀释液将上述 [3] 中产生的天然 MxA 蛋白稀释 20 倍,将其静置 30 分钟以溶解细胞,然后用样本稀释液将其进一步稀释 8 倍,得到测量用样品。

[0162] 使用该样品和实施例的 [6] 中制备的各浓度标准溶液作为样本,遵照 [7] 中描述的操作执行测量。具体来说,一次反应在 25°C 和 37°C 两种温度下执行,二次反应和产色反应在 25°C 执行。在这里,通过下列方程 (1) 来计算天然 MxA 蛋白在 25°C 反应时和在 37°C 反应时的测量变动率。结果显示在表 1 中。

[0163] [方程 1]

[0164] 变动率 (%) = [(在 37°C 下反应时的天然 MxA 蛋白浓度)/(在 25°C 下反应时的天然 MxA 蛋白浓度)-1]\*100 (I)

[0165] [比较例 1]

[0166] 使用与实施例 1 中 [6] 的样本稀释液具有相同组成的样本稀释液,区别在于在组成中使用 1.2% Nonidet P40(聚氧乙烯烷基苯基醚)作为表面活性剂,通过与实施例 1 中相似的方法来计算由反应温度引起的测量变动率。结果显示在表 1 中。

[0167] 表 1

表面活性剂	浓度 (%)	MxA 蛋白浓度*		测量变动率 (%)
		在 25°C 反应	在 37°C 反应	
AMINON PK-03S	1.2	315.0	357.6	13.5
STAFOAM F	1.2	320.2	372.4	16.3
STAFOAM DO	1.2	399.4	422.7	5.8
STAFOAM DOS	1.2	475.8	487.5	2.5
STAFOAM T	1.2	368.8	426.3	15.6
STAFOAM DFC	1.2	315.4	386.4	22.5
STAFOAM DF4	1.2	348.9	379.3	8.7
NONE	0.0	242.5	363.6	49.9
NONIDET P40 (比较例)	1.2	256.3	373.6	45.8

[0169] MxA 蛋白浓度 \*(ng/mL)

[0170] 如表 1 中所示,根据不使用表面活性剂时 (+49.9%) 和使用了已知用于 MxA 蛋白测量的 Nonidet P40(参见国际公布 2008/053973 号小册子)时 (+45.8%) 的比较,证实了使用脂肪酸烷醇酰胺时测量变动率显著降低,并且温度对测定值的影响受到显著抑制。

[0171] [实施例 2]

[0172] 考查 MxA 蛋白测量中测定值的变动 -2(一次反应)

[0173] 将使用 EDTA·2Na 血液收集管从被发现有病毒感染的 5 位 MxA 蛋白阳性患者收集的血液用作样本。使用样品稀释液将全血样本稀释 10 倍,得到测量用样品。

[0174] 与实施例 1 中相似地在 25°C 和 37°C 下执行一次反应,区别在于使用含有 1.2% Stafoam DO 的样本稀释液和含有 1.2% Nonidet P40 的样本稀释液作为样本稀释液,并考查由反应温度引起的测量变动。结果显示在表 2 中。

[0175] 表 2

全血 样本	STAFOAM DO			NONIDET P40		
	MxA 蛋白浓度*		测量变动率 (%)	MxA 蛋白浓度*		测量变动率 (%)
	在 25°C 反应	在 37°C 反应		在 25°C 反应	在 37°C 反应	
[0176] 1	29.1	29.2	0.4	25.1	27.9	11.2
2	17.8	18.0	1.3	12.9	14.7	13.9
3	26.5	27.5	3.7	26.1	28.2	8.0
4	8.7	9.7	12.2	8.3	10.0	20.6
5	15.0	16.3	8.4	8.4	10.3	22.6

[0177] MxA 蛋白浓度\*(ng/mL)

[0178] 如表 2 中所示,即使在使用全血样本时,使用 1.2% Stafoam DO 时测量变动率为 0% 至 +12% 或更低,与此相比使用 1.2% Nonidet P40 时为 +8% 至 23%,证实了反应温度对测定值的影响受到显著抑制。

[0179] [ 实施例 3]

[0180] 考查 MxA 蛋白测量中测定值的变动 -3(二次反应)

[0181] 制备了具有下列组成的 POD 标记的抗体稀释缓冲液。

[0182]

Bis-Tris (由同仁化学研究所社制造) (pH 7.0)	50 mmol/L
BSA (由 InterGen 制造)	0.1%
Proclin 300 (由 Sigma 制造)	0.035%
表面活性剂 (类型和浓度描述在表 3 中)	
4-AA (由埼京化成社制造)	0.01%

[0183] 使用实施例 1 的 [6] 中的样本稀释液 (具体使用 Nonidet P40 作为“表面活性剂”) 将实施例 1 的 [3] 中产生的天然 MxA 蛋白稀释 20 倍,将其静置 30 分钟以溶解细胞,然后将其进一步稀释 8 倍,得到测量用样品。

[0184] 将该样品和实施例 1 的 [6] 中制备的各种浓度的标准溶液用作样本,将用上面提到的 POD 标记的抗体稀释缓冲液稀释 800 倍的实施例 1 的 [5] 中制备的 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体用作 POD 标记的抗体,遵照实施例 1 的 [7] 中描述的操作执行测量。具体来说,一次反应在 25°C 下执行,二次反应在 25°C 和 37°C 两种温度下执行。通过下列方程 (I) 来计算天然 MxA 蛋白在 25°C 反应时和在 37°C 反应时的测量变动率。结果显示在表 3 中。

[0185] [ 方程 2]

[0186] 变动率 (%) = [(在 37°C 下反应时的天然 MxA 蛋白浓度)/(在 25°C 下反应时的天然 MxA 蛋白浓度)-1]\*100 (I)

[0187] [ 比较例 2]

[0188] 通过与实施例 3 中相似的方法来计算由二次反应温度引起的测量变动率,区别在于在实施例 3 的 POD 标记的抗体稀释缓冲液中使用 0.1% Nonidet P40 作为表面活性剂。结果显示在表 3 中。

[0189] 表 3

结构	产品名	浓度(%)	MxA 蛋白浓度*		测量变动率 (%)
			在 25℃ 反应	在 37℃ 反应	
POE · POP 共聚物	PRONON 102	0.1	385.1	352.0	-8.6
	PRONON 104	0.1	372.6	369.6	-0.8
	EMULGEN PP-230	0.1	479.7	458.5	-4.4
	EMULGEN PP-250	0.1	460.0	444.2	-3.4
	PRONON 202B	0.1	470.8	520.3	10.5
	PRONON 403	0.1	509.4	483.7	-5.0
POE · POA 烷基醚	UNILUBE 50MB-168	0.1	345.9	329.9	-4.6
	UNILUBE 75DE-25	0.1	313.6	258.4	-17.6
	UNILUBE 75DE-3800	0.1	288.3	276.7	-4.0
POE · POP 烷基苯基醚	DISPANOL KP189R-40	0.1	552.5	517.7	-6.3
	DISPANOL KP189-40	0.1	560.0	493.5	-11.9
POE 聚环苯基醚	NEWCOL 714	0.1	535.4	465.5	-13.1
	NEWCOL 2614	0.1	551.5	464.8	-15.7
POE · POP 聚环苯基醚	NEWCOL 2616F	0.1	505.8	467.7	-7.5
乙二胺 POE · POP 缩合物	乙二胺 PO40EO40	0.1	534.7	520.4	-2.7
POE 烷基苯基醚	NONIDET P40 (比较例)	0.1	532.3	381.0	-28.4

[0191] MxA 蛋白浓度 \*(ng/mL)

[0192] 如表 3 中所示,证实了当使用 POE · POP 共聚物、POE · POP 烷基醚、POE · POP 烷基苯基醚、POE 聚环苯基醚、POE · POP 聚环苯基醚或乙二胺 POE · POP 缩合物时,与使用 Nonidet P40 作为表面活性剂 (-28.4%) 时相比,测量变动率显著降低,并且反应温度对测定值的影响受到显著抑制。

[0193] [ 实施例 4 ]

[0194] 考查 MxA 蛋白测量中测定值的变动 -4 (二次反应)

[0195] 将使用 EDTA · 2Na 血液收集管从被发现有病毒感染的 4 位 MxA 蛋白阳性患者收集的血液用作样本。使用实施例 1 的 [6] 的样品稀释液 (具体使用 Nonidet P40 (1.2%) 作为“表面活性剂”) 将全血样本稀释 10 倍,得到测量用样品。

[0196] 通过与实施例 3 中相似的方式 (具体来说,一次反应在 25℃ 执行,二次反应在 25℃ 和 37℃ 两种温度下执行),使用在实施例 3 的 POD 标记的抗体稀释缓冲液中含有 0.1% Pronon403、0.1% Pronon102 或 0.1% Nonidet P40 作为表面活性剂的 POD 标记的抗体稀释缓冲液执行测量,来考查由反应温度引起的测量变动。结果显示在表 4 中。

[0197] 表 4

[0198]

全血样本	POE • POP 共聚物					
	PRONON 403		PRONON 102		NONIDET P40	
	MxA 蛋白浓度* 在 25°C 反应	MxA 蛋白浓度* 在 37°C 反应	测量变动率 (%)	MxA 蛋白浓度* 在 25°C 反应	MxA 蛋白浓度* 在 37°C 反应	测量变动率 (%)
<b>6</b>	<b>144.7</b>	<b>142.7</b>	<b>-1.4</b>	<b>108.6</b>	<b>110.8</b>	<b>2.0</b>
<b>7</b>	<b>84.0</b>	<b>84.5</b>	<b>0.6</b>	<b>62.8</b>	<b>60.9</b>	<b>-3.0</b>
<b>8</b>	<b>163.6</b>	<b>163.2</b>	<b>-0.2</b>	<b>124.5</b>	<b>126.7</b>	<b>1.8</b>
<b>9</b>	<b>52.7</b>	<b>50.3</b>	<b>-4.5</b>	<b>39.1</b>	<b>38.6</b>	<b>-1.1</b>
				<b>131.7</b>	<b>88.9</b>	<b>-32.5</b>
				<b>83.2</b>	<b>59.9</b>	<b>-28.0</b>
				<b>149.3</b>	<b>114.1</b>	<b>-23.6</b>
				<b>54.3</b>	<b>32.5</b>	<b>-40.1</b>

MxA 蛋白浓度\* (ng/mL)

[0199] 如表 4 中所示,即使在使用全血样本时,对于 Pronon403 来说测量变动率为 -4.5% 至 +0.6%,对于 Pronon102 来说为 -3.0% 至 +2.0%,与此相比,对于 Nonidet P40 来说为 -40.1% 至 -23.6%,这证明反应温度对测定值的影响受到显著抑制。

[0200] [ 实施例 5]

[0201] 考查 MxA 蛋白测量中测定值的变动 -5 (二次反应)

[0202] 将使用 EDTA·2Na 血液收集管从被发现有病毒感染的 5 位 MxA 蛋白阳性患者收集的血液用作样本。使用实施例 1 的 [6] 的样品稀释液 (具体来说使用 Nonidet P40 (1.2%) 作为“表面活性剂”) 将全血样本稀释 10 倍, 得到测量用样品。

[0203] 通过以与实施例 3 中相似的方式 (具体来说, 一次反应在 25°C 执行, 二次反应在 25°C 和 37°C 两种温度下执行), 使用在实施例 3 的 POD 标记的抗体稀释缓冲液中含有 0.1% Emulgen PP-250、0.1% Unilube50MB-168、0.1% Dispanol KP189R-40、0.1% Newcol2616F 或 0.1% 乙二胺 PO40E040 作为表面活性剂的 POD 标记的抗体稀释缓冲液执行测量, 来考查由反应温度引起的测量变动。结果显示在表 5 中。

[0204] 表 5

[0205]

全血样本	POE • POP 共聚物			POE • POP 烷基醚			POE • POP 烷基苯基醚		
	EMULGEN PP-250			UNILUBE 50MB-168			DISPANOL KP189R-40		
	MxA 蛋白浓度* 在 25°C 反应	MxA 蛋白浓度* 在 37°C 反应	测量变动率 (%)	MxA 蛋白浓度* 在 25°C 反应	MxA 蛋白浓度* 在 37°C 反应	测量变动率 (%)	MxA 蛋白浓度* 在 25°C 反应	MxA 蛋白浓度* 在 37°C 反应	测量变动率 (%)
10	37.7	33.6	-11	26.2	25.5	-3	40.6	35.8	-12
11	42.8	40.1	-6	31.7	29.8	-6	45.6	40.2	-12
12	50.1	52.1	4	40.5	41.5	2	54.6	52.1	-5
13	30.3	28.3	-7	24.5	22.6	-8	33.0	28.1	-15
14	35.3	34.8	-1	29.2	29.1	0	37.1	34.6	-6
POE • POP 聚环烷基醚									
全血样本	NEWCOL 2616F			乙二胺 POE • POP 缩合物			NONIDET P40		
	NEWCOL 2616F			乙二胺 PO40EO40			NONIDET P40		
	MxA 蛋白浓度* 在 25°C 反应	MxA 蛋白浓度* 在 37°C 反应	测量变动率 (%)	MxA 蛋白浓度* 在 25°C 反应	MxA 蛋白浓度* 在 37°C 反应	测量变动率 (%)	MxA 蛋白浓度* 在 25°C 反应	MxA 蛋白浓度* 在 37°C 反应	测量变动率 (%)
10	40.9	33.4	-18	36.1	33.5	-7	39.8	27.6	-31
11	46.5	37.9	-19	40.7	38.3	-6	43.9	29.6	-33
12	54.3	50.6	-7	49.4	49.0	-1	52.1	40.0	-23
13	33.1	27.7	-16	29.7	26.2	-12	30.8	22.1	-28
14	38.4	34.3	-11	33.9	32.5	-4	35.4	28.2	-20

MxA 蛋白浓度\* (ng/mL)

[0206] 如表 5 中所示,即使在使用全血样本时,对于 Emulgen PP-250 来说测量变动率为-1%至-11%,对于 Unilube50MB-168 来说为 0%至-8%,对于 Dispanol KP189R-40 来说为-5%至-15%,对于 Newcol2616F 来说为-7%至-15%,对于乙二胺 P040EO40 来说为-1%

至 -12%，与此相比，对于 Nonidet P40 来说为 -33% 至 -20%。这证明反应温度对测定值的影响受到显著抑制。

[0207] [ 实施例 6]

[0208] 制备了具有下列成分 (a) 至 (g) 的用于测量 MxA 蛋白的试剂盒。

[0209] (a) 抗 MxA 蛋白抗体固定化板

[0210] 按照实施例 1[4] 的方法，通过下面的方法制备了抗 MxA 蛋白抗体固定化板。首先，将抗 MxA 蛋白单克隆抗体 KM1135 在含有 100mmol/L 氯化钠的 100mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.5) 中的 5 μg/mL 溶液，以 100 μL/孔分配到 96 孔微量滴定板 (由 Nalge Nunc International 制造) 中，然后将板放置 3 天，通过吸取除去上清液。接下来，以 300 μL/孔分配 1% BlockAce (由大日本制药社制造) 在含有 100mmol/L 氯化钠的 100mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.5) 中的溶液，并通过将板在室温下放置过夜来进行阻断。在除去阻断溶液后，将板用 PBS 清洗，并使用真空干燥器干燥 3 天，以制备固定化有抗 MxA 蛋白单克隆抗体的板。

[0211] (b) 样本稀释液

[0212] 制备了具有下列组成的样本稀释液。

[0213]

Tris (由同仁化学研究所社制造) (pH 8.5)	0.1 mol/L
CHAPS (由同仁化学研究所社制造)	2.5%
Stafoam DO	1.2%
氯化钠	0.1 mol/L
BSA (由生化学工业社制造)	0.1%
叠氮化钠	0.1%

[0214] (c) POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体溶液

[0215] 使用具有下列组成的 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体稀释液，将通过实施例 1[5] 的方法制备的 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体 KM1124 稀释 800 倍，以制备 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体溶液。

[0216]

Bis-Tris (由同仁化学研究所社制造) (pH 7.0)	0.05 mol/L
Pronon 202B	0.1%
氯化钠	50 mmol/L
BSA (由生化学工业社制造)	0.1%
4-AA (由埼京化成社制造)	0.01%
Proclin 300	0.035%

[0217] (d) 着色溶液

[0218] TMB (由 Serological 制造)

[0219] (e) 淬灭溶液

[0220] 0.5mol/L 硫酸水溶液

[0221] (f) 清洗溶液

[0222] 制备了下列清洗溶液。

[0223] 磷酸缓冲液 (pH7.2) 10mmol/L

[0224] Tween20 0.05%

[0225] 氯化钠 0.15mol/L

[0226] (g) 标准材料和标准溶液

[0227] 将实施例 1[2] 中制备的重组 MxA 蛋白用磷酸缓冲液稀释然后冷冻干燥,以制备 MxA 蛋白的标准材料。

[0228] 使用上述 (b) 的样本稀释液对制备的冷冻干燥状态的标准材料进行稀释,以制备 0(只含样本稀释液)、0.375、0.75、1.5、3、6、12 和 24ng/mL 各种浓度的 MxA 蛋白溶液,并将这些溶液用作标准溶液。

[0229] [比较例 3]

[0230] 制备了具有下列组分 (a) 至 (g) 的用于测量 MxA 蛋白的试剂盒。

[0231] (a) 抗 MxA 蛋白抗体固定化板

[0232] 与实施例 6 的 (a) 中相同的抗 MxA 蛋白抗体固定化板。

[0233] (b) 样本稀释液

[0234] 制备了具有下列组成的样本稀释液。

[0235]

HEPES (由同仁化学研究所社制造) (pH 8.0) 0.1 mol/L

CHAPS (由同仁化学研究所社制造) 4.9%

Nonidet P40 1.2%

氯化钠 0.1 mol/L

BSA (由生化学工业社制造) 0.1%

叠氮化钠 0.1%

[0236] (c) POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体溶液

[0237] 使用具有下列组成的 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体稀释液,将通过实施例 1[5] 的方法制备的 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体 KM1124 稀释 800 倍,以制备 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体溶液。

[0238]

Bis-Tris (由同仁化学研究所社制造) (pH 6.0) 50 mmol/L

Nonidet P40 0.1%

氯化钠 50 mmol/L

BSA (由生化学工业社制造) 0.1%

4-AA (由埼玉化成社制造) 0.01%

Proclin 300 0.035%

[0239] (d) 着色溶液

[0240] TMBBlue(由 Serological 制造)

[0241] (e) 淬灭溶液

[0242] 0.5mol/L 硫酸水溶液

[0243] (f) 清洗溶液

[0244] 制备了下列清洗溶液。

[0245] 磷酸缓冲液 (pH7.2) 10mmol/L

[0246] Tween20 0.05%

[0247] 氯化钠 0.15mol/L

[0248] (g) 标准材料和标准溶液

[0249] 将实施例 1[2] 中制备的重组 MxA 蛋白用磷酸缓冲液稀释然后冷冻干燥,以制备 MxA 蛋白的标准材料。

[0250] 使用上述 (b) 的样本稀释液对制备的冷冻干燥状态的标准材料进行稀释,以制备 0(只含样本稀释液)、0.375、0.75、1.5、3、6、12 和 24ng/mL 各种浓度的 MxA 蛋白溶液,并将这些溶液用作标准溶液。

[0251] [实施例 7]

[0252] 使用实施例 6 的样本稀释液,将实施例 1[3] 中制备的细胞稀释 20 倍,并静置 30 分钟,然后用样本稀释液进一步稀释 8 倍,得到测量用样品;将实施例 6 的试剂盒用作试剂盒;通过下列程序执行测量。

[0253] 向实施例 6(a) 的抗 MxA 蛋白抗体固定化板加入 100  $\mu$  L 在 (g) 中制备的各种标准溶液,并在给定温度 (22°C、25°C、28°C、30°C 或 32°C 的温度) 下执行 1 小时的温育以使 MxA 蛋白与抗体结合。在除去反应溶液后,将板用 400  $\mu$  L (f) 的清洗溶液清洗 5 次。接下来,加入 100  $\mu$  L 在 (c) 中产生的 POD 标记的抗 MxA 蛋白抗体溶液,并在给定温度 (22°C、25°C、28°C、30°C 或 32°C 的温度) 下执行 0.5 小时的温育。在反应后,除去反应溶液,并将板用 400  $\mu$  L (f) 的清洗溶液清洗 5 次。接下来,在暗处加入 100  $\mu$  L 含有 0.05% 四甲基联苯胺和过氧化氢的 (d) 的着色溶液,并在室温下执行 10 分钟的温育,然后加入 100  $\mu$  L (e) 的淬灭溶液,并在室温下温育 10 分钟以淬灭反应。使用读板器测量反应溶液在 450nm 处的吸光度,并产生显示出 MxA 蛋白浓度与吸光度之间的关系的校准曲线。

[0254] [比较例 4]

[0255] 通过与实施例 7 中类似的方法执行测量,制备了显示出 MxA 蛋白浓度与吸光度之间的关系的校准曲线,区别在于使用比较例 3 的试剂盒代替实施例 6 的试剂盒。

[0256] 实施例 7 和比较例 4 的测量结果显示在表 6 中。

[0257] 表 6

试剂盒	测量方法	反应温度 (°C)				
		22	25	28	30	32
[0258] 实施例 6	实施例 7	<b>445.5</b>	<b>443.2</b>	<b>443.5</b>	<b>449.2</b>	<b>435.3</b>
		<b>(100)</b>	<b>(100)</b>	<b>(100)</b>	<b>(101)</b>	<b>(98)</b>
比较例 3	比较例 4	<b>381.0</b>	<b>360.8</b>	<b>338.7</b>	<b>297.6</b>	<b>284.2</b>
		<b>(100)</b>	<b>(95)</b>	<b>(89)</b>	<b>(78)</b>	<b>(75)</b>

[0259] 来自于每种反应温度下的反应的测定值,以及通过将来自于 22°C 下的反应的测定值视为 100 而获得的每种温度下测定值的相对值,两者显示在表 6 中。相对值越接近 100,意味着测量越不可能受反应温度影响。正如从表 6 清楚看到的,与使用比较例 3 的含有 Nonidet P-40 (POE 烷基苯基醚) 的比较例 4 测量方法相比,在使用实施例 6 的含有 Stafoam D0 (脂肪酸烷醇酰胺) 和 Pronon202B (POE • POP 共聚物) 的试剂盒的实施例 7 测量方法中,测定值明显稳定。因此,证明了本发明的测量方法较少可能受反应温度影响的方法。

[0260] 工业实用性

[0261] 本发明提供了用于测量样本中的待测成分的方法和试剂盒,其可用于诊断感染等。

专利名称(译)	用于测定样本中的待测定成分的方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN104034882A</a>	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	CN201410235359.7	申请日	2010-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
[标]发明人	川村瑞穗		
发明人	川村瑞穗		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6866 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	杨青		
优先权	2009250639 2009-10-30 JP		
其他公开文献	CN104034882B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于测定样本中的待测定成分的方法和试剂盒。具体而言，本发明提供了用于测定样本中的待测成分的方法，从而在样本中包含的待测成分例如抗原时能够不受反应温度等的影响而被准确测定。用于测定待测成分的方法的特征在于包含：在脂肪酸烷醇酰胺存在下，将样本中的待测成分与结合所述待测成分的第一抗体进行反应；然后与标记的第二抗体进行反应以形成包含第一抗体、待测成分和标记的第二抗体的免疫复合物，其中标记物被结合到能够与所述待测成分相结合的第二抗体上；以及测量这样形成的免疫复合物中标记物的量。在前述测定方法中使用用于测定样本中的待测成分的测定试剂盒。

HEPES (由同仁化学研究所社制造) (pH 8.0)	0.1 mol/L
CHAPS (由同仁化学研究所社制造)	4.9%
表面活性剂 (类型和浓度描述在表 1 中)	
氯化钠	1.5 mol/L
BSA (由 InterGen 制造)	0.1%
叠氮化钠	0.1%