

[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 200780035440.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

[43] 公开日 2009年8月26日

[11] 公开号 CN 101517412A

[22] 申请日 2007.7.23

[21] 申请号 200780035440.9

[30] 优先权

[32] 2006.7.24 [33] JP [31] 200558/2006

[86] 国际申请 PCT/JP2007/000785 2007.7.23

[87] 国际公布 WO2008/012944 日 2008.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.24

[71] 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 吉田忠晃 高桥弘至

[74] 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所

代理人 刘新宇 李茂家

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

凝集抑制测定法以及凝集抑制测定用试剂

[57] 摘要

本发明的课题在于提供一种凝集抑制测定法及凝集抑制测定用试剂，其能够在低浓度区域至高浓度区域高灵敏度且广范围地测定试样中的配体，同时，还具有好的测定重复性。本发明提供的凝集抑制测定法及凝集抑制测定用试剂，使用负载有配体的不溶性载体颗粒和游离态的特异性受体、以及负载有配体上的结合部位与上述游离态的受体不同的特异性受体的不溶性载体颗粒。

1. 一种凝集抑制测定法，其特征在于，其通过将含有具有两个以上受体结合部位的测定对象配体的试样与下述(A)~(C)混合，来测定颗粒的凝集抑制反应，所述凝集抑制反应反映着试样中的测定对象配体的量，

(A) 预先负载有配体或者配体样物质的不溶性载体颗粒、

(B) 与上述配体特异性反应的游离态受体、

(C) 负载有受体的不溶性载体颗粒，所述受体与上述配体特异性反应、且配体上的结合部位与上述游离态受体不同。

2. 根据权利要求1所述的凝集抑制测定法，其中，不溶性载体颗粒为胶乳颗粒。

3. 根据权利要求1或2所述的凝集抑制测定法，其中，受体为抗体或者含有其功能性部位的片段，配体为抗原，基于受体和配体的免疫反应来测定颗粒的凝集抑制反应。

4. 根据权利要求1~3中任意一项所述的凝集抑制测定法，其中，游离态受体以及不溶性载体颗粒所负载的受体均为单克隆抗体。

5. 根据权利要求1~4中任意一项所述的凝集抑制测定法，其中，测定对象配体为人白蛋白，受体为抗人白蛋白单克隆抗体。

6. 根据权利要求1~5中任意一项所述的凝集抑制测定法，其中，负载有受体的不溶性载体颗粒的平均粒径为负载有配体或者配体样物质的不溶性载体颗粒的平均粒径的 $1/2 \sim 1/10$ 。

7. 一种凝集抑制测定用试剂，其特征在于，含有下述(A)~(C)，并且测定颗粒的凝集抑制反应，所述凝集抑制反应反映着试样中的测定对象配体的量，

(A) 预先负载有配体或者配体样物质的不溶性载体颗粒、

(B) 与上述配体特异性反应的游离态受体、

(C) 负载有受体的不溶性载体颗粒，所述受体与上述配体特异性反应、且配体上的结合部位与上述游离态受体不同。

8. 根据权利要求7所述的凝集抑制测定用试剂，其中，不溶性载体颗粒为胶乳颗粒。

9. 根据权利要求7或8所述的凝集抑制测定用试剂，其中，受体为抗体或者含有其功能性部位的片段，配体为抗原，所述试剂为用于基于受体和配体的免疫反应来测定颗粒的凝集抑制反应的试剂。

10. 根据权利要求7~9中任意一项所述的凝集抑制测定用试剂，其中，游离态受体以及配体上的结合部位不同于上述游离态受体的受体均为单克隆抗体。

11. 根据权利要求7~10中任意一项所述的凝集抑制测定用试剂，其中，负载有受体的不溶性载体颗粒的平均粒径为负载有配体或者配体样物质的不溶性载体颗粒的平均粒径的 $1/2 \sim 1/10$ 。

12. 根据权利要求7~11中任意一项所述的凝集抑制测定用试剂，其中，测定对象配体为人白蛋白，受体为抗人白蛋白单克隆抗体。

## 凝集抑制测定法以及凝集抑制测定用试剂

### 技术领域

本发明涉及一种利用（载体）颗粒的凝集抑制反应来测定试样中的测定对象即配体的方法以及用于该方法的试剂。尤其涉及预先负载有配体的不溶性载体颗粒、配体特异性的游离态的受体以及负载有配体特异性受体的不溶性载体颗粒所形成的凝集被样品中的配体抑制的凝集抑制测定法以及凝集抑制测定用试剂。

### 背景技术

利用不溶性载体颗粒产生颗粒的凝集或者产生凝集抑制，从而对配体进行定性、定量的测定方法既简单又具有高灵敏度，因此正在开发利用抗原抗体间的免疫反应或互补性碱基链间的结合反应等的配体-受体反应原理的各种测定试剂。

凝集法是一种测定凝集程度的方法，所述凝集程度是受体致敏的载体颗粒因对象配体介导的交联反应而凝集的凝集程度，在需要以高灵敏度测定微量物质的背景下，许多测定项目已实用化。

另一方面，凝集抑制法是一种测定凝集被测定对象即配体抑制的比例的方法，所述凝集为事先用配体或者配体样物质致敏的载体颗粒与受体所发生的凝集；凝集法中，除了特殊的配体外，还必须具备2种以上特异性受体，与此相对，凝集抑制法最大特征在于只需1种特异性受体即可构建测定体系。

此外，就免疫反应来说，凝集抑制法虽具有不会引起钩状效应（hook effect）（由于抗原过量而造成的表观上的反应减少的现象）这个优点，但迄今为止的应用中，大部分的场合都以

半抗原这样的低分子配体也就是无法利用2种以上受体的配体作为测定对象。

作为凝集抑制法应用受限的理由，可举出与凝集法相比测定浓度范围的调整较为困难这一点。凝集法中，由于凝集的进行与配体量成比例，因此例如涉及胶乳增强免疫凝集法（latex-enhanced immuno-agglutination method）的专利文献1所示那样，能够仅通过增强高浓度区域的灵敏度增加，而容易地扩大测定范围。

另一方面，关于与配体量成比例地进行凝集抑制反应的凝集抑制法的测定范围，配体高浓度区域的测定上限值基本上依赖于初始凝集（配体量为零时的凝集）的大小，配体低浓度区域的测定下限值依赖于凝集抑制反应的敏感性，因此有必要综合考虑这两个因素。

作为增强凝集抑制法的初始凝集的方法，例如可举出专利文献2中所述的方法，即在半抗原的测定中利用非特异性的促凝物质的方法。根据该方法，能够进行直至高浓度区域的配体的测定，能够扩大测定上限值，但是由于凝集增强是与配体和受体间的特异反应无关的，因此对凝集抑制反应的敏感性降低，结果低浓度区域的检测能力显著恶化。

另外，专利文献3中示出了利用单一的单克隆抗体致敏载体和抗原致敏载体的凝集抑制法。该方法利用了分别负载有配体和受体的载体颗粒，通过增加光学灵敏度的变化量来提高低浓度区域的检测能力，且不损害对凝集抑制反应的敏感性。但是由于该方法并不是增强抗原和抗体间的反应本身，因此看不到扩大测定范围这一效果。同样，专利文献4提出的利用抗原致敏胶乳、抗体以及抗体特异性受体的凝集抑制法，其仅通过抗体和抗原、抗体和受体的特异反应来增强凝集，因此与以往方法

相比，可实现扩大测定范围。但是实施例中作为受体示出的蛋白A由于对所有抗体（IgG）都具有反应性，因此在含有IgG的血清或血浆试样的测定中是不适合的，另外，还要考虑到如下情况，即，抗小鼠IgG大鼠单克隆抗体不是通常使用的材料，有时不易得到。另外还要考虑到测定原理自身是通过抗原-抗体、抗体-受体这样的二相反应（biphasic reaction），因此存在测定仪器、方法导致性能不良的可能性。

如上所述，兼具初始凝集强、且同时对于凝集抑制反应的敏感性也高这样相反特性的凝集抑制测定法以及凝集抑制测定用试剂尚未确立，目前的测定法对于通常的配体、例如具有2个以上受体结合部位的配体而言，处于难以高灵敏度且广范围、重复性良好地进行测定的困境。

专利文献1：日本特开2004-191332号公报

专利文献2：日本特公开05-000665号公报

专利文献3：日本特开昭59-173760号公报

专利文献4：日本特开2001-337092号公报

## 发明内容

### 发明要解决的问题

本发明是为了解决上述现有技术的问题，其课题在于提供一种凝集抑制测定法以及一种凝集抑制测定用试剂，其能够在低浓度区域至高浓度区域高灵敏度且广范围地测定试样中的配体，同时还具有良好的测定重复性。

### 用于解决问题的方案

本发明人等专心致力于凝集抑制测定法的研究，结果发现：通过使用负载有配体的不溶性载体颗粒和游离态的特异性受体，以及负载有配体上的结合部位不同于上述游离态受体的特

异性受体的不溶性载体颗粒，在保持对于凝集抑制反应的敏感性的同时能够增强初始凝集，而且能够在低浓度区域至高浓度区域意外地以高灵敏度、广范围地进行测定，同时具有良好的测定重复性，从而完成了本发明。

即，本发明包括以下方案。

(1) 一种凝集抑制测定法，其特征在于，其通过将含有具有两个以上受体结合部位的测定对象配体的试样与下述(A)~(C)混合，来测定颗粒的凝集抑制反应，所述凝集抑制反应反映着试样中的测定对象配体的量，

(A) 预先负载有配体或者配体样物质的不溶性载体颗粒、  
(B) 与上述配体特异性反应的游离态受体、

(C) 负载有受体的不溶性载体颗粒，所述受体与上述配体特异性反应、且配体上的结合部位与上述游离态受体不同。

(2) 根据上述(1)所述的凝集抑制测定法，其中，不溶性载体颗粒为胶乳颗粒。

(3) 根据上述(1)或(2)所述的凝集抑制测定法，其中，受体为抗体或者含有其功能性部位的片段，配体为抗原，基于受体和配体的免疫反应来测定颗粒的凝集抑制反应。

(4) 根据上述(1)~(3)中任意一项所述的凝集抑制测定法，其中，游离态受体以及不溶性载体颗粒所负载的受体均为单克隆抗体。

(5) 根据上述(1)~(4)中任意一项所述的凝集抑制测定法，其中，测定对象配体为人白蛋白，受体为抗人白蛋白单克隆抗体。

(6) 根据上述(1)~(5)中任意一项所述的凝集抑制测定法，其中，负载有受体的不溶性载体颗粒的平均粒径为负载有配体或者配体样物质的不溶性载体颗粒的平均粒径的 $1/2 \sim$

1/10。

(7)一种凝集抑制测定用试剂,其特征在于,含有下述(A)~(C),来测定颗粒的凝集抑制反应,所述凝集抑制反应反映着试样中的测定对象配体的量,

(A)预先负载有配体或者配体样物质的不溶性载体颗粒、

(B)与上述配体特异性反应的游离态受体、

(C)负载有受体的不溶性载体颗粒,所述受体与上述配体特异性反应、且配体上的结合部位与上述游离态受体不同。

(8)根据上述(7)所述的凝集抑制测定用试剂,其中,不溶性载体颗粒为胶乳颗粒。

(9)根据上述(7)或(8)所述的凝集抑制测定用试剂,其中,受体为抗体或者含有其功能性部位的片段,配体为抗原,所述试剂为用于基于受体和配体的免疫反应来测定颗粒的凝集抑制反应的试剂。

(10)根据上述(7)~(9)中任意一项所述的凝集抑制测定用试剂,其中,游离态受体以及配体上的结合部位不同于上述游离态受体的受体均为单克隆抗体。

(11)根据上述(7)~(10)中任意一项所述的凝集抑制测定用试剂,其中,负载有受体的不溶性载体颗粒的平均粒径为负载有配体或者配体样物质的不溶性载体颗粒的平均粒径的 $1/2 \sim 1/10$ 。

(12)根据上述(7)~(11)中任意一项所述的凝集抑制测定用试剂,其中,测定对象配体为人白蛋白,受体为抗人白蛋白单克隆抗体。

### 发明效果

本发明的凝集抑制测定法以及凝集抑制测定用试剂能够在低浓度区域至高浓度区域高灵敏度且广范围地对测定对象配体

进行测定，同时具有良好的测定重复性。尤其是利用免疫反应的情况下，由于不产生钩状效应这一特征，在可能呈现异常高值的配体测定时，与颗粒凝集法相比，可靠性更高。另外，在本发明的受体为单克隆抗体的情况下，配体只要残留着表位即使不是全长也可发生凝集抑制反应，因此存在片段化的配体也能够与全长的配体同样进行测定的可能性。

## 附图说明

图1示出了实施例以及比较例中白蛋白浓度-吸光度的反应曲线。

## 具体实施方式

### (测定对象试样)

作为含有本发明的测定对象即配体的试样，例如可举出人或者动物的血液、血清、血浆、培养上清、尿、脑脊液、唾液、汗、腹水、或者细胞提取液、组织提取液等。

### (配体)

作为本发明的测定对象即配体，只要是具有两个以上受体结合部位的物质，均可作为对象。具体而言，可举出C反应蛋白(CRP)、FDP、D-二聚体、前列腺特异抗原(PSA)、血红蛋白A<sub>1c</sub>、白蛋白、胃蛋白酶原I(PGI)、胃蛋白酶原II(PGII)、基质金属蛋白酶(MMP)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶等蛋白质，另外还有肽、糖类、核酸、脂质、高分子药剂等。理论上来说，具有两个以上受体结合部位的配体(如果配体为抗原，则为具有两个以上表位(抗原决定簇)的配体，例如能通过利用两种以上单克隆抗体的夹层测定进行检测的配体)均能用作测定对象物质。

配体样物质是指：在与受体的关系中，具有和上述配体同等的、同性质的反应性（如果配体为抗原则为抗原性）的物质。例如，可举出将配体（抗原等）分解而得到的片段、通过基因操作所得到的重组配体、与配体构造类似的物质（配体类似物）等。

#### （受体）

作为本发明所使用的受体，使用与测定对象即配体特异性结合的物质。通常可使用对兔、绵羊、山羊等免疫测定对象的配体而获得的抗配体多克隆抗体或抗配体单克隆抗体。其中从特异性的观点来看，最理想是使用单克隆抗体。使用的抗体也可为根据常用方法而制备的抗体的片段。此外，根据配体的种类可以与抗体一并使用外源凝集素、核酸碱基等，或者单独将它们作为受体。

只要本发明所使用的受体的种类为2种以上即可，此外没有特别限制，但游离态受体和固定于载体上的受体需要使用不同受体。即，需要游离态受体和载体固定化受体为配体上的结合部位不同的受体。即，只要是满足各受体不会相互干扰与配体的结合这样的关系的受体即可。另外，最理想的是游离态受体和载体固定化受体均为单克隆抗体。本发明通过将游离态受体和载体固定化受体两者组合使用，可以促进初始凝集，并且还能够增大高浓度区域的灵敏度变化，扩大能测定的范围。受体的种类或含量、存在方式（游离态或载体负载状态）可考虑配体的受体结合部位的数量、分析所需要的颗粒的凝集程度、作为目的的测定范围等适当选择。

使用单克隆抗体作为受体的情况下，其选择例如可按照以下顺序进行。

首先，通过免疫印迹法（Western blot）或ELISA法等，来

确认以测定对象配体为免疫原而制备的单克隆抗体与配体的反应性，选出2种以上反应性强的抗体。此外，通过夹层ELISA法来确认将选出的这些抗体组合时的反应性。此时，反应性越强，则灵敏度越高、能扩大测定范围的可能性越高，因此，期望根据测定对象、要求性能来适当选择单克隆抗体的组合。将这样获得的单克隆抗体的组合中的一方以固定于载体的状态供于实际的测定体系，另一方以不固定于载体的游离态供于实际的测定体系，考虑初始凝集、测定灵敏度、测定范围、与具有类似于配体结构的测定对象外的物质的交差反应性等，来最终判断哪个组合合适。

#### (载体颗粒)

本发明所使用的负载有配体或受体的不溶性载体颗粒虽无特别限制，但优选平均粒径为50~1000nm的胶乳。胶乳的材质只要适合负载配体或受体即可，除了通常使用的以聚苯乙烯为主要成分的胶乳之外，还可举出苯乙烯-丁二烯共聚物、(甲基)丙烯酸酯类聚合物等。另外，也可使用由金属胶体、明胶、脂质体、微胶囊、二氧化硅、氧化铝、炭黑、金属化合物、金属、陶瓷或者磁性物质等材质形成的颗粒。作为将上述配体或者配体样物质以及受体负载于载体颗粒的方法，除了通常使用的物理吸附法之外，还可以使用化学结合法(chemical bonding methods)。

另外，本发明所使用的分别负载有配体以及受体的载体颗粒，其材质相同或者不同均可。而且，各载体颗粒的粒径可以选择适合分析方法或目的的粒径，但为了充分发挥本发明的效果，负载受体的载体颗粒的平均粒径优选为负载配体的载体颗粒的平均粒径的1/2~1/10。

#### (缓冲液)

本发明中的凝集反应在缓冲液中进行，选择最适合进行凝集反应的该缓冲液的种类、浓度、pH，可以使用磷酸缓冲液、Tris-HCl缓冲液、碳酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Good's缓冲液等。该缓冲液中的缓冲剂的浓度使用5mM~500mM左右，pH多使用中性和碱性区域，通常使用7.0~9.5的范围。

(凝集信号的测定方法)

凝集信号的测定只要为通常用于凝集抑制反应测定中所用的方法即可，可举出利用吸光度比的评价、颗粒数测定、颗粒大小测定(如果凝集则尺寸增大)、散射光测定或吸收光谱的测定(如果凝集则增大或者发生移动)等本领域人员能够使用的方法。此外，在可能的范围内光学检测也可能被电化学检测替代。

凝集信号的测定有如前所述的各种方法，但是使用胶乳颗粒和通用的生物化学分析装置的方法较为便利。例如，向含有作为测定对象的配体的试样中，添加含有负载有与游离态的受体不同的受体的胶乳、负载有配体的胶乳等不溶性载体颗粒的试剂，在一定温度下加热一定时间，测定这期间的吸光度，并检测吸光度的变化量，根据以预先已知浓度的标准溶液为试样时的标准曲线能够计算待测试样中的配体的浓度。胶乳凝集抑制法中，通常使用500~900nm的波长的吸光度，一般使用反应时的吸光度的变化量来进行定量。利用本发明时的测定范围，可以考虑作为测定对象的配体的种类、与受体的亲和性、各受体量的比例等适当设定为所要求的测定范围。例如，测定对象为尿中的白蛋白的情况下，考虑到在临床检测中的使用而优选为1 $\mu$ g/mL至1mg/mL的范围，如后述的实施例所示，根据本发明能够准确地进行测定。

本发明的凝集抑制测定用试剂包含：(A)预先负载有配体

或者配体样物质的不溶性载体颗粒、(B)与上述配体特异性反应的游离态受体、(C)负载有受体的不溶性载体颗粒,所述受体与上述配体特异性反应、且配体上的结合部位与上述游离态受体不同,最理想的是分成含有(B)、(C)的第一试剂和含有(A)的第二试剂。

以下,举出实施例对本发明进行更详细的说明,但本发明不限于此。

### 实施例

#### 利用凝集抑制测定法测定微量白蛋白

##### (1)受体(抗白蛋白单克隆抗体)的制备

将100 $\mu$ g纯化人白蛋白(Sigma公司制)用于每一次免疫。初次免疫使用将白蛋白和弗氏完全佐剂等量混合制备而成的200 $\mu$ L乳浊液,将其注射到BALB/c小鼠的腹腔而进行。加强免疫使用弗氏不完全佐剂,利用与上述同样制备而成的200 $\mu$ L乳浊液重复进行3次腹腔注射,每次间隔两周。

通过将纯化人白蛋白固相化的ELISA法测定从小鼠眼底静脉采集的血液中的抗体效价,选择抗体效价高的小鼠供于细胞融合(另外抗体效价的确认方法与后述的培养上清中的抗白蛋白抗体的存在的确认方法相同)。在距第4次免疫2周后,将100 $\mu$ g白蛋白溶解于200 $\mu$ L生理盐水中,将其注射到小鼠腹腔,3天后取出脾脏。将该取出的脾脏在RPMI1640培养基中打碎,然后以1500rpm离心分离并回收脾细胞。通过将其在不含胎牛血清的RPMI1640培养基中进行3次以上离心、沉淀而进行清洗,之后对于沉淀部分添加2mL含有15%胎牛血清的RPMI1640培养基进行悬浮,制成脾细胞悬浮液。将脾细胞和骨髓瘤细胞SP2/O-AG14以细胞数6比1的比例混合之后,在50%聚乙二醇存在下使细胞融合。利用1500rpm的离心分离收集沉淀部分,悬

浮于GKN溶液（将葡萄糖2g、氯化钾0.4g、氯化钠8g、磷酸氢二钠1.41g以及磷酸二氢钠二水合物0.78g溶于1升纯化水中而成的溶液），通过悬浮离心分离进行清洗，之后回收沉淀部分。将该沉淀部分悬浮于30mL含有15%胎牛血清的RPMI1640培养基而成的液体，每孔分注100 $\mu$ L，向同一孔中每孔分注200 $\mu$ L含有 $2.5 \times 10^6$ 个/mL作为饲养细胞的BALB/c小鼠胸腺细胞的HAT培养基。分注于3个96孔微孔板，于37 $^{\circ}$ C下在5%二氧化碳培养箱中培养。

通过将纯化人白蛋白固相化的ELISA法确认培养上清中的抗白蛋白抗体的存在。培养10天后，在全部孔中都看到了融合细胞的增殖。抗白蛋白抗体的存在确认方法的详细情况如下。

首先，将100 $\mu$ L含有10 $\mu$ g/mL的白蛋白以及150mM氯化钠的10mM磷酸缓冲液（pH7.2；以下简称PBS）分注于96孔微孔板，于4 $^{\circ}$ C下放置一晚。接着，将其用300 $\mu$ L含有0.05%吐温20以及1%牛血清白蛋白的PBS清洗3次后，以50 $\mu$ L/孔添加进行了培养的3个96孔微孔板各孔的培养上清，于室温下放置1小时。之后，用含有0.05%吐温20的PBS清洗3次后，以50 $\mu$ L/孔添加过氧化物酶标记的抗小鼠抗体（第一化学药品公司制），于室温下放置1小时。将其用含有0.05%吐温20的PBS清洗3次后，以50 $\mu$ L/孔添加含有0.2%邻苯二胺以及0.02%过氧化氢的柠檬酸缓冲液（pH5），于室温下放置15分钟后，以50 $\mu$ L/孔添加4.5N硫酸使反应停止，测定波长492nm处的吸光度。测定的结果，选择吸光度高的孔作为抗白蛋白抗体存在（即，存在产生抗白蛋白抗体的融合细胞）的孔（阳性孔）。

通过有限稀释法进行单克隆化。即，将作为饲养细胞的BALB/c小鼠的胸腺细胞以每孔 $10^6$ 个分注于96孔微孔板，将阳性孔中的融合细胞稀释成10个/mL后，将其向上述微孔板中每

孔分注0.1mL。培养基方面，初次时使用HT培养基，第二次以后使用含有15%胎牛血清的RPMI1640培养基，于37℃下在5%二氧化碳培养箱中培养10天。把上述利用将纯化人白蛋白固相化的ELISA法来选择阳性孔以及利用有限稀释法的单克隆化操作各重复3次，获得30种产生抗白蛋白单克隆抗体的细胞。将约 $10^5$ 个各细胞给予到实施了姥鲛烷预处理的小鼠腹腔，分别采集生成的腹水。通过离心分离从采集的各腹水中除去不溶物质，并添加等量的饱和硫酸铵溶液，一边搅拌并放置1晚后，利用离心分离回收沉淀。将回收的沉淀溶解于20mM Tris缓冲液（pH8），用同样的缓冲液进行透析。使各透析内含物分别吸附于用同样的缓冲液平衡后的DEAE-琼脂糖柱，之后分别将在同样的缓冲液中的0~300mM的氯化钠浓度梯度下洗脱得到的IgG级分用50mM甘氨酸缓冲液透析，从由此得到的30种纯化抗体中选择在夹层法中可获得最高灵敏度的2种抗体的组合（抗体1-8和抗体3-8）。

## （2）白蛋白测定用胶乳试剂的制备

向含有2.8mg/mL选出的2种抗白蛋白单克隆抗体中的抗体3-8的20mM Tris缓冲液（pH8.5）3mL中添加3mL平均粒径为50nm的4%胶乳（积水化学工业公司制）悬浮液，于4℃下搅拌2小时。向其中添加6mL含有0.4%牛血清白蛋白的20mM Tris缓冲液（pH8.5），于4℃下搅拌1小时。离心分离后，将沉淀用5mM MOPS缓冲液（pH7.0）重悬，以使波长600nm处的吸光度为40mOD，制备抗白蛋白抗体3-8致敏胶乳。混合游离态的抗体1-8和抗体3-8致敏胶乳从而制备第一试剂。

接着，使用3mL含有0.5mg/mL人血清白蛋白的10mM CHES缓冲液（pH5.5），添加3mL平均粒径为300nm的0.5%胶乳（积水化学工业公司制）悬浮液，于4℃下搅拌1小时。离心分离后

除去上清，将沉淀用5mM MOPS缓冲液（pH7.0）重悬，以使波长600nm处的吸光度为2.15OD，制备第二试剂，即白蛋白致敏胶乳溶液。

### （3）白蛋白的测定

使用通用型的日立7170型自动分析装置测定各浓度的白蛋白试样，确认测定灵敏度。具体而言，向100 $\mu$ L第一试剂中分别添加3 $\mu$ L含有各浓度的白蛋白的试样溶液并进行搅拌，之后于37 $^{\circ}$ C下加热5分钟，再添加100 $\mu$ L第二试剂，于37 $^{\circ}$ C下测定5分钟的主波长570nm/副波长800nm处的吸光度变化量。首先，白蛋白浓度为0 $\mu$ g/mL时的初始凝集示于表1。再测定含有5、12.5、25、50、100、200、400、800 $\mu$ g/mL的白蛋白的各试样测定时初始凝集后的吸光度变化量，白蛋白浓度-(负)吸光度(以下相同)的反应曲线以实线示于图1。基于该反应曲线的形状由0、5、25、100、400、800 $\mu$ g/mL这6点制成标准曲线，将各浓度的白蛋白试样的吸光度变化量换算成白蛋白浓度的测定值示于表2。

### （4）比较例

作为比较例制备下述（A）~（E）5种第一试剂，并使其与实施例中的最终的抗体浓度相同。

（A）单独含有游离态的抗体1-8的第一试剂

（B）单独含有抗体1-8致敏胶乳的第一试剂

（C）含有游离态的抗体1-8和抗体1-8致敏胶乳两者的第一试剂

（D）含有游离态的抗体1-8和游离态的抗体3-8两者的第一试剂

（E）含有抗体1-8致敏胶乳和抗体3-8致敏胶乳两者的第一试剂

组合上述(A)~(E)的各第一试剂和(2)中制备的第二试剂,根据(3)的方法进行测定。与实施例同样将初始凝集的结果示于表1,将白蛋白浓度-吸光度的反应曲线示于图1,基于各比较例的反应曲线的形状由0~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围选出最佳的浓度点制成标准曲线,将各浓度的白蛋白试样的吸光度变化量换算成白蛋白浓度的测定值示于表2。

#### (5) 结果

如表1所示,相对于实施例的初始凝集(吸光度),比较例A、B、C只获得约一半的初始凝集,比较例D只获得2/3左右的初始凝集,可以容易地推测出比较例的试剂在凝集抑制法中基本的测定性能差。另一方面,比较例E中获得比实施例更大的初始凝集。

[表1]

实施例		332.3
比较例	A	157.3
	B	185.2
	C	144.4
	D	214.3
	E	438.3

单位 (mAb s)

根据图1的白蛋白浓度-(负)吸光度的反应曲线,实施例(-●-)凝集抑制反应的敏感性高,在白蛋白低浓度区域(5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )显示大的灵敏度(-吸光度)变化的同时,在白蛋白高浓度区域(100~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )也显示明确的灵敏度变化,因此可确认能够在低浓度区域至高浓度区域广范围地且精度良好地测定白蛋白。另一方面,由于比较例A(-□-)、比较例C(-△-)

在白蛋白低浓度区域几乎无法确认灵敏度变化，因此不能准确测定低浓度区域。另外，虽然比较例D (-x-) 中白蛋白浓度-吸光度的反应曲线的形状与实施例近似，但初始凝集和灵敏度变化自身相对于实施例而言较小，测定精度成为问题。比较例B (-o-)、比较例E (---) 中虽然在白蛋白低浓度区域显示大的灵敏度变化，但由于在高浓度区域无灵敏度变化，因此不能广范围地测定低浓度区域至高浓度区域。

如表2所示，实施例中从低浓度区域至高浓度区域获得了与理论值基本相同的测定值。比较例A、C不能准确测定含有0 $\mu\text{g/mL}$ 白蛋白的低浓度区域。另外，比较例B、E不能准确测定高浓度区域。比较例D中在任何浓度下均与理论值背离较大，因此可确认所有测定值的准确性均存在问题。

[表2]

白蛋白浓度	实施例	比较例A	比较例B	比较例C	比较例D	比较例E
0	0.0	6.9	0.0	2.5	0.0	0.0
5	4.2	0.0	5.8	7.2	4.2	5.2
12.5	12.1	0.0	11.9	19.0	7.0	11.9
25	26.9	17.9	24.4	26.1	18.2	25.7
50	50.1	34.0	50.2	58.4	45.2	49.4
100	97.7	100.4	103.5	111.8	88.8	64.1
200	206.6	194.0	134.6	178.5	198.6	68.0
400	405.7	398.8	153.0	418.3	330.0	69.7
800	809.0	808.3	155.3	785.4	684.0	70.4

单位 ( $\mu\text{g/mL}$ )

对于上述实施例以及比较例，在相同条件下进行同时重复性试验 ( simultaneous reproducibility test ) (  $n=5$  )。结果示于表3。

如表3所示，实施例从低浓度至高浓度的重复性良好，可以得到变异系数为6%以下的值，测定平均值也得到与白蛋白浓度水平同等的测定值。比较例A、C、D重复性差，尤其是低浓度

的变异系数有超过20%的情况。比较例B、E虽然可以重复性良好地测定，但是在高浓度区域的测定平均值与白蛋白浓度水平背离，准确性低。

[ 表 3 ]

白蛋白浓度	再现性(n=5)	实施例	比较例A	比较例B	比较例C	比较例D	比较例E
12.5 水平	平均( $\mu\text{g/mL}$ )	10.8	30.4	11.4	22.5	9.7	10.9
	变异系数(%)	5.2	47.8	4.4	24.2	15.7	4.2
25 水平	平均( $\mu\text{g/mL}$ )	25.5	39.9	24.8	27.4	22.7	25.9
	变异系数(%)	3.2	33.4	1.2	24.9	8.3	1.5
50 水平	平均( $\mu\text{g/mL}$ )	57.3	56.1	52.8	45.3	51.8	49.9
	变异系数(%)	3.7	15.1	7.2	20.3	5.1	0.4
200 水平	平均( $\mu\text{g/mL}$ )	208.6	229.0	119.8	230.7	221.8	63.6
	变异系数(%)	1.7	3.6	2.6	3.1	2.4	0.2
800 水平	平均( $\mu\text{g/mL}$ )	815.7	821.2	134.6	818.7	471.2	65.1
	变异系数(%)	0.5	0.7	3.1	1.5	2.8	0.1

### 产业上的可利用性

根据本发明，能够提供一种凝集抑制测定法以及一种凝集抑制测定用试剂，其能够在低浓度区域至高浓度区域高灵敏度且广范围地对测定对象配体进行测定，同时还具有良好的测定重复性。尤其是利用免疫反应的情况下，由于不产生钩状效应这一特征，测定值的可靠性高，另外，在测定具有可能呈现异常高值的配体的情况下，能够提供比颗粒凝集法更为准确的测定方法。

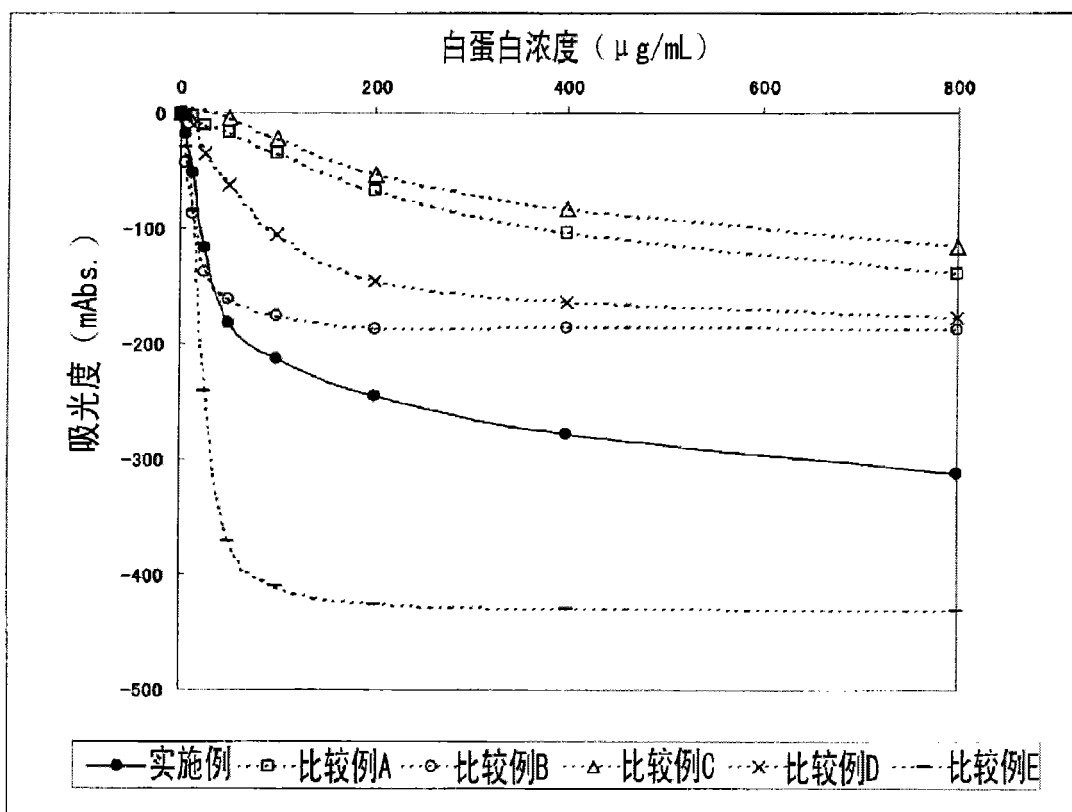


图 1

专利名称(译)	凝集抑制测定法以及凝集抑制测定用试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN101517412A</a>	公开(公告)日	2009-08-26
申请号	CN200780035440.9	申请日	2007-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	吉田忠晃 高桥弘至		
发明人	吉田忠晃 高桥弘至		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/54306		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2005000058 2006-07-24 JP		
其他公开文献	CN101517412B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的课题在于提供一种凝集抑制测定法及凝集抑制测定用试剂，其能够在低浓度区域至高浓度区域高灵敏度且广范围地测定试样中的配体，同时，还具有好的测定重复性。本发明提供的凝集抑制测定法及凝集抑制测定用试剂，使用负载有配体的不溶性载体颗粒和游离态的异性受体、以及负载有配体上的结合部位与上述游离态的受体不同的异性受体的不溶性载体颗粒。

<b>实施例</b>		<b>332.3</b>
<b>比较例</b>	<b>A</b>	<b>157.3</b>
	<b>B</b>	<b>185.2</b>
	<b>C</b>	<b>144.4</b>
	<b>D</b>	<b>214.3</b>
	<b>E</b>	<b>438.3</b>