



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112752974 A

(43) 申请公布日 2021.05.04

(21) 申请号 201980062760.6

(22) 申请日 2019.09.13

(30) 优先权数据

2018-179952 2018.09.26 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/036235 2019.09.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/066722 JA 2020.04.02

(71) 申请人 荣研化学株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 油井惠 牧之段满

(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 盛曼 金龙河

(51) Int.Cl.

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G07K 16/18 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

(54) 发明名称

血红蛋白的测定试剂、测定试剂盒和测定方法

(57) 摘要

本发明的课题在于提供能够抑制因触珠蛋白的添加引起的血红蛋白的测定值的降低、从而更准确地测定血红蛋白的量的血红蛋白的测定试剂和测定方法。本发明的用于测定血红蛋白的试剂含有负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体。本发明的用于测定样本中的血红蛋白的方法包括：(1) 将样本与触珠蛋白混合而形成血红蛋白-触珠蛋白复合物，得到含有血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样的步骤；以及(2) 使步骤(1)中得到的试样与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集的步骤。

1. 一种用于测定血红蛋白的试剂,其含有负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体。

2. 如权利要求1所述的试剂,其中,抗血红蛋白抗体至少为两种。

3. 如权利要求1或2所述的试剂,其中,不溶性载体为胶乳粒子和/或金胶体粒子。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的试剂,其中,抗血红蛋白抗体和抗触珠蛋白抗体为单克隆抗体。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的试剂,其中,抗触珠蛋白抗体为一种。

6. 一种血红蛋白的测定方法,其是用于测定样本中的血红蛋白的方法,其包括:

(1) 将样本与触珠蛋白混合而形成血红蛋白-触珠蛋白复合物,得到含有血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样的步骤;以及

(2) 使步骤(1)中得到的试样与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集的步骤。

7. 如权利要求6所述的测定方法,其中,抗血红蛋白抗体至少为两种。

8. 如权利要求6或7所述的测定方法,其中,不溶性载体为胶乳粒子和/或金胶体粒子。

9. 如权利要求6~8中任一项所述的测定方法,其中,抗血红蛋白抗体和抗触珠蛋白抗体为单克隆抗体。

10. 如权利要求6~9中任一项所述的测定方法,其中,样本为粪便、唾液或尿。

11. 如权利要求6~10中任一项所述的测定方法,其中,触珠蛋白包含在样本保存用溶液中。

12. 如权利要求11所述的测定方法,其中,样本保存用溶液中的触珠蛋白浓度为0.05单位/L~50单位/L。

13. 如权利要求6~12中任一项所述的测定方法,其中,样本中的血红蛋白含有选自由游离血红蛋白、血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体和完全血红蛋白-触珠蛋白复合物组成的组中的至少一种,所述游离血红蛋白的至少一部分在步骤(1)之后与所述触珠蛋白形成血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体和/或完全血红蛋白-触珠蛋白复合物。

14. 一种用于测定样本中的血红蛋白的方法,其包括使样本与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集的步骤。

15. 一种抑制样本中的血红蛋白的测定值降低的方法,其包括使样本与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集的步骤。

血红蛋白的测定试剂、测定试剂盒和测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及血红蛋白的测定试剂和测定方法。

背景技术

[0002] 粪便、尿、唾液等样本中所含的血液的检测对大多数疾病的诊断有用。例如，检测粪便中的血液的粪便潜血检查被用于大肠癌的诊察。作为检测潜血的方法，已知使用抗血红蛋白抗体对粪便等样本中的潜血中所含的血红蛋白进行检测的免疫学方法。

[0003] 供于潜血检查的样本通常从受试者被采集到装有保存溶液的容器中，并被送至医院等检查机构。在大多数情况下，含有样本的保存溶液要保管数天直到实际供于检查为止，在此期间，经常被置于高温下。血红蛋白在溶液中是不稳定的，在高温条件下特别容易发生变性或分解。由于血红蛋白发生变性或分解而使表位或其周边部位的结构变化时，抗体无法识别血红蛋白，因此，基于免疫学方法的血红蛋白的检测的准确性降低。

[0004] 因此，为了使血红蛋白稳定，使用了向样本的保存溶液中添加触珠蛋白的方法（例如专利文献1）。触珠蛋白广泛存在于动物的血液中，是担负着回收由于红细胞的溶血而释放到血液中的血红蛋白的作用的蛋白质。已知触珠蛋白与血红蛋白快速地不可逆地结合而形成稳定的血红蛋白-触珠蛋白复合物。通过预先向保存溶液等中添加触珠蛋白，在向保存溶液等中加入样本时，样本中所含的血红蛋白通过形成血红蛋白-触珠蛋白复合物而稳定化。

[0005] 但是，在添加触珠蛋白的情况下，特别是相对于样本中的游离血红蛋白过量添加触珠蛋白时，有时观察到血红蛋白的测定值的降低（专利文献1）。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1：日本特开平10-132824公报

发明内容

[0009] 发明所要解决的问题

[0010] 本发明的目的在于提供能够抑制因触珠蛋白的添加引起的血红蛋白的测定值的降低、从而更准确地测定血红蛋白的量的血红蛋白的测定试剂和测定方法。

[0011] 用于解决问题的方法

[0012] 本发明人为了解决上述现有技术的课题而反复进行了深入研究，结果发现，通过使结合有抗血红蛋白抗体的不溶性载体和结合有抗触珠蛋白抗体的不溶性载体共存，能够抑制因触珠蛋白的添加引起的血红蛋白的测定值的降低，能够更准确地测定血红蛋白的量，从而完成了本发明。

[0013] 即，本发明涉及例如以下的各发明。

[0014] [1] 一种用于测定血红蛋白的试剂，其含有负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体。

- [0015] [2]如[1]所述的试剂,其中,抗血红蛋白抗体至少为两种。
- [0016] [3]如[1]或[2]中任一项所述的试剂,其中,不溶性载体为胶乳粒子和/或金胶体粒子。
- [0017] [4]如[1]~[3]中任一项所述的试剂,其中,抗血红蛋白抗体和抗触珠蛋白抗体为单克隆抗体。
- [0018] [5]如[1]~[4]中任一项所述的试剂,其中,抗触珠蛋白抗体为一种。
- [0019] [6]一种血红蛋白的测定方法,其是用于测定样本中的血红蛋白的方法,其包括:
- [0020] (1)将样本与触珠蛋白混合而形成血红蛋白-触珠蛋白复合物,得到含有血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样的步骤;以及
- [0021] (2)使步骤(1)中得到的试样与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集的步骤。
- [0022] [7]如[6]所述的测定方法,其中,抗血红蛋白抗体至少为两种。
- [0023] [8]如[6]或[7]所述的测定方法,其中,不溶性载体为胶乳粒子和/或金胶体粒子。
- [0024] [9]如[6]~[8]中任一项所述的测定方法,其中,抗血红蛋白抗体和抗触珠蛋白抗体为单克隆抗体。
- [0025] [10]如[6]~[9]中任一项所述的测定方法,其中,样本为粪便、唾液或尿。
- [0026] [11]如[6]~[10]中任一项所述的测定方法,其中,触珠蛋白包含在样本保存用溶液中。
- [0027] [12]如[11]所述的测定方法,其中,样本保存用溶液中的触珠蛋白浓度为0.05单位/L~50单位/L。
- [0028] [13]如[6]~[12]中任一项所述的测定方法,其中,样本中的血红蛋白含有选自由游离血红蛋白、血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体和完全血红蛋白-触珠蛋白复合物组成的组中的至少一种,上述游离血红蛋白的至少一部分在步骤(1)之后与上述触珠蛋白形成血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体和/或完全血红蛋白-触珠蛋白复合物。
- [0029] [14]一种用于测定样本中的血红蛋白的方法,其包括使样本与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集的步骤。
- [0030] [15]一种抑制样本中的血红蛋白的测定值降低的方法,其包括使样本与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集的步骤。
- [0031] [16]一种试剂盒,其是用于测定样本中的血红蛋白的试剂盒,其含有负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体、负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体和触珠蛋白。
- [0032] [17]一种用于测定样本中的血红蛋白的试剂盒,其含有[1]~[5]中任一项所述的试剂和触珠蛋白。
- [0033] 发明效果
- [0034] 根据本发明,可提供能够更准确地测定血红蛋白的量的测定试剂和测定方法。

具体实施方式

[0035] <定义>

[0036] [血红蛋白-触珠蛋白复合物]

[0037] 血红蛋白是红细胞中存在的蛋白质,具有由各自为两个的被称为 α 亚单位(或 α 链)和 β 亚单位(或 β 链)的两种亚单位构成的四聚体结构 $[\alpha_2\beta_2]$ 。触珠蛋白是存在于血浆中、与血中游离的血红蛋白结合的蛋白质,具有3个类型的结构。例如,1-1型触珠蛋白具有由各自为两个的被称为 α 亚单位(或 α 链)和 β 亚单位(或 β 链)的两种亚单位构成的四聚体结构 $[\alpha_2\beta_2]$ 。

[0038] 血红蛋白与触珠蛋白形成稳定的复合物。通常,相对于1分子触珠蛋白,结合有1分子血红蛋白。这样的复合物被称为血红蛋白-触珠蛋白复合物,在本说明书中,也称为完全血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0039] 另一方面,在相对于触珠蛋白使血红蛋白的摩尔比(血红蛋白:触珠蛋白)小于1的情况下,即,在触珠蛋白相对于血红蛋白过量存在的情况下,具有形成被称为血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体(intermediate)的复合物的倾向(J.V.PASTEWKA et al., Biochimica et Biophysica Acta, 386 (1975) 530-537)。形成血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体时,认为1分子的四聚体血红蛋白 $[\alpha_2\beta_2]$ 解离为2分子的二聚体($\alpha\beta$),各 $\alpha\beta$ 二聚体分别与触珠蛋白1分子结合。即认为,血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体是在1分子的触珠蛋白 $[\alpha_2\beta_2]$ 中结合有1/2分子的血红蛋白($\alpha\beta$)的复合物。

[0040] 本说明书中,只要没有特别说明,则血红蛋白-触珠蛋白复合物包括完全血红蛋白-触珠蛋白复合物和血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体这两者。

[0041] [样本]

[0042] 本说明书中的样本是含有血红蛋白或可能含有血红蛋白的、从待测对象采集的生物样品。样本可以为粪便、唾液或尿,特别优选为粪便。另外,也可以以全血、血清、血浆等作为样本,测定这些样本的血红蛋白量可以作为例如溶血、使用触珠蛋白制剂的治疗的指标有用。

[0043] [试样]

[0044] 本说明书中的试样含有样本,特别是将样本与触珠蛋白混合而得到的试样。样本中的游离血红蛋白通过与触珠蛋白混合而形成稳定的血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0045] 即,试样中,可以含有未与触珠蛋白形成复合物的游离血红蛋白、样本中原本存在的血红蛋白-触珠蛋白复合物(来源于样本的血红蛋白-触珠蛋白复合物)和/或通过触珠蛋白的添加而形成的血红蛋白-触珠蛋白复合物(制备血红蛋白-触珠蛋白复合物)。

[0046] 特别是,从稳定性的观点考虑,在将样本与触珠蛋白混合而得到的试样中,优选全部游离血红蛋白与触珠蛋白形成复合物、从而形成制备血红蛋白-触珠蛋白复合物,试样优选包含来源于样本的血红蛋白-触珠蛋白复合物和制备血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0047] 试样例如可以通过从受试者等采集样本后、迅速地向含有触珠蛋白的样本保存用溶液(以下,根据情况称为“保存溶液”)中添加样本来得到。试样可以在常温下保存数天直至血红蛋白的测定为止,优选在2~10℃下冷藏保存。在样本为含有固体物质的粪便等的情况下,可以将保存溶液过滤而除去固体物质而制成试样。

[0048] [保存溶液]

[0049] 保存溶液是指用于保存样本的样本保存用溶液,优选含有触珠蛋白。

[0050] 保存溶液优选进一步含有缓冲液等。作为缓冲液等,可以为含有2-吗啉乙磺酸(MES)、2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]-乙磺酸(HEPES)、哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)(PIPES)等的Good's缓冲剂的缓冲液,也可以为磷酸缓冲液、Tris缓冲液或甘氨酸缓冲液。保存溶液

的pH可以为5~10,也可以为6~8。

[0051] 保存溶液中的触珠蛋白的浓度取决于样本的种类和量,例如为0.05单位/L~50单位/L、0.1单位/L~10单位/L或0.2单位/L~2单位/L。在此,1单位表示与1mg的血红蛋白结合的触珠蛋白量。上述范围的触珠蛋白浓度是足以使样本中的全部血红蛋白与触珠蛋白形成复合物的浓度。

[0052] 例如,在相对于保存溶液0.2~20mL以使粪便的浓度为0.05%~25% (W/V%)的方式进行悬浮时,样本相对于触珠蛋白的量比可以设定为0.075g/单位~5000g/单位。

[0053] 本发明中的触珠蛋白只要是与作为测定对象的血红蛋白复合化而生成血红蛋白-触珠蛋白复合物的触珠蛋白则没有特别限定。血红蛋白与触珠蛋白的结合的种特异性低,因此,可以利用广泛的触珠蛋白。在以人血红蛋白作为测定对象时,可以利用来源于人、以及马、猪、猴、狗、兔、大鼠等的触珠蛋白。触珠蛋白未必需要使用高度纯化后的状态的触珠蛋白。

[0054] 保存溶液中,可以进一步添加叠氮化钠(NaN_3)等抗菌剂、pH调节剂、用于调节离子强度的盐等可在血红蛋白的保存时使用的公知的添加剂。抗菌剂包含抗生素和溶菌酶。添加剂的例子还包含赖氨酸、组氨酸等氨基酸、白蛋白、蛋白水解酶抑制剂、过渡金属离子的水溶性络合物、乙二胺四乙酸(EDTA)等已知具有使血红蛋白稳定的作用的公知成分。白蛋白的例子包含牛血清白蛋白(BSA)等血清白蛋白和来源于蛋白的白蛋白(卵清蛋白)。

[0055] <血红蛋白的测定试剂>

[0056] 本发明的一个实施方式的血红蛋白的测定试剂含有负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体。作为使用本发明的试剂的测定法,可以使用免疫学方法,作为免疫学方法,可以为利用抗血红蛋白抗体的公知的免疫学方法,可以列举例如免疫凝集法(例如胶乳凝集法或金胶体凝集法)、免疫色谱法、ELISA法。本发明的试剂特别适合用于免疫凝集法、更优选胶乳凝集法。

[0057] 本发明的一个实施方式的血红蛋白的测定试剂在测定时以游离血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物这两者作为测定对象,对血红蛋白的总量进行测定。本发明的试剂在免疫学测定法(特别是免疫凝集法)中对游离血红蛋白、完全血红蛋白-触珠蛋白复合物和血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体各抗原显示出以血红蛋白计大致同等的反应性。特别是,通过使结合在不溶性载体的抗触珠蛋白抗体共存,发挥如下优良效果:对完全血红蛋白-触珠蛋白复合物和血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体这两种抗原,显示出以血红蛋白计同等的反应性(“对血红蛋白的同值反应性”)。

[0058] 需要说明的是,“以血红蛋白计同等的反应性”是指,在试样中存在以血红蛋白计为相同浓度的、游离血红蛋白、完全血红蛋白-触珠蛋白复合物、血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体或它们的混合物各抗原的情况下,通过不溶性载体的免疫凝集反应测定的血红蛋白浓度在各抗原中实质上相等。在此,通过不溶性载体的免疫凝集反应测定的血红蛋白浓度“实质上相等”是指,在将游离血红蛋白的测定值设为100%的情况下,对以血红蛋白计为相同浓度的其他各种抗原进行测定时的血红蛋白浓度的测定值的下限为80%以上、优选为90%以上、更优选为95%以上,另外,测定值的上限值为120%以下、优选为110%以下、更优选为105%以下。

[0059] 本发明的试剂除了含有现有的负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体以外,还含有负

载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体,由此,能够抑制以往的因触珠蛋白的添加引起的血红蛋白的测定值的降低。特别是,即使在添加的触珠蛋白与样本中的游离血红蛋白的摩尔比(血红蛋白/触珠蛋白)小于1的情况下、即存在血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体的情况下,也能够抑制血红蛋白的测定值的降低,能够准确地对样本中的血红蛋白进行检测、测定。此外,在样本中不添加触珠蛋白的情况下,即使在样本中原本存在有触珠蛋白(无论游离触珠蛋白、血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体、血红蛋白-触珠蛋白复合物),也能够抑制血红蛋白的测定值的降低,能够准确地对样本中的血红蛋白进行检测、测定。

[0060] 本发明人认为,以往的因触珠蛋白的添加引起的血红蛋白的测定值的降低的一个原因是血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体的存在,通过添加负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体而解决了该问题。

[0061] 作为不溶性载体,只要是能够负载抗血红蛋白抗体或抗触珠蛋白抗体的不溶性载体即可,优选可以在免疫学方法中使用的不溶性粒子,可以列举通常使用的金胶体粒子等金属胶体粒子、胶乳粒子、二氧化硅粒子、磁性粒子、荧光粒子、红细胞等,但不限于此。作为不溶性粒子,优选胶乳粒子,更优选聚苯乙烯系胶乳粒子。不溶性载体优选为粒状,作为其平均粒径,优选为5~1000nm,更优选为30~500nm,进一步优选为75~350nm,但可以不特别局限于该范围地来使用。

[0062] 负载有抗体是指,通过使抗体物理吸附或化学键合于不溶性载体的表面而使其固定化。作为负载方法(固定化方法),可以为例如作为公知技术的如下方法:将抗体与不溶性载体粒子混合而使抗体物理性吸附于不溶性载体粒子的表面,由此使抗体固定化于不溶性载体粒子上。另外,在使用在表面引入有氨基、羧基的不溶性载体粒子的情况下,可以通过使用戊二醛、羧酐亚胺试剂的化学键合而使抗体固定化于不溶性载体粒子的表面上。

[0063] 抗体的负载量没有特别限定,只要为0.5~2000 μ g/mg胶乳即可,可以为1~1000 μ g/mg胶乳或2~500 μ g/mg胶乳。抗体的负载量可以以从固定化于不溶性载体之前的抗体量中减去固定化后的抗体量而得到的量来算出。

[0064] 抗血红蛋白抗体没有特别限定,优选能够识别血红蛋白-触珠蛋白复合物中的血红蛋白的表位并且不与触珠蛋白发生交叉反应。可以为多克隆抗体或单克隆抗体,但从特异性的观点考虑,优选为单克隆抗体,优选为抗人血红蛋白单克隆抗体。测定试剂中含有的抗血红蛋白抗体至少为一种、优选至少两种。

[0065] 另一方面,抗触珠蛋白抗体没有特别限定,优选能够识别血红蛋白-触珠蛋白复合物中的触珠蛋白的表位并且不与血红蛋白发生交叉反应。特别是,对于抗触珠蛋白抗体而言,优选至少在用于使游离的血红蛋白形成血红蛋白-触珠蛋白复合物的游离的触珠蛋白的添加量的范围内,在游离的触珠蛋白和负载有抗触珠蛋白抗体的不溶性载体中不发生凝集。此外,更优选抗触珠蛋白抗体在游离的触珠蛋白和负载有抗触珠蛋白抗体的不溶性载体中不发生凝集。抗触珠蛋白抗体可以为多克隆抗体或单克隆抗体,但优选为单克隆抗体,优选为抗触珠蛋白单克隆抗体。在抗触珠蛋白抗体为单克隆抗体的情况下,其识别位点可以为触珠蛋白的 α 链(α 链识别抗体)或 β 链(β 链识别抗体)。测定试剂中含有的抗触珠蛋白抗体至少为一种。

[0066] 作为本发明中可以使用的上述抗体,来源的动物种没有特别限定,可以列举例如来源于兔、山羊、小鼠、大鼠、马、绵羊等动物的抗体,可以使用通过公知的方法由免疫了测

定对象物的动物的血清得到的多克隆、将免疫了测定对象物的动物的脾脏与骨髓瘤细胞进行细胞融合而得到的单克隆抗体中的任意一种。另外,可以使用它们的片段[例如F(ab')₂、Fab、Fab' 或Fv]。

[0067] 用于负载抗血红蛋白抗体而使用的的不溶性载体至少为一种,也可以至少为两种。可以在一种不溶性载体中负载有一种或两种以上的抗血红蛋白抗体。另外,一种抗血红蛋白抗体可以负载于一种或两种以上的不溶性载体中。

[0068] 在测定试剂中含有两种以上的抗血红蛋白抗体的情况下,两种以上的抗血红蛋白抗体可以一起负载于相同的不溶性载体中。或者,也可以将在一种不溶性载体中负载有一种抗血红蛋白抗体的不溶性载体混合两种以上来使用。此时,用于负载不同种抗血红蛋白抗体而使用的的不溶性载体可以为同种不溶性载体,也可以为材质或粒径等不同的不同种不溶性载体。

[0069] 用于负载抗触珠蛋白抗体而使用的的不溶性载体至少为一种,也可以至少为两种。可以在一种不溶性载体中负载有一种或两种以上的抗触珠蛋白抗体。另外,一种抗触珠蛋白抗体可以负载于一种或两种以上的不溶性载体中。在测定试剂中含有两种以上的抗触珠蛋白抗体的情况下,与上述的测定试剂中含有两种以上的抗血红蛋白抗体的情况相同。

[0070] 测定试剂的形态没有特别限定,例如,可以由不含不溶性载体的试剂(第一试剂)和含有负载抗体的不溶性载体(抗体负载不溶性载体)的试剂(第二试剂)的双试剂系构成,也可以由仅为含有抗体负载不溶性载体的试剂的单试剂系构成。

[0071] 从反应体系中的、测定对象物或夹杂物的浓度的调整、反应速度的调整等观点考虑,第一试剂可以作为稀释液使用等为了调整测定环境而使用。第二试剂含有抗体负载不溶性载体,与第一试剂和试样混合而发生免疫凝集反应。第一试剂和第二试剂可以适当含有pH缓冲剂、盐、表面活性剂、凝集促进剂、防腐剂等。作为凝集反应时的pH,优选为5~9。

[0072] 另外,测定试剂与保存溶液混合而得到反应液,但不溶性载体的反应液中的浓度可以根据所使用的不溶性载体的粒径、测定体系整体的设计而从例如0.0001mg/mL~10mg/mL的范围内适当选择。测定试剂中的负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体的浓度可以为0.01~20mg/mL或0.05~1mg/mL,负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体的浓度可以为0.01~20mg/mL或0.05~1mg/mL。

[0073] 需要说明的是,不溶性载体的第二试剂中的浓度通过在使用时与保存溶液混合、或者通过与第一试剂和保存溶液混合来进行稀释,因此,该第二试剂中的不溶性载体的浓度可以根据稀释倍率适当选择,例如,在进行2倍稀释来使用的情况下,进行适当调整以使其达到0.004mg/mL~80mg/mL,在进行3倍稀释来使用的情况下,进行适当调整以使其达到0.06mg/mL~120mg/mL。

[0074] <血红蛋白的测定方法>

[0075] [步骤(1)]

[0076] 在步骤(1)中,将样本与触珠蛋白混合而形成血红蛋白-触珠蛋白复合物,得到含有血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样。

[0077] 样本与触珠蛋白的混合如上述[试样]的项目中记载的那样。在此,试样中含有的血红蛋白-触珠蛋白复合物可以包含完全血红蛋白-触珠蛋白复合物和血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体这两者。另外,试样可以含有来源于样本的游离血红蛋白、来源于样本的血红

蛋白-触珠蛋白复合物和来源于样本的其他成分,还可以含有不与血红蛋白形成复合物的游离触珠蛋白。用于与样本混合的触珠蛋白可以包含在样本保存用溶液中,在触珠蛋白以包含在样本保存用溶液中的形式进行添加的情况下,试样除了含有不与血红蛋白形成复合物的游离触珠蛋白以外,还可以含有保存溶液的其他成分。优选来源于样本的游离血红蛋白全部与触珠蛋白形成复合物,因此,混合到样本中的触珠蛋白的量相对于样本中的游离血红蛋白可以为过量。

[0078] [步骤(2)]

[0079] 在步骤(2)中,使步骤(1)中得到的试样与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集反应。

[0080] 通过上述接触,抗血红蛋白抗体识别试样中的血红蛋白,由此使负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体与血红蛋白或血红蛋白-触珠蛋白复合物结合,进一步使不溶性载体彼此凝集。通过不溶性载体的凝集,溶液的浊度发生变化,因此,测定溶液的浊度的变化,利用使用血红蛋白浓度已知的血红蛋白或血红蛋白-触珠蛋白复合物而制作的校正曲线,可以求出试样中的血红蛋白浓度。

[0081] 浊度的变化的测定可以列举利用光学方法测定免疫反应液的吸光度、散射光等的方法。作为光学方法,可以使用例如通用的光学测定装置,例如,可以使用生物化学自动分析装置“JCA-BM2250”(日本电子株式会社制造)或“JCA-BM6070”(日本电子株式会社制造)来进行测定。

[0082] 本发明的测定方法除了使现有的负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体与试样接触以外、还使负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体与试样接触,由此,能够抑制以往的因触珠蛋白的添加引起的血红蛋白的测定值的降低,能够更准确地对样本中的血红蛋白进行检测和测定。需要说明的是,在测定样本中的血红蛋白时不添加触珠蛋白的情况(即,不进行步骤(1)的情况)下,即使在样本中原本存在有触珠蛋白(无论游离触珠蛋白、血红蛋白-触珠蛋白复合物中间体、完全血红蛋白-触珠蛋白复合物),通过使样本与负载抗血红蛋白抗体的不溶性载体和负载抗触珠蛋白抗体的不溶性载体接触而发生免疫凝集(即,仅步骤(2)),也能够抑制血红蛋白的测定值的降低,能够准确地对样本中的血红蛋白进行检测、测定。

[0083] 本发明进一步提供可以在通过上述方法检测样本中的血红蛋白时使用的试剂盒。试剂盒可以包含含有抗血红蛋白抗体负载不溶性载体和抗触珠蛋白抗体负载不溶性载体的测定试剂、触珠蛋白(优选含有触珠蛋白的保存溶液)、校准物和对照等构成,另外,可以包含用于采集样本的器具和容器、用于保存样本的保存溶液等构成。

[0084] 实施例

[0085] <实施例1-1~4-2、比较例1>

[0086] [测定试剂的制备]

[0087] 作为测定试剂,制备第一试剂和第二试剂。

[0088] 作为第一试剂,使用50mM HEPES缓冲液(pH7.4)。

[0089] 作为第二试剂,将50mM HEPES缓冲液(pH7.4)、负载两种以上抗血红蛋白单克隆抗体(抗Hb抗体)各个抗体的各聚苯乙烯胶乳和负载抗触珠蛋白单克隆抗体的聚苯乙烯胶乳以表1所示的浓度进行混合,制备具有表1所示的最终胶乳浓度的实施例1-1~1-4和比较例1的免疫凝集反应测定用的试剂。同样地,作为第二试剂,以规定的浓度进行混合,制备具有

表2所示的最终胶乳浓度的实施例2-1~2-3、实施例3-1~3-3、和实施例4-1~4-2的免疫凝集反应测定用的试剂。

[0090] 作为抗触珠蛋白单克隆抗体,使用AO-53(α 链识别)、AO-27(α 链识别)、AO-35(α 链识别)、或AN12-8(β 链识别)。关于抗触珠蛋白抗体,使用确认到以下述的[试样的制备]的项目中添加的量的游离触珠蛋白不与负载有抗触珠蛋白抗体的不溶性载体发生凝集的物质。

[0091] 抗体负载聚苯乙烯胶乳通过公知的方法来制备。即,将各抗血红蛋白单克隆抗体或抗触珠蛋白单克隆抗体与聚苯乙烯胶乳粒子(平均粒径200nm)混合,在聚苯乙烯胶乳粒子表面上负载抗血红蛋白单克隆抗体或抗触珠蛋白单克隆抗体,由此进行制备。

[0092] [表1]

抗体	第二试剂中的胶乳浓度(mg/mL)				
	比较例 1	实施例 1-1	实施例 1-2	实施例 1-3	实施例 1-4
抗 Hb 抗体	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
AO-53		0.08	0.15	0.23	0.31

[0094] [表2]

抗体	第二试剂中的胶乳浓度(mg/mL)							
	实施例 2-1	实施例 2-2	实施例 2-3	实施例 3-1	实施例 3-2	实施例 3-3	实施例 4-1	实施例 4-2
抗 Hb 抗体	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
AO-27	0.08	0.15	0.31					
AO-35				0.08	0.15	0.31		
AN12-8							0.08	0.15

[0096] [试样的制备]

[0097] 将从人血液纯化出的人血红蛋白(hHb)和人触珠蛋白(hHp)(Haptoglobin Human, Phenotype 1-1(SIGMA公司制造))以达到表3所示的浓度的方式混合到Hb校准物稀释液‘荣研’(荣研化学株式会社制造)中,制备No.0~6的试样。No.3是相对于800 μ g/L人血红蛋白混合有0.8单位/L的人触珠蛋白,血红蛋白和触珠蛋白全部形成完全血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0098] [免疫凝集]

[0099] 向No.0~6的试样中分别添加实施例1-1~1-4、实施例2-1~2-3、实施例3-1~3-3、实施例4-1~4-2和比较例1的测定试剂,使用自动分析仪BM2250来测定浊度,基于预先制成的校正曲线,算出血红蛋白的浓度换算值。此外,还算出相对于No.0(不含人触珠蛋白的试样)的血红蛋白的相对值(%)。将结果示于表3中。

[0100] JCA-BM2250的测定条件如下所述。

[0101] 样本量:2.0 μ L

[0102] 第一试剂:60 μ L

[0103] 第二试剂:30 μ L

[0104] 测定波长:658nm

[0105]

[表3]

No.	hHb (μ g/L)	hHp (单位 /L)	结果	实施例 1-1	实施例 1-2	实施例 1-3	实施例 1-4	实施例 2-1	实施例 2-2	实施例 2-3	实施例 3-1	实施例 3-2	实施例 3-3	实施例 4-1	实施例 4-2	比较例 1
0	800	0	hHb 浓度 换算值 (μ g/ L)	879	904	906	891	881	880	863	899	900	869	878	891	893
1	800	0.267		870	890	888	899	865	867	841	875	860	854	866	881	853
2	800	0.533		874	875	890	879	837	856	838	850	841	823	871	873	826
3	800	0.8		842	867	877	864	818	831	830	820	816	804	848	882	794
4	800	1.067		843	874	868	862	822	819	827	801	799	795	844	885	787
5	800	1.333		830	850	873	851	812	829	836	798	807	801	847	898	795
6	800	1.6		814	845	857	825	795	815	833	760	784	798	855	903	724
0	800	0	相对于 No. 0 的hHb 的相 对值	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1	800	0.267		99%	98%	98%	101%	98%	98%	97%	97%	96%	98%	99%	99%	96%
2	800	0.533		99%	97%	98%	99%	95%	97%	97%	95%	94%	95%	99%	98%	92%
3	800	0.8		96%	96%	97%	97%	93%	94%	96%	91%	91%	92%	97%	99%	89%
4	800	1.067		96%	97%	96%	97%	93%	93%	96%	89%	89%	91%	96%	99%	88%
5	800	1.333		94%	94%	96%	95%	92%	94%	97%	89%	90%	92%	96%	101%	89%
6	800	1.6		93%	93%	95%	93%	90%	93%	96%	84%	87%	92%	97%	101%	81%

[0106] 由表3明确了,在血红蛋白的测定时添加有触珠蛋白的情况下,与仅添加负载抗血红蛋白抗体的胶乳、不添加负载抗触珠蛋白抗体的胶乳的比较例1相比,与负载抗血红蛋白

抗体的胶乳一起添加负载抗触珠蛋白抗体的胶乳的各实施例中,能够抑制因触珠蛋白添加引起的血红蛋白测定值的降低,即,能够得到更接近实际值的测定值。该结果在所使用的 α 链识别和 β 链识别中的任意一种抗触珠蛋白抗体中均可得到,因此证明了不依赖于抗触珠蛋白抗体所识别的亚单位。

[0107] <比较例2-1~2-3、3-1~3-3、4~7>

[0108] 代替实施例1-1中的抗触珠蛋白抗体负载胶乳,制备将未负载于胶乳的游离的抗触珠蛋白抗体与抗血红蛋白抗体负载胶乳混合而得到的试剂,添加到No.0~6的试样中,使其同样地发生凝集反应,算出血红蛋白的浓度换算值和血红蛋白的相对值(%)。各比较例的试剂的组成示于表4中,结果示于表5中。需要说明的是,抗触珠蛋白抗体AN11-2和AN12-3为 β 链识别抗触珠蛋白单克隆抗体,通过公知的方法来制作。

[0109] 根据表5,即使添加未结合于胶乳的游离的抗触珠蛋白抗体,也无法抑制因触珠蛋白添加引起的血红蛋白测定值的降低。反而显示出值变得更低的倾向。其原因推测可能是由于过量存在的抗触珠蛋白抗体而阻碍了结合于胶乳的抗血红蛋白抗体与血红蛋白-触珠蛋白复合物的结合。

[0110] [表4]

	抗 体	比 较 例 2-1	比 较 例 2-2	比 较 例 2-3	比 较 例 3-1	比 较 例 3-2	比 较 例 3-3	比 较 例 4	比 较 例 5	比 较 例 6	比 较 例 7
胶 乳 浓 度 (mg/mL)	抗 Hb 抗 体	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
[0111] 抗 触 珠 蛋 白 抗 体 的 浓 度 (μ g/mL)	AO-53	5	10	20							
	AN11-2				5	10	20				
	AN12-3							20			
	AO-27								20		
	AO-35									20	
	AN12-8										20

[0112]

[表5]

No.	hHb (μ g/L)	hHp (单位/L)	结果	比较例 1	比较例 2-1	比较例 2-2	比较例 2-3	比较例 3-1	比较例 3-2	比较例 3-3	比较例 4	比较例 5	比较例 6	比较例 7
0	800	0	hHb 浓度 换算值 (μ g/L)	893	884	884	906	892	894	911	896	887	880	879
1	800	0.267		853	826	804	809	838	824	811	818	837	818	832
2	800	0.533		826	756	739	755	788	758	703	741	824	768	751
3	800	0.8		794	695	682	660	713	662	589	652	807	715	698
4	800	1.067		787	663	642	623	688	622	533	608	799	693	670
5	800	1.333		795	640	608	598	675	582	482	579	804	669	648
6	800	1.6		724	506	471	437	543	412	323	405	766	569	523
0	800	0	相对于 No. 0 的hHb 的相 对值	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1	800	0.267		96%	93%	91%	89%	94%	92%	89%	91%	94%	93%	95%
2	800	0.533		92%	85%	84%	83%	88%	85%	77%	83%	93%	87%	85%
3	800	0.8		89%	79%	77%	73%	80%	74%	65%	73%	91%	81%	79%
4	800	1.067		88%	75%	73%	69%	77%	70%	58%	68%	90%	79%	76%
5	800	1.333		89%	72%	69%	66%	76%	65%	53%	65%	91%	76%	74%
6	800	1.6		81%	57%	53%	48%	61%	46%	35%	45%	86%	65%	60%

[0113] <实施例5-1~5-5、比较例8>

[0114] [测定试剂的制备]

[0115] 作为测定试剂,制备第一试剂和第二试剂。

[0116] 作为第一试剂,使用50mM HEPES缓冲液(pH7.4)。

[0117] 作为第二试剂,将50mM HEPES缓冲液(pH7.4)、负载多种抗血红蛋白单克隆抗体(抗Hb抗体)各个抗体的各聚苯乙烯胶乳和负载抗触珠蛋白单克隆抗体的聚苯乙烯胶乳以表6所示的浓度进行混合,制备具有表6所示的最终胶乳浓度的实施例5-1~5-5和比较例8的免疫凝集反应测定用的试剂。

[0118] 作为抗触珠蛋白单克隆抗体,使用A0-53(α 链识别)或AN12-8(β 链识别)。关于抗触珠蛋白抗体,使用确认到以下述的[试样的制备]的项目中添加的量的游离触珠蛋白不与负载有抗触珠蛋白抗体的不溶性载体发生凝集的物质。

[0119] 关于确认的方法,除了使用负载有A0-53(α 链识别)或AN12-8(β 链识别)的聚苯乙烯胶乳1.0mg/mL作为第二试剂、使用将游离触珠蛋白以达到0ng/mL或24.5pmol/mL的方式添加到保存溶液(Hb校准物稀释液‘荣研’(荣研化学株式会社制造))中而得到的试样(不含血红蛋白)作为试样以外,与后述的试样的制备和免疫凝集方法同样地进行。需要说明的是,24.5pmol/mL的触珠蛋白浓度相当于1.2单位/L的游离触珠蛋白添加浓度。

[0120] 抗体负载聚苯乙烯胶乳通过公知的方法来制备。即,将各抗血红蛋白单克隆抗体或抗触珠蛋白单克隆抗体与聚苯乙烯胶乳粒子(平均粒径200nm)混合,在聚苯乙烯胶乳粒子表面上负载抗血红蛋白单克隆抗体或抗触珠蛋白单克隆抗体,由此进行制备。

[0121] [表6]

抗体	第二试剂中的胶乳浓度(mg/mL)					
	比较例 8	实施例 5-1	实施例 5-2	实施例 5-3	实施例 5-4	实施例 5-5
抗Hb抗体	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
AO-53		0.08	0.15	0.23	0.31	
AN12-8						0.08

[0123] [试样的制备]

[0124] 从健康人采集2个粪便样本(粪便样本1和2)。将各粪便样本以使粪便浓度为0.5%(W/V%)的方式、另外将从人血液纯化出的人血红蛋白(hHb)和人触珠蛋白(hHp)(Haptoglobin Human, Phenotype 1-1(SIGMA公司制造))以达到表7和8所示的浓度的方式混合到保存溶液(Hb校准物稀释液‘荣研’(荣研化学株式会社制造))中,制备No.0~5的试样。No.3是相对于600 μ g/L人血红蛋白混合有0.6单位/L人触珠蛋白,血红蛋白和触珠蛋白全部形成完全血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0125] [免疫凝集]

[0126] 向粪便样本1和2各自的No.0~5的试样中分别添加实施例5-1~5-5和比较例8的测定试剂,使用自动分析仪JCA-BM6070来测定浊度,基于预先制成的校正曲线,算出血红蛋白的浓度换算值。此外,还算出相对于No.0(不含人触珠蛋白的试样)的血红蛋白的相对值(%)。将结果示于表7和8中。

[0127] JCA-BM6070的测定条件如下所述。

[0128] 样本量:2.0 μ L

[0129] 第一试剂:60 μ L

[0130] 第二试剂:30 μ L

[0131] 测定波长:658nm

[0132] [表7]

[0133] 粪便样本1

[0134]

No.	hHb (μ g/L)	hHp (单位 /L)	结果	比较例 8	实施例 5-1	实施例 5-2	实施例 5-3	实施例 5-4	实施例 5-5
0	600	0.0	hHb 浓度 换算值 (μ g/L)	568	560	563	566	563	570
1	600	0.2		546	552	559	561	557	565
2	600	0.4		524	548	555	556	551	567
3	600	0.6		437	545	564	570	560	562
4	600	0.7		414	541	557	563	560	557
5	600	0.8		401	538	556	565	558	555
0	600	0.0	相对于 No. 0 的hHb 的相 对值	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1	600	0.2		96%	99%	99%	99%	99%	99%
2	600	0.4		92%	98%	99%	98%	98%	100%
3	600	0.6		77%	97%	100%	101%	99%	99%
4	600	0.7		73%	96%	99%	99%	99%	98%
5	600	0.8		71%	96%	99%	100%	99%	97%

[0135] [表8]

[0136] 粪便样本2

[0137]

No.	hHb (μ g/L)	hHp (单位 /L)	结果	比较例 8	实施例 5-1	实施例 5-2	实施例 5-3	实施例 5-4	实施例 5-5
0	600	0.0	hHb 浓度 换算值 (μ g/L)	567	560	564	562	568	571
1	600	0.2		550	556	562	566	564	572
2	600	0.4		528	551	559	557	554	572
3	600	0.6		430	540	559	559	556	560
4	600	0.7		405	536	554	555	554	556
5	600	0.8		380	515	545	550	547	546
0	600	0.0	相对于 No. 0 的hHb 的相 对值	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1	600	0.2		97%	99%	100%	101%	99%	100%
2	600	0.4		93%	98%	99%	99%	97%	100%
3	600	0.6		76%	96%	99%	99%	98%	98%
4	600	0.7		71%	96%	98%	99%	98%	97%
5	600	0.8		67%	92%	97%	98%	96%	96%