



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112888946 A

(43) 申请公布日 2021.06.01

(21) 申请号 201980065033.5

(22) 申请日 2019.10.08

(30) 优先权数据

2018-190905 2018.10.09 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/039564 2019.10.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/075691 JA 2020.04.16

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

申请人 国立研究开发法人医药基盘・健康・营养研究所

(72) 发明人 高山茂雄 仲哲治 世良田聪

(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 33/53 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

富含亮氨酸的 α 2糖蛋白的免疫测定法和测定试剂

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种能够在短时间内简单地测定生物样品中的LRG的测定方法和测定试剂。本发明人进行了深入研究以实现该目的并发现,可以通过使生物样品与携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒在液相中接触的免疫凝集测定方法在短时间内简单地测定生物样品中的LRG,从而完成了本发明。

1. 一种生物来源的样品中富含亮氨酸的 α_2 糖蛋白 (LRG) 的免疫学测定方法, 包括:
使样品至少与携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒在液相中接触。
2. 根据权利要求1的测定方法, 其中所述不溶性载体颗粒是平均粒径分别为100nm至340nm的乳胶颗粒。
3. 根据权利要求1或2的测定方法, 其中所述不溶性载体颗粒是临界凝集浓度分别为65mM至270mM的乳胶颗粒。
4. 根据权利要求1至3中任一项的测定方法, 其中所述携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的平均粒径相同。
5. 根据权利要求1至4中任一项的测定方法, 其中携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒以相同的量包含在液相中。
6. 根据权利要求1至5中任一项的测定方法, 其中所述生物来源的样品是血清。
7. 根据权利要求1至6中任一项的测定方法, 其中免疫凝集测定法是基于均相法的方法。
8. 根据权利要求1至7中任一项的测定方法, 其中使生物来源的样品与携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒在液相中接触的步骤包括以下步骤:
 - (1) 使样品和含有缓冲液的第一试剂在液相中接触; 和
 - (2) 在步骤(1)之后, 将含有携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的第二试剂加入所述液相中。
9. 根据权利要求8的测定方法, 其中(1)的液相的盐浓度为700至900mM。
10. 根据权利要求1至9中任一项的测定方法, 进一步包括:
光学测定LRG与携带抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的复合物的凝集程度。
11. 根据权利要求10的测定方法, 其中光学测定的步骤是利用光学装置测定散射光的强度、吸光度或透射光的强度的步骤。
12. 一种通过免疫学测定方法测定血液样品中LRG的试剂, 至少包括:
携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒。
13. 根据权利要求12的测定试剂, 其中所述不溶性载体颗粒是平均粒径分别为100nm至340nm的乳胶颗粒。
14. 根据权利要求12或13的测定试剂, 其中所述不溶性载体颗粒是临界凝集浓度分别为65mM至270mM的乳胶颗粒。
15. 根据权利要求12至14中任一项的测定试剂, 其中所述携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的平均粒径相同。
16. 根据权利要求12至15中任一项的测定试剂, 其中携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的含量相同。
17. 根据权利要求12至16中任一项的测定试剂, 其中所述生物来源的样品是血清。
18. 根据权利要求12至17中任一项的测定试剂, 其中所述免疫凝集测定法是基于均相法的方法。

19. 一种用于通过免疫凝集测定法测定血液样品中LRG的试剂盒,包括:

(1) 包含缓冲液的第一试剂,和

(2) 包含携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的第二试剂。

20. 根据权利要求19的试剂盒,其中所述不溶性载体颗粒是平均粒径分别为100nm至340nm的乳胶颗粒。

21. 根据权利要求19或20的试剂盒,其中所述不溶性载体颗粒是临界凝集浓度分别为65mM至270mM的乳胶颗粒。

22. 根据权利要求19至21中任一项的试剂盒,其中携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的平均粒径相同。

23. 根据权利要求19至22中任一项的试剂盒,其中(2)的所述第二试剂包含相同量的携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒。

24. 根据权利要求19至23中任一项的试剂盒,其中(1)的所述第一试剂包含使反应液相的盐浓度变为700至900mM的盐量。

25. 根据权利要求19至24中任一项的试剂盒,进一步包括:

(3) 作为标准抗原和/或对照的LRG。

富含亮氨酸的 α 2糖蛋白的免疫测定法和测定试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及富含亮氨酸的 α 2糖蛋白的免疫测定法和免疫测定试剂。特别地,本发明涉及使用不溶性载体颗粒的免疫测定法和免疫测定试剂,所述不溶性载体颗粒携带对富含亮氨酸的 α 2糖蛋白具有特异性亲和力的物质。

背景技术

[0002] 据报道,富含亮氨酸的 α 2糖蛋白(以下有时简称为LRG)是血清蛋白之一,是约50kDa的糖蛋白,是从嗜中性粒细胞分泌的(非专利文献1)。

[0003] 此外,公开了LRG可用作测试诸如白塞氏病(Behcet's disease)的自身免疫疾病的生物标记物(专利文献1)。

[0004] 专利文献1示出了已经通过蛋白质组分析和免疫学方法进行了LRG的检测和定量测定,并且免疫学方法包括使用抗LRG单克隆抗体的ELISA、蛋白质印迹法等。

[0005] 作为用于ELISA的测定试剂,例如,人LRG测定试剂盒-IBL(IBL Co, Ltd.)是可商购的。用于测定人LRG的ELISA试剂通过在与LRG结合的抗体和LRG之间通过抗原-抗体反应形成免疫复合物并测定免疫复合物中标记物的量,从而能够定量测定样品的LRG浓度。

[0006] 通常,适合于通过ELISA进行测定的测定目标的浓度在pg/mL至ng/mL的范围内。因此,当待测物质在生物样品中以 μ g/mL的量级的相对较高浓度存在时,需要进行预处理,以将样品稀释至可发挥测定试剂能力的浓度。

[0007] 而且,有必要通过多个单独的阶段来稀释样品,以防止由于高倍率稀释而引起的误差,并且步骤的复杂性成为问题。具体地,对于上述市售试剂,有必要稀释样品以使样品的LRG浓度落在1.56至100ng/mL的恒定范围内。例如在溃疡性结肠炎的情况下可能在人血清中的最大浓度值为100 μ g/mL时,稀释意味着需要1000倍稀释。

[0008] 此外,对于用于LRG测定的常规ELISA试剂,有必要使待测样品和固相抗体长时间反应。例如,上述市售试剂盒需要一个晚上进行一级反应,以使固相抗体和样品相互接触,到目前为止,还没有可在短时间内测定样品中的LRG的试剂。

[0009] 引文清单

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:JP-A-2010-286279

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:J Leukoc Biol.2002,72 (3),478-85,2002

发明内容

[0014] 技术问题

[0015] 本发明的目的是提供一种可以在短时间内简单地测定生物样品中的LRG的测定方法和测定试剂。

[0016] 解决问题的方法

[0017] 本发明人为了达到该目的而进行了深入研究,发现在使样品与携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒以及携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒接触的免疫学测定方法中,具体地,在免疫凝集测定法中,当试剂具有充分考虑的组成时,可以在短时间内简单地测定生物样品中的LRG,而无需进行稀释等预处理,从而完成了本发明。

[0018] 即,本发明具有以下构成。

[0019] <1>一种生物来源的样品中富含亮氨酸的 α 2糖蛋白(LRG)的免疫学测定方法,包括:

[0020] 使样品至少与携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒在液相中接触。

[0021] <2>根据<1>的测定方法,其中所述不溶性载体颗粒是平均粒径分别为100nm至340nm的乳胶颗粒。

[0022] <3>根据<1>或<2>的测定方法,其中所述不溶性载体颗粒是临界凝集浓度分别为65mM至270mM的乳胶颗粒。

[0023] <4>根据<1>至<3>中任一项的测定方法,其中所述携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的平均粒径相同。

[0024] <5>根据<1>至<4>中任一项的测定方法,其中携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒以相同的量包含在液相中。

[0025] <6>根据<1>至<5>中任一项的测定方法,其中所述生物来源的样品是血清。

[0026] <7>根据<1>至<6>中任一项的测定方法,其中所述免疫凝集测定法是基于均相法的方法。

[0027] <8>根据<1>至<7>中任一项的测定方法,其中使生物来源的样品与携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒在液相中接触的步骤包括以下步骤:

[0028] (1) 使样品和含有缓冲液的第一试剂在液相中接触;和

[0029] (2) 在步骤(1)之后,将含有携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的第二试剂加入所述液相中。

[0030] <9>根据<8>的测定方法,其中(1)的液相的盐浓度为700至900mM。

[0031] <10>根据<1>至<9>中任一项的测定方法,进一步包括:

[0032] 光学测定LRG与携带抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的复合物的凝集程度。

[0033] <11>根据<10>的测定方法,其中光学测定的步骤是利用光学装置测定散射光的强度、吸光度或透射光的强度的步骤。

[0034] <12>一种通过免疫学测定方法测定血液样品中LRG的试剂,至少包括:

[0035] 携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒。

[0036] <13>根据<12>的测定试剂,其中所述不溶性载体颗粒是平均粒径分别为100nm至340nm的乳胶颗粒。

[0037] <14>根据<12>或<13>的测定试剂,其中所述不溶性载体颗粒是临界凝集浓度分别为65mM至270mM的乳胶颗粒。

[0038] <15>根据<12>至<14>中任一项的测定试剂,其中所述携带第一抗LRG单克隆抗体

的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的平均粒径相同。

[0039] <16>根据<12>至<15>中任一项的测定试剂,其中携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的含量相同。

[0040] <17>根据<12>至<16>中任一项的测定试剂,其中所述生物来源的样品是血清。

[0041] <18>根据<12>至<17>中任一项的测定试剂,其中所述免疫凝集测定法是基于均相法的方法。

[0042] <19>一种用于通过免疫凝集测定法测定血液样品中LRG的试剂盒,包括:

[0043] (1) 包含缓冲液的第一试剂,和

[0044] (2) 包含携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的第二试剂。

[0045] <20>根据<19>的试剂盒,其中所述不溶性载体颗粒是平均粒径分别为100nm至340nm的乳胶颗粒。

[0046] <21>根据<19>或<20>的试剂盒,其中所述不溶性载体颗粒是临界凝集浓度分别为65mM至270mM的乳胶颗粒。

[0047] <22>根据<19>至<21>中任一项的试剂盒,其中携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的平均粒径相同。

[0048] <23>根据<19>至<22>中任一项的试剂盒,其中(2)的所述第二试剂包含相同量的携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒。

[0049] <24>根据<19>至<23>中任一项的试剂盒,其中(1)的所述第一试剂包含的盐的量使得反应液相的盐浓度变为700至900mM。

[0050] <25>根据<19>至<24>中任一项的试剂盒,进一步包括:

[0051] (3) 作为标准抗原和/或对照的LRG。

[0052] 发明的有益效果

[0053] 根据本发明,提供了一种可以在短时间内更简单地提供结果的生物样品中的LRG的测定方法和测定试剂。

附图说明

[0054] [图1]示出使用处方例1的第一试剂和第二试剂的组合,使用自动分析仪测定含有已知浓度的LRG的样品的结果的图。

[0055] [图2]示出使用处方例2的第一试剂和第二试剂的组合,使用自动分析仪测定含有已知浓度的LRG的样品的结果的图。

[0056] [图3]示出使用处方例3的第一试剂和第二试剂的组合,使用自动分析仪测定含有已知浓度的LRG的样品的结果的图。

[0057] [图4]示出使用处方例4的第一试剂和第二试剂的组合,使用自动分析仪测定含有已知浓度的LRG的样品的结果的图。

[0058] [图5]示出使用处方例5的第一试剂和第二试剂的组合,使用自动分析仪测定含有已知浓度的LRG的样品的结果的图。

[0059] [图6]示出使用处方例6的第一试剂和第二试剂的组合,使用自动分析仪测定含有

已知浓度的LRG的样品的结果的图。

[0060] [图7]示出通过本发明的测定方法使用健康个体的样本和患者的样本测定血清的LRG浓度的结果的图。

具体实施方式

[0061] (免疫凝集测定法)

[0062] 免疫凝集测定法是使用不溶性载体颗粒并测定抗原或抗体的免疫测定法,该不溶性载体颗粒上固定有对待测对象例如抗原或抗体具有特异性亲和力的物质,并且该测定法广泛地用于临床检查领域。乳胶等主要用于不溶性载体颗粒,在这种情况下,该测定法具体称为乳胶免疫凝集测定法(LTIA)。

[0063] 通过LTIA测定LRG的方法可以大致分为固定有针对LRG的单克隆抗体的乳胶颗粒与作为抗原的LRG反应形成三明治状的免疫复合物并通过由于免疫复合物形成所导致的乳胶颗粒凝集的程度来测定LRG的方法,以及抗原固定化乳胶颗粒和样品中的LRG竞争以抑制乳胶颗粒和抗体的免疫复合物的形成并通过由于免疫复合物形成的抑制所导致的乳胶颗粒的凝集抑制的程度来测定LRG的方法。

[0064] (样品)

[0065] 对本发明的样品没有特别限制,只要该样品是生物样品即可,但通常是血液样品,并且实例包括全血、血清和血浆。血浆包括肝素血浆、EDTA血浆等。

[0066] (待测物质)

[0067] 本发明中的待测物质是富含亮氨酸的 $\alpha 2$ 糖蛋白(leucine-rich $\alpha 2$ glycoprotein, LRG)。

[0068] (测定方法)

[0069] 在以LTIA为代表的使用免疫凝集的测定方法中,可以通过光学或电化学观察所产生的凝集程度来测定待测物质。光学观察方法包括利用光学装置测定散射光的强度,吸光度或透射光的强度的方法(端点法,速率法等)。样品中所含的LRG的浓度(定量值)是通过将通过测定样品而获得的吸光度等的测定值与通过测定标准物质(具有已知LRG浓度的样品)而获得的吸光度等的测定值进行比较而计算得出的。在这方面,可以通过单波长测定或双波长测定(由两个波长产生的差或比率)来测定透射光、散射光等的吸光度等。用于测定的波长通常在500nm至800nm的范围内确定。

[0070] 本发明样品中的LRG可以通过手工处理或使用诸如测定装置的装置来测定。测定装置可以是通用自动分析仪或单目的测定装置(专用装置)。优选通过使用多个操作步骤的方法例如两步法(双试剂法)进行测定。

[0071] (抗LRG单克隆抗体)

[0072] 本发明的单克隆抗体可以通过本领域技术人员已知的方法获得。即,通过将人LRG作为抗原溶解在诸如磷酸盐缓冲的生理盐水之类的溶剂中并将该溶液施用于动物以进行免疫,可以容易地产生单克隆抗体。必要时,可以将适当的佐剂添加到溶液中,然后可以使用乳剂免疫动物。作为佐剂,可以使用通常使用的佐剂,例如油包水乳液、水包油包水乳液、水包油乳液、脂质体和氢氧化铝凝胶,以及来源于生物成分的蛋白质和肽类物质等。例如,可以适当地使用弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂等。佐剂的施用途径、剂量和施用时间没有

特别限制,但是期望适当地选择,以便可以在要用抗原免疫的动物中增强所需的免疫应答。

[0073] 用于免疫的动物种类也没有特别限制,但优选为哺乳动物。例如,可以使用小鼠、大鼠、牛、兔、山羊、绵羊等,并且可以更优选使用小鼠。可以根据一般方法免疫动物,并且可以例如通过向动物皮下、皮内、静脉内或腹膜内注射抗原的溶液,优选与佐剂的混合物来进行免疫。由于免疫应答通常随被免疫动物的种类和品系而不同,因此希望根据所使用的动物适当地设定免疫时间表。优选在第一次免疫后重复几次抗原的施用。

[0074] 当获得单克隆抗体时,遵循以下程序,但是产生单克隆抗体本身的方法不限于该程序,并且可以根据例如Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))中描述的方法进行。

[0075] 最终免疫后,从被免疫的动物中取出作为抗体产生细胞的脾细胞或淋巴结细胞,通过与具有高生长潜力的骨髓瘤细胞进行细胞融合来产生杂交瘤。优选将具有高抗体产生潜力(质量/量)的细胞用于细胞融合,并且骨髓瘤细胞优选与获得要融合的抗体产生细胞的动物具有相容性。可以根据本领域已知的方法融合细胞,但是例如可以采用聚乙二醇法,使用仙台病毒的方法,使用电流的方法等。可以根据已知方法增殖获得的杂交瘤,并且可以在检查产生的抗体的性质的同时选择期望的杂交瘤。杂交瘤可以通过已知方法克隆,例如有限稀释分析或软琼脂分析。

[0076] 说明了产生第一和第二单克隆抗体的杂交瘤的选择。考虑到使用所产生的抗体中进行实际测定的条件,杂交瘤也可以在选择阶段有效地选择。例如,通过ELISA、RIA、Biacore分析等,通过选择产生与人LRG反应的抗体的杂交瘤来获得杂交瘤。具体地,首先使培养物上清液中的单克隆抗体与固定的人LRG反应,然后通过抗原固定化的ELISA选择产生与人LRG具有高反应性的单克隆抗体的杂交瘤,在该ELISA中使标记的抗IgG抗体反应。

[0077] 通过大规模培养如上所述选择的杂交瘤,可以产生具有期望特性的单克隆抗体。大规模的培养方法没有特别限定,但实例包括例如在适当的培养基中培养杂交瘤并因此在该培养基中产生单克隆抗体的方法,向哺乳动物腹腔内注射杂交瘤,使杂交瘤增殖并在中腹水产生抗体的方法等。单克隆抗体可以通过例如阴离子交换色谱、亲和色谱、硫酸铵分级、PEG分级、乙醇分级等的适当组合来纯化。

[0078] 作为本发明的抗体,除了整个抗体分子之外,还可以使用具有抗原-抗体反应性的抗体的功能片段,以及通过上述动物的免疫步骤获得的抗体,使用基因重组技术获得的抗体,也可以使用嵌合抗体。抗体的功能片段的实例包括F(ab')₂、Fab'等,并且可以通过用蛋白酶处理如上所述获得的抗体(例如,胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等)来产生这样的功能片段。

[0079] (不溶性载体颗粒)

[0080] 本发明中使用的不溶性载体颗粒可以是可携带抗LRG单克隆抗体并且可测定样品中的LRG的不溶性载体颗粒。实例包括乳胶颗粒、磁性颗粒、金属颗粒等,但是这些实例中乳胶颗粒是优选的。

[0081] 考虑到样品中LRG的浓度、测定装置的检测灵敏度等,适当地确定不溶性载体颗粒的平均粒径和临界凝集浓度。

[0082] 不溶性载体颗粒的平均粒径优选为100nm至340nm,更优选为150nm至260nm。

[0083] 关于不溶性载体颗粒的临界凝集浓度,适当地选择那些临界凝集浓度优选为65mM至270毫米,更优选为150mM至270mM的不溶性载体颗粒。

[0084] (乳胶颗粒)

[0085] 作为本发明中使用的不溶性载体颗粒的优选实例的乳胶颗粒没有特别限定,只要是通常用作免疫测定试剂的乳胶颗粒即可。乳胶颗粒可以通过各种单体的聚合或共聚获得。这里的单体的实例包括可聚合的不饱和芳族化合物(例如具有苯基的可聚合单体(包括苯乙烯、 α -甲基苯乙烯、邻甲基苯乙烯、对甲基苯乙烯、对氯苯乙烯、4-乙烯基苯甲酸酯、二乙烯基苯、乙烯基甲苯等)、具有苯基和磺酸盐的可聚合单体(包括苯乙烯磺酸盐、二乙烯基苯磺酸盐、邻甲基苯乙烯磺酸盐、对甲基苯乙烯磺酸盐等)以及具有萘基的可聚合单体(包括1-乙烯基萘、2-乙烯基萘、 α -萘基(甲基)丙烯酸酯、 β -萘基(甲基)丙烯酸酯等))、可聚合不饱和羧酸(例如(甲基)丙烯酸、衣康酸、马来酸、富马酸等)、可聚合不饱和羧酸酯(例如(甲基)丙烯酸甲酯、(甲基)丙烯酸乙酯、(甲基)丙烯酸正丁酯、(甲基)丙烯酸2-羟乙酯、(甲基)丙烯酸缩水甘油酯、乙二醇-二-(甲基)丙烯酸酯和(甲基)丙烯酸三溴苯酯)、不饱和羧酸酰胺、可聚合的不饱和腈、乙烯基卤化物和共轭二烯(例如(甲基)丙烯腈、(甲基)丙烯醛、(甲基)丙烯酰胺、N-羟甲基-(甲基)丙烯酰胺、亚甲基双(甲基)丙烯酰胺、丁二烯、异戊二烯、乙酸乙烯酯、乙烯基吡啶、N-乙烯基吡咯烷酮、氯乙烯、偏二氯乙烯和溴乙烯等)。通过所需的表面特性,比重等适当地选择单体。它们可以单独使用,也可以使用两种或以上混合物。

[0086] 可以使用激光衍射/散射法(LS法)、库尔特原理、动态光散射-光子相关光谱法、电子显微镜等分析乳胶颗粒的平均粒径。

[0087] 关于乳胶颗粒的平均粒径,适当地选择平均粒径优选为100nm至340nm,更优选为150nm至260nm的那些乳胶颗粒。原因如下:当平均粒径小于100nm时,低浓度至中等浓度范围的灵敏度降低,并且难以精确测定;当平均粒径超过340nm时,尽管在低浓度下的灵敏度增加,但是在高浓度下引起所谓的钩状效应(hook effect),这引起了这样的现象,即其获得的值低于实际浓度。

[0088] 乳胶颗粒的临界凝集浓度是指乳胶不凝集的最大盐浓度,是指将盐逐步添加到未用抗体敏化的乳胶颗粒中时,比乳胶颗粒完全自凝集的盐浓度低一级的盐浓度。例如,制备了浓度在10至400mM之间相差10mM的磷酸钠水溶液(pH7.4),并且将导致最终浓度为1%(W/V)的量的乳胶颗粒加入到不同的浓度的磷酸钠水溶液中并搅拌。一分钟后视觉观察溶液以确定乳胶是否已自凝集,并将比乳胶已完全自凝集的浓度低一级的磷酸钠水溶液的浓度确定为临界凝集浓度(最大非凝集浓度)。

[0089] 关于乳胶颗粒的临界凝集浓度(磷酸钠水溶液的浓度),适当地选择临界凝集浓度优选为65mM至270mM,更优选为150mM至270mM的那些乳胶颗粒。当临界凝集浓度小于65mM时,难以维持乳胶颗粒的分散,而当临界凝集浓度为270mM以上时,不容易引起免疫应答,并且乳胶颗粒不凝集。

[0090] 乳胶颗粒的临界凝集浓度可以通过适当改变原料的重量比来控制。例如,通过在水性介质中使一定量的具有苯基的可聚合单体例如苯乙烯与一定量的具有苯基和磺酸盐的可聚合单体例如苯乙烯磺酸钠共聚来获得苯乙烯乳胶,在这种情况下,可以通过改变苯乙烯和苯乙烯磺酸钠的混合比来控制临界凝集浓度。

[0091] 所使用的乳胶颗粒的材料和粒径可以适当地选择以获得期望的性质,例如增加的敏感性,并且具有不同的材料和不同的粒径的那些乳胶颗粒也可以组合使用。

[0092] 另外,本发明中的凝集反应测定中的乳胶颗粒的浓度没有特别限定,可以根据期望的灵敏度和性质适当设定。

[0093] (携带抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒)

[0094] 可以通过诸如物理吸附(疏水结合)方法,化学结合方法或其组合的已知方法将抗LRG的抗体固定并携带在不溶性载体颗粒例如乳胶颗粒上。使用乳胶作为不溶性载体颗粒的典型实例给出以下说明。

[0095] 通过将抗LRG的抗体和乳胶颗粒在溶液如缓冲液中混合,并使抗体和乳胶颗粒相互接触,或通过使溶解于缓冲液等中的LRG的抗体与载体接触,可以按照已知方法进行物理吸附法。

[0096] 可以根据由日本临床病理学会编辑,临床病理学出版学会1983年发行的“Extra Special Issue of Clinical Pathology, No. 53, Immunoassay for Clinical Examination-Techniques and Applications-”;由日本生化学会编辑,东京化学同人(Tokyo Kagaku Dojin)1991年发行的“New Courses in Biochemical Experiment 1, Protein IV”等中描述的已知方法来进行化学结合方法,通过混合并使特异性结合LRG的物质和载体与二价交联剂(例如戊二醛、碳二亚胺、酰亚胺酯或马来酰亚胺)接触,并使特异性结合LRG的物质和载体的氨基、羧基、硫醇基、醛基、羟基等与二价交联剂反应。

[0097] 需要至少两种针对乳胶颗粒上携带的特定物质的抗体以形成夹心形状。即,将具有不同识别位点的两种或更多种单克隆抗体用作抗LRG单克隆抗体。

[0098] 第一单克隆抗体和第二单克隆抗体需要承载在不同的不溶性载体颗粒上。

[0099] 在本发明中,如上所述,可以根据所需的灵敏度和性质适当地设定携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的浓度,但是不溶性载体颗粒优选以相同量包含在反应液相中。

[0100] 此外,在本发明中,如上所述,携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的平均粒径分别优选为100nm至340nm。平均粒径优选相似,更优选相同。平均粒径相似意味着平均粒径之一落在另一平均粒径的80%至120%的范围内,并且平均粒径相同意味着平均粒径之一落入另一平均粒径的90%至110%的范围内。

[0101] 当需要处理以抑制乳胶颗粒的自发凝集、非特异性反应等时,可以通过已知方法,例如使乳胶颗粒的表面与蛋白质(例如牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、明胶、蛋清蛋白或其盐)、表面活性剂、脱脂奶粉等接触或用其覆盖,对载体进行封闭(掩蔽)。

[0102] (接触)

[0103] 使包含LRG的样品和携带抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒在液相中彼此接触通常是指下面的(1)至(4)。

[0104] (1) 在将样品和缓冲液混合后,将携带第一抗LRG单克隆抗体和第二抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒混合到混合溶液中的实施方案。

[0105] (2) 将样品、缓冲液、携带第一抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒同时混合的实施方案。

[0106] (3) 在将样品和缓冲液混合后,将携带第一抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒混合,然后将携带第二抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒混合的实施方案。

[0107] (4) 在 (1) 至 (3) 的最后添加并混合样品的实施方案。

[0108] (测定试剂)

[0109] 本发明的测定试剂是用于通过免疫凝集测定法测定血液样品中的LRG的试剂,并且至少包含携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒。通常,试剂包括两种或更多种组成试剂。至少一种构成试剂包含携带抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒,另一种构成试剂包含缓冲液。此外,本发明的测定试剂是液体试剂。

[0110] 特别地,本发明的测定试剂优选是包括第一试剂和第二试剂的双试剂类型。例如,双试剂类型的第一试剂包含用于稀释包含LRG的生物来源的样品的缓冲液,第二试剂是包含携带第一抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒的试剂溶液。

[0111] 当本发明的测定试剂是包括第一试剂、第二试剂和第三试剂的三试剂类型时,例如,第一试剂包含缓冲液等,第二试剂是包含携带第一抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒的试剂溶液,第三试剂是包含携带第二抗LRG单克隆抗体的乳胶颗粒的试剂溶液。

[0112] 本发明的测定试剂中所含的缓冲液可以是通常使用的缓冲液,并且实例包括tris-盐酸、硼酸、磷酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、戊二酸、马来酸、甘氨酸及其盐等,以及Good's缓冲液,例如MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES和HEPES等。

[0113] 缓冲成分的浓度可以在不引起试剂中的不溶性载体颗粒的自发凝集并且引起期望的免疫应答的浓度范围内,反应溶液中的浓度可以为100mM或以上,优选为200mM或以上,更优选为300mM或以上,进一步更优选为400mM或以上。

[0114] 期望本发明的测定试剂进一步包含盐。盐的种类理想地是无机盐,并且无机盐的实例包括氯化钠,氯化钙等。

[0115] 盐浓度可以在不引起试剂中的不溶性载体颗粒的自发凝集并且引起期望的免疫应答的浓度范围内,并且在反应溶液中该浓度的下限可以为100mM以上,优选为300mM以上,更优选为500mM以上,进一步更优选为700mM以上。反应溶液中该浓度的上限优选为2000mM以下,更优选为1500mM以下,进一步更优选为1000mM以下,最优选为900mM以下。

[0116] 反应溶液中的浓度范围优选为100至1500mM,更优选为300至1000mM,进一步更优选为500至1000mM,最优选为700至900mM。

[0117] 本发明的测定试剂的可测定范围(测定范围)可以为约10至80 μ g/mL,期望为5.0至100 μ g/mL,以测定作为诊断标志物的LRG。

[0118] (试剂盒)

[0119] 本发明的试剂盒的特征在于至少包括下面的要素(1)和(2)。

[0120] (1) 包含缓冲液的第一试剂。

[0121] (2) 至少包含携带第一抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒和携带第二抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒的第二试剂。

[0122] 在本发明的试剂盒中,除了上述测定试剂之外,还可以包括(3)作为标准抗原或对照的LRG。

[0123] 还可以包括用于预处理样品的样品预处理试剂。样品预处理试剂可以包含在(1)

的包含缓冲液的第一试剂中,或者也可以包含为(1)和(2)以外的要素。

[0124] 试剂盒可以进一步包括用户指南、样品收集工具(收集移液器、注射器、棉签、过滤器等)、样品稀释剂和样品提取溶液。

[0125] (均相法)

[0126] 在本发明中,均相法是指不进行B/F(结合/游离)分离而特异性地检测样品和试剂溶液的混合溶液(反应溶液)中进行的反应的测定方法,是指与异质测定方法比较而命名的测定方法,异质测定方法的主要反应在通过B/F分离操作完全洗净/除去了未参与测定反应的多余成分后进行并检测。因此,本发明中的“免疫凝集测定是基于均相法的方法”是指步骤(3)是以下典型步骤(1)至(3)中,“在步骤(2)中或步骤(2)后不进行洗涤/分离步骤而测定LRG与不溶性载体颗粒的凝集反应的步骤”。

[0127] (1)使样品和缓冲液在液相中相互接触的步骤。

[0128] (2)在步骤(1)之后,将携带抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒添加到液相中的步骤。

[0129] (3)在步骤(2)之后测定LRG与不溶性载体颗粒的凝集反应的步骤。

[0130] (其他试剂成分)

[0131] 本发明的试剂可以包含诸如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮和磷脂聚合物的聚合物,作为补充不溶性载体颗粒的凝集形成的组分。此外,作为控制凝集形成的组分,也可以包含蛋白质、氨基酸、糖类、金属盐类、表面活性剂类、还原性物质和离液物质(chaotropic substance)等通常使用的成分的一种或组合。

[0132] 实施例

[0133] 下面参考实施例详细解释本发明,但是本发明不应解释为限于这些实施例。

[0134] [测试例1]

[0135] 改变了用于测定LRG浓度的不溶性载体颗粒的粒径,并且检查了是否观察到浓度依赖性的吸光度变化以及是否可以绘制校准曲线。

[0136] 1. 试剂

[0137] (1) 第一试剂

[0138] 试剂包含以下所示的成分。将pH控制为6.5至7.5。

[0139] • HEPES

[0140] • 1M NaCl

[0141] • 1.0%BSA

[0142] • 0.05%Proclin950

[0143] (2) 第二试剂

[0144] (2-1) 处方例1

[0145] 将以下两种抗LRG单克隆抗体敏化的乳胶颗粒溶液以相同的量混合,并用10mM HEPES缓冲液(pH7.2)稀释,以使其在570nm的波长处的吸光度变为4.5Abs,由此获得第二试剂。

[0146] (i) 第一种抗LRG单克隆抗体(Kan10)敏化的乳胶颗粒溶液

[0147] 向平均粒径为343nm,临界凝集浓度为60mM的1%聚苯乙烯乳胶溶液(20mM甘氨酸缓冲液)中,加入相同量的已用50mM甘氨酸缓冲液稀释至0.71mg/mL的抗LRG单克隆抗体

(Kan10) 溶液, 并将混合物在4℃搅拌2小时。然后, 加入相同量的合成聚合物 (JSR制造的Blockmaster CE210), 并将混合物在4℃下搅拌1小时。随后, 加入1/10量的溶于纯化水中的10%BSA溶液, 并将混合物在4℃下搅拌1小时。由此产生了抗LRG单克隆抗体 (Kan10) 敏化的乳胶溶液。

[0148] (ii) 第二抗LRG单克隆抗体敏化的乳胶颗粒溶液

[0149] 使用平均粒径为343nm, 临界凝集浓度为60mM的聚苯乙烯乳胶, 通过与上述 (i) 相同的方法, 制备了抗LRG单克隆抗体 (Kan11) 敏化的乳胶颗粒溶液。

[0150] (iii) 乳胶颗粒的物理性质

[0151] (a) 乳胶颗粒的粒径的测定方法

[0152] 用激光衍射/散射粒径分布分析仪LS13320 (由Beckman Coulter制造) 分析乳胶粒径。

[0153] (b) 乳胶颗粒临界凝集浓度的测定方法

[0154] 制备浓度在10至400mM之间相差10mM的磷酸钠水溶液 (pH7.4), 并将一定量的乳胶颗粒加入不同浓度的磷酸钠水溶液中并搅拌, 使最终浓度为1% (W/V)。然后, 在一分钟后视觉观察溶液以确定乳胶是否自凝集, 并且将比乳胶完全自凝集的浓度低一级的磷酸钠水溶液的浓度确定为临界凝集浓度。

[0155] (2-2) 处方例2至6

[0156] 进行相同的步骤, 不同的是将处方例1的乳胶颗粒如下改变。

[0157] 处方例2: 平均粒径为305nm, 临界凝集浓度为70mM。

[0158] 处方例3: 平均粒径为251nm, 临界凝集浓度为260mM。

[0159] 处方例4: 平均粒径为207nm, 临界凝集浓度为180mM。

[0160] 处方例5: 平均粒径为194nm, 临界凝集浓度为230mM。

[0161] 处方例6: 平均粒径为121nm, 临界凝集浓度为210mM。

[0162] 2. 待测样品

[0163] 将纯化的LRG (由Bio Vendor Laboratory Medicine制备) 以0.5.0、10.0、23.0、50.0和100.0μg/mL的量添加到生理盐水中。

[0164] 3. 测定方法

[0165] 将处方例的第一试剂和第二试剂分别混合, 并使用Hitachi 7180自动分析仪测定含有已知浓度的LRG的样品。具体而言, 将150μL的第一试剂添加到2.5μL的样品中, 并将混合物在37℃孵育温育5分钟。然后, 加入50μL第二种试剂, 并搅拌混合物。然后, 在5分钟后, 在570nm的主波长和800nm的互补波长下, 测定由凝集形成引起的吸光度变化, 并测定吸光度变化。根据测得的吸光度绘制校准曲线, 并确定R2 (测定系数)。

[0166] 4. 测定条件

[0167] Hitachi 7180自动分析仪的参数条件如下所示。

[0168] (1) 液体量: 样本-第一试剂-第二试剂; 2.5μL-150μL-50μL

[0169] (2) 分析方法: 2点终点法 (测光点19-34)

[0170] (3) 测定波长: 主波长570nm/副波长800nm

[0171] (4) 校准: 样条

[0172] 5. 测定结果与讨论

[0173] 结果示于图1至图6中。

[0174] 根据结果,在处方例1中,尽管在高LRG浓度(100 μ g/ml)下观察到钩状效应,但在低浓度至中浓度下吸光度以浓度依赖性方式增加。在处方例2至6中,在低浓度至高浓度下吸光度以浓度依赖性方式增加,并且R²值为0.99以上。特别地,处方例3、4和5的R²值为0.996以上,这是特别优异的。

[0175] 从以上结果发现,当乳胶颗粒的平均粒径为100nm至340nm时,可以在覆盖人血清中整个LRG浓度分布的浓度范围内实现准确的测定,并且特别是当平均粒径为150nm至260nm时,可以实现更高精度的测定。

[0176] 还发现,当临界凝集浓度为65mM至270mM时,可以在覆盖人血清中整个LRG浓度分布的浓度范围内实现准确的测定,并且特别是当临界凝集浓度为150mM至270mM时,可以实现更高精度的测定浓度。

[0177] [测试例2]

[0178] 为了检查是否可以测定与实际样本相似的样本,通过将纯化的LRG加入到合并的血清中来制备已知浓度的模拟LRG样本,并测定LRG的浓度。

[0179] 1. 试剂

[0180] 使用测试例1的处方例2至6的试剂。

[0181] 2. 待测样品

[0182] (1) 将合并的血清用作小组样本(panel specimen)L。

[0183] (2) 将纯化的LRG以28.2 μ g/mL的量添加到合并的血清中,并用作小组样本M。

[0184] (3) 将纯化的LRG以63.1 μ g/mL的量添加到合并的血清中,并用作小组样本H。

[0185] 3. 测定方法和测定条件

[0186] 测试方法和测定条件与测试例1中的相同。使用测试例1中绘制的校准曲线,确定小组样本的浓度,并计算相对于已知浓度的相对比例(%)。

[0187] 4. 测定结果与讨论

[0188] 结果示于表1中。

[0189] 根据该结果,发现使用处方例2至6的试剂可以准确地测定与实际样本相似的模拟样本。特别地,处方例3至5相对于99%的已知浓度具有极高的相对比例精度。

[0190] 从以上结果发现,当乳胶颗粒的平均粒径为100nm至340nm时,可以实现准确的测定,并且特别是当平均粒径为150nm至260nm时,可以实现更高精度的测定。

[0191] 还发现,当乳胶的临界凝集浓度为65mM至270mM时,可以实现准确的测定,并且特别是当临界凝集浓度为150mM至270mM时,可以实现更高精度的测定。

[0192] [表1]

[0193]	小组样本	LRG 浓度	处方例 2	处方例 3	处方例 4	处方例 5	处方例 6
	小组 L	10.3	11.1 (108%)	10.1 (98%)	10.4 (101%)	10.4 (101%)	9.9 (96%)
	小组 M	28.2	29.7 (105%)	27.3 (97%)	28.8 (102%)	28.4 (101%)	27.2 (96%)

[0194]	小组 H	63.1	57.2 (91%)	62.5 (99%)	62.2 (99%)	62.3 (99%)	67.7 (107%)
--------	------	------	---------------	---------------	---------------	---------------	----------------

[0195] *LRG浓度的单位为 $\mu\text{g/mL}$,括号中的值为相对于已知浓度的相对比例(%)。

[0196] [测试例3]

[0197] 证实了可以通过本发明的测定方法使用健康个体的样本和患者的样本来测定作为标志物的LRG。

[0198] 1. 试剂

[0199] 使用测试例1的处方例5的试剂。

[0200] 2. 待测样品

[0201] (1) 健康个体的血清样本

[0202] 从PROMEDDEX购买了七个样本。

[0203] (2) 溃疡性结肠炎患者(轻度(缓解期))的血清样本

[0204] 从Bioreclamtion购买了十三个样本。

[0205] (3) 溃疡性结肠炎患者(重度(活跃期))的血清样本

[0206] 从Bioreclamtion和Proteogenex购买了五个样本。

[0207] 3. 测定方法和测定条件

[0208] 测定方法和测定条件与测试例1相同。

[0209] 4. 测定结果与讨论

[0210] 结果示于图7中。

[0211] 根据该结果,发现可以测定健康个体以及轻度和重度溃疡性结肠炎患者的样本中的LRG,并且可以测定作为可以区分这些状态的标志物。

[0212] 因此,本发明的测定试剂可以起到诊断剂的作用。

[0213] 工业适用性

[0214] 根据本发明,通过使包含LRG的生物样品和携带抗LRG单克隆抗体的不溶性载体颗粒彼此接触并测定凝集程度,可以提供在短时间内容易获得结果的生物样品中LRG的测定方法和测定试剂。本发明的测定方法和测定试剂也可以应用于通用的自动分析仪,因此,可以容易且同时地测定大量的LRG样品。

[0215] 因此,可以在短时间内容易地定量作为生物标志物的LRG,并且容易评估诸如炎性肠病的疾病的活性。

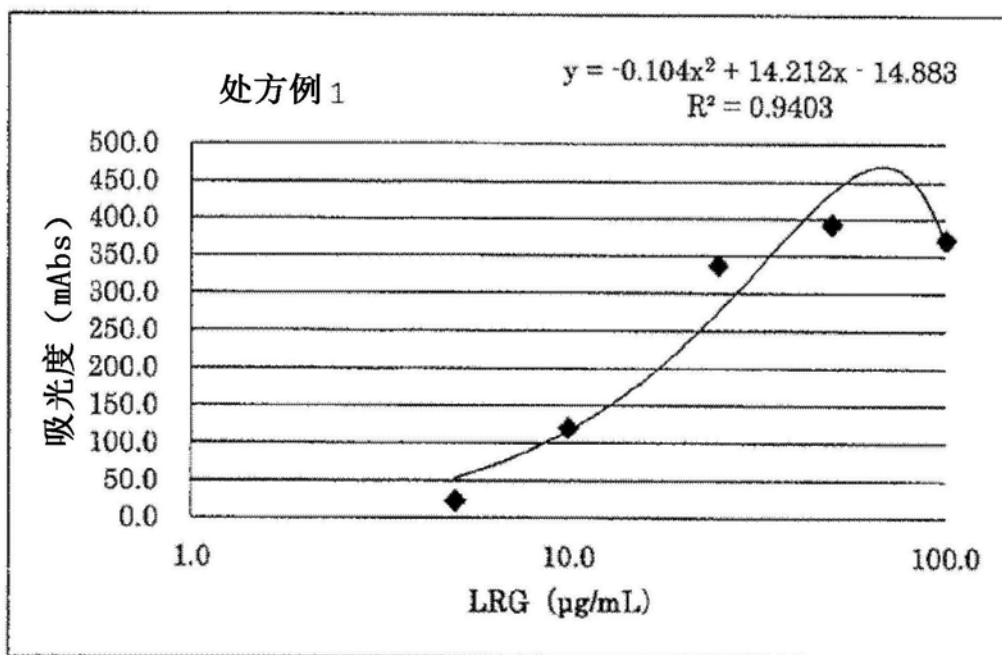


图1

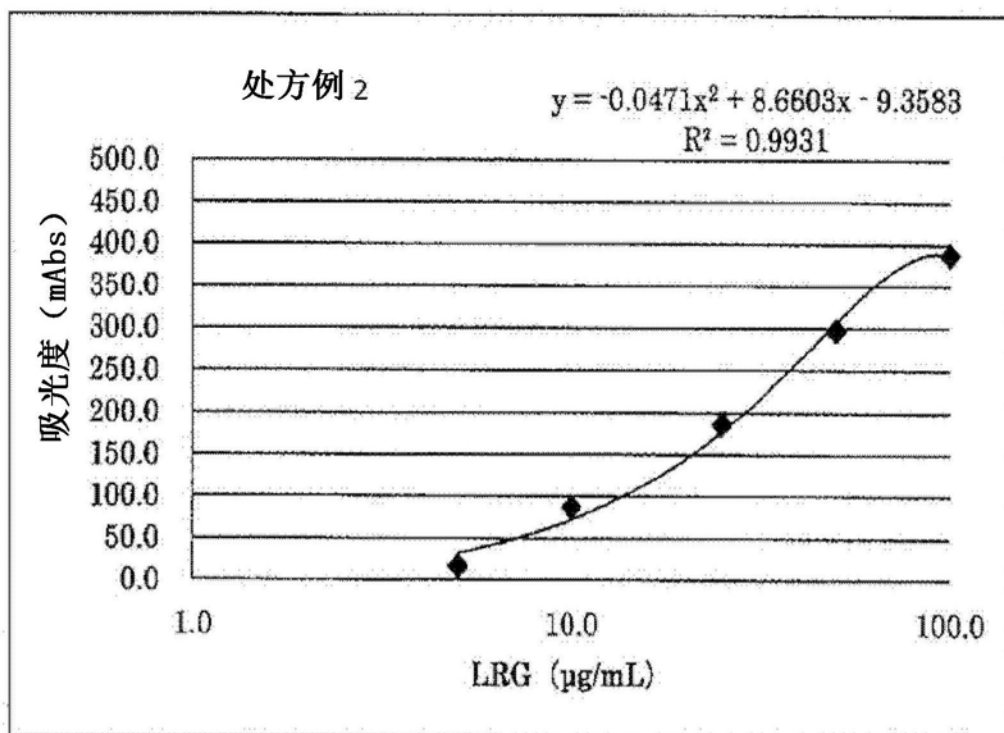


图2

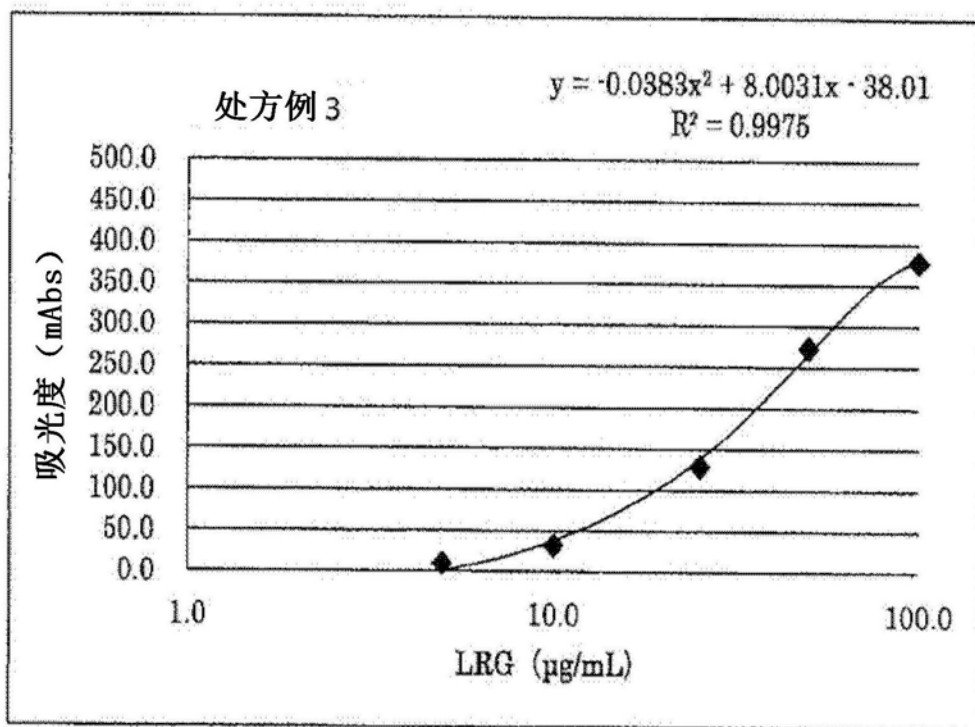


图3

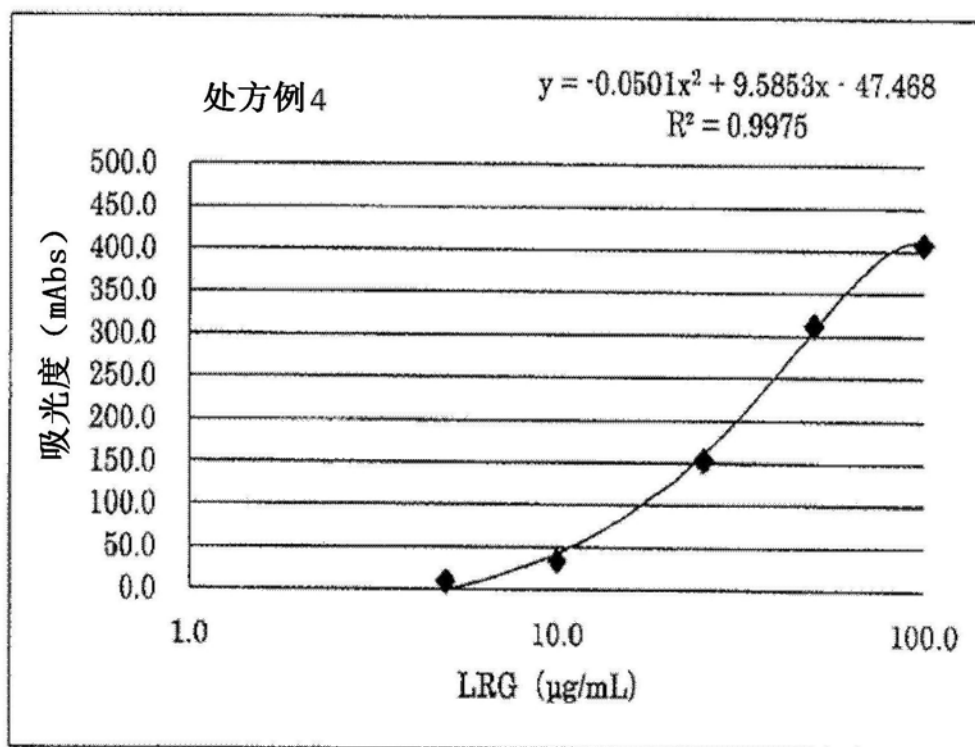


图4

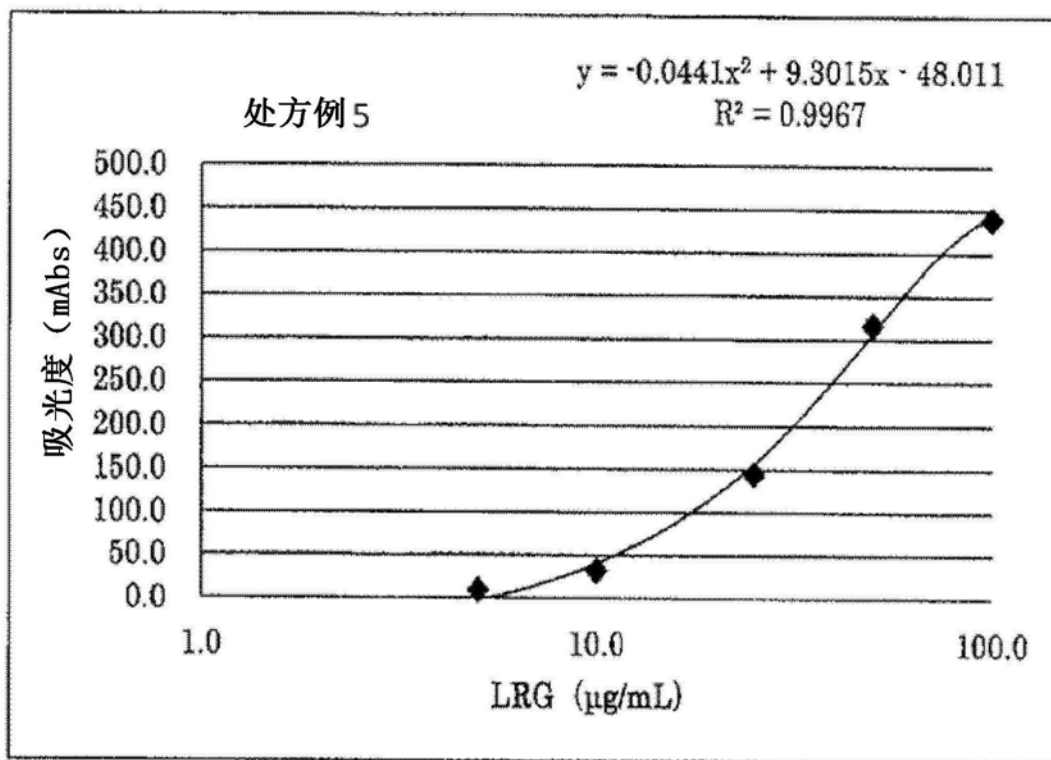


图5

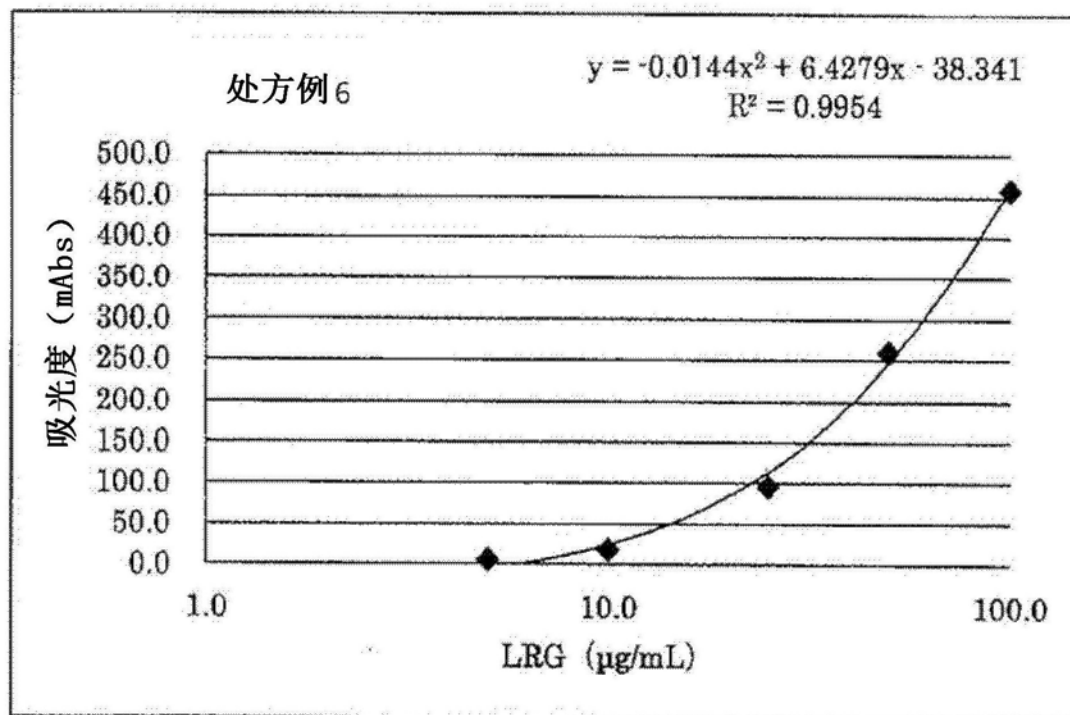


图6

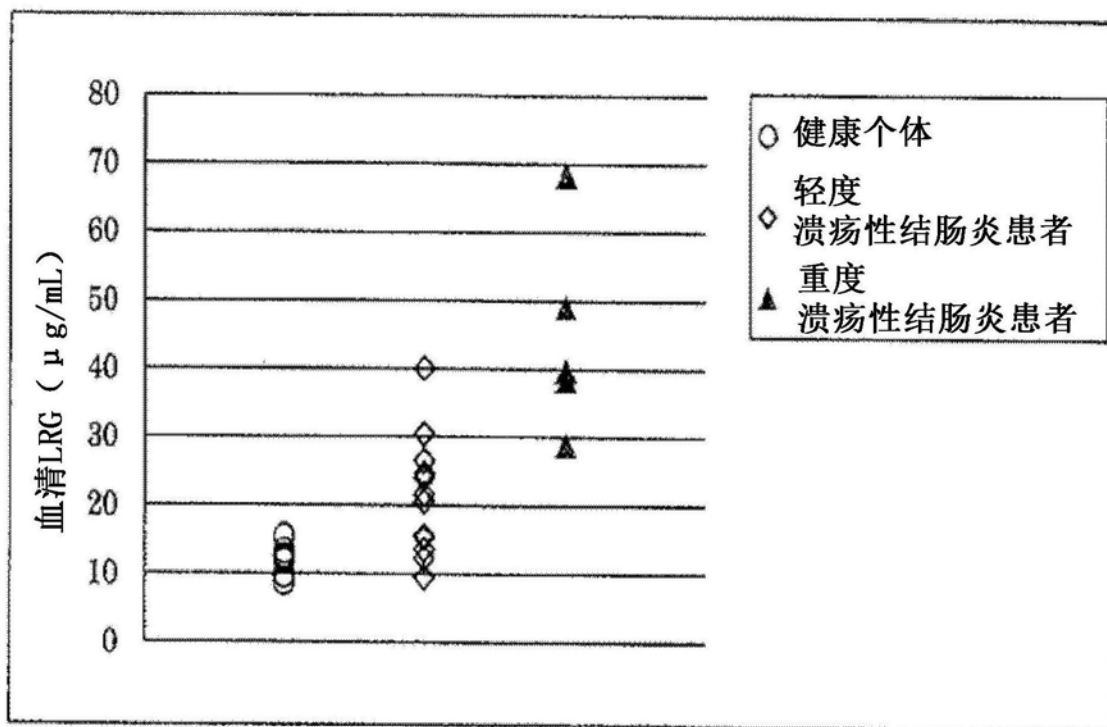


图7