



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110383067 B

(45) 授权公告日 2023.07.21

(21) 申请号 201780027069.5

(72) 发明人 安居良太 油井惠 牧之段满

(22) 申请日 2017.05.26

关泰宏 坂西千纱

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

申请公布号 CN 110383067 A

专利代理人 鲁雯雯 金龙河

(43) 申请公布日 2019.10.25

(51) Int.CI.

G01N 33/53 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/545 (2006.01)

2016-107343 2016.05.30 JP

G01N 33/577 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.31

(56) 对比文件

CN 104781669 A, 2015.07.15

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 104781669 A, 2015.07.15

PCT/JP2017/019736 2017.05.26

US 2008227208 A1, 2008.09.18

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 101236210 A, 2008.08.06

W02017/209001 JA 2017.12.07

CN 104515859 A, 2015.04.15

(83) 生物保藏信息

CN 101868729 A, 2010.10.20

NITE BP-02268 2017.04.03

Horn IR 等. Generation of a

NITE BP-02269 2017.04.03

haptoglobin-hemoglobin complex-specific

NITE BP-02270 2017.04.03

Fab antibody blocking the binding of the

NITE BP-02271 2017.04.03

complex to CD163.《EUROPEAN JOURNAL OF

NITE BP-02272 2017.04.03

HAEMATOLOGY》.2003, 第71卷

(73) 专利权人 荣研化学株式会社

审查员 张建敏

地址 日本东京都

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

抗人血红蛋白单克隆抗体或抗体试剂盒、抗体固定化不溶性载体粒子和它们的应用

(57) 摘要

本发明的目的在于提供用于特异性地简便地检测、测定样本中的血红蛋白-触珠蛋白复合物的抗人血红蛋白单克隆抗体或抗体试剂盒、和该单克隆抗体固定化不溶性载体粒子、以及用于使用它们来特异性地检测、测定样本中的血红蛋白-触珠蛋白复合物的测定试剂和测定方法。本发明的抗人血红蛋白单克隆抗体通过固定化于不溶性载体粒子上，不与未形成复合物的游离血红蛋白和游离触珠蛋白发生反应，而与血红蛋白-触珠蛋白复合物特异性地反应。

1. 一种抗人血红蛋白单克隆抗体，其是NPMD保藏编号为NITE BP-02268的5C-2A、NPMD保藏编号为NITE BP-02270的7C-7B-8E、NPMD保藏编号为NITE BP-02271的1-5G-3C、NPMD保藏编号为NITE BP-02269的12-9G-C或NPMD保藏编号为NITE BP-02272的79-8G-3F。

2. 一种抗体试剂盒，其包含抗人血红蛋白单克隆抗体的组合，所述抗人血红蛋白单克隆抗体的组合选自由NPMD保藏编号为NITE BP-02271的1-5G-3C与SU112的组合、NPMD保藏编号为NITE BP-02268的5C-2A与NPMD保藏编号为NITE BP-02272的79-8G-3F的组合、NPMD保藏编号为NITE BP-02268的5C-2A与NPMD保藏编号为NITE BP-02270的7C-7B-8E的组合、NPMD保藏编号为NITE BP-02270的7C-7B-8E与NPMD保藏编号为NITE BP-02272的79-8G-3F的组合、以及NPMD保藏编号为NITE BP-02269的12-9G-C与NPMD保藏编号为NITE BP-02272的79-8G-3F的组合组成的组。

3. 一种单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其为通过将选自由NPMD保藏编号为NITE BP-02268的5C-2A和NPMD保藏编号为NITE BP-02269的12-9G-C组成的一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体或者权利要求2所述的抗体试剂盒中所包含的抗人血红蛋白单克隆抗体的组合固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子。

4. 如权利要求3所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其中，将所述单克隆抗体固定化的所述不溶性载体粒子为胶乳粒子或金属胶体粒子。

5. 一种用于特异性地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫学测定试剂，其包含权利要求3或4所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子。

6. 选自由NPMD保藏编号为NITE BP-02268的5C-2A和NPMD保藏编号为NITE BP-02269的12-9G-C组成的组中的抗人血红蛋白单克隆抗体或权利要求2所述的抗体试剂盒在制备用于特异性地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫学测定试剂中的应用。

7. 一种抗人血红蛋白单克隆抗体，通过将所述单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子能够从含有游离血红蛋白和/或游离触珠蛋白、以及血红蛋白-触珠蛋白复合物的混合物中仅特异地检测出血红蛋白-触珠蛋白复合物，所述抗人血红蛋白单克隆抗体是NPMD保藏编号为NITE BP-02268的5C-2A或NPMD保藏编号为NITE BP-02269的12-9G-C。

8. 一种抗体试剂盒，其包含抗人血红蛋白单克隆抗体的组合，通过将所述抗人血红蛋白单克隆抗体的组合固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子能够从含有游离血红蛋白和/或游离触珠蛋白、以及血红蛋白-触珠蛋白复合物的混合物中仅特异地检测出血红蛋白-触珠蛋白复合物，所述抗人血红蛋白单克隆抗体的组合选自由NPMD保藏编号为NITE BP-02271的1-5G-3C与SU112的组合、NPMD保藏编号为NITE BP-02268的5C-2A与NPMD保藏编号为NITE BP-02272的79-8G-3F的组合、NPMD保藏编号为NITE BP-02268的5C-2A与NPMD保藏编号为NITE BP-02270的7C-7B-8E的组合、NPMD保藏编号为NITE BP-02270的7C-7B-8E与NPMD保藏编号为NITE BP-02272的79-8G-3F的组合、以及NPMD保藏编号为NITE BP-02269的12-9G-C与NPMD保藏编号为NITE BP-02272的79-8G-3F的组合组成的组。

9. 一种单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其为通过将权利要求7所述的抗体或权利要求8所述的抗体试剂盒中所包含的抗人血红蛋白单克隆抗体的组合固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子。

10. 如权利要求9所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其中，将所述单克隆抗体固定化的所述不溶性载体粒子为胶乳粒子或金属胶体粒子。

11. 一种用于特异性地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫学测定试剂，其包含权利要求9或10所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子。

12. 权利要求9或10所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子在制备用于特异性地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫学测定试剂中的应用。

13. 如权利要求12所述的应用，其中，所述免疫学测定试剂用于基于凝集法特异性地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物。

## 抗人血红蛋白单克隆抗体或抗体试剂盒、抗体固定化不溶性载体粒子和它们的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及在固定化于不溶性载体粒子的情况下与包含血红蛋白-触珠蛋白复合物的被测试样中的血红蛋白-触珠蛋白复合物特异性地发生凝集反应的抗人血红蛋白单克隆抗体或抗体试剂盒、抗人血红蛋白单克隆抗体固定化不溶性载体粒子和使用它们的用于特异地检测、测定被测试样中的血红蛋白-触珠蛋白复合物的测定试剂或测定方法。

### 背景技术

[0002] 作为伴有出血的消化器官的疾病,已知炎症、肿瘤、癌症等。并且,作为这些疾病的筛选检查,进行检查粪便中的血红蛋白的存在的便潜血检查。并且,该检查主要通过免疫测定法来进行(日本特开昭61-137064号公报)。

[0003] 但是,粪便中含有的血红蛋白会由于以作为被测试样的粪便中所含的细菌为代表的各种因素、并且由于在消化道内移动时也被分解而变得无法检测、测定。因此,粪便中的血红蛋白的检测、测定虽然对降结肠、直肠的出血的检查是有效的,但难以对上消化道的出血进行检查。

[0004] 因此,提出了测定不会由于以粪便中含有的细菌为代表的各种因素而受到分解的血红蛋白-触珠蛋白复合物的技术,并加以实施。但是,该测定原理是将与血红蛋白特异性结合的抗体和与触珠蛋白特异性结合的抗体组合的夹心免疫测定法(日本特开平2-193071号公报)。

[0005] 以ELISA为代表的夹心免疫测定法在测定的过程中包括将被测试样中含有的被测定物以外的蛋白质成分等除去的清洗步骤,因此测定所需要的时间延长。因此,不适合于需要在短时间内检测、测定多数被测试样的检测、测定。

[0006] 另外,血红蛋白和触珠蛋白的基本结构形成四聚体,将利用常规方法得到的与血红蛋白特异性结合的抗体和与触珠蛋白特异性结合的抗体组合而应用于能够在短时间内检测、测定多数被测试样的基于凝集法的免疫测定法时,不仅血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应,未形成复合物的游离血红蛋白和游离触珠蛋白也会发生凝集反应,因此难以进行精确的测定。

[0007] 因此,期待制作出能够应用于基于凝集法的免疫测定法、不对未形成复合物的游离血红蛋白和游离触珠蛋白进行检测、测定而仅能检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的抗体,并且期待建立通过使用该抗体的基于凝集法的免疫测定法特异地检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫测定法。

### 发明内容

[0008] 发明所要解决的问题

[0009] 为了早期发现重症化的炎症、肿瘤、癌症等,进行伴有出血的消化器官疾病的筛选检查已成为重要的课题。因此,要求能够在短时间内对消化道内不受分解的血红蛋白-触珠

蛋白复合物进行多组样本的检测、测定的试剂。

[0010] 因此，本发明的目的在于提供一种可用于基于凝集法的免疫测定法的抗体，该抗体不对未形成复合物的游离血红蛋白和游离触珠蛋白进行检测、测定，而能够在短时间内特异性地对血红蛋白-触珠蛋白复合物进行多组样本的检测、测定。

[0011] 用于解决问题的方法

[0012] 本发明人为了解决上述问题进行了深入研究，结果发现了一种抗体，通过使该抗体结合到不溶性载体粒子上，其不与未形成复合物的游离血红蛋白和游离触珠蛋白发生反应，而是与血红蛋白-触珠蛋白复合物特异性地反应，从而完成了本发明。

[0013] 即，本发明包括下述构成。

[0014] (1)一种抗人血红蛋白单克隆抗体，其中，通过将单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应，但不与血红蛋白发生凝集反应。

[0015] (2)如(1)所述的抗人血红蛋白单克隆抗体，其为5C-2A (NPMD保藏编号NITE BP-02268)或12-9G-C (NPMD保藏编号NITE BP-02269)。

[0016] (3)一种抗体试剂盒，其包含两种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体，通过将两种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应，但不与血红蛋白发生凝集反应。

[0017] (4)如(3)所述的抗体试剂盒，其中，两种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体为选自由5C-2A (NPMD保藏编号NITE BP-02268)、7C-7B-8E (NPMD保藏编号NITE BP-02270)、1-5G-3C (NPMD保藏编号NITE BP-02271)、12-9G-C (NPMD保藏编号NITE BP-02269)、79-8G-3F (NPMD保藏编号NITE BP-02272)和SU112组成的组中的至少两种以上。

[0018] (5)如(1)～(4)中任一项所述的抗人血红蛋白单克隆抗体或抗体试剂盒，其中，抗人血红蛋白单克隆抗体来源于小鼠。

[0019] (6)一种抗人血红蛋白单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其为通过将一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其中，单克隆抗体固定化不溶性载体粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应，但不与血红蛋白发生凝集反应。

[0020] (7)如(6)所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其中，一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体为5C-2A (NPMD保藏编号NITE BP-02268)或12-9G-C (NPMD保藏编号NITE BP-02269)的一种。

[0021] (8)如(6)所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其中，一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体为选自由5C-2A (NPMD保藏编号NITE BP-02268)、7C-7B-8E (NPMD保藏编号NITE BP-02270)、1-5G-3C (NPMD保藏编号NITE BP-02271)、12-9G-C (NPMD保藏编号NITE BP-02269)、79-8G-3F (NPMD保藏编号NITE BP-02272)和SU112组成的组中的至少两种以上。

[0022] (9)如(6)～(8)中任一项所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其中，抗人血红蛋白单克隆抗体来源于小鼠。

[0023] (10)如(6)～(9)中任一项所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子，其中，将单克隆抗体固定化的不溶性载体粒子为胶乳粒子或金属胶体粒子。

[0024] (11)一种用于特异性地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫学测定试剂，其包

含(6)～(10)中任一项所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子。

[0025] (12)一种抗人血红蛋白单克隆抗体,其为5C-2A(NPMD保藏编号NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD保藏编号NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD保藏编号NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD保藏编号NITE BP-02269)或79-8G-3F(NPMD保藏编号NITE BP-02272)。

[0026] (13)一种用于特异性地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫学测定方法,其使用(1)～(5)中任一项所述的抗人血红蛋白单克隆抗体或抗体试剂盒、(6)～(10)中任一项所述的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子、(11)所述的免疫学测定试剂或者(12)所述的抗人血红蛋白单克隆抗体。

[0027] (14)一种免疫学测定方法,其为使用通过将一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子的、用于特异性地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫学测定方法,其中,单克隆抗体固定化不溶性载体粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应,但不与血红蛋白发生凝集反应。

[0028] (15)如(14)所述的免疫学测定方法,其中,一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体为5C-2A(NPMD保藏编号NITE BP-02268)或12-9G-C(NPMD保藏编号NITE BP-02269)的一种。

[0029] (16)如(14)所述的免疫学测定方法,其中,一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体为选自由5C-2A(NPMD保藏编号NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD保藏编号NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD保藏编号NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD保藏编号NITE BP-02269)、79-8G-3F(NPMD保藏编号NITE BP-02272)和SU112组成的组中的至少两种以上。

[0030] (17)如(14)～(16)中任一项所述的免疫学测定方法,其中,抗人血红蛋白单克隆抗体来源于小鼠。

[0031] (18)如(14)～(17)中任一项所述的免疫学测定方法,其中,将抗人血红蛋白单克隆抗体固定化的不溶性载体粒子为胶乳粒子或金属胶体粒子。

### [0032] 发明效果

[0033] 本发明通过使用将上述抗人血红蛋白单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而制作的免疫学测定试剂,能够不受被测试样中所含的未形成复合物的游离血红蛋白和/或游离触珠蛋白的影响而特异性地测定血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0034] 并且,由此,将与血红蛋白相比在样本中的稳定性更为优良的血红蛋白-触珠蛋白复合物作为被测物质,能够简便地且在短时间内进行伴有出血的消化器官疾病的筛选检查。

### 附图说明

[0035] 图1是利用ELISA法和胶乳凝集法对样本进行测定时的相关图。

### 具体实施方式

[0036] 本发明的一个实施方式的抗人血红蛋白单克隆抗体是通过将单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应、但不与血红蛋白发生凝集反应的抗人血红蛋白单克隆抗体。

[0037] 本发明的另一实施方式的抗人血红蛋白单克隆抗体为抗体试剂盒,具体而言为包含两种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体的抗体试剂盒,其中,通过将两种以上的抗人血红

蛋白单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应,但不与血红蛋白发生凝集反应。

[0038] 本发明中的血红蛋白-触珠蛋白复合物是由血红蛋白和触珠蛋白形成的、比游离血红蛋白更稳定的复合物。红细胞在血管中由于某种原因而被破坏、血红蛋白游离到血中时,由于游离的血红蛋白被氧化而产生氧化性血管损伤毒性。已知因此触珠蛋白与游离的血红蛋白迅速形成复合物,由此对其毒性进行中和。已知其后血红蛋白-触珠蛋白复合物由网状内皮系统细胞的受体介导而被迅速摄取并被分解处理,但血红蛋白-触珠蛋白复合物本身比血红蛋白更稳定。

[0039] 着眼于血红蛋白-触珠蛋白复合物为稳定结构物的性质,通过特异地检测、测定粪便中含有的血红蛋白-触珠蛋白复合物,能够掌握消化道中的出血。

[0040] 作为进行血红蛋白-触珠蛋白复合物的检测、测定的方法,优选免疫学测定方法,作为在短时间内对多数样本进行筛选检查的方法,进一步优选免疫凝集反应方法。作为免疫凝集反应方法,优选使用载体粒子、例如能够进行高灵敏度测定的均相系统的粒子载体的方法。

[0041] 另外,从特异地检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的观点出发,作为免疫学测定方法中使用的抗体,单克隆抗体是适合的。本发明构建通过将用于免疫凝集反应方法且能够检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而特异地检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的方法。

[0042] 作为用于构建特异地检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的方法的抗人血红蛋白单克隆抗体,其来源没有特别限定,但优选小鼠来源的抗人血红蛋白小鼠单克隆抗体。

[0043] 抗人血红蛋白小鼠单克隆抗体可以利用通常的单克隆抗体的制作方法来制作。可以列举例如使用小鼠的下述方法。具体而言,用人血红蛋白对小鼠进行免疫后,取出肥大化的脾脏,制备脾脏来源的B细胞,通过电融合法与另行增殖的小鼠骨髓瘤细胞进行细胞融合,利用选择培养基对B细胞与骨髓瘤细胞融合而成的细胞进行增殖和克隆化。对结果生长出的集落是否产生了抗人血红蛋白的抗体进行确认。将确认到产生了抗人血红蛋白的抗体的细胞进行克隆化,得到产生抗人血红蛋白小鼠单克隆抗体的细胞株。对所得到的产生抗人血红蛋白小鼠单克隆抗体的细胞株进行培养,由其培养上清或使培养细胞在小鼠的腹腔内增殖而得到的腹水纯化出抗体,作为抗人血红蛋白小鼠单克隆抗体。

[0044] 接着,为了将抗人血红蛋白小鼠单克隆抗体应用于免疫凝集反应方法,将该抗体固定化于不溶性载体粒子上。作为用于固定化单克隆抗体的不溶性载体粒子,可以列举通常使用的胶乳粒子、二氧化硅粒子、金属胶体粒子、磁性粒子、荧光粒子、红细胞等,但不限定于这些。

[0045] 另外,作为该不溶性载体粒子的粒径,优选为50~500nm,进一步优选为75~350nm,但并不特别限定于该范围,均可使用。

[0046] 此外,作为将抗体固定化于不溶性载体粒子上的方法,可以通过作为公知技术的、将抗体与不溶性载体粒子混合并使抗体物理性地吸附到不溶性载体粒子的表面的方法进行抗体向不溶性载体粒子上的固定化。

[0047] 另外,在使用表面引入有氨基或羧基的不溶性载体粒子的情况下,可以通过使用戊二醛、羧酰亚胺试剂的化学结合进行抗体向不溶性载体粒子的表面的固定化。

[0048] 将通过这些方法得到的固定化了一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体的不溶性载体粒子供给至包含未形成复合物的游离血红蛋白和游离触珠蛋白、以及血红蛋白-触珠蛋白复合物的混合物中,确认与游离血红蛋白和游离触珠蛋白未见凝集反应、与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应,得到本申请发明的抗人血红蛋白单克隆抗体和抗人血红蛋白单克隆抗体固定化不溶性载体粒子。

[0049] 即,可以得到通过固定化于不溶性载体粒子上而与血红蛋白-触珠蛋白复合物特异性地发生凝集反应的抗人血红蛋白单克隆抗体,可以通过将该抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到抗人血红蛋白单克隆抗体固定化不溶性载体粒子。由此,还可以得到使血红蛋白-触珠蛋白复合物特异性地发生反应的、包含该抗体或该单克隆抗体固定化不溶性载体粒子的测定试剂;特异地检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的、使用该抗体或该单克隆抗体固定化不溶性载体粒子的测定方法。

[0050] 作为本发明的一个实施方式的抗人血红蛋白单克隆抗体,优选为在固定化于不溶性载体粒子上的情况下与血红蛋白-触珠蛋白复合物特异性地发生凝集反应的、以保藏编号NITE BP-02268保藏于NPMD(国家技术评估学会专利微生物保藏中心,地址:日本千叶县)的5C-2A(保藏日:2017年4月3日)或以保藏编号NITE BP-02269保藏于NPMD的12-9G-C(保藏日:2017年4月3日)。

[0051] 另外,作为本发明的另一实施方式的抗人血红蛋白单克隆抗体试剂盒,优选为在将两种以上的单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上的情况下与血红蛋白-触珠蛋白复合物特异性地发生凝集反应的、选自由以保藏编号NITE BP-02268保藏于NPMD的5C-2A、以保藏编号NITE BP-02270保藏于NPMD的7C-7B-8E(保藏日:2017年4月3日)、以保藏编号NITE BP-02271保藏于NPMD的1-5G-3C(保藏日:2017年4月3日)、以保藏编号NITE BP-02269保藏于NPMD的12-9G-C、以保藏编号NITE BP-02272保藏于NPMD的79-8G-3F(保藏日:2017年4月3日)和SU112(日本Biostest研究所)组成的组中的至少两种以上。

[0052] 本发明的测定试剂包含抗人血红蛋白单克隆抗体或抗体试剂盒、或者抗人血红蛋白单克隆抗体固定化不溶性载体粒子,此外,还可以包含例如各种电解质、缓冲剂、稳定剂、表面活性剂或敏化剂等成分。

[0053] 本发明的测定方法为使用通过将一种以上的抗人血红蛋白单克隆抗体固定化于不溶性载体粒子上而得到的单克隆抗体固定化不溶性载体粒子的、用于特异地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物的免疫学测定方法,该单克隆抗体固定化不溶性载体粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集反应,但不与血红蛋白发生凝集反应,因此,能够从包含未形成复合物的游离血红蛋白和游离触珠蛋白、以及血红蛋白-触珠蛋白复合物的混合物中仅特异地检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0054] 本发明的测定方法中,将上述单克隆抗体固定化不溶性载体粒子与样本(被测试样)混合,根据凝集反应的有无,特异地检测、测定样本中的血红蛋白-触珠蛋白复合物。样本只要是可能包含血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样则没有特别限定,优选为血液、便、尿、汗等,特别优选为便。凝集反应的检测、测定方法只要是通常的方法即可,可以列举例如吸光度的测定、散射光强度的测定、通过目视的测定(玻片凝集法)等。

[0055] 以下,列举实施例对本发明具体地进行说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0056] 实施例

[0057] (实施例1抗人血红蛋白单克隆抗体的制作)

[0058] (1) 对小鼠的免疫

[0059] 用血红蛋白对7周龄的雌性的Balb/c小鼠和ddY小鼠各5只进行免疫。作为免疫操作规程,将与佐剂混合后的血红蛋白溶液以50 $\mu$ g/小鼠的用量在背部皮下进行初次免疫。

[0060] 在初次免疫4周后,将与佐剂混合后的血红蛋白溶液以50 $\mu$ g/小鼠的用量在背部皮下进行免疫,进一步在其4周后将与佐剂混合后的血红蛋白溶液以50 $\mu$ g/小鼠的用量在背部皮下进行免疫。

[0061] 在各次免疫后,利用使用以<sup>125</sup>I标记的血红蛋白的双抗体法的RIA法测定抗血清效价。其结果是,在一只ddY小鼠中得到高的抗血清效价,将其供于细胞融合。需要说明的是,第二次免疫后和第三次免疫后的抗血清效价未观察到变动。

[0062] (2) 细胞融合

[0063] 在进行细胞融合3天前,将血红蛋白溶液以50 $\mu$ g/小鼠的用量在腹腔内进行最终免疫。关于细胞融合,从初次免疫后经过16周的小鼠摘取脾脏,制备脾细胞。

[0064] 利用电融合法将所制备的脾细胞与小鼠骨髓瘤NS-1细胞进行细胞融合,悬浮于融合细胞选择培养基中,接种到96孔微孔板中。

[0065] (3) 单克隆抗体产生细胞株的筛选

[0066] 在细胞融合10天后,利用使用以<sup>125</sup>I标记的血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物的双抗体法的RIA法对抗人血红蛋白单克隆抗体产生细胞进行筛选。

[0067] (实施例2单克隆抗体的结合特异性)

[0068] (1) 单克隆抗体的选择

[0069] 选择通过细胞融合得到的抗人血红蛋白单克隆抗体45个克隆和市售的抗人血红蛋白单克隆抗体SU112(日本Biotest研究所)总计46个克隆,对它们与血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物的结合特异性进行评价。

[0070] 作为评价的方法,将各抗人血红蛋白单克隆抗体固定化于聚苯乙烯胶乳粒子上,对使其与包含血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样反应时的凝集程度进行比较。

[0071] (2) 单克隆抗体向聚苯乙烯胶乳粒子上的固定化

[0072] 将各单克隆抗体固定化于粒径211nm的聚苯乙烯胶乳粒子上。

[0073] 上述的抗体向聚苯乙烯胶乳粒子上的固定化利用公知的技术来实施。即,将聚苯乙烯胶乳粒子与抗体混合,使抗体物理性地吸附到疏水性的聚苯乙烯胶乳粒子的表面,由此进行抗体向聚苯乙烯胶乳粒子上的固定化。

[0074] (3) 试样的制备

[0075] 血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样通过将32.3pmol/mL的血红蛋白和与其等摩尔的触珠蛋白以相等液量进行混合来制作。仅含血红蛋白的试样使用包含16.1pmol/mL的血红蛋白的试样。

[0076] (4) 胶乳凝集的测定方法

[0077] 使用96孔平底微孔板的孔进行凝集反应。具体方法如下:在微孔板的各孔中分注100 $\mu$ L的50mM HEPES缓冲液(pH7.4),添加50 $\mu$ L固定化了各抗体的聚苯乙烯胶乳粒子溶液后,添加30 $\mu$ L试样。

[0078] 使用Sunrise Rainbow酶标仪(帝肯日本公司),在添加试样10秒后和5分10秒后在

波长660nm下测定吸光度,将其差值作为凝集的指标。

[0079] 将与血红蛋白-触珠蛋白复合物反应时的凝集的程度相较于与血红蛋白反应时的凝集的程度更高的抗体或其组合示于表1。将这些抗体保藏于专利微生物保藏中心(NPMD)。通过使用表1所示的单克隆抗体或其组合,可期待能够特异地测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的试剂。确认到:5C-2A(NPMD保藏编号NITE BP-02268)和12-9G-C(NPMD保藏编号NITE BP-02269)的单克隆抗体即使单独使用,也几乎不受血红蛋白的影响地与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集。另外,确认到:1-5G-3C(NPMD保藏编号NITE BP-02271)与SU112(日本Bioteest研究所)的组合、5C-2A(NPMD保藏编号NITE BP-02268)与79-8G-3F(NPMD保藏编号NITE BP-02272)的组合、5C-2A(NPMD保藏编号NITE BP-02268)与7C-7B-8E(NPMD保藏编号NITE BP-02270)的组合、5C-2A(NPMD保藏编号NITE BP-02268)与79-8G-3F的组合、12-9G-C(NPMD保藏编号NITE BP-02269)与79-8G-3F(NPMD保藏编号NITE BP-02272)的组合也几乎不受血红蛋白的影响地与血红蛋白-触珠蛋白复合物发生凝集。

[0080] [表1]

单克隆抗体的组合		血红蛋白 ( $\Delta$ Abs. $\times 10000$ )	血红蛋白-触珠蛋白 复合物 ( $\Delta$ Abs. $\times 10000$ )
[0081]	1-5G-3C	SU112	0
	5C-2A	单独	290
	5C-2A	79-8G-3F	0
	5C-2A	7C-7B-8E	390
	7C-7B-8E	79-8G-3F	0
	12-9G-C	单独	280
	12-9G-C	79-8G-3F	0

[0082] (实施例3与血红蛋白-触珠蛋白复合物的特异性反应(1))

[0083] (1) 单克隆抗体固定化胶乳溶液的制备

[0084] 利用与实施例2同样的方法将5C-2A的单克隆抗体固定化于胶乳粒子上,制成胶乳溶液。

[0085] (2) 血红蛋白-触珠蛋白复合物试样的制备

[0086] 制备在50mM磷酸缓冲液(pH6.6)中包含11.4pmol/mL的血红蛋白和0.0、3.8、7.5或11.3pmol/mL的触珠蛋白的溶液。即,利用血红蛋白和触珠蛋白具有牢固结合的性质,制备血红蛋白-触珠蛋白复合物和血红蛋白在理论上分别含有0.0和11.4pmol/mL、3.8和7.6pmol/mL、7.5和3.9pmol/mL、以及11.3和0.1pmol/mL的溶液。

[0087] (3) 单克隆抗体固定化胶乳粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物的反应

[0088] 使用7170S型自动分析装置(日立高新技术公司制造)对单克隆抗体固定化胶乳粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物的反应进行确认。测定方法如下:在H7170S的反应池中添加含有血红蛋白-触珠蛋白复合物的溶液15 $\mu$ L后,添加50mM HEPES缓冲液(pH7.4)100 $\mu$ L,然后添加单克隆抗体固定化胶乳溶液25 $\mu$ L,求出其后440秒期间的波长660nm下的浊度变化量。

[0089] 将以0pmol/mL的方式添加触珠蛋白时的浊度变化量校正为0,将以含有11.3pmol/mL的方式添加触珠蛋白后的溶液的浊度变化量作为100%,将此时的浊度变化率示于表2。

[0090] 随着触珠蛋白的添加浓度、即血红蛋白-触珠蛋白复合物的浓度的增加,通过与固

定化于胶乳粒子上的单克隆抗体的抗原抗体反应产生的胶乳凝集所导致的浊度变化增加。另外,在触珠蛋白的添加浓度低时,胶乳凝集所导致的浊度变化小,由此推测,未观察到与未与触珠蛋白结合的血红蛋白的反应。由此可知,通过使用5C-2A的单克隆抗体,能够特异地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0091] [表2]

	血红蛋白 (pmol/mL)	触珠蛋白 (pmol/mL)	浊度变化量(%)
[0092]	11.4	0.0	0.0
	11.4	3.8	10.2
	11.4	7.5	53.7
	11.4	11.3	100.0

[0093] (实施例4与血红蛋白-触珠蛋白复合物的特异性反应(2))

[0094] (1) 单克隆抗体固定化胶乳溶液的制备

[0095] 利用与实施例2同样的方法将1-5G-3C、7C-7B-8E、SU112和79-8G-3F的单克隆抗体固定化于胶乳粒子上,制成胶乳溶液。然后,制作1-5G-3C与SU112的组合以及7C-7B-8E与79-8G-3F的组合的胶乳溶液,供于试验。

[0096] (2) 血红蛋白-触珠蛋白复合物试样的制备

[0097] 除了包含13.0pmol/mL的血红蛋白和0.0、9.4、11.3或13.0pmol/mL的触珠蛋白以外,利用与实施例3同样的方法进行制备。即,制备血红蛋白-触珠蛋白复合物和血红蛋白在理论上分别包含0.0和13.0pmol/mL、9.4和3.6pmol/mL、11.3和1.7pmol/mL、以及13.0和0.0pmol/mL的溶液。

[0098] (3) 单克隆抗体固定化胶乳粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物的反应

[0099] 利用与实施例3同样的方法求出浊度变化量。

[0100] 将以0pmol/mL的方式添加触珠蛋白时的浊度变化量校正为0,将使血红蛋白和触珠蛋白为等量而制备的、以包含13.0pmol/mL的方式添加触珠蛋白后的溶液的浊度变化量作为100%,将此时的浊度变化率示于表3。

[0101] 得到了与实施例3同样的结果。即,随着触珠蛋白的添加浓度、即血红蛋白-触珠蛋白复合物的浓度的增加,通过与固定化于胶乳粒子上的单克隆抗体的抗原抗体反应产生的胶乳凝集所导致的浊度变化增加。由此可知,通过使用1-5G-3C与SU112的组合、以及7C-7B-8E与79-8G-3F的组合,能够特异地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0102] [表3]

[0103]

血红蛋白 (pmol/mL)	触珠蛋白 (pmol/mL)	浊度变化量(%)	
		1-5G-3C + SU112	7-7B-8E + 79-8G-3F
13.0	0.0	0	0
13.0	9.4	49	69
13.0	11.3	68	73
13.0	13.1	100	100

[0104] (比较例1利用ELISA法的血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物的测定)

[0105] 对于实施例2中在与血红蛋白反应时未观察到凝集反应、但确认到与血红蛋白-触珠蛋白复合物的特异性反应的5C-2A与79-8G-3F的组合,利用ELISA法对其与血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物的结合的特异性进行评价。

[0106] (1) 单克隆抗体固定化胶乳溶液的制备

[0107] 将5C-2A固相化于96孔微孔板上,制成固相化板,对79-8G-3F标记辣根过氧化物酶而制成酶标记化物。上述的抗体向96孔微孔板上的固相化利用公知的技术来实施。即,在96孔微孔板中添加抗体,使抗体物理性地吸附到疏水性的96孔微孔板的表面,由此进行抗体向96孔微孔板上的固相化。

[0108] (2) 血红蛋白-触珠蛋白复合物试样的制备

[0109] 制备在50mM磷酸缓冲液(pH6.6)中包含12.6pmol/mL的血红蛋白和12.6pmol/mL的触珠蛋白的溶液,将该溶液用50mM磷酸缓冲液(pH6.6)进行倍比稀释,制备包含1.6、3.2、6.3或12.6pmol/mL的血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样。

[0110] (3) ELISA的测定方法

[0111] 在96孔微孔板中添加标准液或样本10μL,搅拌3分钟后,在25℃下静置60分钟。静置后,使用含有表面活性剂的50mM磷酸缓冲液(pH7.4)清洗3次。

[0112] 清洗后,在96孔微孔板中添加酶标记物100μL,搅拌3分钟后,在25℃下静置60分钟。静置后,使用含有表面活性剂的50mM磷酸缓冲液(pH7.4)清洗3次。

[0113] 清洗后,在96孔微孔板中添加含有0.4mg/mL的邻苯二胺的底物溶解液100μL,在25℃下静置14分钟。静置后,添加100μL的3N硫酸作为反应终止液。

[0114] 测定使用Sunrise Rainbow酶标仪(帝肯日本公司)在测定波长492/650nm下进行。将使用5C-2A与79-8G-3F的组合的ELISA法中的测定结果示于表4,该组合通过固定化于胶乳等不溶性载体上,在与血红蛋白反应时未观察到凝集反应、但确认到与血红蛋白-触珠蛋白复合物的特异性反应。在使用5C-2A与79-8G-3F的组合的ELISA法中,与血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物两者发生了反应,无法特异地检测血红蛋白-触珠蛋白复合物。

[0115] [表4]

	浓度* (pmol/mL)	血红蛋白 ( $\Delta$ Abs. $\times$ 10000)	血红蛋白-触珠蛋白 复合物 ( $\Delta$ Abs. $\times$ 10000)
[0116]	1. 6	6672	11165
	3. 2	9632	16668
	6. 3	12282	21758
	12. 6	14382	24458

[0117] \*: 血红蛋白或血红蛋白-触珠蛋白复合物的浓度

[0118] (实施例5与血红蛋白-触珠蛋白复合物的特异性反应(3))

[0119] 对于实施例2中在与血红蛋白反应时未观察到凝集反应、但确认到与血红蛋白-触珠蛋白复合物的特异性反应的5C-2A与79-8G-3F的组合,利用胶乳凝集法对其与血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物的结合的特异性进行评价。

[0120] (1) 单克隆抗体固定化胶乳溶液的制备

[0121] 利用与实施例2同样的方法将5C-2A和79-8G-3F的单克隆抗体固定化于胶乳粒子上,制成胶乳溶液。将固定化了5C-2A和79-8G-3F的单克隆抗体的胶乳溶液混合,供于试验。

[0122] (2) 血红蛋白-触珠蛋白复合物试样的制备

[0123] 制备在50mM磷酸缓冲液(pH6.6)中包含12.6pmol/mL的血红蛋白和12.6pmol/mL的触珠蛋白的溶液,将该溶液用50mM磷酸缓冲液(pH6.6)进行倍比稀释,制备包含1.6、3.2、6.3或12.6pmol/mL的血红蛋白-触珠蛋白复合物的试样。

[0124] (3) 胶乳凝集法的测定方法

[0125] 使用50mM HEPES缓冲液(pH7.4)作为R1,使用上述的单克隆抗体固定化胶乳溶液作为R2。测定使用日立7170S型自动分析装置(日立高新技术公司制造)来进行。测定方法如下:在反应池中添加标准液或样本15μL后,添加50mM HEPES缓冲液(pH7.4)100μL,然后添加单克隆抗体固定化胶乳溶液25μL,测定其后440秒期间的波长660nm下的浊度变化量。

[0126] (4) 单克隆抗体固定化胶乳粒子与血红蛋白-触珠蛋白复合物的反应

[0127] 将使用在ELISA法中确认到与血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合物两者的反应的5C-2A与79-8G-3F的组合的胶乳凝集法中的测定结果示于表5。确认到:5C-2A与79-8G-3F的组合通过固定化于胶乳等不溶性载体上,在与血红蛋白反应时未观察到凝集反应,而是与血红蛋白-触珠蛋白复合物特异地发生反应。

[0128] [表5]

	浓度* (pmol/mL)	血红蛋白 ( $\Delta$ Abs. $\times 10000$ )	血红蛋白-触珠蛋白 复合物 ( $\Delta$ Abs. $\times 10000$ )
[0129]	1. 6	-15	-2
	3. 2	-15	53
	6. 3	-1	199
	12. 6	11	652

[0130] \*: 血红蛋白或血红蛋白-触珠蛋白复合物的浓度

[0131] (实施例6样本的测定(1))

[0132] 使用作为现有方法之一的ELISA法和本发明的方法进行血红蛋白-触珠蛋白复合物的测定。

[0133] (1) 利用ELISA法的血红蛋白-触珠蛋白复合物的测定

[0134] 将抗人触珠蛋白单克隆抗体固相化于96孔微孔板上, 制成固相化板, 对抗人血红蛋白多克隆抗体标记辣根过氧化物酶, 制成酶标记物。

[0135] 在96孔微孔板中添加50mM磷酸缓冲液(pH7.2) 100μL和标准液或样本10μL, 搅拌5分钟后, 在25℃下静置120分钟。静置后, 使用含有表面活性剂的50mM磷酸缓冲液(pH7.5)清洗3次。

[0136] 清洗后, 在96孔微孔板中添加酶标记物100μL, 搅拌5分钟后, 在25℃下静置55分钟。静置后, 使用含有表面活性剂的50mM磷酸缓冲液(pH7.5)清洗3次。

[0137] 清洗后, 在96孔微孔板中添加含有0.4mg/mL的邻苯二胺的底物溶解液100μL, 在25℃下静置15分钟。静置后, 添加100μL的2N硫酸作为反应终止液。

[0138] 测定使用Sunrise Rainbow酶标仪(帝肯日本公司)在测定波长492/650nm下进行, 基于由标准的测定结果得到的标准曲线求出样本的测定值。

[0139] (2) 利用胶乳凝集法的血红蛋白-触珠蛋白复合物的测定

[0140] 使用50mM HEPES缓冲液(pH7.4)作为R1, 使用实施例3的单克隆抗体固定化胶乳溶液作为R2。

[0141] 测定使用JCA-BM2250(日本电子公司)来进行。测定方法如下: 在反应池中添加标准液或样本8μL后, 添加50μL的R1, 然后添加16.7μL的R2, 测定其后471秒期间的波长658nm下的浊度变化量, 基于由标准的测定结果得到的标准曲线求出样本的测定值。

[0142] (3) 测定结果

[0143] 将利用ELISA和胶乳凝集法对5个样本进行测定而得到的结果示于表6, 将测定间的相关图示于图1。

[0144] 利用胶乳凝集法的样本的测定结果与利用ELISA的样本的测定结果同等, 相关系数良好, 为0.998。需要说明的是, 图1的数值1表示以血红蛋白计的浓度为12.9pmol/mL。

[0145] [表6]

	样本	ELISA法	胶乳凝集法
[0146]	A	0.09	0.12

B	0.28	0.31
C	0.48	0.49
D	0.67	0.72
E	0.89	0.91

[0147] 由这些结果判断,通过使用本发明,能够精确地测定样本中的血红蛋白-触珠蛋白复合物,有助于疾病的诊断。

[0148] 产业上的可利用性

[0149] 本发明提供通过固定化于不溶性载体粒子上而能够特异性地检测、测定血红蛋白-触珠蛋白复合物的单克隆抗体或抗体试剂盒、和该单克隆抗体固定化不溶性载体粒子、以及用于使用它们来特异性地检测、测定样本中的血红蛋白-触珠蛋白复合物的测定试剂和测定方法。通过将本发明应用于粪便样本,能够在短时间内以良好的精度检查消化器官中有无出血。

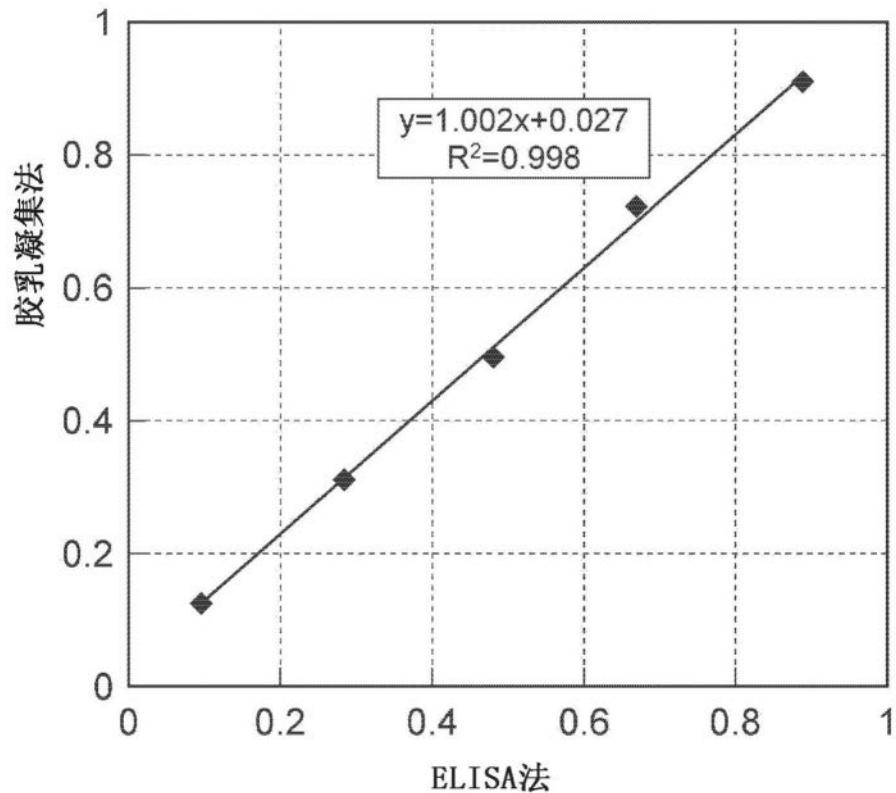


图1