



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112740037 A

(43) 申请公布日 2021. 04. 30

(21) 申请号 201980061828.9

(22) 申请日 2019.09.27

(30) 优先权数据

2018-184017 2018.09.28 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/038076 2019.09.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/067396 JA 2020.04.02

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

(72) 发明人 大田美惠子 宫崎修 妹尾理子

山本光章 西尾朋久

(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)

权利要求书1页 说明书18页

(54) 发明名称

糖化血红蛋白(%)测定方法

(57) 摘要

本发明要解决的问题是提供一种在含有血红蛋白的血液样品中含有异常血红蛋白如HbS或HbC的情况下也能够准确地测定血液中的糖化血红蛋白(%)的测定方法和测定试剂。本发明提供了通过组合两种类型的单克隆抗体,即抗糖化血红蛋白单克隆抗体和针对抗糖化血红蛋白单克隆抗体的单克隆抗体,即使在含有异常血红蛋白的样品中也能够准确测量血液中糖化血红蛋白(%)的方法,以及用于实施该方法的测定试剂。

1. 用于测量样品中糖化血红蛋白(%)的糖化血红蛋白(%)测定方法,包括以下步骤:
通过使样品与不溶性载体接触,将样品中的糖化血红蛋白吸附到不溶性载体上,
通过使吸附到不溶性载体上的糖化血红蛋白与抗糖化血红蛋白单克隆抗体接触,形成抗糖化血红蛋白单克隆抗体、糖化血红蛋白和不溶性载体的复合物,和
通过使所述复合物与与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体接触来凝集不溶性载体。
2. 根据权利要求1所述的糖化血红蛋白(%)测定方法,其中,与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体是不与人IgG反应的抗体。
3. 根据权利要求1或2所述的糖化血红蛋白(%)测定方法,其中,所述不溶性载体是乳胶。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的糖化血红蛋白(%)测定方法,其中,所述样品为全血或血细胞。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的测定方法,其包括光学检测凝集度的步骤。
6. 糖化血红蛋白(%)测定试剂,其包含:至少以下两种类型的单克隆抗体:
 - 1) 抗糖化血红蛋白单克隆抗体,和
 - 2) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体。
7. 根据权利要求6所述的糖化血红蛋白(%)测定试剂,其进一步包含不溶性载体。
8. 根据权利要求7所述的糖化血红蛋白(%)测定试剂,其包含第一试剂和第二试剂,其中
所述第一试剂包含不溶性载体,并且其中所述第二试剂包含至少以下两种类型的单克隆抗体:
 - 1) 抗糖化血红蛋白单克隆抗体,和
 - 2) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体。
9. 根据权利要求6至8中任一项所述的测定试剂,其中,与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体是不与人IgG反应的抗体。
10. 根据权利要求6至9中任一项所述的糖化血红蛋白(%)测定试剂,其中,所述不溶性载体是乳胶。
11. 糖化血红蛋白(%)测定试剂盒,其包含根据权利要求6至10中任一项所述的糖化血红蛋白(%)测定试剂。
12. 与人糖化血红蛋白结合的单克隆抗体反应而不与人IgG反应的单克隆抗体。
13. 减少含有异常血红蛋白的样品中糖化血红蛋白(%)测量值偏差的方法,该方法包括使至少以下两种单克隆抗体、不溶性载体和样品彼此接触的步骤:
 - 1) 抗糖化血红蛋白单克隆抗体,和
 - 2) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体。
14. 抑制含有异常血红蛋白的样品中糖化血红蛋白(%)测量值的假高值的方法,该方法包括使至少以下两种类型的单克隆抗体、不溶性载体和样品彼此接触的步骤:
 - 1) 抗糖化血红蛋白单克隆抗体,和
 - 2) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体。

糖化血红蛋白(%)测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用免疫反应的糖化血红蛋白(%)测定方法和测定试剂。更具体地,本发明涉及使用多种单克隆抗体的糖化血红蛋白(%)测定方法和测定试剂。

背景技术

[0002] 血红蛋白A1c(以下也简称为HbA1c)是葡萄糖非酶促地结合在血红蛋白的β链N末端的氨基酸残基的α-氨基上的糖化血红蛋白。血红蛋白由两个α链和两个β链构成,并具有异四聚体结构。已知血液中HbA1c的比率反映了糖尿病的相对长期的血糖控制状态,并且测量HbA1c对于了解血糖控制状态在临床上非常有意义。以下技术已知为HbA1c的免疫学测定方法。

[0003] 专利文献1公开了一种HbA1c(%)测定方法,其中使未敏化的乳胶与含有HbA1c的样品反应,然后与抗HbA1c抗体反应,以测量吸附HbA1c的乳胶通过抗HbA1c抗体的凝集。在该测定方法中,仅使用一种针对HbA1c的单克隆抗体。

[0004] 专利文献2公开了一种凝集免疫测定法,其中将样品中的HbA1c吸附到不溶性载体颗粒例如乳胶上,与抗HbA1c单克隆抗体(第一抗体)反应,然后进一步与选择性地结合于单克隆抗体的第二抗体反应,选择性地凝集不溶性载体颗粒。尽管在此测定法中使用了两种类型的抗体,但是单克隆抗体只是用作抗HbA1c单克隆抗体的第一抗体,与抗HbA1c单克隆抗体结合的第二抗体是多克隆抗体,而不是单克隆抗体。

[0005] 已知包含第一试剂和第二试剂的HbA1c(%)测定试剂是常规产品,所述第一试剂含有乳胶,所述第二试剂含有抗人HbA1c单克隆抗体与抗小鼠IgG抗体的结合物质(非专利文献1、2)。根据该测定试剂,血液中的HbA1c被吸附在乳胶上,抗体的结合物质与吸附在乳胶上的HbA1c发生免疫反应,由此产生的乳胶凝集为浊度。

[0006] 如上所述,正常的血红蛋白是由两条α链和两条β链构成的异四聚体,但是已知在某些非洲人和美国黑人的血液中存在异常血红蛋白,其β链的一部分发生了突变。具体实例包括HbS,其中来自血红蛋白(Hb)的β链N末端的第六个Glu突变为Val,和HbC,其中同样第六个Glu突变为Lys。尽管具有携带有这种突变序列的异常血红蛋白的HbS症状或HbC症状的日本人的数量非常少,但是这些人仍然以一定比例存在。当通过常规的HbA1c测定方法测量具有这种异常血红蛋白症状的患者的血液时,发现HbA1c的测量值(%) (严格地说,糖化血红蛋白例如糖化HbS和糖化HbC的测量值(%))变得高于HPLC方法,无法进行的准确测量值(参见稍后描述的实施例中的比较例2)。

[0007] 专利文献3描述了一种检测样品中存在的糖化血红蛋白的方法,该方法通过脯氨酸特异性内肽酶消化内肽酶处理的含人血红蛋白的样品,并定量获得的糖化五肽的水平,以检测样品中所有糖化血红蛋白,而不考虑糖化血红蛋白的形式,即检测糖化人血红蛋白A、糖化人血红蛋白S和糖化人血红蛋白C。该方法利用了以下事实:脯氨酸特异性内肽酶消化含有血红蛋白A、血红蛋白S和血红蛋白C的样品,在每种情况下都会产生相同的糖化五肽,即血红蛋白A、血红蛋白S和血红蛋白C。

[0008] 通过使用小鼠单克隆抗HbA1c抗体的凝集抑制测量方法进行上述糖化五肽的定量。然而,该方法需要两种类型的肽酶处理步骤,并且操作复杂。

[0009] 引文文献列表

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本专利公开号特开平6-66795

[0012] 专利文献2:日本专利公开号特开平6-167495

[0013] 专利文献3:日本未审查专利申请公开号特表2011-503632

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:Rapidia (注册商标) Auto HbA1c附件

[0016] 非专利文献2:Detamina (注册商标) LHbA1c附件

发明内容

[0017] 技术问题

[0018] 本发明要解决的问题是提供一种即使在含有血红蛋白的血液样品中含有异常血红蛋白例如HbS或HbC的情况下,也能够准确地测定血液中的糖化血红蛋白(%)而不受异常血红蛋白影响的测定方法和测定试剂。

[0019] 解决问题的技术方案

[0020] 作为解决该问题的深入研究的结果,本发明人发现,通过将抗HbA1c单克隆抗体与抗HbA1c的单克隆抗体的单克隆抗体组合,即使在异常血红蛋白样品中,也可以准确地测量血液中的糖化血红蛋白(%),从而完成本发明。具体地,本发明具有以下构成。

[0021] (1) 测定样品中糖化血红蛋白(%)的糖化血红蛋白(%)测定方法,包括以下步骤:

[0022] 通过使样品与不溶性载体接触,将样品中的糖化血红蛋白吸附到不溶性载体上,

[0023] 通过使吸附到不溶性载体上的糖化血红蛋白与抗糖化血红蛋白单克隆抗体接触,形成抗糖化血红蛋白单克隆抗体、糖化血红蛋白和不溶性载体的复合物,和

[0024] 通过使所述复合物与与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体接触来凝集不溶性载体。

[0025] (2) 根据(1)所述的糖化血红蛋白(%)测定方法,其中与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体是不与人IgG反应的抗体。

[0026] (3) 根据(1)或(2)所述的糖化血红蛋白(%)测定方法,其中所述不溶性载体是乳胶。

[0027] (4) 根据(1)至(3)中任一项所述的糖化血红蛋白(%)测定方法,其中所述样品是全血或血细胞。

[0028] (5) 根据(1)至(4)中任一项所述的测定方法,包括光学检测凝集度的步骤。

[0029] (6) 糖化血红蛋白(%)测定试剂,其包含:至少以下两种单克隆抗体:

[0030] 1) 抗糖化血红蛋白单克隆抗体,和

[0031] 2) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体。

[0032] (7) 根据(6)所述的糖化血红蛋白(%)测定试剂,进一步包含不溶性载体。

[0033] (8) 根据(7)所述的糖化血红蛋白(%)测定试剂,其包含第一试剂和第二试剂,其中

[0034] 所述第一试剂包含不溶性载体,并且其中所述第二试剂包含至少以下两种类型的单克隆抗体:

[0035] 1) 抗糖化血红蛋白单克隆抗体,和

[0036] 2) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体。

[0037] (9) 根据(6)至(8)中任一项所述的测定试剂,其中与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体是不与人IgG反应的抗体。

[0038] (10) 根据(6)至(9)中任一项所述的糖化血红蛋白(%)测定试剂,其中所述不溶性载体是乳胶。

[0039] (11) 糖化血红蛋白(%)测定试剂盒,其包含:(6)至(10)中任一项所述的糖化血红蛋白(%)测定试剂。

[0040] (12) 与结合至人糖化血红蛋白的单克隆抗体反应而不与人IgG反应的单克隆抗体。

[0041] (13) 用于减少含有异常血红蛋白的样品中的糖化血红蛋白(%)测量值的偏差的方法,所述方法包括以下步骤:使至少以下两种类型的单克隆抗体、不溶性载体和样品彼此接触:

[0042] 1) 抗糖化血红蛋白单克隆抗体,和

[0043] 2) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体。

[0044] (14) 抑制含有异常血红蛋白的样品中糖化血红蛋白(%)测量值的假高值的方法,所述方法包括以下步骤:使至少以下两种类型的单克隆抗体、不溶性载体和样品彼此接触:

[0045] 1) 抗糖化血红蛋白单克隆抗体,和

[0046] 2) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的单克隆抗体。

[0047] 发明的效果

[0048] 根据本发明,即使血液样品不仅包含正常的血红蛋白而且还包含异常血红蛋白例如HbS和HbC,也可以进行糖化血红蛋白(%)的准确免疫测定。根据本发明,因为可以以相同的方式测量所有样品,而无需特别选择异常血红蛋白样品,所以可以提供适合于自动连续测量的试剂。

具体实施方式

[0049] (抗糖化血红蛋白单克隆抗体)

[0050] 本发明的单克隆抗体包括至少第一单克隆抗体和第二单克隆抗体,并且当测量糖化血红蛋白(%)时将这些抗体组合使用。只要单克隆抗体与人糖化血红蛋白特异性反应,则任何单克隆抗体都可以用作第一单克隆抗体。与人糖化血红蛋白特异性反应是指该抗体与人糖化血红蛋白反应并且基本上不与非糖化人血红蛋白反应。

[0051] 本发明的第一单克隆抗体是识别对糖化血红蛋白例如HbA1c具有特异性的β链N末端区域的单克隆抗体,并且由于该β链N末端区域被嵌入并存在于血红蛋白高级结构内部,用抗糖化血红蛋白单克隆抗体免疫测定糖化血红蛋白通常需要对样品进行变性处理。但是,认为由于通过将糖化血红蛋白吸附到不溶性载体例如乳胶上而改变了糖化血红蛋白的结构,因此暴露了糖化血红蛋白的β链N末端区域,从而能够利用抗糖化血红蛋白抗体进行免疫测定。

[0052] (抗糖化血红蛋白单克隆抗体的单克隆抗体)

[0053] 只要该单克隆抗体具有至少以下1)的性质,则任何单克隆抗体都可以用作本发明的第二单克隆抗体。理想地,第二单克隆抗体是也具有2)性质的单克隆抗体。

[0054] 1) 与抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应

[0055] 2) 不与人IgG反应。

[0056] 使用本发明的第一单克隆抗体和第二单克隆抗体的组合的糖化血红蛋白(%)测定方法是即使在异常血红蛋白例如HbS和HbC的样品的情况下也几乎不受突变影响的糖化血红蛋白(%)测定方法,异常血红蛋白例如HbS和HbC是样品中含有的正常血红蛋白的突变体。本发明的糖化血红蛋白的测定对象包括由这种异常血红蛋白的糖化产生的糖化HbS和糖化HbC,以及正常糖化血红蛋白(HbA1c)。因此,即使样品中含有任何糖化血红蛋白,也可以获得准确的糖化血红蛋白测量值(%)。

[0057] 使用多克隆抗体例如IgG作为第二抗体的常规免疫凝集测定法存在以下问题:当存在异常血红蛋白时,糖化血红蛋白(%)测量值变高并且偏离正常值。然而,如本发明的测定方法那样,通过使用抗糖化血红蛋白单克隆抗体的单克隆抗体作为第二抗体,即使样品中存在异常血红蛋白,也可以准确地测定糖化血红蛋白(%),尽管原因尚不清楚。

[0058] 在本说明书中,当依次进行使第一单克隆抗体和第二单克隆抗体与各自的抗原反应的步骤时,第一单克隆抗体和第二单克隆抗体可以分别称为一抗和二抗。

[0059] 关于单克隆抗体与抗原之间的反应性,同义使用“反应”、“识别”和“结合”。

[0060] 指出本发明的抗体“不与某种化合物反应”是指该抗体基本上不与某种化合物反应,例如,在下文所述的实施例中,这表示使用固相抗原ELISA酶标仪的测量中,小于0.1Abs。

[0061] 尽管用于获得第一单克隆抗体的抗原可以是任何糖化血红蛋白,但是通常优选使用HbA1c,并且HbA1c可以是整个HbA1c或其一部分。在后面所述的实施例中,将HbA1c用作糖化血红蛋白,将HbA0用作非糖化血红蛋白,以获得本发明的第一单克隆抗体。因此,在这种情况下,抗糖化血红蛋白单克隆抗体特别地被称为抗HbA1c单克隆抗体。

[0062] 被识别为用于获取第二单克隆抗体的抗原的第一单克隆抗体可以是整个单克隆抗体或其一部分。

[0063] 本发明的抗体可以容易地通过将作为抗原的物质溶解在溶剂例如磷酸盐缓冲液中,在所述物质中糖化肽(f-VHLT,f-VHLTPEEKYYC:f表示果糖化)结合至载体蛋白(以下称为糖化肽-结合蛋白),然后将此溶液施用于动物进行免疫。载体蛋白可以是牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白(keyhole-limpet hemocyanin)、卵白蛋白等。可以根据需要在溶液中加入适当的佐剂后使用乳剂进行免疫。佐剂可以是广泛使用的佐剂,例如油包水乳液、水包油包水乳液、水包油乳液、脂质体或氢氧化铝凝胶,以及来源于生物成分的蛋白质或肽类物质。例如,可以优选使用弗氏不完全佐剂或弗氏完全佐剂。虽然没有特别限定,但期望的是,适当地选择佐剂的施用途径、施用剂量和施用时间,使得所期望的免疫应答可通过抗原在待免疫的动物中增强。

[0064] 尽管没有特别限制,但是用于免疫的动物的类型优选是哺乳动物,并且可以是小鼠、大鼠和兔子,并且更优选小鼠。可以根据常规技术对动物进行免疫,例如,可以通过将抗原溶液,优选与佐剂的混合物皮下、皮内、静脉内或腹膜内注射给动物来实现免疫。由于免

疫应答通常根据待免疫动物的种类和系统而不同,因此期望根据所使用的动物适当地设定免疫时间表。优选在初次免疫后重复几次抗原施用。

[0065] 尽管在获得单克隆抗体时连续进行以下操作,但是该操作不限于此,并且可以根据例如Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))中描述的方法进行制备单克隆抗体自身的方法。

[0066] 最终免疫后,可通过从被免疫的动物中提取抗体产生细胞脾脏或淋巴结细胞并将其与具有高增殖能力的骨髓瘤细胞融合来产生杂交瘤。优选将具有高抗体产生能力(定量和定性)的细胞用于细胞融合,并且骨髓瘤细胞优选与衍生出待融合抗体产生细胞的动物相容。可以根据本领域已知的方法进行细胞融合,并且可以采用聚乙二醇方法,使用仙台病毒的方法或利用电流的方法。可以根据已知方法增殖获得的杂交瘤,并且可以在确认所产生的抗体的性质的同时选择期望的杂交瘤。杂交瘤可以通过众所周知的方法例如有限稀释法或软琼脂法克隆。

[0067] 将描述获取第一单克隆抗体的方法。考虑产生的抗体实际用于测量的条件,可以有效地选择产生第一单克隆抗体的杂交瘤。例如,第一单克隆抗体可以通过通过ELISA法、RIA法等选择产生与HbA1c反应的抗体的杂交瘤来获得。具体地,第一单克隆抗体可以通过固相抗原ELISA方法选择产生单克隆抗体的杂交瘤来获得,所述杂交瘤对HbA1c具有高反应性,而不与HbA0反应,在固相抗原ELISA方法中,首先使培养上清液中的单克隆抗体与固定化的糖化肽结合蛋白反应,然后与固定化的HbA0反应。

[0068] 具有所需特性的单克隆抗体可以通过如上描述的选择的杂交瘤的大规模培养来产生。尽管不特别限制大规模培养的方法,但是其实例可以包括通过在适当的培养基中培养杂交瘤而在培养基中产生单克隆抗体的方法,以及通过将杂交瘤注射入哺乳动物腹腔内进行增殖而在腹水中产生抗体的方法。单克隆抗体可以通过适当地组合例如阴离子交换层析法、亲和层析法、硫酸铵分级分离法、PEG分级分离法和乙醇分级分离法来纯化。

[0069] 通过选择产生与作为第一单克隆抗体的抗糖化血红蛋白单克隆抗体反应的抗体,来选择产生第二单克隆抗体的杂交瘤。为了减少非特异性反应,优选地,在上述步骤之后添加选择对人IgG的反应性低于对小鼠IgG的反应性的抗体的步骤。

[0070] 具体而言,第二单克隆抗体可以通过固相抗原ELISA法等从培养上清液中的单克隆抗体中首先选择对抗糖化血红蛋白单克隆抗体表现出高反应性的杂交瘤的步骤,以及选择对人IgG的反应性低于对小鼠IgG的反应性的抗体的步骤两个步骤来获得。

[0071] 本发明的抗体可以是完整的抗体分子,也可以是具有抗原抗体反应活性的抗体的功能性片段,可以通过如上所述的动物的免疫步骤得到的抗体,或可以通过基因重组技术得到的抗体或嵌合抗体。功能片段的实例包括F(ab')₂和Fab,并且这些功能片段可以通过用蛋白水解酶(例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)处理如上所述获得的抗体来产生。

[0072] 另外,本发明的第二单克隆抗体可以用作固定在不溶性载体上的固定(固相)抗体,或者用作被本领域技术人员众所周知的常用标记物质标记的标记的抗体,如下文所描述的。这样的固定抗体和标记抗体均包括在本发明的范围内。例如,可以通过使不溶性载体物理吸附或化学结合单克隆抗体(在它们之间可以存在合适的间隔子)来产生固定的抗体。不溶性载体可以由诸如聚苯乙烯树脂的基于聚合物的材料,诸如玻璃的无机材料以及诸如纤维素和琼脂糖的基于多糖的材料制成,并且其形状不受特别限制,可以选自任何形状,例

如板状(例如,微孔板和膜)、珠子或颗粒形状(例如,乳胶颗粒和胶体磁性颗粒)和管状(例如试管)。

[0073] 通过用可以与抗体结合形成标记抗体的标记物质标记本发明的第二单克隆抗体,可以测定样品中的糖化血红蛋白(%)。也可以使用可以结合本发明的第二单克隆抗体的标记抗体,标记蛋白A、标记蛋白G等。标记物质的实例包括酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、亲和素、放射性同位素、胶体金颗粒或有色乳胶。结合标记物质和抗体的方法可以是本领域技术人员可以使用的方法,例如戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶基二硫化物法或高碘酸法,固定和标记的抗体类型以及制备抗体的方法不限于这些实例。例如,当使用酶(例如过氧化物酶或碱性磷酸酶)作为标记物质时,可以通过使用酶的特定底物(例如当酶为辣根过氧化物酶时为,0-苯二胺或3,3',5,5'-四甲基联苯胺,对于ALP而言为磷酸对硝基苯酯)测定酶的活性,当生物素用作标记物质时,通常至少与抗生物素蛋白或酶修饰的抗生物素蛋白反应。

[0074] 在本说明书中,“不溶性载体”可以表示为“固相”,并且用不溶性载体物理或化学地支持抗原或抗体,或者支持状态可以表示为“固定”、“固定的”、“固相的”、“敏化的”,“吸附”和“结合”。如本文所用,术语“检测”或“测量”的含义包括糖化血红蛋白的存在证明和/或定量。

[0075] 在使用本发明的抗体的测定方法中待检测的对象的“样品”可以是包含糖化血红蛋白的任何样品,并且其实例可以主要包括源自活体(生物体)的体液。具体而言,样品是血细胞或全血。这些样品可以直接使用,也可以在用样品稀释剂稀释后或经过其他预处理后使用。

[0076] 对本发明提供的测定试剂的形式没有特别限制,只要该试剂能够测量糖化血红蛋白(%)即可。以下,以典型的粒子凝集免疫测定法即乳胶免疫凝集测定(以下称为LTIA法)为例进行说明。

[0077] <粒子凝集免疫测定法:LTIA法>

[0078] 对于检测样品中存在的糖化血红蛋白(%)的测定试剂,至少需要以下要素:

[0079] (a) 第一单克隆抗体,

[0080] (b) 第二单克隆抗体,和

[0081] (c) 不溶性载体颗粒。

[0082] 测定试剂可优选用于LTIA方法。可以根据直径和类型适当地选择所使用的乳胶颗粒,以便获得期望的性能,例如高灵敏度。乳胶颗粒可以是适合于抗原HbA1c的吸附和结合的任何颗粒。其实例包括聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸(磺酸盐)共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物和乙酸乙烯酯-丙烯酸酯共聚物。尽管对乳胶颗粒的形状没有特别限制,但是平均粒径优选具有足以用肉眼检测或光学检测由于乳胶颗粒表面上的HbA1c和抗体之间的免疫反应以及抗体之间的凝集反应而产生的聚集体的尺寸。平均粒径优选为0.02 μ m至1.6 μ m,特别优选为0.03 μ m至0.5 μ m。可以使用由诸如金属胶体、明胶、脂质体、微胶囊、二氧化硅、氧化铝、炭黑、金属化合物、金属、陶瓷或磁性材料的材料制成的颗粒代替乳胶颗粒。这些颗粒可以包含荧光物质。本发明的不溶性载体优选是不敏化的。含有本发明的乳胶颗粒的试剂适当地含有缓冲成分(缓冲溶液)。

[0083] 可用于本发明的缓冲溶液可以是任何常用的缓冲溶液,其实例包括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,以及Good's缓冲液,例如MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES和HEPES。

[0084] 本发明的试剂期望是两种试剂(两步法),并且可以是三种试剂(三步法)。在两种试剂的情况下,优选将试剂分为含有不溶性载体的第一试剂和含有两种类型的单克隆抗体的第二试剂。可以配置三试剂系统(三步法),使(a)、(b)和(c)具有不同的试剂配置。

[0085] 在乳胶凝集的测量中,可以通过光学或电化学观察产生的凝集程度来测量糖化血红蛋白(%)。用于光学观察的方法的示例包括用于通过光学仪器测量散射光强度、吸光度或透射光强度的方法(端点法、速率法等)。

[0086] 将通过测量样品获得的吸光度等的测量值与通过测量标准物质(具有已知糖化血红蛋白(%)的样品)获得的吸光度等的测量值进行比较,以计算样品中包含的分析物的浓度(定量值)。透射光或散射光的吸光度等的测量可以是单波长测量或双波长测量(两个波长之间的差异或比值)。测量波长通常选自400nm至800nm。

[0087] 本发明样品中的分析物可以通过手动方法进行测量,或者可以通过使用诸如测量设备的设备进行测量。测量设备可以是通用自动分析仪或专用测量设备(专用机器)。专用的测量设备可以是以下使用微通道的检查设备,该微通道用于使样品与试剂混合并使之反应以进行检测。具体地,采用绕水平旋转轴旋转操作的反应盒,并且该反应盒配备有微通道和与微通道连通并将液体样品引入微通道的注入孔,并且包括易于引入稀释剂的装置。反应通道配备有试剂区域,在该试剂区域中掺入了分析试剂,以及用于通过重力干扰沿微通道的液体样品流的装置,从而使液体样品与分析试剂接触,并且将液体样品与分析试剂一起搅拌,以充分促进预定的反应。装置被布置成使得以这种方式配置的反应盒旋转并振动,以允许液体样品流过微通道并与分析试剂接触,并且使得液体样品与分析试剂一起搅拌,因此以促进预定反应并测量液体样品中的可检测反应。

[0088] 本发明的测量优选通过诸如两步法(两试剂法)的通过多个操作步骤实施的方法来进行。

[0089] 即使当血液样品不仅包含正常的血红蛋白而且包含异常血红蛋白如突变体HbS和HbC时,本发明也能够对糖化血红蛋白(%)进行准确的免疫测定。因此,本发明的测定方法也是用于减少含有异常血红蛋白的样品中的糖化血红蛋白(%)测量值的偏差的方法,还是抑制含有异常血红蛋白的样品中的糖化血红蛋白(%)测量值的假高值的方法。

[0090] 在本发明中,测定试剂可分为多个部分以形成糖化血红蛋白(%)测定试剂盒。或者,可将糖化血红蛋白(%)测定试剂盒与其他组成元素一起形成。其他组成元素的实例包括检测所需的另一种试剂、样品的稀释剂、收集样品的工具或说明手册。

[0091] 将参考例更详细地描述本发明。然而,本发明不限于此。

[0092] 实施例

[0093] [实施例] 本发明的测定试剂的产生

[0094] 1. 获得第一单克隆抗体

[0095] 如下制备抗HbA1c单克隆抗体作为本发明的第一单克隆抗体。

[0096] (1) 纯化的HbA0和纯化的HbA1c的制备

[0097] 使用非专利文献(Melisenda J. McDonald等, JBC, 253(7), 2327-2332, (1978年)中描述的使用Bio-Rex70 (Bio-Rad) 进行离子交换层析从人红细胞溶血产物纯化HbA0和

HbA1c,并用于后续实验。

[0098] (2) 制备各种肽和糖化肽

[0099] 使用自动肽合成仪通过Fmoc方法合成并纯化具有两种类型氨基酸序列的肽(VHLTC (SEQ ID NO:1) 和VHLTPEEKYYC (SEQ ID NO:2):字母表示氨基酸的一个字母表示法)。通过HPLC确认每种肽的纯度为95%以上。通过质谱法(MALDI-TOF法)确认,各肽的分子量与理论值相同。

[0100] 通过日本专利公开号特开昭61-172064中描述的方法将两种类型的肽糖化以纯化糖化肽(f-VHLTC和f-VHLTPEEKYYC:f表示果糖基化)。具体地,将具有这两种序列的每种肽与葡萄糖在无水吡啶中反应以合成糖化肽,通过HPLC纯化。通过质谱法(MALDI-TOF法)确认,每种糖化肽的分子量与理论值相同,即,通过将162加到每个肽的分子量而获得的分子量。

[0101] (3) 获得第一单克隆抗体

[0102] 按照如下生产用作第一单克隆抗体的抗HbA1c单克隆抗体。首先,将(2)中合成的糖化肽(f-VHLTPEEKYYC)结合到匙孔血蓝蛋白上,并将其用作免疫原来免疫小鼠。通过选择6种在固相抗原ELISA中与糖化肽结合蛋白反应而不与纯化的HbA0反应的菌株筛选杂交瘤。克隆后,最终获得了在固相抗原ELISA中与纯化的HbA1c反应而不与纯化的HbA0反应的单克隆抗体(抗体68207、68208、68210、68211、68213、68214)。

[0103] 2. 获得第二单克隆抗体

[0104] 按照如下产生抗-HbA1c单克隆抗体的单克隆抗体作为本发明的第二单克隆抗体。

[0105] (1) 免疫

[0106] 将在1中获得的三种不同的小鼠抗HbA1c单克隆抗体(68210、68211、68213: Sekisui Medical预制备)用作免疫原,并且将大鼠用作宿主,通过常规方法进行免疫。在细胞融合之前的3至4天进行最终免疫,收集脾细胞和淋巴结细胞,并通过电融合或PEG与骨髓瘤细胞(SP2/0)融合。将融合后的细胞在96孔板上培养,并在细胞融合后7至8天后收集培养上清液,并如下所述进行筛选。

[0107] (2) 筛选

[0108] 在杂交瘤的筛选中,通过固相抗原ELISA选择与小鼠IgG反应而不与人IgG反应的株。

[0109] (2-1) 固相抗原ELISA

[0110] (i) 将用PBS稀释至1μg/mL的小鼠抗HbA1c单克隆抗体(68208或68214)或人IgG作为固相抗原以50μL/孔分配到用于ELISA的96孔板中,并在室温下静置2个小时。

[0111] (ii) 用0.05% Tween20-PBS (PBST) (400μL/孔) 洗涤3次后,分配1% BSA-PBST (100μL/孔) 作为封闭溶液,并在室温下静置1小时。

[0112] (iii) 除去封闭溶液后,分配50μL/孔的2倍稀释的培养上清液,并在室温下静置1小时。

[0113] (iv) 洗涤3次后,分配50μL/孔的10000倍稀释的HRP标记的山羊抗大鼠多克隆抗体,并使其在室温下静置1小时。

[0114] (v) 洗涤3次后,分配50μL/孔的OPD着色溶液,并使其在室温下静置10分钟。

[0115] (vi) 分配50μL/孔的终止溶液以终止反应后,用酶标仪(Abs. 492nm) 测量吸光度。

[0116] (2-2) 结果

[0117] 总共获得了13个杂交瘤株 (S07201R至S072013R) (表1)。

[0118] [表1]

[0119] (Abs.)

	免疫原	克隆名称	用于筛选的抗原	
			小鼠 IgG	人 IgG
[0120]	68210	S07201R	0.596	0.074
		S07202R	0.521	0.077
	68211	S07203R	2.543	0.063
		S07204R	2.274	0.062
		S07205R	2.819	0.066
		S07206R	2.475	0.083
		S07207R	2.729	0.066
	68213	S07208R	0.486	0.059
		S07209R	0.544	0.062
		S07210R	0.926	0.095
		S07211R	0.529	0.077
[0121]		S07212R	0.879	0.076
		S07213R	0.992	0.072

[0122] (3) 确认获得的抗体的反应性

[0123] 通过筛选选择的杂交瘤通过有限稀释法制成单克隆,并通过常规方法施用于小鼠腹腔以获得腹水。从获得的腹水中纯化抗体,并通过固相抗原ELISA确认反应性。

[0124] (3-1) 固相抗原ELISA

[0125] 除了将68210和68213用作固相抗原之外,使用与(2)筛选相同的方法。

[0126] (3-2) 结果

[0127] 对于任何固相抗原,获得的13种抗体对小鼠IgG(抗小鼠IgG单克隆抗体)的反应性均强于对人IgG的反应性。

[0128] [表2]

固相抗原 一抗	小鼠 IgG		人 IgG
	68210	68213	
S07201R	1.392	0.994	0.063
S07202R	1.185	1.239	0.074
S07203R	1.612	1.432	0.067
S07204R	1.759	1.321	0.052
S07205R	1.662	1.168	0.056
S07206R	1.220	0.546	0.059
S07207R	1.669	1.210	0.054
S07208R	0.576	0.487	0.061
S07209R	0.648	0.672	0.057
S07210R	0.455	0.569	0.058
S07211R	0.308	0.364	0.051
S07212R	0.197	0.304	0.059
S07213R	0.793	0.939	0.053

[0129] (Abs.)

[0130] 3. 免疫测定方法

[0131] (1) 实施例配方

[0132] (i) 第一试剂的组成为如下所示。

[0133] 10mM EPPS (pH 8.0)

[0134] 乳胶颗粒 (平均粒径: 约120nm)

[0135] (ii) 第二试剂的组成为如下所示。

[0136] 10mM Bis-Tris (pH 6.0)

[0137] 一抗 (0.1mg/mL小鼠抗HbA1c单克隆抗体) (表3)

[0138] 二抗 (0.1mg/mL大鼠抗小鼠IgG单克隆抗体) (表3)

[0139] 500mM氯化钠

[0140] 0.05%吐温20

[0141] 0.09%叠氮化钠

[0142] [表3]

[0144]	编号	一抗	二抗
	实施例 1	68210	S07201R
	实施例 2	68211	S07201R
	实施例 3	68213	S07201R
	实施例 4	68207	S07205R
	实施例 5	68211	S07204R
	实施例 6	68211	S07206R
	实施例 7	68211	S07210R
	实施例 8	68211	S07211R
	实施例 9	68211	S07212R
	实施例 10	68213	S07203R
	实施例 11	68213	S07210R
	实施例 12	68213	S07211R
	实施例 13	68213	S07212R
	实施例 14	68213	S07213R
	实施例 15	68214	S07209R
	实施例 16	68214	S07210R
[0145]	实施例 17	68211	S07203R

[0146] (2) 测定方法

[0147] 使用Hitachi 7170自动分析仪进行测量。将6.3μL样品和150μL第一试剂添加到反应池中并在37℃下反应5分钟后,再将50μL第二试剂添加到反应池中并在37℃下反应5分钟后,通过2点末端法(光度点19-34)在主波长660nm和次波长800nm下测量吸光度的变化量。通过使用由Kyowa Medex有限公司制造的用于液体试剂的Determiner calibrator HbA1c作为参考标准,通过制造商规定的方法来制备校准曲线。

[0148] (3) 比较例

[0149] (i) 比较例1:HPLC法(由ARKRAY制造的Adams HA-8180T)

[0150] 使用制造商指定的方法测量各种样品的糖化血红蛋白(%)。

[0151] (ii) 比较例2:使用多克隆抗体作为二抗的LTIA方法(1)(由Kyowa Medex有限公司生产的Determiner L HbA1c)

[0152] 通过使用由Kyowa Medex有限公司生产的Determiner L HbA1c按照制造商指定的方法测量各种样品的糖化血红蛋白(%)。使用Hitachi 7170自动分析仪进行测量。

[0153] (4) 参考例:使用多克隆抗体作为二抗的LTIA方法(2)(由Sekisui Medical有限公司制备)

[0154] 通过使用实施例2中所述的第一试剂和除了加入0.06mg/mL的68210用作一抗，0.05mg/mL山羊抗小鼠IgG多克隆抗体(Fc特异性抗体：由Tanpaku Seisei Kougyou制造)作为二抗之外具有与实施例2相同的成分的第二试剂来测量各种样品的糖化血红蛋白(%)。使用Hitachi 7170自动分析仪进行测量。

[0155] [试验例1]血细胞样品的糖化血红蛋白(%)测量

[0156] (1) 正常Hb样品的糖化血红蛋白含量(%)测量

[0157] 确认与使用现成的产品(由Kyowa Medex有限公司生产的Determiner L HbA1c)的比较例2相比，在参考例和实施例1至17中，可以高准确度地测定正常样品的糖化血红蛋白(%)。

[0158] 用EDTA血液收集管收集的任何正常血液样品(获得自己知情同意的志愿者)在800G离心5分钟，测量用纯水稀释100倍后获得的下部血细胞层的糖化血红蛋白(%)。表4示出了当测定50个样品时与Determiner L HbA1c进行比较的试剂的相关方程和相关系数。

[0159] 在所有情况下，相关系数都是良好的，并且确认在参考例和实施例1至17中，可以在正常样品中高准确度地测量糖化血红蛋白(%)。

[0160] [表4]

编号	相关系数 r^2
参考例	0.9963
实施例1	0.9980
实施例2	0.9949
实施例3	0.9904
实施例4	0.9904
实施例5	0.9975
实施例6	0.9930
实施例7	0.9967
实施例8	0.9959
实施例9	0.9971
实施例10	0.9958
实施例11	0.9970
实施例12	0.9972
实施例13	0.9974
实施例14	0.9975
实施例15	0.9890
实施例16	0.9959
实施例17	0.9935

[0162] (2) 异常血红蛋白样品糖化血红蛋白(%)测量

[0163] 测定了市售的异常Hb样品(购自日本Bizcom公司)的糖化血红蛋白(%)。这些是在收集血液后通过离心分离血细胞层后在-70℃或更低的温度下冷冻保存的血细胞样品。

[0164] (2-1) 含有HbS的样品的糖化血红蛋白的测定(%)

[0165] 由ARKRAY制造的Adams HA-8180T，即比较例1中描述的HPLC方法，可以以变体模式

检测血细胞和全血样品中的异常Hb,即HbS和HbC。所使用的含有HbS的血细胞样品中的HbS(%)为33.2%。

[0166] 通过HPLC法测定上述含有HbS的样品的糖化血红蛋白(%)为6.2%。表5示出了通过HPLC方法用实施例1至10、比较例2和参考例的试剂测量的上述含HbS的样品的糖化血红蛋白(%)的差异。

[0167] 在使用多克隆抗体作为二抗的比较例2中,测量值为6.9%,比HPLC法高0.7%。即使在将多克隆抗体组合为二抗的参考例中,测量值也为6.7%,比HPLC法高0.5%。

[0168] 另一方面,在将本发明的单克隆抗体作为二抗组合的实施例1至10中,测量值为5.9%至6.4%,与HPLC法的差异为-0.2%至0.2%。可以说,当使用单克隆抗体作为含有突变型Hb即HbS的血细胞样品中的二抗时,测量准确度得到了提高。

[0169] [表5]

[0170]

测定方法		与比较例 1 (HPLC 方法) 的差异 糖化血红蛋白 (%)
比较例 1	HPLC 方法	0.0
比较例 2	Determiner L HbA1c	0.7
参考例	本公司制造的试剂: 多克隆抗体	0.5
实施例 1	本公司制造的试剂: 单克隆抗体	-0.1
实施例 2	本公司制造的试剂: 单克隆抗体	-0.2
实施例 3	本公司制造的试剂: 单克隆抗体	-0.1
实施例 4	本公司制造的试剂: 单克隆抗体	-0.1
实施例 5	本公司制造的试剂: 单克隆抗体	0.2

[0171]		隆抗体	
	实施例 6	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.1
	实施例 7	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.1
	实施例 8	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.0
	实施例 9	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.0
	实施例 10	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.2

[0172] (2-2) 含HbC样品的糖化血红蛋白(%)测量

[0173] 通过HPLC法测定所使用的含有HbC的血细胞样品的HbC(%)为31.8%至40.9%。

[0174] 通过HPLC法测定上述含有HbC的样品的糖化血红蛋白(%)为4.8%至5.9%。表6显示了用比较例2、参考例和实施例1的试剂测量的上述含有HbC的样品的糖化血红蛋白(%)与用HPLC法测定的糖化血红蛋白(%)的差异。

[0175] 当使用多克隆抗体作为二抗在比较例2中测量样品时，与HPLC方法的差异高达0.9%至3.1%，从而使得含有HbC的血细胞样品的糖化血红蛋白(%)用比较例2的试剂不能准确测定。在参考例中，与HPLC法的差异为0.5%至1.7%，因此，与比较例2相比，可更准确地测定糖化血红蛋白(%)。

[0176] 在组合了本发明的单克隆抗体作为二抗的实施例1中，与HPLC法的差异为-0.4%至-0.2%，因此即使在含有HbC的血细胞样品中也可以高准确度地测量糖化血红蛋白(%)。

[0177] [表6]

[0178]	样品编号	HbC%	与比较例 1 (HPLC 方法) 的的差异 糖化血红蛋白 (%)		
			比较例 2	参考例	实施例 1

[0179]

		Determiner L HbA1c	本公司制造的 试剂：多克隆 抗体	本公司制造的 试剂：单 克隆抗体
HbC-1	31.8	0.9	0.5	-0.4
HbC-2	35.7	1.7	0.7	-0.2
HbC-3	40.9	2.9	1.7	-0.2
HbC-4	35.2	1.9	1.0	-0.3
HbC-5	40.2	2.3	0.8	-0.4
HbC-6	35.2	2.0	1.1	-0.2
HbC-7	40.5	3.1	1.3	-0.2
HbC-8	35.6	2.2	1.0	-0.3

[0180] 表7示出了用实施例8至17的试剂测量的样品编号HbC-1的结果。比较例1、2、参考例和实施例1的测量结果与表6相同。通过比较例1的HPLC法测量时，HbC-1的血红蛋白(%)为5.8%。在以多克隆抗体为第二抗体的比较例2中测量样品时，测量值与HPLC法的差异为0.9%，比参考例和本发明的方法高，因此用实施例2的试剂不能准确地测定含HbC的样品的糖化血红蛋白(%)。在参考例中，测量值与HPLC法的差异为0.5%，因此，与比较例2相比，可更准确地测定糖化血红蛋白(%)。此外，在实施例8至17中，将本发明的单克隆抗体作为二抗进行组合，测量值与HPLC法的差异为-0.1%至0.3%，因此即使在含有HbC的样品中，也可以高准确度地测量糖化血红蛋白(%)。

[0181] [表7]

[0182]

测定方法		与比较例 1 (HPLC 方法) 的的差异 糖化血红蛋白 (%)
比较例 1	HPLC 方法	0
比较例 2	Determiner L HbA1c	0.9
参考例	本公司制造的试剂：多克隆抗体	0.5
实施例 8	本公司制造的试剂：单克	-0.1

[0183]

	隆抗体	
实施例 9	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.1
实施例 10	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.2
实施例 11	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.2
实施例 12	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.0
实施例 13	本公司制造的试剂：单克隆抗体	-0.1
实施例 14	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.3
实施例 15	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.0
实施例 16	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.2
实施例 17	本公司制造的试剂：单克隆抗体	0.1

[0184] [试验例2]全血样品的糖化血红蛋白(%)测量

[0185] (1) 正常Hb样品的糖化血红蛋白含量(%)测量

[0186] 在比较例3和实施例3、4、8、9、11至13和15中,已证实正常全血样品的糖化血红蛋白(%)与比较例2的使用现成的产品(由Kyowa Medex有限公司生产的Determiner L HbA1c)的血细胞样品的糖化血红蛋白的测量值相比可以高准确度地测量。

[0187] 在由测试实施例1(1)的正常血液样品的测量中使用的EDTA采血管收集的任何正常血液样品中,测量糖化血红蛋白(%)。每个样品使用全血状态无需离心,并用纯水将全血稀释50倍来制备。表8示出了当测量50个样品时试剂的全血样品的测量结果,与用Determiner L HbA1c测定血细胞样品时的测量值的相关系数。在比较例2的试剂中,与使用其他试剂时相比,相关系数最低,不能准确地测量全血样品的糖化血红蛋白(%)。另一方面,在参考例,实施例3、4、8、9、11至13、15中,相关系数良好,确认在正常全血样品中可以高准确度地测量糖化血红蛋白(%)。

[0188] [表8]

[0189]

编号	一抗	二抗	与比较例 2（在测量血细胞样品时）的相关性（相关系数 r^2 ）
比较例 2	Determiner L HbA1c		0.9683
参考例	68210	多克隆抗体	0.9782
实施例 3	68213	S07201R	0.9831
实施例 4	68207	S07205R	0.9827
实施例 8	68211	S07211R	0.9865
实施例 9	68211	S07212R	0.9892
实施例 11	68213	S07210R	0.9856
实施例 12	68213	S07211R	0.9875
实施例 13	68213	S07212R	0.9876
实施例 15	68214	S07209R	0.9878

[0190] (2) 异常血红蛋白样品糖化血红蛋白 (%) 测量

[0191] 使用市售的异常血红蛋白样品 (购自日本Bizcom) 进行测量。样品是采血后在 -70℃ 或更低的温度下冷冻保存的全血样品。

[0192] (2-1) 含有HbS的样品的糖化血红蛋白的测量 (%)

[0193] 通过HPLC法测定所使用的含HbS的全血样品中的HbS (%) 和糖化血红蛋白 (%), 分别为28.8%至37.1%和4.6%至6.5%。

[0194] 表9示出了用比较例2、参考例和实施例3、4、11、13和15的试剂测量的糖化血红蛋白 (%) 的测量值与HPLC方法的测量值的差异。

[0195] 用比较例2的试剂测量的含量比HPLC法高0.5%至1.4%，测量准确度差。

[0196] 用参考例的试剂测得的含量比比较例2好，尽管其含量比HPLC法高0.3%至0.6%。

[0197] 另一方面，用实施例3、4、11、13和15的试剂测得的测量值与HPLC法相比具有 -0.1%至0.3%的小差异，因此测量准确度良好。当将本发明的单克隆抗体用作二抗时，与将多克隆抗体用作二抗 (参考例) 时相比，测量准确度进一步提高。

[0198] [表9]

[0199]

样品 编号	HbS 含量	与比较例 1 (HPLC 方法) 的差异 糖化血红蛋白 (%)						
		比较 例 2	参考 例	实施 例 3	实施 例 4	实施 例 11	实施 例 13	实施 例 15
HbS-2	28.8	1.1	0.4	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.0
HbS-3	37.1	1.4	0.3	0.0	0.0	-0.1	-0.1	-0.2
HbS-4	33.5	0.5	0.5	-0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
HbS-5	34.8	0.9	0.6	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
HbS-6	32.7	0.6	0.5	0.0	0.1	0.1	0.0	-0.1

[0200] (2-2) 含HbC样品的糖化血红蛋白 (%) 测量

[0201] 含有HbC的全血样品的HbC (%) 和糖化血红蛋白 (%) 通过HPLC法测量, 分别为34.9%至39.4%和5.0%至5.5%。

[0202] 表10示出了用比较例2、参考例和实施例3、8、9、12和13的试剂测得的(糖化血红蛋白 (%)) 的测量值与HPLC方法测得的测量值的差异。

[0203] 首先, 比较例2中测量的测量值比HPLC方法大幅提高了3.4%至4.7%。

[0204] 参考例比比比较例2好, 尽管该值比HPLC法高0.9%至1.1%。

[0205] 另一方面, 实施例3、8、9、12和13的试剂与HPLC方法相差0.1%至0.4%, 因此测量准确度良好。可以说, 当将本发明的单克隆抗体用作二抗时, 测量准确度得以提高。

[0206] [表10]

[0207]

样品编 号	HbC 含 量	与比较例 1 (HPLC 方法) 的差异 糖化血红蛋白 (%)						
		比较 例 2	参考 例	实施 例 3	实施 例 8	实施 例 9	实施 例 12	实施 例 13
HbC-9	34.9	3.4	1.1	0.3	0.1	0.4	0.3	0.2
HbC-10	39.4	4.7	0.9	0.4	0.1	0.3	0.1	0.2

[0208] 工业适用性

[0209] 根据本发明, 不仅在血液样品包含正常的血红蛋白时, 即使在包含异常血红蛋白如HbS和HbC时, 也可以进行糖化血红蛋白 (%) 的准确免疫测定。