



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01814582.5

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1215332C

[22] 申请日 2001.7.27 [21] 申请号 01814582.5  
 [30] 优先权  
     [32] 2000. 7.27 [33] JP [31] 226805/2000  
 [86] 国际申请 PCT/JP2001/006500 2001.7.27  
 [87] 国际公布 WO2002/010760 日 2002.2.7  
 [85] 进入国家阶段日期 2003.2.24  
 [71] 专利权人 协和梅迪克斯株式会社  
     地址 日本东京  
     共同专利权人 爱赐爱儿股份有限公司  
 [72] 发明人 重信香代子  
     审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
 商标事务所  
 代理人 陈 昕

权利要求书 2 页 说明书 16 页

[54] 发明名称 采用不溶性载体粒子的免疫测定方法、免疫测定试剂及其稳定化方法

[57] 摘要

提供测定值准确性和可靠性高的能长期保存的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂，使用该试剂的免疫测定方法以及使该试剂稳定的方法。在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂(但碳酸类缓冲剂除外)和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物存在于水性介质中时，用不溶性载体粒子进行抗原抗体反应的免疫测定方法，在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂(但碳酸类缓冲剂除外)、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物以及不溶性载体粒子的免疫测定用试剂，在含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂(但碳酸类缓冲剂除外)和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的水性介质中含有不溶性载体粒子，提供含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种免疫测定方法，其特征在于在含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的除碳酸类缓冲剂之外的缓冲剂和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的水性介质中，用不溶性载体粒子进行抗原抗体反应。
2. 权利要求 1 记载的免疫测定方法，其特征在于解离碳酸氢根离子的碳酸化合物为碱金属化合物。
3. 权利要求 1 或 2 记载的免疫测定方法，其特征在于碳酸氢根离子浓度为 0.05 ~ 500mmol/L。
4. 权利要求 1 或 2 记载的免疫测定方法，其特征在于在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂浓度在 0.1 ~ 500mmol/L。
5. 权利要求 1 或 2 记载的免疫测定方法，其特征在于不溶性载体粒子为结合有与测定对象物质反应的抗体的粒子。
6. 权利要求 1 或 2 记载的免疫测定方法，其特征在于不溶性载体粒子为结合有测定对象物质的粒子。
7. 权利要求 1 或 2 记载的免疫测定方法，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。
8. 权利要求 1 或 2 记载的免疫测定方法，其特征在于免疫测定方法为比浊免疫测定方法。
9. 一种免疫测定用试剂，其特征在于含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的除碳酸类缓冲剂之外的缓冲剂、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物和不溶性载体粒子。
10. 权利要求 9 记载的免疫测定用试剂，其特征在于在水性介质中含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的除碳酸类缓冲剂之外的缓冲剂、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物和不溶性载体粒子。
11. 权利要求 9 或 10 记载的免疫测定用试剂，其特征在于解离碳酸氢根离子的碳酸化合物为碱金属化合物。
12. 权利要求 9 或 10 记载的免疫测定用试剂，其特征在于碳酸氢根离子的浓度为 0.05 ~ 500mmol/L。

13. 权利要求 9 或 10 记载的免疫测定用试剂，其特征在于在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂的浓度在 0.1 ~ 500mmol/L。

14. 权利要求 9 或 10 记载的免疫测定用试剂，其特征在于不溶性载体粒子是在粒子上结合了与测定对象物质反应的抗体的。

15. 权利要求 9 或 10 记载的免疫测定用试剂，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。

16. 含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于在含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的除碳酸类缓冲剂之外的缓冲剂和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的水性介质中含有不溶性载体粒子。

17. 权利要求 16 记载的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于解离碳酸氢根离子的碳酸化合物为碱金属化合物。

18. 权利要求 16 或 17 记载的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于碳酸氢根离子的浓度为 0.05 ~ 500mmol/L。

19. 权利要求 16 或 17 记载的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂的浓度在 0.1 ~ 500mmol/L。

20. 权利要求 16 或 17 记载的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于不溶性载体粒子为结合有与测定对象物质反应的抗体的粒子。

21. 权利要求 16 或 17 记载的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。

采用不溶性载体粒子的免疫测定方法、免疫测定试剂及其稳定化方法

## 技术领域

本发明涉及用不溶性载体粒子的免疫测定方法，含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂以及使含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂稳定化的方法。

## 技术背景

不溶性载体粒子广泛应用于临床检查领域中的测定检体中抗原或抗体的免疫测定方法。但是，在使用长期保存的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂时，存在测定值不稳定的问题。结果经常不能绘制相同灵敏度的标准曲线，成为测定误差的原因。

## 发明内容

本发明的目的是提供测定值准确性和可靠性高的能长期保存的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂、使用该试剂的免疫测定方法以及使该试剂稳定化的方法。

本发明第 1 发明涉及一种免疫测定方法，其特征在于在含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的水性介质中，用不溶性载体粒子进行抗原抗体反应。本发明第 2 发明的免疫测定方法，其特征在于解离碳酸氢根离子的碳酸化合物为碱金属化合物。本发明第 3 发明的免疫测定方法，其特征在于碳酸氢根离子浓度在 0.05 ~ 500mmol/L。本发明第 4 发明的免疫测定方法，其特征在于在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂浓度在 0.1 ~ 500mmol/L。本发明第 5 发明的免疫测定方

法，其特征在于不溶性载体粒子为结合有与测定对象物质反应的抗体的粒子。本发明第 6 发明的免疫测定方法，其特征在于不溶性载体粒子为结合有测定对象物质的粒子。本发明第 7 发明的免疫测定方法，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。本发明第 8 发明的免疫测定方法，其特征在于免疫测定方法为比浊免疫测定方法。本发明第 9 发明涉及免疫测定用试剂，其特征在于含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物以及不溶性载体粒子。本发明第 10 发明涉及免疫测定用试剂，其特征在于在水性介质中含有在中性或碱性范围有缓冲能力的缓冲剂、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物以及不溶性载体粒子。本发明第 11 发明的免疫测定用试剂，其特征在于解离碳酸氢根离子的碳酸化合物为碱金属化合物。本发明第 12 发明的免疫测定用试剂，其特征在于碳酸氢根离子的浓度为  $0.05 \sim 500\text{mmol/L}$ 。本发明第 13 发明的免疫测定用试剂，其特征在于在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂的浓度在  $0.1 \sim 500\text{mmol/L}$ 。本发明第 14 发明的免疫测定用试剂，其特征在于不溶性载体粒子为在粒子上结合了与测定对象物质反应的抗体的物质。本发明第 15 发明的免疫测定用试剂，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。本发明第 16 发明涉及含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于不溶性载体粒子存在于含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的水性介质中。本发明第 17 发明的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于解离碳酸氢根离子的碳酸化合物为碱金属化合物。本发明第 18 发明的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于碳酸氢根离子的浓度为  $0.05 \sim 500\text{mmol/L}$ 。本发明第 19 发明的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂的浓度在  $0.1 \sim 500\text{mmol/L}$ 。本发明第 20 发明的含

不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于不溶性载体粒子为结合有与测定对象物质反应的抗体的粒子。本发明第 21 发明的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法，其特征在于不溶性载体粒子为胶乳。

### 最佳实施方式

本发明中，在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）若是在 pH7 以上具有缓冲作用的缓冲剂，则没有特别限制。优选在 pH7~12 具有缓冲作用的缓冲剂，特别优选在 pH8~11 具有缓冲作用的缓冲剂。具体可以列举出有机胺类缓冲剂、good's 缓冲剂、生物化学用缓冲剂等。

上述的生物化学用缓冲剂可以列举出咪唑缓冲剂、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲剂、柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲剂、盐酸-巴比妥钠-醋酸钠缓冲剂、磷酸二氢钾-磷酸氢二钠缓冲剂、磷酸二氢钾-硼砂缓冲剂、磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲剂、盐酸-三甲吡啶缓冲剂、盐酸-巴比妥钠缓冲剂、盐酸-三（羟甲基）氨基甲烷缓冲剂、盐酸-硼砂缓冲剂、硼酸-碳酸钠缓冲剂、硼酸-硼砂缓冲剂、盐酸-氨基甲基丙二醇缓冲剂、氯化铵-氨缓冲剂、甘氨酸-氢氧化钠缓冲剂、硼酸-氢氧化钠缓冲剂、盐酸-二甲基甘氨酸钠缓冲剂、硼砂-氢氧化钠缓冲剂、硼砂-碳酸钠缓冲剂、甘氨酸-氯化钠-盐酸缓冲剂、柠檬酸氢二钠-盐酸缓冲剂、柠檬酸氢二钠-氢氧化钠缓冲剂、硼砂-氯化钠缓冲剂、巴比妥钠-醋酸钠-盐酸缓冲剂、硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲剂、三-马来酸缓冲剂、马来酸盐缓冲剂、巴比妥-醋酸盐缓冲剂、巴比妥缓冲剂、Michaelis 缓冲剂、Clark-Lubs' 缓冲剂、Atkins-Pantin 缓冲剂、Paritish 缓冲剂、Kolthoff's 缓冲剂、MacIlvaine 缓冲剂、Hasting-Sendroi 缓冲剂、Britton-Robinson 缓冲剂、Sørensen 缓

冲剂等。

上述的有机氨类缓冲剂可以列举出二乙醇氨缓冲剂、2-乙氨基乙醇缓冲剂、2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲剂、N-甲基-D-葡萄糖胺缓冲剂等。

上述的 good's 缓冲剂可以列举出 MES(2-吗啉基乙烷磺酸)缓冲剂、二-三[二(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷]缓冲剂、ADA[N-(2-乙酰胺)亚氨基二醋酸]缓冲剂、PIPES[哌嗪-N,N'-二(2-乙磺酸)]缓冲剂、ACES{2-[N-(2-乙酰胺)氨基]乙磺酸}缓冲剂、MOPSO(3-吗啉基-2-羟丙烷磺酸)缓冲剂、BES{2-[N,N-二(2-羟乙基)氨基]乙磺酸}缓冲剂、MOPS(3-吗啉基丙磺酸)缓冲剂、TES<2-[N-[三(羟甲基)甲基]氨基]乙磺酸>缓冲剂、HEPES[N-(2-羟乙基)-N'-(2-磺乙基)哌嗪]缓冲剂、DIPSO{3-[N,N-二(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸}缓冲剂、TAPSO<2-羟基-3-[[N-三(羟甲基)甲基]氨基]丙磺酸>缓冲剂、POPSO[哌嗪-N,N'-二(2-羟丙烷-3-磺酸)]缓冲剂、HEPPSO[N-(2-羟乙基)-N'-(2-羟基-3-磺丙基)哌嗪]缓冲剂、EPPS[N-(2-羟乙基)-N'-(3-磺丙基)哌嗪]缓冲剂、麦黄酮[N-三(羟甲基)甲基甘氨酸]缓冲剂、N-二(羟乙基)甘氨酸[N,N-二(2-羟乙基)甘氨酸]缓冲剂、TAPS{3-[N-三(羟甲基)甲基]氨基丙磺酸}缓冲剂、CHES[2-(N-环己氨基)乙磺酸]缓冲剂、CAPSO[3-(N-环己氨基)-2-羟基丙磺酸]缓冲剂、CAPS[3-(N-环己氨基)丙磺酸]缓冲剂等。

另外，本发明中的在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂为碳酸类缓冲剂以外的缓冲剂。此处，碳酸类缓冲剂为以碳酸盐为基础的缓冲剂，所说的碳酸类缓冲剂可以列举出如碳酸钠-碳酸氢钠类缓冲剂、碳酸钾-碳酸氢钾类缓冲剂等。

对在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂的浓度没有特别的限制，优选浓度在 0.1 mmol/L ~ 500mmol/L，更优选浓度在 1 mmol/L ~ 100mmol/L，特别优选浓度在 5 ~ 50mmol/L。

本发明中，解离碳酸氢根离子的碳酸化合物若是释放碳酸氢根离子的化合物，则没有特别限制，可以列举出碱金属化合物或碱土类金

属化合物等。具体可以列举如碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸氢镁、碳酸氢钙等，特别优选碳酸氢钠、碳酸氢钾等碱金属化合物。

另外，解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的浓度没有特别限制，优选浓度在 0.05 ~ 500mmol/L，更优选浓度在 0.1mmol/L ~ 100mmol/L，特别优选浓度在 1 ~ 50mmol/L。

本发明中的水性介质可以列举出水、更具体可以列举精制水，根据需要也可含有酶、辅酶、氯化钠等可溶性盐类、Triton X-100、吐温 20 等表面活性剂、稳定剂和迭氮化钠等防腐剂等。

本发明中对不溶性载体粒子没有特别的限制，可以列举出有机高分子物质的微粒或无机氧化物的微粒，或用有机物质等对有机高分子物质或无机氧化物的表面进行处理的微粒。对不溶性载体的材质没有特别限制，优选在反应液中能够均匀混悬。

另外，对不溶性载体粒子的粒径没有特别限制，优选粒径在 0.4 ~ 0.8 $\mu\text{m}$ ，更优选的不溶性载体粒子可以列举如聚苯乙烯胶乳等胶乳。胶乳的材质可以列举出聚苯乙烯胶乳等苯乙烯类胶乳、丙烯酸类胶乳等。另外，为使其负载电荷，也可优选使用丙烯酸类单体或有磺酸的单体等聚合形成的聚苯乙烯胶乳。

不溶性载体粒子在反应液中的浓度或在试剂中的浓度没有特别限制，优选占溶液的 0.005 ~ 2 重量%。

本发明的免疫测定方法中对测定对象物质没有特别限制，可以列举出铁蛋白、血红蛋白 A1c（以下记做 HbA1c）等抗原或与其对应的抗体。

本发明中，用不溶性载体粒子的抗原抗体反应为不溶性载体粒子作为固定相的抗原抗体反应，作为固定相使用的不溶性载体粒子，可以是预先结合（担载）有测定对象物质或与测定对象物质反应的抗体的粒子，也可是实质上没有结合测定对象物质或与测定对象物质反应的抗体的粒子。在本发明的水性介质中，若是用不溶性载体粒子进行抗原抗体反应的免疫测定方法则没有特别限制，可以列举如比浊免疫测定方法。

本发明的免疫测定方法包括下述工序，1) 在含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的水性介质中，添加上述的不溶性载体粒子，使之混悬的工序，2) 含不溶性载体粒子的混悬液和含测定对象物质的样品进行反应的工序，3) 用该反应测定生成的不溶性载体粒子的凝集的工序。

作为不溶性载体粒子，用实质上没有与测定对象物质或与测定对象物质对应的抗体结合（担载）的状态的物质时，含该不溶性载体粒子的混悬液和含测定对象物质的样品反应的工序后，进行添加含与测定对象物质反应的抗体的试剂的工序。

本发明的免疫测定试剂，若是含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物和不溶性载体粒子的试剂，就没有特别限定，其中在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物和不溶性载体粒子也可以包含在水性介质中。在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物、不溶性载体粒子以及水性介质可以分别使用与前述相同的物质。本发明的试剂根据需要可以含有抗体，抗原，酶，辅酶，氯化钠等可溶性盐类，Triton X-100、吐温 20 等表面活性剂，稳定剂和迭氮化钠等防腐剂等。

本发明的免疫测定试剂可以用试剂盒保存使用。试剂盒的形态可以列举出 2 试剂类试剂盒或 3 试剂类试剂盒。2 试剂类试剂盒可以列举出如由在水性介质中含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的第 1 试剂，在水性介质中含有结合了与测定对象物质反应的抗体的不溶性载体粒子、在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的第 2 试剂组成的试剂盒；由在水性介质中含有实质上没有结合测定对象物质或对于测定对象物质的抗体的不溶性载体粒子、在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲

剂（但碳酸类缓冲剂除外）和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的第 1 试剂，在水性介质中含有与该测定对象物质反应的抗体的第 2 试剂组成的试剂盒。

本发明的含不溶性载体粒子的免疫测定试剂的稳定化方法，不溶性载体粒子若是存在于含在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外）以及解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的水性介质中的方法，则没有特别的限制，在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂（但碳酸类缓冲剂除外），解离碳酸氢根离子的碳酸化合物，不溶性载体粒子和水性介质可以分别使用与前述相同的物质。水性介质中根据需要可以含有抗体，抗原，酶，辅酶，氯化钠等可溶性盐类，Triton X-100、吐温 20 等表面活性剂，稳定剂和迭氮化钠等防腐剂等。

另外，本发明的免疫测定试剂的保存条件没有特别限制，可以列举出如 0~30℃，优选 0~5℃。基于本发明的含不溶性载体粒子的免疫测定试剂的稳定化方法，考虑到是在易使以往试剂不稳定化的非密闭条件，则试剂的稳定化效果更好。

下面列举具体实施例对本发明进行说明，本发明不仅限于该实施例。

### 实施例 1

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

#### R1 试剂

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂（同仁化学社制，pH8.4）

3.26g/L

Triton X-100（Sigma 社制）	0.1g/L
氯化钠（和光纯药社制）	17.5g/L
迭氮化钠（关东化学社制）	0.01g/L
碳酸氢钠（关东化学社制）	0.2g/L

#### R2 试剂（抗体敏感胶乳混悬液）

咪唑缓冲剂（半井化学药品社制，pH8.4） 0.68g/L

Triton X-100 (Sigma 社制)	0.15g/L
碳酸氢钠 (关东化学社制)	0.2g/L
担载抗体胶乳 (参考例 1 制备)	0.1 重量%

### 实施例 2

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

#### R1 试剂

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH8.4)  
3.26g/L

Triton X-100 (Sigma 社制)	0.1g/L
氯化钠 (和光纯药社制)	17.5g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.01g/L
碳酸氢钠 (关东化学社制)	0.4g/L

#### R2 试剂 (抗体敏感胶乳混悬液)

咪唑缓冲剂 (半井化学药品社制, pH8.4)	0.68g/L
Triton X-100 (Sigma 社制)	0.15g/L
碳酸氢钠 (关东化学社制)	0.4g/L
担载抗体胶乳 (参考例 1 制备)	0.1 重量%

### 实施例 3

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

#### R1 试剂

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH8.4)  
3.26g/L

Triton X-100 (Sigma 社制)	0.1g/L
氯化钠 (和光纯药社制)	17.5g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.01g/L
碳酸氢钠 (关东化学社制)	0.6g/L

#### R2 试剂 (抗体敏感胶乳混悬液)

咪唑缓冲剂 (半井化学药品社制, pH8.4)	0.68g/L
-------------------------	---------

Triton X-100 (Sigma 社制)	0.15g/L
碳酸氢钠 (关东化学社制)	0.6g/L
担载抗体胶乳 (参考例 1 制备)	0.1 重量%

## 比较例 1

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

## R1 试剂

N-二(羧乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH8.4)  
3.26g/L

Triton X-100 (Sigma 社制)	0.1g/L
氯化钠 (和光纯药社制)	17.5g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.01g/L

## R2 试剂 (抗体敏感胶乳混悬液)

咪唑缓冲剂 (半井化学药品社制, pH8.4) 0.68g/L

Triton X-100 (Sigma 社制)	0.15g/L
担载抗体胶乳 (参考例 1 制备)	0.1 重量%

## 实施例 4

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

## R1 试剂 (胶乳混悬液)

N-二(羧乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH7.8)	3.26g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L
碳酸氢钠 (关东化学社制)	0.1g/L
胶乳 (粒径 0.0775 $\mu$ m、积水化学社制)	0.033 重量%

## R2 试剂

N-二(羧乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH7.0)  
3.26g/L

氯化钠 (和光纯药社制)	15.0g/L
吐温 20 (和光纯药社制)	2.0g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L
抗人 HbA1c 小鼠单克隆抗体	0.025g (IgG 换算)/L

抗小鼠 IgG 山羊多克隆抗体（和光纯药社制）

0.04g(IgG 换算)/L

### 实施例 5

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

#### R1 试剂（胶乳混悬液）

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂（同仁化学社制，pH7.8） 3.26g/L

迭氮化钠（关东化学社制） 0.1g/L

碳酸氢钠（关东化学社制） 0.2g/L

胶乳（粒径 0.0775 $\mu$ m、积水化学社制） 0.033 重量%

#### R2 试剂

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂（同仁化学社制，pH7.0）  
3.26g/L

氯化钠（和光纯药社制） 15.0g/L

吐温 20（和光纯药社制） 2.0g/L

迭氮化钠（关东化学社制） 0.1g/L

抗人 HbA1c 小鼠单克隆抗体 0.025g(IgG 换算)/L

抗小鼠 IgG 山羊多克隆抗体（和光纯药社制）

0.04g(IgG 换算)/L

### 实施例 6

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

#### R1 试剂（胶乳混悬液）

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂（同仁化学社制，pH8.4） 3.26g/L

迭氮化钠（关东化学社制） 0.1g/L

碳酸氢钠（关东化学社制） 0.2g/L

胶乳（粒径 0.0775 $\mu$ m、积水化学社制） 0.033 重量%

#### R2 试剂

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂（同仁化学社制，pH7.0）

## 3.26g/L

氯化钠 (和光纯药社制)	15.0g/L
吐温 20 (和光纯药社制)	2.0g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L
抗人 HbA1c 小鼠单克隆抗体	0.025g (IgG 换算)/L
抗小鼠 IgG 山羊多克隆抗体 (和光纯药社制)	0.04g (IgG 换算)/L

## 实施例 7

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

## R1 试剂 (胶乳混悬液)

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH8.4)	3.26g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L
碳酸氢钠 (关东化学社制)	0.3g/L
胶乳 (粒径 0.0775 $\mu$ m、积水化学社制)	0.033 重量%

## R2 试剂

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH7.0)	3.26g/L
氯化钠 (和光纯药社制)	15.0g/L
吐温 20 (和光纯药社制)	2.0g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L
抗人 HbA1c 小鼠单克隆抗体	0.025g (IgG 换算)/L
抗小鼠 IgG 山羊多克隆抗体 (和光纯药社制)	0.04g (IgG 换算)/L

## 比较例 2

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

## R1 试剂 (胶乳混悬液)

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH7.8)	3.26g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L

胶乳 (粒径 0.0775 $\mu$ m、积水化学社制)	0.033 重量%
R2 试剂	
N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH7.0)	
3.26g/L	
氯化钠 (和光纯药社制)	15.0g/L
吐温 20 (和光纯药社制)	2.0g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L
抗人 HbA1c 小鼠单克隆抗体	0.025g (IgG 换算)/L
抗小鼠 IgG 山羊多克隆抗体 (和光纯药社制)	
	0.04g (IgG 换算)/L

### 比较例 3

配制下述的 R1 试剂和 R2 试剂。

#### R1 试剂 (胶乳混悬液)

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH8.4)	3.26g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L
胶乳 (粒径 0.0775 $\mu$ m、积水化学社制)	0.033 重量%

#### R2 试剂

N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲剂 (同仁化学社制, pH7.0)	
3.26g/L	
氯化钠 (和光纯药社制)	15.0g/L
吐温 20 (和光纯药社制)	2.0g/L
迭氮化钠 (关东化学社制)	0.1g/L
抗人 HbA1c 小鼠单克隆抗体	0.025g (IgG 换算)/L
抗小鼠 IgG 山羊多克隆抗体 (和光纯药社制)	
	0.04g (IgG 换算)/L

### 参考例 (担载抗体胶乳的配制)

向平均粒子 0.31 $\mu$ m 的 10%聚苯乙烯胶乳液 (JSR 社制) 1 体积中

添加 1/60mol/L 的 PBS 溶液（用 1mol/L 的盐酸或氢氧化钠水溶液配制至 pH7.4）9 体积，稀释胶乳，配成 1%的胶乳液。抗人铁蛋白抗体（多克隆抗体、协和梅迪克斯社制）用 1/60mol/L 的 PBS 溶液稀释至蛋白浓度为 50 $\mu$ g/ml，作为有敏感作用的抗体液。1%胶乳液 600 $\mu$ l 在 25 $^{\circ}$ C 的恒温箱中磁力搅拌机搅拌的同时，迅速添加抗体液 1200 $\mu$ l，25 $^{\circ}$ C 搅拌 2 小时。然后，添加 3ml 下述的封端液 1，25 $^{\circ}$ C 连续搅拌 2 小时。然后，4 $^{\circ}$ C，15,000rpm，离心 1 小时。向得到的沉淀中添加 4ml 封端液 1，同样地离心分离，清洗沉淀。清洗操作重复 3 次后，沉淀作为担载抗体的胶乳使用。

#### 封端液 1

咪唑缓冲液 0.68g 中添加 BSA（牛血清白蛋白）6g，Triton X-100（Sigma 社制）0.15g，20 $^{\circ}$ C 测定 pH 的同时，添加 1mol/L 的盐酸或氢氧化钠溶液，调至 pH 为 7.4，加精制水至全量为 1,000ml，配制成封端液 1。

#### 试验例 1

用实施例 1~3 和比较例 1 配制的各 R1 试剂和各 R2 试剂，采用下述的方法测定血清检体中的铁蛋白浓度。测定铁蛋白浓度时，将刚配制的各 R1 试剂和各 R2 试剂注入自动分析机用容器中，分别使用 4 $^{\circ}$ C 密封保存 3 天后刚开封的试剂（刚开封），开封后在 4 $^{\circ}$ C 保存 14 天的试剂（开封保存 14 天）和开封后在 4 $^{\circ}$ C 保存 28 天的试剂（开封保存 28 天）。

#### 血清检体的配制

用采血管（VENJECT 真空采血管、TERUMO 社制）采取人血液后，放置 2 小时得到的上清液作为血清检体，使用前冷冻保存（-20 $^{\circ}$ C），定量即刻前溶解使用。

#### 用 R1 试剂和 R2 试剂测定铁蛋白的浓度

用刚开封的 R1 试剂和 R2 试剂、配制成浓度为 10.9、21.9、43.8、87.5、175ng/ml 的铁蛋白（Scripps 社制）标准液绘制标准曲线。

血清中铁蛋白的测定，向 R1 试剂 140 $\mu$ l 中添加血清检体 10 $\mu$ l，在 37 $^{\circ}$ C 反应 6 分钟后，添加 R2 试剂 150 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 反应 13 分钟后，在主波长 750nm、副波长 800nm 处用两点法（测光点 21-39）测定吸光度变化量。使用日立自动分析装置 7170 型作为测定仪。

用实施例 1~3 和比较例 1 配制的试剂，测定铁蛋白浓度（ng/ml）的结果如表 1 所示。

表 1

试剂开封后的天数(天)	实施例 1	实施例 2	实施例 3	比较例 1
0	61	62	62	62
14	66	62	60	74
28	69	62	57	83

如表 1 所示，使用没有添加碳酸氢钠的 R1 试剂和 R2 试剂的比较例 1 的情况下，随试剂开封后天数的增加，铁蛋白的测定值发生很大变化，使用添加了碳酸氢钠的 R1 试剂和 R2 试剂的实施例 1~3 的情况下，可以看出，试剂开封后即使经过数天，铁蛋白的测定值也没有发生很大变化。

#### 试验例 2

用实施例 4、5 和比较例 2 以及实施例 6、7 和比较例 3 配制的各 R1 试剂和各 R2 试剂，采用下述的方法测定检体中 HbA1c 的血红蛋白的比例（以下称 HbA1c 的浓度）。测定 HbA1c 的浓度时，对于 R1 试剂，刚配制的各 R1 试剂注入自动分析机用容器，使用 4 $^{\circ}$ C 密封保存 3 天后刚开封的试剂（刚开封），在开封状态 4 $^{\circ}$ C 保存 14 天的试剂（开封保存 14 天）和在开封状态 4 $^{\circ}$ C 保存 28 天的试剂（开封保存 28 天）。另外，对于 R2 试剂，刚配制的各 R2 试剂注入自动分析机用容器，使用 4 $^{\circ}$ C 密封保存 3 天后刚开封的试剂。

#### 检体的配制

用 EDTA 采血管（VENJECT 真空采血管、TERUMO 社制）采取人血液后，放置 2 小时，取沉淀的血细胞层 10 $\mu$ l，用精制水 1ml 稀释。使用前-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存，使用前溶解作为检体使用。

### 用 R1 试剂和 R2 试剂测定 HbA1c 的浓度

用刚开封的试剂，通过自动糖血红蛋白分析仪 HLC-723GHbV（东曹社制）测定 HbA1c 值（=HbA1c 浓度），使用分别为 0.0%、4.2%、7.7%、11.3%、14.8% 的标准检体绘制标准曲线。

检体中 HbA1c 浓度的测定，R1 试剂 240 $\mu$ l 中添加上述配制的检体 3.2 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟后，添加 R2 试剂 80 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟后，在主波长 450nm、副波长 800nm 处用两点法（测光点 16-34）测定吸光度变化量。使用日立自动分析装置 7170 型作为测定仪。

用实施例 4、5 和比较例 2 配制的试剂测定 HbA1c 浓度（%）的结果如表 2 所示，用实施例 6、7 和比较例 3 配制的试剂测定 HbA1c 浓度（%）的结果分别如表 3 所示。

表 2

R1 试剂开封后天数（天）	实施例 4	实施例 5	比较例 2
0	6.0	6.1	6.0
14	6.0	6.0	6.4
28	6.1	5.8	6.8

表 3

R1 试剂开封后天数（天）	实施例 6	实施例 7	比较例 3
0	6.0	6.1	6.1
14	6.4	6.1	6.8
28	6.5	6.1	7.5

如表 2 和表 3 所示，使用没有添加碳酸氢钠的 R1 试剂的比较例 2、3 的情况下，随 R1 试剂开封后天数的增加，HbA1c 的测定值发生很大变化，使用添加了碳酸氢钠的 R1 试剂的实施例 4~7 的情况下可以看出，即使 R1 试剂开封后经过数天，HbA1c 的测定值也没有发生很大变化。

通过本发明，由于抑制不溶性载体粒子的非特异性凝集，可以进行特异的定量，提供了测定值的准确性和可靠性高的免疫测定方法。另外，通过本发明，提供了即使长时间保存，也能抑制非特异性凝集的免疫测定试剂。而且，通过本发明提供了含不溶性载体粒子的免疫测定试剂的长期稳定保存的方法。

专利名称(译)	采用不溶性载体粒子的免疫测定方法、免疫测定试剂及其稳定化方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1215332C</a>	公开(公告)日	2005-08-17
申请号	CN01814582.5	申请日	2001-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社 爱赐爱儿股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社 爱赐爱儿股份有限公司		
[标]发明人	重信香代子		
发明人	重信香代子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54313		
代理人(译)	陈昕		
优先权	2000226805 2000-07-27 JP		
其他公开文献	CN1449494A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供测定值准确性和可靠性高的能长期保存的含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂，使用该试剂的免疫测定方法以及使该试剂稳定的方法。在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂(但碳酸类缓冲剂除外)和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物存在于水性介质中时，用不溶性载体粒子进行抗原抗体反应的免疫测定方法，在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂(但碳酸类缓冲剂除外)、解离碳酸氢根离子的碳酸化合物以及不溶性载体粒子的免疫测定用试剂，在含有在中性或碱性范围内有缓冲作用的缓冲剂(但碳酸类缓冲剂除外)和解离碳酸氢根离子的碳酸化合物的水性介质中含有不溶性载体粒子，提供含不溶性载体粒子的免疫测定用试剂的稳定化方法。

表1

试剂开封后的天数(天)	实施例1	实施例2	实施例3	比较例1
0	61	62	62	62
14	66	62	60	74
28	69	62	57	83

如表1所示，使用没有添加碳酸氢钠的 R1 试剂和 R2 试剂的比较