



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02802082.0

[45] 授权公告日 2006年5月31日

[11] 授权公告号 CN 1258089C

[22] 申请日 2002.6.5 [21] 申请号 02802082.0

[30] 优先权

[32] 2001.6.14 [33] JP [31] 179710/2001

[32] 2001.12.3 [33] JP [31] 368286/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/005568 2002.6.5

[87] 国际公布 WO2003/010541 日 2003.2.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.2.13

[71] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪

[72] 发明人 龟井明仁 权丈纪子 河村达朗

平井真人

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书3页 说明书31页 附图9页

[54] 发明名称

免疫反应测定方法及其所使用的免疫反应测定试剂

[57] 摘要

本发明提供了一种免疫学测定一种包含在样本中的对象物质的方法，其步骤包括在三羧酸或三羧酸盐存在下和酸性条件下使对象物质和能特异性结合到对象物质的特异性结合物质形成一种抗原抗体复合物。本发明还提供了在此方法中使用的包含三羧酸或三羧酸盐的试剂。试剂中包含有一种对象物质以及能免疫学和特异性地与对象物质结合的特异性结合物质。制备此试剂以使得对象物质和特异性结合物质能在酸性条件下结合在一起以形成抗原和抗体复合物。

1. 一种用于测定以包含在样品中的抗原或抗体为对象物质的免疫反应测定方法，包括：步骤 A：将三羧酸或三羧酸盐、一种作为特异性结合物质的能够特异性地结合对象物质的抗体或抗原、和所述样品进行混合；以及步骤 B：在由步骤 A 构成的一种反应体系中检测由对象物质和特异性结合物质之间的抗原抗体反应所生成的抗原抗体复合物，所述反应体系包含样品、特异性结合物质和三羧酸或三羧酸盐，其中的反应体系的 pH 值当抗原抗体反应进行时为 4.0 至 5.0。

2. 权利要求 1 中的免疫反应测定方法，其中在步骤 A 中还另外混合了一种缓冲液。

3. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中反应体系中三羧酸或三羧酸盐的浓度不超过 0.3M。

4. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中三羧酸是柠檬酸或乌头酸。

5. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中反应体系包含 2-6wt% 聚乙二醇。

6. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中抗原抗体复合物是凝集复合物。

7. 权利要求 6 的免疫反应测定方法，其中在步骤 B 中通过检测凝集复合物造成的光学变化来测定凝集复合物。

8. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中抗原在其分子结构中携带有金属离子，而能特异性结合此抗原的抗体在金属离子从此抗原释放后仍能够特异性地结合不含金属离子的抗原。

9. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中抗原是一种具有相应于至少一种抗体的多个结合位点的物质，而抗体是一种能够结合抗原的多个结合位点的单克隆抗体。

10. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中抗原是人白蛋白。
11. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中抗原是人 C-反应蛋白。
12. 用于权利要求 1 的免疫反应测定方法中的免疫反应测定试剂，其中所述试剂包含三羧酸或三羧酸盐以及能够特异性结合对象物质的作为特异性结合物质的抗体或抗原，并且所述试剂被制备成当对象物质和特异性结合物质之间发生抗原抗体反应时其 pH 值是 4.0 至 5.0。
 13. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中进一步包含一种缓冲液。
 14. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中当抗原抗体反应发生时三羧酸或三羧酸盐的浓度不超过 0.3M。
 15. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中三羧酸是柠檬酸或乌头酸。
 16. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中进一步包含聚乙二醇，当抗原抗体反应发生时，聚乙二醇浓度是 2-6wt%。
 17. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中抗原在其分子结构中携带有金属离子，而能特异性结合此抗原的抗体在金属离子从抗原释放后仍能够特异性地结合不含金属离子的抗原。
 18. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中抗原是一种具有相应于至少一种抗体的多个结合位点的物质，而抗体是一种能够结合抗原的多个结合位点的单克隆抗体。
 19. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中抗原是人白蛋白。
 20. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中抗原是人 C-反应蛋白。
21. 一种免疫学测定一种包含在样品中的对象物质的方法，其包含在三羧酸或三羧酸盐存在下和 pH 为 4.0 至 5.0 的条件下对象物

质与能特异性结合对象物质的特异性结合物质形成一个抗原抗体复合物的步骤。

22. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中反应体系的 pH 值是 4.5。

23. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中三羧酸是乌头酸。

24. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中所述特异性结合物质包含多种单克隆抗体。

25. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中反应体系的 pH 值是 4.5。

26. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中三羧酸是乌头酸。

27. 权利要求 12 的免疫反应测定试剂，其中所述特异性结合物质包含多种单克隆抗体。

28. 权利要求 21 的方法，其中反应体系的 pH 值是 4.5。

29. 权利要求 21 的方法，其中三羧酸是乌头酸。

30. 权利要求 21 的方法，其中所述特异性结合物质包含多种单克隆抗体。

免疫反应测定方法及其所使用的免疫反应测定试剂

技术领域

本发明涉及能够检测样本中所含的抗原或抗体（对象物质（subject substances））的免疫反应测定方法，以及此方法中所使用的一种免疫反应测定试剂。

背景技术

为明确各种疾病的诊断和判断疾病的进展情况，可以测定存在于人体体液内的、具有疾病特征性的蛋白的水平。此技术已在医学领域得到广泛的应用。

使用高度特异性的抗原抗体反应的免疫反应测定方法主要用于此种蛋白的含量的测定。目前，多种原理已被应用于对免疫反应测定方法的改进和开发。

其中，检测抗原抗体反应所形成的凝集复合物的测定方法，例如悬度测定法、浊度测定法、玻片凝集法及类似方法已广为熟知的。这些方法在溶液中进行，其中抗原和抗体是均匀分散的，因此总称为均质免疫反应测定方法。

在这些方法中，反应体系因凝集复合物的产生而变得混浊，其混浊度依赖于抗原和抗体的量。悬度测定法和浊度测定法是通过光学测定混浊度的方法。在悬度测定法中，混浊度是通过测量被反应体系散射的光量而测定的。在浊度测定法中，对混浊度的测定则是基于测量由于反应体系的散射而发生的光透射衰减。总体而言，两种方法使用和测定相同的反应体系。能被一种方法测定的对象也可被另一种方法测定。玻片凝集是使用肉眼观察或类似方式对凝集复

合物产生所引起的混浊度进行测定的一种方法。玻片凝集可以使用与悬度测定法和浊度测定法相同的反应体系。

各种添加剂被尝试用于上述传统的免疫反应测定方法中，以便能加速抗原抗体反应并高度敏感地检测到微量的成分。例如，在反应体系中加入一种水溶性的聚合物，如聚乙二醇、右旋糖苷、聚乙烯吡咯烷酮、氯乙烯、或类似物，以加速抗原抗体反应的凝集复合物形成，通过这种方法以改进反应时间和测定的敏感性。这些水溶性聚合物中，已知聚乙二醇即使是在相对低的浓度下也有很好的效果。重量百分比为 2 - 6% (以下简称为 wt %) 的、平均分子量在 6,000 的聚乙二醇用途广泛。特别是当浓度为 4 wt % 时，其只产生极少量的非特异性混浊度，十分高效。

水溶性聚合物的分子量或浓度增加时，其促进抗原抗体反应的作用也会提高(见于《自动化免疫分析》第一部分, Ritchie 编写, 67-112 页 (1978))。

对于抗原抗体反应的测定，依赖于抗原浓度的信号性抗原抗体反应的强度越大，S/N 比越令人满意，即测定越稳定。然而，若想通过使抗原抗体反应进一步加速以达到上述效果，那么就需要提高所加入的传统的水溶性聚合物的分子量或浓度。但这样会增加含有此水溶性聚合物的溶液的粘度，使得分析的操作过程难于把握。

在均质免疫反应测定方法中，区带现象 (zone phenomenon) 十分常见。区带现象指的是，当抗原抗体之一的量超出与其形成最大凝集复合物相当的范围时，会妨碍凝集复合物的产生。著名的 Heidelberger 的格子假说 (lattice hypothesis) 解释了多价抗体与大于一价的抗原的结合反应，其详细描述见于 William E Paul 所编辑的《免疫学概要》(1984) (日文版, Kiso Menekigaku, Tomio Tada 负责, 714-716 页 (1987))。

在实际的均质免疫反应测定中，通常是用抗体检测抗原的浓度，较高的测定值（即抗原的浓度）比较低的测定值通常更有意义。因此，由抗原过量所引起的区带现象是常见的问题。在区带以外的区域则形成含有由抗原抗体交互连接而成的复合物的巨大分子链。如果抗体浓度不变，分子链的数量和大小随抗原的浓度增加而增大。因此，通过检测其光学变化可测定分子链的数量和大小，进而可定量测定抗原的浓度。此外，抗原抗体复合物在溶液中形成的混浊或凝集甚至可以通过肉眼进行观察，这取决于抗原抗体的浓度。因此，抗原的浓度也可通过肉眼观测而进行定性测定。

但是，在抗原过量的区域，由于抗原量远大于抗体量，结合位点被抗原饱和的抗体数量增加。因此，上述分子链的形成受到影响，反应结果将无法分辨抗原浓度是低还是更高。因此将无法对抗原的浓度进行正确的定量测定。为此，必须对所检测的浓度范围做出限定以避免上述情况。

本发明的目的之一是通过提供一种能够简便地提高测定值的免疫反应测定方法，以及一种供此方法使用的免疫反应测定试剂，以解决上述常见的问题。本发明的另一个目的是提供一种能够解决抗原过量的区带现象的免疫反应测定方法，以及一种供本方法使用的免疫反应测定试剂。

发明内容

为解决上述问题，本发明用于测定样品中的抗原或抗体（对象物质）的免疫学测定方法的特征包含：步骤 A：将三羧酸或三羧酸盐和能够特异性结合对象物质的抗体或抗原（特异性结合物质）加入至样品中，和步骤 B：在步骤 A 生成的反应体系中检测由对象物质和特异性结合物质之间的抗原抗体反应所生成的抗原抗体复合

物，所述反应体系包含样品、特异性结合物质和三羧酸或三羧酸盐，并且抗原抗体发生反应时此反应体系的 pH 值是酸性的。

此外，本发明的免疫反应测定试剂的特征包含三羧酸或三羧酸盐和能够特异性结合对象物质的抗体或抗原（特异性结合物质），且所制备的试剂能够使得对象物质和特异性结合物质之间发生抗原抗体反应时的 pH 值是酸性的。

附图简述

图 1 所示为使用本发明实施例或对比例的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人白蛋白进行免疫悬液测定的测定结果。

图 2 所示为使用本发明另一个实施例的含有柠檬酸的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人白蛋白进行免疫悬液测定的 pH 值相关性的检测结果。

图 3 所示为使用本发明实施例的含有反乌头酸的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人白蛋白进行免疫悬液测定的 pH 值相关性的检测结果。

图 4 所示为仍然使用本发明另一个实施例的含有柠檬酸的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人白蛋白进行免疫悬液测定的柠檬酸浓度相关性的检测结果。

图 5 所示为使用本发明实施例的含有反乌头酸的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人白蛋白进行免疫悬液测定的反乌头酸浓度相关性的检测结果。

图 6 所示为使用本发明实施例或对比例的含有三羧酸或三羧酸盐以及另一种缓冲液的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人白蛋白进行免疫悬液测定的测定结果。

图 7 所示为使用本发明另一个实施例或对比例的含有山羊抗人 CRP 多克隆抗体以及柠檬酸的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人 CRP 进行免疫悬液测定的测定结果。

图 8 所示为使用本发明另一个实施例或对比例的含有小鼠抗人 CRP 多克隆抗体以及柠檬酸的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人 CRP 进行免疫悬液测定的测定结果。

图 9 所示为使用本发明实施例或对比例的含有小鼠抗人 CRP 多克隆抗体以及反乌头酸的免疫反应测定试剂、通过免疫反应测定方法对人 CRP 进行免疫悬液测定的测定结果。

实施本发明的最佳方式

本发明涉及一种能够简便地提高测定值的免疫反应测定方法，以及一种供本方法使用的免疫反应测定试剂。本发明还涉及一种能够解决抗原过量的区带现象的免疫反应测定方法，以及一种供本方法使用的免疫反应测定试剂。

本发明人发现，在抗原抗体反应体系中加入三羧酸或三羧酸盐以维持反应体系的 pH 值为酸性，可以改善由抗原抗体结合而引起的免疫反应的测定值，并可以解决在抗原过量产生的区带现象。

本发明的实施方案的免疫反应测定方法是一种测定样品中的抗原或抗体（对象物质）的方法，其特征包含：步骤 A：将三羧酸或三羧酸盐和能够特异性结合对象物质的抗体或抗原（特异性结合物质）加入至样品中，和步骤 B：在步骤 A 生成的反应体系中检测由对象物质和特异性结合物质之间的抗原抗体反应所生成的抗原抗体复合物，所述反应体系包含样品、特异性结合物质和三羧酸或三羧酸盐，并且抗原抗体发生反应时此反应体系的 pH 值是酸性的。反应体系可以同时含有三羧酸和三羧酸盐。进一步地，反应体系中的三羧酸或三羧酸盐优选地使反应体系具有缓冲能力，以维持反应体

系的 pH 值为酸性。在这种情况下不需要其他缓冲液来调整反应体系的 pH 值为酸性，而免疫反应的测定值又可得到有效的提高，并可以有效解决在抗原过量产生的区带现象。反应体系中的三羧酸或三羧酸盐的浓度优选地为至少 0.01 M，以使得反应体系具有缓冲能力。反应体系内也可进一步加入另外的缓冲液。

本发明的实施方案的免疫反应测定试剂的特征为包含三羧酸或三羧酸盐和能够特异性结合对象物质的抗体或抗原（特异性结合物质），且所制备的试剂能够使得对象物质和特异性结合物质之间发生抗原抗体反应时的 pH 值是酸性的。所述试剂可以同时含有三羧酸和三羧酸盐。所述试剂被优选地制备为能够使得其中的三羧酸或三羧酸盐具有缓冲能力，并且当对象物质和特异性结合物质之间发生抗原抗体反应时 pH 值是酸性的。

对于本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂所使用的缓冲液，可以是本领域内已知的缓冲液，例如，包括磷酸缓冲液（如磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等等）、醋酸钠、二甲胍酸钠、2-(N-吗啉代)乙磺酸、琥珀酸，等等。在这种情况下，可以根据反应体系中的缓冲液的类型、含有对象物质的样品（标本）的量、提供与抗原或抗体（对象物质）相关的抗体或抗原的方法等等，对所用的缓冲液的量进行调整，以达到本发明的效果。

在本发明的免疫反应测定方法中，反应体系的 pH 值被优选地设定为 4 - 6。在此 pH 值范围内，因三羧酸或三羧酸盐的存在，免疫反应的测定值被大幅度提高，更利于解决在抗原过量出现的区带现象。考虑到这些效果，反应体系的 pH 值被特别优选地设定为 4.5。

由于上述原因，在发生抗原抗体反应时，本发明的免疫反应测定试剂的 pH 值被设定为 4 - 6。更优选地，pH 值被设定为 4.5。

在本发明的免疫反应测定方法中，反应体系中的三羧酸或三羧酸盐的浓度不超过 0.3 M。在这种情况下，因三羧酸或三羧酸盐的存

在，免疫反应的测定值被大幅度提高，更利于解决在抗原过量出现的区带现象。当反应体系中的三羧酸或三羧酸盐的浓度不超过 0.2 M 时，这些效果优选地进一步增强。当反应体系中的三羧酸或三羧酸盐的浓度为 0.1 M 时，这些效果特别优选地更高。

由于上述原因，在本发明的免疫反应测定试剂中，抗原抗体反应中的三羧酸或三羧酸盐的浓度优选地为不超过 0.3 M，更优选地为不超过 0.2 M，进一步更优选地为不超过 0.1 M。

本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂所使用的三羧酸或三羧酸盐的例子包括柠檬酸、异柠檬酸、乌头酸、及其相应的盐，这些均能够以无水柠檬酸、柠檬酸单水化合物、柠檬酸三钠、柠檬酸三钠二水化合物、柠檬酸二氢钾、柠檬酸三钾单水化合物、柠檬酸三铵、柠檬酸氢二铵、柠檬酸钙四水化合物、无水柠檬酸镁、柠檬酸三锂四水化合物、柠檬酸铜(II) 2.5 水化合物、DL-异柠檬酸三钠、反乌头酸和无水顺乌头酸的形式购得，并可单独或组合使用。其中，优选的三羧酸或三羧酸盐为柠檬酸、柠檬酸盐、乌头酸或乌头酸盐，原因是它们相对便宜、可室温储存、稳定且易于处理。更加优选地，所述乌头酸是反乌头酸。

在本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂的体系中，还可加入本领域已知的任何成分，根据其使用情况选择可实现本发明效果的用量。例如，当本发明用于均质型免疫反应测定方法时，如悬度测定法、浊度测定法、玻片凝集法及类似方法，可在本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂的体系中加入聚乙二醇。本发明的免疫反应测定方法的反应体系中所含有的此成分的浓度优选为 2 - 6% (wt %)，因为此浓度较少引起非特异性凝集，同时可大幅度提高测定的敏感性，更加优选地，其浓度为 4% (wt %)。类似地，在本发明的免疫反应测定试剂中，此成分的浓度优选为 2 - 6% (wt %)，更加优选地为 4% (wt %)。

为减少由于抗原或抗体的自凝集而产生的非特异性混浊，可在本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂的反应体系中加入表面活性剂，如吐温 20、辛基葡糖苷、十二烷基磺酸钠（SDS）、蔗糖单月桂酸酯、CHAPS 等等。表面活性剂在本发明的免疫反应测定方法的反应体系中的浓度优选地不超过 0.3%，因为此浓度对抗原抗体反应的抑制较轻，更优选地不超过 0.1%。类似地，在本发明的免疫反应测定试剂中，此表面活性剂的浓度优选为不超过 0.3%，更加优选地为不超过 0.1%。

本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂可优选地应用于均质测定体系中，包括但不限于悬度测定法、浊度测定法和玻片凝集法，这些体系在抗原过量可产生区带现象。在这种情况下，有望优选地产生更好的效果。特别是当本发明被应用于悬度测定法和浊度测定法等广泛使用自动化检测仪器的检测方法时，测定在抗原过量产生的区带现象所需的步骤可被优选地省略或简化。

在本发明的免疫反应测定方法中，抗原抗体复合物优选地是一种凝集复合物。在步骤 B，对凝集复合物的检测优选地通过测定由凝集复合物所引起的光学变化而进行。更优选地，所述光学变化是光散射强度或透射光量的改变。

在本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂中，作为对象物质的抗原或抗体包括但不限于任何通常可通过抗原抗体反应进行检测的物质，例如蛋白质、核酸、脂类、细菌、病毒、半抗原等等。其中优选的是蛋白质，其为临床化验中通过抗原抗体反应进行测定的主要对象物质。所述蛋白质的例子包括激素（例如，LH（黄体生成素）、FSH（卵泡刺激素）、hCG（人绒毛膜促性腺激素）等等）、各类免疫球蛋白及其亚型、补体成分、各种感染性疾病的标志物、人 C 反应蛋白（在此简称人 CRP）、白蛋白、类风湿因子、血型抗原等等。其中，对象物质优选地为人白蛋白或 CRP。

三羧酸和三羧酸盐具有螯合能力，即有效地隔离反应体系中二价和三价金属离子的特性，所述金属离子例如 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 等等。因此，当抗原的分子结构中存在金属离子时，特异性结合抗原的抗体优选地在抗原中的金属离子被释放时仍然能够与抗原特异性地结合。在这种情况下，即使抗原的分子结构中存在金属离子并且金属离子的释放使抗原分子的结构发生改变，此抗原仍能够被检测。

当抗原的分子结构中存在金属离子，并且金属离子的释放使抗原分子的结构发生改变时，可在反应体系中添加抗原所含有的金属离子，以使得在抗原抗体反应过程中，反应体系内存在所述金属离子。

所添加的金属离子的量取决于所用的三羧酸或三羧酸盐所具有的螯合能力或其浓度、抗原保持金属离子的能力等等。

在分子结构中含有金属离子的抗原的一个例子是 CRP，其结构随着结构中是否存在 Ca^{2+} 而改变。当本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂中的抗原为 CRP，而山羊抗人 CRP 多克隆抗体中包括一种无法与不含有 Ca^{2+} 的人 CRP 结合的抗体，并且所使用的三羧酸为柠檬酸时，则相对于 0.02 M 的柠檬酸，反应体系中要优选地加入 0.02 M 的 Ca^{2+} 。

当一种抗原具有多个与一种抗体结合的位点时，此抗体优选地是能够与此抗原的多个结合位点相结合的单克隆抗体。单克隆抗体由杂交瘤细胞系产生。杂交瘤细胞系通过分离并培养来自于融合细胞的单个细胞而建立，所述融合细胞同时具有产生单克隆抗体的能力和增殖的能力，其通过一种能产生抗体的 B 细胞与一种骨髓瘤细胞的细胞融合过程而获得。由此杂交瘤细胞系所产生的所有抗体均具有相同的特性。杂交瘤细胞系具有很强的增殖能力并可以冻存。如果得到适当的控制，杂交瘤细胞系不会耗竭。通过在培养基中或腹腔中培养杂交瘤细胞系并对其进行纯化，可持久地获得具有相同

特性的抗体。另一方面，通过将一种抗原注射入动物体内，可使其血液中出现能够与该抗原相结合的多种抗体，通过收集并纯化其全部或部分血液可得到多克隆抗体。因此，多克隆抗体的特性取决于动物的个体差异、饲养环境、条件等等，因此很难持续获得具有相同特性的抗体。而如果使用单克隆抗体，则有可能持续使用具有相同特性的抗体并可稳定地使用该抗体作为试剂。这样才有可能在使用免疫反应测定方法或免疫反应测定试剂的免疫反应测定中获得稳定的结果。

本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂中所使用的抗体可以包括但不特别限于 IgG、IgM、IgE、IgA 和 IgD 的任何一型的抗体，只要其可以特异性结合抗原。其中，优选 IgG 抗体，因为 IgG 抗体具有较少的非特异性反应性并且相对地容易购得。用于生产抗体的动物包括但不限于兔、山羊和小鼠。由这些动物产生的抗体相对容易获得并被广泛使用。

本发明的免疫反应测定方法典型地可按下述步骤进行：将三羧酸或三羧酸盐加入到缓冲液中以维持反应体系的 pH 值为酸性，优选地为 4 - 6，更优选地为 4.5。在抗原抗体反应中的三羧酸或三羧酸盐的浓度优选地为不超过 0.3 M，更优选地为不超过 0.2 M，特别优选地为不超过 0.1 M。三羧酸或三羧酸盐也可以用作缓冲液。将含有针对一种抗原或抗体（对象物质）的抗体或抗原的溶液或样品（标本）之一与缓冲溶液混合，然后将另一种与所得缓冲液混合，以形成反应体系。对反应体系中的免疫反应进行检测。

在反应体系中加入三羧酸或三羧酸盐及加入缓冲液以维持其为酸性的方法，以及调整反应体系的 pH 值的方法，并不限于上述的方法。例如，三羧酸或三羧酸盐和缓冲液可以按满足上述要求的方式加入到含有针对一种抗原或抗体（对象物质）的抗体或抗原的溶液中。

本发明的免疫反应测定试剂典型地可按下述步骤进行制备。

分别制备针对一种抗原或抗体（对象物质）的抗体或抗原以及三羧酸或三羧酸盐，然后进行下面的步骤。只要能够达到三羧酸或三羧酸盐的效果，含有针对一种抗原或抗体（对象物质）的抗体或抗原的溶液中可以含有任何成分。含有三羧酸或三羧酸盐的溶液的pH值优选地为4 - 6，更优选地为4.5，以便具有缓冲能力，以维持抗原抗体反应过程中的pH值为酸性。缓冲液和三羧酸或三羧酸盐溶解于纯水中，并调整其浓度以使得抗原抗体反应中的三羧酸或三羧酸盐的浓度优选地为不超过0.3 M，更优选地为不超过0.2 M，特别优选地为不超过0.1 M。如果能够满足上述条件，缓冲液和三羧酸或三羧酸盐可分别配制成溶液。三羧酸或三羧酸盐也可以用作缓冲液。

三羧酸或三羧酸盐可以加入到含有针对一种抗原或抗体（对象物质）的抗体或抗原的溶液中。在这种情况下，三羧酸或三羧酸盐可以按满足上述要求的方式配制成溶液，再以此溶液通过透析或凝胶过滤的方法，将三羧酸或三羧酸盐加入到含有针对一种抗原或抗体（对象物质）的抗体或抗原的溶液中，以便交换低分子量成份。

如上所述，根据本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂，将三羧酸或三羧酸盐加入到免疫反应体系中，将反应体系的pH值调定为酸性，由此提高抗原抗体结合免疫反应的测定值，并解决在抗原过量所产生的区带现象。在使用水溶性聚合物的传统方法中，必须加入高浓度的水溶性聚合物或使用高分子量的水溶性聚合物，以提高抗原抗体反应检测的测定值，以在保持满意的S/N比的同时进行稳定的测定。但在这种情况下，溶液的粘稠度增加，因此给操作用于分析的溶液带来困难。反之，本发明所使用的三羧酸或三羧酸盐是小分子量物质，这样可避免增加溶液的粘稠度，并使得用于分析的溶液易于操作。

进一步地，在抗原过量所产生的区带现象可以得到解决，由此可减小因对象物质浓度过高导致的测定值的降低。因此，可拓宽高测定值和阳性样品的区域，由此扩大可检测浓度的范围。

实施例

下面将通过实施例对本发明进行描述。本发明不仅限于这些实施例。

(实施例 1)

下文将描述一种制备试剂的方法，其中将人白蛋白作为对象物质。在此实施例中，将描述一种制备用于玻片凝集法、悬度测定法或浊度测定法的试剂的方法，所述试剂包含抗体溶液和含有三羧酸或三羧酸盐的缓冲液。

下述缓冲液等以经过 Milli-Q SP TOC (Millipore 制造) 过滤的纯水配制。所有试剂，如盐、缓冲液等等，如未经特别指出，均来自 Wako 精细化工厂。聚乙二醇 6000 和反乌头酸为超纯试剂，其他均为保证试剂。

首先制备抗体溶液。收集经人白蛋白免疫的兔的抗血清，通过蛋白 A 柱层析法纯化得到兔抗人白蛋白多克隆抗体。结合蛋白 A 的凝胶为 Amersham Pharmacia 产品。用于纯化的平衡缓冲液含有 1.5 M 的甘氨酸和 3.0 M 氯化钠，pH 值为 8.9。洗脱缓冲液包含 0.1M 的柠檬酸，pH 值为 4.0。纯化如下进行。将体积比交换柱内装的胶的体积多 5 倍的平衡缓冲液通过交换柱使之平衡，之后用平衡缓冲液双倍稀释含有相应于交换柱全部结合能力 10-20% 的量的抗体的抗血清。稀释液通过交换柱使得血清中的抗体和蛋白 A 结合。之后，平衡缓冲液被连续地通过交换柱直到不能被蛋白 A 结合的血清成分不再从交换柱中流出，如此完成对交换柱的洗涤。之后，将洗脱缓冲液通过交换柱洗脱与蛋白 A 结合的抗体。洗脱的抗体成分被放置在

分子量截留为 10,000 的透析柱上。利用大约 100 倍体积的含 0.05M 3-(N-吗啉代)丙磺酸 (Dojin 生产, 下面简称为 MOPS), 0.15M 氯化钠, 0.04 wt%NaN₃ 和 pH 值为 7.4 的缓冲溶液进行透析数次以交换缓冲液中的成分。其后, 通过在 280nm 处测定吸光度来检测抗体的浓度。用和透析过程中使用的缓冲液相同的缓冲液调整抗体浓度到 3.0mg/ml。所得溶液被认为是抗体溶液。抗体浓度无需如此严格限制。制备好的抗体溶液可以保存在室温下, 然而, 优选地保存在低温以防止抗体的变性, 更优选的保存在 4℃。

包含三羧酸或三羧酸盐的缓冲溶液按如下制备。柠檬酸和反乌头酸可以用作三羧酸或三羧酸盐来制备两种缓冲液。

包含柠檬酸的缓冲液按如下制备。称取相应于终浓度为 0.05M 量的柠檬酸单水化合物, 称取相应于终浓度为 4wt%量的聚乙二醇 6000。将柠檬酸单水化合物和聚乙二醇 6000 溶解在大约为 90%目标制备体积的纯水中。将 NaOH 水溶液加到所得溶液中以调整 pH 到 4.5, 用纯水把所得溶液调整到目标体积。制备好的缓冲液保存在室温。

包含反乌头酸的缓冲液按如下制备。称取相应于终浓度为 0.05M 量的反乌头酸, 称取相应于终浓度为 4wt%量的聚乙二醇 6000。将反乌头酸和聚乙二醇 6000 溶解在大约为 90%目标制备体积的纯水中。将 NaOH 水溶液加到所得溶液中以调整 pH 到 4.5, 用纯水把所得溶液调整到目标体积。制备好的缓冲液保存在室温。

将至少一种如此制备的包含三羧酸或三羧酸盐的缓冲液与抗体溶液混合来制备免疫反应测定试剂。

(实施例 2)

接下来, 下面将描述一种制备以人 CRP 为对象物质的试剂的方法。人 CRP 是一种含有 5 个具有相同结构的亚基的物质, 因此对

于单一抗体有多个结合位点。因此，单一的抗 CRP 单克隆抗体能被用于制备用于均质免疫反应测定的试剂。可以使用的单克隆抗体不止一种。

在这个实施例中，制备一种包含两种抗体溶液，也就是多克隆抗体溶液和单克隆抗体溶液，以及一种含有三羧酸或三羧酸盐缓冲液的试剂。

首先，将描述一种利用多克隆抗体溶液制备试剂的方法。抗体溶液按如下制备。利用蛋白 G 柱层析法从用人 CRP 免疫的山羊中所收集的抗血清中纯化山羊抗人 CRP 多克隆抗体。安装在柱上的蛋白 G 固定胶购自 Amersham-Pharmacia。用于纯化的平衡缓冲液包含 0.02M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠，pH 值为 7.0。洗脱缓冲液包含 0.1M 甘氨酸和 pH 值为 2.7。柱层析法纯化和透析的缓冲液交换按照与实施例 1 相似的方式进行。之后，通过检测 280nm 处的吸光度来测定抗体浓度。用与透析过程中所使用的缓冲液相同的缓冲液调整抗体浓度到 1.0mg/ml，制成抗体溶液。

人 CRP 的结构的变化取决于钙离子的存在与否。因此，当组成试剂的抗体中含有不能与无钙离子的人 CRP 结合的抗体时，三羧酸或三羧酸盐的螯合作用使得无钙离子的人 CRP 增加，由此显著地减少了抗原抗体反应率。上述制备的多克隆抗体溶液中含有一种不能与无钙离子的人 CRP 结合的抗体。因此，钙离子被加入到下面描述的含三羧酸或三羧酸盐的缓冲液中以保持人 CRP 的结构。

包含三羧酸或三羧酸盐的缓冲液按如下制备。使用柠檬酸作为三羧酸或三羧酸盐。

称取相应于终浓度为 0.05M 量的柠檬酸单水化合物，称取相应于终浓度为 0.02M 量的氯化钙，称取相应于终浓度为 4wt%量的聚乙二醇 6000。将柠檬酸单水化合物、氯化钙和聚乙二醇 6000 溶解在大约为 90%目标制备体积的纯水中。将 NaOH 水溶液加到所得

溶液中以调整 pH 到 4.5，用纯水把所得溶液调整到目标体积。制备好的缓冲液保存在室温。

下面，将描述利用单克隆抗体溶液的试剂。做为一种单克隆抗体，所用的抗体即使当反应体系中加入螯合剂，如 0.02M 乙二胺四乙酸时仍不会丧失和人 CRP 的结合能力。也就是说，当钙离子从人 CRP 释放后，此抗体仍能特异性地结合到无钙离子的人 CRP。

一种抗体溶液按如下制备。本实施例中使用的鼠抗人 CRP 单克隆抗体是通过将产生抗体的杂交瘤细胞（工业技术院生命工学工业技术研究所，保藏号为 FERM BP-6620）注射到鼠腹腔内使其增生后获取的。用实施例 1 描述的柱层析法从获取的腹水中纯化抗体。

腹水按如下获取。利用 retired 雌性 BALB/c 鼠来生成腹水。通过在混合有 5-15% 体积的胎牛血清的 RPMI 1640（SIGMA 生产）培养基中使杂交瘤细胞增殖，之后用 RPMI 1640 培养基离心洗涤，用 RPMI 1640 培养基重悬，达到 1×10^6 到 10^7 细胞/毫升浓度，来制备用于注射到腹腔的杂交瘤细胞悬液。将 0.5-1.0 毫升的姥鲛烷注射到鼠的腹腔中。7 天后，将 0.5-1.0 毫升的上述细胞悬液注射到鼠中。当观察到有腹水形成后，从鼠中收集腹水。

柱层析法纯化后的抗体样本被放置在分子量截留为 10,000 的透析柱上。利用大约 100 倍体积的含 0.04 wt% NaN_3 （8g/l 氯化钠，0.2g/l 氯化钾，1.15g/l 磷酸氢二钠十二水，0.2g/l 磷酸二氢钾，pH 值 7.4）的 PBS 缓冲溶液进行透析数次以交换缓冲液中的成分。其后，通过检测 280nm 处的吸光度来测定抗体的浓度。用和透析过程中所使用的缓冲液相同的缓冲液调整抗体浓度到 1.0mg/ml，制成抗体溶液。

包含三羧酸或三羧酸盐的缓冲溶液按如下制备。以柠檬酸和反乌头酸作为三羧酸或三羧酸盐来制备两种缓冲液。在这个实施例中，

人 CRP 中是否拥有的钙离子所引起的人 CRP 结构的改变不影响抗体。因此，钙离子不用加入到缓冲液中。

包含柠檬酸的缓冲液按如下制备。称取相应于终浓度为 0.05M 量的柠檬酸单水化合物，称取相应于终浓度为 4wt% 量的聚乙二醇 6000。将柠檬酸单水化合物和聚乙二醇 6000 溶解在大约为 90% 目标制备体积的纯水中。将 NaOH 水溶液加到所得溶液中以调整 pH 到 4.5，用纯水把所得溶液调整到目标体积。制备好的缓冲液保存在室温。

包含反乌头酸的缓冲液按如下制备。称取相应于终浓度为 0.05M 量的反乌头酸，称取相应于终浓度为 4wt% 量的聚乙二醇 6000。将反乌头酸和聚乙二醇 6000 溶解在大约为 90% 目标制备体积的纯水中。将 NaOH 水溶液加到所得溶液中以调整 pH 到 4.5，用纯水把所得溶液调整到目标体积。制备好的缓冲液保存在室温。

上述制备的抗体溶液的浓度并非仅限于此。制备好的抗体溶液可以保存在室温下，然而，优选地保存在低温以防止抗体的变性，更优选的保存在 4°C。

将至少一种如此制备的包含三羧酸或三羧酸盐的缓冲液与抗体溶液混合来制备免疫反应测定试剂。

应用实施例 1 和 2 中制备好的试剂的一种方法是混合含有抗原的样本（标本）、一种抗体溶液，和含有三羧酸或三羧酸盐的缓冲液以制备反应体系。可以使用任何混合方法。混合比例的确定依赖于所需抗原浓度的测定范围。通过测定这些混合物制备的反应体系中生成的抗原抗体免疫反应，可以确定样本中抗原的浓度。

通过混合，添加的成分如一种缓冲液、三羧酸或三羧酸盐、聚乙二醇等可以被稀释为低于起初浓度的浓度。如果稀释浓度和起初浓度的差异在 10% 以内，测定的结果与起初浓度获得的结果没有大的差异，也就是没有大的影响。为了避免稀释引起的浓度之间的差

异，制备试剂中的各种物质时要考虑到混合所引起的稀释，以便使得每种物质的浓度是目标浓度。

应注意到抗体可以被固定在小颗粒载体上，如乳胶、金胶，磁性颗粒，或者，抗体可以被一种酶，一种染料，一种荧光物质等标记，尽管这些没有在实施例 1 和 2 中描述。

缓冲液成分和抗体溶液的 pH 值并不局限在上面描述的组成和 pH 值。例如，当某种组成的试剂制备后，可以用含有三羧酸或三羧酸盐的酸性缓冲液进行透析以允许抗体溶液含有三羧酸或三羧酸盐来保持反应体系中酸性的 pH 值。

在实施例 1 和 2 中，用 NaOH 调整 pH，相应的，可以应用氢氧化物如 KOH、LiOH、 NH_4OH ， $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ， $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 等。

在实施例 1 和 2 中，使用柠檬酸和反乌头酸作为缓冲液中的三羧酸或三羧酸盐。其他三羧酸或三羧酸盐也可以应用，包括，例如，异柠檬酸，无水柠檬酸，柠檬酸三钠，柠檬酸三钠二水化合物，柠檬酸二氢钾，柠檬酸三钾单水化合物，柠檬酸三铵，柠檬酸氢二铵，柠檬酸钙四水化合物，无水柠檬酸镁，柠檬酸三锂四水化合物，柠檬酸铜(II) 2.5 水化合物，DL-异柠檬酸三钠，和无水顺乌头酸，这些都可以单独或混合使用。在混合使用中，pH 值可以按如下调整：如果纯水中溶解液的 pH 值比目标 pH 值更偏碱性，可以用盐酸等；如果 pH 值是更偏酸性的，可以应用上面描述的氢氧化物或其他等。相应的，三羧酸或三羧酸盐混合比例可以用于调整 pH 值。

在实施例 1 和 2 中，含有三羧酸或三羧酸盐的缓冲液主要因为三羧酸或三羧酸盐而具有缓冲能力。添加到试剂中的三羧酸或三羧酸盐的浓度并无特别的限制。或者，其他的缓冲液可以被用于维持试剂的主要的缓冲能力，或者和三羧酸联合应用来保持缓冲能力。

(实施例 3)

在这个实施例中，通过与免疫反应测定方法中常用的中性反应体系比较，显示了含有三羧酸或三羧酸盐的酸性反应体系在抗原抗体反应中的作用。利用免疫学的悬度测定法测定人白蛋白来进行比较。实施例 1 中制备的试剂被用于制备含有三羧酸或三羧酸盐的酸性反应体系。

这里，作为含有三羧酸或三羧酸盐的缓冲液，含有柠檬酸或其盐作为主要缓冲物并具有与在实施例 1 中制备的相似组成的缓冲液被称为柠檬酸缓冲液，而含有反乌头酸或其盐作为主要缓冲物并具有与在实施例 1 中制备的相似组成的缓冲液被称为乌头酸缓冲液。

做为一个对比例，MOPS 用于制备构成中性反应体系的缓冲液，这个缓冲液的浓度和 pH 值设定为常用数值，也就是，0.05M MOPS，4wt%聚乙二醇 6000，和 pH 值为 7.4。这里，称之为 MOPS 缓冲液。相同的抗体溶液被柠檬酸缓冲液和乌头酸缓冲液分享（shared）。

人白蛋白（Wako Pure 化学公司生产）做为抗原溶解在缓冲液（0.05M MOPS，pH 值 7.4）中形成 0，5，10，30，50 或 100mg/dl 不等浓度。抗体和抗原溶液（标本）在使用前都存放在 4℃，各种缓冲液存放在室温。

一个自制的设备用于测定，其按如下制作。一个具有 680nm 波长，调定于 270Hz 和 15mW 输出功率的半导体激光指示器（Kikoh Giken 制造，型号为 MLXS-D-12-680-35）作为光源。精确测定可见和红外光的硅制光电二极管（Hamamatsu Photonics 制造，型号为 S2387-66R）作为测定仪。将厚度为 0.1cm 的光学玻璃片粘和一起做成一个小杯，其为体积大约为 200ul 的正方形棱镜形状。小杯放置在离光源 0.5cm 处，小杯的一边和光源垂直，测定仪放置在距离小杯 5.5cm 处，与光源有着 90°的夹角。在小杯和测定仪之间放置光线遮蔽管来避免零散的光线进入测定仪。依赖于测定仪测定到的光量

的电流信号被电流-电压转换电路 (10^6V/A) 和一个放大器 (有效的放大器) 放大为 100 倍的电压信号。之后, 电压信号通过锁定同步 (lock-in) 的放大器 (NF 公司生产, 型号为 5610B) 完成相位-敏感测定, 然后通过 GPIB 控制输入到电脑。

对于每种缓冲液, 不同浓度的人白蛋白按如下测定。反应体系的混合比例为 178ul 缓冲液, 9ul 人白蛋白溶液和 7ul 的抗体溶液。反应体系中抗体和白蛋白的终浓度分别为大约 0.11mg/ml 以及测定使用的白蛋白溶液浓度乘以 0.046。

首先, 在小杯中按上面描述的体积加入缓冲液和人白蛋白溶液, 搅拌混合。然后, 往小杯中按上面描述的体积加入抗体溶液, 搅拌混合, 以形成抗原抗体反应。在加入抗体溶液前 10 秒开始测定散射光量, 每 0.5 秒一次连续测定 300 秒。测定值用电压值表示。通过在测定每个反应之前对在小杯中放置的纯水进行测定, 以此为基础对测定数值进行纠正以消除小杯污染对测定的影响。不同时间获得的测定值被 200-300 秒平均。得到的平均结果被认为是各种浓度的人白蛋白溶液的测定值。基于在加入抗体溶液前 10 秒获得的测定值可以确定抗原自身凝集的发生, 不同浓度的人白蛋白溶液的测定值要减去这个测定值的平均值。测定在室温下进行 (大约 20°C)

测定后, 通过利用 pH 计 (Shindengen 电子厂生产, 商标名: PHBOY-P2) 测定混合液 pH 值来观察各种缓冲液、抗体溶液和不同浓度人白蛋白溶液的混合液对反应体系 pH 值的影响。

结果是用于每个测定的各种缓冲液、抗体溶液和不同浓度人白蛋白溶液的混合液的 pH 值和起初缓冲液的 pH 值是一致的。

图 1 显示了相应于各种缓冲液的最大到 100mg/dl 的不同浓度的白蛋白溶液的测定结果的曲线。垂直轴表示的是电压值, 而水平轴表示的是用于测定的不同浓度的人白蛋白溶液。图 1 说明测定的电压值越高, 进入测定仪的散射的光量越多。散射的光量越多说明

反应体系的混浊度越高和抗原抗体反应产生的抗原抗体复合物越大量。从相应于同一缓冲液的、具有不同浓度的人白蛋白溶液所获得测定值中减去一个当该缓冲液不含有白蛋白时的测定值（0 mg/dl）得到曲线值。

象图 1 显示的，当柠檬酸缓冲液和反乌头酸缓冲液用于抗原抗体反应测定时的测定值（相应的在图 1 中，用实心圆和空心圆表示）要高于当用 MOPS 缓冲液作为对照样本时的测定值（图 1 中用实心三角表示）。当应用 MOPS 缓冲液时，测定值从 30mg/dl 附近的顶峰开始显著减少，原因是在抗原过量区域的区带现象。相反的，当应用柠檬酸缓冲液时，顶峰类似于 MOPS 缓冲液在 30mg/dl 附近，因在抗原过量区域产生的区带现象所产生的测定值的减少被抑制。当应用反乌头酸缓冲液时，顶峰被观察到有轻度的改变，因在抗原过量产生的区带现象所产生的测定值的减少被进一步抑制。

根据上面描述的结果，可以确定本发明的免疫反应测定方法能被用于增加抗原抗体反应的测定值。因此，也能确定抗原过量区域产生的区带现象能被解决。

可以确定本发明的免疫反应测定试剂能被用于增加抗原抗体反应的测定值。因此，也能确定抗原过量区域产生的区带现象能被解决。

在临床检测中，检测尿中排泄的微量白蛋白能做为糖尿病肾病的早期诊断标记物。在多个测定方法和试剂（见 Shin-Tonyobyosei-JinshoHasshoyobo-to-Shintenboshi [新糖尿病肾病，预防发生和发展]，Yukio Shigeta, Yoshizo Umitsu 等，第 131 页（1992））中，0.1-20mg/dl 范围做为量化范围。对于传统的应用于利用免疫学的悬度测定法的测定和这些测定的试剂的中性缓冲液，必须要通过增加抗体浓度或通过稀释减少抗原浓度来消除抗原过量区域引起的区带现象，其根据是均质免疫反应是一种平衡反应。根据本发明的免疫反应测定方

法和免疫反应测定试剂，提供了一种测定人白蛋白的方法和试剂，其中抗体浓度可以更低，不需要抗原的稀释，并能消除在抗原过量区域形成的区带现象。例如，根据本实施例的测定结果，提供了一个测定范围，其中至少 20mg/dl 的测定值是阳性的，与用传统的中性缓冲液体系测定相比，其能够测定有着更广的浓度范围的白蛋白，并且可以不考虑抗原过量区域造成的区带现象的影响。

（实施例 4）

接下来，利用柠檬酸和反乌头酸作为三羧酸或三羧酸盐来研究其影响基于免疫学的悬度测定法的抗原抗体反应的 pH 值依赖性。结果将在下面描述。人白蛋白溶液按实施例 3 描述的同样方式制备。人白蛋白溶液浓度为 0, 5, 10, 30, 50, 或 100mg/dl。使用实施例 1 中描述的抗体溶液。

为了研究柠檬酸的 pH 值依赖性，分别制备了一种含有 0.05M 柠檬酸和 4wt%量的聚乙二醇 6000 的溶液和一种含有 0.05M 柠檬酸三钠和 4wt%量的聚乙二醇 6000，然后混合一起得到有着 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 或 6.0 pH 值的柠檬酸缓冲液。

为了研究反乌头酸的 pH 值依赖性，调整一种含有 0.1M 反乌头酸和 4wt%量的聚乙二醇 6000 的溶液得到有 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 或 6.0 pH 值的反乌头酸缓冲液。

MOPS 缓冲液作为对比例。设备和测定方法类似于实施例 3。测定在室温下进行（大约 20°C）。测定后，利用 pH 计测定有着各种缓冲液、抗体溶液和不同浓度人白蛋白溶液的混合液的 pH 值以观察混合液对反应体系 pH 值的影响。

结果显示在图 2 和图 3。用于每个测定的各种缓冲液、抗体溶液和不同浓度人白蛋白溶液的混合液的 pH 值与缓冲液的 pH 值相同。

图 2 显示了相应于各种 pH 值的柠檬酸缓冲液的最大到 100mg/dl 的不同浓度的白蛋白溶液的测定结果的曲线。垂直轴表示的是电压值，而水平轴表示的是用于测定的不同浓度的人白蛋白溶液。图 3 显示了相应于各种 pH 值的反乌头酸缓冲液的最大到 100mg/dl 的不同浓度的白蛋白溶液的测定结果的曲线。类似图 2，垂直轴表示的是电压值，而水平轴表示的是用于测定的不同浓度的人白蛋白溶液。图 2 和 3 中曲线图按与图 1 相同的方式评价。从相应于同一缓冲液的、具有不同浓度的人白蛋白溶液所获得测定值中减去一个当该缓冲液不含有白蛋白时的测定值（0 mg/dl）得到曲线值。

应用 4.0 到 5.5 pH 值范围的柠檬酸缓冲液和 4.5 到 5.0 pH 值范围的乌头酸缓冲液的测定显示定量化在低的浓度范围没有遇到麻烦，且与使用 MOPS 缓冲液（图 2 和图 3 中用 x 表示）的对比例相比，其测定值有所增加。进一步的，解决了抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低。对于两种缓冲液此类效应在 pH4.5 时最大化（在图 2 中用实心三角表示和在图 3 中用空心圆表示）。

对于柠檬酸缓冲液，当 pH 值为小于 4.0（在图 2 中用实心圆表示）或为 6.0 或更高时（图 2 中用空心四方形表示），没有观察到测定值的增加且测定值要低于基于 MOPS 缓冲液的测定值，进一步，观察到其没有解决抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低。在另一方面，对于反乌头酸缓冲液，当 pH 值是 5.5 或更高（在图 3 中用空心三角和实心四方形表示），没有观察到测定值的增加且测定值实际上等于或低于基于 MOPS 缓冲液的测定值，进一步，观察到其没有解决抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低。

进一步，对于乌头酸缓冲液，当 pH 值为 4.0，增加了非特异性混浊度使得在低浓度范围的定量测定遇到了麻烦；然而，观察到

其增加了测定值并解决了抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低（在图 3 中用实心圆表示）。

上面描述的结果总结如下。考虑到测定值的增加，或抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低，柠檬酸 pH 值优选在 4.0-6.0 范围和反乌头酸 pH 值优选在 4.0-5.5 范围。特别的，如果也要考虑到定量化，当 pH 值为 4.5 时，上述效应是最高的。说明 pH 值为 4.5 时有着最高效应。

根据上面描述的结果，说明在应用三羧酸或三羧酸盐的免疫反应测定方法中，反应体系的 pH 值优选设定在 4.0 到 6.0 范围内。也说明当反应体系的 pH 值设定为 4.5 时，能得到最高的效应。

同样的，说明当一个抗原抗体反应发生时，应用三羧酸或三羧酸盐的免疫反应测定试剂被优选制备使得反应体系的 pH 值设定在 4.0 到 6.0 范围内。也说明当一个抗原抗体反应发生时，免疫反应测定试剂被制备使得反应体系的 pH 值设定为 4.5 时，能得到最高的效应。

（实施例 5）

接下来，利用柠檬酸和反乌头酸作为三羧酸或三羧酸盐来研究基于免疫学的悬度测定法的抗原抗体反应效应的浓度依赖性。结果将在下面描述。

以人白蛋白做为对象物质。人白蛋白溶液按实施例 3 描述的同样方式制备。对于柠檬酸的浓度依赖性实验，人白蛋白溶液浓度制备为 0, 5, 10, 30, 50, 或 100mg/dl。对于反乌头酸的浓度依赖性实验，人白蛋白溶液浓度制备为 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 或 200mg/dl。使用实施例 1 中描述的抗体溶液。

为了研究柠檬酸的浓度依赖性，制备了一种含有 0.01, 0.02, 0.1, 0.2 或 0.3M 柠檬酸和 4wt%量的聚乙二醇 6000 的柠檬酸缓冲液 (pH 值 4.5)。

为了研究乌头酸的浓度依赖性，制备了一种含有 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 或 0.3M 反乌头酸和 4wt%量的聚乙二醇 6000 的反乌头酸缓冲液 (pH 值 4.5)。

使用 MOPS 缓冲液作为对比例。设备和测定方法类似于实施例 3，除了应用反乌头酸缓冲液的测定中，测定仪测定的依赖于光量的电流信号被放大为大约 70 倍的电压信号。测定在室温下进行 (大约 20°C)。测定后，利用 pH 计测定有着各种缓冲液、抗体溶液和不同浓度人白蛋白溶液的混合液的 pH 值以观察混合液对反应体系 pH 值的影响。

结果显示如下。当应用 0.01 和 0.02M 柠檬酸缓冲液和反乌头酸缓冲液时，用于每个测定的各种缓冲液、抗体溶液和不同浓度人白蛋白溶液的混合液的 pH 值分别变为 4.8 和 4.7。对于其他的缓冲液而言，混合液与缓冲液的 pH 值是一致的。根据实施例 4 的结果，pH 值改变的影响可以被认为是微小的且可被忽略。

图 4 显示了混合有最大到 100mg/dl 的不同浓度的白蛋白溶液的不同浓度的柠檬酸缓冲液的测定结果的曲线。图 5 显示了混合有最大到 200mg/dl 的不同浓度的白蛋白溶液的不同浓度的反乌头酸缓冲液的测定结果的曲线。

在每个图中，垂直轴表示的是电压值，而水平轴表示的是用于测定的不同浓度的人白蛋白溶液。图 4 中曲线图按与图 1 相同的方式评价。从相应于同一缓冲液的、具有不同浓度的人白蛋白溶液所获得测定值中减去一个当该缓冲液不含有白蛋白时的测定值 (0 mg/dl) 得到曲线值。

尽管缓冲液、抗体溶液和人白蛋白溶液的混合造成了柠檬酸和反乌头酸浓度的轻度降低，降低的幅度不超过 10%。因此，这种混合不认为对结果有着显著影响。

对于柠檬酸缓冲液，当柠檬酸浓度不超过 0.2M（在图 4 中用圆和三角表示）时，测定值比使用 MOPS 缓冲液（在图 4 中用 x 表示）的对比例的测定值高。测定值的增高能得到确认。因此，也观察到其解决了抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低。柠檬酸缓冲液浓度越低，上面描述的效应越高。当柠檬酸浓度为 0.3M（在图 4 中用实心四方形表示）时，测定值比在 MOPS 缓冲液中的测定值要低，观察到测定值没有增高，也观察到其没有解决抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低。

对于反乌头酸缓冲液，所有 0.01 到 0.3M 浓度的测定值都要比使用 MOPS 缓冲液（在图 5 中用 x 表示）的对比例的测定值高。也就是说，其对测定值的增高得到确认。因此，也观察到其解决了抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低。当浓度不超过 0.2M 时，这些效应是更高的，当浓度不超过 0.1M 时，效应是尤其高的（在图 5 中用圆和三角表示），和浓度为 0.05M 时最高（在图 5 中用实心三角表示）。当浓度在 0.2 到 0.05M 时（在图 5 中用三角和实心四方形表示），反乌头酸缓冲液浓度越低，效应越高。当浓度小于 0.05M 时（在图 5 中用实心三角和圆表示）不能确认效应之间的显著差异。

上面描述的结果总结如下。考虑到测定值的增加，或抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低，为了获得比常用的中性缓冲液更高的效应，柠檬酸浓度优选在不超过 0.2M 和反乌头酸浓度优选在不超过 0.3M。特别的，也发现，两种物质的浓度更优选在不超过 0.1M，这样，效应能得到提高。

根据上面描述的结果，说明在应用三羧酸或三羧酸盐的免疫反应测定方法中，反应体系的三羧酸或三羧酸盐浓度优选设定在不超过 0.3M。进一步，当反应体系的三羧酸或三羧酸盐浓度被设定为不超过 0.1M 时，可以获得进一步提高的效应。

同样的，说明应用三羧酸或三羧酸盐的免疫反应测定试剂中，反应体系的三羧酸或三羧酸盐浓度优选设定在不超过 0.3M。进一步，当反应体系的三羧酸或三羧酸盐浓度被设定为不超过 0.1M 时，可以获得进一步提高的效应。

（实施例 6）

接下来，利用免疫学的悬度测定法确认当三羧酸或三羧酸盐与其他缓冲液混合使用对抗原抗体反应的效应。结果描述如下。进行的比较基于人白蛋白的测定。人白蛋白溶液按实施例 3 中描述的制备。人白蛋白溶液浓度为 0, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, 300, 或 500mg/dl。使用一种按实施例 1 中描述的抗体溶液。使用柠檬酸和反乌头酸作为三羧酸或三羧酸盐。琥珀酸和上面描述的缓冲液一起使用。制备一种包含 0.1M 琥珀酸, 0.02M 柠檬酸和 4wt%量的聚乙二醇 6000 的缓冲液 (pH 值 4.5), 和一种包含 0.1M 琥珀酸, 0.02M 反乌头酸和 4wt%量的聚乙二醇 6000 的缓冲液 (pH 值 4.5)。作为没有三羧酸或三羧酸盐存在的对比例, 一种包含 0.12M 琥珀酸和 4wt%量的聚乙二醇 6000 的缓冲液被制备。

将荧光分光光度计 (Shimadzu 公司生产, 型号为 RF-5300PC) 用于测定。一个恒温小杯架 (Shimadzu 公司生产, 型号为 206-15440) 被放置在分光光度计的标本槽内。恒温小杯架和一个恒温水浴箱 (TAITEC 生产, 商品名为 COOLNIT BATH EL-15) 相连。维持在 25°C 的水通过水浴箱循环使得测定保持在恒温下进行。用分光光度

计测定的条件是：激发光和荧光各有 670nm 的波长，荧光侧和激发侧两者的带宽都是 3nm，灵敏度设定为高。

测定按如下进行。2.87ml 缓冲液和 0.1ml 抗体溶液搅拌混合。0.03ml 人白蛋白溶液加入混合液中，搅拌混合。在反应体系中抗体和人白蛋白的终浓度分别为大约 0.1mg/ml 和测定的白蛋白浓度乘以 0.01。混合液转入一个四方形小杯用于荧光分析。四方形小杯放在分光光度计上。一个 T 型的热电偶（来于 RS Components，型号为 219-4696）插入小杯中。时间相关性的测定在加入人白蛋白的 2 分钟后开始，每 0.04 秒一次持续 300 秒。用连接到 T 型热电偶的多导温度计（Advantest 生产，型号为 TR2114）来监测测定过程中小杯的温度。通过在测定每个反应之前对在小杯中放置的纯水进行测定，以此为基础对测定数值进行纠正以消除小杯污染对测定的影响。不同时间获得的测定值被 200-300 秒平均。得到的平均结果被认为是各种浓度的人白蛋白溶液的测定值。测定后，通过利用 pH 计测定混合液 pH 值来观察各种缓冲液、抗体溶液和不同浓度人白蛋白溶液的混合液对反应体系 pH 值的影响。

结果显示如下。用于每个测定的各种缓冲液、抗体溶液和不同浓度人白蛋白溶液的混合液的 pH 值与缓冲液的 pH 值是一致的。测定中小杯的温度保持在 $25.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ，用热电偶测定。

图 6 显示了相应于各种缓冲液的最大到 500mg/dl 的不同浓度的白蛋白溶液的测定结果的曲线。垂直轴表示的是散射光量的强度，而水平轴表示的是用于测定的不同浓度的人白蛋白溶液。从相应于同一缓冲液的、具有不同浓度的人白蛋白溶液所获得测定值中减去一个当该缓冲液不含有白蛋白时的测定值（0 mg/dl）得到曲线值。

做为结果，与只包含琥珀酸的对比例（在图 6 中用实心三角表示）相比，包含柠檬酸或反乌头酸的缓冲液（在图 6 中用圆表示）

增加了测定值。也就是，效应是肯定的。因此，也观察到其解决了抗原过量区域引起的区带现象所造成的测定值的降低。

根据上面描述的结果，甚至当三羧酸或三羧酸盐和其他缓冲液一起使用时，效应能是肯定的。

（实施例 7）

接下来，将应用按实施例 2 制备的山羊抗人 CRP 多克隆抗体溶液的试剂对人 CRP 测定的效应和在免疫反应测定方法中常用的中性反应体系做了比较。结果描述如下。用含有 0.05M MOPS, 0.04wt% 和 NaN₃ 的缓冲液 (pH 7.4) 稀释纯化的人 CRP (国际 Chemicon 生产, 号为 21042246) 而制备了测定中应用的不同浓度的 CRP 溶液。制备的人 CRP 溶液浓度为 0, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 或 200mg/dl。抗体溶液包含了使用按实施例 2 制备的多克隆抗体溶液的试剂。使用 MOPS 缓冲液作为不包含三羧酸或三羧酸盐的对比例。

将按实施例 3 描述的相同设定的设备和按实施例 3 描述的相同的测定条件应用于测定。利用和实施例 3 描述的相同的测定方法和测定数值处理方法，只有抗原溶液是不同的。

反应体系中抗体和人 CRP 的终浓度分别是大约 0.036mg/dl 和测定中使用的人 CRP 溶液浓度乘以 0.046。

结果显示如下。图 7 显示了和最大浓度到 200mg/dl 的人 CRP 溶液混合的缓冲液的测定结果的曲线。垂直轴表示的是电压值，而水平轴表示的是用于测定的不同浓度的人 CRP 溶液。图 7 的曲线按和图 1 中相同的方式评价。从相应于同一缓冲液的、具有不同浓度的人 CRP 溶液所获得测定值中减去一个当该缓冲液不含有 CRP 时的测定值 (0 mg/dl) 得到曲线值。

根据图 7, 与使用 MOPS 缓冲液的对比例测定抗原抗体反应(在图 7 中用空心圆表示) 相比, 当用按实施例 2 制备的包含有山羊抗

人 CRP 多克隆抗体溶液、0.02M 氯化钙和柠檬酸的缓冲液所制备的试剂进行测定（在图 7 中用实心圆表示）时，更高的测定值得到明显的肯定。

（实施例 8）

接下来，将应用按实施例 2 制备的鼠抗人 CRP 单克隆抗体溶液的试剂对人 CRP 测定的效应和在免疫反应测定方法中常用的中性反应体系做了比较。结果描述如下。

同实施例 7 一样的方式制备用于测定的不同浓度的人 CRP 溶液。制备的人 CRP 溶液浓度为 0, 10, 20, 30, 50, 70, 或 100mg/dl。抗体溶液包含了使用按实施例 2 制备的单克隆抗体溶液的试剂。使用 MOPS 缓冲液作为不包含三羧酸或三羧酸盐的对比例。

将按实施例 6 描述的相同设定的设备和按实施例 6 描述的相同的测定条件应用于使用包含柠檬酸做为三羧酸或三羧酸盐的试剂的测定。利用和实施例 6 描述的相同的测定方法和测定数值处理方法，仅抗原溶液是不同的。

反应体系中抗体和人 CRP 的终浓度分别是大约 0.033mg/dl 和测定中使用的人 CRP 溶液浓度乘以 0.010。

将按实施例 3 描述的相同设定的设备和按实施例 3 描述的相同的测定条件应用于使用包含反乌头酸做为三羧酸或三羧酸盐的试剂的测定。利用和实施例 3 描述的相同的测定方法和测定数值处理方法，仅抗原溶液是不同的。

反应体系中抗体和人 CRP 的终浓度分别是大约 0.036mg/dl 和测定中使用的人 CRP 溶液浓度乘以 0.046。

结果显示如下。图 8 显示了表示测定结果的曲线，其中使用了含有柠檬酸做为三羧酸或三羧酸盐的试剂和将最高到 100mgdl 的不同浓度的人 CRP 加到各种缓冲液中。垂直轴表示的是散射光量的强

度，而水平轴表示的是用于测定的不同浓度的人 CRP 溶液。从相应于同一缓冲液的、具有不同浓度的人 CRP 溶液所获得测定值中减去一个当该缓冲液不含有 CRP 时的测定值（0 mg/dl）得到曲线值。测定中小杯的温度保持在 $25.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ，用热电偶测定。

根据图 8，使用 MOPS 缓冲液的对比例来测定抗原抗体反应时，当浓度达到 20mg/dl 之前，人 CRP 溶液之间的测定值没有显著差异。这样，就不能充分地测定出人 CRP 浓度的差异（在图 8 中用空心圆表示）。甚至当测定值达到至少 30mg/dl，不同测定值之间的差异和人 CRP 浓度的分辨率仍是低的。另一方面，当利用包含柠檬酸的试剂进行测定时，在测定不同浓度的人 CRP 溶液时可以清楚地得到更高的测定值。这样，甚至，在所测定的人 CRP 溶液浓度达到 20mg/dl 时，也能测定出人 CRP 浓度的差异（在图 8 中用实心圆表示）。

图 9 显示了表示测定结果的曲线，其中使用了含有反乌头酸做为三羧酸或三羧酸盐的试剂和将最高到 100mg/dl 的不同浓度的人 CRP 加到各种缓冲液中。垂直轴表示的是散射光量的强度，而水平轴表示的是用于测定的不同浓度的人 CRP 溶液。曲线按图 1 的方式评价。从相应于同一缓冲液的、具有不同浓度的人 CRP 溶液所获得测定值中减去一个当该缓冲液不含有 CRP 时的测定值（0 mg/dl）得到曲线值。测定中小杯的温度保持在 $25.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ，用热电偶测定。

根据图 9，当使用 MOPS 缓冲液的对比例用于测定抗原抗体反应时，浓度达到 10mg/dl 之前的人 CRP 溶液之间的测定值没有显著差异。这样，就不能充分地测定出人 CRP 浓度的差异（在图 9 中用空心圆表示）。另一方面，当利用包含反乌头酸的试剂用于测定时，在测定不同浓度的人 CRP 溶液可以清楚地得到更高的测定值。这样，甚至在测定浓度在 10mg/dl 以下的人 CRP 溶液时，也能测定出人 CRP 浓度的差异（在图 9 中用实心圆表示）。

按上面实施例 7 和 8 描述的显示，可以肯定本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂能提高人 CRP 测定的测定值。

工业实用性

如上所示，本发明能提供一种能明显地提高测定值的免疫反应测定方法和用于该方法的免疫反应测定试剂。进一步的，本发明能提供一种能解决在抗原过量区域出现的区带现象的免疫反应测定方法和用于该方法的免疫反应测定试剂。

图1

- 0.05M 柠檬酸, 4wt% PEG6000, PH4.5
- 0.05M 乌头酸, 4wt% PEG6000, PH4.5
- ▲ 0.05M MOPS, 4wt% PEG6000, PH4.5

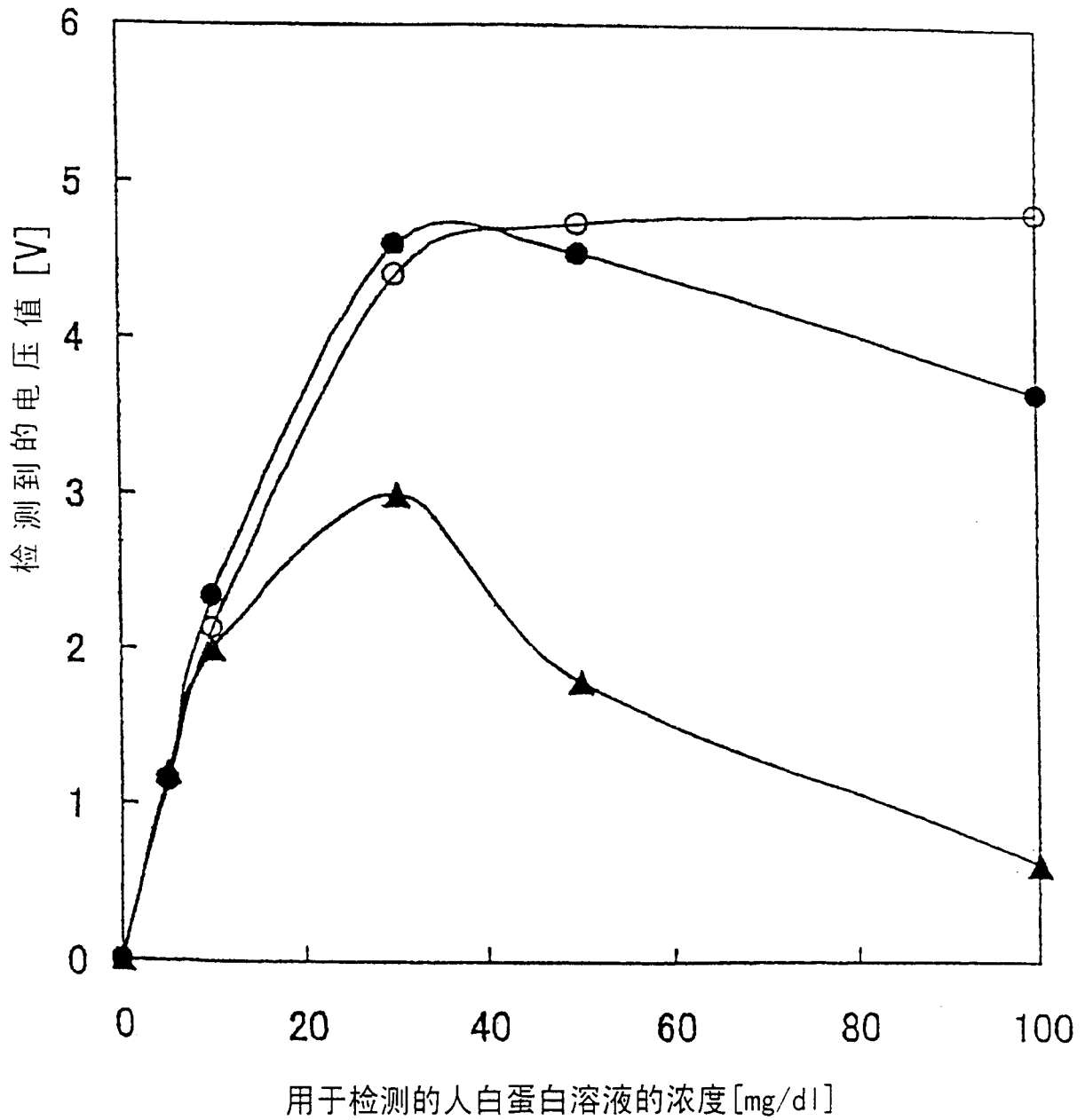


图2

- 0.05M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH3.5
- 0.05M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH4.0
- ▲ 0.05M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH4.5
- △ 0.05M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH5.0
- 0.05M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH5.5
- 0.05M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH6.0
- × 0.05M MOPS, 4% PEG6000, PH7.4

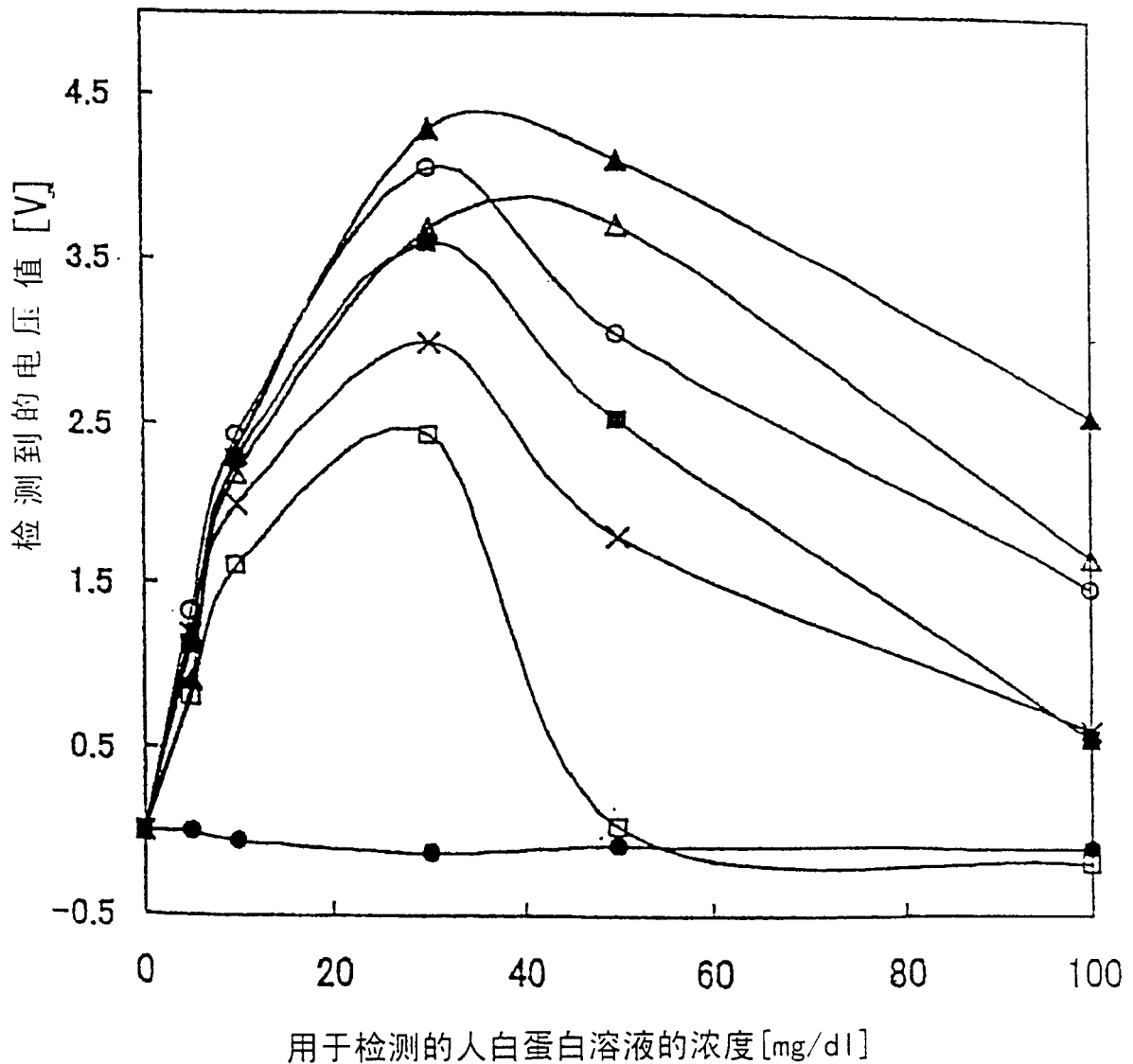


图3

- 0.1M 反乌头酸, 4% PEG6000, pH4.0
- 0.1M 反乌头酸, 4% PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.1M 反乌头酸, 4% PEG6000, pH5.0
- △ 0.1M 反乌头酸, 4% PEG6000, pH5.5
- 0.1M 反乌头酸, 4% PEG6000, pH6.0
- × 0.05M MOPS, 4% PEG6000, PH7.4

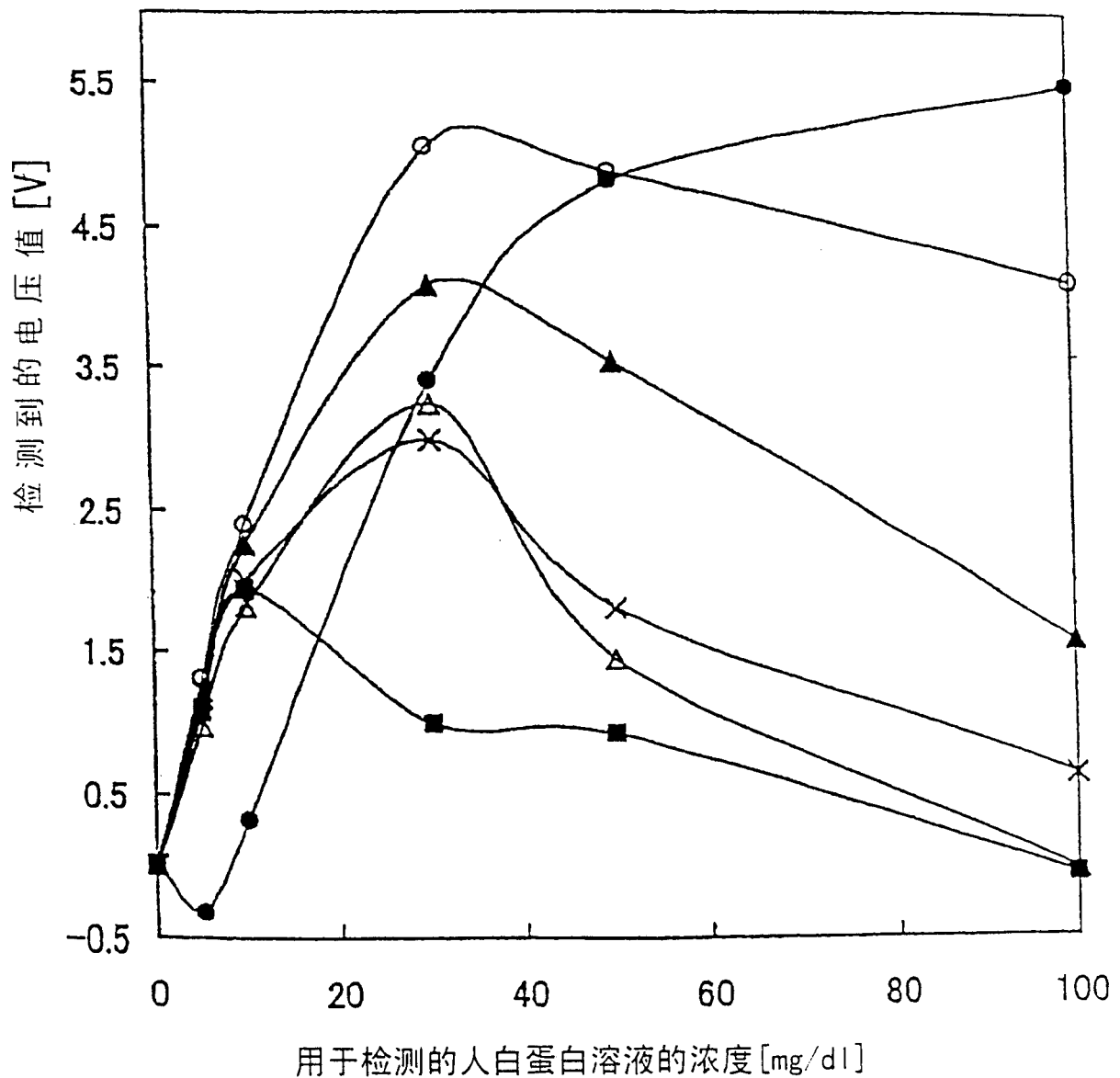


图4

- 0.01M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH4.5
- 0.02M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH4.5
- ▲ 0.1M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH4.5
- △ 0.2M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH4.5
- 0.3M 柠檬酸, 4% PEG6000, PH4.5
- × 0.05M MOPS, 4% PEG6000, PH7.4

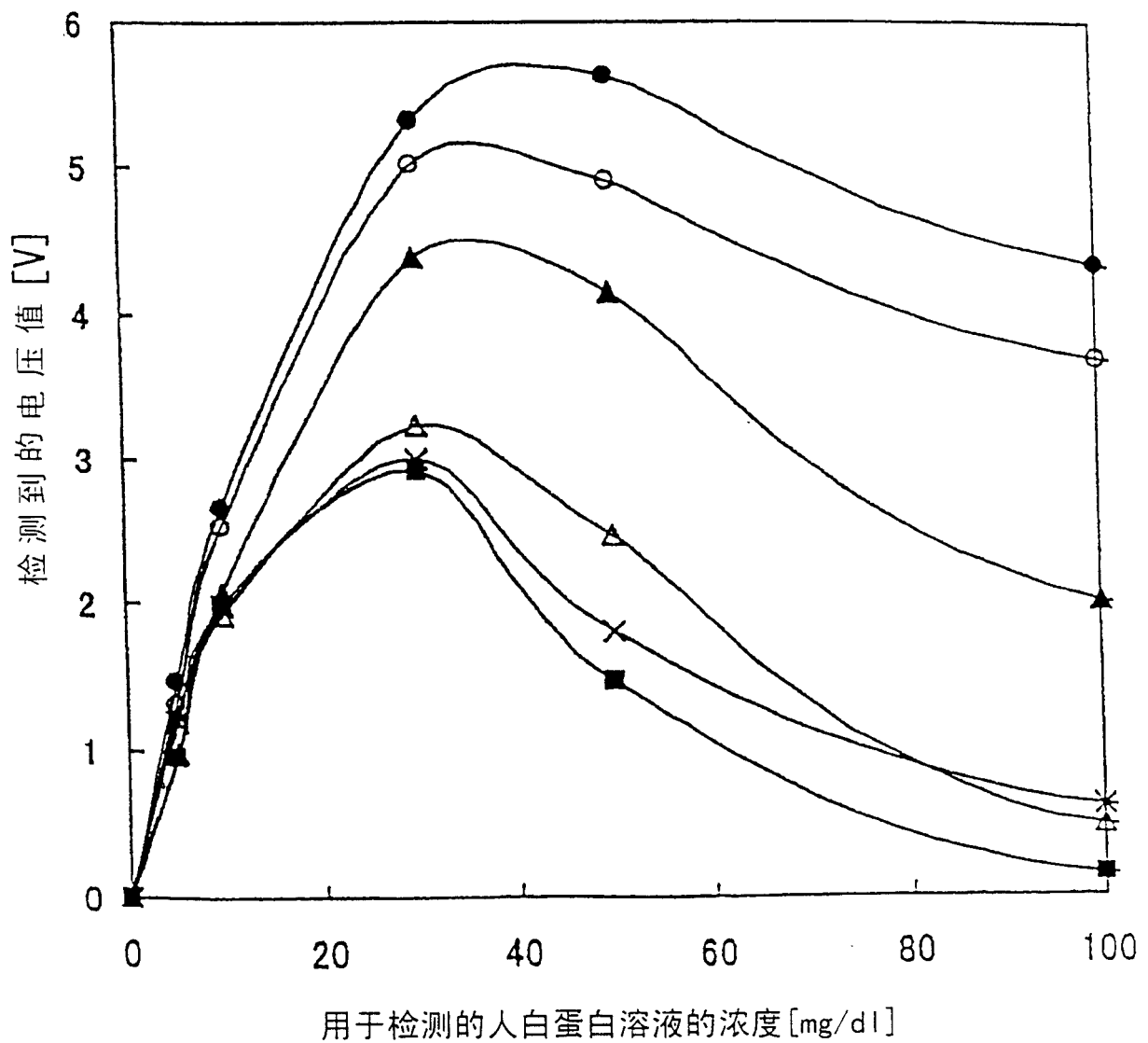


图5

- 0.01M 反乌头酸, 4wt% PEG6000, pH4.5
- 0.02M 反乌头酸, 4wt% PEG6000, pH4.5
- ▲— 0.05M 反乌头酸, 4wt% PEG6000, pH4.5
- △— 0.1M 反乌头酸, 4wt% PEG6000, pH4.5
- 0.2M 反乌头酸, 4wt% PEG6000, pH4.5
- 0.3M 反乌头酸, 4wt% PEG6000, pH4.5
- ×— 0.05M MOPS, 4% PEG6000, PH7.4

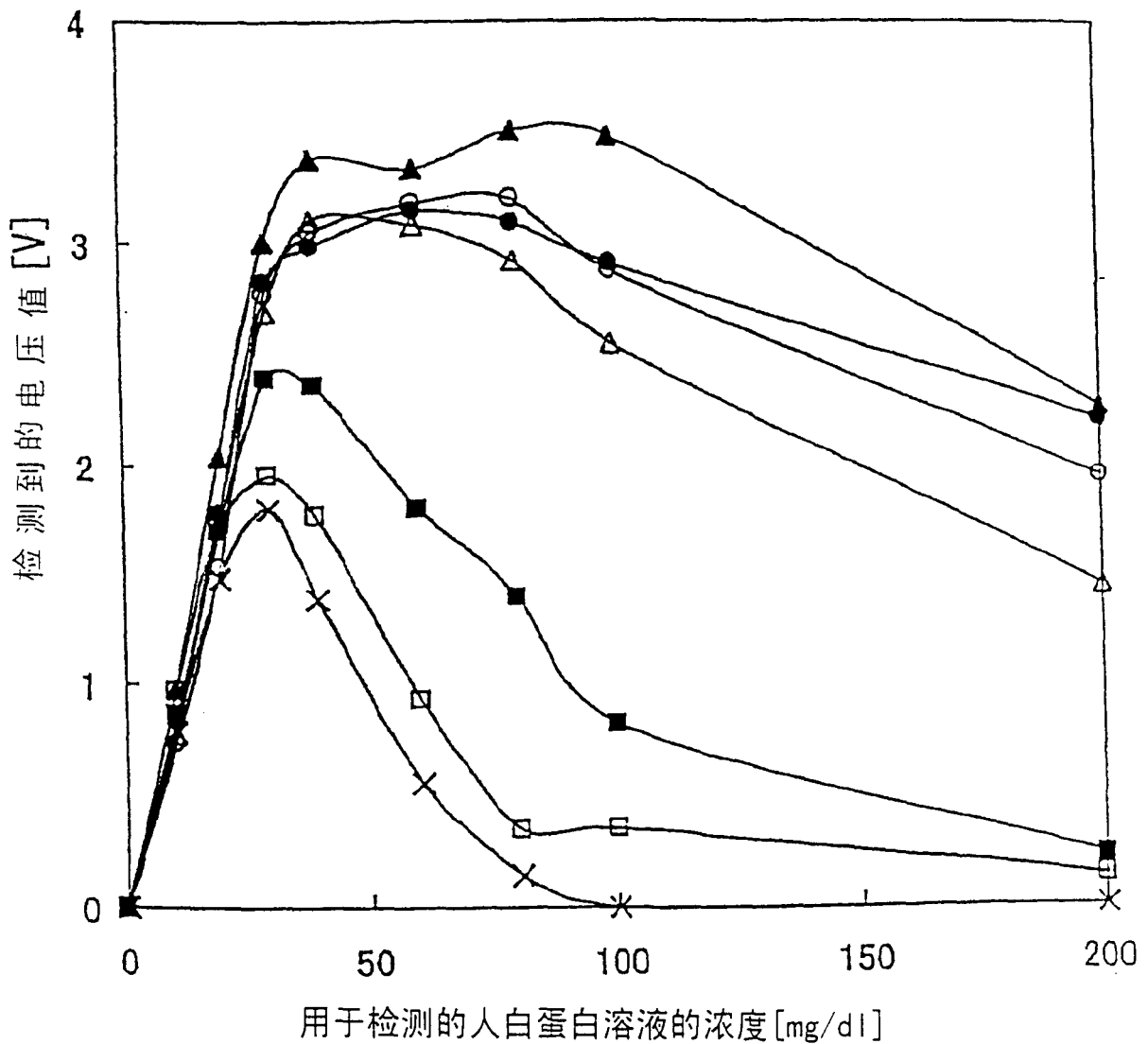


图6

- 0.1M 琥珀酸, 0.02M 柠檬酸,
4% PEG6000, pH4.5
- 0.1M 琥珀酸, 0.02M 反乌头酸,
4% PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.12M 琥珀酸, 4% PEG6000, pH4.5

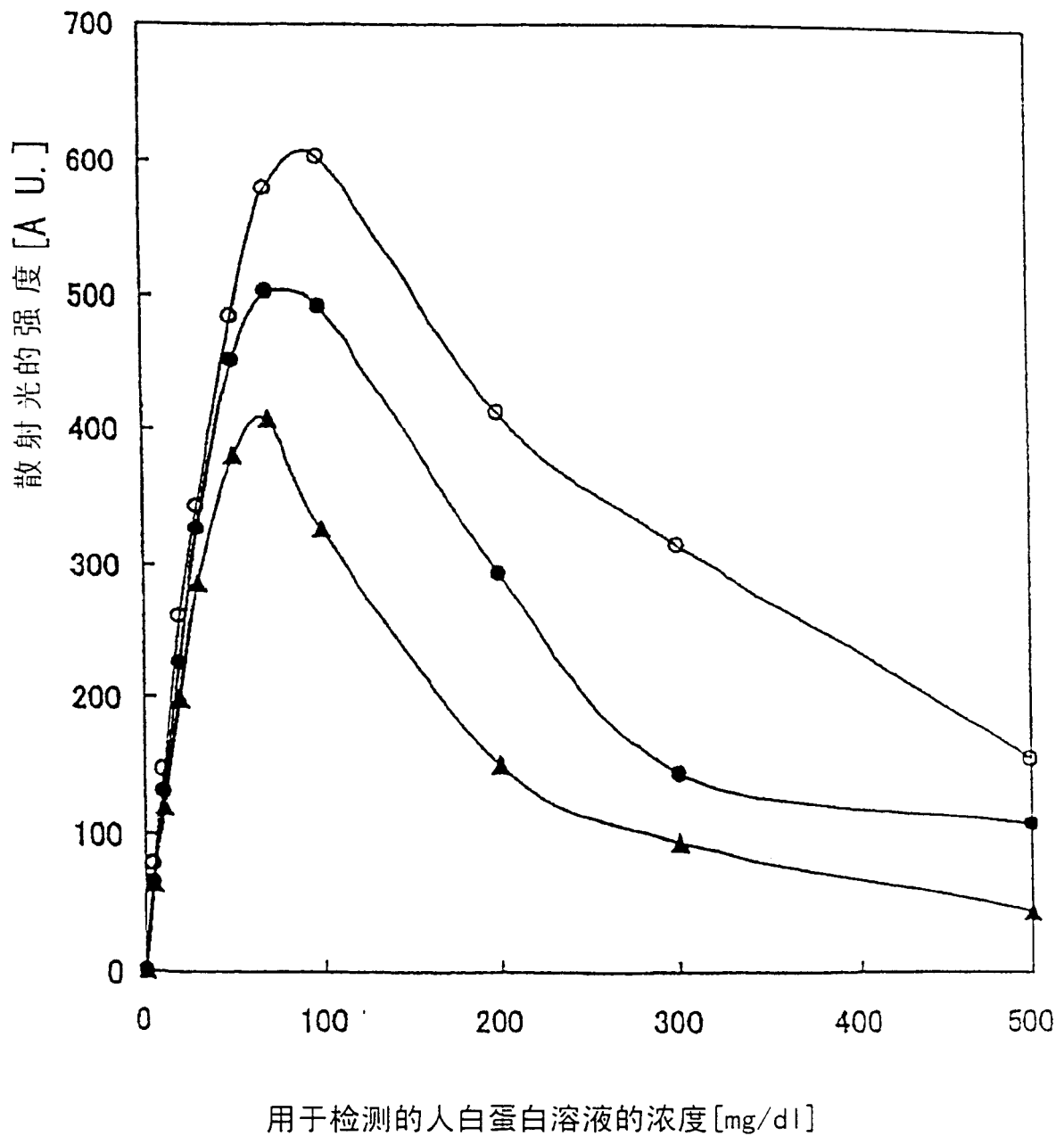


图7

- 0.02M 柠檬酸, 0.02M 氯化钙, 4wt% PEG6000, pH4.5
- 0.05M MOPS, 4wt% PEG6000, pH7.4

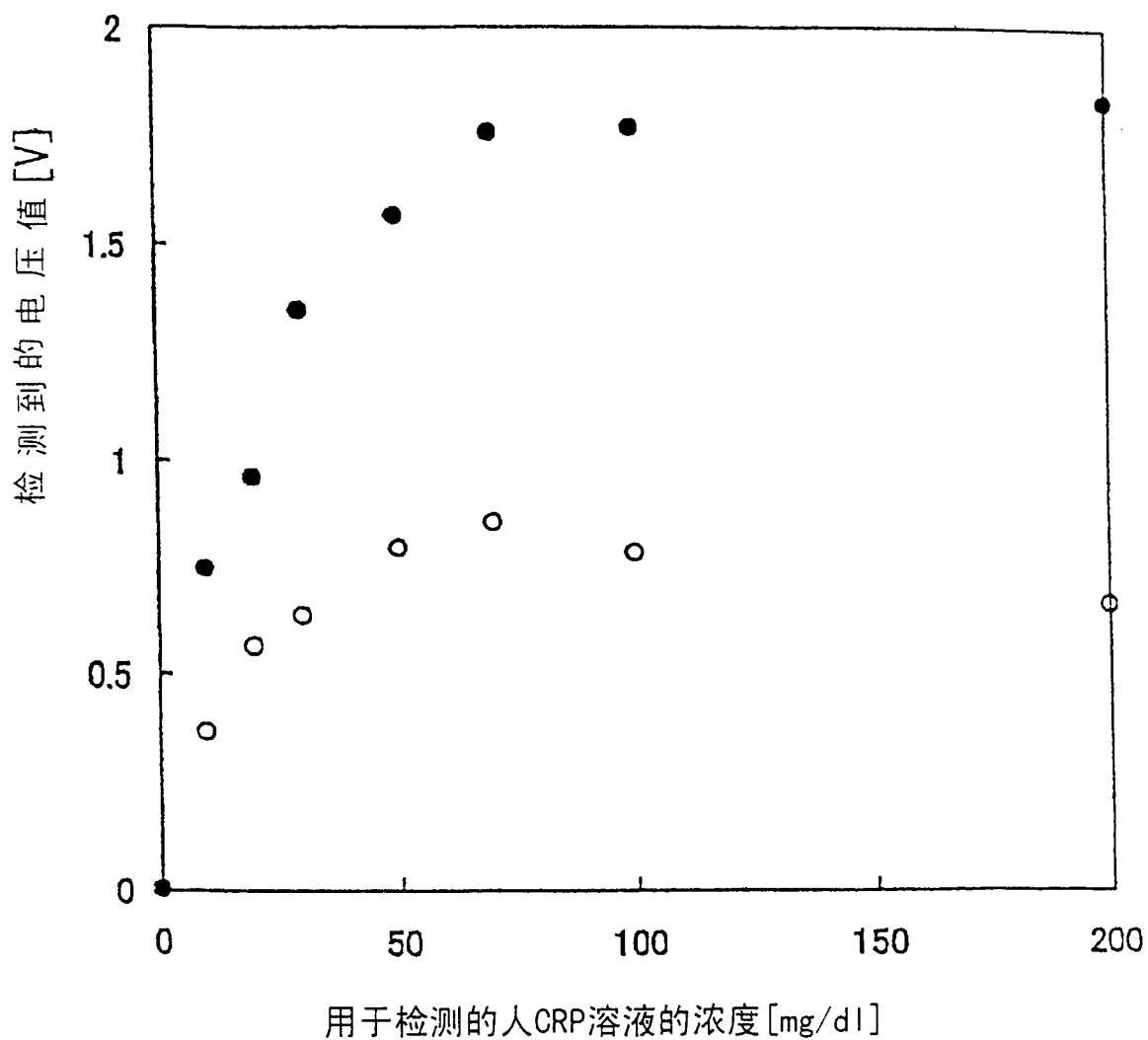


图8

● 0.05M 柠檬酸, 4wt% PEG6000, pH4.5
○ 0.05M MOPS, 4wt% PEG6000, pH7.4

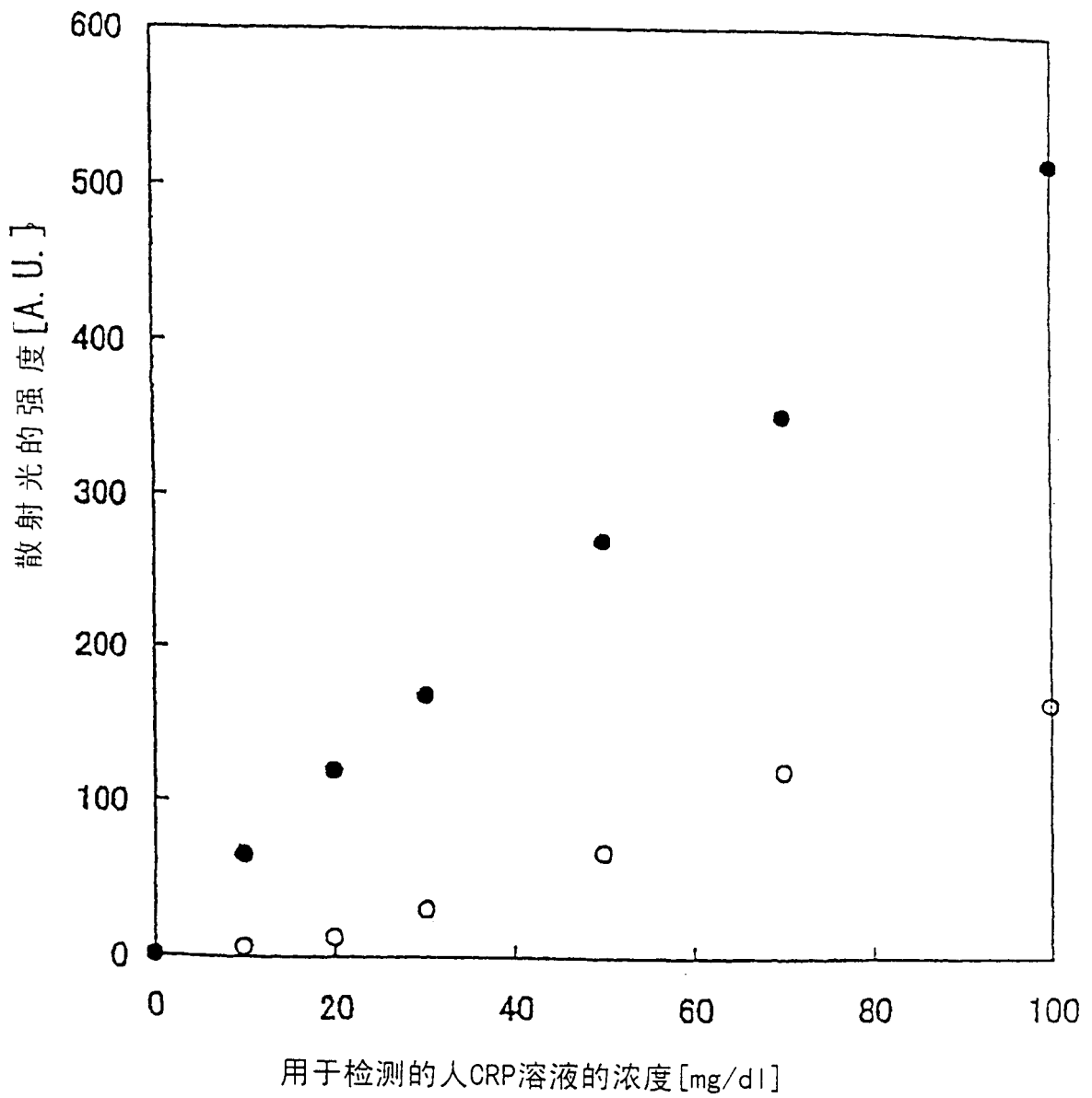
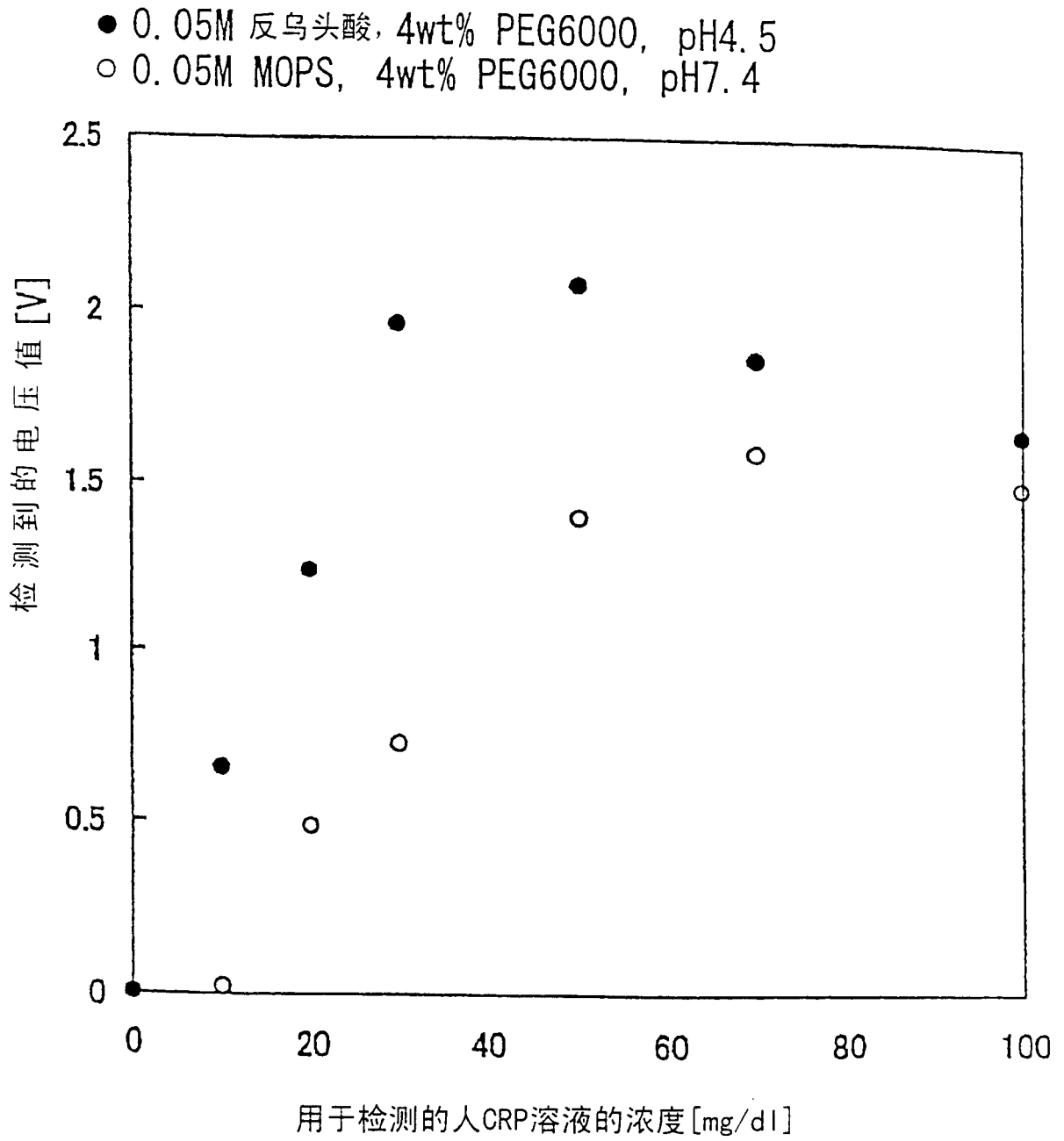


图9



专利名称(译)	免疫反应测定方法及其所使用的免疫反应测定试剂		
公开(公告)号	CN1258089C	公开(公告)日	2006-05-31
申请号	CN02802082.0	申请日	2002-06-05
申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	龟井明仁 权丈纪子 河村达朗 平井真人		
发明人	龟井明仁 权丈纪子 河村达朗 平井真人		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/536 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/54393		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2001179710 2001-06-14 JP 2001368286 2001-12-03 JP		
其他公开文献	CN1463364A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种免疫学测定一种包含在样本中的对象物质的方法，其步骤包括在三羧酸或三羧酸盐存在下和酸性条件下使对象物质和能特异性结合到对象物质的特异性结合物质形成一种抗原抗体复合物。本发明还提供了在此方法中使用的包含三羧酸或三羧酸盐的试剂。试剂中包含有一种对象物质以及能免疫学和特异性地与对象物质结合的特异性结合物质。制备此试剂以使得对象物质和特异性结合物质能在酸性条件下结合在一起以形成抗原和抗体复合物。

