



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103097893 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201180017117. 5

(22) 申请日 2011. 03. 31

(30) 优先权数据

2010-083681 2010. 03. 31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 09. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2011/058281 2011. 03. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/125871 JA 2011. 10. 13

(73) 专利权人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 阿部孝行 大田哲也

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 苗堃 陈剑华

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101341408 A , 2009. 01. 07,

JP 2001-242171 A , 2001. 09. 07,

JP 2003-294753 A , 2003. 10. 15,

JP 平 10-282096 A , 1998. 10. 23,

陈红清 等. 抗磷脂抗体综合症的免疫学. 《国外医学皮肤性病学分册》. 1997, 第 23 卷 (第 6 期),

审查员 段晓露

权利要求书1页 说明书12页 附图12页

(54) 发明名称

甘油磷脂的稳定化方法及使用该方法的试剂

(57) 摘要

本发明提供一种使用甘油磷脂、用于准确稳定的免疫测定的试剂及其稳定化方法。其中,被测物为血中的抗体或抗原,在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、在被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物,其特征在于,在免疫反应的反应系中添加甘油磷脂以及聚乙烯吡咯烷酮。

1. 试剂, 其为测定血中抗磷脂抗体的免疫反应试剂, 其特征在于, 含有磷脂抗原、溶解在免疫反应的反应系中的状态的甘油磷脂, 以及聚乙烯吡咯烷酮,

所述甘油磷脂为选自磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸中的一种以上,

磷脂抗原负载在不溶性载体上。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂, 其特征在于, 抗磷脂抗体为因梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂, 其特征在于, 抗磷脂抗体为因属于自身免疫疾病的抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

4. 改善含甘油磷脂的液体的保存稳定性的方法, 其特征在于, 在用于测定血中抗磷脂抗体的、含磷脂抗原和添加在免疫反应的反应系中的溶解或分散状态的甘油磷脂的免疫反应试剂中添加聚乙烯吡咯烷酮,

所述溶解或分散状态的甘油磷脂为选自磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸中的一种以上,

所述磷脂抗原负载在不溶性载体上。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 被测物抗磷脂抗体为因梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体。

6. 根据权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 被测物抗磷脂抗体为因属于自身免疫疾病的抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

甘油磷脂的稳定化方法及使用该方法的试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗磷脂抗体等被测物的免疫测定试剂及该试剂中所使用的使甘油磷脂稳定化的方法。

背景技术

[0002] 抗磷脂抗体因下面二种疾病而在生物体内产生。一种是在感染了梅毒的病原体即梅毒螺旋体(*Treponema Pallidum*)的情况下,另一种是在一种叫抗磷脂抗体综合症的自身免疫疾病发病的情况下。

[0003] 任何抗磷脂抗体均为针对以磷脂类中的心磷脂为主要成分的磷脂抗原而产生的抗体,其诊断中所使用的检查试剂含有心磷脂。

[0004] 目前,作为使用上述磷脂的梅毒检查方法,正在使用的有以碳或高岭土粉末为载体的 VDRL (性病研究实验室)法、RPR (快速血迹反应素)卡片试验法(非专利文献 1)、以由聚苯乙烯共聚物等形成的乳胶为载体、用生化自动分析仪进行测定的乳胶凝集法(专利文献 1)等。

[0005] 另一方面,作为磷脂抗体综合症的检查方法,用 ELISA 法进行测定(专利文献 2)。

[0006] 作为用这些检查方法测定的检体,使用血清、血浆、脑脊液等。

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献 1 :日本特开平 7-103980 号公报

[0009] 专利文献 2 :日本特开平 6-148193 号公报

[0010] 专利文献 3 :日本特开平 10-282096 号公报

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献 1 :Public Health Reports Vol. 75 (1960),985-988

发明内容

[0013] 一般情况下,通过对用抗原抗体反应进行的免疫凝集反应进行光学测定来诊断是否患有疾病的试剂有时会受到检体中的干扰成分的影响,测定值出现不规则降低。这种现象通过将被测物添加到生理盐水、缓冲液等不受检体中的干扰成分影响的溶液中时和在含有血清及血浆等干扰成分时测定值会有很大不同而变得明显。

[0014] 作为由发生这种现象所引发的问题,可以列举以下两点。

[0015] (1) 检体中的抗体量或抗原量少时,存在由于干扰成分的影响,免疫凝集反应不充分,虽然罹患疾病,但仍漏检的可能性。

[0016] (2) 为了测定含有测定试剂的测定范围以上的抗体量或抗原量的检体的准确的抗体量或抗原量,通常用生理盐水或血清等对该检体进行稀释,使抗体量或抗原量减少至测定范围内进行测定,之后乘以稀释倍数,算出准确的抗体量或抗原量。然而,由于生理盐水中不含上述干扰成分,用不含抗体的血清对检体进行稀释时和用生理盐水进行稀释时的测定结果会背离,不能准确测定抗体量或抗原量。

[0017] 为了弄清这种血清、血浆中的干扰成分,本发明者进行了研究,结果发现,该干扰成分为内源性脂蛋白。进一步研究发现,只要向免疫反应的反应系中添加甘油磷脂即可回避该内源性脂蛋白对测定值的影响,可以更准确地测出检体中的抗体或抗原。

[0018] 通常,在测定抗磷脂抗体时,作为致敏剂而添加水溶性高分子,然而,已经发现,在试剂含有甘油磷脂的情况下,若添加一般使用的聚乙二醇等,则长期保存稳定性会出现问题。

[0019] 因此,本发明的课题在于提供一种使用甘油磷脂、用于准确稳定的免疫测定的试剂及其稳定化方法。

[0020] 因此,为了使使用甘油磷脂的免疫测定用试剂兼具稳定性和准确的测定值,本发明者做了各种研究,结果发现,未能通过添加聚乙二醇、普鲁兰多糖、含 2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的聚合物等而解决的长期保存稳定性在添加聚乙烯吡咯烷酮后得到显著改善,且可以准确测定被测物,由此完成了本发明。

[0021] 即,本发明具有以下构成。

[0022] (1) 一种试剂,其中,被测物为血中的抗体或抗原,在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、在被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物,其特征在于,在免疫反应的反应系中添加甘油磷脂及聚乙烯吡咯烷酮。

[0023] (2) (1)所述的试剂,其中,甘油磷脂为选自磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺及磷脂酰丝氨酸中的一种以上。

[0024] (3) (1)或(2)所述的试剂,其中,被测物为抗磷脂抗体,通过与磷脂抗原的免疫反应来测定前述抗体。

[0025] (4) (3)所述的试剂,其中,磷脂抗原负载在不溶性载体上。

[0026] (5) (3)或(4)所述的试剂,其中,被测物抗磷脂抗体为因梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体。

[0027] (6) (3)或(4)所述的试剂,其中,被测物抗磷脂抗体为因自身免疫疾病抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

[0028] (7) 一种测定方法,其中,被测物为血中的抗体或抗原,在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、在被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物,其特征在于,在免疫反应的反应系中添加甘油磷脂及聚乙烯吡咯烷酮。

[0029] (8) (7)所述的测定方法,其中,甘油磷脂为选自磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺及磷脂酰丝氨酸中的一种以上。

[0030] (9) (7)或(8)所述的测定方法,其中,被测物为抗磷脂抗体,通过与磷脂抗原的免疫反应测定前述抗体。

[0031] (10) (9)所述的测定方法,其中,磷脂抗原负载在不溶性载体上。

[0032] (11) (9)或(10)所述的测定方法,其中,被测物抗磷脂抗体为因梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体。

[0033] (12) (9)或(10)所述的测定方法,其中,被测物抗磷脂抗体为因自身免疫疾病抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

[0034] (13) 一种含有甘油磷脂的液体的稳定化方法,其特征在于,向含有甘油磷脂的液体中添加聚乙烯吡咯烷酮。

[0035] (14) 一种使含有甘油磷脂的液体稳定化的试剂,其特征而在于,以聚乙烯吡咯烷酮为有效成分。

[0036] 根据本发明,能提供一种在用免疫反应测定被测物时,可以回避内源性脂蛋白对免疫反应的影响且保存稳定性良好、能长时间发挥性能的试剂。

附图说明

[0037] 图 1 是研究 1 中的比较参考例 1 的结果,反应系中不含甘油磷脂。

[0038] 图 2 是研究 1 中的参考例 2 的结果,是反应系中含有 0.06 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油时的结果。

[0039] 图 3 是研究 2 中的参考例 1 的结果,是反应系中含有 0.12 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油时的结果。

[0040] 图 4 是研究 2 中的参考例 2 的结果,是反应系中含有 0.06 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油时的结果。

[0041] 图 5 是研究 2 中的参考例 3 的结果,是反应系中含有 0.03 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油时的结果。

[0042] 图 6 是研究 2 中的参考例 4 的结果,是反应系中含有 0.03 重量%的为合成磷脂酰甘油的 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐时的结果。

[0043] 图 7 是研究 2 中的参考例 5 的结果,是反应系中含有 0.06 重量%鸡蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺时的结果。

[0044] 图 8 是研究 2 中的参考例 6 的结果,是反应系中含有 0.03 重量%的为合成磷脂酰胆碱的 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱时的结果。

[0045] 图 9 是研究 2 中的参考例 7 的结果,是反应系中含有 0.03 重量%的为合成磷脂酰胆碱的 1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱时的结果。

[0046] 图 10 是研究 2 中的参考例 8 的结果,是反应系中含有鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油 0.015 重量%及鸡蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺 0.015 重量%时的结果。

[0047] 图 11 是研究 2 中的比较参考例 1 的结果,是反应系中不含甘油磷脂时的结果。

[0048] 图 12 是实施例 1 的结果,是检体稀释液中含有 0.43mg/mL 鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油且含有 0.5 重量%聚乙烯吡咯烷酮时的结果。

[0049] 图 13 是实施例 2 的结果,是检体稀释液中含有 0.55mg/mL 鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油且含有 0.5 重量%聚乙烯吡咯烷酮时的结果。

[0050] 图 14 是实施例 3 的结果,是检体稀释液中含有 0.64mg/mL 鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油且含有 0.5 重量%聚乙烯吡咯烷酮时的结果。

[0051] 图 15 是比较例 1 的结果,是检体稀释液中含有 0.43mg/mL 鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油且含有 0.8 重量%普鲁兰多糖时的结果。

[0052] 图 16 是比较例 2 的结果,是检体稀释液中含有 0.43mg/mL 鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油且含有 0.5 重量%磷脂质聚合物(lipidure)时的结果。

[0053] 图 17 是比较例 3 的结果,是检体稀释液中含有 0.43mg/mL 鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油且含有 0.6 重量%聚乙二醇时的结果。

具体实施方式

[0054] 本发明为一种试剂,它是一种被测物为血中的抗体或抗原,在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、在被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物的试剂,其特征在于,向免疫反应的反应系中添加甘油磷脂及聚乙烯吡咯烷酮。本发明还为一种使用所述试剂的被测物测定方法。

[0055] 本发明的试剂中含有用于回避内源性脂蛋白的影响的甘油磷脂和提高含有该甘油磷脂的液体的保存稳定性的聚乙烯吡咯烷酮。

[0056] 作为上述甘油磷脂,可以是磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸等。其中,优选磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸。

[0057] 添加的甘油磷脂的浓度优选为在反应系中含有 0.005 ~ 0.20 重量%。更优选为 0.015 ~ 0.12 重量%,但由于添加量需要根据测定中使用的检体量做适当调节,因而并不局限于此范围。

[0058] 此外,可将甘油磷脂添加到反应体系中,也可添加到检体稀释液中,还可添加到含有抗体、抗原的试剂中,但从回避内源性脂蛋白的影响的效果的角度考虑,优选添加到检体稀释液中。

[0059] 上述磷脂酸不问其来源动物或植物。磷脂酸一般通过用磷脂酶 A2 分解磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油而得到。

[0060] 对上述磷脂酸中所含的二个酰基的碳数及不饱和度无限制。一般为碳数 10 ~ 18、含有 0 ~ 2 个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。一般地,动物、植物来源的的磷脂酸是具有不同碳数的酰基的磷脂酸及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酸组合而成的混合物。

[0061] 上述磷脂酸可以是化学合成物。实际市售的有 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酸钠盐、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酸钠盐、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酸钠盐等。

[0062] 上述磷脂酰胆碱不问其来源动物或植物。常用的为由大豆、鸡蛋黄精制而成的磷脂酰胆碱。

[0063] 对上述磷脂酰胆碱中所含的二个酰基的碳数和不饱和度无限制。一般为碳数 10 ~ 22、含有 0 ~ 2 个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。一般地,动物、植物来源的磷脂酰胆碱是具有不同碳数的酰基的磷脂酰胆碱及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酰胆碱组合而成的混合物。

[0064] 上述磷脂酰胆碱可以是化学合成物。实际市售的有 1,2-二癸酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1,2-二亚油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1-肉豆蔻酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1-肉豆蔻酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱、1-硬脂酰-2-油酰-

sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰-2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱等。

[0065] 上述磷脂酰甘油不问其来源动物或植物。常用的为由大豆、鸡蛋黄精制而成的磷脂酰甘油。

[0066] 对上述磷脂酰甘油中所含的二个酰基的碳数和不饱和度无限制。一般为碳数10~22、含有0~2个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。一般地,动物、植物来源的磷脂酰甘油是具有不同碳数的酰基的磷脂酰甘油及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酰甘油组合而成的混合物。

[0067] 上述磷脂酰甘油可以是化学合成物。实际市售的有1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸甘油铵盐、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸甘油铵盐、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸甘油铵盐、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐等。

[0068] 上述磷脂酰乙醇胺不问其来源动物或植物。常用的为由大豆、鸡蛋黄精制而成的磷脂酰乙醇胺。

[0069] 对上述磷脂酰乙醇胺中所含的二个酰基的碳数和不饱和度无限制。一般为碳数10~22、含有0~2个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。一般地,动物、植物的磷脂酰乙醇胺是具有不同碳数的酰基的磷脂酰乙醇胺及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酰乙醇胺组合而成的混合物。

[0070] 上述磷脂酰乙醇胺可以是化学合成物。实际市售的有1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺等。

[0071] 上述磷脂酰丝氨酸不问其来源动物或植物。常用的为由大豆、鸡蛋黄精制而成的磷脂酰丝氨酸。

[0072] 对上述磷脂酰丝氨酸中所含的二个酰基的碳数和不饱和度无限制。一般为碳数10~22、含有0~2个不饱和键的酰基。此外,二个酰基各自的碳数及不饱和键的数目不必相同,可以是不同碳数的酰基的组合、饱和与饱和、饱和与不饱和或不饱和与不饱和的酰基的组合。一般地,动物、植物来源的的磷脂酰丝氨酸是具有不同碳数的酰基的磷脂酰丝氨酸及具有不同不饱和键数的酰基的磷脂酰丝氨酸组合而成的混合物。

[0073] 上述磷脂酰丝氨酸可以是化学合成物。实际市售的有1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐等。

[0074] 上述甘油磷脂优选以溶解或分散在反应系的缓冲液中的状态存在。对于难溶的甘油磷脂,可以用超声波处理进行分散或溶解。此外,也可通过添加表面活性剂使其溶解。

[0075] 作为上述表面活性剂,一般地,只要是能增溶脂质的表面活性剂即可使用,优选蔗糖单月桂酸酯等蔗糖脂肪酸酯、溶血磷脂酰胆碱、辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷等烷基糖苷、硫酸葡聚糖等。

[0076] 本发明中使用的聚乙烯吡咯烷酮可以使用工业合成的分子量 1 万到 36 万左右的聚乙烯吡咯烷酮,但以聚乙烯吡咯烷酮的粘度指标 K 值计在 30 以上者为宜,K 值在 60 以上者更佳。

[0077] 这里,K 值是就聚乙烯吡咯烷酮而言,作为分子量的尺度而通常使用的数值,具体地,对聚乙烯吡咯烷酮的 1 重量%水溶液,在 25℃下用毛细管粘度计测定相对粘度,代入下述 Fikentscher 粘度公式

[0078] (公式 1)

$$[0079] \quad \log_{10} \eta_{rel} = \left[\frac{75K_0^2}{1+1.5K_0c} + K_0 \right] c$$

[0080] (式中, η_{rel} 表示相对粘度, c 表示水溶液的浓度 (g/100mL), 即水溶液 100mL 中所含的聚乙烯吡咯烷酮的 g 数, k_0 表示与 K 值相关的变量) 中, 将所得的 k_0 值乘以 1000 倍后的数值。K 值越大, 表明分子量越高。

[0081] 如专利文献 3 所述, 由于还具有作为致敏剂的效果, 上述聚乙烯吡咯烷酮的含有浓度可根据被测物适当确定。从保存稳定性、致敏效果的角度考虑, 一般地, 以相对于反应系总液体量, 在 0.05 ~ 2 重量% 的范围为宜, 0.1 ~ 1.0 重量% 更佳。

[0082] 为了提高含有甘油磷脂的液体的保存稳定性, 优选将上述聚乙烯吡咯烷酮添加在含有甘油磷脂的液体中。

[0083] 用免疫反应进行测定的被测物的量少时, 出于增强免疫凝集反应的目的, 添加致敏剂。此类致敏剂中, 公知的有聚乙二醇、普鲁兰多糖、聚丙烯酸、硫酸葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素, 2-甲基丙烯酰氧乙基磷酰胆碱与甲基丙烯酸的共聚物等。但是, 这些致敏剂中, 聚乙烯吡咯烷酮不仅有致敏作用, 还有对含有甘油磷脂的液体的保存稳定化作用, 这完全出乎意料。

[0084] 本发明的被测物只要是血中的抗体或抗原即可, 无特殊限制, 公知的抗体或抗原均是被测对象。若列举代表性的被测物, 则可以是抗梅毒螺旋体抗体、抗磷脂抗体、抗 HBs 抗体、HBs 抗原、风疹抗体、流感病毒抗原、腺病毒抗原、轮状病毒抗原、幽门螺杆菌抗原、抗幽门螺杆菌抗体、人 C 反应蛋白、链球菌溶血素 O、前列腺特异抗原、癌胚抗原、甲胎蛋白、免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 E、胰岛素、风湿因子等公知的被测物。

[0085] 其中, 优选内源性脂蛋白的影响大的抗磷脂抗体。这里, 作为抗磷脂抗体, 可以是因梅毒感染而在血中出现的抗梅毒磷脂抗体或因自身免疫疾病抗磷脂抗体综合征而在血中出现的抗磷脂抗体。

[0086] 在本发明的方法及测定试剂中, 被测物为抗体时, 使其与抗原进行免疫反应, 被测物为抗原时, 使其与抗体进行免疫反应。因此, 通常, 在本发明的测定试剂中含有与被测物进行免疫反应的抗原或抗体。作为该抗原或抗体, 在被测物为抗磷脂抗体时为磷脂。

[0087] 作为用作上述磷脂抗原的磷脂, 通常可以使用心磷脂、磷脂酰胆碱、胆固醇这三种, 但这三种不必都含有, 根据测定的疾病进行选择。当本发明的测定试剂为自身免疫疾病抗磷脂抗体综合征的测定试剂时, 其至少含有心磷脂即可, 当本发明的测定试剂为抗梅毒

磷脂抗体测定试剂时,其至少含有心磷脂和磷脂酰胆碱即可。出于提高特异性、灵敏度的目的,磷脂酰胆碱、胆固醇多与心磷脂混合使用。作为它们的优选混合比,以重量比计,为心磷脂:磷脂酰胆碱:胆固醇=1:(3~30):(0~10)左右,更优选为1:(3~30):(0.5~10)左右,但并不局限于此,根据目的适当选择混合比。

[0088] 上述磷脂的获取方法有从动植物中获得的方法和合成的方法,可根据目的适当选择。通常,心磷脂可使用从牛的心脏中提取、精制而成的产物,磷脂酰胆碱可使用从蛋黄中提取、精制而成的产物,胆固醇可使用由羊毛提取、精制而成的产物及合成物。此外,也可使用市售产品。

[0089] 上述磷脂抗原等抗原通常分散在适当的溶液中进行使用。作为该溶液,无特殊限制,可以是磷酸缓冲液、Tris 盐酸缓冲液、甘氨酸缓冲液等。作为进行分散的方法,有将其负载在不溶性载体上进行分散的方法和使其形成脂质体进行分散的方法。

[0090] 作为前述不溶性载体,一直以来,在免疫学凝集反应及凝集抑制反应中,可以使用通常使用的微粒载体。其中,优选由工业上可大量生产的合成高分子构成的乳胶。作为上述合成高分子的例子有聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸共聚物、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、醋酸乙烯-丙烯酸酯共聚物等。其中,由于对磷脂的吸附性优异、能保持生物学活性长时间稳定等理由,尤以聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸共聚物更为优选。此外,还可使用动物的红细胞、细菌的细胞等生物学粒子;膨润土、胶棉、胆固醇结晶、硅石、高岭土、碳粉等非生物学粒子等。上述不溶性载体的平均粒径因测定方法、测定仪器而不同,但通常使用透射式电子显微装置测得的平均粒径为 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 、优选为 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 的不溶性载体。

[0091] 作为将上述磷脂抗原负载在上述不溶性载体上的方法,无特殊限制,可以用以往公知的方法进行负载、通过物理及/或化学结合进行负载的方法等。

[0092] 作为将磷脂抗原或抗体物理负载在上述不溶性载体上的方法,例如可以是向溶解在乙醇等适宜溶剂中的磷脂(磷脂混合液)中混合具有适当粒径的乳胶,搅拌(致敏工序),经过一定时间后,用含有蛋白质、糖、肽等的溶液进行处理(封闭工序),分散到适当的溶剂中的方法。

[0093] 作为分散上述乳胶的溶剂,可以是磷酸缓冲液、Tris 盐酸缓冲液、甘氨酸缓冲液等。

[0094] 作为用这些检查方法进行测定的检体,可以使用可能含有前述被测物的血液、血清、血浆、脑脊髓液等。

[0095] 作为测定方法,对通过上述方法得到的试剂与检体中的抗磷脂抗体等被测物的免疫反应而产生的凝集的程度进行光学测定,由此测定检体中的抗磷脂抗体量等被测物的质量。

[0096] 作为对上述凝集的程度进行光学测定的方法,可以使用公知的方法,例如通过浊度的增加来检测凝集的形成、通过粒度分布或平均粒径的变化来检测凝集的形成、用积分球测定由凝集的形成所引起的前方散射光的变化、比较与透射光强度之比的积分球光度浊度法等。在上述测定方法中,可以利用在不同时间点得到至少二个测定值,根据在这些时间点之间的测定值的增加速度来求出凝集程度的速度试验(速率法),或者在某一时间点(通常为被认为是反应终点的时间点)得到一个测定值,根据该测定值求出凝集

程度的终点试验(终点法)。从测定的简便性、迅速性的角度考虑,优选进行通过比浊法进行的速度试验。在光学测定方法中,可以使用能检测出散射光强度、透射光强度、吸光度等的光学仪器,尤其是通用的自动分析仪。测定波长可以使用 250 ~ 1000nm,优选 540 ~ 800nm。

[0097] 反应温度只要是能发生上述免疫反应的温度便无特殊限制,但优选恒温、在 10 ~ 50℃ 的范围内进行,更优选 10 ~ 40℃。反应时间可适当确定。

[0098] 作为进行上述免疫反应时的反应系的反应液,只要是满足能发生免疫反应的生理条件的水溶液便无特殊限制,例如可以是磷酸缓冲液、枸橼酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液、Good' s 缓冲液等。反应液的 pH 优选为 5.5 ~ 8.5,更优选为 6.5 ~ 8.0。在上述反应液中,还可根据需要添加牛血清白蛋白、蔗糖等稳定剂、叠氮化钠等防腐剂、氯化钠等盐浓度调节剂等。

[0099] 根据本发明,若向含有甘油磷脂的液体中添加聚乙烯吡咯烷酮,则含有甘油磷脂的液体长时间稳定。该稳定性可通过加速试验进行评价。一般地,含有抗原或抗体等蛋白质、脂质等生物来源的物质的试剂通常被保存在 2 ~ 10℃。为了类推评价此类试剂的长期保存稳定性,多使用在 20 ~ 40℃ 下短期保存后进行性能评价的加速试验。作为使用温度,一般是在 37℃ 进行的加速试验。

[0100] 实施例

[0101] 根据实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此。

[0102] (参考例 1)

[0103] 1) 脂质抗原液的制作

[0104] 将心磷脂的乙醇溶液(5mg/mL, Sigma 公司产品) 2mL、磷脂酰胆碱(COATSOME NC-50, 日油公司产品)的乙醇溶液(10mg/mL) 10mL、胆固醇(Nacalai Tesque 公司产品)的乙醇溶液(10mg/mL) 3mL 混合,制得脂质抗原液。

[0105] 2) 乳胶粒子的制作

[0106] 向具有搅拌机、回流用冷凝器、温度检测器、氮气导入管及套管的玻璃反应容器(容量 2L)中加入蒸馏水 1100g、苯乙烯 200g、苯乙烯磺酸钠 0.2g 及在蒸馏水 50g 中溶解过硫酸钾 1.5g 而得的水溶液,用氮气置换容器内后,在 70℃ 下边搅拌边聚合 48 小时。

[0107] 聚合终止后,用滤纸对上述溶液进行过滤处理,取出乳胶粒子。用透射式电子显微装置(日本电子公司产品,“JEM-1010 型”)在 10000 倍的倍率下对乳胶粒子进行拍摄,对最低 100 个以上的粒子进行图像解析,由此测定所得乳胶粒子的粒径。这样,得到平均粒径: 0.40 μm 的乳胶 A。

[0108] 3) 脂质抗原致敏乳胶试剂的制作

[0109] 先在缓慢搅拌下将通过上述 2) 制得的乳胶 A (固体成分含量为 10 重量%) 100 μL 保持在 37℃。向其中一下子添加上述脂质抗原液 330 μL , 这样在 37℃ 下缓慢搅拌 2 小时。接着,一下子添加含有牛血清白蛋白(下面称 BSA) (组分 V, 试剂级, Millipore 公司产品) 1 重量% 的 100mM 磷酸缓冲生理盐水(100mM 磷酸缓冲液(pH7.4)、NaCl 0.9 重量% (下面称 PBS)) 2mL, 在 37℃ 下进一步搅拌 1 小时。对此进行离心分离, 除去上清, 将沉淀后的乳胶再次悬浮在含有 1% BSA 的 PBS 中。重复该操作, 最后悬浮在含有 1 重量% BSA、7.5 重量% 氯化胆碱、0.14 重量% EDTA-2Na、0.1 重量% 叠氮化钠的 100mM 磷酸缓冲液(pH7.4) (下面称 PB) 4mL 中, 制得乳胶试剂。

[0110] 4) 检体稀释液的制作

[0111] 向 50mM 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中添加 BSA、普鲁兰多糖 (分子量 20 万, 林原公司产品)、叠氮化钠、鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油 (COATSOME NG-50LS, 日油公司产品), 使它们的浓度分别为 1 重量%、1.0 重量%、0.1 重量%、0.17 重量%, 搅拌后, 冰冷下用超声波粉碎机超声波处理 (在上述仪器中, 功率为 20%, 使用 0.25 英寸的微锥探头) 30 分钟以上, 直至溶液透明, 由此制得检体稀释液。

[0112] (参考例 2)

[0113] 除了在参考例 1 的 4) 检体稀释液的制作中添加了鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油, 使其浓度为 0.085 重量% 以外, 按相同的方法进行。

[0114] (参考例 3)

[0115] 除了在参考例 1 的 4) 检体稀释液的制作中添加了鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油, 使其浓度为 0.043 重量% 以外, 按相同的方法进行。

[0116] (参考例 4)

[0117] 除了在参考例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油, 添加了为合成磷脂酰甘油的 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸甘油钠盐 (COATSME MG-4040, 日油公司产品), 使其浓度为 0.043 重量% 以外, 按相同的方法进行。

[0118] (参考例 5)

[0119] 除了在参考例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油, 添加了鸡蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺 (COATSME NE-50, 日油公司产品), 使其浓度为 0.085 重量% 以外, 按相同的方法进行。

[0120] (参考例 6)

[0121] 除了在参考例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油, 添加了为合成磷脂酰胆碱的 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (COATSME MC-4040, 日油公司产品), 使其浓度为 0.043 重量%, 作为表面活性剂, 添加了溶血磷脂酰胆碱 (COATSME MC-40H, 日油公司产品), 使其浓度为 0.014 重量% 以外, 按相同的方法进行。

[0122] (参考例 7)

[0123] 除了在参考例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油, 添加了为合成磷脂酰胆碱的 1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (COATSME MC-6080, 日油公司产品), 使其浓度为 0.043 重量%, 作为表面活性剂, 添加了溶血磷脂酰胆碱 (COATSME MC-40H, 日油公司产品), 使其浓度为 0.014 重量% 以外, 按相同的方法进行。

[0124] (参考例 8)

[0125] 除了在参考例 1 的 4) 检体稀释液的制作中添加了鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油及鸡蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺, 使它们的浓度分别为 0.021 重量% 及 0.021 重量% 以外, 按相同的方法进行。

[0126] (比较参考例 1)

[0127] 除了在参考例 1 的 4) 检体稀释液的制作中未添加甘油磷脂以外, 按相同的方法进行。

[0128] 下面示出对参考例 1 ~ 8 及比较参考例 1 ~ 2 进行研究后的结果。

[0129] (研究 1)

[0130] 1) 内源性脂蛋白的分离

[0131] 用溴化钾密度梯度离心法分离高密度脂蛋白(下面称 HDL)。

[0132] 向 50mL 超离心管中分注 1.21g/mL 的溴化钾溶液 12mL。再缓慢分注 10mL 的梅毒阴性血清,使其不与溴化钾溶液混合,进行层积。接着缓慢分注精制水 12mL,使其与血清一样不发生混合,进行层积。

[0133] 用超离心分离机在 44000rpm、4℃ 下离心分离 20 小时。

[0134] 准备好将注射针和特富龙(注册商标)管连接而成的装置,使其可通过使用蠕动泵来吸引溶液。将该注射针缓慢插入到超离心分离后的超离心管的底部,用蠕动泵吸起具有溴化钾密度梯度的血清。将吸起的溶液分组,每组分 0.7mL,得到 43 管组分。

[0135] 测定该 43 管组分的 HDL 胆固醇浓度,发现在组分 No. 5 ~ 15 的范围存在 HDL。将 HDL 胆固醇浓度最高区域的组分 No. 9 ~ 13 合并在一起,为了除去溴化钾,用生理盐水进行了透析。用 Cholestest (注册商标)N HDL (积水医疗公司产品)测定透析后的 HDL 胆固醇浓度,为 40mg/dL。

[0136] 通过以上方法,可以得到含有 HDL 的生理盐水溶液。

[0137] 2) 测定检体

[0138] 对具有 120R. U. (R. U. 为梅毒阳性抗体效价的单位,1R. U 相当于 RPR 卡片法的 1 倍,抗体效价在 1R. U. 以上时,诊断为梅毒阳性。对国际标准品进行测定时,1R. U. 为 0.4IU。)的抗体效价的梅毒抗磷脂抗体阳性检体用通过上述研究 1 的 1)得到的含有 HDL 的生理盐水溶液、生理盐水或血清进行连续稀释,调制测定检体。

[0139] 3) 凝集量的测定

[0140] 凝集量的测定中使用了日立 7180 型生化学自动分析装置。将通过上述参考例 2 或比较参考例 1 制成的检体稀释液 180 μ L 和通过上述研究 1 的 2)制成的各检体 20 μ L 在上述自动分析装置的样品池中进行混合,混合后在 37℃ 培养 5 分钟。接着添加通过上述参考例 1 的 3)制成的乳胶试剂 60 μ L,混合后在 37℃ 培养 5 分钟。用自动分析装置算出在测定波长 700nm 的刚添加乳胶试剂后的吸光度与添加乳胶试剂 5 分钟后的吸光度之差(下面,在结果中用 $\Delta \text{Abs} \times 10000$ 表示)。该吸光度差为通过免疫反应而增加了的凝集量。

[0141] 4) 结果

[0142] 将结果示于图 1 及图 2。

[0143] 由图 1 及图 2 可知,比较参考例 1 中,用含有 HDL 的生理盐水溶液稀释时,与用血清稀释时同样,吸光度降低。由此,可以认为,血清中的 HDL 为干扰成分,是吸光度降低的原因。与此相对,在添加了甘油磷脂的参考例 2 中,即使在用含有 HDL 的生理盐水溶液、血清进行稀释的情况下,比较参考例 1 中那样的吸光度降低也受到抑制,它们的吸光度与生理盐水基本相同。由上述情况可知,参考例 2 中添加的甘油磷脂抑制了 HDL 引起的干扰,从而抑制了吸光度降低。

[0144] (研究 2)

[0145] 1) 测定检体

[0146] 用生理盐水或血清连续稀释具有 120R. U. 的抗体效价的梅毒抗磷脂抗体阳性检体,调制测定检体。

[0147] 2) 凝集量的测定

[0148] 凝集量的测定中使用了日立 7180 型生化学自动分析装置。将通过上述参考例 1～8 或比较参考例 1 制成的检体稀释液 180 μL 和通过上述研究 1 的 1) 制成的各检体 20 μL 在上述自动分析装置的样品池中进行混合,混合后在 37℃ 培养 5 分钟。接着添加通过上述参考例 1 的 1) 制成的乳胶试剂 60 μL ,混合后在 37℃ 培养 5 分钟。用自动分析装置算出在测定波长 700nm 的刚添加乳胶试剂后的吸光度与添加乳胶试剂 5 分钟后的吸光度之差(下面,在结果中用 $\Delta \text{Abs} \times 10000$ 表示),该吸光度差为通过免疫反应而增加了的凝集量。

[0149] 将结果示于图 3～图 11。

[0150] 由图 3～图 11 可知,在参考例 1～8 的任一个中,生理盐水和血清的各抗体浓度下的吸光度差均较比较参考例 1 减小,由于各种甘油磷脂的添加,血清中的干扰成分引起的吸光度降低的情况得到改善。

[0151] (实施例 1)

[0152] 1) 脂质抗原液的制作

[0153] 使用了与参考例 1 的 1) 同样的脂质抗原液。

[0154] 2) 乳胶粒子的制作

[0155] 向具有搅拌机、回流用冷凝器、温度检测器、氮气导入管及套管的玻璃反应容器(容量 2L)中加入蒸馏水 1100g、苯乙烯 200g、苯乙烯磺酸钠 0.2g 及在蒸馏水 50g 中溶解过硫酸钾 1.5g 而得的水溶液,用氮气置换容器内后,在 70℃ 下边搅拌边聚合 48 小时。

[0156] 聚合终止后,用滤纸对上述溶液进行过滤处理,取出乳胶粒子。用透射式电子显微装置(日本电子产品,“JEM-1010 型”)在 10000 倍的倍率下对乳胶粒子进行拍摄,对最低 100 个以上的粒子进行图像解析,由此测定了所得乳胶粒子的粒径。这样,得到平均粒径:0.38 μm 的乳胶 B。

[0157] 3) 脂质抗原致敏乳胶试剂的制作

[0158] 除了在参考例 1 的 3) 的脂质抗原致敏乳胶的制作中代替乳胶 A,使用乳胶 B 以外,按相同的方法进行。

[0159] 4) 检体稀释液的制作

[0160] 向 50mM 磷酸缓冲液(pH7.4)中添加 BSA、聚乙烯吡咯烷酮 K90(BASF 公司产品)、叠氮化钠、鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油(COATSOME NG-50LS,日油公司产品),使它们的浓度分别为 1 重量%、0.5 重量%、0.1 重量%、0.43mg/mL,搅拌后,用超声波粉碎机超声波处理(在上述仪器中,以 20% 的功率使用 0.25 英寸的微锥探头)30 分钟以上,直至溶液透明,由此制得检体稀释液。

[0161] (实施例 2)

[0162] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中使添加的鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油的浓度为 0.55mg/mL 以外,按相同的方法进行。

[0163] (实施例 3)

[0164] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中使添加的鸡蛋黄来源的磷脂酰甘油的浓度为 0.64mg/mL 以外,按相同的方法进行。

[0165] (比较例 1)

[0166] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替聚乙烯吡咯烷酮,添加了普鲁兰多糖(分子量 20 万,林原公司产品),使其浓度为 0.8 重量%以外,按相同的方法进行。

[0167] (比较例 2)

[0168] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替聚乙烯吡咯烷酮, 添加了磷脂质聚合物(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱与甲基丙烯酸共聚物: 分子量 100 万, 日油公司生产的 Lipidure-BL), 使其浓度为 0.5 重量%以外, 按相同的方法进行。

[0169] (比较例 3)

[0170] 除了在实施例 1 的 4) 检体稀释液的制作中代替聚乙烯吡咯烷酮, 添加了聚乙二醇(分子量 7 万, 和光纯药工业公司产品), 使其浓度为 0.6 重量%以外, 按相同的方法进行。

[0171] 下面示出对实施例 1~3 及比较例 1~3 进行研究后的结果。

[0172] 1) 37℃加速试验

[0173] 将通过实施例 1~3 及比较例 1~3 制成的检体稀释液装入瓶中, 加塞密封, 放入 37℃的培养器中进行加速试验。于保存 3 天后、7 天后从培养器中取出, 进行下述 3) 的凝集量测定, 研究了保存开始时(0 天)、保存 3 天后及保存 7 天后的凝集量变动(测定值的变化)。此外, 乳胶试剂使用了保存在 4℃的试剂。

[0174] 2) 测定检体

[0175] 使用了 5 个浓度(0R.U.、1R.U.、2R.U.、4R.U.、8R.U.) 的 RPR 标准血清(积水医疗公司产品)。

[0176] 3) 凝集量的测定

[0177] 除了在(研究 1) 的 3) 的凝集量测定中代替通过上述参考例 2 及比较参考例 1 制成的检体稀释液和通过研究 1 的 2) 制成的各检体, 使用了上述 1) 在 37℃保存的通过实施例 1~3 及比较例 1~3 制成的检体稀释液 180 μ L 和上述 2) 各检体 20 μ L 以外, 按相同的方法进行。

[0178] 3) 结果

[0179] 将结果示于图 12~图 17。

[0180] 在实施例 1~3 的任一个中, 在 37℃保存 7 天后的各抗体浓度下的凝集量(测定值) 相对于 0 天, 均在 $\pm 10\%$ 以内。另一方面, 在比较例 1~3 的任一个中, 在 37℃保存 7 天后的各抗体浓度下的凝集量相对于 0 天, 均在 $\pm 10\%$ 以上。由此可知, 与使用其他致敏剂时相比, 聚乙烯吡咯烷酮的保存稳定性良好。

[0181] 根据本发明, 能够提供这样一种通过免疫反应测定血中被测物的试剂, 即, 在为了回避内源性脂蛋白的影响而添加有甘油磷脂的试剂中, 为了使保存稳定性下降的情况得到改善而添加聚乙烯吡咯烷酮, 由此可以使该试剂保存稳定性良好, 能长时间发挥性能。

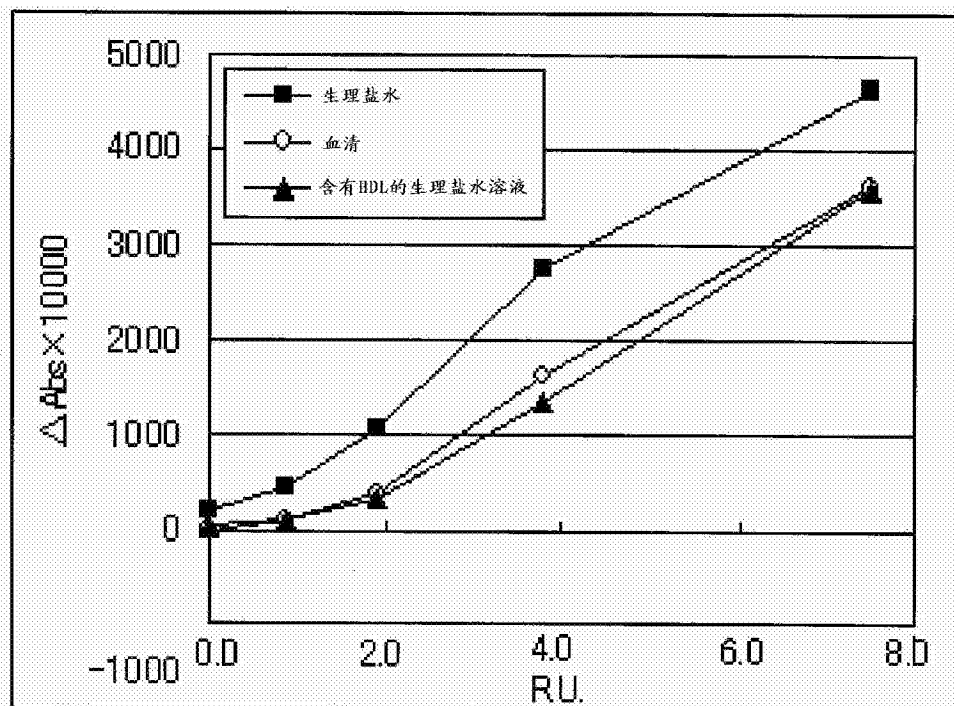


图 1

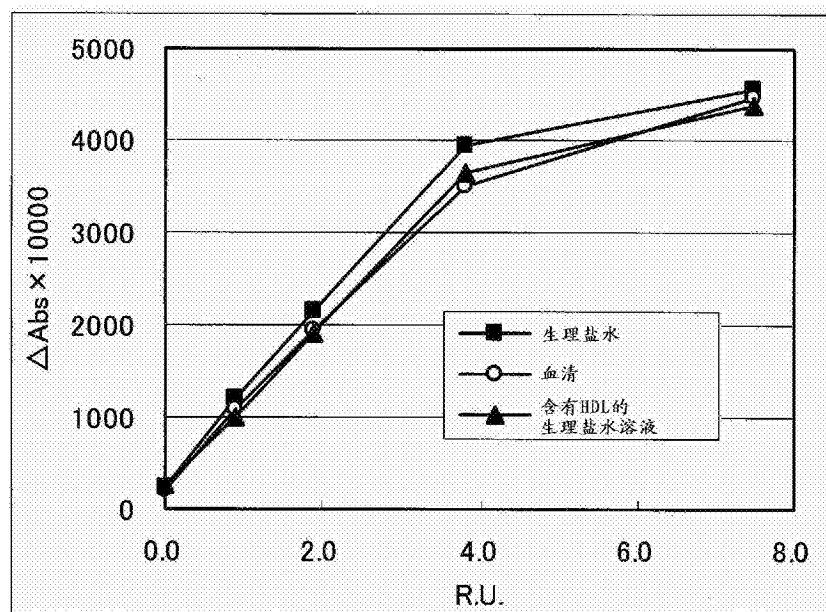


图 2

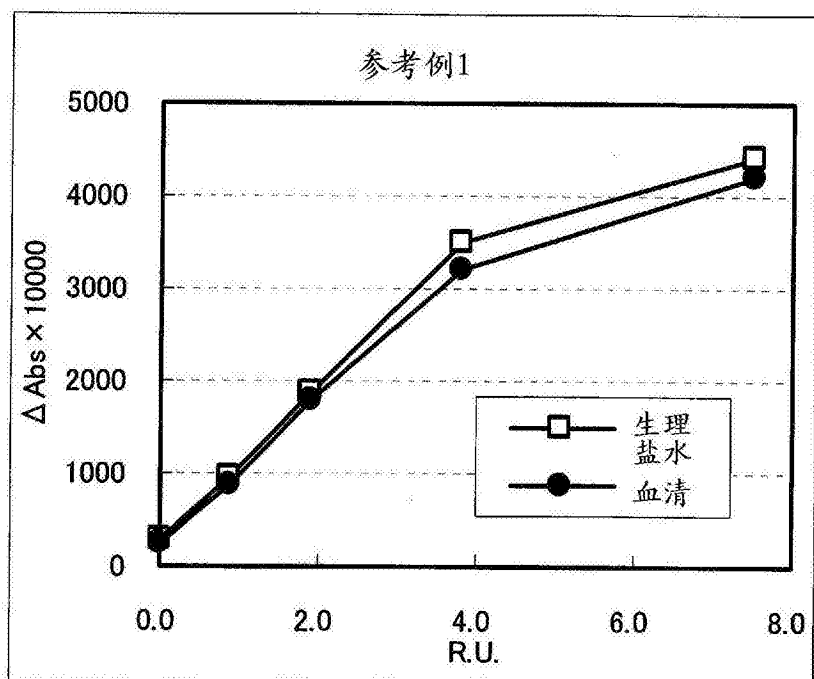


图 3

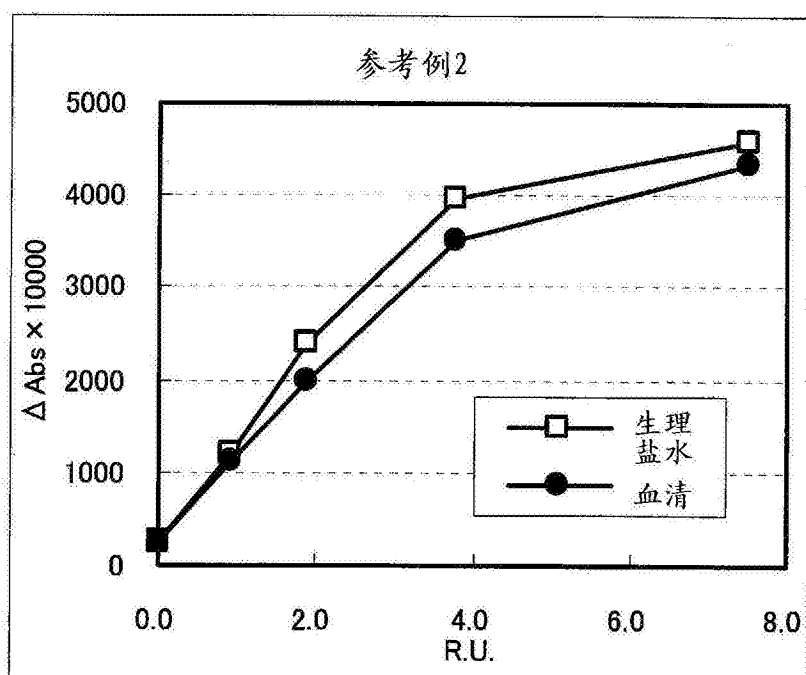


图 4

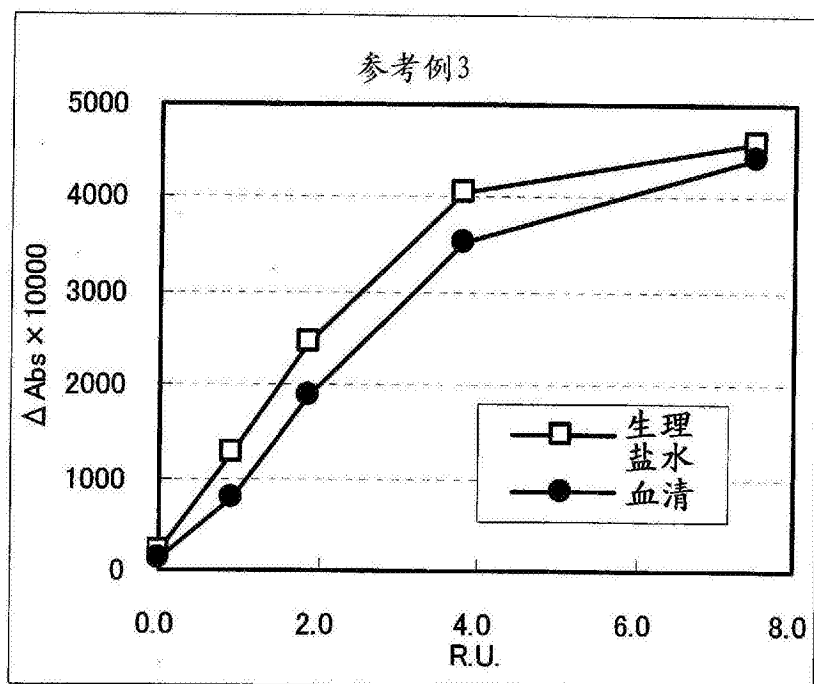


图 5

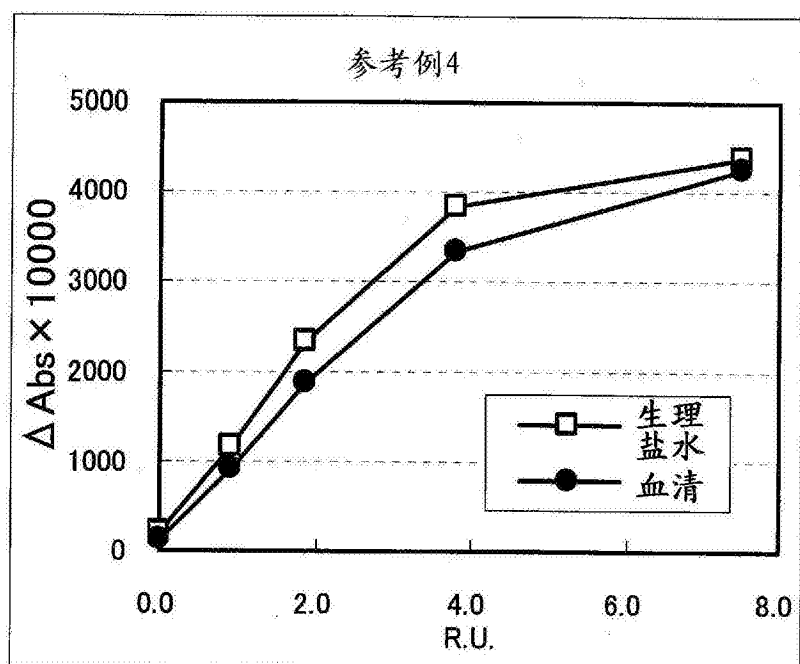


图 6

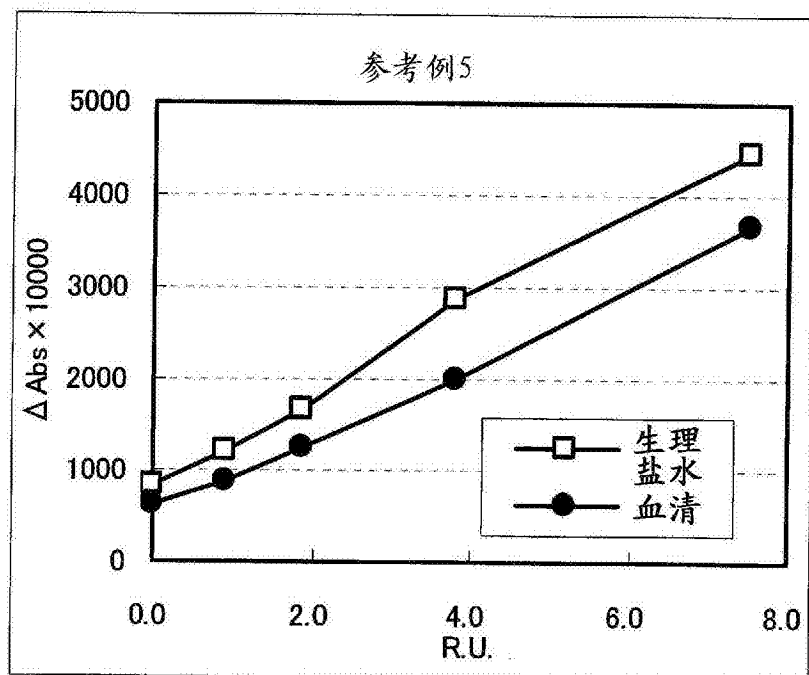


图 7

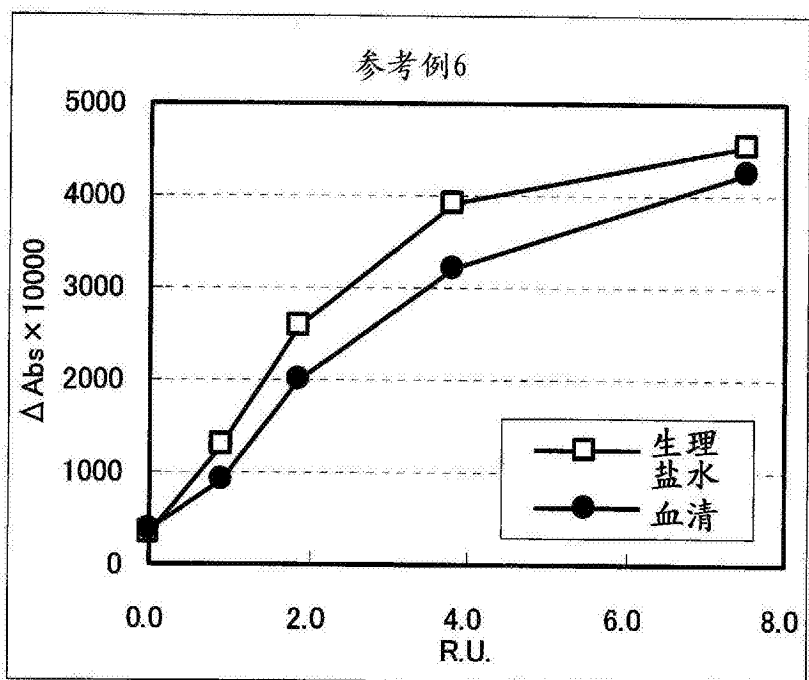


图 8

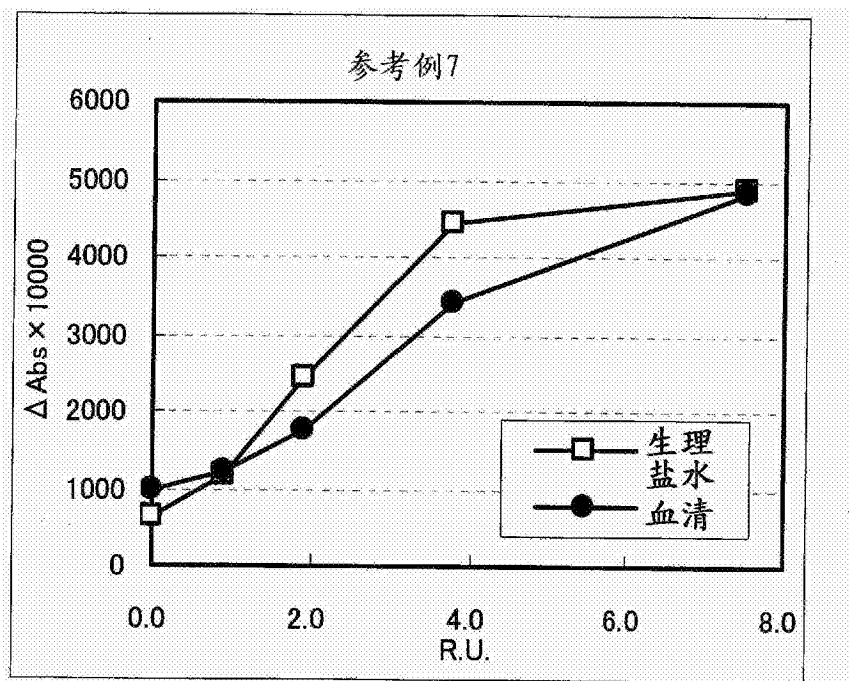


图 9

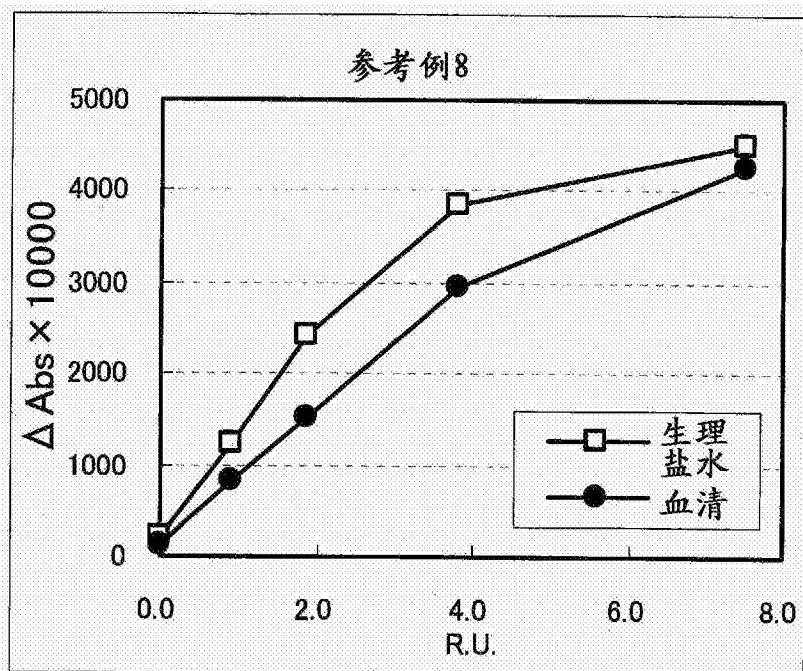


图 10

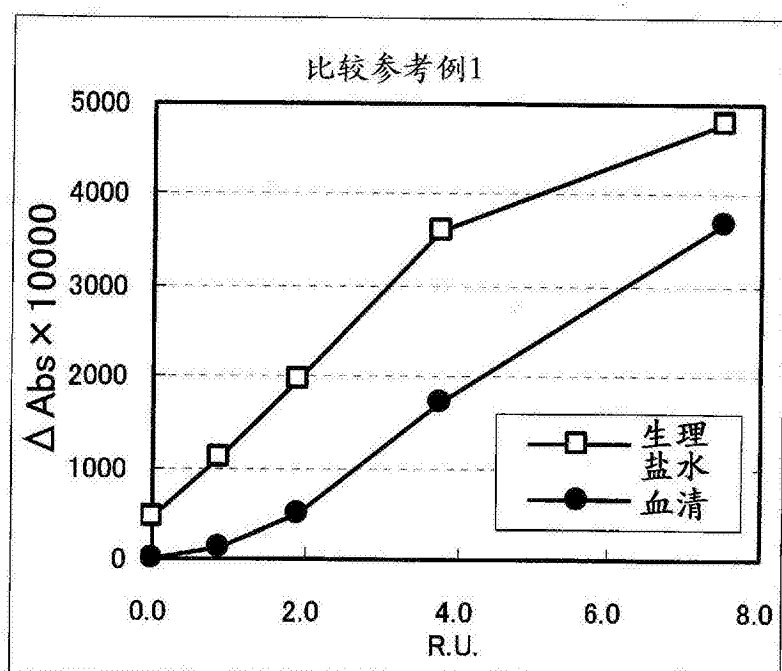


图 11

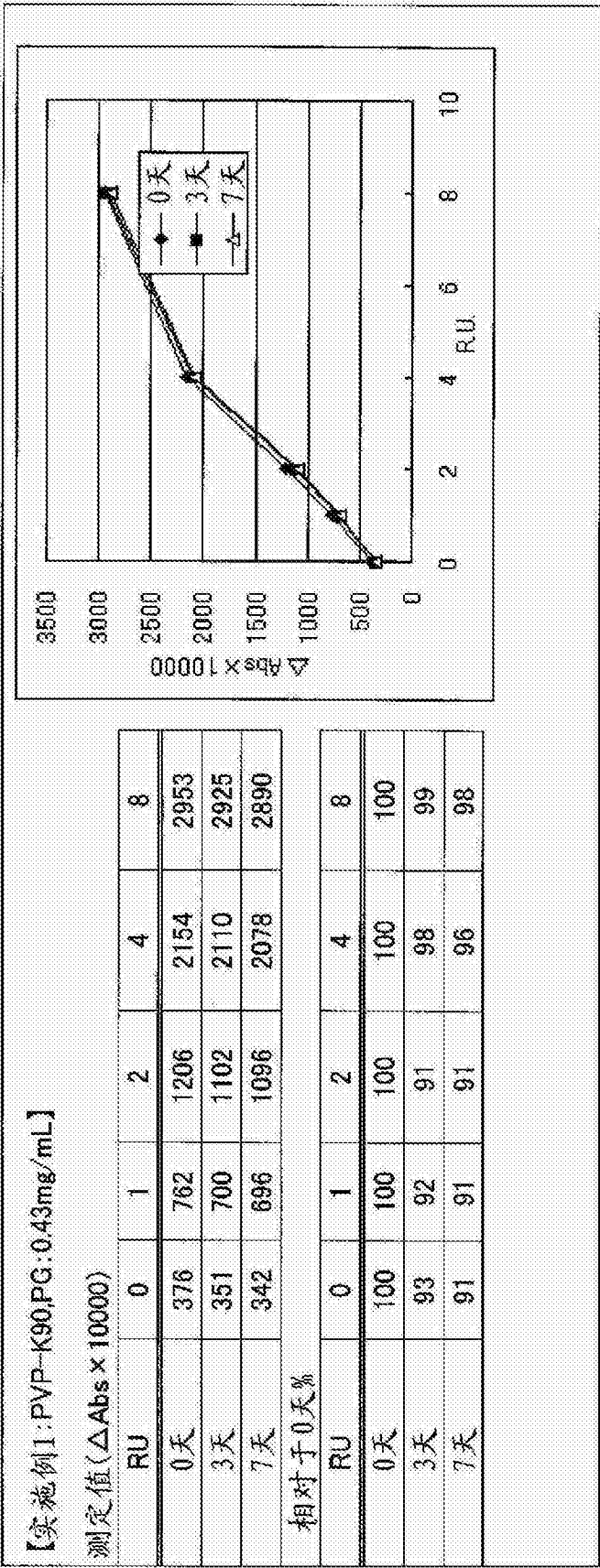


图 12

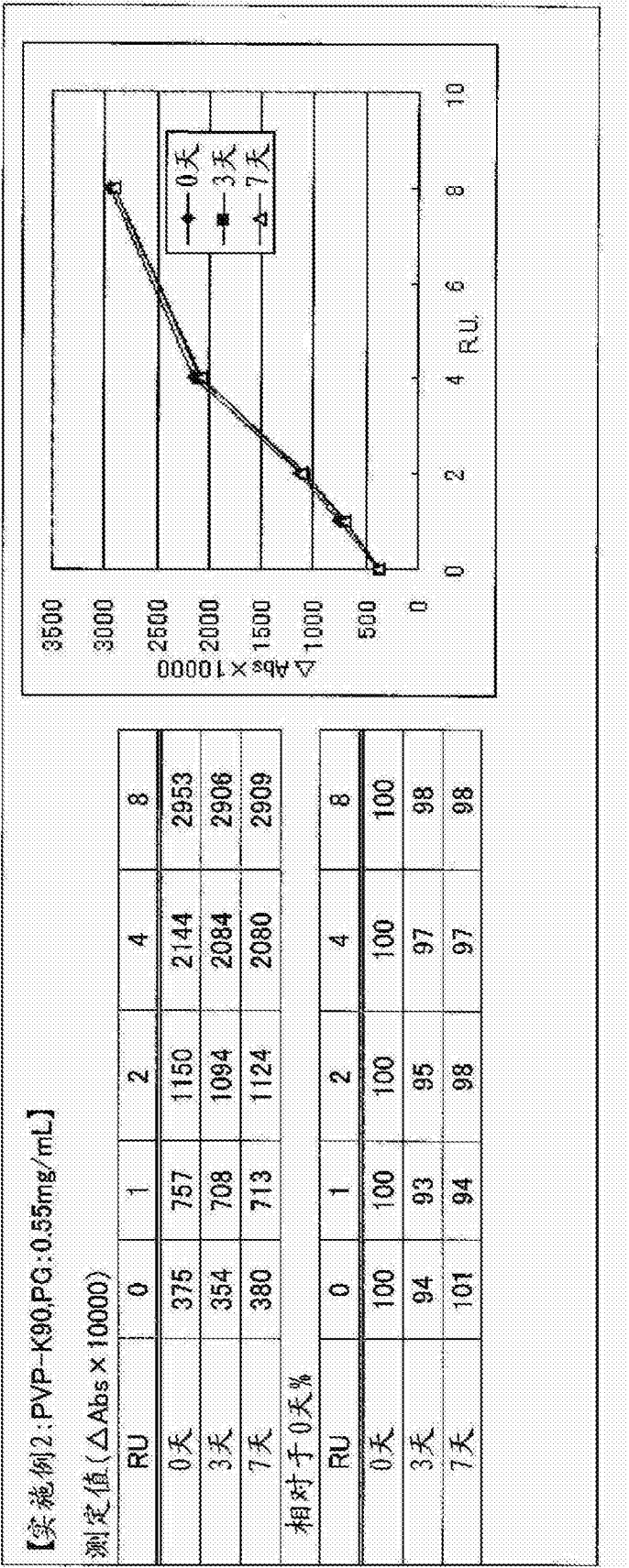


图 13

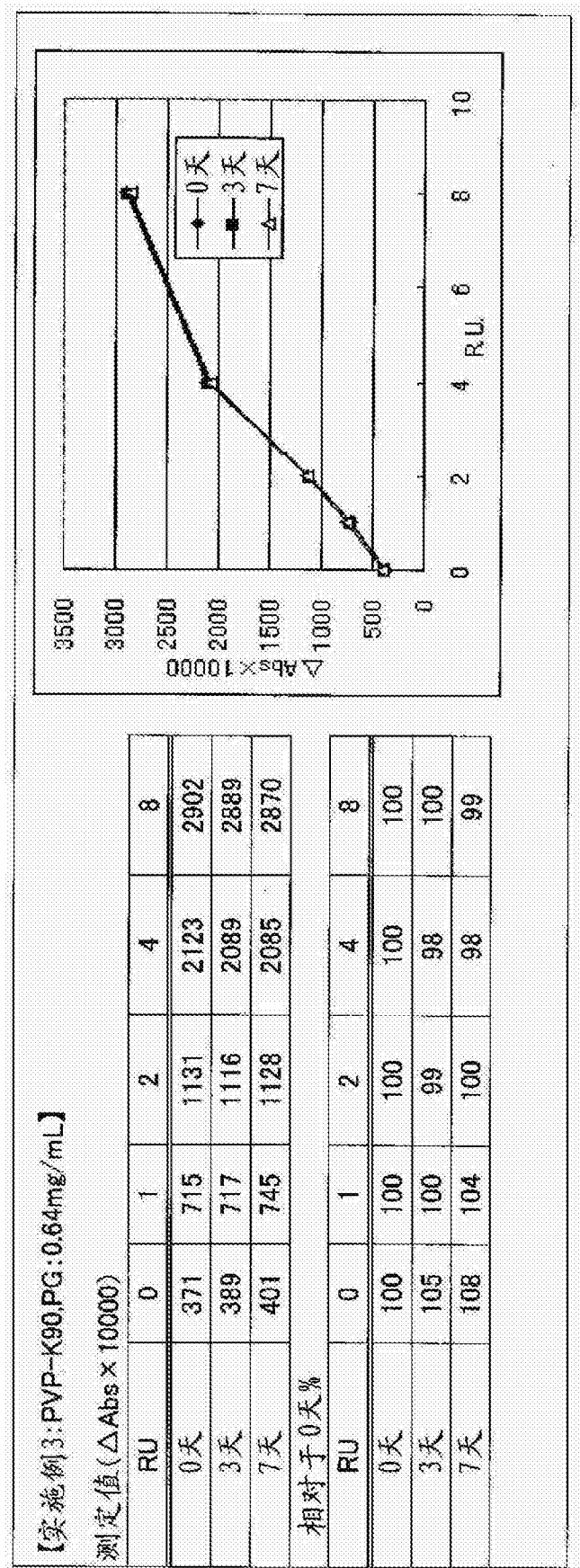


图 14

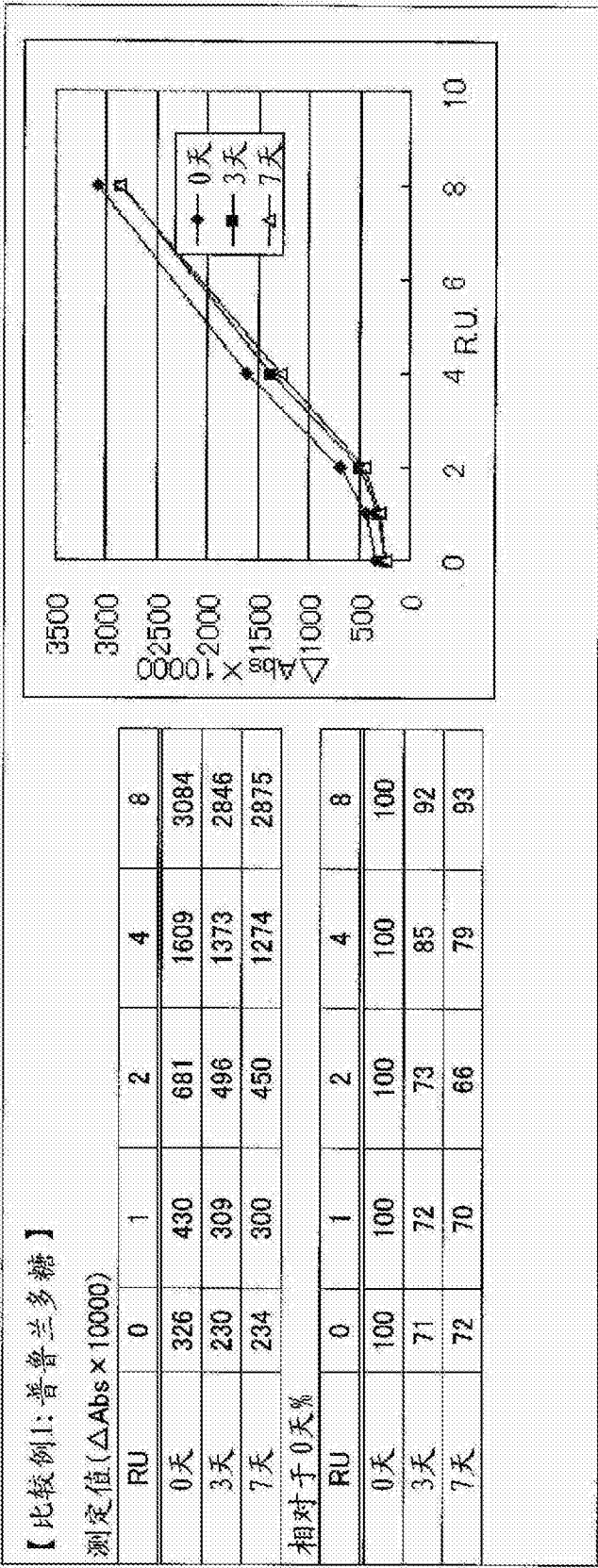


图 15

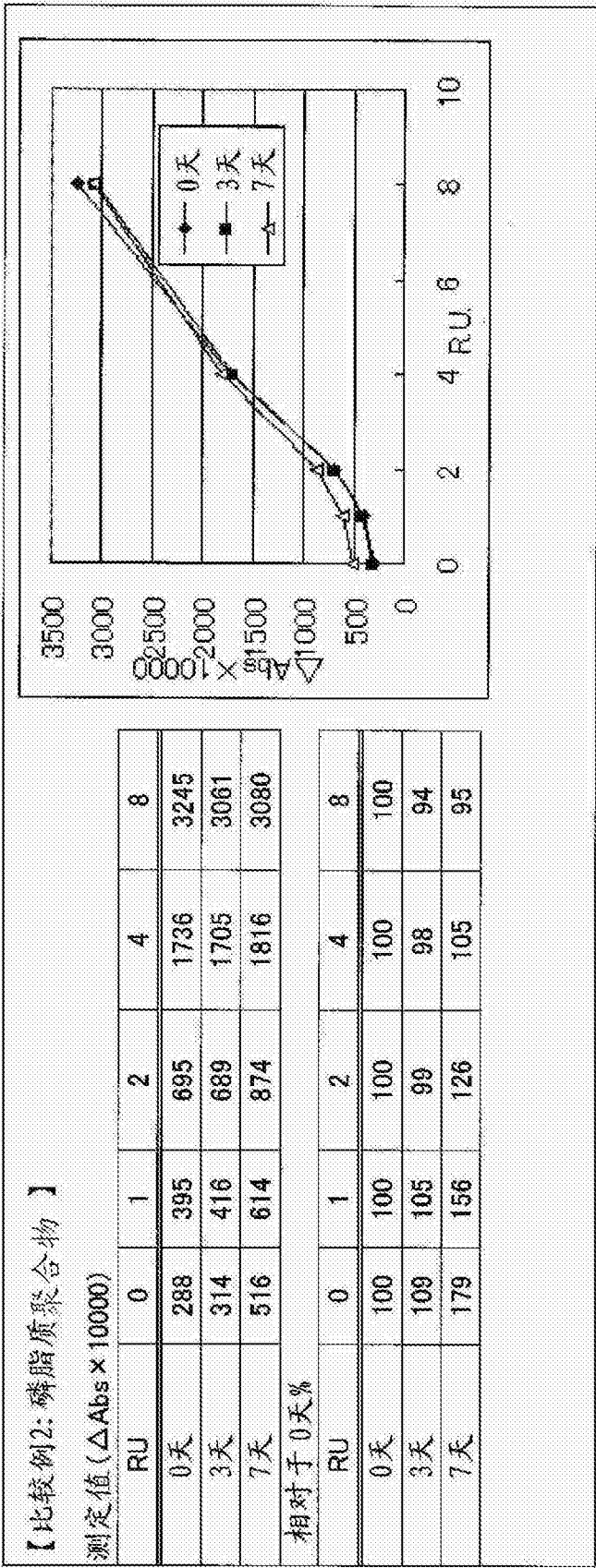


图 16

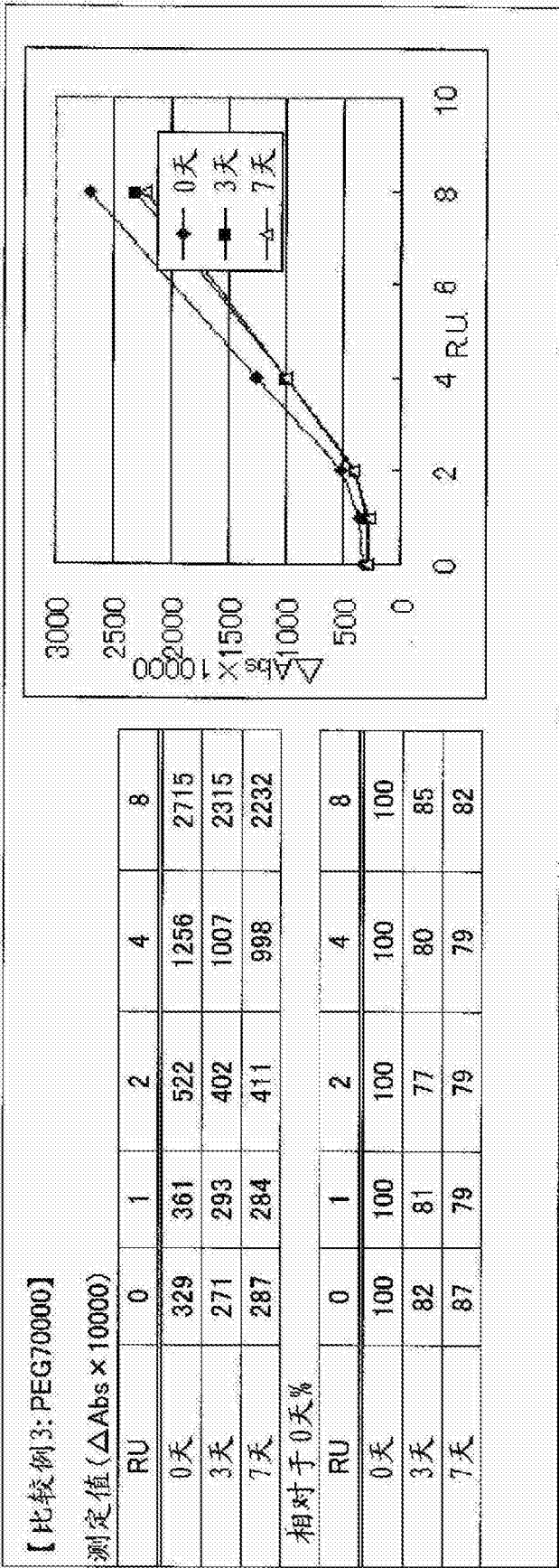


图 17

专利名称(译)	甘油磷脂的稳定化方法及使用该方法的试剂		
公开(公告)号	CN103097893B	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201180017117.5	申请日	2011-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	阿部孝行 大田哲也		
发明人	阿部孝行 大田哲也		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/54393 G01N33/564 G01N33/571 G01N2405/04 G01N2405/06		
代理人(译)	苗堃 陈剑华		
审查员(译)	段晓露		
优先权	2010083681 2010-03-31 JP		
其他公开文献	CN103097893A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种使用甘油磷脂、用于准确稳定的免疫测定的试剂及其稳定化方法。其中，被测物为血中的抗体或抗原，在被测物为抗体时通过与抗原的免疫反应、在被测物为抗原时通过与抗体的免疫反应来测定被测物，其特征在于，在免疫反应的反应系中添加甘油磷脂以及聚乙烯吡咯烷酮。

$$\log_{10} \eta_{rel} = \left[\frac{75K_0^2}{1+1.5K_0c} + K_0 \right] c$$