

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02809704.1

[45] 授权公告日 2006 年 3 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1247996C

[22] 申请日 2002.12.27 [21] 申请号 02809704.1

[30] 优先权

[32] 2001.12.27 [33] JP [31] 396381/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/013871 2002.12.27

[87] 国际公布 WO2003/056333 日 2003.7.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.11

[71] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 龟井明仁 权丈纪子 河村达朗

平井真人

审查员 周 航

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 汪惠民

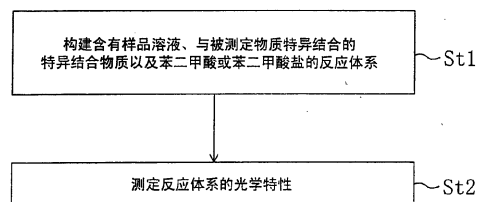
权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图 10 页

## [54] 发明名称

免疫反应测定方法以及方法中使用的免疫反应测定用试剂盒

## [57] 摘要

一种免疫反应测定方法，首先通过图 1 所示的工序 St1 构建含有要对被测定物质含量进行测定的样品、与被测定物质特异结合的特异结合物质以及苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系。此时上述反应体系的 pH 设定为低于 7。而在被测定物质是抗原时特异结合物质是抗体，而被测定物质是抗体时特异结合物质是抗原。然后通过图 1 所示工序 St2 测定反应体系的光学特性。此时在上述工序 St1 中生成凝集复合物时，上述反应体系出现浑浊，散射光强度以及光透过量等都发生变化。因此通过测定散射光强度以及光透过量等可以估计反应体系的浑浊程度。



1. 一种免疫反应测定方法，对液体样品中的被测定物质含量进行测定，其特征在于：包含构建含有上述液体样品、与上述被测定物质特异结合的  
5 特异结合物质以及苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系的工序 A；  
对上述反应体系的光学特性进行测定的工序 B；  
在上述工序 A 中上述反应体系的 pH 设定为 4.5~5.5 范围内，  
上述被测定物质和上述特异结合物质的组合是抗原与抗体的组合。
- 10 2. 根据权利要求 1 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述光学特性是散射光强度或光透过量。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述工序 A 中，上述反应体系还含有缓冲剂。
4. 根据权利要求 1 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述工序  
15 A 中，上述反应体系的 pH 被设定在 4.5~5.0 范围内。
5. 根据权利要求 1 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：在上述工序 A 中，上述反应体系中的苯二甲酸或苯二甲酸盐的浓度在 0.2M 以下。
6. 根据权利要求 1 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述苯二甲酸盐是苯二甲酸氢钾。
- 20 7. 根据权利要求 1 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：反应体系含有 2~6 重量%的聚乙二醇。
8. 根据权利要求 1 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述被测定物质是在其内部具有保持金属离子的结构的抗原，  
上述特异结合物质是与没有保持上述金属离子的上述抗原特异结合的  
25 抗体。
9. 根据权利要求 8 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述被测定物质是人 C 反应性蛋白质。
10. 根据权利要求 1 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述被测定物质是在其内部具有保持金属离子的结构的抗原，  
30 上述特异结合物质是多克隆抗体，

在上述工序 A 中，上述反应体系还含有上述金属离子。

11.根据权利要求 10 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述被测定物质是人 C 反应性蛋白质。

12.根据权利要求 1 所述的免疫反应测定方法，其特征在于：上述被测定物质是抗原，上述特异结合物质是能够与上述抗原的多个部位结合的单克隆抗体。

13.根据权利要求 12 所述免疫反应测定方法，其特征在于：上述被测定物质是人 C 反应性蛋白质。

14.一种免疫反应测定用试剂盒，用于对液体样品中被测定物质含量进行测定，其特征在于，含有：

与上述被测定物质特异结合的特异结合物质，

苯二甲酸或苯二甲酸盐；其中，

在构建含有上述液体样品、上述特异结合物质以及苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系时，将上述反应体系的 pH 调整为 4.5~5.5 范围内；

上述被测定物质和上述特异结合物质的组合是抗原与抗体的组合。

15.根据权利要求 14 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：还含有缓冲剂。

16.根据权利要求 14 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：上述缓冲剂将上述反应体系的 pH 设定在 4.5~5.0 范围内。

17.根据权利要求 14 或 15 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：上述反应体系中的上述苯二甲酸或苯二甲酸盐的浓度被调整在 0.2M 以下。

18.根据权利要求 14 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于，上述苯二甲酸盐是苯二甲酸氢钾。

19.根据权利要求 14 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于，还含有聚乙二醇，而且上述反应体系中的上述聚乙二醇的浓度被调整到 2~6 重量%的范围内。

20.根据权利要求 14 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：上述被测定物质是在其内部具有保持金属离子的结构的抗原，

上述特异结合物质是与没有保持上述金属离子的上述抗原特异结合

的抗体。

21.根据权利要求 19 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：上述抗体是抗人 C 反应性蛋白质抗体。

5 22.根据权利要求 14 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：  
还含有供给金属离子的金属化合物，  
上述被测定物质是在其内部具有保持上述金属离子的结构的抗原，  
上述抗原在其内部具有保持上述金属离子的结构，  
上述特异结合物质是多克隆抗体。

10 23.根据权利要求 21 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：上述抗体是抗人 C 反应性蛋白质抗体。

24.根据权利要求 14 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：  
上述被测定物质是抗原，

上述特异结合物质是能够与上述抗原的多个部位结合的单克隆抗体。

15 25.根据权利要求 23 所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：上述单克隆抗体是抗人 C 反应性蛋白质抗体。

26. 根据权利要求14所述的免疫反应测定用试剂盒，其特征在于：上述特异物质与上述苯二甲酸或上述苯二甲酸盐混合。

## 免疫反应测定方法以及方法中使用的免疫反应测定用试剂盒

5

### 技术领域

本发明涉及可以对作为样品中被测定物质的抗原或抗体进行测定的免疫反应测定方法以及方法中使用的免疫反应测定用试剂盒。

10

### 背景技术

在医疗领域中，为了研究各种各样疾病的诊断以及病状的经过，广泛地进行对存在于人体液的各种疾病中特征的蛋白质含量的测定。在这些蛋白质含量的测定中，主要广泛利用用特异识别靶蛋白作为抗原的抗体的反应（抗原抗体反应）的免疫反应测定方法。现在，在免疫反应测定方法中开发了利用各种各样原理的测定方法。

其中，有公知的对利用抗原抗体反应生成抗原抗体复合物的凝集物（以下称之为凝集复合物）进行检测的免疫散射测浊法（以下略称为散射测浊法）、免疫比浊法（以下略称为比浊法）以及玻片凝集法等测定方法。这些测定方法由于是在溶液中抗原和抗体都以同样分散的状态下进行的方法，所以统称为「均一体系的免疫反应测定方法」。

在抗原抗体反应中，由于凝集复合物的生成在反应体系中出现浑浊。凝集复合物生成在反应体系中出现浑浊的程度与抗原的量和抗体的量有关。根据这一现象，散射测浊法和比浊法是对上述反应体系产生的浑浊程度进行光学上测定，由其测定值算出抗原的量或抗体的量的方法。

散射测浊法是根据反应体系中散射的光量，而比浊法是根据反应体系中因散射而减少的通过光量测定反应体系出现的浑浊程度的。一般来说，无论是散射测浊法还是比浊法都可以在同样反应体系中进行测定。就是说散射测浊法或比浊法任一方能够测定的反应体系，另一方也可以进行测定。玻片凝集法是通过将由于凝集复合物生成而出现浑浊的反应体系中的

溶液采集到载玻片上等，通过目视等判定反应体系中产生的浑浊程度的方法。对于玻片凝集法可以使用与散射测浊法、比浊法同样的反应体系。

在上述以往的均一体系的免疫反应测定方法中，为了促进抗原抗体反应，对微量成分进行高灵敏度地测定，尝试使用各种各样的添加剂。作为人们熟知的例子，例如使聚乙二醇、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮以及聚氯乙烯等水溶性高分子混在反应体系中，通过促进由于抗原抗体反应引起的凝集复合物的形成，缩短反应时间，使测定值提高，从而提高测定灵敏度。已知即使上述水溶性高分子中的聚乙二醇在比较低浓度下，也可以使反应时间缩短，使测定值提高的效果很好。特别是在反应体系中添加终浓度为2~6重量%的平均分子量为6,000的聚乙二醇(PEG)的方法正被广泛采用。尤其是在反应体系中添加终浓度为4重量%的平均分子量为6,000的聚乙二醇(PEG)的方法除了凝集复合物外没有非特异浑浊，上述效果更好。

水溶性高分子促进抗原抗体反应的效果，一般存在越是水溶性高分子的分子量大且水溶性高分子浓度高则效果越大的倾向(参照 Automated Immunoanalysis Part 1, Ritchie 编, 第67—112页(1978))。

考虑抗原抗体反应的测定时，依赖于抗原抗体反应程度(即抗原的浓度)的信号强度(即测定值)越高，越能维持良好的S/N比，可以进行稳定的测定。然而，为了要进一步促进抗原抗体反应，得到上述效果，象以往那样将更高浓度的水溶性高分子或高分子量的水溶性高分子添加到反应体系中时，溶解了水溶性高分子的反应体系中的溶液粘性增大。由于这一原因，存在着测定操作上的处理变得困难的不好状况。因此，有时不能得到高的信号强度(即测定值)，很难进行稳定的测定。

25

## 发明内容

本发明鉴于上述情况，目的在于提供可以容易使测定值提高、获得高的测定灵敏度的免疫反应测定方法以及该方法中使用的免疫反应测定试剂盒。

30 本发明的免疫测定方法是测定样品中被测定物质含量的免疫反应测定

方法，包含构建含有上述样品、与上述被测定物质特异结合的特异结合物质以及苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系的工序 A；对上述反应体系的光学特性进行测定的工序 B，在上述工序 A 中，上述反应体系的 pH 设定为低于 7，而上述被测定物质和上述特异结合物质的组合是抗原与抗体的组合。另外，上述样品是液体样品。

利用本发明的免疫反应测定方法可以使反应体系的光学特性的测定值提高。另外由于本发明中使用的苯二甲酸或苯二甲酸盐是低分子物质，因此不会使反应体系的粘性增大，其测定操作上的处理也变得容易。

上述光学特性可以是散射光强度或光透射量。

在上述工序 A 中，上述反应体系还可以含有缓冲剂。

在上述工序 A 中，上述反应体系的 pH 最好设定在 4.5~5.5 范围内。

在上述工序 A 中，上述反应体系中的苯二甲酸或苯二甲酸盐的浓度最好在 0.2M 以下。

上述苯二甲酸盐最好是苯二甲酸氢钾。

反应体系可以含有 2~6 重量%的聚乙二醇。

上述被测定物质是在其内部具有保持金属离子的结构的抗原，而上述特异结合物质是与没有保持上述金属离子的上述抗原特异结合的抗体。

上述被测定物质可以是人 C 反应性蛋白质。

上述被测定物质是在其内部具有保持金属离子的结构的抗原，而上述特异结合物质是多克隆抗体，在上述工序 A 中上述反应体系还可以含有上述金属离子。

上述被测定物质可以是人 C 反应性蛋白质。

上述被测定物质是抗原，而上述特异结合物质是能够与上述抗原的多个部位结合的单克隆抗体。

上述被测定物质可以是人 C 反应性蛋白质。

本发明免疫反应测定用试剂盒是用于测定样品中被测定物质含量的免疫反应测定用试剂盒，含有：

与上述被测定物质特异结合的特异结合物质，

苯二甲酸或苯二甲酸盐；其中，

在构建含有上述样品、上述特异结合物质以及上述苯二甲酸或苯二甲

酸盐的反应体系时，将上述反应体系的 pH 调整低于 7；

上述被测定物质和上述特异结合物质的组合是抗原与抗体的组合。

利用本发明的免疫反应测定用试剂盒可以使反应体系的光学特性的测定值提高。另外由于本发明中使用的苯二甲酸或苯二甲酸盐是低分子物质，不会使反应体系的粘性增大，其测定操作上的处理也变得容易。

最好将上述反应体系的 pH 调整在 4.5~5.5 范围内。

上述反应体系中的上述苯二甲酸或苯二甲酸盐的浓度最好调整到 0.2M 以下。

上述苯二甲酸盐最好是苯二甲酸氢钾。

还含有聚乙二醇，而且上述反应体系中的上述聚乙二醇的浓度可以调节到 2~6 重量%的范围内。

上述被测定物质是在其内部具有保持金属离子的结构的抗原，而上述特异结合物质是与没有保持金属离子的上述抗原特异结合的抗体。

上述抗体可以是抗人 C 反应性蛋白质抗体。

还含有供给金属离子的金属化合物，上述被测定物质是在其内部具有保持上述金属离子的结构的抗原，上述抗原在其内部具有保持上述金属离子的结构，而上述特异结合物质可以是多克隆抗体。

上述抗体可以是抗人 C 反应性蛋白质抗体。

上述被测定物质是抗原，而上述特异结合物质可以是能够与上述抗原的多个部位结合的单克隆抗体。

上述单克隆抗体可以是抗人 C 反应性蛋白质抗体。

可以将上述特异物质和上述苯二甲酸或上述苯二甲酸盐混合。

#### 附图说明

图 1 是表示本发明一实施方式的免疫反应测定方法的各工序的工艺流程图。

图 2 是对本发明人对本发明的反应机制的推测进行说明的模式图。

图 3 (a) 和 (b) 是表示均一体系免疫反应测定方法的反应体系中抗原和抗体的反应方式的模式图。

图 4 是表示就本发明的一实施例中使用了含有苯二甲酸氢钾的免疫反应

测定用试剂盒的免疫测定方法和比较例，利用散射测浊法进行人白蛋白测定的结果的曲线图。

图 5 是表示就本发明的一实施例中 5 使用含有苯二甲酸的免疫反应测定用试剂盒的免疫测定方法和比较例，利用散射测浊法进行人白蛋白测定的结果的曲线图。

图 6 是表示就本发明的其他实施例中 10 使用含有苯二甲酸氢钾的免疫反应测定用试剂盒的免疫测定方法，利用散射测浊法研究在人白蛋白测定中对 pH 依赖性的结果的曲线图。

图 7 是表示就本发明的另外其他实施例中 15 使用含有苯二甲酸氢钾的免疫反应测定用试剂盒的免疫测定方法，利用散射测浊法研究在人白蛋白测定中对苯二甲酸氢钾浓度依赖性的结果的曲线图。

图 8 是表示就本发明的另外的其他实施例中 20 使用含有苯二甲酸和其它缓冲剂的免疫反应测定用试剂盒的免疫测定方法和比较例，利用散射测浊法测定人白蛋白的结果的曲线图。

图 9 是表示就本发明的另外的其他实施例中 25 使用含有山羊抗人 CRP 多克隆抗体和苯二甲酸的免疫反应测定用试剂盒的免疫测定方法和比较例，利用散射测浊法测定人 CRP 的结果的曲线图。

图 10 是表示就本发明的另外的其他实施例中 30 使用含有小鼠抗人 CRP 单克隆抗体和苯二甲酸氢钾的免疫反应测定用试剂盒的免疫测定方法和比较例，利用散射测浊法测定人 CRP 的结果的曲线图。

### 具体实施方式

象上述那样在对样品中被测定物质含量进行测定的免疫反应测定方法中，由被测定物质引起抗原抗体反应，并且由反应后的反应体系的光学特性的测定值可以算出被测定物质的量。

本发明人等在进行上述测定时发现可以获得高的测定值（即，测定灵敏度高）的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒。另外还发现了利用本发明人发现的该免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒可以缓和在抗原过剩区产生的区带现象（Zone Phenomenon）。

以下参照图 1 对本发明的实施方式进行说明。图 1 是表示本实施方式

的免疫反应测定方法的各工序的工艺流程图。在本说明书中，用语「测定值」只要没有特别记载的话，与信号强度意思相同。

首先，在图 1 所示的工序 St1 中，构建含有要对被测定物质的含量进行测定的样品、与被测定物质特异结合的特异结合物质以及苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系。此时上述反应体系的 pH 设定为低于 7。而被测定物质是抗原时，特异结合物质是抗体，被测定物质是抗体时，特异结合物质是抗原。

依照这样的工序，当样品中含有被测定物质时，通过被测定物质和特异结合物质的抗原抗体反应会生成凝集复合物。当样品中不含有被测定物质时，就不会通过被测定物质和特异结合物质的抗原抗体反应生成凝集复合物。

在图 1 所示的工序 St2 中，对反应体系的光学特性进行测定。此时，当在上述工序 St1 中生成凝集复合物时，上述反应体系出现浑浊、散射光强度以及光透过量等都发生变化。因此通过测定散射光强度以及光透过量等可以估计反应体系的浑浊程度。在此最好是将从上述反应体系中除去特异结合物质后的反应体系作为基准，对上述反应体系的光学变化量、即散射光或光透过量进行测定。另外也可以将从反应体系中除去样品后的反应体系作为基准。

通过实施上述工序，可以使因抗原抗体反应生成的凝集复合物引起的反应体系的光学特性的测定值提高。因此利用本实施方式的免疫反应测定方法可以高灵敏度地测定被测定物质的量。获得这样效果的理由现阶段还不清楚，但本发明人推测存在下述理由。参照图 2 对该推测进行说明。

认为苯二甲酸或苯二甲酸盐无论哪一个在水溶液中都是以苯二甲酸或苯二甲酸离子形式存在的。认为苯二甲酸或苯二甲酸离子无论哪一个都有极性，具有在水溶液中容易吸附水分子的性质。因此通过在上述反应体系中添加苯二甲酸或苯二甲酸盐，水分子聚集在苯二甲酸或苯二甲酸离子的周围。因此就象图 2 所示的那样，存在于抗体分子周围的水分子显著减少，抗体分子的局部存在比率增大。由此认为抗原和抗体之间的冲突增加，促进了抗原抗体反应。其结果也促进了凝集复合物的形成，提高了反应体系的光学特性的测定值。

如上所述，利用以往的添加水溶性高分子的方法，为了使测定值提高，并维持良好的 S/N 比，进行稳定的测定，需要添加高浓度或高分子量的水溶性高分子。因此，存在着使溶液的粘性增大，其分析操作上的处理变得困难的不好状态。然而在本实施方式中由于使用的苯二甲酸或苯二甲酸盐是低分子物质，不会使溶液的粘性增大，其测定操作的处理也变得容易。

另外利用本实施方式的免疫反应测定方法，可以缓和抗原过量存在时产生的区带现象（Zone Phenomenon）。以下参照图 3 进行说明。图 3（a）和（b）是表示均一体系的免疫反应测定方法的反应体系中抗原和抗体的反应方式的模式图。

一般来说，人们知道如果利用均一体系的免疫反应测定方法，会发生称之为区带现象的现象。如图 3（a）所示，如果利用通常均一体系的免疫反应测定方法，会生成抗原与抗体交替结合形成的巨大的分子链的凝集复合物。所谓区带现象就象图 3（b）所示那样，相对于抗体，抗原存在的量比抗原和抗体形成最大量的凝集复合物的当量区还过剩时，凝集复合物变得难于形成的现象。多价抗体和 2 价以上抗原之间的结合反应，Heidelberger 等人的格子学说是著名的，Fundamental Immunology, William E. Paul 编（1984）（邦译 基础免疫学，多田富雄监译，第 714—716 页（1987））文献中有详细记载。

在不发生区带现象的抗体和抗原的浓度范围中，如图（a）所示那样，会生成抗原与抗体交替结合形成的巨大的分子链的凝集复合物。此时如果抗体浓度一定，该凝集复合物的量和大小依赖于抗原浓度而增加。因此，通过将该凝集复合物的量和大小作为光学的变化量进行测定，可以定量测定抗原浓度。另外，凝集复合物由于抗体和抗原的浓度关系，作为溶液中的浑浊或凝集物即使用肉眼也可以充分确认，因此通过目视也可以进行定性判定。

然而，在实际的均一体系的免疫反应测定方法中，往往使用抗体测定抗原浓度。在比抗原浓度低的情况高时，测定值往往具有重要的意义。可是当抗原浓度与抗体相比过剩时，就象图 3（b）所示那样，抗体的结合部位被抗原饱和的抗体量增加，凝集复合物产生变得困难。因此，在抗原低浓度情况与抗原过剩情况之间对抗原抗体反应的结果进行区别变得困难。

因此担心不能进行依赖于抗原浓度的正确定量以及判定，或者说，要进行依赖于抗原浓度的正确定量以及判定会产生所谓的测定浓度受到限制的不良状况。这样一来，由于抗原过量存在产生的区带现象往往是均一体系的免疫反应测定方法中不良状况的一个原因。

5 然而，利用本实施方式的免疫反应测定方法，可以缓和抗原过量存在时产生的区带现象。如上所述，这是由于通过在上述反应体系中添加苯二甲酸或苯二甲酸盐，促进凝集复合物形成的缘故。

另外利用本实施方式的免疫反应测定方法，由于可以缓和区带现象，所以可以减少被测定物质在高浓度下的测定值的下降。由此可以扩展能够  
10 正确测定被测定物质的含量的测定浓度范围。

下面就各个工序进行详细的说明。

在工序 St1 中，如上所述，构建含有被测定物质、与被测定物质特异结合的特异结合物质以及苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系。此时反应体系中可以同时含有苯二甲酸和苯二甲酸盐。当然，反应体系中无论含有苯  
15 二甲酸或苯二甲酸盐哪一种都可以。

另外在工序 St1 中，通过反应体系中含有的苯二甲酸或苯二甲酸盐赋予缓冲能力，最好将反应体系的 pH 设定为低于 7。这样一来，由于反应体系的 pH 设定为低于 7，因此不添加其他缓冲剂，也可以有效地发挥上述的提高测定值的效果以及缓和区带现象的效果。为了通过苯二甲酸或苯  
20 二甲酸盐赋予反应体系缓冲能力，苯二甲酸或苯二甲酸盐的浓度最好在 0.01M 以上。

在本实施方式的免疫反应测定方法中，工序 St1 中反应体系的 pH 优选为 4.5~5.5 范围，更优选 4.5~5.3 范围，特别优选在 4.5~5.0 范围。在上述 pH 范围内，上述的测定值提高效果变好，另外区带现象的缓和效果  
25 也变好。特别是反应体系的 pH 调整在 4.5 是最理想的。

在本实施方式的免疫反应测定方法中，工序 St1 中反应体系的苯二甲酸或苯二甲酸盐浓度最好是在 0.2M 以下。这样一来，上述的测定值提高效果变得更好，另外区带现象的缓和效果也变得更好。为了进一步提高这些效果，反应体系的苯二甲酸或苯二甲酸盐浓度在 0.1M 以下比较好，特  
30 别是为了使上述效果显著提高，最好是将反应体系的苯二甲酸或苯二甲酸

盐浓度大致调整在 0.1M。

另外在工序 St1 中，反应体系可以进一步添加别的缓冲剂。本实施方式的免疫反应测定方法中可以使用的缓冲剂是该领域中众所周知的缓冲剂。例如，可以举出由磷酸二氢钠、磷酸氢二钠构成的磷酸系缓冲剂、乙酸钠、二甲胂酸钠、2-(N-吗啉代)乙磺酸、琥珀酸等。添加缓冲剂时，反应体系应当含有的缓冲剂的量可以根据使用的缓冲剂的种类、含有被测定物质的样品（检体）的量、以及针对反应体系中作为被测定物质的抗原或抗体的抗体或抗原的供给方法等适当调整。

作为本实施方式的免疫反应测定方法中使用的苯二甲酸或苯二甲酸盐，可以举出苯二甲酸、苯二甲酸酐、苯二甲酸氢钾、苯二甲酸钾、苯二甲酸二钠、苯二甲酸铵、苯二甲酸铜（II）等。这些试剂都有销售，容易获得。这些试剂可以单独或搭配起来用。其中作为本实施方式的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒中使用的苯二甲酸盐，从对水的溶解性高、而且溶解时的水溶液的 pH 在 4.0 附近的观点出发，优选苯二甲酸氢钾。

而苯二甲酸存在着 o-苯二甲酸、m-苯二甲酸以及 p-苯二甲酸（对苯二甲酸）异构体。在本实施方式中，可以使用 o-苯二甲酸、m-苯二甲酸以及 p-苯二甲酸的混合物。单独使用对水溶解性高的 o-苯二甲酸最好。使用苯二甲酸盐情况也与苯二甲酸情况一样，可以使用 o-苯二甲酸、m-苯二甲酸以及 p-苯二甲酸的盐的混合物。单独使用对水溶解性高的 o-苯二甲酸盐最好。

另外在本实施方式的免疫反应测定方法中，根据其用途等在获得上述效果的范围内可以添加该领域中众所周知的其他任意成分。例如在适用于散射测浊法、比浊法、玻片凝集法等均一体系的免疫反应测定法的场合，可以向本发明的免疫反应测定方法的反应体系中添加聚乙二醇（PEG）。从非特异凝集少、测定灵敏度高的观点出发，在本实施方式中相对于上述的反应体系，优选聚乙二醇含量为 2~6 重量%浓度，更优选 4 重量%浓度。

另外为了减少由于抗原或抗体自身凝集引起的非特异浑浊，可以向本实施方式的反应体系中加入 Tween 20、辛基糖苷、十二烷基硫酸钠（SDS）、

蔗糖单月桂酸盐、CHAPS 等表面活性剂。其含量从减少抗原抗体反应阻碍的观点出发，在本实施方式中，相对于反应体系优选在 0.3% (w/v) 以下，更优选 0.1% (w/v) 以下。

在本实施方式的免疫反应测定方法的工序 St2 中，适用于测定反应体系的光学特性的测定方法没有特别限定。特别是使用会引起区带现象的散射测浊法、比浊法、玻片凝集法等均一体系的免疫测定方法，预料可以获得更好效果。另外适用于通过自动测定仪器进行测定已经普及的散射测浊法或比浊法的场合，由于可以削减或简化在区带现象判定中需要的工序，所以特别理想。

在本实施方式的免疫反应测定方法中，抗原-抗体复合物优选是凝集复合物。另外在工序 B 中，优选是通过对起因于凝集复合物的光学上的变化量进行测定可以对上述凝集复合物进行检测，更优选光学上的变化量为散射光强度或光透过的变化量。

本实施方式的免疫反应测定方法，其代表性的作法可以通过以下方式  
15 进行。将苯二甲酸或苯二甲酸盐加入到含有缓冲剂的缓冲液中，最终使反应体系的 pH 保持在酸性，pH 保持在 4.5~5.5 比较好，pH 保持在 4.5 更好。此时加入的苯二甲酸或苯二甲酸盐的浓度，使抗原抗体反应时的浓度变为 0.2M 以下，优选 0.1M 以下，特别优选 0.1M 的浓度。苯二甲酸或苯二甲酸盐也可以充当缓冲剂。通过依次向上述缓冲液中添加要测定的被测  
20 定物质的含量的样品（检体）和含有特异结合物质的溶液并进行混合构建反应体系，以样品作为基准测定反应体系的光学上的变化量。

而添加苯二甲酸或苯二甲酸盐的方法、为了将反应体系保持在酸性而添加缓冲剂的方法、以及调整反应体系的 pH 的方法并不限于上述作法。例如为了满足上述必要的条件，首先可以在含有特异结合物质的溶液中混  
25 合苯二甲酸或苯二甲酸盐，然后再混合缓冲剂。

以下就本实施方式的免疫反应测定方法中使用的免疫反应测定用试剂盒进行说明。

本实施方式的免疫反应测定用试剂盒制备成含有与被测定物质特异结合的特异结合物质；苯二甲酸或苯二甲酸盐；用于将含有被测定物质、特  
30 异结合物质以及苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系的 pH 设定在 7 以下的

缓冲剂。被测定物质和上述特异结合物质的组合是抗原和抗体的组合。

通过将本实施方式的免疫反应测定用试剂盒添加到要对被测定物质的含量进行测定的样品中，在图 1 所示的工序 St1 中可以构建含有要对被测定物质的含量进行测定的样品、与被测定物质特异结合的特异结合物质和苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系。当样品中含有被测定物质时，通过被测定物质和特异结合物质之间的抗原抗体反应会生成凝集复合物。当样品中不含有被测定物质时，就不会通过被测定物质和特异结合物质之间的抗原抗体反应生成凝集复合物。

因此通过使用本实施方式的免疫反应测定用试剂盒实施图 1 所示的各个工序，可以使由于抗原抗体反应生成的凝集复合物引起的反应体系的光学特性的测定值提高。就是说，通过使用本实施方式的免疫反应测定用试剂盒可以以高测定灵敏度测定被测定物质的量。另外由于本发明中使用的苯二甲酸或苯二甲酸盐是低分子物质，不会使反应体系的粘性增大，其测定操作上的处理变得容易。

另外，存在的抗原与抗体相比过量时产生的区带现象也可以缓和。由于区带现象被缓和，在被测定物质的高浓度下的测定值的下降被减少。因此可以使能够正确测定被测定物质的含量的测定浓度范围扩展。

这里的本实施方式的免疫反应测定用试剂盒可以既含有苯二甲酸的同时也可以含有苯二甲酸盐。而苯二甲酸或苯二甲酸盐可以赋予反应体系缓冲能力，上述工序 St1 的反应体系的 pH 优选调节为低于 7。即，优选苯二甲酸或苯二甲酸盐也起着缓冲剂的作用。

另外，本实施方式的免疫反应测定用试剂盒也可以含有别的缓冲剂。这样的缓冲剂可以是该领域中众所周知的缓冲剂。例如可以举出由磷酸二氢钠、磷酸氢二钠构成的磷酸系缓冲剂、乙酸钠、二甲胍酸钠、2-(N-吗啉代)乙磺酸、琥珀酸等。此时缓冲剂的量可以根据使用的缓冲剂的种类、含有被测定对象物的样品（检体）的量、以及针对反应体系中作为被测定物质的抗原或抗体的抗体或抗原的供给方法等适当调整。

另外本实施方式的免疫反应测定用试剂盒，在工序 ST1 中反应体系的 pH 调整在 4.5~5.5 范围比较好，调整在 4.5~5.3 范围更好，最好是调整在 4.5~5.0 范围。在上述 pH 范围内，上述的测定值提高效果变好，另外

区带现象的缓和效果也变好。特别是反应体系的 pH 大致调整在 4.5 是最理想的。

本实施方式的免疫反应测定用试剂盒，在工序 St1 的反应体系中的苯二甲酸或苯二甲酸盐浓度最好调整是在 0.2M 以下。这样一来，上述的测定值提高效果变得更好，另外区带现象的缓和效果也变得更好。为了进一步提高这些效果，反应体系的苯二甲酸或苯二甲酸盐浓度调整在 0.1M 以下更好，特别是为了使上述效果显著提高，将反应体系的苯二甲酸或苯二甲酸盐浓度最好调整在 0.1M。

作为本实施方式的免疫反应测定用试剂盒中含有的苯二甲酸或苯二甲酸盐，可以举出苯二甲酸、苯二甲酸酐、苯二甲酸氢钾、苯二甲酸钾、苯二甲酸二钠、苯二甲酸铵、苯二甲酸铜（II）等。这些试剂都有销售，容易获得。这些试剂可以单独或搭配起来用。其中作为本实施方式的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒中使用的苯二甲酸盐，从对水的溶解性高、且溶解时的水溶液的 pH 在 4.0 附近的观点出发，特别优选苯二甲酸氢钾。

而苯二甲酸存在着 o-苯二甲酸、m-苯二甲酸以及 p-苯二甲酸（对苯二甲酸）异构体。在本实施方式中，可以使用 o-苯二甲酸、m-苯二甲酸以及 p-苯二甲酸的混合物。单独使用对水溶解性高的 o-苯二甲酸最好。而使用苯二甲酸盐情况也与苯二甲酸情况一样，可以使用 o-苯二甲酸、m-苯二甲酸以及 p-苯二甲酸的盐的混合物。单独使用对水溶解性高的 o-苯二甲酸的盐最好。

另外在本实施方式的免疫反应测定用试剂盒中，根据其用途等在获得上述效果的范围内可以添加该领域中众所周知的其他任意成分。例如在适用于散射测浊法、比浊法、玻片凝集法等均一体系的免疫反应测定法的情况下，可以向本实施方式的免疫反应测定用试剂盒中添加聚乙二醇（PEG）。添加的量从非特异凝集少、测定灵敏度高的观点出发，在本实施方式中，上述的反应体系中聚乙二醇含量终浓度为 2~6 重量%浓度的量比较好，为 4 重量%浓度更好。

另外为了降低由于抗原或抗体自身凝集引起的非特异浑浊，可以向本实施方式的免疫反应测定用试剂盒中加入 Tween 20、辛基糖苷、十二烷基

硫酸钠 (SDS)、蔗糖单月桂酸盐、CHAPS 等表面活性剂。而在本实施方式  
的免疫反应测定用试剂盒中其含量从减少抗原抗体反应阻碍观点出发,  
在反应体系的 0.3% (w/v) 以下比较好, 0.1% (w/v) 以下更好。

5 适用于本实施方式的免疫反应测定测定用试剂盒的测定体系没有特别  
限定。特别是使用可以引起区带现象的散射测浊法、比浊法、玻片凝集法  
等均一体系的免疫测定方法, 预料可以获得更好效果。另外适用于通过自  
动测定仪器进行测定已经普及的散射测浊法或比浊法的场合, 由于可以削  
减或简化在区带现象的判定中需要的工序, 所以特别理想。

本实施方式的免疫反应测定用试剂盒代表性制作方式如下。

10 象下面那样分别制备含有与被测定物质 (这里指的是抗原) 特异结合  
的特异结合物质 (这里指的是抗体) 的溶液以及含有苯二甲酸或苯二甲酸  
盐的溶液。

含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的溶液使用缓冲剂制备, 使反应体系的 pH  
保持为低于 7。将溶液的 pH 调整在 4.5~5.5 比较好, 调整在 4.5~5.3 更  
15 好, 而调整到 4.5~5.0 特别好。反应体系的 pH 调整到 4.5 最好。而为了  
使苯二甲酸或苯二甲酸盐的浓度在反应体系中的浓度在 0.2M 以下、0.1M  
以下比较好、最好大致在 0.1M 的浓度, 调整苯二甲酸或苯二甲酸盐以及  
缓冲剂的量, 通过将他们溶解于纯水中来制备含有苯二甲酸或苯二甲酸盐  
的溶液。

20 只要满足上述必要条件, 也可以将缓冲剂、苯二甲酸或苯二甲酸盐一  
个一个地分别溶解于溶液中来制备。另外只要是满足上述 pH 范围, 即使  
不添加缓冲剂, 苯二甲酸或苯二甲酸盐兼任缓冲剂的溶液也可以。

含有特异结合物质的溶液与上述含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的溶液混  
合时, 只要是反应体系满足上述必要条件, 可以是任意组成。

25 另外, 也可以将特异结合物质与上述苯二甲酸或上述苯二甲酸盐预先  
混合。此时为了满足上述所示的必要条件, 可以用制备的含有苯二甲酸或  
苯二甲酸盐的溶液通过对含有特异结合物质的溶液进行透析或凝胶过滤,  
对低分子成分进行置换。

30 作为本实施方式的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒的被  
测定物质的抗原或抗体没有特别限定, 一般来说只要是利用抗原抗体反应

可以测定的物质无论什么样物质都可以。例如蛋白质、核酸、脂类、细菌、病毒以及半抗原等。其中由于蛋白质是利用抗原抗体反应进行临床检查中的主要测定对象，所以被测定物质是蛋白质时，本实施方式的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒非常适用。作为蛋白质例如可以是 LH  
5 （促黄体素）、FSH（促卵泡素）、hCG（人绒毛膜促性激素）等激素，以及各种免疫球蛋白类和亚类、补体成分、各种传染病的标志物、CRP、白蛋白、类风湿因子、血型抗原等。其中作为被测定物质要测定人白蛋白和人 C 反应性蛋白质（以下略称为人 CRP）时，利用本实施方式的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒特别合适。

10 苯二甲酸或上述苯二甲酸盐具有螯合作用，具有有效争夺存在于反应体系中的  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Fe}^{3+}$  等二价和三价金属离子的性质。因此当抗原的内部含有保持金属离子的结构时，与抗原特异结合的抗体优选也能特异结合脱去金属离子状态下的抗原。这样一来，抗原即使由于金属离子脱离引起的分子结构发生变化的物质，也可以进行测定。

15 另外，当抗原的内部含有保持金属离子的结构，由于金属离子的脱离引起抗原的分子结构发生变化时，将与抗原保持的金属离子相同的金属离子添加到反应体系中，使得上述金属离子存在于反应体系中也可以。通过这样操作，反应体系内由于金属离子脱离引起的抗原的分子结构变化被抑制，抗体可与抗原结合，可以进行测定。

20 此时添加的金属离子的量可以根据使用的苯二甲酸或苯二甲酸盐的螯合能力、其浓度、抗原具有的金属离子的保持能力等进行设定。

作为具有可保持金属离子的分子结构的抗原如 CRP。CRP 不会由于有无  $\text{Ca}^{2+}$  而发生结构变化。因此，例如在本实施方式的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒中使用的抗原是 CRP，作为抗体使用含有与未带  
25 有  $\text{Ca}^{2+}$  的人 CRP 不结合的抗体的山羊抗人 CRP 多克隆抗体，以及作为苯二甲酸或苯二甲酸盐使用苯二甲酸时，对于 0.02M 苯二甲酸，向反应体系中添加 0.02M 的  $\text{Ca}^{2+}$  比较好。

另外当抗原是对至少一种抗体具有多个结合部位的物质时，抗体是与抗原多个结合部位结合的单克隆抗体比较好。单克隆抗体可以通过杂交瘤  
30 细胞株产生。杂交瘤细胞株是从通过对产生抗体的 B 细胞和骨髓瘤细胞

(myeloma 细胞) 进行细胞融合得到的具有产生抗体能力和很强的增殖能力的融合细胞团中分离出的唯一的细胞, 通过使其增殖确立的。因此产生的抗体的性状都相同。另外杂交瘤细胞株增殖能力强, 由于可冷冻保存, 只要进行适当管理, 可以无限期地使用, 将杂交瘤细胞株在培养液或腹腔  
5 中进行培养, 通过纯化可以不断地得到性状永远相同的抗体。

另外, 多克隆抗体是通过将抗原注入到动物体, 使血液中大量出现与抗原结合的抗体, 采集全部血液或一部分, 通过纯化得到。因此其性质与动物的个体差异、生育环境、状态等有关。因此连续得到同一性状的抗体很困难。

10 就是说, 通过使用单克隆抗体, 经常使用性状相同的抗体成为可能, 可以稳定供给作为试剂的抗体。其结果可以预料能够使利用本实施方式的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒进行的免疫反应测定结果稳定。

本实施方式的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒中使用的  
15 抗体没有特别限定, 只要是与抗原特异结合的, 可以是 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 中的任一类抗体。其中 IgG 抗体最好。这是由于 IgG 抗体具有难于产生非特异反应的性质, 另外由于销售的产品比较多、容易买到的缘故。另外抗体来自动物的种类也没有特别限定, 但由于来自兔、山羊、小鼠的抗体比较容易获得, 使用的例子也比较多, 所以比较好。

## 20 实施例

以下对本发明的实施例进行说明, 但本发明并不限于这些实施例。

### (实施例 1)

以下给出了人白蛋白作为被测定物质时的免疫反应测定用试剂盒的构成方法。在本实施例中由可在基于玻片凝集法、比浊法以及散射测浊法  
25 测定中使用的抗体溶液以及含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液构成的免疫反应测定用试剂盒的制作方法进行叙述。

在制备以下所示的缓冲液等时, 使用了用 Milli-Q SP TOC (Millipore 制作) 过滤的纯水。另外以下没有特别记载的盐、缓冲剂等试剂都是和光纯药工业制造的产品, 使用的聚乙二醇 6,000, trans-乌头酸是 1 级试剂,  
30 其他试剂都是特级试剂。

首先制备抗体溶液。兔抗人白蛋白（和光纯药工业制造）多克隆抗体从，是从免疫人白蛋白的兔采集的抗血清中使用蛋白 A 柱层析进行纯化。填充在柱中的蛋白 A 固定化凝胶使用 Amersham Pharmacia 生产的胶。纯化使用的平衡缓冲液的组成为 1.5M 甘氨酸、3.0M NaCl、pH8.9，洗脱缓冲液组成为 0.1M 柠檬酸、pH4.0。

向下述那样进行纯化。使容量为填充到柱子的凝胶容量的 5 倍的平衡缓冲液流过柱子，对柱子进行平衡后，用平衡缓冲液将柱子全结合容量的 10~20% 的含有抗体的抗血清稀释 2 倍后流过柱子，使血清中抗体结合到蛋白 A 上。然后使平衡缓冲液流过柱子使没有吸附在蛋白 A 的血清成分从柱子上洗出，直洗至没有这些成分。然后使洗脱缓冲液流过柱子，将结合于蛋白 A 上的抗体洗脱出来。将洗脱下来的抗体级分装入分级分子量 1 万的透析袋中，用组成为约 100 倍容量的 0.05M 3-(吗啉代)丙磺酸 (Dojin 生产，以下略称为 MOPS)、0.15M NaCl、0.04 重量%  $\text{NaN}_3$ 、pH7.4 的缓冲液透析数次，置换缓冲液成分。然后通过测定 280nm 的吸光度推定抗体浓度，使用与透析用缓冲液相同的缓冲液将抗体浓度调到 3.0mg/ml，将该溶液作为抗体溶液。而抗体浓度并没有特别限定。制作的抗体溶液可以保存在室温下，但要防止抗体变性，最好是保存在低温下，保存在 4℃ 下更好。

含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液的制备方法如下。而作为苯二甲酸或苯二甲酸盐使用苯二甲酸以及苯二甲酸氢钾，各自构成由各个物质组成的缓冲液。

使用苯二甲酸氢钾的缓冲液的构成方法如下。按照最终浓度计量，苯二甲酸氢钾为 0.05M、聚乙二醇 6,000 为 4 重量%，将他们溶解于约 90% 制备目的体积的纯水中。然后添加 NaOH 水溶液，将 pH 调整到 4.5，用纯水将体积调整到制备目的体积。制备的缓冲液保存在室温下。

使用苯二甲酸的缓冲液的构成方法如下。按照最终浓度计量，苯二甲酸为 0.03M、聚乙二醇 6,000 为 4 重量%，将他们溶解于约 90% 制备目的体积的纯水中。然后添加 NaOH 水溶液，将 pH 调整到 4.5，用纯水将体积调整到制备目的体积。制备的缓冲液保存在室温下。

通过使至少有一种象上述那样构成的含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓

冲液与抗体溶液搭配，可以构成免疫测定用试剂盒。

(实施例 2)

以下给出了以人 CRP 为被测定物质时的免疫测定用试剂盒的构成方法。由于 CRP 具有由具有同一结构的 5 个亚基构成的结构，所以是相对于一种抗体具有多个结合部位的物质。因此，即使使用一种抗 CRP 的单克隆抗体也可以制作均一系统的免疫反应测定中使用的免疫测定用试剂盒。单克隆抗体的种类在 2 种以上也可以。

因此在本实施例中，制作由各自使用多克隆抗体溶液和单克隆抗体溶液的 2 种抗体溶液和含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液构成的免疫反应测定用试剂盒。

首先给出多克隆抗体溶液的制备方法。

使用蛋白 G 柱层析从免疫过人 CRP 的山羊采集的抗血清中纯化山羊抗人 CRP 多克隆抗体。填充在柱中的蛋白 G 固定化凝胶使用 Amersham Pharmacia 生产的凝胶。纯化使用的平衡缓冲液的组成为 0.02M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、pH7.0，洗脱缓冲液组成为 0.1M 甘氨酸、pH2.7。有关利用柱层析的纯化方法、通过透析置换缓冲液的方法与实施例 1 使用的方法一样。然后通过测定 280nm 的吸光度推定抗体浓度，使用与透析用缓冲液相同的缓冲液将抗体浓度调到 1.0mg/ml，将该溶液作为多克隆抗体溶液。

人 CRP 由于是否带有  $\text{Ca}^{2+}$  会发生结构变化。因此构成免疫反应测定用试剂盒的抗体溶液中含有对未带有  $\text{Ca}^{2+}$  的人 CRP 不结合的抗体时，由于苯二甲酸或苯二甲酸盐的螯合作用，未带有  $\text{Ca}^{2+}$  的人 CRP 增加，出现抗原抗体反应的反应率低下的可能性是存在的。最近，对多克隆抗体溶液进行了制备，但在多克隆抗体溶液中含有对未带有  $\text{Ca}^{2+}$  的人 CRP 不结合的抗体。所以在以下所示的含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液的制备中为了保持人 CRP 的结构，在缓冲液中添加了  $\text{Ca}^{2+}$ 。

具体来说，含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液的制备如下。而作为苯二甲酸或苯二甲酸盐在本实施例中使用苯二甲酸。

按照最终浓度计量，苯二甲酸为 0.02M、 $\text{CaCl}_2$  为 0.02M、聚乙二醇 6,000 为 4 重量%，将他们溶解于约 90% 制备目的体积的纯水中。然后添加 NaOH 水溶液，将 pH 调整到 4.5，用纯水将体积调整到制备目的体积。将得到的

缓冲液保存在室温下。

以下给出单克隆抗体溶液的制备方法。

作为单克隆抗体使用即使通过向反应体系添加螯合剂（例如 0.02M 的苯二甲酸或乙二胺四乙酸等）也没有丧失对人 CRP 的结合能力、即与没  
5 带有  $\text{Ca}^{2+}$  的人 CRP 也能特异结合的抗体。具体来说，可以象如下所述那样制备单克隆抗体溶液。

本实施例中使用的小鼠抗人 CRP 单克隆抗体按照下述操作可以得到。首先将产生小鼠抗人 CRP 单克隆抗体的杂交瘤细胞（工业技术院生命工  
学工业技术研究所受托编号 FERM BP-6620 号）注入小鼠腹腔内，通过  
10 使其增殖得到腹水。通过使用与实施例 1 同样的柱层析法从得到的腹水中进行纯化，得到小鼠抗人 CRP 单克隆抗体样品。

具体来说，腹水可以象下述那样得到。为了产生腹水，使用进行了 retire 的雌性 BALB/c 小鼠。向小鼠腹腔内注入 0.5~1ml 的降植烷，约 7 天后注入下述细胞悬浮液 0.5~1ml 后，依次从有腹水产生的小鼠采集腹水。这里  
15 向腹腔内注入的杂交瘤细胞悬浮液是通过使用 RPMI1640 培养基（SIGMA 生产）中混合了 5~15 体积%的胎牛血清的培养基的培养使杂交瘤细胞增殖，增殖的细胞用 RPMI1640 培养基经离心清洗，再悬浮于 RPMI1640 培养基（使其浓度为  $1 \times 10^6 \sim 10^7 \text{ cells/ml}$ ）得到的。

接下来将利用柱层析完成纯化的小鼠抗人 CRP 单克隆抗体样品装入分  
20 级分子量 1 万的透析袋中用约 100 倍容量的含有 0.04 重量%  $\text{NaN}_3$  的 PBS 缓冲液（8g/L NaCl、0.2g/L KCl、1.15g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH7.4）透析数次，置换缓冲液成分。然后通过测定 280nm 的吸光度推定抗体浓度，使用与透析用缓冲液相同的缓冲液将抗体浓度调到 1.0mg/ml，将该溶液作为单克隆抗体溶液。

25 含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液的制备如下。在苯二甲酸或苯二甲酸盐中使用苯二甲酸氢钾构成缓冲液。而在本实施例的单克隆抗体溶液因为不受由于人 CRP 中是否有  $\text{Ca}^{2+}$  引起的结构变化的影响，所以缓冲液中没有添加  $\text{Ca}^{2+}$ 。

含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液的构成方法如下。按照最终浓度  
30 计量，苯二甲酸氢钾为 0.05M、聚乙二醇 6,000 为 4 重量%，将他们溶解

于约 90%制备目的体积的纯水中。然后向得到的溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调整到 4.5，用纯水将体积调整到制备目的体积。将得到的缓冲液保存在室温下。

上述那样制备的各个抗体溶液的浓度并没有限定于这些浓度。制作的抗体溶液可以保存在室温下，但要防止抗体变性，最好是保存在低温下，保存在 4℃下更好。

通过将上述那样构成的含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液与抗体溶液组合可以构成免疫测定用试剂盒。

在实施例 1 和 2 构成的试剂的使用方法，为构建反应体系可以将含有抗原的样品（检材）、抗体溶液、含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液混合之后使用。混合方法可以使用任意方法。混合的比率可以根据需要的抗原浓度的测定范围决定。在通过混合构建的反应体系中会发生抗原抗体反应，生成凝集复合物。通过测定散射光强度的变化量可以估计由于凝集复合物引起的浑浊程度，根据该结果可以知道检测样品中的抗原浓度。

由于混合，缓冲剂、苯二甲酸或苯二甲酸盐、聚乙二醇 6,000 等添加剂的浓度与初期浓度相比变稀了，但稀释后的浓度与初期浓度的差在大致 10%左右，所以得到的结果与由初期浓度预料的测定结果没有太大差别，没有受到多大的影响。而为了避免由于稀释引起的浓度变化，混合时试剂中的各个物质的浓度都按照目的浓度添加就可以制备抗体溶液和含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液。

另外虽然在实施例 1 和 2 中没有给出，但可以将抗体固定于胶乳、金胶体、磁微粒子等微粒子载体上，还可以对抗体进行酶、色素、荧光物质、发光物质等标记。

抗体溶液制备中使用的缓冲剂以及抗体溶液的 pH 并不限于上述组成和 pH。例如，在构成一液系的试剂时，可以使抗体溶液含有苯二甲酸或苯二甲酸盐。因此为了将反应体系的 pH 维持在低于 7，可以用含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的酸性缓冲液进行透析。

在实施例 1 和 2 中 pH 调节使用了 NaOH，也可以使 KOH、LiOH、NH<sub>4</sub>OH、Ca(OH)<sub>2</sub>、Mg(OH)<sub>2</sub> 等氢氧化物。

实施例 1 和 2 在制备含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液时使用了苯

二甲酸氢钾和苯二甲酸，也可以使用其他苯二甲酸或苯二甲酸盐，例如苯二甲酸酐、或苯二甲酸钾、苯二甲酸钠、苯二甲酸铵、苯二甲酸铜（II）等中的任一种。也可以将他们搭配起来用，此时 pH 的调节，如果溶解于纯水时的 pH 处于比调节目的 pH 高的碱性区时，使用 HCl 等，如果处于比调整目的 pH 低的酸性区时，使用上述的氢氧化物等。另外也可以对上述列举的苯二甲酸或苯二甲酸盐的混合比进行调整。

另外，在实施例 1 和 2 中给出了含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液的主要缓冲能力是由苯二甲酸或苯二甲酸盐赋予时的制备方法。然而，添加到缓冲液中的苯二甲酸或苯二甲酸盐的浓度并没有特别限定。另外含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液的主要缓冲能力也可以由其他缓冲剂赋予，也可以使苯二甲酸或苯二甲酸盐与其他的缓冲剂协调赋予缓冲能力。

### （实施例 3）

在本实施例中对在基于本发明的含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的酸性反应体系中的抗原测定的效果与在免疫反应测定方法中一般使用的中性反应体系的抗原测定进行了对比。对比是通过散射测浊法测定人白蛋白进行的。用于构成含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的酸性反应体系的试剂使用实施例 1 中构成的试剂。

以下将实施例 1 中制作的使用苯二甲酸氢钾的缓冲液称之为苯二甲酸氢钾缓冲液，而使用苯二甲酸的缓冲液称之为苯二甲酸缓冲液。

而作为比较例在用于构成中性反应体系的缓冲液的构成中使用 MOPS，准备 0.05M MOPS、4 重量%聚乙二醇 6,000、pH7.4 组成的缓冲液和 0.03M MOPS、4 重量%聚乙二醇 6,000、pH7.4 组成的缓冲液。以下，分别称之为 0.05M MOPS 缓冲液和 0.03M MOPS 缓冲液。各个缓冲液都保存在室温下。

使用用作抗原的人白蛋白（和光纯药工业制造）和 0.05M MOPS、0.04 重量%NaN<sub>3</sub>、pH7.4 组成的缓冲液，制作人白蛋白浓度分别为 0、5、10、20、30、50、70、100、200、300、500mg/dl 的白蛋白溶液。人白蛋白溶液在使用之前保存在 4℃ 下。

测定时使用分光荧光光度计（岛津制作所制造，型号 RF-5300PC）。分光荧光光度计的样品室中配置与恒温水槽（TAITEC 制作，商品名

COOLNIT BATH EL-15) 连接的恒温池架 (岛津制作所制作, 型号 206-15440), 使温度保持在 25℃ 的水在恒温水槽内循环, 测定时要将石英杯内的温度保持一定。分光荧光光度计的测定条件设定为激发、荧光波长都是 670nm, 荧光、激发两者带幅都为 3nm, 灵敏度设定在高灵敏度。

5 测定如下。向 2.87ml 的各个缓冲液中添加 0.1ml 的实施例 1 制备的抗体溶液后, 搅拌混合, 然后再向各个混合液中分别加入各个浓度的人白蛋白溶液 0.03ml, 搅拌混合。反应体系中的兔抗人白蛋白多克隆抗体约为 0.10mg/ml、人白蛋白浓度为测定时使用的人白蛋白溶液浓度乘以 0.01 后的浓度。将他们移到荧光分析用的石英杯中, 设置在分光荧光光度计上,  
10 将 T 型热电偶 (从 RS コンポーネンツ 获得, 型号 219-4696) 浸渍到石英杯内, 在混合白蛋白后 2 分钟开始的时间过程测定中, 每隔 0.04 秒测定一次, 测定 300 秒。测定中的石英杯内的温度通过将 T 型热电偶与数字多级监测器 (アドバンテクト制造, 型号 TR2114) 连接进行监测。为了排除石英杯的污染对测定的影响, 在各反应的测定前将纯水加入杯内, 用测定的值进行修正。求出通过测定得到的 200~300 秒之间的各个测定值的平均值, 把这些值作为对应于各个浓度的人白蛋白溶液的测定值。为了了解各个缓冲液、抗体溶液、各个浓度的人白蛋白溶液由于混合对反应体系的 pH 的影响, 测定结束后用 pH 计对反应体系的混合液的 pH 进行测定。

以下叙述测定结果。由各个测定中使用的各个缓冲液、抗体溶液、各  
20 浓度的人白蛋白溶液构成的反应体系的混合液的 pH 大致与缓冲液的 pH 相同。而通过热电偶测定得到的各个测定中的杯内温度保持在  $25.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

图 4 中的曲线表示对于由 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液构成的反应体系和由 0.05MMOPS 缓冲液构成的反应体系分别加入直至 500mg/dl 的各个人白蛋白溶液之后进行测定的结果。纵轴表示散射光强度, 横轴表示测定中  
25 使用的人白蛋白溶液的浓度。散射光强度越大, 反应体系的浑浊程度 (浊度) 越高, 表明由于抗原抗体反应形成很多凝集复合物。而曲线中的各个值是由就各个缓冲液得到的各个浓度的人白蛋白溶液的测定值减去人白蛋白浓度为 0mg/dl 时的测定值得到的结果。

就象图 4 所示那样, 与使用 0.05MMOPS 缓冲液进行测定时相比, 很  
30 显然使用 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液测定时给出了高的测定值。而使用

0.05MMOPS 缓冲液时，在 50mg/dl 附近出现测定值峰值，随着人白蛋白浓度变高由于区带现象使测定值大大减少。然而，使用 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液时，在 70~100mg/dl 附近具有测定值的峰，即使人白蛋白浓度增高，由于区带现象引起的测定值的减少也被抑制了。

5 图 5 中的曲线表示对于使用 0.03M 苯二甲酸缓冲液的反应体系和使用 0.03MMOPS 缓冲液的反应体系分别加入直至 500mg/dl 的每个人白蛋白溶液之后进行测定的结果。纵轴表示散射光强度，横轴表示测定中使用的人白蛋白溶液的浓度。曲线中的各个值是由就各个缓冲液得到的各个浓度的人白蛋白溶液的测定值减去人白蛋白浓度为 0mg/dl 时的测定值得到的结果。

就象图 5 所示那样，与使用 0.03MMOPS 缓冲液进行测定相比，很显然使用 0.03M 苯二甲酸缓冲液测定时给出了高的测定值。而使用 0.03MMOPS 缓冲液时，在 50mg/dl 附近出现测定值峰值，随着人白蛋白浓度变高由于区带现象使测定值大大减少。而使用 0.03M 苯二甲酸缓冲液  
15 时，在 70~100mg/dl 附近具有测定值的峰，即使人白蛋白浓度增高，由于区带现象引起的测定值的减少也被抑制了。

就象以上结果表明的那样，能够确认利用本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒比使用以往的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒可以得到高的测定值。另外也可以确认与使用以往的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒相比可以使区带现象缓和。

在临床检查中，作为糖尿病性肾病的早期诊断标志，排泄到尿中的微量的人白蛋白成为测定对象，将 0.1~20mg/dl 范围作为定量范围的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒很多（参照新·糖尿病性肾病 预防发病和防止发展 繁田幸雄、海津嘉藏 编辑，第 131 页（1992））。若通过源于散射测浊法的以往的测定方法和该方法中使用的试剂盒，为了缓和区带现象，需要利用均一体系的免疫反应是平衡反应，通过增加作为反应体系被构建的中性缓冲液中的抗体浓度，或者通过中性缓冲液的稀释等使抗原浓度降低来解决。

而如果使用本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒，抗体浓度低，而且在抗原浓度高时区带现象也可以缓和。为此，例如将本实  
30

施例的测定结果作为基础，通过设计将 20mg/dl 以上的测定值作为阳性值的判定区，在由 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液或 0.03M 苯二甲酸缓冲液构成的反应体系中将直至 500mg/dl 的很宽的范围作为测定范围是有可能的。然而，在比较例的中性缓冲液体系中其测定界限在 120~130mg/dl 左右。

- 5 就象以上所示那样，利用本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒与以往的中性缓冲液体系中的测定相比，可以不考虑区带现象的影响而测定更宽浓度范围的人白蛋白。

#### (实施例 4)

10 以下给出了通过散射测浊法对使用苯二甲酸氢钾作为苯二甲酸或苯二甲酸盐的本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒测得的测定值对 pH 的依赖关系进行研究的内容。作为被测定物质使用人白蛋白。人白蛋白溶液的制备用与实施例 3 同样的方法进行，准备浓度分别为 0、5、10、20、30、50、70、100、200、300、500mg/dl 的白蛋白溶液。使用的抗体溶液与实施例 1 相同。

- 15 作为构建用于研究测定值对 pH 依赖性的反应体系的缓冲液，制备将含有 0.05M 苯二甲酸氢钾以及 4 重量%聚乙二醇 6,000 的溶液的 pH 分别调整到 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液。

作为比较例，使用含有 0.05M MOPS、4 重量%聚乙二醇 6,000 的溶液的 pH 调整到 7.4 的 0.05M MOPS 缓冲液。仪器和测定法与实施例 3 相同。

- 20 就结果进行叙述。由各个测定中使用的各个缓冲液、抗体溶液、各浓度的人白蛋白溶液构成的反应体系的混合液的 pH 与缓冲液的 pH 相同。另外测定中石英杯内的温度保持在  $25.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

25 得到的结果如图 6 所示。图 6 中的曲线表示对于使用由各 pH 的 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液构成的反应体系分别加入直至 500mg/dl 的各个人白蛋白溶液之后进行测定的结果。纵轴表示散射光强度，横轴表示测定中使用的人白蛋白溶液的浓度。曲线中的各个值是由就各个缓冲液得到的各个浓度的人白蛋白溶液的测定值减去人白蛋白浓度为 0mg/dl 时的测定值得到的结果。曲线的评估与图 4 一样。

- 30 用 pH4.5~5.5 的 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液构成反应体系并进行测定时，与作为比较例的用 0.05M MOPS 缓冲液构成的反应体系并测定的结

果相比，测定值提高，另外可以看到随着抗原浓度增高产生的区带现象被缓和的效果。该效果在用 pH4.5 的 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液构成反应体系时最大。另外从图 6 的结果可以认为，若由 pH4.5~5.3、优选 pH4.5~5.0 的 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液构成反应体系时，测定值的提高和区带现象的缓和效果是非常稳定的。

在用 pH 为 6.0 的 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液构成的反应体系时，测定值低于用 0.05M MOPS 缓冲液构成的反应体系测定的值。而测定值曲线表现出与用 0.05M MOPS 缓冲液构成的反应体系同样的形状，看不到对随着抗原浓度变成高浓度而出现的区带现象有缓和的效果。

在用 pH 为 4.0 的 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液构成的反应体系中，将直至 100mg/dl 的人白蛋白加入反应体系后测定的值低于用 0.05M MOPS 缓冲液构成的反应体系测定的值。然而将 200mg/dl 以上的人白蛋白加入反应体系后测定的值高于用 0.05M MOPS 缓冲液构成的反应体系测定的值。看到对随着抗原浓度变成高浓度而出现的区带现象有缓和的效果。

以上结果表明，在使用苯二甲酸或苯二甲酸盐的免疫反应测定法中反应体系的 pH 一般设定在 pH4.5~5.5 范围、设定在 pH4.5~5.3 范围更好，最好是设定在 pH4.5~5.0 范围。另外知道将反应体系的 pH 设定在 4.5 可以得到最大的效果。

同样，在使用苯二甲酸或苯二甲酸盐的免疫反应测定用试剂盒中，反应体系的 pH 象设定的那样调整在 pH4.5~5.5 范围、调整在 pH4.5~5.3 范围更好，最好是调整在 pH4.5~5.0 范围。另外可知将反应体系的 pH 象设定的那样调整在 4.5 可以得到最大的效果。

#### (实施例 5)

以下给出了通过散射测浊法对使用苯二甲酸氢钾作为苯二甲酸或苯二甲酸盐的本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒测得的测定值对苯二甲酸或苯二甲酸盐依赖性进行研究的内容。作为被测定物质使用人白蛋白。人白蛋白溶液的制备用与实施例 3 同样的方法进行，准备浓度分别为 0、5、10、20、30、50、70、100、200、300、500mg/dl 的白蛋白溶液。使用的抗体溶液与实施例 1 相同。

作为构建用于研究测定值对苯二甲酸或苯二甲酸盐依赖性的反应体系

的缓冲液，准备分别含有苯二甲酸氢钾浓度为 0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3M 以及 4 重量%聚乙二醇 6,000 的 pH 为 4.5 的各个苯二甲酸氢钾缓冲液。

5 作为比较例，使用含有 0.05M MOPS、4 重量%聚乙二醇 6,000 以及 pH 调整到 7.4 的 0.05M MOPS 缓冲液。仪器和测定法与实施例 3 相同。

以下叙述测定的结果。由各个测定中使用的各个缓冲液、抗体溶液、各浓度的人白蛋白溶液构成的反应体系的混合液的 pH 在使用 0.01 M 苯二甲酸氢钾缓冲液时为 4.7，在使用 0.025 M 苯二甲酸氢钾缓冲液时为 4.6，在使用其他浓度的苯二甲酸氢钾缓冲液时为 4.5。另外测定中石英杯内的  
10 温度保存在  $25.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

得到的结果如图 7 所示。图 7 中的曲线表示对于使用由 pH 大致为 4.5 的各个浓度的苯二甲酸氢钾缓冲液构成的反应体系分别加入直至 500mg/dl 的各个人白蛋白溶液之后进行测定的结果。纵轴表示散射光强度，横轴表示测定中使用的人白蛋白溶液的浓度。曲线中的各个值是由就各个缓冲液  
15 得到的各个浓度人白蛋白溶液的测定值减去人白蛋白浓度为 0mg/dl 时的测定值得到的结果。曲线的评估与图 4 一样。

用苯二甲酸氢钾的浓度在 0.2M 以下的苯二甲酸氢钾缓冲液构成反应体系进行测定时，与作为比较例的 0.05M MOPS 缓冲液构成的反应体系测定的结果相比测定值提高了，能够确认测定值提高的效果。另外也可以看到随着抗原浓度增高产生的区带现象被缓和的效果。缓和区带现象的效果  
20 在用 0.1M 以下浓度的苯二甲酸氢钾缓冲液构成反应体系时特别高。用 0.1M 以下浓度的苯二甲酸氢钾缓冲液构成反应体系测定值提高效果没有太大差别，但缓和区带现象的效果在用 0.1M 浓度的苯二甲酸氢钾缓冲液构成反应体系中最大。

25 在用 0.3M 苯二甲酸氢钾缓冲液构成的反应体系时，人白蛋白浓度直至 100mg/dl 的测定值都低于用 0.05M MOPS 缓冲液构成的反应体系测定的值。而人白蛋白浓度为 200mg/dl 以上的测定值高于比较例，可以看到对随着人白蛋白浓度变成高浓度而出现的区带现象有缓和的效果。

30 由以上结果可知，在使用苯二甲酸或苯二甲酸盐的免疫反应测定法中，为了获得比一般中性缓冲液高的效果，反应体系的苯二甲酸氢钾浓度

调整在 0.2M 以下合适。特别是苯二甲酸氢钾浓度调整在 0.1M 以下更好，苯二甲酸氢钾浓度调整在 0.1M 最好。

同样，如果使用用苯二甲酸或苯二甲酸盐构成的免疫反应测定用试剂盒，可知反应体系的苯二甲酸氢钾浓度调整在 0.2M 以下比较好。特别是  
5 苯二甲酸氢钾浓度调整在 0.1M 以下更好，苯二甲酸氢钾浓度调整为 0.1M 最好。

#### (实施例 6)

以下给出了通过散射测浊法对将苯二甲酸或苯二甲酸盐与其他缓冲剂混合之后使用时利用本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定用试剂盒  
10 测得的测定值进行研究的内容。

作为被测定物质使用人白蛋白。人白蛋白溶液的制备用与实施例 3 同样的方法进行，准备浓度分别为 0、5、10、20、30、50、70、100、200、300、500mg/dl 的白蛋白溶液。使用的抗体溶液与实施例 1 相同。

作为苯二甲酸或苯二甲酸盐使用苯二甲酸。与苯二甲酸共存的缓冲剂  
15 中使用琥珀酸，制备由 0.1M 琥珀酸、0.02M 苯二甲酸、4 重量%聚乙二醇 6,000 组成的 pH 为 4.5 琥珀酸苯二甲酸混合缓冲液。另外作为没有苯二甲酸或苯二甲酸盐时的比较例，使用配制的 0.12M 琥珀酸、4 重量%聚乙二醇 6,000 组成的 pH 为 4.5 琥珀酸缓冲液。

以下叙述测定的结果。由各个测定中使用的各个缓冲液、抗体溶液、  
20 各浓度的人白蛋白溶液构成的反应体系的混合液的 pH 与缓冲液的 pH 大致相同。另外测定中石英杯内的温度保持在  $25.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

得到的结果如图 8 所示。图 8 中的曲线表示对于使用上述由琥珀酸苯二甲酸混合缓冲液以及琥珀酸缓冲液分别构成的反应体系分别加入直至  
25 500mg/dl 的各个人白蛋白溶液之后进行测定的结果。纵轴表示散射光强度，横轴表示测定中使用的人白蛋白溶液的浓度。曲线中的各个值是由就各个缓冲液得到的各个浓度人白蛋白溶液的测定值减去人白蛋白浓度为 0mg/dl 时的测定值得到的结果。曲线的评估与图 4 一样。

结果表明，使用琥珀酸苯二甲酸混合缓冲液时，与作为比较例使用的琥珀酸缓冲液相比，测定值提高了，可以确认有效果。另外也可以看到随着  
30 抗原浓度增高产生的区带现象被缓和的效果。

由以上结果可知，在本发明的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒中，即使将苯二甲酸或苯二甲酸盐与其他缓冲剂一起使用，也可以确认起到了测定值提高效果以及缓和区带现象的效果。

(实施例 7)

5 以下给出了使用实施例 2 制作的山羊抗人 CRP 多克隆抗体溶液对本发明的人 CRP 测定的效果与在以往免疫反应测定方法中一般使用的中性反应体系中的人 CRP 测定进行对比的结果。

测定中使用的各浓度的人 CRP 溶液的配制如下：将纯化的人 CRP (Chemicon International 生产, Lot No.21042246) 用组成为 0.05M MOPS、  
10 0.04 重量%NaN<sub>3</sub>的 pH 为 7.4 缓冲液稀释后配制。制备人 CRP 溶液的浓度分别为 0、10、20、30、50、70、100、200mg/dl 的溶液。

作为抗体溶液使用实施例 2 制作的山羊抗人 CRP 多克隆抗体溶液。

作为含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液使用实施例 2 制作的苯二甲酸缓冲液(0.02M 苯二甲酸、0.02McaCl<sub>2</sub>、4 重量%聚乙二醇 6,000, pH4.5)。

15 另外作为不含苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液比较例使用含有 0.05M MOPS 以及 4 重量%聚乙二醇 6,000 的溶液并且将 pH 调整到 7.4 的 0.05M MOPS 缓冲液。

测定装置使用自己制作的装置，其构成如下。光源做成 270Hz 调制的波长 680nm 的输出功率 15mW 半导体激光头(キヨー技研制, 型号 MLXS  
20 -D-12-680-35)，检测器做成可见红外精密测光用硅光电二极管(滨松フォトニクス制造, 型号 S2387-66R)。杯子是将厚 0.1cm 的光学玻璃板粘接，做成容量约 200 $\mu$ l 的正四角柱形。各配置位于离开光源 0.5cm 的地方，使其一面与光源成垂直地配置杯子，检测器在与光源成 90° 角度方向，离开杯子 5.5cm 的地方配置，为了使杂散光不入射到检测器，在检  
25 测器和杯子之间设置遮光筒。依赖于检测器检测的光量的电流信号经过电流电压变换电路(10<sup>6</sup>V/A)和运算放大器构成的发大电路放大 100 倍的电压信号后，通过同步放大器(エヌエフ回路设计ブロック制造, 型号 5610B)进行位相敏感检波，输入到 GPIB 控制的计算机中。

就各个缓冲液，对各浓度人 CRP 的测定如下。反应体系的混合比为缓冲液 178 $\mu$ l、人 CRP 溶液 9 $\mu$ l、抗体溶液 7 $\mu$ l。反应体系中的山羊抗人  
30

CRP 多克隆抗体的最终浓度约为 0.036mg/ml、人 CRP 的最终浓度为测定中使用的人 CRP 溶液的浓度乘以 0.046 得到的浓度。

首先向杯内按照上述容量加入缓冲液和人 CRP 溶液，搅拌混合。然后按照上述容量加入抗体溶液，进行搅拌混合，使抗原抗体反应发生。散射光的测定从加入抗体溶液前 10 秒开始，每 0.5 秒测定一次，连续测定 300 秒。测定值是作为电压值得到的。杯子的污染对测定的影响可以用通过在各反应前向杯内加入纯水测定的值进行修正除去。求得到的于 200~300 秒之间的平均值，该值作为于各浓度人 CRP 溶液的测定值。另外在可以由加入抗体溶液之前 10 秒的测定值判断出由于抗原产生自身凝集的情况，从上述求出的各浓度的人 CRP 溶液的测定值中减去这些平均值。测定在室温（约 20℃）下进行。

以下给出了测定结果。图 9 中的曲线表示就各个缓冲液加入直至 100mg/dl 的各人 CRP 溶液后测定的结果。纵轴表示测定的电压值，横轴表示测定中使用的人 CRP 溶液的浓度。测定电压值越高，入射到检测器的散射光越多，反应体系的浊度高，即表明由于抗原抗体反应形成许多凝集复合物。另外曲线中的各个值是从得到的各浓度的人 CRP 溶液的测定值减去人 CRP 浓度为 0mg/dl 的测定值得到的结果。

就象图 9 所示那样，与作为比较例使用 MOPS 缓冲液进行测定时相比，可以确认使用实施例 2 制作的由山羊抗人 CRP 多克隆抗体溶液以及含有 0.02M  $\text{CaCl}_2$  和苯二甲酸的缓冲液构成的试剂进行测定时得到的值，在各浓度的人 CRP 溶液的测定中都表现出高的测定值。

#### （实施例 8）

以下给出了使用实施例 2 制作的小鼠抗人 CRP 单克隆抗体溶液对本发明的人 CRP 测定的效果与在以往免疫反应测定方法中一般使用的中性反应体系中的人 CRP 测定进行对比的结果。

测定中使用的各浓度人 CRP 溶液的制备使用与实施例 7 同样的方法。制备人 CRP 溶液的浓度分别为 0、10、20、30、50、70、100mg/dl 的溶液。

作为抗体溶液使用实施例 2 制作的小鼠抗人 CRP 单克隆抗体溶液。

作为含有苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液使用实施例 2 制作的苯二甲

酸氢钾缓冲液（0.05M 苯二甲酸氢钾、4 重量%聚乙二醇 6,000，pH4.5）。

另外作为不含苯二甲酸或苯二甲酸盐的缓冲液比较例使用含有 0.05M MOPS 以及 4 重量%聚乙二醇 6,000 的并且将 pH 调整到 7.4 的 0.05M MOPS 缓冲液。

5 测定中使用与实施例 7 所述同样构成的装置和测定条件。另外有关测定方法以及测定数据的处理方法等也都与实施例 7 所述的方法同样。因此反应体系中的小鼠抗人 CRP 单克隆抗体的最终浓度约为 0.036mg/ml，人 CRP 的最终浓度为测定中使用的人 CRP 溶液的浓度乘以 0.046 得到的浓度。

10 以下给出了测定结果。图 10 中的曲线表示就在苯二甲酸或苯二甲酸盐中使用苯二甲酸氢钾的以实施例 2 构成的 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液和作为比较例的 0.05M MOPS 缓冲液，加入直至 100mg/dl 的各个人 CRP 溶液后测定的结果。纵轴表示测定的电压值，横轴表示测定中使用的人 CRP 溶液的浓度。另外曲线中的各个值是从得到的各浓度的人 CRP 溶液的测定值减去人 CRP 浓度为 0mg/dl 的测定值得到的结果。曲线的评估与图 9 一样。

就象图 10 所示那样，在对比较例使用的 0.05 MOPS 缓冲液进行人 CRP 测定时，就 10mg/dl 的人 CRP 溶液的测定来说，在与 0mg/dl 的人 CRP 溶液的测定值之间没有得到充分的测定值差，实质上不能测定人 CRP 的浓度差。另一方面，用 0.05M 苯二甲酸氢钾缓冲液进行测定时，在各个浓度的人 CRP 溶液测定中都明显表现出很高的测定值，即使在 10mg/dl 的人 CRP 溶液的测定中，在与 0mg/dl 的人 CRP 溶液的测定值之间也可以得到充分的测定值差。就是说，对人 CRP 的浓度差进行测定成为可能。

25 就象以上实施例 7 和 8 所示那样，可以确认本发明的免疫反应测定方法以及方法中使用的免疫反应测定用试剂盒，即使对人 CRP 测定也具有测定值提高的效果。

就象以上说明的那样，利用本发明的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒，通过使免疫反应的反应体系中存在苯二甲酸或苯二甲酸盐，将反应体系的 pH 设定酸性，可以提高通过抗原抗体结合引起的免疫反应的测定值，而且通过上述操作可以缓和在抗原过剩范围中产生的区带

30

现象。

在以往的添加水溶性高分子的方法中，为了使测定值提高，维持良好的 S/N 比，进行稳定的测定，需要添加更高浓度水溶性高分子或高分子量的水溶性高分子。因此，使溶液的粘性增大，存在着其分析操作上的处理变得困难的不好状况。然而在本发明中由于使用的苯二甲酸或苯二甲酸盐是低分子物质，不会使溶液的粘性增大，其分析操作的处理也变得容易。

另外，利用本发明的免疫反应测定方法以及免疫反应测定用试剂盒，由于区带现象被缓和，在被测定物质的高浓度下的测定值的急剧下降被减轻。因此可以使能够正确测定被测定物质的含量的测定浓度范围扩展。

就象以上说明的那样，通过本发明可以提供很容易使测定值提高的免疫反应测定方法以及方法中使用的免疫反应测定用试剂盒。还可以提供使在抗原过剩范围内产生的区带现象缓和的免疫反应测定方法以及方法中使用的免疫反应测定用试剂盒。

15

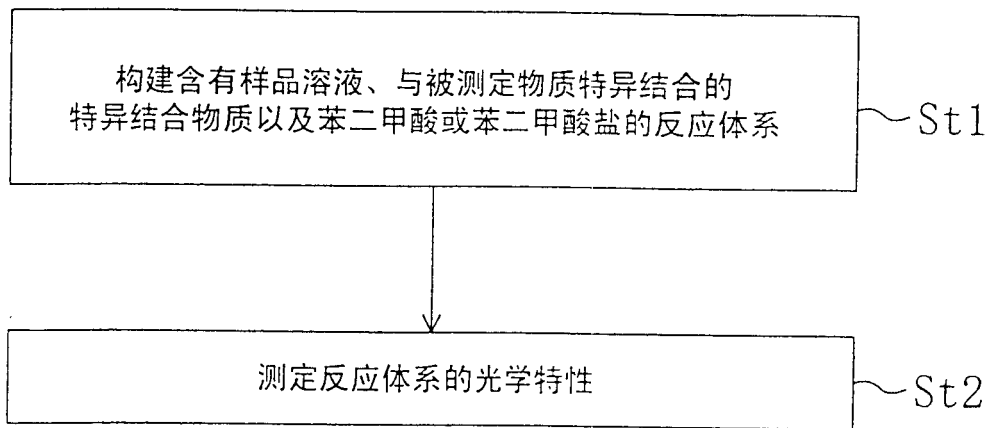


图 1

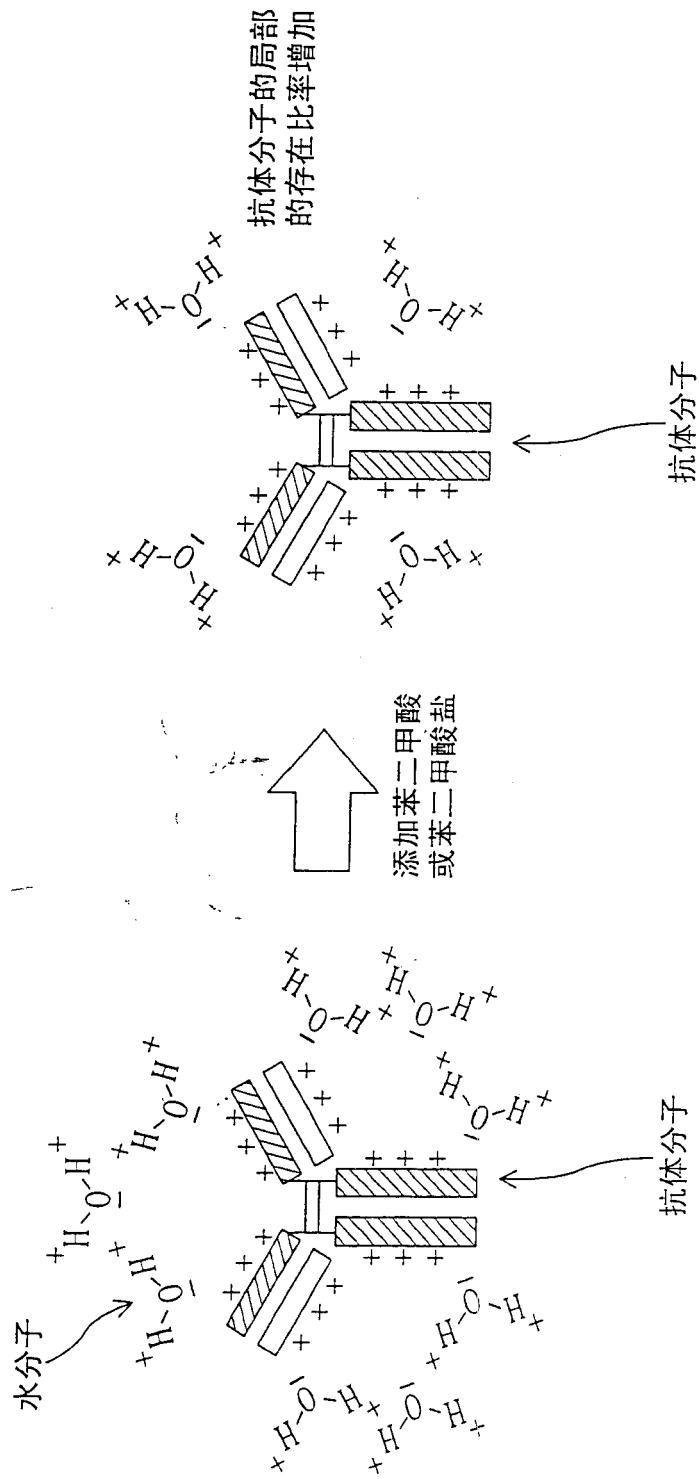


图 2

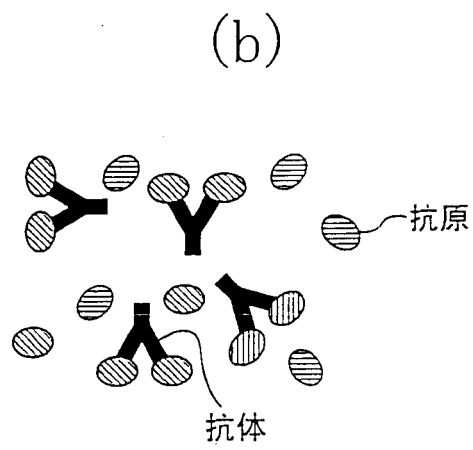
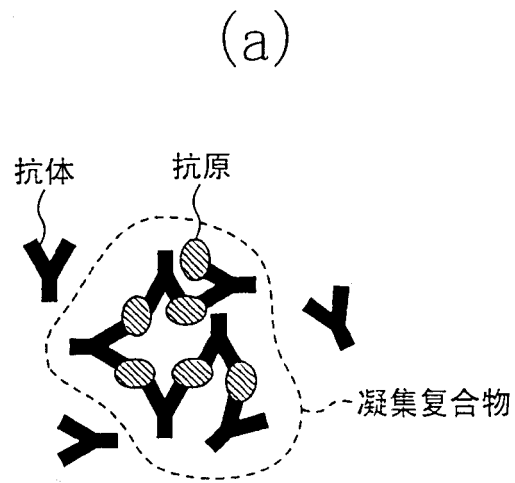


图 3

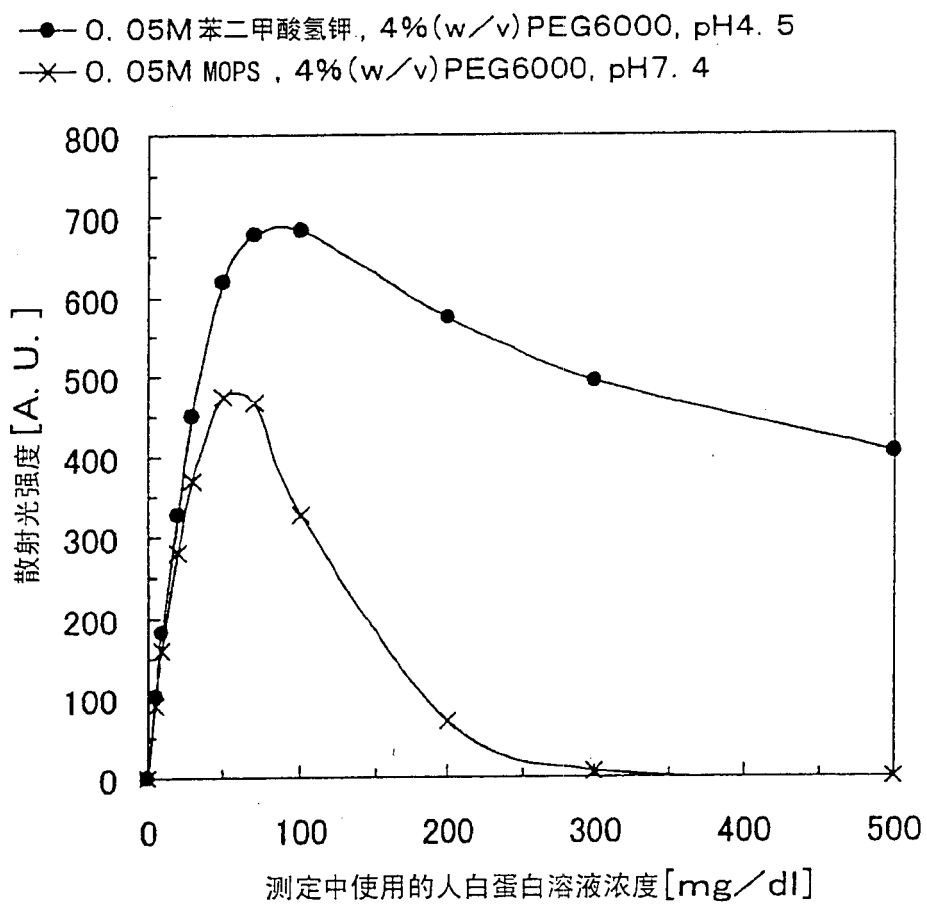


图 4

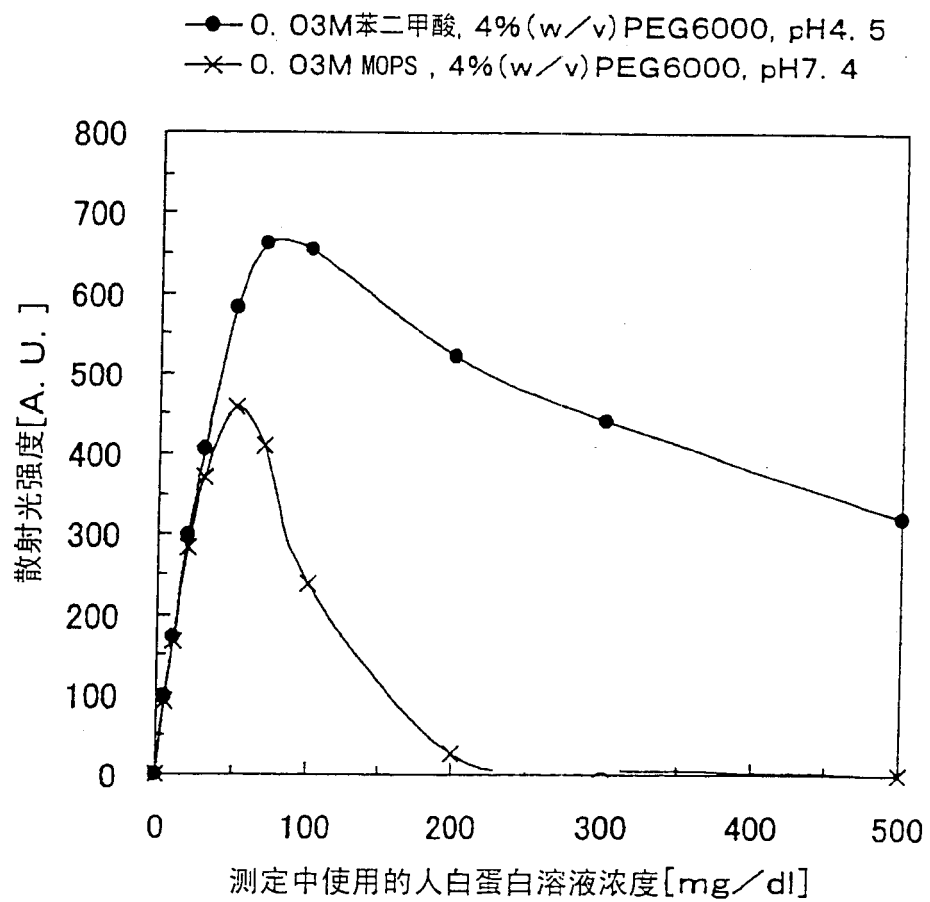


图 5

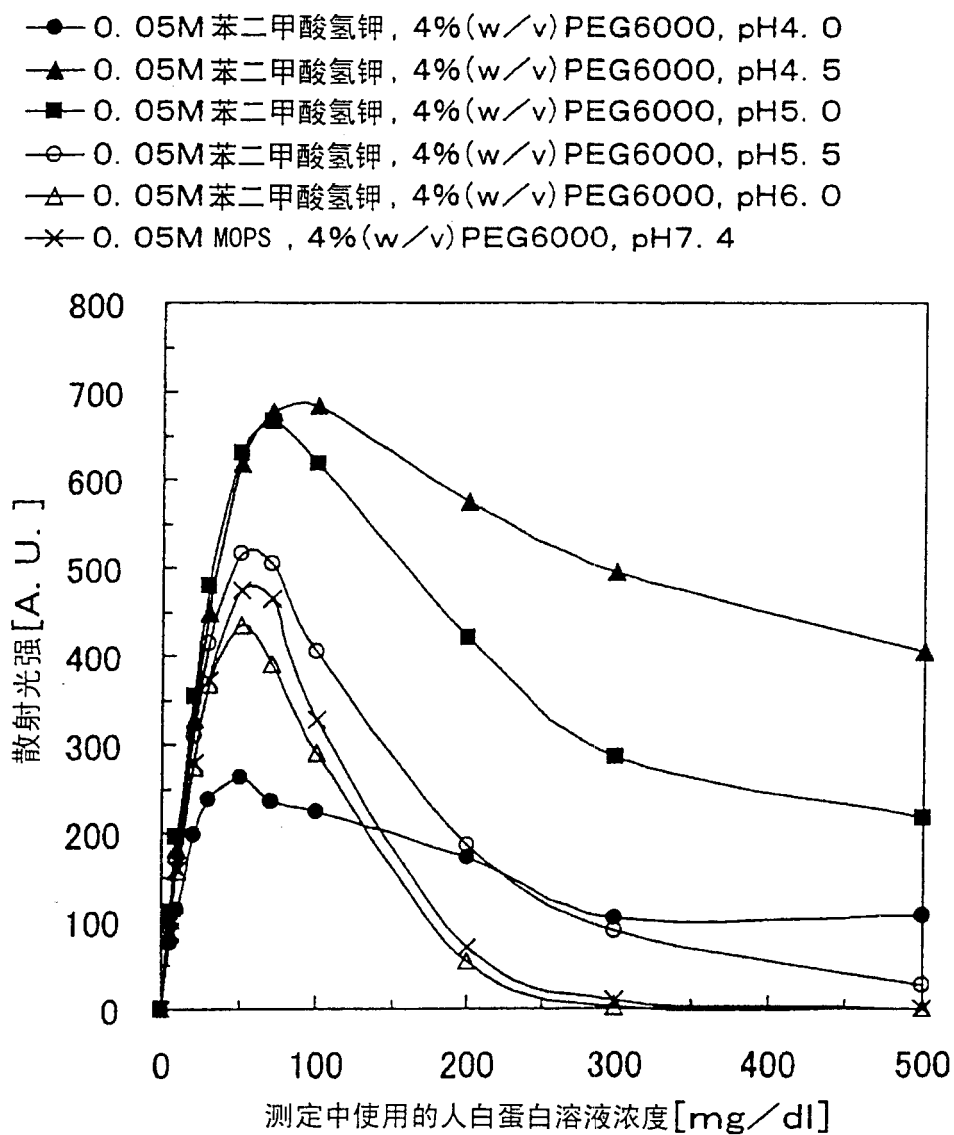


图 6

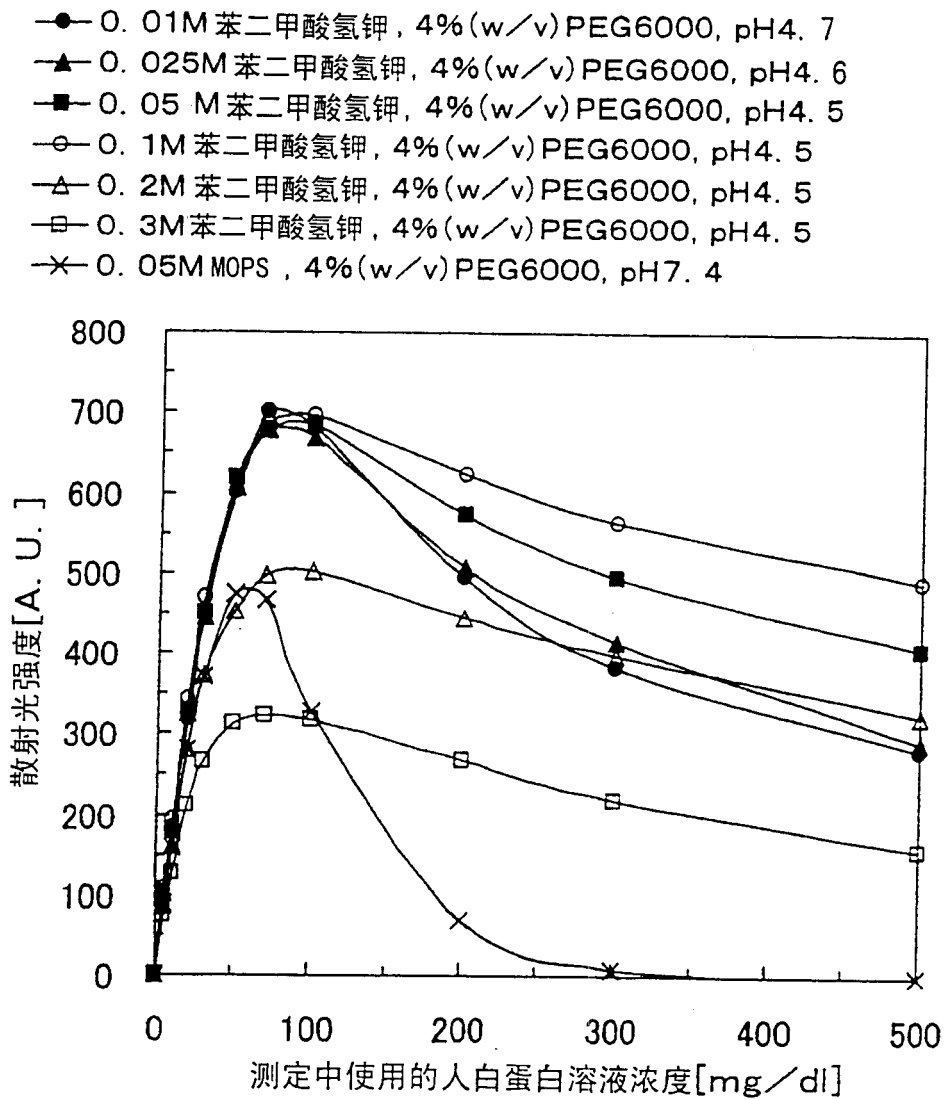


图 7

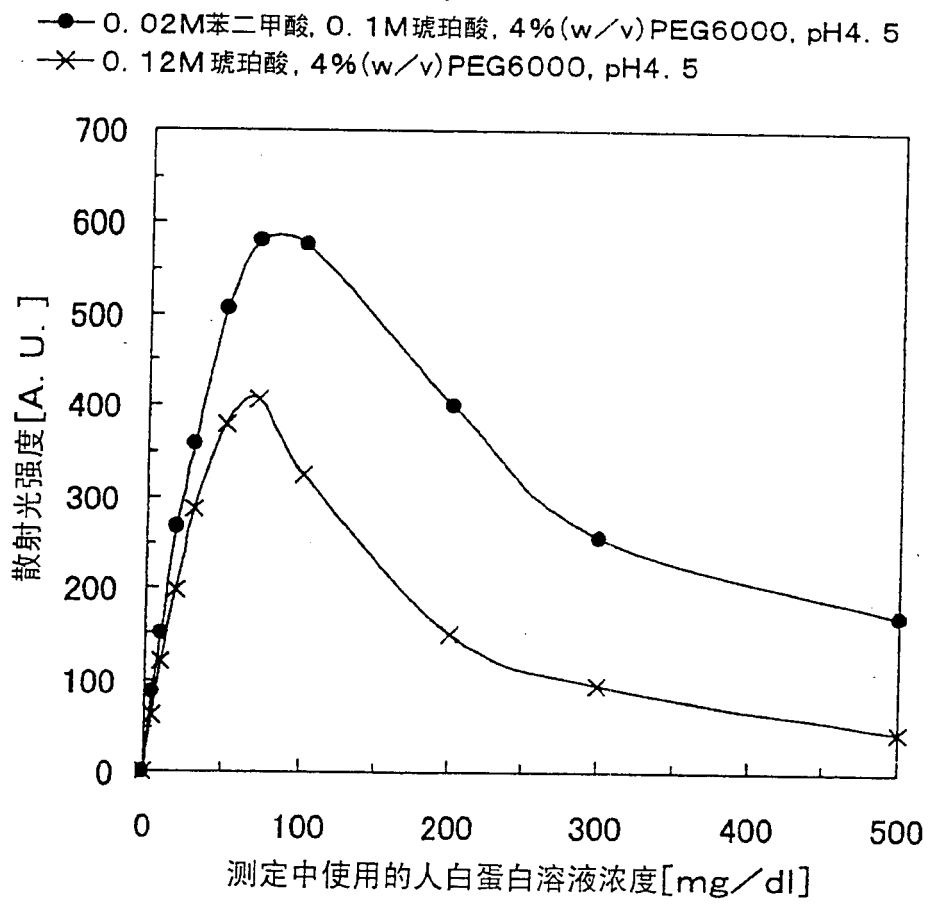


图 8

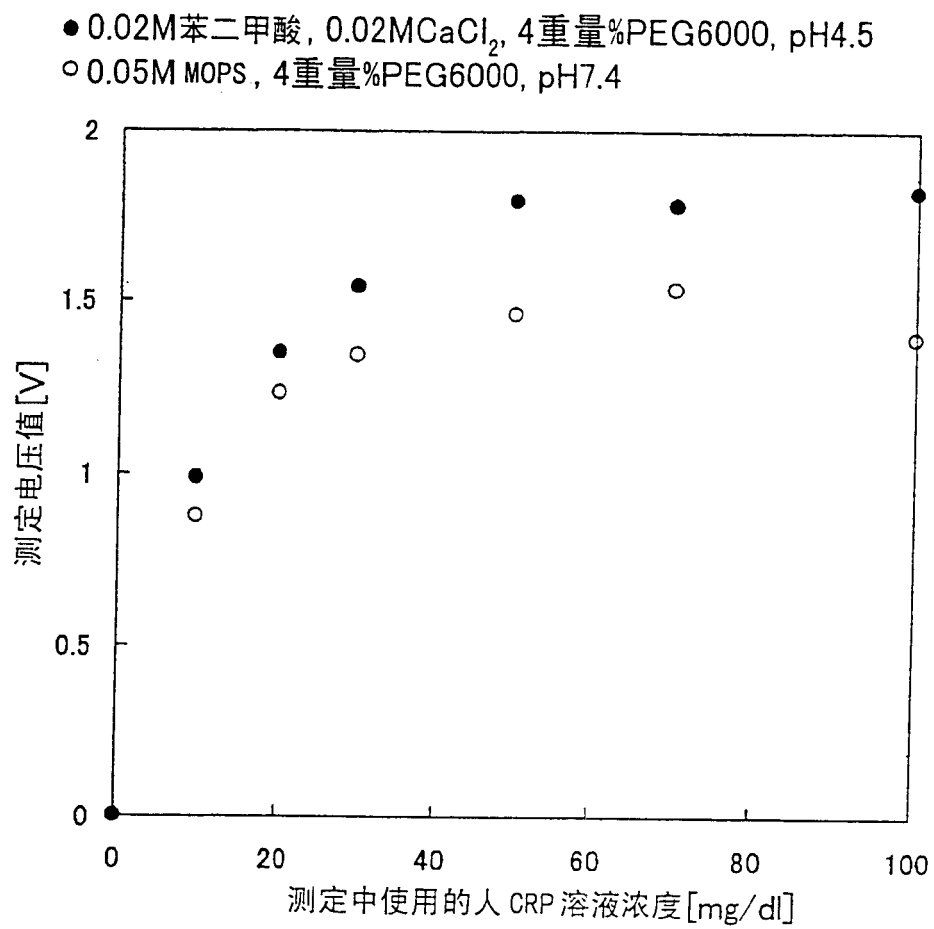


图 9

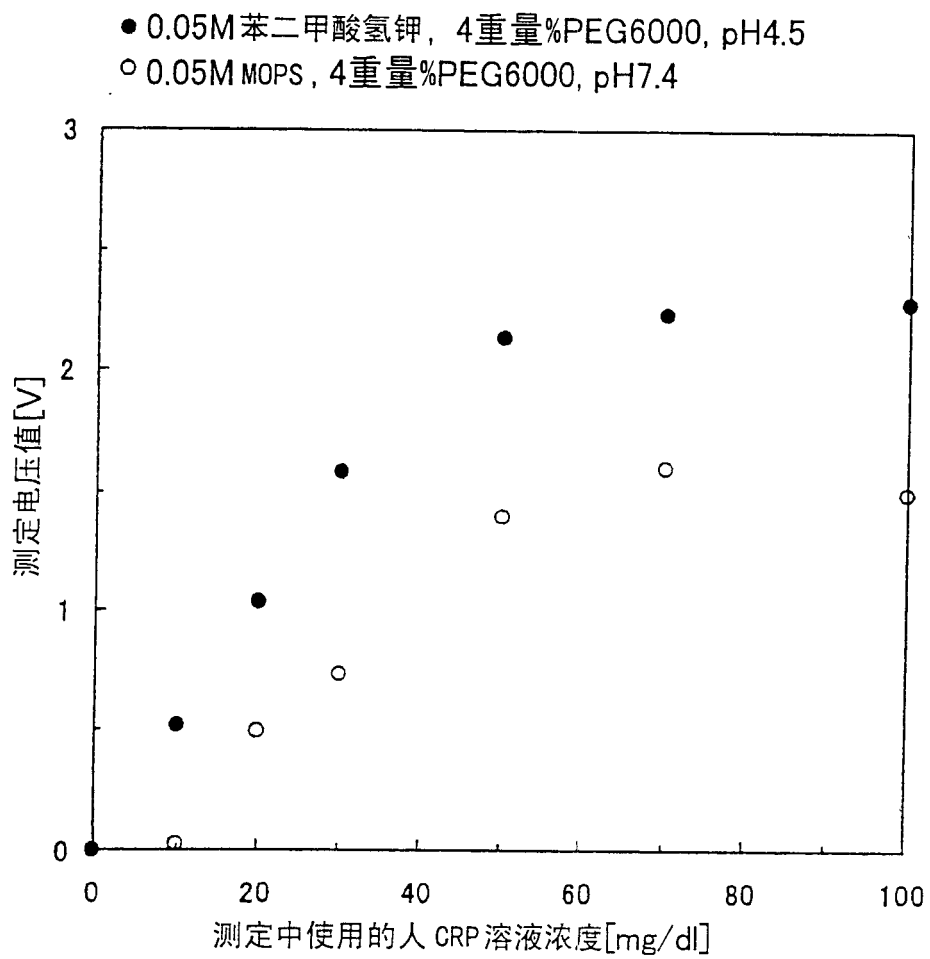


图 10

专利名称(译)	免疫反应测定方法以及方法中使用的免疫反应测定用试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1247996C</a>	公开(公告)日	2006-03-29
申请号	CN02809704.1	申请日	2002-12-27
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	G01N33/536 G01N33/531 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/539 G01N33/542		
CPC分类号	G01N33/542 G01N33/539 G01N33/5375 G01N33/536		
优先权	2001396381 2001-12-27 JP		
其他公开文献	CN1507564A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种免疫反应测定方法，首先通过图1所示的工序St1构建含有要对被测物质含量进行测定的样品、与被测定物质特异结合的特异结合物质以及苯二甲酸或苯二甲酸盐的反应体系。此时上述反应体系的pH设定为低于7。而在被测物质是抗原时特异结合物质是抗体，而被测定物质是抗体时特异结合物质是抗原。然后通过图1所示工序St2测定反应体系的光学特性。此时在上述工序St1中生成凝集复合物时，上述反应体系出现浑浊，散射光强度以及光透过量等都发生变化。因此通过测定散射光强度以及光透过量等可以估计反应体系的浑浊程度。

