



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01816027.1

[43] 公开日 2003年12月10日

[11] 公开号 CN 1461411A

[22] 申请日 2001.9.20 [21] 申请号 01816027.1

[30] 优先权

[32] 2000.9.20 [33] JP [31] 286188/2000

[86] 国际申请 PCT/JP01/08188 2001.9.20

[87] 国际公布 WO02/25274 日 2002.3.28

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.20

[71] 申请人 清野祐子

地址 日本埼玉县

[72] 发明人 清野祐子 石井胜 五津利雄

[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

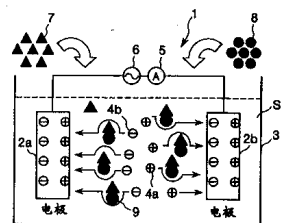
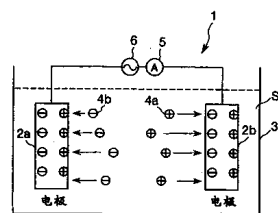
代理人 冯 谱

权利要求书5页 说明书38页 附图25页

[54] 发明名称 反应检测方法,免疫反应检测方法及其设备

[57] 摘要

根据本发明,能够简易而快速地检测物质的反应而无需昂贵和庞杂的设备或测量仪器。本发明的反应检测方法包括基于电解质溶液的电导率的测量,检测电解质溶液中物质的反应。提供了一种免疫反应检测方法,包括基于电解质溶液中电导率的测量,检测电解质中抗原与抗体之间的免疫反应。此外,提供了一种免疫反应检测方法,包括基于受检溶液温度的测量检测受检溶液中抗原与抗体之间的免疫反应。



1. 一种反应检测方法，包括基于电解质溶液的电导率的测量，检测电解质溶液中物质的反应。
2. 根据权利要求1的反应检测方法，其中通过对电解质溶液电导率时间相关的测量，检测反应的反应状态和/或反应产物。
3. 根据权利要求1或2的反应检测方法，其中所述反应是(a) 免疫反应，(b) 酶反应，或(c) 任何其它化学反应，包括结合反应，聚合反应，分解反应，及催化反应。
4. 根据权利要求1、2或3的反应检测方法，其中物质是(i)蛋白质，包括纯化蛋白质与合成蛋白质，(ii)酶，(iii)抗原，包括以上(i)和(ii)，(iv)抗体，包括多克隆抗体和单克隆抗体，或(v)其它化学物质。
5. 根据权利要求1到4的反应检测方法，其中通过检测特定物质与在反应时与该特定物质反应的物质之间的反应，检测和/或定量确定样品中的特定物质。
6. 根据权利要求5的反应检测方法，其中特定物质是与疾病的特定症状相关的物质，与疾病的特定症状相关的基因产物，或与它们相对的抗体。
7. 根据权利要求6的反应检测方法，其中特定的物质是癌症相关的物质，包括癌胚蛋白，荷尔蒙，荷尔蒙受体，薄膜抗原，及癌症相关的基因产物；或与这些物质相对的抗体。
8. 根据权利要求5、或7的反应检测方法，其中样品是体液，包括血液，血清，血浆，尿或腹水；组织或组织浸出物；或是细胞或细胞浸出物。
9. 根据权利要求1到8任何之一的反应检测方法，还包括测量电解质溶液的温度，及进行电导率测量值的温度校正。
10. 根据权利要求1到8任何之一的反应检测方法，还包括采用以下任何之一或组合：(1)保持其中在电解质溶液中发生物质反应的反应系统之外的气氛处于固定温度；(2)对外部气氛热保护反应系统；

以及(3)保持反应系统和外部气氛处于相同的温度, 不进行电导率测量值的温度校正。

11. 根据权利要求 2 到 8 任何之一的反应检测方法, 还包括采用以下任何之一或组合: (1)保持其中在电解质溶液中发生物质反应的反应系统之外的气氛处于固定温度; (2)对外部气氛热保护反应系统; 以及(3)保持反应系统和外部气氛处于相同的温度, 不进行电导率测量值的温度校正, 以及

通过时间相关测量电解质溶液的温度, 及测量每单位温度电导率变化量或变化率, 检测电解质溶液中物质的反应的抗原和/或反应产物。

12. 一种免疫反应检测方法, 包括基于电解质溶液的电导率的测量, 检测电解质溶液中抗原和抗体之间的免疫反应。

13. 根据权利要求 12 的一种免疫检测方法, 其中通过电解质溶液的电导率的时间相关测量, 检测免疫反应的反应状态, 抗原, 抗体和/或免疫复合物。

14. 根据权利要求 12 或 13 的一种免疫检测方法, 还包括测量电解质溶液的温度, 及进行电导率测量值的温度校正。

15. 根据权利要求 12 或 13 的一种免疫检测方法, 还包括采用以下任何之一或组合: (1)保持其中在电解质溶液中发生抗原和抗体之间的免疫反应的反应系统之外的气氛处于固定温度; (2)对外部气氛热保护反应系统; 以及(3)保持反应系统和外部气氛处于相同的温度, 不进行电导率测量值的温度校正。

16. 根据权利要求 13 的一种免疫检测方法, 还包括采用以下任何之一或组合: (1)保持其中在电解质溶液中发生物质反应的反应系统之外的气氛处于固定温度; (2)对外部气氛热保护反应系统; 以及(3)保持反应系统和外部气氛处于相同的温度, 不进行电导率测量值的温度校正, 以及

通过时间相关测量电解质溶液的温度, 及测量每单位温度电导率变化量或变化率, 检测电解质溶液中物质的反应的反应状态和/或反应

产物。

17. 一种免疫反应检测方法，包括基于受检溶液的温度测量，检测受检溶液中抗原和抗体之间的免疫反应。

18. 根据权利要求 17 的一种免疫反应检测方法，其中通过对受检溶液温度进行时间相关测量，检测免疫反应的反应状态，抗原，抗体和/或免疫复合物。

19. 根据权利要求 17 的一种免疫反应检测方法，还包括采用以下任何之一或组合：(1)保持其中在受检溶液中发生抗原和抗体之间免疫反应的反应系统之外的气氛处于固定温度；(2)对外部气氛热保护反应系统；以及(3)保持反应系统和外部气氛处于相同的温度，以便测量受检溶液的温度。

20. 根据权利要求 12 到 19 任何之一的一种免疫反应检测方法，其中抗原是与疾病的特定症状相关的物质，或与疾病的特定状态相关的基因产物，或抗体是与疾病的特定症状相关的物质，或与疾病的特定状态相关的基因产物相对的抗体；并通过检测免疫反应而检测和/或定量确定抗原或抗体。

21. 根据权利要求 12 到 19 任何之一的一种免疫反应检测方法，其中抗原是癌症相关的物质，包括癌胚蛋白，荷尔蒙，荷尔蒙受体，薄膜抗原，及癌症相关的基因产物；或抗体是与癌症相关的物质相对的抗体，癌症相关的物质包括癌胚蛋白，荷尔蒙，荷尔蒙受体，薄膜抗原，及癌症相关的基因产物；以及通过检测免疫反应而检测和/或定量确定抗原或抗体。

22. 一种反应检测设备，包括：

反应器，用于容纳反应物和电解质溶液；

电导率检测装置，发出对应于反应器中电解质溶液的电导率的信号；以及

控制装置，响应在电解质溶液中物质的反应，检测由电导率检测装置发出的信号。

23. 根据权利要求 22 的一种反应检测设备，还包括温度检测装

置，它发出对应于反应器中电解质溶液的温度的信号，以便基于温度检测装置的输出，校正基于电导率检测装置的输出的电导率的测量值。

24. 根据权利要求 22 的一种反应检测设备，还包括以下任何之一或组合：(1)用于保持反应器之外的气氛处于恒温的装置；(2)用于对反应器之外的气氛热保护反应器内部的装置；以及(3)用于保持反应器内部及反应器之外的气氛处于相同温度的装置。

25. 根据权利要求 22 的一种反应检测设备，还包括温度检测装置，它发出对应于反应器中电解质溶液温度的信号，其中控制装置基于由电导率检测装置响应电解质溶液中的物质反应发出的信号，以及由温度检测装置响应电解质溶液中物质反应发出的信号，产生对应于每单位温度电导率变化量或变化率的信号。

26. 一种免疫反应检测设备，包括：

反应器，用于容纳包含抗原和抗体的受检溶液；

电导率检测装置，发出对应于反应器中电解质溶液的电导率的信号；以及

控制装置，响应在电解质溶液中抗原与抗体之间的免疫反应，检测由电导率检测装置发出信号。

27. 根据权利要求 26 的一种免疫反应检测设备，还包括温度检测装置，它发出对应于反应器中电解质溶液的温度的信号，以便基于温度检测装置的输出，校正基于电导率检测装置的输出的电导率的测量值。

28. 根据权利要求 26 的一种免疫反应检测设备，还包括以下任何之一或组合：(1)用于保持反应器之外的气氛处于恒温的装置；(2)用于对反应器之外的气氛热保护反应器内部的装置；以及(3)用于保持反应器内部及反应器之外的气氛处于相同温度的装置。

29. 根据权利要求 28 的一种免疫反应检测设备，还包括温度检测装置，它发出对应于反应器中电解质溶液温度的信号，其中控制装置基于由电导率检测装置响应电解质溶液中的抗原和抗体之间的免疫反应发出的信号，以及由温度检测装置响应电解质溶液中抗原和抗体

之间的免疫反应发出的信号，产生对应于每单位温度电导率变化量或变化率的信号。

30. 一种免疫反应检测设备，包括：

反应器，用于容纳包含抗原和抗体的受检溶液；

温度检测装置，发出对应于反应器中受检溶液的温度的信号；以及

控制装置，响应在受检溶液中抗原与抗体之间的免疫反应，检测由温度检测装置发出的信号。

31. 根据权利要求 30 的一种免疫反应检测设备，还包括以下任何之一或组合：(1)用于保持反应器之外的气氛处于恒温的装置；(2)用于对反应器之外的气氛热保护反应器内部的装置；以及(3)用于保持反应器内部及反应器之外的气氛处于相同温度的装置。

## 反应检测方法，免疫反应检测方法及其设备

### 技术领域

本发明涉及反应检测方法及其设备，它们允许进行物质或具体来说反应产物和反应状态的简易检测，并用于检测和定量确定样品中特定物质。

### 背景技术

物质的反应通常由依赖于反应类型、反应物的种类等的各种方法检测，并提供了对应于各对象的专用的设备和试剂。例如，为了检测抗原和抗体之间的免疫学反应，已经发展了免疫学测定方法。

以下在本说明书中，重点说明作为电解质溶液中的反应的生物分子相关的反应，包括抗原和抗体之间的免疫学反应(免疫反应)，酶与生物基质之间的酶的反应(酶反应)，但本发明不限于此。

从诸如疾病的检查和诊断等临床观点来说，基于免疫学或酶特异性的反应检测是非常重要的。例如，已知在癌症病人体液中存在对于各种癌症具有高特异性癌相关物质。特别是一般由癌胚蛋白表示的所谓肿瘤标记物(肿瘤相关抗原)随着细胞癌变而急速上升，肿瘤标记物的量被认为随癌症的进展而增加。癌相关物质还包括被认为与癌发生或癌症进展密切相关的基因(癌相关基因，致癌基因)产物，在荷尔蒙相关的癌症组织及其受体中急速增加的各种荷尔蒙。

对癌症具有高特异性的癌症踪迹相关物的检测，或针对这些物质的抗体的检测，在诸如癌症诊断、治疗指示剂的确定和预后检查等各种临床阶段是重要的。从癌症的早期检测观点而言其简易快速的检测是非常重要的。

更具体来说，为了检测和定量确定诸如肿瘤标记物或针对这些物质的抗体等癌相关物，传统上一般使用免疫测定法(RIA法)及酶免疫测定法(EIA法)。RIA和EIA方法免疫学测量方法，它们使用基于

免疫学特异性的反应检测抗原、抗体或酶复合物。

正如业内专业人员所熟知的，当通过 RIA 方法或 EIA 方法检测并定量确定诸如肿瘤标记物的抗原物时，通常采用夹层法或竞争法。夹层法例如包括以下步骤，把明确与待检测的抗原物反应的抗体(第一抗体)固化为载体，使这种固化的抗体(第一抗体)与样品接触，分离与固化抗体(第一抗体)未反应(结合)的部分，然后引起标以放射物(RIA 法)或酶(EIA 法)的抗体(第二抗体)把相同的抗原看作为固化抗体(第一抗体)进行反应，并通过测量标记物检测和确定合成的酶复合物。竞争法例如包括这样的步骤，把明确与待检测抗原物反应的抗体固化为载体，并引起明确同这一固化抗体反应的标记的抗原或抗体与固化抗体相关的样品之间的竞争反应。接下来，通过测量合成的酶复合物的标记物，检测并定量确定样品中的目标抗原。无论如何，在 RIA 方法中，从标记的放射物的放射性，并在 EIA 方法中，通过测量标记酶的酶的活性，确定酶反应的最终的量。例如酶的活性是从由作为着色剂的酶基质与酶之间的反应引起的发光强度测量的。

如上所述，在传统的免疫学测量方法中，必须提供诸如珠子或板等固化的载体，诸如放射物或酶等标记物，以及在 EIA 方法中提供诸如着色剂等酶物质。

因为能够通过分别检测特定的免疫学反应而检测并明确地并以高灵敏度定量确定目标物，上述传统的免疫学测量方法被广泛应用。

然而，上述的 RIA 和 EIA 方法需要诸如抗原或抗体固化为载体以及制备标记物这样的过程，这导致必须要复杂的操作和大量的时间。在这些方法中，对每一要测量的物质需要诸如标记物或着色剂(酶物质)等特别的试剂。对于每一种标记物必须根据标记物提供专用的测量仪器，例如对于 RIA 方法是放射检测器，并对于 EIA 方法是荧光检测器或光发射检测器。这些仪器一般结构复杂相当昂贵。

为了检测各种反应，就必须提供专用的试剂和对各种仪器的每一种专用的测量仪器，其结果造成较高的成本。这些情形导致各种试剂或各种器具诸如固化载体消耗量的增加，造成环境问题。

例如在 RIA 方法中的放射性测量需要专用的设备和专用的操作者，且不易进行。

此外，上述的 RIA 和 EIA 方法目的是检测作为酶复合物的最终反应产物，因而不易随时观察反应状态。如果通过一种简单的方法能够与时间相关地检测反应状态，就抗原获得各种优点，这包括能够易于选择与抗原反应更多的抗体，或易于确定抗原和抗体之间灵敏度的存在。然而这种方法现在还没有。

以上讨论了传统的反应检测方法及其中所涉及的问题，特别是对于免疫学反应。然而，对不需要大规模的测量仪器或专用设备或操作者，较小量的试剂消耗以及能够迅速和简单检测反应的要求对所有的反应是共同的。能够借助于结构简单的仪器与时间相关地观察物质反应的状态在各技术领域都是有用的。

于是一般来说，本发明的一个目的，是要提供一种允许更容易进行物质反应检测的反应检测方法及其设备。

本发明的另一目的是要提供一种不需要大规模的设备或测量仪器的反应检测方法及其设备，时间相关反应状态和/或物质反应的反应产物的实时方式的简易快速的检测，并例如可用于样品中特定物质的检测和定量确定。

本发明的另一目的是要提供一种反应检测方法及其设备，其允许较容易进行免疫学或酶反应的检测，并例如使能够更简易地检测和定量确定与疾病特定状态相关的特定物质。

本发明的另一目的是要提供一种反应检测方法，其给出一种新的途径，可快速而简易检测电解质溶液中发生的各种物质反应的时间相关的反应状态和/或反应产物。

本发明的另一目的是要提供一种免疫反应测量方法及其设备，其允许非常容易地检测免疫学反应，并能以样品中特定物质的实时方式，诸如与特定疾病状态相关的特定状态，非常容易和快速检测和定量确定。

本发明的公开

本发明上述的目的是通过本发明的反应检测方法、免疫反应检测方法及其设备实现的。总之，本发明的第一方式提供了一种反应检测方法，包括基于电解质溶液的电导率的测量检测电解质溶液中物质的反应。根据本发明的一实施例，能够通过检测电解质溶液电导率时间相关的测量检测反应的反应状态和/或反应产物。可检测的反应包括：(a) 免疫反应，(b) 酶反应，及(c) 其它化学反应，包括结合反应，聚合反应，分解反应，及催化反应。与可检测反应相关的物质包括：(i) 蛋白质，包括纯化蛋白质与合成蛋白质，(ii) 酶，(iii) 抗原，包括以上(i)和(ii)，(iv) 抗体，包括多克隆抗体和单克隆抗体，以及(v) 其它化学物质。通过检测特定物质与在反应时与该特定物质反应的物质之间的反应能够检测和/或定量确定样品中的特定物质。特定物质可以是与疾病的特定症状相关物质，与疾病的特定症状相关的基因产物，或与这些相对的抗体。根据本发明，特定的物质可以是癌症相关的物质，包括癌胚蛋白，荷尔蒙，荷尔蒙受体，薄膜抗原，及癌症相关的基因产物；或与这些物质相对的抗体。样品可以是体液，包括血液，血清，血浆，尿或腹水；组织或组织浸出物；或是细胞或细胞浸出物。

在本发明的第一方式中，根据一实施例，本发明的方法还包括测量电解质溶液的温度，及进行电导率测量值的温度校正。根据另一实施例，本发明的方法还包括采用以下任何之一或组合：(1) 保持其中在电解质溶液中发生物质反应的反应系统之外的气氛处于固定温度；(2) 对外部气氛热保护反应系统；以及(3) 保持反应系统和外部气氛处于相同的温度，不进行电导率测量值的温度校正。此外，根据另一实施例，本发明的方法还包括采用以上(1)，(2)和(3)任何之一或组合，不进行电导率测量值的温度校正，并通过时间相关测量电解质溶液的温度，及测量每单位温度电导率变化量或变化率，检测电解质溶液中物质的反应的反应状态和/或反应产物。

根据本发明的第二方式，提供了一种免疫反应检测方法，包括基于电解质溶液的电导率的测量，检测电解质溶液中抗原和抗体之间的免疫反应。

根据本发明的第三方式，提供了一种免疫反应检测方法，包括基于受检溶液的温度测量，检测受检溶液中抗原和抗体之间的免疫反应。

根据本发明的第四方式，提供了一种反应检测设备，包括：反应器，用于容纳反应物和电解质溶液；电导率检测装置，发出对应于反应器中电解质溶液的电导率的信号；以及控制装置，响应在电解质溶液中物质的反应，检测由电导率检测装置发出信号。根据本发明的一实施例，反应检测设备还包括温度检测装置，它发出对应于反应器中电解质溶液的温度信号，以便基于温度检测装置的输出，校正基于电导率检测装置输出的电导率的测量值。根据本发明的另一实施例，反应检测设备还包括以下任何之一或组合：(1)用于保持反应器之外的气氛处于恒定温度的装置；(2)用于对反应器之外的气氛热保护反应器内部的装置；以及(3)用于保持反应器内部及反应器之外的气氛处于相同温度的装置。根据本发明的又一实施例，反应检测设备还包括温度检测装置，它发出对应于反应器中电解质溶液温度的信号，其中控制装置响应电解质溶液中的物质反应，以及由温度检测装置响应电解质溶液中物质反应发出的信号，基于由电导率检测装置发出的信号，产生对应于每单位温度电导率变化量或变化率的信号。

根据本发明的第五方式，提供了一种免疫反应检测设备，包括：反应器，用于容纳包含抗原和抗体的受检溶液；温度检测装置，发出对应于反应器中受检溶液的温度信号；以及控制装置，响应在受检溶液中抗原与抗体之间的免疫反应，检测由温度检测装置发出信号。

根据本发明的第六方式，提供了一种免疫反应检测设备，包括：反应器，用于容纳包含抗原和抗体的受检溶液；温度检测装置，发出对应于反应器中受检溶液的温度信号；以及控制装置，响应在受检溶液中抗原与抗体之间的免疫反应，检测由温度检测装置发出信号。

#### 附图的简要说明

图 1 是用于说明本发明的反应检测方法原理的示意图：(A)示出在电解质溶液中运动的离子，以及(B)示出当在电解质溶液中添加反应物时离子的运动；

图 2 是表示生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP(基本胎蛋白)抗原之间的反应的电导率时间相关变化的图示;

图 3 是表示生理盐水中 K1 抗体与癌胚抗原(CEA)之间的反应中的电导率时间相关变化的图示;

图 4 是表示分别只含 K1 抗体或具有不同浓度的三种标准 BFP 抗原的生理盐溶液的电导率中时间变化的图示;

图 5 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应中电导率时间相关变化图;

图 6 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应中反应时间经过的每一部分中标准 BFP 抗原量与电导率变化量之间的关系图;

图 7 是表示生理盐水中 K1 抗体与受检血清之间反应中电导率时间相关变化图;

图 8 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中 MDM2 抗原与 MDM2 抗体之间的反应中电导率时间相关变化图;

图 9 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中 MDM2 抗原与 MDM2 抗体之间的反应中反应时间经过的每一部分中标准 MDM2 抗原量与电导率变化量之间的关系图;

图 10 是表示生理盐水中 MDM2 抗原与受检血清之间的反应中电导率时间相关变化图;

图 11 是表示生理盐水中 K1 抗体与胃蛋白酶之间的反应中电导率时间相关变化图;

图 12 是表示生理盐水电导率温度变化与电导率变化之间的关系图;

图 13 是表示生理盐水溶液温度与温度系数每 1℃ 电导率变化量图;

图 14 是表示生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应电导率与溶液温度不进行温度校正的时间相关变化图;

图 15 是表示生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应中

以下的图示：(A)每 1℃电导率变化量的时间相关变化；及(B) 温度系数时间相关变化；

图 16 是表示只含 K1 抗体的生理盐水电导率与不进行温度校正的溶液温度时间相关变化图；

图 17 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应中电导率与不进行温度校正的溶液温度时间相关变化图；

图 18 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应中以下的图示：(A)每 1℃电导率变化量的时间相关变化；及(B) 温度系数时间相关变化；

图 19 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中，K1 抗体与受检血清((A)健康人(正常健康受检者)的血清；(B)癌症病人血清)之间的反应中电导率与不进行温度校正的溶液温度的时间相关变化图；

图 20 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中，K1 抗体与受检血清((A)健康人的血清；(B)癌症病人血清)之间的反应中，每 1℃的电导率变化量的时间相关变化与温度系数时间相关变化图；

图 21 是表示包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中，具有不同浓度的 K1 抗体与受检血清((A)健康人的血清；(B)癌症病人血清)之间的反应中不进行温度校正电导率时间相关变化图；

图 22 的图示表示：(A)生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应中，标准 BFP 抗原量与不进行温度校正的对于反应时间经过的每一部分电导率变化量之间的关系；(B) 包含加有胎腓肠血清(FCS)的生理盐水中 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应中，标准 BFP 抗原量与不进行温度校正的对于反应时间经过的每一部分电导率变化量之间的关系；

图 23 是表示本发明的反应检测设备一实施例的结构轮廓示意图；

图 24 是表示本发明的反应检测设备另一实施例的结构轮廓示意图；以及

图 25 是表示本发明的免疫反应检测设备一实施例的结构轮廓示

意图。

### 实施本发明的最佳方式

首先将参照图 1 说明本发明的原理。如图 1A 所示，包含在容器 3 中的电解质溶液中，电解质离解为阳离子 4a 和阴离子 4b。当检测这一溶液 S 的电导率时，电导率计 1 的一对电导率测量电极(电导率检测单元，以下简称为“单元”)浸入电解质溶液 S，并接通电连接到这些电极对 2a 和 2b 的电导率测量电源(AC 电源) 6。这使得在电极对 2a 和 2b 的表面的—+(正)电极和—-(负)电极充电。在电极对 2a 和 2b 上，电解质的阴离子 4b 运动到+(正)电极，且电解质的阳离子 4a 运动到—(正)电极，并结果是有电流流动。这电流以连接到电极对 2a 和 2b 的安培计测量，以便计算电解质溶液 S 的电导率。在这一状态下，电解质溶液 S 的电导率与溶液中电解质的浓度有关。

另一方面，考虑向电解质溶液 S 添加在电解质溶液中可反应的物质(反应物)。如图 1B 所示，当通过例如添加两种物质 7 和 8 并通过这两种物质结合而产生反应产物(复合物)9 时，电解质溶液 S 的电导率随反应产物 9 的产生而变化，且在这种情形下电导率变低。并不是要只局限于特定的理论，而是由本发明人进行的研究显示，通过两种物质 7 和 8 的结合反应产物(复合物)9 的产生抑制了离子(阳离子与阴离子)4a 和 4b 的运动。其结果是，电流的流动变得困难(电阻变大)，导致较低的电导率。

当通过在电解质溶液中物质的反应，例如两个或多个物质的反应引起任何物质的分解，或通过分解物质变为较小的物质时，离子的运动变得部件容易(电阻变低)，且与以上相反电导率变高。

International Publication No. WO96/30749 公开了基于电导率的测量确定存在于电解质溶液中非电解质浓度的方法。例如这表明，向主要包含氯化钠作为电解质的电解质溶液相继添加非电解质的葡萄糖，引起电解质溶液电导率的变化(降低)，其结果是，使用非电解质的浓度与先前在同一相同内确定的电解质溶液的电导率之间的相关性，可确定向电解质溶液添加的非电解质质量即浓度。

然而在这一已知的技术中，其浓度待测的非电解质是在电解质溶液中仅存的，并不伴随电电解质中的反应或相互作用。就是说，已知的技术不是可检测电解质溶液中物质的反应的技术。

如上所述，本发明人发现，基于电解质溶液中响应反应状态离子运动方式变化及在电解质溶液中所产生物质的反应的反应物这一新的发现，通过测量电解质溶液的电导率能够检测电解质溶液中物质的反应。

通过检测随着在电解质溶液中物质的反应所引起的电解质溶液电导率的变化，能够检测由物质反应所产生的反应物，诸如通过两种物质的结合所产生的复合物，以及通过物质反应所产生的分解产物。

通过时间相关测量电解质溶液的电导率的变化，能够时间相关地检测电解质溶液中物质的反应状态，并因而易于并在电学上把握结合反应或分解反应进展的状态。这对于分析在物质反应中的时间相关反应状态是有用的，并此外，以实时方式观察反应的可能性，例如允许在免疫反应中易于选择容易与抗原反应的抗体，或易于并在电学上确定抗原与抗体之间灵敏度的存在。

根据本发明，能够检测样品中特定的物质，即确认在样品中特定的物质是否存在。为了存在于样品中的特定物质，只要使用专门与特定物质反应的物质，并检测这些物质之间的反应(反应和反应产物的状态)即可。

根据本发明，样品中的特定物质能够被定量确定。在相同的系统中，关于其浓度待测特定物质和与该物质特定可反应的物质，事先确定电解质溶液的电导率的测量结果对该特定物质的量(浓度)的相关性。例如，与其浓度待测的特定物质可专门反应的物质的浓度保持恒定。然后作为相对于其浓度待测的特定物质各浓度值的定标曲线，事先确定电导率测量的结果对在特定物质与同它可专门反应物质之间的反应中特定物质的浓度的相关性。

可响应每一反应的特性适当准备定标曲线。例如，作为定标曲线，可事先确定在反应开始后经过规定的时间周期时电导率变化量与特定

物质浓度之间的关系，反应速率(电导率变化时间相关速率，诸如反应的初始速率)与特定物质的浓度之间的关系，以及当电导率变化饱和时，特定物质的电导率值与浓度之间关系。业内专业人员能够选择最适合于目标反应的定标曲线。或者，能够通过比较电导率的测量值与规定的阈值(截止值)而估计特定物质在电解质溶液中的量(浓度)。这一阈值如同上述的定标曲线那样，响应每一反应的特性足以被适当的设置，例如作为上述反应速率(电导率的时间相关变化速率，诸如初始反应速率)。这里所使用的术语“定量确定”包括特定物质质量的估计或比较，以及更细致的定量确定。

本发明中，基本上不对待测物质施加任何限制。反应物质(反应物)可以是目前在电解质溶液中可反应的任何物质，不论其种类和数目。例如，能够检测电解质溶液中至少分解为两种物质的物质分解反应，或在电解质溶液中反应的至少两种物质之间的结合反应。反应物自然可以更多。从上述原理显然，反应必须发生在具有其电导率可按所需精确性被测量的浓度的电解质溶液中。

例如，诸如免疫学反应或酶反应等与生物分子相关的反应是本发明中检测的典型的受检体。可使用的反应物包括纯化蛋白，合成蛋白，酶，抗原与抗体。其中，抗原与抗体之间的免疫反应是本发明检测的最典型的对象。

可能发生在电解质溶液中的任何反应，诸如聚合反应，结合反应，分解反应，催化反应(催化作用)或任何其它化学反应都能够被检测。换言之，能够检测其中物质之间的反应能够产生较大物质的反应(聚合反应或结合反应)，其中物质能够被光。紫外线或温度分解而产生较小物质的反应(分解反应)，或者其中至少两种物质之间的反应中任何物质能够被分解而产生较小物质的反应(分解反应)，此外，其中引起上述反应更明显的效果的一种物质的添加引起反应速率的增加的反应(催化反应)。通过检测这些反应，能够检测并定量确定样品中的特定物质。

根据本发明，特别是能够检测与疾病特定状态相关的特定物质和

与其可反应的物质之间的反应，并检测和定量确定样品中存在的特定物质。更具体来说，与疾病特定状态相关的特定物质，是对于体内疾病特定状态特别增加或急速增加的一种物质，特定基因产物，诸如对于特定疾病的特定基因的偏肽，或对这些物质产生的抗体。

例如疾病癌症的特定状态，及对癌症的特定物质，即癌症相关的物质包括：由癌胚蛋白诸如 $\alpha$ -胎蛋白(AFP)表示的免疫标记物(免疫相关抗原)，基本胎蛋白(BFP)，癌胚抗原(CEA)；在荷尔蒙相关的癌症组织及其受体中已知急速增加的各种荷尔蒙；以及其它认为与癌症紧密相关的基因产物。

根据本发明，能够简单检测和定量确定这些在体内相对这些物质产生的癌症相关的物质或抗体。

例如，这些物质包括对癌症基因(致癌基因)的血液自身抗体产物MDM2(Murine Double Minute 2)，该物质作为癌症抑制基因 p53 蛋白的分解酶在致癌作用或癌症进程中起重要作用，以及其在荷尔蒙相关癌症组织中急速增加以很高频率观察到的血液中与荷尔蒙相对的自身抗体，及其受体(雌激素受体(ER)，雄激素受体(AR))。

这些癌症相关的物质和癌症相关的基因产物不容易移出细胞核之外，因为它们是细胞核内的因子。然而在癌发生初始状态，癌细胞被宿主免疫反应攻击和破坏。结果是细胞中的因子移动到细胞之外，并预料荷尔蒙抗体(例如 MDM2 蛋白自身抗体，ER 蛋白自身抗体，AR 蛋白自身抗体)会在癌症宿主血液中出现。因而预料血液中这些自身抗体的检测对于癌症的早期诊断是有用的，因为自身抗体被认为出现在癌发生早期阶段。

对于特定物质的检测和定量确定可适用的样品没有特别的限制。如上所述，当检测并定量确定与疾病特定状态相关的特定物质时，样品一般是从哺乳动物采集供分析的体液，包括血液，血清，血浆，尿或腹水；组织或其浸出物；或是细胞或其浸出物。样品最好是供分析采集的人的体液，包括人的血液，血清，血浆，尿或腹水；人体组织的浸出物；或人体细胞的浸出物。这允许检测并定量确定病人的体液

中特定物质，特别是与疾病特定状态相关的物质。这对于诊断病人是否患有特定的疾病或疾病的状态有用。适用特定的组织或其浸出物，或细胞或其浸出物作为样品，能够易于测量一待测组织特定反应的特定反应率，这样就提供了明显的优点。

当检测怀疑在样品中存在的抗原时，只要引起样品与特别可与这一抗原在电解质容易中可反应的抗体之间的反应，并基于电导率的测量检测这些物质的反应状态及反应产物(免疫复合物)。另一方面，为了检测样品中的抗体，只需使用与这一抗体特别可反应的抗原，并基于电导率的测量进行这些物质的反应状态和反应产物(免疫复合物)的检测。用于反应的抗原可以是能够作为抗原的物质，诸如纯化抗原，化学合成抗原或基因重组抗原。用于反应的抗体可以是市售的抗体，或对于抗原专门制备的纯化抗体。这种抗体还可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

本发明中，对电解质溶液，即电解质的类型及其数目，没有特别的限制。然而电解质溶液是就其中发生的反应来选择的。就是说从测量电解质电导率的观点，当电解质的离子离解常数较高时，能够更容易识别离子转移中的变化。还需要保持电解质溶液中反应物的稳定性。重要的是要考虑这些要求选择电解质及其浓度。

包含钠离子，钾离子和钙离子的水溶液适合于作为电解质溶液。

例如，当检测免疫反应时，生理盐水(0.15M 的水 NaCl 溶液)，或水氯化钾溶液(例如，0.15M 的水 KCl 溶液)是适用的。这种情形下，电解质溶液最好具有范围在 6.0 到 8.0 范围内或更好是大约为 7.0 的 pH。

当在如上所述的酶反应或任何其它化学反应(聚合反应，结合反应，分解反应，及催化反应)时，盐酸(水 HCl 溶液)或氢氧化钠(水 NaOH 溶液)没有限制可用作为电解质溶液或 pH 调节试剂。

本发明中，用于测量电导率的电导率计没有限制可以是市售的测量计。并对于单元，也可使用市售的单元而没有任何特别的限制。为获得所需检测精度自然应当使用具有所需性能的电导率计。

现在将参照测量的具体结果进一步详细说明本发明的例子。

### 例 1

在这例子中，将基于对纯化抗原与同纯化抗原特别反应的抗体之间的免疫反应的电导率测量，检测反应与免疫复合物的时间相关状态。

被称为肿瘤标记物并在业内一般使用，具有大约 55,000 分子量的 BFP (基本胎蛋白) 纯化样品(以下称为“BPF 抗原”)用作为抗原。BPF 抗原的纯化样品(以下被称为“标准 BFP 抗原”)是从裸鼠移植人体肝癌细胞自纯化的。标准 BFP 抗原按照如下业内专业人员一般所知的通常实践被纯化。裸鼠移植人体肝癌细胞的均浆受到使用多克隆 BFP 抗体的实施亲和色谱法处理，然后受到凝胶过滤柱形色谱法处理。通过 Lowry-Folin 法定量确定蛋白浓度。通过 EIA 和 Ouchterlony 法确认每蛋白浓度 BPF 抗原活性。结果显示 99.99% 的标准 BFP 抗原纯化的纯度。在所有以下例子中，使用同一标准 BFP 抗原。

通过细胞融合法使用从作为免疫原的人类肝癌细胞纯化的标准 BFP 抗原自制的鼠单克隆抗体(以下称为“K1 抗体”)(分子量: 大约 150,000)用作为抗体。根据业内重要染色熟知的普通的过程制备 K1 抗体。通过有限稀释法克隆杂交细胞。克隆的杂交细胞以每 BALB/c 小鼠  $10^6$  细胞数接种到腹腔，并经过十天后，BFP 抗体作为腹水被采样。在腹水硫酸铵分级分离之后，通过使用 DEAE 纤维素的离子交换色谱法的纯化获得该抗体。在以下各例子中，使用相同的 K1 抗体。

生理盐水(0.15M 的水 NaCl 溶液)用作为电解质溶液。除非特别规定，否则电解质溶液 pH 为 7，溶液在反应开始为室温(26℃)。因为溶液中非常低的电解质浓度使得不能测量其本身的电导率，电解质浓度必须高到允许进行电导率测量的程度。本例子中使用的生理盐水(0.15 M)并没有对实现本发明的方法造成问题。在所有以下的例子中，使用相同的电解质溶液。

由 TOA Electronics Ltd.(现在是 DKK·TOA Corporation)制造的 CM30V 数字化电导率计(以下简称为“电导率计”)作用为电导率计。电导率计具有单元(用于测量电导率的电极对)，并通过向单元施加 AC

电压(峰到峰值) $V_{p-p}$  = 大约为 100Mv 并测量电极之间流过的电流量, 计算电导率。

电导率随溶液温度变化。本例中使用的电导率计具有自动温度补偿(ATC)功能, 它使用热敏电阻检测溶液温度, 设置溶液温度系数, 并自动校正由溶液温度变化引起的电导率的变化。热敏电阻内置在单元中, 其精度是  $1/10^{\circ}\text{C}$ 。在以下所有例子中, 使用相同的电导率计。

在以下例子中, 还共同使用与本例中相同的反应器和其它测量仪器。

### 测量过程

在小容量管形瓶(容量: 12ml)中提供 10 ml 量的生理盐水, 并不电导率计的单元浸入在这一管形瓶中。然后, 以生理盐水调节为浓度  $0.25\mu\text{g/ml}$  的  $2\mu\text{l}$  量(绝对量: 0.5 ng)的 K1 抗体使用微型注射器添加到这一管形瓶中。然后, 使用微型注射器把以生理盐水溶液调节到浓度  $0.6\mu\text{l/mg}$  的  $2\mu\text{l}$  量(绝对量: 1.2 ng)的标准 BFP 抗原添加到这一管形瓶中。在搅拌这一反应溶液之后, 对电导率进行时间相关测量, 同时保持单元浸入在反应溶液中。

类似地, 以生理盐水(绝对量: 0.6 ng 和 0.3 ng)调节到浓度  $0.3\mu\text{g/ml}$  到  $0.15\mu\text{g/ml}$  的两批标准的 BFP 抗原借助于微型注射器添加到包含 K1 抗体(绝对量: 0.5 ng)的生理盐水, 并如上所述搅拌, 并然后对电导率进行时间相关测量。

替代标准 BFP 抗原, 向包含 K1 抗体(绝对量: 0.5 ng)的生理盐水添加癌胚抗原(CEA)(从 International Enzymes Company 可得) (绝对量: 0.5 ng), 并然后对电导率进行时间相关测量。

此外, K1 抗体(绝对量: 0.5 ng)和标准 BFP 抗原(绝对量: 0.3 ng, 0.6 ng 和 1.2ng)分别独立添加到生理盐水(1.5 M), 并对电导率进行时间相关测量。

### 结果

在 K1 抗体(0.5 ng)与具有各浓度(1.2ng, 0.6 ng 和 0.3 ng)的标准 BFP 抗原反应中, 在时间经过中各点的电导率的测量值示于图 2。包

含 K1 抗体(0.5 ng)和癌胚抗原(CEA) (0.5 ng)的生理盐水各点的电导率值示于图 3。此外, 只包含 K1 抗体(0.5 ng)与 BFP 抗原(0.3 ng, 0.6 ng 和 1.2ng)生理盐水在时间经过中各点的电导率值示于图 4。

图 2 到 4 中, 电导率的测量值通过使用在反应开始后一分钟的电导率作为空白值, 并从时间经过中各点的电导率值减去空白值获得的电导率的变化量表示。

在图 2 中可见, 在 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应中, 随反应时间经过变为较小值。

应当理解, 通过抗原与抗体之间的免疫反应免疫复合物的形成阻止了电解质溶液中离子的运动, 即本例中生理盐水的  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$ , 且这引起电导率的降低。根据本发明, 如上所述, 能够知道由反应物引起的电解质溶液中离子运动的方式的变化, 并检测这种反应特有的反应产物。

在这一例子反应条件下, 在标准 BFP 抗原的较低浓度(0.3ng)比在较高浓度(1.2ng)电导率变为较低值。不是要以特定理论为限, 这些结果提示在抗原与抗体之间的免疫反应中每一种物质定量适应性, 反映了当 K1 抗体量保持不变(0.5ng)时, 0.3 ng 的标准 BFP 抗原的量比 1.2ng 的量趋向更容易引起反应这样的事实。

通过如上所述测量反应溶液的电导率, 能够时间相关地检测作为电导率的电解质溶液中标准 BFP 抗原与 K1 抗体特有的免疫反应的反应状态。还能够易于测量电解质溶液中的反应性质, 诸如 K1 抗体与标准 BFP 抗原之间的反应对标准 BFP 抗原的相关性。

进而从参照图 3 和 4 所示结果明显可见, 本例中测量的结果表明:

(1) 能够作为电导率的变化把握, 其中在 K1 抗体浓度不变下标准 BFP 抗原与 K1 抗体之间的免疫反应与标准 BFP 抗原浓度相关的反应状态;

(2) 随时间的经过电导率趋向显示较低值;

(3) 已知与 K1 抗体不反应的非 BFP 抗原的添加, 即本例中以癌胚抗原(CEA)代替标准 BFP 抗原, 不会导致电导率时间相关的降

低, 并且没有观察到电导率变化对抗原浓度的相关性(图 3); 以及

(4)此外, 即使在类似的电解质溶液中 K1 抗体和标准 BFP 抗原个别存在, 电导率也没有显示时间相关降低的趋势(图 4)。

## 例 2

现在将说明检测电解质溶液中免疫反应的另一例子。

### 测量过程

在这例子中, 事先使用微型注射器向 10ml 生理盐水添加包含大约 70mg 蛋白/ml FCS 的胎腓肠血清(FCS)2 $\mu$ l 量(大约 140 $\mu$ g 蛋白的绝对量), 并以如例 1 相同的测量过程, 对 K1 抗体(0.5ng)与不同浓度(0.6ng, 1.2ng 和 2.4ng)的标准 BFP 抗原之间的每一反应中电导率的变化进行时间相关测量。

当在稍后所描述的例子中估计和定量确定包含在受检血清中的 BFP 抗原量时, 胎腓肠血清用来达到对应于向反应系统的添加量的蛋白量。已知胎腓肠血清不会与 K1 抗体反应。

### 结果

结果如图 5 所示, 图 5 中, 电导率的测量值使用在反应开始后一分钟的电导率作为空白值, 并从时间经过中各点的电导率值减去空白值获得的电导率的变化量表示。对于在反应时间各部分期间标准 BFP 抗原各量的电导率变化量示于图 6 中。

图 5 和 6 表明, 对于每一反应, 电导率随反应时间经过而降低。

从图 5 明显可见, 当向反应系统添加胎腓肠血清时, 电导率变化量(降低)依据标准 BFP 抗原量(浓度)增大而变大。这被认为归因于标准 BFP 抗原与 K1 抗体之间的反应状态, 在作为向反应系统添加胎腓肠血清结果的血清蛋白阻力下的反应。这表明, 在这一状态下, 较大的 BFP 抗原量导致其与 K1 抗体较好的反应率。

从例 1 和 2 的说明明显可见, 根据本发明, 能够非常容易地检测电解质溶液中物质的反应, 而无需昂贵且庞杂的设备。并根据本发明, 不仅能够检测最终形成的免疫复合物(如传统的免疫学测量方法中那样(RIA 和 EIA 法)), 而且还能够检测物质反应的时间相关状态和电解

质溶液中的反应产物。

从以上明显可见，能够时间相关地测量抗原与抗体之间的免疫反应。因而例如能够非常容易而快速地以实时方式实现对更容易与抗原反应的抗体、或更容易与抗体反应的抗原的选择，并实现用于确定抗原与抗体之间灵敏度存在性的测量。

此外根据本发明，能够通过直接向电解质溶液添加反应物而快速简易地检测免疫反应，而无需象传统的免疫学测量方法(RIA 和 EIA)中那样，诸如使抗原或抗体固化为载体及标记物制备的操作。这允许使用非常简单的设备进行免疫反应的检测，不会产生诸如标记物和着色剂(酶物质)或固化载体之类的试剂的废弃物。

### 例 3

在本例中，使用抗-BFP 小鼠单抗体(K1 抗体)检测作为样品中特定物质的血清中的 BFP 抗原的存在，该抗体通过与 BFP 抗原的特定反应形成免疫复合物。

进而在本例中，使用 K1 抗体估计并定量确定血清中 BFP 抗体的量。包含在血清中的 BFP 抗原按其量与 K1 抗体反应。因而通过事先在同一系统中确定与 BFP 抗原的量(浓度)相关的 BFP 抗原与 K1 抗体之间反应状态(反应性质)，通过反应溶液的电导率的测量能够估计并定量确定包含在血清中的 BFP 抗原。

在本例中，健康人(正常健康受检者)与癌症病人(肝癌病人)的人血清冷冻存储在-20℃供测试用。按照通过使用由 Nippon Kayaku Co., Ltd.制造的“Lanazyme(商标)BFP Plate”的标准 EIA 方法测量，本例中使用的健康人与癌症病人的人血清包含 BFP 抗原量分别为 24.8ng/ml 和 540ng/ml。

“Lanazyme(商标)BFP Plate”基于 EIA 方法，该方法使用两种不同类小鼠单克隆 BFP 抗体(K1 抗体和 5C2 抗体)，以及固化在板上的 K1 抗体与辣根-过氧化物酶标记的 5C2 抗体之间的夹层 BFP 抗原。这方法包括以下步骤，对使用以尿素过氧化氢作为基质的 3,3',5,5'-四甲联苯胺(TMB)两个抗体之间夹层的 BFP 着色，测量 405nm 波长的

吸收率，并从以标准 BFP 抗原准备的定标曲线定量测量受检溶液中 BFP 抗体。从裸小鼠-移植肝癌纯化的抗原用作为 BFP 抗原。

### 测量过程

与例 1 和 2 相同的方式进行测量。就是说，借助于微型注射器向 10ml 生理盐水添加 K1 抗体(绝对量: 0.5ng) 2 $\mu$ l 量。使用微型注射器向这一溶液添加回到室温的受检血清(大约 70mg 蛋白/ml)的 2 $\mu$ l 量(大约 140 $\mu$ g 蛋白的绝对量)。在把单元浸入反应溶液时，对电导率进行时间相关测量。

### 结果

当向包含 K1 抗体的生理盐水添加受检血清(健康人和癌症病人)时所测量的电导率值示于图 7。图 7 中，电导率的测量值由使用在反应开始后一分钟的电导率作为空白值，并从时间经过中各点的电导率值减去空白值获得的电导率的变化量表示。结果值作为电导率变化量表示。

如图 7 中所示，通过添加健康人和癌症病人的受检血清，包含 K1 抗体的生理盐水的电导率随受检经过而降低。

使用与 BFP 抗原特别可反应的 K1 抗体，通过对随免疫复合物的形成而变化电解质溶液(生理盐水)的电导率进行时间相关测量，能够非常容易地检测样品(健康人和癌症病人的受检血清)中的 BFP 抗原，即能够确认其存在。

从图 7 所示结果明显可见，健康人受检血清和癌症病人的受检血清之间存在明显的差别。更具体来说，每时间经过的反应度在癌症病人受检血清与 K1 抗体之间的反应中比健康人受检血清与 K1 抗体之间的反应中高。

一般来说，BFP 抗原也出现于健康人的体液中，并已知在癌症病人的体液中比在健康人体液显示较高的值。已知对于健康人和癌症病人在规定 BFP 抗原的截止值的正比率：对应于 75ng/ml(EIA 法)的截止值的正比率为对于健康人是 5% 而对于癌症病人是 80%。

在相同的系统中事先确定，随规定的血清中的浓度的标准 BFP

抗原与 K1 抗体之间的反应(参照反应),所引起的反应溶液电导率的时间相关变化,即例如对应于上述截止值 75 ng/ml 的量。这样,通过测量随对于受检血清与 K1 抗体的反应所引起的反应溶液电导率的变化,并比较每时间经过的反应率与事先确定的参照反应的反应率,能够容易地并以实时方式估计 BFP 抗原是否在样品中以超过规定值的量存在。

本例中,如上所述,按 EIA 方法确定, BFP 抗原分别以 24.8ng/ml 和 540ng/ml 的量包含在健康人和癌症病人的血清中。换言之,在添加到反应系统的 2 $\mu$ l 受检血清中, BFP 抗原分别以大约 50pg 的量在健康人血清中并在癌症病人血清中大约为 1ng 存在。

因而,由于如上所述在健康人和癌症病人之间在对于 K1 抗体的反应率中观察到明显的差别,能够理解到,通过时间相关测量反应溶液的电导率,可非常容易地以大约 50pg 到 1ng 的量检测到迹 BFP 抗原。进而,如果存在至少 50pg 到 1ng 的 BFP 抗原,则很容易时间相关地检测 BFP 抗原与 K1 抗体的之间的免疫反应的行为,并通过非常简单快速实时的方式测量包含 BFP 抗原的样品与 K1 抗体之间的反应率的差,能够估计样品中的 BFP 抗原的量。

此外,受检血清中 BFP 抗原被更细致地定量确定。在这例子中,从例子 2 的结果推导出用于定量确定在受检血清中的 BFP 抗原的定标曲线(标准曲线),其中胎腓肠血清(FCS)作为对应于添加到反应系统中的受检血清的蛋白,被事先添加到(大约 140 $\mu$ g 蛋白绝对量)生理盐水,并引起 K1 抗体和 BFP 抗原反应。

为了准备蛋白曲线,只需根据抗原与抗体之间的反应率、反应条件和测量范围的选择,使用具有已知浓度的抗原与抗体之间的反应,选择最适合的蛋白曲线。

通过绘制图 5 所示结果,横座标为标准 BFP 抗原浓度,纵坐标为电导率(负值)的变化,获得如图 6 所示标准 BFP 抗原量与电导率变化量之间的关系。这例子中,该关系是要表示与反应时间经过的线性:对于经过 30 分钟反应时间,高浓度抗原的反应率趋向导致较高反应

率。

例如，在图 6 所示的关系中，使用标准 BFP 抗原逆浓度与具有如定标曲线的线性的 40 分钟反应经过时间之间的关系，计算出按本方法测量的癌症病人血清中 BFP 抗原量为大约 700ng/ml(这是接近使用 EIA 方法获得的 540ng/ml 的一个值)。另一方面，对于健康人血清，由于 BFP 抗原只以 1/20 癌症病人血清中的量出现，认为结果反映了 K1 抗体量相对于健康人血清中 BFP 抗原量大大超输出的状态。与通过 EIA 方法获得的值一致的程度比在癌症病人血清的情形要低。对于血清中较低浓度 BFP 的测量，只需采用较小的抗原对抗体的比值，并选择更适合的定标曲线。

在健康人血清与癌症病人血清之间与 K1 抗体的反应率有明显的差别，表明每时间经过反应率明显的差别。因而认为通过在已知浓度的标准抗原与 K1 抗体的反应与受检血清和 K1 抗体间的反应之间，比较每时间经过反应率的值，能够定量确定样品中 BFP 抗原量，这通常称为比率测定。

#### 例 4

作为样品中特定物质检测的另一例子，检测作为癌症相关基因产物的相对于 MDM2 蛋白的血液自身抗体。

首先，测量伴随生理盐水中不同量(浓度)的 MDM2 抗原与纯化 MDM2 抗体之间的反应的电导率的变化。作为 MDM2 抗原，使用 N-端侧 20-mer 的合成 MDM2 肽抗原(从 Asahi Techno-Glass Co.可得)(分子量: 大约 1,991)。作为 MDM2 抗体，使用与上述合成肽抗原相对的多克隆兔抗体(从 Santa Cruz Biotechnology, Inc.可得，以下称为“标准 MDM2 抗体”)(分子量: 大约 150,000)。

然后，检测健康血清中，胃癌病人和结肠癌病人冷冻在 20-℃ 的 MDM2 自身抗体。使用与以上相同的 MDM2 抗原。

#### 测量过程

测量过程类似于例子 1 到 3。就是说，MDM2 抗原(绝对量: 200ng)首先添加到 10ml 的生理盐水并搅拌。然后，在向这一溶液添加标准的

MDM2 抗体(绝对量: 6.25ng, 12.5ng, 及 25.0ng)并对其搅拌之后, 在保持单元浸入在反应溶液的同时, 时间相关地测量电导率。

为了保证对检测受检血清中 MDM2 自身抗体时反应条件的适应性, 即如例 2 中反应系统中蛋白量, 向 MDM2 抗原与保证 MDM2 抗体之间的反应系统添加 2 $\mu$ l 量(绝对量: 大约 140 $\mu$ g)的胎腓肠血清(FCS)(大约 70mg 蛋白/ml)。

另一方面, 回到室温的 2 $\mu$ l 量(绝对量: 大约 140 $\mu$ g)的健康人、胃癌病人与结肠癌病人的受检血清(大约 70mg 蛋白/ml)借助于微型注射器分别添加到含有 MDM2 抗原(绝对量: 200ng)的 10ml 生理盐水中并搅拌。然后, 在保持单元浸入在反应溶液的同时, 时间相关地测量电导率。

### 结果

在 MDM2 抗原与标准 MDM2 抗体之间反应中生理盐水的时间经过各点电导率的测量值示于图 8。图 8 中, 电导率的测量值由来自生理盐水电导率的电导率的变化量表示。对于每一 MDM2 抗体浓度的电导率的变化量示于图 9。

从图 8 和 9 可知, 免疫复合物是从 MDM2 抗原与同 MDM2 抗原特别可反应的标准 MDM2 抗体之间的抗原-抗体反应产生的, 并对电导率的降低随时间经过观察。如果 MDM2 抗体的量较大, 则随时间经过电导率的变化量较大。对于一定量的 MDM2 抗原, 检测到 MDM2 抗体的浓度-相关性。

图 10 示出, 当健康人的受检血清与其中病人(胃癌病人和结肠癌病人)的血清添加到含有 MDM2 抗原的生理盐水时, 电导率的测量值。图 10 中, 电导率的测量值由来自生理盐水电导率的变化量表示。

从图 10 明显可见, 在健康人受检血清与癌症病人(胃癌病人和结肠癌病人)受检血清之间, 与 MDM2 抗原的反应中电导率的时间相关变化中有明显差别。

通过这种时间相关测量反应溶液的电导率, 能够确认存在于人的血液中的 MDM2 自身抗体的存在。通过比较受检血清与 MDM2 抗原

之间的反应中每时间经过的值，还能够易于检测健康人和癌症病人之间明显的差别。其结果是，通过与规定的阈值(截止值)比较，能够易于实时估计样品中 MDM2 自身抗体的量。当然，如同在例 3 中那样，使用规定的定标曲线能够进而详细定量确定受检血清中 MDM2 自身抗体。

例如，从图 9 获得 MDM2 抗体量和电导率的变化量之间的关系，在横坐标表示 MDM2 抗体浓度，在纵坐标表示关于图 8 所示结果电导率的变化(负值)。如同在例 3 中，可使用这一关系作为表示 MDM2 抗原与标准 MDM2 之间反应对标准 MDM2 抗体浓度的相关性。从在反应 60 分钟处的定标曲线可知，胃癌病人血清中 MDM 抗体量大约为  $6.25\mu\text{g/ml}$ ，而结肠癌病人血清中 MDM 抗体量大约为  $12.5\mu\text{g/ml}$ 。另一方面，健对于康人 MDM 的抗体量则小于凹槽病人的量：大约为  $3\mu\text{g/ml}$  或更小。

根据本发明，从例 3 和 4 的说明明显可知，通过测量电解质溶液的电导率能够非常容易检测和定量确定样品中特定物质。因而能够非常容易而快速检测和定量确定存在于样品中与疾病特定状态相关的物质，诸如癌症相关物质，癌症相关的基因产物，及与它们相对产生的抗体。

因而，通过简易快速检测和定量确定与疾病特定状态相关的物质，诸如存在于人的血清样品中癌症相关的物质，癌症相关的简基因产物，与它们相对的抗体，本发明在包括诊断、检查和针对癌症建立治疗指示剂等各种临床阶段是非常有用的。

通过直接向本发明中电解质溶液添加反应物能够检测并定量确定特定的物质。因而能够减少废弃物，借助于非常简单的设备检测并定量确定样品中的特定物质。

#### 例 5

作为在电解质溶液中物质反应的另一例子，现在将说明检测两种基质的反应，其中这些基质的一种分解为较小的反应产物。

这例子中，检测的是 K1 抗体和酶胃蛋白酶从属的 K1 抗体的酶

消化反应。这例子中，待检测的反应是酶反应。

使用来源于猪胃粘膜的胃蛋白酶(3,520 单位/mg 蛋白;从 SIGMA Company 可得)(分子量: 大约 34,700)。

#### 测量过程

在小容量管形瓶(容量: 12ml)中提供 10ml 量的生理盐水, 单元浸入在这种管形瓶中。以生理盐水调节为浓度  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$  的  $20\mu\text{l}$  量(绝对量: 50ng)的 K1 抗体借助于微型注射器添加到这一管形瓶中并搅拌。然后, 以生理盐水添加为浓度  $1\text{mg}/\text{ml}$ (3,520 单位/mg 蛋白)胃蛋白酶借助于  $5\mu\text{l}$  量的微型注射器添加到这一溶液中(即 17.6 单位/ $5\mu\text{g}$  蛋白)。在搅拌这一反应溶液后, 在保持单元浸入在反应溶液的同时, 时间相关地测量电导率。

#### 结果

在 K1 抗体与胃蛋白酶之间酶消化反应中, 反应时间经过的各点的电导率测量值示于图 11。在图 11 中, 电导率测量值由使用胃蛋白酶添加之后立即的电导率作为空白值, 并从时间经过的各点电导率值减去空白值而获得的电导率的变化量表示。

如图 11 所示, 电导率随反应时间经过显示较大的值。

这一胃蛋白酶已知切割免疫球蛋白 igG 的 H-链的第 234 和第 333 氨基残基, 并产生  $\text{F}(\text{ab}')_2$  和  $\text{pFc}'$ (分子量: 分别为大约 100,000 及大约 50,000)碎片。还知道进而引起胃蛋白酶作用, 可能产生具有低分子量的肽。

因而这例子中, 电导率随反应时间经过的增加表明原来的 K1 抗体通过 K1 抗体的酶消化被分解为较小的肽片, 这使得离子随反应时间经过较容易在电解质溶液中运动。

根据本发明, 如上所述, 即使当分解反应产生较小的反应产物时, 也能够通过测量电解质溶液的电导率检测反应和反应产物的时间相关状态。

使用在特定分解特定物质时产生分解产物的物质, 几乎如上述例子 2 中那样, 能够检测特定物质, 即确认其存在, 或估计和定量确定

其量。反之，使用在由特定物质特定分解时产生分解产物的特定物质，能够检测引起分解反应的特定物质，或估计并定量确定其量。

正如从这一例子可知，如上所述，能够通过测量电解质溶液的电导率而检测酶反应的时间相关反应状态及反应产物。因而根据本发明，能够非常容易且快速地检测电解质溶液中物质的反应(时间相关反应状态和/或反应产物)，而不论反应或反应物的类型如何，并检测和定量确定样品中的特定物质。

在上述例子 1 到 5 中，借助于电导率计(CM30V 数字化电导率计，由 TOA Electronics Ltd.制造(现在是 DDK·TOA Corporation))测量电导率，同时使用自动温度补偿(ATC)功能，通过测量受检溶液的温度，自动校正由溶液温度变化引起的电导率变化。

更具体来说，溶液的电导率随温度而变化：较高的温度导致较高的电导率，且较低的温度导致较低的电导率。因而为了比较与受检溶液实际温度无关的电导率值，实际通常把测量值转换为在一定温度(基准温度)的电导率值。转换公式如下：

$$\kappa_{\text{REF}} = \kappa_t / [1 + (\alpha/100)(t - t_{\text{REF}})]$$

其中

$\kappa_{\text{REF}}$ : 对于基准温度被转换的电导率(S/m);

$\kappa_t$ : 在  $t^\circ\text{C}$  的电导率(S/m);

$\alpha$ : 温度系数(%/°C);

$t_{\text{REF}}$ : 基准温度(°C)

在  $25^\circ\text{C}$  基准温度，对于大多数水溶液温度系数大约为 2%。因而，通过设置默认温度系数为 2%/°C，并借助于例如内置于单元中的温度传感器(热敏电阻)(自动温度补偿(ATC))测量受检溶液的温度，电导率的测量值通常被自动转换为在基准温度( $25^\circ\text{C}$ )处的电导率值。温度系数可响应受检溶液人工设置。当然，还能够分开测量受检溶液的温度，并参照在规定的校正温度处规定的温度系数人工进行温度校正。在上述各例子中，温度校正是在包括校正温度为  $25^\circ\text{C}$  且温度系数为 2% 条

件学，通过上述自动温度补偿(ATC)进行的。

电导率基本上不在没有温度补偿的状态下进行。

然而，如稍后将详细说明，发现在反应溶液温度不受反应系统外的外部气氛温度影响的反应溶液温度的状态下(使外部气氛温度恒定，或切断反应系统与反应系统外的外部气氛之间的热交换，或反应系统与反应系统外的外部气氛补偿在相同的温度)，通过测量反应溶液的电导率，断开电导率计的自动温度补偿(ATC)而不进行温度校正，能够更精确检测物质之间的反应，特别是抗原与抗体之间的免疫反应。现在将参照某些例子详细描述这一点。

### 例 6

确定了各例子中共同使用的电解质溶液(生理盐水: 0.15M 的水 NaCl 溶液)的温度系数。

单元被浸入到小容量(容量: 12ml)管形瓶的 10ml 生理盐水中。这一管形瓶与内含物一同被浸入到水槽，温度从 27℃ 缓慢降低。不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)，或更具体来说，在温度校正基本上不是通过设置温度系数在 0.00%/℃ 进行的状态下，由内置在单元中的热敏电阻检测的温度测量值和电导率测量值被时间相关记录，以便测量对于溶液温度变化的电导率的变化。

结果如图 12 所示。在图 12 中，电导率和溶液温度测量值，由使用在测量开始(时间经过: 0 分钟)处的电导率和溶液温度作为空白值，并从在时间经过各点的电导率值和溶液温度值减去空白值获得的电导率和溶液温度变化量表示。从图 12 所示的测量结果，确定了在时间经过各点每溶液温度 1℃ 的电导率的变化( $\text{mS/cm/1}^\circ\text{C}$ ,  $\times 10^{-1}\text{S/m/1}^\circ\text{C}$ )和每溶液温度 1℃ 的电导率的变化率(以下称为“温度系数”)(%/1℃)，结果示于图 13。

从图 12 所示的结果可以明白，电导率与电解质溶液温度的变化平行变化。图 13 所示的结果表明，在时间经过的各点温度系数值的平均(%/1℃)为 1.56%，且温度系数显示几乎与时间经过无关是恒定值。

然后对于类似于例 1 的反应，即对于标准 BFP 抗原与 K1 抗体之

间的抗原-抗体反应，时间相关反应状态与反应称为(免疫复合物)被检测而不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)。

### 测量过程

使用如图 1 的测量过程，所不同在于不使用自动温度补偿(ATC)。更具体来说，使用微型注射器向生理盐水添加 K1 抗体的 2 $\mu$ l 量(绝对量: 0.5ng)。向这一溶液添加标准 BFP 抗原 2 $\mu$ l 量(绝对量: 0.6ng, 1.2ng 和 2.4ng)。在搅拌结果的反应溶液后，在保持单元浸入在反应溶液的同时，电导率和溶液温度被时间相关测量。

对于每一只含标准 BFP 抗原(绝对量: 4.8ng)和 K1 抗体(绝对量: 1ng)的生理盐溶液，对电导率和和溶液温度进行时间相关测量。

为了避免外部气氛温度对反应溶液温度的影响，反应在能够保持恒定室温的等温室(26 $^{\circ}$ C)中引起。

标准 BFP 抗原与 K1 抗体之间反应的电导率和在时间经过的各点的溶液温度测量值示于图 14。在图 14 中，电导率和溶液温度的测量值，由使用在反应开始的电导率和温度作为空白值，并从时间经过中各点的电导率和溶液温度值减去空白值获得的电导率和溶液温度的变化量表示。

从图 14 所示的结果，确定了在每一反应过程中溶液温度每 1 $^{\circ}$ C 的电导率的变化(mS/cm/1 $^{\circ}$ C)和溶液温度的每 1 $^{\circ}$ C 的电导率的变化率(温度系数%/1 $^{\circ}$ C)，并分别示于图 15A 和 15B。

从图 14 可以理解，在各浓度的标准 BFP 抗原与 K1 抗体之间的反应中，在电导率的变化与溶液温度变化之间有良好的相关性。对于 K1 抗体(0.5ng)，较大量的标准 BFP 抗原进而导致电导率和溶液温度较大的变化(降低)。

正如从图 15A 可知，以 0.6ng 的标准 BFP 抗原量，溶液温度的每 1 $^{\circ}$ C 电导率的变化(mS/cm/1 $^{\circ}$ C)接近等于生理盐水的变化。反之，以 1.2ng 的标准 BFP 抗原量，在经过 40 分钟后观察到超过生理盐水变化的大的变化(增加)。进而以 2.4ng 的标准 BFP 抗原量，在经过 15 分钟后观察到电导率大的变化(增加)。

如上所述，发现溶液温度的每  $1^{\circ}\text{C}$  电导率的变化量( $\text{mS}/\text{cm}/1^{\circ}\text{C}$ ) 在 BFP 抗原差别量所属的反应之间变化很大，并不象只有电解质溶液的情形那样均匀。温度系数( $\%/1^{\circ}\text{C}$ )是一在时间经过各点溶液温度的每  $1^{\circ}\text{C}$  电导率的变化量( $\text{mS}/\text{cm}/1^{\circ}\text{C}$ )，对于在反应前反应溶液电导率被计算的比率值，且结果显示与电导率变化量( $\text{mS}/\text{cm}/1^{\circ}\text{C}$ )相同的趋势。就是说，发现温度系数( $\%/1^{\circ}\text{C}$ )与免疫反应中抗原及抗体量时间相关地变化。

另一方面，在只包含 K1 抗体或标准 BFP 抗原的生理盐水的时间经过的各点处的电导率和溶液温度的测量值分别示于图 16A 和 16B。在图 16 中，电导率和溶液温度的测量值，由使用反应开始的电导率作为空白值，并从时间经过中各点的电导率减去空白值获得的电导率的变化量表示。

从图 16A 和 16B 明显可知，对于标准 BFP 抗原和 K1 抗体两者没有观察到电导率和溶液温度明显的变化。从这一结果明显地，电导率和溶液温度的变化是由标准 BFP 抗原和 K1 抗体之间的反应引起的。

#### 例 7

其中检测如例 2 中的蛋白(胎腓肠血清(FCS))被添加到反应系统中的标准 BFP 抗原和 K1 抗体之间的反应，但不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)。

#### 测量过程

测量过程与例 2 中类似，所不同在于，不使用自动温度补偿(ATC)。更具体来说，事先向生理盐水添加胎腓肠血清(FCS)(大约  $70\text{mg}$  蛋白/ $\text{ml}$ )的胎腓肠血清(FCS) $2\mu\text{l}$  量(大约  $140\mu\text{g}$  蛋白的绝对量)。对于 K1 抗体( $0.5\text{ng}$ )与不同浓度( $0.075\text{ng}$  和  $0.15\text{ng}$ )的标准 BFP 抗原之间的每一反应，对电导率和溶液温度进行时间相关测量，不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)。如同在例 2 中，在稍后所述的例子的受检血清中估计和定量确定 BFP 抗原量时，为了达到对应于添加到反应系统的量的蛋白量，添加胎腓肠血清。如同例 6 中那样，反应在恒温( $26^{\circ}\text{C}$ )室中进行。

## 结果

在 BFP 抗原与 K1 抗体之间的反应时间结果各点的电导率和溶液温度测量值示于图 17。在图 17 中，由使用在反应开始处的电导率和溶液温度作为空白值，并从在时间经过各点的电导率值和溶液温度值减去空白值获得的电导率和溶液温度变化量表示。

从图 17 所示的结果，确定了在各反应中溶液温度每 1℃ 的电导率的变化(mS/cm/1℃)和溶液温度的每 1℃ 的电导率的变化率(温度系数 %/1℃)，并分别示于图 18A 和 18B。

从图 17 可以理解，在各浓度的标准 BFP 抗原与 K1 抗体之间的反应中，在电导率的变化与溶液温度变化之间有良好的相关性。对于 K1 抗体(0.5ng)使用较大量的标准 BFP 抗原，观察到电导率和溶液温度较大的变化。

正如从图 18A 可知，溶液温度的每 1℃ 电导率的变化量(mS/cm/1℃)与温度系数(%/1℃)在两个水平的抗原量之间没有显示时间相关变化的明显的差别。然而这些值在经过十分钟的反应之后大大变化：例如温度系数(%/1℃)大约为 3%，这明显大于生理盐水的温度系数 1.5%。

这例子中，能够把握以 0.075ng 或 0.15ng 的标准 BFP 抗原量及 K1 抗体 (0.5ng)的非常轻微的量之间的反应。并不是要只限于特定的理论，这可归因于这样的事实，即向反应系统添加胎腓肠血清(FCS)允许保持在电解质溶液中抗原轻微量的稳定性，并改进了抗原-抗体反应的检测灵敏度。

从图 18A 和 18B 所示结果可知，标准 BFP 抗原与 K1 抗体(0.5ng)的反应对于标准 BFP 抗原 0.075ng 和 0.15ng 量的两种情形几乎处于相同水平。在标准 BFP 抗原量及 K1 抗体这种小量的反应之间观察到反应率的差别，以及如同 14, 15A 和 15B 所示的其中标准 BFP 抗原为 0.6 到 2.4ng 量的反应。

### 例 8

如同例子 3，作为样品中特定物质检测血清中的 BFP 抗原，不使

用电导率计的温度自动补偿(ATC)。

冷冻储存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的健康人和癌症病人(肝癌)的人血清用作为受检血清。这例子中使用的健康人和癌症病人血清中 BFP 抗原的量分别为  $35\text{ ng/ml}$  和  $100\text{ ng/ml}$ ，这是使用 Nippon Kayaku Co., Ltd.的 Lanazyme(商标)BFP Plate”测量的。

### 测量过程

测量过程与例 3 中类似，所不同在于，不使用自动温度补偿(ATC)。更具体来说，借助于微型注射器向  $10\text{ml}$  生理盐水添加 K1 抗体  $2\mu\text{l}$  量(绝对量:  $0.5\text{ng}$ )，并搅拌溶液。返回室温的受检血清的  $2\mu\text{l}$  量(大约  $140\mu\text{g}$  蛋白的绝对量) (大约  $70\text{mg}$  蛋白/ $\text{ml}$ )借助于微型注射器添加到结果的溶液，并搅拌。在保持单元浸入在这一反应溶液的同时，对电导率和溶液温度进行时间相关测量，但不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)。

在相同的条件下在变化 K1 抗体浓度(绝对量:  $0.0625\text{ng}$ ,  $0.25\text{ng}$  和  $0.5\text{ng}$ )时对于癌症病人血清引起反应，并对电导率和溶液温度进行时间相关测量，同样不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)。

### 结果

对于健康人血清和癌症病人血清与 K1 抗体的每一反应，在时间经过的各点电导率和溶液温度的测量值示于图 19A 和 19B。从图 19A 和 19B 所示对每一反应的结果，确定溶液温度的每  $1^{\circ}\text{C}$  电导率( $\text{mS/cm}/1^{\circ}\text{C}$ )及溶液温度的每  $1^{\circ}\text{C}$  电导率的变化率(温度系数( $\%/1^{\circ}\text{C}$ ))。结果分别示于图 20A 和 20B。

对于三类浓度的 K1 抗体与癌症病人血清的每一反应时间经过的各点的电导率和溶液温度的测量值示于图 21。

在图 19 和 21 中，电导率和溶液温度的测量值，由使用在反应开始的电导率和溶液温度作为空白值，并从在时间经过各点的电导率值和溶液温度值减去空白值获得的电导率和溶液温度变化量表示。

如同在例 7 中 BFP 抗原和 K1 抗体之间的反应那样，在如图 19A 和 19B 所示结果中健康人血清和癌症病人血清两者中观察到，由溶液

温度降低所伴随的电导率的降低。与健康人血清比较，在癌症病人的血清中观察到电导率更大的变化。

溶液温度的每  $1^{\circ}\text{C}$  电导率 ( $\text{mS}/\text{cm}/1^{\circ}\text{C}$ ) 及温度系数 ( $\%/1^{\circ}\text{C}$ ) 的变化量在健康人与癌症病人之间是不同的。已知健康人的那些值小于癌症病人的值。对于癌症病人的血清，在反应开始后经过十分钟时，电导率 ( $\text{mS}/\text{cm}/1^{\circ}\text{C}$ ) 及温度系数 ( $\%/1^{\circ}\text{C}$ ) 的变化量变化很大。其值显示了从  $2.3(\%/1^{\circ}\text{C})$  到  $4(\%/1^{\circ}\text{C})$  的进展，这高于电解质溶液的温度系数  $1.56(\%/1^{\circ}\text{C})$ 。

这样通过测量电导率能够检测到健康人和癌症病人血清与 K1 抗体的免疫反应，并时间相关地比较反应率。对于 K1 抗体的行为在健康人血清和癌症病人血清之间明显不同。

当向如例 7 所示反应系统添加胎腓肠血清(FCS)时，标准 BFP 抗原( $0.075\text{ng}$  或  $0.15\text{ng}$ )与 K1 抗体 ( $0.5\text{ng}$ )之间的反应中，在  $0.075\text{ng}$  的反应溶液中 BFP 抗原量如果被转换则对应于  $37.5\text{ng}/\text{ml}$  的血清中 BFP 抗原量，并在  $0.15\text{ng}$  的反应溶液中 BFP 抗原量如果被转换则对应于  $75\text{ng}/\text{ml}$  的血清中 BFP 抗原量。

因而，对照这例子中健康人血清或癌症病人血清对于 K1 抗体的反应率与例子 7 中每一反应表明，在健康人血清中对应于  $37.5\text{ng}/\text{ml}$  或更少的 BFP 抗原的存在。另一方面，在癌症病人血清中，认为存在对应于接近  $75\text{ng}/\text{ml}$  的 BFP 抗原。

如上所述，使用 EIA 方法可知，在这例子使用的健康人血清和癌症病人血清中，BFP 抗原分别以  $35\text{ng}/\text{ml}$  和  $100\text{ ng}/\text{ml}$  的量出现。关于含在血清中的 BFP 抗原量，这例子中的估计值几乎与由 EIA 方法的测量值为同一量级。如例子 3 中那样，当然能够使用规定的定标曲线进一步详细定量确定受检血清中的 BFP。例如，通过从图 14 和 17 所示的结果绘制横坐标上的标准 BFP 抗原浓度，并在纵坐标上绘制电导率(负值)变化值，能够获得如图 22A 和 22B 中所示标准 BFP 抗原量与电导率变化量之间的关系。这一关系可用作为定标曲线。

如图 21 中所示，在癌症病人血清中观察到与 K1 抗体浓度相关的

电导率的变化。从这一结果认为，通过测量电导率观察到，使血清 BFP 抗原以满足 K1 抗体量同 K1 抗体反应的反应性质。

在例子 6 到 8 所示的实验结果明显可见，在测量电导率和溶液温度时不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)之下不施加温度校正的状态中，显然观察到，随着在免疫反应进行抗原-抗体反应溶液温度的降低趋势。发现电导率随温度的这一降低而变低。

如上所述，溶液电导率随温度变化：较高的温度导致较高的电导率，较低的温度结果是较低的电导率。然而，从图 15A 和 15B 明显可见，溶液温度的每 1℃电导率 (mS/cm/1℃)及温度系数(%/1℃)的变化量随标准 BFP 抗原不同量的每一反应时间相关地变化。因而，每一反应中电导率的变化不仅与溶液温度的增加相关，而且认为反映了随免疫反映进程电阻的增加的协同效果引起的结果，即免疫复合物的形成。

将进一步详细说明上述的观点。不是要限于特定的理论，在物质之间的反映中，特别是免疫反映中，在抗原与抗体反映时需要结合能，并这被认为引起反映溶液温度的降低。随着溶液温度的这一降低，电解质溶液的电导率发生变化。然而，由响应反映状态溶液温度的变化引起的电导率的变化，超过了仅由电解质溶液的溶液温度变化引起的电导率的变化范围。就是说，如上所述，抗原与抗体的结合能产生了更大分子(免疫复合物)，并这使得电的流动困难，并认为这引起电导率的降低。结果是，这被认为更为精确地反映了物质之间的反应。

根据由本发明人进行的研究，当抗原或抗体浓度较低时，电导率的变化依赖于由免疫反应引起的反应溶液温度降低，并当浓度较高时，来自较大分子的形成结果的增加的电阻的作用程度被认为上升。

换言之，如从图 15A, 15B, 18A, 18B, 20A, 20B 中所示结果可知，当在标准 BFP 抗原与 K1 抗体之间的免疫反应中，标准 BFP 抗原量相对于恒定量的 K1 抗体小时，溶液温度的每 1℃电导率 (mS/cm/1℃)及温度系数(%/1℃)的变化量一般等于生理盐水的变化量，并且这些值随着 BFP 抗原量增加及反应率变得较高而变得比生理盐水的值大。

根据例 1 到 5 中叙述的方法, 可恒定上述明显的效果。然而, 使用电导率计的自动温度补偿(ATC)的测量中, 对反应溶液的温度中的变化进行了恒定的温度补偿。因而大概不能得到足以反映原始反应的结果。因而为了精确把握原始反应, 希望能够精确把握由反应物质引起的溶液温度的变化和电导率的变化。为此, 重要的是使反应溶液温度不受例如周围温度的影响。

因而为了通过测量反应溶液的电导率而精确检测物质的反应, 最好实现这样一种状态, 其中能够精确测量由原始反应引起的溶液温度的变化, 同时保证反应溶液的温度不受例如外部开放空气温度的影响, 并在这种状态下排除电导率计的自动温度补偿, 就是说不进行温度校正而测量电导率以及溶液温度。

通过采用以下任何装置之一或组合, 能够实现反应溶液温度不受诸如开放空气温度等反应系统之外度温影响的状态, 用于保持在电解质溶液中发生的物质反应的反应系统之外的气氛处于恒温的装置, 用于对外部气氛热保护反应系统的装置, 以及用于保持反应系统和外部气氛处于相同温度的装置, 即用于引起反应系统的外部气氛温度响应反应溶液温度的变化而改变, 并基本上消除反应溶液与溶液外部之间的热输入和输出。

在上述例子 6 到 8 中, 反应通过在保持恒温的恒温室中放置反应器(管形瓶)和电导率计进行, 使得外部气氛的影响不会加到反应溶液的温度, 并测量电导率和溶液温度。

比较图 5 (例子 2)和图 17(例子 7), 或图 7(例子 3)和图 19A(例子 8)所示的结果, 表明通过不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)测量电导率, 能够更精确检测反应产物和反应状态。

从例子 6 到 8 所示的结果可知, 从溶液温度的每  $1^{\circ}\text{C}$  电导率 ( $\text{mS}/\text{cm}/1^{\circ}\text{C}$ )或温度系数( $\%/1^{\circ}\text{C}$ )的变化量, 通过不使用电导率计的自动温度补偿(ATC)而时间相关地测量电导率和溶液温度, 能够非常容易检测来自物质反应的反应产物(免疫复合物), 及物之间的反应状态(反应性质), 包括反应率对抗原或抗体浓度的相关性。此外, 例如通过

比较每  $1^{\circ}\text{C}$  电导率 ( $\text{mS}/\text{cm}/1^{\circ}\text{C}$ ) 或温度系数 ( $\%/1^{\circ}\text{C}$ ) 的变化量, 能够检测样品中特定物质, 或估计并定量确定其量。

当然, 使用通常的温度校正技术诸如上述的自动温度补偿(ATC) 测量电导率的优点总是明显的, 这在于能够非常容易地基于反应容易的电导率的测量而测量物质的反应, 微型提供任何装置避免反应系统之外的外部气氛温度对反应溶液的影响。

### 例 9

现在将说明本发明的另一例子。如上所述, 本发明获得了以下新的发现。在被认为反应溶液中需要结合能的反应中, 诸如抗原与抗体之间的免疫反应, 当实现了反应溶液温度不受反应系统之外的外部气氛温度影响的状态时, 反应溶液温度随反应进程下降。

由本发明人所进行的研究指出, 在低浓度反应中, 温度的变化胜过电导率的变化, 而不是由反应产物引起的反应溶液电阻的变化。更具体来说, 它指出, 当抗原和抗体的浓度低时, 抗原和抗体的电阻原来是低的, 于是同反应产物的电阻变化比较, 反应溶液温度的变化胜过来自抗原-抗体反应结果电导率的变化。

基于这种新的发现, 在反应溶液温度不受反应系统之外的外部气氛温度影响, 并特别是在低浓度反应的状态下, 在被认为反应溶液中需要结合能的反应中, 能够通过只测量反应溶液的温度而检测反应产物和反应状态。

如上所述, 反应溶液温度不受反应系统之外诸如开放的空气温度的温度影响的状态, 能够通过采用以下任何一种装置或组合实现, 用于保持在电解质溶液中发生的物质反应, 特别是抗原与抗体之间的免疫反应的反应系统之外的气氛处于恒温的装置, 用于对外部气氛热保护反应系统的装置, 以及用于保持反应系统和外部气氛处于相同温度的装置, 即通过用于引起反应溶液的外部气氛温度响应反应溶液温度的变化而改变, 并基本上消除反应溶液与溶液外部之间的热输入和输出。

如上所述, 图 14 和 17 所示的结果揭示了按照在标准 BFP 抗原

与 K1 抗体之间反应中标准 BFP 抗原的量溶液温度变化中明显的差别。从图 19A 和 19B 可见，在健康人血清和按照病人血清之间溶液温度的变化有明显的差别。

进而，在反应溶液温度不受反应系统之外的外部气氛温度影响的状态下，在来自免疫反应结果的电导率变化和溶液温度变化之间有一良好的相关性。因而根据这一例子，如参照上述诸例子的详细描述，在基于电导率测量的反应检测中有可用的各种功能实现。

更具体来说，根据这一例子，通过时间相关测量反应溶液的温度，能够非常容易地检测免疫反应而无需昂贵的庞杂的设备。例如根据本发明，不仅如传统的免疫学测量方法(RIA 方法和 EIA 方法)那样能够检测最终形成的免疫复合物，而且能够时间相关地检测免疫反应、抗原、抗体和/或免疫复合物的时间相关状态。

因为抗原与抗体之间的免疫反应能够被时间相关地测量，因而例如能够非常容易、快速而事实方式地进行更可与抗原反应的抗体或更可与抗体反应的抗原的选择，或测量抗原与抗体之间灵敏度的存在或缺失。

此外，不必象传统免疫学测量方法(RIA 方法和 EIA 方法)那样，把抗原或抗体固化为载体或进行诸如准备标记物的操作，而是能够通过直接向反应溶液添加反应物快速而简易地检测免疫反应。因而能够借助于非常简单的设备检测免疫检测，无需抛弃标记物、诸如着色剂(酶基质)等试剂，或固化的载体等废弃物。

通过测量反应溶液的温度，能够非常容易地检测样品中特定的物质(抗原或抗体)。能够通过使用关于事先在同一系统确定的溶液温度变化的规定的定标曲线，或比较溶液温度与规定的阈值，定量确定这种特定物质的量。如在电导率的情形下，只要响应反应，例如使用反应率(溶液温度时间相关变化率，诸如初始反应率)作为指示剂，适当设置定标曲线或阈值即可。

因而能够非常简单而快速检测和定量确定出现在样品中与疾病的特定状态相关的物质，例如癌症相关的物质，癌症相关的基因产物，

或相对这种物质产生的抗体。通过简单而快速检测和定量确定，例如出现在人的血清的样品中作为与疾病的特定状态相关的物质，例如上述癌症相关的物质，癌症相关的基因产物，或相对这种物质产生的抗体，本发明在包括诊断、检查和确立癌症治疗指示剂的临床各阶段都是非常有用的。此外，因为通过直接向反应系统添加反应物而实现对特定物质检测和定量确定的可能性，因而能够减少废弃物，并借助于非常简单的设备检测并定量确定样品中的特定物质。

现已有允许以  $1/100^{\circ}\text{C}$  这样的高精测量溶液度温度的测量装置(诸如热敏电阻)。

#### 例 10

现在将说明具有用于实施本发明的配置的设备的例子。

如图 23 所示，反应检测设备基本上包括一电导率计 1 和反应器(反应器容器)3。

电导率计具有一单元(电导率测量电极对)2，这是电导率测量装置，浸入在反应器 3 中的受检溶液 S 中，并发出对应于电导率的信号，诸如微型计算机的控制装置 11，它检测由单元 2 响应受检溶液 S 中的反应发出的信号并处理数据。

存储器装置 12 可连接到控制装置 11。控制装置 11 根据存储在存储器装置 12 中的程序全盘控制设备的操作，基于存储在存储器装置 12 中的信息处理单元 2 的输出，并这样能够响应受检溶液 S 的电导率产生所需形式的信号。输入装置 13 可连接到控制装置 11。设备的各种参数的设置，测量的开始和停止，及所需数据的输入在输入装置 13 上进行。此外，显示装置 14 可连接到控制装置 11。对应于由控制装置 11 基于单元 2 的输出所产生的受检溶液 S 的电导率的信号，被传送到显示装置 14，并能够作为从结果以所需的形式显示。当然，通用的计算/控制装置，诸如个人计算机能够用作为控制装置 11，并与这种计算机连接的装置可用作为存储器这种 12，输入装置 13 和显示装置 14。

可在设备 1 中装设诸如热敏电阻等用于检测受检溶液 S 的温度的温度检测装置 10。温度检测装置 10 可内置于单元 2 中。由温度检测

装置 10 响应受检溶液的温度而发出的信号输入到控制装置 11。控制装置 11 能够在显示装置 14 上, 基于温度检测装置 10 对应于受检溶液的温度的输出, 而显示关于受检溶液的温度的信息。

如以上参照例子 1 到 6 所述, 如同本发明技术领域中通常所作的那样, 控制装置 11 能够基于单元 2 的输出, 通过基于温度检测装置 10 的输出的自动温度补偿(ATC)等, 实现对电导率被测值的温度校正。

另一方面, 如以上参照例子 6 到 8 所述, 为了实现反应溶液温度不受诸如开放空气温度等反应系统之外度温影响的状态, 用于保持在反应器 3 之外的气氛处于一致温度的装置, 用于对反应器 3 之外的气氛热保护反应器 3 内部的装置, 以及用于保持反应器 3 的内部和反应器 3 之外的气氛处于相同温度的装置, 可单独或组合装设。

就是说, 反应器 3, 单元 2 及至少是温度检测装置 10 的检测部分或电导率计 1 本身可配置在恒温室内。用于保证反应器 3 之外气氛的一致温度的介质可以是任何液体、固体或气体。而且, 可装设围绕反应器 3, 单元 2 的检测部分, 及至少是温度检测装置 10 的检测部分的绝热装置。适当的绝热材料或真空容器可用作为绝热装置。此外, 通过响应反应器 3 中受检溶液温度的变化引起受检溶液外部气氛温度的变化, 可基本上消除反应器 3 中的受检溶液与外部之间的热输入/输出。例如, 图 24 示出反应器 3, 单元 2 和温度检测装置 10 由绝热装置 20 围绕的状态。

结果, 能够排除诸如外部气氛的温度环境对反应溶液的影响, 并在没有诸如自动温度补偿(ATC)的状态测量电导率。

进而在图 24 所示的结构中, 控制装置 11 检测由温度检测装置 10 响应受检溶液中的反应而发出的信号。这样, 能够产生对应于来自这一信号和单元 2 的输出信号的溶液温度每 1℃ 的电导率或温度系数变化量的信号。

在这一结构中, 通过使用在存储器装置 12 事先设置或通过输入装置设置的规定的阈值信息和定标曲线信息, 控制装置 11 能够时间相关地检测和显示受检溶液 S 的电导率和温度, 并进而从单元 2 的输出,

或从单元 2 与温度检测装置 10 的输出,检测受检溶液中的特定物质(或估计并定量确定其量)。更具体来说,通过时间相关测量受检溶液的电导率,或随反应状态的进程所检测的溶液温度的每  $1^{\circ}\text{C}$  电导率( $\text{mS}/\text{cm}/1^{\circ}\text{C}$ )或温度系数( $\%/1^{\circ}\text{C}$ )的变化量(在对应于反应的受检溶液的温度被时间相关测量的情形下),使用作为指示剂的随反应状态的进程而检测的时间相关的电导率的变化,基于对于包含在受检溶液中的特定物质预定的阈值信息或定标曲线信息,能够处理数据。不论用于检测受检溶液中特定物质的方法,及用于估计或定量确定其量的方法如何,例 1 到 8 的说明都是适用的。

#### 例 11

现在将说明用于实现参照例 9 的以上说明所述的免疫反应检测方法中的免疫反应检测设备的一例。

如图 25 所示,实施例 9 中所述免疫反应检测方法的设备具有温度检测器 100,该检测器具有粘诸如热敏电阻等温度检测装置 10,它基本上检测反应器 3 中受检溶液 S 的温度。

为了实现反应溶液温度不受诸如开放空气温度等反应系统之外度温影响的状态,用于保持在反应器 3 之外的气氛处于恒定温度的装置,用于对反应器 3 之外的气氛热保护反应器 3 内部的装置,以及用于保持反应器 3 的内部和反应器 3 之外的气氛处于相同温度的装置,可单独或组合装设。

就是说如在例 3 中那样,反应器 3,及至少是温度检测装置 10 的检测部分或温度检测器 100 本身可配置在恒温室内。用于保证反应器 3 之外气氛的一致温度的介质可以是任何液体、固体或气体。而且,可装设围绕反应器 3,及至少是温度检测装置 10 的检测部分的绝热装置。适当的绝热材料或真空容器可用作为绝热装置。此外,通过响应反应器 3 中受检溶液温度的变化引起受检溶液外部气氛温度的变化,可基本上消除反应器 3 中的受检溶液与外部之间的热输入/输出。作为一例,图 24 示出反应器 3,和温度检测装置 10 由绝热装置 20 围绕的状态。

图 25 中，包括控制装置 11，存储器装置 12，输入装置 13，显示装置 14 和气体组件的结构可与例子 10 中类似，所不同在于，电导率测量单元 2 不连接到控制装置 11，且控制装置 11 只检测由温度检测装置 10 响应受检溶液中的反应发出的信号，并引起显示装置 14 显示对应于受检溶液 5 的温度信息。因而其细节说明在此从略。

在这一结构中，通过使用在存储器装置 12 中事先设置或通过输入装置设置的规定的阈值信息和定标曲线信息，控制装置 11 能够时间相关地检测和显示受检溶液 S 的温度，并进而检测受检溶液中的特定物质(或估计并定量确定其量)。更具体来说，通过时间相关测量受检溶液的温度，使用作为指示剂的通过反应状态进程被检测的溶液温度的变化，基于对于包含在受检溶液中的特定物质预定的阈值信息或定标曲线信息，能够处理数据。不论用于检测受检溶液中特定物质的方法，或用于估计或定量确定其量的方法如何，例 9 中的说明是适用的。

#### 工业应用

根据本发明，如上所述，能够更简单地检测物质的反应。不需要昂贵的和庞杂的设备或从略仪器，能够容易而快速地以实时方式检测物质反应的时间相关的反应状态和/或反应产物。因而这对于检测和定量确定例如样品中的特定物质非常有用。

因而根据本发明，能够更容易检测免疫学或酶的反应。例如，这允许更容易检测并定量确定与疾病特定状态相关的特定物质。进而根据本发明，能够提供一种新的方法，用于通过使用简单的设备，简易而快速地检测发生在电解质溶液中各种物质的反应的时间相关反应状态和/或反应产物。

此外，根据本发明，能够非常简单地以实时方式检测免疫反应，并非常容易和快速地检测和定量确定样品中的特定物质，诸如与疾病的特定状态相关的特定物质。

图1A

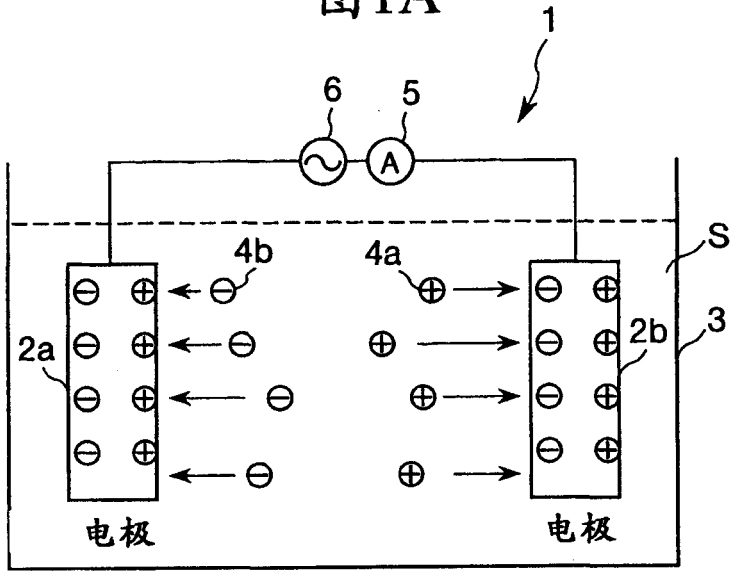


图1B

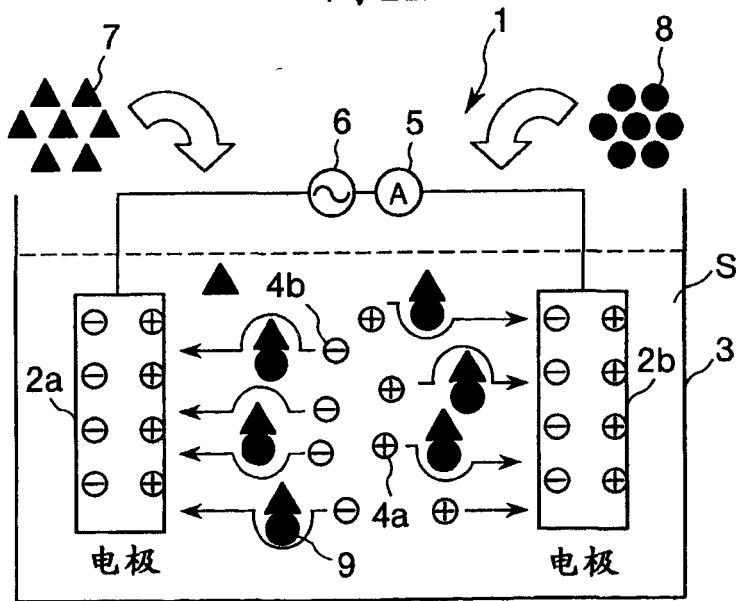
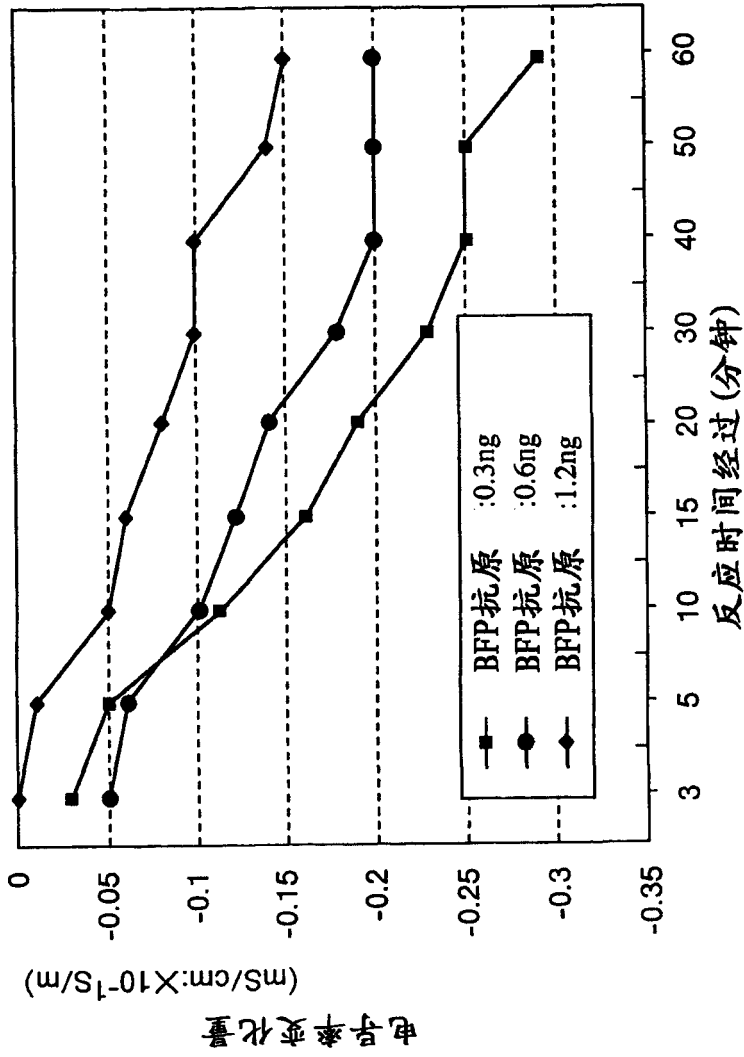
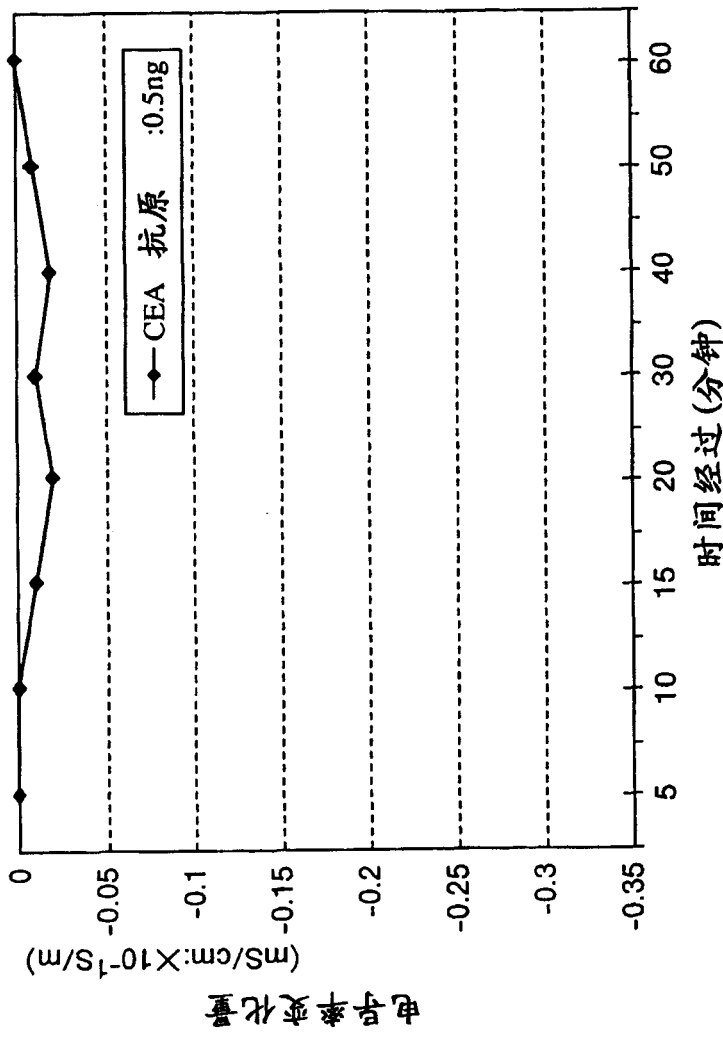


图 2



K1抗体 (0.5ng) 与标准BFP  
抗原之间的反应中电导率的变化

图 3



K1抗体 (0.5ng) 与CA抗原  
之间的反应中电导率的变化

图 4

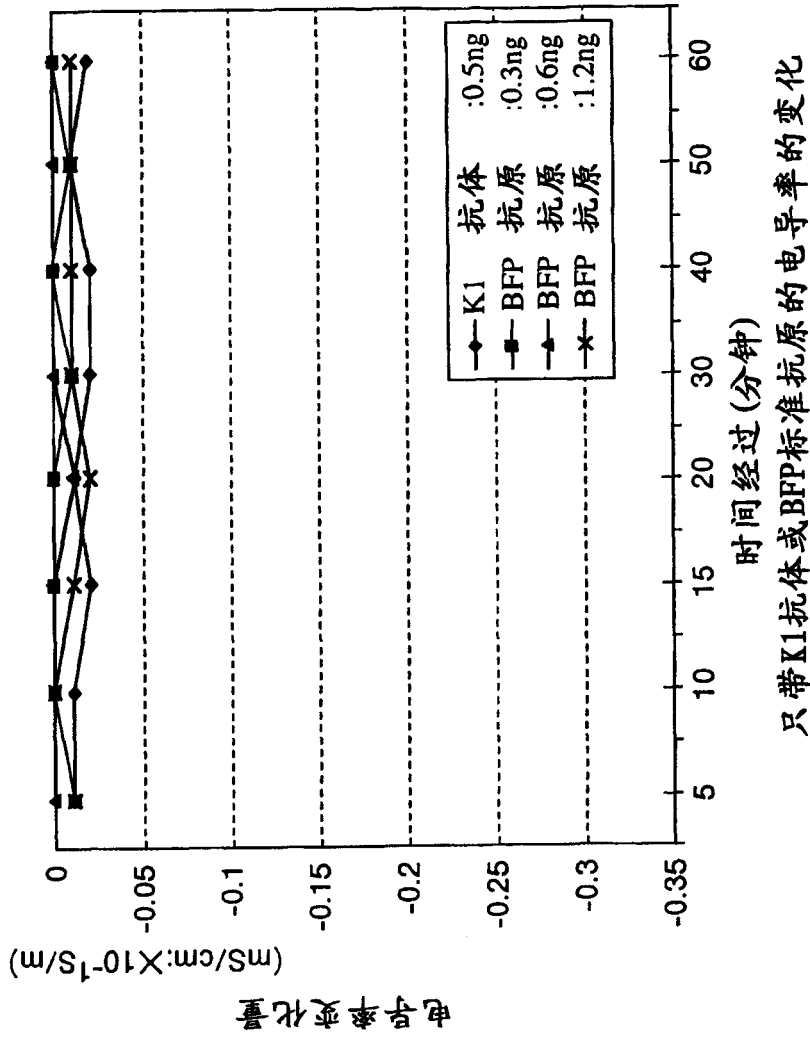
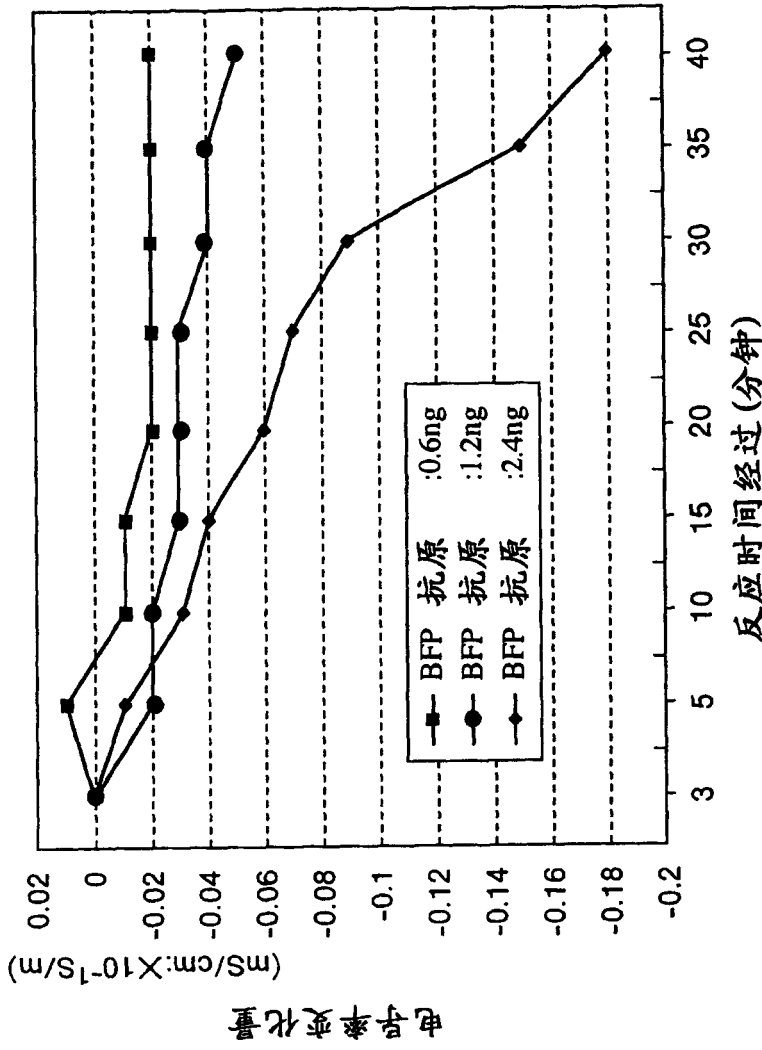
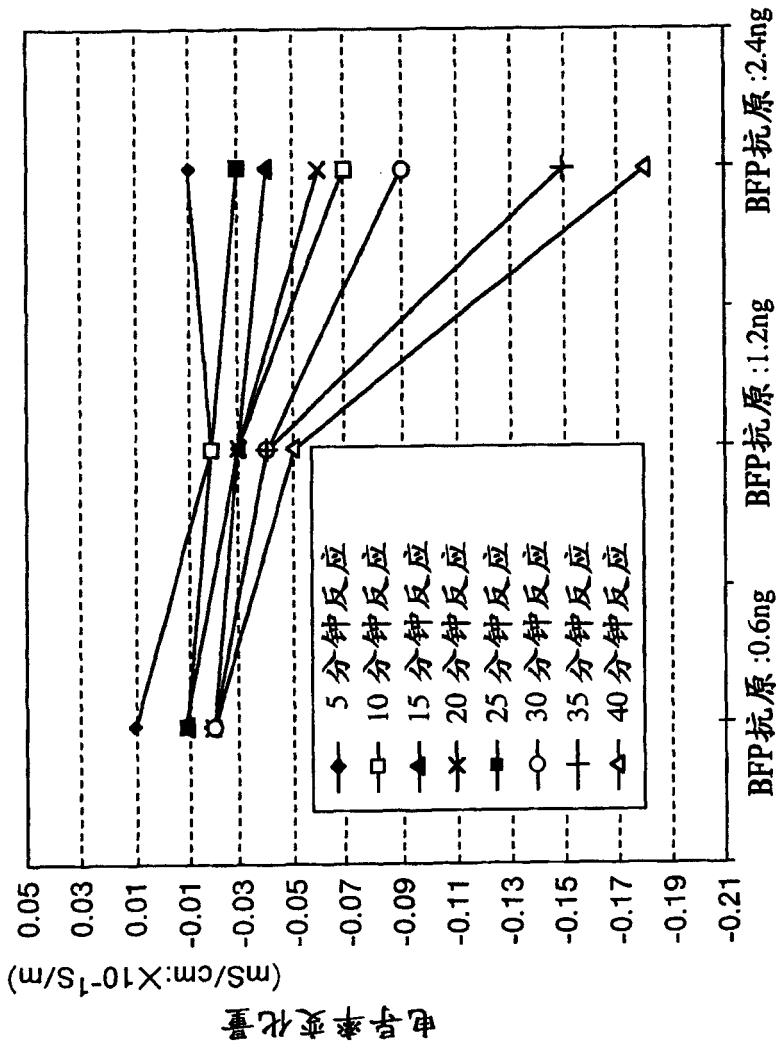


图5



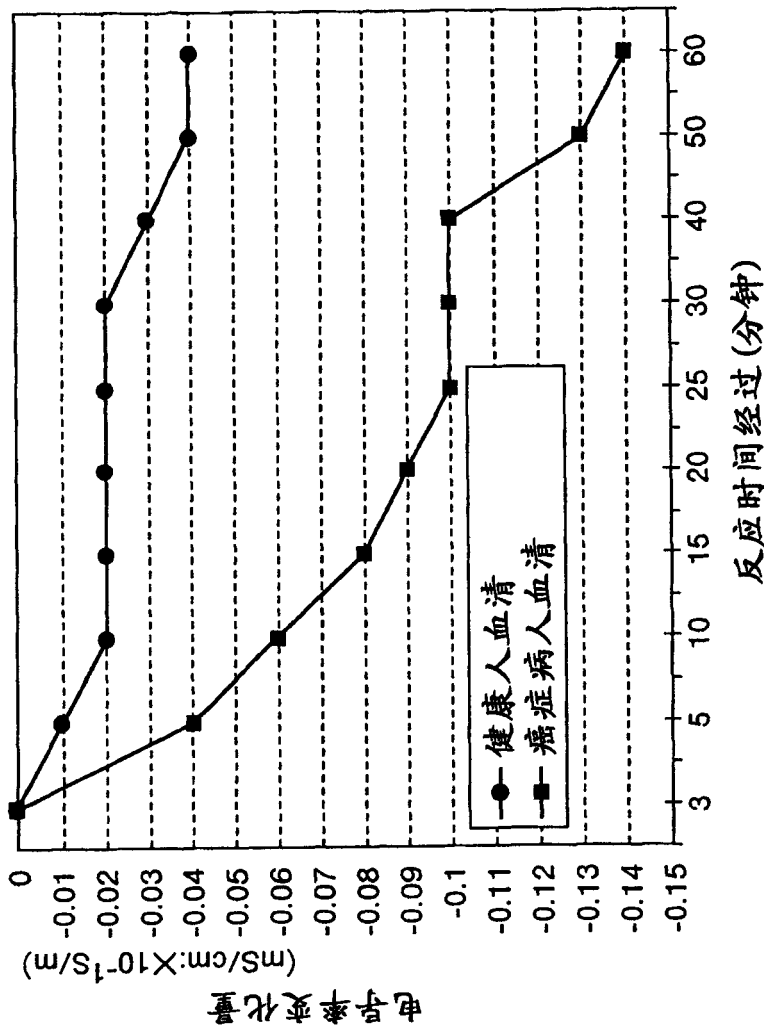
K1抗体(0.5ng)与标准BFP  
抗原之间的反应中电导率的变化

图6



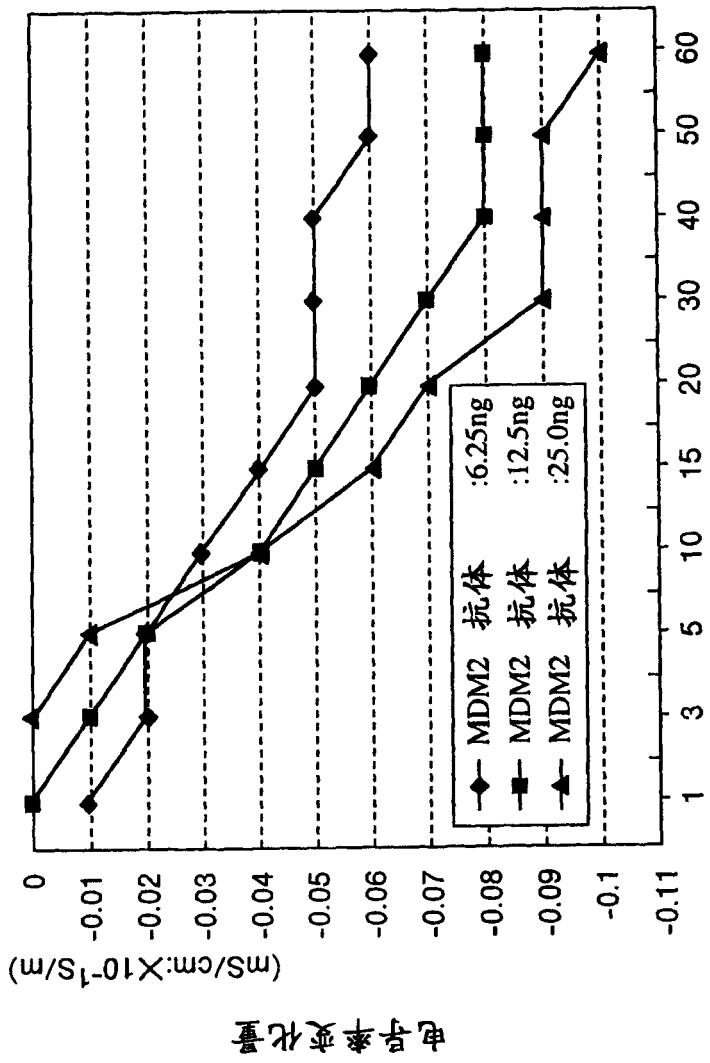
在K1抗体与BFP抗原之间的反应中  
反应时间经过的各点的电导率的变化

图7



K1抗体(0.5ng)与受检血清  
之间的反应中电导率的变化

图8



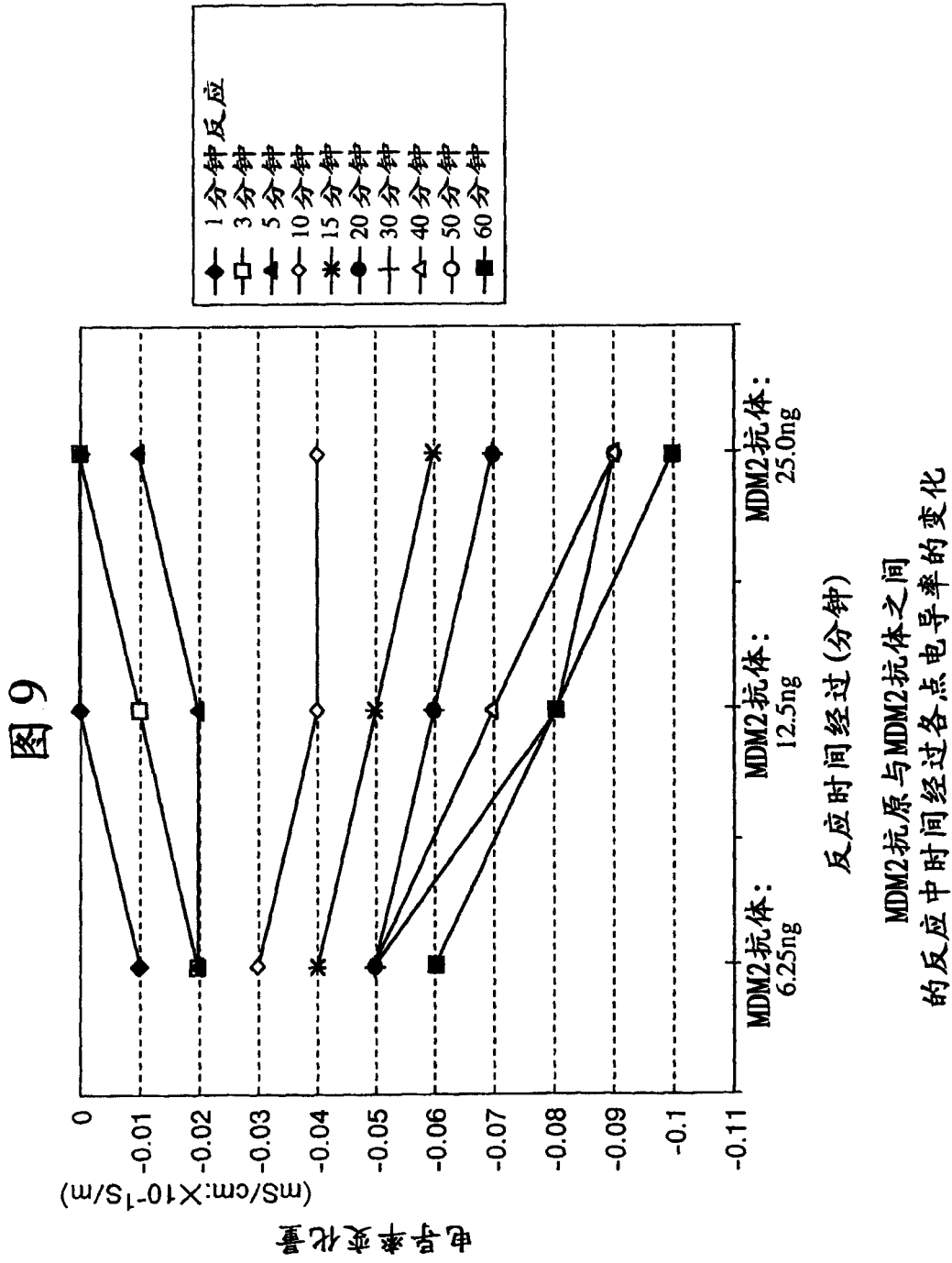
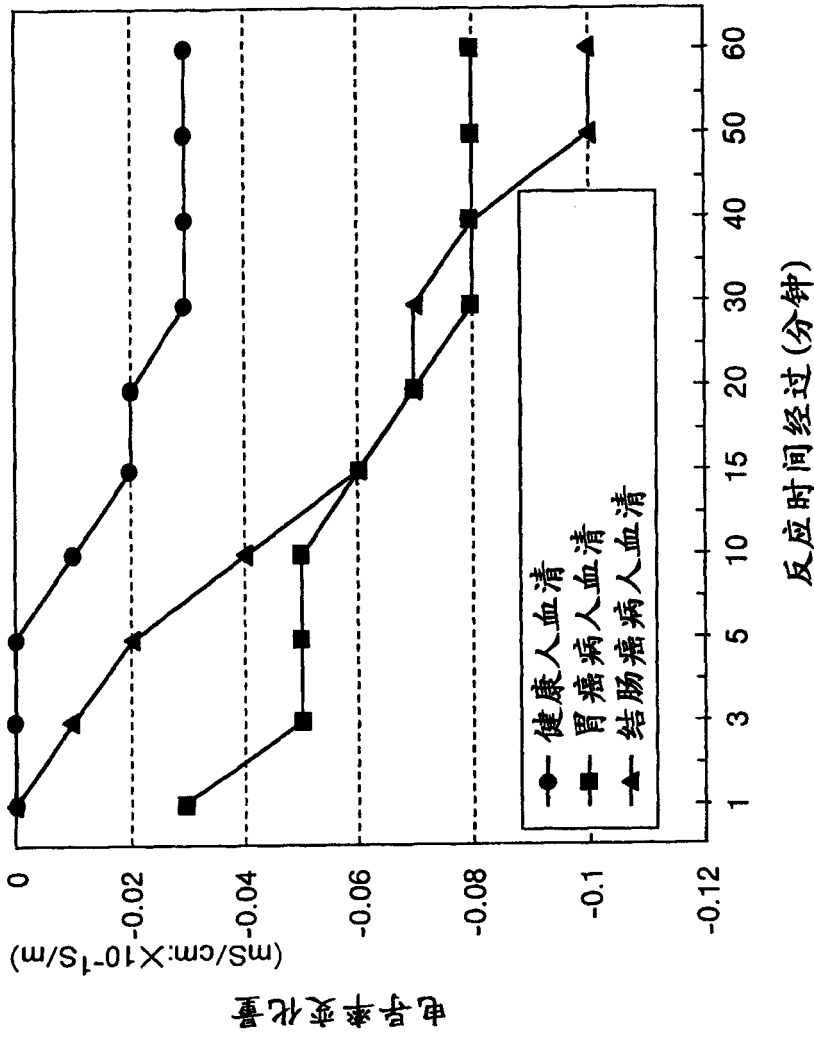
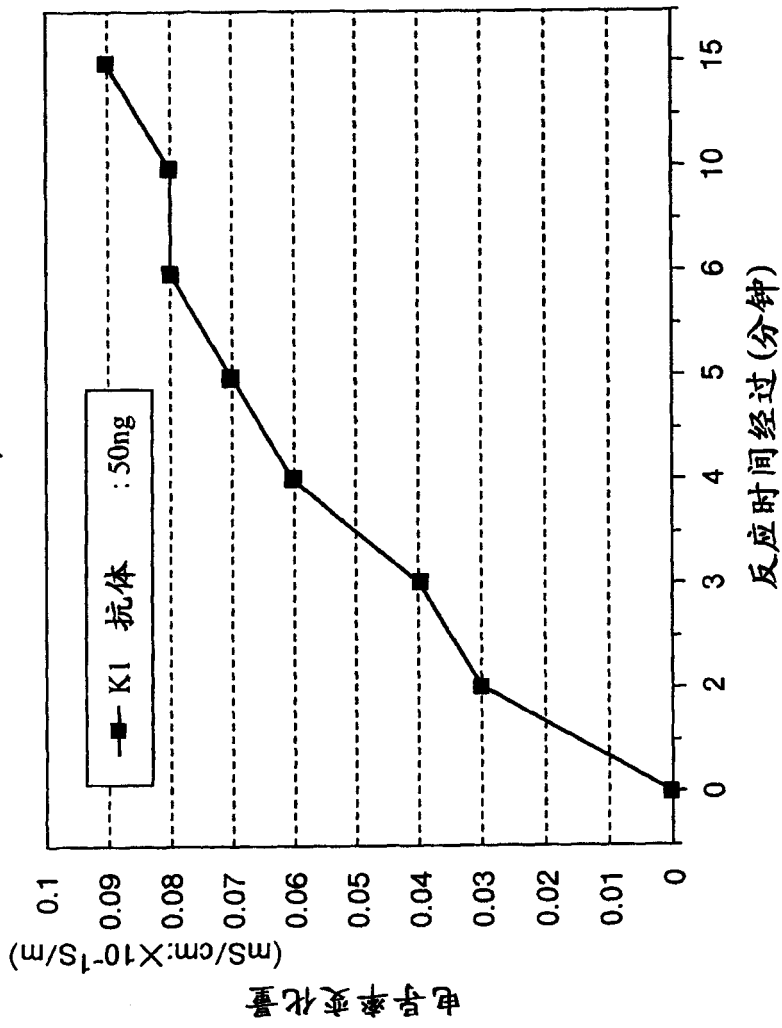


图10



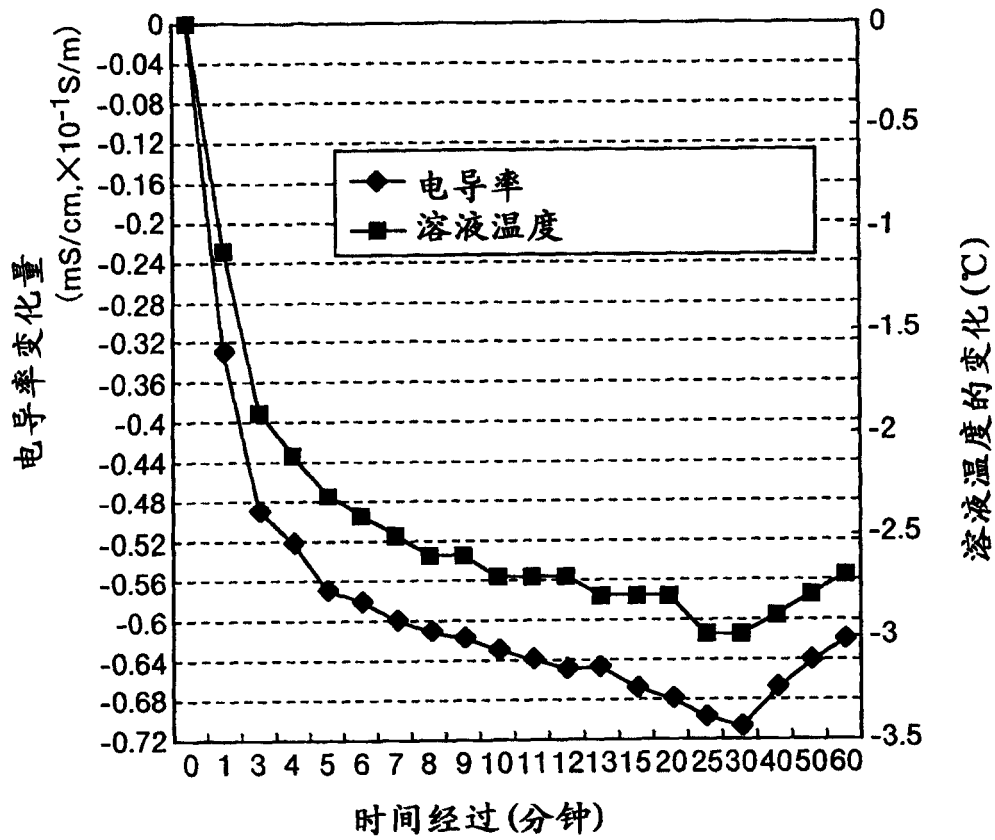
MDM2抗原 (200ng) 与受检血清  
之间的反应中电导率的变化

图11



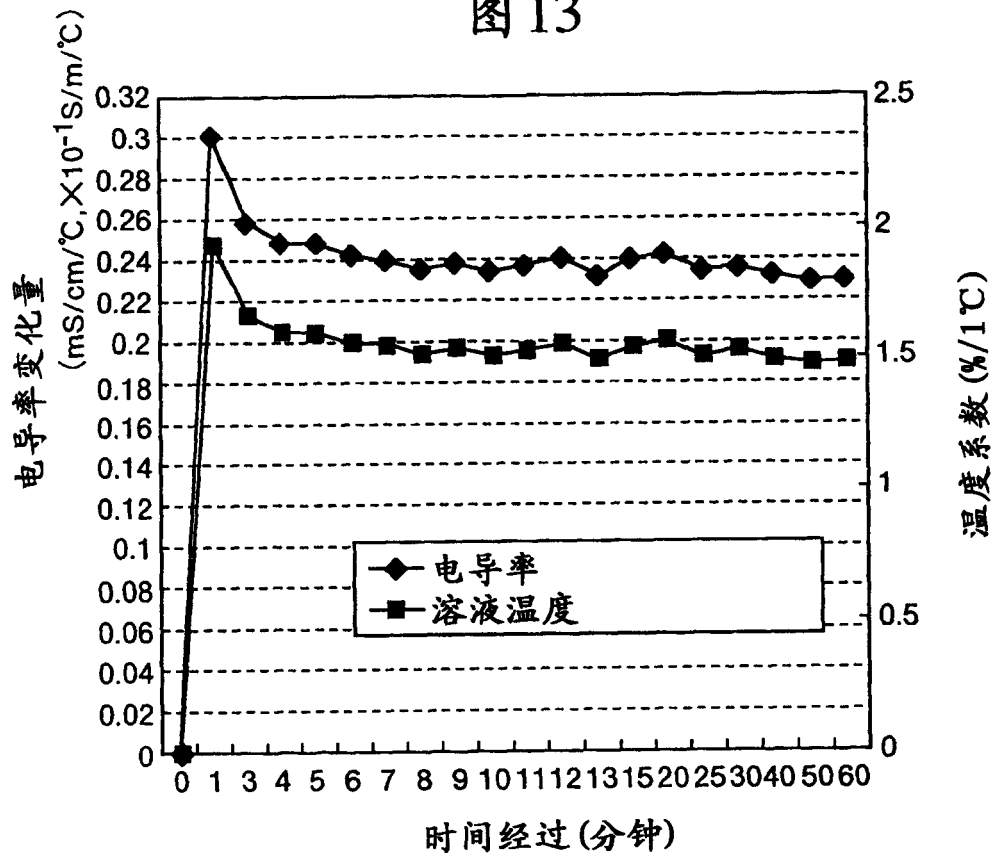
K1抗体 (50ng) 与胃蛋白酶 (17.6U/5 μg) 之间的反应中电导率的变化

图12



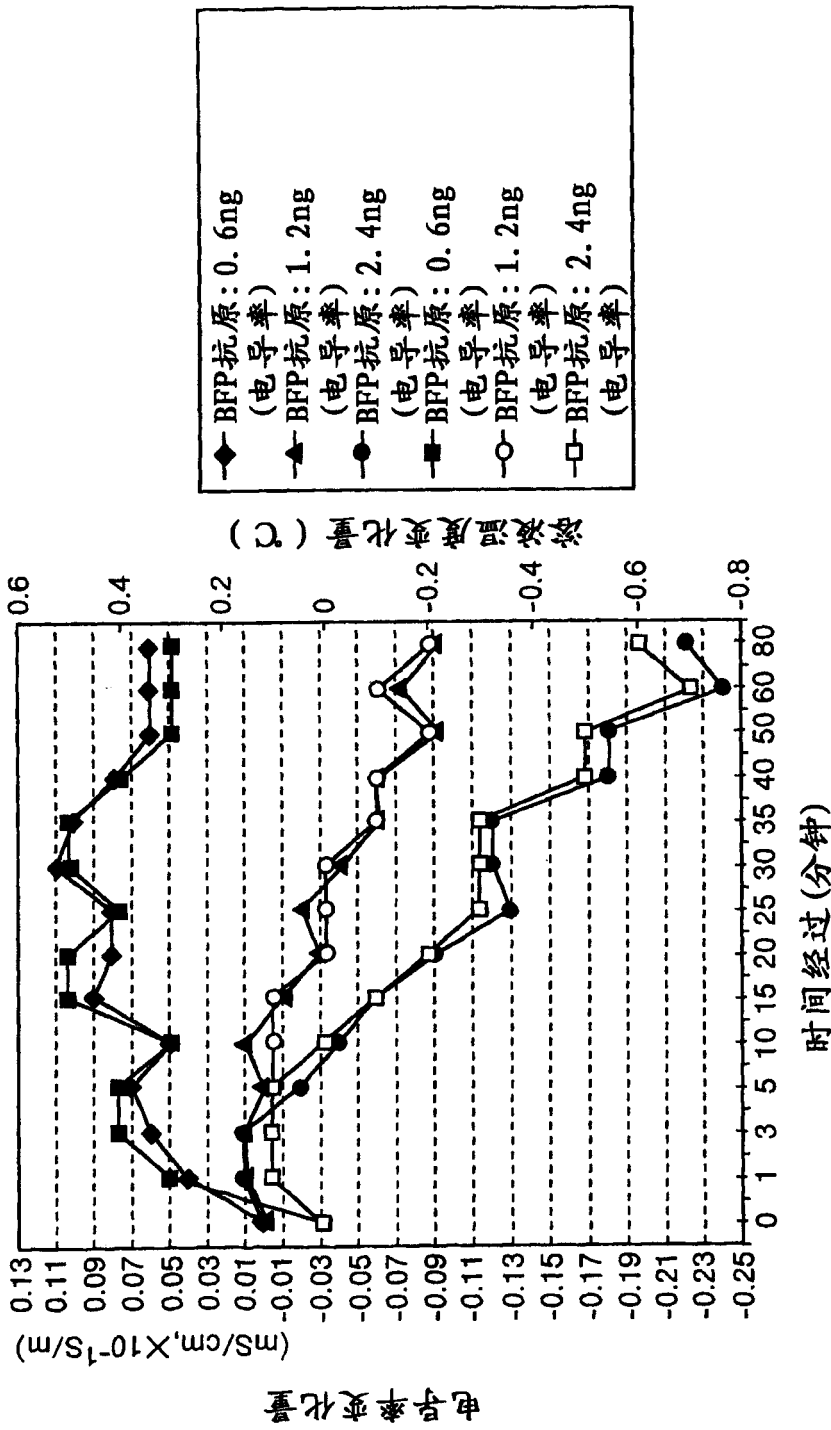
生理盐水温度变化中  
电导率的变化(没有温度校正)

图 13



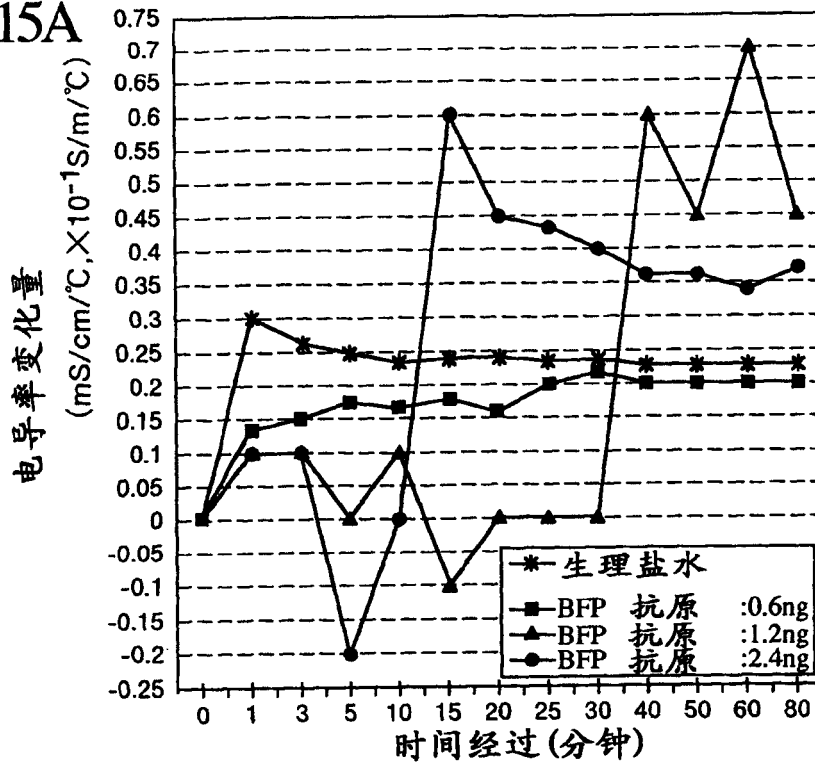
溶液温度每1℃电导率变化量和温度系数

图 14



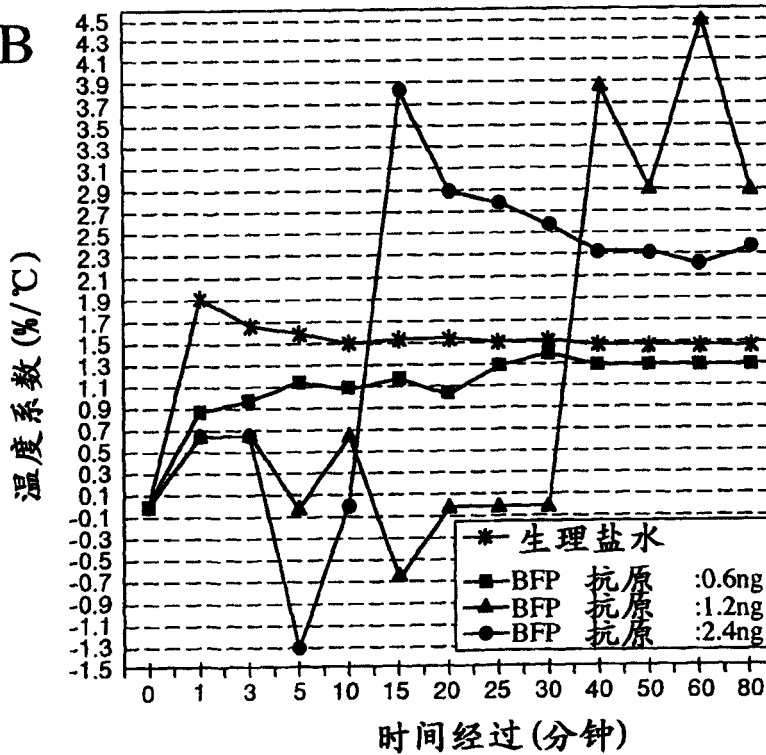
BFP抗原与K1抗体 (0.5ng) 之间  
反应中电导率和溶液温度的变化

图15A



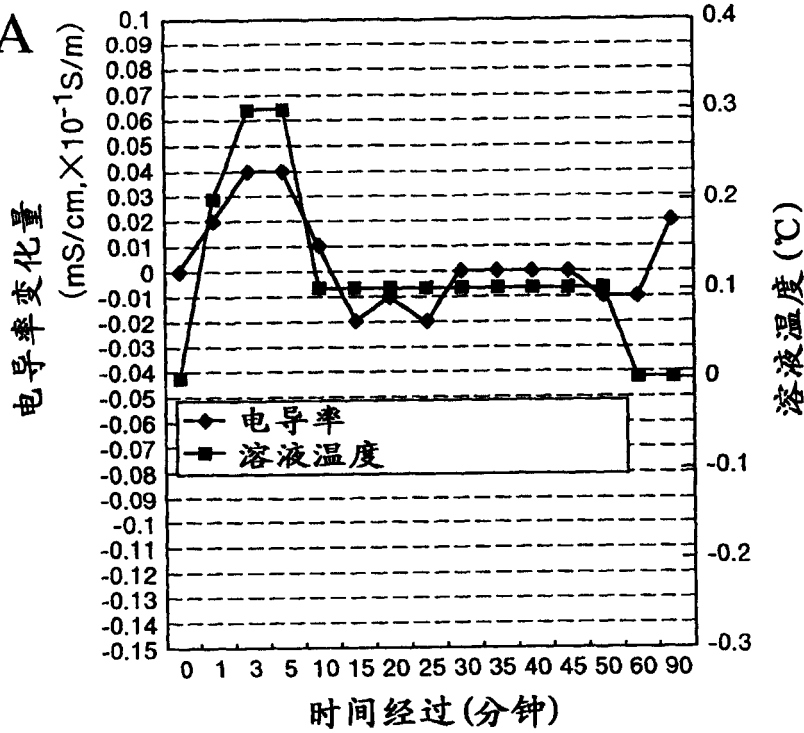
BFP抗原与K1抗体 (0.5ng) 之间反应  
中溶液温度每1℃电导率变化量(无温度校正)

图15B



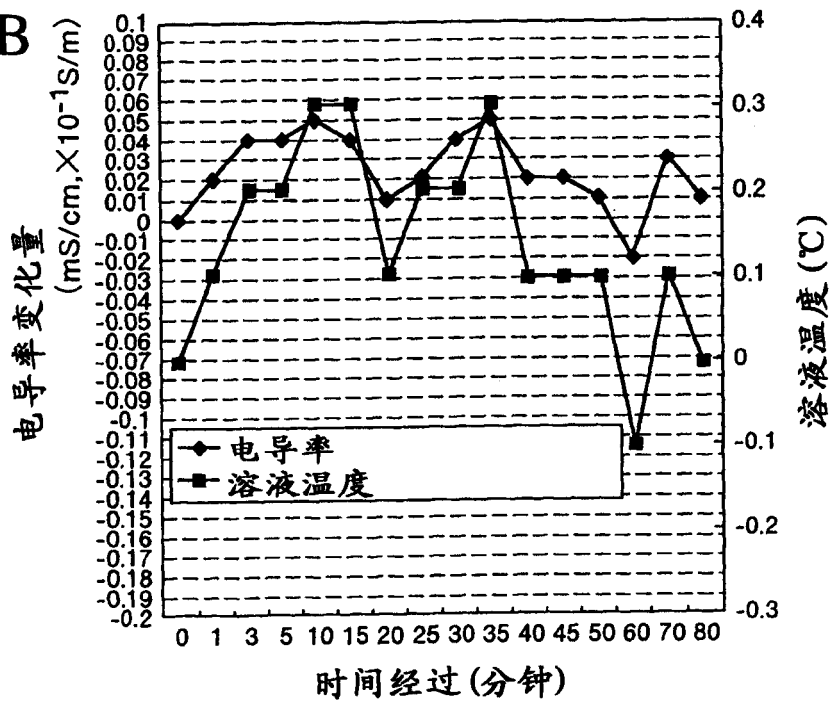
BFP抗原与K1抗体 (0.5ng) 之间反应中温度系数(%)

图16A



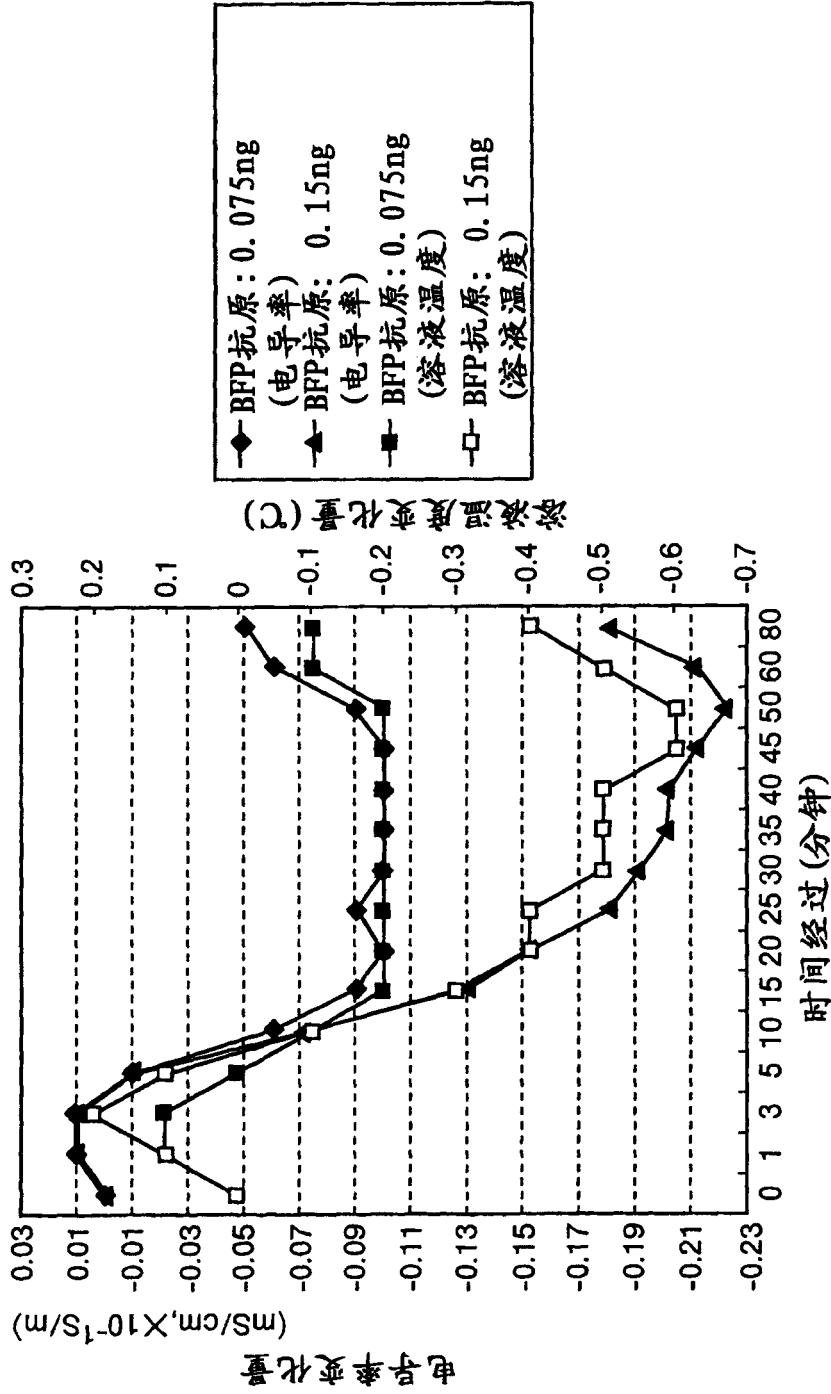
电导率和溶液温度仅随K1抗体(1ng)的变化(无温度校正)

图16B



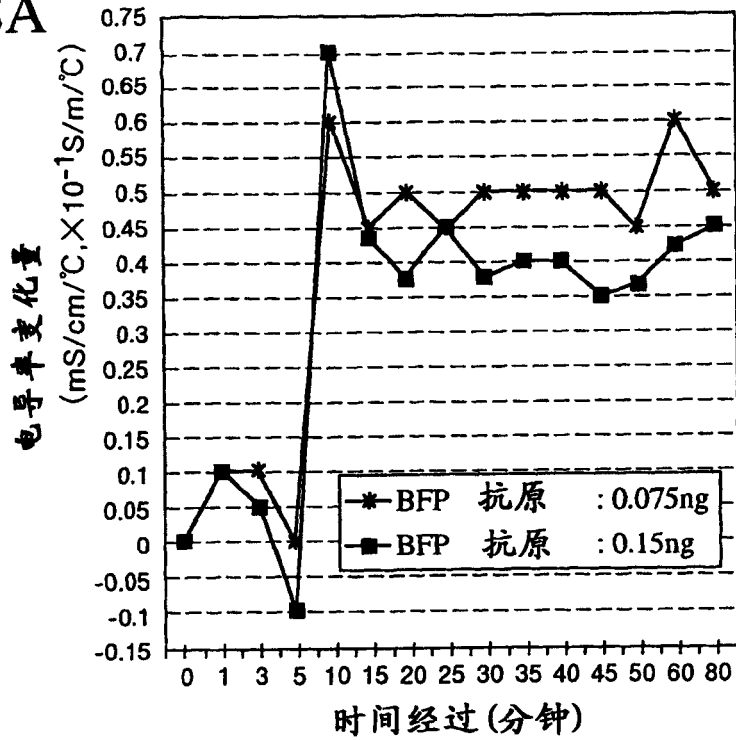
电导率和溶液温度仅随BFP抗原(4.8ng)的变化(无温度校正)

图17



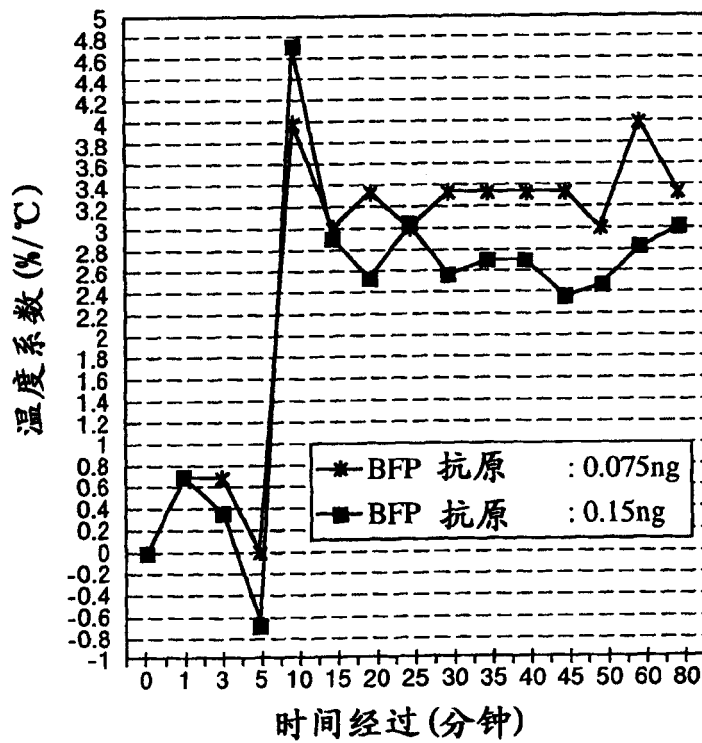
在添加FCS时BFP抗原与K1抗体(0.5ng)之间反应中电导率和溶液温度的变化(无温度校正)

图18A



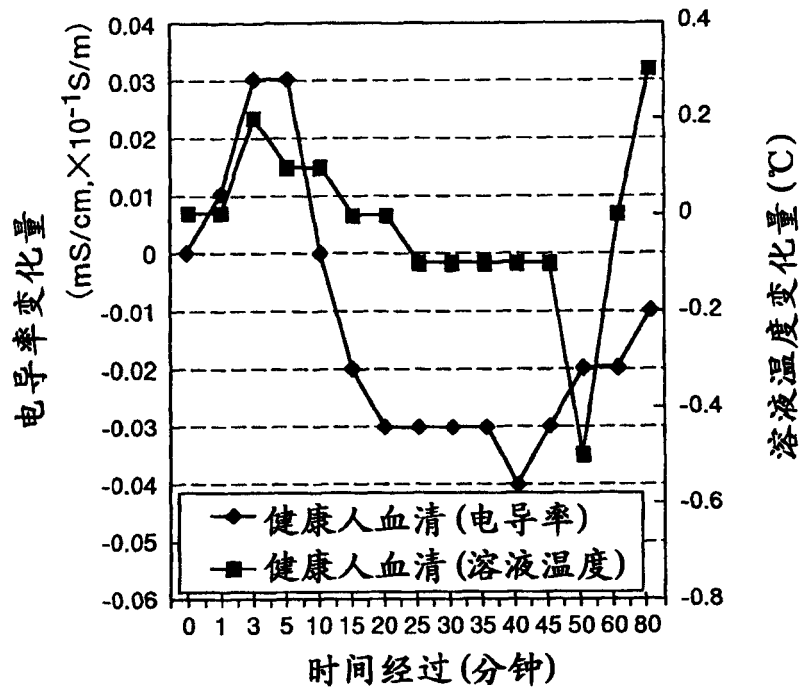
BFP抗原与K1抗体 (0.5ng) 之间反应中溶液温度的每1℃电导率的变化量 (添加FCS, 无温度校正)

图18B



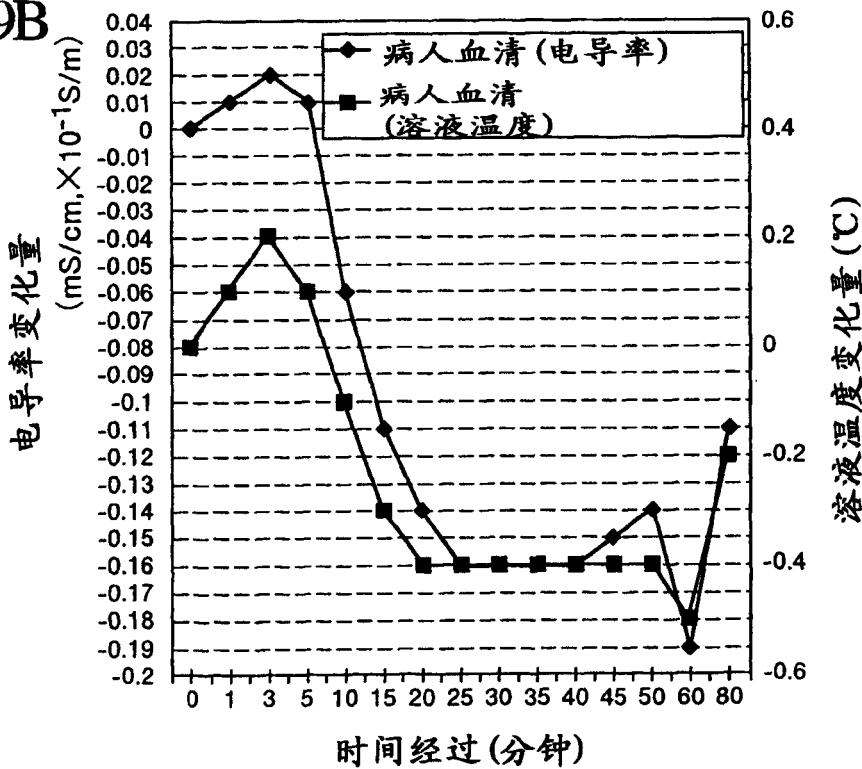
BFP抗原与K1抗体 (0.5ng) 之间反应中的温度系数 (%) (添加FCS, 无温度校正)

图19A



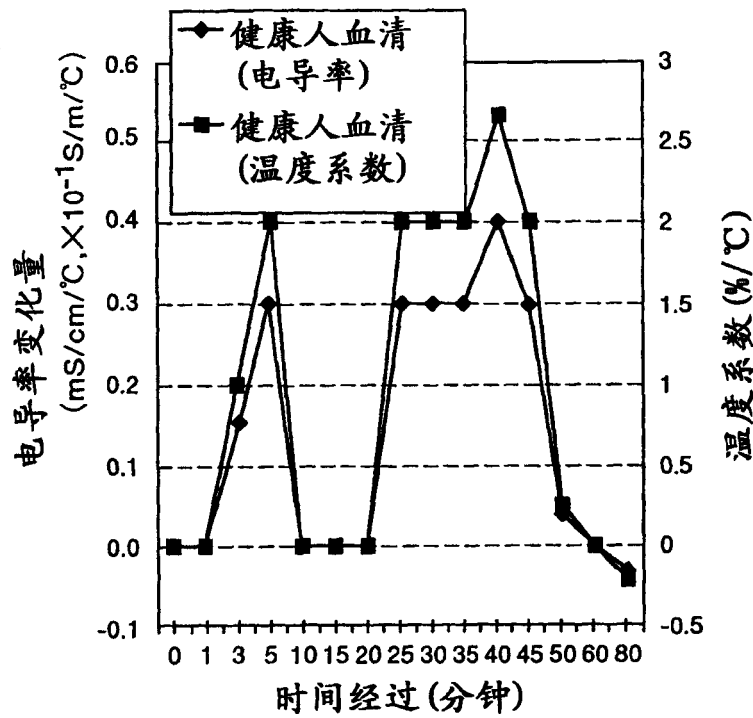
健康人血清与K1抗体(0.5ng)之间反应中电导率和溶液温度的变化(无温度校正)

图19B



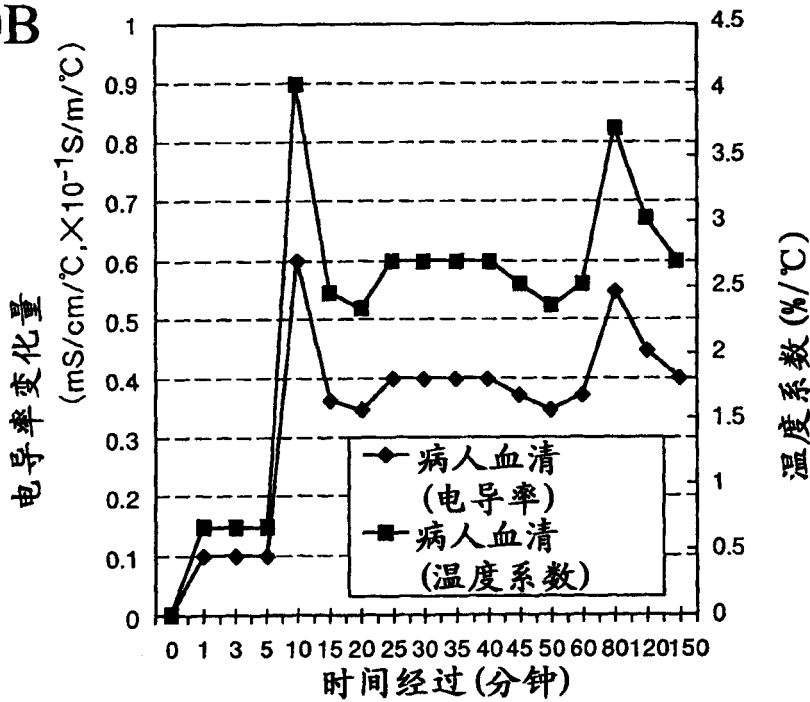
病人血清与K1抗体(0.5ng)之间反应中电导率和溶液温度的变化(无温度校正)

图 20A



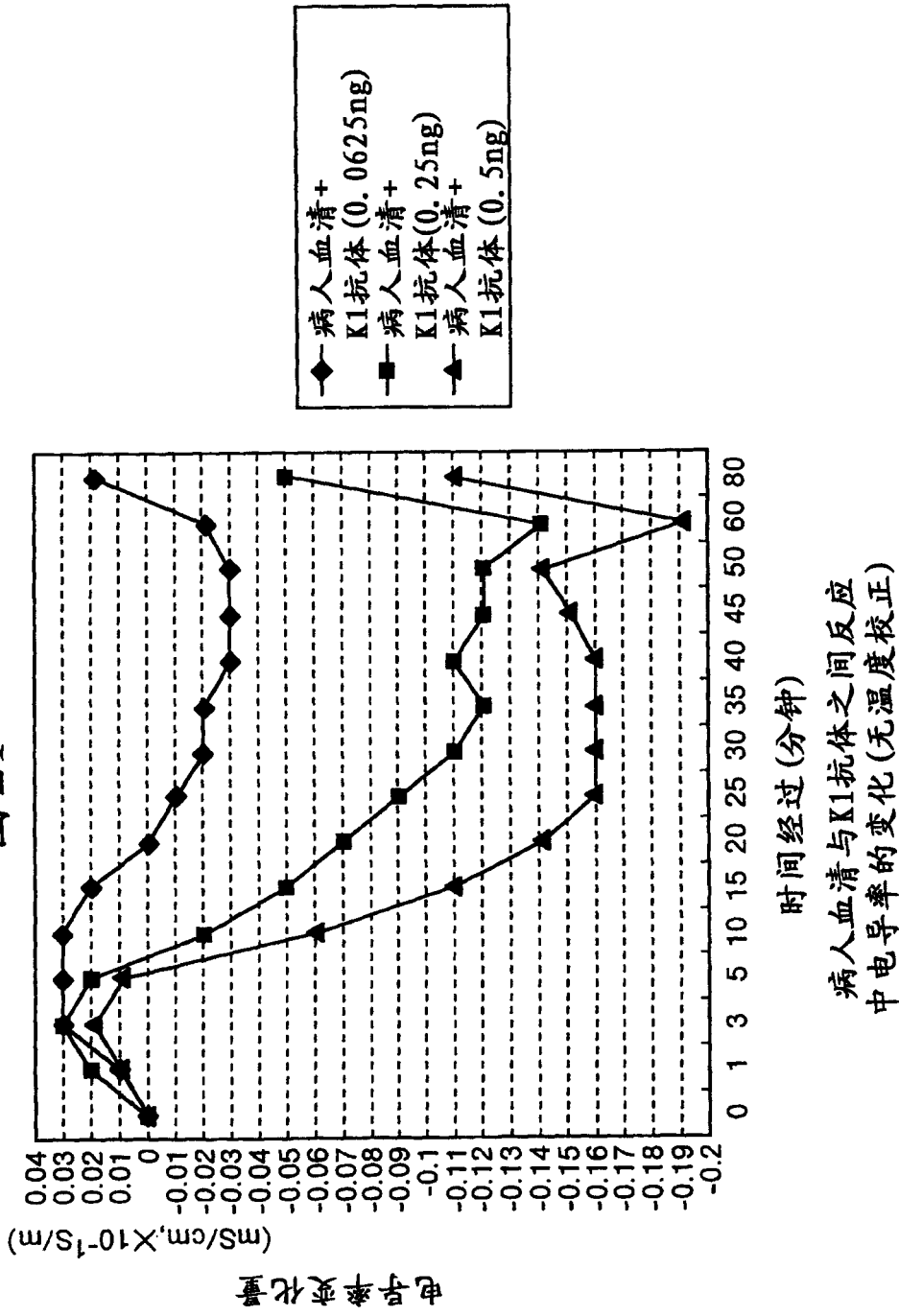
健康人血清与K1抗体 (0.5ng) 之间反应中电导率的变化量和温度系数(无温度校正)

图 20B



病人血清与K1抗体 (0.5ng) 之间反应中电导率的变化量和温度系数(无温度校正)

图21



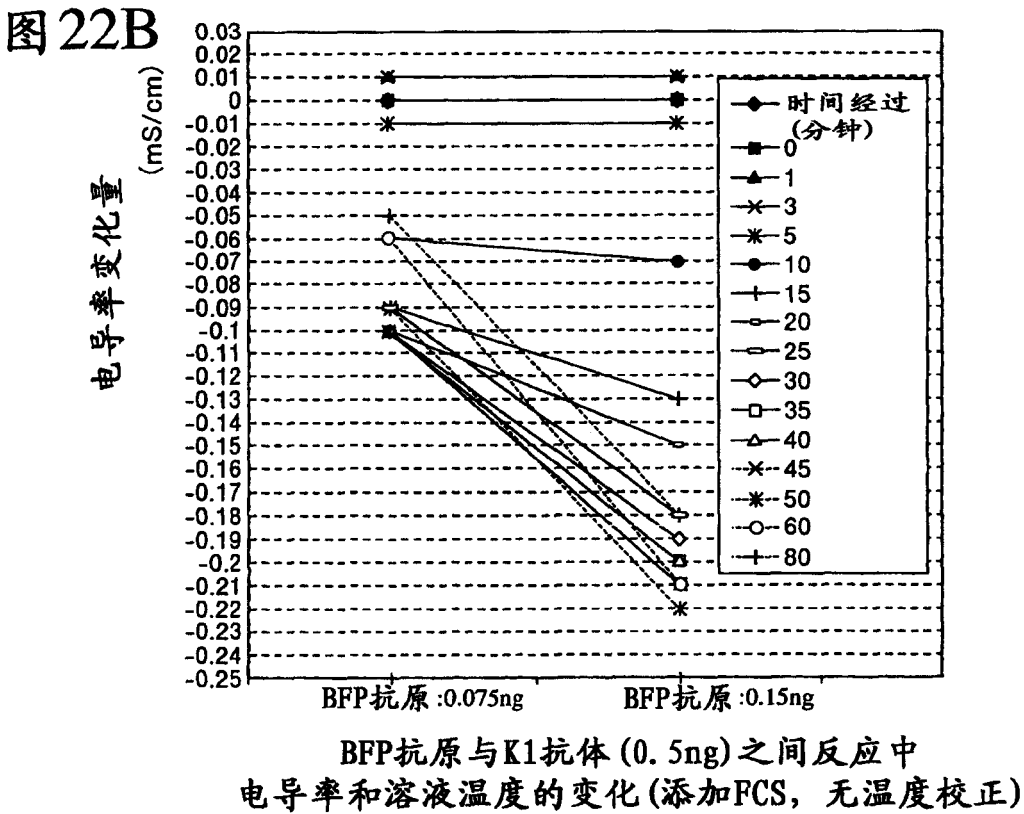
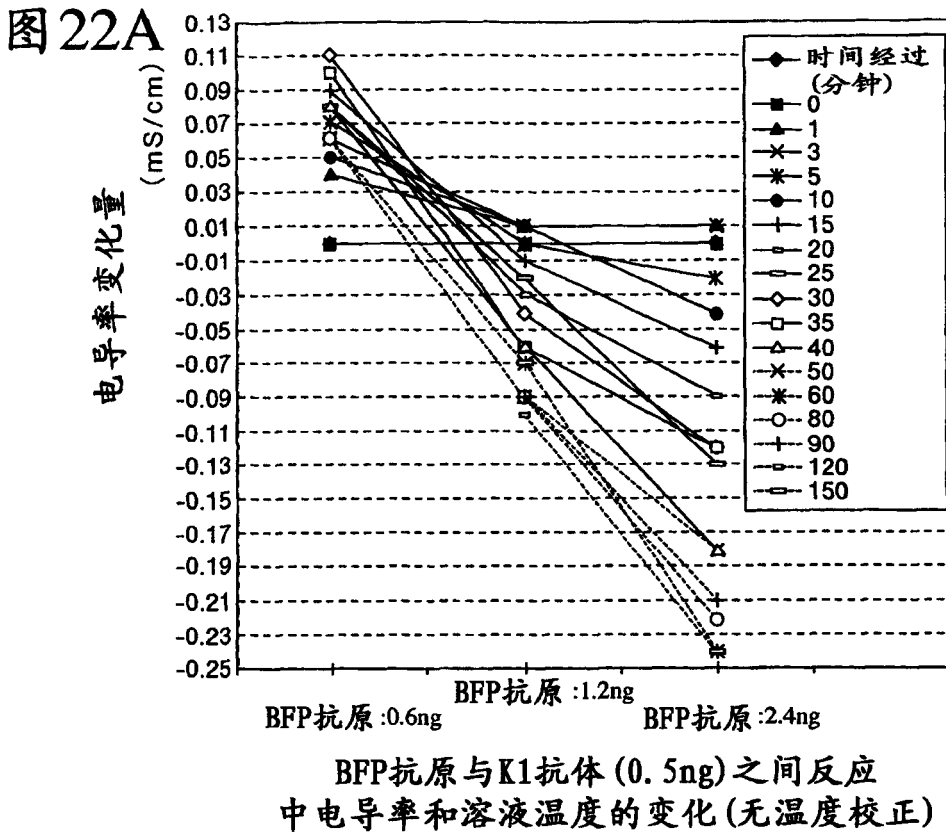


图 23

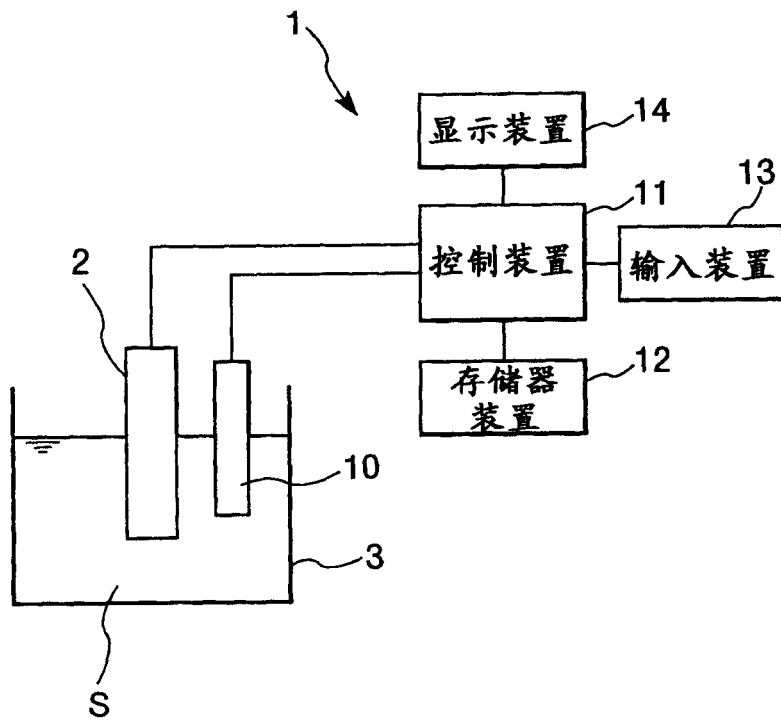


图 24

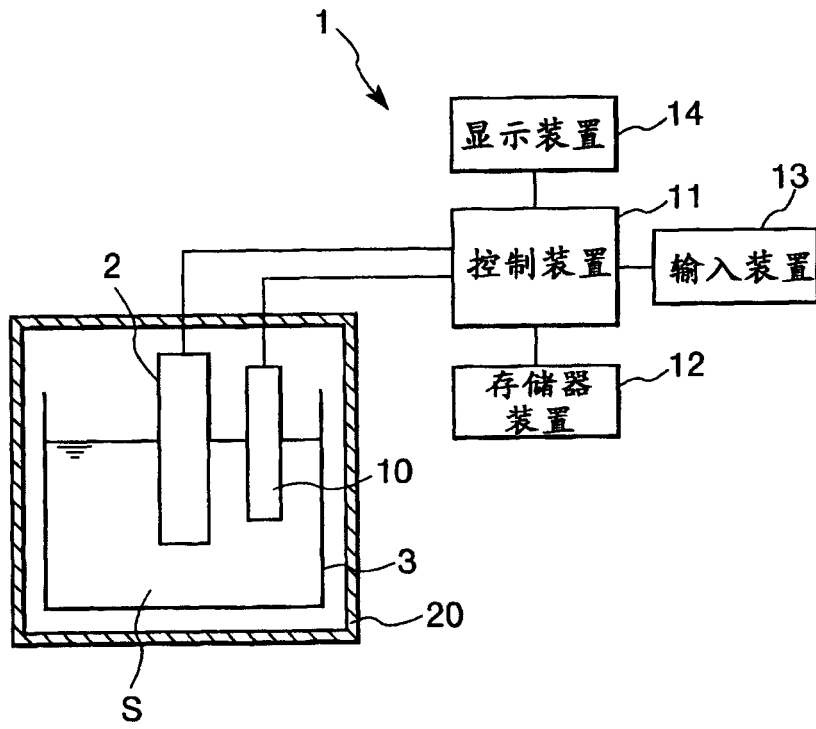
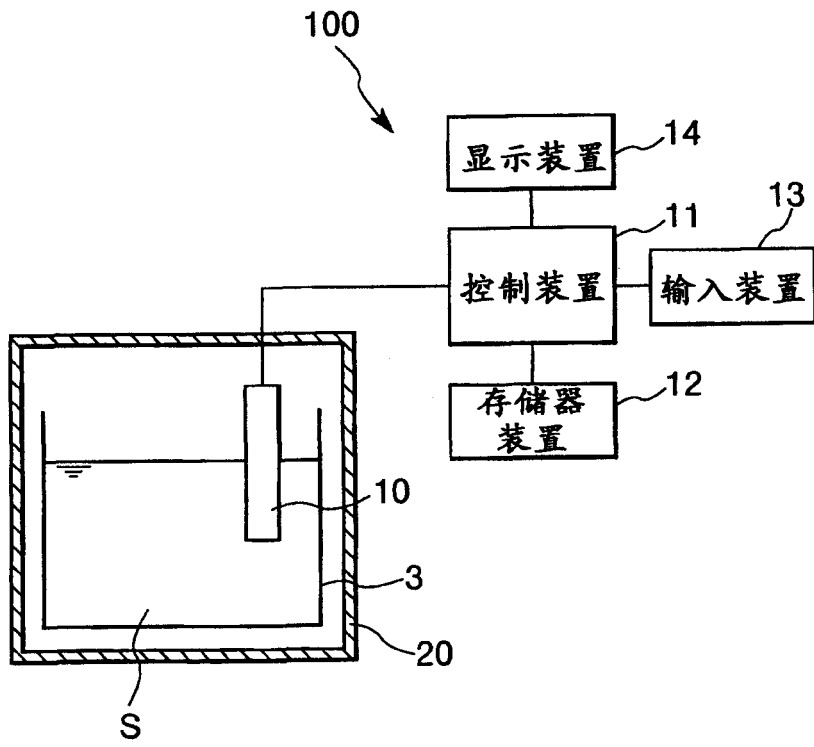


图 25



专利名称(译)	反应检测方法,免疫反应检测方法及其设备		
公开(公告)号	<a href="#">CN1461411A</a>	公开(公告)日	2003-12-10
申请号	CN01816027.1	申请日	2001-09-20
[标]发明人	清野祐子 石井胜 五津利雄		
发明人	清野祐子 石井胜 五津利雄		
IPC分类号	G01N27/02 G01N27/06 G01N33/487 G01N33/536 G01N33/483 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/021 G01N33/536		
优先权	2000286188 2000-09-20 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

根据本发明，能够简易而快速地检测物质的反应而无需昂贵和庞杂的设备或测量仪器。本发明的反应检测方法包括基于电解质溶液的电导率的测量，检测电解质溶液中物质的反应。提供了一种免疫反应检测方法，包括基于电解质溶液中电导率的测量，检测电解质中抗原与抗体之间的免疫反应。此外，提供了一种免疫反应检测方法，包括基于受检溶液温度的测量检测受检溶液中抗原与抗体之间的免疫反应。

