



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380100596.2

[45] 授权公告日 2009年5月27日

[11] 授权公告号 CN 100492008C

[22] 申请日 2003.12.9

[21] 申请号 200380100596.2

[30] 优先权

[32] 2002.12.10 [33] JP [31] 357459/2002

[32] 2002.12.16 [33] JP [31] 364195/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/015754 2003.12.9

[87] 国际公布 WO2004/053489 日 2004.6.24

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.19

[73] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府门真市

[72] 发明人 龟井明仁 河村达朗 汤川系子

[56] 参考文献

JP11-344494 1999.12.14

JP2-61561 1990.3.1

US5658725 1997.8.19

CN1194036 1998.9.23

JP6-82450 1994.3.22

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹 雯 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 18 页

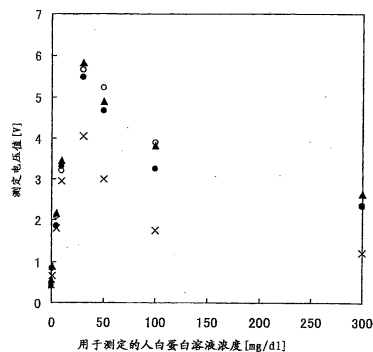
[54] 发明名称

免疫反应测定方法

[57] 摘要

本发明涉及测定试样中含有的抗原或抗体被测物的方法，该方法是将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中至少一种的化合物，与上述被测物特异性结合的特异结合物质——抗体或抗原与上述试样混合，得到酸性反应液，在该反应液中检测因上述被测物与上述特异结合物质结合的抗原抗体反应而产生的抗原-抗体复合物。由此可以提高测定值，使由于在抗原过剩区发生环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽。

● 0.05ML(-) - 苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
○ 0.05ML(+) - 酒石酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
▲ 0.05M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
× 0.05MMOPS, 4%重量 PEG6000, pH7.4



1. 免疫反应测定方法，该方法用于测定试样中含有的抗原或抗体被测物，其特征在于包含下述步骤：

(A) 将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ，式中 n 为 1-7 的整数，所表示的直链二元羧酸以及这些二元羧酸的盐中的至少一种化合物，以及可与上述被测物特异性结合的特异结合物质——抗体或抗原和上述试样混合，得到酸性反应液的步骤；其中，所述的具羟基的二元羧酸是苹果酸和酒石酸，上述具双键的二元羧酸是衣康酸；上述反应液的 pH 设定为 4.5-6.0；

(B) 在上述反应液中检测因上述被测物与上述特异结合物质的抗原抗体反应而产生的抗原-抗体复合物的步骤。

2. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中在上述步骤(A)中，在上述反应液中进一步混合缓冲剂。

3. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中所述的至少一种化合物选自苹果酸，酒石酸，衣康酸以及它们的盐；且上述反应液的 pH 设定为 4.5-5.0。

4. 权利要求 1 的免疫反应测定方法，其中所述的至少一种化合物选自化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ，式中 n 为 1-7 的整数，所表示的直链二元羧酸以及它们的盐，且上述反应液的 pH 设定为 5.0-6.0。

5. 权利要求 1-3 中任一项的免疫反应测定方法，其中上述反应液中上述的至少一种化合物的浓度设定为 0.1 M 或以下。

6. 权利要求 5 的免疫反应测定方法，其中上述反应液中上述的至少一种化合物的浓度设定为 0.01-0.1 M 的范围。

7. 权利要求 5 的免疫反应测定方法，其中上述反应液中上述的至少一种化合物的浓度设定为 0.01-0.05 M 的范围。

8. 权利要求 1-4 中任一项的免疫反应测定方法，其中上述反应液含有 2-6 重量%的聚乙二醇。

9. 权利要求 1-4 中任一项的免疫反应测定方法，其中上述抗原-抗体复合物为凝集复合物。

10. 权利要求 9 的免疫反应测定方法，该方法通过测定因上述凝集

复合物导致的光学变化量来检测上述凝集复合物。

11. 权利要求 10 的免疫反应测定方法，其中上述光学变化量是散射光强度的变化量。

12. 权利要求 1-4 中任一项的免疫反应测定方法，其中上述特异结合物质是含有单克隆抗体的抗体。

13. 权利要求 1-4 中任一项的免疫反应测定方法，其中上述特异结合物质含有至少两种单克隆抗体。

14. 权利要求 1-4 中任一项的免疫反应测定方法，其中上述抗原是人白蛋白。

15. 用于测定免疫反应的试剂，该试剂在测定试样中含有的抗原或抗体被测物的免疫反应测定方法中使用，其特征在于其包含选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ，式中 n 为 1-7 的整数，所表示的直链二元羧酸以及这些二元羧酸的盐中的至少一种化合物，和可与上述被测物特异性结合的特异结合物质——抗体或抗原；其中，所述的具羟基的二元羧酸是苹果酸和酒石酸，上述具双键的二元羧酸是衣康酸；上述反应液的 pH 设定为 4.5-6.0；

制备含有上述试样、上述化合物和上述特异结合物质的反应液时，要使上述反应液的 pH 为酸性。

16. 权利要求 15 的免疫反应测定试剂，其中还含有缓冲剂。

17. 权利要求 15 或 16 的免疫反应测定试剂，其中上述反应液中，上述的至少一种的化合物的浓度设定为 0.1 M 或以下。

18. 权利要求 15 或 16 的免疫反应测定试剂，其中上述反应液还含有聚乙二醇，上述聚乙二醇在上述反应液中的浓度为 2-6 重量%。

19. 权利要求 15 或 16 的免疫反应测定试剂，其中上述特异结合物质是含有单克隆抗体的抗体。

免疫反应测定方法

技术领域

本发明涉及对试样中含有的抗原或抗体被测物进行测定的免疫反应测定方法，以及其中使用的免疫反应测定试剂。

背景技术

在医疗领域，为了进行各种疾病的诊断和调查病状过程，对存在于人体液中的各疾病的特征性蛋白质含量进行调查，这得到了广泛的应用。

作为这些蛋白质含量的测定方法，利用特异性高的抗原抗体反应的免疫反应测定方法得到主要的、广泛的应用，目前，已开发和应用了利用各种原理的免疫反应测定方法。

其中，广为人知的有散射比浊法、透射比浊法和玻片凝集法等检测抗原抗体反应生成的凝集复合物的测定方法。这些方法是抗原和抗体在溶液中以同样分散的状态进行的，因此总称为均一体系的免疫反应测定方法。

这些反应都生成凝集复合物，反应液产生与抗原和抗体量相关的混浊。散射比浊法、透射比浊法是光学测定该混浊的方法，散射比浊法是依据反应体系中被散射掉的光量而测定混浊，透射比浊法是依据反应体系中因散射而减少的透射光量而测定混浊。通常可以使用同一个反应液(反应体系)作为两种方法的测定对象，由其中之一的方法测定的对象，也可用剩下的另一种方法进行测定。

玻片凝集法是在载波片上等通过目视等判定因凝集复合物的生成而产生的混浊的方法，可以使用与散射比浊法、透射比浊法相同的反应体系。

在上述目前的均一体系免疫反应测定方法中，为了促进抗原抗体反应，高灵敏度地测定微量成分，尝试使用了各种添加剂。已知的例子有使聚乙二醇(PEG)、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮或聚氯乙烯等水溶性高分子与反应体系混合，促进抗原抗体反应产生凝集复合物，缩短反应时间和提高测定灵敏度的方法已被证实。

这些水溶性高分子中，已知聚乙二醇可以以比较低的浓度获得高的效果，普遍采用以 2-6 重量%的浓度使用平均分子量 6000 的聚乙二醇的方法。特别是 4 重量%浓度产生的非特异性混浊少，效果高。

关于水溶性高分子对抗原抗体反应的促进效果，通常其分子量越大、所使用的水溶液的浓度越高，则促进效果越大。应用于抗原抗体反应的测定时，则抗原抗体反应的程度、即与抗原浓度相关的信号强度高，可保持良好的 S/N 比，可进行稳定的测定。但是，当希望通过进一步促进抗原抗体反应获得上述效果时，以往的水溶性高分子的添加需要添加更高浓度或高分子量的水溶性高分子。这样一来，由于溶解水溶性高分子的溶液的粘性增大，出现了分析操作困难的问题。

另外，已知在均一体系的免疫反应测定方法中通常出现被称为环带现象的现象。环带现象是指抗原和抗体中任一方过量存在，其量超过形成最大凝集复合物的当量区时，凝集复合物变得难以生成的现象。关于多价抗体与 2 价或以上的抗原之间的结合反应，Hidelberger 等人的格子假说是很有名的，例如在 William E. Paul 编的“Fundamental Immunology”1984 年和多田富雄监译“基础免疫学”1987 年，p.714-716 中有详细记载。

在实际的均一体系的免疫反应测定中，大多是使用抗体测定抗原浓度。另外，抗原浓度高时比低时，其测定值往往具有重要的意义。因此，因抗原过量而产生的环带现象大多会带来一些问题。在环带以外的区域，生成含有抗体与抗原交互结合形成的复合物的巨大分子链，当抗体浓度一定时，该分子链的量和大小随抗原浓度增加。通过光学变化量测定该分子链的量和大小，可以定量计算抗原浓度。另外，抗原-抗体复合物随着抗体和抗原的浓度的变化，作为溶液中的混浊和凝集物，足可以用肉眼进行确认，因此，可以通过目视等进行定性判定。

但是在抗原过剩区，抗原比抗体更过量地存在，结合部位被抗原所饱和的抗体的量增加。因此，之前所述的分子链难以生成，这种情况下的反应结果难以与抗原为低浓度时的反应结果进行区别。因此不能进行与抗原浓度相关的正确的定量或判定，另外，为了避免该问题，测定浓度范围也受到了限制。

有人提出了以下的方法作为改善该环带现象的方法。

例如日本特开平 09-089894 号公报中公开了在 pH 6.0-8.0 的中性条件下,使氯化钠浓度为 20-250 g/L,抑制免疫反应,不稀释被测定物地进行测定的方法;日本特开平 10-332694 号公报中公开了在 pH 3.5-5.5 的酸性条件或在 pH 9.0-12.0 的碱性条件下,使氯化钠浓度为 10-250 g/L,抑制免疫反应,不稀释被测定物地进行测定的方法。日本特开平 11-344494 号公报中提出了例如在 pH 7.4 的中性条件下,使氯化钠浓度为 0.05-0.08 M,使免疫反应的一方——抗体或抗原与不溶性载体颗粒结合,进行免疫学凝集反应,在该反应中,使选自苹果酸、戊二酸、己二酸、丁二酸和它们的盐以及酯中至少一种的二元羧酸以 1-20%重量在反应体系中含有的方法。

但是,上述公报中所述方法都有下述问题:在环带区以外的测定区域,免疫反应的测定值低。

因此本发明的目的在于鉴于上述问题,提供可容易地提高测定值的免疫反应测定方法、以及该测定方法中使用的免疫反应测定试剂。本发明的目的还在于提供可以放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象所导致的对测定范围的限定的免疫反应测定方法、以及该测定方法中使用的免疫反应测定试剂。

发明内容

本发明涉及免疫反应的测定方法,该方法测定试样中含有的抗原或抗体被测物,其特征在于包含下述步骤:

(A) 将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物(以下称为“特定化合物”),与上述被测物特异性结合的特异结合物质——抗体或抗原与上述试样混合,得到酸性反应液的步骤:

(B) 在上述反应液中检测因上述被测物与上述特异结合物质通过抗原抗体反应而产生的抗原-抗体复合物的步骤。

优选上述具羟基的二元羧酸是苹果酸和酒石酸,上述具双键的二元羧酸是衣康酸、富马酸和马来酸。

优选上述直链二元羧酸的亚甲基链的长度为 $n=1-7$ 的整数。

进一步优选在上述反应液中添加缓冲剂。

优选将上述反应液的 pH 设定为 4.0-6.0。

优选将上述反应液的 pH 设定为 4.5-6.0。

还可以将上述反应液的 pH 设定为 4.5-5.0。

也可以将上述反应液的 pH 设定为 5.0-6.0。

优选上述反应液中上述特定化合物的浓度设定为 0.1 M 或以下。

上述反应液中上述特定化合物的浓度还可以设定为 0.01-0.1 M 的范围。

上述反应液中上述特定化合物的浓度也可以设定为 0.01-0.05 M 的范围。

优选上述反应液含有 2-6 重量%的聚乙二醇。

优选上述抗原-抗体复合物为凝集复合物。

上述步骤(B)中, 优选通过测定因上述凝集复合物导致的光学变化量来检测上述凝集复合物。

优选上述光学变化量是散射光强度的变化量。

优选上述特异结合物质是含有单克隆抗体的抗体。

还优选上述特异结合物质是制备成一种或以上的单克隆抗体的混合物, 以便于生成凝集复合物。

优选上述抗原是人白蛋白。

本发明还涉及免疫反应测定试剂, 该免疫反应测定试剂是在测定上述试样中含有的抗原或抗体被测物的免疫反应测定方法中使用的, 其特征在于含有选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物(特定化合物), 与上述被测物特异性结合的特异结合物质——抗体或抗原; 制备上述被测物与上述特异结合物质发生抗原抗体反应时反应液的 pH 为酸性的试剂。

此时也优选上述具羟基的二元羧酸是苹果酸和酒石酸, 上述具双键的二元羧酸是衣康酸、富马酸和马来酸。

优选上述直链二元羧酸的亚甲基链的长度为 $n=1-7$ 的整数。

进一步优选上述免疫反应测定试剂含有缓冲剂。

优选上述免疫反应测定试剂制备成上述反应液的 pH 为 4.0-6.0。

该 pH 还可以为 4.5-6.0、4.5-5.0 或 5.0-6.0。

优选上述免疫反应测定试剂制备成使上述反应液中上述特定化合

物的浓度为 0.1 M 或以下。

还优选上述免疫反应测定试剂制备成使上述反应液中上述特定化合物的浓度为 0.01-0.1 M 的范围。

进一步优选上述免疫反应测定试剂制备成使上述反应液中上述特定化合物的浓度为 0.01-0.05 M 的范围。

还优选上述免疫反应测定试剂含有聚乙二醇，发生抗原抗体反应时上述聚乙二醇的浓度为 2-6 重量%。

优选上述特异结合物质是含有单克隆抗体的抗体。

优选上述特异结合物质制备成一种或以上的单克隆抗体的混合物，以便于生成凝集复合物。

优选上述抗原是人白蛋白。

附图简述

图 1 是表示本发明实施例 2 中的免疫反应测定结果的图。

图 2 是表示本发明实施例 3 中使用含有丙二酸等的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 3 是表示本发明实施例 3 中使用含有丁二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 4 是表示本发明实施例 4 中使用含有 L(-)-苹果酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 5 是表示本发明实施例 4 中使用含有 L(+)-酒石酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 6 是表示本发明实施例 4 中使用含有衣康酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 7 是表示本发明实施例 5 中使用含有丙二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 8 是表示本发明实施例 5 中使用含有丁二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 9 是表示本发明实施例 5 中的使用含有戊二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 10 是表示本发明实施例 5 中使用含有己二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 11 是表示本发明实施例 5 中使用含有庚二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 12 是表示本发明实施例 5 中使用含有辛二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 13 是表示本发明实施例 5 中使用含有壬二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 14 是表示本发明实施例 6 中使用含有 L(-)-苹果酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 15 是表示本发明实施例 6 中使用含有衣康酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 16 是表示本发明实施例 6 中使用含有丁二酸的试剂进行的免疫反应测定结果的图。

图 17 是表示本发明实施例 7 中的免疫反应测定结果的图。

图 18 是表示本发明实施例 8 中的免疫反应测定结果的图。

实施发明的最佳方式

本发明涉及可容易地提高测定值的免疫反应测定方法以及其中使用的免疫反应测定试剂。本发明特别涉及可以放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的免疫反应测定方法、以及其中使用的免疫反应测定试剂。

本发明人进行了深入的研究，结果发现：发生抗原抗体反应时，使选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物(特定化合物)与反应体系混合，使上述反应液保持酸性，可以提高抗原抗体结合的免疫反应测定值。还发现：可以放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定。

上述效果可能是基于以下的假说。在免疫透射比浊法、散射比浊法等均一体系的免疫反应测定中，通过抗原抗体反应生成凝集复合物。该生成包括因特异性抗原抗体反应而产生的暂时凝集和凝集复合物之间的二次凝集。上述特定化合物可能主要作用于凝集复合物之间的二次凝集。如果将凝集复合物视为一种胶体，则通常已知该凝集通过离子的作用而得到促进。多元羧酸离子是胶体凝集作用非常强的离

子，因此促进复合物之间的二次凝集。但是，由于多元羧酸的离子强度高，另一方面也对抗原抗体反应多少显示抑制作用。

在酸性条件下，上述特定化合物所具有的羧基的离解率降低，离子强度下降，对抗原抗体的抑制作用降低，凝集复合物的生成增加，因胶体的凝集作用使得凝集复合物之间的二次凝集变得明显。容易发生凝集复合物生成反应，测定值提高。另外，由于在抗原过剩区发生的环带现象所导致的对测定范围的限定得到放宽。

本发明的免疫反应测定方法是测定试样中含有的抗原或抗体被测物的免疫反应测定方法，其特征在于包含下述步骤：(A) 将选自具羧基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物，和与上述被测物特异性结合的特异结合物质——抗体或抗原添加到上述试样中，得到酸性反应液的步骤；以及(B) 在上述反应液中检测因上述被测物和上述特异结合物质的抗原抗体反应而生成的抗原-抗体复合物的步骤。

其中，上述反应液(反应体系)可以含有上述酸和它们的盐两者。

通过上述特定化合物使反应液具有缓冲能力，使反应液设定为酸性。这样，无需再添加其它使反应液为酸性的缓冲剂，且可有效地发挥提高上述免疫反应的测定值的效果。另外也可有效地发挥放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的效果。当然还可以向上述反应液中添加缓冲剂。

另外，本发明也涉及在测定上述试样中含有的抗原或抗体被测物的免疫反应测定方法中使用的试剂。即，本发明涉及免疫反应测定试剂，其特征在于含有上述特定化合物、与上述被测物特异性结合的特异结合物质——抗体或抗原；且该免疫反应测定试剂被制备成在上述被测物和上述特异结合物质发生抗原抗体反应时反应液为酸性。上述试剂也可以含有上述酸和它们的盐两者。

上述试剂制备成：通过上述特定化合物使反应液具有缓冲能力、且在被测物和特异结合物质发生抗原抗体反应时反应液为酸性。这样，无需再添加其它使反应液为酸性的缓冲剂，且可有效地体现提高上述免疫反应的测定值的效果。另外也可有效地体现放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的效果。上述试剂

还可以含有缓冲剂。

为了使上述反应液获得足够的缓冲能力，上述反应液中含有的上述特定化合物的浓度优选 0.01 M 或以上。从提高测定值的效果、以及放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定这样的角度考虑，优选为 0.1 M 或以下。为使这些条件均成立，优选 0.01-0.1 M，进一步优选 0.01-0.05 M。

因而，使用本发明的免疫反应试剂时，由于上述理由，上述反应液中含有的上述特定化合物的浓度可以为 0.1 M 或以下，优选 0.01-0.1 M，进一步优选 0.01-0.05 M。上述特定化合物可以以相对于水显示缓冲能力的浓度溶解于水中，这样提高免疫反应的测定值的效果大。另外，放宽使由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的效果大。

这里，本发明的免疫反应测定方法和免疫反应试剂中所用的具羟基二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐例如有 L(-)-苹果酸、D-苹果酸、DL-苹果酸、DL-苹果酸钠、L(-)-苹果酸钠、L(+)-酒石酸、DL-酒石酸、D(-)-酒石酸、中酒石酸一水合物、(+)-酒石酸钾-水(2/1)、(+)-酒石酸钠钾四水合物、(+)-酒石酸铵、(+)-酒石酸氢钾、(+)-酒石酸氢钠一水合物、(+)-酒石酸钠二水合物、衣康酸、衣康酸酐、富马酸、富马酸一钠、富马酸钠、富马酸亚铁、马来酸、马来酸酐、马来酸钠、马来酸二钠、丙二酸、丙二酸钠、丙二酸二钠、丙二酸铯、丙二酸二铯、丁二酸、丁二酸铵、丁二酸二钠、戊二酸、己二酸、己二酸铵、己二酸二铵、己二酸二钾、庚二酸、辛二酸、壬二酸等，可将它们单独或组合使用。

上述具羟基的二元羧酸例如优选苹果酸和酒石酸等。其中，从在更广泛的 pH 范围内获得提高抗原抗体结合的免疫反应测定值的效果和放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的效果来看，特别优选酒石酸。

上述具有双键的二元羧酸例如优选衣康酸、富马酸和马来酸等。其中，从溶解度更高、容易使反应液的 pH 稳定的角度考虑，优选衣康酸和马来酸。从提高抗原抗体结合的免疫反应测定值的效果和放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的效果

来看，特别优选衣康酸。

上述化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸优选亚甲基链的长度以 $n=1-7$ 的整数表示。用常用名具体表示，则优选丙二酸($n=1$)、丁二酸($n=2$)、戊二酸($n=3$)、己二酸($n=4$)、庚二酸($n=5$)、辛二酸($n=6$)、壬二酸($n=7$)等。其中，从在更广泛的 pH 范围内获得提高抗原抗体结合的免疫反应测定值的效果和放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的效果来看，特别优选丙二酸。

缓冲剂可以使用本领域公知的物质，例如有含有磷酸二氢钠和磷酸氢二钠等的磷酸系缓冲剂、乙酸钠、卡可酸钠以及 2-(N-吗啉代)乙磺酸等。

此时，上述反应液中含有的缓冲剂的量，可根据所用缓冲剂的种类、含有被测对象的试样(检体)量和相对于被测物质是抗原或抗体而对应供给抗体或抗原的供给反应体系的方法等，在无损本发明效果的范围内适当调整。

本发明的免疫反应测定方法中，优选将上述反应液的 pH 设定为 4.0-6.0。此时通过上述特定化合物提高免疫反应测定值的效果大。另外，放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的效果也大。更进一步优选将上述反应液的 pH 设定为 4.5-6.0。可以将上述反应液的 pH 设定为 4.5-5.0，也可以设定为 5.0-6.0。

优选本发明的免疫反应试剂制备成：与发生抗原抗体反应时的反应液混合时，上述反应液的 pH 为 4.0-6.0，进一步优选 4.5-5.0 或 5.0-6.0。

根据用途等，在不损害本发明的效果的范围内，可以根据不同用途向本发明的免疫反应测定方法中的反应液和免疫反应试剂中添加本领域公知的其它任意成分。例如采用散射比浊法、透射比浊法、玻片凝集法等均一体系的免疫反应测定方法时，可以向上述反应液和免疫反应试剂中添加聚乙二醇(PEG)。

从非特异性凝集少、测定灵敏度提高的效果大的角度考虑，优选在本发明的免疫反应测定方法中聚乙二醇含量为反应液的 2-6 重量%，进一步优选 4 重量%。同样，在本发明的免疫反应试剂中，优选上述成分在发生抗原抗体反应时的浓度为 2-6 重量%，进一步优选 4

重量%。

为了降低因抗原或抗体的自身凝集而生成的非特异性混浊，可以向上述反应液和免疫反应试剂中添加吐温 20、辛基葡糖苷、月桂基硫酸钠(SDS)、蔗糖单月桂酸酯或 CHAPS 等表面活性剂。从对抗原抗体反应的阻碍少的角度看，在本发明的免疫反应测定方法中，优选其含量为反应液的 0.3 重量%或以下，进一步优选 0.1 重量%或以下。

同样，本发明的免疫反应试剂中，优选其含量在发生抗原抗体反应时的浓度为 0.3 重量%或以下，特别优选为 0.1 重量%或以下。

适合本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂的测定系统并没有特定限定，从有望获得上述本发明的效果的角度看，特别优选具有在抗原过剩区发生环带现象的散射比浊法、透射比浊法、玻片凝集法等均一体系的测定系统。特别是因自动测定仪器而使测定得到普及的散射比浊法、透射比浊法可以省略或简略掉需要对在抗原过剩区发生的环带现象进行判定的步骤，因而优选。

本发明的免疫反应测定方法中，优选上述抗原-抗体复合物为凝集复合物。另外，在步骤(B)中，优选通过测定凝集复合物导致的光学变化量来检测上述凝集复合物。进一步优选光学变化量是散射光强度或透射光量的变化量。特别优选为可对凝集复合物的大小敏锐地反应的散射光强度的变化量。

可应用本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂的试样只要含有抗原或抗体被测物即可，例如有尿、血液等体液。另外，对于试样中含有的抗原或抗体被测物并没有特别限定，只要是通常可利用抗原抗体反应测定的物质即可，可以是任何物质。例如有蛋白质、核酸、脂质、细菌、病毒和半抗原等。其中，蛋白质是采用抗原抗体反应进行的临床检查上的主要测定对象，因此优选。

蛋白质例如有 LH (促黄体生成激素)、FSH (促卵泡激素)、hCG (人绒毛膜促性腺激素)等激素，各种免疫球蛋白类或亚类，补体成分，各种感染病症的标记物，CRP，白蛋白、类风湿因子和血型抗原等。其中特别优选人白蛋白。

具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐都具有螯合剂的作用，具有高效捕捉存在于反应液中的 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 等

二价和三价金属离子的性质。因此当抗原的分子结构内保有金属离子时，优选与该抗原特异性结合的抗体在金属离子从抗原中脱离出来时也仍然与该抗原特异性结合。这样，抗原的分子结构内保有金属离子、且即使因金属离子脱离而使抗原分子结构发生变化，仍可进行测定。

另外，当抗原在分子结构内保有金属离子、因金属离子脱离而使抗原分子结构发生变化时，可以向反应液内添加与抗原原来所保有的金属离子同样的金属离子，使得在反应液内发生抗原抗体反应时，该金属离子存在于反应液内。此时，在添加到反应液中的金属离子的量可以根据具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐的螯合能、浓度以及抗原所具有的金属离子保持能力等来设定。

本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂中所使用的抗体并没有特别限定，只要与抗原特异性结合即可，可以是 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 的任意类的抗体。其中，从非特异性反应少，且市售较多，容易获得的角度考虑，更优选 IgG 抗体。另外对于产生抗体的动物种类也没有特别限定，从比较容易获得，使用例也多的角度考虑，优选来自兔、山羊、小鼠的抗体。

特异结合物质可以任意使用多克隆抗体和单克隆抗体。即，可以将多克隆抗体和单克隆抗体单独或混合使用，但从可一直生成同样的抗体的角度考虑，优选含有单克隆抗体。更优选制备成一种或以上单克隆抗体的混合物，以便于生成凝集复合物。

单克隆抗体通过杂交瘤细胞株生成。杂交瘤细胞株是将生成抗体的 B 细胞和骨髓瘤细胞(骨髓瘤细胞)通过细胞融合而获得，由同时具有抗体生成能力和强的增殖能力的融合细胞集团中只分离出一个细胞，使其增殖而建立。因此它们生成的抗体的性状完全相同。另外杂交瘤细胞株的增殖能力强，可冷冻保存。因此，只要管理得当，就可永远在培养液或腹腔中培养杂交瘤细胞株，并通过纯化永久持续地获得相同性状的抗体。

另一方面，多克隆抗体可以通过将抗原给予动物，在血液中使与抗原结合的抗体大量表达，采集该血液的全部或部分，纯化而获得。因此，其性质与动物的个体差异、生长环境、状态等相关，难以持续获得相同性状的抗体。如上所述，通过使用单克隆抗体，可以总是使

用相同性状的抗体。因此，可以稳定地供应抗体作为试剂，结果可以使免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂导致的免疫反应测定结果的稳定性增加。

由单克隆抗体构成特异结合物质时应该满足的条件是：与抗原特异性结合，形成凝集复合物。即，当抗原与1种单克隆抗体有多个结合部位时，可通过1种单克隆抗体生成凝集复合物。但是，当抗原与1种单克隆抗体(第1单克隆抗体)只有1个结合部位时，至少需要使用两种单克隆抗体。第2单克隆抗体的条件是需要与抗原的其它部位结合，与上述第1单克隆抗体一起与抗原结合时，可生成凝集复合物。

本发明的免疫反应测定方法的一个例子如下所示。

首先，将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物添加到缓冲液中，其中所述缓冲液含有使后述的反应液为酸性、优选使反应液的 pH 设定为 4.0-6.0 的缓冲剂。

然后，将含有相对于抗原或抗体被测物的抗体或抗原的分散液或溶液以及试样(检体)的任意一方、和上述缓冲液混合，再将余下的另一方混进其中，制备反应液，测定该反应液中发生的免疫反应。

此时，反应液中化合物的浓度只要在可以提高测定值的效果、以及放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定的效果范围之内，则可以是任意的。优选上述化合物的浓度为 0.1 M，优选 0.01-0.1 M，进一步优选 0.01-0.05 M。另外上述化合物可以兼具缓冲剂的作用。

添加上述特定化合物的方法、为使上述反应液的 pH 保持酸性而添加缓冲剂的方法、以及调节上述反应液的 pH 的方法都不限定于上面所述的方法。例如，可以预先使上述特定化合物和缓冲剂满足上述条件地存在于含有相对于抗原或抗体被测物的抗体或抗原的溶液中。

本发明的免疫反应试剂的制备方法的一个例子如下所示。

分别制备相对于抗原或抗体被测物的抗体或抗原和上述特定化合物时，可分别如下制备。含有相对于抗原或抗体被测物的抗体或抗原的溶液只要可获得上述特定化合物的效果即可，可以是任意组成。

为了获得抗原抗体反应时使反应液保持酸性而需要的缓冲能力，优选含有上述化合物的溶液调节反应液的 pH 为 4.6-6.0。另外，反应

液中上述特定化合物的浓度只要在可获得提高测定值的效果和使由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽的效果范围之内即可。优选将缓冲剂和上述特定化合物混合，向所得混合物中加入纯水来调节浓度，使上述特定化合物的浓度为 0.1 M 或以下，优选 0.01-0.1 M，进一步优选 0.01-0.05 M。上述条件得到满足，则上述缓冲剂和上述特定化合物可在各自的溶液中分别存在。另外，也可以是上述特定化合物本身也兼具缓冲剂作用。

可以使上述特定化合物存在于含有相对于抗原或抗体被测物的抗体或抗原的溶液中。此时，为满足上述条件，可以用制备的含有上述特定化合物的溶液对含有相对于抗原或抗体被测物的抗体或抗原的溶液进行透析或凝胶过滤，置换低分子成分，以此来含有上述特定化合物。

如上所述，本发明的免疫反应测定方法和免疫反应测定试剂可以使选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物存在于免疫反应的反应体系中，使反应体系为酸性，提高抗原抗体结合的免疫反应的测定值。并且，还可使由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽。

现有的添加水溶性高分子的方法，在测定抗原抗体反应时，为了提高测定值、保持良好的 S/N 比以进行稳定的测定，需要添加更高浓度或更高分子量的水溶性高分子。因此，溶液的粘性增大，产生分析操作困难的问题。而本发明中使用的上述特定化合物的分子量低，因此溶液的粘性低，分析操作容易。

另外，通过放宽由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定，减轻高浓度被测物的测定值的降低幅度，可使测定值变高，扩大判定为阳性的区域，可扩大测定的浓度范围。

以下，具体说明本发明的实施例，但本发明并不只限定于这些实施例。虽然在以下的实施例中并未表示，但可以将抗体固定于胶乳、胶体金、磁性微粒等微粒载体上。另外可以在抗体上标记酶、色素、荧光物质、发光物质等。

本发明中，对抗体溶液的缓冲剂和 pH 并没有特别限定。例如试剂构成单组分系统时，为了在抗体溶液中含有选自具羟基的二元羧

酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数) 所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物且使反应体系的 pH 保持在酸性区域, 可以用含有上述特定化合物的酸性缓冲液进行透析。

另外, 在以下的实施例中使用 NaOH 调节 pH, 也可以使用 KOH、LiOH、 NH_4OH 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 或 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 等氢氧化物。另外, 在含有上述特定化合物的 10 种缓冲液的制备中, 使用了 L(-)-苹果酸、L(+)-酒石酸、衣康酸丙二酸、丁二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸和壬二酸。不过也可以使用上述的其它化合物作为特定化合物。

关于使用多种特定化合物时的 pH 的调节, 当化合物溶解于纯水时 pH 比目标 pH 偏于碱一侧时, 可以利用 HCl 等; 当偏于酸一侧时, 可以利用上述氢氧化物等进行调节。另外也可以调节上述特定化合物的混合比来进行。

实施例 1

本实施例中, 使用可在玻片凝集法、比浊法和散射比浊法测定中使用的抗体溶液以及含有缓冲液的试剂进行免疫反应测定, 其中所述缓冲液含有选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数) 所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物。

后述的缓冲液等的制备使用了用 Milli-Q SP TOC (Millipore 公司制造) 过滤的纯水。另外没有特别写明的盐和缓冲剂等试剂均使用和光纯药工业(株)制造的产品。聚乙二醇(PEG)6000 使用 1 级试剂, 除此之外使用特级试剂。

(1) 抗体溶液的制备

作为抗体溶液准备了使用兔抗人白蛋白多克隆抗体的溶液、和混合有 3 种小鼠抗人白蛋白单克隆抗体的溶液。

首先, 如下制备使用兔抗人白蛋白多克隆抗体的溶液。兔抗人白蛋白多克隆抗体是将人白蛋白对兔免疫, 由兔采集抗血清, 用 A 蛋白柱层析由抗血清纯化而得。填充柱子固定有 A 蛋白的凝胶采用 Amersham-Pharmacia 公司制造的产品。纯化中使用的平衡缓冲液使

用含有 1.5 M 甘氨酸和 3.0 M 氯化钠、pH 8.9 的缓冲液。洗脱缓冲液使用含有 0.1 M 柠檬酸、pH 4.0 的缓冲液。

纯化按照以下方法进行。使相当于填充于柱子的 5 倍凝胶容量的平衡缓冲液流过柱子，平衡柱子，然后将含有相当于 10-20% 柱子总结合容量的抗体的抗血清用平衡缓冲液稀释为 2 倍容量，流入柱子，使血清中的抗体与 A 蛋白结合。接着注入平衡液，洗柱子，直至柱子中不再流出未吸附到 A 蛋白上的血清成分。

将洗脱缓冲液注入柱子，使与 A 蛋白结合的抗体洗脱出来。将洗脱的抗体流分装入截止分子量 1 万的透析管中，用含有约 100 倍容量 0.05 M 的 3-(N-吗啉代)丙磺酸(Dojin 公司制造)(以下以 MOPS 表示)、0.15 M 氯化钠和 0.04 重量%的 NaN_3 、pH 7.4 的缓冲液透析数次，置换缓冲液成分。

接着，通过 280 nm 吸光度测定来推定抗体浓度，用与透析时使用的缓冲液相同的缓冲液调节，使抗体浓度为 3.0 mg/ml，以此作为抗体溶液。

接着如下制备将 3 种小鼠抗人白蛋白单克隆抗体混合使用的抗体溶液。

小鼠抗人白蛋白单克隆抗体使用抗体工业技术院生命工学工业技术研究所保藏号 FERM BP-7938 号细胞株(以下表示为 7938 株)所生成的单克隆抗体、以及 Biotest 研究所制备的 FU-301 和 FU-303。7938 细胞株所生成的单克隆抗体由小鼠腹水获得，经与上述同样的 A 蛋白柱层析纯化得到。向抗体溶液中混合各单克隆抗体时，7938 细胞株所生成的单克隆抗体为 0.0333 mg/ml、FU-301 为 0.0333 mg/ml、FU-303 为 0.0333 mg/ml，另外，抗体溶液中总单克隆抗体的终浓度约为 0.1 mg/ml。

上述制备的各抗体溶液的浓度和混合比并没有特别限定。另外，制备的抗体溶液可以在室温下保存，但从防止抗体变性的角度考虑，更优选低温保存，更优选 4℃ 下保存。

(2) 缓冲液的制备

缓冲液使用如下所示的 10 种化合物。

具羟基的二元羧酸使用 L(-)-苹果酸或 L(+)-酒石酸，具双键的二

元羧酸使用衣康酸，化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸使用丙二酸($n=1$)、丁二酸($n=2$)、戊二酸($n=3$)、己二酸($n=4$)、庚二酸($n=5$)、辛二酸($n=6$)、壬二酸($n=7$)。

含有 L(-)-苹果酸的缓冲液如下制备。称量 L(-)-苹果酸和聚乙二醇 6000，使 L(-)-苹果酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 4 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 4.5，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。

含有 L(+)-酒石酸的缓冲液如下制备。称量 L(+)-酒石酸和聚乙二醇 6000，使 L(+)-酒石酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 4 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 4.5，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。

含有衣康酸的缓冲液如下制备。称量衣康酸和聚乙二醇 6000，使衣康酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 4 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 4.5，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。

含有丙二酸的缓冲液如下制备。称量丙二酸和聚乙二醇 6000，使丙二酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 5 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 5.0，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。

含有丁二酸的缓冲液如下制备。称量丁二酸和聚乙二醇 6000，使丁二酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 5 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 5.0，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。

含有戊二酸的缓冲液如下制备。称量戊二酸和聚乙二醇 6000，使戊二酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 5 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 5.0，加入纯水，制备目标

体积的溶液，得到缓冲液。

含有己二酸的缓冲液如下制备。称量己二酸和聚乙二醇 6000，使己二酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 5 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 5.0，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。

含有庚二酸的缓冲液如下制备。称量庚二酸和聚乙二醇 6000，使庚二酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 5 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 5.0，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。

含有辛二酸的缓冲液如下制备。称量辛二酸和聚乙二醇 6000，使辛二酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 5 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 5.0，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。

含有壬二酸的缓冲液如下制备。称量壬二酸和聚乙二醇 6000，使壬二酸的终浓度为 0.05 M、聚乙二醇 6000 为 5 重量%，加入相当于最终得到的缓冲液体积的约 90% 体积的纯水，溶解上述物质。向所得溶液中添加 NaOH 水溶液，将 pH 调节为 5.0，加入纯水，制备目标体积的溶液，得到缓冲液。上述得到的各缓冲液在室温下保存。

实施例 2

本实施例中，将采用含有选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物的酸性反应体系的本发明对抗原抗体反应的效果，与免疫反应测定方法中通常使用的中性反应体系的效果进行了比较。与现有方法的比较是通过用免疫散射比浊法测定作为被测物的人白蛋白而进行。

试剂使用将含有与实施例 1 同样的 L(-)-苹果酸、L(+)-酒石酸或衣康酸的各缓冲液、含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液混合而得到的试剂。

用于比较的、形成中性反应体系的缓冲液使用含有 0.05 M MOPS 和 4 重量%聚乙二醇 6000、pH 为 7.4 的缓冲液。抗体溶液与上述相同。

将作为抗原的人白蛋白(和光纯药工业(株)制造)溶解于含 0.04 重量%NaN₃ 的 PBS 缓冲液(8g/L NaCl、0.2g/L KCl、1.15g/L Na₂HPO₄·12H₂O 和 0.2 g/L KH₂PO₄、PH 7.4), 使浓度为 0、1、5、10、30、50、100 或 300 mg/dl, 将由此得到的抗原溶液作为试样。

抗体溶液和试样(抗原溶液)在使用之前一直在 4℃ 保存, 各缓冲液在室温下保存。

测定装置使用以下装置。光源采用由 270Hz 调制的波长 680 nm、射出输出功率约为 15 mW 的半导体激光指向仪(Kikoh 技研(株)制造, 型号 MLXS-D-12-680-35)。检测器采用用于可见红外精密测光的硅光电二极管(浜松 Photonics (株)制造, 型号 S2387-66R)。样品皿采用用 0.1 cm 厚度的光学玻璃粘合、容量约为 200 μl 的正方形柱体。

在距光源 0.5 cm 的位置设置样品皿, 使其一个面与光源垂直。检测器设置于与光源成 90°角的方向、距样品皿 5.5 cm 的位置。为了防止杂散光射入检测器, 在检测器与样品皿之间设置遮光筒。由检测器检测的与光量相关的电流信号经由增幅电路增幅为 100 倍的电压信号, 其中所述增幅电路通过电流电压转换电路(106V/A)和运算放大器进行增幅。之后通过锁定放大器(NF Corporation 制造, 型号 5610B)进行相敏检波, 通过 GPIB 控制输入计算机。

对于各缓冲液, 各浓度的人白蛋白溶液的测定如下进行。反应液是将 178 μl 缓冲液、9 μl 人白蛋白溶液和 7 μl 抗体溶液混合得到。即, 反应液中, 抗体的终浓度约为 0.11 mg/ml, 人白蛋白的终浓度为用于测定的人白蛋白溶液浓度乘以 0.046。

首先, 在样品皿内加入上述容量的缓冲液和人白蛋白溶液, 搅拌混合。接着加入上述容量的抗体溶液, 搅拌混合, 得到反应液, 同时发生抗原抗体反应。散射光强度的测定由加入抗体溶液之前 10 秒时开始, 间隔 0.5 秒测定一次, 持续 300 秒。所得测定值为电压值。样品皿污染对测定的影响通过在测定各反应前向样品皿中加入纯水进行测定, 以此校正测定值而除去。求出 200-300 秒期间所得各时间下的测定值的平均值, 以此作为各浓度的人白蛋白溶液的测定值。测定在

室温(约 20℃)下进行。

其测定结果如图 1 所示。对于各缓冲液，将 300 mg/dl 以内的各浓度人白蛋白溶液的测定结果标记作图，如图 1 所示。纵轴表示电压值，横轴表示用于测定的人白蛋白溶液的浓度。标记的各值是由相对于各缓冲液得到的各浓度人白蛋白溶液的测定值中减去在相同缓冲液下不含人白蛋白时的测定值(0 mg/dl)所得的值。测定电压值高，则射入检测器的散射光多，反应体系的浊度高，显示抗原抗体反应形成较多的抗原-抗体复合物。

由图 1 可知，分别使用本实施例各缓冲液的情形(图 1 的 ●、○、▲)比使用比较例的缓冲液的情形(图 1 的 ×)可得到高的测定值。使用比较例的缓冲液(×)时，峰值出现在 30 mg/dl，随后因抗原过剩区发生环带现象而测定值减小。

而分别使用 0.05 M L(-)-苹果酸、L(+)-酒石酸和衣康酸的缓冲液(图 1 的 ●、○、▲)时，峰值也出现在 30 mg/dl，随后因抗原过剩区发生环带现象，测定值显示了同样的减小倾向。但是，可知通过测定值的提高，可在更广的抗原浓度范围内不受抗原过剩区发生的环带现象导致的测定值减小的影响进行测定。

本实施例的测定结果显示，在比较例的使用含有 MOPS 的缓冲液的情况(图 1 的 ×)下，人白蛋白溶液的浓度在 50 mg/dl 范围之内，可以不考虑在抗原过剩区发生的环带现象的影响进行测定。而在使用 L(-)-苹果酸、L(+)-酒石酸和衣康酸各缓冲液的情况下(图 1 的 ●、○、▲)，人白蛋白溶液的浓度在 100 mg/dl 范围之内，可以不考虑抗原过剩区发生的环带现象的影响进行测定，可知这比较例的可测定的浓度范围增宽了。

实施例 3

本实施例与上述实施例 2 同样，对于含有选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物的酸性反应体系对抗原抗体反应的效果，和免疫反应测定方法中通常使用的中性反应体系的情形进行了比较研究。与现有方法的比较通过用免疫散射比浊法测定作为被测物的人白蛋白进行。

将分别含有与实施例 1 同样的丙二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸或壬二酸的各缓冲液、含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液组合，将由此得到的溶液作为试剂。另外还使用将含有与实施例 1 同样的丁二酸的缓冲液和含有鼠抗人白蛋白单克隆抗体的抗体溶液组合得到的溶液。

作为比较例，用于形成中性反应体系的缓冲液使用含有 0.05 M MOPS 和 4 重量%聚乙二醇 6000、pH 为 7.4 的缓冲液。与含有丙二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸或壬二酸的各缓冲液进行对比时，抗体溶液使用含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液；与含有丁二酸的缓冲液对比时，抗体溶液使用含有小鼠抗人白蛋白单克隆抗体的抗体溶液。

作为试样使用的抗原溶液——人白蛋白溶液如下制备：将人白蛋白溶解于长浜尿液对照品(10 g/L 尿素、10 g/L NaCl、0.5 g/L 肌酸酐、0.2 g/L 丙酮溶解于蒸馏水中)中，使浓度分别为 0、5、10、30、50、100 或 300 mg/dl。抗体溶液和试样(抗原溶液)在使用之前一直在 4℃ 保存，各缓冲液在室温下保存。

测定装置采用如下装置。该装置与实施例 2 的原理相同，但结构不同。光源采用以 270Hz 调制的波长 785 nm、射出输出功率约为 20 mW 的半导体激光指向仪(Kikoh 技研(株)制造，型号 MLXS-D-12-785-70)。检测器采用用于可见红外精密测光的硅光电二极管(浜松 Photonics (株)制造，型号 S2387-66R)。样品皿采用用 0.1 cm 厚度的光学玻璃粘合、容量约为 600 μ l 的正方形柱体。

在距离光源 1 cm 的位置设置样品皿，使其一个面与光源垂直。检测器设置于与光源成 90°角的方向、距样品皿 1 cm 的位置。为了防止杂散光射入检测器，在检测器与样品皿之间设置遮光筒。由检测器检测的与光量相关的电流信号通过电流电压转换电路(106V/A)后再通过锁定放大器(NF Corporation 制造，型号 5610B)进行相敏检波，通过 GPIB 控制输入计算机。

关于各缓冲液，各浓度的人白蛋白溶液的测定如下进行。将 534 μ l 缓冲液、27 μ l 人白蛋白溶液和 21 μ l 抗体溶液混合得到反应液。即，反应液中，抗体的终浓度为用于测定的抗体溶液的浓度乘以约 0.036，人白蛋白的终浓度为用于测定的抗体溶液的浓度乘以约 0.046。

首先，在样品皿内加入上述容量的缓冲液和人白蛋白溶液，搅拌均匀。接着加入上述容量的抗体溶液，搅拌均匀，发生抗原抗体反应。7 分钟后，以 1 秒的间隔测定散射光强度 10 秒钟。所得测定值为电压值。样品皿污染对测定的影响通过在测定各反应前向样品皿中加入纯水进行测定，以此校正测定值而除去。求出如上得到的测定值的算术平均值，以此作为各浓度人白蛋白溶液的测定值。测定在室温(约 20 ℃)下进行。

其测定结果如图 2 和 3 所示。图 2 是使用分别含有丙二酸(●)、戊二酸(○)、己二酸(▲)、庚二酸(△)、辛二酸(■)、壬二酸(□)的各缓冲液以及含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液，将 300 mg/dl 以内的各浓度人白蛋白溶液的测定结果标记作图。纵轴表示电压值，横轴表示用于测定的人白蛋白溶液的浓度。标记的各值是由相对于各缓冲液得到的各浓度人白蛋白溶液的测定值中减去在相同缓冲液下不含人白蛋白时的测定值(0 mg/dl)所得的值。

由图 2 可知，除去空白值(人白蛋白浓度为 00 mg/dl 时)，使用本实施例的各缓冲液(图 2 的 ●、○、▲、△、■、□)比使用比较例的缓冲液(含有 0.05 M 的 MMOPS、5 重量%聚乙二醇的 pH7.4 的缓冲液)(图 1 的 ×)可得到高的测定值。另外因抗原过剩区发生环带现象，测定值在所有场合均显示减小倾向。但是，可知在实施例 3 中，基于与实施例 2 同样的理由，可在比比较例更广的抗原浓度范围内不受抗原过剩区发生环带现象导致的测定值减小的影响，进行测定。

图 3 是使用含有丁二酸的缓冲液和含有小鼠抗人白蛋白单克隆抗体的抗体溶液，将 300 mg/dl 以内的各浓度人白蛋白溶液的测定结果标记作图(●)。由图 3 可知，本实施例的使用含有丁二酸的缓冲液的情形(●)比比较例的使用缓冲液的情形(×)可得到高的测定值。因抗原过剩区发生环带现象，测定值在所有场合均显示减小倾向。这种情况下，也基于与实施例 2 同样的理由，可在更广的抗原浓度范围内不受抗原过剩区发生环带现象导致的测定值减小的影响，进行测定。

如上所述，由实施例 2 和实施例 3 表明：通过本发明的免疫反应测定方法，可以提高抗原抗体反应的测定值。还表明使由于抗原过剩区发生环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽。

并表明：通过使用本发明的免疫反应测定试剂，可以提高抗原抗

体反应的测定值。还表明使由于抗原过剩区发生环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽。

另外，对将抗体溶液、缓冲液和试样混合的顺序没有特别限定，混合比例可以根据所需要的抗原浓度测定范围来确定。

上述测定中，通过混合试剂和试样，与混合前相比，缓冲剂，选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物，以及聚乙二醇 6000 等添加剂得到稀释。但是，如果稀释后与稀释前的浓度相比，浓度差在约 10% 以内，则所得测定结果与按照稀释前的浓度所预想的结果没有大的差异，稀释带来的影响几乎没有。另外，为了避免稀释带来的浓度变化，考虑到混合导致的稀释，也可以在混合时制备成使试剂中各物质的浓度为目标浓度。

实施例 4

通过免疫散射比浊法研究由具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸分别显示出的对抗原抗体反应的效果与 pH 的相关性。

本实施例中对具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸进行了研究。具羟基的二元羧酸使用 L(-)-苹果酸和 L(+)-酒石酸；具双键的二元羧酸使用衣康酸。被测物使用人白蛋白。人白蛋白试样溶液与实施例 2 同样。抗体溶液与实施例 1 相同，使用含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液。

为了研究使用具羟基的二元羧酸时的 pH 相关性，制备含有 0.05 M L(-)-苹果酸和 4 重量%聚乙二醇 6000，pH 分别为 4.0、4.5 和 5.0 的各缓冲液。另外制备含有 0.05 M L(+)-酒石酸和 4 重量%聚乙二醇 6000，pH 分别为 4.0、4.5 和 5.0 的各缓冲液。

为了研究使用具双键的二元羧酸时的 pH 相关性，制备含有 0.05 M 衣康酸和 4 重量%聚乙二醇 6000，pH 分别为 4.0、4.5 和 5.0 的各缓冲液。

使用含有 0.05 M MOPS 和 4 重量%聚乙二醇 6000，pH 为 7.4 缓冲液作为比较例。抗体溶液使用与上述同样的含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液。

免疫反应的测定按照与实施例 2 同样的方法进行。

所得测定结果如图 4-6 所示。图 4 是对 L(-)-苹果酸的结果标记作图，图 5 是对 L(+)-酒石酸的结果标记作图，图 6 是对衣康酸的结果标记作图。纵轴表示电压值，横轴表示用于测定的人白蛋白溶液的浓度。

由图 4-6 可知：使用 pH 4.5-5.0 的含有 L(-)-苹果酸的缓冲液、pH 4.0-5.0 的含有 L(+)-酒石酸的缓冲液、和 pH 4.5-5.0 的含有衣康酸的缓冲液时，比使用比较例的缓冲液的情形(图 4-6 的 ×)显示高的测定值。另外可知抗原过剩区发生的环带现象导致的对测定范围的限定得到放宽。

由以上的结果可知：在使用含有具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸以及它们的盐的缓冲液进行的免疫反应测定方法中，要顾及这些化合物的 pH 特性，通过至少将反应体系的 pH 设定为 4.0-5.0 范围，可以提高抗原抗体反应的测定值。另外可知抗原过剩区发生的环带现象导致的对测定范围的限定得到放宽。

在含有具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸以及它们的盐的免疫反应测定试剂中，优选顾及这些化合物的 pH 特性，使制备的试剂在发生抗原抗体反应时反应液的 pH 设定在 4.0-5.0 之间。

实施例 5

本实施例中，通过免疫散射比浊法研究由化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)表示的直链二元羧酸显示出的对抗原抗体反应的效果与 pH 的相关性。上述直链二元羧酸使用丙二酸(n=1)、丁二酸(n=2)、戊二酸(n=3)、己二酸(n=4)、庚二酸(n=5)、辛二酸(n=6)和壬二酸(n=7)。

人白蛋白试样溶液与实施例 3 相同。抗体溶液与实施例 1 相同。

将后述的分别含有丙二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸的各缓冲液和与含有与实施例 1 相同的兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液混合，用作试剂。还将后述的含有丁二酸的缓冲液和含有与实施例 1 相同的小鼠抗人白蛋白单克隆抗体的抗体溶液混合使用。

为了研究使用丙二酸情况下与 pH 的相关性，制备含有 0.05 M 丙

二酸和 5 重量%聚乙二醇 6000, pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0 的各缓冲液。

为了研究使用丁二酸情况下与 pH 的相关性, 制备含有 0.05 M 丁二酸和 5 重量%聚乙二醇 6000, pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0 的各缓冲液。

为了研究使用戊二酸情况下与 pH 的相关性, 制备含有 0.05 M 戊二酸和 5 重量%聚乙二醇 6000, pH 分别为 4.5、5.0 和 6.0 的各缓冲液。

为了研究使用己二酸情况下与 pH 的相关性, 制备含有 0.05 M 己二酸和 5 重量%聚乙二醇 6000, pH 分别为 4.5、5.0、5.5 和 6.0 的各缓冲液。

为了研究使用庚二酸情况下与 pH 的相关性, 制备含有 0.05 M 庚二酸和 5 重量%聚乙二醇 6000, pH 分别为 4.5、5.0、5.5 和 6.0 的各缓冲液。

为了研究使用辛二酸情况下与 pH 的相关性, 制备含有 0.05 M 辛二酸和 5 重量%聚乙二醇 6000, pH 分别为 5.0、5.5 和 6.0 的各缓冲液。

为了研究使用壬二酸情况下与 pH 的相关性, 制备含有 0.05 M 壬二酸和 5 重量%聚乙二醇 6000, pH 分别为 5.0、5.5 和 6.0 的各缓冲液。

比较例中使用含有 0.05 M MOPS 和 5 重量%聚乙二醇 6000, pH 为 7.4 的缓冲液; 与含有丙二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸的各缓冲液进行对比时, 使用含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液作为抗体溶液; 与含有丁二酸的缓冲液进行对比时, 使用含有小鼠抗人白蛋白单克隆抗体的抗体溶液。免疫反应的测定按照与实施例 3 同样的方法进行。

所得测定结果如图 7-13 所示。图 7 是对使用丙二酸的结果标记作图, 图 8 是对使用丁二酸的结果标记作图, 图 9 是对使用戊二酸的结果标记作图, 图 10 是对使用己二酸的结果标记作图, 图 11 是对使用庚二酸的结果标记作图, 图 12 是对使用辛二酸的结果标记作图, 图 13 是对使用壬二酸的结果标记作图。纵轴表示电压值, 横轴表示人白蛋白溶液的浓度。

由图 7-13 可知, 使用 pH 4.5-6.0 的含丙二酸的缓冲液、pH 5.0-6.0 的含丁二酸的缓冲液、pH 5.0-6.0 的含戊二酸的缓冲液、pH 5.0-6.0 的含己二酸的缓冲液、pH 5.0-6.0 的含庚二酸的缓冲液、pH 5.0-6.0 的含辛二酸的缓冲液和 pH 5.0-6.0 的含壬二酸的缓冲液的情形, 比比较例的使用含 MOPS 的缓冲液的情形显示高的测定值。另外可知由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽。

由以上结果可知: 在使用含有化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐的缓冲液的免疫反应测定方法中, 顾及到这些化合物的 pH 特性, 通过至少将反应体系的 pH 设定为 4.5-6.0 范围, 可以提高抗原抗体反应的测定值。另外可知由于在抗原过剩区发生的环带现象导致的对测定范围的限定得到放宽。

在使用含有化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐的免疫反应测定试剂中, 通过顾及这些化合物的 pH 特性, 优选将试剂制备成发生抗原抗体反应时反应液的 pH 设定在 4.5-6.0 之间。

如上所述, 实施例 4 和 5 表明: 在本发明的免疫反应测定方法中, 通过使用选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的化合物, 可以保持提高上述免疫反应的测定值的效果和使由于在抗原过剩区产生的环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽的效果, 同时可将反应体系的 pH 设定在 4.0-6.0。

另外表明: 在本发明的免疫反应测定试剂中, 通过使用选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物, 可将试剂制备成发生抗原抗体反应时的 pH 在 4.0-6.0 之间。

实施例 6

以下研究选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物所显示出的对抗原抗体反应的效果与浓度的相关性。

人白蛋白溶液与实施例 3 相同。另外, 抗体溶液使用与实施例 1

相同的含兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液。

缓冲液分别使用 L(-)-苹果酸、衣康酸和丁二酸按如下所示方法制备。

为了研究使用 L(-)-苹果酸情况下与浓度的相关性，制备含有 4 重量%聚乙二醇 6000、pH 为 5.0，分别含有 0.01、0.02、0.05、0.1 和 0.2 M 的 L(-)-苹果酸的各缓冲液。

为了研究使用衣康酸时的效果与浓度的相关性，制备含有 4 重量%聚乙二醇 6000、pH 为 5.0，分别含有 0.01、0.02、0.05、0.1 和 0.2 M 衣康酸的各缓冲液。

为了研究使用丁二酸时的效果与浓度的相关性，制备含有 4 重量%聚乙二醇 6000、pH 为 5.0，分别含有 0.01、0.02、0.05、0.1 和 0.2 M 丁二酸的各缓冲液。使用含有 0.05 M MOPS 和 4 重量%聚乙二醇 6000、pH 为 7.4 的缓冲液作为比较例。抗体溶液使用兔抗人白蛋白单克隆抗体。

免疫反应的测定按照与实施例 3 同样的方法进行。

所得测定结果如图 14-16 所示。图 14 是对使用 L(-)-苹果酸的结果标记作图，图 15 是对使用衣康酸的结果标记作图，图 16 是对使用丁二酸的结果标记作图。纵轴表示电压值，横轴表示人白蛋白溶液的浓度。

由图 14-16 可知，在本实施例中所研究的浓度范围内，在任何情况下，选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物的浓度在 0.01-0.1 M 的范围内，都比使用比较例的含 MOPS 的缓冲液的情况显示高的测定值。另外可知由于在抗原过剩区发生的环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽。

以上结果可知：本发明的免疫反应测定方法中，优选将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物的浓度设定在 0.1 M 或以下。另外可知通过上述化合物使反应液具有缓冲能时，优选上述浓度设定为 0.01-0.1 M。

与以上同样，可知优选将本发明的免疫反应测定试剂制备为在发生抗原抗体反应时，选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化

学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中的至少一种化合物的浓度设定在 0.1 M 或以下。另外可知通过上述化合物使反应液具有缓冲能时, 优选将试剂制备为上述浓度设定在 0.01-0.1 M。

实施例 7

通过免疫散射比浊法验证将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1): $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐的化合物混合使用时对抗原抗体反应的效果。

使用人白蛋白作为被测物。人白蛋白溶液的制备按照与实施例 2 同样的方法进行, 浓度为 0、5、10、20、30、50、70、100、200 和 300 mg/dl。抗体溶液与实施例 1 同样, 使用含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液。

缓冲液分别使用含有丁二酸、和 L(-)-苹果酸、L(+)-酒石酸、衣康酸、富马酸和马来酸其中之一, pH 设定为 4.5 的溶液。pH 为 4.5 时, 丁二酸没有效果, 容易验证 L(-)-苹果酸、L(+)-酒石酸、衣康酸、富马酸和马来酸所产生的效果。比较例使用只含丁二酸的缓冲液。表 1 表示缓冲液的组成和 pH。

表 1

	组成	pH
1	0.02 M L(-)-苹果酸、0.1 M 丁二酸 4 重量%聚乙二醇 6000	4.5
2	0.02 M L(+)-酒石酸、0.1 M 丁二酸 4 重量%聚乙二醇 6000	4.5
3	0.02 M 衣康酸、0.1 M 丁二酸 4 重量%聚乙二醇 6000	4.5
4	0.02 M 富马酸、0.1 M 丁二酸 4 重量%聚乙二醇 6000	4.5
5	0.02 M 马来酸、0.1 M 丁二酸 4 重量%聚乙二醇 6000	4.5
比较	0.12 M 丁二酸 4 重量%聚乙二醇 6000	4.5

使用荧光分光光度计(岛津制作所(株)制造、型号 RF-5300PC)进行测定。荧光分光光度计的样品室设有恒温样品皿(岛津制作所(株)制造、型号 206-15440),与恒温水槽(TAITEC (株)制造、商品名 COOLNIT BATH EL-15)连接。其中循环温度保持 25℃的水,使测定时的温度保持恒定。荧光分光光度计的测定条件设定为:激发、荧光波长均为 670 nm,荧光、激发的狭缝宽度均为 3 nm,灵敏度为高灵敏度。

测定如下进行。将 2.87 ml 缓冲液和 0.1 ml 抗体溶液搅拌混合,然后向其中加入 0.03 ml 的人白蛋白溶液,搅拌混合,得到反应液。即反应液中的抗体和人白蛋白的终浓度为:抗体约为 0.10 mg/ml,人白蛋白为用于测定的人白蛋白溶液浓度乘以 0.01。将其装入荧光分析用的石英比色杯中,同时设置于荧光分光光度计上,将 T 型电热对(RS Components 公司、型号 219-4696)浸渍于比色杯内。混合人白蛋白后经过 2 分钟,由该时刻开始,测定时间曲线(クイムコース),每间隔 0.04 秒测定一次,测定 300 秒。

通过将 T 型电热对连接到数字式多功能热监测仪(Advantest (株)制造、型号 TR2114),对测定中比色杯内温度进行监控。对与皿污染的影响,在各反应测定之前向比色杯内装入纯水进行测定,以此进行校正、除去。求出由测定得到的 200-300 秒之间各测定值的平均值,以此作为对各浓度人白蛋白溶液的测定值。为了研究将各缓冲液、抗体溶液和各浓度的人白蛋白溶液混合而制成的反应液对 pH 的影响,在测定结束后用 pH 仪测定混合液的 pH。

结果,用于各测定的含有各缓冲液、抗体溶液、各浓度的人白蛋白溶液的混合液的 pH 均与缓冲液的 pH 相同。由热电对测定的各测定过程中比色杯内的温度保持在 $25.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

测定结果如图 17 所示。向各缓冲液加入最高为 300 mg/dl 的各人白蛋白溶液进行测定,将结果标记作图,如图 17 所示。纵轴表示散射光强度,横轴表示用于测定的人白蛋白溶液的浓度。

本实施例的使用含有 L(-)-苹果酸、L(+)-酒石酸、衣康酸、富马酸和马来酸的缓冲液的情形,与比较例的使用只含有丁二酸的缓冲液的情形相比,测定值得到提高。另外由于在抗原过剩区发生环带现象而导致的对测定范围的限定也得到放宽。

以上的结果表明：对于抗原抗体反应，将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们盐的化合物混合使用时，与单体使用时显示同样的效果。

实施例 8

下面通过免疫散射比浊法，对于将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们盐的化合物混合使用时对抗原抗体反应显示效果的 pH 的范围是否会因协同作用而具有扩大的效果进行研究。

使用人白蛋白作为被测物。人白蛋白溶液与实施例 3 相同。抗体溶液使用与实施例 1 相同的含有兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液。

使用含有 0.025 M 的 L(+)-酒石酸、0.025 M 的丁二酸以及 4 重量%聚乙二醇 6000，pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0 的各缓冲液作为缓冲液。分别单独使用 L(+)-酒石酸、丁二酸时，在实施例 4 和实施例 5 所研究的范围内，L(+)-酒石酸的有效 pH 为 4.0-5.0，丁二酸的有效 pH 为 5.0-6.0。

作为比较例，使用含有 0.05 M MOPS 和 4 重量%聚乙二醇 6000，pH 7.4 的缓冲液；使用含有与上述同样的兔抗人白蛋白多克隆抗体的抗体溶液作为抗体溶液。

免疫反应的测定按照与实施例 3 同样的方法进行。

所得测定结果如图 18 所示。纵轴表示电压值，横轴表示用于测定的人白蛋白溶液的浓度。

使用含有 L(+)-酒石酸和丁二酸的缓冲液时，对抗原抗体反应有效的 pH 为 4.5-6.0，与使用分别单独含有的缓冲液的情形相比，有效 pH 的范围扩大了。

以上表明，通过将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐的各化合物的特性组合，可以扩大有效 pH 的范围。

产业实用性

如上所述，本发明可提供可容易地提高测定值的免疫反应测定方法和其中使用的免疫反应测定试剂。并且可提供可使由于在抗原过剩区发生环带现象而导致的对测定范围的限定被放宽的免疫反应测定方法以及其中使用的免疫反应测定试剂。

- 0.05ML(-) - 苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- 0.05ML(+) - 酒石酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.05M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- × 0.05MMOPS, 4%重量 PEG6000, pH7.4

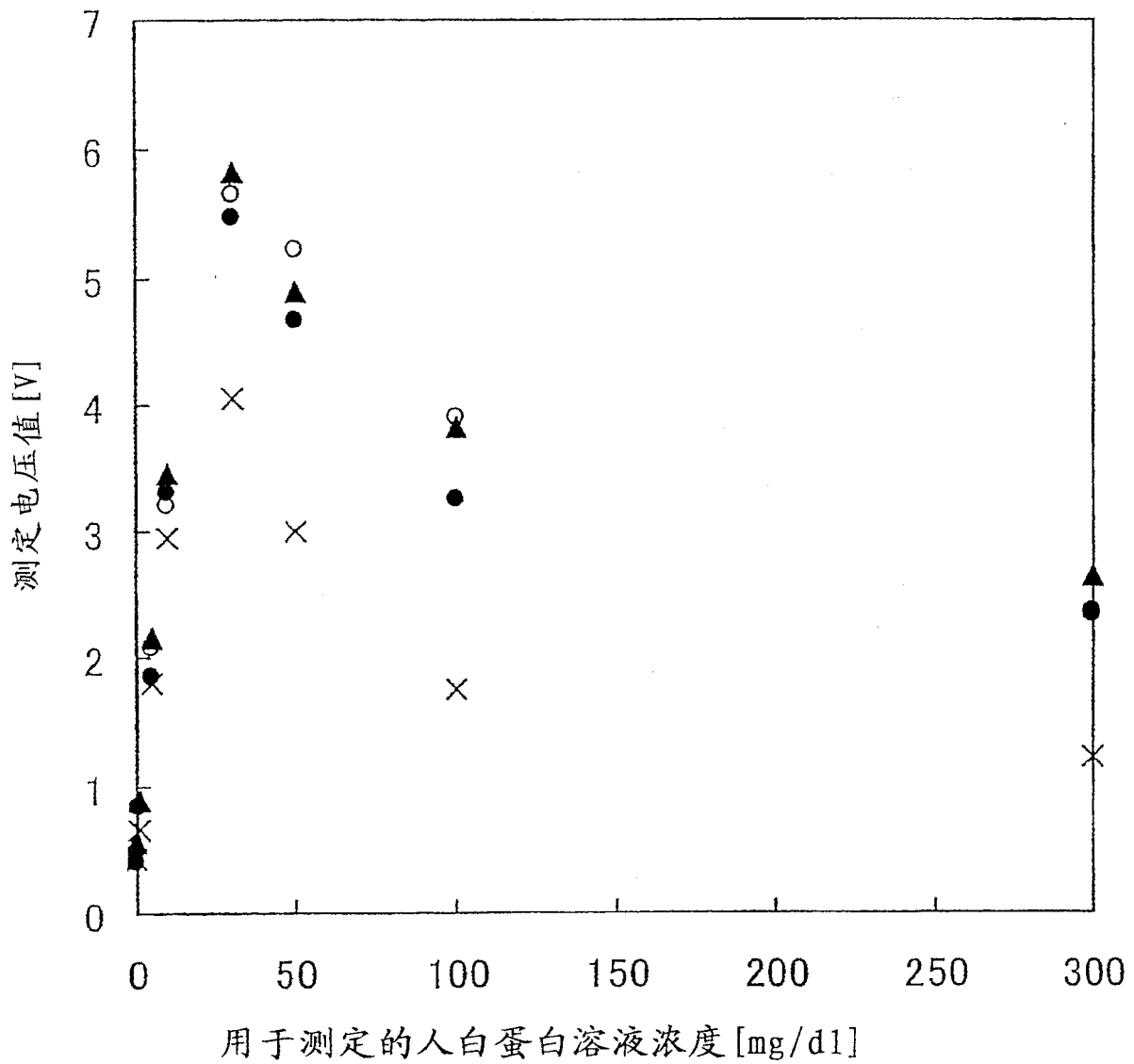


图 1

- 0.05M 丙二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.05M 戊二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- ▲ 0.05M 己二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.05M 庚二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.05M 辛二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.05M 壬二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- × 0.05M MOPS, 5%重量 PEG6000, pH7.4

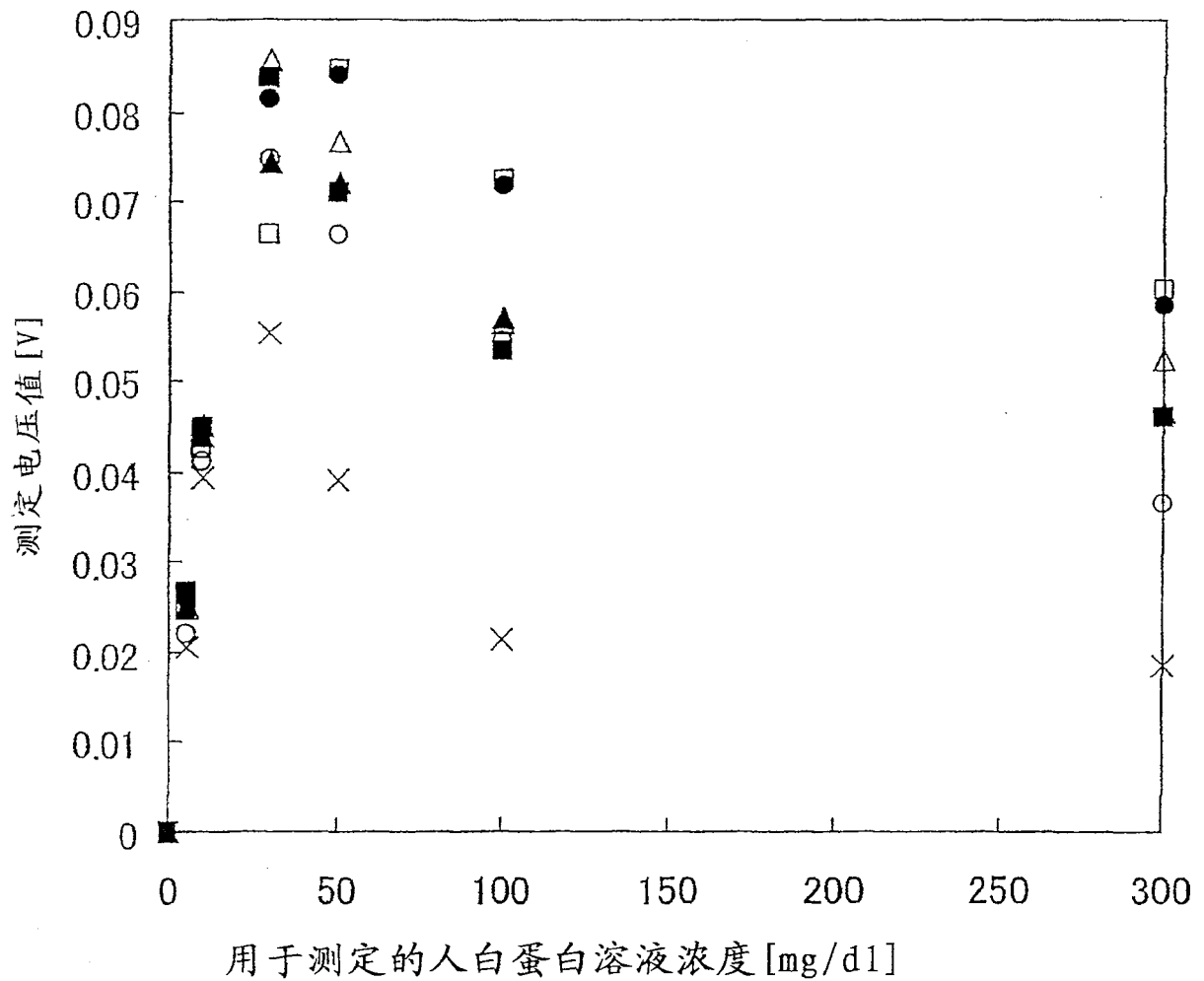


图 2

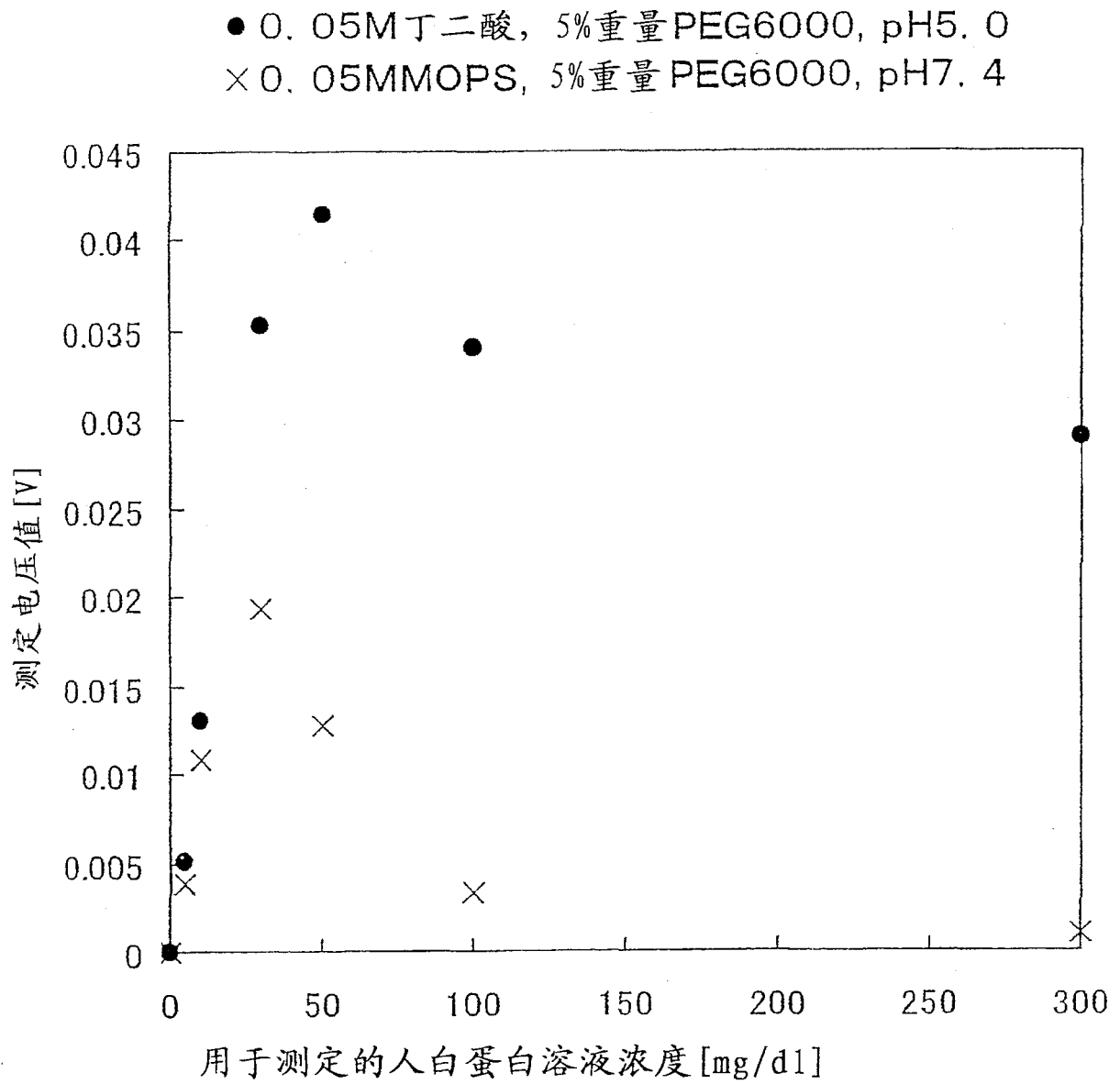


图 3

- 0.05ML(-)-苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH4.0
- 0.05ML(-)-苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.05ML(-)-苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- × 0.05MMOPS, 4%重量 PEG6000, pH7.4

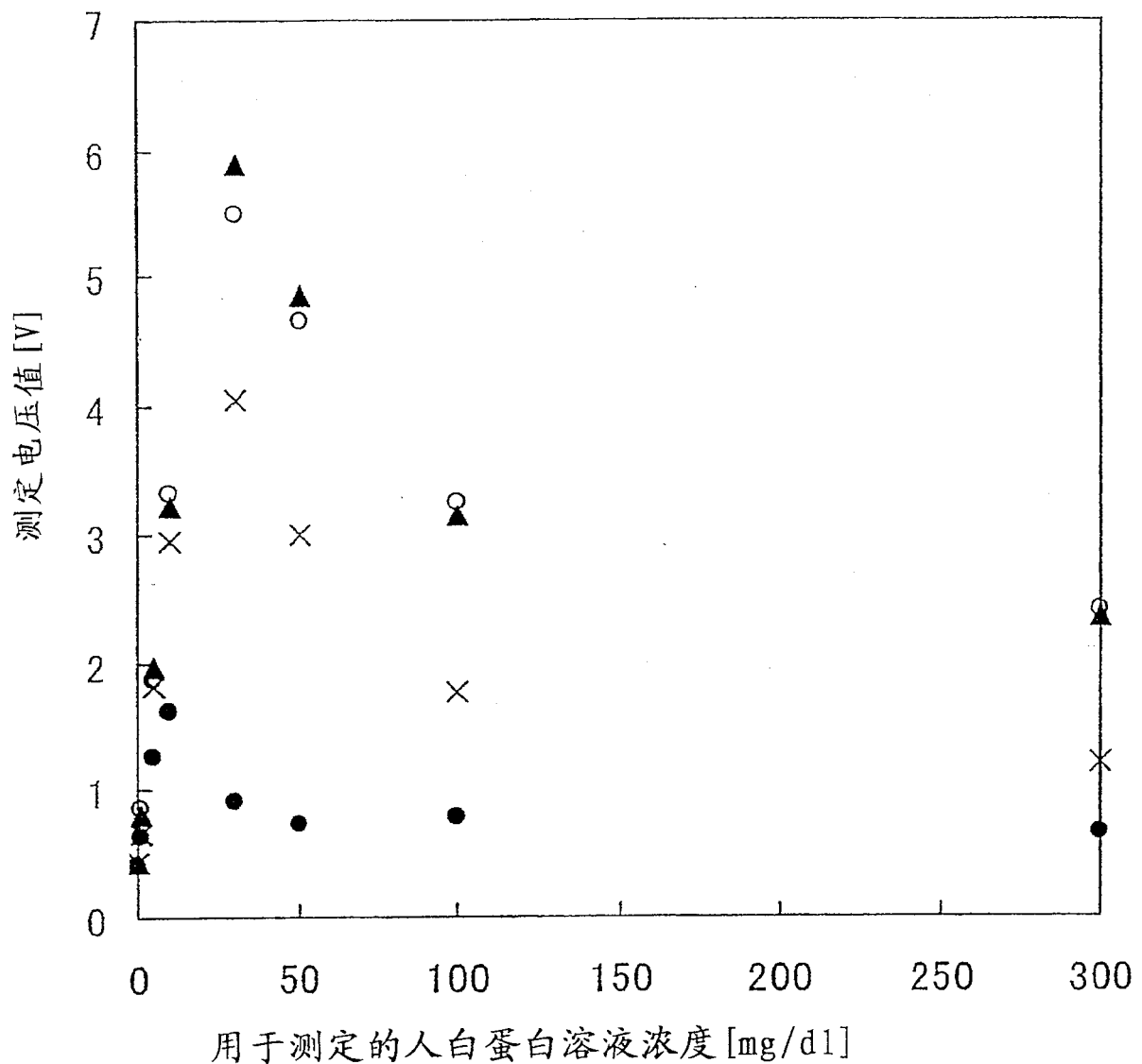


图 4

- 0.05ML(+)—酒石酸, 4%重量PEG6000, pH4.0
- 0.05ML(+)—酒石酸, 4%重量PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.05ML(+)—酒石酸, 4%重量PEG6000, pH5.0
- × 0.05MMOPS, 4%重量PEG6000, pH7.4

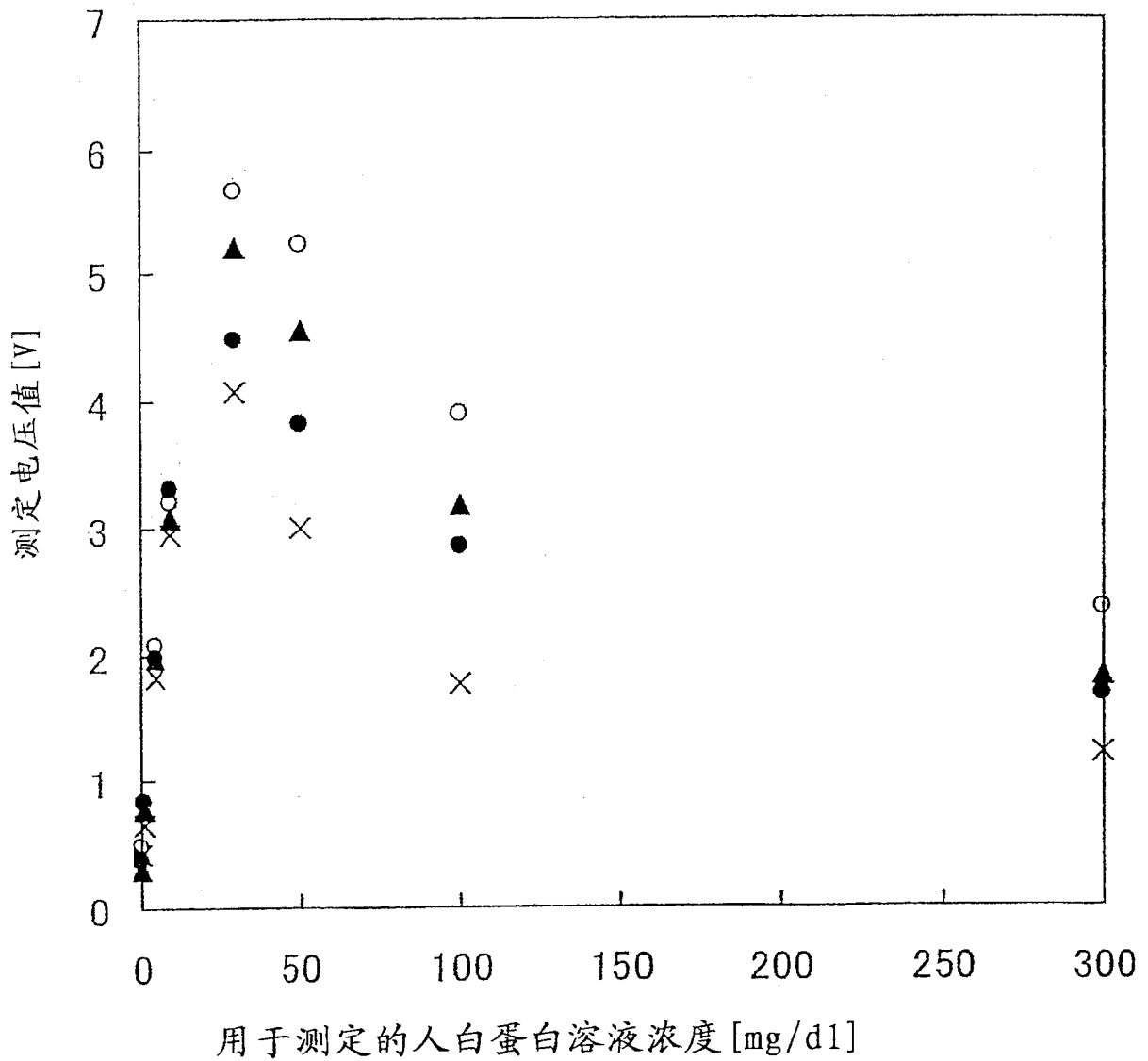


图 5

- 0.05M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH4.0
- 0.05M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.05M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- × 0.05M MOPS, 4%重量 PEG6000, pH7.4

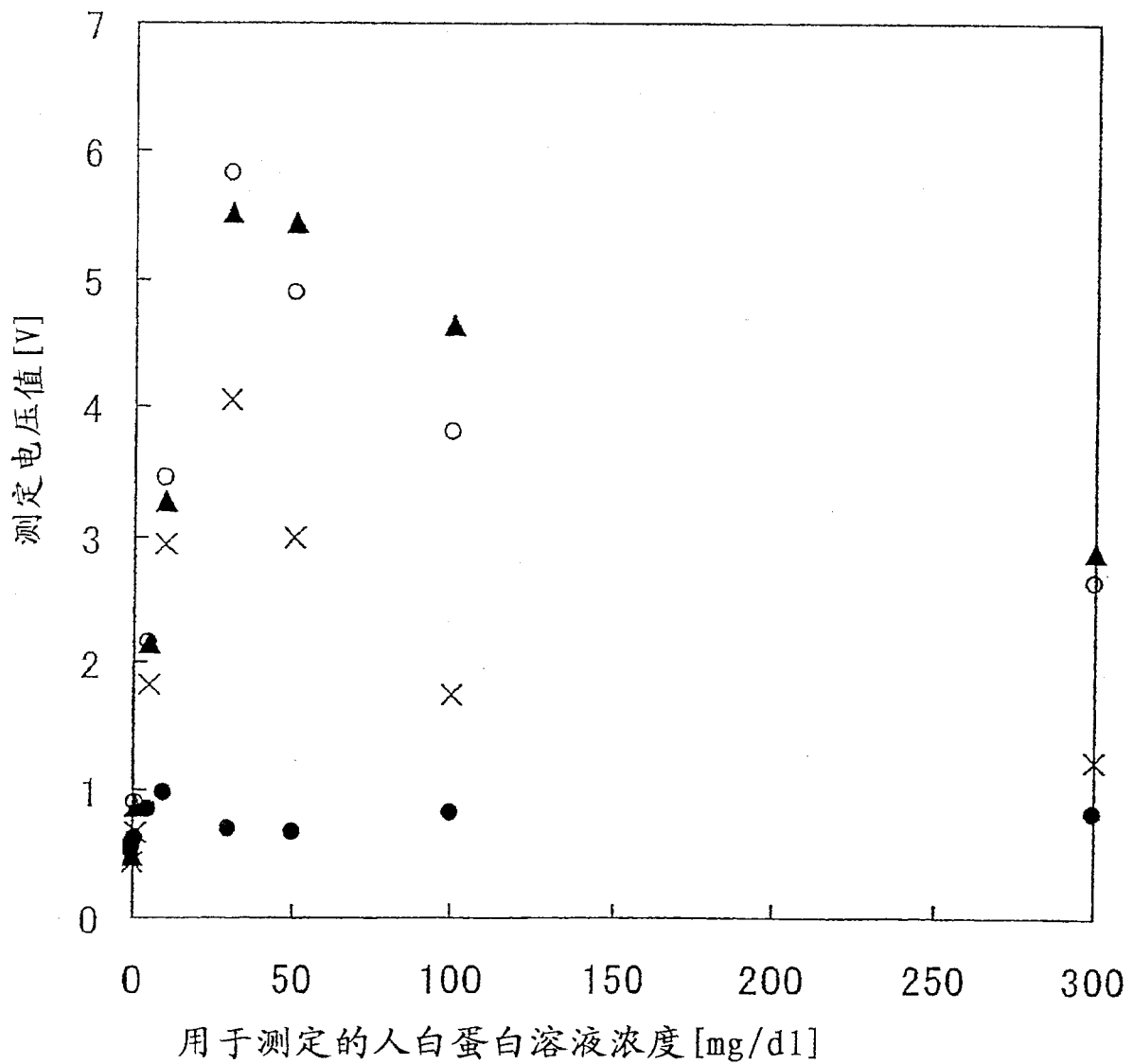


图 6

- 0.05M丙二酸, 5%重量 PEG6000, pH4.0
- 0.05M丙二酸, 5%重量 PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.05M丙二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.05M丙二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.5
- 0.05M丙二酸, 5%重量 PEG6000, pH6.0
- × 0.05MMOPS, 5%重量 PEG6000, pH7.4

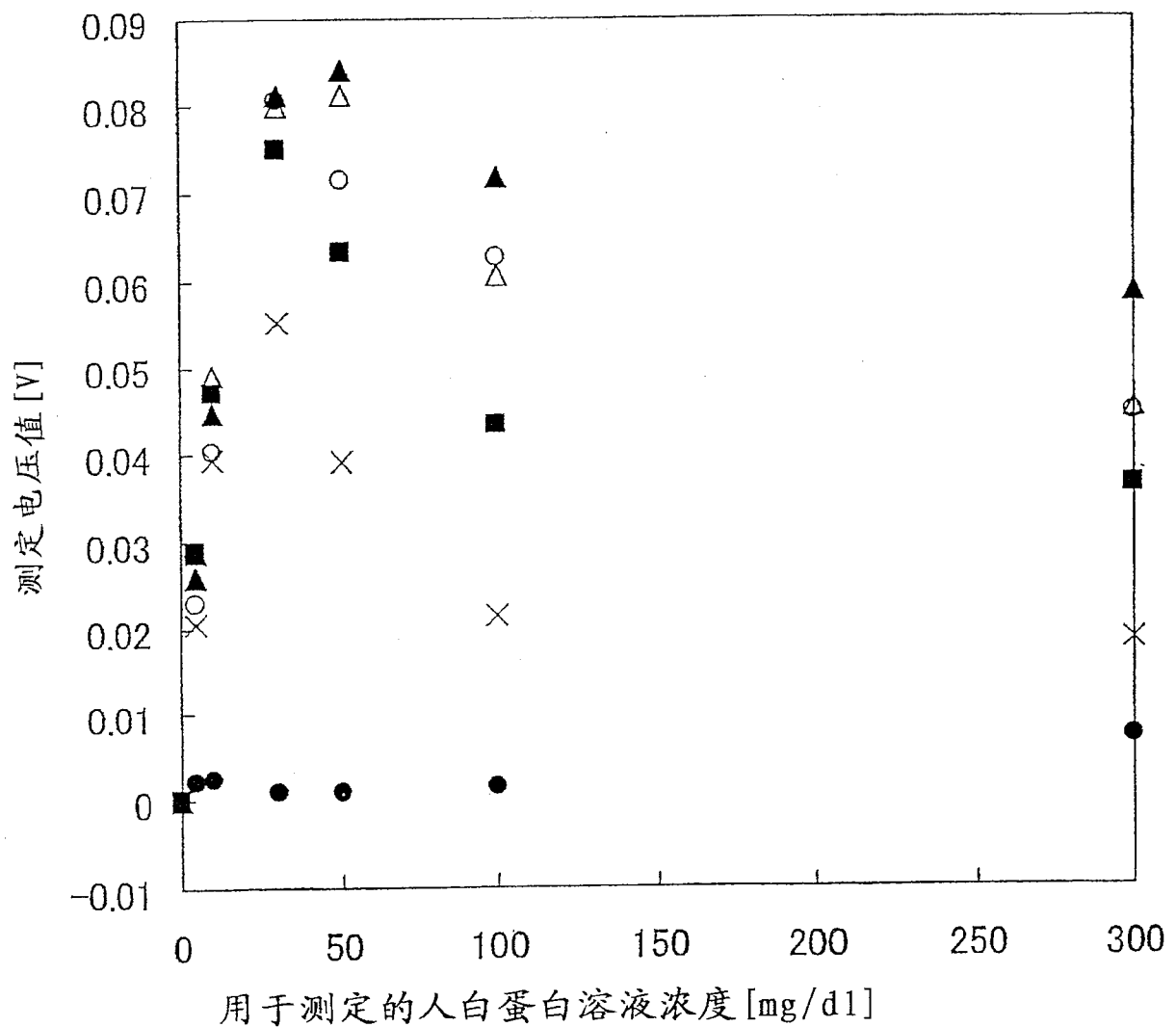


图 7

- 0.05M 丁二酸, 5%重量 PEG6000, pH4.0
- 0.05M 丁二酸, 5%重量 PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.05M 丁二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.05M 丁二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.5
- 0.05M 丁二酸, 5%重量 PEG6000, pH6.0
- × 0.05M MOPS, 5%重量 PEG6000, pH7.4

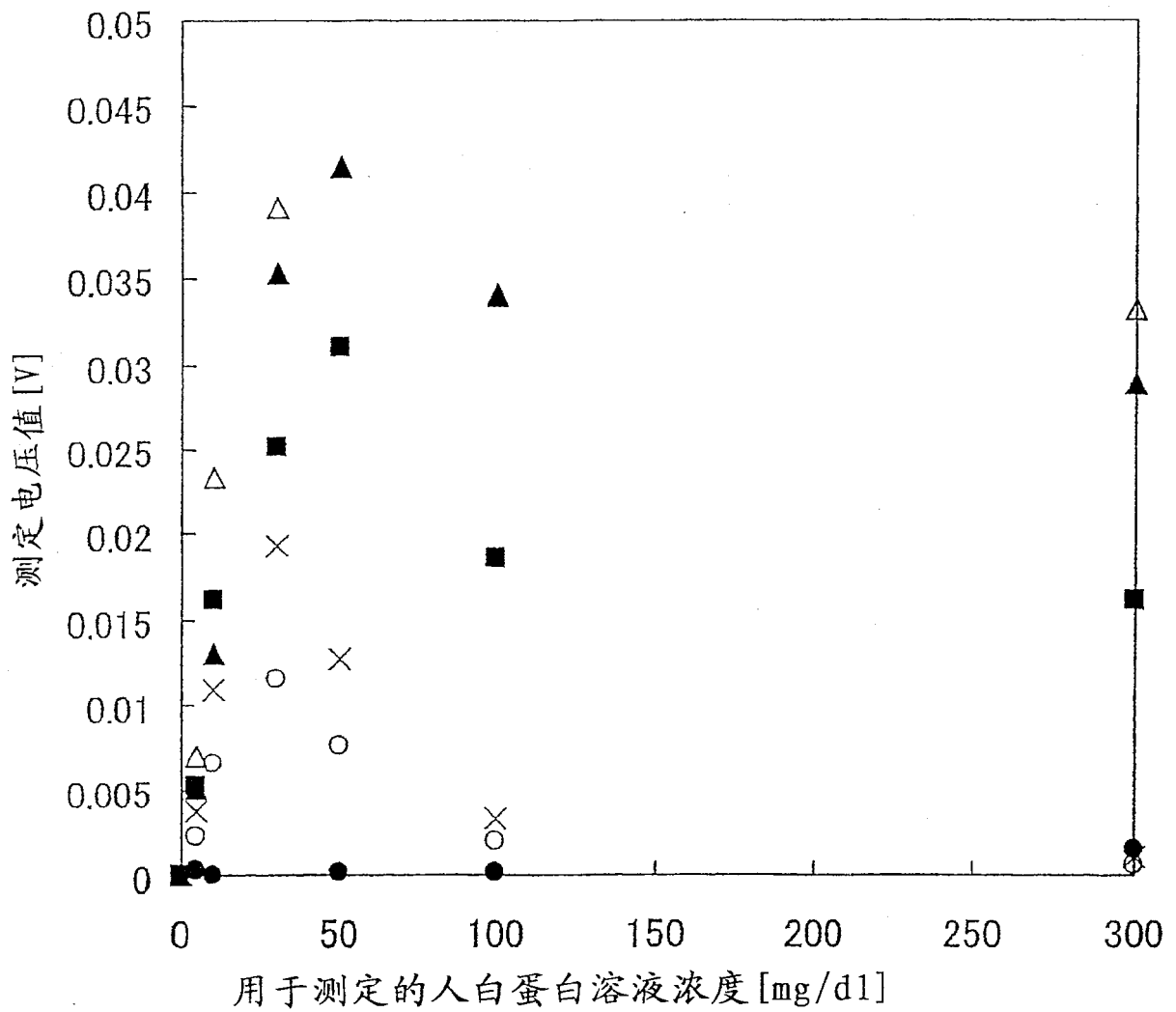


图 8

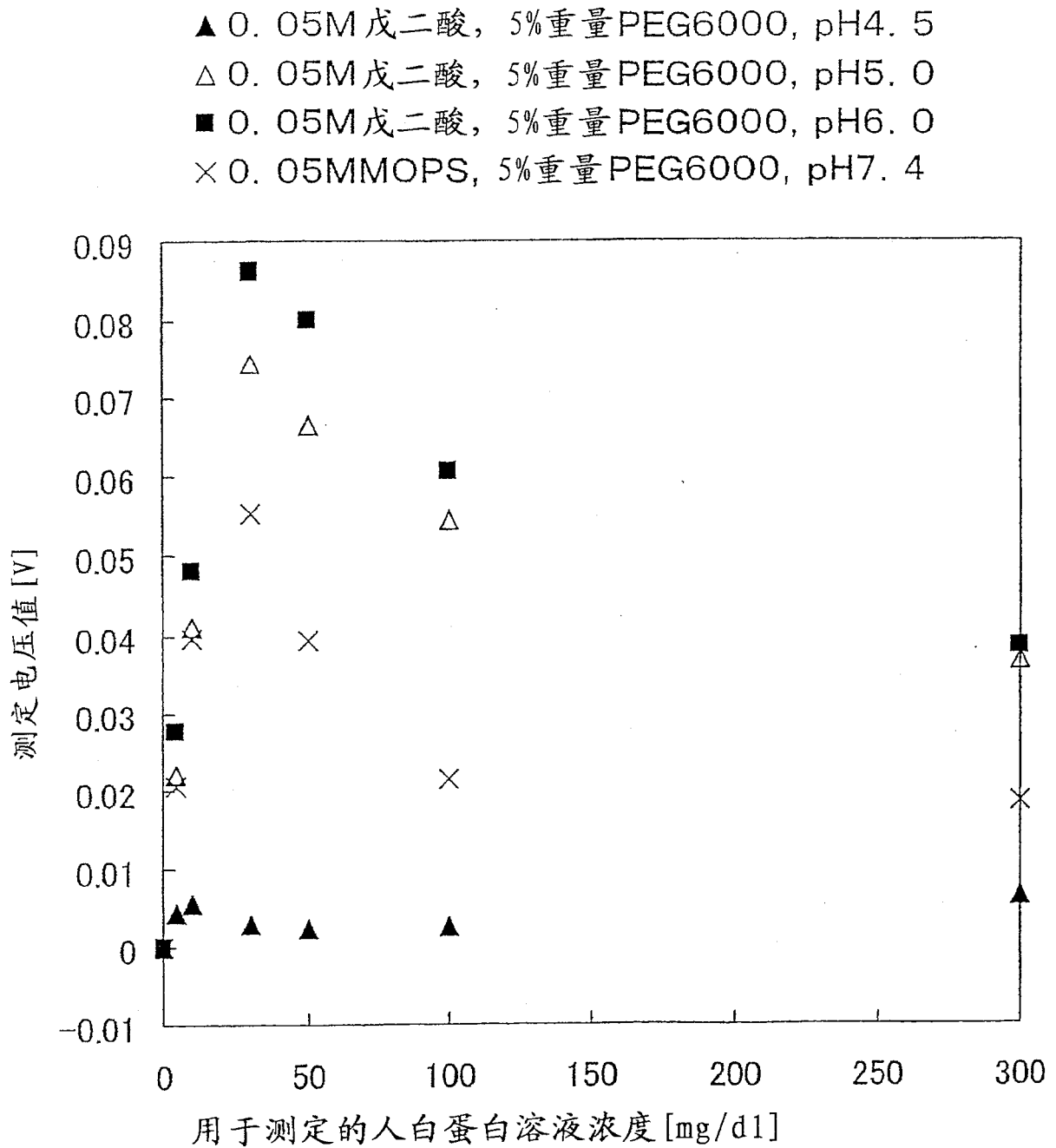


图 9

- 0.05M 己二酸, 5%重量 PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.05M 己二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.05M 己二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.5
- 0.05M 己二酸, 5%重量 PEG6000, pH6.0
- × 0.05M MOPS, 5%重量 PEG6000, pH7.4

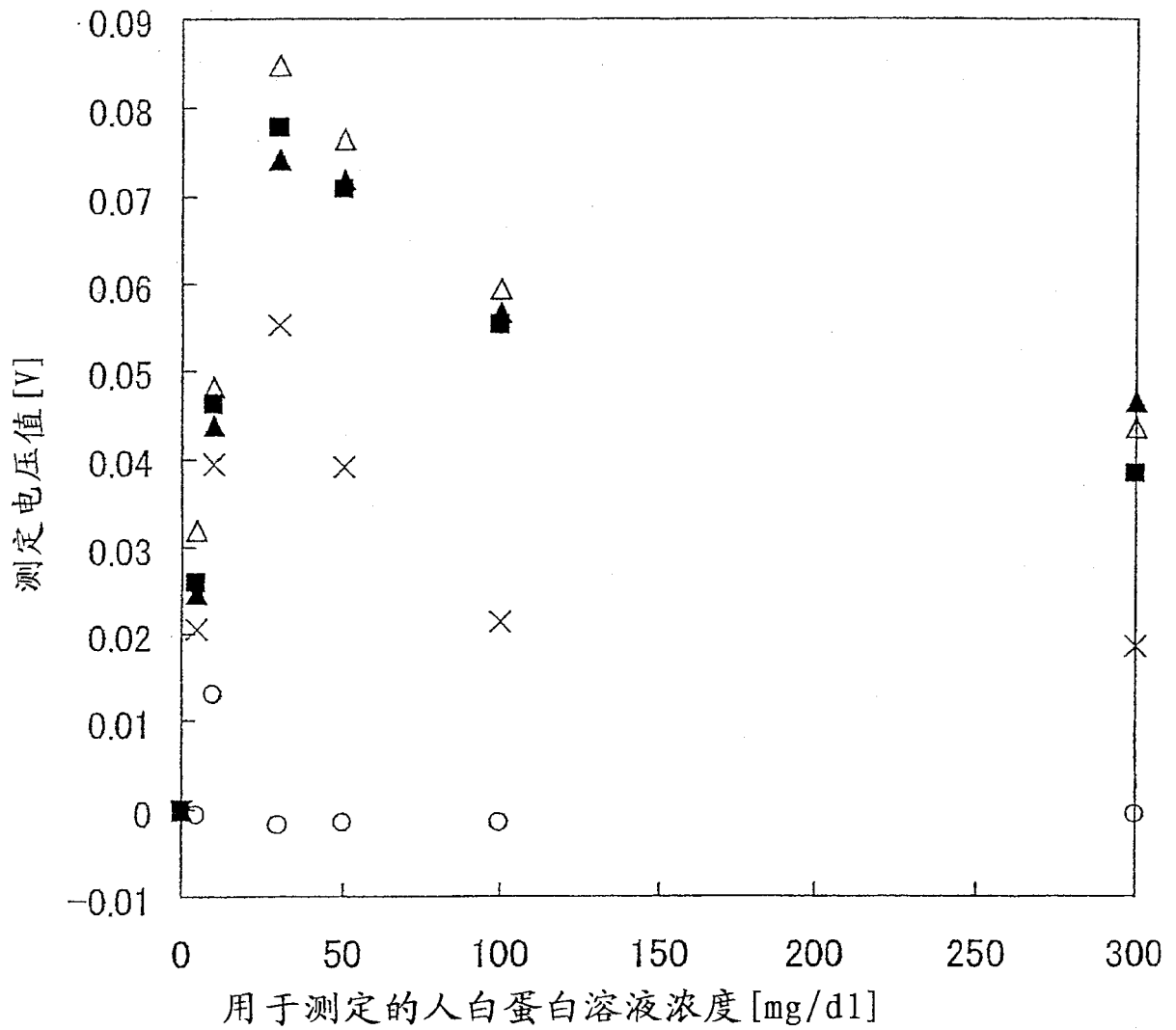


图 10

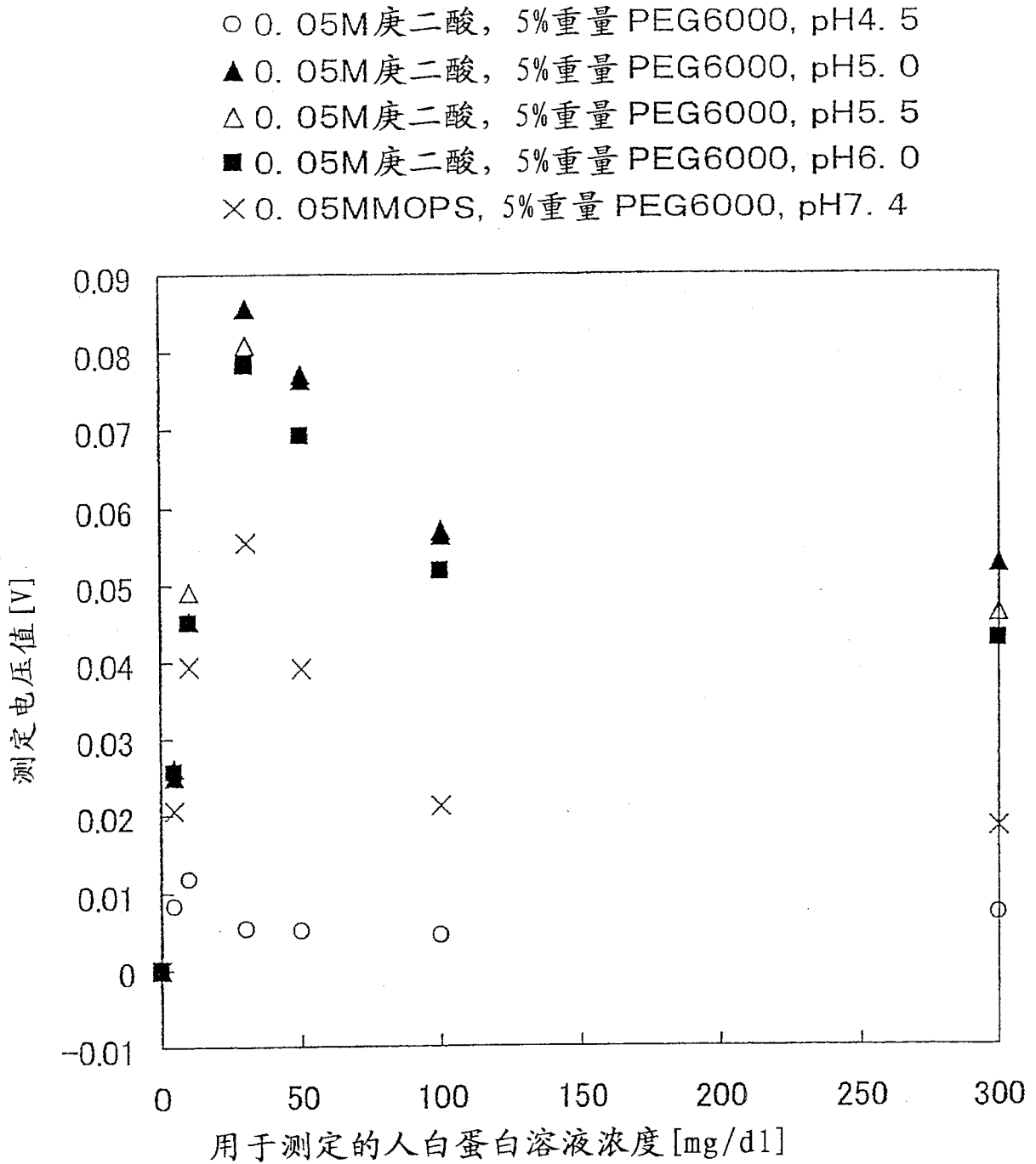


图 11

- ▲ 0.05M 辛二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.05M 辛二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.5
- 0.05M 辛二酸, 5%重量 PEG6000, pH6.0
- × 0.05M MOPS, 5%重量 PEG6000, pH7.4

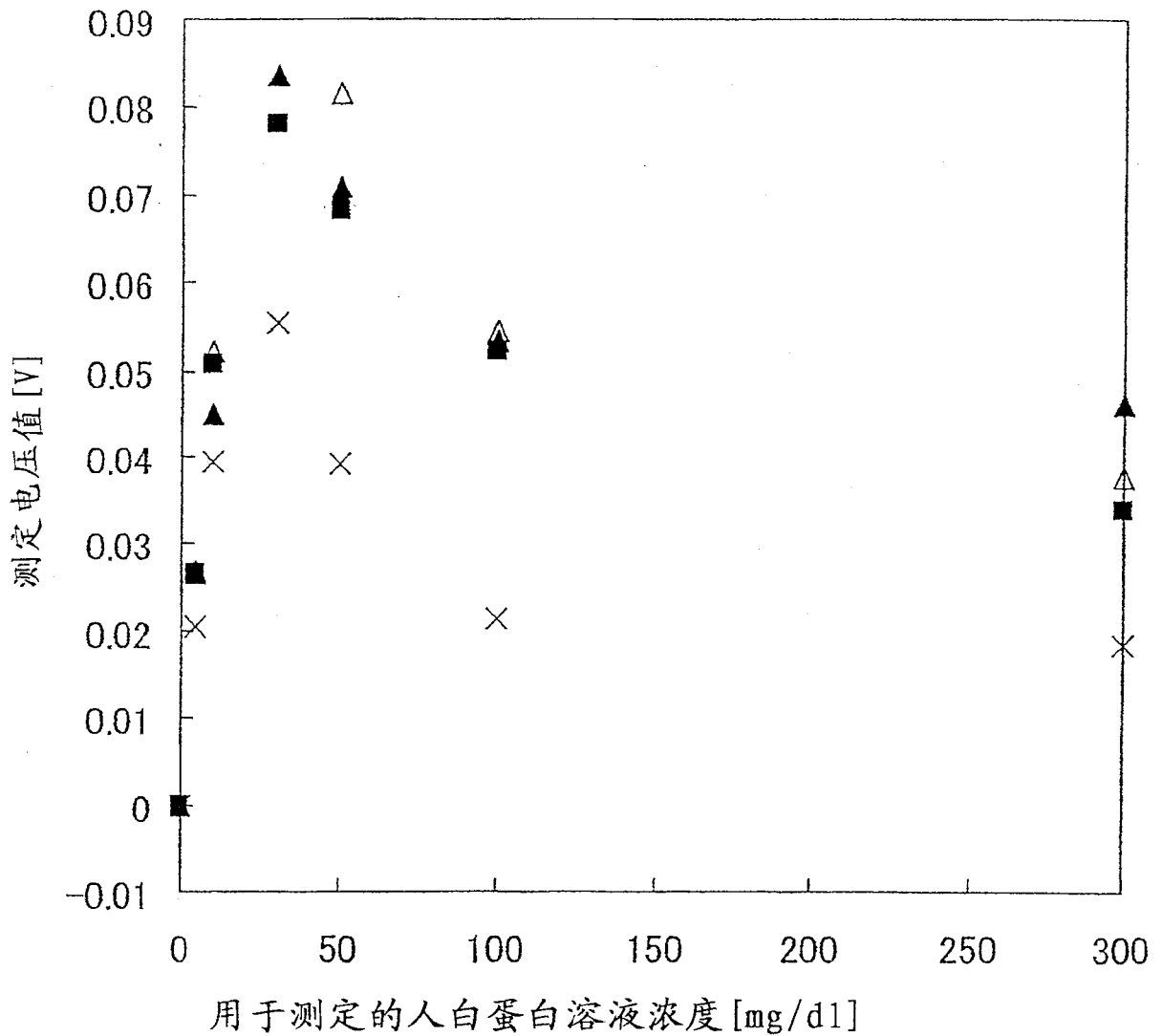


图 12

- ▲ 0.05M 壬二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.05M 壬二酸, 5%重量 PEG6000, pH5.5
- 0.05M 壬二酸, 5%重量 PEG6000, pH6.0
- × 0.05M MOPS, 5%重量 PEG6000, pH7.4

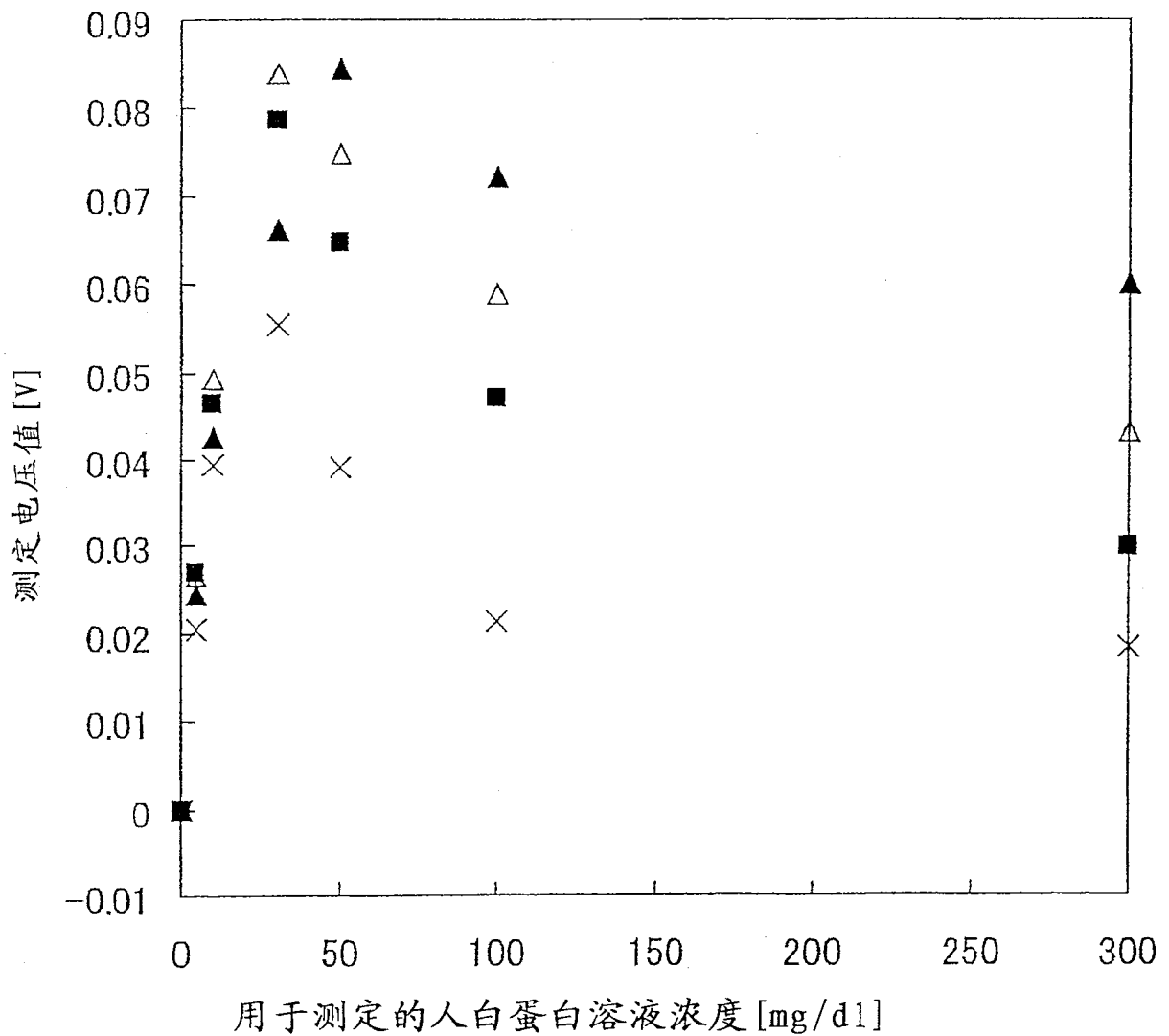


图 13

- 0.01ML(-)-苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.02ML(-)-苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- ▲ 0.05ML(-)-苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.1ML(-)-苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.2ML(-)-苹果酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- × 0.05MMOPS, 4%重量 PEG6000, pH7.4

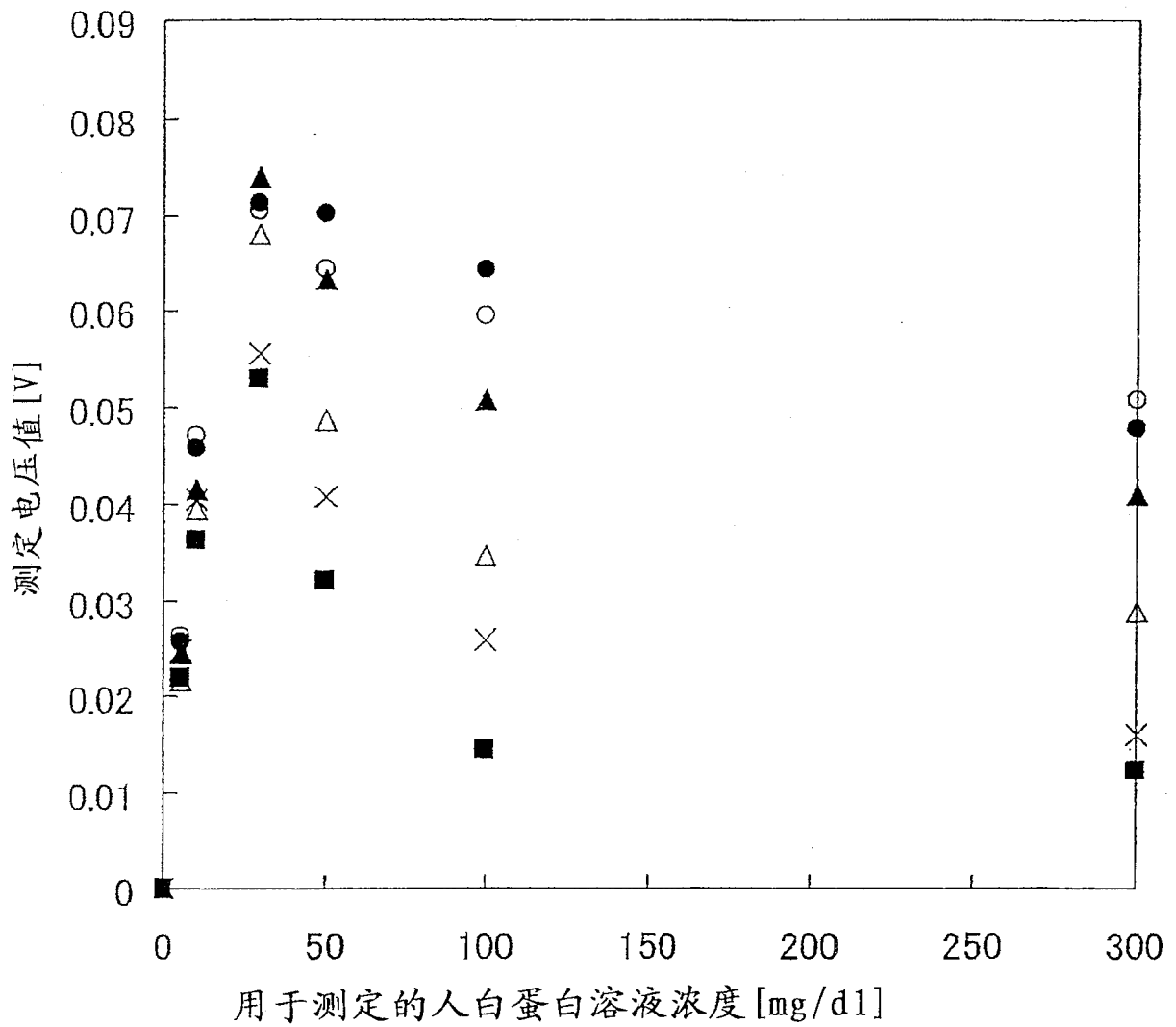


图 14

- 0.01M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.02M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- ▲ 0.05M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.1M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.2M 衣康酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- × 0.05M MOPS, 4%重量 PEG6000, pH7.4

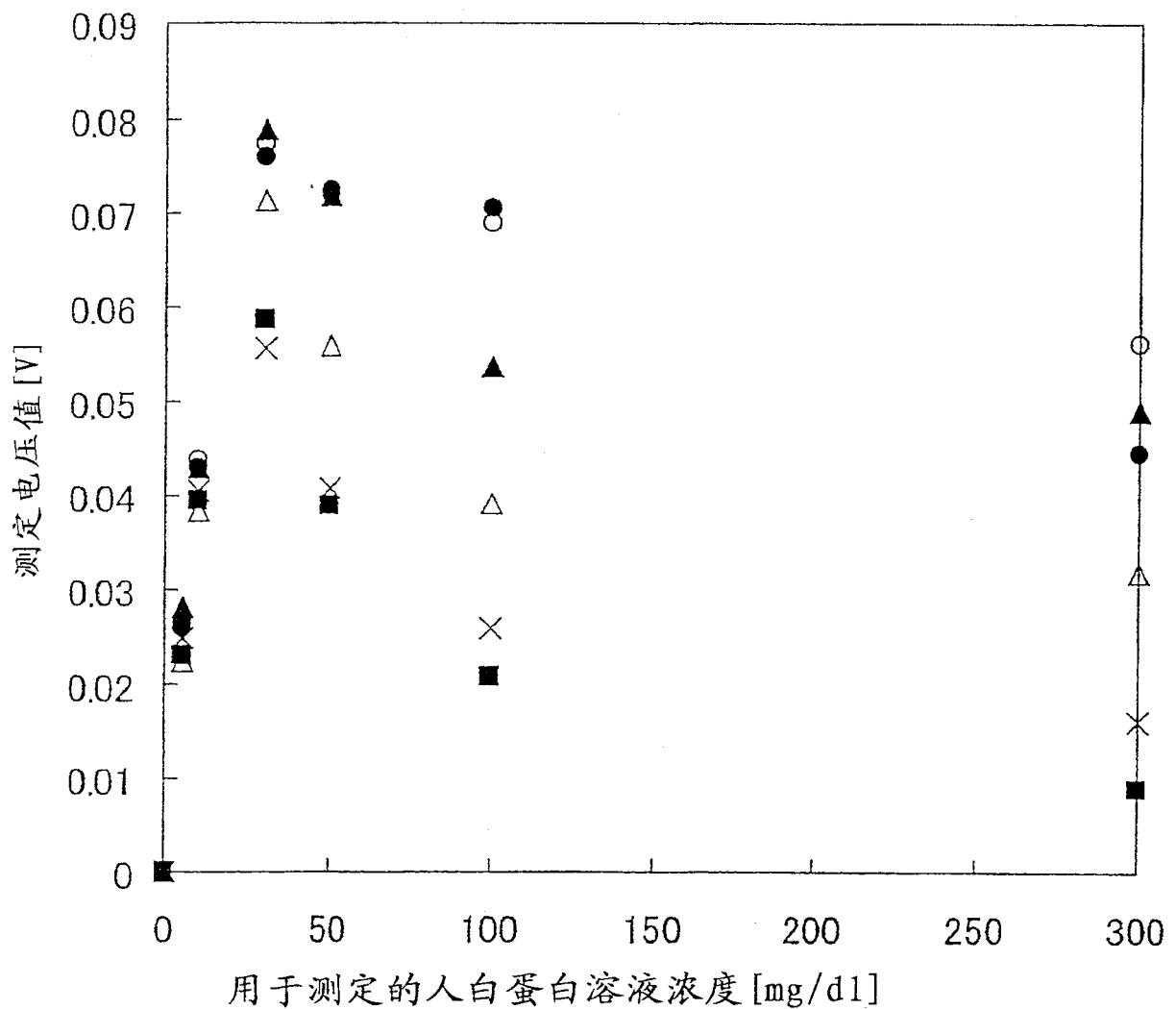


图 15

- 0.01M丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.02M丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- ▲ 0.05M丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- △ 0.1M丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- 0.2M丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH5.0
- × 0.05MMOPS, 4%重量 PEG6000, pH7.4

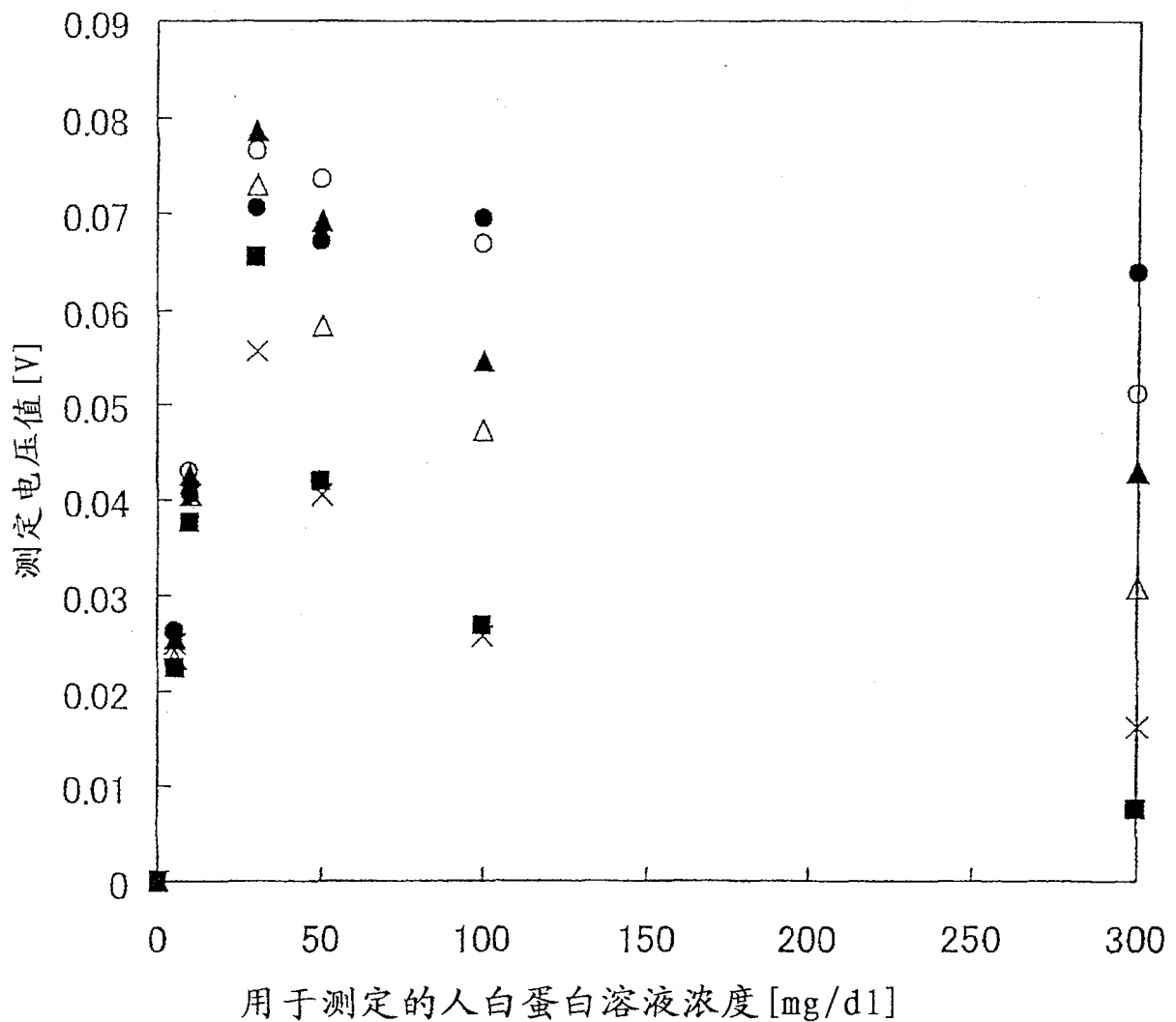


图 16

- 0.02M 苹果酸, 0.1M 丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- 0.02M 酒石酸, 0.1M 丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- ▲ 0.02M 衣康酸, 0.1M 丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- △ 0.02M 富马酸, 0.1M 丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- 0.02M 马来酸, 0.1M 丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5
- × 0.12M 丁二酸, 4%重量 PEG6000, pH4.5

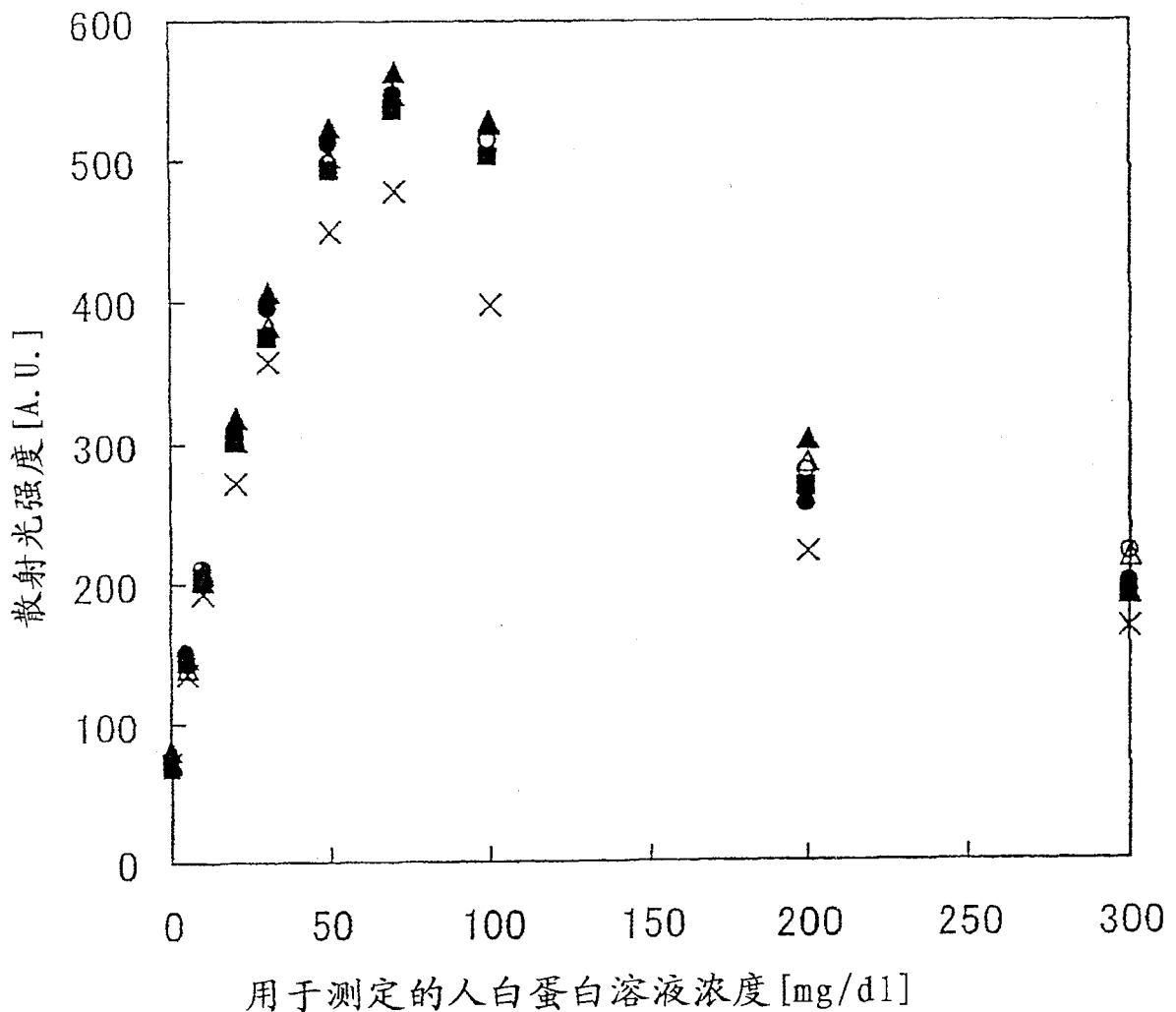


图 17

- 0.025ML(+)-酒石酸,0.025M丁二酸,4%重量PEG6000,pH4.0
- 0.025ML(+)-酒石酸,0.025M丁二酸,4%重量PEG6000,pH4.5
- ▲ 0.025ML(+)-酒石酸,0.025M丁二酸,4%重量PEG6000,pH5.0
- △ 0.025ML(+)-酒石酸,0.025M丁二酸,4%重量PEG6000,pH5.5
- 0.025ML(+)-酒石酸,0.025M丁二酸,4%重量PEG6000,pH6.0
- × 0.05MMOPS,4%重量PEG6000,pH7.4

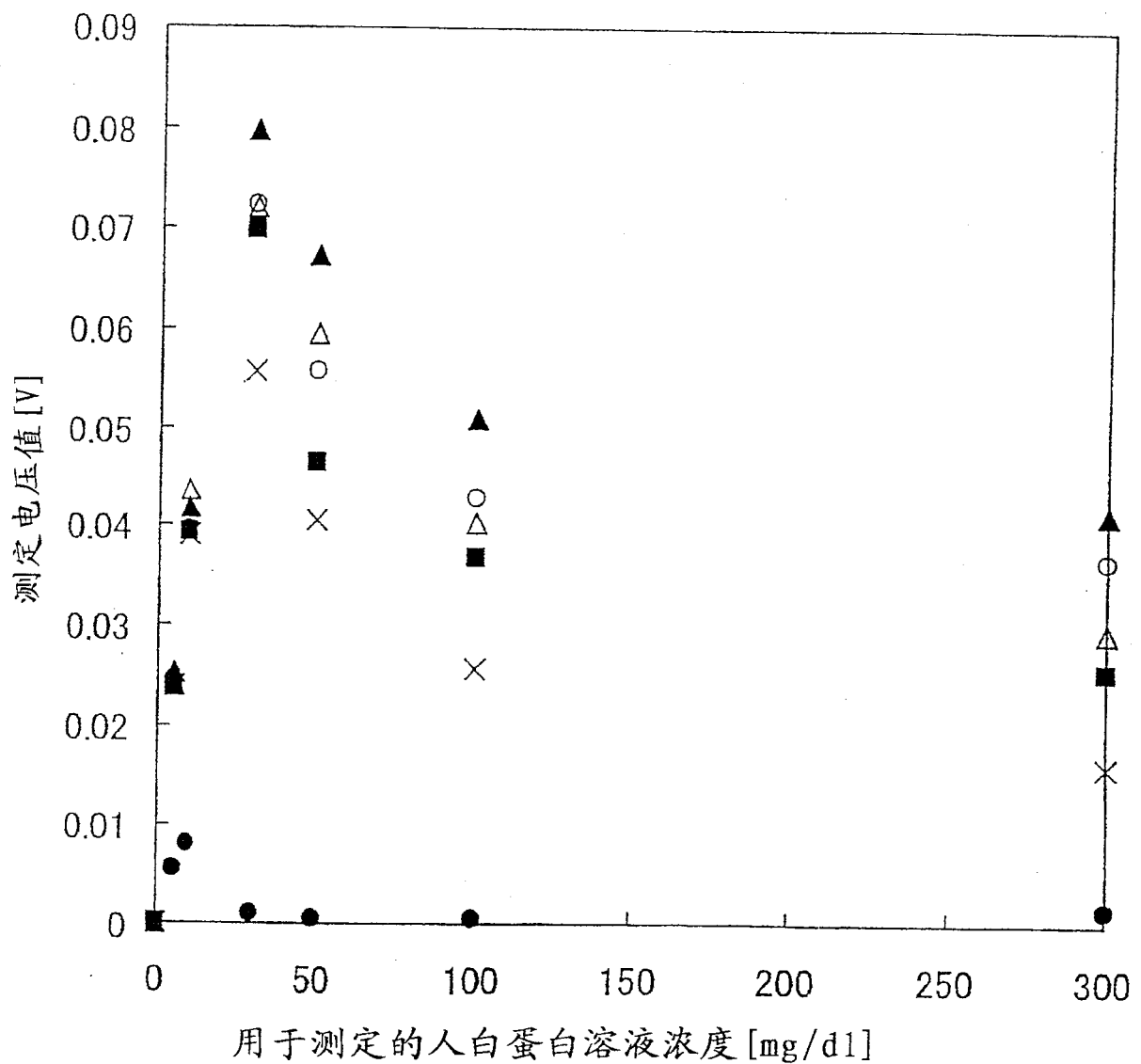


图 18

专利名称(译)	免疫反应测定方法		
公开(公告)号	CN100492008C	公开(公告)日	2009-05-27
申请号	CN200380100596.2	申请日	2003-12-09
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 河村达朗 汤川系子		
发明人	龟井明仁 河村达朗 汤川系子		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	曹雯 王景朝		
优先权	2002364195 2002-12-16 JP 2002357459 2002-12-10 JP		
其他公开文献	CN1692281A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及测定试样中含有的抗原或抗体被测物的方法，该方法是将选自具羟基的二元羧酸、具双键的二元羧酸、化学式(1)： $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 为整数)所表示的直链二元羧酸以及它们的盐中至少一种的化合物，与上述被测物特异性结合的特异结合物质——抗体或抗原与上述试样混合，得到酸性反应液，在该反应液中检测因上述被测物与上述特异结合物质结合的抗原抗体反应而产生的抗原-抗体复合物。由此可以提高测定值，使由于在抗原过剩区发生环带现象而导致的对测定范围的限定得到放宽。

