



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480028043.5

[43] 公开日 2006年11月8日

[11] 公开号 CN 1860365A

[22] 申请日 2004.9.22
 [21] 申请号 200480028043.5
 [30] 优先权
 [32] 2003. 9. 26 [33] JP [31] 336199/2003
 [86] 国际申请 PCT/JP2004/014317 2004. 9. 22
 [87] 国际公布 WO2005/031353 日 2005. 4. 7
 [85] 进入国家阶段日期 2006. 3. 27
 [71] 申请人 松下电器产业株式会社
 地址 日本大阪府
 [72] 发明人 北脇文久 龟井明仁 河村达朗

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
 代理人 包于俊

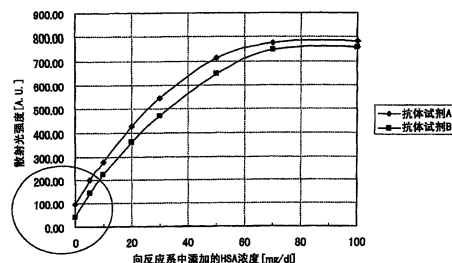
权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 8 页

[54] 发明名称

免疫反应测定方法及该方法所用的试剂、试剂盒以及光学单元

[57] 摘要

本发明提供了在酸性条件下，测定检体中的被测物质的方法。该方法的特征在于，包括混合上述检体和上述检体中被测物质的抗体而形成反应系的工序 A 和测定上述反应系中抗原抗体反应的工序 B，上述反应系的 pH 设定在酸性，并且上述抗体的 pI 和上述反应系的 pH 之间的关系设定为 $pI > pH$ ，通过本发明，在以酸性缓冲液为基础的免疫测定反应系中，特别是可提高抗原低浓度范围内的精密度。



1. 测定方法,所述测定方法是在酸性 pH 条件下测定检体中的被测物质的方法,其特征在于,包括混合上述检体和上述检体中的被测物质的抗体而形成反应系的工序 A 以及测定上述反应系中的抗原抗体反应的工序 B, 上述反应系的 pH 设定在酸性, 并且上述抗体的 pI 和上述反应系中的 pH 的关系设定成 $pI > pH$ 。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征还在于,在上述工序 B 中,测定在上述被测物质和上述抗体之间形成的抗原抗体复合体的量。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征还在于,上述 pI 和上述 pH 的差在约 1.0 以上。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征还在于,上述 pI 和上述 pH 的差在约 1.5 以上。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征还在于,上述 pH 在约 4~6 的范围内。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征还在于,上述 pH 在约 4.5~5.0 的范围内。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征还在于,在上述工序 A 中,混合上述检体、上述抗体和缓冲剂而形成反应系。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征还在于,上述反应系含有有机酸或有机酸盐。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征还在于,上述有机酸或有机酸盐为多元羧酸或多元羧酸盐。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征还在于,上述多元羧酸或多元羧酸盐是三羧酸或三羧酸盐, 或者二羧酸或二羧酸盐。
11. 如权利要求 1 所述的方法,其特征还在于,上述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体或标记抗体。
12. 如权利要求 2 所述的方法,其特征还在于,上述测定工序 B 包括测定由上述复合体的量或大小产生的光学参数。
13. 试剂,所述试剂是在酸性 pH 条件下,以抗原抗体反应原理为基础测定检体中被测物质用的试剂,其特征在于,含有上述被测物质的抗体,对应于上述酸性 pH,将该抗体的 pI 调整为 $pI > pH$ 。
14. 如权利要求 13 所述的试剂,其特征还在于,上述 pI 和上述 pH 的差在约

1.0 以上。

15. 如权利要求 13 所述的试剂，其特征还在于，上述 pI 和上述 pH 的差在约 1.5 以上。

16. 如权利要求 13 所述的试剂，其特征还在于，上述 pH 在约 4~6 的范围内。

17. 如权利要求 13 所述的试剂，其特征还在于，上述 pH 在约 4.5~5.0 的范围内。

18. 如权利要求 13 所述的试剂，其特征还在于，含有有机酸或有机酸盐。

19. 如权利要求 18 所述的试剂，其特征还在于，上述有机酸或有机酸盐为多元羧酸或多元羧酸盐。

20 如权利要求 19 所述的试剂，其特征还在于，上述多元羧酸或多元羧酸盐是三羧酸或三羧酸盐，或者二羧酸或二羧酸盐。

21. 如权利要求 13 所述的试剂，其特征还在于，上述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体或标记抗体。

22. 如权利要求 13 所述的试剂，其特征还在于，以冷冻干燥的状态被提供。

23. 如权利要求 13 所述的试剂，其特征还在于，作为溶液被提供。

24. 测定用试剂盒，所述试剂盒是在酸性 pH 条件下，以抗原抗体反应原理为基础，测定检体中的被测物质用的试剂盒，其特征在于，含有缓冲液和含被测物质的抗体的试剂，

上述试剂中，相对应于上述酸性 pH，上述抗体的 pI 调整为 $pI > pH$ 。

25. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述 pI 和上述 pH 的差在约 1.0 以上。

26. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述 pI 和上述 pH 的差在约 1.5 以上。

27. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述缓冲液的 pH 在约 4~6 的范围内。

28. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述缓冲液的 pH 在约 4.5~5.0 的范围内。

29. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述缓冲液含有有机酸或有机酸盐。

30. 如权利要求 29 所述的试剂盒，其特征还在于，上述有机酸或有机酸盐为多元羧酸或多元羧酸盐。

31. 如权利要求 30 所述的试剂盒，其特征还在于，上述多元羧酸或多元羧酸盐是三羧酸或三羧酸盐，或者二羧酸或二羧酸盐。

32. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体或标记抗体。

33. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述抗体是识别不同表位的至少 2 种以上的单克隆抗体的混合物。

34. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述试剂以冷冻干燥的状态被提供。

35. 如权利要求 24 所述的试剂盒，其特征还在于，上述缓冲液和上述试剂在临用于测定上述被测物质之前被混合，作为试验溶液被使用的。

36. 免疫反应测定用光学单元，所述光学单元为在酸性 pH 条件下，以抗原抗体反应原理为基础，测定液体检体中的被测物质的光学单元，其特征在于，具有为注入液体检体的开口部，

上述被测物质的抗体被可溶解于上述液体检体地负载于上述光学单元中，

混合上述液体检体和上述被测物质的抗体而形成的反应系的 pH 为酸性，且上述反应系的 pH 和上述抗体的 pI 之间的关系为 $pI > pH$ 。

37. 如权利要求 36 所述的光学单元，其特征还在于，上述光学单元内还具有缓冲剂。

免疫反应测定方法及该方法所用的试剂、试剂盒以及光学单元

技术领域

本发明涉及可在酸性 PH 条件下，测定检体中所含被测物质的免疫反应测定方法及该方法所用的试剂、试剂盒以及光学单元。

背景技术

在医疗、临床检查的领域中，为了诊断各种疾病以及调查病状的过程，普遍进行对人体体液中存在的各种疾病特征性蛋白质的调查。例如，如个体被溶血性链球菌感染，则在血液中产生抵抗其的称之为 ASO 的抗体。因此，通过进行以血液中的该抗体的量为测定项目的试验，可以调查出该个体是否被溶血性链球菌感染。另外，已知在 RA(慢性关节风湿症)患者的血清中，RF(风湿症因子)高频出现。RA 患者的血清中的 IgG 糖链与健康者 IgG 糖链比较，发生了半乳糖显著缺失的糖链异常。自 RA 发病初期开始，就产生半乳糖缺失的 IgG，与其相应的自身抗体这被认为与关节炎等的发病有关。因此通过使用半乳糖缺失的 IgG 抗原进行以血清中的抗半乳糖缺失 IgG 抗体为测定项目的试验，可诊断 RA。

在这些蛋白质的含量的测定中，以特异性高的免疫反应测定方法为主被广泛应用。其中，免疫散射比浊法(或，免疫比浊法)是检测由抗原和抗体的特异反应生成的凝集复合体的方法，由于基本是在均一的溶液中进行的，因此是定量性较好的方法。另外，由于是不用分离抗原抗体复合体和未反应的抗原及抗体就可测定的方法，因此操作容易。

另一方面，在免疫散射比浊法的测定中，一般在抗原过剩的范围中会发生前带现象。因此，存在有的测定项目在需要的测定浓度范围不能正确测定的问题。“前带现象”也称为“带现象”，是与抗原可抗体形成最大的凝集复合体的当量域相比，当抗原和抗体任一者过剩存在时，难以生成凝集复合体，测定值(例如，散射光强度)比原值小的现象。

在实际的均一系的免疫反应测定中，使用抗体测定作为被测物质的抗原的浓度的情况很多。一般，在不发生前带现象的抗原浓度范围中，生成由抗原和抗体相

互结合的复合体形成的巨大的分子链(凝集复合体),由于在抗体浓度一定时,其量和大小依赖于抗原浓度而增加,因此该分子链的量和大小的变化可作为光学的量的变化(例如,散射光的强度或透过光的强度的变化)测定,这样就可以定量测定抗原浓度。但是,在抗原过剩的范围中,由于抗原对抗体过剩存在,因此抗体的抗原结合部位被饱和,难以通过抗原形成交联结构。因此,由于难生成上述的分子链,抗原抗体的复合体的量和大小的变化不能作为光学的量的变化而测得,测定值较小。结果,与低浓度的情况难区分。因此,如发生了前带现象,则不仅存在不能正确测定被测物质浓度的问题,而且还产生假阴性的问题。

已有关于作为用于缓和在这种抗原过剩范围中所发生缓和前带现象的反应系,使用含有多元羧酸或多元羧酸盐的酸性缓冲剂的报道(例如,日本专利特开2003-66047号公报)。一般,由抗原抗体反应的测定多在中性到弱碱性的范围进行测定,但是在日本专利特开2003-66047号公报中,报道了通过在弱酸性条件下进行反应,可抑制前带现象,特别是在抗原过剩的宽范围中,可更正确地定量测定。

发明的揭示

如上述,使用酸性缓冲剂的免疫反应测定法,对解决在抗原过剩范围中的由前区现象所引发的问题优良。但是,另一方面,在抗原浓度为零时的测定值(空白值)却有增大的趋势。

本发明就是鉴于这种情况完成的。即,本发明的目的是提供在以酸性 pH 条件下的抗原抗体反应为基础测定被测物质时,即使是在抗原浓度为低浓度的情况,也可高精度定量测定的免疫反应测定方法、其中使用的试剂、试剂盒以及光学单元(cell)。

本发明人发现了后述的验证结果,即,在酸性的反应系中,通过选择抗体分子的 pI 和反应系中的 pH 使(抗体的 pI 值) > (反应系的 pH 值),可降低抗体分子的非特异的凝集,防止空白值的升高。这被认为是由下列原因引起的,即,通过按上述设定抗体的 pI 和构成反应系的溶液的 pH,在溶液中各抗体分子带正电荷,这样由于带正电荷的抗体分子之间的电斥力可抑制抗体分子的非特异凝集。这样,特别是在抗原浓度低的情况下,由于如下情况被抑制,所述情况是:在测定抗原抗体反应的反应量时除抗原抗体反应的反应量外,还将抗体分子之间的非特异的凝集反应量也测定在内,因此可期望提高 S/N 比,提高测定的精密度。

因此,本发明提供了测定方法,该方法是在酸性 pH 条件下测定检体中的被测

物质的方法，包括下述工序：混合上述检体和上述检体中被测物质的抗体，从而形成反应系的工序 A 和测定上述反应系中抗原抗体反应的工序 B，使上述反应系中的 pH 设定在酸性，并且上述抗体的 pI 和上述反应系中的 pH 的关系设定为 $pI > pH$ 。

在本发明的测定方法的较好的实施方式中，在上述工序 B 中，测定上述被测物质和上述抗体之间形成的抗原抗体复合体的量。

在本发明的测定方法的较好的实施方中，上述 pI 和上述 pH 的差为约 0.5 以上。上述 pI 和上述 pH 的差较好为在约 1.0 以上。更好为，pI 和 pH 的差在约 1.5 以上。

本发明的测定方法的较好实施方式中，上述反应系的 pH 在约 4~6 的范围。最好为，上述反应系的 pH 在约 4.5~5.0 的范围。

本发明的测定方法的较好实施方式中，在上述工序 A 中，混合上述检体、上述抗体和缓冲剂而形成反应系。

在本发明的测定法的较好实施方式中，上述反应系含有有机酸或有机酸盐。较好为，上述有机酸或有机酸盐为多元羧酸或三羧酸盐。更好为，上述多元羧酸或多元羧酸盐为三羧酸或三羧酸盐，或者二羧酸或二羧酸盐。

本发明的测定方法的较好实施方式中，上述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体或标记抗体。

本发明的测定方法的较好实施方式中，上述测定的工序 B 中包括测定由上述复合体的量或大小引起的光学参数。

另一方面，本发明提供了试剂，该试剂是用于在酸性条件下以抗原抗体反应原理为基础测定检体中的被测物质的试剂，其中含有上述被测物质的抗体，并相对应于上述酸性 pH，调制上述抗体的 pI 使 $pI > pH$ 。

本发明的试剂的较好实施方式中，上述 pI 和上述 pH 的差为约 0.5 以上。较好为，上述 pI 和上述 pH 的差为约 1.0 以上。更好为，上述 pI 和上述 pH 的差为约 1.5 以上。

本发明的试剂的较好实施方式中，上述 pH 在约 4~6 的范围中。最好为，上述 pH 在约 4.5~5.0 的范围中。

本发明的试剂的较好实施方式中，上述试剂含有有机酸或有机酸盐。较好为，上述有机酸或有机酸盐为多元羧酸或多元羧酸盐。更好为，上述多元羧酸或多元羧酸盐为三羧酸或三羧酸盐，或者二羧酸或二羧酸盐。

本发明的试剂的较好实施方式中，上述试剂中含有的抗体是单克隆抗体、多

克隆抗体或标记抗体。

本发明的试剂的较好实施方式中，上述试剂以干燥的状态被提供。例如，可通过冷冻干燥被提供。其它较好的实施方式中，上述试剂作为溶液被提供。

另一方面，本发明提供了测定用试剂盒，该试剂盒是在酸性条件下以抗原抗体反应原理为基础测定检体中的被测物质的试剂盒，其中含有缓冲液和含有被测物质的抗体的试剂，相对应于上述酸性 pH，使上述抗体的 pI 为 $pI > pH$ 来调制上述试剂。

本发明的试剂盒的较好实施方式中，上述 pI 和上述 pH 的差为约 0.5 以上。较好为，上述 pI 和上述 pH 的差为约 1.0 以上。更好为，上述 pI 和上述 pH 的差为约 1.5 以上。

本发明的试剂盒的较好实施方式中，缓冲液的 pH 在约 4~6 的范围中。最好为，缓冲液 pH 在约 4.5~5.0 的范围中。

本发明的试剂盒的较好实施方式中，上述缓冲液含有有机酸或有机酸盐。较好为，上述有机酸或有机酸盐为多元羧酸或三羧酸盐。更好为，上述多元羧酸或多元羧酸盐为三羧酸或三羧酸盐，或者二羧酸或二羧酸盐。

本发明的试剂盒的较好实施方式中，上述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体或标记抗体。

本发明的试剂盒的较好实施方式中，上述抗体是识别不同表位的至少 2 种以上的单克隆抗体的混合物。

本发明的试剂盒的较好实施方式中，上述试剂是以干燥状态提供的。例如可通过冷冻干燥来提供。

本发明的试剂盒的较好实施方式中，将上述缓冲液和上述试剂在临测定被测物质之前混合，作为试验溶液来使用。

另一方面，本发明提供了在酸性 pH 条件下以抗原抗体反应原理为基础的测定液体检体中的被测物质用的光学单元。该光学单元具有注入液体检体的开口部，将上述被测物质的抗体可溶解于上述液体检体地负载在上述容器内，通过混合上述液体检体和上述被测物质的抗体而形成的反应系的 pH 为酸性，另外使上述反应系的 pH 和上述抗体的 pI 的关系为 $pI > pH$ 。在此，也可在上述光学单元中负载缓冲剂。

本发明的光学单元的较好的实施方式中，上述光学单元通过使用柱塞，可从上述开口部吸入液体检体，而且具有用于连接柱塞的连接用开口部。

本发明的光学单元的较好实施方式中，上述光学单元是由具有实质上平坦的、

在可见光区光学透明的材质构成的。作为这样的材质，有石英玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯等。特好为聚苯乙烯。

本发明的光学单元的较好的实施方式中，上述抗体的 pI 和缓冲液的 pH 的差为约 0.5 以上，较好为约 1.0 以上。更好为，上述 pI 和上述 pH 的差为约 1.5 以上。

本发明的光学单元的更好实施方式中，缓冲液的 pH 在约 4~6 的范围中。最好为，缓冲液的 pH 在约 4.5~5.0 的范围中。

本发明的光学单元的更好实施方式中，本发明的光学单元中所含的缓冲剂为有机酸或有机酸盐。较好为，上述有机酸或有机酸盐为多元羧酸或多元羧酸盐。更好为，上述多元羧酸或多元羧酸盐为三羧酸或三羧酸盐，或者二羧酸或二羧酸盐。

本发明的光学单元的较好实施方式中，本发明的光学单元中使用的抗体，为单克隆抗体、多克隆抗体或者标记抗体。更好为，上述抗体为识别不同表位的至少 2 种以上的单克隆抗体的混合物。

本发明的光学单元的较好实施方式中，本发明的光学单元中所含的抗体试剂以干燥状态被提供。例如，可通过冷冻干燥来提供。

本发明的光学单元的较好实施方式中，上述缓冲剂以干燥状态被负载。

通过本发明，在酸性 pH 条件下，以抗原抗体反应原理为基础，测定检体中的被测物质的量时，可抑制抗体分子间的非特异凝集的形成。通过这样，即使在抗原浓度为低浓度的情况下，也可正确获得抗原抗体反应量，从而高精度或高灵敏度地测定。另外，由于消除了非特异反应，因此即使在抗原为低浓度的情况，也可重现性良好地进行以抗原抗体为基础的定量测定。

另外，例如，也可充分抑制由凝集无经时限制的非特异凝集对测定值的经时影响(由从加入测定试剂到测定之间的时间长短引起的测定值的变化)。

另外，通过抑制抗体的非特异凝集，可抑制试剂批次之间的测定值的差别，更换新的试剂批次进行测定时，可最大程度减少每次校正的必要性。

另外，通过本发明的免疫反应测定方法，可充分排除用于降低抗原或抗体的非特异自身凝集的吐温 20、辛烷葡糖苷、十二烷基硫酸钠(SDS)、蔗糖单月桂酸酯、CHAPS 等表面活性剂的使用。这些表面活性剂虽然是为了降低非特异性自身凝集而使用的，但是如果其量过大，反而会减弱抗原抗体反应的结合能力。因此，必须严格设定表面活性剂的量。但是，由于通过本发明不使用表面活性剂就可消除非特异的自身凝集，因此可排除由表面活性剂引起的蛋白质变性等不良影响。

附图的简单说明

图 1 是为了研究本发明一实施方式中所使用的抗体的等电点而使用的抗体的等电点电泳法的简图。

图 2 是为了研究本发明的一实施方式中所使用的抗体的等电点而使用的电泳的 pH 滴定分析的简图。

图 3 是本发明的一实施方式中涉及的, 由在使用苯二甲酸缓冲液的酸性条件下的免疫散射比浊法测定人白蛋白的散射光强度的结果示意图。

图 4 是本发明的一实施方式涉及的, 使用苯二甲酸缓冲液的酸性条件下的免疫散射比浊法测定中的各 pH 下的空白值的示意图。

图 5 是本发明的一实施方式涉及的, 等电点为 6.0 的鼠抗人白蛋白单克隆抗体的反应溶液的, 依赖于 pH 的、由自身凝集引起的空白值变化的示意图。

图 6 是对 pH4.5 的反应溶液中的抗体试剂 B 以及抗体试剂 A 测定的散射光强度的比较的示意图。

图 7 是本发明的一实施方式涉及的, 免疫反应测定用光学单元 2 的斜视图(a)和截面图(b)。

图 8 是本发明的一实施方式涉及的, 免疫反应测定用光学单元 2 的工作示意图。

实施发明的最佳方式

在本发明的免疫反应测定方法, 其中所用的试剂、试剂盒以及光学单元的实施方式中, 混合有作为被测物质的抗原和其抗体的反应溶液的 pH 设定为酸性。作为反应溶液使用酸性溶液的优点是可以得到缓和被测物质高浓度时的前带现象以及抑制与前带现象伴随的光谱测定值减小的效果。这种酸性的反应溶液的 pH, 较好为设定在 pH 约 4~6 的范围, 最好为设定在 pH 约 4.5~5.0 的范围。

设定在酸性 pH 的反应溶液, 由于将抗体的变性等可能性降至最小, 因此较好为在临测定之前调制。

本发明的免疫反应测定方法中, 被测物质的抗体的 pI 与混合被测物质和抗体而形成的反应系的 pH 的关系设定为 $pI > pH$ 。通过这样, 反应系中的抗体分子带正电荷, 利用抗体分子之间的电斥力, 可抑制抗体分子之间的非特异凝集。

为了促进抗体分子之间的电排斥, 抗体的 pI 值与溶液的 pH 值之间的差 ($|pI - pH|$) 越大越好, $|pI - pH|$ 较好为设定在 0.5 以上, 更好为设定在 1.0 以上,

最好为设定在 1.5 以上。

抗体分子的 pI，例如可通过等电点电泳的 pH 滴定分析知道。使用等电点电泳分析、选择具有规定 pI 值的抗体例如可如下进行。参考图 1 进行说明。使用等电点电泳用琼脂糖凝胶，临试样点样之前在琼脂糖凝胶上形成电位差制成 pH 梯度琼脂糖凝胶(13)。之后，立即点样，使试样泳动约 1 小时。试样如果带负电则开始向阳极(12)泳动(14)，如果带正电则开始向阴极(11)泳动。任一者经过一段时间在 pH 梯度琼脂糖凝胶上泳动，随着凝胶上的 pH 值和试样的 pI 值逐渐接近，试样的带电性减少，逐渐变成非带电状态停止泳动。该停止位置的凝胶 pH 值就是试样抗体的 pI 值。

试样的滴定分析也可使用等电点电泳装置进行。参考图 2(a)以及图 2(b)进行说明。与上述相同，首先制备 pH 梯度琼脂糖凝胶(15)(图 2(a))。之后，使制成的凝胶旋转 90 度后安装在电泳用装置中(16)(图 2(b))。在上面点样进行约 1 小时的泳动。通过这样可知道各 pH 条件下的试样的电荷(17)。即，在酸性侧，由于试样带正电则会向阴极泳动，在碱性侧，由于试样带负电则会向阳极侧泳动，这样如 17 所示，得到依赖 pH 的滴定曲线。通过该曲线能分析出在哪一 pH 范围，带正电荷还是负电荷，带电程度大小。

本发明的免疫反应测定中使用的反应溶液系中，较好含有有机酸或者有机酸盐。这些有机酸或者有机酸盐，较好为多元羧酸或多元羧酸盐。多元羧酸是具有多个羧基的有机酸，在本发明中特好为三羧酸或三羧酸盐，或者二羧酸或二羧酸盐。三羧酸或三羧酸盐，或者二羧酸或二羧酸盐的浓度可以是任意的，但是为了显著地达到缓和前带现象的效果以及抑制测定值下降的效果，较好为不超过 0.3M。更好为，三羧酸或者三羧酸盐，以及二羧酸或二羧酸盐的浓度不超过 0.2M，最好为不超过 0.1M。

作为三羧酸或者三羧酸盐的示例，可列举如枸橼酸、异枸橼酸、乌头酸以及它们的盐。这些的市售品，例如有枸橼酸酐、枸橼酸一水合物、枸橼酸三钠、枸橼酸三钠二水合物、枸橼酸三钾一水合物、枸橼酸三铵、枸橼酸氢二铵、枸橼酸钙四水合物、枸橼酸镁九水合物、枸橼酸三锂水合物、枸橼酸铜(II)2.5 水合物、DL-异枸橼酸三钠、trans-乌头酸、cis-乌头酸酐等，这些可单独使用或组合使用。尤其是枸橼酸、枸橼酸盐、乌头酸或者乌头酸盐，可得到比较便易且可在室温保存，又稳定性高的物质，另外，从使用容易性的观点来看，也较好。

另外，作为二羧酸或二羧酸盐的示例，可列举如邻苯二甲酸、苹果酸、酒石酸、

衣康酸、富马酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸以及它们的盐。这些的市售品可列举如邻苯二甲酸、邻苯二甲酸酐、邻苯二甲酸氢钾、邻苯二甲酸钾、邻苯二甲酸钠、邻苯二甲酸铵、邻苯二甲酸铜(II)、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、内消旋酒石酸一水合物、(+)-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、琥珀酸、琥珀酸铵、琥珀酸二钠、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，这些可单独使用也可组合使用。

本发明中，含有这些有机酸或者有机酸盐的反应溶液或反应系的 pH 设定在酸性，较好为设定在 pH 约 4~6 的范围。最好为，反应的 pH 设定在 pH 约 4.5~5.0 附近。通过这样设定 pH，可得到缓和前带现象，或者抑制与前带现象伴随的测定值下降的现象。

在本发明的免疫反应测定方法及其中所用的试剂、试剂盒以及光学单元中使用的“被测物质的抗体”，是指以抗原抗体反应原理为基础的与被测物质特异结合的抗体。这些抗体，例如可以是单克隆抗体、多克隆抗体、或者标记抗体等。单克隆抗体可通过杂交瘤细胞株产生。杂交瘤细胞株是通过细胞融合产生抗体的 B 细胞和骨髓瘤细胞(myeloma 细胞)得到兼具产生抗体能力和强增殖分裂能力的融合细胞集团，再从该细胞集团中分离 1 个细胞，使之增殖而得到的。多克隆抗体是向动物投以抗原，使在血中出现大量与抗原结合的抗体，采集全部或部分该血液，再通过精制而得。将伴随抗原抗体反应(形成复合体)的分子大小的变化量作为测定被测物质的量的指标利用的均一系列的免疫反应测定中，较好为使用易形成凝集复合体的抗体。多克隆抗体由于是识别各种表位的抗体的集合体，因此容易形成凝集复合体，所以较为适宜。单克隆抗体只识别 1 个表位，按照 1:1 的反应形成复合体，因此与多克隆抗体的情况相比，较难形成凝集复合体，但是当被测物质是例如单体蛋白的 5 聚体的 C 反应性的蛋白质样的多价抗原的情况时，可充分使用。另外，通过形成识别不同表位的至少 2 种以上的单克隆抗体的混合物，也可人工设计一种多克隆抗体。

此外，通过使用例如金属粒子、胶乳粒子作为标记物，形成标记抗体可更加促

进凝集复合体的形成。在此，金胶体标记抗体的制造，例如可通过以下来进行。向500mL的三角烧瓶中加入290nm吸光度调整为0.86的氯金酸溶液(和光纯药工业制造)200mL，在沸腾中迅速添加1%的枸橼酸钠(和光纯药工业制造)溶液4mL。反应溶液，由蓝色不久变成深红色，确认该变化后再放置15分钟。将自然冷却后所得的金胶体溶液调至pH8.9，再依次添加抗体、牛血清白蛋白，使抗体标记。标记后，为了除去未标记抗体和牛血清白蛋白进行离心分离。这样制成金胶体标记抗体。

在本发明的免疫反应测定方法及其中使用的试剂、试剂盒以及光学单元中使用的抗体，没有特别的限定，如果是与抗原即被测物质特异性结合的物质，可是IgG、IgM、IgE、IgA或者IgD中任一系列的抗体。其中，由于IgG抗体的非特异反应较少，而且市售品也比较多，比较容易得到，因此较好(例如，通过Funakoshi、コスモバイオ等供应商提供的市售品，但不限于此)。另外，对于抗体的来源动物种类，也没有特别的限定，由于来自兔子、山羊、小鼠的抗体比较容易到手，使用例也多，因而较好。

在本发明的免疫反应测定方法及其中使用的试剂、试剂盒以及光学单元中使用的具有规定pI的抗体的精制方法，可使用各种分析方法以及精制法。例如，等电点沉淀法、等电点电泳、等电点色谱、离子交换色谱等利用物质所带电荷的差异的方法。特好为等电点电泳。

精制的抗体，作为抗体试剂，可以干燥的状态或溶液状态被提供。为了长期保存，较好为以冷冻干燥状态被保存。这样的抗体试剂，可也含有合适的缓冲剂。上述抗体试剂，较好为在使用前为了防止蛋白质的变性在中性附近的pH保存，在使用时溶解于具有酸性的pH的缓冲液中使用。作为用于将pH设定在中性附近的缓冲液的一例，可例举如后述的由0.05M 3-(N-吗啉代)丙磺酸、0.15M NaCl、0.04重量%NaN₃组成的pH7.4的缓冲液，但不限于此。作为具有酸性pH的缓冲液，可例举如含有上述有机酸或有机酸盐的缓冲液。

本发明中以抗体分子的pI值和溶液的pH值的关系为基础设定反应系时，考虑抗体分子的标记化的影响、抗体周围的环境的影响、等电域等是很重要的。因为，一般，抗体的等电点pI为约pH5.0~8.0的范围(这样的抗体的等电点的分布范围在本发明中称为“等电域”)，但是根据抗体的标记情况以及抗体周围的环境，也有小于5.0或大于8.0的情况发生。即，等电点受到缓冲液的离子强度、缓冲液组成的种类的影响。还受到用例如金属胶体、乳胶粒子或者色素化合物等标记抗体的影响。另外，多克隆抗体或者单克隆抗体时，由于各个抗体分子分别具有稍稍不同

的等电点，因此在这样的溶液中，溶解的抗体分子的等电点通常以如上所述的“等电域”的形式存在。

在本发明的免疫反应测定方法及其中使用的试剂、试剂盒以及光学单元中使用的被测物质没有特别的限定，一般只要是利用抗原抗体反应可测定的物质就可以。其中，可例举如蛋白质、核酸、脂质、细菌、病毒、半抗原等。特好为作为临床检查上主要测定对象的蛋白质。作为这样的蛋白质，例如 LH(促黄体激素)、FSH(促卵泡激素)、hcG(绒毛膜促性腺激素)等激素、各种免疫球蛋白家族或亚家族、补体成分、各种感染症特征因子、C 反应蛋白质、白蛋白、风湿症因子、血液型抗原等。

在本发明的免疫反应测定中，为了测定抗原抗体复合体的量，较好为使用测定由复合体形成时分子的量和大小的变化引起的光学参数的方法。特好为，光学参数是光散射强度或吸光度。

本发明另一方面提供的，在酸性 pH 条件下，以抗原抗体反应原理测定检体中的被测物质用的试剂盒，包括缓冲液和含有被测物质的抗体的试剂，对于上述试剂，调制成上述抗体的 pI 相对于上述酸性 pH 为 $pI > pH$ 。作为本发明的试剂盒的方式，可以以上述抗体试剂在溶液中含有的状态提供，也可以干燥的状态提供。从保存稳定性的观点来看，上述抗体试剂较好为以冷冻干燥的状态提供。

本发明另一方面提供的在酸性 pH 条件下，以抗原抗体反应原理测定检体中的被测物质用的光学单元，具有注入液体检体的开口部，在上述光学单元内负载上述被测物质的抗体使其可在上述液体检体中溶解。在此，通过混合上述液体检体和上述被测物质的抗体而形成的反应系的 pH 为酸性，且将上述反应系的 pH 和上述抗体的 pI 之间的关系，调制成 pI 大于 pH。在此，也可将缓冲剂负载在光学单元中。

本发明的光学单元中，上述缓冲剂较好为上述有机酸盐或有机酸盐。在上述容器内可移动地负载的有机酸或有机酸盐以及上述被测物质的抗体，从溶解的观点来看，较好为以冷冻干燥的状态提供。另外，上述有机酸或有机酸盐以及上述被测物质的抗体，可以混合后再干燥，也可分别冷冻干燥。

本发明的光学单元，通过使用柱塞可从上述开口部吸入液体检体，较好为还具有为连接柱塞的连接用开口部。这样，可以容易地向光学单元中注入液体检体。

作为本发明的光学单元的材料，较好为具有实质上平坦的面的，在可见光区光学透明的材料，有石英玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯等。特好为聚苯乙烯。另外，较好为可进行透过光测定以及散射光测定的。

以上述说明和下述示例的实施例为基础，本技术领域的技术人员，不用进行额

外的实验,既可构筑抗体的 pI 和反应溶液的 pH 经调整的本发明涉及的免疫反应测定用的反应系。

以下,通过实施例,更具体说明本发明,但是本发明不限于这些实施例。

实施例

(比较例)在酸性条件下的人白蛋白的免疫散射比浊法的分析

在以下所示的缓冲液等的调制中,使用经 MILLI-Q SP TOC(Mililipore 公司制)过滤的纯水。另外,以下无特别说明的盐、缓冲剂等试剂均使用和光纯药工业制的特级试剂。但是,聚乙二醇 6000 使用 1 级试剂。

首先,调制抗体试剂。兔抗人白蛋白多克隆抗体,从采自免疫人白蛋白的兔子的抗血清,用蛋白质 A(アマシャム・ファルマシア制)柱色谱精制。精制是使用 1.5M 的甘油、3.0M 的 NaCl、pH8.9 的结合缓冲液,在柱中平衡化蛋白质 A 后,向柱中灌入抗血清,抗血清中的抗体被特异地吸附在蛋白质 A 上,与抗血清中的抗体以外的成分分离。分离后,冲流 0.1M 枸橼酸、pH4.0 的洗脱缓冲液,使抗体自蛋白质 A 洗脱后回收。向截止分子量为 1 万的透析管中加入洗脱回收的抗体,用由 0.05M 的 3-(N-吗啉代)丙磺酸(同仁制,以下略称为吗丙磺)、0.15M NaCl、0.04 重量% NaN_3 组成的 pH7.4 的缓冲液(5L×2 次)进行透析,置换缓冲液成分。通过 10000g 的离心分离,除去透析后的抗体溶液中的不溶物。通过在 280nm 的吸光度测定来测定抗体浓度,最后,使用透析中所用的缓冲液调制成 3.0mg/ml,将其作为抗体试剂(抗体试剂 A)。

接着,按照以下做法,调制含有多元羧酸或多元羧酸盐的缓冲液。多元羧酸使用苯二甲酸。称量苯二甲酸氢钾以及聚乙二醇 6000 溶于调制目标体积的约 90% 的纯水中,使其浓度分别为 0.05M、4 重量%。使用 NaOH 分别调整缓冲液的 pH 至 4.0、4.5、5.0、5.5 以及 6.0。

在免疫反应测定中,使用分光荧光光度计(岛津制造所制,型号 RF-5300PC)。在分光荧光光度计的试样室中配置高温单位台(岛津制作所,型号 06-15440),与恒温槽(TITEC 制,商品名为 COOLNIT BATH EL-15)连接,循环保持在 25℃ 的水,在测定时保持一定的温度。对于分光光度计的测定条件,激发、荧光波长均为 670nm,在荧光侧和激发侧的带幅 3nm 均设置灵敏度为高灵敏度。

按照以下进行测定。搅拌混合含有 2.87ml 上述多元羧酸的缓冲液和 0.1ml 的抗体试剂 A 后,再通过向其中加入搅拌混合 0.03ml 的规定浓度的人白蛋白溶液,

来调制测定用反应液。将该反应溶液转移到荧光分析用石英容器中，将该容器设置在分光荧光光度计中，将测定温度的 T 型热电偶 (RS コンポーネンツ提供，型号 219-4696) 浸渍在容器内。自混合人白蛋白后的 2 分钟的时间点开始，在时间程序测定上进行 0.04 秒间隔的 300 秒的光谱测定。测定中的温度为通过将 T 型热电偶与数字多倍温度计 (アドバンテクト制，型号 TR2114) 连接来进行监测。求所得的 200 到 300 秒之间的测定值的平均值，并将其作为该反应溶液的测定值。变化人白蛋白的浓度再进行该操作。

结果示于图 3 及图 4。图 3 是横轴为人白蛋白浓度、纵轴为散射光强度的曲线。观察到依赖于反应溶液的 pH (pH4.0、4.5、5.0、5.5 以及 6.0)，前带现象被缓和，测定值的减小被抑制。抑制测定值减小的效果，在 pH4.5 的反应系中最显著。

图 4 是横轴为反应系的 pH，纵轴为人白蛋白浓度为 0 时的散射光强度 (空白值) 的图。观察到 pH 在 5.0 以下，特别是 pH 在 4.5 以下时空白值高。

这考虑是由于使用的兔抗人白蛋白多克隆抗体大体的等电域在约 4.5~7.4 附近引起的。

特别是，pH 在 5.0 以下的酸性条件下时，对蛋白质的变性也有影响，包括该变性的影响在内，在该 pH 附近具有等电点的抗体分子之间的电斥力减弱，引起抗体分子之间的非特异吸附进一步增强，这些提高散射光强度，使空白值特别高。

(实施例 1) pH 与抗体的 pI 的关系对空白值的影响的确认

使用性状一定的单克隆抗体，确认 pH 与抗体的 pI 的关系对空白值的影响。抗体使用抗人白蛋白小鼠单克隆抗体 FU-302 (日本バイオテスト公司制)。通过等电点电泳判断所用抗体的 pI，约为 pH6。通过在 280nm 的吸光度测定来求得抗体浓度，用含有 0.04 重量 % 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 KH_2PO_4 ，pH 7.4) 稀释成 3.0mg/ml。

缓冲液使用由 0.025M 2-(N-吗啉代)乙磺酸 (同仁制，以下简称为吗乙磺)、0.025M 吗丙磺以及 4 重量 % 聚乙二醇 6000 组成的 pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 以及 7.5 的溶液。

测定装置使用按以下方法自制的装置。作为光源，使用在 270Hz 调制的波长为 680nm 的发射功率约 15mW 的半导体激光指示器 (キコー技研 (株) 制的型号为 MLXS-D-12-680-35)。作为检测器，使用可视红外精密测光用硅光电二极管 (滨松フォトニクス (株) 制的型号为 S2387-66R)。作为样品用容器，使用将厚度为 0.1cm 的光学玻璃板粘在一起形成的容量约为 200 μl 的正四棱柱形状容器。

在自光源的 0.5cm 处设置一面与光源垂直的容器，在距容器约 5.5cm 处，与来自光源的光的方向呈 90° 角度地设置检测器。在检测器和容器之间设置遮光筒不使杂散光入射到检测器中。依赖于检测器检测的光量的电流信号，通过由电流电压变换回路 (10⁶V/A) 以及放大器形成的增幅回路增幅成 100 倍的电压信号之后，通过锁定放大器 (エヌエフ回路设计ブロック制，型号 5610B)，形成位相敏感检波，通过 GPIB 控制进入到计算机中。

关于各缓冲液的空白值的测定按照以下进行。反应溶液的混合比为缓冲液为 187 μl。抗体溶液为 7 μl。反应溶液中的抗体的最终浓度为约 0.11mg/ml。

向容器中加入上述容量的缓冲液和抗体溶液搅拌混合。散射光的测定，从添加抗体溶液前 10 秒开始，以 0.5 秒的间隔进行 300 秒。测定值作为电压值得到。求所得各时间的测定值的在 200~300 秒之间的平均值，并将其作为各缓冲液的空白值。测定在室温 (约 25℃) 下进行。

结果示于图 5。图 5 的纵轴表示散射光，横轴表示 pH。如图所示，在所用抗体的等电点 (约 6.0) 附近 pH5.5~6.5 范围，空白值增高，但是在低于等电点 0.5 的 pH，即 pH5.5 附近观察到空白值的抑制，在低于抗体的等电点 1.0 以上的 pH，即 pI-pH ≥ 1.0 的 pH5.0 以下的范围，可以观察到空白值被显著 (三分之一左右) 抑制。因此，清楚了在低于等电点约 1.0 以上的 pH 条件的情况下，降低空白值的效果高。特别是，该效果在 pI-pH 大于等于 1.5 的 pH4.5 以下的范围更高，几乎显示了最大的效果，空白值被抑制到五分之一左右。

(实施例 2) 人白蛋白测定用反应试剂试剂盒的制造

根据以上结果，制造用于在 pH4.5 反应的人白蛋白测定用反应试剂试剂盒。

由上述结果可以认为，在免疫散射比浊法这样的免疫反应测定方法中，要维持缓和前带现象和防止测定值下降的效果，以及抑制空白值，可以使用如下的抗体作为试验试剂，该抗体在远离酸性缓冲液 pH 的 pH 范围具有等电域。研究图 4 的结果，认为最好选择在远离反应溶液 (测定溶液) 的 pH 至少 1.0 以上的范围内具有等电域的抗体。组合与人白蛋白不同的表位结合的 2 种以上的单克隆抗体也可以制成抗体试剂，该抗体在远离反应溶液的 pH 至少 1.0 以上的 pH5.5 以上的范围具有等电点，在本实施例中显示了使用多克隆抗体来制造抗体试剂的方法。

首先，调制抗体试剂。兔抗人白蛋白多克隆抗体是由与比较例相同的抗血清经使用蛋白质 A 柱色谱进行精制而得。精制是使用 1.5M 甘油、3.0M NaCl、pH8.9 的结合缓冲液，在柱中平衡化蛋白质 A 后，向柱中灌入抗血清，抗血清中的抗体被特

异地吸附在蛋白质 A 上,与抗血清中的抗体以外的成分分离。分离后,冲流 0.1M 枸橼酸、pH4.0 的洗脱缓冲液,使抗体自蛋白质 A 洗脱后回收。向截止分子量为 1 万的透析管中加入洗脱回收的抗体,用由 0.05M 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸(同仁制,以下略称为吗乙磺)、0.04 重量% NaN_3 组成的 pH5.5 的缓冲液(5L \times 2 次)进行透析,置换缓冲液成分。

通过 10000g 的离心分离,除去透析后的抗体溶液中的不溶物。灌注到 DEAE 阴离子交换柱色谱中,采集非吸附成分。通过该操作,可选择地采集在 pH5.5 带正电的抗体,即 pI 大于 5.5 的抗体。在由 0.05M 3-(N-吗啉代)丙磺酸(同仁制,以下略称为吗丙磺)、0.15M NaCl、0.04 重量% NaN_3 组成的 pH7.4 的缓冲液(5L \times 2 次)中,透析采集的非吸附成分,置换缓冲液成分。通过 10000g 的离心分离,除去透析后抗体溶液中的不溶物。超滤浓缩后,通过在 280nm 的吸光度测定来测定抗体浓度,最后,使用透析中所用的缓冲液调制成 3.0mg/ml,将其作为抗体试剂(抗体试剂 B)。抗体试剂 B 是只含有具有 pI 值 5.5~7.4 范围等电域的抗体的试剂。

上述调制的抗体浓度,没有特别的限定。虽然所制的抗体溶液在室温也可保存,但是从防止抗体变性的角度来考虑,较好在较低温度下保存,更好为在 4℃ 保存。

接下来,按照下述做法进行调制含有多元羧酸或者多元羧酸盐的缓冲液。多元羧酸使用苯二甲酸。称量一定量的苯二甲酸氢钾、聚乙二醇 6000 溶于调制目标体积的约 90%的纯水中,使其最终浓度分别为 0.05M、4 重量%。使用 NaOH 将缓冲液的 pH 调整到 4.5。

通过组合上述形成的含有多元羧酸或多元羧酸盐的缓冲液和上述调制的抗体试剂,可制成人白蛋白测定用反应试剂试剂盒。

使用上述形成的人白蛋白测定用反应试剂试剂盒时,为了形成反应系,混合含有人白蛋白的试样(检体)、抗体试剂以及含有多元羧酸或多元羧酸盐的缓冲液再使用。

上述混合,可采用任意的办法。混合的比率可根据要测定的人白蛋白的浓度来决定。通过测定在由混合形成的反应系中生成的,由人白蛋白和抗体的免疫反应造成的变量(例如抗原抗体复合体的量),可知道检体中抗原浓度。

另外,使抗体在胶乳、金胶体、磁微粒等微粒载体上固定化,或者也可在抗体上标记酶、色素、荧光物质、发光物质等。

另外,上述试剂盒的调制中,在 pH 调制中使用 NaOH,但是也可使用 KOH、LiOH、 NH_4OH 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 等氢氧化物。

另外,在实施例中,在调制含有多元羧酸或多元羧酸盐的缓冲液中使用了苯二甲酸氢钾,但是也可使用其它的多元羧酸或多元羧酸盐,例如可使用枸橼酸酐、枸橼酸一水合物、枸橼酸三钠、枸橼酸三钠二水合物、枸橼酸三钾一水合物、枸橼酸三铵、枸橼酸氢二铵、枸橼酸钙四水合物、枸橼酸镁九水合物、枸橼酸三锂水合物、枸橼酸铜(II) 2.5 水合物、DL-异枸橼酸三钠、trans-乌头酸、cis-乌头酸酐、苯二甲酸、苯二甲酸酐、苯二甲酸钾、苯二甲酸钠、苯二甲酸铵、苯二甲酸铜(II)、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、内消旋酒石酸一水合物、(+)-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、琥珀酸、琥珀酸铵、琥珀酸二钠、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、癸二酸等中的任一者。另外,也可将这些组合使用,这种情况的pH调整,当在纯水中溶解时的pH在作为调整目标的pH的碱性侧则可使用HCl,如在酸性侧则可使用上述氢氧化物等,另外也可调整上述示例的多元羧酸或多元羧酸盐的混合比。

另外,抗体溶液的缓冲剂成分以及pH,不限于上述组成和pH。例如,一液系的试剂,即形成试验溶液时,由于在抗体溶液中含有多元羧酸或多元羧酸盐,为了使反应系的pH为酸性,用含有目的多元羧酸或多元羧酸盐的,调整到目的酸性pH的缓冲液透析既可。

另外,在本实施例中显示了使用抗人白蛋白多克隆抗体的试剂的制造方法,但是也可通过混合与人白蛋白不同结合部位结合的2种以上的单克隆抗体形成,这种情况时,使用的抗体的pI要比所用缓冲液的pH大,较好为大0.5以上,更好为大1.0以上,最好为大1.5以上。本实施例的情况中,较好为pI在5.5以上,最好为pI在6.0以上。

(实施例3)降低人白蛋白测定用反应试剂试剂盒的空白值的效果

使用在实施例2中调制的只含有具有pI值5.5~7.4范围的等电域的抗体的抗体试剂B和在比较例中调制的只含有具有pI值4.5~7.4范围的等电域的抗体的抗体试剂A,按照与比较例相同的操作,在pH4.5的反应溶液中进行光谱测定。对于抗体试剂A和抗体试剂B,测定时反应溶液中的缓冲液成分是含有多元羧酸或多元羧酸盐的相互一样的成分。

结果示于图 6。如图所示可以明白，对于向反应系中添加人白蛋白浓度为 0 时的抗体试剂 B 的散射光强度（即，空白值）要比比较例中使用的抗体试剂 A 的空白值显著减少。

这样，通过选择具有相对于所用的缓冲液的 pH 的合适的等电域的抗体来使用，可抑制免疫反应测定法中空白值的上升，可确认本发明的一实施方式中的人白蛋白测定用反应试剂试剂盒的有效性。

（实施例 4）免疫反应测定用光学单元的构成

以下，参考附图详细说明本发明的免疫反应测定用光学单元。图 7(a) 是显示本发明的免疫反应测定用光学单元 2 构成的斜视图，图 7(b) 是其截面图。

本实施例的免疫反应测定用光学单元 2 设置有光学测定用窗 21、试样导入道 22、开口部 23 以及柱塞连结部 24。本实施例中，光学单元 2 的存在光学测定用窗 21 的部分的立体形状是正四棱柱，四个面均是实质上平坦的，是由在可见光区光学透明的材质构成的。光路长定为 1cm，可吸入约 1ml 的试样，是可光学测定的结构。本实施例中，作为容器的材质使用聚苯乙烯。

通过冷冻干燥试剂 25，可将其可移动地负载在免疫反应测定用光学单元 2 的从光学测定用窗 21 到试样导入道 22 的内壁上。本实施例中，试剂 25，调制成使其在导入 1ml 的液体试样时的最终浓度分别为，人白蛋白抗体 1mg/ml、苯二甲酸为 0.05M，聚乙二醇 6000 为 4 重量%，且 pH 为 5.0。

接着，参考图 8(a)~图 8(d) 来说明按照以上形成的免疫反应测定用光学单元 2 的主要构成。

图 8(a) 是装着免疫反应测定用光学单元 2 的分析装置 3 的主要结构的示意图。本实施例中，分析装置 3 是由在框体 31 中与免疫反应测定用光学单元 2 连接的柱塞 32、与免疫反应测定用光学单元 2 的光学测定用窗 21 的一面垂直配置的光源 35 以及包括在光源 35 的透过光路上与光学测定用窗 21 的另一面垂直配置的透过光检测用检测器 33、与光源 35 的透过光路相同高度的，与光学测定用窗的又另一面垂直配置的散射光检测用检测器 34 的检测部分组成。

如图 8(b)~图 8(d) 所示，通过向上移动柱塞 32，液体试样 36 经开口部 23 流入。通过该液体试样 36 的流入，如图 8(b) 所示，通过冷冻干燥，在免疫反应测定用光学单元 2 的光学测定用窗 21 的内壁可移动负载的由人白蛋白抗体、苯二甲酸以及聚乙二醇 6000 形成的试剂 25 与液体试样 36 相接触，使试剂 25 在液体试样 36 中分散，开始溶解（液体试样中分散的试剂 37）。如图 8(c) 所示，通过进一步

向上移动柱塞 32, 液体试样 36 到达比存在免疫反应测定用光学单元 2 的光学测定用窗 21 上的光源 35, 透过光检测用检测器 33 以及散射光检测器 34 的部位更上的部位。

由自液体试样 36 的开口部 23 的液体试样 36 的流入产生的流动而分散在液体试样中的由人白蛋白抗体、苯二甲酸以及聚乙二醇 6000 形成的试剂 37, 最终如图 8(d) 所示, 在液体试样中溶解。这样, 通过在液体试样 36 中所含的人白蛋白和人白蛋白抗体的抗原抗体反应生成凝集复合体, 在液体试样中产生混浊。

由于该混浊的程度依赖于在液体试样 36 中所含的人白蛋白的浓度, 通过测定该程度, 可知道液体试样 36 中所含人白蛋白浓度。

为了测定液体试样 36 的混浊程度, 对着光学测定用窗 21 的一面, 几乎垂直地照射来自光源 35 的光。由光学测定用窗 21 的一面入射的光, 透过液体试样 36 中后, 直进性高的光, 通过光源 35 侧的光源测定用窗 21 的对面的光学测定用窗 21 射出, 在透过光检测用检测器 33 被接收, 在液体试样 36 中的由抗原抗体反应生成的凝集复合体而形成的散射光, 通过与光源 36 侧的光学测定用窗 21 垂直的光学测定用窗 21 射出, 在散射光检测用检测器 34 被接收。在此, 图中未示, 来自任一检测器的功率均经 A/D 变换, 输入到微型计算机或个人计算机中, 进行数据处理。

以在透过光检测用检测器 33 及散射光检测用检测器 34 所接受的光的强度的至少一方为基础, 可测定所生成的试样与免疫反应测定用试剂的反应。以透过光检测用检测器 33 的光强度为基础时, 求得吸光度或混浊度。这种情况时, 事先将导入液体试样前的透过光作为参考光。

以散射光检测用检测器 34 的光的强度作为基础时, 求得散射光强度。可使用任一指标测定试样和试剂的反应, 由试样和试剂的反应产生的混浊程度较低的情况时, 可更高灵敏度地测定求得散射光强度。

由上所述, 由于使用本实施例的免疫反应测定用光学单元 2, 可在采集试样的同时, 迅速分光测定抗原抗体反应, 特别是在测定反应过渡变化的情况时, 时间损耗少, 可确实捕捉到过渡的变化。另外, 不需要移动交换光学单元液体试样·试剂混合液, 操作简便。

以上, 详细说明了本发明, 上述的说明的所有方面只是本发明的示例, 而不使本发明的限定。可在不超出本发明的范围内进行各种改良和变形。

产业上利用的可能性

本发明涉及的免疫反应测定方法及其中所用试剂、试剂盒以及光学单元，具有可抑制检体的免疫反应测定中的前带现象，抑制测定值的减少，并且抑制抗体分子间的非特异凝集的效果，因此作为免疫散射比浊法、免疫比浊法、玻片凝集法等使用均一系列的测定系的免疫反应测定方法及其中所用试剂、试剂盒以及光学单元等是有用的。

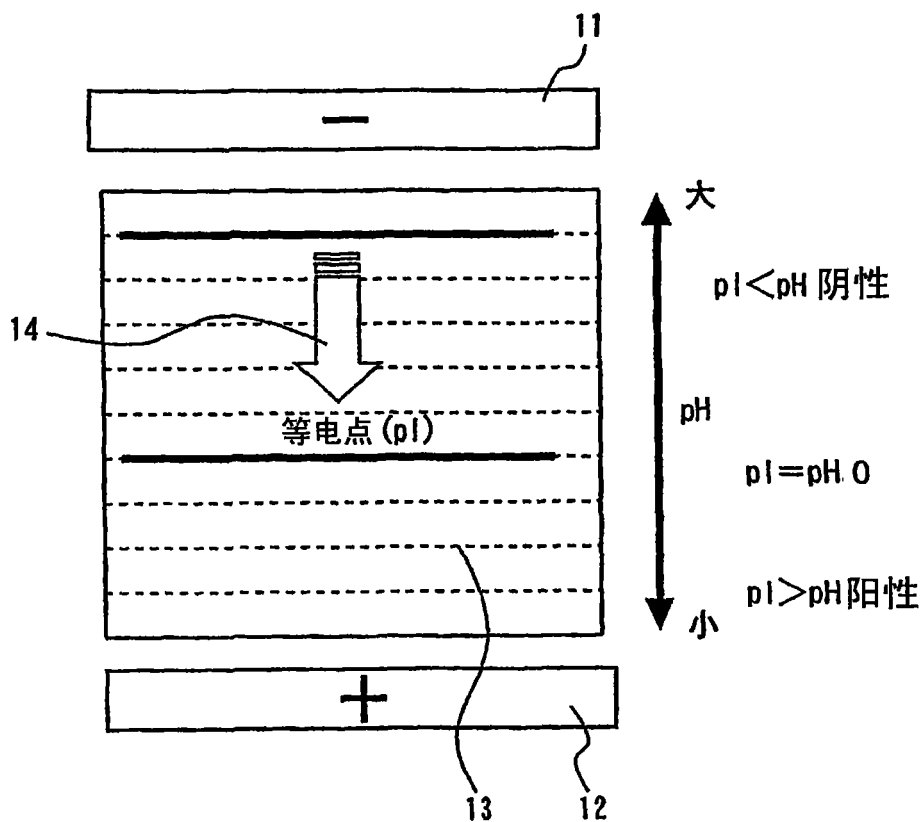


图 1

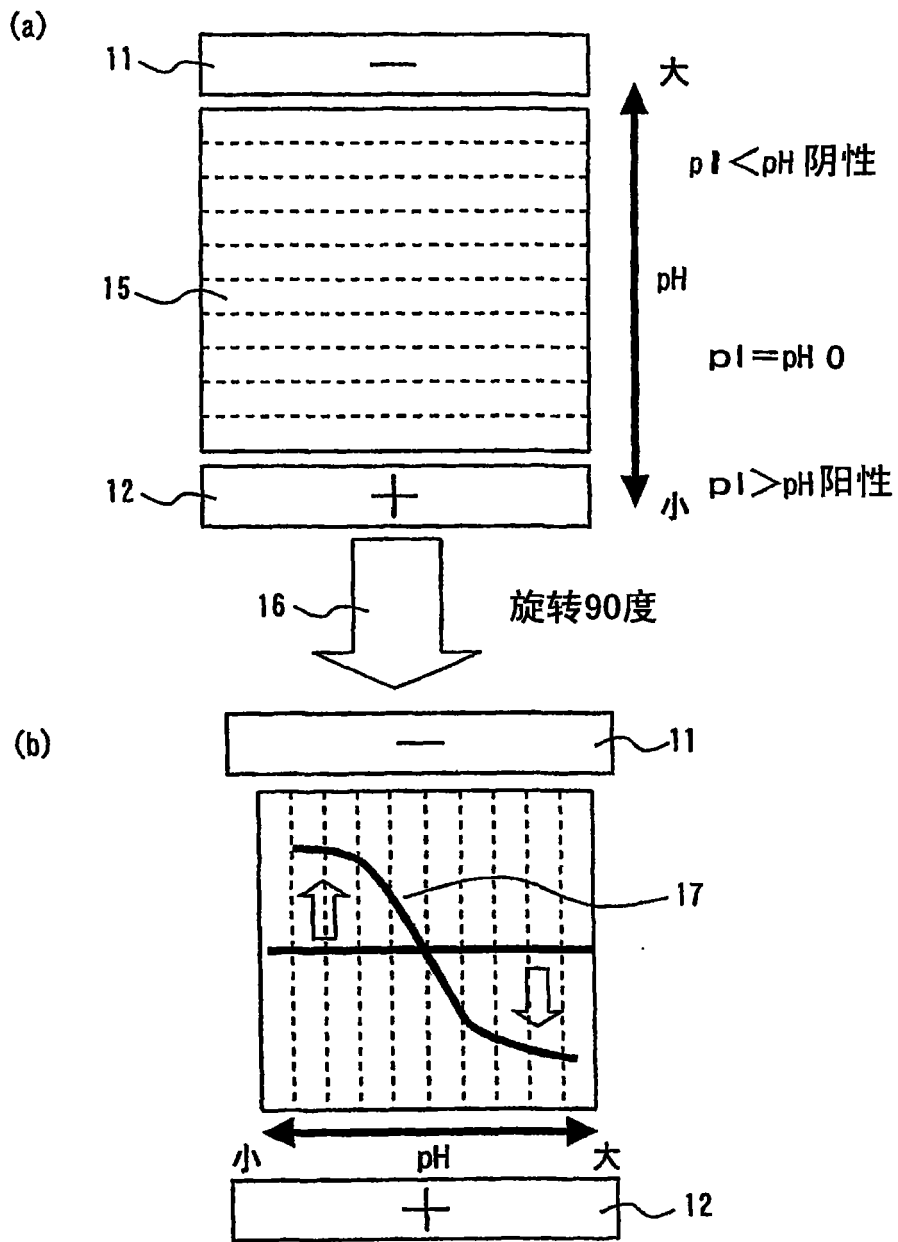


图 2

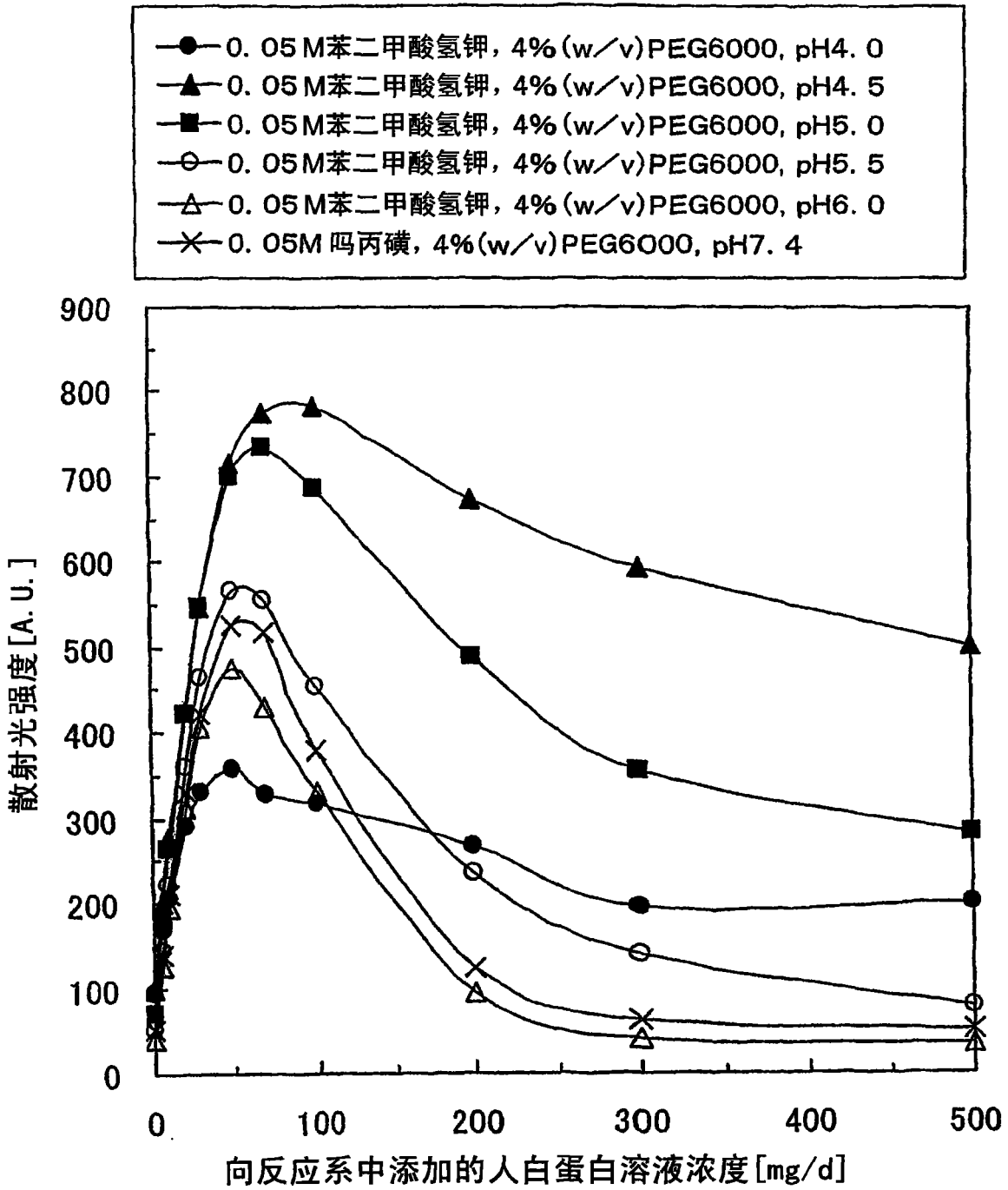


图 3

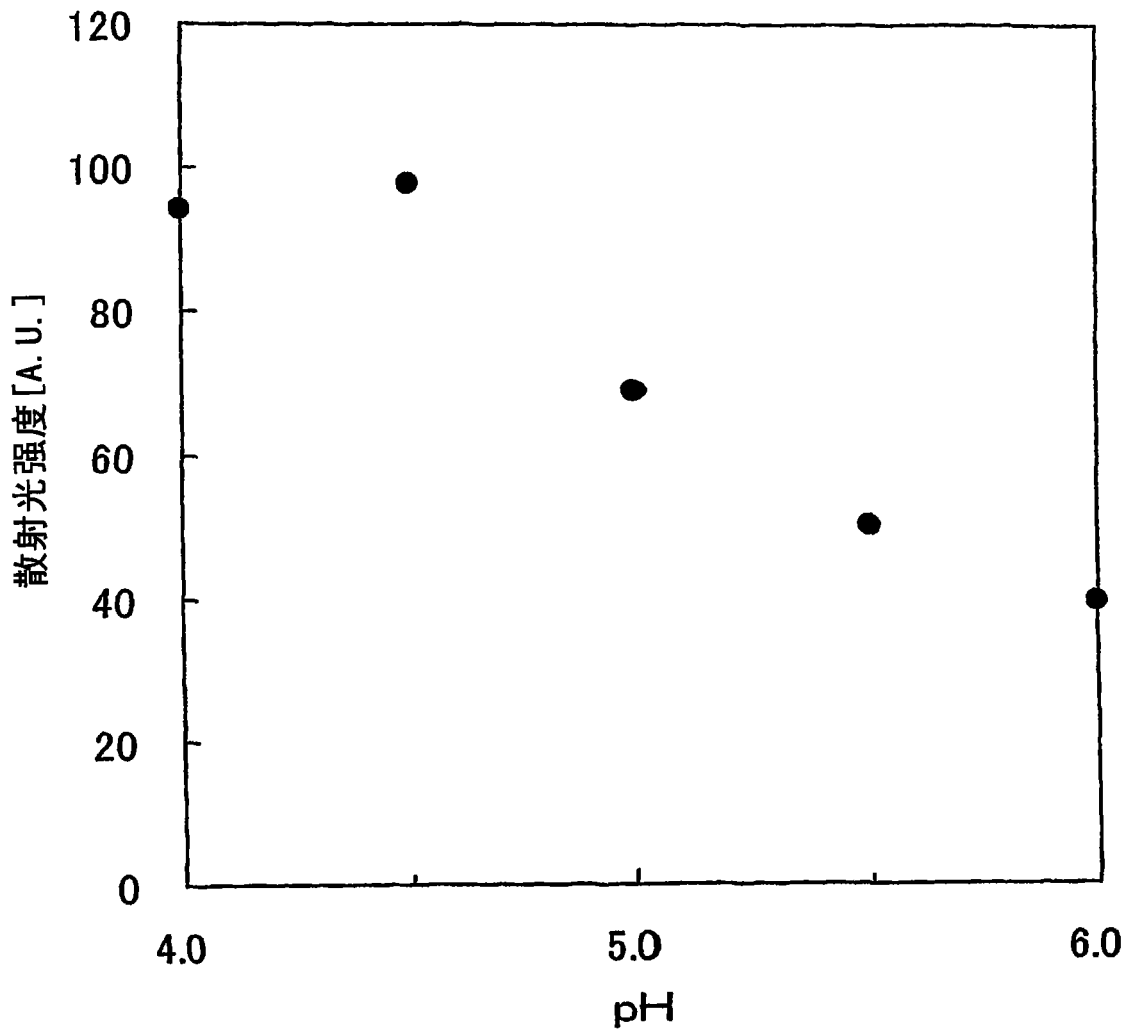


图 4

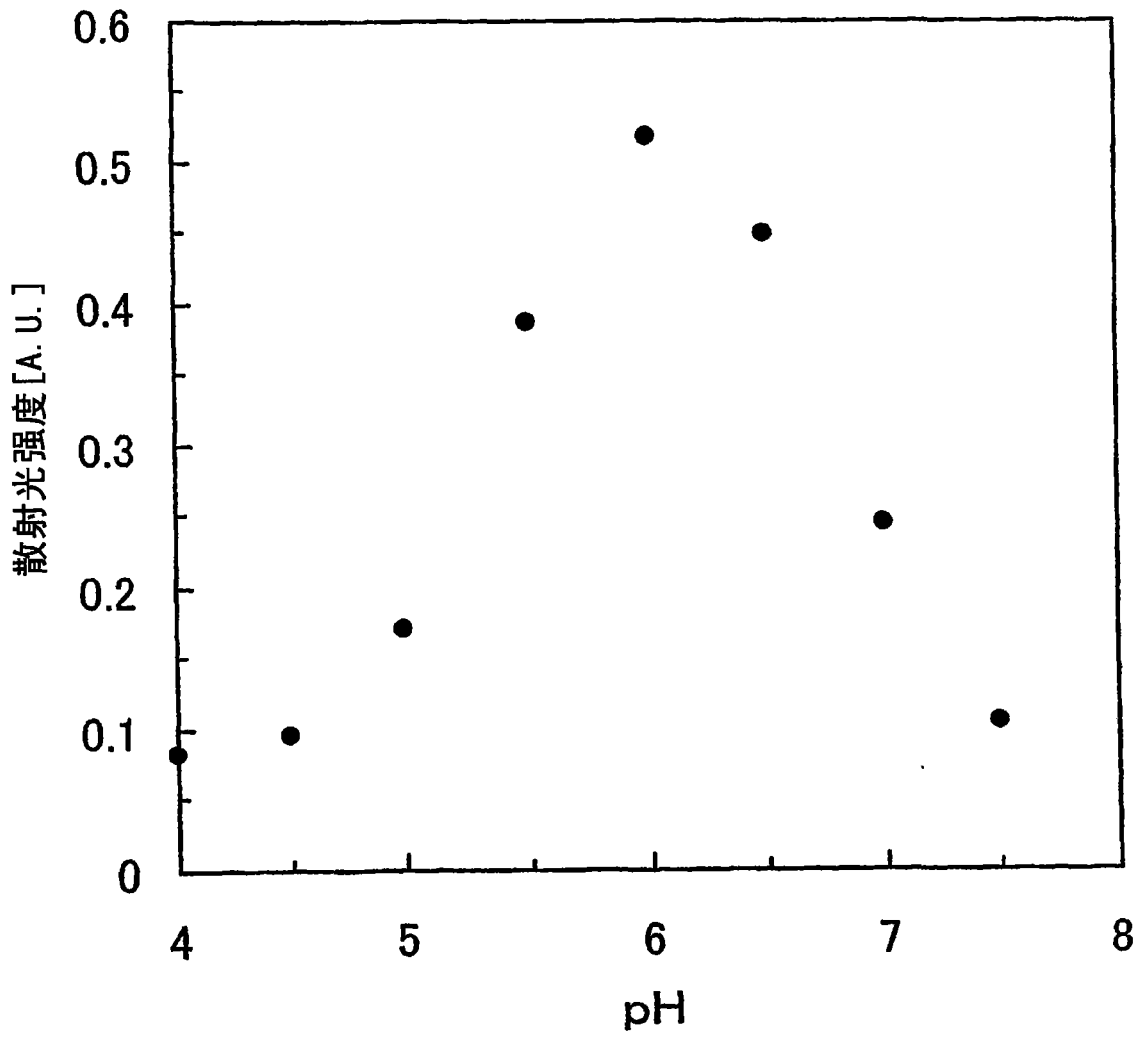


图 5

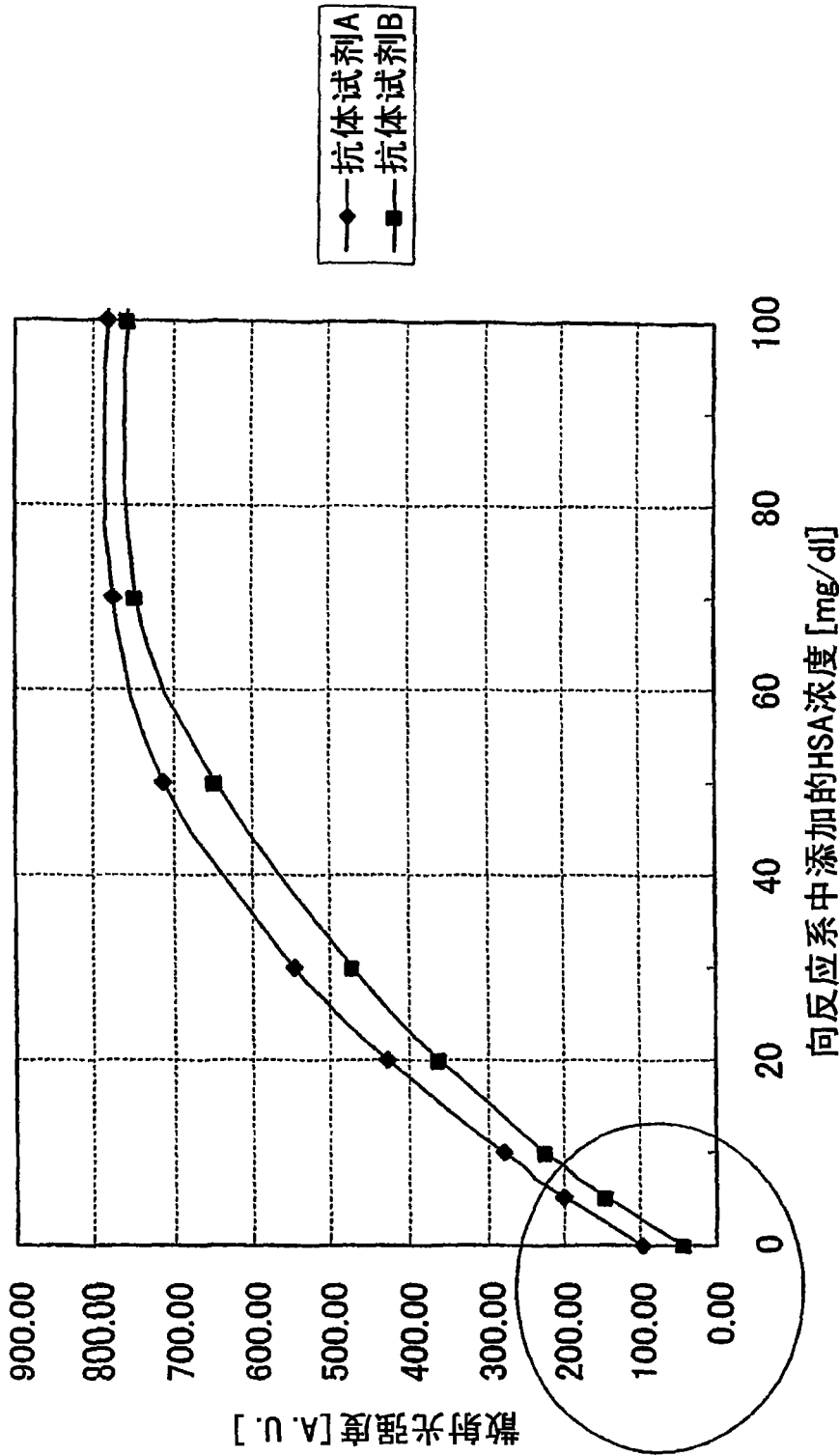


图 6

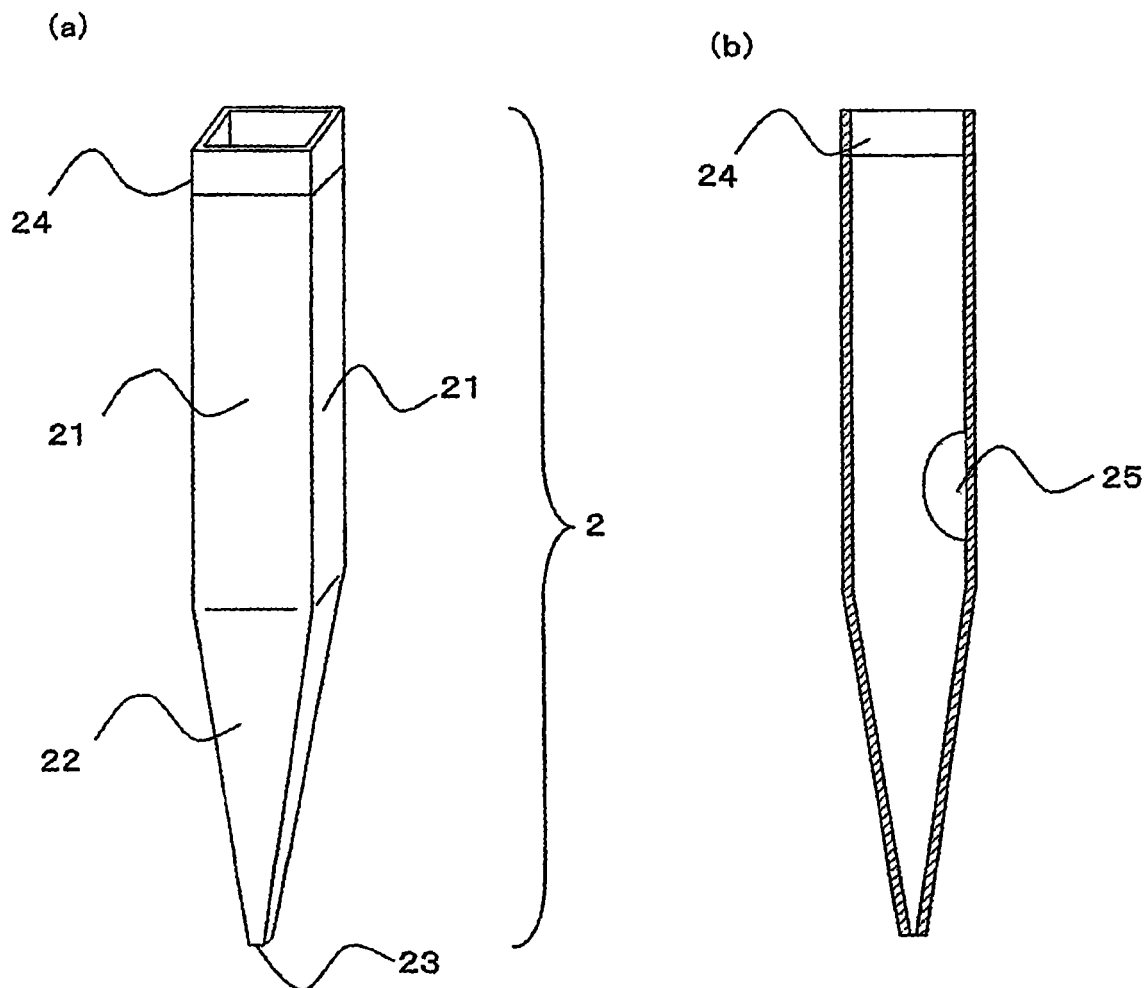
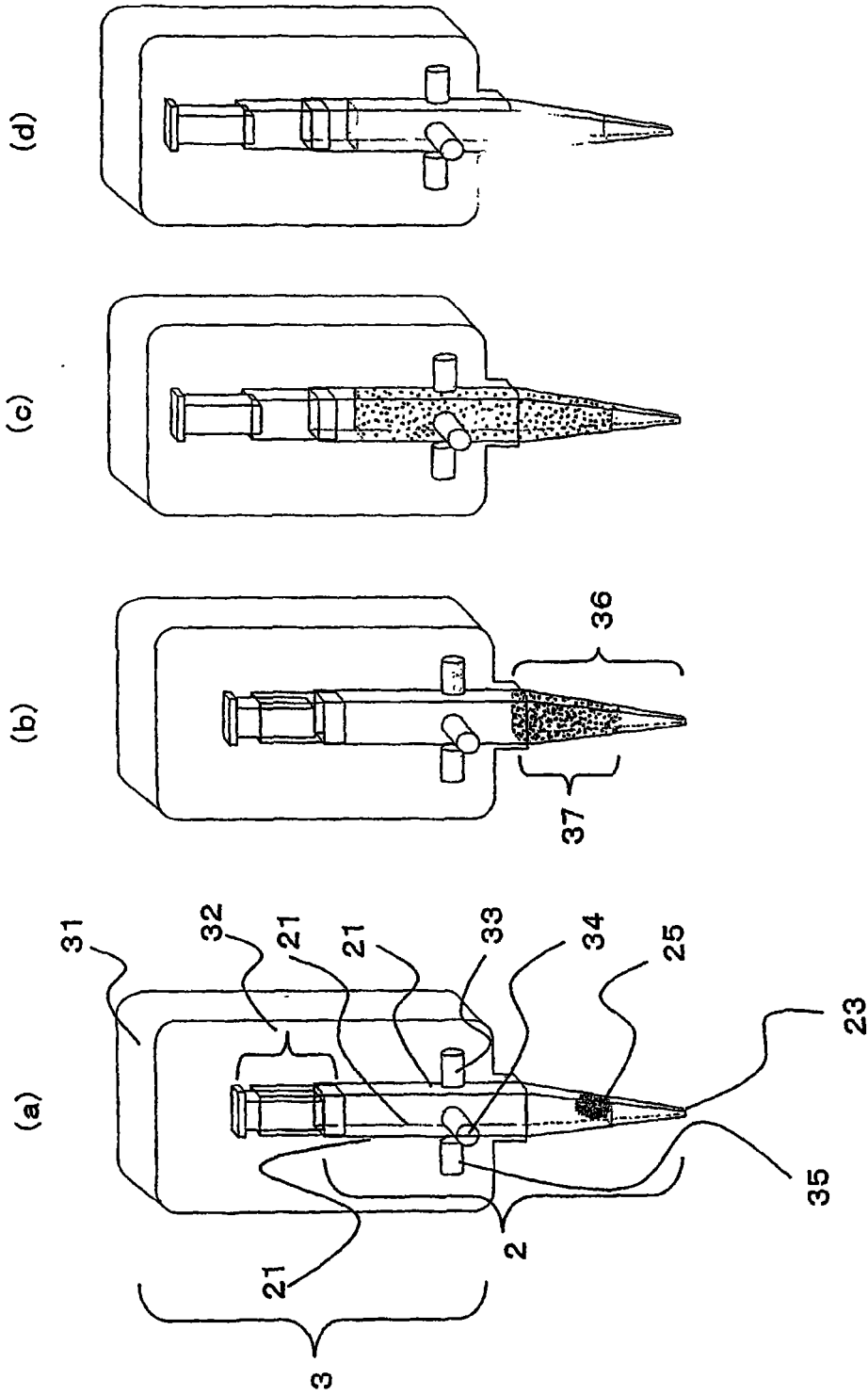


图 7



8

专利名称(译)	免疫反应测定方法及该方法所用的试剂、试剂盒以及光学单元		
公开(公告)号	CN1860365A	公开(公告)日	2006-11-08
申请号	CN200480028043.5	申请日	2004-09-22
申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	北脇文久 龟井明仁 河村达朗		
发明人	北脇文久 龟井明仁 河村达朗		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/84		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/84		
优先权	2003336199 2003-09-26 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了在酸性条件下，测定检体中的被测物质的方法。该方法的特征在于，包括混合上述检体和上述检体中被测物质的抗体而形成反应系的工序A和测定上述反应系中抗原抗体反应的工序B，上述反应系的pH设定在酸性，并且上述抗体的pI和上述反应系的pH之间的关系设定为 $pI > pH$ ，通过本发明，在以酸性缓冲液为基础的免疫测定反应系中，特别是可提高抗原低浓度范围内的精密度。

