



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102439449 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 02

(21) 申请号 201080022548. 6

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22) 申请日 2010. 11. 22

代理人 白丽 陈建全

(30) 优先权数据

2009-267109 2009. 11. 25 JP

PCT/JP2010/003573 2010. 05. 27 JP

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 11. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/006831 2010. 11. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02011/064981 JA 2011. 06. 03

(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 若井纯子 龟井明仁 村冈仁

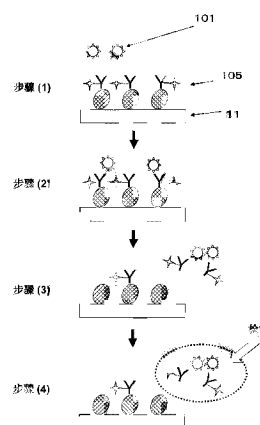
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 11 页

(54) 发明名称

免疫测定方法

(57) 摘要

本发明提供一种免疫测定方法。该方法无需两种以上的抗体,而能减少免疫测定体系构筑时消耗的劳力,并且除高分子抗原之外还能应用于半抗原等低分子抗原。本发明的方法是一种使经由蛋白 A 结合在基板表面的免疫球蛋白 G 抗体从上述表面解离的方法,上述方法包括以下步骤 A 及 B。即,提供具有经由蛋白 A 结合免疫球蛋白 G 抗体的表面的基板的步骤 A,其中,所述免疫球蛋白 G 抗体由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株生成;以及将含有人血清白蛋白的溶液提供至上述表面,从而使上述免疫球蛋白 G 抗体从上述蛋白 A 解离的步骤 B,其中,所述溶液具有 6 以上 8.9 以下、优选 7.4 以上 8.9 以下的 pH。



1. 一种使经由蛋白 A 结合在基板表面的免疫球蛋白 G 抗体从所述表面解离的方法，所述方法包括以下步骤 A 及步骤 B：

步骤 A，制备具有经由蛋白 A 结合免疫球蛋白 G 抗体的表面的基板；

步骤 B，将含有人血清白蛋白的溶液提供至所述表面，从而使所述免疫球蛋白 G 抗体从所述蛋白 A 解离；

其中，所述免疫球蛋白 G 抗体为由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体，即 2F13F11G11，

所述溶液具有 6 以上 8.9 以下的 pH。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，在所述步骤 B 中，通过抗原抗体反应，形成所述免疫球蛋白 G 抗体与所述人血清白蛋白的复合物。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中，在所述复合物形成时，所述免疫球蛋白 G 抗体从所述表面解离。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中，在所述步骤 B 之后，所述溶液含有从所述表面解离的所述免疫球蛋白 G 抗体。

5. 如权利要求 2 所述的方法，其中，在所述步骤 B 之后，所述溶液含有所述复合物。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述溶液为缓冲液。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中，所述 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

9. 一种对溶液中所含人血清白蛋白进行定量的方法，包括以下步骤 A 至步骤 C：

步骤 A，制备具有经由蛋白 A 结合免疫球蛋白 G 抗体的表面的基板，其中，所述免疫球蛋白 G 抗体被标记物所修饰，所述免疫球蛋白 G 抗体为由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体，即 2F13F11G11；

步骤 B，将含有人血清白蛋白的溶液提供至所述表面，从而使所述免疫球蛋白 G 抗体从所述蛋白 A 解离并混合在所述溶液中，其中，所述溶液具有 6 以上 8.9 以下的 pH；

步骤 C，对混合在所述溶液中的修饰所述免疫球蛋白 G 抗体的所述标记物进行定量，从而对所述溶液中含有的所述人血清白蛋白进行定量。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中，在所述步骤 B 中，通过抗原抗体反应，形成所述免疫球蛋白 G 抗体与所述人血清白蛋白的复合物。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其中，在所述复合物形成时，所述免疫球蛋白 G 抗体从所述表面解离。

12. 如权利要求 9 所述的方法，其中，在所述步骤 B 之后，所述溶液含有从所述表面解离的所述免疫球蛋白 G 抗体。

13. 如权利要求 10 所述的方法，其中，在所述步骤 B 之后，所述溶液含有所述复合物。

14. 如权利要求 9 所述的方法，其中，所述 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

15. 如权利要求 9 所述的方法，其中，所述溶液为缓冲液。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中，所述 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

17. 一种确定溶液中是否含有人血清白蛋白的方法，包括以下步骤 A 至步骤 D：

步骤 A，制备具有经由蛋白 A 结合免疫球蛋白 G 抗体的表面的基板，其中，所述免疫球蛋白 G 抗体被标记物所修饰，所述免疫球蛋白 G 抗体为由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细

胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体,即 2F13F11G11;

步骤 B,将有可能含有人血清白蛋白的溶液提供至所述表面,从而使所述免疫球蛋白 G 抗体从所述蛋白 A 解离并混合在所述溶液中,其中,所述溶液具有 6 以上 8.9 以下的 pH;

步骤 C,检测混合在所述溶液中的修饰所述免疫球蛋白 G 抗体的所述标记物;

步骤 D,如果在所述步骤 C 中检测出所述标记物,则确定所述溶液含有所述人血清白蛋白。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中,在所述步骤 B 中,通过抗原抗体反应,形成所述免疫球蛋白 G 抗体与所述人血清白蛋白的复合物。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中,在所述复合物形成时,所述免疫球蛋白 G 抗体从所述表面解离。

20. 如权利要求 17 所述的方法,其中,在所述步骤 B 之后,所述溶液含有从所述表面解离的所述免疫球蛋白 G 抗体。

21. 如权利要求 18 所述的方法,其中,在所述步骤 B 之后,所述溶液含有所述复合物。

22. 如权利要求 17 所述的方法,其中,所述 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

23. 如权利要求 17 所述的方法,其中,所述溶液为缓冲液。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中,所述 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

免疫测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种使利用蛋白 A 结合在基板表面的免疫球蛋白 G 从所述表面解离的方法。

背景技术

[0002] 蛋白 A 是在金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的细胞壁成分构成中占 5% 比重的蛋白质, 简称为“SpA”。蛋白 A 对免疫球蛋白 G 具有高亲合性。蛋白 A 夹在基板的表面和该免疫球蛋白 G 之间, 并将免疫球蛋白 G 固定在该基板的表面上。专利文献 1 的第 3 页右下第 3 行~第 4 行公开了免疫球蛋白 G 结合于蛋白 A, 但通过降低 pH 使免疫球蛋白 G 从蛋白 A 解离的技术。利用这种 pH 降低导致的解离, 可以检测或定量生体试样中含有的目的物质。

[0003] pH 的降低可对生体试样产生不期望的变性效果。并且, 为了使 pH 降低, 也需增加处理步骤的数目。

[0004] 本发明人们发现, 在经由蛋白 A 结合了由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株生成的抗人白蛋白单克隆抗体 (2F13F11G11) 所构成的免疫球蛋白 IgG 抗体的表面上供给含有人血清球蛋白的生体材料时, 即使该生体材料的 pH 为 6 以上、优选为 7.4 以上, 该免疫球蛋白 IgG 抗体也可从蛋白 A 解离。

[0005] 【专利文献 1】: 日本特开平 02-073158 号公报

发明内容

[0006] 本发明提供一种使经由蛋白 A 结合在基板表面的免疫球蛋白 G (IgG) 抗体从上述表面解离的方法。这种方法包括以下步骤。即, (A) 制备具有经由蛋白 A 结合了免疫球蛋白 G 抗体的表面的基板的步骤, 以及 (B) 将含有人血清白蛋白的溶液提供至上述表面, 从而使上述免疫球蛋白 G 抗体从上述蛋白 A 解离的步骤。这里, 免疫球蛋白 G 抗体为由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体 (2F13F11G11), 上述溶液具有 6 以上 8.9 以下的 pH。

[0007] 本说明书中使用的术语中, 术语“蛋白 A”是指, 也称之为“SpA”的蛋白质。这一蛋白质是从金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的细胞壁成分中发现的。本领域技术人员可通过市售供给渠道而获得天然或合成的蛋白 A。

[0008] 在一种实施方式中, 在上述步骤 (B) 中, 通过抗原抗体反应可形成上述免疫球蛋白 G 抗体与上述人血清白蛋白的复合物。

[0009] 本说明书中使用的术语中, 术语“复合物”是指, 2 个以上的分子通过相互作用结合, 且在其整体上形成如 1 个分子状地行使功能的状态的一组分子。例如, 多肽、多聚核酸、脂质、糖、低分子等多个分子相互作用并结合, 并可形成如 1 个分子状地行使功能的状态的一组分子。在本说明书的上述例子中, 上述免疫球蛋白 G 抗体与人血清白蛋白分子通过相互作用而结合, 并形成如 1 个分子状地行使功能的状态的一组分子。

[0010] 本说明书中使用的术语中,术语“相互作用”是指,针对 2 个物质(的分子)而言,其含义可涵盖一方的物质与另一方的物质之间的作用力(例如,分子间作用力(范德华力)、氢键、疏水性相互作用等)。通常,相互作用后的 2 个物质处于会合或结合的状态。

[0011] 本说明书中使用的术语中,术语“结合”是指,在 2 个蛋白质或化合物或相关的蛋白质或化合物之间、或它们的组合之间的物理相互作用或化学相互作用。这种结合包括离子键结合、非离子键结合、氢键结合、范德华结合、疏水性相互作用等。物理相互作用(结合)可以是直接性或间接性结合,间接性结合或借助或起因于其他蛋白质或化合物的性能效果。直接性结合是指,即便借助或起因于其他蛋白质或化合物的性能效果也不会产生、且不伴随其他实质性化学中间体的相互作用。

[0012] 在另一种实施方式中,上述复合物形成时,上述免疫球蛋白 G 抗体可从上述表面解离。

[0013] 此外,上述免疫球蛋白 G 抗体从上述表面解离后,在其解离时存在的复合物无需一定要稳定存在,在解离的同时即便其复合物间的结合解开,也可在后续的步骤中构建适宜必要的测定体系。

[0014] 在另一种实施方式中,在上述步骤(B)之后,上述溶液中可含有从上述表面解离的上述免疫球蛋白 G 抗体。

[0015] 再者,在另一种实施方式中,在上述步骤(B)之后,上述溶液中可含有上述复合物。

[0016] 再者,在另一种实施方式中,上述 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

[0017] 再者,在另一种实施方式中,上述溶液可以是缓冲液。更优选为,上述 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

[0018] 作为其他的形态,本发明还可提供利用使经由蛋白 A 结合在基板表面的免疫球蛋白 G(IgG) 抗体从上述表面解离的方法来定量溶液中所含的被测物质的方法,或者确定其溶液中是否含有被测物质的方法。这里,经由蛋白 A 结合在基板表面的免疫球蛋白 G 抗体被适当的标记物修饰。并且,免疫球蛋白 G 抗体与该溶液中存在的被测物质(人血清白蛋白)相互作用,并从蛋白 A 解离。解离后的免疫球蛋白 G 抗体被混合至该溶液中,从而通过检测是否存在结合在该免疫球蛋白 G 抗体上的标记物、或通过在该溶液中检测该标记物的量,来实现是否存在被测物质的检测及其定量。

[0019] 作为其他的形态,本发明提供一种利用使经由蛋白 A 结合在上述基板表面的免疫球蛋白 G 抗体从上述表面解离的方法来实施免疫测定方法的装置。

[0020] 作为用于实施本发明的一种实施方式所涉及的免疫测定方法的装置,例如至少包括与被标记物修饰的被测物质进行特异性结合的抗体(由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株所生成的免疫球蛋白 G 抗体)、与上述抗体进行特异性结合的结合剂(蛋白 A)、以及载体(例如基板)。

[0021] 在该装置上实施的免疫测定方法包括以下步骤。即,包括

[0022] (1) 对于经由上述结合剂固定在上述载体上的上述抗体,提供被测物质的步骤;

[0023] (2) 通过抗原抗体反应,形成上述抗体与上述被测物质的复合物的步骤;

[0024] (3) 上述抗体与上述被测物质形成复合物时,上述抗体通过解除与上述结合剂的结合而从上述载体解离的步骤;以及

[0025] (4) 计量解离后的上述抗体的上述标记物的量的步骤。

[0026] 作为上述计量解离后的上述抗体的上述标记物的量的步骤,只要是通过利用标记物的化学性质或物理性质来定量标记物的方式,可以采用任何方式加以实现。

[0027] 发明效果:本发明完成了以只采用与抗原进行特异结合的一种抗体、和简单的步骤为特征的免疫测定体系的构建。由此,可提供不仅能够测定由高分子的抗原构成的被测物质、还能够测定由低分子的抗原构成的被测物质的免疫测定方法及装置。另外,多数生体试样的 pH 为中性。因此,无需降低 pH 的步骤,即可将生体试样作为溶液加以利用。从而,在本发明中可避免因 pH 的降低而对生体试样产生的不良影响。

附图说明

[0028] 图 1 为本发明的免疫测定方法的基本结构图。

[0029] 图 2 为表示本发明的免疫测定方法的测定流程的图。

[0030] 图 3 为表示本发明的免疫测定方法在免疫层析中的应用例的图。

[0031] 图 4 为实施例 1 中测定的感应图。

[0032] 图 5 为实施例 2 中测定的感应图。

[0033] 图 6 为表示实施例 2 中的盐浓度与解离度的关系的图。

[0034] 图 7 为表示实施例 2 中的缓冲液种类及 pH 与解离度的关系的感应图。

[0035] 图 8 为表示实施例 2 中的缓冲液种类及 pH 与解离度的关系的图。

[0036] 图 9 为比较例 2 中测定的感应图。

[0037] 图 10 为比较例 2 中测定的感应图。

[0038] 图 11 为比较例 2 中测定的感应图。

[0039] 附图标记说明

[0040] 11 载体

[0041] 101 被测物质

[0042] 102 抗体

[0043] 103 标记物

[0044] 104 结合剂

[0045] 105 抗体-结合剂复合物

[0046] 111 免疫层析试片

[0047] 112 PTFE 基板

[0048] 113 硝基纤维素膜

[0049] 114 玻璃纤维滤纸

[0050] 115 吸水垫片

[0051] 116 第 2 抗体

具体实施方式

[0052] 以下,参照附图对本发明的示例性的实施方式进行说明。

[0053] <实施方式 1>

[0054] 图 1 示出实施方式 1 中的免疫测定方法的基本结构图。抗体 102 为与被测物质进

行特异结合的抗体。标记物 103 为与抗体 102 进行特异结合的标记物。如图 1(a) 所示, 抗体 102 经由结合剂 104 固定在载体 11 上。如图 1(b) 所示, 抗体 102 结合在结合剂 104 上, 并形成抗体-结合剂复合物 105。这一抗体-结合剂复合物 105 包括抗体 102、结合在该抗体 102 的结合剂结合位点 111 上的结合剂 104。

[0055] 载体 11 只要可固定结合剂 104 即可, 对其不做特殊限定。作为具体的载体 11, 可例举玻璃及在表面具有金属膜的树脂基板。

[0056] 抗体 102 具有因被测物质结合于抗体 102 而从经由结合剂结合位点 111 结合的结合剂 104 解离的性质。作为具体的抗体 102, 可例举 IgG 抗体。更具体的抗体 102 为由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体 (2F13F11G11)。在此情况下, 被测物质 (例如, 在后述的图 2 中, 由 101 示出) 为人血清白蛋白 (hSA)。在供给了有 hSA 时, 抗体 102, 即上述抗人白蛋白单克隆抗体可与 hSA 相互作用并结合。

[0057] 结合剂 104 具有当对结合在结合剂 104 上的抗体 102 结合了被测物质时使该抗体 102 解离的性质。作为具体的结合剂, 可例举蛋白 A。

[0058] 标记物 103 为可用于对抗体 102 的存在量进行光学性或电化学性计量的物质。作为具体的标记物 103, 可例举辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶等酶, 荧光色素、钆配合物、鲁米诺 (Luminol) 等发光色素, 二茂铁 (Ferrocene) 等电化学活性物质等, 但不仅限于此。

[0059] 以下, 对本发明的免疫测定方法的一个例子进行说明。

[0060] 图 2 示出实施方式 1 中的免疫测定方法的测定流程。该方法包括以下步骤 (1) 至 (4)。

[0061] 在步骤 (1) 中, 含有被测物质 101 的溶液被供给至具有抗体-结合剂复合物 105 的载体 11。溶液的 pH 为 6 以上 8.9 以下。优选该 pH 为 7.4 以上 8.9 以下。

[0062] 在步骤 (2) 中, 通过抗原抗体反应, 被测物质 101 及抗体 102 形成复合物。

[0063] 在步骤 (3) 中, 在被测物质 101 及抗体 102 形成了复合物时, 抗体 102 从结合剂 104 解离。如上所述, 被测物质 104 为人血清白蛋白 (hSA)。在后述的示例性的实施例中也明确, 采用牛血清白蛋白 (BSA) 替代 hSA 时, 抗体 102 (免疫球蛋白抗体 IgG) 不从结合剂 104 解离。

[0064] 在步骤 (4) 中, 通过测定解离后的抗体 102 所具有的标记物 103 的量, 来算出解离后的抗体 102 的量。由此, 来定量该溶液中所含被测物质 101。取代之, 在步骤 (4) 中, 也可通过检测解离后的抗体 102 所具有的标记物 103, 来检测该溶液中是否含有被测物质 101。

[0065] 使含抗原的试样与抗体-结合剂复合物反应, 若抗原结合于抗体, 进而使抗体从结合剂解离这一原理使得简便的免疫测定成为可能。再者, 由于标记物 103 的检测可相应于所使用的标记物的性质来进行选择, 因此易于将实施方式 1 的免疫测定方法应用到现有的免疫测定方法中。

[0066] < 免疫层析测定试剂盒的例子 >

[0067] 以下, 对将上述免疫测定法应用在由免疫层析试片及试验用反应液构成的免疫层析测定试剂盒的例子进行说明。图 3 示出将实施方式 1 的免疫测定方法应用在该免疫层析测定试剂盒的例子。在含有测试样品的物质 (移动相) 通过特定物质的表面或内部 (称之为固定相或载体) 时, 这一免疫层析测定试剂盒利用该测试样品中的抗原 (被测物质) 与

标记抗体相互作用的过程,来实现对该被测物质的存在的确认。

[0068] 免疫层析试片提供固定相及附属的结构体。免疫层析试片由具有生成毛细管现象的性质(例如,结构或物性)的材料制得。优选这种免疫层析试片为多孔性载体的硝基纤维素膜。对于这种硝基纤维素膜,蛋白质易于被固定。并且,硝基纤维素膜的强度低。因此,硝基纤维素膜以粘附于聚四氟乙烯基板(以下,称之为 PTFE 基板)的形式被使用。并且,在其内侧补强粘附有 PTFE 基板的形式硝基纤维素膜已有市售。

[0069] 图 3 中,由硝基纤维素膜 113(例如,宽 1cm×长 6cm、厚 200 μm)构成的多孔性载体用喷涂糊贴付在 PTFE 基板 112(例如,宽 1cm×长 10cm、厚 3mm)上。硝基纤维素膜 113 在其长度方向的一端具有由玻璃纤维滤纸构成的试样导入部 114。另外,硝基纤维素膜 113 在其长度方向的另一端具有由玻璃纤维性的吸水垫片构成的吸水部 115。

[0070] 免疫层析试片 111 也可不具备吸水部。该免疫层析试片具有不被作为移动相而导入的试样液完全浸润的程度的长度。

[0071] 在本例子中,在移动相沿硝基纤维素膜 113 的长度方向移动的路径上,免疫层析试片 111 依次具有标记固定部、以及判断部。

[0072] 在本例子中,用标记 103 标记的抗体 102 经由结合剂 104 固定在硝基纤维素膜 113 上,从而形成上述标记固定部。

[0073] 抗体 102 为可对被测物质 101 进行特异结合的 IgG 抗体。被测物质 101 为人血清白蛋白时,优选这一抗体 102 为由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株所生成的 IgG 抗体(即,抗人白蛋白单克隆抗体(2F13F11G11))。

[0074] 标记物 103 可以是例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶之类的酶。使这类酶结合在抗体 102 的各种方法已被确立。

[0075] 例如,作为辣根过氧化物酶的标记方法,已知有戊二醛法、过碘酸法、马来酰亚胺法。

[0076] 可以利用以可标记抗体的 NH₂ 基的过氧化物酶标记试剂盒 -NH₂(Peroxidase Labeling Kit-NH₂)、以及可标记抗体的 SH 基的过氧化物酶标记试剂盒 -SH(Peroxidase Labeling Kit-SH,均为同仁化学公司制)为代表的市售的标记用试剂盒。

[0077] 该市售试剂盒可使得在抗体上标记酶的操作过程变得容易。

[0078] 优选结合剂 104 为蛋白 A。

[0079] 第 2 抗体 116 固定在硝基纤维素膜 113 上,从而形成上述判断部。

[0080] 第 2 抗体 116 可以采用用 IgG 抗体(2F13F11G11)分子的全部或 Fc 部分来对动物进行免疫而得到的抗人 IgG 抗体。优选第 2 抗体 116 为用该人 IgG 抗体的 Fc 部分来进行免疫而得到的抗体。通过这种方式得到的抗体不阻碍抗体 102 及被测物质的结合。

[0081] 结合剂 104 及第 2 抗体 116 通过以下所述的方式固定在硝基纤维素膜 113 上。

[0082] 在距硝基纤维素膜 113 的长度方向一端 2cm 的地方用涂布器(dispensor)涂布溶解有 1mg/ml 蛋白 A(结合剂 104 的)的 100 μl PBS 缓冲液(8g/l NaCl、0.2g/l KCl、1.15g/l Na₂HPO₄·12H₂O、0.2g/l KH₂PO₄, pH7.4)。

[0083] 在距硝基纤维素膜 113 的长度方向的另一端 2cm 的地方,用涂布器涂布溶解有第 2 抗体 116 的 100 μl 的 PBS 缓冲液(浓度:1mg/ml)。

[0084] 之后,于 40℃处理约 2 小时,使基板 112 干燥。

[0085] 将结合剂 104 及第 2 抗体 116 固定在硝基纤维素膜 113 上之后,优选用不干预抗原抗体反应的物质来对硝基纤维素膜 113 进行封闭处理。通过封闭处理,可防止抗体 102 不经结合剂 104 而非特异性地结合在硝基纤维素膜 113 上的问题。并且,还可防止测试样品中含有的成分在测定时结合至硝基纤维素膜 113 上的问题。作为封闭处理,例如通过以下方式进行。将硝基纤维素膜 113 在含 1 重量%的酪蛋白的 PBS 缓冲液中浸渍处理 15 分钟左右,从而使得酪蛋白结合在硝基纤维素膜 113 上。

[0086] 被进行了封闭处理的硝基纤维素膜 113 在装有 PBS 缓冲液的容器中振荡洗净约 15 分钟,从而去除多余的酪蛋白。被洗净的硝基纤维素膜 113 再次于 40℃干燥约 2 小时。随后,用涂布器将溶解有具有标记物 103 的 1mg/ml 抗体 102 的 100 μ l PBS 缓冲液涂布在标记固定部上。在室温静置约 1 小时,从而具有标记物 103 的抗体 102 结合在结合剂 104 上。

[0087] 静置后,通过将装有 PBS 缓冲液的容器振荡约 15 分钟来进行洗净处理。由此,可除去未与结合剂 104 结合的多余沉积的抗体 102。洗净后,将硝基纤维素膜 113 于 40℃干燥约 2 小时。由此,在硝基纤维素膜 113 上可形成标记固定部及判断部。

[0088] 经过以上程序,免疫层析试片 111 制备完成。

[0089] 试验用反应液为用于鉴定标记物 103 的存在量的反应液。这一试验用反应液可通过以下方式调制而成。

[0090] 将辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶之类的酶用作标记物 103 时,试验用反应液由以下所示的 A 液及 B 液构成。A 液为酶反应提供必须的底物,另一方面, B 液为酶反应提供必须的 H_2O_2 。

[0091] 作为底物,例如,调制溶解有 3,3'-二氨基联苯胺的、具有 0.5mg/ml 的浓度的 HBS 缓冲液 (0.05M Hepes-Na、0.15M NaCl, pH7.5) (A 液)。优选将 A 液进行遮光保存。

[0092] 为了提供酶反应所必须的 H_2O_2 ,调制含 0.15% H_2O_2 的 HBS 缓冲液 (B 液)。A 液及 B 液在使用时被混合,从而得到试验用反应液。

[0093] 其次,对由所得到的免疫层析试片及试验用反应液构成的免疫层析测定试剂盒的使用方法进行说明。

[0094] 将试样液滴入到由玻璃纤维滤纸 114 构成的试样液导入部。试样液通过毛细管现象而在硝基纤维素膜 113 上移动,并到达由结合剂 104 和抗体 102 的复合物构成的标记固定部。

[0095] 试样液中存在被测物质时,被测物质结合至用标记物 103 修饰的抗体 102 上,从而形成被测物质与抗体 102 的复合物。所形成的这一复合物从固定在硝基纤维素膜 113 上的结合剂 104 解离,而基于毛细管现象在硝基纤维素膜 113 上移动的试样液的液流将驱使该复合物移动至判断部。该复合物到达判断部后则结合在第 2 抗体 116 上。此外,即使由被测物质与抗体 102 形成的上述复合物在硝基纤维素膜 113 上移动的期间分离为被测物质和抗体 102,这一抗体 102 也可结合在第 2 抗体 116 上。在此情况下,由于抗体 102 被标记物 103 修饰,因此与上述形成的复合物一样可成为判断部的判断对象。

[0096] 在判断部未被结合的分子并同多余的试样液通过毛细管现象在硝基纤维素膜 113 上进一步进行移动,并在吸水部 115 被吸收。

[0097] 在试样液到达吸水部 115、且在确认了已经没有滴入到试样液导入部的试样液之后,滴入溶解有底物的溶液和含 H_2O_2 的溶液 (在上述步骤制得的 A 液和 B 液得混合物)。这

一滴入位置处于判断部与标记固定部之间,滴入操作从接近于判断部的上游侧来进行。滴入 A 液和 B 液的混合液并经过一定时间后,对判断部的着色进行目测或通过仪器进行判断。

[0098] 如同应用于免疫层析法那样,实施方式 1 的免疫测定方法也易于应用于化学发光及电化学发光。

[0099] < 实施例 1 >

[0100] 以下,示出本发明的免疫测定方法的具体例子。在本实施例中,利用表面等离子共振谱仪(以下,称之为 SPR 装置)进行了测定。具体为,将 Biacore 公司制的 Biacore3000 系统(以下,记为 Biacore)用作测定装置。这一测定装置将表面等离子共振现象作为测定原理,并且是无需标记即可对生物分子间的相互作用进行检测的分析装置。为了使用 Biacore 来测定作为测定对象的分子间相互作用,需将测定对象分子的一方固定在测定用芯片上,并将含有与所固定的分子作用的分子的试样液送样至该测定用芯片表面上。在此情况下,这一测定装置将由在测定用芯片表面上发生的分子间的结合/解离引起的微量的质量变化作为表面等离子共振信号来检测,并按时间顺序监测该信号,然后将监测的结果作为感应图谱进行记录。

[0101] 本实施例中,将 Biacore 公司制的 CM5(以下,记为感应芯片)用作测定芯片。这一感应芯片在玻璃板上的金膜表面具有羧甲基葡聚糖。将试样固定在感应芯片上时,用适当的试剂(例如,N-羟基丁二酰亚胺(NHS))活化羧甲基葡聚糖的羧基,之后在其上导入待要固定的试样。通过该葡聚糖具有的羧基与该试样具有的氨基之间的偶联(氨基偶联),可针对感应芯片进行结合剂的固定。

[0102] 以下,对评价中所用的被测物质、抗体及结合剂进行说明。将人白蛋白(以下,记为 hSA)用作被测物质。使用的人白蛋白为 SIGMA 公司制的人白蛋白。本测定例中使用的抗体为由保藏编号 FERM BP-10459 号生成细胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体(以下,记为 2F13F11G11)。作为结合剂,使用 CALBIOCHEM 公司制的蛋白 A(Lot#D33524)。

[0103] 其次,对测定抗原(即,被测物质)存在/不存在时的、抗体与结合剂的结合量变化的测定顺序进行说明。

[0104] 首先,通过前述的氨基偶联将结合剂(蛋白 A)固定在感应芯片上。这一固定按照 Biacore 提供的固定方法进行。固定时使用具有规定的 pH 的醋酸缓冲液稀释后的蛋白 A。有必要确定为将足够量的蛋白 A 进行固定而需的该醋酸缓冲液的 pH。在此,分别准备在 pH4、pH5 及 pH6 的 10mM 醋酸缓冲液中溶解有 20ng/ml 的蛋白 A 的溶液。使这些具有不同 pH 的调制溶液以 10 μ l/ 分的流速依次流入到 Biacore 所具备的 4 个流体槽的任意一个中。基于所得到的有关各调制溶液的感应图谱,确定可固定足够量的蛋白 A 的 pH。

[0105] 本实验中采用了在感应芯片上固定量最大的 pH4 的条件。在上述 pH4 的条件下,在感应芯片上固定了约 5ng/mm² 的蛋白 A。并且,为测定空白值,在流体槽中不固定蛋白 A 的条件下也测得了感应图谱。

[0106] 其次,用 Biacore 对抗原存在/不存在时的抗体与蛋白 A 的结合量变化进行测定。

[0107] 首先,使流量为 10 μ l 的溶解有 2F13F11G11 的缓冲液以 20 μ l/ 分的流速流入到所有 4 个流体槽中,使之与固定在感应芯片上的蛋白 A 结合。在此情况下,缓冲液中溶解的 2F13F11G11 的浓度为 200nM。并且,在蛋白 A 上的结合量约为 5ng/mm²。这里,为排除与蛋白 A 结合的 2F13F11G11 以外的物质的影响,使 2F13F11G11 流入到流体槽之后,只使缓冲液

流入到流体槽中。本实验中,作为缓冲液使用了含 0.05% Tween20 的 PBS 缓冲液 (pH7.4)。

[0108] 其次,使溶解有被测物质 hSA 的缓冲液流入到流体槽中,使其与 2F13F11G11 结合反应。此时的流速为 20 μ l/分、流量为 60 μ l。所使用的 hSA 的浓度为 4 μ M、2 μ M、500nM 及 0nM。图 4 示出由测定的结果得到的感应图谱。图 4 中还示出了以下的比较例 1 的结果。

[0109] <比较例 1>

[0110] 为测定 hSA 与 2F13F11G11 的特异性,用不与 2F13F11G11 反应的牛血清白蛋白(以下,记为 BSA)替代 hSA 进行了同样的实验 (pH:7.4)。

[0111] 由图 4 可知,流入 hSA 时可以观测到响应的降低。另一方面,这种响应降低在流入 BSA 时没有马上被观测到。这说明,由于 hSA 与 2F13F11G11 的特异性结合反应, hSA 与 2F13F11G11 的复合物在 pH:7.4 的条件下也可从蛋白 A 解离。

[0112] 由此表明,通过采用上述实验中使用的、与被测物质进行特异反应且可基于该反应而从蛋白 A 解离的抗体,本发明的免疫测定方法成为可实现的方法。

[0113] <比较例 2>

[0114] 用 11-4B 抗体、42-DA3 抗体及 13-3B 抗体替代 2F13F11G11 进行了与实施例 1 同样的实验 (pH:7.4)。

[0115] 11-4B 抗体为由保藏编号 FERM BP-7937 号生成细胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体。

[0116] 42-DA3 抗体为由保藏编号 FERM BP-10637 号生成细胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体。

[0117] 13-3B 抗体为由保藏编号 FERM BP-7938 号生成细胞株所生成的抗人白蛋白单克隆抗体。

[0118] 图 9 示出从使用 11-4B 抗体进行测定的结果得到的感应图谱。

[0119] 图 10 示出从使用 42-DA3 抗体进行测定的结果得到的感应图谱。

[0120] 图 11 示出从使用 13-3B 抗体进行测定的结果得到的感应图谱。

[0121] 从图 9 ~ 图 11 可知,即便流入 hSA 或 BSA 也观测不到响应的降低。因此,只有 2F13F11G11 及 hSA 的组合才可以使得 pH 为 6 以上 8.9 以下、优选 pH 为 7.4 以上 8.9 以下时的免疫球蛋白 G 抗体从所述蛋白 A 的解离。

[0122] <实施例 2>

[0123] 其次,通过采用 SPR 装置的测定例,对适用于本发明的免疫测定方法的条件加以说明。

[0124] 实施例 2 中,由于使用与实施例 1 类似的测定体系,因此以所使用的测定体系中的差异点为中心进行说明。

[0125] 作为测定装置,使用 Biacore 公司制的 Biacore3000 系统(以下,记为 Biacore)。并且,所采用的被测物质、抗体、结合剂均与实施例 1 相同。将 Biacore 公司制的 CM5(以下,记为感应芯片)用作测定芯片。通过氨基偶联,将作为结合剂的蛋白 A 固定于上述感应芯片上。蛋白 A 的固定量为约 6ng/mm²。并且,为测定空白值,得到了在流体槽中不固定蛋白 A 的条件下的感应图谱。

[0126] 其次,调制具有多种 NaCl 浓度的含 0.005% Tween20 的 PBS 缓冲液 (pH7.4)。将 NaCl 的浓度定为 0g/l、4g/l、8g/l、12g/l 或 24g/l。在得到的各 PBS 缓冲液中溶解

2F13F11G11。使这一系列的 2F13F11G11 溶液在 $20\ \mu\text{L}/\text{分}$ 的流速、 $40\ \mu\text{L}$ 的流量的条件下流入到所有 4 个流体槽中,使其与固定在感应芯片上的蛋白 A 结合。在此情况下,所结合的 2F13F11G11 的浓度为 $1\ \mu\text{M}$ 。

[0127] 再者,为排除与蛋白 A 结合了的 2F13F11G11 以外的物质的影响,使 2F13F11G11 流入到流体槽之后,只使缓冲液流入到流体槽中。其次,使溶解有被测物质 hSA 的缓冲液流入到流体槽中,使其与 2F13F11G11 结合反应。此时的流速为 $20\ \mu\text{L}/\text{分}$,流量为 $40\ \mu\text{L}$,浓度为 $1\ \mu\text{M}$ 。这些操作分别使用先前叙述的 5 种缓冲液来进行。

[0128] 图 5 示出通过测定而得到的感应图谱。这一感应图谱示出从各测定值减去没有固定蛋白 A 的空白值后的结果。在 5 种缓冲液中,观测到了依赖于 NaCl 浓度,蛋白 A 与 2F13F11G11 的结合量变化发生了较大的变化。NaCl 浓度为 0g/L 时,流入缓冲液时也可观测到响应的上升,因此可以认为是易于产生非特异性反应的条件。这一条件可被认为是适合于被测物质的测定。对含 4g/L 以上的 NaCl 的缓冲液,则得到了如以下所述的观测结果。即,越是具有低盐浓度的缓冲液,越体现出具有较大的 2F13F11G11 结合量的倾向。并且,在流入 hSA 时,越是具有低盐浓度的缓冲液,hSA 与 2F13F11G11 的复合物从蛋白 A 解离的量越大。

[0129] 图 6 示出 NaCl 浓度与解离量的关系。图 6 所示的曲线中的解离率是使 2F13F11G11 流入到流体槽之后,以添加 hSA 之前的 Biacore 响应为 100% 、将因添加 hSA 而减小的 Biacore 响应的比率用 $\%$ 来表示的解离率。但在 NaCl 浓度为 0g/L 时,由于没有观测到解离,因此没有示出该情况下的数据。由图 6 可知,使用含 4g/L 或 8g/L 的 NaCl 的缓冲液时解离率变高。

[0130] 这些结果说明,通过采用含 4g/L 至 8g/L 的 NaCl 的缓冲液,可以以更好的灵敏度来实现采用从蛋白 A 解离的抗体的免疫测定方法。

[0131] 其次,对作为适用于本发明的免疫测定方法的条件的缓冲液 pH 和缓冲液种类进行探讨并示出结果。所采用的测定体系与先前使用 SPR 装置进行测定所使用的测定体系相同。

[0132] 调制具有 8g/L 的 NaCl 浓度的含 0.005% Tween20 的 PBS 缓冲液 (pH7.4)、具有 8g/L 的 NaCl 浓度的含 0.005% Tween20 的 PBS 缓冲液 (pH8.9)、及具有 8g/L 的 NaCl 浓度的含 0.005% Tween20 的甘氨酸缓冲液 (pH8.9)。将 2F13F11G11 溶解在这些调制的各缓冲液中。

[0133] 使所得到的 2F13F11G11 溶液在流速为 $20\ \mu\text{L}/\text{分}$ 且流量为 $40\ \mu\text{L}$ 的条件下流入到所有 4 个流体槽中,使其与固定在感应芯片上的蛋白 A 结合。在此情况下,溶解在缓冲液中的 2F13F11G11 的浓度为 $1\ \mu\text{M}$ 。再者,为排除与蛋白 A 结合了的 2F13F11G11 以外的物质的影响,使 2F13F11G11 流入到流体槽之后,只使缓冲液流入到流体槽中。随后,使溶解有被测物质 hSA 的缓冲液流入到流体槽中,使其与 2F13F11G11 结合反应。此时的流速为 $20\ \mu\text{L}/\text{分}$,流量为 $40\ \mu\text{L}$,并且浓度为 $1\ \mu\text{M}$ 。

[0134] 图 7 示出所得到的有关各缓冲液的感应图谱。图 8 示出基于图 7 所示的结果而算出的相应于 hSA 添加的解离率。参照图 7 可知,根据 pH 和缓冲液种类,2F13F11G11 的结合量显示出差异。但参照图 8 可知,由于缓冲液的 pH 及缓冲液种类的不同而导致的解离率的差异较小。即,至少在使用 PBS 缓冲液或甘氨酸缓冲液中的任一缓冲液时可以利用上述测

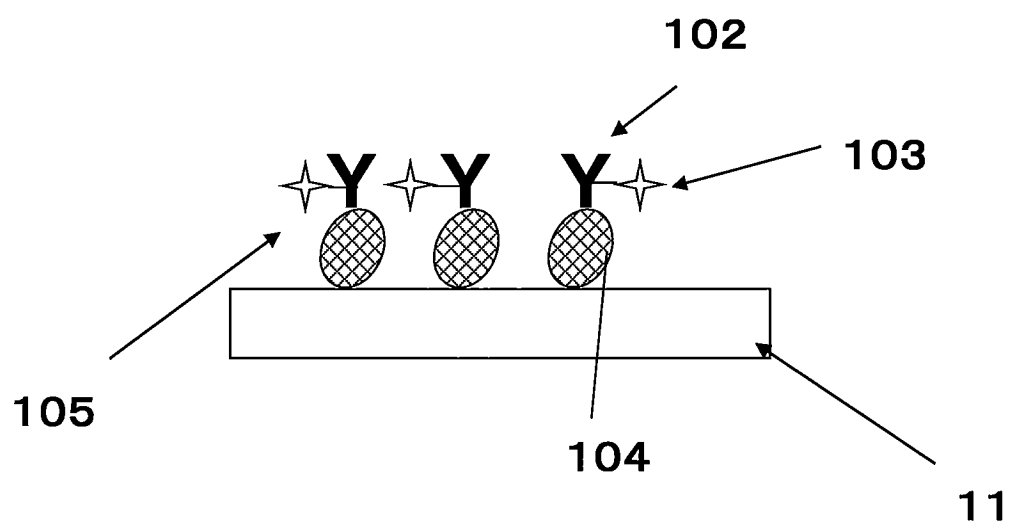
定体系。并且,上述结果还说明,在 pH 为 7.4 至 8.9 之间的 pH 范围也可使用该测定体系。

[0135] 以上对本发明进行了详细说明,但上述说明只是在各个方面对本发明所做的例示,并不对本发明构成限定。毋庸多言,在不脱离本发明范围的前提下可以对本发明进行种种改进及变性。还需加以说明的是,对本发明的范围的解释只以权利要求书为准。并且,本领域技术人员参照本发明的具体实施方式的记载、并基于本发明的记载及技术常识应该可以在等同的范围内实施本发明。并且只要不是特别提及,对于在本说明书中所有部分出现的单数形式的表现应理解为也涵盖了其复数形式的概念。因此只要不是特别提及,对单数形式的冠词或形容词(例如,英语的“a”、“an”、“the”等)应理解为也涵盖了其复数形式的概念。并且除非特别提及,对本说明书中使用的术语应理解为是在该领域通常使用的术语。因此除非特别定义,本说明书中使用的所有专业术语及技术术语与本发明所属领域的技术人员通常理解的术语的概念具有相同的含义。出现不一致的情况时,应以本说明书(包含定义)为优先。

[0136] 工业实用性

[0137] 本发明例如能够用与抗原进行特异结合的一种抗体来构成免疫测定体系。由此,可以减少免疫测定体系构筑时的劳力。并且,由于没有必要用抗原及与其进行特异结合的两种抗体来形成夹芯形式的结合物,所以本发明也适用于如半抗原等的低分子化合物抗原。

a)



b)

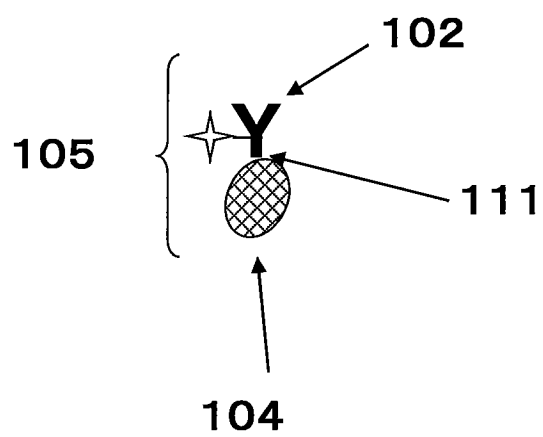


图 1

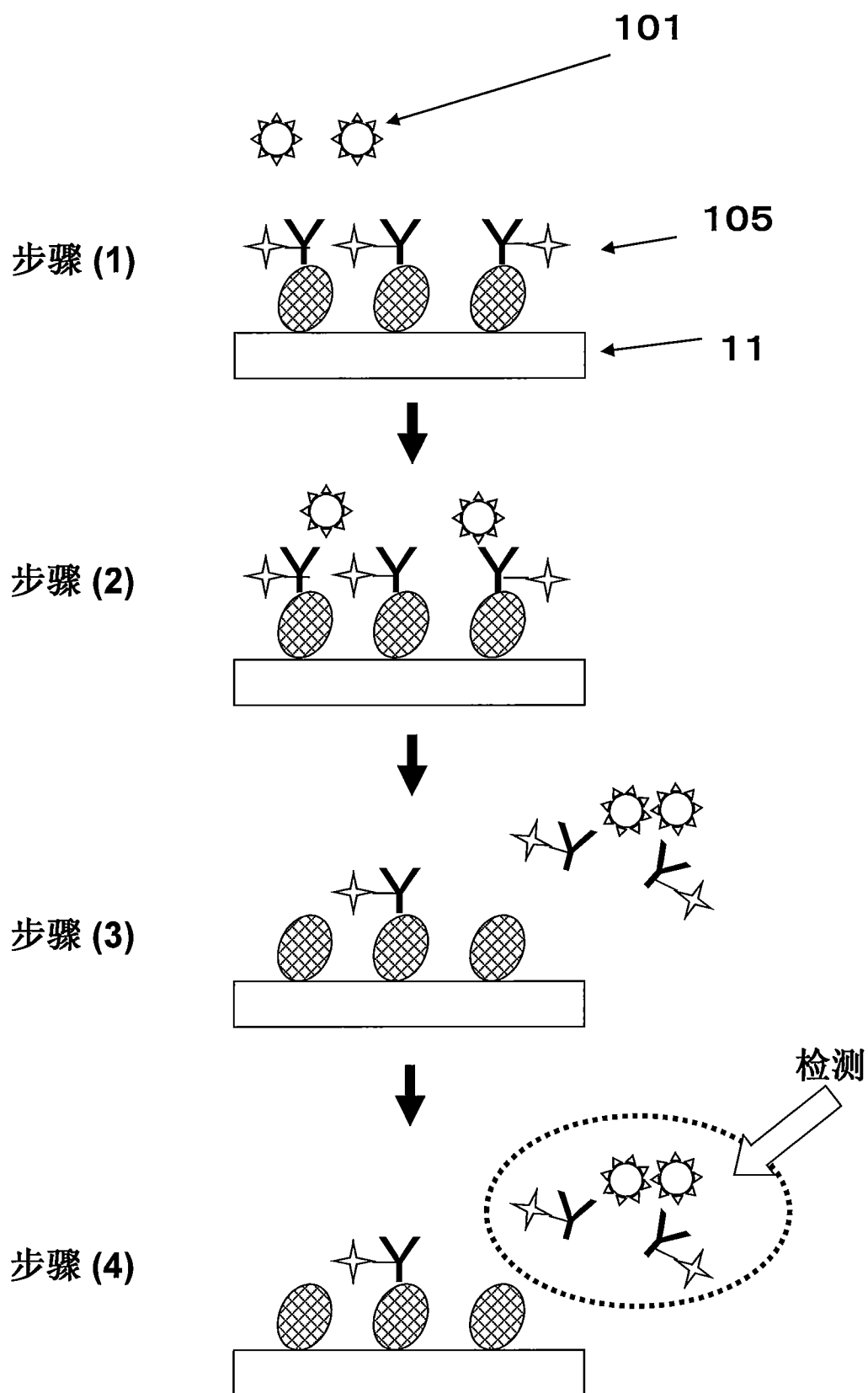


图 2

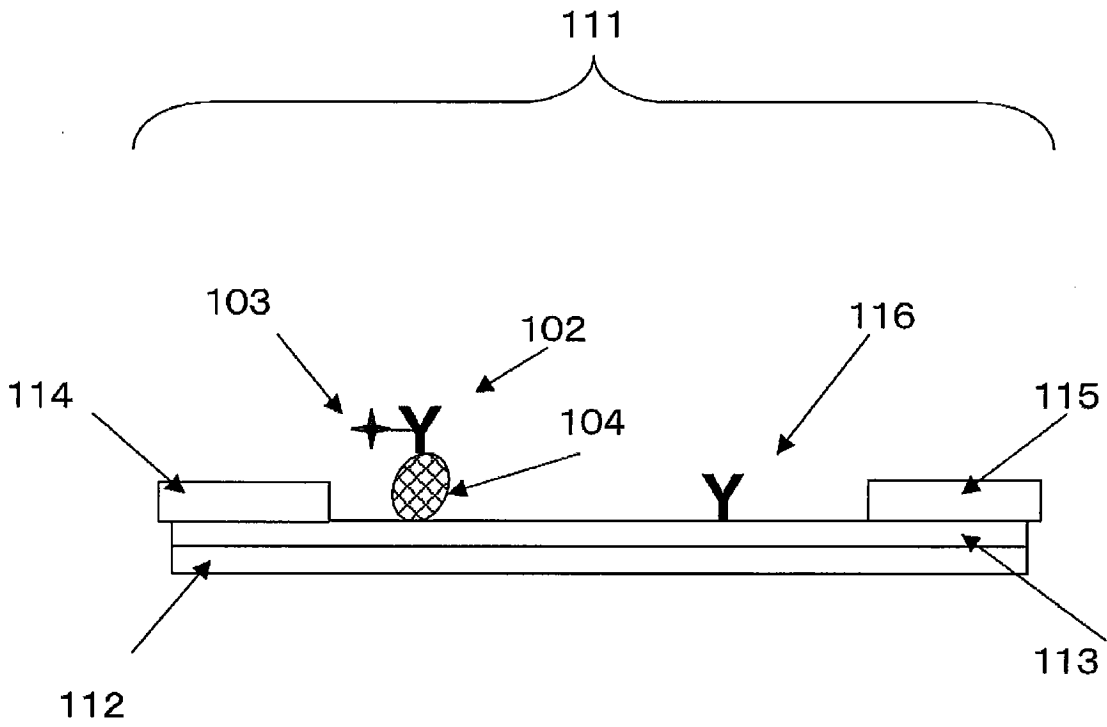


图 3

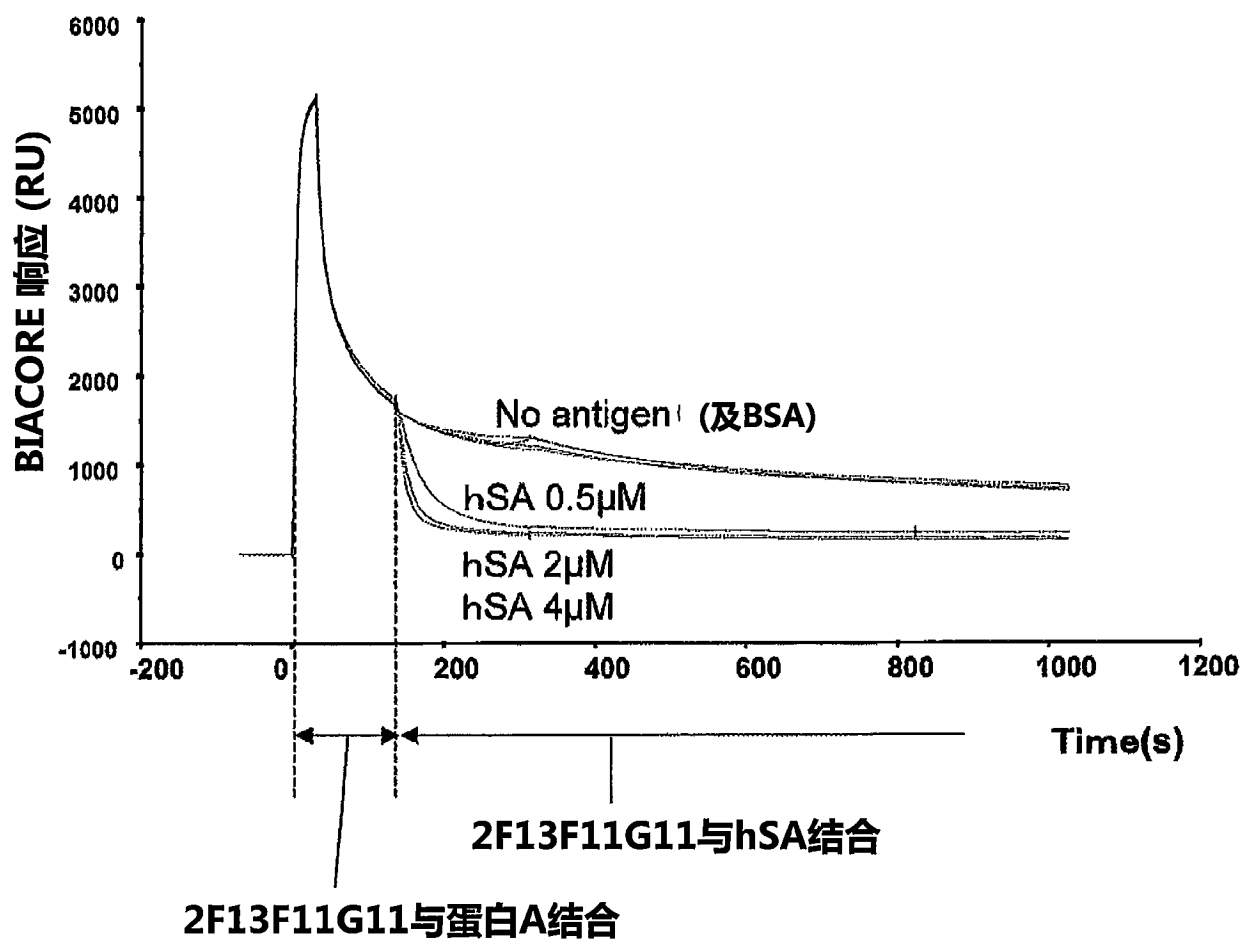


图 4

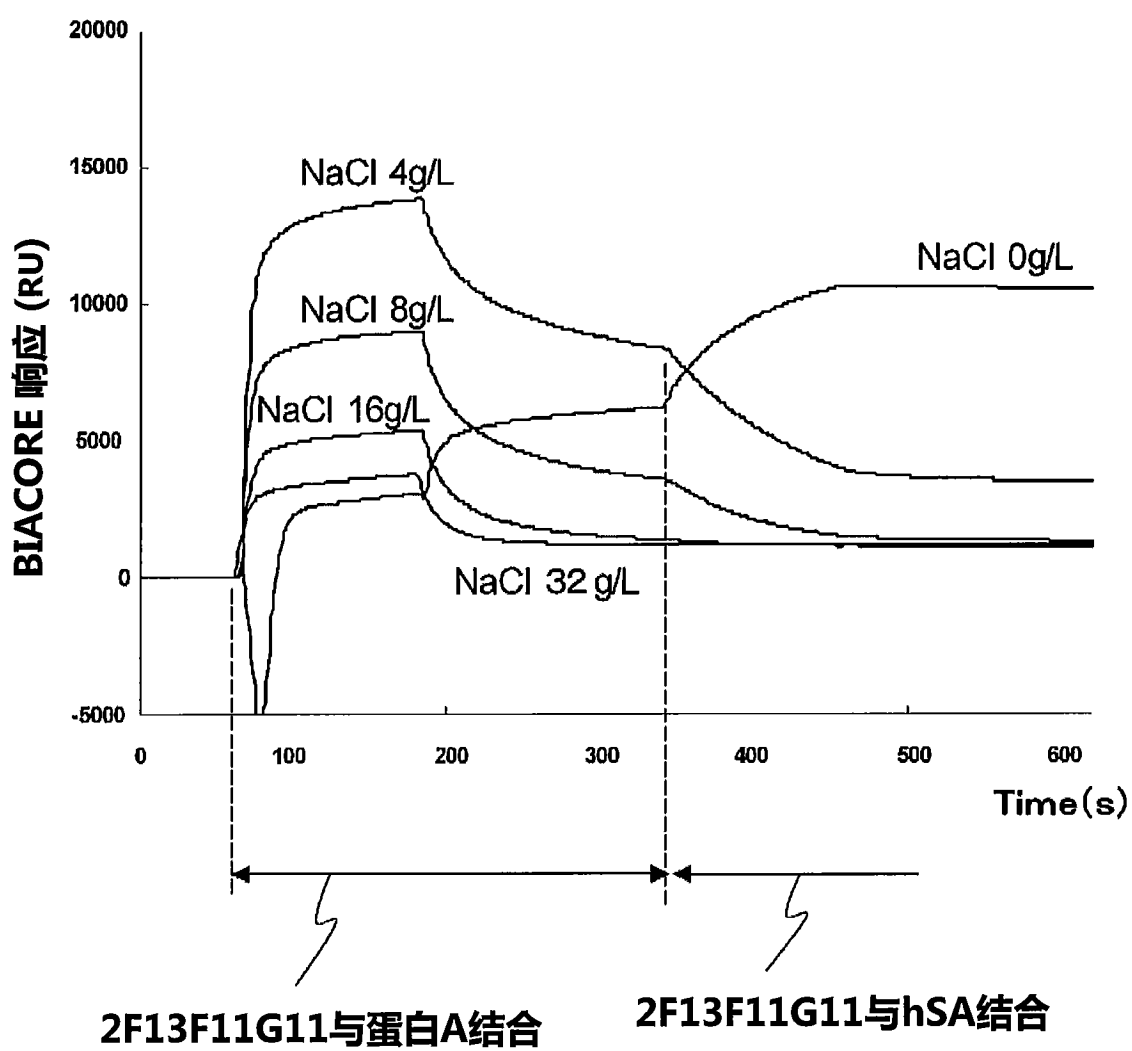


图 5

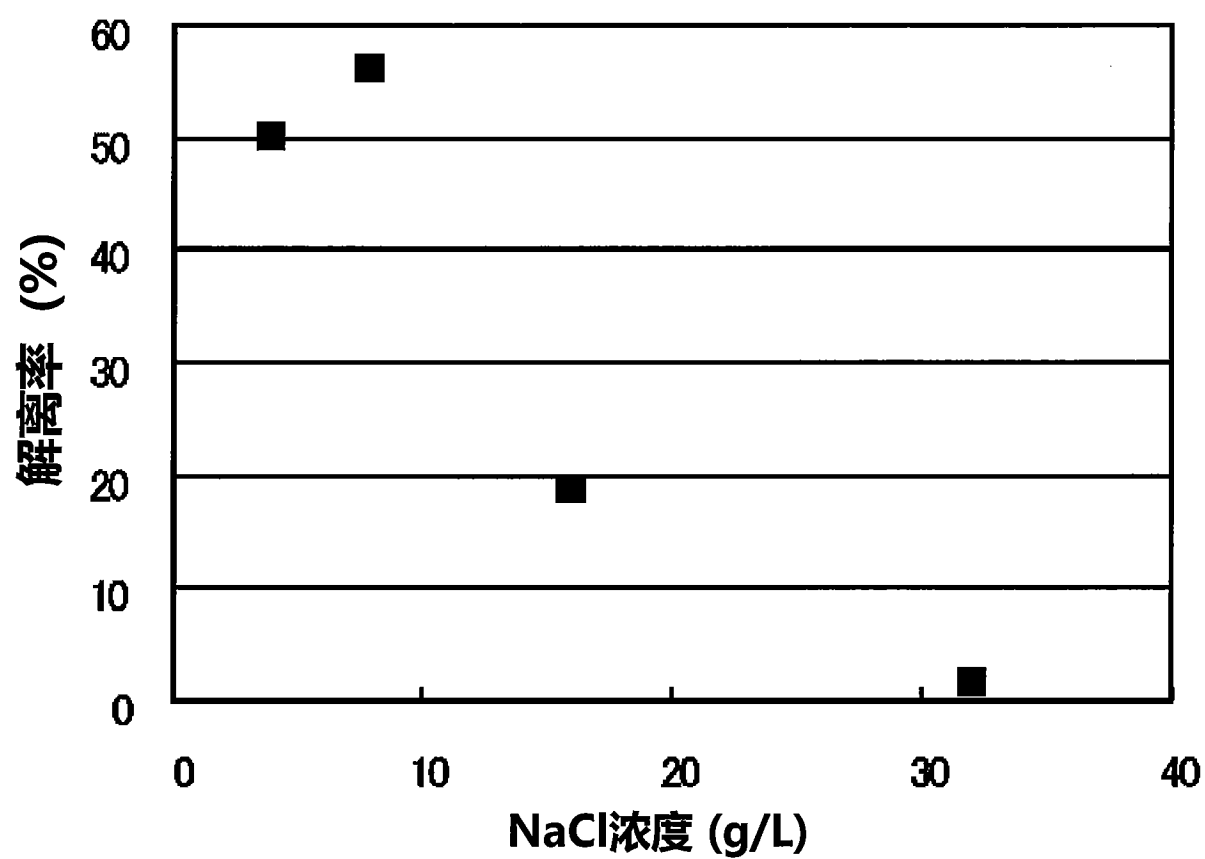


图 6

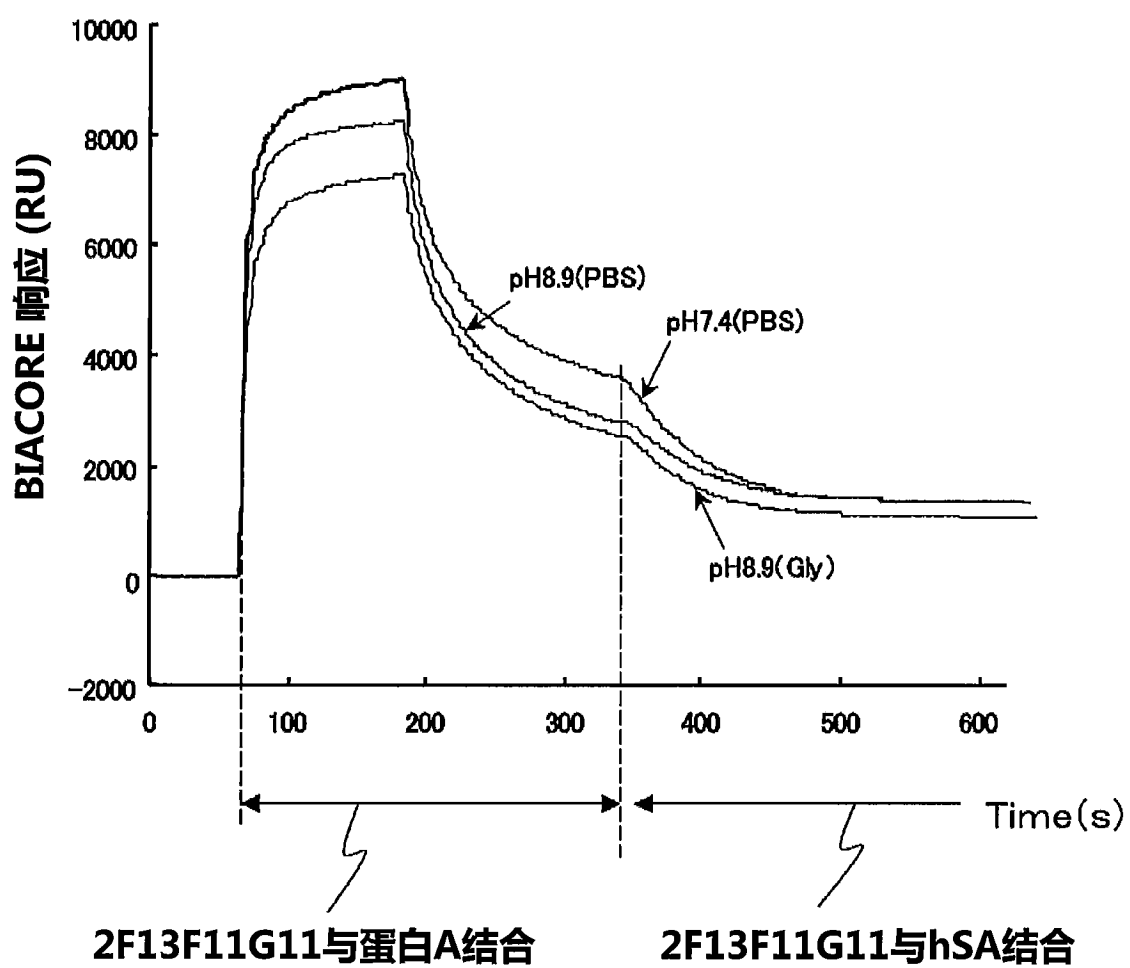


图 7

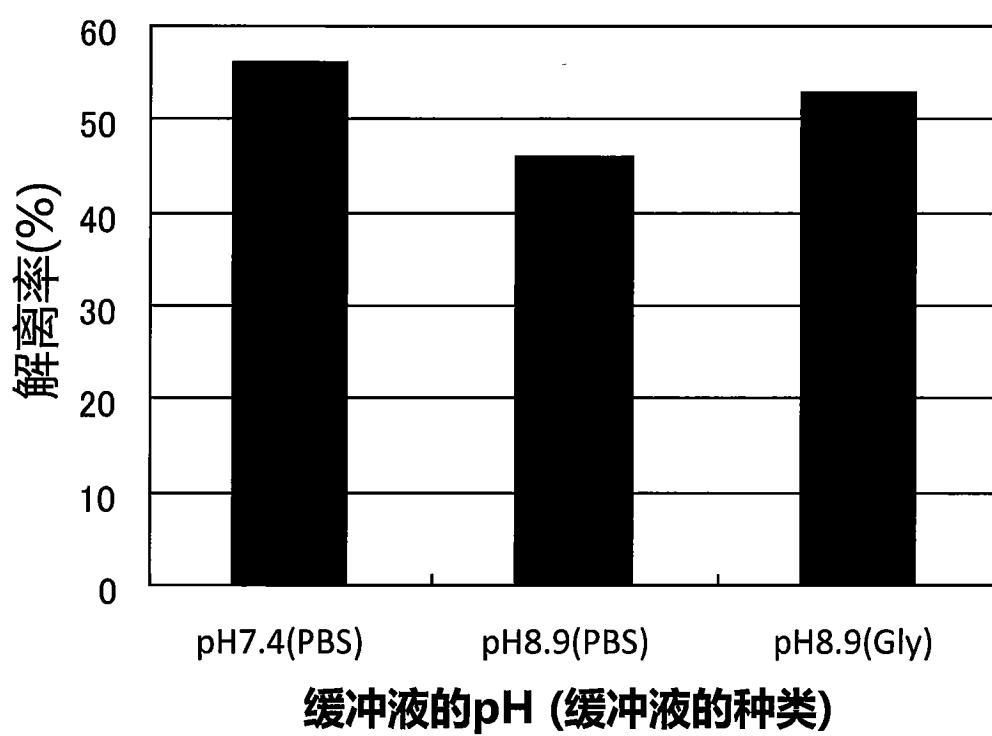
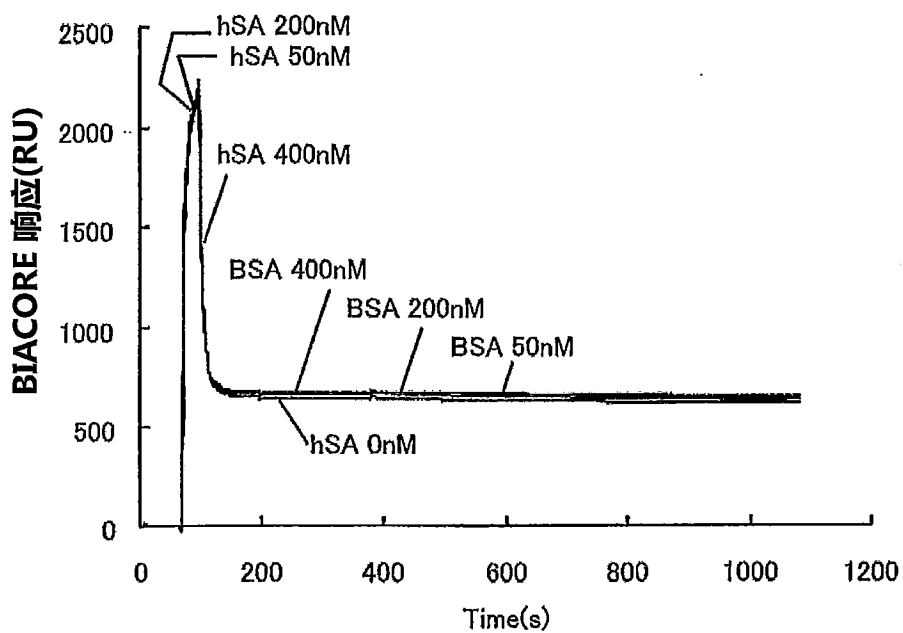
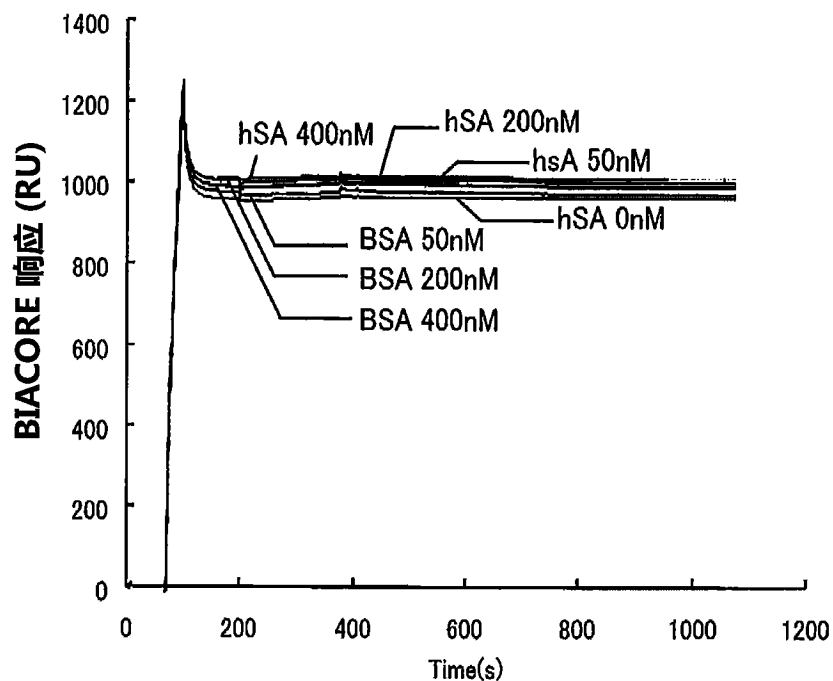


图 8

相应于11-4B抗体与hSA·BSA反应的BIACORE响应

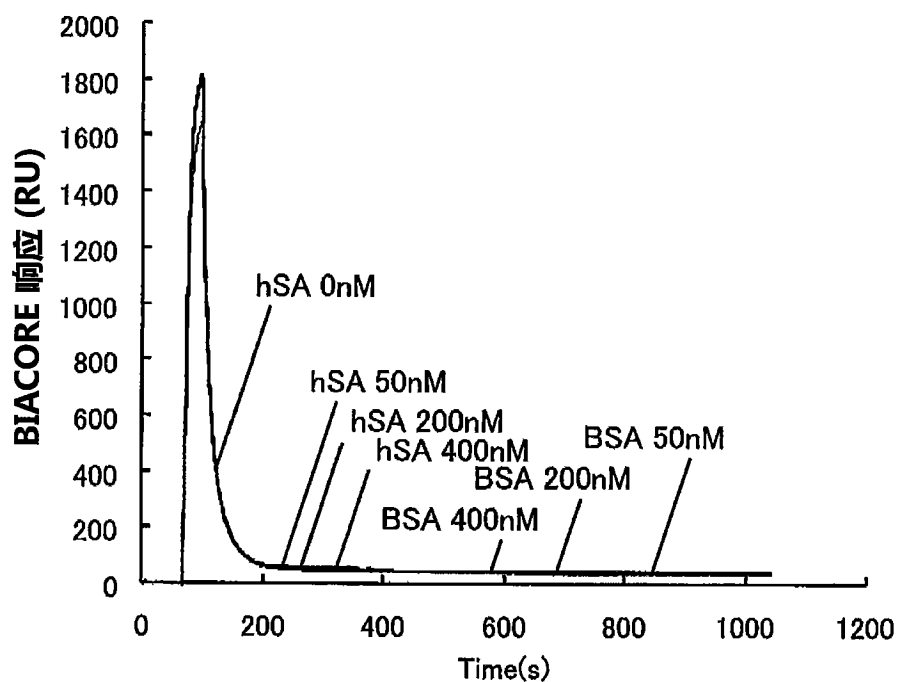
各种浓度
抗体：1 μ M
蛋白A：~ 3.5 ng/mm²
抗原：记载于图中
缓冲液条件：PBS，0.005% Tween20，pH7.4

图 9

相应于42DA3抗体与hSA·BSA反应的BIACORE响应

各种浓度
抗体：1 μ M
蛋白A：~ 3.5 ng/mm²
抗原：记载于图中
缓冲液条件：PBS，0.005% Tween20，pH7.4

图 10

相应于13 - 3B抗体与hSA·BSA反应的BIACORE响应

各种浓度
抗体：1 μ M
蛋白A：~ 3.5 ng/mm²
抗原：记载于图中
缓冲液条件：PBS，0.005% Tween20，pH7.4

图 11

专利名称(译)	免疫测定方法		
公开(公告)号	CN102439449A	公开(公告)日	2012-05-02
申请号	CN201080022548.6	申请日	2010-11-22
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	若井纯子 龟井明仁 村冈仁		
发明人	若井纯子 龟井明仁 村冈仁		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/544		
CPC分类号	G01N2333/765 G01N33/6854		
代理人(译)	白丽 陈建全		
优先权	2009267109 2009-11-25 JP PCT/JP2010/003573 2010-05-27 WO		
其他公开文献	CN102439449B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种免疫测定方法。该方法无需两种以上的抗体，而能减少免疫测定体系构筑时消耗的劳力，并且除高分子抗原之外还能应用于半抗原等低分子抗原。本发明的方法是一种使经由蛋白A结合在基板表面的免疫球蛋白G抗体从上述表面解离的方法，上述方法包括以下步骤A及B。即，提供具有经由蛋白A结合免疫球蛋白G抗体的表面的基板的步骤A，其中，所述免疫球蛋白G抗体由保藏编号FERM BP-10459号生成细胞株生成；以及将含有人血清白蛋白的溶液提供至上述表面，从而使上述免疫球蛋白G抗体从上述蛋白A解离的步骤B，其中，所述溶液具有6以上8.9以下、优选7.4以上8.9以下的pH。

