



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105793709 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201480065579.8

(22)申请日 2014.10.31

(30)优先权数据

10-2013-0137770 2013.11.13 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2014/010356 2014.10.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/072686 KO 2015.05.21

(71)申请人 SK电信有限公社

地址 韩国首尔

(72)发明人 朴仙荣 金廷律 金圣宇 申锦珠

李志哲

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 孙占华

(51)Int.Cl.

G01N 33/563(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

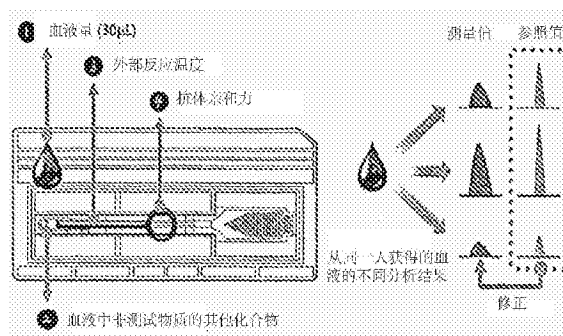
序列表7页 附图8页

(54)发明名称

使用半抗原和与其结合的抗体作为参照抗体的免疫测量方法,以及使用参照抗体的免疫测量装置

(57)摘要

本发明涉及使用半抗原和与其结合的抗体作为参照抗体的免疫测量方法,以及使用所述参照抗体的免疫测量装置。根据本发明,周围环境被反映在例如对结果值的修正中,其中被外部因素(例如样品和装置的温度、所述样品的输入体积和成分,以及所述装置的变异性)改变的测试区的数值被反映在参照区中并被改变,以便可在免疫测定中。此外,由于不可能发生与所述样品中的物质的非特异性反应,因此可以使分析误差最小化。



1.一种用于使用半抗原和结合所述半抗原的抗体作为参照抗体的免疫测量方法,其中所述抗体包含i)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区CDR1;ii)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的重链可变区CDR2;iii)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的重链可变区CDR3;iv)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR1;v)具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR2;以及vi)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR3。

2.权利要求1的方法,其中所述方法是对样品中的测试物质的定量分析。

3.权利要求1的方法,其中所述半抗原是莠去津或其衍生物。

4.权利要求3的方法,其中所述衍生物是扑灭津、扑草净、扑灭通、西玛津、西草净、草怕津、草达津、氰草津或其衍生物。

5.权利要求1的方法,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链可变区。

6.一种用于使用包括半抗原和结合所述半抗原的抗体的参照抗体的免疫测量的装置,其中所述抗体包含i)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区CDR1;ii)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的重链可变区CDR2;iii)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的重链可变区CDR3;iv)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR1;v)具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR2;以及vi)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR3。

7.权利要求6的装置,其中所述半抗原是莠去津或其衍生物。

8.权利要求7的装置,其中所述衍生物是扑灭津、扑草净、扑灭通、西玛津、西草净、草怕津、草达津、氰草津或其衍生物。

9.权利要求6的装置,其中所述装置使用毛细管力、微通道、色谱法或硝酸纤维素膜。

10.权利要求6的装置,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链可变区。

11.权利要求6的装置,其包括:

(1)缀合区,其中共同浸透了特异性结合样品中的测试物质的测试探针与特异性结合所述半抗原或半抗原抗体的参照探针;

(2)测试区,其中浸透了特异性结合所述测试物质的捕获抗体;以及

(3)参照区,其中浸透了所述半抗原或半抗原抗体。

使用半抗原和与其结合的抗体作为参照抗体的免疫测量方法,以及使用参照抗体的免疫测量装置

技术领域

[0001] 本发明涉及使用半抗原和结合所述半抗原的抗体作为参照抗体的免疫测量方法,以及使用所述参照抗体进行免疫测量的装置。

背景技术

[0002] 使用兔IgG和抗兔IgG作为参照抗体的常规免疫测量方法使用生物芯片,其中特异性结合待检测的物质的探针与特异性结合兔抗体的探针被固定在缀合区(conjugate zone),针对待检测的物质的捕获抗体被固定在测试区,抗兔抗体被固定在参照区(WO2013/125855)。但是,当使用参照抗体对样品进行定量时,即使注射相同量的样品,测量值也可能会随多种因素(例如,由样品中存在的大量物质引起的粘度和组分的差异,以及抗兔抗体的非特异性反应等)而改变。此外,当使用常规参照抗体时,可能会在样品注射时发生样品量的误差,并且样品和/或装置的温度可能会因测量样品时所处的环境而升高或降低。因此,总是存在测量区中的值改变的可能性。此外,测试区和参照区中的抗体的结合亲和力可能会因上文所述得因素而改变。

[0003] 同时,半抗原是在人体中没有针对其的抗体的物质,因为该物质本身不引起免疫应答。当使用不能存在于人体中的毒性组分的半抗原时,预期在样品中几乎不会发生非特异性反应。此外,具有不同的针对所述半抗原的亲合常数的抗体在不同的温度下具有不同的抗原结合亲和力。但是,目前尚未有将结合于显示所述特征的半抗原的抗体用作参照抗体的情况。

[0004] 因此,本发明人开发了包括参照抗体的免疫测量方法,所述参照抗体包括半抗原和结合所述半抗原的抗体,其中所述免疫测量方法通过根据用户环境的参数补充结果值并减少与样品的非特异性反应,能够提高定量测量的准确性。因此,本发明是基于所述事实得以完成。

发明内容

[0005] 因此,本发明的一方面是提供能够提高样品定量的准确性的免疫测量方法。

[0006] 本发明的另一方面是提供使用参照抗体进行免疫测量的装置。

[0007] 根据本发明的一方面,本发明提供了使用半抗原和结合所述半抗原的抗体作为参照抗体的免疫测量方法。这里,所述抗体包含i)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区CDR1;ii)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的重链可变区CDR2;iii)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的重链可变区CDR3;iv)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR1;v)具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR2;以及vi)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR3。

[0008] 根据本发明的另一方面,本发明提供了使用参照抗体进行免疫测量的装置,所述参照抗体包括半抗原和结合所述半抗原的抗体。这里,所述抗体包括i)具有SEQ ID NO:3所

示的氨基酸序列的重链可变区CDR1;ii)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的重链可变区CDR2;iii)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的重链可变区CDR3;iv)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR1;v)具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR2;以及vi)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR3。

附图说明

[0009] 根据以下对实施方案的描述,结合附图,本发明的这些和/或其他目的和特征将变得显而易见和更易于理解,在所述附图中:

[0010] 图1是示出了在基于微流体的定量分析装置中引起分析误差的因素的图,示出了由于所述因素在来自同一人的血液中观察到不同的检查结果;

[0011] 图2示出了通过分析抗体针对莠去津(atrazine)的亲和力而获得的结果(ELISA);

[0012] 图3示出了在本发明的一个示例性实施方案的抗莠去津抗体中,#2抗体的表面等离子共振(SPR)感应图(sensogram)结果;

[0013] 图4示出了本发明的一个示例性实施方案的抗莠去津抗体的SDS-PAGE结果,其中SM代表分子量标记物(size marker),R和NR分别代表还原和非还原条件;

[0014] 图5是针对代表值作的图表,所述代表值分别由使用本发明的一个示例性实施方案的莠去津抗体和常规的对照抗体测量的样品中TSH浓度转换得到;

[0015] 图6是使用本发明的一个示例性实施方案的抗莠去津抗体,根据测量的温度,针对信号强度值和T/R比值作的图表。

[0016] 图7是使用常规的抗兔的抗体,根据测量的温度,针对信号强度值和T/R比值作的图表;以及

[0017] 图8是根据测量的温度,针对本发明的一个示例性实施方案的抗莠去津抗体的反应性作的图表。

具体实施方式

[0018] 下文将进一步详细描述本发明。

[0019] 本发明提供了用于使用半抗原和结合所述半抗原的抗体(在下文中被称为半抗原抗体)作为参照抗体的免疫测量方法。具体而言,本发明提供了用于使用半抗原和结合所述半抗原的抗体作为参照抗体的免疫测量方法,其中所述抗体包括i)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区CDR1;ii)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的重链可变区CDR2;iii)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的重链可变区CDR3;iv)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR1;v)具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR2;以及vi)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR3。本发明的一个示例性实施方案的方法的目的是使用抗原-抗体反应准确地测量待测量的测试物质的量。

[0020] 根据本发明的一个示例性实施方案,通过在参照区中反映测试区的误差——其是因例如样品和装置的温度、注射的样品的量和组分、装置的变化等因素而产生,例如,通过保持测试区的信号强度值/参照区的信号强度值的比值(在下文中被称为T/R比值)为常数,可最小化分析(特别是定量分析)中的误差。具体而言,即使在来自同一人的样品中测量的数值也可能会由于一些因素而以不同方式表示,所述因素例如由样品中存在的大量物质而

引起的粘度和组分的差异、非特异性反应、样品注射时的样品量,以及测量样品时所处的环境。在这种情况下,本发明的一个示例性实施方案的免疫测量方法通过在参照区的数值中反映因外部因素的影响而改变的测试区的数值,使T/R比值恒定。

[0021] 根据本发明的一个示例性实施方案,由于使用者可便利地自由选择参照抗体——其具有与测试区中的温度依赖性抗原-抗体结合特征相似的抗原-抗体结合特征,可能构成适于待诊断的疾病的参照抗体。

[0022] 在本发明中,所述半抗原是低分子量有机化合物,其本身不能引起免疫应答,但是仅当所述半抗原与载体分子连接时才引起免疫应答。在本发明中,可使用被广泛用作除草剂的莠去津(化学名称:2-氯-4-(乙氨基)-6-(异丙氨基)-s-三嗪)或其衍生物作为半抗原。

[0023] 例如,莠去津的衍生物可包括扑灭津(propazine)、扑草净(prometryn)、扑灭通(prometon)、西玛津(simazine)、西草净(simetryn)、草怕津(ipazine)、草达津(trietazine)、氰草津(cyanazine)或其衍生物。

[0024] 在本发明中,例如,可使用莠去津作为半抗原,可开发与莠去津结合的抗体并将其用作参照抗体。因此,莠去津和所述抗体可用于样品的准确定量测量。

[0025] 在本发明中,可根据制备抗体的常规方法来制备结合所述半抗原的抗体,并可将浓缩和纯化方法(例如,超滤、硫酸铵分级分离、离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法和亲和色谱法)适当地组合并用于制备抗体。

[0026] 根据本发明的一个示例性实施方案,可通过使用噬菌体展示来开发特异性结合莠去津的多种抗体并且构建随温度而具有不同的亲和力常数和多种抗原结合亲和力的抗体的文库,可制备所述抗体。在这种情况下,可将所述抗体用作半抗原抗体。因此,在本发明中,可在真正的样品测量时选择并使用参照抗体——其具有与测试区中温度依赖性抗原-抗体结合特征相似的反应性特征。

[0027] 在本发明中,所述半抗原抗体可包括具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0028] 在本发明中,使用参照抗体的免疫测量方法可通过在以下各区的反应进行:(1)缀合区,其中共同浸透了(impregnate)特异性结合样品中的测试物质的探针(即测试探针)和特异性结合半抗原或半抗原抗体的探针(即参照探针);(2)测试区,其中浸透了特异性结合所述测试物质的抗体(在下文中被称为捕获抗体);以及(3)参照区,其中浸透了所述半抗原或半抗原抗体。

[0029] 在本发明中,将特异性针对所述样品中的测试物质的探针和特异性针对所述半抗原的探针混合并浸透在缀合区中。当通过样品注射孔注射样品时,所述样品中的测试物质结合特异性针对所述测试物质的探针以形成复合物。所述复合物沿着扩散膜扩散到测试区和参照区。

[0030] 所述样品中的待分析的测试物质可包括来自所有种类的哺乳动物的有机物质或人工合成的有机分子。例如,所述测试物质可包括药物、毒素、蛋白质、碳水化合物、核酸等,但是本发明不限于这些。根据本发明的一个示例性实施方案,所述测试物质可以是促甲状腺激素(TSH)、前列腺特异性抗原(PSA)、 α -甲胎蛋白(AFP)、肌酸磷酸激酶(CK-MB)、肌钙蛋白I(TnI)、肌红蛋白、高灵敏度C反应蛋白(hsCRP)、D-二聚体、黄体化激素(即睾酮)或维生素D。

[0031] 此外,包含所述测试物质的样品可以是血液、血清、血浆、尿液、泪液、唾液、母乳或细胞培养上清液的形式。

[0032] 所述探针用于测量和搜索靶标(target object)的目的,并且当特异性结合反应发生时,所述探针通过荧光直接或间接产生可识别的或可检测的信号。所述探针的可检测信号包括分光光度计测量(spectrophotometric)的信号、可见信号、电化学信号和其他电学方法可检测(electrically detectable)的信号。

[0033] 在本发明中,测试区是在其中浸透了针对测试物质的捕获抗体的区域。所述样品中的测试物质结合测试区中的捕获抗体。具体而言,当在缀合区获得的复合物结合于测试区中浸透的针对测试物质的捕获抗体时,所述复合物可发出信号。例如,在缀合区获得的探针和TSH的复合物可结合于测试区中浸透的抗TSH的抗体,所述探针通过所述复合物与抗TSH的抗体的结合反应发出信号,例如光。

[0034] 在本发明中,参照区具有浸透在其中的半抗原或半抗原抗体。例如,(1)当所述半抗原被浸透在参照区中时,通过使半抗原抗体与缀合区中特异性针对所述半抗原抗体的探针的结合而形成的复合物会结合于所述半抗原,从而使得所述探针可发光,或者(2)当所述半抗原抗体被浸透在参照区中时,当半抗原结合于特异性针对半抗原的探针时而形成的复合物会在所述复合物结合于半抗原抗体时发出信号,从而探针可发光。

[0035] 缀合区、测试区和参照区中的每一个均还可包含试剂。

[0036] 根据本发明的一个示例性实施方案,本发明的免疫测量方法可使用具有微通道的微芯片,所述微通道容纳待分析的样品并且在其中发生反应,缀合区、测试区、参照区和反应终止区可依次存在于微芯片底板中的微通道中。与待检测的试剂和抗原(例如,TSH)特异性结合的探针,以及与半抗原或半抗原抗体特异性结合的探针可被固定于缀合区的表面中,与所述待检测的试剂和抗原(例如,TSH)特异性结合的捕获抗体可被固定于测试区的表面中。此外,所述试剂和半抗原或半抗原抗体可被固定于参照区的表面中。

[0037] 在待分析的样品通过样品注射孔被滴入微通道中之后,将微芯片安装在分析仪(例如,自动免疫测定系统)上,然后将微通道的横截面暴露于分析仪的光学传感器以将荧光信号转化为电信号。随后,可使用计算每个区中的信号的方法来自动确定可检测的抗原的存在和待分析的样品的量。

[0038] 更具体而言,根据本发明的一个示例性实施方案,使用包括半抗原和结合所述半抗原的抗体的参照抗体的免疫测量方法包括:(1)将样品通过样品注射孔注射到微通道中;(2)在缀合区中使所述样品中的测试物质与特异性针对所述测试物质的探针结合以形成测试物质-探针复合物,并使半抗原或半抗原抗体与特异性针对所述半抗原或半抗原抗体的探针结合以形成半抗原-或半抗原抗体-探针复合物;(3)使所述复合物沿着扩散膜扩散到测试区和参照区;(4)在测试区中使针对所述测试物质的捕获抗体与测试物质-探针复合物结合;(5)在参照区中使所述半抗原-或半抗原抗体-探针复合物与所述半抗原或半抗原抗体结合;(6)测量信号;以及(7)分析所述信号。

[0039] 此外,本发明提供了使用参照抗体进行免疫测量的装置,所述参照抗体的特征在于包括半抗原和结合所述半抗原的抗体。在本文中,所述抗体包括:i)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区CDR1;ii)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的重链可变区CDR2;iii)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的重链可变区CDR3;iv)具有SEQ ID NO:6所

示的氨基酸序列的轻链可变区CDR1;v)具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR2;以及vi)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区CDR3。

[0040] 所述半抗原、所述结合半抗原的半抗原抗体,以及所述参照抗体为如以上所述的。

[0041] 在本发明中,用于免疫测量的装置的特征在于,其使用毛细管力、微通道、色谱法或硝酸纤维素膜。

[0042] 根据本发明的一个示例性实施方案,用于免疫测量的装置可使用具有包括参照抗体(即半抗原抗体)的微通道的微芯片,所述微通道可包括(1)缀合区,其中共同浸透了特异性结合样品中的测试物质的测试探针和特异性结合半抗原或半抗原抗体的参照探针;(2)测试区,其中浸透了特异性结合所述测试物质的捕获抗体;以及(3)参照区,其中浸透了所述半抗原或半抗原抗体。

[0043] 在本说明书中,术语“抗体”是指在免疫系统中通过抗原的刺激而产生的物质,但是抗体的类型没有特别地限制。在本说明书中,所述抗体包括所有类型的动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。在本说明书中,所述抗体也包括具有抗原结合活性的抗体的片段,例如Fab。

[0044] 实施例

[0045] 在下文中,将参照以下实施例进一步详细描述本发明。但是,应理解,以下实施例仅为举例说明本发明,而不意欲限制本发明的范围。

[0046] 实施例1:用莠去津-载体免疫的动物

[0047] 在本发明中,开发了针对作为半抗原的莠去津(BioceII)的多种抗体,并构建了根据温度而具有不同的亲和力常数和不同的抗原结合亲和力的抗体的文库。人体中不存在抗体,因为所述半抗原不存在于人体中并且不引起免疫应答。

[0048] 为了筛选特异性结合莠去津的抗体,首先,构建经免疫的动物的抗体文库。通过以下方式来构建所述文库:用莠去津-载体蛋白(钥孔虫凝集素蛋白(KLH)或卵清蛋白(OVA))对动物进行免疫、从免疫细胞获得mRNA、使用抗体基因的引物组合通过PCR扩增抗体基因、以及将所述抗体基因克隆到载体中用于噬菌体展示。

[0049] 具体而言,以1:1的比例将100 μ g莠去津-KLH或莠去津-OVA(BioSeII,US)与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(Sigma,US)混合,将所获得的混合物以0.5mI/头的剂量交替地经皮下注射到三只白来亨鸡中,注射4次,间隔为3周。

[0050] 从经免疫的动物获得血清,用PBSB(补充有3%BSA的PBS)将其稀释到1:100、1:500、1:2500、1:12500和1:62500的浓度并贮存。然后,使用酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定未用于免疫的莠去津-BSA与莠去津的结合。该方法如下:将1 μ g/ml莠去津-BSA添加到ELISA板,并在4 $^{\circ}$ C下包被过夜,然后添加经稀释的血清,并在37 $^{\circ}$ C下反应2小时。用PBST(补充有0.1%Tween 20的PBS)冲洗所得的反应溶液3次,以1:2000稀释抗鸡免疫球蛋白-辣根过氧化物酶(HRP),将其添加到反应溶液中并反应一小时。用PBST冲洗反应溶液3次,向其中添加50 μ L ABTS(Thermo,US)并反应20分钟以显色。然后,使用酶标仪(micropIate reader)测量所述反应溶液在405nm处的吸光度。选择这样的动物,即其在免疫后产生的血清与免疫前的血清相比与莠去津-BSA的结合更强。

[0051] 实施例2:抗体文库的构建

[0052] (2-1)cDNA合成

[0053] 在实施例1中最后一次皮下注射5天之后,从所选择的鸡的骨髓、脾脏和法氏囊获得组织。将以上获得的组织与10mI TrizoI(Invitrogen,US)混合,并用匀浆器使其均质化。然后,再添加20mI TrizoI,以3500rpm离心所得混合物10分钟以获得上清液。将3mI 1-溴-3-氯丙烷(BCP,Sigma,US)添加到上清液,然后离心以获得上清液。将15mI 异丙醇添加到上清液,通过离心沉淀并获得总RNA。

[0054] 使用0Iigo dT作为引物,以及SuperScript转录系统(Invitrogen,US),对以上获得的总RNA进行逆转录反应(65℃5分钟,4℃5分钟,50℃50分钟,以及85℃5分钟)。将2μI 包含cDNA(其为逆转录反应的反应产物)的反应溶液上样到1%琼脂糖凝胶中,进行电泳以确定具有多种长度的cDNA条带。

[0055] (2-2)抗体基因的扩增

[0056] 为了从实施例2-1中获得的cDNA扩增鸡抗体的重链和轻链的可变区V_H和V_L,如下进行PCR反应。首先使用实施例2-1中合成的cDNA作为模板进行PCR反应以扩增V_H和V_L结构域,并纯化每个所扩增的V_H和V_L结构域。然后,通过PCR连接V_H和V_L结构域以构建单链Fv(scFv)片段。

[0057] 具体而言,将0.5μI 实施例2-1中获得的cDNA文库,30pmoIe 下表1中列出的V_H和V_L结构域的每种正向和反向引物(SEQ ID NOS:9和10,以及SEQ ID NOS:11和12),10×PCR缓冲液,200μM dNTPs和0.5μI Taq DNA聚合酶混合至终体积为50μI,并在94℃下反应5分钟。然后,对所得的反应溶液进行PCR(重复进行30个循环:94℃15秒,56℃30秒,72℃90秒)。随后,在1%琼脂糖凝胶中对经PCR扩增的抗体DNA进行电泳,根据经扩增的DNA的大小进行分离,并使用凝胶提取试剂盒(EIpis Biotech Inc.,Korea)纯化。

[0058] 同时,为了获得scFv DNAs,将50ng经纯化的V_H结构域和50ng经纯化的V_L结构域用作模板,将30pmoIe 下表1中列出的scFv正向和反向引物(SEQ ID NO:13和14)、10×PCR缓冲液、200μM dNTPs和0.5μI Taq DNA聚合酶混合至终体积为50μI,然后在94℃下反应5分钟。之后,使所得的反应溶液进行PCR(重复进行20个循环:94℃30秒,56℃30秒,72℃2分钟)。随后,在1%琼脂糖凝胶中对经PCR扩增的抗体DNA进行电泳,根据每种经扩增的DNA的大小进行分离,并使用凝胶提取试剂盒(EIpis Biotech Inc.,Korea)纯化。

[0059] 【表1】

[0060]

用于 PCR 反应中的引物

[0061]

项	引物	序列	SEQ ID NO
V _H	正向	GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GGC GGT GGT GGC AGC TCC GGT GGT GGC GGT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG	9
	反向	CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC	10
V _L	正向	GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC	11
	反向	GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G	12
scFv	正向	GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG	13
	反向	GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG	14

[0062] (2-3)抗体文库的构建

[0063] 用限制性酶SfiI(Roche,US)消化实施例2-2中制备的scFv DNA和噬菌粒pComb3X(the Scripps Research Institute,US)。

[0064] 具体而言,添加10μg实施例2-2中制备的编码scFv的PCR片段、360单位的SfiI和20μI 10×缓冲液,至终体积为200μI,在50℃下反应过夜。此外,添加20μg pComb3X载体、120单位的SfiI和20μI 10×缓冲液,至最终体积为200μI,在50℃下反应过夜。在1%琼脂糖凝胶中对如以上所述用限制性酶消化的各片段进行电泳,然后使用凝胶提取试剂盒(EIpis Biotech Inc.,Korea)纯化。

[0065] 为了将scFv片段插入到pComb3X载体中,将700ng如以上所述用限制性酶SfiI消化的scFv片段和1.4μg pComb3X载体混合,并在其中添加T4DNA连接酶(Invitrogen,US),在16℃下反应过夜。使用2×体积的乙醇和0.3M乙酸钠,通过乙醇沉淀法纯化连接混合物,并通过电穿孔将其转化到大肠杆菌(Escherichia coli)ER2738(New England BioLab,US)中。在存在50μg/ml羧苄青霉素和70μg/ml卡那霉素的情况下,培养转化的大肠杆菌以构建具有 1×10^9 复杂度(complexities)的文库。

[0066] 实施例3:抗莠去津的抗体的筛选

[0067] 使用由固体支持的莠去津-BSA,从抗体文库中筛选结合莠去津的抗体,所述抗体具有以实施例2中获得的scFv的形式随机化的重链和轻链。

[0068] (3-1)包含结合莠去津的scFv的噬菌体的筛选

[0069] 首先,使3μg莠去津-BSA与磁珠缀合。

[0070] 此外,将100μg/ml羧苄青霉素、70μg/ml卡那霉素和VCSM13辅助噬菌体(1:1000,

Stratagene,US)添加到包含实施例2-3中构建的文库的大肠杆菌中,在37℃下反应过夜以诱导其中表达所述抗体的噬菌体的生长。对大肠杆菌培养液进行离心以仅回收上清液,向其中添加40mg/ml聚乙二醇8000和30mg/ml NaCl,离心以收集沉淀的噬菌体,用PBS重悬所述噬菌体。

[0071] 在室温下使以上获得的表达抗体文库的噬菌体,以及与磁珠缀合的莠去津-BSA反应2小时以使具有亲和力的噬菌体与莠去津结合。使用补充有0.5%Tween 20的PBS冲洗与莠去津结合的噬菌体,用0.1M甘氨酸(pH 2.2)溶液洗脱,并用1M Tris(pH 9.0)溶液中和(淘选)。用洗脱的噬菌体感染大肠杆菌ER2738用于下一轮淘选,培养过夜以进行生长,并用40mg/ml聚乙二醇8000和30mg/ml NaCl回收。以这种方式重复进行淘选4次,冲洗次数随着淘选次数的增加而增加以累积具有高结合亲和力的噬菌体。

[0072] 将从三级和四级淘选的产物的板筛选的各克隆加入到96深孔板中,并向其中加入100μg/ml羧苄青霉素、70μg/ml卡那霉素和VCSM13辅助噬菌体(1:1000),在37℃下培养过夜以诱导其中表达所述抗体的噬菌体的生长。获得包含噬菌体的培养液,然后使用莠去津-BSA对其进行酶联免疫吸附测定(ELISA)以确定包含结合莠去津的抗体克隆的噬菌体的存在。在所述方法中,将1μg/ml莠去津-BSA加入到ELISA板中,在4℃下包被过夜,然后用PBST(补充有0.1%Tween 20的PBS)冲洗3次。随后,在37℃下使所得的混合物在补充有1%BSA(Sigma,US)的PBS中反应1小时,向其中添加以上获得的包含噬菌体的培养液,在37℃下反应2小时。用PBST冲洗所得的反应混合物3次,以1:2000稀释与HRP缀合的抗HA(结合scFv的血凝素标签)并反应1小时。用PBST冲洗反应混合物3次,向其中添加100μl ABTS,使其反应以显色。然后,使用酶标仪测量反应溶液在405nm处的吸光度。选择包含显示莠去津-BSA阳性信号的抗体克隆的噬菌体。

[0073] (3-2)所筛选的抗体的测序

[0074] 在SB培养基(30g/L胰蛋白胨、20g/L酵母提取物和10g/L MOPS,pH 7.0)中过夜培养包含如实施例3-1中筛选的显示莠去津阳性信号的克隆的大肠杆菌ER2738,然后离心以获得转化的大肠杆菌。使用DNA mini-prep试剂盒(GeneAII Biotechnology Co.,Ltd., Korea)从转化的大肠杆菌获得质粒DNA,然后进行测序。

[0075] 对于测序,使用下表2中列出的ScFv测序引物对质粒DNA进行测序,并通过编号指定筛选的抗体。此外,在下表3中列出在本实验中所使用的抗体的#1抗体的重链和轻链CDR的氨基酸序列的具体信息。

[0076] 【表2】

scFv 测序引物		
	序列	SEQ ID NO
[0077]	正向 ACA CTT TAT GCT TCC GGC TC	15
	反向 CAA AAT CAC CGG AAC CAG AG	16

[0078] 【表3】

[0079]

用于本实验中的一种抗体的重链和轻链 CDR 的氨基酸序列		
	序列	SEQ ID NO
HCDR1	GFSIGDYGMG	3
HCDR2	SIRSDGSSTYYGSAVKG	4
HCDR3	DGVGWSATIDA	5
LCDR1	SGGGGSYG	6
LCDR2	YNNKRPS	7

[0080]

LCDR3	GSTDIRSTPI	8
--------------	-------------------	----------

[0081] 实施例4:抗体的产生

[0082] 为了分析以上筛选的抗体的亲和力和特征,以IgG的形式产生嵌合抗体,其中鸡可变区和小鼠恒定区(IgG2a亚型的C_H和C_K)相互结合。

[0083] 首先,通过PCR从包含scFv基因的pComb3x质粒获得可变区的片段,获得所述片段以用于上述scFv测序。在这种情况下,使用下表4中列出的SEQ ID NOS:17和18所示的引物对和SEQ ID NO:23和24所示的引物对,分别获得重链和轻链可变区片段。

[0084] 使用包含小鼠IgG2a的C_H和C_K的质粒作为模板,通过PCR获得恒定区的C_H和C_K片段。在这种情况下,使用下表4中列出的SEQ ID NOS:19和20所示的引物对和SEQ ID NO:25和26所示的引物对,分别获得C_H和C_K。

[0085] 使用下表4中列出的SEQ ID NOS:21和22所示的引物对和SEQ ID NO:23和24所示的引物对,对以上获得的可变区和恒定区进行PCR,从而分别获得重链片段(HC)和轻链片段(LC)。在这种情况下,在与实施例2中所述的条件相同的条件下进行PCR。

[0086] 使用pcDNA3.3™-**TOPO**®TA克隆试剂盒和pOPTIVEC™-**TOPO**®TA克隆试剂盒(Invitrogen,US)分别将以上获得的抗体的重链和轻链DNA转移至哺乳动物细胞表达质粒。即,将所述重链和轻链DNA分别与1μI pcDNA3.3™-**TOPO**®载体和pOPTIVEC™-**TOPO**®载体混合,将所得的混合物添加到补充有200mM NaCl和10mM MgCl₂的缓冲液中直至总体积为6μI,然后在室温下反应5分钟以进行连接。对大肠杆菌DH5α感受态细胞进行热激以用所述连接产物转化所述感受态细胞,培养所述感受态细胞以获得克隆。在SB培养基中大规模培养所述克隆以获得质粒。

[0087] 使用以上制备的质粒转染HEK293F细胞(Invitrogen,US),然后在135rpm和8%CO₂的条件下培养7天以获得培养液。使用蛋白A柱(GE,US)纯化所述培养液中的抗体。将所述培养液上样到所述柱上以使所述培养液中的抗体(IgG)与蛋白A结合,用20mM柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0)洗脱与蛋白A结合的抗体(IgG),然后用磷酸缓冲液中和。之后,对洗脱的抗体(IgG)进行SDS-PAGE以确定重链和轻链的分子量是否与理论值一致,并获得具有高纯度的经纯化的蛋白。

[0088] 【表4】

[0089]

项	引物	序列	SEQ ID NO
V _H	正向	GCT AGC CGC CAC CAT GGG CTG GTC CTG CAT CAT CCT GTT CCT GGT GGC CAC CGC CAC CGG CGC CGT GAC GTT GGA CGA GTC CGG G	17
	反向	AGA TGG TGC GGT AGT TTT AGC GGA GGA GAC GAT GAC TTC	18
C _H	正向	GCT AAA ACT ACC GCA CCA TCT	19
	反向	GGA TCC CTT GCC GGC CGT CGC	20
HC	正向	CTA GCT AGC CGC CAC CAT GGG	21
	反向	GAC ACC TAC TCA GAC AAT GC	22
V _L	正向	AAG CTT GCC GCC ACC ATG GGC TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTC CTG GTG GCC ACC GCC ACC GGC GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG	23
	反向	CAC GGT TGG GGC TGC ATC GGC TAG GAC GGT CAG GGT TGT	24
C _k	正向	GCC GAT GCA GCC CCA ACC GTG	25
	反向	TCT AGA CTA ACA CTC ATT TCT GTT	26
LC	正向	CCC AAG CTT GCC GCC ACC ATG	27
	反向	GGA CAC CTA GTC AGA CAA AAT G	28

[0090] 实施例5:亲和力分析

[0091] 使用ELISA和表面等离子共振(SPR)分析实施例4中筛选的抗体与莠去津的亲和力。

[0092] 为了使用ELISA分析抗体亲和力,首先,将1 μ g/mL的莠去津-BSA添加到96孔免疫板(Corning,US)中,在4℃下贮存过夜以用莠去津-BSA包被所述板的底部,然后用PBST(补充有0.1%Tween 20的PBS)冲洗3次。之后,使所述免疫板在37℃下在补充有1%BSA(Sigma,US)的PBS中反应1小时,用PBST冲洗3次,并用以递增浓度(0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30和100nM)稀释的抗体处理,对于每种抗体,剂量为50 μ L/孔。使所述免疫板在37℃下反应1小时以使所述抗体与所述抗原结合,然后用PBST冲洗3次。以1:2000稀释抗小鼠免疫球蛋白Fc-HRP(Jackson,US),以50 μ L/孔的剂量处理,然后在室温下反应1小时。当反应完成时,用PBST冲洗所述免疫板3次,向每个孔中添加50 μ L ABTS,并反应20分钟以显色。然后,使用酶标仪(Biotek,USA)测量所述反应溶液在405nm处的吸光度。结果示于图2。

[0093] 如图2所示,所述抗体对莠去津的亲和分析结果表明,所筛选的抗体克隆以高亲和力与莠去津结合。

[0094] 同时,为了使用另一种方法SPR来分析所筛选的抗体与莠去津的亲和力,根据制造商的说明使莠去津-BSA与羧甲基葡聚糖生物传感器芯片(CM5,GE,US)偶联。为了测量结合/解离速率,将偶联有莠去津-BSA的生物芯片安装到Biacore®(GE,US)仪器中,将每个克隆的抗体蛋白继续加倍稀释至50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.13nM和1.56nM的浓度并注入其中。抗体与莠去津的结合和解离由感应图表示,使用简单的1:1Langmuir结合模型(BIACore X100评估软件,版本2.0)计算结合速率常数和解离速率常数。平衡解离常数(KD)为通过使解离速率常数(Kd)除以结合速率常数(Ka)而获得的值。当将平衡速率常数(KD)计算为实际值时,确认抗体具有小于或等于nM的高KD值。

[0095] 所述克隆的SPR感应图结果示于图3中。因此,可见抗体克隆具有高Kon和Koff值,并且快速与莠去津结合并缓慢从莠去津上解离。

[0096] 实施例6:化学物理特征的分析

[0097] 分析经筛选的抗体的化学物理特征。

[0098] 在(1)还原条件(R)(其中处理二硫苏糖醇(DTT)以除去二硫键)和(2)非还原条件(NR)(其中DTT未经处理)下制备抗体蛋白,然后使用NuPAGE 4-12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen,US)进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。使用考马斯溶液(0.1%考马斯、45%甲醇、10%乙酸)对根据分子量通过电力在凝胶上分离的蛋白质进行染色。测量本发明中筛选的11种抗体类型的重链和轻链及其桥接形式的分子量。结果示于图4。

[0099] 如图4所示,表明当在还原条件(R)下分析抗体的重链和轻链时,在55kDa和20.1kDa分子量标记物中每一种的附近观察到一条主带,表明所述主带对应于抗体的重链和轻链。对于在非还原条件下分析的样品,在116kDa分子量标记物和205kDa分子量标记物之间观察到一条主带,表明重链和轻链在抗体中桥接。此外,因为未观察到对应于抗体的重链和轻链及其桥连形式的条带以外的其他条带,预期所纯化的蛋白具有90%或更高的纯度。

[0100] 作为一种对经纯化的抗体蛋白的纯度分析,也使用TSK凝胶G3000SWxI柱(Tosoh, Japan)通过分子筛色谱法-高效液相色谱法(SE-HPLC)分析可溶性聚集物的水平。使用100mM磷酸缓冲液(pH6.6)作为移动相,通过等度洗脱法分离抗体蛋白,并监测280nm处的吸光度。在这种情况下,单体峰的面积与总峰面积的比值平均为96%,表明抗体蛋白具有高纯度。此外,聚集物峰的比值被证明为0%(四种聚集物)、4至8%(四种聚集物)和12.8%(一种聚集物)。

[0101] 实验实施例1:由样品的粘度差异引起的结果值的差异的校正

[0102] 将来自韩国江原国立大学医学院实验室医学系的患者的测试血清样品用作本发明中使用的血液样品,按照随机方式选择一组患者。所述患者组包括甲状腺疾病患者,将甲状腺特异性抗原(即促甲状腺素(TSH))用作生物标记物。使用自动免疫测定系统(Access 2分析仪,Beckman Coulter)测量患者血清中存在的TSH的量。在这些样品中,选择具有相同浓度但是不同粘度的三个样品,并根据本发明的一个示例性实施方案使用免疫测量装置来测量TSH浓度。

[0103] 具体而言,以30μL的剂量将各测试血清样品1至3通过微芯片的样品注射孔滴入,

并在5分钟之后将微芯片插入测量装置。所述测量装置是具有容纳待分析的样品并在其中发生反应的微通道的微芯片,其被制造为使得缀合区、测试区、参照区和反应终止区依次存在于微芯片的底板上。特异性结合TSH的探针和特异性结合莠去津或莠去津抗体的探针被固定在缀合区的表面中。特异性结合所述试剂和TSH的捕获抗体被固定在测试区的表面中。此外,所述试剂和莠去津或莠去津抗体被固定在参照区的表面中。

[0104] 当经由样品注射孔将待分析的样品滴入微通道时,将微芯片安装在测量装置上,使微通道的横截面暴露于分析仪的光学传感器以将荧光信号转化为电信号。随后,使用在每个区中计算信号的方法可自动测定可检测的抗原的存在和TSH的量。

[0105] 约40秒之后,当将微芯片插入测量装置中时,在所述测量装置的显示屏上显示出所述样品中TSH的(定量的)量,以及测试区和参照区中的信号强度值。分别通过以下方程1和方程2测量测试区中的荧光信号和参照区中的荧光信号,并计算测试区和参照区之间荧光信号的比值。结果列于下表5中。

[0106] [方程1]

$$[0107] \quad \text{测试区中的荧光信号} = \int_{X_{tc}-30}^{X_{tc}+30} (X_n - X_b)$$

[0108] [方程2]

$$[0109] \quad \text{参照区中的荧光信号} = \int_{X_{rc}-30}^{X_{rc}+30} (X_n - X_b)$$

[0110] 在方程1和2中,

[0111] X_n 代表第 n 位置处的荧光信号;

[0112] X_{tc} 代表测试区中心的荧光信号;

[0113] X_{rc} 代表参照区中心的荧光信号;以及

[0114] X_b 代表微通道0-900位置处至少50个点的荧光信号的平均值,其中0-900代表编号部分——在其中以恒定的间隔分隔微通道中的信号测量区。

[0115] 【表5】

[0116]

	测试区	参照区	比值(T/R)
样品1	60431	43987	1.374
样品2	54177	41354	1.310
样品3	35724	26763	1.335

[0117] 考虑到测试区中的信号,确认样品1具有最高的信号强度,样品1和样品3之间的信号强度差异为约25000。但是,当比较通过用测试区的信号强度除以参照区的信号强度而获得的比值时,确认存在于3个样品中的TSH的量是相同的。即,即使在所述患者的具有相同TSH浓度的样品中血液粘度也有差异,因此测试区的信号能够是任何大程度的不同。但是,根据本发明的用于免疫测量的装置,也可以可通过以下方式使T/R比值保持恒定:将测试区中改变的信号反映到参照区的信号强度中并以类似的比例改变测试区中的信号,从而使得可以进行准确的定量分析。

[0118] 实验实施例2:通过相同样品的重复测量验证对实验环境的反映

[0119] 为了确定分析再现性,计算测试区中和参照区中的信号强度,以及T/R比例中出现的变异系数(CV:%)。通过表达式:标准偏差/平均值 $\times 100$ 来计算变异系数,从通过5次重复

实验获取的结果计算平均值和标准偏差。

[0120] 具体而言,从其中使用大规模自动免疫测定系统(Access 2分析仪,Beckman Coulter)测定患者血清中存在的TSH的量的结果中,选择其中TSH的浓度被测量为0.00 μ IU/mI的样品,并直接增加TSH至浓度为5 μ IU/mI和100 μ IU/mI(Spiking)以制备之后用于实验的样品A和B。将具有两种不同浓度的每种样品注入5个微芯片中并进行分析。

[0121] 通过微芯片的样品注射孔滴入30 μ I测试血清样品,并在5分钟之后将所述微芯片插入本发明的一个示例性实施方案的免疫测量装置中。约40秒之后,在所述测量装置的显示屏上显示出样品中TSH的(定量的)量,以及测试区和参照区中的信号强度值。此外,在下表6中列出使用所述参数测量的变异系数。

[0122] 【表6】

[0123]

	样品 A			样品 B		
	测试区	参照区	比值 (T/R)	测试区	参照区	比值 (T/R)
样品盒 1	15600	45870	0.340	211202	66017	3.199
样品盒 2	15637	48629	0.322	183114	60548	3.024
样品盒 3	19661	51810	0.379	148279	55952	2.650
样品盒 4	17018	47024	0.362	188573	60039	3.141
样品盒 5	21054	68214	0.309	144859	51085	2.836
CV(%)	13.82	17.53	8.43	16.10	9.49	7.62

[0124] 如表6所列出的,表明测试区或参照区中的信号具有差异,并且CV值大于10%,但是当计算T/R比值时,CV值降至小于10%。即,表明根据本发明的一个示例性实施方案的免疫测量装置能够重复测量具有不同浓度的相同样品,并因此总是显示出相同的结果,因为实验人员的操作误差、注射样品量的细微差异和装置的变化自身已经被反映出来。

[0125] 实验实施例3:根据浓度比较样品数据

[0126] 分析检测区内存在的13个TSH血清样品的信号强度的结果值,其中使用本发明的一个示例性实施方案的莠去津参照抗体和常规的抗兔参照抗体通过免疫测量方法在实验实施例1中测量的血清中TSH的浓度是已知的。

[0127] 通过微芯片的样品注射孔以30 μ L的剂量滴入30 μ L TSH试验血清样品,并在5分钟之后将所述微芯片插入本发明的一个示例性实施方案的测量装置中。约40秒之后,在所述测量装置的显示屏上显示出所述样品中TSH的(定量的)量,以及测试区和参照区中的信号强度值。

[0128] 同时,以与上文相同的方式实施使用常规抗兔参照抗体的测量方法,除了在本文中使用这样的微芯片,即所述微芯片被制造为使得抗兔抗体被固定在参照区中,特异性结合TSH的探针和特异性结合抗兔抗体(抗兔山羊抗体)的探针被固定在缀合区中(参见国际公开号W0 2013/125855)。结果在以下表7中列出。

[0129] 【表7】

[0130]

	使用莠去津抗体的测量			使用常规的抗兔参照抗体的测量		
TSH 浓度	测试区	参照区	T/R	测试区	参照区	T/R
0	3025	66201	0.046	103	63356	0.002
0.32	4403	61931	0.071	2414	71066	0.034
1	15121	65789	0.230	4474	51907	0.086
1.5	26448	82746	0.320	5170	45527	0.114
2	29793	76689	0.388	10007	63647	0.157
3	56779	89275	0.636	12454	60564	0.206
3.38	31930	66310	0.482	10466	52429	0.200
5.37	53908	60230	0.895	21380	57541	0.372
6.68	53206	60901	0.874	21399	46373	0.461
10.16	65724	56800	1.157	42264	63195	0.669
13.25	113709	63342	1.795	56566	56710	0.997
16.31	126499	71101	1.779	57326	50438	1.137
24.52	155941	62522	2.494	95615	57430	1.665

[0131] 如表7中所列出的,表明当使用本发明的一个示例性实施方案的莠去津参照抗体测量样品时,每个区中的信号强度和T/R比值的增加与样品中TSH增加的浓度成比例。

[0132] 因此,之前绘制了针对仅在测试区中发生特异性反应的标准物质的标准曲线,根据每种浓度,将对应的T/R比值应用于对应所述曲线的函数以转化TSH的浓度,从而将从T/R比值获得的样品中TSH的浓度表示为代表值。使用大规模自动免疫测定系统针对所述相关性作图,并示于图5中。

[0133] 作为分析参数之间关系的一种工具,回归分析经过以下步骤:设置回归模型,估计实测(actually observed)样品的回归模型系数,以及推导显示参数之间关系的线性回归方程。

[0134] 决定系数是由表示从所述样品测定(observation)估计的回归线解释实测样品的程度(例如,确定回归线代表实测值的程度以显示拟合优度)的系数代表。在这种情况下,决定系数代表0至1之间的值。所述决定系数与表示两个参数之间相关程度的相关系数(通常被称为“r”)的乘积相同,因此用 R^2 (R的平方)表示。当假定 $R^2=1$ 时,这意指所述样品的所有实测值均存在于所估计的回归线上,从而表明所估计的回归线完全解释了参数之间的关系。在另一方面,当假定 $R^2=0$ 时,这意指所估计的回归线完全无法解释参数之间的关系。

[0135] 如图5中所示,确认了相比于使用包括兔IgG和抗兔抗体的常规参照抗体时, R^2 值为0.9805的事实,当使用本发明的一个示例性实施方案的参照抗体时, R^2 值为0.9883,该值大于等效水平。

[0136] 实验实施例4:样品随测量温度的比较数据

[0137] 通过使用本发明的一个示例性实施方案的莠去津参照抗体和常规抗兔参照抗体的测量方法对以5 μ IU/mL的固定浓度和4 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C的递增温度存在于检测区中的测试血清样品进行检测测试。每个温度条件使用5个样品盒(cartridge)进行测量,并计算以上获得的5个检测结果的平均值。

[0138] 具体而言,将样品盒和样品保持在4 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C下1小时以使得温度被设置成与对应的温度相同。之后,通过样品盒的样品注射孔滴入30 μ L样品,所述样品在对应的温度条件下扩散。5分钟之后,将微芯片插入免疫测量装置(在室温下安装)中。约40秒之后,在所述测量装置的显示屏上显示出所述样品中TSH的(定量的)量,以及所述测试区和参照区中的信号强度值。结果列于下表8中。

[0139] 【表8】

[0140]

	T/R 信号比例				
T/R 测量的次数	37 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C	15 $^{\circ}$ C	4 $^{\circ}$ C
1	0.328	0.389	0.327	0.279	0.269
2	0.363	0.285	0.306	0.275	0.308
3	0.334	0.304	0.398	0.254	0.261
4	0.367	0.295	0.305	0.326	0.248
5	0.321	0.284	0.358	0.252	0.295
AVE (平均值)	0.34	0.31	0.34	0.28	0.28

[0141]

SD (标准偏差)	0.021	0.044	0.040	0.030	0.025
CV (%)	6.23	14.19	11.67	10.68	8.95

[0142] 如表8中所示,表明当使用本发明的一个示例性实施方案的莠去津参照抗体时,随着测量的温度分别升高至4 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C时,T/R比值的平均值是恒定的为0.28、0.28、0.34、0.31和0.34,表明T/R比值几乎不受到温度变化的影响。

[0143] 此外,图6示出了针对每个区中信号强度值以及T/R比值绘制的图的结果。图6的左侧轴代表信号强度,右侧轴代表T/R比值。如图6所示,可以看出信号强度随着测量的温度的升高而增大。据判断这是由于抗原/抗体反应随着温度的升高而增加。

[0144] 另一方面,用于检测前列腺特异性抗原(PSA)的微芯片用于测试常规抗兔参照抗体的使用。将来自首尔国立大学Bundang医院实验室医学系门诊检查室的患者的测试血清样品用作本实验中使用的血液样品,并以随机方式选择一组患者。所述患者组包括前列腺癌患者,并测量所述患者血清中肿瘤标记物PSA的量。

[0145] 制造微芯片以使得PSA捕获抗体被固定在测试区中,抗兔抗体被固定在参照区中,特异性结合PSA的探针和特异性结合抗兔抗体的探针(即山羊抗兔抗体)被固定在缀合区中,并使用以上制造的微芯片以与实验实施例3中所述的相同的方式检测PSA。结果如图7所

示。

[0146] 如图7所示,可以看出当使用常规抗兔参照抗体时,测试区(T)中的信号强度随着温度改变而增大,但是由于参照区(R)中的信号强度几乎未改变,因此T/R比值增大,导致所检测的PSA的量随着温度的改变而改变。

[0147] 实验实施例5:比较参照抗体的反应水平随测量的温度的差异

[0148] 通过使用本发明的一个示例性实施方案的莠去津参照抗体测量TSH的方法对以5 μ IU/mL的固定浓度和4 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C的递增温度存在于检测区中的试验血清样品进行检测测试。以与实验实施例4所述的相同的方式在其他条件下进行测量。

[0149] 测量在各温度下重复进行5次时获得的结果的平均值,使用左侧轴作为参照区的信号值进行作图。结果如图8所示。

[0150] 如图8所示,可以看出所述抗体的抗原-抗体结合反应性随温度升高的改变是不同的。例如,#6抗体(克隆6)对温度变化几乎没有反应,但是#15抗体(克隆15)对温度变化的反应最灵敏,#18抗体(克隆18)对温度变化的反应为中等水平。

[0151] 如以上所述,根据本发明的一个示例性实施方案使用半抗原和结合所述半抗原的抗体(参照抗体)的免疫测量方法或装置可用于构建包括在不同温度下具有不同反应性的抗体的抗体文库,以及选择和使用具有与测试区中根据温度的反应性特征相似的特性的参照抗体。

[0001]

<110> SK TELECOM CO., LTD.

<120> 使用半抗原和与其结合的抗体作为参照抗体的免疫测量方法，以及使用参照抗体的免疫测量装置

<130> OPP20160813US

<160> 28

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 参照抗体的重链可变区(VH)氨基酸序列

<400> 1

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Ser Leu Ile Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Gly Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Gly Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Arg Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Val Gly Trp Ser Ala Thr Ile Asp Ala Trp Gly His
100 105 110

Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 103

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 参照抗体的轻链可变区(VL)氨基酸序列

<400> 2

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Gly Thr Val
1 5 10 15

Lys Leu Thr Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr Tyr Asn Asn Lys
35 40 45

Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Phe Gly Ser

50	55	60
Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val		
65	70	75 80
Tyr Phe Cys Gly Ser Thr Asp Ile Arg Ser Thr Pro Ile Phe Gly Ala		
	85 90	95
Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu		
	100	

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 参照抗体的重链可变区的CDR1氨基酸序列(HCDR1)

<400> 3
Gly Phe Ser Ile Gly Asp Tyr Gly Met Gly
1 5 10

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0002] <220>
 <223> 参照抗体的重链可变区的CDR2(HCDR2)

<400> 4
Ser Ile Arg Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 参照抗体的重链可变区的CDR3(HCDR3)

<400> 5
Asp Gly Val Gly Trp Ser Ala Thr Ile Asp Ala
1 5 10

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 参照抗体的轻链可变区的CDR1(LCDR1)

<400> 6
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 参照抗体的轻链可变区的CDR2 (LCDR2)

<400> 7
Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 参照抗体的轻链可变区的CDR3 (LCDR3)

<400> 8
Gly Ser Thr Asp Ile Arg Ser Thr Pro Ile
1 5 10

[0003]

<210> 9
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH结构域的PCR正向引物

<400> 9
ggtcagtcct ctgacatcttc cggcgggtggt ggcagctccg gtggtggcgg ttccgccgtg 60
acgttggacg ag 72

<210> 10
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH结构域的PCR反向引物

<400> 10
ctggccggcc tggccactag tggaggagac gatgacttcg gtcc 44

<210> 11
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

	<220>		
	<223>	VL结构域的PCR正向引物	
	<400>	11	
		gtggcccagg cgccctgac teagccgtcc tcggtgtc	38
	<210>	12	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	VL结构域的PCR反向引物	
	<400>	12	
		ggaagatcta gaggactgac ctaggacggt cagg	34
	<210>	13	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	scFv结构域的PCR正向引物	
	<400>	13	
		gaggaggagg aggaggaggt ggcccaggcg gccctgactc ag	42
[0004]	<210>	14	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	scFv结构域的PCR反向引物	
	<400>	14	
		gaggaggagg aggaggagga gctggccggc ctggccacta gaggagg	47
	<210>	15	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	scFV测序正向引物	
	<400>	15	
		acactttatg cttccgctc	20
	<210>	16	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223>	scFV测序反向引物	
	<400>	16	
		caaaatcacc ggaaccagag	20
	<210>	17	
	<211>	85	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的VH结构域的PCR正向引物	
	<400>	17	
		gctagccgcc accatgggct ggtcctgcat catcctgttc ctggtggcca ccgccaccgg	60
		cgccgtgacg ttggacgagt ccggg	85
	<210>	18	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的VH结构域的PCR反向引物	
[0005]	<400>	18	
		agatgggtgcg gtagttttag cggaggagac gatgacttc	39
	<210>	19	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的重链恒定区(CH)的PCR正向引物	
	<400>	19	
		gctaaaacta ccgcaccatc t	21
	<210>	20	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的重链恒定区(CH)的PCR反向引物	
	<400>	20	
		ggatcccttg ccggccgtcg c	21
	<210>	21	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

	<220>		
	<223>	参照抗体的重链(HC)的PCR正向引物	
	<400>	21	
		ctagctagcc gccaccatgg g	21
	<210>	22	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的重链(HC)的PCR反向引物	
	<400>	22	
		gacacctact cagacaatgc	20
	<210>	23	
	<211>	87	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的VL结构域的PCR正向引物	
	<400>	23	
		aagcttgccg ccaecatggg ctggtcctgc atcactctgt tcttggtggc caccgccacc	60
[0006]		ggcgccctga ctcagccgtc ctcggtg	87
	<210>	24	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的VL结构域的PCR反向引物	
	<400>	24	
		cacggttggg gctgcatcgg ctaggacggt cagggttgt	39
	<210>	25	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的kappa链恒定区(Ck)结构域的PCR正向引物	
	<400>	25	
		gccgatgcag ccccaaccgt g	21
	<210>	26	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

	<220>		
	<223>	参照抗体的Ck结构域的PCR反向引物	
	<400>	26	
		tctagactaa cactcatttc tggt	24
	<210>	27	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的轻链(LC)的PCR正向引物	
[0007]	<400>	27	
		cccaagcttg ccgccaccat g	21
	<210>	28	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	参照抗体的轻链(LC)的PCR反向引物	
	<400>	28	
		ggacacctag tcagacaaaa tg	22

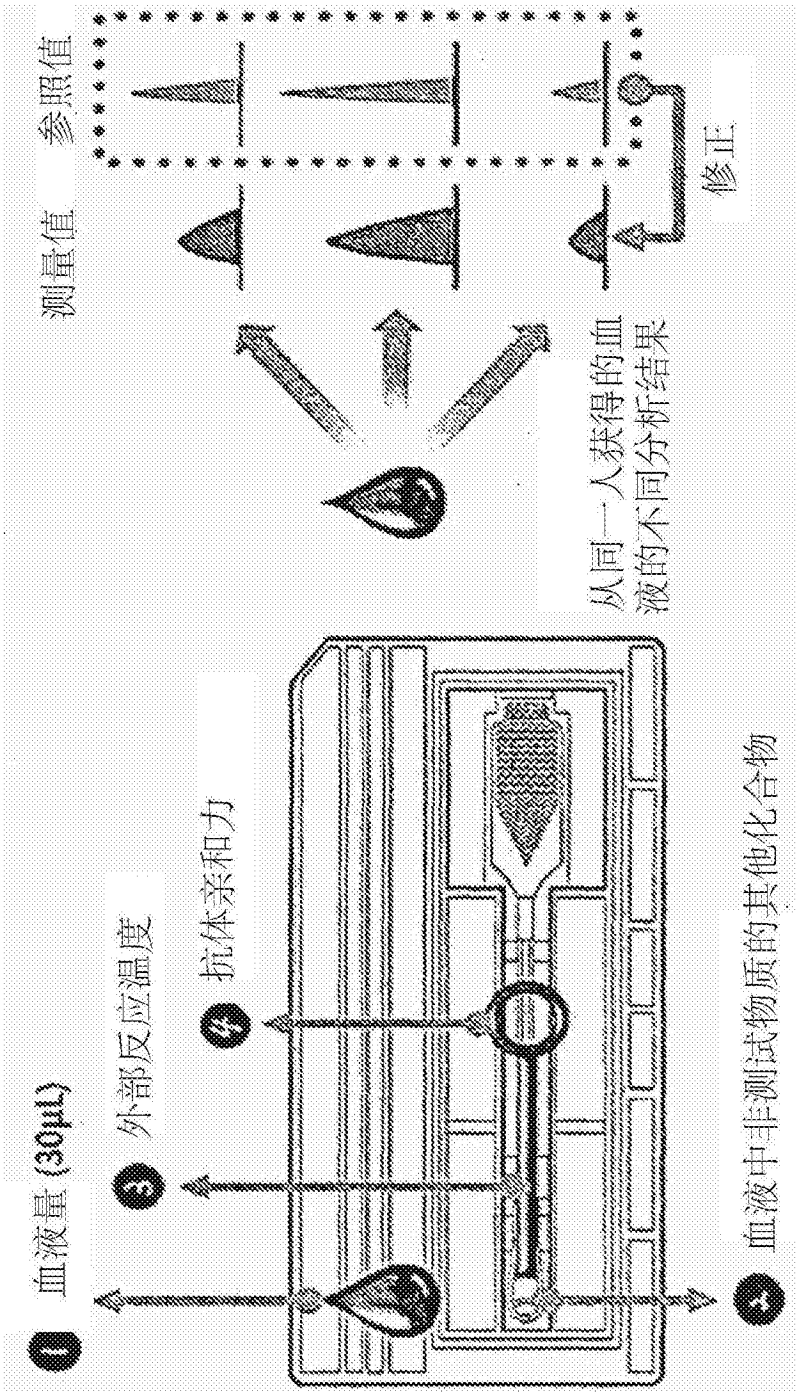


图1

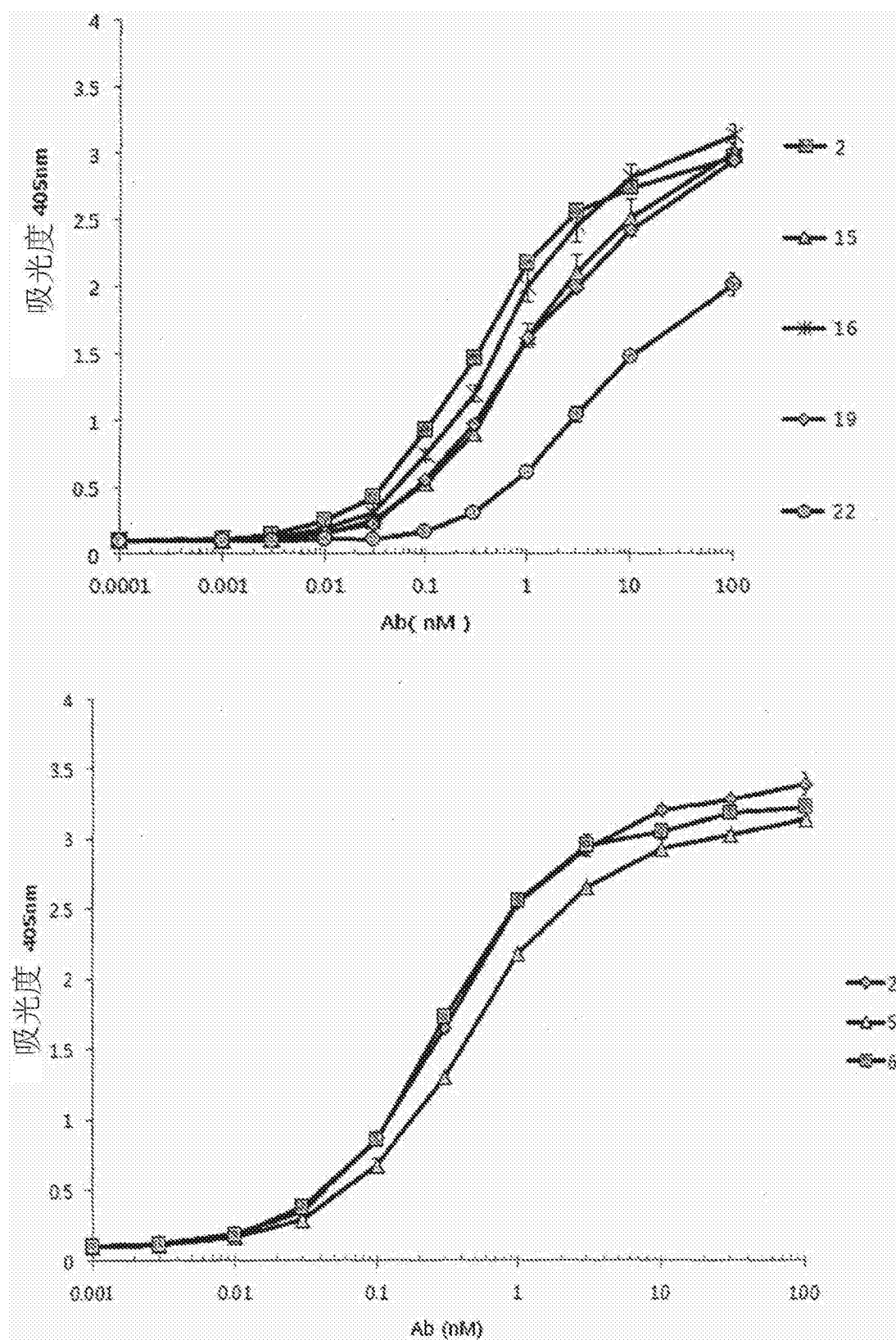


图2

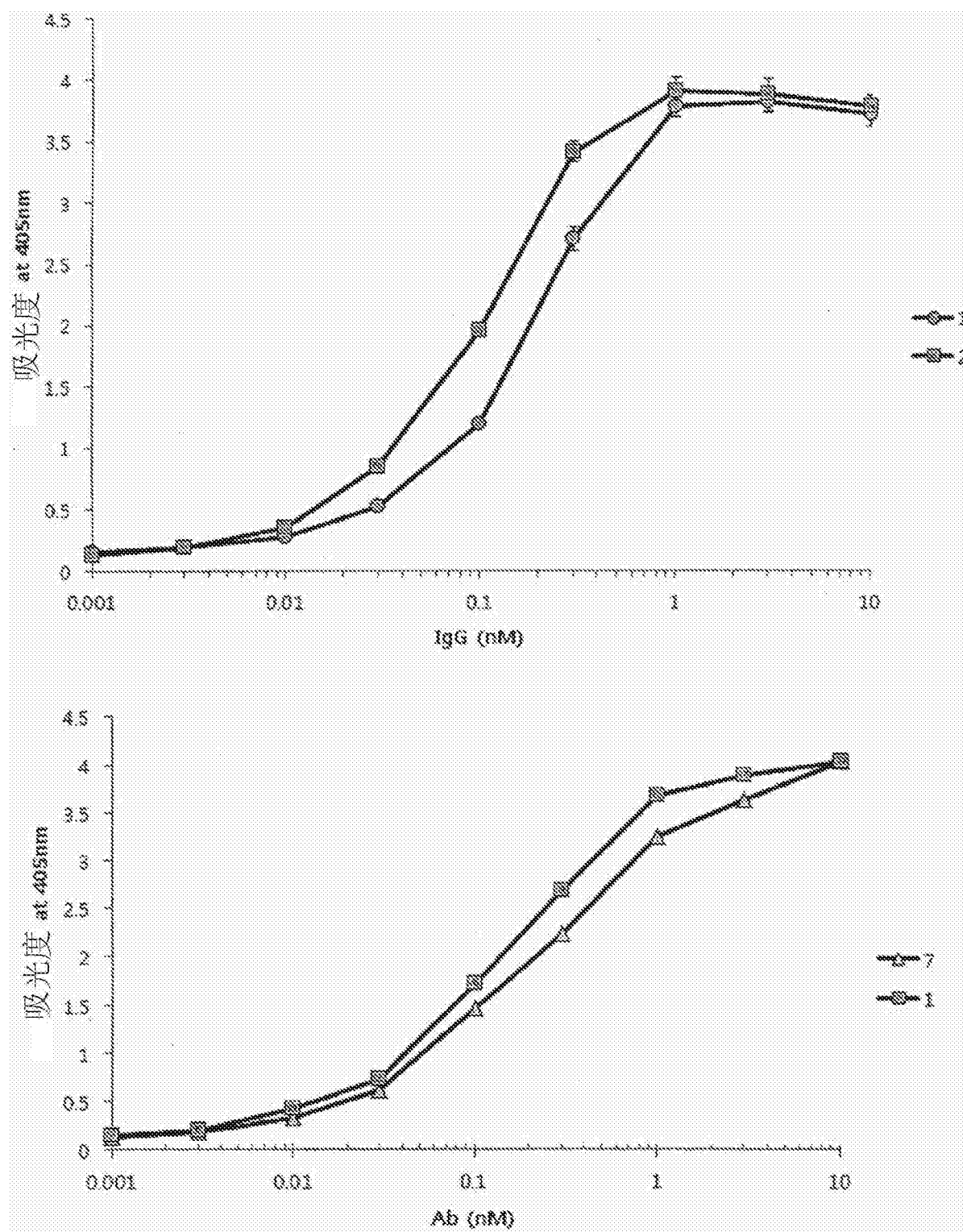


图2续

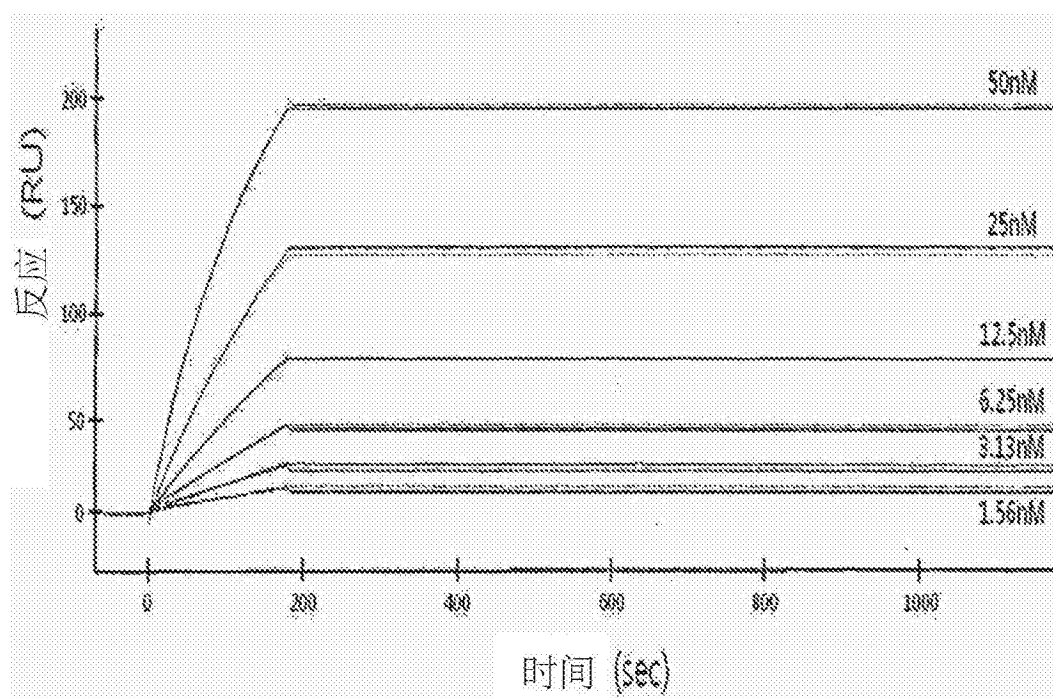


图3

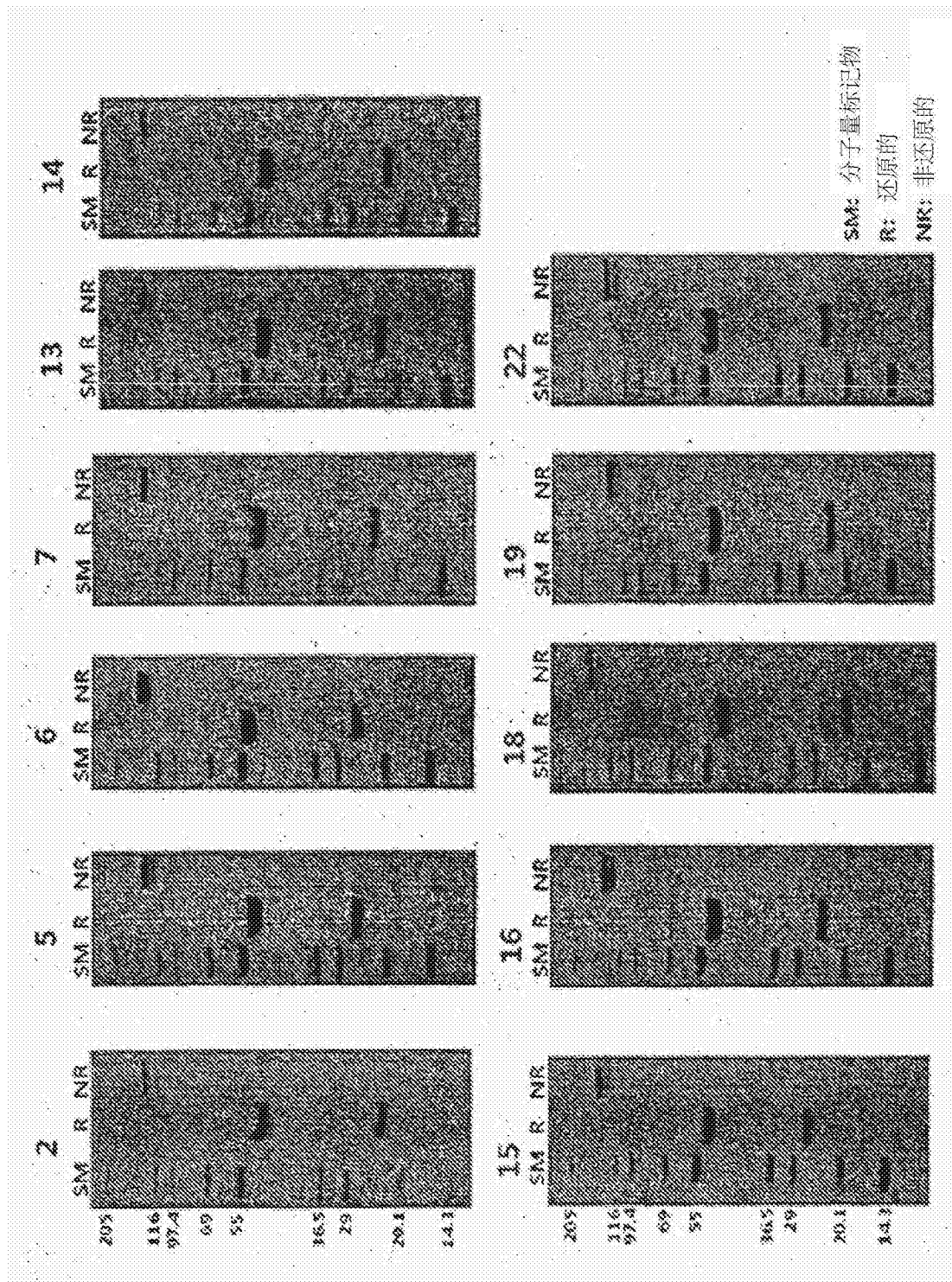
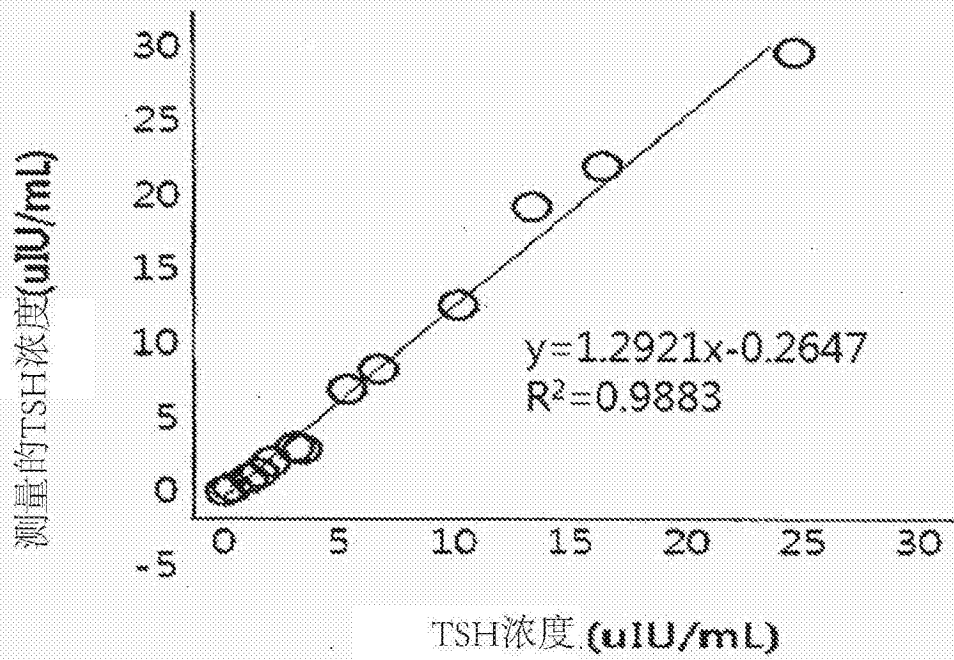


图4

抗莠去津的抗体



对照抗体

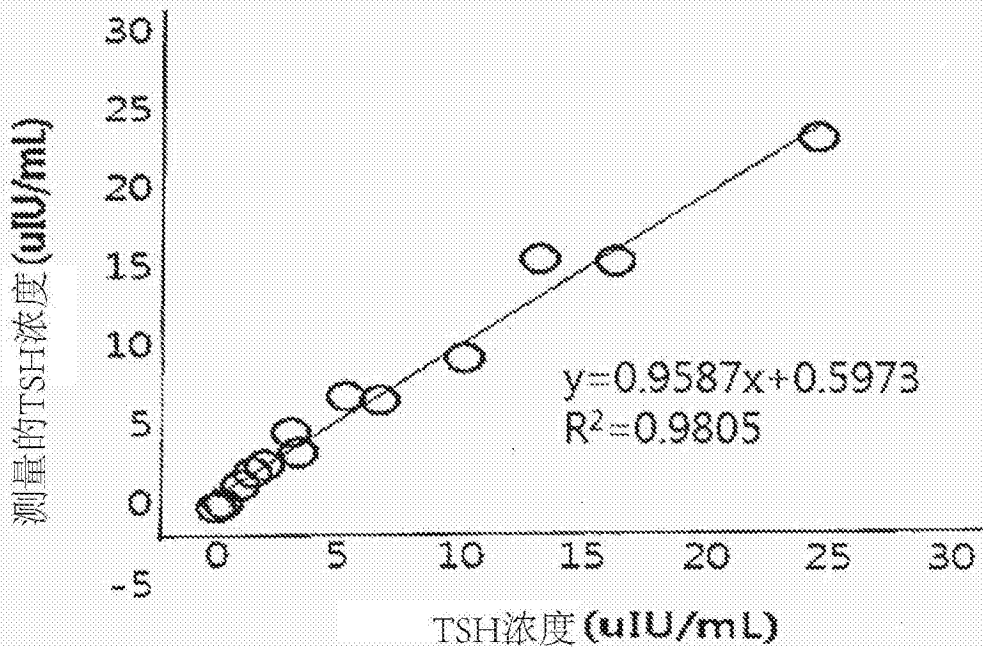


图5

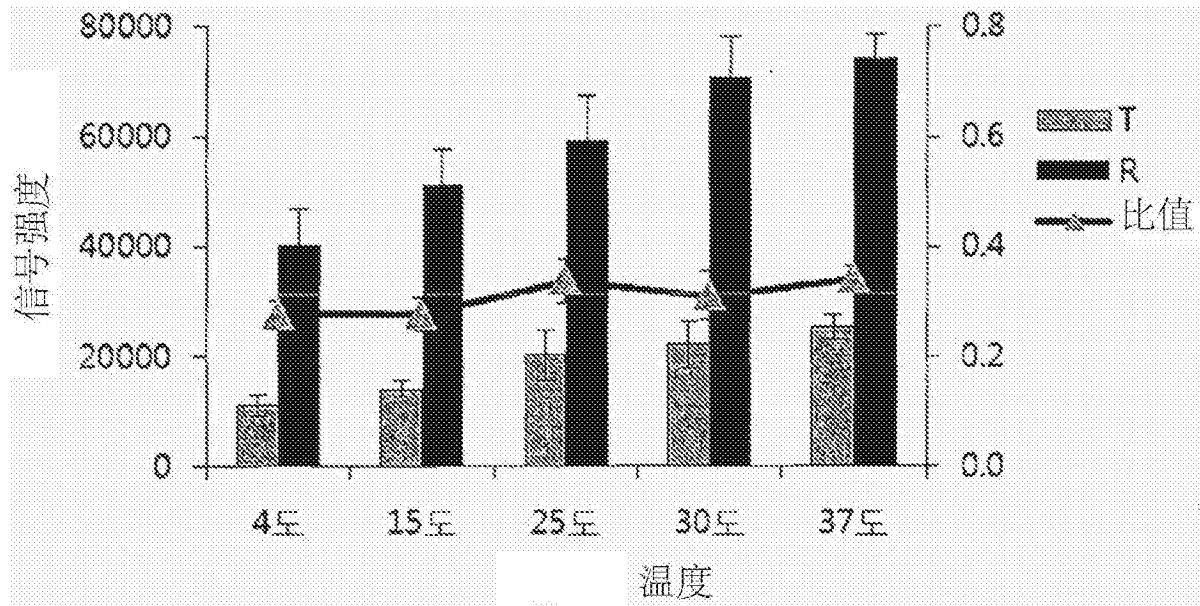


图6

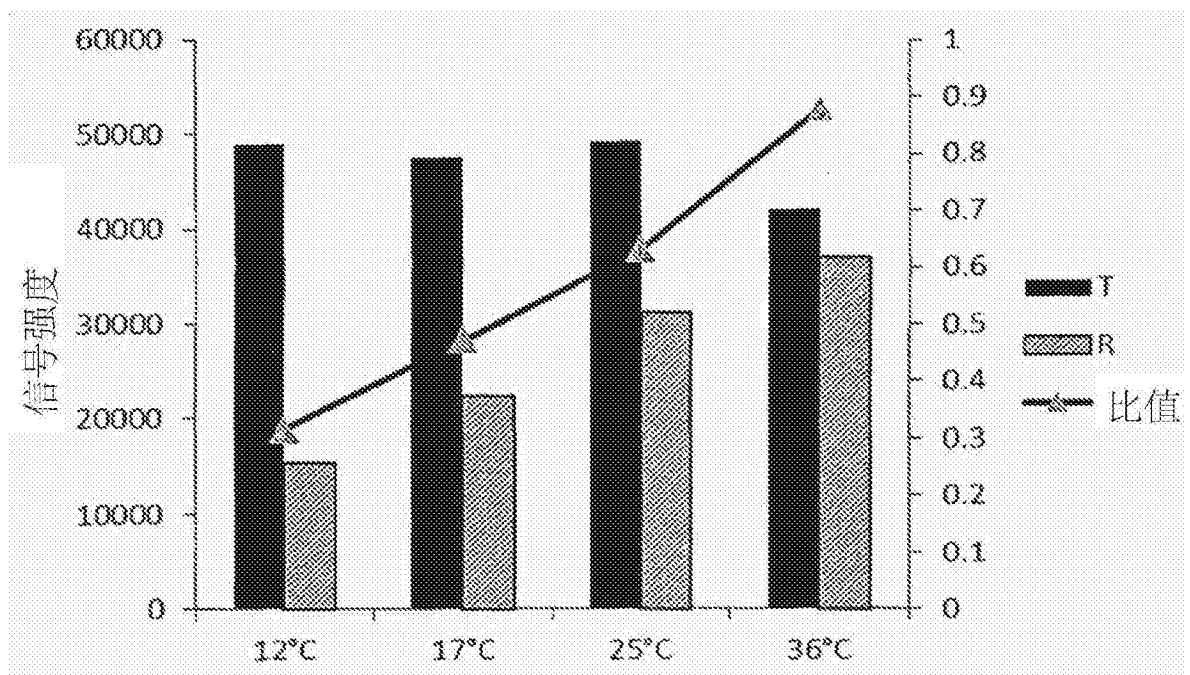


图7

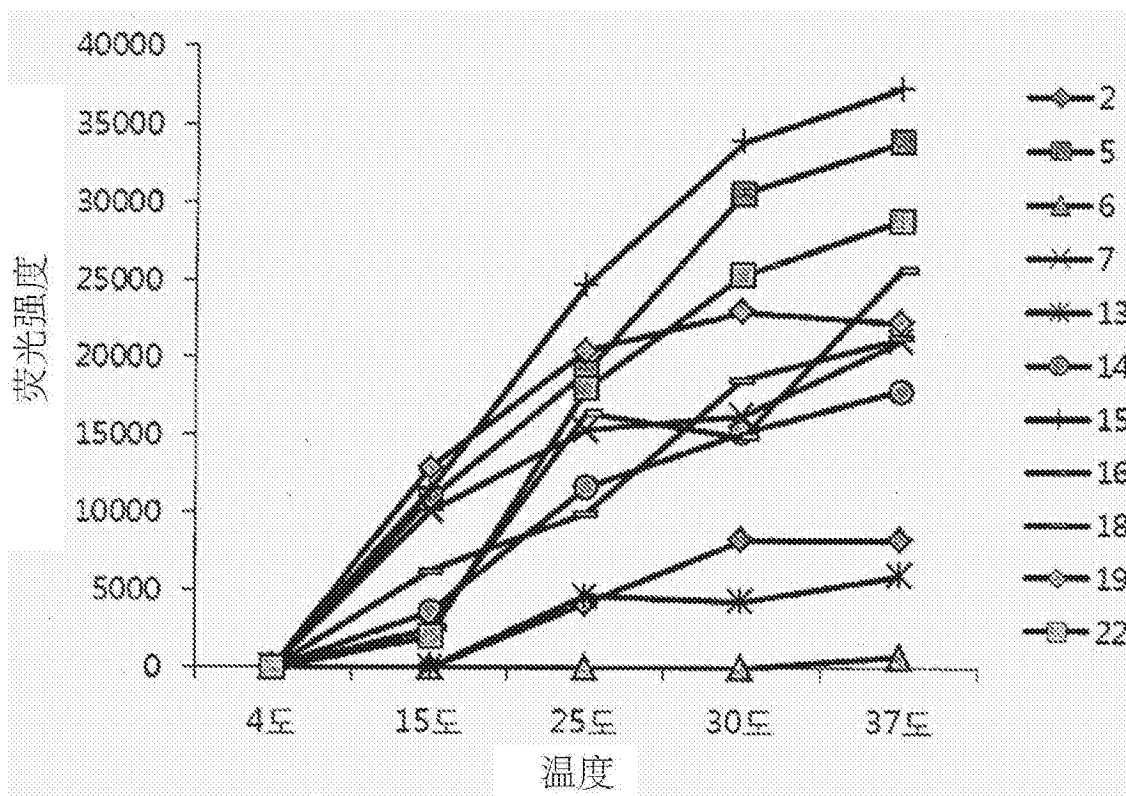


图8

专利名称(译)	使用半抗原和与其结合的抗体作为参照抗体的免疫测量方法，以及使用参照抗体的免疫测量装置		
公开(公告)号	CN105793709A	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201480065579.8	申请日	2014-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	韩国移动通信株式会社		
申请(专利权)人(译)	SK电信有限公社		
当前申请(专利权)人(译)	SK电信有限公社		
[标]发明人	朴仙荣 金廷律 金圣宇 申锦珠 李志哲		
发明人	朴仙荣 金廷律 金圣宇 申锦珠 李志哲		
IPC分类号	G01N33/563 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/78 G01N33/543 G01N33/6854		
代理人(译)	孙占华		
优先权	1020130137770 2013-11-13 KR		
其他公开文献	CN105793709B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及使用半抗原和与其结合的抗体作为参照抗体的免疫测量方法，以及使用所述参照抗体的免疫测量装置。根据本发明，周围环境被反映在例如对结果值的修正中，其中被外部因素(例如样品和装置的温度、所述样品的输入体积和成分，以及所述装置的变异性)改变的测试区的数值被反映在参照区中并被改变，以便可在免疫测定中。此外，由于不可能发生与所述样品中的物质的非特异性反应，因此可以使分析误差最小化。

