

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 20048000023.7

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年9月5日

[11] 授权公告号 CN 100335901C

[22] 申请日 2004.3.3

[21] 申请号 20048000023.7

[30] 优先权

[32] 2003.9.30 [33] JP [31] 340412/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/002604 2004.3.3

[87] 国际公布 WO2005/033704 日 2005.4.14

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.29

[73] 专利权人 森永制果株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 村冈嗣朗 渡边由美子 境雅寿  
本庄勉

[56] 参考文献

CN1126836A 1996.7.17

EP967484A1 1999.12.29

JP9077798A 1997.3.25

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 22 页

[54] 发明名称

免疫测定

[57] 摘要

本发明提供一种方法，其中微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质在随后的免疫反应中敏捷锐且容易检测，同时维持从样品提取的高效率。揭示了一种高度敏感和容易的免疫测定，特征是样品中微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质用水溶剂提取/溶解，水溶剂含相对高浓度的离子表面活性剂，然后提取物中的蛋白质通过抗蛋白质的抗体直接检测，蛋白质预先用离子表面活性剂变性。

1. 一种检测样品中微溶于水/几乎不能提取的蛋白质存在的免疫测定方法，其中所述微溶于水/几乎不能提取的蛋白质在含有离子表面活性剂的缓冲溶液中的溶解度和/或提取效率至少是在无离子表面活性剂的纯水或缓冲溶液中的溶解度和/或提取效率的5倍，其特征在于，所述方法包括步骤：

(1) 用含离子表面活性剂的水溶剂提取和/或溶解样品中微溶于水/几乎不能提取的蛋白质，

(2) 加入抗体，抗体用微溶于水/几乎不能提取的蛋白质作为免疫原获得，蛋白质预先用步骤(1)中所用离子表面活性剂变性：

a) 上面步骤(1)中所得蛋白质溶液没有显著稀释溶液，或

b) 稀释，其中上面步骤(1)中所得蛋白质溶液稀释的范围使离子表面活性剂浓度不降至0.03%(W/V)或更低，

从而微溶于水/几乎不能提取的蛋白质和抗体间形成抗原-抗体复合物，

(3) 检测形成的抗原-抗体复合物。

2. 如权利要求1所述的测定方法，其特征在于，步骤(1)中水溶剂的离子表面活性剂浓度高于0.3%(W/V)。

3. 如权利要求1或2所述的测定方法，其特征在于，步骤(2)中抗原-抗体复合物的形成在浓度高于0.3%(W/V)的离子表面活性剂存在时完成。

4. 如权利要求1所述的测定方法，其特征在于，离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸锂、月桂基肌氨酸钠、溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶和它们的混合物。

5. 如权利要求4所述的测定方法，其特征在于，离子表面活性剂是十二烷基硫酸钠。

6. 如权利要求1所述的测定方法，其特征在于，步骤(1)中的水溶剂进一步包括还原剂。

7. 如权利要求6所述的测定方法，其特征在于，还原剂是2-巯基乙醇、二硫苏糖醇或它们的混合物。

8. 如权利要求7所述的测定方法，其特征在于，步骤(1)中的水溶剂包括1%(W/V)十二烷基硫酸钠和1M 2-巯基乙醇。

9. 如权利要求1所述的测定方法，其特征在于，步骤(1)中进一步煮沸蛋白

质溶液。

10. 如权利要求 9 所述的测定方法, 其特征在于, 煮沸至少在 80°C 连续 5 分钟。

11. 如权利要求 1 所述的测定方法, 其特征在于, 蛋白质选自卵清蛋白、卵类粘蛋白、酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、荞麦蛋白、小麦蛋白和花生蛋白, 所述蛋白质处于在含有离子表面活性剂的缓冲溶液中的提取效率至少是在无离子表面活性剂的纯水或缓冲溶液中的提取效率的 5 倍的状态下。

12. 一种适用于检测含有离子表面活性剂的水性溶剂中存在蛋白质的抗体, 其中该蛋白质选自卵清蛋白、卵类粘蛋白、酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、荞麦蛋白、小麦蛋白和花生蛋白, 所述抗体针对经所述离子表面活性剂变性的蛋白。

13. 根据权利要求 12 所述的抗体, 其中离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸锂、月桂基肌氨酸钠、溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶和它们的混合物。

14. 如权利要求 13 所述的抗体, 其中所述离子表面活性剂是十二烷基硫酸钠。

15. 如权利要求 12 至 14 任一所述的抗体, 其中蛋白质在还原剂存在下用离子表面活性剂变性。

16. 如权利要求 15 所述的抗体, 其中所述还原剂是 2-巯基乙醇、二硫苏糖醇或它们的混合物。

17. 一种用于检测蛋白质存在的免疫试验试剂盒, 所述蛋白质选自卵清蛋白、卵类粘蛋白、酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、荞麦蛋白、小麦蛋白和花生蛋白, 所述试剂盒包含权利要求 12 所述的抗体。

## 免疫测定

### 技术领域

本发明涉及的免疫测定用于高度敏感测量微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质。

### 技术背景

随着分子生物的迅速发展，对于免疫测定试验中更高敏感度的需求渐增。在生命科学领域，日益证明多种膜结合细胞表面蛋白在细胞内或细胞间信号转导中发挥很重要的作用。这些细胞表面蛋白在动物或组织中以多种亚型表达，它们的时程和空间表达模式受到严格调节。因此，在今天的生命科学领域，高度敏感检测细胞表面蛋白对于了解各种生命现象是必需的。然而，大部分膜结合细胞表面蛋白在没有离子表面活性剂的水溶剂中不溶/微溶或几乎不能提取。

公共卫生领域中对高敏感免疫测定的需求也渐增。随着消费者越来越关心遗传工程植物、BSE、食物过敏原等的使用，他们期望食品制造商对这些蛋白质进行高度敏感检测。特别是，蛋白质如食物变应原存在于加工食物时，趋向于和加工食物中的其它成分形成复杂的复合体，因此根据经验，蛋白质不易用没有离子表面活性剂的水溶剂从加工食物中提取，即使蛋白质本质上是水溶性的。例如，蛋白质趋向于和加工小麦食物中来自小麦的麸质很强结合，因此水提取溶剂缺乏离子表面活性剂时几乎不能提取蛋白质。

因而，为通过免疫测定实现高度敏感检测微溶于水/几乎不能提取的蛋白质，测定中所用抗体的特异性和亲和性应改进到足以检测很少量的这种溶解/提取差的蛋白质的存在。然而，特异性和亲和性的改进有一些限制。

因此，在这种高敏感免疫测定中，除了改进抗体的特异性和亲和性，应修改测定的整个操作。特别考虑能显著改进整个测定的敏感性，通过从样品中有效提取微溶于水/几乎不能提取的分析蛋白质，为了此目的，用离子表面活性剂如十二烷基硫酸钠（SDS）溶解/提取微溶于水的蛋白质等可以是一种很有力的技术。然而，离子表面活性剂被认为在随后的免疫测定中抑制抗原-抗体反应，从而避免在高浓

度离子表面活性剂存在下的抗原-抗体反应。

当相对高浓度的离子表面活性剂如 SDS 用于有效提取蛋白质并因而通过常规免疫测定测量提取的蛋白质时，离子表面活性剂应从提取物中去除或免疫测定前提取物本身应足够稀释从而使离子表面活性剂减少至认为表面活性剂不对免疫反应施加不利影响的浓度。实际上，预处理提取物以减少其中离子表面活性剂浓度，通过方法如 1) 用赛璐玢管等透析提取物，2) 溶剂通过离心过滤等与无表面活性剂的溶剂交换，3) 溶剂通过凝胶过滤或离子交换层析与无表面活性剂的溶剂交换，或 4) 用化学物质选择性沉淀表面活性剂。然而，离子表面活性剂易和蛋白质形成胶束，因此在很多情况中选择性去除表面活性剂非常难，意味着上述去除处理可能是所需蛋白质的产量显著减少的原因。此外，首先进行去除处理较麻烦。另外，可适当稀释完整提取物以减少离子表面活性剂浓度，然而待测量的提取蛋白质浓度也同时被稀释减少，结果随后免疫测定中的检测敏感性根本没改进。一般认为由于免疫反应的可行性，使用高浓度离子表面活性剂以从样品中有效提取微溶于水/几乎不能提取的蛋白质与随后的免疫测定不相容。

日本专利申请待公开(Laid-Open)出版号 9-77798 (JP 9077798A) 描述了离子表面活性剂 SDS 存在时的抗原-抗体反应(第 5 页, 右栏, 0030 段; 第 6 页, 左栏, 0033 段; 第 10 页, 左栏, 0051 段)。此参考文献涉及无稳定结构的血浆蛋白 CETP (胆固醇酯转移蛋白) 的稳定和无交叉反应的免疫测定, 在此测定中, 检测到用 0.001 到 10%(W/V) SDS 预变性的 CETP。在此参考文献中, 也描述了甚至在 0.001 到 0.3%(W/V) SDS 存在时可进行 CETP 和相对抗体间抗原-抗体反应, 特别优选范围是 0.02 到 0.03%(W/V) SDS。此外, 在本文实施例中, 0.25% SDS 预处理的 CETP 进一步稀释 11 倍(通过加入 200  $\mu$ l 抗体溶液到 20  $\mu$ l 预处理溶液)以调节 SDS 浓度至约 0.023%。其后, 进行抗原-抗体反应。

在此参考文献中, 认为 0.03%或更高浓度的离子表面活性剂如 SDS 等抑制免疫测定中的抗原-抗体反应。因此参考文献讲授进行抗原-抗体反应时, 含高浓度 SDS 的样品应充分稀释, 从而 SDS 浓度降至 0.03%或更低。

#### 发明的揭示

因此, 本发明的目的是提供一种方法, 其中微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质在随后的免疫反应中敏感且容易检测, 同时维持从样品提取的高效率, 蛋白质需要以很高的敏感度检测。

与现有技术中的普通技术知识相反，令人惊讶地发现即使存在高浓度离子表面活性剂时，抗原-抗体反应本身不被抑制到不能检测的水平。也发现即使对于其抗原-抗体反应明显被高浓度离子表面活性剂抑制的某一蛋白，用抗此蛋白的抗体可令人满意地影响抗原-抗体反应，蛋白质预先用离子表面活性剂预变性。在这些发现的基础上，本发明人完成了一种高度敏感和容易的免疫测定，用于微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质。因此根据本发明，提供了一种高度敏感和容易的免疫测定，特征是样品中所含微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质可用水溶剂提取/溶解，溶剂含相对高浓度的离子表面活性剂，然后所得提取物中的蛋白质能通过免疫测定直接检测，没有提取物溶剂与另一种溶剂的交换，或没有显著稀释提取物从而蛋白质浓度未减少到不能检测的水平。

因此，本法提供免疫测定用于检测样品中微溶于水/几乎不能提取的蛋白质，包括步骤：

(I) 用含离子表面活性剂的水溶剂提取和/或溶解样品中微溶于水/几乎不能提取的蛋白质，

(II) 加入抗体，抗体用微溶于水/几乎不能提取的蛋白质作为免疫原获得，蛋白质预先用步骤(I)中所用离子表面活性剂变性：

a) 上面步骤(I)中所得蛋白质溶液没有显著稀释溶液，或

b) 稀释，其中上面步骤(I)中所得蛋白质溶液稀释的范围使离子表面活性剂浓度不降至0.03%(W/V)或更低，

从而微溶于水/几乎不能提取的蛋白质和抗体间形成抗原-抗体复合物，和

(III) 检测形成的抗原-抗体复合物。

发现即使步骤(I)的水溶剂中离子表面活性剂浓度高于例如0.03%(W/V)，在用所述水溶剂提取的样品(蛋白质)溶液中形成抗原-抗体复合物不受抑制。即步骤(II)中的抗原-抗体复合物可在浓度高于0.3%(W/V)的离子表面活性剂存在时形成，优选1%(W/V)或更高。即使样品溶液应稀释用于定量分析等目的，离子表面活性剂不需要稀释到0.03%(W/V)或更低浓度，在现有技术中认为极好的抗原-抗体反应需要0.03%(W/V)或更低浓度，这意味着可实践本发明方法而不损失离子表面活性剂的高提取力。

本发明的离子表面活性剂可选自十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸锂、月桂基肌氨酸钠、溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶等，如果需要可混合这些表面活性剂。由于其可用性等，生化领域常用的十二烷基硫酸

钠 (SDS) 尤其能作为较佳例子提及。

已显示步骤 (I) 中的水溶剂也可包含还原剂如 2-巯基乙醇、二硫苏糖醇等, 它们能进一步变性蛋白质。因此, 步骤 (I) 中优选水溶剂的非限制例子包括含 1% (W/V) 十二烷基硫酸钠和 1M 2-巯基乙醇的水溶剂。

为保证测量的稳定性和可重复性, 蛋白质溶液优选在步骤 (I) 中进一步煮沸, 优选在 80°C 或更高连续煮沸 5 分钟或更长。

本发明方法特别有利于高度敏感测量卵清蛋白、卵类粘蛋白、酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、荞麦蛋白、小麦蛋白和花生蛋白, 它们处于几乎不能提取状态。卵清蛋白、卵类粘蛋白、酪蛋白等本身易溶于水, 但存在于加工食物等的复杂基质中时, 蛋白质可能用常规水溶剂几乎不能提取。本发明方法可很有效用于高度敏感测量处于这种不能提取状态的蛋白质。

因此, 由于离子表面活性剂对蛋白质溶解的极好效果和新发现高浓度离子表面活性剂存在时的抗原-抗体反应性质, 本发明方法能很有效用于现在的生命科学研究和确保食物质量, 其中需要高度敏感检测微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质。

#### 附图的简述

图 1 显示标准卵类粘蛋白的测量结果 (在 450nm 波长和 630nm 副波长测量的吸光度), 连续稀释标准后用本发明所述方法 (基于 EIA 原理的固相三明治方法)。

图 2 显示测量系统中未知浓度的含卵类粘蛋白样品的测量结果 (样品 a 到 c) (在 450nm 波长和 630nm 副波长测量的吸光度), 用本发明所述方法 (基于 EIA 原理的固相三明治方法)。

图 3 显示 HDTMAB、HDTMAC 和 HDPC 存在时卵清蛋白的测量结果 (参考实施例)。各表面活性剂浓度 (%) 在横坐标和纵坐标吸光度上显示。

图 4 显示 LDS、月桂酰肌氨酸钠、SDS 存在时卵清蛋白的测量结果 (参考实施例)。各表面活性剂浓度 (%) 在横坐标和纵坐标吸光度上显示。

图 5 显示 HDTMAB、HDTMAC 和 HDPC 存在时卵类粘蛋白的测量结果。各表面活性剂浓度 (%) 在横坐标和纵坐标吸光度上显示。

图 6 显示 LDS、月桂基肌氨酸钠、SDS 存在时卵类粘蛋白的测量结果。各表面活性剂浓度 (%) 在横坐标和纵坐标吸光度上显示。

图 7 显示吐温 20、Lubrol PX、Triton X-100 和 DOC 存在时卵清蛋白的测量

结果（参考实施例）。各表面活性剂浓度（%）在横坐标和纵坐标吸光度上显示。

图 8 显示吐温 20、Luburool PX、Triton X-100 和 DOC 存在时卵类粘蛋白的测量结果（参考实施例）。各表面活性剂浓度（%）在横坐标和纵坐标吸光度上显示。

图 9 显示 SDS 存在时酪蛋白的测量结果。各表面活性剂（SDS）浓度（%）在横坐标和纵坐标吸光度上显示。（闭合正方形）是存在抗原，（闭合菱形）是缺乏抗原（对照）。

图 10 显示 SDS 存在时 $\beta$ -乳球蛋白的测量结果。表面活性剂（SDS）浓度（%）在横坐标和纵坐标吸光度上显示。（闭合正方形）是存在抗原，（闭合菱形）是缺乏抗原（对照）。

图 11 显示 SDS 存在时荞麦蛋白的测量结果。表面活性剂（SDS）浓度（%）在横坐标和纵坐标吸光度上显示。（闭合正方形）是存在抗原，（闭合菱形）是缺乏抗原（对照）。

图 12 显示 SDS 存在时小麦蛋白（麦醇溶蛋白）的测量结果。表面活性剂（SDS）浓度（%）在横坐标和纵坐标吸光度上显示。（闭合正方形）是存在抗原，（闭合菱形）是缺乏抗原（对照）。

图 13 显示 SDS 存在时花生蛋白的测量结果。表面活性剂（SDS）浓度（%）在横坐标和纵坐标吸光度上显示。（闭合正方形）是存在抗原，（闭合菱形）是缺乏抗原（对照）。

图 14 显示卵清蛋白的测量结果，用根据本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体。

图 15 显示在用根据本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体的方法中，煮沸卵清蛋白样品溶液随着时间对检测敏感度的稳定性的效果。参考实施例显示测量结果，其中使用天然蛋白的抗体，加热或不加热样品溶液。

图 16 显示在用根据本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体的方法中，煮沸卵类粘蛋白样品溶液随着时间对检测敏感度的稳定性的效果。参考实施例显示测量结果，其中使用天然蛋白的抗体，加热或不加热样品溶液。

图 17 显示在用根据本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体的方法中，煮沸花生蛋白样品溶液随着时间对检测敏感度的稳定性的效果。参考实施例显示测量结果，其中使用天然蛋白的抗体，加热或不加热样品溶液。

图 18 显示在用根据本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体的方法中，煮沸荞麦蛋白样品溶液随着时间对检测敏感度的稳定性的效果。参考实施例显示测量

结果，其中使用天然蛋白的抗体，加热或不加热样品溶液。

图 19 显示本发明一个优选方面的测定敏感性，其中使用抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体结合煮沸样品溶液。例子显示测量结果，其中各浓度的卵清蛋白溶解于缓冲溶液（PBS, pH6.5）以制备样品溶液，缓冲溶液含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇，样品溶液在 100℃热水浴中加热 5 分钟，然后冷却并用 ELISA 测量，而参考例显示测量结果，其中使用天然卵清蛋白的抗体，加热样品溶液。

图 20 显示本发明一个优选方面的测定敏感性，其中使用抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体结合煮沸样品溶液。例子显示测量结果，其中各浓度的卵类粘蛋白溶解于缓冲溶液（PBS, pH6.5）以制备样品溶液，缓冲溶液含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇，样品溶液在 100℃热水浴中加热 5 分钟，然后冷却并用 ELISA 测量，而参考例显示测量结果，其中使用天然卵类粘蛋白的抗体，加热样品溶液。

图 21 显示本发明一个优选方面的测定敏感性，其中使用抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体结合煮沸样品溶液。例子显示测量结果，其中各浓度的花生蛋白溶解于缓冲溶液（PBS, pH6.5）以制备样品溶液，缓冲溶液含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇，样品溶液在 100℃热水浴中加热 5 分钟，然后冷却并用 ELISA 测量，而参考例显示测量结果，其中使用天然花生蛋白的抗体，加热样品溶液。

图 22 显示本发明一个优选方面的测定敏感性，其中使用抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体结合煮沸样品溶液。例子显示测量结果，其中各浓度的荞麦蛋白溶解于缓冲溶液（PBS, pH6.5）以制备样品溶液，缓冲溶液含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇，样品溶液在 100℃热水浴中加热 5 分钟，然后冷却并用 ELISA 测量，而参考例显示测量结果，其中使用天然荞麦蛋白的抗体，加热样品溶液。

#### 完成发明的最佳模式

本发明的主题“微溶于水/几乎不能提取的蛋白质”是一种蛋白质，在无离子表面活性剂的纯水或一般使用的生理缓冲溶液中不表现出显著溶解性或不能用这种缓冲溶液从样品中大量提取，但用含本发明离子表面活性剂的缓冲溶液等能溶解或提取蛋白质到可被随后免疫测定检测的浓度。换句话说，本发明的“微溶于水/几乎不能提取的蛋白质”用含离子表面活性剂的缓冲溶液等显示的溶解性和/或提取效率显著高于无离子表面活性剂的纯水或缓冲溶液。通常，本发明的主题“微溶于水/几乎不能提取的蛋白质”在含本发明离子表面活性剂的缓冲溶液中可表现出溶解性和/或提取效率改进，至少是无离子表面活性剂的纯水或缓冲溶液中

溶解性和提取效率的 5 倍，优选至少 10 倍，更优选至少 50 倍。微溶于水/几乎不能提取的蛋白质的非限制例子包括结构蛋白和膜结合细胞表面蛋白。特别是，有生化重要功能的膜蛋白例如细胞表面受体和细胞粘附因子是有趣的。微溶于水/几乎不能提取的蛋白质的其它例子包括在加工食物等中存在的食物变应原蛋白。例如，卵清蛋白、卵类粘蛋白、酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、荞麦蛋白、小麦蛋白和花生蛋白被认为是重要的食物变应原蛋白。这些蛋白质包括本身溶于水的，但当与加工食物中其它成分强络合且在食物基质中整合时，可处于几乎不能提取的状态。处于这种几乎不能提取状态的水溶性蛋白质也在本文所指“微溶于水/几乎不能提取的蛋白质”的范围中，只要它们能通过本发明的离子表面活性剂作用第一次提取。

本发明所指“样品”可以是液体、半固体或固体、或它们的混合物，怀疑含微溶于水/几乎不能提取的蛋白质，且可有利地是样品，包括的固体基质具有整合其中的微溶于水/几乎不能提取的蛋白质，固体基质包括但不限于细胞、细胞膜、组织和器官，也包括食物和材料。

在本发明方法中，上述微溶于水/几乎不能提取的蛋白质用含离子表面活性剂的“水溶剂”溶解/提取。“水溶剂”指水；盐溶液如氯化钠、氯化钾和碳酸氢钠；多种缓冲溶液一般用于生化领域，例如磷酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液和柠檬酸缓冲液；碱性或酸性溶液，其 pH 用氢氧化钠、盐酸等调节。水溶剂也可包含辅助成分以进一步改进蛋白质的溶解性和提取效率。例如，螯合化合物如乙二胺四乙酸（EDTA）、酶如磷脂酶、控制 HLB 的非离子表面活性剂可加入水溶剂。也能加入蛋白酶抑制剂用于在提取和贮存中控制溶液中的蛋白质降解，抗微生物剂如叠氮化钠用于防止微生物繁殖，抗氧化剂如抗坏血酸。此外，极性有机溶剂如甘油和乙醇也可加入水溶剂，加入范围使随后免疫测定可行。

加入水溶剂的本发明离子表面活性剂可以是任何已知表面活性剂，因为它能显著改进微溶于水/几乎不能提取的蛋白质的溶解性和提取。离子表面活性剂优选选自十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸锂、月桂基肌氨酸钠、溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶和它们的混合物。从可用性和处理观点看，十二烷基硫酸钠（SDS）可作为特别优选的离子表面活性剂提及。特别是，SDS 是广泛用于电泳如 SDS-PAGE 的离子表面活性剂，但是用于促进电泳与免疫测定关联的优选离子表面活性剂。

加入的离子表面活性剂浓度可以是充分达到本发明目的的任何浓度，本发明目

的是溶解和提取微溶于水/几乎不能提取的蛋白质，但通常离子表面活性剂以 0.1%(W/V)或更高浓度加入，优选 0.3%(W/V)或更高，或甚至 0.5%(W/V)或更高。离子表面活性剂更优选以 1%(W/V)或更高浓度加入水溶剂，也可使用约 10%(W/V)高浓度的离子表面活性剂。在本发明方法中，用含离子表面活性剂的水溶剂以这种高浓度溶解/提取的蛋白质可通过随后免疫测定检测，同时充分维持离子表面活性剂浓度。

除了高浓度离子表面活性剂，优选加入还原剂到本发明特别优选的水溶剂，通常是 2-巯基乙醇、二硫苏糖醇 (DTT)、氰氢硼化钠 (SCBH)、二甲胺硼烷 (DMAB)、氢硼化钠 (SBH) 或半胱氨酸。这是因为通常根据经验，随后免疫测定的重复性可通过加入还原剂来改进，尽管没有揭示此改进的原理。还原剂优选以约 1mM 到 2M 的浓度加入水溶剂，通常以约 1M 的浓度。

如上所述，本发明特别优选的含离子表面活性剂的水溶剂可以是例如含 1%(W/V)十二烷基硫酸钠和 1M 2-巯基乙醇的磷酸缓冲液。

如已证明的，本发明优点在于微溶于水/几乎不能提取的蛋白质用离子表面活性剂溶解/提取，离子表面活性剂有溶解蛋白质的强能力，所得提取溶液可经受随后的免疫测定而没有大量稀释提取物。根据常规技术常识，认为当离子表面活性剂如 SDS 以相对高浓度（例如 0.03%或更高）存在于反应溶液时，不能获得所需抗原-抗体反应。因此在涉及微溶于水/几乎不能提取的蛋白质的典型常规免疫测定中，抗体加入样品溶液前需要麻烦的预处理或大量稀释样品溶液，样品溶液含高浓度离子表面活性剂；即在抗原-抗体反应前通过此预处理或稀释，样品溶液中离子表面活性剂浓度必须降至约 0.03%。因此，例如在抗原-抗体反应前，含用 10%(W/V) SDS 提取的微溶蛋白的样品溶液应稀释至少 300 倍 (0.03%SDS)，意味着蛋白质检测敏感性减少到 1/300。

另一方面，在本发明方法中，即使存在高浓度离子表面活性剂，抗原-抗体反应可令人满意地完成，抗原-抗体反应的特异性和亲和性能用变性蛋白的抗体显著改进，变性蛋白通过用相同离子表面活性剂变性目标蛋白质获得，在此发现基础上，预期整个测定敏感性用蛋白质溶液改进，蛋白质用含如 1% SDS 的水溶剂溶解，作为随后抗原-抗体反应中的样品溶液而没有大量稀释它。在本发明方法中，用含至少 10%(W/V) SDS 的溶剂溶解的微溶蛋白可通过抗原-抗体反应在 10% SDS 溶液中测量。为精确定量样品溶液中的抗原蛋白，通常需要适当连续稀释的溶液用于确定测量的线性等。在本发明中，不需减少如上连续稀释中样品溶液中的 SDS 浓度，

因此避免由于 SDS 浓度降低的结果微溶于水的蛋白质的可能沉淀。因此在本发明中，离子表面活性剂浓度不需降至 0.03%(W/V)或更低，即使含高浓度离子表面活性剂的样品溶液视情况稀释。

如上所述，本发明的一个重要特征是以抗原-抗体反应为基础的本免疫测定用微溶于水/几乎不能提取的蛋白质的特异抗体进行，蛋白质在前面用特定离子表面活性剂变性，其中变性蛋白的特异抗体获得自施用变性蛋白作为免疫原的免疫动物。

具体地，当已知样品中微溶于水/几乎不能提取的蛋白质可用含 SDS 的水溶剂提取时，蛋白质用 SDS 变性，变性蛋白作为免疫原施用给待免疫动物以制备本发明抗体。能容易完成蛋白变性，通过溶解或悬浮溶液中微溶于水/几乎不能提取的分析蛋白质并然后置于室温至少过夜，溶液含高浓度离子表面活性剂。在本发明较佳例子中，其中用于溶解/提取蛋白质的水溶剂含另外的还原剂如 2-巯基乙醇和 SDS，免疫原蛋白变性可优选在 2-巯基乙醇和 SDS 存在时进行。在这种情况下，微溶于水/几乎不能提取的分析蛋白质可悬浮/溶解于含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇的水溶剂中，然后置于室温至少过夜，可用作变性蛋白免疫原用于制备本发明抗体。

在施用这样获得的变性蛋白到待免疫的动物时，可使用本领域技术人员已知的任何方案，方案的最优化对本领域技术人员也是容易的。作为免疫动物，可使用小鼠、大鼠、绵羊、兔等。

特别是，当本发明抗体以多克隆抗体形式使用时，多克隆抗体制备自免疫动物的抗血清。具体地能特定获得来自免疫动物的抗血清，例如通过皮下注射含佐剂的免疫原到待免疫动物，以适当间隔（如 1 周）预定次数（如 5 次）重复此皮下施用，最终免疫后收集全血，分离抗血清。这些方法描述于例如《新编免疫学实验指南》(Current Protocols in Immunology), 2.4 章, John Wiley&Sons, Inc., New York 出版。可完成从抗血清纯化多克隆抗体，通过将动物免疫所用变性蛋白固定到层析树脂上，例如 CNBr-活化琼脂糖或 HiTrap<sup>®</sup>NHS-活化 (Amersham Pharmacia 生产)，然后应用抗血清到固定树脂上以特异吸收抗血清中的抗体到树脂上，用合适的缓冲液或离液序列高的离子洗脱来回收树脂上吸附的抗体。多克隆抗体也可通过任何其它方法纯化。

当本发明抗体作为单克隆抗体获得时，免疫小鼠的脾细胞通过本领域技术人员已知技术与用于细胞融合的亲代细胞融合，如骨髓瘤细胞株，合适的融合细胞选自所得杂交瘤，然后克隆，体外或体内培养，高度特异的单克隆抗体收集自培养

混合物。

作为本发明的抗体，不仅能用上述多克隆/单克隆抗体，也能用酶消化抗体所得的反应性抗体片段。抗体片段的例子包括 Fab 片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、F(v) 片段、H-链单体、L-链单体或二聚体、一条 H 链和一条 L 链组成的二聚体。片段可通过用蛋白酶如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体获得，接着如果需要用还原剂处理。H-或 L-链单体也可用还原剂如二硫苏糖醇处理完整抗体获得，然后分离纯化的链。

在本发明中，离子表面活性剂-变性蛋白的抗体优选用于测量，但显示用于某些蛋白质时，不总是需要其变性蛋白的抗体，其天然蛋白的抗体也可用于获得容许的检测。然而，观察到在用这种天然蛋白的抗体的检测中，检测敏感性一般与时间段成比例减少，其中留下含离子表面活性剂的样品溶液。即当微溶于水/几乎不能提取的特定蛋白质用含离子表面活性剂的水溶剂提取并然后相对立即进行随后抗原-抗体反应时，意识到形成相对稳定的抗原-抗体复合物，但提取后，复合物形成的速度随着时间减少。这意味着在用天然蛋白的抗体的免疫测定中，在测定完成前测定的重复性能以时间-依赖的方式降低。

另一方面，发现当使用本发明的变性蛋白的抗体时，这种随着时间的检测变化可忽略。也发现特别是当提取物在前面被煮沸时，能完成高重复性的测定。即在本发明进一步的优选方面中，微溶于水/几乎不能提取的蛋白质用含高浓度离子表面活性剂的水溶剂提取，然后煮沸所得蛋白质溶液，如在 80°C 或更高温度加热 5 分钟或更长，然后冷却，离子表面活性剂-变性蛋白的抗体加入溶液以形成抗原-抗体复合物。

因此，提供了一种高度敏感免疫测定方案，在有效溶解/提取微溶于水/几乎不能提取的蛋白质后能有效完成抗原-抗体反应且没有通过稀释等损失高程度提取。

本发明免疫测定包括检测以上述方式形成的抗原-抗体复合物，要理解的是此检测能用本领域技术人员已知的任何方法完成。例如，在作为本发明免疫测定例子之一的三明治免疫测定中，本发明离子表面活性剂-变性蛋白的抗体可用于包被固相如孔底以提供捕获-侧(capture-side)抗体，而另一种变性蛋白的抗体(可以和捕获-侧抗体相同或不同)能用放射性物质、有色颗粒或酶标记以提供检测-侧抗体。含离子表面活性剂的样品溶液加入有捕获-侧抗体的孔并孵育一段预定时间后，样品提取物从各孔中取出，孔用合适的缓冲溶液充分洗涤，检测-侧的抗体加入孔。孵育一段预定时间后，洗孔，然后检测到捕获-侧抗体/分析物/检测-侧抗

体复合物的形成。此检测取决于标记检测-侧抗体的标记物质的性质。当标记是放射性物质时检测到放射量，或当标记是有色颗粒时检测到着色强度或吸光度，当标记是酶时检测到合适的底物加入孔并预定孵育后的吸光度(ELISA方法)。ELISA方法中酶标记所用的酶没有特别限制，酶如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶可有利地使用。在辣根过氧化物酶标记的情况下，3,3',5,5'-四甲基联苯胺等能用作酶的底物。当使用碱性磷酸酶时，p-硝基苯基磷酸作为底物提及。在免疫测定的测量结果的基础上，可检测到本发明主题微溶于水/几乎不能提取的蛋白质。

本领域技术人员根据上面描述可充分利用本发明而不需更多描述。在下文中，给出实施例仅用于解释。以下除非另有说明，浓度(%)表示为重量/体积(W/V)%。

### 实施例 1

通过固相三明治方法测量含 SDS 样品中的卵类粘蛋白(用天然卵类粘蛋白的抗体)

#### (1) 抗卵类粘蛋白抗体的固定

兔抗(天然)卵类粘蛋白多克隆抗体以  $1\mu\text{g/ml}$  溶于碳酸盐缓冲液(pH9.6)。此溶液以  $100\mu\text{l}$ /孔体积吸入微量滴定板(Nunc生产的微型平板 Maxsorp-F8)并置于环境温度中2小时。

#### (2) 封闭微量滴定板

抗体溶液从各孔去除后， $300\mu\text{l}$ 封闭溶液(20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.4)，含150mM NaCl、0.05%吐温20、0.1%牛血清清蛋白)加入各孔并置于环境温度中2小时。

#### (3) 测量卵类粘蛋白

封闭溶液从各孔去除后， $100\mu\text{l}$ 卵类粘蛋白标准(商品名：蛋胰蛋白酶抑制剂，Nacalai Tesque生产)溶液用样品稀释液(20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.4)，含0.1%牛血清清蛋白、150mM NaCl、0.05%吐温20和0%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%或1%SDS)连续稀释，加入各孔并置于环境温度中2小时。(在测量下示多种样品中，当样品中所含卵类粘蛋白的量在上面系统测量范围以外时，用样品稀释液测量前进一步稀释样品以致卵类粘蛋白的量在系统测量范围内。)

然后，各孔用  $300\mu\text{l}$ 洗涤溶液洗6次， $100\mu\text{l}$ 辣根过氧化物酶标记的抗卵类粘蛋白多克隆抗体溶液加入各孔并置于环境温度中30分钟，抗体溶液预先用20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.4)稀释，缓冲液含0.1% BSA、150mM NaCl和0.05%吐温

20。然后，各孔用 300  $\mu$ l 洗涤溶液洗 5 次，TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺) 溶液以 100  $\mu$ l/孔体积加入，然后在环境温度中暗处反应 10 分钟。之后，100  $\mu$ l 1N 硫酸加入各孔以终止反应。用微量滴定板读数器在 450nm 主波长和 630nm 副波长测量各孔的吸光度。所得标准曲线示于图 1。

如从图 1 可见，确定在此测量系统中，即使存在 SDS 时也能定量卵类粘蛋白，因为 0.01 到 1.0% SDS 溶液中样品的标准曲线几乎与无 SDS 溶液中样品的曲线相同。

实际测量多种样品中卵类粘蛋白的量时，在以此方式获得的标准曲线基础上确定样品中卵类粘蛋白的量。

#### (4) 样品的免疫测定

根据上述测试，实际进行样品的免疫测定。来自 3 种商业购买 mayonnaise 产品的样品溶液通过用含 1% SDS 的样品稀释液 3 倍连续稀释 mayonnaise 样品来制备，在制备自同时测量标准卵类粘蛋白的标准曲线基础上，确定样品的卵类粘蛋白浓度。如图 2 中的结果所示，获得经过坐标原点的极佳线性。

#### (5) 回收测试

根据上述测试方法进行抗原回收测试。

3 种商业购买的饼干产品用作样品以制备含 1% SDS 的提取物。即各饼干均一压成粉末，称重 2g 粉末并收集。含 1% SDS 的 38ml 样品稀释液加入粉末并用匀浆器搅匀 30 秒两次，所得混合物以 3,000x g 离心 20 分钟。所得上清用 5A 滤纸过滤，过滤物在测量中用作食物提取物（含 1% SDS 的提取物）。然后，标准卵类粘蛋白加入提取物且进行免疫测定，从测量中确定加入的卵类粘蛋白的回收。回收表示为（进一步加入抗原的样品中检测的抗原量-原始样品中检测的抗原量）/（加入的抗原量[%]）的比例。

如表 1 所示，回收高达 88.7 到 96.1%，表明食物中的卵类粘蛋白可通过本发明的方法准确和敏捷测量。

表 1. 回收测试的结果

	样品中所含原始抗原浓度 (ng/mL)	加入的抗原的浓度 (ng/mL)	加入后的测量 (ng/mL)	回收 (%)
样品 1	5.14	11.32	15.18	88.69
	5.14	22.79	25.54	89.51
样品 2	8.44	11.32	19.06	93.80
	8.44	22.79	29.87	94.02
样品 3	17.98	11.32	28.86	96.11
	17.98	22.79	39.30	93.55

### 实施例 2

通过固相三明治方法测量含多种离子表面活性剂或非离子表面活性剂的样品中的卵类粘蛋白和卵清蛋白（用抗天然蛋白的抗体）

SDS、十二烷基硫酸锂（LDS）和月桂基）肌氨酸钠作为本发明的阴离子表面活性剂，溴化十六烷基三甲铵（HDTMAB）、氯化十六烷基三甲铵（HDTMAC）和氯化十六烷基吡啶（HDPC）作为阳离子表面活性剂，吐温 20、Luburool PX 和 Triton X-100 作为参考的非离子表面活性剂，脱氧胆酸（DOC）作为具类固醇骨架的表面活性剂，在与实施例 1 相同条件下检测它们对卵类粘蛋白和卵清蛋白的免疫测定系统（参考实施例）的影响。

即在上述各表面活性剂以不同浓度存在时，测量免疫测定中含 64ng/ml 卵清蛋白和 64ng/ml 卵类粘蛋白的样品，确定吸光度。结果示于表 2 到 5 和图 3 到 8。

表 2. 卵清蛋白测量系统中离子表面活性剂的影响

表面活性剂浓度 (%)	阴离子表面活性剂			阳离子表面活性剂		
	LDS	月桂基肌氨酸钠	SDS	HDTMAB	HDTMAC	HDPC
0.005	1.743	1.805	0.751	0.725	0.707	0.735
0.014	1.782	1.720	0.746	0.733	0.736	0.748
0.041	1.260	1.713	0.600	0.715	0.707	0.718
0.123	0.005	1.570	0.033	0.134	0.089	0.076
0.370	0.004	1.360	0.024	0.034	0.016	0.028
1.110	0.004	1.185	0.018	0.045	0.016	0.023
3.330	0.002	1.055	0.015	未测出	0.017	0.023
10.000	0.002	0.886	0.021	未测出	未测出	0.023

表 3. 卵类粘蛋白测量系统中离子表面活性剂的影响

表面活性剂浓度 (%)	阴离子表面活性剂			阳离子表面活性剂		
	LDS	月桂基肌氨酸钠	SDS	HDTMAB	HDTMAC	HDPC
0.005	1.898	1.870	0.459	0.444	0.456	0.465
0.014	1.849	1.857	0.439	0.432	0.419	0.469
0.041	1.808	1.738	0.433	0.410	0.444	0.439
0.123	1.639	1.729	0.384	0.402	0.408	0.424
0.370	1.336	1.719	0.319	0.412	0.410	0.406
1.110	0.904	1.731	0.239	0.398	0.405	0.376
3.330	0.644	1.732	0.221	0.402	0.434	0.386
10.000	0.381	1.737	0.205	0.278	0.398	0.338

表 4. 卵清蛋白测量系统中非离子表面活性剂的影响

表面活性剂浓度 (%)	非离子表面活性剂			类固醇表面活性剂
	吐温 20	Luburool PX	Triton X-100	DOC
0.005	1.769	1.859	1.667	1.888
0.014	1.713	1.803	1.837	1.889
0.041	1.718	1.727	1.847	1.895
0.123	1.786	1.710	1.828	1.820
0.370	1.754	1.609	1.788	1.830
1.110	1.743	1.658	1.812	1.627
3.330	1.780	1.612	1.791	1.383
10.000	1.668	1.399	1.735	1.199

表 5. 卵类粘蛋白测量系统中非离子表面活性剂的影响

表面活性剂浓度 (%)	非离子表面活性剂			类固醇表面活性剂
	吐温 20	Luburool PX	Triton X-100	DOC
0.005	1.762	1.979	1.988	1.867
0.014	1.845	1.943	1.937	2.028
0.041	1.899	1.866	1.915	2.0223
0.123	1.832	1.877	1.894	1.940
0.370	1.879	1.846	1.869	1.866
1.110	1.836	1.877	1.900	1.775
3.330	1.844	1.780	1.869	1.733
10.000	1.778	1.117	1.645	1.447

此测试结果显示在卵清蛋白测量系统中，测量敏感性显著降低且免疫测定被相对高浓度（如 0.1%或更高）离子表面活性剂抑制，而在卵类粘蛋白测量系统中，即使存在很高浓度约 10%离子表面活性剂时测量也是充分可行的。因此证明除了抗（天然）卵清蛋白抗体即使抗天然蛋白抗体，也可用于使免疫测定系统达到极佳检测敏感性和准确性，结合本发明离子表面活性剂的高蛋白提取能力。参考的非离子表面活性剂和脱氧胆酸在卵清蛋白或卵类粘蛋白测量系统中不施加影响。

### 实施例 3

#### 测量酪蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白（用抗天然蛋白的抗体）

酪蛋白或  $\beta$ -乳球蛋白在与实施例 1 几乎相同的流程中测量,除了使用抗(天然)酪蛋白抗体或抗(天然)  $\beta$ -乳球蛋白抗体取代抗(天然)卵类粘蛋白抗体。即乳蛋白质以 64ng/ml 的量加入样品稀释液,连续稀释至 10%到 0.156% SDS 浓度,产生测量的样品溶液。样品中的酪蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白分别通过商业购买的酪蛋白牛奶免疫测定试剂盒和  $\beta$ -乳球蛋白牛奶免疫测定试剂盒测量,都用来自 Morinaga Insutitute of Biological Science Co.,Ltd.,的天然蛋白的抗体(商品名,用于特殊物质的 Morinaga 免疫测定试剂盒,牛奶测量试剂盒(酪蛋白);用于特殊物质的 Morinaga 免疫测定试剂盒,牛奶测量试剂盒( $\beta$ -乳球蛋白))。结果示于图 9 和 10。

图 9 和 10 显示即使使用天然蛋白的抗体,免疫测定酪蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白也可在高浓度离子表面活性剂 SDS 存在时令人满意地完成。

### 实施例 4

#### 测量荞麦蛋白、小麦蛋白和花生蛋白（用抗天然蛋白的抗体）

离子表面活性剂对测量荞麦蛋白、小麦蛋白(麦醇溶蛋白)和花生蛋白的影响以和实施例 3 相同的方式证明。回收实验所用荞麦蛋白制备如下:碾磨荞麦谷粒,然后用缓冲溶液(Tris-HCl 缓冲液等)提取,缓冲溶液含盐类如氯化钠,然后离心所得提取物以回收其上清,上清应用于凝胶过滤柱 Superdex<sup>®</sup>G-200 或 Superose<sup>®</sup>6(都由 Amersham Pharmacia 生产),回收洗脱范围在 70 到 500kD 分子量的部分。

所用小麦蛋白(麦醇溶蛋白)是获得自 Asama Kasei Co.,Ltd.的商业购买产品。花生蛋白制备如下:碾磨花生,然后用缓冲溶液(Tris-HCl 缓冲液等)提取,缓冲溶液含盐类如氯化钠,然后离心所得提取物以回收其上清,上清应用于凝胶过滤柱 Superdex<sup>®</sup>G-200 或 Superose<sup>®</sup>6(都由 Amersham Pharmacia 生产),回收洗脱范围在 30 到 100kD 分子量的部分作为花生蛋白。用这些样品的免疫测定通过来自 Morinaga Insutitute of Biological Science Co.,Ltd.,的商业购买免疫测定试剂盒(用于特殊物质的 Morinaga 免疫测定试剂盒,荞麦测量试剂盒;用于特殊物质的 Morinaga 免疫测定试剂盒,小麦测量试剂盒(麦醇溶蛋白);用于特殊

物质的 Morinaga 免疫测定试剂盒, 花生测量试剂盒, 任何一种都使用天然蛋白的抗体)。结果示于图 11 到 13。

图 11 到 13 显示在高浓度离子表面活性剂存在时, 免疫测定荞麦蛋白、小麦蛋白和花生蛋白可用天然蛋白的抗体令人满意地完成。

### 实施例 5

#### 制备抗离子表面活性剂-变性蛋白的抗体

实施例 1 到 4 显示在免疫测定卵类粘蛋白、酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、荞麦蛋白、小麦蛋白和花生蛋白中特异抗原-抗体反应可在高浓度离子表面活性剂存在时完成, 即使使用抗天然蛋白的抗体, 但这种抗原-抗体反应不能在卵清蛋白的免疫测定中完成。因此, 用蛋白抗体的方法以下列方式检测, 蛋白质预先用离子表面活性剂处理变性。

#### (1) 蛋白的变性

下列蛋白质以 0.1 到 10mg/ml 浓度溶解于含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇的溶液, 然后仍在室温过夜。

1. 卵清蛋白(商品名: 蛋清蛋白, 5x Cryst. (鸡), 购自 Seikagaku Corporation)
2. 卵类粘蛋白(商品名: 胰蛋白酶抑制剂(来自鸡蛋白), 购自 Nacalai Tesque)
3. 花生蛋白以下列方式制备。

1) 碾磨花生, 然后用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液等) 提取, 缓冲溶液含盐类如氯化钠。

2) 离心提取物以回收上清。

3) 上清应用于凝胶过滤柱 Superdex®G-200 或 Superose®6(都由 Amersham Pharmacia 生产), 回收洗脱范围在 30 到 100kD 分子量的部分。

4. 荞麦蛋白以下列方式制备。

1) 碾磨荞麦谷粒, 然后用缓冲液 (Tris-HCl 缓冲液等) 提取, 缓冲液含盐类如氯化钠。

2) 离心提取物以回收上清。

3) 上清应用于凝胶过滤柱 Superdex®G-200 或 Superose®6(都由 Amersham Pharmacia 生产), 回收洗脱范围在 70 到 500kD 分子量的部分。

#### (2) 制备兔多克隆抗体

使用弗氏佐剂, 如上所述变性的各蛋白质被乳化, 所得乳剂皮下注射到待免疫

的兔。各免疫施用 1mg 变性蛋白，此施用以 1 周间隔进行 5 次。最终免疫后 1 周，收集免疫兔的全血以制备抗血清。从抗血清中制备本发明抗体根据下列流程完成。即免疫兔所用变性蛋白经共价键固定到树脂 HiTrap<sup>®</sup>NHS-活化 (Amersham Pharmacia 生产)，抗血清应用到此固定树脂。然后，结合固定树脂上蛋白部分的抗体用 0.1M Gly-HCl 调至 pH2.7，产生本发明抗体。

### 实施例 6

#### 通过抗离子表面活性剂-变性蛋白的抗体的测量

免疫测定 (ELISA) 用根据本发明的离子表面活性剂-变性蛋白的抗体，在下列规程基础上评估。

#### [固定抗体]

1. 制备 1  $\mu$ g/mL 离子表面活性剂-变性蛋白的兔多克隆抗体溶液，如上在碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 中。

2. 溶液以 100  $\mu$ l/孔体积吸入微量滴定板 (Nunc 生产的微型平板 Maxsorp-F8) 然后置于环境温度中 2 小时。

#### [封闭]

1. 固定抗体后，去除抗体溶液，300  $\mu$ l 封闭溶液 (20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4)，含 150mM NaCl、0.05%吐温 20、0.1%牛血清清蛋白) 加入各孔并置于环境温度中 2 小时。

#### [制备样品溶液]

1. 标准蛋白溶解于缓冲溶液 (PBS, pH6.5) 以制备样品溶液，缓冲溶液含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇，然后通过 100 $^{\circ}$ C 热水浴中煮沸加热 1 到 10 分钟。

2. 加热后，标准蛋白用上面相同的缓冲溶液稀释至 1 到 64ng/ml。

#### [测量]

1. 封闭后，各浓度的标准蛋白溶液以 100  $\mu$ l/孔体积加入抗体-固定的平板，然后在环境温度中进行静止反应 1 小时。

2. 反应后，各孔用 300  $\mu$ l 洗涤溶液洗 6 次，20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 中辣根过氧化物酶标记的抗体溶液以 100  $\mu$ l/孔体积加入，缓冲液含 0.1% BSA、150mM NaCl 和 0.05%吐温 20，然后在环境温度中进行静止反应 30 分钟。

3. 各孔用 300  $\mu$ l 洗涤溶液洗 6 次，TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 溶液以 100  $\mu$ l/孔体积加入，然后在环境温度中暗处反应 10 分钟。

4. 100  $\mu$ l 1N 硫酸加入各孔以终止反应。用微量滴定板读数器在 450nm 主波长和 630nm 副波长测量各孔的吸光度。所示结果是一式两份测量的平均值。

#### (1) 测量卵清蛋白

卵清蛋白不能用天然蛋白的抗体测量（参见图 3 和 4），用根据本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白的抗体测量。测量结果示于图 14。在此实验中，含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇的缓冲溶液（PBS, pH6.5）中各浓度卵清蛋白溶液在 100°C 热水浴中加热 5 分钟，然后冷却，通过上述 ELISA 检测。

如从图 14 可见，即使在高浓度离子表面活性剂存在时几乎不能用天然蛋白的抗体测量的蛋白质可用抗离子表面活性剂-变性蛋白的抗体以很高敏感性测量。

#### (2) 煮沸样品溶液的效果

显示使用根据本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体的方法，能通过预先煮沸样品溶液来显著改进测量稳定性和敏感性。结果示于图 15 到 18。

例子显示测量结果，其中各蛋白质以 64ng/ml 浓度溶解于缓冲溶液（PBS, pH6.5）以制备样品溶液，缓冲溶液含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇，样品溶液在 100°C 热水浴中加热 5 分钟，然后置于室温 0 到 6 小时，用根据本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体进行 ELISA 测量。一方面，参考例显示测量结果，其中使用天然蛋白的抗体，加热或不加热样品溶液，然后用于测量。结果表明当使用天然蛋白的抗体且不加热样品溶液时，能维持相对短时间的高检测敏感性，但敏感性随着时间减少。进一步显示当使用天然蛋白的抗体且加热样品溶液时，检测敏感性比开始时显著减少。

另一方面，显示当使用本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体且预先煮沸样品溶液时，维持长时间的高检测敏感性，测定可以相当高的重复性和敏感性完成。

#### (3) 测定敏感性

本发明一个优选方面中的测定敏感性示于图 19 到 22，其中使用抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体结合煮沸样品溶液。例子显示测量结果，各蛋白以各种浓度溶解于缓冲溶液（PBS, pH6.5）以制备样品溶液，缓冲溶液含 1%SDS 和 1M 2-巯基乙醇，样品溶液在 100°C 热水浴中加热 5 分钟，然后冷却并用 ELISA 测量。图中的参考例显示测量结果，其中使用天然蛋白的抗体且加热样品溶液。如从这些图中可见，本发明方法有很高的重复性和敏感性。

### 工业可应用性

通过使用本发明的抗离子表面活性剂-变性蛋白抗体，即使在高浓度离子表面活性剂存在时能令人满意地完成蛋白质的免疫测定，如实施例 6 所特别证明。因此，微溶于水/几乎不能提取的蛋白质通过离子表面活性剂对溶解蛋白质的极佳效果来溶解/提取，可用免疫测定直接检测，本发明方法能很有效地用于生命科学研究和确保食物质量，它们需要这种高敏感性检测。

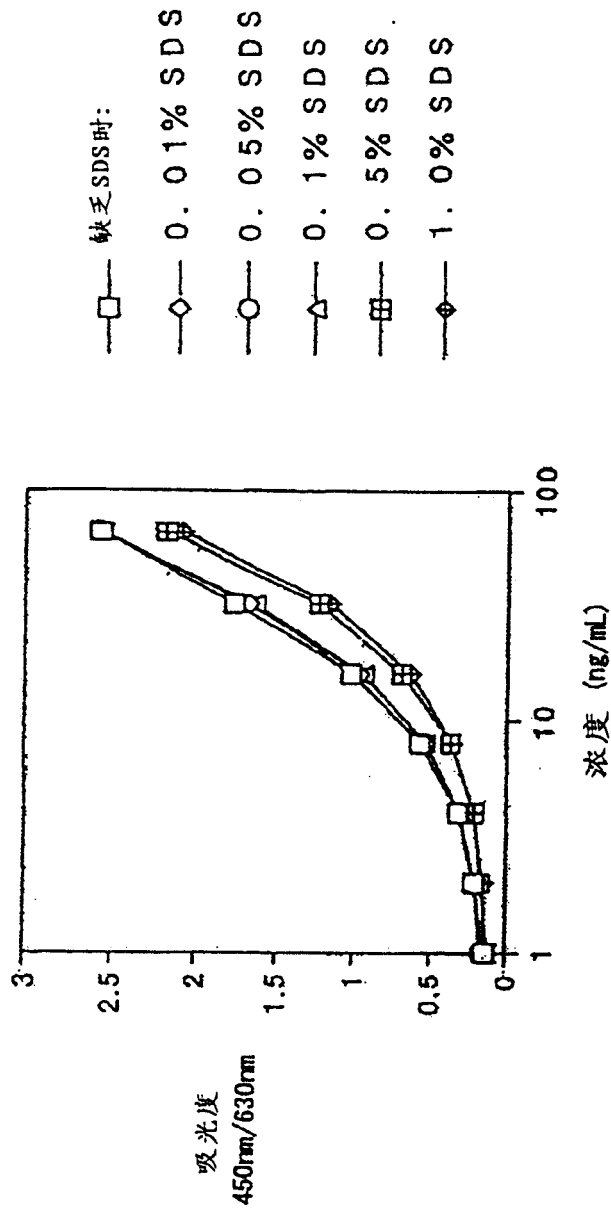


图 1

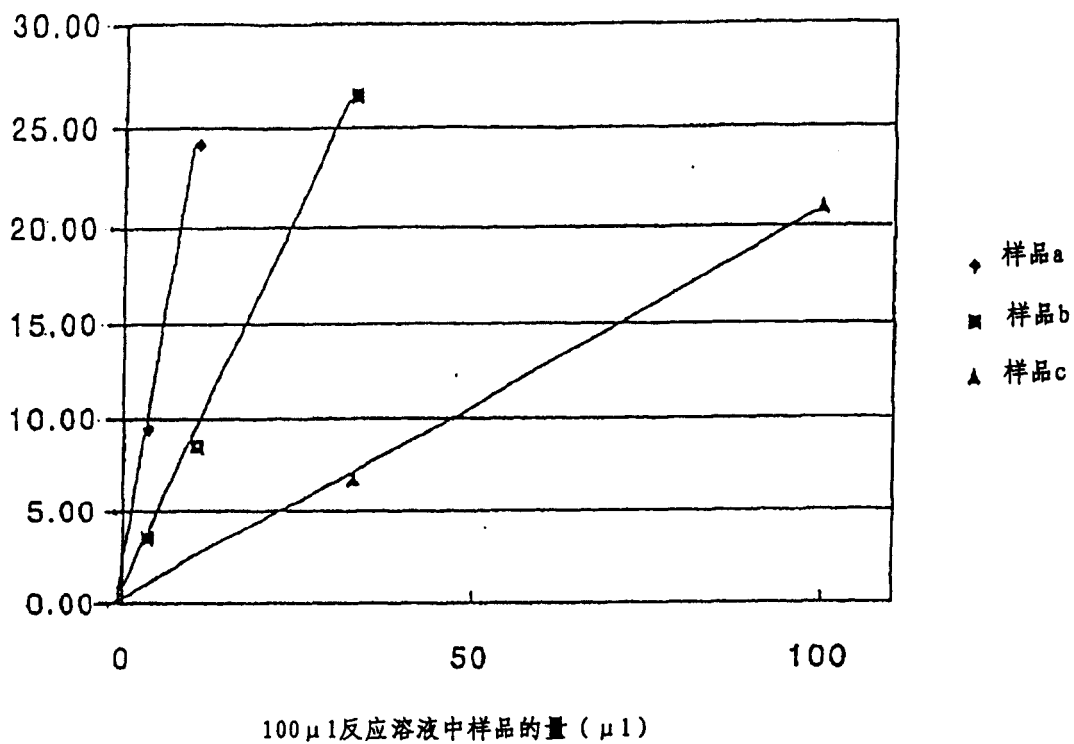


图 2

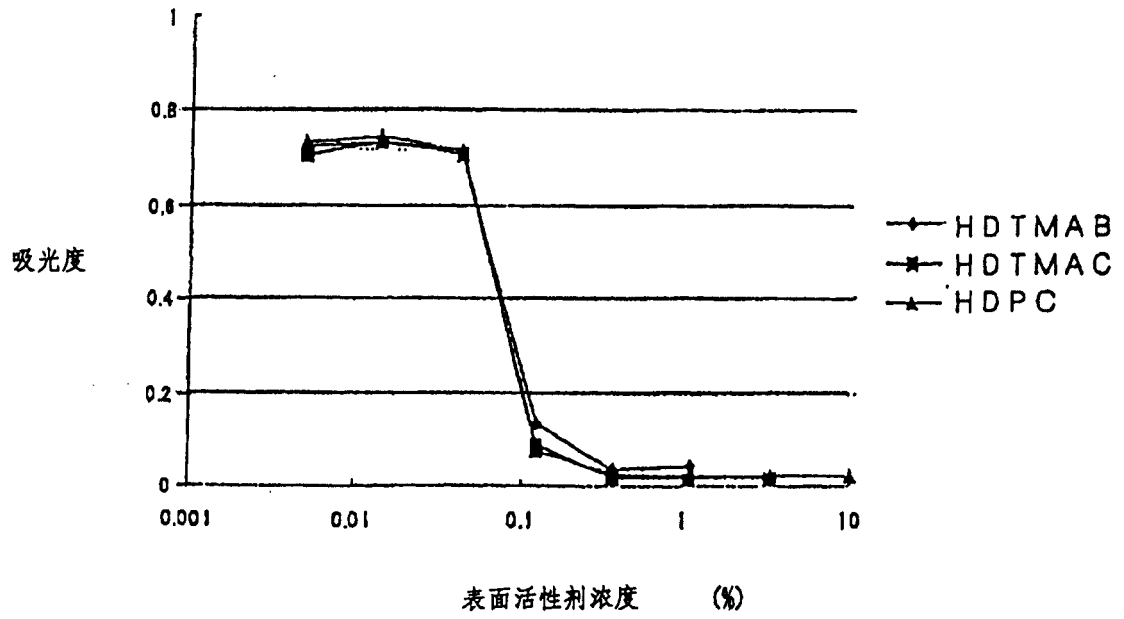


图 3

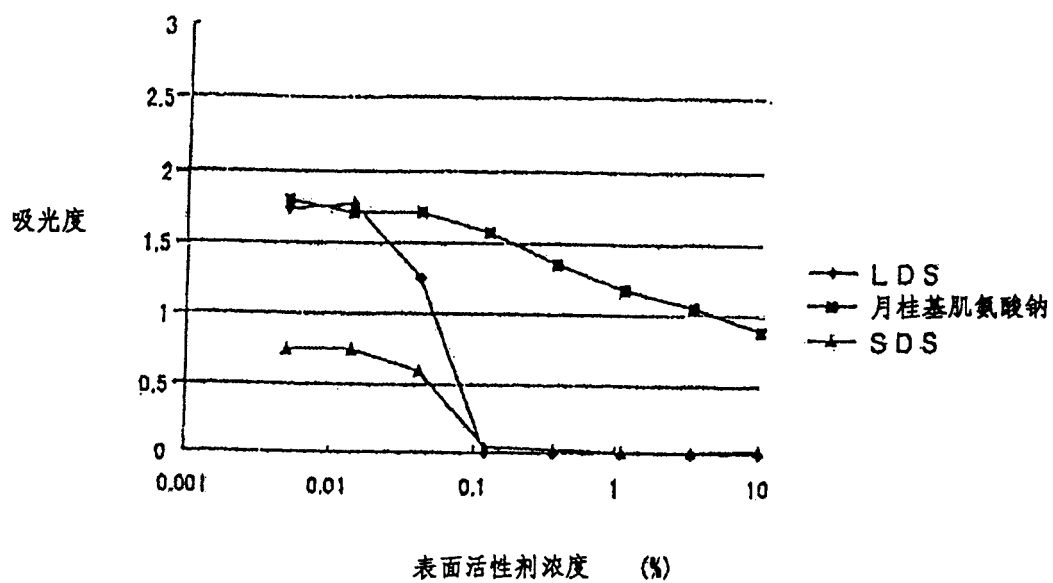


图 4

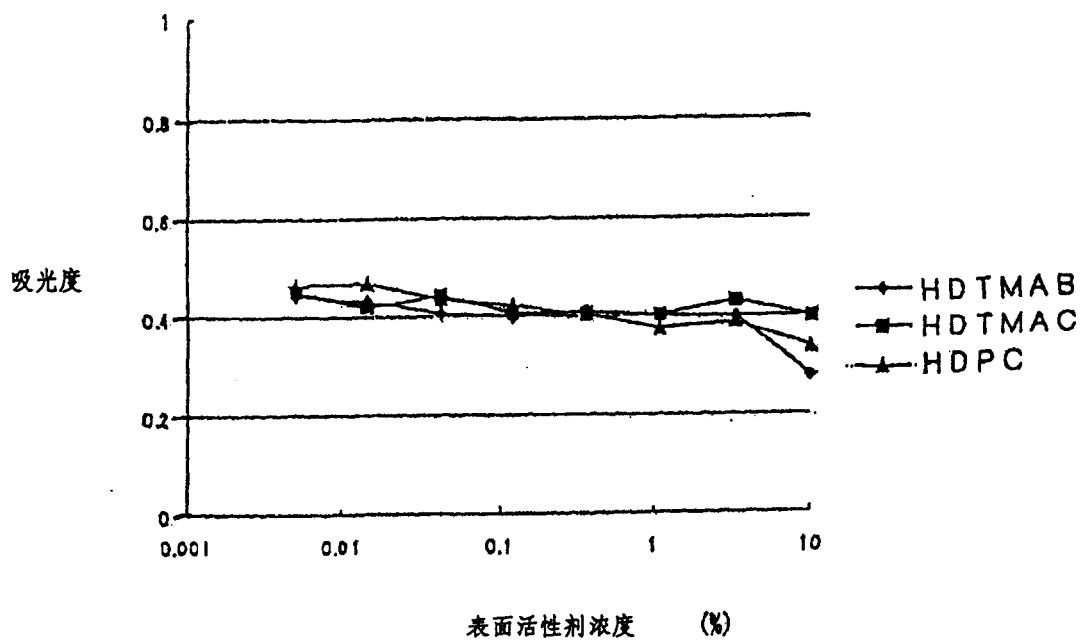


图 5

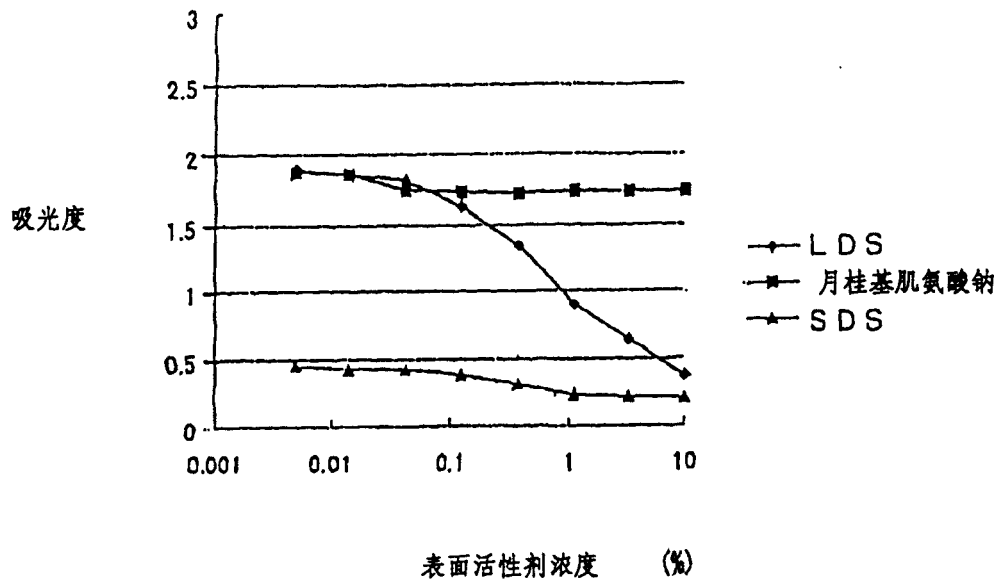


图 6

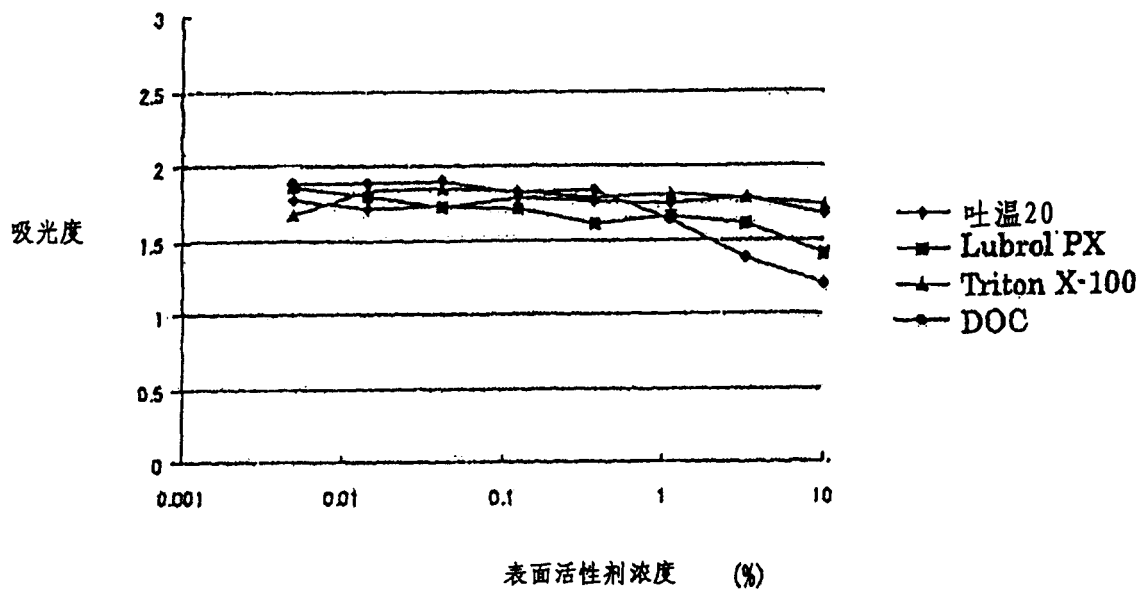


图 7

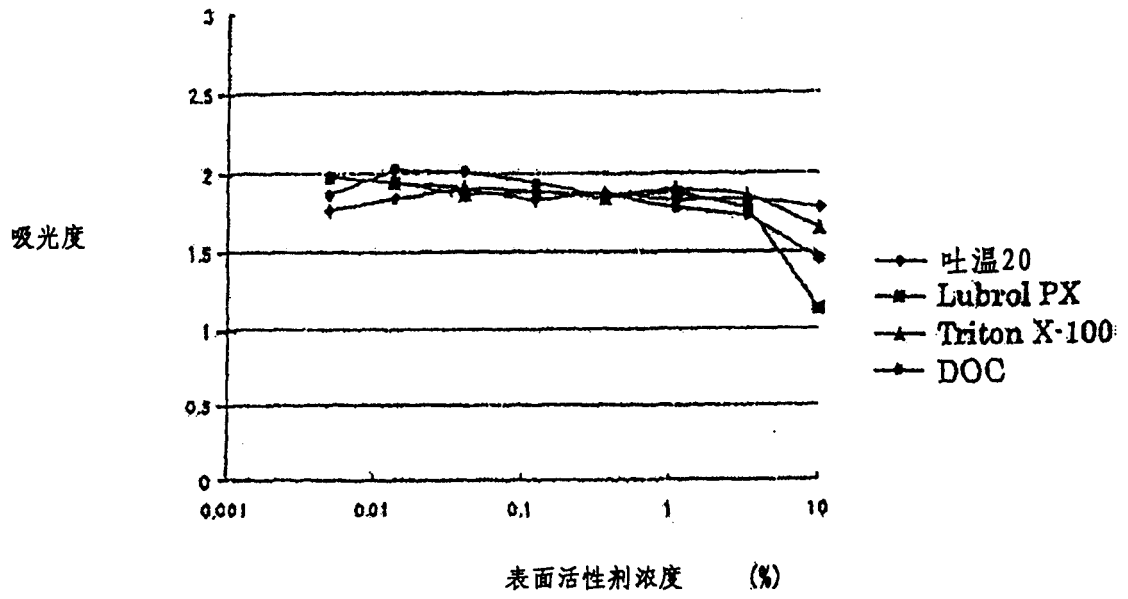


图 8

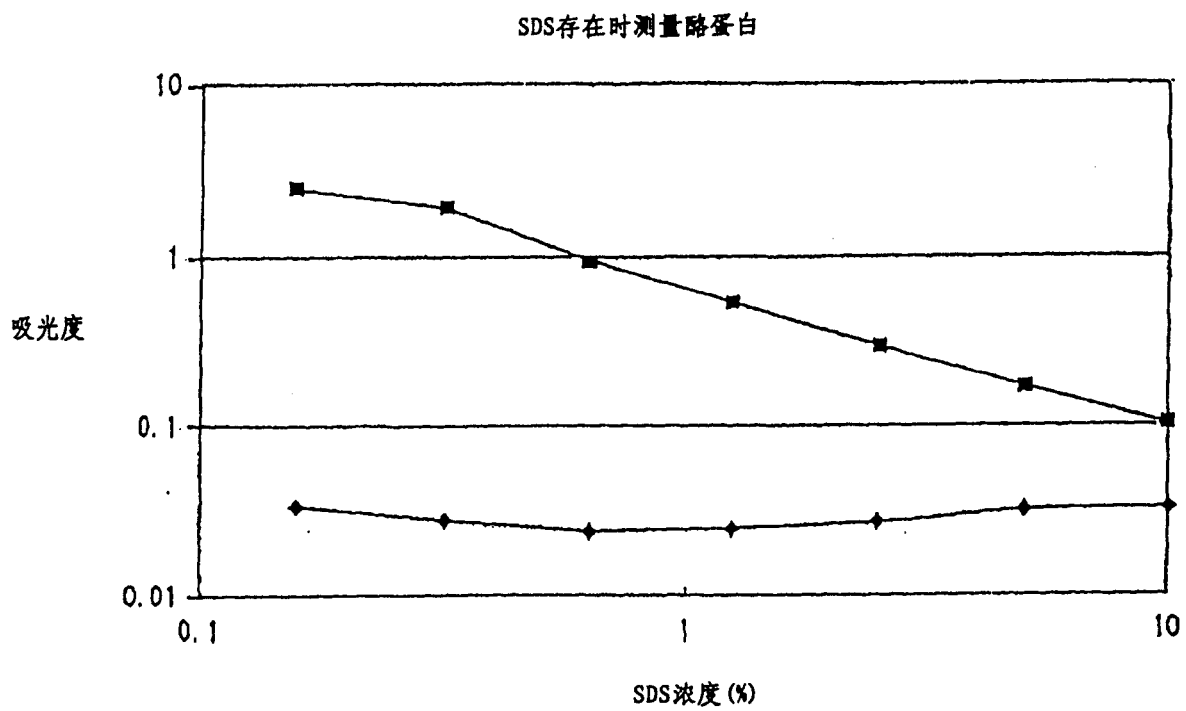


图 9

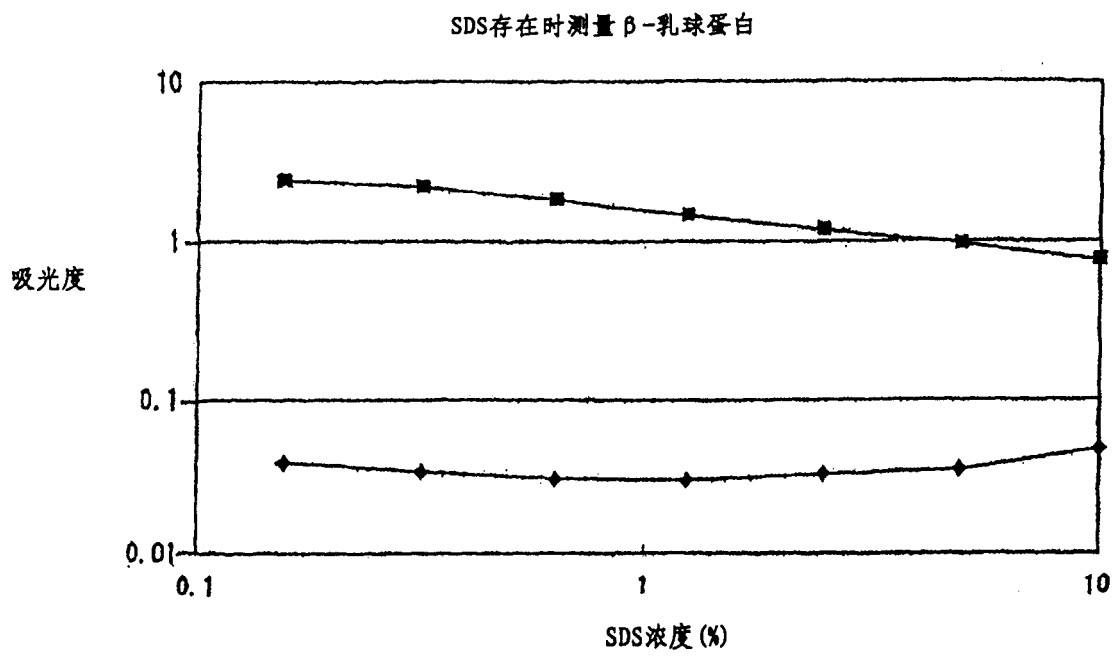


图 10

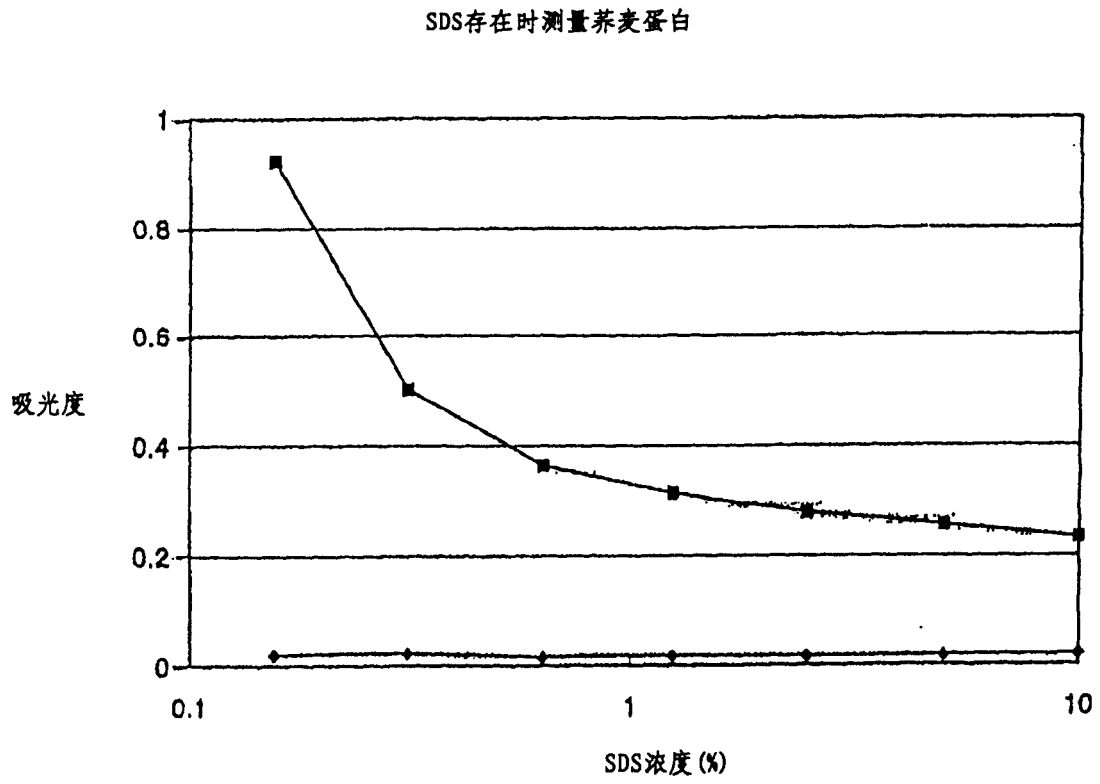


图 11

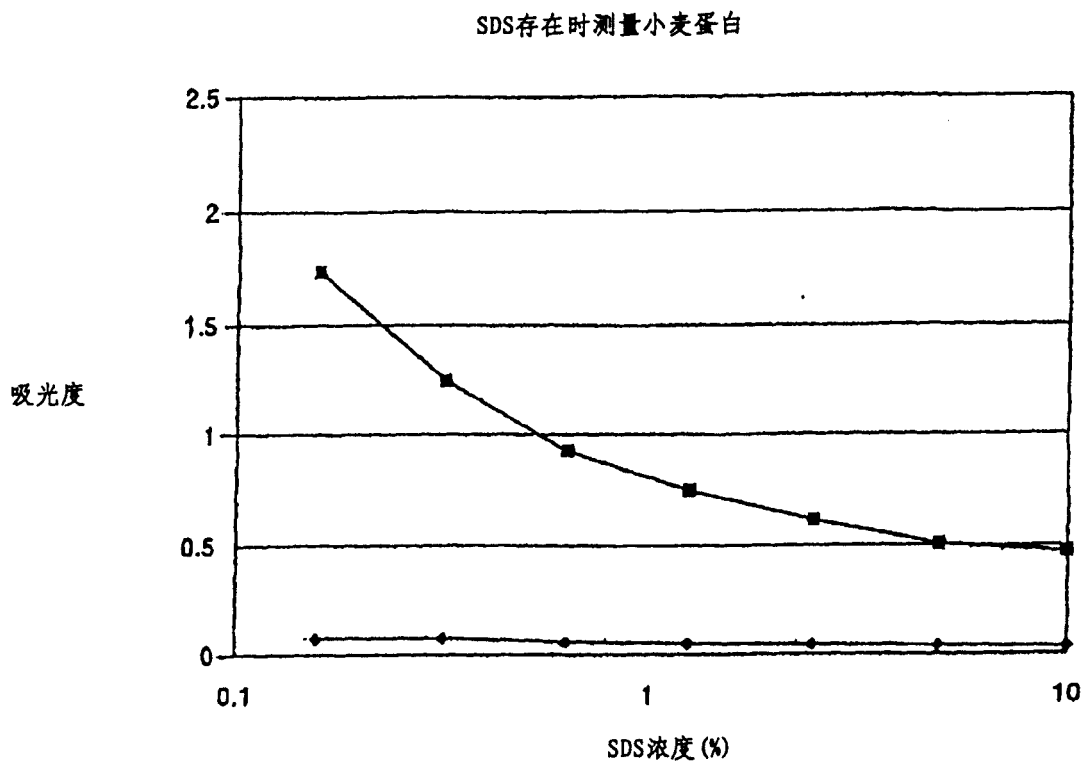


图 12

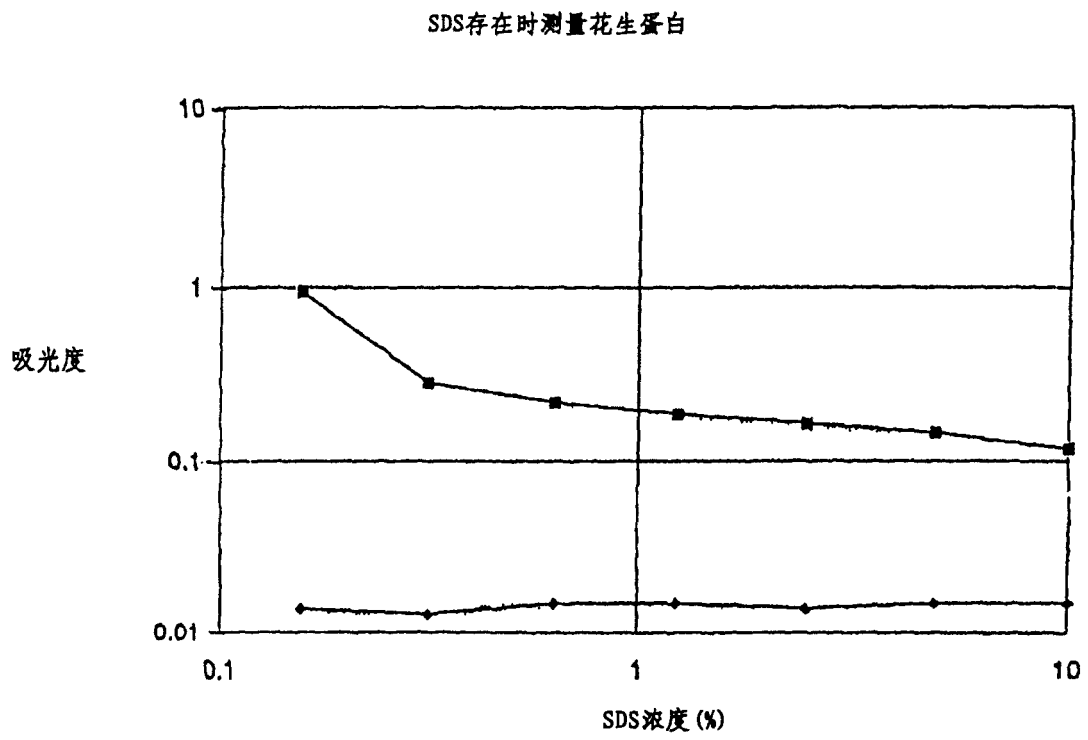


图 13

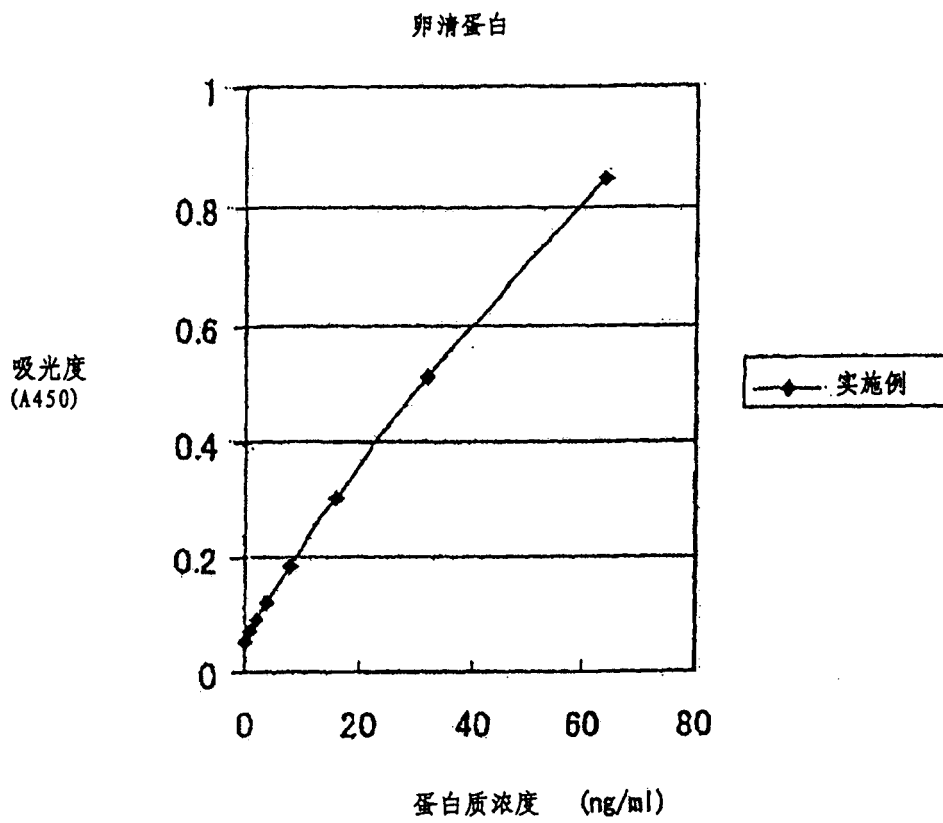


图 14

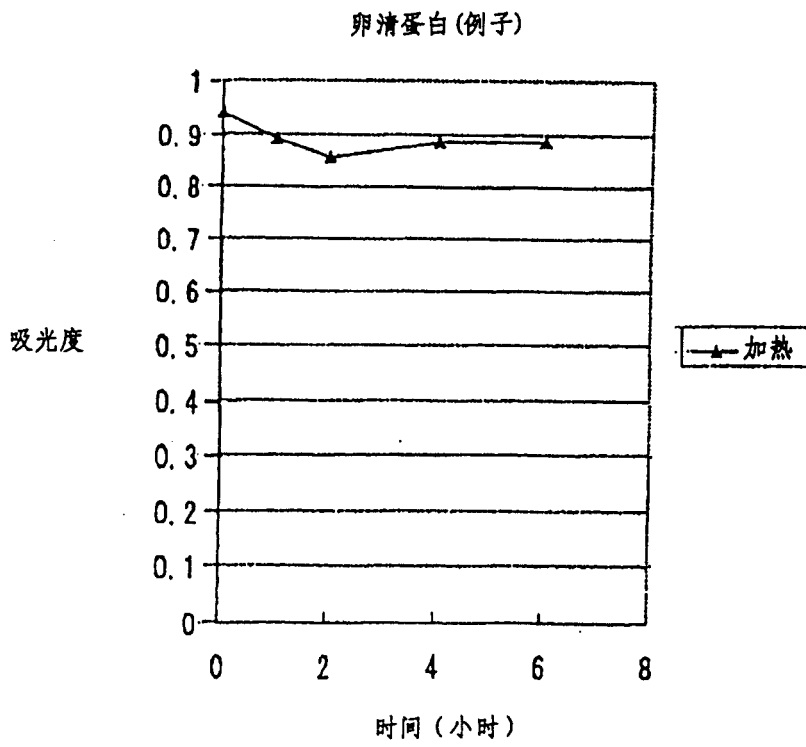
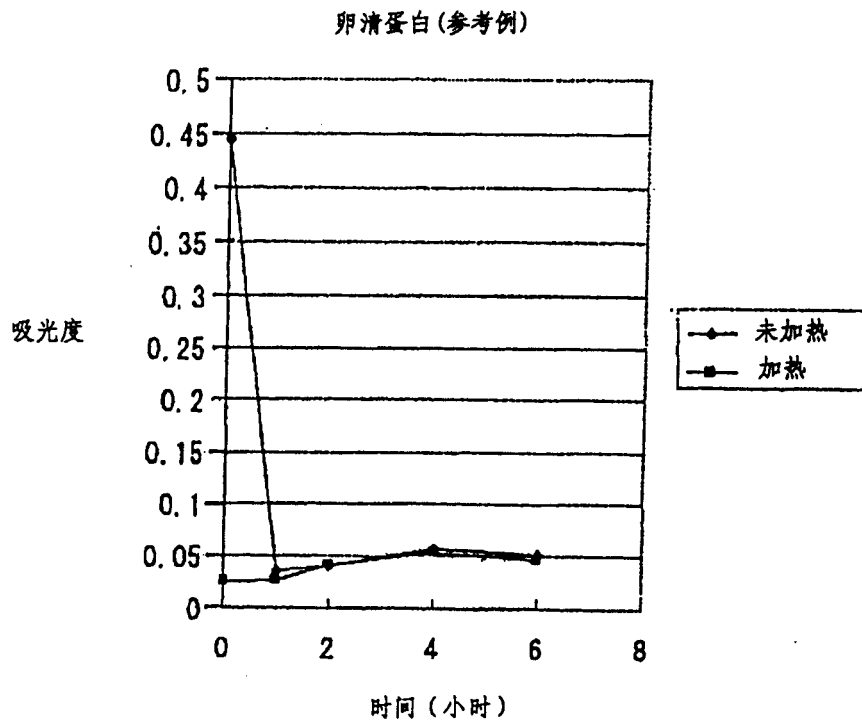


图 15

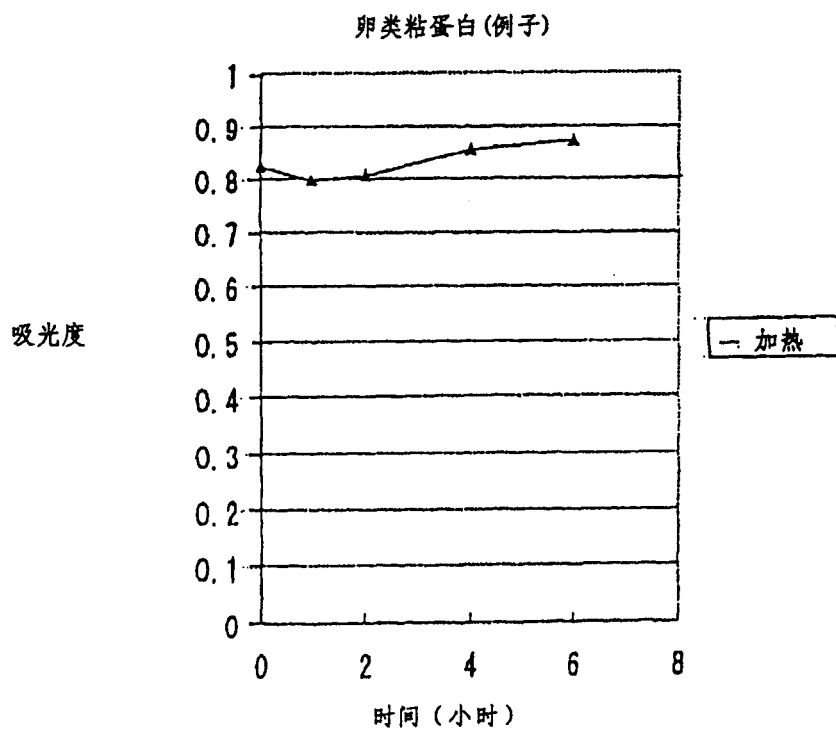
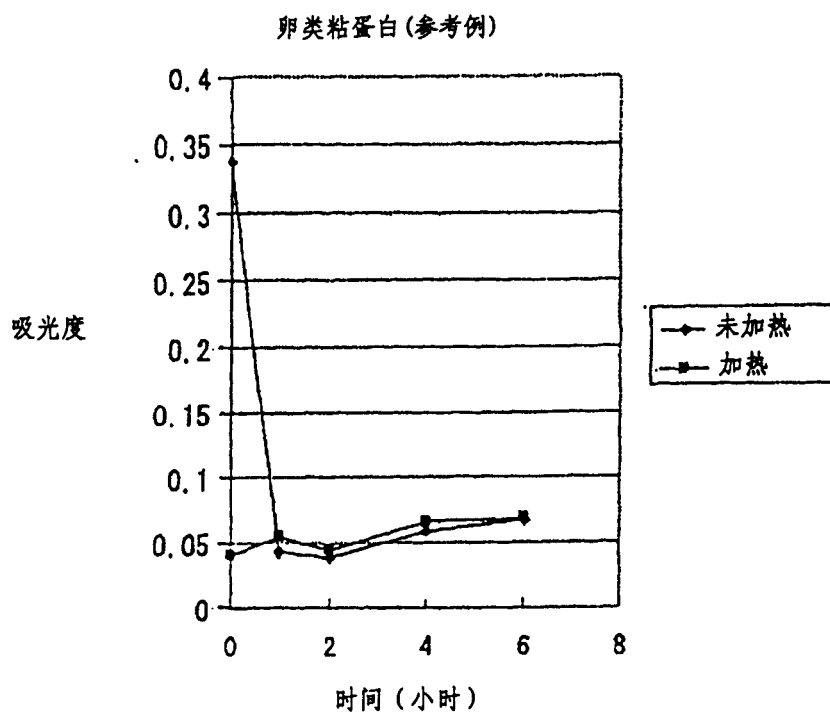


图 16

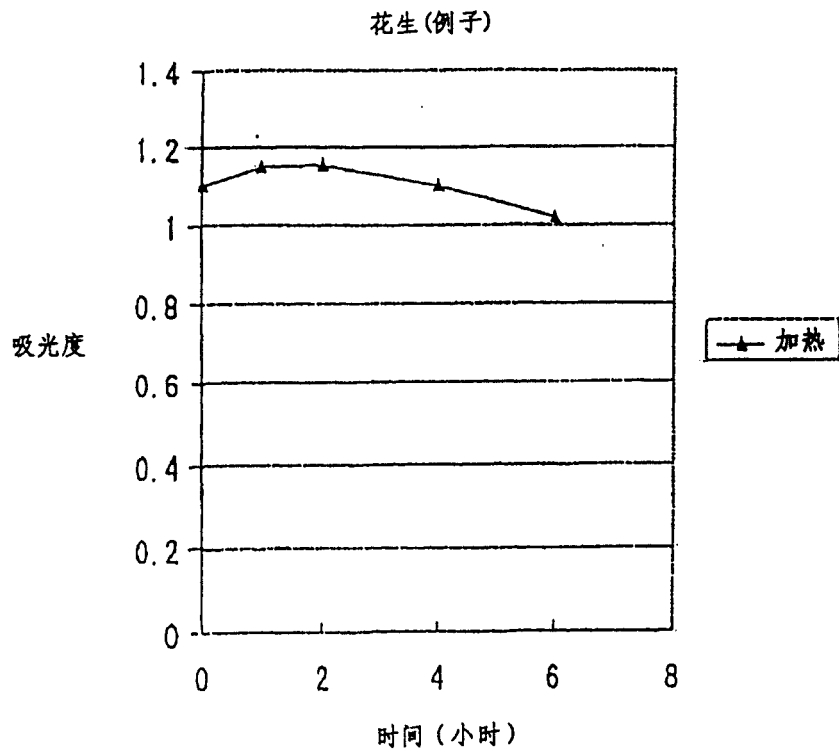
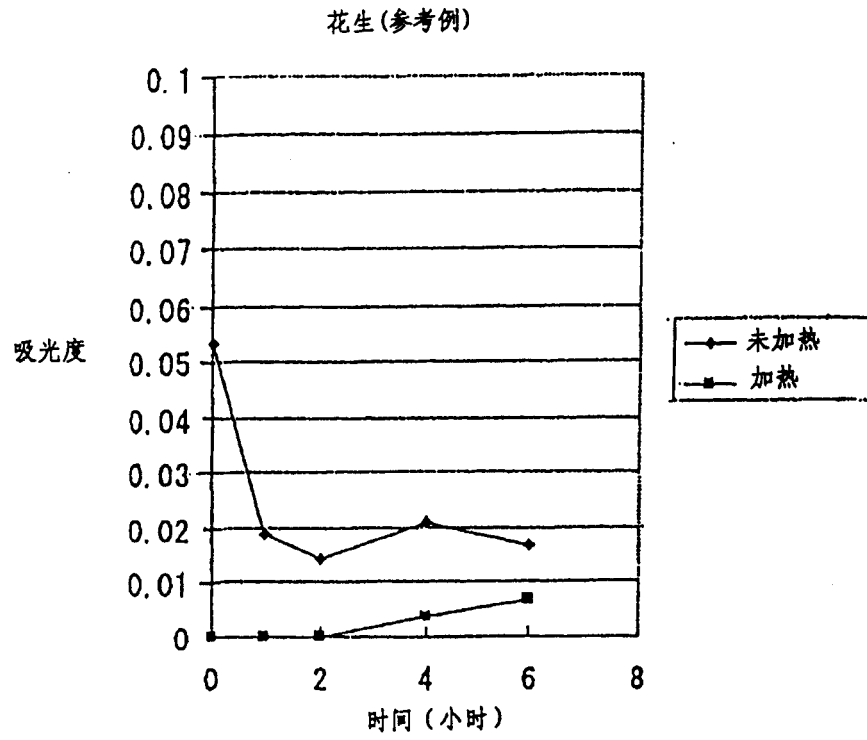


图 17

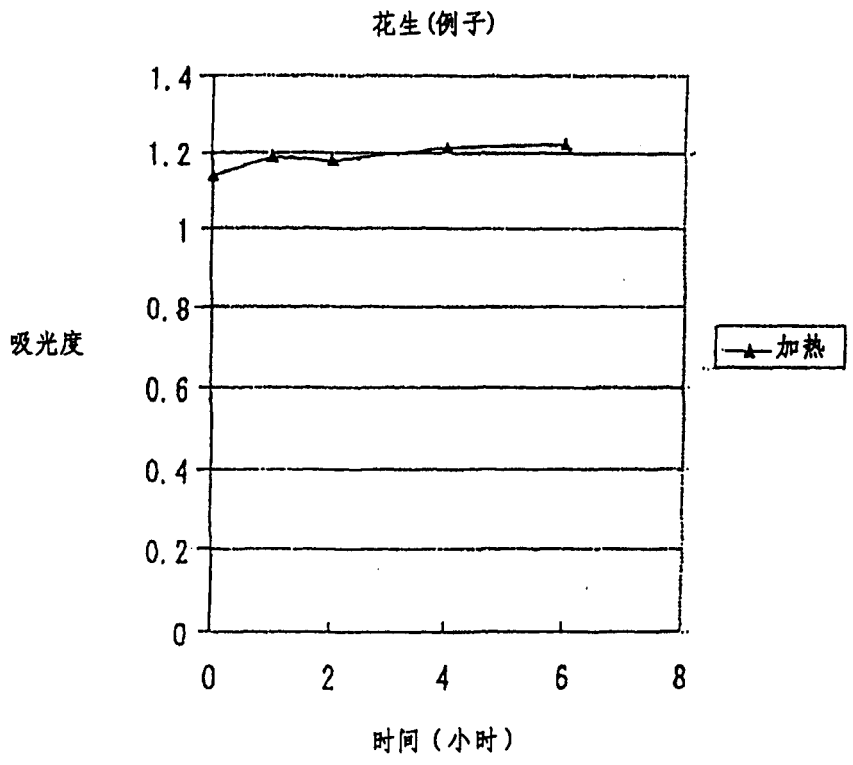
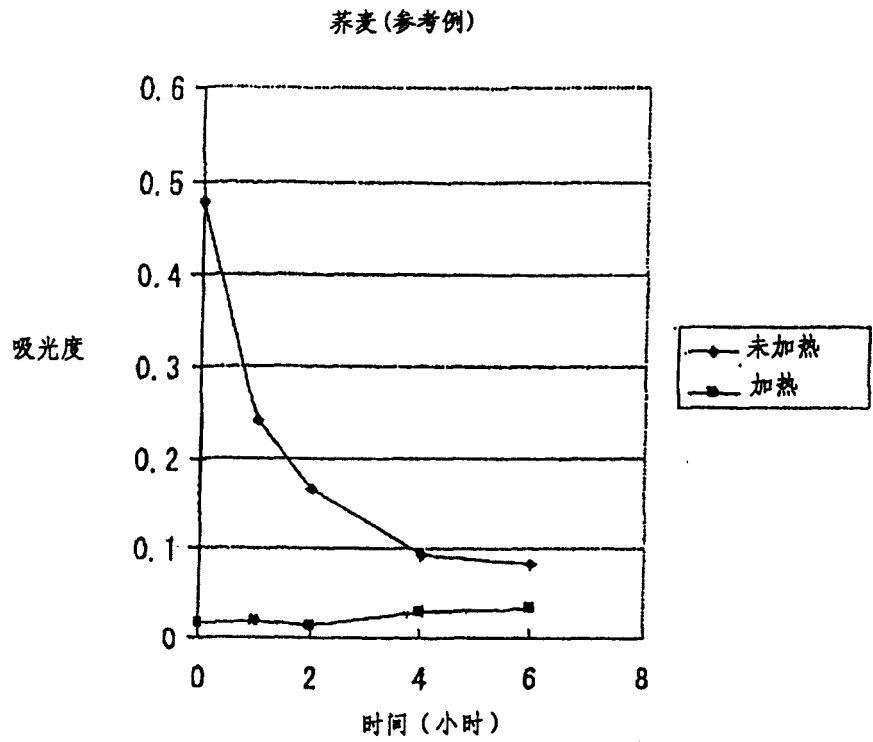


图 18

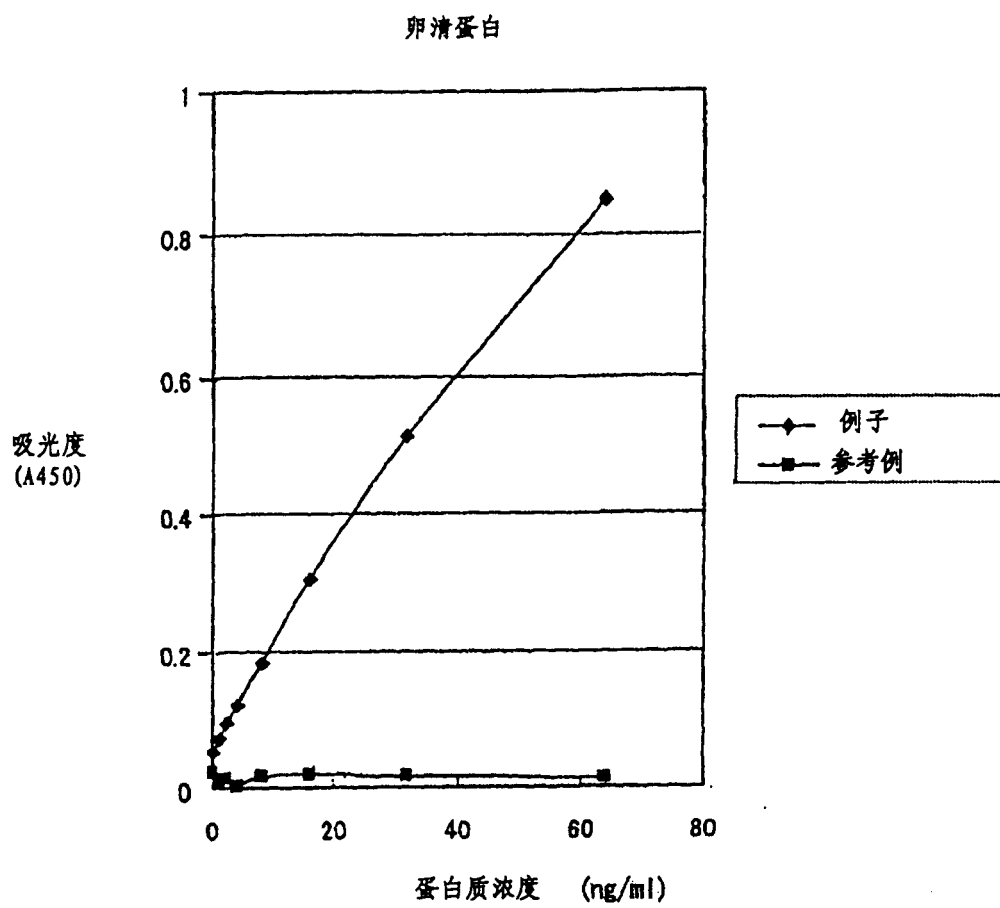


图 19

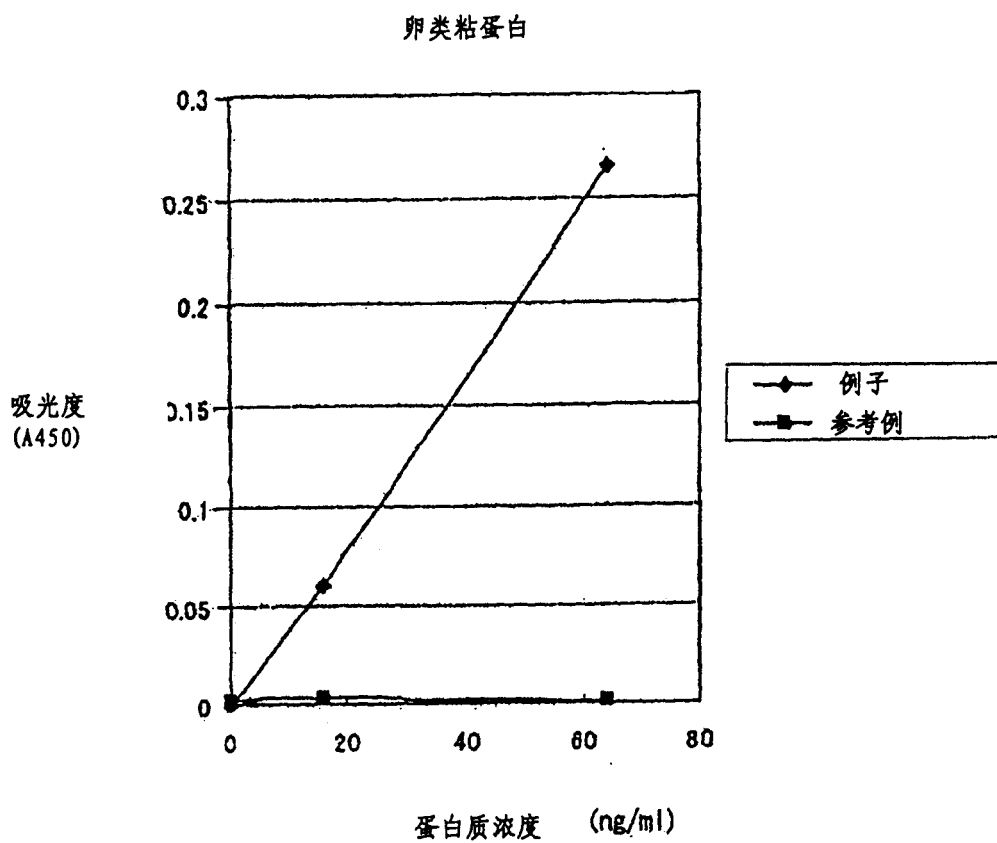


图 20

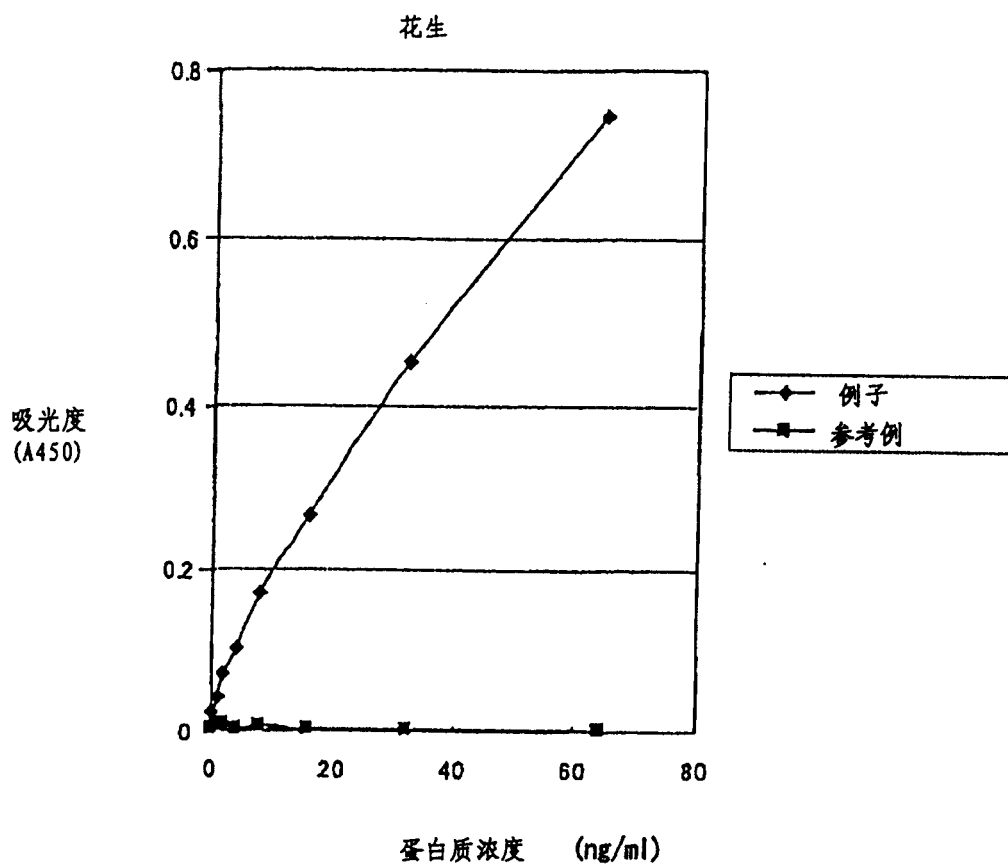


图 21

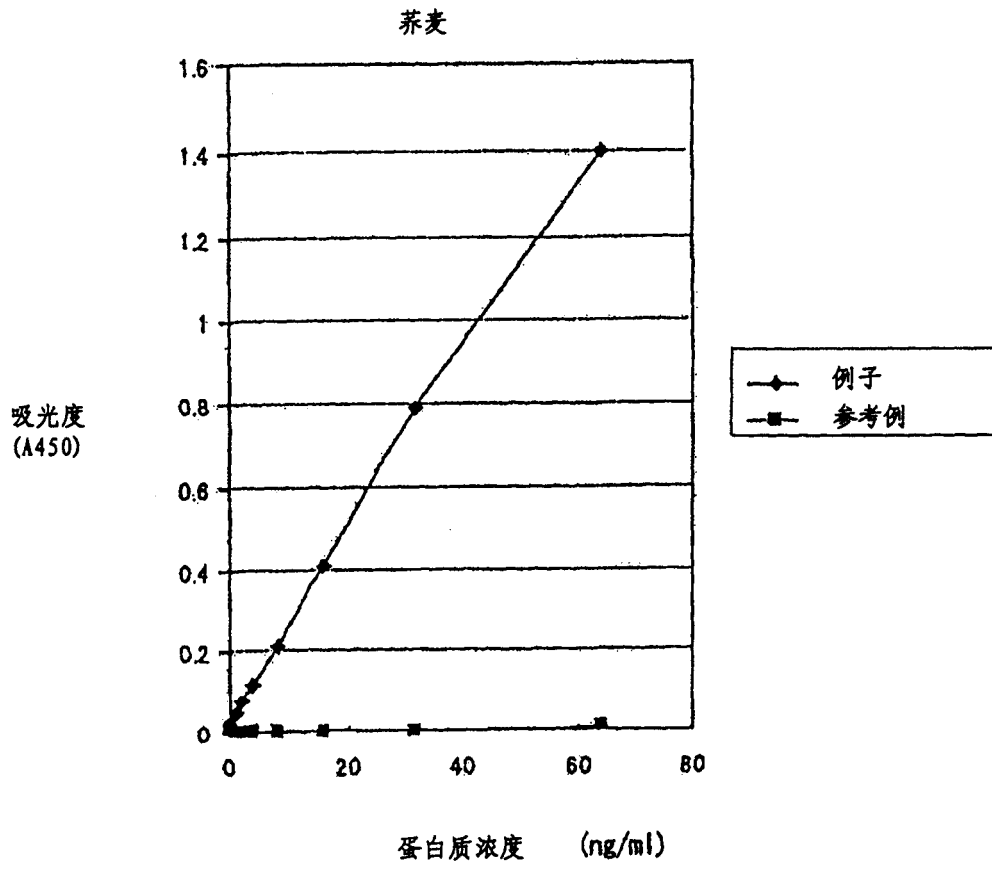


图 22

专利名称(译)	免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN100335901C</a>	公开(公告)日	2007-09-05
申请号	CN20048000023.7	申请日	2004-03-03
申请(专利权)人(译)	森永制果株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	森永制果株式会社		
[标]发明人	村冈嗣朗 渡边由美子 境雅寿 本庄勉		
发明人	村冈嗣朗 渡边由美子 境雅寿 本庄勉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 C07K14/415 C07K16/16 C07K16/18 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/536		
代理人(译)	周承泽		
优先权	2003340412 2003-09-30 JP		
其他公开文献	CN1697973A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种方法，其中微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质在随后的免疫反应中敏捷锐且容易检测，同时维持从样品提取的高效率。揭示了一种高度敏感和容易的免疫测定，特征是样品中微溶于水的蛋白质或处于几乎不能提取状态的蛋白质用水溶剂提取/溶解，水溶剂含相对高浓度的离子表面活性剂，然后提取物中的蛋白质通过抗蛋白质的抗体直接检测，蛋白质预先用离子表面活性剂变性。

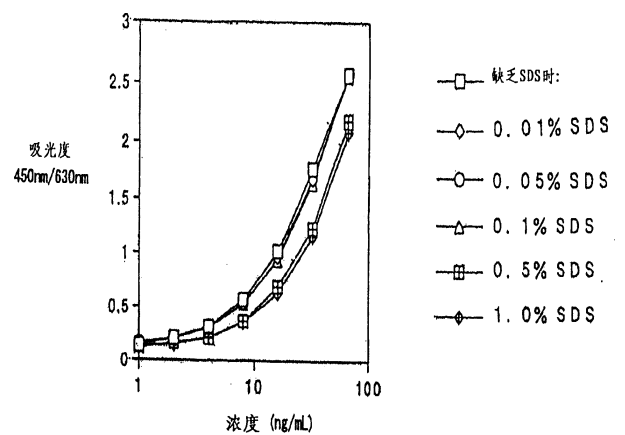


图 1