

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/533

G01N 33/543



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00816405.3

[43] 公开日 2003年3月12日

[11] 公开号 CN 1402834A

[22] 申请日 2000.9.28 [21] 申请号 00816405.3

[30] 优先权

[32] 1999.9.29 [33] JP [31] 277629/1999

[86] 国际申请 PCT/JP00/06743 2000.9.28

[87] 国际公布 WO01/23891 日 2001.4.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.29

[71] 申请人 科学技术振兴事业团

地址 日本琦玉县

[72] 发明人 田代启 本庶佑 池川雅哉

松本和子

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 姜建成

权利要求书3页 说明书27页 附图15页

[54] 发明名称 高灵敏度的免疫检测方法

[57] 摘要

本发明提供高灵敏度检测体液样品中细胞因子的方法。该方法是时间分辨荧光免疫检测(TR-FIA)方法,包括捕捉细胞因子,在固相上形成含有与镧系金属离子络合的荧光结构部分的复合物的步骤,以及测定荧光结构部分的荧光的步骤。该复合物由依次结合(a)具有固相结合部分和能与细胞因子结合的区域的第一抗体,(b)细胞因子,(c)具有能与细胞因子结合的区域和生物素结合部分的第二抗体,(d)具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白、能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物,以及(e)镧系金属离子而形成。荧光结构部分可用通式(I)表示。

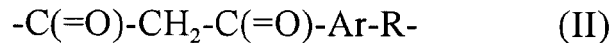
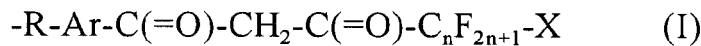
I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 检测体液样品中细胞因子的时间分辨荧光免疫检测 (TR-FIA) 方法, 该方法包括:

5 在固相上形成依次结合了 (a)具有固相结合部分和能与细胞因子结合的区域的第一抗体, (b)该细胞因子, (c)具有能与该细胞因子结合的区域和生物素结合部分的第二抗体, (d)具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白、能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物, 以及(e)镧系金属离子的复合物的步骤; 以及

测定与镧系金属离子络合的荧光结构部分的荧光的步骤;

10 这里, 该荧光结构部分可用通式(I)表示:

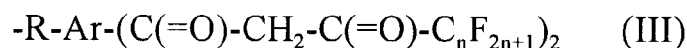


15

式中, R 为能与蛋白质形成共价键的官能团残基, Ar 为具有共轭双键体系的烃基, n 为 1 以上的整数, X 为氟原子或通式(II)表示的基团。

2. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 上述镧系金属离子为铕。

20 3. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 上述荧光结构部分可用通式(III)表示;



25 式中, R、Ar 及 n 与权利要求 1 中的定义相同。

4. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 上述荧光结构部分为 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-磺酰基-邻-三苯基。

5. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 上述结合物中, 相对于每 1 分子的链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白, 存在 10 ~ 60 单位上述荧光结构部分。

30 6. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 上述测定荧光的步骤在不解离在上述固相上形成的复合物情况下进行。

7. 权利要求 1 所述的方法，其中，上述测定荧光的步骤在解离上述固相上形成的复合物后进行。

8. 权利要求 1 所述的方法，其中，上述细胞因子为属于趋化因子家族的细胞因子。

5 9. 权利要求 8 所述的方法，其中，上述细胞因子为 CXC 趋化因子。

10. 权利要求 9 所述的方法，其中，上述细胞因子为基质细胞来源的因子-1 (SDF-1)。

11. 权利要求 1 所述的方法，其中，上述体液样品为血浆或全血。

10 12. 权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括在上述形成复合物的步骤之前，用样品稀释缓冲液稀释上述体液样品的步骤；该样品稀释缓冲液是含有 0.1 ~ 0.3% 牛血清白蛋白，0.05 ~ 0.2% 叠氮钠，以及 0.5 ~ 1.5% 的氯化钠的 pH7.3 ~ 8.3 的 0.01 ~ 0.1M Tris-HCl。

15 13. 权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括在上述形成复合物的步骤之前，在上述细胞因子的非变性温度条件下加热处理上述体液样品的步骤。

14. 权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括在上述测定荧光的步骤之前，用洗涤缓冲液洗涤在上述固相上形成的复合物的步骤；该复合物洗涤缓冲液是含有 0.01 ~ 0.1% 的聚氧乙烯山梨糖醇  
20 酞单月桂酸酯的 pH 8.5 ~ 9.5 的 0.01 ~ 0.1M Tris-HCl。

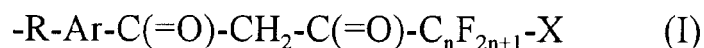
15. 权利要求 1 所述的方法，其中，上述固相为具有 50 ~ 200ng/cm<sup>2</sup> IgG 吸附能力的微量滴度板。

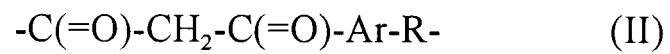
16. 用于检测体液样品中细胞因子的时间分辨荧光免疫检测(TR-FIA)方法的试剂盒，该试剂盒包括：

25 具有固相结合部分和能与细胞因子结合的区域的第一抗体，具有能与该细胞因子结合的区域和生物素结合部分的第二抗体，具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白、能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物，以及镧系金属离子；

这里，该荧光结构部分可用通式(I)表示：

30





5 式中，R 为能与蛋白质形成共价键的官能团残基，Ar 为具有共轭双键体系的烃基，n 为 1 以上的整数，X 为氟原子或通式(II)表示的基团。

## 高灵敏度的免疫检测方法

## 技术领域

5 本发明涉及用于检测体液样品中细胞因子的时间分辨荧光免疫检测 (TR-FIA) 方法, 特别是涉及利用荧光络合物高灵敏度检测体液样品中细胞因子的检测方法。

## 技术背景

10 正常人血浆等体液中存在的游离细胞因子或趋化因子的浓度接近或低于常规 ELISA 测定的检测界限。例如, 据报道通过应用检测界限为 6 皮摩尔 (pM) 的传统 ELISA 测定, 从正常人血浆中检测不到 IL-8 (Leonard 等 (文献 1))。为了正确测定体液样品中趋化因子的浓度, 增大测定灵敏度以及减低来源于体液样品的非特异性背景就成为主要课题。

15 近年来, 开发了利用络合物的时间分辨荧光免疫检测方法, 并正用于临床上 (Kropf 等 (文献 2))。游离的、形成了络合物的镧离子 ( $\text{Eu}^{3+}$ ) 的放射波长为 615nm, 不会受到激发波长 (340nm) 或某种蛋白质造成的短寿命背景荧光 (350nm ~ 600nm) 的影响, 所以很合适。基于该原理的 1 种分析方法是商业化的 DELFIA (解离-增强型镧系荧光免疫检测; Pharmacia), 例如可用于  $\text{TNF}\alpha$  和 IL-6 的测定。但是, 应用 DELFIA 时  
20 不能成功地正确测定这些细胞因子在血浆中的浓度 (Ogata 等 (文献 3))。

最近, 松本等研究小组开发了 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-磺酰基-邻-三苯基(BHHCT)- $\text{Eu}^{3+}$ 络合物作为标记化合物。该络合物可与蛋白质直接结合, 通过时间分辨型荧光测定可以进行高灵敏度分析 (Yuan 等('97)(文献 4)和 Yuan 等('98)(文献 5))。BHHCT 具有  
25  $\beta$ -二酮结构, 与  $\text{Eu}^{3+}$  结合的稳定系数高达  $10^{10}\text{M}^{-1}$ 。所生成的  $\text{Eu}^{3+}$  络合物的寿命超过 400 微秒 ( $\mu\text{s}$ ), 吸收和发射波长的最大值为 330nm 和 615nm, 显示了极良好的性质。说明该络合物可用于检测人血浆中肿瘤标志物甲胎蛋白 (Yuan 等('98)(文献 5)) 和免疫球蛋白 E(IgE) (Yuan 等('97)(文献 4)) 的检测。但是, 还不知道应用上述  $\text{Eu}^{3+}$  络合物检测体液样品中细胞  
30 因子的例子。

基质细胞来源的因子-1 (SDF-1) 是属于趋化因子家族的细胞因子, 它是 1993 年从骨髓基质细胞系初次克隆出来 (Tashiro 等(文献 6))。SDF-1

是 CXCR4 受体的主要配体 (Bleul 等(文献 7)和 Oberlin 等(文献 8))。已知该受体作为 I 型人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 亚群的 CD4 共受体 (coreceptor) 起作用。最近的研究表明, SDF-1 基因的多态性与获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 进展的延迟相关。(例如, Winkler 等(文献 9) 和 Martin 等(文献 10))。但是, 其作用机制有多种阐释, 尚未确立。

还有文献指出 SDF-1 在造血、心血管和神经系统的胚胎形成中起着重要作用 (例如, Zou 等(文献 11)和 Tachibana 等(文献 12))。另一方面, 现状是 SDF-1 在成人组织中的生物学功能还有许多尚未阐明。

如上所述, 开发一种正确定量、监测体液样品中 SDF-1 的技术, 将对加深理解 SDF-1 起到极为重要的作用。不言而喻, 对其它趋化因子和细胞因子也一样, 体液样品的正确测定方法将会为学术和临床作出贡献。基于这样的观点, 期望有以更高灵敏度检测细胞因子的测定方法。

### 发明公开

本发明的目的是解决上述课题, 并提供高灵敏度且能简便检测体液样品中细胞因子的方法。

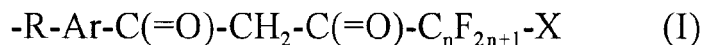
根据本发明, 它提供用于检测体液样品中细胞因子的时间分辨荧光免疫检测 (TR-FIA) 方法, 该方法包括:

在固相上形成依次结合了 (a)具有固相结合部分和能与细胞因子结合的区域的第一抗体, (b)该细胞因子, (c)具有能与该细胞因子结合的区域和生物素结合部分的第二抗体, (d)具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白、能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物, (e)镧系金属离子的复合物的步骤; 以及

测定与镧系金属离子络合的荧光结构部分的荧光的步骤;

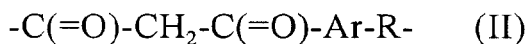
这里, 该荧光结构部分可用通式(I)表示:

25



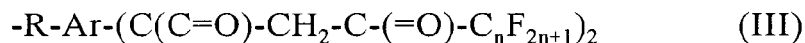
(式中, R 为能与蛋白质形成共价键的官能团残基, Ar 为具有共轭双键体系的烃基, n 为 1 以上的整数, X 为氟原子或通式(II)表示的基团)

30



本发明的一实施方案中，上述镧系金属离子为铕。

本发明的一实施方案中，上述荧光结构部分可用通式(III)表示。



5

(式中，R、Ar及n与上面相同)

本发明的一实施方案中，上述荧光结构部分为4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-磺酰基-邻-三苯基。

10 本发明的一实施方案中，上述结合物中，相对于每1分子链霉抗生素蛋白或抗生物素蛋白，存在10~60单位上述荧光结构部分。

本发明的一实施方案中，上述测定荧光的步骤在不解离在固相上形成的复合物的情况下进行。

15 本发明的另一实施方案中，上述测定荧光的步骤是在解离在固相上形成的复合物后进行。

本发明的一实施方案中，上述细胞因子为趋化因子家族的细胞因子。

本发明的一实施方案中，上述细胞因子可以是CXC趋化因子。

本发明的一实施方案中，上述细胞因子为基质细胞来源的因子-1(SDF-1)。

20 或者，本发明的一实施方案中，上述细胞因子可以作为血循环中的可溶性因子存在，并且是微量即具有生物活性的细胞因子。

或者，本发明的一实施方案中，上述细胞因子可以是粒细胞-巨噬细胞-单集落刺激因子(GM-CSF)或白细胞介素2(IL-2)。

本发明的一实施方案中，上述体液样品为血浆或全血。

25 本发明的一实施方案中，还包括在上述形成复合物的步骤之前，用样品稀释缓冲液稀释上述体液样品的步骤；该样品稀释缓冲液是pH7.3~8.3的0.01~0.1M Tris-HCl，并含有0.1~0.3%牛血清白蛋白，0.05~0.2%叠氮钠，以及0.5~1.5%的氯化钠。

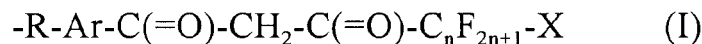
30 本发明的一实施方案中，还包括在上述形成复合物的步骤之前，在上述细胞因子的非变性温度条件下，对上述体液样品进行加热处理的步骤。

本发明的一实施方案中，还包括在测定荧光的步骤之前，用洗涤缓

冲液洗涤在上述固相上形成的复合物的步骤；该复合物洗涤缓冲液是 pH 8.5 ~ 9.5 的 0.01 ~ 0.1M Tris-HCl，并含有 0.01 ~ 0.1% 的聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯。

5 本发明的一实施方案中，上述固相是有 50 ~ 200ng/cm<sup>2</sup> IgG 吸附能力的微量滴度板。

另外，根据本发明，还提供用于检测体液样品中细胞因子的时间分辨荧光免疫检测(TR-FIA)方法的试剂盒，该试剂盒包括具有固相结合部分和能与细胞因子结合的区域的第一抗体，具有能与该细胞因子结合的区域和生物素结合部分的第二抗体，具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白以及能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物，以及镧系金属离子；这里，该荧光结构部分可用通式(I)表示：



15 (式中，R 为能与蛋白质形成共价键的官能团残基，Ar 为具有共轭双键体系的烃基，n 为 1 以上的整数，X 为氟原子或通式(II)表示的基团)



20

#### 附图的简单说明

图 1a 是表示 SDF-1 校正曲线的图。应用实施例 2 所述的 TR-FIA 法测定标准 SDF-1。数据是 3 次测定的平均值。

图 1b 是与图 1a 相同的校正曲线，是特别在低浓度范围内测定的。图中的直线， $Y=1.3X + 1.2(\times 10000\text{a.u.})$ ， $r = 0.995$ 。数据是 3 次测定的平均值。

图 1c 是为了监测 SDF-1 的生物学活性，按照实施例 3 所述的方案测定 EL-4 细胞表面的 CXCR4 表达的结果图。通过与没有人 SDF-1 $\beta$  时进行培养的对照相比较，计算出平均荧光强度(MFI)的减少%。数据是 1 轮实验进行 3 次后选择的中间值。

30 图 1d 表示为了评价 TR-FIA 对 SDF-1 的特异性，测定各种趋化因子的结果图。数据是测定 3 次的平均值。

图 2 是针对 SDF-1 的，TR-FIA 与 DELFIA 进行比较的图。图 2 的

左侧是以人 SDF-1 $\beta$ 为标准溶液，用与实施例 2 中使用的相同组合的捕捉抗体和检测抗体，用 DELFIA 和 TR-FIA 体系进行测定的结果。图 2 的右侧表示用两种体系检测血浆样品中内源性 SDF-1 浓度的结果。图 2 右侧所示的样品中未添加标准 SDF-1。图 2 右侧的数据和表 1 的数据是对不同样品进行测定的结果。数据是 3 次测定的平均值。

图 3a 是表示抗凝剂和蛋白酶抑制剂对用 TR-FIA 测定 SDF-1 的影响。用 EDTA (1mg/ml)，肝素 (30IU/ml)，柠檬酸盐 (0.38%柠檬酸钠) 及具有抑肽酶 (1 $\mu$ g/ml) 的 EDTA (1mg/ml) 中的任一种处理血浆样品。黑柱和斜线柱是对两个不同样品进行测定的结果。数据是 3 次测定的平均值。

图 3b 表示血浆样品的预加热对用 TR-FIA 测定 SDF-1 的影响。测定前 55 $^{\circ}$ C 预先温育血浆样品 30 分钟，或不加热直接进行测定。24 份体液样品来自健康的日本志愿者。数据是 2 次测定的平均值。

图 3c 表示血浆样品的稀释对用 TR-FIA 测定 SDF-1 的影响。用缓冲液 4 稀释各样品。5 份体液样品来自健康的日本志愿者。数据是 3 次测定的平均值。

图 4a 表示作为 SDF-1 的对照的，用 ELISA 定量 IL-8 时血细胞的影响。将 IL-8 添加到血浆样品后，混合细胞沉积物或血浆。37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟后，对血浆中的可溶性 IL-8 进行定量。白方块是未与细胞沉积物或血浆混合的标准样品，黑圆圈表示与血浆混合的样品，白圆圈表示与细胞沉积物混合的样品。数据是 4 次测定的平均值。

图 4b 是作为 SDF-1 的对照的，用 ELISA 对 MCP-1 进行定量时血细胞的影响。向血浆样品中添加 MCP-1 后，与细胞沉积物或血浆混合。37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟后对血浆中的可溶性 MCP-1 进行定量。符号与图 4a 相同。数据是测定 4 个复本的均值。

图 4c 表示在 SDF-1 的 TR-FIA 定量中血细胞的影响。向血浆样品中添加 SDF-1 后，与细胞沉积物或血浆混合。37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟后，对血浆中的可溶性 SDF-1 进行定量。符号与图 4a 相同。数据是测定 4 个复本的均值。

图 5 表示 36 个健康日本志愿者的人血浆中 SDF-1 的水平。测定前，于 55 $^{\circ}$ C 对所有的血浆样品进行 30 分钟热处理。数据是 2 轮不同测定的各 3 次测定的平均值。

图 6 表示人血浆样品中 Protein G-Sepharose 引起的 IgG 耗竭的影响。将从 7 个健康日本志愿者获取的血浆样品与 Protein G-Sepharose 在冰上一起温育 30 分钟，离心分离，测定上清中的 SDF-1 量。斜线柱和黑柱分别表示非加热样品和加热（55℃30 分钟）样品。

5 图 7 表示 GM-CSF 的校正曲线。用 TR-FIA 方法测定标准 GM-CSF。数据是 3 次测定的平均值。

图 8 是 IL-2 的校正曲线。用 TR-FIA 法测定标准 IL-2。数据是 3 次测定的平均值。

### 实施本发明的最佳方式

10 以下，对本发明进行更详细的说明。

本发明的方法基于时间分辨荧光免疫检测(TR-FIA)方法。

“时间分辨荧光免疫检测”是应用如本发明中镧系金属离子络合物的能放射长寿命荧光的荧光化合物，通过免疫学反应标记测定对象物，在较短寿命的背景荧光消失后，对来自标记物的荧光信号进行时间分辨  
15 型测定的测定方法。

本发明的方法尤其适于高灵敏度检测体液样品中的细胞因子。“体液样品”是指从动物，优选从哺乳动物，尤其是从人体采集的液态物质。代表例有血液（即全血）及其分级物血浆和血清，以及脑脊髓液、胆汁、羊水、胸水、腹水、呼吸道内分泌液、骨髓液、乳汁、泪液、鼻腔分泌物、心内膜液、关节内包液、唾液、精液、尿等。动物来源的培养细胞  
20 的上清液等也包括在体液样品中。本发明的方法在应用全血、血浆、血清或脑脊髓液时，尤其是应用全血或血浆时效果显著。称为体液样品时，通常包括生物体液自身和用生物体液适宜的载体进行稀释等处理后的液态样品两者。

25 “细胞因子”是指在生物体细胞间负责信息传递的蛋白质性化学物质。对于每种细胞因子来讲，靶细胞表面上表达其特征的受体，通过与受体结合而显示细胞增殖、分化等生理活性。统称为“造血因子”的一组诱导血细胞分化和增殖的细胞因子包括包含粒细胞-巨噬细胞-单集落刺激因子（GM-CSF）的集落刺激因子（CSF）、干细胞因子、促红细胞  
30 生成素、促血小板生成素等。调控淋巴细胞的白细胞介素包括 IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、IL-18 等。统称为“生长因子”的一组细胞因子包括 TGF- $\beta$  家族、EGF 家族、FGF 家族、IGF 家族、NGF 家族、

血小板来源的生长因子 (PDGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 等。统称为“肿瘤坏死因子”的一组细胞因子包括 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$  等。统称为“干扰素”的一组细胞因子包括 INF- $\alpha$ 、INF- $\beta$ 、INF- $\gamma$  等。其它已知的细胞因子有内皮素、胶质细胞株来源的神经营养因子 (GDNF) 等。细胞因子中, 使任一种功能上成熟的血细胞具有化学趋避性的一组细胞因子称作趋化因子。按照其 N 末端所保存的半胱氨酸的位置, 将趋化因子分为 CC、CXC、C、CXXC 4 类。

本发明的方法中的检测对象可以是上述趋化因子中的任一种。再者, 属于上述细胞因子一组的新发现的成员, 或者不属于上述细胞因子一组的新发现的细胞因子也是本发明方法中的检测对象。尤其是, 本发明的方法适用于在血循环中以可溶性因子存在、微量即具有生物学活性、与多种疾病相关的细胞因子。

本发明方法中检测对象的例子有属于上述趋化因子家族的细胞因子, 尤其是 CXC 趋化因子, 但不一定限于这些分类。本发明中最优选的检测对象的例子为 SDF-1。

本发明的方法中, 为了选择性捕捉、标记体液样品中所期望的细胞因子, 在固相上形成包含该细胞因子的复合物。具体而言, 含有细胞因子的复合物是由以下成分在适宜的固相上形成的:

- (a) 具有固相结合部分和能与细胞因子结合区域的第一抗体;
- (b) 细胞因子;
- (c) 具有能与细胞因子结合的区域和生物素结合部分的第二抗体;
- (d) 具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白和能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物; 以及
- (e) 镧系金属离子。

以下, 对各成分进行说明。

首先, 作为“固相”可应用任意形状和材质的固体物质, 只要是能进行抗体的结合且不妨碍上述复合物的形成以及后述的荧光测定即可。为了便于测定方法的实施, 代表性的可应用多孔型微量滴度板, 也可应用填充了珠子的柱子 (珠子的材质为葡聚糖、琼脂糖等, 但并不限于此) 等其它形状的物质。本发明中尤适宜应用具有中等程度的蛋白质吸附能力的微量滴度板。这里的“中等程度”的吸附能力是指当免疫球蛋白 G(IgG) 作为标准蛋白质被吸附时, 代表性的吸附约 50 ~ 约 200ng/cm<sup>2</sup>, 优选约

15 ~ 约 150ng/cm<sup>2</sup>, 更优选约 90 ~ 约 120ng/cm<sup>2</sup>的吸附能力。微量滴度板的材质优选聚苯乙烯, 但不限于于此。

成分(a)“第一抗体”是以与上述固相结合的状态存在, 且通过抗原-抗体反应能与所期望的细胞因子结合的抗体。根据这种概念, 将第一抗体称做“捕捉抗体”。本说明书中的“抗体”包含多克隆抗体、单克隆抗体、Fab、(Fab)<sub>2</sub>、嵌合抗体等任意类型的免疫球蛋白(Ig)和免疫球蛋白来源的分子。术语“抗体”用意广泛, 只要与免疫球蛋白同样能与细胞因子结合, 以该细胞因子作配体的受体也包含在内。优选的抗体例子是多克隆抗体或单克隆抗体。针对各种细胞因子的抗体均有市售, 例如可  
5  
10 购自 R&D System Inc. (Minnesota, US)、Dako Immunoglobulinsals (丹麦)、PharMingen (California, US)、Southern Biotechnology Associates (Alabama, US)等公司。或者可以利用免疫动物、杂交瘤技术等常规方法制备针对所期望的细胞因子的抗体。

结合到固相的方法可按照常规的方法进行, 例如将第一抗体直接涂布到微量滴度板上。第一抗体中的“固相结合部分”代表性的指其一部分吸附到固相上的、抗体的 Fc 区域, 但并不限于此。例如也可应用能分别与固相和抗体的一部分结合的双功能性的连接分子。  
15

成分(b), 即存在于体液样品中的所期望的细胞因子, 代表性的是通过与第一抗体结合而固定到固相上。细胞因子不必以游离状态与第一抗体接触, 例如可与后述的第二抗体结合后与第一抗体结合。这样品发明中复合物的形成不限于各成分结合的次序。  
20

本发明者们发现当把含有所期望细胞因子的体液样品暴露给能与该细胞因子结合的抗体时, 用适当的缓冲液将之稀释成适宜的浓度对于高灵敏度检测细胞因子是很重要的。用缓冲液稀释体液样品的稀释倍数, 当用(体液样品: 缓冲液)的体积表示时, 代表性的约 1:1 ~ 约 1:30, 25 优选约 1:2.5 ~ 约 1:20, 更优选约 1:5 ~ 约 1:15 的范围。稀释倍数的最适值要根据体液样品的种类和细胞因子的种类而变动, 还要依赖于样品稀释缓冲液的组成。

适宜的样品稀释缓冲液为由三(羟甲基)氨基甲烷(略作“Tris”)和无机酸构成的弱碱性缓冲液, 代表性的为 Tris-HCl。其 pH, 代表性的为约 7.0 ~ 约 8.0, 优选约 7.3 ~ 约 8.3, 更优选约 7.5 ~ 约 8.1。代表性的浓度为约 0.005 ~ 约 0.2 摩尔(M), 优选约 0.01 ~ 约 0.1M, 更优选约 0.025  
30

~ 约 0.075M。

样品稀释缓冲液还包含适量的血浆蛋白质成分和盐类。血浆蛋白质成分代表性的为血清白蛋白，优选牛血清白蛋白（BSA）。其浓度代表性的为约 0.05 ~ 约 0.5% 左右，优选约 0.1 ~ 约 0.3%，更优选约 0.15 ~ 约 0.25%。盐类代表性的为叠氮钠（ $\text{NaN}_3$ ）和氯化钠（ $\text{NaCl}$ ）。 $\text{NaN}_3$  的浓度代表性的为约 0.02 ~ 约 0.4%，优选约 0.05 ~ 约 0.2%，更优选约 0.05% ~ 约 0.15%。 $\text{NaCl}$  的浓度代表性的为约 0.2 ~ 约 3%，优选约 0.5 ~ 约 1.5%，更优选约 0.6 ~ 约 0.12%。

不用说样品稀释缓冲液的组成不限定于上述条件，也允许该领域的技术人员进行便宜的各种改变。例如，可用其它碱金属或碱土金属对应的盐置换上述钠盐的一部分或全部。样品稀释缓冲液的 pH 和各成分的浓度等的最佳值可根据检测对象细胞因子的种类而不同，还依赖于体液样品的稀释倍率。该领域的技术人员可在通常条件设定方法的范围内使之最优化。

成分(c) “第二抗体” 具有能与细胞因子结合的区域，并与第一抗体一起以夹心形式捕捉所期望的细胞因子。第一抗体与第二抗体最好是互不干涉，识别同一细胞因子不同部位（即不同表位）的抗肽抗体。因此，与所期望的细胞因子的结合能力相关，第一抗体和第二抗体的适当组合是很重要的。例如，可用全长细胞因子，或用已知或预测包含多个表位的细胞因子的片段免疫适当的动物，从获得的多种多克隆抗体中选择适当的组合。或者从识别表位不同的多个单克隆抗体中选择适当的组合。这样的选择不是特别难进行，例如可通过制备细胞因子的标准溶液，对需检测的抗体组合用常规 ELISA 进行预实验。

第二抗体还具有生物素结合部分，并可通过荧光测定检测细胞因子。根据这这种概念，又把第二抗体叫做“检测抗体”。生物素是一种维生素，又叫做维生素 H 或辅酶 R，并可与肽等的氨基形成酰胺键。第二抗体可通过应用常规方法，对检测对象细胞因子的抗体进行生物素化和纯化来进行制备。第二抗体中的“生物素结合部分”是指生物素自身和结合了生物素的抗体的一部分（代表性的为 Fc 区域）。必要时可应用能与生物素和抗体的一部分结合的双功能性连接分子连接这两部分。

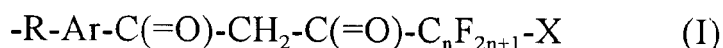
这里，“第二抗体”不必为单一分子，可表示任意结构单位，只要能履行必要的功能（即，通过抗原-抗体反应或配体-受体结合反应可结

合细胞因子的功能，以及携持生物素的功能)即可。上述“第一抗体”也同样。例如，本发明中可应用抗所期望细胞因子的抗体和能与该抗细胞因子抗体结合的生物素化抗 IgG 抗体的组合。此时，抗细胞因子抗体与生物素化抗 IgG 抗体的组合统称为“第二抗体”。生物素化抗 IgG 抗体具有普遍适用性，所以很方便。另外，当针对所期望细胞因子的抗体因某种原因对生物素化反应有抵触性时，组合应用生物素化抗 IgG 抗体则可以奏效。另一方面，从简化测定程序、且使细胞因子的检测灵敏度最大化的观点出发，优选应用单一分子作为第二抗体。

成分(d)的“结合物”是具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白以及能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的任意结构单位，代表性的是链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白与荧光结构部分直接或间接通过共价键连接起来的分子。众所周知，链霉抗生物素蛋白通常是由放线菌产生的分子量约 6 万的蛋白质，具有很强地与生物素结合的性质。但是，本发明中的“链霉抗生物素蛋白”对微生物来源不作限定，只要它基本上维持与生物素结合的能力，可包含其它微生物来源的相应蛋白质及其修饰物。众所周知，通常抗生物素蛋白是卵白中包含的分子量约 7 万的蛋白质，也很强地与生物素结合的性质。本发明中的“抗生物素蛋白”不限于天然的卵白蛋白质，只要能基本上维持与生物素结合的能力，也包含其修饰物。

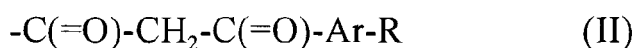
由上述原则可知，本发明的方法也可通过应用具有能与细胞因子结合的区域和链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白结合部分的抗体替代成分(c)，以及通过应用具有生物素和能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物替代成分(d)来完成。

成分(d)的结合物中能与镧系金属离子络合的荧光结构部分是指相应的荧光化合物与链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白间直接或间接形成共价键，通过这样的反应而得到的部分结构。荧光结构部分可用下面的通式(I)表示。

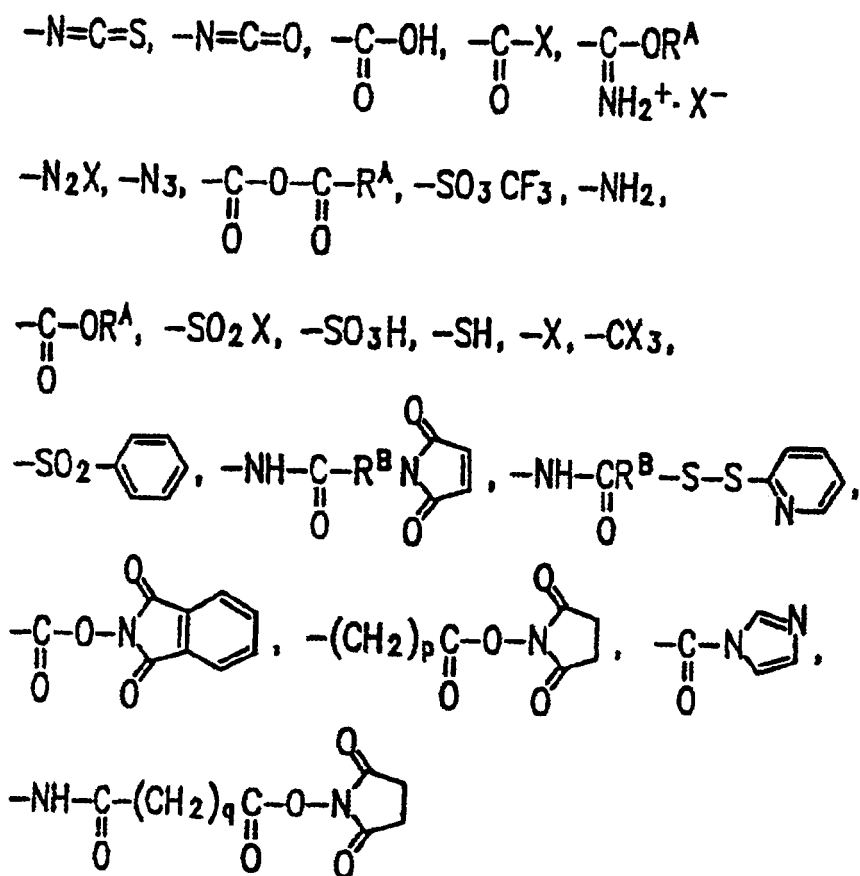


30

(式中，R 为能与蛋白质形成共价键的官能团残基，Ar 是具有共轭双键体系的烃基，n 为 1 以上的整数，X 为氟原子或通式(II)表示的基团)



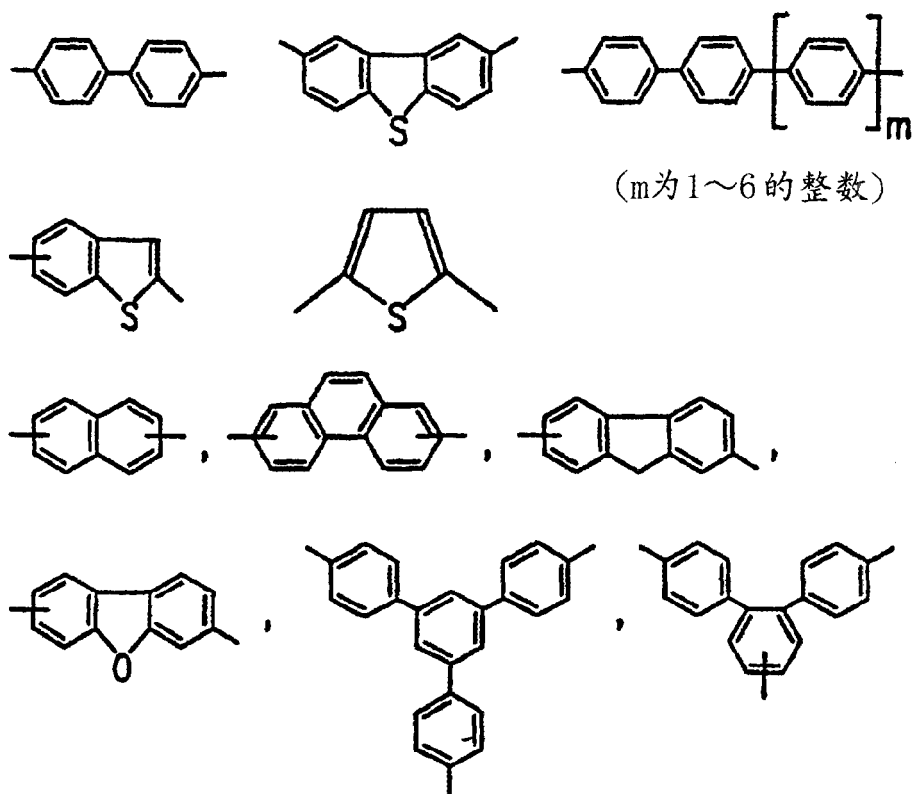
上述通式中，规定残基 R 的“能与蛋白质形成共价键的官能团”是指能与蛋白质中氨基酸残基具有的任意反应性基团（代表性的如氨基、羧基和羟基）反应并能形成共价键的任何有机官能团。这样的官能团的例子包括下面所示的基团：



10 （其中，X 选自卤素原子、 $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OSO}_2\text{F}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{OSO}_2\text{C}_4\text{F}_9$  或  $-\text{OSO}_2\text{PhCH}_3$ -p(Ph 为苯基)， $\text{R}^{\text{A}}$  选自烷基、链烯基、芳香基、或芳烷基， $\text{R}^{\text{B}}$  选自亚烷基、亚烯基、亚芳基或亚芳烷基，p 为 0~5，q 为 2~10)

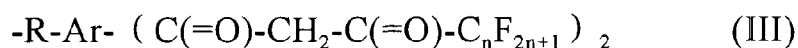
上述通式中，规定 Ar 的“具有共轭双键体系的烃基”是指至少有 3 个共轭的双键的烃基，代表性的是至少有 1 个苯环的 2 价或 3 价芳香族  
15 烃基。对烃基的碳原子数上限没有特殊限制，代表性的在约 50 个以内，优选在约 30 个以内。这里，1 个以上的碳可被杂原子（例如氧或硫原子）

所取代。烃基 Ar 的例子包括下列基团。



优选烃基 Ar 为 3 价，荧光结构部分可用通式(III)表示。

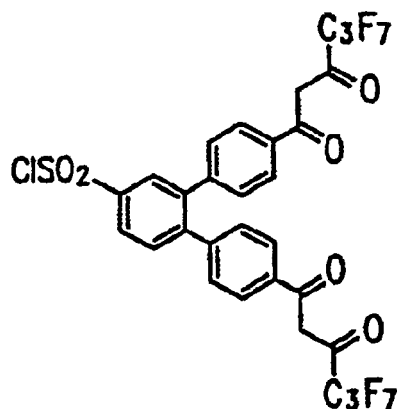
5



这里,较优选的 Ar 例子是在 4,4'位与 2 个 $\beta$ -二酮基结合的 O-三苯基。同样优选的 Ar 的其它例子是将 2 个 $\beta$ -二酮放置在与 O-三苯基中的 $\beta$ -二酮位置近似或基本上同一空间距离的 3 价芳香族烃基。

上述通式中, n 为 1 以上的整数,代表性的为 1~6, 优选 2~4。

本发明中特别优选的荧光结构部分是 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-磺酰基-邻-三苯基。它是从相应的荧光化合物 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-氯磺酰基-邻-三苯基  
15 (略作“BHHCT”)获得的。BHHCT 的结构式如下所示:



提供上述荧光结构部分的所期望的荧光化合物，可利用常规的有机合成反应而合成。代表性的是按照包括以下 2 个步骤的工序合成：

（第一步）在适当的溶剂中以及碱性催化剂（例如甲基钠盐）存在的条件下，使乙酰基化的芳香族化合物与过氟羧酸酯进行 Claisen 缩合反应，生成乙酰基的  $\text{CH}_3$  被过氟羧酸酯化了的  $\beta$ -二酮化合物。

（第二步）将能与蛋白质形成共价键的官能团导入  $\beta$ -二酮化合物中。例如，通过应用氯磺酸进行氯磺化反应而使芳香环的氢被置换为氯磺酰基（ $\text{ClSO}_3^-$ ）。必要时在各步后进行重结晶、沉淀等纯化。

所得荧光性化合物依赖于在上述第二步中导入的官能团种类，在适当的条件下可与蛋白质进行反应，从而提供目的荧光结构部分。例如，氯磺酰基与蛋白质中的氨基在碱性反应条件下很容易地形成酰胺。

本发明中，成分(d)的结合物可通过用荧光化合物直接标记链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白而制备。或者通过首先结合链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白与其它蛋白质（例如牛血清白蛋白）后，再对之进行标记而制备。链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白与其它蛋白的结合可按常规方法进行，如应用戊二醛进行交联反应。

用荧光化合物标记蛋白质的反应，代表性的是将蛋白质溶解到已调节至适于反应的 pH（例如，进行氯磺化时，pH 约为 9 左右）的缓冲液中后，在该缓冲液中以期望的摩尔比量添加溶解到适宜溶剂（例如乙醇或二甲基甲酰胺）的荧光化合物来进行。可通过调节相对于蛋白质的荧光化合物的摩尔比以及通过调节含有荧光化合物的溶液的浓度，控制每 1 个蛋白质分子结合的荧光化合物的比率（亦称为“结合比”）。该结合比相当于本发明的结合物中每 1 分子链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋

白的荧光结构部分的单位数。结合比代表性的为 5-100 单位，优选 10~60 单位。结合比过低的话，得不到足够高的细胞因子检测的灵敏度。另一方面，结合比过高也不会提高检测灵敏度。

5 本发明方法中，通过成分(e)镧系金属离子与上述荧光结构部分络合，在固相上形成复合物。镧系金属离子的例子包括铕(Eu)、钐(Sm)、铽(Tb)和镝(Dy)。其中，优选铕。通常镧系金属离子预先与成分(d)的络合物络合，在此状态下用于复合物的形成。也就是说，通常在上述链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白和生物素形成结合的时间点，荧光结构部分已形成了挟持  $\text{Eu}^{3+}$  的络合物。但并不妨碍与此相反的程序。

10 本发明人等发现将上述在固相上形成的复合物进行荧光测定之前，用适宜的缓冲液进行充分洗涤，对于高灵敏度的细胞因子的检测是重要的。这里所讲的适当的复合物洗涤缓冲液是由 Tris 和无机酸构成的碱性缓冲液，代表性的是 Tris-HCl。其 pH，代表性的为约 8.2~约 9.8，优选约 8.5~约 9.5，更优选约 8.7~约 9.4。其浓度，代表性的是约 0.005~  
15 约 0.2M，优选约 0.01~约 0.1M，更优选约 0.025~约 0.075M。

复合物洗涤缓冲液还含有适量的、具有蛋白质促溶能力的非离子表面活性剂。该非离子表面活性剂，代表性的为聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯，优选商品名为“Tween(注册商标)20”的市售聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯（分子量约 1200）。也可优选应用与 Tween（注册商标）  
20 基本上具有同一性质（例如羟基值为约 95~约 115，皂化值为约 35~约 55，HLB 为约 15~约 18（亲水性-疏水性平衡））的其它非离子表面活性剂。非离子表面活性剂的浓度代表性的为约 0.005~约 0.2%，优选约 0.01~约 0.1%，更优选约 0.025~约 0.075%。

不言而喻，复合物洗涤缓冲液的组成并不限定于上述条件，允许该  
25 领域的技术人员进行便宜的各种改变。PH 和各成分的浓度等的最佳值可根据作为检测对象的细胞因子的种类而不同。这种最优化可由该领域的技术人员在通常条件设定方法的范围内进行。

以下，概括说明本发明方法中在固相上形成复合物的代表性程序的例子。

30 1) 将用适宜的涂布用缓冲液稀释的第一抗体的溶液施用到固相上（例如 96 孔微量滴度板的孔），通过孵育，将一抗固定到固相。作为涂布缓冲液，例如可应用含有适量 NaCl 的磷酸缓冲液。孵育的条件，代表

性的是约 2~6℃左右 20 小时以上。

2) 接着用洗涤缓冲液洗涤数次涂布了第一抗体的固相表面。作为洗涤缓冲液，例如可应用弱碱性的 Tris-HCl，必要时可添加适量的具有蛋白质促溶能力的非离子表面活性剂。洗涤后将涂布了的固相保存于-20℃，直到需要进行测定之前。

3) 如上所述，优选预先用稀释缓冲液对含有检测对象细胞因子的体液样品进行适当稀释。将该体液样品以及根据需要将该细胞因子的标准溶液施用到已涂布了的固相上进行孵育。孵育的条件，代表性的是约 35~39℃左右约 40 分钟~约 2 小时左右。孵育后与上述同样，用洗涤缓冲液数次洗涤固相表面。

4) 其后，将用适当的缓冲液稀释的第二抗体溶液施用到固相上。这里，优选应用与上述样品稀释缓冲液相同的溶液。孵育条件与体液样品的上述孵育条件相同。孵育后与上面同样，用洗涤缓冲液数次洗涤固相表面。

5) 将结合物与镧系金属离子的盐溶液混合，形成荧光性络合部分。用适当的溶剂稀释络合的结合物后，施用到固相上进行孵育。孵育条件与体液样品和二抗的上述各孵育条件相同。孵育后，如上所述，用适当的复合物洗涤缓冲液洗涤在固相上形成的复合物。

将由上述步骤得到的含有镧系络合物的复合物供给到固相或液相的时间分辨型荧光测定。该荧光测定的装置可从市场上购买。测定条件是，代表性的是延迟时间为约 0.2~约 0.3 毫秒(ms)，窗口时间为约 0.2~约 0.6ms，闪烁速度 (flash rate) 为约 0.5~约 1.5ms，激发波长为 337.1nm (氮激光的波长)，测定波长为 615nm。

进行固相荧光测定时，可将具有上述复合物的固相直接供给到荧光测定条件。进行液相荧光测定时，要通过用适当的解离溶液处理复合物，使含有荧光性络合部分的结构单位游离到溶液中，再将该溶液提供给荧光测定条件。代表性的解离溶液是含有三烷基膦氧化物和阴离子表面活性剂的弱碱性水溶液。作为解离溶液的例子，可应用含有三(正辛基)膦氧化物 (TOPO) 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 的碳酸氢钠 (NaHCO<sub>3</sub>) 水溶液。应用这样的解离溶液，通过与具有上述复合物的固相例如在约 45~55℃左右孵育约 40 分~约 2 小时，切断上述链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白和生物素的结合，使含有荧光络合物部分的结合物游离到溶液中。

根据上述液相荧光测定，因为固相与荧光测定无关，所以其优点是固相种类及材质的选择范围更广。另一方面，与固相荧光测定相比，液相荧光测定需要额外的步骤，所以程序复杂。再者，与固相荧光测定相比，因在用解离溶液处理的过程中容易受杂质的影响，液相荧光测定的灵敏度有一些降低。但是，可以认为固相和液相荧光测定各自所能达到的最大灵敏度，可以通过与测定相关的各种条件的组合来进行变动。

根据本发明，它还提供用于实施上述时间分辨荧光测定 (TR-FIA) 的试剂盒。通常，该试剂盒至少包括上述成分(a)、(c)、(d)和(e)作为构成物件。也就是说，将具有固相结合部分和能与细胞因子结合的区域的第一抗体，具有能与细胞因子结合的区域和生物素结合部分的第二抗体，具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白和能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物，和镧系金属一起提供给测定者，使检测体液样品中的细胞因子的测定可以实施。必要时试剂盒还可包括测定对象细胞因子的标准品，上述各种缓冲液 (特别是样品稀释缓冲液和复合物洗涤缓冲液) 等。通常试剂盒的构成物件各自以适宜的方式贮存在容器内，与使用说明书或指示书一起作为一整体进行包装。

根据本发明，使得正确且高灵敏度检测体液样品中的细胞因子，尤其是包含 SDF-1 的趋化因子的新方法可以应用。当用与下述实施例 2 基本上相同的条件进行检测时，本发明方法中细胞因子的检测界限代表性的为约 100pg/ml 以下，优选为约 50pg/ml 以下，更优选为约 30pg/ml 以下。同样在与实施例 2 基本上相同的条件下进行检测时，细胞因子测定的变动系数 (CV) 代表性的为约低于 10%，优选约低于 8%，更优选约低于 7%。另外，当在与实施例 6 基本上相同的条件下进行检测时，该细胞因子由血浆样品的回收率代表性的为约 70% 以上，优选约 80% 以上，更优选 90% 以上。此外，于不同日期内在同一条件下重复测定 4 次同一个体来源的血浆样品中细胞因子时，其测定值的变动优选在约 10 ~ 约 20% 的范围内。

如下述实施例所示，尤其对于 SDF-1，与 ELISA 和 DELFIA 等传统方法相比，本发明中通过利用荧光化合物 BHHCT 来源的  $\text{Eu}^{3+}$  络合物，可使血浆样品中的检测灵敏度改善 2 ~ 3 个数量级。正确把握 SDF-1 在体内的行为并阐明其生理功能，对深入理解 HIV-1 感染、开拓 AIDS 治疗的新展望是极其重要的。很明显本发明能对细胞因子的分子生物学的

发展及应用作出极为有意义的贡献。

此外,如下实施例所示,根据本发明,通过应用荧光化合物 BHHCT 来源的  $\text{Eu}^{3+}$  络合物,可以与 SDF-1 同样的高灵敏度测定趋化因子家族以外的细胞因子,例如在血循环中以可溶性因子存在、微量即保持生物活  
5 性、不仅与多种病理相关且已用于治疗细胞因子,且再现性良好。

### 实施例

以下,结合实施例更具体地说明本发明。但这些实施例并不限定本发明。

实施例中使用的材料、装置及测定条件如下:

10 抗体:用包含人 SDF-1  $\beta$  的残基 33 ~ 45 (RFFESHIRANVK) 的多克隆抗体原肽 (Research Genetics, Alabama, U.S.) 免疫兔子,以诱导抗 SDF-1 的抗血清。用亲和柱纯化抗血清,然后应用。针对人 SDF-1  $\beta$  的山羊多克隆抗体购自 R&D System Inc. (Minnesota, U.S.)。针对人粒细胞-巨噬细胞-单集落刺激因子 (GM-CSF) 的人单克隆抗体购自 PharMingen  
15 (California, U.S.)。针对人白细胞介素 2 (IL-2) 的单克隆抗体购自 PharMingen (California, U.S.)。

趋化因子:人 RANTES、人 MIP-1  $\alpha$  和  $\beta$ 、人 MDC 和人 fractalkine 购自 DIACLONE Research (法国)。人 IL-8 购自 ENDOGEN (Massachusetts, U.S.)。用市售的 ELISA 试剂盒来测定加入到血浆中的小鼠 IL-8 和小鼠  
20 MCP-1。小鼠 IL-8 购自 Amersham Pharmacia Biotech (瑞典),小鼠 MCP-1 购自 PharMingen (California, U.S.)。小鼠 SDF-1  $\alpha$ 、小鼠 SDF-1  $\beta$ 、人 SDF-1  $\alpha$  和人 SDF-1  $\beta$  均由 Genetics Institute (Massachusetts, U.S.) 赠送。人 GM-CSF 购自 PharMingen (California, U.S.)。人 IL-2 购自 PharMingen (California, U.S.)。

25 装置及测定条件:应用 Wallac (法国) 和 Amersham Pharmacia Biotech 的 1420 型 ARVO 多标记计数仪进行时间分辨型荧光测定。测定条件如下:延迟时间:0.20 毫秒(ms),窗口时间 0.40ms,闪烁速度 1.00ms。为了得到最灵敏的 TR-FIA 测定体系,测定了 5 种购自 Nunc (丹麦) 的微量滴度板。其中, polysorp 板在标准人 SDF-1  $\beta$  的测定中产生最敏锐的  
30 荧光信号。灵敏度的次序如下: White C96 polysorp > White C96 maxisorp > White C8maxisorp > Black F16maxisorp。以下实验常用 White C96maxisorp 微量滴度板。

( 实施例 1: TR-FIA 的预研究 )

最初试图找出测定 SDF-1 的、基于 ELISA 的免疫检测体系适用的固相结合捕捉抗体与检测抗体的良好组合。为了这一目的, 对多克隆兔抗 SDF-1 抗体和多克隆山羊抗 SDF-1 抗体共 5 种进行了各种组合。有 3 种组合可进行标准 SDF-1 的特异性检测。但是 ELISA 测定时, SDF-1 的检测界限没有超越约 10 ~ 20ng/ml 的范围。通常, 血浆中存在的 SDF-1 的水平远远低于该检测界限。因此可以确定用 ELISA 测定事实上不能进行血浆样品中 SDF-1 的检测。

应用在上面找到的最佳多克隆抗体的组合, 对通常的 TR-FIA 条件进行了如下改变后, 进行 SDF-1 的检测。

( 实施例 2: 标准 SDF-1 的 TR-FIA )

为 TR-FIA 制备 4 种测定缓冲液。涂布 96 孔微量滴度板的缓冲液 1 (含有 0.14M NaCl 的 0.15M 磷酸缓冲液(PBS)); 洗涤板的缓冲液 2 (含 0.05% Tween 20 的 0.05M Tris-HCl, pH 7.8); 洗涤缓冲液 3 (0.05M Tris-HCl, pH 7.8); 稀释蛋白质溶液的缓冲液 4 (含有 0.2% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub> 和 0.9% NaCl 的 0.05M Tris-HCl, pH 7.8)。

BHHCT 的合成按照 Yuan 等('98) (文献 5) 所述的方法实施。链霉抗生物素蛋白-牛血清白蛋白 (SA-BSA) 结合物的制备, 及用 BHHCT 对结合物的标记按照 Yuan 等('97) (文献 4) 所述的方法进行。将标记的结合物溶液于 -20℃ 保存, 使用前即刻用下述的缓冲液 (缓冲液 4) 稀释 100 倍。

应用兔抗人 SDF-1 β 多克隆抗体或山羊抗人 SDF-1 β 多克隆抗体作为捕捉抗体。它们各产生相似的结果。将用缓冲液 1 稀释到 10μg/ml 的捕捉抗体溶液 (各 60μl) 加到 96 孔微量滴度板的孔中, 4℃ 保温 24 小时。然后用缓冲液 2 将孔洗 2 次, 用缓冲液 3 洗 1 次。这样的用抗 SDF-1 抗体涂布的板子在 -20℃ 至少可保存 1 个月。

将 SDF-1 标准溶液 (50μl) 吸到涂布的上述板中, 37℃ 孵育 1 小时。用缓冲液 2 和 3 洗涤板子后, 将 50μl 用缓冲液 4 稀释 1000 倍的生物素化的山羊抗人 SDF-1 β 多克隆抗体 (用常规方法使上述 R&D System 的山羊抗体生物素化) 加到孔中, 37℃ 孵育 1 小时。孵育后, 用缓冲液 2 洗 2 次板, 然后用缓冲液 3 洗 1 次, 然后加入 50μl 用 BHHCT-Eu<sup>3+</sup> 标记的 BSA-SA 溶液 (50μl), 37℃ 孵育 1 小时。用含有 0.05% Tween 20 的 0.05M

Tris-HCl (pH 9.1) 将板洗 4 次。应用 1420 型 ARVO 多标记计数仪对该培养板进行固相荧光测定。

通过上述 TR-FIA 得到的水性溶液中的 SDF-1 的校正曲线如图 1a 和图 1b 所示。应用 TR-FIA 时, SDF-1 的检测界限可通过以下计算式(Kropf 等 (文献 2)) 计算。

$$3 \times [S_0] \times S_B / (S_0 - B)$$

这里,

[S<sub>0</sub>] 为标准溶液的最低浓度

10 S<sub>B</sub> 为空白的标准偏差

S<sub>0</sub> 为最低浓度标准溶液的荧光信号强度

B 为空白的荧光信号强度

通过上式计算出 TR-FIA 的检测界限为 30pg/ml。这比上述参考例中的 ELISA 的检测界限(约 10-20ng/ml)低 3 个数量级。由于每孔应用 50μl 溶液, 所以用 TR-FIA 检测出的 SDF-1 蛋白质的最小量为 1.5pg/孔。

在测定的重现性这一点上 TR-FIA 也有所改善。标准样品在 0.1ng/ml ~ 1204ng/ml 的浓度范围内时, 应用 TR-FIA 检测 SDF-1 的变动系数 (CV) < 7%。与此相对, 上述参考例中, 在 10ng/ml ~ 1000ng/ml 的浓度范围内, 应用 ELISA 时的 CV 值超过 10%; 在 0.1ng/ml ~ 1024ng/ml 的浓度范围内, 应用 DELFIA (参照下述比较例) 时的 CV 值也超过 10%。

除了上述固相荧光测定外, 对液相荧光测定也进行了研究。即, 通过用酸性螯合的表示活性剂溶液(含有 10μM TOPO 和 0.05% SDS 的 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 水溶液)处理按上述程序在固相上形成的荧光性复合物(抗 SDF-1 多克隆抗体-SDF-1-生物素化抗 SDF-1 多克隆抗体-BHHCT-Eu<sup>3+</sup>标记的 BSA-SA), 使标记的 BSA-SA 结合物从固相上游离出来。用 1420 型 ARVO 多标记计数仪测定溶液中的结合物的荧光强度。此时的 SDF-1 检测灵敏度约为 100pg/ml, 不如上述固相测定那么高。

(实施例 3: 人 SDF-1 β 对 CXCR 4 的下调)

为了确认用实施例 2 中的 TR-FIA 测定 SDF-1 的测定值与标准 SDF-1 蛋白质生物活性的相关性, 用 EL-4 细胞体外测定通过与 SDF-1 结合而诱导的 SDF-1 受体 (CXCR 4) 的下调。

在人 SDF-1 β (1, 10, 20, 40, 100 和 1000ng/ml) 存在或不存在

的条件下，在补充了 10% 胎牛血清 (FCS) 的 Dulbecco 改进 Eagle's 培养基 (D'MEM) 中培养 EL-4 细胞。37°C 培养 6 小时后，用 Fc-人 SDF-1 $\alpha$  嵌合蛋白和 FITC 结合山羊 F(ab')<sub>2</sub> 抗人 IgG (Southern Biotechnology Associates, Alabama, U.S.) 对细胞表面上的 CXCR4 进行染色。用荧光细胞计数仪 (FACSCalibur, BECTON DICKINSON, California, U.S.) 进行  
5 荧光强度测定。通过计算 CXCR4 染色的平均荧光强度(MFI)减少 % 来评价 CXCR4 的下调。结果如图 1c 所示。

图 1c 显示，与人 SDF-1  $\beta$  一起培养的 EL-4 细胞中 CXCR4 的表达以用量依赖性方式下调。所得结果与以前的报道 (Hesselgesser 等(文献 13) 和 Amara 等(文献 14)) 一致性良好，即 SDF-1  $\alpha$  和  $\beta$  分别以 5~10nM 和 2.3~3.6nM 的 Kd 值与 CXCR4 结合。  
10

(实施例 4: TR-FIA 对 SDF-1 测定的特异性)

为了确认 TR-FIA 对 SDF-1 的特异性，对以下各种趋化因子进行与实施例 2 同样的 TR-FIA 测定：CC 趋化因子 (小鼠 MCP-1、人 MIP-1  $\alpha$  和  $\beta$ 、人 RANTES, 人 MDC)、CXC 趋化因子 (人 IL-8、小鼠 SDF-1  $\alpha$  和小鼠 SDF-1 $\beta$ 、人 SDF-1  $\alpha$  和人 SDF-1  $\beta$ ) 以及 CXXXC 趋化因子 (人 Fractalkine)。结果如图 1d 所示。除 SDF-1 之外其它任何趋化因子均未看到荧光强度的显著性升高。因此可以确定上述 TR-FIA 可高特异性检测 SDF-1。人和小鼠的 SDF-1  $\alpha$  和 SDF-1  $\beta$  间存在交差反应性。  
15

20 (实施例 5: 血浆样品的制备)

以下各实施例中使用的血浆样品是用 EDTA (1mg/ml 血液) 作抗凝剂，从 36 名 18~30 岁健康的志愿者 (日本人) 血液制备的。具体而言，在用 0.1M EDTA 涂层了的注射器中按每 1ml 采取血液为 7 $\mu$ l 填充含 0.5M EDTA 的 PBS。将血采集到这样的注射器中，室温保存 5 分钟，然后  
25 3000rpm 离心 10 分钟，得到血浆。-80°C 保存血浆样品，分析前立即用缓冲液 4 稀释 10 倍，除非有其它指示。测定前不要反复冻融。

(实施例 6: 用血浆样品进行的 TR-FIA)

应用 SDF-1 标准溶液和上述血浆样品 (来自 5 个个体) 进行实施例 2 中所述的 TR-FIA。与由标准溶液的测定求出的校正曲线 (图 2 左侧所示黑圆线图) 进行对比，计算出血浆样品中的 SDF-1 浓度。为了确认测定的准确性，再向各血浆样品中加入 0.4 或 0.8ng/ml 的标准 SDF-1 进行测定，算出回收率。  
30

添加标准 SDF-1 后所测定的血浆样品的荧光强度如图 2 右侧 (“TR-FIA” 栏) 所示。添加标准 SDF-1 前后血浆样品的 SDF-1 浓度及回收率示于下述的表 1 中。结果表明与对标准溶液进行测定时相同, 应用 TR-FIA, 从血浆样品中也可检测出 SDF-1 并且回收率极高。

5 (比较例: DELFIA 对 SDF-1 的检测)

如无其它特殊情况, 以下 DELFIA 的测定操作按制造者 (Amersham Pharmacia Biotech, 以下称作 “APB 公司”) 的指示进行。洗涤时全部应用 PBS/0.05% Tween 20。

10 将用 PBS 稀释到  $10\mu\text{g/ml}$  的兔抗人 SDF-1 $\beta$  抗体或山羊抗人 SDF-1 $\beta$  抗体溶液 (各  $60\mu\text{l}$ ) 吸附到透明的 maxisorp 板 (Nunc, 丹麦) 中,  $4^\circ\text{C}$  孵育 24 小时后, 洗涤 1 次。接着用  $180\mu\text{l}$  DELFIA 测定缓冲液 (APB 公司) 于室温至少处理 30 分钟, 以封闭非特异性结合。

15 洗板 3 次后, 每孔加入  $50\mu\text{l}$  用 DELFIA 测定缓冲液稀释的标准 SDF-1 或 10 倍稀释的血浆, 然后于  $4^\circ\text{C}$  至少孵育 6 小时。将板洗 3 次后, 添加  $100\mu\text{l}$  在测定缓冲液中稀释到  $20\text{ng/ml}$  的 Eu 标记链霉抗生物素蛋白 (APB 公司), 然后室温孵育 30 分钟。洗板 6 次后, 添加 DELFIA 增感溶液 (APB 公司), 从与固相结合的 Eu 标记抗体解离出  $\text{Eu}^{3+}$ 。将微量板缓慢振荡 5 分钟后, 用时间分离型荧光仪 (ARVO 1420) 进行荧光测定。

20 由标准溶液测定所得校正曲线如图 2 左侧所示 (黑方块线图)。按实施例 2 所述的计算公式算出的检测界限为  $130\text{pg/ml}$ 。应用 DELFIA 能检测出标准溶液中的 SDF-1, 但灵敏度比 TR-FIA 低。但是, 对血浆样品 (来自 4 个个体) 进行测定时, 均检测不到内源性 SDF-1。而且, 向各血浆样品中添加  $1.0\text{ng/ml}$  的标准 SDF-1 并进行测定时, 其回收率约为 20% 以下, 远低于 TR-FIA。

25 对添加标准 SDF-1 后的血浆样品进行测定的荧光强度示于图 2 的右侧 (“DELFIA” 栏)。添加标准 SDF-1 前后的血浆样品的 SDF-1 浓度和回收率示于表 1 中 (图 2 和图 1 的数据中显示的血浆样品均进行了  $55^\circ\text{C}$ 、30 分钟的预热)。

表 1  
添加到人血浆中的 SDF-1 的回收率

	添加的标准 SDF-1(ng/ml)	SDF-1 的测定值 (ng/ml)	预测的总 SDF-1 (ng/ml)	回收率 (%)
(a) TR-FIA	0	1.08	-	
	1.0	2.10	2.08	102
	0	1.53	-	
	1.0	2.48	2.53	95
	0	1.68	-	
	1.0	2.69	2.68	101
	0	1.87	-	
	1.0	2.83	2.87	96
	0	2.14	-	
	1.0	3.11	3.14	97
(b) DELFIA	0	<D.L.		
	1.0	0.20	>1.0	<20
	0	<D.L.		
	1.0	0.16	>1.0	<16
	0	<D.L.		
	1.0	0.17	>1.0	<17
	0	<D.L.		
	1.0	0.20	>1.0	<20

<D.L.: 低于检测界限 (130pg/ml) >

#### 5 (实施例 7: 抗凝剂和蛋白酶抑制剂的影响)

据报道, 抗凝剂和蛋白酶抑制剂影响人血浆样品中细胞因子的检测 (Thavasu 等 (文献 15))。为了研究 TR-FIA 对 SDF-1 的测定是否也受这些因素的影响进行了以下实验。

向血浆样品中添加乙二胺四乙酸 (EDTA) (1.0mg/ml)、肝素 (30IU/ml)、柠檬酸钠 (0.38%) 或乙二胺四乙酸 (EDTA) (1.0mg/ml) 和蛋白酶抑制剂抑肽酶 (1 $\mu$ g/ml)。应用与实施例 2 同样的 TR-FIA 测定各添加样品中的 SDF-1。结果如图 3a 所示。可以确实抗凝剂和蛋白酶

抑制剂对用 TR-FIA 进行的血浆 SDF-1 的测定有显著性影响。

(实施例 8: 血浆样品预热的影响)

为了确保应用 TR-FIA 进行 SDF-1 测定在临床应用中的安全性, 有必要将存在于血液样品中的 HIV 病毒灭活。于是研究了血浆样品的预加热对 TR-FIA 的影响。

首先, 为了试验 SDF-1 蛋白的热稳定性, 将 SDF-1 标准溶液分别置于 0℃30 分钟, 37℃30 分钟, 55℃30 分钟, 70℃30 分钟, 100℃1 分钟, 然后进行测定。观察到在 70℃30 分钟和 100℃1 分钟的条件检测量降低, 考虑是由于 SDF-1 的热变性造成。另一方面, 37℃或 55℃加热 30 分钟时, 可得到与不加热样品几乎相同的校正曲线, 不影响 SDF-1 的测量。

在以上结果的基础上, 测定前对 24 份血浆样品 (参照实施例 5) 于 55℃进行 30 分钟的预孵育或者不加热, 应用与实施例 2 同样的 TR-FIA 对 SDF-1 进行测定。(预加热在用缓冲液 4 稀释血浆样品前进行)。结果如图 3b 所示。55℃30 分钟的预加热可增大平均约 20% 的荧光强度。

该结果提示血浆样品的 SDF-1 中至少有一部分以多聚体形式存在, 和/或以与可热解离或分解等的结合因子结合的形式存在。也许在这样的多聚体和/或结合状态下, SDF-1 表位与抗体的结合受到抑制。

(实施例 9: 血浆样品稀释的影响)

有关测定血浆样品中 IL-8 和 MCP-1 的以往的研究 (Thavasu 等 (文献 15) 和 Kajikawa 等 (文献 16)) 表明过低评价了非稀释样品的测定中趋化因子的存在量。所以, 研究了血浆样品的稀释对应用 TR-FIA 测定 SDF-1 的影响。

用缓冲液 4 将 5 份不同个体的血浆样品稀释到 1:1 ~ 1:20 的各种比例, 应用与实施例 2 同样的 TR-FIA 测定 SDF-1。结果如图 3c 所示。当稀释倍数由 1 倍增加到 10 倍时, 可以看到几乎一致性的检测灵敏度的提高。另一方面, 当稀释倍率在 10 ~ 20 倍时, 检测灵敏度未增加。因此 10 倍稀释 (即 1 份血浆样品用 10 份缓冲液 4 稀释) 可被评价为最有效的条件。

(实施例 10: 血浆样品中添加血细胞时的影响)

据报道, 向全血中添加 IL-8 和 MCP-1, 这些趋化因子可被血细胞吸附 (Amara 等 (文献 14), Darbonne 等 (文献 17) 和 Neote 等 (文献 18))。

于是，研究了是否能观察到血细胞对 SDF-1 有同样的吸收。

将 250 $\mu$ l 全血在微量离心机上离心，使细胞沉淀，取 125 $\mu$ l 上清组分的血浆。按预先设定的终浓度向 125 $\mu$ l 血浆中添加 IL-8、MCP-1 或 SDF-1。然后将添加了这些趋化因子的血浆与 125 $\mu$ l 体积的细胞沉积物或 125 $\mu$ l 血浆混合，然后 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。接着，将混合了细胞沉积物的样品离心使细胞沉淀并分离。用 ELISA 对样品中的可溶性 IL-8 和 MCP-1 进行定量，用 TR-FIA 对其中的 SDF-1 进行定量。结果如图 4a ~ 图 4c 所示。

IL-8 和 MCP-1 添加量的大部分被血细胞吸收（图 4a 和 4b）。而与血细胞孵育后 SDF-1 的减少量低于 10%（图 4c）。此外，在其它实验中，将 SDF-1 直接添加到全血，孵育后分离血细胞，用 TR-FIA 进行定量时，与将 SDF-1 添加到血浆中的对照间没有显著性差异（数据未给出）。由以上可以确定 SDF-1 几乎不被血细胞吸收。

（实施例 11：血浆样品的 TR-FIA 多次测定）

对 36 份不同个体的血浆样品进行 55 $^{\circ}$ C 30 分钟的预加热（参照实施例 7）后，用与实施例 2 相同的 TR-FIA 测定 SDF-1。结果如图 5c 所示。人血浆中的 SDF-1 水平的平均值和标准偏差为 0.85 $\pm$ 0.26ng/ml。

在相同条件下，在不同日子对同一个体（3 名）来源的血浆样品重复测定 4 次，测定值的变动为 10 ~ 20% 的范围。这表明 TR-FIA 对血浆 SDF-1 测定的可信度十分高。

（实施例 12：血浆样品中 SDF-1 和 IgG 的会合）

据报道，与 IL-8 和 MCP-1 相关的，妨碍血浆样品的免疫检测的其它主要原因是与循环系统中的自身抗体结合或会合的可能性（Leonard 等（文献 1）和 Thavasu 等（文献 15））。如下所述对 SDF-1 与血浆中 IgG 的会合进行评价。

将 7 个个体来源的血浆样品不加热或加热处理（55 $^{\circ}$ C 30 分钟）后，与 Protein G-Sepharose 一起在冰上放置 30 分钟，耗竭 IgG。将样品离心，取其上清组分。应用 TR-FIA 测定该上清中的 SDF-1。与 Protein G-Sepharose 处理前的血浆样品的测定值进行对比，求出荧光强度的减少度。结果如图 6 所示。

图 6 中斜线柱和黑柱分别表示非加热样品和加热处理的样品。可以看出，与加热样品相比，未加热样品易受 Protein G-Sepharose 处理的影

响。通过耗竭非加热样品的 IgG, TR-FIA 可测定的 SDF-1 水平减少 23 ~ 37% (平均 30%)。而加热处理的样品相对应的减少度为 6 ~ 22% (平均 15%)。因此实施例 8 中显示的预加热的效果 (图 3b) 可以用以下的假说进行解释。即, 血浆样品中一部分 SDF-1 与 IgG 会合存在, 通过加热解离, 转变成 TR-FIA 可以测定的可溶性形式。

其它实验中, Protein G-Sepharose 处理后, 未观察到加到血浆样品中的标准 SDF-1 的显著性减少 (未列出数据)。因此, 否定了 SDF-1 自身被 Protein G-Sepharose 吸附的可能性, 及血浆样品中的抗 SDF-1 IgG 以外的抗体或蛋白质被 Protein G-Sepharose 吸附, 而 SDF-1 被它们吸附的可能性。

由以上结果可以理解用 TR-FIA 测定出的人血浆中 SDF-1 水平与血液中实际存在的生理性 SDF-1 的水平极其接近。

(实施例 13: GM-CSF 的 TR-FIA)

除应用抗人 GM-CSF 单克隆抗体作捕捉抗体和应用生物素化抗人 GM-CSF 单克隆抗体 (按常规方法对上述 PharMingen 人抗体进行生物素化) 外, 与实施例 2 同样将 GM-CSF 标准溶液 (50 $\mu$ l) 供给固相荧光测定, 制作标准 GM-CSF 的校正曲线。结果如图 7 所示。再用与实施例 5 同样的方法由健康日本人志愿者的血液制备血浆样品, 按实施例 9 所述, 用缓冲液 4 稀释, 并与标准溶液同样用 TR-FIA 测定 GM-CSF。结果表明, 对 GM-CSF 也可进行高灵敏度的测定, 并且得到了重现性良好的结果。

(实施例 14: 对 IL-2 的 TR-FIA)

除应用抗人 IL-2 单克隆抗体作捕捉抗体和应用生物素化抗人 IL-2 单克隆抗体 (按常规方法使上述 PharMingen 人抗体生物素化) 之外, 与实施例 2 同样, 将 IL-2 的标准溶液 (50 $\mu$ l) 供给固相荧光测定, 制作标准 IL-2 的校正曲线。结果如图 8 所示。再用与实施例 5 同样的方法由健康日本志愿者制备血浆样品, 按实施例 9 所述, 用缓冲液 4 稀释, 并与标准溶液同样通过 TR-FIA 测定 IL-2。结果表明, 对 IL-2 也可以进行高灵敏度的测定, 并且可以得到重现性良好的结果。

#### 产业上的实用性

本发明提供能极其灵敏且简便地检测体液样品中细胞因子, 尤其是包括 SDF-1 的趋化因子的时间分辨荧光免疫检测 (TR-FIA) 方法, 以及

---

用于该方法的试剂盒。该方法及试剂盒适用于作为可溶性因子存在于血液循环中的，微量即具有生物学活性并与多种病理相关的细胞因子。

## (参考文献列表)

1. Leonard, E. J.等, (1996) *METHOD* 10:150-157
2. Kropf, J. 等, (1991) *Aanl. Biochem.* 197:258-265
3. Ogata, A. 等, (1992) *J. Immunol. Methods* 148:15-22
- 5 4. Yuan, J. 等, (1997) *Anal. Biochem.* 254(2):283-287
5. Yuan, J. 等, (1998) *Anal. Chem.* 70(3):596-601
6. Tashiro, K. 等, (1993) *Science* 26:600-603
7. Bleul, C. C. 等, (1996) *Nature* 382:635-638
8. Oberlin, E. 等, (1996) *Nature* 382:829-833
- 10 9. Winkler, C. 等, (1998) *Science* 279:389-393
10. Martin, M. P. 等, (1998) *Science* 282:1907-1911
11. Zou, Y-R. 等, (1998) *Nature* 393:595-599
12. Tachibana, K. 等, (1998) *Nature* 393:591-594
13. Hesselgesser, J. 等, (1998) *J. Immunol.* 160:877-883
- 15 14. Amara, A. 等, (1997) *J. Exp. Med.*, 186:139-146
15. Thavasu, P. W. 等, (1992) *J. Immunol. Methods* 153:115-124
16. Kajikawa, O. 等, (1996) *J. Immunol. Methods* 197:19-29
17. Darbonne, W. C. 等, (1991) *J. Clin. Invest.* 88:1362-1369
18. Neote, K. (1994) *Blood* 84:44-52

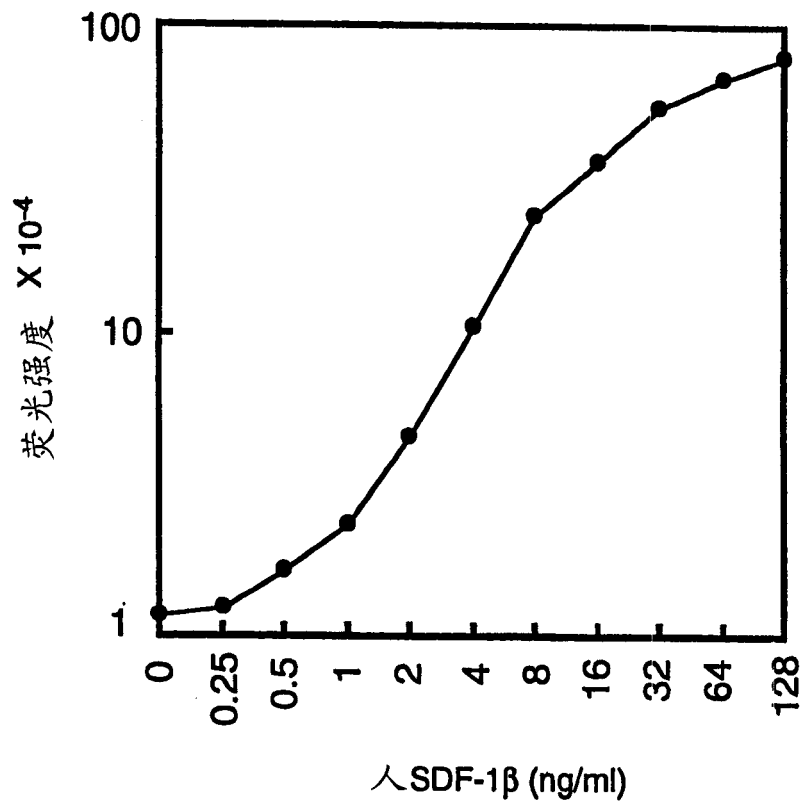


图 1a

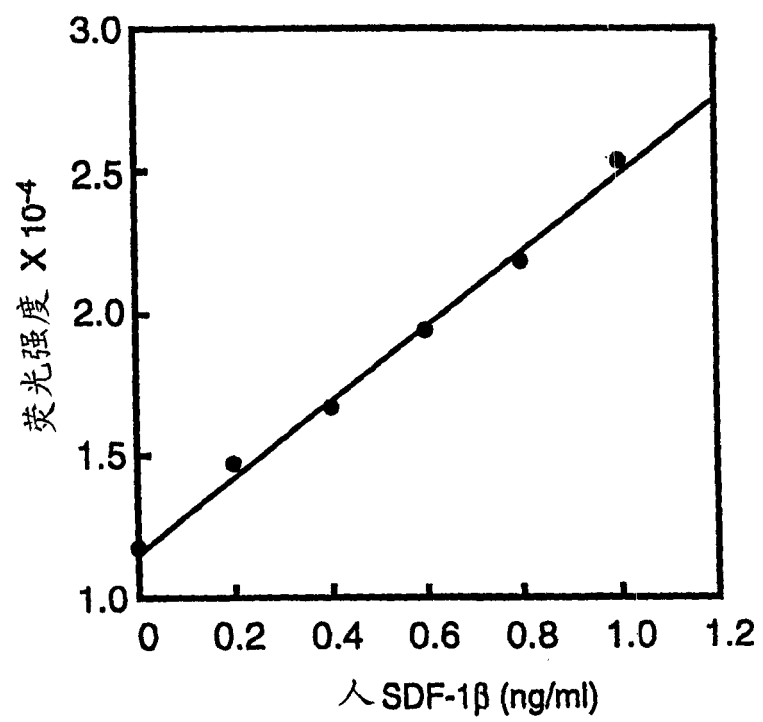


图 1b

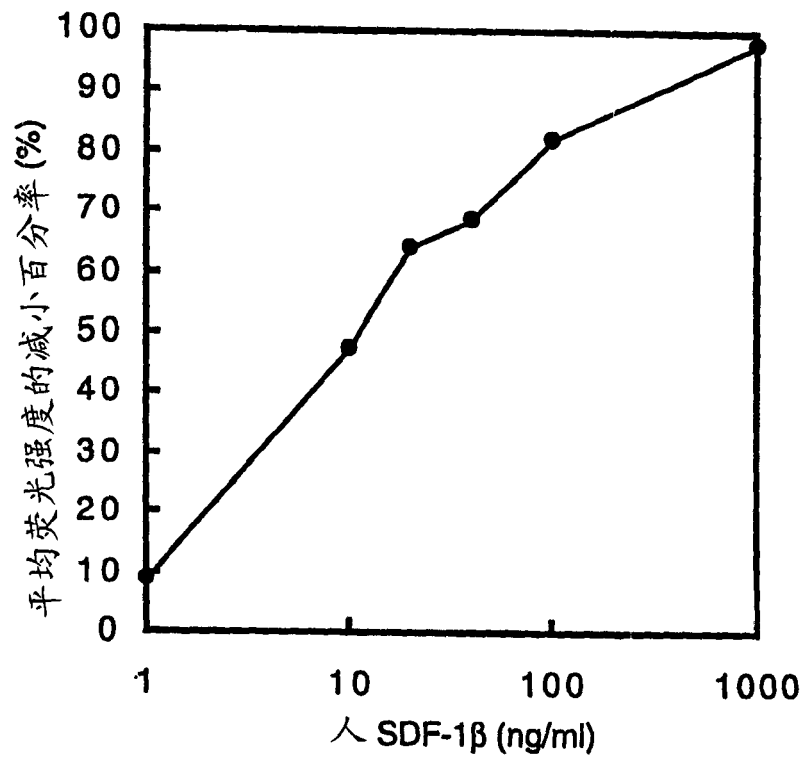


图 1c

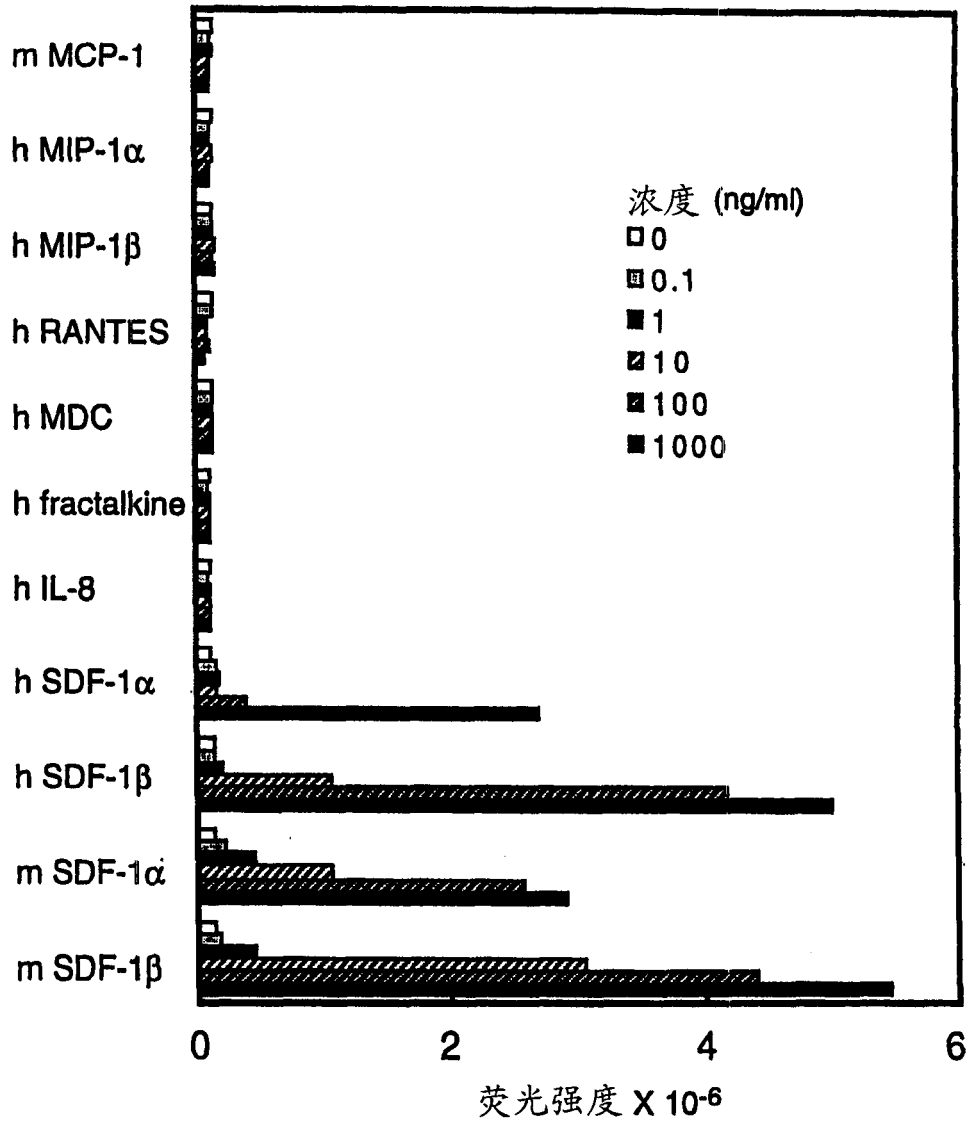


图 1d

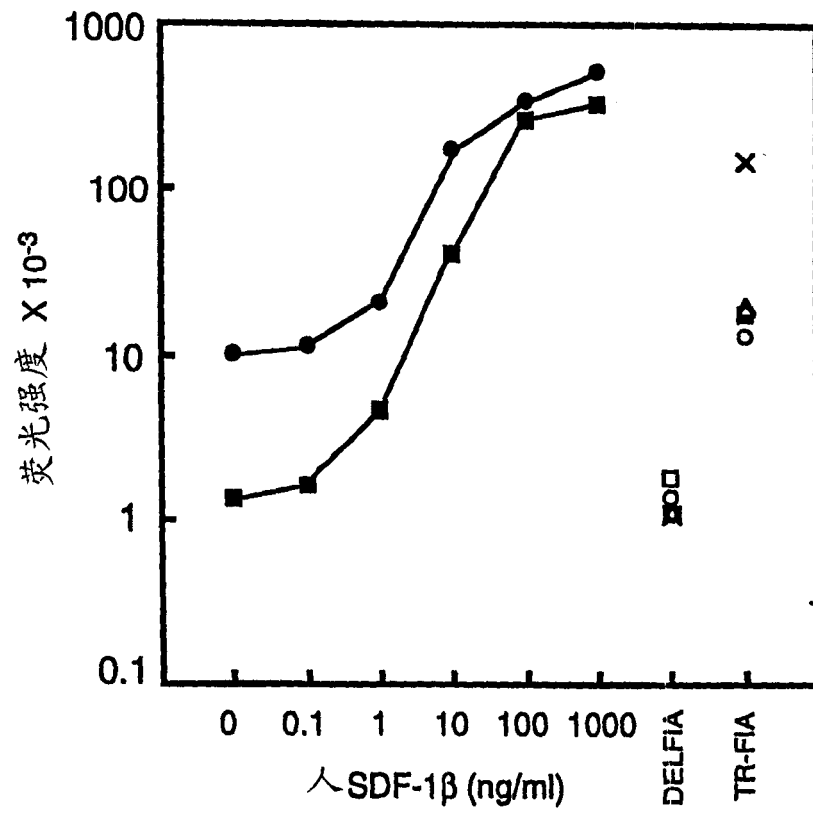


图 2

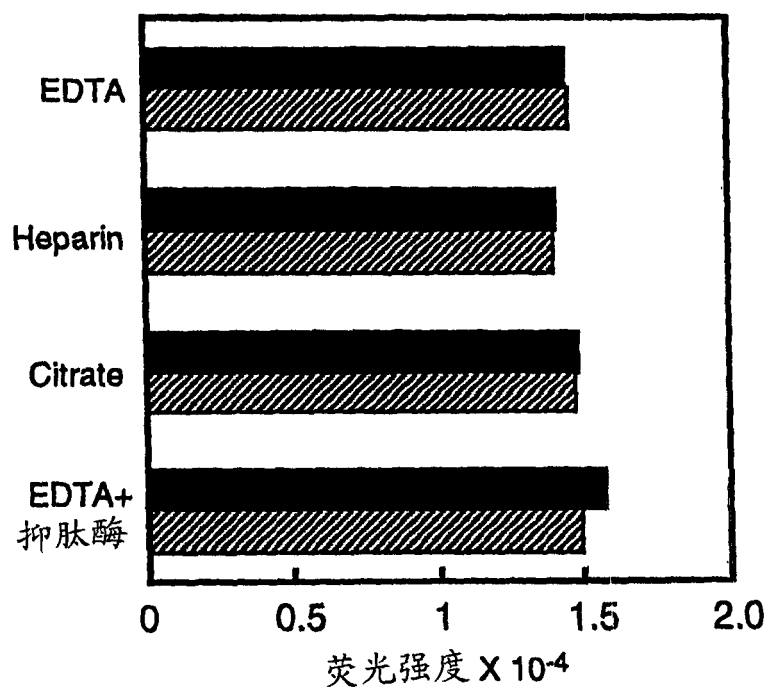


图 3a

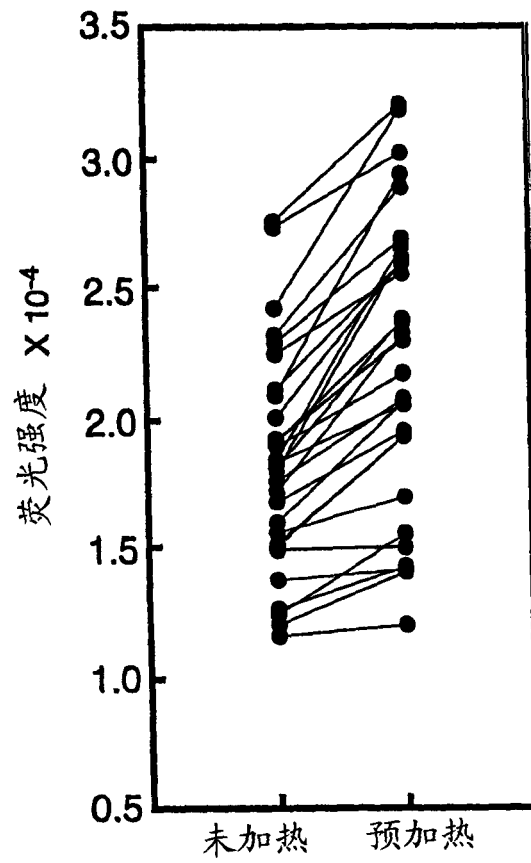


图 3b

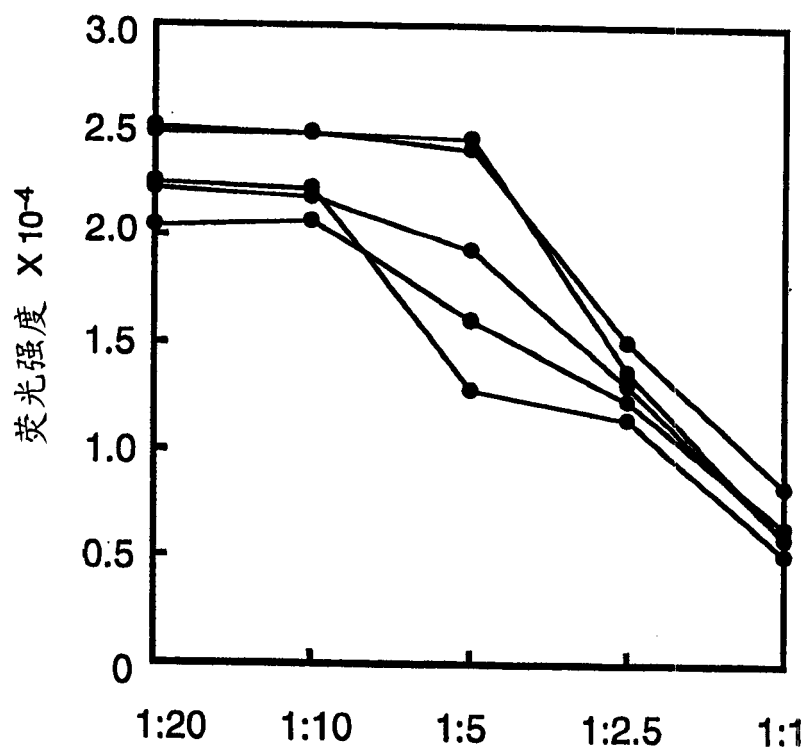


图 3c

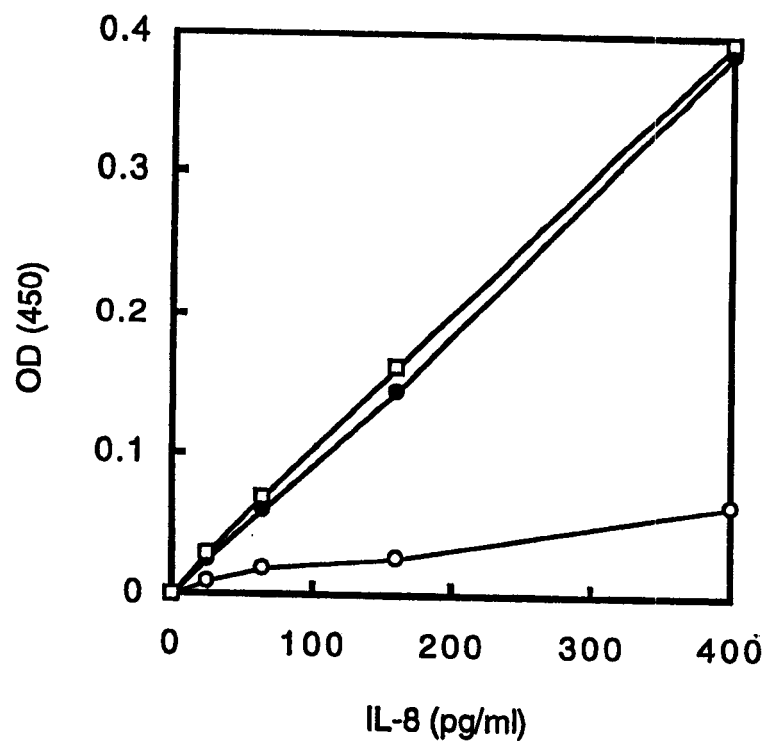


图 4a

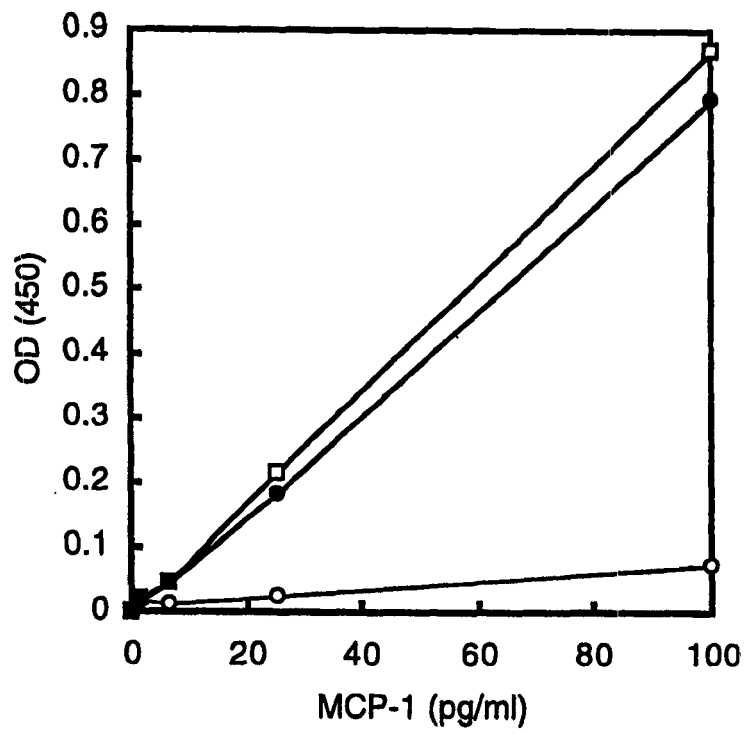


图 4b

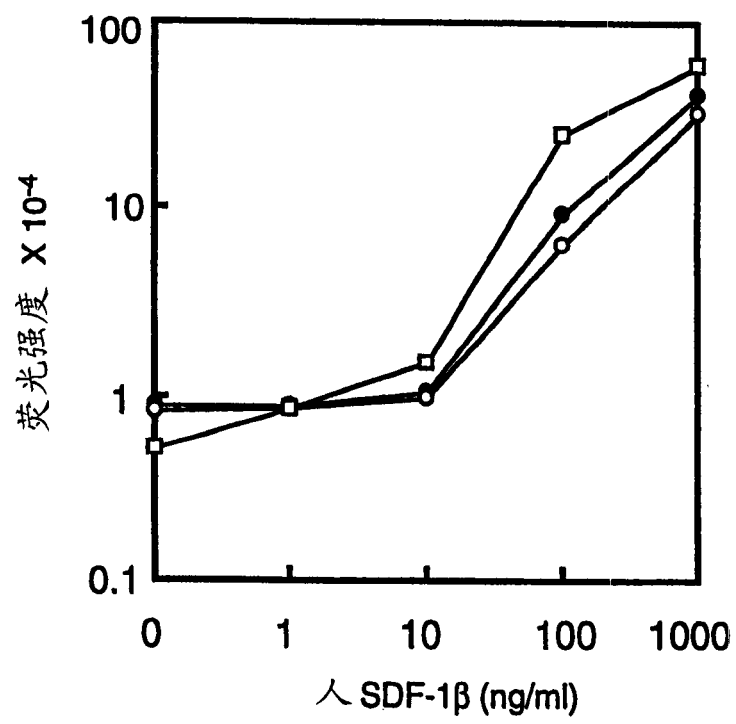


图 4c

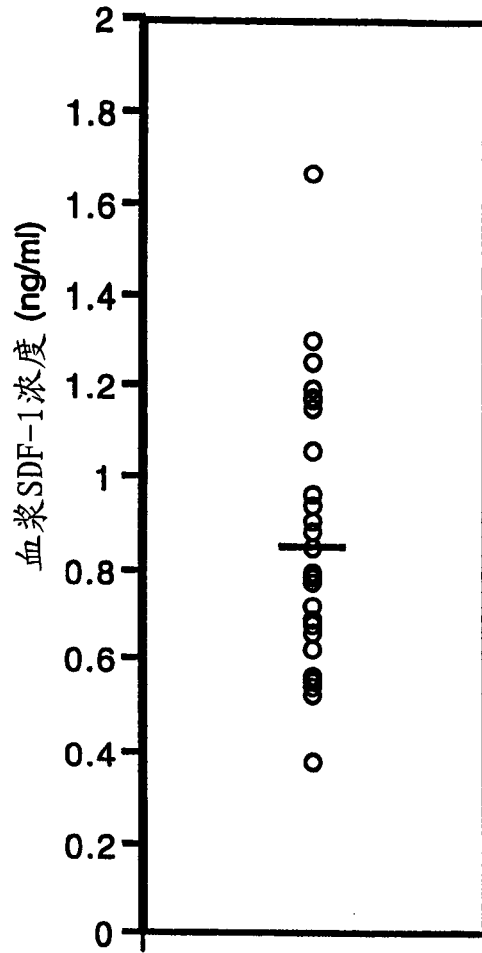


图 5

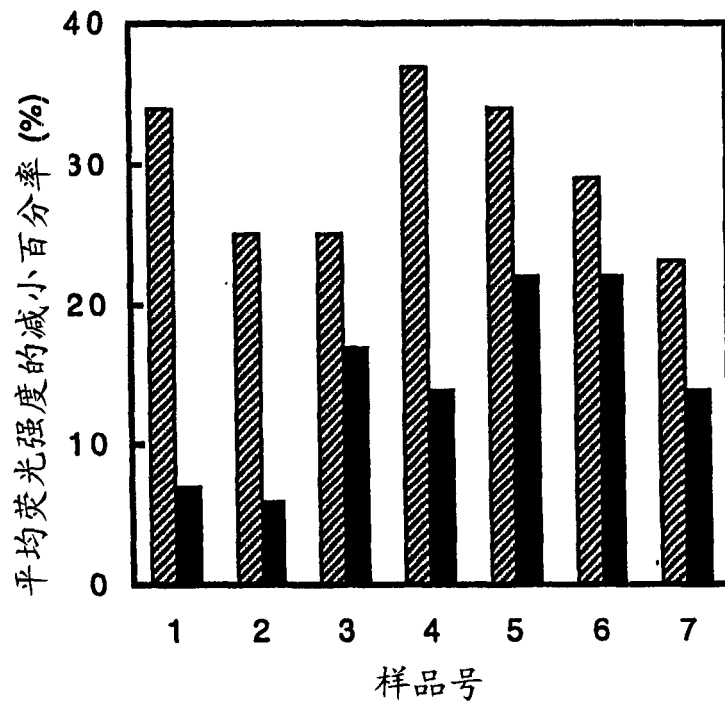


图 6

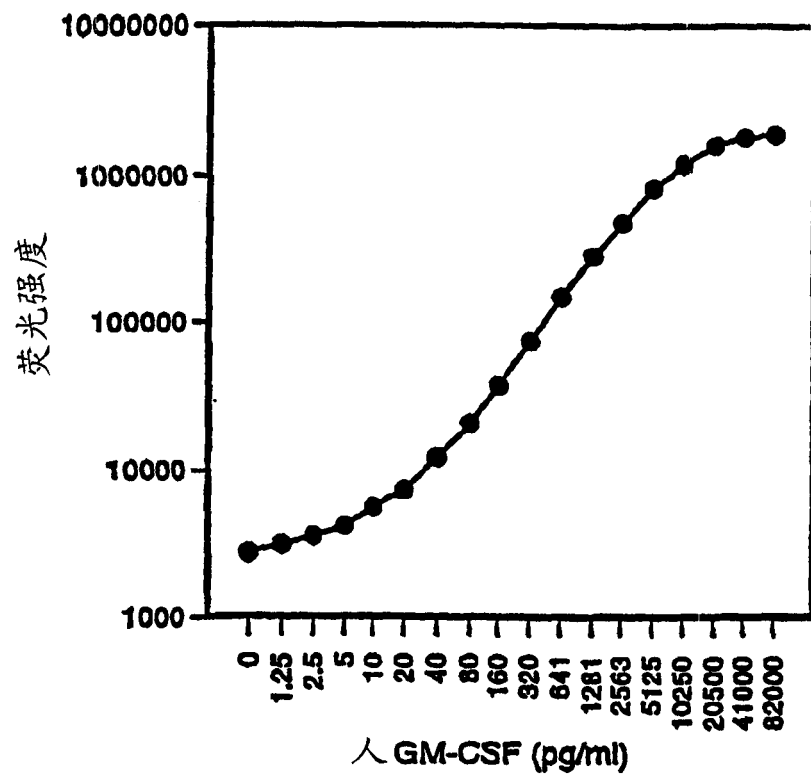


图 7

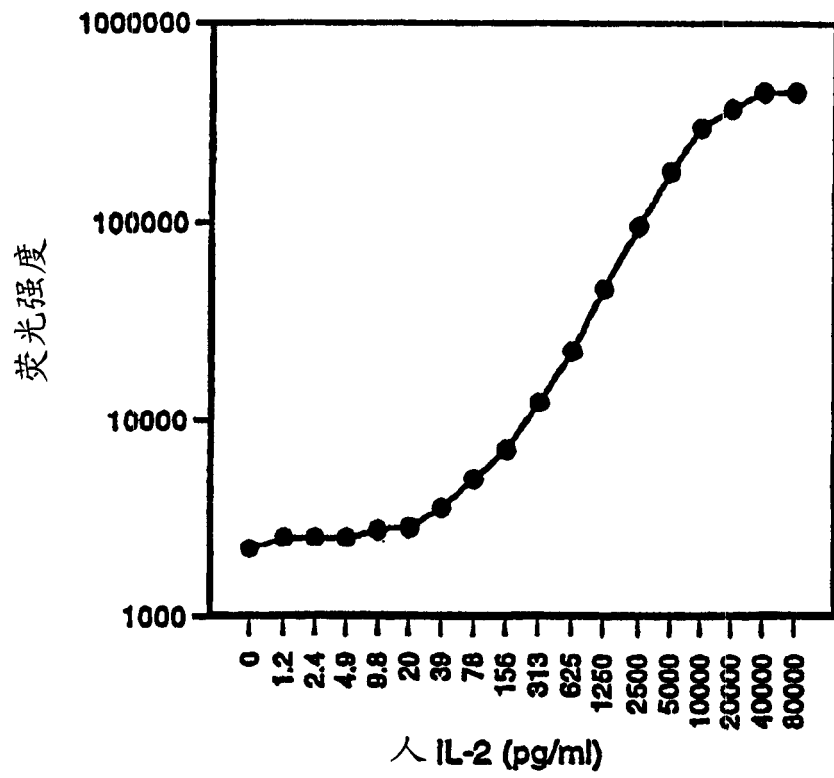


图 8

专利名称(译)	高灵敏度的免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1402834A</a>	公开(公告)日	2003-03-12
申请号	CN00816405.3	申请日	2000-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
当前申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
[标]发明人	田代启 本庶佑 池川雅哉 松本和子		
发明人	田代启 本庶佑 池川雅哉 松本和子		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/68 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	Y10S435/975 G01N2458/40 Y10S435/968 G01N33/582 Y10S435/97 G01N33/6863		
代理人(译)	曹雯 姜建成		
优先权	1999277629 1999-09-29 JP		
其他公开文献	CN1227532C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供高灵敏度检测液体样品中细胞因子的方法。该方法是时间分辨荧光免疫检测(TR - FIA)方法,包括捕捉细胞因子,在固相上形成含有与镧系金属离子络合的荧光结构部分的复合物的步骤,以及测定荧光结构部分的荧光的步骤。该复合物由依次结合(a)具有固相结合部分和能与细胞因子结合的区域的第一抗体,(b)细胞因子,(c)具有能与细胞因子结合的区域和生物素结合部分的第二抗体,(d)具有链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白、能与镧系金属离子络合的荧光结构部分的结合物,以及(e)镧系金属离子而形成。荧光结构部分可用通式(I)表示。

