



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108603880 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201780010831.9

(22)申请日 2017.02.06

(30)优先权数据

2016-021610 2016.02.08 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/004271 2017.02.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/138497 JA 2017.08.17

(71)申请人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

(72)发明人 渡边敏弘

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

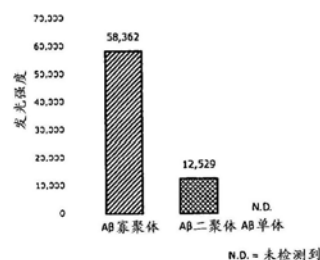
权利要求书3页 说明书16页 附图4页

(54)发明名称

受试物质的检测方法及受试物质的检测用试剂盒

(57)摘要

本发明提供受试物质的检测方法包括：使受试物质、标记抗体、捕获抗体、第1固相接触，在第1固相上形成免疫复合物的工序，通过解离捕获抗体和第1固相的结合来使免疫复合物游离，使与捕获抗体结合的第2固相和免疫复合物接触，向第2固相上转移免疫复合物的工序和测定第2固相上的复合物中所含的标记而检测受试物质的工序。用此方法检测的受试物质是多聚体的抗原、特别是淀粉样蛋白 β 或 τ 蛋白质。



1. 受试物质的检测方法,其包括:

使受试物质和与上述受试物质结合的标记抗体、与上述受试物质结合的第1捕获抗体、与上述受试物质结合的第2捕获抗体、及与上述第1捕获抗体结合的第1固相接触,在上述第1固相上形成含上述受试物质、上述标记抗体、上述第1捕获抗体及上述第2捕获抗体的复合物的工序,

通过解离上述第1捕获抗体和上述第1固相的结合来使上述复合物游离,使与上述第2捕获抗体结合的第2固相和上述复合物接触,向上述第2固相上转移上述复合物的工序,及

对上述第2固相上的复合物中所含的标记进行测定,检测上述受试物质的工序,

上述受试物质是多聚体,

上述标记抗体的表位、上述第1捕获抗体的表位及上述第2捕获抗体表位重复。

2. 权利要求1所述的方法,其中上述受试物质含多肽。

3. 权利要求1或2所述的方法,其中上述受试物质是三聚体以上的多聚体。

4. 权利要求1~3之任一项所述的方法,其中上述受试物质是淀粉样蛋白 β 或 τ 蛋白质。

5. 权利要求1~4之任一项所述的方法,其中

上述第1捕获抗体含第1结合物质,上述第1固相含与上述第1结合物质特异性地结合的第1结合偶体,

在上述形成工序中,由上述第1结合偶体和上述第1结合物质的特异性结合,上述复合物结合于上述第1固相上,

上述第2捕获抗体含第2结合物质,上述第2固相含与上述第2结合物质特异性地结合的第2结合偶体,

在上述转移工序中,由上述第2结合偶体和上述第2结合物质的特异性结合,游离的上述复合物与上述第2固相结合。

6. 在权利要求1~5之任一项所述的方法中使用,含上述标记抗体、上述第1捕获抗体、及上述第2捕获抗体的,受试物质的检测试剂盒。

7. 受试物质的检测方法,其包括:

使受试物质、与上述受试物质结合的标记抗体、与上述受试物质结合的捕获抗体、与上述捕获抗体结合的第1固相接触,在上述第1固相上形成含上述受试物质、上述标记抗体、及上述捕获抗体的复合物的工序,

通过解离上述捕获抗体和上述第1固相的结合来使上述复合物游离,使与上述捕获抗体结合的第2固相和上述复合物接触,向上述第2固相上转移上述复合物的工序,

对上述第2固相上的复合物中所含的标记进行测定,检测上述受试物质的工序,

上述受试物质是多聚体,

上述标记抗体的表位及上述捕获抗体的表位重复。

8. 权利要求7所述的方法,其中上述受试物质含多肽。

9. 权利要求7或8所述的方法,其中上述受试物质是二聚体以上的多聚体。

10. 权利要求7~9之任一项所述的方法,其中上述受试物质是淀粉样蛋白 β 或 τ 蛋白质。

11. 权利要求7~10之任一项所述的方法,其中

上述捕获抗体含第1结合物质及第2结合物质,

上述第1固相含与上述第1结合物质特异性地结合的第1结合偶体,

上述第2固相含与上述第2结合物质特异性地结合的第2结合偶体，

在上述形成工序中，由上述第1结合偶体和上述第1结合物质的特异性结合，上述复合物结合于上述第1固相上，

在上述转移工序中，由上述第2结合偶体和上述第2结合物质的特异性结合，游离的上述复合物与上述第2固相结合。

12. 受试物质的检测方法，其包括：

使受试物质、与上述受试物质结合的标记抗体、与上述受试物质结合的捕获抗体、及与上述捕获抗体结合的第1固相接触，使含上述受试物质、上述标记抗体及上述捕获抗体的复合物在上述第1固相上形成的工序，

通过解离上述捕获抗体和上述第1固相的结合来使上述第1固相上的复合物游离，转移到与上述捕获抗体结合的第2固相的工序，及

对上述第2固相上的复合物中所含的标记进行测定，检测上述受试物质的工序，

上述受试物质是淀粉样蛋白 β 或 τ 蛋白质。

13. 权利要求12所述的方法，其中

上述捕获抗体含第1结合物质及第2结合物质，

上述第1固相含与上述第1结合物质特异性地结合的第1结合偶体，

上述第2固相含与上述第2结合物质特异性地结合的第2结合偶体，

在上述形成工序中，由上述第1结合偶体和上述第1结合物质的特异性结合，上述复合物结合于上述第1固相上，

在上述转移工序中，由上述第2结合偶体和上述第2结合物质的特异性结合，游离的上述复合物与上述第2固相结合。

14. 权利要求1~13之任一项所述的方法，其中

上述第1固相是粒子，

在上述形成工序之后、上述转移工序之前，包括进行未反应成分的除去及上述第1固相的回收的工序。

15. 权利要求1~14之任一项所述的方法，其中在上述转移工序中，由游离剂使上述第1固相上的复合物从上述第1固相游离。

16. 权利要求1~15之任一项所述的方法，其中在上述转移工序之后、上述检测工序之前，包括进行未反应成分的除去及上述第2固相的回收的工序。

17. 权利要求5、11或13记载的方法，其中

上述第1结合偶体是抗半抗原抗体，

上述第1结合物质是半抗原，

上述第2结合偶体是亲和素类，

上述第2结合物质是生物素类。

18. 权利要求17所述的方法，其中

上述半抗原是二硝基苯基，

在上述转移工序中，使用二硝基苯基氨基酸而从上述第1固相游离上述第1固相上的复合物。

19. 权利要求1~18之任一项所述的方法，其中上述标记是酶或荧光物质。

20. 权利要求1~19之任一项所述的方法,其中
上述标记是 β 半乳糖苷酶或碱性磷酸酶,
在上述测定工序中,使上述酶的底物和上述酶反应,对从由上述酶反应生成的反应产物发生的标记进行测定。
21. 权利要求1~19之任一项所述的方法,其中
上述标记是荧光物质,
在上述测定工序中,向上述第2固相上的复合物照射激发光,对从上述复合物的标记发生的荧光进行测定。
22. 受试物质的检测试剂盒,其
在权利要求7~21所述的方法中使用,且
含上述标记抗体及上述捕获抗体。
23. 权利要求6或22所述的试剂盒,其中还含上述第1固相。
24. 权利要求6、22或23所述的试剂盒,其中还含上述第2固相。

受试物质的检测方法及受试物质的检测用试剂盒

【技术领域】

[0001] 本发明涉及受试物质的检测方法及受试物质的检测用试剂盒。

【背景技术】

[0002] 作为免疫学测定法广泛使用的夹心免疫测定是使标记抗体和捕获抗体与试样中的抗原结合,基于标记检测抗原的方法。在夹心免疫测定中,由于如果标记抗体的表位和捕获抗体的表位重复,则因立体障碍而仅某个与抗原结合而检测变得无法进行,通常使用表位不同的2种抗体。但是,当抗原是多聚体时,抗原上会存在多个相同的表位。当以表位重复的2种抗体作为标记抗体及捕获抗体使用时,会检测不到单体,而检测到多聚体。

[0003] 例如,在专利文献1或非专利文献1中记载了使用检测抗体和捕获抗体的夹心免疫测定。在这些文献中,由于检测抗体的表位和捕获抗体的表位相同或重叠,可检测淀粉样蛋白 β 的多聚体。在非专利文献2~4中,记载了使用检测抗体和2种捕获抗体的夹心免疫测定。在这些文献中,由于检测抗体的表位和2种捕获抗体的表位全部相同或重叠,可检测淀粉样蛋白 β 的多聚体。

[0004] 【现有技术文献】

[0005] 【专利文献】

[0006] 专利文献1:美国专利申请公开第2010/021943号说明书

[0007] 【非专利文献】

[0008] 非专利文献1:Savage, et al., J. Neuroscience 2014, 34 (8) :2884-97

[0009] 非专利文献2:LeVine III, Anal. Biochem. 335 (2004) 81-90

[0010] 非专利文献3:Kamali-Moghaddam, et al., BMC Neuroscience 2010, 11:124

[0011] 非专利文献4:Wang-Dietrich, et al., J. Alzheimer's Disease 34 (2013) 985-94

[0012] 【发明的概要】

[0013] 【发明要解决的课题】

[0014] 本发明的目的是提供对抗原免疫学地进行测定的新方法。

[0015] 【用于解决课题的手段】

[0016] 本发明提供受试物质的检测方法。此方法包括:使受试物质和与受试物质结合的标记抗体、与物质结合的第1捕获抗体、与受试物质结合的第2捕获抗体、及与第1捕获抗体结合的第1固相接触,在第1固相上形成含受试物质、标记抗体、第1捕获抗体及第2捕获抗体的复合物的工序,通过解离第1捕获抗体和第1固相的结合而使复合物游离,使与第2捕获抗体结合的第2固相和复合物接触,向第2固相上转移复合物的工序,对第2固相上的复合物中所含的标记进行测定,检测物质的工序。在此方法中,受试物质是多聚体,标记抗体的表位、第1捕获抗体的表位及第2捕获抗体表位重复。

[0017] 另外,本发明提供不同的实施方式的受试物质的检测方法。此方法包括:使受试物质、与受试物质结合的标记抗体、与受试物质结合的捕获抗体、与捕获抗体结合的第1固相接触,在第1固相上形成含受试物质、标记抗体、及捕获抗体的复合物的工序,通过解离捕获

抗体和上述第1固相的结合而使复合物游离,使与捕获抗体结合的第2固相和复合物接触,向第2固相上转移复合物的工序,对第2固相上的复合物中所含的标记进行测定,检测受试物质的工序。在此方法中,受试物质是多聚体,标记抗体的表位及捕获抗体的表位重复。

[0018] 另外,本发明提供不同的实施方式的受试物质的检测方法。此方法包括:使受试物质、与受试物质结合的标记抗体、与受试物质结合的捕获抗体、及与捕获抗体结合的第1固相接触,使含受试物质、标记抗体及捕获抗体的复合物在第1固相上形成的工序,通过解离捕获抗体和第1固相的结合而使第1固相上的复合物游离,转移到与捕获抗体结合的第2固相的工序,对第2固相上的复合物中所含的标记进行测定,检测受试物质的工序。在此方法中,受试物质是淀粉样蛋白 β 或 τ 蛋白质。

[0019] 【发明的效果】

[0020] 根据本发明,提供免疫学地测定抗原的新方法。

【附图说明】

[0021] 【图1】显示第1实施方式的测定机理。

[0022] 【图2】显示第2实施方式的测定机理。

[0023] 【图3】显示第3实施方式的测定机理。

[0024] 【图4】显示试剂盒的一例。

[0025] 【图5】显示试剂盒的一例。

[0026] 【图6】是显示实施例1及比较例1的结果的坐标图。

[0027] 【图7】是显示实施例2的结果的坐标图。

[0028] 【图8】是显示实施例3的结果的坐标图。

[0029] 【图9】是显示实施例4的结果的坐标图。

[0030] 【图10】是显示实施例5的结果的坐标图。

【具体实施方式】

[0031] 在作为本发明的一实施方式的受试物质的检测方法中,由包括后述的各工序的免疫复合物转移法(以下,也称为“ICT-EIA”)检测受试物质。

[0032] 以下,对于本发明的实施方式进行说明。

[0033] [第1实施方式]

[0034] 在本实施方式中,作为受试物质检测到多聚体。“多聚体”也称为聚合物,多个单体分子物理学—化学地聚合或凝集而形成。作为单体分子,例示多肽、核酸、糖链等。作为多肽的多聚体,具体而言,例示淀粉样蛋白 β 单体聚合的淀粉样蛋白 β 寡聚体、 τ 蛋白质聚合的 τ 寡聚体等。除此之外,例示血清-淀粉样-A-蛋白质-凝集体、IgG-轻链-凝集体、ApoAI-凝集体、ApoAII-凝集体、ATTR-凝集体、DISC1-凝集体、FUS-凝集体、IAPP-凝集体、SOD1-凝集体、 α -突触核蛋白-凝集体、TDP-43-凝集体、Huntingtin-凝集体、溶菌酶-凝集体等。“多聚体”含多个单体分子即可,也可含此外的分子。“多聚体”无单体分子彼此必然由共价键等牢固地结合的必要,也包括由更缓和的结合凝集而集合的凝集体。

[0035] 淀粉样蛋白 β 是通常由40个左右的氨基酸构成的多肽,有凝集而形成不溶性的淀粉样纤维的性质。 τ 蛋白质也称为“ τ ”,是分子量约5万的蛋白质,有结合到细胞内的微小管

而使细胞骨架稳定化等的功能。在人中， τ 蛋白质因外显子2、外显子3及外显子10的选择性剪接而存在6种同种型。在本说明书中，“ τ 蛋白质”或“ τ ”的词语只要是不特别言及，就还含任何的同种型。

[0036] 受试物质含在生物来源的试样中。作为试样，例示从生物体或死体采集的试样、培养细胞等。具体而言，例示脑组织、血液（全血）、血浆、血清、脑脊髓液等。生物种不特别限定，可从人或人以外的哺乳动物采集。

[0037] 【复合物的形成工序】

[0038] 在本实施方式的检测方法中，进行使受试物质和与受试物质结合的标记抗体、与受试物质结合的第1捕获抗体、与受试物质结合的第2捕获抗体、及与第1捕获抗体结合的第1固相接触，在上述第1固相上形成含受试物质、标记抗体、第1捕获抗体及第2捕获抗体的复合物的工序。在本说明书中，“抗体”也包括Fab、F(ab')₂等的抗原结合性抗体片段或其衍生物。形成工序通常在溶液中进行。

[0039] 在本实施方式中，标记抗体的表位、第1捕获抗体的表位及第2捕获抗体的表位重复。“表位重复”是指这些抗体的表位相同或部分一致。通过表位相同或部分一致，对于单体分子的表位而结合了仅1个抗体，此外的抗体因立体障碍抑制结合。在免疫学测定法中，通过使用表位重复的多种抗体而检测到含表位多个多聚体。特别是，由于在本实施方式中使用3种抗体，单体分子的检测及含2分子单体的多聚体（二聚体）的检测被抑制，适宜地检测到含3分子以上单体的多聚体。

[0040] 标记抗体只要是可与受试物质特异性地结合，并且被免疫学方法中惯用的公知的标记物质标记的抗体，就不特别限定。这样的标记抗体可通过由使用适当的交联剂或市售的标记试剂盒等的公知的方法，使抗体和标记物质结合或连接来制作。

[0041] 标记物质只要是可发能测定的信号的物质，就不特别限定，例如，可举出酶、荧光物质、放射性同位素等。作为酶，可举出碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、酪氨酸酶、酸性磷酸酶、荧光素酶等。作为荧光物质，可举出异硫氰酸荧光素（FITC）等的荧光染料、绿色荧光蛋白质（GFP）等的荧光蛋白质等。作为放射性同位素，可举出¹²⁵I、¹⁴C、³²P等。在它们之中，作为标记物质，也特别优选酶。

[0042] 第1固相可从免疫学方法中惯用的公知的固相选择。作为这样的固相的材料，例如，可举出乳胶、橡胶、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、聚氯乙烯、聚醋酸乙烯基、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、苯乙烯-甲基丙烯酸酯共聚物、聚缩水甘油基甲基丙烯酸酯、丙烯醛-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物、聚偏二氟乙烯（PVDF）、硅酮、琼脂糖、明胶、红细胞、硅胶、玻璃、无活性氧化铝、磁性体等。另外，也可将这些中的1种或2种以上组合。作为固相的形状，例如，可举出微滴定板、试管、粒子等。粒子也可有磁性。在磁性粒子是现有技术中公知的，作为基材，可举出含Fe₂O₃及/或Fe₃O₄、钴、镍、千枚岩、磁铁矿等的粒子。

[0043] 通过复合物中的第1捕获抗体与第1固相结合，在第1固相上固定复合物。该第1捕获抗体和第1固相的结合样式只要是能解离的结合，就不特别限定，例如，可举出物理吸附、离子键等。另外，也可使用介于第1捕获抗体和第1固相之间的物质而使两者结合。作为这样的物质，优选互相特异性地结合，并且能解离的2个物质的组合（将2种物质各自称为“结合物质”及“结合偶体”）。例如，通过使结合物质与第1捕获抗体结合，使该结合偶体与第1固相结合，可利用结合物质和结合偶体的亲和性而使第1捕获抗体和第1固相结合。与结合物质

结合偶体的组合是在现有技术中公知的,例如,可举出抗原(除受试物质之外)及其抗体、配体及其受体、寡核苷酸及其互补链、生物素类(含生物素、脱硫生物素等的生物素类似物)和亲和素类(含亲和素、链霉亲和素等的亲和素类似物)、镍和组氨酸标签、谷胱甘肽和谷胱甘肽-S-转移酶的组合。再者,作为抗原及其抗体的组合,优选半抗原和抗半抗原抗体、及,生物素(或者脱硫生物素)和抗生物素抗体(另外抗脱硫生物素抗体)。另外,作为半抗原和抗半抗原抗体的组合,特别优选2,4-二硝基苯酚(DNP)和抗DNP抗体。

[0044] 在上述的组合中,以哪一方作为结合物质,以哪一方作为结合偶体不特别限定。例如,在半抗原和抗半抗原抗体的组合的情况下,可以半抗原作为结合物质,以抗半抗原抗体作为结合偶体使用,也可以抗半抗原抗体作为结合物质,以半抗原作为结合偶体使用。由于结合物质与第1捕获抗体结合,优选以半抗原作为结合物质,以抗半抗原抗体作为结合偶体使用。使结合物质或结合偶体与抗体及第1固相结合的方法是在现有技术中公知的。例如,当使第1捕获抗体和生物素结合时,已知使用与该抗体中的氨基或巯基反应的交联剂(例如,马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺等)的方法。另外,作为使结合偶体和第1固相结合的方法,已知物理的吸附法、共价键法、离子键法等。

[0045] 在形成工序中,受试物质、上述的标记抗体、第1捕获抗体和第2捕获抗体由抗原抗体反应结合,形成了含“标记抗体-受试物质-第1捕获抗体及第2捕获抗体”的夹心复合物。进而,该复合物中所含的第1捕获抗体被第1固相捕获。

[0046] 标记抗体、第1捕获抗体、第2捕获抗体及第1固相的添加量不特别限定,通常比预计的受试物质质量过量地添加到反应系统中。标记抗体、第1捕获抗体、第2捕获抗体、第1固相及含受试物质的试样的接触顺序不特别限定。优选为,使标记抗体、第1捕获抗体、第2捕获抗体及受试物质接触而形成复合物之后,使第1固相接触。或者,使第1捕获抗体和第1固相最开始接触。

[0047] 在形成工序中的反应温度及反应时间不特别限定,通常在20~45℃的温度下静置15~30分钟,或者也可稳定搅拌。

[0048] 在形成工序之后,优选进行回收第1固相的工序。在反应系统中,使上述的复合物形成的第1固相之外,存在预处理液的构成成分、试样中所含的混杂物、剩余的抗体等的未反应的成分。其中,“未反应的成分”是结合于第1固相上的复合物以外的成分,是不与第1固相结合的自由成分。例如仅含标记抗体及第1捕获抗体的复合物是未反应的成分。回收工序一般称为B/F分离,该第1固相从未反应的成分分离而回收。从而,由此回收工序,可除去给后述的测定工序带来不良影响的未反应成分。在回收工序中,无完全地除去未反应成分的必要,只要是不给测定带来不良影响的程度,就也可残留。

[0049] 回收试样中的第1固相的方法本身是在现有技术中公知的,可对应于第1固相的种类适宜确定。例如,当使用磁性粒子时,可由磁分离回收试样中的第1固相。具体而言,通过使磁铁接近放入了在形成工序中得到的试样的容器的壁面而使试样中的磁性粒子在容器的壁面固定,吸除液相,可回收磁性粒子。另外,使用明胶粒子或乳胶粒子时,由离心分离使该粒子沉淀之后,可通过吸除液相回收。

[0050] 回收工序可还含清洗回收的第1固相的工序。第1固相的清洗,例如,可通过向回收的第1固相添加清洗液之后,从该第1固相除去清洗液来进行。作为清洗液,优选不损害在第1固相上形成的复合物的缓冲液。作为这样的清洗液,特别优选含表面活性剂的缓冲液,例

如,可举出TBS-T(含有0.05%Tween20的Tris缓冲生理盐水)及PBST(含有0.05%Tween20的磷酸缓冲生理盐水)等。另外,也可使用HISCL清洗液(Sysmex株式会社制)等的市售的清洗液。可由清洗工序除去非特异性地吸附到第1固相或复合物的成分。

[0051] 【转移工序】

[0052] 接下来,进行使第1固相上的复合物游离而转移到与该第1固相不同的第2固相的工序。游离通常在溶液中进行。其中,使固相上的复合物游离的方法本身是在现有技术中公知的。例如,可举出使用可使形成工序中得到的复合物中的第1捕获抗体和第1固相的结合解离的物质(以下,称为“游离剂”)的方法。游离剂是在现有技术中公知的,可对应于第1捕获抗体和第1固相的结合样式适宜选择。例如,当复合物中的第1捕获抗体和第1固相由物理吸附结合时,通过作为游离剂使用含表面活性剂的溶液,可使该复合物游离。另外,离子键的情况可通过使用含离子的溶液而使该复合物游离。

[0053] 在第1捕获抗体和第1固相利用结合物质和结合偶体的亲和性结合时,也可通过使用使结合物质和结合偶体的结合解离的游离剂来使复合物游离。这样的游离剂也在现有技术中公知,可对应于结合物质和结合偶体的组合适宜选择。例如,在半抗原和抗半抗原抗体的结合时,作为游离剂,可使用该半抗原或其衍生物。另外,在生物素(或者脱硫生物素)和亲和素(或者链霉亲和素)的结合时,作为游离剂,可使用生物素。

[0054] 使用游离剂而使复合物游离时,处理温度及处理时间可根据游离剂的种类适宜设定。通常在20~45℃的温度下静置3~8分钟,或者也可稳定搅拌。

[0055] 在转移工序中,通过使如上所述从第1固相游离的复合物与和第1固相不同的第2固相接触而使结合,向该第2固相转移该复合物。其中,在本说明书中,“与第1固相不同的第2固相”是指与在上述的形成工序中添加之时起存在的第1固相不同的第2固相(以下,也简称为“第2固相”)。即不是指,在此转移工序中,游离的复合物再结合于形成工序中添加之时起存在的第1固相。在本实施方式中,回收从第1固相游离的复合物而与新准备的第2固相接触。例如,当作为第1固相使用粒子时,从第1固相游离复合物之后,与上述的回收工序同样地由磁力或离心分离等使该第1固相固定在容器的壁面或底部。进而,可回收含该复合物的液相,使此液相与上述的第2固相接触。复合物和第2固相的接触通常在溶液中进行。第2固相的材料及形状与上述的第1固相中所述的同样。第1固相和第2固相的材料及形状可与第1固相不同,也可相同。

[0056] 在本实施方式中,通过游离的复合物中所含的第2捕获抗体与第2固相结合,复合物固定在第2固相。第2固相和复合物的结合样式不特别限定,优选使用介于复合物中的第2捕获抗体和第2固相之间的物质而使两者结合。作为这样的物质,可举出上述的结合物质及结合偶体的组合。例如,以结合物质作为“与第2固相的结合部位”而预先与第2捕获抗体结合,通过使结合偶体与第2固相结合,可利用结合物质和结合偶体的亲和性而使复合物中的第2捕获抗体和第2固相结合。作为结合物质和结合偶体的组合,优选生物素类和亲和素类。再者,用于第2捕获抗体和第2固相的结合的结合物质和结合偶体的组合优选与用于该第1捕获抗体和第1固相的结合的结合物质和结合偶体的组合不同。例如,通过使用结合DNP的第1捕获抗体,固定抗DNP抗体的第1固相,结合生物素的第2捕获抗体和固定链霉亲和素的第2固相。

[0057] 用于向第2固相转移复合物的处理温度及处理时间不特别限定,通常在20~45℃

的温度下静置1~30分钟,或者也可稳定搅拌。特别是,当第2固相的形状是粒子时,静置1~5分钟,或者也可稳定搅拌。

[0058] 优选在转移工序之后,在测定工序之前进行回收第2固相的工序。第2固相的回收工序可由与第1固相的回收工序同样的方法进行。

[0059] 【测定工序】

[0060] 在测定工序中,测定到第2固相上的复合物中所含的标记。其中,对标记进行测定的方法本身是在现有技术中公知的。在本发明的实施方式中,可选择对应于来源于上述的标记物质的信号的种类的适合的测定方法。例如,当该标记物质是酶时,可通过使用公知的装置测定通过使对于该酶的底物反应而发生的光、色等的信号进行。作为这样的测定装置,可举出分光光度计、发光计等。

[0061] 酶的底物可对应于酶的种类而从公知的底物适宜选择。例如,当作为酶使用碱性磷酸酶时,作为底物,可举出CDP-Star (注册商标) (4-氯-3-(甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]-4-基)苯基磷酸2钠)、CSPD (注册商标) (3-(4-甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]-4-基)苯基磷酸2钠)等的化学发光底物;p-硝基苯基磷酸酯、5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸(BCIP)、4-硝基蓝四唑鎓氯化物(NBT)、碘硝基四唑鎓(INT)等的发光底物;4-甲基伞形花酰·磷酸酯(4MUP)等的荧光底物;5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸(BCIP)、5-溴-6-氯-吡啶基磷酸2钠、p-硝基苯基磷酸等的显色底物。当作为酶使用 β -半乳糖苷酶时,作为底物的例,可举出4-甲基伞形花酰- β -D-吡喃半乳糖苷。

[0062] 当标记物质是放射性同位素时,可使用闪烁计数器等公知的装置测定作为信号的放射线。另外,当标记物质是荧光物质时,可使用荧光酶标仪等公知的装置测定作为信号的荧光。

[0063] 基于上述的测定结果而检测受试物质。其中,“检测”的词语含定性检测存在与否,定量及半定量。“半定量”是指如“阴性”、“弱阳性”、“强阳性”等一样阶段性地判断受试物质的含量。

[0064] 当定性检测受试物质时,优选设定可预先对阴性和阳性高精度地进行分类的阈值,将测定结果与此阈值比较,判断受试物质的存在与否。阈值可使用不含或微量含多种受试物质的试样(例如,从健康者得到的生物体试样)、及含多种受试物质的试样(例如,从阿尔茨海默型认知症等的神经系疾病患者得到的生物体试样)而预先测定受试物质浓度,以可最高精度地分类阴性组和阳性组的值作为阈值。在阈值的设定中,可考虑灵敏度、特异性、阳性的中率、阴性的中率等,对应于测定的目的而本领域技术人员适宜设定。

[0065] 对于本实施方式的测定机理的具体例而参照图1而进行说明。此具体例是适宜地检测淀粉样蛋白 β (在图中,表述为A β)的三聚体以上的寡聚体的系统。这终究是一例,不限定本发明。

[0066] 图1(A):含淀粉样蛋白 β 的单体、二聚体及三聚体的试样和标记抗体、第1捕获抗体、第2捕获抗体及第1固相被混合。标记抗体上标记有酶。第1捕获抗体附加有DNP。第2捕获抗体附加有生物素。第1固相是使抗DNP抗体固定化的粒子。标记抗体、第1捕获抗体及第2捕获抗体是识别淀粉样蛋白 β 的特定的表位的相同的单克隆抗体。即,这些抗体的表位相同。

[0067] 图1(B):单体上结合了第1捕获抗体。在二聚体上结合了第1捕获抗体及标记抗体。

在三聚体上结合了第1捕获抗体、第2捕获抗体及标记抗体。

[0068] 图1 (C) :在B/F分离之后,作为游离剂,添加DNP-Lys (DNP-赖氨酸),从第1固相游离淀粉样蛋白 β 和抗体的复合物。

[0069] 图1 (D) :向含 (C) 工序中得到的复合物的液相级分添加固定化链霉亲和素的第2固相。由此,含淀粉样蛋白 β 三聚体的复合物和第2固相结合。

[0070] 图1 (E) :在B/F分离之后,添加酶底物,对由酶反应发生的发光进行测定。

[0071] 在图1 (B) 中,在此例中,在单体上结合了第1捕获抗体,但也可存在结合的不是第1捕获抗体,而是结合了标记抗体或第2捕获抗体的单体。当结合了标记抗体或第2捕获抗体时,也从此复合物检测不到信号。

[0072] 在此例中,在二聚体上结合了第1捕获抗体及标记抗体,但在第1捕获抗体、第2捕获抗体及标记抗体之中,可结合2分子相同或不同的种类的抗体。在任何情况中,均从此复合物检测不到信号。

[0073] 在此例中,也考虑在三聚体上结合了第1捕获抗体、第2捕获抗体及标记抗体,例如有3处表位之中至少2处结合了相同的种类的抗体。此时,从此复合物检测不到信号。

[0074] 如上所述,如果不是结合了1分子以上第1捕获抗体、第2捕获抗体及标记抗体的全部的复合物,则不进行固相的转移或酶反应,而信号不发生。在聚合度高的受试物质上结合了1分子以上第1捕获抗体、第2捕获抗体及标记抗体的概率变高。一方面,聚合度越变低,任何种类的抗体一分子都不结合的概率变高。由本实施方式的方法而来自低分子量的寡聚体的信号被抑制,可更正确地检测高分子量的寡聚体。

[0075] [第2实施方式]

[0076] 在本实施方式中,作为受试物质检测到多聚体。“多聚体”及含受试物质的“试样”与在第1实施方式中说明的同样。

[0077] 【复合物的形成工序】

[0078] 在本实施方式的检测方法中,进行使受试物质和与受试物质结合的标记抗体、与受试物质结合的捕获抗体、及与捕获抗体结合的第1固相接触,在上述第1固相上形成含受试物质、标记抗体及捕获抗体的复合物的工序。“抗体”与在第1实施方式中说明的同样。

[0079] 在本实施方式中,标记抗体的表位及捕获抗体的表位重复。“表位重复”与在第1实施方式中说明的同样。由于在本实施方式中使用2种抗体,从而单体分子的检测被抑制,适宜地检测到多聚体。

[0080] 标记抗体与在第1实施方式中说明的同样。

[0081] 第1固相与在第1实施方式中说明的同样。

[0082] 在本实施方式中,捕获抗体上结合了第1结合物质和第2结合物质,向第1固相固定与第1结合物质特异性地结合的第1结合偶体,向第2固相固定与第2结合物质特异性地结合的第2结合偶体。捕获抗体和第1固相的结合样式与第1实施方式的说明中说明的第1捕获抗体和第1固相的结合样式同样。捕获抗体和第2固相的结合样式与第1实施方式的说明中说明的第1捕获抗体和第2固相的结合样式同样。

[0083] 在形成工序中,受试物质、上述的标记抗体和捕获抗体由抗原抗体反应结合,形成了含“标记抗体-受试物质-捕获抗体”的夹心复合物。进而,该复合物中所含的捕获抗体被第1固相捕获。

[0084] 标记抗体、捕获抗体及第1固相的添加量与在第1实施方式中说明的同样。标记抗体、捕获抗体、第1固相及含受试物质的试样的接触顺序与在第1实施方式中说明的同样。

[0085] 优选在形成工序之后,进行回收第1固相的工序。对于回收工序,与在第1实施方式中说明的同样。

[0086] 【转移工序】

[0087] 从第1固相的复合物的游离与在第1实施方式中说明的同样。

[0088] 在本实施方式中,与第1实施方式不同,捕获抗体上含第1结合物质及第2结合物质这两方。通过游离的复合物中所含的捕获抗体的第2结合物质和第2固相上的第2结合偶体结合,游离的复合物固定在第2固相。

[0089] 优选在转移工序之后,在测定工序之前进行回收第2固相的工序。第2固相的回收工序可由与第1固相的回收工序同样的方法进行。

[0090] 【测定工序】

[0091] 对于标记的测定及受试物质的检测,与在第1实施方式中说明的同样。

[0092] 对于本实施方式的测定机理的具体例,参照图2而进行说明。此具体例是检测淀粉样蛋白 β (在图中,表述为A β)的二聚体以上的寡聚体的系统。这终究是一例,不限定本发明。

[0093] 图2(A):含淀粉样蛋白 β 的单体、二聚体及三聚体的试样和标记抗体、捕获抗体及第1固相被混合。标记抗体上标记有酶。捕获抗体附加有DNP(图中,以圆点表示)及生物素(图中,以四角形表示)。第1固相是使抗DNP抗体固定化的粒子。标记抗体、捕获抗体是识别淀粉样蛋白 β 的特定的表位的相同的单克隆抗体。即,这些抗体的表位相同。

[0094] 图2(B):在单体上结合了捕获抗体。在二聚体上结合了捕获抗体及标记抗体。在三聚体上结合了捕获抗体和标记抗体2分子。

[0095] 图2(C):在B/F分离之后,作为游离剂,添加DNP-Lys(DNP-赖氨酸),从第1固相游离淀粉样蛋白 β 和抗体的复合物。

[0096] 图2(D):向含(C)工序中得到的复合物的液相级分添加固定化链霉亲和素的第2固相。由此,复合物和第2固相结合。

[0097] 图2(E):在B/F分离之后,添加酶底物,对由酶反应发生的发光进行测定。

[0098] 在图2(B)中,在此例中,在单体上结合了捕获抗体,但也可存在结合了未捕获抗体的标记抗体的单体。当结合了标记抗体时,也从此复合物检测不到信号。

[0099] 在此例中,在二聚体上结合了捕获抗体及标记抗体,在捕获抗体及标记抗体上可结合了2分子相同或不同的种类的抗体。当结合了2分子捕获抗体时或结合了2分子标记抗体时,检测不到信号。

[0100] 在此例中,在三聚体上结合了捕获抗体及标记抗体2分子,当结合了捕获抗体3分子时或结合了3分子标记抗体时,检测不到信号。

[0101] 如上所述,如果不是结合了1分子以上捕获抗体及标记抗体这两方的复合物,则不进行固相的转移或酶反应而信号不发生。在聚合度高的受试物质上结合了1分子以上捕获抗体及标记抗体的概率变高。一方面,聚合度越变低,任何种类的抗体一分子都不结合的概率变高。由本实施方式的方法,来自低分子量的寡聚体的信号被抑制,可更正确地检测高分子量的寡聚体。

[0102] [第3实施方式]

[0103] 在本实施方式中,作为受试物质检测到淀粉样蛋白 β 及 τ 蛋白质。在本实施方式中,标记抗体的表位及捕获抗体的表位相异,标记抗体及捕获抗体可结合于作为本实施方式的受试物质的淀粉样蛋白 β 或 τ 蛋白质的不同的部位。由此,不仅是多聚体,还可检测到单体分子。对于此外的方面,与第2实施方式同样。

[0104] 对于本实施方式的测定机理的具体例而参照图3而进行说明。此具体例是检测淀粉样蛋白 β (在图中,表述为A β)的系统。这终究是一例,不限定本发明。

[0105] 图3(A):含淀粉样蛋白 β 的单体及二聚体的试样和标记抗体、捕获抗体及第1固相被混合。标记抗体上标记有酶。捕获抗体附加有DNP(图中,以圆点表示)及生物素(图中,以四角形表示)。第1固相是使抗DNP抗体固定化的粒子。标记抗体及捕获抗体表位相异,结合于淀粉样蛋白 β 的氨基酸序列中不同的位置。

[0106] 图3(B):在单体及二聚体上各自结合了捕获抗体及标记抗体。

[0107] 图3(C):在B/F分离之后,作为游离剂,添加DNP-Lys(DNP-赖氨酸),从第1固相游离复合物。

[0108] 图3(D):向含(C)工序中得到的复合物的液相级分添加固定化链霉亲和素的第2固相。由此,复合物和第2固相结合。

[0109] 图3(E):在B/F分离之后,添加酶底物,对由酶反应发生的发光进行测定。

[0110] 在图3(A)中,在此例中,试样中含单体及二聚体,但对于三聚体以上的多聚体也同样地结合了捕获抗体及标记抗体,可检测到信号。

[0111] 如上所述,如果不是结合了1分子以上捕获抗体及标记抗体这两方的复合物,则不进行固相的转移或酶反应而信号不发生。在聚合度高的受试物质上结合了1分子以上捕获抗体及标记抗体的概率变高。一方面,聚合度越变低,任何种类的抗体一分子都不结合的概率变高。由本实施方式的方法,来自低分子量的寡聚体的信号被抑制,可更正确地检测高分子量的寡聚体。

[0112] 【在第1实施方式中使用的试剂盒】

[0113] 试剂盒含标记抗体、第1捕获抗体及第2捕获抗体。也可还含第1固相及第2固相。当标记是酶时,也可还含所述酶的底物。另外,也可还含用于将复合物从第1固相分离的游离剂。这些试剂之中的一部分可收容在相同的容器中,也可为了抑制在容器内的非特异性的反应,各试剂收容在分别的容器中。在是酶时,标记抗体和底物有收容在分别的容器的必要。游离剂由于在第1固相上形成复合物之后添加到反应系统中,优选收容在与其他试剂不同的容器中。这些试剂以干燥状态或液状(溶解或分散于液中的状态)提供于使用者,但由于在上述的检测方法中的化学反应优选在溶液中进行,试剂优选是液状。再者,这些试剂的详细细节与在第1实施方式中说明的同样。

[0114] 试剂盒也可还含其他试剂。例如,含缓冲液。这样的缓冲液只要是在pH6.5~8有缓冲作用的缓冲液,就不特别限定,例如可举出磷酸缓冲液(PBS)、咪唑缓冲液、三乙醇胺盐酸盐缓冲液(TEA)、Good缓冲液等。作为Good缓冲液,可举出MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、Bis-Tris-Propane、ACES、MOPS、MOPSO、BES、TES、HEPES、HEPPS、Tricine、Tris、Bicine、TAPS等的缓冲液。另外,缓冲液也可根据需要,含蛋白质稳定化剂(BSA等)、防腐剂(叠氮化钠、苯基甲磺酰氟等)、无机盐类(氯化镁、氯化锌等)等的公知的添加物。

[0115] 图4显示试剂盒的例。此实施方式的试剂盒40含收容第1捕获抗体的第1容器41,收

容第2捕获抗体的第2容器42,作为第1固相,收容粒子的第3容器43,作为第2固相,收容粒子的第4容器44,收容标记抗体的第5容器45。这些容器与附带文书47一同收容在捆包箱48内。

[0116] 本发明含标记抗体、第1捕获抗体及第2捕获抗体用于制造在第1实施方式的检测方法中使用的试剂盒的用途。

[0117] **【在第2实施方式中使用的试剂盒】**

[0118] 试剂盒含标记抗体及捕获抗体。与第1实施方式中使用的试剂盒不同,捕获抗体可为1种。对于此外的构成,与对于在第1实施方式中使用的试剂盒进行说明的同样。

[0119] 图5显示试剂盒的例。此实施方式的试剂盒30含收容捕获抗体的第1容器31,作为第1固相,收容粒子的第2容器32,作为第2固相,收容粒子的第3容器33,收容标记抗体的第4容器34。这些容器与附带文书37一同收容在捆包箱38内。

[0120] 本发明含标记抗体及捕获抗体用于制造在第2实施方式的检测方法中使用的试剂盒的用途。

[0121] **【在第3实施方式中使用的试剂盒】**

[0122] 试剂盒的构成与第2实施方式中使用的试剂盒基本上同样。此试剂盒中所含的捕获抗体和标记抗体的表位不同。

[0123] 本发明含标记抗体及捕获抗体用于制造在第3实施方式的检测方法中使用的试剂盒的用途。

[0124] 接下来,将本发明由实施例详细地说明,但本发明不限于这些实施例。再者,在实施例中,“粒径”是直径。

[0125] **【实施例】**

[0126] 在下文中,各略语的含意如下所述。

[0127] BSA:牛血清白蛋白

[0128] DNP:2,4-二硝基苯基

[0129] Bio:生物素基

[0130] OPDM:N,N'-(1,2-亚苯基)二马来酰亚胺

[0131] SATA:N-琥珀酰亚胺S-乙酰硫代乙酸酯

[0132] EMCS:N-(6-马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺

[0133] SH:巯基

[0134] mal:马来酰亚胺基

[0135] BSA-Bio-DNP:由生物素和DNP修饰的BSA

[0136] (PEG)₈-BSA-Bio-DNP:附加PEG接头的BSA-Bio-DNP

[0137] 4-MUG:4-甲基伞形花酰-β-D-吡喃半乳糖苷

[0138] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[0139] PEG:聚乙二醇链

[0140] (PEG)_n:氧乙烯基的加成摩尔数是n的聚乙二醇链

[0141] Gal:β-半乳糖苷酶

[0142] ALP:碱性磷酸酶

[0143] **【实施例1:由ICT-EIA的淀粉样蛋白β42的检测】**

[0144] 1.受试物质溶液的调制

[0145] 将淀粉样蛋白 β 42ELISA试剂盒 (Covance公司制、商品名:BetaMark) 的标准物质用缓冲液A (含0.4M氯化钠、0.1质量%BSA及0.1M磷酸钠缓冲液 (pH7.0)) 进行梯度稀释, 调制含0pg、0.003pg、0.01pg、0.1pg、0.3pg、1pg、3pg或10pg淀粉样蛋白 β 42的受试物质溶液100 μ L。

[0146] 2. 抗体溶液的调制

[0147] 如以下一样地制作用Gal标记的抗体。由惯用的方法, 将抗淀粉样蛋白 β 42兔单克隆抗体 (IgG) (Life Technologies公司制、克隆名:H31L21) 用胃蛋白酶片段化而得到F(ab')₂片段。还原F(ab')₂片段而得到Fab'-SH。使OPDM与Gal反应而得到Gal-mal。通过使Fab'-SH和Gal-mal反应, 得到含Fab'-Gal的标记抗体溶液。

[0148] 如以下一样地制作结合生物素及DNP的捕获抗体。由惯用的方法, 将抗淀粉样蛋白 β 42小鼠单克隆抗体 (IgG) (Covance公司制、克隆名:6E10) 用胃蛋白酶片段化而得到F(ab')₂片段。还原得到的F(ab')₂片段而得到Fab'-SH。另外, 使BSA-Bio-DNP和接头 (Life Technologies公司制、商品名:SM (PEG)₈) 反应而得到BSA-Bio-DNP-(PEG)₈-mal。通过使Fab'-SH和BSA-Bio-DNP-(PEG)₈-mal反应而得到含Fab'-(PEG)₈-BSA-Bio-DNP的捕获抗体溶液。

[0149] 将标记抗体溶液、捕获抗体溶液及缓冲液A混合至标记抗体成为10fmol、捕获抗体成为100fmol的含量, 调制抗体溶液100 μ L。

[0150] 3. 固相的调制

[0151] 通过向粒径6.35mm的聚苯乙烯珠 (Immunochemical公司制、商品名:Immuno bead **6.35 ϕ**) 由惯用的方法固定化抗DNP抗体 (由惯用的方法制成的兔多克隆抗体), 调制抗DNP抗体固相。

[0152] 通过向粒径6.35mm的聚苯乙烯珠 (Immunochemical公司制、商品名:Immuno bead **6.35 ϕ**) 由惯用的方法固定化链霉亲和素 (和光纯药工业公司制、商品名链霉亲和素), 调制链霉亲和素固相 (以下, 称为“STA固相”)。

[0153] 4. 测定

[0154] (1) 复合物形成

[0155] 将测定试样100 μ L和抗体溶液100 μ L混合。于4℃温育12小时, 使标记抗体-受试物质-捕获抗体的夹心复合物形成。

[0156] (2) 向复合物的第1固相的固定

[0157] 向含复合物的溶液200 μ L添加抗DNP抗体固相1个。于25℃温育30分钟, 向固相上固定复合物。

[0158] 除去液相, 使用2mL的清洗液1 (含0.1M氯化钠、0.1质量%BSA及0.1M磷酸钠缓冲液 (pH7.0)) 清洗2次。

[0159] (3) 复合物的游离

[0160] 向固定化复合物的固相添加150 μ L的溶出液1 (含12mM DNP)。通过于25℃温育30分钟, 切断抗DNP抗体固相和复合物之间的结合而使复合物游离。

[0161] (4) 向复合物的第2固相的固定

[0162] 回收含复合物的上清, 向其中添加1个STA固相。于25℃温育30分钟, 向固相上固定复合物。除去液相, 使用2mL的缓冲液B (含0.1M氯化钠、0.1质量%BSA及0.1M磷酸钠缓冲液

(pH7.0))清洗3次。

[0163] (5) 酶反应及荧光测定

[0164] 向固定化复合物的固相添加200 μ L的缓冲液B和基质溶液(含0.2mM的4-MUG),于30 $^{\circ}$ C温育20小时。向反应液照射波长360nm的激发光,对波长450nm的荧光的强度进行测定。不含使复合物固定化的固相,与上述同样地测定将200 μ L的缓冲液B和基质溶液混合的溶液的荧光强度,作为背景的值。从使用固定化复合物的固相测定的荧光强度扣除背景的值。

[0165] 【比较例1:由夹心ELISA的淀粉样蛋白 β 42的检测】

[0166] 作为比较,用未进行复合物的转移的夹心ELISA进行淀粉样蛋白 β 42的测定。与实施例1(1)及(2)同样地向抗DNP抗体固相固定化复合物、清洗,与实施例1(5)同样地向其中添加底物溶液,于30 $^{\circ}$ C温育2小时之后,进行荧光强度的测定。在比较例1中,不进行实施例1(3)及(4)的工序。

[0167] 【实施例1及比较例1的结果】

[0168] 在实施例1及比较例1中算出的荧光强度示于图6。实施例1的方法的检测界限是约0.1pg/mL,比较例1的方法的检测界限是约1pg/mL。从以上可知,与比较例1比,由实施例1的方法可以约10倍高灵敏度进行检测。

[0169] 【实施例2:由ICT-EIA检测 τ 蛋白质】

[0170] 1. 受试物质溶液的调制

[0171] 将 τ 蛋白质(Millipore公司制、商品名:HUMAN TAU-381)用缓冲液A进行梯度稀释,调制受试物质溶液70 μ L至 τ 蛋白质成为0pg/mL、0.3pg/mL、0.6pg/mL、1.25pg/mL、2.5pg/mL、5pg/mL、10pg/mL、100pg/mL或1000pg/mL的浓度。

[0172] 2. 抗体溶液的调制

[0173] 如以下一样地制作用ALP标记的抗体。由惯用的方法将抗 τ 小鼠单克隆抗体(IgG)(Biolegend公司制、克隆名:TAU12)用胃蛋白酶片段化而得到F(ab')₂片段。还原得到的F(ab')₂片段而得到Fab'-SH。使EMCS与ALP反应而得到ALP-mal。通过使Fab'-SH和ALP-mal反应而得到含Fab'-ALP的标记抗体溶液。调整标记抗体的浓度成为50fmol/20 μ L。

[0174] 如以下一样地制作结合生物素及DNP的捕获抗体。由惯用的方法,将抗 τ 小鼠单克隆抗体(IgG)(Covance公司制、克隆名:TAU5)用胃蛋白酶片段化而得到F(ab')₂片段。还原得到的F(ab')₂片段而得到Fab'-SH。另外,使BSA-Bio-DNP和接头(Life Technologies公司制、商品名:SM(PEG)8)反应而得到BSA-Bio-DNP-(PEG)₈-mal。通过使Fab'-SH和BSA-Bio-DNP-(PEG)₈-mal反应而得到含Fab'-(PEG)₈-BSA-Bio-DNP的捕获抗体溶液。调整捕获抗体的浓度成为200fmol/20 μ L。

[0175] 3. 固相的调制

[0176] 通过向粒径2.2 μ m的磁性粒子(JSR公司制、商品名:MAG2201)由惯用的方法固定化抗DNP抗体(Sysmex公司制)而调制抗DNP抗体固相。

[0177] 链霉亲和素固相(以下,称为“STA固相”)使用HISCL R2试剂(Sysmex公司制)。

[0178] 4. 测定

[0179] (1) 复合物形成

[0180] 将受试物质溶液70 μ L和捕获抗体溶液20 μ L混合,于42 $^{\circ}$ C反应216秒钟。向其中添加20 μ L的标记抗体溶液,于42 $^{\circ}$ C反应584秒钟,使标记抗体-受试物质-捕获抗体的夹心复合物

形成。

[0181] (2) 向复合物的第1固相的固定

[0182] 添加抗DNP抗体固相的悬浮液(粒子浓度2.5%) 20 μ L。于42℃温育720秒钟,向固相上固定复合物。除去液相,使用300 μ L的HISCL清洗液(Sysmex公司制)清洗4次。

[0183] (3) 复合物的游离

[0184] 向固定化复合物的固相添加41 μ L的溶出液2(含5mM DNP-Lys、DMSO、0.1M MES、2%酪蛋白Na、NaOH、NaN₃)。通过于42℃温育144秒钟,切断抗DNP固相和复合物之间的结合而使复合物游离。

[0185] (4) 向复合物的第2固相的固定

[0186] 回收含复合物的上清30 μ L,向其中添加HISCL R2试剂(Sysmex公司制) 30 μ L。于42℃温育288秒钟,向固相上固定复合物。除去液相,使用300 μ L的HISCL清洗液(Sysmex公司制)清洗4次。

[0187] (5) 酶反应及荧光测定

[0188] 向固定化复合物的固相混合HISCL发光底物组R4试剂(Sysmex公司制) 50 μ L和HISCL发光底物组R5试剂(Sysmex公司制) 100 μ L,于42℃反应300秒钟,对发光强度进行测定。

[0189] **【结果】**

[0190] 在实施例2中测定的荧光强度示于图7。实施例2的方法的检测界限是约0.3pg/mL,得知由所述方法能高灵敏度地进行检测。

[0191] **【实施例3:由使用表位重复的捕获抗体及标记抗体的ICT-EIA检测淀粉样蛋白 β 】**

[0192] 1. 受试物质溶液的调制

[0193] 调制含1000pg/mL淀粉样蛋白 β (1-11)单体(Anaspec公司制)的单体试样。

[0194] 调制含1000pg/mL淀粉样蛋白 β (1-16)二聚体(IBL公司制)的二聚体试样。

[0195] 使淀粉样蛋白 β 42(IBL公司制)聚合而调制寡聚体,调制含1000pg/mL其的寡聚体试样。由凝胶过滤层析,根据常规方法而分析寡聚体的分子量的结果,寡聚体试样的主要的构成成分是5聚体寡聚体。

[0196] 2. 抗体溶液的调制

[0197] 使用抗淀粉样蛋白 β 小鼠单克隆抗体(IgG)(IBL公司制、克隆名:82E1),与实施例1的2.同样地调制标记抗体。

[0198] 使用抗淀粉样蛋白 β 小鼠单克隆抗体(IgG)(IBL公司制、克隆名:82E1),与实施例1的2.同样地调制捕获抗体。

[0199] 将标记抗体溶液、捕获抗体溶液及缓冲液A混合至成为标记抗体100fmol、捕获抗体100fmol的含量,调制抗体溶液80 μ L。

[0200] 3. 固相的调制

[0201] 与实施例2的3.同样地调制抗DNP抗体固相及STA固相。

[0202] 4. 测定

[0203] (1) 复合物形成

[0204] 将受试物质溶液70 μ L和抗体溶液80 μ L混合,于42℃反应92分钟,使标记抗体-受试物质-捕获抗体的夹心复合物形成。

[0205] (2) 向复合物的第1固相的固定

[0206] 添加抗DNP抗体固相的悬浮液(粒子浓度2.5%) 20 μ L。于42℃温育11分钟,向固相上固定复合物。除去液相,使用300 μ L的HISCL清洗液(Sysmex公司制)清洗4次。

[0207] (3) 复合物的游离

[0208] 向固定化复合物的固相添加110 μ L的溶出液2(含2.5mM DNP-Lys、DMSO、0.1M MES、2%酪蛋白Na、NaOH、NaN₃)。通过于42℃温育5分钟来切断抗DNP固相和复合物之间的结合而使复合物游离。

[0209] (4) 向复合物的第2固相的固定

[0210] 回收含复合物的上清80 μ L,向其中添加HISCL R2试剂(Sysmex公司制) 30 μ L。于42℃温育5分钟,向固相上固定复合物。除去液相,使用300 μ L的HISCL清洗液(Sysmex公司制)清洗4次。

[0211] (5) 酶反应及荧光测定

[0212] 向固定化复合物的固相混合HISCL发光底物组R4试剂(Sysmex公司制) 50 μ L和HISCL发光底物组R5试剂(Sysmex公司制) 100 μ L,于42℃反应5分钟,对发光强度进行测定。

[0213] **【结果】**

[0214] 在实施例3中测定的荧光强度示于图8。检测到淀粉样蛋白 β (在图中,表述为A β)的寡聚体及二聚体,但检测不到单体。由所述方法检测到二聚体以上的淀粉样蛋白 β ,得知单体的检测被抑制。

[0215] **【实施例4:由使用表位重复的第1捕获抗体、第2捕获抗体及标记抗体的ICT-EIA检测淀粉样蛋白 β 】**

[0216] 1. 受试物质溶液的调制

[0217] 与实施例3同样地调制。

[0218] 2. 抗体溶液的调制

[0219] 使用抗淀粉样蛋白 β 小鼠单克隆抗体(IgG)(IBL公司制、克隆名:82E1),与实施例1的2.同样地调制标记抗体。

[0220] 使用SATA(Thermo Fischer Scientific公司制)而向抗淀粉样蛋白 β 小鼠单克隆抗体(IgG)(IBL公司制、克隆名:82E1)导入巯基。将DNP-Lys(东京化成工业公司制)使用EMCS马来酰亚胺化。将导入巯基的抗体和马来酰亚胺化的DNP-Lys混合而使反应来调制第1捕获抗体。

[0221] 使用SATA(Thermo Fischer Scientific公司制)而向抗淀粉样蛋白 β 小鼠单克隆抗体(IgG)(IBL公司制、克隆名:82E1)导入巯基。将导入巯基的抗体和生物素-PEAC5-马来酰亚胺(6-[N'-[2-(N-马来酰亚胺)乙基]-N-哌嗪基酰胺]己基D-生物素酰胺盐酸盐)混合而使反应来调制第2捕获抗体。

[0222] 将标记抗体溶液、第1捕获抗体溶液、第2捕获抗体溶液及缓冲液A混合至成为标记抗体100fmol、第1捕获抗体50fmol、第2捕获抗体50fmol的含量,由此调制抗体溶液80 μ L。

[0223] 3. 固相的调制

[0224] 与实施例2的3.同样地调制抗DNP抗体固相及STA固相。

[0225] 4. 测定

[0226] 与实施例3同样地对发光强度进行测定。

[0227] 【结果】

[0228] 在实施例4中测定的荧光强度示于图9。从淀粉样蛋白 β (在图中记作AB) 的寡聚体试样检测到强的发光。从二聚体试样检测到略微发光。从单体试样检测不到发光。由所述方法检测到5聚体以上的淀粉样蛋白 β , 得知二聚体及单体的检测被抑制。

[0229] 【实施例5: 由使用表位重复的捕获抗体及标记抗体的ICT-EIA检测 τ 蛋白质】

[0230] 1. 受试物质溶液的调制

[0231] 调制含1000pg/mL的 τ 蛋白质单体(NIPRO公司制)的单体试样。

[0232] 使 τ 蛋白质单体(Wako公司制)聚合而调制寡聚体, 调制含1000pg/mL其的寡聚体试样。由凝胶过滤层析, 根据常规方法而分析寡聚体的分子量的结果, 寡聚体试样的主要的构成成分是10聚体寡聚体。

[0233] 2. 抗体溶液的调制

[0234] 与实施例2的2. 同样地调制标记抗体。

[0235] 使用抗 τ 蛋白质小鼠单克隆抗体(Biolegend公司制、IgG、克隆名: Tau12), 与实施例1的2. 同样地调制捕获抗体。

[0236] 将标记抗体溶液、捕获抗体溶液及缓冲液A混合至成为标记抗体100fmol、捕获抗体100fmol的含量, 由此调制抗体溶液80 μ L。

[0237] 3. 固相的调制

[0238] 与实施例2的3. 同样地调制抗DNP抗体固相及STA固相。

[0239] 4. 测定

[0240] (1) 复合物形成

[0241] 将受试物质溶液70 μ L和抗体溶液80 μ L混合, 于37 $^{\circ}$ C反应27分钟, 使标记抗体-受试物质-捕获抗体的夹心复合物形成。

[0242] (2) 向复合物的第1固相的固定

[0243] 添加抗DNP抗体固相的悬浮液(粒子浓度2.5%) 20 μ L。于37 $^{\circ}$ C温育11分钟, 向固相上固定复合物。除去液相, 使用300 μ L的HISCL清洗液(Sysmex公司制)清洗4次。

[0244] (3) 复合物的游离

[0245] 向固定化复合物的固相添加110 μ L的溶出液2(含2.5mM DNP-Lys、DMSO、0.1M MES、2%酪蛋白Na、NaOH、NaN₃)。通过于37 $^{\circ}$ C温育5分钟, 切断抗DNP固相和复合物之间的结合而使复合物游离。

[0246] (4) 向复合物的第2固相的固定

[0247] 回收含复合物的上清80 μ L, 向其中添加STA固相的悬浮液(粒子浓度2.5%) 30 μ L。于37 $^{\circ}$ C温育5分钟, 向固相上固定复合物。除去液相, 使用300 μ L的HISCL清洗液(Sysmex公司制)清洗4次。

[0248] (5) 酶反应及荧光测定

[0249] 向固定化复合物的固相混合HISCL发光底物组R4试剂(Sysmex公司制) 50 μ L和HISCL发光底物组R5试剂(Sysmex公司制) 100 μ L, 于42 $^{\circ}$ C反应5分钟而对发光强度进行测定。

[0250] 【结果】

[0251] 在实施例5中测定的荧光强度示于图10。检测到 τ 蛋白质的寡聚体, 但检测不到单体。由所述方法检测到 τ 蛋白质寡聚体, 得知单体的检测被抑制。

- [0252] **【符号的说明】**
- [0253] 30: 试剂盒
- [0254] 31: 第1容器
- [0255] 32: 第2容器
- [0256] 33: 第3容器
- [0257] 34: 第4容器
- [0258] 37: 附带文书
- [0259] 38: 捆包箱
- [0260] 40: 试剂盒
- [0261] 41: 第1容器
- [0262] 42: 第2容器
- [0263] 43: 第3容器
- [0264] 44: 第4容器
- [0265] 45: 第5容器
- [0266] 47: 附带文书
- [0267] 48: 捆包箱

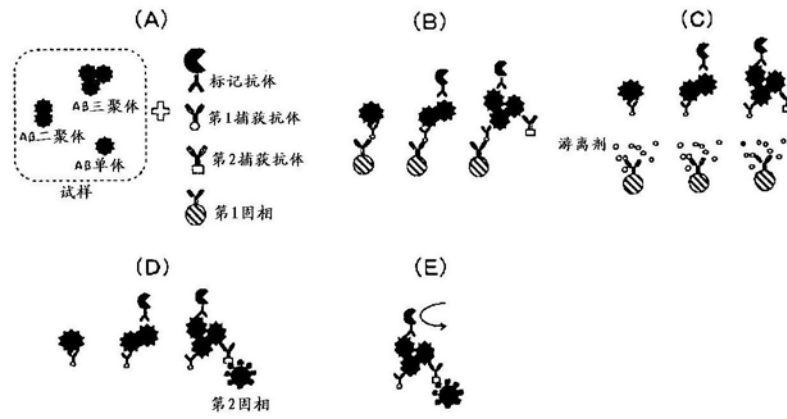


图1

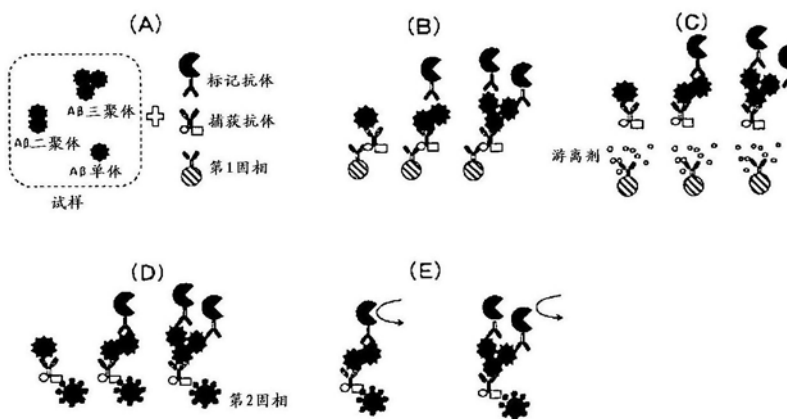


图2

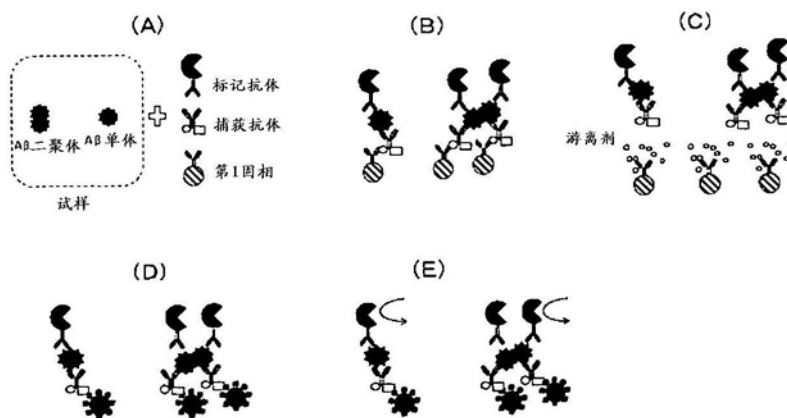


图3

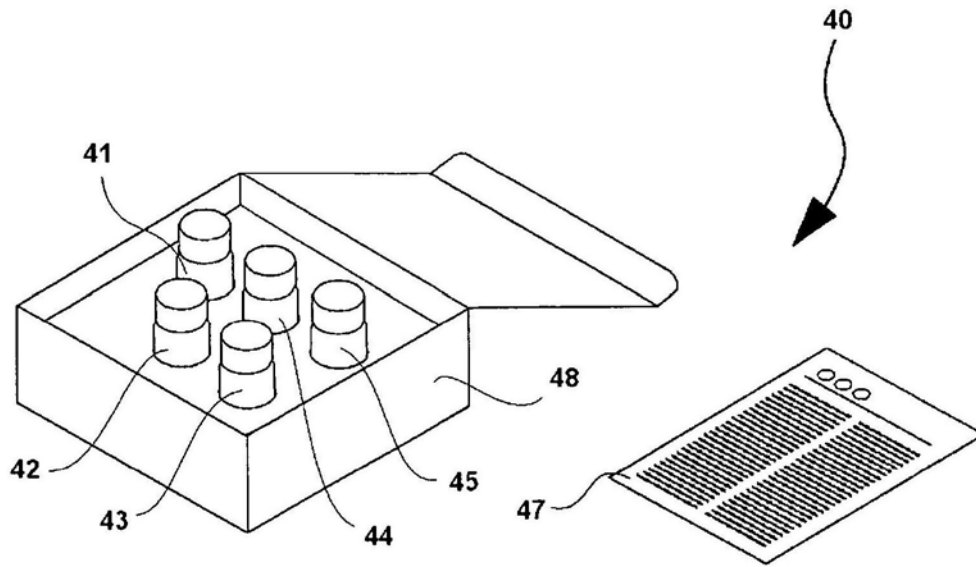


图4

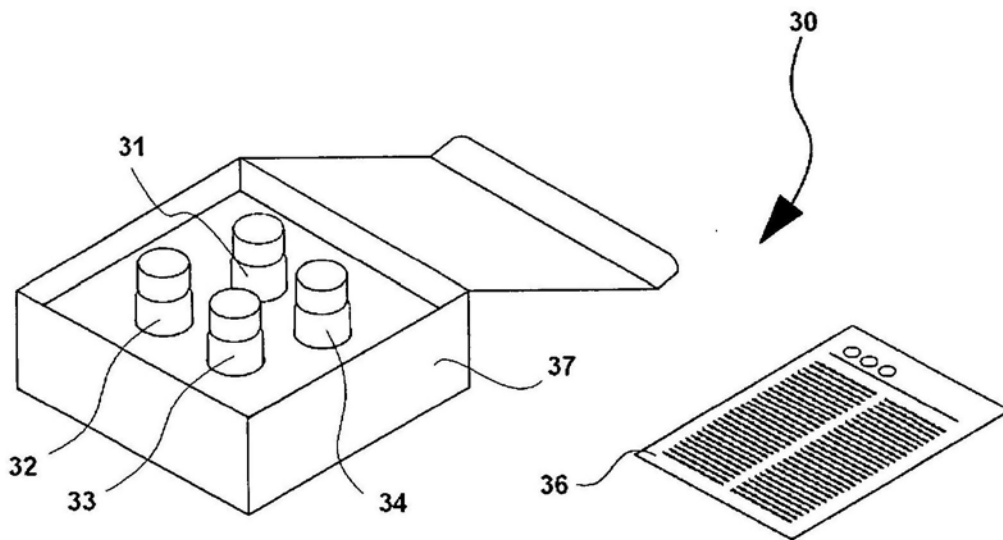


图5

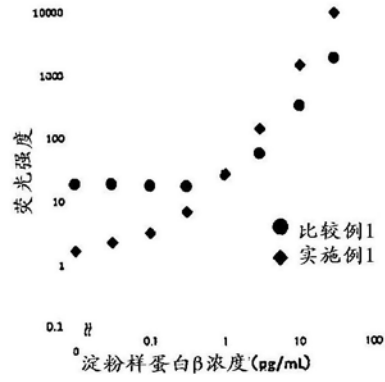


图6

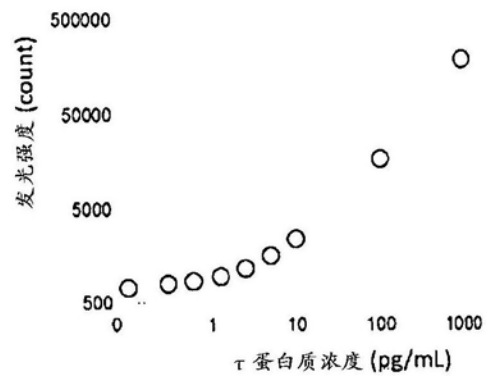


图7

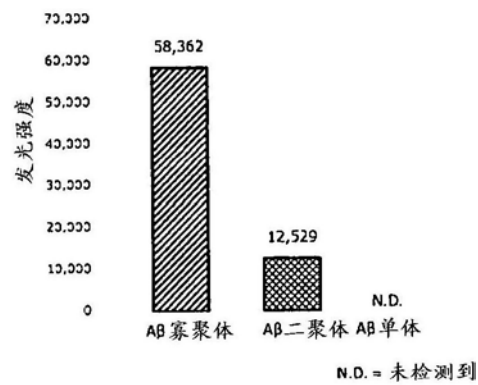


图8

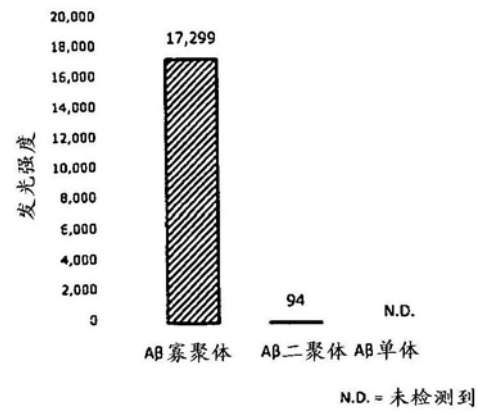


图9

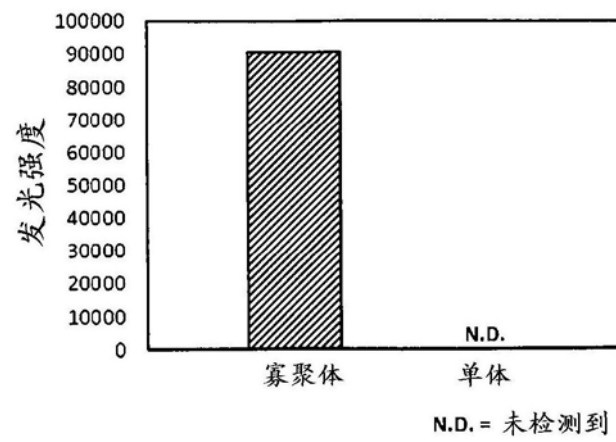


图10

专利名称(译)	受试物质的检测方法及受试物质的检测用试剂盒		
公开(公告)号	CN108603880A	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201780010831.9	申请日	2017-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
[标]发明人	渡边敏弘		
发明人	渡边敏弘		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/54313 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
优先权	2016021610 2016-02-08 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供受试物质的检测方法包括：使受试物质、标记抗体、捕获抗体、第1固相接触，在第1固相上形成免疫复合物的工序，通过解离捕获抗体和第1固相的结合来使免疫复合物游离，使与捕获抗体结合的第2固相和免疫复合物接触，向第2固相上转移免疫复合物的工序和测定第2固相上的复合物中所含的标记而检测受试物质的工序。用此方法检测的受试物质是多聚体的抗原、特别是淀粉样蛋白 β 或 τ 蛋白质。

