

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580018036.1

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1997894A

[22] 申请日 2005.6.1

[21] 申请号 200580018036.1

[30] 优先权

[32] 2004.6.3 [33] JP [31] 166440/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/010043 2005.6.1

[87] 国际公布 WO2005/119256 日 2005.12.15

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.4

[71] 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

[72] 发明人 金城政孝 堀内基広 藤井文彦

坂田启司 田村守 上野雅由

柳谷孝幸

[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司

代理人 曾旻辉

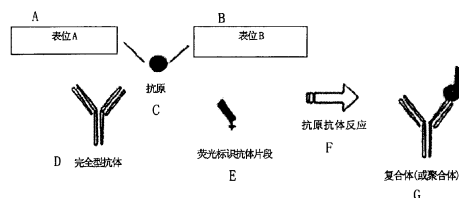
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 3 页

[54] 发明名称

通过荧光相关分光法迅速检测和/或测定抗原的方法

[57] 摘要

本发明提供一种通过简便的操作能够迅速且正确地检测和/或测定异常型 prion 或像食品材料中所含的有害蛋白质这样的抗原蛋白质等抗原的检测和/或测定方法。在使用荧光相关分光法(FCS)的抗原分子的检测,测定中,通过使用荧光标识抗体片段和通过抗原与该荧光标识抗体片段结合的非荧光标识化完全抗体,使在不与抗原结合的荧光标识抗体片段和由荧光标识抗体片段-抗原-非荧光标识化完全抗体之间的抗原抗体反应形成的复合体之间产生了扩散速度中的显著差异,使之不依赖于抗原的形状和分子量,即使是像分子量较小的抗原蛋白质这样的抗原的情况也可以使用 FCS 检测测定抗原,可以迅速测定大范围的抗原。



- A 表位 A
- B 表位 B
- C 抗原
- D 完全型抗体
- E 荧光标识抗体片段
- F 抗原抗体反应
- G 复合体(或聚合物)

1、一种通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于使用以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段，和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体，使之形成抗原与荧光标识抗体片段以及非荧光标识化完全型抗体的抗原抗体复合体，通过荧光相关分光法检测、分析形成的抗原抗体复合体

2、根据权利要求 1 记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述抗原是抗原蛋白质。

3、根据权利要求 1 或 2 记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述通过荧光相关分光法检测、分析形成的抗原抗体复合体是利用基于荧光标识化荧光标识抗体片段与形成的标识化抗原抗体复合体的扩散速度差异的识别对抗原进行检测、分析。

4、根据权利要求 1-3 中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述抗原的迅速检测和/或测定是基于通过荧光相关分光法对形成的抗原抗体复合体进行的检测、分析，对抗原的存在，抗原的浓度，抗原的大小或抗原的形狀的检测和/或测定。

5、根据权利要求 1-4 中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于，所述以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段是由以抗原作为免疫原制备的单克隆抗体而制备的，所述以抗原蛋白质的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体是以抗原作为免疫原制备的单克隆抗体。

6、一种通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于，在被检试样中添加以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段，和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体，使之进行抗原抗体反应，通过荧光相关分光法检测、分析所形成的抗原与荧光标识抗体片段以及非荧光标识化完全型抗体的抗原抗体复合体。

7、根据权利要求 6 记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述抗原是抗原蛋白质。

8、根据权利要求 6 或 7 记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述通过荧光相关分光法的抗原的检测和/或测定不经历被检试样中所含的抗原的物理的分离过程而进行。

9、根据权利要求 6-8 中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于自动或半自动地进行以下过程：在被检试样中添加以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段，和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体的过程，通过该被检试样，荧光标识抗体片段和非荧光标

识化完全型抗体进行抗原抗体反应的过程,和用荧光相关分光法检测分析进行了该抗原抗体反应的被检试样的过程。

10、根据权利要求 6-9 中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法,其特征在于所述被检试样是生物体蛋白质试样,所述抗原是病原性蛋白质抗原。

11、根据权利要求 10 中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法,其特征在于所述病原性蛋白质抗原是异常型 Prion。

12、根据权利要求 6-9 中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法,其特征在于所述被检试样是食品材料,所述抗原是食品材料中所含的有害蛋白质抗原。

13、一种用于通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定的检测试剂,其由以检测和/或测定的抗原表位为目标的荧光标识化荧光标识抗体片段和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体构成。

14、一种用于通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定的试剂盒,其装备有权利要求 12 记载的检测试剂。

通过荧光相关分光法迅速检测和/或测定抗原的方法

技术领域

本发明涉及一种迅速检测和/或测定抗原的方法，该方法使用荧光相关分光法，迅速地检测和/或测定像异常型 prion 这样的病原性蛋白质或像食品材料中所含的有害蛋白质等抗原蛋白质等抗原。

背景技术

近年来，在利用天然物质来源的食品材料和饲料材料时，这些材料中所含的有害蛋白质和病原性蛋白质等物质的存在已成为问题。作为有害蛋白质，可以例举有例如，荞麦，小麦，米等食品材料中所含的现已成为问题的过敏原蛋白质等，作为病原性蛋白质，可以例举有例如食用肉，肉骨粉的原料中所含的已成为问题的异常型 prion(感染型)这样的病原性蛋白质等。如果通过例示来说明的话，可作为近年来已成为问题的病原性蛋白质的代表例来例举的异常型 prion 是以牛海绵样脑病(BSE)为代表的 prion 病的成因蛋白质。通常存在于动物的脑和神经细胞膜表面的正常型 prion 蛋白质是分子量为约 3.3-3.5 万(33-35kDa)的糖蛋白质，其作为感染型 prion 蛋白质积蓄于脑内的细胞内(Lait, 76:571-578,1996)。异常型 prion 一旦侵入动物体内，在体内特定部位产生的正常型 prion 转换为异常型 prion，其结果是，异常型 prion 在这些部位积蓄。如果在脑中积蓄异常型 prion，脑就形成海绵状，动物就会死亡。

在利用这种食品材料和饲料材料时，为了防止人和动物摄取这些材料中所含的过敏原蛋白质等有害蛋白质和病原性蛋白质，需要检测、测定该食品材料和饲料材料中所含的过敏原蛋白质等有害蛋白质和病原性蛋白质，防止含有这些有害蛋白质和病原性蛋白质的食品材料和饲料材料的利用。

以往，在 Prion(异常型)等天然的生物体蛋白质的测定中，可以采用 ELISA(固相酶免疫测定法)和 Westernblot(immunoblot, 免疫印迹法)等免疫测定法。ELISA 是一种在固相上进行，用酶标识抗原或抗体，利用酶活性检测抗体或抗原的存在的方法，例如，可以通过如下方法进行：通过 Mab 3F4 抗体结合固定在微量滴定板上的 Prion，通过经由与其结合的酶催化着色反应的第二抗体检测该抗体(美国专利第 4806627 号说明书)。此外，westernblot 法是用电泳分离的蛋白质固定在疏水性膜上，用特异于抗原的抗体检测目的蛋白质的方法。但是在 Prion 的检测中可以通过例如如下方法进行：用单克隆抗 Prion 蛋白质抗体 Mab 13A5，进行 westernblot 检测异常型 Prion(J. Infect.Dis.154:518-1986)。

但是，例如为了用 ELISA 和 westernblot 法等以往的方法进行 Prion 的检测，测定，

以往的方法中为了通过区分正常型 Prion 和异常型 Prion 来检测，首先需要用蛋白酶 K 从被检试样中预先处理正常型 Prion，预先进行分解，除去等处理。此外，western blot 法需要进行电泳，由于复杂需要花费时间，因此存在不适于短时间内检查多种试样这样的问题。进而，ELISA，为了达到必要的敏感度，需要在 Prion 蛋白质的凝集状态解除前进行用 SDS 的一次变性处理和用甲醇处理的蛋白质浓缩操作，在该甲醇处理前和胍硫氰酸处理前需要分别进行离心分离，因此该离心分离操作花费时间，由于该方法必须进行这种复杂的处理，因此存在不适于在短时间内检查多种试样这样的问题。

因此，为了改善这些可以在 Prion 的检测，测定中使用的 ELISA 和 western blot 法的问题，最近已经提出了几种方法。例如，在特开平 10-267928 号公报中公开了，应用 ELISA，用抗 Prion 蛋白质抗体，用任意 DNA 片段标识该抗体，通过 PCR 检测该 DNA 片段的免疫 PCR 法。此外，在特开 2003-130880 号公报中公开了以下方法作为不进行以往的 ELISA 和 western blot 法的费时的电泳操作和离心分离操作而以高敏感度免疫测定异常型 Prion 的方法：通过使用通过在磁性颗粒上固定与经变性剂处理的异常型 Prion 发生抗原抗体反应的第 1 抗体或其抗原结合性片段而成的试剂作为异常型 Prion 免疫测定试剂，可以不进行 ELISA 和 western blot 法的电泳操作和离心分离操作而进行异常型 Prion 的测定，可以在短时间内检查多种试样的方法。

进而，特开 2003-215131 号公报中公开了如下方法：在体液试样中，使 Prion 蛋白质与化学物质反应使之形成共价结合，由此被化学修饰，如果存在病原性 Prion 蛋白质，质谱中可以观察到至少一个峰的 Prion 蛋白质的用质谱分析的方法。这些都是对以往方法的 ELISA 和 western blot 法改良的方法，但是这些方法依然必须经历各种处理，未必足以能够简便且快速地检测、测定 Prion 等抗原蛋白质。此外，这些检测测定方法不能称为是一种适于自动或半自动地进行用于进行该检测测定的处理过程，进行大量试样测定的方法。

另一方面，近年来，作为尤其是可以在生物来源分子的分析等中常用，且不经历试样的物理的分离过程并且可以大致实时检测测定例如蛋白质分子的数量，大小或形状等物理量的分析方法，已知的有荧光相关分光法(FCS:Fluorescence correlation spectroscopy)(Chem.Phys. 4,390-401, 1974; Biopolymers, 13, 1-27, 1974-physical Rev.A, 10:1938-1945,1974; in Topics in Fluorescence Spectroscopy, 1, pp.337-378, Plenum Press, New York and London, 1991; R.Rigler, E.S.Elson (Eds.), Fluorescence Correlation Spectroscopy.Theory and Applications, Springer, Berlin, 2001.)。FCS 通过以下方式来实行：用激光共焦点显微镜在微小区域捕捉被荧光标识的目的分子的介质中的布朗运动，来分析荧光强度根据波动的扩增时间，测定目的分子的物理量(分子的数量，大小)，因此通过这种在微小区域捕捉分子波动的 FCS 的分析在以高敏感度检测特异性分子间相互作用方面现已成为一种有效的手段。

作为在生物体试样中所含的蛋白质等的检测测定中使用 FCS 时的特征，存在以下特征：不经历物理分离过程就可以大致实时地检测溶液中所含经荧光标识的目的分子的浓

度和分子间相互作用。因此，在使用 FCS 的检测系统中，可以省去可作为以往生物体分子的检测系统的主流而使用的 ELISA 等分析手段中所必需的复杂的 Bound/Free 分离过程，因此可以在短时间内以高敏感度测定多量试样，从而趋于自动化测定。

可是，为了用 FCS 进行抗原蛋白质等的检测，使用荧光标识化抗体分子，利用该荧光标识化抗体与抗原蛋白质间的抗原抗体反应，利用该荧光标识化抗体以及由该荧光标识化抗体与抗原蛋白质间的抗原抗体反应形成的抗原抗体复合体分子的依赖于其所具有的形状及其分子量的扩散速度的差异，进行分析。这里，所称的扩散速度(扩散常数或 D)是指单位时间内分子自由扩散的面积。另一方面，所谓扩散时间(Diffusion Time: (DT)或 τD)是指分子通过由装置决定的焦点区域内所需要的时间。

因此，为了通过 FCS 进行试样中的抗原蛋白质等的正确测定，必需要使用使标识化抗体的扩散速度与由该荧光标识化抗体与抗原蛋白质间的抗原抗体反应形成的抗原抗体复合体的扩散速度产生显著的差异的抗原和抗体的组合。因此，以往，由于这种需要，可以通过 FCS 检测的抗原蛋白质等的种类非常有限。作为解决这种问题的方法，以往进行的是：考虑抗原和抗体的形状和分子量对抗原抗体复合体进行各种修饰，给扩散速度设置显著的差异(特开 2001-272404 号公报，特许第 3517241 号公报)。但是，即使使用这些方法，适用 FCS 的检测方法的检测对象也有限度。

专利文献 1：特开平 10-267928 号公报。

专利文献 2：特开 2001-272404 号公报。

专利文献 3：特开 2003-130880 号公报。

专利文献 4：JP,2003-215131 号公报。

专利文献 5：特许第 3517241 号公报。

非专利文献 1 J. Infect.Dis.154:518- 521,1986.

非专利文献 2 Chem.Phys. and 4,390- 401 , 1974.

非专利文献 3 Biopolymers, 13, and 1- 27, 1974.

非专利文献 4 Physical Rev.A, 10:1938-1945, 1974.

非专利文献 5 in Topics in Fluorescence Spectyoscopy, 1, pp.337-378, Plenum Press, New York and London, 1991.

非专利文献 6 R. Rigler, E.S.Elson (Eds.), Fluorescence Correlation Spectyoscopy.Theory and Applications, Springer, Berlin, 2001.

发明内容

发明要解决的问题

本发明的问题在于提供一种抗原的迅速检测和/或测定的方法，该方法可以广泛应用于异常型 Prion 等病原性蛋白质或食品材料中所含的有害蛋白质等抗原蛋白质等抗原的检测和/或测定中，该方法可以以简便的操作，迅速且正确地检测和/或测定该抗原。

用于解决问题的方法

本发明人为了解决上述问题进行的积极的研究中,近年来,着眼于已知作为尤其是生物来源的分子的分析等中常用的不经历试样的物理的分离过程并且可以大致实时检测测定蛋白质分子的数量,大小或形状等物理量的分析方法的荧光相关分光法(FCS:Fluorescence correlation spectroscopy),用该FCS的蛋白质分子等的检测测定中利用通过抗原抗体反应检测的抗原分子的荧光标识化,而且,在通过该抗原抗体反应的荧光标识化时,通过使用荧光标识片段和通过抗原与该荧光标识抗体片段结合的非荧光标识化完全抗体,可以使在不与抗原结合的荧光标识抗体片段和由荧光标识抗体片段-抗原-非荧光标识化完全抗体间的抗原抗体反应形成的复合体之间在其扩散速度上形成显著的差异,因此,发现不依赖于抗原的形状和分子量,即使是分子量比较小的抗原蛋白质等抗原的情况下,用FCS也可以检测测定抗原,可以测定大范围的抗原,从而实现本发明。

也就是说,本发明由一种检测和/或测定抗原的方法构成,该方法采用以抗原蛋白质等抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段,和以该抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体,使抗原与荧光标识抗体片段以及非荧光标识化完全型抗体的形成抗原抗体复合体,通过荧光相关分光法检测、分析形成的抗原抗体复合体。本发明的检测和/或测定抗原的方法可以广泛应用于异常型Prion等病原性蛋白质或食品材料中所含的有害蛋白质等抗原蛋白质等抗原的检测和/或测定中,该方法可以以简便的操作,迅速且正确地检测和/或测定该抗原蛋白质。

如果对本发明的功能进行进一步说明,本发明由如下内容构成:通过混合以抗原蛋白质等抗原(例如,异常型Prion等病原性蛋白质和过敏原蛋白质等有害蛋白质)的各个不同表位(抗原决定簇)为目标的荧光标识抗体片段和完全型抗体(或其混合物(本发明提供的抗原检测试剂))和抗原,使之发生抗原抗体反应,FCS测定这种混合物。检测和/或测定试样中如果存在抗原蛋白质等抗原,这些荧光标识片段,非荧光标识化完全型抗体就会通过该抗原形成复合体(图1)。

在用FCS的抗原的检测和/或测定中,为了验证使用非荧光标识化完全型抗体时抗原抗体复合体分子的布朗运动中对扩散速度的影响,不使用位于复合体中心的抗原,用完全型抗体和直接识别该抗原的标识化抗体片段进行FCS(图2)。测定的结果是,只有标识化抗体片段的扩散速度与标识化抗体片段-抗体复合体的扩散速度之间获得了显著差异(图3)。也就是说,如图3所示,进行识别非荧光标识化完全型抗体(图3,Ab)的Fc部分(图2,表位C)的荧光标识抗体片段与非荧光标识化完全型抗体之间的抗原抗体反应,用FCS进行测定的结果是,只有标识化抗体片段(Ab(-))的扩散时间与由荧光标识抗体片段和非荧光标识化完全型抗体形成的复合体(Ab(+))的扩散时间理论上达到约600 μ s,900 μ s,与之相对,只有测定值达到约600 μ s,950 μ s的标识化抗体片段的扩散速度和标识化抗体片段-抗体复合体的扩散速度之间存在显著差异。

这意味着，存在位于抗原抗体复合体的中心的抗原，形成荧光标识抗体片段-抗原-非荧光标识化完全型抗体的复合体时，这些荧光标识分子的扩散速度中必然产生显著差异。因此，清楚了如果使用这种组合，不论抗原的分子量通过 FCS 测定都可以检测抗原蛋白质等抗原。在本发明的方法中，用于制备使用的荧光标识抗体片段的抗体和非荧光标识化完全型抗体优选使用 IgG 类单克隆抗体。

并且，上图 2 和 3 中所示的实验例如下操作：

(使用的材料)：

Alexa Fluor647(Zenon One Mouse IgG1 标识试剂盒)

Fab647(Zenon One IgG1 标识试剂)

抗体(图 2 中表示为 Ab)(Zenon One 封闭试剂(小鼠 IgG))

(FCS 测定装置)

MF-20 (分子间相互作用分析系统：Olympus 光学工业株式会社)

(操作)

将经 N101(日本油脂)封闭处理的只有 10nM 的 Fab647(小鼠 IgG 抗体)的溶液和与 100nM 完全型抗体混合的 Fab647 混合物提供给 384 孔板(Olympus)，用 MF20(Olympus)测定。测定以激光功率 100 μ W 进行 30 秒 \times 3 次的测定。用 MF20 的处理软件以扩散时间为首导入各参数。

也就是说，具体的是，本发明由以下内容构成：(1) 一种通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于使用以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段，和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体，使之形成抗原与荧光标识抗体片段以及非荧光标识化完全型抗体的抗原抗体复合体，通过荧光相关分光法检测、分析形成的抗原抗体复合体；和(2)根据前述(1)记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述抗原是抗原蛋白质；和(3)根据前述(1)或(2)记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述通过荧光相关分光法检测、分析形成的抗原抗体复合体是利用基于荧光标识化荧光标识抗体片段与形成的标识化抗原抗体复合体的扩散速度差异的识别对抗原进行检测、分析；和(4) 根据前述(1)-(3)中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述抗原的迅速检测和/或测定是基于通过荧光相关分光法对形成的抗原抗体复合体进行的检测、分析，对抗原的存在，抗原的浓度，抗原的大小或抗原的形狀的检测和/或测定；和(5)根据前述(1)-(4)中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段是由以抗原作为免疫原制备的单克隆抗体而制备的，所述以抗原蛋白质的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体是以抗原作为免疫原制备的单克隆抗体。

此外，本发明还由以下内容构成：(6) 一种通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检

测和/或测定方法，其特征在于在被检试样中添加以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段，和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体，使之进行抗原抗体反应，通过荧光相关分光法检测、分析所形成的抗原与荧光标识抗体片段以及非荧光标识化完全型抗体的抗原抗体复合体；和(7) 根据前述(6)记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述抗原是抗原蛋白质；和(8) 根据前述(6)或(7)记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述通过荧光相关分光法的抗原的检测和/或测定不经历被检试样中所含的抗原的物理的分离过程而进行；和(9) 根据前述(6)-(8)中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于自动或半自动地进行以下过程：在被检试样中添加以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段，和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体的过程，通过该被检试样，荧光标识抗体片段和非荧光标识化完全型抗体进行抗原抗体反应的过程，和用荧光相关分光法检测分析进行了该抗原抗体反应的被检试样的过程；和(10) 根据前述(6)-(9)中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述被检试样是生物体蛋白质试样，所述抗原是病原性蛋白质抗原。

进而，本发明还由以下内容构成：(11) 根据前述(10)中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述病原性蛋白质抗原是异常型 Prion；和(12) 根据前述(6)-(9)中任一项中记载的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法，其特征在于所述被检试样是食品材料，所述抗原是食品材料中所含的有害蛋白质抗原；和(13)一种用于通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定的检测试剂，其由以检测和/或测定的抗原表位为目标的荧光标识化荧光标识抗体片段和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体构成；和(14) 一种用于通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定的试剂盒，其装备有前述(12)记载的检测试剂。

附图说明

图 1：是表示本发明的用 FCS 对抗原进行迅速检测和/或测定的方法的概略图；

图 2：是表示为了证明本发明的用 FCS 对抗原进行迅速检测和/或测定的方法的功能，表示就在只有荧光标识抗体片段时与有荧光标识抗体片段和完全型抗体的复合体时的扩散速度的差异进行的试验的概略图；

图 3：是表示为了证明本发明的用 FCS 对抗原进行迅速检测和/或测定的方法的功能，表示就在只有荧光标识抗体片段时与有荧光标识抗体片段和完全型抗体的复合体时的扩散速度的差异进行的试验的概略图；

图 4：是表示本发明中使用的 FCS 测定装置的概略的图；

图 5：是表示在本发明的用 FCS 对抗原进行迅速检测和/或测定的方法中使用的荧光标识抗体片段的制备的概况的图；

图 6: 是表示在本发明的实施例中, 使用荧光标识抗体片段和完全型抗体, 就由该抗体与抗原蛋白质的复合体的形成所产生的扩散时间的差异进行试验的结果的图。

具体实施方式

本发明的通过荧光相关分光法对抗原进行迅速检测和/或测定方法由以下内容构成: 使用以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段, 和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体, 使抗原与荧光标识抗体片段以及非荧光标识化完全型抗体的形成抗原抗体复合体, 通过荧光相关分光法(FCS)检测、分析所形成的抗原抗体复合体。

也就是说, 为了实施本发明, 通过以下方式进行: 在被检试样中添加以抗原的表位作为目标的荧光标识化的荧光标识抗体片段, 和以抗原的其它表位为目标的非荧光标识化完全型抗体, 混合添加了该抗体的试样使之进行抗原抗体反应, 通过荧光相关分光法检测、分析所形成的抗原与荧光标识抗体片段以及非荧光标识化完全型抗体的抗原抗体复合体, 迅速检测和/或测定试样中的抗原的存在, 大小, 浓度等来进行。本发明的通过 FCS 的检测和/或测定中的处理操作不经历被检试样中所含抗原的物理的分离过程, 只添加混合试样和由荧光标识抗体片段和非荧光标识完全型抗体构成的检测试剂的操作, 然后就可以进行自动或半自动地进行抗原的检测测定的过程。

(抗蛋白质抗体的制备)

在本发明中, 制备特异性结合于抗原的抗体以制备作为检测试剂使用的荧光标识抗体片段和非荧光标识化完全型抗体。作为可以在本发明中使用的特异性结合抗原的抗体, 可以例举有多克隆抗体和单克隆抗体等, 但是其中单克隆抗体在其特异性方面更为优选。为了制备针对这种抗原的抗体, 首先纯化, 获得检测抗原。该抗原可以用公知的纯化方法从来源分离纯化, 此外, 如果抗原是抗原蛋白质, 该抗原蛋白质的氨基酸序列是公知的, 也可以通过基因工程学方法, 用微生物或动物细胞等使之产生该抗原蛋白质, 从而纯化获得。可能的情况是, 通过肽的化学合成法制备该抗原蛋白质。肽的化学合成可以采用公知的合成方法。例如, 可以例举有叠氮法, 酸酐仿法, 酸酐法, 混合酸酐法, DCC 法, 活性酯法, 羰基咪唑法(carbo imidazole), 氧化还原法等。

为了制备针对该抗原的抗体, 使用该抗原, 用常用的方法使动物或植物致敏, 进行制备。例如, 在单克隆抗体的制备中, 可以使用带来连续细胞系的培养物产生的抗体的杂交瘤法(Nature 256, 495-497, 1975), TORIOMA 法, 人 B 细胞杂交瘤法(Immunology Today 4, 72, 1983)和 EBV-杂交瘤法(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985)等任意方法。

为了制备抗原蛋白质等抗原的单克隆抗体, 对大鼠, 小鼠, 家兔等哺乳动物施以该抗原蛋白质作为抗原, 使之致敏。根据需要, 还可以使用等弗氏(freund's)完全佐剂(FCA), 弗氏不完全佐剂(FIA)等佐剂。免疫主要通过注入于静脉内, 皮下, 腹腔内中进行。此外, 免疫的间隔没有特别的限定, 在数日至数周间隔, 进行 1-10 次免疫。

然后，自最终的免疫日起 1-60 天后收集抗体产生细胞。作为抗体产生细胞，可以例举有脾脏细胞，淋巴结细胞，外周血细胞等。为了获得杂交瘤，进行抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合。作为与抗体产生细胞融合的骨髓瘤细胞，可以使用一般可以获得的确立细胞系。作为使用的细胞株，可以使用具有药物选择性，具有在未融合状态下在 HAT 选择培养基(含有次黄嘌呤，氨嘌呤，胸腺嘧啶脱氧核苷)中无法生存且只能在于抗体产生细胞融合的状态下生存的性质的骨髓瘤细胞。

从细胞融合处理后的细胞中选择杂交瘤。作为从建立的杂交瘤中收集单克隆抗体的方法，可以采用通常的细胞培养法或腹水形成法等。上述抗体的收集方法中需要纯化抗体时，可以适当选择硫酸铵盐析法，阳离子交换层析，凝胶过滤，亲和层析等公知的方法，或者通过它们的组合来纯化。

在本发明中，作为本发明中使用的抗原蛋白质的抗体，除了如上所述的制备外，存在已经制备好的市售的抗体时可以使用该抗体。

(荧光标识抗体片段的制备)

本发明的抗原的迅速检测和/或测定法中，作为与抗原进行抗原抗体反应用于检测的检测试剂，可以使用由该抗原制备的荧光标识抗体片段。在本发明中，可以在荧光标识抗体片段的制备中使用的抗体，可以选择相同的本发明中可使用的非荧光标识化完全型抗体和其结合的抗原的表位不同的抗体。在该荧光标识抗体片段的制备中，通过用胃蛋白酶和木瓜蛋白酶等酶将抗原的完全型抗体片段化，用 2-巯基甲胺或 2-巯基乙醇等将其还原形成单体后，标识化来制备。该标识化中，可以使用荧光色素，例如可以使用异硫氰酸荧光素(FITC)，Alexa532 等荧光色素。

(用 FCS 进行检测测定)

本发明的抗原的迅速检测和/或测定法中，在被检试样中添加，混合荧光标识抗体片段和非荧光标识化完全型抗体作为检测试剂，通过 FCS(荧光相关分光法)对进行了抗原抗体反应的被检试样进行抗原的检测和/或测定。FCS 是一种利用溶液中的荧光分子的布朗运动，获得分子的“大小”和“数量”等物理量的方法。

FCS 的特征有：不经历被检试样中所含抗原的物理的分离过程，就可以大致实时检测。因此，在采用 FCS 的检测系统中可以省去作为主流的以往的生物体分子检测系统中(例如 ELISA 等)所必需的复杂的 Bound/Free 分离过程。因此，可以在短时间内以高敏感度且自动测定多量试样。FCS 已知有多种种类，但是只要在本发明中不阻碍本发明的检测、测定对象的检测测定，也可以使用任意一种方法(蛋白质 核酸 酶，Vol.44, No.9, 1431-1438, 1999; Bioindustry, 4 月刊, p52-59, 2003; 特开 2001-272404 号公报; 特许第 3517241 号公报)。

(FCS 测定装置)

可以在使用 FCS 的检测和测定中使用的装置的基板结构示于图 4 中。如果通过附图来概述，(A)表示 FCS(荧光相关分光法)装置的模式图。由激光发出的激发光通过分

色镜(DM)和接物镜被导向盖玻片上的试样溶液中。荧光发光通过 long pass filter 或带通滤波器(F), 在共焦点上的小孔处去除共焦点面以外的背景光, 被导向雪崩光电二极管检测器 (APD) 或光电倍增管(PMT), 进而用数字相关器分析其信号。(B)表示观测区域的扩大模式图。表示布朗运动的荧光分子通过用接物镜挤压到极限的共焦点区域的样子。(C)表示荧光相关分光分析后的相关曲线。通过用公式分析观测的荧光强度的波动, 可以获得分子的数量和大小等物理量。

在通过 FCS 的测定中, 通过使用共焦点光学系统, 检测发自试样溶液的极微小区域(直径约 400nm, 轴长约 2 μm, 体积~10⁻¹⁶)的荧光(图 4)。在本发明的实施例中使用 Olympus 公司制造的 MF20 作为 FCS 测定装置。测定通过在波长 543, 633nm 处进行 3 次 30 秒钟的测定的方法实施。

(观测的荧光强度的波动)

在通过 FCS 的测定中, 由于观测区域是开放系统, 荧光分子按照布朗运动出入区域内。于是, 观测区域中的分子的数量以某值为中心变动, 发生数次波动。然后, 观察到由这种数次波动引起的荧光强度的波动(蛋白质 核酸 酶, Vol.44, No.9, 1431-1438, 1999)。

(波动的分析)

通过用以下公式(1)-(4)分析所观察的荧光强度的波动, 可以获得分子的“大小”和“数量”等物理量。

也就是说, 用自相关函数从波动的信号引出信息。FCS 中使用的自相关函数由公式(1)表示。

公式 1

$$C(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[\frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \right] \left[\frac{1}{1 + (1/S)^2 (\tau/\tau_D)} \right]^{1/2}$$

这里, s 为 $s = z/w$, 表示观测区域的半径(w)和半长轴的比。 τ_D 称为扩散时间(或相关时间), 表示荧光分子通过扩散通过观测区域的平均时间。 N 表示在一定时间内存在于观测区域中的分子的平均数。

如果用公式(1)分析波动, 可以获得如图 4(C)中所示的曲线, 由此可以获得表示分子的“波动”扩散时间 τ_D 和分子的“数量” N 。如果分子的尺寸(大小)通过与其它分子会合等变大, 相关曲线就向右移动, 相反, 如果通过解离等大小变小就向左移动。

公式(1)所得的扩散时间 τ_D 存在扩散常数 D 与公式(2)的关系。

公式 2

$$\tau_D = w^2/4D$$

进而, 根据假定分子为球的情况的 Einstein-Stokes 公式, 扩散常数 D 与分子半径 r 存在公式(3)所示的关系。

公式 3

$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta r}$$

这里， κ_B ， T 和 η 分别是玻耳兹曼常数，绝对温度和溶剂的粘性。因此，根据公式(2)和(3)扩散时间 τ_D 与相当于分子的“大小”(尺寸)的分子的半径 r 的关系如公式(4)所示。

公式(4)

$$\tau_D \propto 1/D \propto r$$

通过用公式(1)和(4)分析这种荧光强度的波动，可以获得存在于观察区域内的分子的“数量”和“大小”。与波动和自相关函数相关的详细说明在说明书中解说(武者利光著《Bluebacks 波动》，讲坛社，1980; D, Eisenberg 等人名著《用于生命科学的物理学(下)》，培风馆，p596-600，1988; 日野干雄著《光谱分析》朝仓书店，p25-39，1977)。

(使用 FCS 测定的场合的操作，需要时间)

对于本发明的通过 FCS 对抗原蛋白质进行检测和/或测定的操作，所需时间，通过与使用以往方法 ELISA 的抗原蛋白质的检测和/或测定法的情况进行比较来表示。

(1) 操作的比较(简便性的比较)

本发明的通过 FCS 对抗原蛋白质进行迅速检测和/或测定的方法的各个步骤中的操作示于表 1。

表 1

1. 操作的比较(简便性的比较)

步骤	ELISA 法	本方法
试样处理过程	试样向平板的固定(抗原抗体反应)	用本发明的试剂对试样进行标识 (抗原抗体反应)
	非特异性吸附试样和游离试样的清洗(3 次)	
信号扩增过程	酶标识抗体向固定化试样的固定	—
	非特异性吸附试剂的清洗(5 次)	
	基质发色液的分注(酶反应)	
	反应停止液的分注(酶反应)	
分析过程	用平板读数器进行信号测定	用 FCS 进行信号分析

(2) 所需时间的比较(迅速性的比较)

本发明的通过 FCS 对抗原蛋白质进行迅速检测和/或测定的方法的各个步骤所需时间示于表 2 中。

表 2

2.所需时间的比较(迅速性的比较)

步骤	ELISA 法	本方法
试样处理过程	试样向平板的固定 75 分钟	用本发明的试剂对试样进行 标识 75 分钟
	非特异性吸附试样和游离试样的清 洗 1 分钟	
信号扩增过程	酶标识抗体向固定化试样的固定 60 分钟	—
	非特异性吸附试剂的清洗 1 分钟	
	基质发色 30 分钟	
分析过程	用平板读数器进行信号测定 2 分钟 (96 种试样)	用 FCS 进行信号分析 20 分钟 (10 秒测定/1 种试样×96 种 试样)
合计	169 分钟	95 分钟

以下，通过实施例对本发明进行更具体的说明，但是本发明的技术范围不受这些示例的限定。

实施例 1

[使用 FCS 的抗原(抗原蛋白质)的检测测定]

(装置和材料)

(1) 装置

FCS 装置

分子间相互作用分析系统(MF-20, Olympus 光学工业株式会社制)

(2) 材料

荧光标识抗体片段的制备

该实施例中，以抗 Prion 抗体的荧光标识抗体片段(Fab'-Alexa532)作为例子。

Fab'-Alexa532 的制备的概况示于图 5 中。使用 PD-10 柱(Pharmacia)以柠檬酸溶液(pH6.3)平衡抗 PrP 抗体溶液后，添加胃蛋白酶(1% (w/w)) (37 °C，约 30 分钟)，制备 F(ab')₂。用 HPLC (柱; G300SWXL)确定消化程度。然后，用 0.1M 磷酸缓冲液(pH6.3)，用 FPLC (柱; Superdex 200 (16/60))纯化后，浓缩保存。进而，添加 2- mercapto monomethylamine (0.01M)还原(37 °C，约 1.5 小时)，制备 F(ab')₂。用 HPLC (柱; G300SWXL)确定还原的程度。然后，使用 PD-10 柱(Pharmacia)，以柠檬酸缓冲液(pH3.5)

平衡化后, 迅速加入 2 当量的 Alexa532 顺丁烯二酰亚胺(分子探针), 于 4℃ 放置一晚进行结合。然后, 用 0.05M 磷酸缓冲液(pH7.8, 0.05%NH₃), 用 FPLC (柱; Superdex 200 (16/60))纯化, 于-80℃ 冷冻保存。两种抗 PrP 抗体(上述标识片段化的抗体, 作为完全型抗体使用的抗体)和重组牛 PrP(抗原)都是由富士 REBIO(株)提供的。

(抗原蛋白质的检测, 测定实验操作)

在用 N101(日本油脂)封闭处理的 384 孔板(Olympus 光学工业株式会社)上, 按顺序加入 Fab'-Alexa532(荧光标识抗体片段) (6.86E-10M), prion 蛋白质(抗原蛋白质) (6.12E-8M)和完全型抗体 (抗牛重组 prion 抗体) (8.76E-7M), 用移液管充分搅拌。37 °C 放置 1 小时后, 用 MF20 (FCS 测定装置: Olympus 光学工业株式会社)测定。测定时的激光功率设为 150 μ W, 进行 30 秒×3 次的测定。使用 MF20 的处理软件以扩散时间为首导入各参数。

(实验结果)

实验结果示于图 6。在该实施例中, Prion 蛋白质的分子量为约 30kDa, 因此存在不使用完全型抗体时扩散时间不存在显著差异的可能性。具体的是, 荧光标识抗体片段和复合体(荧光标识抗体片段和+Prion 蛋白质)的理论的扩散时间分别为约 600 μ s, 650 μ s。在实验中, 荧光标识抗体片段和复合体(荧光标识抗体片段和+Prion 蛋白质)的扩散时间分别达到约 600 μ s, 650 μ s, 不会产生显著的差异(图 6)。另一方面, 荧光标识抗体片段和复合体(荧光标识抗体片段和+完全型抗体+Prion 蛋白质)的理论的扩散时间分别为约 600 μ s, 900 μ s, 会产生显著的差异。在实验中, 荧光标识抗体片段和复合体的扩散时间分别达到约 600 μ s, 950 μ s, 接近于理论值, 产生了显著的差异(图 6)。因此, 通过该实施例, 验证了使用本方法可以检测如果不使用本发明的方法就无法检测的分子量小的抗原。

工业上利用的可能性

本发明的通过荧光相关分光法(FCS)对抗原进行迅速检测和/或测定方法, 不依赖于检测和/或测定的抗原蛋白质等抗原的形状和分子量, 即使是异常型 Prion 等病原性蛋白质和食品材料中所含的有害蛋白质等分子量比较小的抗原蛋白质等抗原的情况下, 也可以检测和测定, 因此可以用于检测和/或测定大范围的抗原。此外, 本发明的检测和/或测定法通过 FCS 进行检测和/或测定, 不经历试样的物理的分离过程, 就可以大致实时检测测定蛋白质分子的数量, 大小或形状等物理量, 可以用简便的操作, 迅速且正确地检测和/或测定抗原。

进而, 通过 FCS 进行检测和/或测定的本发明的方法, 用于用 FCS 检测和测定的处理操作是混合被检试样(包括抗原)和由荧光标识抗体片段和非荧光标识化完全型抗体构成的检测试剂, 只进行抗原抗体反应的操作, 并且, 由于其测定结果可以实时监测, 因此被检试样与检测试剂的混合直至反应得到的测定结果的表示趋于自动或半自动进行。此外, 与以往可以在 Prion 等抗原蛋白质的测定中使用的 ELISA 和 westernblot 法等

方法比较，该方法分析操作中涉及的步骤少，试样即使为数 μl -数十 μl ，也可以测定，因此可以经济地且大量地进行被检试样的测定，可有望作为一种实用的抗原蛋白质的测定方法来使用。

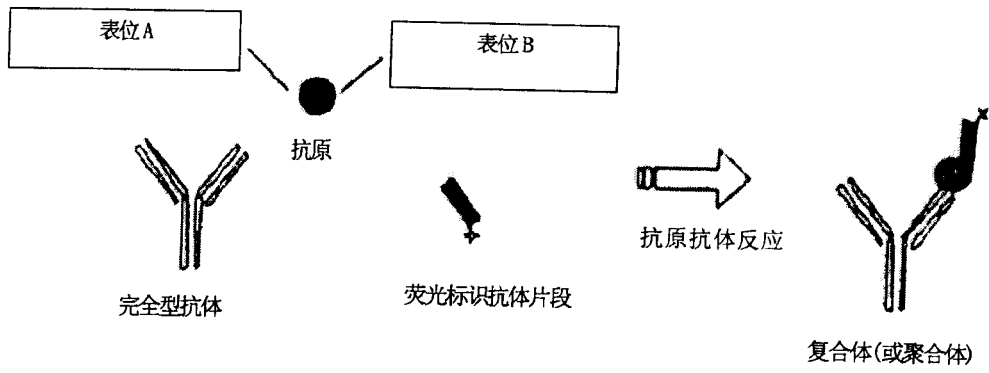


图 1



图 2

扩散时间中的显著差异 (抗原 (-))

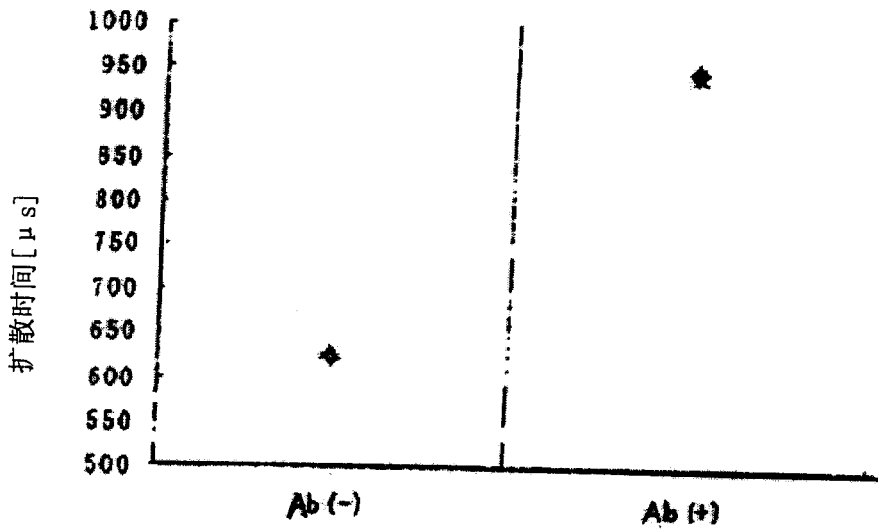


图 3

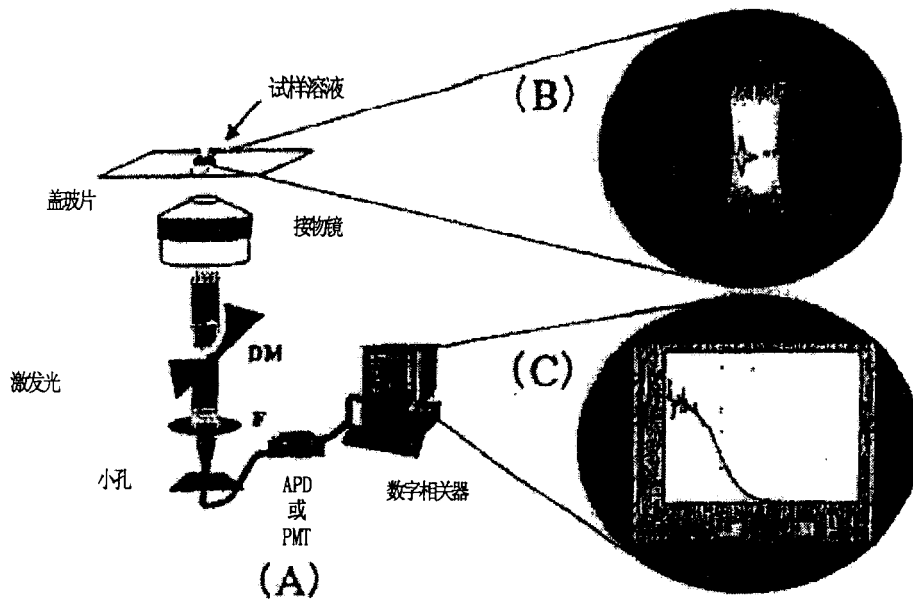


图 4

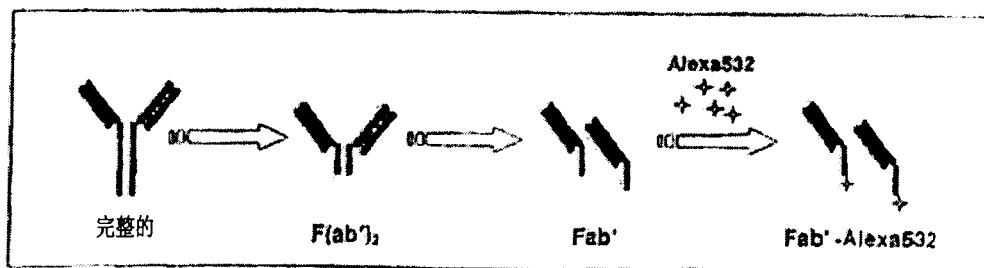


图 5

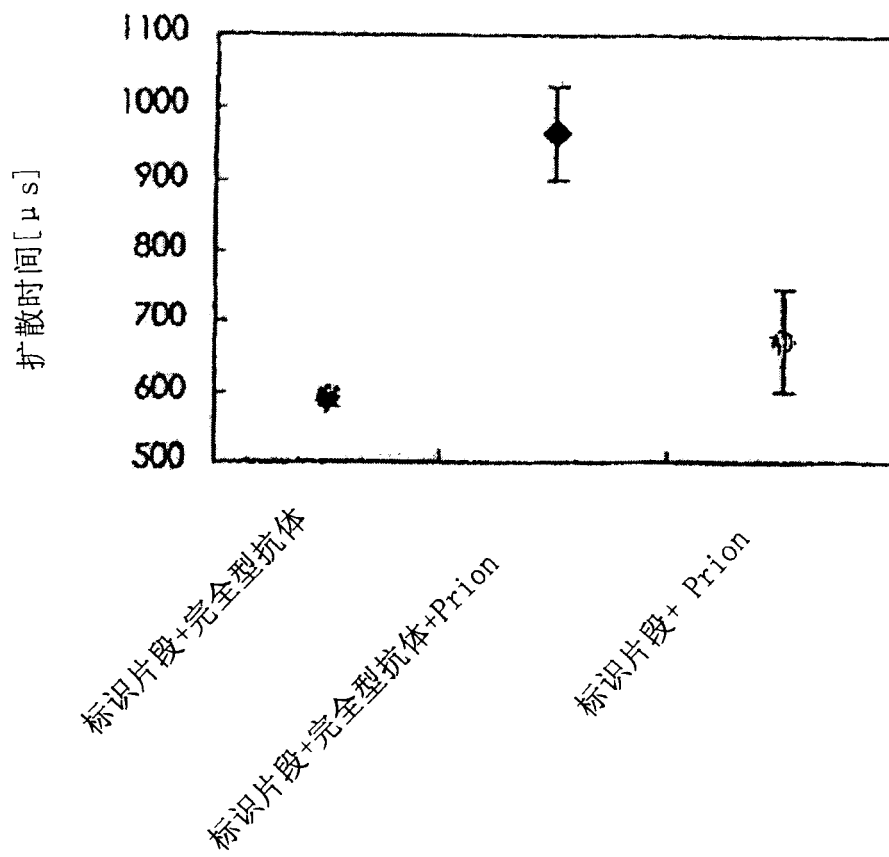


图 6

专利名称(译)	通过荧光相关分光法迅速检测和/或测定抗原的方法		
公开(公告)号	CN1997894A	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200580018036.1	申请日	2005-06-01
[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)	独立行政法人科学技术振兴机构		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
[标]发明人	金城政孝 堀内基広 藤井文彦 坂田启司 田村守 上野雅由 柳谷孝幸		
发明人	金城政孝 堀内基広 藤井文彦 坂田启司 田村守 上野雅由 柳谷孝幸		
IPC分类号	G01N33/542 G01N21/64 G01N33/558 G01N21/78 G01N33/536 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2800/2828 G01N33/6896 G01N33/536 G01N33/6857 G01N33/582		
优先权	2004166440 2004-06-03 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种通过简便的操作能够迅速且正确地检测和/或测定异常型 prion 或像食品材料中所含的有害蛋白质这样的抗原蛋白质等抗原的检测和/或测定方法。在使用荧光相关分光法(FCS)的抗原分子的检测，测定中，通过使用荧光标识抗体片段和通过抗原与该荧光标识抗体片段结合的非荧光标识化完全抗体，使在不与抗原结合的荧光标识抗体片段和由荧光标识抗体片段 - 抗原 - 非荧光标识化完全抗体之间的抗原抗体反应形成的复合体之间产生了扩散速度中的显著差异，使之不依赖于抗原的形状和分子量，即使是像分子量较小的抗原蛋白质这样的抗原的情况也可以使用FCS检测测定抗原，可以迅速测定大范围的抗原。

