



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107589249 B

(45)授权公告日 2020.04.07

(21)申请号 201710202700.2

(22)申请日 2017.03.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107589249 A

(43)申请公布日 2018.01.16

(30)优先权数据
2016-129759 2016.06.30 JP

(83)生物保藏信息
FERM BP 10583 2005.04.07
NITE BP-1483 2012.12.13
NITE BP-845 2010.09.21

(73)专利权人 希森美康株式会社
地址 日本兵库县

(72)发明人 桥田诚一 森本彩 渡边敏弘
山垣内孝博

(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 何杨

(51)Int.Cl.
G07K 16/00(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件
Eiji Ishikawa等.Principle and Applications of Ultrasensitive Enzyme Immunoassay (Immune Complex Transfer Enzyme Immunoassay) for Antibodies in Body Fluids.《Journal of Clinical Laboratory Analysis》.1993,第7卷第376-393页.

审查员 陈伟潘

权利要求书2页 说明书19页 附图2页

(54)发明名称

用于通过免疫复合物转移法检测被检物质的抗体试剂及其制造方法、以及该抗体试剂的用途

(57)摘要

本发明涉及用于通过免疫复合物转移法检测被检物质的抗体试剂及其制造方法、以及该抗体试剂的用途。本发明的课题在于,提供一种能够减少免疫复合物转移法中的非特异性信号的抗体试剂。通过提供一种抗体试剂来解决上述课题,所述抗体试剂含有能够与被检物质结合的标记抗体,与免疫复合物转移法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数在抗体试剂所含的标记抗体的分子数中所占的比例为约 3.34×10^{-7} 以下。

1. 一种被检物质的检测方法,其含有以下工序:

使含有能够与所述被检物质结合的标记抗体的抗体溶液与第1固相和/或第2固相接触的工序、

使所述固相和与所述固相接触的抗体溶液分离、由与所述固相接触的抗体溶液制备所述抗体试剂的工序、

将所述抗体试剂、含有所述被检物质的试样、含有能够与所述被检物质结合的捕捉物质的试剂和所述第1固相混合,将含有所述抗体试剂所含的标记抗体、所述被检物质和所述捕捉物质的免疫复合物固定在所述第1固相上的工序、

从所述固定工序所得到的混合物中除去未包含于所述免疫复合物的游离成分的工序、

使所述免疫复合物从所述第1固相游离的工序、

将游离的所述免疫复合物转移到与所述第1固相不同的第2固相上的工序、和

检测基于所述第2固相上的免疫复合物所含的所述标记抗体的信号,基于所述信号检测所述被检物质的工序。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中

所述固相具有结合物质,且

所述捕捉抗体具有能够与所述结合物质结合的结合配偶体。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中

所述结合物质为与二硝基苯(DNP)基特异性结合的抗体,且

所述结合配偶体为DNP基。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中

所述被检物质为HBs抗原,

所述抗体溶液所含的抗体为抗HBs抗体,且

所述捕捉物质为结合于所述HBs抗原中与所述抗体溶液所含的抗体所结合的位点不同的位点的抗HBs抗体。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述标记为选自由酶及荧光物质组成的组中的至少1种。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述酶为选自碱性磷酸酶、过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、糖苷酶、多酚氧化酶、酪氨酸酶、酸性磷酸酶及荧光素酶中的至少1种。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中,与所述免疫复合物转移法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数在所述抗体试剂所含的标记抗体的分子数中所占的比例为 3.34×10^{-7} 以下。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中,将不含被检物质的试样供于权利要求1所述的方法,测定所述被检物质不存在时的非特异性信号,

对基于1次检测中使用的量的所述抗体试剂所含的标记抗体的信号进行测定,

通过下述式(1)获得的第1比的值为 1.02×10^{-7} 以下,

第1比 = $a/b \cdots (1)$

式中,a为所述被检物质不存在时的非特异性信号的值,b为基于1次检测中使用的量的所述抗体试剂所含的标记抗体的信号的值。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中,将不含被检物质的试样供于权利要求1所述的方

法,测定所述被检物质不存在时的非特异性信号,

将不含被检物质的试样供于权利要求1所述的方法中的固定工序及游离成分的除去工序,测定不进行转移工序时的所述被检物质不存在时的非特异性信号,

通过下述式(2)获得的第2比的值为 4.68×10^{-2} 以下,

$$\text{第2比} = a/c \cdots (2)$$

式中,

a为所述被检物质不存在时的非特异性信号的值,

c为不进行转移工序时的所述被检物质不存在时的非特异性信号的值。

用于通过免疫复合物转移法检测被检物质的抗体试剂及其制备方法、以及该抗体试剂的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及用于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质的抗体试剂、及含有该抗体试剂的试剂盒。另外,本发明涉及该抗体试剂的制造方法。进一步地,本发明涉及使用该抗体试剂的被检物质检测方法。

背景技术

[0002] 免疫学测定方法能够利用试样中的被检物质和与该被检物质结合的检测用抗体之间的特异性抗原抗体反应以高精度检测被检物质。但已知的是,免疫学测定方法中,试样中的被检物质以外的物质成为非特异性反应的原因。这类非特异性反应使背景信号上升,因此免疫学测定方法的灵敏度、特异性下降。

[0003] 一直以来,为了抑制免疫学测定方法中的非特异性反应,尝试了各种对策。例如,专利文献1公开了:将具有规定范围内的平均分子量及等电点的酪蛋白等蛋白质作为封闭剂添加于试样中。专利文献2公开了:对与标记抗体中使用的抗体相同的抗体进行加热处理,将所得到的丧失了本来的反应性的抗体作为非特异性反应的抑制剂添加于试样中。专利文献3公开了:在将磁性粒子作为固相使用的免疫学测定方法中,为了防止试样中的被检物质以外的物质与磁性粒子非特异性结合,将表面由与磁性粒子相同的材料形成的不具有磁性的粒子添加于试样中。专利文献4公开了:为了抑制人血液中存在的人抗小鼠抗体所引起的非特异性反应,使用将酶相对于检测用抗体的结合数限定为规定比例的酶标记抗体。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本专利第2523171号

[0007] 专利文献2:日本专利第3667434号

[0008] 专利文献3:日本专利第5005511号

[0009] 专利文献4:日本专利第4866724号

发明内容

[0010] 供于免疫学测定方法的试样、特别是生物试样中,除了被检物质以外,还含有各种物质。因此,免疫学测定方法中,非常重视对来自试样的被检物质以外的物质所引起的非特异性反应进行抑制。实际上,上述现有技术均为用于防止试样中的被检物质以外的物质非特异性吸附或结合于检测用抗体、固相的技术。但是,本发明人发现,测定所使用的试剂中也存在成为非特异性反应的原因的物质。即,本发明人发现了如下问题:在免疫复合物转移测定法中,能够与被检物质结合的标记抗体非特异性结合于固相并产生非特异性信号。换言之,发现了如下问题:并不是试剂所含的标记抗体的所有分子都均一地与被检物质形成特异性结合,这些抗体分子中,不仅存在与被检物质特异性结合的标记抗体,也存在非特异性吸附于固相的标记抗体。本发明的课题在于,分离并除去这种非特异性吸附于固相的标

记抗体,减少非特异性信号。

[0011] 用于解决课题的方案

[0012] 本发明人发现,通过使含有能够与被检物质结合的标记抗体的抗体溶液与固相接触的预处理,可以减少由该标记抗体产生的非特异性信号,从而完成了本发明。

[0013] 因此,本发明的第1方式提供一种抗体试剂,其用于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质。该抗体试剂含有能够与被检物质结合的标记抗体,与免疫复合物转移法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数在抗体试剂所含的标记抗体的分子数中所占的比例为约 3.34×10^{-7} 以下。

[0014] 本发明的第2方式提供一种试剂盒,其用于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质。该试剂盒含有上述抗体试剂、含有能够与被检物质结合的捕捉物质的试剂、游离剂、第1固相和第2固相。第1结合物质在第1固相上。第2结合物质固定在第2固相上。捕捉物质具有能够与第1结合物质结合的第1结合配偶体和能够与第2结合物质结合的第2结合配偶体。游离剂使第1结合物质与第1结合配偶体的结合解开。

[0015] 本发明的第3方式提供一种抗体试剂的制造方法,所示抗体试剂用于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质。该方法含有以下工序:使含有能够与被检物质结合的抗体的抗体溶液与免疫复合物转移法所使用的固相接触的工序;及使固相和与该固相接触的抗体溶液分离,由与固相接触后的抗体溶液制备抗体试剂的工序。该制造方法中,抗体溶液中的抗体具有标记,固相具有结合物质。该结合物质是用于将免疫复合物转移法所使用的作为捕捉物质的捕捉抗体固定在固相上的物质。免疫复合物转移法中,捕捉抗体与被检物质特异性结合、且具有能够与结合物质结合的结合配偶体。

[0016] 本发明的第4方式提供一种含有能够与试样中的被检物质结合的抗体的抗体溶液的预处理方法。该方法含有以下工序:使含有能够与被检物质结合的抗体的抗体溶液与免疫复合物转移法所使用的固相接触的工序;及使固相和与固相接触后的抗体溶液分离,由与固相接触后的抗体溶液制备用于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质的抗体试剂的工序。该预处理方法中,抗体溶液中的抗体具有标记,固相具有结合物质。该结合物质是用于将免疫复合物转移法所使用的作为捕捉物质的捕捉抗体固定在固相上的物质。免疫复合物转移法中,捕捉抗体与被检物质特异性结合、且具有能够与结合物质结合的结合配偶体。

[0017] 本发明的第5方式提供被检物质的检测方法。该方法含有以下工序:将通过上述制造方法制备的抗体试剂、含有被检物质的试样、含有能够与被检物质结合的捕捉物质的试剂和第1固相混合,将含有抗体试剂所含的标记抗体、被检物质和捕捉物质的免疫复合物固定在第1固相上的工序;从固定工序所得到的混合物中除去未包含于免疫复合物的游离成分的工序;使免疫复合物从第1固相游离的工序;将游离后的复合物转移到与第1固相不同的第2固相上的工序;及检测基于第2固相上的免疫复合物所含的标记抗体的信号,基于信号检测被检物质的工序。

[0018] 发明效果

[0019] 通过使含有能够与被检物质结合的标记抗体的抗体溶液与固相接触,从而部分标记抗体分子与固相发生非特异性吸附。通过将该固相分离、除去,从而可以将与固相发生非特异性吸附的标记抗体分子从抗体溶液中除去。由此,可以减少免疫复合物转移法中的非

特异性信号。

附图说明

- [0020] 图1为示出本实施方式的抗体试剂的一例的概要图。
- [0021] 图2A为示出以试剂盒形态提供的本实施方式的抗体试剂的一例的概要图。
- [0022] 图2B为示出本实施方式的试剂盒的一例的概要图。
- [0023] 图2C为示出本实施方式的试剂盒的一例的概要图。
- [0024] 符号说明
- [0025] 10、21、31、41:第1容器
- [0026] 20、30、40:试剂盒
- [0027] 22、36、47:包装说明书
- [0028] 23、37、48:包装箱
- [0029] 32、42:第2容器
- [0030] 33、43:第3容器
- [0031] 34、44:第4容器
- [0032] 35、45:第5容器
- [0033] 46:第6容器

具体实施方式

[0034] [1. 抗体试剂]

[0035] 本实施方式的抗体试剂(以下也简称为“抗体试剂”)为含有能够与被检物质结合的标记抗体、适于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质的试剂。在此,免疫复合物转移法(以下也称为“ICT法”)含有如下工序:在固相上形成至少含有本实施方式的抗体试剂所含的标记抗体、被检物质和能够与该被检物质结合的捕捉物质的免疫复合物后,将该免疫复合物转移到另一固相的工序。

[0036] ICT法本身在该技术领域是公知的。通常的ICT法中,使用用于检测被检物质的标记抗体(检测用标记抗体)和用于捕捉被检物质的抗体(捕捉抗体)按照以下步骤来检测被检物质。首先,在第1固相上形成含有检测用标记抗体、被检物质和捕捉抗体的免疫复合物。该免疫复合物中,被检物质被检测用标记抗体和捕捉抗体夹持。然后,将该免疫复合物从第1固相转移到与第1固相不同的第2固相。然后,测定基于第2固相上的免疫复合物所含的检测用标记抗体的信号,基于信号的测定值来检测被检物质。ICT法中,在将免疫复合物向第2固相转移时,除去第1固相。此时,与第1固相非特异性结合的杂质也同时被除去,因此非特异性信号减少。

[0037] 本实施方式的抗体试剂也可以用于通过应用ICT法的免疫学测定方法来检测试样中的被检物质。作为这样的测定法,可以列举例如:使用酶标记抗体的ICT法、即免疫复合物转移-酶免疫测定法(ICT-EIA法),使用用催化产生化学发光的反应的酶进行标记的抗体的ICT法、即免疫复合物转移-化学发光酶免疫测定法(ICT-CLEIA法)等。

[0038] 作为本实施方式的抗体试剂的对象的试样,只要可能含有被检物质则没有特别限定。作为试样,可以列举例如:血液、血浆、血清、淋巴液、细胞或组织的可溶化液等生物试

样;尿、粪便等排泄物;河水、海水、土壤等环境样品等。

[0039] 就被检物质的种类而言,只要能够与被检物质结合的抗体存在或这样的抗体可以制造则没有特别限定。即,具有抗原性的物质均可以成为被检物质。作为被检物质的例子,可以列举:蛋白质、肽、核酸、生理活性物质、泡囊、细菌、病毒、半抗原、治疗药剂、治疗药剂的代谢物等,没有特别限定。抗体也可以成为被检物质。蛋白质不仅包含天然存在的蛋白质,而且还包含重组蛋白等非天然的蛋白质。肽不仅包含氨基酸残基数多的多肽,而且还包含二肽、三肽等氨基酸残基数少的寡肽。核酸不仅包含天然存在的核酸,而且还包含核酸类似物等人工合成的核酸。多糖类还包含存在于细胞或蛋白质的表面的糖链、及作为细菌的外膜成分的脂多糖。作为生理活性物质,可以列举例如:细胞增殖因子、分化诱导因子、细胞粘附因子、酶、细胞因子、激素、糖链、脂质等,没有特别限定。泡囊只要是膜所构成的小泡则没有特别限定。泡囊可以在内部含有液相。作为泡囊,可以列举例如:外来体、微泡囊、凋亡小体等细胞外滤泡、脂质体等人工泡囊等。

[0040] 本实施方式的抗体试剂所含的、能够与被检物质结合的标记抗体只要是可以通过针对被检物质的特异性抗原抗体反应而与被检物质结合、且用标记物质进行了标记的抗体即可。该标记抗体相当于ICT法中的检测用标记抗体。标记抗体本身可以通过用该技术领域公知的标记物质对能够与被检物质结合的抗体进行标记而得到。能够与被检物质结合的抗体本身可以通过该技术领域公知的抗体制作法得到。

[0041] 本实施方式的抗体试剂可以含有1种标记抗体,也可以含有彼此不同的能够与被检物质结合的2种以上标记抗体。在抗体试剂含有2种以上标记抗体时,各标记抗体优选用以可相互区别的信号来检测的标记物质进行标记。作为这样的标记物质,可以列举例如:可以产生可相互区别的程度的不同波长或强度的荧光的荧光色素的组合等。

[0042] 标记抗体中使用的抗体的种类可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。对抗体的来源没有特别限定,可以是来自小鼠、大鼠、仓鼠、兔、山羊、马、骆驼等中的任一哺乳动物的抗体。另外,抗体的同种型可以是IgG、IgM、IgE、IgA等中的任一种,优选为IgG。标记抗体中可以使用抗体的片段及其衍生物,可以列举例如:Fab片段、F(ab')₂片段、单链抗体(scFc)等。

[0043] 标记物质可以使用其本身产生信号的物质(以下也称为“信号产生物质”)、或催化其它物质的反应而产生可检测的信号的物质。作为信号产生物质,可以列举荧光物质、放射性同位素等。作为催化其它物质的反应而产生可检测的信号的物质,可以列举酶。优选的标记物质为酶及荧光物质。作为酶,可以列举:碱性磷酸酶、过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、糖苷酶、多酚氧化酶、酪氨酸酶、酸性磷酸酶、荧光素酶等。作为荧光物质,可以列举:异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明、Alexa Fluor(注册商标)、酞菁系色素等荧光色素、GFP等荧光蛋白等。作为放射性同位素,可以列举¹²⁵I、³⁵S、³²P、¹⁴C等。这些中,优选酶,特别优选碱性磷酸酶、过氧化物酶及 β -半乳糖苷酶。

[0044] 本实施方式的抗体试剂,其特征在于,与免疫复合物转移法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数在该抗体试剂所含的标记抗体的分子数中所占的比例(以下也称为“非特异性抗体的比例”)为约 3.34×10^{-7} 以下。与ICT法所使用的固相非特异性结合的标记抗体成为非特异性信号的产生原因。本实施方式的抗体试剂,由于与固相非特异性结合的标记抗体减少到上述比例,因此能够在ICT法中将非特异性信号抑制为较低程度。在

此,“非特异性结合”是指并非基于抗原抗体反应的结合,可以列举例如:物理性吸附、静电相互作用等。

[0045] 本实施方式中,与ICT法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数在抗体试剂所含的标记抗体的分子数中所占的比例优选为约 3.34×10^{-7} 以下,更优选为约 2.81×10^{-7} 以下。在进一步的实施方式中,与ICT法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数在抗体试剂所含的标记抗体的分子数总所占的比例为 3.34×10^{-7} 以下,优选为 2.81×10^{-7} 以下。

[0046] 非特异性抗体的比例可以基于反映标记抗体的分子数的值算出。作为这样的值,可以列举例如:抗体试剂中的蛋白质的浓度或量、抗体试剂中的标记物质的浓度或量、基于标记抗体的信号的测定值等。非特异性抗体的比例可以将反映抗体试剂所含的标记抗体的分子数的值除以反映与ICT法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数的值而算出。此时,优选反映抗体试剂所含的标记抗体的分子数的值的单位和反映与ICT法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数的值的单位相同。

[0047] 反映抗体试剂所含的标记抗体的分子数的值可以为蛋白质的浓度或量、标记物质的浓度或量、基于标记抗体的信号的测定值中的任一种。在此,本实施方式的抗体试剂所含的蛋白质成分主要是标记抗体,因此抗体试剂中的蛋白质的浓度及量反映抗体试剂所含的标记抗体的分子数。抗体试剂所含的蛋白质的浓度及量可以通过该技术领域公知的蛋白质定量法来测定。

[0048] 标记抗体中,标记物质结合或固定于抗体,因此抗体试剂中的标记物质的浓度及量反映抗体试剂所含的标记抗体的分子数。抗体试剂所含的标记物质的浓度或量可以根据标记物质的种类通过该技术领域公知的方法来测定。或者,抗体试剂中的标记物质的浓度及量可以由制作标记抗体时使用的标记物质的量算出。

[0049] 基于标记抗体的信号的量或强度根据所使用的抗体试剂所含的标记抗体的分子数而变化,因此基于规定量的抗体试剂所含的标记抗体的信号的测定值反映该量的抗体试剂所含的标记抗体的分子数。基于标记抗体的信号的量或强度可以利用与标记物质的种类相应的公知的测定法测定基于规定量的抗体试剂所含的标记抗体的信号。标记抗体的浓度高时,可以测定基于稀释后的抗体试剂所含的标记抗体的信号。这种情况下,可以通过将得到的信号的测定值乘以稀释率而算出基于稀释前的抗体试剂所含的标记抗体的信号的值。

[0050] 本实施方式中,可以由规定量的抗体试剂中的蛋白质或标记物质的量与基于该规定量的抗体试剂所含的标记抗体的信号的测定值算出用于将信号的测定值转换为蛋白质或标记物质的量的系数(以下也称为“转换系数”)。该系数可以用于获得反映与ICT法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数的值。

[0051] 作为反映与ICT法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数的值,优选获得这种基于标记抗体的信号的测定值。例如,在固相为磁性粒子时,可以按照以下方式得到基于与固相非特异性结合的标记抗体的信号的测定值。首先,将规定量的本实施方式的抗体试剂和磁性粒子混合,在 $37 \sim 42^\circ\text{C}$ 下温育 $60 \sim 600$ 秒钟。对抗体试剂及固相的量没有特别限定,为进行通常的检测测定时使用的量即可。然后,为了除去所得到的混合物中的游离成分(未反应的标记抗体),通过磁体或集磁装置回收磁性粒子并洗涤。然后回收磁性粒子,测定基于与该磁性粒子非特异性结合的标记抗体的信号,获得信号的测定值。在获得上述转

换系数时,还可以由信号的测定值和该系数算出蛋白质或标记物质的量,将其作为反映与固相非特异性结合的标记抗体的分子数的值。

[0052] 将本实施方式的抗体试剂的一例示于图1。图1中,10表示收容有抗体试剂的第1容器。本实施方式的抗体试剂的形态可以为液体,也可以为粉末(冷冻干燥品)。在抗体试剂为液体时,溶剂只要可以溶解、保存标记抗体则没有特别限定。作为溶剂,可以列举例如:水、生理盐水、磷酸缓冲液(PBS)、Good's缓冲液等。作为Good's缓冲液,可以列举例如:MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、Bis-Tris-Propane、ACES、MOPS、MOPSO、BES、TES、HEPES、HEPPS、Tricine、Tris、Bicine、TAPS等。

[0053] 本实施方式的抗体试剂可以根据需要含有公知的添加物。作为添加物,可以列举例如:牛血清白蛋白(BSA)等蛋白质稳定剂,叠氮化钠等防腐剂,氯化钠等无机盐类等。

[0054] 近年获知,在对感染了B型肝炎病毒(HBV)的类风湿患者、癌症患者使用免疫抑制剂时,HBV被再次激活而引起重症肝炎。为了防止这种肝炎重笃化,重要的是早期发现HBV的再次激活。为此,需要能够以高灵敏度检测作为存在于HBV被膜的抗原的HBs抗原的检查。本实施方式的抗体试剂可以实现检测灵敏度高的ICT法,因此适合用于HBs抗原的检测。因此,用于通过ICT法检测试样中的HBs抗原的本实施方式的抗体试剂中,含有标记后的抗HBs抗体,该抗体试剂中的非特异性抗体的比例为约 3.34×10^{-7} 以下,优选为 3.34×10^{-7} 以下。

[0055] 本发明的范围中还包括一种标记抗体的用途,所述标记抗体用于制造用于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质的抗体试剂、且能够与该被检物质结合,与免疫复合物转移法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数在抗体试剂所含的标记抗体的分子数中所占的比例为约 3.34×10^{-7} 以下,优选为 3.34×10^{-7} 以下。

[0056] [2. 试剂盒]

[0057] 本实施方式的抗体试剂可以以试剂盒的形态提供给用户,所述试剂盒将收容有该抗体试剂的容器包装在箱中而成。该箱中可以同时装入有试剂的包装说明书。该包装说明书优选记载例如抗体试剂的组成、被检物质的检测程序等。将以试剂盒的形态提供的抗体试剂的一例示于图2A。图2A中,20表示试剂盒,21表示收容有本实施方式的抗体试剂的第1容器,22表示包装说明书,23表示包装箱。

[0058] 本实施方式中,可以将除了上述抗体试剂以外、还含有用于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质的各种试剂的试剂盒提供给用户。即,在本发明的范围中,包含用于通过免疫复合物转移法检测试样中的被检物质的试剂盒(以下也简称为“试剂盒”)。本实施方式的试剂盒含有本实施方式的抗体试剂、含有能够与被检物质结合的捕捉物质的试剂、游离剂、第1固相和第2固相。本实施方式的抗体试剂如上所述。

[0059] 将本实施方式的试剂盒的一例示于图2B。图2B中,30表示试剂盒,31表示收容有本实施方式的抗体试剂的第1容器,32表示收容有含有能够与被检物质结合的捕捉物质的试剂的第2容器,33表示收容有游离剂的第3容器,34表示收容有作为粒子的第1固相的第4容器,35表示收容有作为粒子的第2固相的第5容器,36表示包装说明书,37表示包装箱。

[0060] 能够与被检物质结合的捕捉物质(以下也简称为“捕捉物质”)为与被检物质特异性结合的物质,且具有能够与第1结合物质结合的第1结合配偶体、及能够与第2结合物质结合的第2结合配偶体。结合物质及结合配偶体容后说明。捕捉物质优选结合于被检物质中与本实施方式的抗体试剂所含的标记抗体所结合的位点不同的位点。这样的捕捉物质在被检

物质与标记抗体的抗原抗体反应中不会对该标记抗体产生竞争性抑制。另外,在ICT法中,可以得到含有被标记抗体和捕捉物质夹持的被检物质的免疫复合物。

[0061] 对捕捉物质的种类没有特别限定,可以根据被检物质来适当选择。作为捕捉物质的种类,可以列举例如:抗体及其片段、适体、Affibody(注册商标)、凝集素、核酸等。凝集素与糖链结合,因此可以作为针对具有糖链的被检物质的捕捉物质使用。在被检物质为核酸时,如果使用核酸作为捕捉物质,则可以利用形成互补的碱基对来捕捉该被检物质。这些中,优选抗体。抗体的种类及来源的细节与关于标记抗体的说明相同。本说明书中,也将作为捕捉物质的抗体称为“捕捉抗体”。

[0062] 第1固相为用于捕捉含有标记抗体、被检物质和捕捉物质的免疫复合物的固相。固相的材料可以从有机高分子化合物、无机化合物、生物高分子等中选择。作为有机高分子化合物,可以列举:胶乳、聚苯乙烯、聚丙烯等。作为无机化合物,可以列举:磁性体(氧化铁、氧化铬、钴及铁素体等)、二氧化硅、氧化铝、玻璃等。作为生物高分子,可以列举:不溶性琼脂糖、不溶性葡聚糖、明胶、纤维素等。可以将这些中的2种以上组合使用。对固相的形状没有特别限定,可以列举:粒子、微孔板、微管、试管等。这些中,优选粒子。在通过全自动免疫测定装置进行ICT法时,特别优选第1固相为磁性粒子。

[0063] 本实施方式中,第1固相上固定有用于固定免疫复合物中的捕捉物质的第1结合物质。本实施方式中,捕捉物质具有能够与第1结合物质结合的第1结合配偶体,因此通过该第1结合配偶体与固定在第1固相上的第1结合物质进行结合,免疫复合物中的捕捉物质被固定在第1固相上。由此,免疫复合物被捕捉到第1固相。

[0064] 就第1结合物质及第1结合配偶体而言,只要存在能够将两者的结合解开的物质则没有特别限定。作为这样的第1结合物质及第1结合配偶体的组合,可以列举例如:生物素与亲和素或亲和素样蛋白、半抗原与抗半抗原抗体、镍与组氨酸标签、谷胱甘肽和谷胱甘肽-S-转移酶等组合。在此,亲和素样蛋白是指与亲和素同样地对生物素具有高亲和性的蛋白质,可以列举例如:链霉亲和素、Tamavidin(注册商标)等。这些中,优选生物素与亲和素或亲和素样蛋白、半抗原与抗半抗原抗体。优选第1结合物质为半抗原、第1结合配偶体为抗半抗原抗体。更优选第1结合物质为二硝基苯(DNP)基、第1结合配偶体为与DNP基特异性结合的抗体(抗DNP抗体)。

[0065] 游离剂为能够使第1结合物质与第1结合配偶体的结合解开的试剂。通过添加游离剂,固定在第1固相上的免疫复合物从该第1固相游离。游离剂可以根据第1结合物质及第1结合配偶体的组合来适当选择。例如,生物素与亲和素或亲和素样蛋白的结合可以通过添加过量的生物素来解开。半抗原与抗半抗原抗体的结合可以通过添加半抗原来解开。镍与组氨酸标签的结合可以通过添加咪唑来解开。谷胱甘肽与谷胱甘肽-S-转移酶的结合可以通过添加还原型谷胱甘肽来解开。在第1结合物质为DNP基、第1结合配偶体为抗DNP抗体时,游离剂优选为DNP衍生物。作为DNP衍生物,可以列举例如用DNP修饰的氨基酸等,这些中,特别优选N-(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸(以下也称为“DNP赖氨酸”)。

[0066] 第2固相为用于捕捉通过游离剂而从第1固相游离的免疫复合物的固相。固相的材料及形状的细节与关于第1固相的说明相同。通过全自动免疫测定装置进行ICT法时,特别优选第2固相为磁性粒子。

[0067] 本实施方式中,在第2固相上固定有用于固定免疫复合物中的捕捉物质的第2结合

物质。本实施方式中,捕捉物质具有能够与第2结合物质结合的第2结合配偶体,因此通过该第2结合配偶体与固定在第2固相上的第2结合物质进行结合,免疫复合物中的捕捉物质被固定在第2固相上。由此,免疫复合物被捕捉到第2固相。

[0068] 第2结合物质及第2结合配偶体的组合只要与第1结合物质及第1结合配偶体的组合不同则可以从上述第1结合物质及第1结合配偶体的组合中适当选择。在第1结合物质为DNP基、第1结合配偶体为抗DNP抗体时,优选第2结合物质为亲和素或亲和素样蛋白、第2结合配偶体为生物素。

[0069] 在标记抗体的标记物质为酶时,本实施方式的试剂盒可以进一步含有该酶的底物。底物可以根据酶而从该技术领域公知的底物中适当选择。在使用碱性磷酸酶作为酶时,作为底物,可以列举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)苯基磷酸二钠)、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)苯基磷酸二钠)等化学发光底物,5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸(BCIP)、5-溴-6-氯-1-吡啶基磷酸二钠、对硝基苯基磷酸等显色底物。在使用过氧化物酶作为酶时,作为底物,可以列举:鲁米诺及其衍生物等化学发光底物,2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸铵)(ABTS)、1,2-苯二胺(OPD)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)等显色底物。

[0070] 将进一步含有底物的本实施方式的抗体试剂盒的一例示于图2C。图2C中,40表示试剂盒,41表示收容有本实施方式的抗体试剂的第1容器,42表示收容有含有能够与被检物质结合的捕捉物质的试剂的第2容器,43表示收容有游离剂的第3容器,44表示收容有作为粒子的第1固相的第4容器,45表示收容有作为粒子的第2固相的第5容器,46表示收容有底物的第6容器,47表示包装说明书,48表示包装箱。

[0071] 本实施方式的试剂盒可以实现检测灵敏度高的免疫复合物转移法,因此适合用于HBs抗原的检测。因此,用于通过ICT法检测试样中的HBs抗原的本实施方式的试剂盒优选含有:含有标记后的抗HBs抗体的本实施方式的抗体试剂,和作为捕捉物质的、结合于HBs抗原中与该抗体试剂所含的标记抗体所结合的位点不同的位点的抗HBs抗体。

[0072] [3. 抗体试剂的制造方法]

[0073] 以下说明制造本实施方式的抗体试剂的方法(以下也简称为“制造方法”)。本实施方式的制造方法中,首先使含有能够与被检物质结合的抗体的抗体溶液与免疫复合物转移法所使用的固相接触。如上所述,抗体溶液可含有一定量的与固相非特异性吸附的抗体。通过在抗体溶液和固相接触后将固相与抗体溶液分离、回收溶液成分,从而可以除去与固相非特异性吸附的抗体。通过将该溶液成分作为抗体试剂使用、进行ICT法,可以减少非特异信号。

[0074] 含有能够与被检物质结合的抗体的抗体溶液可以是含有通过针对被检物质的特异性抗原抗体反应而与被检物质结合的抗体的溶液。另外,也可以使用市售的抗体溶液。对该抗体溶液中的抗体浓度没有特别限定,通常为10~1000ng/mL。抗体的种类及来源的细节与关于标记抗体的说明相同。能够与被检物质结合的抗体可以用标记物质进行标记。作为标记物质,优选酶及荧光物质。标记物质的细节如上所述。

[0075] 抗体溶液可以含有1种抗体,也可以含有彼此不同的能够与被检物质结合的2种以上抗体。在抗体溶液含有2种以上抗体时,各抗体优选为用以可相互区别的信号来检测的标

记物质标记的标记抗体。这样的标记物质的例子如上所述。

[0076] 与抗体溶液接触的固相可以是第1固相、第2固相或这两者。在预先知晓抗体与任一固相非特异吸附与否时,可以添加抗体非特异吸附的固相。固相优选可以固定免疫复合物中的捕捉物质。固相上可以固定有用于固定捕捉物质(优选为捕捉抗体)的结合物质。这样的结合物质的细节与关于第1结合物质的说明相同。本实施方式中,固相优选为具有第1结合物质的磁性粒子。

[0077] 使抗体溶液与固相接触的操作可以根据固相的形状来适当决定。固相为微孔板、微管、试管等容器形状时,通过将适量的抗体溶液加入作为固相的容器内,从而抗体溶液和固相接触。在固相为磁性粒子等粒子形状时,通过在抗体溶液中添加粒子或将抗体溶液和粒子的悬浊液混合,从而抗体溶液和固相接触。在固相为粒子时,对粒子的量没有特别限定,例如,相对于抗体1mg,通常可以使用0.5g左右的粒子。对抗体溶液和固相接触时的温度及时间没有特别限定,例如,可以在4~27℃下温育10~30小时。温育期间可以进行搅拌或振荡。

[0078] 本实施方式的制造方法中,此后使固相和与该固相接触的抗体溶液分离,由与该固相接触的抗体溶液制备本实施方式的抗体试剂。从固相分离、回收与固相接触后的抗体溶液的手段可以根据固相的形状来适当决定。在固相为容器形状时,可以回收收容在作为固相的容器中的抗体溶液。在固相为粒子形状时,可以从粒子和抗体溶液的混合物中分离、回收上清。作为分离上清的方法,可以列举:离心分离、过滤等。在固相为磁性粒子时,通过磁体或集磁装置收集磁性粒子,从而分离上清。

[0079] 通过使固相和与该固相接触的抗体溶液分离,从而将与固相非特异性结合或吸附的抗体与固相一起从抗体溶液中除去。因此,与固相分离后的抗体溶液中,成为非特异性信号的原因的抗体减少。与固相分离后的抗体溶液可以直接作为本实施方式的抗体试剂使用。根据需要,也可以将与固相分离后的抗体溶液供于浓缩、稀释、纯化、冷冻干燥等处理。在抗体未进行标记的情况下,可以用标记物质对所回收的抗体溶液所含的抗体进行标记。

[0080] 如上所述,在本实施方式的制造方法中,通过在抗体溶液和固相接触后除去该固相,从而该抗体溶液所含的与固相非特异性结合的抗体减少,得到本实施方式的抗体试剂。通过本实施方式的制造方法得到的抗体试剂中,上述非特异性抗体的比例达到约 3.34×10^{-7} 以下(优选为 3.34×10^{-7} 以下)。根据需要,还可以按照上述方式对通过本实施方式的制造方法得到的抗体试剂确认非特异性抗体的比例。

[0081] 本实施方式的制造方法期望在通过ICT法检测试样中的被检物质之前实施。即,ICT法中的将试样、含有能够与被检物质结合的抗体的抗体溶液和固相混合的工序不相当于本实施方式的制造方法中的接触工序。因此,本实施方式的制造方法中,上述接触工序及制备工序在将试样和抗体溶液混合之前进行。

[0082] 在通过本实施方式的制造方法制造用于通过ICT法检测试样中的HBs抗原的抗体试剂时,可以使用含有抗HBs抗体的抗体溶液作为抗体溶液、使用具有用于固定抗HBs抗体的结合物质的固相作为ICT法所使用的固相,所述抗HBs抗体结合于HBs抗原中与该抗体溶液所含的抗HBs抗体所结合的位点不同的位点。

[0083] [4. 抗体溶液的预处理方法]

[0084] 本实施方式的制造方法也可以解释为用于得到能够减少ICT法中非特异性信号的

抗体试剂的、抗体溶液的预处理方法。因此,在本发明的范围中,包含含有能够与试样中的被检物质结合的抗体的抗体溶液的预处理方法(以下也简称为“预处理方法”)。在此,就抗体溶液的预处理而言,期望在通过ICT法检测试样中的被检物质之前进行抗体溶液、制备本实施方式的抗体试剂。

[0085] 本实施方式的预处理方法中,首先使含有能够与被检物质结合的抗体的抗体溶液与ICT法所使用的固相接触。抗体溶液、固相及接触操作的细节与关于本实施方式的制造方法的说明相同。然后,使固相和与该固相接触的抗体溶液分离,由与该固相接触的抗体溶液制备用于通过ICT法检测试样中的被检物质的抗体试剂。将固相和抗体溶液分离的手段及由分离后的抗体溶液制备抗体试剂的步骤的细节与关于本实施方式的制造方法的说明相同。

[0086] [5. 被检物质的检测方法]

[0087] 在本发明的范围中,还包含使用通过本实施方式的制造方法制备的抗体试剂、通过ICT法检测试样中的被检物质的方法(以下也简称为“检测方法”)。本实施方式的检测方法既可以通过人工方法进行,也可以通过全自动免疫测定装置进行。

[0088] 本实施方式的检测方法中,首先将通过本实施方式的制造方法制备的抗体试剂、含有被检物质的试样、含有能够与该被检物质结合的捕捉物质的试剂和第1固相混合。对混合的顺序没有特别限定。通过将上述混合,从而形成含有抗体试剂所含的标记抗体、被检物质和捕捉物质的免疫复合物,将该复合物固定在第1固相上。在此,抗体试剂、含有被检物质的试样、含有能够与被检物质结合的捕捉物质的试剂、及第1固相的细节与此前所述相同。

[0089] 可以根据试样或被检物质的种类,在将试样和上述各种试剂混合前对试样进行预处理,而使其适合于检测。这样的预处理在该技术领域是公知的。例如,在试样为含有HBs抗原的血清时,HBs抗原上有时结合有内源性抗体,因此可以用含有碱性物质及表面活性剂的缓冲液对血清进行预处理。

[0090] 本实施方式中,捕捉物质优选具有上述能够与第1结合物质结合的第1结合配偶体、及能够与第2结合物质结合的第2结合配偶体的抗体。另外,第1固相优选固定有上述第1结合物质的磁性粒子。结合物质及结合配偶体的细节与关于本实施方式的试剂盒的说明相同。本实施方式中,优选第1结合物质为抗DNP抗体、第1结合配偶体为DNP基、第2结合配偶体为生物素。

[0091] 对将免疫复合物固定在第1固相上的工序(固定工序)中的温度及反应时间没有特别限定,例如,可以在37~42℃下温育60~600秒钟。温育期间,可以进行搅拌或振荡。

[0092] 然后,从上述固定工序所得到的混合物中除去未包含于免疫复合物的游离成分。该游离成分的除去工序通过将固定于固相的分子(Bound)与未固定于固相的游离状态的分子(Free)分离而进行。这类分离也被称为B/F分离。作为未包含于免疫复合物的游离成分,可以列举:未反应的标记抗体、未反应的捕捉物质、未与标记抗体及捕捉物质结合的被检物质等。B/F分离可以通过该技术领域公知的方法进行。例如,在第1固相为粒子时,可以对混合物进行离心分离并除去含有游离成分的上清,从而进行B/F分离。在第1固相为磁性粒子时,可以通过磁体或集磁装置收集磁性粒子并除去含有游离成分的液相,从而进行B/F分离。根据需要,可以用适当的洗涤液洗涤固定有免疫复合物的第1固相。

[0093] 除去游离成分后,使免疫复合物从第1固相游离。该操作优选如下进行:添加游离

剂,从而使免疫复合物中的捕捉物质与第1固相的结合解开。例如,在免疫复合物中的捕捉物质和第1固相通过物理吸附而结合时,通过使用含有表面活性剂的溶液作为游离剂可以使该复合体游离。另外,为离子键时,通过使用含有离子的溶液可以使该复合体游离。在免疫复合物中的捕捉物质和第1固相介由第1结合物质及第1结合配偶体而结合时,添加本实施方式的试剂盒中使用的游离剂即可。对使免疫复合物从第1固相游离的工序(游离工序)中的温度及反应时间没有特别限定,例如,可以在37~42℃下温育120~240秒钟。温育期间,可以进行搅拌或振荡。

[0094] 将按照上述方式而游离的免疫复合物转移到与第1固相不同的第2固相上。该操作如下进行:使游离的免疫复合物与第2固相接触,将该免疫复合物固定在该第2固相上。本实施方式中,第2固相优选为固定有上述第2结合物质的磁性粒子。第2结合物质优选为亲和素或亲和素样蛋白。

[0095] 在将游离的免疫复合物转移到第2固相的工序(转移工序)中,游离的免疫复合物与第1固相再次结合的情况是不期望出现的。因此,本实施方式中,优选在游离工序和转移工序之间进行B/F分离、回收含有游离的免疫复合物的液相。通过使所回收的液相和第2固相接触,从而可以将免疫复合物转移到第2固相上。对转移工序中的温度及反应时间没有特别限定,例如,可以在37~42℃下温育约240秒钟。温育期间,可以进行搅拌或振荡。

[0096] 将游离的免疫复合物转移到第2固相后,测定基于该第2固相上的免疫复合物所含的标记抗体的信号,基于该信号检测被检物质。在此,“检测信号”包括:定性地检测信号的有无;对信号的量或强度进行定量;以及如“不信号产生”、“弱”、“强”等那样按照多个阶段来半定量地检测信号。另外,“检测被检物质”包括根据信号的检测结果进行被检物质的定性检测、定量检测及半定量检测。被检物质的半定量检测是指如“阴性”、“弱阳性”、“阳性”、“强阳性”等按照阶段来表示试样中的被检物质的量或浓度的方式。

[0097] 基于标记抗体的信号的检测方法本身在该技术领域是公知的。信号的检测方法可以根据标记抗体所使用的标记物质的种类来适当选择。例如,在该标记物质为酶时,可以使用公知的测定装置对使酶与针对该酶的底物反应而产生的光、颜色等信号进行测定,从而进行检测。作为这样的测定装置,可以列举:分光光度计、照度计等。在标记物质为荧光物质时,可以使用荧光酶标仪等公知的装置测定作为信号的荧光。需要说明的是,激发波长及荧光波长可以根据所使用的荧光物质的种类适当决定。

[0098] 本实施方式中,为了确认检测的信号/噪声比(S/N比),可以将不含被检物质的试样供于检测方法,定量检测被检物质不存在时的非特异性信号的值。该检测除了使用不含被检物质的试样来代替可含有被检物质的试样以外,可以按照上述所说明的方法来进行。根据需要,还可以测定本实施方式的抗体试剂以外的试剂(例如底物溶液等)所产生的背景值。这种背景也被称为空白试剂。

[0099] 本实施方式的检测方法中,为了确认非特异性信号减少了多少,可以算出下式(1)所示的第1比。

[0100] 第1比 = $a/b \cdot \cdot \cdot$ (1)

[0101] (式中,a为被检物质不存在时的非特异性信号的值,b为基于1次检测中使用的量的抗体试剂所含的标记抗体的信号的值)

[0102] 1次检测中使用的量的抗体试剂是指在上述固定工序中、相对于1个试样而添加的

量的抗体试剂(以下也称为“1次测定量的抗体试剂”)。基于1次测定量的抗体试剂所含的标记抗体的信号的值可以如下测定。在标记抗体的标记物质为酶时,使1次测定量的抗体试剂与酶的底物反应,定量检测所产生的信号的量或强度。在标记抗体的标记物质为荧光色素时,对1次测定量的抗体试剂照射激发光,定量测定所产生的荧光的强度。

[0103] 第1比为测定不含被检物质的试样时的信号值、与基于1次检测中使用的量的本实施方式的抗体试剂所含的标记抗体的信号值之比。本实施方式中,第1比的值通常为约 1.02×10^{-7} 以下,优选为约 6.80×10^{-8} 以下。在进一步的实施方式中,第1比的值为 1.02×10^{-7} 以下,优选为 6.80×10^{-8} 以下。第1比是基于信号值的,因此能够在不同的测定之间对非特异性信号的减少效果进行比较。

[0104] 本实施方式的检测方法中,为了确认非特异性信号减少了多少,可以算出下式(2)所示的第2比。

[0105] 第2比 = $a/c \cdot \cdot \cdot$ (2)

[0106] (式中,a为被检物质不存在时的非特异性信号的值,

[0107] c为不进行转移工序时的被检物质不存在时的非特异性信号的值)

[0108] 可以按照如下方式获得不进行转移工序时的被检物质不存在时的非特异性信号的值。首先,将不含被检物质的试样供于本实施方式的检测方法中的固定工序及游离成分的除去工序。然后,回收第1固相,定量检测基于非特异性结合于该第1固相的标记抗体的信号。即,式(2)中的c的值为不含转移工序的免疫学测定方法中的、被检物质不存在时的非特异性信号的值。

[0109] 第2比为测定不含被检物质的试样时的信号值、与通过不含免疫复合物的转移工序的测定法得到的非特异性信号的值之比。第2比为表示与不含免疫复合物的转移工序的测定法相比、可以在ICT法中减少多少非特异性信号的指标。本实施方式中,第2比的值通常为约 4.68×10^{-2} 以下,优选为约 3.12×10^{-2} 以下。进一步的实施方式中,第2比的值为 4.68×10^{-2} 以下,优选为 3.12×10^{-2} 以下。第2比的值越小,表明与不含免疫复合物的转移工序的测定法相比,非特异性信号的减少效果越高。

[0110] 以下通过实施例更详细地说明本发明,但本发明不受这些实施例限定。需要说明的是,以下记载的“HISCL”为SYSMEX株式会社的注册商标。

[0111] 实施例

[0112] 实施例1:含有检测用标记抗体的试剂的制备及其性能的评价

[0113] 实施例1中,通过使含有检测用标记抗体的溶液与固相接触而进行预处理、制备含有检测用标记抗体的试剂。对于所得到的试剂,研究检测用标记抗体与固相的非特异性反应是否减少。

[0114] (1) 检测用标记抗体的制备

[0115] 使用2种用碱性磷酸酶(ALP)标记的抗HBs抗体片段作为检测用标记抗体(以下分别称为“ALP标记HBs149Fab'”及“ALP标记HBs85Fab'”)。ALP标记HBs149Fab'由保藏编号为FERM BP-10583、于2005年4月7日保藏在独立行政法人制品评价技术基盘机构专利生物保藏中心(旧名称:独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心)(邮编292-0818、日本国千叶县木更津市上总镰足2-5-8(旧地址:邮编305-8566、日本国茨城县筑波市东1丁目1番地1中央第6))的杂交瘤所产生的单克隆抗体来制作。ALP标记HBs85Fab'由保藏编号为

NITE BP-1483、于2012年12月13日保藏在独立行政法人制品评价技术基盘机构专利微生物保藏中心(邮编292-0818、日本国千叶县木更津市上总镰足2-5-8)的杂交瘤所产生的单克隆抗体制作。具体的检测用标记抗体的制作步骤如下。对各单克隆抗体进行胃蛋白酶消化及还原,得到Fab'片段。另外,用EMCS(N-(6-马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺)(株式会社同仁化学研究所)对ALP(Oriental Yeast Co., Ltd.)进行马来酰亚胺化。然后,将所得到的Fab'片段和马来酰亚胺化的ALP混合,使其反应,从而得到检测用标记抗体(Fab'-ALP)。将得到的检测用标记抗体用稀释液(0.1M MES (pH6.5)、0.15M NaCl、1.0%BSA、0.1%NaN₃、10mM MgCl₂及1mM ZnCl₂)稀释。将各检测用标记抗体的稀释液以1:1混合,制备含有检测用标记抗体的溶液(ALP浓度10pmol/mL)。以下,也将得到的溶液称为“无预处理的抗体试剂”。

[0116] (2) 抗DNP抗体固定磁性粒子的制备

[0117] 在磁性粒子(Micromer M、Micromod公司)的表面固定抗DNP抗体(DNP-1753),得到第1固相。将得到的第1固相用稀释液(0.1M MES (pH6.5)、0.15M NaCl、0.25%BSA及0.1%NaN₃)稀释,得到含有抗DNP抗体固定磁性粒子的溶液(粒子浓度1.0%)。在此,抗体向磁性粒子的固定使用Sulfo-SMCC(Pias Corporation)进行。上述DNP-1753抗体是由保藏编号为NITE BP-845、于2010年9月21日保藏在独立行政法人制品评价技术基盘机构专利微生物保藏中心(邮编292-0818、日本国千叶县木更津市上总镰足2-5-8)的杂交瘤所产生的单克隆抗体。

[0118] (3) 含有检测用标记抗体的试剂的制备(抗体溶液的预处理)

[0119] 相对于上述(1)所得到的含有检测用标记抗体的溶液500μL,添加上述(2)所得到的含有抗DNP抗体固定磁性粒子的溶液10μL,在4℃下翻转搅拌一晚。然后,使用磁体使溶液中的磁性粒子集中并仅回收上清,从而从溶液中除去磁性粒子。以下,将得到的上清作为含有检测用标记抗体的试剂(以下也称为“进行了预处理的抗体试剂”)使用。

[0120] (4) 检测用标记抗体的标记物质的量与信号值的关系

[0121] 实施例1的检测用标记抗体中,抗体片段和标记物质(ALP)共价结合。因此,进行了预处理的抗体试剂中的ALP的量反映该试剂所含的检测用标记抗体的分子数。在底物的量恒定时,通过ALP与底物的反应而产生的化学发光的信号值反映该反应中使用的ALP的量。因此,为了基于信号值算出参与非特异性反应的检测用标记抗体的分子数的比例,按照以下方式算出表示含有检测用标记抗体的试剂中的ALP的摩尔数与信号值的关系的系数(以下也称为“转换系数”)。需要说明的是,该系数相当于本实施方式的抗体试剂的说明中所说明的转换系数。

[0122] (4-1) 试剂及测定装置

[0123] • r3试剂:上述(3)所得到的含有检测用标记抗体的试剂

[0124] • ALP活性用缓冲液:0.1M MES (pH6.5)、0.15M NaCl、0.25%BSA及0.1%NaN₃

[0125] • 发光底物用缓冲液:HISCL R4试剂(SYSMEX株式会社)

[0126] • 发光底物:HISCL R5试剂(CDP-Star(注册商标))(SYSMEX株式会社)

[0127] • 测定装置:全自动免疫测定装置HISCL-800(SYSMEX株式会社)

[0128] (4-2) 测定的步骤

[0129] 以下的操作通过HISCL-800(SYSMEX株式会社)来进行。将r3试剂用ALP活性用缓冲液稀释成1/1000的浓度(1000倍稀释)。将HISCL-800设为ALP活性模式,将稀释后的r3试剂

(20 μ L)、HISCL R4试剂(50 μ L)及HISCL R5试剂(100 μ L)混合。然后,将HISCL-800设为ICT测定模式,将所得到的混合液在42 $^{\circ}$ C下温育5分钟,测定发光强度作为信号值。

[0130] (4-3) 结果

[0131] 通过上述测定得到的发光强度为3,997,991count。该值为由1000倍稀释的r3试剂(20 μ L)所含的检测用标记抗体的ALP与底物的反应而得到的值。将该值乘以稀释率(1000倍),算出3,997,991,000count。算出的值为稀释前的r3试剂(20 μ L)所含的全部检测用标记抗体的ALP与底物反应时得到的发光强度的理论值。然后,按照以下方式算出稀释前的r3试剂(20 μ L)中的ALP的摩尔数。上述(3)所得到的含有检测用标记抗体的试剂的ALP浓度与上述(1)所得到的含有检测用标记抗体的溶液的ALP浓度同样地设为10pmol/mL。因此,r3试剂(20 μ L)所含的ALP的摩尔数为200fmol(10pico mol/mL \times 20 μ L=200femto mol)。将上述信号值除以ALP的摩尔数,而算出作为转换系数的“20count/zmol”(3,997,991,000count/200fmol=约20count/zepto mol)。

[0132] (5) 含有检测用标记抗体的试剂所产生的非特异性信号的研究

[0133] (5-1) 试样、试剂及测定装置

[0134] • 试样:HISCL HBsAg标准品(HBs抗原浓度0IU/mL)(SYSMEX株式会社)

[0135] • 试样处理用缓冲液:0.1M MES(pH6.5)、1.0%BSA、10mM MgCl₂及1mM ZnCl₂

[0136] • r3试剂:上述(3)所得到的含有检测用标记抗体的试剂

[0137] • r5试剂(第1固相):上述(2)所得到的含有抗DNP抗体固定磁性粒子的溶液

[0138] • 洗涤液:HISCL洗涤液(SYSMEX株式会社)

[0139] • 底物用缓冲液:HISCL R4试剂(SYSMEX株式会社)

[0140] • 发光底物:HISCL R5试剂(CDP-Star(注册商标))(SYSMEX株式会社)

[0141] • 测定装置:全自动免疫测定装置HISCL-800prototype(SYSMEX株式会社)

[0142] (5-2) 测定的步骤

[0143] 以下的操作通过HISCL-800prototype(SYSMEX株式会社)来进行。将试样(70 μ L)和试样处理用缓冲液(60 μ L)混合,在42 $^{\circ}$ C下温育72秒钟。在得到的混合液中加入r3试剂(20 μ L),在42 $^{\circ}$ C下温育584秒钟。在得到的混合液中加入r5试剂(20 μ L),在42 $^{\circ}$ C下温育720秒钟。使得到的混合液中的磁性粒子集中,除去上清,加入HISCL洗涤液(300 μ L)洗涤磁性粒子(B/F分离)。进一步进行3次B/F分离。除去上清,在磁性粒子中加入HISCL R4试剂(50 μ L)及HISCL R5试剂(100 μ L)。将得到的混合液在42 $^{\circ}$ C温育300秒钟,测定发光强度。另外,除了不加入r3试剂以外,与上述同样进行,测定空白试剂的值。为了进行比较,使用上述(1)所得到的含有检测用标记抗体的溶液(20 μ L)代替r3试剂,除此以外与上述同样进行,测定使用无预处理的抗体试剂时的发光强度。

[0144] (5-3) 结果

[0145] 从所测定的信号值减去空白试剂的值(360count),得到真正的信号值。实施例1中使用的试样不含作为被检物质的HBs抗原,因此所得到的值表示来自非特异性结合于第1固相的检测用标记抗体的发光强度。将真正的信号值除以转换系数(20count/zmol),算出非特异性结合于第1固相的检测用标记抗体的ALP的摩尔数。在此,r3试剂及无预处理的抗体试剂中的ALP浓度均为10pmol/mL。因此,1次测定量(20 μ L)的抗体试剂中的ALP的摩尔数为200fmol。ALP的摩尔数是反映检测用标记抗体的分子数的值。使用这些值,以ALP的摩尔比

形式算出与第1固相非特异性反应的检测用标记抗体的分子数在含有检测用抗体的试剂所含的检测用标记抗体的分子数中所占的比例。将各值示于表1。表1中，“Ave.”表示2个值的平均值。

[0146] 【表1】

	信号值 (counts)	真正的信号值 (counts)	ALP 的摩尔数 (zmol)	抗体的分子数的比例 (ALP的摩尔比)
[0147] 预处理过的 抗体试剂	1696	1336	67	3.35×10^{-7}
	1483	1123	56	2.80×10^{-7}
	(Ave. 1590)	(Ave. 1230)	(Ave. 62)	(Ave. 3.07×10^{-7})
无预处理的 抗体试剂	1778	1418	71	3.55×10^{-7}
	1842	1482	74	3.70×10^{-7}
	(Ave. 1810)	(Ave. 1450)	(Ave. 73)	(Ave. 3.63×10^{-7})

[0148] 如表1所示,使用预处理过的抗体试剂时的信号值比使用无预处理的抗体试剂时的信号值低。另外,关于与第1固相非特异性反应的检测用标记抗体的分子数在检测用抗体试剂所含的检测用标记抗体的分子数中所占的比例,预处理过的抗体试剂也低于无预处理的抗体试剂。因此表明,通过使检测用抗体试剂与固相接触而进行预处理,可以减少源于检测用标记抗体的非特异性结合的非特异性信号。

[0149] 实施例2:使用含有检测用标记抗体的试剂的免疫复合物转移法

[0150] 使用实施例1所制备的含有检测用标记抗体的试剂(预处理过的抗体试剂),通过ICT-EIA法测定HBs抗原。为了进行比较,使用实施例1所制备的无预处理的抗体试剂同样测定HBs抗原。

[0151] (1) 试样、试剂及测定装置

[0152] • 试样: HISCL HBsAg标准品 (HBs抗原浓度0IU/mL及0.25IU/mL) (SYSMEX株式会社)

[0153] • 试样预处理液: 0.3N NaOH、5mM NaH₂PO₄、25mM Na₂HPO₄、2.4M脲及0.8%Brij (注册商标) 35

[0154] • 中和液: 0.1M柠檬酸、20mM巯基乙胺、20mM NaCl及0.1%NaN₃

[0155] • r3试剂(检测用抗体): 实施例1所得到的含有检测用标记抗体的试剂

[0156] • r4试剂(捕捉用抗体): 含有用生物素及DNP修饰的抗HBs Ag抗体片段 (Fab' - BSA-Bio-DNP) 的试剂 (该试剂通过WO 2014/115878A1中记载的步骤而制备。)

[0157] • r5试剂(第1固相): 实施例1所得到的含有抗DNP抗体固定磁性粒子的溶液

[0158] • r6试剂(游离剂): 5mM N-(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸 (DNP-Lys)、0.1M MES (pH6.5)、2%酪蛋白钠及0.1%NaN₃

[0159] • r7试剂(第2固相): 含有固定有链霉亲和素的磁性粒子 (MAG2201、JSR株式会社) 的溶液

[0160] • 洗涤液: HISCL洗涤液 (SYSMEX株式会社)

[0161] • 底物用缓冲液: HISCL R4试剂 (SYSMEX株式会社)

[0162] • 发光底物: HISCL R5试剂 (CDP-Star (注册商标)) (SYSMEX株式会社)

[0163] • 测定装置: 全自动免疫测定装置HISCL-800 (SYSMEX株式会社)

[0164] (2) 测定的步骤

[0165] 以下的操作通过HISCL-800 (SYSMEX株式会社) 来进行。将试样 (70 μ L) 和试样预处理液 (20 μ L) 混合, 在42 $^{\circ}$ C下温育504秒钟。在其中加入中和液 (20 μ L), 在42 $^{\circ}$ C下温育72秒钟。在得到的混合液中加入r4试剂 (20 μ L), 在42 $^{\circ}$ C下温育216秒钟。在得到的混合液中加入r3试剂 (20 μ L), 在42 $^{\circ}$ C下温育584秒钟, 形成含有HBs抗原、检测用标记抗体和捕捉用抗体的免疫复合物。在其中加入r5试剂 (20 μ L), 在42 $^{\circ}$ C下温育720秒钟, 将免疫复合物捕捉到第1固相上。使所得到的混合液中的磁性粒子集中, 除去上清, 加入HISCL洗涤液 (300 μ L) 来洗涤磁性粒子 (B/F分离)。进一步进行3次B/F分离。除去上清, 在磁性粒子中加入r6试剂 (41 μ L), 在42 $^{\circ}$ C下温育144秒钟, 使被捕捉到第1固相上的免疫复合物游离到溶液中。回收上清 (30 μ L) 并转移到另一比色皿 (キュベット) 中。在其中加入r7试剂 (30 μ L), 在42 $^{\circ}$ C下温育288秒钟, 将免疫复合物捕捉到第2固相上 (免疫复合物的转移)。使所得到的混合液中的磁性粒子集中, 除去上清, 加入HISCL洗涤液 (300 μ L) 来洗涤磁性粒子 (B/F分离)。进一步进行3次B/F分离。除去上清, 在磁性粒子中加入HISCL R4试剂 (50 μ L) 及HISCL R5试剂 (100 μ L)。将得到的混合液在42 $^{\circ}$ C下温育300秒钟, 测定发光强度。为了进行比较, 使用实施例1所得到的含有检测用标记抗体的溶液 (20 μ L) 来代替r3试剂, 除此以外与上述同样进行, 测定使用无预处理的抗体试剂时的发光强度。另外, 将r7试剂 (30 μ L)、HISCL R4试剂 (50 μ L) 及HISCL R5试剂 (100 μ L) 混合, 测定发光强度, 得到空白试剂的值。

[0166] (3) 结果

[0167] 由所测定的信号值减去空白试剂的值 (434count), 得到真正的信号值。在此, 对HBs抗原浓度为0IU/mL的试样进行测定而得到的信号值为不含被检物质的试样的测定值, 相当于检测用标记抗体的由非特异性反应产生的噪声。由得到的信号值通过下式算出S/N比。将真正的信号值 (counts) 及S/N比示于表2。

[0168] $(S/N比) = [(HBs抗原浓度0.25IU/mL的试样的信号值) - (HBs抗原浓度0IU/mL的试样的信号值)] / (HBs抗原浓度0IU/mL的试样的信号值)$

[0169] 【表2】

	HBs 抗原 (IU/mL)		S/N 比
	0	0.25	
[0170] 预处理过的抗体试剂	128	119358	931
无预处理的抗体试剂	484	118255	243

[0171] 如表2所示, 就HBs抗原浓度0IU/mL的试样而言, 使用预处理过的抗体试剂时的信号值下降至使用无预处理的抗体试剂时的信号值的1/4左右。因此表明, 通过使检测用抗体试剂与固相接触而进行预处理, 在免疫复合物转移法中, 可以减少源于检测用标记抗体的非特异性结合的非特异性信号。另一方面, 就HBs抗原浓度0.25IU/mL的试样而言, 信号值未观察到大的变化。这表明, 检测用抗体试剂的预处理对被检物质的检测性能没有影响。结果是, 通过检测用抗体试剂的预处理, 噪声大幅降低且对信号没有影响, S/N比显著提高。如表2所示, 使用预处理过的抗体试剂时的S/N比变高为使用无预处理的抗体试剂时的S/N比的约4倍。

[0172] 实施例3: 非特异性信号减少效果的评价 (1)

[0173] 基于信号值评价了利用本实施方式的被检物质的检测方法的非特异性信号减少效果。具体而言, 使用实施例1及2所得到的信号值算出第1比, 基于所算出的值来评价非特

异性信号减少效果。第1比是测定不含被检物质的试样时的信号值与基于1次检测中使用的量(1次测定量)的检测用抗体试剂所含的检测用标记抗体的信号值之比。以下也将第1比称为“非特异比(X)”。实施例3中,非特异比(X)通过下式算出。

[0174] (非特异比(X)) = [(HBs抗原浓度0IU/mL的试样的信号值) - (空白试剂的值)] / (基于20 μ L的r3试剂所含的ALP标记抗体的信号值)

[0175] 由实施例1可知,源于20 μ L的r3试剂(1次测定量的检测用抗体试剂)所含的全部检测用标记抗体的信号值为3,997,991,000count。另外,由实施例2可知,减去空白试剂的值后的HBs抗原浓度0IU/mL的试样的信号值为128count。因此,使用预处理过的抗体试剂的ICT-EIA法的非特异比(X)为 3.2×10^{-8} ($128/3997991000 = \text{约} 3.2 \times 10^{-8}$)。同样,算出使用无预处理的抗体试剂的ICT-EIA法的非特异比(X)则为 12.1×10^{-8} ($484/3997991000 = \text{约} 12.1 \times 10^{-8}$)。使用预处理过的抗体试剂时的非特异比(X)下降至使用无预处理的抗体试剂时的非特异比(X)的1/4左右。

[0176] 通过比较非特异比(X)可知,使用预处理过的抗体试剂时的非特异性信号减少效果与使用无预处理的抗体试剂时相比变高为约4倍。如上所述,非特异比(X)是基于信号值的,因此能够在不同的测定之间,对非特异性信号减少效果进行比较。

[0177] 参考例:不含免疫复合物的转移工序的测定法中的检测用抗体试剂的预处理的效果

[0178] 在不含免疫复合物的转移工序的测定法(夹心免疫测定法)中使用预处理过的抗体试剂时,与ICT-EIA法同样地研究是否可观察到非特异性信号减少效果。

[0179] (1) 试样、试剂及测定装置

[0180] • 试样: HISCL HBsAg标准品 (HBs抗原浓度0IU/mL及0.25IU/mL) (SYSMEX株式会社)

[0181] • 试样预处理液: 0.3N NaOH、5mM NaH₂PO₄、25mM Na₂HPO₄、2.4M脲及0.8%Brij (注册商标) 35

[0182] • 中和液: 0.1M柠檬酸、20mM巯基乙胺、20mM NaCl、及0.1%NaN₃

[0183] • r3试剂(检测用抗体): 实施例1所得到的含有检测用标记抗体的试剂

[0184] • r4试剂(捕捉用抗体): 与实施例2相同的试剂(含有Fab'-BSA-Bio-DNP的试剂)

[0185] • r5试剂(第1固相): 实施例1所得到的含有抗DNP抗体固定磁性粒子的溶液

[0186] • 洗涤液: HISCL洗涤液 (SYSMEX株式会社)

[0187] • 底物用缓冲液: HISCL R4试剂 (SYSMEX株式会社)

[0188] • 发光底物: HISCL R5试剂 (CDP-Star (注册商标)) (SYSMEX株式会社)

[0189] • 测定装置: 全自动免疫测定装置HISCL-800 (SYSMEX株式会社)

[0190] (2) 测定的步骤

[0191] 以下的操作通过HISCL-800 (SYSMEX株式会社) 来进行。将试样(70 μ L)和试样预处理液(20 μ L)混合,在42 $^{\circ}$ C下温育504秒钟。在其中加入中和液(20 μ L),在42 $^{\circ}$ C下温育72秒钟。在得到的混合液中加入r4试剂(20 μ L),在42 $^{\circ}$ C下温育216秒钟。在得到的混合液中加入r3试剂(20 μ L),在42 $^{\circ}$ C下温育584秒钟,形成含有HBs抗原、检测用标记抗体和捕捉用抗体的免疫复合物。在其中加入r5试剂(20 μ L),在42 $^{\circ}$ C下温育720秒钟,将免疫复合物捕捉到第1固相上。使所得到的混合液中的磁性粒子集中,除去上清,加入HISCL洗涤液(300 μ L)来洗涤磁性

粒子(B/F分离)。进一步进行3次B/F分离。除去上清,在磁性粒子中加入HISCL R4试剂(50 μ L)及HISCL R5试剂(100 μ L)。将得到的混合液在42 $^{\circ}$ C下温育300秒钟,测定发光强度。为了进行比较,使用实施例1所得到的含有检测用标记抗体的溶液(20 μ L)来代替r3试剂,除此以外与上述同样进行,测定使用无预处理的抗体试剂时的发光强度。另外,将r5试剂(20 μ L)、HISCL R4试剂(50 μ L)及HISCL R5试剂(100 μ L)混合,测定发光强度,得到空白试剂的值。

[0192] (3) 结果

[0193] 由所测定的信号值中减去空白试剂的值,得到真正的信号值。由所得到的信号值与实施例2同样地算出S/N比。将真正的信号值(counts)及S/N比示于表3。

[0194] 【表3】

	HBs 抗原 (IU/mL)		S/N 比
	0	0.25	
预处理过的抗体试剂	3269	328457	99
无预处理的抗体试剂	3996	341250	84

[0196] 如表3所示,就HBs抗原浓度0IU/mL的试样而言,使用预处理过的抗体试剂时的信号值与使用无预处理的抗体试剂时的信号值相比下降。但是,S/N比并未提高那么多。因此可知,即使将预处理过的抗体试剂用于夹心免疫测定法,也观察不到像S/N比显著提高那样的非特异性信号减少效果。即,表明在免疫复合物转移法中可更显著地发挥检测用抗体试剂的预处理效果。

[0197] 实施例4:非特异性信号的减少效果的评价(2)

[0198] 基于与通过不含免疫复合物的转移工序的测定法得到的非特异性信号的值的比较,来评价本实施方式的被检物质的检测方法所带来的非特异性信号减少效果。具体而言,使用实施例2及参考例所得到的信号值来算出第2比,基于所算出的值来评价非特异性信号的减少效果。第2比为测定不含被检物质的试样时的信号值与通过不含免疫复合物的转移工序的测定法得到的非特异性信号的值之比。以下,也将第2比称为“非特异比(Y)”。实施例4中,非特异比(Y)通过下式算出。

[0199] (非特异比(Y)) = [(HBs抗原浓度0IU/mL的试样的信号值) - (空白试剂的值)] / (利用夹心免疫测定法的HBs抗原浓度0IU/mL的试样的信号值)

[0200] 由参考例可知,利用夹心免疫测定法的HBs抗原浓度0IU/mL的试样的信号值为3269count及3996count。实施例4中使用这些信号值的平均值(3633count)。另外,由实施例2可知,减去了空白试剂的值后的HBs抗原浓度0IU/mL的试样的信号值为128count。因此,使用预处理过的抗体试剂的ICT-EIA法的非特异比(Y)为 3.5×10^{-2} ($128/3633 = \text{约} 3.5 \times 10^{-2}$)。同样地,算出使用无预处理的抗体试剂的ICT-EIA法的非特异比(Y)则为 13.4×10^{-2} ($484/3633 = \text{约} 13.4 \times 10^{-2}$)。

[0201] 非特异比(Y)是表示与不含免疫复合物的转移工序的测定法相比、免疫复合物转移法可以将非特异性信号减少多少的指标。非特异比(Y)的值越小,则意味着与不含免疫复合物的转移工序的测定法相比非特异性信号的减少效果越高。使用无预处理的抗体试剂的ICT-EIA法的非特异比(Y)为 13.4×10^{-2} ,因此可以说,正如此前已知那样,该方法与夹心免疫测定法相比,非特异性信号减少效果也高。另一方面,使用预处理过的抗体试剂的ICT-

EIA法的非特异比(Y)为 3.5×10^{-2} 。因此可知,本实施方式的检测方法与使用无预处理的抗体试剂的ICT-EIA法相比,非特异性信号减少效果更高。

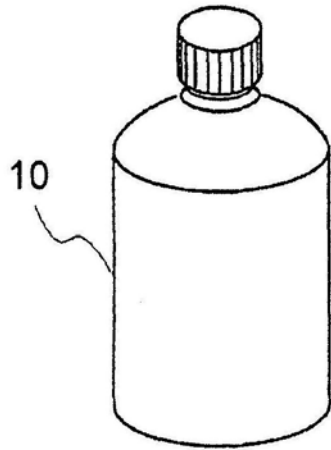


图1

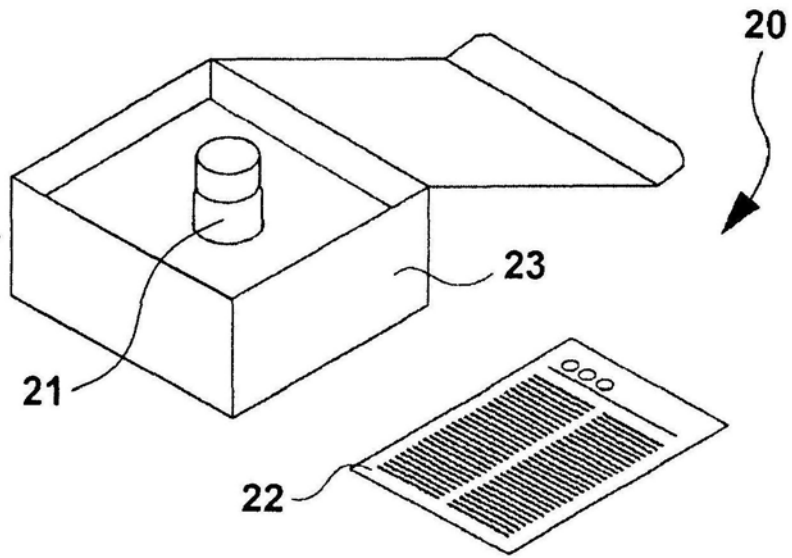


图2A

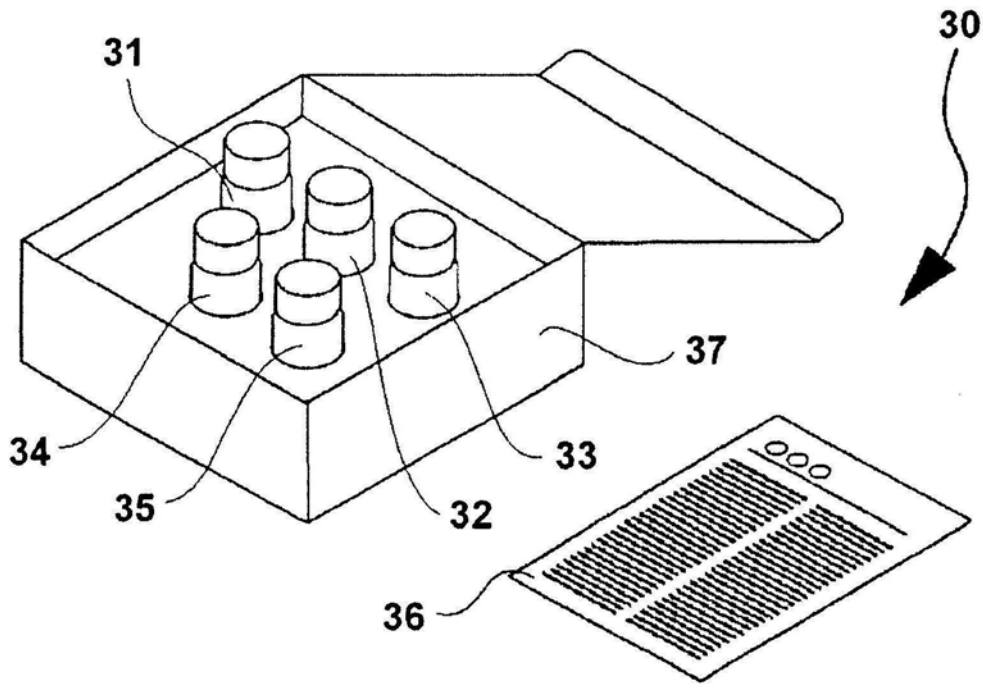


图2B

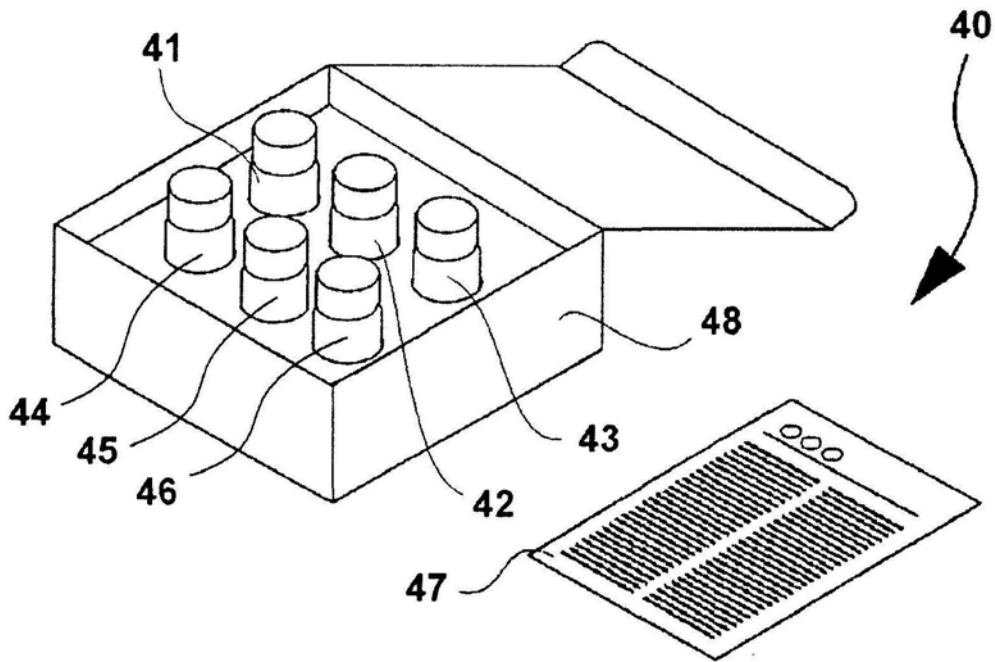


图2C

专利名称(译)	用于通过免疫复合物转移法检测被检物质的抗体试剂及其制造方法、以及该抗体试剂的用途		
公开(公告)号	CN107589249B	公开(公告)日	2020-04-07
申请号	CN201710202700.2	申请日	2017-03-30
[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	桥田诚一 森本彩 渡边敏弘 山垣内孝博		
发明人	桥田诚一 森本彩 渡边敏弘 山垣内孝博		
IPC分类号	C07K16/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/082 G01N33/54306 G01N33/54393 G01N33/5764 C07K16/00 G01N33/535 G01N33/5761 G01N2333/02		
代理人(译)	何杨		
优先权	2016129759 2016-06-30 JP		
其他公开文献	CN107589249A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于通过免疫复合物转移法检测被检物质的抗体试剂及其制造方法、以及该抗体试剂的用途。本发明的课题在于，提供一种能够减少免疫复合物转移法中的非特异性信号的抗体试剂。通过提供一种抗体试剂来解决上述课题，所述抗体试剂含有能够与被检物质结合的标记抗体，与免疫复合物转移法所使用的固相非特异性结合的标记抗体的分子数在抗体试剂所含的标记抗体的分子数中所占的比例为约 3.34×10^{-7} 以下。

