



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105492605 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201480034006. 9

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 08. 01

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 12. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/070396 2014. 08. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/017037 JA 2016. 02. 04

(71) 申请人 比科尔公司

地址 日本京都府

(72) 发明人 乡保正 织田康则

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军 牛蔚然

(51) Int. Cl.

C12N 15/09(2006. 01)

C12N 7/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书28页

序列表6页 附图20页

(54) 发明名称

用于免疫检验的病毒样颗粒、用于所述免疫检验的封闭剂、及包含它们的试剂盒

(57) 摘要

本发明的一个目的是提供一种检测灵敏度优异且能显著抑制检测背景的免疫检验方法。本发明的解决手段为提供一种病毒样颗粒,所述颗粒包含具有自组织能力的蛋白质,并且所述颗粒在该具有自组织能力的蛋白质的至少1个半胱氨酸残基上经由其一个或多个巯基而被生物学活性分子修饰。

1. 蛋白质免疫检验用病毒样颗粒,所述颗粒包含具有自组织能力的,所述病毒样颗粒在所述具有自组织能力的蛋白质的至少1个半胱氨酸残基上经由其一个或多个巯基被生物学活性分子修饰。

2. 如权利要求1所述的病毒样颗粒,其中,所述具有自组织能力的蛋白质为HBsAg蛋白质。

3. 如权利要求1的病毒样颗粒,其中,所述具有自组织能力的蛋白质含有序列号1所示的氨基酸序列。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的病毒样颗粒,其中,所述具有自组织能力的蛋白质具有抗体结合结构域。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的病毒样颗粒,其中,所述生物学活性分子为选自由酶、抗体结合结构域、生物素、荧光染料、发光染料及亲和素化合物组成的组中的至少一种。

6. 如权利要求5所述的病毒样颗粒,其中,所述抗体结合结构域为选自由蛋白质A的抗体结合结构域、蛋白质G的抗体结合结构域及蛋白质L的抗体结合结构域组成的组中的至少一种。

7. 如权利要求4或5所述的病毒颗粒,其中,所述抗体结合结构域由序列号3~5中任一所示的氨基酸序列构成。

8. 病毒样颗粒,其为权利要求1~7中任一项所述的病毒样颗粒,其中,所述生物学活性分子为抗体结合结构域,并且抗体结合于所述抗体结合结构域。

9. 封闭剂,其为用于使用权利要求1~8中任一项所述的病毒样颗粒的免疫检验中的封闭剂,所述封闭剂包含选自由羟烷基纤维素、聚乙烯醇、环氧乙烷/环氧丙烷共聚物及2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的共聚物组成的组中的至少1种。

10. 如权利要求9所述的封闭剂,其中,所述环氧乙烷/环氧丙烷共聚物为 **Pluronic®**。

11. 如权利要求9所述的封闭剂,其中,所述环氧乙烷/环氧丙烷共聚物为 **Pluronic® F127**和/或**Pluronic® P105**。

12. 免疫检验用试剂盒,包含权利要求1~8中任一项所述的病毒样颗粒和权利要求9~12中任一项所述的封闭剂。

用于免疫检验的病毒样颗粒、用于所述免疫检验的封闭剂、及包含它们的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及用于免疫检验的病毒样颗粒(virus-like particle)、用于该免疫检验的封闭剂(blocking agent)、及包含该病毒样颗粒和该封闭剂的试剂盒。

背景技术

[0002] 使用各种颗粒作为免疫检验传感器(immunoassay sensors)的方法是已知的(专利文献1~8)。例如,专利文献1或专利文献2中公开了利用荧光半导体纳米颗粒或二氧化硅颗粒作为免疫检验中的检测元件的方法,该方法是利用纳米颗粒发射的荧光进行免疫检验的方法。

[0003] 专利文献8中公开了一种纳米颗粒缀合物(nanoparticle conjugate),所述纳米颗粒缀合物包含作为核心的金属材料、磁性材料或半导体材料以及缀合至其上的各种肽。

[0004] 具有乙型肝炎病毒表面抗原、且在位于该抗原的N末端的Pre-S1及Pre-S2区域以串联的方式插入有2个源自蛋白质A的与抗体的Fc区域对应的结合结构域(Z标签)的病毒样颗粒(下文中有时称为ZZ-BNC),是在使用酵母经基因重组而制造的L型乙型肝炎病毒颗粒的Pre-S1及Pre-S2区域插入有2个源自蛋白质A的与抗体的Fc区域对应的结合结构域(Z标签)的病毒样颗粒(专利文献9)。专利文献10中公开了上述病毒样颗粒的制造方法及其作为药物传递系统的有用性。

[0005] 着眼于该BNC-ZZ所具有的作为传感器元件的高性能,专利文献3的实施例中公开了使用酶标记抗体和BNC-ZZ的组合的方法、利用经荧光标记的BNC-ZZ的抗体检测方法、在免疫检验中利用BNC-ZZ的方法。专利文献6中公开了将BNC-ZZ用于经阵列固定的抗体来提高灵敏度的方法。专利文献4中公开了将生物素化的BNC-ZZ应用于免疫检验的方法,其在实施例中显示,与未经生物素化的BNC-ZZ相比,经由链亲和素而结合有生物素化HRP酶或生物素化抗体的生物素化BNC-ZZ的灵敏度增高。

[0006] 专利文献5中公开了一种方法,用于制造并利用包含不具有Pre-S区域的蛋白质分子和具有ZZ标签的蛋白质分子的杂合(hybrid)型颗粒,以通过提高BNC-ZZ颗粒所具有的抗体结合能力来提高免疫检验的灵敏度。此外,专利文献7的实施例中公开了通过将抗体较弱地交联于经荧光标记的BNC-ZZ上来同时检测多种抗原的方法。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特表2006-517985号公报

[0010] 专利文献2:日本特表2002-544488号公报

[0011] 专利文献3:日本特开2007-127626号公报

[0012] 专利文献4:日本特开2008-191143号公报

[0013] 专利文献5:日本特开2010-096677号公报

[0014] 专利文献6:日本特开2007-121276号公报

- [0015] 专利文献7:日本特开2010-210444号公报
[0016] 专利文献8:日本特表2007-506084号公报
[0017] 专利文献9:日本特开2001-316298号公报
[0018] 专利文献10:日本特开2004-002313号公报
[0019] 非专利文献
[0020] 非专利文献1:Vaccine 19,3154-3163,2001

发明内容

[0021] 在免疫分析中,为了提高灵敏度,通常采用以下方法中的任一种:(1)利用对检测元件的检测对象物质具有高亲和性的检测元件;(2)增强与检测对象物质结合后的检测元件所产生的信号强度。在将如上所述的BNC-ZZ用作检测元件时,其对检测对象物质的亲和性恒定。因此,增强产生的信号强度是最有效的手段。

[0022] 但是,在公开了利用BNC-ZZ的方案专利文献4中,作为利用生物素化BNC-ZZ的方法,仅仅公开了利用已为人们所熟知的生物素与链亲和素的特异性结合能力、使HRP结合量升高从而增强信号的方法,并没有对BNC-ZZ进行研究。

[0023] ZZ-BNC具有源自蛋白质A的抗体结合部位,与免疫检验中的重要抗体(小鼠IgG₁、大鼠IgG、绵羊IgG₁、山羊IgG₁、人IgG₃等)的结合弱,使用方法、使用范围受到很大限制。进而,由于ZZ-BNC与各种IgG结合,所以在存在多种抗体的环境下,例如在抗体夹心ELISA(antibody-sandwich ELISA)中、或在对存在多种抗体的血清等的评价中,会发生与目标以外的抗体的结合,因此,难以进行抗体特异性检测。

[0024] 此外,考虑到实用化时,由于BNC-ZZ、经标记的BNC-ZZ和经修饰的BNC-ZZ为脂蛋白,因此会非特异地结合于玻璃、塑料。非特异性吸附不仅给免疫分析带来很大影响,而且在经稀释溶液的长时间保存中也将造成严重的问题。

[0025] 为了解决上述课题,本申请的发明人进行了锐意研究,结果发现当利用生物学活性分子、通过病毒样颗粒中包含的具有自组织能力(self-organization ability)的蛋白质的特定部位对病毒样颗粒进行标记时,所得到的病毒样颗粒可合适地用于免疫检验。

[0026] 进而,本申请的发明人还发现在使用上述病毒样颗粒的免疫检验中,特定的封闭剂可发挥优异的封闭效果。

[0027] 本发明是基于上述发现而完成的,包括下述广泛的技术方案。

[0028] 项1.免疫检验用病毒样颗粒,所述颗粒包含具有自组织能力的蛋白质,所述颗粒在该具有自组织能力的蛋白质的至少1个半胱氨酸残基上经由其一个或多个巯基而被生物学活性分子修饰。

[0029] 项2.如上述项1所述的病毒样颗粒,其中,所述具有自组织能力的蛋白质为HBsAg蛋白质。

[0030] 项3.如上述项1的病毒样颗粒,所述具有自组织能力的蛋白质含有序列号1所示的氨基酸序列。

[0031] 项4.如上述项1~项3中任一项所述的病毒样颗粒,其中,所述具有自组织能力的蛋白质具有抗体结合结构域。

[0032] 项5.如上述项1~项4中任一项所述的病毒样颗粒,其中,所述生物学活性分子为

选自由酶、抗体结合结构域、生物素、荧光染料、发光染料及亲和素化合物(avidin compound)组成的组中的至少1种。

[0033] 项6.如上述项5所述的病毒样颗粒,其中,所述酶为碱性磷酸酶及/或过氧化物酶。

[0034] 项7.如上述项4或项5所述的病毒样颗粒,其中,所述抗体结合结构域为选自由蛋白质A的抗体结合结构域、蛋白质G的抗体结合结构域及蛋白质L的抗体结合结构域组成的组中的至少1种。

[0035] 项8.如上述项4或项5所述的病毒颗粒,其中,所述抗体结合结构域由序列号3~5中任一个所示的氨基酸序列构成。

[0036] 项9.如上述项5所述的病毒样颗粒,其中,所述亲和素化合物为选自由亲和素、链亲和素、中性亲和素蛋白(neutravidin)、AVR蛋白质、Bradavidin、Rhizavidin及**Tamavidin®**组成的组中的至少1种。

[0037] 项10.上述项1~9中任一项所述的病毒样颗粒,其中,生物学活性分子为抗体结合结构域,并且抗体结合于该抗体结合结构域。

[0038] 项11.封闭剂,其为使用上述项1~项10中任一项所述的病毒样颗粒的免疫检验用封闭剂,该封闭剂包含选自由羟烷基纤维素、聚乙烯醇、环氧乙烷/环氧丙烷共聚物及2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(2-methacryloyloxyethylphosphocholine)的共聚物组成的组中的至少1种。

[0039] 项12.如上述项11所述的封闭剂,其中,所述羟烷基纤维素为羟丙基甲基纤维素。

[0040] 项13.如上述项11所述的封闭剂,其中,所述聚乙烯醇的聚合度为200~5000。

[0041] 项14.如上述项11所述的封闭剂,其中,所述环氧乙烷/环氧丙烷共聚物为**Pluronic®**。

[0042] 项15.如上述项11所述的封闭剂,其中,所述环氧乙烷/环氧丙烷共聚物为**Pluronic®**F127和/或**Pluronic®**P105。

[0043] 项16.如上述项11所述的封闭剂,其中,2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的共聚物为**Biolipidure®**。

[0044] 项17.如上述项11所述的封闭剂,其中,2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的共聚物为**Biolipidure®**206及/或**Biolipidure®**802。

[0045] 项18.免疫检验用试剂盒,包含上述项1~项10中任一项所述的病毒样颗粒和上述项11~项17中任一项所述的封闭剂。

[0046] 本发明的病毒样颗粒能够以优异的检测灵敏度进行免疫检验。

[0047] 在使用本发明的病毒样颗粒进行的免疫检验中,本发明的封闭剂可发挥降低所得数据的背景和/或使检测信号灵敏化的功能,由此显著提高S/N比。

[0048] 根据使用本发明的试剂盒的免疫检验,能够显著提高所得到的数据的S/N比。

附图说明

[0049] 图1是表示实施例5的结果的图。

[0050] 图2是表示实施例6的结果的图。

[0051] 图3是表示实施例16的结果的图。

- [0052] 图4是表示实施例17的结果的图。
[0053] 图5是表示实施例18的结果的图。
[0054] 图6是表示实施例20的结果的图。
[0055] 图7是表示实施例21的结果的图。
[0056] 图8是表示实施例22的结果的图。
[0057] 图9是表示实施例23的结果的图。
[0058] 图10是表示实施例24的结果的图(抗GFP抗体)。
[0059] 图11是表示实施例24的结果的图(HMG单克隆抗体)。
[0060] 图12是表示实施例25的结果的图。
[0061] 图13是表示实施例27的结果的图。
[0062] 图14是表示实施例28的结果的图。
[0063] 图15是表示实施例29的结果的图。
[0064] 图16是表示实施例30的结果的图。
[0065] 图17是表示实施例31的结果的图。
[0066] 图18是表示实施例32的结果的图。
[0067] 图19是表示实施例33的结果的图。
[0068] 图20是表示实施例34的结果的图。
[0069] 图21是表示实施例35的结果的图。
[0070] 图22是表示实施例36的结果的图。

具体实施方式

[0071] <病毒样颗粒>

[0072] 本发明的病毒样颗粒用于免疫检验方法,并且包含具有自组织能力的蛋白质。具有自组织能力的蛋白质在该蛋白质的至少一个半胱氨酸残基上经由其一个或多个巯基而被生物学活性分子修饰。

[0073] 所谓具有自组织能力的蛋白质,是能够在生物体内(特别是细胞内)通过包入(enclosing)脂双层膜(例如内质网腔(endoplasmic reticulum lumen)、细胞膜、核膜等)而形成病毒样颗粒的蛋白质,该蛋白质没有特别限定,只要具有半胱氨酸残基即可,例如可举出与具有包膜(envelope)的病毒的出芽(budding)功能有关的蛋白质、包膜蛋白(envelope protein)、或它们的变异体等。

[0074] 具有包膜的病毒没有特别限定,例如可举出乙型肝炎病毒(HBV)、鸭乙型肝炎病毒等属于嗜肝DNA病毒(Hepadnaviridae)科的病毒;仙台病毒(HVJ)等属于副粘病毒科的病毒;单纯疱疹病毒等属于疱疹病毒科的病毒;流感病毒等属于正粘病毒科的病毒;人免疫缺陷病毒等属于反转录病毒(Retroviridae)科的病毒等。

[0075] 具有自组织能力的蛋白质没有特别限定,例如可举出乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)蛋白质(其是与HBV的出芽功能有关的蛋白质)、蛋白质F(其是与HVJ的出芽功能有关的蛋白质)、血凝素神经氨酸酶蛋白质(hemagglutinin neuraminidase protein)、或它们的变异体。其中,HBsAg蛋白质、蛋白质F、血凝素神经氨酸酶蛋白质、它们的变异体等是优选的。

[0076] 变异体没有特别限定,只要具有至少一个的半胱氨酸残基、并且发挥如上所述的能够形成病毒样颗粒的作用即可。引入的突变的具体数量也没有特别限定,只要所得到的变异体满足上述条件即可。通常,突变引入数可为使得得到的变异体与突变前的氨基酸序列具有85%以上、优选90%以上、更优选95%以上、最优选99%以上的同一性的数量。

[0077] 需要说明的是,此处所谓的突变,包括取代、缺失、插入等。作为具体的突变引入方法,可以不受特别限制地采用已知的方法,例如要进行取代时,可采用保守取代(conservative substitution)技术。术语“保守取代技术”是指,氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所取代。

[0078] 保守取代技术包括例如具有赖氨酸、精氨酸、组氨酸等碱性侧链的氨基酸残基彼此之间的取代。作为保守取代技术的其他例子,包括:具有酸性侧链的氨基酸残基(例如天冬氨酸和谷氨酸)彼此之间的取代;具有非带电极性侧链的氨基酸残基(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)彼此之间的取代;具有非极性侧链的氨基酸残基(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)彼此之间的取代;具有 β -分枝侧链的氨基酸残基(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)彼此之间的取代;具有芳香族侧链的氨基酸残基(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)彼此之间的取代。

[0079] 术语“同一性”是指,2条以上可进行比较的氨基酸序列之间相同的氨基酸序列的程度。因此,2条氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性高,这些序列的同一性或相似性就高。对于氨基酸序列之间的同一性的水平,例如,使用序列分析工具FASTA,基于缺省参数(default parameters)进行确定。这些分析方法的具体技术是已知的,可参照美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information,NCBI)的网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

[0080] 作为HBsAg,没有特别限定,例如可举出含有序列号1所示的氨基酸序列的蛋白质等,作为该HBsAg的变异体,例如可举出专利文献5、9中公开的HBsAg变异体等。作为蛋白质F,没有特别限定,例如可举出由NCBI的网站上登记的登记号为NP_056877;版本:NP_056877.1GI:9627226所示的氨基酸序列构成的蛋白质等。作为血凝素神经氨酸酶蛋白质,没有特别限定,例如可举出由NCBI的网站上登记的登记号为NP_056878;版本:NP_056878.1GI:9627227所示的氨基酸序列构成的蛋白质等。

[0081] 具有自组织能力的蛋白质具有半胱氨酸残基,通过半胱氨酸残基上的一个或多个巯基而被生物学活性分子修饰。半胱氨酸残基没有特别限定,但优选为位于基于具有自组织能力的蛋白质形成的病毒样颗粒的表面、且经生物学活性分子修饰的特定的半胱氨酸残基。

[0082] 作为这样的半胱氨酸残基,例如,对上述含有序列号1所示的氨基酸序列的HBsAg蛋白质而言,可举出第107、121、124、137、138、139、147或149位的半胱氨酸残基。需要说明的是,作为该HBsAg蛋白质的跨膜结构域,推定为第9~28位、第80~98位及第170~192位所示的氨基酸序列。

[0083] 例如,对由上述NCBI的网站上所记载的氨基酸序列构成的蛋白质F而言,可举出第70、199、338、347、362、370、394、399、401或424位的半胱氨酸残基。需要说明的是,作为该蛋白质F的跨膜结构域,推定为第1~25位、第117~139位及第501~523位所示的氨基酸序列。

[0084] 例如,对由上述NCBI的网站上所记载的氨基酸序列构成的血凝素神经氨酸酶蛋白质而言,可举出第129、138、161、192、216、258、271、352、357、365、463、469、473、535、544或571位的半胱氨酸残基。需要说明的是,作为该血凝素神经氨酸酶蛋白质的跨膜结构域,推定为第38~60位所示的氨基酸序列。

[0085] 生物学活性分子没有特别限定,例如可举出酶、抗体结合结构域、生物素、荧光染料、发光染料、亲和素化合物等。如上所述,本发明的具有自组织能力的蛋白质具有一个以上的半胱氨酸残基,且通过其中的至少1个半胱氨酸残基与生物学活性分子结合,因此,上述酶、抗体结合结构域、生物素、荧光染料、发光染料、亲和素化合物等中之一或其中2种以上的组合,可以经由各个半胱氨酸残基与上述蛋白质结合。

[0086] 具体的酶可以是免疫检验领域中通常使用的任意酶,例如可举出过氧化物酶、碱性磷酸酶等。

[0087] 具体的抗体结合结构域没有特别限定,优选为与抗体的Fc结构域结合的结构域。作为具体的抗体结合结构域,例如可举出蛋白质A的抗体结合结构域(序列号3)、蛋白质G的抗体结合结构域(序列号4)、及蛋白质L的抗体结合结构域(序列号5)等,但并不限于于此。

[0088] 作为生物学活性分子中所包含的抗体结合结构域,可以为包含2个以上的相同或不同的上述抗体结合结构域的实施方式。作为这样的实施方式,例如可举出包含由从N末端起依次含有蛋白质A的抗体结合结构域、蛋白质G的抗体结合结构域、及蛋白质G的抗体结合结构域的氨基酸序列的抗体结合结构域(序列号6);从N末端起依次以串联的方式含有蛋白质A的抗体结合结构域的ZZ标签等。

[0089] 与抗体结合结构域结合的抗体没有特别限定,其结构也并不限于免疫球蛋白,只要是至少具有能发挥识别抗原的功能的结构的分子即可,例如可使用多价抗体等具有构造块结构(building block structure)的抗体。

[0090] 此外,抗体的来源也没有特别限定,可以使用源自适于产生抗体的各种动物的抗体。

[0091] 例如,抗体为免疫球蛋白时,其亚型没有特别限定。此外,免疫球蛋白为IgG、IgA等时,其亚类也没有特别限定。

[0092] 上述生物学活性分子为抗体结合结构域时,该结构域与上述抗体结合的实施方式也包含在本发明的病毒样颗粒的范围内。需要说明的是,抗体结合结构域与抗体的结合,也可以是使用已知的交联剂而形成的牢固的结合(本说明书中,有时称为不可逆性结合。)。作为已知的交联剂,可举出BS₃等。

[0093] 生物素、荧光染料及发光染料为免疫检验领域中通常所使用的物质即可,没有特别限定,可适宜使用任何已知的生物素、荧光染料及发光染料。

[0094] 具体的亲和素化合物没有特别限定,例如可举出亲和素、链亲和素、中性亲和素蛋白、AVR蛋白质、Bradavidin、Rhizavidin、Tamavidin等。

[0095] 本发明的病毒样颗粒可如下制造:采用已知的方法获得包含具有自组织能力的蛋白质的病毒样颗粒,使用用于修饰蛋白质的试剂盒等,经由半胱氨酸残基使上述生物学活性分子与获得的病毒样颗粒结合。此外,结合后,可以适宜采用凝胶过滤等已知的手段对其实施纯化工序。

[0096] 需要说明的是,使生物学活性分子结合于病毒样颗粒之后,可以采用已知方法使

用已知的交联剂对所得到的病毒样颗粒进行处理,以使得病毒样颗粒中包含的具有自组织能力的蛋白质的半胱氨酸残基与生物学活性分子之间的结合变得牢固。作为已知的交联剂,可举出BS₃等。

[0097] 本发明的病毒样颗粒中也包含病毒样颗粒的下述实施方式,所述病毒样颗粒包含具有自组织能力的蛋白质,所述具有自组织能力的蛋白质不仅经上述半胱氨酸残基与一个生物学活性分子结合,还与另一生物学活性分子(以下,说明书中有时称为第2生物学活性分子)结合。

[0098] 作为上述实施方式的病毒样颗粒,可举出下述实施方式:形成病毒样颗粒的脂双层膜的脂质成分与第2生物学活性分子结合的实施方式;第2生物学活性分子经由上述具有自组织能力的蛋白质的半胱氨酸残基以外的氨基酸残基或经由糖链而结合的实施方式;将第2生物学活性分子组入至上述具有自组织能力的蛋白质的特定部位的实施方式。

[0099] 上述第2生物学活性分子可以与通过上述半胱氨酸残基而被修饰的生物学活性分子相同。

[0100] 例如,作为将抗体结合结构域作为第2生物学活性分子组入至上述具有自组织能力的蛋白质的N末端区域的实施方式,可举出包含含有序列号2所示的氨基酸序列的具有自组织能力的蛋白质的病毒样颗粒。特别地,这样的具有自组织能力的蛋白质,可以具有抗体结合结构域作为经由该蛋白质的至少1个半胱氨酸残基上的巯基而结合的生物学活性分子,并且在该蛋白质的N末端区域具有抗体结合结构域。

[0101] 例如,第2生物学活性分子结合在上述具有自组织能力的蛋白质的糖链上的实施方式,可通过将唾液酸等糖链的末端糖残基醛基化而得到。

[0102] 对于具有自组织能力的蛋白质与第2生物学活性分子的结合而言,可以如上所述使用已知的交联剂进行加强。作为已知的交联剂,可举出BS₃等。

[0103] 此外,第2生物学活性分子为抗体结合结构域时,抗体结合于该结构域的实施方式也包含在本发明的病毒样颗粒的范围内。根据需要而对该病毒样颗粒实施了用以使该结合牢固的交联处理的实施方式也包含在本发明的病毒样颗粒的范围内。作为已知的交联剂,可举出BS₃等。

[0104] 本发明的病毒样颗粒的优选实施方式包含具有自组织能力的蛋白质,且满足以下描述之一:(1)病毒样颗粒在该蛋白质的N末端区域具有抗体结合结构域,并且还经由该蛋白质的上述特定半胱氨酸残基而结合有酶(对应于下文实施例中制造例3中的“SH-HRP标记BNC-ZZ”及制造例4中的“SH-ALP标记BNC-ZZ”);(2)病毒样颗粒在该蛋白质的N末端区域具有抗体结合结构域,并且还经由该蛋白质的上述特定半胱氨酸残基而结合有抗体结合结构域(对应于下文实施例中制造例5中的“AGG-BNC-ZZ”);(3)病毒样颗粒在该蛋白质的N末端区域具有抗体结合结构域,经由该蛋白质的上述特定半胱氨酸残基而结合有抗体结合结构域,并且还经由该蛋白质的N末端或赖氨酸残基而结合有酶(对应于下文实施例中制造例6中的“HRP标记AGG-BNC-ZZ”);(4)病毒样颗粒经由该蛋白质的上述特定半胱氨酸残基而结合有亲和素化合物(对应于下文实施例中制造例8中的“BNC-SA”);(5)病毒样颗粒经由该蛋白质的上述特定半胱氨酸残基而结合有亲和素化合物,并且经由该蛋白质的赖氨酸残基而结合有酶(对应于下文实施例中制造例8中的“HRP标记BNC-SA”);(6)病毒样颗粒通过该蛋白质的上述特定的半胱氨酸残基而结合有酶(对应于下文实施例中制造例9中的“HRP标记

BNC-L”);(7)病毒样颗粒通过该蛋白质的糖链而结合有抗体结合结构域,并且通过该蛋白质的上述特定的半胱氨酸残基而结合有酶(对应于下文下述实施例中制造例10中的“SH-HRP标记BNC-(糖链)-AGG”);(8)病毒样颗粒通过该蛋白质的上述特定的半胱氨酸残基而结合有酶(对应于下文下述实施例中制造例11中的“HRP标记HVJ-E”)等。

[0105] 本说明书中定义的免疫检验方法,可以是任何采用基于抗体的抗原-抗体结合作用作为测定原理的测定方法,例如可举出Western印迹法、ELISA法、免疫色谱法、免疫染色法、EIA法、FIA法、及以上述方法为基础的各种改良方法等。

[0106] <封闭剂>

[0107] 本发明的封闭剂可用于使用了上述本发明的病毒样颗粒的免疫检验方法。该封闭剂能够发挥降低上述免疫检验中所得到的数据的背景及/或使检测信号灵敏化的作用,从而显著提高S/N比。

[0108] 对于上述效果,不仅基于所得到的数据进行评价,而且还例如通过确认对上述病毒样颗粒向免疫检验方法中常用实验仪器上的吸附的抑制来进行评价。

[0109] 病毒样颗粒及免疫检验方法可以是上文<病毒样颗粒>项中详细说明过的那样。

[0110] 本发明的封闭剂包含羟烷基纤维素、聚乙烯醇、环氧乙烷/环氧丙烷共聚物、2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的共聚物、或它们中的2种以上。

[0111] 羟烷基纤维素没有特别限定,但优选含有碳原子数为1~4左右的烷基。例如,可举出羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基甲基纤维素、羟丙基乙基纤维素、羟乙基乙基纤维素等,其中优选羟丙基甲基纤维素。

[0112] 本发明的封闭剂中包含的羟烷基纤维素可以为2种以上的上述化合物的组合,作为具体的获得方法,可举出购买市售品、采用已知方法进行制造等。

[0113] 聚乙烯醇只要是具有乙烯醇作为单体单元的聚合物即可。聚乙烯醇的聚合度没有特别限定,通常优选为200~5000左右,更优选为500~2000左右。

[0114] 此外,通常所使用的聚乙烯醇大多是将聚乙酸乙烯酯皂化而制造的,因此,可以如上所述具有乙酸乙烯酯作为单体单元。从上述观点考虑,上述聚乙烯醇的皂化度(摩尔%)通常可以为80~98左右,优选为85~98左右。

[0115] 本发明的封闭剂中包含的聚乙烯醇可以为2种以上的上述化合物的组合,作为具体的获得方法,可举出从市场上购入、采用已知方法进行制造等。

[0116] 环氧乙烷/环氧丙烷共聚物只要是以环氧乙烷和环氧丙烷为单体单元的共聚物即可,没有特别限定,例如优选为Pluronic®或其等同物。

[0117] 作为更优选的环氧乙烷/环氧丙烷共聚物,可举出Pluronic L31、Pluronic L35、Pluronic L64、Pluronic P94、Pluronic F68、Pluronic F87、Pluronic F-127、Pluronic P-105等(以上均为BASF公司的商标),作为它们的等同物,可举出泊洛沙姆(Poloxamer)(ICI公司的商标)。其中,Pluronic F-127或Pluronic P-105、其等同物等是最优选的。

[0118] 本发明的封闭剂中包含的环氧乙烷/环氧丙烷共聚物,可以为2种以上的上述化合物的组合,作为具体的获得方法,可举出购买市售品(BASF公司、ICI公司等)、采用已知方法进行制造等。

[0119] 2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的共聚物,只要是以2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱及其他单体成分为构成单元的共聚物即可,没有特别限定。

[0120] 更具体而言,作为上述2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱的共聚物,可举出Lipidure®、Biolipidure®、它们的等同物等。

[0121] 作为优选的2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱的共聚物,例如可举出Lipidure BL-405、Lipidure BL-203、Lipidure BL-1002、Lipidure BL-103、Lipidure BL-206、Lipidure BL-802、它们的等同物等,没有特别限定,但其中,Lipidure BL-206、Lipidure BL-802、它们的等同物等是最优选的(需要说明的是,本文中,例如将Lipidure BL-802简记为Lipidure 802)。

[0122] 本发明的封闭剂中包含的2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱的共聚物,可以是2种以上的上述化合物的组合,作为具体的获得方法,可举出购买市售品(日油株式会社)、采用已知方法进行制造等。

[0123] 本发明的封闭剂中包含的羟烷基纤维素、聚乙烯醇、环氧乙烷/环氧丙烷共聚物、或2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱的共聚物的含量没有特别限定,相对于封闭剂100重量份而言,羟烷基纤维素、聚乙烯醇、环氧乙烷/环氧丙烷共聚物及2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱的共聚物的总重量可以为0.001重量份~100重量份左右。具体而言,可以将羟烷基纤维素、聚乙烯醇、环氧乙烷/环氧丙烷共聚物、或2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱的共聚物自身用作本发明的封闭剂。

[0124] 本发明的封闭剂中,只要在不妨碍上述效果的范围内,则也可以包含免疫检验方法中使用的除上述羟烷基纤维素、聚乙烯醇、环氧乙烷/环氧丙烷共聚物、2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱的共聚物以外的成分。作为具体的其他成分,没有特别限定,例如可举出防腐剂、pH调节剂、盐、表面活性剂、稳定剂等。此外,本发明的封闭剂可以以被包含在免疫检验中常用的水、缓冲液等中的形态提供,或者可以以固体状的形态提供,在使用前将其溶解在上述水、缓冲液等中来使用。

[0125] 本发明的封闭剂的使用量没有特别限定,例如,相对于免疫检验中使用的缓冲液等溶液100体积份而言,通常可以为0.0001~5体积份左右。

[0126] <免疫检验用试剂盒>

[0127] 本发明的免疫检验用试剂盒包含上述本发明的病毒样颗粒和上述本发明的封闭剂。

[0128] 病毒样颗粒及封闭剂如上述<封闭剂>项中详细说明过的那样。免疫检验可以与上述<病毒样颗粒>项中详细说明过的免疫检验方法相同。

[0129] 本发明的免疫检验用试剂盒中,还可以包含反应容器、显色·发光底物、反应溶液、标准物质、可弃置装置(disposable instrument)、制造商的说明书等。

[0130] 需要说明的是,在本发明的免疫检验用试剂盒中,上述本发明的病毒样颗粒和上述本发明的封闭剂可以分别装在不同的容器(包装袋、瓶等)中,也可以装在同一容器中。此外,病毒样颗粒及封闭剂可以以被包含在水、缓冲液等中的形态提供,尤其是封闭剂可以以粉末状提供,在进行免疫检验时,在使用前用水、缓冲液等适宜进行制备(稀释)从而使用。

[0131] 实施例

[0132] 下述实施例用于更详细地说明本发明。但是,本发明不以任何方式被解释为受下述实施例所限。

[0133] 制造例1:BNC-L的制备

[0134] BNC-L是包含含有序列号1所示的氨基酸序列的具有自组织能力的HBsAg蛋白质的病毒样颗粒,BNC-L是通过日本专利第4085231号或日本专利第4936272号中公开的方法制造的。

[0135] 具体而言,对表达日本专利第4085231号中获得的BNC-L的酵母进行培养,利用玻璃珠将培养的细胞粉碎从而得到细胞粉碎液,于70°C对该细胞粉碎液进行20分钟的热处理。在热处理后实施离心工序,回收得到的上清液后,使用硫酸化Cellulofine柱(cellulofine sulfate column)及凝胶过滤柱进行纯化,进行浓缩以使得蛋白质浓度为0.2mg/mL以上,得到BNC-L。

[0136] 需要说明的是,包含含有序列号1所示的氨基酸序列的具有自组织能力的蛋白质的BNC-L形成为颗粒,有报道称每个颗粒包含约110个分子的该蛋白质(Yamada et al., Vaccine 19,3154-3163,2001)。

[0137] 制造例2:BNC-ZZ的制备

[0138] BNC-ZZ是下述这样的病毒样颗粒,所述病毒样颗粒包含序列号2所示的具有自组织能力的蛋白质,并且具有以串联方式插入至制造例1中所得到的BNC-L中含有的HBsAg蛋白质N末端的2个蛋白质A的抗体结合结构域(Z结构域)。BNC-ZZ是通过日本专利第4212921号及日本专利第4936272号中记载的方法制造的。

[0139] 具体而言,对表达日本专利第4212921号中获得的BNC-ZZ的酵母进行培养,利用玻璃珠将培养的细胞粉碎从而得到细胞粉碎液,于70°C对该细胞粉碎液进行20分钟的热处理。在热处理后实施离心工序,回收得到的上清液后,使用猪IgG柱(porcine IgG column)及凝胶过滤柱进行纯化,进行浓缩以使得蛋白质浓度为0.2mg/mL以上,得到BNC-ZZ。

[0140] 需要说明的是,基于从上述BNC-L的类推,可推定BNC-ZZ含有大约110个分子的、包含含有序列号2所示的氨基酸序列的具有自组织能力的蛋白质。当BNC-ZZ与抗体混合时,基于颗粒的抗体结合结构域与抗体的Fc结构域的结合而形成保持了抗体的抗原结合能力的复合体。BNC-ZZ的酶标记物也可形成同样的复合体。以下,有时将该复合体称为混合复合体。

[0141] 制造例3:HRP标记BNC-ZZ的制备

[0142] 针对制造例2中得到的BNC-ZZ,利用用于经由SH基团进行HRP标记的试剂盒及用于经由NH₂基团进行HRP标记的试剂盒(分别为过氧化物酶标记试剂盒-SH(Peroxidase Labeling Kit-SH)及过氧化物酶标记试剂盒-NH₂(Peroxidase Labeling Kit-NH₂);均为同仁化学制),按照它们的制造商说明书进行HRP标记后,利用凝胶过滤柱进行纯化,得到2种HRP标记BNC-ZZ。

[0143] 需要说明的是,在经由SH基团进行的HRP标记中,确认到了每个BNC-ZZ颗粒包含约110分子的HRP分子。即,结果表明:在由上述序列号2所示的氨基酸序列构成的蛋白质中的至少1个半胱氨酸残基的SH基团上,交联有约1分子的HRP分子。

[0144] 此外,对于制作HRP标记BNC-ZZ时所使用的BNC-ZZ,在不对其颗粒形状产生影响的缓和的条件下实施HRP标记处理。实际上,采用动态光散射法测定颗粒大小的结果是,相对于标记前的54nm而言,标记后为58nm,未确认到大的差异。因此,可以确认经HRP标记的NH₂基团及SH基团均为来自露出至颗粒表面的氨基酸残基的NH₂基团及SH基团。

[0145] 以示出BNC-ZZ中包含的蛋白质的氨基酸序列的序列号2为基准,例如当BNC-ZZ经

由NH₂基团而被HRP标记时,该NH₂基团显示为N末端的NH₂基团、或第1、43、67、70、98、112、113、121、125、128、156、170、171、179、308或327位中任意的赖氨酸残基侧链上的NH₂基团。

[0146] 另一方面,当BNC-ZZ经由SH基团而被HRP标记时,例如,该SH基团显示为第293、307、310、323、324、325、333或335位中任意的半胱氨酸残基的SH基团。

[0147] 实施例1

[0148] 进行实验以测定利用上述制造例3中所示的2种方法制备的HRP标记BNC-ZZ的HRP活性。作为HRP的底物,使用SAT-blue溶液(同仁化学制),测定492nm处的吸光度(Abs 492nm),此外,使用通过测定280nm处的吸光度而算出的蛋白质的量,求出比活性。

[0149] 结果,经由NH₂基团进行了HRP标记的BNC-ZZ(下文中有时将其称为NH₂-HRP标记BNC-ZZ)的比活性为0.351单位/μg(U/μg),另一方面,经由SH基团进行了HRP标记的BNC-ZZ(下文中有时将其称为SH-HRP标记BNC-ZZ)的比活性为0.844U/μg。即,NH₂-HRP标记BNC-ZZ仅显示出了SH-HRP标记BNC-ZZ的约41%的活性。需要说明的是,“单位”表示使用作为底物的SAT-blue在上述条件下进行测定时的Abs 492nm值的特异性增加。

[0150] 上述结果表明,被称为HRP的蛋白质分子能够以可标记的水平接近的NH₂基团比SH基团少。此外,由于经由SH基团能够实现更多个HRP分子的标记,因此可以确认,经由SH基团的标记方法更具有将HRP标记BNC-ZZ用作为高灵敏度的抗体检测探针的潜力。

[0151] 制造例4:ALP标记BNC-ZZ的制备

[0152] 针对制造例2中得到的BNC-ZZ,利用用于经由SH基团进行ALP标记的试剂盒及用于经由NH₂基团进行ALP标记的试剂盒(分别为碱性磷酸酶标记试剂盒-SH(Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH)及碱性磷酸酶标记试剂盒-NH₂(Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂);均为同仁化学制),按照它们的制造商的说明书进行ALP标记后,利用凝胶过滤柱进行纯化,得到2种ALP标记BNC-ZZ。

[0153] 此外,与制造例3中制作的HRP标记BNC-ZZ同样地,针对制作ALP标记BNC-ZZ时所使用的BNC-ZZ,在不破坏其颗粒形状的条件下实施ALP标记处理。

[0154] 在NH₂-ALP标记BNC-ZZ和SH-ALP标记BNC-ZZ中,BNC-ZZ也显示为经由与上述HRP标记BNC-ZZ中同样的氨基酸残基的NH₂基团或SH基团而被ALP标记。

[0155] 实施例2

[0156] 进行实验以测定利用上述制造例4中所示的2种方法制备的ALP标记BNC-ZZ的ALP活性。作为ALP的底物,使用pNPP(Sigma Fast磷酸对硝基苯酯片(p-nitro phenyl phosphate tablets)),测定405nm处的吸光度(Abs 405nm),此外,使用通过测定280nm处的吸光度而算出的蛋白质的量,求出比活性。

[0157] 结果显示,经由NH₂基团进行了ALP标记的BNC-ZZ(下文中有时将其称为NH₂-ALP标记BNC-ZZ)的ALP酶的比活性为3.56U/μg,另一方面,经由SH基团进行了ALP标记的BNC-ZZ(下文中有时将其称为SH-ALP标记BNC-ZZ)的ALP酶的比活性为5.61U/μg。即,NH₂-ALP标记BNC-ZZ仅显示出了SH-ALP标记BNC-ZZ的约60%的活性。需要说明的是,“单位”表示使用作为底物的pNPP在上述条件下进行反应时的Abs 405nm值的特异性增加。

[0158] 上述结果表明,经由SH基团能够实现更多个ALP分子的标记,这清楚表明,经由SH基团的标记方法更具有将ALP标记BNC-ZZ用作为高灵敏度的抗体检测探针的潜力。

[0159] 制造例5:AGG-BNC-ZZ的制备

[0160] 在大肠杆菌中制备包含序列号6所示的氨基酸序列(其由1个源自具有上述Z结构域的蛋白质A的结合结构域和2个源自蛋白质G的结合结构域构成)的蛋白质(下文中有时将其称为AGG)。在AGG蛋白质溶液中添加EMCS(同仁化学制),从而在AGG的氨基上引入马来酰亚胺基。

[0161] 使用TCEP(Thermo Scientific制)对制造例2中得到的BNC-ZZ进行还原处理,对经还原处理的BNC-ZZ和引入了马来酰亚胺基的AGG进行孵育,从而进行交联反应,由此得到AGG-BNC-ZZ。即,AGG-BNC-ZZ是包含含有上述序列号2所示的氨基酸序列的蛋白质、经由该蛋白质的半胱氨酸残基而结合有AGG的病毒样颗粒。

[0162] 制造例6:HRP标记AGG-BNC-ZZ的制备

[0163] 使用过氧化物酶标记试剂盒-NH₂,按照其制造商的说明书,在制造例5中得到的AGG-BNC-ZZ上进行HRP标记,得到HRP标记AGG-BNC-ZZ。

[0164] 实施例3

[0165] 为了对制造例6中得到的HRP标记AGG-BNC-ZZ的HRP酶活性和制造例3中得到SH-HRP标记BNC-ZZ的酶活性进行比较研究而进行了实验。取预定量的HRP标记AGG-BNC-ZZ或SH-HRP标记BNC-ZZ,向其中添加作为HRP的底物的TMB溶液(One-Step TMB Ultra, Thermo Scientific制),测定Abs 450nm。

[0166] 结果表明,HRP标记AGG-BNC-ZZ的HRP比活性为HRP标记BNC-ZZ的HRP比活性的约1/3。从实施例2(其中,经由NH₂基团或SH对BNC-ZZ进行HRP标记并研究了HRP活性)的结果来判断,清楚表明AGG-BNC-ZZ也能够以与BNC-ZZ大致相同的效率经由NH₂基团而被HRP标记。

[0167] 制造例7:HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体的制备

[0168] 如制造例2中所记载的那样,在将BNC-ZZ和抗体混合时,形成混合复合体。由于在该混合复合体中,抗体的Fc区域与BNC-ZZ的抗体结合部位的结合是可逆性的,因此在存在多种抗体的条件下,已结合的抗体可能被另外的抗体替换。因此,如果使该结合为不可逆性结合,则能够向BNC-ZZ赋予已结合的抗体所具有的结合能力。因此,如下所述制造了抗体结合结构域与抗体的结合交联而成的产物。即,将制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ和源自兔的抗小鼠IgG抗体(Bethyl制)混合从而形成两者的复合体,进而加入作为交联剂的BS₃(同仁化学制),使其终浓度分别为0、50、200、400或1000μM。接着,使用蛋白质A琼脂糖树脂(Protein A Sepharose resin)(GE Healthcare制)除去剩余的源自兔的抗小鼠IgG抗体,得到HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体。

[0169] 实施例4

[0170] 进行实验以测定制造例7中得到的HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体的HRP活性。使用HRP标记BNC-ZZ/抗体复合体,采用实施例3中记载的方法进行HRP活性测定。结果示于表1。无论在使用何种交联剂浓度的情况下,Abs 450nm均显示为几乎相同的值,表明HRP的活性几乎没有变化。

[0171] 表1

[0172]

各种试样	Abs 450nm(相对值)
交联剂0μM(无交联剂)	1.000
交联剂50μM	0.935

交联剂200 μ M	0.966
交联剂400 μ M	0.998
交联剂1,000 μ M	0.978

[0173] 实施例5

[0174] 为了对结合于SH-HRP标记BNC-ZZ/抗体复合体的抗体的结合性能进行评价,进行了竞争实验。利用蛋白质A/G琼脂糖(GE Healthcare制)纯化从正常小鼠血清得到不具有抗原特性的IgG(下文中有时称为源自对照小鼠的IgG),将其以各种浓度添加至ELISA板的各孔中并进行固定化。然后,使用k-Block-e(Beacle, Inc. 制)进行封闭。

[0175] 将制造例7中得到的HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体与源自对照兔的IgG(由Beacle, Inc. 与上述方法同样地进行制备)混合并进行孵育后,将该混合物添加至完成固定化的各孔中并使其反应,清洗后,采用与实施例3同样的方法测定Abs 450nm。结果示于图1。

[0176] 在以0M的交联剂浓度制备HRP标记BNC-ZZ与源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体时,即,在不进行交联处理时,与不存在源自对照兔的IgG的情况相比,在共存有源自对照兔的IgG的情况下,与固定化的源自小鼠的IgG的反应在整体浓度范围内下降至70%。在使用50 μ M的BS₃交联HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体时,在存在源自对照兔的IgG的情况下,观察到与固定化的源自小鼠的IgG的反应略微下降,这表明残留有可逆性结合。此外,在使用浓度为200 μ M的BS₃实施交联处理而得到的复合体中,即使添加源自对照兔的IgG,与源自小鼠的IgG的反应也完全没有变化。这表明在以200 μ M的BS₃实施交联而得的HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体中,没有发生与其结合的抗体的替换,形成了通过不可逆性结合而产生的复合体。

[0177] 从上述结果可知,在以浓度为200 μ M以上的BS₃实施交联而得到HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体时,能够形成通过不可逆性结合而产生的复合体。

[0178] 实施例6

[0179] 进行实验以评价制造例7中得到的HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体的残存抗体结合活性及可逆性的抗体结合活性。除使用源自对照兔的IgG的复合体代替源自兔的抗小鼠IgG抗体之外,按照与上述制造例7中所述的使用各种浓度的交联剂进行处理的HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体的制造方法相同的方法制造复合体。需要说明的是,使用的BS₃的浓度为0 μ M、50 μ M及200 μ M。将这些复合体加入ELISA板的各孔中进行固定化,进而使用k-Block-e(Beacle, Inc. 制)进行封闭。接着,向各孔中添加稀释至1/10000、1/5000及1/1000的ALP标记源自兔的抗小鼠IgG抗体(Invitrogen制)并使其反应,进行清洗后,采用实施例2与同样的方法测定Abs 405nm。结果示于图2。

[0180] 就BNC-ZZ、HRP标记BNC-ZZ而言,ALP酶活性依经ALP标记的兔抗体的添加量而增大。与未添加经ALP标记的兔抗体的情况相比,在添加1/1000稀释的该抗体时,ALP酶活性增加至4倍以上。这表明ALP标记兔抗体结合于BNC-ZZ、HRP标记BNC-ZZ的抗体结合部位。另一方面,就仅通过预先将HRP标记BNC-ZZ与源自对照兔的IgG混合而形成的混合复合体(图2中的“ZZ-HRP 0”)、添加BS₃的50 μ M进行交联而形成的复合体(图2中的“ZZ-HRP 50”)而言,与未添加经ALP标记的兔抗体的情况相比,在添加1/1000稀释的该抗体时,前者显示出了170%的ALP活性,后者显示出了137%的ALP活性。上述结果表明ALP标记兔抗体能够与这些

复合体结合,与之相对地,当复合体是使用200 μ M的BS₃进行交联时(图2中的“ZZ-HRP 200”),没有观察到ALP标记兔抗体的结合。

[0181] 上述结果表明,在使用浓度为200 μ M以上的BS₃进行交联而形成HRP标记BNC-ZZ与抗体的复合体的情况下,HRP标记BNC-ZZ没有残存的抗体结合活性,也没有可逆性结合。

[0182] 制造例8:HRP标记BNC-SA/抗小鼠IgG抗体复合体的制备

[0183] 使用EMCS,向链亲和素(SA,Thermo Scientific公司制)的氨基中引入马来酰亚胺基(MAL基)。接着,对制造例1中得到的BNC-L和上述引入了MAL基的SA进行孵育,从而进行交联反应,由此得到SA标记BNC-L(下文中有时称为BNC-SA)。即,BNC-SA是包含由序列号1所示的氨基酸序列构成的蛋白质、经由该蛋白质的至少1个半胱氨酸残基而结合有SA的病毒样颗粒。进一步,使用过氧化物酶标记试剂盒-NH₂使得到的BNC-SA与HRP交联,从而得到HRP标记BNC-SA。此外,利用生物素标记试剂盒-NH₂(同仁化学制)得到源自兔的生物素化抗小鼠IgG抗体。然后,将上述HRP标记BNC-SA和源自兔的生物素化抗小鼠IgG抗体以按蛋白质的量计相等的量进行混合,从而得到HRP标记BNC-SA/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体。

[0184] 实施例7

[0185] 进行实验以测定HRP标记BNC-SA/抗小鼠IgG抗体复合体的HRP活性。采用与上述实施例1同样的方法测定了制造例8中得到的HRP标记BNC-SA/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体的HRP活性。

[0186] 结果发现,HRP标记BNC-SA/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体的HRP活性为作为对照的SH-HRP标记BNC-ZZ的约1/8。从实施例1的结果可知,NH₂-HRP标记BNC-ZZ的HRP活性为SH的情况下的约1/2.4,由此可以判断,HRP标记BNC-SA/源自兔的抗小鼠IgG抗体的HRP活性为NH₂-HRP标记BNC-ZZ的约1/3。

[0187] 实施例8

[0188] 为了研究BNC-ZZ向容器上的吸附和封闭剂的效果而进行了实验。将制造例2中得到的BNC-ZZ溶解于PBS中以其浓度为300ng/mL,将所制备的溶液注入至聚乙烯制的微型管(microtube)中,向其中添加表2所示的各种封闭剂。将各管盖严后,在使其旋转的同时于室温下放置4天后,测定溶液中残存的BNC-ZZ量。测定中,使用用于测定BNC-ZZ的颗粒表面的Pre-S1区域的ELISA试剂盒(HB Pre-S1Antigen Quantitative ELISA Kit,Rapid,Beacle,Inc.制),按照所附的制造商的说明书进行测定。结果示于表2。

[0189] 仅使用PBS时,溶液中残存有1.3%的BNC-ZZ,由此可知大多数BNC-ZZ被吸附在容器上。向其中添加各种封闭剂时,所有封闭剂均显示出了抑制效果,但效果较高的是脱脂乳、Blockace(大日本制药制)、Pluronic F-127、Lipidure 802。

[0190] 表2

[0191]

各种封闭剂	溶液中BNC-ZZ的残存率(%)
PBS(无封闭剂)	1.3
0.5%脱脂乳	92.3
0.4%Blockace	92.5
0.1%Pluronic F-127	89.3
0.1%Pluronic P-105	77.0

0.1%HPMC	52.8
0.1%PVA-2000	57.2
0.1%Lipidure 206	61.6
0.1%Lipidure 802	81.9

[0192] 实施例9

[0193] 为了研究HRP标记BNC-ZZ向容器上的吸附和封闭剂的效果而进行了实验。制备以终浓度为300ng/mL含有制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ、以及表3所示的各种封闭剂的PBS溶液,并将其分别装入未经表面处理的聚乙烯制管、经MPC(2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱,2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)处理的管、及玻璃管中。将所有的管盖严,在使其旋转的同时于4°C下放置2天,通过下述方法测定各溶液中的HRP活性。即,向ELISA用96孔微孔板的各孔中添加2μg/mL的猪IgG并进行固定化。接着,添加1%Blockace进行封闭。向各孔中添加置于上述各种管中的HRP标记BNC-ZZ溶液,使其与固定化的猪IgG结合。接着,向各孔中添加TMB溶液(1-Step TMB slow,Thermo Scientific制)后,使用酶标仪(plate reader)测定Abs 450nm值。关于各试样的HRP标记BNC-ZZ的残存率,将以相似方式保存于MPC处理管中的浓度为500μg/mL的对照试样稀释至300ng/mL,以所得溶液的Abs 450nm值为基准进行计算。结果示于表3。

[0194] 表3

[0195]

管 \ 处理	PBS	0.1%明胶	0.1% BSA	0.1% HPMC	0.1% Pluronic F127	0.1% Pluronic P105
未经处理的PE管	22.3	66.3	88.5	84.2	92.3	93.3
经MPC处理的PE管	89.1	95.5	99	95.5	99.5	97.8
玻璃管	52.4	77.6	94.3	87.6	97.5	90.3

[0196] 将不含封闭剂的溶液(表3中的PBS)装入未经处理的塑料管的情况下,在2天内发生78%的吸附;装入玻璃管的情况下,发生了48%的吸附。虽然MPC处理管上的吸附被抑制,但仍有10%的吸附。与之相对地,向其中添加了各种封闭成分时,各添加成分中均观察到了抑制效果,BSA、HPMC、Pluronic F-127、Pluronic P-105的添加实现了特别高的抑制效果。

[0197] 实施例10

[0198] 为了研究BNC-ZZ向PVDF膜上的吸附和封闭剂的效果而进行了实验。将PVDF膜切成小片,于室温下在含有表4所示的各种浓度的封闭剂的PBS中浸渍1小时从而进行封闭处理,用PBS-T清洗3次从而除去未结合于膜的封闭剂。接着,在含有表4所示的各种浓度的封闭剂的PBS-T中,使将制造例2中得到的BNC-ZZ以300ng/mL的浓度溶解而得的反应溶液与上述完成封闭的PVDF膜在室温下反应1小时,然后,使其与溶解在PBS-T中的HRP标记兔抗体在室温下反应20分钟。

[0199] 反应结束后,用PBS-T清洗5次,使其与作为HRP的发光用底物的ECL Prime(GE Healthcare制)反应,利用发光传感器(luminescence sensor)(ChemiDoc XRS,Bio-Rad制)曝光20分钟,由此测定发光。

[0200] 需要说明的是,作为对照,使用了用不含封闭成分的PBS-T进行了同样的处理的

BNC-ZZ。结果示于表4。

[0201] 表4

[0202] 表4

[0203]

使用的封闭剂		结果 信号强度
PVDF 膜	反应溶液	
PBS	PBS-T	+++++
5%脱脂乳	1%脱脂乳	-
4% Blockace	1% Blockace	-
5% BSA	1% BSA	-
1%Pluronic F-127	0.1%Pluronic F-127	-
1%Pluronic P-105	0.1%Pluronic P-105	-
1% HPMC	0.1% HPMC	-
1% PVA 2000	0.1 PVA 2000	-
1% PVA 500	0.1% PVA 500	-
1% Lipidure 206	0.1% Lipidure 206	-
1% Lipidure 802	0.1% Lipidure 802	-

[0204] ※对于信号强度,根据使用发光传感器而得到的图像的强度进行了评价,并分为6个等级即-、+、++、+++、++++、及+++++。“-”表示没有获得信号。

[0205] 经不含封闭剂的PBS处理的PVDF膜的图像整体变黑,这明确表明大量的BNC-ZZ吸附在PVDF膜上。

[0206] 与之相反,在使用各种封闭剂对PVDF膜实施封闭处理,并且相同的封闭剂也被包括进将要进一步反应的BNC-ZZ溶液中的情况下,无论使用何种封闭剂时,均几乎未观察到BNC-ZZ向PVDF膜上的吸附。

[0207] 从上述结果可知,本实验中使用的的所有封闭剂,在用于PVDF膜的封闭处理和添加在反应液中进行的封闭处理两者中时,均显示出封闭效果。

[0208] 实施例11

[0209] 为了研究HRP标记BNC-ZZ向PVDF膜上的吸附和封闭剂的效果而进行了实验。制备在TBS中溶解有5%的脱脂乳、10%的脱脂乳+3%的鱼明胶(Funakoshi制)、4%的Blockace、5%的牛血清白蛋白的溶液(膜封闭液)。使用上述膜封闭液对切分成小片的PVDF膜进行封闭处理。作为膜封闭处理的对照,使用了未经处理的PVDF膜。

[0210] 接着,制备包含制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ的TBS-T,进而添加1%的脱脂乳、1%的Blockace、1%的BSA、或2%的明胶,制备反应封闭液,在上述PVDF膜上添加反应封闭液。作为对照,使用了包含SH-HRP标记BNC-ZZ的TBS-T。添加后,采用与实施例10同样的方法对经适宜清洗的PVDF膜进行检测。结果示于表5。

[0211] 表5

[0212]

		反应封闭液				
		对照	1%脱脂乳	1% Blockace	1% BSA	1%明胶
膜 封 闭 液	对照	+++++	+	+	+++	+
	5%脱脂乳	+++	+	+	+++	+
	4%脱脂乳	+++	+	+	+++	+
	5% BSA	+++	+	+	++++	+
	10%脱脂乳 + 3%明胶	+++	+	+	+++	++

[0213] ※对于信号强度,根据使用发光传感器而得到的图像的强度进行了评价,并分为6个等级即-、+、++、+++、++++、及+++++。“-”表示没有获得信号。

[0214] 在未对PVDF膜进行封闭处理的情况下添加包含HRP标记BNC-ZZ的TBS-T时,图像整体变黑,其信号强度的得分为+++++。这表明大量的HRP标记BNC-ZZ吸附在PVDF膜上。另一方面,在经各种膜封闭液处理的PVDF膜上添加包含HRP标记BNC-ZZ的TBS-T时,HRP标记BNC-ZZ向PVDF膜上的吸附被抑制,但仍然观察到了明显的吸附反应。而在用膜封闭液对PVDF膜进行处理、进而还添加相同的封闭液的情况下,在除包含BSA的反应封闭液之外的所有情况下,与对照相比,HRP标记BNC-ZZ向PVDF膜上的吸附均被强烈抑制。在使用包含BSA的反应封闭液时,与其他反应封闭液不同,无论对PVDF膜进行的封闭处理为何种类型,从PVDF膜获得的信号强度的程度均较高。

[0215] 上述结果表明,对PVDF膜的封闭处理对于抑制HRP标记BNC-ZZ向PVDF膜上的吸附而言是重要的,并且所使用的反应封闭液的种类是更重要的。上述结果还表明,用于对PVDF膜进行处理时,所有封闭液均显示出相同程度的效果,但在作为反应封闭液使用时,Blockace、脱脂乳、鱼明胶显示出几乎相同程度的效果,而BSA的效果则较弱。

[0216] 实施例12

[0217] 为了研究HRP标记BNC-ZZ向PVDF膜上的吸附和化学性封闭剂的效果而进行了实验。将表6所示的各种封闭剂溶解在TBS中,使得各封闭剂的浓度为1%。作为对照,制备在TBS中溶解有5%的脱脂乳的TBS。使用上述溶液将PVDF膜封闭,接着,使其与制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ进行反应,之后采用与实施例11同样的方法进行评价。结果示于表6。

[0218] 就用5%脱脂乳进行了封闭处理的PVDF膜而言,观察到膜整体淡淡地黑化,HRP标记BNC-ZZ向膜上的吸附没有被完全抑制。在所研究的化合物中,在Pluronic F-127、Pluronic P-105、HPMC、PVA 2000、PVA 500、Lipidure 206及Lipidure 802中,几乎没有发生膜的黑化,确认到了强的抑制效果。

[0219] 表6

	各种封闭剂	信号强度
[0220]	5%脱脂乳	++
	1%Pluronic F-127	-
	1%Pluronic P-105	-
	1% CMC	++
	1% HPMC	-
	1% PVP K-25	+++
	1% PVP K-70	++
	1% PVA 2000	-
	1% PVA 500	-
[0221]	1% Lipidure 103	++
	1% Lipidure 206	-
	1% Lipidure 802	-

[0222] ※对于信号强度,根据使用发光传感器而得到的图像的强度进行了评价,并分为6个等级即-、+、++、+++、++++、及+++++。

[0223] “-”表示没有获得信号。

[0224] 实施例13

[0225] 为了研究Western印迹中的HRP标记BNC-ZZ的效果而进行了实验。从实施例11及12的结果可以推断,当在PVDF膜中使用SH-HRP标记BNC-ZZ时,若使用Pluronic F-127、Pluronic P-105、HPMC、PVA 2000、PVA 500、Lipidure 206及Lipidure 802作为封闭剂,则能抑制HRP标记BNC-ZZ向膜上的吸附,此外,从实施例10的结果可以推断,若使HRP标记BNC-ZZ的反应液中含有封闭剂,则可获得更高的效果。

[0226] 因此,对于使反应液中含有上述封闭剂时的效果,使用抗波形蛋白(vimentin)抗体及制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ,通过HuH7细胞提取液的Western印迹进行了研究。检测方法与实施例10相同。需要说明的是,膜的封闭使用5%脱脂乳进行,将下表7所示的各种封闭剂以1%的终浓度用于反应时的封闭。

[0227] 表7

[0228]

反应封闭剂	条带	背景
脱脂乳	++	++
Pluronic F-127	++	-
Pluronic P-105	++	+
HPMC	++	+
PVA 2000	++	-
PVA 500	++	-
Lipidure 206	++	+
Lipidure 802	++	-

[0229] ※对于信号强度,根据使用发光传感器而得到的图像的强度进行了评价,并分为6个等级即-、+、++、+++、++++、及+++++。

[0230] “-”表示没有获得信号。

[0231] 在添加有1%的脱脂乳的对照实验中,作为背景,膜整体的图像淡淡地黑化。另一方面,在反应液中添加有Pluronic F-127、Pluronic P-105、HPMC、PVA 2000、PVA 500、Lipidure 206及Lipidure 802时,虽然根据所使用的封闭剂种类的不同,效果存在些许差异,但背景均比对照更低,可知上述各封闭剂的添加在抑制吸附方面是有效的。另一方面,关于抗体特异性的条带的信号强度,与所使用的封闭剂的种类无关,几乎没有变化。

[0232] 上述结果表明,通过在HRP标记BNC-ZZ的反应液中加入封闭剂,能够抑制HRP标记BNC-ZZ的非特异性吸附,此时,抗原特异性的信号得以保持。

[0233] 实施例14

[0234] 进行实验以研究ELISA中各种封闭剂对于探针的特异性结合的效果。将源自对照小鼠的IgG(多克隆的)固定化于ELISA板。作为对照,准备了源自对照小鼠的IgG未固定化的ELISA板。上述板均通过使用k-Block-e进行封闭处理从而制备。

[0235] 在上述板上,以一定浓度添加各种探针(制造例2中得到的BNC-ZZ、制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ、制造例6中得到的HRP标记AGG-BNC-ZZ、制造例7中得到的HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体、及制造例8中得到的HRP标记BNC-SA/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体),观察其与固定化的源自对照小鼠的IgG的结合反应。

[0236] 需要说明的是,与各种探针一同使用了表8所示的各种封闭剂(终浓度分别为0.1%)。作为封闭剂的对照,使用了含有终浓度为0.2%的酪蛋白的PBS-T。

[0237] 需要说明的是,同时添加BNC-ZZ和经HRP标记的源自兔的对照IgG抗体并使其反应后,进行清洗,采用与实施例9同样的方法测定Abs 450nm。关于测定值,针对每个探针,将含有固定化抗体但不含封闭成分的反应液中的反应作为100%,将未使用固定化抗体而得到的测定值作为空白值减去,以如上算出的特异性反应值的形式表示。结果示于表8。

[0238] 表8

[0239]

	无	Pluronic F127	Pluronic F105	HPMC	PVA 500	Lipidure 206	Lipidure 802	酪蛋白
BNC-ZZ+IgG-HRP	-3.6	23.8	29.1	6.2	0.9	32.5	22.3	14.9
HRP 标记 BNC-ZZ	-1.5	17.2	46.4	23.3	-12.1	67.3	45.5	51.5
HRP 标记 AGG-BNC-ZZ	0.8	36.0	60.1	3.0	-1.4	66.1	61.6	17.3
HRP 标记 BNC-ZZ IgG 缀合物 BS ₃ 50μM	-4.5	40.8	66.1	6.9	0.7	64.8	50.4	26.9
HRP 标记 BNC-ZZ IgG 缀合物 BS ₃ 200μM	0.0	27.3	48.7	8.9	0.0	52.9	31.1	13.5
HRP 标记 BNC-ZZ IgG 缀合物 BS ₃ 400μM	-10.4	16.8	41.3	4.5	0.4	46.9	24.2	9.3
HRP 标记 BNC-SA-IgG 缀合物	2.2	4.9	10.9	0.6	-1.6	13.6	6.2	3.0

[0240] 在不添加封闭成分的条件下使抗体与探针反应时,非特异性结合非常高,几乎没有观察到特异性反应。SH-HRP-BNC-ZZ显示出了与作为对照的酪蛋白的相当高水平的特异性反应,但与其他探针的反应较低。封闭剂中,使用HPMC或PVA作为封闭剂的情况下,特异性反应较低,使用其他封闭剂的情况下,尽管根据所述使用的探针的不同,反应的程度不同,

但有时也观察到了良好的特异性反应。

[0241] 实施例15

[0242] 接着,改变实施例14中使用的封闭剂的浓度,进行实验以研究各种探针向ELISA板上的吸附和各种封闭剂对于特异性反应的效果。将使用大肠杆菌制备的GFP蛋白质固定化于ELISA板,使用k-Block-e进行封闭。

[0243] 在该板上,加入添加有各种封闭剂的各种探针(制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ与源自兔的抗GFP抗体的混合复合体;制造例6中得到的HRP标记AGG-BNC-ZZ与源自兔的抗GFP抗体的混合复合体;HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗GFP抗体复合体),观察其与抗原的结合反应。然后,针对表9所示的各种封闭剂,在终浓度分别为0.01%、0.05%、0.1%的3个条件下进行研究。

[0244] 需要说明的是,HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗GFP抗体复合体如下制备:使制造例7中的BS₃的浓度为1000 μ M,并使用源自兔的抗GFP抗体来代替源自兔的抗小鼠IgG抗体,除此之外,采用与制造例7同样的方法进行制备。作为对照,使用上述源自对照兔的IgG代替抗GFP兔抗体而进行制备。采用与实施例9所示的方法同样的方法测定Abs 450nm。

[0245] 所得到的结果示于表9。将在不存在抗GFP抗体的条件下得到的值作为噪声值,将在抗GFP抗体存在的条件下得到的值作为特异性信号值,将用各信号值除以各噪声值得到的数值表示为S/N比。

[0246] 表9

[0247]

		S/N 比		
		HRP 标记 BNC-ZZ	HRP 标记 AGG-BNC-ZZ	HRP 标记 BNC-ZZ/IgG 1000
Pluronic F127	0.10%	6.5	4.2	5.4
	0.05%	10.6	5.8	8.2
	0.01%	9.6	7.2	8.9
Pluronic F105	0.10%	8.2	9.6	5.6
	0.05%	8.4	7.2	6.4
	0.01%	8.5	12.4	10.8
HPMC	0.10%	6.5	6.1	8.3
	0.05%	6.4	6.3	12.7
	0.01%	8.5	8.1	14.3
PVA-500	0.10%	5.9	6.3	10.4
	0.05%	5.6	7.1	9.3
	0.01%	9.9	10.1	13.3
Lipidure 206	0.10%	12.3	6.9	6.5
	0.05%	13.1	8.6	12.0
	0.01%	9.6	9.2	11.7
Lipidure 802	0.10%	12.2	7.7	13.5
	0.05%	9.3	6.9	13.5
	0.01%	9.7	7.0	9.3

[0248] 各种封闭剂对每个探针显示出了不同的S/N比。就某些封闭剂而言,其浓度越高,越显示出高的S/N比;与此相反,就其他封闭剂而言,其浓度越低,越显示出高的S/N比。上述结果表明,这些封闭剂只要以适当的浓度进行使用,则在ELISA中使用BNC-ZZ等探针时均是

有效的。

[0249] 实施例16

[0250] 进行实验以评价HRP标记BNC-ZZ的抗体结合活性。通过ELISA来比较制造例3中制备的NH₂-HRP标记BNC-ZZ和SH-HRP标记BNC-ZZ的抗体结合活性。将源自对照兔的IgG固定化于ELISA板,使用1%的Blockace对各孔进行封闭。制备按BNC-ZZ蛋白质的量计浓度分别为0、9.375、18.75、37.5、75、150、300、600ng/mL的HRP标记BNC-ZZ溶液,向孔中添加含有终浓度为0.05%的Pluronic F-127的PBS-T并使其反应,进行清洗后,采用实施例9所示的方法测定Abs 450nm。结果示于图3。

[0251] 在所有浓度条件下,以SH-HRP标记BNC-ZZ得到的测定值均比以NH₂-HRP标记BNC-ZZ得到的测定值高。尤其是在300ng/mL、600ng/mL的浓度下,以SH-HRP标记BNC-ZZ得到的测定值是以NH₂-HRP标记BNC-ZZ得到的测定值的约2.1倍~2.7倍高。该倍增因子(multiplication factor)与上述实施例1中所示的两者之间的HRP比活性的差异(前者为0.844U/μg,后者为0.351U/μg,因此高至约2.4倍)几乎为相同水平。上述结果表明,在上述浓度下,SH-HRP标记BNC-ZZ和NH₂-HRP标记BNC-ZZ均几乎以最大量结合于固定化抗体。另一方面,在低于上述水平的浓度条件下,以SH-HRP标记BNC-ZZ得到的测定值相对于以NH₂-HRP标记BNC-ZZ得到的测定值的倍增因子变高,当HRP标记BNC-ZZ浓度为37.5ng以下时,以SH-HRP标记BNC-ZZ得到的测定值平均高至约7.24倍。这表明在低浓度区域,SH-HRP标记BNC-ZZ以更多的量结合于固定化抗体。考虑到HRP的比活性的差异为约2.4倍的话,上述结果显示,SH-HRP标记BNC-ZZ对抗体的结合亲和性比NH₂-HRP标记BNC-ZZ高,为其3倍左右。经由NH₂基团进行的标记主要是以构成颗粒的BNC-ZZ蛋白质的赖氨酸残基为靶标进行的,由于赖氨酸残基存在许多抗体结合部位,所以认为经由NH₂基团进行的标记对抗体结合部位造成影响,结果抑制抗体的结合。另一方面,由于SH基团存在于BNC-ZZ蛋白质的跨膜区域中的露出至外部的部位,因此可以认为以SH基团为靶标时,不会对抗体结合能力产生影响。

[0252] 因此,对BNC-ZZ进行HRP标记时,经由SH基团进行标记能够更有效地利用BNC-ZZ的抗体结合能力,并且HRP活性也高,能够形成在对抗体的结合活性和HRP标记方面高约7.2倍的标记物,由此可得出如下结论:经由SH基团进行的标记显著优异。以下,只要没有特别的说明,HRP标记BNC-ZZ表示经由SH基团进行标记。

[0253] 实施例17

[0254] 进行实验以研究HRP标记BNC-ZZ在ELISA中的应用。将作为乙型肝炎病毒的表面抗原的肽的Pre-S2(Beacle, Inc. 制,产品编号BCL-AGS2-21)固定化于ELISA板,使用k-Block-e将该板封闭,添加各种浓度的抗Pre-S2小鼠抗体(2APS42,特殊免疫研究所制)。接着,添加溶解于以终浓度为0.05%含有Pluronic F-127的PBS-T中的HRP标记抗小鼠抗体、制造例3中得到的HRP标记BNC-ZZ()、或同浓度的上述二者的组合并使其反应,进行清洗后,采用与实施例9同样的方法测定Abs 450nm。结果示于图4。

[0255] 结果确认到:与图4中的黑色圆形标记的“第二IgG”所示的用抗小鼠抗体进行的检测相比,如图4中的白色三角形标记的“HRP-ZZ”所示,使用HRP标记BNC-ZZ时,灵敏度上升至10倍左右,并且,如图4中的黑色方形标记的“HRP-ZZ+IgG”所示,并用上述两者时,灵敏度上升30倍左右。

[0256] 实施例18

[0257] 与实施例17同样地,对使用HRP标记BNC-ZZ的抗体检测型ELISA进行了研究。本实验中使用的利什曼原虫(*Leishmania protozoa*)的重组蛋白质和对照人抗血清均从爱知医科大学的感染·免疫学系获得。代替Pre-S2而将利什曼病的病原体即原虫的重组蛋白质固定化于ELISA板,使用k-Block-e将该板封闭,添加各种浓度的对照人抗血清。接着,添加HRP标记抗人IgG抗体(其溶解在含有终浓度为0.05%的Pluronic F-127的PBS-T中)、制造例3中得到的HRP标记BNC-ZZ、或同浓度的上述二者的组合并使其反应,进行清洗后,使用ABTS(1-STEP ABTS,Thermo Scientific制)作为底物测定了Abs 405nm。结果示于图5。需要说明的是,抗体效价的测定值以单位/mL表示。

[0258] 结果确认到:与图5中的黑色三角形标记的“第二IgG”所示的用抗人IgG抗体进行的检测相比,如图5中的白色方形标记的“HRP-ZZ”所示,利用HRP标记BNC-ZZ时,灵敏度上升至接近10倍,并且,如图5中的黑色圆形标记的“HRP-ZZ+IgG”所示,并用上述两者时,灵敏度上升至30倍左右。

[0259] 以上实施例17及18所示的结果表明,HRP标记BNC-ZZ有助于抗体检测型ELISA中的高灵敏度检测,尤其是在共存有检测抗体时,能够进行更高灵敏度的检测。

[0260] 实施例19

[0261] 进行实验以研究HRP标记BNC-ZZ在ELISA测定中的实践应用。将GFP蛋白质固定化于ELISA板,使用k-Block-e将该板封闭。将浓度已知的抗GFP小鼠IgG抗体作为标准品(standard),将稀释100倍以上的小鼠抗GFP抗血清作为试样,分别添加至上述ELISA板的各孔中。接着,分别添加制造例3中得到的HRP标记BNC-ZZ(其溶解在含有终浓度为0.05%的Pluronic F-127的PBS中)、源自兔的抗小鼠IgG抗体与HRP标记BNC-ZZ的混合复合体、或源自兔的HRP标记抗小鼠IgG抗体并使其反应,进行清洗后,采用与实施例9同样的方法测定Abs 450nm。测定值如下得到:基于用标准抗体得到的各标准曲线,以 $\text{mean} \pm \text{std}(\text{ng/mL}, n=3)$ 的形式算出抗血清中的抗GFP小鼠IgG的浓度。

[0262] 结果,使用HRP标记BNC-ZZ、和HRP标记BNC-ZZ与抗小鼠IgG的混合复合体测得的值分别为 15613 ± 936 、 15403 ± 1192 ,与使用HRP标记抗小鼠IgG抗体定量得到的 15400 ± 109 非常一致,由此表明该检测足以作为定量分析。

[0263] 实施例20

[0264] 为了评价ALP标记BNC-ZZ的抗体结合活性而进行了实验。将源自对照兔的IgG固定化于ELISA板,使用1%的Blockace将该板封闭。将50 μ L的上述制造例4中制作的NH₂-ALP标记BNC-ZZ或SH-ALP标记BNC-ZZ以换算成BNC-ZZ蛋白质的量分别为0、9.375、18.75、37.5、75、150、300、600ng/mL的浓度添加至各孔中,使其反应后,进行清洗,采用与实施例2同样的方法测定Abs 405nm。需要说明的是,与ALP标记BNC-ZZ一同使用了终浓度为0.05%的Pluronic F-127。结果示于图6。

[0265] 在BNC-ZZ的所有浓度条件下,以SH-ALP标记BNC-ZZ得到的测定值均比以NH₂-ALP标记BNC-ZZ得到的测定值高。尤其是在600ng/mL的浓度下,以SH-ALP标记BNC-ZZ得到的测定值是以NH₂-ALP标记BNC-ZZ得到的测定值的约1.7倍高。该倍增因子与两者之间的ALP比活性的差异(前者为5.61单位/ μ g,后者为3.56单位/ μ g,因此为1.6倍高)几乎为相同水平。上述结果表明,在上述浓度下,SH-ALP标记BNC-ZZ和NH₂-ALP标记BNC-ZZ均几乎以最大量结合于固定化抗体。另一方面,在低于上述水平的浓度条件下,以SH-ALP标记BNC-ZZ得到的测

定值相对于以NH₂-ALP标记BNC-ZZ得到的测定值的倍增因子变高,当BNC-ZZ浓度为37.5ng以下时,以SH-ALP标记BNC-ZZ得到的测定值平均为约3.6倍高。

[0266] 上述结果表明,在低浓度区域,SH-ALP标记BNC-ZZ以更多的量结合于固定化抗体。考虑到ALP的比活性差异约1.6倍的话,上述结果表明,SH-ALP标记BNC-ZZ对抗体的结合亲和性为NH₂-ALP标记BNC-ZZ的2.3倍高。关于经由NH₂基团进行的标记比经由SH基团进行标记时的抗体结合能力低的原因,认为其与上述实施例16中记载的HRP标记的情形的原因相同。

[0267] 实施例21

[0268] 为了研究ALP标记BNC-ZZ在ELISA中的应用而进行了实验。将源自对照小鼠的IgG(多克隆的)固定化于ELISA板,使用0.5%的酪蛋白将该板封闭。向各孔中添加各种浓度的制造例4中得到的SH-ALP标记BNC-ZZ或ALP标记源自兔的抗小鼠IgG抗体并使其反应,进行清洗后,采用与实施例2同样的方法测定Abs 405nm。

[0269] 需要说明的是,与ALP标记BNC-ZZ一同使用了终浓度为0.05%的Pluronic F-127。结果示于图7。

[0270] 与使用经ALP标记的抗体的情况相比,在使用ALP标记BNC-ZZ时,获得了更高效的反应,这表明ALP标记BNC-ZZ对高灵敏度的抗体检测是有用的。

[0271] 实施例22

[0272] 为了评价HRP标记AGG-BNC-ZZ的抗体结合活性而进行了实验。将源自对照猪的IgG(由Beacle, Inc.利用实施例5的方法制备而得)固定化于ELISA板,然后使用0.5%酪蛋白进行封闭。向各孔中添加图8中的图的横轴所示的各种浓度的制造例6中得到的HRP标记AGG-BNC-ZZ或制造例3中得到的NH₂-HRP标记BNC-ZZ作为探针,使其反应,进行清洗后,采用与实施例9同样的方法测定Abs450nm。需要说明的是,探针中添加有终浓度为0.05%的Pluronic F-127。结果示于图8。

[0273] 如实施例3中所示的那样,已知HRP标记AGG-BNC-ZZ的HRP活性是HRP标记BNC-ZZ的1/3,因此,如果假定两探针的抗体结合活性相同,则HRP标记AGG-BNC-ZZ与固定化的源自猪的IgG的反应应当为HRP标记BNC-ZZ的1/3。

[0274] 但是,实际上,较之HRP标记BNC-ZZ而言,HRP标记AGG-BNC-ZZ的反应为其1/1.1~1/2.4左右。这表明HRP标记AGG-BNC-ZZ具有比HRP标记BNC-ZZ更高的抗体结合活性。上述结果表明,HRP标记AGG-BNC-ZZ及HRP标记BNC-ZZ均具有比抗体更优异的抗体结合活性。

[0275] 实施例23

[0276] 为了评价HRP标记AGG-BNC-ZZ的源自蛋白质G的抗体结合能力而进行了实验。代替实施例22中所使用的源自对照猪的IgG,将源自小鼠的IgG₁(其被认为BNC-ZZ难以与其结合)固定化,除此之外,与实施例22同样地进行实验。结果示于图9。

[0277] HRP标记AGG-BNC-ZZ显示出了与小鼠IgG₁的高效的结合反应。另一方面,在HRP标记BNC-ZZ中,则几乎没有检测到结合反应。这表明HRP标记AGG-BNC-ZZ的源自蛋白质G的抗体结合部位良好地发挥了作用,即使对于源自蛋白质A的抗体结合部位难以与其结合的抗体,HRP标记AGG-BNC-ZZ也具有高的结合能力。

[0278] 实施例24

[0279] 进行了HRP标记AGG-BNC-ZZ向ELISA中的应用实验。将利用大肠杆菌制造的GFP蛋白质固定化于ELISA板,然后使用k-Block-e进行封闭。向各孔中以图10中的图的横轴所示

的各种浓度添加源自兔的抗GFP抗体,进而加入100ng/mL的制造例6中得到的HRP标记AGG-BNC-ZZ或制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ作为探针,使其反应,进行清洗后,采用与实施例9同样的方法测定Abs 450nm。需要说明的是,探针中添加有终浓度为0.05%的Pluronic F-127。结果示于图10。

[0280] 与用作对照的SH-HRP标记BNC-ZZ同样地,HRP标记AGG-BNC-ZZ显示出了依赖于所添加的抗体浓度的反应,但HRP标记AGG-BNC-ZZ的反应为SH-HRP标记BNC-ZZ的约1/2。考虑到HRP标记AGG-BNC-ZZ的HRP活性为HRP标记BNC-ZZ的1/3的话,可知HRP标记AGG-BNC-ZZ显示出了高于HRP标记BNC-ZZ的反应。

[0281] 接着,代替源自兔的抗GFP抗体,对源自小鼠的抗HMG1单克隆抗体(Cosmobio; IgG₁)进行固定化处理,除此之外,采用与上述方法同样的方法进行实验。结果示于图11。

[0282] 将HRP标记AGG-BNC-ZZ用作检测探针时,观察到了依赖于所添加的抗体浓度的反应,但在使用HRP标记BNC-ZZ的情况下,则几乎没有观察到反应。

[0283] 上述结果表明,HRP标记AGG-BNC-ZZ能够用于抗体检测型ELISA的实践性的测定体系中。此外,上述结果还表明,HRP标记AGG-BNC-ZZ能够对小鼠IgG₁(其无法使用HRP标记BNC-ZZ进行检测)进行检测,具有非常高的有用性。

[0284] 实施例25

[0285] 为了研究HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体的抗体结合活性而进行了实验。将源自对照小鼠的IgG固定化于ELISA板,然后与k-Block-e反应1小时从而进行封闭。作为探针,将使用交联剂BS₃制造的HRP标记BNC-ZZ/源自兔的抗小鼠IgG抗体的复合体(制造例7中得到的)中、用浓度为200μM及1000μM的交联剂BS₃制作的复合体(浓度分别为0、0.55、1.65、4.94、14.8、44.4、133、400ng/mL的)添加至各孔中并使其反应,进行清洗后,采用与实施例9同样的方法测定Abs 450nm。需要说明的是,探针中添加有终浓度为0.05%的Pluronic F-127。结果示于图12。

[0286] 观察到了依赖于所使用的复合体的浓度的反应。对制备时的交联剂浓度为200μM和1000μM的复合体进行比较,结果表明,虽然后者的结合活性稍微降低,但两者均显示出了实用水平的抗体结合活性。

[0287] 实施例26

[0288] 进行实验以验证通过用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)免疫而得到的抗OVA小鼠抗血清中存在的抗OVA小鼠IgE、抗OVA小鼠IgG两者是否能够被实际测量。将OVA固定化于ELISA板,然后使用h-Block-e进行封闭。向该板中加入稀释100倍以上的各抗OVA小鼠抗血清。作为IgE测定用探针,使用制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ与抗小鼠IgE(Nordic Immunology Lab制)复合体(按照制造例7的方法使用浓度为1000μM的BS₃进行制备)、和HRP标记抗小鼠IgE。作为IgG测定用探针,使用制造例3中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ与源自兔的抗小鼠IgG抗体的混合复合体。向各为测定而准备的板的孔中添加上述探针并使其反应,进行清洗后,采用与实施例9同样的方法测定Abs 450nm。测定值如下得到:使用标准抗体制作标准曲线,基于标准抗体的抗体效价,以mean ± std(单位/mL, n=3)的形式算出各抗体的抗体效价。

[0289] 关于小鼠血清中的抗OVAIgE的抗体效价,使用HRP标记BNC-ZZ/抗小鼠IgE复合体时为3807 ± 1439纳单位/mL,使用HRP标记抗小鼠IgE时为3558 ± 935纳单位/mL,两者显示出

了同样的值。

[0290] 此外,抗OVA小鼠IgG的抗体效价为 4175 ± 8717 微单位/mL。上述结果表明,使用了上述复合体的测定体系能够充分测定IgE、IgG的抗体效价,具有实践上的有用性。

[0291] 实施例27

[0292] 使用制造例8中制备的HRP标记BNC-SA/源自兔的抗小鼠IgG抗体的复合体,进行实验以确认其与小鼠IgG的结合反应。将源自对照小鼠的IgG固定化于ELISA板,然后使用1%的Blockace进行封闭。作为探针,使制造例8中得到的用HRP标记BNC-SA/源自兔的抗小鼠IgG抗体复合体。作为对照探针,使用制造例3中得到的NH₂-HRP标记BNC-ZZ与抗小鼠IgG兔抗体(Bethyl制)的混合复合体、及源自兔的HRP标记抗小鼠IgG抗体。将上述各探针分别以0、0.55、1.65、4.94、14.8、44.4、133、400ng/mL的浓度添加至各孔中并使其反应,进行清洗后,采用与实施例9同样的方法测定Abs_{450nm}。需要说明的是,探针中添加有终浓度为0.05%的Pluronic F-127。结果示于图13。

[0293] 随着各探针浓度的增加,反应均增强,而与所使用的探针的种类无关。HRP标记BNC-SA/抗体复合体的结合活性,为经由相同的NH₂基团被HRP标记而得的HRP标记BNC-ZZ与抗体的混合复合体的约1/2。考虑到前者的HRP酶活性为后者的约1/3的话,可知与NH₂-HRP标记BNC-ZZ与抗体的混合复合体相比,HRP标记BNC-SA/抗体复合体具有更高的对抗体的结合能力。另一方面,与HRP标记抗体相比,HRP标记BNC-SA/抗体复合体显示出了约2倍的反应。上述结果表明,HRP标记BNC-SA/抗体复合体对抗体的结合能力高于HRP标记抗小鼠IgG抗体,具有有用性。

[0294] 实施例28

[0295] 与实施例13的方法同样地,对HuH7细胞的提取液进行Western印迹分析。使用5%的脱脂乳进行膜的封闭,使用源自小鼠的抗波形蛋白抗体(Progen制,1/1000稀释)作为第一抗体。作为探针,使用含有1%脱脂乳的源自兔的HRP标记抗小鼠IgG抗体(Rockland制,1/10000;图14中的第二抗体)、或含有0.1%的Pluronic F-127及1%脱脂乳的制造例3中的HRP标记BNC-ZZ。结果示于图14。

[0296] 在使用源自兔的HRP标记抗小鼠IgG抗体作为探针进行检测的情况下,在将提取液稀释至1/10时,没有检测到条带的信号。与之相对地,在使用HRP标记BNC-ZZ的情况下,即使在将提取液稀释至1/10时,也得到了同等的信号。因此,可知HRP标记BNC-ZZ对于高灵敏度检测是有效的。

[0297] 实施例29

[0298] 采用与实施例28同样的方法进行Western印迹分析。作为第一抗体使用上述抗波形蛋白小鼠抗体的1/3000稀释液,作为第二抗体使用HRP标记抗小鼠IgG抗体(Rockland制,#611-1302,1/10000稀释),进行检测(图15中的检测-1)。进一步,溶解于含有0.1%Lipidure 802的溶液中后,使用HRP标记BNC-ZZ作为追加探针进行检测(图15中的检测-2)。结果示于图15。

[0299] 结果表明,使用HRP标记抗小鼠抗体作为第二抗体的检测获得了较差的检测灵敏度(检测-1),而与之相对地,使用HRP标记BNC-ZZ作为追加探针而进行的再次检测(检测-2)则能够增强条带信号。需要说明的是,虽数据未示出,但发现即使补加第二抗体,信号也几乎没有上升。因此,由于仅通过追加HRP标记BNC-ZZ即可使信号灵敏化,所以有用性非常高。

[0300] 实施例30

[0301] 采用与实施例28同样的方法进行Western印迹分析。作为第一抗体使用抗波形蛋白小鼠抗体(Progen制,1/2000稀释)、抗GAPDH兔抗体(EPITOMICS制,1/10000稀释)、或它们两者,作为第二抗体使用HRP标记抗小鼠IgG抗体(Rockland制)、HRP标记抗兔IgG抗体(Santa Cruz制)、或HRP标记BNC-ZZ(HRP-ZZ),进行检测。需要说明的是,HRP标记BNC-ZZ与浓度为0.1%的Pluronic F-127一同使用。结果示于图16。

[0302] 结果表明,使用HRP标记BNC-ZZ时,在用各第二抗体进行检测的位置,能够一次性地检测出波形蛋白和GAPDH。此外,结果还表明,使用HRP标记BNC-ZZ时,即使抗体源自于不同的动物物种,也能够同等地同时对波形蛋白和GAPDH进行检测。

[0303] 实施例31

[0304] 作为试样,向HuH7细胞提取液中添加以2倍稀释系列浓度制备的GFP-Histag蛋白质,采用与实施例28同样的方法对其进行Western印迹分析。使所得到的产物与作为第一抗体的抗GAPDH兔抗体(EPITOMICS制,1/10000)及抗GFP兔抗体(Rockland制,1/2000)反应,然后,使用经含有0.1%的Lipidure 206的PBS-T稀释的HRP标记BNC-ZZ(HRP-ZZ),同时对GAPDH和GFP进行检测。结果示于图17。

[0305] 使用HRP标记BNC-ZZ时,随着添加的GFP蛋白质的浓度增加,信号增强,这表明该检测是定量检验。

[0306] 实施例32

[0307] 采用与实施例28同样的方法进行Western印迹分析。预先将抗波形蛋白小鼠抗体(Progen制,1/2000稀释)和HRP标记BNC-ZZ等量混合,将其混合复合体添加至PVDF膜,从而采用一步法进行检测。需要说明的是,HRP标记BNC-ZZ与抗体的混合复合体的反应液中,使用了含有0.1%Pluronic F-127的TBS-T。作为对照,还通过两步法进行检测,具体而言,进行与抗波形蛋白小鼠抗体的反应,还进行与HRP标记抗小鼠抗体(Rockland制,1/5000)的反应。结果示于图18。一步法中,在将蛋白质转印至PVDF膜后到进行检测为止的操作的总时间为65分钟左右,所述操作依次为:封闭5分钟(图18中的Q1)或15分钟(图18中的Q2),然后清洗5分钟,然后反应(第一抗体+HRP标记BNC-ZZ)30分钟,然后清洗25分钟(5分钟×5:Q1)或15分钟(3分钟×5:Q2)。与之相对地,使用HRP标记抗小鼠抗体的两步法(图18中的M)中,进行下述操作的总时间为230分钟左右,所述操作依次为:封闭60分钟,然后清洗10分钟(5分钟×2),然后进行第一抗体反应60分钟,然后清洗15分钟(5分钟×3),然后进行第二抗体反应60分钟,然后清洗25分钟(5分钟×5)。

[0308] 在常规方法两步法中,到利用蛋白质转印膜检测信号为止,需要总计230分钟的工序,而与之相对地,使用HRP标记BNC-ZZ的一步法(图19中的Q1、Q2)的情况下,能够缩短清洗时间、其他操作时间,从而能够在将时间缩短至65分钟的同时获得同等的结果。因此,可以确认HRP标记BNC-ZZ能够用于快速检测Western印迹。

[0309] 实施例33

[0310] 采用与实施例28同样的方法进行Western印迹分析。作为第一抗体,使用抗p53兔抗体(Santa Cruz制,1/200)。作为第二抗体,使用ALP标记抗兔IgG抗体(Sigma制,1/50000)、或制造例4中得到的SH-ALP标记BNC-ZZ。作为ALP用底物,使用CDP-Star(NEB制)。结果示于图19。

[0311] 使用ALP标记抗兔IgG抗体进行检测的情况和使用ALP标记BNC-ZZ进行检测的情况下,获得了几乎同等的信号。该结果表明,ALP标记BNC-ZZ在Western印迹中也是非常有用的探针,可用于使用了HRP标记BNC-ZZ的本申请的实施例中所所述的各种使用方法。

[0312] 实施例34

[0313] 采用与实施例28同样的方法进行Western印迹分析,但是替代性地使用A431细胞提取液。使该提取液与作为第一抗体的抗体种类为小鼠IgG₁的抗EGFR抗体(Cell Signaling制,1/1000稀释)、或抗p53兔抗体(Santa Cruz制,1/200稀释)反应后,使其与经含有0.1%的Pluronic F-127的TBS-T稀释的制造例6中得到的HRP标记AGG-BNC-ZZ或制造例3中得到的HRP标记BNC-ZZ反应。结果示于图20。

[0314] 使用作为小鼠IgG₁的抗EGFR抗体的情况下,用HRP标记BNC-ZZ(图20中的Z)完全不能检测到,而与之相对地,使用HRP标记AGG-BNC-ZZ(图20中的A)时,则能检测到该抗体。另一方面,使用作为兔IgG的抗p53抗体的情况下,使用HRP标记BNC-ZZ或使用HRP标记AGG-BNC-ZZ均能够良好地检测到该抗体。

[0315] 上述结果与下述情况非常一致,即,由于HRP标记AGG-BNC-ZZ具有源自蛋白质G的抗体结合部位,因此也容易与小鼠IgG₁结合;由于HRP标记BNC-ZZ仅具有源自蛋白质A的抗体结合部位,因此几乎不与小鼠IgG₁结合。上述结果证明了HRP标记AGG-BNC-ZZ的有用性。

[0316] 制造例9:HRP标记BNC-L的制备

[0317] 使用过氧化物酶标记试剂盒-SH,经由制造例1中得到的BNC-L的SH基团实施HRP标记,得到HRP标记BNC-L。

[0318] 实施例35

[0319] 将作为乙型肝炎病毒的表面抗原的肽的Pre-S2固定化于ELISA板,并将该板封闭。向各孔中添加各种浓度的抗Pre-S2抗体。接着,添加制造例9中得到的HRP标记BNC-L并使其反应,进行清洗后,采用实施例9所示的方法测定Abs 450nm(抗原夹心ELISA)。结果示于图21。

[0320] 结果明确地表明,HRP标记BNC-L能够充分地作为ELISA测定用探针使用。

[0321] 制造例10:SH-HRP标记BNC-(糖链)-AGG

[0322] 使用NaIO₄对制造例1中得到的BNC-L进行氧化处理,在附加至BNC-L的糖链中的糖残基上形成醛基。接着,使所得产物与AGG蛋白质反应,使醛基与AGG肽的赖氨酸残基结合。向反应混合物中添加NaBH₄溶液,进行凝胶过滤处理而得到BNC-AGG。进一步,使用过氧化物酶标记试剂盒-SH,经由得到的BNC-AGG的SH基团实施HRP标记。即,得到的BNC经由其糖链而结合有AGG,并且还经由其SH基团而结合有HRP(下文中有时称为SH-HRP标记BNC-(糖链)-AGG。)

[0323] 实施例36

[0324] 使用各种浓度的兔IgG将固定化的ELISA板封闭,向各孔中添加SH-HRP标记BNC-(糖链)-AGG(制造例10中得到的)并使其反应,进行清洗后,采用实施例9所示的方法测定Abs 450nm。结果示于图22。

[0325] 结果表明,虽然与使用制造例4中得到的SH-HRP标记BNC-ZZ作为对照的情况相比,利用SH-HRP标记BNC-(糖链)-AGG得到的Abs 450nm值较低,但是仍具有充分的检测能力。

[0326] 制造例11:HRP标记HVJ-E的制备

[0327] 使用过氧化物酶标记试剂盒-SH,通过作为包含仙台病毒的包膜蛋白的病毒样颗粒的HVJ-E(Genome One,石原产业)的颗粒表面上存在的蛋白质的半胱氨酸残基中的SH基团进行HRP标记,得到HRP标记HVJ-E。

[0328] 实施例37

[0329] 采用与实施例1同样的方法,测定制造例11中得到的HRP标记HVJ-E的HRP活性,结果为0.05U/ μ g。

[0330] 在具有跨膜型的蛋白质的病毒样颗粒中,常常在蛋白质的跨膜区域内或在该区域附近具有SH基团。本实施例表明:HVJ-E也能够经由SH基团而被标记,病毒样颗粒中存在的SH基团作为标记的靶标是有用的。

序列表

<110> 比科尔公司

<120> 用于免疫检验的病毒样颗粒、用于所述免疫检验的封闭剂、及包含它们的试剂盒

<130> P14-073

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 1

[0001]

```

Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1           5           10           15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
           20           25           30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys
           35           40           45

Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
           50           55           60

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65           70           75           80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
           85           90           95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly
           100          105          110

Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala
           115          120          125

Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
           130          135          140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg
145          150          155          160

```

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile
195 200 205

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 2

<211> 412

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> ZZ-BNC

[0002]

<400> 2

Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu
1 5 10 15

Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser
20 25 30

Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp Pro Glu
35 40 45

Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Gly Arg Ala Gln His Asp Glu Ala Val
50 55 60

Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
65 70 75 80

His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser
85 90 95

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
100 105 110

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys

	115	120	125
	Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn		
	130	135	140
	Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser		
	145	150	155 160
	Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln		
	165	170	175
	Ala Pro Lys Ala Ala Ala Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser		
	180	185	190
	Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu		
	195	200	205
	Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser		
	210	215	220
	Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln		
	225	230	235 240
[0003]	Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro		
	245	250	255
	Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile		
	260	265	270
	Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly		
	275	280	285
	Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr		
	290	295	300
	Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe		
	305	310	315 320
	Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile		
	325	330	335
	Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala		
	340	345	350
	Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp		
	355	360	365
	Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met		
	370	375	380

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro
385 390 395 400

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
405 410

<210> 3

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 蛋白质 A 的抗体结合结构域

<400> 3

Asp Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Trp Glu
1 5 10 15

Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile
20 25 30

[0004] Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu
35 40 45

Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 4

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 蛋白质 G 的抗体结合结构域

<400> 4

Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr
1 5 10 15

Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr
20 25 30

Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr
35 40 45

Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
50 55

<210> 5

<211> 81

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 蛋白质 L 的抗体结合结构域

<400> 5

Pro Phe Val Glu Asn Lys Glu Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Thr Asp
1 5 10 15

Ser Glu Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly
20 25 30

Ser Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser
35 40 45

[0005] Glu Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr
50 55 60

Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala
65 70 75 80

Gly

<210> 6

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 实施例中记载的 AGG 肽

<400> 6

Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1 5 10 15

Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Leu Glu Asp Val Asp Asn Lys Phe
20 25 30

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Trp Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
 35 40 45

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
 50 55 60

Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 65 70 75 80

Ala Gln Ala Pro Lys Gly Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Lys Leu Val Ile
 85 90 95

Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala
 100 105 110

Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val
 115 120 125

[0006]

Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr
 130 135 140

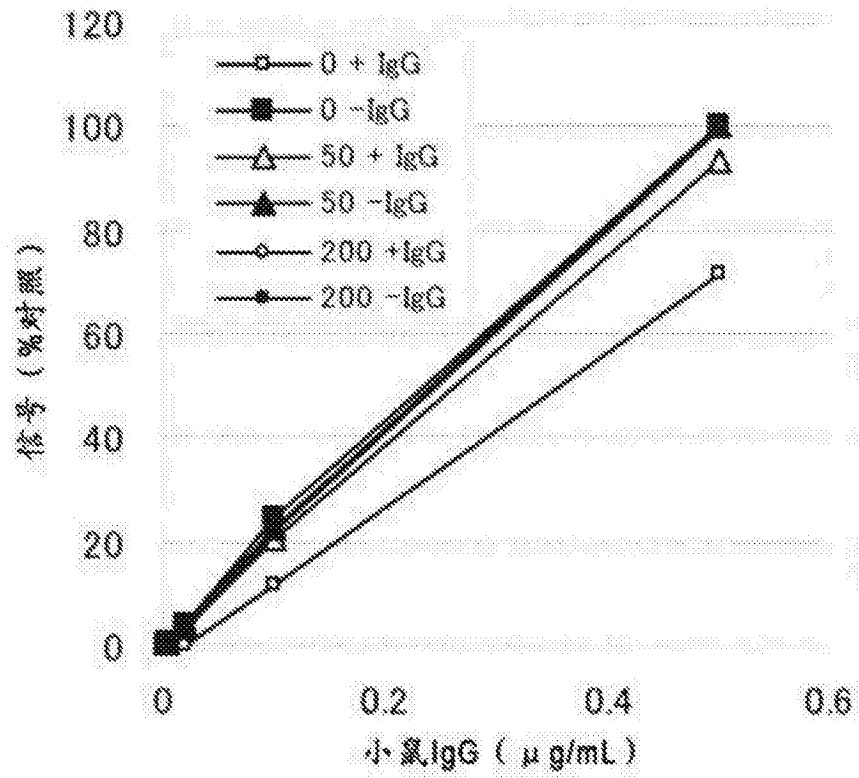
Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr
 145 150 155 160

Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr
 165 170 175

Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr
 180 185 190

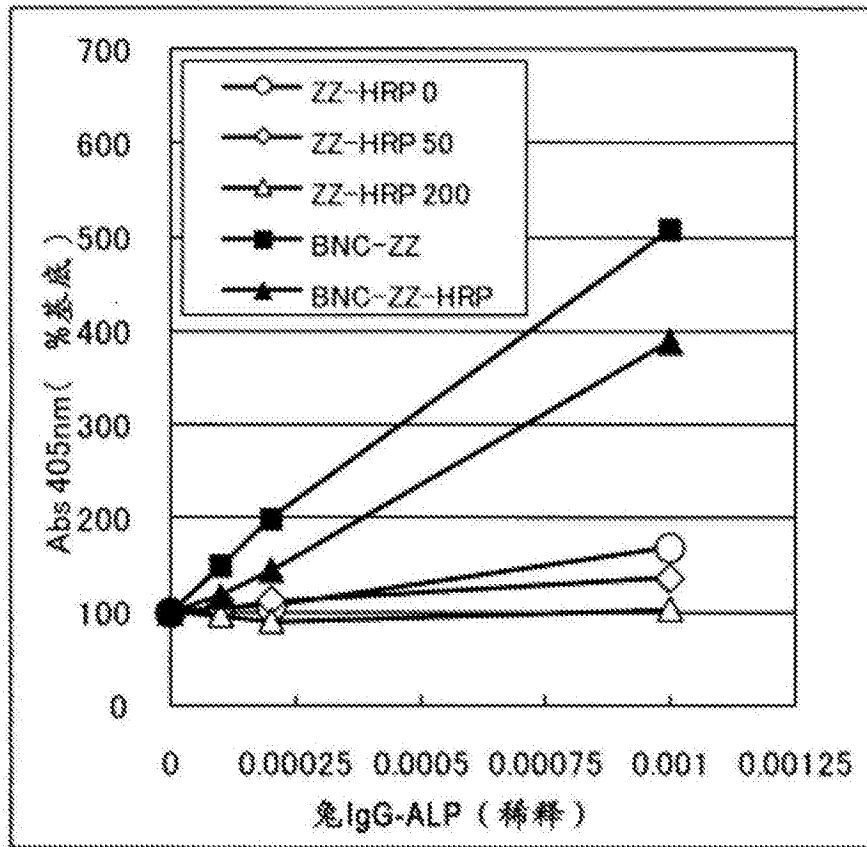
Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr
 195 200 205

Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Gly Ser His His His His His His
 210 215 220



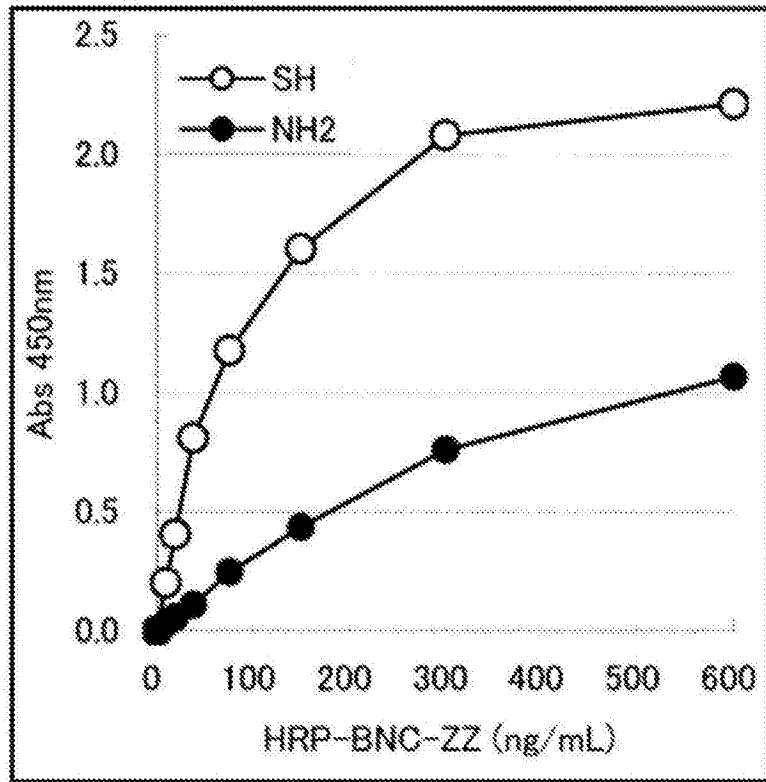
试样	BS ₂ (μM)	兔IgG (60 ng/mL)
0 + IgG	0	+
0 - IgG	0	-
50 + IgG	50	+
50 - IgG	50	-
200 + IgG	200	+
200 - IgG	200	-

图1



试样	HRP 标记	BS ₂ (μM)	IgG
ZZ-HRP 0	+	-	+
ZZ-HRP 50	+	50	+
ZZ-HRP 200	+	200	+
BNC-ZZ	-	-	-
ZZ-HRP	+	-	-

图2



BNC-ZZ (ng/mL)	Abs 450nm		倍 SH/NH ₂
	SH	NH ₂	
600	2.21	1.07	2.07
300	2.08	0.76	2.73
150	1.60	0.44	3.68
75	1.18	0.25	4.74
37.5	0.81	0.11	7.43
18.75	0.41	0.06	7.12
9.375	0.20	0.03	7.18

图3

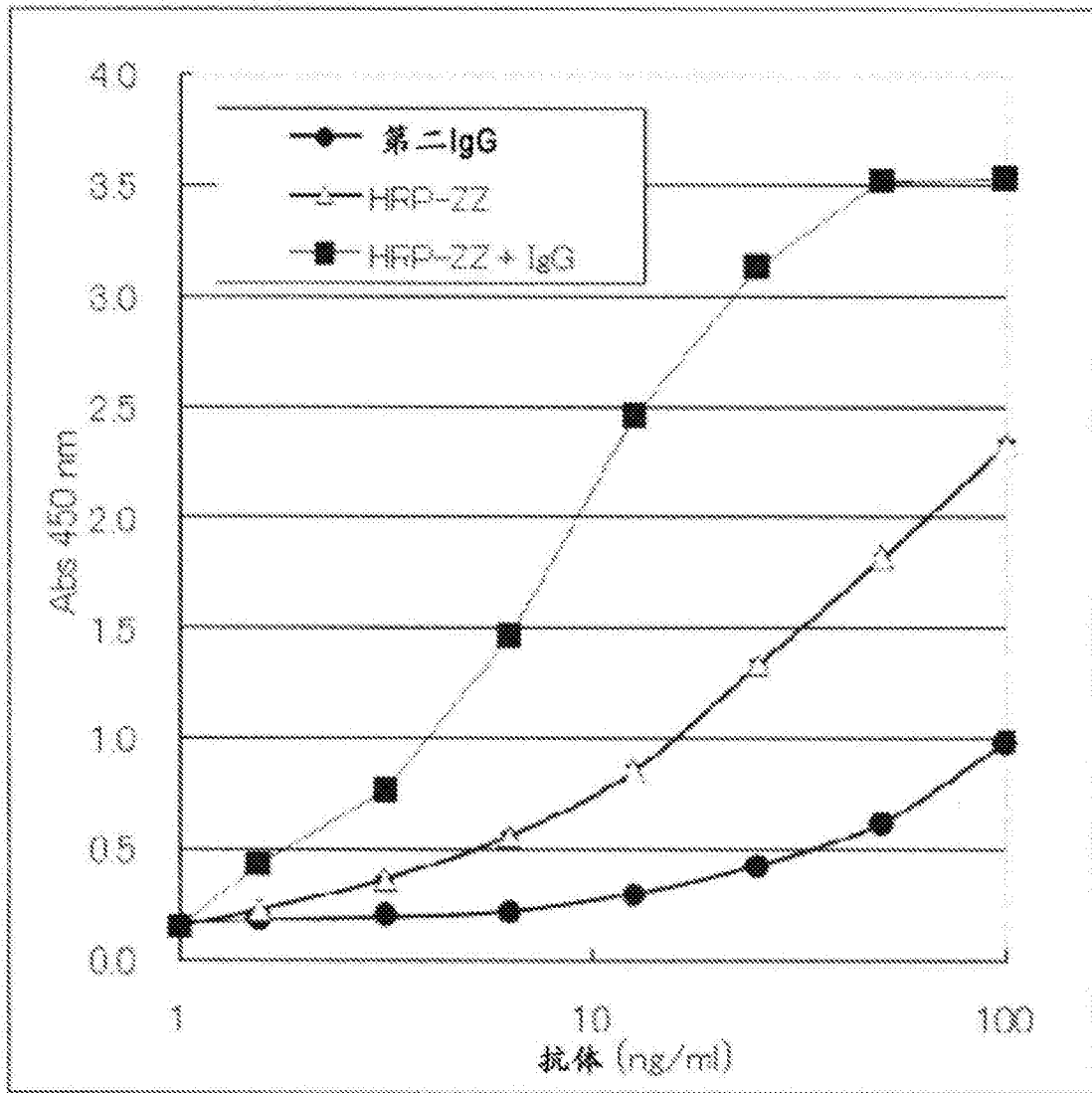


图4

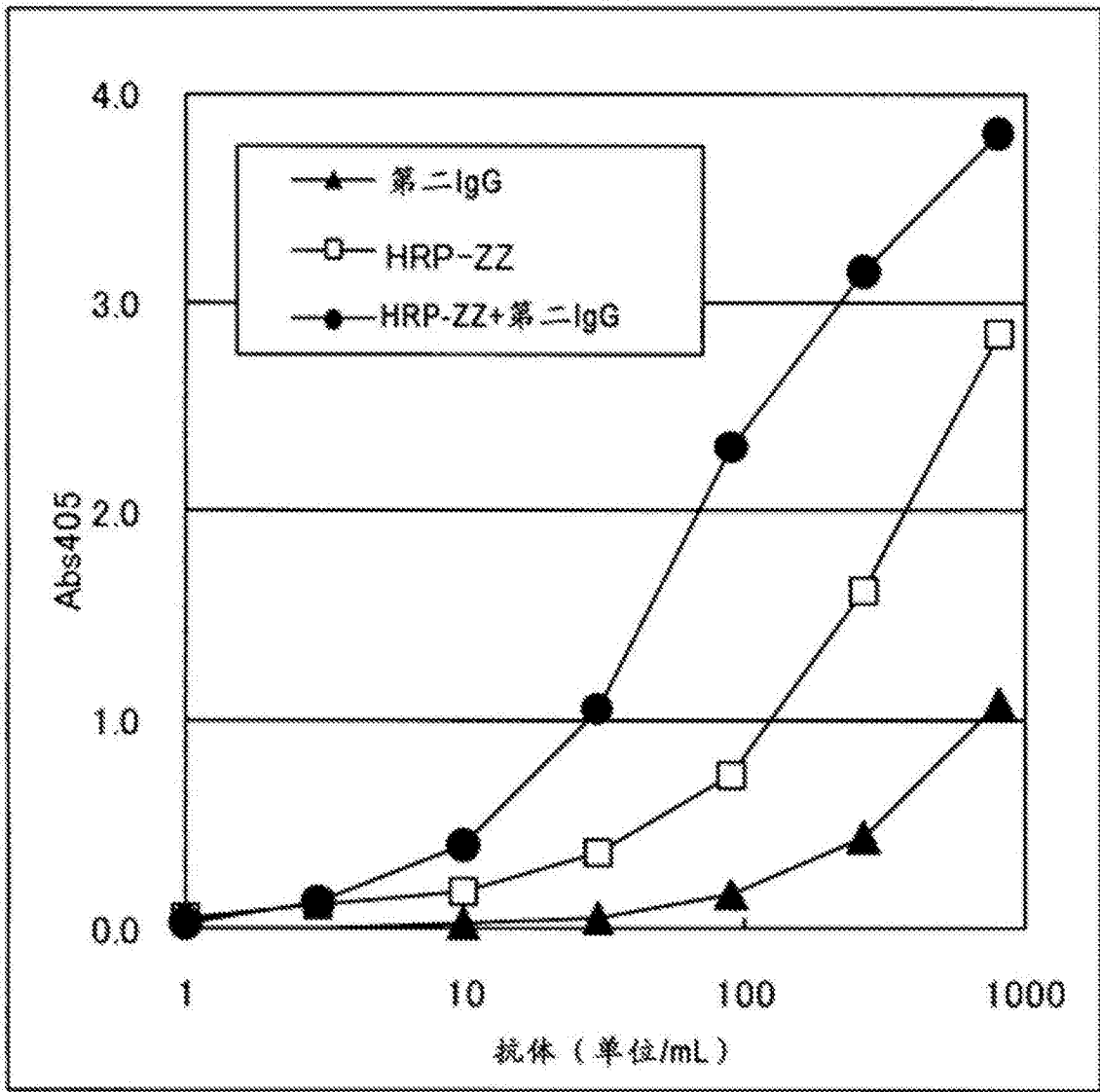
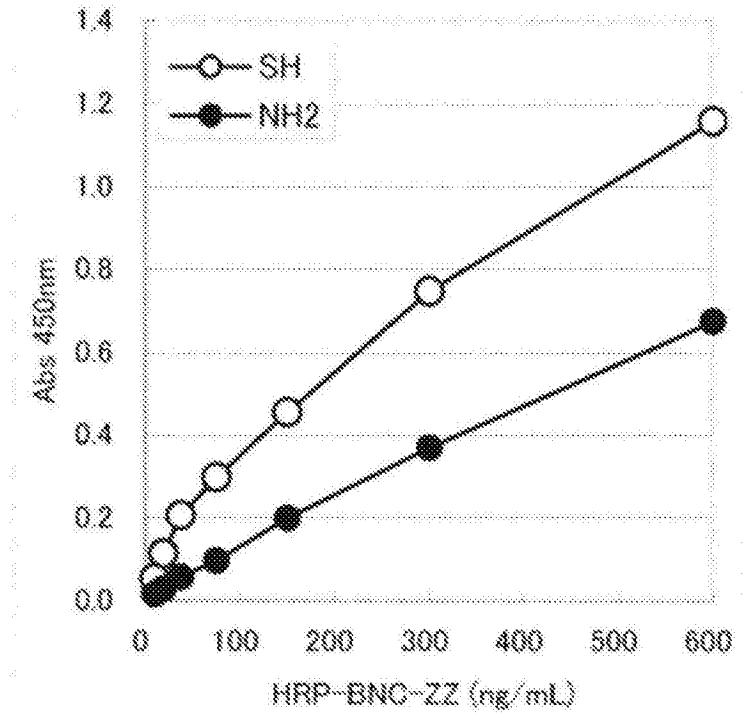


图5



BNC-ZZ (ng/mL)	Abs 450nm		倍 SH/NH ₂
	SH	NH ₂	
600	1.16	0.68	1.72
300	0.75	0.37	2.03
150	0.46	0.20	2.28
75	0.30	0.10	3.04
37.5	0.21	0.06	3.50
18.75	0.11	0.03	3.84
9.375	0.05	0.02	3.40

图6

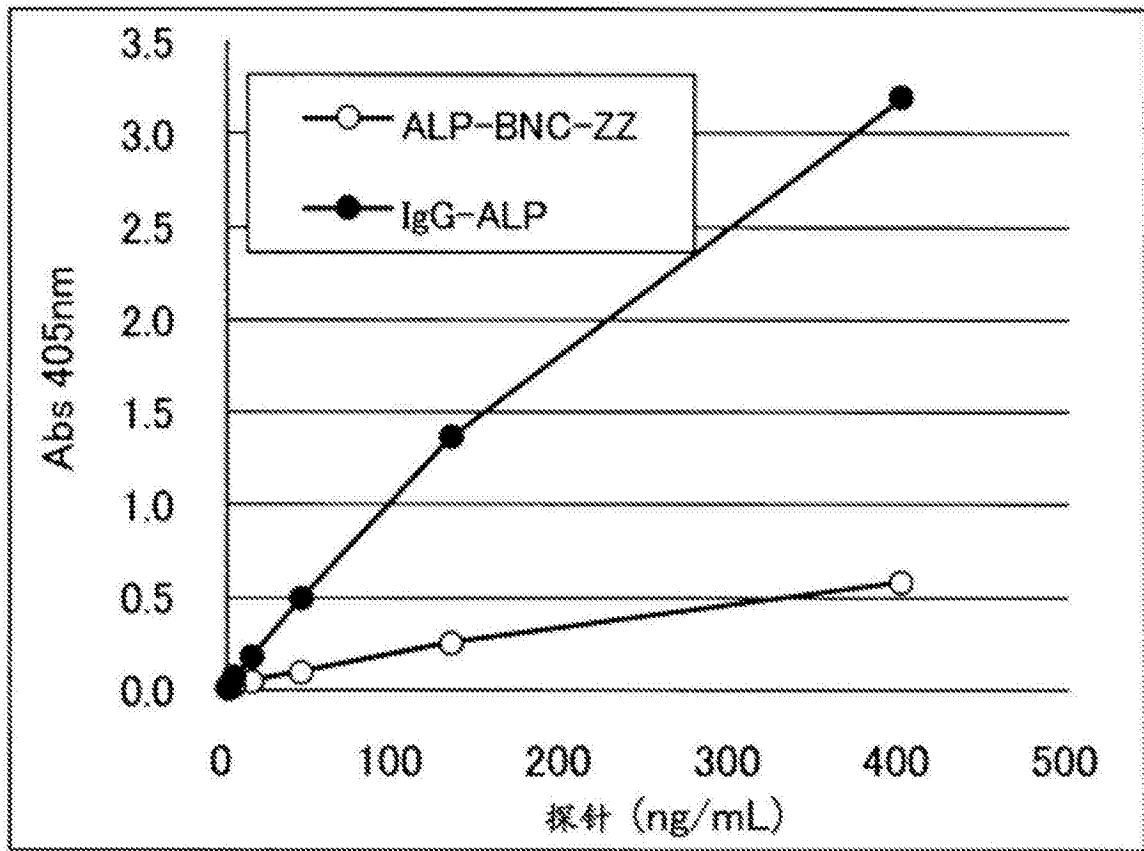


图7

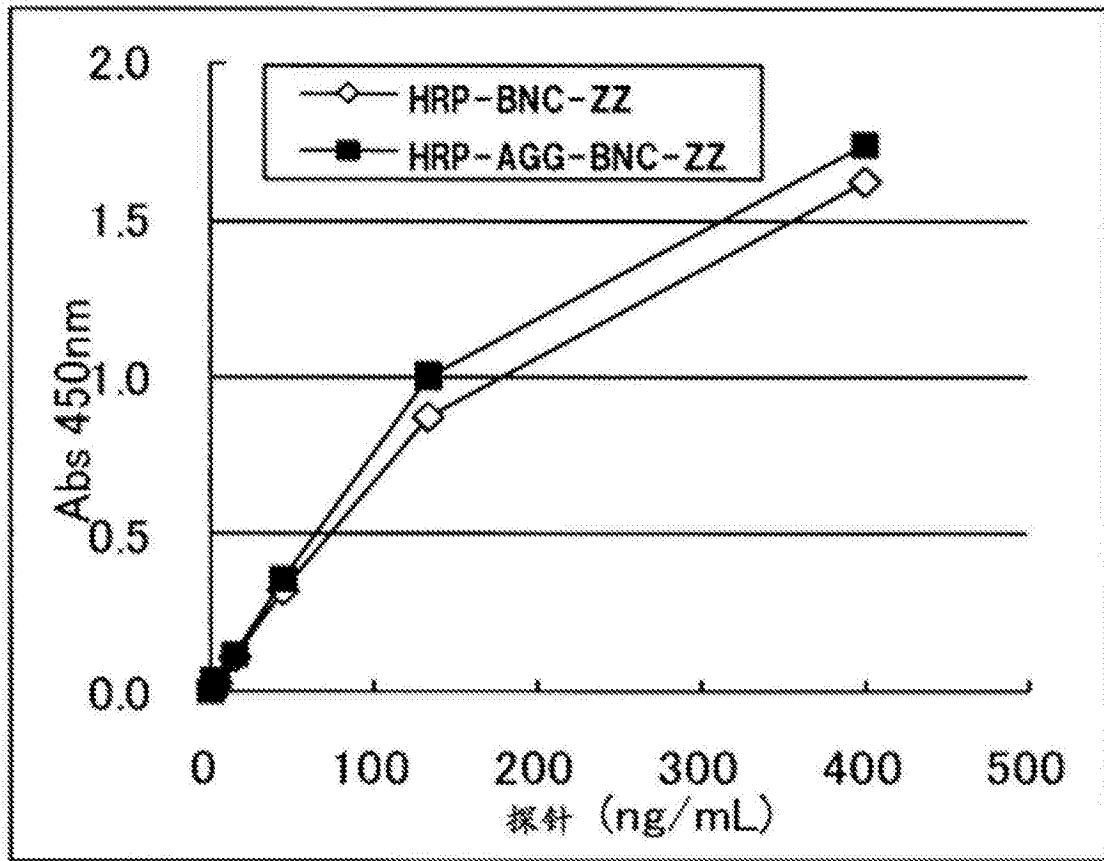


图8

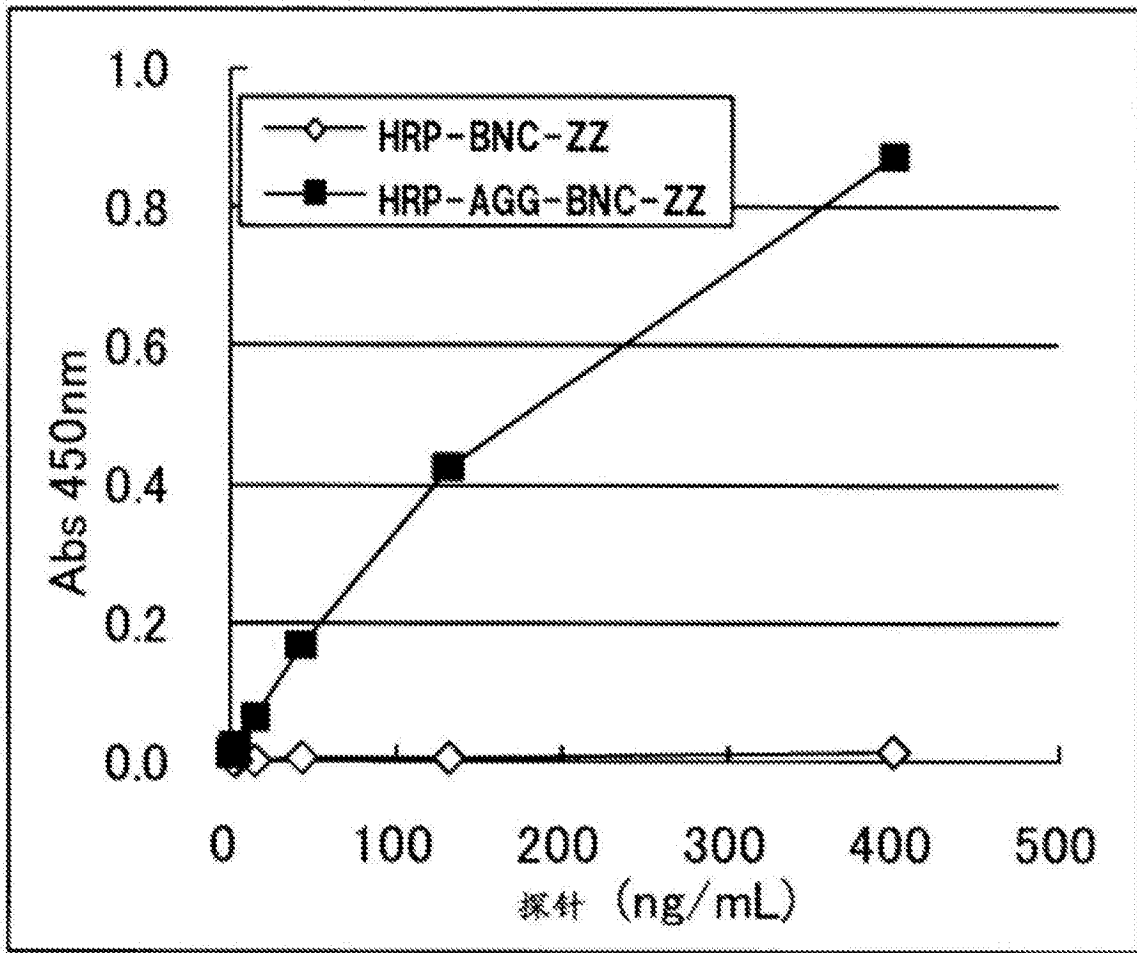


图9

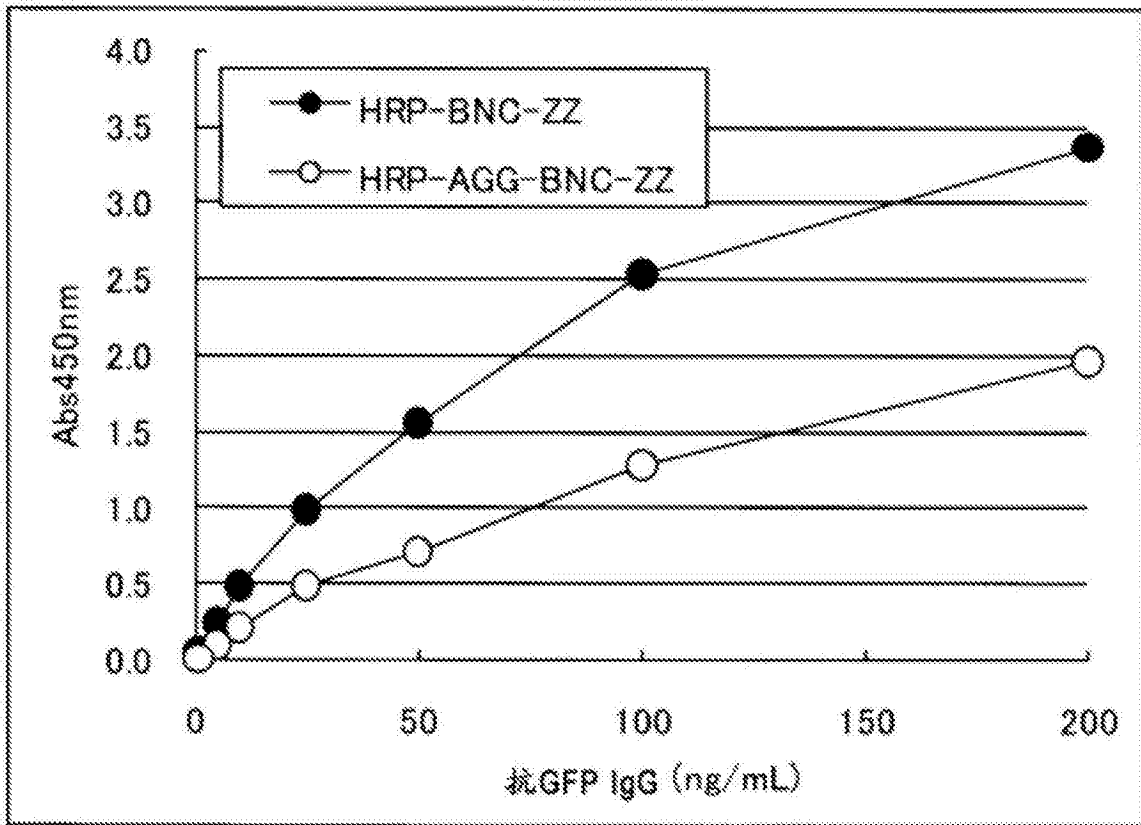


图10

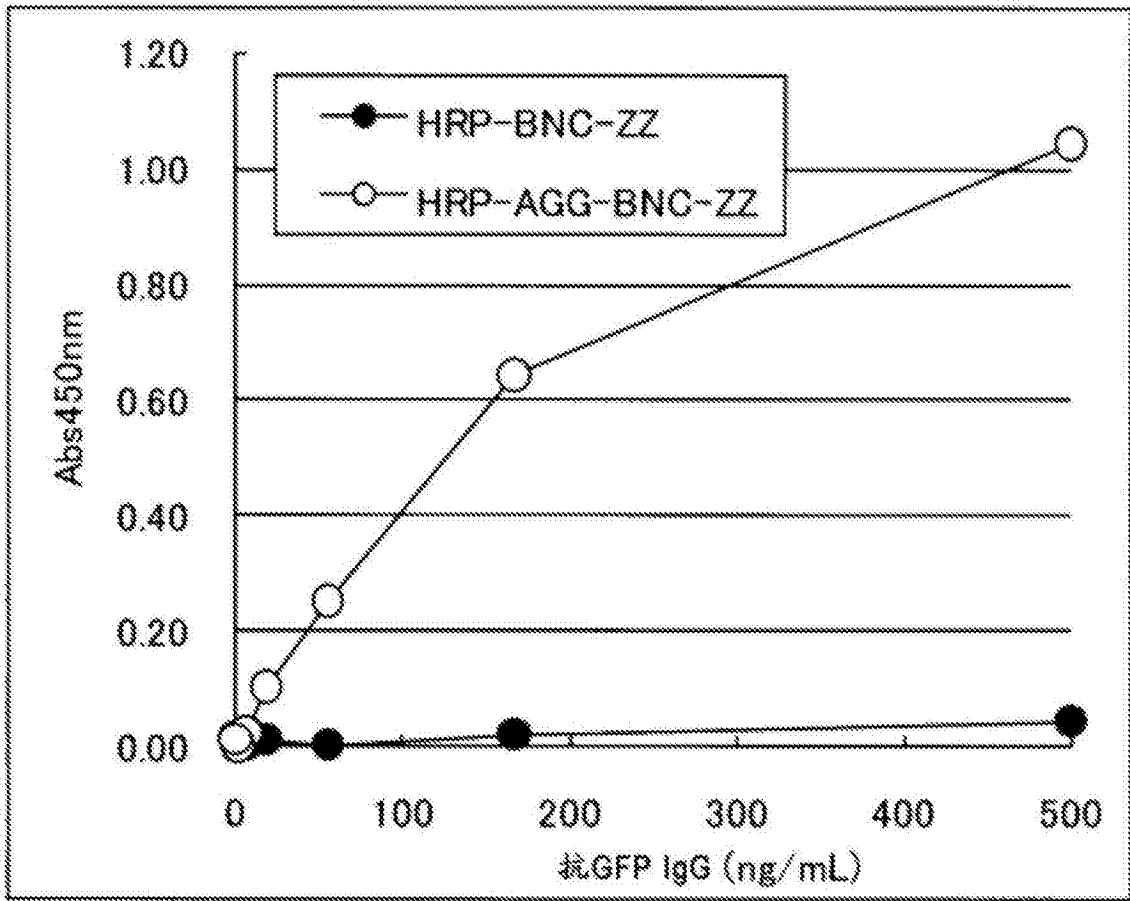


图11

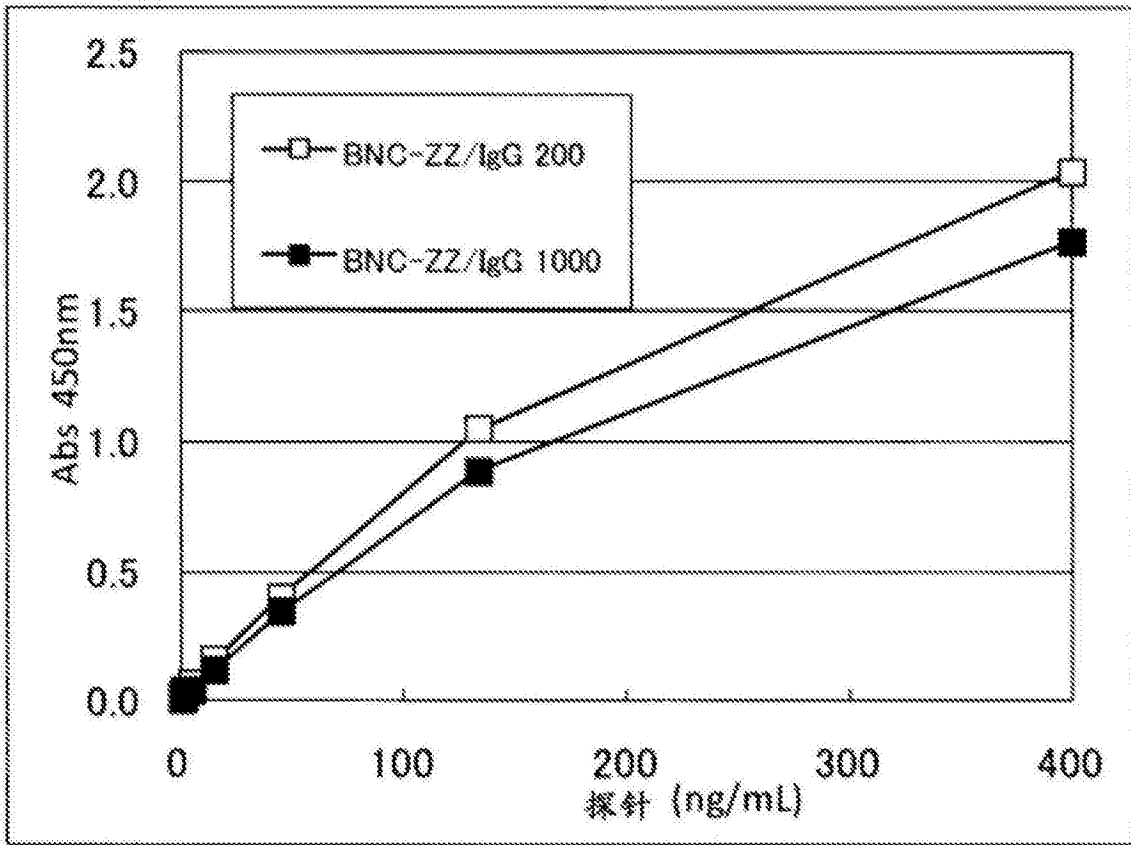


图12

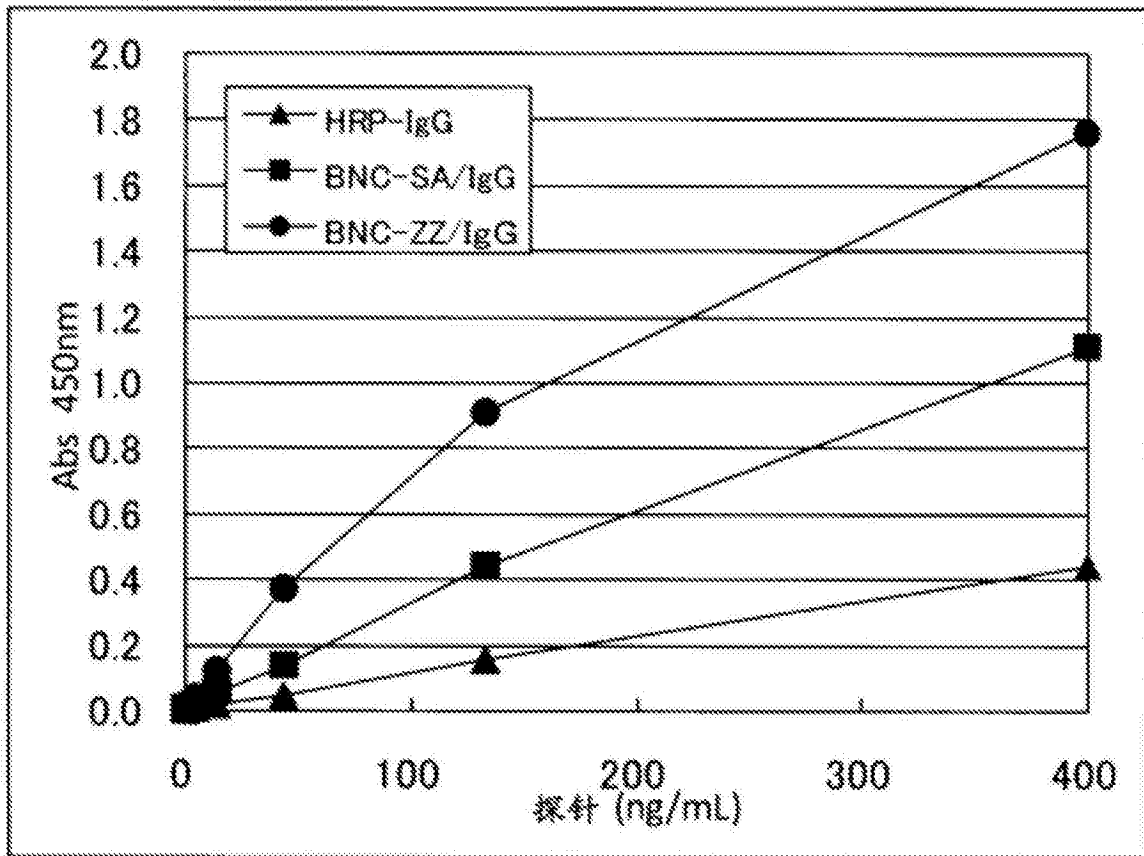


图13

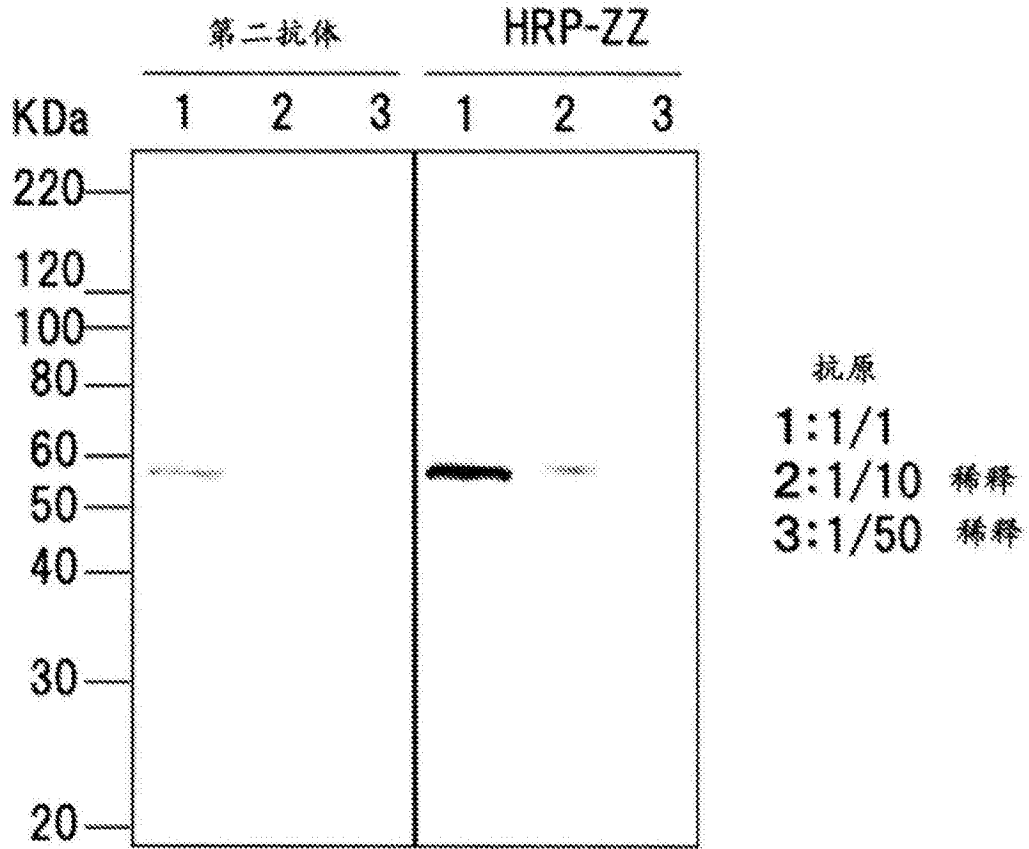


图14

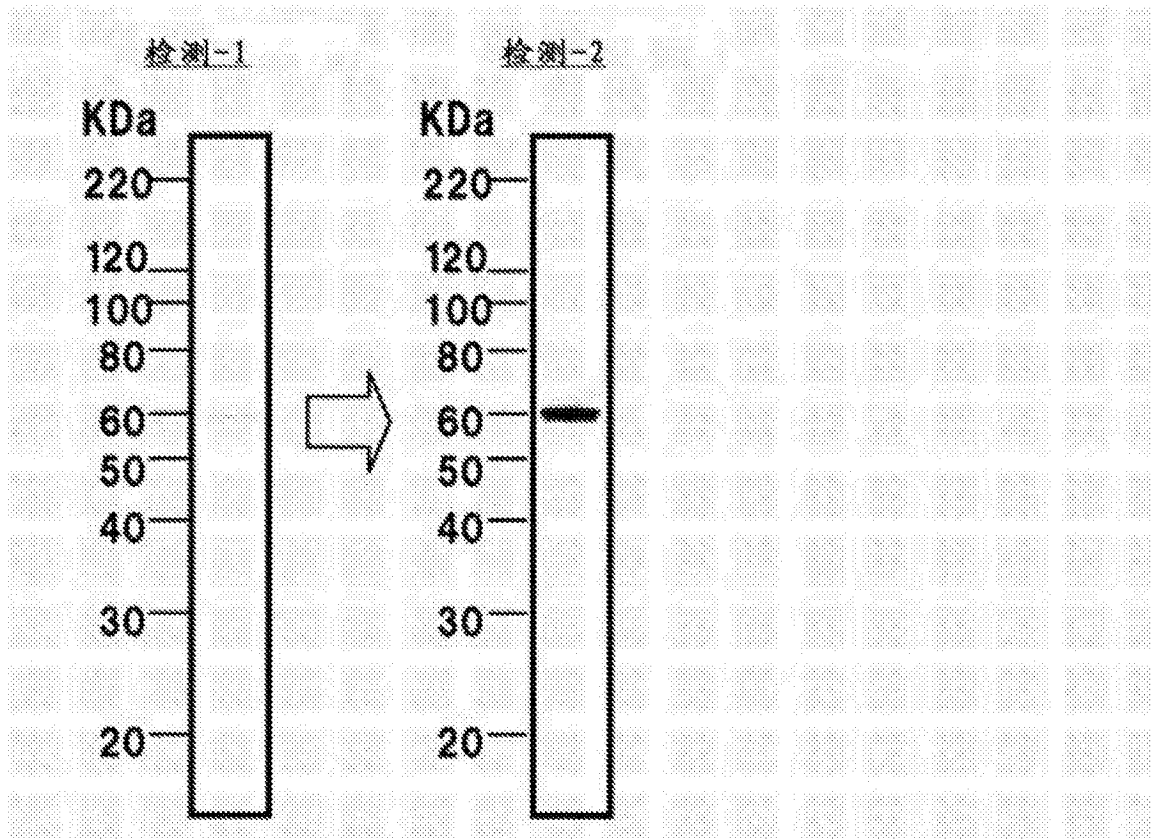


图15

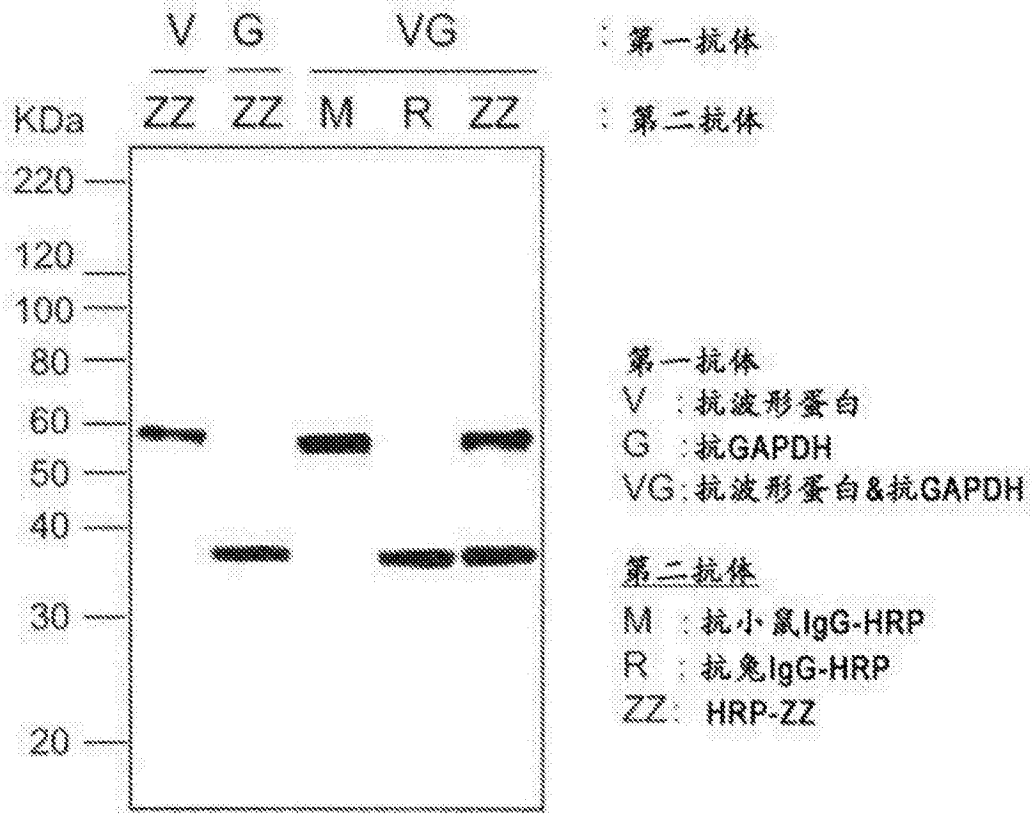


图16

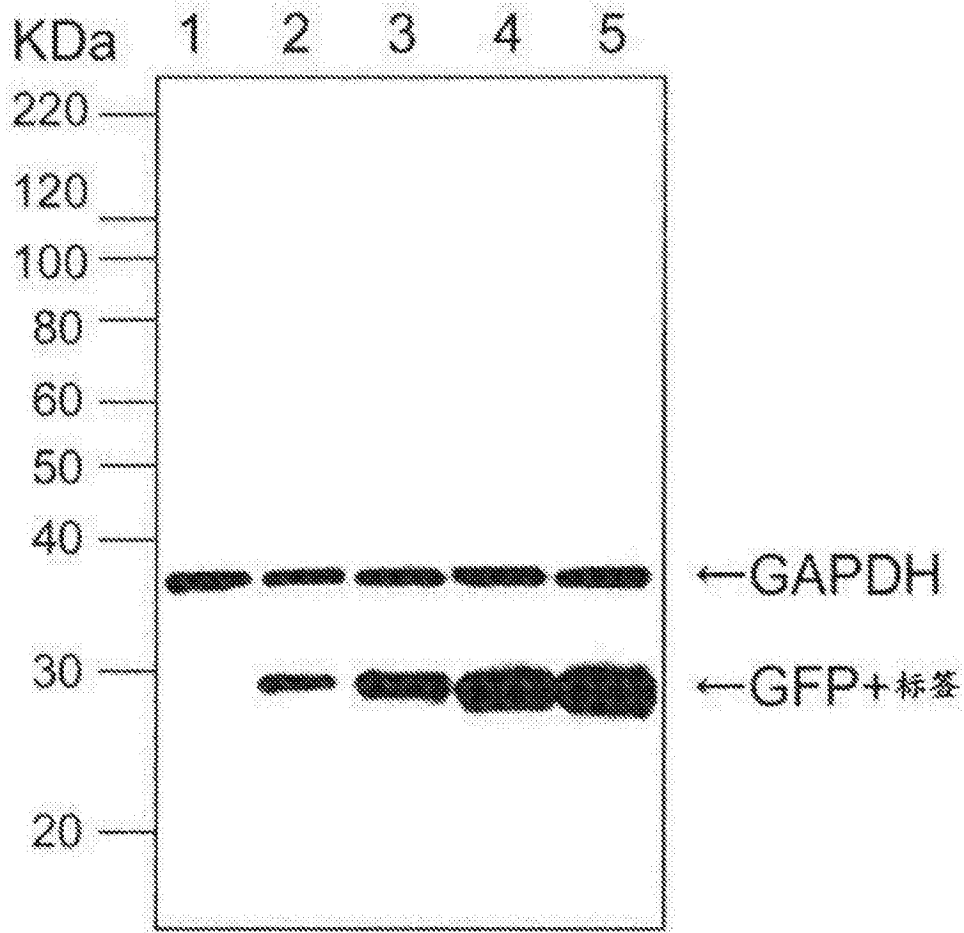


图17

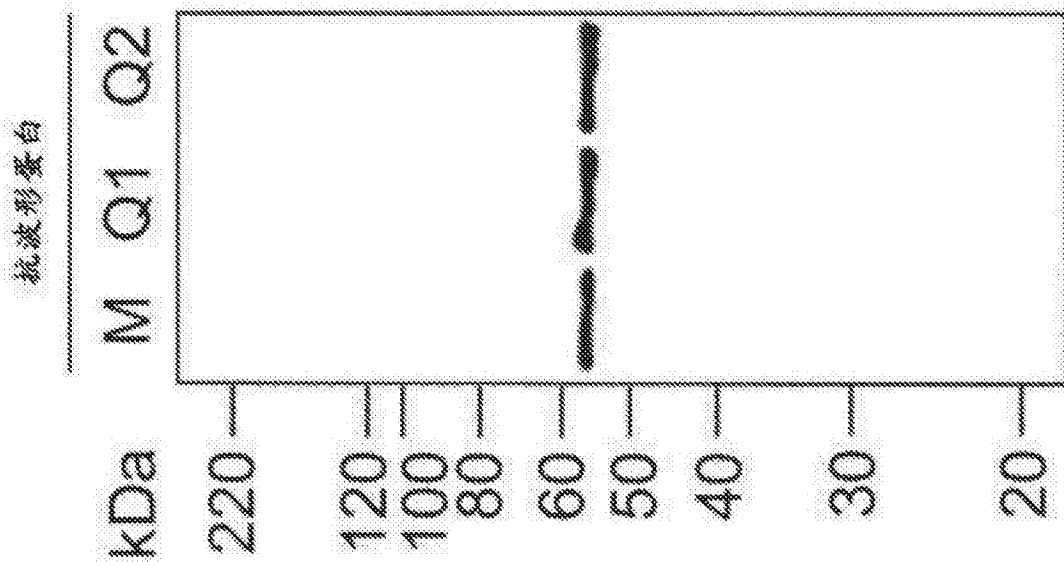


图18

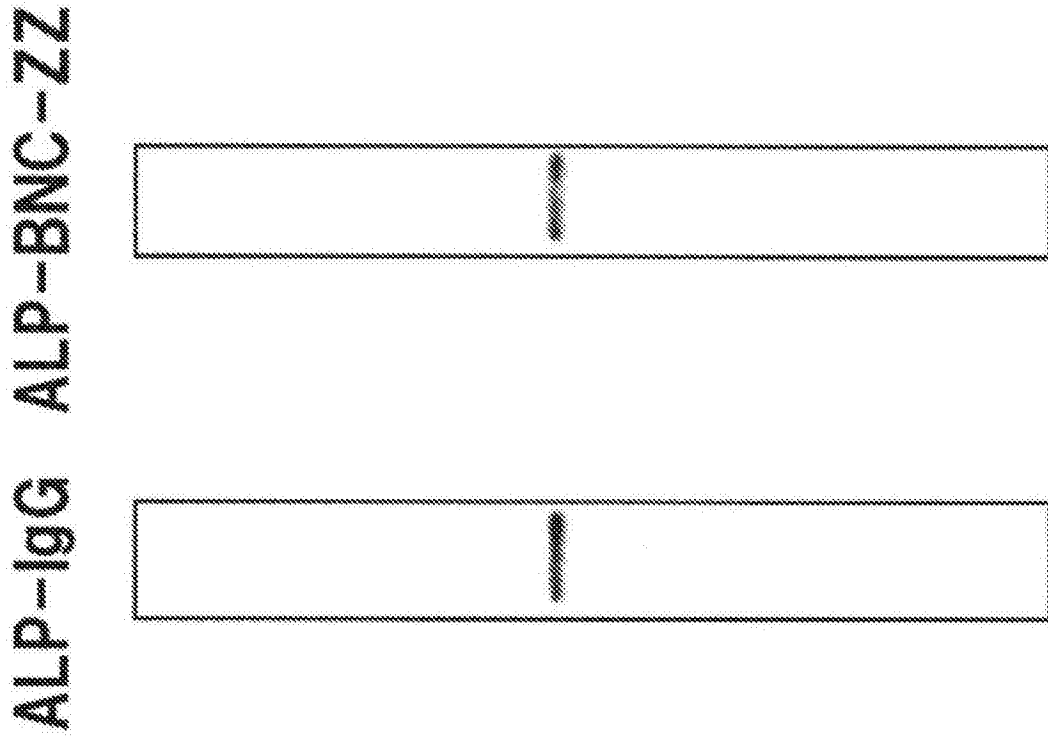


图19

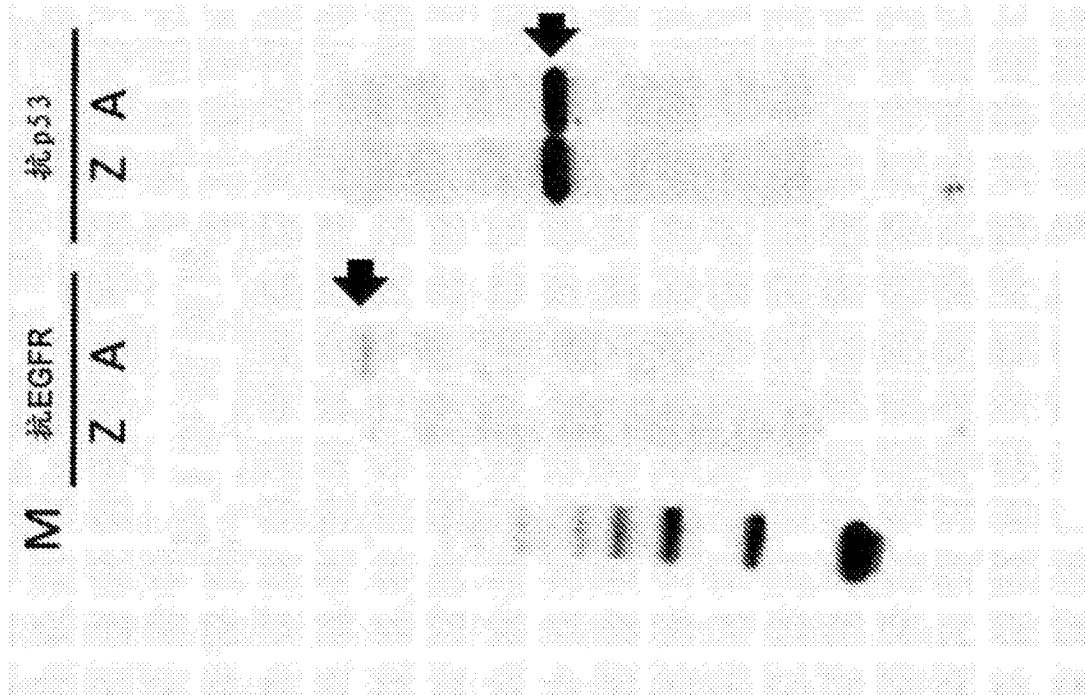


图20

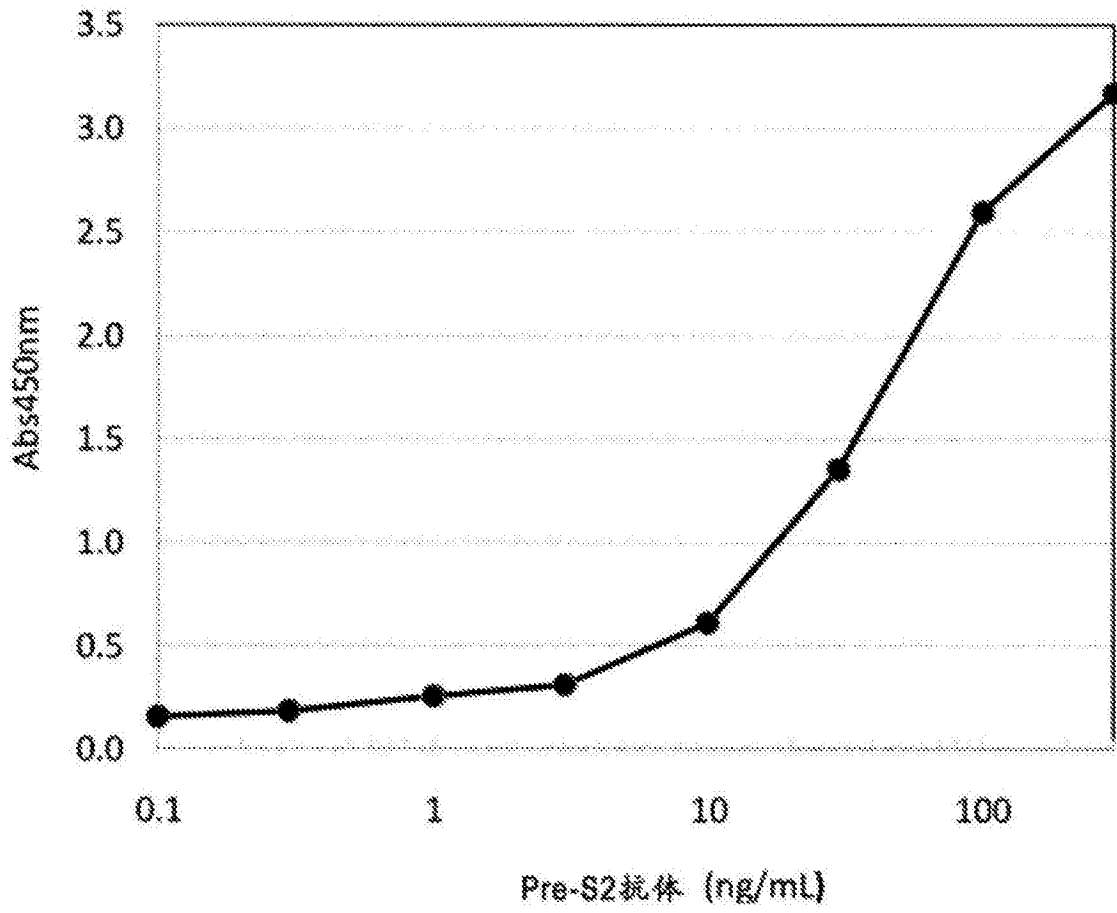


图21

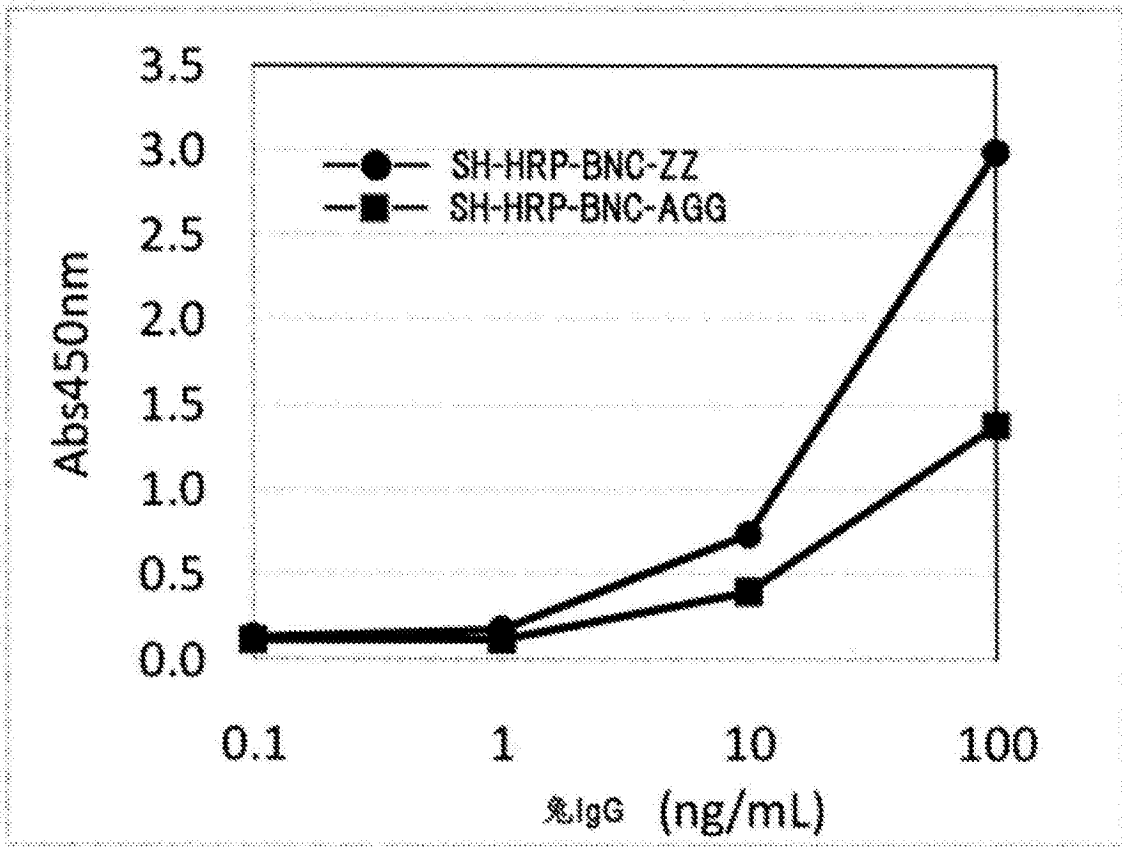


图22

专利名称(译)	用于免疫检验的病毒样颗粒、用于所述免疫检验的封闭剂、及包含它们的试剂盒		
公开(公告)号	CN105492605A	公开(公告)日	2016-04-13
申请号	CN201480034006.9	申请日	2014-08-01
[标]发明人	乡保正 织田康则		
发明人	乡保正 织田康则		
IPC分类号	C12N15/09 C12N7/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/705 C12N2730/10122 C12N2730/10123 C12N2760/18823 G01N33/544 G01N2333/02 C07K14/195 C07K14/31 C07K14/315 G01N33/54346 G01N33/56905 G01N33/56966 G01N33/56983 G01N2333/44 G01N2333/71		
代理人(译)	杨宏军 牛蔚然		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种检测灵敏度优异且能显著抑制检测背景的免疫检验方法。本发明的解决手段为提供一种病毒样颗粒，所述颗粒包含具有自组织能力的蛋白质，并且所述颗粒在该具有自组织能力的蛋白质的至少1个半胱氨酸残基上经由其一个或多个巯基而被生物学活性分子修饰。

管	处理	PBS	0.1%明胶	0.1% BSA	0.1% HPMC	0.1% Pluronic F127	0.1% Pluronic P105
未经处理的PE管		22.3	66.3	88.5	84.2	92.3	93.3
经MPC处理的PE管		89.1	95.5	99	95.5	99.5	97.8
玻璃管		52.4	77.6	94.3	87.6	97.5	90.3