



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104884958 B

(45)授权公告日 2017.07.11

(21)申请号 201380052689.6

(22)申请日 2013.08.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104884958 A

(43)申请公布日 2015.09.02

(30)优先权数据
2012-178722 2012.08.10 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.04.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2013/071653 2013.08.09

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/025013 JA 2014.02.13

(73)专利权人 独立行政法人产业技术综合研究所
地址 日本东京都

(72)发明人 成松久 久野敦 池原让
桥本康弘 城谷圭朗 奈良清光
苅谷庆喜 伊藤浩美 星京香

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 崔丽娟 郑霞

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件
US 5591589 A,1997.01.07,
CN 102317785 A,2012.01.11,
CN 102625915 A,2012.08.01,
US 2004/0132118 A1,2004.07.08,
WO 2012/081701 A1,2012.06.21,

审查员 苗君叶

权利要求书2页 说明书24页 附图14页

(54)发明名称

糖链异构体检测方法及其糖链异构体检测装置

(57)摘要

本发明的目的在于,开发并提供一种以少的工序数迅速且特异性地检测特定的糖链异构体的方法。提供一种糖链异构体检测方法,所述方法包括对在将与糖链非还原末端结合性凝集素及与糖链异构体的蛋白质部分特异性地结合的抗体等与被检试样混合时所形成的免疫复合物进行定量,将得到的免疫复合物量与未混合所述糖链非还原末端结合性凝集素时或混合对照蛋白质时的对照试样得到的对照免疫复合物量进行比较,以及基于这两个量之间的差异判定被检试样中目标糖链异构体的有无。

1. 一种糖链异构体检测方法,其检测被检试样中的目标糖链异构体,所述方法包括:

凝集素混合工序,将糖链非还原末端结合性凝集素与所述被检试样进行混合,所述糖链非还原末端结合性凝集素与所述目标糖链异构体的糖链部分中的糖链非还原末端的全部或一部分区域结合;

抗体混合工序,将与所述目标糖链异构体中的蛋白质部分特异性地结合的抗体与所述被检试样进行混合;

复合物定量工序,定量所述凝集素混合工序及抗体混合工序后所述抗体和所述目标糖链异构体的免疫复合物;及

判定工序,基于所述免疫复合物量与未混合所述糖链非还原末端结合性凝集素时或混合对照蛋白质时的对照试样得到的对照免疫复合物量的差异,判定被检试样中的目标糖链异构体的有无,

其中所述糖链部分中的糖链非还原末端选自自由以下组成的组: α 2,6-唾液酸、 α 2,3-唾液酸、半乳糖、GalNAc、GlcNAc、聚乳糖胺和血型抗原岩藻糖,

其中所述糖链非还原末端结合凝集素选自自由以下组成的组: α 2,6-唾液酸结合凝集素、 α 2,3-唾液酸结合凝集素、半乳糖/GalNAc结合凝集素、GlcNAc结合凝集素、聚乳糖胺结合凝集素和血型抗原岩藻糖结合凝集素。

2. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,在所述判定工序中,当免疫复合物量于统计学上显著低于对照免疫复合物量时,判定为在所述被检试样中含有所述目标糖链异构体。

3. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,在所述凝集素混合工序后进行所述抗体混合工序。

4. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,在所述抗体混合工序后进行所述凝集素混合工序。

5. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,将所述凝集素混合工序和所述抗体混合工序同时进行。

6. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,所述被检试样为体液或组织切片。

7. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,所述 α 2,6-唾液酸结合凝集素选自自由SSA、SNA和TJA-1组成的组。

8. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,所述 α 2,3-唾液酸结合凝集素是MAL。

9. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,所述半乳糖/GalNAc结合凝集素选自自由ECA、RCA120、BPL、TJA-11和WFA组成的组。

10. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,所述GlcNAc结合凝集素选自自由PVL、UDA、GSL-11和ABA组成的组。

11. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,所述聚乳糖胺结合凝集素是LEL或STL。

12. 根据权利要求1所述的糖链异构体检测方法,其中,所述血型抗原岩藻糖结合凝集素是LTL或UEA-1。

13. 一种糖链异构体检测装置,其检测目标糖链异构体,所述装置包含:

反应部,将与待被检测的糖链异构体的糖链部分中的糖链非还原末端的全部或一部分区域结合的糖链非还原末端结合性凝集素、与所述待被检测的糖链异构体的蛋白质部分特异性地结合的抗体及被检试样进行混合,产生所述糖链异构体与所述糖链非还原末端结合性凝集素或所述抗体的结合反应;

检测部,定量地检测由所述反应部产生的所述糖链异构体和所述抗体的免疫复合物;

比较判定部,将由所述检测部得到的免疫复合物量与未混合所述糖链非还原末端结合性凝集素时或混合对照蛋白质时的对照试样得到的对照免疫复合物量进行比较,基于该比较结果判定被检试样中的目标糖链异构体的有无,

其中所述糖链部分中的糖链非还原末端选自自由以下组成的组: α 2,6-唾液酸、 α 2,3-唾液酸、半乳糖、GalNAc、GlcNAc、聚乳糖胺和血型抗原岩藻糖,

其中所述糖链非还原末端结合凝集素选自自由以下组成的组: α 2,6-唾液酸结合凝集素、 α 2,3-唾液酸结合凝集素、半乳糖/GalNAc结合凝集素、GlcNAc结合凝集素、聚乳糖胺结合凝集素和血型抗原岩藻糖结合凝集素。

14. 根据权利要求13所述的糖链异构体检测装置,其中,所述反应部包括混合顺序控制装置,所述混合顺序控制装置控制糖链非还原末端结合性凝集素、抗体与被检试样的混合顺序。

15. 根据权利要求13或14所述的糖链异构体检测装置,其中,当由所述检测部得到的免疫复合物量于统计学上显著低于对照免疫复合物的对照免疫复合物量时,所述比较判定部判定在所述被检试样中含有所述糖链异构体。

16. 根据权利要求13所述的糖链异构体检测装置,其中,所述被检试样为体液或组织切片。

17. 一种糖链异构体鉴别方法,其使用权利要求1-12所述的糖链异构体检测方法鉴别糖链异构体。

18. 根据权利要求13所述的糖链异构体检测装置,其中,所述 α 2,6-唾液酸结合凝集素选自自由SSA、SNA和TJA-1组成的组。

19. 根据权利要求13所述的糖链异构体检测装置,其中,所述 α 2,3-唾液酸结合凝集素是MAL。

20. 根据权利要求13所述的糖链异构体检测装置,其中,所述半乳糖/GalNAc结合凝集素选自自由ECA、RCA120、BPL、TJA-11和WFA组成的组。

21. 根据权利要求13所述的糖链异构体检测装置,其中,所述GlcNAc结合凝集素选自自由PVL、UDA、GSL-11和ABA组成的组。

22. 根据权利要求13所述的糖链异构体检测装置,其中,所述聚乳糖胺结合凝集素是LEL或STL。

23. 根据权利要求13所述的糖链异构体检测装置,其中,所述血型抗原岩藻糖结合凝集素是LTL或UEA-1。

糖链异构体检测方法及其检测装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可以检测具有特定糖链的糖蛋白异构体(糖链异构体)的糖链异构体检测方法及其使用该方法的糖链异构体检测装置。

背景技术

[0002] 在以迎接老龄化社会的日本为首的先进各国中,存在老龄性疾病增加的倾向。其中,以阿尔茨海默病为代表的痴呆症的增加较为显著,由于伴有日常生活的困难性和家人等的护理负担的增加等,因此,在全社会成为大问题。

[0003] 但是,作为显示与阿尔茨海默病类似的症状的疾病,已知有特发性正常压力脑积水(idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus;iNPH;以下称为“iNPH”)。流行病学调查显示,日本国内的痴呆症患者数超过300万人,据估算,其中阿尔茨海默病患者为半数以上,另外,特发性正常压力脑积水(iNPH)患者为31万人。两种疾病具有痴呆症和脑室扩大的共同特征,但在以下方面具有较大不同:阿尔茨海默病的根治疗法还没有被确立,而iNPH是可以通过手术如分流手术等而根治的“治愈的痴呆症”(非专利文献1)。但是,该分流手术数量在日本国内一年只有1,200例,在31万人的潜在患者中,接受该手术的患者仅每年度只有0.4%。其原因的实例包括由于鉴别阿尔茨海默病患者和iNPH患者的简便且可信的诊断方法没有确立,因此许多iNPH患者被误诊为阿尔茨海默病。

[0004] iNPH的原因不清楚,怀疑是脊髓液吸收异常导致的脊髓液过量。在iNPH中,过量的脊髓液导致大脑受到压迫。因此,在iNPH的确定诊断中,采用包括通过腰椎穿刺除去大量的脊髓液并以是否缓和脑的压迫症状为指标的方法(穿刺实验)。但是,该方法为高侵袭性,而且假阴性率也高。另外,由于许多iNPH患者为高龄者,所以因腰椎变形而只能少量采集脊髓液,诊断自身也大多不能进行。因此,两种疾病的正确诊断方法的开发在医疗上成为重要的主题(非专利文献1)。

[0005] 为了解决上述问题,近年来,包括研究包含在体液中并与特定的疾病相关性高的糖蛋白,并将其作为诊断标志物用于疾病的病变判定的方法备受关注。体液中的大部分蛋白质被糖链修饰,这些糖链修饰通常具有特异于该糖链源自的脏器、组织、细胞种类或病态的结构。即,已知具有即使为相同的蛋白质,由于脏器、组织的不同,则具有不同的糖链。因此,通过利用糖链异构体,可以检测特定脏器的异常。

[0006] 例如,专利文献1公开了具有含末端N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的糖链的脊髓液型糖蛋白转铁蛋白-1(Tf-1)(脊髓液特征性糖链异构体),作为可鉴别阿尔茨海默病和iNPH的诊断标志物(非专利文献2)。该方法可以通过脊髓液检测具有所述糖链的Tf-1而以高精度鉴别阿尔茨海默病和iNPH。另外,还可以鉴别额颞叶痴呆、路易氏体痴呆等其它痴呆症。另一方面,在脊髓液中,除Tf-1之外,还存在具有不同糖链结构的转铁蛋白异构体(转铁蛋白-2:Tf-2)。为了在这样的糖链异构体混合存在的脊髓液中检测特定的糖链异构体,目前,必须分别在不同工序中进行利用抗体的蛋白质部分的鉴别和利用凝集素的糖链部分的鉴别。这种检测方法缺乏效率性,另外迅速性差。进而,具有工序多且复杂而难以全自动化、不能大

量处理的问题。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特开2010-121980号

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:lshikawa et al.,2008,Neurologia medico-chirurgica,48, Supplement (Guidelines for iNPH)

[0012] 非专利文献2:Futakawa et al.,2012,Neurobiol Aging,33:1807-15.

发明内容

[0013] 本发明的课题在于,开发并提供一种以少的工序数迅速且特异性地检测特定的糖链异构体的方法。

[0014] 本发明人等为了解决所述课题反复进行了潜心研究,结果发现以下现象:将凝集素与糖蛋白的糖链非还原末端结合时,抑制由特异性地识别该糖蛋白中的蛋白质部分的抗体引起的抗原抗体反应。而且,还得知该现象不是仅在使用特定限定的抗体时产生的特殊现象,而是在识别糖蛋白的蛋白质部分的一般抗体中观察到的普遍现象。

[0015] 抗体和凝集素针对糖蛋白的竞争迄今为止也有报道。例如,Suzuki等利用单克隆抗体和凝集素进行葡糖基化 α -胎蛋白(AFP-L3)的定量(Suzuki,Y.,et al.,Br J Cancer,1987,55(2):147-52)。该定量方法是包括通过使用具有捕获用和检测用的2种抗AFP单克隆抗体的双抗夹心ELISA体系中添加LCA凝集素(lens culinaris agglutinine;小扁豆凝集素),并检测抗体与AFP-L3结合被LCA和AFP-L3结合的抑制作为ELISA信号的降低量来定量总AFP中的AFP-L3的方法,可定量具有核心岩藻糖的糖链异构体(AFP-L3),而不将其从其它糖链异构体中分离。

[0016] 另外,Kato等公开有:在甲状腺癌中出现的含有核心岩藻糖的糖蛋白甲状腺球蛋白的检测,几个抗甲状腺球蛋白单克隆抗体与抗原的结合通过与核心岩藻糖结合的AAL凝集素的存在被抑制(Kato,R.et al.,Journal of Kagawa Prefectural College of Health Science,2003.5:39-44)。

[0017] 利用上述LCA和AAL凝集素的抗体结合的抑制机制被认为是:在糖链异构体中,通过将所述凝集素与从与氨基酸直接结合的糖分支的岩藻糖,即核心糖链中的核心岩藻糖结合,位于该核心糖链的附近的抗原表位被遮蔽,其结果是与抗体的反应性降低(Suzuki,Y.,et al.,Br J Cancer,1987,55(2):147-52)。即,在免疫复合物的形成抑制中,认为糖蛋白的抗原表位和凝集素结合部位的接近性是重要的。一般而言,蛋白质上非常有限数目的抗原表位被糖链基部结合性凝集素遮蔽,大部分单克隆抗体可与糖蛋白结合而不与凝集素竞争。事实上,与糖蛋白的结合被糖链基部结合性凝集素中的核心岩藻糖结合凝集素抑制的单克隆抗体在所研究的30克隆中仅为2克隆(Taketa K,et al,Tumour Biol,1998,19:318-28.)。

[0018] 另一方面,由于糖链非还原末端存在于蛋白质的远端,因此糖链非还原末端结合性凝集素不能抑制抗原抗体反应的说法是该领域的一般说法。因此,可以认为,抗体和凝集素针对糖蛋白的竞争不是普遍的现象,而是可以通过与糖链基部结合的极少一部分的单克

隆抗体和糖链基部结合性凝集素的组合而产生的极其特殊的现象。

[0019] 但是,本发明人等所发现的上述现象为完全推翻现有说法的结果。即,迄今为止有报道的与核心糖链结合的凝集素的抗原抗体反应抑制能力表明:以完全不同的机制抑制糖蛋白和抗体的结合。本发明是基于上述新现象而完成的发明,提供以下发明。

[0020] (1) 一种所述糖链异构体检测方法,其为检测被检试样中的目标糖链异构体的方法,其中,所述方法包括:凝集素混合工序,将糖链非还原末端结合性凝集素与所述被检试样进行混合,所述糖链非还原末端结合性凝集素与所述目标糖链异构体的糖链部分中的糖链非还原末端的全部或一部分区域结合;抗体混合工序,将与所述目标糖链异构体中的蛋白质部分特异性地结合的抗体或其活性片段与所述被检试样进行混合;复合物定量工序,定量所述凝集素混合工序及抗体混合工序后所述抗体或其活性片段和所述目标糖链异构体的免疫复合物;及判定工序,基于所述免疫复合物量和相对于未混合所述糖链非还原末端结合性凝集素时或混合对照蛋白质时的对照试样得到的对照免疫复合物量的差异,判定被检试样中的目标糖链异构体的有无。

[0021] (2) 如(1)所述的糖链异构体检测方法,其中,在所述判定工序中,当免疫复合物量于统计学上显著低于对照免疫复合物量时,判定为在所述被检试样中含有所述目标糖链异构体。

[0022] (3) 如(1)或(2)所述的糖链异构体检测方法,其中,在所述凝集素混合工序后进行所述抗体混合工序。

[0023] (4) 如(1)或(2)所述的糖链异构体检测方法,其中,在所述抗体混合工序后进行所述凝集素混合工序。

[0024] (5) 如(1)或(2)所述的糖链异构体检测方法,其中,将所述凝集素混合工序和所述抗体混合工序同时进行。

[0025] (6) 如(1)-(5)中任一项所述的糖链异构体检测方法,其中,所述被检试样为体液或组织切片。

[0026] (7) 一种所述糖链异构体检测装置,其为检测目标糖链异构体的装置,其中,所述装置包含:反应部,将与待被检测的糖链异构体的糖链部分中的糖链非还原末端的全部或一部分区域结合的糖链非还原末端结合性凝集素、与所述待被检测的糖链异构体的蛋白质部分特异性地结合的抗体或其活性片段及被检试样进行混合,产生所述糖链异构体与所述糖链非还原末端结合性凝集素或所述抗体或其活性片段的结合反应;检测部,定量地检测由所述反应部产生的所述糖链异构体和所述抗体或其活性片段的免疫复合物;比较判定部,将由所述检测部得到的免疫复合物量与未混合所述糖链非还原末端结合性凝集素时或混合对照蛋白质时的对照试样得到的对照免疫复合物量进行比较,基于该比较结果判定被检试样中的目标糖链异构体的有无。

[0027] (8) 如(7)所述的糖链异构体检测装置,其中,所述反应部包括混合顺序控制装置,所述混合顺序控制装置控制糖链非还原末端结合性凝集素、抗体或其活性片段及被检试样的混合顺序。

[0028] (9) 如(7)或(8)所述的糖链异构体检测装置,其中,当由所述检测部得到的免疫复合物量于统计学上显著低于对照免疫复合物量时,所述判定部判定在所述被检试样中含有所述糖链异构体。

[0029] (10) 如(7)-(9)中任一项所述的糖链异构体检测装置,其中,所述被检试样为体液或组织切片。

[0030] (11) 一种糖链异构体鉴别方法,其使用所述(1)-(6)的糖链异构体检测方法鉴别糖链异构体。

[0031] 本说明书包含作为本申请的优先权的基础的日本国专利申请2012-178722号的说明书和/或附图中所记载的内容。

[0032] 发明效果

[0033] 根据本发明的糖链异构体检测方法,可以以与现有方法相比少的工序迅速、简便地且以高通量鉴别糖链异构体。

[0034] 根据本发明的糖链异构体检测装置,可以进行被检试样中待被检测的糖链异构体的自动检测。

附图说明

[0035] 图1是表示本发明的糖链异构体检测方法的流程的图。

[0036] 图2是表示本发明的糖链异构体中的核心糖链的图。A表示三甘露糖基核心糖链,另外,B(a)-(i)表示O-聚糖核心糖链。该图中,还示出与各核心糖链结合的氨基酸残基,即与三甘露糖基核心糖链结合的天冬酰胺(Asn)残基及与O-聚糖核心糖链结合的丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)残基。

[0037] 图3是表示利用糖链非还原末端结合性凝集素的免疫复合物的形成抑制的图。纵轴表示相对于对照的抑制率。横轴表示在血清Tf及脊髓液中作为特征的异构体的Tf-1,另外,SSA、PVL、UDA等表示与所述糖链异构体进行混合的凝集素。

[0038] 图4-1是表示通过糖链非还原末端结合性凝集素的免疫复合物的形成抑制,基于该凝集素与糖链异构体的糖链特异性的结合的图。

[0039] 图4-2是凝胶电泳分析的结果。图中,Ser表示血清中Tf,Tf表示精制Tf,而且,AsT表示去唾液酸Tf。Silver表示银染色,Tf-Ab表示利用抗人Tf抗体的蛋白质印迹法,且,SSA表示利用SSA凝集素的凝集素作图法。

[0040] 图5是表示使用市售的其它制造商(DAKO社)的抗人Tf抗体时的免疫复合物形成抑制的图。

[0041] 图6是表示相对于抑制效果的SSA浓度曲线的图。

[0042] 图7是表示由图6的浓度曲线算出的双重倒数作图法的图。

[0043] 图8是表示在实施例4记载的条件下定量具有 $\alpha 2,6$ 唾液酸末端的Tf时的标准曲线的图。

[0044] 图9是表示现有的转铁蛋白糖链异构体检测法(蛋白质印迹法)和本发明的转铁蛋白糖链异构体检测方法中得到的转铁蛋白指标值的相关性图($R^2=0.934$)。

[0045] 图10是表示免疫复合物形成后的糖链非还原末端结合性凝集素的混合导致的免疫复合物形成的抑制效果的图。

[0046] 图11是用蛋白质印迹法检测了使用将抗人Tf抗体进行固定化的珠进行免疫沉淀时的上清液中所含的血清Tf的图。

[0047] 图12表示具有 $\alpha 2,6$ 唾液酸作为末端糖链的 $\alpha 2$ 巨球蛋白的测定。

[0048] 图13-1表示人肝脏切片中具有 $\alpha 2,6$ 唾液酸的血清Tf的检测。

[0049] 图13-2是表示通过SSA凝集素的免疫复合物的形成抑制依赖于人肝脏切片的唾液酸酶处理后免疫组织化学中唾液酸的图。

[0050] 图14表示人大肠中的具有WFA结合性糖链的MUC1的检测。由于图14A和B为镜面切片,因此本来存在左右对称的关系,但在此为了容易进行比较,使B的像左右反转。

[0051] 图15表示人脊髓液型糖蛋白转铁蛋白中的2种糖链异构体的结构。图15A表示Tf-2,图15B表示Tf-1。图中所示的凝集素(SSA、PVL、UDA、E4-PHA、AAL分别将用糖链上的箭头表示的虚线框内的区域作为结合部位进行识别。

[0052] 图16表示人大肠癌切片中的具有 $\alpha 2,6$ 唾液酸的癌胚抗原(CEA)的检测。图16A是进行了BSA处理的切片,另外,图16B是进行了SSA处理的切片。图中的箭头表示进行了抗体染色的 $\alpha 2,6$ -唾液酸化CEA,另外,箭头表示将细胞体用抗CEA抗体进行了浓染的细胞(利用苏木素染色成淡紫色的椭圆的部分是该细胞的核)。

具体实施方式

[0053] 1. 糖链异构体检测方法

[0054] 1-1. 概要及定义

[0055] 本发明的第1实施方式为用于将被检试样中的目标糖链异构体进行区别而检测的方法。就本实施方式的检测方法而言,基于其中与糖链异构体的糖链非还原末端结合的凝集素对特异性地识别该糖链异构体的蛋白质部分(以下,在本说明书中,经常表述为“核心蛋白质”)的抗体或其活性片段引起的抗原抗体反应的抑制的现象,与现有的糖链异构体的检测方法相比可以以少的工序迅速、简便地且以高通量鉴别被检试样中的目标糖链异构体。例如,由于癌症标志物的70%为糖链,因此可以通过本发明基于癌症中特有的糖链异构体检测肿瘤。在肿瘤检测中,现有方法仅检测糖链部分并进行筛选,而根据本发明,可以同时监测核心蛋白质,因此可以更迅速且特异性地检测肿瘤。

[0056] 在本说明书中,“糖链异构体”是指在糖链部分具有各种异构体(异构体)的各个糖蛋白的总称。例如,核心蛋白质及其糖链中的核心糖链(后述)相同,其以外的糖链结构可列举不同的糖蛋白等。另外,在本说明书中,“目标糖链异构体”是指从本实施方式中的被检试样中待被检测的糖链异构体。更具体而言,可列举例如与特定的疾病相关性高的、可以成为疾病检测用标志物的糖链异构体。由于糖链异构体显示细胞种类特异性或组织特异性,所以,通过糖链异构体的鉴别,可以鉴别全部的细胞种类、组织。

[0057] 在本说明书中,“被检试样”是指被提供给本实施方式的检测方法的被检对象物、可以含有糖链异构体的物质。可列举例如从一个或多个个体中采集的体液、组织、细胞或来自它们的物质(例如组织悬浮液等)。

[0058] 在本说明书中,所述“个体”是指脊椎动物、优选哺乳动物、更优选人的个体。个体可以为具有任何疾病的疾病病变体、存在疾病的病变可能性的个体或健康体的任一种。

[0059] 在本说明书中,所述“体液”是指可以含有糖链异构体的液体状的生物体试样。可列举例如:血液(包含血清、血浆及间质液)、淋巴液、脊髓液、腹水、胸水、神经根周围液、泪液、鼻涕、唾液、痰液、尿液、阴道液、精液、各组织或细胞的提取液等。优选为血液、脊髓液或淋巴液。需要说明的是,在本说明书中的体液中,还包含来自个体的糖链异构体的溶液,如

可以含有使用有生理盐水等的腹腔灌洗液。就体液而言,既可以直接使用从个体中采集的体液,也可以根据需要使用进行了稀释或浓缩的体液,或如果为血液,则为添加有血液凝固阻止剂如肝磷脂的体液。体液的采集基于该领域的公知的方法进行即可。例如,如果为血液或淋巴液,则按照公知的采血方法即可。具体而言,例如,如果为末梢血,则可以对末梢部的静脉等进行注射而采集。另外,如果为脊髓液,则通过公知的腰椎穿刺采集即可。体液既可以在采集后立即使用,也可以通过冷冻或冷藏保存一定期间后,根据需要进行解冻等处理而使用。

[0060] 所述“组织”是指构成个体的组织。在本说明书中的被检试样中,相当于所有的组织,没有特别限制。

[0061] 1-2. 构成

[0062] 将本实施方式的检测方法的流程示于图1。如该图所示,本实施方式的糖链异构体检测方法包括:凝集素混合工序S0101、抗体混合工序S0102、复合物定量工序S0103及判定工序S0104。图1中,为了方便,在凝集素混合工序之后图示抗体混合工序,但这2个工序的顺序不限。例如,既可以在凝集素混合工序之后进行抗体混合工序,也可以在抗体混合工序之后进行凝集素混合工序。另外,也可以同时进行凝集素混合工序和抗体混合工序。

[0063] 下面,对本实施方式的糖链异构体检测方法中的各工序进行具体说明。

[0064] (1) 凝集素混合工序

[0065] “凝集素混合工序”S0101为将糖链非还原末端结合性凝集素与被检试样进行混合的工序,所述糖链非还原末端结合性凝集素与目标糖链异构体的糖链部分中的糖链非还原末端的全部或一部分区域结合。本工序的目的在于,使糖链非还原末端结合性凝集素与可存在于被检试样中的目标糖链异构体的糖链部分中的糖链非还原末端的全部或一部分区域结合。

[0066] 在本说明书中,“糖链非还原末端”是指,在糖链异构体的糖链部分中核心糖链以外的糖链区域。在本说明书中,“核心糖链”是指在糖链异构体的糖链部分中包含与蛋白质的氨基酸直接结合的糖的糖链基部区域、且由与各种糖链异构体共同的母核糖链结构构成的区域。例如,图2A所示的与天冬酰胺残基结合的三甘露糖基核心糖链($\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(+\text{Fuc}\alpha 1-6)\text{GlcNAc}$),对应于天冬酰胺(Asn,N)结合型糖链(N-聚糖)的核心糖链。在该三甘露糖基核心糖链中,岩藻糖(所谓的核心岩藻糖)可与氨基酸(天冬酰胺残基)直接结合的GlcNAc结合。另外,如果为O-聚糖的核心糖链,则可列举在与丝氨酸、苏氨酸残基直接结合的GalNAc上进一步结合1或2个糖的结构、即图2B所示的(a)-(i)的结构。具体而言,为(a) $\text{Sia}\alpha 2-6\text{GalNAc}$ 、(b) $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ 、(c) $\text{GlcNAc}\beta 1-6(\text{Gal}\beta 1-3)\text{GalNAc}$ 、(d) $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{GalNAc}$ 、(e) $\text{GlcNAc}\beta 1-6(\text{GlcNAc}\beta 1-3)\text{GalNAc}$ 、(f) $\text{GalNAc}\alpha 1-3\text{GalNAc}$ 、(g) $\text{GlcNAc}\beta 1-6\text{GalNAc}$ 、(h) $\text{GalNAc}\alpha 1-6\text{GalNAc}$ 及(i) $\text{Gal}\alpha 1-3\text{GalNAc}$ 的9种核心糖链。

[0067] 在本说明书中,“糖链非还原末端结合性凝集素”是指识别所述糖链非还原末端的全部或一部分的糖链而结合的凝集素。如果为与糖链非还原末端的全部或一部分结合的凝集素,则其种类不限。例如,在糖链非还原末端为 $\alpha 2,6$ 唾液酸(唾液酸 $\alpha 2,6$ 半乳糖/GalNAc结构)的情况下,可列举 $\alpha 2,6$ 唾液酸结合性凝集素。具体而言,相当于例如来自无梗接骨木(*Sambucus sieboldiana*)的凝集素SSA凝集素、来自西洋接骨木(*Sambucus nigra*)的凝集素SNA凝集素及来自日本栝蒌(*Trichosanthes japonica*)的I型凝集素TJA-1凝集素。另外,

在糖链非还原末端为 α 2,3唾液酸(唾液酸 α 2,3半乳糖结构)的情况下,可列举 α 2,3唾液酸结合性凝集素。具体而言,相当于例如来自朝鲜槐(*Maackia amurensis*)的凝集素MAL凝集素。在糖链非还原末端为以半乳糖或GalNAc为末端糖的糖链异构体的情况下,可列举末端半乳糖/GalNAc结合性凝集素。具体而言,相当于例如来自鸡冠刺桐(*Erythrina cristagalli*)的凝集素ECA凝集素、来自蓖麻(*Ricinus communis*)的凝集素RCA120凝集素、来自洋紫荆(*Bauhinia purpurea*)的凝集素BPL凝集素、来自所述日本栝萎的凝集素TJA-11凝集素、来自多花紫藤(*Wisteria floribunda*)的凝集素WFA凝集素及与其对应的凝集素ACA凝集素。在糖链异构体具有末端糖GlcNAc为糖链非还原末端的情况下,可列举末端GlcNAc结合性凝集素。具体而言,相当于例如来自豆科加纳谷物(*Griffonia simplicifolia*)的凝集素GSL-11凝集素及来自双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)的凝集素ABA凝集素。在糖链异构体具有在三甘露糖核心结构上具有取得了进展的乳糖胺(Gal β 1,4GlcNAc)的重复结构作为糖链非还原末端的情况下,可列举聚乳糖胺结合性凝集素。具体而言,相当于例如来自番茄(*Lycopersicon esculentum*)的凝集素LEL凝集素及来自马铃薯(*Solanum tuberosum*)的凝集素STL凝集素。在糖链异构体具有ABO及路易斯血型抗原中所含的岩藻糖作为糖链非还原末端的情况下,可列举血型抗原岩藻糖结合性凝集素等。具体而言,相当于例如来自翅荚百脉根(*Lotus tetragonolobus*)的凝集素LTL凝集素、来自乌乐树(*Ulex europaeus*)的凝集素UEA-1凝集素等。这些凝集素也可以使用市售的凝集素。例如,如果为SSA凝集素,则可以使用生物化学Bio-Business社的300177或MBL社的J1001014,如果为SNA凝集素,则可以使用西格玛社的L6890Lectin from *Sambucus nigra* (elder),如果为TJA-1凝集素,则可以使用生物化学Bio-Business社的300186。

[0068] 就混合条件而言没有特别限定,只要是可将目标糖链异构体和糖链非还原末端结合性凝集素结合的条件。在具有适当的盐浓度、pH的缓冲剂中进行混合即可。在被检试样为体液那样的液体试样的情况下,也可以将糖链非还原末端结合性凝集素在体液中直接混合。与被检试样混合的糖链非还原末端结合性凝集素的量根据被检试样的分量适当确定即可。通常与可存在于被检试样中的具有凝集素结合部位的糖蛋白的总量相比,作为摩尔比,大幅度过量添加糖链非还原末端结合性凝集素。例如,在从被检试样检测血清型糖链异构体Tf-2的情况下,可添加糖链非还原末端结合性凝集素使得不仅由Tf2携带的 α 2,6唾液酸表位,而且所有含 α 2,6唾液酸的糖蛋白的表位都被 α 2,6唾液酸结合性凝集素例如SSA饱和。具体而言,例如,如果为脊髓液中的Tf-2的测定,则相对于0.5 μ L的脊髓液混合10 μ g SSA凝集素即可。需要说明的是,脊髓液中含有 α 2,6唾液酸的总糖蛋白为0.2-0.3 μ g/0.5 μ L的浓度。另外,脊髓液中的Tf-2约为0.01 μ g/0.5 μ L的浓度。

[0069] (2) 抗体混合工序

[0070] “抗体混合工序”S0102为将与所述目标糖链异构体的核心蛋白质特异性地结合的抗体或其活性片段与所述被检试样进行混合的工序。本工序的目的在于,通过将抗体或其活性片段(以下,将它们归纳,经常称为“抗体等”)与被检试样混合,使该抗体等与可存在于被检试样中的目标糖链异构体的核心蛋白质结合。

[0071] 本工序中使用的抗体等为识别存在于目标糖链异构体的核心蛋白质上的任一种抗原表位并与其特异性地结合的抗核心蛋白质抗体等。例如,在目标糖链异构体为脊髓液型转铁蛋白(Tf-2)的情况下,可列举特异性地识别作为其核心蛋白质的转铁蛋白并与其结

合的抗转铁蛋白抗体或其活性片段。

[0072] 在本说明书中，“抗体”是指免疫球蛋白、嵌合抗体、人源化抗体或合成抗体。

[0073] 在抗体为免疫球蛋白的情况下，可以是作为与目标糖链异构体的核心蛋白质结合的多种抗体的集合体的多克隆抗体，或一类识别特定的表位的克隆抗体的单克隆抗体的任一种。另外，免疫球蛋白可以设为任意的类，例如IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及IgY，或任意的亚类，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等。

[0074] “嵌合抗体”是将来自某种物种的抗体的恒定区用来自其它物种的抗体的恒定区取代的抗体。在本发明中，是指将来自人以外的动物的抗体的恒定区取代为来自人的适当的抗体的恒定区的抗体。例如，相当于将小鼠抗人转铁蛋白单克隆抗体的恒定区用人抗体的恒定区取代的抗体。

[0075] “人源化抗体”是将源自来自某种物种的抗体（通常为非人抗体、例如小鼠抗体）的CDR群（即CDR1、CDR2、CDR3）和人抗体的FR群（即FR1、FR2、FR3、FR4）及恒定区人为地组合成的镶嵌抗体。这种人源化抗体也被称为CDR植入抗体（Nature (1986) Vol. 321, 522）。

[0076] “合成抗体”是指例如使用重组DNA法重新合成的抗体或抗体片段。具体而言，不限定，相当于使本发明的抗体的一个以上的V_L及一个以上的V_H经由具有适当的长度和序列的接头肽等而人工地连结成的单体多肽分子或其多聚体多肽。作为单体多肽分子，相当于例如单链Fv（scFv：单链可变区片段（single chain Fragment of variable region））（参照Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995, Pierce Chemical Co., Rockford, IL）。另外，作为所述多聚体多肽，相当于例如双抗体（diabody）、三抗体（triabody）或四抗体（tetraabody）等。双抗体为具有以单链Fv的二聚体结构为基础的结构分子（Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448）。在作为二价的抗体片段的双抗体中，不需要各抗原结合部位与相同表位结合，可以具有分别识别不同表位并与其结合的双特异性。与双抗体相同，三抗体及四抗体具有以单链Fv结构为基础的其三聚体及四聚体结构。分别为三价及四价的抗体片段，可以为多特异性抗体。

[0077] 就本工序中使用的抗体等而言，在检测灵敏度、检测精度及供给面的稳定性方面，优选单克隆抗体或以其为标准的嵌合抗体、人源化抗体或合成抗体（以下，称为“单克隆抗体等”）。本工序中使用的抗体等可以组合使用识别不同的抗原表位并与其结合的多个单克隆抗体等。

[0078] 在本说明书中，“其活性片段”是指上述抗体的部分区域、且具有与该抗体具有的抗原特异性结合活性实质上同等活性的多肽链或其复合物。相当于例如具有至少1个轻链可变区域（V_L）和至少一个重链可变区域（V_H）的多肽链或其复合物。作为具体的例子，可列举通过将免疫球蛋白用各种肽酶切断而产生的抗体片段等。作为更具体的例子，相当于Fab、F(ab')₂、Fab'等。

[0079] 本工序中使用的抗体等可以通过糖基化、乙酰化、甲酰基化、酰胺化、磷酸化或聚乙二醇（PEG）化等而被修饰。进而，如后述的复合物定量工序记载的那样，抗体等可以被标记。

[0080] 本工序中使用的抗体等可以来自所有动物包括哺乳动物及鸟类。可列举例如：小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、驴、绵羊、骆驼、马、鸡或人等。

[0081] 上述的现有核心糖链结合性凝集素与抗体等竞争的糖链异构体检测法中，由于凝

集素结合导致的遮蔽和抑制机制,抗体等识别的抗原表位需要位于核心糖链附近。但是,本工序中使用的抗体等并不限定于那样的位置。因此,既可以是识别存在于核心蛋白质的一级结构(氨基酸序列)的抗体,也可以是识别核心蛋白质的二级结构或立体结构等高级结构的抗体。

[0082] 本工序中使用的抗体等可以按照该领域中公知的方法来制备。例如,参照Kennet et al., (Ed.) *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York, 1980即可。列举多克隆抗体制备方法的具体一个实例,以下进行说明。首先,将目标糖链异构体的核心蛋白质的全部或部分作为抗原,溶解于缓冲液而制备免疫原溶液。如果需要,则既可以与钥孔血蓝蛋白(KLH)、酪蛋白、血清白蛋白等载体蛋白质结合,也可以为了有效地进行免疫而添加佐剂。作为佐剂的例子,可列举市售的费罗因德完全佐剂(FCA)、费罗因德不完全佐剂(F1A)等,可以将这些佐剂单独使用或混合使用。接着,将所述制备的免疫原溶液对例如大鼠、小鼠、兔等哺乳动物进行免疫。免疫原溶液的1次给药量根据免疫动物的种类、给药途径等适当确定。通常可以含有约50-200 μ g/只的免疫原。免疫原溶液的给药方法可列举例如使用有F1A或FCA的皮下注射、使用有F1A的腹腔内注射、或使用有0.15mol/L的氯化钠的静脉注射。免疫的间隔没有特别限定,在初次免疫后,以数日-数周间隔、优选以1-4周间隔进行2-10次、优选3-4次追加免疫。初次免疫之后,利用ELISA法等测定免疫动物的血清中的抗体效价,在抗体效价达到稳定水平之后,将免疫原溶液注射于静脉内或腹腔内,设为最终免疫。免疫后,可以从血液中回收针对目标蛋白质的多克隆抗体。另外,需要单克隆抗体的情况下,其制备按照该领域中公知的方法进行即可。以下,示出该单克隆抗体及产生其的杂交瘤的制备实例。

[0083] 杂交瘤的制备可以利用用于制备多克隆抗体的免疫动物。从该免疫动物中采集抗体产生细胞。作为抗体产生细胞,可列举:脾脏细胞、淋巴节细胞、末梢血细胞等,优选脾脏细胞或局部淋巴节细胞。作为与抗体产生细胞融合的骨髓瘤(myeloma)细胞系,一般而言,可以使用可获得的已建成的细胞。作为使用的细胞系,优选为具有药剂选择性、可在未融合的状态下在HAT选择培养基(包含次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷)上不能生存、仅在与抗体产生细胞融合的状态下生存的性质的细胞系。另外,已建成的细胞优选为来自与免疫动物同种系的动物。作为骨髓瘤细胞系的具体例子,可列举:P3X63-Ag.8系(ATCC T1B9)、P3X63-Ag.8.U1系(JCRB9085)、P3/NS1/1-Ag4-1系(JCRB0009)、P3x63Ag8.653系(JCRB0028)或Sp2/0-Ag14系(JCRB0029)等。接着,使制备的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞系融合。融合方法按照公知的方法进行即可(Kohler, G. and Milstein, C., 1981, *Methods Enzymol.*, 73:3-46)。就细胞融合而言,在不含血清的DMEM、RPMI-1640培养基等动物细胞培养用培养基中将抗体产生细胞和骨髓瘤细胞系以约1:1-20:1的比例进行混合,在细胞融合促进剂的存在下进行融合反应即可。作为细胞融合促进剂,可以以约10-80%的浓度使用平均分子量1500-4000Da的PEG等。另外,根据情况,为了提高融合效率,可以并用二甲基亚砜等辅助剂。进而,也可以使用利用了电刺激(例如电蚀孔法)的市售的细胞融合装置使抗体产生细胞和骨髓瘤细胞系融合(Nature, 1977, 266:550-552)。最后,从细胞融合处理后的细胞中挑选目标抗肿瘤细胞单克隆抗体产生杂交瘤。首先,将细胞悬浮液在例如含胎牛血清的RPMI-1640培养基等上适当地稀释后,接种于微量滴定板上,在各孔中加入选择培养基,然后适当地交换选择培养基,在约37 $^{\circ}$ C下进行培养。在此,通过使用HAT培养基,可以仅选择性地培养具有抗体产生能

力的细胞和骨髓瘤细胞系的杂交瘤并使其增殖。其结果,在选择培养基上开始培养后,可以将从约14天左右繁殖的细胞作为杂交瘤得到。利用酶免疫测定法(EIA:Enzyme Immuno Assay、及ELISA)、放射免疫测定法(RIA:Radio Immuno Assay)等筛选在进行了增殖的杂交瘤的培养物上清液中是否存在目标抗体,最终建立目标单克隆抗体产生细胞的杂交瘤。

[0084] 单克隆抗体可以利用惯用的技术回收。即针对建立的杂交瘤,可以采用常见的细胞培养法或腹水形成法等。在细胞培养法中,将杂交瘤在含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基、MEM培养基或无血清培养基等动物细胞培养培养基中,在通常的培养条件(例如37℃、5%CO₂浓度)下培养2-10天,从其培养物上清液中取得抗体。腹水形成法的情况下,对与骨髓瘤细胞所源自的哺乳动物同种系动物的腹腔内给药杂交瘤约1000万个,使杂交瘤大量地增殖。并且,在1-2周后采集腹水或血清。在上述抗体的采集方法中,需要抗体的精制的情况下,通过适当地选择硫酸铵盐析法、离子交换色谱法、亲和色谱法、凝胶色谱法等公知的方法或将这些方法组合,可以得到被精制的单克隆抗体。

[0085] 或者,也可以利用针对目标糖链异构体的核心蛋白质的市售的抗体。制备其活性片段的情况下,将得到的抗体用番木瓜酶和胃蛋白酶等各种肽酶切断即可。

[0086] 就混合条件而言没有特别限定,只要是可以使目标糖链异构体和抗体等结合的条件。通常在具有可形成免疫复合物的适当的盐浓度、pH的缓冲剂中进行混合即可。在被检试样为体液那样的液体试样的情况下,也可以在体液中直接混合抗体等。与被检试样混合的抗体量根据被检试样的分量适当确定即可。

[0087] 如上所述,本工序和所述凝集素混合工序的工序顺序不限。这是因为,在糖链非还原末端结合性凝集素和抗体等之间针对糖链异构体的竞争不限工序顺序而产生,因此即使以任一顺序进行,也可以实现本发明的目的。例如,在将凝集素混合工序比抗体混合工序先进行的情况下,在被检试样中的目标糖链异构体的糖链非还原末端的全部或一部分区域结合糖链非还原末端结合性凝集素,凝集素/糖链异构体复合物先形成。其后,通过抗体混合工序添加抗体等,在所述凝集素/糖链异构体复合物中的凝集素和抗体等之间针对目标糖链异构体而产生竞争。该情况下,许多目标糖链异构体已经与糖链非还原末端结合性凝集素结合,因此目标糖链异构体对抗体等的结合被阻碍或抑制。另一方面,在将抗体混合工序比凝集素混合工序先进行的情况下,在被检试样中的目标糖链异构体的抗原表位结合抗体等,免疫复合物先形成。其后,通过凝集素混合工序添加糖链非还原末端结合性凝集素,在所述免疫复合物中的抗体等和糖链非还原末端结合性凝集素之间针对目标糖链异构体而产生竞争。该情况下,利用所添加的糖链非还原末端结合性凝集素,抗体等从已经形成的免疫复合物的一部分中被竞争性地排除。进而,在同时进行凝集素混合工序和抗体混合工序的情况下,在糖链非还原末端结合性凝集素和抗体等之间针对被检试样中的目标糖链异构体而产生竞争。

[0088] 在将抗体混合工序比凝集素混合工序先进行的情况下,还可以实现利用抗体等从被检试样中部分精制抗原。其在含有许多杂质蛋白质的被检试样例如血清的情况下,可以在将糖链非还原末端结合性凝集素进行混合之前除去该杂质蛋白质,因此方便,另外,在目标糖链异构体仅极其微量地存在于被检试样中的情况下,可以将糖链异构体浓缩至检测中需要的量,因此方便。因此该工序顺序比其它顺序更优选。

[0089] 需要说明的是,由于抗体也可以具有糖链,因此,作为竞争者使用的糖链非还原末

端结合性凝集素和抗体结合,由此也可以增强背景。因此,优选将使用的抗体预先利用唾液酸酶、半乳糖苷酶、己糖胺酶等酶进行处理而除去抗体的糖链表位、或通过过碘酸氧化引起的氧化反应预先将抗体的糖链表位破坏。

[0090] (3) 复合物定量工序

[0091] “复合物定量工序”S0103为在所述凝集素混合工序及抗体混合工序后定量含有所述抗体等和所述目标糖链异构体的免疫复合物的工序。本工序的目的在于,定量糖链非还原末端结合性凝集素和抗体等竞争后的免疫复合物量。

[0092] 在本说明书中,“复合物量”是指存在于试样(被检试样或后述的对照试样)中的复合物(免疫复合物或后述的对照免疫复合物)的量。该量可以为荧光强度、发光强度、浊度、吸光度、放射性量、或用浓度表示的相对量,也可以为试样中所包含的所述复合物的重量或容量那样的绝对量。

[0093] 就免疫复合物的定量而言没有特别限定,只要是可测定免疫复合物量的方法。由于免疫复合物为抗原抗体反应的产物,因此,一般而言,优选适用免疫学的检测法。作为免疫学的检测法,可列举例如:酶免疫测定法(包含ELISA法、EIA法)、荧光免疫测定法、放射免疫测定(RIA)法、发光免疫测定法、表面等离子体共振(SPR)法、水晶振子微平衡(QCM)法、免疫比浊法、胶乳凝集免疫测定法、胶乳比浊法、免疫粘着红细胞凝集反应(IAHA)、粒子凝集反应法、金胶体法、毛细管电泳法、蛋白质印迹法或免疫组织化学法(免疫染色法)。这些方法均为公知的方法,作为原则,按照该领域中的通常方法进行即可。例如,参照Current protocols in Protein Sciences,1995,John Wiley&Sons Inc.;Current protocols in Immunology,2001,John Wiley&Sons Inc.;Sambrook,J.et.al.,(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual Third Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York;日本临床病理学会编“臨床病理臨時増刊特集第53号,臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用”,临床病理刊行会,1983年;石川荣治等编“酵素免疫測定法”,第3版、医学书院,1987年;北川常广等编“タンパク質核酸酵素別冊No.31酵素免疫測定法”,共立出版,1987年;入江实编“ラジオイムノアッセイ”,讲谈社科学,1974年;入江实编“続ラジオイムノアッセイ”,讲谈社科学,1979年;永田和宏,半田宏编,生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法,Springer-Verlag东京、1988年;森泉丰荣,中本高道,センサ工学,昭晃堂,1997年,记载的方法即可。

[0094] 作为以组织切片为对象的情况的优选的定量方法的一个例子,可列举,将利用荧光免疫染色法等得到的图像数据的荧光强度进行数值化的方法。基于该定量结果,在后述的判定工序中进行凝集素添加试样图像和非添加试样图像之间的数值上的差异分析,以揭示具有免疫复合物的形成抑制的部位和抑制效果的程度。

[0095] 利用所述酶免疫测定法、荧光免疫测定法、放射免疫测定法、发光免疫测定法、表面等离子体共振法、水晶振子微平衡法、胶乳凝集免疫测定法、胶乳比浊法、粒子凝集反应法及金胶体法等免疫学的测定法定量免疫复合物的情况下,优选将所述抗体等在固相载体上进行固定化,或将被检试样中的糖链异构体进行固定化。在固相载体中可以使用聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚氯乙烯、聚乙烯基甲苯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、胶乳、琼脂糖、纤维素、琼脂糖凝胶、明胶、玻璃、金属(包含磁体)、陶瓷等材质。固相载体的形状没有限定。可以设为珠、微板、试管、棒或试验片等形状的不溶性载体。抗体等或糖链异构体在固相

载体上的固定化,按照物理吸附法、化学结合法或这些方法并用等公知的方法使抗体等或糖链异构体结合在固相载体上即可。

[0096] 如上所述,抗体等可以利用各种标记物进行标记。作为标记抗体等的标记物,如果为酶免疫测定法,则可列举:碱性磷酸酶、过氧化物酶(POD)、 β -半乳糖苷酶、尿素酶、过氧化氢酶、葡糖氧化酶、乳酸脱氢酶、淀粉酶等标记酶或生物素或(链霉素)抗生物素蛋白等。如果为荧光免疫测定法,可列举:Alexa(注册商标)、Alexa Fluoro(注册商标)、荧光素异硫代氰酸酯、四甲基若丹明异硫代氰酸酯、若丹明取代的异硫代氰酸酯、二氯三嗪异硫代氰酸酯等。如果为放射免疫测定法,可列举: ^3H 、 ^{125}I 或 ^{131}I 等。另外,如果为发光免疫测定法,则可列举:NADH、FMNH₂、荧光素酶类、鲁米诺-过氧化氢-POD类、吖啶酯类或二氧杂环丁烷化合物类等。

[0097] 免疫复合物的检测根据所述测定方法而进行。例如,如果为酶免疫测定法,则使标记的酶在其最适条件下与基质反应,通过光学方法或显色方法等测定其反应生成物的量即可。如果为荧光免疫测定法,则测定荧光物质标记物产生的荧光强度即可。如果为放射免疫测定法,则测定放射性物质标记物产生的放射性量即可。另外,如果为发光免疫测定法,则测定发光反应类产生的发光强度即可。

[0098] 免疫复合物的检测可以为直接检测或间接检测的任一种。在直接检测的情况下,将抗体等进行标记即可。另外,在间接检测的情况下,使用被标记的二抗等即可。

[0099] 直接检测方法的情况下,例如,将被检试样中的糖链异构体在固相载体上进行固定化,进行凝集素混合工序及抗体混合工序,与在抗体混合工序中标记的抗体等接触而形成免疫复合物。其后,可以将未结合的标记的抗体等进行洗涤分离,由结合的标记的抗体量或未结合的标记的抗体量检测免疫复合物,另外测定其量。

[0100] 间接检测方法的情况下,使被检试样中的目标糖链异构体或凝集素/糖链异构体复合物与作为一抗的抗体等反应(初次反应),并进一步与标记的二抗反应(再次反应)。初次反应和再次反应既可以按相反顺序进行,也可以同时进行。另外,标记的二抗既可以为特异性地识别一抗并与其结合的抗体,也可以为识别目标糖链异构体的抗原表位并与其结合的抗体。包括将识别目标糖链异构体上的不同抗原表位并与其结合的2种不同抗体等的一种抗体等进行固定化、将另一种抗体等进行标记并检测目标抗原蛋白质的双抗夹心法(例如双抗夹心ELISA法等)被优选作为间接检测方法,因为该方法可被应用于使用有现存的自动免疫检测装置的自动化。免疫复合物形成后,可以洗涤被检试样中的免疫复合物以外的蛋白质及未结合的标记的二抗,由结合的标记的二抗量或未结合的标记的二抗量检测被检试样中的目标糖链异构体,另外测定其量。

[0101] 另外,在免疫复合物的检测中,使用免疫比浊法、胶乳凝集反应、胶乳比浊法、红细胞凝集反应或粒子凝集反应的情况下,通过将基于含有免疫复合物的凝集物的生成量的溶液的透射光和散射光的变化作为吸光度和浊度进行测定,可以测定免疫复合物量。

[0102] (4) 判定工序

[0103] “判定工序”S0104为基于所述免疫复合物量和对照免疫复合物量的差异,判定被检试样中的目标糖链异构体的有无的工序。本工序的目的在于,基于上述复合物定量工序的结果,判定在被检试样中是否存在目标糖链异构体。

[0104] 在本说明书中,“对照免疫复合物”为成为作为本发明的检测及测定对象的免疫复

合物的阴性对照的免疫复合物。对照免疫复合物在使对照试样经受与本发明的检测方法相同的工序时、或在凝集素混合工序S0101中未混合所述糖链非还原末端结合性凝集素时或混合对照蛋白质时的对照试样得到。为了以更高的精度检测目标糖链异构体,更优选将在混合对照蛋白质时得到的对照免疫复合物设为阴性对照。

[0105] 在本说明书中,“对照试样”是指用于测定对照免疫复合物量且与经受本发明的检测方法的被检试样实质上同质及同量的阴性对照用试样。例如,经受糖链异构体的检测的被检试样为液体试样如血清的情况下,将该液体试样分为两份,其中的一份成为本发明的被检试样,另一份成为对照试样。另外,经受糖链异构体的检测的被检试样为固体试样如组织的情况下,连续的2个切片或截面的左区域和右区域的一个成为本发明的被检试样,另一个成为对照试样。

[0106] 另外,在本说明书中,“对照蛋白质”为明显不与目标糖链异构体的糖链部分及使用的抗体等结合的蛋白质。可列举例如不具有牛血清白蛋白(BSA)或人血清白蛋白(HSA)等的糖链的蛋白质。此外,具有 α 2,6唾液酸糖链的糖链异构体为目标糖链异构体的情况下,不与该 α 2,6唾液酸糖链结合的SSA、SNA、TJA-1凝集素等也可以作为对照使用。原则上,对照蛋白质将以与被检试样混合的糖链非还原末端结合性凝集素同量与对照试样混合。

[0107] 在本工序中,将上述复合物定量工序中得到的免疫复合物的定量结果和对照免疫复合物的定量结果进行比较,基于其差异判定被检试样中的目标糖链异构体的有无。

[0108] 如上所述,在被检试样中,在凝集素混合工序中加入糖链非还原末端结合性凝集素。在被检试样中存在目标糖链异构体、即具有特定糖链的蛋白质的情况下,在其蛋白质部分具有抗原表位的抗体等和糖链非还原末端结合性凝集素之间会针对与该糖链异构体的结合产生竞争。结果,抗体等的结合被与糖链异构体中的特定糖链结合的糖链非还原末端结合性凝集素、即凝集素/糖链异构体复合物阻碍或抑制。与此相对,在对照试样中,在凝集素混合工序中未加入糖链非还原末端结合性凝集素、或取代它而加入对照蛋白质。该情况下,与抗体等竞争试样中的目标糖链异构体的结合的竞争者不存在。因此,在被检试样中存在目标转铁蛋白糖链异构体的情况下,免疫复合物量与对照免疫复合物量相比相对地变少。在本工序中,基于该免疫复合物量和对照免疫复合物量的差异,判定被检试样中的目标转铁蛋白糖链异构体的有无。如上所述,判定在免疫复合物量比对照免疫复合物量相对地少的情况下,在被检试样中存在目标转铁蛋白糖链异构体即可。是否相对地少,根据免疫复合物量与对照免疫复合物量相比是否在量上低、更优选是否在统计学上显著地低来判断。在本说明书中,“在统计学上显著”是指:在将免疫复合物量与对照免疫复合物量的差异在统计学上进行处理时,存在显著的差异。统计学处理的检验方法适当使用可判断显著性的有无的公知的检验方法即可。例如,可以使用学生t检验法、多重比较检验法。具体而言,可列举例如风险比率(显著水平)小于5%、1%或0.1%的情况。因此,在免疫复合物量于统计学上显著低于对照免疫复合物量的情况下,在被检试样中存在目标转铁蛋白糖链异构体,在两者没有统计学的显著差异的情况下,判定为在被检试样中目标转铁蛋白糖链异构体不存在即可。

[0109] 但是,在试样中,仅核心蛋白质与目标转铁蛋白糖链异构体相同的其它糖链异构体也可以存在。抗体等也结合这种糖链异构体,可形成免疫复合物,但原则上,由于在被检试样及对照被检试样的任一种中也以相同的量形成该免疫复合物并相抵消,因此对本工序

的判定没有影响。

[0110] 1-3. 糖链异构体鉴别方法

[0111] 本发明的糖链异构体检测方法也可以作为糖链异构体的鉴别方法使用。例如,关于各种公知的糖链异构体,收集关于可检测其糖链异构体的糖链非还原末端结合性凝集素和抗体等组合的信息。接着,将含有种类未知的糖链异构体的试样分成两份,在一份(被检用)中加入凝集素和抗体,在另一份(对照用)中仅加入抗体,将在被检用和对照用中所形成的免疫复合物量进行比较。检测被检用的免疫复合物量比对照用的免疫复合物量相对地少的糖链非还原末端结合性凝集素和抗体等的组合,与该组合对应的糖链异构体可以判定为试样中所含的种类未知的糖链异构体。

[0112] 另外,在将本发明应用于各种公知的糖链异构体的大规模筛选的情况下,可以使用抗体阵列。将特定疾病的糖链异构体试样分成两份,制备要研究的添加及不添加凝集素的比较试样集。将各自覆盖到相同批量的抗体阵列,对通过添加凝集素而显示信号降低的糖链异构体进行鉴别。在该信号降低因特定的疾病而变化的情况下,该糖链异构体作为疾病标志物被鉴别。另外,揭示了用于将来筛选用凝集素。

[0113] 1-4. 效果

[0114] 根据本发明的糖链异构体检测方法,可以以与现有方法相比少的工序迅速且高精度地检测糖链异构体。另外,根据本发明的糖链异构体检测方法,可以进行被检试样中的目标糖链异构体的检测的自动化。

[0115] 具有癌症糖链抗原的糖蛋白为癌症检测中的重要目标分子。该病理诊断中所使用的抗癌糖链抗体大多仅识别糖链部分,不识别核心蛋白质,因此,存在具有该糖链的其它蛋白质也被检测出的疑似阳性的问题。但是,根据本发明,可以避免所述疑似阳性,提高癌症诊断的精度。

[0116] 2. 糖链异构体检测装置

[0117] 2-1. 概要

[0118] 本发明的第2实施方式为糖链异构体检测装置。本实施方式的检测装置为将所述第1实施方式记载的糖链异构体检测方法进行系统化的装置,其目的在于,迅速地检测被检试样中的待被检测的糖链异构体。另外,可以进行自动化,因此可以以低成本且高通量进行目标糖链异构体的检测或鉴别。

[0119] 2-2. 构成

[0120] 本实施方式的糖链异构体检测装置包含:(1)反应部、(2)检测部,及(3)比较判定部。以下,对各部中的构成进行具体说明。

[0121] (1) 反应部

[0122] “反应部”为执行所述第1实施方式的糖链异构体检测方法中的凝集素混合工序及抗体混合工序的部,以以下方式构成:将与待被检测的糖链异构体的糖链部分中的糖链非还原末端的全部或一部分区域结合的糖链非还原末端结合性凝集素、与所述待被检测的糖链异构体的核心蛋白质特异性地结合的抗体等及被检试样进行混合,产生所述糖链异构体和所述糖链非还原末端结合性凝集素或所述抗体等的结合反应。即,其目的在于,在反应部中,使糖链非还原末端结合性凝集素和所述抗体等竞争试样中可能含有的目标糖链异构体,形成免疫复合物或凝集素/糖链异构体复合物。

[0123] 反应部具有凝集素、抗体等及作为试样的混合及结合反应的场所的反应槽。对反应槽的形状没有特别限定,只要其可进行所述结合反应。可列举例如凹状容器(包含桶状、沟状、穴状或孔状容器)、管状容器(包含毛细管容器)、或面状容器(包含板状容器、球状容器的表面等)。反应槽的材质没有特别限定,只要是不阻碍或不抑制所述糖链非还原末端结合性凝集素、抗体等及被检试样的结合反应的材质、且不因糖链非还原末端结合性凝集素、抗体等或被检试样而变质的材质。可列举例如:玻璃、塑料、合成橡胶、陶瓷、金属、植物纤维(包含纸)或高分子凝胶(包含明胶、琼脂、高吸水性高分子)等。

[0124] 反应部可包括混合顺序控制装置。

[0125] “混合顺序控制装置”以控制反应槽内的糖链非还原末端结合性凝集素、抗体等与被检试样的混合顺序的方式构成。

[0126] 另外,反应部也可以包括凝集素贮藏装置、凝集素导入装置、抗体贮藏装置、抗体导入装置、试样贮藏装置、试样导入装置或搅拌装置。

[0127] “凝集素贮藏装置”以贮藏用于结合反应的凝集素的方式构成。

[0128] “凝集素导入装置”以根据需要将凝集素从所述凝集素贮藏装置导入至反应槽内的方式构成。

[0129] “抗体贮藏装置”以贮藏用于结合反应的抗体等的方式构成。

[0130] “抗体导入装置”以根据需要将抗体从所述抗体贮藏装置导入至反应槽内的方式构成。

[0131] 作为“凝集素贮藏装置”及“抗体等贮藏装置”的具体实例,可列举例如贮藏槽。作为“凝集素导入装置”及“抗体导入装置”的具体实例,可列举例如导入管及阀等。

[0132] 关于反应部中的糖链非还原末端结合性凝集素、抗体等与被检试样的混合方法等,原则上按照第1实施方式的糖链异构体检测方法记载的工序进行即可。含有反应部中所形成的免疫复合物的溶液被送至以下的检测部。

[0133] (2) 检测部

[0134] “检测部”为执行所述第1实施方式的糖链异构体检测方法中的复合物定量工序的部,以定量地检测所述反应部中产生的所述糖链异构体和所述抗体等的免疫复合物的方式构成。

[0135] 检测部具有定量免疫复合物量的复合物定量装置。复合物定量装置因检测部中进行的免疫复合物的定量方法而不同。例如,在将复合物量作为荧光强度和发光强度进行定量的情况下,可以包括照度计等;在作为浊度或吸光度进行定量的情况下,可以包括分光(吸光)光度计等;在对放射性进行定量的情况下,可以包括闪烁计数器等;在使用表面等离子体共振法进行定量的情况下,可以包括SPR测定器;另外,在使用水晶振子微平衡法进行定量的情况下,可以包括QCM测定器。检测部也可以包括两个以上的免疫复合物定量装置。在检测部,原则上,在复合物定量装置中将免疫复合物量作为数值信息(例如测定值)取得。

[0136] 在所述反应部中的反应槽中包括复合物定量装置的情况下,也可以使反应部和检测部一体化。

[0137] 原则上,检测部中的免疫复合物的定量方法按照第1实施方式的糖链异构体检测方法中的复合物定量工序记载的方法进行即可。检测部中得到的免疫复合物量的信息被输出至以下的比较判定部。

[0138] (3) 比较判定部

[0139] “比较判定部”为执行所述第1实施方式的糖链异构体检测方法中的判定工序的部,以以下方式构成:将所述检测部中得到的免疫复合物量与在未混合所述糖链非还原末端结合性凝集素时或混合对照蛋白质时的对照试样得到的对照免疫复合物量进行比较、基于该比较结果判定被检试样中的目标糖链异构体的有无。

[0140] 在此,在本实施方式的糖链异构体检测装置中,对照免疫复合物量可在与所述反应部及检测部分开配置的并与其具有相似构成的对照试样用反应部及对照试样用检测部中确定。或者,对照免疫复合物量的定量可以在所述反应部及检测部中在来自所述被检试样的免疫复合物量的定量前或定量后进行。后者的情况下,以来自被检试样的免疫复合物和来自对照试样的对照免疫复合物不混合以在各自的定量前后可以将反应部及检测部用水和缓冲剂等充分洗涤的方式构成即可。

[0141] 比较判定部具有比较装置、判定装置及显示装置。

[0142] “比较装置”将从所述检测部(或对照试样用检测部)取得的免疫复合物量的信息和对照免疫复合物量的信息进行比较,在两者存在差异的情况下,判断相对于对照免疫复合物量的免疫复合物量是否相对地少,更具体而言,例如判断是否在统计学上显著地少,将其结果作为比较结果信息输出至判定装置。根据需要,比较结果信息也可以输出至后述的显示装置。

[0143] “判定装置”基于从所述比较装置中取得的比较结果信息,判定被检试样中的目标糖链异构体的有无,将其判定结果信息输出至显示装置。比较装置及判定装置由例如计算机等硬件和分析用应用程序等适当的软件构成。

[0144] 在“显示装置”中,将从判定装置中取得的判定结果信息及根据需要从比较装置中取得的比较结果信息进行显示。显示装置由例如监视器构成。

[0145] 关于比较判定部中的免疫复合物量和对照免疫复合物量的比较方法及基于该比较结果的被检试样中的目标糖链异构体的有无的判定方法,按照第1实施方式的糖链异构体检测方法中的判定工序记载的方法进行即可。

[0146] 2-3. 效果

[0147] 根据本发明的糖链异构体检测装置,可以迅速且高精度地检测糖链异构体。另外,在糖蛋白的种类自身未知的情况下,也可以作为鉴别其的糖链异构体鉴别装置应用。

[0148] 根据本发明的糖链异构体检测装置,可以进行被检试样中的目标糖链异构体的自动检测。

[0149] 实施例

[0150] <实施例1:糖链非还原末端结合性凝集素导致的免疫复合物的形成抑制>

[0151] (目的)

[0152] 对与糖链非还原末端结合的凝集素导致的免疫复合物的形成抑制效果进行了验证。

[0153] (方法)

[0154] 由于ELISA中使用的捕获抗体的一部分具有唾液酸,因此,有时SSA凝集素结合而提高背景值。因此,将捕获抗体预先进行过碘酸处理,将唾液酸进行化学修饰(破坏)。具体而言,将兔抗人Tf抗体(Cappel#55045)用终浓度1mM的过碘酸钠在4℃下处理18小时。反应

后,加入终浓度1M的甘氨酸。将脱盐后的抗体作为过碘酸处理的抗体在板上进行固定化。具体而言,将抗体(3.2mg/mL)用0.05M碳酸氢钠(pH9.6)稀释至1:250,并以100 μ L/孔添加至ELISA用板(NUNC,445101)中,在4 $^{\circ}$ C下静置一夜。用在三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(TBS)中加入有0.05%吐温20的缓冲剂(TBST)洗涤3次,并用0.4%Block Ace(雪印乳业、UK-B80)-TBS在4 $^{\circ}$ C下封闭6小时以上。在0.5 μ L脊髓液中加入凝集素(终浓度186nM)或作为阴性对照的牛血清白蛋白(85040C、Sigma-Aldich)(终浓度186nM),在室温下反应1小时后,添加至进行了抗体包被的板上,在室温下使其反应1小时。用含有0.05%吐温20的TBS(TBST)洗涤3次后,使山羊抗人转铁蛋白-HRP缀合抗体(A80-128P、BETHYL Laboratories;以下简称为“山羊抗人Tf-HRP抗体”)(0.1 μ g/mL)反应用于检测。用TBST洗涤3次后,按照试剂盒的说明书制备作为显色试剂的TMB微孔过氧化物酶底物(TMB Microwell Peroxidase substrate)(50-76-00,KPL),在各孔中加入100 μ L,在室温下静置10分钟。用1N-HCl使反应停止后,用微盘式偏极荧光仪(Mode I 680、BIO RAD)测定450nm的吸光度。通过未添加SSA或添加BSA中的测定求出总Tf量。

[0155] 就添加的凝集素而言,在后述的Tf-2或血清Tf(T4382、Sigma-Aldich)中使用SSA凝集素(300177、生物化学工业),另外,在Tf-1中使用PVL凝集素(165-17591、和光纯药)、UDA凝集素(BA80051、COSMO BIO)、AAL凝集素(J101、J-oiI MILS)、或E4-PHA凝集素(J111、J-oiI MILS)。就SSA凝集素而言,单体的分子量为40kDa,但由于在水溶液中形成四聚体,因此将表观上分子量作为160kDa计算摩尔浓度。需要说明的是,“血清Tf”为存在于血清中的Tf。另外,由于存在于脊髓液中的Tf-2被认为来自血清,因此在以下的实验中,血清Tf及Tf-2均用作阳性对照。

[0156] 作为测定对象的糖链异构体,使用具有糖链的人脊髓液转铁蛋白。在人脊髓液转铁蛋白(Tf)中,存在具有与血清Tf相同的二天线的复合型糖链结构的图15A所示的Tf-2和图15B所示的Tf-1的2种糖链异构体。将各自的糖链异构体完全精制,用作标准品。Tf-2的糖链异构体在非还原末端具有唾液酸 α 2,6半乳糖结构(Sia α 2,6Gal-结构)。该Sia α 2,6Gal-结构成为SSA凝集素、SNA凝集素及TJA-I凝集素的结合表位。另一方面,Tf-1的糖链异构体与Tf-2的糖链异构体不同,如图15B所示,在非还原末端具有N-乙酰葡萄糖胺结构(GlcNAc-结构)。该GlcNAc-结构成为PVL凝集素及UDL凝集素的结合部位。进而,Tf-1在糖链基部具有平分GlcNAc-结构及核心岩藻糖-结构,分别成为E4-PHA凝集素及AAL凝集素的结合部位。

[0157] 因此,利用ELISA验证Tf-1、Tf-2及血清Tf对抗人Tf抗体的结合是否通过对各种凝集素的结合而被抑制。

[0158] (结果)

[0159] 图3显示了使用有Tf-1及血清Tf的实验结果。该图的纵轴表示将竞争凝集素不存在(BSA存在)下的免疫复合物的信号量设为100%时的免疫复合物形成的抑制率(信号的减少率)。如图3所示,作为糖链非还原末端结合性凝集素的SSA凝集素存在下的血清Tf免疫复合物的信号量抑制54%。另外,同样地,作为凝集素的PVL或UDA凝集素存在下的Tf-1免疫复合物的信号量也分别抑制9%及13%。其显示:与糖链非还原末端结合的凝集素与糖链结合的情况下,竞争的抗体与核心蛋白质(在此为Tf)的结合被抑制。另一方面,AAL及E4PHA凝集素的Tf-1免疫复合物的信号量几乎不被抑制。其显示:如现有说法那样,即使与糖链基部结合的凝集素与糖链结合,一般而言不抑制竞争的抗体与核心蛋白质的结合。

[0160] <实施例2:免疫复合物的形成抑制和凝集素结合的相关性>

[0161] (目的)

[0162] 验证了实施例1中所示的免疫复合物的形成抑制,即抗体与核心蛋白质的结合抑制取决于糖链非还原末端结合性凝集素与糖链异构体的糖链特异性的结合。

[0163] (方法)

[0164] 用唾液酸酶除去血清Tf中的非还原末端的Sia α 2,6Gal-结构中的唾液酸,制备具有末端半乳糖的去唾液酸Tf (asiaIo-Tf)。进而通过半乳糖苷酶处理除去露出的半乳糖,制备具有末端GlcNAc的去唾液酸-去半乳糖Tf (asiaIo-agaLacto-Tf)。SSA凝集素可以与非还原末端的唾液酸结合,但不能与去唾液酸Tf及去唾液酸-去半乳糖Tf结合。

[0165] <免疫复合物形成抑制>

[0166] 抗体结合抑制实验,即免疫复合物的形成抑制实验基本上按照实施例1记载的方法进行。作为阳性对照用试样,使用在糖链非还原末端具有Sia α 2,6Gal-结构的Tf-2及血清Tf,作为阴性对照用试样,使用在糖链非还原末端具有GlcNAc-结构的Tf-1。

[0167] <凝胶电泳分析>

[0168] 在凝胶电泳分析中,使用作为样品的血清Tf 0.0075 μ L/泳道、Tf-2 30ng/泳道、AsT 30ng/泳道,5-20%梯度凝胶(wako)。在Tris甘氨酸缓冲液中以300V、350mA、45分钟电泳后,用银染色法、蛋白质印迹法及凝集素作图法验证相对于转铁蛋白及去唾液酸转铁蛋白的反应性。在蛋白质印迹法中,使用山羊抗人转铁蛋白抗体(A80-128P, Bethy I Laboratories;以下简称为“抗人Tf抗体”;Tf DAKO(+):1:3000,120-2(+):1:500,596-3(+):1:500),另外,在凝集素作图中,使用SSA凝集素探针(SSA-bio,生物化学工业;1:1000)。

[0169] (结果)

[0170] 图4显示了结果。

[0171] 图4-1表示免疫复合物形成的抑制率。在具有可以结合SSA凝集素的糖链异构体的血清Tf及Tf-2中,分别观察到54%及48%的免疫复合物的形成抑制,再现了实施例1的结果。另一方面,除去具有 α 2,6唾液酸的Tf的糖链末端结构,在不能结合SSA凝集素的去唾液酸Tf及去唾液酸-去半乳糖Tf中,免疫复合物的形成抑制几乎被丧失。由该结果证实:由具有 α 2,6唾液酸的Tf证实的免疫复合物的形成抑制,基于SSA对存在于Tf糖链的非还原末端的Sia α 2,6Gal-结构的结合。

[0172] 图4-2为凝胶电泳分析的结果。图中,Ser表示血清中Tf,Tf表示精制Tf,而且,AsT表示去唾液酸Tf。用银染色(Silver)分别检测血清中Tf、精制Tf及去唾液酸Tf。去唾液酸Tf显示比血清中Tf和精制Tf稍微低的Rf值。另外,在利用抗人Tf抗体的蛋白质印迹法(Tf-Ab)中,血清中Tf、精制Tf及去唾液酸Tf显示与银染色大致相同的反应性。另一方面,在凝集素作图(SSA)中,血清Tf及Tf进行反应,但去唾液酸Tf完全不反应,唾液酸的除去被再次证实。

[0173] <实施例3:免疫复合物形成抑制的一般性验证>

[0174] (目的)

[0175] 验证了在使用与实施例1中使用的捕获抗体(抗人Tf抗体)不同的捕获抗体时,是否也观察到糖链非还原末端结合性凝集素导致的同样的免疫复合物形成抑制。

[0176] (方法)

[0177] 作为捕获抗体,取代实施例1中使用的Cappel社的抗人Tf抗体,使用DAKO社的兔抗人Tf抗体(目录号A0061)。另外,凝集素使用SSA,在试样中,使用血清Tf及Tf-2作为阳性试样,使用Tf-1作为阴性试样。具体的方法按照实施例1记载的方法。

[0178] (结果)

[0179] 图5显示了结果。在使用Cappel社及DAKO社的任一种抗人Tf抗体的情况下,同样在血清Tf及Tf-2中观察到免疫复合物的形成抑制。另一方面,在Tf-1中,与实施例2相同,没有观察到免疫复合物的形成抑制。该结果证实:基于在实施例1及2中所观察到的SSA凝集素的结合,观察到Tf和抗人Tf抗体导致的复合物形成的抑制是一般性的,并不依赖于使用的抗体的批量。

[0180] <实施例4:凝集素的浓度和免疫复合物的形成抑制效果的关系>

[0181] (目的)

[0182] 验证了免疫复合物的形成抑制效果对凝集素浓度依赖性。

[0183] (方法)

[0184] 分别在血清Tf中加入以在6.2pM-186nM的范围内各种浓度制备的SSA(300177、生物化学工业)之后,测定与抗人Tf抗体的免疫复合物的形成抑制率。具体的方法按照实施例1记载的方法。

[0185] (结果)

[0186] 图6显示了结果。纵轴表示免疫复合物的形成抑制率(信号的减少率),与实施例1相同,将取代SSA用作对照并以与其相同的浓度添加的BSA的存在下的免疫复合物的信号量设为100%。在SSA的浓度为0.2-6.2nM的范围内,抑制率呈浓度依赖性增大。以62nM以上的高浓度,抑制率大致为恒定(饱和)状态。另一方面,在BSA的添加中,在6.2pM-186nM的全部浓度范围内完全没有观察到抑制效果。由以上的结果,将SSA添加的标准条件设为186nM。

[0187] 为了求出上述实验条件下的最大抑制率(Inhibition max.%),制作图7所示的双重倒数作图法。如图7所示,与X轴截距的交点表示 $-1/\text{最大抑制率}(-1/\text{Inhibition max.}\%)$,因此算出最大抑制率为约60%。

[0188] 图8显示在上述实验条件下将血清Tf设为标准品时的标准曲线。标准曲线至少在3-50ng/mL的范围内显示为线性。

[0189] <实施例5:现有的检测法(蛋白质印迹法)和本发明的检测方法中的Tf指标值的相关性>

[0190] (目的)

[0191] 用现有的检测方法和本发明的检测方法的两者测定未精制的脊髓液中转铁蛋白异构体,验证了两者中得到的Tf指标值(Tf-2/Tf-1)的相关性。

[0192] (方法)

[0193] 在现有方法中,如日本特开2010-121980记载的那样,利用蛋白质印迹法检测Tf-1及Tf-2,计算出各自的浓度。其结果,在iNPH中,显示Tf-1浓度的降低。为了内部标准性地利用Tf-2,将Tf-1相对于Tf-2的比率($[\text{Tf-2}]/[\text{Tf-1}]$ 率)作为Tf指标值,用于诊断标志物。

[0194] 另一方面,在本发明中,用实施例1的方法,使用图8的标准曲线测定未精制的脊髓液中Tf-2的浓度。在血清Tf的添加回收实验中,可得到90%以上的回收率,因此,显示几乎没有受到脊髓液中的杂质物质的影响。另外,关于总Tf量(即Tf-1和Tf-2之和),也可以利用

通常的双抗夹心ELISA法算出。因此,通过从[总Tf量(totaI Tf)]中减去[Tf-2]而算出[Tf-1],所以,可以求出Tf指标值。因此,利用现有的检测法和本发明的检测方法的各自的方法求出相同个体的Tf指标值,对其相关性进行了研究。需要说明的是,在两种测定法中,均将未精制的脊髓液用作样品。

[0195] (结果)

[0196] 图9显示了结果。横轴表示利用本发明的检测方法的Tf指标值,纵轴表示利用现有的蛋白质印迹法的Tf指标值。如该图所示,使用有未精制脊髓液试样的两者的Tf指标值显示良好的相关($R^2=0.934$)。由该结果显示:本发明的检测方法成为取代现有的蛋白质印迹法的高通量的糖链异构体检测法。

[0197] <实施例6:免疫复合物形成后的凝集素的抑制效果>

[0198] (目的)

[0199] 在上述实施例1-5中,将糖链非还原末端结合性凝集素和糖蛋白预先进行混合,预先形成凝集素/糖链异构体复合物之后,与ELISA板上的抗体反应,验证了抑制免疫复合物的形成。因此,在本实施例中,在免疫复合物形成后加入糖链非还原末端结合性凝集素时,也同样地验证是否产生免疫复合物的形成抑制。

[0200] (方法)

[0201] 在试样中加入作为凝集素(终浓度186nM)或阴性对照的BSA(85040C,Sigma)(终浓度186nM),在室温下反应1小时后,添加至与实施例1同样地进行了抗体包被的板上(血清Tf+SSA→板上的抗原抗体反应)。另一方面,在改变SSA的添加顺序的实验中,在SSA不存在下将血清Tf添加于板上,在室温下反应1小时(血清Tf→板上的抗原抗体反应)。用TBST洗涤3次后,添加SSA凝集素(终浓度186nM),在室温下反应1小时。将各自的板用TBST洗涤3次后,使山羊抗人Tf-HRP缀合抗体(A80-128P,BETHYL Laboratories)(0.1 μ g/ml)反应用于检测。用TBST洗涤3次后,按照试剂盒的说明书制备作为显色试剂的TMB微孔过氧化物酶底物(50-76-00,KPL),添加100 μ L至各孔中,在室温下静置10分钟。用1N-HCl使反应停止之后,用微盘式偏极荧光仪(ModeI 680,BIO RAD)测定450nm的吸光度。

[0202] (结果)

[0203] 图10显示了结果。由该结果显示:在抗原抗体反应后添加SSA凝集素的方法的抑制率(41%)与在预先使SSA凝集素和血清Tf结合后与抗体反应的方法的抑制率(54%)相比,显示稍微低的不限于凝集素的添加顺序的检测。即,证实了糖链非还原末端结合性凝集素导致的免疫复合物的形成抑制的产生与糖链非还原末端结合性凝集素及抗体的糖蛋白的混合顺序没有关系。

[0204] <实施例7:使用有免疫沉淀法的本发明的糖链异构体检测方法的验证>

[0205] (目的)

[0206] 在上述实施例1-6,利用ELISA法检测了糖链非还原末端结合性凝集素导致的免疫复合物的形成抑制,进行实验以确认免疫沉淀法是否也可以检测出同样的抑制。

[0207] (方法)

[0208] 将ProteinG-Sepharose珠(GE,17-0618-02)利用0.1%BSA+TBST在室温下封闭1小时。接着,加入利用与实施例1同样的方法进行了过碘酸处理的抗人Tf抗体溶液(Cappel#55045,18.6 μ g/ml)。搅拌1小时以上之后,用TBST洗涤,除去珠未结合的抗体,制备抗体珠。

接着,在1 μ g的血清Tf中加入300 μ g的SSA或同量的BSA,在室温下反应1小时。反应后,加入上述抗体珠(50%悬浮液)10 μ L,在4 $^{\circ}$ C下反应2小时(总体积500 μ L)。反应后,通过离心分离珠和上清液。在该上清液中含有未吸附的Tf。将从各自中回收的上清液8 μ L与2 μ L的Laemmli样品缓冲液(5倍浓缩)混合之后,使用7.5%聚丙烯酰胺凝胶进行SDS/PAGE。以20mA的恒定电流电泳70分钟,将所分离的蛋白质在硝酸纤维素膜上以350mA的恒定电流电转45分钟。将电转后的硝酸纤维素膜用3%脱脂乳-0.1%吐温20-PBS(磷酸盐缓冲生理盐水)封闭1小时以上。使在3%脱脂乳-0.1%吐温20-PBS中以1:2000稀释的山羊抗人Tf抗体(BETHYL Laboratories,A80-128A)(0.5 μ g/mL)和硝酸纤维素膜反应2小时。用0.1%吐温20-PBS将上述硝酸纤维素膜每10分钟洗涤3次之后,与在3%脱脂乳-0.1%吐温20-PBS中以1:2000稀释的抗山羊IgG-HRP缀合抗体(Jackson,705-035-147)(0.5 μ g/mL)一起反应1小时。用洗涤液将硝酸纤维素膜再次每10分钟洗涤3次,使用化学发光底物(PierceSuperSignal West DuraExtended Duration Substrate)用CS分析仪(Cool Saver:ATTO)对Tf条带进行检测。

[0209] (结果)

[0210] 图11表示结果。没有添加SSA或BSA的情况下,许多血清Tf与抗体珠结合而沉淀,因此,从上清液中几乎没有检测出Tf(泳道1)。但是,在该反应体系中混合有300 μ g的SSA的情况下,从上清液中检测出Tf(泳道2)。另一方面,在添加有BSA的情况下,从上清液中没有检测出Tf(泳道3)。由该结果证实:即使是使用有抗体珠的免疫沉淀法,也可抑制糖链非还原末端结合性凝集素导致的免疫复合物的形成。

[0211] <实施例8:针对 α 2巨球蛋白测定的SSA凝集素的抑制效果>

[0212] (目的)

[0213] 在实施例1-7中,核心蛋白质全部为Tf。因此,验证了即使为具有其它核心蛋白质的糖链异构体,也通过糖链非还原末端结合性凝集素的存在而产生免疫复合物的形成抑制。

[0214] (方法)

[0215] 作为被检试样,使用作为血清糖蛋白的血清 α 2巨球蛋白。血清 α 2巨球蛋白(Siaa2M)与血清Tf相同,在非还原末端具有含有作为SSA的结合部位的Siaa2,6Gal-结构的糖链。因此,使用血清 α 2巨球蛋白、将血清 α 2巨球蛋白进行了唾液酸酶处理的去唾液酸- α 2巨球蛋白、进而用半乳糖苷酶进行了处理的去唾液酸-去半乳糖- α 2巨球蛋白,利用与实施例1及2相同的双抗夹心ELISA测定法,对利用SSA凝集素的免疫复合物的形成抑制效果进行了探讨。测定方法按照实施例1及2记载的方法进行。但是,作为目标糖链异构体,使用10ng精制的人 α 2巨球蛋白(Sigma,#M6159);作为捕获抗体,使用将山羊抗人 α 2巨球蛋白抗体(Cappel,#55113)进行了过碘酸处理的物质;而且,检测抗体使用山羊抗-人 α 2巨球蛋白抗体(GeneTex,#GTX27339)。

[0216] (结果)

[0217] 图12显示了结果。将添加BSA时的ELISA信号设为100%的情况下,通过SSA的添加,抑制约65%的ELISA信号。另一方面,在去唾液酸- α 2巨球蛋白及去唾液酸-去半乳糖- α 2巨球蛋白的情况下,完全没有观察到SSA导致的ELISA信号的抑制。这些结果与实施例1及2的结果相同。由以上表明:非还原末端结合性凝集素导致的免疫复合物的形成抑制为在核心蛋白质为Tf以外的情况下也产生的普遍现象。

[0218] <实施例9:N-聚糖糖链异构体的免疫组织化学(1)>

[0219] (目的)

[0220] 通过免疫组织化学验证本发明的糖链异构体的检测方法以确认其对无病理的组织切片上的N-聚糖糖链异构体的适用性。

[0221] (方法)

[0222] 在病理解剖病例中,从无病理的进行了福尔马林固定的肝脏中采集一部分。将肝脏样品进行石蜡包埋,制备厚度5 μ m的连续切片。组织切片在氨基硅烷包被的载玻片(松波硝子社)上进行伸展、贴附。接着,将组织切片用二甲苯进行脱石蜡,接着用乙醇清洗二甲苯。用磷酸缓冲液(100mM磷酸盐缓冲生理盐水;PBS)洗涤之后,在0.3%过氧化氢-甲醇溶液中静置20分钟。用PBS洗涤后,在柠檬酸缓冲液中进行10分钟微波处理。进行组织中的抗原的活化之后,在室温下进行冷却。将上述组织切片用PBS洗涤后,作为抗Tf抗体的竞争者,将预先制备好的40 μ g/mL的SSA凝集素溶液以可以充分覆盖组织的量滴加在组织上。凝集素的对照使用BSA溶液(40 μ g/mL)。将处理后的组织切片放置于湿箱内,在4 $^{\circ}$ C下静置一夜。

[0223] 接着,将作为捕获抗体(一抗)的抗人Tf兔IgG抗体(DAKO)按照实施例1记载的方法进行过碘酸处理之后,针对滴加有凝集素溶液的上述组织切片,以稀释倍率1:1000滴加,在4 $^{\circ}$ C下反应一夜。在组织切片上进行捕获抗体的结合的区域利用作为检测抗体(二抗)的生物素标记的抗兔IgG抗体(HistofineSAB-PO(R),NICHIREI)和简单染色-DAB溶液进行染色并可视化。将染色后的组织切片用流水洗涤,用2%甲基绿水溶液进行核染色。组织切片用乙醇脱水,用二甲苯透明化之后,滴加密封剂(bioIeit,应研商事),固封在盖玻片下,用显微镜(DZ9000、keyence社)进行观察。

[0224] 进而确认:免疫组织化学中的凝集素导致的免疫复合物的形成抑制依赖于唾液酸。因此,对组织切片进行唾液酸酶处理。具体的处理条件按照实施例2。

[0225] (结果)

[0226] 图13显示了结果。

[0227] 图13-1为凝集素导致的免疫复合物的形成抑制结果。图13-1A表示添加BSA时的组织切片上的血清Tf的分布,另外,图13-1B表示添加SSA时的组织切片上的血清Tf的分布。由图13-1A及B表明:血清Tf从肝细胞中分泌。在图13-1B的组织切片中,与作为对照的图13-1A的组织切片进行比较,观察到免疫染色的明显的降低。该结果显示:SSA抑制存在于组织中的血清Tf(SSA结合性Tf)与捕获抗体引起的免疫复合物的形成。即,证实了本发明的N-聚糖糖链异构体检测方法在免疫组织化学中也可以适用。

[0228] 图13-2为进行了唾液酸酶处理的切片的SSA凝集素染色及免疫组织化学的结果。图13-2C表示唾液酸酶处理前的肝组织切片,另外,图13-2D、E及F表示唾液酸酶处理后的肝组织切片。图13-2C和D以及图13-2E和F分别为对应的肝组织切片,图13-2C及D为SSA凝集素染色的结果,另外,图13-2E及F为抗人Tf抗体染色的结果。在图13-2C及D中,在唾液酸酶处理前的图13-2C中,检测出肝组织切片上的 α 2,6唾液酸残基,但在唾液酸酶处理后的图13-2D中, α 2,6唾液酸残基的信号几乎消失,确认肝组织切片上的唾液酸被除去。另一方面,在图13-2E及F中,通过唾液酸酶处理而除去 α 2,6唾液酸残基时,即使添加SSA(F),也与BSA添加(E)时相同,观察到Tf强的信号,没有观察到凝集素导致的抑制效果。其表明:通过唾液酸酶处理而除去Tf的糖链末端的唾液酸,由此,利用SSA凝集素的免疫复合物的形成抑制被解

除。即表明：在免疫组织化学中，对于利用SSA凝集素的抗Tf抗体的免疫复合物的形成抑制， α 2,6唾液酸残基对SSA凝集素的结合为必须的。

[0229] <实施例10:O-聚糖糖链异构体的免疫组织化学>

[0230] (目的)

[0231] 通过免疫组织化学验证：本发明的糖链异构体的检测方法在无病理的组织切片上的O-聚糖糖链异构体中也可以适用。

[0232] (方法)

[0233] 从在病理解剖病例中无病理的进行福尔马林固定的大肠中采集一部分。大肠切片的制备与实施例9同样地进行。组织切片在氨基硅烷包被的载玻片(松波硝子社)上进行伸展、贴附,在本实施例中,也制备一组2张镜面切片(将连续切片的最初的一张里外反转而贴附于载玻片上,将下一个切片直接贴附而成的切片)。将上述组织切片用PBS洗涤后,将预先制备的40 μ g/mL的WFA凝集素溶液以能够充分覆盖组织的量滴加在组织上。凝集素的对照使用BSA溶液(40 μ g/mL)。将处理后的组织切片放置于湿箱内,在4 $^{\circ}$ C下静置一夜。

[0234] 接着,针对滴加有凝集素溶液的上述组织切片以稀释倍率1:1000滴加作为捕获抗体(一抗)的抗sialylMUC1抗体(Takeuchi,H.et al.,Journal of Immunological Methods.2002,270:199-209),在4 $^{\circ}$ C下反应一夜。在组织切片上进行了捕获抗体的结合的区域利用作为检测抗体(二抗)的生物素标记的抗小鼠IgG抗体(HistofineSAB-PO(R),NICHIREI)和简单染色-DAB溶液染色并可视化。将染色后的组织切片用流水洗涤,用2%甲基绿水溶液进行核染色。组织切片用乙醇脱水,用二甲苯透明化之后,滴加密封剂(bioIeit,应研商事),固封于盖玻片下,用显微镜(DZ9000、keyence社)进行观察。

[0235] (结果)

[0236] 图14表示结果。唾液酸化MUC1从一部分的大肠杯状细胞(goblet cell)被分泌。图14A表示使BSA作用时的组织切片上的抗唾液酸化MUC1抗体的信号,B表示使WFA作用时的组织切片上的抗唾液酸化MUC1抗体的信号。在图14B的组织切片中,与作为对照的图14A的组织切片进行比较,观察到染色信号的降低。该结果表明:WFA抑制存在于组织中的唾液酸化MUC1(WFA结合性唾液酸化MUC1)与抗唾液酸化MUC1抗体之间的免疫复合物的形成。即,证实了本发明的O-聚糖糖链异构体检测方法在免疫组织化学中也可以适用。

[0237] <实施例11:N-聚糖糖链异构体的免疫组织化学(2)>

[0238] (目的)

[0239] 通过免疫组织化学验证了本发明的糖链异构体的检测方法也可以适用于观察到病理的癌组织切片上的N-聚糖糖链异构体。

[0240] (方法)

[0241] 在抗体中使用针对癌胚抗原(Carcinoembryonic Antigen:以下简称为“CEA”)的抗体(抗CEA抗体)。CEA具有结合有25-28条N-聚糖的多种糖链结构。例如,已知有在大肠癌的肝转移病灶中表达的CEA进行了 α 2,6-唾液酸化(Yamashita et al.,1995,Cancer Res 55:1675-1679)。另一方面,由于作为CEA的正常配对物(normal counterpart)的NFA-2进行了 α 2,3-唾液酸化,因此暗示 α 2,6-唾液酸化CEA的表达与大肠癌的转移相关。因此,通过在原发病灶中检测 α 2,6-唾液酸化CEA,可以预测包括肝转移的远端转移。另外,作为转移标志物,血清中的 α 2,6-唾液酸化CEA也是有用的。因此, α 2,6-唾液酸化CEA是用于具有远端转移

的再发癌的有用的标志物,以确定转移的有无或适于转移状况的治疗方案。另外,CEA也用于癌症的筛选,但存在在吸烟者的一部分中显示高值等疑似阳性例,因此导致正确诊断率的降低。通过 $\alpha 2,6$ -唾液酸化CEA的检测,可以进行癌症特异性高的筛选。

[0242] 在观察到血清CEA值的上升的大肠癌的手术病例中,将切除的大肠癌进行福尔马林固定,将其一部分进行石蜡包埋,用与实施例9同样的方法进行切片制备及前处理。凝集素导致的免疫复合物的形成抑制的验证与实施例9相同,使用SSA溶液(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。另外,凝集素的对照使用BSA溶液(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。SSA识别 $\alpha 2,6$ -唾液酸表位。

[0243] 将抗CEA抗体(No.10094:IBL)以稀释倍率1:1000滴加于切片上,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应一夜。将生物素标记的抗小鼠IgG抗体(Histofine通用试剂盒:NICHIREI)用作二抗并染色,将抗CEA抗体的免疫反应可视化。将染色后的组织切片用流水洗涤,用苏木精进行核染色(核被染色成淡紫色的椭圆形)。固封、观察与实施例9同样地进行。

[0244] (结果)

[0245] 图16显示了大肠癌的浸润性病灶中的CEA免疫染色的结果。图16A表示进行了BSA处理的切片,另外,图16B表示进行了SSA处理的切片。

[0246] 浸润性病灶的细胞其分化程度比较高,保持腺管结构。在图16A及B的两者中,特别是在细胞的顶端侧(顶点侧),CEA的信号被检测出(箭头)。但是,在添加有SSA的图16B中,与添加有对照的BSA的图16A进行比较,观察到CEA免疫染色的降低。即,许多顶端侧的CEA具有 $\alpha 2,6$ -唾液酸,认为受到SSA导致的染色抑制。

[0247] 进而,在图16A中观察到淡紫色的椭圆形的核的周围被浓染的细胞(箭头)。该染色图像被认为是细胞内的CEA信号。在SSA添加条件下的图16B中,虽然为连续切片,但是浓染细胞的数目少,即使在存在的情况下,细胞的染色性也低。因此,用图16A进行了浓染的细胞为具有 $\alpha 2,6$ -唾液酸化CEA的细胞,显示其信号在SSA存在下(图16B)减弱。由该结果可知,大肠癌的浸润性病灶中的 $\alpha 2,6$ -唾液酸化CEA的存在因本发明而被可视化。

[0248] 将本说明书中引用的全部的刊行物、专利及专利申请直接作为参考被引入本说明书中。

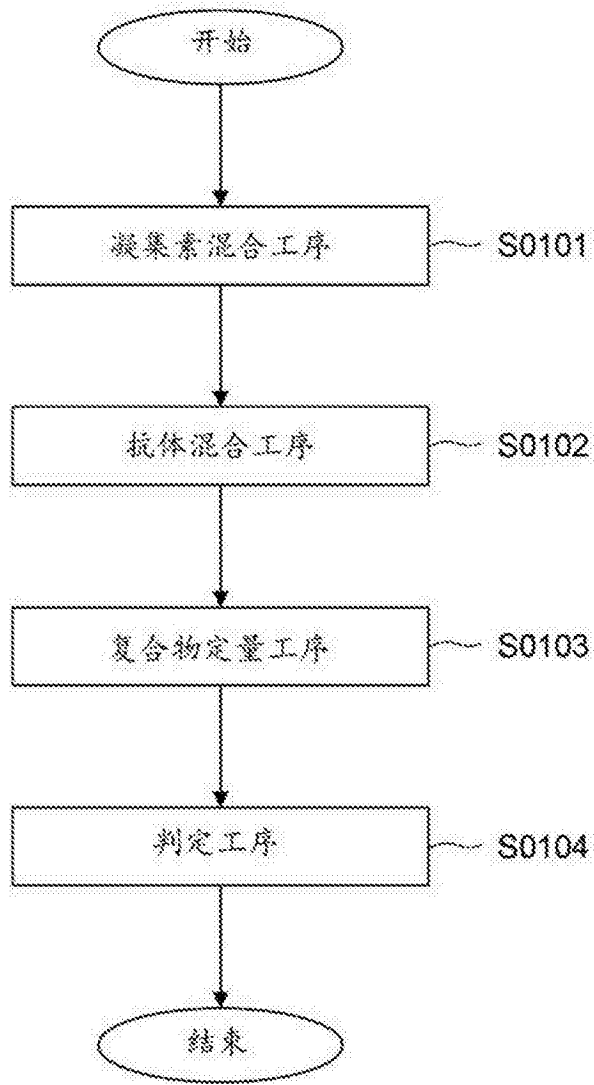
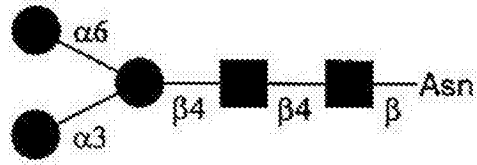


图1

A



B

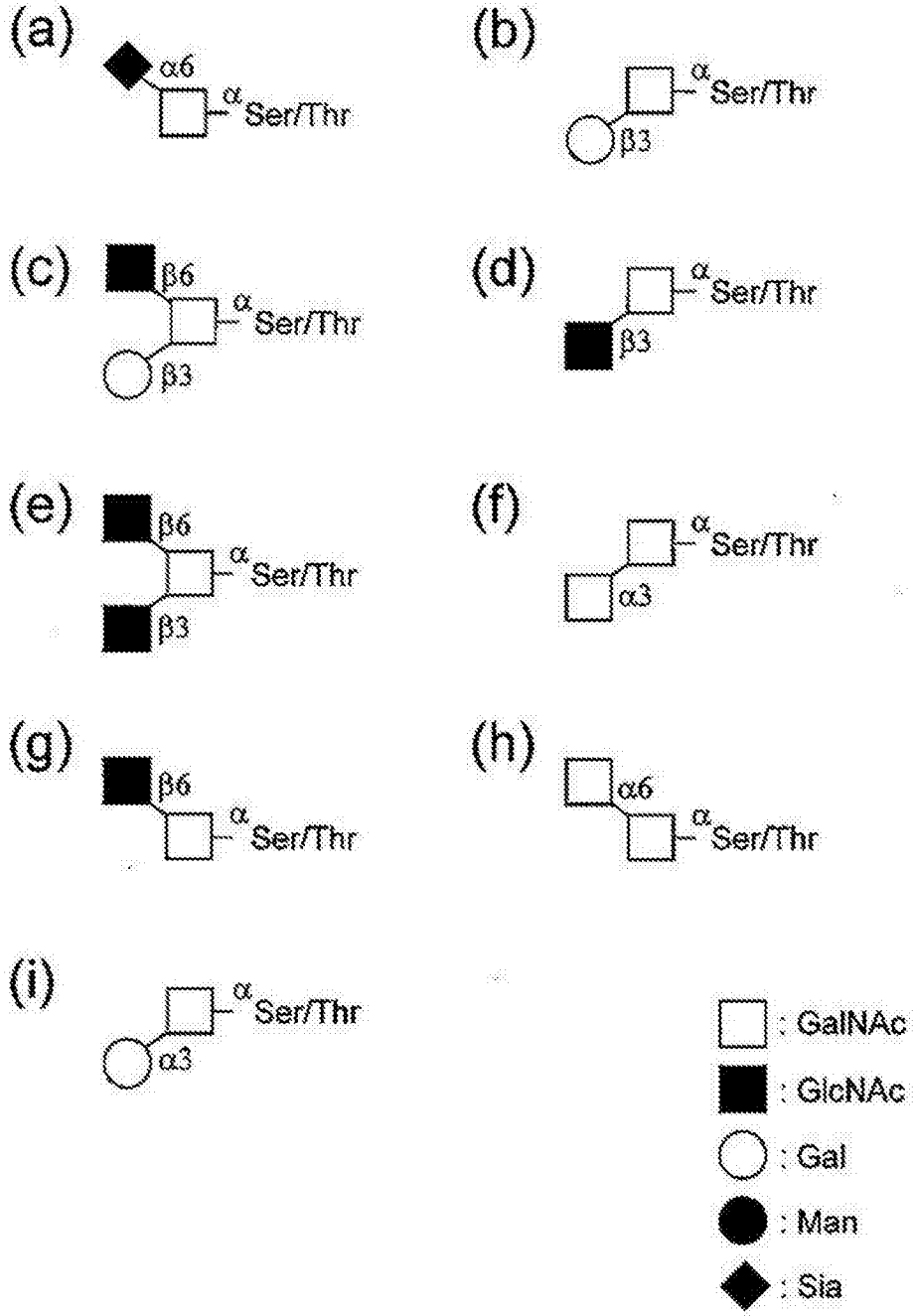


图2

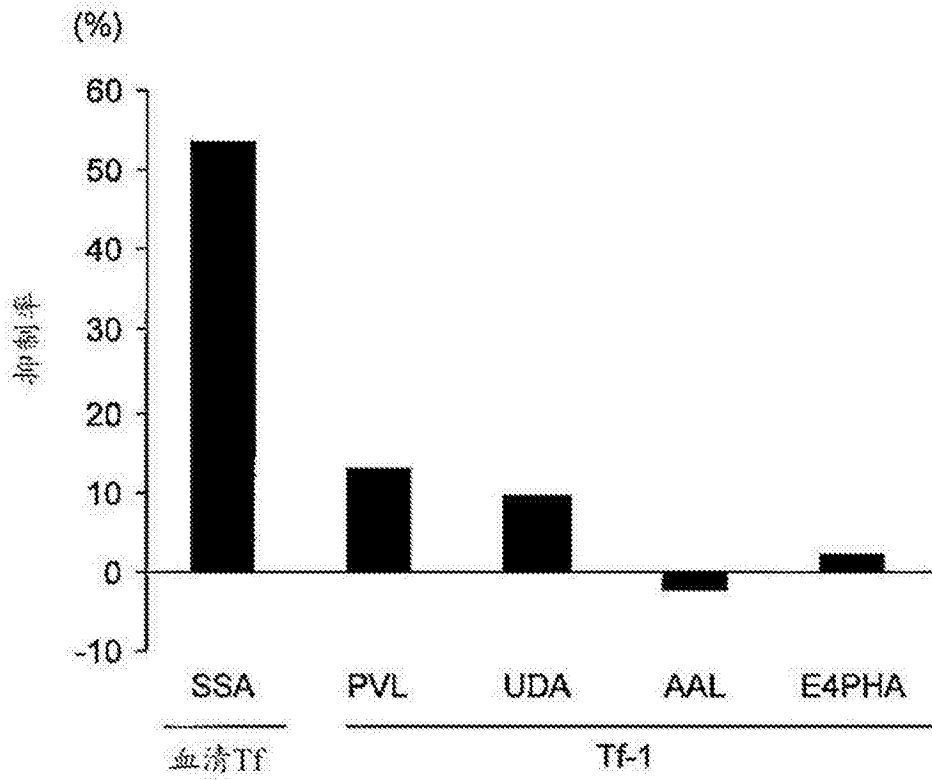


图3

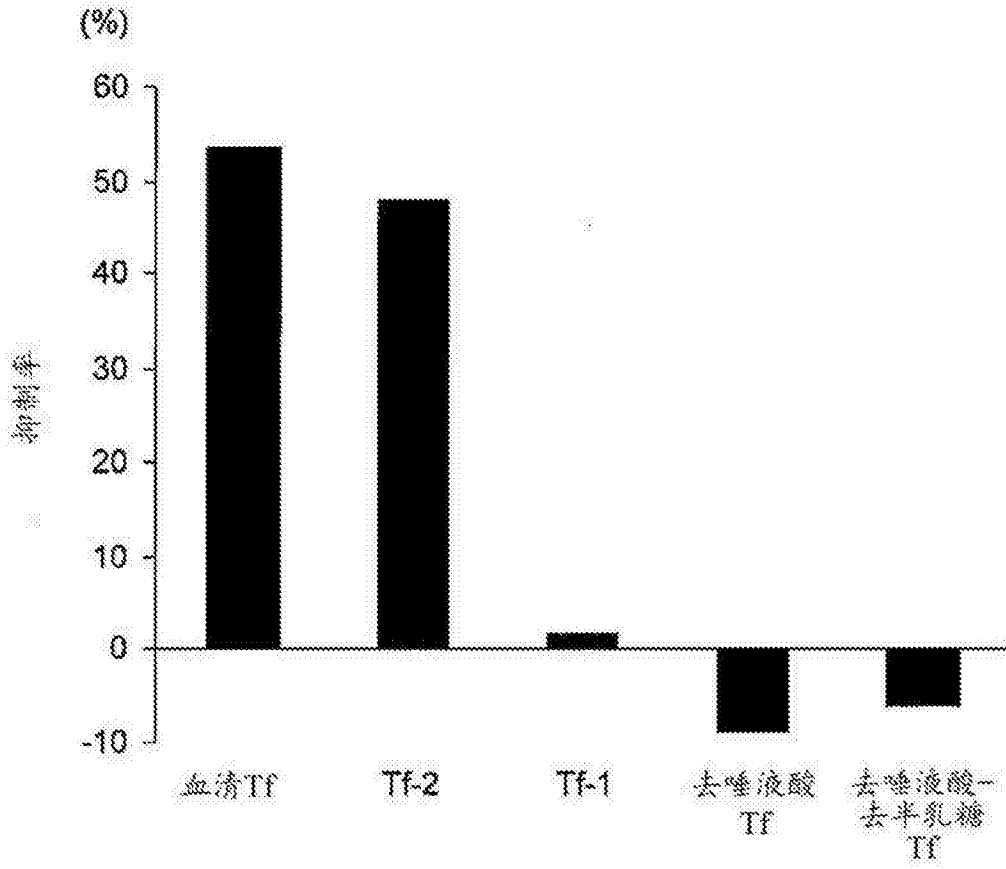


图4-1

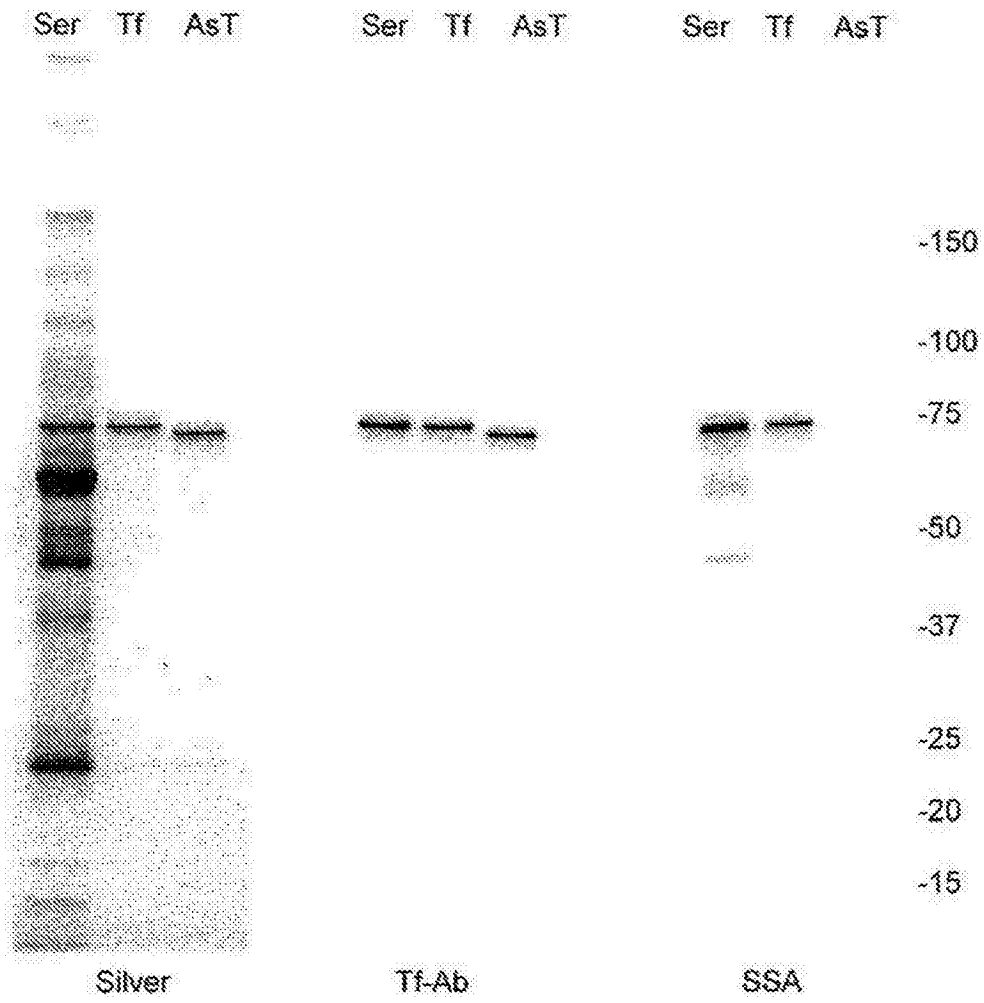


图4-2

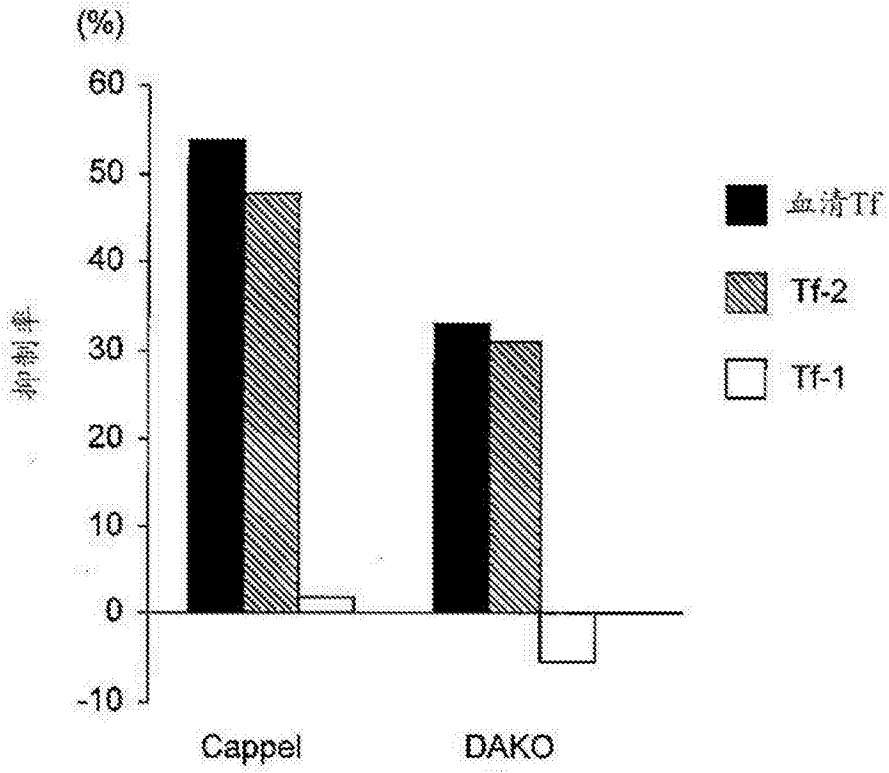


图5

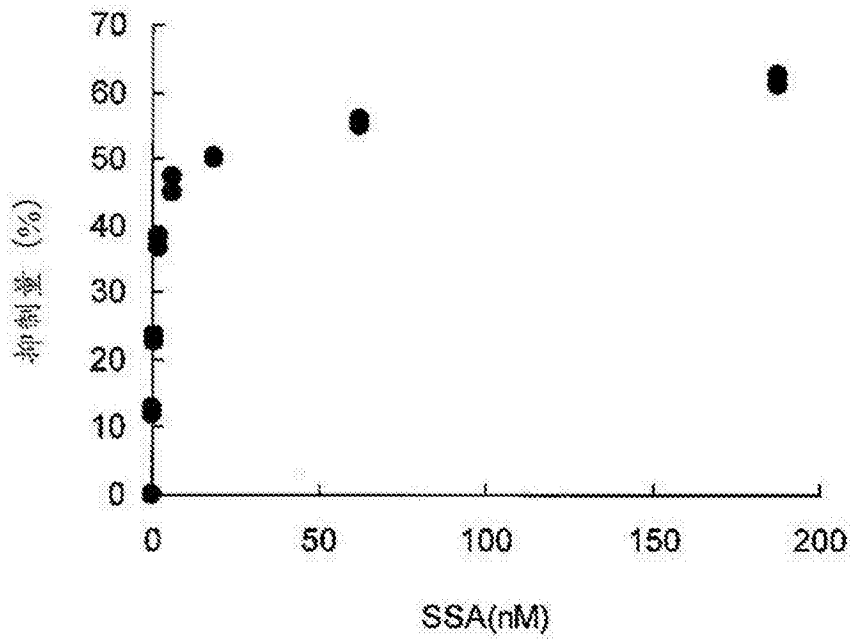


图6

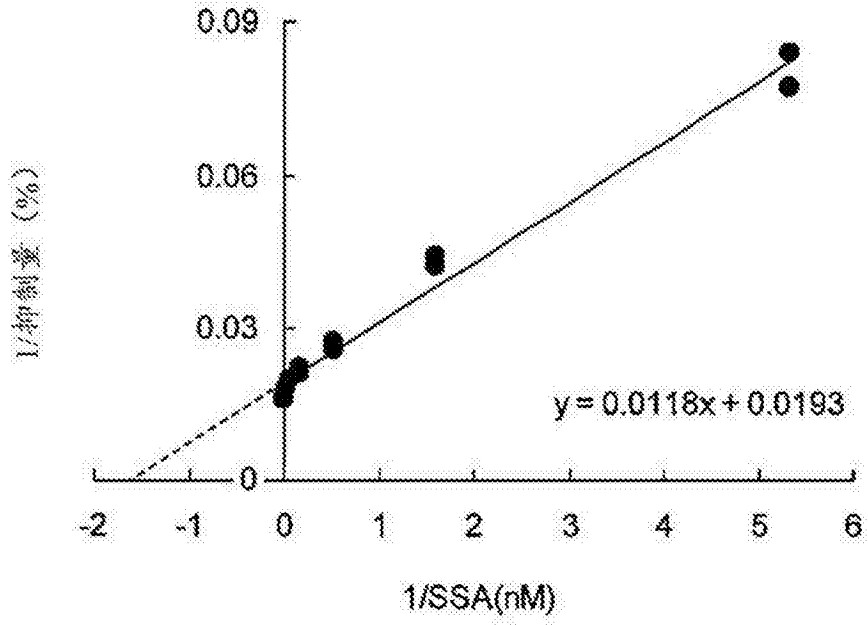


图7

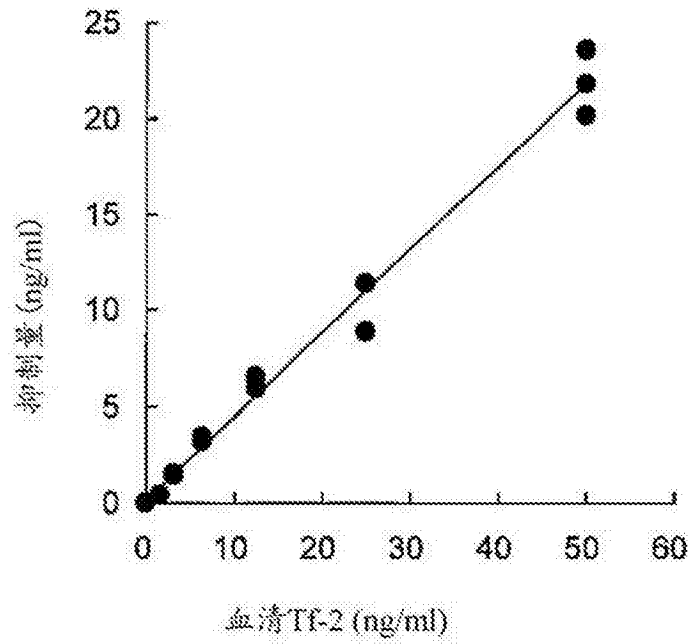


图8

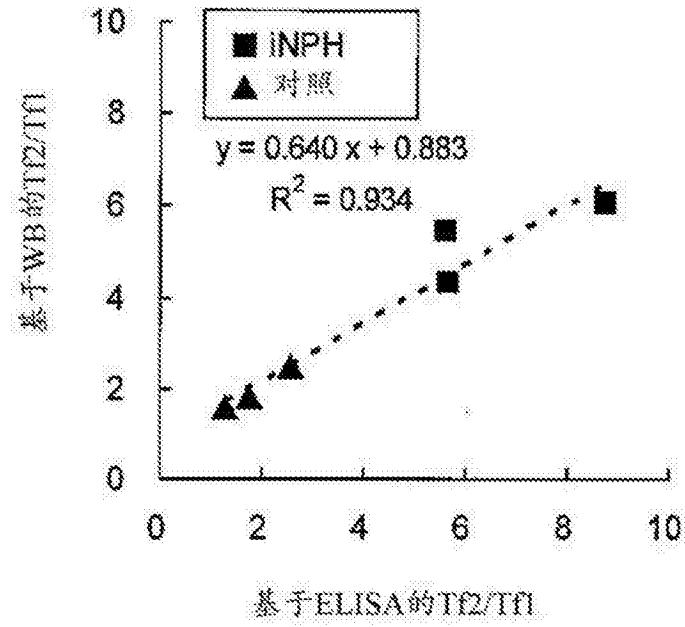


图9

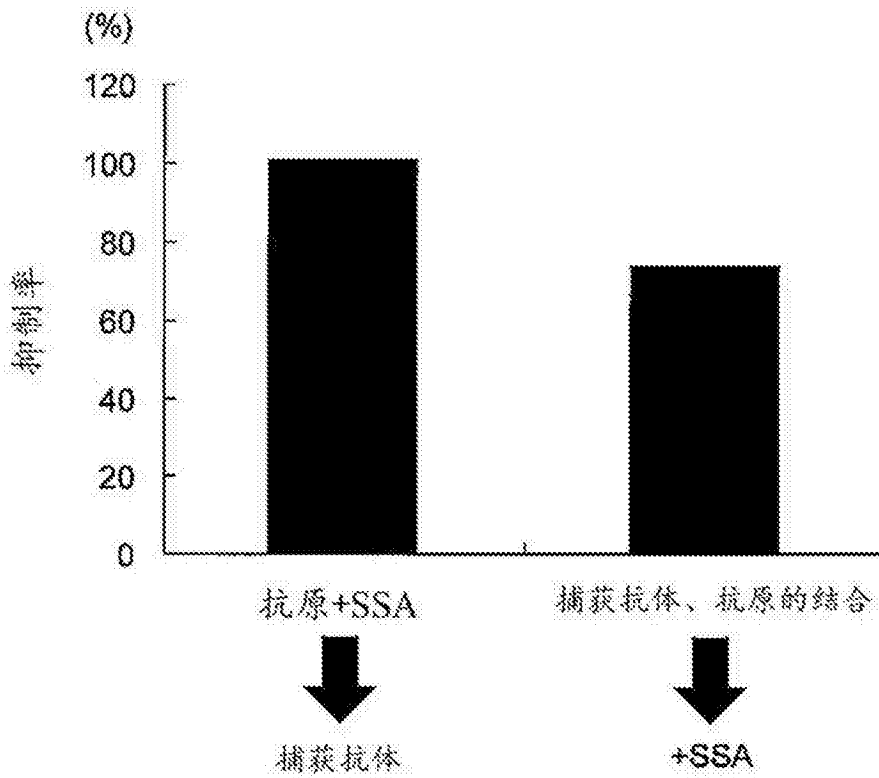


图10

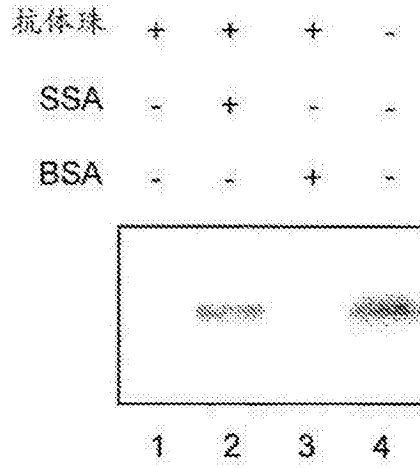


图11

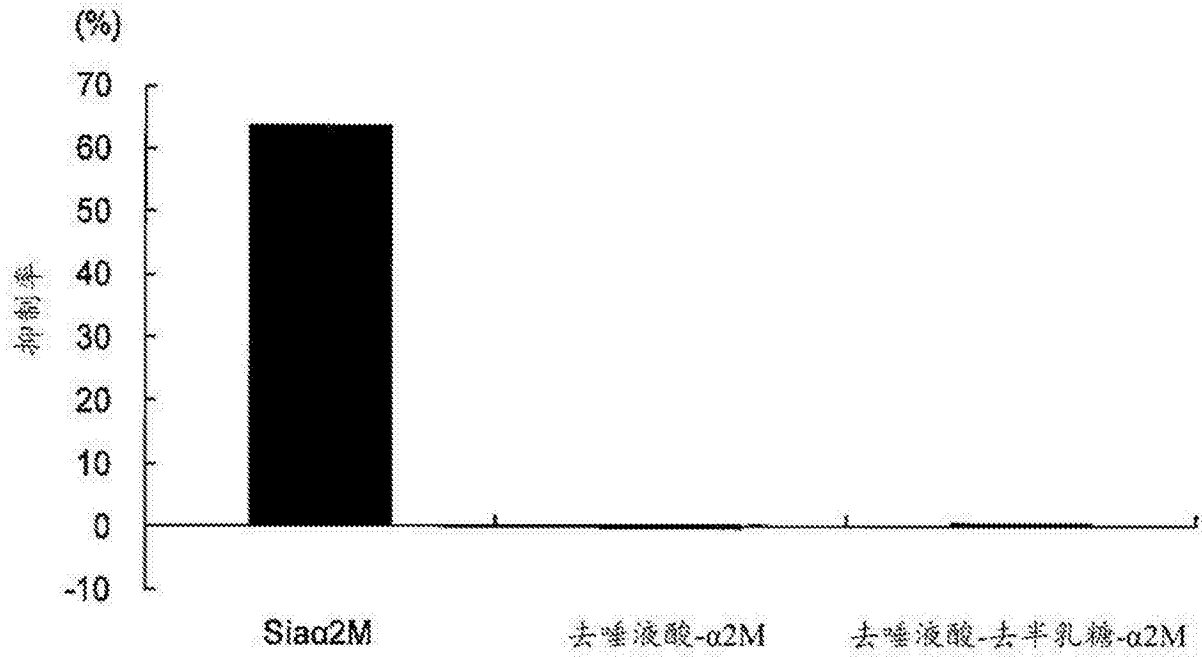


图12

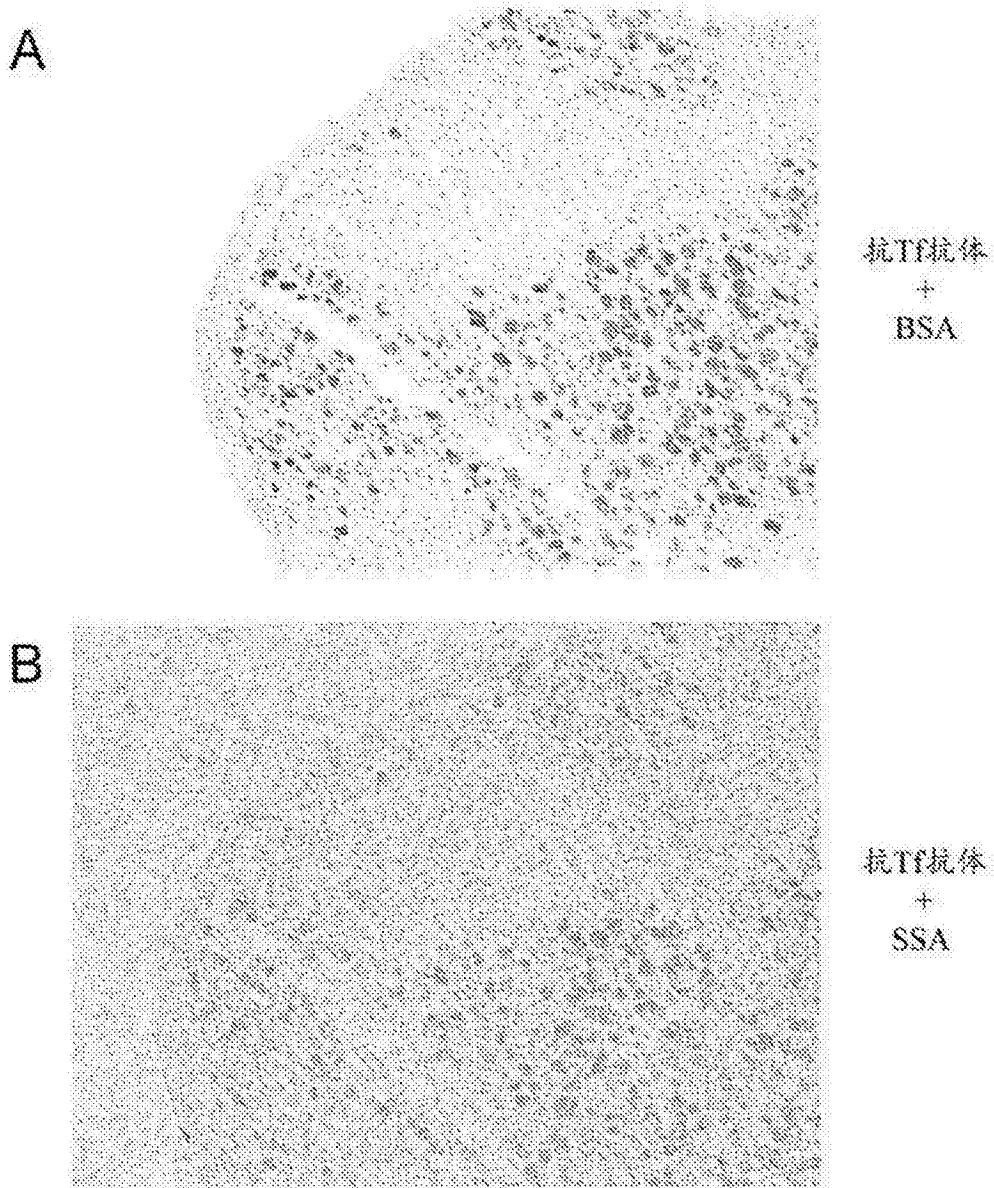


图13-1

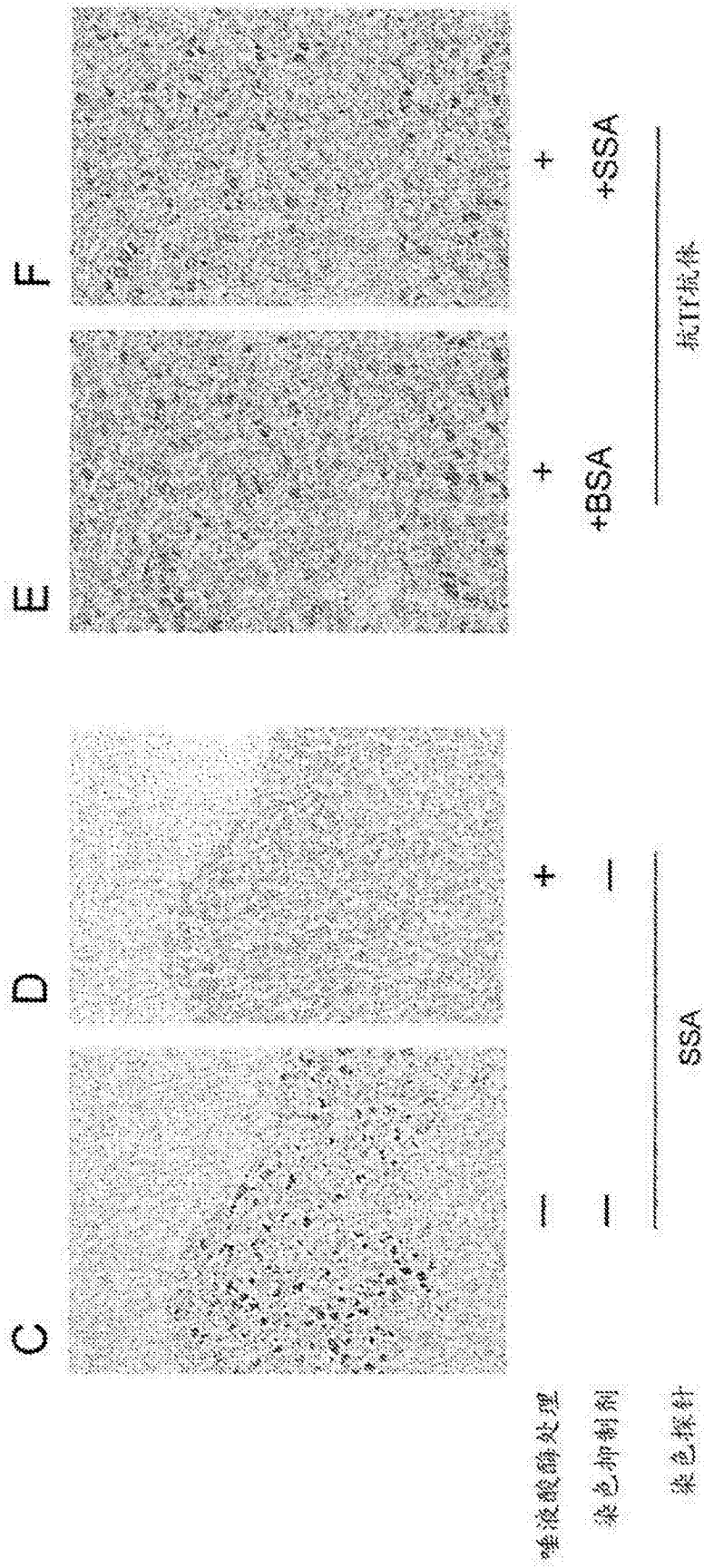


图13-2

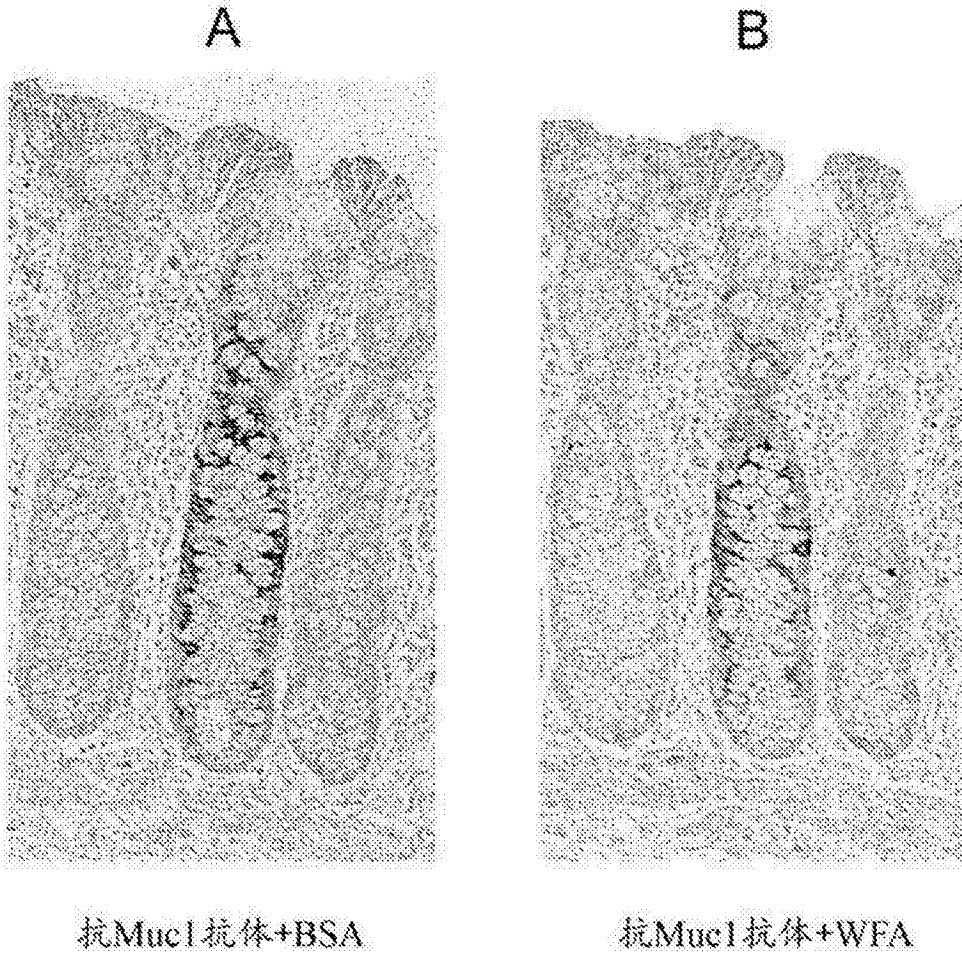


图14

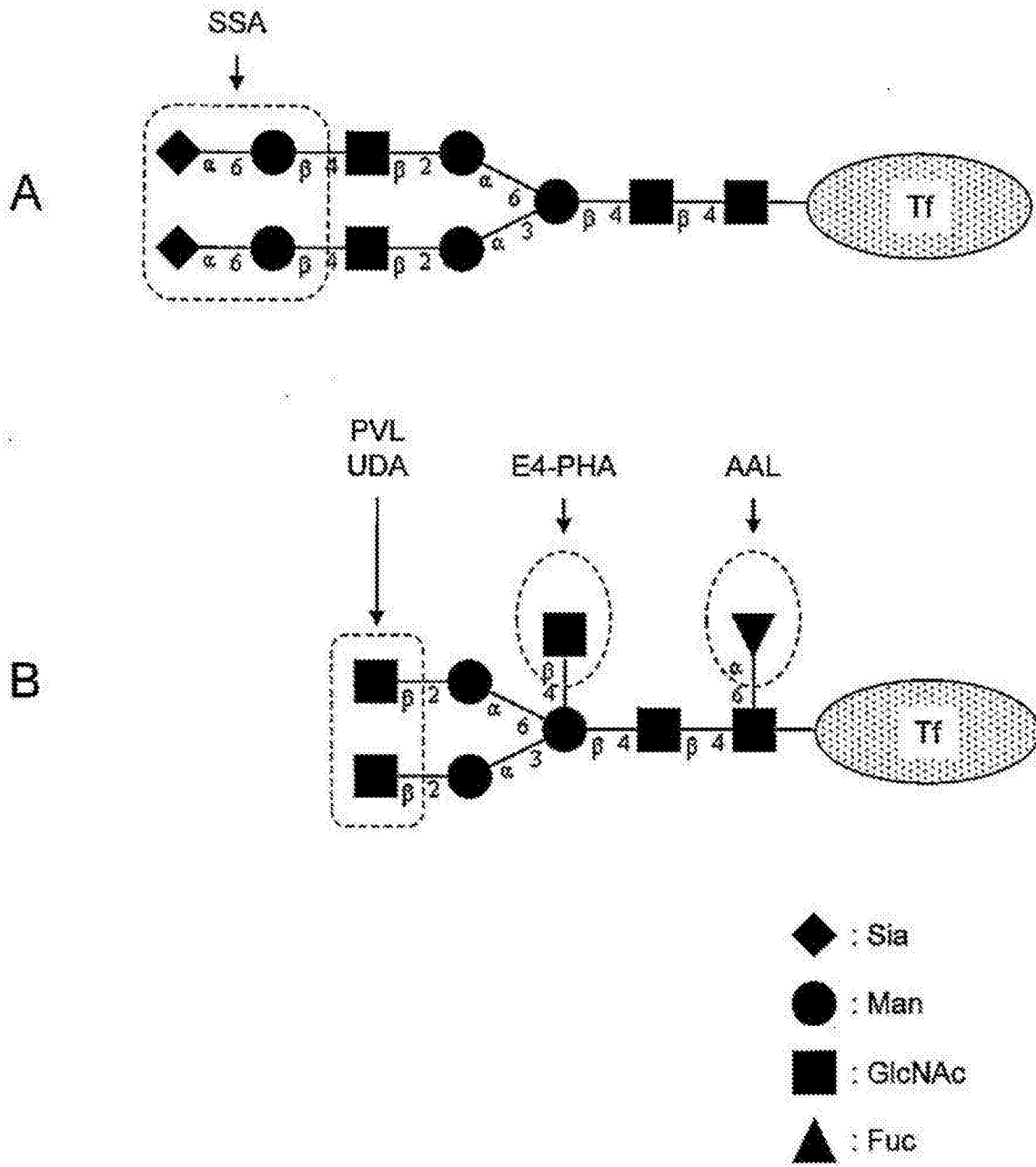


图15

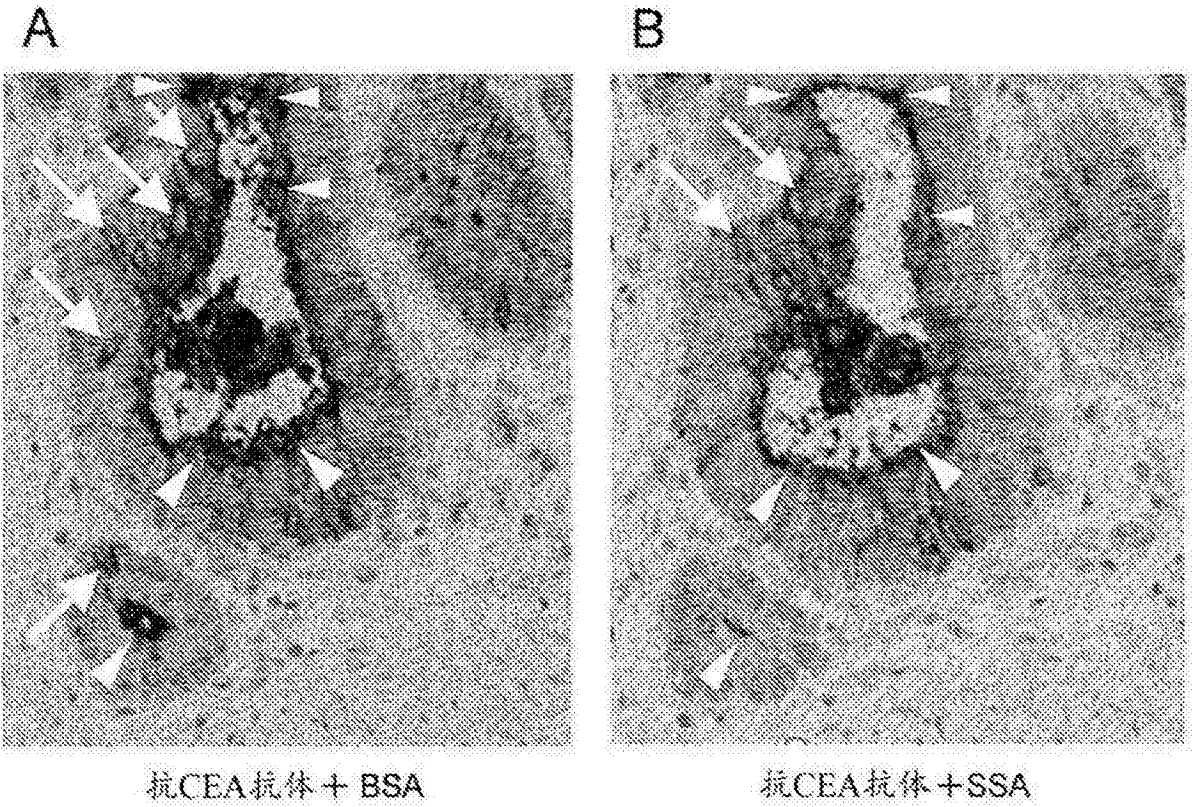


图16

专利名称(译)	糖链异构体检测方法及糖链异构体检测装置		
公开(公告)号	CN104884958B	公开(公告)日	2017-07-11
申请号	CN201380052689.6	申请日	2013-08-09
申请(专利权)人(译)	独立行政法人产业技术综合研究所		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人产业技术综合研究所		
[标]发明人	成松久 久野敦 池原让 桥本康弘 城谷圭朗 奈良清光 苅谷庆喜 伊藤浩美 星京香		
发明人	成松久 久野敦 池原让 桥本康弘 城谷圭朗 奈良清光 苅谷庆喜 伊藤浩美 星京香		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/536 G01N33/6854 G01N2333/42 G01N2333/4724 G01N2400/00 G01N2440/38 G01N2496/00		
代理人(译)	崔丽娟 郑霞		
优先权	2012178722 2012-08-10 JP		
其他公开文献	CN104884958A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于，开发并提供一种以少的工序数迅速且特异性地检测特定的糖链异构体的方法。提供一种糖链异构体检测方法，所述方法包括对在将与糖链非还原末端结合性凝集素及与糖链异构体的蛋白质部分特异性地结合的抗体等与被检试样混合时所形成的免疫复合物进行定量，将得到的免疫复合物量与未混合所述糖链非还原末端结合性凝集素时或混合对照蛋白质时的对照试样得到的对照免疫复合物量进行比较，以及基于这两个量之间的差异判定被检试样中目标糖链异构体的有无。

