



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102159592 A

(43) 申请公布日 2011.08.17

(21) 申请号 200980134113.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.06.30

*C07K 16/46* (2006.01)

(30) 优先权数据

*C12N 15/09* (2006.01)

2008-171512 2008.06.30 JP

*C12Q 1/68* (2006.01)

*G01N 33/532* (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.02.25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/061959 2009.06.30

(87) PCT申请的公布数据

W02010/001891 JA 2010.01.07

(71) 申请人 财团法人东京都医学研究机构

地址 日本东京都

申请人 新世来科技有限公司

(72) 发明人 芝崎太 森实芳仁

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 卢曼 郭文洁

权利要求书 2 页 说明书 10 页

序列表 16 页 附图 3 页

(54) 发明名称

抗体复合物、抗原检测方法及抗体复合物的  
制造方法

(57) 摘要

为了提高 MUSTag 的检测灵敏度,本发明提供一种抗体复合物,该抗体复合物包含作为标记的核酸链、与抗原特异性结合的抗体、以及将核酸链和抗体结合的接合体部位,在该抗体复合物中,使接合体部位包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区并使其与抗体结合,将接合体部位与抗体化学交联,从而制成交联型抗体复合物。

1. 用于检测抗原的抗体复合物,其特征在于,  
包含作为标记的核酸链、与所述抗原特异性结合的抗体、以及将所述核酸链和所述抗体结合的接合体部位,  
所述接合体部位包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区,  
所述接合体部位与所述抗体化学交联。
2. 权利要求 1 所述的抗体复合物,其特征在于,包含能切断所述核酸链的切割位点。
3. 权利要求 2 所述的抗体复合物,其特征在于,所述切割位点被限制酶、光照射或活性氧切断。
4. 权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的抗体复合物,其特征在于,  
所述接合体部位含有融合蛋白,  
该融合蛋白包含亲和素类的生物素结合区 ;以及 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白的免疫球蛋白结合区,  
核酸链是生物素结合核酸。
5. 权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的抗体复合物,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。
6. 检测抗原的方法,其特征在于,包括:  
使所述抗原与权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的抗体复合物接触,形成包含所述抗原和所述抗体复合物的抗原抗体复合物的工序 ;以及  
检测所述寡核苷酸链的检测工序。
7. 权利要求 6 所述的方法,其特征在于,  
所述抗原抗体复合物包含权利要求 2 或 3 所述的抗体复合物,  
所述检测工序包括在所述切割位点切断并回收所述寡核苷酸链的工序。
8. 权利要求 6 或 7 所述的方法,其特征在于,  
所述检测工序包括:  
扩增所述寡核苷酸链的工序 ;以及  
检测扩增后的所述寡核苷酸链的工序。
9. 抗原的检测用试剂盒,其特征在于,  
包含抗体复合物,该抗体复合物包含作为标记的核酸链、与所述抗原特异性结合的抗体、以及将所述核酸链和所述抗体结合的接合体部位,  
所述接合体部位包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区,  
所述接合体部位与所述抗体化学交联。
10. 权利要求 9 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗体复合物包含能切断所述核酸链的切割位点。
11. 权利要求 10 所述的试剂盒,其特征在于,所述切割位点被限制酶、光照射或活性氧切断。
12. 权利要求 9 ~ 11 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,  
所述接合体部位含有融合蛋白,  
该融合蛋白包含亲和素类的生物素结合区 ;以及 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白的免疫球蛋白结合区,  
核酸链是生物素结合核酸。

- 
13. 权利要求 9 ~ 12 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。

## 抗体复合物、抗原检测方法及抗体复合物的制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗体复合物、使用抗体复合物的抗原检测方法以及抗体复合物的制造方法。

### 背景技术

[0002] 作为微量抗原的检测方法,以往开发了 ELISA 等,而最近开发出提高了检测灵敏度的、使用被称作 MUSTag 的复合物的方法(国际公报 W02006/049289)。具体而言,作为一例,可例举如下方法:采用使作为标记的寡核苷酸通过 G 蛋白与抗体结合而成的复合物,使该复合物的抗体部分与抗原结合后,将寡核苷酸切断并回收,用 PCR 检测寡核苷酸,藉此检测抗原。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提高 MUSTag 的检测灵敏度。

[0004] 发明人为了提高 MUSTag 的检测灵敏度而对各种条件进行了研究,结果发现,如实施例所示,通过将接合体(adapter)部位与抗体交联,从而抗原的检测灵敏度提高。以往已知 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白以高亲和力结合于 IgG 分子的 Fc 区域,因此该发现对本领域技术人员而言是出乎意料的,这就提示使用了 MUSTag 的抗原的检测方法中,G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白与抗体的结合力不足。

[0005] 本发明的一种实施方式是用于检测抗原的抗体复合物,包含作为标记的核酸链、与所述抗原特异性结合的抗体、以及将所述核酸链和所述抗体结合的接合体部位,所述接合体部位包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区,所述接合体部位与所述抗体化学交联。所述抗体复合物可以包含能切断所述核酸链的切割位点。所述切割位点可以被限制酶、光照射或活性氧切断。所述接合体部位可以含有包含亲和素类的生物素结合区和 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白的免疫球蛋白结合区的融合蛋白,核酸链可以是生物素结合核酸。所述抗体可以是单克隆抗体。

[0006] 本发明的又一种实施方式是检测抗原的方法,包括:使所述抗原与所述任一种抗体复合物接触,形成包含所述抗原和所述抗体复合物的抗原抗体复合物的工序;以及检测所述寡核苷酸链的检测工序。所述抗原抗体复合物可以包含所述抗体复合物,所述检测工序可以包括在所述切割位点切断并回收所述寡核苷酸链的工序。所述检测工序可以包括扩增所述寡核苷酸链的工序以及检测经扩增的所述寡核苷酸链的工序。

[0007] 本发明的又一种实施方式是抗原的检测用试剂盒,包含抗体复合物,该抗体复合物包含作为标记的核酸链、与所述抗原特异性结合的抗体、以及将所述核酸链和所述抗体结合的接合体部位,所述接合体部位包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区,所述接合体部位与所述抗体化学交联。所述抗体复合物可以包含能切断所述核酸链的切割位点。所述切割位点可以被限制酶、光照射或活性氧切断。所述接合体部位含有包含亲和素类的生物素结合区和 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白的免疫球蛋白结合区的融合蛋白,

核酸链可以是生物素结合核酸。所述抗体可以是单克隆抗体。

[0008] ==相关申请的交叉引用==

[0009] 本申请主张基于 2008 年 6 月 30 日向日本特许厅提交的特愿 2008-171512 的优先权,通过引用该基础申请而将其包括在本说明书中。

#### 附图说明

[0010] 图 1 是表示本发明的一个实施例中的纯化后的 G 蛋白 / 链霉亲和素 /His-tag 融合蛋白的 SDS-PAGE 的结果的照片。

[0011] 图 2 是表示本发明的一个实施例中使用交联型 MUSTag 来检测各种抗原浓度中的抗原的结果的图。

[0012] 图 3 是将本发明的一个实施例中使用交联型 MUSTag 来检测各种抗原浓度中的抗原的结果标准化后的图。

[0013] 图 4 是表示本发明一个实施例中使用采用多种交联剂制成的交联型 MUSTag 来检测各种抗原浓度中的抗原的结果的图以及将检测结果标准化后的图。

#### 具体实施方式

[0014] 以下例举实施例对基于上述发现而完成的本发明的实施方式进行详细说明。对实施方式和实施例没有特别说明的情况下,采用 J. Sambrook, E. F. Fritsch&T. Maniatis(编),分子克隆实验指南 (Molecular cloning, a laboratory manual)(第 3 版),冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Press),纽约冷泉港,(2001);F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl(编),新编分子生物学实验指南 (Current Protocols in Molecular Biology),约翰韦利森公司 (John Wiley&Sons Ltd.) 等标准的试验方案 (protocol) 集中记载的方法或者对其进行修饰或改变后的方法。使用市售的试剂盒或测定装置的情况下,如无特别说明,则采用它们附带的试验方案。

[0015] 应予说明,本发明的目的、特征、优点及其技术思想通过本说明书的记载而为本领域技术人员所知,根据本说明书的记载,只要是本领域技术人员即可容易地再现本发明。以下记载的发明的实施方式及具体实施例等表示本发明的优选实施方式,是为了例举或说明而示出的,本发明并不限于此。对本领域技术人员而言显而易见的是,在本说明书中揭示的本发明的思想及范围内,可以基于本说明书的记载进行各种改变及修饰。

[0016] ==交联型抗体复合物==

[0017] 本发明的抗体复合物包含作为标记的核酸链、与作为检测对象的抗原特异性结合的抗体、以及将核酸链和抗体结合的接合体部位,接合体部位包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区,接合体部位与抗体化学交联。

[0018] 作为标记的核酸链可以是 DNA 也可以是 RNA,因为可使检测变得容易,所以较好是 DNA。其长度没有限制,优选为较短,以使切割或检测时酶等容易作用,但为了易于检测,较好是十几个碱基~几十个碱基长度的寡核苷酸。另外,可以是单链或双链,从稳定性的角度来看较好是双链。为了通过 PCR 等检测该核酸链,核酸链的碱基序列较好是尽可能为特异性的。

[0019] 抗体复合物所包含的核酸链和抗体通过接合体部位结合。藉此,可进一步提高寡核苷酸复合抗体的结构稳定性,进一步提高所得复合物的产率,并且还可获得提高检测灵敏度和检测效果等效果。

[0020] 该接合体部位如果包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区,则其它构成无特别限制。

[0021] 因此,接合体部位可以包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白的蛋白本身,也可以包含它们的免疫球蛋白结合区和其它肽的融合蛋白。应予说明,这里,G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白不仅可以是野生型蛋白,也可以是具有免疫球蛋白结合活性的突变型蛋白。

[0022] 例如, G 蛋白 (GenBank 登录号 cDNA :X06173, 蛋白质 :CAA29540) 的情形,免疫球蛋白结合区是第 303-357 位、第 373-427 位、第 443-497 位氨基酸的区域 ;A 蛋白 (GenBank 登录号 cDNA :M18264, 蛋白质 :AAA26677) 的情形,免疫球蛋白结合区是第 39-88 位、第 100-149 位、第 158-207 位、第 216-265 位、第 274-323 位氨基酸的区域 ;L 蛋白 (GenBank 登录号 cDNA :M86697, 蛋白质 :AAA25612) 的情形,免疫球蛋白结合区是第 115-173 位、第 185-245 位、第 257-317 位、第 329-389 位、第 400-462 位氨基酸的区域。

[0023] 接合体部位还可以包含制造时所需的标签 (tag)。标签的种类无特别限制,可以是 GST-tag 或 MBP-tag、myc-tag 或 flag-tag 等,从因能结合于低分子的镍而在化学交联工序中没有影响的角度来看,标签较好是 His-tag。

[0024] 接合体部位所包含的免疫球蛋白结合区与抗体直接结合,但与核酸链既可以直接结合也可以间接结合。间接结合的情况下,可以想到例如以下各种形态:亲和素类的生物素结合区和 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白的免疫球蛋白结合区通过接头 (linker) 化合物而结合、或形成融合蛋白,另一方面,核酸链与生物素结合,且生物素结合区与生物素结合的情况;免疫球蛋白结合区和核酸链均与生物素结合,且这些生物素彼此通过亲和素类结合的情况等。作为接头化合物,可使用例如 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯 (Sulfo · SMCC) 等。

[0025] 这里,因为亲和素类通常形成同型四聚体,每 1 个亚单位具有 1 个生物素结合区,所以整个蛋白具有 4 个生物素结合区,但对于本发明所用的生物素结合区而言,只要具有 1 个亚单位即可,或者也可以形成四聚体。但是,为了形成将作为标记的核酸链暴露在溶液中的结构,较好是在 1 分子 G 蛋白上结合 1 分子的核酸链,为此,较好是使用不形成四聚体而仅有 1 个生物素结合区那样的单体的亲和素类突变体。至今为止对成为单体的亲和素类突变体进行了大量的研究,但大多都不成功 (Qureshi, M. H., 和 Wong, S. L (2002). Protein Expr Purif 25 卷,409-415 页 ;Laitinen, O. H. 等, (2003). J Biol Chem 278 卷,4010-4014 页)。但是,本发明中,如实施例所示,通过使用具有链霉亲和素的第 39-183 位氨基酸序列的肽,可制成不丧失与生物素的结合活性的突变体。

[0026] 亲和素类是指亲和素、链霉亲和素或中性亲和素 (ニユートラアビジン) 等生物素结合蛋白。例如,亲和素 (RefSeq 登录号 cDNA :NM 205320, 蛋白质 :NP 990651) 和中性亲和素 (序列与亲和素相同,经过脱糖基处理) 的情形,生物素结合区是第 28-146 位氨基酸的区域 ;链霉亲和素 (GenBank 登录号 cDNA :X03591, 蛋白质 :CAA27265) 的情形,生物素结合区是第 39-156 位氨基酸的区域。

[0027] 接合体部位与抗体化学交联,但对于交联的种类无特别限制。可例举例如氨基间

交联、羧基间交联、巯基间交联等。接合体部位中,与抗体交联的氨基酸残基无特别限制,较好是与抗体直接结合的免疫球蛋白结合区中的残基。

[0028] 抗体只要能与作为检测对象的抗原特异性结合,则既可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体。抗体的种类无特别限制,例如可以是 IgG 也可以是 IgM,但必须是接合体部位所包含的免疫球蛋白结合区结合的种类的抗体。

[0029] 如上所述,在包含核酸链、抗体及将核酸链和抗体结合的接合体部位的抗体复合物中,通过将接合体部位与抗体交联而制成交联型抗体复合物,从而使抗原的检测灵敏度显著提高。

[0030] 上述抗体复合物可以包含能切断核酸链的切割位点。该切割位点可以设置在核酸、抗体、接合体部位中的任意一个上,其特性根据设置部位而不同,例如,设置在核酸上时,是利用限制酶的切割位点;设置在抗体或蛋白的接合体上时,是利用蛋白酶的切割位点;设置交联剂(crosslinker)(2价的交联剂等)作为接合体时,是利用光照射或活性氧的切割位点。但是,从简便性和特异性方面考虑,较好是在核酸链上设置利用限制酶的切割位点。

[0031] 另外,为了使核酸链作为标记起作用,可使其与放射性同位素、荧光染料、酶等标记物结合。

[0032] ==交联型抗体复合物的制造方法==

[0033] 包含核酸链、抗体及将核酸链和抗体结合的接合体部位交联型抗体复合物只要制造成包含这些构成要素即可,无特别限制。

[0034] 例如可以首先使作为标记部分的核酸链结合于接合体部位,接着将接合体部位固定于抗体而制成抗体复合物,然后用化学交联剂将接合体部位与抗体交联。

[0035] 使核酸链直接结合于接合体部位的情况下,可以结合于接合体部位的任何位置,例如可以用氨基或巯基修饰核酸链的末端,用合适的交联剂使其与接合体部位中的氨基、羧基、巯基等官能团通过化学交联而结合。另外,使核酸链间接结合于接合体部位的情况下,可以使接合体部分与亲和素类的生物素结合区结合,将核酸链生物素化,通过常规方法将两者混合,藉此使核酸链结合于接合体部分。或者,也可以预先将接合体部分和核酸链等都生物素化,通过常规方法将该接合体部分与核酸链混合,同时添加亲和素类,藉此使核酸链通过亲和素类结合于接合体部分。接着,通过常规方法将接合体部分/核酸链结合体与抗体混合,藉此可获得抗体复合物。

[0036] 最后,用化学交联剂处理该抗体复合物,藉此将抗体复合物中的接合体部位与抗体交联。作为交联剂,可使用庚二亚氨酸二甲酯(dimethyl pimelidate, DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(dimethyl suberimidate, DMS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate, BS3)等,为了提高交联的效率,使抗体复合物-接合体部位更特异性地交联,较好是使用 DMP。

[0037] ==使用交联型抗体复合物的抗原检测方法==

[0038] 使由此制成的交联型抗体复合物与作为检测对象的抗原接触,形成抗原抗体复合物。

[0039] 对于作为检测对象的抗原,其种类、存在形式等无特别限制,只要能用抗体来识别,则是蛋白质、糖、核酸均可,既可以是纯化物也可以是提取物。另外,可以存在于病毒或

细胞,此时,可以将病毒或细胞直接用于检测。因此,被检试样可以是例如生物体成分(组织或血液)或其提取物、食用肉类或蔬菜等食品类、土壤或河水等。

[0040] 抗原抗体复合物的制造方法无特别限制,可以使抗原在支撑物上固定化或不固定化,例如,通过将抗原在支撑物上固定化,使交联型抗体复合物结合于抗原,从而使交联型抗体复合物结合于支撑物。然后,通过用缓冲液洗涤,可除去未反应的交联型抗体复合物,可获得高纯度的抗原抗体复合物。该支撑物可使用塑料的底面或珠(ビーズ)等。此外,要将抗原固定化于支撑物,既可以使抗原直接结合于支撑物,也可以使抗原间接结合于支撑物。直接结合的情况下,只要使含抗原的缓冲液与支撑物接触即可;间接结合的情况下,只要预先使抗原所结合的物质(例如抗体等)结合于支撑物,这时再使含抗原的缓冲液与支撑物接触即可。为了提高特异性,较好是后者的间接结合。

[0041] 为了检测结合于抗原的交联型抗体复合物,可以连同容器一起通过 PCR 等来检测交联型抗体复合物中的核酸,但为了简化检测操作,较好是回收核酸。

[0042] 核酸可以连同交联型抗体复合物一起回收,例如可按照常规方法通过使抗原和抗体解离来回收交联型抗体复合物。或者也可以只回收核酸,实施酸处理、碱处理、热处理、蛋白酶处理等来使交联型抗体复合物变性或分解即可。

[0043] 但是,通过这样过于激烈的处理,无法通过 HRP 等的酶反应进行检测,为了进行 PCR,需要纯化核酸,以使 Taq 聚合酶等酶能工作。因此,较好是在交联型抗体复合物上设置可通过限制酶处理或光处理等柔和的处理将核酸链切断的切割位点。于是,为了进行核酸链的检测,在该切割位点处将核酸链从抗原抗体复合物上切断并回收。通过该回收工序,可在核酸链检测前进行浓缩,即使是更少量的核酸链也能检测出来。

[0044] 对如上所述回收的核酸链进行检测。检测方法无特别限制,核酸链上结合有放射线同位素、荧光染料、酶等标记时也可以检测该标记。但是,从检测灵敏度的角度来看,较好是将核酸链扩增后进行检测。扩增方法按照常规方法即可,可使用 PCR 法、LAMP 法、ICAN 法等。另外,检测也只要采用电泳法等常规方法即可。

[0045] 应予说明,为了同时检测多种抗原,通过使用包含与各抗原特异性结合的抗体以及与抗原的种类一一对应的核酸链的抗体复合物,可使各抗原与各核酸链相对应。这样,通过检测各核酸链,可分别检测各抗原。

[0046] 此时,为了获得与各抗原相对应的特异性抗体复合物,需要在分别形成各抗体复合物后预先进行纯化,使用时将抗体复合物分别混合即可。

[0047] 对于与不同抗原相对应的核酸链,既可以通过改变序列来使其具有特异性,也可以通过改变长度来使其具有特异性。后者的情况下,也可以使 DNA 扩增用引物能通用。另外,通过用不同种类的标记(例如酶的情况下如碱性磷酸酶和 HRP)对核酸链进行标记,也可使其具有特异性。

[0048] ==抗原检测用试剂盒==

[0049] 为了使采用本发明的交联型抗体复合物的抗原检测变得容易,可以将必要的试剂制成试剂盒以作为抗原检测用试剂盒。

[0050] 该试剂盒包含抗体复合物,该抗体复合物包含作为标记的核酸链、与作为检测对象的抗原特异性结合的抗体、以及将核酸链和抗体结合的接合体部位。这里,接合体部位包含 G 蛋白、A 蛋白或 L 蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区,接合体部位与抗体化学交联。

[0051] 其它抗体复合物的形态如“交联型抗体复合物”项中所述。

[0052] 该试剂盒中除了交联型抗体复合物外还可以包含其它构成成分,可以包含各种缓冲液、引物或酶等检测用试剂。

[0053] 实施例

[0054] 下面通过实施例对本发明进一步进行具体说明,但本发明的范围不受下述实施例的限定。

[0055] == G 蛋白 / 链霉亲和素 / His-tag 融合蛋白的制作 ==

[0056] 首先制作 G 蛋白 / 链霉亲和素 / His-tag 融合蛋白 (下称融合蛋白)。首先,作为包含 G 蛋白中的与 IgG 抗体 Fc 区域的结合区域的部分,通过基于磷酸基部位无保护法的化学合成法来合成编码序列号 1 (G 蛋白全长, GenBank 登录号 : M13825) 所示的氨基酸序列中的第 228 位~第 268 位的氨基酸序列区 (序列号 2) 的 DNA (序列号 3 所示的碱基序列中的第 1259 位~第 1381 位的碱基序列 (序列号 4)); 以及,作为包含链霉亲和素中的与生物素的结合区域的部分,通过基于磷酸基部位无保护法的化学合成法来合成编码序列号 5 (链霉亲和素全长, GenBank 登录号 : X03591) 所示的氨基酸序列中的第 39 位~第 183 位的氨基酸序列区 (序列号 6) 的 DNA (序列号 7 所示的碱基序列中的第 164 位~第 598 位的碱基序列区 (序列号 8))。此时,根据需要使以片段的形式合成的各双链 DNA 结合,制成全长 DNA。然后,分别以各合成好的 DNA 为模板,用下述引物以 <95°C 30 秒 -55°C 30 秒 -72°C 30 秒进行 35 个循环> 的反应条件进行 PCR, 扩增各双链 DNA。应予说明,设计各引物,使得通过 PCR 得到的 DNA 片段的两端 (小写字体部分的碱基序列) 具有限制酶识别位点。

[0057] G 蛋白引物 F :

[0058] 5' -CATATGCACTTACAAATTAATCCTTAA-3' (序列号 9)

[0059] G 蛋白引物 R :

[0060] 5' -GAATTCGGATCCTTCACCGTCAACACCGTTG-3' (序列号 10)

[0061] 链霉亲和素引物 F :

[0062] 5' -GAATCAAGCTTGCCGGCATCACCGGCACCTG-3' (序列号 11)

[0063] 链霉亲和素引物 R :

[0064] 5' -CTGCAGCTGCTGAACGGCGTCGAGCG-3' (序列号 12)

[0065] 用 EcoRI 切割所得 DNA 片段后,通过连接 (ligation) 使其结合,再次用 G 蛋白引物 F 和链霉亲和素引物 R 进行 PCR, 扩增融合 DNA 片段。

[0066] 接着,使用用于合成与 His-tag 的融合蛋白的细菌用表达载体 pCR2.1 (英杰 (Invitrogen) 公司), 用 NdeI 切割扩增后的融合 DNA 片段, 插入该载体的 NdeI 位点。如上所述构成具有编码 G 蛋白 / 链霉亲和素 / His-tag 融合蛋白 (序列号 13) 的碱基序列 (序列号 14) 的重组载体。

[0067] 将该重组载体导入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用 IPTG 诱导表达后, 使大肠杆菌溶菌, 用固相化有镍螯合物的琼脂糖珠 (品名 : Ni-NTA agarose, 公司名 : 凯杰 (QIAGEN), 产品编号 : 30210) 来纯化 G 蛋白 / 链霉亲和素 / His-tag 融合蛋白。纯化后的蛋白的分析结果的一例 (采用 SDS-PAGE 的分析) 示于图 1。

[0068] == 寡核苷酸的生物素化 ==

[0069] 以插入了具有序列号 15 的序列 (131 个碱基) 的 DNA 的 pcDNA3 (英杰公司制) 作

为模板 DNA,用包含生物素化引物 (5-MUSTagBio) 的下述引物 (序列号 16 和 17) 以 <95°C 60 秒 -55°C 60 秒 -72°C 30 秒进行 35 个循环> 的反应条件进行 PCR,由此合成 5' 末端被生物素化的寡核苷酸链 #1 (序列号 15)。

[0070] #1 :

[0071] 5'-[生物素]-CACTGCTTACTGGCTTATCGAAATGGAATTCTGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCT ATAGCATAGTGTACCTAAATGCTAGGCACCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGCACACCAAACGTGGCTTGCC-3' (序列号 15)

[0072] 同样地,以插入了具有序列号 18 的序列的 DNA 的 pcDNA3 (英杰公司制) 作为模板,用相同的引物 (序列号 16、17) 来合成 5' 末端被生物素化的寡核苷酸链 #7 (序列号 18)。

[0073] #7 :

[0074] 5'-[生物素]-CACTGCTTACTGGCTTATCGAAATGGAATTCTGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCT ATAGCATAGTGTACCTAAATGCTAGGCAACCGACAATTGCATGAAGAACTCGCACATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCACCACCAAACGTGGCTTGCC-3' (序列号 18)

[0075] <PCR 用引物的序列>

[0076] 5-MUSTag 引物 Bio-F :

[0077] 5' -[生物素]-CACTGCTTACTGGCTTATCGAAA-3' (序列号 16)

[0078] 3-MUSTag 引物 R :

[0079] 5' -GGCAAGCCACGTTTGGTG-3' (序列号 17)

[0080] ==交联型抗体复合物的制造==

[0081] (1) 寡核苷酸和抗体向融合蛋白的结合

[0082] 在微量离心管中添加结合缓冲液 (0.2M 硼酸盐 (Borate) pH 9.0, 0.5M NaCl, 0.1mM EDTA, 0.05% 单癸酸酯 (Monocaprato)) 243.4  $\mu$ l、融合蛋白 6.6  $\mu$ l (100pmol)、生物素化寡核苷酸 (对于 IFN- $\gamma$  及 IL-12 而言是 #1, 对于 EGF 及 IL-15 而言是 #7) 40  $\mu$ l (100pmol), 室温下旋转 0.5 小时并同时使生物素化寡核苷酸与融合蛋白的链霉亲和素部位结合。然后添加下述抗体 (0.5mg/ml) 60  $\mu$ l (200pmol), 室温下旋转 1 小时并同时使抗体与融合蛋白的 G 蛋白部位结合。

[0083] <抗体的种类>

[0084] 抗 hEGF 抗体:种类:山羊多克隆的 (goat polyclonal), 公司名:R&D, 产品编号:AF236, 浓度:0.5mg/mL

[0085] 抗 hIFN- $\gamma$  抗体:种类:山羊多克隆的, 公司名:R&D, 产品编号:AF-285-NA, 浓度:0.5mg/mL

[0086] 抗 hIL-12p70 抗体:种类:小鼠 IgG1, 公司名:R&D, 产品编号:MAB611(clone 24945), 浓度:0.5mg/mL

[0087] 抗 hIL-15 抗体:种类:小鼠 IgG1, 公司名:R&D, 产品编号:MAB247(clone 34593), 浓度:0.5mg/mL

[0088] (2) 交联反应

[0089] 以与反应溶液相同的量 (约 350  $\mu$ l) 添加临使用前用偶联缓冲液调整至 6mM 的 DMP (Pierce, #21667, MW 259.177) 并混合, 室温下静置 1 小时。添加 1M Tris (pH 7.4) 以使终浓度达到 50mM, 室温下静置 15 分钟, 使交联反应停止后, 用 0.45  $\mu$ m PTFE 滤器 (制品

名:Millex FH,公司名:密理博(Millipore),产品编号:SLFHR04NL)过滤。最后以下述条件通过凝胶过滤色谱法分离反应液,回收分子量最大的峰的组分,将其作为 MUSTag 溶液。溶液中的 MUSTag 的浓度以制造中所用的抗体为标准,通过用 ELISA 进行比较来测定。

[0090] < 凝胶过滤色谱法的条件 >

[0091] 机器:制品名:SMART system,公司名:原法玛西亚(Pharmacia)(现通用医疗(GE Healthcare),制造中止品)

[0092] 柱:制品名:Superdex 200PC 3.2/30,公司名:通用医疗,产品编号:17-1089-01

[0093] 缓冲液:10mM Tris-HCl pH 7.4,0.5M NaCl,0.1mM EDTA,0.05%单癸酸酯

[0094] 流速:100  $\mu$  l/min

[0095] (3) 抗原与 MUSTag 的结合

[0096] 将分别针对 EGF、IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-15 的下述捕捉用抗体采用固相化用缓冲液(0.05M NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>缓冲液(pH 9.6)、0.02%叠氮化钠)调整至 2  $\mu$  g/mL 的浓度,在 96 孔板的各孔内添加 50  $\mu$  l,于 4 $^{\circ}$ C 静置过夜,藉此将捕捉用抗体固相化于板。固相化后,弃掉孔内的液体,添加 1% BSA/PBS 50  $\mu$  l,室温下静置 60 分钟,进行板的封闭。然后,添加如下调整的 8 级浓度的各抗原 50  $\mu$  l 并混合,室温下静置 60 分钟,使其与固相化于板上的捕捉用抗体结合。抗体结合后,弃掉孔内的溶液,添加 25  $\mu$  l 的用 MUSTag 稀释液(1% BSA/0.05% Tween 20/0.45M NaCl/50mMNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 7.4))调整至 8ng/mL 的浓度的交联 MUSTag、以及作为对照的未交联的 MUSTag,室温下放置 60 分钟,使其与抗原结合。然后,用第一洗涤缓冲液(0.5M NaCl/0.05% Tween20/20mM Tris-HCl(pH 7.4))300  $\mu$  L 洗涤各孔 1 次,用第二洗涤缓冲液(0.05% Tween 20/PBS 300  $\mu$  L)洗涤各孔 3 次。

[0097] < 捕捉用抗体的种类 >

[0098] 抗 hEGF 抗体:种类:小鼠 IgG1,公司名:R&D,产品编号:MAB636(clone 10827),保存浓度:0.5mg/mL

[0099] 抗 hIFN- $\gamma$  抗体:种类:小鼠 IgG2A,公司名:R&D,产品编号:MAB2852(clone K3.53),保存浓度:0.5mg/mL

[0100] 抗 hIL-12 抗体:种类:山羊多克隆的,公司名:R&D,产品编号:AF-219-NA,保存浓度:0.5mg/mL

[0101] 抗 hIL-15 抗体:种类:小鼠 IgG1,公司名:R&D,产品编号:MAB647(clone 34505),保存浓度:0.5mg/mL

[0102] < 抗原的调整 >

[0103] 下面,各抗原的稀释中使用抗原稀释液(1% BSA/PBS)。

[0104] 将 rhEGF 的原液(公司名:R&D,产品编号:236-EG,保存浓度:200  $\mu$  g/mL)稀释 100000 倍,调整至 2000pg/mL。进一步将稀释抗原液以 10 倍的倍数逐级稀释,制成 7 个等级的 10 倍稀释系列,包括阴性对照(0pg/mL,仅有抗原稀释液)在内准备了 8 种浓度(2000, 200, 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002, 0[pg/mL])的抗原。

[0105] 将 rhIFN- $\gamma$  的原液(公司名:R&D,产品编号:285-IF,保存浓度:100  $\mu$  g/mL)稀释 5000 倍,调整至 20000pg/mL。进一步将稀释抗原液以 5 倍的倍数逐级稀释,制成 7 个等级的 5 倍稀释系列,包括阴性对照(0pg/mL,仅有抗原稀释液)在内准备了 8 种浓度(20000, 4000, 800, 160, 32, 6.4, 1.28, 0[pg/mL])的抗原。

[0106] 将 rhIL-12 的原液 (公司名:R&D, 产品编号:219-IL, 保存浓度:10  $\mu$ g/mL) 用 1% BSA/PBS 稀释 250 倍, 调整至 40000pg/mL。进一步将稀释抗原液以 5 倍的倍数逐级稀释, 制成 7 个等级的 5 倍稀释系列, 包括阴性对照 (0pg/mL, 仅有抗原稀释液) 在内准备了 8 种浓度 (40000, 8000, 1600, 320, 64, 12.8, 2.56, 0[pg/mL]) 的抗原。

[0107] 将 rhIL-15 的原液 (公司名:R&D, 产品编号:247-IL, 保存浓度:10  $\mu$ g/mL) 稀释 2500 倍, 调整至 4000pg/mL。进一步将稀释抗原液以 5 倍的倍数逐级稀释, 制成 7 个等级的 5 倍稀释系列, 包括阴性对照 (0pg/mL, 仅有抗原稀释液) 在内准备了 8 种浓度 (4000, 800, 160, 32, 6.4, 1.28, 0.256, 0[pg/mL]) 的抗原。

[0108] (4) 寡核苷酸链的检测

[0109] 将洗涤后的各孔的溶液完全除去, 添加 EcoRI 酶溶液 (7.5 单位/mL EcoRI/50mM NaCl/10mM MgCl<sub>2</sub>/10mM Tris-HCl (pH 7.4)) 30  $\mu$ L (EcoRI 含量 0.225 单位/孔), 室温下反应 15 分钟, 切断抗体复合物的寡核苷酸链。回收反应后的上清, 对于该上清 3  $\mu$ L, 用下述引物和探针 (引物序列在 #1 和 #7 中可以通用) 进行实时 PCR。应予说明, PCR 以 < 95°C、15min 的预热后, 将 95°C、15sec-60°C、1min 进行 35 个循环 > 的条件进行。反应开始后对每一个循环分别测定随着利用实时 PCR 进行的 DNA 链的合成反应而变化的荧光量, 从而对抗原的各稀释系列的每一个孔分别观察能否检测出扩增片段以及扩增量的变化。

[0110] < 实时 PCR 用引物、探针的序列 >

[0111] 正向引物: 5' -GGGCGGCTGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATA-3' (序列号 19)

[0112] 反向引物: 5' -GGCAAGCCACGTTTGGTG-3' (序列号 20)

[0113] #1 的探针: 5' -CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTT-3' (序列号 21)

[0114] #7 的探针: 5' -ACCGACAATTGCATGAAGAACTC-3' (序列号 22)

[0115] (5) 所得结果的标准化和分析

[0116] 上述检测方法中, 抗原抗体反应的检测结果用 Ct 值 (通过 PCR 扩增的 DNA 达到标准量所需要的循环数) 表示。其结果示于图 2。

[0117] 此外, 对于各检测结果, 从空白的 Ct 值的平均值中减去各抗原浓度下的 Ct 值而求出差值 ( $\Delta$ Ct), 藉此进行各标准曲线的标准化。其结果示于图 3。

[0118] 这里, 以  $\Delta$ Ct 达到各测定体系中的空白的测定值的标准偏差的 3.3 倍时的抗原浓度作为低浓度侧的检测限, 将 (使用有交联的 MUSTag 时的低浓度侧的检测限的抗原浓度) / (使用无交联的 MUSTag 时的低浓度侧的检测限的抗原浓度) 作为检测灵敏度 (将使用无交联的 MUSTag 时的灵敏度设为 1)。同样地, 用所得标准曲线将各抗原浓度下的  $\Delta$ Ct 转换成浓度时, 算出当转换后的值的变差系数 (C.V.) 达到 20% 时的浓度, 将其作为高浓度侧的定量限。

[0119] 使用各细胞因子时的低浓度侧的检测限、检测灵敏度及高浓度侧的定量限示于表 1。

[0120] [表 1]

[0121]

| 细胞因子   | 交联剂                  | 检测限              |           | 定量限(高浓度侧)        |           |
|--|----------------------|------------------|-----------|------------------|-----------|
|  |                      | Ag 浓度<br>(pg/mL) | 灵敏度       | Ag 浓度<br>(pg/mL) | 灵敏度       |
| EGF#7<br>(捕捉: 单克隆→MUSTag: 多克隆)<br>(capture: mono→MUSTag: poly) | 无交联                  | 0.1981527        | 1         | 2290.5922        | 1         |
|  | 有交联                  | 0.049351         | 4.0151734 | 3843.8635        | 1.6781091 |
| IFN- $\gamma$ #1<br>(捕捉: 单克隆→MUSTag: 多克隆)                      | 无交联                  | 11.38072         | 1         | 10899.282        | 1         |
|  | 有交联                  | 3.521915         | 3.2314011 | 20848.85         | 1.9128646 |
| IL-12#1<br>(捕捉: 多克隆→MUSTag: 单克隆)                               | 无交联                  | 983.3599         | 1         | 17463.556        | 1         |
|  | 有交联                  | 32.32467         | 30.421344 | 41759.316        | 2.3912264 |
| IL-15#7<br>(捕捉: 多克隆→MUSTag: 单克隆)                               | 无交联                  | 110.7488         | 1         | 1256.4623        | 1         |
|  | 2mM DMP              | 1.31649          | 84.1243   | 1206.8069        | 0.96048   |
|  | 2mM DMS              | 0.9153934        | 120.98492 | 1841.1857        | 1.4653728 |
|  | 10mM BS <sup>3</sup> | 8.38939          | 13.201055 | 1434.9854        | 1.1420839 |
|  | 5mM BS <sup>3</sup>  | 7.113186         | 15.569507 | 1560.0045        | 1.2415848 |

[0122] (6) 基于交联的有无的灵敏度比较

[0123] 通过交联反应,对于山羊多克隆 (goat polyclonal) 制的 MUSTag (EGF, IFN- $\gamma$ ) 可获得 3 ~ 5 倍的灵敏度提高,对于小鼠单克隆 (mouse monoclonal) 制的 MUSTag (IL-12, IL-15) 可获得 20 ~ 100 倍的灵敏度提高。不仅是上述低浓度下的最高灵敏度得到了改善,高浓度侧的定量限也得到了改善,可测定的范围整体扩大。

[0124] 此外,关于将对于相同抗原浓度的  $\Delta Ct$  值进行比较时的信号强度,也可确认山羊多克隆抗体有最大 2 倍的  $\Delta Ct$  的增大,小鼠单克隆抗体有最大 5 倍的  $\Delta Ct$  的增大。如上所述,通过使用交联型 MUSTag,测定的 S/N 比得到了改善,可实现更高精度的定量。

[0125] (7) 基于交联剂的不同灵敏度比较

[0126] 使用 DMS (PIERCE, #20700, MW :273.2, 终浓度 :2mM) 或 BS<sup>3</sup> (PIERCE, #21580, MW :572.43, 终浓度 :5mM 或 10mM) 来代替 DMP 作为交联剂,对抗原 IL-15 进行检测实验,结果示于图 4。关于此时的用 DMS 进行了交联的 MUSTag,显示出与用 DMP 进行了交联的 MUSTag 同等的反应性。采用 BS<sup>3</sup> 的交联中,与对照相比,也可确认明显的灵敏度、波动幅度 (レンジ幅) 的提高。

[0127] 如上所述,无论胺反应性交联剂是何种类,通过交联反应均可改善 MUSTag 的反应性。

[0128] 工业适用性

[0129] 通过本发明,可提高 MUSTag 的检测灵敏度。



|   |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|
|   | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ala Lys Ala Lys Ala Asp Ala Leu | 100 | 105 | 110 |     |
| Lys Glu Phe Asn Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile | 115 | 120 | 125 |     |
| Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Ile Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val | 130 | 135 | 140 |     |
| Val Glu Ser Ala Lys Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ser Asp Phe Leu Lys Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys | 180 | 185 | 190 |     |
| Tyr Gly Val Ser Asp Tyr His Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr | 195 | 200 | 205 |     |
| Val Glu Gly Val Lys Glu Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro | 210 | 215 | 220 |     |
| Lys Thr Asp Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe | 245 | 250 | 255 |     |
| Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp |     |     |     |     |

[0003]

|   |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|
|   | 260 | 265 | 270 |     |
| Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp |     |     |     |     |
|   | 275 | 280 | 285 |     |
| Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn |     |     |     |     |
|   | 290 | 295 | 300 |     |
| Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu |     |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 |     | 320 |
| Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp |     |     |     |     |
|   | 325 | 330 |     | 335 |
| Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu |     |     |     |     |
|   | 340 | 345 |     | 350 |
| Met Val Thr Glu Val Pro Gly Asp Ala Pro Thr Glu Pro Glu Lys Pro |     |     |     |     |
|   | 355 | 360 |     | 365 |
| Glu Ala Ser Ile Pro Leu Val Pro Leu Thr Pro Ala Thr Pro Ile Ala |     |     |     |     |
|   | 370 | 375 |     | 380 |
| Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Thr Lys Lys Glu Asp Ala Lys Lys |     |     |     |     |
| 385   | 390 | 395 |     | 400 |
| Pro Glu Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Ala Glu Thr Leu Pro Thr |     |     |     |     |
|   | 405 | 410 |     | 415 |
| Thr Gly Glu Gly Ser Asn Pro Phe Phe Thr Ala Ala Ala Leu Ala Val |     |     |     |     |
|   | 420 | 425 |     | 430 |
| Met Ala Gly Ala Gly Ala Leu Ala Val Ala Ser Lys Arg Lys Glu Asp |     |     |     |     |

[0004]

|       |   |     |       |
|-------|---|-----|-------|
|       | 435   | 440 | 445   |
| <210> | 2   |     |       |
| <211> | 41  |     |       |
| <212> | PRT   |     |       |
| <213> | 链球菌属( <i>Streptococcus</i> sp.)                                   |     |       |
| <400> | 2   |     |       |
|       | Thr Tyr Lys Leu Ile Leu 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                               |     |       |
|       |   | 35  | 40    |
| <210> | 3   |     |       |
| <211> | 1950  |     |       |
| <212> | DNA   |     |       |
| <213> | 链球菌属( <i>Streptococcus</i> sp.)                                   |     |       |
| <400> | 3   |     |       |
|       | aagctttggg ggagaaattg gctggcgaat ccagcttcac cgggtttca ccagtagatg  |     | 60    |
|       | ctttctggtg tcttattgac acgcacttgt ggcgagagta ctaacagtca cagcgacgtt |     | 120   |
|       | aactttattt tccttatgag aggttaagaa aaaacgttat taaatagcag aaaagaatat |     | 180   |
|       | tatgactgac gtaggagtt ttctcctaac gttttttta gtacaaaaag agaattctct   |     | 240   |
|       | attataaata aaataaatag tactatagat agaaaaatc attttaaaa agtcttgttt   |     | 300   |
|       | tcttaaagaa gaaaataatt gtgaaaaat tatagaaaat cattttata ctaatgaat    |     | 360   |
|       | agacataagg ctaaattggg gagtgatga taggagattt attgtaagg attccttaat   |     | 420   |
|       | tttattaatt caacaaaaat tgatagaaaa attaaatgga atccttgatt taattttatt |     | 480   |

[0005]

|  |      |
|--|------|
| aagttgata ataaaaagt aaattattaa atcgtagttt caaattgtc ggcttttaa      | 540  |
| tatgtgctgg catattaaa ttaaaaaagg agaaaaaatg gaaaaagaaa aaaaggtaaa   | 600  |
| atactttta cgtaaatcag cttttgggtt agcatccgta tcagctgcat ttttagtggg   | 660  |
| atcaacggta ttcgctgttg atcaccaat cgaagatacc ccaattattc gtaatgggtg   | 720  |
| tgaaitaact aatcttctgg ggaattcaga gacaacactg gctttgcgta atgaagagag  | 780  |
| tgctacagct gatttgacag cagcagcggg agccgatact gtggcagcag cggcagctga  | 840  |
| aatgctggg gcagcagctt gggaagcagc ggcagcagca gatgctctag caaaagccaa   | 900  |
| agcagatgcc cttaaagaat tcaacaaata tggagtaagt gactattaca agaattctaat | 960  |
| caacaatgcc aaaactgtg aaggcataaa agacctcaa gcacaagtg tgaatcagc      | 1020 |
| gaagaaagcg cgtatttcag aagcaacaga tggcttatct gatttctga aatcgcaaac   | 1080 |
| acctgctgaa gatactgtaaatcaattga attagctgaa gctaaagtct tagctaacag    | 1140 |
| agaacttgac aaatatggag taagtgacta tcacaagaac ctaatcaaca atgccaaaac  | 1200 |
| tgttgaaggt gtaaaagaac tgatagatga aattttagct gcattaccta agactgacac  | 1260 |
| ttacaaatta atccttaatg gtaaaacatt gaaaggcgaa acaactactg aagctgttga  | 1320 |
| tgctgctact gcagaaaaag tottcaaca atacgctaac gacaacgggtg ttgacgggtga | 1380 |
| atggacttac gacgatgca ctaagacctt tacagttact gaaaaccag aagtgatcga    | 1440 |
| tgcgtctgaa ttaacaccag ccgtgacaac ttacaaactt gtfattaatg gtaaaacatt  | 1500 |
| gaaaggcgaa acaactacta aagcagtaga cgcagaaact gcagaaaaag cttcaaca    | 1560 |
| atacgtaac gacaacgggtg ttgatgggtg ttgacttat gatgatgca ctaagacctt    | 1620 |
| tacggtaact gaaatggta cagaggttcc tggatgca ccaactgaac cagaaaaacc     | 1680 |
| agaagcaagt atccctctg ttccgttaac tccgtcaact ccaattgcta aagatgacgc   | 1740 |
| taagaaagac gatactaaga aagaagatgc taaaaacca gaagctaaga aagatgacgc   | 1800 |

[0006]





Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser  
 35 40 45

Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala  
 50 55 60

Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly  
 65 70 75 80

Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu  
 85 90 95

Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly  
 100 105 110

His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala  
 115 120 125

Ala Lys Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln  
 130 135 140

Gln  
 145

<210> 7  
 <211> 638  
 <212> DNA  
 <213> 链霉亲和素(*Streptomyces avidinii*)

<400> 7  
 ccctcgtcc ccgcegggca acaactaggg agtattttc gigtctcaca tgcgcaagat 60  
 cgtcgttgca gccatgccc tttccctgac cacggctcag attacggcca gcgcttcggc 120

[0009]

|  |     |
|--|-----|
| agaccctcc aaggactcga aggccaggt ctggccgcc gaggccgca tcaccggcac    | 180 |
| ctgtacaac cagctcggct cgacctcat cgtgaccgcg ggcccgacg gcgccctgac   | 240 |
| cggaacctac gagtcggcg tcggcaacgc cgagagccgc tacgtcctga ccggtcgta  | 300 |
| cgacagcgc ccggccaccg acggcagcgg caccgccctc ggttgacgg tggcctggaa  | 360 |
| gaataactac cgcaacgcc actccgcgac cacgtggagc ggccagtacg tcggcggcgc | 420 |
| cgaggcgagg atcaacacc agtggctgct gacctccggc accaccgagg ccaacgcctg | 480 |
| gaagtccacg ctgtcggcc acgacacctt caccaaggtg aagccgtccg ccgcctccat | 540 |
| cgacgcggcg aagaaggcgg gcgtcaaaa cggaacccg ctgcagccg ttcagcagta   | 600 |
| gtcgcgtccc ggcaccggcg ggtgccggga cctcggcc                        | 638 |
| <210> 8  |     |
| <211> 435  |     |
| <212> DNA  |     |
| <213> 链霉亲和素( <i>Streptomyces avidinii</i> )                      |     |
| <400> 8  |     |
| gccggcatca ccggcacctg gtacaaccag ctggcctcga cctcatcgt gaccgcgggc | 60  |
| gccgacggcg cctgaccgg aacctagag tcggccgtcg gcaacgccga gagccgctac  | 120 |
| gtcctgaccg gtcgttaga cagcgcctcg gccaccgacg gcagcggcac cgccctcggc | 180 |
| tggacggtgg cctggaagaa taactaccg aaccccact ccgcgaccac gtggagcggc  | 240 |
| cagtacgtcg gcggcggcga ggcgaggatc aacaccagc ggctgctgac ctccggcacc | 300 |
| accgaggcca acgcttgaa gtccacgtg gtcggccacg acaccttac caagtgaa     | 360 |
| ccgtccgcc cctccatcga cgcggcgaag aagccggcg tcaacaacgg caaccgctc   | 420 |
| gacgccgttc agcag   | 435 |
| <210> 9  |     |
| <211> 27   |     |

[0010]

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| <212> DNA                           |    |
| <213> 人工序列                          |    |
| <220>                               |    |
| <223> PCR 引物                        |    |
| <400> 9                             |    |
| catatgcact tacaaattaa tccttaa       | 27 |
| <210> 10                            |    |
| <211> 31                            |    |
| <212> DNA                           |    |
| <213> 人工序列                          |    |
| <220>                               |    |
| <223> PCR 引物                        |    |
| <400> 10                            |    |
| gaattcggat ccttcaccgt caacaccgtt g  | 31 |
| <210> 11                            |    |
| <211> 32                            |    |
| <212> DNA                           |    |
| <213> 人工序列                          |    |
| <220>                               |    |
| <223> PCR 引物                        |    |
| <400> 11                            |    |
| gaattcaagc ttgccggcat caccggcacc tg | 32 |
| <210> 12                            |    |
| <211> 26                            |    |
| <212> DNA                           |    |
| <213> 人工序列                          |    |
| <220>                               |    |
| <223> PCR 引物                        |    |
| <400> 12                            |    |
| ctgcagctgc tgaacggcgt cgagcg        | 26 |

[0011]



Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr  
 130 135 140

Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly  
 145 150 155 160

Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr  
 165 170 175

Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr  
 180 185 190

Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys Lys Ala Gly  
 195 200 205

Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln Leu Gln Lys Pro  
 210 215 220

Asn Ser Ala Asp Ile His His Thr Gly Gly Arg Ser Ser Met His Leu  
 225 230 235 240

Glu Gly Pro Ile Arg Pro Ile Val Ser Arg Ile Thr Ile His Trp Pro  
 245 250 255

Ser Phe Tyr Asn Val Val Thr Gly Lys Thr Leu Ala Leu Pro Asn Leu  
 260 265 270

Ile Ala Leu Gln His Ile Pro Leu Ser Pro Ala Gly Val Ile Ala Lys  
 275 280 285

Arg Pro Ala Pro Ile Ala Leu Pro Asn Ser Cys Ala Ala  
 290 295 300

[0013]

<210> 14  
 <211> 906  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 编码融合蛋白的 DNA  
  
 <400> 14  
 atgaccaiga ttacgccaaag cttggtaccg agctcggatc cactagtaac ggccgccagt 60  
  
 gtgctggaat tcggcttcat atgcacttac aaattaatcc ttaatggtaa aacattgaaa 120  
  
 ggcgaaacaa ctactgaage tgttgatgct gctactgcag aaaaagtctt caaacaatac 180  
  
 gctaacgaca acgggtgtga cgggtgaagga tccgaattca agcttgccgg catcaccggc 240  
  
 acctggtaca accagctcgg ctcgaccttc atcgtgaccg cgggcccga cggcgcctg 300  
  
 accggaacct acgagtcggc cgtcggcaac gccgagagcc gctacgtcct gaccggtcgt 360  
  
 tacgacagcg ccccgccac cgacggcagc ggcaccgcc tcggttgac ggtggcctgg 420  
  
 aagaataact accgcaacgc ccaactcggc accacgtgga gcggccagta cgtcggcggc 480  
  
 gccgaggcga ggatcaacac ccagtggctg ctgacctcg gcaccaccga ggccaacgcc 540  
  
 tggagtgcca cgctggtcgg ccacgacacc ttaccaagg tgaagccgtc cgccgcctcc 600  
  
 atcgacgcgg cgaagaaggc cggcgtcaac aacggcaacc cgctcgacgc cgttcagcag 660  
  
 ctgcagaagc cgaattctgc agatatccat cacactggcg gccgctcgag catgcatcta 720  
  
 gagggcccaa ttcgccctat agtgagtctg attacaaatc actggccgtc gttttacaac 780  
  
 gtctgtactg ggaaaacct ggcgttacc aactaatcg ccttgacga catccccctt 840  
  
 tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttccaa cagttgcgca 900  
  
 gcctga 906

<210> 15  
 <211> 131

[0014]

|  |     |
|--|-----|
| <212> DNA  |     |
| <213> 人工序列   |     |
| <220>  |     |
| <223> 寡核苷酸链 #1   |     |
| <400> 15   |     |
| cactgcttac tggcttatcg aatggaatt ctgcatgcat ctagagggcc ctattctata | 60  |
| gcatagtgtc acctaaatgc taggcacctt ctagtgccca gccatctgtt gcacaccaa | 120 |
| cgtggcttgc c   | 131 |
| <210> 16   |     |
| <211> 23   |     |
| <212> DNA  |     |
| <213> 人工序列   |     |
| <220>  |     |
| <223> PCR 引物   |     |
| <400> 16   |     |
| cactgcttac tggcttatcg aaa  | 23  |
| <210> 17   |     |
| <211> 18   |     |
| <212> DNA  |     |
| <213> 人工序列   |     |
| <220>  |     |
| <223> PCR 引物   |     |
| <400> 17   |     |
| ggcaagccac gtttggtg  | 18  |
| <210> 18   |     |
| <211> 161  |     |
| <212> DNA  |     |
| <213> 人工序列   |     |
| <220>  |     |

[0015]

|   |     |
|---|-----|
| <223> 寡核苷酸链 #7  |     |
| <400> 18  |     |
| cactgcttac tggcttatcg aatggaatt ctgcatgcat ctgaggggcc ctattctata  | 60  |
| gcatagtgtc acctaaatgc taggcaaccg acaattgcat gaagaactcg cacattgacg | 120 |
| tcaataatga cgtatgttcc caccacaaa cgtggcttgc c                      | 161 |
| <210> 19  |     |
| <211> 32  |     |
| <212> DNA   |     |
| <213> 人工序列  |     |
| <220>   |     |
| <223> PCR 引物  |     |
| <400> 19  |     |
| gggcggctgc atctagaggg ccctattcta ta                               | 32  |
| <210> 20  |     |
| <211> 18  |     |
| <212> DNA   |     |
| <213> 人工序列  |     |
| <220>   |     |
| <223> PCR 引物  |     |
| <400> 20  |     |
| ggcaagccac gtttggtg   | 18  |
| <210> 21  |     |
| <211> 24  |     |
| <212> DNA   |     |
| <213> 人工序列  |     |
| <220>   |     |
| <223> PCR 探针  |     |
| <400> 21  |     |
| ccttctagtt gccagccatc tggt  | 24  |

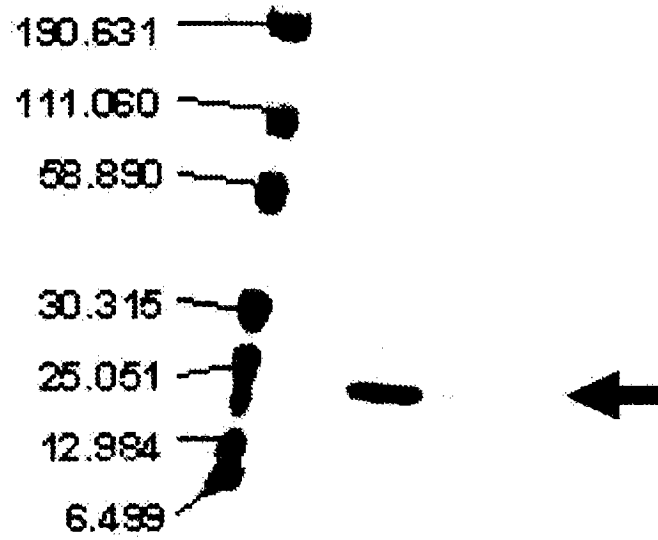
[0016]

<210> 22  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> PCR 探针

<400> 22  
accgacaatt gcatgaagaa ctc

23



经纯化的融合蛋白的  
聚丙烯酰胺凝胶电泳图  
(使用 5~20% 梯度凝胶)

图 1

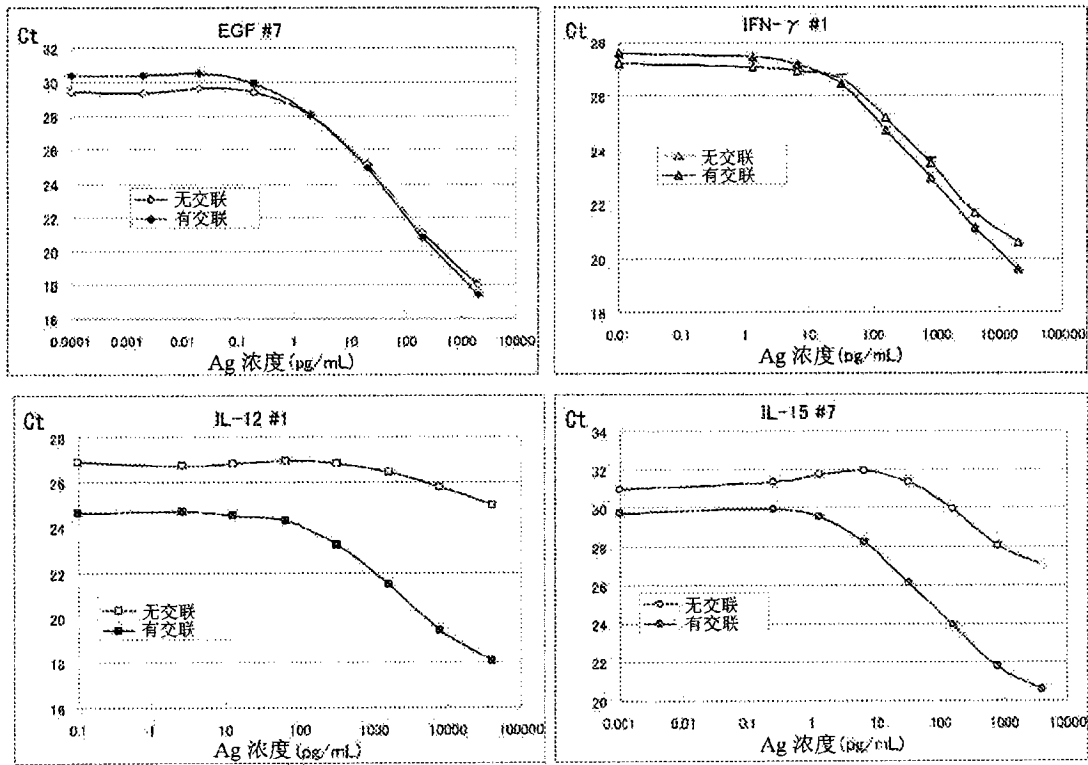


图 2

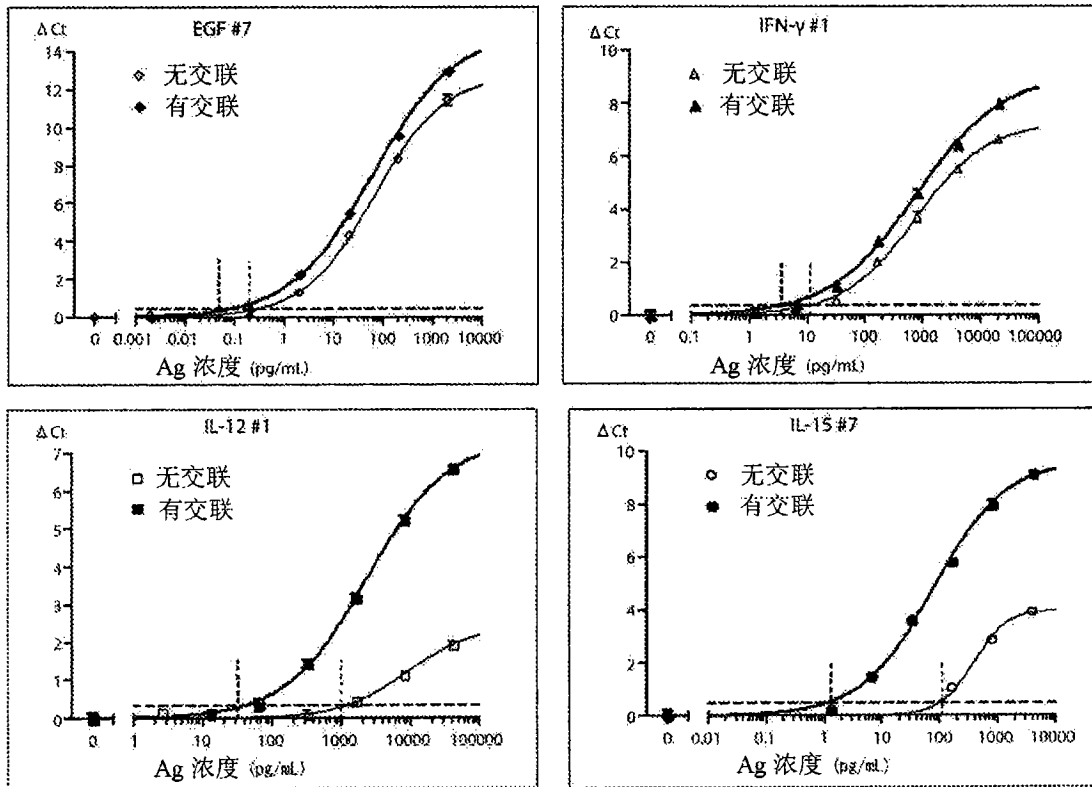


图 3

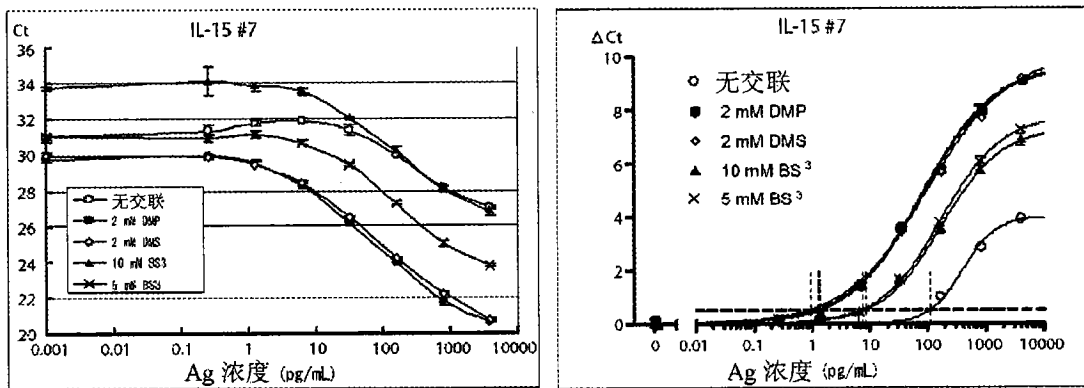


图 4

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 抗体复合物、抗原检测方法及抗体复合物的制造方法                                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102159592A</a>                           | 公开(公告)日 | 2011-08-17 |
| 申请号            | CN200980134113.8                                       | 申请日     | 2009-06-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 新世来科技有限公司  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 财团法人东京都医学研究机构<br>新世来科技有限公司                             |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 财团法人东京都医学研究机构<br>新世来科技有限公司                             |         |            |
| [标]发明人         | 芝崎太<br>森实芳仁  |         |            |
| 发明人            | 芝崎太<br>森实芳仁  |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/46 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/532                |         |            |
| CPC分类号         | C12Q1/68 G01N33/58 G01N33/569 G01N2458/10 C12Q2563/179 |         |            |
| 代理人(译)         | 卢曼<br>郭文洁  |         |            |
| 优先权            | 2008171512 2008-06-30 JP                               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>         |         |            |

#### 摘要(译)

为了提高MUSTag的检测灵敏度，本发明提供一种抗体复合物，该抗体复合物包含作为标记的核酸链、与抗原特异性结合的抗体、以及将核酸链和抗体结合的接合体部位，在该抗体复合物中，使接合体部位包含G蛋白、A蛋白或L蛋白中的任一种的免疫球蛋白结合区并使其与抗体结合，将接合体部位与抗体化学交联，从而制成交联型抗体复合物。

| 细胞因子   | 交联剂                  | 检测限           |           | 定量限(高浓度侧)     |           |
|--|----------------------|---------------|-----------|---------------|-----------|
|  |                      | Ag 浓度 (pg/mL) | 灵敏度       | Ag 浓度 (pg/mL) | 灵敏度       |
| EGF#7<br>(捕获: 单克隆→MUSTag: 多克隆)<br>(capture: mono→MUSTag: poly) | 无交联                  | 0.1981527     | 1         | 2290.5922     | 1         |
|  | 有交联                  | 0.049351      | 4.0151734 | 3843.8635     | 1.6781091 |
| IFN-γ#1<br>(捕获: 单克隆→MUSTag: 多克隆)                               | 无交联                  | 11.38072      | 1         | 10899.282     | 1         |
|  | 有交联                  | 3.521915      | 3.2314011 | 20848.85      | 1.9128646 |
| IL-12#1<br>(捕获: 多克隆→MUSTag: 单克隆)                               | 无交联                  | 983.3599      | 1         | 17463.556     | 1         |
|  | 有交联                  | 32.32467      | 30.421344 | 41759.316     | 2.3912264 |
| IL-15#7<br>(捕获: 多克隆→MUSTag: 单克隆)                               | 无交联                  | 110.7488      | 1         | 1256.4623     | 1         |
|  | 2mM DMP              | 1.31649       | 84.1243   | 1206.8069     | 0.96048   |
|  | 2mM DMS              | 0.9153934     | 120.98492 | 1841.1857     | 1.4653728 |
|  | 10mM BS <sup>3</sup> | 8.38939       | 13.201055 | 1434.9854     | 1.1420839 |
|  | 5mM BS <sup>3</sup>  | 7.113186      | 15.569507 | 1560.0045     | 1.2415848 |