



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102667480 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201080057171. 8  
 (22) 申请日 2010. 11. 19  
 (30) 优先权数据  
 2009-264420 2009. 11. 19 JP  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2012. 06. 15  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/JP2010/006809 2010. 11. 19  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02011/061944 JA 2011. 05. 26  
 (73) 专利权人 优志旺电机株式会社  
 地址 日本东京都  
 (72) 发明人 上田宏 阿部亮二 伊原正喜  
 高木广明  
 (74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
 责任公司 11219  
 代理人 杨青 穆德骏  
 (51) Int. Cl.  
 G01N 33/533 (2006. 01)  
 G01N 21/78 (2006. 01)  
 (56) 对比文件  
 EP 2062974 A1, 2009. 05. 27,  
 CN 1719255 A, 2006. 01. 11,

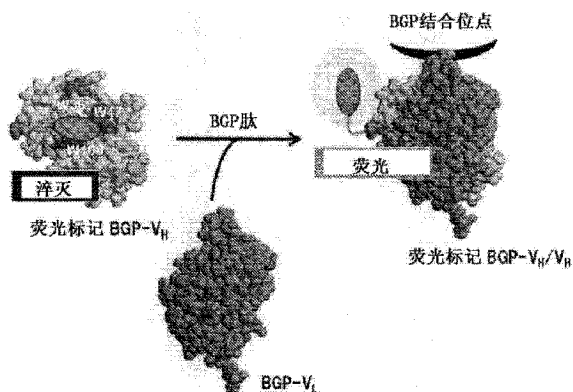
WO 2006033413 A1, 2006. 03. 30,  
 TW 200827441 A, 2008. 07. 01,  
 CN 1711476 A, 2005. 12. 21,  
 CN 1820027 A, 2006. 08. 16,  
 US 2008187941 A1, 2008. 08. 07,  
 WO 2008051762 A2, 2008. 05. 02,  
 Martial Renard, et al.. Knowledge-based  
 Design of Reagentless Fluorescent  
 Biosensors from Recombinant Antibodies.  
 《Journal of Molecular Biology》. 2002, 第 318  
 卷 (第 2 期), 摘要, 第 435 页右栏第 54 行 - 第  
 436 页左栏第 38 行, 图 1、3.  
 Martial Renard, et al.. Knowledge-based  
 Design of Reagentless Fluorescent  
 Biosensors from Recombinant Antibodies.  
 《Journal of Molecular Biology》. 2002, 第 318  
 卷 (第 2 期), 摘要, 第 435 页右栏第 54 行 - 第  
 436 页左栏第 38 行, 图 1、3.  
 Laurent Jespers, et al.. Selection of  
 optical biosensors from chemisynthetic  
 antibody libraries. 《Protein Engineering,  
 Design and Selection》. 2004, 第 17 卷 (第 10  
 期), 第 709-713 页. (续)  
 审查员 张绚

权利要求书2页 说明书21页  
 序列表13页 附图23页

(54) 发明名称  
 荧光免疫测定方法  
 (57) 摘要

本发明的课题在于提供一种免疫测定方法, 其不需要固相化步骤和洗涤步骤, 能够在液相中快速且简易地进行目标物质的定量测定, 并且能够使抗原可见化。通过如下方式解决该课题: 依次进行下述 (a) ~ (c) 的步骤来测定受试物质中存在的目标抗原的浓度: (a) 在液相中, 使抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽与受试物质中的抗原接触, 或者在液相中, 使抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽与受试物质中的抗原接触; (b)

测定所述荧光色素的荧光强度; (c) 以液相中的抗原浓度与所述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标, 计算出受试物质中含有的抗原量。



[ 转续页 ]

CN 102667480 B

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*G01N 33/531* (2006.01)

*G07K 16/18* (2006.01)

(56) 对比文件

Laurent Jespers, et al.. Selection of optical biosensors from chemisynthetic antibody libraries. 《Protein Engineering, Design and Selection》. 2004, 第 17 卷 (第 10 期), 第 709-713 页.

Hannes Neuweiler, et al.. Detection of Individual p53-Autoantibodies by Using Quenched Peptide-Based Molecular Probes. 《Angew. Chem. Int. Ed》. 2002, 第 41 卷 (第 24 期),

第 4769-4773 页.

Martial Renard, et al.. Deriving Topological Constraints from Functional Data for the Design of Reagentless Fluorescent Immunosensors. 《J. Mol. Biol.》. 2003, 第 326 卷 (第 1 期), 第 167-175 页.

Martial Renard, et al.. Deriving Topological Constraints from Functional Data for the Design of Reagentless Fluorescent Immunosensors. 《J. Mol. Biol.》. 2003, 第 326 卷 (第 1 期), 第 167-175 页.

1. 一种抗原浓度测定和检测用试剂盒,具备抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽,且所述抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽中的任意一者由荧光色素标记,该荧光色素在标记到抗体重链可变区多肽或抗体轻链可变区多肽上的状态下被淬灭,其特征在于,所述抗体重链可变区多肽和抗体轻链可变区多肽通过抗原而形成复合物时淬灭被解除,从而使荧光强度增加,能够以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而进行抗原浓度的测定或抗原的可见化。

2. 如权利要求 1 所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,抗体重链可变区多肽与抗体轻链可变区多肽结合成单链抗体。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,荧光色素为罗丹明类荧光色素或噁嗪类荧光色素。

4. 如权利要求 3 所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,荧光色素为 CR110、TAMRA 或 ATTO655。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,抗体重链可变区多肽包括由序列号 1 表示的氨基酸序列构成的多肽,抗体轻链可变区多肽包括由序列号 2 表示的氨基酸序列构成的多肽。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,抗体重链可变区多肽包括由序列号 6 表示的氨基酸序列构成的多肽,抗体轻链可变区多肽包括由序列号 7 表示的氨基酸序列构成的多肽。

7. 一种抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,依次包括下述步骤 (a) ~ (c) :

(a) 使抗体轻链可变区多肽和由在标记到抗体重链可变区多肽上的状态下被淬灭的荧光色素标记的抗体重链可变区多肽、或者抗体重链可变区多肽和由在标记到抗体轻链可变区多肽上的状态下被淬灭的荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽

(a1) 在液相中与受试物质中的抗原接触,或

(a2) 与施用了抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽、或者抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽的受试非人动物对象中的抗原接触,或

(a3) 在体外与受试对象中的抗原接触;

(b) 在所述 (a1) 的情况下,测定荧光色素的荧光强度,

在所述 (a2) 和 (a3) 的情况下,检测所述荧光色素的荧光;

(c) 所述抗体重链可变区多肽和抗体轻链可变区多肽通过抗原而形成复合物时淬灭被解除,从而使荧光强度增加,以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标,在所述 (a1) 的情况下,计算出受试物质中含有的抗原量,在所述 (a2) 和 (a3) 的情况下,使受试对象中含有的抗原可见化。

8. 如权利要求 7 所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,抗体重链可变区多肽与抗体轻链可变区多肽结合成单链抗体。

9. 如权利要求 7 或 8 所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,荧光色素为罗丹明类荧光色素或噁嗪类荧光色素。

10. 如权利要求 9 所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,荧光色素为 CR110、

TAMRA 或 ATTO655。

11. 如权利要求 7 或 8 所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,抗体重链可变区多肽包括由序列号 1 表示的氨基酸序列构成的多肽,抗体轻链可变区多肽包括由序列号 2 表示的氨基酸序列构成的多肽。

12. 如权利要求 7 或 8 所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,抗体重链可变区多肽包括由序列号 6 表示的氨基酸序列构成的多肽,抗体轻链可变区多肽包括由序列号 7 表示的氨基酸序列构成的多肽。

## 荧光免疫测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及不需要固相化步骤和洗涤步骤的新的抗原浓度测定方法和用于实施该抗原浓度测定方法的试剂盒等。

### 背景技术

[0002] 测定抗原或抗体的浓度的方法中,在临床诊断、基础研究和环境调查等中使用最广泛的测定方法是使用识别同一抗原的不同表位的 2 种单克隆抗体或者使用单克隆抗体与多克隆抗体的、称为夹心 ELISA 法(或夹心 RIA 法)的免疫测定方法。夹心法的详情如下所述。作为第一阶段,将称为一次抗体的单克隆/多克隆抗体固定在测定用板上,向其中注入含有抗原的样本,反应一定时间而使抗体与抗原结合。接着,作为第二阶段,使用洗涤液将与抗体结合的杂质和非特异性结合在板上的抗原洗涤除去。作为第三阶段,注入预先结合有酶、荧光色素或放射性同位素等报告分子的标记二次抗体溶液,反应一定时间,使被一次抗体填补的抗原上进一步结合标记二次抗体。反应后,使用洗涤液除去多余的标记抗体,利用酶活性、荧光或放射性同位素等对结合在测定用板上的报告分子的量进行测定,由此测定样本中的抗原量。

[0003] 如上所述,通常的夹心 ELISA 法中,需要使用表位不同的 2 种抗体,但在例如以低分子化合物等作为抗原的情况下,难以制作识别不同表位的多种抗体。因此,上田等人建立了使用 1 种抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)、称为开放式夹心法的高精度的低分子化合物的免疫测定方法(专利文献 1 和 2、非专利文献 1 和 2)。该方法为如下的抗原浓度测定方法:制备对抗原进行特异性识别的抗体的 VH 区多肽和 VL 区多肽,利用报告分子标记一种多肽而制成标记化多肽,将另一种多肽固定在固相上而制成固定化多肽,使含有抗原的试样和标记化多肽与固定化多肽接触,测定结合在固定化多肽上的标记化多肽的报告分子的量。此外,作为用于测定低分子化合物的测定方法,除了免疫测定方法之外,还有液相色谱法等,但该方法需要高精度的测定仪器,并且受试体的需要量也多,测定还耗费时间,而且通用性低。

[0004] 此外,作为使用荧光色素标记后的抗体来测定抗原的浓度的免疫测定方法,已知如下方法:利用不同的荧光色素分别对抗体和抗原进行标记,以荧光色素间发生的荧光共振能量转移(FRET)的效率的变化作为指标的免疫测定方法(非专利文献 3 和 4);以利用通过预先在荧光标记后的抗体中混合消光物质而消光的抗体的荧光因目标检测物质的导入而增强的现象的淬灭效率的变化为指标的免疫测定方法;使用由荧光色素标记后的抗体来测定由标记抗体与测定对象物凝集而引起的荧光强度的减小的荧光免疫测定方法(专利文献 3)。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献 1:日本特开平 10-78436 号公报

[0008] 专利文献 2:日本专利第 3784111 号公报

- [0009] 专利文献 3 :日本特开平 10-282098 号公报
- [0010] 非专利文献
- [0011] 非专利文献 1 :上田宏, 薬学雑誌, 27 :71-80 (2007)
- [0012] 非专利文献 2 :Lim SL, et al., Anal Chem., 79(16):6193-200 (2007)
- [0013] 非专利文献 3 :Iijima I. and Hohsaka T., Chembiochem., 17;10(6) : 999-1006 (2009)
- [0014] 非专利文献 4 :Kajihara D, et al., Nat Methods., 3(11):923 (2006)

## 发明内容

[0015] 发明所要解决的问题

[0016] 如上所述,到现在为止已知的免疫测定方法均需要使抗体或抗原固相化的步骤和用于除去非特异性的标记化合物的吸附的洗涤步骤。这些步骤操作繁琐而耗费时间,而且会导致结果产生偏差,因此,要求开发不需要固相化步骤和洗涤步骤的液相体系免疫测定方法。本申请发明的课题在于提供一种免疫测定方法,其不需要固相化步骤和洗涤步骤,能够在液相中快速且简易地进行目标物质的定量测定,并且能够使抗原可见化。

[0017] 用于解决问题的方法

[0018] 首先,本发明人使用由不同荧光色素标记的抗体 VH 和 VL,尝试建立了以荧光共振能量转移 (FRET) 效率为指标的抗体 / 抗原结合活性评价体系。FRET 测定使用由荧光色素 CR110 标记的抗 BGP 抗体轻链区 (CR110-VL) 和由荧光色素 TAMRA 标记的抗 BGP 抗体重链区 (TAMRA-VH),在不存在抗原的情况下,不发生由 CR110 向 TAMRA 的 FRET,与此相对,在存在抗原的情况下, VH 和 VL 通过抗原而形成三者的复合物,从而预测会发生由 CR110 向 TAMRA 的 FRET,将 CR110-VL 和 TAMRA-VH 或未标记的 VH 与不同浓度的 BGP 抗原肽一同孵育,利用荧光强度分布分析法 (FIDA) 分析 CR110 的荧光强度的变化。结果,在使 CR110-VL 与 TAMRA-VH 反应的情况下,CR110 的荧光强度依赖于 BGP 抗原肽的浓度而降低,因此可以确认,CR110-VL 和 TAMRA-VH 通过抗原肽进行结合而形成复合物,从而发生所预测的由 CR110 向 TAMRA 的 FRET。

[0019] 另一方面,令人意外的是,在使 CR110-VL 与未标记的 VH 反应的情况下,CR110 的荧光强度依赖于 BGP 抗原肽的浓度而增加。为了确认在使用标记后的 VH 的情况下是否也能观察到同样的现象,本发明人将 TAMRA-VH 和 CR110-VL 或未标记的 VL 与不同浓度的 BGP 抗原肽一同孵育,并对 TAMRA 的荧光强度的变化进行了分析。结果可知,在使 TAMRA-VH 与未标记的 VL 反应的情况下,TAMRA-VH 的荧光强度也依赖于 BGP 抗原肽的浓度而增加。上述结果完全是预料之外的结果,从而建立了如下假说:也许 VL 和 VH 作为淬灭剂对荧光色素 (CR110、TAMRA) 发挥作用,仅在 VH 和 VL 通过抗原肽而形成复合物时,该淬灭才会解除,从而使荧光强度增加。

[0020] 基于上述假说,本发明人尝试建立了利用淬灭现象的新的测定方法(以下有时也称为“均相荧光免疫测定方法 (homogenous fluorescent based immunoassay)”),使 TAMRA-VH 和不同浓度的 BGP 肽在存在或不存在未标记的 VL 的条件下反应并测定荧光强度。结果发现,在 VL 存在下,TAMRA-VH 的荧光强度依赖于 BGP 肽的浓度而增加,根据存在 / 不存在 VL 时的 TAMRA-VH 的荧光强度之比 (+VL/-VL) 的分析结果,能够构建高灵敏度的均相

荧光免疫测定方法。此外,本发明人确认,通过使用 ATTO655 作为荧光色素、并且借助间隔区将荧光色素标记到 VH 上,使上述“均相荧光免疫测定方法”的灵敏度增加。

[0021] 此外,本发明人使用将存在于 VH 上的 4 个色氨酸(以下有时也记为 Trp 或 W) 分别突变成苯丙氨酸(以下有时也记为 Phe 或 F) 而得到的突变 VH 进行了确认淬灭效果的实验,发现 VH 的氨基酸序列中的第 36 位、第 47 位、第 106 位(对应于 Kabat 编号体系中的第 103 位)的色氨酸作为荧光色素的淬灭剂起作用。这些色氨酸在小鼠抗体 VH 中高度保守,因此可知,通过应用本发明的“均相荧光免疫测定方法”,能够使用各种抗体进行抗原的测定。

[0022] 本发明基于以上发现而完成。

[0023] 发明效果

[0024] 根据本发明,可以提供能够在液相中快速且简易地进行目标物质的定量测定的免疫测定方法和用于实施利用该测定方法的抗原测定的试剂盒。本发明的测定方法是以标记在抗体 VL 或 VH 上的荧光色素的荧光强度为指标来检测/测定抗原与上述抗体 VL 和 VH 的结合的方法,该方法基于下述新发现:上述抗体 VL 与 VH 未结合时,上述荧光色素处于淬灭的状态,当上述抗体 VL 和 VH 通过抗原而结合时,上述荧光色素的淬灭被解除,并且该方法不需要现有免疫测定方法中必不可少的固相化步骤和洗涤步骤,因此,能够在短时间内得到偏差小、精度高的测定结果。

[0025] 即,本发明涉及:(1) 一种抗原浓度测定和检测用试剂盒,具备抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽,且上述抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽中的任意一者由荧光色素标记,其特征在于,能够以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而进行抗原浓度的测定或抗原的可见化;(2) 如上述(1)所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,抗体重链可变区多肽与抗体轻链可变区多肽结合成单链抗体。

[0026] 此外,本发明涉及:(3) 如上述(1)或(2)所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,荧光色素为罗丹明类荧光色素或噁嗪类荧光色素;(4) 如上述(3)所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,荧光色素为 CR110、TAMRA 或 ATTO655;(5) 如上述(1)~(4)中任一项所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,抗体重链可变区多肽包括由序列号 1 表示的氨基酸序列构成的多肽,抗体轻链可变区多肽包括由序列号 2 表示的氨基酸序列构成的多肽;(6) 如上述(1)~(4)中任一项所述的抗原浓度测定和检测用试剂盒,其特征在于,抗体重链可变区多肽包括由序列号 6 表示的氨基酸序列构成的多肽,抗体轻链可变区多肽包括由序列号 7 表示的氨基酸序列构成的多肽。

[0027] 进而,本发明涉及:(7) 一种抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,依次包括下述步骤(a)~(c):(a) 使抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽、或者抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽(a1) 在液相中与受试物质中的抗原接触,或(a2) 与施用了抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽、或者抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽的受试非人动物对象中的抗原接触,或(a3) 在体外与受试对象中的抗原接触;(b) 在上述(a1)的情况下,测定荧光色素的荧光强度,在上述(a2)和(a3)的情况下,检测上述荧光色素的荧光;(c) 以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标,在上述(a1)

的情况下,计算出受试物质中含有的抗原量,在上述(a2)和(a3)的情况下,使受试对象中含有的抗原可见化。

[0028] 另外,本发明涉及:(8)如上述(7)所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,抗体重链可变区多肽与抗体轻链可变区多肽结合成单链抗体;(9)如上述(7)或(8)所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,荧光色素为罗丹明类荧光色素或噁嗪类荧光色素;(10)如上述(9)所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,荧光色素为CR110、TAMRA或ATTO655;(11)如上述(7)~(10)中任一项所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,抗体重链可变区多肽包括由序列号1表示的氨基酸序列构成的多肽,抗体轻链可变区多肽包括由序列号2表示的氨基酸序列构成的多肽;(12)如上述(7)~(10)中任一项所述的抗原浓度测定和检测方法,其特征在于,抗体重链可变区多肽包括由序列号6表示的氨基酸序列构成的多肽,抗体轻链可变区多肽包括由序列号7表示的氨基酸序列构成的多肽。

### 附图说明

[0029] 图1是示意性地表示本发明的CR110标记抗BGP抗体轻链可变区多肽(CR110-VL)、TAMRA标记抗BGP抗体重链可变区多肽(TAMRA-VH)和它们的复合物(CR110-VL/TAMRA-VH)的图。

[0030] 图2是表示在不同浓度的BGP肽存在下使CR110-VL与TAMRA-VH反应、并使用490nm的激发光测定荧光光谱而得到的结果的图。

[0031] 图3是表示在不同浓度的BGP肽存在下使CR110-VL与TAMRA-VH反应、并测定525nm(F525)和575nm(F575)的荧光强度的变化而得到的结果的图。

[0032] 图4是表示在不同浓度的BGP肽存在下使CR110-VL与TAMRA-VH反应、测定525nm和575nm的荧光强度并分析荧光强度之比(F575/F525)的变化而得到的结果的图。

[0033] 图5是表示使本发明的CR110标记抗BGP抗体轻链可变区多肽与TAMRA标记抗BGP抗体重链可变区多肽在不同浓度的BGP肽存在下进行反应、并使用488nm的激光和510~560nm的荧光滤光片通过荧光强度分布分析法(FIDA)进行分析而得到的结果的图。图中,CR110-VL表示CR110标记抗BGP抗体轻链可变区多肽,TAMRA-VH表示TAMRA标记抗BGP抗体重链可变区多肽,w. t. -VH表示未标记的抗BGP抗体重链可变区多肽。

[0034] 图6是表示使本发明的CR110标记抗BGP抗体轻链可变区多肽与TAMRA标记抗BGP抗体重链可变区多肽在不同浓度的BGP肽存在下进行反应、并使用543nm的激光和560~620nm的荧光滤光片通过荧光强度分布分析法(FIDA)进行分析而得到的结果的图。图中,CR110-VL表示CR110标记抗BGP抗体轻链可变区多肽,TAMRA-VH表示TAMRA标记抗BGP抗体重链可变区多肽,w. t. -VL表示未标记的抗BGP抗体轻链可变区多肽。

[0035] 图7是表示使本发明的TAMRA标记抗BGP抗体重链可变区多肽与不同浓度的BGP肽在存在或不存在未标记的抗BGP抗体轻链可变区多肽的条件下进行反应、并使用543nm的He-Ne激光测定荧光强度而得到的结果的图。图中,+VL表示在存在未标记的抗BGP抗体轻链可变区多肽的条件下进行反应的结果,-VL表示在不存在未标记的抗BGP抗体轻链可变区多肽的条件下进行反应并测定荧光强度而得到的结果。

[0036] 图8是表示使本发明的TAMRA标记抗BGP抗体重链可变区多肽与不同浓度的BGP

肽在存在或不存在未标记的抗 BGP 抗体轻链可变区多肽的条件下进行反应、并对荧光强度之比 (+VL/-VL) 进行分析而得到的结果的图。

[0037] 图 9 是表示本发明的抗 BGP 抗体重链可变区多肽中存在的色氨酸残基的图。该图是表示抗 BGP 抗体重链可变区多肽与抗 BGP 抗体轻链可变区多肽的复合物 (VH/VL 复合物) 以及单独的抗 BGP 抗体重链可变区多肽 (VH) 的三维结构预测模型中的色氨酸残基 (W33、W36、W47、W106) 的位置的图。需要说明的是, 这些色氨酸残基的位置在 Kabat 数据库的编号体系中分别对应于 VH 的第 33 位、第 36 位、第 47 位、第 103 位的氨基酸。

[0038] 图 10 是表示使野生型抗 BGP 抗体重链可变区多肽 (WT) 或突变型抗 BGP 抗体重链可变区多肽 (W33F、W36F、W47F、W106F) 与抗 BGP 抗体轻链可变区多肽在不同浓度的 BGP 肽存在下进行反应、并使用 543nm 的 He-Ne 激光测定荧光强度而得到的结果的图。

[0039] 图 11 是表示使野生型抗 BGP 抗体重链可变区多肽 (WT) 或突变型抗 BGP 抗体重链可变区多肽 (W33F、W36F、W47F、W106F) 与抗 BGP 抗体轻链可变区多肽在不同浓度的 BGP 肽存在下进行反应、并利用荧光相关光谱法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy; FCS) 分析扩散时间 (diffusion time) 的变化而得到的结果的图。

[0040] 图 12 是表示附加有间隔区的荧光标记抗 BGP 抗体重链可变区多肽 (Fluorescent labeled BGP-VH) 与抗 BGP 抗体轻链可变区多肽 (BGP-VL) 的复合物 (Fluorescent labeled BGP-VH/VL) 的三维结构预测模型的图。

[0041] 图 13 是表示使包含或不包含间隔区 (GGGSGGGG; 序列号 4) 的 ATTO655 标记抗 BGP 抗体重链可变区多肽与抗 BGP 抗体轻链可变区多肽在不同浓度的 BGP 肽存在下进行反应、并测定荧光强度而得到的结果的图。

[0042] 图 14 是表示使包含或不包含间隔区 (GGGSGGGG; 序列号 4) 的 ATTO655 标记抗 BGP 抗体重链可变区多肽与抗 BGP 抗体轻链可变区多肽在不同浓度的 BGP 肽存在下进行反应而测定的荧光强度之比的图。

[0043] 图 15 是表示使本发明的荧光标记抗体重链可变区多肽与抗体轻链可变区多肽结合而成的荧光标记单链抗体的三维结构预测模型的图。

[0044] 图 16 是表示使本发明的荧光标记抗体重链可变区多肽与抗体轻链可变区多肽结合而成的荧光标记单链抗体的一维结构的示意图的图。

[0045] 图 17 是表示使包含或不包含间隔区的 ATTO655 标记抗 BGP 单链抗体与不同浓度的 BGP 肽反应、并测定荧光强度而得到的结果的图。

[0046] 图 18 是表示使包含或不包含间隔区的 ATTO655 标记抗 BGP 单链抗体与不同浓度的 BGP 肽反应而测定的荧光强度之比的图。

[0047] 图 19 是表示使本发明的 ATTO655 标记抗 BGP 单链抗体与不同浓度的 BGP 肽反应、并使用荧光影像分析仪 (FMBIO-III; 日立软件工程有限公司制造) 对荧光进行检测而得到的结果的图。图中, FL92 表示由序列号 3 表示的氨基酸序列构成的间隔序列, 2TAG 表示由 MX (X 为荧光标记氨基酸) 构成的间隔序列。

[0048] 图 20 是表示使包含或不包含间隔区的荧光标记抗 BGP 单链抗体与不同浓度的 BGP 肽反应、并使用荧光影像分析仪 (FMBIO-III; 日立软件工程有限公司制造) 对荧光进行定量而得到的结果的图。图中, FL92 表示由序列号 3 表示的氨基酸序列构成的间隔序列, 2TAG 表示由 MX (X 为荧光标记氨基酸) 构成的间隔序列。

[0049] 图 21 是表示使包含或不包含间隔区的荧光标记抗 BGP 单链抗体与不同浓度的 BGP 肽反应、并使用荧光影像分析仪 (FMBIO-III ; 日立软件工程公司制造) 对荧光进行检测而得到的结果的图。图中, FL92 表示由序列号 3 表示的氨基酸序列构成的间隔序列, 2TAG 表示由 MX (X 为荧光标记氨基酸) 构成的间隔序列。

[0050] 图 22 是表示使包含 FL92 间隔区 (序列号 3) 的荧光标记抗 BGP 单链抗体与不同浓度的 BGP 肽反应、并使用荧光影像分析仪 (FMBIO-III ; 日立软件工程公司制造) 和 MF20/FluoroPoint-Light (奥林巴斯公司制造) 进行测定而得到的荧光强度之比的图。

[0051] 图 23 是表示使包含或不包含间隔区的 TAMRA 标记抗 BGP 单链抗体与不同浓度的 BGP 肽反应、并对荧光进行检测而得到的结果的图。G3S(1) 表示包含 GGGs 的间隔区 (接头) 的序列, G3S(2) 表示包含 GGGSGGGs (序列号 4) 的间隔区 (接头) 的序列, G3S(3) 表示包含 GGGSGGGSGGGs (序列号 10) 的间隔区 (接头) 的序列。

[0052] 图 24 是表示使 TAMRA 标记抗 BGP 单链抗体蛋白质与不同浓度的 BGP 在 PBST 缓冲液和终浓度为 50% 的人血浆存在下进行反应、并测定荧光强度而得到的结果的图。

[0053] 图 25 是表示使本发明的 ATTO655 标记抗双酚 A (BPA) 抗体重链可变区多肽与不同浓度的 BPA 在存在或不存在未标记的抗 BPA 抗体轻链可变区多肽的条件下反应、并测定荧光强度而得到的结果的图。

[0054] 图 26 是表示使 ATTO655 标记抗 BPA 抗体重链可变区多肽与不同浓度的 BPA 在存在或不存在未标记的抗 BPA 抗体轻链可变区多肽的条件下反应而测定的荧光强度之比的图。

[0055] 图 27 是表示使包含或不包含间隔区的 TAMRA 标记抗 BPA 单链抗体与不同浓度的 BPA 肽反应、并对荧光进行检测而得到的结果的图。G3S(2) 表示包含 GGGSGGGs (序列号 4) 的间隔区 (接头) 的序列, G3S(3) 表示包含 GGGSGGGSGGGs (序列号 10) 的间隔区 (接头) 的序列, G3S(5) 表示包含 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGs (序列号 11) 的间隔区 (接头) 的序列。

[0056] 图 28 是表示使 TAMRA 标记抗 HEL 单链抗体与不同浓度的 HEL 蛋白反应、并对荧光进行检测而得到的结果的图。

[0057] 图 29 是表示使 TAMRA 标记抗雌二醇单链抗体与不同浓度的雌二醇反应、并对荧光进行检测而得到的结果的图。

[0058] 图 30 是表示使 TAMRA 标记抗 SA 单链抗体与不同浓度的 BSA 或 HSA 反应、并对荧光进行检测而得到的结果的图。

[0059] 图 31 是表示 Kabat 数据库的编号体系中的第 36 位、第 47 位或第 103 位的色氨酸在小鼠抗体重链可变区的氨基酸序列中保守的图。该图是表示 A) 抗 BGP 小鼠抗体重链可变区的三维结构预测模型、以及该抗 BGP 小鼠抗体重链可变区中含有的色氨酸残基中 W36、W47、W106 与淬灭特别相关的可能性的图。

[0060] 图 32 是表示 W33 在很多种类的小鼠抗体重链可变区中高度保守的图。

[0061] 图 33 是表示 W36 在很多种类的小鼠抗体重链可变区中高度保守的图。

[0062] 图 34 是表示 W47 在很多种类的小鼠抗体重链可变区中高度保守的图。

[0063] 图 35 是表示 W106 在很多种类的小鼠抗体重链可变区中高度保守的图。需要说明的是, 上述 VH 的氨基酸序列中的 Trp106 对应于 Kabat 数据库的编号体系中第 103 位的位置。

## 具体实施方式

[0064] 作为本发明的抗原浓度测定和检测用试剂盒,只要是如下所述的试剂盒则没有特别限制:具备抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽,且上述抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽中的任意一者由荧光色素标记,其特征在于,能够以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而进行抗原浓度的测定或抗原的可见化。即,只要是下述(1)~(4)所示的试剂盒则没有特别限制:(1)一种抗原浓度测定用试剂盒,具备抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽,其中,所述试剂盒能够以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而测定抗原浓度;(2)一种抗原检测用试剂盒,具备抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽,其中,所述试剂盒能够以受试对象中的抗原量与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而使抗原可见化;(3)一种抗原浓度测定用试剂盒,具备抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽,其中,所述试剂盒能够以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而测定抗原浓度;(4)一种抗原检测用试剂盒,具备抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽,其中,所述试剂盒能够以受试对象中的抗原量与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而使抗原可见化。上述抗体轻链可变区多肽与上述抗体重链可变区多肽只要能够通过同一抗原分子形成复合物,则既可以以各自独立的两个多肽片段的形式来制备,也可以以通过接头等融合而成的单链抗体的形式来制备。此外,作为上述抗原,只要是上述抗体重链可变区多肽和上述抗体轻链可变区多肽特异性识别的抗原则没有特别限制,可以列举例如:蛋白质、肽、糖质、脂质、糖脂质、低分子化合物等。

[0065] 作为本发明的抗原浓度测定和检测方法,只要是特征在于依次包括下述(a)~(c)的步骤的抗原浓度测定和检测方法则没有特别限制,所述步骤为:(a)使抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽、或者抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽(a1)在液相中与受试物质中的抗原接触,或(a2)与施用了抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽、或者抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽的受试非人动物对象中的抗原接触,或(a3)在体外与受试对象中的抗原接触;(b)在上述(a1)的情况下,测定荧光色素的荧光强度,在上述(a2)和(a3)的情况下,检测上述荧光色素的荧光;(c)以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标,在上述(a1)的情况下,计算出受试物质中含有的抗原量,在上述(a2)和(a3)的情况下,使受试对象中含有的抗原可见化。即,只要是如下所述的方法则没有特别限制,所述方法为:一种抗原浓度测定方法(以下有时称为“测定方法[I]”),其特征在于,依次包括下述步骤:在液相中使抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽与受试物质中的抗原接触的步骤(a1-1),测定上述荧光色素的荧光强度的步骤(b),计算出受试物质中含有的抗原量的步骤,即以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而计算出受试物质中含有的抗原量的步骤(c);一种抗原浓度测定方法(以下有时称为“测定方法[II]”),其特征在于,依次包括下述步骤:在液相中使抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽与受试物质中的抗原接触的步骤(a1-2),测定上述荧光色素的荧光强度的步骤(b),计算出受试物质中含有的抗原量的步骤,即以液相中的抗原浓度与上述荧光色素的荧光强度存在正相关

关系为指标而计算出受试物质中含有的抗原量的步骤 (c) ;一种抗原检测方法 ( 以下有时称为“非人动物检测方法 [I]” ), 其特征在于, 依次包括下述步骤: 与施用了抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽的受试非人动物对象中的抗原接触的步骤 (a2-1), (b) 检测上述荧光色素的荧光的步骤, (c) 以受试非人动物对象中的抗原量与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而使受试对象中含有的抗原可见化的步骤; 一种抗原检测方法 ( 以下有时称为“非人动物检测方法 [II]” ), 其特征在于, 依次包括下述步骤: 与施用了抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽的受试非人动物对象中的抗原接触的步骤 (a2-2), 检测上述荧光色素的荧光的步骤 (b), 以受试非人动物对象中的抗原量与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而使受试对象中含有的抗原可见化的步骤 (c) ;一种抗原检测方法 ( 以下有时称为“体外检测方法 [I]” ), 其特征在于, 依次包括下述步骤: 在体外使抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽与受试对象中的抗原接触的步骤 (a3-1), 检测上述荧光色素的荧光的步骤 (b), 以受试对象中的抗原量与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而使受试对象中含有的抗原可见化的步骤 (c) ;一种抗原检测方法 ( 以下有时称为“体外检测方法 [II]” ), 其特征在于, 依次包括下述步骤: 在体外使抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽与受试对象中的抗原接触的步骤 (a3-2), 检测上述荧光色素的荧光的步骤 (b), 以受试对象中的抗原量与上述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标而使受试对象中含有的抗原可见化的步骤 (c) 。上述抗体轻链可变区多肽与上述抗体重链可变区多肽只要能够通过同一抗原分子形成复合物, 则既可以以各自独立的两个多肽片段的形式来制备, 也可以以通过接头等融合而成的单链抗体的形式来制备。此外, 作为上述抗原, 只要是上述抗体重链可变区多肽和上述抗体轻链可变区多肽特异性识别的抗原则没有特别限制, 可以列举例如: 蛋白质、肽、糖质、脂质、糖脂质、低分子化合物等。

[0066] 作为上述抗体重链可变区多肽, 只要包含由抗体重链基因的 V 区、D 区和 J 区的外显子编码的抗体重链可变区中特异性的氨基酸序列则没有特别限制, 在上述抗体重链可变区中特异性的氨基酸序列的 N 末端和 / 或 C 末端侧可以进一步附加有任意的氨基酸序列。此外, 作为上述抗体重链可变区中特异性的氨基酸序列, 优选为 Kabat 数据库的编号体系中第 36 位、第 47 位或第 103 位的氨基酸为色氨酸的氨基酸序列, 具体而言, 可以优选例示序列号 1 表示的氨基酸序列、序列号 6 表示的氨基酸序列。

[0067] 作为上述抗体轻链可变区多肽, 只要包含由抗体轻链基因的 V 区和 J 区的外显子编码的抗体轻链可变区中特异性的氨基酸序列则没有特别限制, 在上述抗体轻链可变区中特异性的氨基酸序列的 N 末端和 / 或 C 末端侧可以进一步附加有任意的氨基酸序列。此外, 作为上述抗体轻链可变区中特异性的氨基酸序列, 优选为 Kabat 数据库的编号体系中第 35 位的氨基酸为色氨酸的氨基酸序列, 具体而言, 可以优选例示序列号 2 表示的氨基酸序列、序列号 7 表示的氨基酸序列。

[0068] 抗体轻链可变区多肽、抗体重链可变区多肽以及含有抗体轻链可变区和抗体轻链可变区两者的单链抗体多肽可以通过公知的化学合成法、基因重组技术、利用蛋白分解酶使抗体分子分解的方法等来制备, 其中, 优选利用比较容易操作且能够进行大量制备的基因重组技术来制备。在利用基因重组技术制备上述多肽的情况下, 可以将含有编码抗体轻链可变区或抗体轻链可变区中特异性的氨基酸序列的碱基序列的 DNA 导入到适当的载体

中来制作表达载体,利用使用细菌、酵母、昆虫、动植物细胞等作为宿主的表达系统或无细胞翻译系统来表达目的多肽。在无细胞翻译系统中进行多肽的表达时,例如,可以使多肽在向大肠杆菌、小麦胚芽、兔网织红细胞等的无细胞提取液中添加三磷酸核苷和各种氨基酸而得到的反应液中进行表达。

[0069] 作为上述荧光色素,只要是在标记到抗体重链可变区多肽或抗体轻链可变区多肽上的状态下被淬灭(消光)的荧光色素则没有特别限制,可以例示具有罗丹明、香豆素、Cy、EvoBlue、嘿嗪、卡波派洛宁(Carbopyronin)、萘、联苯、葱、菲、芘、咪唑等作为基本骨架的荧光色素或该荧光色素的衍生物,具体而言,可以列举:CR110:羧基罗丹明 110, RhodamineGreen(商标名);TAMRA:羧基四甲基罗丹明, TMR;ATTO655(商标名);BODIPY FL(商标名):4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-对称引达省-3-丙酸;BODIPY 493/503(商标名):4,4-二氟-1,3,5,7-四甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-对称引达省-8-丙酸;BODIPYR6G(商标名):4,4-二氟-5-(4-苯基-1,3-丁二烯基)-4-硼-3a,4a-二氮杂-对称引达省-3-丙酸;BODIPY 558/568(商标名):4,4-二氟-5-(2-噻吩基)-4-硼-3a,4a-二氮杂-对称引达省-3-丙酸;BODIPY 564/570(商标名):4,4-二氟-5-苯乙炔基-4-硼-3a,4a-二氮杂-对称引达省-3-丙酸;BODIPY576/589(商标名):4,4-二氟-5-(2-吡咯基)-4-硼-3a,4a-二氮杂-对称引达省-3-丙酸;BODIPY 581/591(商标名):4,4-二氟-5-(4-苯基-1,3-丁二烯基)-4-硼-3a,4a-二氮杂-对称引达省-3-丙酸;Cy3(商标名);Cy3B(商标名);Cy3.5(商标名);Cy5(商标名);Cy5.5(商标名);EvoBlue10(商标名);EvoBlue30(商标名);MR121;ATTO 390(商标名);ATTO 425(商标名);ATTO 465(商标名);ATTO 488(商标名);ATTO 495(商标名);ATTO520(商标名);ATTO 532(商标名);ATTO Rho6G(商标名);ATTO 550(商标名);ATTO 565(商标名);ATTO Rho3B(商标名);ATTO Rho11(商标名);ATTO Rho12(商标名);ATTO Thio12(商标名);ATTO 610(商标名);ATTO 611X(商标名);ATTO 620(商标名);ATTO Rho14(商标名);ATTO633(商标名);ATTO 647(商标名);ATTO 647N(商标名);ATTO 655(商标名);ATTO Oxa12(商标名);ATTO 700(商标名);ATTO 725(商标名);ATTO 740(商标名);Alexa Fluor 350(商标名);Alexa Fluor 405(商标名);Alexa Fluor 430(商标名);Alexa Fluor 488(商标名);Alexa Fluor 532(商标名);Alexa Fluor 546(商标名);Alexa Fluor 555(商标名);Alexa Fluor568(商标名);Alexa Fluor 594(商标名);Alexa Fluor 633(商标名);Alexa Fluor 647(商标名);Alexa Fluor 680(商标名);Alexa Fluor 700(商标名);Alexa Fluor 750(商标名);Alexa Fluor 790(商标名);Rhodamine Red-X(商标名);Texas Red-X(商标名);5(6)-TAMRA-X(商标名);5TAMRA(商标名);SFX(商标名),其中,可以特别优选列举作为罗丹明类荧光色素的 CR110、TAMRA 以及作为嘿嗪类荧光色素的 ATTO655。

[0070] 作为利用荧光色素对抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽进行标记的方法,没有特别限制,可以使用下述方法:利用多肽的两端或侧链的官能团,直接进行标记或者借助交联剂间接进行标记的方法;在利用体外转录-翻译系统合成多肽的同时位点特异性地进行标记的方法等。作为利用体外转录-翻译系统进行标记的方法,已知有:琥珀抑制法(Elleman J et al. (1991)Methods Enzymol. 202:301-36)、C末端标记法(日本特开 2000-139468 号公报)、N末端标记法(美国专利第 5643722 号公报、Olejnik et al. (2005)

Methods 36:252-260) 等,在琥珀抑制法中,制作将编码标记的靶位点的氨基酸的密码子替换成作为终止密码子之一的琥珀密码子的 DNA 或 mRNA,利用体外转录-翻译系统由该 DNA 或 mRNA 合成蛋白质。此时,通过向蛋白质合成反应液中添加结合有被标记的非天然氨基酸的抑制型 tRNA,能够合成在替换成琥珀密码子的位点上导入有标记氨基酸的蛋白质。此外,在 C 末端标记法中,通过在以最佳浓度添加有标记的嘌呤霉素的体外转录-翻译系统中进行由 DNA 或 mRNA 向蛋白质的翻译,能够合成在 C 末端特异性地导入有标记的蛋白质。

[0071] 上述本发明的抗原浓度测定和检测用试剂盒可以包括缓冲液、测定用的管或板、能够作为标准物质使用的抗原等此种免疫测定试剂盒中通常使用的试剂和器具。该本发明的抗原浓度测定和检测用试剂盒能够适合用于本发明的抗原浓度测定和检测方法。

[0072] 上述本发明的测定方法 [I] 的步骤 (a1-1) 中,向缓冲液、生理盐水等溶液中分别添加抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽,然后,添加受试物质并进行孵育,从而在溶液中形成由抗体轻链可变区多肽 / 由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽 / 被抗体特异性识别的抗原构成的三者的复合物。此外,上述测定方法 [II] 的步骤 (a1-2) 中,向缓冲液、生理盐水等溶液中分别添加抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽,然后,添加受试物质并进行孵育,从而在溶液中形成由抗体重链可变区多肽 / 由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽 / 被抗体特异性识别的抗原构成的三者的复合物。作为上述受试物质,可以列举:可能含有作为测定对象的靶抗原的血清、血浆、唾液、尿液等体液、培养上清、细胞提取液、菌体提取液、工业废水。此外,作为上述孵育条件,只要是一般能够用于抗体抗原反应的条件则没有特别限制,温度条件可以设定为例如 1~30°C,优选设定为 18~25°C,反应时间可以设定为例如 5~180 分钟,优选设定为 60~120 分钟。孵育结束后的溶液可以不经洗涤等步骤而直接供于以下的步骤 (b)。这是本发明的抗原浓度测定和检测方法的一大特征。

[0073] 上述本发明的测定方法 [I] 或测定方法 [II] 的步骤 (b) 中,可以通过对由上述步骤 (a1-1) 或 (a1-2) 制备的溶液照射激发光来测定溶液中的荧光色素的荧光强度。用于测定的荧光测定装置没有特别限制,可以优选列举例如:MF20/FluoroPoint-Light (奥林巴斯公司制造)、FMBIO-III (日立软件工程公司制造) 等。此外,测定时,作为由上述步骤 (a1-1) 制备的溶液的阴性对照,优选对下述溶液进行测定:1) 不含抗体轻链可变区多肽而仅含有由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽的溶液;2) 不含抗体轻链可变区多肽而仅含有由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽和受试物质的溶液;3) 含有抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽、但不含受试物质的溶液;4) 含有抗体轻链可变区多肽、未标记的抗体重链可变区多肽和受试物质的溶液;等,作为由上述步骤 (a1-2) 制备的溶液的阴性对照,优选对下述溶液进行测定:1) 不含抗体重链可变区多肽而仅含有由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽的溶液;2) 不含抗体重链可变区多肽而仅含有由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽和受试物质的溶液;3) 含有抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽、但不含受试物质的溶液;4) 含有抗体重链可变区多肽、未标记的抗体轻链可变区多肽和受试物质的溶液;等。

[0074] 上述本发明的测定方法 [I] 或测定方法 [II] 的步骤 (c) 中,可以由上述步骤 (b) 所得到的荧光强度的测定值计算出受试物质中含有的抗原量。即,由于由上述步骤 (a1-1) 或 (a1-2) 制备的溶液中的抗原浓度与由步骤 (b) 测定的荧光强度存在正相关关系,因此,

通过测定使用含有已知浓度的抗原的受试物质时的荧光强度来制作显示抗原浓度与荧光强度的关系的标准曲线,由该标准曲线计算出使用含有未知浓度的抗原的受试物质时的荧光强度的测定值所对应的抗原浓度,由此可以求出受试物质中含有的抗原量。此外,步骤(c)中的“计算出抗原量”也包括利用基于标准曲线而预先设定的换算式等自动地计算出抗原量的情况。

[0075] 上述本发明的非人动物检测方法 [I] 的步骤 (a2-1) 中,对受试非人动物对象施用抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽,在受试非人动物对象中形成由抗体轻链可变区多肽 / 由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽 / 被抗体特异性识别的抗原构成的三者的复合物。此外,上述非人动物检测方法 [II] 的步骤 (a2-2) 中,对受试非人动物对象的全身或局部施用抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽,在受试非人动物对象中形成由抗体重链可变区多肽 / 由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽 / 被抗体特异性识别的抗原构成的三者的复合物。作为上述受试非人动物对象,只要是人以外的动物则没有特别限制,可以优选列举例如:小鼠、大鼠、仓鼠、猴、猪等。此外,作为上述“施用”方法,可以从肌肉内注射、腹腔内注射、静脉内注射、皮下注射、埋植、涂布等非经口的局部施用方法或经口的施用方法中适当选择。

[0076] 上述本发明的非人动物检测方法 [I] 或非人动物检测方法 [II] 的步骤 (b) 中,在保持个体的状态下以非侵袭的方式对在上述步骤 (a2-1) 或 (a2-2) 中施用了其中任意一者由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽的受试非人动物对象中的荧光色素的荧光进行检测,或者对从上述受试非人动物对象中采集的组织或细胞中的荧光色素的荧光进行检测。作为上述“检测”方法,只要是能够对受试非人动物对象的个体、组织或细胞照射激发光而对荧光色素的荧光进行二维或三维检测的方法则没有特别限制。此外,检测时,优选同时制作使用内窥镜、X射线、CT、MRI、超声波、显微镜等来显示受试非人动物对象的个体、组织或细胞的结构图像。

[0077] 上述本发明的非人动物检测方法 [I] 或非人动物检测方法 [II] 的步骤 (c) 中,根据由上述步骤 (b) 得到的荧光色素的荧光的检测结果,使受试非人动物对象中的抗原可见化。即,由于受试非人动物对象中的抗原量与由步骤 (b) 检测到的荧光的荧光强度存在正相关关系,因此,通过将显示受试非人动物对象的个体、组织或细胞的结构图像数据与由步骤 (b) 检测到的荧光的二维或三维图像进行比较,能够获知抗原的定位(位置)。例如,在使用内窥镜进行检测的情况下,对受试非人动物对象的组织照射可见光从而制作能够观察的可见光图像,并且,通过涂布等使其中任意一者进行了标记的抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽与该组织接触,然后,照射针对所标记的荧光色素的激发光来制作荧光图像,将上述可见光图像与荧光图像进行比较,由此能够获知组织中的抗原的定位。

[0078] 上述本发明的体外检测方法 [I] 的步骤 (a3-1) 中,在体外将抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽与受试对象中的抗原进行孵育,从而形成由抗体轻链可变区多肽 / 由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽 / 被抗体特异性识别的抗原构成的三者的复合物。此外,上述体外检测方法 [II] 的步骤 (a3-2) 中,在体外将抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽与受试对象中的抗原进行孵育,从而形成由抗体重链可变区多肽 / 由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽 / 被抗体特异性识别的抗原构成的三者的复合物。作为上述受试对象,可以列举:可能含有作为测定对象的靶抗原的

培养细胞、组织切片、从生物体采集的组织或细胞等以及印迹在硝酸纤维素膜、PVDF 膜等上的细胞提取液等。此外,作为上述孵育条件,只要是一般能够用于抗体抗原反应的条件则没有特别限制,温度条件可以设定为例如 1~30℃,优选设定为 18~25℃,反应时间可以设定为例如 5~180 分钟,优选设定为 60~120 分钟。孵育结束后的溶液可以不经洗涤等步骤而直接供于以下的步骤 (b)。这是本发明的抗原浓度测定和检测方法的一大特征。

[0079] 上述体外检测方法 [I] 或体外检测方法 [II] 的步骤 (b) 中,对在上述步骤 (a3-1) 或 (a3-2) 中与其中任意一者由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽孵育后的受试对象中的荧光色素的荧光进行二维或三维检测。作为上述“检测”方法,可以列举:荧光显微镜、荧光影像分析仪等。

[0080] 上述体外检测方法 [I] 或体外检测方法 [II] 的步骤 (c) 中,根据由上述步骤 (b) 得到的荧光色素的荧光的检测结果,能够使受试对象中的抗原可见化。即,由于受试对象中的抗原量与由步骤 (b) 检测到的荧光的荧光强度存在正相关关系,因此,基于由步骤 (b) 检测到的荧光的二维或三维图像,能够获知抗原的定位(位置)。

[0081] 在以下所示的实施例中,具体且更详细地对本发明进行说明。下述实施例是用于说明本发明的例子,本发明的技术范围不受这些实施例的限定。

[0082] 实施例 1

[0083] 1. 使用抗 BGP 抗体来源的 VH 和 VL 的均相荧光免疫测定方法的建立

[0084] (抗 BGP 抗体 V 区基因表达载体的构建)

[0085] 在编码抗人骨钙素(人谷氨酸蛋白, human Bone Gla Protein; BGP) 的抗体的重链可变区(VH; 序列号 1) 或轻链可变区(VL; 序列号 2) 的 DNA 序列的 N 末端上附加包含琥珀密码子的 ProX<sup>TM</sup> 标签(MSKQIEVNXSNET(X 为荧光标记氨基酸); 序列号 3) 的 DNA 序列,将所得的基因重组到 pIVEX2. 3d 载体(罗氏诊断公司制造)的 NcoI 与 HindIII 位点中。该构建的表达载体以在插入的 VH 或 VL 的 N 末端附加有 ProX<sup>TM</sup> 标签(MSKQIEVNXSNET(X 为荧光标记氨基酸); 序列号 3)、在 C 末端附加有 His- 标签的方式来设计。图 1 中示意性地示出 CR110 标记抗 BGP 抗体轻链可变区多肽(CR110-VL)、TAMRA 标记抗 BGP 抗体重链可变区多肽(TAMRA-VH) 以及它们的复合物(CR110-VL/TAMRA-VH)。以同样的方式将 TAG 密码子替换成 TTT 密码子,制作将荧光标记氨基酸残基替换成苯丙氨酸残基的野生型 VH 和 VL 表达载体。

[0086] 进而,也一并制作如下载体:将上述 VH 基因中所含的 4 个色氨酸密码子(TGG; Trp33, Trp36, Trp47, Trp106) 分别替换成苯丙氨酸密码子(TTT) 而得到的突变 VL(W33F、W36F、W47F、W106F) 表达载体,在 ProX 标签与 VH 基因的 N 末端之间附加有间隔区(GGGSGGG; 序列号 4) 的附加间隔区 VH 表达载体,利用接头(LVTVSSGGGGSGGGSGGGGS, 序列号 5; 或 GGGSGGGSGGGGS, 序列号 9) 使 VH 基因与 VL 基因结合而得到的单链抗体(scFv) 表达载体,在 ProX<sup>TM</sup> 标签与 scFv 的 N 末端之间具有间隔区(GGGSGGGSGGGGS, 序列号 4; 或 GGGSGGGSGGGGS, 序列号 10) 序列的单链抗体(scFv) 表达载体,在 N 末端具有 MX(X 为荧光标记氨基酸) 的 scFv 的表达载体。

[0087] (标记抗 BGP 抗体 V 区蛋白的制作)

[0088] 使用 RTS100 大肠杆菌二硫键蛋白表达试剂盒(E. coli Disulfide Kit)(罗氏诊断公司制造),利用无细胞翻译系统向 V 区蛋白 N 末端区域引入荧光标记氨基酸。反应液

(50  $\mu$  L) 中添加有 7  $\mu$  L 的氨基酸混合物、1  $\mu$  L 的蛋氨酸、7  $\mu$  L 的反应混合物、25  $\mu$  L 的活化大肠杆菌裂解物、5  $\mu$  L 的质粒 DNA (500ng)、5  $\mu$  L 的荧光标记琥珀抑制氨酰 tRNA (0.8nmol)。用于制作荧光标记蛋白的荧光标记氨酰 tRNA (TAMRA-X-AF-琥珀抑制 tRNA、CR110-X-AF-琥珀抑制 tRNA 和 ATTO655-X-AF-琥珀抑制 tRNA) 使用定点引入非天然氨基酸的蛋白质功能化的 CloverDirect™ tRNA 试剂 (プロテインエクスプレス公司制造)。使反应液在 20°C、600rpm 的条件下反应 2 小时后,进一步在 4°C 下进行 16 小时的反应。反应结束后,使用 1  $\mu$  L 反应液进行 SDS-PAGE (15%),利用荧光影像分析仪 (FMBIO-III;日立软件工程公司制造) 观察蛋白表达。进而,使用 His- 标签抗体进行蛋白免疫印迹,确认合成了目的蛋白。

[0089] 合成的 V 区蛋白利用 His-Spin Trap 柱 (GE ヘルステア公司制造) 进行纯化。向上述反应液 (50  $\mu$  L) 中添加洗涤液 (20mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)/0.5M NaCl/60mM 咪唑/0.1% 聚氧乙烯 (23) 月桂醚) 使其达到 400  $\mu$  L,并加到 His-Spin Trap 柱上。在室温下孵育 15 分钟后,用洗涤液洗涤三次。接着,用 200  $\mu$  L 的洗脱液 (20mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)/0.5M NaCl/0.5M 咪唑/0.1% 聚氧乙烯 (23) 月桂醚) 洗脱两次。进而,使用 UltraFree-0.5 离心管 (ミリポア公司制造),用 PBS (+0.05% 吐温 20) 对洗脱液进行缓冲液交换和浓缩。纯化后的样品的浓度使用 SDS-PAGE 和 FCS (MF20;奥林巴斯公司制造) 来测定。

[0090] 实施例 2

[0091] (荧光光谱测定)

[0092] 使用 PBS (+0.05% 吐温 20) 将实施例 1 中制作的 TAMRA 标记抗 BGP 抗体 VH 蛋白和 CR110 标记抗 BGP 抗体 VL 蛋白 (分别为 1  $\mu$  g/mL、30  $\mu$  L) 与作为抗原的 7 个残基的 BGP 的 C 末端肽 (RRFYGPV;序列号 8) 制备成总计 200  $\mu$  L。在 25°C 下放置 90 分钟后,使用荧光分光光度计 (FluoroMax-4;ホリバ・ジヨバンイボン公司制造) 进行荧光光谱测定。对于 CR110-VL 与 TAMRA-VH 的混合物而言,激发波长设置为 490nm,对于 TAMRA-VH 而言,激发波长设置为 550nm。计算出 CR110-VL 与 TAMRA-VH 的混合物的荧光强度比  $I_A/I_D$ 。 $I_A$  和  $I_D$  分别为 575nm 和 525nm 下的荧光强度。通过荧光强度比 ( $I_A/I_D$ ) 或最大荧光波长的荧光强度的曲线拟合计算出离解常数 (Kd) 值。此时,使用 Graphpad Prism (Graphpad 公司制造) 的 S 型量效模型作为统计分析软件。将在不同浓度的 BGP 肽存在下使 CR110-VL 与 TAMRA-VH 反应、并使用 490nm 的激发光测定荧光光谱而得到的结果示于图 2 中,将在不同浓度的 BGP 肽存在下使 CR110-VL 与 TAMRA-VH 反应、并测定 525nm 和 575nm 的荧光强度的变化所得到的结果示于图 3 中,将在不同浓度的 BGP 肽存在下使 CR110-VL 与 TAMRA-VH 反应、并分析 525nm 和 575nm 的荧光强度之比 ( $F_{575}/F_{525}$ ) 的变化所得到的结果示于图 4 中。使用 PBS (+0.05% 吐温 20、0.2%BSA) 将包含或不包含间隔区的 TAMRA 标记抗 BGP 抗体 scFv 蛋白 (2  $\mu$  g/mL、25  $\mu$  L) 和作为抗原的 BGP 肽制备成总计 200  $\mu$  L 的样品。然后,将样品在 25°C 下放置 70 分钟后,使用荧光分光光度计 (FluoroMax-4;ホリバ・ジヨバンイボン公司制造) 进行荧光光谱测定,通过曲线拟合计算出荧光强度。此时,使用 ImageJ 软件 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) 的 S 型量效模型作为统计分析软件。在激发波长为 550nm、测定波长为 580nm 的条件下进行测定。

[0093] (荧光强度分布分析法)

[0094] 使用 PBS (+0.05% 吐温 20) 将实施例 1 中制作的荧光标记 VH 蛋白和荧光标记 VL 蛋白 (分别为 1  $\mu$  g/mL、7.5  $\mu$  L) 或者荧光标记 scFv (1  $\mu$  g/mL、7.5  $\mu$  L) 连同 BGP 肽一起制备

成 50  $\mu$  L, 加入到 384 孔的玻璃底微孔板 (奥林巴斯公司制造) 中, 在 25 $^{\circ}$ C 下孵育 90 分钟。利用荧光强度分布分析法 (Fluorescence Intensity Multiple Distribution Analysis; FIDA) 的测定中, 使用 MF20/FluoroPoint-Light (奥林巴斯公司制造) 在 25 $^{\circ}$ C 下进行测定。TAMRA 和 ATTO655 分别用 543nm 和 633nm 的激光进行激发。每次测定中获取 10 秒钟的数据, 对每个样品进行 10 次测定。由该测定值计算出平均值和标准差。

[0095] 实施例 3

[0096] (TAMRA-VH 和 CR110-VL 与 BGP 肽的结合活性评价)

[0097] 首先, 尝试建立利用荧光共振能量转移法 (FRET) 的抗体 / 抗原结合活性评价体系。FRET 测定中分别使用 CR110 和 TAMRA 作为供体和受体。供体 (CR110) 的荧光与受体 (TAMRA) 的吸收有充分的重叠, 因而可以作为 FRET 对使用。使取向因子 ( $\kappa^2$ ) 为 2/3 时, 计算出福斯特 (フェルスタ) 距离 ( $R_0$ ) 为 62 $\text{\AA}$ , 该值适于检测蛋白质的分子间相互作用。在不存在抗原的情况下, VL 与 VH 间的相互作用弱, 因此, 不发生由 CR110 向 TAMRA 的 FRET, 与此相对, 在存在抗原的情况下, VH、VL 和抗原形成三者的复合物, 结果, 预测会发生由 CR110 向 TAMRA 的 FRET。

[0098] 为了确认通过抗原使 CR110-VL 与 TAMRA-VH 结合时是否会检测到由 CR110 向 TAMRA 的 FRET, 进行了以下的实验。将 CR110-VL 与 TAMRA-VH 或未标记的 VH 连同不同浓度的 BGP 抗原肽 (110000ng) 一起进行孵育, 利用荧光强度分布分析法 (FIDA) 分析 CR110 的荧光强度的变化。测定中, 使用 488nm 的激光作为激发光, 使用 510~560nm 的荧光滤光片进行检测。结果示于图 5 中。在使 CR110-VL 与 TAMRA-VH 进行反应的情况下, CR110 的荧光强度依赖于 BGP 抗原肽的浓度而降低。由该结果确认, CR110-VL 和 TAMRA-VH 通过抗原肽进行结合而形成复合物, 由此引起了所预测的由 CR110 向 TAMRA 的 FRET。另一方面, 令人意外的是, 在使 CR110-VL 与未标记的 VH 反应的情况下, CR110 的荧光强度依赖于 BGP 抗原肽的浓度而增加。由该结果推测出以下的可能性: VL 作为淬灭剂对 CR110 起作用, 在 CR110-VL 单独存在的情况下, CR110 的荧光被 VL 淬灭, 但在 CR110-VL、VH 和抗原肽形成三者的复合物的情况下, 该淬灭效果解除。

[0099] 为了确认对于 VH 而言是否也能观察到这种 VL 所带来的淬灭效果, 进行了以下的实验。使 TAMRA-VH 与 CR110-VL 或未标记的 VL 连同不同浓度的 BGP 抗原肽 (1~10000ng) 一起进行孵育, 利用荧光强度分布分析法 (FIDA) 分析 TAMRA 的荧光强度的变化。测定中, 使用 543nm 的激光作为激发光, 使用 560~620nm 的荧光滤光片进行检测。结果示于图 6 中。在使 TAMRA-VH 与 CR110-VL 进行反应的情况下, TAMRA 的荧光强度依赖于 BGP 抗原肽的浓度而增加。此外, 同样地, 在使 TAMRA-VH 与未标记的 VL 进行反应的情况下, TAMRA-VH 的荧光强度也依赖于 BGP 抗原肽的浓度而增加。由上述结果推测出以下的可能性: 与 VL 同样, VH 也作为淬灭剂对 TAMRA 起作用, 在 TAMRA-VH 单独存在的情况下, TAMRA 的荧光被淬灭, 但在 TAMRA-VH、VL 和抗原肽形成三者的复合物的情况下, 该淬灭效果解除。由以上的结果暗示出, VH 和 VL 对荧光色素具有淬灭效果, 并且, 该效果随着 VH/VL/ 抗原的三者复合物的形成而解除 (图 9)。

[0100] 实施例 4

[0101] (利用淬灭现象的抗原浓度的均相荧光免疫测定方法的建立)

[0102] 本发明人考虑, 是否可以利用实施例 3 中明确的淬灭现象来建立新的免疫测定方

法,从而进行了以下的实验。使 TAMRA-VH 与不同浓度的 BGP 肽在存在或不存在未标记的 VL 的条件下进行反应,使用 543nm 的 He-Ne 激光测定荧光强度而得到的结果示于图 7 中。在 VL 存在下,TAMRA-VH 的荧光强度依赖于 BGP 肽的浓度而增加。另一方面,在不存在 VL 的条件下,TAMRA-VH 的荧光强度无论在与何种浓度的 BGP 肽反应的情况下均保持较低。此外,对 TAMRA-VH 在存在 / 不存在 VL 的条件下的荧光强度之比 (+VL/-VL) 进行分析的结果是,离解常数  $K_d$  为  $1.2 \times 10^{-7}$  [M] (图 8)。由以上的结果表明,能够建立利用 VH 和 VL 蛋白所带来的淬灭现象的、全新的均相荧光免疫测定方法。

[0103] 实施例 5

[0104] (VH 中的 Trp 所带来的淬灭效果的研究)

[0105] 由实施例 3 的结果表明,对于抗原的滴定而言,TAMRA 的荧光增加量高于 CR110 的荧光减少量。TAMRA 为罗丹明 (Rhodamine) 类色素,迄今为止的研究报道了罗丹明类色素被色氨酸 (Trp) 等氨基酸淬灭 (消光)。因此,本发明人推测存在于 VH 中的 Trp 残基参与 TAMRA 的淬灭,从而建立了如下假说:在 TAMRA-VH 单独存在的情况下,TAMRA 的荧光被存在于其附近的 Trp 残基淬灭,但通过 TAMRA-VH 与 VL 和抗原形成复合物,使 TAMRA/Trp 间的相互位置发生变化,从而解除了淬灭。如图 9 所示,VH 具有 4 个 Trp 残基 (Trp33、Trp36、Trp47、Trp106)。在利用预测分子模型而进行的分析中,预测 Trp33、Trp36 和 Trp106 参与了与 VL 的疏水相互作用,Trp33 参与了与 BGP 肽的相互作用。为了研究这些 Trp 残基是否对淬灭产生影响,使用将 Trp 替换成 Phe 的 4 种突变型 VH,进行了以下的实验。

[0106] 使野生型或突变型抗 BGP 抗体重链可变区多肽 (W33F、W36F、W47F、W106F) 与 VL 在不同浓度的 BGP 肽存在下进行反应,使用 543nm 的 He-Ne 激光测定荧光强度。结果示于图 10 和表 1 中。对突变体的荧光标记 VH 单独的荧光强度进行测定的结果是,与野生型 (WT) 相比,W106F 和 W36F 分别显示出 31% 和 29% 的荧光增加。W47F 显示出 11% 的荧光增加。另一方面,W33F 显示出 9% 的荧光减少。由上述结果表明,主要是 Trp36、Trp47 和 Trp106 参与 TAMRA 的荧光淬灭。此外,W33F、W36F、W106F 通过与 VL 和 BGP 肽一同反应,分别显示出 1.5 倍、1.3 倍、1.5 倍的依赖于抗原浓度的荧光增加。因 Trp 向 Phe 的突变而使依赖于抗原的淬灭的解除减少,上述结果暗示,Trp33、Trp36 和 Trp106 部分地参与淬灭。另一方面,在使 W47F 与 BGP 肽和 VL 反应的情况下,也完全未观察到荧光的增加。利用 FCS 测定而得到的扩散时间 (diffusion time) 的分析结果 (图 11) 表明,因 Trp47 的突变而使抗体的结合活性消失,因此可知,VH 的 Trp47 对于抗体与抗原的结合是必需的。

[0107] 根据以上的结果,由荧光标记 VH 单独的荧光增加和依赖于抗原浓度的荧光增加量的减少的这两点可以确认,Trp33 和 Trp106 是对于淬灭重要的 Trp。此外,Trp47 与依赖于抗原浓度的淬灭的关联尚不清楚,但可知其对于抗原介导的 VH 和 VL 的复合物形成是非常重要的位点。需要说明的是,上述 VH 的氨基酸序列中的 Trp106 在 Kabat 数据库的编号体系中对应于第 103 位的位置 (Kabat, E. et al., "Sequences of proteins of immunological interest, 5th edn.", U. S. Department of Health and Human Service, Public Service, National Institute of Health, Washington, DC, 1991.)。

[0108] [表 1]

[0109] 表 1. TAMRA 标记 VH 蛋白的相对荧光淬灭

V <sub>H</sub> 蛋白	荧光强度 (I <sub>0</sub> ) <sup>*1</sup>	荧光强度 (I <sub>0</sub> ) <sup>*2</sup>	荧光强度 (I <sub>BP</sub> ) <sup>*3</sup>	荧光增加量 <sup>*4</sup> (I <sub>0</sub> /I <sub>WT</sub> )	荧光变化量 <sup>*5</sup> (I <sub>BP</sub> /I <sub>0</sub> )	K <sub>d</sub> <sup>*6</sup>
WT	24.7	25.6	47.1	1.00	1.84	1.2×10 <sup>-7</sup>
W33F	21.8	23.7	34.8	0.88	1.47	1.6×10 <sup>-7</sup>
W36F	31.8	31.5	41.4	1.29	1.31	7.2×10 <sup>-8</sup>
W47F	26.7	27.4	27.6	1.08	1.01	ND
W106F	30.8	31.9	46.7	1.25	1.46	1.4×10 <sup>-6</sup>

[0110] \*1 (I<sub>0</sub>)= 未添加 VL 和 BGP 肽时的荧光强度 (荧光标记 V<sub>H</sub> 单独的荧光强度)

[0111] \*2 (I<sub>H</sub>)= 添加 VL、但未添加 BGP 肽时的荧光强度

[0112] \*3 (I<sub>BP</sub>)= 添加 VL 和 BGP 肽时的荧光强度 (此时, BGP 肽的浓度为 10000ng/mL)

[0113] \*4 荧光增加量 = 各 I<sub>0</sub> 的荧光强度相对于 WT 的 I<sub>0</sub> 的荧光强度 (表示为 I<sub>WT</sub>) 的比例

[0114] \*5 荧光变化量 = 依赖于抗原浓度的荧光的增加量

[0115] \*6 离解常数

[0116] 实施例 6

[0117] ( 噁嗪类荧光色素和间隔区的附加所带来的淬灭效果的研究 )

[0118] 对于荧光色素和间隔区对均相荧光免疫测定方法的灵敏度产生的影响进行了研究。淬灭的效率依赖于荧光色素的种类而有较大变化, 据报道与罗丹明类色素相比, 噁嗪 (Oxazin) 类色素能够更有效地淬灭。因此, 本发明人制作了使用噁嗪类荧光色素 ATTO655 作为标记物质的 ATTO655-VH, 并进行了与实施例 4 同样的实验。进而, 制作了 ATTO655 与 VH 之间附加有 GGGSGGGS (序列号 4) 作为间隔区的 ATTO655-VH(+ 间隔区), 对间隔区的有无给淬灭效果带来的影响进行了研究。图 12 中示出附加有间隔区的荧光标记抗 BGP 抗体重链可变区多肽 (Fluorescent labeled BGP-VH) 与抗 BGP 抗体轻链可变区多肽 (BGP-VL) 的复合物 (Fluorescent labeled BGP-VH/VL) 的三维结构预测模型。

[0119] 使用附加或未附加间隔区的 ATTO655-VH 进行与实施例 4 同样的实验的结果 (图 13) 是, 在任何一种情况下, ATTO655-VH 的荧光强度均依赖于 BGP 肽的浓度而增加。此外, 由未附加间隔区的 ATTO655-VH 得到的荧光强度与使用 TAMRA-VH 时相比为 3 倍。进而明确, 通过附加间隔区, 与未附加间隔区时相比, 荧光强度增加约 2 倍。认为通过附加 GGGSGGGS 间隔区, 使作为淬灭剂的 Trp 与荧光色素之间的距离靠近, 从而对这种荧光强度的增加产生影响。

[0120] 此外, 对 ATTO655-VH 在存在 / 不存在 VL 的条件下的荧光强度之比 (+VL/-VL) 进行分析的结果 (图 14) 是, 在未附加间隔区的情况下, 离解常数 K<sub>d</sub> 为 8.4×10<sup>-8</sup>[M], 在附加有间隔区的情况下, 离解常数 K<sub>d</sub> 为 1.8×10<sup>-7</sup>[M]。认为离解常数越高则测定体系的灵敏度越高, 因此, 以上的结果意味着, 通过在荧光色素与 VH 之间设置间隔区, 能够建立灵敏度更高的测定体系。

[0121] 实施例 7

[0122] ( 使用单链抗体的均相荧光免疫测定方法的建立 )

[0123] 为了建立使用利用由序列号 5 或序列号 9 表示的氨基酸序列构成的接头使 VH 与 VL 结合而成的单链抗体 (scFv) 的均相荧光免疫测定方法, 进行了以下的实验。将使本发明的荧光标记抗体重链可变区多肽与抗体轻链可变区多肽结合而成的荧光标记单链抗体的三维结构预测模型示于图 15 中, 将上述荧光标记单链抗体的一维结构示于图 16 中。与分别使用 VH 和 VL 的肽片段时同样, 在使用荧光标记 scFv 的情况下, 也观察到依赖于 BGP 肽

浓度的荧光强度的增加。将利用序列号 5 的接头结合而成的 ATTO655 标记抗 BGP 抗体 scFv 的结果示于图 17~22 中,将利用序列号 9 的接头结合而成的 TAMRA 标记抗 BGP 抗体 scFv 的结果示于图 23 中。

[0125] 实施例 8

[0126] (人血浆中的荧光免疫测定)

[0127] 使用 PBS(+0.05%吐温 20、0.2%BSA) 将 TAMRA 标记抗 BGP 抗体 scFv 蛋白(2 $\mu$ g/mL、6.25 $\mu$ L)与作为抗原的 BGP 肽制备成总计 50 $\mu$ L,以形成含有 50%人血浆的样品。然后,在 25 $^{\circ}$ C 下放置 90 分钟后,利用荧光影像分析仪(FMBIO-III;日立软件工程公司制造)进行观察。在激发波长为 532nm、测定波长为 580nm 的条件下进行测定。结果示于图 24 中。在含有 50%的人血浆的样品中,也观察到依赖于 BGP 肽浓度的荧光强度的增加。

[0128] 实施例 9

[0129] 2. 使用抗 BPA 抗体来源的 VH 和 VL 的均相荧光免疫测定方法的建立

[0130] (抗 BPA 抗体来源的 V 区基因表达载体的构建)

[0131] 在编码抗双酚 A(BPA) 抗体的 VH(序列号 6) 的基因的 N 末端附加包含琥珀密码子的 ProX<sup>TM</sup> 标签(MSKQIEVNXSNET(X 为荧光标记氨基酸);序列号 3) 的 DNA 序列,将所得的基因重组到 pIVEX2.3d 载体(罗氏诊断公司制造)的 NcoI 与 HindIII 位点中。该构建的表达载体以在插入的 VH 或 VL 的 N 末端附加有包含琥珀密码子的 ProX<sup>TM</sup> 标签(MSKQIEVNXSNET(X 为荧光标记氨基酸);序列号 3)、在 C 末端附加有 His- 标签的方式来设计。此外,以同样的方式在编码抗 BPA 抗体的 VL(序列号 7) 的基因的 N 末端附加 ProX<sup>TM</sup> 标签的氨基酸 X 被替换成 F 而得到的 DNA 序列,并重组到 pIVEX2.3d 载体(罗氏诊断公司制造)的 NcoI 与 HindIII 位点中。该构建的表达载体以在插入的 VL 的 N 末端附加有 ProX<sup>TM</sup> 标签的氨基酸 X 被替换成 F 而得到的序列、在 C 末端附加有 His- 标签的方式来设计。进而,也一并制作如下载体:利用接头(GGGGSGGGSGGGG;序列号 9)使 VH 基因与 VL 基因结合而成的单链抗体(scFv)表达载体,在 ProX<sup>TM</sup> 标签与 scFv 的 N 末端之间具有间隔区(GGGSGGG,序列号 4;GGGSGGGSGGG,序列号 10;或 GGGSGGGSGGGSGGG,序列号 11) 的 3 种单链抗体(scFv)表达载体。

[0132] (利用无细胞翻译系统的荧光标记蛋白的制作)

[0133] 使用 RTS 100 大肠杆菌二硫键蛋白表达试剂盒(罗氏诊断公司制造),利用无细胞翻译系统向 V 区蛋白的 N 末端区域引入荧光标记氨基酸。反应液(50 $\mu$ L)中添加有 7 $\mu$ L 的氨基酸混合物、1 $\mu$ L 的蛋氨酸、7 $\mu$ L 的反应混合物、25 $\mu$ L 的活化大肠杆菌裂解物、5 $\mu$ L 的质粒 DNA(500ng)、5 $\mu$ L 的 ATTO655-X-AF- 琥珀抑制 tRNA(0.8nmol)。用于制作荧光标记蛋白的 ATTO655-X-AF- 琥珀抑制 tRNA 使用定点引入非天然氨基酸的蛋白质功能化的 CloverDirect<sup>TM</sup> tRNA 试剂(プロテインエクスプレス公司制造)。使反应液在 20 $^{\circ}$ C、600rpm 的条件下反应 2 小时,然后在 4 $^{\circ}$ C 下进行 16 小时的反应。反应结束后,使用 1 $\mu$ L 反应液进行 SDS-PAGE(15%),利用荧光影像分析仪(FMBIO-III;日立软件工程公司制造)观察蛋白表达。进而,使用 His- 标签抗体进行蛋白免疫印迹,确认合成了目的蛋白。

[0134] 接着,使用 His Spin Trap 柱(GE ヘルステア公司制造),对合成的 V 区蛋白进行纯化。向上述反应液(50 $\mu$ L)中添加洗涤液(20mM 磷酸盐缓冲液(pH7.4)/0.5M NaCl/60mM 咪唑/0.1% 聚氧乙烯(23)月桂醚)使其达到 400 $\mu$ L,并加到 His-Spin Trap 柱上。在

室温下孵育 15 分钟后,用洗涤液洗涤三次。接着,用 200  $\mu$ L 的洗脱液(20mM 磷酸盐缓冲液(pH7.4)/0.5M NaCl/0.5M 咪唑/0.1% 聚氧乙烯(23)月桂醚)洗脱两次。进而,使用 UltraFree-0.5 离心管(ミリポア公司制造),将洗脱液的缓冲液交换为 PBS(+0.05% 吐温 20),同时进行浓缩。使用 SDS-PAGE 和 FCS(MF20;奥林巴斯公司制造)对样品浓度进行测定。

[0135] 实施例 10

[0136] (荧光光谱测定)

[0137] 将实施例 9 中制作的 ATTO655 标记抗 BPA 抗体 VH 蛋白和未标记的抗 BPA 抗体 VL 蛋白(分别为 1  $\mu$ g/mL、7.5  $\mu$ L)与作为抗原的 BPA 制备成总计 50  $\mu$ L 的 10%MeOH 的 PBS(+0.05% 吐温 20)溶液,在 25 $^{\circ}$ C 下放置 90 分钟后,利用荧光影像分析仪(FMBIO-III;日立软件工程公司制造)进行观察。在激发波长为 635nm、测定波长为 670nm 的条件下进行测定。通过荧光测定值的曲线拟合计算出离解常数(Kd)值。此时,使用 Graphpad Prism(Graphpad 公司制造)的 S 型量效模型作为统计分析软件。

[0138] 用 PBS(+0.05% 吐温 20、0.2%BSA、1%MeOH)将包含或不含间隔区的 TAMRA 标记抗 BPA 抗体 scFv 蛋白(2  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ L)与作为抗原的 BPA 制备成总计 200  $\mu$ L 的样品。然后,将样品在 25 $^{\circ}$ C 下放置 10 分钟后,使用荧光分光光度计(FluoroMax-4;ホリバ・ジヨバンイボン公司制造)进行荧光光谱测定,通过曲线拟合计算出荧光强度。此时,使用 ImageJ 软件(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)的 S 型量效模型作为统计分析软件。在激发波长为 550nm、测定波长为 580nm 的条件下进行测定。

[0139] 实施例 11

[0140] (使用标记抗 BPA 抗体来源的 V 区蛋白的均相荧光免疫测定方法的建立)

[0141] 为了建立使用 ATTO655-VH 和未进行荧光标记的 VL 的均相荧光免疫测定方法,进行了以下的实验。使 ATTO655-VH 与不同浓度的 BPA 在存在或不存在未标记的 VL 的条件下进行反应,并测定荧光强度(图 25)。在 VL 存在下,ATTO655-VH 的荧光强度依赖于 BPA 的浓度而增加。另一方面,在不存在 VL 的条件下,ATTO655-VH 的荧光强度无论在与何种浓度的 BPA 反应的情况下均保持较低。此外,对 ATTO655-VH 在存在/不存在 VL 的条件下的荧光强度之比(+VL/-VL)进行分析的结果是,离解常数(Kd)为  $2.4 \times 10^{-8}$  [M](图 26)。此外,与实施例 7 同样,为了建立使用单链抗体(scFv)的荧光免疫测定方法,进行了以下的实验。在使用 TAMRA 标记抗 BPA 抗体 scFv 的情况下,与分别使用 VH 和 VL 的肽片段时同样,也观察到依赖于 BPA 浓度的荧光强度的增加(图 27)。

[0142] 实施例 12

[0143] 3. 使用各种抗体来源的单链抗体的均相荧光免疫测定方法的建立

[0144] (抗 HEL 抗体来源、抗雌二醇抗体来源、抗 SA 抗体来源的 V 区基因表达载体的构建)

[0145] 将在单链抗体(scFv)的 DNA 序列的 N 末端具有包含琥珀密码子的 ProX<sup>TM</sup> 标签(MSKQIEVNXSNET(X 为荧光标记氨基酸);序列号 3)、在 C 末端具有 His- 标签、在 ProX<sup>TM</sup> 标签与 scFv 的 N 末端之间具有间隔区(GGGSGGG,序列号 4)的 DNA 序列重组到 pIVEX2.3d 载体(罗氏诊断公司制造)的 NcoI 与 HindIII 位点中,从而构建表达载体。各单链抗体(scFv)的 DNA 序列如下所示:抗鸡卵清溶菌酶(HEL)抗体 scFv 的 DNA 序列是利用接

头序列 (GGGSGGGSGGGGS, 序列号 9) 使抗 HEL 抗体的 VH(序列号 12) 与 VL(序列号 13) 依次结合而成的序列; 抗雌二醇 (estradiol) 抗体 scFv 的 DNA 序列是利用接头序列 (GGGSGGGSGGGGS; 序列号 9) 使抗雌二醇抗体的 VH(序列号 14) 与 VL(序列号 15) 依次结合而成的序列; 抗 SA(血清白蛋白, Serum Albumin) 抗体 scFv 的 DNA 序列是利用接头序列 (GGGSGGGSGGGGS, 序列号 9) 使抗 SA 抗体的 VH(序列号 16) 与 VL(序列号 17) 依次结合而成的序列。

[0146] (荧光标记抗 HEL 抗体、抗雌二醇抗体、抗 SA 抗体 V 区蛋白的制作)

[0147] 使用 RTS100 大肠杆菌二硫键蛋白表达试剂盒 (罗氏诊断公司制造), 利用无细胞翻译系统向 V 区蛋白 N 末端区域引入荧光标记氨基酸。反应液 (50  $\mu$ L) 中添加有 7  $\mu$ L 的氨基酸混合物、1  $\mu$ L 的蛋氨酸、7  $\mu$ L 的反应混合物、25  $\mu$ L 的活化大肠杆菌裂解物、5  $\mu$ L 的质粒 DNA (500ng)、5  $\mu$ L 的荧光标记琥珀抑制氨酰 tRNA (0.8nmol)。用于制作荧光标记蛋白的荧光标记氨酰 tRNA (TAMRA-X-AF-琥珀抑制 tRNA) 使用定点引入非天然氨基酸的蛋白质功能化的 CloverDirect™ tRNA 试剂 (プロテインエクスプレス公司制造)。使反应液在 20°C、600rpm 的条件下反应 2 小时后, 进一步在 4°C 下进行 16 小时的反应。反应结束后, 使用 1  $\mu$ L 反应液进行 SDS-PAGE (15%), 利用荧光影像分析仪 (FMBIO-III; 日立软件工程有限公司制造) 观察蛋白表达。进而, 使用 His- 标签抗体进行蛋白免疫印迹, 确认合成了目的蛋白。

[0148] 合成的 V 区蛋白利用 His-Spin Trap 柱 (GE ヘルステア公司制造) 进行纯化。向上述反应液 (50  $\mu$ L) 中添加洗涤液 (20mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)/0.5M NaCl/60mM 咪唑/0.1% 聚氧乙烯 (23) 月桂醚) 使其达到 400  $\mu$ L, 并加到 His-Spin Trap 柱上。在室温下孵育 15 分钟后, 用洗涤液洗涤三次。接着, 用 200  $\mu$ L 的洗脱液 (20mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)/0.5M NaCl/0.5M 咪唑/0.1% 聚氧乙烯 (23) 月桂醚) 洗脱两次。进而, 使用 UltraFree-0.5 离心管 (ミリポア公司制造), 用 PBS (+0.05% 吐温 20) 对洗脱液进行缓冲液交换和浓缩。纯化后的样品的浓度使用 SDS-PAGE 和 FCS (MF20; 奥林巴斯公司制造) 进行测定。

[0149] 实施例 13

[0150] (荧光光谱测定)

[0151] 使用 PBS (+0.05% 吐温 20、1%BSA) 将 TAMRA 标记抗 HEL 抗体 scFv 蛋白 (2  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ L) 与作为抗原的 HEL 蛋白制备成总计 200  $\mu$ L 的样品。使用 PBS (+0.05% 吐温 20、1%BSA) 将 TAMRA 标记抗雌二醇抗体 scFv 蛋白 (2  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ L) 与作为抗原的雌二醇制备成总计 200  $\mu$ L 的样品。使用 PBS (+0.05% 吐温 20、0.2% 明胶) 将 TAMRA 标记抗 SA 抗体 scFv 蛋白 (2  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ L) 与作为抗原的 BSA (牛血清白蛋白) 或 HSA (人血清白蛋白) 制备成总计 200  $\mu$ L 的样品。然后, 将样品在 25°C 下放置 5 分钟后, 使用荧光分光光度计 (FluoroMax-4; ホリバ・ジヨバンイボン公司制造) 进行荧光光谱测定, 通过曲线拟合计算出荧光强度。此时, 使用 ImageJ 软件 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) 的 S 型量效模型作为统计分析软件。在激发波长为 550nm、测定波长为 580nm 的条件下进行测定, 结果观察到依赖于抗原浓度的荧光强度的增加 (图 28~30)。如上所述, 可知能够使用各个种类的抗体的荧光标记单链抗体 (scFv) 来实施荧光免疫测定方法。

[0152] 实施例 14

[0153] 4. 小鼠抗体 VH 中的 Trp 残基的保守性

[0154] 如实施例 4、图 9 和表 1 所示, 可知: Kabat 数据库的编号体系中, VH 的氨基酸序列

中的第 33 位、第 36 位和第 106 位的 Trp 对标记抗 BGP 抗体的荧光色素的淬灭发挥重要的作用,此外,第 47 位的 Trp 对抗体 (VH 和 VL) 与抗原的结合是必需的(需要说明的是,上述 VH 的氨基酸序列中的 Trp106 对应于 Kabat 数据库的编号体系中第 103 位的位置)。因此,对这些色氨酸残基在抗 BGP 抗体以外的小鼠抗体 VH 区是否也具有保守性进行了确认。小鼠抗体的氨基酸残基分布的分析使用 Abysis 数据库 (Andrew C. R. Martin 博士的团队; <http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>)。此外,关于上述数据库中的、依照 Kabat 序列表示法而得到的各抗体残基的残基编号,可以通过 AbCheck (Andrew C. R. Martin 博士的团队; Martin, A. C. R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133; <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>) 来调查。结果如图 31~35 中所示,对于小鼠抗体的 VH 区中 4 个 Trp 残基的保守率而言,Trp33 为 40%, Trp36 为 98%, Trp47 为 94%, Trp103 为 95%。上述结果表明,实施均相荧光免疫测定方法时重要的 VH 的 4 个 Trp 残基在多数小鼠抗体 VH 中是保守的。

[0155] 将依照 Kabat 序列表示法对上述实施例中使用的抗 BGP 抗体的 VH (序列号 1) 和 VL (序列号 2)、抗 BPA 抗体的 VH (序列号 6) 和 VL (序列号 7) 中含有的色氨酸残基的位置进行编号而得到的结果示于表 2 中,将依照 Kabat 序列表示法对抗 BGP 抗体 scFv、抗 BPA 抗体 scFv、抗 HEL 抗体 scFv、抗 SA 抗体 scFv、抗雌二醇抗体 scFv 中含有的色氨酸残基的位置进行编号而得到的结果示于表 3 中。

[0156] [表 2]

<b>V<sub>H</sub></b>	Kabat 的序列表示法	<b>Trp33</b>	<b>Trp36</b>	<b>Trp47</b>	<b>Trp103</b>
	<b>BGP</b>	<b>Trp33</b>	<b>Trp36</b>	<b>Trp47</b>	<b>Trp106</b>
<b>BPA</b>	<b>Trp35</b>	<b>Trp37</b>	<b>Trp48</b>	<b>Trp109</b>	

[0157]

<b>V<sub>L</sub></b>	Kabat 的序列表示法	<b>Trp35</b>
	<b>BGP</b>	<b>Trp40</b>
<b>BPA</b>	<b>Trp39</b>	

[0158] [表 3]

	残基编号*											
	CDRH1				CDRH3				CDRL3			
	... H33	H34	H35	H36 ...	H47 ...	H95 ...	H103 ...	L35 ...	L47 ...	L91 ...	L92 ...	L94 ...
<b>αBGP</b>	<b>W</b>	<b>I</b>	<b>H</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>V</b>
<b>α双酚A</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>I</b>
<b>αHEL</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>W</b>
<b>αBSA</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>S</b>
<b>α雌二醇</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>H</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>

[0160] 产业上的可利用性

[0161] 根据本发明,能够提供使用由荧光色素标记的抗体(片段)并且以该荧光色素的淬灭的解除为指标的均相荧光免疫测定方法。本发明的均相荧光免疫测定方法不需要进行抗体或抗原的固定化或洗涤,能够通过混合有抗体和受试物质的混合液的荧光强度进行直接监测来测定目标物质的浓度,因此,预测能够实现更简易且快速的低分子化合物的检

测。此外,由于对淬灭产生影响的抗体 VH 区的 Trp 残基在很多种类的抗体中是保守的,因此,本发明的均相荧光免疫测定方法能够用于各种抗原浓度的测定。

[0001]

## 序列表

<110> 株式会社蛋白质表达(ProteinExpress Co., Ltd.)

<120> 荧光免疫测定方法(Fluoroimmunoassay Method)

<130> 2010C603I

<150> JP 2009-264420

<151> 2009-11-19

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventor: Ueda, Hiroshi; Abe, Ryoji

Inventor: Ihara, Masaki; Takagi, Hiroaki

<220>

<223> anti-BGP antibody VH

<400> 1

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Phe Val Lys Ala Gly Ala  
1                    5                    10                    15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Asn Tyr  
                  20                    25                    30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                  35                    40                    45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Gly Tyr Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50                    55                    60

[0002]

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ser Ser Thr Ser Val Gly Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 2  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> anti-BGP antibody VL

<400> 2

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

[0003]



Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 5  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Linker

<400> 5

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser  
20

<210> 6  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> anti-BPA antibody VH

<400> 6

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
35 40 45

[0005]

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Val Leu Gly Arg Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anti-BPA antibody VL

<400> 7

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30

Thr Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Ile Lys Tyr Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg

[0006]

	50		55		60											
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	
65					70					75					80	
Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Trp	Glu	
				85					90						95	
Ile	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg		
			100					105						110		

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> BGP C-terminal peptide

<400> 8

Arg	Arg	Phe	Tyr	Gly	Pro	Val
1				5		

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> linker

<400> 9

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 10

[0007]

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> linker

<400> 10

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 1                    5                    10

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> linker

<400> 11

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 1                    5                    10                    15

Gly Gly Gly Ser  
                   20

<210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> anti-HEL antibody VH

<400> 12

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1                    5                    10                    15

[0008]

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Tyr Met  
 35 40 45

Gly Tyr Val Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu  
 65 70 75 80

Asp Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Asn Trp Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105 110

Ser

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anti-HEL antibody-VL

<400> 13

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Asn Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn

[0009]

	20		25		30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile	35		40		45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr	65		70		75
					80
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr		85		90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	100		105		
<210> 14					
<211> 116					
<212> PRT					
<213> Artificial					
<220>					
<223> anti-Estradiol antibody-VH					
<400> 14					
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	1		5		10
					15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr		20		25	30
Thr Ile His Trp Val Lys Gln Thr His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	35		40		45

[0010]

Gly Gly Ile Asn Pro Ile Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Lys Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Glu Ile Tyr Tyr Gly Ser Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 15

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anti-Estradiol antibody-VL

<400> 15

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ala Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

Lys Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp  
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

[0011]

	50		55		60														
	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Met	Glu			
	65					70					75					80			
	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Tyr	Phe	Cys	Leu	Gln	Trp	Ser	Gly	Tyr	Pro			
				85						90					95				
	Pro	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg						
				100						105									
<210>	16																		
<211>	116																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial																		
<220>																			
<223>	anti-SA antibody-VH																		
<400>	16																		
	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
	1			5						10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr			
				20					25					30					
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
		35					40						45						
	Ser	His	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ala	Asn	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val			
	50						55					60							
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
	65				70						75				80				

[0012]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Gly Leu Arg Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 17

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anti-SA antibody-VL

<400> 17

Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Arg Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Arg Asp Arg Pro

[0013]

85

90

95

Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

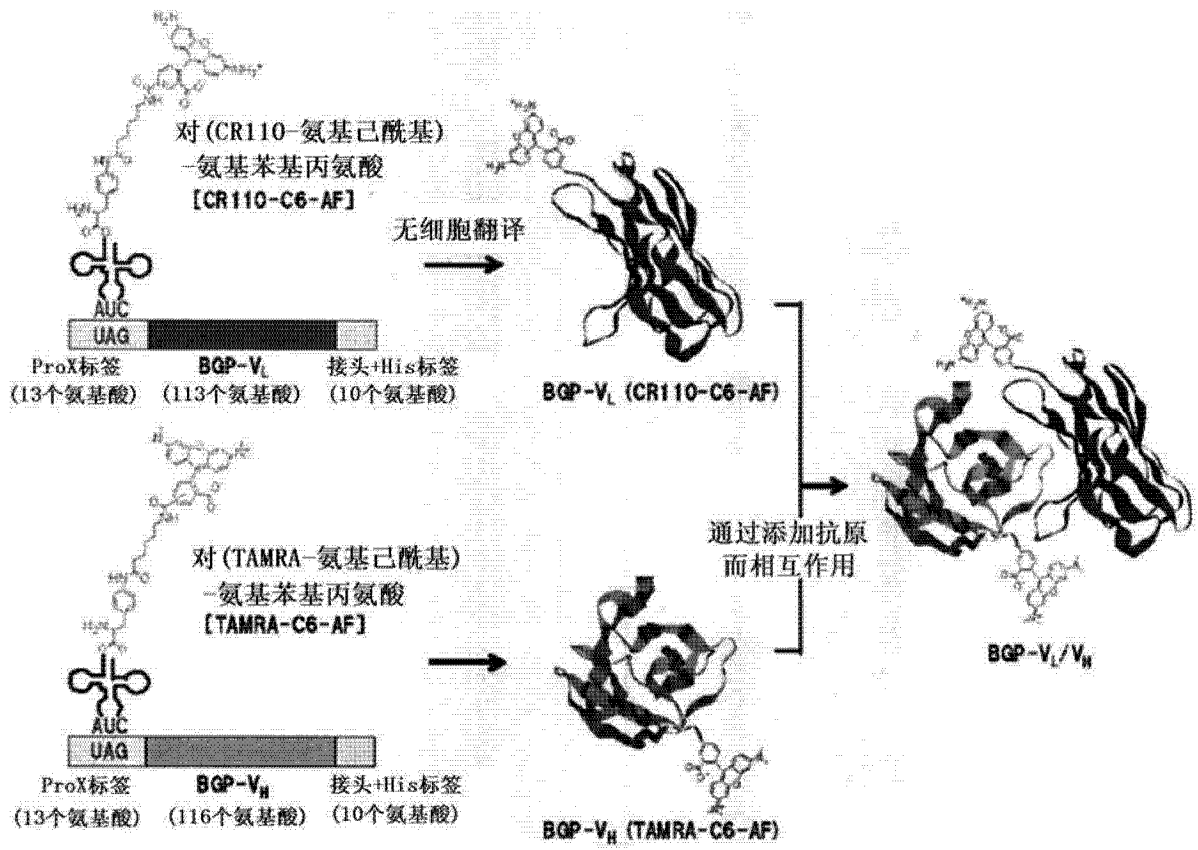


图 1

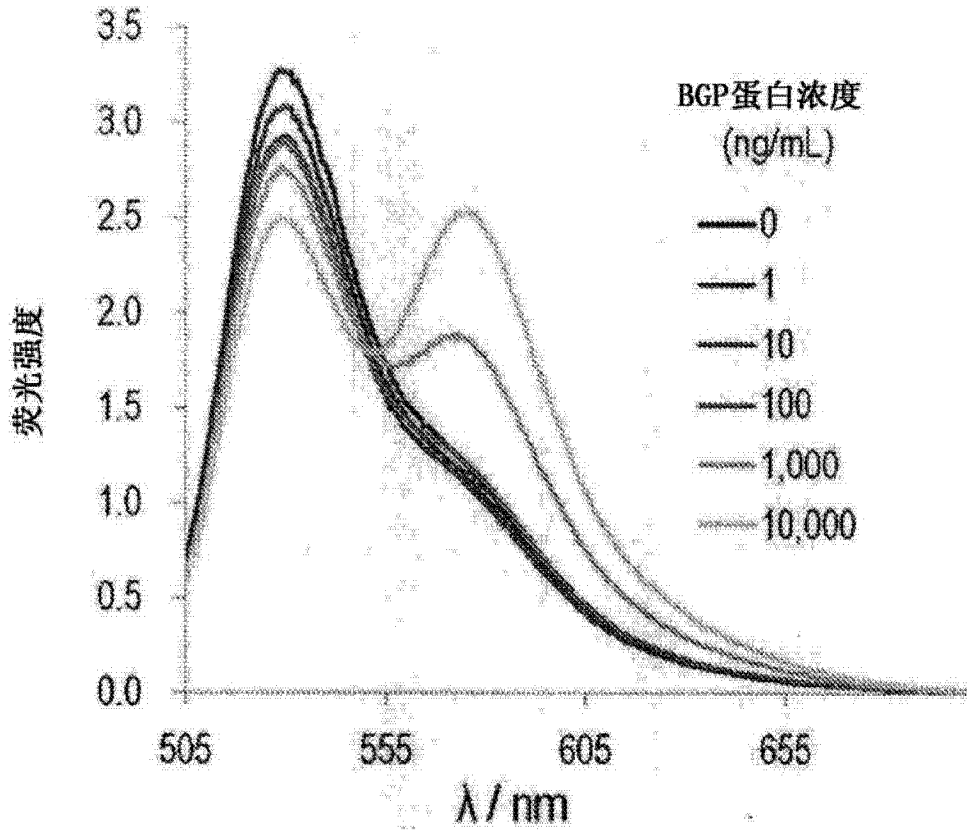


图 2

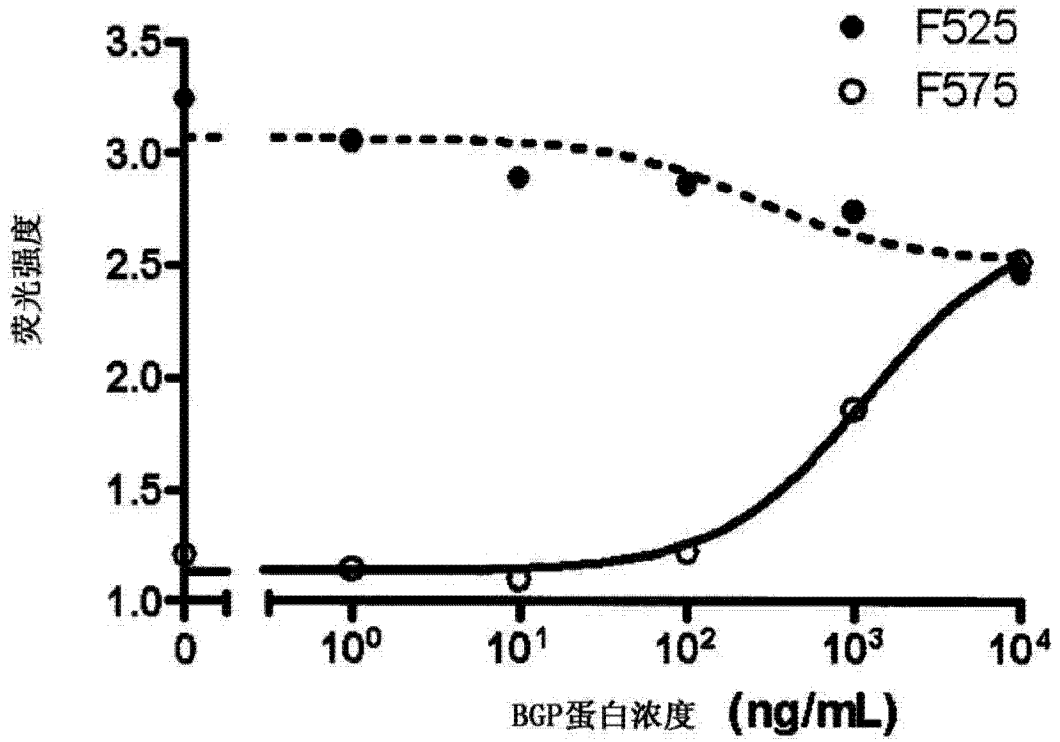


图 3

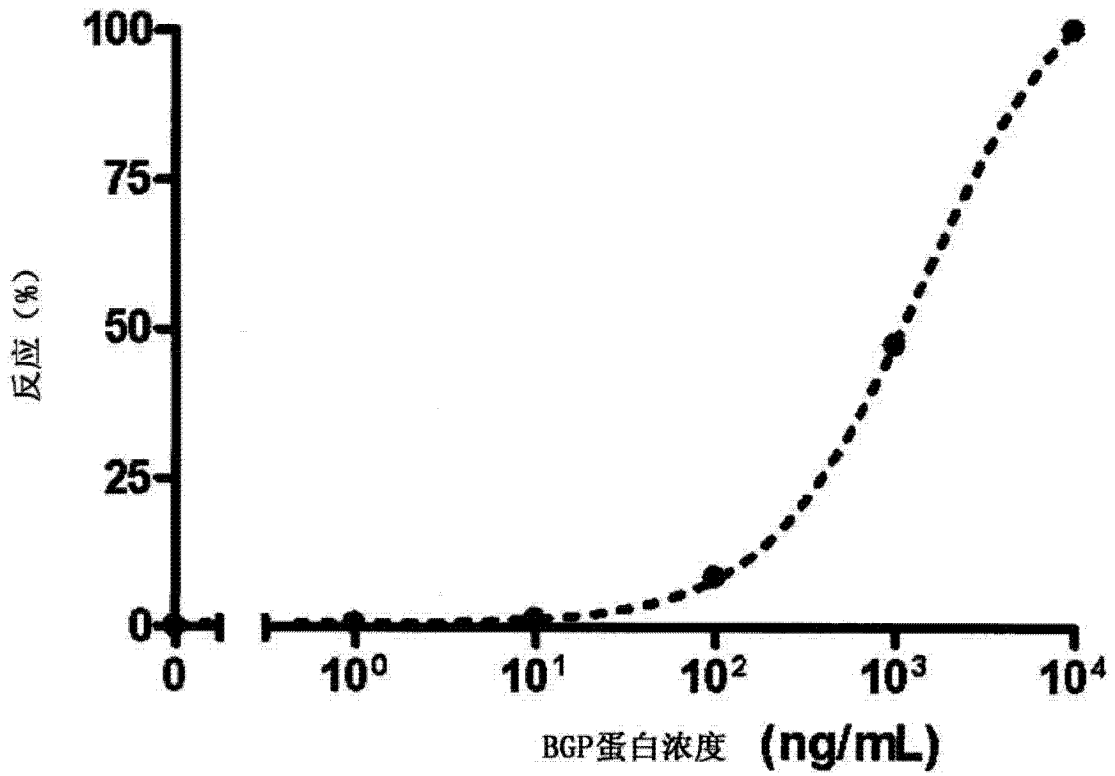


图 4

488nm激光 (滤光片: 510~560nm)

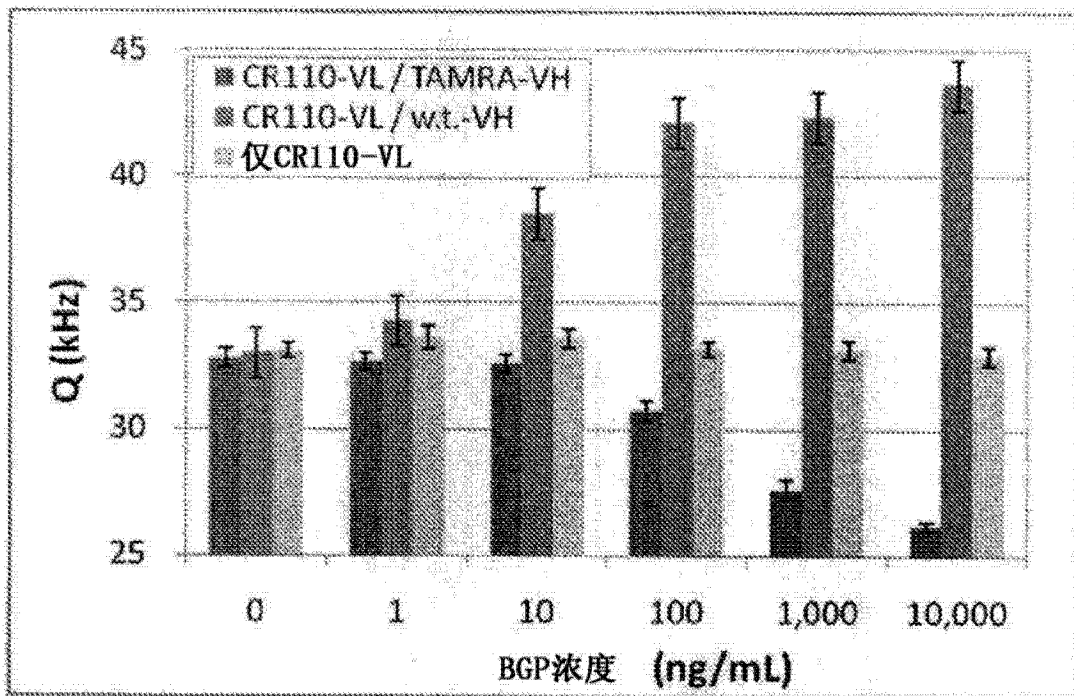


图 5

543nm激光(滤光片: 560~620nm)

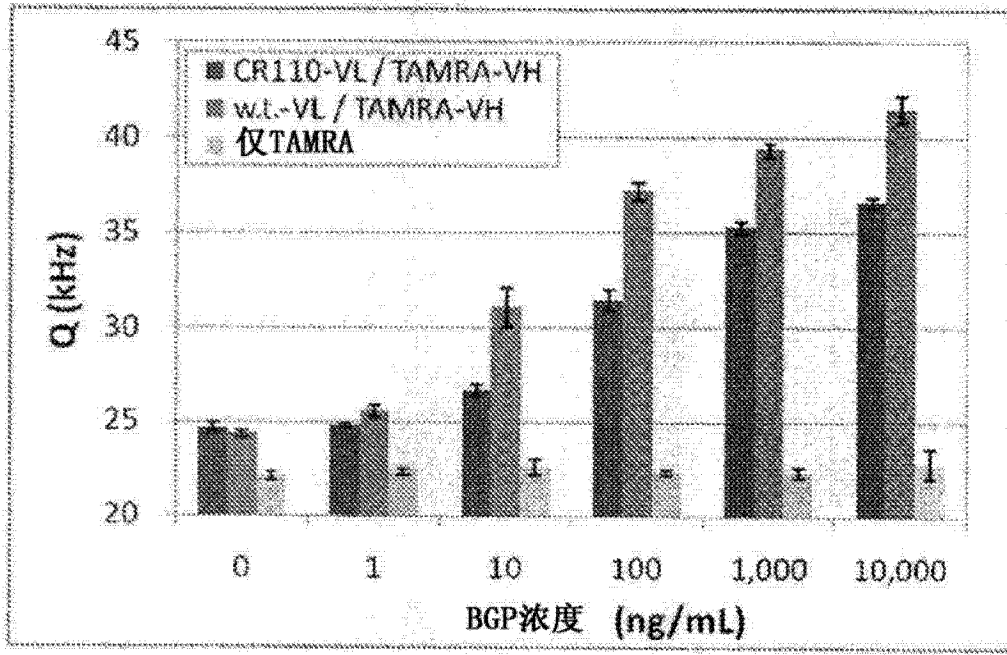


图 6

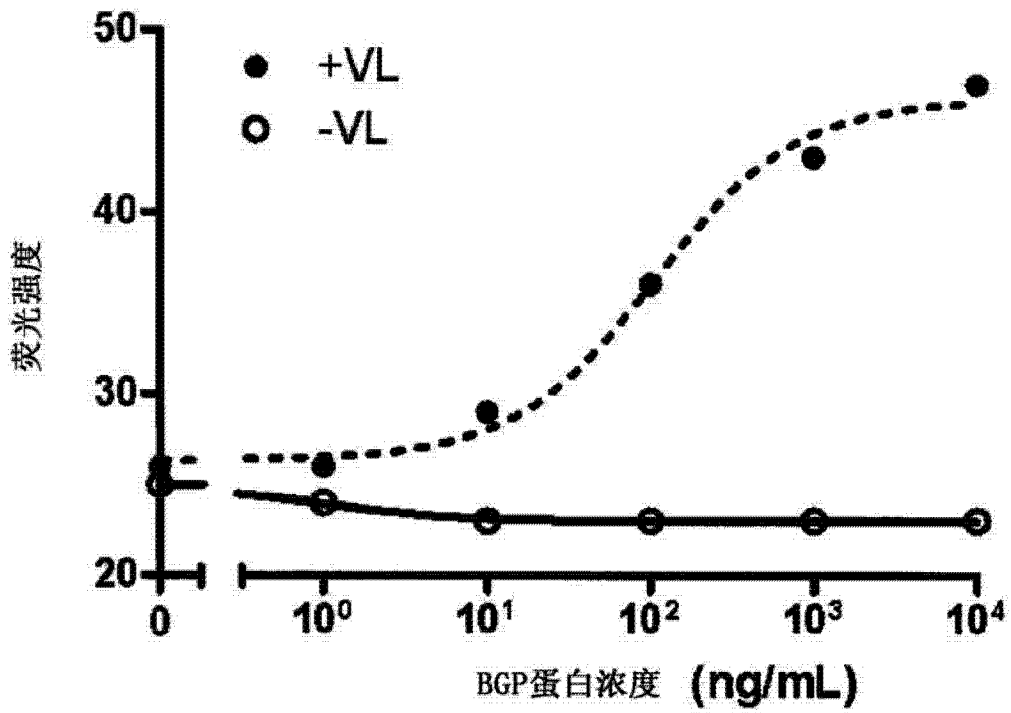


图 7

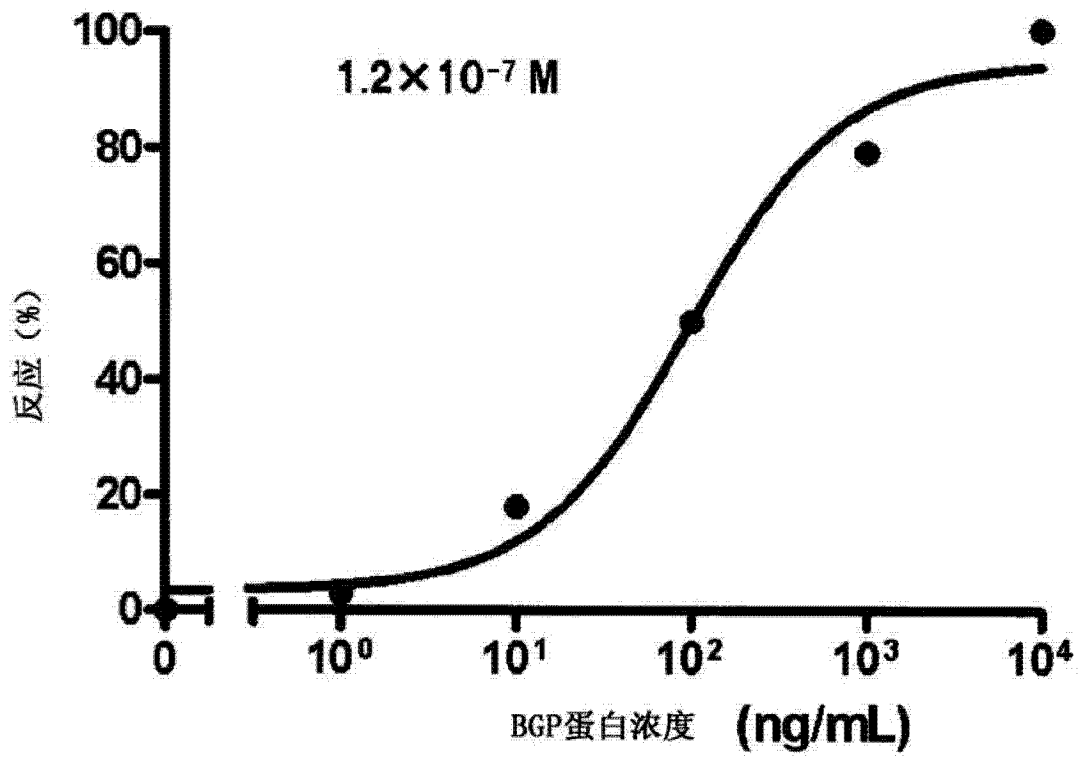


图 8

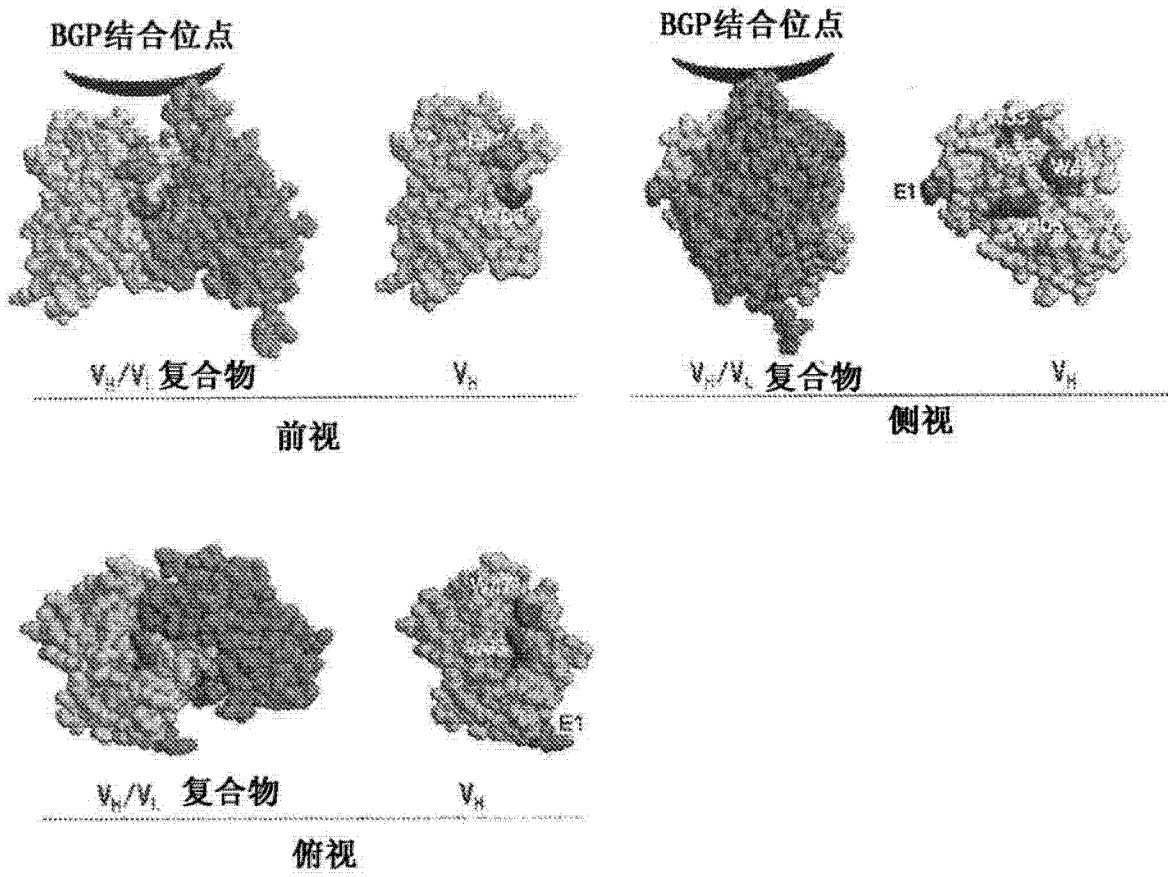


图 9

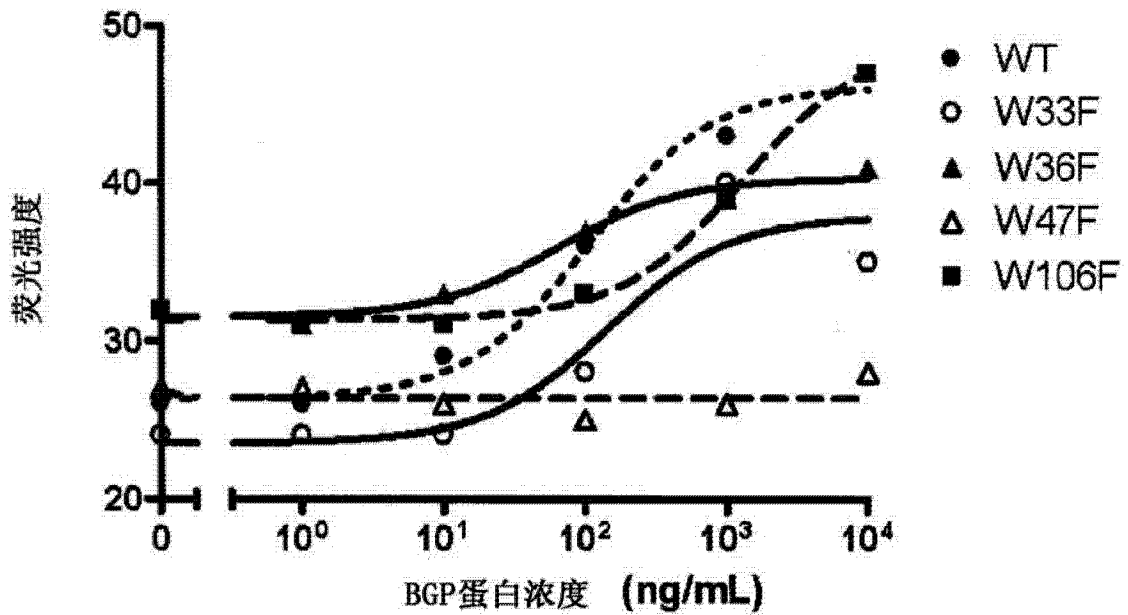


图 10

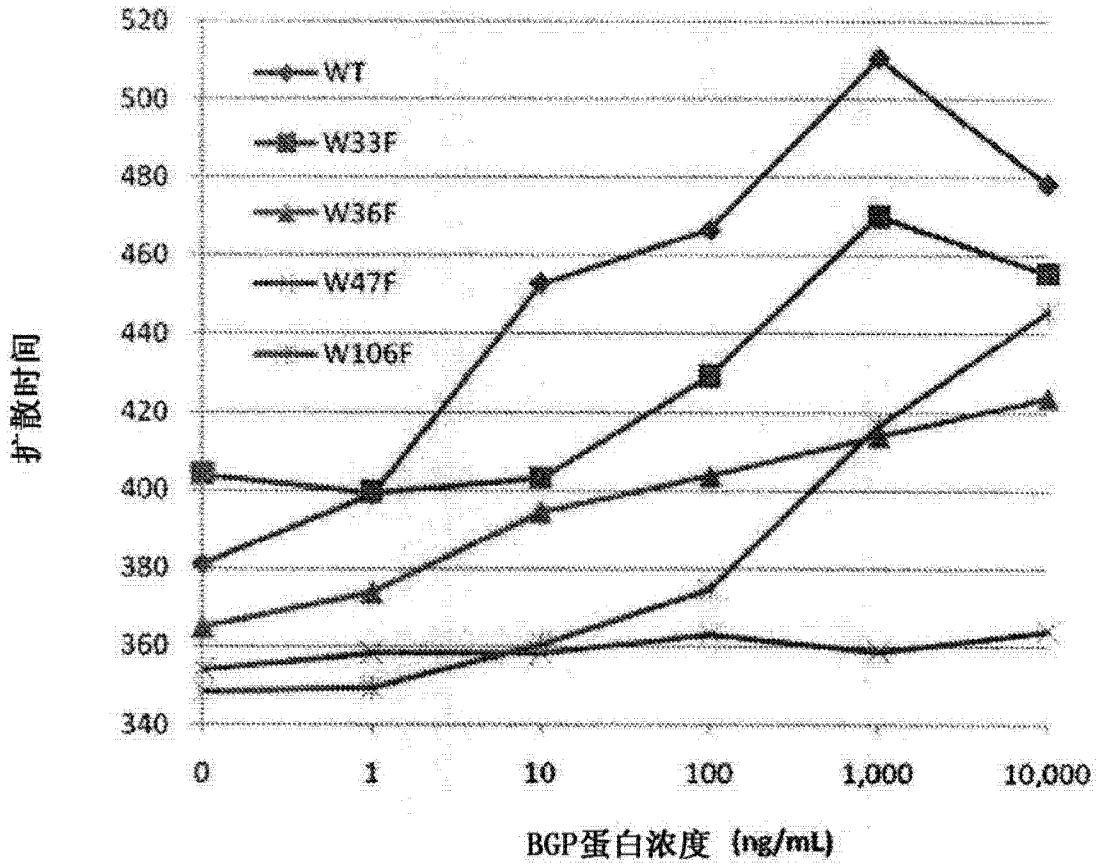


图 11

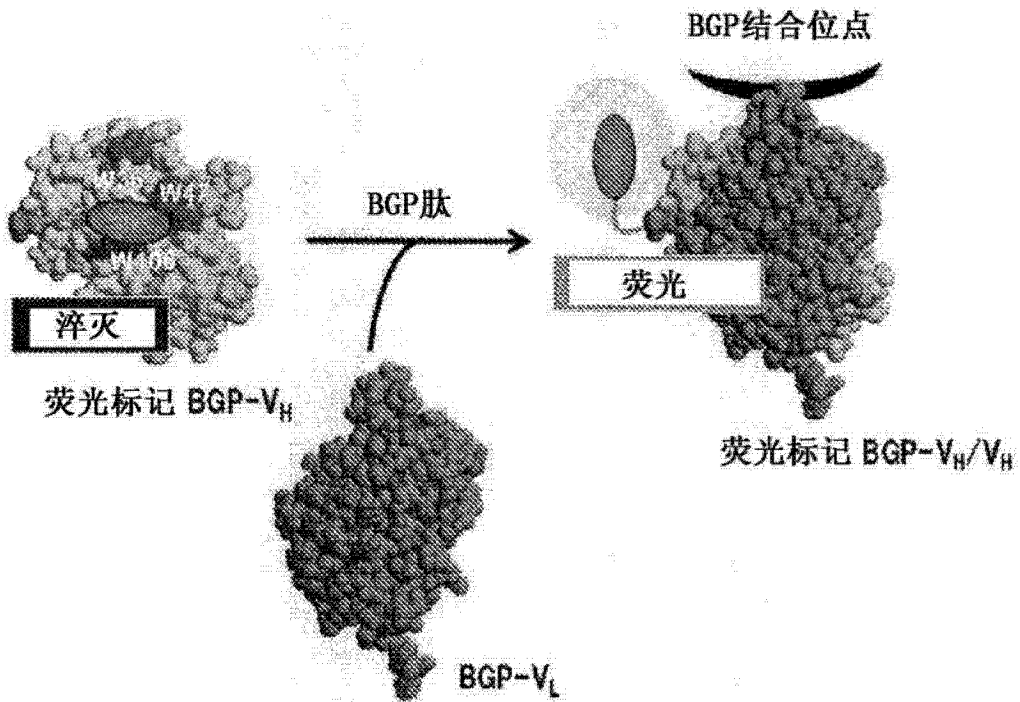


图 12

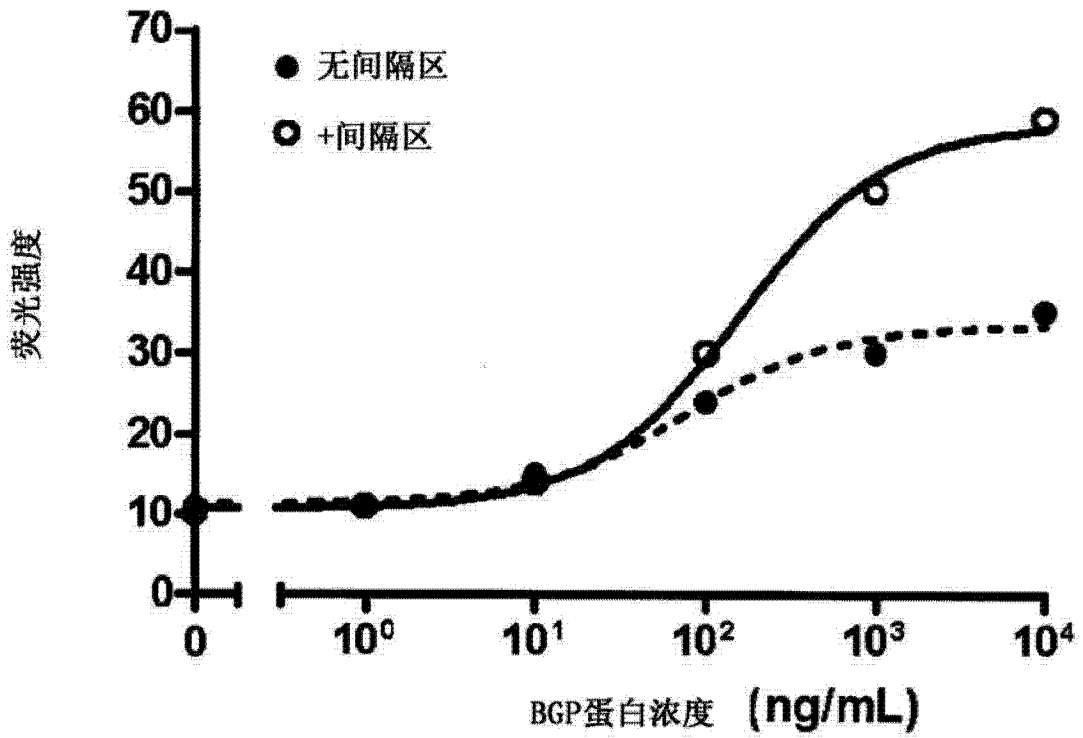


图 13

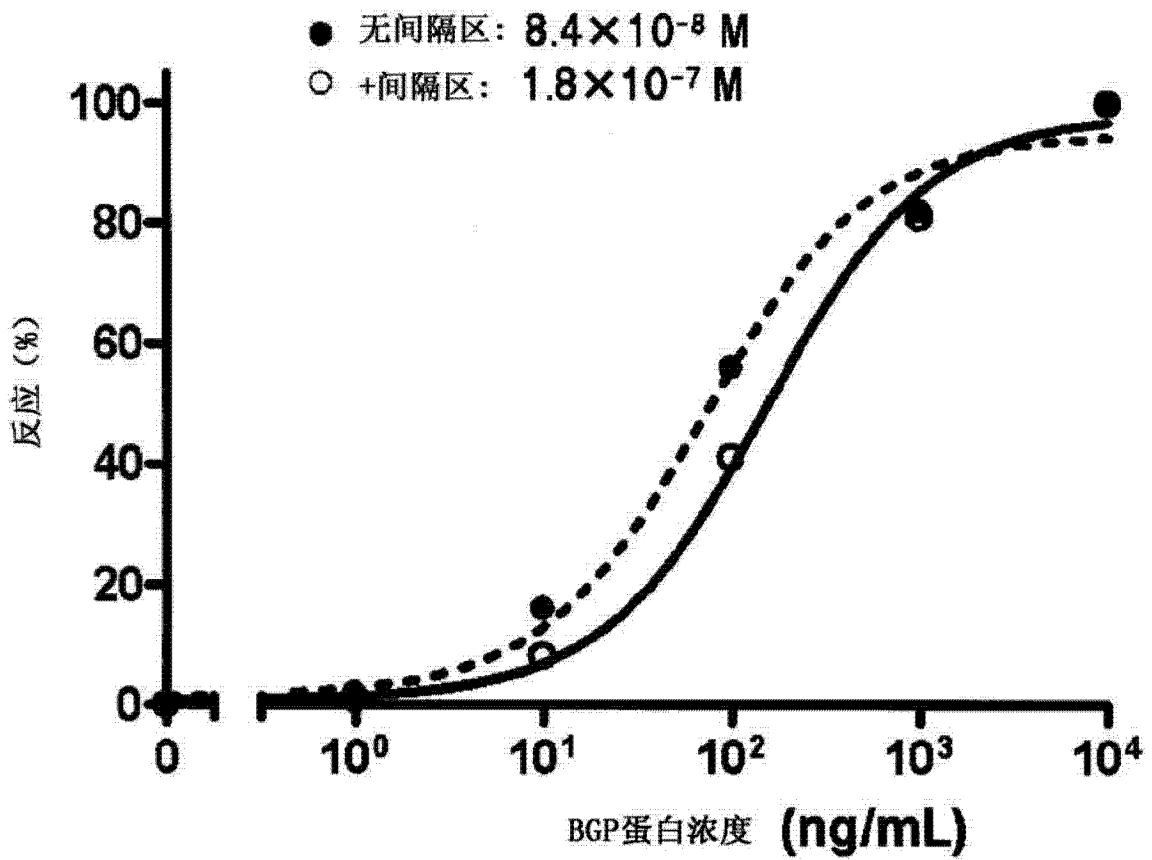


图 14

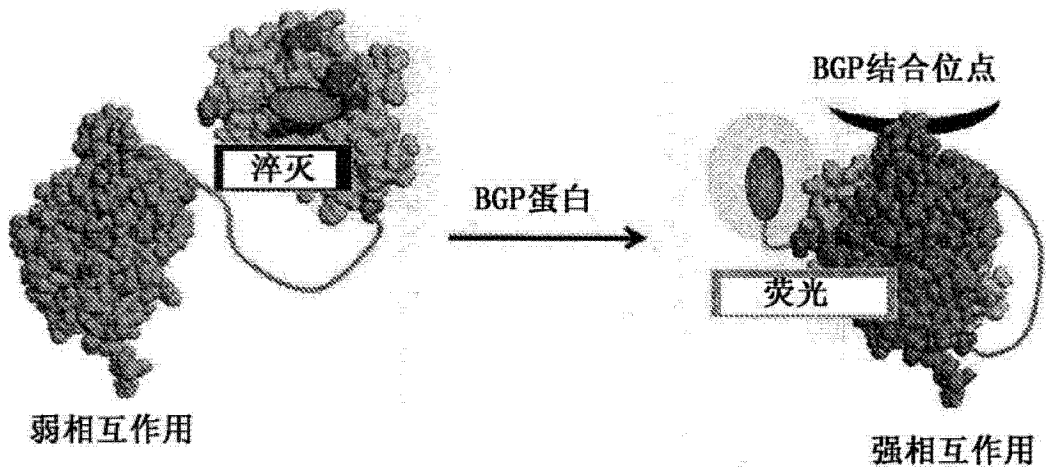


图 15

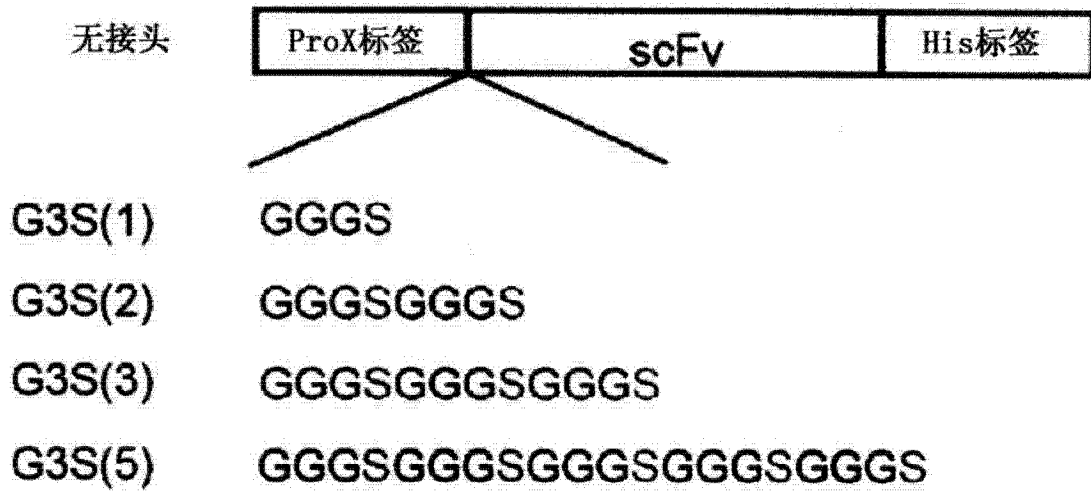


图 16

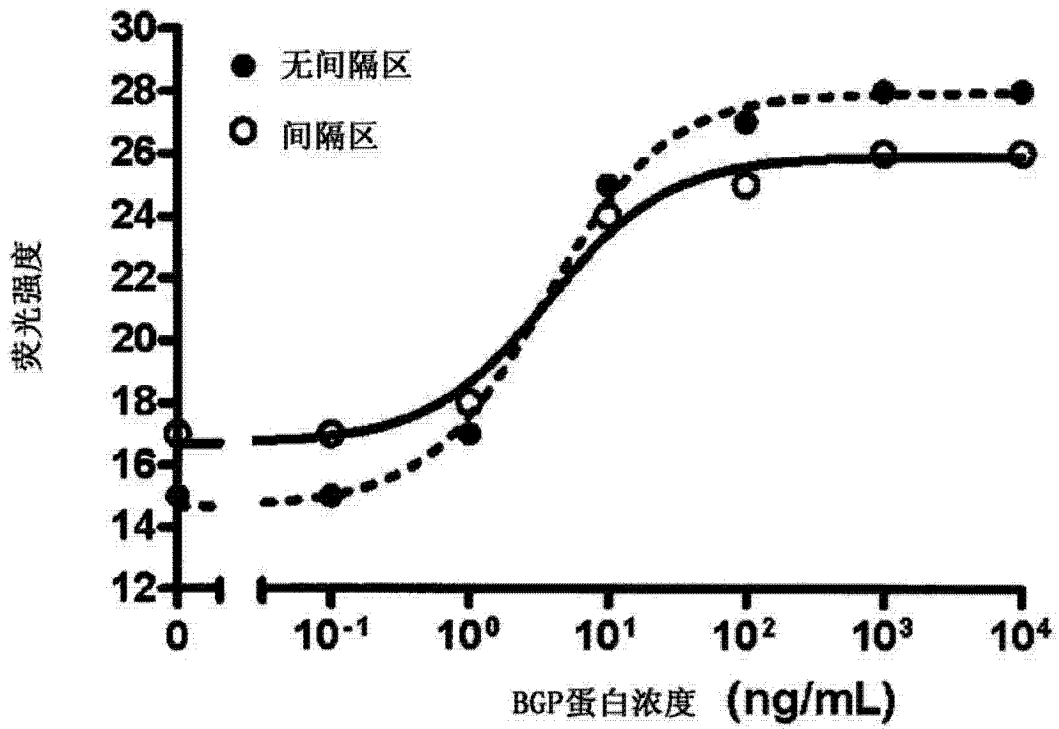


图 17

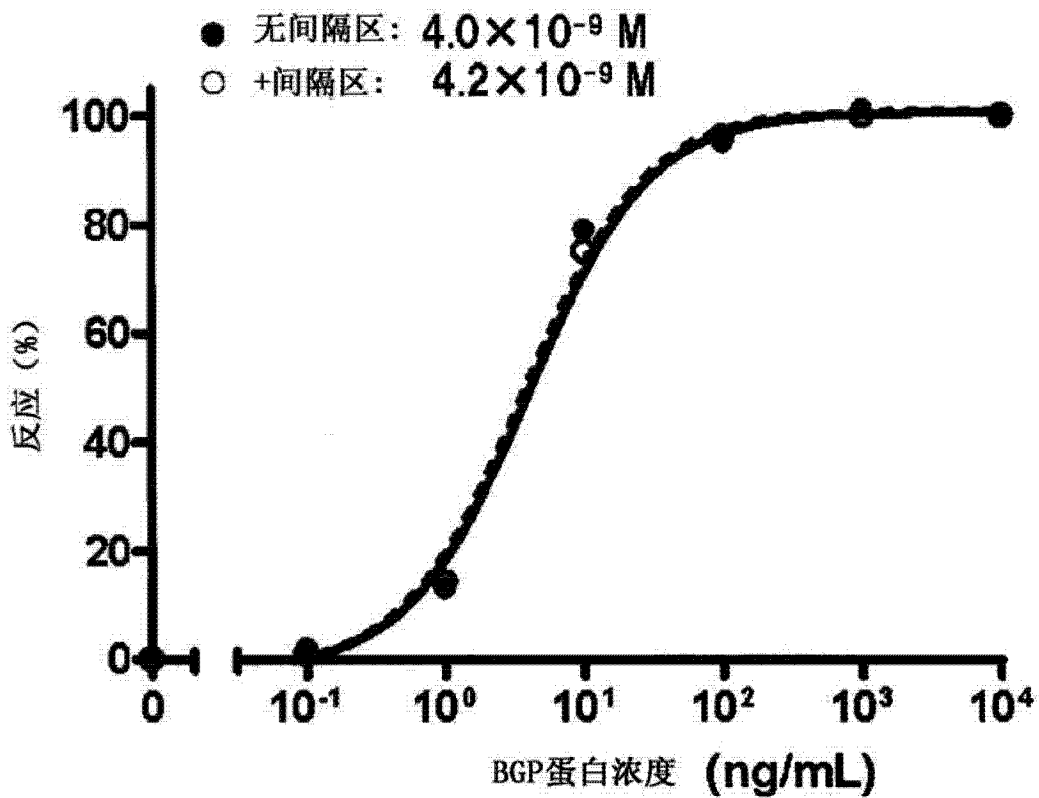


图 18

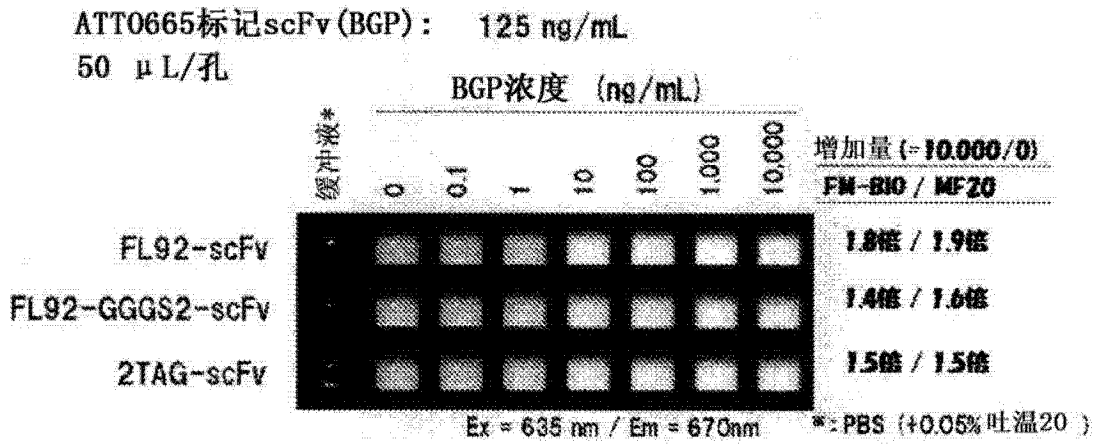


图 19

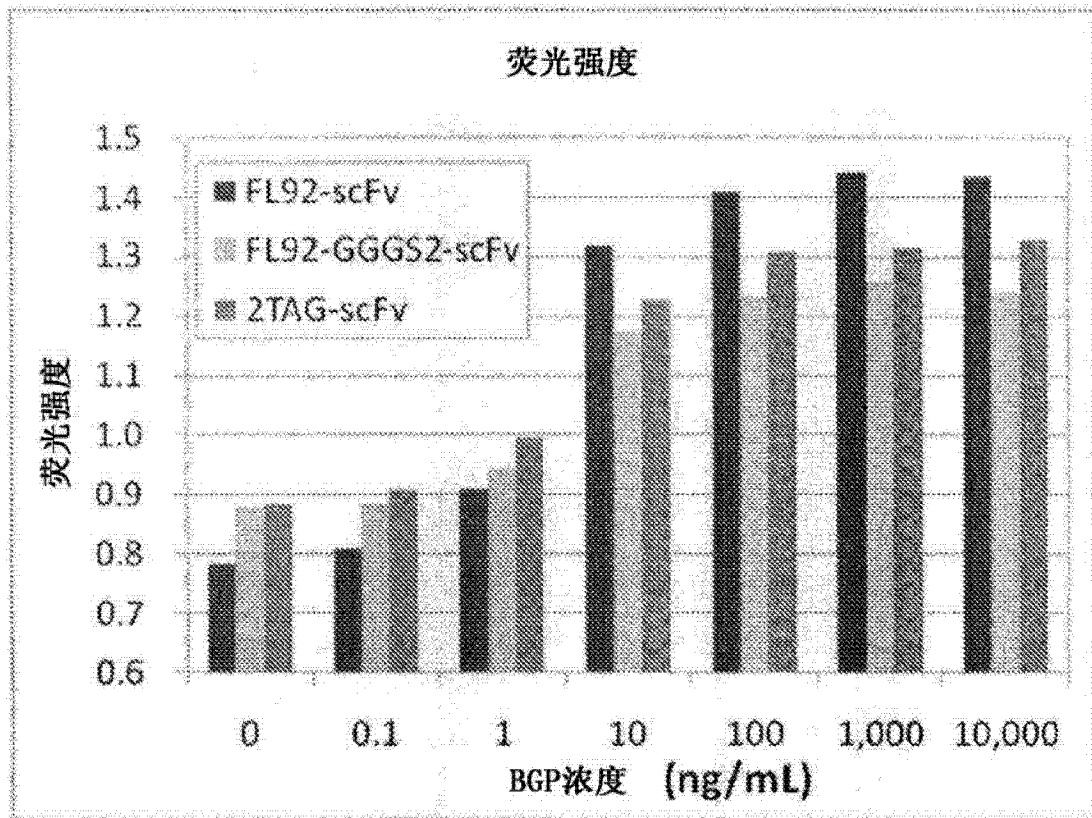


图 20

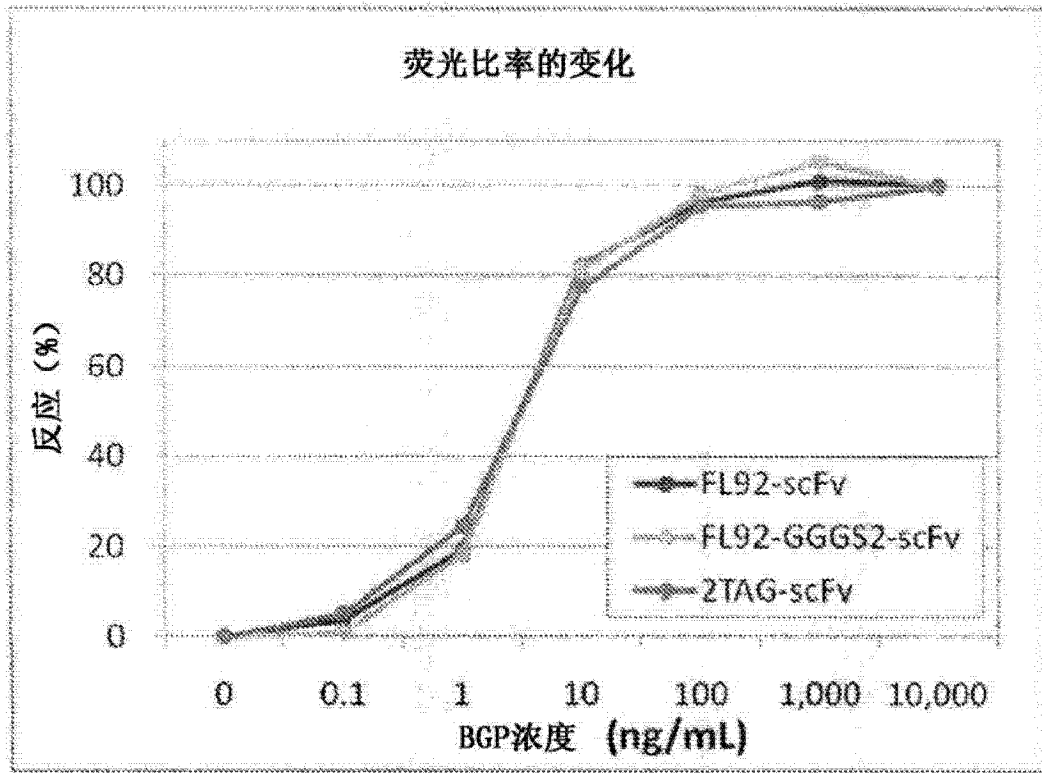


图 21

### FL92-scFv (比较)

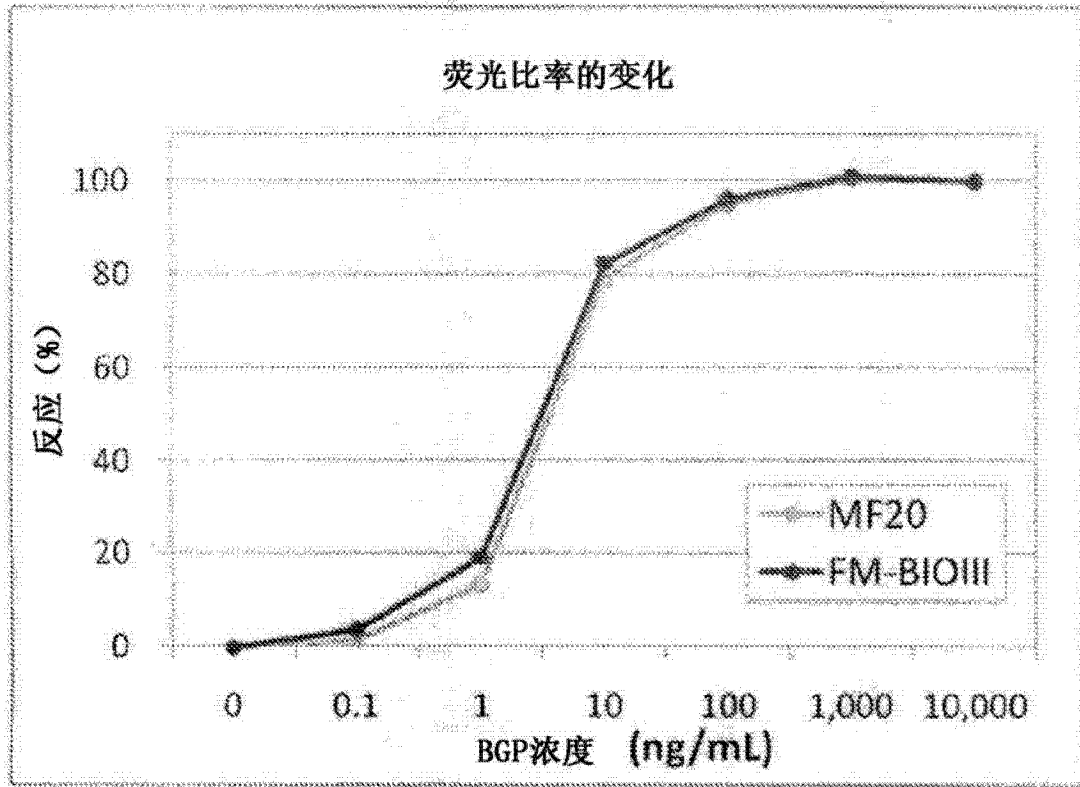


图 22

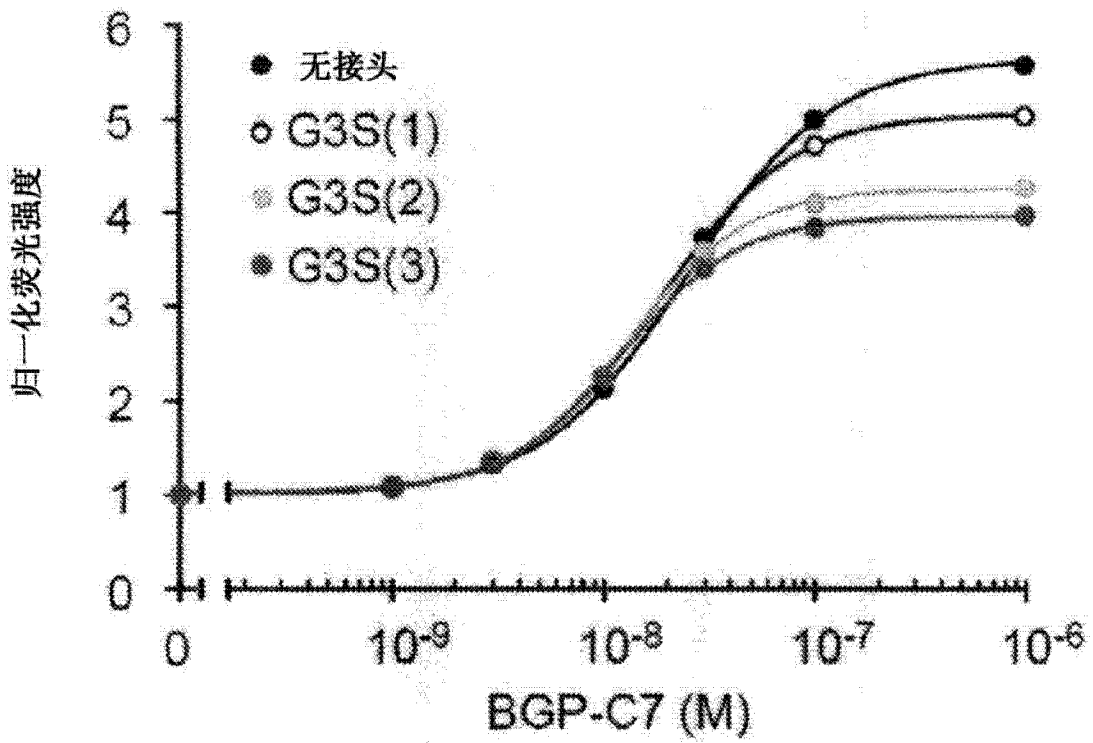


图 23

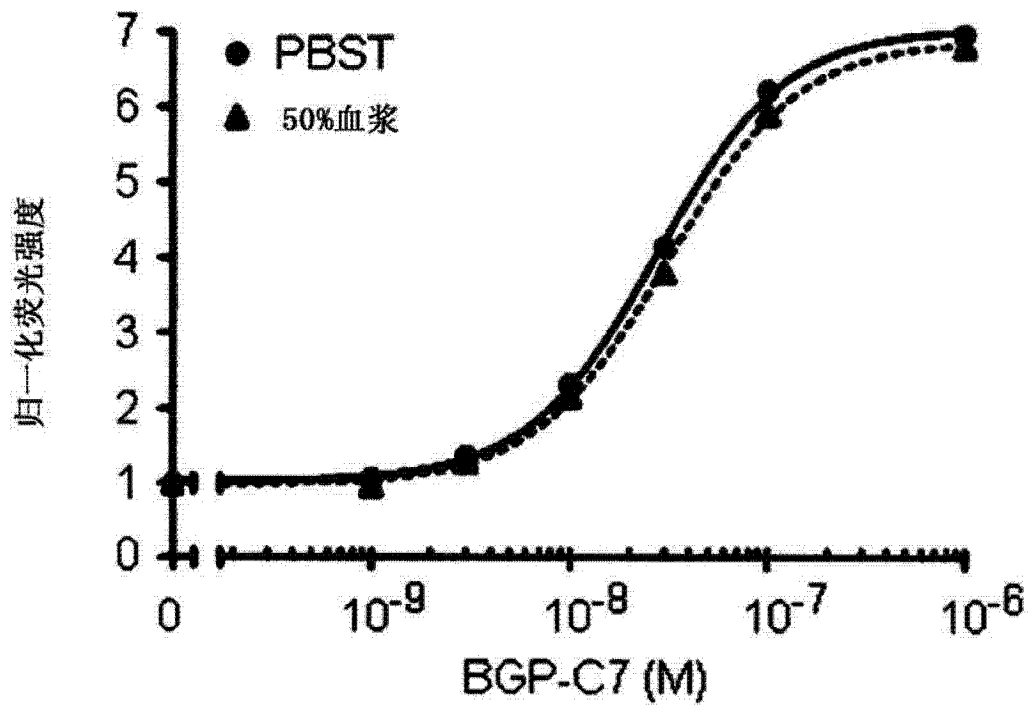


图 24

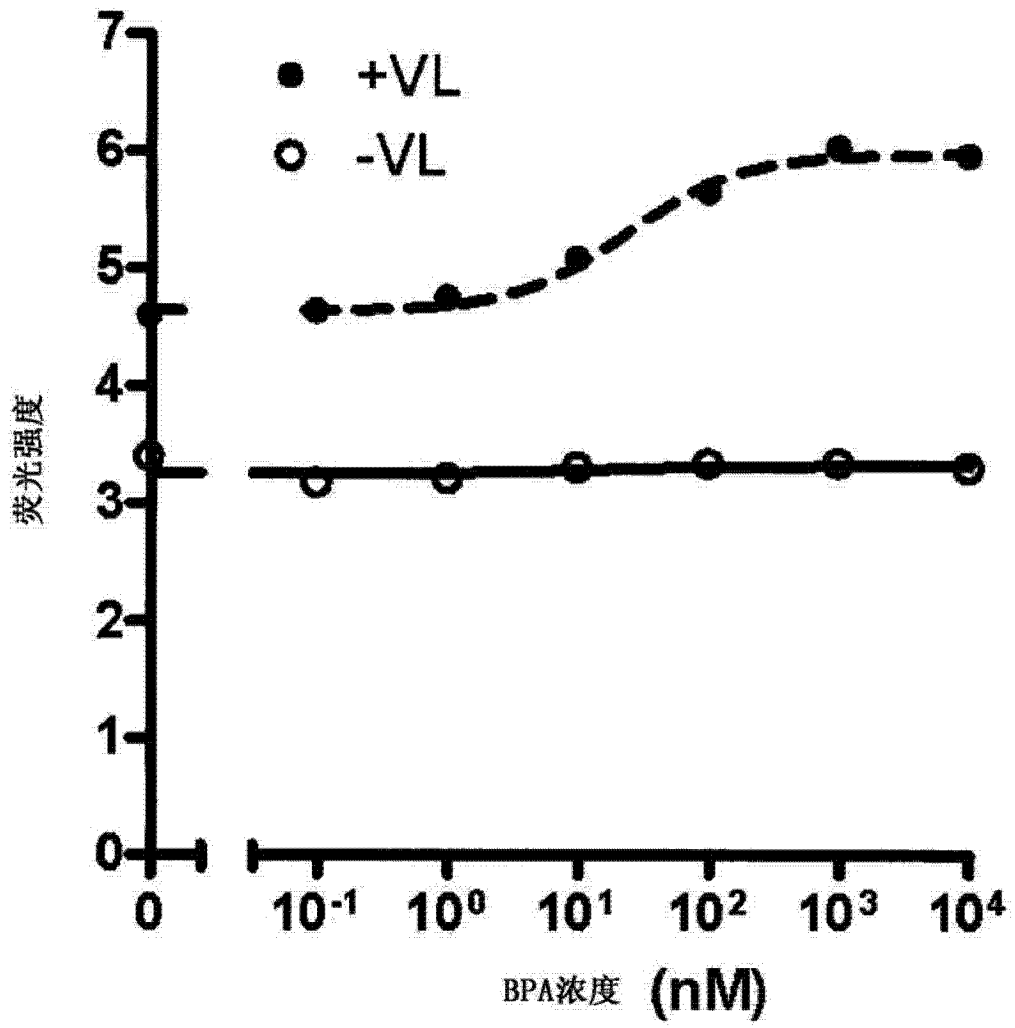


图 25

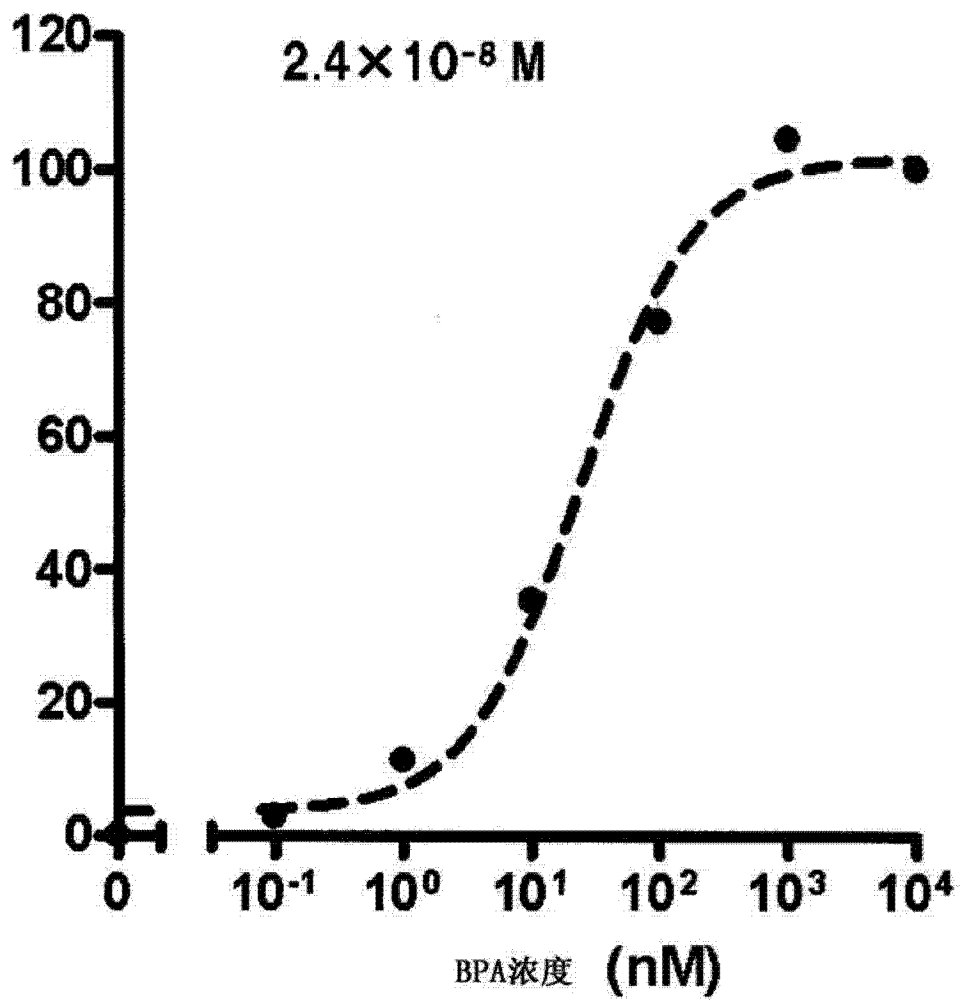


图 26

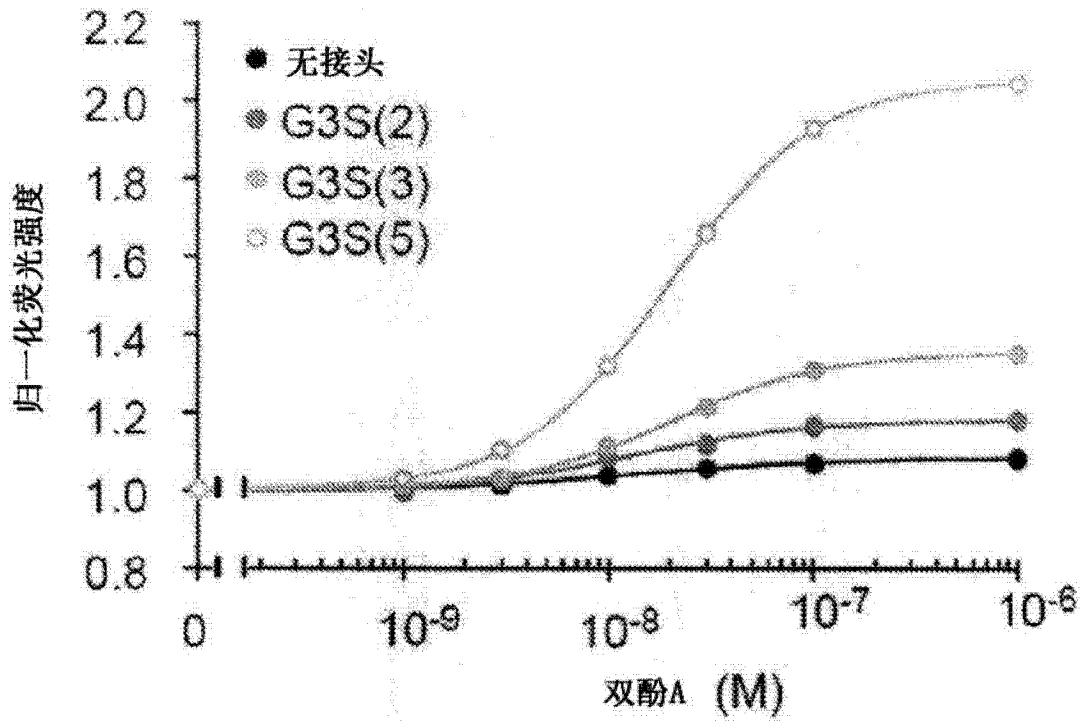


图 27

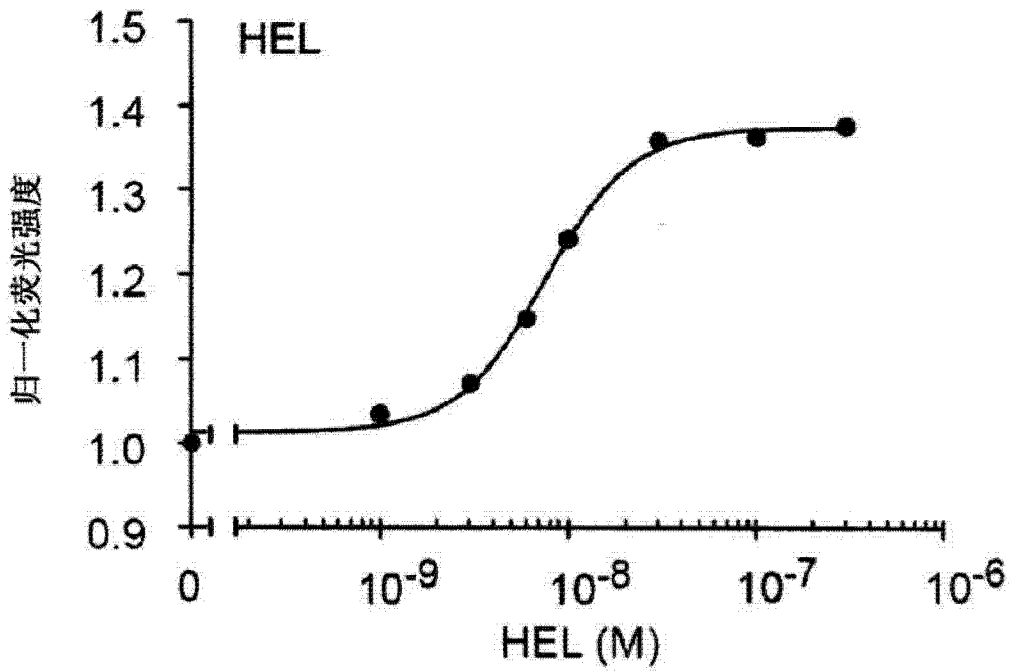


图 28

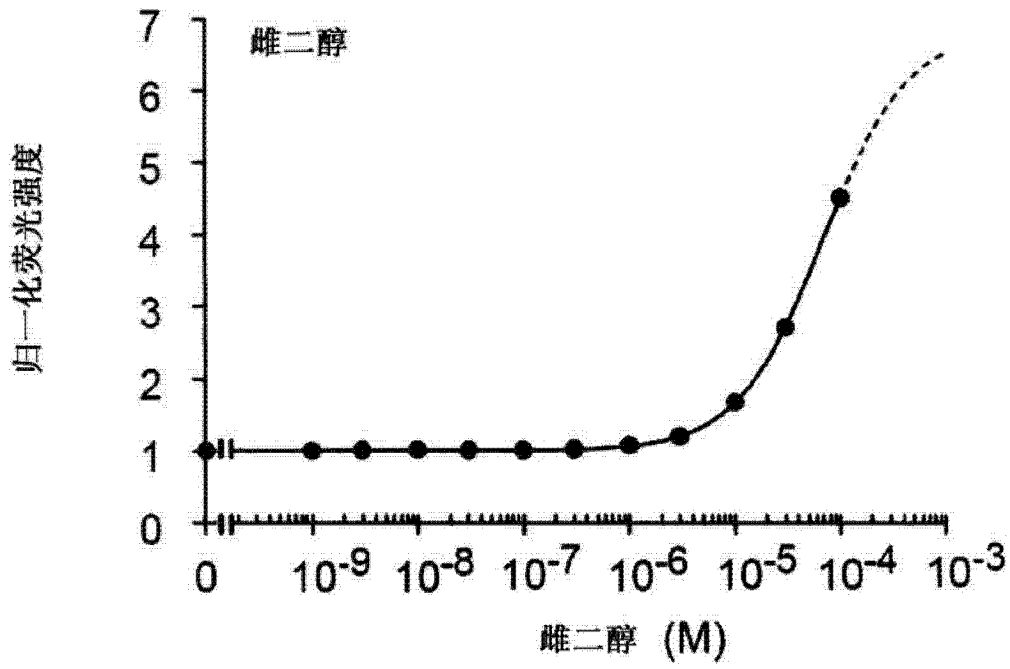


图 29

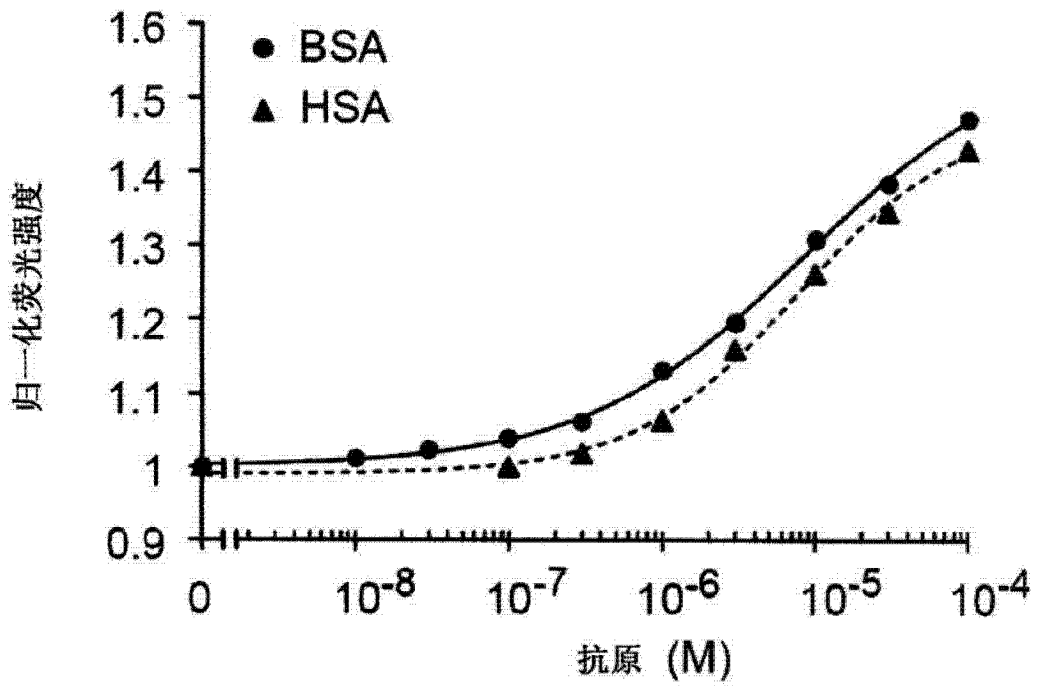
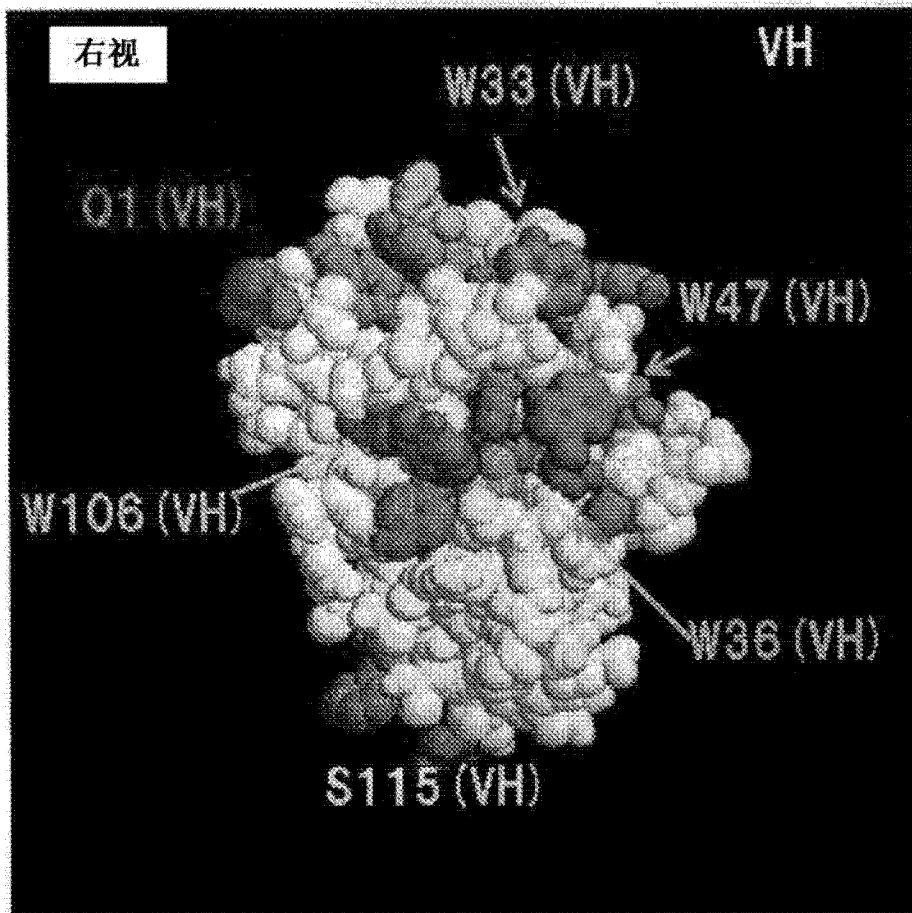


图 30



	淬灭 (CPP)	结合力 (扩散时间)	相互作用分子
WT	-	⊙	-
W33F	-5.8	○	BGP
W36F	23.5	△	-
W47F	11.7	×	VL
W106F	32.9	△	VL

图 31

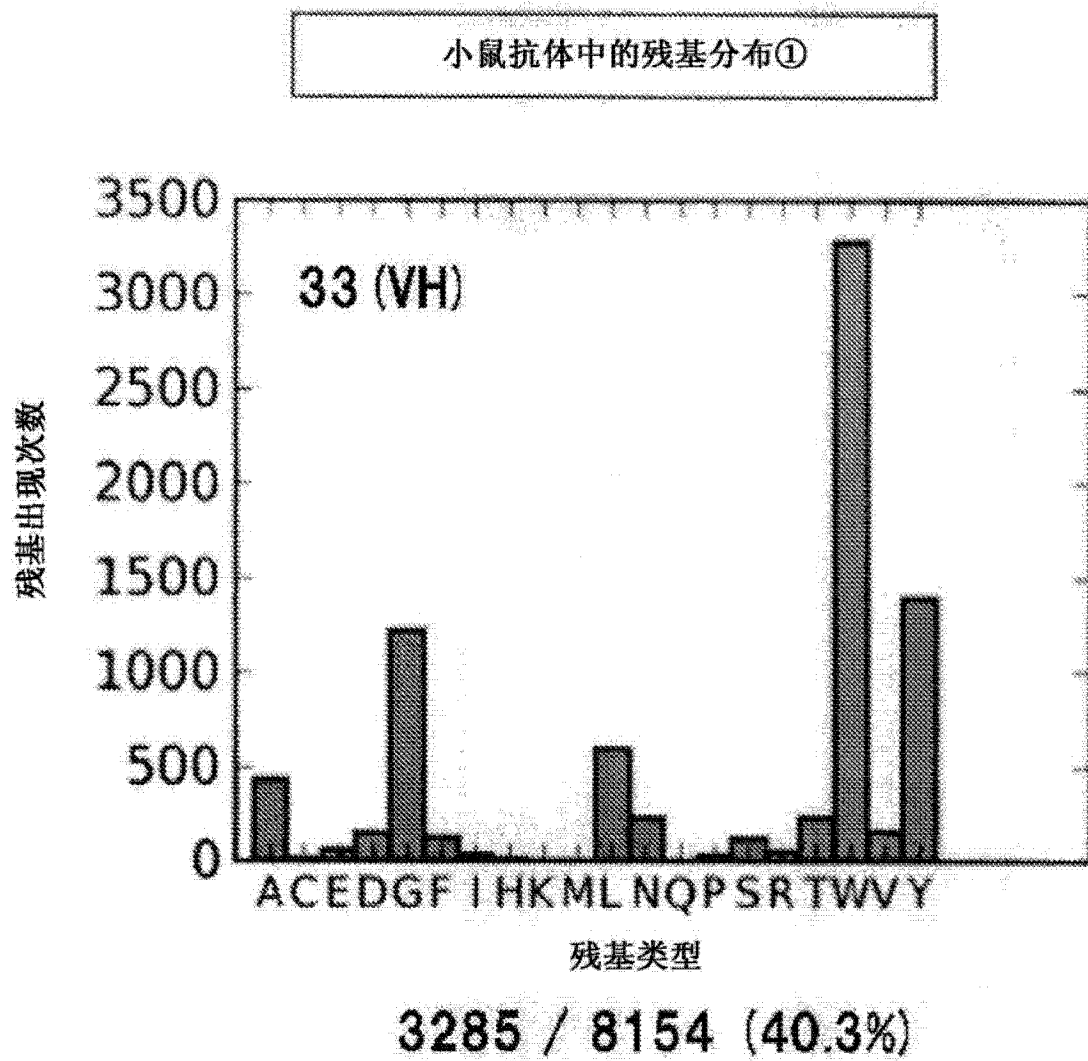


图 32

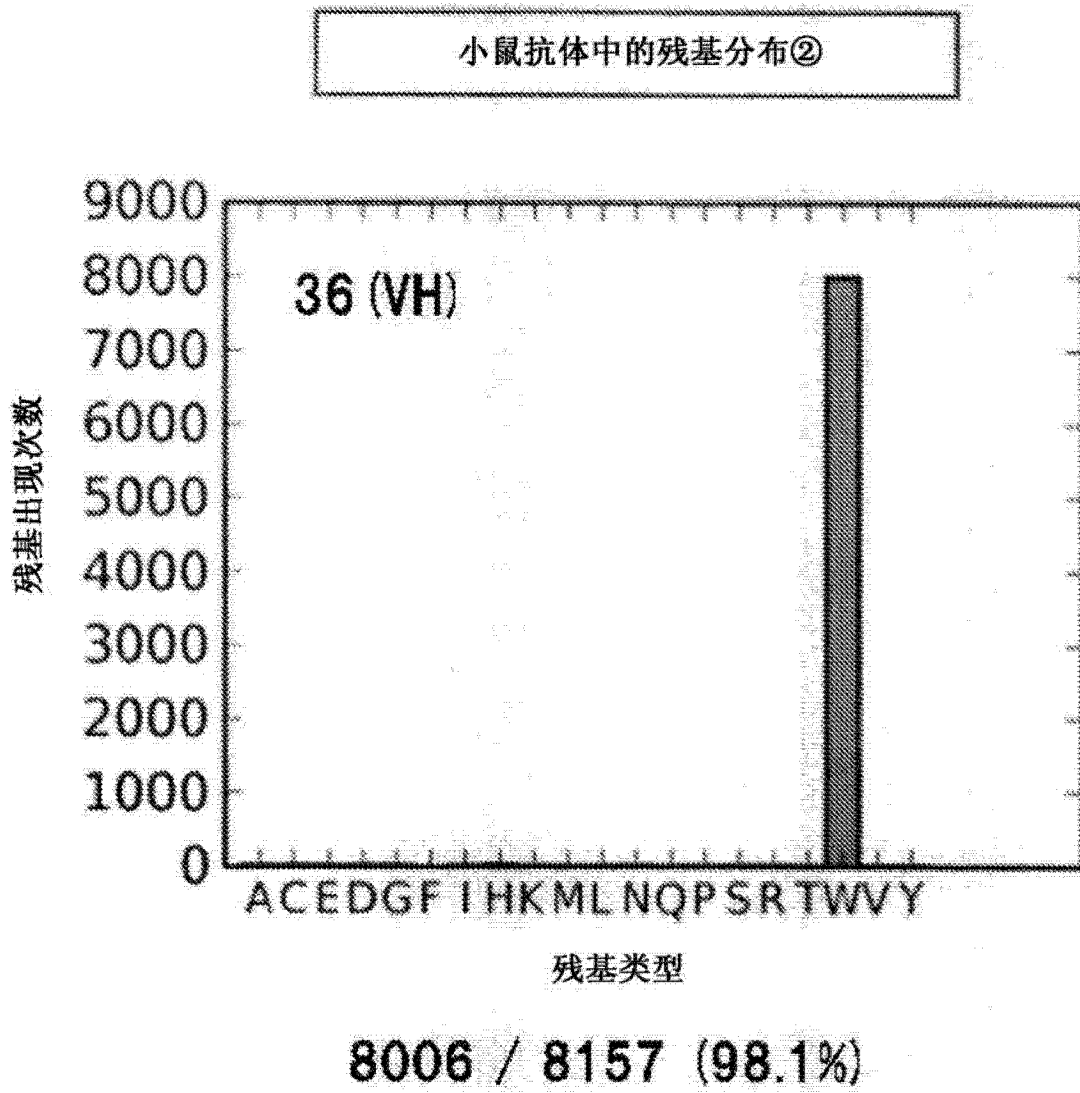


图 33

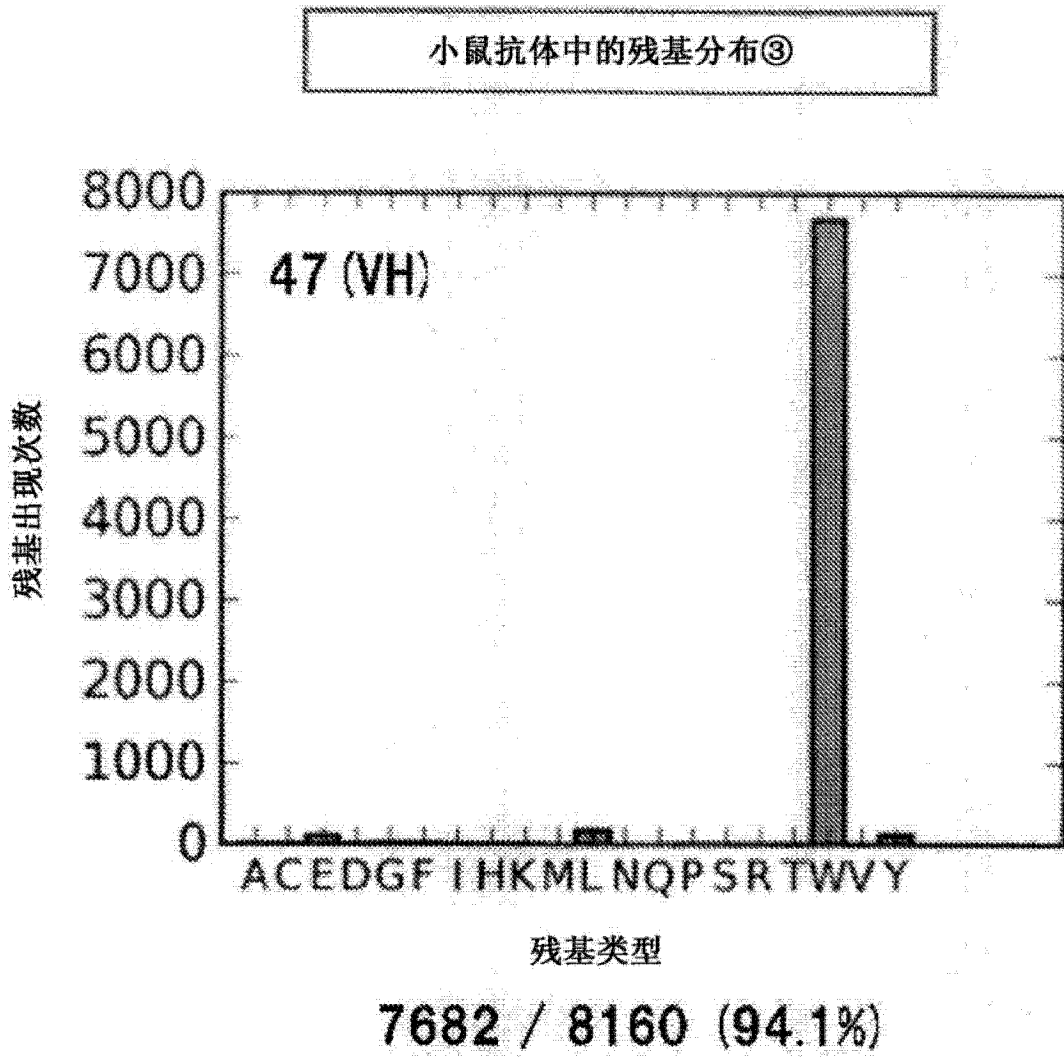


图 34

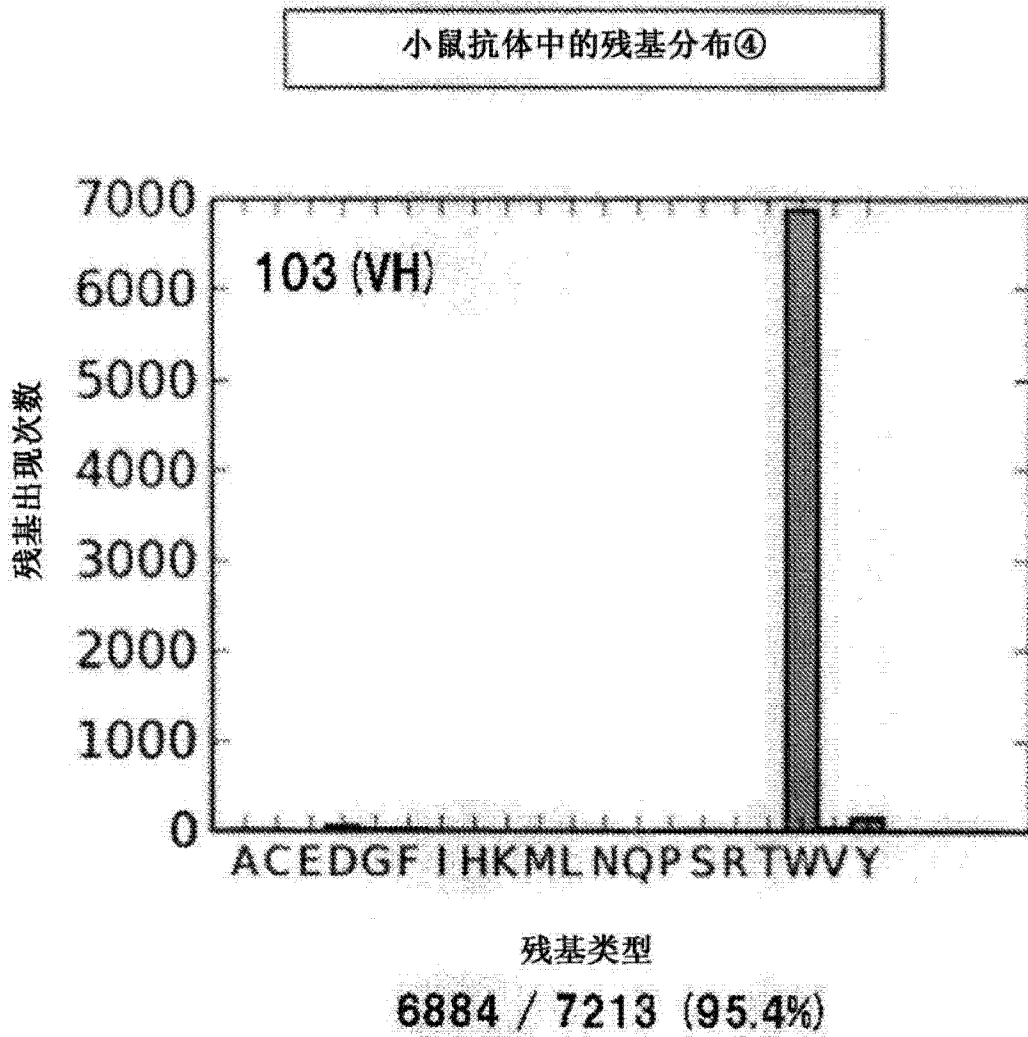


图 35

专利名称(译)	荧光免疫测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102667480B</a>	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN201080057171.8	申请日	2010-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社蛋白质表达		
申请(专利权)人(译)	株式会社蛋白质表达		
当前申请(专利权)人(译)	优志旺电机株式会社		
[标]发明人	上田宏 阿部亮二 伊原正喜 高木广明		
发明人	上田宏 阿部亮二 伊原正喜 高木广明		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/78 G01N33/531 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/582 C07K2317/622 G01N2021/6439 G01N33/6857 G01N21/6428 C07K16/18 C07K2317/56 C07K2317/92 A61K49/0058 C07K16/44		
代理人(译)	杨青		
审查员(译)	张绚		
优先权	2009264420 2009-11-19 JP		
其他公开文献	CN102667480A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的课题在于提供一种免疫测定方法，其不需要固相化步骤和洗涤步骤，能够在液相中快速且简易地进行目标物质的定量测定，并且能够使抗原可见化。通过如下方式解决该课题：依次进行下述(a)~(c)的步骤来测定受试物质中存在的目标抗原的浓度：(a)在液相中，使抗体轻链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体重链可变区多肽与受试物质中的抗原接触，或者在液相中，使抗体重链可变区多肽和由荧光色素标记的抗体轻链可变区多肽与受试物质中的抗原接触；(b)测定所述荧光色素的荧光强度；(c)以液相中的抗原浓度与所述荧光色素的荧光强度存在正相关关系为指标，计算出受试物质中含有的抗原量。

