



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103917872 B

(45) 授权公告日 2016.05.18

(21) 申请号 201280053916.2
 (22) 申请日 2012.11.01
 (30) 优先权数据
 2011-241402 2011.11.02 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2014.04.30
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2012/007025 2012.11.01
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02013/065314 JA 2013.05.10
 (73) 专利权人 优志旺电机株式会社
 地址 日本东京
 (72) 发明人 上田宏 阿部亮二 高木广明
 (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 高瑜 郑霞

(51) Int. Cl.
 G01N 33/533(2006.01)
 G01N 21/64(2006.01)
 G01N 21/78(2006.01)
 G01N 33/542(2006.01)
 (56) 对比文件
 CA 2780845 A1, 2011.05.26,
 CN 1719255 A, 2006.01.11,
 CN 1682112 A, 2005.10.12,
 杨唐斌. 小分子抗原酶免疫分析方法研究进展. 《中国生物工程杂志》. 2005, 第 25 卷 (第 6 期), 第 1-6 页.
 Ryoji Abe. "Quenchbodies": Quench-Based Antibody Probes That Show Antigen-Dependent Fluorescence. 《J. Am. Chem. Soc.》. 2011, 第 133 卷

审查员 刘迎鸣

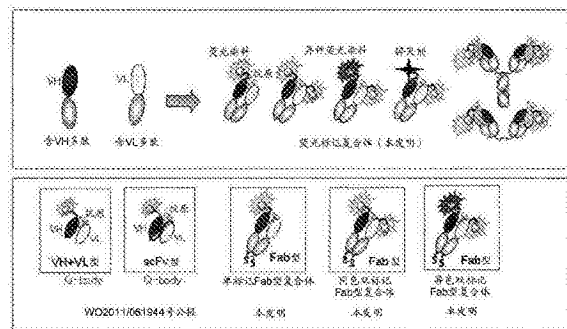
权利要求书2页 说明书23页
序列表27页 附图7页

(54) 发明名称

使用含荧光标记抗体可变区域的多肽复合体的荧光免疫测定方法

(57) 摘要

本发明的课题在于提供一种免疫测定法,其不需要固相步骤和洗涤步骤,能够在液相中快速且简便地进行目标物质的定量测定,并且能够使抗原可视化,检测灵敏度高。通过如下方式解决所述的课题,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,使包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体与用于测定的试样中的抗原接触的步骤,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个或两者由荧光染料标记;(b) 检测所述荧光染料的荧光、或测定荧光强度的步骤;(c) 以抗原浓度与所述荧光染料的荧光强度存在正相关关系为指标,算出样本中所含的抗原量,或使抗原可视化的步骤。



CN 103917872 B

1. 一种用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒具有包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽两者由荧光染料标记,

能够以液相中抗原浓度与上述荧光染料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视化,并且所述复合体是Fab抗体、 $F(ab')_2$ 抗体片段或全长抗体。

2. 如权利要求1所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,利用相同的荧光染料分别标记含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽。

3. 如权利要求1所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,利用不同种类的荧光染料分别标记含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽。

4. 如权利要求1所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,荧光染料选自罗丹明类荧光染料及噁嗪类荧光染料。

5. 如权利要求4所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,荧光染料选自羧基罗丹明110、羧基四甲基罗丹明及ATT0655。

6. 一种用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒具有包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体,且所述复合体是Fab抗体、2个Fab抗体经由铰链并通过二硫醚键键合的 $F(ab')_2$ 抗体或全长抗体,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个由荧光染料标记,

能够以液相中抗原浓度与上述荧光染料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视化。

7. 一种用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒 具有包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的一个由荧光染料标记,且另一个由猝灭该荧光染料的猝灭剂标记,

能够以液相中抗原浓度与上述荧光染料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视化,

其中在所述抗原不存在下,所述荧光染料被所述猝灭剂和所述含有抗体轻链可变区域的多肽中的色氨酸残基和/或所述含有抗体重链可变区域的多肽中的色氨酸残基猝灭。

8. 如权利要求7所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,所述包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体是Fab抗体、 $F(ab')_2$ 抗体或全长抗体。

9. 如权利要求7所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,猝灭剂为7-硝基苯并呋喃(NBD)。

10. 一种抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,依次具有以下的步骤(a)~(c):

(a)在液相中使包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体与用于测定的试样中的抗原接触的步骤,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽两者由荧光染料标记,并且所述复合体是Fab抗体、 $F(ab')_2$ 抗体或全长抗体;

(b)检测荧光染料的荧光、或测定荧光染料的荧光强度的步骤;

(c)以抗原浓度与上述荧光染料的荧光强度存在正相关关系为指标,算出所述试样中

所含的抗原量,或使抗原可视化的步骤。

11. 如权利要求10所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,利用相同的荧光染料分别标记含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽。

12. 如权利要求10所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,利用不同种类的荧光染料分别标记含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽。

13. 如权利要求10的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,抗原为低分子化合物。

14. 如权利要求10所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,抗原为人骨钙蛋白、双酚A、血清白蛋白、克伦特罗、莱克多巴胺、可替丁、A型流行性感病毒血凝素、吗啡类、甲基苯丙胺类、可卡因、四氢大麻酚、氯胺酮。

15. 一种抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,依次具有以下步骤(a)~(c):

(a)在液相中使包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体与用于测定的试样中的抗原接触的步骤,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个由荧光染料标记,且所述复合体是Fab抗体、2个Fab抗体经由铰链并通过二硫醚键键合的 $F(ab')_2$ 抗体或全长抗体;

(b)检测荧光染料的荧光、或测定荧光染料的荧光强度的步骤;

(c)以抗原浓度与所述荧光染料的荧光强度存在正相关关系为指标,算出所述试样中所含的抗原量,或使抗原可视化的步骤。

16. 如权利要求15所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,抗原为人骨钙蛋白、双酚A、血清白蛋白、克伦特罗、莱克多巴胺、可替丁、A型流行性感病毒血凝素、吗啡类、甲基苯丙胺类、可卡因、四氢大麻酚、氯胺酮。

17. 一种抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,依次具有以下步骤(a)~(c):

(a)在液相中使包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体与用于测定的试样中的抗原接触的步骤,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的一个由荧光染料标记,且另一个由猝灭该荧光染料的猝灭剂标记;

(b)检测荧光染料的荧光、或测定荧光染料的荧光强度的步骤;

(c)以抗原浓度与所述荧光染料的荧光强度存在正相关关系为指标,算出所述试样中所含的抗原量,或使抗原可视化的步骤,

其中在所述抗原不存在下,所述荧光染料被所述猝灭剂和所述含有抗体轻链可变区域的多肽中的色氨酸残基猝灭和所述含有抗体重链可变区域的多肽中的色氨酸残基猝灭。

18. 如权利要求17所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,所述包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体是Fab抗体、 $F(ab')_2$ 片段或全长抗体。

使用含荧光标记抗体可变区域的多肽复合体的荧光免疫测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可以不需要固相步骤及洗涤步骤、以高灵敏度检测低分子化合物的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒及抗原浓度测定/检测方法。

背景技术

[0002] 利用抗体和抗原的结合的免疫测定法广泛用于试样中的物质的检测及浓度测定。这些测定抗原及抗体的浓度的方法中,临床诊断、基础研究及环境调查等中最广泛地使用的测定方法是使用识别同一抗原的不同的表位的2种单克隆抗体或者使用单克隆抗体与多克隆抗体的、被称为夹心ELISA法(或夹心RIA法)的免疫测定法。夹心法的详细情况如下所述。作为第一阶段,将被称为一次抗体的单克隆或多克隆抗体固定在用于测定的板上,向其中注入含有抗原的样本,反应一定时间而使抗体和抗原结合。接着,作为第二阶段,将与抗体结合的杂质和非特异性地结合在板上的抗原用洗涤液洗涤并除去。作为第三阶段,注入预先结合了酶、荧光染料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进一步结合标记二次抗体。反应后,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用于测定的平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,需要表位不同的两种抗体,但在例如以低分子化合物等作为抗原的情况下,难以制作识别不同的表位的多种抗体。因此,上田等人确立了使用1种抗体的轻链可变区域(VL)和重链可变区域(VH)的、被称为开放式夹心法的高精度的低分子化合物的免疫测定法(专利文献1和2、非专利文献1合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区域多肽及VL区域多肽,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。另外,作为用于测定低分子化合物的测定法,除免疫测定法之外,还有液相色谱法等,但该方法存在如下问题: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] 另外,作为使用荧光染料标记后的抗体来测定抗原的浓度的免疫测定方法,已知有如下方法:利用不同的荧光染料分别对抗体和抗原进行标记,以荧光染料间发生的荧光共振能量转移(FRET)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的抗体中混合猝灭物质而猝灭抗体的荧光因目标检测物质的导入而增强的现象的猝灭效率的变化为指标的免疫测定方法;使用荧光染料标记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少的免疫测定方法(专利文献3)。

[0005] 但是,许多免疫测定方法需要使抗体或抗原进行固相化的步骤和用于除去非特异性标记化合物的吸附的洗涤步骤。这些步骤的操作繁琐且耗费时间,而且成为测定结果的偏差的原因,因此,要求开发不需要固相步骤和洗涤步骤的液相系统免疫测定方法。因此,

本发明人等开发有以下方法:其为不需要固相步骤和洗涤步骤的液相系统,可以快速且简便地进行目的物质的定量测定,并且能够使抗原可视化的免疫测定法“均相荧光免疫测定法(也称为“均相荧光免疫分析法”或“Quenchbody测定法”或“Q-body测定法”。)”(专利文献4、非专利文献5、图1~3)。

[0006] 上述“均相荧光免疫测定法”的免疫测定法为使用利用了猝灭(quenching)现象的技术的测定方法,涉及以下试剂盒:(1)一种抗原浓度用于测定/检测的试剂盒,其具有抗体轻链可变区域(被称为VL的区域)多肽和抗体重链可变区域(被称为VH的区域)多肽,上述抗体轻链可变区域多肽和抗体重链可变区域多肽中的任一个由荧光染料标记,其中,能够以液相中的抗原浓度与上述荧光染料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视化;(2)如上述(1)所述的抗原浓度用于测定/检测的试剂盒,其为VL多肽和VH多肽连接而成的单链抗体。即,是将VL多肽和VH多肽中的任一个被荧光标记的双链抗体片段、或荧光标记的VL多肽和VH多肽连接而成的单链抗体(scFv)(将上述(1)及(2)也称为“Quenchbody”或“Q-body”,将(1)也称为VH+VL型Q-body,将(2)也称为scFv型Q-body。)与检查是否含有抗原的受试试样溶液混合,能够以上述荧光染料的荧光强度和抗原浓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视化的荧光免疫测定方法(图1~3)。所述的测定方法的原理在于,抗体分子内的保守性高的色氨酸残基和荧光染料相互作用而将荧光染料猝灭,由此加入抗原可抗原依赖性地解除所述猝灭。

[0007] 使用上述Q-body的“均相荧光免疫测定法”的方法的优点可列举:1)其为不需要洗涤步骤、仅通过与少量的样品混合并测定荧光强度而完成测定的非常简便的测定技术;2)将存在于抗体中的保守性高的色氨酸应用于猝灭,因此,即使改变抗体的种类也可得到猝灭效应,也可以广泛适用于使用各种抗体检测各种物质,在这方面通用性优异;3)抗原位点可以为1处,因此,原理上对低分子化合物也可以适用等(参照专利文献4、图1)。而且,设想为:由于是没有洗涤步骤的简便的测定方法,所以,将测定设备设计为非常小型,可以小型化至能够携带的手掌尺寸,没有接受专门教育的普通人也可以在现场进行测定。但是,如上所述,其为非常有用的荧光免疫测定方法,但是抗原不存在时的荧光强度和抗原达到饱和时的荧光强度之比大的值为6倍,小的值为1.2倍左右,因此,期待进一步扩展测定结果的动态范围而提高灵敏度,进一步提高性能。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本特开平10-78436号公报

[0011] 专利文献2:专利第3784111号公报

[0012] 专利文献3:日本特开平10-282098号公报

[0013] 专利文献4:W02011/061944号公报

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:上田宏,药学杂志27:71-80(2007)

[0016] 非专利文献2:Lim SL,等,Anal Chem.79(16):6193-200(2007)

[0017] 非专利文献3:Iijima I.and Hohsaka T.,Chembiochem.17;10(6):999-1006(2009)

[0018] 非专利文献4:Kajihara D,等,Nat Methods.3(11):923(2006)

[0019] 非专利文献5:Abe R,等,J.Am.Chem.Soc.133(43):17386-17394(2011)

发明内容

[0020] 发明所要解决的课题

[0021] 本申请发明的课题在于提供一种荧光免疫测定方法,其不需要固相步骤和洗涤步骤,能够在液相中快速且简便地进行目标物质的检测和/或定量测定,并且能够使抗原可视化,所述的测定结果的动态范围更广,灵敏度高。

[0022] 用于解决课题的方法

[0023] 在不存在抗原的溶液中,由于将猝灭的荧光标记单链抗体(scFv)用胍盐酸进行改性的抗体的荧光强度和抗原达到饱和时的荧光强度几乎为相同程度,因此认为,提高抗原不存在时的猝灭效率为扩展动态范围的有效手段,进行了以下的研究。

[0024] 即,据推测:猝灭的主要原因是VL多肽及VH多肽中高度保守的色氨酸残基和标记的荧光染料接触引起的,通过伴随抗原结合的可变区域的结构稳定化而从抗原结合袋中驱逐荧光染料,由此解除猝灭状态,荧光强度增加。而且设想:VL多肽及VH多肽作为两种蛋白质存在的情况下,VL多肽及VH多肽解离且相互作用弱,因此,荧光染料和色氨酸残基的接触效率低,与其相伴的猝灭状态也低。另外,在单链抗体(scFv)中,通过使VL多肽和VH多肽用人工的肽接头作为单链抗体结合,可以提高VL多肽和VH多肽的相互作用,但认为有可能通过人工的肽接头的添加而使本来具有的与抗原的结合活性及稳定性等抗体的功能降低。如果包括抗体轻链可变区域(VL)及抗体轻链恒定区域构成的多肽和由抗体重链可变区域(VH)及抗体重链恒定区域的多肽为包括通过二硫醚键键合的1分子的异质二聚体蛋白质的Fab抗体(Fragment,antigen binding),则推测为保持本来具有的抗体的功能,将Fab抗体的含VH多肽或含VL多肽中的任一个进行荧光标记,结果发现:在抗原不存在下,所述荧光染料更强地猝灭,使本底(バックグラウンド)下降。而且,分别在Fab抗体的含VH多肽及含VL多肽中标记同色的荧光染料,结果发现:除荧光染料和色氨酸残基的接触引起的猝灭之外,加入染料间的猝灭效应(H-dimer),可得到更高的检测灵敏度。另外,分别在Fab抗体的含VH多肽及含VL多肽中标记异色的荧光染料,结果发现:除荧光染料和色氨酸残基的接触引起的猝灭和染料间的猝灭效应之外,也可得到FRET效应引起的猝灭效应,可得到更高的检测灵敏度。而且,分别在Fab抗体的含VH多肽及含VL多肽中标记猝灭荧光染料和该荧光染料的猝灭剂,结果发现:也可得到荧光染料和色氨酸残基的接触引起的猝灭以及荧光染料和猝灭剂间的猝灭效应,可得到高的检测灵敏度。

[0025] 测定现有的荧光标记单链抗体(scFv)和本发明的荧光标记Fab型复合体的热稳定性,结果发现:荧光标记单链抗体(scFv)改性的温度为61℃,但荧光标记Fab型复合体改性的温度为73℃,耐热性优异,保存性也优异。基于上述见解,直至完成本发明(图4)。

[0026] 即,本发明涉及:

[0027] [1]一种用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,所述试剂盒具有包括所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个或两者由荧光染料标记,其特征在于,能够以液相中的抗原浓度与上述荧光染料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视化;

[0028] [2]如上述[1]所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其中,利用相同的荧光染料分别标记含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽;

[0029] [3]如上述[1]所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,利用不同种类的荧光染料分别标记含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽;

[0030] [4]如上述[1]所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的一个由荧光染料标记,而另一个由猝灭该荧光染料的猝灭剂标记;

[0031] [5]如上述[1]所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个由荧光染料标记;

[0032] [6]如上述[1]~[5]中任一项所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体为Fab抗体(Fragment,antigen binding);

[0033] [7]如上述[1]~[6]中任一项所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,荧光染料选自罗丹明类荧光染料及噁嗪类荧光染料;

[0034] [8]如上述[7]所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,荧光染料选自羧基罗丹明110、羧基四甲基罗丹明及ATT0655(商标名);

[0035] [9]如上述[4]~[8]中任一项所述的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,其特征在于,猝灭剂为7-硝基苯并呋喃(NBD)。

[0036] 另外,本发明涉及:

[0037] [10]一种抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,依次具有以下步骤(a)~(c):

[0038] (a)使包括所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体与用于测定的试样中的抗原接触的步骤,所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个或两者由荧光染料标记;

[0039] (b)检测荧光染料的荧光、或测定荧光染料的荧光强度的步骤;

[0040] (c)以抗原浓度与所述荧光染料的荧光强度存在正相关关系为指标,算出样本中所含的抗原量,或使抗原可视化的步骤;

[0041] [11]如上述[10]所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,利用相同的荧光染料分别标记含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽;

[0042] [12]如上述[10]所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,利用不同种类的荧光染料分别标记含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽;

[0043] [13]如上述[10]所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的一个由荧光染料标记,而另一个由猝灭该荧光染料的猝灭剂标记;

[0044] [14]如上述[10]所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个由荧光染料标记;

[0045] [15]如上述[10]~[14]中任一项所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体为Fab抗体(Fragment,antigen binding);

[0046] [16]如上述[10]~[15]中任一项所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,抗

原为低分子化合物；

[0047] [17]如上述[10]~[15]中任一项所述的抗原浓度测定/检测方法,其特征在于,抗原为人骨钙蛋白、双酚A、血清白蛋白、克伦特罗、莱克多巴胺、可替丁、A型流行性感病毒血凝素、吗啡类、甲基苯丙胺类、可卡因、四氢大麻酚、氯胺酮。

[0048] 发明效果

[0049] 根据本发明,可以提供能够在液相系统中快速且简便地进行目的物质的检测和/或定量测定、也能够测定低分子化合物的高灵敏度的免疫测定方法和可以用于利用该测定方法进行抗原的测定的试剂盒。本发明的测定方法可以以上述荧光染料的荧光强度为指标来检测和/或测定包括含有任一方或两者分别由荧光染料标记的抗体轻链可变区域的多肽(以下也称为“含VL多肽”。)和含有抗体重链可变区域的多肽(以下也称为“含VH多肽”。)的复合体(以下也称为“本发明的荧光标记复合体”。)和抗原的结合。本发明的荧光标记复合体没有与抗原结合时,上述荧光染料处于有效地猝灭(quenching)的状态,因此,可以灵敏度好地检测和/或测定抗原。

附图说明

[0050] 图1是表示Q-body测定法的特征的图。抗体重链可变区域多肽和抗体轻链可变区域多肽中的任一个被荧光标记的两种多肽(VH+VL)、或荧光标记的抗体重链可变区域多肽和抗体轻链可变区域多肽连接而成的单链抗体(scFv)可以仅通过与抗原掺合而快速、高灵敏度地测定抗原浓度(参照W02011/061944号公报)。

[0051] 图2是表示Q-body的原理的图。通过荧光染料和在抗体可变区域中广泛地保守的氨基酸、即抗体重链可变区域的Trp33、Trp47、Trp36、Trp106及抗体轻链可变区域的Trp40的相互作用,在抗原不存在下荧光被猝灭,但抗原浓度依赖性地解除猝灭,荧光增加。将荧光标记VH+VL及荧光标记scFv称为Quenchbody(Q-body)。

[0052] 图3是表示利用Q-body测定抗原浓度的均相荧光免疫分析法的实施的一个实例的图。表示在作为Q-body的TAMRA标记抗BGP单链抗体(scFv)中使抗原浓度变化、使用荧光分光光度计(FluoroMax-4)测定荧光光谱及使用荧光影像分析仪(FM-BIOIII)测定荧光强度的结果。

[0053] 图4是示意性地表示包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体的图,含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个或两者由荧光染料标记。即,示意性地表示本发明的荧光标记复合体(上图)。另外,是示意性地表示实施例中使用的Q-body及本发明的信号标记Fab型复合体、同色双标记Fab型复合体、异色双标记Fab型复合体的图(下图)。

[0054] 图5是示意性地表示本发明的荧光标记Fab型复合体的制作方法的图。制作本发明的信号标记Fab型复合体的情况下,将含有ProX标签(TAG)、VH、CH₁、在C末端上赋予接头及His标签的DNA序列的基因的质粒和含有ProX标签(TTT)、VL、C_κ、在C末端上赋予接头及FLAG标签的DNA序列的基因的质粒和TAMRA-AF-tRNA^{amber}(CloverDirect)加入大肠杆菌无细胞合成试剂盒(RYTS)中,在20°C下反应2小时,通过共表达合成TAMRA标记的含VH多肽和含VL多肽。其后,在4°C下静置16小时,形成复合体。使用赋予C末端的FLAG和His标签精制蛋白质。设定为同色双标记的情况下,使用在含VH基因及含VL基因的N末端赋予ProX标签(TAG)

的质粒,用与信号标记Fab型复合体同样的方法进行合成、精制。另外,设定为异色双标记的情况下,使用分别将ProX标签(TAG)和ProX标签(CGCG)赋予任一个基因的N末端的质粒,利用添加有染料A-AF-tRNA_{amber}、染料B-AF-tRNA_{CGCG}(CloverDirect)的上述的方法进行合成、精制。框栏中表示通过4碱基密码子导入荧光标记氨基酸的示意图。

[0055] 图6是表示本发明的信号标记Fab型复合体可以以高于VH+VL型Q-body及scFv型Q-body的荧光强度比测定BGP及双酚A的图。

[0056] 图7是表示本发明的同色双标记Fab型复合体可以以高于本发明的信号标记Fab型复合体的荧光强度比测定BGP的图。

[0057] 图8是表示本发明的同色双标记Fab型复合体可以以高于本发明的信号标记Fab型复合体的荧光强度比测定HAS的图。

[0058] 图9是表示本发明的异色双标记Fab型复合体可以以高于本发明的信号标记Fab型复合体的荧光强度比测定BGP的图。

[0059] 图10是表示本发明的异色双标记Fab型复合体可以以高于本发明的信号标记Fab型复合体的荧光强度比测定HAS的图。

[0060] 图11是表示包括用CR110标记的含有抗SA抗体的重链可变区域(VH)和抗体重链恒定区域(CH₁)的多肽和用TAMRA标记的含有抗SA抗体的轻链可变区域(VL)和抗体轻链恒定区域(C_k)的多肽的抗SA抗体的异色双标记Fab型复合体可以以高于本发明的信号标记Fab型复合体的荧光强度比测定HAS的图。

[0061] 图12是表示本发明的一个由荧光染料标记,另一个由猝灭该荧光染料的猝灭剂标记的Fab型复合体可以以高的荧光强度比测定BGP的图。全部在Ex/Em=530/580下进行测定。

[0062] 图13是表示引起本发明的荧光标记Fab型复合体的热改性的温度比引起荧光标记scFv的热改性的温度高12°C,温度稳定性优异的图。

具体实施方式

[0063] 作为本发明的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒,只要是如下所述的试剂盒就没有特别限制,所述试剂盒具有包括含有抗体轻链可变区域的多肽(含VL多肽)和含有抗体重链可变区域的多肽(含VH多肽)的复合体,具有上述含VL多肽和含VH多肽中的任一个或两者由荧光染料标记的上述复合体,其特征在于,能够以液相中的抗原浓度与上述荧光染料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视化,除含有任一方或两者由荧光染料标记的、包括含VL多肽和含VH多肽的复合体作为构成要素之外,可以具有能够作为标准物质使用的抗原及通常用于该种免疫测定试剂盒的试剂等器具、使用说明书等。

[0064] 作为上述抗原,只要是利用上述含VH多肽及上述含VL多肽、包括这些多肽的复合体特异性地识别的抗原,就没有特别限制,例如,除蛋白质、肽、糖质、脂质、糖脂质、低分子化合物之外,可以列举磷酸化、甲基化等蛋白质修饰等及接受了这些修饰的蛋白质等,本发明的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒由于检测灵敏度优异,因此,在低分子化合物的检测中特别有用。

[0065] 本发明的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒中的、构成包括含VL多肽和含VH多肽

的复合体的含VL多肽和含VH多肽,只要其中的任一方或两者由荧光染料标记即可,可以做成:(i)任一方由荧光染料标记的复合体、(ii)利用分别为相同的荧光染料标记的复合体、(iii)利用分别为不同种类的荧光染料标记的复合体、或(iv)任一个由荧光染料标记、另一个由猝灭该荧光染料的猝灭剂标记的复合体。添加于含VH多肽及含VL多肽中的任一个的情况下,荧光染料可以添加于任一个多肽,但优选添加于可得到高的检测灵敏度的一方。分别为不同的两种的荧光染料添加于含VH多肽及含VL多肽的情况下,任一种荧光染料可以添加于任一个多肽,优选设定为可得到高的检测灵敏度的荧光染料和多肽的组合。含VL多肽和含VH多肽限于均不抑制上述荧光染料的发光及检测、猝灭,除利用包括任意的氨基酸序列的蛋白质及ProX标签(序列号1)、FLAG标签、His标签、HA标签、Ni标签等肽标签、包括任意的氨基酸序列的接头、稳定放射性同位体、酶、与上述荧光染料不同的种类的荧光染料等标记之外,可以接受糖链添加及磷酸化、甲基化等修饰。

[0066] 抗体轻链可变区域(VL)只要在抗体轻链基因的V区域及J区域的利用外显子编码的抗体轻链可变区域(VL)中含有特异性的氨基酸序列,就没有特别限制,只要不损害上述含VL多肽或本发明的荧光标记复合体和抗原的亲合性,就可以在上述抗体轻链可变区域中在特异性的氨基酸序列的N末端和/或C末端侧进一步添加任意的氨基酸序列,也可以缺失、替换、插入1或2个以上的氨基酸。所述的与抗原的亲合性可以利用ELISA法及FACS等常规方法适当研究。另外,作为上述抗体轻链可变区域中特异性的氨基酸序列,优选在卡巴特(Kabat)的编号体系中第35号的氨基酸为色氨酸的氨基酸序列。

[0067] 抗体重链可变区域(VH)只要在抗体重链基因的V区域、D区域及J区域的利用外显子编码的抗体重链可变区域(VH)含有特异性的氨基酸序列,就没有特别限制,只要不损害上述含VH多肽或本发明的荧光标记复合体和抗原的亲合性,就可以在上述抗体重链可变区域中在特异性的氨基酸序列的N末端和/或C末端侧进一步添加任意的氨基酸序列,也可以缺失、替换、插入1或2个以上的氨基酸。所述的与抗原的亲合性可以利用ELISA法及FACS等常规方法适当研究。另外,作为上述抗体重链可变区域中特异性的氨基酸序列,优选在卡巴特(Kabat)的编号体系中第36号、第47号、或第103号的氨基酸为色氨酸的氨基酸序列。

[0068] 作为含VL多肽,只要含有抗体轻链可变区域(VL)即可,可以含有抗体轻链及在抗体轻链中包括任意的氨基酸序列的肽,例如,可以设定为在抗体轻链可变区域(VL)中赋予抗体轻链恒定区域(C_k)、进而较链部分的多肽,其中,优选在VL中赋予C_k的多肽等。作为上述含VL多肽,具体而言,可以优选例示:包括在序列号5中添加序列号4的序列、在序列号7中添加序列号4的序列、在序列号10中添加序列号4的序列、在序列号15中添加序列号4的序列、在序列号17中添加序列号4的序列、在序列号19中添加序列号4的序列、在序列号21中添加序列号4的序列、在序列号23中添加序列号4的序列、在序列号25中添加序列号4的序列、在序列号27中添加序列号4的序列及在序列号29中添加序列号4的序列所示的氨基酸序列的多肽,此外,可以根据测定对象的抗原适当制作能够识别抗原的含VL多肽。

[0069] 作为含VH多肽,只要含有抗体轻重可变区域(VH)即可,可以含有抗体重链及在抗体重链中包括任意的氨基酸序列的肽,例如,可以设定为在抗体重链可变区域(VH)中赋予抗体重链恒定区域(CH₁)、进而较链部分及Fc区域的多肽,其中,优选在VH中赋予CH₁的多肽等。作为上述含VH多肽,具体而言,可以优选例示包括在序列号3中添加序列号6的序列、在序列号9中添加序列号6的序列、在序列号12中添加序列号6的序列、在序列号16中添加序列

号6的序列、在序列号18中添加序列号6的序列、在序列号20中添加序列号6的序列、在序列号22中添加序列号6的序列、在序列号24中添加序列号6的序列、在序列号26中添加序列号6的序列、在序列号28中添加序列号6的序列及在序列号30中添加序列号6的序列所示的氨基酸序列的多肽,此外,可以根据测定对象的抗原适当制作能够识别抗原的含VH多肽。

[0070] 含VL多肽和含VH多肽优选形成复合体,只要在抗体轻链可变区域(VL)及抗体重链可变区域(VH)中分别键合含有形成复合体的氨基酸序列的肽,就没有特别限制。作为形成复合体的肽,除上述抗体恒定区域(CH₁及C_k等)之外,也可以将形成二聚物的肽中的一个赋予在VL上,将另一个赋予在VH上。另外,也可以选择相互作用并有助于这些复合体形成的两种蛋白质。

[0071] 作为本发明的荧光标记复合体中的“复合体”,只要含有含VL多肽和含VH多肽作为构成要素并形成复合体即可,限于不损害本发明的荧光标记复合体的功能,除上述含VL多肽和含VH多肽之外,可以进一步含有肽及蛋白质、脂质、金属、其它化合物等作为构成要素。

[0072] 另外,本发明的复合体只要是上述多肽彼此组合并可以作为一体起作用的结构体即可,上述多肽间的化学键的有无不是特别重要作为上述键,可以列举上述多肽彼此形成的二硫键及使用交联剂形成的键等,这些键可以在1个复合体中组合多个而使用。其中,可以优选例示二硫醚键。本发明的复合体优选形成上述多肽彼此处于相互接近的距离的复合体,优选含有具有这种功能的肽的、包括含VL多肽及含VH多肽的复合体。在抗体分子中,抗体轻链恒定区域和抗体重链恒定区域通过其相互作用,将抗体轻链可变区域和抗体重链可变区域设定为更近的距离,产生形成坚固的抗原结合袋的辅助的作用。由此,作为本发明的复合体,包括抗体轻链可变区域和抗体轻链恒定区域的多肽和包括抗体重链可变区域和抗体重链恒定区域的多肽链优选作为通过二硫醚键键合的1分子的抗体蛋白质的Fab抗体、2个Fab抗体经由铰链并通过二硫醚键键合的F(ab')₂抗体及完全体的抗体,其中,最优选Fab抗体。所述的包括含VL多肽及含VH多肽的Fab抗体形式的本发明的荧光标记复合体有时称为“本发明的荧光标记Fab型复合体”。其中,含VL多肽或含VH多肽中的任一个被荧光标记的本发明的荧光标记Fab型复合体有时称为“本发明的信号标记Fab型复合体”。另外,含VL多肽及含VH多肽全部被荧光标记的本发明的荧光标记Fab型复合体,该两种荧光染料相同的情况下,有时称为“本发明的同色双标记Fab型复合体”,两种荧光染料不同的情况下,有时称为“本发明的异色双标记Fab型复合体”。

[0073] 在本发明中,含VL多肽及含VH多肽、含有这些多肽的复合体及其构成要素等可以使用公知的化学合成法、基因重组技术、利用蛋白质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可以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,可以将含有编码所述的多肽的碱基序列的DNA导入到优选的表达载体而制作重组载体,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及无细胞翻译系统来表达目标多肽(图5)。在无细胞翻译系统中进行目标多肽的表达时,例如,可以在向大肠杆菌、小麦胚芽、兔网状红细胞等无细胞提取液中添加三磷酸核苷和各种氨基酸的反应液中使目标多肽表达。此时,含VL多肽及含VH多肽可以添加ProX标签及FLAG标签、His标签等标签,这些标签可以用于荧光染料的添加及多肽的精制等。可以在荧光染料标记的同时或标记的前后、在适当的溶剂中使这样得到的含VL多肽及含VH多肽彼此形成复合体,可以列举通过二硫醚键或交联剂而键合、形成复合体的例子。例如,将上述编码含

VL多肽及含VH多肽的基因在大肠杆菌无细胞合成体系中共表达后,在4°C下培养16小时,由此,可以形成二硫醚键,形成复合体。另外,可以通过在大肠杆菌无细胞合成反应体系中添加蛋白质二硫醚异构酶及脯氨酸顺反异构酶等分子伴侣而促进二硫醚键。另外,作为上述交联剂,只要是能够交联多肽并彼此键合的化合物即可,可以列举例如醛类(例如戊二醛)、碳化二亚胺类、酰亚胺酯类等,可以适当得到市售品,利用常规方法使用。另外,本发明的复合体也可以用酶等切断抗体而制作,通过使用例如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体,也可以分别制作Fab抗体及F(ab')₂抗体。

[0074] 在本发明中,由荧光染料标记含VL多肽及含VH多肽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借助交联剂等间接地标记的方法;在利用无细胞翻译系统合成多肽的同时位点特异性地标记的方法等。作为利用无细胞翻译系统标记的方法,已知有:琥珀抑制法(Ellman J等(1991)Methods Enzymol.202:301-36)、4碱基密码子法(Hohsaka T.,等,J.Am.Chem.Soc.,118,9778-9779,1996)、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5,643,722号公报、Olejnik等(2005)Methods36:252-260)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,使用无细胞翻译系统由该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标记氨基酸的蛋白质。在4碱基密码子法中,制作主要将密码子扩展为CGGG、将编码氨基酸的密码子替换成CGGG的DNA或mRNA,使用无细胞翻译系统由该DNA或mRNA合成蛋白质。此时,通过在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tRNA_{CGGG},能够合成在替换成4碱基密码子的位点上导入标记氨基酸的蛋白质。在本发明中的异色双标记中,通过使用无细胞翻译系统组合琥珀抑制法和4碱基密码子法使其共表达,能够在含VH多肽及含VL多肽中用不同的荧光染料进行标记,形成复合体。另外,在C末端标记法中,通过在以最佳浓度添加标记的嘌呤霉素的无细胞翻译系统中进行由DNA或mRNA向蛋白质的翻译,能够合成在C末端特异性地导入标记的蛋白质。

[0075] 另外,也可以使用利用以大肠杆菌及动物细胞为宿主的基因重组技术位点特异性地导入荧光染料的方法。可以以识别叠氮酪氨酸的氨酰tRNA合成酶和导入了抑制型叠氮酪氨酸-tRNA的大肠杆菌为宿主,在多肽上位点特异性地导入叠氮酪氨酸,在导入的叠氮基上键合荧光染料。另外,可以以来自古细菌的吡咯烷基tRNA合成酶和导入了抑制型吡咯烷基-tRNA的动物细胞为宿主,在多肽上位点特异性地导入叠氮乙赖氨酸,在导入的叠氮基上键合荧光染料。

[0076] 在本发明中,作为用于荧光标记的荧光染料,只要是在标记含VH多肽和/或含VL多肽的情况下,在形成本发明的荧光标记复合体的状态下、在抗原不存在下被猝灭(quenching)的荧光染料、且在所述的复合体和抗原结合时解除猝灭功能并发出荧光的荧光染料,就没有特别限制。另外,将相同或不同的种类的荧光染料分别添加于含VH多肽和含VL多肽的情况下,除上述的猝灭之外,优选有效地产生在抗原不存在下选择染料间的猝灭及利用FRET效应的猝灭的组合。作为用于荧光标记的荧光染料,可以例示具有罗丹明、香豆素、Cy、EvoBlue、噁嗪、卡波派洛宁(Carbopyronin)、萘、联苯、蒽、菲、芘、喹唑等作为基本骨架的荧光染料或该荧光染料的衍生物,具体而言,可以列举:CR110:羧基罗丹明110:罗丹明

绿(商标名)、TAMRA:羧基四甲基罗丹明:TMR、羧基罗丹明6G:CR6G、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、BODIPY493/503(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、BODIPY R6G(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、BODIPY558/568(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、BODIPY564/570(商标名):4,4-二氟-5-苯乙烯基-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、BODIPY581/591(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、ATTO390(商标名)、ATTO425(商标名)、ATTO465(商标名)、ATTO488(商标名)、ATTO495(商标名)、ATTO520(商标名)、ATTO532(商标名)、ATTO Rho6G(商标名)、ATTO550(商标名)、ATTO565(商标名)、ATTO Rho3B(商标名)、ATTORho11(商标名)、ATTO Rho12(商标名)、ATTO Thio12(商标名)、ATTO610(商标名)、ATTO611X(商标名)、ATTO620(商标名)、ATTO Rho14(商标名)、ATTO633(商标名)、ATTO647(商标名)、ATTO647N(商标名)、ATTO655(商标名)、ATTO Oxa12(商标名)、ATTO700(商标名)、ATTO725(商标名)、ATTO740(商标名)、Alexa Fluor350(商标名)、Alexa Fluor405(商标名)、Alexa Fluor430(商标名)、Alexa Fluor488(商标名)、Alexa Fluor532(商标名)、Alexa Fluor546(商标名)、Alexa Fluor555(商标名)、Alexa Fluor568(商标名)、Alexa Fluor594(商标名)、Alexa Fluor633(商标名)、Alexa Fluor647(商标名)、Alexa Fluor680(商标名)、Alexa Fluor700(商标名)、Alexa Fluor750(商标名)、Alexa Fluor790(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,可以特别优选例示作为罗丹明类荧光染料的CR110或TAMRA及作为噁嗪类荧光染料的ATTO655。

[0077] 作为本发明中的猝灭剂,只要是在抗原不存在下在本发明的荧光标记复合体中,作为其构成要素的含VL多肽和含VH多肽中的任一个标记的荧光染料的荧光能够被添加于另一个肽的猝灭剂猝灭的猝灭剂、且在所述复合体和抗原结合的情况下解除所述猝灭功能并发出荧光的猝灭剂,就没有特别限制。所述的猝灭剂可以例示以NBD:7-硝基苯并呋咱、DABCYL、BHQ、ATTO、QXL、QSY、Cy、Lowa Black、IRDYE等为基本骨架的猝灭染料及其猝灭染料的衍生物,具体而言,可以列举:NBD、DABCYL、BHQ-1(商标名)、BHQ-2(商标名)、BHQ-3(商标名)、ATTO540Q(商标名)、ATTO580Q(商标名)、ATTO612Q(商标名)、QXL490(商标名)、QXL520(商标名)、QXL570(商标名)、QXL610(商标名)、QXL670(商标名)、QXL680(商标名)、QSY-35(商标名)、QSY-7(商标名)、QSY-9(商标名)、QSY-21(商标名)、Cy5Q(商标名)、Cy7Q(商标名)、Lowa Black FQ(商标名)、LowaBlackRQ(商标名)、IRDYE QC-1(商标名),其中,优选NBD。另外,本发明的复合体中的荧光染料和猝灭剂的组合可以适当选择猝灭剂在抗原不存在下有效地猝灭荧光染料、在抗原存在下不抑制荧光染料的发光的组合,可以例示荧光染料TAMRA和NBD的组合。

[0078] 本发明的荧光标记复合体、即包括含VL多肽和含VH多肽的复合体、且上述含VL多肽和含VH多肽中的任一个或两者由荧光染料标记的复合体,在抗原不存在下产生在前述的荧光染料与抗体可变区域中保守的色氨酸残基之间的相互作用,引起的荧光染料的猝灭。

除此之外,在上述多肽分别被同色的荧光染料标记的本发明的荧光标记复合体中,可得到荧光染料间的猝灭效应。另外,在上述多肽分别被异色的荧光染料标记的本发明的荧光标记复合体中,除上述色氨酸残基引起的猝灭、荧光染料间的猝灭之外,可得到荧光共振能量转移(FRET)效应引起的猝灭效应。而且,在上述多肽分别被荧光染料和猝灭该染料的猝灭剂标记的本发明的荧光标记复合体中,利用荧光染料和猝灭剂间的猝灭效应,可以增大动态范围。

[0079] 作为本发明的抗原浓度测定/检测方法,只要是其特征为依次具有以下步骤(a)~(c)的抗原浓度测定和/或检测方法即可,所述步骤为:

[0080] (a)使包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体与用于测定的试样中的抗原接触的步骤,上述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个或两者由荧光染料标记;

[0081] (b)检测荧光染料的荧光、或测定荧光染料的荧光强度的步骤;

[0082] (c)以抗原浓度与上述荧光染料的荧光强度存在正相关关系为指标,算出样本中所含的抗原量,或使抗原可视化的步骤;

[0083] 上述复合体只要是本发明的荧光标记复合体即可,其中,可以例示本发明的荧光标记Fab型复合体、更优选本发明的信号标记Fab型复合体、本发明的同色双标记Fab型复合体、本发明的异色双标记Fab型复合体。另外,本发明的抗原浓度测定/检测方法可以使用本发明的荧光标记复合体及本发明的用于测定和/或检测抗原浓度的试剂盒而进行。

[0084] 本发明的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒的使用及本发明的抗原浓度测定/检测方法优选在液相中进行本发明的荧光标记复合体和抗原的接触,因此,作为测定对象试样的样本优选作为含有适当液体或者液体的、或浸渍于液体的用于测定的试样制备,供于上述步骤(a)及本发明的抗原浓度测定/检测方法。本发明的用于测定和/或检测抗原浓度的试剂盒的使用及本发明的抗原浓度测定和/或检测方法中的样本的来源等没有特别限制,可以适当实施前处理等而制成上述用于测定的试样。液体的样本限于直接作为用于测定的试样供于测定、或者既不损害抗原也不抑制抗原浓度测定/检测,也可以用缓冲液及生理盐水等稀释或浓缩、或适当调整pH及盐浓度等而制成用于测定的试样。作为所述的液体的样本,可以列举例如可能含有作为测定对象的靶抗原的血清、血浆、唾液、骨髓液、尿等体液、培养上清液、细胞提取液、菌体提取液、工业废水等。

[0085] 固体等液体以外的样本限于直接或者既不损害抗原也不抑制抗原浓度测定/检测,在实施制作适当分割、细断、粉碎、磨碎、组织切片、或仅除去或提取样本的特定成分等处理的基础上,在缓冲液及生理盐水等液体中溶解、悬浮或液浸,由此,可以设定为本发明的荧光标记复合体能够与抗原接触的状态,做成用于测定的试样。在上述组织切片的制作中,可以在不损害抗原的范围内使用对甲醛及戊二醛等实施固定处理,而且,也可以利用BSA(牛血清白蛋白)及脱脂牛奶等进行粘连处理。作为所述的固体等样本,可以列举例如印迹有从生物体中采取的组织、细胞、蛋白质及糖等成分的确基纤维素膜及PVDF膜、食品、土壤等。另外,用于测定的试样限于既不损害抗原也抑制不抗原浓度测定/检测,可以含有适当防腐剂、防霉剂、pH调节剂、表面活性剂、防凝固剂、螯合剂等。

[0086] 在本发明中,可以进一步将生物体内的血液或骨髓液等体液、组织等也做成用于测定的试样。即,通过对实验动物等非人动物施用本发明的荧光标记复合体,可以使本发明

的荧光标记复合体和生物体内的抗原接触。作为所述的非人动物,只要是人以外的动物即可,可以列举例如脊椎动物,其中,可以列举哺乳类、鱼类、鸟类、爬行动物类、两栖动物类等非人动物,其中,优选哺乳类,更优选小鼠、大鼠、仓鼠、猴、猪等。另外,上述施用方法也没有特别限制,可以从肌肉内注射、腹腔内注射、静脉内注射、皮下注射、填埋、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。另外,可以与本发明的荧光标记复合体施用同时、或在其前后施用其它药剂等。通过对非人动物施用本发明的荧光标记复合体,也可以观察生物体内的抗原的位置或其移动、抗原量或其变化。在所述的观察中,可以经时地采取体液或组织等样本而制备用于测定的试样,进行荧光强度测定或荧光的定位观察,或者也可以实时地检测并观察生物体中的荧光强度或其变化、荧光的定位或其移动。

[0087] 作为使本发明的荧光标记复合体和用于测定的试样中的抗原接触的反应条件,只要是在用于测定的试样中添加本发明的荧光标记复合体、在一般可以用于抗原抗体反应的条件下进行培养,就没有特别限制,温度条件可以设定为例如1~30°C、优选18~25°C,反应时间可以设定为例如瞬时~180分钟、优选1~90分钟。另外,在非人动物体内进行反应的情况下,施用后培养例如5~180分钟、优选60~120分钟,可以根据需要适当进行提取组织、血液、细胞等、或使观察对象位点暴露等处理。在培养结束后的试样中,识别抗原的本发明的荧光标记复合体中的猝灭被解除,通过激发光的照射发出荧光,但不识别抗原的本发明的荧光标记复合体至被猝灭为止,通过激发光的照射也不发出荧光。因此,添加上述荧光标记复合体的用于测定的试样可以不经洗涤等步骤而直接供于抗原浓度测定和/或检测,该情况为本发明的用于测定/检测抗原浓度的试剂盒及本发明的抗原浓度测定/检测方法的大的特征之一。

[0088] 本发明中的用于测定的试样中的荧光的检测方法只要可以检测从荧光染料发出的荧光,就没有特别限制,对上述反应后的用于测定的试样照射激发光而测定和/或检测荧光染料的荧光强度即可。照射的激发光及测定和/或检测的荧光的波长可以根据使用的荧光染料的种类适当选择,例如,在荧光染料中使用CR110的情况下,可以设定为激发光波长480nm和荧光波长530nm的组合,使用TAMRA的情况下,可以设定为激发光波长530nm和荧光波长580nm的组合,使用ATT0655的情况下,可以设定为激发光波长630nm和荧光波长680nm的组合。另外,使用两种不同的荧光染料的情况下,也适当选择使用可以测定抗原浓度和/或检测抗原的激发光波长及荧光波长的组合即可。例如,在与本发明的荧光标记复合体反应的用于测定的试样中,照射适于上述荧光标记复合体中所含的荧光染料中的任一种的激发波长的光,对两种荧光染料获取荧光光谱,由此可以确定最适于抗原浓度测定/检测的激发光波长及荧光波长的组合。例如,作为激发光波长和荧光波长的组合,可以列举适于任一方的荧光染料的激发光波长及荧光波长的组合,更优选可以列举适于激发光波长及荧光波长短的荧光染料的激发光波长及荧光波长的组合。予以说明,荧光可以作为荧光光谱检测,也可以作为特定波长中的光强度检测,例如,使用CR110和TAMRA的组合的情况下,可以将激发光波长设定为480nm并检测波长530nm的荧光,也可以作为波长515nm~650nm的荧光光谱检测。适于两种不同的荧光染料任一方的激发光波长及荧光波长的组合可以有效地检测抗原不存在时的FRET(荧光共振能量移动:Fluorescence resonance energy transfer)效应引起的本底的减少,可以以更高灵敏度测定。

[0089] 在本发明中用于荧光检测的光源及测定装置可以适当选择,光源只要是能够照射

激发光波长的光源即可,作为光源,可以列举水银灯、氙灯、LED、激光等,可以使用适当的过滤器得到特定波长的激发光。荧光测定装置可以使用通常用于荧光观察的设备,可以适当利用具有激发光的光源及其照射系统、荧光影像采集系统的显微镜等,可以例示MF20/FluoroPoint-Light(OLYMPUS公司制)及FMBIO-III(日立软件工程公司制)等。由于荧光强度和抗原的浓度存在正相关关系,所以,可以测定使用含有浓度已知的抗原的受试物质时的荧光强度,制作表示抗原浓度和荧光强度的关系的标准曲线,由该标准曲线算出浓度未知的抗原浓度。所述的抗原浓度的算出也可以利用基于制作的标准曲线而预先设定的换算式等自动地算出抗原量。予以说明,荧光的检测可以为荧光光谱的检测,也可以为特定波长的荧光强度的检测。

[0090] 另外,对非人动物施用本发明的荧光标记复合体的情况下,除采取其体液及组织等之外,也可以对非人动物的检测对象区域照射激发光,二维或三维地测定和/或检测荧光染料的荧光,该情况下,可以列举使用荧光显微镜及荧光影像分析仪、具有光源的内窥镜等的例子。另外,检测时,优选同时取得使用内窥镜、X射线、CT、MRI、超声波、显微镜等来显示非人动物的个体、组织或细胞的结构图像。由于被测定和/或检测的荧光强度和抗原量存在正相关关系,所以,可以基于受试测的荧光的二维或三维的图像获知抗原的定位(位置)和/或量,此时也可以与显示上述结构的图像进行比较。在检测这些荧光时,优选以不含有本发明的荧光标记复合体的、或不含有样本的用于测定的试样等作为阴性对照而制备,同时进行测定和/或检测。另外,也可以使用上述阴性对照中的荧光测定值除用于测定的试样中的荧光测定值所得的荧光强度比进行抗原量的测定等。或者,由于在本发明中荧光强度和抗原量存在正相关关系,所以,在可得到超过适当设定的阈值的荧光强度的情况下,也可以判定为在测定试样中存在抗原。

[0091] 如上所述,根据本发明,可以检测能够用ELISA法、免疫扩散法、胶乳凝集法、免疫色谱法、表面等离子共振法等免疫测定法进行测定的全部的抗原类。例如,对于低分子物质的免疫测定法通常使用竞争ELISA法,但本发明的低分子物质的检测测定在方法的简便程度、测定灵敏度及SN比等方面比竞争ELISA法优异,最能够发挥其能力。可以列举例如:氨基丙苯、甲基苯丙胺、吗啡、海洛因、可待因等兴奋剂及麻药类,黄曲霉素、柄曲菌素、新茄镰孢菌醇、瓜萎镰孢菌醇、串珠镰孢菌素、赭曲霉素、植物内生菌产生的毒素等霉菌毒素,睾丸激素及雌二醇等性激素,克伦特罗及莱克多巴胺等饲料中不正当地使用的添加物,PCB、棉子酚、组胺、苯并芘、三聚氰胺、丙烯酰胺、二噁英等有害物质,吡虫啉、吡虫啉、溴虫啉、马拉硫磷、胺甲萘、噻虫胺、氟菌唑、四氯异苯腈、农用抗生素刺糖菌素、灭多威、甲胺磷、氯吡硫磷等残留农药,双酚A等环境激素等。

[0092] 另外,根据本发明,在瞬间得到测定结果的基础上,检测方法简单,因此,可以将检测设备小型化且低价格化。这些优点不限于低分子物质,可以在前往现场并进行测定的现场分析中发挥威力。而且测定容易,因此,即使不是专家,也可以进行测定。可以在例如检测/或测量流行性感冒、传染病(伝染病)或感染症(感染症)等的原因病毒或细菌、血中药物浓度及POCT的临床诊断领域,或工作场所、学校、托儿所及家庭中的简易健康测定领域、炭疽菌、肉毒杆菌毒素、沙林毒气及VX气体等反恐对策等的安心安全领域,需要在现场旁边测定的环境污染物质及室内尘埃等环境领域,需要免疫测定的研究开发领域等中没有遗憾地发挥其能力。

[0093] 在以下所示的实施例中,对本发明具体且更详细地说明,但本发明的技术范围并不受这些实施例限定。

[0094] 实施例1

[0095] 1.使用本发明的荧光标记复合体的均相荧光免疫测定法的确立

[0096] 表达载体的构建

[0097] 1)信号标记Fab型复合体

[0098] 在编码含有抗人骨钙蛋白(ヒトオステオカルシン、human Osteocalcin)(人骨谷氨酸蛋白, human Bone Gla Protein;BGP)的抗体的轻链可变区域(VL;序列号5)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予ProX(商标名)标签(对应于第九号氨基酸的碱基序列为TTT,翻译为MSKQIEVNFSNET;序列号1)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及FLAG标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(罗氏诊断公司制)。另外,将编码含有抗BGP的抗体的重链可变区域(VH;序列号3)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的DNA序列、在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(对应于第九号氨基酸的碱基序列为TAG,翻译为MSKQIEVNXSNET(X为荧光标记的氨基酸);序列号2)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及His标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(罗氏诊断公司制)(图5)。这些构建的表达载体以在插入的VL或VH的N末端添加ProX标签(翻译时,VH被标记,VL不被标记)、在C末端添加His标签或FLAG标签的方式来设计。

[0099] 在编码含有抗双酚A(bisphenol A)的抗体的轻链可变区域(VL;序列号7)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予ProX标签(序列号1)及GGGS5间隔区(GGGSGGSGGGSGGSGGGS;序列号8)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及FLAG标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(罗氏诊断公司制)。另外,在编码含有抗双酚A的抗体的重链可变区域(VH;序列号9)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(序列号2)及GGGS5间隔区(序列号8)的DNA序列、在C末端赋予有接头(序列号14)及His标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(罗氏诊断公司制)(图5)。这些构建的表达载体以在插入的VL或VH的N末端添加ProX标签(翻译时,VH被标记,VL不被标记)、在C末端添加His标签或FLAG标签的方式来设计。

[0100] 在编码含有抗血清白蛋白(SA)的抗体的轻链可变区域(VL;序列号10)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予ProX标签(序列号1)及GGGS2间隔区(GGGSGGGS;序列号11)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及FLAG标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(罗氏诊断公司制)。另外,在编码含有抗血清白蛋白(SA)的抗体的重链可变区域(VH;序列号12)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(序列号2)及GGGS5间隔区(序列号8)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及His标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(罗氏诊断公司制)(图5)。这些构建的表达载体以在插入的VL或VH的N末端添加ProX标签(翻译时,VH被标记,VL不被标记)、在C末端添加His标签或FLAG标签的方式来设计。

[0101] 2)同色双标记Fab型复合体

[0102] 在编码含有抗BGP的抗体的轻链可变区域(VL;序列号5)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(翻译为序列号

2)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及FLAG标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体。另外,在编码含有抗BGP的抗体的重链可变区域(VH;序列号3)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(翻译为序列号2)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及His标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体。这些构建的表达载体以在插入的VL或VH的N末端中添加ProX标签(琥珀抑制)、在C末端添加His标签或FLAG标签的方式来设计。

[0103] 在编码含有抗血清白蛋白(SA)的抗体的轻链可变区域(VL;序列号10)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(翻译为序列号2)及GGGS2间隔区(序列号11)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及FLAG标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(罗氏诊断公司制)。另外,在编码含有抗SA的抗体的重链可变区域(VH;序列号12)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(翻译为序列号2)及GGGS2间隔区(序列号11)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及His标签的DNA序列的基因插入pIVEX2.3d载体。这些构建的表达载体以在插入的VL或VH的N末端添加ProX标签(琥珀)、在C末端添加His标签或FLAG标签的方式来设计。

[0104] 3)异色双标记Fab型复合体

[0105] 在编码含有抗BGP的抗体的轻链可变区域(VL;序列号5)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有CGGG4碱基密码子的ProX标签(对应于第九号氨基酸的碱基序列为CGGG,翻译为序列号2)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及FLAG标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体。另外,在编码含有抗BGP的抗体的重链可变区域(VH;序列号3)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(翻译为序列号2)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及His标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(图5)。这些构建的表达载体以在插入的VL或VH的N末端添加ProX标签、在C末端添加His标签或FLAG标签的方式来设计。

[0106] 在编码含有抗血清白蛋白(SA)的抗体的轻链可变区域(VL;序列号10)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有CGGG4碱基密码子的ProX标签(翻译为序列号2)及GGGS2间隔区(序列号11)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及FLAG标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体(罗氏诊断公司制)。另外,在编码含有抗SA的抗体的重链可变区域(VH;序列号12)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的DNA序列中,将在N末端赋予含有琥珀密码子的ProX标签(翻译为序列号2)及GGGS2间隔区(序列号11)的DNA序列、在C末端赋予接头(序列号14)及His标签的DNA序列的基因插入于pIVEX2.3d载体。这些构建的表达载体以在插入的VL或VH的N末端添加ProX标签、在C末端添加His标签或FLAG标签的方式来设计。

[0107] 荧光标记Fab型复合体的合成

[0108] 使用RYTS(商品名)大肠杆菌无细胞合成试剂盒(蛋白表达公司制),利用无细胞翻译系统进行荧光标记氨基酸向含抗体可变区域肽和/或含抗体可变区域肽的N末端区域的导入。

[0109] 1)信号标记或同色双标记Fab型复合体

[0110] 反应液(60μL)中添加有3μL的酶混合物、0.6μL的蛋氨酸、30μL的2×反应混合物、

20 μ L的大肠杆菌裂解物、2 μ L的两种质粒DNA(各200ng)、3 μ L的荧光标记氨酰-tRNA_{Amber}(480pmol)、1.4 μ L的无核酸酶水。用于制作荧光标记蛋白质的荧光标记氨酰-tRNA(TAMRA-X-AF-tRNA_{Amber}、CR110-X-AF-tRNA_{Amber}及ATTO655-X-AF-tRNA_{Amber})使用定点蛋白质功能化的CloverDirect(商标名)tRNA Reagents for site-Directed protein Functionalization(蛋白表达公司制)。将反应液在20 $^{\circ}$ C下静置2小时并进行反应,进行蛋白质合成,其后,进一步在4 $^{\circ}$ C下反应16小时,由此完成复合体形成。反应结束后,使用0.5 μ L反应液进行SDS-PAGE(15%),用荧光影像分析仪(FMBIO-III;日立软件工程公司制)观察蛋白表达。进而,使用抗His标签抗体或抗FLAG标签抗体进行蛋白免疫印迹(Western Blot),确认目标的含荧光标记抗体可变区域的肽被合成。

[0111] 2)异色双标记Fab型复合体

[0112] 反应液(60 μ L)中添加有3 μ L的酶混合物、0.6 μ L的蛋氨酸、30 μ L的2 \times 反应混合物、20 μ L的大肠杆菌裂解物、2 μ L的两种质粒DNA(各200ng)、1.5 μ L的两种荧光标记氨酰-tRNA_{Amber}及CGGG(各自480nmol)、1.4 μ L的无核酸酶水。用于制作荧光标记蛋白质的荧光标记氨酰-tRNA(TAMRA-X-AF-tRNA_{Amber}或CGGG、CR110-X-AF-tRNA_{Amber}或CGGG及ATTO655-X-AF-tRNA_{Amber}或CGGG)使用定点蛋白质功能化的CloverDirect(商标名)tRNA Reagents for site-Directed protein Functionalization(蛋白表达公司制)。在含VH区域多肽及含VL区域多肽的标记中分别使用tRNA_{Amber}、tRNA_{CGGG}。将反应液在20 $^{\circ}$ C下静置2小时并反应,进行蛋白质合成,其后,进一步在4 $^{\circ}$ C下反应16小时,由此完成复合化形成。反应结束后,使用0.5 μ L反应液进行SDS-PAGE(15%),用荧光影像分析仪(FMBIO-III;日立软件工程公司制)观察蛋白表达。进而,使用抗His标签抗体或抗FLAG标签抗体进行蛋白免疫印迹,确认合成了目标含荧光标记抗体可变区域的肽。

[0113] 3)一个由荧光染料标记,另一个由猝灭该荧光染料的猝灭剂标记的Fab型复合体

[0114] 使用TAMRA作为荧光染料、NBD-X, SE(Anspec社)作为猝灭剂。将阿部等的方法(Abe R,等,J.Biosci.Bioeng.110(1):32-38(2010))的TAMRA-X, SE分别变更为NBD-X, SE(Anspec公司),合成NBD-X-AF-tRNA_{CGGG}。反应液(60 μ L)中添加有3 μ L的酶混合物、0.6 μ L的蛋氨酸、30 μ L的2 \times 反应混合物、20 μ L的大肠杆菌裂解物、2 μ L的两种质粒DNA(各200ng)、1.5 μ L的TAMRA-X-AF-tRNA_{Amber}及NBD-X-AF-tRNA_{CGGG}(各自480nmol)、1.4 μ L的无核酸酶水。在含VH区域多肽及含VL区域多肽的标记中分别使用tRNA_{Amber}、tRNA_{CGGG}。将反应液在20 $^{\circ}$ C下静置2小时并使其反应,进行蛋白质合成,其后,进一步在4 $^{\circ}$ C下反应16小时,由此完成复合化形成。反应结束后,使用0.5 μ L反应液进行SDS-PAGE(15%),用荧光影像分析仪(FMBIO-III;日立软件工程公司制)观察蛋白表达。进而,使用抗His标签抗体或抗FLAG标签抗体进行蛋白免疫印迹,确认合成了目标含荧光标记抗体可变区域的肽。

[0115] 荧光标记Fab型复合体的精制

[0116] 合成的荧光标记Fab型复合体通过抗FLAGM2亲和凝胶(Sigma-Aldrich公司制)及His-Spin Trap Column(GEhealth care公司制)进行精制。将上述反应液(60 μ L)应用于放入有抗FLAGM2亲和凝胶的色谱柱,在室温下培养15分钟之后,用洗涤缓冲液(20mM磷酸缓冲液(pH7.4)/0.5M NaCl/0.1%聚氧化乙烯(23)月桂基醚)进行3次洗涤。接着,用200 μ L的洗脱缓冲液(20mM磷酸缓冲液(pH7.4)/0.5M NaCl/100 μ gFLAGpeptide/0.1%聚氧化乙烯(23)月桂基醚)洗脱3次。接着,将洗脱液应用于His-Spin Trap Column。在室温下培养15分钟之

后,用洗涤缓冲液(20mM磷酸缓冲液(pH7.4)/0.5M NaCl/60mM咪唑/0.1%聚氧化乙烯(23)月桂基醚)进行3次洗涤。接着,用200 μ L的洗脱缓冲液(20mM磷酸缓冲液(pH7.4)/0.5M NaCl/0.5M咪唑/0.1%聚氧化乙烯(23)月桂基醚)洗脱3次。进一步将洗脱液使用Amicon Ultra-0.5离心式过滤器10kDa(密理博公司制)、在PBS(+0.05%吐温20)中进行缓冲液交换、浓缩。使用荧光影像分析仪(FMBIO-III;日立软件工程公司制)测定精制后的样品的浓度。

[0117] Q-body的制作

[0118] 利用接头(GGGGSGGGGSGGGGS)连接的用TAMRA标记的抗BGP抗体的VH和VL(VH为标记的,VL为未标记的)及用TAMRA标记的抗BGP抗体、抗双酚A抗体的VH和VL的单链抗体(scFv)的制作根据国际公开公报W02011/061944中记载的方法。

[0119] 实施例2

[0120] 2.利用使用本发明的荧光标记复合体的均相荧光免疫测定法的测定

[0121] 使用信号标记Fab型复合体的荧光光谱测定

[0122] 使用实施例1中制作的、包括含有抗BGP(人骨钙蛋白)的抗体的轻链可变区域(VL;序列号5)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA荧光标记的抗BGP的抗体的重链可变区域(VH;序列号3)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的TAMRA信号标记抗BGP抗体Fab型复合体、或TAMRA标记抗BGP抗体scFv、或TAMRA标记抗BGP抗体VH+抗BGP抗体VL测定BGP浓度。使用含有1%BSA的PBS(+0.05%吐温20)将TAMRA信号标记抗BGP抗体Fab型复合体、或TAMRA标记抗BGPscFv(70nM、6.25 μ L)、或TAMRA标记抗BGP抗体VH+抗BGP抗体VL(70nM/mL、6.25 μ L)与作为抗原的BGP-C7(序列号13)(0、1、3、10、25、100、或1,000nM)制备成50 μ L。将该溶液在25 $^{\circ}$ C下放置70分钟之后,使用荧光分光光度计(FluoroMax-4;HORIBA Jobin Yvon公司制)进行荧光光谱测定。使用543nm的He-Ne激光,激发波长设置为530nm,测定580nm下的荧光强度。图6左上的坐标图表示各抗原浓度下的荧光强度相对于没有抗原时的荧光强度的比,图6中左下的表表示BGP-C7为1,000nM时的荧光强度的比。同样地进行包括含有用TAMRA荧光标记的抗双酚A的抗体的VL(序列号7)和C_k(序列号4)的多肽及含有抗双酚A的抗体的VH(序列号9)和CH₁(序列号6)的多肽的TAMRA信号标记抗双酚A抗体Fab型复合体或TAMRA标记抗双酚A抗体scFv与双酚A(0、1、3、10、30、100或1,000nM)的反应,测定荧光强度。图6中右上的坐标图表示各抗原浓度下的荧光强度相对于没有抗原时的荧光强度的比,图6中右下的表表示双酚A为1,000nM时的荧光强度的比。可以确认:不依赖于荧光染料种类及抗原浓度,本发明的信号标记Fab型复合体与现有的scFv型Q-body及VH+VL型Q-body相比,可以得到高的荧光强度比,可以以高灵敏度检测及定量低分子化合物及蛋白质。因此,认为本发明的Fab型复合体与scFv型Q-body及VH+VL型Q-body相比,形成作为其构成要素的多肽彼此为相互近的距离的复合体,有效地产生抗体的可变区域的色氨酸引起的荧光染料的猝灭效应。

[0123] 实施例3

[0124] 使用同色双标记Fab型复合体的荧光光谱测定

[0125] 使用含有1%BSA的PBS(+0.05%吐温20)将实施例1中制作的、包括含有用CR110、TAMRA或ATT0655的荧光染料标记的抗BGP的抗体的轻链可变区域(VL;序列号5)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用相同的染料标记的抗BGP的抗体的重链可变区域

(VH;序列号3)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体(70nM、6.25μL)与作为抗原的BGP-C7(0~10,000nM)制备成总计50μL。作为对照,准备含有抗BGP的抗体VL(序列号5)和C_κ(序列号4)的多肽或含有抗BGP的抗体VH(序列号3)和CH₁(序列号6)的多肽中的任一个被荧光标记的信号标记Fab型复合体的样品。将这些溶液在25℃下放置70分钟之后,使用荧光分光光度计(FluoroMax-4;HORIBA Jobin Yvon公司制)进行荧光光谱测定。使用CR110荧光染料标记同色双标记Fab型复合体的情况下,激发波长(Ex)设置为480nm,测定荧光波长(Em)530nm下的荧光强度。使用TAMRA荧光染料标记同色双标记Fab型复合体的情况下,激发波长设置为530nm,测定荧光波长580nm下的荧光强度。使用ATTO655荧光染料标记同色双标记Fab型复合体的情况下,激发波长设置为630nm,测定荧光波长680nm下的荧光强度。将各抗原浓度下的荧光强度相对于没有抗原时的荧光强度的比设定为荧光强度比,示于图7的坐标图。图7中的表表示BGP-C7为1,000nM、或10,000nM时的荧光强度之比。

[0126] 另外,同样地进行含有抗血清白蛋白(SA)的抗体的轻链可变区域(VL;序列号10)和抗体轻链恒定区域(C_κ;序列号4)的多肽及含有用相同的染料标记的抗SA的抗体的重链可变区域(VH;序列号12)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体与作为抗原的HSA(0~100μM)的反应,测定荧光强度。图8的坐标图表示荧光强度比,图8中的表表示HAS为100μM时的荧光强度之比。由以上的结果可以确认:不依赖于荧光染料及抗原的种类,本发明的同色双标记Fab型复合体可以以高于信号标记Fab型复合体的荧光强度比测定抗原量。认为在同色双标记Fab型复合体中,除抗体的可变区域的色氨酸引起的荧光染料的猝灭效应之外,通过加入荧光染料间的猝灭效应(H-dimer),可以减少本底,增强动态范围。

[0127] 实施例4

[0128] 使用异色双标记Fab型复合体的荧光光谱测定

[0129] 使用含有1%BSA的PBS(+0.05%吐温20)将实施例1中制作的、包括含有用CR110、TAMRA或ATTO655的荧光染料标记的抗BGP的抗体的轻链可变区域(VL;序列号5)和抗体轻链恒定区域(C_κ;序列号4)的多肽及含有用与上述不同的染料标记的抗BGP的抗体的重链可变区域(VH;序列号3)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的BGP抗体的异色双标记Fab型复合体(70nM、6.25μL)与作为抗原的BGP-C7(0~1,000nM)制备成总计50μL。作为对照,准备同色双标记Fab型复合体的样品。与实施例3同样地设想荧光强度,得到各抗原浓度下的荧光强度相对于没有抗原时的荧光强度的比。予以说明,使用CR110及TAMRA的情况下,激发波长设置为480nm,测定荧光波长530nm下的荧光强度(图9左坐标图)。使用CR110、TAMRA及ATTO655的情况下,激发波长设置为530nm,测定荧光波长580nm下的荧光强度(图9中央坐标图)。使用TAMRA及ATTO655的情况下,激发波长设置为630nm,测定荧光波长680nm下的荧光强度(图9右坐标图)。图9中的各表表示BGP-C7为1,000nM时的荧光强度之比。

[0130] 另外,同样地进行实施例1中制作的、包括含有用CR110、TAMRA或ATTO655的荧光染料标记的抗SA的抗体的重链可变区域(VH;序列号12)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽及含有用与上述不同的染料标记的抗SA的抗体的轻链可变区域(VL;序列号10)和抗体轻链恒定区域(C_κ;序列号4)的多肽的SA抗体的异色双标记Fab型复合体与作为抗原的HSA(0~100μM)反应,测定荧光强度。将各抗原浓度下的荧光强度相对于没有抗原时的荧光

强度的比设定为荧光强度比,示于图10中的坐标图。图10中的表表示HAS为100 μ M时的荧光强度比。

[0131] 而且,使包括含有用CR110标记的抗SA抗体的重链可变区域(VH;序列号12)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽及含有用TAMRA标记的抗SA抗体的轻链可变区域(VL;序列号10)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的抗SA抗体的异色双标记Fab型复合体(也表示为CR110__TAMRA。)与作为抗原的HSA(1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} M)反应,用波长480nm(图11左上坐标图)或波长530nm(图11右上坐标图)的激发光照射,测定荧光光谱。另外,使包括含有用CR110标记的抗SA抗体VH(序列号12)和CH₁(序列号6)的多肽及含有抗SA抗体VL(序列号10)和C_k(序列号4)的多肽的抗SA抗体的CR110信号标记Fab型复合体(CR110_无)与作为抗原的HSA(1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} M)反应,用波长480nm的激发光照射,测定荧光光谱(图11左下坐标图)。使包括含有抗SA抗体VH(序列号12)和CH₁(序列号6)的多肽及含有用TAMRA标记的抗SA抗体VL(序列号10)和C_k(序列号4)的多肽的SA抗体的TAMRA信号标记Fab型复合体(无__TAMRA)与作为抗原的HSA(1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} M)反应,用波长530nm的激发光照射,使用荧光分光光度计(FluoroMax-4)测定荧光光谱(图11右下坐标图)。坐标图中的曲线从上侧为HSA浓度为 1×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、0M的样品的数据。

[0132] 由该结果得知:在异色双标记Fab型复合体CR110__TAMRA中,在用波长480nm的激发光照射的情况下利用FRET效应抑制抗原不存在下的约530nm的波长的荧光,因此,在约530nm的波长中可得到高的荧光强度之比。另外得知:在照射波长530nm的激发光的情况下,也利用荧光染料间的猝灭效应,在荧光波长约530nm中,CR110__TAMRA与无__TAMRA相比,可得到高的荧光强度之比。因此,认为除抗体的可变区域的色氨酸引起的荧光染料的猝灭效应之外,通过加入荧光染料间的猝灭效应、进而FRET效应,可以减少本底,增强动态范围。在本实验体系中,可以通过CR110__TAMRA最大为75倍的荧光增加来检测抗原,显示本发明的有用性。

[0133] 实施例5

[0134] 使用包括荧光标记和猝灭剂标记的Fab型复合体的荧光光谱测定

[0135] 使用含有1%BSA的PBS(+0.05%吐温20)将实施例1中制作的、包括含有进行了TAMRA标记的抗BGP的抗体的重链可变区域(VH;序列号3)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)及用NBD标记的抗BGP的抗体的轻链可变区域(VL;序列号5)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽的Fab型复合体(70nM,6.25 μ L)与作为抗原的BGP-C7(0~10,000nM)制备成总计50 μ L。将该溶液在25 $^{\circ}$ C下放置70分钟之后,使用荧光分光光度计(FluoroMax-4;HORIBA Jobin Yvon公司制)进行荧光光谱测定。激发波长设置为530nm,测定荧光波长580nm下的荧光强度。将各抗原浓度下的荧光强度相对于没有抗原时的荧光强度的比设定为荧光强度比,示于图12的坐标图。图12中的表表示BGP-C7为1,000nM时的荧光强度之比。

[0136] 由该结果得知,Fab型复合体TAMRA__NBD可以与信号标记Fab型复合体(TAMRA__无)(图7)同程度的1nM的浓度检测BGP,且可以通过比双标记(TAMRA__TAMRA)(图7)高27倍的荧光增加来检测抗原,显示本发明的有用性。

[0137] 实施例6

[0138] 温度稳定性的测定

[0139] 为了测定实施例1中制作的抗BGP__TAMRA信号标记Fab复合体和抗BGP__TAMRA标记scFv的热稳定性,进行了热转移分析。使用StepOne实时PCR系统(应用生物系统公司)使温度以每分钟1℃上升,测定各温度下的荧光强度。基于每种抗体经历热改性时,其结构崩溃且猝灭状态解除并增加荧光强度的原理,测定热稳定性。如图13所示,TAMRA标记scFv的T_m值(引起热改性的温度)为61℃,但作为本发明的TAMRA信号标记Fab复合体的T_m值为73℃,上升了12℃。就该热稳定性而言,可以进行试剂的长期保存,可以对流通温度、保存温度、保存时间等工业上的价值有很大贡献。

[0140] 实施例7

[0141] 荧光标记Fab型复合体的克伦特罗的测定

[0142] 将按照实施例1所示的方法合成的包括含有用CR110标记的抗克伦特罗的抗体的轻链可变区域(VL;序列号15)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗克伦特罗的抗体的重链可变区域(VH;序列号16)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的异色双标记Fab型复合体与作为抗原的克伦特罗(0~16μg/mL)反应,用实施例4的方法测定荧光强度。表1表示克伦特罗为16μg/mL时的荧光强度之比。该结果,可以测定16μg/mL的克伦特罗。

[0143] [表1]

通过荧光标记Fab型复合体测定克伦特罗

荧光标记Fab抗体	抗原	标记荧光色素		测定	荧光增加*1
		含VH多肽	含VL多肽	Ex / Em	
抗-克伦特罗	克伦特罗	TAMRA	CR110	480 / 530	1.5

*1{(16μg/mL克伦特罗的荧光强度)/(无抗原的荧光强度)}

[0145] 实施例8

[0146] 莱克多巴胺、可替丁的荧光标记Fab型复合体测定

[0147] 按照实施例1所示的方法合成包括含有用TAMRA标记的抗莱克多巴胺的抗体的轻链可变区域(VL;序列号17)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗莱克多巴胺的抗体的重链可变区域(VH;序列号18)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体。另外,合成包括含有用TAMRA标记的抗可替丁的抗体的轻链可变区域(VL;序列号19)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗可替丁的抗体的重链可变区域(VH;序列号20)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体。接着,分别使它们与作为抗原的莱克多巴胺3.4μg/mL或可替丁3.5μg/mL反应,用实施例4的方法测定荧光强度。表2表示其结果。如表2所示,可以以2.3及1.9的荧光增加比测定荧光强度比。

[0148] [表2]

通过荧光标记Fab型复合体测定莱克多巴胺、可替丁

[0149]

荧光标记Fab抗体	抗原	标记荧光色素		测定 Ex / Em	荧光增加
		含VH多肽	含VL多肽		
抗-莱克多巴胺	莱克多巴胺	TAMRA	TAMRA	530 / 580	2.2 *1
抗-可替丁	可替丁	TAMRA	TAMRA	530 / 580	1.8 *2

*1(3.4 μ g/ml莱克多巴胺的荧光强度)/(无抗原的荧光强度)
*2(3.5 μ g/ml可替丁的荧光强度)/(无抗原的荧光强度)

[0150] 实施例9

[0151] A型流行性感病毒血凝素(HA)的荧光标记Fab型复合体测定

[0152] 将按照实施例1所示的方法合成的包括含有用CR110标记的抗流行性感病毒A型H5N1、H1N1的血凝素(HA)的抗体的轻链可变区域(VL;序列号21)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗流行性感病毒A型H5N1、H1N1的血凝素(HA)的抗体的重链可变区域(VH;序列号22)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的异色双标记Fab型复合体和各自的抗原30 μ g/mL反应,用实施例4的方法测定荧光强度。表3表示其结果。如表3所示,相对于各自的抗原H5N1HA及H1N1HA,可以分别以6.1及7.1测定荧光增加比。

[0153] [表3]

通过荧光标记Fab型复合体测定A型流行性感病毒HA

[0154]

荧光标记Fab抗体	抗原	标记荧光色素		测定 Ex / Em	荧光增加*1
		含VH多肽	含VL多肽		
抗-HA	H5N1 HA	TAMRA	CR110	480 / 530	6.1
	H1N1 HA	TAMRA	CR110	480 / 530	7.1

*1(30 μ g/ml抗原的荧光强度)/(无抗原的荧光强度)

[0155] 实施例10

[0156] 吗啡类、甲基苯丙胺类、可卡因的荧光标记Fab型复合体测定

[0157] 合成按照实施例1所示的方法合成的包括含有用TAMRA标记的抗吗啡的抗体的轻链可变区域(VL;序列号23)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗吗啡的抗体的重链可变区域(VH;序列号24)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体。同样地,合成包括含有用TAMRA标记的抗甲基苯丙胺的抗体的轻链可变区域(VL;序列号25)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗甲基苯丙胺的抗体的重链可变区域(VH;序列号26)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体、包括含有用TAMRA标记的抗可卡因的抗体的轻链可变区域(VL;序列号27)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗可卡因的抗体的重链可变区域(VH;序列号28)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体。另外,按照实施例1,制作利用接头(GGGGSGGGGSGGGG)连接的用TAMRA标记的抗吗啡抗体的VL和VH的单链抗体(scFv)以及利用接头(GGGGSGGGGSGGGG)连接的抗甲基苯丙胺抗体的VH和VL的单链抗体(scFv)。使构建的TAMRA双标记Fab复合体及TAMRA标记scFv和各种吗啡类、甲基苯丙胺类、可卡因、氯胺酮反应,用

实施例3或实施例1的方法测定荧光强度。表4表示其结果。三种荧光标记Fab复合体特异性地识别各自的抗原，且荧光标记吗啡Fab复合体和scFv的比较、荧光标记甲基苯丙胺Fab复合体和scFv的荧光增加比都是Fab复合体高，动态范围大大增大。

[0158] [表4]

通过荧光标记Fab型复合体测定吗啡类、甲基苯丙胺类、可卡因

抗原	荧光标记Fab抗体	抗原100 μ g/mL下的荧光增加值*1							
		抗-吗啡		抗-甲基苯丙胺		抗-可卡因		抗-吗啡	抗-甲基苯丙胺
		含VH多肽	含VL多肽	含VH多肽	含VL多肽	含VH多肽	含VL多肽	scFv	scFv
		TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA
吗啡类									
吗啡		7.8		0.9		0.9		1.5	
海洛因		8.3						1.5	
可待因		8.1						1.5	
苯巴因		8.2							
乙基吗啡		8.4							
双氢可待因		8.3							
甲基苯丙胺类									
甲基苯丙胺				7.2				1.0	1.8
安非他命				6.8					
MDMA				7.2					
MDA		1.3		5.8		0.5			
可卡因									
可卡因		1.3		1.0		3.7		1.0	
氯胺酮									
氯胺酮		1.3		1.0		0.9		1.0	

*1(100 μ g/mL抗原的荧光强度)/(无抗原的荧光强度)

[0160] 实施例11

[0161] 大麻成分THC和氯胺酮的荧光标记Fab型复合体测定

[0162] 按照实施例1所示的方法合成包括含有用TAMRA标记的抗大麻成分THC的抗体的轻链可变区域(VL;序列号29)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗大麻成分THC的抗体的重链可变区域(VH;序列号30)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体。同样地，合成包括含有用TAMRA标记的抗氯胺酮的抗体的轻链可变区域(VL;序列号31)和抗体轻链恒定区域(C_k;序列号4)的多肽及含有用TAMRA标记的抗氯胺酮的抗体的重链可变区域(VH;序列号32)和抗体重链恒定区域(CH₁;序列号6)的多肽的同色双标记Fab型复合体。接着，分别使它们与作为抗原的THC(100 μ g/mL)或氯胺酮(1.0mg/mL)反应，用实施例4的方法测定荧光强度。如表5所示，可以以1.3及2.0的荧光增加比测定荧光强度比。

[0163] [表5]

通过荧光标记Fab型复合体测定大麻成分THC、氯胺酮

荧光标记Fab抗体	抗原	标记荧光色素		测定 Ex / Em	荧光增加
		含VH多肽	含VL多肽		
抗-THC	THC	TAMRA	TAMRA	530 / 580	1.3 ±
抗-氯胺酮	Ketamine	TAMRA	TAMRA	530 / 580	2.0 ±

*1(100 μ g/mL THC的荧光强度)/(无抗原的荧光强度)
*2(1.0 μ g/mL氯胺酮的荧光强度)/(无抗原的荧光强度)

[0165] 工业上应用的可能性

[0166] 本发明可以在试样分析及药物检查的领域、便携式试样分析试剂盒的领域等中有

用地应用。

<223> Xaa 是荧光氨基酸.

<400> 2

Met Ser Lys Gln Ile Glu Val Asn Xaa Ser Asn Glu Thr
1 5 10

<210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗-BGP 抗体 VH

<400> 3

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

[0002]

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
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Ala Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

<211> 102
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 肽 CH1

<400> 6

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

[0005] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys
 100

<210> 7
 <211> III
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 抗-双酚 A 抗体 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
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro
65 70 75 80

[0006]

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> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 间隔区 GGGGS

<400> 8

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> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗-双酚 A 抗体 VH

<400> 9

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

[0007]

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

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> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 抗-SA 抗体 VL

<400> 10

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

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

[0008] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Arg Asp Arg Pro Ala
 85 90 95

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

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 间隔区 GGGG2

<400> 11

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗-SA 抗体 VH

<400> 12

[0009] 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

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> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 肽 BGP-C7

<400> 13

Arg Arg Phe Tyr Gly Pro Val
 1 5

[0010]

<210> 14
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头 GGGs

<400> 14

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> Clen-VL-15

<400> 15

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

[0011]

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Lys Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Clen-VH-16

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

[0012] Ser Arg Asp Gly Asn Asp Glu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Ract-VL-17

<400> 17

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser

20

25

30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Ser Lys Val 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
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

[0013]

Arg

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Ract-VH-18

<400> 18

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Ala Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110

[0014] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Coti-VL-19

<400> 19

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

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Ala
 20 25 30

Lys Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu

35 40 45

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

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

Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Thr Tyr Tyr Gly Pro
85 90 95

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

<210> 20

<211> 116

[0015]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Coti-VH-20

<400> 20

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

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile His Gly Asn Arg Gly Phe Asn Tyr His Ala Ser Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg
65 70 75 80

Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95

Ala Asp Asp Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

[0016] <220>

<223> Inf1-VL-21

<400> 21

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Thr Phe Asn
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Ala Lys Asp Ser Gln Leu Arg Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Trp Leu Ser
 100 105 110

Gln Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 23

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Morp-VL-23

<400> 23

[0018]

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn

85

90

95

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Morp-VH-24

<400> 24

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

[0019] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ser Gln Val His Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Meth-VL-25

<400> 25

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

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

[0020]

Phe Leu Tyr 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 Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Asn Tyr Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 26

<213> 人工的

<220>

<223> Coca-VL-27

<400> 27

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

[0022]

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Phe
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 28

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Coca-VH-28

<400> 28

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30

Trp Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Lys Tyr Thr Glu
 50 55 60

[0023]

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Ser Val Pro Gln Leu Gly Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> THC-VL-29

<400> 29

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

Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu
65 70 75 80

[0024]

Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 30

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> THC-VH-30

<400> 30

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

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

Val Met Val Trp Leu Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

[0025] Arg Gly Thr Thr Ile Val Ala Gly Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Keta-VL-31

<400> 31

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20

25

30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ser Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

[0026]

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> Keta-VH-32

<400> 32

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

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

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

[0027] Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

Q-body测定法

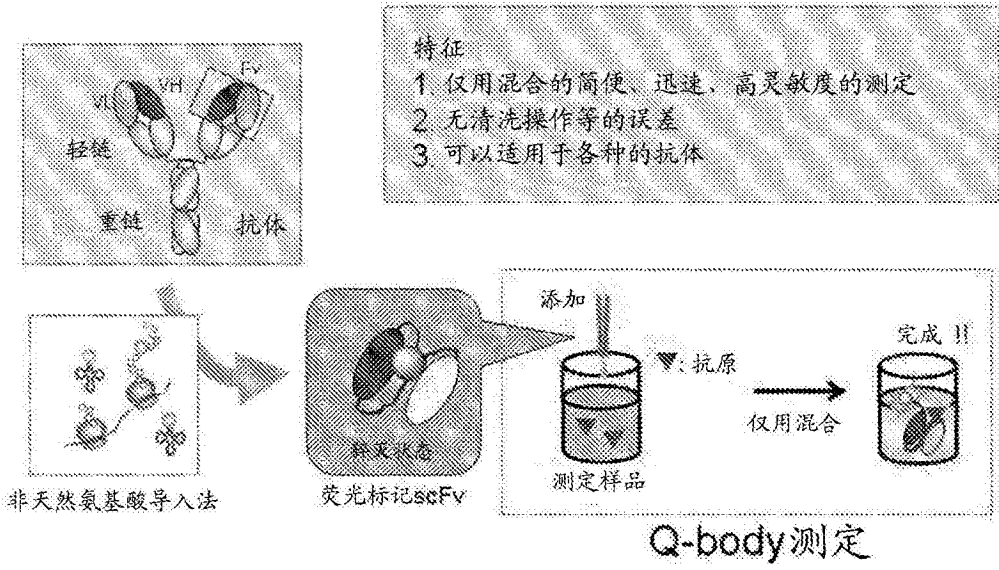


图1

Q-body的原理

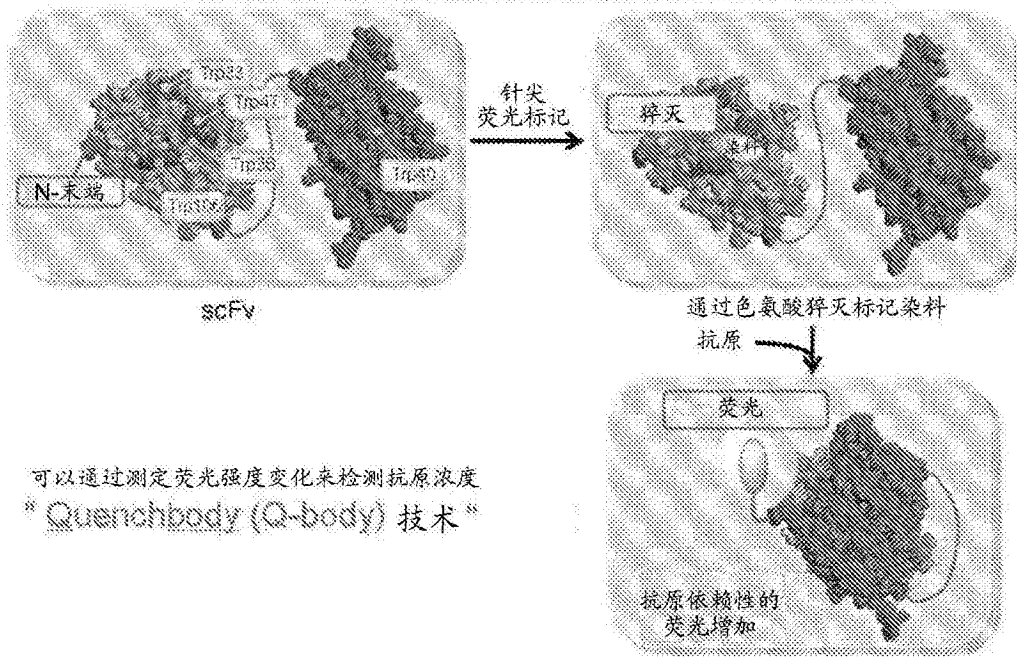


图2

均相荧光免疫测定法

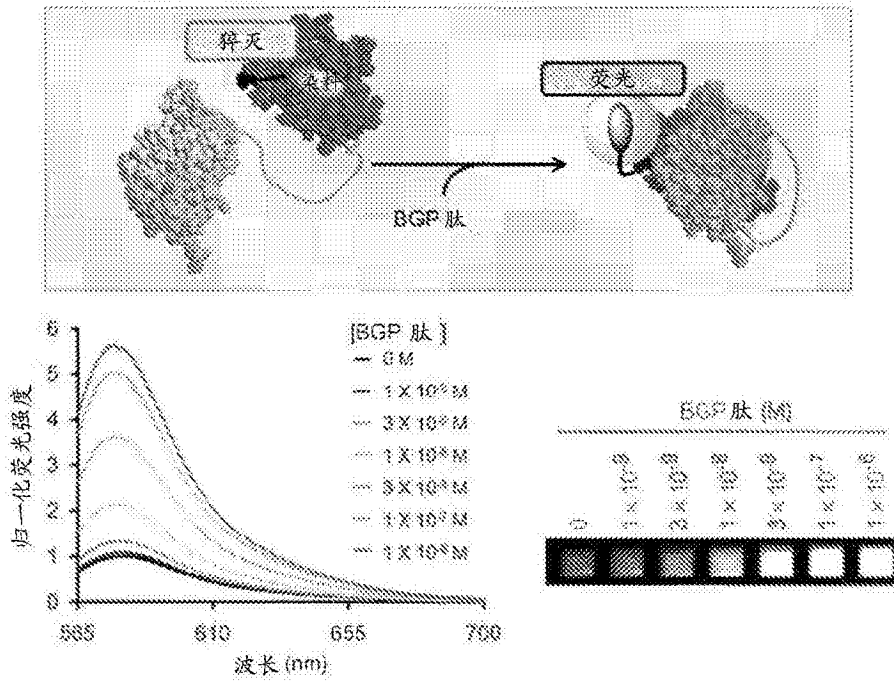


图3

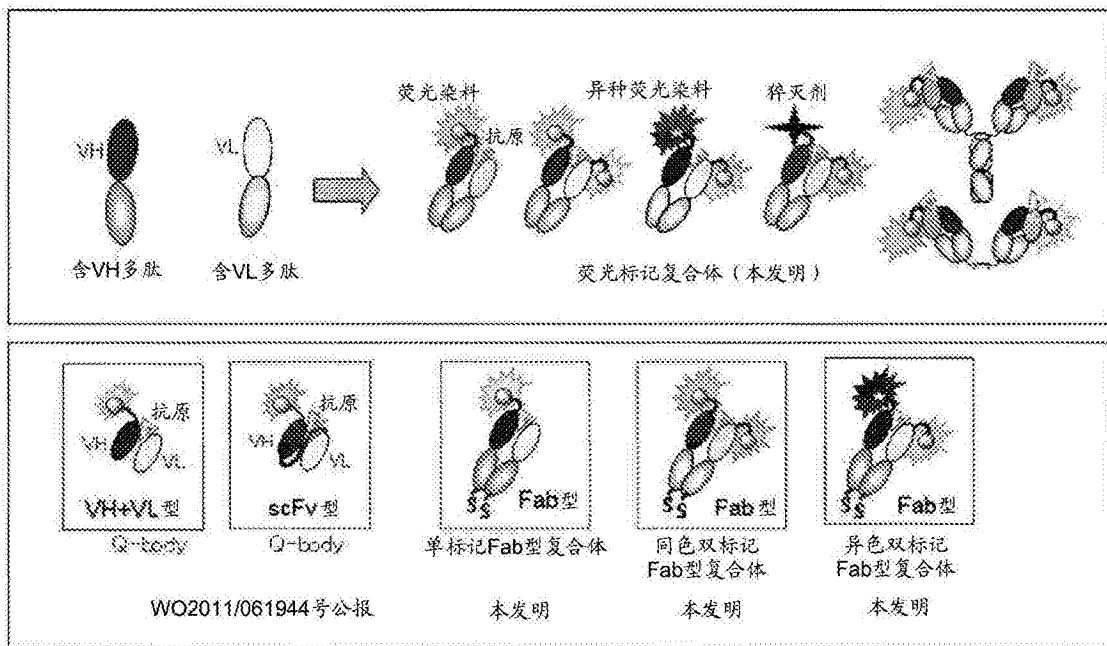


图4

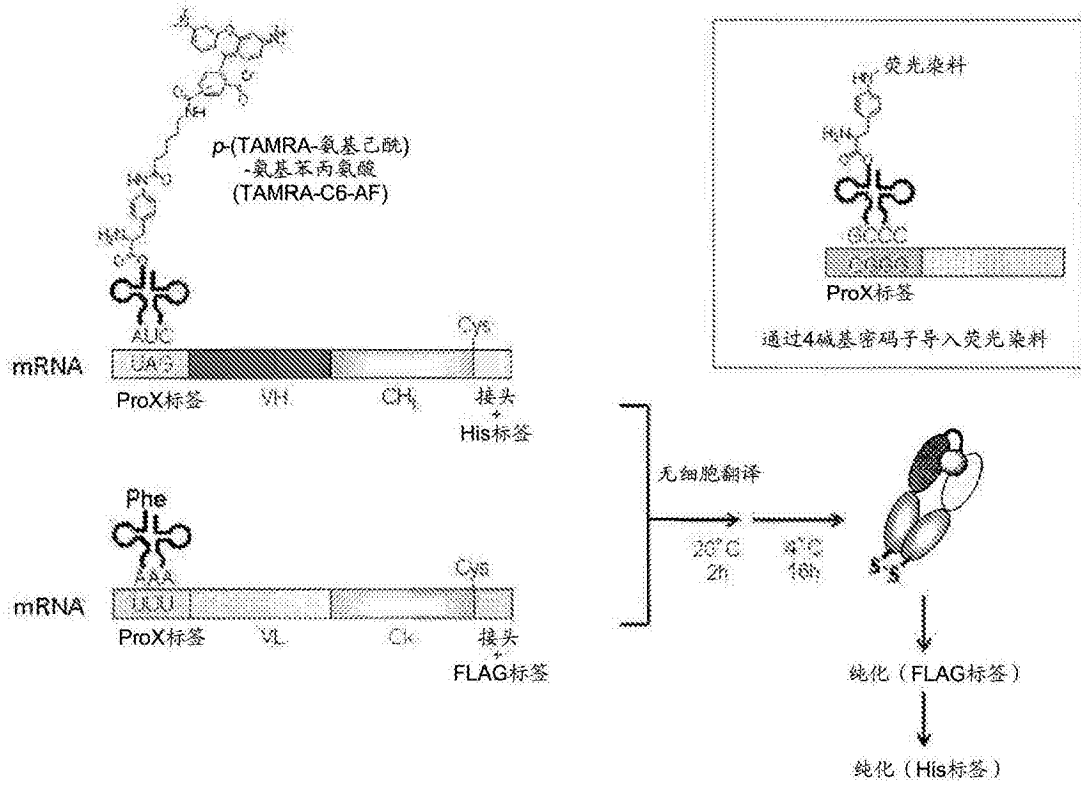


图5

评价单标记Fab型复合体

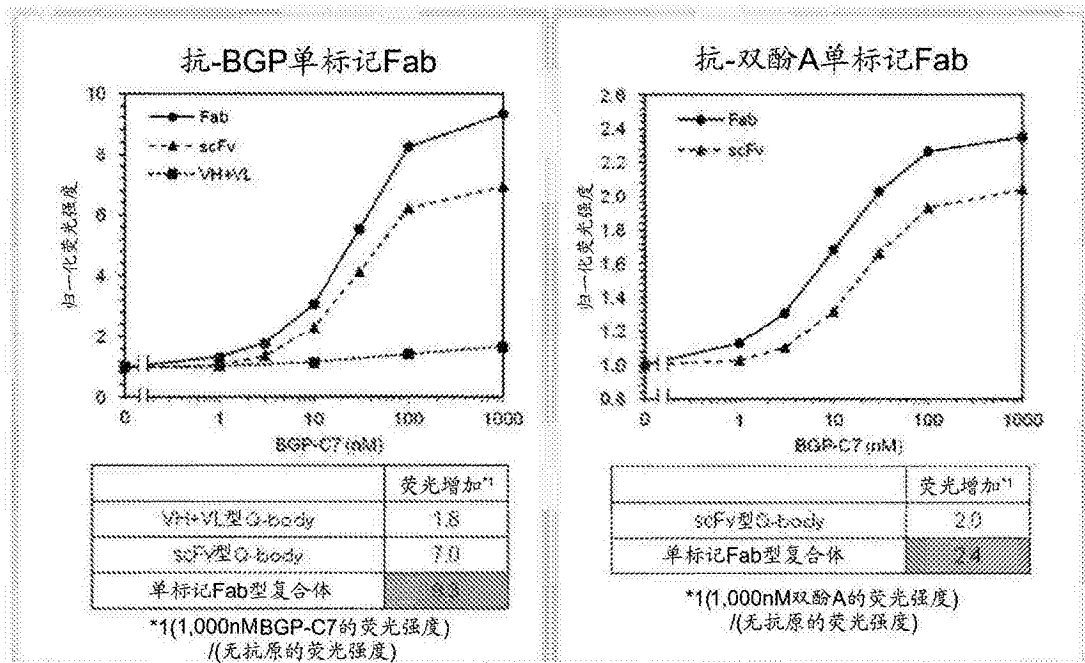
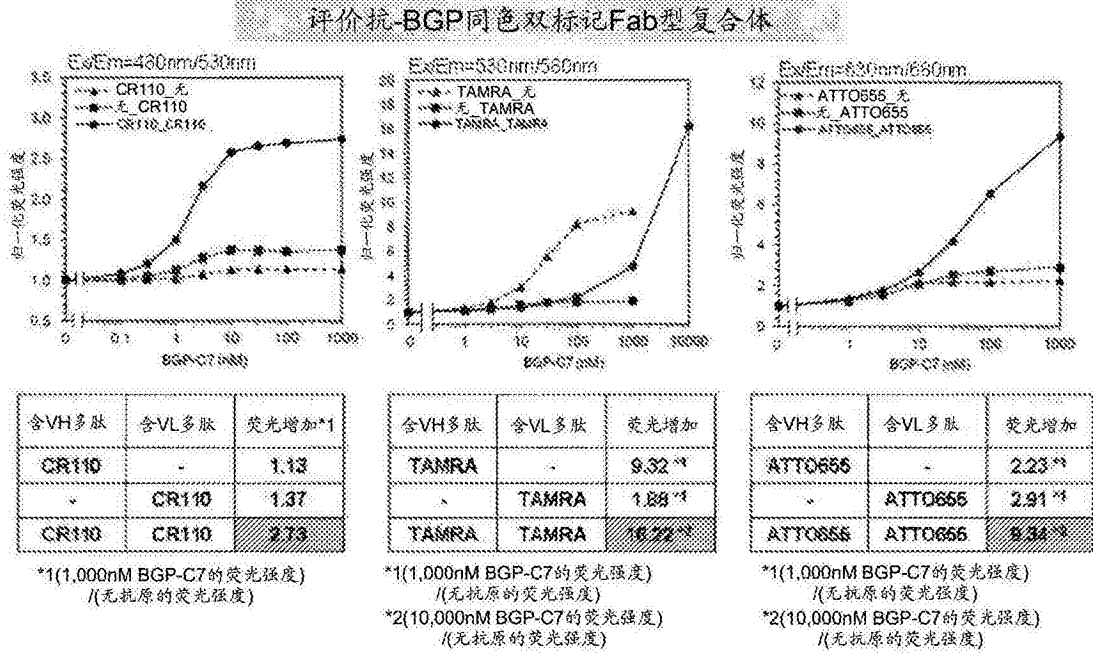
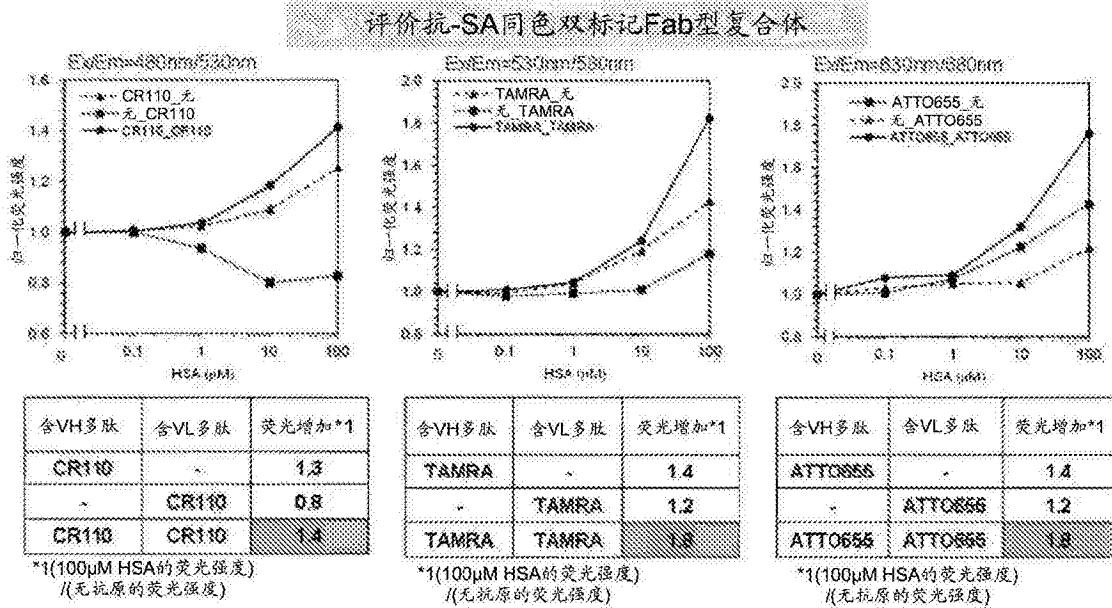


图6



表明可以利用同色双标记增加猝灭效果。

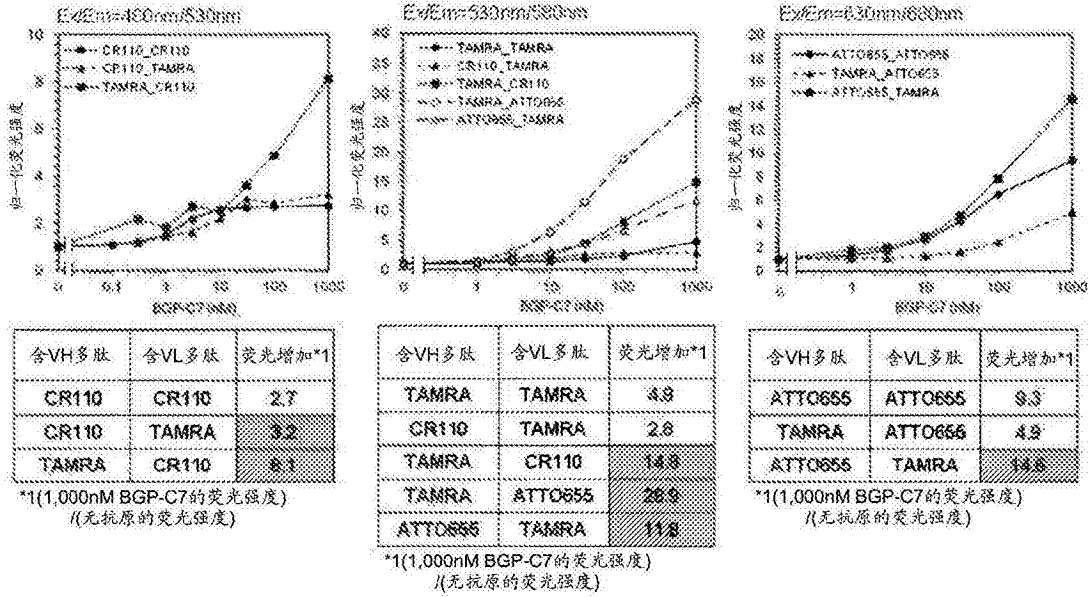
图7



表明可以利用同色双标记增加猝灭效果。

图8

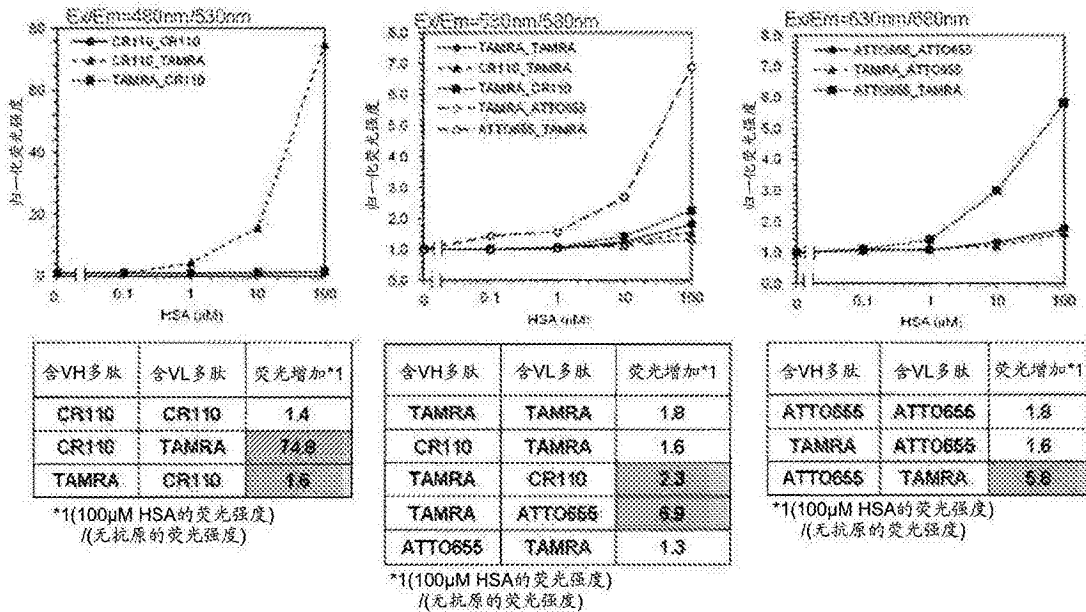
评价抗-BGP异色双标记Fab型复合体



表明可以利用异色双标记进一步增加荧光变化。

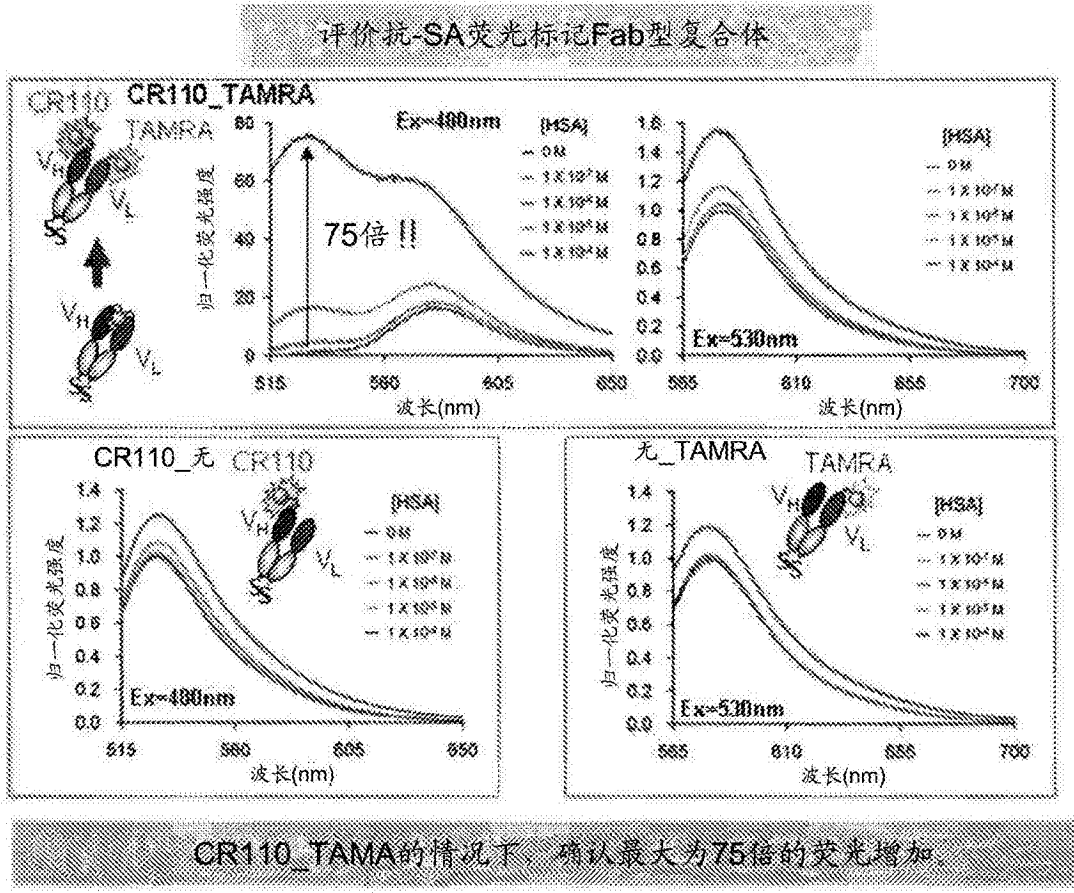
图9

评价抗-SA异色双标记Fab型复合体



表明可以利用异色双标记进一步增加荧光变化。

图10



CR110_TAMRA的情况下，确认最大为75倍的荧光增加。

图11

评价抗-BGP猝灭剂、荧光染料的双标记Fab型复合体

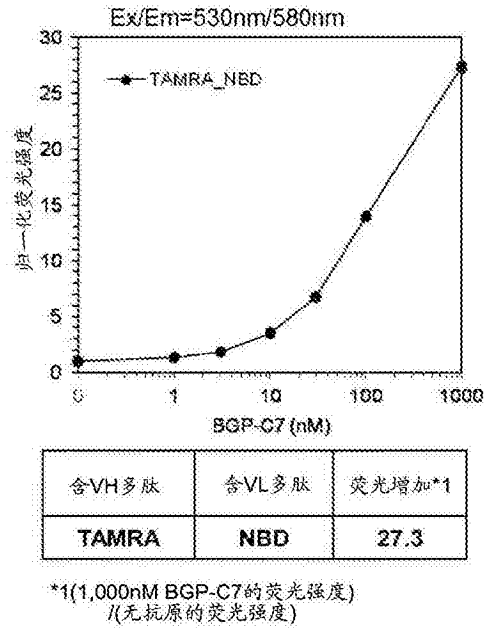
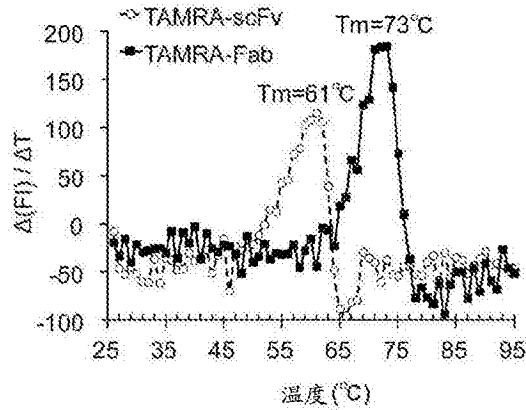


图12

评价抗-BGPscFv和Fab型复合体的温度稳定性



热转移测定的原理

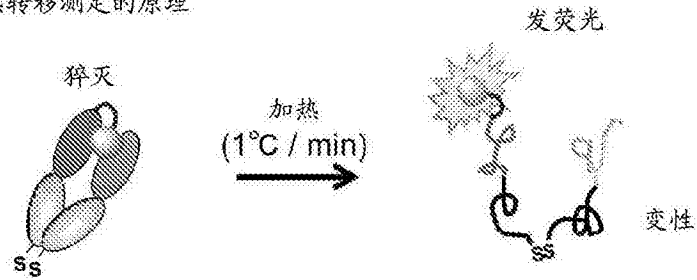


图13

专利名称(译)	使用含荧光标记抗体可变区域的多肽复合体的荧光免疫测定方法		
公开(公告)号	CN103917872B	公开(公告)日	2016-05-18
申请号	CN201280053916.2	申请日	2012-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	优志旺电机株式会社		
申请(专利权)人(译)	优志旺电机株式会社		
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 高木广明		
发明人	上田宏 阿部亮二 高木广明		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 G01N21/78 G01N33/542		
CPC分类号	G01N33/536 C07K16/44 C07K2317/55 C07K2317/94 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/542 G01N33/56983 G01N33/582 G01N33/6857 G01N33/946 G01N33/948 G01N33/9486 G01N2021/6432		
代理人(译)	高瑜 郑霞		
优先权	2011241402 2011-11-02 JP		
其他公开文献	CN103917872A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的课题在于提供一种免疫测定法，其不需要固相步骤和洗涤步骤，能够在液相中快速且简便地进行目标物质的定量测定，并且能够使抗原可视化，检测灵敏度高。通过如下方式解决所述的课题，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，使包括含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽的复合体与用于测定的试样中的抗原接触的步骤，所述含有抗体轻链可变区域的多肽和含有抗体重链可变区域的多肽中的任一个或两者由荧光染料标记；(b)检测所述荧光染料的荧光、或测定荧光强度的步骤；(c)以抗原浓度与所述荧光染料的荧光强度存在正相关关系为指标，算出样本中所含的抗原量，或使抗原可视化的步骤。

