

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 335574

(P2001 - 335574A)

(43)公開日 平成13年12月4日(2001.12.4)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マ-ト* (参考)

C 0 7 D401/14

C 0 7 D401/14

4 B 0 6 3

G 0 1 N 33/533

G 0 1 N 33/533

4 C 0 6 3

// C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17数)

(21)出願番号 特願2000 - 155987(P2000 - 155987)

(71)出願人 598136792

松本 和子

東京都世田谷区代沢3 - 9 - 12 - 105

(22)出願日 平成12年5月26日(2000.5.26)

(72)発明者 松本 和子

東京都世田谷区代沢3 - 9 - 12 - 105

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年11月29日 ~
11月30日 開催の「科学技術振興事業団 戦略的基礎
研究推進事業 単一分子・原子レベルの反応制御 第
3回シンポジウム」において文書をもって発表

(74)代理人 100091731

弁理士 高木 千嘉 (外 2 名)

F タ-ム (参考) 4B063 QA01 QQ42 QR08 QR32 QR56

QS25 QS34 QX02

4C063 AA03 AA05 BB02 BB06 CC25

CC43 CC75 CC92 DD12 EE01

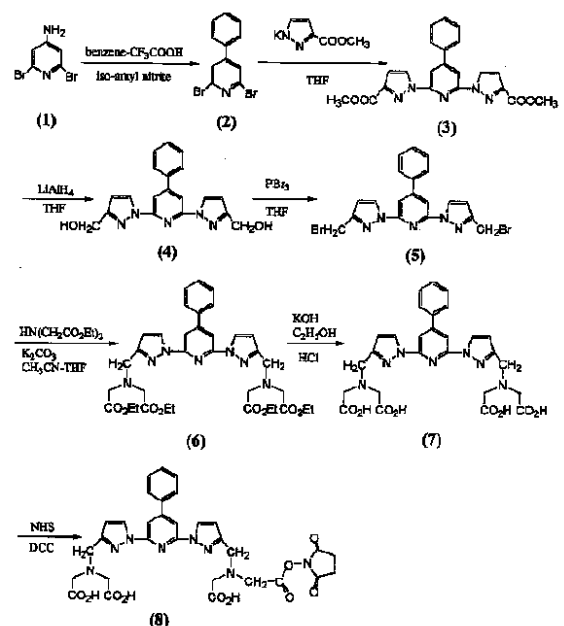
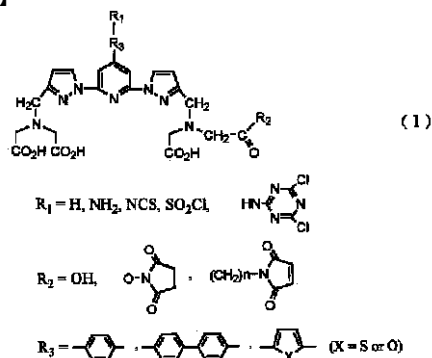
(54)【発明の名称】 新規標識化合物

(57)【要約】

【課題】 タンパク質、ペプチド、核酸、核酸塩基およびその誘導体、ヌクレオチド、ホルモンおよびその他の有機化合物の新規標識化合物、その希土類イオン錯体、およびそれらを用いた免疫測定方法および核酸検出方法を提供する。

【解決手段】 下式 (I) で表される標識化合物およびその希土類イオン錯体を使用する。

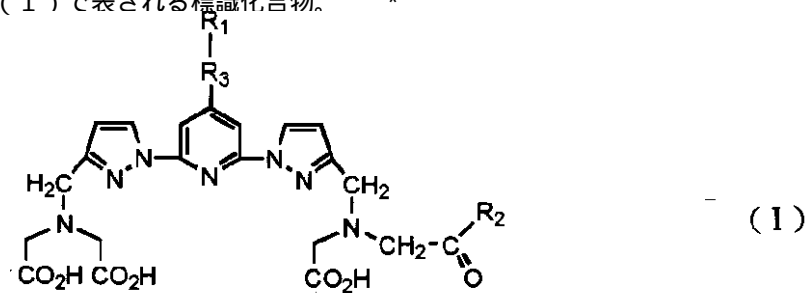
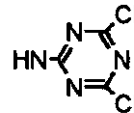
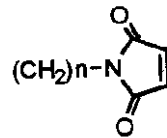
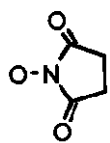
【化 1】



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下式 (I) で表される標識化合物、

*【化 1】


 $R_1 = \text{H}, \text{NH}_2, \text{NCS}, \text{SO}_2\text{Cl},$

 $R_2 = \text{OH},$

 $R_3 =$
 $,$
 $,$
 $(X = \text{S or O})$

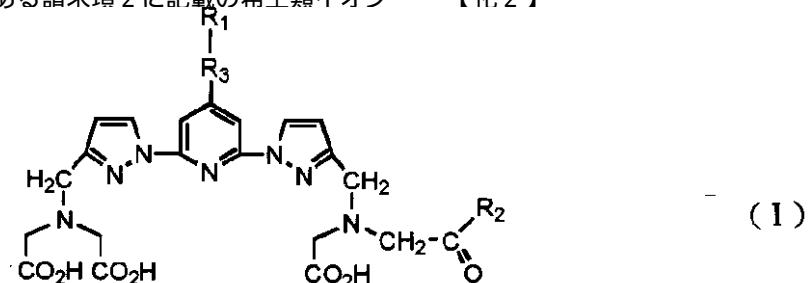
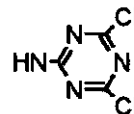
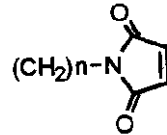
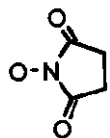
【請求項 2】 請求項 1 に記載の標識化合物の希土類イオン錯体。

*錯体。

【請求項 3】 前記希土類イオンが三価ユウロピウム、テルビウム、サマリウム、ジスプロシウム、ガドリウムまたはネオジウムである請求項 2 に記載の希土類イオン*

【請求項 4】 下式 (I) で表される標識化合物またはその希土類イオン錯体を用いる時間分解蛍光免疫測定方法。

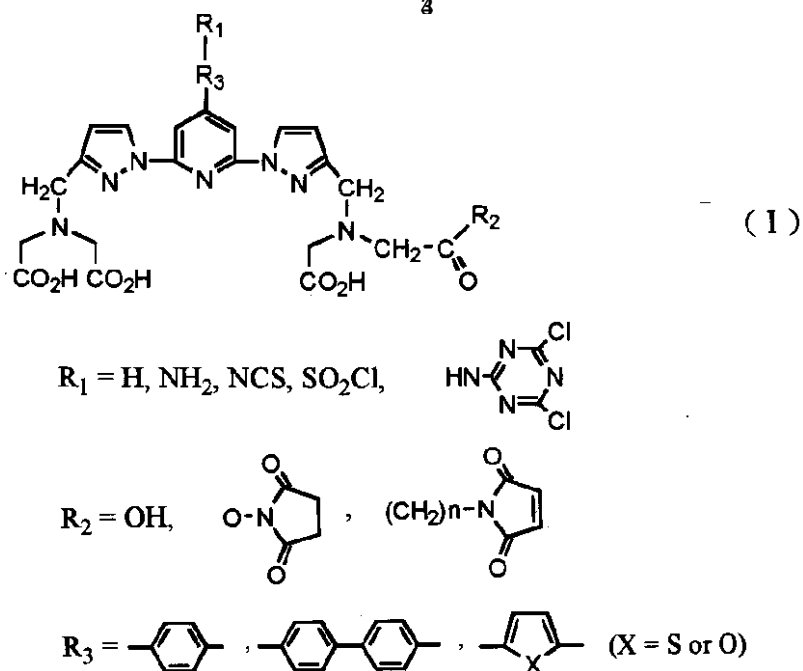
【化 2】


 $R_1 = \text{H}, \text{NH}_2, \text{NCS}, \text{SO}_2\text{Cl},$

 $R_2 = \text{OH},$

 $R_3 =$
 $,$
 $,$
 $(X = \text{S or O})$

【請求項 5】 前記免疫測定法が、免疫アッセイ法、免疫組織化学法、蛍光イメージング法、または細胞活性測定法である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 下式 (I) で表される標識化合物またはその希土類イオン錯体を用いる核酸検出法。

【化 3】



【請求項 7】 前記核酸検出法が、DNA ハイブリダイゼーションアッセイ法、DNA シークエンス法、DNA 発現プロファイリングまたはイムノアッセイ法、免疫組織化学法、蛍光イメージング法、または RNA 測定法である請求項 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、タンパク質、ペプチド、核酸、核酸塩基およびその誘導体、ヌクレオチド、ホルモンおよびその他の有機化合物の新規標識化合物、その希土類イオン錯体、およびそれらを用いた免疫測定方法および核酸検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生体試料中の微量物質を分析する場合、高い感度、高い選択性を得るため適当な標識方法を使用することが知られている。放射性同位体を用いる標識方法は高い感度が得られるという点で優れているが、取り扱い（貯蔵、運送、使用、処理等）に際して不便であるという欠点がある。同様に酵素を用いて標識する方法も高い感度が得られるという点で優れているが、分子量が大きく温度等の外的環境に影響されやすいという欠点がある。また、非放射性でありかつ安定な有機蛍光色素を標識剤として用いる方法が知られているが、この測定方法では励起光の散乱光や試料中に共存する蛍光性物質によるバックグラウンドノイズが大きく高感度の測定が困難であるという欠点がある。

【0003】かかる欠点のない非放射性的な安定な蛍光標識剤として、希土類イオン錯体を利用した標識方法が知られている。希土類錯体は一般に長い蛍光寿命、大きい

ストークスシフト、シャープな蛍光ピーク等の特徴を示すことから、特に時間分解蛍光測定によりバックグラウンドのない高い感度の測定方法が可能である。しかしながら、いくつかの希土類錯体を利用した標識方法、標識剤が知られているが（例えば、EDTA 誘導体の錯体、フェナントロリン誘導体の錯体、クロロスルホニル化 4 座 β -ジケトンの錯体）、標識手順（反応ステップ）が多くて複雑であったり、固相測定ができないという問題点、十分な水溶性がないため被標識物が制限される、また錯体の蛍光が弱くて検出感度が十分でないという問題点があった。

【0004】

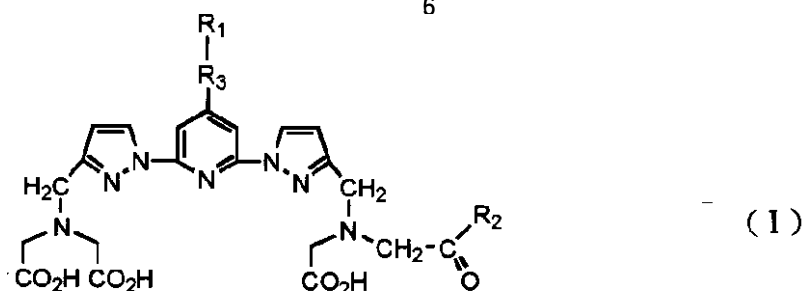
【発明が解決しようとする課題】本発明は、簡単な手順で、水溶液中で、アミノ基、メルカプト基などを有するタンパク質、ペプチド、核酸、核酸塩基およびその誘導体、ヌクレオチド、ホルモンおよびその他の有機化合物と共有結合を形成可能であり、かつ種々の希土類イオンと安定な、長い蛍光寿命と強い蛍光を示す新規標識化合物を提供する。さらにこれらを用いた生体試料中の微量物質の分析方法を提供する。

【0005】

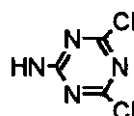
【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題が以下の特徴を有する化合物により達成できることを見出し本発明を完成した。すなわち、本発明は下式 (I) で表される構造を有することを特徴とする標識化合物を提供するものである。

【0006】

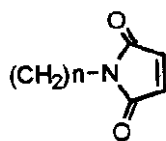
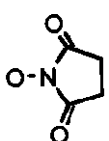
【化 4】



$R_1 = \text{H}, \text{NH}_2, \text{NCS}, \text{SO}_2\text{Cl},$



$R_2 = \text{OH},$



$R_3 =$, , (X = S or O)

【0007】また、本発明は、上述の標識化合物の希土類イオン錯体を提供するものである。さらに、かかる希土類イオンが三価ユロビウム、テルビウム、サマリウム、ジスプロシウム、ガドリウムまたはネオジウムである希土類イオン錯体を提供するものである。

【0008】さらには、本発明は、前記式(1)で表される標識化合物またはその希土類イオン錯体を用いる時間分解蛍光免疫測定方法を提供するものである。特に前記免疫測定法が、イムノアッセイ法、免疫組織化学法、

蛍光イメージング法、または細胞活性測定法である。【0009】また、本発明は、式(1)で表される標識化合物またはその希土類イオン錯体を用いる核酸検出法を提供するものである。特に、前記核酸検出法が、DNAハイブリダイゼーションアッセイ法、DNAシーケンシング法、DNA発現プロファイリングまたはイムノアッセイ法、免疫組織化学法、蛍光イメージング法、またはRNA測定法である。以下、本発明を実施の形態に即して詳細に説明する。

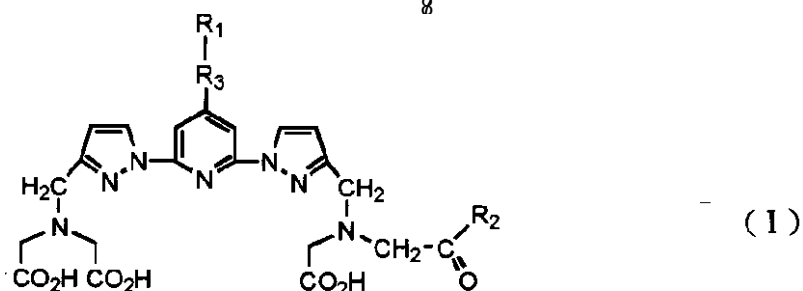
【0010】

【発明の実施の形態】標識化合物

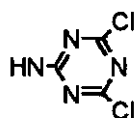
本発明にかかる標識化合物は、機能的には、(1)水溶液中で被標識物と容易に安定な共有結合を形成可能であり、かつ(2)希土類イオンと安定な錯体を形成可能であり、かつ(3)その希土類錯体が長い蛍光寿命と強度を有するものである。かかる機能を発揮するために、具体的には水溶性に富む複素環化合物による基本骨格と、複数のアミノ基置換酢酸基と、被標識物との共有結合性官能基とを有する構造を少なくとも同じに満たす必要がある。かかる機能を満たす構造として本発明においては、1つのピリジン環と2つのピラゾール環からなる骨格と、それぞれのピラゾール環には2個のカルボン酸基を有するアミノ基が結合した基本構造を有し、かつ該ピリジン環もしくはカルボン酸には被標識物と共有結合可能な官能基を有するものが好ましい。なお、該ピリジン環にはさらに芳香環を結合した構造も含むものである。すなわち、本発明にかかる標識化合物は一般式(1)で表される構造を有する。

【0011】

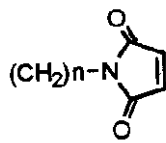
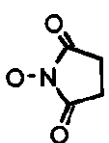
【化5】



$R_1 = \text{H}, \text{NH}_2, \text{NCS}, \text{SO}_2\text{Cl}$,



$R_2 = \text{OH}$,



$R_3 =$, , (X = S or O)

【0012】ここで、1つのピリジン環と2つのピラゾール環からなる骨格と、それぞれのピラゾール環に2個のカルボン酸基を有するアミノ基が結合した基本構造は、これらの親水性基により十分な水溶性を示す。

【0013】また、 R_1 または R_2 は、主に被標識物との共有結合を形成するために導入された官能基であり、被標識物の有する反応性基により種々の官能基を導入可能である。被標識物が、アミノ基、メルカプト基などを有するタンパク質、ペプチド、核酸、核酸塩基およびその誘導体、ヌクレオチド、ホルモンおよびその他の有機化合物の場合には、 R_1 としては、 NH_2 、 NCS 、 SO_2Cl が特に好ましい。

【0014】 NH_2 基は、被標識物にカルボン酸基がある場合、通常公知の脱水縮合剤により容易にアミド結合を形成しうる。 NCS 基や SO_2Cl 基は被標識物の活性水素を有する置換基（アミノ基、水酸基、カルボン酸基、メルカプト基等）と容易に反応し、アミド結合、尿素結合、ウレタン結合、エステル結合、チオエステル結合等を形成する。 R_2 はカルボン酸基の反応性を高めるための活性化置換基であり、被標識物とエステル結合を形成する。

【0015】式(I)で表される標識化合物の合成方法については特に制限はない。通常公知の有機合成手段により合成可能である。具体的にはその一例が図1に示されるように、ピリジン環への置換ピラゾール環の反応、さらに、ピラゾール環の前記置換基をアミノ置換酢酸基へ変換することで基本骨格を合成することが可能である。この際、ピリジン環に種々の置換基をあらかじめ導入しておくことは容易である。例えばフェニル基はアミノ基と置換ベンゼンとの反応で導入可能である。

【0016】さらに、 R_1 基（アミノ基、イソシアネート基、クロロスルホニル酸基）へ変換可能な前駆置換基

を有するベンゼン誘導体、ジフェニル誘導体、またはフランまたはチオフェン誘導体を置換基とするピリジン誘導体を用いても当業者であれば容易である。また、 R_2 基の導入は公知の方法により容易である。

【0017】本発明にかかる標識化合物の同定には特に制限はなく、通常の分光学的方法（赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴吸収スペクトル(NMR)、UV-VISスペクトル)、質量分析、元素分析、融点測定、種々のクロマトグラフ（液体クロマトグラフ、薄相クロマトグラフ等）により可能である。

【0018】標識化合物の希土類イオン錯体

本発明にかかる標識化合物は、容易に種々の希土類イオン（三価）と錯体を形成する。三価希土類イオンとしては特に制限はないが、それぞれの塩酸塩、硝酸塩を好ましく用いることができる。水溶液のpHは5.5～9.5の範囲が好ましく、また標識化合物と三価希土類イオンの濃度の比は1:1～1:1.5の範囲が好ましい。具体的にはユウロピウムの場合、水溶液のpHは5.5～9.5の範囲が好ましく、また濃度の比は1:1～1:1.5の範囲が好ましい。テルビウムの場合には水溶液のpHは5.5～9.5の範囲が好ましく、濃度の比は1:1～1:1.5の範囲が好ましい。

【0019】希土類イオン錯体は溶液中で合成してそのまま使用してもよいし、また種々の分離手段で、分離精製して使用してもよい。分離手段としてはたとえば液体クロマトグラフや再結晶法が好ましく使用できる。得られた標識化合物、または希土類イオン錯体は、固体状態でも溶液状態でも保存安定性に優れており、例えばユウロピウム錯体（濃度 10^{-3}M ）では、室温で約半年以上保存可能である。

【0020】標識方法

本発明にかかる標識化合物、または希土類イオン錯体

と、種々の被標識物とは水溶液中ですみやかに進行する。通常室温で約180分攪拌することで反応は完了する。必要ならば溶液を加熱(約40~60℃)し反応を完結させることが好ましい。被標識物へいくつ標識化合物で標識するかにより、標識化合物の使用する濃度を変更することができる。また、被標識物への標識化合物の数は種々の分光学的方法で決定することも可能である。

【0021】時間分解蛍光免疫測定方法または核酸検出法

本発明にかかる式(I)で表される標識化合物の希土類イオン錯体を利用することにより、被標識物に、安定で長い蛍光寿命と強い蛍光を発する蛍光標識が可能となる。また、コウロピウムのみならずテルビウムイオンによってもまた安定で長い蛍光寿命と強い蛍光を発する蛍光標識錯体を与える。かかる優れた特性を示す蛍光標識を従来公知の種々の時間分解蛍光免疫測定方法または核酸検出法に適用することにより、さらに高い感度でより広い範囲の生体試料中の微量物質の分析を行うことができる。

【0022】従って、本発明にかかる標識化合物を用いた希土類イオン蛍光標識が使用可能な時間分解蛍光免疫測定方法または核酸検出法には特に制限はない。具体的にはイムノアッセイ法(例えばJ. Yuan, G. Wang, H. Kimura, K. Matsumoto, Anal. Biochem., 254, 283 (1997)を参照)、免疫組織化学法(例えばR. R. de Haas, N. p. Verwoerd, M. p. van der Corput, R. p. van Gijlswijk, H. Siitari, H. J. Tabke, J. Histochem. Cytochem., 44, 1091 (1996)を参照)、蛍光イメージング法(例えばG. Marriott, M. Heidecker, E. P. Diamandis, Y. Yan-Marriott, Biophys. J., 67, 957 (1994)を参照)、細胞活性測定法(例えばK. Blomberg, R. Hautala, J. Lovgren, V. - M. Mikkala, C. Lindquist, K. Akerman, J. Immunol. Methods, 193, 199 (1996)を参照)、DNAハイブリダイゼーションアッセイ法(例えばK. Yoshikawa, J. Yuan, K. Matsumoto, H. Kimura, Anal. Sci., 15, 121 (1999)を参照)、DNAシーケンス法(例えばS. - C. Hung, J. Ju, R. A. Mathies, A. N. Glazer, Anal. Biochem., 238, 165 (1996)を参照)、DNA発現プロファイリング(例えばH. Yu, J. Chao, D. Patek, R. Mujumdar, S. Mujumdar, A. S. Waggoner, Nucl. Acids Res., 22, 3226 (1994)を参照)またはイムノアッセイ法、免疫組織化学法、蛍光イメージング法、RNA測定法において好ましく適用可能であり、測定条件等についても当業者であれば容易に最適化することができる。以下、実施例に基づきさらに詳細に説明する。

【0023】

【実施例】実施例1 標識剤NHS-PPPTAの合成

標識剤NHS-PPPTAは図1に示す合成経路に従い次のように合成した。

1. 4-amino-2,6-dibromopyridine (化合物

(1))の合成: 2,6-dibromopyridineから4-nitro-2,6-dibromopyridine-N-oxideを合成した(R. F. Evans, M. van Ammers, and H. J. den Hertog, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 78, 408-411(1959))。さらに4-nitro-2,6-dibromopyridine-N-oxideをFe-CH₃COOHで還元して、4-amino-2,6-dibromopyridineを合成した(M. van Ammers, and H. J. den Hertog, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 77, 340-345(1958))。

元素分析結果: 計算値 C₅H₄Br₂N₂ (%), C = 23.84, H = 1.60, N = 11.16; 実測値(%), C = 24.00, H = 1.47, N = 11.02。

¹H NMR(acetone-d₆, TMS): 6.82(s, 2H), 6.16(b, 2H)。

【0024】2,2,6-dibromo-4-phenylpyridine

(化合物(2))の合成: 3.7gの化合物(1)と180mlのベンゼンと30mlのCF₃COOHからなる溶液に3.3gのamyl nitriteを加え、攪拌しつつ、2.5時間還流した後、50mlのベンゼンを加えた。反応溶液を3×100ml H₂Oと100mlの5% Na₂CO₃で洗い、Na₂SO₄で乾燥した後、減圧蒸留でベンゼンを除去した。生成物をシリカゲルカラム(ベンゼンで展開)で精製した後、得られた生成物をメタノールから1回再結晶した(収量2.3g、収率49.0%)。

元素分析結果: 計算値 C₁₁H₇Br₂N (%), C = 42.21, H = 2.25, N = 4.47; 実測値(%), C = 41.76, H = 2.11, N = 4.65。

¹H NMR (acetone-d₆, TMS): 7.95(s, 2H), 7.88-7.84(m, 2H), 7.58-7.53(m, 3H)。

【0025】3,2,6-bis(3'-methoxycarbonyl-1'-pyrazolyl)-4-phenylpyridine (化合物

(3))の合成: 150mlの乾燥THFと5.04g(40mmol)のmethoxycarbonylpyrazoleとからなる溶液に1.56g金属カリウム(40mmol)を加え、約60℃でカリウムを全部溶かすまで攪拌した。次にその溶液に3.13g(10mmol)の化合物(2)を加え、攪拌しつつ、1週間環流した。減圧蒸留でTHFを除去し、生成物を3×150ml CH₂Cl₂で抽出した。減圧蒸留でCH₂Cl₂を除去し、生成物をシリカゲルカラム(CH₂Cl₂とCH₂Cl₂-CH₃OH(98:2, w/w)で展開)で精製した後、得られた生成物をベンゼンから1回再結晶した(収量0.55g、収率13.6%)。

元素分析結果: 計算値 C₂₁H₁₇N₅O₄ (%), C = 62.53, H = 4.25, N = 17.36; 実測値(%), C = 62.48, H = 4.01, N = 17.28。

¹H NMR(CDCl₃, TMS): 8.65, 8.64(d, 2H), 8.31(s, 2H), 7.86-7.82(m, 2H), 7.57-7.50(m, 3H), 7.05, 7.04(d, 2H), 4.00(s, 6H)。

【0026】4,2,6-bis(3'-hydroxymethyl-

1'-pyrazolyl)-4-phenylpyridine(化合物(4))の合成: 250mlの乾燥THFと500mgのLiAlH₄の溶液に、1.0gの化合物(3)(2.48mmol)を加え、室温で3.5時間撹拌した後、溶液に0.45ml水、0.45ml 15% NaOH及び1.5ml水を順次に滴下した。沈澱をろ過し、ろ液を回収した。減圧蒸留でTHF溶媒を除去した後、生成物をCH₃CNで洗い、真空乾燥した(収量0.66g、収率76.6%)。

¹H NMR(DMSO-d₆, TMS): 8.92、8.91(d, 2H)、7.96(s, 2H)、7.91-7.87(m, 2H)、7.64-7.56(m, 3H)、6.61、6.60 (d, 2H)、5.33、5.31、5.29 (t, 2H)、4.58、4.56(d, 4H)。

【0027】5,2,6-bis(3'-bromomethyl-1'-pyrazolyl)-4-phenylpyridine(化合物(5))の合成: 100mlの乾燥THFと0.66gの化合物(4)(1.9mmol)の溶液に1.45gのPBr₃(5.36mmol)を加え、撹拌しつつ、4時間環流した後、減圧蒸留でTHFを除去した。生成物を10% Na₂CO₃と水でよく洗った後、一晚真空乾燥した。生成物を20mlベンゼンに加え、加熱で溶解させた後、ろ過で微量の不溶物を除去した。減圧蒸留でベンゼンを除去した後、生成物をヘキサンでよく洗い、真空乾燥した(収量0.81g、収率90.0%)。

¹H NMR(CDCl₃, TMS): 8.55、8.54(d, 2H)、8.08(s, 2H)、7.84-7.80(m, 2H)、7.60-7.50(m, 3H)、6.58、6.57 (d, 2H)、4.59(s, 4H)。

【0028】6-tetraethyl N,N,N',N'-[2,6-bis(3'-aminomethyl-1'-pyrazolyl)-4-phenylpyridine] tetrakis(acetate)(化合物(6))の合成: 100mlの乾燥CH₃CNと20ml乾燥THFと0.75gの化合物(5)(1.58mmol)の溶液に608mg(3.2mmol)のdiethyl iminodiacetateと20mlのCH₃CN溶液と2.2g K₂CO₃(16mmol)を加え、撹拌しつつ、24時間環流した。ろ過で不溶物を除去し、減圧蒸留で溶媒を除去した後、生成物を200ml CHCl₃に溶かし、2×100ml H₂Oで洗い、Na₂SO₄でCHCl₃溶液を乾燥した。減圧蒸留で溶媒を除去し、油状生成物を2時間真空乾燥した後、シリカゲルカラムで生成物を精製し(酢酸エチルで展開)、真空乾燥した(収量0.57g、収率52.3%)。

¹H NMR(CDCl₃, TMS): 8.54、8.53(d, 2H)、8.05(s, 2H)、7.84-7.80(m, 2H)、7.55-7.45(m, 3H)、6.57、6.56 (d, 2H)、4.22、4.19、4.17、4.14(q, 8H)、4.08(s, 4H)、3.64(s, 8H)、1.29、1.26、1.23(t, 12H)。

【0029】7-N,N,N',N'-[2,6-bis(3'-aminomethyl-1'-pyrazolyl)-4-phenylpyridine] tetrakis(acetic acid)(化合物(7)、以下PPPTAとする)の合成: 550mgの化合物(6)(0.80mmol)と40mlのC₂H₅OHと5mlのH₂Oの溶液に1.2g KOHを加え、撹拌しつつ、3時間環流した。減圧蒸留で溶媒を除去した後、生成物を40mlの純水に溶かし、撹拌しつつ、3倍希釈した塩酸を溶液のpHを1になるまで滴下した。室温で3時間撹拌した後、生成物の沈澱をろ別し、100倍希釈した塩酸でよく洗い、少量のジエチルエーテルで洗った後、生成物を真空乾燥した(収量429mg、収率90.0%)。

元素分析結果: 計算値 C₂₇H₂₉N₇O₉(PPPTA·H₂O)(%)、C=54.45、H=4.91、N=16.45; 実測値(%), C=54.12、H=5.03、N=16.18。

¹H NMR(DMSO-d₆, TMS): 8.93、8.92(d, 2H)、8.20(s, 2H)、7.90-7.86(m, 2H)、7.60-7.55(m, 3H)、6.59、6.58(d, 2H)、4.00(s, 4H)、3.53(s, 8H)。

【0030】8-N,N,N',N'-[2,6-bis(3'-aminomethyl-1'-pyrazolyl)-4-phenylpyridine] tetrakis(acetic acid) succinimidy monoester(化合物(8)、以下NHS-PPPTAとする)の合成: PPPTA·H₂O(化合物(7))をP₂O₅乾燥剤共存のデシケータ中で24時間乾燥した後、173mg(0.3mmol)を取り、5ml乾燥DMFに加え、撹拌しつつ、34.5mg(0.3mmol)のN-hydroxysuccinimideと61.9mg(0.3mmol)のN,N'-dicyclohexylcarbodiimide(DCC)を加えた。室温で24時間撹拌した後、ろ過で不溶物を除去し、DMF溶液を減圧蒸留で溶媒を除去した。生成物に10mlのイソプロパノールを加え、室温で1時間撹拌した後、生成物の沈澱を濾別し、真空乾燥した(収量167mg、収率82.5%)。得られたNHS-PPPTAを精製せず、そのままタンパクやほかのアミノ基を持つもの標識に使用した。

【0031】9-PPPTAとTb³⁺及びEu³⁺との錯体の蛍光特性評価

(i) 蛍光スペクトル、蛍光強度および蛍光寿命
水溶液中で、PPPTAはTb³⁺或いはEu³⁺と混合すると、速やかに蛍光錯体を生成した。pH9.1の0.05M ほう酸緩衝溶液中で、PPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の蛍光スペクトル、量子収率(φ)、蛍光寿命(τ)およびモル吸光係数(ε)を測定し、PPPTAとTb³⁺及びEu³⁺との錯体の蛍光特性を評価した。表1にPPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の蛍光特性を示した。図2にPPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の蛍光スペクトルを示した。

【0032】

【表1】

【0032】

【表1】

pH 9.1 の 0.05 M ほう酸緩衝溶液中の PPPTA-Tb³⁺及び PPPTA-Eu³⁺の蛍光特性

化合物	吸収極大波長(nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{em, max}$ (nm)	ϕ	τ (ms)
PPPTA-Tb ³⁺	325、271	9290、42700	543	1.00	2.681
PPPTA-Eu ³⁺	325、271	9290、42700	620	0.134	1.379

【0033】表1により、PPPTA-Tb³⁺とPPPTA-Eu³⁺は両方とも強い蛍光と非常に長い蛍光寿命を持つことが示された。特に、PPPTA-Tb³⁺は1.0の蛍光量子収率と2.681msの蛍光寿命を示し、PPPTA-Eu³⁺より、蛍光強度が約7.5倍大きく、蛍光寿命も約2倍長いことが示された。また、図2に示すようにPPPTA-Tb³⁺の励起極大波長は325nmであり、489、543、582、620nmの4つの蛍光発光ピークを有するが、各ピークの強さは543nm>489nm>582nm>620nmの順である。PPPTA-Eu³⁺の励起極大波長も325nmであるが、589nmと620nmの2つの蛍光発光ピークを有す*

る。2つのピークの強さは620nm>589nmの順である。

【0034】(ii) PPPTA-Tb³⁺の蛍光強度と蛍光寿命に対するpHの影響

0.05 M Tris-HCl buffer中で、 1×10^{-6} M PPPTA-Tb³⁺溶液の蛍光強度と蛍光寿命に対するpHの影響を測定した。測定したpHの範囲は5.5~9.6である。その結果を表2に示した。

【0035】

【表2】

PPPTA-Tb³⁺溶液の蛍光強度と蛍光寿命に対するpHの影響

pH	5.5	6.1	6.8	7.4	8.0	8.5	9.0	9.6
I(a.u.)	2990	3065	3080	3100	3170	3170	3163	3190
τ (ms)	2.695	2.725	2.725	2.725	2.725	2.725	2.725	2.725

0.05M Tris-HCl buffer、concentration of PPPTA-Tb³⁺ is 1×10^{-6} M.

【0036】表2の結果から、pHは5.5から8.0に増加するにつれ、PPPTA-Tb³⁺溶液の蛍光強度が少し増加し、pHは8.0以上になると、蛍光強度はpHによる影響がなくなること示した。同時に、表2の結果によって、溶液の蛍光寿命がpH(6.1~9.6)による影響がないことがわかる。

【0037】(iii) PPPTA-Tb³⁺の蛍光強度に対する光照射時間の影響

pH 9.1の0.05 M ほう酸緩衝溶液中で 1×10^{-6} M PPPTA-Tb³⁺と 1×10^{-7} M FITC (fluorescein isothiocyanate)の蛍光強度に対する490nmと366nmの光の照射時間の影響を調べ、その結果を図3に示した。490nmの光はHitachi F-4500の励起光を用いた。366nmの光はMineralight Lamp、Model UVGL-25を用いた。490nmの光に対してPPPTA-Tb³⁺はFITCより安定であり、60分間照射した後、FITCの蛍光強度が15%減少したが、PPPTA-Tb³⁺の蛍光強度がわず*

か1%の減少であった。366nmの光に対してPPPTA-Tb³⁺はFITCより少し不安定である。150分間照射した後、FITCの蛍光強度が8%減少したが、PPPTA-Tb³⁺の蛍光強度が11%減少した。

【0038】(iv) PPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の蛍光寿命に対するD₂Oの影響

0.05 MのNaHCO₃-H₂OとNaHCO₃-D₂O溶液を用いて、異なる比例のD₂Oを含む緩衝溶液を調節し、この緩衝溶液中でのPPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の蛍光寿命を測定し、その結果を表3に示した。D₂Oの比例が増加するにつれ、PPPTA-Tb³⁺とPPPTA-Eu³⁺の蛍光寿命が、いずれも増大したことを示された。これは錯体の溶液にD₂Oを加えると、錯体中の一部分の配位H₂O分子がD₂Oに置換され、H₂O分子の蛍光消光作用が弱くなることによるものであると考えられる。

【0039】

【表3】

PPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の蛍光寿命に対するD₂Oの影響

D ₂ O%	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
τ (ms, Eu)	1.351	1.416	1.488	1.562	1.647	1.736	1.842	1.968	2.088	2.252
τ (ms, Tb)	2.688	2.740	2.778	2.817	2.841	2.874	2.907	2.932	2.958	2.994

【0040】図4には1/(PPPTA-Tb³⁺ or PPPTA-Eu³⁺の蛍光寿命)とH₂Oの比例の相関性を示したが、両

方とも直線の関係を示した。1 / lifetimeは蛍光decayの速度常数であるので、図4から、 H_2O 比例の増加により、PPPTA - Eu^{3+} の蛍光decay速度の増加はPPPTA - Tb^{3+} の蛍光decay速度の増加より大きいことがわかる。これはPPPTA - Eu^{3+} の蛍光に対して H_2O の消光作用が強いことを示す。図4から100% D_2O と100% H_2O 溶液中でのPPPTA - Eu^{3+} の蛍光寿命を求め、 $n = 1.05 (1 / \tau_{H_2O} - 1 / \tau_{D_2O})$ によりPPPTA - Eu^{3+} の Eu^{3+} に配位する H_2O 分子の数を計算した結果、約0.3個の H_2O がPPPTA - Eu^{3+} の Eu^{3+} に配位することがわかった。

【0041】(v) PPPTA - Tb^{3+} 及びPPPTA - Eu^{3+} を用いた時間分解蛍光測定の実験

pH 8.0の0.05 M Tris - HCl bufferを用いて、PPPTA - Tb^{3+} 及びPPPTA - Eu^{3+} を希釈し、時間分解蛍光測定を用いたPPPTA - Tb^{3+} 及びPPPTA - Eu^{3+} の測定感度を測定した。測定装置はDELTA 1234 time - resolved fluorometerであり、delay timeを0.4 ms、window timeを0.4 msの測定条件を使用した。図5には測定結果を示した。バックグラウンドの2SDを検出限界として計算した結果、PPPTA - Tb^{3+} の検出限界は 5.8×10^{-13} Mであり、PPPTA - Eu^{3+} の検出限界は 4.7×10^{-12} Mであることがわかった。両者の検出限界の差は約8倍であり、両者の量子収率の差(約8倍)と一致することを示した。

【0042】実施例2 新規標識剤NHS - PPPTAを用いたストレプトアビジン(SA)の標識

1. 標識方法：攪拌中の5 mg SAを含む10 mlの0.1 M炭酸緩衝溶液に10 mgのNHS - PPPTAを加え、室温で3時間攪拌した後、反応溶液を3 Lの0.1 M $NaHCO_3$ - 0.25 g NaN_3 溶液に対して4で24時間ずつ3回透析することにより、未反応のラベル剤を除去した。透析後の溶液に25 mg NaN_3 を加え、1 mlずつ小分けした後、-20で保存した。 $TbCl_3$ の標準溶*

pH 9.1の0.05 M ほう酸緩衝溶液中のSA-PPPTA- Tb^{3+} 及びSA-PPPTA- Eu^{3+} の蛍光特性

化合物	吸収極大波長(nm)	$\epsilon (M^{-1}cm^{-1})$	$\lambda_{em, max} (nm)$	ϕ	$\tau (ms)$
SA-PPPTA- Tb^{3+}	322	17000	543	0.38	2.100
SA-PPPTA- Eu^{3+}	322	17000	619	0.043	1.202

【0046】100% H_2O (0.05 M $NaHCO_3$)と100% D_2O (0.05 M $NaHCO_3$)溶液中のSA - PPPTA - Eu^{3+} の蛍光寿命を測定し(1.213 ms in 100% H_2O 、2.285 ms in 100% D_2O)、SA - PPPTA - Eu^{3+} の Eu^{3+} に配位する H_2O 分子の数を計算した結果、約0.4個の H_2O がSA - PPPTA - Eu^{3+} の Eu^{3+} に配位することがわかった。フリーのPPPTA - Eu^{3+} の場合はPPPTA - Eu^{3+} の Eu^{3+} に配位する H_2O 分子の数が0.3であるので、SAに結合したPPPTA - Eu^{3+} の Eu^{3+} に配位する H_2O 分子の数が0.1個増加したことを示

*液で標識SA溶液を蛍光適定する方法で標識SA溶液中のPPPTA濃度を求め、標識率(PPPTA : SA)を計算した結果、得られた標識SAの標識率が約18であった。同じ試薬量を用いて、室温で4時間標識反応を行った場合は、標識率が約26の標識SAが得られた。イムノアッセイなどに使う時に、PPPTAと等モル量の $TbCl_3$ を加え、0.2% BSA - 0.9% $NaCl$ - 0.1% NaN_3 を含むpH 7.8の0.05 M Tris - HCl緩衝溶液で希釈した後使用した。

【0043】2. 標識SA - Tb^{3+} と標識SA - Eu^{3+} 溶液の蛍光特性：水溶液中で、標識SAは Tb^{3+} 或いは Eu^{3+} と混合すると、速やかに蛍光性溶液になった。pH 9.1の0.05 M ほう酸緩衝溶液中で、SAと結合した状態のPPPTA - Tb^{3+} 及びPPPTA - Eu^{3+} の蛍光スペクトル、量子収率(ϕ)、蛍光寿命(τ)およびモル吸光係数(ϵ)を測定し、SA - PPPTAと Tb^{3+} 及び Eu^{3+} との錯体の蛍光特性を評価した。表4にSA - PPPTA - Tb^{3+} 及びSA - PPPTA - Eu^{3+} の蛍光特性を示した。

【0044】フリーのPPPTA - Tb^{3+} 及びPPPTA - Eu^{3+} の蛍光特性に比べると、SAに結合したPPPTA - Tb^{3+} 及びPPPTA - Eu^{3+} は蛍光強度($\epsilon \times \phi$)が弱くなり、蛍光寿命が少し短くなったことを示した。SAに結合した後、PPPTA - Tb^{3+} の蛍光強度が約30%減少し、PPPTA - Eu^{3+} の蛍光強度が約42%減少した。蛍光強度と蛍光寿命のこうした変化はおそらく標識反応によってPPPTAの1つCOOH基がSAのアミノ基と結合したため、PPPTAは Tb^{3+} あるいは Eu^{3+} との配位結合が少し弱くなり(生成した1つのアミドが Tb^{3+} あるいは Eu^{3+} と配位することができるが、COOH基より配位結合が弱いと考えられる)、錯体の中心イオンに配位する H_2O 分子の数が増えたことが原因であると考えられる。

【0045】

【表4】

【0047】3. SA - PPPTA - Tb^{3+} の蛍光寿命に対するpHの影響：0.05 M Tris - HCl緩衝溶液を用いて、SA - PPPTA - Tb^{3+} の蛍光寿命に対するpHの影響を測定した。その結果を表5に示した。この結果によってpH 6.1 - 8.0の範囲でSA - PPPTA - Tb^{3+} の蛍光寿命に対するpHの影響がないことがわかった。

【0048】

【表5】

18
SA-PPPTA-Tb³⁺溶液の蛍光強度と蛍光寿命に対するpHの影響

pH	5.5	6.1	6.8	7.4	8.0	8.5	9.0	9.6
τ (ms)	2.242	2.353	2.353	2.353	2.353	2.381	2.404	2.457

【0049】4. SA-PPPTA-Tb³⁺及びSA-PPPTA-Eu³⁺を用いた時間分解蛍光測定の実験条件

pH 8.0の0.05 M Tris-HCl緩衝溶液を用いて、SA-PPPTA-Tb³⁺及びSA-PPPTA-Eu³⁺を希釈し、その希釈溶液の時間分解蛍光測定を行い、SA-PPPTA-Tb³⁺及びSA-PPPTA-Eu³⁺を用いた時間分解蛍光測定の測定感度を評価した。測定装置と測定条件は上で使用した条件と同じである。測定結果は図6に示した。バックグラウンド蛍光の2SDを用いて、SAと結合した後のPPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の検出限界を計算した結果、PPPTA-Tb³⁺の検出限界は 1.6×10^{-12} Mであり、PPPTA-Eu³⁺の検出限界は 5.1×10^{-12} Mである。

【0050】実施例3 PPPTA-Tb³⁺標識SAを用いた時間分解蛍光イムノアッセイ

1. PPPTA-Tb³⁺標識SAを用いた時間分解蛍光イムノアッセイによるヒト α -fetoprotein (AFP)の測定
PPPTA-Tb³⁺標識SAを用いて、次のようにサンドイッチ法時間分解蛍光イムノアッセイによるヒト α -fetoprotein (AFP)の測定を行った。ヒトAFP標準溶液は5% BSA-0.9% NaCl-0.1% NaN₃を含むpH 7.8の0.05 M Tris-HCl bufferを用いて、ヒトAFP (Nippon Bio-Test Laboratories, Inc.)を希釈して調製した。ビオチン化AFPポリクロナール抗体は、goat anti-human AFP antibody (Nippon Bio-Test Laboratories, Inc.)とNHS-LC-Biotin (Pierce Chem. Co.)を用いて調製した。イムノアッセイに使用する際は、0.2% BSA-0.9% NaCl-0.1% NaN₃を含むpH 7.8の0.05 M Tris-HCl bufferで希釈した後使用した。

【0051】5 μ g/ml抗ヒトAFPモノクロナール抗体 (Oemconcepts Co., IgG1, antibody was purified utilizing immunoaffinity chromatography protein A agarose)を含むpH 9.6の0.1 M炭酸緩衝溶液を60 μ lずつ96-ウェルプレート (FluoroNunc plate)の各ウェルに分注し、4で24時間インキュベートした後、0.05% Tween 20を含むpH 7.8の0.05 M Tris-HCl buffer (buffer 1)でプレートを2回洗浄し、更にpH 7.8の0.05 M Tris-HCl buffer (buffer 2)でプレートを1回洗浄した。以上の方法で、抗AFPモノクロナール抗体でコートしたプレートが得られた。コートしたプレートは-20で保存した。

【0052】抗AFPモノクロナール抗体でコートしたプレートの各ウェルに50 μ lのAFP標準溶液を分注し、37で1時間インキュベートした後、buffer 1で2回洗浄し、buffer 2で1回洗浄した。プレートの各ウェルに50 μ lのビオチン化AFPポリクロナール抗

体を分注し、37で1時間インキュベートした後、buffer 1で2回洗浄し、buffer 2で1回洗浄した。プレートの各ウェルに50 μ lのSA-PPPTA-Tb³⁺を分注し、37で1時間インキュベートした後、buffer 1で4回洗浄した。プレートをそのまま固相時間分解蛍光測定に用いた。測定装置はDELTA 1234 time-resolved fluorometerである。測定条件: delay timeは0.2 ms、window timeは0.4 ms。

【0053】図7にSA-PPPTA-Tb³⁺を用いた時間分解蛍光イムノアッセイによるヒトAFP測定の検量線を示した。バックグラウンドの2SDを検出限界として計算した結果、本測定法の検出限界は42 pg/mlであった。図7にはバックグラウンドを除いた蛍光強度とAFP濃度との相関も示した。この場合では濃度と蛍光強度は直線関係を示した。

【0054】2. PPPTA-Tb³⁺標識SAを用いた時間分解蛍光イムノアッセイによるヒト甲状腺刺激ホルモン (TSH)の測定: 抗ヒトTSH β -subunitモノクロナール抗体でコートした96-ウェルプレート、ビオチン化抗ヒトTSH α -subunitモノクロナール抗体及びPPPTA-Tb³⁺標識SAを用いて、ヒトAFP測定と同じ方法でヒトTSHの測定を行った。得られたTSH測定の検量線を図8に示した。バックグラウンドの2SDを検出限界として計算した結果、本測定法の検出限界は0.08 μ IU/mlであった。

【0055】3. PPPTA-Tb³⁺標識SAを用いた時間分解蛍光イムノアッセイによる除草剤ベンスルフロメチル (BSM)の測定: PPPTA-Tb³⁺標識SAを用いて、次のように競合時間分解蛍光イムノアッセイによる除草剤ベンスルフロメチル (BSM)の測定を行った。ビオチン化BSM-BSA結合体はBSM-BSA結合体 (Iatron Laboratories, Inc.)とNHS-LC-Biotin (Pierce Chem. Co.)を用いて調製した。BSM標準溶液は1 mg/mlのBSM-アセトニトリルを調製した後、pH 7.8の0.05 M Tris-HCl bufferで希釈して調製した。

【0056】6 μ g/ml抗BSMモノクロナール抗体 (Iatron Laboratories, Inc.)を含むpH 9.6の0.1 M炭酸緩衝溶液を96-ウェルプレートの各ウェルに60 μ lずつ分注し、4で24時間インキュベートした後、buffer 1で2回プレートを洗浄し、buffer 2で1回プレートを洗浄した。以上の方法で抗BSMモノクロナール抗体コートしたプレートが得られた。コートしたプレートは-20で保存した。

【0057】抗BSMモノクロナール抗体でコートした各ウェルに1:1のBSM標準溶液とビオチン化BSA-BSM結合体を50 μ lずつ分注し、37で2時間

インキュベートした後、buffer 1 で 2 回、buffer 2 で 1 回各ウェルを洗浄した。各ウェルに SA-PPPTA-Tb³⁺ を 50 μl ずつ分注し、37℃ で 1 時間インキュベートした後、buffer 1 で 4 回各ウェルを洗浄した。プレートをそのまま固相時間分解蛍光測定に用いた。測定装置と測定条件は A F P 測定と同じであった。得られた B S M 測定の検量線を図 9 に示した。バックグラウンドの 2 S D を検出限界として計算した結果、本測定法の検出限界は*

* 0.4 ng/ml であった。

【0058】表 6 に、上で説明した方法を用いた B S M を含む水サンプルの測定結果を示す。この方法による B S M サンプル測定の C V は 2 ~ 6 % (average 3.43 %) であり、回収率は 95 ~ 105 % (平均 100.3 %) であった。

【0059】

【表 6】

SA-PPPTA-Tb³⁺を用いた時間分解蛍光イムノアッセイによるBSMサンプルの測定結果

Sample	Conc. (ng/ml)	CV%(n=5)	Recovery(%)
Sample of 41.5 ng/ml	42.5	2.78	102.4
Sample of 20.0 ng/ml	20.9	3.71	104.5
Sample of 10.0 ng/ml	9.74	3.04	97.4
Sample of 4.15 ng/ml	4.12	2.41	99.3
Sample of 1.38 ng/ml	1.35	5.23	97.8
平 均		3.43	100.3

【0060】4. PPPTA-Tb³⁺標識 S A を用いた新規ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイシステム：ホモジニアスイムノアッセイは結合型と遊離型の分離 (B/F 分離) がなく、固相材料が必要でない、また速やかな測定ができるなどのメリットがあり、望ましいイムノアッセイ法である。ユウロピウム蛍光錯体の長寿命蛍光特性と蛍光化合物間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用して、Mathisらはユウロピウム-トリスビビリジニクリプテート蛍光錯体を蛍光共鳴エネルギー移動のドナーとし、蛍光色素タンパクアロフィコシアニン (cross-linked allophycocyanin) を蛍光共鳴エネルギー移動のレセプターとして用い、ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイシステム “time resolved amplified cryptate emission (TRACE)” を開発し、様々な生体分子の測定に用いた ((1) G. Mathis, Clin. Chem., 39, 1953(1993); (2) G. Mathis, Clin. Chem., 41, 1391(1995); (3) G. Mathis, F. Socquet, M. Viguier, B. Darboure t, Anticancer Res., 17, 3011(1997); (4) G. Mathis, J. Clin. Ligand Assay, 20, 141(1997); (5) A. J. Kolb, P. V. Kaplita, D. J. Hayes, Y.-W. Park, C. Pernell, J. S. Major, and G. Mathis, Drug Discovery Today, 3, 333(1998))。

【0061】本発明では、PPPTA-Tb³⁺を蛍光エネルギー移動 (fluorescence energy transfer) のドナーとし、有機蛍光色素 C Y 3.5 (Amersham Life Science, Inc. 社製) を蛍光エネルギー移動のレセプターとして用いて、新規ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイシステムを開発した。図 10 には PPPTA-Tb³⁺と C Y 3.5 の蛍光スペクトルを示した。図 10 からわかるように、PPPTA-Tb³⁺の 545 nm における蛍光発光ピークが C Y 3.5 の蛍光励起スペクトルと重なり、PPPTA-Tb³⁺の蛍光発光エネルギーが C Y 3.5 に移動することが示され

る。則ち、PPPTA-Tb³⁺と C Y 3.5 が近い距離にある場合は、約 340 nm の光で励起すると、PPPTA-Tb³⁺の長寿命蛍光発光エネルギーが C Y 3.5 に移り、C Y 3.5 の蛍光が発光する。こうした発光が PPPTA-Tb³⁺の蛍光エネルギー移動による発光であるので、その蛍光寿命がフリーの C Y 3.5 の数ナノ秒から 100 マイクロ秒以上と長くなる (PPPTA-Tb³⁺と C Y 3.5 の距離に関係する)。

【0062】図 11 に PPPTA-Tb³⁺標識 S A を用いた新規ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイシステムの原理を示した。C Y 3.5 標識抗体と抗原とビオチン標識抗原及び PPPTA-Tb³⁺標識 S A が競合反応した後、C Y 3.5 標識抗体-ビオチン標識抗原-PPPTA-Tb³⁺標識 S A 免疫複合体が生成し、PPPTA-Tb³⁺が C Y 3.5 と近付き、約 340 nm の光で励起すると、PPPTA-Tb³⁺の長寿命蛍光発光エネルギーが C Y 3.5 に移り、長寿命の C Y 3.5 蛍光を時間分解蛍光測定で測定することができる。この時、遠い距離にある未反応の C Y 3.5 標識抗体の蛍光は寿命が短いので、時間分解蛍光測定で除去され、遠い距離にある未反応の PPPTA-Tb³⁺標識 S A の蛍光が C Y 3.5 の蛍光発光波長と違うため、C Y 3.5 の蛍光を測定するので、影響が小さい。この競合反応システムでは、C Y 3.5 標識抗体-ビオチン標識抗原-PPPTA-Tb³⁺標識 S A 免疫複合体の生成量が競合反応の抗原の量と逆比例する。従って、エネルギー移動に由来した長寿命 C Y 3.5 の蛍光強度と競合反応の抗原の量とは逆比例の関係が成立する。実サンプルの 340 nm における吸収の差の影響を除去するため、このシステムでは 545 nm における PPPTA-Tb³⁺の蛍光強度を内部標準とし、時間分解蛍光測定で測定した C Y 3.5 の蛍光強度と 545 nm における PPPTA-Tb³⁺の蛍光強度の比を用い、抗原の濃度変化によるこの比の変化を用いて、測定

検量線を描いた。この測定法は、固相材料、蛋白質の固相材料へのコーティングや反応後の洗浄などの手順が全て必要でない非常に簡便な方法である。

【0063】以上の原理に基づいて、CY3.5標識抗BSMモノクローナル抗体とビオチン化BSM-BSA結合体およびPPPTA-Tb³⁺標識SAを用いて、BSMのホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイを行い、この方法の実用性を証明した。CY3.5標識抗BSMモノクローナル抗体は、CY3.5 monofunctional reactive dye (Amersham Life Science, Inc.) と抗BSMモノクローナル抗体を用いて調製した。測定装置にはDELTA 1234時間分解蛍光測定装置を用いた。CY3.5の蛍光測定にはDELTA 1234のサマリウム蛍光測定用フィルター（波長643nm）を用い、delay timeは0.04ms、window timeを0.10msの条件で測定を行った。PPPTA-Tb³⁺の蛍光測定にはDELTA 1234のテルビウム蛍光測定用フィルター（波長545nm）を用い、delay time = 0.04ms、window time = 0.10msの条件で測定を行った。

【0064】マイクロチューブの中にCY3.5標識抗BSMモノクローナル抗体、BSM標準溶液、ビオチン化BSM-BSA結合体およびPPPTA-Tb³⁺標識SAを*

*加え、室温で10分間反応した後、時間分解蛍光測定を行った。図12にはこのシステムを用いたBSM測定の検量線を示したが、約1ng/mlの検出限界であった。この方法の測定感度は固相材料を用いた測定法の感度より少し減るが（検出限界：1ng/mlと0.4ng/ml）、測定の簡便性、快速性など、固相材料を用いた測定法にない大きなメリットがある。

【0065】表7には新規ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイシステムを用いたBSM-水サンプルの測定結果を示した。この方法によるBSMサンプル測定のCVは0.4~1.5%（average 0.83%）であり、回収率は95~105%（average 100.2%）であった。表6の結果と比べると、新規ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイシステムを用いたBSMサンプル測定の精度が、固相材料を用いた方法より大きく改善されたことを示す。固相材料を用いた方法では、抗体のcoatingや各ステップの反応後の洗浄などすべての操作は測定の再現性に影響し、その結果、標準溶液やサンプル測定のCVが大きくなったと考えられる。

【0066】

【表7】

ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイによるBSMサンプルの測定結果

Sample	Conc. (ng/ml)	CV%(n=6)	Recovery(%)
Sample of 31.1 ng/ml	30.6	1.35	98.4
Sample of 20.8 ng/ml	21.7	0.54	104.3
Sample of 9.34 ng/ml	9.24	0.78	98.9
Sample of 6.22 ng/ml	6.20	0.40	99.6
Sample of 3.11 ng/ml	3.11	1.07	100.0
平均		0.83	100.2

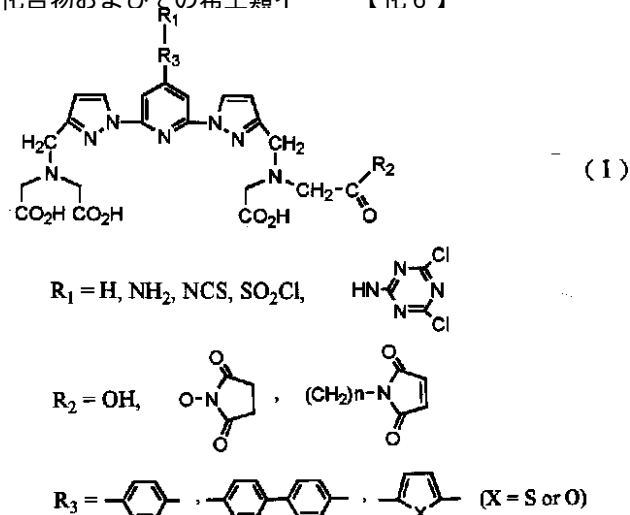
【0067】

*オン錯体を提供するものである。

【発明の効果】本発明は、下式（I）で表される構造を有することを特徴とする標識化合物およびその希土類イ*

【0068】

【化6】



【0069】従って、水溶液中で被標識物と容易に安定な共有結合を形成可能となり、かつ希土類イオンと安定

な錯体を形成し、かつその希土類錯体が長い蛍光寿命と強度を有することとなる。かかる優れた性質を有する標識化合物またはその希土類イオン錯体を用いることで、高い感度の時間分解蛍光免疫測定方法および核酸検出法を可能とする。特に前記免疫測定法としてのイムノアッセイ法、免疫組織化学法、蛍光イメージング法、細胞活性測定法、および前記核酸検出法としてのDNAハイブリダイゼーションアッセイ法、DNAシーケンス法、DNA発現プロファイリングまたはイムノアッセイ法、免疫組織化学法、蛍光イメージング法、またはRNA測定法において、低いバックグラウンドノイズを実現し、高い感度の測定を可能とする。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明にかかる標識化合物NHS-PPPTA(化合物(8))の合成例を示す図である。

【図2】PPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の蛍光スペクトルを示す図である。

【図3】PPPTA-Tb³⁺の蛍光強度に対する光照射時間の影響を示す図である。

【図4】1/lifetimeとH₂Oの比例の相関性を示す図

である。

【図5】PPPTA-Tb³⁺及びPPPTA-Eu³⁺の希釈溶液の時間分解蛍光測定結果を示す図である。

【図6】SA-PPPTA-Tb³⁺及びSA-PPPTA-Eu³⁺を用いた時間分解蛍光測定の結果を示す図である。

【図7】SA-PPPTA-Tb³⁺を用いた時間分解蛍光イムノアッセイによるヒトAFP測定の検量線を示す図である。

【図8】SA-PPPTA-Tb³⁺を用いた時間分解蛍光イムノアッセイによるヒトTSH測定の検量線を示す図である。

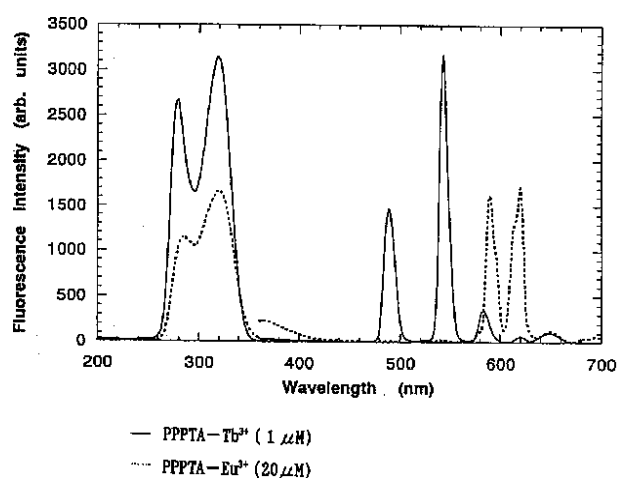
【図9】SA-PPPTA-Tb³⁺を用いた時間分解蛍光イムノアッセイによるBSM測定の検量線を示す図である。

【図10】PPPTA-Tb³⁺とCY3.5の蛍光スペクトルを示す図である。

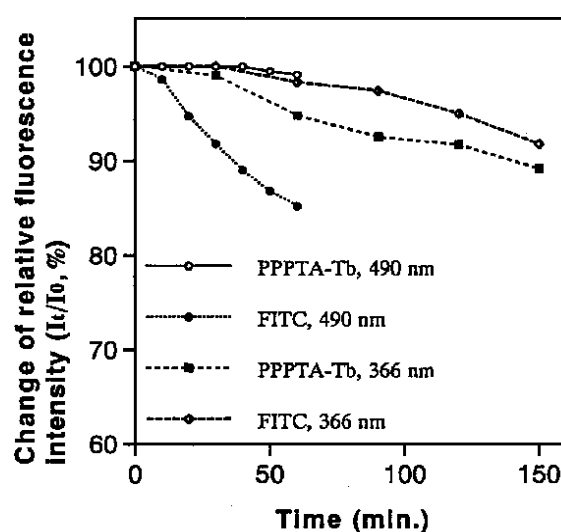
【図11】PPPTA-Tb³⁺標識SAを用いた新規ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイシステムの原理を示す図である。

【図12】新規ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイシステムを用いたBSM測定の検量線を示す図である。

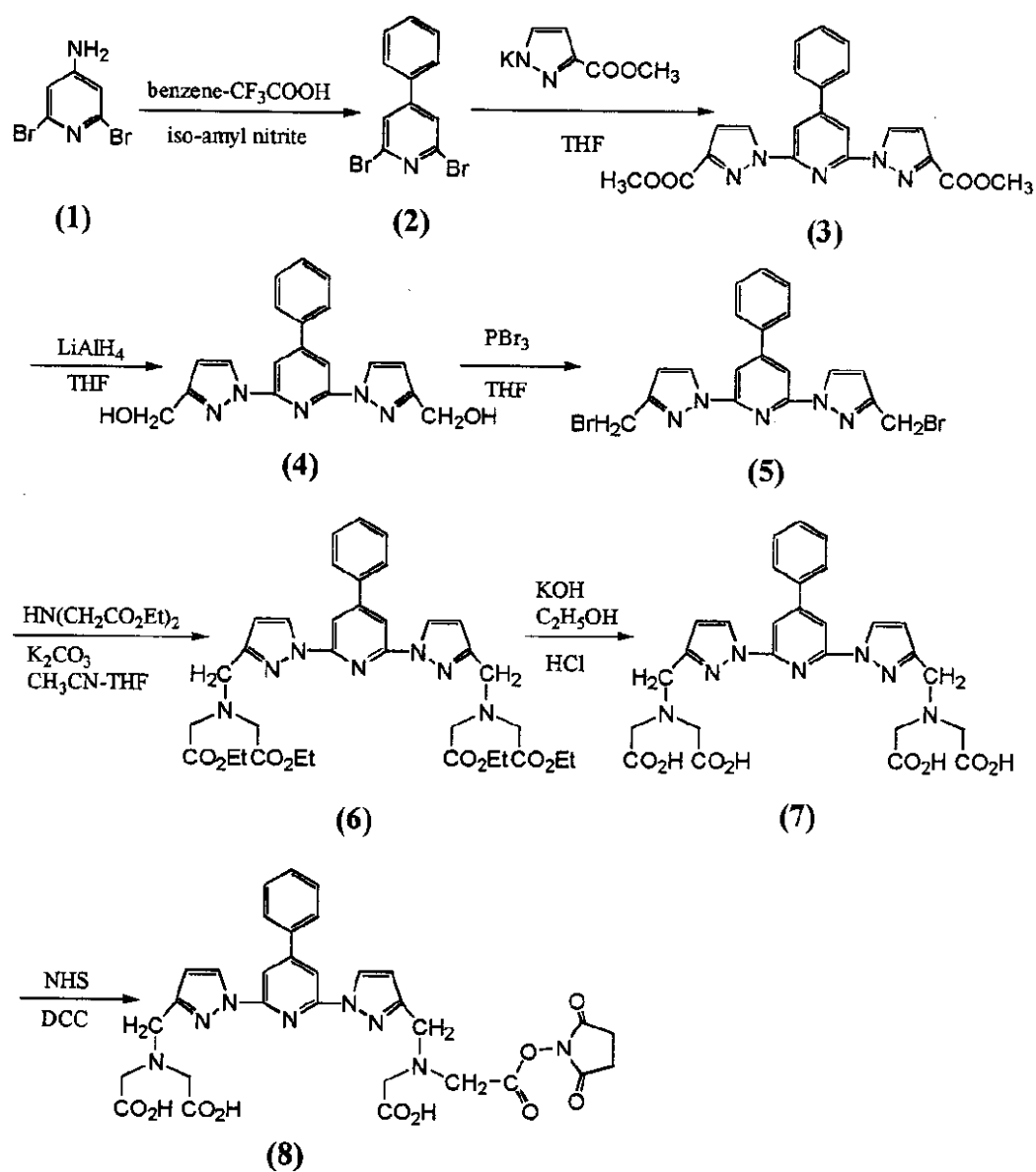
【図2】



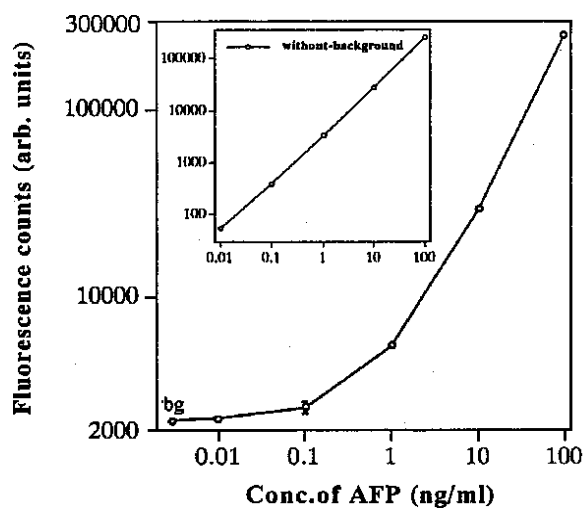
【図3】



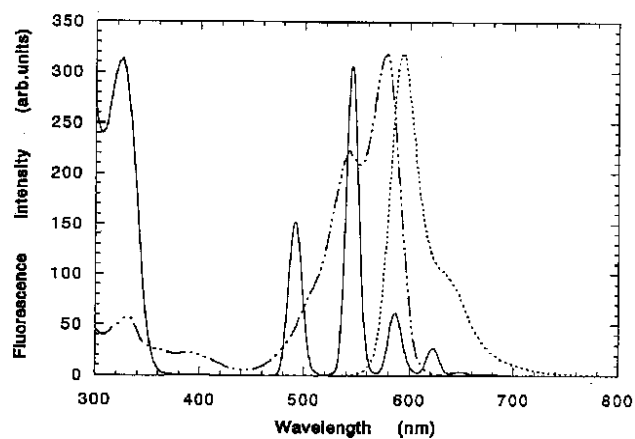
【図1】



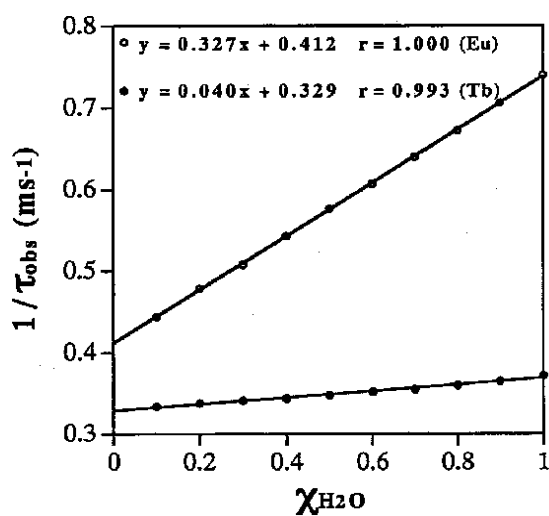
【図7】



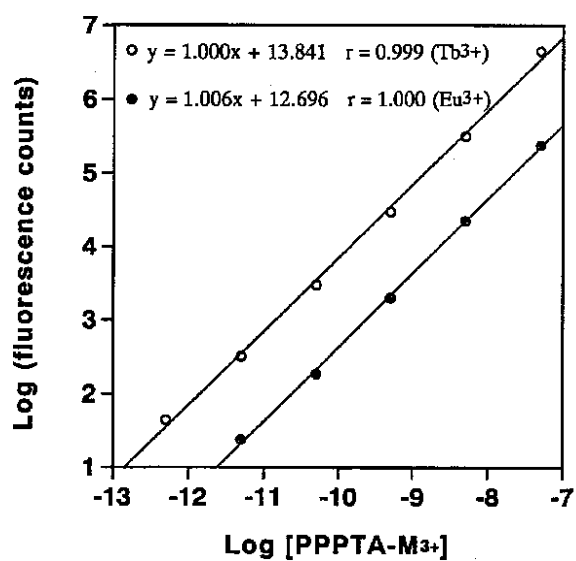
【図10】



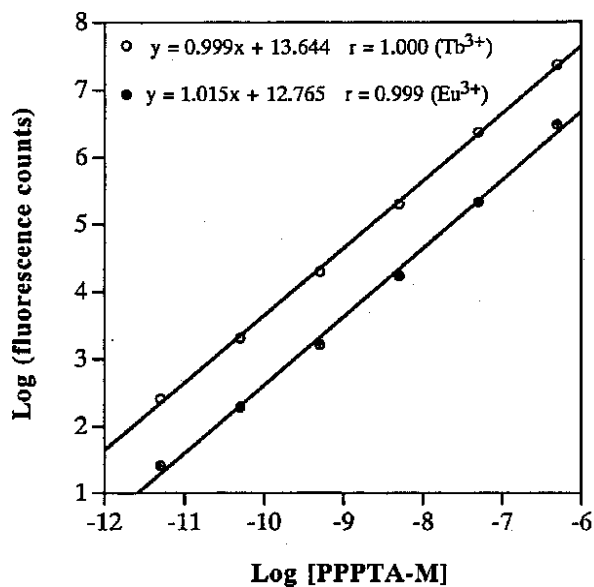
【図4】



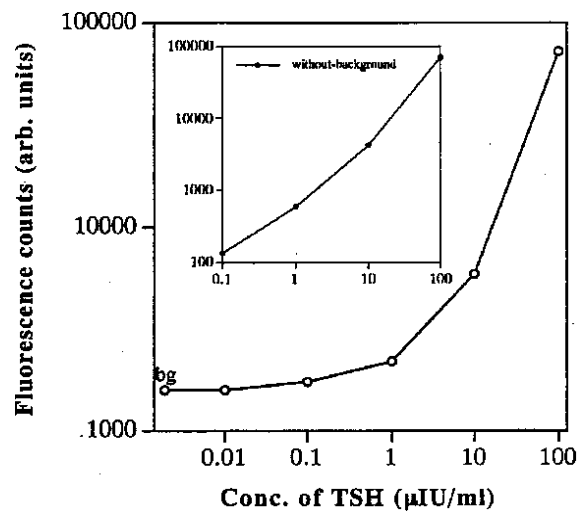
【図5】



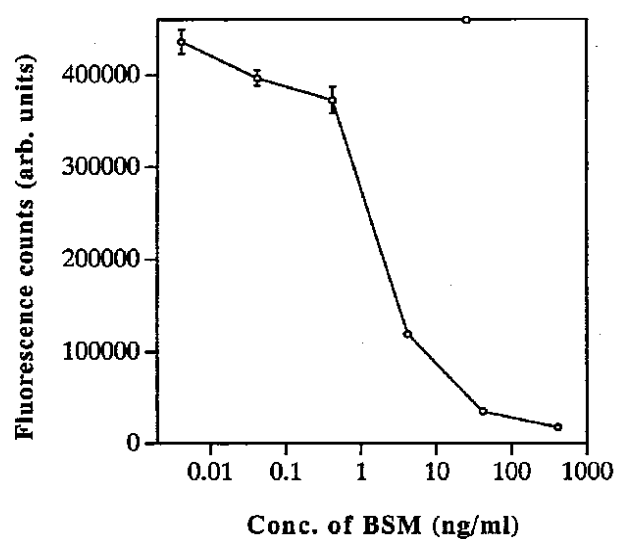
【図6】



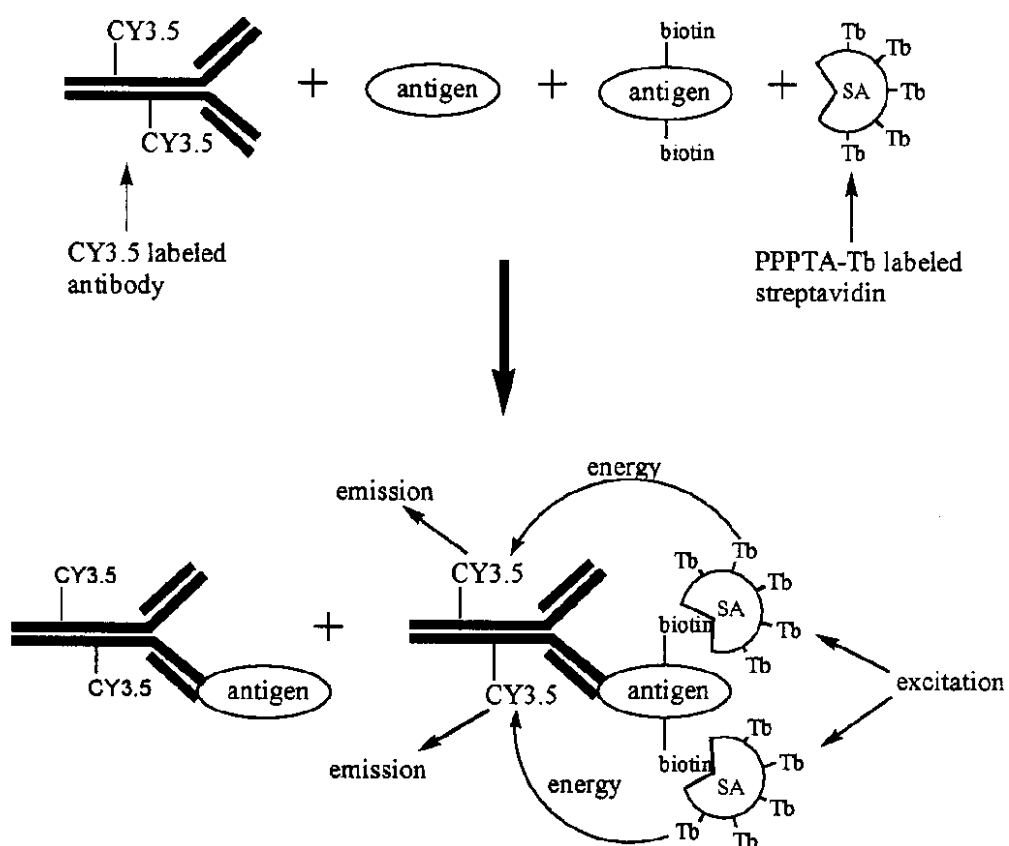
【図8】



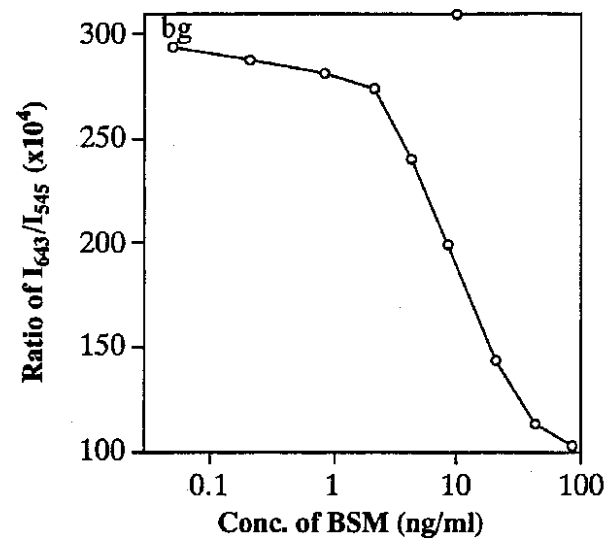
【図9】



【図11】



【図12】



专利名称(译)	新规标识化合物		
公开(公告)号	JP2001335574A	公开(公告)日	2001-12-04
申请号	JP2000155987	申请日	2000-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	松本和子		
申请(专利权)人(译)	松本和子		
[标]发明人	松本和子		
发明人	松本 和子		
IPC分类号	G01N33/533 C07D401/14 C12Q1/68		
FI分类号	C07D401/14 G01N33/533 C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C063/AA03 4C063/AA05 4C063/BB02 4C063/BB06 4C063/CC25 4C063/CC43 4C063/CC75 4C063/CC92 4C063/DD12 4C063/EE01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于蛋白质，肽，核酸，核碱基及其衍生物，核苷酸，激素和其他有机化合物的新型标记化合物，其稀土离子络合物以及使用它们的免疫测定方法和核酸检测方法。使用下式(1)表示的标记化合物及其稀土离子络合物。[化学1]

