



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년07월21일
(11) 등록번호 10-0847349
(24) 등록일자 2008년07월14일

(51) Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7027538

(22) 출원일자 2006년12월28일

심사청구일자 2006년12월28일

변역문제출일자 2006년12월28일

(65) 공개번호 10-2007-0026671

(43) 공개일자 2007년03월08일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2005/010043

국제출원일자 2005년06월01일

(87) 국제공개번호 WO 2005/119256

국제공개일자 2005년12월15일

(30) 우선권주장

JP-P-2004-00166440 2004년06월03일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

JP 3517241 B2*

WO 03/081243 A

WO 01/016600 A

JP 2001-272404 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

도꾸리즈교세이호징 가가꾸 기쥬즈 신키오 기꼬

일본 사이따마켄 가와구찌시 혼쇼 4쵸메 1방 8고

(72) 발명자

킨조 마사타카

일본국 홋카이도 001-0024 삿포로시 기타구

키타24쵸 니시12쵸메1-7 라포르에르무노모리

A1108

호리우찌 모토히로

일본국 홋카이도 064-0953 삿포로시 추오구 미야

노모리3쵸 10쵸메5-3 403-13

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

황이남

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 안규정

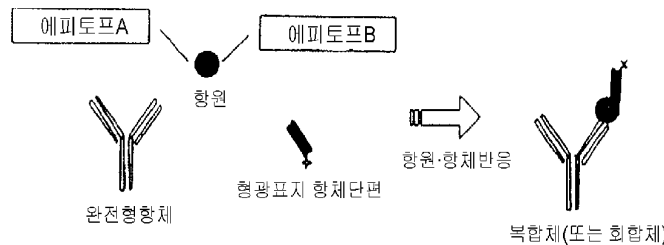
(54) 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법

(57) 요약

이상형 프리온 또는 식품소재 중에 포함되는 유해단백질과 같은 항원단백질 등의 항원을 간편한 조작으로, 신속하고 정확하게 검출 및/또는 측정할 수가 있는 검출 및/또는 측정방법을 제공한다.

형광상관분광법(FCS)을 이용한 항원분자의 검출과 측정에, 형광표지 항체단편과, 상기 형광표지 항체단편과 항원을 통해서 결합하는 비형광표지화 완전항체를 사용하는 것에 의하여, 항원과 결합하고 있지 않는 형광표지 항체단편과, 형광표지 항체단편-항원-비형광표지화 완전항체와의 항원·항체반응에 의하여 형성되는 복합체와의 사이에, 확산속도에 있어서 의미있는 차이를 발생시켜, 항원의 형상과 분자량에 의존하지 않고, 비교적 분자량이 작은 항원단백질과 같은 항원의 경우에 있어서도, FCS를 이용하여 항원의 검출, 측정이 가능하게 되며, 넓은 범위의 항원을 신속하게 측정할 수가 있다.

도1



(72) 발명자

후지이 후미히코

일본국 홋카이도 060-0033 삿뽀로시 추오구 기타3
조 히가시10쵸메16-6 류미에르소레르 203

사카타 히로시

일본국 홋카이도 001-0022 삿뽀로시 기타구 기타2
2조 니시7쵸메1-35-502

타무라 마모루

일본국 홋카이도 063-0001 삿뽀로시 니시구 야마노
테1조 7쵸메라이온즈MS 야마노테 901

우에노 마사요시

일본국 홋카이도 080-0803 오비히로시 히가시3조
미나미 25쵸메1반짜

야나기야 타카유키

일본국 홋카이도 080-0017 오비히로시 니시7조 미
나미32쵸메6반짜

특허청구의 범위

청구항 1

항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 사용하고, 항원과 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체와의 항원·항체복합체를 형성시키고, 형성된 항원·항체복합체를 형광상관분광법에 의하여 검출, 해석하는 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 항원이, 항원단백질인 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 형성된 항원·항체복합체의 형광상관분광법에 의한 검출과 해석이, 형광표지화된 형광표지 항체단편과, 형성된 표지화된 항원·항체복합체와의 확산속도의 차이에 근거한 식별을 이용하여 항원의 검출과 해석을 실시하는 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 항원의 신속검출이, 형성된 항원·항체복합체의 형광상관분광법에 의한 검출과 해석에 근거하여, 항원의 존재, 항원의 농도, 항원의 크기, 또는 항원의 형태를 검출하는 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편이, 항원을 면역원으로 하여 제작된 모노클로날 항체로부터 조제된 것이며, 항원단백질의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체가, 항원을 면역원으로 하여 제작된 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 6

피검시료에, 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 첨가하여, 항원·항체반응을 실시하고, 형성된 항원과 형광표지 항체단편, 및 비형광표지화 완전형항체와의 항원·항체복합체를, 형광상관분광법에 의하여 검출, 해석하는 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 7

제6항에 있어서,
상기 항원이, 항원단백질인 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,
상기 형광상관분광법에 의한 항원의 검출이, 피검시료에 포함되는 항원의 물리적인 분리과정을 거치지 않고 실시되는 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 피검시료에, 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 첨가하는 공정, 상기 피검시료, 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체에 의하여 항원·항체반응을 실시하는 공정, 그리고 상기 항원·항체반응을 실시한 피검시료를 형광상관분광법에 의하여 검출과 해석을 실시하는 공정을, 자동적 또는 반자동적으로 실시하는 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 피검시료가, 생체단백질 시료이며, 항원이 병원성(病原性) 단백질 항원인 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 병원성 단백질 항원이, 이상형(異常型) 프리온인 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 12

제6항에 있어서,

상기 피검시료가, 식품소재이며, 항원이 상기 식품소재 중에 포함되는 유해단백질 항원인 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출방법.

청구항 13

검출하는 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체로 이루어지는, 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출시약.

청구항 14

제13항에 기재된 검출시약을 구비한, 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출용 키트.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은, 형광상관분광법을 이용하여, 이상형(異常型) 프리온과 같은 병원성 단백질 또는 식품소재 중에 포함되는 유해단백질 등의 항원 단백질 등, 항원을 신속하게 검출 및/또는 측정하는 항원의 신속검출 및/또는 측정방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 최근, 천연물 유래의 식품소재나 사료소재의 이용에 있어서, 이들 소재중에 포함되는 유해단백질이나, 병원성 단백질 등의 존재가 문제시되고 있다. 유해단백질로서는, 예를 들면, 메밀, 밀, 쌀 등의 식품소재에 함유되어 문제가 되는 알레르겐 단백질 등을 들 수가 있으며, 병원성 단백질로서는, 예를 들면, 식육, 육골분의 원료에 함유되어 문제가 되는 이상형(異常型)이 된 프리온(prion;감염형)과 같은 병원성 단백질 등을 들 수가 있다. 예를 들어 설명하면, 최근 문제시되고 있는 병원성 단백질의 대표적인 예로서 들 수 있는 이상형 프리온은, 소해면상뇌증(BSE)으로 대표되는 프리온병의 원인이 되는 단백질이다. 동물의 뇌나 신경세포막의 표면에 통상적으로 존재하는 정상형(正常型) 프리온 단백질은 분자량이 약 3.3~3.5만(33~35kDa)의 당단백질이며, 감염형 프리온 단백질로서 뇌내의 세포내에 축적되어 있는 것이다(Lait, 76:571-578,1996). 이상형 프리온은, 동물의 체내에 침입하면, 체내의 특정 부위에서 생산되는 정상형 프리온을 이상형 프리온으로 변환시키고, 그 결과, 이들 특정부위에 있어서 이상형 프리온이 축적된다. 뇌에 이상형 프리온이 축적되면, 뇌가 스핀지 형상이 되어, 동물은 죽음에 이르게 된다.

- <3> 이와 같은 식품소재나 사료소재의 이용에 있어서, 이들 소재중에 포함되는 알레르겐 단백질과 같은 유해단백질이나, 병원성 단백질을, 사람과 동물이 섭취하는 것을 방지하기 위해서는, 상기 식품소재나 사료소재에 포함되는 알레르겐 단백질과 같은 유해단백질이나, 병원성 단백질을 검지, 측정하고, 이들 유해단백질이나 병원성 단백질을 포함하고 있는 식품소재나 사료소재의 이용을 방지할 필요가 있다.
- <4> 종래부터, 프리온(이상형)과 같은 천연의 생체 단백질의 측정에는 ELISA(고상효소면역측정법)나 웨스턴블로팅법(immunoblotting)과 같은 면역측정방법이 사용되고 있다. ELISA는, 고상에서 실시되며, 항원 또는 항체를 효소로 표지하고, 항체 또는 항원의 존재를 효소활성을 이용하여 검출하는 방법인 바, 예를 들면, 마이크로타이터 플레이트상에 고정된 프리온을 Mab 3F4 항체에 의하여 결합시키고, 상기 항체를 이것에 커플링하는 효소에 의하여 착색반응을 촉매하는 제2의 항체에 의해서 검출하는 방법으로 실시된다(미국특허 제4806627호 명세서). 또, 웨스턴블로팅법은, 전기영동으로 분리한 단백질을 소수성의 막에 고정하고, 항원에 특이적인 항체를 사용하여 목적으로 하는 단백질을 검출하는 방법인 바, 프리온의 검출에는, 예를 들면, 모노클로날 항 프리온 단백질 항체 Mab 13A5를 사용하고, 웨스턴블로팅법을 실시하여 이상형 프리온을 검출하는 등의 방법으로 실시된다(J. Infect. Dis. 154:518-521,1986).
- <5> 그러나, 예를 들면, ELISA나 웨스턴블로팅법과 같은 종래의 방법으로 프리온의 검출, 측정을 실시하는데는, 종래법에서는 정상형 프리온과 이상형 프리온을 구별하여 검출하기 위해서, 먼저, 피검시료로부터 미리 정상형 프리온을 프로테아제K로 처리하여, 분해 제거해 두는 처리를 실시해 놓을 필요가 있다. 또, 웨스턴블로팅법은, 전기영동을 실시할 필요가 있으며, 번잡하고 시간이 걸리기 때문에, 다수의 시료를 단시간에 검사하기 위해서는 적합하지 않다는 문제가 있다. 더 구체적으로 설명하면, ELISA는, 필요한 감도(感度)를 달성하기 위해서는 프로테아제K로 처리한 후의 시료를 구아니딘 티오시안산으로 변성처리하고, 프리온 단백질의 응집상태를 해제하기 전에, SDS에 의한 1차 변성처리 및 메탄올 처리에 의한 단백질 농축조작을 실시할 필요가 있으며, 상기 메탄올 처리의 이전 및 구아니딘 티오시안산 처리의 이전에는 각각 원심분리를 실시할 필요가 있으며, 그리고 상기 원심분리조작은 시간이 걸린다. 상기와 같은 방법은 이와 같은 번잡한 처리를 실시하지 않으면 안되기 때문에, 다수의 시료를 단시간에 검사하기 위해서는 적합하지 않다는 문제가 있다는 것이다.
- <6> 그래서, 이들 프리온의 검출, 측정에 사용되고 있는 ELISA나 웨스턴블로팅법을 사용하는데 있어서의 문제를 개선하기 위하여, 최근, 몇 가지 방법이 제안되고 있다. 예를 들면, 일본국 특개평 10-267928호 공보에는, 이상프리온단백질을 고감도로 검출하기 위하여, ELISA를 응용하고, 항 프리온 단백질 항체를 사용하여, 상기 항체를 임의의 DNA단편으로 표지하여, 상기 DNA단편을 PCR에 의하여 검출하는 면역PCR법이 개시되어 있다. 또, 일본국 특개 2003-130880호 공보에는, 종래의 방법인 ELISA나 웨스턴블로팅법의 시간이 걸리는 전기영동조작이나 원심분리조작을 실시하지 않고 고감도로 이상형 프리온을 면역측정하는 방법으로서, 자성입자에, 변성제 처리한 이상형 프리온과 항원·항체 반응하는 제1항체 또는 그 항원결합성 프래그먼트를 부동화시켜 이상형 프리온 면역측정시약으로 사용하는 것에 의하여, ELISA나 웨스턴블로팅법의 원심분리조작이나 전기영동을 실시하지 않고 이상형 프리온의 측정을 실시하여, 다수의 검체에 대하여 단시간에 검사를 실시할 수 있게 하는 방법이 개시되어 있다.
- <7> 또한, 일본국 특개 2003-215131호 공보에는, 체액 샘플에 있어서, 프리온 단백질을 화학물질과 반응시켜서 공유결합을 형성시키는 것에 의하여, 화학적으로 수식되고, 병원성 프리온이 존재하면 매스스펙트럼에 적어도 다시 1개의 피크가 관찰되도록 한 프리온 단백질의 매스스펙트럼(Mass spectrum;MS)을 사용한 분석방법이 개시되어 있다. 이들은, 종래방법인 ELISA나 웨스턴블로팅법을 개량하고 있으나, 여전히, 각종 처리를 거치지 않으면 안되며, 프리온과 같은 항원단백질을, 간편하고 신속하게 검출, 측정하기에는 반드시 충분한 것이 아니다. 또, 이들의 검출과 측정방법은, 상기 검출, 측정을 위한 처리공정을, 자동 또는 반자동적으로 실시하고, 대량의 시료 측정을 실시하기에는 적당한 방법이라고 할 수가 없다.
- <8> 한편, 최근, 특히 생물 유래의 분자 해석 등에 많이 이용되며, 예를 들면, 단백질 분자의 수나, 크기, 또는 형태 등 물리적인 양을, 시료의 물리적인 분리과정을 거치지 않고, 게다가 거의 실시간으로 검출, 측정할 수 있는 분석법으로서 형광상관분광법(FCS:Fluorescence Correlation Spectroscopy)이 알려져 있다(Chem.Phys.,4,390-401,1974;Biopolymers,13,1-27,1974;Physical Rev.A,10:1938-1945,1974;in Topics in Fluorescence Spectyoscopy,1,pp.337-378,Plenum Press, New York and London, 1991;R.Rigler, E.S.Elson(Eds.), Fluorescence Correlation Spectyoscopy. Theory and Applications, Springer, Berlin, 2001). 상기 FCS는, 형광으로 표지한 표적분자의 매질 중에 있어서의 브라운운동을 레이저 공초점 현미경계(系)에 의하여 미소(微小)영역에 포착하는 것에 의하여, 형광강도의 요동으로부터 확산시간을 해석하고, 표적분자의 물리량(분자의 수, 크기)을 측정하는 것에 의하여 실행되는 것으로서, 이와 같은 미소한 영역에서 분자 요동을 포착하는

FCS에 의한 해석은, 고감도, 특이적으로 분자간 상호작용을 검출하는데에 유효한 수단으로 되어 있다.

- <9> 상기 FCS를, 생체시료 중에 포함되는 단백질 등의 검출, 측정에 사용한 경우의 특징으로서, 용액에 포함되는 형광으로 표지한 표적분자의 농도나 분자간 상호작용을 물리적인 분리과정을 거치지 않고 거의 실시간으로 모니터링 할 수 있다는 것이다. 이 때문에, FCS를 사용한 검출계에서는, 지금까지 생체분자의 검출계의 주류로서 사용되어 온 ELISA 등의 분석수단에 있어서 필요했던 번잡한 Bound/Free 분리과정을 생략할 수가 있으며, 따라서, 단시간에 다량의 샘플을 고감도로 측정하는 것이 가능하며, 자동화 측정용에도 적합하다.
- <10> 그러나, FCS를 사용하여, 항원단백질 등의 검출을 실시하는데에는, 형광표지화한 항체분자를 사용하고, 상기 형광표지화 항체와 항원단백질과의 항원·항체반응을 이용하여, 상기 형광표지화 항체와, 상기 형광표지화 항체와 항원단백질과의 항원·항체반응에 의하여 형성된 항원·항체복합체분자가 갖는 형상 및 그 분자량에 의존하는 확산속도의 차를 이용하여, 분석이 실시된다. 여기서, 확산속도(확산정수 또는 D)란, 단위시간에 분자가 자유 확산하는 면적을 말한다. 확산시간(Diffusion Time:(DT) 또는 τD)이란, 장치에 의해 결정되는 초점영역 내를 분자가 통과하는 데에 필요한 시간을 말한다.
- <11> 따라서, FCS에 의하여, 시료 중의 항원단백질 등의 정확한 측정을 실시하기 위해서는, 표지화항체의 확산속도와, 상기 표지화항체와 항원단백질과의 항원·항체반응에 의하여 형성되는 항원·항체복합체의 확산속도와의 사이에 의미있는 차이를 발생시키는 항원과 항체의 조합을 사용할 필요가 있다. 그래서, 종래에는, 이와 같은 필요성 때문에, FCS에 의하여 검출할 수 있는 항원단백질 등의 종류는 매우 한정되어 있었으며, 상기 문제를 해결하는 수단으로서, 종래에는, 항원과 항체와의 형상 및 분자량을 고려하여 항원·항체복합체에 대하여 여러가지 수식을 가지고, 확산속도에 의미있는 차이를 설정하는 것이 실시되어 있었다(일본국 특개 2001-272404호 공보, 일본국 특허 제3517241호 공보). 그러나, 이와 같은 방법을 사용해도, FCS의 검출방법을 적용하는 검출대상에는 한도가 있었다.
- <12> 특허문헌 1 : 일본국 특개평 10-267928호 공보.
- <13> 특허문헌 2 : 일본국 특개 2001-272404호 공보.
- <14> 특허문헌 3 : 일본국 특개 2003-130880호 공보.
- <15> 특허문헌 4 : 일본국 특개 2003-215131호 공보.
- <16> 특허문헌 5 : 일본국 특허 제3517241호 공보.
- <17> 비특허문헌 1 : J.Infect.Dis.154:518-521,1986.
- <18> 비특허문헌 2 : Chem.Phys., 4,390-401,1974.
- <19> 비특허문헌 3 : Biopolymers, 13,1-27,1974.
- <20> 비특허문헌 4 : Physical Rev. A,10:1938-1945,1974.
- <21> 비특허문헌 5 : in Topics in Fluorescence Spectyoscopy,1,pp.337-378,Plenum Press, New York and London, 1991.
- <22> 비특허문헌 6 : R.Rigler, E.S.Elson(Eds.),Fluorescence Correlation Spectyos copy. Theory and Applications, Springer, Berlin, 2001.

발명의 상세한 설명

- <23> 본 발명의 과제는, 이상형 프리온과 같은 병원성 단백질 또는 식품소재 중에 포함되는 유해단백질과 같은 항원 단백질 등의 항원의 검출 및/또는 측정에 광범하게 적용할 수 있고, 상기 항원을 간편한 조작으로, 신속하고 정확하게 검출 및/또는 측정할 수가 있는 항원의 신속검출 및/또는 측정방법을 제공하는 것이다.
- <24> 본 발명자는, 상기 과제를 해결하기 위하여 예의검토하던 중에, 최근, 특히 생물유래의 분자의 해석 등에 많이 사용되며, 단백질분자의 수나, 크기, 또는 형태 등 물리량을, 시료의 물리적인 분리과정을 거치지 않고, 게다가 거의 실시간으로 검출, 측정할 수가 있는 분석법으로서 알려져 있는 형광상관분광법(FCS:Fluorescence Correlation Spectroscopy)에 착안하여, 상기 FCS를 사용한 단백질분자 등의 검출과 측정에, 항원·항체반응에 의하여 검출하는 항원분자의 형광표지화를 이용하고, 그리고, 상기 항원·항체반응에 의한 형광표지화에 있어서, 형광표지 항체단편과, 상기 형광표지 항체단편과 항원을 통해 결합하는 비형광표지화 완전항체를 사용

하는 것에 의하여, 항원과 결합하고 있지 않은 형광표지 항체단편과, 형광표지 항체단편-항원-비형광표지화 완전형항체의 항원·항체반응에 의하여 형성되는 복합체와의 사이에, 그 확산속도에 있어서의 의미있는 차이를 발생시킬 수가 있으며, 따라서, 항원의 형상이나 분자량에 의존하지 않고, 비교적 분자량이 작은 항원단백질과 같은 항원의 경우에도 상기 FCS를 사용하여 항원의 검출측정이 가능하고, 넓은 범위의 항원을 측정할 수가 있다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

<25> 즉, 본 발명은, 항원단백질과 같은 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및, 상기 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 사용하고, 항원과 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체와의 항원·항체복합체를 형성시키고, 형성된 항원·항체복합체를 형광상관분광법에 의하여 검출, 해석하는 것에 의하여 항원을 검출 및/또는 측정하는 방법으로 이루어진다. 본 발명의 검출 및/또는 측정방법은, 이상형 프리온과 같은 병원성 단백질 또는 식품소재 중에 포함되는 유해단백질과 같은 항원 단백질의 검출 및/또는 측정에 광범하게 적용될 수가 있으며, 상기 항원 단백질을 간편한 조작으로, 신속하고 정확하게 검출 및/또는 측정할 수가 있다.

<26> 본 발명의 기능에 대하여 더 설명한다. 본 발명은, 항원 단백질과 같은 항원(예를 들면, 이상형 프리온과 같은 병원성 단백질이나 알레르겐 단백질과 같은 유해단백질)의 각각 다른 에피토프(항원결정기;antigenic determinant)를 표적으로 하는 형광표지 항체단편, 및 완전형의 항체(또는 그 혼합물(본 발명이 제공하는 항원 검출시약))를 항원과 혼합함으로써 항원·항체반응시키고, 그 혼합물을 FCS에 의해 측정하는 것으로 이루어진다. 이들의 형광표지 항체단편, 비형광표지화 완전형항체는, 검출 및/또는 측정시료 중에 항원단백질과 같은 항원이 존재하면, 상기 항원을 통하여 복합체를 형성한다(도1).

<27> FCS에 의한 항원의 검출 및/또는 측정에 있어서, 비형광표지화 완전형항체를 사용한 경우의 항원·항체복합체 분자의 브라운운동에 있어서의 확산속도에서의 영향을 검증하기 위하여, 복합체의 중심에 위치하는 항원을 사용하지 않고, 완전형항체와 이를 직접 인식하는 표지화 항체단편을 사용하여 FCS측정을 실시하였다(도2). 측정의 결과, 표지화 항체단편만의 확산속도와 표지화 항체단편-항체복합체의 확산속도와의 사이에 의미있는 차가 얻어졌다(도3). 즉, 도3에 나타낸 바와 같이, 비형광표지화 완전형항체(도3, Ab)의 Fc부분(도2, 에피토프C)을 인식하는 형광표지 항체단편과 비형광표지화 완전형항체와의 항원·항체반응을 실시하고, FCS에 의한 측정을 실시한 결과, 표지화 항체단편만(Ab(-))의 확산시간과, 형광표지 항체단편과 비형광표지화 완전형항체와의 복합체(Ab(+))의 확산시간은, 이론적으로는, 약600 μ s, 900 μ s로 되는 것에 대하여, 측정치도 약600 μ s, 950 μ s이 되어 표지화 항체단편만의 확산속도와 표지화 항체단편-항체복합체의 확산속도와의 사이에 의미있는 차가 나타났다.

<28> 이와 같은 결과는, 항원·항체복합체의 중심에 위치하는 항원이 존재하여 형광표지 항체단편-항원-비형광표지화 완전형항체의 복합체가 형성된 경우에는, 반드시 이들의 형광표지분자의 확산속도에 의미있는 차가 발생하는 것을 의미하고 있다. 따라서, 상기와 같은 조합을 사용하면, 항원의 분자량에 의거하지 않고 FCS측정에 의한 항원 단백질과 같은 항원의 검출이 가능하다는 것이 명확하게 되었다. 본 발명의 방법에 있어서는, 사용하는 형광표지 항체단편을 조제하기 위한 항체 및 비형광표지화 완전형항체는, IgG클래스의 모노클로날 항체를 사용하는 것이 바람직하다.

<29> 또한, 상기 도2 및 도3에 나타내는 실험에는, 다음과 같은 조작에 의한 것이다 :

<30> (사용한 재료):

<31> Alexa Fluor647(Zenon One Mouse IgG1 Labeling Kit)

<32> Fab647(Zenon One IgG1 Labeling Reagent)

<33> 항체(도3 중 Ab로 표시하였다)(Zenon One Blocking Reagent(mouse IgG))

<34> (FCS측정장치)

<35> MF-20(분자간 상호작용 해석시스템 : 일본국 올림퍼스 광학공업주식회사 제품)

<36> (조작)

<37> 10nM의 Fab647(마우스 IgG항체)만의 용액과, 100nM의 완전형항체와 혼합한 Fab647혼합물을, N101(일본유지제품)로 블록킹처리한 384웰플레이트(상기 올림퍼스제품)에 공급하고, MF20(상기 올림퍼스제품)을 사용하여 측정하였다. 측정은 레이저 파워 100 μ W로 하고, 30초간×3회의 측정을 실시하였다. MF20의 처리 소프트웨어를 사용하여 확산시간을 비롯한 각 매개변수(parameter)를 도출하였다.

<38> 즉, 더 구체적으로 설명하면 본 발명은, (1) 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 사용하고, 항원과 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체와의 항원·항체복합체를 형성시키고, 형성된 항원·항체복합체를 형광상관분광법에 의하여 검출, 해석하는 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (2) 항원이 항원단백질인 것을 특징으로 하는 상기(1)기재의 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (3) 형성된 항원·항체복합체의 형광상관분광법에 의한 검출과 해석이, 형광표지화된 형광표지 항체단편과 형성된 표지화된 항원·항체복합체와의 확산속도의 차이에 근거한 식별을 이용하여 항원의 검출과 해석을 실시하는 것을 특징으로 하는 상기(1) 또는 (2)기재의 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (4) 항원의 신속검출 및/또는 측정이, 형성된 항원·항체복합체의 형광상관분광법에 의한 검출과 해석에 근거하여, 항원의 존재, 항원의 농도, 항원의 크기, 또는 항원의 형태를 검출 및/또는 측정하는 것을 특징으로 하는 상기(1)-(3)항 중 어느 한 항에 기재된 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (5) 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편이, 항원을 면역원으로 하여 제작된 모노클로날항체로부터 조제된 것이며, 항원단백질의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체가, 항원을 면역원으로하여 제작된 모노클로날항체인 것을 특징으로 하는 상기(1)-(4)항 중 어느 한 항에 기재된 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법으로 이루어진다.

<39> 또, 본 발명은, (6) 피검시료에, 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 첨가하여, 항원·항체반응을 실시하고, 형성된 항원과 형광표지 항체단편, 및 비형광표지화 완전형항체와의 항원·항체복합체를, 형광상관분광법에 의하여 검출, 해석하는 것을 특징으로 하는 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (7) 항원이 항원단백질인 것을 특징으로 하는 상기 (6)기재의 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (8) 형광상관분광법에 의한 항원의 검출 및/또는 측정이, 피검시료에 포함되는 항원의 물리적인 분리과정을 거치지 않고 실시되는 것을 특징으로 하는 상기 (6) 또는 (7)기재의 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (9) 피검시료에, 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 첨가하는 공정, 상기 피검시료, 형광표지 항체단편, 및 비형광표지화 완전형항체에 의하여 항원·항체반응을 실시하는 공정, 그리고, 상기 항원·항체반응을 실시한 피검시료를 형광상관분광법에 의하여 검출, 해석을 실시하는 공정을, 자동적 또는 반자동적으로 실시하는 것을 특징으로 하는 상기(6)-(8)항 중 어느 한 항에 기재된 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (10) 상기 피검시료가 생체단백질 시료이며, 항원이 병원성(病原性) 단백질 항원인 것을 특징으로 하는 상기 (6)-(9)항 중 어느 한 항에 기재된 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법으로 구성된다.

<40> 또한, 본 발명은, (11) 병원성 단백질 항원이, 이상형(異常型) 프리온(prion)인 것을 특징으로 하는 상기 (10)기재의 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (12) 상기 피검시료가, 식품소재이며, 항원이 상기 식품소재 중에 포함되는 유해단백질 항원인 것을 특징으로 하는 상기 (6)-(9)항 중 어느 한 항에 기재된 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법과, (13) 검출 및/또는 측정하는 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체로 이루어지는, 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정에 사용되는 검출시약과, (14) 상기 (12)항 기재의 검출시약을 구비한, 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정용 키트로 이루어진다.

실시예

<47> 본 발명의 형광상관분광법에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법은, 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 사용하고, 항원과 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체와의 항원·항체복합체를 형성시키고, 형성된 항원·항체복합체를 형광상관분광법(FCS)에 의하여 검출, 해석하는 것에 의해 이루어진다.

<48> 즉, 본 발명을 실시하는 때에는, 피검시료에, 항원의 에피토프를 표적으로 하는 형광표지화된 형광표지 항체단편, 및 항원의 다른 에피토프를 표적으로 하는 비형광표지화 완전형항체를 첨가하고, 상기 항체를 첨가한 시료를 혼합하여 항원·항체반응을 실시하고, 형성된 항원과 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체와의 항원·항체복합체를, 형광상관분광법에 의하여 검출, 해석하여, 시료 중의 항원의 존재, 크기, 농도 등을 신속하게 검출 및/또는 측정하는 것에 의하여 실시된다. 본 발명의 FCS에 의한 검출 및/또는 측정에 있어서의 처

리조작은, 피검시료에 포함되는 항원의 물리적인 분리과정을 거치지 않고, 시료와, 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체로 이루어지는 검출시약을 첨가, 혼합하는 것만의 조작으로 실시되기 때문에, 항원의 검출, 측정을 실시하는 공정을, 자동적 또는 반자동적으로 실시할 수가 있다.

<49> (항 단백질 항체의 조제)

<50> 본 발명에 있어서는, 검출시약으로 사용되는 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체를 조제하기 위하여 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 조제한다. 본 발명에 있어서 사용되는, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체로서는, 폴리클로날항체 및 모노클로날 항체 등을 들 수가 있는바, 그 중에서도 모노클로날항체가 그 특이성 때문에 보다 바람직하다. 이와 같은 항원에 대한 항체를 조제하는데에는, 먼저, 검출할 항원을 정제하여 취득한다. 상기 항원은, 공지의 정제수단을 사용하여 공급원으로부터 분리·정제하여 조제할 수가 있으며, 또, 항원이 항원단백질로서 이 항원단백질의 아미노산 서열이 공지된 것이라면, 유전자 공학적 수법에 의하여, 미생물이나 동물세포 등을 사용하여 상기 항원단백질을 산생시켜, 정제하여 취득할 수도 있다. 가능하다면, 상기 항원단백질을, 펩티드의 화학합성법에 의하여 조제할 수가 있다. 펩티드의 화학합성은 공지의 합성수단을 채용할 수가 있다. 예를 들면, 아지드법, 산(酸)클로라이드법, 산무수물법, 혼합산무수물법, DCC법, 활성 에스테르법, 카르보이미다졸법, 산화환원법 등을 들 수가 있다.

<51> 상기 항원에 대한 항체를 조제하는데에는, 상기 항원을 사용하고, 관용하는 프로토콜항체를 사용하여, 동물 또는 식물에 감각(感作)시켜서 조제한다. 예를 들면, 모노클로날 항체의 조제에 있어서는, 연속세포계의 배양물에 의하여 산생되는 항체를 얻게 하는, 하이브리도마법(Nature 256, 495-497, 1975), 트리오마법, 인간B세포 하이브리도마법(Immunology Today 4, 72, 1983) 및 EBV-하이브리도마법(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc.,1985) 등 임의의 방법을 사용할 수가 있다.

<52> 항원 단백질과 같은 항원의 모노클로날 항체를 조제하는데에는, 예를 들면, 상기 항원단백질을 항원으로 하고, 쥐, 마우스, 토끼 등의 포유동물에 투여하여 감각(感作)시킨다. 필요에 따라서, 프로인트 완전 어쥬번트(FCA), 프로인트 불완전 어쥬번트(FIA) 등의 어쥬번트를 사용할 수도 있다. 면역은, 주로 정맥내, 피하, 복강내에 주입하는 것에 의하여 실시된다. 또, 면역의 간격은 특별히 한정되지 않으며, 수일부터 수주간의 간격으로, 1-10회의 면역을 실시한다. 그리고, 최종의 면역일로부터 1~60일후에 항체산생세포를 채집한다. 항체산생세포로서는, 비장세포, 임파절세포, 말초혈세포 등을 들 수가 있다. 하이브리도마를 얻기 위하여, 항체산생세포와 미에로마 세포와의 세포융합을 실시한다. 항체산생세포와 융합시키는 미에로마세포로서, 일반적으로 입수가 가능한 주화세포(株化細胞)를 사용할 수가 있다. 사용하는 세포주로서는, 약제의 선택성을 가지며, 미융합의 상태에서는 HAT선택배지(하이포크산틴, 아미노프테린, 티미딘을 포함한다)에서 생존하지 못하며, 항체산생세포와 융합한 상태에서만 생존할 수가 있는 성질을 가진 것이 사용된다.

<53> 세포융합처리 후의 세포에서 목적으로 하는 하이브리도마를 선별한다. 수립한 하이브리도마로부터 모노클로날 항체를 채취하는 방법으로서, 통상의 세포배양법 또는 복수(腹水)형성법 등을 채용할 수가 있다. 상기 항체의 채취방법에 있어서 항체의 정제를 필요로 하는 경우는, 황산암모늄염석법(硫酸鹽析法), 이온교환 크로마토그래피, 겔 여과, 어피티티 크로마토그래피 등의 공지의 방법을 적절히 선택하거나, 또는 이를 조합시키는 것에 의하여 정제할 수가 있다.

<54> 본 발명에 있어서는, 본 발명에서 사용되는 항원단백질의 항체로서는, 상기와 같이 하여 조제된 것 외에, 이미 조제되어 있는 시판의 항체가 있는 경우에는, 그 항체를 사용할 수가 있다.

<55> (형광표지 항체단편의 조제)

<56> 본 발명의 항원의 신속검출 및/또는 측정방법에 있어서는, 항원과 항원·항체반응을 실시하여 검출하기 위한 검출시약으로서, 상기 항원으로부터 조제된 형광표지 항체단편이 사용된다. 본 발명에 있어서, 형광표지 항체단편의 조제에 사용되는 항체는, 마찬가지로 본 발명에서 사용되는 비형광표지화 완전형항체와는 그 결합하는 항원의 에피토프가 다른 항체가 선택된다. 상기 형광표지 항체단편의 조제에는, 항원의 완전형항체를 펩신이나 파파인과 같은 효소로 단편화하고, 이를 2-메르캅토메틸아민 또는 2-메르캅토에탄올 등으로 환원시켜 단량체로 한 후, 표지화하여 조제한다. 상기 표지화에는, 형광색소가 사용되며, 예를 들면, 플루오레세인·이소티오시아네이트(FITC), Alexa532와 같은 형광색소가 사용된다.

<57> (FCS에 의한 검출, 측정)

<58> 본 발명의 항원의 신속검출 및/또는 측정방법에 있어서는, 피검시료에, 검출시약으로서 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체를 첨가하고, 혼합하여, 항원·항체반응을 실시한 피검시료를 FCS(형광상관분광법)에

의하여 항원의 검출 및/또는 측정을 실시한다. FCS는, 용액 중의 형광분자의 브라운운동을 이용하여, 분자의 「크기」나 「수」와 같은 물리량을 얻는 방법이다.

<59> FCS의 특징은, 용액에 포함되는 형광분자의 농도나 분자간 상호작용을 물리적인 분리과정을 거치지 않고 거의 실시간으로 모니터링할 수 있다는 데에 있다. 그 때문에, FCS를 사용한 검출계에서는, 이제까지 주류로 되어 있던 생체분자검출계(예를 들면, ELISA 등)에서 필요했던 번잡한 Bound/Free 분리과정을 생략할 수가 있다. 따라서, 단시간에 다량의 샘플을 고감도로, 또한 자동적으로 측정하는 것이 가능하게 된다. FCS는, 여러 가지가 알려져 있으나, 본 발명에 있어서는, 본 발명의 검출, 측정대상의 검출, 측정에 장애가 되는 경우가 없는 한, 모든 방법을 사용할 수가 있다(단백질 핵산 효소, Vol. 44, No.9, 1431-1438, 1999; 바이오 인터스트리 4월호, p.52-59, 2003; 일본국 특개 2001-272404호 공보; 일본국 특허 제3517241호 공보).

<60> (FCS측정장치)

<61> FCS에 의한 검출 및 측정에 사용되는 장치의 기본구조를 도4에 나타낸다. 도면을 따라서 개략적으로 설명하면, (A)는, FCS(형광상관분광)장치의 모식도를 나타낸다. 레이저로부터의 여기광은, 다이크로익 미러(DM)와 대물렌즈를 경유하여 커버유리판상의 시료용액으로 도입된다. 형광발광은, 롱패스필터 또는 밴드패스필터(F)를 통과하고, 공초점 상의 핀홀에서 공초점면 이외의 백그라운드광을 제거하여, 애벌란시 포토다이오드 검출기(APD), 또는 광전자 증폭관(PMT)으로 도입되며, 그 신호는 다시 디지털 상관기에서 해석된다. (B)는, 관측영역의 확대모식도를 나타낸다. 대물렌즈에 의하여 극한까지 죄여진 공초점영역을, 브라운운동을 하고 있는 형광분자가 통과하는 모양을 나타낸다. (C)는, 형광상관해석 후의 상관곡선을 나타낸다. 관측되는 형광강도의 요동을 식(式)을 이용하여 해석(解析)함으로써, 분자의 「수」나 「크기」와 같은 물리량이 얻어진다.

<62> FCS에 의한 측정에서는, 공초점 광학계를 사용하는 것에 의하여, 시료용액의 극미소영역(직경 약400nm, 축길이 약2 μ m, 부피 $\sim 10^{-16}$)으로부터의 형광을 검출하고 있다(도4). 본 발명의 실시예에서는, FCS측정장치로서, 상기 올림퍼스사 제품인 MF20을 사용하였다. 측정은, 파장 543, 633nm에서 30초간의 측정을 3회 실시하는 방식으로 실시하였다.

<63> (관측되는 형광강도의 요동)

<64> FCS에 의한 측정에서는, 관측영역은 개방계(開放系)이기 때문에, 형광분자는 브라운운동에 따라 영역내를 출입한다. 그러면, 관측영역 중의 분자의 수는 어떤 값을 중심으로 변동하여, 수의 요동이 발생한다. 그리고, 상기 수의 요동에 기인한 형광강도의 요동이 관측된다(단백질 핵산 효소, Vol. 44, No.9, 1431-1438, 1999).

<65> (요동의 해석)

<66> 관측되는 형광강도의 요동을, 다음 식(1)~(4)를 사용하여 해석함으로써, 분자의 「수」나 「크기」와 같은 물리량이 얻어진다.

<67> 즉, 요동의 신호로부터 정보를 인출하기 위해서 자기상관관수를 사용한다. FCS에서 사용되는 자기상관관수는 다음 식(1)으로 나타낸다.

<68> 식(1)

$$C(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[\frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \right] \left[\frac{1}{1 + (1/s)^2 (\tau/\tau_D)} \right]^{1/2}$$

<69>

<70> 식중, s는 $s=z/w$ 이며, 관측영역의 반지름(w)과 반장축(半長軸)(z)의 비를 나타낸다. τ_D 는 확산시간(또는 상관시간)이라고 불리며, 형광분자가 확산에 의하여 관측영역을 통과하는 평균시간을 나타낸다. N은 일정시간 내에 관측영역내에 존재하는 분자의 평균수를 나타낸다.

<71> 요동을 식(1)에 의하여 해석하면, 도4(C)에 나타낸 바와 같은 곡선이 얻어지며, 거기에서 분자의 「움직임의 용이성」을 나타내는 확산시간(τ_D)과 분자의 「수」N이 얻어진다. 상관곡선은, 형광분자가 다른 분자와 회합하는 등에 의하여 분자의 사이즈(크기)가 커지면 오른쪽으로 시프트(전위)하고, 반대로 해리(解離)하는 등에 의하여 사이즈가 작아지면 왼쪽으로 시프트한다.

<72> 식(1)에서 얻어지는 확산시간(τ_D)은, 확산정수(D)와 하기 식(2)의 관계에 있다.

<73> 식(2)

$$\tau_D = w^2 / 4D$$

<74>

<75> 다시, 확산정수(D)는, 분자를 구(球)로 가정했을 경우의 아인슈타인-스톡스(Einstein-Stokes)식에 의하여, 분자의 반지름(r)과 하기 식(3)에 나타내는 관계에 있다.

<76> 식(3)

$$D = \frac{\kappa_D T}{6\pi\eta r}$$

<77>

<78> 식중, κ_D , T, 및 η 는 각각 볼츠만정수, 절대온도, 및 용매의 점성이다. 따라서, 확산시간(τ_D)은 상기 식(2)와 (3)으로부터 분자의 「크기」(사이즈)에 해당하는 분자반지름(r)과 하기 식(4)과 같이 관계지어진다.

<79> 식(4)

$$\tau_D \propto 1/D \propto r$$

<80>

<81> 상기와 같이 형광강도의 요동을 식(1) 및 (4)를 사용하여 해석함으로써, 관측영역내에 존재하는 분자의 「수」나 「크기」를 얻을 수가 있다. 요동과 자기상관관수에 관한 상세한 설명은 하기의 해설서에 기술되어 있다(일본국 무샤토시미즈 저 「블루박스 요동의 세계」, 코단샤, 1980;D. 아이젠버그 외 1명 저 「생명과학을 위한 물리학(하)」 바이후우칸, p596-600, 1988; 히노미키오 저 「스펙트럼해석」 아사쿠라쇼텐, p25-39, 1977).

<82> (FCS측정을 사용한 경우의 조작, 소요시간)

<83> 본 발명의 FCS에 의한 항원단백질의 검출 및/또는 측정의 조작, 소요시간에 대하여, 종래의 방법인 ELISA를 사용한 항원단백질의 검출 및/또는 측정방법의 경우와 비교하여 표시하였다.

<84> (1)조작의 비교(간편성의 비교)

<85> 본 발명의 FCS에 의한 항원단백질의 신속검출 및/또는 측정방법의 각 스텝에 있어서의 조작을 표1에 정리하였다.

표 1

<86> 1. 조작의 비교(간편성의 비교)

스텝	ELISA법	본 방법
검체처리과정	검체의 플레이트로의 고정화 (항원·항체반응)	검체로의 본 발명 시약에 의한 표지화 (항원·항체반응)
	비특이적 흡착시료 및 유리시료의 세정 (×3회)	

시그널증폭과정	고정화한 검체로의 효소표지항체의 고정화(항원·항체반응)	-
	비특이적 흡착시약의 세정(×5회)	
	기질발색액의 분주(효소반응)	
	반응정지액의 분주(효소반응저해)	
해석과정	플레이트 리더에 의한 시그널 측정	FCS에 의한 시그널해석

<87> (2)소요시간의 비교(신속성의 비교)

<88> 본 발명의 FCS에 의한 항원단백질의 신속검출 및/또는 측정방법의 각 스텝에 있어서의 소요시간을 표2에 나타냈다.

표 2

<89> 2. 소요시간의 비교(신속성의 비교)

스텝	ELISA법	본 방법
검체처리과정	검체의 플레이트로의 고정화 75분간	검체로의 본 발명 시약에 의한 표지화 75분간
	비특이적 흡착시료 및 유리시료의 세정 1분간	
시그널증폭과정	고정화한 검체로의 효소표지항체의 고정화 60분간	-
	비특이적 흡착시약의 세정 1분간	
	기질발색 30분간	

해석과정	플레이트 리더에 의한 시그널 측정 2분간 (96샘플)	FCS에 의한 시그널 해석 20분간 (10초간 측정/1샘플 ×96샘플)
합계	169분간	95분간

- <90> 이하, 실시예를 따라서 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 본 발명의 기술적 범위는 이들의 예시에 한정되는 것이 아니다.
- <91> 실시예 1
- <92> [FCS를 사용한 항원(항원단백질)의 검출, 측정]
- <93> (장치 및 재료)
- <94> (1) 장치
- <95> FCS장치
- <96> 분자간상호작용해석시스템(MF-20, 일본국 올림퍼스 광학공업주식회사 제품)
- <97> (2) 재료
- <98> 형광표지 항체단편의 조제
- <99> 본 실시예에서는, 항 프리온 항체의 형광표지 항체단편(Fab'-Alexa532)을 예로 하였다.
- <100> Fab'-Alexa532의 조제의 개략을 도5에 나타내었다. 항PrP 항체용액을 PD-10 칼럼(파머시아)을 사용하여 구연산 용액(pH6.3)으로 평형화시킨 후, 펩신(1%(w/w))을 첨가하여(37℃, 약 30분간), F(ab')₂를 조제하였다. 소화되는 정도는 HPLC(칼럼;G300SWXL)로 확인하였다. 그 후, 0.1M 인산완충액(pH6.3)을 사용하여 FPLC(칼럼;Superdex 200(16/60))로 정제한 후, 농축 보존하였다. 다시, 2-메르캅토메틸아민(0.01M)을 첨가하여 환원시키고(37℃, 약 1.5시간), Fab'를 조제하였다.
- <101> 환원의 정도는 HPLC(칼럼;G300SWXL)로 확인하였다. 용액을 PD-10칼럼(파머시아)을 사용하여 구연산용액(pH3.5)으로 평형화시킨 후, 신속하게 2당량의 Alexa532 말레이미드(Molecular Probe)를 첨가하고, 4℃에서 하룻밤 방치하여 커플링을 실시하였다.
- <102> 그 후, 0.05M 인산완충액(pH7.8, 0.05%NH₃)을 사용하여 FPLC(칼럼;Superdex 200(16/60))으로 정제하고, -80℃에서 동결보존하였다. 2종류의 항PrP 항체(상기 표지단편화한 것, 완전형항체로서 사용되는 것), 및 제조합 소(牛)PrP(항원)는, 함께 일본국 후지레비오(주)로부터 제공되었다.
- <103> (항원단백질의 검출, 측정실험조작)
- <104> N101(일본유지)에서 블록킹처리한 384홀 플레이트(일본국 올림퍼스 광학공업주식회사제)에, Fab'-Alexa532(형광표지 항체단편)(6.86E-10M), 프리온 단백질(항원단백질)(6.12E-8M), 완전형항체(항 소 제조합 프리온 항체)(8.76E-7M)의 순서로 넣고, 피펫로 자주 교반하였다. 37℃에서 1시간 방치한 후, MF20(FCS측정장치:상기 올림퍼스제)을 사용하여 측정하였다. 측정시의 레이저파워는 150μW로 하고, 30초간×3회의 측정을 실시하였다. MF20의 처리 소프트웨어를 사용하여 확산시간을 비롯한 각 매개변수를 도출하였다.
- <105> (실험결과)
- <106> 실험결과를, 도6에 나타낸다. 본 실시예에 있어서, 프리온 단백질의 분자량이 약 30kDa이기 때문에, 완전형항체를 사용하지 않는 경우는 확산시간에 의미있는 차이가 발생하지 않을 가능성이 있다. 구체적으로 설명하면, 형광표지 항체단편과 복합체(형광표지 항체단편 + 프리온 단백질)의 이론적인 확산시간은 각각 약 600μs, 650μs로 된다. 실험에 있어서도, 형광표지 항체단편과 복합체(형광표지 항체단편 + 프리온 단백질)의 확산시간은 각각 약 600μs, 650μs으로 되며, 의미있는 차이가 발생하지 않았다(도6). 한편, 형광표지 항체단편과 복합체(형광표

지 항체단편 + 완전형항체 + 프리온 단백질)의 이론적인 확산시간은 각각 약 600 μ s, 900 μ s으로 되며, 의미있는 차이가 발생한다. 실험에 있어서도, 형광표지 항체단편과 복합체의 확산시간은 각각 약 600 μ s, 950 μ s으로 이론 값에 가깝고, 의미있는 차이가 발생하였다(도6). 따라서, 상기 실험예에 의하여, 본 발명의 방법을 사용하지 않으면 검출할 수가 없는 분자량이 작은 항원을, 본 방법을 사용하여 검출할 수 있다는 것이 입증되었다.

산업상 이용 가능성

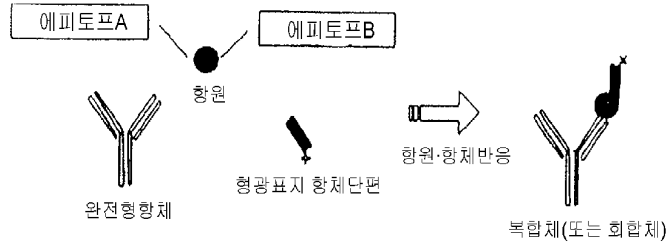
- <107> 본 발명의 형광상관분광법(FCS)에 의한 항원의 검출 및/또는 측정방법은, 검출 및/또는 측정하는 항원단백질과 같은 항원의 형상이나 분자량에 의존하지 않고, 이상형 프리온과 같은 병원성 단백질과, 식품소재 중에 포함되는 유해단백질과 같은 비교적 분자량이 작은 항원단백질과 같은 것이라도, 검출 및 측정이 가능하며, 넓은 범위의 항원의 검출 및/또는 측정에 사용할 수가 있다. 또, 본 발명의 검출 및/또는 측정방법은, FCS에 의하여 검출 및/또는 측정을 실시하기 때문에, 검출하는 항원분자의 수나, 크기, 또는 형태 등의 물리적인 양을, 시료의 물리적인 분리과정을 거치지 않고 더욱이 거의 실시간으로 검출, 측정하는 것이 가능하며, 항원을 간편한 조작으로 신속하고 정확하게 검출 및/또는 측정하는 것이 가능하다.
- <108> 또한, FCS에 의한 검출 및/또는 측정을 실시하는 본 발명의 방법은, FCS로 검출 및 측정하기 위한 처리조작은, 피검시료(항원을 포함한다)와, 형광표지 항체단편 및 비형광표지화 완전형항체로 이루어지는 검출시약을 혼합하여, 항원·항체반응만을 실시하는 조작이며, 게다가, 그 측정결과는 거의 실시간으로 모니터링하는 것이 가능하기 때문에, 피검시료에 대한 검출시약의 혼합, 반응에서부터 측정결과의 표시까지를 자동적 또는 반자동적으로 실시하는데 적합한 방법이다. 또, 종래의 프리온과 같은 항원단백질의 측정에 사용되었던 ELISA나 웨스턴블로팅법과 같은 방법과 비교해서, 분석조작에 관련되는 단계수가 적고, 샘플도 수 μ l~ 수십 μ l로 측정가능하기 때문에, 경제적으로 대량의 피검시료의 측정을 실시할 수가 있으므로, 실용적인 항원단백질의 측정수단으로서의 이용을 기대할 수가 있다.

도면의 간단한 설명

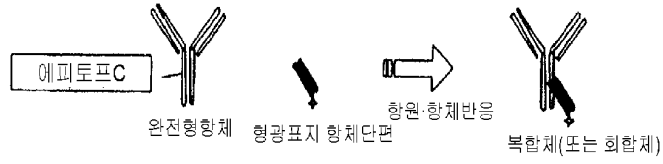
- <41> 도1은, 본 발명의 FCS에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법을 개략적으로 나타내는 도면.
- <42> 도2는, 본 발명의 FCS에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법의 기능을 증명하기 위하여, 형광표지 항체단편만의 경우와, 형광표지 항체단편과 완전형항체와의 복합체의 경우에 있어서의 확산속도의 차이에 대한 시험을 개략적으로 나타내는 도면.
- <43> 도3은, 본 발명의 FCS에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법의 기능을 증명하기 위하여, 형광표지 항체단편만의 경우와, 형광표지 항체단편과 완전형항체와의 복합체의 경우에 있어서의 확산속도의 차이에 대한 시험의 결과를 나타내는 도면.
- <44> 도4는, 본 발명에 있어서 사용되는 FCS측정장치의 개략도.
- <45> 도5는, 본 발명의 FCS에 의한 항원의 신속검출 및/또는 측정방법에 있어서 사용되는 형광표지 항체단편의 조제를 나타내는 개략도.
- <46> 도6은, 본 발명의 실시예에 있어서, 형광표지 항체단편 및 완전형항체를 사용하여, 상기 항체와 항원단백질과의 복합체의 형성에 의한 확산시간의 차이에 대하여 시험한 결과를 나타내는 도면.

도면

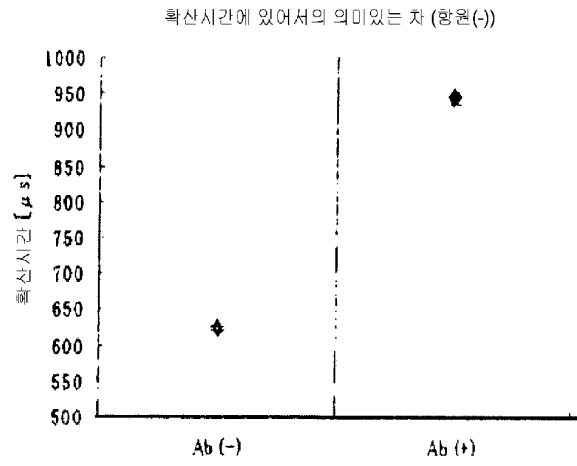
도면1



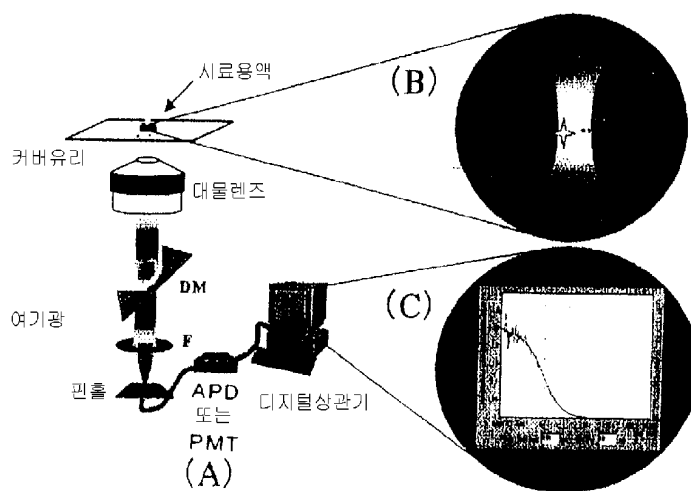
도면2



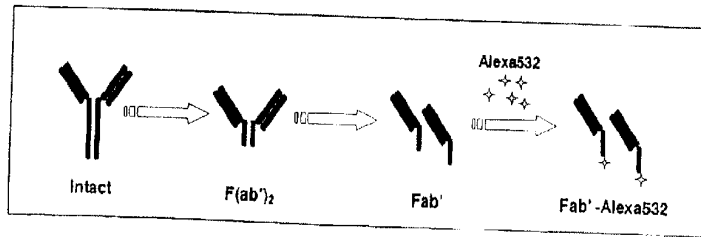
도면3



도면4



도면5



도면6

