

五、發明說明(|)

發明之背景

發明範圍

本發明有關抗體 - 酵素複合物，其中第一抗體通過一種橋連劑與酵素軛合，酵素與第二抗體免疫性結合。本發明另有關使用此抗體 - 酵素複合物之酵素免疫檢測。

先前技藝

酵素免疫檢測 (EIA) 是一種偵測抗原，抗體等之方法，其使用抗體，抗原或特定反應性物質如卵磷脂及 Clq 化學結合高敏感度之酵素作為標記，此酵素高敏感度使度可偵測得極少量之活性。不像放射免疫檢測 (RIA)，EIA 不具有放射性污染，不會受制於丟棄放射性物質的限制法規。此外，EIA 與 RIA 一樣敏感。因此，EIA 現廣泛地被使用 [奧利它 (Orita) 等人，Dictionary of Immunology; Saishin Igaku sha)。

在 EIA 中軛合抗原或抗體與酵素之方法，有戊醛法 (阿米思 (Avrameas), S. Immunochemistry 6, 43-52, 1969)，高碘酸鹽法 [納坎 (Nakane), P.K., J. Histochem. Cytochem. 22, 1084-1091, 1974)，馬來醯亞胺法，二硫吡啶法 [卡森 (Carlsson), J. Biochem. J. 173, 723-737, 1987]，等等。馬來醯亞胺法及二硫吡啶 (pyridil disulfide) 法較有益，在於下列數點，不產生聚合物，抗原抗體，及酵素的活性保持良好，軛合效益高。

五、發明說明(乙)

馬來醯亞胺法根據馬來醯亞胺基團與硫醇基團在溫和的條件下形成穩定的橋之事實。即是，馬來醯亞胺基團引入使用馬來醯亞胺化合物作為橋連劑之酵素內，在抗體／抗原上作出硫醇基團，然後其二者互相反應得到酵素軛合的抗體／抗原。

二硫吡啶法是根據二硫吡啶鍵被硫醇基團取代之事實。即是，二硫吡啶基引入使用二硫吡啶化合物作為橋連劑之酵素內，在抗體／抗原上作出硫醇基團，然後其二者互相反應得到一種酵素－軛合抗體／抗原。

此等方法中，可使用硫醇基團（其由還原抗體絞鏈區中的二硫鍵形成）。使用抗體 Fab' 片段絞鏈區中之硫醇基團的方法稱為絞鏈－酵素－軛合法（絞鏈法）。依據本法，可製備具極微小非特異結合的極有用酵素－軛合的 Fab' [石川 (Ishikawa 等人, J. Immunoassay 4(3), 209-327, 1983)]。因此現常使用絞鏈法。

如上述，絞鏈法是 EIA 中最佳的酵素軛合法。但是本法中天然二價的抗體變成單價，因為，使用抗體的單價 Fab' 與酵素軛合，造成抗體對抗原之親和力降低，尤其在抗原是多價的狀況下。

本發明者進行恢復絞鏈法所降低的抗體活性，並增加 EIA 中之敏感性之研究。

總論

本發明者勤勉地努力完成其上述目的。結果，他們使

五、發明說明(→)

酵素軛合抗體成為多價抗體酵素複合物，成功地顯著恢復抗體之親和性，即是，將酵素軛合抗體與另一個對抗此酵素之抗體結合。抗體酵素複合物包含通過橋連劑與酵素軛合之抗體及另一個對抗酵素，與酵素結合之抗體。

圖的簡介

圖1是顯示抗-HRP McAb濃度對直接ELISA之吸收性之圖，此直接ELISA對含固定量的LS 180 G50I之試樣，使用本抗體酵素複合物進行(第一抗體：NKY13抗體，橋連劑：EMCS，軛合酵素：HRP，第二抗體：抗-HRP McAb)。

圖2是一種標準曲線，對含固定量LS 180 G50I之試樣，使用本抗體-酵素複合物(第一抗體：NKY13抗體，橋連劑：EMCS，軛合酵素：HRP，及第二抗體：抗HRP McAb)進行利用小珠的三明治EIA所得。

圖3是一種標準曲線，於使用小珠的三明治EIA中獲得，其中本抗體-酵素複合物在檢測中形成(第一抗體：KY-ANP-I抗體，橋連劑：EMCS，軛合酵素：HRP，第二抗體：多株抗體)。

較佳具體實例之說明

本發明有關一種抗體-酵素複合物，其中第一抗體通過橋連劑與酵素軛合，該酵素免疫性地結合至第二抗體。作為第一抗體，可使用IgG，IgM，IgA，IgD及IgE任何一種，以IgG較佳。例如，NKY13抗體(EP 293262)，

五、發明說明(4)

是種得自人類腸癌對抗糖蛋白的單株抗體，及KY-ANP-I抗體(EP 306309)，是一種對抗人類心房鈉尿性多肽(hANP)之單株抗體，可作為第一抗體。NKY13抗體可由EP 293262中所述之方法利用融合瘤"NKY13"製備，其已於1987, 5, 26依據布達佩斯條約(Budapest Treaty)存放於位於英國PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wilts的European Collection of Animal Cell Cultures(ECACC)，登記號碼為87052601。KY-ANP-I抗體亦由EP 306309中所述之方法使用融合瘤"KY-ANP-I"製備，已依據布達佩斯條約，以登記號碼87082001存放於ECACC。

此外，第一抗體可為能與酵素軛合之抗體片段，例如，Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, 及Fd, 而Fab'較佳。

酵素，可使用所有常用於EIA中之酵素，例如稗菜過氧化酶， β -半乳糖苷酶，葡萄糖氧化酶，鹼生磷酸酶，溶菌酵素，葡萄糖-6-磷酸脫氫酶，等等。以使用稗菜過氧化酶較佳。

作為軛合第一抗體與酵素之方法，使用橋連劑如戊醛，馬來醯亞胺化合物，或二硫吡啶化合物之方法及利用由高碘酸氧化作用鈉古(Nakaue)法較佳。尤其以使用馬來醯亞胺之方法更佳。馬來醯亞胺化合物包括N-(ϵ -馬來醯亞胺基己醯氧基)琥珀醯亞胺(EMCS)，N-琥珀醯亞胺基-4-馬來醯亞胺基丁酸酯，N-琥珀醯亞胺基-6-馬來醯

五、發明說明(5)

亞胺基己酸酯，N-琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-碳酸酯，等等，以EMCS較佳。此等橋連劑作為第一抗體依據習用法軛合至酵素。

作為第二抗體，使用鑑識酵素之多株或單株抗體。此等抗體可購得，且可由習用法製備。

此外，本發明提供仗用抗體-酵素複合物之酵素免疫檢測。此酵素免疫檢測可由習用法如競爭法，三明治法等等進行。此等方法之選擇依據待測抗原特點改變。抗體-酵素複合物之親合性比酵素軛合的Fab'高出許多，因為複合物之抗體價數為多價，但Fab'是單價。因此，使用抗體-酵素複合物，作為酵素-軛合抗體，替代由絞鏈法製得之酵素-軛合的Fab'，可增加本檢測之敏感性。

製備本抗體-酵素複合物之方法，以及使用其的酵素免疫檢測，舉例說明如下，採用Fab'作為第一抗體之實例。

1. 抗體-酵素複合物之製備

(1) 抗體之純化

對抗待測定抗原的抗體之溶液裝載至先用適當緩衝液平衡過的柱[蛋白質-A西法洛斯柱(Protein-A Sepharose column)等等]。清洗柱後，溶離吸附物以得到純抗體。

(2) 酵素對抗體之軛合

由石川(Ishikawa)等人之方法製備酵素-軛合抗體(石川等人, J. Immunoassay 4, 209-327, 1983), 用酵素

五、發明說明 (6)

消化抗體之條件，以及還原 $F(ab')_2$ 之條件，按照所使用之抗體適當地設定。

上述 (1) 中純化的抗體溶液施用至使用經適當緩衝液平衡之凝膠柱層析法中。緩衝液交換後，所得物濃縮至所需的濃度。加入用相同緩衝液製備之胃蛋白酶溶液，使胃蛋白酶對抗體之比例以重量計為數百分之一，接著靜置於 0 至 50°C 水浴中數十分鐘至數小時。用鹼如 Tris 提升溶液之 pH 值以停止反應。所得物裝載至用適當緩衝劑平衡的柱上以用相同緩衝液進行凝膠過濾。測量每數百微升溶離物之吸收性以計算蛋白質之量，收集主要尖峰作為 $F(ab')_2$ 餾份。

所得之 $F(ab')_2$ 餾份濃縮至所需濃度，其內加入用含乙二胺四醋酸 (EDTA) 之磷酸鹽緩衝劑 (PB) 製備之 2-氫硫基乙胺 (2-MEA) 至足以還原 $F(ab')_2$ 中之二硫鍵，接著靜置在 0 至 50°C 水浴中數十分鐘至數小時。所得物裝載至經該 PB 平衡的柱上以進行凝膠過濾。蛋白質之量計自每數百微升溶離物之吸收性，回收的主要尖峰作為 Fab' 餾份。所得 Fab' 餾份濃縮至所需的濃度。利用石川等人之方法計數每 Fab' 分子之 SH 基團 (石川，E 等人，同文獻)。

同時，加適當之橋連劑至欲與抗體軀合之酵素溶液內，接著在 0 至 50°C 振搖數十分鐘至數小時。離心所得物，所得之上清物施用凝膠過濾作用以得到無效餾份。此無效餾份與先前製得的 Fab' 餾份等價混合，在 0 至 50°C

五、發明說明(7)

靜置數小時至數十小時，接著凝膠過濾此所得物。測量每數百微升溶離液之吸光度，回收第一尖峰作為粗酵素-軛合抗體醱份。純化粗醱份以得酵素-軛合抗體。

其他的抗體片段及完整抗體亦由習用法軛合至酵素。

(3) 抗體-酵素複合物之製備

上述(2)中製得之酵素-軛合抗體溶液與一種對抗酵素之抗體反應得到抗體-酵素複合物。複合物之製備可由一開始同時將其添加在檢測系統中於酵素免疫檢測中進行。或檢測前，由其在0至50℃反應數十分鐘至數小時得到複合物。

2. 酵素免疫檢測法

使用抗原固定化平板之酵素連結免疫吸收檢測(ELISA)

(1) 抗原-固定化平板之製備

抗原固定化平板可由JP KOKAI 62-212568號中所述之方法固定。即是，將抗原溶液調配至微滴定平板之各井中，在室溫靜置數小時。然後，以加L-聚溶胺酸至各井並混合較佳，接著靜置至少10小時以得到一種抗原固定化平板。

(2) ELISA

上述(1)製備之抗原固定化平板用阻斷溶液如含牛血清白蛋白(BSA)及Tween 20之磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)清洗。然後將阻斷溶液調配至各井內，接著在室溫培養數小時以產生阻斷。抽吸去除阻斷溶液後，上述1(3)中製

五、發明說明(8)

得之抗體-酵素複合物溶液加至各井中，接著於0至50℃靜置反應數小時。反應後，清洗各井。然後，加生色受質溶液如H₂O₂及ABTS{2,2'-連氮基-貳(3-乙基苯駢噻啉-6-磺酸)之商品名}檸檬酸鹽緩衝劑(CB)至各井中，在室溫反應數十分鐘至數小時，接著加終止溶液如NaN₃之CB溶液。一部份終產物轉移至另一個新的聚苯乙烯微滴定平板以測量吸光度。

本檢測中，使用其上未固定抗原之微滴定平板作為空白組。

使用抗體-固定化珠之三明治EIA

(1) 抗體固定化珠之製備

小珠浸在乙醇中約10分鐘至數十分鐘，用適當緩衝液如PBS清洗。加相同的緩衝液後，進行脫氣數十分鐘，接著靜置於0至50℃水浴數十分鐘。

抗體溶液調整至足夠濃度，脫氣，然後靜置0至50℃水浴數十分鐘。

浸泡小珠的緩衝液由抽吸去除，加抗體溶液接著置放在0-50℃水浴中，連續攪拌數次，於0至50℃培養器中培養數小時至數10小時。抽吸去除抗體溶液，清洗小珠，加阻斷溶液如BSA之PBS溶液，接著置0至50℃水浴中數小時以發生阻斷作用。抽吸去除阻斷溶液，清洗小珠加同樣溶液，接著保存在4℃。

(2) 使用小珠的三明治EIA

五、發明說明(9)

用適當緩衝液如酪蛋白之PBS溶液製備之抗原溶液，以及上述1(3)中製備的抗體-酵素複合物置於管中，攪拌，其內放一個如上述(1)中製備的抗體-固定小珠。在室溫反應至少10小時後，清洗小珠。小珠送至新管內，其內加生色受質溶液出 H_2O_2 及ABTS於CB溶液，接著在0至50℃反應數十分鐘。添加終止溶液如 NaN_3 CB溶液終止反應，然後在415nm測量反應混合物之吸光度。

參考下列實例舉例說明本發明，但此等實例不欲限制本發明。

實例 1

1. 材料

NKY13抗體由EP 293262中所述使用融合瘤"NKY13"產生的NKY13抗體，其已於1987, 5, 26依據布達佩斯條約存放位於英國PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wilts European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), 登記號碼87052601。得自LS 180細胞(LS 180 G50I)之糖胜肽是一種標準抗原，購自Bio Chiba Co., Ltd。BSA(晶體)，胃蛋白酶，辣菜過氧化酶(HRP)，2-硫氨基乙胺(2-MEA)， α -甲基甘露糖甘，及L-聚溶胺酸購自西格瑪化學公司(Sigma Chemical Co.)，ABTS及酪蛋白購自百靈佳曼尼翰(Boehringer Mannheim)。N-(ϵ -馬來亞醯胺基己醯氧基)琥珀醯亞胺(EMCS)購自多金化學公司(Dojin Chemical Co.)，二甲基亞砷(DMSO)，戊

五、發明說明(10)

醛及 Tween 20來自納卡來公司 (Nacalai Tesque, Inc)

蛋白質-A西法洛斯 CL-4B柱, Con-A西法洛斯柱, CNBr-活化的西法洛斯 4B柱, 及 PD-10柱, 購自法馬西 (Pharmacia)公司。西萃空 (Centricon) 10, 30來自阿米空 (Amicon)公司, 聚乙烯氣微滴定盤來自法空 (Falcon)公司。聚苯乙烯小珠 (直徑 1/4 英寸) 購自免疫化學巴克公司 (Immunochemical and Bax Co.)。

抗-HRP單株抗體 (抗 HRP McAb) 購自芮特公司 (Zymet Co.) 及人類血清來自麥爾斯 (Miles) 公司。

速普洛斯 (Superose) 12柱層析是於 FPLC系統進行 (泵桶 P-500 (2個), 控制器 LCC-500, UV監測器 UV-1, 餾份收集器 FRAC-100) (法瑪西 (Pharmacia))。為測量吸收性, 使用分光光度計 UV-265 [島津 (Shimadzu) 公司] 及免疫讀計 NJ-200 (英頓 (Intemed))。

2. 抗體-酵素複合物

(1) NKY13抗體之純化

100毫克/17.5毫升 NKY13抗體 (Lot. BCS-1), 其由等價混合 0.01M 硼酸緩衝食鹽水 (BBS) (pH 8.5) 與 BCS-1 以調整混合物 pH 值成 8.5, 裝至先用 0.01M BBS (pH 8.5) 平衡之蛋白質-A西法洛斯 CL-4B柱。柱用 0.01M BBS (pH 8.5) 及 0.01M PBS (pH 6.0) 清洗柱後, 用 0.01M 檸檬酸緩衝食鹽水 (CBS) (pH 4.0) 溶離吸收物。溶離後利用已裝有 1M

五、發明說明(1)

Tris-HCl (pH 8.5) 之分離管立即提高溶離物之 pH 值。收集溶離所得之餾份 (pH 4.0) 作為純化 NKY13 抗體。

(2) 酵素-軛合抗體之製備

依據石川等人 (石川 E. 等人 J. Immunoassay 4, 209-327, 1983) 之方法製備酵素-軛合抗體。用酵素消化抗體以及還原 $F(ab')_2$ 之條件於 NKY13 抗體上新設立。

NKY13 抗體溶液，其如上述 (1) 中由蛋白質-A 純化，施用至利用先徑 0.1M CB (pH 4.8) 平衡的 PD-10 柱之明膠層析以進行緩衝液交換，然後利用西萃空 30 濃縮至 5.5 毫克/毫升。加胃蛋白酶溶液，用 0.1M CB (pH 4.8) 製備成 1 毫克/毫升，使胃蛋白酶/抗體之比例到達 1/400 以重量計，接著在 37°C 水浴中反應 30 分鐘。用 1M Tris 提升溶液 pH 以終止反應。所得物裝至先徑含 5mMEDTA 之 0.1M PB (pH 6.0) 平衡之速普洛斯 12 柱 (16/50) 上，用相同緩衝液以流速 1.5 毫升/分鐘溶離。於 280nm 測量每 0.75 毫升溶離物之吸收性以計算蛋白質之量，收集主尖峰部份作為 $F(ab')_2$ 餾份。

所得之 $F(ab')_2$ 餾份利用西萃空 30 濃縮至 5 毫克/毫升，其內加由含 5mM EDTA 之 0.1M PB (pH 6.0) 製得之 25mM 2-MEA 1/9 體積 (2-MEA 之終濃度為 2.5mM)，接著靜置於 25°C 水浴中 60 分鐘。所得物裝至先用含 5mM EDTA 之 0.1MPB (pH 6.0) 平衡之西法洛斯 12 柱 (16/15)，以 1.5 毫升/分鐘之流速溶離。在 285nm 測溶離物每 0.75 毫升之吸收

五、發明說明(12)

度計算蛋白質之數量，收集主要尖峰作為 Fab' 餾份。所得之 Fab' 餾份利用西萃空 10 濃縮至 4.0 毫克/毫升。利用石川等人之方法計算每 Fab' 分子之 SH 基團數目(石川，E 等人，ibid)。

同時，用 0.1M PB (pH 7.0) 製備的 11 毫克/1.65 毫升 HRP 與 8.8 毫克 EMCS 在 110 微升 DMSO 中於 0°C 反應 1 小時，同時振搖。所得物在 3000 rpm 離心 10 分鐘。所得上清液裝至先用 0.1M PB (pH 6.0) 平衡之 PD-10 柱上，收集無效餾份作為馬來醯亞胺 HRP。所得的馬來醯亞胺 HRP，其濃度經調整成 3.6 毫克/毫升與上述製得之 Fab' 餾份等價混合，接著在 4°C 靜置 20 小時。所得物裝至先前用含 0.2M NaCl 之 0.05M Tris-HCl (pH 7.2) 平衡之西法洛斯 12 (16/50) 內，用相同的緩衝劑溶離，流速 1.5 毫升/分鐘。在 280nm 處測量每 0.75 毫升溶離液之吸收性，收集第一個尖峰作為粗酵素-軛合的抗體餾份。

加 CaCl_2 及 MnCl_2 至粗酵素軛合抗體餾份致使各濃度達到 1mM。將餾份裝載至先經含 0.2M NaCl, 1mM CaCl_2 及 1mM MnCl_2 之 0.05M Tris-HCl (pH 7.2) 平衡之空 A 西法洛斯柱 (Con A Sepharose column (1.0 × 1.5 公分))。用相同緩衝液清洗柱。用含 0.5M α -甲基甘露糖苷之相同緩衝液溶離吸附物，收集作為純酵素-軛合抗體。

(3) 抗體-酵素複合物溶液之製備

含終濃度 10 微克/毫升上述 (2) 中製備的酵素-軛合抗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(13)

體之溶液，及終濃度為1, 3, 10或30微克/毫升用含0.1%酪蛋白PBS製備的抗-HRP McAb在室溫靜置2小時以得到一種抗體-酵素複合溶液。

作為陰性對照組，使用用0.1%酪蛋白PBS溶液製得之10微克/毫升酵素-軛合抗體。

3. 三明治EIA 敏感度之增加

使用抗原-固定化平板之直接ELISA

(1) 抗原固定化平板之製備

100微克/100毫升LS 180 G50I, 1.9毫升0.01M PBS (pH7.4), 及30微升戊二醛於PBS中之混合物20微升調配至聚乙烯氣微滴定平板之各井內在室溫靜置1小時。然後10微升L-聚溶胺酸, 其濃度經0.01M PBS調整至0.25毫克/毫升, 加至各井內, 接著在4℃靜置至少18小時以得到抗原固定化平板。

(2) ELISA

上述(1)中製備的抗原-固定盤之各井用含1% BSA及0.05% Tween 20(下文稱Tween緩衝液)之0.01M PBS 200微升(pH7.4)清洗3次。然後, 調配200微升Tween緩衝液至各井中, 接著於室溫培養1小時以發生阻斷。緩衝液經抽吸去除後, 20微升抗體-酵素複合溶液或陰性對照溶液, 其於上述2(3)中製備, 調配至各井內。平板在25℃靜置4小時以使抗體-酵素複合物與抗原反應。各井用200微升Tween緩衝液清洗3次。然後, 將100微升

五、發明說明(14)

含 2mM H_2O_2 及 4.3mM ABTS之 0.1M CB(pH4.5)之生色受質溶液調配至各井內。在室溫反應 30分鐘後，加 100 微升 0.76mM NaN_3 於 0.1M CB(pH4.5)中之溶液以終止反應。然後，150微升所得物送至另一個新的聚苯乙烯微滴定平板中，當吸光度數值高時在 415nm或 450nm測量吸光度。

結果，吸光度與抗體-酵素複合物中之抗-HRP McAb濃度增加成比例增加，當抗-HRP McAb之濃度是 10微克/毫升時，反應性增加至無抗-HRP McAb存在時之 4 倍(-○-圖 1)。

本檢測中，使用其中無固定化抗原的微滴定平板作為空白組(圖 1 之 -□-)。

使用小珠之三明治 EIA

(1) NKY13 抗體-固定化小珠之製備

聚苯乙烯小珠(直徑 1/4英吋)每珠浸於 0.15 毫升乙醇中 10分鐘，然後每珠用 0.2毫升 10mM PBS(pH7.4)清洗 3 次。每珠加 0.2 毫升 PBS 後，進行脫氣 30分鐘，接著靜置於 37℃ 水浴中 30分鐘。

用 10mM PBS(pH7.4)調整抗體溶液之濃度至 20微克/毫升，進行脫氣，溶液在 37℃ 水浴中靜置 30分鐘。

抽吸去除其內已浸泡小珠之 PBS，加每珠 0.2毫升抗體溶液至其內並混合。混合物靜置於 37℃ 水浴，以間隔 15 分鐘攪拌 4 次，接著送至 37℃ 培養器置 19.5 小時。抽吸

五、發明說明(15)

去除抗體溶液後，用10mM PBS(pH7.4)小珠3次，其內加含0.1%BSA之PBS溶液每珠0.2毫升，接著靜置於37℃水浴中2小時以產生阻斷。抽吸去除阻斷溶液，小珠用0.05%Tween 20之PBS溶液清洗5次，用PBS連續3次，加0.1%BSA之PBS溶液每珠0.2毫升，接著保存在4℃。保存1天後小珠用於三明治EIA中。

(2) 無抗原人類血清之製備

混合物，含50毫克NKY13抗體於20毫升0.1M重碳酸鹽緩衝液(pH8.3)及經1mM HCl膨脹之10毫升CNBr-活化的Sephrose 4B，在室溫下攪拌反應2小時，通過玻璃濾器過濾以收集Sephrose明膠。明膠經用1M乙醇胺(pH8.0)阻斷以得到NKY13抗體-固定化的Sephrose 4B。

30毫升人類血清以流速0.3毫升/分鐘裝載至先經0.01M PBS(pH7.4)平衡的NKY13抗體固定Sephrose 4B柱(1.0×8.0公分)上。去除第一個10毫升溶離物，其餘的經再循環以吸附存在於人類血清中之抗原。

(3) 標準抗體之製備

用含0.1%酪蛋白之PBS或上述製得之無抗原人類血清將LS 180 G50I調整至0.078, 0.313, 1.25, 5及10微克/毫升。

(4) 使用小珠之三明治EIA

上述(3)中製得之20微升標準溶液，100微升含0.1%酪蛋白之PBS溶液，及上述2(3)中製得含10微升/毫升

五、發明說明(16)

抗-HRP McAb之抗體-酵素複合物溶液置於管中並攪拌，其內放入一份NKY13抗體-固定化小珠。在室溫反應18小時，用2毫升0.05% Tween 20之PBS溶液清洗3次。小珠送入另一個新管內，其內加含2mM H_2O_2 ，4.3mM ABTS之0.1M CB(pH4.5)，接著在37°C反應30分鐘。加2毫升0.38mM NaN_3 之0.1M CB(pH4.5)終止反應。在415nm測量所得物之吸光度。

同時，使用抗體-酵素複合物溶液之陰性控制溶液，進行上述方法。結果，抗-HRP McAb之存在(圖2中之-O-)，與不存時比較(圖2中之-●-)增加反應性及敏感性4倍。

此外，改0.1%含酪蛋白PBS為無抗原人類血清作為標準溶液之溶劑，在415nm處空白組之吸光度自0.08-0.09降至0.028。

實例2

1. 酵素軛合抗體之製備

使用為對抗hANP之單株抗體的KY-ANP-I，一種依據石川等人之方法(石川，E等人，ibid)以如同實例1之方法製備的酵素軛合KY-ANP-I。

KY-ANP-I抗體可由EP 306309中所述利用融合瘤"KY-ANP-I"之方法製備，後者已於1987年8月20日依據布達佩斯條約存放在英國，PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wilts. 之European Collection of

五、發明說明 (17)

Animal Cell Cultures (ECACC), 登記號碼 87082001。

所得之酵素-軛合抗體溶於含 0.1% BSA 之磷酸鹽緩衝溶液中，使濃度達到 500 毫克/毫升，然後用於 EIA 中。

2. 抗-HRP 抗體溶液之製備

抗-HRP 多株抗體 (達可公司 (Dako Co.)) 溶於含 0.1% BSA 之磷酸鹽緩衝溶液中，使濃度到達 0.100 或 200 毫微克標記/毫升，然後用於 EIA。

3. AN111 抗體免疫珠之製備

AN111 抗體固定化珠，其抗體是鑑識 ANP 之 C-端的單株抗體，依據實例 1 中對 NKY13 抗體固定小珠之相同方法製備。

AN111 抗體由 EP 393640 中所述之方法利用 "老鼠融合瘤 AN111" 製備，其已於 1988 年 12 月 20 日依據布達佩斯條約存放在日本茨城縣筑波市 305，東一丁目 1-3 之工業科技院醱酵研究所，登記號碼為 FERM BP-2197。

4. 標準溶液之製備

hANP (胜肽 (Peptide) 公司) 溶於含 0.1% BSA 之磷酸鹽緩衝溶液中，使濃度到達 20, 60, 200, 600 或 2000 pg/毫升，然後用於 EIA 中。

5. 使用小珠之夾層 EIA

100 微升標準溶液，100 微升酵素軛合抗體溶液，100 微升抗-HRP 抗體溶液置於試管中並攪拌，其內放入一份 AN111 抗體固定化小珠。在 4℃ 反應 20 小時後，小珠用 2

五、發明說明(18)

毫升 0.05% Tween 20 之 PBS 溶液清洗 3 次。小珠轉送至另一個新管內，其內加 300 微升生色受質溶液 (0.1M CB, pH4.5, 含 2mM H_2O_2 及 4.3mM ABTS)，接著在 37°C 反應 30 分鐘。添加 2 毫升含 0.38mM NaN_3 之 0.1M CB (pH4.5) 終止反應。於 415nm 測量所得物之吸收性。

結果，100 毫微克 / 毫升及 200 毫微克 / 毫升抗 -HRP 抗體之存在 (分別為圖 3 中之 - Δ - 及 - \square -) 與不存在者 (圖 3 中 - \circ -) 一樣增加反應性及吸光度 3 倍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：

抗體-酵素複合物及其酵素免疫

分析用途

本發明有關抗體-酵素複合物，其中第一抗體通過一種橋連劑與酵素軛合，酵素免疫性地與第二抗體結合，以及有關使用此抗體-酵素複合物之酵素免疫檢測。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

英文發明摘要(發明之名稱：

ANTIBODY-ENZYME COMPLEX AND
ENZYME IMMUNOASSAY USING IT

The present invention relates to an antibody-enzyme complex wherein a first antibody is conjugated with an enzyme through a bridging agent, and the enzyme is immunologically bound to a second antibody, and to an enzyme immunoassay using the antibody-enzyme complex.

附註：本案已向 日本 國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

1991年5月29日特願平3-155594號

205096

公告本

申請日期	810522
案號	81100002
類別	G01N 33/535

81113

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書 (81年11月修正)

一、發明名稱	中文	抗體-酵素複合物及其酵素免疫分析用途
	英文	ANTIBODY-ENZYME COMPLEX AND ENZYME IMMUNOASSAY USING IT
二、發明人	姓名	1. 今川敬一 2. 小杉葉子
	籍貫 (國籍)	1-2皆為日本國
	住、居所	1. 大阪府寢屋川市木屋元町5-8-703 2. 大阪府堺市高倉台4-4-3
三、申請人	姓名 (名稱)	鹽野義製藥股份有限公司 (塩野義製藥株式會社)
	籍貫 (國籍)	日本國
	住、居所 (事務所)	大阪府大阪市中央區道修町3丁目1番8號
	代表人 姓名	吉利一雄

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

205096

82年3月10日 修正

公告 卷7
B7
C7

D7

六、申請專利範圍

第 81104002 號「抗體-酵素複合物及其酵素免疫分析用途」

專利案

(82年3月修正)

1. 一種抗體-酵素複合物，其中第一抗體通過橋連劑軛合至酵素選自洋芥過氧化酶， β -半乳糖苷酶，葡萄糖氧化酶，鹼性磷酸酯酶，溶菌酶，葡萄糖-6-磷酸鹽脫氫酶，蟲螢光素酶，小過氧化酶，細胞色素C，氧化還原酶，羧酸酯酶，芳基硫酸酶，轉化酶，酒精脫氫酶，黃嘌呤氧化酶，丙酮酸激酶，丙酮酸氧化酶，來自 *arthromyces ramosus* 之過氧化酶，羧基胜肽酶 A，羧基胜肽酶 B，澱粉酶，上述酵素軛合抗體與抗此酵素之第二抗體免疫地結合。
2. 依申請專利範圍第 1 項之複合物，其中該第一抗體是抗體片段。
3. 依申請專利範圍第 2 項之複合物，其中該抗體片段是 Fab'。
4. 依申請專利範圍第 1 項之複合物，其中該第一抗體是 IgG。
5. 依申請專利範圍第 1 項之複合物，其中該第一抗體是 NKY13 抗體或 KY-ANP-I 抗體。
6. 依申請專利範圍第 1 項之複合物，其中該酵素是洋芥過氧化酶。

六、申請專利範圍

7. 依申請專利範圍第1項之複合物，其中該橋連劑是 N-(ϵ -馬來醯亞胺基己醯氧基)琥珀醯亞胺。
8. 一種酵素免疫檢測法，其使用依申請專利範圍第1項之複合物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

205096

修正補充
81年11月13日

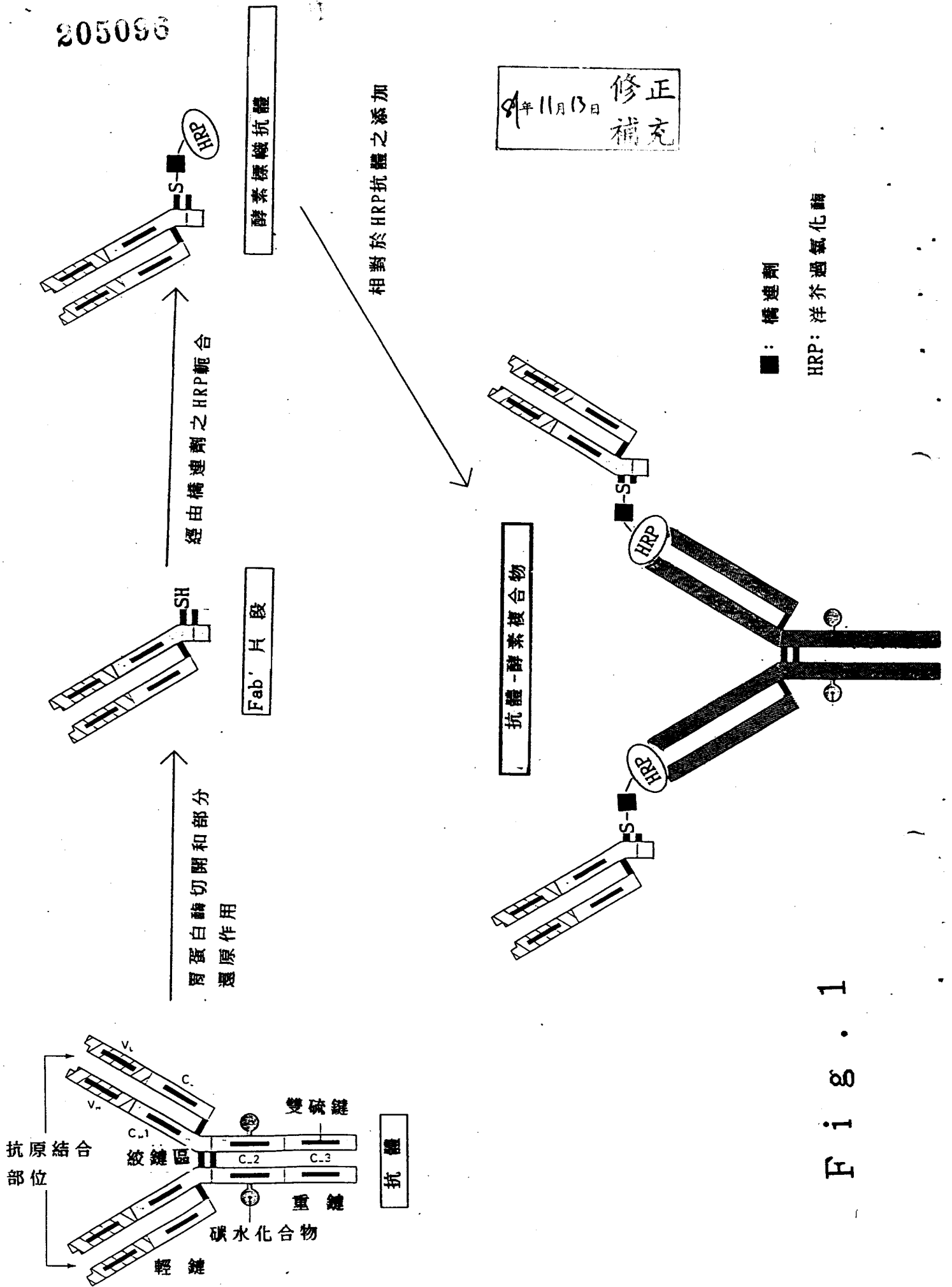
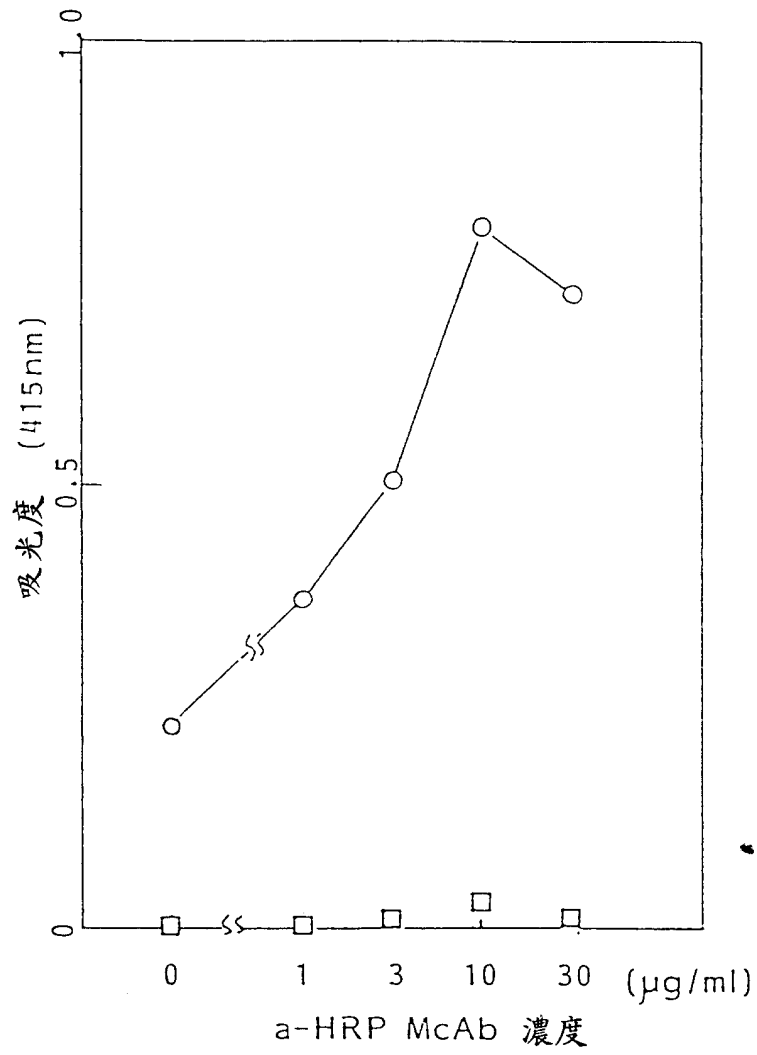
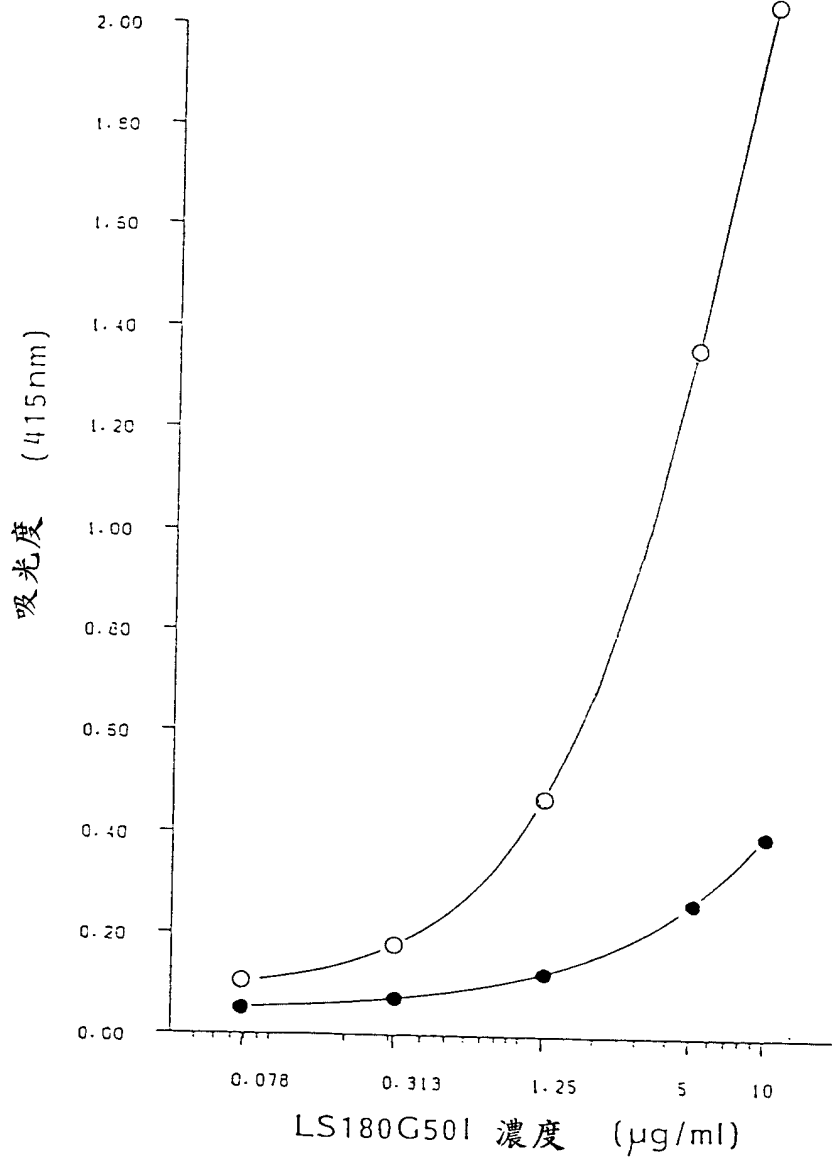


Fig. 1

第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖

