

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01819885.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年8月19日

[11] 授权公告号 CN 100529758C

[22] 申请日 2001.11.27 [21] 申请号 01819885.6

[30] 优先权

[32] 2000.11.30 [33] DE [31] 10059720.3

[86] 国际申请 PCT/EP2001/013780 2001.11.27

[87] 国际公布 WO2002/044731 德 2002.6.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.5.30

[73] 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 B·乌普梅尔 D·施利珀

F·多尼

[56] 参考文献

US5258501 1993.11.2

DE2615349 1976.10.14

审查员 李 冰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 孟凡宏

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称

分子内共价交联蛋白质作为免疫测试中的结合配偶体的用途

[57] 摘要

本发明涉及分子内共价交联蛋白质的用途，涉及 HIV 的共价交联的逆转录酶作为免疫测试中免疫结合配偶体的用途，还涉及检测样品中分析物的免疫测试方法，其中使用分子内共价交联蛋白质作为结合配偶体，并且涉及 HIV 的分子内共价交联逆转录酶以及这些逆转录酶的制备方法。

1. 分子内共价交联的 HIV 逆转录酶作为免疫测试方法中免疫结合配偶体的用途，所述逆转录酶由以下方法制备

- 提供溶解形式的逆转录酶
- 任选地使逆转录酶与 SH 基团的封闭剂反应
- 用含水缓冲液透析混合物
- 激活的逆转录酶与交联试剂 3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯反应
- 任选地终止反应
- 通过透析从反应产物分离过量的反应物。

2. 检测样品中分析物的免疫测试方法，其特征在于使用权利要求 1 的分子内共价交联的 HIV 逆转录酶作为免疫结合配偶体。

3. 权利要求 1 的分子内交联的 HIV 的逆转录酶的制备方法，包括下面的步骤：

- 提供溶解形式的逆转录酶
- 使逆转录酶与 SH 基团的封闭剂反应
- 用含水缓冲液透析混合物
- 激活的逆转录酶与交联试剂 3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯反应
- 终止反应
- 通过透析从反应产物分离过量的反应物。

4. 一种组合物，其由权利要求 3 方法制备的分子内共价交联的 HIV 逆转录酶组成，其特征在于只有逆转录酶的两个亚基彼此共价交联，其中没有数个逆转录酶分子之间的彼此连接存在。

5. 权利要求 4 制备的分子内共价交联的 HIV 逆转录酶，其特征在于使用 3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯作为交联剂。

分子内共价交联蛋白质作为 免疫测试中的结合配偶体的用途

技术领域

本发明涉及分子内共价交联蛋白质的用途，特别是来自 HIV 的分子内共价交联的逆转录酶作为免疫测试中免疫结合配偶体 (Bindopartner) 的用途，其中使用分子内共价交联蛋白质作为结合配偶体的检测样品中分析物的免疫测试方法，涉及来自 HIV 的分子内共价交联逆转录酶和这种逆转录酶的制备方法。

背景技术

蛋白质作为用于在免疫诊断试验方法中检测分析物的结合配偶体的用途已经公知了很长时间了，在所有的常规免疫测试中，样品与一种或多种对该分析物特异性的结合配偶体温育。这一种或多种结合配偶体特异性结合要检测的分析物。在抗体试验的情况下，例如在 HCV 感染情况下，要检测的样品例如与特异性结合要测定的抗-HCV-抗体的 HCV 抗原接触。在例如为了检测肿瘤标记物前列腺特异性抗原 (PSA) 的抗原试验中，样品与特异性结合样品中 PSA 的抗体接触。

接着在所有的免疫测试中检测分析物。可以例如通过结合并且接着检测另一种结合配偶体来进行，所述结合配偶体带有与分析物和免疫结合配偶体形成的复合体结合的可检测标记。

免疫测试一般以异源或同源试验形式进行。异源试验形式常常以夹心或桥式试验进行。竞争方法是公知的，其中通过例如加入标记的分析物类似物从分析物和特异性结合配偶体的复合体置换分析物或者特异性结合配偶体。

在所有的免疫测试方法中，用作特异性免疫结合配偶体的反应物以稳定形式存在并且它们不会被例如因为不适宜的贮存条件破坏这一点是重要的。特别是当用作特异性结合配偶体的蛋白质由几个亚基 (Untereinheiten) 构成时才出现这种危险。所述亚基可以通过共价键，例如通过二硫桥，或非共价键，例如通过氢桥，相反电荷和/或疏水性相互作用连接在一起。

在某些情况下，免疫测试需要的材料 (例如作为液体试剂) 在为试验制备的工作溶液中在贮存条件下或者在免疫反应期间本身可能变得不稳定并变性。结果蛋白质的三级和四级结构可以以这样一种方式

变化，使得该物质不再能够在免疫测试中使用。

可以在不适宜的条件下彼此分开用作特异性结合配偶体对的蛋白质的亚基成分。在天然共价桥的情况下，可以例如通过普通缓冲液添加剂例如 DTT 将二硫桥还原以引起亚基的离解。

但是，通过电荷或疏水性作用结合在一起的蛋白质的非共价连接亚基的离解的危险甚至更大。这样的蛋白质的亚基即使通过普通缓冲液添加剂，例如盐或去污剂或者不适宜的 pH-和温度变化都非常容易离解。因此各个的在一定程度上没有保护的亚基也容易变性。这可能导致蛋白质的三级结构或者各个亚基的大的变化。这也意味着免疫学性质，例如重要表位的可接近性变化到这样的程度，使得在免疫测试中用作结合配偶体的蛋白质不再被免疫识别，即不再特异性结合。

亚基离解的另一个危险是带有不同的标记基团的亚基由于化学平衡调节而再次离解。在一个具体的情况下，在桥式试验形式中在抗体试验中使用的两个亚基构成的蛋白质一方面为了使用普遍适用的固相而被衍生化，另一方面，相同的蛋白质也被用作产生信号的成分，并且为了这个目的与标记物（例如酶，荧光素或化学发光标记）偶联，所以可能发生下面的情况：最初由阳性样品（含有分析物的样品）产生的校正曲线随着时间的进程而变平。阴性样品（空白值）信号增加并且越来越增加接近上面的阳性样品值使得不再可能区分没有分析物和含有分析物的样品的差异。

德国专利申请 DE2615349 中描述了通过与醌反应而化学修饰酶的方法。这些修饰作用提高了导致提高的酶活性的稳定性。指明了酶分子可以彼此交联，即分子间和分子内交联。在这种情况下免疫反应表位的保留不起任何作用。没有描述在免疫诊断方法中使用用醌修饰的酶。

Debyser 和 De Clercq (Protein Science 1996, 5, 278-286 页) 描述了利用 suberimidate 二甲酯交联 HIV-1 逆转录酶 (RT) 的两个亚基，这样，赖氨酸侧链彼此连接。交联的目的是研究两个 RT 亚基的二聚作用。只有二聚 RT 才是酶学活性的。这两个亚基在各种抑制剂的存在下共价交联。化学交联反应之后形成取决于抑制剂效力而较强或较弱交联的 RT 分子和多聚体。交联对免疫相关表位的作用或者免疫测试中交联分子的使用是不重要的。

EP-A-0331068 中公开了在免疫测试中使用分子间交联的免疫球蛋白。这意味着数个免疫球蛋白分子或者其片段彼此共价连接在一起。抗体及其片段的多聚体被用作减少干扰的试剂。交联免疫球蛋白及其片段是为了消除针对免疫球蛋白的人血清中的干扰因子。

现有技术描述的在天然条件下由数个亚基构成的交联蛋白用作抗原或免疫结合配偶体是不适合的或者只有有限的适合性，因为一般形成数个蛋白质分子组成的分子间多聚体。这些多聚体对于免疫测试只有有限用途，因为它们通常不具有确定的大小。因此多聚体只具有随机大小分布，即单体，二聚体，三聚体，四聚体等共同存在于一个混合物中。不确定的交联可以屏蔽表位。结果例如要检测的样品抗体可能不能与被屏蔽的抗原表位结合，因此会获得假阴性结果。

使用多聚体作为免疫结合配偶体的另一个问题是这样的事实，即干扰因子与样品中存在的多聚体蛋白质非特异性结合的危險增加。干扰因子，例如类风湿病因子经常具有数个低亲和力结合位点。那么如果多聚体蛋白质被用作免疫结合配偶体，则可能会具有特别是干扰因子会发现很多靶点，即多聚体蛋白质上的结合位点。因此这可能导致假阳性试验结果，而且免疫测试的特异性总体上就大大降低。

发明内容

因此本发明的目的是提供可以在免疫测试中用作结合配偶体的具有改善的稳定性的蛋白质。以这种方式改进的蛋白质应该具有好的表位可接触性，并且应该保留其中使用该蛋白质的免疫测试方法的特异性。

根据独立权利要求所述的发明达到本发明的这个目的。从属权利要求代表优选的实施方案。

令人惊奇地发现能够制备几乎专一地分子内交联的蛋白质而且不损失它们的免疫学特性，并且这些蛋白质可以作为免疫结合配偶体以有利方式在免疫测试程序中使用。这样基本上避免了蛋白质没有交联时存在的稳定性问题。因此本发明涉及在免疫测试程序中使用分子内共价交联蛋白质作为免疫结合配偶体。

本领域技术人员熟知的免疫测试方法中要求的所有的蛋白质可以用作这种蛋白质。可以使用所有的由于其折叠，即其三级或四级结构可倾向于在免疫测试的条件下损失其折叠，变性或在其各种亚基中高解的多肽。当发生这样的结构变化时，存在着免疫学重要的表位以这

样一种方式改变使得例如它们不再被抗体特异性结合这样的危险。在最坏的情况下，这意味着免疫测试结果是阴性的，即没有指明存在要检测的抗体，因为用作结合配偶体的蛋白质变性了。通过使用根据本发明的分子内共价交联的蛋白质基本上避免了这些缺点。

特别地，使用天然由数个亚基构成的那些分子内共价交联的蛋白质。优选使用 DNA-或 RNA-聚合酶，特别优选来自 HIV 的逆转录酶，非常特别优选来自 HIV-1 的逆转录酶。

蛋白质的来源可以是任意天然的。要使用的蛋白质可以从自然来源，即例如生物体或病毒分离。但是使用遗传工程制备的重组蛋白质是优选的。非常特别优选使用由例如 Müller 等，*J. Biol. Chem.* 264/24: 13975-13978 (1989) 中描述的表达克隆表达的重组制备的纯化 RT。

对于分子内共价交联的蛋白质来说，交联不改变免疫识别重要的表位或只是稍微改变使得另外的免疫结合配偶体在测试中和没有交联的蛋白质一样好地精确地良好地识别并且特异性结合交联蛋白这一点是重要的。因此交联应该不产生任何有可能使得测试结果失真的免疫学相关制品。

术语蛋白质指由至少大约 50 个氨基酸，优选至少 100 个氨基酸组成的所有的多肽。术语蛋白质还包括修饰的蛋白质，例如与糖基，唾液酸或脂质结构连接的蛋白质。

术语“分子内共价交联”指其多肽链以这样一种方式通过化学修饰连接在一起使得其不再解折叠，即它不再丧失其三级结构并且因此易于接近重要的表位的蛋白质。在蛋白质由数个亚基组成的情况下，分子内共价交联保留了三级结构和四级结构。修饰作用阻止各种多肽链彼此离散。

共价键只是在蛋白质分子内存在这一点是重要的。在蛋白质只是由一个多肽链组成和因此在自然条件下只有一个亚基组成情况下，连接多肽链内至少两个位点。因此分子内共价交联不形成数种蛋白质构成的低聚物。这样的低聚物在下文中也称为聚合物或多聚体。因此只有化学连接物质在蛋白质中共价连接并且总质量因此稍微提高的话，分子内共价交联蛋白质的分子量才增加。

在由数个亚基构成的蛋白质的情况下，根据本发明的连接只存在

于也天然形成完整的蛋白质分子的那些亚基之间。这意味着根据本发明的分子内共价交联蛋白质的大小和分子量只是因为交联化学物质而稍有提高。几乎不排除数个蛋白质分子内的连接，这样形成蛋白质的低聚物或甚至聚合物。

根据本发明，在交联之前或之后可以用其它修饰基团提供给交联蛋白质，该其它修饰基团例如是用作标记的抗原或者为了使交联蛋白质结合到固相所需要的。这里例如提及与生物素或链霉抗生物素蛋白或者产生信号的标记基团例如酶，荧光素或化学发光团的连接。这样的修饰作用是本领域技术人员熟知的。这些修饰作用应该不改变根据本发明的分子内共价交联蛋白质的免疫学性质，或者只是改变至这样一种程度使得仍然保证免疫测试中特异性结合配偶体的识别作用。

例如利用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 接着用考马斯蓝染色能够检测蛋白质基本上专一的分子内键合，特别是在蛋白质具有四级结构的情况下。蛋白质根据本发明交联之后，应该不可能用肉眼检查到在 SDS-PAGE 凝胶中大于蛋白质天然分子量的任何分子量。如果例如使用 8-25% 聚丙烯酰胺商售小型化 SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶 (从 Pharmacia 公司获得的 Phast™ 系统)，则每条泳道 (Spur) 使用的蛋白质的量是大约 500ng。在该量下根据本发明在该系统中用肉眼不能觉察大于天然分子量的分子量。在天然具有数个亚基，即数个多肽链的蛋白质情况下，交联后泳带分子量应该不超过亚基分子量的总和。具有相当于亚基分子量总和的分子量的凝胶上的蛋白质泳带可以被认为是具有四级结构的蛋白质的成功分子内交联的检验。因此 SDS-PAGE 可以被用来检验一方面由数个亚基构成的蛋白质并且另一方面没有多聚体的成功的分子内交联。

检测多聚体不存在的另一种方法是利用凝胶渗透色谱法，也称为凝胶排阻色谱法，可以例如使用商售 HPLC 仪器进行。具有相当于各个蛋白质的多聚体的分子量的复合体远早于单独存在的蛋白质被洗脱出来。根据本发明，应该只有极低百分数的这样的多聚体存在。如果以 HPLC 色谱的积分测量，则意味着相对于根据本发明的只有分子内交联的蛋白质的洗脱峰 (积分) 应该存在最高大约 5% 的多聚体。

免疫结合配偶体指在免疫测试条件下能与其它分子特异性结合的所有分子。特别地，免疫结合配偶体应该能够特异性结合分析物或

者与分析物结合的物质。常见典型构象是抗体与抗原的特异性结合，例如抗-PSA 抗体与 PSA 的结合。抗体和抗原是免疫结合配偶体。根据本发明，分子内共价交联蛋白质在免疫测试中被用作免疫结合配偶体。当意在检测针对这些抗原的抗体时，抗原优选被用作免疫结合配偶体。在这种情况下，利用根据本发明交联的 HIV 逆转录酶检测抗-HIV-RT-抗体是优选的并且在下面的段落中描述。

本发明还涉及在样品中检测分析物的免疫测试方法。该方法特征在于分子内共价交联蛋白质被用作免疫结合配偶体。发现分子内共价交联蛋白质，特别是天然由数个亚基构成的那些，在免疫测试条件下比没有交联的蛋白质稳定得多。

免疫测试的各种形式和实施方案以及各种检测方法，例如利用酶反应，荧光或化学发光物质对于本领域技术人员来说是熟知的，因此不需要在这里具体描述。根据本发明优选异源测试形式，其中在免疫反应完成之后分离固相和液相。

所述方法优选是诊断 HIV 感染的免疫测试。如果患者有 HIV 感染，可以以抵抗血液，血清或血浆样品中病毒的某些抗原而产生的抗体为基础进行检测。经常还可以检测 HIV 病毒抗原本身，例如 HIV-1 的 p24 抗原。这要求使用特异性的抗 HIV-抗原-这里抗 p24 定向的抗体。

经常以组合式抗原和抗体检测试验进行样品中 HIV 感染的检测。这些试验也称作组合式试验。这样一种组合式试验在 W098/40744 中有描述。这里，不仅是 HIV-抗原，即 HIV-1 或 HIV-1 亚型 O 的 p24 抗原和相应的 HIV-2 的 p26 抗原借助特异性抗体被检测，而且抗 HIV 定向的对病原体的包膜蛋白，例如 HIV-1 的 gp160, gp120, gp41 和 HIV-2 的 gp140, gp110, gp36 的抗体也可以。另外，在根据 W098/40744 的组合式试验中也检测抗 HIV-RT 抗体。为此目的，使用重组产生的 HIV-1 逆转录酶作为免疫结合配偶体，然而其不是分子内共价交联的。

根据本发明，在检测样品中 HIV 感染的组合式试验中优选使用来自 HIV 的分子内共价交联 RT，特别是来自 HIV-1 的 RT。

本发明的另一个主题是来自 HIV 的分子内共价交联的逆转录酶，这是一种天然存在的有两种亚基的酶。HIV RT 在天然条件下作为异二聚体存在。HIV-1 RT 由一个 51kDa 的亚基和一个 66 kDa 的亚基组成。重组形式可以例如从表达克隆获得（例如，Müller 等，

J. Biol. Chem. 264/24:13975-13978)。由于氨基酸水平大约 60%，一些片段中甚至 100% 的同源度，一般也可以使用 HIV-1 RT 来检测抗 HIV-2 RT 的抗体。术语 HIV 包括 HIV-1 和 HIV-2 和病毒的所有的亚型和亚类，例如 HIV-1 亚型 O。优选分子内共价交联形式的 HIV-1 RT。

令人惊奇地发现分子内共价交联 HIV RT 在免疫测试条件下比没有交联的形式稳定得多。根据本发明的 RT 比没有交联的形式好得多，即使负载以温度例如更长更不合适贮存或即使在测试条件下。根据本发明的分子内共价交联 RT 特征在于两个亚基彼此共价连接在一起，其中没有数个分子的分子间连接。例如用如已经阐明的通过使用凝胶排阻色谱法或用 SDS-PAGE 分析检测不存在数个 RT 分子的低聚物。

优选使用同-和异-双官能连接剂 (Linker) 作为交联剂。特别地，优选使用下面的物质将 RT 分子内交联：MHS (3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)，EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺)，DSS (二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)，HSAB (N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯)，磺基-SANPAH (磺基琥珀酰亚胺基-6(4'-酰氨基-2'-硝基苯基酰胺基) 己酸酯)。如已经阐明的，交联连接剂的化学反应只导致蛋白质的分子内交联或者两个 RT 亚基的分子内交联而没有几个 RT 分子之间的彼此交联这一点是重要的。另外，该化学反应不破坏免疫相关表位这一点是重要的。

本发明的另一个主题是制备分子内交联 HIV 的逆转录酶的方法，该方法包括下面的步骤

- 提供溶解形式的 RT
- 任选地使 RT 与 SH 基团的封闭剂 (Blockierungsreagenz) 反应
- 用含水缓冲液透析混合物
- 激活的 RT 与下列交联试剂之一反应

MHS (3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)，EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺)，DSS (二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)，HSAB (N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯)，磺基-SANPAH (磺基琥珀酰亚胺基-6(4'-酰胺基-2'-硝基苯基酰胺基) 己酸酯)

- 任选地终止反应
- 通过透析从反应产物分离过量的反应物

- 任选地用 UV 光照射透析过的反应产物。

RT 与交联剂的优选化学计量是大约 1: 1 至 1: 20。选择反应物比例，使得数个 RT 分子彼此之间没有低聚作用或者只有可忽略的低聚作用。

附图说明

图 1 说明交联后获得的 RT 的分子量借助凝胶渗透色谱的分析。

具体实施方式

通过下面的实施例进一步阐明本发明。

实施例 1

HIV-1 逆转录酶的分子内交联

a) 用 MHS 交联

在 50mM 二乙醇胺，pH8.8，25 mM NaCl，1 mM DTT，1 mM EDTA 中溶解 HIV-1 逆转录酶（10 毫克 / 毫升）。通过加入 1M KH_2PO_4 溶液将 pH 调节至 6.4。

通过加入适当等份的 1M NMM (N-甲基马来酰亚胺) 的 DMSO 溶液将混合物调节至 5 mM NMM，并且接着在搅拌下在 25℃ 下培育 60 分钟。接着用 50mM 二乙醇胺，pH8.8，25 mM NaCl 透析。

通过加入 1M KH_2PO_4 溶液将 pH 调节至 7.0。在 DMSO 中制备 MHS (3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯) 贮备溶液 (5 毫克 / 毫升)。向混合物中加入相当于 1: 8 (逆转录酶摩尔数 / MHS 摩尔数) 量的最初化学计量的该溶液，然后在搅拌下在 25℃ 下再培育 60 分钟。通过以 10 mM 终浓度向反应混合物加入赖氨酸终止反应，并且再培育 30 分钟。通过用 10 mM 磷酸钾缓冲液，pH6.0，50 mM NaCl，1mM EDTA 透析分离过量的反应物。

透析之后，通过加入 1M K_2HPO_4 溶液将 pH 调节至 7.4，加入半胱氨酸至 2 mM 终浓度之前，混合物在搅拌下在 25℃ 下再培育 4 小时。又培育 30 分钟之后，加入 NMM (终浓度 5 mM) 终止反应。混合物用 50mM 二乙醇胺，pH 8.8，25 mM NaCl 透析。

b) 用 EDC 交联

在 50mM 二乙醇胺，pH8.8，25 mM NaCl，1 mM DTT，1 mM EDTA 中溶解 HIV-1 逆转录酶（10 毫克 / 毫升）。通过加入 1M KH_2PO_4 溶液将 pH 调节至 6.4。

通过加入适当等份的 1M NMM (N-甲基马来酰亚胺) 的 DMSO 溶液使混合物达到 5 mM NMM，并且接着在搅拌下在 25℃ 下培育 60 分钟。接

着用 10mM 磷酸钾缓冲液, pH7.0, 50 mM NaCl 透析。

在 DMSO 中制备 EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺) 贮备溶液 (2 毫克/毫升)。向混合物中加入相当于 1: 10 (逆转录酶摩尔数/EDC 摩尔数) 量的最初化学计量的该溶液, 然后在搅拌下在 25℃ 下再培育 60 分钟。通过用 25 mM 磷酸钾缓冲液, pH7.0, 50 mM NaCl 透析分离过量的反应物。

c) 用 DSS 交联

在 50mM 二乙醇胺, pH8.8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA 中溶解 HIV-1 逆转录酶 (10 毫克/毫升)。通过加入 1M KH_2PO_4 溶液将 pH 调节至 6.4。

通过加入适当等份的 1M NMM(N-甲基马来酰亚胺)的 DMSO 溶液使混合物达到 5 mM NMM, 并且接着在搅拌下在 25℃ 下培育 60 分钟。接着用 10mM 磷酸钾缓冲液, pH8.0, 25 mM NaCl 透析。

在 DMSO 中制备 DSS(二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)贮备溶液 (2 毫克/毫升)。向混合物中加入相当于 1: 10 (逆转录酶摩尔数/DSS 摩尔数) 量的最初化学计量的该溶液, 然后在搅拌下在 25℃ 下再培育 60 分钟。通过用 25 mM 磷酸钾缓冲液, pH7.0, 50 mM NaCl 透析分离过量的反应物。

d) 用 HSAB 交联

在 50mM 二乙醇胺, pH8.8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA 中溶解 HIV-1 逆转录酶 (10 毫克/毫升)。通过加入 1M KH_2PO_4 溶液将 pH 调节至 6.4。

通过加入适当等份的 1M NMM(N-甲基马来酰亚胺)的 DMSO 溶液使混合物达到 5 mM NMM, 并且接着在搅拌下在 25℃ 下培育 60 分钟。接着用 10mM 磷酸钾缓冲液, pH8.0, 25 mM NaCl 透析。

在 DMSO 中制备 HSAB (N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯) 贮备溶液 (2 毫克/毫升)。向混合物中加入相当于 1: 5 (逆转录酶摩尔数/HSAB 摩尔数) 量的最初化学计量的该溶液, 然后在搅拌下在 25℃ 下再培育 60 分钟。通过用 25 mM 磷酸钾缓冲液, pH7.0, 50 mM NaCl 透析分离过量的反应物。

接着用 UV 灯照射混合物 7 分钟。

e) 用磺基-SANPAH 交联

在 50mM 二乙醇胺, pH8.8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA 中溶解 HIV-1 逆转录酶 (10 毫克/毫升)。通过加入 1M KH_2PO_4 溶液将 pH 调节至 6.4。

通过加入适当等份的 1M NMM(N-甲基马来酰亚胺)的 DMSO 溶液使混合物达到 5 mM NMM, 并且接着在搅拌下在 25℃下培育 60 分钟。接着用 10mM 磷酸钾缓冲液, pH8.0, 25 mM NaCl 透析。

在 DMSO 中制备磺基-SANPAH(磺基琥珀酰亚胺基-6(4'-酰胺基-2'-硝基苯基酰胺基)己酸酯)贮备溶液(4 毫克/毫升)。向混合物中加入相当于 1: 5 (逆转录酶摩尔数/磺基-SANPAH 摩尔数)量的最初化学计量的该溶液,然后在搅拌下在 25℃下再培育 60 分钟。通过用 25 mM 磷酸钾缓冲液, pH7.0, 50 mM NaCl 透析分离过量的反应物。

接着用 UV 灯照射混合物 7 分钟。

实施例 2

HIV-1 逆转录酶专一分子内交联的检测

a) SDS 凝胶电泳

在 Phast-凝胶-仪器 (Pharmacia™) 上根据生产商的标准说明在 SDS 存在下通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析分子内交联 HIV-1 逆转录酶的等份。

没有交联的对照物只有相当于逆转录酶亚基的 66kD 和 51kD 分子量泳带。分子内交联逆转录酶展现 110-120 kD 分子量泳带,证明亚基之间成功的交联。检测不到较大的蛋白质复合体,即根据本发明交联方法不发生逆转录酶数个分子的分子间桥接。

b) 分析凝胶渗透色谱法

使用商售 HPLC 仪器根据生产商的标准说明在 TSK3000 柱 (Toso Haas™) 上通过凝胶渗透色谱法分析分子内交联 HIV-1 逆转录酶的等份。

分子内交联逆转录酶从柱子上洗脱出来,保留时间相当于具有 100-130 kD 分子量的球状蛋白(在这种情况下是 7.5 分钟)。检测不到在色谱法中有较短保留时间的较大蛋白质复合体,即根据本发明的交联方法不会导致逆转录酶数个分子之间桥接形成低聚物或聚合物结构。图 1 说明色谱法。

实施例 3

使用生物素标记物作为例子对分子内交联 HIV-1 逆转录酶的衍生化作用

分子内交联 HIV-1 逆转录酶 (参见实施例 1) 存在于二乙醇胺或磷酸钾缓冲液中。作为对照用 N-甲基马来酰亚胺处理没有交联的 RT, 并且用二乙醇胺透析。如果需要, 通过加入氢氧化钠在所有的 RT 混合物中将 pH 调节至 8.6-8.8。在 DMSO 中制备生物素-DDS (生物素基-二氨基二氧杂辛烷-二琥珀酰亚胺基辛二酸酯) 贮备溶液 (6 毫克/毫升)。向混合物中加入相当于 1:4 (逆转录酶摩尔数/生物素-DDS 摩尔数) 量的最初化学计量的该溶液, 然后在搅拌下在 25℃ 下再培育 60 分钟。通过以 10 mM 终浓度向反应混合物加入赖氨酸终止反应, 并且再培育 30 分钟。通过用 50 mM 二乙醇胺, pH8.8, 25 mM NaCl 透析分离过量的反应物。

实施例 4

功能试验中稳定性检测

在从 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim 公司购得的 Elecsys® 上进行免疫测试, 来检查 HIV-1 逆转录酶的稳定性。除了不含有抗-RT-抗体的阴性对照 (NK) 和含有抗-RT-抗体的阳性对照 (PK) 之外, 分别还检测具有抗-RT-活性的两种 HIV-阳性人血清。

为此, 37℃ 下 45 微升样品与 55 微升试剂 1 (生物素化 RT) 和 55 微升试剂 2 (钆-标记的 RT) 培育 9 分钟。接着加入链霉抗生物素蛋白-包被的磁珠, 再将混合物培育 9 分钟。然后通过磁性捕获磁珠, 并且定量测定电化学发光信号。

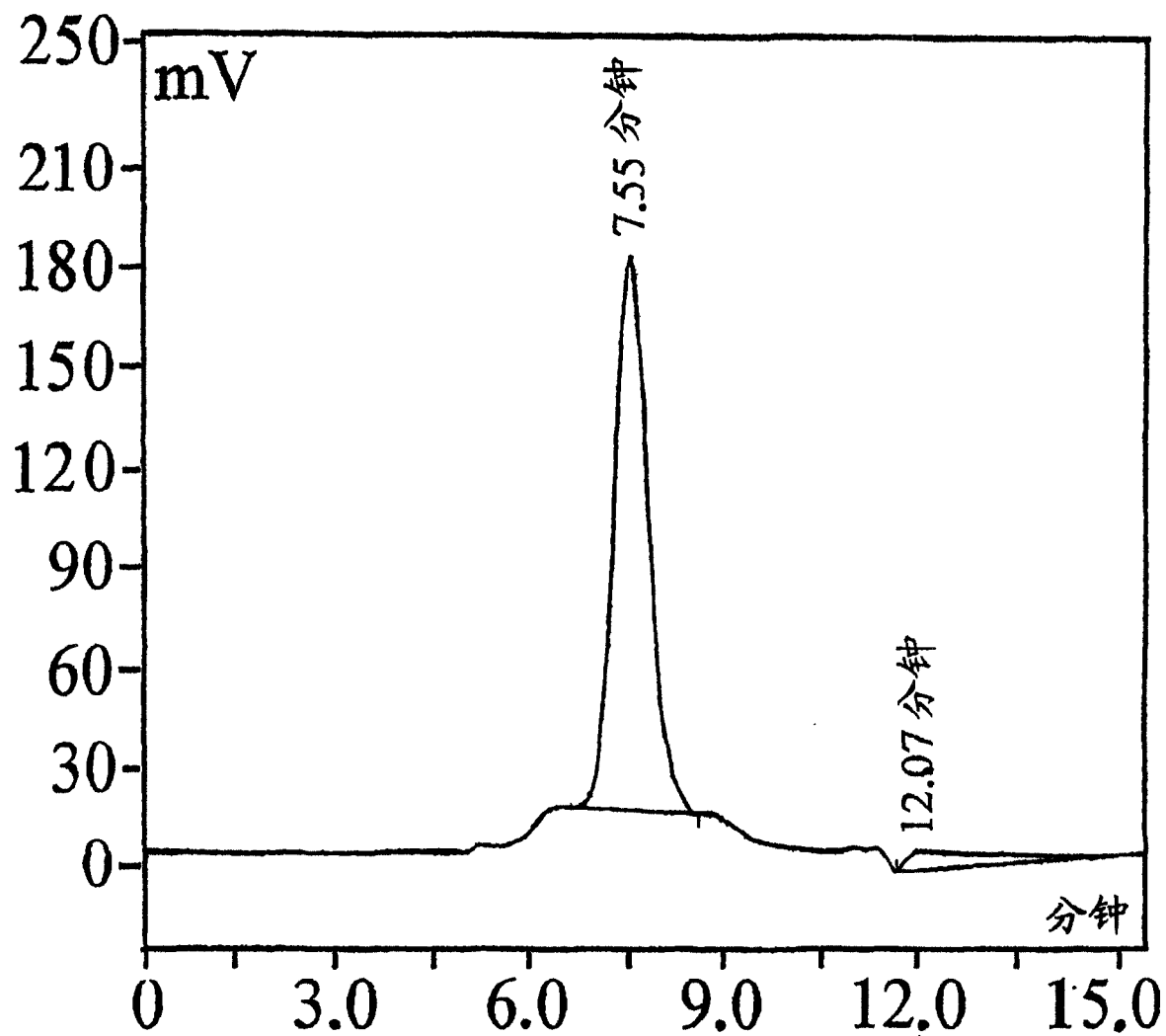
为了比较检测根据本发明交联形式的和没有交联形式的生物素化逆转录酶的稳定性, 在进行试验之前, 试剂 1 (生物素化 RT) 在 42℃ 下被培育 18 小时。同时制备的并且在 4℃ 下保存的试剂 1 用作参照物。分别新鲜制备所有的其他试剂用于实验。

通过信号动力学评估, 即测定所得信号和各种阴性对照的商。信号动力学数值越大, HIV 抗体-阳性和阴性样品之间差异越大。因此期望大的信号动力学范围。利用各个值之间的相互关系比较负载的 RT 和没有负载的 RT。结果在表 1 中给出。

表 1

重组 HIV-1-RT-Bi(DDS); 未交联						
样品	未负载		42°C 下负载18小时		负载/未负载的比较	
	量	信号动力学范围	量	信号动力学范围	量	信号动力学范围
阴性对照	1763	1.0	1049	1.0	60 %	100 %
阳性对照	16848	9.6	1480	1.4	9 %	15 %
HIV 血清 1	6209	3.5	1054	1.0	17 %	29 %
HIV 血清 2	5162	2.9	917	0.9	18 %	30 %
HIV 血清 3	5832	3.3	1150	1.1	20 %	33 %
HIV 血清 4	111444	63.2	6267	6.0	6 %	9 %
重组 HIV-1-RT (MHS)- Bi(DDS); 根据本发明交联的						
样品	未负载		42°C 下负载18小时		负载/未负载的比较	
	量	信号动力学范围	量	信号动力学范围	量	信号动力学范围
阴性对照	1304	1.0	1206	1.0	92 %	100 %
阳性对照	73335	56.2	77611	64.4	106 %	114 %
HIV 血清 5	8476	6.5	7092	5.9	84 %	90 %
HIV 血清 6	14504	11.1	10615	8.8	73 %	79 %
HIV 血清 7	69459	53.3	59347	49.2	85 %	92 %
HIV 血清 8	168674	129.4	168304	139.6	100 %	108 %

显示即使在升温下负载数小时之后，使用根据本发明交联的 RT 在免疫测试中信号的动力学范围与没有负载的 RT 相比仍然至少是 79 % 并且优选至少 90 %，而以阴性对照为基础的动力学范围在没有交联的 RT 下最多是大约 30 %，有时大大小于 30 %，或甚至低于 20 %。当使用没有交联的 RT 时，信号降至阴性血清水平，而根据本发明的交联的 RT 保持其免疫学功能。因此样品抗体识别的 RT 表位基本上保留，即使有热负载。这意味着根据本发明的交联的 RT 比没有交联的 RT 稳定得多。



峰号:	保留时间[分钟]	相对面积[%]
1	7.55	91.66
2	12.07	8.34

图 1

专利名称(译)	分子内共价交联蛋白质作为免疫测试中的结合配偶体的用途		
公开(公告)号	CN100529758C	公开(公告)日	2009-08-19
申请号	CN01819885.6	申请日	2001-11-27
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	B乌普梅尔 D施利珀 F多尼		
发明人	B·乌普梅尔 D·施利珀 F·多尼		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 C12N9/12 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/531 G01N33/56988		
代理人(译)	张元忠		
审查员(译)	李冰		
优先权	10059720 2000-11-30 DE		
其他公开文献	CN1478202A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及分子内共价交联蛋白质的用途，涉及HIV的共价交联的逆转录酶作为免疫测试中免疫结合配偶体的用途，还涉及检测样品中分析物的免疫测试方法，其中使用分子内共价交联蛋白质作为结合配偶体，并且涉及HIV的分子内共价交联逆转录酶以及这些逆转录酶的制备方法。