



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01110355.8

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1141581C

[22] 申请日 2001.4.6 [21] 申请号 01110355.8

[71] 专利权人 台湾元生生物科技股份有限公司

地址 台湾新竹市明湖路 482 巷 36 号

[72] 发明人 许宗雄 姚文法

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

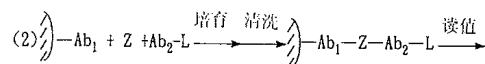
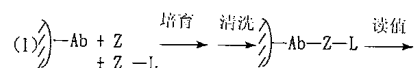
代理人 王学强

权利要求书 4 页 说明书 9 页 附图 5 页

[54] 发明名称 利用反应性染料选择性染色水溶性蛋白质的方法

[57] 摘要

本发明使用纺织工业用的反应性染料，来染色包括抗体在内的各种水溶性蛋白质。染料分子分别结合在组成蛋白质的氨基酸分子的羟基、氨基或硫醇基上。当染色对象是抗体时，被控制在酸性环境，以利于染料分子与抗体组成氨基酸或抗体分子恒定区低糖类碳水化合物上的羟基作用。在免疫分析中，当不需要用抗体来做标示配体时，在微碱性溶液中染色，蛋白质可染有较深颜色。蛋白质经活性染料染色后，未完全反应的染料分子，必须分离去除方能使用。纯化后各种颜色蛋白质稳定性很高，并可以通过真空冷冻干燥进一步提高其储存性。



1. 一种水溶性蛋白质的染色方法，其特征在于：利用一反应性染料让该水溶性蛋白质进行一染色反应，该反应性染料可选自于纺织工业所用的三氮六环苯与乙烯基砒系列反应性染料所组成的族群，而该染色反应是在一酸性或一碱性的环境下进行的，其中当该水溶性蛋白质是一抗体时，该染色反应是在酸性的环境下进行的，使染料分子作用于该抗体蛋白质氨基酸支链的羟基上、结构恒定区与重链部分的羟基上、以及与该抗体共轭的低聚糖的羟基上。

2. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：该染色反应进行所需的碱性环境的pH值10.5。

3. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：当该抗体是一肌红蛋白抗体时，该染色反应是在pH值4.8的酸性环境下进行的。

4. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：在利用该反应性染料染色该水溶性蛋白质之后，还包括利用管柱分离方法、分子筛、过滤膜、盐析或有机溶剂方式将游离的该染料分子与该染色的蛋白质分子分开。

5. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于酶联接免疫分析法的平板分析。

6. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于组织学的标的物显色及计量。

7. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于细胞学标的物显色及计量。

8. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的

该水溶性蛋白质，可应用于各种免疫凝集法的显色与计量。

9. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种电泳方法的显色与计量。

10. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种免疫色层分析法的显色与计量。

11. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种液相层析的应用。

12. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种传感器的应用。

13. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种核酸探针的染色及计量。

14. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种分析化学用途。

15. 一种水溶性蛋白质的染色方法，其特征在于：利用一反应性染料让该水溶性蛋白质进行一染色反应，该反应性染料可选自于纺织工业所用的三氮六环苯与乙烯基砒系列反应性染料所组成的族群，而该染色反应是在一酸性或一碱性的环境下进行的，其中当该水溶性蛋白质是一氨基端需被保护的水溶性蛋白质时，该染色反应在酸性的环境下进行，使染料分子作用于该氨基端需被保护的水溶性蛋白质氨基酸支链的羟基上、及共轭其上低聚糖的羟基上。

16. 根据权利要求15所述的方法，其特征在于：该染色反应进行所需的碱性环境的pH值10.5。

17. 根据权利要求15所述的方法，其特征在于：当该氨基端需被保护的水溶性蛋白质是一肌红蛋白抗体时，该染色反应在pH值4.8的

酸性环境下进行。

18. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：在利用该反应性染料染色该水溶性蛋白质之后，还包括利用管柱分离方法、分子筛、过滤膜、盐析或有机溶剂方式将游离的该染料分子与该染色的蛋白质分子分开。

19. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于酶联接免疫分析法的平板分析。

20. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于组织学的标的物显色及计量。

21. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于细胞学标的物显色及计量。

22. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种免疫凝集法的显色与计量。

23. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种电泳方法的显色与计量。

24. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种免疫色层分析法的显色与计量。

25. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种液相层析的应用。

26. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种传感器的应用。

27. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色的该水溶性蛋白质，可应用于各种核酸探针的染色及计量。

28. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：通过该方法染色

的该水溶性蛋白质，可应用于各种分析化学用途。

利用反应性染料选择性染色水溶性蛋白质的方法

技术领域

本发明涉及一种蛋白质染色的方法，且特别涉及一种利用反应性染料选择性染色水溶性蛋白质的方法。

背景技术

各种免疫分析法在临床诊断、食品品管、污染防治及科学研究各领域，应用越来越广泛。但无论那一类型免疫分析法，都必须把蛋白质标示起来，做为分析过程中的计量用途。如被测物 Z 是抗原 Ag，或是抗体 Ab，则可根据抗原、抗体的价格及取得的难易程度等因素，有如图 1 举例(1)及(2)的分析逻辑设计。此时，Ab1 和 Ab2 为抗被测物 Z 的两种不同性质的抗体，L 即是所谓标示配体(marker ligand)。当 L 是放射性元素时，这种方法被称为放射免疫分析法；当 L 是酶时，称为酶免疫分析法；L 是萤光物或化学冷光物时，称为萤光免疫分析法及冷光免疫分析法。总之，随着 L 的不同，免疫分析法有不同的计量方式，而冠之有不同名称。以上这四种方法是现阶段实用免疫分析法的主流。

五十年代放射免疫分析法实用化以来，对人类社会有重大贡献，灵敏又便宜，但是操作者的安全性顾虑及废弃物处理，限制了它的发展。七十年代发明的酶免疫分析法，顺利的取代了放射免疫分析法大部分市场。酶免疫分析法的缺点在于稳定性及灵敏性较差，培育时间长。萤光免疫分析法好处是灵敏度高，进一步取代了一些放射免疫分

析的应用，缺点是仪器设备配合问题，使得临床检验这种使用频繁的应用领域，不易借以做日常化验。化学冷光免疫分析法的好处与荧光免疫分析法相同，但一旦改装为高速度、自动化免疫分析仪器，不免变得体积庞大及价格昂贵，并不利于免疫分析在民生福利社会的推广应用。

在八十年代，有人用扩散性染料，做成 200~300 纳米(nanometer)微粒来吸附抗体，发展出所谓的染料免疫分析法(dye immunoassay, DIA)。此方法因微粒大小、形状及分布控制较困难、不同抗体对同样扩散性染料有不同吸附能力、不同扩散性染料对同一蛋白质又有不同吸附反应等工艺因素，外加吸附抗体的染料微粒稳定性较差等产品因素，而一直未得以实用。

反应性染料(reactive dye)又称为活性染料(active dye)，1956 年推出，设计目的为通过共价键结合方式，将染料分子接合在绵纤维的羟基上。基本上分为 (1)亲核性取代反应(substitution)，染料如三氮六环苯(triazine)反应性染料系列及(2)亲核性加成反应(addition)，染料如乙烯基砒(vinyl sulfone)系列两大类。虽然原设计为染色棉纱，但因以上两种亲核性反应(nucleophilic reaction)，又可以与氨基及硫醇基作用，所以多年来又常用之于羊毛及蚕丝的染色。反应性染料一般在绵纱、羊毛及蚕丝材料的染色时，一般均采取 pH 值 10.5 以上，反应温度在 60~100℃间，同时加上大量盐类。目的如下：(1)促使各种纺织材料膨胀，易使着色均匀；(2)加快染色速度；(3)染料着色率高、废料少、符合环保要求；(4)在碱性环境中，羟基、硫醇基游离化，而氨基被中和，氨基酸中上述各官能团的未配对电子对(lone paired electron)的负电性均大为增加，而有利于对染料分子的亲核性反应。

发明内容

因此本发明的主要目的就在于提供一种利用反应性染料选择性染色水溶性蛋白质的方法。当其应用在免疫分析上时具有安全、反应时间短、制作简便、经济而灵敏的优点。

本发明的目的是这样实现的，反应性染料的染料分子分别结合在组成蛋白质的氨基酸分子的羟基、氨基或硫醇基上。当染色对象是抗体时，被控制在酸性环境，以利于染料分子与抗体组成氨基酸或抗体分子恒定区低糖类碳水化合物上的羟基作用。在免疫分析中，当不需要用抗体来做标示配体时，在微碱性溶液中染色，蛋白质可染有较深颜色。蛋白质经活性染料染色后，分离未完全反应的染料分子，纯化后各种颜色蛋白质稳定性很高。

为使本发明的上述和其它目的、特征和优点能更明显易懂，下文特举一较佳实施例，并配合附图，作详细说明：

附图说明

图 1 是一非均质式免疫分析法示意图；

图 2 是经反应性染料波心红（procion red MX-8R）染色的肌红蛋白抗体与肌红蛋白在琼脂基板上产生的沉淀线图；

图 3 是经阿米多黑（amido black）染色及脱色的肌红蛋白抗体与肌红蛋白在琼脂基板上产生的沉淀线图；

图 4 是牛血清白蛋白经波心红（procion red MX-8R）染色后的可见光图谱；

图 5 是未经染色的牛血清白蛋白可见光图谱，其浓度是 7.8 mg/ml。

具体实施方式

抗体在免疫分析中扮演关键性角色，而以免疫球蛋白G而言，在其分子结构的恒定区及重链上有占分子量2~3%的低聚糖分子。而抗体分子上的抗原结合部位，不巧正是抗体分子的氨基端。如果任由反应性染料随机的反应，则此氨基端极易结合一染料分子而丧失该抗体分子抗原结合性能。一般非抗体蛋白质的反应性染料染色，应用在免疫分析时，则无此顾虑。

本抗体染色及其在免疫分析应用上的发明，在于使用纺织工业用的反应性染料，如与被染色物进行亲核性取代反应的三氮六环苯系列，以及与被染色物进行亲核性加成反应的乙烯基砒系列。以控制酸碱度的方式，使反应集中在抗体蛋白质及共轭其上的低聚糖的羟基上，而使染色抗体维持其原有力价及免疫性质。染色反应后的蛋白质，经分离纯化，去除未反应染料，可以用在免疫分析中的各种用途，成为一种创新性的染料免疫分析法，可以称为溶解性染料分析法(soluble dye immunoassay, SDIA)。与放射免疫分析法相比较，有安全便利的好处；比酶免疫分析法灵敏、快速、稳定；更比荧光或冷光免疫分析法有使用便利及成本低廉的优点。

水溶性蛋白质反应性染料染色，举肌红蛋白(myoglobin)及牛血清白蛋白为例，依下列条件进行：

(一)肌红蛋白抗体染色反应。

10毫克兔子抗人肌红蛋白抗体溶于pH 4.8、0.01M的醋酸钠盐缓冲溶液中，加入5毫克波心红(procion red MX-8R)，在冰浴温度避光搅拌反应廿四小时后，注入一1.1×30厘米的Sephadex G-25管柱，以pH 6.8、0.05M磷酸盐缓冲液，每小时20毫升速度冲流，并用分级

收集器，每管收集一毫升。经共价键染色肌红蛋白抗体，因体积大，不进入 Sephadex G-25 分子筛胶粒的孔隙，不被吸附，因此流出较快；未反应及凝结(aggregate)的染料分子，则因被吸附进入胶粒中孔隙而较慢流出。先冲出的红色各管经集中冷冻干燥后保存，供进一步实验使用。

(二)肌红蛋白抗体免疫力价测定。

1%琼脂配制于巴比妥(barbital) (pH 8.2, 0.05 M)缓冲液中，在 50℃溶解，配制 Ouchterlony 双向免疫扩散薄板。取染色的抗体 1.32 毫克/毫升做成 2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048、4096 等倍数的稀释液。未经染色抗体取同样浓度，稀释亦同，做对比实验。

取 15 微升 2.1 毫克 / 毫升的人肌红蛋白，放置于配制好的 Ouchterlony 琼脂板的中间孔洞，另各取 15 微升不同稀释倍数染色及未染色的肌红蛋白抗体分别注入琼脂板中间孔洞的外围孔洞，加盖，室温静置六小时。观察发现在 2 至 64 倍稀释的染色肌红蛋白抗体与中心肌红蛋白之间产生红色沉淀线。而未染色抗体仅在 2 至 16 倍稀释与抗原有混浊沉淀线。再经静置六小时，染色抗体与抗原的红色沉淀线并未增加 (见图 2)。未染色抗体双向扩散琼脂平皿上，经用阿米多黑 (Amido black) 染色及脱色，在 2 至 64 倍稀释未染色抗体与抗原间，亦染出沉淀线，参见图 3。

本实验说明，肌红蛋白抗体经在 pH 4.8 环境中与反应性染料作用后，不但仍保持其活性，其力价与未染色抗体相比，并未产生改变。

(三)反应性染料在抗体上共价键结合位置。

a.神经胺酶(neuramidase)的前处理。

购入的神经胺酶经在 pH 8.0, 0.05 M 醋酸缓冲液 4℃透析一夜，

再注入一 5 毫升 Sepharose 固定的牛胎球蛋白(fetuin)管柱, 然后用缓冲液冲洗至 210nm 吸收值降至 0.05 以下。然后用标准重碳酸盐 (bicarbonate) 缓冲液将神经胺酶冲出, 中和后, 经 pH 8.0 磷酸缓冲液透析备用。

b.肌红蛋白抗体的低聚糖去除。

取一毫升经前述处理的已去除蛋白质分解酶的神经胺酶, 加入 50 微升、7.5 毫克 / 毫升的肌红蛋白抗体, 再加入 0.05%链霉素, 在 40℃培育 48 小时。然后注入 1.1×45 厘米的 Sephadex G-150 管柱, 以每小时 10 毫升速度流洗, 收取淡肉红色各管即为肌红蛋白, 经离心浓缩后, 供作以下的染色实验。

(四)去低聚糖的肌红蛋白抗体染色反应。

将前述处理抗体的浓度调整到10毫克/毫升, 其余染色步骤均与(一)所述相同。

本节与(一)节所得产品, 称取同重量冻干品稀释, 经用 Beckman DU-65 光谱计扫描结果, 如表一:

表一: 去低聚糖 / 未去低聚糖抗体染色表

样 本	最大吸收量, 纳米 (nm)	
	520	550
经去低聚糖处理肌红蛋白抗体	1.09	1.10
未经去低聚糖处理肌红蛋白抗体	2.09	2.10

表一说明, 明显表示部分波心红 (procion red MX-8R) 原以共价键结合方式与肌红蛋白抗体低聚糖部分相连, 经神经胺酶将抗体恒定区及重链部分的低聚糖切除后, 反应性染料分子在酸性环境中对羟基

作用对象趋减而造成如表一的对照结果。

(五)牛血清白蛋白染色反应。

取 Cohn V 级牛血清白蛋白做染色反应,因为是一般蛋白质染色,并没有像抗体染色时避免氨基端被 600~700 分子量染料分子占据而影响抗原 / 抗体活性的顾虑。所以将反应酸碱值调在碱性范围中,较合适的是约 pH10.5,希望蛋白质氨基酸上氨基、硫醇基、及羟基均可以参加反应,增加染色的深度及未来在免疫分析应用上的灵敏度。其余染色及纯化步骤同(一)所述。经紫外光可见光光谱仪扫描,其结果见图 4,未经染色的同一浓度牛血清白蛋白可见光图谱见图 5。

由实验一至五结果可以证明,当染色反应对象为非抗体的任何蛋白质时,则可选择碱性环境,不使用高温,不需加盐或电解质。在此操作简易的情况下,能使得氨基酸支链的羟基、氨基、硫醇基呈富电子状态,以有利于对染料分子的亲核反应,生成共价键的染色蛋白质分子共轭物,因此而得到染色度较高的蛋白质。当染色反应对象为抗体时,选用酸性环境,使染料分子作用于抗体蛋白质氨基酸、支链羟基与结构恒定区以及重链部分的羟基上。避免了抗体分子氨基端被染料分子结合上以后,对抗原活性的影响,从而提高在免疫分析应用上的灵敏度。

通过本发明所提供的方法染色的蛋白质在以下应用中,当做标示配体。例如应用于酶联接免疫分析法(enzyme linked immunoassay)的平板分析,应用于组织学(histology)、细胞学(cell cytology)、各种免疫凝集法(immunoagglutination)、各种电泳方法、各种免疫色层分析法(immunochromatography),应用于各种液相层析(liquid chromatography),应用于各种传感器(sensor),应用于各种核酸探针的染色及计量,或者

是应用于其它各种分析化学用途。

虽然本实施例以管柱分离方法将游离染料分子与染色的白质分子分开。然而对于熟悉该技术的人员，可了解蛋白质经反应性染料染色后，还可以用分子筛、过滤膜、盐析、或有机溶剂方式将游离染料分子与染色的蛋白质分子分开。蛋白质经活性染料染色后，通过上述方法分离、去除未反应完全的染料分子，纯化后的各种颜色蛋白质稳定性很高，并可以透过真空冷冻干燥进一步提升其储存性。

本发明的重要性举图 1 为例，当 L 配位子为放射性同位素或酶或萤光物或化学冷光物体，分别就有放射免疫分析法、酶免疫分析法、萤光免疫分析法及冷光免疫分析法等各种应用。组合本发明将反应性染料作为 L，同理，所谓的溶解性染料免疫分析法(soluble dye immunoassay, DIA)出现，极可能取代酶免疫分析法。其优点如下：

(1)比酶免疫分析法灵敏，因为染料分子都是强调高克分子吸光系数而设计的。

(2)免疫分析时间较短，因不需要测定酶活性的时间。

(3)蛋白质经共价键与染料分子结合后较稳定，不像酶共轭化物保存 / 取用需要注意不丧失酶活性。

(4)制作简便，批量生产容易，仅需控制酸碱值，加上简单的分离纯化，就可以有实用的抗体 / 抗原。

(5)反应性染料大量用于纺织工业，计吨销售，价格较任何免疫分析的配体便宜。

(6)染料颜色的选择范围推广，扩大了染色蛋白质在分析化学领域里应用。

虽然本发明已以一较佳实施例说明如上，但其并非用以限定本发

明，任何熟悉该技术的人员，在不脱离本发明的精神和范围内，当可作简单的改进和修饰，但本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。

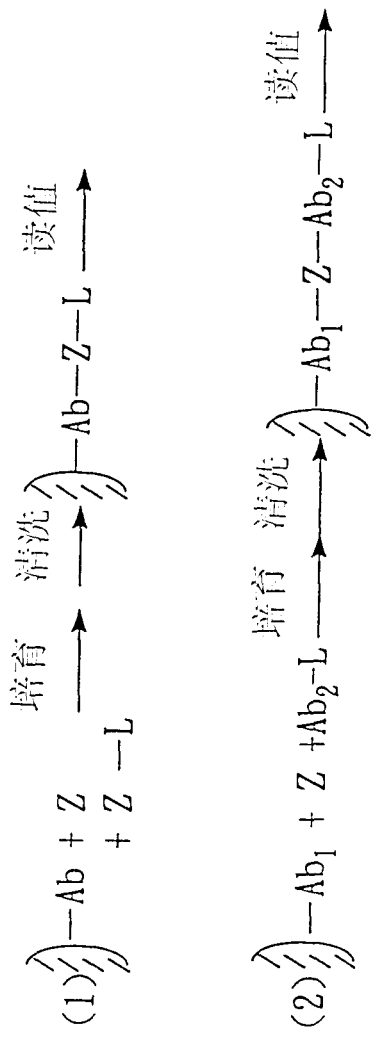


图 1

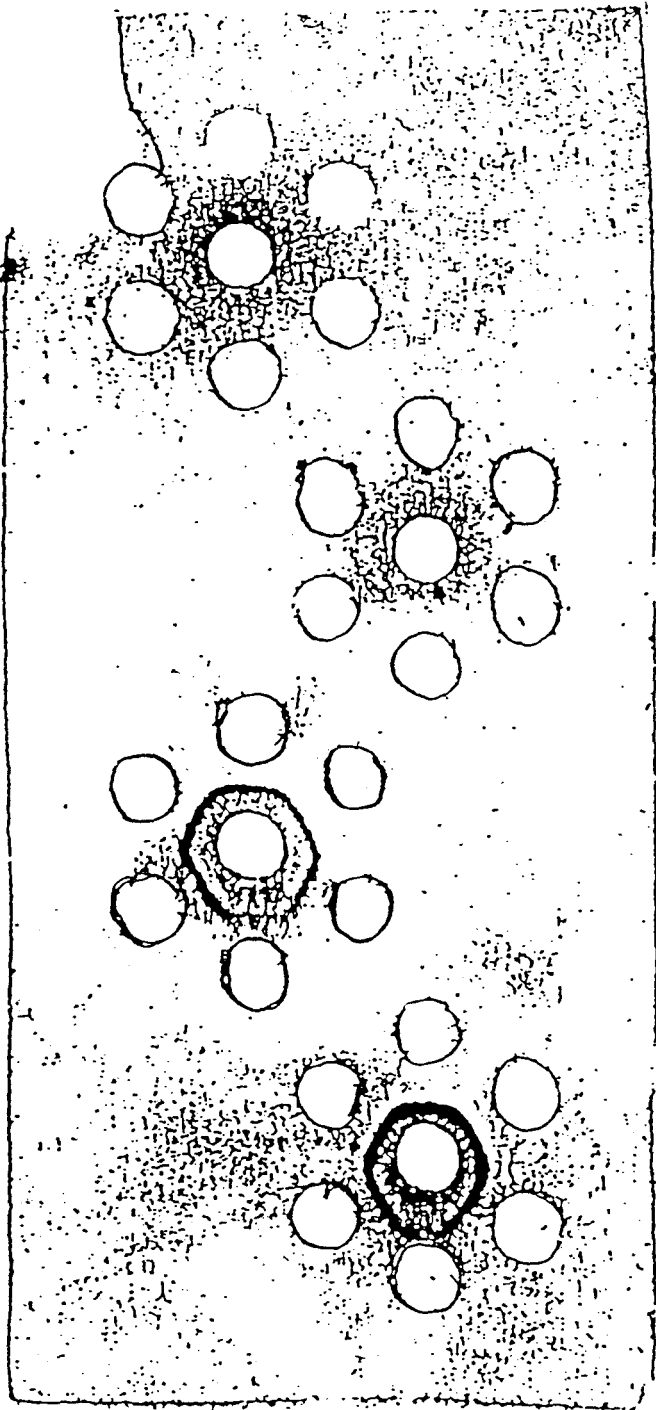


图 2



图3

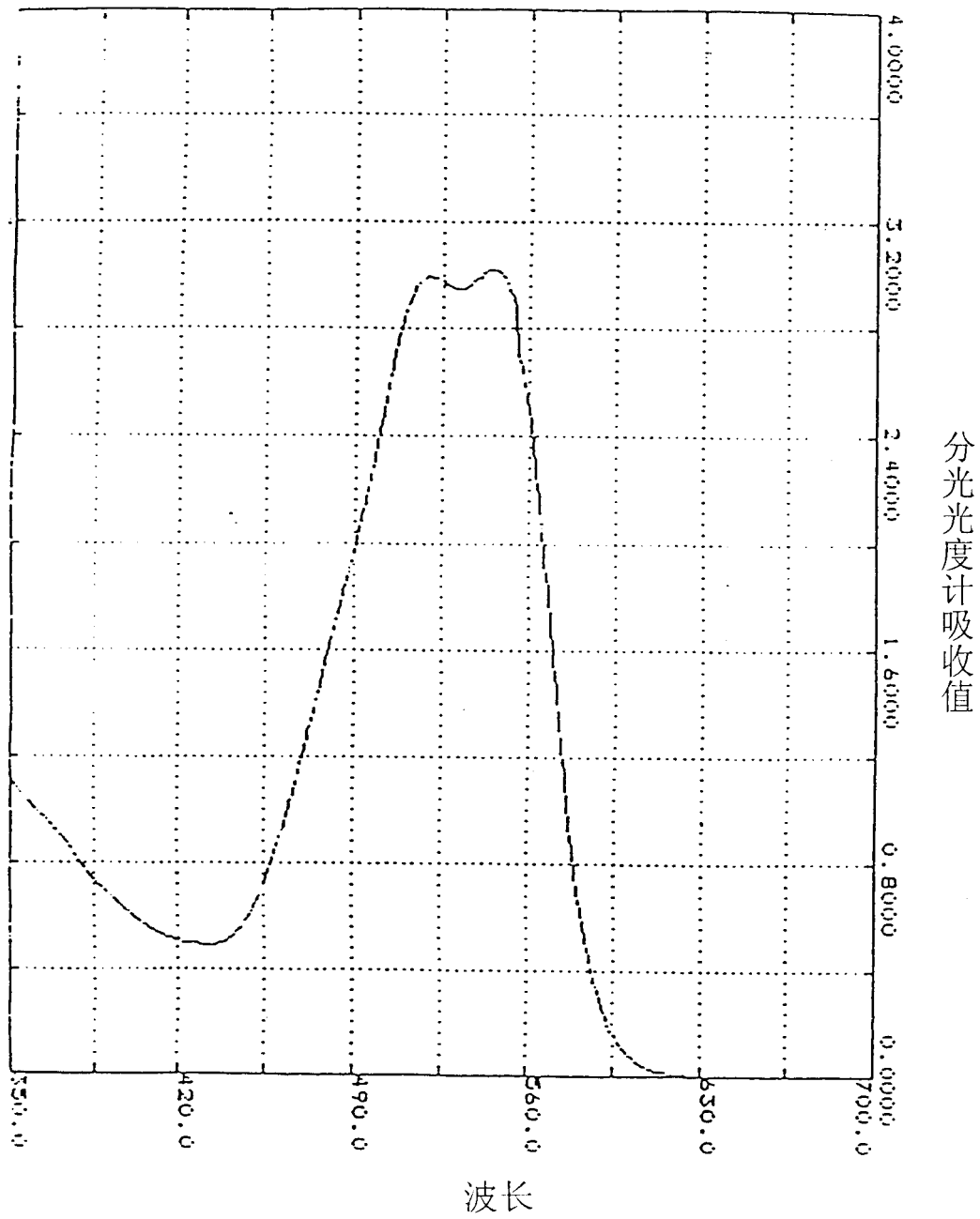


图 4

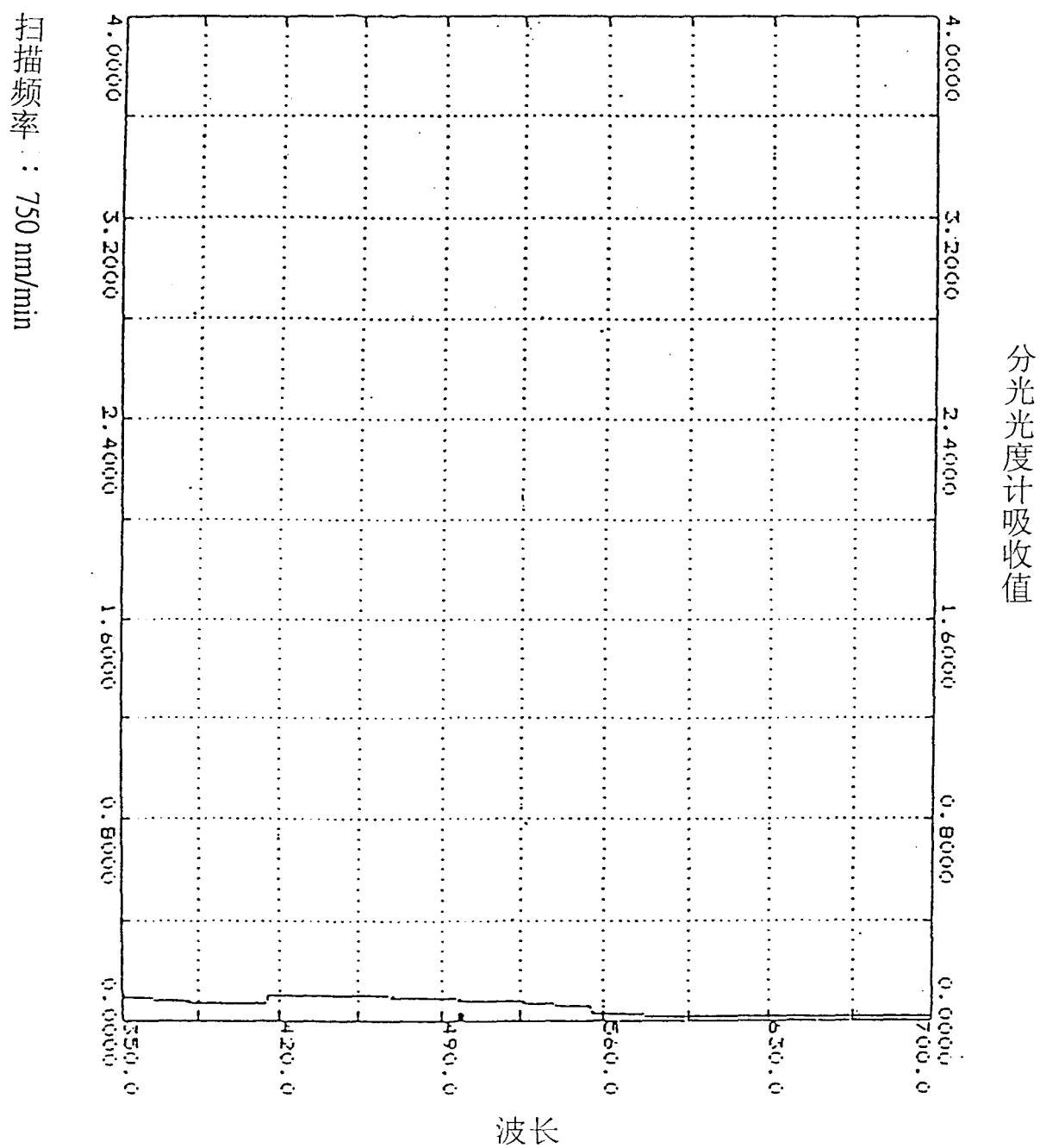


图 5

专利名称(译)	利用反应性染料选择性染色水溶性蛋白质的方法		
公开(公告)号	CN1141581C	公开(公告)日	2004-03-10
申请号	CN01110355.8	申请日	2001-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	台湾元生生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	台湾元生生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	台湾元生生物科技股份有限公司		
[标]发明人	许宗雄 姚文法		
发明人	许宗雄 姚文法		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/532		
代理人(译)	王学强		
其他公开文献	CN1379245A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明使用纺织工业用的反应性染料，来染色包括抗体在内的各种水溶性蛋白质。染料分子分别结合在组成蛋白质的氨基酸分子的羟基、氨基或硫醇基上。当染色对象是抗体时，被控制在酸性环境，以利于染料分子与抗体组成氨基酸或抗体分子恒定区低醌类碳水化合物上的羟基作用。在免疫分析中，当不需要用抗体来做标示配体时，在微碱性溶液中染色，蛋白质可染有较深颜色。蛋白质经活性染料染色后，未完全反应的染料分子，必须分离去除方能使用。纯化后各种颜色蛋白质稳定性很高，并可以通过真空冷冻干燥进一步提高其储存性。

