

[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 00136479.0

[51] Int. Cl.  
G01N 33/535 (2006.01)  
G01N 33/544 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年9月19日

[11] 授权公告号 CN 100338465C

[22] 申请日 2000.12.21 [21] 申请号 00136479.0

[30] 优先权

[32] 1999.12.22 [33] JP [31] 365554/99

[73] 专利权人 株式会社日冷生物科学

地址 日本东京都

[72] 发明人 大林弘一 北野由里子

[56] 参考文献

EPO269461A 1988.6.1

EP0123300A 1984.10.31

EP0155224A 1985.9.18

EP0151492A 1985.8.14

CN88102419A 1988.11.9

审查员 倪晓红

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 杨丽琴

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

[54] 发明名称

酶-蛋白质复合物

[57] 摘要

本发明涉及到酶、蛋白质和载体的复合物，这一复合物包括两个或多个酶分子，这种酶分子通过氨基或其他基团结合到载体例如多聚赖氨酸上；还包括具有特异与其他物质(如抗原)结合能力的蛋白质(如抗体)，这种蛋白质至少能与上述两个或多个酶分子中的一个结合，此复合物能以极高的灵敏度精确地检测痕量物质。

1. 一种酶、蛋白质和载体的复合物，包括：
  - (1) 载体；
  - (2) 酶，指能以两个或多个分子结合到(1)中载体上的酶；和
  - (3) 具有与其他物质特异结合能力的蛋白质，这种蛋白质至少能与(2)中的两个或多个酶分子中的一个结合。
2. 权利要求1的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的载体由凝胶过滤层析法确定其平均分子量为5,000—500,000 Da。
3. 权利要求2的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的载体由凝胶过滤层析法确定其平均分子量为10,000—300,000 Da。
4. 权利要求1的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的载体有两个或多个氨基。
5. 权利要求1的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的载体是选自下组：(a)具有两个或多个碱性氨基的肽聚合物，(b)导入了活性基团的多糖，这类活性基团选自氨基、醛基和乙烯基中的至少一种。
6. 权利要求1的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的载体是多聚赖氨酸。
7. 权利要求1的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的酶是选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和葡糖氧化酶中的一种。
8. 权利要求1的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的具有与其它物质特异结合能力的蛋白质选自抗体和其抗体片段中的至少一种。
9. 权利要求8的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。
10. 权利要求8的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的抗体片段是选自 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 和 $Fabc'$ 中的至少一种。
11. 权利要求1的酶、蛋白质和载体的复合物，其中的具有与其他物质特异结合能力的蛋白质是抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。
12. 一种免疫测定试剂盒，包括权利要求1的复合物。
13. 权利要求12的免疫测定试剂盒，其中所说的免疫测定是免疫组织染色或酶免疫测定。
14. 一种酶、蛋白质和载体的复合物，包括：

- (1) 载体;
- (2) 酶, 指能以两个或多个分子结合到(1)中载体上的酶;
- (3) 具有与其他物质特异结合能力的蛋白质, 这种蛋白质至少能与(2)中的两个或多个酶分子中的一个结合; 和
- (4) 与(3)中相同的蛋白质, 该蛋白质被直接结合到(1)中的载体上。

15. 权利要求14的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的载体由凝胶过滤层析法确定其平均分子量为5,000—500,000 Da。

16. 权利要求15的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的载体由凝胶过滤层析法确定其平均分子量为10,000—300,000 Da。

17. 权利要求14的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的载体有两个或多个氨基。

18. 权利要求14的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的载体是选自下组: (a) 具有两个或多个碱性氨基的肽聚合物, (b) 导入了活性基团的多糖, 这类活性基团选自氨基、醛基和乙烯基中的至少一种。

19. 权利要求14的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的载体是多聚赖氨酸。

20. 权利要求14的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的酶是选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶中的一种。

21. 权利要求14的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的具有与其它物质特异结合能力的蛋白质选自抗体和其抗体片段中的至少一种。

22. 权利要求21的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

23. 权利要求21的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的抗体片段是选自 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 和 $Fabc'$ 中的至少一种。

24. 权利要求14的酶、蛋白质和载体的复合物, 其中的具有与其它物质特异结合能力的蛋白质是抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。

25. 一种免疫测定试剂盒, 包括权利要求14的复合物。

26. 权利要求25的免疫测定试剂盒, 其中所说的免疫测定是免疫组织染色或酶免疫测定。

## 酶-蛋白质复合物

本发明涉及一种酶、蛋白质和载体复合物，此复合物是通过将具有特异结合其他物质能力的蛋白质结合到与载体共价结合的酶上而制备。这种复合物可用于免疫测定，如用于免疫组织化学和酶免疫测定等。

由于最近时期免疫化学上的进展，利用抗原-抗体反应来高灵敏地检测痕量物质的免疫测定术被广泛应用。目前，通常采用的两种免疫测定是免疫组织染色和酶免疫测定。

免疫组织染色是一种用识别特异性抗原的抗体来检测组织中特异性抗原的方法。一般地，抗原抗体识别反应是在一薄的组织切片上进行的，组织切片的制备包括固定和石蜡包埋等步骤。抗原的存在与否是通过与之反应的抗体的有无来确定。首先被用来与抗原反应的抗体通常称为一抗。当与一抗结合的物质发出可见或可被仪器检测的信号时，信号的强度即显示一抗的量，而一抗的量是与样品中抗原的量呈正相关的。能够发出信号的物质有荧光物质和酶等。在免疫组织染色的早期发展阶段主要是利用荧光物质，而那样就必须用荧光显微镜来检测信号。

随后，Nakane 等发展了酶标抗体的方法，使得用普通光学显微镜来分析染色图象成为可能。目前，酶已经被广泛应用为发出信号的物质。在免疫组织染色中，通过对结合在一抗上的酶引入发色物质来产生显色反应，而显色反应的强度显示了相应的酶活性。因此，显色反应的强度也就显示了酶标抗体的量，也即组织样品中抗原的量。然而，用这种方法可能得不到足够的灵敏度。

目前通常采用的方法称为链霉抗生物素蛋白-生物素法（SAB法），即一种放大结合在抗原上的一抗的信号的方法。此方法包括首先使识别组织样品中特异性物质的一抗与之反应，然后加入能结合一抗的第二抗体。通常，二抗是能识别并结合一抗的多克隆抗体。这样，多个分子的二抗就被结合到一抗上。而每个二抗分子上已经被事先结合上了多分子的生物素。而随后用结合上链霉抗生物素蛋白的酶来与此一抗-生物素结合的二抗复合物反应。由此形成了一抗-生物素结合

的二抗-链霉抗生物素蛋白结合的酶的复合物。因为每个一抗分子上结合了多分子的生物素结合的二抗分子，而每个生物素结合的二抗分子上又结合了多分子的链霉抗生物素蛋白结合的酶，间接结合在一抗分子上的酶量得以显著增加。这就使得组织样品上的抗原被以极高的灵敏度检出。

如前所述，由于结合在抗原上的一分子一抗上可最终结合多分子的酶，而这样就产生了更强的信号，因此，SAB法是一种很好的免疫测定方法。然而，从另一方面讲，此方法要求三个步骤：一抗反应、二抗反应和酶制剂反应。由于要求烦琐的步骤，SAB法不能在要求简便、快速和精确的临床应用等方面广泛使用。因此，SAB法有待改进。

另外一种常用的免疫测定术被称为酶免疫测定（EIA），经典的酶免疫测定方法和步骤如下：首先，用来识别某种待测物质的抗体被固定在聚苯乙烯珠或微量培养板等载体上。在载体被清蛋白等封闭后，作为待测目标的含有抗原的样品溶液被滴加。随后，再加入结合上酶的识别特异性抗原的抗体（酶标抗体）。换句话说，抗原被“插”到两个抗体的之间。接着洗去多余的酶标抗体，用酶的显色底物来发生显色反应。因为抗原的量由酶的活性而定，样品中抗原的浓度就可以通过和已知浓度抗原的显色反应来比较而确定。许多因素影响酶免疫测定的灵敏度，其中酶标抗体的质量是最重要的因素之一。尤其重要的是，当酶标抗体上结合了更多酶分子时，更强的信号被检测到，而这样抗原就可以被高灵敏度的测定。

如前所述，对免疫测定而言，酶标抗体的质量就显得尤为重要，酶标抗体的质量极大的影响着测定体系的灵敏度和测定步骤的烦琐程度。下面数例阐明了为使酶标抗体达到更高的灵敏度而采取的不同尝试。这些尝试大部分包括在某种载体上结合更多的酶和抗体。

在日本专利申请公开（Japanese Patent Application Publication）JP-A 63-503138(1988)中，抗体被结合到已经结合上可检测标记衍生物的载体上，可检测标记包括药物、毒素、螯合剂和硼加合物等。利用氨基葡聚糖作为载体，首先，一种药物例如氨甲蝶呤（methotaxate）被结合到氨基葡聚糖上；在过碘酸钠存在的条件下抗体的糖链被氧化产生醛基，醛基和氨基葡聚糖反应，随后，由氢硼化氘还原产生共价键，从而形成药物、抗体和氨基葡聚糖复合物。

在日本专利申请公开 ( Japanese Patent Application Publication ) JP-A3-158758(1991)中, 由过碘酸钠氧化葡聚糖产生的醛基与碱性磷酸酶和抗体的氨基反应, 再用氢硼化钠还原, 从而制备酶、抗体和葡聚糖复合物。

在日本专利申请公开 ( Japanese Patent Application Publication ) No.6-509167(1994)中, 二乙烯基砒和聚合物如葡聚糖反应产生乙烯基, 再与酶和抗体反应从而制备酶、抗体和葡聚糖复合物。

通过上述各方法制备的复合物都是将两种物质直接连接到某聚合物上。据称, 和不加任何的载体而直接将抗体与酶连接相比, 以上方法都具有较好的性能。然而, 这些方法也都具有如下缺点。更具体地, 在两种物质都要连接到载体上的情况下, 任一种物质结合到载体上的量是有限的。其中一种物质结合到载体上的量越多, 另一种物质结合到载体上的量就越少。如果能够克服上述缺点, 就能够获得具有更高性能的复合物。

因此, 本发明的目的在于提供一种克服了上述缺点的新的高质量的酶-蛋白质-载体复合物。

图1示实施例9的结果。

本发明人为获得高质量的酶-蛋白质-载体复合物而对生成酶-蛋白质-载体复合物的方法做了详尽的研究。发明者发现通过先将酶结合到载体上, 再将蛋白质结合到酶上就可以达到获得高质量的酶-蛋白质-载体复合物的目的。通过深入的研究, 此项发明得以最终形成。

换言之, 此发明涉及一种酶-蛋白质-载体复合物的制备, 这种酶-蛋白质-载体复合物的制备是通过将两分子或更多的酶结合到载体上, 进而将具有特异结合其他物质能力的蛋白质结合到至少一分子的酶上。此外, 此发明还涉及了直接将具有特异结合其他物质能力的蛋白质结合到上面提及的酶-蛋白质-载体复合物的载体上。于是, 在本发明的酶-蛋白质-载体复合物中, 酶和结合了具有特异结合其他物质能力的蛋白质的酶被分别大量的结合到载体上; 或者, 酶和结合了具有特异结合其他物质能力的蛋白质的酶以及具有特异结合其他物质能力的蛋白质被分别大量的结合到载体上。此发明详述如下。

此发明的完成经过了在免疫组织化学和酶免疫测定领域的对酶-

蛋白质复合物可行性的检查。然而，并不限制此项发明在其它领域的应用。

本发明涉及的载体是指没有特殊限制的蛋白质和多糖。然而，为了提高免疫测定的灵敏度，能使更多分子的酶结合到载体上就更为可取。因此，（1）一定范围的分子量，（2）和酶结合的反应功能基团的存在或此种反应功能基团引入的可能性或潜力是必须的。能够适应此种要求的载体包括分子量在 5,000 到 500,000 Da 的多肽和/或多糖，通过凝胶过滤层析测定多糖或多肽的分子量在 100,000 到 300,000 Da 时更为可取。于是，上述分子量范围仅有着简单的目的。只要在溶液中不发生沉淀，分子量范围大于此的也是可以的；同样，只要能达到本发明的目的，分子量范围小于此的也是可以的。

例如，按照本发明，一种含有两个或更多氨基的具有结合能力的肽是适合作为载体的。例如某种包含以下氨基酸其中之一的肽：赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、谷氨酸和其它的碱性氨基酸。这些氨基酸至少含有一种  $\alpha$ -氨基、 $\epsilon$ -氨基和其它的氨基。而且，其中很特别的例子包括多聚赖氨酸，它是含有  $\epsilon$ -氨基的赖氨酸的聚合物；还有包含赖氨酸和其它氨基酸的多种多样的肽，例如赖氨酸和甘氨酸的随机共聚物，赖氨酸和丝氨酸的随机共聚物，赖氨酸和谷氨酸的随机共聚物，以上聚合物各种分子量的都可以从商业途径得到。

在本发明中应用的另一种载体是引入了醛基、氨基或其它活性基团的多糖。例如葡聚糖、琼脂糖、糊精和可溶性淀粉等。向多糖引入醛基可通过使多糖与过碘酸钠反应达到。多糖中氨基的引入可以根据已知的方法，例如，带有氨基的葡聚糖可以通过先用过碘酸钠处理葡聚糖使之产生醛基，再使之与二胺反应，最后用氢硼化钠还原制得。向多糖中引入活性基团可以按照已知的方法，例如，带有乙烯基的葡聚糖可以通过使葡聚糖与二乙烯砷反应制得。

本发明中的酶是指含有两个或两个以上的氨基的酶并且它通常被用在免疫测定中，例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶。

本发明中具有特异结合其他物质能力的蛋白质包括：（1）一种蛋白质（2）蛋白质的片段（3）一种蛋白质及其片段的混合物，更广泛地讲，还包括与特异性抗原结合的抗体，与特异性配体结合的受

体, 例如: 单克隆抗体, 多克隆抗体, 抗生物素蛋白和特异性与生物素结合的链霉抗生物素蛋白; 特异性与抗体结合的蛋白 A (Protein A) 及蛋白 G (Protein G); 特异性与糖链结合的外源凝集素; 特异性与透明质酸结合的透明质酸结合蛋白, 此外, 本发明中的蛋白质还包括特异性与特定物质结合的蛋白质片段, 这些蛋白质片段如: 抗体片段  $F(ab')_2$ ,  $Fab'$ ,  $Fabc'$ 。

本发明中具有特异结合其他物质能力的蛋白质包括具有特异与单一物质结合能力的蛋白质及具有特异与多种物质结合能力的蛋白质。

依据本发明, 首先制备一载体与酶的复合物, 例如一种包括将载体的氨基修饰为硫醇基, 将所得载体与所含氨基被修饰为顺丁烯二酰亚胺基的酶混合, 由于硫醇基与顺丁烯二酰亚胺基迅速反应, 形成共价键, 于是得到与酶相结合的载体的方法。

将硫醇基引入载体, 已知的方法中使用的物质有 S-乙酰基巯基琥珀酸酐, N-琥珀亚胺基 3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP), S-乙酰基巯基乙酸-N-羟基琥珀亚胺 (SATA), 这些试剂与氨基反应, 引入被封闭的硫醇基, 之后, 若使用的是 S-乙酰基巯基琥珀酸酐和 SATA, 则以羟胺除去封闭硫醇基的保护基团, 而若使用的是 SPDP, 则用二硫苏糖醇 (DTT) 除去封闭硫醇基的保护基团。

将顺丁烯二酰亚胺基引入蛋白质的氨基, 利用一种在一个分子内同时具有顺丁烯二酰亚胺基和琥珀酰亚胺酯基的化合物, 优选的是利用一端存在有与顺丁烯二酰亚胺基的二价交联, 而在另一端具有与 N-羟基琥珀亚胺基的二价交联的试剂, 这种试剂如: N-(6-顺丁烯二酰亚胺己酰氧基)琥珀亚胺 (EMCS), 及 N-(4-顺丁烯二酰亚胺丁酰氧基)琥珀亚胺 (GMBS)。

除了上述 EMCS 及 GMBS, 同一分子中具有顺丁烯二酰亚胺基及琥珀亚胺基的化合物还包括如下几种, 但不限制此范围: N-琥珀酰亚胺基-N-顺丁烯二酰亚胺乙酸酯; N-琥珀酰亚胺基-4-(N-顺丁烯二酰亚胺基)丁酸酯; N-琥珀酰亚胺基-6-(N-顺丁烯二酰亚胺基)己酸酯; N-琥珀酰亚胺基-4-(N-顺丁烯二酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯; N-琥珀酰亚胺基-m-(N-顺丁烯二酰亚胺基)苯甲酸酯; N-琥珀亚胺-p-(N-顺丁烯二酰亚胺苯基)-4-丁酸酯; N-硫代琥珀亚胺-4-(N-顺丁烯二

酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯; N-琥珀亚胺-m-(N-顺丁烯二酰亚胺)苯甲酸酯; N-硫代琥珀亚胺-p-(N-顺丁烯二酰亚胺苯基)-4-丁酸酯等等。

由于本发明中载体不需额外地与其他物质结合,最好制备一种酶和载体复合物,其中,酶分子尽可能多的结合于此复合物,下面详细解释一种完成此构想的方法:将大量顺丁烯二酰亚胺试剂加入酶-载体复合物,进行反应,在所有复合物残余的氨基上引入顺丁烯二酰亚胺基;并硫醇基化与生产该复合物所需的相同的酶,同时使其有一个或多个氨基残余,这将利于随后利用酶上残余的氨基同具有特异与其他物质结合能力的蛋白质结合。并使二者的顺丁烯二酰亚胺基和硫醇基反应。

之后,剩余的顺丁烯二酰亚胺基以具有硫醇基的物质封闭,通常这些物质包括巯基乙醇,半胱氨酸盐酸盐和半胱氨酸,使用巯基乙醇封闭时,氨基仅仅在酶-载体复合物的硫醇基化的酶中出现,而半胱氨酸盐酸盐或半胱氨酸用于封闭时,氨基在酶-载体复合物的已被硫醇基化的酶及用于封闭残余顺丁烯二酰亚胺基的试剂上都出现。

在将如前所述具有特异与其他物质结合能力的蛋白质结合到酶-载体复合物时,优选的是利用制备酶-载体复合物中硫醇基与顺丁烯二酰亚胺基的反应,例如:用前面所述的引入顺丁烯二酰亚胺基的试剂与酶-载体复合物上的氨基进行反应,另一方面,用前面所述的引入硫醇基的试剂与可特异结合于其他物质的蛋白质反应,混合上述两种反应物后,便可制备一种酶-特异结合其他物质的蛋白质-载体的复合物,若 S-S 键不参与特异结合其他物质的蛋白质与其他物质的结合,则可使用半胱氨酸盐酸盐或巯基乙醇而不采用硫醇化作用来还原 S-S 键,从而产生硫醇基。

若特异结合其他物质的蛋白质具有糖链,糖链便可以很好的利用,例如,以过碘酸钠氧化特异结合其他物质的蛋白质的糖链,使之产生的醛基与酶-载体复合物的氨基进行反应,进而,再经还原作用使之结合。完全制备好的复合物应是:载体上的残余顺丁烯二酰亚胺基在制备酶-载体复合物的过程中为巯基乙醇所封闭,而具有特异结合其他物质能力的蛋白质单独结合于酶;或载体上残余的顺丁烯二酰亚胺基最终在制备酶-载体复合物过程中为半胱氨酸盐酸或半胱氨酸

所封闭, 而具有特异结合其他物质能力的蛋白质结合于酶及载体上。

为实现本发明, 以多聚-L-赖氨酸作为载体, 过氧化物酶作为酶, 抗体片段  $F(ab')_2$  作为特异结合其他物质的蛋白质, 生产酶-蛋白质-载体复合物的方法详细叙述如下:

#### 1. 硫醇基化的载体的制备

将 S-乙酰硫基琥珀酐加入到含有多聚-L-赖氨酸的溶液, 然后使羟胺与上述反应混合物进行反应, 在载体中引入硫醇基(载体-SH 的制备), 此过程中必须有一些氨基游离, 故载体不能被完全硫醇基化。

#### 2. 顺丁烯二酰亚胺基化的过氧化物酶的制备

EMCS 与辣根过氧化物酶(POD)反应, 制备顺丁烯二酰亚胺基化的过氧化物酶。

#### 3. POD-聚-L-赖氨酸复合物 1 的制备

硫醇基化的载体和顺丁烯二酰亚胺基化的过氧化物酶混合进行反应, 制备复合物(载体-S-M-POD), 反应结束后, 以巯基乙醇封闭残余的顺丁烯二酰亚胺基, 通过反应, 具有多个 S-M-POD 和 SH 基以及游离氨基的载体便得以获得。

#### 4. 顺丁烯二酰亚胺基化的复合物的制备

将含多个 EMCS 的溶液加入 3 所获得的复合物, 从而将顺丁烯二酰亚胺基引入复合物的所有氨基, 通过反应, 一种具有多个 S-M-POD, 顺丁烯二酰亚胺基及使 EMCS 与 SH 结合后经水解 EMCS 的 N-羟基琥珀亚胺酯而产生的-COOH 基的载体得以获得。

#### 5. 硫醇基化的过氧化物酶的制备

使 S-乙酰硫基乙酸-N-羟基琥珀亚胺酯与 POD 进行反应, 反应混合物再与羟胺反应, 从而在 POD 中引入硫醇基, 这样, 游离氨基便可以保留在 POD(SH-POD-NH<sub>2</sub>) 中。

#### 6. POD-聚-L-赖氨酸复合物 2 的制备

SH-POD-NH<sub>2</sub> 与 4 所得复合物反应, 使硫醇基化的过氧化物酶与顺丁烯二酰亚胺基化的载体反应, 随后, 以巯基乙醇处理残余的顺丁烯二酰亚胺基, 转化其为-OH 基, 通过反应, 一具有多个 S-M-POD, 多个 M-S-POD-NH<sub>2</sub>, -COOH 基和-OH 基的载体(复合物)便得到了。

7. 具有顺丁烯二酰亚胺基化 POD 的 POD-聚-L-赖氨酸复合物 2 的制备

EMCS 溶液与 6 中获得的酶复合物反应, 将复合物中 POD 的氨基顺丁烯二酰亚胺基化, 制备具有多个 S-M-POD, 多个 M-S-POD-M, -COOH 基和-OH 基的复合物。

#### 8. 还原性抗体片段的制备

胃蛋白酶处理羊抗鼠 IgG, 获得其 F(ab')<sub>2</sub> 片段, 并与半胱氨酸盐酸反应, 获得还原性抗体片段 (SH-Fab')。

#### 9. 酶-抗体-载体复合物的制备

混合还原性抗体片段及其中所获得的复合物, 抗体片段结合于 POD 的顺丁烯二酰亚胺基, 通过反应, 一种结合有多个 S-M-POD, 多个 M-S-POD-M-S-Fab', 多个 M-S-POD-M, -COOH 基, 及-OH 基的载体(酶-抗体复合物) 得以获得, 若需要, 所得载体可以用巯基乙醇处理, 将未发生反应的 M-S-POD-M 中的顺丁烯二酰亚胺基转化为-OH 基, 从而封闭顺丁烯二酰亚胺基。

酶-蛋白质-载体复合物的制备, 使人们首次成功地认识到了前面所提到的结构, 由于载体上大量的酶的存在, 当发生显色反应时, 便会产生强烈的颜色变化。此外, 尽管许多分子的酶占据在载体的表面, 由于具有特异与其他物质结合能力的蛋白质可以结合到酶上, 因而, 多个具有特异结合其他物质能力的蛋白质的分子便能结合到复合物上, 因此, 其结合其他物质的能力得以大大提高。

由于具有特异结合其他物质能力的蛋白质的许多分子在酶-蛋白质-载体的复合物中出现, 即使是痕量的待分析物质也能够被捕获并结合到酶-蛋白质-载体上, 若待分析物质结合到蛋白质的任何一个分子或分子的片段上, 由于酶的许多分子结合于酶-蛋白质-载体的复合物, 也会产生强烈的显色反应, 换句话讲, 依据本发明, 即使是痕量物质也可以被高灵敏度检测到, 因此, 依照本发明可以做精确的分析, 相应的, 可以获得一种应用此复合物的高效试剂盒。

依据本发明, 酶-蛋白质-载体复合物的制备过程中, 多聚赖氨酸并未首先以 EMCS 处理(沉淀的产生使赖氨酸无法使用), 而是先以 S-乙酰巯基琥珀酰修饰载体的一部分氨基, 使之成为硫醇基, 再将此硫醇基化的载体与顺丁烯二酰亚胺基化的酶连接, 用大量用于顺丁烯二酰亚胺基化和羧化作用的 EMCS 处理后, 再与硫醇基化的酶反应, 这样, 酶的获得满足了下述要求: 即使前一步酶结合的分子数目很

少，多分子的酶能最终结合于载体；而这一过程无沉淀或沉淀作用的产生，在溶液状态下多分子的酶与载体结合，可达到最好的效果。

相应的，本发明带来了一个广阔的前景，即可分析样品中痕量物质或极稀样品中的物质。

#### 实施例

为了更详细地描述本发明，在下文提供了实施例。但本发明并不限于这些实施例。

#### 实施例 1

##### 酶-载体复合物的制备

顺丁烯二酰亚胺化的过氧化物酶以如下方法制备：将 20mg 的 EMCS 溶解于 0.6ml 二甲基甲酰胺（DMF）中，然后将此反应物加入到 2.4ml 已事先溶解了 100mg 辣根过氧化物酶的 0.1M, pH7.5 的磷酸钠缓冲液中，室温反应 30 分钟，反应液过 Sephadex G 25 (Pharmacia 公司生产) 柱，收集 403nm 吸收峰处的洗脱组分，超滤浓缩。

硫醇基化多聚赖氨酸制备如下：20 $\mu$ l 溶有 6mg 乙酰巯基琥珀酸酐的二甲基甲酰胺（DMF）溶液，加至 1ml 溶有 5mg 多聚赖氨酸溴化氢（Sigma 公司生产，平均分子量 37, 600D）的 0.1M, pH6.5 的磷酸钠缓冲液中，30 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟。然后，反应体系中加入 100 $\mu$ l 0.1M pH 7 的 Tris-HCl 缓冲液，10 $\mu$ l 0.1M pH 7 的 EDTA 溶液，100 $\mu$ l 1M pH 7 的羟胺，30 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟。反应液过 Sephadex G 25 凝胶柱，收集 230nm 吸收峰处的洗脱组分，超滤浓缩。这种情况下，并不是所有的氨基被修饰成硫醇基。

顺丁烯二酰亚胺基化过氧化物酶和硫醇基化多聚赖氨酸混合，4 $^{\circ}$ C 反应 18 小时。反应液中加入 1/10 体积的 0.1M 巯基乙醇，30 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟；然后，反应液过 Ultrogel AcA44 (Biosepla 公司生产) 柱，测每一洗脱组分 403nm 处吸收值。高分子量滤过组分为辣根过氧化物酶和多聚赖氨酸混合物。此组分置换至 0.1M, pH 7.5 的磷酸钠缓冲液中，超滤浓缩至 3ml，混合物中辣根过氧化物酶量为 20mg。这被称为酶-载体复合物 1。

向此复合物中加入 0.75ml 溶有 50mg EMCS 的 DMF，室温反应 30 分钟，反应液过 Sephadex G 25 凝胶柱，收集 403nm 吸收峰处的洗脱组分，超滤浓缩。得到顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 1。这种

情况下，所有的氨基都被修饰成顺丁烯二酰亚胺基，而硫醇基转化为羧基。

硫醇基化辣根过氧化物酶制备如下：0.5ml 溶有 2.5mg S-乙酰巯基乙酸-N-羧基琥珀亚胺酯 (SATA) 的 DMF 加至 2.5ml 溶有 100mg 辣根过氧化物酶的 0.1M pH 7.5 的磷酸钠缓冲液中，室温反应 30 分钟。然后，反应体系中加入 100 $\mu$ l 0.1M pH 7 的 EDTA 溶液，0.5ml 1M pH 7 的羧胺，室温反应 5 分钟。反应液过 Sephadex G 25 凝胶柱，收集 403nm 吸收峰处的洗脱组分，超滤浓缩。硫醇基化辣根过氧化物酶中硫醇基含量测定据免疫测定杂志 (Immunoassay, 4(3), 209-327 页)，计算出每一分子辣根过氧化物酶结合的硫醇基数为 1.3，而一分子辣根过氧化物酶含三个或三个以上氨基，所以上述方法制备的硫醇基辣根过氧化物酶中至少有一个氨基保留未被修饰。

顺丁烯二酰亚胺基化酶和载体复合物 1 与硫醇基化辣根过氧化物酶混合，4 $^{\circ}$ C 反应 18 小时。反应液中加入 1/10 体积 0.1M 的巯基乙醇，30 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟；过 Ultrogel AcA44 (Biosepla 公司生产) 柱，测洗脱组分 403nm 处吸收值。复合物存在于高分子量滤过组分中。这被称为酶-载体复合物 2。

顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 1 与硫醇基化辣根过氧化物酶混合，4 $^{\circ}$ C 反应 18 小时。反应液中加入 1/10 体积 0.1M 半胱胺氯化氢，用上述方法纯化。反应复合物称为酶-载体复合物 3。复合物 2、复合物 3 中辣根过氧化物酶的含量均为 40mg。

## 实施例 2

### 酶-二抗-载体复合物制备方案 1:

已知方法制备好羊抗小鼠 IgG F(ab')<sub>2</sub> 片段。羊抗小鼠 IgG Fab' 如下制备：将 0.1M 半胱氨酸盐酸盐溶解在 0.1M pH 6 的磷酸钠缓冲液中，加入 EDTA 5mM，取此液 55 $\mu$ l 加至 0.5ml 溶有 5mg 羊抗小鼠 IgG F(ab')<sub>2</sub> 片段的 0.1M pH 6 的磷酸钠缓冲液中，37 $^{\circ}$ C 反应 1.5 小时。反应液过 Sephadex G 25 凝胶柱，收集 280nm 吸收峰处的洗脱组分，超滤浓缩。

顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 2 如下制备：375 $\mu$ l 溶有 10mg EMCS 的 DMF 加至 1.5 ml 溶有 5mg 酶-载体复合物 2 的 0.1M pH 7.5 的磷酸钠缓冲液中，室温反应 30 分钟。反应液过 Sephadex G 25 凝

胶柱，收集 403nm 吸收峰处的洗脱组分，超滤浓缩。

顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 2 和羊抗鼠 IgG Fab' 混合，4℃ 反应 18 小时。反应液中加入 1/10 体积 0.1M 的巯基乙醇，30℃ 反应 20 分钟。反应液过 Ultrogel AcA44 柱，测洗脱组分 280nm、403nm 处吸收值。吸收峰重叠处高分子量滤过组分为酶-Fab'-载体复合物。

### 实施例 3

酶-二抗-载体复合物制备方案 2:

顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 3 如下制备: 375μl 溶有 10mg EMCS 的 DMF 加至 1.5 ml 溶有 5mg 酶-载体复合物 3 的 0.1M pH 7.5 的磷酸钠缓冲液中，室温反应 30 分钟。反应液过 Sephadex G 25 凝胶柱，收集 403nm 吸收峰处的洗脱组分，超滤浓缩。

依上述方法制备羊抗小鼠 IgG Fab' 和顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 3 混合，4℃ 反应 18 小时。反应液中加入 1/10 体积 0.1M 的巯基乙醇，30℃ 反应 20 分钟。反应液过 Ultrogel AcA44 柱，测洗脱组分 280nm、403nm 处吸收值。吸收峰重叠处高分子量滤过组分为酶-Fab'-载体复合物。

### 实施例 4

酶-一抗-载体复合物制备方案 1:

根据已知方法，用胃蛋白酶消化兔抗 p-53 基因产物抗体 (Nichirei 公司生产) 制得 F(ab')<sub>2</sub> 片段。兔抗 p-53 基因产物抗体 Fab' 用如下方法制备: 将 0.1M 半胱氨酸盐酸盐溶解在 0.1M pH 6 的磷酸钠缓冲液中，加入 EDTA 5mM，取此液 55μl 加至 0.5ml 溶有 5mg 兔抗 p-53 基因产物抗体 F(ab')<sub>2</sub> 片段的 0.1M pH 6 的磷酸钠缓冲液中，37℃ 反应 1.5 小时。将反应液过 Sephadex G 25 凝胶柱，收集 280nm 吸收峰处的洗脱组分，超滤浓缩。

将用实施例 3 方法制得的顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 3 和兔抗 p-53 基因产物抗体 Fab' 混合，4℃ 反应 18 小时。反应液中加入 1/10 体积 0.1M 的巯基乙醇，30℃ 反应 20 分钟。过 Ultrogel AcA44 柱，测洗脱组分 280nm、403nm 处吸收值。吸收峰重叠处高分子量滤过组分为酶-Fab'-载体复合物。

### 实施例 5

酶-一抗-载体复合物制备方案 2:

硫醇基化的抗 CD34 单克隆抗体 (Nichirei 公司生产) 制备如下: 50 $\mu$ l 溶有 0.1mg SATA 的 DMF 加至 1ml 溶有 5mg 抗 CD34 单克隆抗体的 PBS 中, 室温反应 30 分钟。加入 10 $\mu$ l 0.1M pH 7 的 EDTA 溶液, 100 $\mu$ l 1M pH 7 的羟胺, 室温反应 5 分钟。反应液过 Sephadex G 25 凝胶柱。将制得的硫醇基化抗 CD34 单克隆抗体和用实施例 3 方法制得的顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 3 混合, 4 $^{\circ}$ C 反应 18 小时。反应液中加入 1/10 体积 0.1M 的巯基乙醇, 30 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟。过 Ultrogel AcA44 柱, 测洗脱组分 280nm、403nm 处吸收值。吸收峰重叠处高分子量滤过组分为酶-单克隆抗体-载体复合物。

#### 实施例 6

##### 酶-链霉抗生物素蛋白复合物的制备

硫醇基化链霉抗生物素蛋白制备如下: 250 $\mu$ l 溶有 0.25mg SATA 的 DMF 加至 2.5ml 溶有 25mg 链霉抗生物素蛋白的 0.1M pH 7.5 的磷酸钠缓冲液中, 室温反应 30 分钟。加入 50 $\mu$ l 0.1M pH 7 的 EDTA 溶液, 200 $\mu$ l 1M pH 7 的羟胺, 室温反应 5 分钟。反应液过 Sephadex G 25 凝胶柱。制得的硫醇基化链霉抗生物素蛋白和用实施例 3 方法制得的顺丁烯二酰亚胺基化酶-载体复合物 3 混合, 4 $^{\circ}$ C 反应 18 小时。加入 1/10 体积 0.1M 的巯基乙醇, 30 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟。过 Ultrogel AcA44 柱, 测洗脱组分 280nm、403nm 处吸收值。吸收峰重叠处高分子量滤过组分为酶-链霉抗生物素蛋白-载体复合物。

#### 实施例 7

实施例 3 中制得的酶-抗体-载体复合物和传统方法制得的酶标抗体在免疫组织化学方面作一比较, 并和 SAB 方法作一比较。

用抗 LCA 单克隆抗体 (Nichirei 公司生产) 作为一抗, 染肠组织切片。首先将石蜡组织包埋、切片转移至载玻片上。然后去除石蜡和过氧化物酶, 制得的样品与一抗室温反应 1 小时, PBS 充分漂洗, 这样得到一抗结合的样品。向其中滴加二抗。二抗分别为依实施例 3 中制得的 Fab' 含量为 6 $\mu$ g/ml 的酶-Fab'-载体复合物, 和用传统方法制得的过氧化物酶标记的同样浓度的 Fab', 标记方法依免疫测定杂志 (Immunoassay, 4 (3), 209-327 页), 其中所用的材料和试剂与实施例 3 所用相同。这两种二抗分别和上述一抗标记的样品室温反应 30 分钟。

在 SAB 方法中，生物素标记的抗鼠多克隆抗体作为二抗。二抗和一抗标记的样品反应 10 分钟，漂洗，滴加过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白（Nichirei 公司生产），反应 5 分钟。

然后，彻底漂洗上述三样品，向此样品中滴加底物溶液（二氨基联苯胺，过氧化氢）使之反应，然后用蒸馏水漂洗，封片并用显微镜观察。

结果如下表 1，与常规方法制备的酶标抗体相比，实施例 3 中制备的酶-二抗-载体复合物有其突出的优点；而且，与包含放大处理过程的 SAB 法相比，实施例 3 中制备的酶-二抗-载体复合物也显示出其相当的优越性。

表 1:

样品	染色强度
A	±
B	+++
C	+

A: 传统方法制备的酶标抗体。

B: 按实施例 3 制备的酶-二抗-载体复合物。

C: SAB 法。

#### 实施例 8:

实施例 4 中制备的酶-一抗-载体复合物与 SAB 法在免疫组织化学方面作一比较。

与实施例 4 中的材料相同，SAB 法中所用的一抗也是兔抗 p53 蛋白的多克隆抗体（Nichirei 公司生产）。首先，将石蜡包埋的胃癌组织块切成薄片并置于载玻片上。然后，进行脱蜡和去除过氧化物酶的处理；并让这种制备好的样品与一抗在室温下反应 1 小时。经 PBS 彻底漂洗后，再让这种结合有一抗的样品与生物素标记的抗兔的多克隆抗体（Nichirei 公司生产）在室温下反应 10 分钟。漂洗后，滴加过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白，反应 5 分钟。

使实施例 4 中制备的酶-一抗-载体复合物（即酶、Fab' 片段及载体的复合物）也分别与上面提到的这种制备好的样品在室温下反应 1 小时。其中酶标抗体复合物浓度与 Fab' 片段的浓度一样，都是

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

对上述两种处理的样品进行彻底的漂洗后，向样品中滴加底物溶液（二氨基联苯胺，过氧化氢）进行显色反应，然后用蒸馏水漂洗，封片并用显微镜观察。

得出的结果是用酶-一抗-载体复合物得到的染色强度与用包含放大处理过程的 SAB 法得到的染色强度相同。

#### 实施例 9:

实施例 3 中制备的酶-二抗-载体复合物与传统方法制备的酶标抗体在酶免疫测定方面的比较。

取 100 $\mu\text{l}$  羊抗小鼠 IgG 抗体，以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的浓度加入到 96 孔微量滴定板中，室温下孵育 2 小时。用生理盐水漂洗微量滴定板，接着加入 200 $\mu\text{l}$  的 1% 的牛血清清蛋白孵育 2 小时。将给定不同浓度（0—1000 $\text{pg}/\text{ml}$ ）的 100 $\mu\text{l}$  鼠 IgG 加入到微量滴定板，孵育 2 小时后用生理盐水漂洗。然后向这种制备好的微量滴定板中加入按实施例 3 制备的酶-二抗-载体复合物 100 $\mu\text{l}$ ，浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，此浓度应以抗体的量（即抗体的浓度）为基准；或者加入传统方法制备的酶标抗体 100 $\mu\text{l}$ ，浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，此浓度也是以抗体的量为基准，孵育 30 分钟用生理盐水进一步漂洗，随后加入 100 $\mu\text{l}$  底物溶液（四甲基联苯胺，过氧化氢），反应 15 分钟。加入 50 $\mu\text{l}$  的 1N 的硫酸终止反应。用酶标仪测定显色反应程度。从图 1 可看出，其结果表明：微量体积的实施例 3 中制备的酶-二抗-载体复合物中获得的显色反应强度比从用传统方法制备的酶标抗体中获得的强度更高。

图 1 显示了上述结果。图中横坐标表示小鼠 IgG 的浓度，纵坐标表示波长 450nm 处的吸光度。其中，实心圆点示按实施例 3 制备的酶-抗体-载体复合物，而空心圆点示传统方法制备的酶标抗体。

#### 发明优点:

此发明所述酶-蛋白质-载体复合物极具应用潜力，尤其在作为酶标抗体（一抗或二抗）应用在免疫组织化学和酶免疫测定方面，这种复合物能以极高的灵敏度用于免疫测定。

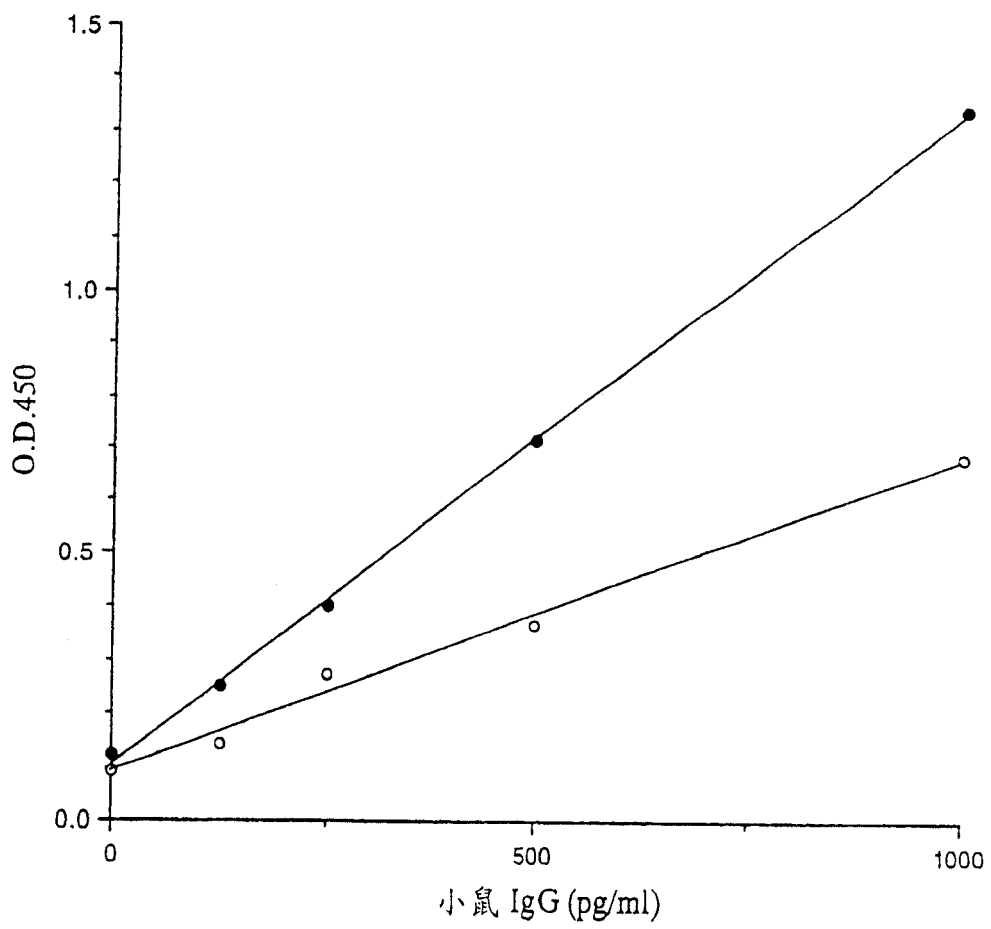


图 1

专利名称(译)	酶 - 蛋白质复合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN100338465C</a>	公开(公告)日	2007-09-19
申请号	CN00136479.0	申请日	2000-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日冷		
申请(专利权)人(译)	株式会社日冷		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社日冷生物科学		
[标]发明人	大林弘一 北野由里子		
发明人	大林弘一 北野由里子		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/544 C12N11/08 C07K16/18 C12N9/08 C12N9/16 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/535 Y10S435/964 Y10S435/96		
代理人(译)	卢新华 杨丽琴		
审查员(译)	倪晓红		
优先权	1999365554 1999-12-22 JP		
其他公开文献	CN1300942A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及到酶、蛋白质和载体的复合物，这一复合物包括两个或多个酶分子，这种酶分子通过氨基或其他基团结合到载体例如多聚赖氨酸上；还包括具有特异与其他物质(如抗原)结合能力的蛋白质(如抗体)，这种蛋白质至少能与上述两个或多个酶分子中的一个结合，此复合物能以极高的灵敏度精确地检测痕量物质。

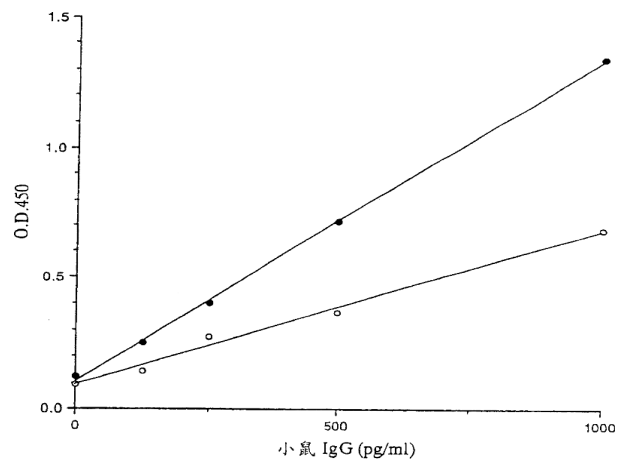


图 1