



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101750486 A

(43) 申请公布日 2010.06.23

(21) 申请号 200810242798.5

(22) 申请日 2008.12.19

(71) 申请人 苏州纳凯科技有限公司

地址 215125 江苏省苏州市苏州工业园区独墅湖高等教育区若水路 398 号

(72) 发明人 费浩 周明 贾俊丽 王小波  
黄泽柱

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

C07K 2/00(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

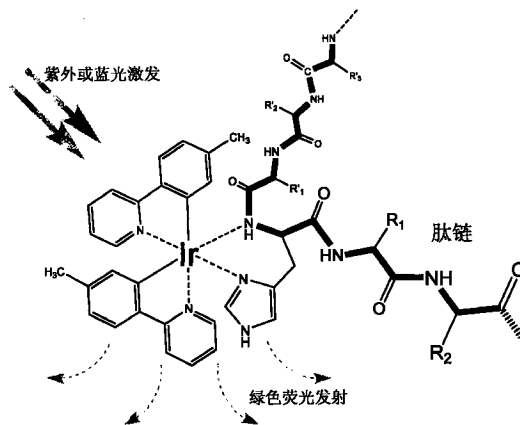
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用一类基于与组氨酸结合生成荧光基团的铈配合物标记抗体

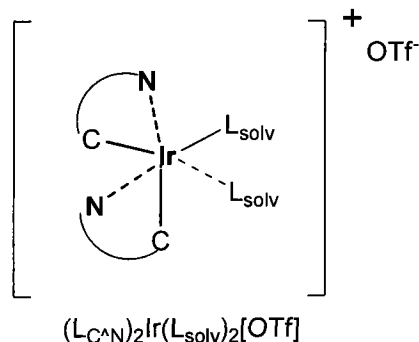
(57) 摘要

本发明公开了一种新颖的生物分子标记方法,即用一种含溶剂分子(水或乙腈)的环金属铈配位化合物通过与蛋白质或多肽中的组氨酸残基结合而形成一个荧光基团。该方法可以标记多肽和包括抗体在内的蛋白质等生物活性分子,并可进一步用于生物检测、细胞和组织标记、生物分子材料示踪等应用领域。由于这类化合物的荧光颜色丰富,且标记反应在常温 and 常规缓冲溶液中一步完成,因而比市场上通常使用的标记化合物及标记方法具有优势,具有广泛的应用前景。



1. 一种新型生物标记方法,该方法使用一类由两个相同的 C<sup>∧</sup>N 二齿配体以及两个溶剂分子配位络合的环金属铱配位化合物标记抗体、多肽和蛋白质,被标记对象的氨基酸序列中至少含有一个组氨酸残基。

2. 根据权利要求 1 所述的环金属铱配位化合物具有如下的化学分子式:  
(L<sub>C<sup>∧</sup>N</sub>)<sub>2</sub>Ir(L<sub>solv</sub>)<sub>2</sub>[OTf] 其结构为:



其中, L<sub>C<sup>∧</sup>N</sub> 代表 C<sup>∧</sup>N 二齿配体, L<sub>solv</sub> 代表溶剂分子, OTf 代表三氟甲基磺酸根。

3. 根据权利要求 2 所述的环金属铱配位化合物中的 C<sup>∧</sup>N 二齿配体 L<sub>C<sup>∧</sup>N</sub> 包括但不限于 2- 苯基吡啶、1- 苯基异喹啉、2- 苯基苯并噻吩、苯并噻啉、4- 甲基苯基吡啶、4,6- 二氟苯基吡啶、2-( 苯并噻吩 ) 吡啶、2- 苯基噻啉和 2,5- 二苯基噻啉。

4. 根据权利要求 2 所述的环金属铱配位化合物中的溶剂分子包括但不限于水、乙腈、DMF 和 DMSO。

5. 根据权利要求 1 所述的环金属铱配位化合物用于荧光标记的抗体分子,包括但不限于天然纯化获得的抗体、体外重组表达的抗体、各类抗体亚型 (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE 等)、来源于各类物种的抗体分子 (人, 小鼠, 大鼠, 羊, 兔, 鸡, 马, 驴, 荷兰猪, 骆驼等)、多克隆抗体、单克隆抗体、Fab 片段、Fab' 片段和 Fc 片段。

6. 根据权利要求 1 所述的环金属铱配位化合物用于荧光标记的多肽和蛋白质,包括但不限于人工合成多肽、体外重组表达多肽、生物体内提纯多肽、人工合成蛋白质、体外重组表达蛋白质、生物体内提纯蛋白质、含天然分子序列的多肽或蛋白质、含人工设计序列的多肽或蛋白质、多肽类药物制剂和蛋白质类药物制剂等。

7. 根据权利要求 6 所述的多肽是指含有 n 个氨基酸残基的由酰胺键构成主链结构的链状分子 (2 ≤ n ≤ 50)。

8. 根据权利要求 1 所述的环金属铱配位化合物用于标记生物活性分子的过程中使用常规缓冲液体系,包括但不限于磷酸缓冲液 (PBS)、Tris 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、MES 缓冲液和 HEPES 缓冲液。

9. 根据权利要求 4 所述的标记后的抗体分子用于基于免疫方法的生物检测,包括但不限于基于光致发光的免疫分析 (酶联免疫分析, 如双抗体夹心法、间接法、间接双抗体夹心法、抗原直接包被法, 时间分辨荧光免疫分析 (Time-resolved Fluorescence), 荧光能量共振转移免疫分析 (Förster Resonance Energy Transfer))、基于电化学发光 (Electrochemiluminescence) 的免疫分析方法、细胞及组织切片免疫染色 (标记一抗用于免疫染色、标记二抗用于免疫染色、多重染色) 和免疫分子印迹等。

10. 根据权利要求 5 所述的标记后的多肽和蛋白质进一步用于生物医学样品标记、核

酸或多肽药物组装,包括但不限于体内 (in vivo) 或体外 (in vitro) 的生物检测、细胞染色、动物组织标记和药物组装与标记等实验。

## 用一类基于与组氨酸结合生成荧光基团的铈配合物标记抗体

### 技术领域

[0001] 该发明涉及一种新颖的生物标记方法,即通过一类自身无荧光的金属铈配位化合物与蛋白质上的组氨酸残基结合,形成可被激发的荧光基团,从而得以标记抗体分子,并用于免疫分析检测、免疫荧光成像等生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 生物分子的荧光标记是应用生物技术中的重要组成部分,被荧光基团标记的生物分子如抗体、多肽及核酸等通过分子间相互作用,识别目标分子,后通过高灵敏的光学方法或电化学方法(光致发光、荧光共振能量转移、时间分辨、电化学发光)获取标记分子产生的信号,以此形成一系列基于荧光标记的检测手段,被广泛地应用于各种生命科学基础研究、临床医学诊断、食品卫生安全等领域。常见的荧光标记物包括有机小分子(如罗丹明和荧光素等)、无机过渡金属配位化合物(如三联吡啶钌),以及金属和半导体纳米颗粒(如量子点)等,这些材料可以通过化学修饰的手段,在其上引入可被活化的化学基团,通过共价交联方式标记生物分子。

[0003] 蛋白质和多肽的表面分布着大量较活泼的化学基团,例如  $\alpha$ -氨基( $-\text{NH}_2$ )、羧基( $-\text{COOH}$ )、巯基( $-\text{SH}$ )和羟基( $-\text{OH}$ )等。其中,位于蛋白质 N 末端或赖氨酸残基侧链末端的  $\alpha$ -氨基,以及位于半胱氨酸残基侧链末端的巯基最常被用于同标记化合物或交联剂(crosslinker)交联<sup>[1]</sup>。同  $\alpha$ -氨基发生反应的基团包括经过 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)活化后的羧基,或者是其进一步与氮羟基琥珀酰亚胺(NHS)形成的较稳定的活性琥珀酰亚胺酯中间体,两者皆可与氨基交联形成稳定的肽键;另外,氨基也可以同异硫氰酸基团( $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ )发生定量反应并以硫脲键进行交联。同巯基发生反应的包括马来酰亚胺基团,含有该基团的交联剂可以与蛋白质上的巯基形成稳定的硫醚键。以上这些反应方式目前应用比较广泛,有些需要在交联基团的活化过程中添加额外的试剂,这就意味着需要更多的反应步骤和时间来完成标记;有些商业销售的标记化合物则被预先活化以方便用户,但这些化合物受到稳定性和反应条件的限制,不能长期保存。此外,在实际工作中,以上提到的标记基团的可选择性比较有限,通常在被标记物中进行一种类型的标记(如  $-\text{NH}_2$  同  $-\text{COOH}$  或  $-\text{SH}$  的交联反应)之后,即难以进行第二,以至第三种标记。

[0004] 组氨酸由于其侧链的咪唑基团上的两个 N 原子各含有一对孤电子,因而具有较强的与二价金属离子(如  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ )的配位能力,这一特性在许多研究和应用中得到验证。比如,人血液中存在有一种富组氨酸的糖蛋白(histidine-rich glycoprotein, HRG),在 pH 和  $\text{Zn}^{++}$  浓度的调节下,HRG 上组氨酸通过与  $\text{Zn}^{++}$  的络合,引起一系列蛋白结构的变化和信号转导,最终引发细胞凋亡,抑制血管的生成<sup>[2]</sup>。又如,6 联组氨酸序列( $\text{His}_6$ )与  $\text{Ni}^{++}$  的络合能力被研究者开发成为一种使用极为广泛的蛋白质表达纯化手段,德国 QIAGEN 公司开发的用于纯化和检测  $\text{His}_6$  标签蛋白的试剂盒,即利用了组氨酸与 Ni-NTA 可

逆的高亲和力相互作用<sup>[3]</sup>。在此基础上,通过在Ni-NTA上交联荧光基团,His<sub>6</sub>序列与Ni-NTA的高亲和力也被发展用于His<sub>6</sub>标签蛋白的荧光标记,但所报道的这些标记基团在结合蛋白前后没有荧光强度的改变,不仅需要序列中包含连续的6个组氨酸残基,且荧光标记结构庞大,应用受到限制<sup>[4][5]</sup>。组氨酸与Cu<sup>++</sup>的络合能力也被广泛地研究,其中有研究者利用含共轭芳香环的化合物与铜离子结合,制备成为一种荧光探针,利用竞争置换法检测溶液中游离的组氨酸,该方法虽然灵敏度较高,但从其反应原理上(置换法)无法进行多肽和蛋白质的标记<sup>[6]</sup>。

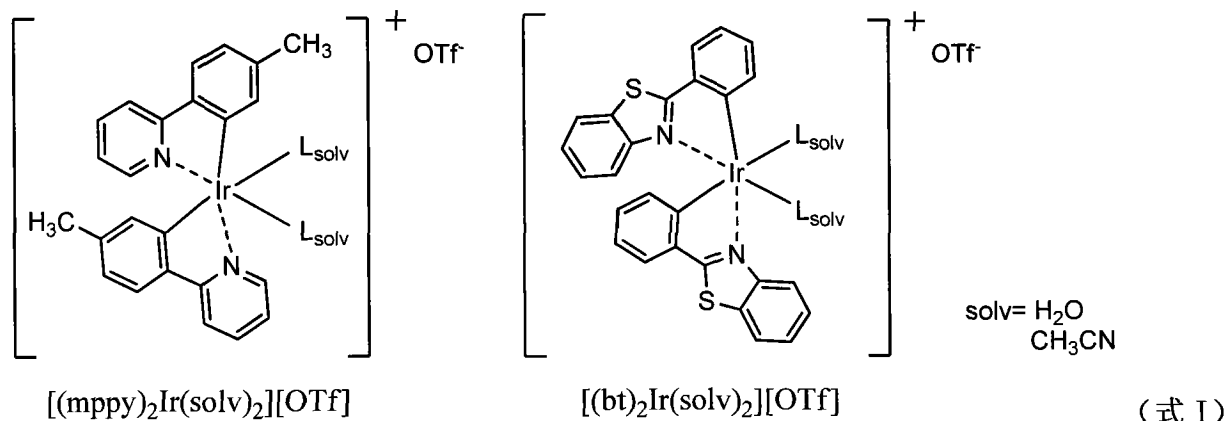
[0005] 本发明的特色是利用新型的过渡金属铱配位化合物,直接地、特异性地标记多肽和蛋白质(抗体)中的单个组氨酸残基,标记前后荧光强度大大增强,形成的荧光基团分子量小,标记过程简单快速,形成的产物化学性质稳定,光学性质优良,可以广泛用于免疫检测、分子示踪等领域。

### 发明内容

[0006] 本发明是利用一类环金属铱配位化合物,对抗体、多肽等蛋白质进行标记,发明内容包括标记过程与分析方法,以及标记产物用于进一步的生物分析。

[0007] 两个此类化合物的结构如式 I 所示。

[0008]



[0009] 其中 mppy 代表 2-(p-tolyl)pyridine(2-(对甲苯基)吡啶), bt 代表 2-phenylbenzothiazolate(2-(苯基)苯并噻唑), OTf<sup>-</sup> 代表 Trifluoromethanesulfonate(三氟甲基磺酸根), L<sub>solv</sub> 代表易于从中心金属脱离的溶剂分子,比如水或乙腈。

[0010] 本发明的主要优点在于:

[0011] 1) 利用环金属铱配位化合物与蛋白质的单个组氨酸残基(Histidine)结合进行标记,标记产物稳定、不可逆。作为一种新颖的交联方式,提供除了(-COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH)交联基团之外的另一种选择。

[0012] 2) 所使用的标记反应是通过组氨酸残基与金属配位化合物络合,反应在常温、常用的缓冲溶液中进行,不需要额外的交联试剂,操作步骤简单。

[0013] 3) 大多数的荧光标记物在与生物分子结合之前就已具备荧光,标记前后,荧光标记物的发光特性不会有明显的改变。而本发明所使用的金属配位化合物在与蛋白质的组氨酸残基结合之前仅有极微弱的荧光,标记后形成的复合物则有明显的荧光增强,从而集化

学交联和荧光标记于一步之中。

[0014] 4) 环金属配位化合物具有较好的光稳定性、较长的荧光寿命等光物理学特性,此外用于高灵敏度的电化学发光检测将是此类化合物的另一重要优势。

[0015] 5) 环金属铱配位化合物性质稳定,在常规条件下以固体或溶液形式可以长时间保存。

[0016] 6) 该发明中的环金属铱配位化合物与组氨酸残基形成的发光基团能够被从紫外到蓝光的任何波长所激发。

[0017] 7) 该发明中的环金属铱配位化合物与组氨酸残基形成的发光基团也能够通过电化学发光的方式激发,产生与光致发光同样的发射。

[0018] 本发明尤其突出的特点和优势在于可用于抗体分子的快速高效标记。即便来源物种不同,抗体分子 IgG 通常具有相似的结构,其上含有的组氨酸残基也通常在 10 ~ 20 个左右,且多分布于分子表面,易于标记。例如图 1 所示的是一个小鼠源的 IgG 分子晶体结构,其上突出显示的组氨酸残基共有 28 个。

### 附图说明

[0019] 图 1 是小鼠源的 IgG 分子晶体结构,其上的组氨酸残基被突出显示。

[0020] 图 2 中 1,2,3,4 分别代表四种化合物 L-组氨酸,组胺,尿刊酸和咪唑,左侧显示四种化合物的结构,右侧显示其各自与铱配位化合物  $[(mppy)_2Ir(CH_3CN)_2](OTf)$  反应后在紫外灯照射下产生荧光的结果。

[0021] 图 3 是  $(mppy)_2Ir$  与组氨酸形成的发光基团结构示意图。

[0022] 图 4 是铱配位化合物同组氨酸结合前后吸收光谱的变化。

[0023] 图 5 是  $[(mppy)_2Ir-histidine]$  在 328nm 紫外光激发下产生的荧光发射光谱,最高发射峰在 490nm,次峰在 515nm。

[0024] 图 6 是两种多肽(左:KQEASGSTA 和右:KQEAHGSTA)分别与  $[(mppy)_2Ir(CH_3CN)_2](OTf)$  反应后在紫外灯照射下产生荧光的结果。

[0025] 图 7 是含组氨酸的多肽结合铱配位化合物后在 328nm 紫外光激发下产生的荧光发射光谱。

[0026] 图 8 是  $(mppy)_2Ir$  与多肽或蛋白质肽链序列中的组氨酸形成的发光基团结构示意图。其中加深显示的为肽链的主链结构,Rn' 和 Rn 各自代表肽链中组氨酸残基上游和下游的氨基酸侧链残基。

[0027] 图 9 是 (1) 兔抗羊 IgG 在 PBS 中, (2) 兔抗羊 IgG 中加入铱配位化合物, (3) 铱配位化合物在 PBS 中,在紫外灯照射下产生荧光的结果。

[0028] 图 10 是兔抗羊 IgG 结合铱配位化合物后在 328nm 紫外光激发下产生的荧光发射光谱。

[0029] 图 11 是标记或未标记荧光基团的兔抗羊抗体,用于基于 96 微孔板的免疫检测实验。

### 具体实施方式

[0030] 实施实例 1:铱配位化合物同组氨酸等四种化合物的络合反应

[0031] [(mppy)<sub>2</sub>Ir(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>](OTf) 分别与组氨酸等四种含咪唑基团的化合物(L-组氨酸,组胺,尿刊酸以及咪唑)反应时,[(mppy)<sub>2</sub>Ir(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>](OTf)及四种物质的浓度均为50 μM,反应在PBS(pH 7.4)中进行,在试管内混合后,于室温下静置反应约10min。图2分别显示4种物质的化学结构,以及各自反应结束后的实验结果。在紫外光(365nm)照射下,L-组氨酸,组胺同[(mppy)<sub>2</sub>Ir(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>](OTf)的结合产物能够产生荧光,而另外两个化合物不能够产生荧光。依此所推测的结果是组氨酸中的-NH<sub>2</sub>参与了络合反应,并形成了图3所示的发光基团。图4显示了铱配位化合物同组氨酸结合前后吸收光谱的变化。图5显示了[(mppy)<sub>2</sub>Ir-histidine]在328nm激发下的荧光发射光谱。该反应条件及结果是以下实施例2至4的基础。

[0032] 实施例2:铱配位化合物同含组氨酸多肽的络合反应

[0033] [(mppy)<sub>2</sub>Ir(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>](OTf)分别与两条多肽链(其中一条含有组氨酸残基:KQEAHGSTA,另一条作为对照,不含有组氨酸残基:KQEASGSTA)进行反应时,[(mppy)<sub>2</sub>Ir(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>](OTf)与多肽的浓度均为50 μM,反应在PBS(pH 7.4)中进行。反应物在试管内混合后,于室温下静置反应约10min。两种多肽与铱配位化合物反应结束后,含组氨酸残基的多肽在紫外光(365nm)照射下呈现的荧光(图6)。图7显示了含组氨酸的多肽结合铱配位化合物后,在328nm激发下的荧光发射光谱。由于多肽[1]不含组氨酸残基而多肽[2]序列中含有一个组氨酸残基,这一结果表明环金属铱配位化合物[(mppy)<sub>2</sub>Ir(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>](OTf)与多肽[2]上的组氨酸残基形成了一个类似于图3的发光基团(如图8)。

[0034] 实施例3:铱配位化合物同兔抗羊免疫球蛋白IgG的络合反应

[0035] [(mppy)<sub>2</sub>Ir(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>](OTf)浓度为50 μM,兔抗羊免疫球蛋白IgG的浓度为1mg/mL,反应在PBS(pH 7.4)中进行。以上物质或对照组在试管内混合后,于室温下静置反应约10min。图9显示反应结束后,在紫外光(365nm)照射下[(mppy)<sub>2</sub>Ir(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>](OTf)结合兔抗羊IgG后产生的荧光。图10显示在328nm激发下,结合IgG的铱发光化合物产生的荧光发射光谱。

[0036] 实施例4:荧光标记的兔抗羊抗体用于免疫分析

[0037] 首先,向96微孔板内每孔加入100 μL羊IgG(30 μg/mL,50mM碳酸钠缓冲液,pH9.6),4℃静置过夜。后用300 μL清洗缓冲液(50mM Tris,50mM NaCl,0.1% Tween20,pH8.0)清洗微孔板三次。之后用1%牛血清白蛋白(PBS,pH7.4)在4℃封板过夜,再清洗微孔板三次。之后,向各孔中加入100 μL不同浓度的荧光标记或未荧光标记的兔抗羊抗体,在37℃振荡温育2小时。之后洗去未结合抗体,并用PerkinElmerVictorX4微孔板检测系统检测荧光强度(滤色片设置:355nm激发,515nm发射)。图11显示了每孔的荧光信号的强度与加入的标记后的抗体浓度呈正比关系,表明:1)荧光标记的信号可以有效被酶标仪检测设备获取;2)标记后的兔抗体可以结合在微孔板表面包被的抗原(羊IgG),其生物活性未受标记化合物交联的影响。

[0038] 参考文献

[0039] 【1】<http://www.piercenet.com/files/1601361Crosslink.pdf>

[0040] 【2】Jones AL, Hulett MD, Parish CR. :Histidine-rich glycoprotein:A novel adaptorprotein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation

systems. Immunol Cell Biol. 2005Apr ;83(2) :106-18.

[0041] 【3】<http://www1.qiagen.com/Products/Protein/PureHis/default.aspx>

[0042] 【4】Guignet EG, Hovius R, Vogel H. :Reversible site-selective labeling of membraneproteins in live cells. Nat Biotechnol. 2004 Apr ;22(4) :440-4.

[0043] 【5】Lata S, Gavutis M, Tampé R, Piehler J. :Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation. J Am Chem Soc. 2006Feb 22 ;128(7) :2365-72.

[0044] 【6】李洪祥, 胡文平, 付艳艳 :组氨酸荧光探针及其专用荧光化合物, 中华人民共和国国家知识产权局发明专利, 公开号 CN 101037595A。

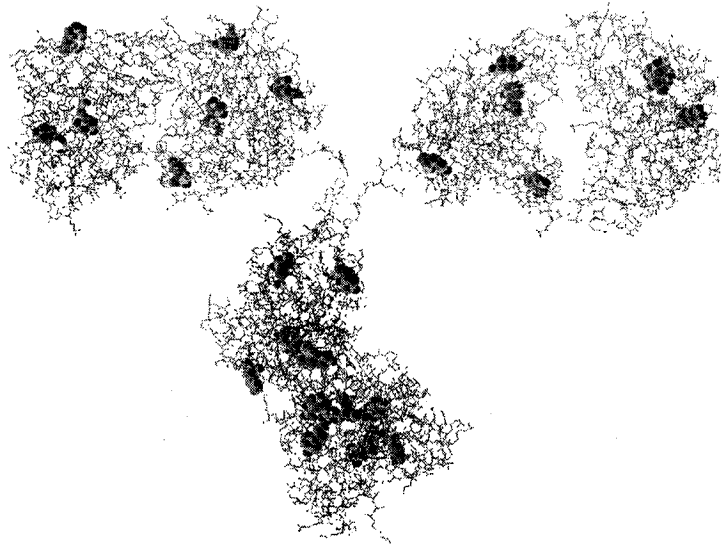


图 1

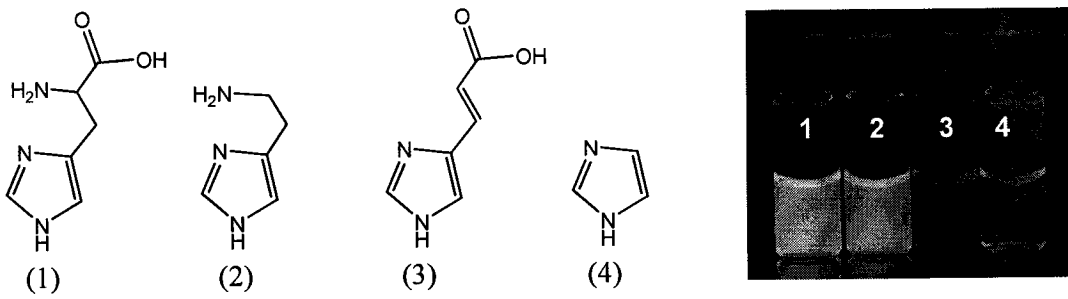


图 2

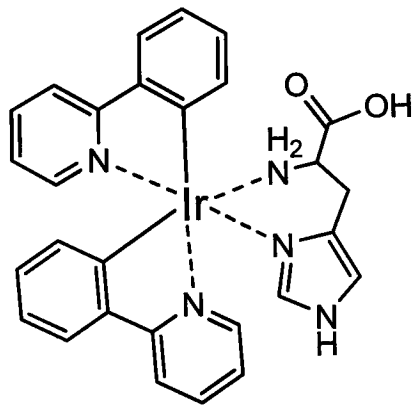


图 3

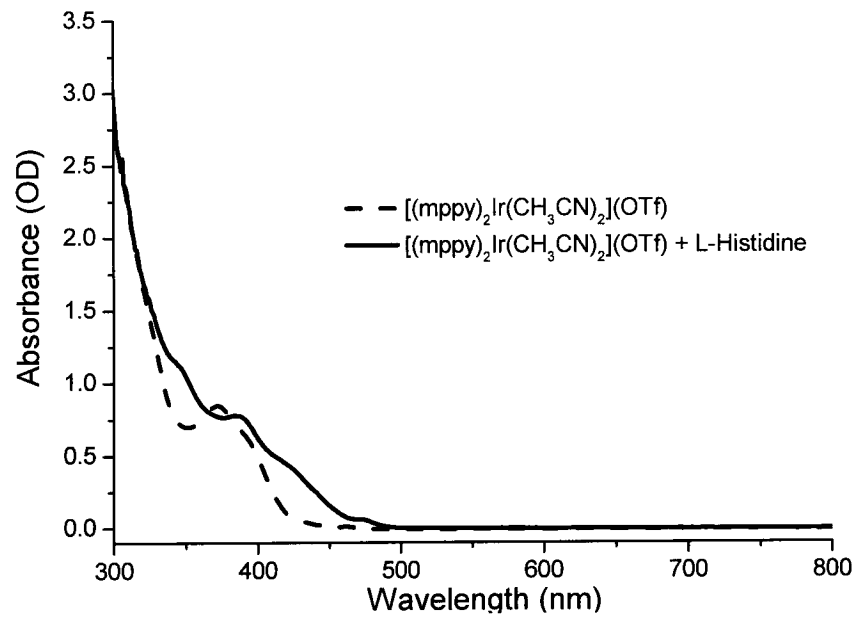


图 4

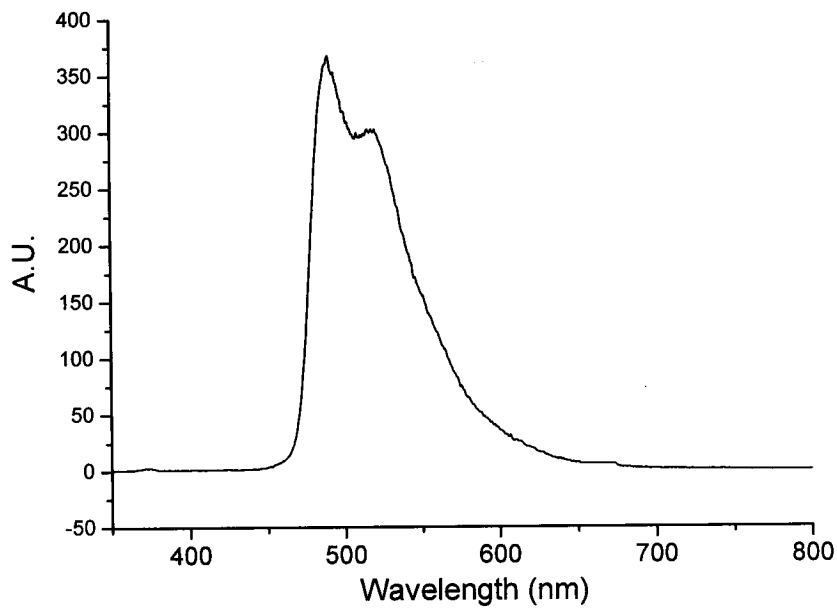


图 5

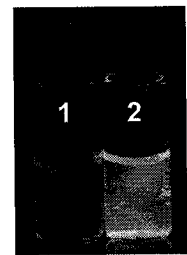


图 6

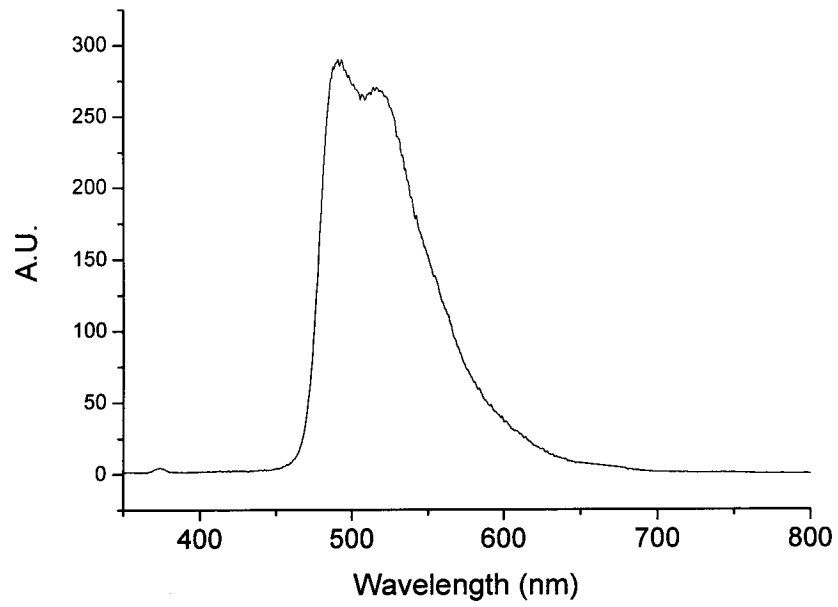


图 7

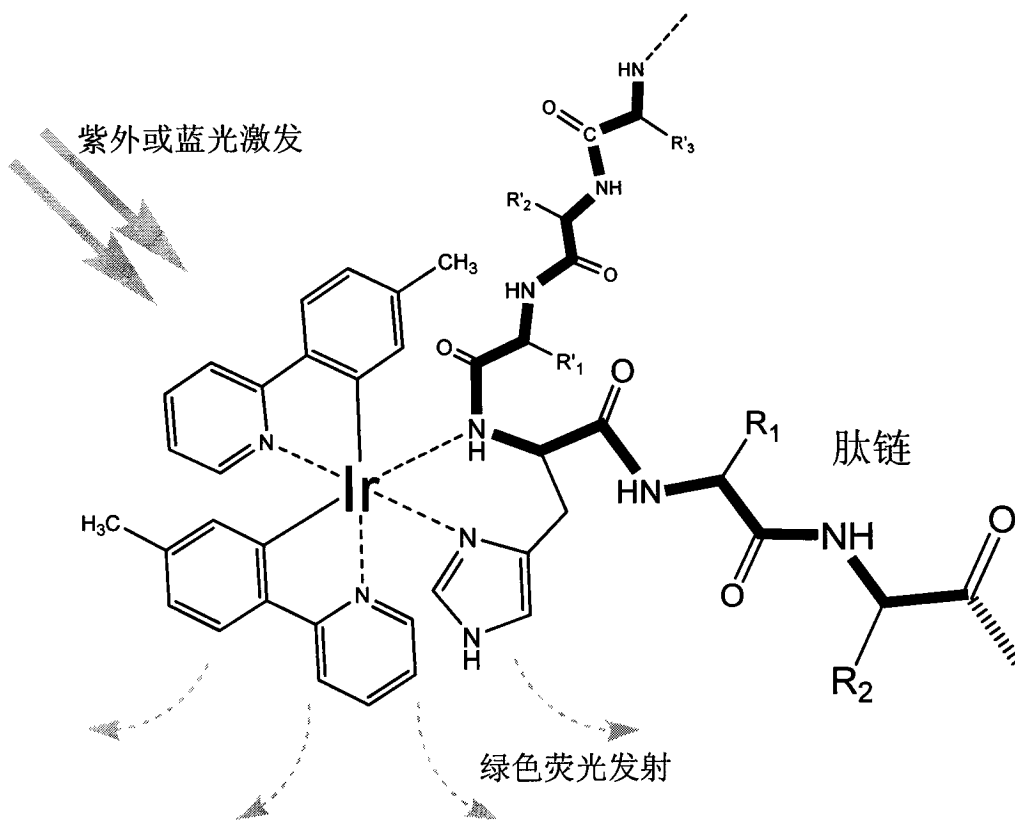


图 8

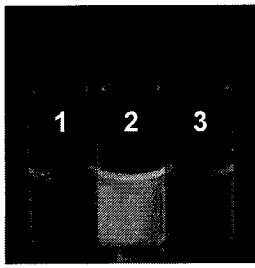


图 9

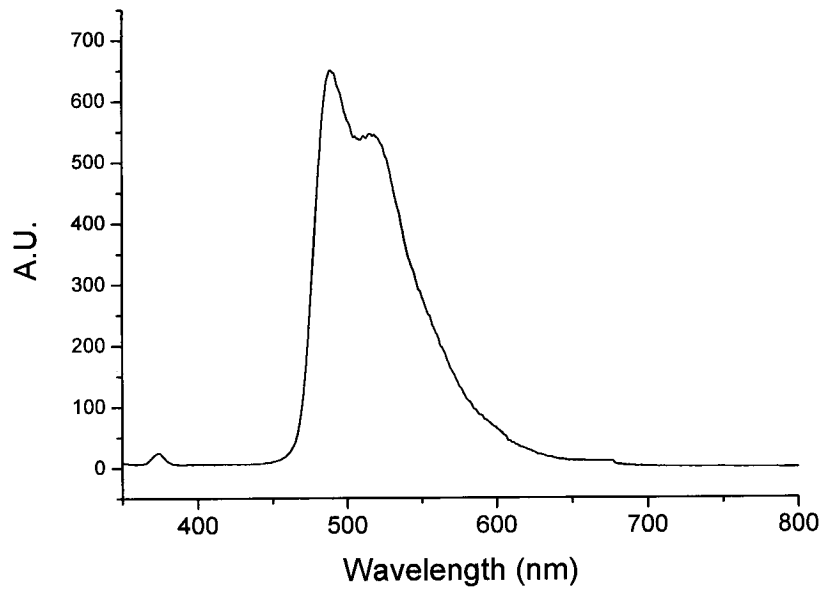


图 10

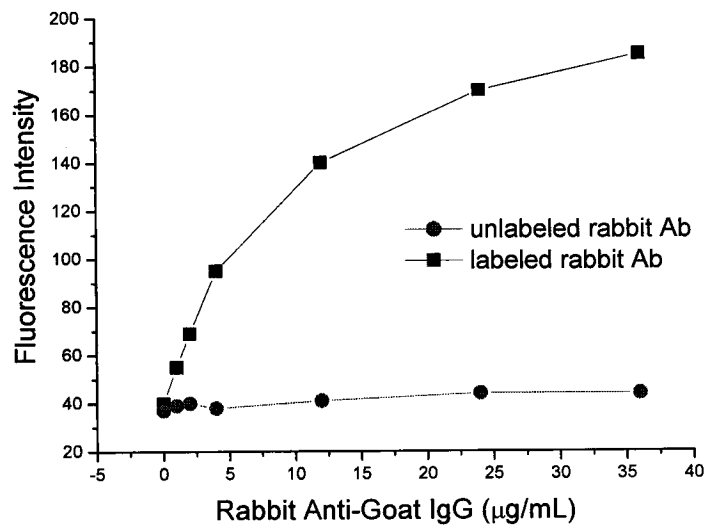


图 11

专利名称(译)	用一类基于与组氨酸结合生成荧光基团的铈配合物标记抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101750486A</a>	公开(公告)日	2010-06-23
申请号	CN200810242798.5	申请日	2008-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	苏州纳凯科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州纳凯科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州纳凯科技有限公司		
[标]发明人	费浩 周明 贾俊丽 王小波 黄泽柱		
发明人	费浩 周明 贾俊丽 王小波 黄泽柱		
IPC分类号	G01N33/533 C07K2/00 C07K16/00		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种新颖的生物分子标记方法，即用一种含溶剂分子(水或乙腈)的环金属铈配位化合物通过与蛋白质或多肽中的组氨酸残基结合而形成一个荧光基团。该方法可以标记多肽和包括抗体在内的蛋白质等生物活性分子，并可进一步用于生物检测、细胞和组织标记、生物分子材料示踪等应用领域。由于这类化合物的荧光颜色丰富，且标记反应在常温和常规缓冲溶液中一步完成，因而比市场上通常使用的标记化合物及标记方法具有优势，具有广泛的应用前景。

