

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025719.X

[43] 公开日 2007年7月4日

[11] 公开号 CN 1993618A

[22] 申请日 2005.7.28

[21] 申请号 200580025719.X

[30] 优先权

[32] 2004.7.30 [33] JP [31] 223019/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/013812 2005.7.28

[87] 国际公布 WO2006/011543 日 2006.2.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.29

[71] 申请人 株式会社先端生命科学研究所

地址 日本埼玉县

[72] 发明人 青柳克巳 饭田久美子 松原直子
石田雄彦

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陶家蓉

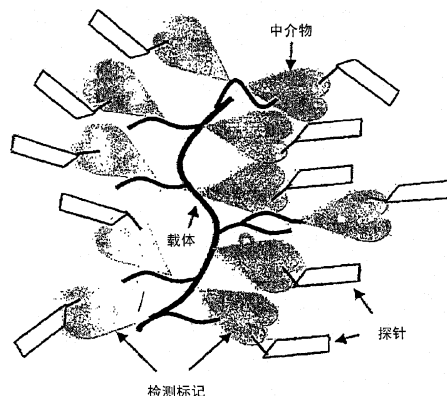
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称

探针复合物

[57] 摘要

[问题] 提供具有确保用于高灵敏度免疫测定的高度操作能力的可溶性高灵敏探针复合物。 [解决问题的方法] 可通过将亲水中介物连接到载体并将检测标记如生物素、半抗原或低分子量肽和抗体连接到中介物来制造该高灵敏探针复合物。 通过将亲水中介物连接到载体, 可连接许多半抗原分子, 同时探针复合物整体变得亲水, 从而可获得不诱导非特异性反应并具有高度操作能力的探针复合物。



-
1. 一种探针复合物，其中，亲水中介物连接到载体，探针和检测标记连接到中介物。
 2. 如权利要求 1 所述的探针复合物，其特征在于，所述检测标记是生物素。
 3. 如权利要求 1 所述的探针复合物，其特征在于，所述检测标记是半抗原。
 4. 如权利要求 1 所述的探针复合物，其特征在于，所述检测标记含有放射性同位素。
 5. 如权利要求 1 所述的探针复合物，其特征在于，所述检测标记是具有结合抗体能力的物质。

探针复合物

[发明领域]

本发明涉及制造探针复合物的技术，该探针复合物中，探针和检测标记如半抗原或低分子量肽通过中介物连接到载体。如此制得的探针复合物可广泛用于采用免疫反应的免疫测量，包括酶免疫测定和免疫组织化学。

[背景技术]

免疫组织化学法和免疫测定法已经被用作一种利用抗原和抗体之间的免疫反应检测生物中的自身抗原或外源抗原的方法。这些方法的高特异性和灵敏度使其可能检测生物中的少量物质而无需分离这些物质。

免疫组织化学法是通过抗原和抗体之间的特异性反应来检测抗原在细胞和组织内的定位的方法。广泛采用的免疫组织化学 ABC 法是按照以下步骤进行的。从冷冻组织或石蜡固定组织制作组织切片。用牛血清白蛋白等将它们封闭以防止非特异性结合。使其与结合感兴趣抗原的生物素化抗体反应以形成抗原和生物素化抗体之间的复合物。在免疫复合物中加入抗生物素蛋白偶联的酶如辣根过氧化物酶(HRP)以形成生物素-抗生物素蛋白酶复合物，并通过酶的发色或发光底物检测感兴趣的抗原。或者，可将包括荧光素的荧光材料或包括吖啶酮酯的发光材料加到抗生物素蛋白中以检测感兴趣的抗原。

检测生物样品如血清中的抗原的免疫测定方法可按照以下步骤进行。将与待测抗原结合的捕获抗体固定到固相如微型板上。随后用牛血清白蛋白等进行封闭过程以防止非特异性吸附到抗体和固相。加入含有待测抗原的样品，使捕获抗体结合感兴趣的抗原。将探针复合物加入捕获的抗原中，该探针复合物中，探针如识别抗原的抗体和半抗原如生物素连接。这导致在固相如微型板上形成免疫复合物：捕获抗体-抗原-探针复合物。免疫复合物中的生物素与 HRP 标记的抗生物素蛋白偶联，加入 HRP 的发色或发光底物以测量感兴趣的抗原。

如上所述，免疫组织化学法和免疫测定法使用含有探针如抗体和与其相连的生物素的探针复合物。同时，已经开发的方法中，半抗原如二硝基苯酚(DNP)、洋地黄毒苷(DIG)或 FITC 可代替生物素连接到抗体以产生探针复合物，同时酶被偶联到识别

这些半抗原以进行检测的抗体上(参见, 例如, 非专利文献 1)。

已经开发出不使用酶的免疫测定法, 其中, 通过将荧光底物如荧光素和发光底物如吡啶鎓酯而非生物素连接到抗体来制造探针复合物, 然后用荧光或发光进行检测。

这些免疫化学方法和免疫测定法是高度灵敏和特异的检测方法。然而, 生物中有许多难以通过常规方法检测的痕量物质。例如, 正常个体的人胃泌素释放肽前体(proGRP)的血清浓度约为 14pg/ml, 这说明与在正常人中血清浓度为 5-20 ng/mL 的癌胚抗原(CEA)或甲胎蛋白相比需要约 1000 倍的灵敏度。作为外源抗原, 血液中丙肝病毒(HCV)的病毒水平非常低, 正因如此, 需要能够检测每毫升 100-1,000 拷贝病毒 RNA 的灵敏度, 表示为蛋白质浓度, 这约等于每毫升 0.03-0.3 皮克核心抗原。

尝试提高免疫组织化学法和免疫测定法的灵敏度以检测生物中的痕量物质。在可能影响提高免疫组织化学法和免疫测定法灵敏度的各种因素中, 一个因素是提高连接有探针如上述结合抗原的抗体和生物素的探针复合物的功能。例如, 增加连接到一种抗体分子的生物素分子的数目将增加含有结合到生物素的抗生物素蛋白的分子和结合抗生物素蛋白的酶的数量, 从而增强发色或发光信号以提高灵敏度。

然而, 半抗原被直接连接到抗体以制备常规的包含探针如抗体和与其连接的生物素或半抗原的探针复合物。例如, 一种方法中, 抗体中的氨基与引入生物素的 NHS 酯反应以通过共价结合连接生物素和抗体。在该方法中, 对反应条件的研究将增加连接到一种抗体分子的生物素分子的数量。然而, 抗体中所含氨基的数量和可连接到抗体的生物素的数量都是有限的。此外, 连接于抗体抗原决定簇附近的氨基的生物素可能会由于空间位阻而对抗体与其抗原的结合造成不良影响。

此外, 当连接的半抗原是疏水物质时, 将通过许多疏水性半抗原与抗体的结合而增强探针复合物整体的疏水性。在进行免疫组织化学法和免疫测定法时, 探针复合物的强疏水性将导致由于疏水键造成的复合物与组织或平板的非特异性结合, 所导致的背景提高阻碍了足够灵敏度的获得。

非专利文献 1: Harlow E 和 Lane, D. 《抗体: 实验室手册》(Antibodies: LABORATORY MANUAL) (U.S.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 340-341 页。

[发明概述]

因此, 本发明的目的是提供一种具有确保用于高灵敏度免疫测定的高度操作能力的可溶性高灵敏探针复合物。

为了解决上述问题，发明人最近发现，可通过将亲水中介物连接到载体并将检测标记如生物素、半抗原、放射性同位素或低分子量肽和抗体连接到中介物来制造该高灵敏探针复合物，从而完成了本发明。通过将亲水中介物连接到载体，能连接增加数量的检测标记，同时探针复合物整体变得亲水，从而可获得不诱导非特异性反应并具有高度操作能力的探针复合物。

[附图简述]

[图 1]

本发明的探针复合物的示意图。

[本发明的有益效果]

本发明的探针复合物是经过改进以检测生物内源抗原和蛋白质的探针复合物。使用这些探针复合物能够通过免疫组织化学法和免疫测定法测量以前无法测量的抗原和蛋白质。

此外，由于中介物的亲水性提高了探针复合物的亲水性，因此即便检测标记如半抗原、生物素、放射性同位素和低分子量肽是疏水的，整体疏水性也将降低。因此预计免疫反应中通过疏水键发生的非特异性反应将减少。

[发明详述]

在本发明中，亲水性物质如中介物连接到载体，探针和检测标记如生物素、半抗原、放射性同位素、低分子量肽和凝集素直接连接到亲水性物质。这里使用的检测标记是标记的物质，以将本发明的探针复合物用于免疫反应。

在本发明中，对载体没有限制，只要其分子量范围为 20,000-4,000,000。然而，为提高灵敏度，需要分子量超过一定水平的载体以使更为大量的探针如抗体和半抗原可与它们结合。载体的例子包括多糖、高分子量蛋白质和肽聚合物，它们具有 20,000-20,000,000，优选 20,000-4,000,000，更优选 70,000-2,000,000 的适当分子量。当使用多糖和肽聚合物时，具有更多侧链的载体相比那些分子量相同但侧链较少的载体能结合更多中介物。

用于本发明的多糖载体包括，但不限于：葡聚糖、氨基葡聚糖、菲可(Ficoll)、糊精、琼脂糖、各种纤维素、壳多糖、水溶性脱乙酰壳多糖和可溶性淀粉。用于本发

明的高分子量蛋白质载体包括，但不限于： β -半乳糖苷酶、甲状腺球蛋白和血蓝蛋白等。可用于本发明的肽聚合物载体是包括聚赖氨酸在内的各种肽聚合物。

分子量不小于 2000 的各种水溶性物质可用作本发明的中介物。例如，中介物包括蛋白质，如牛血清白蛋白、人血清白蛋白、运铁蛋白、核糖核酸酶、酪蛋白、血红蛋白和卵清蛋白，以及抗生物素蛋白可溶性脱乙酰壳多糖。也可使用肽聚合物，如聚赖氨酸。

探针可以是任何能结合待测物质的蛋白质，如抗体(单克隆抗体和多克隆抗体)及其片段(F(ab')₂、Fab'、Fab、F(abc')、Fabc'等)，以及各种受体。也可使用各种抗生物素蛋白(抗生物素蛋白 D、链霉抗生物素蛋白等)、蛋白 A、蛋白 G、蛋白 L、各种凝集素(伴刀豆球蛋白 A、小扁豆凝集素、菜豆(*Phaseolus Vulgaris*)凝集素等)和核酸结合探针分析物等。

可使用任何抗体，只要它们能结合感兴趣的抗原或分析物。用蛋白酶类如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶处理抗体可得到片段，如 F(ab')₂ 和 Fab。抗体的重链(H 链)通常通过 S-S 键相互连接，用还原剂可断裂该键。还原剂包括半胱胺和巯基乙醇，用还原剂也可将 F(ab')₂ 切成 Fab'，从而产生新的巯基(SH)。这种抗体片段(F(ab')₂、Fab'、Fab、F(abc')、Fabc'等)可用于本发明。

在本发明的中介物上可连接诸如半抗原、低分子量肽和凝集素等物质作为检测标记，这些物质可用于检测免疫反应产生的信号。检测标记是经过标记以便将探针复合物用于免疫测量的物质。预计这种检测标记是生物素或半抗原。半抗原包括二硝基苯酚(DNP)、洋地黄毒苷(DIG)和 FITC 等。当生物素连接到探针复合物时，例如，用酶如 HRP、荧光物质如荧光素或发光材料如吖啶鎓酯标记的对生物素具有亲合力的抗生物素蛋白与探针复合物反应，并可通过发色、荧光或发光等检测信号。

同时，荧光材料和发光材料如异硫氰酸荧光素(FITC)和吖啶鎓酯可作为半抗原直接连接到中介物。此外，可通过荧光或发光检测信号。

此外，将放射性同位素直接连接到中介物以及将放射性同位素标记的半抗原连接到中介物都是允许的。此时，可通过它们的放射性检测信号。

而且，可连接 DIG 和 DNP 作为半抗原。这里，可检测用酶、荧光材料或发光材料标记的 DIG-或 DNP-结合抗体反应生成的信号。此时，任何材料都可用作免疫测量系统的检测标记，只要能得到抗半抗原的抗体即可。

除了半抗原，低分子量肽也可用作检测标记。将低分子量肽连接到探针复合物的

中介物上，并用酶、荧光材料或发光材料标记抗该肽的抗体以进行信号检测。这些肽可含有糖链或脂质。

当通过抗检测标记的抗体检测免疫反应信号时，也可使用除半抗原和低分子量肽之外的材料，只要该检测标记是能产生抗体的抗原性物质并可连接到中介物即可。

也可将发光或发色酶的底物连接到中介物作为检测标记，因为酶与底物反应使得信号检测得以进行。

要连接到本发明探针复合物的检测标记的理想分子量不大于 10,000。这是因为那些具有较高分子量的标记可能由于连接到中介物的分子数有限而无法提高免疫测定的灵敏度。

此外，各种凝集素(伴刀豆球蛋白 A、小扁豆凝集素、菜豆凝集素等)也可用作检测标记。

我们下面将非限制性地简单阐述探针复合物的制造方法。

在本发明中，制造了载体与中介物连接的复合物。例如，当它们连接到作为载体的带有糖链的葡聚糖或菲可等以及连接到作为中介物的蛋白质如 BSA 和酪蛋白时，首先使葡聚糖或菲可与高碘酸钠反应生成醛基。醛基与蛋白质如 BSA 中的氨基反应，形成含有载体和中介物的复合物。

该复合物相比那些仅含有载体的复合物不仅亲水性增加，而且可用于连接探针和半抗原等的面积也增加。

作为检测标记的探针和半抗原然后被连接到中介物上。为控制连接的探针和半抗原的数量，用于各连接的官能团宜互不相同。例如，如果将生物素作为半抗原而 Fab' 作为探针连接到 BSA(中介物)，可考虑使用下述方法。

将磺基-NHS-LC-生物素的 NHS 酯(其中 NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)酯连接到生物素)结合到 BSA 的氨基上。同时，在 BSA 中引入接头以连接 Fab' 和 BSA。用盐酸半胱胺、DTT(二硫苏糖醇)等还原 BSA 内的 S-S 键，产生巯基。巯基与作为接头的 1,2-二马来酰亚胺反应引入马来酰亚胺基。马来酰亚胺基和 Fab 的巯基反应得到含有载体、中介物、检测标记和探针的探针复合物。

检测标记包括各种半抗原、放射性同位素和肽。当将肽连接到中介物时，半胱氨酸被引入肽的末端，例如，中介物如 BSA 中的巯基和氨基可用于连接。也可用接头将琥珀酰亚胺基等引入中介物以使它们与肽中的氨基反应。

可用共价键将上述载体连接到中介物、将中介物连接到检测标记并将中介物连接

到探针。各种官能团可用于共价键连接。例如，可利用醛基和氨基、胍基和醛基、马来酰亚胺基和巯基、琥珀酰亚胺基和氨基、乙烯基和羟基基、乙烯基和巯基之间的共价键，但不限于这些官能团之间的连接。如果载体、中介物、检测标记和探针缺乏合适的官能团，可通过引入带有官能团的接头分子实现连接。

可接受任何接头，只要它们具有两个或多个不同或相同的官能团即可。

所得包含载体、中介物、探针和作为检测标记的半抗原或低分子量肽的探针复合物可用于免疫反应如免疫组织化学和免疫测定。当使用生物素时，可将抗原连接到探针复合物，然后使抗生物素蛋白-HRP 与加入的比色底物或发光底物反应，从而进行检测。除了 HRP，结合(连接)到酶如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖氧化酶或萤光素酶的抗生物素蛋白也可用于检测。

或者，吡啶鎓酯及其衍生物可连接到探针复合物。吡啶鎓酯由于具有 NHS 酯可与 BSA 等的氨基反应。吡啶鎓酯可用于化学发光免疫测定，并可用于高灵敏测量系统。

当将 DNP、DIG、FITC 或低分子量肽用作检测标记时，可通过共价键将它们连接到中介物。酶如 HRP 可连接到可特异性结合这些材料的抗体，并可通过发色和发光进行检测。

[实施例]

我们下面将描述关于探针复合物的制造方法和它们的性能的实施例，以更加详细地非限制性地阐述本发明。

(实施例 1)

用菲可 400 作为载体制造生物素-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物

称量 44mg 菲可 400(Amersham Biosciences)并将其溶于 0.8mL 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 加入 0.4mL 高碘酸钠溶液并混合。室温孵育 2 小时后通过凝胶过滤(Sephadex G25, Amersham Biosciences)除去过量高碘酸钠, 加入牛血清白蛋白(BSA)溶液并在室温反应 3 小时, 将 BSA 加入菲可。为稳定反应产物, 加入硼酸二甲胺(DMAB; Seikagaku Corporation)并混合, 室温反应 1 小时, 然后加入 Tris 溶液以封闭菲可上未反应的醛基。室温反应过夜后, 通过凝胶过滤(Sephacryl S300, 1.6×30)纯化反应产物, 并测量 280nm 的吸光度以计算载体 BSA 偶联物的浓度。用盐酸半胱胺还原 1 mg 载体 BSA 偶联物, 过量盐酸半胱胺通过凝胶过滤(Sephadex G25, Amersham

Biosciences)除去, 加入溶于二甲基甲酰胺的 1,2-二马来酰亚胺和磺基-NHS-LC 生物素(Pierce #21335)水溶液并混合, 然后将混合物室温孵育 1.5 小时使其反应, 在载体 BSA 偶联物中引入马来酰亚胺基和生物素。通过凝胶过滤(Sephadex G25, Amersham Biosciences)除去过量 1,2-二马来酰亚胺和磺基-NHS-LC 生物素。在 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中抗-HCV 核心抗原单克隆抗体的 F(ab)'₂ 的溶液(等量 C11-14 F(ab)'₂ 和 C11-9 F(ab)'₂ 的混合物)中加入 1/10 体积 0.15M 盐酸半胱胺, 混合物于 37°C 孵育 1.5 小时, 通过凝胶过滤(Sephadex G25, Amersham Biosciences)除去过量盐酸半胱胺以获得抗-HCV 核心抗原单克隆抗体 Fab'。将该 Fab' 和马来酰亚胺和生物素偶联的载体 -BSA 混合, 于 4°C 孵育过夜, 进行凝胶过滤(Sephacryl S300, 1.6×30)以除去游离 Fab'。此时, 本发明的载体 BSA-Fab' 复合物似乎接近空隙分数(void fraction), 就 Sephacryl S300 分子量 1,500,000 的排阻极限而言, 估计该复合物的分子量为数十万或更高。测量用这种方法制备的载体 BSA-Fab' 复合物在 280nm 的吸光度, 并计算浓度(假定吸光度与抗体浓度相等)。

(实施例 2)

用常规方法制备生物素化的抗-HCV 核心抗原单克隆抗体

按照磺基-NHS-LC-生物素(Pierce #21335)所附文件所述的方法制备生物素化的抗体。在 PBS 中混合磺基-NHS-LC-生物素和抗-HCV 核心抗原单克隆抗体(等量 C11-14 IgG 和 C11-9 IgG 的混合物), 并在室温孵育 1 小时, 然后通过凝胶过滤(Sephadex G25, Amersham Biosciences)除去过量磺基-NHS-LC-生物素。测量生物素化的抗-HCV 核心抗原单克隆抗体在 280nm 的吸光度以计算抗体浓度。

(实施例 3)

实施例 1 中制备的生物素-抗-HCV 核心抗原单克隆抗体复合物与实施例 2 中用常规方法制备的生物素化的抗-HCV 核心抗原单克隆抗体的比较。

用 0.1M 乙酸盐/0.1M 磷酸盐缓冲液(pH 4.8)将抗-HCV 核心抗原单克隆抗体调至 4μg/mL, 在 96 孔微型板的各孔中加入 250μl, 并将各孔在 4°C 孵育过夜。用 PBS 洗涤之后在各孔加入 350μl 0.5%酪蛋白, 各孔在室温孵育 3 小时。加入浓度为 0 fmol/L、148 fmol/L、444 fmol/L、1333 fmol/L、4000 fmol/L、12000 fmol/L 和 36000 fmol/L 的重组 HCV 核心抗原(c11)作为样品, 将各孔于室温下搅拌着孵育 1 小时。用含 0.05% Tween 20 的 10 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.3(洗涤液)洗涤 6 次后, 在各孔中加入浓度为 1μg/mL 的实施例 1 中制备的生物素-抗-HCV 核心抗原单克隆抗体复合物和实施例 2

中用常规方法制备的生物素化的抗-HCV 核心抗原单克隆抗体各 200 μ l 作为第二抗体, 并将各孔室温孵育 1 小时。用洗涤液洗涤 6 次后, 在各孔加入 200 μ L 稀释 5,000 倍的 HRP 连接的抗生物素蛋白溶液, 并将各孔在室温孵育 30 分钟。随后, 用洗涤液洗涤 6 次后, 在各孔加入 200 μ L 底物溶液(邻苯二胺-过氧化物混合物), 各孔在室温孵育 30 分钟, 并加入 50 μ L 5N 硫酸以终止反应。在微型板阅读器(MPRA4i, TOSOH)上测量 492nm 的吸光度(参考波长为 600nm)。表 1 显示了加入各浓度重组 HCV 核心抗原(c11)的孔的吸光值减去 0 fmol/L 的吸光值得到的值。

[表 1]

核心抗原浓度	用常规方法制备的生物素化的抗体	按实施例 1 制备的生物素-抗体复合物
36000 fmol/L	2.083	2.983
12000 fmol/L	0.844	2.353
4000 fmol/L	0.330	1.213
1333 fmol/L	0.107	0.509
444 fmol/L	0.030	0.184
148 fmol/L	0.002	0.052
(0 fmol/L 的值:	0.024	0.017)

如表 1 所示, 当使用常规方法制得的生物素化的抗体时我们不能发现 444 fmol/L 核心抗原和 0 fmol/L 之间有任何区别, 而在实施例 1 中制备的生物素-抗体复合物显然足以检测 444 fmol/L 核心抗原, 甚至是进一步稀释 3 倍的 148 fmol/L 核心抗原。当比较吸光度时, 相比用常规方法获得的生物素-抗体复合物, 本发明的生物素-抗体复合物在 1333 fmol/L 时的吸光度高出约 5 倍, 在 444 fmol/L 时的吸光度高出约 6 倍。

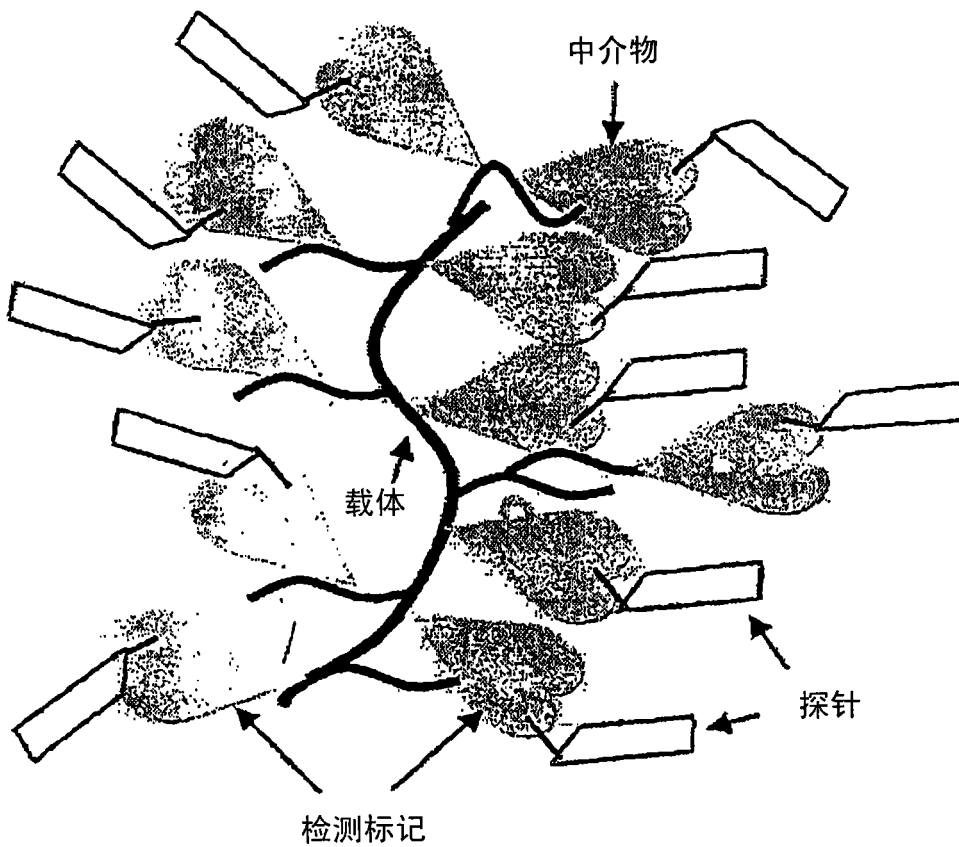


图 1

专利名称(译)	探针复合物		
公开(公告)号	CN1993618A	公开(公告)日	2007-07-04
申请号	CN200580025719.X	申请日	2005-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	青柳克巳 饭田久美子 松原直子 石田雄彦		
发明人	青柳克巳 饭田久美子 松原直子 石田雄彦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/547		
CPC分类号	G01N33/542 G01N33/54393		
优先权	2004223019 2004-07-30 JP		
其他公开文献	CN1993618B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

[问题]提供具有确保用于高灵敏度免疫测定的高度操作能力的可溶性高灵敏探针复合物。[解决问题的方法]可通过将亲水中介物连接到载体并将检测标记如生物素、半抗原或低分子量肽和抗体连接到中介物来制造该高灵敏探针复合物。通过将亲水中介物连接到载体，可连接许多半抗原分子，同时探针复合物整体变得亲水，从而可获得不诱导非特异性反应并具有高度操作能力的探针复合物。

