



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01120463. X

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1164947C

[22] 申请日 2001.7.16 [21] 申请号 01120463. X
 [71] 专利权人 中国科学院化工冶金研究所
 地址 100080 北京市海淀区中关村北二条 1 号
 [72] 发明人 吴 萍 顾 铭 欧阳藩
 审查员 周 航

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
 代理人 李 柏

权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称 利用固相免疫吸附法制备交联抗体的方法

[57] 摘要

本发明所属技术领域为医疗诊断中应用最广的标记免疫分析和生物芯片，特别涉及利用固相免疫吸附法制备交联抗体的方法。首先用抗原分子偶联活化的固相载体，制备固相免疫吸附剂；将固相免疫吸附剂与纯化的抗体充分混合，使抗体免疫结合于固相免疫吸附剂上；以活化功能试剂分别活化处理大分子探针和与固相免疫吸附剂免疫结合的抗体，然后混合反应，形成交联物；将标记好的抗体由固相免疫吸附剂上解离、脱盐，获得大分子探针与抗体共价结合的标记物——交联抗体。固相免疫吸附剂可循环多次用于固相交联制备标记物交联抗体。本发明制备出的交联抗体，大分子标记物与抗体的共价结合对抗体的抗原结合能力影响较小，交联抗体具有较为完整的抗原结合部位。

1. 一种利用固相免疫吸附法制备交联抗体的方法，首先用抗原分子偶联活化的固相载体，制备固相免疫吸附剂；将固相免疫吸附剂与纯化的抗体充分混合，使抗体免疫结合于固相免疫吸附剂上，抗体与固定化抗原免疫结合形成较为稳定的免疫复合物；以活化功能试剂分别活化处理大分子探针和与固相免疫吸附剂免疫结合的抗体，然后混合反应，形成交联物；将标记好的抗体由固相免疫吸附剂上解离、脱盐，获得大分子探针与抗体共价结合交联抗体。

2. 如权利要求 1 所述的方法，所述方法的具体步骤为：

(1) 制备固相免疫吸附剂

首先选取固相载体，通过载体表面基团的活化，将抗原分子固定化于固相载体表面，制成稳定的固相免疫吸附剂，剩余的活性位点以小分子封闭试剂封闭，经充分清洗，获得固相免疫吸附剂；

(2) 免疫吸附

在 pH 为有利于免疫复合物结合的中性或偏碱性及低离子强度的环境下，将步骤 (1) 所制备的固相免疫吸附剂与待交联的抗体蛋白混合，抗体加入量以过量饱和抗原为准，充分温育，将反应混合物离心后，去除过量的未结合抗体，取沉淀充分清洗，获得与抗体免疫结合的固相免疫吸附剂；

(3) 固相交联

将步骤 (2) 所获得的与抗体免疫结合的固相免疫吸附剂用于固相交联；采用液相法交联流程，以活化功能试剂分别活化处理大分子探针与步骤 (2) 所获得的与抗体免疫结合的固相免疫吸附剂，其中，抗体与大分子探针的摩尔比为 1:1~1:5，进而混合反应，加入终止液中中止交联反应；离心后收集沉淀充分洗涤；得到与固相免疫吸附剂结合的交联抗体；

(4) 解离标记物

采用离液序列高的解离液进行解离，解离是在解离缓冲液中进行，打断抗原、抗体的免疫结合，使交联抗体从固相免疫吸附剂上解离下来；

将解离下来的交联抗体迅速置换到中性缓冲液中，去除解离液成分，获得交联抗体。

3.如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述的固相载体是琼脂糖凝胶微珠、微载体或聚苯乙烯微珠。

4.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的小分子试剂是乙醇胺或甘氨酸。

5.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的封闭时的条件是采用摇床室温反应 1~8 h，或大于 0°C 小于等于 10 °C 过夜。

6.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的温育条件为 15~37 °C，反应 2~4 h；或大于 0°C 小于等于 10 °C，反应 8~16 h。

7.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的活化功能试剂包括同双功能试剂或异双功能试剂。

8.如权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述的双功能试剂是戊二醛或高碘酸钠；所述的异双功能试剂是 SPDP、SMCC 或 SMPB。

9.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的活化处理和混合反应条件为室温振荡反应 1~8 h；或大于 0°C 小于等于 10 °C，反应 4~16 h。

10.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的终止液是 N-乙酰马来酰亚胺或碘乙酸钠。

11.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的中性缓冲液是 pH6~8 的磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或 Tris/HCl 缓冲液。

12.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的解离缓冲液为 pH 2~3 的酸性解离液、pH10~11 的碱性解离液或浓盐解离液。

13.如权利要求 12 所述的方法，其特征在于：所述的酸性解离液为甘氨酸-HCl 蒸馏水溶液，碱性解离液为甘氨酸-NaOH 蒸馏水溶液，浓盐解离液为 KCSN 蒸馏水溶液；其中，所述的甘氨酸-HCl 的浓度为 0.1~0.5mol/L；所述的甘氨酸-NaOH 的浓度为 0.1~0.5mol/L；所述的 KCSN 的浓度为 0.5~3mol/L。

14.如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述的大分子探针是藻胆蛋白。

15.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于：所述的藻胆蛋白是藻红蓝蛋白、异藻蓝蛋白、藻蓝蛋白、B-藻红蛋白或 R-藻红蛋白。

16.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的解离后的固相免疫吸附剂，经充分洗涤，悬浮于活化缓冲液中，与步骤（1）新制备的固相免疫吸附剂混合，重新用于待交联抗体的固相交联，制备抗体与大分子探针的交联抗体。

利用固相免疫吸附法制备交联抗体的方法

技术领域

本发明所属技术领域为医疗诊断中应用最广的标记免疫分析和生物芯片，特别涉及利用固相免疫吸附法制备交联抗体的方法。

背景技术

在标记免疫分析的检测试剂盒和生物芯片的制备中，需选择适当的探针来制备标记物，标记物是建立标记免疫分析方法的关键试剂，它的质量直接影响检测分析的灵敏度、稳定性和准确性。

抗体的分子标记即在不改变抗体的免疫特性的前提下，将报告分子与抗体相连，获得具有示踪效果的抗体或具有治疗作用的抗体。抗体标记是免疫化学最常用技术之一，可达到鉴定抗原、对抗原进行定位等目的。直接标记时标记物直接标在纯化的特异性抗体上。

标记的方法与选用的探针有关。常用的探针包括同位素放射性核素、荧光染料及酶分子等。通过这些报告分子的标记，可以有效地实现放射免疫分析、荧光免疫分析以及酶联免疫分析等。

目前，大分子探针与抗体的交联技术，即以荧光蛋白染料及酶等的标记技术。由于探针与抗体都是蛋白质，因此标记时，可借鉴蛋白质共价交联的一般流程。蛋白质之间的交联反应，主要受到蛋白质分子内所具有的适合于偶联的化学功能团类型和数量的限制。大部分交联反应是通过蛋白质分子中的 α -和 ϵ -氨基、亚氨基和巯基的亲核性质实现的，可以采用适当的活化功能试剂。可选的活化功能试剂包括同双功能试剂与异双功能试剂。同双功能试剂包括戊二醛等，异双功能试剂包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(简记为: SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-甲基马来酰亚胺)环己烷-1-碳酸酯(简记为: SMCC)、琥珀酰亚胺基- γ -(对-苯基马来酰亚胺)丁酸盐(简记为: SMPB)等。当标记蛋白与抗体蛋白用同型双功能试剂进行交联时，可以采用一步反应或二步反应，

但常常形成不均一的混合物，有多种聚合物同时存在。人工合成的异双功能试剂的研制及应用，克服了同型双功能试剂的这一缺点，使共价直接标记方式至今仍被广泛应用。如目前应用较多的 SPDP，使用 SPDP 可将标记物蛋白与抗体蛋白通过两者的氨基进行交联，而不会形成标记物蛋白或抗体蛋白自身的聚合物，具有较高的结合效率。

上述标记方法采用液相交联反应实现，通过抗体分子的游离氨基引入标记物时，共价结合位点较为随机，有时可能位于或邻近抗体的 F(ab) 段。特别是以荧光蛋白染料或酶等标记时，由于标记物分子较大，这种结合可能会造成交联抗体的抗原结合位点的部分屏蔽或空间位阻，阻碍抗体与抗原的结合，影响标记抗体的抗原结合活性。在蛋白质交联反应中，偶尔也会有某种抗体在偶联过程中部分或全部失活的现象，失活有时是由于抗原结合位点的封闭或构象改变引起的。需通过选择合适的位点特异性偶联方法来解决。

发明内容

本发明的目的是针对在液相交联反应制备交联抗体中，大分子探针因共价结合位点的随机性（结合位点可能位于或邻近抗体活性部位）而导致交联抗体的抗原结合能力受损；提供一种利用固相免疫吸附法制备交联抗体的方法（大分子探针与抗体的共价结合物）。以固相免疫吸附剂为基础，在抗体的抗原结合部位被保护，且保存抗体的抗原结合能力的前提下，制备大分子探针与抗体的交联物。交联条件温和，制备工艺简单，易于掌握控制，制备的交联抗体完整，且交联后抗体的抗原结合位点受大分子探针空间位阻的影响较小。

抗体具有两个重要的结构域，一个是抗原抗体结合部位，另一个是固定区，抗体活性的保持有赖于抗体中抗原决定簇构型的完整保存。因此抗体与其它蛋白的化学交联时应充分考虑抗体蛋白构型，对活化区域进行优化，最佳方案是有效控制交联反应，并使活化基团避开抗原抗体结合部位。

本发明针对液相交联的随机性对大分子探针与抗体交联所带来的缺陷，产生了以抗原与抗体先行免疫结合再进行标记分子与抗体结合制备标记物有序交联的新思路。

本发明在标记物（如 R-藻红蛋白）——交联抗体的制备中，提出与传统液相中制备交联抗体的不同方法和技术，是在固相免疫吸附剂上制备大分子探针与抗体的交联抗体。首先将抗原固定化于固相载体，然后将抗体免疫吸附于固相抗原上，再进行固相交联将大分子探针与抗体交联，最后将交联好的抗体从固相抗原上解离下来，获得探针与抗体结合的标记物，固相化抗原可循环使用多次。在交联过程中由于抗体的抗原结合部位已与抗原分子免疫结合，大分子探针与抗体分子共价结合时，共价结合位点远离抗体的抗原结合部位，对抗体结合抗原能力影响小，获得的交联抗体标记物的活性损失较小。

本发明首先用抗原分子偶联活化的固相载体，制备固相免疫吸附剂；将固相免疫吸附剂与纯化的抗体充分混合，使抗体免疫结合于固相免疫吸附剂上，抗体与固定化抗原免疫结合形成较为稳定的免疫复合物；以活化功能试剂分别活化处理大分子探针和与固相免疫吸附剂免疫结合的抗体，然后混合反应，形成交联物；将标记好的抗体由固相免疫吸附剂上解离、脱盐，获得大分子探针与抗体共价结合的标记物——交联抗体。

固相交联法中所应用的固相免疫吸附剂经回收，可与新制备的固相免疫吸附剂一起，重新用于交联抗体的固相交联制备。

本发明利用固相免疫吸附法制备交联抗体的具体方法：

（1）制备固相免疫吸附剂

首先选取固相载体，通过载体表面基团（如羟基等）的活化，将抗原分子固定化于固相载体表面，制成稳定的固相免疫吸附剂，剩余的活性位点以小分子封闭试剂封闭，经充分清洗，获得固相免疫吸附剂。

（2）免疫吸附

在 pH 为有利于免疫复合物结合的中性或偏碱性及低离子强度的环境下，将步骤（1）所制备的固相免疫吸附剂与待交联的抗体蛋白混合，抗体加入量以过量饱和抗原为准，充分温育，将反应混合物离心后，去除过量的未结合抗体，取沉淀充分清洗，获得与抗体免疫结合的固相免疫吸附剂。其固相载体吸附的抗体分子以 Fab 段与固定化抗原免疫结合，其 Fc 段远离固相载体表面。

（3）固相交联

将步骤（2）所获得的与抗体免疫结合的固相免疫吸附剂用于固相交联；采用液相法交联流程，以活化功能试剂分别活化处理大分子探针与

步骤(2)所获得的与抗体免疫结合的固相免疫吸附剂,进而混合反应,其中,抗体与大分子探针的摩尔比为1:1~1:5,加入终止液中中止交联反应;离心后收集沉淀充分洗涤;得到与固相免疫吸附剂结合的双链抗体。

(4) 解离标记物

采用离液序列高的解离液进行解离,解离是在解离缓冲液中进行,打断抗原、抗体的免疫结合,使双链抗体从固相免疫吸附剂上解离下来;将解离下来的双链抗体迅速置换到中性缓冲液中,去除解离液成分,获得双链抗体。

本发明将标记物—双链抗体从固相免疫吸附剂上解离下来,参考亲和分离的解离液配方:亲和分离时,常用解离缓冲液,解离缓冲液为pH 2~3的酸性解离液、pH 10~11的碱性解离液或浓盐解离液。

所述的酸性解离液为甘氨酸-HCl蒸馏水溶液,碱性解离液为甘氨酸-NaOH蒸馏水溶液,浓盐解离液为KCSN蒸馏水溶液;其中,所述的甘氨酸-HCl的浓度为0.1~0.5mol/L;所述的甘氨酸-NaOH的浓度为0.1~0.5mol/L;所述的KCSN的浓度为0.5~3mol/L。

大多数抗原-抗体复合物的解离作用在pH 2~3(甘氨酸-HCl)或者pH10~11(甘氨酸-NaOH)的解离液中进行;除此以外,加入某些促溶试剂(如KCSN等)也会影响结合分子的洗脱。选择适当的解离液可以有效的打断抗原、抗体的免疫结合,使双链抗体从固相免疫吸附剂上解离下来。将解离下来的双链抗体迅速置换到中性缓冲液中,去除解离液成分,获得固相交联法制备的目标产物——双链抗体。

另外,还可收获固相免疫吸附剂,经充分洗涤,悬浮于活化缓冲液中,该步骤回收的固相免疫吸附剂可与步骤(1)新制备的固相免疫吸附剂混合,用于待交联抗体的固相交联,可制备抗体与大分子探针的双链物。

所述的固相载体包括琼脂糖凝胶微珠、微载体或聚苯乙烯微珠等。

所述的小分子试剂包括乙醇胺或甘氨酸等。

所述的封闭时的条件是采用摇床室温反应1~8 h,或大于0°C 小于等于10 °C 过夜。

所述的温育条件为15~37 °C,反应2~4 h,或大于0°C 小于等于10 °C,反应8~16 h。

所述的活化功能试剂包括同双功能试剂，如戊二醛或高碘酸钠等；或异双功能试剂，如 SPDP、SMCC 或 SMPB 等。

所述的活化处理和混合反应条件为室温振荡反应 1~8 h，或大于 0°C 小于等于 10 °C，反应 4~16 h。

所述的终止液包括 N-乙酰马来酰亚胺或碘乙酸钠等。

所述的中性缓冲液包括 pH6~8 左右的磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或 Tris/HCl 缓冲液等生化常用缓冲液。

所述的大分子探针是藻胆蛋白。所述的藻胆蛋白是藻红蓝蛋白、异藻蓝蛋白、藻蓝蛋白、B-藻红蛋白或 R-藻红蛋白。

本发明提出了一种新的制备交联抗体的新方法，用于制备大分子探针与抗体的共价结合物——交联抗体，可较大程度地保持抗体的抗原结合能力。

这种固相合成交联抗体的方法原则上与液相合成法相似，由于配基（抗原）与固相载体的化学结合，固相抗原对 pH、离子强度等条件具有一定的耐受力，固相抗原既有效地保护抗体的抗原决定簇，又提供了较为简便的分离标记物的手段。

例如：通过固相交联法制备的 R-藻红蛋白荧光标记抗体 HBsAb（见实施例 1），用于双抗体夹心法检测血清可溶性抗原 HBsAg，探针分子的标记率均一性较好，每分子抗体共价结合 1.18 个 R-藻红蛋白分子；抗体效价高，用于 500 份血清样品的检测（80 份 HBsAg 阴性血清、44 份 HBsAg 弱阳性血清、376 份 HBsAg 阳性血清），具有较高的检出率（检测结果的正确率），阴性检出率 100%，无一例假阳性，阳性检出率 99.5%，对弱阳性的检出率为 95.5%，总检出率达 99.6%；用于临检中心所购的 HBsAg 血清盘的检测，检出率达 100%。我们在实验研究中以液相交联也制备了 R-藻红蛋白荧光标记抗体 HBsAb，经测定其标记率也在 1.2 左右，用于上述 500 份血清样品的免疫检测，阴性检出率 100%，无一例假阳性，总检出率 96.6%，对弱阳性血清的检测效果较不理想，弱阳性血清的检出率仅为 61.4%。

下面结合附图及实施例对本发明的技术方案作进一步的描述。

附图说明

图 1. 利用固相免疫吸附法制备交联抗体的示意图。

如图所示, 通过这种固相合成的方法获得的交联抗体, 具有完整的抗原结合部位, 引入的大分子探针较少影响其结合抗原的能力。

先将抗原作为配基以共价键方式连接在固相载体上, 制成固相免疫吸附剂(固相抗原); 通过抗体的抗原决定簇, 特异性地与抗原发生免疫反应, 形成抗原—抗体免疫复合物, 在一定条件下免疫复合物可有效解离; 引入大分子探针与抗体共价结合; 选择一定的洗涤条件, 解离抗体与大分子探针共价结合的标记物——交联抗体, 使交联抗体从固定化配基(固相免疫吸附剂)上解离下来。

固相免疫复合物中的抗体的抗原决定簇与固相抗原结合后, 在一定程度上抗体的抗原结合部位获得了保护。因此活化处理固相免疫复合物时, 活化基团引入抗体的抗原决定簇的机率可大幅度降低, 当大分子探针(如藻胆蛋白)通过活化基团与抗体交联时, 交联抗体仍保留完整的抗原结合部位。探针藻胆蛋白通过活化基团与抗体形成交联物。

具体实施方式

实施例 1:

以荧光探针 R-藻红蛋白(大分子蛋白质, 分子量 240KD)为例, 制备 R-藻红蛋白与乙肝病毒表面抗原(HBsAg)单克隆抗体的交联抗体。

1. 制备固相免疫吸附剂

将乙肝病毒表面抗原(HBsAg)固定化于固相载体, 制成稳定的免疫吸附剂—固相抗原。采用溴化氰活化的琼脂糖凝胶 4B 为固相载体, 它是亲和纯化单克隆抗体时常用的固相填料, 用于制备固相抗原时, 已建立了规范的操作流程。采用的制备方法如下:

- ①称量 0.3 g 的冻干粉, 溶涨于 10^{-3} N 盐酸 30 min, 并以 60 mL 的盐酸溶液清洗, 再迅速以 0.1 mol/L, pH8.3 NaHCO_3 溶液洗涤一次, 获得 1 mL 活化凝胶;
- ②立即加入待偶联抗原 HBsAg(5 mg), HBsAg 预先以 0.1 mol/L, pH 8.3 NaHCO_3 溶液平衡, 室温下缓慢搅拌 6 h;
- ③离心, 吸取上清, 在凝胶中加入 2 mL 1.0 mol/L 乙醇胺溶液, 室温下振荡反应 2 h, 使多余的活性基团被封闭;
- ④以 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.0 及 50 mM Glycine, 1 M NaCl, pH 3.5 交替清洗凝胶 8 遍, 以去除非特异结合物质;

- ⑤以 50 mM, pH 7.5, PBS 清洗凝胶, 离心, 收获固相免疫吸附剂, 即偶联有 HBsAg 抗原的凝胶 1 mL。

2. 免疫吸附

为使抗体与固相免疫吸附剂形成较为稳定的免疫复合物, 选择有利于免疫复合物结合的酸碱度 pH 7.5、低离子强度(50 mM PBS)的缓冲液环境, 以过量的抗体完全中和抗原。操作步骤如下:

- ①将 1.5 mL 抗体 (3.2 mg/mL, 50 mM, pH 7.5, PBS) 与 1 mL 固相免疫吸附剂混合, 缓慢搅动, 4 °C 过夜;
- ②离心, 吸取上清 (保留), 测定 280 nm 的光吸收值 A;
- ③当 A 不为 0 时, 加入适量 PBS (50 mM, pH 7.5) 清洗凝胶, 重复步骤 2;
- ④当 A 为 0 时, 合并所有上清, 浓缩, 测得游离抗体 2.2 mg, 免疫吸附的抗体的量共 2.6 mg, 需加入的 R-藻红蛋白的巯基化衍生物 6.9 mg。

3. 固相交联

固相交联法基本按液相交联法进行。异双功能试剂 SMCC 已广泛用于蛋白质的液相交联。它的一端有胺重新活化的 NHS 酯, 另一端为马来酰亚胺端, 极稳定、水解慢, 允许一种蛋白通过氨基对其 NHS 酯端进行修饰, 形成稳定的酰胺键, 产生末端马来酰亚胺基, 可与含巯基的蛋白特异交联。因此含氨基的载体 (与抗体免疫结合的固相免疫吸附剂) 也能用 SMCC 修饰产生末端马来酰亚胺基, 供给含巯基的配基 (巯基活化的大分子探针) 偶联用。

具体步骤如下:

- ①配制活化缓冲液 (促进 NHS 偶联的缓冲液 pH 7.2, 0.1 mol/L PBS, 含 0.15 mol/L NaCl), 4 °C 预冷, 以冰冷的活化缓冲液洗涤所制得的凝胶, 并调整凝胶浓度 60% (v/v), 振荡混合;
- ②称量 SMCC 5 mg, 溶于 20 μ L 无水 DMSO, 边振荡边滴加入凝胶悬浮液中;
- ③在 4 °C 继续混合反应 4 h;
- ④迅速以冷的活化缓冲液冲洗凝胶, 再以 1 mol/L NaCl 冲洗后, 以除去未偶联的交联试剂和反应的副产物, 并将凝胶等体积重悬于活化缓冲液中;

⑤立即加入 2-IT 巯基衍生化的 R-藻红蛋白(蛋白浓度 5.5 mg/ml),
4°C 混合振荡反应 4 h;

⑥将凝胶灌装入柱,以活化缓冲液流洗,检测至柱后无蛋白流出,
达到平衡,此时取少许凝胶于显微镜下观察,可见明亮的荧光微珠。

4. 解离标记物

正确的选择洗脱条件关系到标记物的成功解离,适宜的洗脱缓冲液不仅要以最小的体积解离结合的物质,而且解离的标记抗体仍应能保持与抗原再度结合的能力。参考亲和层析分离中解离抗体的成功经验,筛选了适宜的解离液配方:筛选的对象包括 0.5 mol/L~3 mol/L KSCN、pH 2.8, 0.1~0.2 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液、以及 pH 10.6, 0.1 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液等。从中获得 0.2 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液, pH 2.8, 含 1 mol/L NaCl 解离效果最好。

将凝胶与上述解离液按 1:1 体积比混合,轻轻振荡,离心,收集上清,迅速将解离的交联抗体过脱盐柱置换缓冲液至 50 mM, pH 7.5, PBS。获得 R-藻红蛋白荧光标记 HBsAg 单克隆抗体,可用于血清 HBsAg 的免疫检测。

与此同时,解离后的凝胶经充分洗涤,悬浮于活化缓冲液中。可与新制备的有 HBsAg 偶联凝胶混合,重新用于抗体的固相交联。

实施例 2:

以 R-藻红蛋白与前列腺特异性抗原单克隆抗体的交联抗体的固相制备为例,对该发明的操作过程再次阐述如下:

1. 制备固相免疫吸附剂

采用溴化氰活化的琼脂糖凝胶 4B 为固相载体,将前列腺特异性抗原(PSA)固定化于固相载体,制成稳定的固相免疫吸附剂。制备方法如下:

①称量 0.3 g 的冻干粉,溶胀于 10^{-3} N 盐酸 30 min,并以 60 mL 的盐酸溶液清洗,再迅速以 0.1 mol/L, pH 8.3 NaHCO_3 溶液洗涤一次,获得 1 mL 活化凝胶;

②立即加入待偶联抗原 PSA(2 mg),抗原预先以 0.1 mol/L, pH 8.3 NaHCO_3 溶液平衡,室温下缓慢搅拌 8 h;

- ③离心，吸取上清，在凝胶中加入 2 mL 1.0mol/L 乙醇胺溶液，室温下振荡反应 8 h，使多余的活性基团被封闭；
- ④以 50 mM Tris, 1M NaCl, pH 8.0 及 50 mM Glycine, 1 M NaCl, pH 3.5 交替清洗凝胶 8 遍，以去除非特异结合物质；
- ⑤以 50 mM, pH 7.5, PBS 清洗凝胶，离心，收获固相免疫吸附剂，即偶联有 PSA 的凝胶。

2. 免疫吸附

以过量的 PSA 单克隆抗体完全中和上一步骤所制备的固相免疫吸附剂。操作步骤如下：

- ①将 1.5 mL PSA 抗体 (3.2 mg/mL, 50 mM, pH 7.5, PBS) 与 1 mL PSA 固相免疫吸附剂混合，缓慢搅动，37 °C，温育 2h；
- ②离心，吸取上清（保留），彻底清洗凝胶，至上清 280 nm 无吸收。

3. 固相交联

- ①配制活化缓冲液 (pH 7.2, 0.1 mol/L PBS, 含 0.15 mol/L NaCl)，4 °C 预冷，以冰冷的活化缓冲液洗涤所制得的凝胶，并调整凝胶浓度 60% (v/v)，振荡混合；
- ②称量 SMCC 5 mg，溶于 20 μ L 无水 DMSO，边振荡边滴加入凝胶悬浮液中；
- ③在 4 °C 继续混合反应 4 h；
- ④迅速以冷的活化缓冲液冲洗凝胶，再以 1 mol/L NaCl 冲洗后，以除去未偶联的交联试剂和反应的副产物，并将凝胶等体积重悬于活化缓冲液中；
- ⑤立即加入 2-IT 巯基衍生化的 R-藻红蛋白（蛋白浓度 2.5 mg/mL）1 mL，10 °C 混合振荡反应 16 h；
- ⑥以活化缓冲液彻底清洗，检测上清无蛋白。

4. 解离标记物

选取解离液为 0.1 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液，pH 2.8, 含 1 mol/L NaCl。

将第三步所获得的凝胶与上述解离液按 1:1 体积比混合，轻轻振荡，离心后，收集上清，并迅速将解离的交联抗体过脱盐柱置换缓冲液至 50

mM, pH 7.5, PBS。同时充分洗涤解离后的凝胶，并悬浮于活化缓冲液中。

所制备的 R-藻红蛋白与 PSA 单克隆抗体的交联物，用于检测 5 ng/mL 的 PSA 纯化抗原，检出结果呈阳性。

实施例 3:

以聚苯乙烯微珠（直径 60~250 μm ）为固相载体，固相制备 R-藻红蛋白与 HBsAg 单克隆抗体的交联抗体：

1. 制备固相免疫吸附剂

- ①称量 0.5 g 的聚苯乙烯微珠，室温，在新鲜的戊二醛溶液（体积百分比为 25%）中浸泡 4 h 后，迅速以 0.1 mol/L, pH 8.3 NaHCO_3 溶液洗涤一次；
- ②立即加入待偶联抗原 HBsAg(5 mg)，抗原预先以 0.1 mol/L, pH 8.3 NaHCO_3 溶液平衡， 1°C 下缓慢搅拌 10 h；
- ③离心，吸取上清，在微珠中加入 2 mL 0.1 mol/L 甘氨酸溶液，室温下振荡反应 1 h，使多余的活性基团被封闭；
- ④以 50 mM Tris, 1M NaCl, pH 8.0 及 50 mM Glycine, 1 M NaCl, pH 3.5 交替清洗凝胶 8 遍，以去除非特异结合物质；
- ⑤以 50 mM, pH 7.5, PBS 清洗微珠，离心后，收获固相免疫吸附剂，即偶联有 HBsAg 的聚苯乙烯微珠。

2. 免疫吸附

以过量的 HBsAg 单克隆抗体完全中和上一步骤所制备的固相免疫吸附剂。操作步骤如下：

- ①将 1.5 mL PSA 抗体（3.2 mg/mL, 50 mM, pH 7.5, PBS）与上述制备的固相免疫吸附剂混合，缓慢搅动， 1°C 过夜；
- ②离心，吸取上清（保留），彻底清洗聚苯乙烯微珠，至上清 280 nm 无吸收。

3. 固相交联

- ①配制活化缓冲液（pH 7.2, 0.1 mol/L PBS, 含 0.15 mol/L NaCl）， 4°C 预冷，以冰冷的活化缓冲液洗涤聚苯乙烯微珠；
- ②称量 SMCC 5 mg，溶于 20 μL 无水 DMSO，边振荡边滴加入微珠悬浮液中；

- ③在 4 °C 继续混合反应 4 h;
- ④迅速以冷的活化缓冲液冲洗微珠，再以 1 mol/L NaCl 冲洗后，以除去未偶联的交联试剂和反应的副产物，并将微珠重悬于活化缓冲液中;
- ⑤立即加入 2-IT 巯基衍生化的 R-藻红蛋白（蛋白浓度 2.5 mg/mL）1 mL，4 °C 混合振荡反应 4 h;
- ⑥以活化缓冲液彻底清洗，检测上清无蛋白。

4. 解离标记物

选取解离液为 0.1 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液，pH 2.8, 含 1 mol/L NaCl。

将第三步所获得的微珠与上述解离液按 1:1 体积比混合，轻轻振荡，离心后，收集上清，并迅速将解离的交联抗体过脱盐柱置换缓冲液至 50 mM, pH 7.5, PBS。同时充分洗涤解离后的微珠，并悬浮于活化缓冲液中。

所制备的 R-藻红蛋白与 HBsAg 单克隆抗体的交联物，用于检测阴、阳性血清，检出结果正确。

实施例 4:

以藻红蓝蛋白（PEC，分子量 100KD）为荧光探针，与 HBsAg 单克隆抗体固相交联制备荧光标记抗体。

1. 制备固相免疫吸附剂

- ①称量 0.3 g 的冻干粉，溶涨于 10^{-3} N 盐酸 30 min，并以 60 mL 的盐酸溶液清洗，再迅速以 0.1 mol/L, pH 8.3 NaHCO₃ 溶液洗涤一次，获得 1 mL 活化凝胶;
- ②立即加入待偶联抗原 HBsAg (5 mg), HBsAg 预先以 0.1 mol/L, pH 8.3 NaHCO₃ 溶液平衡，室温下缓慢搅拌 6 h;
- ③离心，吸取上清，在凝胶中加入 2 mL 1.0 mol/L 乙醇胺溶液，室温下振荡反应 2 h，使多余的活性基团被封闭;
- ④以 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.0 及 50 mM Glycine, 1 M NaCl, pH 3.5 交替清洗凝胶 8 遍，以去除非特异结合物质;
- ⑤以 50 mM, pH 7.5, PBS 清洗凝胶，离心，收获固相免疫吸附剂，即偶联有 HBsAg 抗原的凝胶 1 mL。

2. 免疫吸附

- ①将 1mL HBsAg 抗体 (5 mg/mL, 50 mM, pH 7.5, PBS) 与 1 mL 固相免疫吸附剂混合, 缓慢搅动, 15 °C, 温育 4h;
- ②离心, 吸取上清 (保留), 测定 280 nm 的光吸收值 A;
- ③当 A 不为 0 时, 加入适量 PBS (50 mM, pH 7.5) 清洗凝胶, 重复步骤 2;
- ④当 A 为 0 时, 合并所有上清, 浓缩, 测得游离抗体 1.3 mg, 免疫吸附的抗体的量共 3.7 mg, 需加入的 PEC 的巯基化衍生物 4.6 mg。

3. 固相交联

- ①配制活化缓冲液 (促进 NHS 偶联的缓冲液 pH 7.2, 0.1 mol/L PBS, 含 0.15 mol/L NaCl), 4°C 预冷, 以冰冷的活化缓冲液洗涤所制得的凝胶, 并调整凝胶浓度 60% (v/v), 振荡混合;
- ②称量 SMCC 5 mg, 溶于 20 μ L 无水 DMSO, 边振荡边滴加入凝胶悬浮液中;
- ③在 4°C 继续混合反应 4 h;
- ④迅速以冷的活化缓冲液冲洗凝胶, 再以 1 mol/L NaCl 冲洗后, 以除去未偶联的交联试剂和反应的副产物, 并将凝胶等体积重悬于活化缓冲液中;
- ⑤立即加入 2-IT 巯基衍生化的 PEC (2.5 mg/mL, 1.85 mL), 4°C 混合振荡反应 4 h; 以活化缓冲液彻底洗涤, 离心, 取沉淀用于解离。

4. 解离标记物

将上述沉淀与 0.2 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液, pH 2.8, 含 1 mol/L NaCl 按 1:1 体积比混合, 轻轻振荡, 离心, 收集上清, 迅速将解离的交联抗体过脱盐柱置换缓冲液至 50 mM, pH 7.5, PBS。获得藻红蓝蛋白标记 HBsAg 单克隆抗体。

与此同时, 解离后的凝胶经充分洗涤, 悬浮于活化缓冲液中。可与新制备的有 HBsAg 偶联凝胶混合, 重新用于抗体的固相交联。

所制备的 PEC 与 HBsAg 单克隆抗体的交联物, 用于检测阴、阳性血清, 检出结果正确。

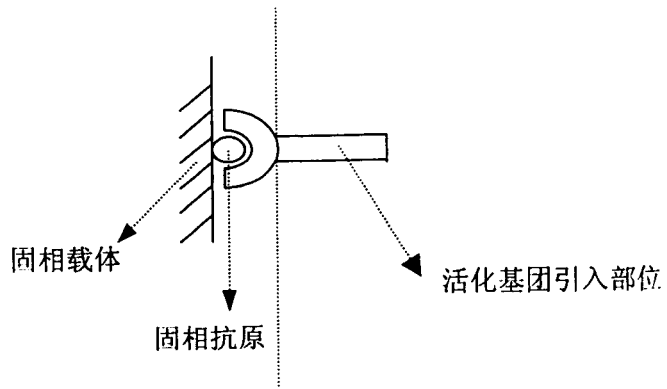


图 1

专利名称(译)	利用固相免疫吸附法制备交联抗体的方法		
公开(公告)号	CN1164947C	公开(公告)日	2004-09-01
申请号	CN01120463.X	申请日	2001-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院过程工程研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院化工冶金研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院化工冶金研究所		
[标]发明人	吴萍 顾铭 欧阳藩		
发明人	吴萍 顾铭 欧阳藩		
IPC分类号	C07K16/00 G01N33/531 G01N33/532		
代理人(译)	李柏		
其他公开文献	CN1396454A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明所属技术领域为医疗诊断中应用最广的标记免疫分析和生物芯片，特别涉及利用固相免疫吸附法制备交联抗体的方法。首先用抗原分子偶联活化的固相载体，制备固相免疫吸附剂；将固相免疫吸附剂与纯化的抗体充分混合，使抗体免疫结合于固相免疫吸附剂上；以活化功能试剂分别活化处理大分子探针和与固相免疫吸附剂免疫结合的抗体，然后混合反应，形成交联物；将标记好的抗体由固相免疫吸附剂上解离、脱盐，获得大分子探针与抗体共价结合的标记物——交联抗体。固相免疫吸附剂可循环多次用于固相交联制备标记物交联抗体。本发明制备出的交联抗体，大分子标记物与抗体的共价结合对抗体的抗原结合能力影响较小，交联抗体具有较为完整的抗原结合部位。

