

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610064048.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月26日

[11] 公开号 CN 101149375A

[22] 申请日 2006.9.22
[21] 申请号 200610064048.4
[30] 优先权
 [32] 2005. 9. 22 [33] EP [31] 05077175.7
[71] 申请人 兰多克斯实验室有限公司
 地址 英国北爱尔兰
[72] 发明人 埃尔奥亚特·本奇克
 罗伯特·I·麦康奈尔
 斯蒂芬·P·菲茨杰拉德
 安德鲁·P·劳里

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 代理人 封新琴 巫肖南

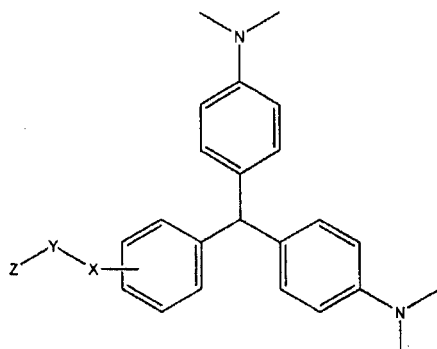
权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 8 页

[54] 发明名称
 对隐色孔雀绿和孔雀石绿进行免疫测定的方法和试剂盒

[57] 摘要
 本发明提供半抗原、包含与赋予抗原性的载体材料偶联的所述半抗原的免疫原、包含与标记物结合的所述半抗原的偶联物、以及对抗这样的免疫原并能与隐色孔雀绿和孔雀石绿结合的抗体。

1、免疫原，其包含隐色孔雀绿且该隐色孔雀绿利用交联剂与赋予抗原性的载体材料偶联，其中所述交联剂从隐色孔雀绿的未取代苯环的对位、邻位或间位伸出。

2、权利要求1的免疫原，其中所述交联剂包含-X-Y-Z:



式 I

其中 X 是第一个双价连接，Y 是第二个双价连接，Z 是能够与赋予抗原性的材料偶联的反应基团。

3、权利要求1或2所述的免疫原，其中所述交联剂从隐色孔雀绿的未取代苯环的对位伸出。

4、权利要求2或3所述的免疫原，其中 X 是选自 O、S 和 N 的杂原子，其中 X 最优选 O 原子。

5、权利要求2-4之一的免疫原，其中 Y 是 C₁₋₁₀，更优选 C₂₋₆，最优选 C₃，取代或未取代的直链，饱和亚烷基部分，或亚芳基部分。

6、权利要求2-5之一的免疫原，其中 Z(与赋予抗原性的载体材料偶联之前)选自羧基、二硫代吡啶基、顺丁烯二酰亚胺、氨基、羟基、巯基、硫酯或醛部分，其中 Z(与赋予抗原性的载体材料偶联之前)可选是羧基(COOH)部分。

7、免疫原，包含与赋予抗原性的载体材料偶联的对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿。

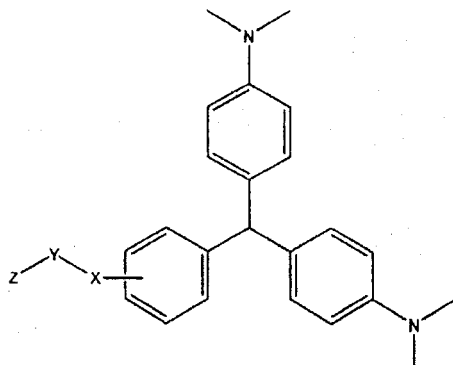
8、权利要求1-7之一的免疫原，其中所述载体材料选自蛋白质、蛋白片段、合成多肽或半合成多肽。

9、抗权利要求1-8之一的免疫原的抗体，其中所述抗体能与隐色孔雀绿和孔雀石绿的至少一种结构性表位结合。

10、抗权利要求 1-8 之一的免疫原的抗体，所述抗体具有对隐色孔雀绿的特异性，其特征在于对孔雀石绿具有交叉反应性，其中所述抗体可选对孔雀石绿有大于 10% 的交叉反应性。

11、偶联物，包含通过交联剂与可检测的标记物共价结合的隐色孔雀绿，其中所述交联剂从隐色孔雀绿的未取代苯环的对位、邻位或间位伸出。

12、权利要求 11 的偶联物，其中所述交联剂包含-X-Y-Z:



式 I

其中 X 是第一个双价连接，Y 是第二个双价连接，Z 是能够与可检测的标记物偶联的反应基团。

13、权利要求 11 或 12 所述的偶联物，其中所述交联剂从隐色孔雀绿的未取代苯环的对位伸出。

14、权利要求 12 或 13 所述的偶联物，其中 X 是选自 O、S 和 N 的杂原子，其中 X 最优选 N 原子。

15、权利要求 12-14 之一的偶联物，其中 Y 是 C₁₋₁₀，更优选 C₂₋₆，最优选 C₃，取代或未取代的直链，饱和亚烷基部分，或亚芳基部分。

16、权利要求 12-15 之一的偶联物，其中 Z (与可检测的标记物偶联之前)选自羧基、二硫代吡啶基、顺丁烯二酰亚胺、氨基、羟基、巯基、硫酯或醛部分。

17、权利要求 12-16 之一的偶联物，其中 Z (与可检测的标记物偶联之前)是巯基或硫酯。

18、偶联物，包含与可检测的标记物偶联的对-(3-硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿。

19、权利要求 11-18 之一的偶联物，其中可检测的标记物选自酶、发光物质和放射活性物质。

20、检测或测定样品中隐色孔雀绿和孔雀石绿的方法，该方法包括将该样品与至少一种权利要求 11-19 之一所述偶联物和至少一种权利要求 9 或 10 所述抗体接触；检测结合的偶联物；从标准曲线推导出样品中隐色孔雀绿和孔雀石绿的存在或其量。

21、测定样品中包含隐色孔雀绿和孔雀石绿的每种分析物的量的方法，该方法包括将该样品与至少一种权利要求 11-19 之一所述偶联物和至少一种权利要求 9 或 10 所述抗体接触并测定结合的偶联物；将该样品与至少一种权利要求 9 或 10 所述抗体接触并测定结合的孔雀石绿；从标准曲线推导出样品中隐色孔雀绿和孔雀石绿各自的量。

22、用于检测或测定隐色孔雀绿和孔雀石绿的试剂盒，该试剂盒包括至少一种权利要求 11-19 之一所述偶联物和至少一种权利要求 9 或 10 所述抗体。

23、至少一种权利要求 11-19 之一所述偶联物和至少一种权利要求 9 或 10 所述抗体用于检测或测定样品如生物液体中隐色孔雀绿和孔雀石绿的用途。

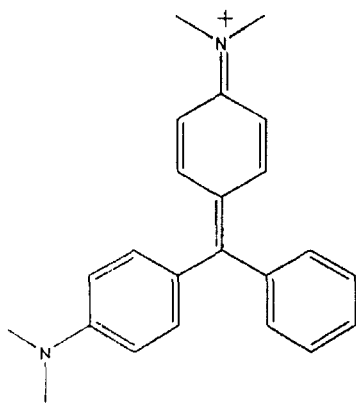
对隐色孔雀绿和孔雀石绿进行免疫测定的方法和试剂盒

发明领域

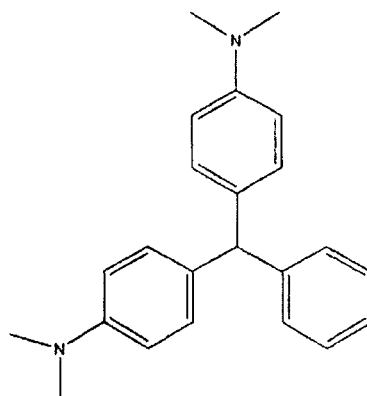
本发明涉及新的免疫原、抗体和偶联物，它们用于检测和/或测定隐色孔雀绿(leucomalachite Green)和孔雀石绿(Malachite Green)的免疫测定。本发明也涉及用于检测或测定隐色孔雀绿和孔雀石绿的免疫测定方法和试剂盒。“检测(detecting)”是指定性分析隐色孔雀绿和/或孔雀石绿在样品中的存在或不存在。“测定(determining)”是指定量分析隐色孔雀绿和/或孔雀石绿在样品中的量。

发明背景

孔雀石绿是养鱼中使用的外用驱虫剂、杀真菌剂和杀菌剂。然而，它却是潜在的致癌剂、致突变剂和致畸变剂。自从1933年以来，已经认识到在可食用鱼类(例如鲑鱼(trout)和鳗鱼(eel))中的非法和威胁公众安全的使用。吸收后，孔雀石绿迅速地被还原为其无发色团的代谢物隐色孔雀绿，其是在受处理的水生动物的药物残留分析中检测到的普遍的残留物。孔雀石绿和隐色孔雀绿具有下列结构式：



孔雀石绿



隐色孔雀绿。

最近孔雀石绿和隐色孔雀绿受到残留物分析者的高度关注，因为在养殖的大西洋鲑鱼和鳕(hake)鱼中发现了它们(参见，对食物和饲料的每周欧盟

快速预警报告 2003/2004(Weekly EC Rapid Alert Reports for Food and Feed 2003/2004))。

用于孔雀石绿和隐色孔雀绿测定的方法相当有限。孔雀石绿具有光谱可见光区域(580-620nm)的发色团,这种发色团在孔雀石绿的分析中相当有帮助。然而,隐色孔雀绿在 260-270nm 具有 λ_{\max} ,使得其在相同的条件下难于分析。已经采用了很多方法来避免该问题。一种方法使用过柱后氧化的步骤,在 HPLC 分离后和检测前,将隐色孔雀绿氧化为孔雀石绿,以允许在更高的波长进行检测。通常,将分散于 Celite(商品名)的铅氧化物或其本身包装放入短柱中使用。在另一变通方法中,Klein 等人 (E. Klein, M. Edelhaeuser 和 R. Lippold, Dtsch. Lebensm.-Rundsch., 1991, 87, 350)使用二氧化铅进行过柱前的氧化,测定的孔雀石绿为母体和隐色孔雀绿的总和。已使用电化学氧化作为二氧化铅的替代物。检测孔雀石绿和隐色孔雀绿的可选择的方法是使用 LC-MS。粒子束 LC-MS 已经用于在鲶鱼(catfish)中确认孔雀石绿。

欧洲最低要求的执行极限(European minimum required performane limit, MRPL),残留物实验室的定性参数,设定孔雀石绿和隐色孔雀绿的总量为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。最近,气相色谱质谱(GC-MS)和其它液相色谱串连质谱(LC-MS/MS)方法已经出现于第五届欧洲残留物会议(Euro Residue Conference)中。GC-MS 和 LC-MS 方法都具有良好的表现,能以远低于设定 MRPL 的浓度可靠地检测和鉴定这些残留物。

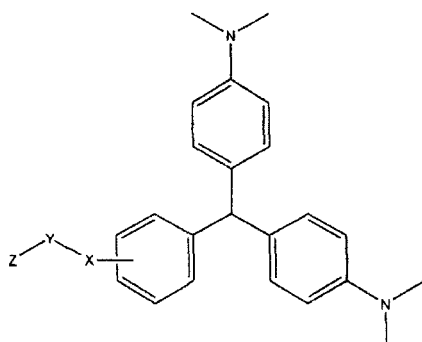
特异性结合反应,例如抗体-抗原相互作用,已经在免疫测定中广泛使用,用来检测组织提取物中存在的多种物质。因此,例如放射性免疫测定(RIA)可用于孔雀石绿和隐色孔雀绿的测定。放射性免疫测定非常敏感,但却需要放射性核素示踪物,例如 ^{125}I 和 ^3H 。目前还没有已知用于孔雀石绿和隐色孔雀绿的 RIA。酶联免疫吸附测定(ELISA)是非放射性的方法,可选用该方法对孔雀石绿和隐色孔雀绿进行定性和定量测定。最近,用于孔雀石绿的测试试剂盒已经可以商业性获得。Bioo Scientific 生产孔雀石绿 ELISA 测试试剂盒,其设计为仅检测孔雀石绿。这表明 Bioo 试剂盒包含抗基于孔雀石绿的免疫原的抗体,不像本发明使用基于隐色孔雀绿的免疫原。这得到 Bioo Scientific 提供的信息的进一步支持,该信息给出对隐色孔雀绿的交叉反应性为 1%。由于孔雀石绿快速和广泛地代谢为隐色孔雀绿, Bioo

Scientific 免疫测定要求在抗原-抗体结合之前引入样品预处理步骤，使隐色孔雀绿转化为孔雀石绿。这使所述免疫测定因使用额外的步骤而比本发明更费时以及更易产生试验误差。

发明概述

在第一方面，本发明提供包含隐色孔雀绿的免疫原，其中隐色孔雀绿通过交联剂与赋予抗原性的载体材料偶联、且该交联剂从隐色孔雀绿的未取代苯环的对位、邻位或间位伸出。本发明也提供对抗这样的免疫原的抗体。此外，本发明涉及包含隐色孔雀绿的偶联物，其中隐色孔雀绿通过交联剂与可检测的标记物共价结合、且该交联剂从隐色孔雀绿的未取代苯环的对位、邻位或间位伸出。

本发明的免疫原和偶联物均可得自于下式 I 的半抗原，其中交联剂(该交联剂包含-X-Y-Z)从隐色孔雀绿的未取代苯环的对位、邻位或间位伸出：



“式 I”

其中 X 是第一个二价连接，Y 是第二个二价连接，Z 是可与赋予抗原性的载体材料偶联(产生免疫原)或可与可检测的标记物偶联(产生偶联物)的反应基团。优选，交联剂从隐色孔雀绿的未取代苯环的对位伸出。

优选，X 是选自 O、S 和 N 的杂原子，最优选在免疫原的情况下 X 是 O 原子，最优选在偶联物的情况下 X 是 N 原子。

优选，Y 是 C₁₋₁₀，更优选 C₂₋₆，最优选 C₃，取代或未取代的直链，饱和亚烷基部分(alkylene moiety)，或亚芳基部分(arylene moiety)。一个合适的取代基是羰基(C=O)。

有利的是，Z(与赋予抗原性的载体材料偶联(产生免疫原)或与可检测的标记物偶联(产生偶联物)之前)选自羧酸、二硫代吡啶基(dithiopyridyl)、顺丁烯二酰亚胺、氨基、羟基、巯基(thiol)、硫酯或醛部分。与赋予抗原性的载

体材料偶联之前，Z是羧酸(COOH)时，羟基的氧原子首先与DCC结合，然后与NHS结合，形成带有强效离去基团的酯。通过赋予抗原性的载体材料上的游离氨基，对上述酯的羰基(C=O)进行亲核攻击，导致酰胺键和形成所期望的免疫原。当Z在与可检测的标记物偶联前是巯基(在硫酯的情形下，该巯基通过在碱性条件下水解而形成)时，有该巯基和BrCH₂C(O)NH-HRP参与的亲核取代反应导致溴被巯基取代，并形成所期望的偶联物。本领域读者可参考Bioconjugate Techniques G. Hermanson, ed., Academic Press, 1996, 785 pp.(其内容以其全部在此引入)中关于Z反应基团和赋予抗原性的载体材料或可检测的标记物之间相互作用的详细描述，其中Z是选自羧酸、二硫代吡啶基、顺丁烯二酰亚胺、氨基、羟基、巯基、硫酯或醛部分所组成的组中的剩余者(remainder)。最有利的是，Z(与赋予抗原性的载体材料偶联(产生免疫原)之前)是羧酸(COOH)部分。最有利的是，Z(与可检测的标记物偶联(产生偶联物)之前)是巯基或硫酯部分。

最有利的是，半抗原是对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿(半抗原A)。半抗原A的结构式显示于图1。

优选，免疫原是与赋予抗原性的材料偶联的对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿，其中所述材料可以是选自牛血清白蛋白(BSA)和牛甲状腺球蛋白(BTG)。

孔雀石绿的半抗原衍生物(以及相应的免疫原、抗体和偶联物)可通过用交联剂在孔雀石绿未取代苯环的对位、邻位或间位(优选对位)以相似的方式衍生而制得。孔雀石绿的半抗原衍生物之一是对-(3-羧基丙氧基)孔雀石绿(半抗原B)，结构式也显示于图1。

将半抗原(如上所述)与修饰或未修饰的赋予抗原性的载体材料偶联，可制备免疫原。优选，所述载体材料是蛋白质、蛋白片段、合成多肽或半合成多肽。所获得的免疫原然后施用于哺乳动物宿主以激发产生特异性抗体，可以是多克隆抗体，其然后用于研发对隐色孔雀绿和孔雀石绿的免疫测定方法，使用与标记物偶联的半抗原作为检测试剂。

在其它方面，本发明涉及抗本发明免疫原的抗体，所述抗体能够与隐色孔雀绿和孔雀石绿的至少一种结构性表位结合。

在其它方面，本发明涉及对隐色孔雀绿具有特异性的抗体，其特征在于对孔雀石绿具有交叉反应性。可选，所述抗体(以及包括这些抗体的方法和试剂盒)对孔雀石绿具有超过10%的交叉反应性。进一步可选，所述抗体

(以及包括这些抗体的方法和试剂盒)对孔雀石绿具有超过 20% 的交叉反应性。进一步可选,所述抗体(以及包括这些抗体的方法和试剂盒)对孔雀石绿具有超过 25% 的交叉反应性。在每个这样的情形中,所提到的可选对隐色孔雀绿的最小交叉反应性是以对隐色孔雀石绿的交叉反应性为 100% 而言的。

本发明进一步提供制备这些抗体的方法,该方法包括通过重复施用本发明免疫原免疫动物(优选脊椎动物,最优选哺乳动物)的步骤以及从所述被免疫的动物收集所产生的血清的步骤。优选,本方法进一步包含将所述的血清抗体固定于背板底物(backing substrate),优选固体支撑物,最优选聚苯乙烯(polystyrene)固体支撑物。优选,所述抗体是多克隆抗体。作为备选,所述抗体是单克隆抗体。

在另一方面,本发明包含偶联物,该偶联物包含与可检测的标记物共价结合的此处所公开的半抗原。优选,标记物选自酶、发光物、放射活性物或它们的混合物。更优选,标记物是酶,优选过氧化物酶,最优选,辣根过氧化物酶(HRP)。作为备选,或另外的,发光物可以是生物发光物、化学发光物或荧光物。

优选,偶联物是与可检测的标记物共价结合的对-(3-乙酰硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿(p-(3-acetylthiopropionamido) leucomalachite)。一种这样的合适的标记物是辣根过氧化物酶。

在另一方面,本发明包括检测或测定样品中隐色孔雀绿和孔雀石绿的方法,该方法包括将样品与至少一种本发明的偶联物接触,并与至少一种本发明抗体接触;检测或测定结合的偶联物;从标准曲线推导出样品中隐色孔雀绿和孔雀石绿的存在或其量。这是半定量的方法,而下面的方法是定量的方法。该半定量的方法可选检测或测定样品中分析物,该分析物选自隐色孔雀绿、孔雀石绿或隐色孔雀绿和孔雀石绿的混合物。作为备选,该方法包括将一份样品与至少一种本发明的偶联物以及至少一种本发明的抗体接触,并且将其它样品与至少一种本发明的抗体接触;测定第一份样品中结合的偶联物(从而测定隐色孔雀绿和孔雀石绿的总量),并测定第二份样品中结合的孔雀石绿(从而测定孔雀石绿的量);从标准曲线中推导样品中隐色孔雀绿和孔雀石绿各自的量。可以理解的是,在第一份样品中测定的步骤是竞争性免疫测定,该测定被安排为测定隐色孔雀绿和孔雀石绿的总

量。也可以理解的是，在第二份样品中测定的步骤是免疫测定，该测定被安排为测定结合型孔雀石绿的量。后者的测定步骤可使用合适的分光镜方法(spectroscopic method)进行。本发明备选方法中的推导步骤如下进行：推导第二份样品中结合型孔雀石绿的量，以及推导第一份样品中隐色孔雀绿和孔雀石绿的量，随后从第二份样品的结合型孔雀石绿的量减去第一份样品的隐色孔雀绿和孔雀石绿的量，得到样品中隐色孔雀绿的量。

在另一方面，本发明包括检测或测定隐色孔雀绿和孔雀石绿的试剂盒，该试剂盒包括至少一种本发明的偶联物，以及至少一种本发明的抗体。试剂盒可选包括使用所述偶联物和所述抗体检测隐色孔雀绿和孔雀石绿的使用说明书。这是半定量试剂盒，其能可选的检测或测定样品中选自隐色孔雀绿、孔雀石绿以及隐色孔雀绿与孔雀石绿的混合物的分析物。作为备选，该试剂盒用于测定隐色孔雀绿和孔雀石绿中的每一个，该试剂盒包括至少一种本发明的偶联物，以及至少一种本发明的抗体。这样的试剂盒可选的包括使用所述偶联物和所述抗体测定样品中隐色孔雀绿和孔雀石绿各自的量的说明书。优选，样品是溶液，例如生物液体。更优选样品是血清或尿。

在本发明任意单独的方法和试剂盒中，用于制备偶联物的基本半抗原和用于制备免疫原(其刺激抗体生成)的基本半抗原，可以是相同或不同的。优选它们是不同的，这样增加测定的敏感性。不期望被如此限制，可以认为样品中的靶分析物更有能力与一种偶联物竞争抗体结合位点，该偶联物是与刺激生成抗体的免疫原在结构上有稍许不同。如此获得的更好的敏感性结果例证于下面的实施例 12。在本发明任意单独的方法和试剂盒中，所述方法或试剂盒每个对隐色孔雀绿显示敏感性或 $IC_{50}(ng/ml)$ 低于 35ng/ml，可选低于 30ng/ml。如果用于制备偶联物的基本半抗原和用于制备免疫原(其刺激抗体生成)的基本半抗原是不同的，所述方法或试剂盒每个对隐色孔雀绿显示敏感性或 $IC_{50}(ng/ml)$ 低于 10ng/ml，可选低于 7.5ng/ml，进一步可选低于 5.0 ng/ml。在本发明任意单独的方法和试剂盒中，所述方法或试剂盒每个对孔雀石绿显示敏感性或 $IC_{50}(ng/ml)$ 低于 150ng/ml，可选低于 125ng/ml，进一步可选低于 105ng/ml。如果用于制备偶联物的基本半抗原和用于制备免疫原(其刺激抗体生成)的基本半抗原是不同的，所述方法或试剂盒每个对孔雀石绿显示敏感性或 $IC_{50}(ng/ml)$ 低于 35ng/ml，可选低于 25ng/ml，进一步可选低于 15ng/ml。

在另一方面，本发明涉及至少一种根据本发明的偶联物，以及至少一种根据本发明的抗体，在检测或测定样品(例如生物体液)中隐色孔雀绿和孔雀石绿的用途。

发明附图

现通过实施例和参考相应附图来描述本发明的实施方案，其中：

图 1 显示对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿(半抗原 A)、对-(3-羧基丙氧基)孔雀石绿(半抗原 B)、对-(3-乙酰硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿(半抗原 C)的结构式。

图 2 显示图 1 的对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿(半抗原 A)的制备步骤。

图 3 显示图 1 的对-(3-羧基丙氧基)孔雀石绿(半抗原 B)的制备步骤。

图 4 显示图 1 的对-(3-乙酰硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿(半抗原 C)的制备步骤。

图 5 显示图 1 的对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿(半抗原 A)的 NMR 结果。

图 6 显示对 BSA 的 MALDI 结果。

图 7 显示对免疫原 I(结合 BSA 的图 1 所示对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿(半抗原 A))的 MALDI 结果。

图 8 显示用于开发隐色孔雀绿和孔雀石绿的竞争性 ELISA 的竞争性 ELISA 微滴定板测定。

发明内容

制备半抗原

按图 2 的三个步骤制备对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿(半抗原 A)。首先，4-羟基苯甲醛，1，与 4-溴丁酸乙酯在有碳酸钾存在的条件下在乙腈中回流得到对[3-(乙基羧基)丙氧基]苯甲醛，2。所获得的酯，2，与 N,N-二甲苯胺在有硫酸存在的条件下于 120℃ 反应 48 小时得到中等收率的对[3-(乙基羧基)丙氧基]隐色孔雀绿，3。将隐色孔雀绿酯，3，与氢氧化钠在四氢呋喃(THF)和甲醇中皂化后得到半抗原 A。

通过用铅氧化物(PbO₂)或 2,3-二氯-5,6-二氧基-1,4-苯醌(DDQ)氧化半抗原 A 得到对(3-羧基丙氧基)孔雀石绿，半抗原 B(图 3)。

在第三步中制备半抗原 C，对-(3-乙酰硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿(图 4)。首先，在酸性条件下 4-硝基苯甲醛，4，与 N,N-二甲苯胺加热得到对硝基隐色孔雀绿，5。其在甲酸铵存在下在 MeOH/THF 中用 Pd/C 还原得到对氨基隐色孔雀绿，6。最后，在 N,N-二异丙基乙胺存在下在 1,4-二噁烷(dioxane)中，使对氨基隐色孔雀绿与 N-琥珀酰亚氨基 3-(乙酰硫代)丙酸酯反应，并在室温搅拌过夜得到半抗原 C。

制备免疫原和偶联物

尽管此处公开的半抗原提供指定的结构性表位，它们本身没有免疫原性，因此需要与载体材料结合，当施用给宿主动物时，其将引起免疫反应。合适的载体材料通常包含聚(氨基酸)片段，包括多肽、蛋白质和糖蛋白。有用的载体材料的实例有牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(egg ovalbumin)、牛 γ 球蛋白、牛甲状腺球蛋白(BTG)、匙孔血蓝蛋白(KLH)等。作为备选，可使用具有足够数量的、可以利用的氨基基团(例如赖氨酸)的合成性聚(氨基酸)，也可以利用携有反应性官能团的其它合成或天然的聚合物。特别是，碳水化合物、酵母或多糖可与所述半抗原结合产生免疫原。

此处公开的半抗原也可与可检测的标记物结合，用于制备在免疫测定中使用的偶联物(或检测试剂)，所述标记物例如酶(如辣根过氧化物酶)、具有荧光性质的底物或放射性标记。荧光底物可以是例如，荧光素的单价残留物或其衍生物。

免疫原形成(实施例 7 和 8)涉及常规的偶联化学，其中半抗原 A 羟基的氧首先与 DCC 结合，然后与 NHS 结合，形成带有强效离去基团的酯。通过蛋白质(BSA 或 BTG)上的游离氨基，对上述酯的羰基进行亲核攻击，导致酰胺键和形成靶免疫原。半抗原 A-HRP 偶联物的形成遵循相似的机理，并使用 EDC 和硫代 NHS(实施例 9)。水解半抗原 C 来形成硫代衍生物，随后由水解的半抗原 C 对修饰型 HRP 进行亲核取代，导致形成偶联物(实施例 10)。

为了确认半抗原已与载体材料充分偶联，在免疫之前，使用基质支持 UV 激光解吸附/离子化飞行时间质谱(matrix-assisted UV laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectroscopy, MALDI-TOF MS)评估每一种免疫原。为了产生用于检测隐色孔雀绿和孔雀石绿的抗体，本发明的免疫原适合用于免疫接种。

对免疫原进行 MALDI-TOF 分析的一般过程

使用 Voyager STR 生物光谱研究站(Biospectrometry Research Station)激光解吸附质谱以及延时萃取进行 MALDI-TOF 质谱。每个待分析样品的等份试样在 0.1%的三氟乙酸(TFA)水溶液中稀释得到 1mg/ml 的样品溶液。使用芥子(Sinapinic)酸的基质分析等份试样(1 μ l), 牛血清白蛋白用作外标(external calibrant)。图 6 显示了对 BSA 载体材料的分析。如图所示, 存在主要的信号, 其表示此样品的平均质子化质量为 m/z 66,400。在 m/z 33,203 的信号与双电极形式(doubly-charged form)的主要成分一致。观察到其他信号, 包括 m/z 13,495。

制备抗血清

为了得到多克隆抗血清, 本发明的免疫原与弗氏佐剂(Freund's Adjuvant)混合, 并将混合物注射于宿主动物, 例如兔、羊、小鼠、豚鼠或马。进行进一步的注射(加强注射), 并对血清取样以评估抗体滴度。当获得最佳滴度时, 将宿主动物放血得到合适容积的特异性抗血清。抗体纯化所需的纯度取决于预期的应用。对于很多目的而言, 没有对纯度的要求, 然而, 在其他情况下, 例如当抗体固定于固体支撑物时, 可进行纯化步骤去除不期望的物质和消除非特异性结合。

本发明制备的特异性抗体用作检测或测定生物液体中隐色孔雀绿和孔雀石绿的免疫测定中的试剂。本发明的抗体能够与代谢的隐色孔雀绿以及与母体孔雀石绿结合。

实施例

实施例 1: 制备对[3-(乙基羧基)丙氧基]苯甲醛(2)

向 4-羟基苯甲醛, 1, (20 g, 164 mMol)和碳酸钾(68g, 492 mMol)的乙腈(300 ml)的混悬液中加入 4-溴丁酸乙酯(35.2 ml, 246 mMol)。然后将混合物加热回流过夜。冷却至室温后, 过滤掉固体, 真空除去溶剂。然后向残留物中加入水(200ml), 并用乙酸乙酯萃取(3 x 200 ml)。合并有机相用盐水(brine)洗(1 x 200 ml), 硫酸钠干燥, 过滤、蒸发至干燥。所得残留物使用 30%乙酸乙酯的己烷溶液作为洗液(eluent)在硅胶(silica gel)上经过急骤层析(flash chromatography), 纯化得到无色油状 2(27 g, 69.8%)。

IR 光谱(film): 1733.7, 1692.5, 1601.2, 1577.9, 1509.8, 1257.7, 1161.1 cm^{-1} 。

实施例 2: 制备对[3-(乙基羧基)丙氧基]隐色孔雀绿(3)

向对[3-(乙基羧基)丙氧基]苯甲醛 2(10 g, 42.4 mMol)和 N,N-二甲基苯胺(12.38 g, 106 mMol)的混合物中加入浓硫酸(2ml), 并且混合物在 120 $^{\circ}\text{C}$ 加热 48 小时。然后冷却溶液至室温, 加入水(200ml), 用固体碳酸钠中和混合物, 再用乙酸乙酯萃取(3 x 100 ml), 用盐水洗(1 x 100 ml), 硫酸钠干燥, 过滤并真空浓缩至干燥。所得粗品使用 25%乙酸乙酯的己烷溶液作为洗液在硅胶上经过急骤层析, 纯化得到橘色油状酯 3(6.9 g, 35%)。

IR光谱(film): 1735.3, 1612.2, 1518.3, 1242.6 cm^{-1} 。

实施例 3: 制备对-(3-羧基丙氧基)隐色孔雀绿(半抗原 A)

向酯, 3, (8.4 g, 18.75 mMol)溶于甲醇和 THF(2: 1, 240ml)混合物所得的溶液中加入氢氧化钠(2N,40ml)。将混合物在室温搅拌 16 小时。真空去除溶剂并加入水(100ml)。该溶液通过加入 HCl(2N)中和至 pH7, 所获得的沉淀通过过滤收集, 在干燥器中经五氧化二磷干燥。得到蓝/绿色固体的半抗原 A(3.2g,40%)。

NMR ^{13}C , 溶剂 δ -MeOH (图5): 178.8, 156.9, 148.9, 137.7, 133.6, 130.6, 129.9, 114.1, 112.9, 66.6, 54.2, 40.9, 30.9, 24.6。

实施例4: 制备对硝基隐色孔雀绿

向对硝基苯甲醛, 4, (12.81g,84.77mMol)和N,N-二甲基苯胺(24.76 g, 204.3 mMol)中加入硫酸(5ml)。加热48小时后, 加入水(200ml), 该溶液通过加入饱和碳酸钠溶液中和。所得溶液用二氯甲烷(3 x 200ml)和乙酸乙酯(3 x 200ml)萃取, 经硫酸钠干燥, 过滤并蒸发至干燥。粗品通过柱层析纯化(使用硅胶; 20%乙酸乙酯的乙烷溶液)得到黄色固体对硝基隐色孔雀绿, 5, (3.5g,11%)。

NMR ^{13}C , 溶剂 CDCl_3 : 153.5, 149.5, 146.2, 131.0, 129.4, 123.4, 113.9, 54.9, 40.9。

实施例5: 制备对氨基隐色孔雀绿

向甲醇和四氢呋喃(1: 1, 160ml)混合物中的对硝基隐色孔雀绿(2.1g, 5.6mMol)中加入甲酸铵(1.91g, 30.29mMol)和 Pd/C(300mg, 2.83mMol), 并且将混合物在室温搅拌 3 小时。真空去除溶剂, 加入水(200ml), 用乙酸乙酯(3 × 200ml)萃取所得溶液, 硫酸钠干燥, 并蒸发至干燥。粗品通过柱层析纯化(使用硅胶; 10%己烷的乙酸乙酯溶液)得到蜡状紫/红色固体对氨基隐色孔雀绿, 6, (2.43g, 75%)。

实施例 6: 制备对-(3-乙酰硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿(半抗原 C)

对氨基隐色孔雀绿(470 mg, 1.36 mMol)、N,N-二异丙基乙胺(350 μ l, 2.04mMol)和 N-琥珀酰 3-(乙酰硫代)丙酸酯(367mg, 1.5mMol)在 1,4-二噁烷(25ml)中室温搅拌过夜。真空去除溶剂。粗品通过柱层析纯化(硅胶; 乙酸乙酯: 己烷, 1: 5)得到紫色油状对-(3-乙酰硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿, 半抗原 C, (560mg, 87%)。

IR 光谱 (film): 1741, 1692, 1611, 1518, 1353, 1204 cm^{-1}

实施例 7: 半抗原 A 与 BSA 偶联(制备免疫原 I)

向半抗原 A(60mg, 0.14mMol)的 DMF(2ml)溶液中加入 N-羟基琥珀酰亚胺(17.7mg, 0.154mMol)和 N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC)(31.8mg, 0.154mMol), 将混合物在室温搅拌过夜。通过过滤去除所形成的二环己脲, 将滤出液滴加至 BSA(200mg)的 0.1M 碳酸氢钠溶液(pH8.5, 9ml)中。混合物在室温搅拌过夜。该溶液在 4°C 用 50mM 磷酸缓冲液 pH7.2 透析 24 小时(换 3 次透析液), 然后冻干。

MALDI 结果显示 47.9 摩尔半抗原 A 已经与 1 摩尔 BSA 偶联(图 7)。

实施例 8: 半抗原 A 与 BTG 偶联(制备免疫原 II)

用: 半抗原 A(80mg)、N-羟基琥珀酰亚胺(24mg)、DCC (36mg)和 BTG (150 mg), 按实施例 7 的方法, 使半抗原 A 与 BTG 偶联。

实施例 9: 半抗原 A 与 HRP(辣根过氧化物酶)偶联

将 EDC.HCl (10 mg)溶于水(0.5ml), 并立即加至半抗原 A (2mg)的 DMF 溶液(0.2ml)中。混合后, 将该溶液滴加至 HRP (20mg)的水溶液(1ml)中。加入硫代 NHS (sulfo-NHS, 5mg), 将反应混合物于室温避光保温过夜。在已用 pH7.2 PBS(磷酸盐缓冲液)预平衡的 PD-10 柱(Pharmacia)上连续脱盐, 去除过量半抗原。然后将半抗原-HRP 偶联物用 10L PBS/pH7.2 在 4℃透析过夜。

实施例 10: 对-(3-乙酰硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿与 HRP (辣根过氧化物酶)偶联

将 1M 的氢氧化钾溶液(100ml)加至对-(3-乙酰硫代丙酰氨基)隐色孔雀绿(2mg)的 DMF 溶液(0.2ml)中。保温 10 分钟后, 加入 0.1M 的磷酸缓冲液, 随后加入 1M HCl。混合后, 将该溶液滴加于修饰型 HRP(20mg)的溶液中。在已用 pH7.2 PBS(磷酸盐缓冲液)预平衡的 PD-10 柱(Pharmacia)上连续脱盐, 去除过量半抗原。然后将半抗原-HRP 偶联物用 10L PBS/pH7.2 在 4℃透析过夜。

实施例 11: 制备抗实施例 8 所得免疫原 II 的抗体

将免疫原 II 的水溶液与弗氏完全佐剂(FCA)配制成 2mg/ml 免疫原的在 50% (v/v) FCA 中的乳液。三只羊用该乳液免疫(1^0 免疫), 在每只羊臀部取四个位点, 每一位点肌肉内注射 0.25ml 该乳液。随后的免疫(加强免疫)包含 1mg/ml 免疫原。所有加强免疫物在 50%(v/v)弗氏完全佐剂(FCA)中乳化, 并且以与 1^0 免疫相同的方式以月为间隔持续 1 年施用。在每次加强免疫后 7-14 天取血样。处理每个样本以产生抗血清, 通过辛酸和硫酸铵沉淀进一步纯化得到免疫球蛋白(Ig)级分(fraction)。Ig 级分通过竞争性 ELISA 微滴板测试来评估, 如下面实施例 12 所描述。

实施例 12: ELISA 测定隐色孔雀绿和孔雀石绿

抗免疫原 II(半抗原 A-BTG)(实施例 8)的抗血清的 Ig 级分用 10 mM Tris pH8.5 稀释, 用它对增强结合型 96 孔聚苯乙烯微滴板的孔进行包被(125 μ l/孔)。适当的抗体包被稀释度用标准 ELISA 棋盘技术(checkerboard technique)测定。该板在 37℃保温 2 小时, 用含有吐温 20 的 Tris 缓冲盐水(Tris buffered saline) (TBST)洗 4 次, 拍干。在 TBST 中制备 0、5、10、50、100、250、

500 和 1000 ng/ml 的标准隐色孔雀绿和孔雀石绿溶液，每种浓度各取 50 μ l 添加至相应孔中(图 8)。

75 μ l 偶联物 I(半抗原 A-HRP)(实施例 9)，用包含 EDTA、D-甘露醇、蔗糖、硫柳汞和 BSA 的 Tris 缓冲液(pH7.2)稀释后，加至每个孔，如图 8 所显示。适当的偶联物稀释度也用标准 ELISA 棋盘技术测定。该板在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。过量的未结合的偶联物通过在 10 分钟内用 TBST 洗 6 次而除去。将 125 μ l 的四甲基联苯氨(TMB)底物溶液加于板上每孔，然后将板室温避光保温 15-20 分钟。通过向每孔加入 125 μ l 0.2M H₂SO₄ 终止反应。然后使用微滴板读数器在 450nm 处测量吸收值。测试中所得数据列于表 1。

表 1: 用抗免疫原 II(半抗原 A-BTG)(实施例 8)的抗血清和偶联物 I(实施例 9)进行隐色孔雀绿和孔雀石绿的竞争性微滴板测定得到的数据。

标准浓度 ng/ml	隐色孔雀绿		孔雀石绿	
	A ₄₅₀	%B/B ₀	A ₄₅₀	%B/B ₀
0	1.814	100	1.691	100
5	1.378	76.0	1.440	85.2
10	1.225	67.5	1.392	82.3
50	0.762	42.0	1.075	63.6
100	0.547	30.2	0.869	51.4
250	0.366	20.2	0.664	39.3
500	0.247	13.6	0.520	30.8
1000	0.178	9.8	0.416	24.6

IC ₅₀ (ng/ml)	27.33	103.39
%CR	100	26.43

A₄₅₀= 在 450nm 的吸收值

B= 在 x ng/ml 标准浓度、在 450nm 的吸收值

B₀= 在 0 ng/ml 标准浓度、在 450nm 的吸收值

IC₅₀= 产生 50%B/B₀ 的标准浓度

%CR= 基于隐色孔雀绿特异性的交叉反应百分数-这是本说明书中术语“交叉反应性”的含意。

75 μ l 偶联物 C(半抗原 C-HRP)(实施例 10), 用包含 EDTA、D-甘露醇、蔗糖、硫柳汞和 BSA 的 Tris 缓冲液(pH7.2)稀释后, 加于每个孔, 如图 8 所显示。适当的偶联物稀释度也用标准 ELISA 棋盘技术测定。该板在 25 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。过量的未结合的偶联物通过在 10-15 分钟内用 TBST 洗 6 次而除去。

将 125 μ l 的四甲基联苯氨(TMB)底物溶液加于板上每孔, 然后将板室温避光保温 20 分钟。通过向每孔加入 100 μ l 0.2M H₂SO₄ 终止反应。然后使用微滴板读数器在 450nm 处测量吸收值。测试中所得数据列于表 2。

表 2: 用抗免疫原 II(半抗原 A-BTG)(实施例 8)的抗血清和偶联物 II(实施例 10)进行隐色孔雀绿和孔雀石绿的竞争性微滴板测定得到的数据。

标准浓度 ng/ml	隐色孔雀绿		孔雀石绿	
	A ₄₅₀	%B/B ₀	A ₄₅₀	%B/B ₀
0	1.725	100	1.692	100
0.5	1.550	90	1.611	95
1	1.323	77	1.504	89
5	0.772	45	1.137	67
10	0.538	31	0.967	57
50	0.184	11	0.497	29
100	n/a	n/a	0.342	20
250	n/a	n/a	0.227	13
500	n/a	n/a	0.184	11
1000	n/a	n/a	0.113	7

IC ₅₀ (ng/ml)	3.74	13.962
%CR	100	26.8

A₄₅₀= 在 450nm 的吸收值

B= 在 x ng/ml 标准浓度下、450nm 的吸收值

B₀= 在 0 ng/ml 标准浓度下、450nm 的吸收值

IC_{50} = 产生 50%B/B₀ 的标准浓度

%CR= 基于隐色孔雀绿特异性的交叉反应百分数

隐色孔雀绿的敏感度或 IC_{50} (ng/ml)在表 2 显示为 3.74, 表 1 显示为 27.33。孔雀石绿的敏感度或 IC_{50} (ng/ml)在表 2 显示为 13.962, 表 1 显示为 103.39。可以认为, 这些敏感度差异是由于使用偶联物而该偶联物带有与免疫原的交联基结构不同的交联基造成的。不期望受限于理论, 可以认为测试中的受分析物更能与所述偶联物竞争抗体结合位点, 因此增加测试敏感度但保留其特异性。

本发明将不限于此处描述的实施方案, 其可在不偏离本发明范围下进行修改或修饰。

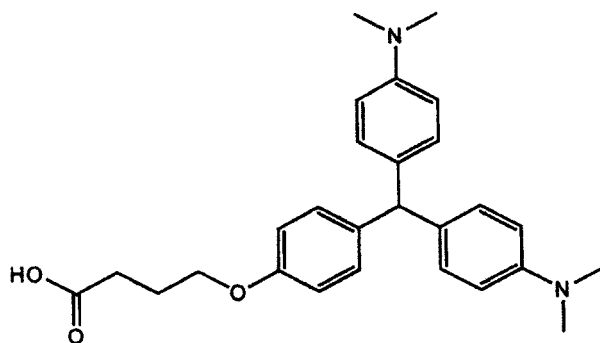
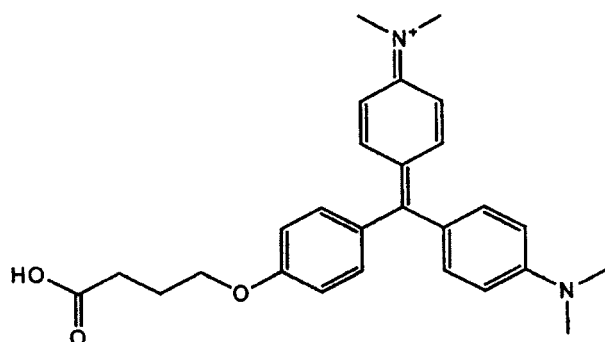
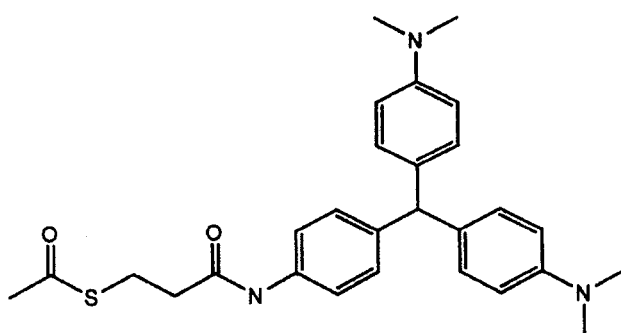
半抗原 A、B 和 C 的结构半抗原 A半抗原 B半抗原 C

图 1

半抗原 A 的化学合成

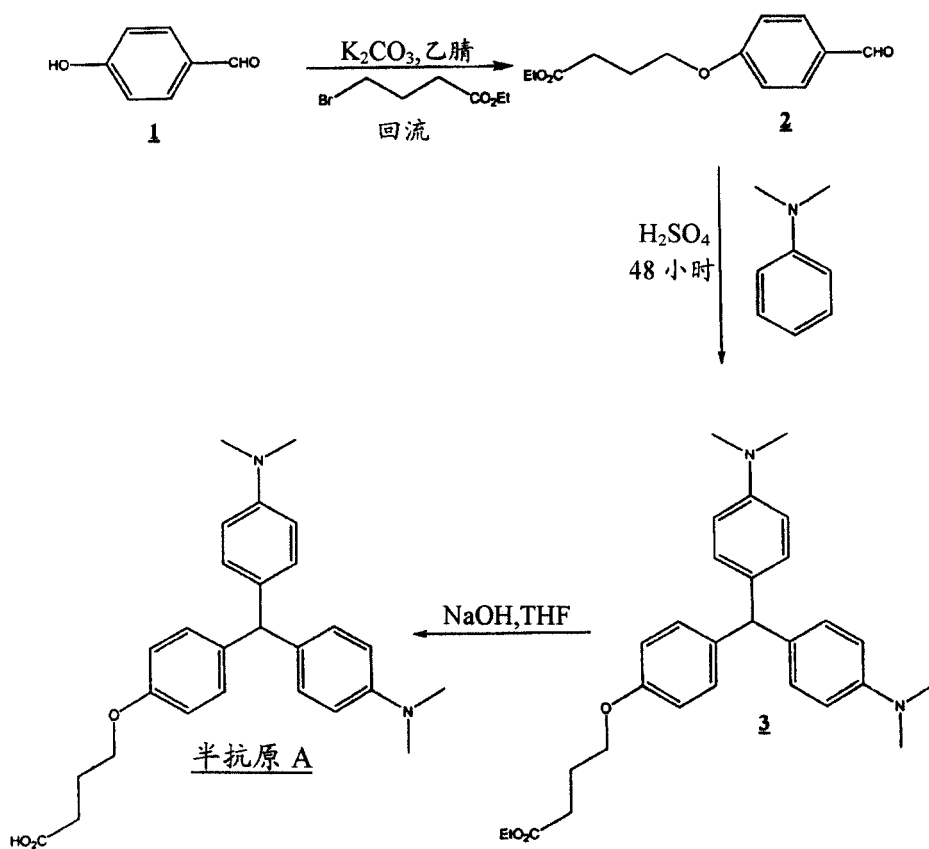


图 2

半抗原 C 的化学合成

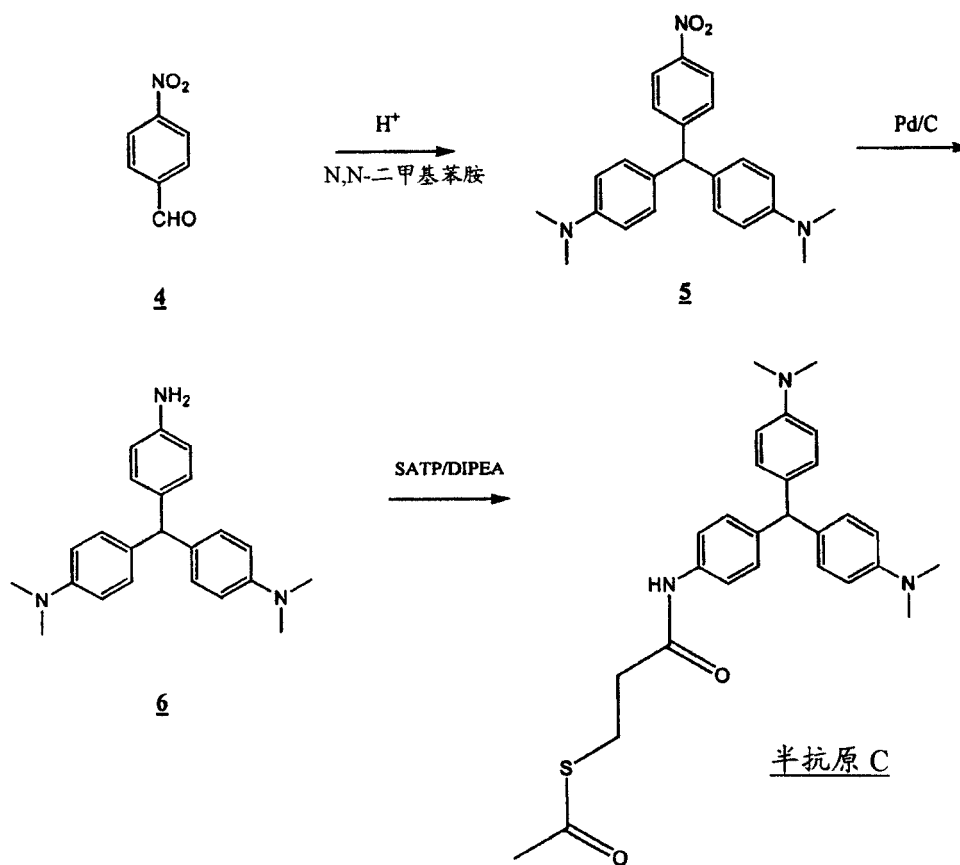


图 4

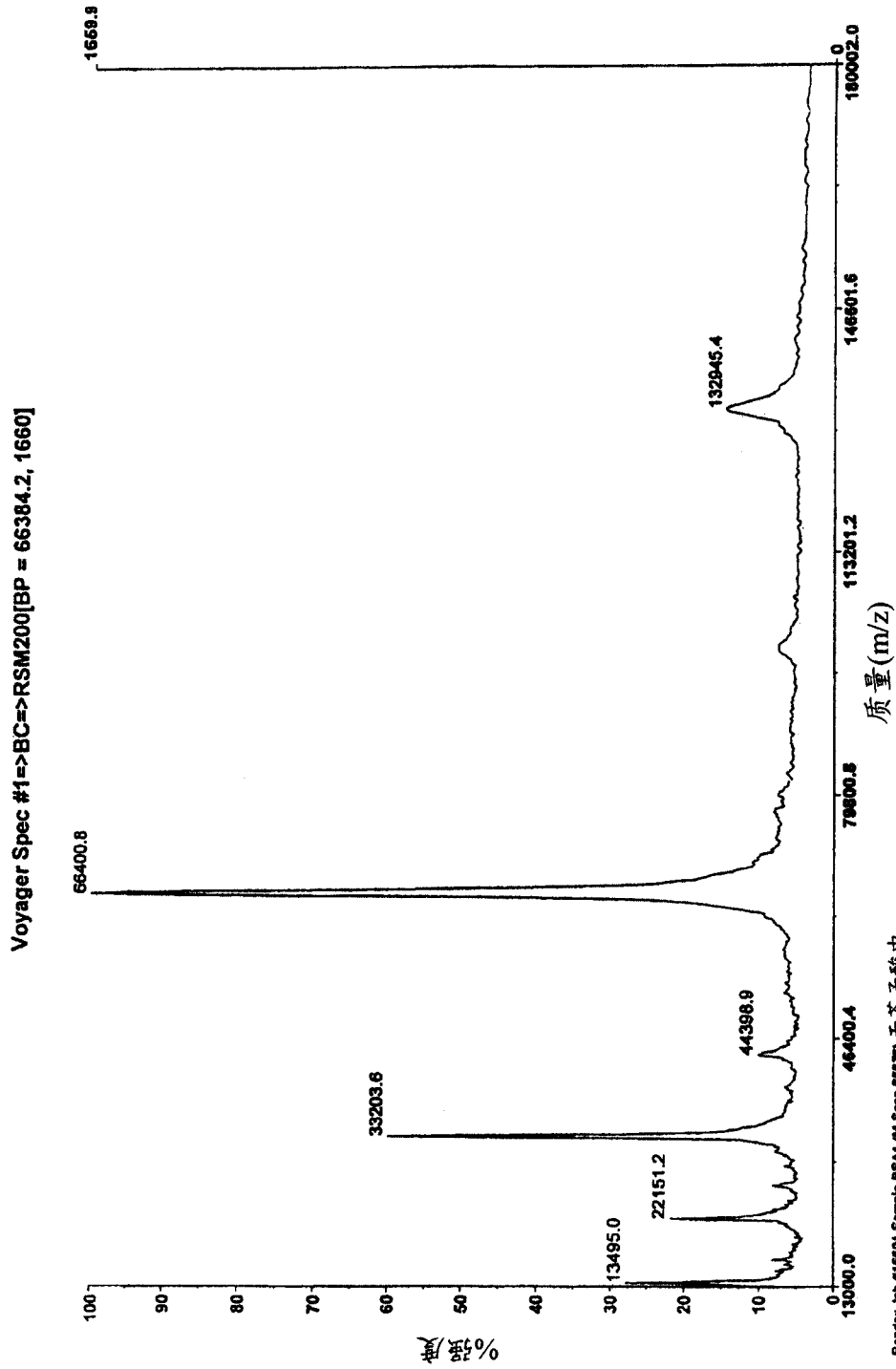


图 6

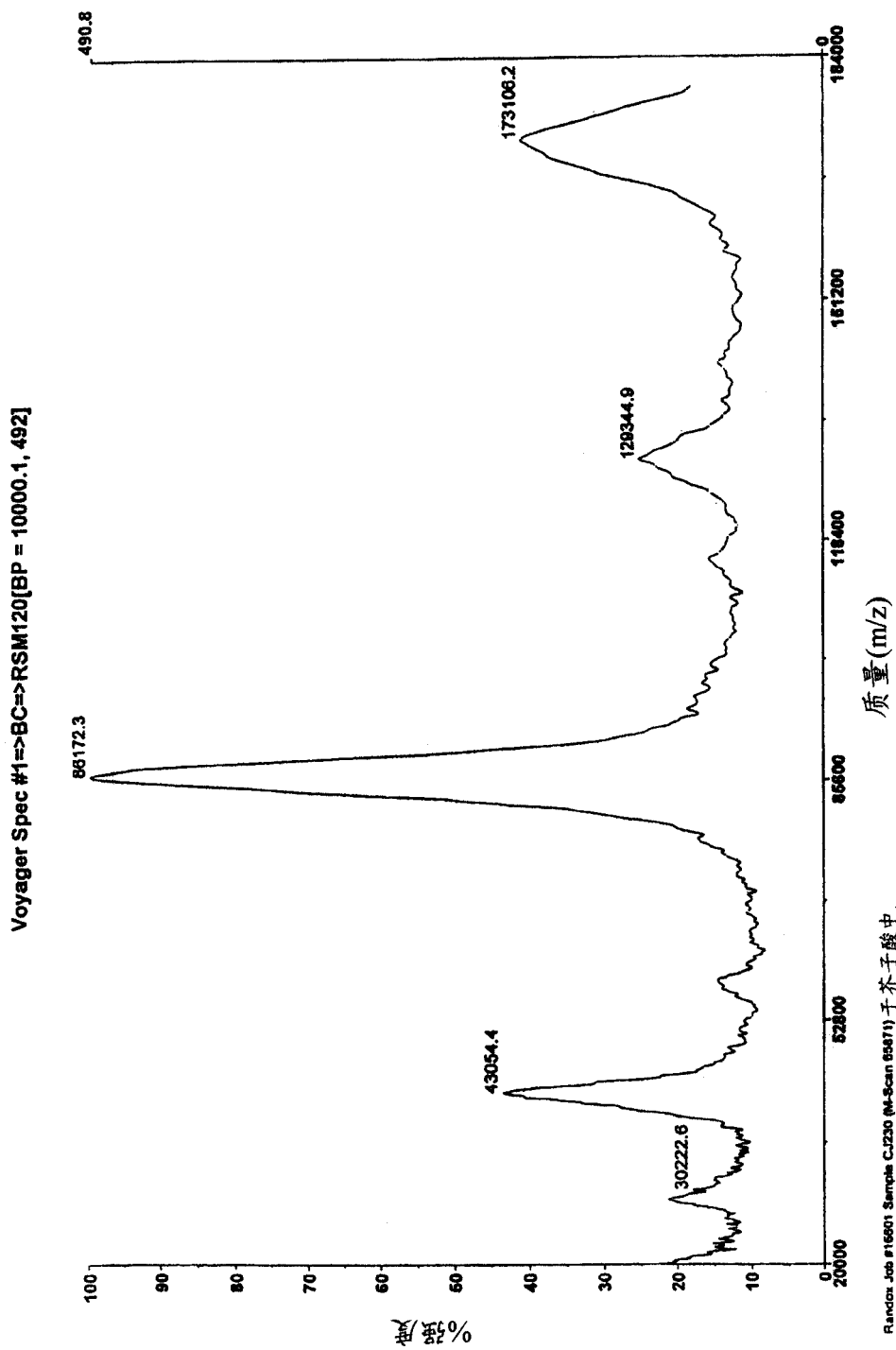
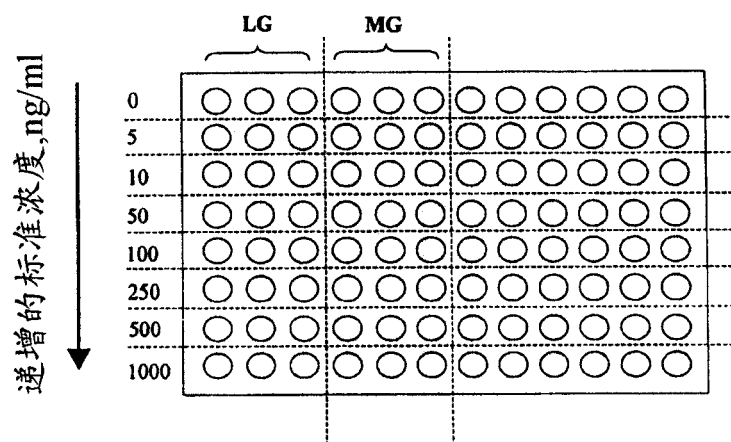


图 7

图 8: 对隐色孔雀绿(LG)和孔雀石绿(MG)的竞争性 ELISA 微滴板测定



专利名称(译)	对隐色孔雀绿和孔雀石绿进行免疫测定的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN101149375A	公开(公告)日	2008-03-26
申请号	CN200610064048.4	申请日	2006-09-22
[标]发明人	埃尔奥亚特本奇克 罗伯特I麦康奈尔 斯蒂芬P菲茨杰拉德 安德鲁P劳里		
发明人	埃尔奥亚特·本奇克 罗伯特·I·麦康奈尔 斯蒂芬·P·菲茨杰拉德 安德鲁·P·劳里		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/84 G01N33/53		
优先权	2005077175 2005-09-22 EP		
其他公开文献	CN101149375B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供半抗原、包含与赋予抗原性的载体材料偶联的所述半抗原的免疫原、包含与标记物结合的所述半抗原的偶联物、以及对抗这样的免疫原并能与隐色孔雀绿和孔雀石绿结合的抗体。

