

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/532 G01N 33/573



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03150895.2

[43] 公开日 2005 年 3 月 16 日

[11] 公开号 CN 1595157A

[22] 申请日 2003.9.10 [21] 申请号 03150895.2

[71] 申请人 上海长岛生物技术有限公司

地址 201400 上海市奉贤区庄行镇航南支路 8 号

[72] 发明人 肖国伟

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 一种新型的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶交联技术

[57] 摘要

本发明适用于免疫组化技术领域。鉴于同位素标记对人体的伤害，本发明采用新型的标记分子结合技术以提高非同位素标记检测灵敏度，从而替代同位素标记。本发明的关键技术基于水溶性的聚合载体分子—右旋糖苷，它可共价结合多个联乙烯砜单体(在单体末端为游离且具有反应活性的乙烯基)，自由的乙烯基可以结合有功能基团的分子。这些分子包括标记分子(酶、荧光、重金属离子等)，以及抗原、半抗原、抗体、核苷酸等被标记物质。本技术可以将被标记物质标记进行定性和定量分析。基于本技术的 HRP - 右旋糖苷 - RAM 复合物一步免疫分析法比 LASB 三步分析法操作简易，比基于普通结合物的一步法具有明显优势。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、本发明涉及到不同标记分子的结合方法，可以用于酶免疫分析（EIA）如ELISA，免疫组化分析，细胞化学分析，膜杂交技术（即在膜或纸上发生杂交反应如硝酸纤维素膜，包括Southern和Northern杂交技术）。关键技术基于水溶性的聚合载体分子—右旋糖苷，它可共价结合多个联乙烯砒单体（在单体末端为游离且具有反应活性的乙烯基），自由的乙烯基可以结合有功能基团的分子。这些功能分子包括标记分子（酶、荧光、重金属离子等），以及抗原、半抗原、抗体、核苷酸等被标记物质。

一种新型的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶交联技术

技术领域

本发明适用于免疫组化技术领域，关键技术基于水溶性的聚合载体分子，它具有中到高分子量，可共价结合联乙烯砜单体（在单体末端为游离且具有反应活性的乙烯基）。通过调节结合反应时间、聚合物载体分子浓度或反应体系pH值（或几种因素综合），可以在更大限度内重复改变交联程度，从而结合不同的功能分子种类（既可结合免疫球蛋白，又能结合果氧化物酶）。本发明中所涉及的试剂及结合物，在溶液中非常稳定。

背景技术

近二十年来，免疫组化分析进展神速，尤其是抗原、半抗原或抗体的定性定量分析。一般一抗自身带有合适的标记（同位素、酶、荧光基团或重金属）便于检测，还可以利用一抗与带合适标记（同位素、酶、荧光基团或重金属）的二抗（可与一抗反应）之间的免疫化学反应进行检测。常规的标记系统有以下几种：

酶标系统：用显色底物处理样品，酶与底物反应会在酶及其周围形成有色沉淀，光学显微镜检测；重金属标记系统：用含银的增强剂处理样品，银金属在金及其周围形成黑色沉淀，光学或电子显微镜检测；荧光标记系统：一般不需要其他试剂处理样品，应用合适波长的激发光用荧光显微镜检测；同位素标记系统：不许其它试剂处理，X光处理观察。

发明内容

（一）发明目的

由于同位素对人体的伤害，非放射性标记逐渐替代同位素标记，但是其灵敏度不如同位素高。人们通过选用不同的抗体、酶、荧光标记分子以及载体（聚合物载体）提高免疫分析的灵敏度。本发明即建立在利用可溶性载体基础上，提高免疫分析灵敏度。

可溶性载体（带有免疫化学反应活性基团、酶/标记分子等）处于均一溶液中，与处于不均一相中相比，活性基团间反应速率会大大提高；可溶性载体还可以使组织中具有免疫化学反应的单体或抗原决定簇充分接触并反应；而且易于去除（如通过冲洗）过量的未结合待测抗原的抗体（检测抗原）或未结合待测抗体的抗原、二抗（检测抗体）。

（二）发明的优势

本发明采用的技术大大提高了上述不同类型的检测和分析过程的灵敏度和可靠性。本发明在保证灵敏度的前提下，进一步降低了免疫反应成分（抗原、抗体、二抗等）的连续层数量，而这些连续层在传统的ELISA或组织化学反应中是必须的。

另外，利用本技术制备的水溶性试剂及结合物，在合适的pH值下具有非常高的稳定性/保存期，而与温度关系不大（无论在低温或者温度高于周围环境的情况下）。聚合物载体右

旋糖苷可与多个联乙烯砜单体通过末端的乙烯基结合在一起，而另一末端的游离乙烯基可以与合适的功能基团进行反应。乙烯自由基的固有反应活性会被中性pH值抑制，而在碱性pH值如9-11下具有高反应活性，而在液体溶液中以及合适的pH条件下具有相似的高稳定性/保存期。这些特性使得利用本发明制成的产品非常适于商用。

另外，本发明采用的聚合物载体为右旋糖苷，可装载分子的能力高。每个载体分子可以结合成千上万的小分子量分子或上千个相对高分子量的分子，这取决于这些分子以及聚合载体分子的空间大小及分子量。

(三) 发明内容详述

本发明提供技术的关键是将水溶性聚合载体分子与多个联乙烯砜单体通过乙烯基共价结合在一起，而后另一末端的游离乙烯基则与功能基团的“分子”进行反应，从而将不同的分子种类结合在一起，如可以将标记分子与被标记分子结合在一起完成分子标记。

此处提到的“分子”代表一些分子或离子，可以作为标记（如酶、荧光或冷光）或目标分子（半抗原或半抗原结合物、抗原、抗体、核酸序列或激素），这些目标分子可以选择性或特异性的结合到一个或多个目标分子、单体、受体或抗原决定簇。

其中作为标记的分子主要包括：蛋白类（如铁蛋白、藻红蛋白、藻青蛋白、藻胆素）、酶类（如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶、牛乳糖或脲酶）、毒素类、药物类、染料类、荧光类、化学发光类、磷光以及其它发光类底物、金属螯合类底物（如亚氨基乙酰乙酸、EDTA、DTPA或去铁敏B）以及同位素或重金属离子标记的底物；荧光标记为FITC、曙红、赤藓红、桑色素、若单明，8-氨基-1-萘磺酸；放射性同位素标记为氢（氚，H3）、碳（C14）、磷（P32）、硫（S35）、碘（I131）、铋（Bi212）钷（Y90）、铪（Tc99）、钯（Pd109）、钷（Sm153）；重金属离子包括Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, In, Ag, Au, Hg, I, Bi, Y, La, Ce, Eu 和Gd，其中Gold (Au)（可能是Ag合金）用途最广。

另外，分子还包括抗原、半抗原、单克隆或多克隆抗体、基因探针、天然或合成的寡核苷酸或多聚核苷酸、凝集素、抗生物素蛋白或链霉胍、生物素、生长因子、激素、受体分子或蛋白A、蛋白G。合适的激素如固醇类激素（雌激素、黄体酮或可的松）、氨基酸激素（如甲状腺素）或蛋白和肽类激素（如抗利尿激素、胃泌激素、胰岛素）。

本发明中聚合物载体分子可以从下列物质中挑选：天然或人工的聚多糖及其衍生物如右旋糖苷及右旋糖苷衍生物，淀粉及淀粉衍生物，纤维素衍生物，多糖及胶质或某些天然橡胶及其衍生物如阿拉伯胶，褐藻酸盐；具有反应活性的同聚物如多熔素、多聚组氨酸及多聚鸟氨酸；天然和合成的多肽和蛋白如牛或其它哺乳动物血清白蛋白以及合成的有亲核基团的聚合物如聚乙烯醇、聚丙烯醇、聚乙烯乙二醇及聚丙烯酸替代物。其中最合适的聚合物载体分子是多糖及其衍生物如右旋糖苷、羧基-甲基-右旋糖苷、羟乙基和羟丙酯淀粉、糖原、琼脂糖衍生物以及羟乙基和羟丙酯纤维素。正如工作样品证明，右旋糖苷最适合作聚合物载体分子。

由于净的正负电荷会引起内部反应如结合物与底物及其它物质的非特异结合，因此本发明中所用的试剂及结合物无净电荷，这可以通过使用不带净电荷的载体分子制备得到。这些聚合物载体分子在单体状态下，pH值约在4-10范围内是线性、不带电的，这一pH值范围实践

证明适于绝大多数免疫化学反应、杂交反应以及本发明结合物适用的其它反应。

本发明中不同种类的试剂及结合物，都基于从低到很高分子量水溶性的聚合载体之上，这些聚合载体分子量在1,000-40,000,000之间，这里给出的工作例子选用的合适载体的最大分子量在1,000-80,000和80,000-2,000,000之间，而右旋糖苷的最大分子量约在500,000。

说明书中使用的“最大分子量”（又名最大平均分子量）表示给定样品中含最多数量的单体分子时的分子量。目前市场上有数目众多的聚合物适用于本发明，如右旋糖苷，制造商或发行人可以提供可靠的最大分子量（由凝胶过滤或色谱柱确定）数据，这些数据又为选择合适聚合载体分子制备试剂及结合物提供依据。

吸附的分子，按其分子量大小可分为2000以下的和2000以上的两种。在前一种情况下，结合物的聚合物载体分子可共价吸附1-10000分子，第二种情况下，则可共价吸附1-1000个分子。分子通过联乙烯砒衍生的基团与聚合载体分子共价吸附在一起。

具体实施方式

（一）具体步骤

1. 右旋糖苷的联乙烯砒（DVS）活化（最大分子量500000）：

溶液：5% w/v 右旋糖苷；0.25M 磷酸氢二钾/氢氧化钠（pH 11.5）；0.25 mg/mL 硼氢化钠；10% v/v 联乙烯砒。

在25°C下活化15分钟，接着用5M HCl调节反应液pH值为7，所有样品进行水透析以去除过量的试剂。

2. DVS-活化的右旋糖苷与辣根过氧化物酶（HRP）共价交联：

第一步的右旋糖苷制备物与辣根过氧化物酶混合，其反应缓冲体系如下：2.75 mg/mL DVS-活化的右旋糖苷；10 mg/mL 辣根过氧化物酶；0.2M磷酸氢二钾/氢氧化钠（pH 10.0）。在37°C下交联16小时，接着用1M HCl调节反应液pH值为6-7以中止反应。

3. 辣根过氧化物酶右旋糖苷与兔抗鼠免疫球蛋白共价交联：

第二步的辣根过氧化物酶-右旋糖苷制备物与兔抗鼠免疫球蛋白（RAM）交联，反应体系为：1.9 mg/mL兔抗鼠免疫球蛋白；HRP-右旋糖苷相当于0.25 mg/mL右旋糖苷；0.5M 磷酸氢二钾（用盐酸或氢氧化钠调节至pH 8.5）。在42°C下孵育20小时，期间不要搅拌。

（二）实施结果

免疫组化分析结果显示，基于HRP-右旋糖苷-RAM复合物的一步法比LASB三步分析法操作简易，比基于普通结合物的一步法具有明显优势。这又一次证明了本发明复合物的优点。

专利名称(译)	一种新型的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶交联技术		
公开(公告)号	CN1595157A	公开(公告)日	2005-03-16
申请号	CN03150895.2	申请日	2003-09-10
[标]发明人	肖国伟		
发明人	肖国伟		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/573		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明适用于免疫组化技术领域。鉴于同位素标记对人体的伤害，本发明采用新型的标记分子结合技术以提高非同位素标记检测灵敏度，从而替代同位素标记。本发明的关键技术基于水溶性的聚合载体分子—右旋糖苷，它可共价结合多个联乙烯砜单体(在单体末端为游离且具有反应活性的乙烯基)，自由的乙烯基可以结合有功能基团的分子。这些分子包括标记分子(酶、荧光、重金属离子等)，以及抗原、半抗原、抗体、核苷酸等被标记物质。本技术可以将被标记物质标记进行定性和定量分析。基于本技术的HRP - 右旋糖苷 - RAM复合物一步免疫分析法比LASB三步分析法操作简易，比基于普通结合物的一步法具有明显优势。