



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105566499 B

(45)授权公告日 2017.06.16

(21)申请号 201610013923.X

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2016.01.06

G01N 33/68(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105566499 A

(56)对比文件

CN 1311856 A,2001.09.05,

CN 1580774 A,2005.02.16,

(43)申请公布日 2016.05.11

审查员 唐慧

(73)专利权人 广州深达生物制品技术有限公司

地址 511458 广东省广州市南沙区环市达

到南8号科技创新中心B区C栋四楼

(72)发明人 郭金灿

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C07K 1/13(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

C12N 11/08(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

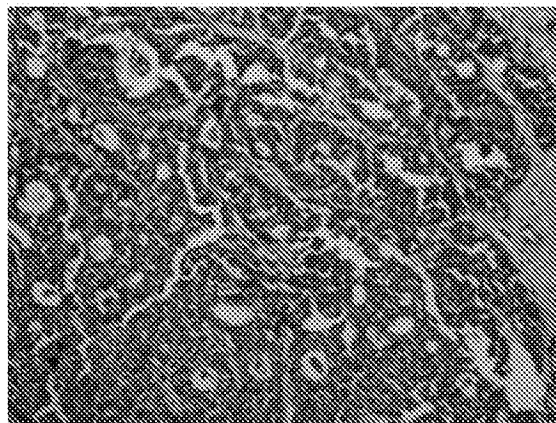
权利要求书1页 说明书7页 附图6页

(54)发明名称

一种多聚体酶-抗体及其制备方法

(57)摘要

本发明属于医学检测技术领域,特别是涉及一种多聚体酶标联抗体及其制备方法,采用DVS活化的酶,与PAMAM Dendrimer系列具有多分枝有机分子载体聚合后获得多聚体酶;多聚体酶用DVS再度活化,然后与抗体混合孵育,得到球状多聚体酶标联二抗抗体。该方法克服目前使用链状高分子(比如以葡聚糖或多肽)为载体的多聚体酶标联方法的主要缺陷,极大地缩小了多聚体酶的体积,提高抗体上酶标的密度,使单位体积内标联到二抗上的酶的数目大幅度增加。这一方法生产的多聚体酶标联二抗与现有的酶标二抗相比有更高的灵敏度和稳定性。



1. 一种多聚体酶-抗体的标联方法,其特征在于:

1) 将2,000,000U、7.5克过氧化酶在室温下溶解在0.1M、pH8.00、2.0ml的碳酸氢钠缓冲液中,加入0.24ml的DVS,然后在30℃下温和搅拌30分钟;

2) 将上述反应液经一个50ml的Sephadex G-25的柱子纯化去除剩余的DVS,纯化在0.1M、pH8.0碳酸氢钠缓冲液中进行,收集棕色的组分,为活化酶;

3) 将上述活化酶用离心浓缩管浓缩至4.0ml;

4) 向上述浓缩了的4ml活化酶中,加入144mg PAMAM Dendrimer 5.0,其中活化酶与PANMAM的分子数比例为40:1;将此溶液在30℃下,温和搅拌16个小时;

5) 将第4)步的反应液经过一个50ml的Sephadex G-25的柱子纯化,并将溶液转换到0.1M、pH8.0碳酸氢钠缓冲液中,第一个棕色的组分为多聚体过氧化酶;

6) 将第5)步生产的多聚体过氧化酶浓缩至4.0ml,向此溶液中加入0.24ml DVS,在30℃下温和搅拌3个小时;

7) 用一个50ml的Sephadex G-25分离柱子将剩余的DVS去除,纯化采用含有10mM磷酸钠和140mM氯化钠、其pH7.40PBS缓冲液,收集棕色组分,棕色的组分为活化了的的多聚体过氧化酶;

8) 将第7)步生产得到的活化了的的多聚体过氧化酶浓缩至4.0ml;

9) 将80mg经过亲和纯化并且去除了与人免疫球蛋白的交叉反应的羊抗鼠球蛋白,其中羊抗鼠球蛋白加入PBS中,浓度为5mg/ml, pH为7.4;和第8)步所产生的活化了的的多聚体过氧化酶混合,使之均匀混合,然后在黑暗中在室温下静止孵育24小时;

10) 向第9)步试剂中加入0.4g牛血清蛋白以及0.1%的Proclin-300;

11) 所生产的球状多聚体过氧化酶-羊抗鼠免疫球蛋白经过稀释之后便可用于免疫组化染色。

一种多聚体酶-抗体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检测技术领域,特别是涉及一种多聚体酶-抗体及其制备方法。

背景技术

[0002] 免疫组织化学是一种利用抗原与抗体特异性识别的特征进行对病理标本中肿瘤特异性蛋白或抗原检测的免疫组织化学技术[1、2]。这个技术不仅能够检测到特征物质的性质和量,更因为这种技术能够特征蛋白或抗原原本的位置上并在保持组织原有形态的基础上进行检测,使之成为对病理病因分析(尤其是对肿瘤病理的分析)最为有效的方法,已成为肿瘤诊断、鉴定、鉴别和疗效预测等最为普遍使用的临床方法之一。

[0003] 免疫组织化学的实验操作步骤和原理是[2、3]:1)通过外科手术获取病理标本(肿瘤组织或其它病灶组织),经过福玛琳固定,酒精脱水,石蜡包埋后,切片成3-5微米厚度的组织切片,粘附在玻片上。2)经过有机溶剂脱蜡,酒精清洗和水化后,再经过高温烹煮使组织上的特征物质(比如肿瘤特征蛋白或抗原,或病原体蛋白)回复原有形状。3)经过使用特异性抗体(具有与特征物质或与特异性抗原结合能力的抗体,称之为“一抗”)对特征蛋白的识别。4)经过使用标记酶标记的抗一抗的抗体(称之为“二抗”)的孵育,使酶标记的二抗与一抗结合,确定特异性特征物质(蛋白)的位置。5)使用显色剂在标记酶的催化下起化学反应,形成不溶性有色化合物在原位上沉淀下来,从而显示酶标二抗所存在的位置(也就是特征蛋白或抗原所在的位置)。6)使用苏木素把整个组织形态衬染出来以便于对组织形态的识别。7)经过这样一个系列的操作过程,使肿瘤特征蛋白或病原体蛋白所存在的位置和量通过颜色的位置和深浅显示出来,起到鉴定和鉴别的作用,指导临床治疗。

[0004] 免疫组织化学整个试验操作过程需要近三十个步骤[3、4],包括:脱蜡、水化、内源性酶阻断、清洗、高温热修复、冷却、清洗、一抗孵育、清洗、二抗孵育、清洗、增效剂孵育、清洗、显色、清洗、衬染、清洗、脱水、封片等步骤。这些步骤中除了需要规范的组织取样和预处理外,影响切片标本处理效果的关键因素一是一抗的特异性和亲和力,二是二抗的信号放大效果。而二抗的放大能力取决于二抗的特异性和亲和力以及二抗上所标联的标记酶的数量。现有技术的原理及其缺点:目前市场常用的标记酶标联的二抗其工作原理有以下三种方法:a)使用生物素-亲生物素放大法[1](图1)。此方法的原理是:在二抗上使用生物素标记,然后把标记酶与亲生物素标联[2]。在切片标本的处理过程中,在标本上滴加一抗之后,滴加生物素标记的二抗,接着再滴加与标记酶标联的亲生物素。利用亲生物素与生物素之间的特异高亲和力,使与亲生物素标联的标记酶定位在特征物质所在的位置上。此方法的优点在于生物素是个有机小分子,因为体积小可以在二抗上较多地标记而较少影响二抗的特异性和亲和力。在二抗上标记的生物素量多,就有可能与更多的标记酶标联的亲生物素结合,可以提高信号放大的效果,提高检测灵敏度。然而,此方法存在一个严重的缺点是:生物素是生物体内存在的维生素之一,尤其在小肠组织,肾组织,脑组织和肝组织中普遍存在,使用生物素-亲生物素放大法在上述组织中会出现与检测本身无关的阳性信号,即出现假阳性的误诊可能。此方法的另一个缺点是需要多出一个操作步骤。b)直接酶-二抗标联

法 [2] (图2)。此方法便是把标记酶通过有机小分子偶联试剂直接标联在二抗上。由于标记酶本身分子量较大(常用的过氧化酶分子量为40,000Da,碱性磷酸酶分子量为140,000Da,尿素酶分子量为200,000Da),体积较大,只能在二抗分子上标联1-2个酶分子,标联多了便会降低二抗本身的特异性(降低特异性便会引起高背景和非特异性信号)以及降低二抗的亲合力,降低了其检测的灵敏度。c) 多聚体酶-二抗标联法。这是近一些年来新型的标记酶与二抗的标联方法(图3) [5,6]。为了减少标记酶对二抗特异性和亲和力的损害,不直接将标记酶标联到二抗分子上,而是将标记酶首先链接到一个链状的有机高分子上(比如葡聚糖 [5],多聚赖氨酸多肽 [6] 等),然后将此多聚了的多聚体酶标联到二抗分子上面,既增加了每个二抗分子上标记酶的数目,又使标记酶与二抗有一定的空间距离,减少对二抗特异性和亲和力的不利影响。与前面两种标联方法相比,多聚体酶标联法排除了内源性生物素干扰的可能性,简化了操作步骤(减少了一个步骤,改两步:滴加生物素标记的二抗以及滴加酶标记的生物素成为一步:滴加多聚体酶标联的二抗)同时具有较高的检测灵敏度 [5,6]。此方法已成为市场上最为通用的切片标本处理的信号放大方法。但是此方法所存在的缺点是:链式多聚体酶标联的二抗整体结构松散,体积较长,影响了对组织的穿透性,对一些存在于细胞核内特征物质的检测需要比较长的孵育时间以达到所需要的灵敏度,对于一些在福玛琳中固定(浸泡)时间较长的组织的信号放大效果不够有效。

发明内容

[0005] 基于上述原因,申请人研究一种新的标记酶标联抗体以及制备方法,本发明的多聚体酶-抗体:采用DVS活化标记酶(比如过氧化氢酶),接着用活化了的过氧化氢酶与PAMAM Dendrimer进行化学反应,形成多标记酶-PAMAM Dendrimer的多聚体酶。将此多聚体酶再次使用DVS活化,然后与二抗抗体混合孵育,得到多聚体酶标记的二抗抗体。

[0006] PAMAM Dendrimer是个球状的多分枝有机分子,并在每个分支的末端各有可以活化的氨基。使用PAMAM Dendrimer为支架进行多聚生产的多聚体标记酶具有球状体的紧密的分子结构。该方法克服目前使用链状高分子多聚体酶标记方法的主要缺陷,极大地缩小了多聚体酶的体积,提高酶标的密度,使单位体积内标联到二抗上的酶的数目大幅度增加。

[0007] 本发明通过下述技术方案实现的。

[0008] 一种多聚体酶-抗体的标联方法,采用DVS活化的酶与PAMAM Dendrimer系列有机小分子聚合后获得多聚体酶,多聚体酶用DVS进一步活化后,与抗体混合孵育,得到多聚体酶标联的二抗抗体。

[0009] 所述一种多聚体酶二抗抗体的标联方法:

[0010] 1) 将标记酶(比如过氧化氢酶)在室温下溶解在0.1M、pH8.0碳酸氢钠溶液,加入DVS,在20-35℃下温和搅拌20-40钟;

[0011] 2) 将上述反应液经Sephadex G-25的柱子纯化去除剩余的DVS,洗脱溶剂为0.1M、pH8.0的碳酸氢钠溶液,收集含酶的组分,浓缩至小于原有体积的两倍,得到活化酶溶液;

[0012] 3) 取活化酶溶液,加入PAMAM 5.0,活化酶溶液与PANMAM的分子数比例为30-50:1,将此溶液在20-35℃下温和搅拌16个小时;

[0013] 4) 将第3)步溶液经过Sephadex G-25的柱子纯化,洗脱溶剂为0.1M、pH8.0的碳酸氢钠溶液,第一个棕色的组分为多聚体过氧化酶溶液,将收集到的溶液浓缩至约等于原有

的体积；

[0014] 5) 向第4) 步的溶液中加入DVS, DVS与酶的分子比例为10-30:1, 在20-35℃下搅拌2-4个小时; 用Sephadex G-25分离柱子将剩余的DVS去除, 洗脱溶液为PBS (PBS为10mM磷酸钠、140mM氯化钠, pH=7.40), 收集棕色组分, 棕色的组分为活化了的多聚体过氧化酶, 浓缩至等于原有的体积;

[0015] 6) 取二抗抗体和第5) 步活化的多聚体过氧化酶溶液混合, 混合均匀, 在黑暗中在室温下静止孵育12-48小时; 加入牛血清蛋白以及0.1%的Proclin-300, 得到得到多聚体酶标-抗体。

[0016] 上述所述的酶包括: 过氧化酶、碱性磷酸酶或尿素酶。

[0017] 上述所述的抗体包括: 鼠抗羊免疫球蛋白、兔抗羊免疫球蛋白、羊抗鼠免疫球蛋白、羊抗兔免疫球蛋白、马抗羊免疫球蛋白、马抗鼠免疫球蛋白、马抗兔免疫球蛋白、鼠抗人免疫球蛋白、兔抗人免疫球蛋白、羊抗人免疫球蛋白、马抗人免疫球蛋白等, 以及以上各种抗体的活性片段, 比如Fab或(Fab) 2片段等。

[0018] 所述的多聚体酶-抗体在免疫组织化学中的应用。

[0019] 所述的多聚体酶-抗体在肿瘤检测中的应用。

[0020] 本发明具有有益的技术效果:

[0021] 1) 本发明增加了二抗上标联酶的数量和密度从而提高了检测灵敏度(图5、6)。尤其是对存在于细胞核内抗原的检测的灵敏度明显提高(图7、8), 因为体积小的酶标联的二抗更容易渗透到细胞核内与核抗原结合。

[0022] 2) 采用球状多分支有机小分子为载体, 使多个酶紧密地连接到球状多分支载体体分子上, 增加了酶分子之间的紧密度, 使标记酶更加稳定。这是酶和其它蛋白质共有的特征, 当他们的浓度越高或者越相互靠近, 稳定性越好(图9-10)。

[0023] 尽管以下本发明的实施方案进行了描述, 但本发明并不局限于上述的具体实施方案和应用领域, 下述的具体实施方案仅仅是示意性的、指导性的, 而不是限制性的。本领域的普通技术人员在本说明书的启示下和在不脱离本发明权利要求所保护的的范围的情况下, 还可以做出很多种的形式, 这些均属于本发明 保护之列。

附图说明

[0024] 图1生物素-亲生物素酶标二抗免疫组化法工作示意图: 1: 组织抗原, 2: 一抗, 3: 二抗, 4: 生物素, 5: 酶(过氧化酶、碱性磷酸酶或尿素酶), 6: 亲生物素。

[0025] 图2直接酶标二抗免疫组化法工作示意图: 1: 组织抗原, 2: 一抗, 3: 二抗, 4: 酶(过氧化氢酶、碱性磷酸酶或尿素酶)。

[0026] 图3链状多聚体酶酶标二抗免疫组化法工作示意图: 1: 组织抗原, 2: 一抗, 3: 二抗, 4: 酶(过氧化氢酶、碱性磷酸酶或尿素酶), 5: 葡聚糖。

[0027] 图4球状多聚体酶酶标二抗免疫组化法工作示意图: 1: 组织抗原, 2: 一抗, 3: 二抗, 4: 酶(过氧化氢酶、碱性磷酸酶或尿素酶)。

[0028] 图5使用本发明方法生产的球状多聚体酶标羊抗鼠二抗(实施例1生产的, 1:1000稀释) 进行免疫组化法检测乳腺癌组织E-粘合(E-Cadherin) 蛋白。

[0029] 图6使用链状多聚体酶标羊抗鼠二抗(Dako Catalog No.:K4000) 进行免疫组化法

检测乳腺癌组织E-粘合 (E-Cadherin) 蛋白。

[0030] 图7使用本发明方法生产的球状多聚体酶标羊抗兔二抗(实施例2生产的,1:1000)进行免疫组织法检测扁桃体中的Ki67蛋白。

[0031] 图8使用链状多聚酶羊抗兔二抗 (Dako Catalog No.:K4001) 进行免疫组织法检测扁桃体中的Ki67蛋白。

[0032] 图9本发明方法生产的球状过氧化酶多聚体酶标羊抗鼠二抗(实施例1生产的,1:1000稀释)的稳定性:经过在37℃下放置八个星期之后的效果。

[0033] 图10使用链状过氧化酶多聚体酶标羊抗鼠二抗 (Dako Catalog No.:K4000) 的稳定性:经过在37℃下放置八个星期之后的效果。

[0034] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步的解释。

具体实施方式

[0035] 尽管本发明涵盖了各种修改和替代性方法和装置,然而本发明的实施方式在附图中显示并且将在下文详细描述。然而,应当理解具体的描述和附图不意在将本发明限于所公开的具体形式。相反,要求保护的本发明的范围意图包括落入如所附权利要求中所表述的本发明精神和范围的其全部修改和替代性构造至它们等同物的全部范围。在附图中,相同的指示符用于相同或相似的特征。

[0036] 实施例一:

[0037] 1) 将2,000,000U过氧化酶 (Sigma Chemical Company, Catalog#No.P8375-250KU, 7.5克) 在室温下溶解在2.0ml的碳酸氢钠缓冲液中 (0.1M, pH8.00), 加入0.24mL的DVS (Sigma Chemical Company, Catalog#No.V3700-5G) 然后在30℃下温和搅拌30分钟;

[0038] 2) 将上述反应液经一个50ml的Sephadex G-25的柱子 (Sigma Chemical Company, Catalog No.G25150) 纯化去除剩余的DVS, 纯化在碳酸氢钠缓冲液中进行 (0.1M碳酸氢钠, pH8.0)。收集棕色的组分, 为活化酶;

[0039] 3) 将上述活化酶用离心浓缩管浓缩至4.0ml;

[0040] 4) 向上述浓缩了的4ml活化酶中, 加入144mg PAMAM Dendrimer 5.0 (Sigma Chemical Company, Catalog No.536709-5G) 加到上述活化酶中 (活化酶与PANMAM的分子数比例为40:1)。将此溶液在30℃下, 温和搅拌16个小时;

[0041] 5) 将第4) 步的反应液经过一个50ml的Sephadex G-25的柱子纯化并将溶液转换到碳酸氢钠 (0.1M, pH8.0) 中。第一个棕色的组分为多聚体过氧化酶;

[0042] 6) 将第5) 步生产的多聚体过氧化酶浓缩至4.0ml, 向此溶液中加入0.24ml DVS, 在30℃下温和搅拌3个小时;

[0043] 7) 用一个50ml的Sephadex G-25分离柱子将剩余的DVS去除, 纯化在PBS缓冲液 (10mM磷酸钠, 140mM氯化钠, pH7.40) 中, 收集棕色组分, 棕色的组分为活化了的的多聚体过氧化酶;

[0044] 8) 将第7) 步生产得到的活化了的的多聚体过氧化酶浓缩至4.0ml;

[0045] 9) 将80mg经过亲和纯化并且去除了与人免疫球蛋白的交叉反应的羊抗鼠球蛋白【Goat anti-mouse IgG (H+L), 5mg/ml in PBS, pH 7.4】和第8) 步所产生的活化了的的多聚体过氧化酶混合, 使之均匀混合, 然后在黑暗中在室温下静止孵育24小时;

[0046] 10) 向第9)步试剂中加入0.4g牛血清蛋白(稳定剂)以及0.1%的Proclin-300(杀菌剂);

[0047] 11) 所生产的球状多聚体过氧化酶-羊抗鼠免疫球蛋白【Dendrimeric Poly-HRP Goat anti-Mouse IgG (H+L)】经过稀释之后便可用于免疫组化染色。

[0048] 实施例二

[0049] 1) 将2,000,000U过氧化酶(Sigma Chemical Company,Catalog No.P8375-250KU,7.5克)在室温下溶解在2.0ml的碳酸氢钠缓冲液中(0.1M,pH8.00),加入0.24mL的DVS(Sigma Chemical Company,Catalog No.V3700-5G)然后在30℃下温和搅拌30分钟;

[0050] 2) 将上述反应液经一个50ml的Sephadex G-25的柱子(Sigma Chemical Company,Catalog No.G25150)纯化去除剩余的DVS,纯化在碳酸氢钠缓冲液中进行(0.1M碳酸氢钠,pH8.0)。收集棕色的组分,为活化酶;

[0051] 3) 将上述活化酶用离心浓缩管浓缩至4.0ml;

[0052] 4) 向上述浓缩了的4ml活化酶中,加入144mg PAMAM Dendrimer 5.0(Sigma Chemical Company,Catalog No.536709-5G)加到上述活化酶中(活化酶与PANMAM的分子数比例为40:1),将此溶液在30℃下,温和搅拌16个小时;

[0053] 5) 将第4)步的反应液经过一个50ml的Sephadex G-25的柱子纯化,纯化在碳酸氢钠缓冲液(100mM碳酸钠,pH8.0)中进行,第一个棕色的组分为多聚体过氧化酶;

[0054] 6) 将第5)步生产的多聚体过氧化酶浓缩至2.0ml,向此溶液中加入0.24ml DVS,在30℃下温和搅拌3个小时;

[0055] 7) 用一个50ml的Sephadex G-25分离柱子将剩余的DVS去除,纯化在PBS缓冲液(10mM磷酸钠,140mM氯化钠,pH7.40)中,收集棕色组分,棕色的组分为活化了的的多聚体过氧化酶;

[0056] 8) 将第7)步生产得到的活化了的的多聚体过氧化酶浓缩至4.0ml;

[0057] 9) 将80mg经过亲和纯化并且去除了与人免疫球蛋白的交叉反应的羊抗兔球蛋白【Goat anti-rabbit IgG (H+L),5mg/ml in PBS,pH 7.4】和第8)步所产生的活化了的的多聚体过氧化酶混合,轻缓摇晃几次使之均匀混合,然后在黑暗中在室温下静止孵育24小时;

[0058] 10) 向第9)步试剂中加入0.4g牛血清蛋白(稳定剂)以及0.1%的Proclin-300(杀菌剂)

[0059] 11) 所生产的球状多聚体过氧化酶-羊抗兔免疫球蛋白【Dendrimeric Poly-HRP Goat anti-Rabbit IgG (H+L)】经过稀释之后便可用免疫组化染色。

[0060] 具体使用实例

[0061] 本发明生产的球状多聚体酶标联二抗用于免疫组化病理标本染色有比市场上现有的链状多聚体酶标联二抗更高的灵敏度以及更好的稳定性。以下应用实例一、应用实例二、应用实例三中均采用相同的操作步骤进行灵敏度和稳定性的比较。所使用的球状多聚体酶二抗采用本发明实例1第11)步生产所得的多聚体酶标联二抗1:1000稀释在二抗稀释液(广州深达生物制品技术有限公司,目录号:BD02-100)中,对比的链状多聚体酶标联二抗(即用型)采购于美国Dako公司,目录号K4000以及K4001。其它试剂均采用广州深达生物制品技术有限公司目录上常规销售的试剂。使用实例操作步骤详细如下:

[0062] 1) 脱蜡:取相应的石蜡包埋的切片组织(见各图标注),在二甲苯中浸泡各10分钟,

3次。

[0063] 2) 水化:取上述切片转移到100%的酒精中浸泡各5分钟,两次;在95%酒精中浸泡5分钟1次;在75%的酒精中浸泡5分钟,1次;在纯化水中浸泡3分钟,1次。

[0064] 3) 热修复:取上述切片,浸泡在EDTA抗原修复液中,使用高压锅加热,在温度达到120℃后维持3.5分钟。停止加热,后自然冷却30分钟。取出切片,浸泡在PBS缓冲液中3分钟。

[0065] 4) 一抗孵育:取出切片,甩干PBS,在每张切片上滴加0.1ml相应的一抗(见各图标注)以覆盖组织,在室温下孵育60分钟后,甩干一抗,将切片浸泡在PBS缓冲液中各3分钟3次。

[0066] 5) 二抗孵育:取出切片,甩干PBS,在每张切片上滴加相应的二抗(见各图标注)0.1ml以覆盖组织。在室温下孵育20分钟后,甩干二抗,将切片浸泡在PBS中各3分钟3次。

[0067] 6) 显色:取出切片,甩干PBS,在每张切片上滴加DAB,0.1ml以覆盖切片上的组织,在室温下孵育5分钟。甩干DAB,将切片浸泡在纯化水中1分钟。

[0068] 7) 衬染:取出上述切片,甩干水,在每张切片上滴加0.1ml苏木素以覆盖切片上的组织,在室温下孵育3分钟,甩干苏木素,将切片放置在切片架上在自来水下冲洗3分钟。

[0069] 8) 脱水:取出上述切片,分别在如下液体中浸泡3分钟:95%的酒精,100%的酒精,100%的酒精,二甲苯。

[0070] 9) 封片:取出上述切片,在抽风柜中吹干,在每张切片上滴加一滴(约0.02ml)香味封片剂,盖上该玻片,放置的抽风柜内吹干(约5分钟)。

[0071] 10) 阅片:在显微镜下观察染色效果。

[0072] 应用实例一

[0073] 应用实例一显示,在同样操作步骤下,使用本发明生产的球状多聚体酶标联二抗试剂(实施例一,第11)步所得的试剂,1:1000稀释)进行免疫组化法检测人乳腺癌组织E-粘合(E-Cadherin)蛋白的染色强度(图5)明显强于使用链状多聚体酶二抗试剂进行免疫组化法检测同一个组织中E-粘合(E-Cadherin)蛋白的染色强度(图6)。本发明生产的多聚体酶标联二抗试剂有更高的灵敏度。

[0074] 应用实例二

[0075] 应用实例二显示,在同样操作步骤下,使用本发明生产的球状多聚体酶二抗试剂(实施例二,第11)步所得的试剂,1:1000稀释)进行免疫组化法检测人扁桃体组织中Ki67抗原蛋白(Ki67)的染色强度(图7)明显强于使用链状多聚体酶标联二抗试剂进行免疫组化法检测同一个扁桃体组织中Ki67抗原蛋白(Ki67)的染色强度(图8)。本发明生产的多聚体酶标联二抗试剂对检测细胞核 抗原有更高的灵敏度。

[0076] 应用实例三

[0077] 应用实例三显示,在同样操作步骤下,本发明生产的球状多聚体酶标联二抗试剂(实施例一,第11)步所得的试剂,1:1000稀释)经过放置在37℃温度下八星期之后,使用该试剂进行免疫组化法检测人皮肤组织中广谱角蛋白,仍然能够有效地染出皮肤组织中广谱角蛋白(Cytokeratin-Pan)(图9),而链状多聚体酶标联二抗试剂经过放置在37℃下八个星期之后明显减弱了检测同一个皮肤组织中广谱角蛋白的能力(图10)。本发明生产的多聚体酶标联二抗试剂有更好的热稳定性。

[0078] 尽管本发明涵盖了各种修改和替代性方法和装置,然而本发明的实施方式在附图

中显示并且将在下文详细描述。然而,应当理解具体的描述和附图不意在将本发明限于所公开的具体形式。相反,要求保护的本发明的范围意图包括落入如所附权利要求中所表述的本发明精神和范围的其全部修改和替代性构造至它们等同物的全部范围。在附图中,相同的指示符用于相同或相似的特征。参考文献

[0079] 1.Hsu SM,Raine L,and Fanger H.Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques:a comparison between ABC and unlabeled antibody (PaP) procedures.J Histochem Cytochem 1981;29:577-80.

[0080] 2.Mason te,Phifer,RF,Spicer SS.an immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens.J Histochem Cytochem 1969;17:563-9.

[0081] 3.Kawarai Y,Nakane PK.Localization of tissue antigens on the ultrathin sections with peroxidase-labeled antibody method.J Histochem Cytochem 1970; 18:161-6.

[0082] 4.Merz H,Malisis R,Mann-Weiler S,Zhchow R,Hartmann W,orscheschek K,Moubayed P,Feller aC.Methods in laboratory investigation immunoMax.a maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens.Lab Invest 1995;73:149-56.

[0083] 5.Heras a,Roach CM,Key Me.Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry.Lab Invest 1995;72:165 (abstract).

[0084] 6.Shi,Shan-Rong;Guo,James;Cote,Richard J.Sensitivity and Detection Efficiency of a Novel Two-Step Detection System (PowerVision) for Immunohistochemistry.Applied Immunohistochemistry&Molecular Morphology.7 (3) : 201,September 1999.

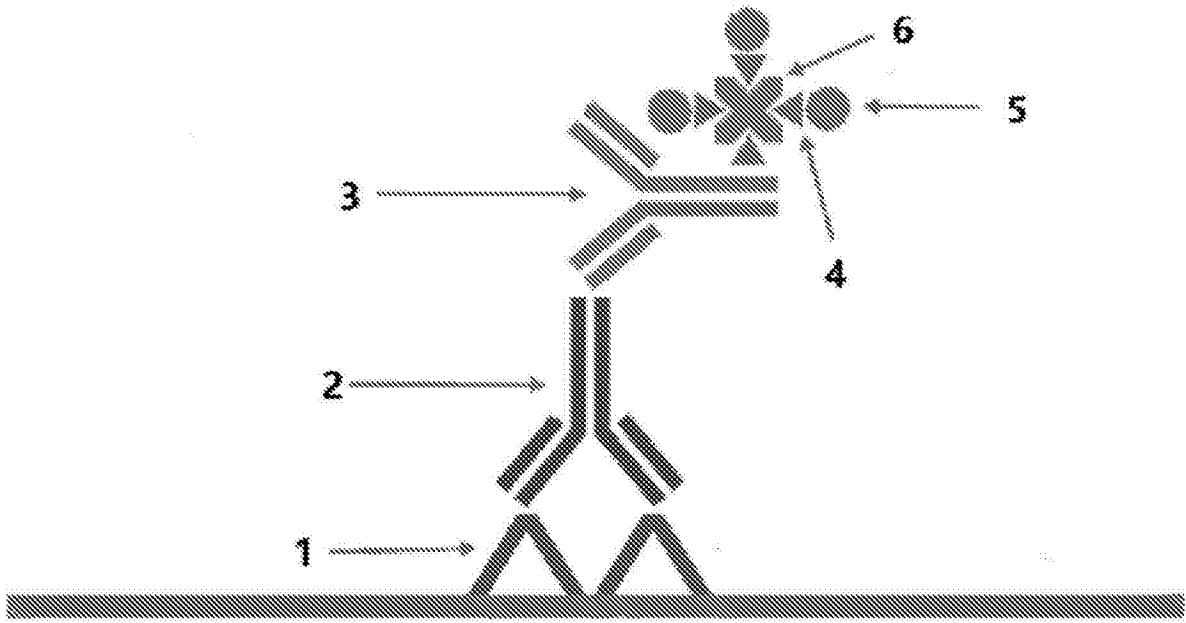


图1

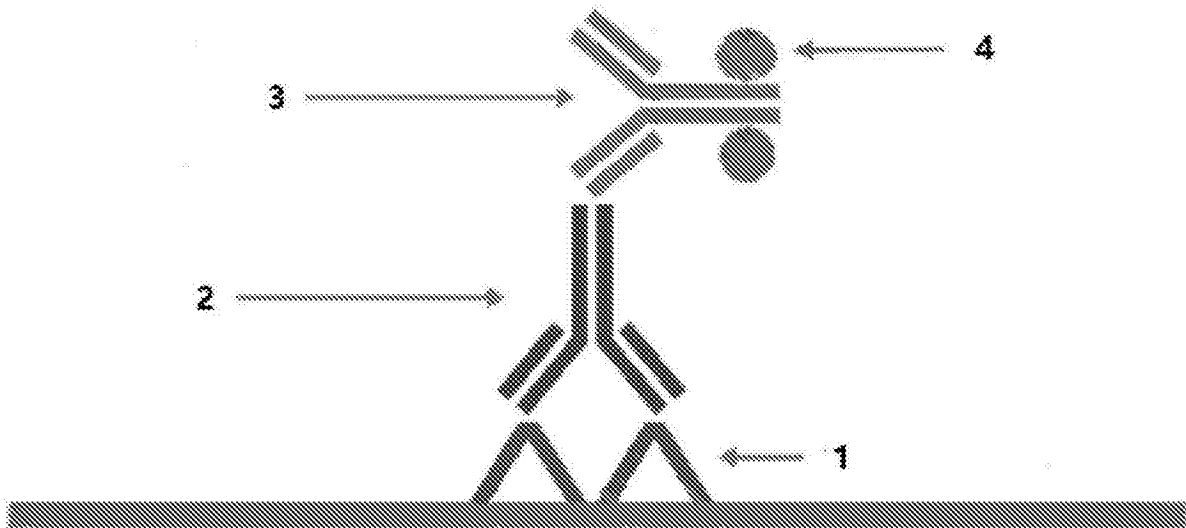


图2

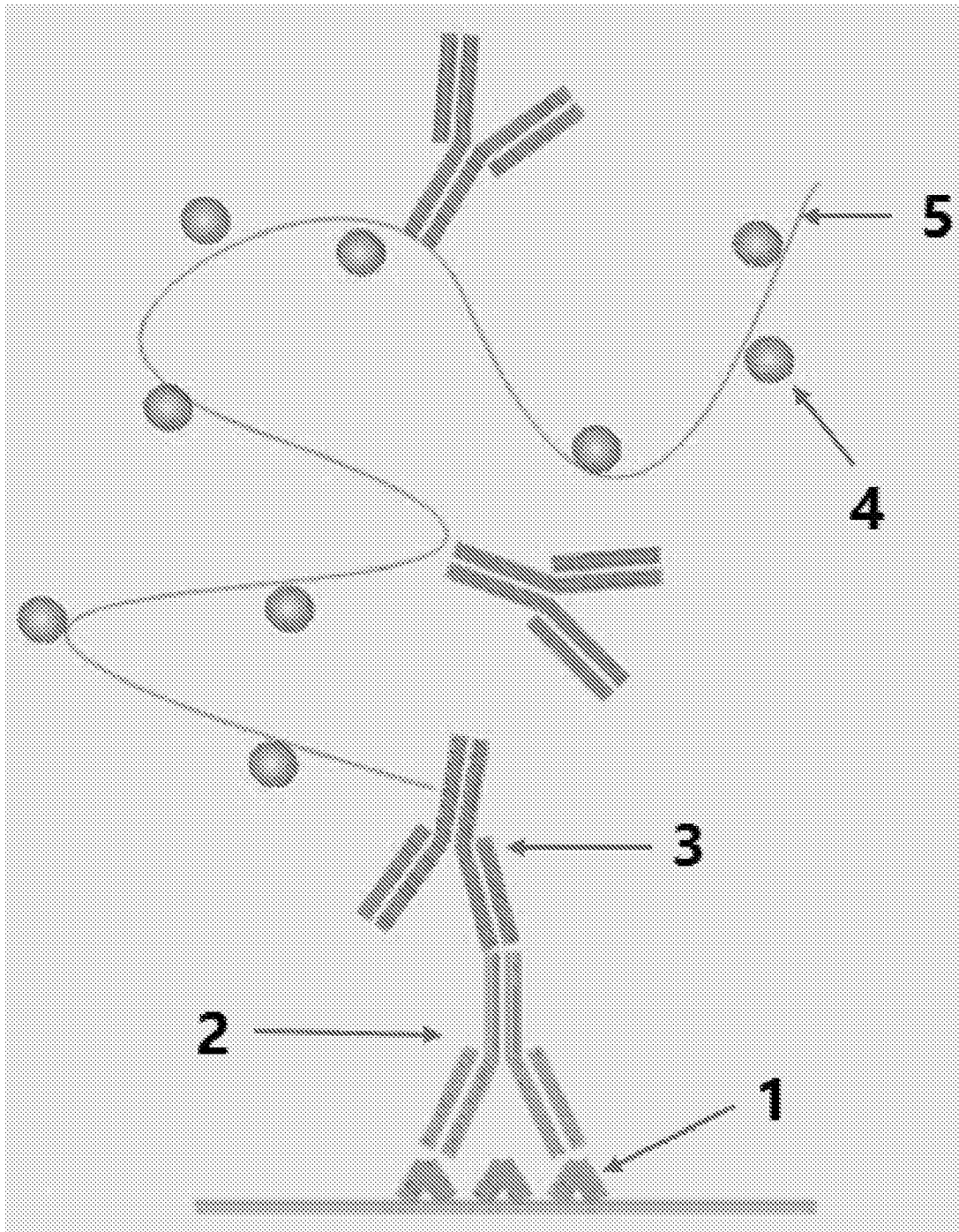


图3

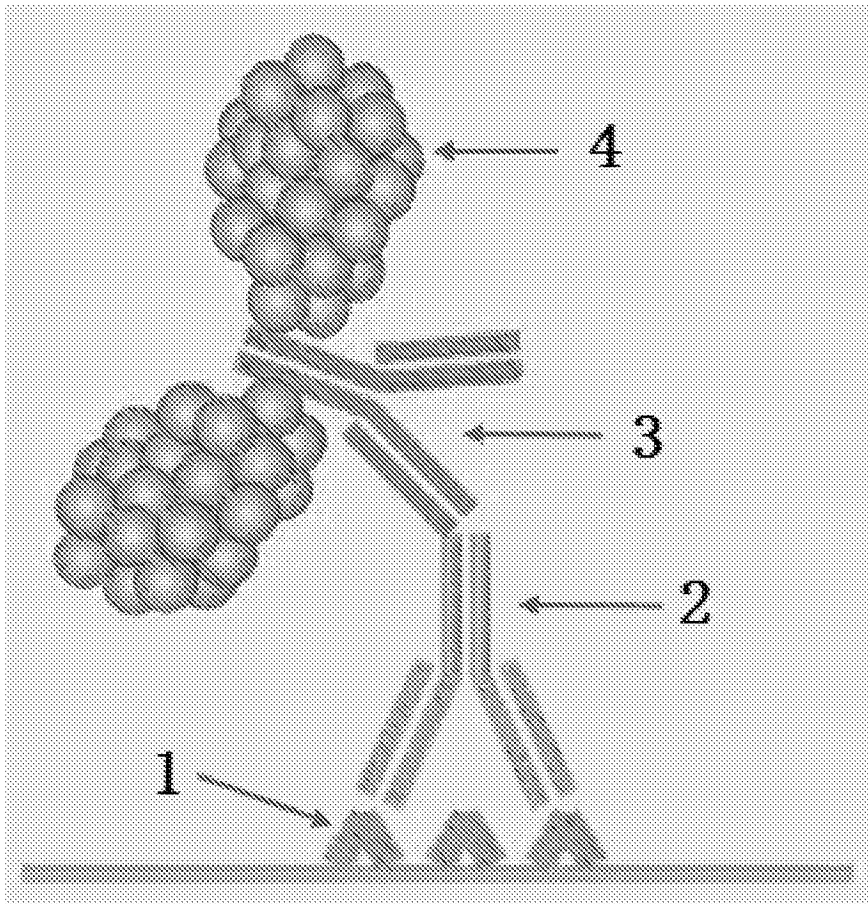


图4

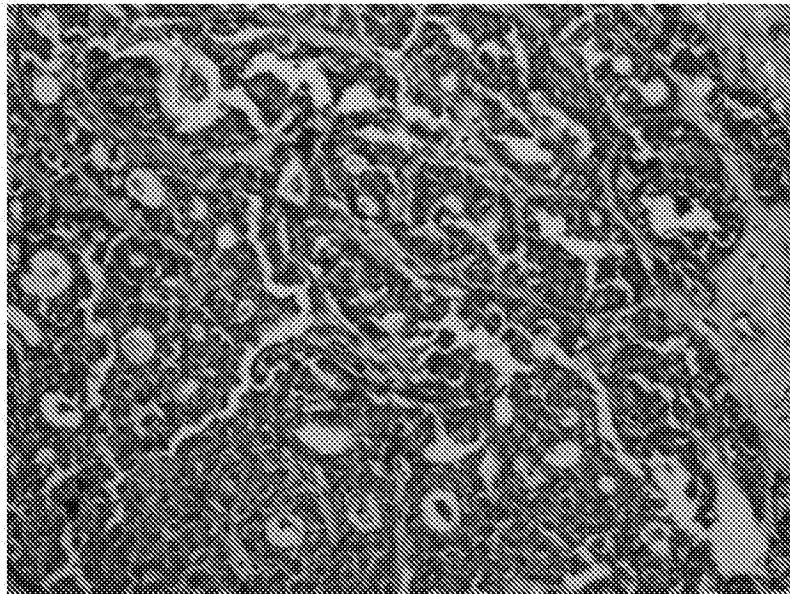


图5

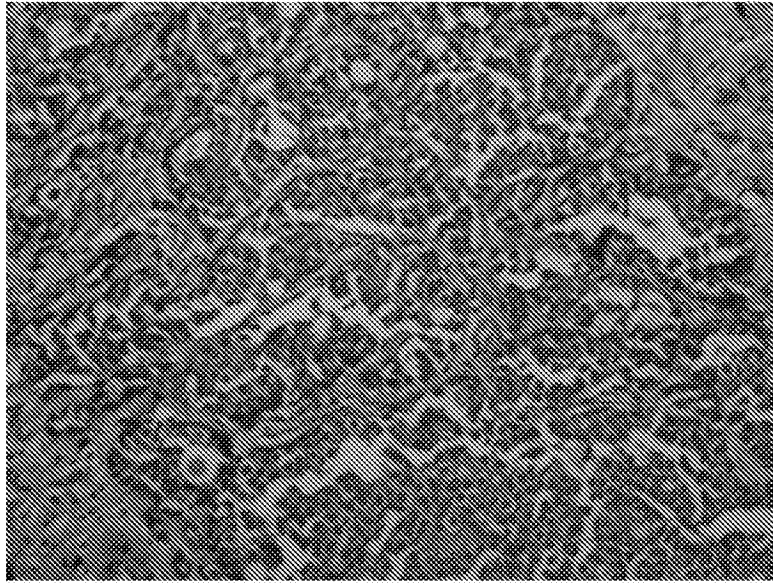


图6

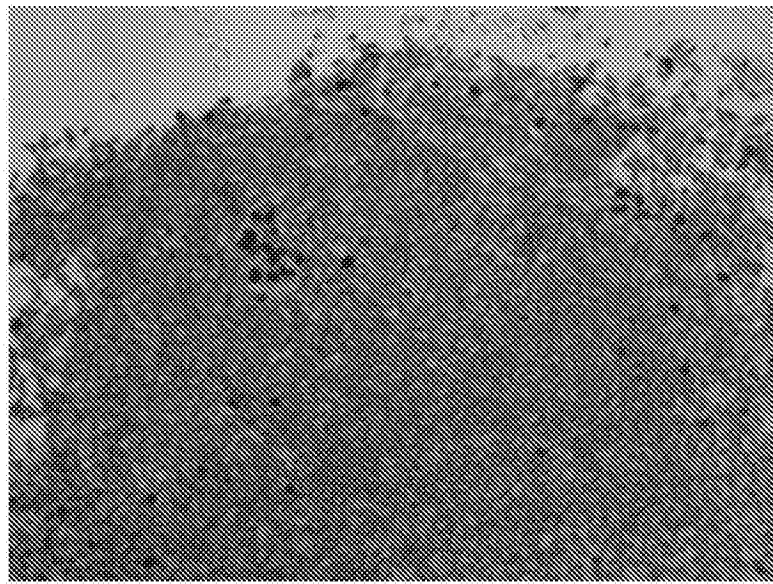


图7

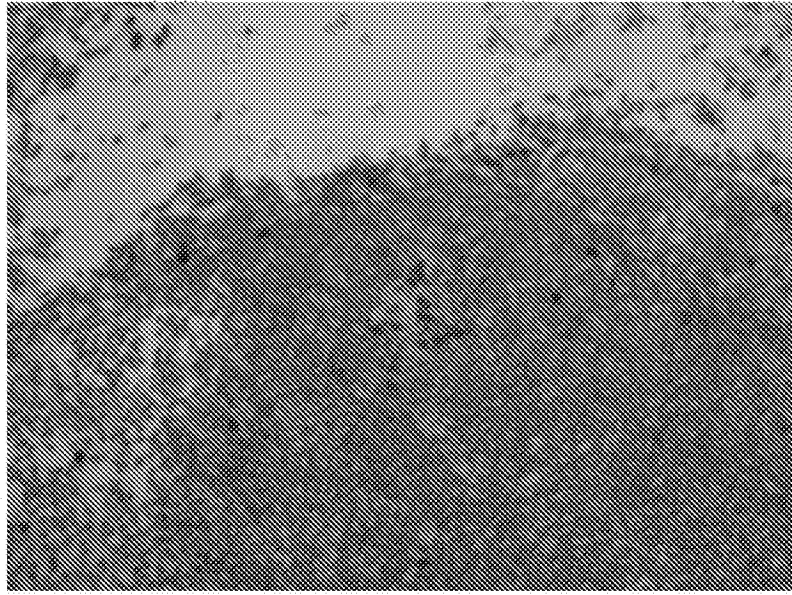


图8

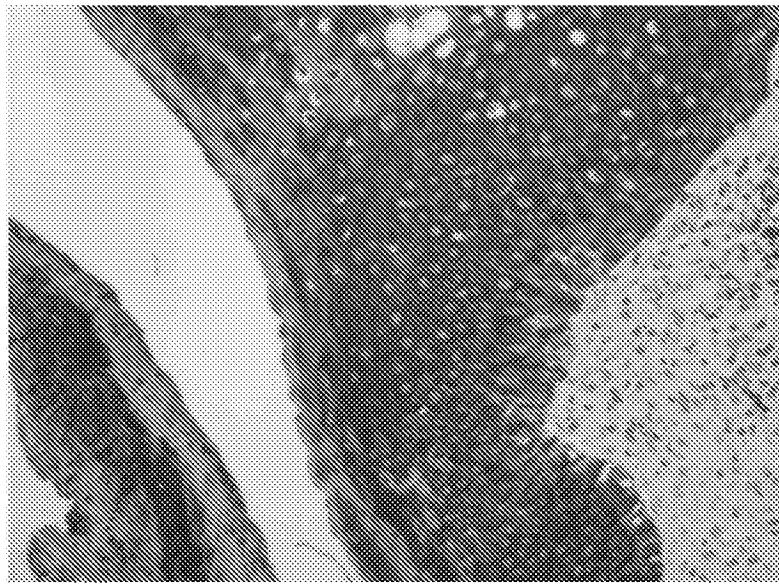


图9

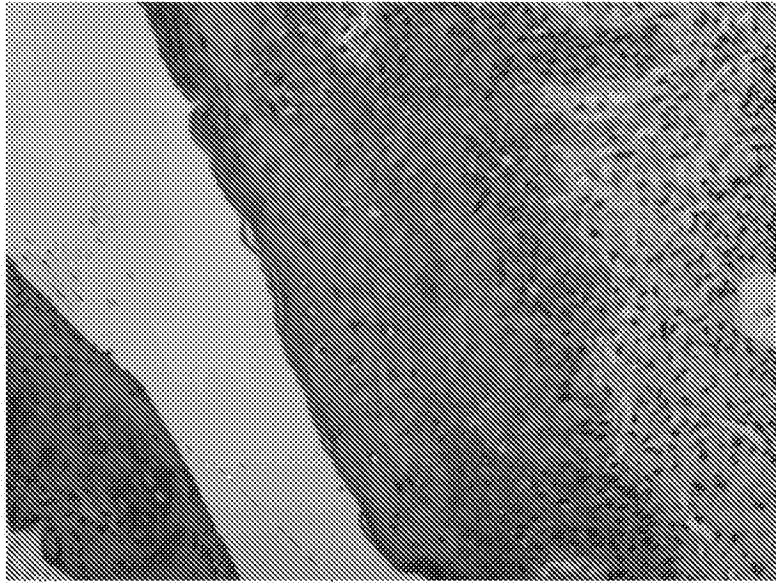


图10

专利名称(译)	一种多聚体酶-抗体及其制备方法		
公开(公告)号	CN105566499B	公开(公告)日	2017-06-16
申请号	CN201610013923.X	申请日	2016-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	广州深达生物制品技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州深达生物制品技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州深达生物制品技术有限公司		
[标]发明人	郭金灿		
发明人	郭金灿		
IPC分类号	C07K19/00 C07K1/13 C07K1/16 C12N11/08 G01N33/535 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	C07K1/13 C07K1/16 C07K16/4241 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2319/61 C12N9/0065 C12N9/16 C12N9/80 C12N11/08 C12Y301/03001 C12Y305/01005 G01N33/535 G01N33/574 G01N33/6854		
审查员(译)	唐慧		
其他公开文献	CN105566499A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于医学检测技术领域，特别是涉及一种多聚体酶标联抗体及其制备方法，采用DVS活化的酶，与PAMAM Dendrimer系列具有多分枝有机分子载体聚合后获得多聚体酶；多聚体酶用DVS再度活化，然后与抗体混合孵育，得到球状多聚体酶标联二抗抗体。该方法克服目前使用链状高分子(比如以葡聚糖或多肽)为载体的多聚体酶标联方法的主要缺陷，极大地缩小了多聚体酶的体积，提高抗体上酶标的密度，使单位体积内标联到二抗上的酶的数目大幅度增加。这一方法生产的多聚体酶标联二抗与现有的酶标二抗相比有更高的灵敏度和稳定性。

