



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101178402 B

(45) 授权公告日 2011.08.24

(21) 申请号 200710168647.5

(22) 申请日 2007.12.06

(73) 专利权人 武汉赛欣生物技术有限公司

地址 430070 湖北省武汉市东湖高新技术开
发区东信路数码港

(72) 发明人 宋晓华 张薇 范力仁

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102

代理人 唐万荣

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5922558 A, 1999.07.13, 全文.

CN 1904042 A, 2007.01.31, 全文.

CN 1595157 A, 2005.03.16, 全文.

EP 0982590 A1, 2000.03.01, 全文.

张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和
技术. 《生化实验方法和技术》. 高等教育出版
社, 1997, 367.

陈建华等. 抗体夹心酶联免疫吸附法测定
重组 E. coli L- 门冬酰胺酶研究. 《药物生物技
术》. 2004, 第 11 卷 (第 5 期), 286-289.

Nuchat A Motlekar and Sunil S Bhagwat.
Activity of horseradish peroxidase
in aqueous and reverse micelles and
back-extraction from reverse-micellar
phases. 《Journal of Chemical Technology
and Biotechnology》. Society of Chemical
Industry, 2001, 第 76 卷 643-649.

郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效
的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. 《上海
免疫学杂志》. 1983, 第 3 卷 (第 2 期), 97-100.

审查员 张小勇

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

聚合酶标记抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明属于酶免疫技术领域, 具体涉及一种
聚合酶标记抗体的制备方法。聚合酶标记抗体
的制备方法, 其特征在于它包括如下步骤: 在非
离子表面活性剂存在下, 使可溶性辣根过氧化物
酶 (HRP) 胶束化, 以 NaIO_4 先将 HRP 表面的糖分
子氧化成醛基, 然后利用 HRP 上的氨基与醛基发
生缩合反应生成聚合酶 (Poly-HRP), 再利用聚
合酶上过量的醛基与 IgG 上的氨基相结合, 生成
可溶性的 Poly-HRP-IgG, 用 NaBH_4 将所生成的
不饱和键还原后, 生成稳定的聚合酶标记抗体
(Poly-HRP-IgG)。该方法制备过程简单, 制备的聚
合酶标记抗体在应用时具有较快的显色速度, 较
高的灵敏度和更好的贮存稳定性。

1. 聚合酶标记抗体的制备方法,其特征在于它包括如下步骤:

1) 氧化反应:取 8mg 辣根过氧化物酶,加 8mmol NaIO_4 ,反应 20 分钟,得到含醛基的 HRP;

2) 聚合形成多聚酶:步骤 1) 得到的含醛基的 HRP 中加入 2ml 质量浓度为 3% 的非离子表面活性剂,再用 1M Na_2CO_3 - NaHCO_3 溶液调 pH 至 8.8-9.2,然后 4℃ 旋转反应过夜得多聚酶;

所述的非离子表面活性剂为 TritonX-100;

3) 纯化:步骤 2) 得到的多聚酶用 10mM 磷酸盐生理缓冲液透析换液 3 次,得透析物;

4) 连接 IgG:取出步骤 3) 得到的透析物,加入 IgG 0.27mg;

5) 用 10 μl 浓度为 1M 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液调 pH 至 8.3-8.7,旋转反应 4 小时;

6) 还原稳定化:加入 120 μl 浓度为 5mg/ml NaBH_4 ,摇匀,室温静置还原 90 分钟;

7) 纯化:10mM 磷酸盐生理缓冲液透析,换液 3 次,取出透析物,得聚合酶标记抗体。

聚合酶标记抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于酶免疫技术领域,具体涉及一种聚合酶标记抗体 (Poly-HRP-IgG) 的制备方法。

技术背景

[0002] 酶标记物包括酶标记抗原、酶标记抗体和酶标记 SPA 等。酶标记物质量的好坏直接关系到免疫酶技术的成功与否,因此被称为关键的试剂。酶标记物中最常用的是酶标记抗体,它是将酶与特异性抗体经适当方法连接而成。酶标记抗体的质量主要取决于纯度好、活性强及亲和力高的酶和抗体,其次要有良好的制备方法。目前,高质量的酶(如辣根过氧化物酶,简称 HRP) 国内已有商品供应。高质量的抗体则可通过提取纯化而获得。Dako 公司在美国申请了一项发明专利 (US005543332A 1996),主要内容和关键技术是利用水溶性高分子—右旋糖苷作聚合载体分子,将多个联乙烯砒单体(在单体末端为游离且具有反应活性的乙烯基)以共价键连接其上,自由的乙烯基可以结合有功能基团的抗原、半抗原、抗体、核苷酸等被标记物质;中国专利申请号 03150895.2,公开了一种新型的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶交联技术,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抗原、半抗原、抗体、核苷酸等被标记物质,生成的 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。但无论是 Dako 的专利 (US005543332A 1996) 还是中国专利申请号 03150895.2,其主要问题来自于试剂制备过程中需要用到聚合物载体分子——右旋糖苷和具有毒性和危险性的乙烯砒,且制备过程步骤多,复杂。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种聚合酶标记抗体 (Poly-HRP-IgG) 的制备方法,该方法制备过程简单,制备的聚合酶标记抗体在应用时具有较快的显色速度,较高的显色灵敏度和更好的贮存稳定性。

[0004] 为了实现上述目的,本发明的技术方案是:在非离子表面活性剂存在下,使可溶性 HRP 胶束化,以 NaIO_4 先将 HRP 表面的糖分子氧化成醛基,然后利用 HRP 上的氨基与醛基发生缩合反应生成聚合酶 (Poly-HRP),再利用 Poly-HRP 上过量的醛基与 IgG 上的氨基相结合,生成可溶性的 Poly-HRP-IgG,用 NaBH_4 将所生成的不饱和键还原后,生成稳定的聚合酶标记抗体。

[0005] 聚合酶标记抗体的制备方法,其特征在于它包括如下步骤:

[0006] 1) 氧化反应:取 8mg 辣根过氧化物酶,加 8mmol NaIO_4 ,反应 20 分钟,得到含醛基的 HRP;

[0007] 2) 聚合形成多聚酶:步骤 1) 得到的含醛基的 HRP 中加入 2ml 质量浓度为 3% 的非离子表面活性剂,再用 1M Na_2CO_3 - NaHCO_3 溶液调 pH 至 8.8-9.2,然后 4℃ 旋转反应过夜,第二天室温反应 1 小时,得多聚酶;

[0008] 3) 纯化:步骤 2) 得到的多聚酶用 10mM 磷酸盐生理缓冲液 (PBS) 透析换液 3 次, 得透析物;

[0009] 4) 连接 IgG:取出步骤 3) 得到的透析物, 加入 IgG 0.27mg;

[0010] 5) 用 10ul 浓度为 1M 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液调 PH 至 8.3-8.7, 旋转反应 4 小时;

[0011] 6) 还原稳定化:加入 120ul 浓度为 5mg/ml NaHB_4 , 摇匀, 室温静置还原 90 分钟;

[0012] 7) 纯化:10mM 磷酸盐生理缓冲液 (PBS) 透析, 换液 3 次, 取出透析物, 得聚合酶标记抗体 Poly-HRP-IgG。

[0013] 本发明所用的 HRP (Horseradish Peroxidase, HRP, 辣根过氧化物酶) 广泛分布于植物界, 是能呈现有色化学反应的酶, 具有来源广泛, 易于纯化, 比活性高, 性质稳定, 酶活性和量能用简单方法测定的特点。HRP 由无色的酶蛋白和棕色的铁卟啉结合而成的糖蛋白, 糖含量 18%。HRP 由多个同功酶组成, 分子量为 40,000, 等电点为 pH3 ~ 9, 酶催化的最适 pH 因供氢体不同而稍有差异, 多在 pH5 左右。HRP 的辅基和酶蛋白最大吸收光谱分别为 403nm 和 275nm, 一般以 OD403nm/OD275nm 的比值 RZ (德文 Reinheit Zahl) 表示酶的纯度。高纯度的酶 RZ 值应在 3.0 左右 (最高可达 3.4)。RZ 值越小, 非酶蛋白就越多。HRP 的催化反应需要底物过氧化氢 (H_2O_2) 和供氢体 (DH_2)。供氢体多为无色的还原型染料, 通过反应可生成有色的氧化型染料 (D)。本发明所用供氢体是 DAB (3,3'-二氨基联苯胺), 形成的产物为深桔黄色或棕色, 可溶性好, 在避光处颜色稳定, 空白可近于无色。

[0014] 本发明所用的非离子表面活性剂, 能吸附在 HRP 周围, 使 HRP 胶束化, 具有显著调节聚合酶 Poly-HRP 聚合度的作用。所述非离子表面活性剂包括聚乙二醇类非离子表面活性剂、多元醇类非离子表面活性剂。聚乙二醇类非离子表面活性剂, 如烷基聚氧乙烯醚、烷基酚聚氧乙烯醚等; 多元醇类非离子表面活性剂, 如 Span 类、Tween 类等。

[0015] 本发明的有益效果:

[0016] 1、在非离子表面活性剂存在时, 胶束化的 HRP 在氧化剂过碘酸钠作用下自交联生成多聚酶 (Poly-HRP), 使制备过程得以简化。

[0017] 2、本发明的关键技术基于非离子表面活性剂存在时, 胶束化的辣根过氧化物酶 (HRP) 在氧化剂过碘酸钠作用下自交联生成多聚酶 (Poly-HRP), 然后将此多聚酶在不进行氧化还原反应的条件下与 IgG 结合成 Poly-HRP-IgG; 通过调节非离子表面活性剂的用量, 控制反应时的 pH 值和反应时间, 来调节 Poly-HRP 聚合度的大小, 从而使后续生成的聚合酶标记抗体 (Poly-HRP-IgG) 在应用时具有较快的显色速度, 较高的显色灵敏度和更好的贮存稳定性。所获聚合酶标记抗体的产率高, 酶与 Ig 的活性无重大损失, 免疫分析时显色灵敏度高, 速度快。

[0018] 3、用非放射性标记法替代同位素标记, 可以避免放射性对人的伤害; 避免使用有毒或对人具有危害性的试剂。

附图说明

[0019] 图 1 是本发明实施例 1 的 Poly-HRP-IgG 应用于免疫组织化学实验的阳性结果图。

[0020] 图 2 是本发明实施例 1 的 Poly-HRP-IgG 应用于免疫组织化学实验的阴性对照图。

具体实施方式

[0021] 为了更好地理解本发明,下面结合实施例进一步阐明本发明的内容,但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0022] 实施例 1:

[0023] 聚合酶标记抗体的制备方法,它包括如下步骤:

[0024] 1) 氧化反应:取 8mg 辣根过氧化物酶 (HRP),加 8mmol NaIO₄,反应 20 分钟;NaIO₄(氧化剂)的加入起氧化作用,得到含醛基的 HRP;

[0025] 2) 聚合形成多聚酶 (Poly-HRP):步骤 1) 得到的含醛基的 HRP 中加入 2ml 质量浓度为 3% 的非离子表面活性剂 TritonX-100,再用 1M Na₂CO₃-NaHCO₃ 溶液调 pH 至 8.8-9.2 (最佳为 9.0),然后 4℃ 旋转反应过夜,第二天室温反应 1 小时,得多聚酶 (Poly-HRP);非离子表面活性剂加入形成胶束化包覆;

[0026] 3) 纯化:步骤 2) 得到的多聚酶 10mM 磷酸盐生理缓冲液 (PBS) 透析换液 3 次,得透析物;

[0027] 4) 连接 IgG:取出步骤 3) 得到的透析物 (透析物中含 HRP 2mg),加入 IgG 0.27mg;

[0028] 5) 用 10ul (微升) 浓度为 1M 的 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲溶液调 PH 至 8.3-8.7 (最佳为 8.5),旋转反应 4 小时;

[0029] 6) 还原稳定化:加入 120ul (微升) 浓度为 5mg/ml NaHB₄ (还原剂,用 2mM NaOH 配制),摇匀,室温静置还原 90 分钟;

[0030] 7) 纯化:10mM PBS 透析换液 3 次;取出透析物,得聚合酶标记抗体 (Poly-HRP-IgG)。

[0031] 酶活性的检验:

[0032] 按实施例 1 的步骤 1) 和 2) 得到的聚合酶 Poly-HRP,具有高的催化活性。其催化活性的检验方法和效果如下:

[0033] 1、方法:HRP 溶解成 1mg/ml 的原液,临用前取 0.1ml 稀释到 250ml;底物 I 为 H₂O₂,取质量浓度 30% H₂O₂ 1ml (1 毫升) 用蒸馏水稀释到 100ml,使用前取 1ml 用 pH6.0 的 0.01MPB (磷酸盐缓冲液) 稀释到 100ml;底物 II 为 1% 邻联茴香胺甲醇溶液。底物 II 0.05ml 和底物 I 6.0ml 混匀后,取 2.9ml 加入反应用比色皿,其余加入对照比色皿。在反应皿中加入酶稀释液 0.1ml,即记录为零时,迅速混匀,以对照皿为空白,每隔 15 秒记录反应皿的 A_{460nm} 共 1-2 分钟。HRP 活性 (U/mg) = $\Delta A_{460nm} / \text{分} \div (11.3 \times \text{HRP mg 数} / \text{每 ml 反应物})$ 。

[0034] 2、结果:按实施例 1 的步骤 1) 和 2) 得到的聚合酶 Poly-HRP 酶活性为未交联前的 80% 左右,符合进入下一步交联 IgG 的要求。

[0035] Poly-HRP-IgG 应用于免疫组织化学实验结果:

[0036] 目前最普遍地免疫组织化学方法是三步法,而利用本发明所涉及的 Poly-HRP-IgG,可以将三步法缩减为两步法,简化了操作步骤,试验证明,根据实施例 1 得到的 Poly-HRP-IgG 可以用于免疫组织化学两步法实验,实验结果见图 1 (阳性结果),图中抗原阳性胞核胞浆着色 (深棕色) 明显,图 2 (阴性对照),细胞核、组织间质和胞浆等无非特异着色 (深棕色),两图中蓝色部分为阴性细胞核苏木素复染后的呈色。

[0037] 本发明所列举的非离子表面活性剂,都能实现本发明;调 pH 值的上限、下限都能实现本发明,在此不一一列举实施例。

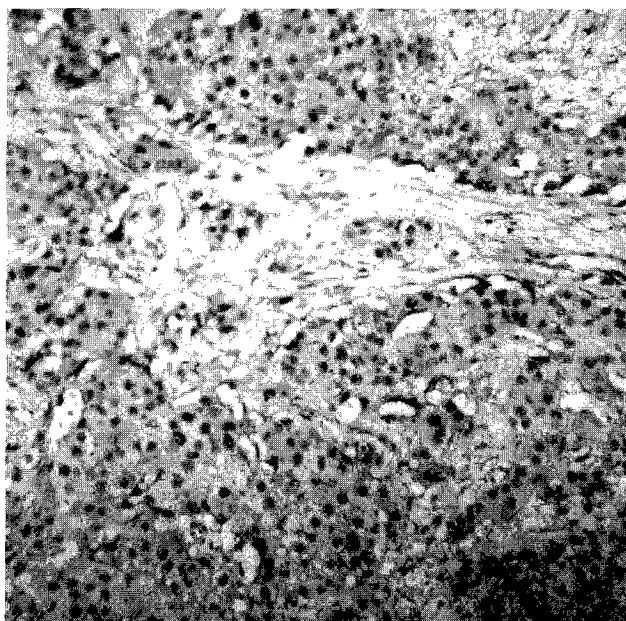


图 1

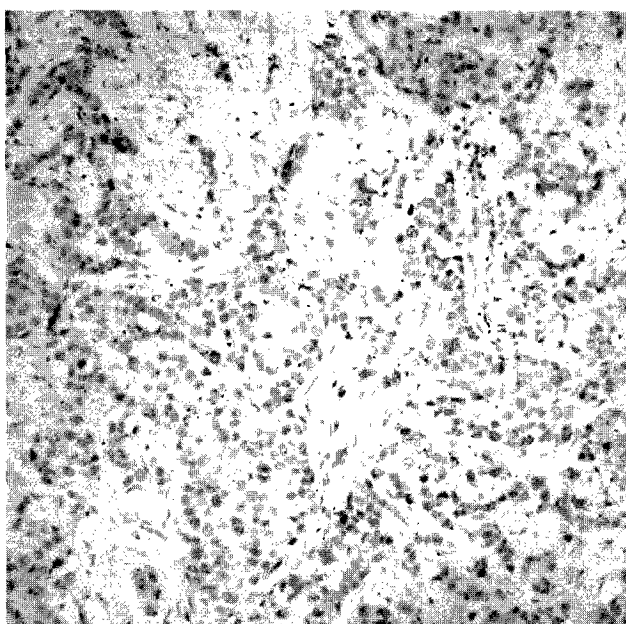


图 2

专利名称(译)	聚合酶标记抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN101178402B	公开(公告)日	2011-08-24
申请号	CN200710168647.5	申请日	2007-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	武汉赛欣生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉赛欣生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉赛欣生物技术有限公司		
[标]发明人	宋晓华 张薇 范力仁		
发明人	宋晓华 张薇 范力仁		
IPC分类号	G01N33/535		
审查员(译)	张小勇		
其他公开文献	CN101178402A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于酶免疫技术领域，具体涉及一种聚合酶标记抗体的制备方法。聚合酶标记抗体的制备方法，其特征在于它包括如下步骤：在非离子表面活性剂存在下，使可溶性辣根过氧化物酶(HRP)胶束化，以NaIO₄先将HRP表面的糖分子氧化成醛基，然后利用HRP上的氨基与醛基发生缩合反应生成聚合酶(Poly-HRP)，再利用聚合酶上过量的醛基与IgG上的氨基相结合，生成可溶性的Poly-HRP-IgG，用NaBH₄将所生成的不饱和键还原后，生成稳定的聚合酶标记抗体(Poly-HRP-IgG)。该方法制备过程简单，制备的聚合酶标记抗体在应用时具有较快的显色速度，较高的灵敏度和更好的贮存稳定性。

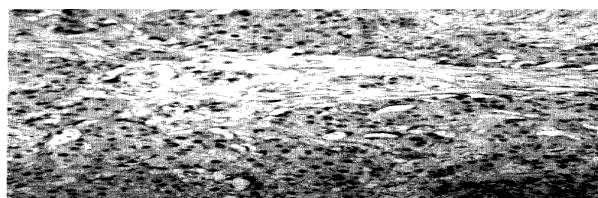


图 1

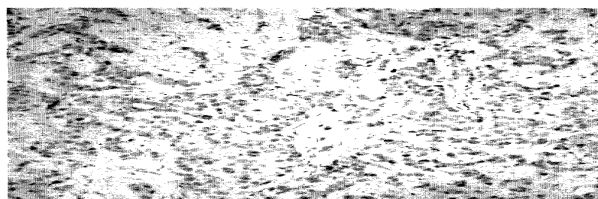


图 2