



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580044664.7

[43] 公开日 2007年12月12日

[11] 公开号 CN 101088009A

[22] 申请日 2005.12.26
 [21] 申请号 200580044664.7
 [30] 优先权
 [32] 2004.12.28 [33] JP [31] 378906/2004
 [86] 国际申请 PCT/JP2005/023763 2005.12.26
 [87] 国际公布 WO2006/070732 日 2006.7.6
 [85] 进入国家阶段日期 2007.6.25
 [71] 申请人 株式会社先端生命科学研究所
 地址 日本埼玉县
 [72] 发明人 青柳克己

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
 代理人 韦东

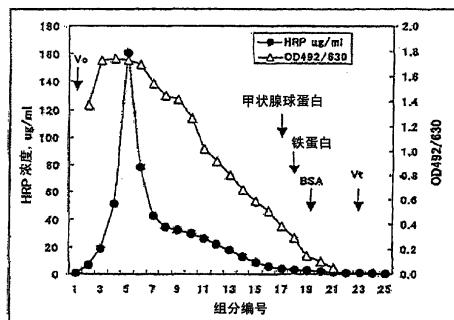
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 5 页

[54] 发明名称

嵌段酶 - 探针复合物

[57] 摘要

问题：提供可用于以高灵敏度检测活体中以极少量存在的抗原、蛋白质等的嵌段酶标记物复合物。解决问题的方法：提供了包含嵌段的嵌段酶探针复合物，所述嵌段由两个或多个分子量为 20,000 - 4,000,000 的分子的载体和酶的组合组成，它们通过酶或接头结合，其中探针分子与酶结合。



1. 一种嵌段酶-探针复合物，其中探针分子与其中两个或多个分子量为20,000-4,000,000 的作为载体的分子通过结合于所述载体的酶连接起来的复合物偶联。
2. 如权利要求 1 所述的嵌段酶-探针复合物，其特征在于，所述载体和酶分子通过所述载体上的官能团和氧化所述酶分子中的糖链形成的醛基结合。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的嵌段酶-探针复合物，其特征在于，所述载体是选自下组的一种或多种载体：葡聚糖、氨基葡聚糖、聚蔗糖、糊精、琼脂糖、支链淀粉、各种纤维素、壳多糖、壳聚糖、 β -半乳糖苷酶、甲状腺球蛋白、血蓝蛋白、聚赖氨酸、多肽和 DNA。
4. 如权利要求 1 或 2 所述的嵌段酶-探针复合物，其特征在于，所述酶是选自下组的一种或多种酶：辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖氧化酶和萤光素酶。
5. 如权利要求 1 或 2 所述的嵌段酶-探针复合物，其特征在于，所述探针是选自下组的一种或多种探针：抗体分子或其功能片段、蛋白 A、蛋白 G、蛋白 L、凝集素、受体和抗生物素蛋白。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的嵌段酶-探针复合物，其特征在于，两种或多种探针相偶联。
7. 如权利要求 5 或 6 所述的嵌段酶-探针复合物，其特征在于，所述抗体分子或其功能片段是选自下组的一种或多种：抗-HCV 核心抗原抗体、抗胃泌素释放肽前体抗体和它们的功能片段。
8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的嵌段酶-探针复合物，其特征在于，所述嵌段酶-探针复合物的分子量为 440,000 或更高。
9. 一种包含权利要求 1-8 中任一项所述的嵌段酶-探针复合物的免疫检测试剂盒或核酸检测试剂。
10. 一种产生权利要求 1-8 中任一项所述的嵌段酶-探针复合物的方法，所述方法包括以下步骤：通过将分子量为 20,000-4,000,000 的载体与酶结合形成嵌段物；和将探针偶联于所述嵌段物。
11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，通过以载体:酶=1:0.1-1:20 的重量

比使所述载体与所述酶分子反应形成所述嵌段物。

嵌段酶-探针复合物

技术领域

本发明涉及用酶标记探针的技术。如此产生的嵌段酶-探针复合物广泛用于采用免疫反应的免疫检测，如酶免疫检测、免疫组化等。

背景技术

在免疫学检测或测定方法中通常已广泛使用用酶标记探针的酶标探针。例如，用辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP)、 β -半乳糖苷酶、葡糖氧化酶等标记的探针可用于免疫组化和酶免疫测定的检测步骤。

免疫组化和酶免疫测定已经长期广泛用作在活体中检测自身抗原或外来抗原的方法。由于这些采用免疫反应的检测方法具有高特异性和灵敏度，可无需分离而检测体内的少量物质。然而，许多物质存在于体内的量非常少，以致于普通的免疫组化和酶免疫测定不能检测，已进行了一些研究以发现提高检测方法灵敏度的方法以检测这些物质。

例如，健康人血清中肿瘤标记物如癌胚抗原(CEA)和甲胎蛋白的浓度为 5-20 ng/ml。然而，健康个体血清中人胃泌素释放肽前体(ProGRP)的浓度约为 14 pg/ml，需要高 1000 倍的灵敏度以检测 ProGRP。此外，对于外来抗原，例如丙肝病毒，在血液中的量很小，因此需要高灵敏度的抗原检测方法。为了检测该抗原，需要可检测 100-1000 个拷贝的病毒 RNA 和约 0.03-0.3 pg/ml 蛋白质浓度的灵敏度水平。

为提高免疫检测方法的灵敏度以检测以这样的微量存在于体内的抗原或物质，已经进行了多种努力。Ishikawa 等(非专利文献 1)详细描述了对提高酶免疫检测灵敏度的研究。影响酶免疫检测灵敏度的因素包括检测系统类型、标记的检测灵敏度、标记方法的类型、免疫反应时间以及抗原和抗体间的亲和力。此外，影响用夹心法测定抗原的灵敏度提高的条件包括：抗体与固相连接的条件；抗原反应效率；酶标抗体的反应效率；标记抗体与固相的非特异性吸附的降低；标记抗体的添加量；免疫反应时间；温度、pH、离子强度和免疫反应缓冲液的选择；立体化学构型和抗原决定基团的数量。

除了上述研究以外，为了提高酶免疫检测的灵敏度，人们努力在检测步骤中在酶和抗体的交联方面改进标记方法。已知制备标记抗体的各种方法，具体地说，Ishikawa 等报道的制备标记抗体的方法已经广泛应用于普通诊断试剂。在通常所述方法中，一至几个酶主要结合于抗体(在 IgG 的情况下，分子量约为 150,000，在 Fab' 的情况下，分子量约为 46,000)，例如其中三个辣根过氧化物酶(HRP)(分子量 40,000)分子与一个 IgG 分子结合在一起的复合物的总分子量为 $40,000 \times 3 + 150,000 = 270,000$ 。同时，其中三个碱性磷酸酶(ALP)分子(分子量 100,000)与一个 IgG 分子结合在一起的复合物的总分子量为 $100,000 \times 3 + 150,000 = 450,000$ 。然而，Ishikawa 等的描述显示，优选通过以 1 个分子:1 个分子的比例将抗体结合于酶，尤其是采用去除 Fc 部分后的 Fab' 部分，实现灵敏度最高的测定，并开发了一种将一个抗体分子共价连接于一个酶分子方法(非专利文件 2)。在酶与抗体 1:1 结合的抗体酶标记法的情况下，例如共价连接的一个 HRP 分子和 1 个 Fab' 分子的复合物的总分子量为 $40,000 + 46,000 = 86,000$ 。通常，主要采用总分子量为 200,000 或更小的酶标记复合物。

为了开发高灵敏度的免疫检测方法，以各种方式试验了通过增加步骤以增强信号。例如，采用生物素和抗生物素蛋白的高亲和力，主要将几个生物素分子引入第二抗体，生物素化的第二抗体与待分析物质反应后，去除过量的生物素化第二抗体。然后加入抗生物素蛋白-酶，形成生物素化第二抗体-抗生物素蛋白-酶复合物，并通过增加连接于第二抗体的酶分子数提高灵敏度。可以用抗生物素蛋白-生物素-酶复合物替代抗生物素蛋白-酶。同时，Butler 等描述了作为过氧化物酶-抗过氧化物酶抗体的抗体-酶复合物(非专利文献 3)。Bobrow 等将过氧化物酶标记的第二抗体与待分析物质进行反应，并在去除过量过氧化物酶标记的第二抗体后，加入生物素-酪胺(tyramide)，使自由基化的生物素-酪胺与过氧化物酶标记的第二抗体周围的封闭蛋白结合，并在洗涤后用过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白放大酶信号(非专利文献 4)。然而，这些方法都有缺点，如增加步骤数量和测定时间。

已经报道了一种使酶结合于某种载体，并然后使抗体结合于酶联载体以增加结合于抗体的酶分子数量的方法，并且按照这一方法，可以最少步骤提高灵敏度(专利文献 1)。在此方法中，将马来酰亚胺基或巯基(SH)引入具有氨基的载体中，并将一种酶酶连接于所述载体。将马来酰亚胺基引入抗体结合载体所留有的至少一个氨基上。由于在这种方法中抗体和酶通过载体连接，可以看出与将酶和抗体直接连接的方法相比，可连接数量更多的酶分子，并因此提高灵敏度。然而，所述发明人提到载体的分子量适合为 5,000-500,000，优选 10,000-300,000。在这种情况下，例如，将

辣根过氧化物酶用作所述酶时，分子量约为 40,000。即使载体的分子量为 500,000，能够与分子量为 500,000 的分子结合的分子量为 40,000 的分子数量在物理上和空间上受限是正常的，因此限制了能够结合于载体的酶分子的数量。即，当所述载体与一种酶和一种抗体结合时，载体上的官能团必须为酶和抗体所共享，酶分子数量减少且信号会被降低。当更多酶分子结合于所述载体时，用于抗体结合的空间会更小，并且与抗原的反应能力会降低。这意味着，尽管抗体和酶尽可能结合于同一载体可能会更好，根据大分子的制备过程，倾向于发生聚集和沉淀，引起导致灵敏度降低的更高的检测背景。

专利文献 1：日本专利申请特开号（KOKAI）2000-88850

非专利文献 1：超高灵敏度的酶免疫检测方法（Ultra High Sensitive Enzyme Immunoassay Method），Eiji Ishikawa, 1993, Japan Scientific Societies Press

非专利文献 2：Imagawa 等, *J. Appl. Biochem.* 第 4 卷；400, 1982

非专利文献 3：Butler(1981), *Methods Enzymol.*, 第 73 卷；482-523

非专利文献 4：Bobrow(1981), *J. Immunol. Methods*, 125, 279-285

发明内容

本发明解决的问题

本发明发明人试验性地按照上述专利申请所述制备方法制备了酶标探针，并将其应用于需要高灵敏度的 ProGRP 和 HCV 抗原检测系统。然而，在测定微量生物物质的检测系统中，即使采用所述灵敏度高于常规探针的酶标探针，也不一定能获得足够的灵敏度。因此，本发明解决的问题是提供一种高度灵敏的酶标探针，该探针可用于高度灵敏的检测系统。

解决问题的方法

本发明人进行研究以获得一种高度灵敏的酶标探针。结果是，本发明人产生了一种嵌段复合物，其中两个或多个作为载体的分子通过与所述载体结合的酶连接起来，并且通过使探针结合于此嵌段复合物成功实现了所述目标，即高度灵敏的嵌段酶-探针复合物。

即，本发明是：

(1)一种嵌段酶-探针复合物，其中探针分子是与作为载体的两个或多个分子量为 20,000-4,000,000 的分子通过酶连接起来的复合物相偶联。

(2)如(1)所述的嵌段酶-探针复合物,其中所述载体和所述酶分子通过该载体上的官能团和通过氧化该酶分子中的糖链形成的醛基结合。

(3)如(1)或(2)所述的嵌段酶-探针复合物,其中所述载体是选自下组的一种或多种载体:葡聚糖、氨基葡聚糖、聚蔗糖、糊精、琼脂糖、支链淀粉、各种纤维素、壳多糖、壳聚糖、 β -半乳糖苷酶、甲状腺球蛋白、血蓝蛋白、聚赖氨酸、多肽和DNA。

(4)如(1)或(2)所述的嵌段酶-探针复合物,其中所述酶是选自下组的一种或多种酶:辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖氧化酶和萤光素酶。

(5)如(1)或(2)所述的嵌段酶-探针复合物,其中所述探针是选自下组的一种或多种探针:抗体分子或其功能片段、蛋白A、蛋白G、蛋白L、凝集素、受体和抗生物素蛋白。

(6)如(1)-(5)中任一项所述的嵌段酶-探针复合物,其中两种或多种探针偶联。

(7)如(5)或(6)所述的嵌段酶-探针复合物,其中所述抗体分子或其功能片段是选自下组的一种或多种:抗-HCV核心抗原抗体、抗胃泌素释放肽前体抗体和它们的功能片段。

(8)如(1)-(7)中任一项所述的嵌段酶-探针复合物,其中所述嵌段酶-探针复合物的分子量为440,000或更高。

(9)包含(1)-(8)中任一项所述的嵌段酶-探针复合物的免疫检测试剂盒或核酸检测试剂。

(10)一种产生(1)-(8)中任一项所述的嵌段酶-探针复合物的方法,所述方法包括以下步骤:通过将分子量为20,000-4,000,000的载体与酶结合形成嵌段物;和将探针偶联于所述嵌段物。

(11)如(10)所述的方法,其中通过所述载体与所述酶分子以载体:酶=1:0.1-1:20的重量比反应形成所述嵌段物。

此外,按照本发明(1)所述分子量为20,000-4,000,000的作为载体的两个或多个分子的连接包括不由酶介导的连接。例如,可以由具有官能团的接头或蛋白介导。此外,本发明包括嵌段酶-探针复合物,其中载体、酶和探针分别通过具有官能团的接头分子结合。即,本发明是嵌段酶-探针复合物,其中载体通过酶或接头互相结合,酶和探针结合于该分子,因此该复合物的一个分子中含有许多酶分子或探针分子。

可使酶结合于载体形成嵌段物,并使探针分子结合于此嵌段物,从而产生本发明的嵌段酶-探针复合物。也可使酶和探针结合于载体形成偶联物、然后将该偶联物互相连接形成嵌段复合物,从而产生本发明的嵌段酶-探针复合物。

在本发明中，可通过酶连接载体分子增加分子量，从而使较多的酶分子或探针与所述嵌段物结合。另一方面，由于探针结合于嵌段物表面，嵌段酶-探针复合物中很难发生位阻现象，因此产生复合物时可以不考虑探针分子的大小。对于嵌段酶-探针复合物的最终产物，分子量为 440,000 或更高的嵌段酶-探针复合物具有高效能，而且分子量为 668,000 或更高的嵌段酶-探针复合物具有较高灵敏度。原则上，嵌段酶-探针复合物的分子量越大，一个复合物分子上结合的酶分子越多，则灵敏度越高。可按照本发明所述方法产生具有大分子量的嵌段酶-探针复合物，并可采用诸如凝胶过滤等方法选择具有较大分子量的嵌段酶-探针复合物。

虽然取决于所采用的载体、酶和探针，嵌段复合物形成后分子量可能略有不同，但任何分子量都可接受，只要嵌段酶-探针复合物不在液体中沉淀或沉积，就不应设定分子量上限。葡聚糖用作载体时(下述实施例 1 和 6)，就分子量而言，20,000,000 根本没有问题，并且分子量在 40,000,000-100,000,000 之间也没有问题。

虽然最初是在寻找可用于免疫检测和免疫组化领域的酶-探针复合物时实现了本发明，但并不限制将该复合物应用于其它领域。

本发明的有益效果

本发明的酶标抗体使得检测活体内痕量存在的抗原和蛋白质成为可能，用常规酶标抗体不能检测到这些抗原和蛋白质。采用这种酶标抗体，可以测定以前无法测定的抗原和蛋白质

附图简要说明

图 1 显示了用凝胶过滤对本发明的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物进行分子量分析的结果；

图 2 显示了采用酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物和常规的酶-抗体检测核心抗原时灵敏度的比较结果；

图 3 显示了一种单克隆抗体结合于载体-酶复合物时和两种单克隆抗体结合于载体-酶复合物时的反应活性；

图 4 显示了其中酶的氨基被封闭并然后结合于探针的复合物和其中酶的氨基未封闭并结合于探针的复合物的反应活性；以及

图 5 显示了采用酶-抗 ProGRP 抗原单克隆抗体复合物和常规方法的酶-抗体检测 ProGRP 时灵敏度的比较结果。

实施本发明的最佳方式

本发明中的所述载体不受特别限制，只要其分子量在 20,000-4,000,000 的范围内。然而，由于需要结合大量酶分子以提高灵敏度，优选某种水平的分子量。载体的例子包括多糖、高分子量蛋白质和肽聚合物，它们的合适分子量为 20,000-20,000,000，优选 20,000-4,000,000，更优选 70,000-2,000,000。此外，采用多糖或肽聚合物时，即使分子量相同，富含侧链的分子的信号倾向于更强。

本发明所述多糖载体的例子包括葡聚糖、氨基葡聚糖、聚蔗糖、糊精、琼脂糖、支链淀粉、各种纤维素、壳多糖、壳聚糖、可溶性淀粉等。此外，本发明所述高分子量蛋白质载体的例子包括 β -半乳糖苷酶、甲状腺球蛋白、血蓝蛋白等。此外，聚赖氨酸以及各种肽聚合物可用作本发明所述的肽聚合物载体。

可用于本发明的酶不受特别限制，适合采用免疫检测通常所用的辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP)、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、萤光素酶等。由于所述酶结合于两个或多个载体，或载体和探针分子，所述酶需要含有两个或多个官能团，例如糖链和氨基；或两个或多个氨基；氨基和羧基；以及巯基和氨基。

可采用任何接头或结合方式使载体与酶结合。然而，由于所述载体与酶结合后需要使探针结合于嵌段物，所述酶或载体上必须留有官能团。

可通过使酶分子通过胍基结合于分子量为(例如)20,000-4,000,000 的载体产生酶分子介导的嵌段物，所述胍基存在于所述载体上或用合适的接头分子引入该载体，或用合适的接头分子引入所述酶分子中。可通过所述嵌段物的载体分子中或与载体连接的酶分子中的官能团结合探针分子，产生所述嵌段酶-探针复合物。

类似地，可通过将引入分子量为 20,000-4,000,000 的载体的胍基结合于通过氧化酶分子的糖链产生的醛基以使载体结合于酶分子，然后，通过结合于通过酶分子形成的嵌段物的载体分子中或结合于载体的酶分子中的官能团的接头分子结合探针分子，从而产生嵌段酶-探针复合物。

在这种情况下，引入载体或酶的具有胍基的接头分子可以是具有胍基(-NHNH₂)的胍盐，如硫酸胍和盐酸胍；具有胍基的酰胍(-CO-NHNH₂)；或者具有官能团和胍基的物质。

同时，具有官能团如马来酰亚胺基、琥珀酰亚胺基、羧基、巯基等的物质可用作将载体或酶分子连接于探针分子的接头分子。

而且，在制备酶介导的嵌段酶时，酶与载体的重量比优选为 0.2-10 倍，更优选 0.3-5 倍，虽然这取决于载体上官能团如胍基的数量。

另一个例子是，通过氧化辣根过氧化物酶(HRP)的糖链制备酶介导的嵌段酶，它进而结合于分子量为 20,000 或更高的葡聚糖，此葡聚糖上引入了胍基。为了将马来酰亚胺基引入嵌段酶的表面，将接头分子如 N-(6-马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺(EMCS)连接于载体上残留的胍基和 HRP 上残留的氨基，并与探针分子中存在的或引入探针分子的 SH 基团反应，从而制备嵌段酶-探针复合物。以此方式，利用酶分子的糖链以及残留胍基和残留氨基制备嵌段酶-探针复合物。

可用任何交联剂使嵌段物和探针结合，并可采用任何结合方式。优选采用在水溶液中高度稳定的杂双功能(heterobifunctional)交联剂或同双功能(homobifunctional)交联剂。

抗体(单克隆抗体、多克隆抗体)及其片段(F(ab')₂、Fab'、Fab、F(abc')、Fabc'等)、各种受体、各种抗生物素蛋白(抗生物素蛋白 D、链霉抗生物素蛋白等)、蛋白 A、蛋白 G、蛋白 L、各种凝集素(伴刀豆球蛋白 A、小扁豆凝集素、植物血凝素等)、能够结合于各种待测核酸的探针等可用作探针。

可采用结合于待分析的靶抗原或物质的任何抗体。可用蛋白酶如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶由抗体获得抗体片段如 F(ab')₂ 和 Fab。抗体的重链(H 链)通常通过 S-S 键互相连接，可用还原剂破坏此键。还原剂包括半胱胺和巯基乙醇。用还原剂将 F(ab')₂ 切割成 Fab'，以产生新的巯基(SH)。本发明也可采用这些抗体片段如 F(ab')₂、Fab'、Fab、F(abc')、Fabc'等。

为了以非限制性方式详细描述本发明，下面显示了产生酶-探针复合物的方法及其特征描述的例子。

实施例 1

用葡聚糖 T2000 作为载体制备酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物

称量 0.3 g 葡聚糖 T2000(平均分子量 2,000,000; Amersham)，溶解于 6 ml 0.1 M 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中。加入 3 ml 高碘酸钠溶液并混合，将该混合物室温静置 2 小时以进行反应，然后进行凝胶过滤(Sephadex G25, Amersham)，以收集空组分。将盐酸胍(Wako Pure Chemical Industris Inc.)加入空组分以将胍引入葡聚糖。理论上，分子量为 2,000,000 的葡聚糖分子上最多可引入 22,000 个胍。称量 100 mg 过氧化物酶(HRP, Toyobo Co. Ltd.)，混合并溶解于 3 ml 0.1M 碳酸氢钠溶液中。加入 1.5 ml 高碘酸钠溶液并混合，将该混合物室温静置 2 小时以进行反应。通过凝胶过滤(Sephadex G25)使该混合物脱盐，然后加入约 150 mg 事先获得的葡聚糖酰胍并混合。该混合物

在室温下反应 2 小时，还原后，加入甘氨酸至最终浓度为 0.1M。4℃透析该混合物 3 次，每次 4 小时，以获得嵌段的载体 HRP 偶联物。由于此反应中未结合的 HRP 为 10%或更少，同时根据回收率，似乎约 12-16 个 HRP 结合于一个葡聚糖 T2000(平均分子量: 2,000,000)分子。将溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中的 1 mg N-(6-马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺(EMCS, Dojindo Laboratories)加入 5 mg 偶联物中，室温下反应 2 小时，然后通过凝胶过滤(Sephadex G25)去除过量 EMCS，以将马来酰亚胺引入载体 HRP 偶联物中。将 1/10 体积 0.1 M 盐酸半胱胺溶液加入 3.5 mg 抗 HCV 核心抗原单克隆抗体的 F(ab')₂(由等量的 c11-10 F(ab')₂ 和 c11-14 F(ab')₂ 组成)的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中，37℃孵育该混合物 90 分钟，以将 F(ab')₂ 转化为 Fab'。对该混合物进行凝胶过滤(Sephadex G25)，通过收集空组分获得 Fab'。此 Fab'和引入了马来酰亚胺基的载体 HRP 偶联物在 4℃反应过夜，进行凝胶过滤(Superdex 200 pg, 1.6×60cm, Amersham)以去除游离的 Fab'。此时，在空组分附近洗脱出本发明 HRP-Fab 复合物。由于此反应中游离的 Fab'占 10%或更少，同时根据回收率，似乎约 6-10 个 Fab'结合于一个葡聚糖 T2000(平均分子量: 2,000,000)分子。将牛血清白蛋白(BSA)加入收集的组分中，至浓度为 0.5%，将该混合物储存于 4℃。在 403 nm 处测定这样制备的 HRP-Fab 复合物的吸光度，用 403 nm 处 HRP 的分子吸收系数计算复合物中 HRP 的浓度。

实施例 2

用葡聚糖 T70 作为载体制备酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物

称量 0.3 g 葡聚糖 T70(平均分子量 70,000; Amersham)，以类似于实施例 1 的方式获得 HRP-Fab 复合物。在 403 nm 处测定 HRP-Fab 复合物的吸光度，用 403 nm 处 HRP 的分子吸收系数计算复合物中 HRP 的浓度。

实施例 3

用葡聚糖 T500 作为载体通过改变载体与酶的比例制备酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物

称量 0.3 g 葡聚糖 T500(平均分子量 500,000; Amersham)，以下述比例制备载体-酶偶联物：载体(150 mg):酶(100 mg)的重量比(0.66)，与实施例 1 相似；载体 100 mg:三倍量的酶(300 mg)的重量比(2.00)；载体 100 mg:五倍量的酶(500 mg)的重量比(3.33)。然后，以类似于实施例 1 的方式偶联抗 HCV 核心抗原单克隆抗体。在 403 nm

处测定 HRP-Fab 复合物的吸光度，用 403 nm 处 HRP 的分子吸收系数计算复合物中 HRP 的浓度。

实施例 4

用葡聚糖 T500 作为载体制备酶-抗 ProGRP 抗体复合物

称量 0.3 g 葡聚糖 T500(平均分子量 500,000; Amersham)，以类似于实施例 1 的方式获得载体-Fab 复合物。将溶解于 DMF 中的 1 mg EMCS 加入 5 mg 此偶联物中，室温下反应 2 小时。然后通过凝胶过滤(Sephadex G25)去除过量 EMCS，将马来酰亚胺引入载体 HRP 偶联物中。将 1/10 体积 0.1 M 盐酸半胱胺溶液加入抗 ProGRP 单克隆抗体(2B10)的 F(ab')₂ 的溶液中，37°C 孵育该混合物 90 分钟，以产生 Fab'。对该混合物进行凝胶过滤(Sephadex G25)，收集空组分以获得 Fab'。此 Fab' 和引入了马来酰亚胺基的载体 HRP 偶联物在 4°C 反应过夜，进行凝胶过滤(Superdex 200 pg, 1.6×60cm, Amersham)。收集空组分附近的组分，与牛血清白蛋白(BSA)混合，至终浓度为 0.5%，并储存于 4°C。在 403 nm 处测定这样制备的 HRP-Fab 复合物的吸光度，用 403 nm 处 HRP 的分子吸收系数计算复合物中 HRP 的浓度。

对比实施例 1

用常规方法制备酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体

Ishikawa 等报道的制备标记抗体的方法已经广泛应用于普通诊断试剂。此方法(超高灵敏度的酶免疫检测方法, Eiji Ishikawa, 1993, Japan Scientific Societies Press)用作常规方法。称量 4 mg HRP，并溶解于 0.6 ml 0.1 M 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中。加入溶解于 DMF 的 1 mg EMCS，室温下反应 2 小时。通过凝胶过滤(Sephadex G25)去除过量 EMCS，将马来酰亚胺引入 HRP 的氨基。将 1/10 体积 0.1 M 盐酸半胱胺溶液加入每个抗 HCV 核心抗原单克隆抗体(c11-10 和 c11-14)的 F(ab')₂ 的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中，37°C 孵育该混合物 90 分钟，以产生 Fab'。对 Fab' 进行凝胶过滤(Sephadex G25)，收集空组分。此 Fab' 和引入了马来酰亚胺基的 HRP 在 4°C 反应过夜，对该混合物进行凝胶过滤(Superdex 200 pg, 1.6×60cm)，收集 HRP-Fab 组分，与牛血清白蛋白(BSA)混合，至终浓度为 0.5%，4°C 保存。在 403 nm 处测定这样制备的 HRP-Fab 偶联物的吸光度，用 403 nm 处 HRP 的分子吸收系数计算偶联物中 HRP 的浓度。

对比实施例 2

用常规方法制备酶-抗 ProGRP 单克隆抗体

以类似于对比实施例 1 的方式将马来酰亚胺引入 HRP 的氨基中。将 1/10 体积 0.1 M 盐酸半胱胺溶液加入抗 ProGRP 单克隆抗体(2B10)的 F(ab')₂ 的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中, 37°C 孵育该混合物 90 分钟, 以产生 Fab'。对 Fab' 进行凝胶过滤(Sephadex G25), 收集空组分。此 Fab' 和引入了马来酰亚胺的 HRP 在 4°C 反应过夜, 对该混合物进行凝胶过滤(Superdex 200 pg, 1.6×60cm), 收集 HRP-Fab 组分, 与牛血清白蛋白(BSA)混合, 至终浓度为 0.5%, 4°C 保存。在 403 nm 处测定这样制备的 HRP-Fab 偶联物的吸光度, 用 403 nm 处 HRP 的分子吸收系数计算偶联物中 HRP 的浓度。

实施例 5

通过凝胶过滤对实施例 1 中制备的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物进行分子量分析

用 Sephacryl S-500 Superfine(amersham)(1.6×60)柱对实施例 1 中制备的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物进行凝胶过滤。这种 Sephacryl S-500 Superfine 柱主要用于分离大分子量的分子与小颗粒。根据 Pharmacia 的“凝胶过滤理论和实践”(Gel filtration theory and practice), 对于多糖而言, 此柱的分级范围是 4×10^4 - 2×10^7 。用 PBS 作为载体以 1 ml/分钟的流速进行凝胶过滤。收集 4 ml/2 分钟组分。测定 403 nm 处的吸光度, 用 HRP 的分子吸收系数计算 HRP 浓度($\mu\text{g/ml}$)。将各组分稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$ 当量的 HRP 浓度, 研究反应活性。检测方法如下。

将 200 μl 抗 HCV 核心抗原单克隆抗体(等量的 c11-3 和 c11-7 的混合物)以 4 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入 96 孔微量滴定板的各孔中, 4°C 孵育过夜。用 10 mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.3)洗涤后, 将 350 μl 0.5% 的酪蛋白加入各孔, 孵育 2 小时。加入其中重组 HCV 核心抗原(c11)的浓度被调整为 0 fmol/L 和 1200 fmol/L 的样品, 室温下振荡孵育 60 分钟。用含有 0.05% 吐温 20 的 10 mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.3)(洗涤溶液)洗涤 6 次后, 加入 200 μl 稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$ HRP 当量浓度的各组分和 1 $\mu\text{g/ml}$ HRP 当量浓度的常规制备的酶-抗体偶联物作为第二抗体, 孵育 30 分钟。各孔用洗涤溶液再洗涤 6 次, 加入 200 μl 底物溶液(邻苯二胺, 过氧化氢)并孵育 30 分钟。通过加入 50 μl 5N 硫酸终止酶反应, 用酶标仪(Corona MTP32)测定 492 nm(参比波长 630 nm)处的吸光度。表 1 和图 1 显示了各凝胶过滤组分的 HRP 浓度和上述检测的结果(核心抗原 1200 fmol/L 和 0 fmol/L 之间吸光度的差异)。3 个分子量标记物的分子量是: 甲状腺球蛋白, 668,000;

铁蛋白, 440,000; BSA, 68,000。此外, 同时测定的核心抗原为 0 fmol/L 和 1200 fmol/L 的情况下常规方法制备的 1 $\mu\text{g/ml}$ 酶-抗体偶联物的吸光度分别为 0.000 和 0.050。因此, 常规方法测定的 1200 fmol/L 和 0 fmol/L 核心抗原的吸光度的差异为 0.050。图 1 验证了分子量越大, 1200 fmol/L 核心抗原的吸光度越高。

表 1

组分编号	HRP $\mu\text{g/ml}$	OD492/630	各组分吸光度与常规方法吸光度(0.050)的比值
1	0.6		
2	6.3	1.372	27.4
3	18.7	1.724	34.5
4	51.3	1.736	34.7
5	160.7	1.724	34.5
6	78.4	1.894	33.9
7	42.0	1.539	30.8
8	34.5	1.446	28.9
9	31.7	1.413	28.3
10	29.3	1.266	25.3
11	25.8	1.016	20.3
12	21.8	0.918	18.4
13	17.3	0.801	16.0
14	12.6	0.682	13.6
15	8.5	0.589	11.8
16	5.5	0.511	10.2
17	3.9	0.387	7.7
18	3.0	0.298	5.9
19	2.5	0.147	2.9
20	1.6	0.102	2.0
21	1.1	0.049	1.0
22	0.5		
23	0.4		
24	0.4		
25	0		

在 19 之后的组分中, 与常规方法相比信号增加了三倍或更少, 但在组分 2-18 中, 信号增加了 3 倍或更多。由于甲状腺球蛋白(分子量 668,000)和铁蛋白(分子量 440,000)分别显示出在组分 17 和组分 18 附近的峰值, 这说明在分子量约为 440,000 或更高时本发明的效果比常规方法优越约 5.9 倍或更高, 在分子量约为 668,000 或更高时本发明的效果比常规方法优越约 7.7 倍。

本实施例中葡聚糖 T2000 的平均分子量为 2,000,000, 当 14 个分子量为 40,000 的 HRP 分子结合于这种载体, 另有 8 个分子量为 46,000 的 Fab' 分子结合于这种嵌段的载体-酶时, 酶-探针复合物的分子量约为 2,900,000。这被认为是本实施例中酶-探

针复合物的基本单元。

另一方面，用于本实施例中凝胶过滤的 Sephacryl S-500 Superfine 柱的分级范围是 4×10^4 - 2×10^7 ，如表 1 中明确表示，包含空组分的第一组分显示出高活性。包含空组分的第一组分含有分子量至少为 2×10^7 或更高的酶-探针复合物。由于本实施例中酶-探针复合物的基本单元的分子量是 2,900,000，可以解释为包含空组分的第一组分中存在的酶-探针复合物形成了分子量较高的酶-探针复合物，其中至少两个或多个酶-探针复合物共价连接，这就是嵌段酶-探针复合物。

另外，用于本实施例的载体葡聚糖 T2000 必然含有分子量小于平均分子量 2,000,000 的葡聚糖和其降解产物。它们显然也参与了酶-探针复合物或嵌段酶-探针复合物的形成，因此本实施例中包括分子量小于 2,900,000(酶-探针复合物的基本单元的平均分子量)的酶-探针复合物。本发明中也包括它们。

实施例 6

改变载体与酶的比例时酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物的反应活性

采用实施例 3 制备的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物，研究稀释至 2 $\mu\text{g/ml}$ 当量酶浓度后这些复合物的反应活性。以下是测试方法。

将 200 μl 抗 HCV 核心抗原单克隆抗体(等量的 c11-3 和 c11-7 的混合物)以 4 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入 96 孔微量滴定板的各孔中，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 10 mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.3)洗涤后，将 350 μl 0.5%的酪蛋白加入各孔，孵育 2 小时。将重组 HCV 核心抗原(c11)的浓度调整为 0 fmol/L、25.9 fmol/L、77.8 fmol/L、233.3 fmol/L 和 700 fmol/L，作为样品加入，室温下振荡孵育 60 分钟。用含有 0.05%吐温 20 的 10 mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.3)洗涤 6 次后，加入稀释至 2 $\mu\text{g/ml}$ 酶当量浓度的各酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物，孵育 30 分钟。然后用洗涤溶液洗涤各孔 6 次，加入 200 μl 底物溶液(邻苯二胺、过氧化氢)，孵育 30 分钟。通过加入 50 μl 5N 硫酸终止酶反应，用酶标仪(Corona MTP32)测定 492 nm(参比波长 630 nm)处的吸光度。

比较采用载体与酶重量比为 0.66、2.00 和 3.33 的载体-酶偶联物制备的抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物的反应活性时，重量比为 2.00 和 3.33 的复合物的反应活性为重量比为 0.66 的复合物的反应活性的 77.6%和 70.5%，这表明酶量越多，反应活性越低。即使载体:酶重量比为 2.00、3.33 或更高的复合物的灵敏度仍然比常规方法高得多。然而，酶相对于载体过量存在时，因为更多的酶结合于一个载体分子，产生更多的作为最小单元的酶-载体。然而，推测产生其中最小单元通过酶互相结合

的复合物如载体-酶-载体-酶-载体-酶的概率较小。就是说，正如实施例 5 的凝胶过滤分析中所述，本发明的酶-探针复合物的反应活性较高可解释为因为形成了分子量较高的酶-探针复合物，其中至少两个或多个作为所述复合物最小单元的酶-探针复合物共价连接起来，换言之，因为形成了嵌段酶-探针复合物。

实施例 7

用实施例 1 和 2 中制备的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物和常规的酶-抗体进行核心抗原检测的灵敏度的比较

将 200 μl 抗 HCV 核心抗原单克隆抗体(等量的 c11-3 和 c11-7 的混合物)以 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度加入 96 孔微量滴定板的各孔中，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 10 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.3(PBS)洗涤后，将 350 μl 0.5%的酪蛋白加入各孔，孵育 2 小时。吸除 0.5%酪蛋白后，从 21870 fmol/L 起连续三倍稀释重组 HCV 核心抗原(c11)，作为样品加入，室温下振荡孵育 60 分钟。用洗涤溶液洗涤 6 次后，以 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HRP 加入 200 μl 实施例 1 和 2 中制备的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物或常规方法制备的酶-抗体，作为第二抗体，孵育 30 分钟。用洗涤溶液再将各孔洗涤 6 次，加入 200 μl 底物溶液(10 mg 邻苯二胺、过氧化氢)，孵育 30 分钟。通过加入 50 μl 5N 硫酸终止酶反应，用酶标仪(Corona MTP32)测定 492 nm(参比波长 630 nm)处的吸光度。图 2 显示了结果。如果将 0 fmol/L 和 OD0.030 之间的差异定为检测限，常规的酶-抗体、实施例 2 的酶-抗体复合物和实施例 1 的酶-抗体复合物分别可检测到约 263 fmol/L、约 75 fmol/L 和约 10 fmol/L(0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。即，本发明的灵敏度比常规方法高 3.5-26.3 倍。由于易于测定 HCV 感染以及宽范围的病毒定量，具有更高灵敏度的此种方法的实用性得到了提高。

实施例 8

用其中两种单克隆抗体结合在一起的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物和其中两种单克隆抗体分别结合的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物检测核心抗原的灵敏度的比较

在实施例 1 或 2 中，两种抗 HCV 核心抗原单克隆抗体{c11-10F(ab')₂ 和 c11-14F(ab')₂}一起与嵌段载体-酶反应。此外，这两种单克隆抗体分别与嵌段载体-酶反应，并制备了酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物。研究了其中两种单克隆抗体结合在一起的制备物以及其中 c11-10 和 c11-14 单克隆抗体以 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度单

单独结合的制备物的反应活性。也通过将单独结合的 c11-10 单克隆抗体的制备物和单独结合的 c11-14 单克隆抗体的制备物混合来研究反应活性,其中各抗体的浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (共 1 $\mu\text{g/ml}$)。结果见图 3。

将 200 μl 抗 HCV 核心抗原单克隆抗体(等量的 c11-3 和 c11-7 的混合物)以 4 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入 96 孔微量滴定板的各孔中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 10 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.3(PBS)洗涤后, 将 350 μl 0.5%的酪蛋白加入各孔, 孵育 2 小时。吸除 0.5%酪蛋白后, 从 21870 fmol/L 起连续三倍稀释重组 HCV 核心抗原(c11), 作为样品加入, 室温下振荡孵育 60 分钟。用洗涤溶液洗涤 6 次后, 加入 200 μl 其中两种单克隆抗体结合在一起制备物、其中 c11-10 和 c11-14 单克隆抗体单独结合的制备物以及等量的单独结合的 c11-10 单克隆抗体制备物和 c11-14 单克隆抗体制备物的混合物, 其 HRP 浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。用洗涤溶液再将各孔洗涤 6 次, 加入 200 μl 底物溶液(10 mg 邻苯二胺、过氧化氢), 孵育 30 分钟。通过加入 50 μl 5N 硫酸终止酶反应, 用酶标仪(Corona MTP32)测定 492 nm(参比波长 630 nm)处的吸光度。

与单独存在时相比, 单独结合的 c11-10 和 c11-14 单克隆抗体各为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的混合物中反应活性稍有提高(约 1.2 倍)。然而, 与混合的制备物相比, 两种抗体结合在一起制备物的反应活性提高了大约 2-2.5 倍。因此, 结合探针以使两种或多种单克隆抗体和其片段结合于嵌段载体-酶更有效。

实施例 9

其中单克隆抗体特异性结合于嵌段载体-酶上的载体的酶-抗 HCV 核心抗原单克隆抗体复合物的反应活性

HRP 中的氨基数量非常少, 尝试用氨基将马来酰亚胺基引入 HRP 的 Ishikawa 等的结果表明, 其中至多有 1-3 个基团(Eiji Ishikawa, *Methods for Biochemistry Experiments* 27, 酶标记方法, Japan Scientific Societies Press)。用 2-甲基马来酸酐封闭 HRP 中的这几个氨基后, 以类似于实施例 3 的方式用葡聚糖 T500 作为载体制备载体-酶偶联物, 载体:酶重量比为 0.66, 然后结合抗 HCV 核心抗原单克隆抗体。测定 403 nm 处的吸光度, 用 403 nm 处 HRP 的分子吸收系数计算复合物中 HRP 的浓度。将 200 μl 抗 HCV 核心抗原单克隆抗体(等量的 c11-3 和 c11-7 的混合物)以 4 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入 96 孔微量滴定板的各孔中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 10 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.3(PBS)洗涤后, 将 350 μl 0.5%的酪蛋白加入各孔, 孵育 2 小时。吸除 0.5%酪蛋白后, 从 21870 fmol/L 起连续三倍稀释重组 HCV 核心抗原(c11), 作为样品加入, 室温

下振荡孵育 60 分钟。用洗涤溶液洗涤 6 次后，以总浓度 2 $\mu\text{g/ml}$ 当量 HRP 浓度加入 200 μl 标记抗体，孵育 20 分钟。用洗涤溶液再将各孔洗涤 6 次，加入 200 μl 底物溶液(10 mg 邻苯二胺、过氧化氢)，孵育 30 分钟。通过加入 50 μl 5N 硫酸终止酶反应，用酶标仪(Corona MTP32)测定 492 nm(参比波长 630 nm)处的吸光度。作为对比参照，用类似于实施例 3 的方式以载体:酶重量比 0.66 制备载体-酶偶联物，并随后结合抗 HCV 核心抗原单克隆抗体后使用(图 4)。

如图 4 所示，其中氨基被封闭的酶-抗体复合物的反应活性约为氨基未封闭的制备物的 88.1%，因此确证，抗体仅结合于载体时能获得足够的反应活性。由于本发明所述嵌段酶-抗体复合物中没有采用大量过量的酶，抗体可结合于载体或酶，但看来作为探针的抗体仅结合于载体时显示出了足够的反应活性。

实施例 10

采用实施例 4 中制备的酶-抗 ProGRP 单克隆抗体复合物和常规的酶-抗体的检测灵敏度的比较

将 200 μl 抗 ProGRP 单克隆抗体(2B10)以 5 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入 96 孔微量滴定板的各孔中，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 10 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.3(PBS)洗涤两次后，将 350 μl 0.5%的酪蛋白加入各孔，孵育 2 小时。吸除 0.5%酪蛋白后，从 8000 pg/mL 起连续三倍稀释重组 ProGRP(31-98)，作为样品加入，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 分钟。用洗涤溶液洗涤 5 次后，以总浓度 1.5 $\mu\text{g/ml}$ HRP 加入 200 μl 实施例 4 中制备的酶-抗 ProGRP 单克隆抗体复合物或常规方法制备的酶-抗体，作为第二抗体，孵育 30 分钟。用洗涤溶液再将各孔洗涤 6 次，加入 200 μl 底物溶液(10 mg 邻苯二胺、过氧化氢)，孵育 30 分钟。通过加入 50 μl 5N 硫酸终止酶反应，用酶标仪(Corona MTP32)测定 492 nm(参比波长 630 nm)处的吸光度。结果见图 5。横轴代表 ProGRP 的浓度，纵轴代表 492 nm 处的吸光度。可以明显看出，与常规方法制备的酶标抗体相比，实施例 4 中制备的酶抗体复合物显示出极高的信号。如果将 0 pg/mL 和 OD0.020 之间的差异定为检测限，那么常规的酶-抗体和实施例 3 的酶-抗体复合物分别可检测到约 115 pg/ml 和约 7 pg/ml 。即，本发明方法的灵敏度比常规方法高 16.4 倍。由于健康个体的血清中 ProGRP 的浓度约为 14 pg/ml 且截止值约为 50 pg/ml (*Jpn. J. Cancer Res.* 1995, 86, 698-705)，用常规方法不能检测到健康个体或一些小细胞肺癌患者的样品中的 ProGRP。通过本发明则可能检测到常规方法检测不到的患者和健康个体的样品中的 ProGRP，从而验证了本发明的有用性。

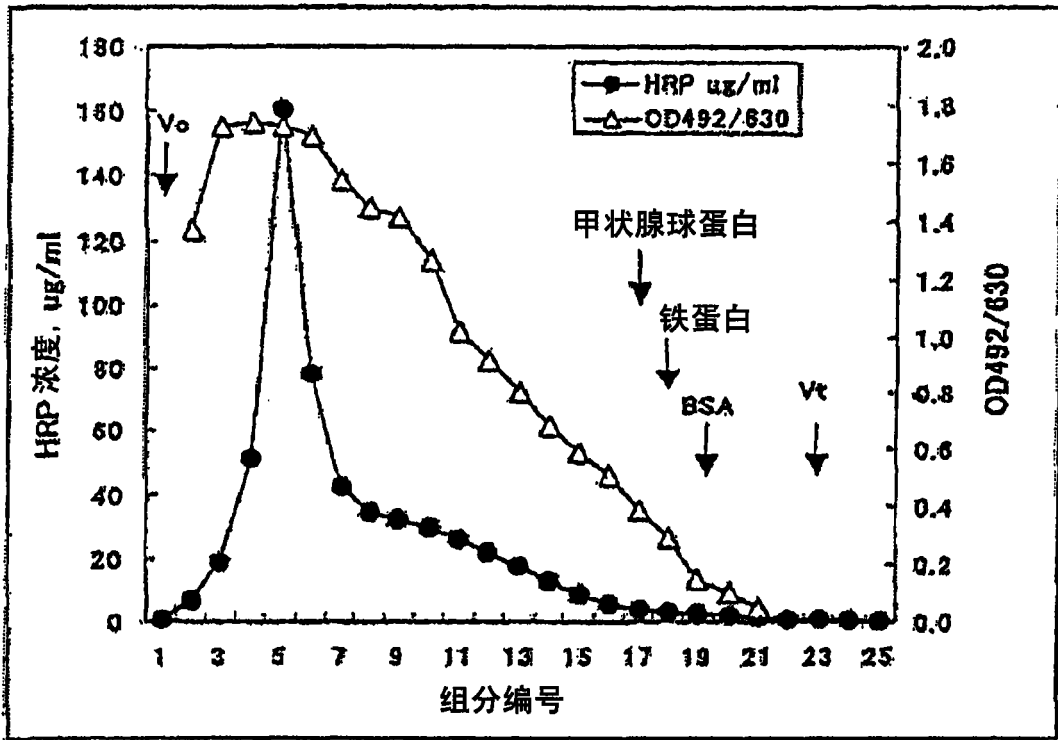


图 1

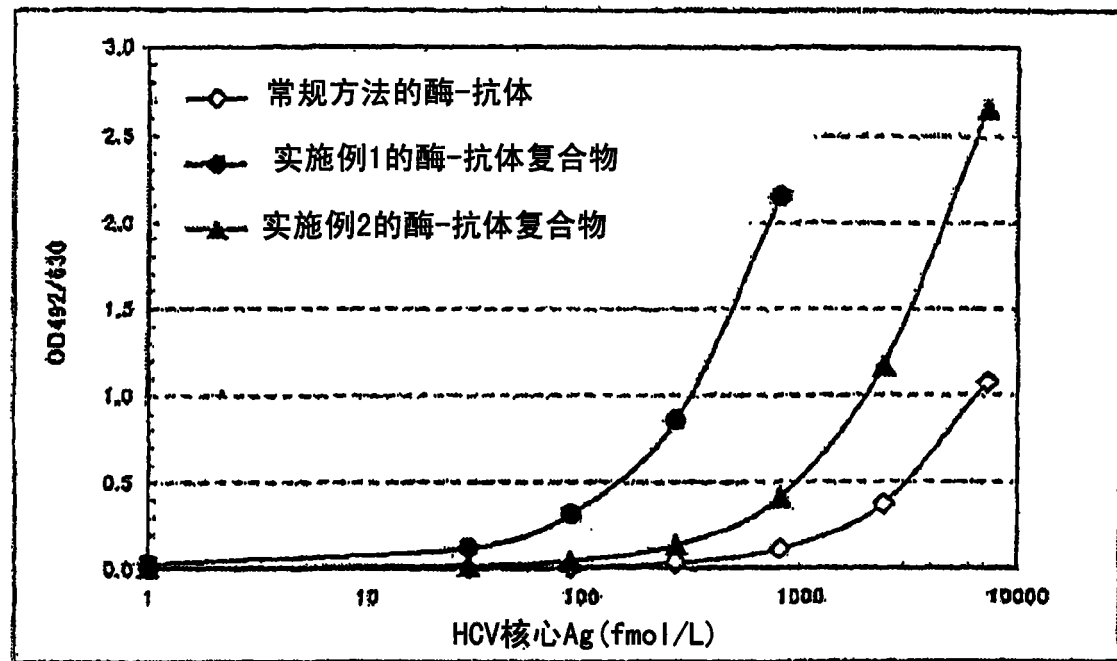


图 2

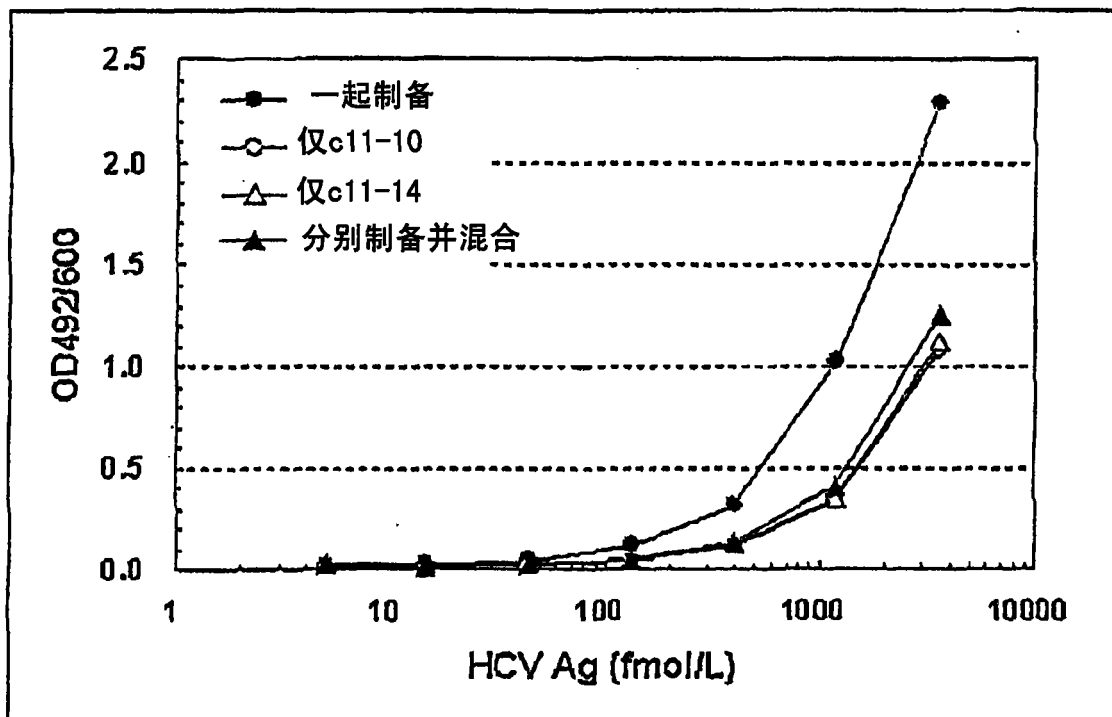


图 3

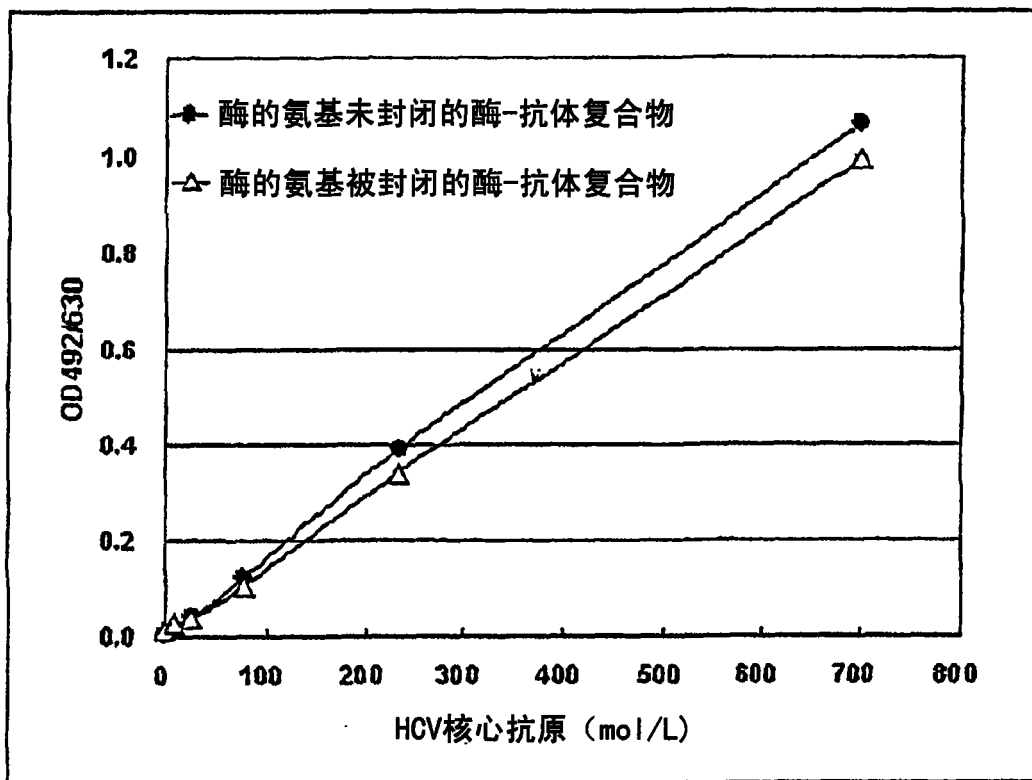


图 4

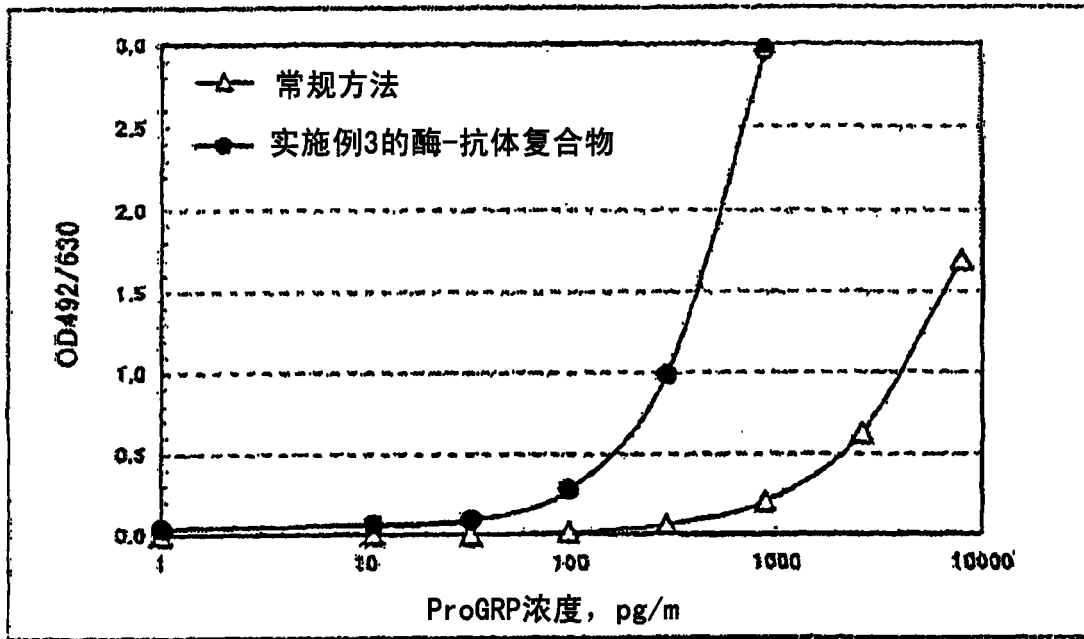


图 5

专利名称(译)	嵌段酶 - 探针复合物		
公开(公告)号	CN101088009A	公开(公告)日	2007-12-12
申请号	CN200580044664.7	申请日	2005-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	青柳克己		
发明人	青柳克己		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/581 G01N33/5767		
代理人(译)	韦东		
优先权	2004378906 2004-12-28 JP		
其他公开文献	CN101088009B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

问题：提供可用于以高灵敏度检测活体中以极少量存在的抗原、蛋白质等的嵌段酶标记物复合物。解决问题的方法：提供了包含嵌段的嵌段酶探针复合物，所述嵌段由两个或多个分子量为20,000 - 4,000,000的分子的载体和酶的组合组成，它们通过酶或接头结合，其中探针分子与酶结合。

