

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/385

G01N 21/64 G01N 33/48

G01N 33/52 A61P 15/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99106739.8

[45] 授权公告日 2003 年 10 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1122532C

[22] 申请日 1999.5.14 [21] 申请号 99106739.8

[30] 优先权

[32] 1998.5.14 [33] JP [31] 132421/1998

[71] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本国大阪府

[72] 发明人 重藤修行 宫崎仁诚 中山浩

审查员 刘 锋

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

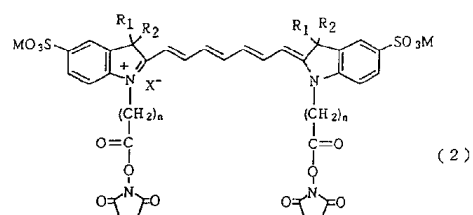
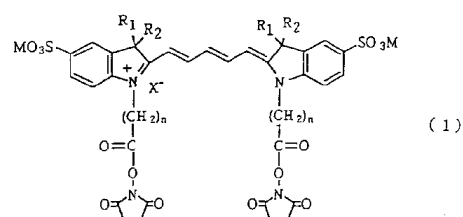
代理人 章鸣玉

权利要求书 3 页 说明书 9 页

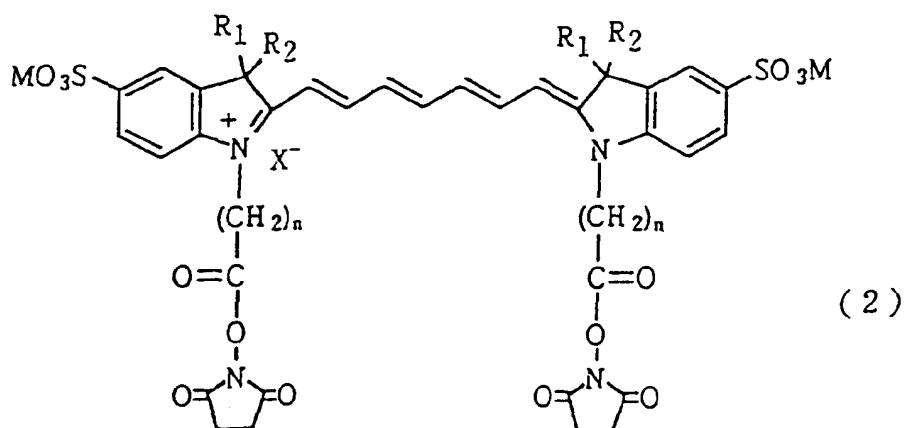
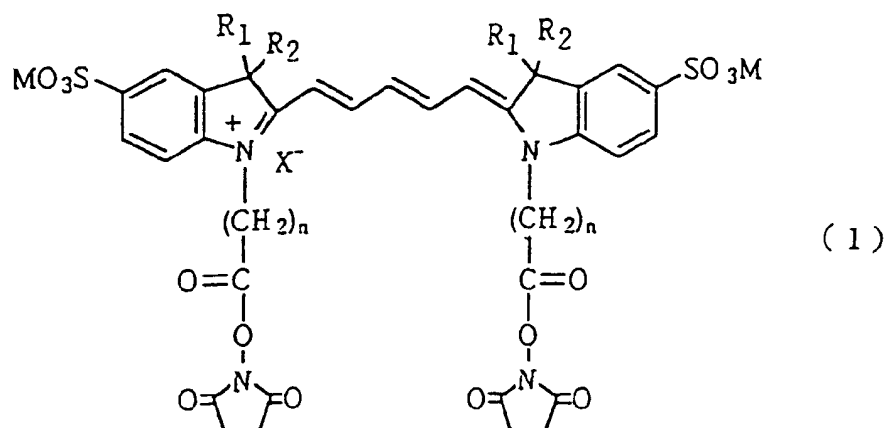
[54] 发明名称 色素标记蛋白质复合物及其制备方法

[57] 摘要

公开了用众多色素分子标记的色素标记蛋白质复合物。此色素标记蛋白质复合物由抗体经二硫键与蛋白质结合形成的蛋白质复合物与下式(1)或式(2)所示花青类色素所形成,所述色素标记所述蛋白质复合物。式中, R_1 和 R_2 表示氢或烷基, X 表示卤素, M 表示氢或碱金属, n 表示1-4的整数。

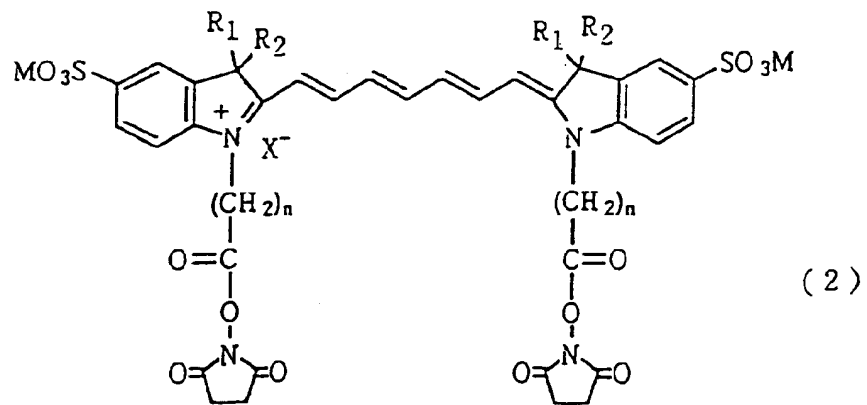
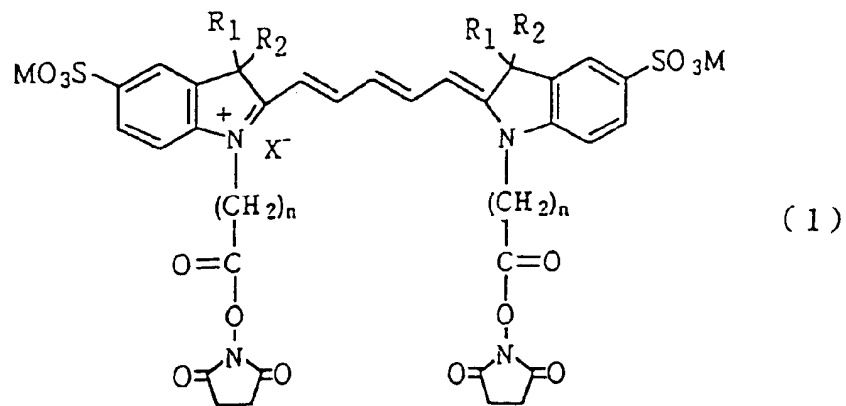


1. 色素标记蛋白质复合物，其特征在于：由抗体经二硫键与蛋白质结合形成的蛋白质复合物与下式(1)或式(2)所示花青类色素所形成，所述色素的骨架通
- 5 过所述花青色素的琥珀酰亚胺基的碳与所述蛋白质复合物的氨基氮形成共价键与蛋白质复合物结合，所述色素标记所述蛋白质复合物



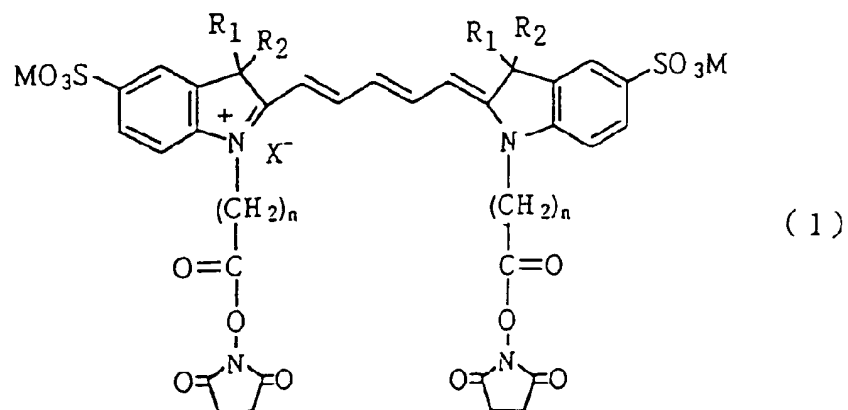
式中， R_1 和 R_2 表示氢或烷基， X 表示卤素， M 表示氢或碱金属， n 表示 1-4 的整数。

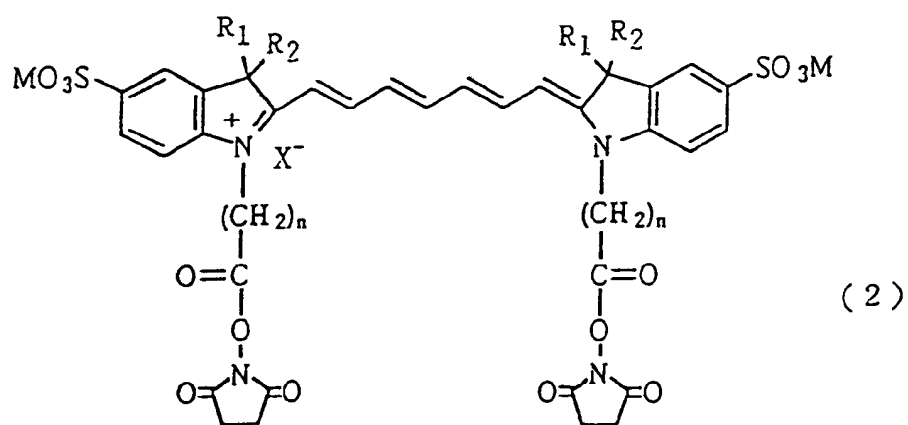
- 10 2. 权利要求 1 所述的色素标记蛋白质复合物的制备方法，其特征在于包括以下步骤：在中性或弱碱性的磷酸缓冲液中还原蛋白质；在此缓冲液中加入抗体，制成蛋白质复合物；及在此缓冲液中加入式(1)或式(2)所示花青类色素，标记上述蛋白质复合物



式中， R_1 和 R_2 表示氢或烷基， X 表示卤素， M 表示氢或碱金属， n 表示 1-4 的整数。

3. 权利要求 1 所述的色素标记蛋白质复合物的制备方法，其特征在于包括
- 5 以下步骤：在中性或弱碱性的磷酸缓冲液中还原蛋白质；在此缓冲液中加入式 (1) 或式 (2) 所示花青类色素，标记所述还原蛋白质；及在此缓冲液中加入所述抗体





式中， R_1 和 R_2 表示氢或烷基， X 表示卤素， M 表示氢或碱金属， n 表示 1-4 的整数。

色素标记蛋白质复合物及其制备方法

5 发明领域

本发明涉及用花青苷系色素标记与蛋白质结合的抗体形成的蛋白质复合物而成的色素标记抗体复合物及其制备方法。

背景技术

色素标记抗体，因能与试液中抗原发生特异反应，同时具有可视性，所以可
10 被如免疫感知器检出，在临床上可利用免疫学的抗原抗体反应来检测试液中所含的检体。目前已广泛用于各医疗机构的临床诊断中。

标记抗体用的色素大多使用具有高的摩尔吸光系数、反应性高的花青类标记色素(Bioconjugate Chemistry Vol. 4, No. 2, pp105-111, 1993)。

这样的花青类色素其官能团与抗体的氨基或羧基反应，进行共价结合，对于
15 1 分子抗体来说，结合 20-50 分子的上述色素。

这样制成的花青类色素标记抗体一般肉眼识别性好，例如可用免疫层析法，能有效地检出只存在于孕妇尿中的人绒毛膜促性腺素等微量成分。

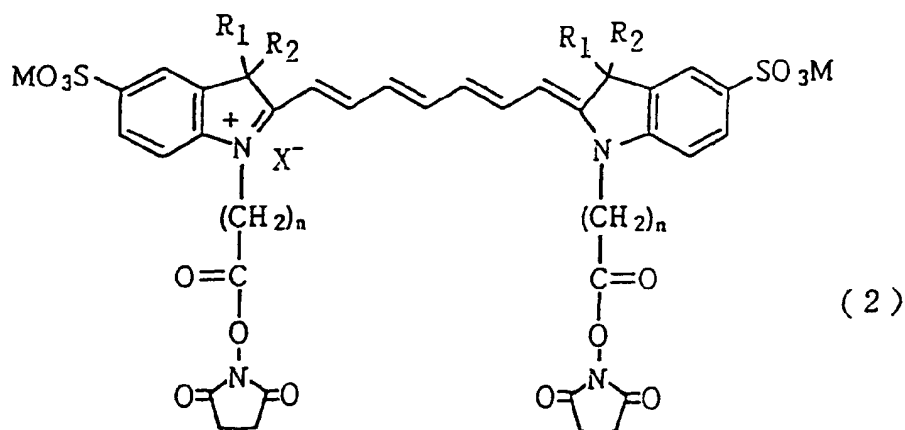
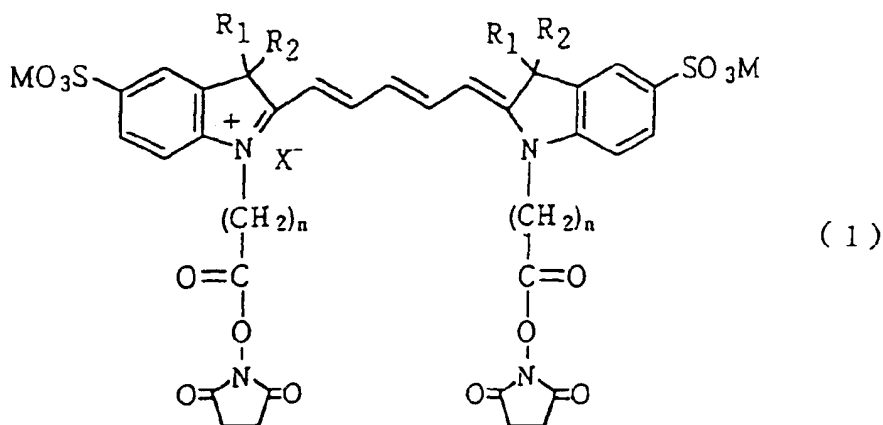
通常，在抗体上存在数百至数千个氨基或羧基。然而，抗体具有三维立体结构，因此考虑到其中可参与反应的为 50 个左右，对于 1 分子抗体而言，最多结
20 合 50 分子色素。

因此，这种色素标记抗体用于免疫感知器时，若检测对象浓度低，则存在检测困难的问题。

发明内容

25 鉴于上述问题，本发明的目的在于提供用多量色素分子标记的色素标记蛋白质复合物及其制备方法。

本发明提供抗体经二硫键与蛋白质结合形成的蛋白质复合物，以及由如下式(1)或式(2)所示花青类色素形成的用上述色素标记上述蛋白质复合物的色素标记蛋白质复合物，其中所述色素的骨架通过所述花青色素的琥珀酰亚胺基的碳与
30 所述蛋白质复合物的氨基氮形成共价键与蛋白质复合物结合。



式中， R_1 和 R_2 表示氢或烷基， X 表示卤素， M 表示氢或碱金属， n 表示 1-4 的整数。

将蛋白质结合于抗体，扩大了花青类色素可结合的面积，因此结合于蛋白质复合物的花青色素的数目比单与抗体结合的数目为多。例如，用本法结合于每分子抗体的色素的分子数约十倍于类似的现有技术。因此，所得的色素标记蛋白质复合物的肉眼识别性好。

从而，本发明的色素标记蛋白质复合物如果用于如免疫层析法，则在检测对象(检体)浓度低的情况下，也能高灵敏度地检出检体。而且，由于灵敏度高，本发明的色素标记蛋白质复合物也可适用于生物感知器。

本发明的色素标记蛋白质复合物通过上述花青色素的琥珀酰亚胺碳与上述蛋白质复合物的氨基氮共价结合形成上述色素的骨架与蛋白质复合物结合的结构。

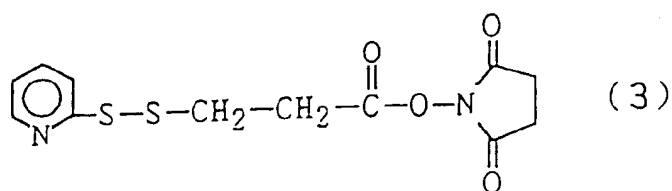
本发明上述的色素标记蛋白质复合物的制备方法包括以下步骤：在中性或弱碱性的磷酸缓冲液中还原蛋白质；在此缓冲液中加入抗体，制成蛋白质复合物；及在

此缓冲液中加入式(1)或式(2)所示花青类色素, 标记上述蛋白质复合物。

也可包括以下步骤: 在中性或弱碱性的磷酸缓冲液中还原蛋白质; 在此缓冲液中加入式(1)或式(2)所示花青类色素, 标记上述还原蛋白质; 及在此缓冲液中加入上述抗体。

- 5 在还原蛋白质与抗体结合的步骤前, 还可包括在中性或弱碱性的磷酸缓冲液中用式(3)所示的吡啶基二硫丙酸琥珀酰亚胺酯进行标记的步骤。

在任何有关方法中, 磷酸缓冲液的 PH 以 7.0-8.0 为宜。



SPDP

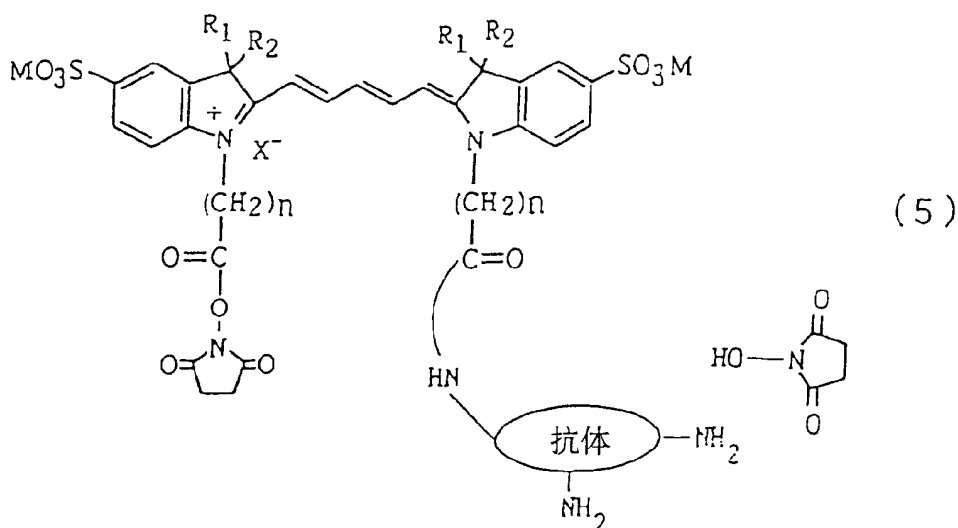
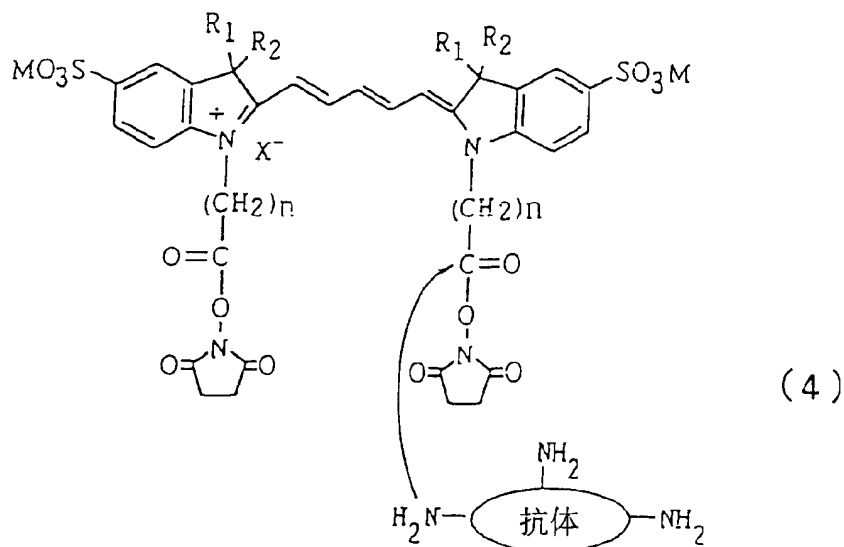
- 10 可用于本发明的色素标记蛋白质复合物的抗体无特殊限制, 与抗体的来源及其亚型等无关。例如, 作为免疫球蛋白(Ig), 可列举小鼠 IgG、小鼠 IgM、小鼠 IgA、小鼠 IgE、大鼠 IgG、大鼠 IgM、大鼠 IgA、大鼠 IgE、家兔 IgG、家兔 IgM、家兔 IgA、家兔 IgE、山羊 IgG、山羊 IgM、山羊 IgE、山羊 IgA、绵羊 IgG、绵羊 IgM、绵羊 IgA、绵羊 IgE 等。这些抗体可从商业途径购得也可直接
- 15 从动物身上采取。

结合于抗体上的蛋白质可以是不起抗体作用的任何蛋白质, 较好的是高水溶性蛋白。例如, 血清白蛋白等因其不抑制抗体反应且水溶性高而较佳。

式(1)或式(2)所示花青色素是青色系列的色素, 在长波长范围内有吸收, 不易受杂质的影响, 因此, 可用于根据吸光度检出特定物质的感知器。

- 20 在式(1)或式(2)中, X 表示的卤素可列举如氟、氯、溴或碘, M 表示的金属可列举锂、钠、钾等。

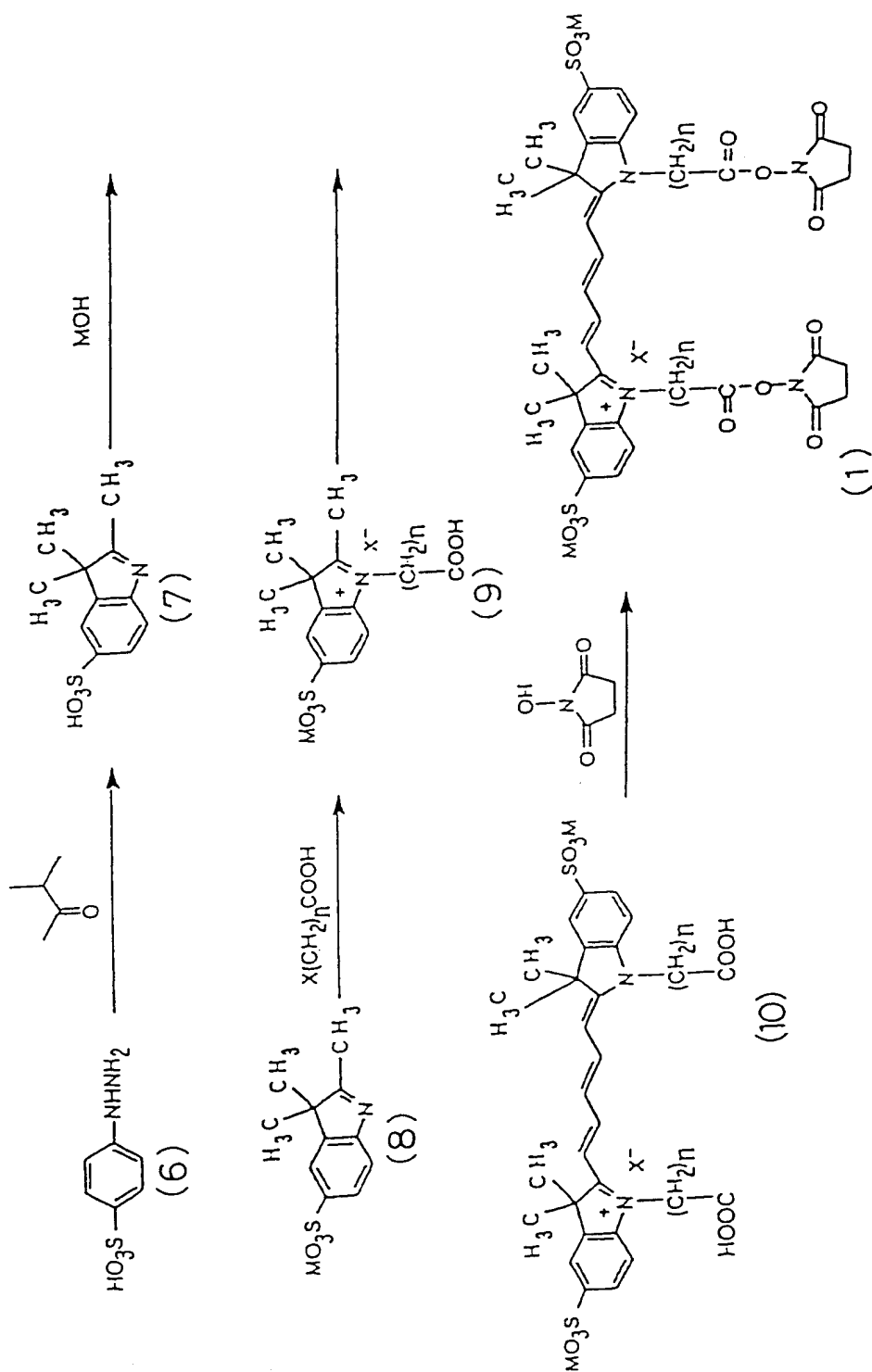
以下说明抗体与花青色素结合反应的机制。



首先，如式(4)所示，将具有琥珀酰亚胺基的花青色素与抗体混合，抗体的氨基接近上述色素的琥珀酰亚胺基的酯结合部位。

- 5 然后，如式(5)所示，上述氨基与上述酯结合部位反应，从上述氨基夺取一个氢原子。从此氨基脱离的氢原子与上述琥珀酰亚胺基的琥珀酰亚胺结合，琥珀酰亚胺从琥珀酰亚胺基变成羟基琥珀酰亚胺而脱离，与此同时，上述琥珀酰亚胺基的剩余部分与上述被夺取一个氢原子的氨基形成酰胺键，上述色素通过此酰胺键与上述抗体结合。

- 10 下面给出式(1)所示花青色素合成途径的一个例子。



首先, 将胍基苯磺酸(6)与异丙基甲基酮溶于酸性溶剂中, 加热, 形成磺酸假吡啶鎓(7)。然后, 在磺酸假吡啶鎓(7)的醇溶液中加热金属氢氧化物的醇溶液, 得到磺酸假吡啶鎓的金属盐(8)。

接着, 在上述金属盐(8)的有机溶剂溶液中加入饱和脂肪酸的卤化物, 加热, 得到羧基烷基磺酸假吡啶鎓的金属盐(9)。考虑到水溶性, 上述脂肪酸的碳原子数以 1-4 为宜。

然后, 将上述金属盐(9)与四甲氧基丙烷

溶于碱性有机溶剂, 加热, 制成羧酸衍生物(10), 最后, 在羧酸衍生物(10)的有机溶剂溶液中加入羟基琥珀酰亚胺和缩合剂二环己基碳化二亚胺, 搅拌, 得到式(1)所示花青类标记色素。

在式(2)所示花青类色素的合成上, 用戊烯二醛四甲基缩醛代替四甲氧基丙烷。

又, 式(1)、式(2)、式(9)和式(10)所示各化合物中所含的卤素例如氟、氯、溴、碘。式(1)、式(2)和式(8)-(10)所示各化合物中所含的金属例如锂、钠、钾等。

具体实施方式

以下举出具体的实施例对本发明作更详细的说明。

实施例 1

(1)小鼠 IgG 的吡啶基二硫丙酸琥珀酰亚胺酯标记

将 5mg (3.3×10^{-5} mmol) 小鼠 IgG (以下简称 IgG) 溶于 2ml 磷酸缓冲液 (以下称作 PBS) 中。在室温下边搅拌边滴加吡啶基二硫丙酸琥珀酰亚胺酯 (以下称作 SPDP) 的乙醇溶液 0.1ml。滴加的 SPDP 溶液中含 0.52mg (1.67×10^{-3} mmol) SPDP。

然后, 室温搅拌 30 分钟后, 用琼脂糖凝胶 (Pharmacia 制, Sephadex G25 柱) 过滤, 得到约 6ml SPDP 标记 IgG (以下称作 IgG-SPDP) 的 PBS 溶液。进行如下计算, 求出所得溶液的浓度和 SPDP 对抗体的结合分子数。

首先, 取 0.5ml 所得溶液, 测定 280nm 处的吸光度, 结果为 1.25。

然后, 在此溶液中加入 100mM 二硫苏糖醇 (以下称作 DTT) 水溶液 0.025ml, 静置 1 分钟后, 测定 343nm 处的吸光度。所得的吸光度为 0.39。

IgG 在 343nm 处无吸收, 因此, 所观察到的 343nm 处的吸光度是 DTT 还原放出的硫代吡啶酮所致。此放出的硫代吡啶酮是 SPDP 的吡啶基二硫基还原所致, 因此其浓度等于与抗体结合的 SPDP 的浓度。从而, SPDP 的浓度 (SPDP) 可计算如下。硫代吡啶酮在 343nm 处的吸光系数为 8.08×10^3 。

$$[\text{SPDP}] = 0.39 / (8.08 \times 10^3) = 4.83 \times 10^{-5} (\text{M})$$

又, 观察到的 280nm 处的吸光来自 IgG, 而结合的 SPDP 在 280nm 处也有吸收, 扣除此影响, 求出 IgG 的浓度 $[\text{IgG}]$ 如下。IgG 的 280nm 吸光度为 $\text{Ab}_{280, \text{IgG}}$, SPDP 的 280nm 摩尔吸光系数为 5.1×10^3 , IgG 的 280nm 摩尔吸光系数为 2.10×10^5 。

$$\text{Ab}_{280, \text{IgG}} = 1.25 - (4.83 \times 10^{-5} \times 5.1 \times 10^3) = 1.00$$

$$[\text{IgG}] = 1.00 / (2.10 \times 10^5) = 4.78 \times 10^{-6} (\text{M})$$

10 每分子 IgG 结合的 SPDP 的分子数计算如下。

$$[\text{SPDP}] / [\text{IgG}] = 4.83 \times 10^{-5} / 4.78 \times 10^{-6} = 10.1 (\text{个})$$

(2)用二硫苏糖醇还原牛血清白蛋白

将 110mg 牛血清白蛋白(以下称作 BSA)溶于 10ml PBS 中, 在其中加入溶于 PBS 的 77mg DTT, 室温搅拌 15 分钟。用 Sephadex G25M 柱进行快速凝胶过滤, 15 得到约 24ml BSA(无 SH)的 PBS 溶液。

(3)蛋白质复合物(IgG-SPDP-BSA)的制备

所得的 BSA(无 SH)溶液与上面所得的 IgG-SPDP 的 PBS 溶液(6ml)迅速混合, 于 4℃ 静置 20 小时。为了除去未反应的 BSA, 对添加了叠氮钠作防腐剂的 PBS 溶液(以下称作 PBS · Az)20 升(5 升 × 4)进行透析, 得到约 5ml IgG-SPDP-BSA 的 PBS 溶液。

(4)蛋白质复合物(IgG-SPDP-BSA)的色素标记

将式(1)所示色素 134.3mg 溶于 1ml PBS(总蛋白量的 400 倍)中, 配制成色素溶液(以下称作 SLIC5)。但是, 使用式(1)中 X 为碘、M 为钾、碳原子数 n 为 2 的化合物。

25 然后, 将 SLIC5 缓缓滴入(3)中所得的 IgG-SPDP-BSA 溶液(使总蛋白量为 $3.18 \times 10^{-4} \text{mmol}$)。其后, 于 4℃ 静置 20 小时, 对 20 升 PBS · Az 进行透析, 得到约 26ml SLIC5 标记蛋白质复合物的 PBS 溶液。按如下计算, 求出所得的 SLIC 标记蛋白质复合物的每分子蛋白质复合物的 SLIC5 的分子数。

30 测定所得溶液的 640nm 处吸光度。吸光度为 83.0。IgG-SPDP-BSA 在 640nm 处无吸收, 因此, 观察到的吸光来自结合的 SLIC5。然而, SLIC5 的浓度 $[\text{SLIC5}]$ 可按如下方法求出。SLIC5 的 640nm 处摩尔吸光系数为 1.01×10^5 。

$$[\text{SLIC5}] = 83.0/1.01 \times 10^5 = 8.218 \times 10^{-4} (\text{M})$$

将 SLIC5 标记蛋白质复合物的 PBS 溶液中的 IgG 的浓度 $[\text{IgG}]$ 调整为 $1.06 \times 10^{-6} \text{M}$ (SPDP 标记以下各步骤中, IgG 无损失), 求出每分子蛋白质复合物的 SLIC5 的分子数为如下:

$$[\text{SLIC5}] / [\text{IgG}] = 8.218 \times 10^{-4} / 1.06 \times 10^{-6} = 775.3 (\text{个})$$

实施例 2

(1) IgG 的 SPDP 标记

按实施例 1 所述方法, 用 SPDP 标记 IgG。总量为 6ml, IgG 浓度为 $4.10 \times 10^{-6} \text{M}$, 而每分子 IgG 的 SPDP 的分子数为 11.5 个。

10 (2) BSA-SLIC5 的制备

将 110mg ($1.62 \times 10^{-3} \text{mmol}$) BSA 溶于 10ml PBS 中, 然后于室温下边搅拌边缓缓滴加 SLIC5 1ml。但是, 滴加的 SLIC5 中含与实施例 1 同样的色素 171.1mg (0.162mmol , 100 当量)。

然后, 于 4℃ 搅拌过夜, 对 20 升 (5 升 $\times$ 4) PBS · Az 进行透析, 得到 13ml SLIC5 15 标记 BSA 的 PBS 溶液。按如下方法计算, 求出溶液的浓度及每分子 BSA 结合的 SLIC5 的分子数。

测定所得溶液的 280nm 和 640nm 处吸光度。吸光度分别为 15.3 和 60.2。BSA 在 640nm 处无吸收, 因此, 观察到的 640nm 处的吸光为 BSA 结合的 SLIC5 所致。然而, SLIC5 的浓度 $[\text{SLIC5}]$ 可计算如下。SLIC5 的 640nm 处的吸光 20 系数为 1.01×10^5 。

$$[\text{SLIC5}] = 60.2/1.01 \times 10^5 = 5.96 \times 10^{-4} (\text{M})$$

又, 观察到的 280nm 处的吸光来自 BSA, 结合的 SPDP 在 280nm 处也有吸收, 扣除此影响, 求出 BSA 的浓度 $[\text{BSA}]$ 如下。BSA 的 280nm 吸光度为 $\text{Ab}_{280, \text{BSA}}$, SLIC5 的 280nm 摩尔吸光系数为 2.11×10^4 , BSA 的 280nm 摩尔吸光 25 系数为 4.36×10^4 。

$$\text{Ab}_{280, \text{BSA}} = 15.3 - (5.96 \times 10^{-4} \times 2.11 \times 10^4) = 2.7244$$

$$[\text{BSA}] = 2.7244/4.36 \times 10^4 = 6.249 \times 10^{-5} (\text{M})$$

30 每分子 BSA 结合的 SLIC5 的分子数计算如下。

$$[\text{SLIC5}] / [\text{BSA}] = 5.96 \times 10^{-4} / 6.249 \times 10^{-5} = 9.5(\text{个})$$

(3)BSA-SLIC5 的 DTT 还原

在前述 BSA-SLIC5 溶液(110mg, 13ml)中加入溶于 1ml PBS 的 100mg DTT(终浓度 50mM), 室温搅拌 15 分钟。用 Sephadex G25M 柱进行快速凝胶过滤, 得到
5 约 24ml BSA-SLIC5(无 SH)PBS 溶液。

(4)色素标记蛋白质复合物的制备

将前述 BSA-SLIC5(无 SH)溶液与前述 SPDP 标记 IgG 溶液混合, 4℃ 搅拌反应一夜后, 对 20 升 PBS · Az 进行透析, 除去未反应的 BSA-SLIC5。得到约 30ml 色素标记蛋白质复合物的 PBS 溶液。按如下方法计算, 求出所得 SLIC5 标记蛋白质复合物每分子的 SLIC5 的分子数。
10

测定所得溶液的 640nm 处吸光度, 吸光度为 35.2。IgG 在 640nm 处无吸收, 因此, 观察到的吸光来自结合于 BSA 的 SLIC5。然而, SLIC5 的浓度 $[\text{SLIC5}]$ 可按如下方法求出。SLIC5 的 640nm 处摩尔吸光系数为 1.01×10^5 。

$$[\text{SLIC5}] = 35.2 / 1.01 \times 10^5 = 3.49 \times 10^{-4}(\text{M})$$

15 将 SLIC5 标记蛋白质复合物的 PBS 溶液中的 IgG 的浓度 $[\text{IgG}]$ 调整为 $8.20 \times 10^{-7}\text{M}$ (SPDP 标记以下各步骤中, IgG 无损失), 求出每分子蛋白质复合物的 SLIC5 的分子数为如下:

$$[\text{SLIC5}] / [\text{IgG}] = 3.49 \times 10^{-4} / 8.20 \times 10^{-7} = 425.6(\text{个})$$

如上所述, 本发明的色素标记蛋白质复合物每分子蛋白质结合的色素分子数
20 似乎为现有技术的约 10 倍。因此, 可将其引入利用免疫层析法的传感器并可制备高灵敏度传感器。