

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/395

G01N 33/532



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99106745.2

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1135114C

[22] 申请日 1999.5.13 [21] 申请号 99106745.2

[30] 优先权

[32] 1998.5.14 [33] JP [31] 132420/1998

[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 平井真人

审查员 王 宏

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

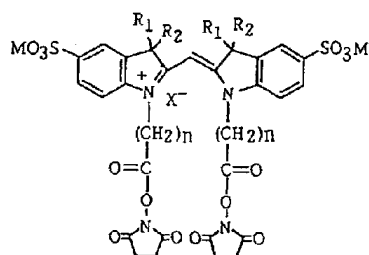
代理人 章鸣玉

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 色素标记聚合抗体及其制备方法

[57] 摘要

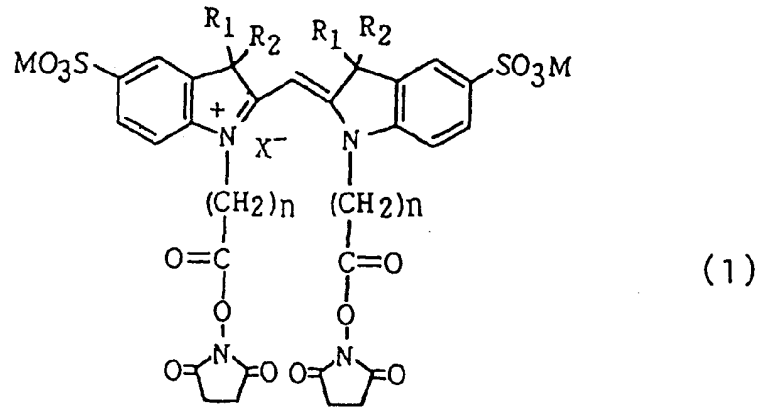
本发明公开了检测对象低浓度时也可能检出的高灵敏度色素标记聚合抗体。该色素标记聚合抗体由抗体和如下式(1)所示花青类色素制成,所述抗体经多官能团试剂聚合,该聚合抗体被所述色素标记。式中, R₁ 和 R₂ 表示氢或烷基, X 表示卤素, M 表示氢或碱金属, n 表示 1-4 的整数。



(1)

ISSN 1008-4274

1. 色素标记聚合抗体，其特征在于：由抗体和如下式(1)所示花青类色素制成，所述抗体经多官能团试剂聚合，该聚合抗体被所述色素标记



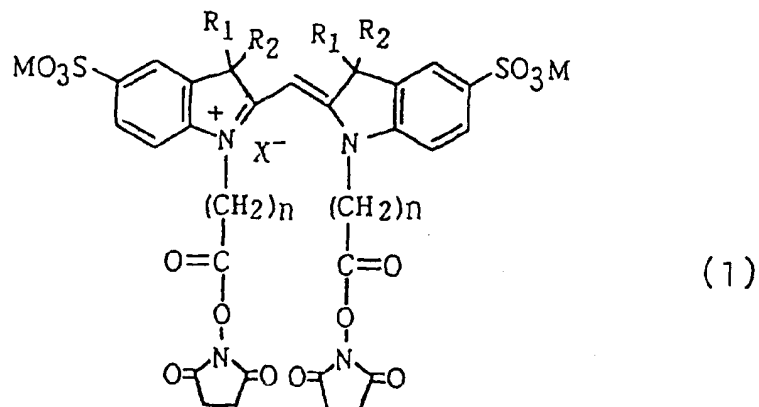
5

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。

2. 如权利要求 1 所述的色素标记聚合抗体，其特征还在于：所述色素的骨架通过所述花青类色素的琥珀酰亚胺基碳与所述聚合抗体的氨基氮形成共价键与聚合抗体结合。

10

3. 色素标记聚合抗体的制备方法，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用多官能团试剂聚合抗体；及在此缓冲液中加入式(1)所示花青类色素，标记所述聚合抗体



15 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。

色素标记聚合抗体及其制备方法

5 技术领域

本发明涉及用色素标记的聚合抗体及其制备方法。

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 被如免疫传感器检出，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。

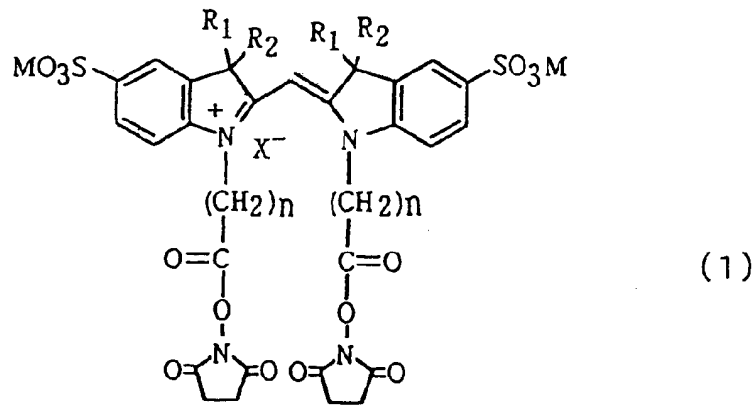
通常，1分子抗体与抗原反应部位只有2个，因此与抗原的反应灵敏度不高。

所以，在将现有色素标记抗体用于免疫传感器等情况下，限于其灵敏度，若
20 试样液中所含的检测对象(抗原)浓度低时，其检出有困难。

鉴于上述问题，本发明的目的在于提供检测对象浓度低时也能检出的高灵敏
度的色素标记聚合抗体及其制备方法。

发明内容

25 本发明提供色素标记聚合抗体，它由抗体和如下式(1)所示花青色素制成，
所述抗体经多官能团试剂聚合，该聚合抗体被所述色素标记。



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。

聚合抗体是具有多个抗原反应部位的多价抗体，因此与通常的二价抗体相比，与抗原的结合灵敏度高。

- 5 而且，每分子聚合抗体结合的色素数目比 1 分子抗体也增多，因此肉眼识别性提高。

从而，本发明的色素标记聚合抗体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，本发明的色素标记聚合抗体也可适用于生物传感器。

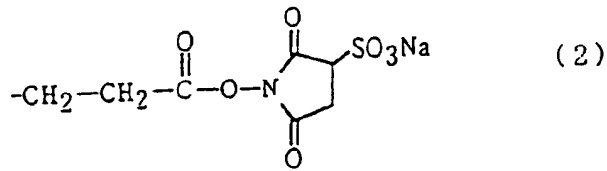
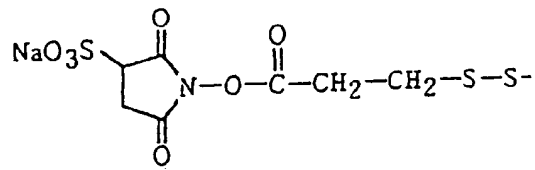
- 10 本发明的色素标记聚合抗体通过上述花青色素的琥珀酰亚胺碳与上述聚合抗体的氨基氮共价结合形成上述色素的骨架与聚合抗体结合的结构。

本发明的色素标记聚合抗体中抗体的聚合度通常以 2-50 范围内为佳。

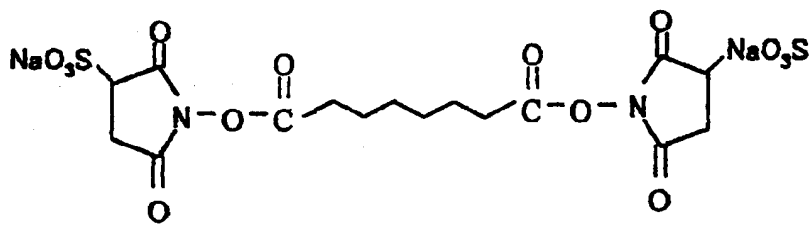
- 15 本发明也涉及色素标记聚合抗体的制备方法，包括如下步骤：在中性或弱碱性磷酸缓冲液中用多官能团试剂聚合抗体和在此缓冲液中加入式(1)所示花青类色素标记所述聚合抗体。此处所用的磷酸缓冲液的 pH 以 7.0-8.0 为佳。

- 20 可用于本发明的色素标记聚合抗体的抗体无特殊限制，与抗体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从动物身上采取。

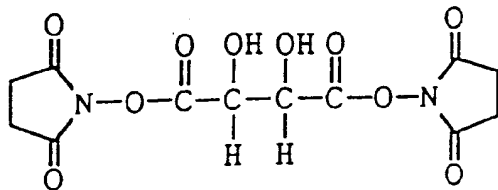
- 25 多官能团试剂可列举在同一个分子上有两个或两个以上能结合于抗体的官能团如琥珀酰亚胺基、吡啶基二硫基等的试剂。这些试剂的例子可以是式(2)所示丙酸二硫基磺基琥珀酰亚胺酯、式(3)所示辛二酸二(磺基琥珀酰亚胺)酯、式(4)所示酒石酸二琥珀酰亚胺酯、式(5)所示二(琥珀酰亚胺基琥珀酸乙二醇酯)、式(6)所示 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸等。



DTSSP

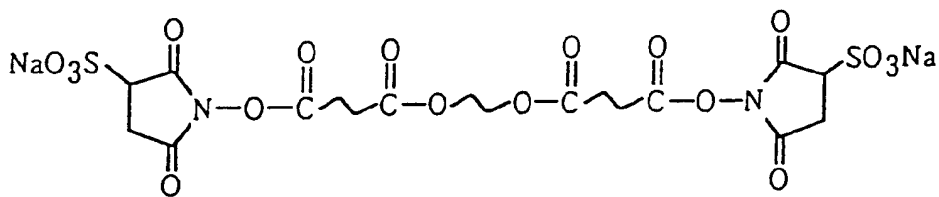
BS³

(3)



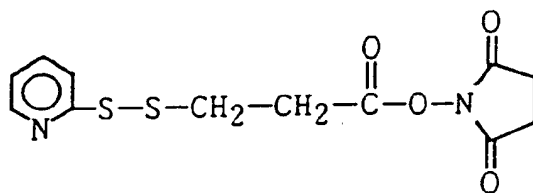
(4)

DST



EGS

(5)



(6)

SPDP

式(1)所示花青类色素是肉眼容易确认的红色系统色素，共价碳原子数目少，因此是花青类色素中水溶性最高的。

式(1)中，X表示的卤素可列举氟、氯、溴或碘，M表示的金属可列举锂、钠和钾等。

5

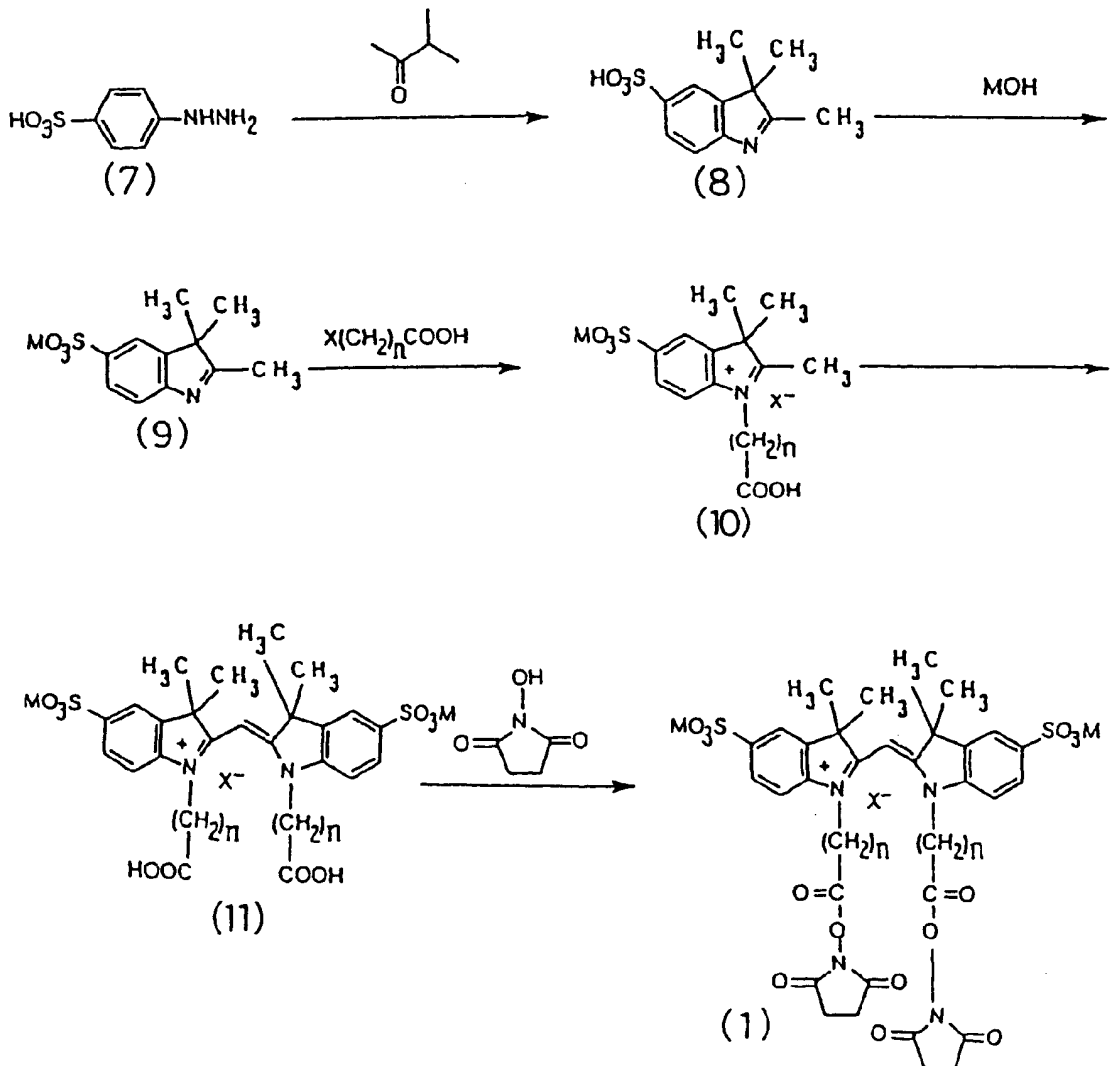
附图说明

图1是阐明本发明的一个实施例中免疫层析传感器结构概况的斜视图。

具体实施方案

10

下面描述式(1)所示花青类色素的合成途径的一个实施例。



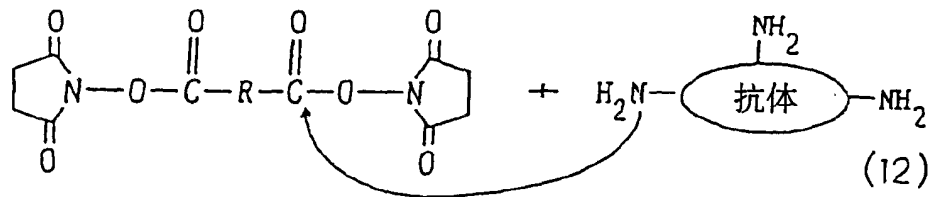
首先，将胍基苯磺酸(7)与异丙基甲基酮溶于酸性溶剂中，加热，形成磺酸假吡啶鎓(8)。然后，在磺酸假吡啶鎓(8)的醇溶液中加入金属氢氧化物的醇溶液，得到磺酸假吡啶鎓的金属盐(9)。

接着，在上述金属盐(9)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(10)。考虑到水溶性，上述脂肪酸的碳原子数以 1-4 为宜。

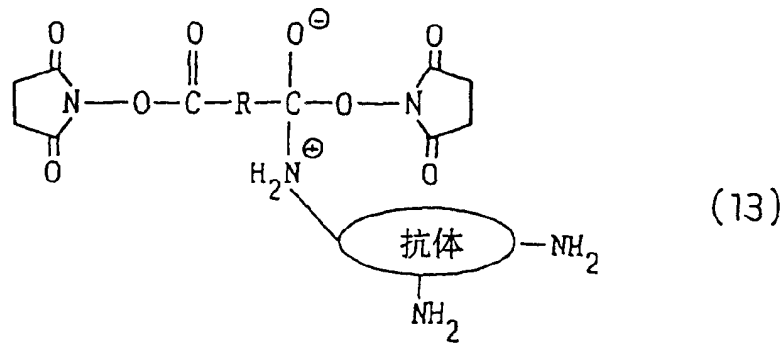
然后，将上述金属盐(10)与 N-羧基乙基-3,3-二甲基假吡啶溶于碱性有机溶剂，加热，制成羧酸衍生物(11)，最后，在羧酸衍生物(11)的有机溶剂溶液中加入羟基琥珀酰亚胺和缩合剂二环己基碳化二亚胺，搅拌，得到式(1)所示花青类标记色素。

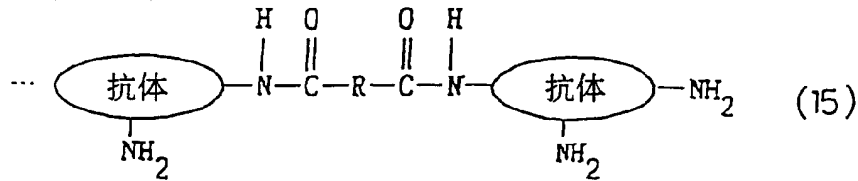
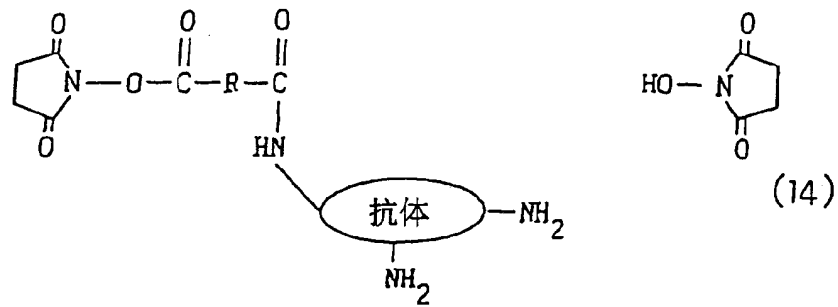
又，式(1)、式(10)和式(11)所示各化合物中所含的卤素为例如氟、氯、溴、碘。式(1)、式(9)-(11)所示各化合物中所含的金属为例如锂、钠、钾等。

下面将描述用多官能团试剂进行抗体聚合反应的机制。



15





首先，如式(12)所示，将多官能团试剂(具有2个以上琥珀酰亚胺基的二硫二(丙酸磺基琥珀酰亚胺酯))与抗体混合，如式(13)所示，抗体的氨基接近上述试剂的一个琥珀酰亚胺基的酯结合部位。

然后，如式(14)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，琥珀酰亚胺变成羟基琥珀酰亚胺从琥珀酰亚胺基上脱离，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，上述试剂通过此酰胺键与上述抗体结合。

上述试剂的其它琥珀酰亚胺基也与上述同样起反应，如式(15)所示，上述试剂与其它抗体通过酰胺键结合。此反应反复进行，使抗体发生聚合。

花青类色素的琥珀酰亚胺基与抗体的氨基结合反应的机制也与上述相同。

以下举出具体的实施例对本发明作更详细的说明。

15 (I)小鼠 IgG 的聚合

将 10mg(6.667×10^{-5} mmol)小鼠 IgG(以下简称 IgG)溶于 1ml 磷酸缓冲液(以下简称“PBS”)。将其在室温下边搅拌边滴加含二硫二(丙酸磺基琥珀酰亚胺酯)(ヒアス公司制，以下简称“DTSSP”)的 PBS 溶液 0.1ml。所滴加的 DTSSP 的 PBS 溶液中含 DTSSP 4.057mg(0.006667 mmol，100 当量)。

20 然后，于 35℃ 搅拌 30 分钟，将混合物用琼脂糖凝胶(商品名：Sephadex G25M 柱)过滤，得到约 6ml IgG 凝聚物(以下称作 IgGagg.)的 PBS 溶液。所得溶液的浓度计算如下：

取所得的溶液 0.5ml 于 280nm 处测定吸光度，吸光度值为 2.43，由于 280nm

处观察到的吸光度来自 IgG，因此，IgG 凝聚物的 1 分子 IgG 的浓度 [IgGagg.] 可计算如下。然而，IgG 在 280nm 处的吸光系数为 2.099×10^5 。

$$[\text{IgGagg.}] = 2.43/2.099 \times 10^5 = 1.158 \times 10^{-5} (\text{M})$$

(2) 聚合抗体的色素标记

5 将式(1)所示色素溶于 0.2ml PBS(总蛋白量的 400 倍)中，配制成色素溶液(以下称作 SLIC1)26.8mg。但是，使用式(1)中 X 为碘、M 为钾、碳原子数 n 为 2 的化合物。

10 然后，将 SLIC1 缓缓滴入(1)中所得的 IgGagg. 溶液(使总抗体量为 10mg)。其后，于 4℃ 静置 20 小时，再对添加了叠氮钠作为防腐剂的 PBS 20 升进行透析，以除去未反应的色素分子。最终得到约 6ml SLIC1 标记聚合抗体的 PBS 溶液。

按如下计算，求出所得的 SLIC1 标记聚合抗体的每分子 IgG 的 SLIC1 的分子数。

15 测定所得溶液的 280nm 和 430nm 处吸光度。结果，吸光度分别为 6.80 和 40.2。聚合抗体在 430nm 处无吸收，因此，观察到的吸光来自结合的 SLIC1。然而，SLIC1 的浓度 [SLIC1] 可按如下方法求出。SLIC1 的 430nm 处摩尔吸光系数为 1×10^5 。

$$[\text{SLIC1}] = 40.2/1 \times 10^5 = 4.02 \times 10^{-4} (\text{M})$$

20 又，观察到的 280nm 处的吸光来自聚合抗体的 IgG，而结合的 SLIC1 在 280nm 处也有吸收，扣除此影响，按下式求出聚合抗体的 IgG 分子的浓度 [IgGagg.]。而来自聚合抗体的 280nm 吸光度为 $Ab_{280, \text{IgG}}$ ，SLIC1 的 280nm 摩尔吸光系数为 9.8×10^3 ，聚合抗体的 IgG 分子的 280nm 摩尔吸光系数为 2.099×10^5 。

$$Ab_{280, \text{IgG}} = 6.8 - (4.02 \times 10^{-4} \times 9.8 \times 10^3) = 2.86$$

$$[\text{IgGagg.}] = 2.86/2.099 \times 10^5 = 1.363 \times 10^{-5} (\text{M})$$

25

从而，SLIC1 标记聚合抗体的每分子 IgG 结合的 SLIC1 的分子数计算如下。

$$[\text{SLIC1}] / [\text{IgGagg.}] = 4.02 \times 10^{-4} / 1.363 \times 10^{-5} = 29.5 (\text{个})$$

(3) 色素标记聚合抗体的评价

30 将(2)中制得的色素标记聚合抗体用免疫层析传感器测定 430nm 处吸光度来评估因色素标记聚合抗体的集聚而产生的发光度(敏感性)。

图 1 是显示免疫层析传感器概略结构的斜视图。将第一玻璃滤纸 2、硝基纤维素制的抗体固定膜 5 和第二玻璃滤纸 6 依次放置在聚氯乙烯之类塑料制的支持板 1 上。然后，将第一玻璃滤纸 2 的接触抗体固定膜 5 侧的端部浸渍(2)中所得的色素标记聚合抗体，这部分形成标记抗体部 3。将能与色素标记聚合抗体的同样 5 抗原反应的抗体吸附固定于抗体固定膜 5 的预定部位，形成抗体固定部 4。

用具有上述结构的免疫层析传感器测定吸光度按例如下面的方法进行。

按照层析法的原理，当试样液滴加到图 1 的第一玻璃滤纸 2 的不与抗体固定膜 5 接触的另一端时，试样液开始从第一玻璃滤纸 2 向第二玻璃滤纸 6 移动。在 10 标记抗体部 3 上，色素标记聚合抗体与试样液中的抗原结合。然后，此含有标记抗体与抗原结合形成的复合物的试样液向抗体固定部 4 移动，上述抗原在此处与固定抗体结合，固定在此处。剩余的试样液经抗体固定膜 5 继续移动，最后吸附在第二玻璃滤纸 6 上。

将波长 430nm 的 L1 光辐照抗体固定部 4，测定反射光 L2，从而测得吸光度。

15 作为对比实施例，除了不聚合抗体外，按上述同样的方法制备色素标记抗体。与上述同样地，将其用免疫层析传感器测定吸光度。

结果，使用本发明的色素标记聚合抗体时，吸光度约为 0.8，使用色素标记抗体时的吸光度约为 0.07。

20 从该结果可以认为，本发明的实施例的色素标记聚合抗体的灵敏度约为对比实施例灵敏度的 10 倍。

如上所述，本发明的色素标记聚合抗体具有多个与抗原反应部位，因此灵敏度高。然而，例如将本发明的色素标记聚合抗体用于免疫层析法的传感器，则可制成比用现有技术制成标记抗体时灵敏度高的传感器。

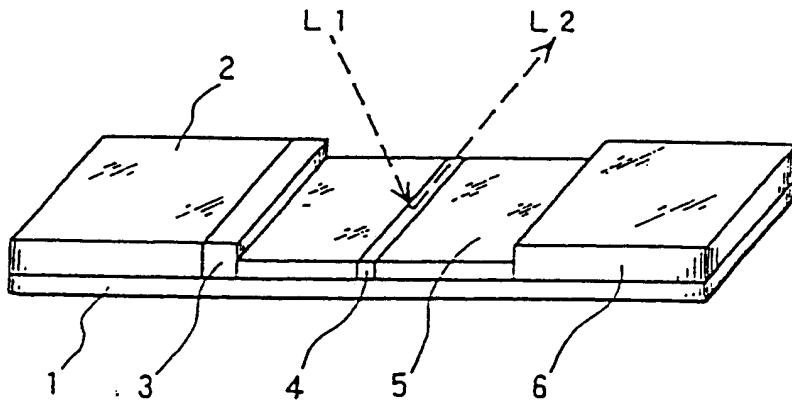


图 1