



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111122845 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201811458647.3

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2018.11.30

(66)本国优先权数据

201811288959.4 2018.10.31 CN

(71)申请人 博阳生物科技(上海)有限公司

地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试
验区蔡伦路88号1幢三楼、五楼

申请人 科美诊断技术股份有限公司

(72)发明人 章春奇 金鑫 赵卫国 刘宇卉

李临 其他发明人请求不公开姓名

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限

公司 11372

代理人 刘建军 吴大建

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书3页 说明书16页

(54)发明名称

一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试
剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及化学发光免疫分析技术领域的一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒及其应用。所述试剂盒包括:a).抗干扰剂,其包括载体和活性分子,所述载体为多孔介质,所述活性分子填充于所述载体之中,并能够与生物素分子特异性结合;b).免疫分子,其能够与待测目标分子免疫结合;c).化学发光试剂。本发明所述试剂盒包括一种抗干扰剂,该抗干扰剂通过将能够与生物素分子特异性结合的活性分子作为“客体分子”,以恰当方式填充于载体之中,形成“介孔组装主客体”体系,从而使得本发明所述试剂盒避免了因游离生物素造成的假阳性或假阴性结果。

1. 一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒,其包括:
 - a). 抗干扰剂,其包括载体和活性分子,所述载体为多孔介质,所述活性分子填充于所述载体之中,并能够与生物素分子特异性结合;
 - b). 免疫分子,其能够与待测目标分子免疫结合;
 - c). 化学发光试剂。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂能够识别游离生物素分子和生物素结合物。
3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂能够选择性吸附游离生物素分子。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述游离生物素分子能够扩散到所述载体中,并与其中的所述活性分子特异性结合。
5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂能够限制比所述活性分子尺寸更大的生物大分子进入其载体之中。
6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂能够在液相反应体系中均匀分布。
7. 根据权利要求1-6中任意一项所述的抗试剂盒,其特征在于,所述载体的内表面积大于其外表面积;优选地,所述载体的内表面积为其外表面积的5倍以上,优选为10倍以上,更优选为20倍以上;和/或,
所述载体的粒径为15-300nm,优选为30-250nm,更优选为50-200nm;和/或,
所述载体的比表面积为 $200\text{m}^2/\text{g}$ 以上,优选为 $400\text{m}^2/\text{g}$ 以上,更优选为 $600\text{m}^2/\text{g}$ 以上,最优选为 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 以上;和/或,
所述载体的最小孔隙率大于40%,优选大于50%,更优选大于60%。
8. 根据权利要求1-7中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述多孔介质选自多孔金属材料、多孔非金属材料和多孔高分子材料中的一种或多种。
9. 根据权利要求1-8中任意一项所述的抗试剂盒,其特征在于,所述载体为介孔微球,优选为有序介孔微球。
10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述介孔微球的孔径为2-50nm,优选为4-30nm,更优选为5-15nm。
11. 根据权利要求9或10所述的试剂盒,其特征在于,所述介孔微球为笼状中空介孔微球。
12. 根据权利要求9-11中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述介孔微球选自 Al_2O_3 介孔材料、 W_3O_3 介孔材料、 TiO_2 介孔材料、 ZrO_2 介孔材料、硅基介孔材料和/或介孔碳材料中的至少一种,优选选自硅基介孔材料。
13. 根据权利要求1-12中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述活性分子选自亲和素和/或链霉亲和素。
14. 根据权利要求1-13中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述活性分子通过物理吸附方式填充于所述载体中。
15. 根据权利要求1-14中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述活性分子通过在含有缓冲液的体系中与载体接触而填充于所述载体之中。

16. 根据权利要求15所述的试剂盒,其特征在于,所述含有缓冲液的体系的pH值为7至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,进一步优选7.3-7.6。

17. 根据权利要求1-13中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述活性分子通过直接或间接化学交联的方式填充于所述载体之中。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒,其特征在于,所述载体内表面修饰有化学基团,所述活性分子通过与所述化学基团的共价偶联而填充于所述载体之中;其中,所述化学基团选自羧基、醛基、氨基、巯基和羟基中的一种或多种。

19. 根据权利要求1-18中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述载体内表面连接有生物素分子,所述活性分子通过与生物素分子的特异结合作用而填充于所述载体之中。

20. 根据权利要求1-19中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂还包括缓冲溶液,优选PBS缓冲溶液。

21. 根据权利要求1-20中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述载体以及填充在所述载体中的活性分子在抗干扰剂中的总浓度为5-50ug/mL,优选8-30ug/mL,更优选10-20ug/mL。

22. 根据权利要求1-21中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂的制备方法包括:步骤S1,使载体与活性分子进行接触;优选地,所述接触在第一缓冲液体系中进行。

23. 根据权利要求22所述的试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂的制备方法还包括步骤S0:用第二缓冲液体系将载体进行清洗,步骤S0在步骤S1之前进行。

24. 根据权利要求22或23所述的试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂的制备方法还包括步骤S2:除去未填充到载体中的活性分子,步骤S2在步骤S1之后进行;优选地,通过向步骤S1处理后的载体中加入第三缓冲液体系,然后进行固液分离,以除去未填充到载体中的活性分子。

25. 根据权利要求1-24中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括生物素结合物,其包括与生物素直接或间接结合且参与免疫反应的物质。

26. 根据权利要求25所述的试剂盒,其特征在于,所述生物素结合物为生物素结合抗体和/或生物素结合抗原。

27. 根据权利要求1-26中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为均相化学发光免疫分析试剂盒。

28. 根据权利要求1-26中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为包含固相载体的非均相化学发光免疫分析试剂盒。

29. 根据权利要求28所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括以下组分:

组分L,其包含固相载体以及与之直接结合或间接结合的第一免疫分子,所述第一免疫分子能够与待测目标分子的第一表位结合;

组分M,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第二免疫分子,所述第二免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

30. 根据权利要求28所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括以下组分:

组分L,其包含固相载体以及与之直接结合或间接结合的第一免疫分子,所述第一免疫分子能够与待测目标分子的第一表位结合;

组分M,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第一化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第二免疫分子,所述第二免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠;

组分N,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第二化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第三免疫分子,所述第三免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

31. 根据权利要求28-30中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述固相载体选自磁性微球、塑料微球、塑胶微粒、微孔板、玻璃、毛细管或尼龙;优选选自磁性微球。

32. 根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,所述磁性微球的粒径0.05-50微米;优选0.1-40微米;更优选5-20微米。

33. 根据权利要求29-32中任意一项所述的试剂盒,所述化学发光试剂选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯及其衍生物、金刚烷、稀土元素或联吡啶钌配合物。

34. 根据权利要求29-32中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光试剂为化学发光催化剂,所述化学发光催化剂选自辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

35. 根据权利要求29-34中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一免疫分子与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述固相载体与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第一抗体或其结合片段与生物素结合,而所述固相载体与链霉亲和素结合。

36. 根据权利要求29-35中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第二抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述化学发光试剂与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第二抗体或其结合片段与生物素结合,而所述化学发光试剂与链霉亲和素结合。

37. 一种如权利要求1-36中任意一项所述的试剂盒在生物素-链霉亲和素系统检测中的应用;优选地在甲状腺功能检测中的应用;进一步优选地在三碘甲状腺原氨酸和/或四碘甲状腺原氨酸检测中的应用。

一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于化学发光免疫分析技术领域,具体涉及一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin-System,BAS)是70年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统。BAS系统具有高亲和力,灵敏度高,稳定性高等优点的信号放大标记技术。结合二者即可偶联抗原抗体等大分子生物活性物质。它们的结合迅速、专一、稳定,并具有多级放大效应。目前BAS系统主要应用于免疫学,分子生物学等领域。在体外诊断的实际应用中更是具有巨大的优越性,该法最大的缺点是有生物素的干扰,造成检测的误差。

[0003] 生物素干扰可能产生假阳性,也可能产生假阴性。一般来说,夹心法产生假阴性,竞争法产生假阳性。目前常见解决方法:1.更换非使用亲和素-生物素系统的平台;2.停用相关药物/食物后隔日或一周后重测;3.样本预处理:链霉抗生物素蛋白包被的微粒去除样品中的生物素。

[0004] 但是,目前还没有一种方法在亲和素-生物素系统中能够很好地解决生物素干扰的问题。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的不足提供一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒,该试剂盒能够很好地解决生物素干扰的问题。

[0006] 为此,本发明第一方面提供了一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒,其包括:

[0007] a).抗干扰剂,其包括载体和活性分子,所述载体为多孔介质,所述活性分子填充于所述载体之中,并能够与生物素分子特异性结合;

[0008] b).免疫分子,其能够与待测目标分子免疫结合;

[0009] c).化学发光试剂。

[0010] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够识别游离生物素分子和生物素结合物。

[0011] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述抗干扰剂能够选择性吸附游离生物素分子。

[0012] 在本发明的一些实施方式中,所述游离生物素分子能够扩散到所述载体中,并与其中的所述活性分子特异性结合。

[0013] 在本发明的另一些实施方式中,所述抗干扰剂能够限制比所述活性分子尺寸更大的生物大分子进入其载体之中。

[0014] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够在液相反应体系中均匀分布。

[0015] 在本发明的一些具体实施方式中,所述载体的内表面积大于其外表面积;优选地,

所述载体的内表面积为其外表面积的5倍以上,优选为10倍以上,更优选为20倍以上。

[0016] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述载体的粒径为15-300nm,优选为30-250nm,更优选为50-200nm。

[0017] 在本发明的一些具体实施方式中,所述载体的比表面积为 $200\text{m}^2/\text{g}$ 以上,优选为 $400\text{m}^2/\text{g}$ 以上,更优选为 $600\text{m}^2/\text{g}$ 以上,最优选为 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 以上。

[0018] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述载体的最小孔隙率大于40%,优选大于50%,更优选大于60%。

[0019] 在本发明的一些实施方式中,所述多孔介质选自多孔金属材料、多孔非金属材料和多孔高分子材料中的一种或多种。

[0020] 在本发明的另一些实施方式中,所述载体为介孔微球,优选为有序介孔微球。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,所述介孔微球的孔径为2-50nm,优选为4-30nm,更优选为5-15nm。

[0022] 在本发明的另一些实施方式中,所述介孔微球为笼状中空介孔微球。

[0023] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述介孔微球选自 Al_2O_3 介孔材料、 WO_3 介孔材料、 TiO_2 介孔材料、 ZrO_2 介孔材料、硅基介孔材料和/或介孔碳材料中的至少一种,优选选自硅基介孔材料。

[0024] 在本发明的一些实施方式中,所述活性分子选自亲和素和/或链霉亲和素。

[0025] 在本发明的另一些实施方式中,所述活性分子通过物理吸附方式填充于所述载体中。

[0026] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述活性分子通过在含有缓冲液的体系中与载体接触而填充于所述载体之中。

[0027] 在本发明的一些具体实施方式中,所述含有缓冲液的体系的pH值为7至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,进一步优选7.3-7.6。

[0028] 在本发明的一些实施方式中,所述活性分子通过直接或间接化学交联的方式填充于所述载体之中。

[0029] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述载体内表面修饰有化学基团,所述活性分子通过与所述化学基团的共价偶联而填充于所述载体之中;其中,所述化学基团选自羧基、醛基、氨基、巯基和羟基中的一种或多种。

[0030] 在本发明的一些具体实施方式中,所述载体内表面连接有生物素分子,所述活性分子通过与生物素分子的特异结合作用而填充于所述载体之中。

[0031] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂还包括缓冲溶液,优选PBS缓冲溶液。

[0032] 在本发明的另一些实施方式中,所述载体以及填充在所述载体中的活性分子在抗干扰剂中的总浓度为5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优选8-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,更优选10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0033] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂的制备方法包括:步骤S1,使载体与活性分子进行接触;优选地,所述接触在第一缓冲液体系中进行。

[0034] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述抗干扰剂的制备方法还包括步骤S0:用第二缓冲液体系将载体进行清洗,步骤S0在步骤S1之前进行。

[0035] 在本发明的另一些优选的实施方式中,所述抗干扰剂的制备方法还包括步骤S2:除去未填充到载体中的活性分子,步骤S2在步骤S1之后进行;优选地,通过向步骤S1处理后

的载体中加入第三缓冲液体系,然后进行固液分离,以除去未填充到载体中的活性分子。

[0036] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒还包括生物素结合物,其包括与生物素直接或间接结合且参与免疫反应的物质。

[0037] 在本发明的另一些实施方式中,所述生物素结合物为生物素结合抗体和/或生物素结合抗原。

[0038] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒为均相化学发光免疫分析试剂盒。

[0039] 在本发明的另一些实施方式中,所述试剂盒为包含固相载体的非均相化学发光免疫分析试剂盒。

[0040] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒包括以下组分:

[0041] 组分L,其包含固相载体以及与之直接结合或间接结合的第一免疫分子,所述第一免疫分子能够与待测目标分子的第一表位结合;

[0042] 组分M,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第二免疫分子,所述第二免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

[0043] 在本发明的另一些实施方式中,所述试剂盒包括以下组分:

[0044] 组分L,其包含固相载体以及与之直接结合或间接结合的第一免疫分子,所述第一免疫分子能够与待测目标分子的第一表位结合;

[0045] 组分M,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第一化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第二免疫分子,所述第二免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠;

[0046] 组分N,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第二化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第三免疫分子,所述第三免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

[0047] 在本发明的一些实施方式中,所述固相载体选自磁性微球、塑料微球、塑胶微粒、微孔板、玻璃、毛细管或尼龙;优选选自磁性微球。

[0048] 在本发明的另一些实施方式中,所述磁性微球的粒径0.05-50微米;优选0.1-40微米;更优选5-20微米。

[0049] 在本发明的一些实施方式中,所述标记物为化学发光标记物,所述化学发光试剂选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯及其衍生物、金刚烷、稀土元素或联吡啶钌配合物。

[0050] 在本发明的另一些实施方式中,所述化学发光试剂为化学发光催化剂,所述化学发光催化剂选自辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

[0051] 在本发明的一些实施方式中,所述第一免疫分子与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述固相载体与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第一抗体或其结合片段与生物素结合,而所述固相载体与链霉亲和素结合。

[0052] 在本发明的另一些实施方式中,所述第二抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述化学发光试剂与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第二抗体或其结合片段与生物素结合,而所述化学发光试剂与链霉亲和素结合。

[0053] 本发明第二方面提供了一种如本发明第一方面所述的试剂盒在生物素-链霉亲和

素系统检测中的应用;优选地在甲状腺功能检测中的应用;进一步优选地在三碘甲状腺原氨酸和/或四碘甲状腺原氨酸检测中的应用。

[0054] 本发明的有益效果为:本发明所述试剂盒中包括一种抗干扰剂,该抗干扰剂通过将活性分子如SA或avidin蛋白质分子等作为“客体分子”,以恰当方式填充于多孔介质的孔内,形成“介孔组装主客体”体系,能够有效区分游离生物素分子与生物素结合物,从而使得本发明所述试剂盒能够消除游离生物素的干扰,避免了化学发光免疫测定中的假阳性和/或假阴性结果。另外,本发明所述试剂盒还具有实用性和通用性,可以在不同的技术平台上应用,对试剂的性能影响小。

具体实施方式

[0055] 为使本发明容易理解,下面将详细说明本发明。但在详细描述本发明前,应当理解本发明不限于描述的具体实施方式。还应当理解,本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式,而并不表示限制性的。

[0056] 在提供了数值范围的情况下,应当理解所述范围的上限和下限和所述规定范围内的任何其他规定或居间数值之间的每个居间数值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小的范围中,并且也涵盖在本发明内,服从规定范围内任何明确排除的限度。在规定的范围包含一个或两个限度的情况下,排除那些包括的限度之任一或两者的范围也包含在本发明中。

[0057] 除非另有定义,本文中使用的所有术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用,但是现在描述了优选的方法和材料。

[0058] I. 术语

[0059] 本发明所述用语“均相”所对应的英文定义为“homogeneous”,其是指无须对结合的抗原抗体复合物和剩余的游离抗原或抗体进行分离既可进行检测。

[0060] 本发明所述用语“非均相”所对应的英文定义为“非均相免疫测定”,是指在用荧光物质、放射性核素、酶或化学发光物质等进行标记的操作过程中,各种相关试剂混合反应后需要进行分离,将待测物与反应体系分离后再进行检测。

[0061] 本发明所述用语“载体”是指能载带活性分子共同参与化学或物理过程的物质。本发明对载体的化学成分没有特别的限制,可以是有机材质的、也可以无机材质的,如高分子聚合物、金属、玻璃、矿物盐、硅藻、磷脂囊泡、硅颗粒、微晶染料等等。

[0062] 本发明所使用的术语“多孔介质”是指由固体物质组成的骨架和由骨架分隔成大量密集成群的微小空隙所构成的物质。

[0063] 本发明所使用的术语“活性分子”是指具有与生物素分子特异性结合能力的分子。示例性的活性分子为亲和素和链霉亲和素。

[0064] 本发明所述用语“待测目标分子”是指检测时待检测样本中的物质。与待测目标分子具有特异性结合亲和力的一种或多种物质会被用于检测该目标分子。待测目标分子可以是蛋白、肽、抗体或可以使其与抗体结合的半抗原。

[0065] 本发明所述用语“抗体”以最广含义使用,包括任何同种型的抗体,保留对抗原的特异性结合的抗体片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv、和Fd片段、嵌合抗体、人源化抗体、单

链抗体、双特异性抗体、和包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。

[0066] 本发明所述用语“抗原”是指能够刺激机体产生免疫应答,并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体内外结合,发生免疫效应的物质。

[0067] 本发明所述用语“结合”指由于例如共价、静电、疏水、离子和/或氢键等相互作用,包括但不限于如盐桥和水桥等相互作用引起的两个分子间的直接联合。

[0068] 本发明所述用语“特异性结合”,是指两种物质之间的相互辨别和选择性结合反应,从立体结构角度上说就是相应的反应物之间构象的对应性。

[0069] 本发明所述用语“活性氧”是指机体内或者自然环境中由氧组成,含氧并且性质活泼的物质的总称,主要为一种激发态的氧分子,包括氧的一电子还原产物超氧阴离子($O_2 \cdot^-$)、二电子还原产物过氧化氢(H_2O_2)、三电子还原产物羟基自由基($\cdot OH$)以及一氧化氮和单线态氧($1O_2$)等。

[0070] 本发明中,所述用语“受体”是指能够与活性氧反应可以产生可检测信号的物质。当供体被能量或者活性化合物诱导激活并释放高能态的活性氧时,该高能态的活性氧可以被近距离的受体俘获,从而传递能量以激活所述受体。在本发明的一些具体实施例中,所述受体是这样的物质,其经历与活性氧(例如单线态氧)的化学反应以形成不稳定的亚稳态中间体,所述亚稳态中间体可以分解,同时或随后发光。这些物质的典型例子包括但不限于:烯醇醚、烯胺、9-烷叉黄原胶、9-烷叉-N-烷基吡啶满、芳乙烯醚、双环氧乙烷、二甲基噻吩、芳香性咪唑或光泽精。在本发明的另一些具体实施例中,所述受体是能够与活性氧(例如单线态氧)反应以形成可以分解成酮类或羧酸衍生物的氢过氧化物或二氧环丁烷的烯烃类;可以通过光的作用分解的稳定二氧环丁烷;可以与活性氧(例如单线态氧)反应以形成二酮类的乙炔类;可以形成偶氮化合物或偶氮羰基化合物的腈类或酰肼类,诸如鲁米诺;和可以形成内过氧化物类的芳族化合物。可以根据本公开和要求保护的发明利用的受体的具体的、非限制性实例记载于美国专利号US5340716(该专利文献在此全文引为参考)。在本发明另一些具体实施例中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其是非粒子化的并且在含水介质中可溶,这种情况可参见专利PCT/US2010/025433(该专利文献在此全文引为参考)。

[0071] 本发明中,所述“化学发光化合物”即一种被称作为标记物的化合物,可进行化学反应以便引起发光,比如通过被转化为在电子激发态下形成的另一种化合物。激发态可以是单线态或是三重激发态。激发态可弛豫到基态直接发光,或者是通过将激发能量传递到发射能量受体,从而自身恢复到基态。在此过程中,能量受体微球将被跃迁为激发态而发光。

[0072] 用语“能够直接或间接地结合”是指指定的实体物能够特异地结合到实体物上(直接地),或者指定的实体物能够特异性地结合至特异性结合配对成员、或具有两个或更多能够结合其他实体物的特异性结合伴侣的复合物上(间接地)。

[0073] 本发明所述“特异性结合配对成员”选自(1)小分子和对于所述小分子的结合配偶体,以及(2)大分子和对于所述大分子的结合配偶体。

[0074] 在本发明中,所述用语“供体”是指通过能量或者活性化合物的激活后能够产生与受体反应的诸如单线态氧的活性中间体的敏化剂。供体可以是光活化的(如染料和芳香化合物)或者化学活化的(如酶、金属盐等)。在本发明一些具体实施例中,所述供体是光敏剂,

所述光敏剂可以是本领域已知的光敏剂,优选相对光稳定且不与单线态氧有效反应的化合物,其非限定性的例子包括例如美国专利US5709994(该专利文献在此全文引为参考)公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素等化合物,以及这些化合物的具有1-50个原子取代基的衍生物,所述取代基用于使得这些化合物更具有亲脂性或更具有亲水性、和/或作为连接至特异性结合配对物的连接基团。本领域技术人员已知的其他光敏剂的例子也可以在本发明中使用,例如美国专利US6406913中记载的内容,该专利文献并入本文以供参考。在本发明另一些具体实施例中,所述供体是化学活化的其他敏化剂,其非限定性的例子是某些化合物,它们催化过氧化氢转化为单线态氧和水。其他一些供体的例子包括:1,4-二羧基乙基-1,4-萘内过氧化物、9,10-二苯基蒽-9,10-内过氧化物等,加热这些化合物或者这些化合物直接吸收光会释放活性氧(例如单线态氧)。

[0075] 光敏剂一般通过照射含有上述反应物的介质来活化化学发光化合物。介质必须用具有一定的波长、且能量足以将光敏剂转化至激发态、进而使得它能够将分子氧活化为单线态氧的光照射。能够激发分子氧的光敏剂的激发态一般位于三重态,其比处于基态的光敏剂的能量高大约20Kcal/mol、通常至少23Kcal/mol。虽然可以使用较短的波长,如230-950nm,但是优选地,使用波长大约是450-950nm的光来照射介质。可以以任何传统方式,诸如照相、肉眼直观、光度计等,来测定产生的光,以便确定其与介质中分析物含量相关的量。光敏剂优选是相对非极性的,以确保可溶解到亲脂性成员中。

[0076] 可以选择光敏剂和/或化学发光化合物溶解在、或非共价地结合到颗粒的表面。在这种情况下,这些化合物优选是疏水性的,以降低它们从颗粒解离下来的能力,从而使两种化合物都能和相同的颗粒结合。

[0077] II. 具体实施方案

[0078] 下面将更详细地说明本发明。

[0079] 本发明所述试剂盒包括一种抗干扰剂,该抗干扰剂通过将能够与生物素分子特异性结合的活性分子作为“客体分子”,以恰当方式填充于载体之中,形成“介孔组装主客体”体系,从而使得本发明所述试剂盒避免了因游离生物素造成的假阳性或假阴性结果。

[0080] 本发明第一方面所涉及的抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒,其包括:

[0081] a). 抗干扰剂,其包括载体和活性分子,所述载体为多孔介质,所述活性分子填充于所述载体之中,并能够与生物素分子特异性结合;

[0082] b). 免疫分子,其能够与待测目标分子免疫结合;

[0083] c). 化学发光试剂。其中,“活性分子填充于载体之中”是指活性分子位于载体中的空隙中,可以与骨架接触,也可以与骨架不接触。

[0084] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够识别游离生物素分子和生物素结合物。在本发明中,“识别”可以是指抗干扰剂中的活性分子与游离生物素分子和/或生物素结合物通过分子间作用力的协同作用达到相互结合。

[0085] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述抗干扰剂能够选择性吸附游离生物素分子。

[0086] 在本发明的一些实施方式中,所述游离生物素分子能够扩散到所述载体中,并与其中的所述活性分子特异性结合。在本发明中,所述“扩散”可以是指由于分子的无规则运动而导致的游离生物素分子分散到载体中。

[0087] 在本发明的另一些实施方式中,所述抗干扰剂能够限制比所述活性分子尺寸更大的生物大分子进入其载体之中。

[0088] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够在液相反应体系中均匀分布。

[0089] 在本发明的一些实施方式中,所述载体满足以下条件中的至少一个:a)载体的内孔有足够大的表面积(远超载体表面积),并且空隙仅能让活性分子进入,但限制活性分子更大的蛋白质,比如抗体或大的抗原等;b)能将活性分子如SA或Avdin通过化学或物理吸附方法填充于载体中,例如空隙内部;c)载体能稳定地均匀分布在溶液(如水溶液)中,而不发生沉淀。

[0090] 在本发明的一些具体实施方式中,所述载体的内表面积大于其外表面积;优选地,所述载体的内表面积为其外表面积的5倍以上,优选为10倍以上,更优选为20倍以上。在本发明的一些优选实施方式中,所述载体的内表面积为其外表面积的倍数包括但不限于:5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、16倍、18倍、20倍、22倍、24倍、26倍、28倍或30倍。

[0091] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述载体的粒径为15-300nm,例如15nm、20nm、25nm、30nm、40nm、50nm、100nm、250nm、300nm等,优选为30-250nm,更优选为50-200nm。载体粒径过大,会造成载体沉降过快,不利于形成稳定的均匀溶液。

[0092] 在本发明的一些具体实施方式中,所述载体的比表面积为 $200\text{m}^2/\text{g}$ 以上,例如 $200\text{m}^2/\text{g}$ 、 $400\text{m}^2/\text{g}$ 、 $600\text{m}^2/\text{g}$ 、 $800\text{m}^2/\text{g}$ 、 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 、 $1200\text{m}^2/\text{g}$ 、 $1500\text{m}^2/\text{g}$ 等,优选为 $400\text{m}^2/\text{g}$ 以上,更优选为 $600\text{m}^2/\text{g}$ 以上,最优选为 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 以上。

[0093] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述载体的最小孔隙率大于40%,优选大于50%,更优选大于60%。

[0094] 在本发明的一些实施方式中,所述多孔介质选自多孔金属材料、多孔非金属材料和多孔高分子材料中的一种或多种。

[0095] 在本发明的另一些实施方式中,所述载体为介孔微球,优选为有序介孔微球。

[0096] 在本发明的一些实施方式中,所述介孔微球的孔径为2-50nm,例如2nm、5nm、10、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、50nm等,优选为4-30nm,更优选为5-15nm。

[0097] 在本发明的另一些实施方式中,所述介孔微球为笼状中空介孔微球。

[0098] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述介孔微球选自 Al_2O_3 介孔材料、 WO_3 介孔材料、 TiO_2 介孔材料、 ZrO_2 介孔材料、硅基介孔材料和/或介孔碳材料中的至少一种,优选选自硅基介孔材料。

[0099] 硅基介孔材料是一类由 $\text{SiO}_2(\text{CH}_2)_2$ 四面体结构单元所构成的周期性介孔物质。介孔二氧化硅材料从微观上可以分为两类:一类是以二氧化硅干凝胶和气凝胶类为代表的无序介孔固体。无序介孔二氧化硅宏观上可以是粉体,块体,片状或者薄膜。另一类是以MCM41为代表的有序介孔二氧化硅。有序介孔二氧化硅的结构特点是孔径大小均匀,按六方有序排列,介孔孔径可以在2-10nm之间可调。由于其孔壁较薄,硅基单元交流度不高,水热稳定性不好。其比表面积可达 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 。还有SBA系列,HMM系列,TUD系列,FSM系列,KIT系列,CMK系列,FDU系列,starbon等。其中SBA-15研究也较多,材料的水热稳定性比MCM系列要好。孔径在5-30nm可调。HMM是球形的介孔材料,其孔径是4-15nm,外径20-80nm可调。

[0100] 在本发明的一些实施方式中,所述活性分子选自亲和素和/或链霉亲和素。亲和素是一种糖蛋白,可由蛋清中提取,其分子量约60kD,每个分子由4个亚基组成,可以和4个生

物素分子亲密结合。所述亲和素包括但不限于：卵白亲和素、链亲和素、卵黄亲和素及类亲和素。链霉亲和素(SA)是与亲和素(A)有类似生物学特性的一种蛋白质,其是由 *Streptomyces avidin* 菌在培养过程中分泌的一种蛋白质产物,SA也可以通过基因工程手段生产。SA的分子量为65000,由4条序列相同的肽链构成,每条SA肽链可以结合1个生物素分子。因此与亲和素一样,每个SA分子也具有4个可与生物素分子结合位点,其结合常数与亲和素相同为 10^{15} mol/L。

[0101] 在本发明的另一些实施方式中,所述活性分子通过物理吸附方式填充于所述载体中。物理吸附也称范德华吸附,它是由吸附质和吸附剂分子间作用力所引起,此力也称作范德华力。

[0102] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述活性分子通过在含有缓冲液的体系中与载体接触而填充于所述载体之中。

[0103] 在本发明的一些具体实施方式中,所述含有缓冲液的体系的pH值为7至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,进一步优选7.3-7.6。

[0104] 在本发明的一些实施方式中,所述活性分子通过直接或间接化学交联的方式填充于所述载体之中。

[0105] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述载体内表面修饰有化学基团,所述活性分子通过与所述化学基团的共价偶联而填充于所述载体之中;其中,所述化学基团选自羧基、醛基、氨基、巯基和羟基中的一种或多种。

[0106] 在本发明的一些具体实施方式中,所述载体内表面连接有生物素分子,所述活性分子通过与生物素分子的特异结合作用而填充于所述载体之中。

[0107] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂还包括缓冲溶液,优选PBS缓冲溶液。

[0108] 在本发明的另一些实施方式中,所述载体以及填充在所述载体中的活性分子在抗干扰剂中的总浓度为5-50ug/mL,例如5ug/mL、10ug/mL、15ug/mL、20ug/mL、25ug/mL、30ug/mL、35ug/mL、40ug/mL、45ug/mL、50ug/mL等,优选8-30ug/mL,更优选10-20ug/mL。

[0109] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂的制备方法包括:步骤S1,使载体与活性分子进行接触;优选地,所述接触在第一缓冲液体系中进行。在上述方法的一些实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、9.0等。

[0110] 在上述方法的一些实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、9.0等。

[0111] 在上述方法的另外一些实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6等。

[0112] 根据一些具体实施方式,所述方法还包括步骤S0:用第二缓冲液体系将载体进行清洗,步骤S0在步骤S1之前进行。在上述方法的一些实施方式中,所述第二缓冲液体系的pH

值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、9.0等。在上述方法的另外一些实施方式中,所述第二缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6等。

[0113] 根据一些具体实施方式,所述方法还包括步骤S2:除去未填充到载体中的活性分子,步骤S2在步骤S1之后进行。优选地,通过向步骤S1处理后的载体中加入第三缓冲液体系,然后进行固液分离,以除去未填充到载体中的活性分子。

[0114] 在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在该实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值的示例包括7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、9.0等。在上述方法的另外一些实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。在该实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值的示例包括3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6等。

[0115] 在上述方法的一些实施方式中,所述第一缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂、3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。在上述方法的一些实施方式中,所述第二缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

[0116] 在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系还包含表面活性剂。根据一些实施例,所述表面活性剂包含选自吐温-20、Tween-80、Triton X-405、Triton X-100、BRIJ 35和Pluronic L64中的一种或多种。根据一些实施例,所述表面活性剂包含吐温-20。

[0117] 在上述方法的一些实施方式中,步骤S1中,所述接触的温度为0-50℃,优选20-40℃,例如25-30℃(即室温);和/或,接触的时间为6-24小时,优选为8-12小时,例如8小时、9小时、10小时、11小时、12小时等。在上述方法的一些另一些实施方式中,所述接触的温度为0-50℃,优选20-40℃,例如25-30℃(即室温);和/或,接触的时间为1-10小时,优选为2-6小时、例如2小时、3小时、4小时、5小时、6小时等。

[0118] 在上述方法的一些实施方式中,还包括步骤S3,加入第四缓冲体系。优选地,所述第四缓冲体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

[0119] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒还包括生物素结合物,其包括与生物素直接或间接结合且参与免疫反应的物质。

[0120] 在本发明的另一些实施方式中,所述生物素结合物为生物素结合抗体和/或生物素结合抗原。

[0121] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒为均相化学发光免疫分析试剂盒。

[0122] 在本发明的另一些实施方式中,所述试剂盒为包含固相载体的非均相化学发光免疫分析试剂盒。

[0123] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒包括以下组分:

[0124] 组分L,其包含固相载体以及与之直接结合或间接结合的第一免疫分子,所述第一免疫分子能够与待测目标分子的第一表位结合;

[0125] 组分M,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第二免疫分子,所述第二免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

[0126] 在本发明的另一些实施方式中,所述试剂盒包括以下组分:

[0127] 组分L,其包含固相载体以及与之直接结合或间接结合的第一免疫分子,所述第一免疫分子能够与待测目标分子的第一表位结合;

[0128] 组分M,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第一化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第二免疫分子,所述第二免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠;

[0129] 组分N,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第二化学发光试剂以及与之直接结合或间接结合的第三免疫分子,所述第三免疫分子能够与待测目标分子的第二表位结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

[0130] 在本发明的一些实施方式中,所述固相载体选自磁性微球、塑料微球、塑胶微粒、微孔板、玻璃、毛细管或尼龙;优选选自磁性微球。

[0131] 在本发明的另一些实施方式中,所述磁性微球的粒径0.05-50微米;优选0.1-40微米;更优选5-20微米。

[0132] 在本发明的一些实施方式中,所述标记物为化学发光标记物,所述化学发光试剂选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯及其衍生物、金刚烷、稀土元素或联吡啶钌配合物。

[0133] 在本发明的另一些实施方式中,所述化学发光试剂为化学发光催化剂,所述化学发光催化剂选自辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

[0134] 在本发明的一些实施方式中,所述第一免疫分子与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述固相载体与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第一抗体或其结合片段与生物素结合,而所述固相载体与链霉亲和素结合。

[0135] 在本发明的另一些实施方式中,所述第二抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述化学发光试剂与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第二抗体或其结合片段与生物素结合,而所述化学发光试剂与链霉亲和素结合。

[0136] 本发明第二方面涉及一种如本发明第一方面所述的试剂盒在生物素-链霉亲和素系统检测中的应用;优选地在甲状腺功能检测中的应用;进一步优选地在三碘甲状腺原氨酸和/或四碘甲状腺原氨酸检测中的应用。

[0137] III. 实施例

[0138] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例来进一步详细说明本发明,这些实施例仅起说明性作用,并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无

特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0139] 试剂和仪器:

[0140] SA (Sigma Aldrich公司), 羧基官能团化的硅基微球 (粒径15-200nm, 孔径2-15nm, Sigma Aldrich公司), 磷酸盐缓冲液 (0.02M PBS, pH 7.4), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDAC (Thermo fisher), Tween-20, 0.1M MES缓冲液 (pH 6.0), 生物素 (D-biotin), ProteinG亲和柱 (GE公司), 去激素血清, 三碘甲状腺原氨酸 (T3) 检测试剂盒 (博阳生物科技(上海)有限公司), 光激化学发光分析系统通用液 (感光珠溶液/链霉亲和素标记的供体溶液)。LiCA HT (博阳生物科技(上海)有限公司), 日立高速冷冻离心机等。

[0141] 物理吸附方式制备本发明的抗干扰剂

[0142] 实施例1

[0143] 第一步, 2mL离心管中, 取10mg羧基官能团化的硅基微球 (粒径15nm, 孔径2nm), 加入0.02M PBS (pH 7.4) 的缓冲液, 4°C离心10000rpm, 15min清洗一次。

[0144] 第二步, 加入200uL PBS缓冲液超声分散均匀, 再加入150uL 10mg/mL SA的水溶液, 补充PBS缓冲液至微球反应浓度20mg/mL, 室温搅拌过夜。

[0145] 第三步, 用含有0.5% Tween-20的0.02M PBS (pH 7.4) 缓冲溶液将SA微球离心, 4°C离心10000rpm, 15min, 清洗三次, 去除未吸附的SA, 最后用0.02M PBS (pH 7.4) 缓冲液定容至10mg/mL。

[0146] 实施例2-7

[0147] 制备方法同实施例1, 区别在于各实施例采用了不同粒径和/或孔径的羧基官能团化的硅基微球 (参见表1)。

[0148] 共价偶联方式制备本发明的抗干扰剂

[0149] 实施例8 (共价偶联方式)

[0150] 第一步, 2mL离心管中, 取10mg羧基官能团化的硅基微球, 用0.1M MES (pH 6.0) 的缓冲溶液, 4°C离心10000rpm, 15min清洗一次。

[0151] 第二步, 加入200uL 0.1M MES (pH 6.0) 缓冲液超声分散均匀, 再加入150uL 10mg/mL SA的水溶液, 接着加入100uL 10mg/mL EDAC (0.1M MES) 溶液, 室温搅拌4h。

[0152] 第三步, 用含有0.5% Tween-20的0.02M PBS (pH 7.4) 缓冲溶液将SA微球离心清洗三次, 去除未吸附的SA, 最后用PBS缓冲液定容至10mg/mL。

[0153] 实施例9: 本发明抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒的效果评价一

[0154] 实验步骤:

[0155] 1. 添加T3浓溶液于去激素血清中, 配制成浓度为1nmol/L、2nmol/L的T3溶液。

[0156] 2. 配制感光珠溶液40ug/mL, 采用实施例1-7中制备的抗干扰剂配制不同浓度的溶液 (用PBS稀释), 见表1。

[0157] 3. 添加生物素于上述T3溶液中, 配制成生物素浓度分别为0, 128ng/ml的样本溶液。

[0158] 4. 加入25uL样本溶液, 再依次加入T3试剂盒中的试剂一 (含有二碘甲状腺氨酸包被的受体溶液) 和试剂二 (含有生物素标记的抗三碘甲状腺原氨酸抗体溶液) 各25uL (按反应模式手工加入25uL样本溶液及25uL试剂一和25uL试剂二), 再按照如下表1加入25uL步骤2制备的抗干扰剂溶液, 其中条件1、2不加入抗干扰剂。

- [0159] 5.放入LICA HT中,进行第一阶段温育:37℃温育17min。
 [0160] 6.手工加入175ul通用液(含有链霉亲和素标记的供体)。
 [0161] 7.进行第二阶段温育:37℃温育15min,温育后得到相应的待测样品。
 [0162] 8.利用能量激发上述待测样品并对产生的发光信号读数。读数结果参见表2和3。
 [0163] 表1
 [0164]

载体信息					生物素 浓度
编号	粒径	孔径	浓度	比表面积	
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	128ng/mL
3 (实施例 1)	15 nm	2nm	5 ug/mL	200 m ² /g	128ng/mL
4 (实施例 2)	50 nm	5nm	5 ug/mL	400 m ² /g	128ng/mL
5 (实施例 3)	50 nm	10nm	5 ug/mL	600 m ² /g	128ng/mL
6 (实施例 4)	50 nm	10nm	10ug/mL	600 m ² /g	128ng/mL
7 (实施例 5)	100nm	10nm	10 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
8 (实施例 5)	100nm	10nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
9 (实施例 6)	150 nm	15nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
10 (实施例 7)	200 nm	15nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL

- [0165] 表2 表3

1nmol/L T3,T3 试剂盒 1701		
感光珠溶液 40 ug/mL		
编号	信号	偏差
1	242378	
2	25680	-89%
3	26755	-89%
4	64327	-73%
5	113522	-53%
6	179467	-26%
7	229875	-5%
8	220986	-9%
9	178621	-26%
10	144351	-40%

2nmol/L T3,T3 试剂盒 1701		
感光珠溶液 40 ug/mL		
编号	信号	偏差
1	138706	
2	9322	-93%
3	10026	-93%
4	36707	-74%
5	45006	-68%
6	98670	-29%
7	132557	-4%
8	124205	-10%
9	102145	-26%
10	92205	-34%

- [0166] 数据分析:
 [0167] 当T3浓度为1nM、生物素浓度为128ng/mL时,化学发光免疫反应的信号下跌89%,生物素干扰较严重。加入孔径2nm的微球(表1中的序号3)时,发光信号几乎无明显变化,当

采用粒径50nm,孔径5nm,10nm(表1中的序号4和5)时,发光信号出现一定的提升,下跌幅度50%-70%。

[0169] 当粒径和孔径不变时,提高抗干扰剂的浓度至10ug/mL(表1中的序号5和6对比),发光信号进一步提升,下跌幅度25%左右。当孔径10nm,浓度10ug/ml,增大微球粒径至100nm(表1中的序号6和7)时,下跌幅度偏差10%以内,生物素干扰现象消失。当浓度提高至20ug/ml(表1中的序号7和8)时,信号下跌偏差10%以内。当浓度20ug/mL不变,增大粒径和孔径时,信号出现一定程度下跌,下跌幅度20%-40%。

[0170] 实验结论:

[0171] 当本发明所述试剂盒包括的抗干扰剂为,填充SA(链霉亲和素)的微球粒径100nm,孔径10nm,浓度10-20ug/mL时,所述试剂盒的抗生物素干扰能力最强。当所添加的抗干扰剂的孔径较小,2nm时,所述试剂盒无抗生物素干扰能力。当所添加的抗干扰剂的粒径大于100nm,孔径10nm,继续增大粒径和孔径时,所述试剂盒的抗生物素干扰能力会下降。

[0172] 实施例10:本发明抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒的效果评价二实验步骤:

[0173] 1.添加T3浓溶液于去激素血清中,配制成浓度为1nmol/L、2nmol/L的T3溶液。

[0174] 2.配制感光珠溶液40ug/mL,采用实施例5和8中制备的抗干扰剂配制不同浓度的溶液(用PBS稀释),见表4(用PBS稀释)10ug/mL、20ug/mL。

[0175] 3.添加生物素于上述T3溶液中,配制成生物素浓度分别为0、128ng/ml的样本溶液。

[0176] 4.加入25uL样本溶液,再依次加入T3试剂盒中的试剂一和试剂二各25uL按反应模式手工加入25uL样本溶液及25uL试剂一和25uL试剂二),再按照如下表格加入25uL步骤2中制备的抗干扰剂溶液,条件1和2不加入抗干扰剂。

[0177] 5.放入LICA HT中,进行第一阶段温育:37°C温育17min。

[0178] 6.手工加入175uL感光珠溶液。

[0179] 7.进行第二阶段温育:37°C温育15min,温育后得到相应的待测样品。

[0180] 8.利用能量激发上述待测样品和并对产生的发光信号读数。读数结果参见表5和6。

[0181] 表4

[0182]

载体信息					生物素 浓度	结合方式
编号	粒径	孔径	浓度	比表面积		
1	0	0	0	0	0	-
2	0	0	0	0	128ng/mL	-
3 (实施例 5)	100nm	10nm	10 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL	物理
4 (实施例 5)	100nm	10nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL	吸附
5 (实施例 8)	100nm	10nm	10 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL	共价
6 (实施例 8)	100nm	10nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL	偶联

[0183] 表5 表6

1nmol/L T3 ,T3 试剂盒 1701 感光珠溶液 40 ug/mL		
编号	信号	偏差
1	258459	
2	25368	-90%
3	239848	-7%
4	231546	-10%
5	139665	-46%
6	172236	-33%

2nmol/L T3 ,T3 试剂盒 1701 感光珠溶液 40 ug/mL		
编号	信号	偏差
1	137715	
2	9744	-93%
3	131026	-5%
4	122596	-11%
5	75305	-45%
6	98424	-29%

[0184] 数据分析:

[0186] 从表4中的序号3和5对比,物理吸附方式制备的抗干扰剂的抗生物素干扰能力强,发光信号下跌10%左右,共价偶联方式制备的抗干扰剂的发光信号下跌50%左右。表4中的序号4和6对比,物理吸附方式制备的抗干扰剂的抗生物素干扰能力也优于共价偶联的方式制备的抗干扰剂。

[0187] 实验结论:

[0188] 对于相同粒径,孔径,浓度,比表面积,包括物理吸附方式制备的抗干扰剂的化学发光免疫分析试剂盒的抗生物素干扰能力优于包括共价偶联的方式制备的抗干扰剂的化学发光免疫分析试剂盒。

[0189] 实施例11:游离甲状腺素(T4)磁微粒化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法

[0190] 一、试剂盒的组分

[0191] 1) 链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,

[0192] 2) 碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物,

[0193] 3) 生物素标记的甲状腺素抗体,

[0194] 4) 测试稀释液,

[0195] 5) 甲状腺素校准品,

[0196] 6) 甲状腺素质控品,

[0197] 7) 抗干扰剂。

[0198] 二、试剂盒的制备

[0199] (1) 碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入甲状腺素衍生物(T4-NHS),在温度为4℃-37℃的条件下反应0.5-24小时,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化酶标抗体,得到甲状腺素酶结合物,将甲状腺素酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,所述稀甲状腺素酶结合物与酶标记物缓冲液释比例为1:400-1:2000,优选的稀释比例为1:1000。

[0200] (2) 生物素标记的甲状腺素抗体制备方法:将甲状腺素抗体(小鼠,单克隆)加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入生物素衍生物,在温度为4℃-37℃的条件下反应0.5-24小时,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到甲状腺素生物素结合物,将甲状腺素生物素稀释于生物素标记物缓冲液中,所述甲状腺素生物素与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:200~1:1000,优选的稀释比例为1:500。

[0201] (3) 甲状腺素校准品的制备方法:用校准品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为0,8.00,15.00,30.00,60.00,100.00pmol/L。

[0202] (4) 甲状腺素质控品的制备方法:用质控品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为15.00,60.00pmol/L。

[0203] (5) 组装:将上述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物、生物素标记的甲状腺素抗体、甲状腺素校准品、甲状腺素质控品组装成盒,于2-8℃条件下保存。

[0204] 实施例12:游离甲状腺素(T4)磁微粒化学发光免疫分析试剂盒的效果评价

[0205] 一、采用的试剂盒

[0206] (1) 实施例11中所述试剂盒

[0207] (2) 对比试剂盒:不含有抗干扰剂,其余与实施例11中所述试剂盒相同。

[0208] 二、评价方法

[0209] (1) 添加T4浓溶液于去激素血清中,配制成浓度为1nmol/L、2nmol/L的T4溶液。加生物素于上述T4溶液中,配制成生物素浓度分别为0、128ng/ml的样本溶液。

[0210] (2) 加样和孵育过程:吸取游离甲状腺素校准品、质控品或样本溶液25uL加入反应管中,然后加入碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物50uL和生物素标记的甲状腺素抗体25uL,以及抗干扰剂25uL(10ug/mL),7℃孵育反应10分钟;然后加入链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液25uL,37℃孵育反应10分钟;

[0211] (3) 磁分离清洗过程:将孵育反应完成后的反应管放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第一次加入磁珠包被物缓冲液150uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第二次加入磁珠包被物缓冲液150uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第三次加入磁珠包被物缓冲液150uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;

[0212] (4) 发光过程:加入Lumi-Phos 530底物液(采购于美国Lumigen公司)50uL,37℃避光孵育5分钟后,用自动化学发光仪测量发光值。检测结果如表7和表8所示。其中表格中的条件1和2采用的是对比试剂盒,其不加抗干扰剂。

[0213] 表7 表8

1nmol/L T4,T4 试剂盒			2nmol/L T4,T4 试剂盒		
编号	信号	偏差	编号	信号	偏差
1	1235841		1	635841	
2	256384	-79%	2	146384	-77%
3	1186523	-4%	3	606523	-5%
4	1057745	-14%	4	557745	-12%
5	635588	-49%	5	305588	-52%
6	898510	-27%	6	488510	-23%

[0214] 从上述结果可知,含有抗干扰剂的试剂盒的效果明显优于不含有抗干扰剂的试剂盒。

[0215] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

[0216] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

专利名称(译)	一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN111122845A	公开(公告)日	2020-05-08
申请号	CN201811458647.3	申请日	2018-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
[标]发明人	金鑫 赵卫国 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
发明人	章春奇 金鑫 赵卫国 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
代理人(译)	刘建军		
优先权	201811288959.4 2018-10-31 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及化学发光免疫分析技术领域的一种抗生物素干扰的化学发光免疫分析试剂盒及其应用。所述试剂盒包括：a).抗干扰剂，其包括载体和活性分子，所述载体为多孔介质，所述活性分子填充于所述载体之中，并能够与生物素分子特异性结合；b).免疫分子，其能够与待测目标分子免疫结合；c).化学发光试剂。本发明所述试剂盒包括一种抗干扰剂，该抗干扰剂通过将能够与生物素分子特异性结合的活性分子作为“客体分子”，以恰当方式填充于载体之中，形成“介孔组装主客体”体系，从而使得本发明所述试剂盒避免了因游离生物素造成的假阳性或假阴性结果。

编号	载体信息				生物素
	粒径	孔径	浓度	比表面积	浓度
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	128ng/mL
3 (实施例 1)	15 nm	2nm	5 ug/mL	200 m ² /g	128ng/mL
4 (实施例 2)	50 nm	5nm	5 ug/mL	400 m ² /g	128ng/mL
5 (实施例 3)	50 nm	10nm	5 ug/mL	600 m ² /g	128ng/mL
6 (实施例 4)	50 nm	10nm	10ug/mL	600 m ² /g	128ng/mL
7 (实施例 5)	100nm	10nm	10 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
8 (实施例 5)	100nm	10nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
9 (实施例 6)	150 nm	15nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
10 (实施例 7)	200 nm	15nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL