



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109884318 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201910214084.1

(22)申请日 2019.03.20

(71)申请人 杭州博谱医药科技有限公司

地址 311121 浙江省杭州市余杭区仓前街
道龙潭路8号1幢105室

(72)发明人 王轶雄 杨晓东 缪刘 曹静

(74)专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公
司 33109

代理人 尉伟敏

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种均相酶免疫偶联物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及均相酶免疫检测技术领域,尤其涉及一种小分子半抗原与酶在偶联剂的作用下脱水得到的偶联产物。首先将小分子半抗原溶解于磷酸盐缓冲液中;然后向上述小分子半抗原溶液中加入偶联剂、酶以及蛋白质反应得到均相酶免疫偶联物。本发明克服了现有技术中通过均相酶免疫法测定血清中特定抗原抗体的过程中使用的酶偶联物容易受到个体健康状况影响,导致测试结果可靠性不足以及偶联效率较低的缺陷,本发明具有降低个体健康状况对测试的干扰,提高测试结果可靠性;酶以及蛋白质与小分子半抗原在偶联剂的作用下直接结合,无需其它桥连分子,偶联效率高且反应条件温和;所制得的酶偶联物水溶性好,酶活力损失较小等优点。

1. 一种均相酶免疫偶联物, 其特征在于, 所述的均相酶免疫偶联物为小分子半抗原与酶及蛋白质在偶联剂的作用下脱水得到的偶联产物。

2. 根据权利要求1所述的一种均相酶免疫偶联物, 其特征在于, 所述的小分子半抗原为甘胆酸或3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸中的一种; 所述的酶为苹果酸脱氢酶或者甲酸脱氢酶中的一种; 所述的蛋白质为牛血清白蛋白、卵白蛋白、血蓝蛋白、卵清蛋白或多聚赖氨酸中的一种; 所述的偶联剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐或二环己基碳二亚胺中的一种或两种组合物。

3. 一种如权利要求1~2中所述的均相酶免疫偶联物的制备方法, 其特征在于, 所述的制备方法具体步骤如下:

(S.1) 将小分子半抗原溶解于磷酸盐缓冲液中, 得到小分子半抗原溶液;

(S.2) 向上述小分子半抗原溶液中加入酶以及蛋白质, 搅拌混合后再加入偶联剂, 继续搅拌反应得到反应液;

(S.3) 将反应得到的反应液进行透析纯化, 得到均相酶免疫偶联物。

4. 根据权利要求3所述的一种均相酶免疫偶联物的制备方法, 其特征在于, 所述的步骤(S.1)中的磷酸盐缓冲液的pH值为6~8, 所述的磷酸盐缓冲液中还添加有一定的有机溶剂, 所述的有机溶剂为甲醇、二甲亚砷或者N, N-二甲基甲酰胺中的一种。

5. 根据权利要求3所述的一种均相酶免疫偶联物的制备方法, 其特征在于, 所述的步骤(S.2)中蛋白质的质量与小分子半抗原的质量之比为(0.5~2): 20。

6. 根据权利要求3或5所述的一种均相酶免疫偶联物的制备方法, 其特征在于, 所述的步骤(S.2)中小分子半抗原与酶的质量之比为20:(1~6), 小分子半抗原与偶联体系之间的质量比为1:(0.8~2)。

7. 根据权利要求6所述的一种均相酶免疫偶联物的制备方法, 其特征在于, 所述的步骤(S.2)中搅拌混合时间为10~30min, 搅拌反应条件为避光2~8℃或室温反应2~8h。

8. 根据权利要求3一种均相酶免疫偶联物的制备方法, 其特征在于, 所述的步骤(S.3)中透析袋的通透分子大小<14KD, 透析温度为4℃, 6小时换液1次, 连续6~8次。

9. 一种如权利要求1~2中所述的均相酶免疫偶联物在均相酶免疫检测试剂体系中应用。

一种均相酶免疫偶联物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及均相酶免疫检测技术领域,尤其涉及一种均相酶免疫偶联物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 均相酶免疫技术是一种基于液相均相反应体系的竞争性免疫测定技术,该技术基于抗原-抗体反应原理,即酶标记的半抗原与其对应的抗体结合后产生空间位阻抑制酶活力,而当样本中含有游离的小分子半抗原时,其将与酶标记的半抗原竞争性结合抗体,与抗体结合的酶标记半抗原将得到释放,其活力也将增强,通过建立吸光值与待测物校准品浓度的标准曲线,计算未知样本的含量。该方法反应灵敏度高、特异性强;且因为是均相酶促反应体系,既避免了抗原、抗体分离对结果的影响,同时反应可以在较短时间内达到平衡,利用全自动生化分析仪可实现样本的快速高通量检测。

[0003] 血清甘胆酸(Cholyglycine,CG)是胆酸与甘氨酸结合而成的结合型胆酸之一。当肝细胞受损时,肝细胞摄取CG能力下降,致使血中CG含量增高;胆汁郁滞时,肝脏排泄胆酸发生障碍,而返流血液循环的CG含量增高,也使血CG含量增高。因此,测定血清甘胆酸水平是评价肝细胞功能及其肝胆系物质循环功能的敏感指标之一。

[0004] 甘胆酸也是妊娠晚期血清中最主要的胆汁酸组分,随着CG值的升高程度不同,对母婴有着不同程度的损伤,且CG值越高危害越大。孕妇血清CG水平由于妊娠期胎盘合成和分泌大量雌激素和孕激素以及代谢负荷增大,可能诱发肝胆系统的变化,使孕妇易患妊娠肝内胆汁淤积症(ICP),随ICP患者血清CG增高使羊水污染率、早产率、胎儿宫内窘迫率及剖宫产率增高,甘胆酸增高10倍以上,这些危险进一步增加。因此,测定孕妇血清甘胆酸水平对于及早发现ICP,降低胎儿宫内窘迫、早产等风险具有重要意义。

[0005] 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸(CMPF)是一种内源性的呋喃脂肪酸代谢产物,是主要的尿毒症毒素之一,属于蛋白结合类毒素。近期的一些临床研究结果表明:血清中CMPF水平在妊娠糖尿病(GDM)、糖耐量受损(IGT)、2型糖尿病(T2DM)患者中明显偏高。Shan Zhang 等(Shan Zhang et al.Circulating 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid(CMPF) levels are associated with hyperglycemia and β cell dysfunction in a Chinese population.Scientific Reports 7:3114.)研究表明,在糖尿病前期及2型糖尿病一级亲属人群组血浆中,CMPF水平也出现明显偏高。Kacey J.Prentice等(Kacey J.Prentice.et al.The furan fatty acid metabolite CMPF is elevated in diabetes and induces beta cell dysfunction.J.Cell Metab.2014.19, 653-666.)研究表明: CMPF 通过作用于 β -细胞,从而导致线粒体功能异常,降低葡萄糖诱导的ATP的累积,诱导氧化应激反应,导致关键转录因子调节异常,最终降低胰岛素的生物合成。Liu Ying等(Liu Ying et al.Rapid elevation in CMPF may act as a tipping point in diabetes development.Cell Rep,2016, 14(12):2889-2900.)研究也表明: CMPF会降低葡萄糖刺激的胰岛素分泌,增加活性氧的形成,加速 β -细胞功能紊乱,加速糖尿

病的形成。因此, CMPF水平的检测对于及早预防及检测糖尿病具有重要意义。

[0006] 目前, 血清中肝胆酸的检测主要有: 放射免疫分析法 (RIA)、化学发光免疫分析法 (CLIA)、酶联免疫吸附法 (ELISA) 等。而检测血清中 CMPF 含量所公开的方法较少, 目前研究者大都采用高效液相色谱及质谱法来检测其含量, 但该方法需用到高端精密仪器。近年来对这两种化合物也有使用均相酶免疫法, 但包括本公司已经公开的发明在内 (例如授权公告号: CN 106226512B), 大都使用的是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 该酶在人体内本身含量较高, 且其活力受个体健康状况影响较大, 因而测试时血清中本身存在的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶对结果可能产生干扰, 导致测试结果可靠性不足。同时葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在反应过程中酶活力损失较大, 导致偶联效率相对较低。

发明内容

[0007] 本发明是为了克服现有技术中通过均相酶免疫法测定血清中特定抗原抗体的过程中使用的酶偶联物容易受到个体健康状况影响, 导致测试结果可靠性不足, 同时偶联效率较低的缺陷, 提供了一种能够避免人体中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶对结果可能产生的干扰, 提高结果的可靠性, 同时提高合成过程中偶联效率的均相酶免疫偶联物及其制备方法。

[0008] 为实现上述发明目的, 本发明通过一下技术方案实现:

一种均相酶免疫偶联物, 所述的均相酶免疫偶联物为小分子半抗原与酶及蛋白质在偶联剂的作用下脱水得到的偶联产物。

[0009] 作为优选, 所述的小分子半抗原为甘胆酸或3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸中的一种; 所述的酶为苹果酸脱氢酶或者甲酸脱氢酶中的一种; 述的步骤 (S.2) 中的蛋白质为牛血清白蛋白 (BSA)、卵白蛋白、血蓝蛋白 (KLH)、卵清蛋白 (OVA) 或多聚赖氨酸中的一种; 所述的偶联剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 或二环己基碳二亚胺 (DCC) 的一种或两种组合物。

[0010] 本发明中用于与小分子半抗原偶联的酶为苹果酸脱氢酶 (MDH)、甲酸脱氢酶 (FDH), 其在人体中的含量相对较少, 且其在人体中的含量较为稳定, 因此在测试血清过程中, 不会对结果产生干扰, 使得结果的可靠性大大提升。同时, 该两种酶在与本发明中的小分子半抗原甘胆酸 (CG) 或者3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸 (CMPF) 偶联时的效率相较于传统的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶而言更高。本发明所使用的小分子化合物 (CG、CMPF) 可与蛋白质载体结合, 最终经分离纯化可获得CG或CMPF的特异性抗体。该特异性抗体可与上述合成的酶偶联物, 根据均相酶免疫法的原理, 构建CG或CMPF的检测试剂体系。因此, 本发明无论在测试结果的稳定性以及合成效率上其表现均优于现有技术, 具有明显的技术进步以及创造性。

[0011] 一种均相酶免疫偶联物的制备方法, 所述的制备方法具体步骤如下:

(S.1) 将小分子半抗原溶解于磷酸盐缓冲液中, 得到小分子半抗原溶液;

(S.2) 向上述小分子半抗原溶液中加入酶以及蛋白质, 搅拌混合后再加入偶联剂, 继续搅拌反应得到反应液;

(S.3) 将反应得到的反应液进行透析纯化, 得到均相酶免疫偶联物。

[0012] 本发明中的均相酶免疫偶联物的制备方法制备工艺较为简单, 通过具有游离氨基 (-NH₂) 或者羧基 (-COOH) 的酶与含有游离氨基 (-NH₂) 或者羧基 (-COOH) 的小分子半抗原及

酶在偶联剂的作用下,氨基(-NH₂)与羧基(-COOH)脱水形成酰胺键(-NH-CO-),实现酶与小分子的结合。且反应后处理简单,仅仅需要进行经过透析或切向流过滤处理即可得到较纯的酶偶联物。

[0013] 作为优选,所述的步骤(S.1)中磷酸盐缓冲液的pH值为6~8,所述的磷酸盐缓冲液中还添加有一定的有机溶剂,所述的有机溶剂为甲醇、二甲亚砜或者N,N-二甲基甲酰胺中的一种。

[0014] 本发明中制得的均相酶免疫偶联物中,酶的活性在其之后的应用中有着极其重要的作用,本发明中的磷酸盐缓冲液的pH值在6~8之间,能够防止本发明中的酶不会因为过度的酸或碱而发生部分失活或者完全失效的现象,保证了其在后续应用中的活性。此外,由于本发明中的某些特定小分子半抗原(例如3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸)其在磷酸盐缓冲液中的溶解性有限,因而需要加入一定量的有机溶剂助溶,保证各反应物之间的偶联顺利进行,从而提升反应时的偶联效率。

[0015] 作为优选,所述的蛋白质的质量与小分子半抗原的质量之比为(0.5~2):20。

[0016] 作为优选,所述的步骤(S.2)中小分子半抗原与酶的质量之比为20:(1~6),小分子半抗原与偶联剂之间的质量比为1:(0.8~1.5)。

[0017] 作为优选,所述的步骤(S.2)中搅拌混合时间为10~30min,搅拌反应条件为避光2~8℃反应2~8h。

[0018] 作为优选,所述的步骤(S.3)中透析袋的通透分子大小<14KD,透析温度为4℃,6小时换液1次,连续6~8次。

[0019] 一种如前所述的均相酶免疫偶联物在均相酶免疫检测试剂体系中应用。

[0020] 本发明所合成的酶标抗原可与相对应的抗体发生特异性的结合,通过均相酶免疫法检测反应前后酶活力的变化,可以实现对人血清样本中CG、CMPF等浓度水平的测试。

[0021] 因此,本发明具有以下有益效果:

(1) 本发明采用人体中含量较少且相对稳定的酶作为反应物,降低了可能产生干扰的概率,提高了结果的可靠性;

(2) 本发明中的酶与小分子在偶联剂的作用下直接结合,无需其它桥连分子,偶联效率高且反应条件温和;

(3) 所制得的酶偶联物水溶性好,且反应过程中酶活力损失较小。

附图说明

[0022] 图1为本发明实施例7中定标结果测试图。

[0023] 图2为本发明实施例8中定标结果测试图。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明做进一步描述,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。

[0025] 本发明各实施例中的部分原料以及原料生产厂家如下表1所示,但其仅仅表示个例,基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0026] 表1

名称	CAS号	购买厂家
甘胆酸钠	863-57-0	阿拉丁
EDC	25952-53-8	阿拉丁
NHS	6066-82-6	苏州亚科
MDH	9001-64-3	Roche
FDH	9028-85-7	Roche
CMPF	86879-39-2	TRC

[0027] 实施例1

CG-MDH:称甘胆酸钠(200mg)溶于20mL pH 7.6,100mM的磷酸盐缓冲液中,称15mg血蓝蛋白(KLH)以及苹果酸脱氢酶MDH(10mg),溶解于pH7.6,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌10分钟,再加入160mg水溶性1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)粉末,2℃避光温和搅拌120分钟,反应结束后,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续6次,即可得到所需的酶偶联物CG-MDH。

[0028] 实施例2

CG-MDH:称甘胆酸钠(200mg)溶于20mL pH 7.6,100mM的磷酸盐缓冲液中,称10mg牛血清白蛋白(BSA)及MDH(30mg),溶解于pH7.6,100mM的磷酸盐缓冲液中,8℃搅拌15分钟,再加入200mg水溶性1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)粉末,室温避光温和搅拌180分钟,反应结束后,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续6次,即可得到所需的酶偶联物CG-MDH。

[0029] 实施例3

CG-FDH:称甘胆酸钠(200mg)溶于20mL pH 7.6,100mM的磷酸盐缓冲液中,称5mg血蓝蛋白(KLH)及FDH(50mg),溶解于pH6,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌15分钟,再加入250mg水溶性二环己基碳二亚胺粉末(DCC),2℃避光温和搅拌8h,反应结束后,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续8次,即可得到所需的酶偶联物CG-FDH。

[0030] 实施例4

CMPF-FDH:称取CMPF(100mg),用10mL二甲亚砜溶解,称10mg多聚赖氨酸(德国Roche公司)及甲酸脱氢酶FDH(30mg)溶解于pH7.2,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌30分钟,再加入125mg水溶性1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)粉末及75mg水溶性二环己基碳二亚胺粉末(DCC),室温避光温和搅拌360分钟,反应结束后,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续6次,即可得到所需的酶偶联物CMPF-FDH。

[0031] 实施例5

CMPF-MDH:称取CMPF(100mg),用10mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,称10mg卵清蛋白(OVA)及MDH(25mg)溶解于pH8,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌20分钟,再加入150mg水溶性二环己基碳二亚胺(DCC)粉末,室温避光温和搅拌5h,反应结束后,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续7次,即可得到所需的酶偶联物CMPF-MDH。

[0032] 实施例6

CMPF-FDH:称取CMPF (100mg),用10mL甲醇溶解,称8mg多聚赖氨酸(德国Roche公司)以及FDH (25mg)溶解于pH8,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌20分钟,再加入200mg 水溶性1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),室温避光温和搅拌5h,反应结束后,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续7次,即可得到所需的酶偶联物CMPF-FDH。

[0033] 实施例1~6中合成得到的酶偶联物CG-MDH、酶偶联物CMPF-FDH、酶偶联物 CMPF-MDH及酶偶联物CG-FDH可以用于测定血清中CG或CMPF的含量。

[0034] 血清CG及CMPF测定的具体实施方案如下:

实施例7

血清CG的测试采用苹果酸脱氢酶法进行。

[0035] 试剂R1:三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)缓冲液50mM,pH6.8;甘胆酸抗体5mg/L(杭州博谱医药科技有限公司),0.05%吐温20,0.1%PC-300,0.8%NaCl,1mM NAD。

[0036] 试剂R2:三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)缓冲液50mM,pH6.8;甘胆酸-MDH偶联物(酶偶联物CG-MDH)100U/L(实施例1以及实施例2中制备得到),0.05%吐温20,0.1%PC-300,0.5%BSA。

[0037] 标准液配制:精确称取美国Sigma公司甘氨胆酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于12.5 mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/L BSA;甘氨胆酸浓度为80 μg/mL,然后再用内含5g/L BSA,50mM三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)缓冲液作倍比稀释为40 μg/mL、20μg/mL、10μg/mL、2.5μg/mL、1.25μg/mL和0μg/mL等。

[0038] 质控品配制:精确称取美国Sigma公司甘氨胆酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于6.25 mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/L BSA;甘氨胆酸浓度为160 μg/mL,然后再用健康人新鲜血清作1:8和1:32稀释,即甘氨胆酸浓度分别为20μg/mL和5 μg/mL。

[0039] 检测步骤:

反应类型:速率法 温度:37℃ 比色杯光径:0.6cm

主/副波长:340nm/405nm 单位:U/ml 反应方向:上升

	空白管(B)	标准管(S)	测定管(T)	质控管
试剂 R1	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
纯化水	10 μ L			
标准液		10 μ L		
样品			10 μ L	
质控品				10 μ L
混匀, 37℃孵育 3-5 分钟,				
试剂 R2	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L

混匀, 37℃延迟 30 秒, 反应 5 分钟, 读取吸光度 $\Delta A/\text{min}$ 。

[0040] 结果确定:

计算校准品吸光度的差值(A校准-A空白), 建立合适的数学模(非线性)如Logit-Log等, 拟合成多点定标的校准曲线。根据校准曲线的反应变化幅度、线性范围、相关系数和反应可重复性确定血清甘氨酸含量, 其定标结果如图1所示。

[0041] 血清CMPF测试采用甲酸脱氢酶法进行。

[0042] 试剂R1: 磷酸盐缓冲液50mM, pH6.8; CMPF抗体5mg/L (杭州博谱医药科技有限公司), 0.05%吐温80, 0.1%PC-300, 0.8%NaCl, 1mM NAD。

[0043] 试剂R2: 磷酸盐缓冲液50mM, pH 7.0; CMPF-FDH偶联物100U/L (实施例4以及实施例6中制备得到), 0.05%吐温80, 0.1%PC-300, 0.5%BSA。

[0044] 标准液配制: 精确称取CMPF (纯度99%) 1.000mg溶解于12.5mL磷酸盐缓冲液50mM, pH6.8, 内含5g/L BSA; CMPF浓度为80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 然后再用内含5g/L BSA, 50mM的磷酸盐缓冲液作倍比稀释为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等。

[0045] 质控品配制: 精确称取CMPF (纯度99%) 1.000mg溶解于6.25mL磷酸盐缓冲液50mM, pH6.8, 内含5g/L BSA; CMPF浓度为160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 然后再用健康人新鲜血清作1:8和 1:32稀释, 即CMPF浓度分别为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0046] 检测步骤:

反应类型: 速率法 温度: 37℃ 比色杯光径: 0.6cm

主/副波长: 340nm/405nm 单位: U/ml 反应方向: 上升

	空白管(B)	标准管(S)	测定管(T)	质控管
试剂 R1	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
纯化水	10 μL			
标准液		10 μL		
样品			10 μL	
质控品				10 μL
混匀, 37℃孵育 3-5 分钟,				
试剂 R2	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
混匀, 37℃延迟 30 秒, 反应 5 分钟, 读取吸光度 $\Delta A/\text{min}$ 。				

[0047] 结果确定:

计算校准品吸光度的差值(A校准-A空白), 建立合适的数学模(非线性)如Logit-Log等, 拟合成多点定标的校准曲线。根据校准曲线的反应变化幅度、线性范围、相关系数和反应可重复性确定血清CMPF含量, 其定标结果如图2所示。

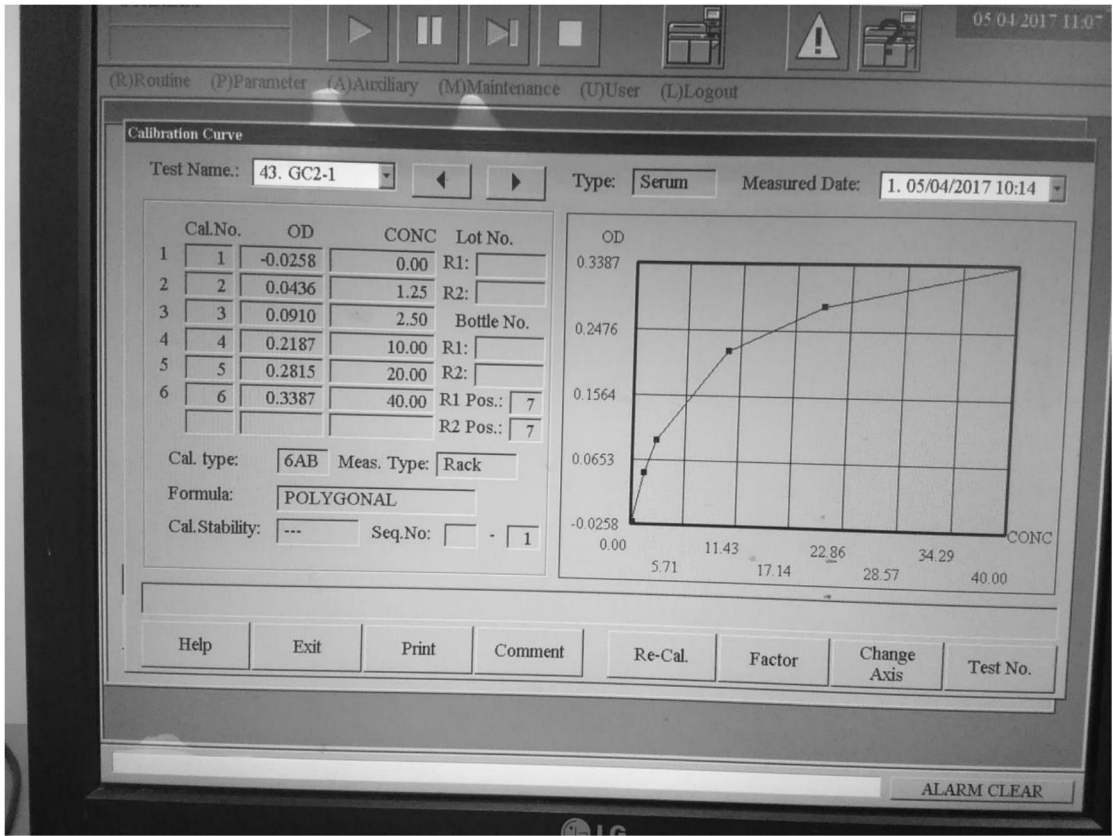


图1

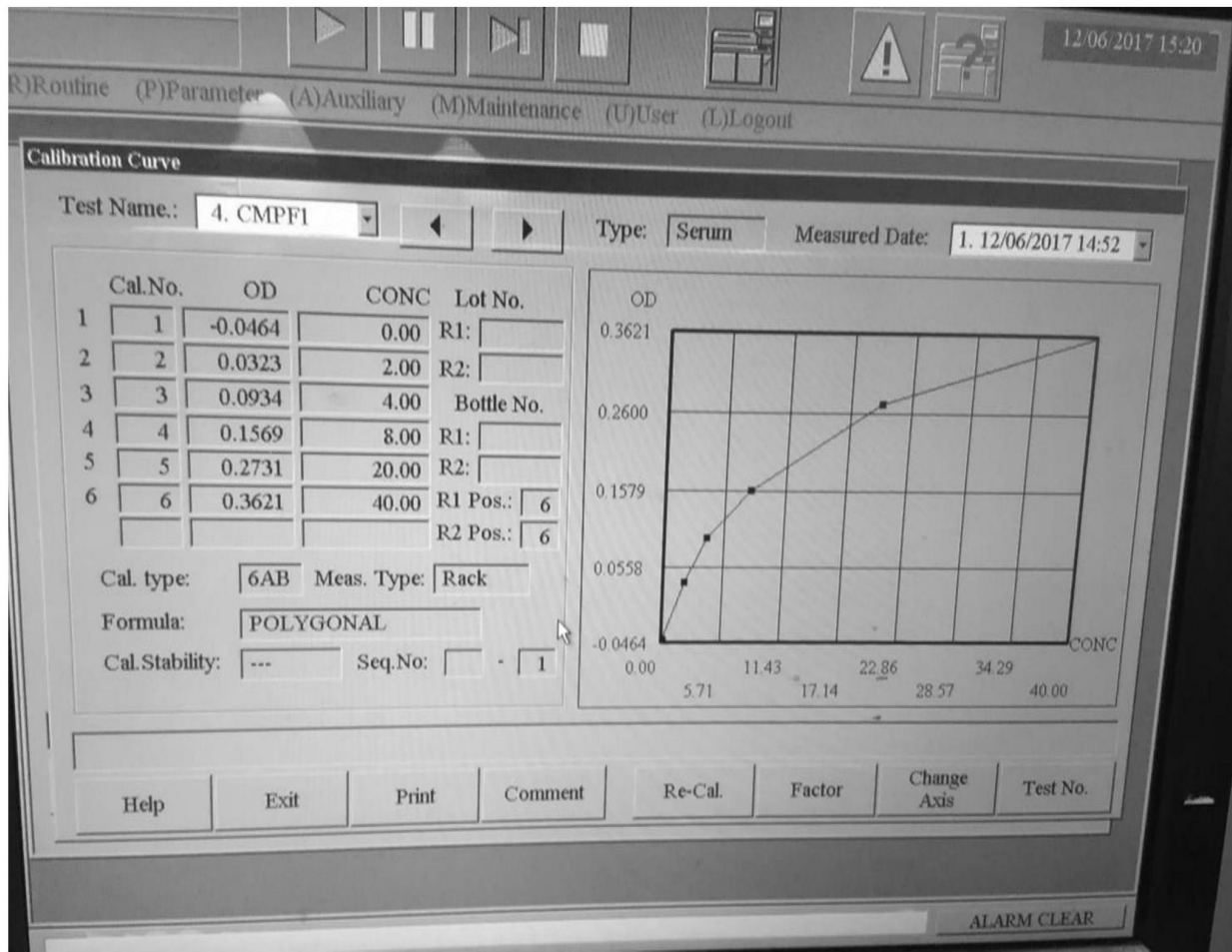


图2

专利名称(译)	一种均相酶免疫偶联物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109884318A	公开(公告)日	2019-06-14
申请号	CN201910214084.1	申请日	2019-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	杭州博谱医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州博谱医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州博谱医药科技有限公司		
[标]发明人	王轶雄 杨晓东 缪刘 曹静		
发明人	王轶雄 杨晓东 缪刘 曹静		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及均相酶免疫检测技术领域，尤其涉及一种小分子半抗原与酶在偶联剂的作用下脱水得到的偶联产物。首先将小分子半抗原溶解于磷酸盐缓冲液中；然后向上述小分子半抗原溶液中加入偶联剂、酶以及蛋白质反应得到均相酶免疫偶联物。本发明克服了现有技术中通过均相酶免疫法测定血清中特定抗原抗体的过程中使用的酶偶联物容易受到个体健康状况影响，导致测试结果可靠性不足以及偶联效率较低的缺陷，本发明具有降低个体健康状况对测试的干扰，提高测试结果可靠性；酶以及蛋白质与小分子半抗原在偶联剂的作用下直接结合，无需其它桥连分子，偶联效率高且反应条件温和；所制得的酶偶联物水溶性好，酶活力损失较小等优点。

	空白管(B)	标准管(S)	测定管(T)	质控管
试剂 R1	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
纯化水	10 μ L			
标准液		10 μ L		
样品			10 μ L	
质控品				10 μ L
混匀，37℃孵育 3-5 分钟，				
试剂 R2	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L