



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108700584 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201780003894.1

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.01.20

G01N 33/569(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.04

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2017/071968 2017.01.20

(71)申请人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518122 广东省深圳市坪山区坑梓街
道金沙社区金辉道16号

(72)发明人 饶微 方中刚 袁锦云 王燕梅
李婷华 王小莉

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 韩建伟 金田蕴

权利要求书2页 说明书19页 附图1页

(54)发明名称

标记复合物及其制备方法、试剂盒、应用和
检测系统

(57)摘要

本发明公开了一种标记复合物、其制备方法、包含所述标记复合物的试剂盒及应用和包括该试剂盒的检测系统。其中,所述标记复合物包括:抗原;标记蛋白,与抗原偶联形成标记复合物中间品;以及信号生成物,与标记复合物中间品偶联形成标记复合物。



1. 一种标记复合物,其特征在于,包括:
抗原;
标记蛋白,与所述抗原偶联形成标记复合物中间品;以及
信号生成物,与所述标记复合物中间品偶联形成所述标记复合物。
2. 根据权利要求1所述的标记复合物,其特征在于,所述抗原为重组抗原或天然抗原。
3. 根据权利要求2所述的标记复合物,其特征在于,所述抗原为HIV-1重组抗原、HIV-2重组抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、人类T淋巴细胞病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、幽门螺旋杆菌抗原或人乳头瘤病毒抗原;优选的,所述抗原为HIV-1重组抗原或HIV-2重组抗原。
4. 根据权利要求1所述的标记复合物,其特征在于,所述标记蛋白表面带有功能基团,所述功能基团为羧基、氨基、羟基、巯基、醛基、糖基和咪唑基中的至少一种,所述功能基团与所述抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联。
5. 根据权利要求4所述的标记复合物,其特征在于,所述标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵白蛋白、牛IgG、鼠IgG、羊IgG、兔IgG、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或 β -半乳糖苷酶,优选的,所述标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白或碱性磷酸酶。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的标记复合物,其特征在于,所述信号生成物为鲁米诺、异鲁米诺及异鲁米诺衍生物、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吡啶酯及其衍生物或三联吡啶钌;优选的,所述异鲁米诺衍生物为N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺。
7. 根据权利要求1至5中任一项所述的标记复合物,其特征在于,所述标记蛋白和所述信号生成物为不同的物质。
8. 一种如权利要求1至7中任一项所述的标记复合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
将表面带有功能基团的标记蛋白与抗原进行偶联反应,得到标记复合物中间品;
将信号生成物质与所述标记复合物中间品进行偶联反应,得到所述标记复合物。
9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述偶联反应采用的方法为混合酞酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法;
优选的,所述偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。
10. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述标记蛋白与所述抗原进行偶联反应时,所述标记蛋白和所述抗原的摩尔比为1:1-3:1。
11. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述偶联反应中用到的缓冲液为pH为4.0-6.5的PBS缓冲液、pH为8.0-9.8的碳酸盐缓冲液、pH为7.0-8.0的0.5%-5%的戊二醛溶液或pH为4.0-6.0的MES缓冲液。

12. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述标记复合物中间品或所述标记复合物制备完成后放入储存液中保存,所述储存液包括:0.2-0.5g/L磷酸二氢钾、3.0-6.0g/L磷酸氢二钠、4.0-8.0g/L氯化钠、0.5-1.5g/L BSA,0.25-0.5g/L叠氮钠和0.25-0.5mL/L吐温-20。

13. 一种检测试剂盒,其特征在于,包括如权利要求1至7中任一项所述的标记复合物或权利要求8至12中任一项所述制备方法制备得到的标记复合物。

14. 根据权利要求13所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒进一步包括:

包被抗原的磁性微球溶液;或

包被链霉亲和素的磁性微球溶液和生物素化的抗原溶液;或

包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液和标记异硫氰酸荧光素的抗原溶液。

15. 根据权利要求14所述的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒为检测HIV-1抗体的试剂盒,含有HIV-1重组抗原的标记复合物;

优选的,所述试剂盒具体包括:

包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液和HIV-1重组抗原的标记复合物溶液;或

包被链霉亲和素的磁性微球溶液、HIV-1重组抗原的标记复合物溶液和生物素化的HIV-1重组抗原溶液;或

包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液、标记异硫氰酸荧光素的HIV-1重组抗原溶液和HIV-1重组抗原的标记复合物溶液;

优选的,包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L;

优选的,磁性微球浓度为0.25-1.25mg/mL;

优选的,所述HIV-1重组抗原的标记复合物溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L;

优选的,HIV-1重组抗原的标记复合物浓度为0.1-1mg/L;

优选的,所述生物素化的HIV-1重组抗原溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L,生物素浓度为0.1-1mg/L;

优选的,所述标记异硫氰酸荧光素的HIV-1重组抗原溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L,异硫氰酸荧光素浓度为0.1-1mg/L。

16. 如权利要求13至15中任一项所述的试剂盒在免疫检测中的应用,其特征在于,标记蛋白与被检测蛋白为非源性蛋白。

17. 根据权利要求16所述的应用,其特征在于,所述试剂盒用于检测HIV-1抗体、HIV-2抗体、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、庚型肝炎病毒、人类T淋巴细胞病毒、梅毒螺旋体抗体、幽门螺旋杆菌抗体或人乳头瘤病毒抗体。

18. 根据权利要求16或17所述的应用,其特征在于,所述试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪。

19. 一种检测系统,其特征在于,包括:如权利要求13至15中任一项所述的试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。

标记复合物及其制备方法、试剂盒、应用和检测系统

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断试剂领域,具体而言,涉及一种标记复合物、其制备方法、包含其的试剂盒及应用和包括该试剂盒的检测系统。

背景技术

[0002] 目前,临床上涉及免疫检测的方法主要包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、蛋白印迹试验(WB)、免疫胶体金技术(GICT)、放射免疫沉淀试验(RIPA)、化学发光法(CLIA)等。ELISA和CLIA适用于临床上的大规模的初筛,但由于试剂组份的不稳定或者性能不足,导致检测结果出现假阳性和假阴性。因此,进一步提高试剂的灵敏度和稳定性是十分必要的。

[0003] ELISA法是目前临床血液筛查中普遍使用检测技术,但是相对于CLIA全自动操作及高灵敏度的优势,ELISA试验操作程序相对复杂,且出现假阳性或假阴性的概率较高。近几年国内外出现了以胶体金或乳胶颗粒为代表的快速检测试纸条,但是由于结果是肉眼目视观察,容易受观察者主观判断的影响,灵敏度低,结果准确度也不高。

[0004] 免疫印迹法(WB)是目前临床检测的确认方法之一,结果准确可靠,但是其技术难度大,目前全世界也只有屈指可数的几家公司可以生产,高昂的使用成本使得它目前仅用于可疑标本的确认,而很少用于筛选。

[0005] 化学发光分析法具有灵敏度高,线性范围宽,特异性好,仪器设备操作简单等优点,已成功应用于生命科学、食品科学、临床医学以及环境检测等领域,成为现代分析领域中一种有效的微量及痕量分析技术。用于化学发光反应的发光物质根据发光机理主要有以下几种:鲁米诺及其衍生物、光泽精(Lucigenin)、过氧草酸酯(Peroxyoxalate)等。鲁米诺的衍生物主要有异鲁米诺、4-氨基己基-N-乙基异鲁米诺等,鲁米诺在碱性条件下可被一些氧化剂氧化发生化学发光反应,辐射出最大发射波长为425nm的化学发光。光泽精(N,N-二甲基二吡啶硝酸盐,Lucigenin)自身在碱性环境中产生微弱的化学发光,加入过氧化氢时化学发光强度会大大增加,被氧化而发出420-500nm的光,具有较高的发光效率。过氧草酸酯(peroxalate)的化学发光反应涉及过氧化氢与芳基草酸酯之间的反应,是最有效的非生物化学发光反应。鲁米诺类和吡啶酯类化学发光试剂是最常用的化学发光标记试剂;常用的酶标记物有辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(ALP),它们有各自的发光底物;而在实际应用中的电化学发光体系主要是钌联吡啶[Ru(bpy)₃]²⁺体系。

[0006] 目前,在免疫检测中以双抗原(双抗体)夹心法的应用较为广泛。双抗原(双抗体)夹心法原理是:在固相材料上包被第一抗原(抗体),加入待检样本,加入有标记物的第二抗原(抗体)进行检测。如果待检样本中含有待检测物,则形成“包被抗原(抗体)-抗体(抗原)-标记抗原(抗体)”的三明治结构,通过检测标记物的信号来判定结果。应用双抗原夹心法的关键之一在于标记抗原的质量,标记抗原的活性对免疫检测的灵敏度以及稳定性有着决定性的影响。而高活性的标记抗原需要具备两个条件:其一是标记抗原中单位抗原上结合的标记物要尽可能多;其二是标记过程对抗原的免疫学活性损失尽量小。很多抗原在和标记物偶联之后,标记抗原的活性会有很大损失。通常的解决方法就是在抗原上融合表达一段

融合蛋白,形成融合蛋白-抗原的嵌合抗原的表达形式,使用该方法表达出来的重组抗原在可溶性和表达量方面均有更好的表现,从而具备优良的标记性能。但是融合蛋白的运用存在一定程度的不足,例如用原核表达系统往往存在包涵体,导致标记抗原后有假阳性较高的影响。

[0007] 公开号为CN1888901A的中国专利中提出的采用磁分离直接化学发光试剂及其测试方法,采用异鲁米诺衍生物作为发光标记物,异鲁米诺发光标记物的单克隆抗体时通过将异鲁米诺发光标记物与二氯硫化碳或N-羟基琥珀酸联接后再与单克隆抗体联接。该专利未涉及针对重组抗原通过二次标记提高发光标记物的稳定性和灵敏度。

[0008] 公开号为CN100582780A的中国专利文献中曾提出一种“小分子间接标记的双抗原夹心法测定丙型肝炎病毒总抗体”,该试剂采用的是用小分子物质标记HCV抗原;将HCV抗原包被固相材料;以信号生成物质标记抗小分子抗体或其他能与小分子结合的物质。样本中的抗HCV抗体可与固相材料表面的HCV抗原及小分子标记的HCV抗原反应,形成双抗原夹心复合物,然后通过小分子与信号报告分子反应,使形成的复合物带有可检测的信号生成物质。该专利提出利用小分子标记有利于保持抗原活性、具有信号放大作用,从而提高HCV抗体检测的灵敏度和特异性。该专利需要合适的小分子物质和抗小分子抗体或能与小分子结合的物质,同时还需研究小分子标记抗原和信号生成物质标记抗小分子抗体后的稳定性。

[0009] 在申请号为EP20050714754的PCT专利和公开号为CN101363848A的中国专利中提出“间接标记纳米颗粒的抗体检测双抗原夹心法及其试剂盒”中提出:纳米颗粒类标记物与标记抗原之间的标记是通过抗原上的标签和标记在纳米颗粒标记物上的可特异性识别该标签的配体相结合来完成的间接标记,其中的标记抗原为基因工程重组抗原。采用此种间接标记的方式,可以显著提高纳米颗粒的抗体检测双抗原夹心法的灵敏度并改善特异性。该专利需要将重组抗原在表达时标记上标签蛋白,同时还需要可特异性识别该标签的配体,并对配体进行标记。这样就需要做成两个试剂盒组份,并且需要研究两种组份的最适的反应比例。同时,该专利也为涉及标签蛋白或标签蛋白配体标记物的稳定性。

[0010] 公开号为CN102115737B和公开号为CN101561432B的中国专利文献中曾提出一种“稳定碱性磷酸酶或其标记物的试剂和方法”和“一种能够维护酶标记物溶液高稳定性的稀释液”,以上两篇专利均是从优化标记物稀释液组份提高标记物的稳定性。通过优化稀释液中保护蛋白、溶液的离子强度、pH值、增加多元醇、多糖、表面活性剂、蛋白酶抑制剂等使碱性磷酸酶或其标记物经过37℃加速破坏两周基本无损失。有0.05M pH7.2的PBS磷酸盐生理盐水缓冲液、保护蛋白、复合氨基酸、多糖、芦荟提取液、鼠血清、葡萄糖酸钾、辛酸钠、吐温 and 防腐剂组成的稀释液能够是HRP标记物在37℃保存一周以上。合适的稀释液组份是保证标记复合物稳定性的前提条件,但是通过优化稀释液组份不足以改变稳定性时需要改变标记复合物的标记工艺。

[0011] 目前,现有的技术方案主要存在以下技术问题:

[0012] 1) 针对抗原抗体标记的方法,目前大部分采用的是直接标记法,但有些抗原经过被检测信号物质直接标记,其免疫学活性会受到影响,从而影响标记物的稳定性和灵敏度;

[0013] 2) 通过小分子或者标签蛋白间接标记法能改善标记部分抗原的灵敏度,但需要寻找合适的小分子或者标签蛋白及相对应的可识别的配体,同时会增加试剂组份,使其复杂化;

[0014] 3) 通过融合蛋白-抗原的嵌合抗原的表达形式,使重组抗原有更好的可溶性,标记性能也有所提高,但是融合蛋白的运用存在一定程度的不足,例如用原核表达系统往往存在包涵体,抗原标记后会有假阳性较高的现象。

发明内容

[0015] 本发明旨在提供一种标记复合物、其制备方法、包含其的试剂盒及应用和包括该试剂盒的检测系统,以提高标记复合物的灵敏度。

[0016] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种标记复合物。该标记复合物包括:抗原;标记蛋白,与抗原偶联形成标记复合物中间品;以及信号生成物,与标记复合物中间品偶联形成标记复合物。

[0017] 进一步地,抗原为重组抗原或天然抗原。

[0018] 进一步地,抗原为HIV-1重组抗原、HIV-2重组抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、人类T淋巴细胞病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、幽门螺旋杆菌抗原或人乳头瘤病毒抗原;优选的,抗原为HIV-1重组抗原或HIV-2重组抗原。

[0019] 进一步地,标记蛋白表面带有功能基团,功能基团为羧基、氨基、羟基、巯基、醛基、糖基和咪唑基中的一种或多种,功能基团与抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联。

[0020] 进一步地,标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵白蛋白、牛IgG、鼠IgG、羊IgG、兔IgG、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或 β -半乳糖苷酶;优选的,标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白或碱性磷酸酶。

[0021] 进一步地,信号生成物为鲁米诺、异鲁米诺及异鲁米诺衍生物、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吡啶酯及其衍生物或三联吡啶钌;优选的,异鲁米诺衍生物为N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺。

[0022] 进一步地,标记蛋白和信号生成物为不同的物质。

[0023] 根据本发明的另一个方面,提供一种上述标记复合物的制备方法。该制备方法包括以下步骤:将表面带有功能基团的标记蛋白与抗原进行偶联反应,得到标记复合物中间品;将信号生成物质与标记复合物中间品进行偶联反应,得到标记复合物。

[0024] 进一步地,偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法;优选的,偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

[0025] 进一步地,标记蛋白与抗原进行偶联反应时,标记蛋白和抗原的摩尔比为1:1-3:1。

[0026] 进一步地,偶联反应中用到的缓冲液为pH为4.0-6.5的PBS缓冲液、pH为8.0-9.8的碳酸盐缓冲液、pH为7.0-8.0的0.5%-5%的戊二醛溶液或pH为4.0-6.0的MES缓冲液。

[0027] 进一步地,标记复合物中间品或标记复合物制备完成后放入储存液中保存,储存液包括:0.2-0.5g/L磷酸二氢钾、3.0-6.0g/L磷酸氢二钠、4.0-8.0g/L氯化钠、0.5-1.5g/L BSA,0.25-0.5g/L叠氮钠和0.25-0.5mL/L吐温-20。

[0028] 根据本发明的再一个方面,提供一种检测试剂盒。该试剂盒包括上述任一种的标记复合物或上述任一种标记复合物的制备方法制备得到的标记复合物。

[0029] 进一步地,试剂盒还包括:包被抗原的磁性微球溶液;或包被亲和素的磁性微球溶液和生物素化的抗原溶液;或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液和标记异硫氰酸荧光素的抗原溶液。

[0030] 进一步地,检测试剂盒为检测HIV-1抗体的试剂盒,含有HIV-1重组抗原的标记复合物;优选的,试剂盒具体包括:包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液、HIV-1重组抗原的标记复合物溶液;或包被亲和素的磁性微球溶液、HIV-1重组抗原的标记复合物溶液和生物素化的HIV-1重组抗原溶液;或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液和标记异硫氰酸荧光素的HIV-1重组抗原溶液;优选的,包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L;优选的,磁性微球浓度为0.25-1.25mg/mL;优选的,HIV-1重组抗原的标记复合物溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L;优选的,HIV-1重组抗原的标记复合物浓度为0.1-1mg/L;优选的,生物素化的HIV-1重组抗原溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L,生物素浓度为0.1-1mg/L;优选的,所述标记异硫氰酸荧光素的HIV-1重组抗原溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L,异硫氰酸荧光素浓度为0.1-1mg/L。

[0031] 根据本发明的又一个方面,提供一种上述试剂盒在免疫检测中的应用,其中,标记蛋白与被检测蛋白为非源性蛋白。

[0032] 进一步地,试剂盒用于检测HIV-1抗体、HIV-2抗体、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、庚型肝炎病毒、人类T淋巴细胞病毒、梅毒螺旋体抗体、幽门螺旋杆菌抗体或人乳头瘤病毒抗体。

[0033] 进一步地,试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪。

[0034] 根据本发明再一个方面,提供一种检测系统。该检测系统包括上述任一种试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。应用本发明的技术方案,通过标记蛋白与抗原的功能基团偶联,维持抗原的构象或者使构象改变但不会导致抗原表位被覆盖,能够保持抗原的免疫反应活性。另外,以标记蛋白标记抗原可以使一个抗原上带有多个标记蛋白,进行二次标记信号生成物质时,一个标记蛋白又与多个信号生成物质结合,产生有效的信号放大作用,从而进一步提高了检测的灵敏度。

附图说明

[0035] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0036] 图1示出了根据本发明一实施方式的标记复合物的制备流程及结构示意图。

具体实施方式

[0037] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0038] 本发明中涉及的缩写及术语解释如下：

[0039] HIV (Human Immunodeficiency Virus, 人类免疫缺陷病毒)、AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome, 获得性免疫缺陷综合症)、CLIA (化学发光免疫分析法)、BSA (牛血清白蛋白)、NaN₃ (叠氮钠)、ABEI [N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺]、FITC (异硫氰酸荧光素)、Biotin (生物素)、SA (链霉亲和素)、HRP (Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶)、吖啶酯 (Acridinium Ester)、碱性磷酸酶 (ALP)、抗FITC抗体 (抗异硫氰酸荧光素抗体)、ELISA (酶联免疫吸附试验法)、蛋白印迹试验 (WB)、免疫胶体金技术 (GICT)、试剂放射免疫沉淀试验 (RIPA)。

[0040] 标记: 本发明中使用的术语“标记”是指配体跟标记物的偶联。

[0041] 标记物: 本发明中使用的术语“标记物”指在免疫检测中可被检测到的物质, 也可指包含该标记物的“标记复合物”。

[0042] 融合蛋白: 本发明中涉及的术语“融合蛋白”是指与标记抗原融合表达成融合抗原的蛋白, 此融合抗原与标记物偶联, 用于检测目的抗体。

[0043] 标记蛋白: 本发明中使用的术语“标记蛋白”是指用于第一次标记抗原的蛋白质。

[0044] 标记抗原: 本发明中使用的术语“标记抗原”为免疫检测中与待测目的抗体结合的抗原;

[0045] 间接标记: 本发明中使用的术语“间接标记”是指标记抗原和标记物不是直接结合, 而是通过标记抗原上面的标签与其对应配体特异性识别, 由配体直接标记标记物。

[0046] 二次标记: 本发明中使用的术语“二次标记”是指标记抗原通过第一次标记标记蛋白后, 再将标记复合物进行第二次的可被检测信号物质的标记。

[0047] 配体: 本发明中涉及的术语“配体”为可以与标签特异性识别的分子, 例如抗体, 亲和素等。

[0048] 标签: 本发明中使用的术语“标签”包括但不限于多肽或蛋白、生物素或者为它们与肽或蛋白的组合物, 这里所说的多肽或蛋白为除该试剂盒包被抗原里任意一段之外的多肽或蛋白。

[0049] 交联剂: 本发明中所述的“交联剂”一般为一类小分子化合物, 具有2个或者更多的针对特殊基团 (-NH₂、-COOH、-HS等) 的反应性末端, 可以和2个或者更多的分子分别偶联, 从而使这些分子结合在一起。

[0050] 生物素: Biotin, 下文可以简称为Bio。

[0051] 链霉亲和素: Streptavidin, 下文可以简称为亲和素或SA。

[0052] 术语“信号生成物质”或“标记物”是指这样的部分: 其连接至特异性结合配偶体, 诸如抗原或分析物, 以使得特异性结合的配偶体 (诸如抗原和分析物) 是可检测的, 且如此标记的特异性结合配偶体 (例如, 抗原或分析物) 被称作“可检测的”。标记可以产生通过视觉装置或仪器装置可检测的信号。各种标记物包括产生信号的物质, 诸如色原体、荧光化合物、化学发光的化合物、放射性化合物等。标记物的代表性例子包括产生光的部分 (例如, 吖啶酯化合物) 和产生荧光的部分 (例如, 荧光素)。

[0053] 现有技术中, 抗原直接标记后, 标记复合物的稳定性不足和灵敏度不够, 单独优化缓冲液的成份不足以满足试剂的性能; 间接标记需要寻找合适的小分子或者标签蛋白及相对应的可识别的配体, 同时增加重组抗原表达的难度和增加试剂组份。

[0054] 为了提高标记复合物的灵敏度,本发明提供了如下技术方案:如图1所示,将表面带有功能基团的标记蛋白20与抗原10进行第一次标记,得到标记复合物中间品;将信号生成物质30与标记复合物中间品进行第二次标记,并通过分离纯化去除未结合物质,得到最终的标记复合物。

[0055] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种该标记复合物。该标记复合物包括:抗原;标记蛋白,与抗原偶联形成标记复合物中间品;以及信号生成物,与标记复合物中间品偶联形成标记复合物。

[0056] 分析本发明能达到技术效果的具体原因:蛋白质变性是指当蛋白质受到物理或化学因素影响时,其分子内部的一、二、三、和四级结构会发生变化,导致其生物功能丧失或物理化学性质改变。由温度导致的蛋白质变性主要为非共价相互作用的去稳定化。因此在一些抗原标记后的标记复合物在温度较高的条件下,抗原的构象发生改变,导致抗原表位被覆盖,引起抗原的免疫反应活性下降或者丧失。通过标记标记蛋白与抗原的功能基团偶联,维持抗原的构象或者使构象改变但不会导致抗原表位被覆盖,能够保持抗原的免疫反应活性。以标记蛋白标记抗原可以使一个抗原上带有多个标记蛋白,进行二次标记信号生成物质时,一个标记蛋白又与多个信号生成物质结合,产生有效的信号放大作用,从而进一步提高了检测的灵敏度。

[0057] 其中,抗原为重组抗原或天然抗原;优选的,抗原包括但不限于HIV-1重组抗原、HIV-2重组抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、人类T淋巴细胞病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、幽门螺旋杆菌抗原或人乳头瘤病毒抗原;优选的,抗原为HIV-1重组抗原或HIV-2重组抗原。

[0058] 理论上任何蛋白都可以作为本发明的标记蛋白,优选的,标记蛋白具有以下性质:1) 表面带有羧基(-COOH)、氨基(-NH₂)、羟基(-OH)、巯基(-SH)、氨基(-NH₂)、醛基(-CHO)、糖基(-C=O)、咪唑基等其他具有化学活性的功能基团的蛋白,以便与抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联;2) 具有偶联足够多分子容量的蛋白;3) 为防止非特异性结合的产生,标记蛋白应该选用与被检测对象非同源性蛋白;4) 应具有足够的稳定性,且应该是廉价易得的。

[0059] 因此,标记蛋白包括但不限于:辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵白蛋白、牛IgG、鼠IgG、羊IgG、兔IgG、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或β-半乳糖苷酶等。优选的,标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白或碱性磷酸酶。

[0060] 所述的“信号生成物质”包括但不限于:化学发光物质如鲁米诺、异鲁米诺及异鲁米诺衍生物;碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吡啶酯及其衍生物、三联吡啶钌等;优选的,异鲁米诺衍生物为N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(以下简称为ABEI)。

[0061] 优选的,标记蛋白和信号生成物为不同的物质,这是因为选择二次标记是因为信号生成物质一次标记不足以提高稳定性和灵敏度,如果标记蛋白和信号生成物质是同一物质,即使进行二次标记也只是有信号放大(灵敏度提高)而不能提高稳定性的作用。

[0062] 根据本发明的另一个方面,提供一种上述标记复合物的制备方法。该制备方法包括以下步骤:将表面带有功能基团的标记蛋白与抗原进行偶联反应,得到标记复合物中间品;将信号生成物质与标记复合物中间品进行偶联反应,并分离纯化去除未结合的物质,得

到标记复合物。

[0063] 其中,标记蛋白表面带有的功能基团包括但不限于羧基(-COOH)、氨基(-NH₂)、羟基(-OH)、巯基(-SH)、醛基(-CHO)、糖基(-C=O)和咪唑基,功能基团与抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联(由于本发明已经限定标记蛋白表面带有的功能基团与抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联,所以本领域技术人员可以明显排除标记蛋白上的功能基团与抗原上游离的基团均为相同基团不能偶联的情况)。偶联反应完毕后通过处理,去除未结合和其他的物质,其中处理方法包括但不限于:透析、超滤、离子交换层析、凝胶过滤、盐溶与盐析、等电点沉淀法、亲和层析等;然后将得到的标记复合物中间品进行使用或将其分散于储存液中进行保存。

[0064] 根据本发明一种典型的实施方式,该制备方法具体步骤如下:A.根据偶联官能团选择合适的方法将标记蛋白与抗原进行偶联反应;B.去除未结合物质,获得标记复合物中间品;C.根据偶联官能团选择合适的方法将信号生成物质与标记复合物中间品进行偶联反应;D.去除未结合物质,获得最终的标记复合物。

[0065] 将信号生成物质根据偶联官能团选择合适的方法与标记复合物中间品进行偶联反应,偶联反应采用的方法包括但不限于混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法等。

[0066] 所述的偶联反应用到的交联剂包括但不限于:

[0067] 1) 氨基-氨基交联剂:基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂,如:DSG(二琥珀酰亚胺基戊二酸酯)、DST(酒石酸二琥珀酰亚胺酯)、DMA(二甲基己二酰亚胺)等;

[0068] 2) 巯基-糖类交联剂:基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的交联剂,适用于连接巯基和糖类,如:BMPH(N-β-马来酰亚胺基丙酸酰肼)、MPBH(4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼)、PDPH(3-(2-吡啶基二硫代)丙酰肼)等;

[0069] 3) 巯基-巯基交联剂:基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂,适用于与蛋白或多肽的硫醇(还原型半胱氨酸)进行特异性共价连接,以形成稳定的硫醚键,如:BMOE(双马来酰亚胺乙烷)、BMB(1,4-双马来酰亚胺丁烷)、BMH(双马来酰亚胺己烷)等;

[0070] 4) 氨基-巯基交联剂:异型双功能蛋白交联剂适用于蛋白和其他分子的伯胺(赖氨酸)和巯基(半胱氨酸)基团之间的连接,如:SIA(琥珀酰亚胺基碘乙酸酯)、SPDP(琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、AMAS(N-α-马来酰亚胺基乙酰氧基琥珀酰亚胺酯)等;

[0071] 5) 羧基-氨基交联剂:适用于羧基(谷氨酸、天冬氨酸、C端)与伯胺(赖氨酸、N端)连接的碳二亚胺交联剂NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)等;

[0072] 6) 光反应性交联剂:芳香叠氮、双苧丙啶和其他光反应(光活化)的异型双功能交联剂,如:SDA(琥珀酰亚胺基-4,4'-氮杂戊酸酯)和ANB-NOS(N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺);

[0073] 7) 化学选择性连接交联剂,如:ManNAz(N-叠氮基乙酰甘露糖胺四酰化)和GalNAz(N-叠氮基乙酰半乳糖胺四酰化)等。

[0074] 8) 双功能交联剂:如戊二醛的两个醛基分别与抗原和蛋白质上的氨基形成schiff

键。

[0075] 优选的,标记蛋白与抗原进行偶联反应时,标记蛋白和抗原的摩尔比为1:1-3:1。

[0076] 偶联反应用到缓冲液包括但不限于:pH为4.0-6.5的PBS缓冲液、pH为8.0-9.8的碳酸盐缓冲液、pH为7.0-8.0的0.5%-5%的戊二醛溶液、pH为4.0-6.0的MES缓冲液等。

[0077] 根据本发明一种典型的实施方式,标记复合物中间品或标记复合物制备完成后可放入储存液中保存,储存液包括但不限于:0.2-0.5g/L磷酸二氢钾、3.0-6.0g/L磷酸氢二钠、4.0-8.0g/L氯化钠、0.5-1.5g/L BSA,0.25-0.5g/L叠氮钠和0.25-0.5mL/L吐温-20。

[0078] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种检测试剂盒。该试剂盒包括本发明中任一种标记复合物或本发明的任一种标记复合物制备方法制备得到的标记复合物。该检测试剂盒可以为酶联免疫诊断试剂盒、免疫胶体金试剂盒、放射免疫分析试剂盒或化学发光法免疫诊断试剂盒,当然也可以是其他能够使用本发明的标记复合物的检测试剂盒,提高该类型产品的稳定性和产品性能。

[0079] 根据本发明一种典型的实施方式,检测试剂盒还包括:包被抗原的磁性微球溶液;或包被亲和素的磁性微球溶液和生物素化的抗原溶液;或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液和标记异硫氰酸荧光素的抗原溶液。例如,检测试剂盒为检测HIV-1抗体的试剂盒,则含有HIV-1重组抗原的标记复合物。优选的,试剂盒还包括试剂盒缓冲液。

[0080] 优选的,本发明中采用的磁性微球为纳米级的 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体,并具有0.1-5 μm 的粒径;并且,所述磁球通过表面改性而带有一种或多种活性基团。所述活性基团包括羧基、羟基、氨基中的至少一种。该磁性微球是具有超顺磁性和极大量蛋白吸附容量的微米级的固相微球,具有在外加磁场作用下可迅速被磁化,在撤走磁场后剩磁为零的属性。采用该磁性微球,可以通过表面改性使磁球表面连接活性基团,不仅能够减少非特异性吸附,且增加体系的稳定性,不产生凝聚,同时显著提高结合率。

[0081] 根据本发明一种典型的实施方式,检测试剂盒为化学发光法免疫诊断试剂盒,具体包括:包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液和HIV-1重组抗原的标记复合物溶液;或包被亲和素的磁性微球溶液、HIV-1重组抗原的标记复合物溶液和生物素化的HIV-1重组抗原溶液;或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液、标记异硫氰酸荧光素的HIV-1重组抗原溶液和HIV-1重组抗原的标记复合物溶液。优选的,试剂盒还包括试剂盒缓冲液。

[0082] 根据本发明一种典型的实施方式,包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液中HIV-1重组抗原浓度、包被亲和素的磁性微球溶液中亲和素浓度或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液中抗异硫氰酸荧光素抗体浓度为10-200 $\mu\text{g}/\text{L}$,磁性微球浓度为0.25-1.25mg/mL,包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液、包被亲和素的磁性微球溶液、或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液中含有0.1-0.3M磷酸盐缓冲液,0.3-0.6M NaCl,0.05%-0.15%BSA,0.05-0.10%TritonX-100,pH值为7.2-7.8。

[0083] 根据本发明一种典型的实施方式,HIV-1重组抗原的标记复合物溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 $\mu\text{g}/\text{L}$,HIV-1重组抗原的标记复合物浓度为0.1-1mg/L,HIV-1重组抗原的标记复合物稀释液中含有0.2-0.6g/L酪蛋白、1.0-3.0g/L Tris-base、5.0-8.0g/L氯化钠、5.0-10.0g/L丙三醇、0.5-0.8mL/L吐温-20、200-300mM的EDTA、1%-3%的蔗糖、0.2-0.5M甘氨酸、20%-50%的小牛血清,pH为7.5-8.0。

[0084] 根据本发明一种典型的实施方式,试剂盒缓冲液含1.0-3.0g/L的Tris、0.8-1.6g/L的NaCl、0.05%-0.15%TritonX-100和0.5-1.5g/L的BSA、0.05%-0.15%HCl,pH为7.2-7.8,Tris的纯度 \geq 99%,NaCl为分析纯,BSA的纯度 \geq 99%,HCl为分析纯,纯度为36%-38%。

[0085] 根据本发明一种典型的实施方式,生物素化的HIV-1重组抗原溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L,生物素浓度为0.1-1mg/L;或标记异硫氰酸荧光素的HIV-1重组抗原溶液中HIV-1重组抗原浓度为10-200 μ g/L,异硫氰酸荧光素浓度为0.1-1mg/L。

[0086] 根据本发明一种典型的实施方式,包被亲和素的磁性微球溶液为包被链霉亲和素的磁性微球溶液。

[0087] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种检测HIV-1抗体的试剂或试剂盒(化学发光免疫分析法),含有上述HIV-1重组抗原标记复合物。该试剂盒包括以下组分:

[0088] 1) 包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液

[0089] HIV-1重组抗原浓度:10-200 μ g/L磁性微球浓度:0.25-1.25mg/mL

[0090] 磁性微球溶液中含有0.1-0.3M磷酸盐缓冲液,0.3-0.6M NaCl,0.05%-0.15%BSA,0.05-0.10%TritonX-100,其pH值为7.2-7.8。

[0091] 2) HIV-1重组抗原的标记复合物溶液

[0092] HIV-1重组抗原浓度:10-200 μ g/L标记复合物浓度:0.1-1mg/L

[0093] 标记复合物稀释液中含有0.2-0.6g/L酪蛋白、1.0-3.0g/L Tris-base、5.0-8.0g/L氯化钠、5.0-10.0g/L丙三醇、0.5-0.8mL/L吐温-20、200-300mM的EDTA、1%-3%的蔗糖、0.2-0.5M甘氨酸、20%-50%的小牛血清,pH为7.5-8.0。

[0094] 3) 试剂盒缓冲液

[0095] 试剂盒缓冲液含1.0-3.0g/L的Tris(纯度 \geq 99%)、0.8-1.6g/L的NaCl(分析纯)、0.05%-0.15%TritonX-100和0.5-1.5g/L的BSA(纯度 \geq 99%)、0.05%-0.15%HCl(分析纯,纯度为36%-38%),pH为7.2-7.8。

[0096] 所述各组分均含有防腐剂,防腐剂为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin系列中的任一种或两种以上混合物。

[0097] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种检测HIV-1抗体的试剂或试剂盒(化学发光免疫分析法),含有上述HIV-1重组抗原标记复合物。该试剂盒包括以下组分:

[0098] 1) 包被链霉亲和素(SA)的磁性微球溶液

[0099] 链霉亲和素浓度:10-200 μ g/L磁性微球浓度:0.25-1.25mg/mL

[0100] 磁性微球溶液中含有0.1-0.3M磷酸盐缓冲液,0.3-0.6M NaCl,0.05%-0.15%BSA,0.05-0.10%TritonX-100,其pH值为7.2-7.8。

[0101] 2) HIV-1重组抗原的标记复合物溶液

[0102] HIV-1重组抗原浓度:10-200 μ g/L标记复合物浓度:0.1-1mg/L

[0103] 标记复合物稀释液中含有0.2-0.6g/L酪蛋白、1.0-3.0g/L Tris-base、5.0-8.0g/L氯化钠、5.0-10.0g/L丙三醇、0.5-0.8mL/L吐温-20、200-300mM的EDTA、1%-3%的蔗糖、0.2-0.5M甘氨酸、20%-50%的小牛血清,pH为7.5-8.0。

[0104] 3) 生物素(Biotin)化的HIV-1重组抗原溶液

[0105] HIV-1重组抗原浓度:10-200 μ g/L生物素浓度:0.1-1mg/L

[0106] 稀释缓冲液含1.0-3.0g/L的Tris (纯度 $\geq 99\%$)、0.8-1.6g/L的NaCl (分析纯)、0.05%-0.15% TritonX-100和0.5-1.5g/L的BSA (纯度 $\geq 99\%$)、0.05%-0.15% HCl (分析纯,纯度为36%-38%), pH为7.2-7.8。

[0107] 所述各组分均含有防腐剂,防腐剂为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin系列中的任一种或两种以上混合物。

[0108] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种检测HIV-1抗体的试剂或试剂盒(化学发光免疫分析法),含有上述HIV-1重组抗原标记复合物。该试剂盒包括以下组分:

[0109] 1) 包被羊抗FITC的磁性微球溶液

[0110] 羊抗FITC的浓度:10-200 $\mu\text{g/L}$ 磁性微球浓度:0.25-1.25mg/mL

[0111] 磁性微球溶液中含有0.1-0.3M磷酸盐缓冲液,0.3-0.6M NaCl,0.05%-0.15% BSA,0.05-0.10% TritonX-100,其pH值为7.2-7.8。

[0112] 2) HIV-1重组抗原的标记复合物溶液

[0113] HIV-1重组抗原浓度:10-200 $\mu\text{g/L}$ 标记复合物浓度:0.1-1mg/L

[0114] 标记复合物稀释液中含有0.2-0.6g/L酪蛋白、1.0-3.0g/L Tris-base、5.0-8.0g/L氯化钠、5.0-10.0g/L丙三醇、0.5-0.8mL/L吐温-20、200-300mM的EDTA、1%-3%的蔗糖、0.2-0.5M甘氨酸、20%-50%的小牛血清,pH为7.5-8.0。

[0115] 3) FITC标记的HIV-1重组抗原溶液

[0116] HIV-1重组抗原浓度:10-200 $\mu\text{g/L}$ FITC浓度:0.1-1mg/L

[0117] 稀释缓冲液含1.0-3.0g/L的Tris (纯度 $\geq 99\%$)、0.8-1.6g/L的NaCl (分析纯)、0.05%-0.15% TritonX-100和0.5-1.5g/L的BSA (纯度 $\geq 99\%$)、0.05%-0.15% HCl (分析纯,纯度为36%-38%), pH为7.2-7.8。

[0118] 所述各组分均含有防腐剂,防腐剂为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin系列中的任一种或两种以上混合物。

[0119] 本发明中当抗原是HIV-2重组抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、人类T淋巴细胞病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、幽门螺旋杆菌抗原或人乳头瘤病毒抗原时,遵循本发明公开的发明构思,参照抗原是HIV-1重组抗原的实施方式或实施例,本领域技术人员可以通过常规技术手段对上述溶液或反应条件进行适应性调整,从而实现本发明的技术方案。

[0120] 下面将结合实施例进一步说明本发明的有益效果。

[0121] 1. 原材料来源:

[0122] 羊抗FITC多克隆抗体,来源:购自北京百浩生物科技有限公司。

[0123] 磁性微球,来源:为深圳新产业生物医学股份有限公司生产。

[0124] FITC:购自上海纪宁实业有限公司。

[0125] ABEI由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产。

[0126] 生物素、链霉亲和素:均购自Roche。

[0127] HIV-1抗体校准品(货号:B65875G),来源:Meridian公司。

[0128] 用于包被的HIV-1重组抗原(货号:VTI310),来源:Meridian公司。

[0129] 用于标记的HIV-1重组抗原(货号:R18550),来源:Meridian公司。

[0130] 2、部分原材料来源的具体解释:

[0131] 用于包被的HIV-1重组抗原(货号:VTI310)由毕赤酵母表达,为HIV-1跨膜蛋白gp41重组抗原,储存溶液中含1M尿素,0.5M氯化钠,0.2M磷酸钠,pH7.4±0.2。用于标记的HIV-1重组抗原(货号:R18550)由大肠杆菌表达,为HIV-1跨膜蛋白gp41片段大部分和gp120的C端融合表达,分子量为27.3kDa,储存溶液中含0mM Tris,pH 8.0,含有0.1%SDS,5mM DTT,2.5mM EDTA。HIV-1抗体校准品(货号:B65875G)用于灵敏度和稳定性评估的检测样本。

[0132] 实施例1

[0133] 1) 称取5mg HRP (M=44000) 溶解于1mL蒸馏水中(5mg/mL)。

[0134] 2) 于上述溶液中加入0.5mL新配的0.06M NaIO₄ (M=213.89) 溶液,混匀,4℃避光静置30min。

[0135] 3) 加入0.5mL 0.16M乙二醇(去除多余的NaIO₄),混匀,室温放置30min。

[0136] 4) 1mg HIV-1重组抗原(2mg/mL)用0.05M pH 9.5碳酸盐缓冲液4℃透析2h,然后立即加NaIO₄氧化的HRP 1mg,室温避光轻轻搅拌2h。

[0137] 5) 加入50μL新配的2mg/mL NaBH₄ (M=37.83) 溶液,混匀后4℃静置2h。

[0138] 6) 将上述液装入透析袋中,对0.01M pH7.4PBS 4℃透析过夜。

[0139] 7) 选用截留量3500的透析袋,量取合适的尺寸,润湿后扎紧一端,纯化水试漏3次(以无漏液为宜);

[0140] 8) 取0.5mg经过一次标记HRP的HIV-1重组抗原,用0.1mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液调体积至0.5mL,扎紧透析袋另一端后放入pH 9.5碳酸盐缓冲液透析液中透析1h,速度400转/分钟;

[0141] 9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入2mL容积的玻璃瓶中,加入25μg ABEI活化酯,室温振摇反应1.5h。

[0142] 10) 用G25凝胶柱纯化,去除未结合的ABEI活化酯,即可获得二次标记HIV的标记复合物。

[0143] 将上述的标记复合物按照1:400的比例稀释到缓冲液中,并按照以下描述的HIV-1抗体检测试剂盒,利用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的全自动化学发光免疫分析仪Maglumi 2000Plus进行评估。同时配制7份标记复合物溶液置于37℃恒温恒湿箱中进行加速稳定性试验。

[0144] 试剂盒组份主要包括以下:

[0145] a. 包被HIV-1重组抗原的磁性微球溶液

[0146] HIV-1重组抗原浓度:10μg/mL 磁性微球浓度:1.0mg/mL

[0147] 磁性微球溶液中含有0.25M磷酸盐缓冲液,0.3M NaCl,0.15%BSA,0.05% TritonX-100,其pH值为7.4。

[0148] b. 二次标记HIV-1重组抗原的标记复合物溶液

[0149] HIV-1重组抗原浓度:50μg/L 标记复合物浓度:0.2mg/L

[0150] 标记复合物稀释液中含有0.2g/L酪蛋白、1.5g/L Tris-base、6.0g/L氯化钠、10.0g/L丙三醇、0.6mL/L吐温-20、250mM的EDTA、2%的蔗糖、0.4M甘氨酸、25%的小牛血清,pH为7.8。

[0151] c. 试剂盒缓冲液

[0152] 试剂盒缓冲液含2.0g/L的Tris(纯度≥99%)、1.2g/L的NaCl(分析纯)、0.1%

TritonX-100和0.5g/L的BSA (纯度 $\geq 99\%$)、0.1% HCl (分析纯, 纯度为36%–38%), pH为7.5。

[0153] 所述各组分均含有0.2%的ProClin300作为防腐剂。

[0154] 实施例2

[0155] 1) 称取5mg HRP (M=44000) 溶解于1mL蒸馏水中 (5mg/mL)。

[0156] 2) 于上述溶液中加入1.0mL新配的0.06M NaIO_4 (M=213.89) 溶液, 混匀, 4℃避光静置30min。

[0157] 3) 加入1.0mL 0.16M乙二醇, 混匀, 室温放置30min。

[0158] 4) 1mg HIV-1重组抗原 (2mg/mL) 用0.05M pH 9.5碳酸盐缓冲液4℃透析2h, 然后立即加 NaIO_4 氧化的HRP 2mg, 室温避光轻轻搅拌2h。

[0159] 5) 加入100 μL 新配的2mg/mL NaBH_4 (M=37.83) 溶液, 混匀后4℃静置2h。

[0160] 6) 将上述液装入透析袋中, 对0.01M pH7.4PBS 4℃透析过夜。

[0161] 7) 选用截留量3500的透析袋, 量取合适的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏3次 (以无漏液为宜);

[0162] 8) 取0.5mg经过一次标记HRP的HIV-1重组抗原, 用0.1mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液调体积至0.5mL, 扎紧透析袋另一端后放入pH 9.5碳酸盐缓冲液透析液中透析1h, 速度400转/分钟;

[0163] 9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入2mL容积的玻璃瓶中, 加入25 μg ABEI活化酯, 室温振摇反应1.5h。

[0164] 10) 用G25凝胶柱纯化, 去除未结合的ABEI活化酯。

[0165] 将上述的标记复合物按照实施例1中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0166] 实施例3

[0167] 1) 称取5mg HRP (M=44000) 溶解于1mL蒸馏水中 (5mg/mL)。

[0168] 2) 于上述溶液中加入1.5mL新配的0.06M NaIO_4 (M=213.89) 溶液, 混匀, 4℃避光静置30min。

[0169] 3) 加入1.5mL 0.16M乙二醇, 混匀, 室温放置30min。

[0170] 4) 1mg HIV-1重组抗原 (2mg/mL) 用0.05M pH 9.5碳酸盐缓冲液4℃透析2h, 然后立即加 NaIO_4 氧化的HRP 3mg, 室温避光轻轻搅拌2h。

[0171] 5) 加入150 μL 新配的2mg/mL NaBH_4 (M=37.83) 溶液, 混匀后4℃静置2h。

[0172] 6) 将上述液装入透析袋中, 对0.01M pH7.4PBS 4℃透析过夜。

[0173] 7) 选用截留量3500的透析袋, 量取合适的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏3次 (以无漏液为宜);

[0174] 8) 取0.5mg经过一次标记HRP的HIV-1重组抗原, 用0.1mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液调体积至0.5mL, 扎紧透析袋另一端后放入pH 9.5碳酸盐缓冲液透析液中透析1h, 速度400转/分钟;

[0175] 9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入2mL容积的玻璃瓶中, 加入25 μg ABEI活化酯, 室温振摇反应1.5h。

[0176] 10) 用G25凝胶柱纯化, 去除未结合的ABEI活化酯。

[0177] 将上述的标记复合物按照实施例1中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0178] 实施例4

[0179] 1) 称取5mg HRP (M=44000) 溶解于1mL蒸馏水中 (5mg/mL)。

[0180] 2) 于上述溶液中加入1.0mL新配的0.06M NaIO₄ (M=213.89) 溶液, 混匀, 4℃避光静置30min。

[0181] 3) 加入1.5mL 0.16M乙二醇, 混匀, 室温放置30min。

[0182] 4) 1mg HIV-1重组抗原 (2mg/mL) 用0.05M pH 9.5碳酸盐缓冲液4℃透析2h, 然后立即加NaIO₄氧化的HRP 2mg, 室温避光轻轻搅拌2h。

[0183] 5) 加入100μL新配的2mg/mL NaBH₄ (M=37.83) 溶液, 混匀后4℃静置2h。

[0184] 6) 将上述液装入透析袋中, 对0.01M pH7.4PBS 4℃透析过夜。

[0185] 7) 选用截留量3500的透析袋, 量取合适的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏3次 (以无漏液为宜);

[0186] 8) 取0.5mg经过一次标记HRP的HIV-1重组抗原, 用0.1mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液调体积至0.5mL, 扎紧透析袋另一端后放入pH 9.5碳酸盐缓冲液透析液中透析1h, 速度400转/分钟;

[0187] 9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入2mL容积的玻璃瓶中, 加入25μg ABEI活化酯, 室温振摇反应1.5h。

[0188] 10) 用G25凝胶柱纯化, 去除未结合的ABEI活化酯。

[0189] 将上述的标记复合物按照实施例1中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0190] 试剂盒组份主要包括以下:

[0191] a. 包被链霉亲和素 (SA) 的磁性微球溶液

[0192] 链霉亲和素浓度: 20μg/L 磁性微球浓度: 1.0mg/mL

[0193] 磁性微球溶液中含有0.25M磷酸盐缓冲液, 0.3M NaCl, 0.15% BSA, 0.05% TritonX-100, 其pH值为7.4。

[0194] b. 二次标记HIV-1重组抗原的标记复合物溶液

[0195] HIV-1重组抗原浓度: 10μg/L 标记复合物浓度: 0.2mg/L

[0196] 标记复合物稀释液中含有0.2g/L酪蛋白、1.5g/L Tris-base、6.0g/L氯化钠、10.0g/L丙三醇、0.6mL/L吐温-20、250mM的EDTA、2%的蔗糖、0.4M甘氨酸、25%的小牛血清, pH为7.8。

[0197] c. 生物素 (Biotin) 化的HIV-1重组抗原溶液

[0198] HIV-1重组抗原浓度: 10μg/L 生物素浓度: 0.1μg/L

[0199] 生物素 (Biotin) 化的HIV-1重组抗原稀释液中含2.0g/L的Tris (纯度≥99%)、1.2g/L的NaCl (分析纯)、0.1% TritonX-100和0.5g/L的BSA (纯度≥99%)、0.1% HCl (分析纯, 纯度为36%-38%), pH为7.5

[0200] 所述各组份均含有0.2%的ProClin300作为防腐剂。

[0201] 实施例5

[0202] 1) 称取5mg HRP (M=44000) 溶解于1mL蒸馏水中 (5mg/mL)。

[0203] 2) 于上述溶液中加入1.0mL新配的0.06M NaIO₄ (M=213.89) 溶液,混匀,4℃避光静置30min。

[0204] 3) 加入1.5mL 0.16M乙二醇,混匀,室温放置30min。

[0205] 4) 1mg HIV-1重组抗原 (2mg/mL) 用0.05M pH 9.5碳酸盐缓冲液4℃透析2h,然后立即加NaIO₄氧化的HRP 2mg,室温避光轻轻搅拌2h。

[0206] 5) 加入100μL新配的2mg/mL NaBH₄ (M=37.83) 溶液,混匀后4℃静置2h。

[0207] 6) 将上述液装入透析袋中,对0.01M pH7.4PBS 4℃透析过夜。

[0208] 7) 选用截留量3500的透析袋,量取合适的尺寸,润湿后扎紧一端,纯化水试漏3次(以无漏液为宜);

[0209] 8) 取0.5mg经过一次标记HRP的HIV-1重组抗原,用0.1mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液调体积至0.5mL,扎紧透析袋另一端后放入pH 9.5碳酸盐缓冲液透析液中透析1h,速度400转/分钟;

[0210] 9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入2mL容积的玻璃瓶中,加入25μg ABEI活化酯,室温振摇反应1.5h。

[0211] 10) 用G25凝胶柱纯化,去除未结合的ABEI活化酯。

[0212] 将上述的标记复合物按照实施例1中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0213] 试剂盒组份主要包括以下:

[0214] a. 包被羊抗FITC的磁性微球溶液

[0215] 羊抗FITC的原浓度:20μg/L 磁性微球浓度:1.0mg/mL

[0216] 磁性微球溶液中含有0.25M磷酸盐缓冲液,0.3M NaCl,0.15%BSA,0.05% TritonX-100,其pH值为7.4。

[0217] b. 二次标记HIV-1重组抗原的标记复合物溶液

[0218] HIV-1重组抗原浓度:10μg/L 标记复合物浓度:0.2mg/L

[0219] 标记复合物稀释液中含有0.2g/L酪蛋白、1.5g/L Tris-base、6.0g/L氯化钠、10.0g/L丙三醇、0.6mL/L吐温-20、250mM的EDTA、2%的蔗糖、0.4M甘氨酸、25%的小牛血清,pH为7.8。

[0220] c. FITC标记的HIV-1重组抗原溶液

[0221] HIV-1重组抗原浓度:10μg/L FITC的浓度:0.1μg/L

[0222] d. 试剂盒缓冲液

[0223] 试剂盒缓冲液含2.0g/L的Tris (纯度≥99%)、1.2g/L的NaCl (分析纯)、0.1% TritonX-100和0.5g/L的BSA (纯度≥99%)、0.1%HCl (分析纯,纯度为36%-38%),pH为7.5。

[0224] 所述各组份均含有0.2%的ProClin300作为防腐剂。

[0225] 实施例6

[0226] 将上述实施例1中的HRP的标记工艺替换为碱性磷酸酶的标记,并将标记复合物中间品二次标记ABEI。具体标记步骤如下:

[0227] 将100μL碱性磷酸酯酶加入到300μL10mM PBS (pH7.2),再加入40μL 25%的戊二醛,混匀,4摄氏度反应20小时;透析至10mM PBS (pH7.2),24小时,换液4次;将HIV-1重组抗

原用10mM PBS (pH7.2) 配成2mg/mL;将250 μ L HIV-1重组抗原加入经过透析的碱性磷酸酶中(终浓度为5000U AP/mg HIV-1重组抗原),混匀,4摄氏度反应24小时。将上述透析好的标记复合物中间品装入2mL容积的玻璃瓶中,加入25 μ g ABEI活化酯,室温振摇反应1.5h。用G25凝胶柱纯化,去除未结合的ABEI活化酯。

[0228] 将上述的标记复合物按照实施例1中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0229] 实施例7

[0230] 将上述实施例1中的HRP的标记工艺替换为牛血清白蛋白(BSA)的标记,并将标记复合物中间品二次标记ABEI。具体标记步骤如下:

[0231] 将100 μ L BSA加入到300 μ L 10mM PBS (pH7.2),再加入40 μ L 25%的戊二醛,混匀,4摄氏度反应20小时;透析至10mM PBS (pH7.2),24小时,换液4次;将HIV-1重组抗原用10mM PBS (pH7.2)配成2mg/mL;将250 μ L HIV-1重组抗原加入经过透析的BSA中(终浓度为1mg BSA/mg HIV-1重组抗原),混匀,4摄氏度反应24小时。将上述透析好的标记复合物中间品装入2mL容积的玻璃瓶中,加入25 μ g ABEI活化酯,室温振摇反应1.5h。用G25凝胶柱纯化,去除未结合的ABEI活化酯。

[0232] 将上述的标记复合物按照实施例1中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0233] 对比例1

[0234] 1) 选用截留量3500的透析袋,量取合适的尺寸,润湿后扎紧一端,纯化水试漏3次(以无漏液为宜);

[0235] 2) 取0.5mg HIV-1重组抗原(2mg/mL),用0.1mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液调体积至0.5mL,扎紧透析袋另一端后放入pH 9.5碳酸盐缓冲液透析液中透析1h,速度400转/分钟;

[0236] 3) 将上述透析好的标记复合物中间品装入2mL容积的玻璃瓶中,加入25 μ g ABEI活化酯,室温振摇反应1.5h;

[0237] 4) 用G25凝胶柱纯化,去除未结合的ABEI活化酯。

[0238] 将上述的标记复合物按照实施例1中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0239] 对比例2

[0240] 将上述对比例1中的直接标记的标记复合物按照实施例4中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0241] 对比例3

[0242] 将上述对比例1中的直接标记的标记复合物按照实施例5中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

[0243] 实验数据和结果分析

[0244] 利用HIV阴性样本S6对倍稀释中度阳性样本S1获得S2,并依次稀释获得S3、S4、S5。将以上样本作为检测样本,利用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的全自动化化学发光免疫分析仪Maglumi 2000Plus测定其光强度(RLU)。

[0245] 上述实施例及对比例中得到的产品的灵敏度检测结果见表1至表3。

[0246] 表1

灵敏度 参考品	对比例 1	实施例 1		实施例 2		实施例 3	
	(RLU)	(RLU)	相对偏差	(RLU)	相对偏差	(RLU)	相对偏差
S1	215032	338917	58%	363668	69%	330832	54%
S2	126390	171963	36%	194806	54%	169737	34%
S3	70134	98012	40%	114540	63%	95831	37%
S4	38648	56675	47%	64515	67%	55820	44%
S5	23580	35466	50%	37336	58%	34896	48%
S6	11845	12135	2%	12657	7%	12302	4%

[0247] 表2

[0248]

灵敏度 参考品	对比例 2	实施例 4		对比例 3	实施例 5	
	(RLU)	(RLU)	相对偏差	(RLU)	(RLU)	相对偏差
S1	206578	318345	54%	230434	343636	49%
S2	126395	174804	38%	137746	184701	34%
S3	64710	89725	39%	64193	103566	61%
S4	36257	48492	34%	39233	54586	39%

[0249]

S5	21461	26130	22%	22650	34558	53%
S6	12399	11762	-5%	12456	12055	-3%

[0250] 表3

灵敏度 参考品	对比例 1	实施例 6		实施例 7	
	(RLU)	(RLU)	相对偏差	(RLU)	相对偏差
S1	215032	315787	47%	328770	53%
S2	126390	169209	34%	177332	40%
S3	70134	94173	34%	102532	46%
S4	38648	57626	49%	54657	41%
S5	23580	31023	32%	33609	43%
S6	11845	12036	2%	11785	-1%

[0251] 由表1中结果可知,实施例1、实施例2和实施例3对标记蛋白HRP投料比例的研究表明:HIV-1重组抗原与HRP的投料比例为1:2时较两者投料比为1:1和1:3效果更优;同时,这三个实施例较对比例1均有较大幅度的提升。

[0252] 表2中结果可知:实施例4与对比例2的结果和实施例5与对比例3的结果进一步表

明HIV-1重组抗原通过二次标记的标记复合物对HIV-1抗体的检测灵敏度有较大幅度的提升。

[0255] 表3中结果可知:实施例6和实施例7选择不同的标记蛋白ALP和BSA进行一次标记,再进行ABEI的二次标记,相对于对比例1的直接标记均有明显提高检测灵敏度的效果。

[0256] 因此,通过二次标记的标记复合物其检测灵敏度要高于直接标记。由于标记蛋白标记抗原可以使一个抗原上带有多个标记蛋白,而进行二次标记信号生成物质时,一个标记蛋白又与多个信号生成物质结合,产生有效的信号放大作用,从而提高了HIV-1抗体检测的灵敏度,有利于缩短HIV-1抗体检测的窗口期。

[0257] 将试剂分别置于37℃恒温恒湿箱中进行加速实验,实验持续8天。以高值阳性样本作为检测样本,利用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的全自动化学发光免疫分析仪Maglumi 2000Plus测定加速实验前后的光强度(RLU)。

[0258] 不同实施例高温加速热稳定性对比见表4至表6。

[0259] 表4

[0260]

实施例	对比例 1		实施例 1		实施例 2		实施例 3	
37 °C	检测值	偏差	检测值	偏差	检测值	偏差	检测值	偏差

[0261]

处理	(RLU)	(%)	(RLU)	(%)	(RLU)	(%)	(RLU)	(%)
第 0 天	623002	-	1012527	-	1132528	-	972531	-
第 1 天	452922	-37.55%	1007465	-0.50%	1123468	-0.81%	957943	-1.52%
第 2 天	414424	-50.33%	998398	-1.42%	1114480	-1.62%	956027	-1.73%
第 3 天	389558	-59.93%	990410	-2.23%	1105564	-2.44%	947423	-2.65%
第 4 天	365016	-70.68%	982487	-3.06%	1098931	-3.06%	940791	-3.37%
第 5 天	338370	-84.12%	962837	-5.16%	1086842	-4.20%	923857	-5.27%
第 6 天	308932	-101.66%	955135	-6.01%	1081408	-4.73%	922009	-5.48%
第 7 天	284217	-119.20%	953224	-6.22%	1074920	-5.36%	921087	-5.59%

[0262] 表5

[0263]

实施例	对比例 2		实施例 4		对比例 3		实施例 5	
37 °C 处理	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)
第 0 天	621248	-	1032362	-	603357	-	1089629	-
第 1 天	444814	-39.66%	1010683	-2.15%	432004	-39.66%	1076553	-1.21%
第 2 天	406115	-52.97%	999565	-3.28%	401331	-50.34%	1072247	-1.62%
第 3 天	378499	-64.13%	985571	-4.75%	368824	-63.59%	1051874	-3.59%
第 4 天	353140	-75.92%	979658	-5.38%	345588	-74.59%	1050822	-3.69%
第 5 天	329126	-88.76%	974760	-5.91%	316904	-90.39%	1028755	-5.92%
第 6 天	301809	-105.84 %	966961	-6.76%	290601	-107.62 %	1022582	-6.56%
第 7 天	287925	-115.77 %	959226	-7.62%	274037	-120.17 %	1017470	-7.09%

[0264] 表6

实施例	实施例 6		实施例 7		对比例 1	
37 °C 处理	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)
第 0 天	1042528	-	1072526	-	623002	-
第 1 天	1037315	-0.50%	1041423	-2.99%	452922	-37.55%
第 2 天	1015531	-2.66%	1009139	-6.28%	414424	-50.33%
第 3 天	986081	-5.72%	1002075	-7.03%	389558	-59.93%
第 4 天	981150	-6.26%	992054	-8.11%	365016	-70.68%
第 5 天	970358	-7.44%	976181	-9.87%	338370	-84.12%
第 6 天	969387	-7.54%	972277	-10.31%	308932	-101.66%
第 7 天	959694	-8.63%	963526	-11.31%	284217	-119.20%

[0267] 由表4、表5和表6中结果可知,通过二次标记的标记复合物,HIV-1重组抗原仍保持较高的免疫反应活性,经过37°C高温加速7天下降幅度在10%左右;而直接标记的标记复合物在第一天就下降了40%左右,并且呈现持续下降的趋势;对比结果可知,经过二次标记的标记复合物的稳定性改善十分明显。

[0268] HIV-1重组抗原受到物理或化学因素影响时,其分子内部的二、三、和四级结构会

发生变化,抗原的构象发生改变,导致抗原表位被覆盖,引起抗原的免疫反应活性下降或者丧失。而通过标记蛋白与抗原的功能基团偶联,维持抗原的构象或者使构象改变但不会导致抗原表位被覆盖,从而能够保持抗原的免疫反应活性。

[0269] 从以上的描述中,可以看出,本发明上述的实施例实现了如下技术效果:

[0270] 1) 通过二次标记提高重组抗原经过标记后的标记复合物的稳定性,有利于保证试剂盒的性能;

[0271] 2) 提高了检测的灵敏度,从而有利于缩短检测的窗口期,且有利于节省原料;

[0272] 3) 避免了间接标记需要寻找合适的小分子或者标签蛋白及相对应的可识别的配体以及增加重组抗原表达的难度和增加试剂组份等难题。

[0273] 4) 将HIV抗原进行二次标记,HIV抗原保持较高的免疫反应活性,并且标记复合物的稳定性改善十分明显

[0274] 5) 解决了HIV抗原直接标记后,标记复合物的稳定性不足和灵敏度不够,不足以满足试剂的性能的问题。

[0275] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



图1

专利名称(译)	标记复合物及其制备方法、试剂盒、应用和检测系统		
公开(公告)号	CN108700584A	公开(公告)日	2018-10-23
申请号	CN201780003894.1	申请日	2017-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
[标]发明人	饶微 方中刚 袁锦云 王燕梅 李婷华 王小莉		
发明人	饶微 方中刚 袁锦云 王燕梅 李婷华 王小莉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/576 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N33/5761 G01N33/5767 G01N33/5768 G01N21/76 G01N33/569 Y02A50/54 G01N33/532		
代理人(译)	韩建伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种标记复合物、其制备方法、包含所述标记复合物的试剂盒及应用和包括该试剂盒的检测系统。其中，所述标记复合物包括：抗原；标记蛋白，与抗原偶联形成标记复合物中间品；以及信号生成物，与标记复合物中间品偶联形成标记复合物。

