



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108593909 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810499103.5

(22)申请日 2018.05.23

(71)申请人 苏州立禾生物医学工程有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖
街218号生物纳米园B11号501室

(72)发明人 胡庆锋 李勇 高炜晰

(74)专利代理机构 苏州知途知识产权代理事务
所(普通合伙) 32299

代理人 陈瑞洸

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种定点标记免疫试剂的方法、标记免疫试剂及应用

(57)摘要

本发明涉及一种定点标记免疫试剂的方法、标记免疫试剂及应用,该方法首先在抗体或抗原末端连接多肽片段Leu-Pro-X-Thr-Gly,再在信号分子上连接末端含有至少3个甘氨酸的多肽片段,最后将改造抗体或抗原、改造信号分子及转肽酶Sortase A混合反应,使信号分子定量定点标记到抗原或抗体上,反应中还加入多羟基化合物作为蛋白保护剂,可有效保护抗原或抗体的活性,有效避免转肽酶SortaseA导致的抗原或抗体亲和力受损、稳定性受损等,极大改善了标记免疫试剂的热稳定性和特异性,制备的标记免疫试剂批间差异小,将其应用于免疫分析时还可极大节约抗原或抗体。

1. 一种定点标记免疫试剂的方法,其特征在于,包括如下步骤:

在抗体或抗原末端连接含5个氨基酸的多肽片段Leu-Pro-X-Thr-Gly,得改造抗体或抗原;

在信号分子上连接末端至少含3个甘氨酸的多肽片段,得改造信号分子;

将改造抗体或抗原、改造信号分子、转肽酶Sortase A及多羟基化合物加入pH为6.0~8.0的缓冲液中,在30-45℃的温度下混合反应1-2h,将信号分子连接到抗原或抗体上;

所述信号分子为生物素、吡啶酯或吡啶磺酰胺。

2. 根据权利要求1所述的定点标记免疫试剂的方法,其特征在于,所述缓冲液为PB缓冲液、Tris缓冲液、HEPES缓冲液、MOPS0缓冲液、DIPS0缓冲液、甘氨酸缓冲液、醋酸缓冲液中的一种,浓度为0.01mol/L~0.2mol/L。

3. 根据权利要求1或2所述的定点标记免疫试剂的方法,其特征在于,所述改造抗体或抗原、改造信号分子、转肽酶Sortase A及多羟基化合物按0.1-5mol:1-100mol:0.01-0.5g:0.045-1g的比例进行反应。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的定点标记免疫试剂的方法,其特征在于,所述多羟基化合物为聚乙二醇与多糖的混合物,所述聚乙二醇与多糖的质量比为1:0.5-2,所述聚乙二醇为PEG4000、PEG6000、PEG8000中的至少一种,所述多糖为果糖、蔗糖、海藻糖中的至少一种。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的定点标记免疫试剂的方法,其特征在于,所述含5个氨基酸的多肽片段Leu-Pro-X-Thr-Gly连接到抗体Fc末端。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的定点标记免疫试剂的方法,其特征在于,所述信号分子连接末端至少含3个甘氨酸的多肽片段的方法为:将N-羟基琥珀酰亚胺活化的信号分子溶于有机溶剂中,得活化的信号分子溶液;于活化的信号分子溶液中加入碱性溶液调至pH为8-9,室温反应2-3小时;加入酸性溶液调至pH为6.5-7.5,再加入sulfo-SMCC,室温反应1-2小时;加入碱性溶液调至pH为8-9,加入末端至少含3个甘氨酸的多肽序列,室温反应8-16小时。

7. 根据权利要求6所述的定点标记免疫试剂的方法,其特征在于,所述碱性溶液为有机胺溶液,所述有机胺为乙二胺、三乙胺、三乙烯二胺、二乙醇胺、三乙醇胺、四甲基乙二胺中的任意一种;

所述酸性溶液为有机酸溶液,所述有机酸为甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、辛酸、己二酸、乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊酸、己酸、癸酸、丙烯酸中的任意一种。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的定点标记免疫试剂的方法,其特征在于,所述末端至少含3个甘氨酸的多肽序列为Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys。

9. 一种通过定点标记免疫试剂的方法获得的标记免疫试剂,所述标记免疫试剂为抗原或抗体与信号分子定点结合的结合物,所述信号分子为生物素、吡啶酯或吡啶磺酰胺。

10. 一种通过定点标记免疫试剂的方法获得的标记免疫试剂在标记免疫测定技术的应用。

一种定点标记免疫试剂的方法、标记免疫试剂及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种定点标记免疫试剂的方法、标记免疫试剂及应用,属于标记免疫测定技术领域。

背景技术

[0002] 临床免疫测定技术最早出现可追溯至19世纪末,免疫沉淀和免疫凝集技术为经典的免疫测定技术,在此基础上发展出来的标记免疫测定技术可以解决许多经典的免疫测定技术所不能解决的临床测定问题。

[0003] 自从标记免疫测定技术发展以来,发现和应用新的标记物以提高免疫测定的灵敏度、特异性、稳定性和简便性一直是标记免疫测定技术的主要研究方向之一,目前的标记物有同位素、酶、荧光素、胶体金、发光分子等信号分子。

[0004] 标记免疫试剂通常由信号分子标记抗体/抗原而成,传统的标记技术是利用抗原或抗体具有的赖氨酸残基与各种活化形式的信号分子反应,而由于抗原或抗体的赖氨酸残基数量繁多(据统计,150kDa的抗体有超过100个赖氨酸残基),标记具有随意性,标记物种类、反应温度、投料比、反应体系大小、反应时间、搅拌等因素都会影响标记效果,信号分子标记抗体/抗原的数量和位点均不能很好地控制,过多的信号分子标记到抗原/抗体上会导致其亲和力受损、稳定性受损等,信号分子标记到抗原/抗体的关键位点(如抗原决定簇)会直接导致抗原/抗体失活,不恰当的位置标记还会引起抗原/抗体物理性能(如疏水性)的改变,导致抗原/抗体标记信号分子后完全不可用,因此,优化标记过程以控制信号分子标记免疫试剂的数量和位点,并保持抗原或抗体的活性,避免抗原或抗体亲和力受损、稳定性受损等,这对标记免疫试剂的表现至关重要。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是:为解决现有技术存在的上述技术问题以控制信号分子标记免疫试剂的数量和位点,并保持抗原或抗体的活性,避免抗原或抗体亲和力受损、稳定性受损等,提供一种定点标记免疫试剂的方法、标记免疫试剂及应用。

[0006] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0007] 一种定点标记免疫试剂的方法,包括如下步骤:

[0008] 在抗体或抗原末端连接含5个氨基酸的多肽片段Leu-Pro-X-Thr-Gly (Leu为亮氨酸,Pro为脯氨酸,X为任意氨基酸,Thr为苏氨酸,Gly为甘氨酸),得改造抗体或抗原;

[0009] 在信号分子上连接末端至少含3个甘氨酸的多肽片段,得改造信号分子;

[0010] 将改造抗体或抗原、改造信号分子、转肽酶Sortase A及多羟基化合物加入pH为6.0~8.0的缓冲液中,在30-45℃的温度下混合反应1-2h,将信号分子连接到抗原或抗体上;

[0011] 所述信号分子为生物素、吡啶酯或吡啶磺酰胺;

[0012] 优选地,所述缓冲液为PB缓冲液、Tris缓冲液、HEPES缓冲液、MOPSO缓冲液、DIPSO

缓冲液、甘氨酸缓冲液、醋酸缓冲液中的一种,浓度为0.01mol/L~0.2mol/L。

[0013] 优选地,所述改造抗体或抗原、改造信号分子、转肽酶Sortase A及多羟基化合物按0.1-5mol:1-100mol:0.01-0.5g:0.045-1g的比例进行反应。

[0014] 优选地,所述多羟基化合物为聚乙二醇与多糖的混合物,所述聚乙二醇与多糖的质量比为1:0.5-2。

[0015] 优选地,所述聚乙二醇为PEG4000、PEG6000、PEG8000中的至少一种,所述多糖为果糖、蔗糖、海藻糖中的至少一种。

[0016] 优选地,所述含5个氨基酸的多肽片段Leu-Pro-X-Thr-Gly连接到抗体Fc末端。

[0017] 优选地,所述信号分子连接末端至少含有3个甘氨酸的多肽片段的方法为:将N-羧基琥珀酰亚胺活化的信号分子溶于有机溶剂中,得活化的信号分子溶液;于活化的信号分子溶液中加入碱性溶液调至pH为8-9,室温反应2-3小时;加入酸性溶液调至pH为6.5-7.5,再加入sulfo-SMCC,室温反应1-2小时;加入碱性溶液调至pH为8-9,加入末端至少含3个甘氨酸的多肽序列,室温反应8-16小时。

[0018] 优选地,所述碱性溶液为有机胺溶液,所述有机胺为乙二胺、三乙胺、三乙烯二胺、二乙醇胺、三乙醇胺、四甲基乙二胺中的任意一种。

[0019] 优选地,所述酸性溶液为有机酸溶液,所述有机酸为甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、辛酸、己二酸、乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊酸、己酸、癸酸、丙烯酸中的任意一种。

[0020] 优选地,所述末端至少含3个甘氨酸的多肽序列为Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys(Cys为半胱氨酸)。

[0021] 本发明还提供一种通过上述定点标记免疫试剂的方法获得的标记免疫试剂,所述标记免疫试剂为抗原或抗体与信号分子定点结合的结合物,所述信号分子为生物素、吡啶酯或吡啶磺酰胺。

[0022] 本发明还提供一种通过上述定点标记免疫试剂的方法获得的标记免疫试剂在标记免疫测定技术的应用。

[0023] 本发明的有益效果是:

[0024] 本申请提供了一种新颖高效的方法以将信号分子定点标记抗原或抗体,首先在抗体或抗原末端连接含5个氨基酸的多肽片段Leu-Pro-X-Thr-Gly,再在信号分子上通过特定方法连接末端至少含有3个甘氨酸的多肽片段,最后将改造抗体或抗原、改造信号分子及转肽酶Sortase A混合反应,使信号分子定量定点标记到抗原或抗体上,值得一提的是,反应中还加入多羟基化合物作为蛋白保护剂,可有效保护抗原或抗体的活性,有效避免转肽酶Sortase A导致的抗原或抗体亲和力受损、稳定性受损等,极大改善了标记免疫试剂的热稳定性和特异性,且采用该方法制备的标记免疫试剂批间差异小,极大地减少了企业生产试剂时为筛选合格标记批次而带来的人力物力财力的浪费,将其应用于免疫分析时还可极大节约抗原或抗体。

具体实施方式

[0025] 现在对本发明作进一步详细的说明。

[0026] 实施例1

[0027] 本实施例提供一种吡啶酯定点标记人类免疫缺陷病毒(HIV)抗原的方法获得吡啶

酯标记的HIV抗原,具体步骤为:

[0028] 在HIV抗原的末端克隆进带Leu-Pro-Ala-Thr-Gly (Ala为丙氨酸)的表达质粒,将表达质粒转染大肠杆菌后表达,即可在HIV抗原末端连接多肽片段Leu-Pro-Ala-Thr-Gly,得改造HIV抗原;

[0029] 将N-羟基琥珀酰亚胺活化的吡啶酯用DMF溶解,得吡啶酯溶液;于吡啶酯溶液中加入乙二胺溶液调至pH为8-9,室温反应3小时;加入乙酸溶液调至pH为6.5-7.5,再加入sulfo-SMCC,室温反应2小时;加入乙二胺溶液调至pH为8-9,加入多肽序列Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys,室温反应16小时,得改造信号分子;

[0030] 将改造HIV抗原、改造信号分子、转肽酶Sortase A、PEG4000及果糖加入50mM, pH为6.0的PB缓冲液中,使改造HIV抗原、改造信号分子、转肽酶Sortase A、PEG4000及果糖的浓度分别为5 μ mol/L、100 μ mol/L、0.5 μ g/L、0.5 μ g/L、0.5 μ g/L,在50rpm的摇床里,45 $^{\circ}$ C的温度下混合反应1h,将信号分子连接到HIV抗原上,即得标记免疫试剂溶液;

[0031] 将标记免疫试剂溶液移至透析袋(截留分子量8000-12000),采用0.05mol/L pH为9.5CB缓冲液透析2次,每次透析3小时,加入等量甘油,放置-20 $^{\circ}$ C以下保存。

[0032] 实施例2

[0033] 本实施例提供一种吡啶磺酰胺定点标记HIV抗原的方法获得吡啶磺酰胺标记的HIV抗原,具体步骤为:

[0034] 在HIV抗原的末端克隆进带Leu-Pro-Cys-Thr-Gly的表达质粒,将表达质粒转染大肠杆菌后表达,即可在HIV抗原末端连接多肽片段Leu-Pro-Cys-Thr-Gly,得改造HIV抗原;

[0035] 将N-羟基琥珀酰亚胺活化的吡啶磺酰胺用DMF溶解,得吡啶磺酰胺溶液;于吡啶磺酰胺溶液中加入有三乙烯二胺溶液调至pH为8-9,室温反应2.5小时;加入己二酸溶液调至pH为6.5-7.5,再加入sulfo-SMCC,室温反应1.5小时;加入三乙烯二胺溶液调至pH为8-9,加入多肽序列Gly-Gly-Gly-Cys,室温反应10小时,得改造信号分子;

[0036] 将改造HIV抗原、改造信号分子、转肽酶Sortase A、PEG6000及蔗糖加入50mM, pH为8.0的Tris缓冲液中,使改造HIV抗原、改造信号分子、转肽酶Sortase A、PEG6000及蔗糖的浓度分别为0.1 μ mol/L、1 μ mol/L、0.01 μ g/L、0.03 μ g/L、0.015 μ g/L,在50rpm的摇床里,30 $^{\circ}$ C的温度下混合反应2h,将吡啶磺酰胺连接到HIV抗原上,即标记免疫试剂溶液;

[0037] 将标记免疫试剂溶液移至透析袋(截留分子量8000-12000),采用0.05mol/L pH为9.5CB的缓冲液透析2次,每次透析3小时,加入等量甘油,放置-20 $^{\circ}$ C以下保存。

[0038] 实施例3

[0039] 本实施例提供一种生物素定点标记抗甲胎蛋白(AFP)特异性单克隆抗体1的方法获得生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1,具体步骤为:

[0040] 在抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1的Fc末端克隆进带Leu-Pro-Leu-Thr-Gly的表达质粒,将表达质粒转染大肠杆菌后表达,即可在HIV抗原末端连接多肽片段Leu-Pro-Leu-Thr-Gly,得改造抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1;

[0041] 将N-羟基琥珀酰亚胺活化的生物素用DMF溶解,得生物素溶液;于生物素溶液中加入二乙醇胺溶液调至pH为8-9,室温反应2小时;加入丙烯酸溶液调至pH为6.5-7.5,再加入sulfo-SMCC,室温反应1小时;加入二乙醇胺溶液调至pH为8-9,加入多肽序列Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys,室温反应8小时,得改造信号分子;

[0042] 将改造抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1、改造信号分子、转肽酶Sortase A、PEG6000及海藻糖加入50mM, pH为6.8的HEPES缓冲液中,使改造抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1、改造信号分子、转肽酶Sortase A、PEG6000及海藻糖的浓度分别为1 μ mol/L、10 μ mol/L、0.1 μ g/L、0.1 μ g/L、0.2 μ g/L,在50rpm的摇床里,40℃的温度下混合反应1.5h,将生物素连接到抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1上,即标记免疫试剂溶液;

[0043] 将标记免疫试剂溶液移至透析袋(截留分子量8000-12000),采用0.05mol/L pH为9.5CB的缓冲液透析2次,每次透析3小时,加入等量甘油,放置-20℃以下保存。

[0044] 对比例1

[0045] 本对比例提供一种通过N-羟基琥珀酰亚胺将吡啶酯标记到HIV抗原的传统方法以获得吡啶酯标记的HIV抗原,具体步骤为:

[0046] 将抗原采用0.05mol/L pH为9.5的CB缓冲液配制抗原溶液;于抗原溶液中加入NHS活化的吡啶酯,使抗原、NHS活化的吡啶酯的摩尔比为1:10,室温反应2小时,得反应液;将反应液移至透析袋(截留分子量8000-12000),采用0.05mol/L pH为9.5的CB缓冲液透析2次,每次透析3小时,加入等量甘油,放置-20℃以下保存。

[0047] 对比例2

[0048] 本对比例提供一种通过N-羟基琥珀酰亚胺将吡啶磺酰胺标记到HIV抗原的传统方法以获得吡啶磺酰胺标记的HIV抗原,具体步骤为:

[0049] 将抗原采用0.05mol/L pH为9.5的CB缓冲液配制抗原溶液;于抗原溶液中加入NHS活化的吡啶磺酰胺,使抗原、NHS活化的吡啶磺酰胺的摩尔比为1:50,室温反应0.5小时,得反应液;将反应液移至透析袋(截留分子量8000-12000),采用0.05mol/L pH为9.5的CB缓冲液透析2次,每次透析3小时,加入等量甘油,放置-20℃以下保存。

[0050] 对比例3

[0051] 本对比例提供一种通过N-羟基琥珀酰亚胺将生物素标记到抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1的传统方法以获得生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1,具体步骤为:

[0052] 将抗原采用0.05mol/L pH为9.5的CB缓冲液配制抗原溶液;于抗原溶液中加入NHS活化的生物素,使抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1、NHS活化的生物素的摩尔比为1:50,室温反应0.5小时,得反应液;将反应液移至透析袋(截留分子量8000-12000),采用0.05mol/L pH为9.5的CB缓冲液透析2次,每次透析3小时,加入等量甘油,放置-20℃以下保存。

[0053] 效果例1

[0054] 本效果例采用实施例1的方法制得三批次吡啶酯标记的HIV抗原,分别为定向标记物1-1、定向标记物2-1、定向标记物3-1,并采用对比例1的方法制得三批次吡啶酯标记的HIV抗原,分别为传统标记物1-1、传统标记物2-1、传统标记物3-1,并将所有吡啶酯标记的HIV抗原分别在4℃和37℃下放置3天,然后通过化学发光免疫分析方法检测500例阴性血样,具体步骤为:

[0055] S1:将50 μ L待测样本和100 μ L浓度为0.4mg/L的生物素化的HIV抗原溶液反应10分钟,形成抗原-抗体复合体;

[0056] S2:加入20 μ L浓度为0.8mg/L的链霉亲和素包被的磁颗粒试剂,与S1的抗原-抗体复合体反应10分钟后,形成磁性抗原-抗体复合体悬浮液;

[0057] S3:将S2的磁性抗原-抗体复合体悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性抗原-抗体复

合体；

[0058] S4:将S3的洗涤后的磁性抗原-抗体复合体与150 μ L浓度为0.1mg/L的吡啶酯标记的HIV抗原溶液反应20分钟后,形成磁性复合物悬浮液；

[0059] S5:将S4的磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物；

[0060] S6:向S5洗涤后的磁性复合物中注入150 μ L化学发光激发液A(0.1M硝酸和1g/100mL过氧化氢),1.5秒后,注入150 μ L化学发光激发液B(0.25M氢氧化钠和0.1g/100tritonx-100),收集5秒内的化学发光光子强度；

[0061] 将所述化学发光光子强度与Cutoff值比较,若样本化学发光光子强度大于cutoff值,判为阳性,若样本化学发光光子强度小于cutoff值,判为阴性,所述Cutoff值是为500例阴性样本发光值的平均值+2SD,结果如表1。

[0062] 表1不同吡啶酯标记HIV抗原用于免疫分析的发光情况

[0063]

	传统标记 物 1-1	传统标记 物 2-1	传统标记 物 3-1	定向标记 物 1-1	定向标记 物 2-1	定向标记 物 3-1
发光均值 (4°C)	769	1108	1580	1505	1532	1538
发光均值 (37°C)	1680, 1 例假阳性	1660, 3 例假阳性	3548, 5 例假阳性	1625, 无 假阳性	1612, 无 假阳性	1569, 无 假阳性

[0064] 从上表可见,将传统方法(通过N-羟基琥珀酰亚胺将吡啶酯标记到HIV抗原)制备的标记免疫试剂用于化学发光免疫分析测阴性血样时,测得的发光值批间差较大,且随着温度升高发光值明显增大,采用37°C放置的标记免疫试剂时出现假阳性结果,这可能是吡啶酯标记HIV抗原的数量和位点不能控制的原因导致;与采用传统方法制备的标记免疫试剂相比,采用转胺酶Sortase A定向标记技术制备的标记免疫试剂可以很好地控制发光值的批间差,极大地减少企业生产试剂时为筛选合格标记批次而带来的人力物力财力的浪费,而且随着温度升高发光值变化较小,无假阳性结果,可见采用定向标记技术制备的标记免疫试剂热稳定性得到了极大改善。

[0065] 效果例2

[0066] 本效果例采用实施例2的方法制得三批次吡啶磺酰胺标记的HIV抗原,分别为定向标记物1-2、定向标记物2-2、定向标记物3-2,并采用对比例2的方法制得三批次吡啶磺酰胺标记的HIV抗原,分别为传统标记物1-2、传统标记物2-2、传统标记物3-2,并将所有吡啶磺酰胺标记的HIV抗原分别在4°C和37°C下放置3天,然后通过效果例1的化学发光免疫分析方法检测阳性血样,结果见表2。

[0067] 表2不同吡啶磺酰胺标记HIV抗原用于免疫分析的发光情况

[0068]

	传统标记 物 1-2	传统标记 物 2-2	传统标记 物 3-2	定向标记 物 1-2	定向标记 物 2-2	定向标记 物 3-2
发光均值 (4°C)	172095	146904	224537	201985	196706	194537
发光均值 (37°C)	101536	96523	132268	181687	177035	183701

[0069] 从上表可见,将传统方法(通过N-羟基琥珀酰亚胺将吡啶磺酰胺标记到HIV抗原)制备的标记免疫试剂用于化学发光免疫分析测阳性血样时,测得的发光值批间差较大,且随着温度升高发光值明显变小,采用37°C放置的标记免疫试剂比采用4°C放置的标记免疫试剂发光值降低34.3%-41.1%,这可能是吡啶磺酰胺标记HIV抗原的数量和位点不能控制的原因导致;与采用传统方法制备的标记免疫试剂相比,采用转肽酶Sortase A定向标记技术制备的标记免疫试剂可以很好地控制发光值的批间差,极大地减少企业生产试剂时为筛选合格标记批次而带来的人力物力财力的浪费,而且随着温度升高发光值变化较小,采用37°C放置的标记免疫试剂比采用4°C放置的标记免疫试剂发光值降低5.6%-10.0%,可见采用定向标记技术制备的标记免疫试剂热稳定性得到了极大改善。

[0070] 效果例3

[0071] 本效果例采用实施例3的方法制得三批次生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1,分别为定向标记物1-3、定向标记物2-3、定向标记物3-3,并采用对比例3的方法制得三批次生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1,分别为传统标记物1-3、传统标记物2-3、传统标记物3-3,通过化学发光免疫分析方法检测甲胎蛋白浓度为0IU/mL、0.5IU/mL、1.5IU/mL、5IU/mL、15IU/mL、50IU/mL的标准品,化学发光免疫分析方法的步骤如下:

[0072] S1:将50μL待测样本和100μL生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1溶液(简称生物素化抗体1溶液)及50μL浓度为0.1mg/L的吡啶酯标记的抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体2反应10分钟,形成抗体-抗原-抗体夹心复合体;

[0073] S2:加入20μL浓度为0.8mg/L的链霉亲和素包被的磁颗粒试剂,与S1的抗体-抗原-抗体夹心复合体反应10分钟后,形成磁性复合体悬浮液;

[0074] S3:将S2的磁性复合体悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合体;

[0075] S4:向S3洗涤后的磁性复合体中注入150μL化学发光激发液A(0.1M硝酸和1g/100mL过氧化氢),1.5秒后,注入150μL化学发光激发液B(0.25M氢氧化钠和0.1g/100tritonx-100),收集5秒内的化学发光光子强度,结果见表3。

[0076] 表3不同生物素化抗甲胎蛋白抗体1用于免疫分析的发光情况

[0077]

标记物 甲胎蛋白浓度	传统标 记物 1-3	传统标 记物 2-3	传统标 记物 3-3	定向标 记物 1-3	定向标 记物 2-3	定向标 记物 3-3
	生物素化抗体 1 溶液(0.2mg/L)			生物素化抗体 1 溶液(0.04mg/L)		
0IU/mL	2769	1869	5231	1409	1380	1544
0.5IU/mL	35827	41593	52109	56197	54153	58742
1.5IU/mL	135746	153204	163819	164104	158962	162926
5IU/mL	403403	387564	550285	461406	455846	454800
15IU/mL	1265094	1409312	1560986	1218995	1180999	1172460
50IU/mL	3271146	3587654	3875426	3850689	3838058	3777569
相关系数 R^2	0.9925	0.9914	0.9893	0.9996	0.9997	0.9997

[0078] 从上表来看,采用转肽酶Sortase A定向标记技术制备的生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1将多肽片段Leu-Pro-Leu-Thr-Gly标记在单克隆抗体1的Fc末端,与传统方法(通过N-羟基琥珀酰亚胺将生物素标记到抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1)制备的生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1相比,应用于免疫分析时,定向标记技术制备的生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1的利用率更好,仅用五分之一的浓度即可达到用传统方法制备的生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1的发光值,线性好,不同标记批次的发光值批间差小,这是因为实施例3的方法可以将生物素定点标记到抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1上,使得抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1可以有效地伸向溶液中去捕获抗原,而传统方法制备的生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1,生物素标记抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1的数量和位点不能控制,抗体1的各部位均可能交联有生物素而不能有效捕获抗原。可见,本发明的定向标记方法制备的生物素化抗甲胎蛋白特异性单克隆抗体1不同标记批次的批间差小,将其应用于免疫分析时可极大节约抗体。

[0079] 以上述依据本发明的理想实施例为启示,通过上述的说明内容,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

专利名称(译)	一种定点标记免疫试剂的方法、标记免疫试剂及应用		
公开(公告)号	CN108593909A	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201810499103.5	申请日	2018-05-23
[标]发明人	胡庆锋 李勇 高炜晰		
发明人	胡庆锋 李勇 高炜晰		
IPC分类号	G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种定点标记免疫试剂的方法、标记免疫试剂及应用，该方法首先在抗体或抗原末端连接多肽片段Leu-Pro-X-Thr-Gly，再在信号分子上连接末端含有至少3个甘氨酸的多肽片段，最后将改造抗体或抗原、改造信号分子及转肽酶Sortase A混合反应，使信号分子定量定点标记到抗原或抗体上，反应中还加入多羟基化合物作为蛋白保护剂，可有效保护抗原或抗体的活性，有效避免转肽酶SortaseA导致的抗原或抗体亲和力受损、稳定性受损等，极大改善了标记免疫试剂的热稳定性和特异性，制备的标记免疫试剂批间差异小，将其应用于免疫分析时还可极大节约抗原或抗体。

	传统标记 物 1-1	传统标记 物 2-1	传统标记 物 3-1	定向标记 物 1-1	定向标记 物 2-1	定向标记 物 3-1
发光均值 (4°C)	769	1108	1580	1505	1532	1538
发光均值 (37°C)	1680, 1 例假阳性	1660, 3 例假阳性	3548, 5 例假阳性	1625, 无 假阳性	1612, 无 假阳性	1569, 无 假阳性