

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810127046.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月23日

[11] 公开号 CN 101609090A

[22] 申请日 2008.6.19

[21] 申请号 200810127046.4

[71] 申请人 北京华科泰生物技术有限公司

地址 100070 北京市丰台区科技园区海鹰路8
号院2号楼606室

[72] 发明人 林 斯

[74] 专利代理机构 北京华科联合专利事务所

代理人 王 为

权利要求书3页 说明书10页

[54] 发明名称

一种采用吖啶酯标记抗原或抗体分析方法

[57] 摘要

本发明涉及一种化学发光免疫测定方法，特别涉及一种采用吖啶酯标记抗原或抗体分析方法以及用该方法制备一种免疫测定试剂盒，吖啶酯标记物在化学结构上有产生发光的特殊基团，在发光免疫分析过程中直接参与发光反应，通常这类物质没有本底发光，在反应中能用于检测低浓度或微量浓度的样品，是一类发光效率很高的发光剂，吖啶酯 I、II 分子和吖啶酰胺 III 均可与抗体(或抗原)结合，生成具有化学发光活性强、免疫反应特异性高的标记抗体。

- 1、一种采用吡啶酯标记抗原或抗体分析方法，其特征在于，将吡啶酯与抗体或抗原结合，生成标记抗体。
- 2、根据权利要求1所述的方析方法，其特征在于，吡啶酯标记在抗原或抗体的氨基上，抗体上与抗原反应的可变区，主要由有几个氨基组成，这几个氨基决定了免疫反应的特异性和亲和性。
- 3、根据权利要求1所述的方析方法，其特征在于，其中还包括一种包被技术，利用聚苯乙烯包被，吡啶酯标记抗原或抗体的技术组成中，将吡啶酯标记在抗体的固定区上，使其在聚苯乙烯固相的包被技术中，其标记抗体既保持应有的特性，又不易失活。
- 4、根据权利要求1所述的方析方法，其特征在于，还包括一种反应放大系统，其特征在于，采用生物素-亲和素的反应建立放大系统。
- 5、根据权利要求4所述的方析方法，其特征在于，所述的反应放大系统，其特征在于，用生物素标记包被抗体，与固相抗原结合后标记物混合后，再加入亲和素-结合物聚苯乙烯固相。
- 6、根据权利要求4所述的方析方法，其特征在于，所述的反应放大系统，其特征在于，采用链霉亲和素-生物素的反应方法系统。
- 7、根据权利要求4所述的方析方法，其特征在于，所述的反应放大系统，以磁性微球或聚苯乙烯固相作为载体，在表面上最大量的包被上链霉亲和素，
 - (1) 与标记了生物素的抗原或抗体反应形成链霉亲和素-生物素包被抗体，
 - (2) 再与标记物一起形成高亲合力的牢固结合及多级放大效应，可达到检测浓度小于 1Pmol/L 的超微量物质。
- 8、根据权利要求4所述的方析方法，其特征在于，所述的反应放大系统，生物素-亲和素反应放大系统应用于磁颗粒的包被中，用所形成的亲和素-生物素-酶复合物抗体与磁颗粒结合，追踪生物素酶或吡啶酯标记的抗原或抗体，通过酶催化底物显色，可检出相应的抗体或抗原。
- 9、一种利用权利要求1的方法制备的甲状腺素(T4)免疫诊断试剂盒，其特征在于，该试剂盒采用吡啶酯标记工艺对T4抗原进行标记并纯化，在磁颗粒的包

被技术中，用辣根过氧化物酶标记，借助抗体与磁颗粒的结合，追踪辣根过氧化物酶标记的抗原或抗体，可检出相应的抗体或抗原，

用包被有抗荧光素抗体或抗羊二抗的磁性微粒子，将羊抗 T4 多抗标记荧光素后预先与包被有抗荧光素抗体的磁性微粒子反应或直接将 T4 羊抗与包被有抗羊二抗的磁性微粒子反应，最终实现间接将羊抗 T4 多抗包被在磁性微粒子上，并通过洗涤分离后保存，

利用生物素-亲和素系统，将羊抗 T4 多抗标记生物素，借助所形成的亲和素-生物素-抗体与磁颗粒结合，与辣根过氧化物酶标记的抗原或抗体反应，检出相应的抗体或抗原，

将抗体包被在磁颗粒上，采用闪光型化学发光物质吖啶酯作为标记物，标记抗体（抗原），与样本中的抗原（抗体）三者结合，直接发光进行定性和定量分析。

10、根据权利要求 9 的甲状腺素（T4）免疫诊断试剂盒，其特征在于，包括以下内容

吖啶酯标记物的制备：

吖啶酯标记物在化学结构上有产生发光的特殊基团，在发光免疫分析过程中直接参与发光反应，通常这类物质没有本底发光，在反应中能用于检测低浓度或微量浓度的样品，是一类发光效率很高的发光剂，吖啶酯 I、II 分子和吖啶酰胺 III 均可与抗体（或抗原）结合，生成具有化学发光活性强、免疫反应特异性高的标记抗体，吖啶酯标记在抗原（抗体）的氨基上，抗体上与抗原反应的可变区有几个氨基，这几个氨基决定了免疫反应的特异性和亲和性，所以要想既能比较高效率的标记上吖啶酯又不能损伤抗体活性，一个很好的途径就是将吖啶酯标记在抗体的固定区上，使其既保持应有的特性，又不易失活，

将抗体包被在磁颗粒上：

微粒子是由高分子单体聚合成的微球或颗粒，直径多为微米或毫米级，微粒子带有能与蛋白质结合的功能团（如-NH₂、-COOH、-OH、-CHO 等），易于抗体（抗原）形成化学偶联，且结合容量大，此外，在反应时，微粒子可以均匀的分散到整个反应溶液中，使反应面积增加，反应速度加快，

磁性颗粒在液相中可使反应物（抗体）迅速有效的结合到其表面，在这里也

可应用亲和素-生物素放大系统，

亲和素-生物素放大系统的应用：

生物素通过噻吩环戊酸侧链上的羧基与多种大分子偶连活化后，可用于标记各种蛋白质（包括抗原、抗体、酶等），形成生物素化蛋白质衍生物，一个蛋白质分子可以与多个生物素分子结合，从而具有较高的比活性，生物素化大分子的多价性是生物素-亲和素系统多级放大作用的物质基础。

一种采用吡啶酯标记抗原或抗体分析方法

技术领域:

本发明涉及一种化学发光免疫测定方法,特别涉及一种采用吡啶酯标记抗原或抗体分析方法以及用该方法制备一种免疫测定试剂盒。

背景技术:

化学发光免疫测定(Chemiluminescent Immunoassay, CLIA)是免疫测定技术继酶免技术(EIA)、放免技术(RIA)、荧光免疫技术(FIA)和时间分辨荧光免疫技术(TRFIA)之后发展的一项新兴测定技术。

化学发光技术是近二、三十年来发展起来的一种测定方式,其利用化学反应释放的自由能激发中间体(常用碱性磷酸酶—金刚烷胺),使其从激发态回到基态,当中间体从激发态回到基态时会释放等能级的光子,对光子进行测定而进行定量分析。

化学发光具有荧光的特异性,同时不需要激发光,就避免了荧光分析中激发光杂散光的影响有很高的灵敏度,并且不像放射分析那样存在强烈的环境污染和健康危害,是一种非常优秀的定量分析方法。虽然化学发光具备很高的特异性和很小的干扰,但化学分析本身的不特异性,制约了整个方法的使用。因此,如同RIA、FIA等一样利用免疫反应的特异性和化学发光本身的信号特异性形成了目前所说的化学发光免疫测定(CLIA)技术。

化学发光免疫测定技术是一种高度敏感的微量测定技术,凡具有抗原性的物质(包括半抗原)都可以用化学发光免疫测定技术测定。其具备以下特点:

- ①高度敏感,极限达 10^{-17} — 10^{-19} M/L,远高于RIA、EIA,与TRFIA相当但比TRFIA便宜。
- ②特异性强,重复性好C.V. < 5%。
- ③测定范围宽,可达7个数量级。
- ④试剂稳定性好,无污染有效期6—12月。
- ⑤操作简单,易于自动化。

化学发光免疫分析分为：化学发光酶免疫分析和闪光型化学发光免疫分析两种。其中化学发光酶免疫分析属于酶免疫测定的一种类型，只是最后一步酶促反应所用的底物为发光剂，通过发光反应的光在特定的仪器上进行测定的。在标记方面：常用的标记酶有辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）和碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP），而闪光型化学发光免疫分析是采用吖啶酯标记抗原或抗体。

辣根过氧化物酶是一种分子量达44000的糖蛋白，由无色的酶蛋白和深棕色的铁卟啉结合而成。辣根过氧化物酶的发光底物是鲁米诺（Lumimol）。鲁米诺属于苯胍类的化合物。在碱性条件下，过氧化物酶对鲁米诺与过氧化氢反应起催化作用。

碱性磷酸酶是一种磷酸酯水解酶，从大肠杆菌提取的AP分子量为80kDa，最适pH值为8.0；从小肠粘膜提取的AP分子量为100kDa，最适pH值为9.6。AMPPD是碱性磷酸酶的发光底物。

AMPPD的分子结构中由两个重要部分：一个是连接苯环和金刚烷的二氧化环，它可以断裂并发射光子；另一个是磷酸基团，它维持整个分子结构的稳定。在碱性磷酸酶的作用下，这种底物迅速脱去磷酸基团，生成不稳定的中间体AMPD。AMPD很快自行分解，从高能激发态回到低能稳定态，同时发出光子。

HRP和AP在化学发光技术中，用于标记抗体（抗原）形成酶标记抗体（抗原）结合物，此结合物既保留抗体（抗原）的免疫活性，又保留的酶对底物的催化活性。酶标抗体（抗原）与抗原（抗体）的免疫反应进行后，利用其对发光底物催化作用而直接发光，通过发光强度的测定而直接进行定量。

目前酶促化学发光诊断产品均停留在半自动化水平，操作时间较长，检测结果重复性差，误检率高。如T4酶促化学发光诊断试剂至少1个小时出结果，而且为了降低成本往往需要集合一定样本量后才进行检测，这样最早来体检的病人少则等待2天，多则半月。

本发明的开展目的就是使得用户能够更简便、快捷、准确的获得检测数据。

本发明主要利用抗原和抗体免疫反应的特异性和亲合性，通过在抗原或抗体标记可以用来示踪的能发生化学发光的有机小分子来确定待测抗原的浓度的一种微量物质诊断技术。

另外,本发明还结合目前先进的磁性微粒子技术来达到快速自动化诊断的目的。

发明内容:

本发明的目的在于提供一种闪光型化学发光免疫分析方法,特别涉及采用吡啶酯标记抗原或抗体分析方法。

吡啶酯标记物在化学结构上有产生发光的特殊基团,在发光免疫分析过程中直接参与发光反应。通常这类物质没有本底发光,在反应中能用于检测低浓度或微量浓度的样品,是一类发光效率很高的发光剂。吡啶酯I、II分子和吡啶酰胺III均可与抗体(或抗原)结合,生成具有化学发光活性强、免疫反应特异性高的标记抗体。

吡啶酯标记在抗原(抗体)的氨基上,抗体上与抗原反应的可变区,主要由有几个氨基组成,这几个氨基决定了免疫反应的特异性和亲和性。由于吡啶酯标记抗体时有将可变区上的氨基屏蔽的可能,这样将导致抗体失去生物活性、失去特异性。我们采用一种特殊工艺,能够避开可变区,将吡啶酯标记在抗体的固定区上,使其既保持应有的特性,又不易失活。

本发明采用闪光型化学发光物质吡啶酯作为标记物,吡啶酯是有机小分子,发光信号与分子个数一一对应,不受环境影响,因此检测结果的重现性好。

本发明的另一个目的在于提供一种包被技术。

本发明采用目前国际上先进的聚苯乙烯包被技术,可以使得参与免疫反应的抗体浓度大大增加,进而提高检测灵敏度和反应速率。由于在聚苯乙烯表面进行免疫反应近似于液相反应,与目前国内包被板技术相比,微观反应过程不需要反应物由液相主体扩散至固液界面后再进行分子碰撞,因此大大减少了液体环境中的干扰物质对整个免疫反应过程干扰的几率,使得检测结果更准确。

为了提高化学发光免疫分析测定的敏感性,出现了众多的测定放大系统,以生物素-亲和素反应为基础的放大系统便是其中之一。在包被技术方面,我们利用的生物素-亲和素反应基础的放大系统。

生物素通过噻吩环戊酸侧链上的羧基与多种大分子偶连活化后,可用于标记各种蛋白质(包括抗原、抗体、酶等),形成生物素化蛋白质衍生物。一个蛋白质分子可以与多个生物素分子结合,从而具有较高的比活性。生物素化大分子的

多价性是生物素-亲和素系统多级放大作用的物质基础。

亲和素-生物素系统在化学发光技术中的应用有多种形式,亦可用于间接包被。可以在固相上预先包被亲和素,原用吸附法包被固相的抗体或抗原与生物素结合,通过亲和素-生物素反应而使生物素化的抗体或抗原与亲和素结合。这种包被法不仅可增加吸附的抗体或抗原量,而且使其结合点充分暴露。

生物素(biotin, B)分子量为244.3kDa,等电点为pH值3.5。生物素结构中的咪唑酮环是与亲和素结合的主要部位,噻吩环戊酸侧链末端羧基是与抗体和酶等蛋白质结合的主要部位。利用生物素的羧基加以化学修饰后可制成各种活性基团的衍生物(活化生物素),以适合与各种生物大分子结合的需要。

亲和素(avidin, A)分子量68kDa,等电点为PH值10-10.5。亲和素富含色氨酸,借助色氨酸残基与生物素的咪唑酮环结合。亲和素与生物素之间的亲和力极强,比抗原与抗体的亲和力至少高1万倍,且具有高度特异性和稳定性。

由生物素-亲和素反应建立放大系统为基础,是用生物素标记包被抗体,与固相抗原结合后标记物混合后,再加入亲和素-结合物聚苯乙烯固相,由于一个抗体可以连接多个生物素分子,因此在一个生物素化的抗体在反应时可与多个亲和素分子结合,亲和素性质极为稳定,每分子可结合4个生物素衍生物,其作为生物素化的分子之间的桥接物,起放大作用。

同时,它又是糖蛋白,可直接与各种生物分子如IgG及茶碱、苯妥英、蛋白质等偶连,从而使测定的反应放大。我们已经将此方法用于包被板上,并取得了良好的效果:生物素与亲和素结合具有高度的亲和力,且均能偶连抗体、抗原和辣根过氧化物酶而不影响生物活性。

在接下来技术优化的过程中,我们要将生物素-亲和素系统技术应用于磁颗粒的包被中,借助所形成的亲和素-生物素-酶复合物抗体与磁颗粒结合,追踪生物素酶或吡啶酯标记的抗原或抗体,通过酶催化底物显色,可检出相应的抗体或抗原。

此方法的好处在于在不同的项目可以共用试剂,使其具有更特异、灵敏、简便、快速的特点。

本发明的工艺创新在于:

包被技术中采用新型的反应放大系统——采用链霉亲和素-生物素包被技

术。这是一种新型反应放大系统。以磁性微球或聚苯乙烯固相作为载体，在表面上最大量的包被上链霉亲和素，与标记了生物素的抗原或抗体反应形成链霉亲和素-生物素包被抗体，再与标记物一起形成高亲合力的牢固结合及多级放大效应，使得检测更加灵敏，可达到检测浓度小于1Pmol/L的超微量物质的目的。

链霉亲和素是一种略偏酸性蛋白，其分子量为65000，由4条序列相同的亚基构成，每个亚基可以结合1个生物素分子，因此1个链霉亲和素分子具有4个可与生物素分子结合的位点。链霉亲和素不含糖基，在与组织细胞、DNA结合时，不易产生非特异性结合。它的活性可达18u。在化学发光免疫分析中，磁性微球或聚苯乙烯固相作为载体，能够包被最大量的链霉亲和素，并有效的与生物素试剂结合，大大加快免疫反应速度。

生物素又称维生素H，呈环形结构，分为I环和II环，I环是链霉亲和素结合的主要部位，II环是标记抗体和酶的唯一结构，可有效结合不同的抗原和各种酶，用于测定多种蛋白、激素、抗原和多种药物，抗体标记了生物素后，其结合抗原的活性不受影响，多种酶结合生物素后其催化力基本上保持不变，所以采用生物素与多种标记物结合起到有效地放大作用；其生物素化形成的许多“触脚”的多价试剂，使整个反应系统出现多级放大反应，对待测物的检测具有极高的灵敏性，而且反应速度比较快，满足临床和科研需求。

本发明的工艺大大加快了反应速度。在测试过程中，温育时间为9~18 min，20 min 可以出结果，较放射免疫分析法大大缩短了时间，提高了工作效率。高特异性和高亲和力的抗体试剂可以吸附更多的抗原或抗体。发光信号检测的宽线性加上和链霉亲和素-生物素包被技术的信号放大作用，使化学发光检测的线性范围更宽。

本发明的包被工艺，并将其合理运用在实际生产中。这不仅保证了按照整个工艺流程生产出来的产品消耗降至最低，也保证了产品质量的安全可靠。当产品项目繁多并成为一系列时，产品都将进行不同抗体（抗原）的包被，避免生产过程时的混淆及污染。新型工艺的包被技术，可统一固相载体组分，避免不必要的误差，使得检测更简洁、方便。

本发明进一步的是利用本发明的技术进行生物医药体外诊断，开发的产品主要应用于临床医疗诊断的试剂盒，优选的如：制备甲状腺素（T4）体外免疫诊断

试剂盒。最主要受众是各级医院，其他受众还包括食品安全监督系统，公安系统，从事与检验相关的科研系统。化学发光技术作为免疫诊断检测手段最有前途的技术方向，具有广阔的市场前景。

与其它免疫诊断方法如放射免疫分析、酶免疫分析和时间分辨荧光免疫分析相比较，本发明的化学发光免疫分析拥有灵敏度高、特异性强、检测范围宽、产品有效期长、重现性好、成本相对低廉等优势，可用于半定量和定量分析。此方法在使用方面其快速，全部检测时间只需1-3分钟。操作简便可随时随地进行。目前成为在免疫诊断领域目前全球使用最广泛的分析方法，也是免疫试剂重要的发展方向之一。国家“863”计划中对于该领域重点支持该技术的开发与应用推广。表1为项目技术优势图，表2为各分析方法的对比。

表1、项目技术优势图

	免疫诊断技术的优点	免疫诊断技术缺点
生化诊断	价格低廉，更适合大规模筛查，可在临床症状表现前检出，无须口服药物。	价格比生化试剂贵，产品不如生化产品全
仪器诊断	应用面广，操作程序化，对操作人员素质要求不高。	不可作为确诊标准
其他诊断	应用面广，操作程序化，对操作人员素质要求不高。	针对性不强，故大部分无法作为确诊标准

表2、各分析方法的对比

	优点	缺点
放射免疫分析	历史悠久技术成熟，结果重现性好。	放射性废物后处理困难，操作复杂，操作时间长，产品货架期短，不易自动化。
酶免疫分析	操作简便，操作时间短，结果直观，产品货架期长。	灵敏度和检测范围不如放免，检测结果受环境影响大
酶促化学发光免疫分析	操作简便，操作时间短，产品货架期长，灵敏度高，检测范围宽。	结果受环境影响大，重现性差
时间分辨荧光免疫分析	操作简便，产品货架期长，灵敏度高，检测范围宽，结果重现性好，不随环境变化	检测时间长
闪光型化学发光免疫分析	操作简便，货架期长，灵敏度高，检测范围宽，结果重现性好，不随环境变	需要自动化仪器配合

	化，检测时间短	
--	---------	--

本发明的闪光型化学发光主要是用吡啶酯直接标记抗原(抗体)的技术组成，灵敏度高是闪光型化学发光分析技术优越性的关键，其能够检测出放射免疫分析和酶联免疫分析等方法无法检出的物质，对疾病的早期诊断具又重要的意义。吡啶酯标记试剂有效期长，性质稳定，可达一年。

闪光型化学发光技术中吡啶酯作为标记物，我们做到用户不用重复测定标准曲线，可以两点定标，并快速、准确得到数据。目的就是在使其系统化的同时使得患者能够更简便、快捷、准确的获得检测数据。

具体实施方式：

以下通过实施例进一步说明本发明，但不作为本发明的限制。

实施例 1

在吡啶酯的标记技术中，本发明采用一种特殊工艺，避开抗体上与抗原反应的可变区，将吡啶酯标记在抗体的固定区上，使其既保持应有的特性，又不易失活。在进一步的发展中，要将辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、吡啶酯同时标记于抗原(抗体)上，做到在不影响抗原(抗体)活性，不影响酶活性，不互相干扰影响的情况下联合标记。

本发明采用以生物素-亲和素反应为基础的包被技术，此技术可以使得参与免疫反应的抗体浓度大大增加，进而提高检测灵敏度和反应速率。将生物素-亲和素系统技术应用于磁颗粒的包被中是公司在此项目中的技术优化，借助所形成的亲和素-生物素-抗体与磁颗粒结合，追踪酶或吡啶酯标记的抗原或抗体，可检出相应的抗体或抗原。

本发明具体的实施例是用于制备甲状腺素(T4)诊断的试剂盒，该试剂盒主要指标为：

(1) 对国家质控品的检测误差在正负 20%范围，灵敏度 $\leq 5\text{ng/ml}$ ，精密性分析内变异系数 $\text{CV}\% < 15\%$ ；

(2) 分析间变异系数 $\text{CV}\% < 20\%$ 。线性相关系数绝对值 $|r| \geq 0.9900$ 批内变异系数和批间变异系数小于 15%。对 300 例以上的正常人检测结果误检率小于 15%，与进口同类产品检测结果的相关分析的相关系数大于 0.9。

(3) 产品货架期大于 12 个月。

实施例 2

甲状腺素 (T4) 免疫诊断试剂盒

采用链霉亲和素-生物素反应放大系统,结合聚苯乙烯包被技术,辣根过氧化物酶标记抗原(抗体)利用链霉亲和素-生物素反应放大系统,使得参与免疫反应的抗体浓度大大增加,进而提高检测灵敏度和反应速率。

在利用聚苯乙烯包被,吖啶酯标记抗原(抗体)的技术组成中,将吖啶酯标记在抗体的固定区上,使其在聚苯乙烯固相的包被技术中,其标记抗体既保持应有的特性,又不易失活

采用吖啶酯标记工艺对 T4 抗原进行标记并纯化。在磁颗粒的包被技术中,用辣根过氧化物酶标记,借助抗体与磁颗粒的结合,追踪辣根过氧化物酶标记的抗原或抗体,可检出相应的抗体或抗原。

用包被有抗荧光素抗体或抗羊二抗的磁性微粒子,将羊抗 T4 多抗标记荧光素后预先与包被有抗荧光素抗体的磁性微粒子反应或直接将 T4 羊抗与包被有抗羊二抗的磁性微粒子反应,最终实现间接将羊抗 T4 多抗包被在磁性微粒子上,并通过洗涤分离后保存。

利用生物素-亲和素系统,将羊抗 T4 多抗标记生物素,借助所形成的亲和素-生物素-抗体与磁颗粒结合,与辣根过氧化物酶标记的抗原或抗体反应,检出相应的抗体或抗原。

将抗体包被在磁颗粒上,采用闪光型化学发光物质吖啶酯作为标记物,标记抗体(抗原),与样本中的抗原(抗体)三者结合,直接发光进行定性和定量分析。

采用磁板吸附后洗涤分离的方法来实现分离。

实施例 3

1. 吖啶酯标记物的制备:

吖啶酯标记物在化学结构上有产生发光的特殊基团,在发光免疫分析过程中直接参与发光反应。通常这类物质没有本底发光,在反应中能用于检测低浓度或微量浓度的样品,是一类发光效率很高的发光剂。吖啶酯 I、II 分子和吖啶酰胺 III 均可与抗体(或抗原)结合,生成具有化学发光活性强、免疫反应特异性高的标记抗体。吖啶酯标记在抗原(抗体)的氨基上,抗体上与抗原反应的可变区有几个氨基,这几个氨基决定了免疫反应的特异性和亲和性。所以要想既能比较

高效率的标记上吡啶酯又不能损伤抗体活性，一个很好的途径就是将吡啶酯标记在抗体的固定区上，使其既保持应有的特性，又不易失活。

2. 将抗体包被在磁颗粒上：

微粒子是由高分子单体聚合成的微球或颗粒，直径多为微米或毫米级。微粒子带有能与蛋白质结合的功能团（如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CHO}$ 等），易于抗体（抗原）形成化学偶联，且结合容量大。此外，在反应时，微粒子可以均匀的分散到整个反应溶液中，使反应面积增加，反应速度加快。

磁性颗粒在液相中可使反应物（抗体）迅速有效的结合到其表面，在这里也可应用亲和素-生物素放大系统。

3. 亲和素-生物素放大系统的应用：

生物素通过噻吩环戊酸侧链上的羧基与多种大分子偶连活化后，可用于标记各种蛋白质（包括抗原、抗体、酶等），形成生物素化蛋白质衍生物。一个蛋白质分子可以与多个生物素分子结合，从而具有较高的比活性。生物素化大分子的多价性是生物素-亲和素系统多级放大作用的物质基础。

亲和素-生物素系统在化学发光技术中的应用有多种形式，亦可用于间接包被。可以在固相上预先包被亲和素，原用吸附法包被固相的抗体或抗原与生物素结合，通过亲和素-生物素反应而使生物素化的抗体或抗原与亲和素结合。这种包被法不仅可增加吸附的抗体或抗原量，而且使其结合点充分暴露。

另外，在常规化学发光技术中的酶标抗体也可用生物素化的抗体替代，然后连接亲和素-酶结合物，以放大反应信号。

- 1) 首先利用公司现成的 T4 CLEIA 技术成熟的方法学、配方以及原料，这样至少可以保证免疫反应过程是合理可信的，这样可以最大可能的减少后面研究的变量。
- 2) 采用我已经作过摸索的并取得成功的吡啶酯标记工艺对 T4 抗原进行标记并纯化。
- 3) 采购意大利某公司的包被有抗荧光素抗体或抗羊二抗的磁性微粒子，将羊抗 T4 多抗标记荧光素后预先与包被有抗荧光素抗体的磁性微粒子反应或直接将 T4 羊抗与包被有抗羊二抗的磁性微粒子反应，最终实现间接将羊抗 T4 多抗包被在磁性微粒子上，并通过洗涤分离后保存。

- 4) 在早期仪器不能实现自动将反应完成后的磁性微粒子与反应液分离前提下，公司采取用磁板吸附后洗涤分离的方法来实现分离。
- 5) 待稳定地建立起 T4 的 CLIA 方法学以后再逐步改良操作步骤，实现自动化。

专利名称(译)	一种采用吡啶酯标记抗原或抗体分析方法		
公开(公告)号	CN101609090A	公开(公告)日	2009-12-23
申请号	CN200810127046.4	申请日	2008-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
[标]发明人	林斯		
发明人	林斯		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N21/76		
代理人(译)	王为		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种化学发光免疫测定方法，特别涉及一种采用吡啶酯标记抗原或抗体分析方法以及用该方法制备一种免疫测定试剂盒，吡啶酯标记物在化学结构上有产生发光的特殊基团，在发光免疫分析过程中直接参与发光反应，通常这类物质没有本底发光，在反应中能用于检测低浓度或微量浓度的样品，是一类发光效率很高的发光剂，吡啶酯I、II分子和吡啶酰胺III均可与抗体(或抗原)结合，生成具有化学发光活性强、免疫反应特异性高的标记抗体。