



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110862438 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201911143251.4

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2019.11.20

(71)申请人 东莞市东阳光诊断产品有限公司

地址 523871 广东省东莞市长安镇长安振  
安中路368号2号楼303室

(72)发明人 张瑜 陈立勇 刘仁源 顾志鹏  
邓晓侠 熊灿

(74)专利代理机构 北京辰权知识产权代理有限  
公司 11619

代理人 董李欣

(51)Int.Cl.

C07K 14/36(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种复合物及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明涉及一种复合物及其制备方法与应用,本发明提供了一种用于降低抗亲和素抗体干扰的复合物,所述复合物包括生物素和亲和素,所述亲和素饱和结合所述生物素。本发明还提供了其制备方法及其在免疫检测中应用。由于部分人体内存在抗链霉亲和素抗体,在体外免疫诊断过程中,该抗体作为内源干扰物会影响检测结果,而本发明提供的复合物可与该抗体结合,从而避免该抗体对检测造成干扰,减少相应的误差或错误,显著提高检测结果的准确性。

1. 一种用于降低抗亲和素抗体干扰的复合物,其特征在于,所述复合物包括生物素和亲和素,所述亲和素饱和结合所述生物素。

2. 如权利要求1所述复合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括,使所述亲和素与所述生物素在缓冲液中进行反应,制备得到所述复合物;

其中,所述亲和素与所述生物素的摩尔比为1:4-6。

3. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述缓冲液的pH为7-8;

优选地,所述缓冲液为PB、PBS或PBST;

优选地,所述缓冲液的浓度为10-100mM;

优选地,所述反应的温度为25-37℃,优选为37℃。

4. 如权利要求2或3所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法还包括,在所述亲和素与所述生物素进行反应后,进行超滤。

5. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述超滤采用超滤管进行过滤;

优选地,所述超滤管的截留分子量为10-50kD,优选为10-20kD,更优选为20kD。

6. 如权利要求1所述的复合物在免疫检测中的应用,其特征在于,所述免疫检测包括应用亲和素、生物素和如权利要求1所述的复合物对待测样本进行检测。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述免疫检测为酶联免疫检测、化学发光免疫检测、免疫层析检测中的一种;

优选地,所述亲和素结合有酶、荧光染料、放射性碘、微球或层析垫;所述微球优选为磁珠;

优选地,所述生物素结合有抗体,所述抗体可特异性结合待测蛋白。

优选地,所述待测样本为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水。

8. 一种免疫检测方法,其特征在于,所述免疫检测方法包括应用亲和素、生物素和如权利要求1所述的复合物对待测样本进行检测。

9. 如权利要求8所述的免疫检测方法,其特征在于,所述免疫检测为酶联免疫检测、化学发光免疫检测、免疫层析检测中的一种;

优选地,所述亲和素结合有酶、荧光染料、放射性碘、微球或层析垫;所述微球优选为磁珠;

优选地,所述生物素结合有抗体,所述抗体可特异性结合待测抗原;

优选地,所述免疫检测的样本为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水。

10. 如权利要求8或9所述的免疫检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将偶联亲和素的磁珠、如权利要求1所述复合物、生物素化抗体和待测样本混合后依次进行孵育、洗涤;

(2) 向步骤(1)得到的反应液中加入酶标抗体,混匀后依次进行孵育、洗涤;

(3) 向步骤(2)得到的反应液中加入所述酶对应的底物,孵育后进行检测。

## 一种复合物及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种复合物及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin System,BAS)自70年代末起开始引入酶联免疫、反射免疫和荧光免疫等检测技术中,改善了这些方法的稳定性和特异性,大大提高了方法的灵敏度。为准确、快速检测微量抗原和抗体,开辟了一条新的途径,目前已广泛应用于抗原、抗体的定性、定量检测。

[0003] 生物素(biotin)发现于20世纪60年代初,广泛存在于动植物体内,尤其是卵黄和肝脏中含量较高。生物素由咪唑酮环和噻吩环组成,与亲和素结合的主要是咪唑酮环,而噻吩环侧链末端的羧基则可结合抗体和其他大分子物质。

[0004] 亲和素(avidin)又称抗生物素蛋白,最早是从蛋清中提取出的一种碱性糖蛋白。链霉菌(*Streptomyces avidinii*)分泌的链霉亲和素(streptavidin,SA)是目前常用的一类亲和素,分子量为65kD。链霉亲和素分子由4条相同的肽链组成,其中每条肽链都能结合一个生物素,并且不带任何糖基,一个链霉亲和素分子能结合4个生物素分子,二者亲和常数(K)亦为 $10^{15}$ mol/L,比抗原与抗体间的亲和力至少高1万倍。链霉亲和素与生物素结合形成复合物的解离常数很小,呈不可逆反应性,而且酸、碱、变性剂、蛋白溶解酶以及有机溶剂均不影响其结合,因此,二者结合的产物有较高的稳定性。

[0005] 人的身体如果感染链霉菌,体内则会产生抗链霉菌的抗体,该抗体的靶蛋白为链霉亲和素蛋白,因此部分人血清中存在抗链霉亲和素的抗体。在体外诊断检测过程中,此抗体会与检测试剂盒中磁珠上偶联的链霉亲和素结合,影响整体检测结果。若干扰抗体结合较多SA-磁珠,由于位阻效应减少了SA-磁珠与生物素抗体结合,导致固相结合物磁珠不能连接入血清中目标抗原,最终检测结果呈假阴性。若干扰物质不仅与SA-磁珠结合,还可以与酶标抗体反应,形成(SA-磁珠—干扰物质—酶标抗体)夹心结构,最终检测结果呈假阳性。因此人血清中抗链霉亲和素抗体的存在严重影响了人体内目标抗原的检测,而现有技术中尚未提出有效的解决办法。现提出消除该物质干扰的解决办法。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种复合物及其制备方法与应用。

[0007] 为此,本发明的第一方面,提供了一种用于降低抗亲和素抗体干扰的复合物,所述复合物包括生物素和亲和素,所述亲和素饱和结合所述生物素。

[0008] 进一步,所述亲和素为链霉亲和素。在具体的实施方式中,在所述复合物中,每个亲和素结合4个所述生物素。

[0009] 本发明的第二方面,提供了所述复合物的制备方法,包括,使所述亲和素与所述生物素在缓冲液中进行反应,制备得到所述复合物;其中,所述亲和素与所述生物素的摩尔比为1:4-6。

- [0010] 进一步,所述缓冲液的pH为7.0-8.0,例如7.0、7.2、7.4、7.5、7.6、7.8、8.0。
- [0011] 进一步,所述缓冲液为PB、PBS或PBST,所述缓冲液的浓度为10-100mM,例如10mM、20mM、40mM、60mM、80mM、100mM。
- [0012] 进一步,所述反应的温度为25-37℃,优选为37℃。
- [0013] 进一步,所述制备方法还包括,在所述亲和素与所述生物素进行反应后,进行超滤。
- [0014] 进一步,所述超滤采用超滤管进行过滤。
- [0015] 进一步,所述超滤管的截留分子量为10-50kD,优选为10-20kD,更优选为20kD。
- [0016] 本发明的第三方面,提供了本发明所述的复合物在免疫检测中的应用,所述免疫检测包括应用亲和素、生物素和本发明所述的复合物对待测样本进行检测。
- [0017] 进一步,所述亲和素结合有酶、荧光染料、放射性碘、微球或层析垫;所述微球优选为磁珠。
- [0018] 进一步,所述生物素结合有抗体,所述抗体可特异性结合待测蛋白。
- [0019] 进一步,所述免疫检测为酶联免疫检测、化学发光免疫检测、免疫层析检测中的一种。
- [0020] 进一步,所述免疫检测的样本为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水。
- [0021] 第四方面,本发明提供一种免疫检测方法,所述免疫检测方法包括应用亲和素、生物素和本发明所述的复合物对待测样本进行检测。
- [0022] 进一步,所述亲和素结合有酶、荧光染料、放射性碘、微球或层析垫;所述微球优选为磁珠。
- [0023] 进一步,所述生物素结合有抗体,所述抗体可特异性结合待测抗原。
- [0024] 进一步,所述免疫检测为酶联免疫检测、化学发光免疫检测、免疫层析检测中的一种。
- [0025] 进一步,所述免疫检测的样本为血液、血清、血浆、细胞外液、组织液、淋巴液、脑脊液或房水。
- [0026] 在具体实施方式中,所述免疫检测方法为化学发光免疫检测,包括以下步骤:
- [0027] (1) 将偶联亲和素的磁珠、本发明所述复合物、生物素化抗体和待测样本混合后依次进行孵育、洗涤;
- [0028] (2) 向步骤(1)得到的反应液中加入酶标抗体,混匀后依次进行孵育、洗涤;
- [0029] (3) 向步骤(2)得到的反应液中加入所述酶对应的底物,孵育后进行检测。
- [0030] 酶标抗体可与待测抗原发生特异性结合,且具有酶的活性,加入对应底物后,底物可被酶催化为有色产物或发光产物,通过对所述产物进行检测,即可实现对待测抗原的定性或定量分析。
- [0031] 在具体的实施方式中,所述酶为碱性磷酸酶(ALP)或辣根过氧化物酶(HRP);相应地,当所述酶为碱性磷酸酶时,所述酶对应的发光底物为32(2' 2螺金刚烷)242甲氧基242(3' 2磷酸氧基)2苯基21,22环二氧乙烷(AMPPD);当所述酶为辣根过氧化物酶时,所述酶对应的发光底物为鲁米诺或异鲁米诺。
- [0032] 进一步,步骤(1)中所述复合物的浓度为30-150μg/ml,例如30μg/ml、50μg/ml、70μ

g/ml、90μg/ml、110μg/ml、130μg/ml、150μg/ml、。

[0033] 进一步,所述孵育的温度为25-37℃,优选为37℃;孵育的时间为1-10min,例如1min、3min、5min、7min、10min,优选为3-10min;所述孵育的湿度为28-32%,优选为30%。

[0034] 进一步,所述洗涤所用的溶液的pH为6.5-8.0,优选为7.0-7.4,进一步优选为7.4。

[0035] 进一步,所述洗涤所用的溶液选自下组:磷酸盐缓冲液例如磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液、磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,Tris-盐酸缓冲液,三乙醇胺(TEA)缓冲液,Tricine缓冲液,HEPES缓冲液,PIPES缓冲液和MOPS缓冲液。

[0036] 本发明提供的复合物为生物素饱和的亲素,即亲素表面的4条肽链饱和结合生物素,且其他蛋白结合位点暴露。因此,所述复合物中的亲素无法再与免疫检测体系中的生物素化抗体结合,但可与待测样本中的内源干扰物抗链霉亲和素抗体结合,从而降低抗链霉亲和素抗体对检测的干扰。在优选的实施方式中,免疫检测体系中的亲素偶联于磁珠,由于所述复合物为游离态,相比较偶联磁珠的亲素更易于结合抗链霉亲和素,从而可以更好地消除抗链霉亲和素抗体对检测的干扰。

[0037] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0038] (1) 本发明提供了一种复合物,该复合物可结合免疫检测体系中的抗链霉亲和素抗体,从而有效减少体外诊断免疫检测中由于抗链霉亲和素抗体带来的干扰,避免由此造成的假阳性、假阴性的错误检测结果。

[0039] (2) 本发明提供的复合物成本较低,在没有显著增加免疫检测试剂盒成本的前提下,即可实现抗干扰效果。

[0040] (3) 本发明提供的复合物具有广泛的应用范围,由于该复合物不会与检测体系中的生物素化抗体发生反应,不影响检测体系中各试剂的原有功能,因此,对于所有应用生物素-亲素系统的免疫检测系统,均可通过加入该复合物以减少相应内源干扰物带来的误差或错误。

## 具体实施方式

[0041] 下面将更详细地描述本公开的示例性实施方式,应当理解,可以以各种形式实现本公开而不应被这里阐述的实施方式所限制。相反,提供这些实施方式是为了能够更透彻地理解本公开,并且能够将本公开的范围完整的传达给本领域的技术人员。

[0042] 实施例1制备生物素饱和的链霉亲和素(SA-B)

[0043] a) 取0.6ml SA(10mg/ml,10mM PB,pH 7.5)

[0044] b) 向SA中加入0.1ml D-生物素(1mg/ml,10mM PB,pH 7.5),37℃旋转反应1h;

[0045] c) 将步骤b)得到的产物超滤4次((UFC901096,Millipore Amicon Ultra超滤离心管[15ml 10KD])10mM PB,pH 7.5),即制得生物素饱和的链霉亲和素(SA-B)。将制得的SA-B用于实施例2。

[0046] 实施例2检测癌胚抗原(CEA)

[0047] 一、主要试剂与材料:

[0048] 链霉亲和素磁珠(南京盘古基因),浓度10mg/ml,100μl/管(1mg/管)

[0049] 偶联抗体:菲鹏CEA-23,菲鹏CEA-100

- [0050] 偶联试剂:活化剂Traut's (Thermo), SM (PEG) 4 (Thermo)
- [0051] 生物素:NHS-PEG12-Biotin (Thermo)
- [0052] 待测样本:来自临床的16个血清样本,编号分别为1、2、3~15、16
- [0053] 底物:AMPPD (深圳美凯特)
- [0054] Buffer 10D:20mM 7.2PBS+0.1%BSA+0.05%TW-20+0.05%PC300
- [0055] Tris缓冲液:50mM Tris+0.9%NaCl+0.1%Tween20+0.05%Pc300,pH 7.4
- [0056] 二、步骤:
- [0057] (1) 生物素抗体制备 (Bio-Ab)
- [0058] 1、抗体缓冲液置换
- [0059] a. 超滤管 (0.5mL 50K)+100μg抗体+PBS缓冲液 (10mM, pH 7.2) 至0.4mL;
- [0060] b. 8000g离心;
- [0061] c. 重复步骤b 2次,回收。
- [0062] 2、抗体与生物素偶联
- [0063] 抗体:生物素=10:1 (摩尔量比),加液,混匀,室温避光偶联1h。
- [0064] 3、超滤脱盐
- [0065] a. 0.5mL 50K超滤管+偶联抗体+PBS缓冲液 (10mM, pH 7.2, 0.5%BSA);
- [0066] b. 4℃, 8000g, 5min离心3次;立换新管,倒置开盖管带朝内,1000g离心2min回收。
- [0067] 4、保存
- [0068] 加等体积50%甘油,混匀,-20℃保存。
- [0069] (2) 酶标抗体制备 (ε-Ab)
- [0070] 1、缓冲液置换
- [0071] a. 抗体:超滤管 (0.5mL 50K)+120μg抗体+PBS缓冲液 (10mM, pH7.2) 至0.4mL;
- [0072] b. AP酶:超滤管 (0.5mL 30K)+250μg酶+PBS缓冲液 (10mM, pH 7.2) 至0.4mL;
- [0073] c. 将步骤a、b制得的抗体和酶8000g离心;
- [0074] d. 重复步骤c 2次,立换新管,倒置开盖管带朝内,1000g离心2min回收。
- [0075] 2、抗体与酶的活化
- [0076] a. 抗体100μg+活化剂Traut's 10μg,总体积控制在100ul,混匀,RT避光反应2h;
- [0077] b. 酶200μg+SM (PEG) 4 10μg,混匀,RT避光反应1h。(硅化管)。
- [0078] 3、活化抗体与活化酶偶联
- [0079] 按照酶:抗体=2:1 (质量比),加液,轻柔混匀,室温静置避光反应30min;
- [0080] 4、超滤脱盐
- [0081] a. 0.5mL 50K超滤管+偶联抗体+PBS缓冲液 (10mM, pH 7.2, 0.5%BSA);
- [0082] b. 4℃, 8000g, 5min离心3次;立换新管,倒置开盖管带朝内,1000g离心2min回收。
- [0083] 5、保存
- [0084] 加等体积50%甘油,混匀,-20℃保存。
- [0085] (3) 稀释配制
- [0086] 分别取出缓冲液Buffer 10D、抗原、底物、Bio-Ab、ε-Ab,在室温中进行平衡;
- [0087] 稀释Bio-Ab:用Buffer 10D将Bio-Ab稀释至1.667μg/ml;
- [0088] 稀释ε-Ab:用Buffer 10D将ε-Ab稀释至2μg/ml;

[0089] 干扰物质：使用癌胚抗原 (CEA) 的血清稀释干扰物质至适当浓度；

[0090] 将配制得到的Bio-Ab、 $\epsilon$ -Ab用于以下实验步骤。

[0091] (4) 反应

[0092] 向白色化学发光板加入10 $\mu$ l链霉亲和素磁珠 (4mg/ml)，10 $\mu$ l血清样本，10 $\mu$ l SA-B (2mg/ml)，120 $\mu$ l Bio-Ab，37℃恒温孵育3min，Tris缓冲液洗涤三次；再加入150 $\mu$ l  $\epsilon$ -Ab (1.34 $\mu$ g/ml)。最后一次加液时液体冲击混匀，桌面稍旋混匀，恒温恒湿 (37℃，30 $\pm$ 2%) 孵育3min。

[0093] (5) 洗涤

[0094] Tris缓冲液洗涤三次。

[0095] (6) 发光检测

[0096] 向步骤(4)洗涤后的化学发光板中每孔加入200 $\mu$ l已平衡的AMPPD底物，在96孔板内震荡混匀，酶标仪内37℃孵育5min检测发光。

[0097] 以上述检测为实验组，另设置对照组，对照组与实验组的区别在于，不加入SA-B。检测结果见表1所示，表1中同时列出了使用CEA罗氏检测试剂盒的检测结果，将罗氏检测数据与实验组结果和对照组结果分别进行曲线拟合，计算相关系数 $R^2$ 。

[0098] 表1

编号	CEA 浓度 ng/mL (罗氏检测结果)	酶标仪检测结果	
		实验组	对照组
1	23.85	104590	111892
2	32.52	142110	146665
3	42.94	174690	183035
4	71.49	259182	284956
5	96.74	501466	481886
6	117	544630	573810
7	156.7	802110	882303
8	175.9	724380	707438
9	249.9	1117704	1202418
10	416.6	1518106	1484370
11	513.4	2213366	2614264
12	624.8	2031970	2077812
13	773.1	2909694	2657744
14	846.3	2411694	2160293
15	911.9	2992328	2695298
16	984.6	3480712	3414818
$R^2$		0.969	0.9208

[0101] 内源性干扰物是临床实验室检测误差的一个重要来源，在体外免疫诊断中，存在抗链霉亲和素抗体影响检测结果，甚至使检测结果出现假阳性或假阴性的问题。在本次检

测过程中,尝试通过在样本中加入商业主动/被动阻断剂均无明显改善效果,而通过应用本发明提供的技术方案,有效降低了内源干扰,使得血清样本的检测结果与罗氏检测结果相关性显著上升。

[0102] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。



专利名称(译)	一种复合物及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110862438A</a>	公开(公告)日	2020-03-06
申请号	CN201911143251.4	申请日	2019-11-20
[标]发明人	张瑜 陈立勇 刘仁源 顾志鹏 邓晓侠 熊灿		
发明人	张瑜 陈立勇 刘仁源 顾志鹏 邓晓侠 熊灿		
IPC分类号	C07K14/36 C07K11/107 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/36 G01N33/5306 G01N33/54326 G01N33/581		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种复合物及其制备方法与应用，本发明提供了一种用于降低抗亲和素抗体干扰的复合物，所述复合物包括生物素和亲和素，所述亲和素饱和结合所述生物素。本发明还提供了其制备方法及其在免疫检测中应用。由于部分人体内存在抗链霉亲和素抗体，在体外免疫诊断过程中，该抗体作为内源干扰物会影响检测结果，而本发明提供的复合物可与该抗体结合，从而避免该抗体对检测造成干扰，减少相应的误差或错误，显著提高检测结果的准确性。

编号	CEA 浓度 ng/mL (罗氏检测结果)	酶标仪检测结果	
		实验组	对照组
1	23.85	104590	111892
2	32.52	142110	146665
3	42.94	174690	183035
4	71.49	259182	284956
5	96.74	501466	481886
6	117	544630	573810
7	156.7	802110	882303
8	175.9	724380	707438
9	249.9	1117704	1202418
10	416.6	1518106	1484370