



(21)申请号 201710467575.8

(22)申请日 2017.06.20

(71)申请人 山东莱博生物科技有限公司

地址 250101 山东省济南市高新区大正路  
1777号

(72)发明人 盖中涛 欧兰香 汪运山 王露楠  
朱之炜 江长林 丁兴龙

(74)专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

代理人 王绪银

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种丙肝抗体多聚体酶标记物及其制备与应用

(57)摘要

本发明公开了一种丙肝抗体多聚体酶标记物,它是以葡聚糖T500作为多聚体载体,经盐酸胍活化后与HRP交联成多聚体酶标记物(Poly-HRP),同时用巯基修饰丙肝抗体,再将巯基修饰后的丙肝抗体与多聚体酶标记物(Poly-HRP)胶联构成。本发明还公开了配套该丙肝抗体多聚体酶标记物使用的多聚体酶稳定剂和稀释液。实验证实,本发明的丙肝抗体多聚体酶标记物加多聚体酶稳定剂后可稳定保存二年,它经多聚体酶稀释液稀释后用于酶联免疫检测及化学发光免疫检测比传统过碘酸钠法或戊二醛法标记的酶标记物灵敏度大大提高。

1. 一种丙肝抗体多聚体酶标记物, 其特征在于: 它是由巯基修饰后的丙肝抗体与多聚体酶标记物 (Poly-HRP) 胶联构成; 其中, 所述巯基修饰后的丙肝抗体是以二甲基甲酰胺 (DMF) 为溶剂配制浓度为  $1\text{mg/ml}$  的 N-琥珀酰亚胺 S-乙酰硫代乙酸盐 (SATA) 溶液, 取  $200\mu\text{l}$  并加入  $1\text{ml}$  待联接的以  $0.1\text{M}$  PBS 为溶剂配制的浓度为  $5\text{mg/ml}$ 、 $\text{pH}7.2$  的丙肝抗体, 室温反应  $1 \pm 0.2$  小时制得; 所述多聚体酶标记物是以葡聚糖 T500 作为多聚体载体, 经盐酸胍活化后与辣根过氧化物酶 (HRP) 交联制成。

2. 一种配套权利要求 1 所述丙肝抗体多聚体酶标记物使用的多聚体酶稳定剂, 其特征在于: 所述多聚体酶稳定剂是以制备好的丙肝抗体多聚体酶标记物为基质加牛血清白蛋白 (BSA), 使其终浓度为  $10\text{mg/ml}$ , 加 kathon, 使其终浓度为  $10\mu\text{l/ml}$ , 加碘代乙酰胺, 使其终质量浓度为万分之一, 加甘油, 使其体积比为三分之一制得。

3. 一种配套权利要求 1 所述丙肝抗体多聚体酶标记物使用的稀释液, 其特征在于: 所述稀释液是以  $\text{pH}7.2$ 、 $0.1\text{M}$  的 PBS 为基质, 以体积比计, 加入  $20\%$  的新生牛血清, 万分之五的 Procin300, 以重量体积比计, 加入  $1\%$  的 BSA, 万分之五的氨基比林、千分之五的葡聚糖 T2000、 $2\%$  的蔗糖、 $1\%$  的甘氨酸制得。

4. 权利要求 1 所述丙肝抗体多聚体酶标记物的制备方法, 步骤是:

(一) 多聚体的活化: 以葡聚糖 T500 作为多聚体载体, 经盐酸胍活化

- 1) 以如下比例量, 称出  $25\text{mg}$  葡聚糖 T500, 溶解在  $0.5\text{ml}$   $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}7.2$  的 PBS 中;
- 2) 加入  $0.5\text{ml}$   $0.1\text{M}$   $\text{NaIO}_4$ , 在室温下避光反应  $2 \pm 0.2$  小时;
- 3) 用 PD-10 脱盐柱以  $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}7.2$  的 PBS 进行脱盐, 收集含葡聚糖的洗出液, 加  $0.6\text{g}$  盐酸胍, 用  $2\text{M}$   $\text{NaHCO}_3$  调  $\text{pH}$  至  $9.0$ , 室温下轻轻搅动反应  $2 \pm 0.2$  小时;
- 4) 再加  $5\text{mg}$  三甲胺硼烷化合物 (TMAB), 室温反应  $2 \pm 0.2$  小时;
- 5) 用 PD-10 脱盐柱以  $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}7.2$  的 PBS 进行脱盐, 收集第一峰的液体, 于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  保存备用;

(二) 多聚体酶标记物 (Poly-HRP) 的制备及纯化

- 1) 以如下比例量, 称  $25\text{mg}$  辣根过氧化物酶 (HRP), 溶解在  $1\text{ml}$  双蒸水中, 再加  $0.15\text{ml}$   $0.1\text{M}$   $\text{NaIO}_4$ , 室温反应  $15 \pm 2\text{min}$ ;
- 2) 用 PD-10 脱盐柱以  $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}7.2$  的 PBS 进行脱盐, 收集 HRP 的洗出液, 并与步骤 (一) 收集的液体进行混合, 室温反应  $2 \pm 0.2$  小时;
- 3) 按每毫升反应液加入  $8\text{mg}$  的量计, 加入 TMAB, 室温反应  $2 \pm 0.2$  小时;
- 4) 再加入甘氨酸晶体, 使其最终浓度为  $0.2\text{M}$ , 室温反应  $2 \pm 0.2$  小时后过 Superdex200 柱, 以  $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}7.2$  的 PBS 进行洗脱, 收集第一峰的液体, 用超滤浓缩管浓缩校正为  $3\text{ml}$ , 即为纯化好的 Poly-HRP, 于  $2 \sim 4^\circ\text{C}$  保存备用;

(三) 巯基修饰丙肝抗体

以 DMF 为溶剂配制浓度为  $1\text{mg/ml}$  的 N-琥珀酰亚胺 S-乙酰硫代乙酸盐 (SATA) 溶液, 按如下比例量, 取  $200\mu\text{l}$  并加入  $1\text{ml}$  待联接的以  $0.1\text{M}$  PBS 为溶剂配制的浓度为  $5\text{mg/ml}$ 、 $\text{pH}7.2$  的丙肝抗体, 室温反应  $1 \pm 0.2$  小时, 即获得巯基修饰丙肝抗体;

(四) 巯基修饰丙肝抗体与多聚体酶标记物的胶联及纯化

- 1) 以 DMF 为溶剂配制浓度为  $1\text{mg/ml}$  的 N-[ $\epsilon$ -马来酰亚胺乙酰基氧]硫代琥珀酰亚胺酯 (EMCS) 溶液, 等体积量加入步骤 (二) 制得的多聚体酶标记物 (Poly-HRP), 室温反应  $2 \pm 0.2$

小时,即获得EMCS活化的poly-HRP;

2) 将步骤(三)制得的巯基修饰丙肝抗体,加入等体积量的0.5M的盐酸羟胺,室温反应 $15\pm 2$ min后,用PD-10脱盐柱以0.1M、pH7.2的PBS进行脱盐,收集第一峰的液体,并按等体积量加入到步骤1)获得的EMCS活化好的poly-HRP中,室温反应 $2\pm 0.2$ 小时;

3) 按每毫升反应液量加入300u1以双蒸水为溶剂配制的重量体积百分比浓度为2%的2-巯基乙胺,室温反应 $15\pm 2$ min;

4) 再按步骤3) 每毫升反应液量加入150u1以DMF为溶剂配制的浓度为80mg/ml的N-乙基马来酰亚胺(NEM)溶液,室温反应 $15\pm 2$ min后过Superdex200柱,以0.1M、pH7.2的PBS进行洗脱,收集第一峰的液体,用超滤浓缩管浓缩校正为8ml,即制得纯化好的丙肝抗体多聚体酶标记物。

5. 权利要求1所述丙肝抗体多聚体酶标记物在制备丙型肝炎病毒的核心抗原酶联免疫检测试剂盒或化学发光检测试剂盒中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述丙肝抗体多聚体酶标记物的使用方法是:以制备好的丙肝抗体多聚体酶标记物为基质加入配套其使用的权利要求2所述多聚体酶稳定剂,再用配套其使用的权利要求3所述稀释液进行 $1:2000\pm 200$ 稀释后用于丙型肝炎病毒的核心抗原酶联免疫检测或化学发光检测。

## 一种丙肝抗体多聚体酶标记物及其制备与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于酶免疫技术领域,具体涉及一种丙肝抗体多聚体酶标记物及其制备方法与应用。

### 技术背景

[0002] 检测丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 核心抗原可以直观地反映出HCV的感染状况,并缩短HCV感染的检测窗口期。但在HCV感染人体后,其核心抗原在血液中的含量非常低,需采用高灵敏度的方法来检测。

[0003] 在酶免疫分析检测中,抗原或抗体酶标记物对免疫分析的灵敏度及特异性具有重要的作用,是酶免疫分析检测中的关键试剂。辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 比活性高,稳定,分子量小,纯酶容易制备,现在是最常用的蛋白酶标记物的制备原料。传统的辣根过氧化物酶标抗体,是应用酶和抗体上氨基、巯基或糖蛋白上的羟基作为交联的基团,通过过碘酸钠或戊二醛法将抗体与酶直接连接在一起。由于分子大小不同,一般一个抗体分子上仅能联接1~2个HRP分子。免疫反应通过HRP催化底物来显现。以多聚体作为载体将抗体与HRP连接在一起,由于多聚体的延伸,可使一个抗体连接10个以上HRP分子,每1个抗体与抗原反应信号可以通过连接的10倍数量的HRP催化底物系统而体现,因此,检测灵敏度大幅提高。Dako公司在美国申请的发明专利 (US005543332A 1996),其关键技术是用水溶性高分子右旋糖落昔作聚合载体分子,将多个联乙烯砒单体以共价键连接其上,自由的乙烯基可以结合有功能的基团的抗原、半抗原、抗体、核苷酸等被标记物;中国专利 (专利申请号03150859.2) 公开了一种新型的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶交联技术,其关键技术也是基于水溶性的聚合载体分子——右旋糖昔,与多个联乙烯砒单体通过乙烯基共价结合在一起,而后另一末端的游离乙烯基则与功能基团的“分子”进行反应,从而将不同的标记分子与被标记分子结合在一起完成分子标记。然而这两个专利中用到的乙烯砒,具有较强的毒性,刺激眼睛、呼吸系统和皮肤。中国专利 (专利申请号200710168647.5) 公开了一种聚合酶标记抗体的制备方法,其关键技术是在非离子表面活性剂存在下,使可溶性辣根过氧化物酶 (HRP) 胶束化,以NaIO<sub>4</sub>先装饰HRP表面的糖分子氧化成醛基,然后利用HRP上的氨基与醛基发生缩合反应生成聚合物 (Poly-HRP),但未公开其具体应用方法。经检索,用巯基修饰抗体,修饰后的抗体经羟胺暴露后再与多聚体酶标记物 (Poly-HRP) 的胶联及纯化后制备一种丙肝抗体多聚体酶标记物的文献与产品还未见报道。

### 发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明所要解决的问题是提供一种丙肝抗体多聚体酶标记物及其制备方法与应用。

[0005] 本发明所述的丙肝抗体多聚体酶标记物,其特征在于:它是由巯基修饰后的丙肝抗体与多聚体酶标记物 (Poly-HRP) 胶联构成;其中,所述巯基修饰后的丙肝抗体是以二甲基甲酰胺 (DMF) 为溶剂配制浓度为1mg/ml的N-琥珀酰亚胺S-乙酰硫代乙酸盐 (SATA) 溶液,

取200ul并加入1ml待联接的以0.1M PBS为溶剂配制的浓度为5mg/ml、pH7.2的丙肝抗体，室温反应 $1 \pm 0.2$ 小时制得；所述多聚体酶标记物是以葡聚糖T500作为多聚体载体，经盐酸胍活化后与辣根过氧化物酶 (HRP) 交联制成。

[0006] 为长期有效的保存制备好的丙肝抗体多聚体酶标记物，本发明还公开了一种配套上述丙肝抗体多聚体酶标记物使用的多聚体酶稳定剂，其特征在于：所述多聚体酶稳定剂是以制备好的丙肝抗体多聚体酶标记物为基质加牛血清白蛋白 (BSA)，使其终浓度为10mg/ml，加kathon，使其终浓度为10ul/ml，加碘代乙酰胺，使其终质量浓度为万分之一，加甘油，使其体积比为三分之一制得。实验证实，制备的丙肝抗体多聚体酶标记物，加入此配套酶稳定剂后，可长期稳定至少二年。

[0007] 本发明还公开了一种配套上述丙肝抗体多聚体酶标记物使用的稀释液，其特征在于：所述稀释液是以pH7.2、0.1M的PBS为基质，以体积比计，加入20%的新生牛血清、万分之五的Procin300，以重量体积比计，加入万分之五的氨基比林、千分之五的葡聚糖T2000、2%的蔗糖、1%的甘氨酸、1%的BSA制得。

[0008] 本发明所述丙肝抗体多聚体酶标记物的制备方法，步骤是：

[0009] (一) 多聚体的活化：以葡聚糖T500作为多聚体载体，经盐酸胍活化

[0010] 1) 以如下比例量，称出25mg葡聚糖T500，溶解在0.5ml 0.1M、pH7.2的PBS中；

[0011] 2) 加入0.5ml 0.1M  $\text{NaIO}_4$ ，在室温下避光反应 $2 \pm 0.2$ 小时；

[0012] 3) 用PD-10脱盐柱以0.1M、pH7.2的PBS进行脱盐，收集含葡聚糖的洗出液，加0.6g盐酸胍，用2M  $\text{NaHCO}_3$ 调pH至9.0，室温下轻轻搅动反应 $2 \pm 0.2$ 小时；

[0013] 4) 再加5mg三甲胺硼烷化合物 (TMAB)，室温反应 $2 \pm 0.2$ 小时；

[0014] 5) 用PD-10脱盐柱以0.1M、pH7.2的PBS进行脱盐，收集第一峰的液体，于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 保存备用；

[0015] (二) 多聚体酶标记物 (Poly-HRP) 的制备及纯化

[0016] 1) 以如下比例量，称25mg辣根过氧化物酶 (HRP)，溶解在1ml双蒸水中，再加0.15ml 0.1M  $\text{NaIO}_4$ ，室温反应 $15 \pm 2\text{min}$ ；

[0017] 2) 用PD-10脱盐柱以0.1M、pH7.2的PBS进行脱盐，收集HRP的洗出液，并与步骤(一)收集的液体进行混合，室温反应 $2 \pm 0.2$ 小时；

[0018] 3) 按每毫升反应液加入8mg的量计，加入TMAB，室温反应 $2 \pm 0.2$ 小时；

[0019] 4) 再加入甘氨酸晶体，使其最终浓度为0.2M，室温反应 $2 \pm 0.2$ 小时后过Superdex200柱，以0.1M、pH7.2的PBS进行洗脱，收集第一峰的液体，用超滤浓缩管浓缩校正为3ml，即为纯化好的Poly-HRP，于 $2 \sim 4^\circ\text{C}$ 保存备用；

[0020] (三) 巯基修饰丙肝抗体

[0021] 以DMF为溶剂配制浓度为1mg/ml的N-琥珀酰亚胺S-乙酰硫代乙酸盐 (SATA) 溶液，按如下比例量，取200ul并加入1ml待联接的以0.1M PBS为溶剂配制的浓度为5mg/ml、pH7.2的丙肝抗体，室温反应 $1 \pm 0.2$ 小时，即获得巯基修饰丙肝抗体；

[0022] (四) 巯基修饰丙肝抗体与多聚体酶标记物的胶联及纯化

[0023] 1) 以DMF为溶剂配制浓度为1mg/ml的N-[ $\epsilon$ -马来酰亚胺乙酰基氧]硫代琥珀酰亚胺酯 (EMCS) 溶液，等体积量加入步骤(二)制得的多聚体酶标记物 (Poly-HRP)，室温反应 $2 \pm 0.2$ 小时，即获得EMCS活化的poly-HRP；

[0024] 2) 将步骤(三)制得的巯基修饰丙肝抗体,加入等体积量的0.5M的盐酸羟胺,室温反应 $15\pm 2$ min后,用PD-10脱盐柱以0.1M、pH7.2的PBS进行脱盐,收集第一峰的液体,并按等体积量加入到步骤1)获得的EMCS活化好的poly-HRP中,室温反应 $2\pm 0.2$ 小时;

[0025] 3) 按每毫升反应液量加入300u1以双蒸水为溶剂配制的重量体积百分比浓度为2%的2-巯基乙胺,室温反应 $15\pm 2$ min;

[0026] 4) 再按步骤3) 每毫升反应液量加入150u1以DMF为溶剂配制的浓度为80mg/ml的N-乙基马来酰亚胺(NEM)溶液,室温反应 $15\pm 2$ min后过Superdex200柱,以0.1M、pH7.2的PBS进行洗脱,收集第一峰的液体,用超滤浓缩管浓缩校正为8ml,即制得纯化好的丙肝抗体多聚体酶标记物,置于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 可保存4周以上。

[0027] 本发明所述丙肝抗体多聚体酶标记物在制备丙型肝炎病毒的核心抗原酶联免疫检测试剂盒或化学发光检测试剂盒中的应用。

[0028] 本发明以葡聚糖T500作为多聚体载体,经盐酸胍活化后与HRP交联成多聚体酶标记物(Poly-HRP)并纯化;巯基修饰丙肝抗体,修饰后的丙肝抗体经羟胺暴露后再与多聚体酶标记物的胶联及纯化即获得丙肝抗体多聚体酶标记物。若加入多聚体酶稳定剂,使制备的丙肝抗体多聚体酶标记物可长期(二年以上)有效保存。其应用时,使用多聚体酶稀释液进行1:2000至1:3000稀释后用于酶联免疫等、化学发光免疫检,比普通酶标记物灵敏度高3至7倍。

[0029] 具体的,所述丙肝抗体多聚体酶标记物的使用方法是:以制备好的丙肝抗体多聚体酶标记物为基质加入配套其使用的多聚体酶稳定剂,再用配套其使用的稀释液优选进行 $1:2000\pm 200$ 稀释后即可用于丙型肝炎病毒的核心抗原酶联免疫检测或化学发光检测。

[0030] 本发明体现出的有益效果是:

[0031] 本发明对比已有技术具有一下创新点:

[0032] 1.以葡聚糖T500作为多聚体载体,经盐酸胍活化后与HRP交联成多聚体酶标记物(Poly-HRP)。

[0033] 2.用巯基修饰丙肝抗体,修饰后的丙肝抗体经羟胺暴露后再与多聚体酶标记物的胶联。

[0034] 3.研制了多聚体的酶稳定剂,使制备的丙肝抗体多聚体酶标记物能长期有效保存。

[0035] 4.研制了多聚体酶稀释液,使制备的丙肝抗体多聚体酶标记物经该稀释液稀释后灵敏度更高,背景值更低。

[0036] 本发明对比已有技术有一下显著优点:

[0037] 用丙肝抗体多聚体酶标记技术与多聚体酶稳定剂、多聚体酶稀释液的结合显著提高了丙肝抗体多聚体酶标记物的灵敏度和稳定性、大大降低了检测的背景值,使特异性更好。

## 具体实施方式

[0038] 为了更好的理解本发明,下面结合实施例对本发明的技术方案做进一步说明,但本发明所保护范围不仅限于此。

[0039] 实施例1:

[0040] 丙肝抗体的多聚体酶标记步骤如下:

[0041] 第一步:多聚体的活化:以葡聚糖T500作为多聚体载体,经盐酸胍活化

[0042] 1) 称出25mg葡聚糖T500,溶解在0.5ml 1×PBS (0.1M PBS, pH7.2) 中;

[0043] 2) 加入0.5ml 0.1M NaIO<sub>4</sub>,在室温下避光反应2小时;

[0044] 3) 用PD-10脱盐柱以0.1M PBS (pH7.2) 进行脱盐,收集含葡聚糖的洗出液,加0.6g盐酸胍,用2M NaHCO<sub>3</sub>调pH至9.0,室温下轻轻搅动反应2小时;

[0045] 4) 加5mg三甲胺硼烷化合物(TMAB),室温反应2小时;

[0046] 5) 用PD-10脱盐柱以0.1M PBS (pH7.2) 进行脱盐,收集第一峰的液体,于2~8℃保存备用;

[0047] 第二步:多聚体与辣根过氧化物酶(HRP)的交联,即多聚体酶标记物(Poly-HRP)的制备及纯化:

[0048] 1) 称25mg HRP,溶解1ml在新配制的双蒸水中,加0.15ml 0.1M NaIO<sub>4</sub>,室温反应15min;

[0049] 2) 用PD-10脱盐柱以0.1M PBS (pH7.2) 进行脱盐,收集HRP的洗出液,与第一步收集的液体进行混合,室温反应2小时;

[0050] 3) 按每毫升反应液加入8mg的量计,加入TMAB,室温反应2小时;

[0051] 4) 加入甘氨酸晶体,最终浓度为0.2M,室温反应2小时后过Superdex200柱,以0.01M PBS进行洗脱,收集第一峰的液体,用超滤浓缩管浓缩校正为3ml,即为纯化好的Poly-HRP,于2~4℃保存备用。

[0052] 第三步:丙肝抗体的修饰,丙肝抗体与多聚体酶标记物的胶联及纯化:

[0053] 1) 巯基修饰丙肝抗体:称1mg N-琥珀酰亚胺S-乙酰硫代乙酸盐(SATA),以1ml DMF溶解,取200ul SATA浓液加入1ml待联接的丙肝抗体(浓度为5mg/ml, 0.1M PBS, pH7.2) 室温反应1小时;

[0054] 2) 称量1mg N-[ε-马来酰亚胺乙酰基氧]硫代琥珀酰亚胺酯(EMCS),以1ml二甲基甲酰胺(DMF)溶解,加入等体积量第二步制得的多聚体酶标记物(Poly-HRP),室温反应2小时,即获得EMCS活化的poly-HRP;

[0055] 3) 将步骤1) 修饰好的丙肝抗体,加1ml 0.5M的盐酸羟胺,室温反应15min后,以PD-10脱盐柱以0.1M PBS (pH7.2) 进行脱盐,收集第一峰并加入经步骤2) EMCS活化好的poly-HRP中,室温反应2小时;

[0056] 4) 加300ul重量体积百分比浓度为2%的2-巯基乙胺(以双蒸水配制,现配现用),室温反应15min;

[0057] 5) 加入150ul N-乙基马来酰亚胺(NEM,以DMF进行溶解,浓度为80mg/ml),室温反应15min后过Superdex200柱,以0.01M PBS进行洗脱,收集第一峰的液体,用超滤浓缩管浓缩校正为8ml,即为纯化好的丙肝抗体的多聚体酶标记物,可于2~8℃保存4周以上。

[0058] 实施例2:

[0059] 1、配套本发明所述丙肝抗体多聚体酶标记物使用的多聚体酶稳定剂的配制及使用:

[0060] 为长期有效的保存制备好的丙肝抗体的多聚体酶标记物,可在制备好的丙肝抗体的多聚体酶标记物中加BSA(使其终浓度为10mg/ml),加kathon(终浓度10ul/ml),加碘代乙

酰胺(终浓度为万分之一),加三分之一体积的甘油。

[0061] 制备的多聚体酶标记物,加入此酶稳定剂后,可长期稳定至少二年。相关监测结果可见实施例3。

[0062] 2、配套本发明所述丙肝抗体多聚体酶标记物使用的稀释液配制方法如下:

[0063] 在0.1M PBS (pH7.2) 中以体积比计加入20%的新生牛血清,万分之五的Procin300,以重量体积比计,1%BSA,加入万分之五的氨基比林,千分之五的葡聚糖T2000,2%蔗糖,1%甘氨酸。

[0064] 以上述多聚体酶稀液对不加多聚体酶稳定剂的丙肝抗体多聚体酶标记物的进行1:3000稀释比普通酶标记物灵敏度高3倍左右,以多聚体的酶稀液对加了多聚体酶稳定剂的丙肝抗体的多聚体酶标记物进行1:2000稀释比普通酶标记物灵敏度高5倍左右。相关测试结果见实施例3。

[0065] 实施例3:

[0066] 实施例1制备的丙肝抗体多聚体酶标记物与比普通酶标记方式(过碘酸钠法)标记的丙肝抗体的酶标记物相比具有更高的灵敏度,其使用及验证方法如下:

[0067] 以实施例2中的酶稀释液对不加酶稳定剂的按实施例1标记的丙肝抗体的多聚体酶标记物的进行1:3000稀释,对加了实施例2中酶稳定剂的丙肝抗体的多聚体酶标记物进行1:2000稀释,与普通酶标记方式(过碘酸钠法)标记的丙肝抗体酶标记物在酶联免疫检测试剂盒中进行对比检测,记录其OD值,计算P均值/N均值,结果见表1。

[0068] A、普通酶标记,原试剂盒中所用酶稀释液,1:500稀释

[0069] B、本发明方法标记的多聚体酶标记物,不加多聚体酶稳定剂,用原试剂盒中所用酶稀释液,1:1000稀释

[0070] C、本发明方法标记的多聚体酶标记物,不加多聚体酶稳定剂,用本发明下的多聚体酶稀释液稀释,1:3000

[0071] D、本发明方法标记的多聚体酶标记物,加本发明下的多聚体酶稳定剂,用本发明下的多聚体酶稀释液稀释,1:2000

[0072] 表1:丙肝多聚体酶标记物不同使用方法与丙肝普通酶标记的对比

[0073]

|  | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | N1 | N2 | N3 | N4 | N5 | P均值/N均值 |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------|
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------|

[0074]

|   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0.198 | 0.229 | 0.295 | 0.332 | 0.416 | 0.070 | 0.085 | 0.083 | 0.081 | 0.066 | 3.81  |
| B | 0.224 | 0.433 | 0.407 | 0.669 | 0.831 | 0.050 | 0.059 | 0.061 | 0.060 | 0.065 | 8.69  |
| C | 0.233 | 0.477 | 0.432 | 0.692 | 0.866 | 0.040 | 0.045 | 0.043 | 0.040 | 0.045 | 12.67 |
| D | 0.243 | 0.489 | 0.446 | 0.711 | 0.899 | 0.025 | 0.033 | 0.031 | 0.030 | 0.020 | 19.89 |

[0075] 经实验检测,用相同的原试剂盒中的稀释液,B组稀释倍数是A组的2倍,检测效果也是A组的2.28倍,说明发明的丙肝多聚体酶标记物灵敏度比普通过碘酸钠法标记的酶标

记物灵敏度更高。

[0076] C组稀释倍数是A组的6倍,检测效果反而是A组的3.33倍,D组是其加了多聚体酶稳定剂,因单位体积内的有效酶含量减少,所以其稀释倍数比C低三分之一,但仍是A组稀释倍数的4倍,检测效果是A组的5.22倍。说明采用了本发明中的多聚体酶稀释液,能进一步提高灵敏底,降低背景值。

[0077] 进一步对比不加多聚体酶稳定剂与加本发明中的多聚体酶稳定剂的稳定效果,对不加本发明的多聚体酶稳定剂用用本发明的多聚体酶稀释液稀释,1:3000稀释后进行监测,对加了本发明的多聚体酶稳定剂的丙肝抗体多聚体酶标记物,分别于0月、3月、6月、12月、15月、18月、21月、24月,用本发明的多聚体酶稀释液稀释,1:2000稀释后进行监测,对比多聚体酶稳定剂长期稳定效果。结果见表2,表3。

[0078] 表2:未加多聚体酶稳定剂的稳定效果监测

[0079]

|     | P1    | P2    | P3    | P4    | P5    | N1    | N2    | N3    | N4    | N5    | P 均值/N<br>均值 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| 0 月 | 0.233 | 0.477 | 0.432 | 0.692 | 0.866 | 0.040 | 0.045 | 0.043 | 0.040 | 0.045 | 12.67        |
| 1 月 | 0.201 | 0.212 | 0.231 | 0.262 | 0.326 | 0.035 | 0.042 | 0.039 | 0.041 | 0.039 | 6.31         |

[0080] 表3:多聚体酶稳定剂稳定效果监测

[0081]

|     | P1    | P2    | P3    | P4    | P5    | N1    | N2    | N3    | N4    | N5    | P均值/N均值 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| 0月  | 0.243 | 0.489 | 0.446 | 0.711 | 0.899 | 0.025 | 0.033 | 0.031 | 0.030 | 0.020 | 19.89   |
| 3月  | 0.223 | 0.447 | 0.495 | 0.699 | 0.831 | 0.022 | 0.030 | 0.030 | 0.030 | 0.020 | 20.41   |
| 6月  | 0.244 | 0.469 | 0.486 | 0.699 | 0.879 | 0.029 | 0.031 | 0.033 | 0.030 | 0.023 | 19.02   |
| 12月 | 0.251 | 0.467 | 0.466 | 0.719 | 0.892 | 0.025 | 0.031 | 0.030 | 0.030 | 0.022 | 20.25   |
| 15月 | 0.253 | 0.488 | 0.456 | 0.742 | 0.890 | 0.027 | 0.032 | 0.031 | 0.030 | 0.021 | 20.06   |
| 18月 | 0.229 | 0.502 | 0.471 | 0.721 | 0.901 | 0.026 | 0.030 | 0.033 | 0.029 | 0.024 | 19.89   |
| 21月 | 0.247 | 0.488 | 0.487 | 0.702 | 0.893 | 0.023 | 0.033 | 0.034 | 0.030 | 0.025 | 19.42   |
| 24月 | 0.232 | 0.491 | 0.476 | 0.721 | 0.889 | 0.029 | 0.033 | 0.032 | 0.029 | 0.022 | 19.37   |

[0082] 实验结果表明,不加多聚体酶稳定剂1个月后其检测灵敏度即大大下降。加本发明的多聚体酶稳定剂,2年后检测结果与第0月时无区别,24个月后的实验未进行监测,但可证明加本发明的多聚体酶稳定剂可令本发明的丙肝抗体多聚体酶标记物稳定效果至少24个月。

[0083] 实施例4:

[0084] 本发明的丙肝抗体多聚体酶标记物在丙型肝炎核心抗原检测试剂盒(化学发法)上的应用及效果测试:

[0085] 本发明的丙肝抗体多聚体酶标记物用本发明的多聚体酶稳剂后,再用多聚体酶稀释液进行1:2000稀释与普通酶标记方式(过碘酸钠法)标记的丙肝抗体的酶标记物在化学发光检测系统上进行对比:结果见表4。

[0086] A、普通酶标记,原试剂盒中所用酶稀释液,1:500稀释。

[0087] D、本发明方法标记获得的多聚体酶标记物,加本发明的多聚体酶稳定剂,再用本

发明的多聚体酶稀释液稀释1:2000。

[0088] 表4:本发明在化学发光检测系统上的应用比较

[0089]

| S/CO | P1   | P2   | P3    | P4    | P5    | N1   | N2   | N3   | N4   | N5   | P均值/N均值 |
|------|------|------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|---------|
| A    | 1.78 | 2.39 | 12.92 | 13.56 | 14.23 | 0.72 | 0.81 | 0.82 | 0.82 | 0.86 | 11.13   |
| D    | 2.59 | 4.79 | 34.96 | 37.65 | 38.67 | 0.27 | 0.32 | 0.31 | 0.33 | 0.21 | 82.40   |

[0090] 实验结果表明,本发明的丙肝抗体多聚体酶标记物在化学发光检测系统上应用比普通酶标记物要高7倍以上。

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种丙肝抗体多聚体酶标记物及其制备与应用                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN107037207A</a>                   | 公开(公告)日 | 2017-08-11 |
| 申请号            | CN2017110467575.8                              | 申请日     | 2017-06-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 山东莱博生物科技有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 山东莱博生物科技有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 山东莱博生物科技有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 盖中涛<br>欧兰香<br>汪运山<br>王露楠<br>朱之炜<br>江长林<br>丁兴龙  |         |            |
| 发明人            | 盖中涛<br>欧兰香<br>汪运山<br>王露楠<br>朱之炜<br>江长林<br>丁兴龙  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/535                                     |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/535                                     |         |            |
| 其他公开文献         | CN107037207B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种丙肝抗体多聚体酶标记物，它是以葡聚糖T500作为多聚体载体，经盐酸胍活化后与HRP交联成多聚体酶标记物(Poly-HRP)，同时用巯基修饰丙肝抗体，再将巯基修饰后的丙肝抗体与多聚体酶标记物(Poly-HRP)胶联构成。本发明还公开了配套该丙肝抗体多聚体酶标记物使用的多聚体酶稳定剂和稀释液。实验证实，本发明的丙肝抗体多聚体酶标记物加多聚体酶稳定剂后可稳定保存二年，它经多聚体酶稀释液稀释后用于酶联免疫检测及化学发光免疫检测比传统过碘酸钠法或戊二醛法标记的酶标记物灵敏度大大提高。

