



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102788879 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 21

(21) 申请号 201110131706. 8

(22) 申请日 2011. 05. 20

(71) 申请人 常州康卫生物技术有限公司

地址 213022 江苏省常州市新北区高新科技
园创新科技楼北区 B1 座 409

(72) 发明人 戴立军

(74) 专利代理机构 北京中博世达专利商标代理
有限公司 11274

代理人 张华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/573 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

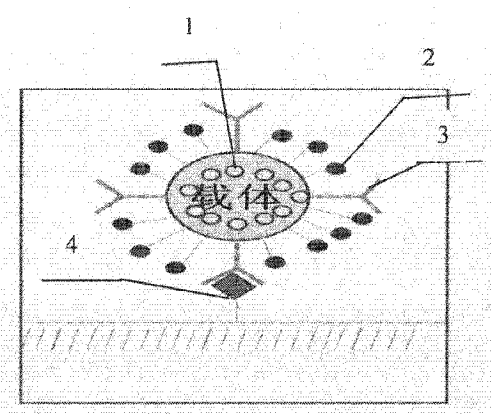
权利要求书 5 页 说明书 17 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种生物检测试剂

(57) 摘要

本发明属于生物检测领域,具体涉及一种生物检测试剂。为解决现有生物检测试剂灵敏度较低及信号稳定性较差的问题,本发明提供一种生物检测试剂,该试剂包括载体、靶物检测器和信号发生器,所述载体通过共价键或物理作用载有靶物检测器和信号发生器,且靶物检测器和信号发生器之间只通过载体间接相连,而不直接相连。该生物检测试剂灵敏度和稳定性较高,能够 (1) 检测到现有试剂所不能检测到的样品, (2) 大幅提升数据的可靠性与可量化性; (3) 能减少试剂用量,降低生物测试费用。



1. 一种生物检测试剂,其特征在于,所述生物检测试剂包括载体、靶物检测器和信号发生器,所述载体通过共价键或物理作用载有靶物检测器和信号发生器,且靶物检测器和信号发生器之间只通过载体间接相连,而不直接相连。

2. 一种如权利要求 1 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述载体内部含有不与其外部水相连通部分;所述载体为有机物、无机物或复合材料的纳米粒子,微球,纳米胶束,脂质体,高分子体 (Polymersome);所述靶物检测器为单、多克隆抗体或抗体有效片段/蛋白/多肽/DNA/PNA/RNA/Aptamer/小分子配体中的一种或两种以上物质的组合物;所述信号发生器为荧光染料和/或生物酶中的一种或两种以上物质的组合物。

3. 一种如权利要求 2 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述载体内部不与外部水相连通部分载有荧光染料,而载体外表面连接有诱发发光或变色或两者均可的生物酶以及靶物检测器;所述载于载体外表面的生物酶与载于载体内部的荧光染料为信号发生器。

4. 一种如权利要求 3 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述靶物检测器为抗体或抗体有效片段。

5. 一种如权利要求 4 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述荧光染料为疏水荧光染料,该疏水荧光染料通过疏水相吸力或共价键载于载体内部。

6. 一种如权利要求 4 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述载体为脂质体或高分子体,所述荧光染料为水溶性荧光染料,该水溶性荧光染料溶于不与外部水相连通的载体内部水相内腔里。

7. 一种如权利要求 4 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述抗体有效片段为 DTT 还原 IgG 所得活性片段,所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase) 或荧光素酶 (Luciferase)。

8. 一种如权利要求 3 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述靶物检测器为抗生蛋白链菌素 (streptavidin),抗生蛋白 (avidin), neutravidin (是指去除了"糖"以后的 Avidin) 中的一种或两种以上物质的组合物;所述信号发生器为荧光染料与一种或两种以上的生物酶;所述生物酶包括辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase) 或荧光素酶 (Luciferase)。

9. 一种如权利要求 3 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述靶物检测器为生物素 (biotin);所述信号发生器为荧光染料与辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase) 或荧光素酶 (Luciferase)。

10. 一种如权利要求 3 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述靶物检测器为 DNA/PNA/RNA 中的一种或两种以上物质的组合物;所述信号发生器为荧光染料与一种或两种以上生物酶。

11. 一种如权利要求 10 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase) 或荧光素酶 (Luciferase)。

12. 一种如权利要求 5 所述的生物检测试剂,其特征在于,所述载体为纳米粒子,所述纳米粒子上携带氨基 ($-NH_2$),所述疏水荧光染料通过疏水相吸力载于载体内部。

13. 一种如权利要求 12 所述的生物检测试剂,其特征在于,该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

(1) 所述纳米粒子内部疏水部分携带疏水荧光染料,所述纳米粒子上所携带的 $-NH_2$ 通

过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

(2) 将完整的抗体分子通过过量二硫苏糖醇 (DTT) 还原其自身铰链 (Hinge) 处的二硫键而产生 -SH 官能团, 然后除去过量 DTT;

(3) 将每一个生物酶分子上所携带的 -NH₂ 中的 1-5 个通过 2-亚氨基氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 -SH, 然后除去过量 Traut's reagent;

(4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 -SH 官能团与步骤 (1) 中纳米粒子所携带的 maleimide 在 pH 6-8 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为: X : 1 (X = 2-20), 搅拌 10-120 分钟; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为: Y : 1 (Y = 2-100), 搅拌 10-300 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8℃ 轻微搅拌 10-300 分钟;

(5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物: 抗体-载体 (荧光染料)-生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

14. 一种如权利要求 12 所述的生物检测试剂, 其特征在于, 所述抗体为粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体 (goat-anti-rabbit IgG), 所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP), 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

(1) 将纳米粒子溶于 1×PBS 缓冲液中, SMCC 预溶于二甲基亚砷 (DMSO) 中, 按照纳米粒子表面的 -NH₂ 与 SMCC 的摩尔比为: 1 : 2-20 的比例, 将上述两种溶液混合, 室温下搅拌两小时, 然后除去剩余未反应的 SMCC;

(2) 将粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体 (goat-anti-rabbit IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中, 置于摇床低速旋转 10 分钟, 然后除去剩余未反应的 DTT;

(3) 将步骤 (2) 所得抗体与步骤 (1) 所得纳米粒子按照摩尔比 X : 1 (X = 2-20) 相混合后, 搅拌 10-120 分钟;

(4) 与此同时, 向 20-100mg/mL HRP 1×PBS 溶液中加入 2-5 倍于 HRP 的 Traut's reagent, 室温下搅拌两小时, 然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

(5) 将步骤 (4) 所得生物酶与步骤 (3) 所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 Y : 1 (Y = 2-100) 的比例相混合, 搅拌 10-120 分钟;

(6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤 (5) 所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 100-10000 : 1 的比例混合, 室温 / 低温 (2-8℃) 搅拌 10-120 分钟, 以除去游离 -SH 基团;

(7) 将步骤 (6) 所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中, 在压力下过柱子, 除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 收集含纳米粒子的组分;

(8) 向步骤 (7) 所得的纳米粒子中加入 1-10% N, O-双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.01-2% 硫汞撒 (thimerosal), 低温储藏样品。

15. 一种如权利要求 12 所述的生物检测试剂, 其特征在于, 所述抗体为粉状羊抗鼠免

疫球蛋白抗体 (goat-anti-mouse IgG), 所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP), 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

(1) 将纳米粒子溶于 $1\times$ PBS 缓冲液中, SMCC 预溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 按照纳米粒子表面的 $-NH_2$ 与 SMCC 的摩尔比为 $1:5-15$ 的比例, 将上述两种溶液混合, 室温下搅拌两小时, 然后除去剩余未反应的 SMCC;

(2) 将粉状羊抗鼠免疫球蛋白抗体 (goat-anti-mouse IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中, 置于摇床低速旋转 10 分钟, 然后除去剩余未反应的 DTT;

(3) 将步骤 (2) 所得抗体与步骤 (1) 所得纳米粒子按照摩尔比 $X:1$ ($X=5-15$) 相混和后, 搅拌 10-120 分钟;

(4) 与此同时, 向 30-80mg/mL HRP $1\times$ PBS 溶液中加入 2-5 倍于 HRP 的 Traut's reagent, 室温下搅拌两小时, 然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

(5) 将步骤 (4) 所得生物酶与步骤 (3) 所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 $Y:1$ ($Y=20-80$) 的比例相混合, 搅拌 10-120 分钟;

(6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤 (5) 所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 1000-8000 : 1 的比例混合, 室温 / 低温 ($2-8^{\circ}\text{C}$) 搅拌 10-120 分钟, 除去游离 $-SH$ 基团;

(7) 将步骤 (6) 所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中, 在压力下过柱子, 除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 收集含纳米粒子的组分;

(8) 向步骤 (7) 所得的纳米粒子中加入 2-8% N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.01-1.5% thimerosal, 低温储藏样品。

16. 一种如权利要求 12 所述的生物检测试剂, 其特征在于, 所述抗体为粉状兔抗羊免疫球蛋白抗体 (rabbit-anti-goat IgG), 所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP), 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

(1) 将纳米粒子溶于 $1\times$ PBS 缓冲液中, SMCC 预溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 按照纳米粒子表面的 $-NH_2$ 与 SMCC 的摩尔比为 $1:8-10$ 的比例, 将上述两种溶液混合, 室温下搅拌两小时, 然后除去剩余未反应的 SMCC;

(2) 将粉状兔抗羊免疫球蛋白抗体 (rabbit-anti-goat IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中, 置于摇床低速旋转 10 分钟, 然后除去剩余未反应的 DTT;

(3) 将步骤 (2) 所得抗体与步骤 (1) 所得纳米粒子按照摩尔比 $X:1$ ($X=8-12$) 相混和后, 搅拌 10-120 分钟;

(4) 与此同时, 向 40-60mg/mL HRP $1\times$ PBS 溶液中加入 2-5 倍于 HRP 的 Traut's reagent, 室温下搅拌两小时, 然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

(5) 将步骤 (4) 所得生物酶与步骤 (3) 所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 $Y:1$ ($Y=40-60$) 的比例相混合, 搅拌 10-120 分钟;

(6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤 (5) 所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 200-5000 : 1 的比例混合, 室温 / 低温 ($2-8^{\circ}\text{C}$) 搅拌 10-120 分钟, 除去游离 $-SH$ 基团;

(7) 将步骤 (6) 所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中, 在压力下过柱子, 除去

游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物,收集含纳米粒子的组分;

(8) 向步骤 (7) 所得的纳米粒子中加入 5% N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.01-1% thimerosal, 低温储藏样品。

17. 一种如权利要求 8 所述的生物检测试剂, 其特征在于, 所述靶物检测器为 streptavidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

(1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

(2) 将完整 Streptavidin 通过 3-5 当量的 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 $pH = 6-8$ 的合适缓冲液里生成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

(3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

(4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 $-SH$ 官能团与步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 $pH 6-7$ 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为 $X : 1 (X = 2-20)$, 搅拌 10-120 分钟; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为 $Y : 1 (Y = 5-100)$, 搅拌 10-300 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, $2-8^{\circ}C$ 轻微搅拌 10-300 分钟;

(5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离 Streptavidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物: Streptavidin- 载体 (荧光染料)- 生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

18. 一种如权利要求 8 所述的生物检测试剂, 其特征在于, 所述靶物检测器为 Neutravidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

(1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

(2) 将完整 Neutravidin 通过 3-5 当量的 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 $pH = 7-8$ 的 $1 \times PBS$ 缓冲液里生成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

(3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

(4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 $-SH$ 官能团与步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 $pH 7-8$ 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为 $X : 1 (X = 2-20)$, 搅拌 10-120 分钟; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为 $Y : 1 (Y = 5-100)$, 搅拌 10-300 分钟, 最后再加

入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8℃轻微搅拌 10-300 分钟;

(5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离 Neutravidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物: Neutravidin- 载体 (荧光染料)- 生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

19. 一种如权利要求 8 所述的生物检测试剂, 其特征在于, 所述靶物检测器为 Avidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

(1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

(2) 将完整 Avidin 通过 3-5 当量的 2-亚氨基氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 pH = 7-8 的 1×PBS 缓冲液里生成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

(3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2-亚氨基氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

(4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 $-SH$ 官能团与步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 pH 7-8 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为: $X : 1$ ($X = 2-20$), 搅拌 10-120 分钟; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为: $Y : 1$ ($Y = 5-100$), 搅拌 10-300 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8℃轻微搅拌 10-300 分钟;

(5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离 Avidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物: Avidin- 载体 (荧光染料)- 生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

一种生物检测试剂

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种生物检测试剂。

背景技术

[0002] 现有一般的生物检测试剂是将能识别被检测对象的生物片断(靶物检测器或称检测探针;如抗体、蛋白/多肽等)与能直接或间接产生信号的片断(信号发生器:如荧光素或辣根过氧化物酶(HRP)等)直接相连。这样当检测探针与被检测对象相互作用后,再将未相互作用的生物检测试剂通过一定的分离方法从分析体系中清除出去,最后再直接读取信号(荧光素)或者加入其他信号产生所需物质(如酶发光所需底物),以达到生物检测、免疫分析等目的。

[0003] 生物酶催化的发光体系(如HRP,胰蛋白酶(Trypsin),组织蛋白酶(Cathpesin)等)由于能进行信号扩增,一个酶分子能催化数百甚至更多的底物产生光子,因而具有较好的灵敏度,但是由于酶的活性会随时间迅速下降,因而释放出的光信号会随时间迅速下降,因而信号的稳定性、可重复性、量化性均较差。

[0004] 荧光素是具有光致荧光特性的染料,产生的荧光一般比较稳定,可以被反复激发数次而不会显著影响其荧光强度,因而在生物检测中被广泛使用,荧光染料种类很多,目前常用于标记抗体的荧光素有以下几种:异硫氰酸荧光素,四乙基罗丹明,四甲基异硫氰酸罗丹明,酶作用后产生荧光的物质等。由于荧光素自身不能进行信号扩增,其检测的灵敏度一般不及生物酶催化的发光信号扩增体系,如HRP等。现有生物检测试剂由于是靶物检测器和信号发生器直接相连,限制了靶物检测器的数量,所以灵敏度和稳定性较低。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明为解决现有技术中存在的检测载体不能同时提高检测的灵敏度和信号的稳定性的缺陷,提供一种生物检测试剂。该生物检测试剂能够提高信号放大能力,进而提高生物检测的灵敏度,并具有较高的稳定性。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用下述技术方案:

[0007] 本发明提供一种生物检测试剂,它的特点是,所述生物检测试剂包括载体、靶物检测器和信号发生器,所述载体通过共价键或物理作用载有靶物检测器和信号发生器,且靶物检测器和信号发生器之间只通过载体间接相连,而不直接相连。

[0008] 所述靶物检测器为能与待检测对象相互作用而形成较强的相互结合力(如抗体与抗原相互作用,二抗与一抗相互作用,DNA与其互补序列之间相互作用等),而与其它非待检测的生物环境因素之间无或仅有较弱的相互作用力的生物片断。

[0009] 上述信号发生器是,但不局限于荧光染料,核磁共振试剂、超声试剂、PET和生物酶。

[0010] 优选的上述生物检测试剂,它的特点是,所述载体内部含有不与其外部水相连通部分;所述载体为有机物、无机物或复合材料的纳米粒子,微球,纳米胶束,脂质体,高分子

体 (Polymersome), 纳米或微米胶体金, ; 所述靶物检测器为单、多克隆抗体或抗体有效片段 / 蛋白 / 多肽 / DNA/PNA/RNA/Aptamer/ 小分子配体中的一种或两种以上物质的组合物; 所述信号发生器为荧光染料和 / 或生物酶中的一种或两种以上物质的组合物。

[0011] 上述高分子体是, 但不局限于高分子聚合物或蛋白质, 上述高分子聚合物是, 但不局限于, 聚赖氨酸 (Polylysine), 多聚谷氨酸 (PolyGlutamic acid), 聚天冬氨酸 (polyAspartate), 聚丙烯酸等具有 20 个以上可偶合官能团的天然或合成的高分子聚合物; 上述蛋白质是, 但不局限于, 牛血清白蛋白 (BSA); 上述微球是, 但不局限于, 聚苯乙烯。

[0012] 上述生物酶是, 但不局限于, 辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphotase)、荧光素酶 (Luciferase)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase)、胰蛋白酶 (Trypsin)、组织蛋白酶 (Cathpesin)。

[0013] 进一步优选的上述生物检测试剂, 它的特点是, 所述载体内部不与外部水相连通部分载有荧光染料, 而载体外表面连接有诱发发光或变色或两者均可的生物酶以及靶物检测器; 所述载于载体外表面的生物酶与载于载体内部的荧光染料为信号发生器, 形成靶物检测器 - 载体 (荧光染料) - 生物酶体系。

[0014] 基于上述生物检测试剂, 它的特点是, 所述靶物检测器为抗体或抗体有效片段, 形成抗体 - 载体 (荧光染料) - 生物酶体系。

[0015] 基于上述的生物检测试剂, 它的特点是, 所述荧光染料为疏水荧光染料, 该疏水荧光染料通过疏水相吸力或共价键载于载体内部。

[0016] 基于上述的生物检测试剂, 它的特点是, 所述载体为脂质体或高分子体, 所述荧光染料为水溶性荧光染料, 该水溶性荧光染料溶于不与外部水相连通的载体内部水相内腔里。

[0017] 基于上述生物检测试剂, 它的特点是, 所述抗体有效片段为 DTT 还原 IgG 所得活性片段, 所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphotase)、或荧光素酶 (Luciferase)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase)、胰蛋白酶 (Trypsin)、组织蛋白酶 (Cathpesin)。

[0018] 基于上述的生物检测试剂, 它的特点是, 所述靶物检测器为抗生蛋白链菌素 (streptavidin), 抗生素蛋白 (avidin), neutravidin (是指去除了 " 糖 " 以后的 Avidin) 中的一种或两种以上物质的组合物; 所述信号发生器为荧光染料与一种或两种以上的生物酶; 所述生物酶包括辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphotase)、或荧光素酶 (Luciferase)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase)、胰蛋白酶 (Trypsin)、组织蛋白酶 (Cathpesin), 形成抗生素 - 载体 (荧光染料) - 生物酶体系。

[0019] 基于上述靶物检测器 - 载体 (荧光染料) - 生物酶体系的生物检测试剂, 它的特点是, 所述靶物检测器为生物素 (biotin); 所述信号发生器为荧光染料与辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphotase)、或荧光素酶 (Luciferase)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase)、胰蛋白酶 (Trypsin)、组织蛋白酶 (Cathpesin)。

[0020] 基于上述靶物检测器 - 载体 (荧光染料) - 生物酶体系的生物检测试剂, 它的特点是, 所述靶物检测器为 DNA/PNA/RNA 中的一种或两种以上物质的组合物; 所述信号发生器为荧光染料与一种或两种以上生物酶。

[0021] 基于上述的生物检测试剂, 它的特点是, 所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP) 或

碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphotase) 或荧光素酶 (Luciferase)。

[0022] 基于上述抗体-载体(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,它的特点是,所述载体为纳米粒子,所述纳米粒子上携带氨基($-\text{NH}_2$),所述疏水荧光染料通过疏水相吸力载于载体内部,形成抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系。

[0023] 基于上述抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,它的特点是,该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0024] (1) 所述纳米粒子内部疏水部分携带疏水荧光染料,所述纳米粒子上所携带的 $-\text{NH}_2$ 通过 Maleimide-NHS(含有马来酰亚胺官能团的N-羟基琥珀酰亚胺)或其他类似化合物,如 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate(SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate(Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺(maleimide),然后通过离心柱(Spin Column)或者脱盐柱(desalting column)除去过量 SMCC 或(Sulfo-SMCC);

[0025] (2) 将完整的抗体分子通过过量二硫苏糖醇(DTT)还原其自身铰链(Hinge)处的二硫键而产生 $-\text{SH}$ 官能团,然后通过 Spin Column 或者 desalting column 除去过量 DTT;

[0026] (3) 将每一个生物酶分子上的所携带的 $-\text{NH}_2$ 中的1-5个通过2-亚氨基氯化硫醇(Traut's reagent)在有利于生物酶活性的pH值的缓冲液里转化成 $-\text{SH}$,然后通过 Spin Column 或者 desalting column 除去过量 Traut's reagent;

[0027] (4) 将步骤(2)的产物加入到步骤(1)的产物中,步骤(2)产生的 $-\text{SH}$ 官能团与步骤(1)中纳米粒子所携带的 maleimide 在 pH 6-8 的缓冲液(如 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0)中发生偶合反应,步骤(2)产物与步骤(1)产物的摩尔比为:X:1($X=2-20$),搅拌10-120分钟;然后再加入步骤(3)的产物,步骤(3)的产物与步骤(1)的产物摩尔比为:Y:1($Y=2-100$),搅拌10-300分钟,最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物(Maleimide-增加水溶性片断或类似衍生化合物),如 Maleimide-PEG(含有马来酰亚胺官能团的聚乙二醇)或 Sulfo-Maleimide。这些化合物不但可以清除生物酶上存在的游离 $-\text{SH}$ 基团,以防止这些残留 $-\text{SH}$ 氧化形成酶分子内或分子间的二硫键($-\text{S}-\text{S}-$)(这些分子内与分子间的二硫键会显著削弱生物酶的活性,降低其水溶性);同时这些化合物会增强生物酶的水溶性,从而提高所形成的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的稳定性,防止聚集态(Aggregate)的形成。加入助水溶性化合物后在2-8℃轻微搅拌10-300分钟;

[0028] (5) 将步骤(4)所得产物通过尺寸排除色谱柱 Size Exclusion Chromatography(SEC) Column 将游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物从目标产物中分离出去,得到目标产物:抗体-载体(荧光染料)-生物酶体系,然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂,如 N,O-双三甲硅基乙酰胺(BSA),叠氮化钠(sodium Azide),硫汞散(thimerosal)等。该产物然后便可低温储藏。

[0029] 基于上述抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,它的特点是,所述抗体为粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体(goat-anti-rabbit IgG),所述生物酶为辣根过氧化物酶(HRP),该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0030] (1) 将纳米粒子溶于1×PBS缓冲液中,SMCC预溶于二甲基亚砷(DMSO)中,按照纳米粒子表面的 $-\text{NH}_2$ 与 SMCC 的摩尔比为:1:2-20的比例,将上述两种溶液混合,室

温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 SMCC;可采用下述方法除去剩余未反应的 SMCC:将反应液滴加入到 PD-10 脱盐柱 (PD-10Desalting columns(Amersham Biosciences) with SephadexTMG-25Medium) 中,然后再将 PD-10 脱盐柱置于离心机中旋转 5 分钟(转速 10000rpm);

[0031] (2) 将粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体 (goat-anti-rabbit IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中,置于摇床低速旋转 10 分钟,然后除去剩余未反应的 DTT;

[0032] (3) 将步骤 (2) 所得抗体与步骤 (1) 所得纳米粒子按照摩尔比 $X : 1$ ($X = 2-20$) 相混和后,搅拌 10-120 分钟;

[0033] (4) 与此同时,向 20-100mg/mL HRP 1×PBS 溶液中加入 2-5 倍于 HRP 的 Traut's reagent(Traut's reagent 与 HRP 的摩尔比为 2-5 : 1),室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

[0034] (5) 将步骤 (4) 所得生物酶与步骤 (3) 所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 $Y : 1$ ($Y = 2-100$) 的比例相混合,搅拌 10-120 分钟;

[0035] (6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤 (5) 所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 100-10000 : 1 的比例混合,室温 / 低温 (2-8℃) 搅拌 10-120 分钟,以除去游离 -SH 基团;

[0036] (7) 将步骤 (6) 所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中,在压力下过柱子,除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物,收集含纳米粒子的组分;

[0037] (8) 向步骤 (7) 所得的纳米粒子中加入 1-10% N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.01-2% 硫汞撒 (thimerosal), 低温储藏样品。

[0038] 基于上述抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,它的特点是,所述抗体为粉状羊抗鼠免疫球蛋白抗体 (goat-anti-mouse IgG),所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP),该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0039] (1) 将纳米粒子溶于 1×PBS 缓冲液中,SMCC 预溶于二甲基亚砷 (DMSO) 中,按照纳米粒子表面的 $-NH_2$ 与 SMCC 的摩尔比为 $1 : 5-15$ 的比例,将上述两种溶液混合,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 SMCC;

[0040] (2) 将粉状羊抗鼠免疫球蛋白抗体 (goat-anti-mouse IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中,置于摇床低速旋转 10 分钟,然后除去剩余未反应的 DTT;

[0041] (3) 将步骤 (2) 所得抗体与步骤 (1) 所得纳米粒子按照摩尔比 $X : 1$ ($X = 5-15$) 相混和后,搅拌 10-120 分钟;

[0042] (4) 与此同时,向 30-80mg/mL HRP 1×PBS 溶液中加入 2-5 倍于 HRP 的 Traut's reagent,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

[0043] (5) 将步骤 (4) 所得生物酶与步骤 (3) 所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 $Y : 1$ ($Y = 20-80$) 的比例相混合,搅拌 10-120 分钟;

[0044] (6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤 (5) 所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 1000-8000 : 1 的比例混合,室温 / 低温 (2-8℃) 搅拌 10-120 分钟,除去游离 -SH 基团;

[0045] (7) 将步骤 (6) 所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中,在压力下(如高

效液相色谱 HPLC) 过柱子, 除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 收集含纳米粒子的组分;

[0046] (8) 向步骤 (7) 所得的纳米粒子中加入 2-8% N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.01-1.5% thimerosal, 低温储藏样品。

[0047] 基于上述抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂, 它的特点是, 所述抗体为粉状兔抗羊免疫球蛋白抗体 (rabbit-anti-goat IgG), 所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP), 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0048] (1) 将纳米粒子溶于 1×PBS 缓冲液中, SMCC 预溶于二甲基亚砷 (DMSO) 中, 按照纳米粒子表面的 $-NH_2$ 与 SMCC 的摩尔比为 1 : 8-10 的比例, 将上述两种溶液混合, 室温下搅拌两小时, 然后除去剩余未反应的 SMCC;

[0049] (2) 将粉状兔抗羊免疫球蛋白抗体 (rabbit-anti-goat IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中, 置于摇床低速旋转 10 分钟, 然后除去剩余未反应的 DTT;

[0050] (3) 将步骤 (2) 所得抗体与步骤 (1) 所得纳米粒子按照摩尔比 X : 1 ($X = 8-12$) 相混和后, 搅拌 10-120 分钟;

[0051] (4) 与此同时, 向 40-60mg/mL HRP 1×PBS 溶液中加入 2-5 倍于 HRP 的 Traut's reagent, 室温下搅拌两小时, 然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

[0052] (5) 将步骤 (4) 所得生物酶与步骤 (3) 所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 Y : 1 ($Y = 40-60$) 的比例相混合, 搅拌 10-120 分钟;

[0053] (6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤 (5) 所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 200-5000 : 1 的比例混合, 室温/低温 (2-8℃) 搅拌 10-120 分钟, 除去游离 -SH 基团;

[0054] (7) 将步骤 (6) 所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中, 在压力下过柱子, 除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 收集含纳米粒子的组分;

[0055] (8) 向步骤 (7) 所得的纳米粒子中加入 5% N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.01-1% thimerosal, 低温储藏样品。

[0056] 基于上述抗生素-载体(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂, 它的特点是, 所述靶物检测器为 streptavidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0057] (1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

[0058] (2) 将完整 Streptavidin 通过 3-5 当量的 2-亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 pH = 6-8 值的合适缓冲液里生成 -SH, 然后除去过量 Traut's reagent;

[0059] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2-亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 -SH, 然后除去过量 Traut's reagent;

[0060] (4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 -SH 官能团与步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 pH 6-7 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与

步骤 (1) 产物的摩尔比为 :X : 1 ($X = 2-20$), 搅拌 10-120 分钟 ; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为 :Y : 1 ($Y = 5-100$), 搅拌 10-300 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, $2-8^{\circ}\text{C}$ 轻微搅拌 10-300 分钟 ;

[0061] (5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离 Streptavidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物 : Streptavidin- 载体 (荧光染料)- 生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

[0062] 基于上述抗生素 - 载体 (荧光染料)- 生物酶体系的生物检测试剂, 它的特点是, 所述靶物检测器为 Neutravidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤 :

[0063] (1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 $-\text{NH}_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC) ;

[0064] (2) 将完整 Neutravidin 通过 3-5 当量的 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 $\text{pH} = 7-8$ 的 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液里生成 $-\text{SH}$, 然后除去过量 Traut's reagent ;

[0065] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-\text{NH}_2$ 中的 1-5 个通过 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-\text{SH}$, 然后除去过量 Traut's reagent ;

[0066] (4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 $-\text{SH}$ 官能团与步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 $\text{pH} 7-8$ 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为 :X : 1 ($X = 2-20$), 搅拌 10-120 分钟 ; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为 :Y : 1 ($Y = 5-100$), 搅拌 10-300 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, $2-8^{\circ}\text{C}$ 轻微搅拌 10-300 分钟 ;

[0067] (5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离 Neutravidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物 : Neutravidin- 载体 (荧光染料)- 生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

[0068] 基于上述抗生素 - 载体 (荧光染料)- 生物酶体系的生物检测试剂, 它的特点是, 所述靶物检测器为 Avidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤 :

[0069] (1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 $-\text{NH}_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC) ;

[0070] (2) 将完整 Avidin 通过 3-5 当量的 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 $\text{pH} = 7-8$ 的 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液里生成 $-\text{SH}$, 然后除去过量 Traut's reagent ;

[0071] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-\text{NH}_2$ 中的 1-5 个通过 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-\text{SH}$, 然后除去过量 Traut's reagent ;

[0072] (4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 $-\text{SH}$ 官能团与

步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 pH 7-8 的缓冲液中进行偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为 :x : 1 ($X = 2-20$), 搅拌 10-120 分钟 ; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为 :Y : 1 ($Y = 5-100$), 搅拌 10-300 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8℃ 轻微搅拌 10-300 分钟 ;

[0073] (5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离 Avidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物 :Avidin- 载体 (荧光染料) - 生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

[0074] 与现有技术相比, 本发明提供的生物检测试剂的优点可总结为如下四点 :

[0075] 一、整体结构创新 : 靶物检测器与信号发生器不直接相连, 而是通过载体为中间体间接相联。这样信号发生器的数量不会显著影响靶物检测器的生物活性 ; 信号发生器的数量可增加到数十个甚至更多, 取决于载体的大小 ; 增加信号发生器的数量能显著增强释放出的信号。此外, 载体上可同时载有多个检测探针 (靶物检测器), 可有效增强检测探针与被检测物之间的亲和力。因而, 该发明的技术可有效增加检测的灵敏度。具体说, (1) 本发明将多个抗体负载于纳米粒子、高分子体等载体上 ; 由于每个抗体只与载体发生一次共价键相连, 故抗体的活性几乎不受到任何影响。同时一个载体上可负载几个抗体, 比现有 Ab-Enzyme 试剂的单一抗体能提供更高的与待检测对象的相互结合力。(2) 同时将数十个, 甚至上百个生物酶负载于纳米粒子、高分子体等载体上 ; 由于每个生物酶只与载体通过有限的共价键相连, 故生物酶的活性受到非常有限的影响。由于一个载体上可负载众多生物酶, 本发明的试剂比现有 Ab-Enzyme 试剂的单一生物酶能提供 stronger 的生物信号。

[0076] 二、扩展生物酶类型 : 上述载体上还可同时负载不同类型生物酶, 如一种生物酶可催化发光 (如 Alkaline phosphatase), 一种可催化变色 (如 HRP), 一种可催化产生荧光, 从而方便使用者根据可利用设备来选择所使用酶的底物来读取信号。不同信号之间还可互为验证, 相互补充, 克服传统单一类型信号免疫分析试剂的不足 : 如第一种酶催化产生或者激活第二种酶的底物, 只有当两种酶相互靠近时, 该底物才能发出可检测信号, 从而大大降低了待检测生物体系自身所携带类似生物酶所带来的背景噪音 (Background or noise)。

[0077] 三、载体内部 / 外部分工, 扩展信号种类 : 本发明所述载体内部可通过非共价键, 如纳米粒子 / 纳米管内部疏水部分利用疏水相吸力 (hydrophobic attraction force) 来负载疏水性对比度试剂, 如疏水性荧光染料 ; 或者脂质体 / 高分子体 (liposomes, polymersomes) 等内部亲水内室来负载亲水性对比度试剂, 如亲水性荧光染料等 ; 同时在载体外表面 (亲水部分) 通过共价键负载生物酶与抗体, 从而可实现多种信号的产生, 如荧光与发光同时产生。

[0078] 四、检测范围广 : 将抗体用 DNA, Aptamer, ligand, Protein, Peptide 等其他能与待检测生物分子间发生较强相互作用 (如受体与配体, DNA 与 complementary DNA 等) 特定的生物片断来取代时, 上述结构还可被用来构建更为广泛的生物检测试剂 (Bio-detection reagents)。如 DNA 由于能与其互补的 DNA 相互作用, 因而可被载于载体上, 用于酶标分子诊断试剂 (Molecular Diagnostics)。还可将两种以上用于检测特定生物分子的片断 (如抗体与 DNA, Aptamer, ligand, protein, Peptide 等) 负载在载体上, 从而可同时检测不同的待检测生物分子。

[0079] 本发明提供的生物检测试剂灵敏度和稳定性较高, 能够 (1) 检测到现有试剂所不

能检测到的样品, (2) 大幅提升数据的可靠性与可量化性 (因为发光信号不会随时间显著衰减, 数据的读取时间可延长至 30 分钟以上); (3) 能减少试剂用量, 降低生物测试费用。

附图说明

[0080] 图 1 为 Sulfo-Maleimide 的结构式;

[0081] 图 2 为 Sulfo-SMCC 的结构式;

[0082] 图 3 为生物酶上所携带的 $-NH_2$ 通过 Traut's reagent 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$ 的示意图;

[0083] 图 4 为现有荧光 / 发光免疫分析试剂与本发明荧光 / 发光免疫分析试剂的结构示意图;

[0084] 图 5 为 Streptavidin-载体 (荧光染料)-HRP 用于 biotin-BSA 的检测结果;

[0085] 图 6 为现有检测试剂与本发明提供的抗体-载体 (荧光染料)-HRP 用于 IgG 的检测图对比结果。

具体实施方式

[0086] 实施例中的有机物、无机物或复合材料的纳米粒子, 微球, 纳米胶束, 脂质体, 高分子体 / 大分子, 单、多克隆抗体或抗体有效片段 / 蛋白 / 多肽 / DNA/PNA/RNA/Aptamer / 小分子配体, HRP, Alkaline Phosphatase, Caspase, Trypsin, Cathpesin, Luciferase, streptavidin, avidin, neutravidin 等均为市场上销售的常用产品或可按照现有常用方法生产出来。

[0087] 如图 2 所示, Sulfo-SMCC 分子可以将载体上所携带的 $-NH_2$ 转化为马来酰亚胺 (maleimide), 活化载体, 使其能够与抗体和生物酶反应。

[0088] 如图 3 所示, 将生物酶上的所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 Traut's reagent 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$, 使其能够加载于载体上。

[0089] 如图 4 所示, 图 4(1) 为现有的荧光免疫分析试剂, 其中, 靶物检测器 3, 如二抗 3 (Streptavidin) 直接与信号发生器, 如荧光染料 1 以共价键相连; 图 4(2) 为现有的发光免疫分析试剂, 其中, 二抗 3 直接与 2, 如酶 2 (HRP) 以共价键相连; 故现有的分析试剂中, 检测探针 (靶物检测器) 只能负载极少的酶或荧光染料, 否则抗体活性会大幅下降; 图 4(3) 为本发明提供的荧光 / 发光免疫分析试剂, 其中, 纳米载体将更多荧光染料 1 等非生物活性的对比度试剂负载于载体内部疏水部分, 同时将诱发发光的众多生物酶 2 与数个二抗 3 (片断) 负载于载体表面, 同时保持抗体与生物酶的活性几乎不受影响, 二抗 3 可用于检测一抗 4 (biotin)。

[0090] 如图 4(3) 所示, 本发明提供的 Streptavidin-载体 (荧光染料)-HRP 用于 biotin-BSA 的检测, 检测方法如下:

[0091] (1) 将 biotin-BSA (Invitrogen) 稀释成 $1000ng/\mu L$, $100ng/\mu L$, $10ng/\mu L$, 然后用滴管滴加 $1\mu l$ 的上述 biotin-BSA 溶液到硝基纤维素或聚偏二氟乙烯膜上, 在室温下干燥, 得到三个 biotin-BSA 圆点, 其直径约为 2-4 毫米, 三圆点分别含 $1000ng$, $100ng$ 与 $10ng$ 的 biotin-BSA。

[0092] (2) 将步骤 1) 所得 biotin-BSA 硝基纤维素或聚偏二氟乙烯膜置于 10ml 含有 5%

(重量百分比)牛奶的 PBS 缓冲液中,摇晃 10 分钟后,用上述 PBS 洗涤前述含 biotin-BSA 圆点的硝基纤维素或聚偏二氟乙烯膜,重复洗涤 3 次。

[0093] (3) 将 25 μ L 的 1.5 μ M 的表面偶合有 streptavidin 以及 HRP 的纳米粒子(内部载有荧光染料)加入含有 5% (重量百分比)牛奶的 10ml PBS 缓冲液中,然后将该溶液加入含步骤(2)所得的含 biotin-BSA 的硝基纤维素或聚偏二氟乙烯膜的敞口小盒中,室温下摇晃 30 分钟,然后倒掉缓冲液,保留硝基纤维素或聚偏二氟乙烯膜。

[0094] (4) 洗涤:将步骤(3)所得硝基纤维素或聚偏二氟乙烯膜置于含 5% (重量百分比)牛奶的 1 $\times$ PBS 缓冲液浸泡 10 分钟,然后除去 PBS 缓冲液;重复此洗涤步骤 3 次。

[0095] (5) 硝基纤维素膜或聚偏二氟乙烯膜置于柯达活体成像仪内,在合适的光学过滤器下进行荧光成像,或在没有激发光下进行发光成像。

[0096] (6) 对所得图像进行 ROI analysis。

[0097] 检测结果如图 5 所示,说明本发明提供的 Streptavidin-载体(荧光染料)-HRP 体系的试剂检测信号较强。

[0098] 图 6 为现有分析试剂与本发明提供的抗体-载体(荧光染料)-HRP 用于 IgG 的检测图对比结果,如图 6(1)所示,本发明提供的纳米免疫分析试剂无论荧光检测灵敏度还是发光检测灵敏度均强于现有产品;如图 6(2)所示,本发明提供的试剂的发光时间更长,信号更加稳定;如图 6(3)所示,本发明提供的纳米免疫分析试剂同时具备荧光与发光两种可互为互补的功能。

[0099] 本发明提供的靶物检测器-载体(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,其中,所述靶物检测器为单、多克隆抗体或抗体有效片段/蛋白/多肽/DNA/PNA/RNA/Aptamer/小分子配体;所述生物酶为辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphotase)、荧光素酶(Luciferase)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)、胰蛋白酶(Trypsin)、组织蛋白酶(Cathpesin);所述载体为有机物、无机物或复合材料的纳米粒子,微球,纳米胶束,脂质体,高分子体。其制备方法为常用的方法。

[0100] 为了进一步说明本发明提供的技术方案,详细举例如下:

[0101] 实施例 1

[0102] 本发明提供的靶物检测器-载体(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述靶物检测器为生物素,所述信号发生器为荧光染料与辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(Alkaline Phosphotase)或荧光素酶(Luciferase),制备方法为常用方法。

[0103] 实施例 2

[0104] 本发明提供的靶物检测器-载体(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述靶物检测器为 DNA/PNA/RNA,制备方法为常用方法。

[0105] 实施例 3

[0106] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述抗体为抗体有效片段,为 DTT 还原 IgG 所得活性片段,所述生物酶为辣根过氧化物酶(HRP),制备方法为常用方法。

[0107] 实施例 4

[0108] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述生物酶为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(Alkaline Phosphotase)或荧光素酶

(Luciferase), 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0109] (1) 所述纳米粒子内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述纳米粒子上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

[0110] (2) 将完整的抗体分子通过过量二硫苏糖醇 (DTT) 还原其自身铰链 (Hinge) 处的二硫键而产生 $-SH$ 官能团, 然后除去过量 DTT;

[0111] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

[0112] (4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 $-SH$ 官能团与步骤 (1) 中纳米粒子所携带的 maleimide 在 pH 6-8 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为: $X : 1 (X = 2)$, 搅拌 10-20 分钟; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为: $Y : 1 (Y = 2)$, 搅拌 10-30 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8°C 轻微搅拌 10-30 分钟;

[0113] (5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物: 抗体-载体 (荧光染料)-生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

[0114] 实施例 5

[0115] 本发明提供的抗体-纳米粒子 (荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂, 所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase) 或荧光素酶 (Luciferase), 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0116] (1) 所述纳米粒子内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述纳米粒子上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

[0117] (2) 将完整的抗体分子通过过量二硫苏糖醇 (DTT) 还原其自身铰链 (Hinge) 处的二硫键而产生 $-SH$ 官能团, 然后除去过量 DTT;

[0118] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

[0119] (4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 $-SH$ 官能团与步骤 (1) 中纳米粒子所携带的 maleimide 在 pH 6-8 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为: $X : 1 (X = 20)$, 搅拌 100-120 分钟; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为: $Y : 1 (Y = 100)$, 搅拌 300 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8°C 轻微搅拌 300 分钟;

[0120] (5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物: 抗体-载体 (荧光染料)-生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

[0121] 实施例 6

[0122] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述生物酶为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase)或荧光素酶(Luciferase),该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0123] (1) 所述纳米粒子内部疏水部分携带疏水荧光染料,所述纳米粒子上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺(maleimide),然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

[0124] (2) 将完整的抗体分子通过过量二硫苏糖醇(DTT)还原其自身铰链(Hinge)处的二硫键而产生 $-SH$ 官能团,然后除去过量 DTT;

[0125] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2-亚氨氢氯化硫醇(Traut's reagent)在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$,然后除去过量 Traut's reagent;

[0126] (4) 将步骤(2)的产物加入到步骤(1)的产物中,步骤(2)产生的 $-SH$ 官能团与步骤(1)中纳米粒子所携带的 maleimide 在 pH 6-8 的缓冲液中发生偶合反应,步骤(2)产物与步骤(1)产物的摩尔比为 $X:1$ ($X=10$),搅拌 70 分钟;然后再加入步骤(3)的产物,步骤(3)的产物与步骤(1)的产物摩尔比为 $Y:1$ ($Y=50$),搅拌 200 分钟,最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物,2-8℃轻微搅拌 200 分钟;

[0127] (5) 除去步骤(4)所得产物中的游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物,得到目标产物:抗体-载体(荧光染料)-生物酶体系,然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂,低温储藏该产物。

[0128] 实施例 7

[0129] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述抗体为粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体(goat-anti-rabbit IgG),所述生物酶为辣根过氧化物酶(HRP),该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0130] (1) 将纳米粒子溶于 1×PBS 缓冲液中,SMCC 预溶于二甲基亚砜(DMSO)中,按照纳米粒子表面的 $-NH_2$ 与 SMCC 的摩尔比为 $1:2$ 的比例,将上述两种溶液混合,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 SMCC;

[0131] (2) 将粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体(goat-anti-rabbit IgG)溶于 1M 的 DTT 水溶液中,置于摇床低速旋转 10 分钟,然后除去剩余未反应的 DTT;

[0132] (3) 将步骤(2)所得抗体与步骤(1)所得纳米粒子按照摩尔比 $X:1$ ($X=2$)相混和后,搅拌 10 分钟;

[0133] (4) 与此同时,向 20mg/mL HRP 1×PBS 溶液中加入 2 倍于 HRP 的 Traut's reagent,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

[0134] (5) 将步骤(4)所得生物酶与步骤(3)所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 $Y:1$ ($Y=2$)的比例相混合,搅拌 10 分钟;

[0135] (6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤(5)所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 100:1 的比例混合,室温/低温(2-8℃)搅拌 10 分钟,以除去游离 $-SH$ 基团;

[0136] (7) 将步骤(6)所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中,在压力下过柱子,除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物,收集含纳米粒子的组分;

[0137] (8) 向步骤(7)所得的纳米粒子中加入 1% N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.01% 硫汞撒 (thimerosal), 低温储藏样品。

[0138] 实施例 8

[0139] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述抗体为粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体 (goat-anti-rabbit IgG),所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP),该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0140] (1) 将纳米粒子溶于 1×PBS 缓冲液中, SMCC 预溶于二甲基亚砷 (DMSO) 中,按照纳米粒子表面的 $-NH_2$ 与 SMCC 的摩尔比为 1 : 20 的比例,将上述两种溶液混合,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 SMCC;

[0141] (2) 将粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体 (goat-anti-rabbit IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中,置于摇床低速旋转 10 分钟,然后除去剩余未反应的 DTT;

[0142] (3) 将步骤(2)所得抗体与步骤(1)所得纳米粒子按照摩尔比 X : 1 (X = 20) 相混和后,搅拌 120 分钟;

[0143] (4) 与此同时,向 100mg/mL HRP 1×PBS 溶液中加入 5 倍于 HRP 的 Traut' s reagent,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 Traut' s reagent;

[0144] (5) 将步骤(4)所得生物酶与步骤(3)所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 Y : 1 (Y = 100) 的比例相混合,搅拌 120 分钟;

[0145] (6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤(5)所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 10000 : 1 的比例混合,室温 / 低温 (2-8℃) 搅拌 120 分钟,以除去游离 -SH 基团;

[0146] (7) 将步骤(6)所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中,在压力下过柱子,除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物,收集含纳米粒子的组分;

[0147] (8) 向步骤(7)所得的纳米粒子中加入 10% N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 2% 硫汞撒 (thimerosal), 低温储藏样品。

[0148] 实施例 9

[0149] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述抗体为粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体 (goat-anti-rabbit IgG),所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP),该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0150] (1) 将纳米粒子溶于 1×PBS 缓冲液中, SMCC 预溶于二甲基亚砷 (DMSO) 中,按照纳米粒子表面的 $-NH_2$ 与 SMCC 的摩尔比为 1 : 10 的比例,将上述两种溶液混合,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 SMCC;

[0151] (2) 将粉状羊抗兔免疫球蛋白抗体 (goat-anti-rabbit IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中,置于摇床低速旋转 10 分钟,然后除去剩余未反应的 DTT;

[0152] (3) 将步骤(2)所得抗体与步骤(1)所得纳米粒子按照摩尔比 X : 1 (X = 10) 相混和后,搅拌 70 分钟;

[0153] (4) 与此同时,向 60mg/mL HRP 1×PBS 溶液中加入 3.5 倍于 HRP 的 Traut's reagent,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

[0154] (5) 将步骤 (4) 所得生物酶与步骤 (3) 所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 $Y : 1$ ($Y = 50$) 的比例相混合,搅拌 70 分钟;

[0155] (6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤 (5) 所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 5000 : 1 的比例混合,室温/低温 (2-8℃) 搅拌 70 分钟,以除去游离 -SH 基团;

[0156] (7) 将步骤 (6) 所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中,在压力下过柱子,除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物,收集含纳米粒子的组分;

[0157] (8) 向步骤 (7) 所得的纳米粒子中加入 6% N,O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA),0.2% 硫汞撒 (thimerosal),低温储藏样品。

[0158] 实施例 10、实施例 11、实施例 12

[0159] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述抗体为粉状羊抗鼠免疫球蛋白抗体 (goat-anti-mouse IgG),所述生物酶为辣根过氧化物酶 (HRP),该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0160] (1) 将纳米粒子溶于 1×PBS 缓冲液中,SMCC 预溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中,按照纳米粒子表面的 $-NH_2$ 与 SMCC 的摩尔比为 $1 : 5-15$ (具体比例为:实施例 10 中为 $1 : 5$;实施例 11 中为 $1 : 15$;实施例 12 中为 $1 : 10$;) 的比例,将上述两种溶液混合,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 SMCC;

[0161] (2) 将粉状羊抗鼠免疫球蛋白抗体 (goat-anti-mouse IgG) 溶于 1M 的 DTT 水溶液中,置于摇床低速旋转 10 分钟,然后除去剩余未反应的 DTT;

[0162] (3) 将步骤 (2) 所得抗体与步骤 (1) 所得纳米粒子按照摩尔比 $X : 1$ ($X = 5-15$) (具体比例为:实施例 10 中为 $X = 5$;实施例 11 中为 $X = 15$;实施例 12 中为 $X = 10$;) 相混和后,搅拌 10-120 (具体比例为:实施例 10 中为 10;实施例 11 中为 120;实施例 12 中为 70;) 分钟;

[0163] (4) 与此同时,向 30-80mg/mL (具体为:实施例 10 中为 30mg/mL;实施例 11 中为 80mg/mL;实施例 12 中为 50mg/mL;) HRP 1×PBS 溶液中加入 2-5 (具体为:实施例 10 中为 2;实施例 11 中为 5;实施例 12 中为 3.5;) 倍于 HRP 的 Traut's reagent,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

[0164] (5) 将步骤 (4) 所得生物酶与步骤 (3) 所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 $Y : 1$ ($Y = 20-80$) (具体比例为:实施例 10 中为 $Y = 20$;实施例 11 中为 $Y = 80$;实施例 12 中为 $Y = 50$;) 的比例相混合,搅拌 10-120 (具体为:实施例 10 中为 10;实施例 11 中为 120;实施例 12 中为 70;) 分钟;

[0165] (6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤 (5) 所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 1000-8000 : 1 (具体比例为:实施例 10 中为 1000 : 1;实施例 11 中为 8000 : 1;实施例 12 中为 5000 : 1;) 的比例混合,室温/低温 (2-8℃) 搅拌 10-120 (具体为:实施例 10 中为 10;实施例 11 中为 120;实施例 12 中为 70;) 分钟,除去游离 -SH 基团;

[0166] (7) 将步骤(6)所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中,在压力下过柱子,除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物,收集含纳米粒子的组分;

[0167] (8) 向步骤(7)所得的纳米粒子中加入 2-8% (具体为:实施例 10 中为 2%;实施例 11 中为 8%;实施例 12 中为 5%;)N,O-双三甲硅基乙酰胺(BSA),0.01-1.5% (具体为:实施例 10 中为 0.01%;实施例 11 中为 1.5%;实施例 12 中为 0.15%;)thimerosal,低温储藏样品。

[0168] 实施例 13、实施例 14、实施例 15

[0169] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂,所述抗体为粉状兔抗羊免疫球蛋白抗体(rabbit-anti-goat IgG),所述生物酶为辣根过氧化物酶(HRP),该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0170] (1) 将纳米粒子溶于 1×PBS 缓冲液中,SMCC 预溶于二甲基亚砜(DMSO)中,按照纳米粒子表面的-NH₂与 SMCC 的摩尔比为:1:8-10(具体为:实施例 13 中为 1:8;实施例 14 中为 1:10;实施例 15 中为 1:9;)的比例,将上述两种溶液混合,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 SMCC;

[0171] (2) 将粉状兔抗羊免疫球蛋白抗体(rabbit-anti-goat IgG)溶于 1M 的 DTT 水溶液中,置于摇床低速旋转 10 分钟,然后除去剩余未反应的 DTT;

[0172] (3) 将步骤(2)所得抗体与步骤(1)所得纳米粒子按照摩尔比 X:1(X=8-12)(具体为:实施例 13 中为 X=8;实施例 14 中为 X=12;实施例 15 中为 X=10;)相混和后,搅拌 10-120(具体为:实施例 13 中为 10;实施例 14 中为 120;实施例 15 中为 70;)分钟;

[0173] (4) 与此同时,向 40-60mg/mL HRP 1×PBS(具体为:实施例 13 中为 40;实施例 14 中为 60;实施例 15 中为 50;)溶液中加入 2-5(具体为:实施例 13 中为 2;实施例 14 中为 5;实施例 15 中为 3.5;)倍于 HRP 的 Traut's reagent,室温下搅拌两小时,然后除去剩余未反应的 Traut's reagent;

[0174] (5) 将步骤(4)所得生物酶与步骤(3)所得溶液按照生物酶与纳米粒子的摩尔比为 Y:1(Y=40-60)(具体为:实施例 13 中为 Y=40;实施例 14 中为 Y=60;实施例 15 中为 Y=50;)的比例相混合,搅拌 10-120(具体为:实施例 13 中为 10;实施例 14 中为 120;实施例 15 中为 70;)分钟;

[0175] (6) 将 Sulfo-Maleimide 水溶液与步骤(5)所得溶液按照 Sulfo-Maleimide 与纳米粒子的摩尔比为 200-5000:1(具体为:实施例 13 中为 200:1;实施例 14 中为 5000:1;实施例 15 中为 2500:1;)的比例混合,室温/低温(2-8℃)搅拌 10-120(具体为:实施例 13 中为 10;实施例 14 中为 120;实施例 15 中为 70;)分钟,除去游离-SH 基团;

[0176] (7) 将步骤(6)所得溶液滴加到凝胶过滤 Superdex 200 柱子中,在压力下过柱子,除去游离抗体、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物,收集含纳米粒子的组分;

[0177] (8) 向步骤(7)所得的纳米粒子中加入 5% N,O-双三甲硅基乙酰胺(BSA),0.01-1% thimerosal(具体为:实施例 13 中为 0.01%;实施例 14 中为 1%;实施例 15 中

为 0.1% ;), 低温储藏样品。

[0178] 实施例 16、实施例 17、实施例 18

[0179] 本发明提供的抗体-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂, 所述靶物检测器为 streptavidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0180] (1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

[0181] (2) 将完整 Streptavidin 通过 3-5 (具体为: 实施例 16 中为 3; 实施例 17 中为 5; 实施例 18 中为 4;) 当量的 2-亚氨基氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 pH = 6-8 的合适缓冲液里生成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

[0182] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2-亚氨基氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

[0183] (4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 $-SH$ 官能团与步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 pH 6-7 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为: $X : 1$ ($X = 2-20$) (具体为: 实施例 16 中为 $X = 2$; 实施例 17 中为 $X = 20$; 实施例 18 中为 $X = 10$;) , 搅拌 10-120 (具体为: 实施例 16 中为 10; 实施例 17 中为 120; 实施例 18 中为 70;) 分钟; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为: $Y : 1$ ($Y = 5-100$) (具体为: 实施例 16 中为 $Y = 5$; 实施例 17 中为 $Y = 100$; 实施例 18 中为 $Y = 50$;) , 搅拌 10-300 (具体为: 实施例 16 中为 10; 实施例 17 中为 $X = 300$; 实施例 18 中为 150;) 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8℃ 轻微搅拌 10-300 (具体为: 实施例 16 中为 10; 实施例 17 中为 $X = 300$; 实施例 18 中为 150;) 分钟;

[0184] (5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离 Streptavidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物: Streptavidin-载体(荧光染料)-生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

[0185] 实施例 19、实施例 20、实施例 21

[0186] 本发明提供的靶物检测器-纳米粒子(荧光染料)-生物酶体系的生物检测试剂, 所述靶物检测器为 Neutravidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤:

[0187] (1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 $-NH_2$ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC);

[0188] (2) 将完整 Neutravidin 通过 3-5 (具体为: 实施例 19 中为 3; 实施例 20 中为 5; 实施例 21 中为 4;) 当量的 2-亚氨基氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 pH = 7-8 的 1×PBS 缓冲液里生成 $-SH$, 然后除去过量 Traut's reagent;

[0189] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 $-NH_2$ 中的 1-5 个通过 2-亚氨基氯化硫醇

(Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 -SH, 然后除去过量 Traut's reagent;

[0190] (4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 -SH 官能团与步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 pH 7-8 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为 :X : 1 (X = 2-20) (具体为 : 实施例 19 中为 X = 2 ; 实施例 20 中为 X = 20 ; 实施例 21 中为 X = 10 ;), 搅拌 10-120 (具体为 : 实施例 19 中为 10 ; 实施例 20 中为 120 ; 实施例 21 中为 70 ;) 分钟 ; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为 :Y : 1 (Y = 5-100) (具体为 : 实施例 19 中为 Y = 5 ; 实施例 20 中为 Y = 100 ; 实施例 21 中为 Y = 50 ;), 搅拌 10-300 (具体为 : 实施例 19 中为 10 ; 实施例 20 中为 300 ; 实施例 21 中为 150 ;) 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8℃ 轻微搅拌 10-300 (具体为 : 实施例 19 中为 10 ; 实施例 20 中为 300 ; 实施例 21 中为 150 ;) 分钟 ;

[0191] (5) 除去步骤 (4) 所得产物中的游离 Neutravidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物 : Neutravidin- 载体 (荧光染料) - 生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

[0192] 实施例 22、实施例 23、实施例 24

[0193] 本发明提供的靶物检测器 - 纳米粒子 (荧光染料) - 生物酶体系的生物检测试剂, 所述靶物检测器为 Avidin, 该生物检测试剂的制备方法包括下述步骤 :

[0194] (1) 所述载体内部疏水部分携带疏水荧光染料, 所述载体上所携带的 -NH₂ 通过 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 或 Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) 转化成马来酰亚胺 (maleimide), 然后除去过量 SMCC 或 (Sulfo-SMCC) ;

[0195] (2) 将完整 Avidin 通过 3-5 (具体为 : 实施例 22 中为 3 ; 实施例 23 中为 5 ; 实施例 24 中为 4 ;) 当量的 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在 pH = 7-8 的 1×PBS 缓冲液里生成 -SH, 然后除去过量 Traut's reagent ;

[0196] (3) 将每一个生物酶分子上所携带的 -NH₂ 中的 1-5 个通过 2- 亚氨氢氯化硫醇 (Traut's reagent) 在有利于生物酶活性的 pH 值的缓冲液里转化成 -SH, 然后除去过量 Traut's reagent ;

[0197] (4) 将步骤 (2) 的产物加入到步骤 (1) 的产物中, 步骤 (2) 产生的 -SH 官能团与步骤 (1) 中载体所携带的 maleimide 在 pH 7-8 的缓冲液中发生偶合反应, 步骤 (2) 产物与步骤 (1) 产物的摩尔比为 :X : 1 (X = 2-20) (具体为 : 实施例 22 中为 X = 2 ; 实施例 23 中为 X = 20 ; 实施例 24 中为 X = 10 ;), 搅拌 10-120 (具体为 : 实施例 22 中为 10 ; 实施例 23 中为 120 ; 实施例 24 中为 70 ;) 分钟 ; 然后再加入步骤 (3) 的产物, 步骤 (3) 的产物与步骤 (1) 的产物摩尔比为 :Y : 1 (Y = 5-100) (具体为 : 实施例 22 中为 Y = 5 ; 实施例 23 中为 Y = 100 ; 实施例 24 中为 Y = 50 ;), 搅拌 10-300 (具体为 : 实施例 22 中为 10 ; 实施例 23 中为 300 ; 实施例 24 中为 150 ;) 分钟, 最后再加入过量含有 Maleimide 官能团的助水溶性化合物, 2-8℃ 轻微搅拌 10-300 (具体为 : 实施例 22 中为 10 ; 实施例 23 中为 300 ; 实施例 24 中为 150 ;) 分钟 ;

[0198] (5) 除去步骤(4) 所得产物中的游离 Avidin、游离生物酶、过量的 Maleimide 官能团的助水溶性化合物以及其他残留的小分子化合物, 得到目标产物 :Avidin- 载体 (荧光染料)- 生物酶体系, 然后再向目标产物中加入可稳定目标产物的助剂, 低温储藏该产物。

[0199] 本发明提供的抗体 - 载体 - 生物酶体系的用途简述如下 : 抗体与待检测的抗体或抗原在一定的生物缓冲液中相互作用后, 洗去未结合的试剂 ; 然后加入生物酶底物 (如 HRP 底物 :3- 氨基邻苯二甲酰肼 (luminol) 或 4- 氨基邻苯二甲酰肼 (isoluminol)), 底物在生物酶催化作用下发光或变色, 其发光或变色强度可以进一步被量化成待检测抗体或抗原的浓度或数量。

[0200] 以上所述, 仅为本发明较佳实施例而已, 并非用于限定本发明的保护范围。凡是根据本发明内容所做的均等变化与修饰, 均涵盖在本发明的专利范围内。

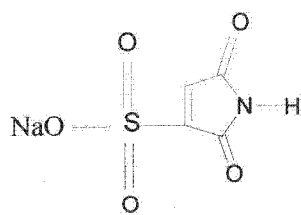


图 1

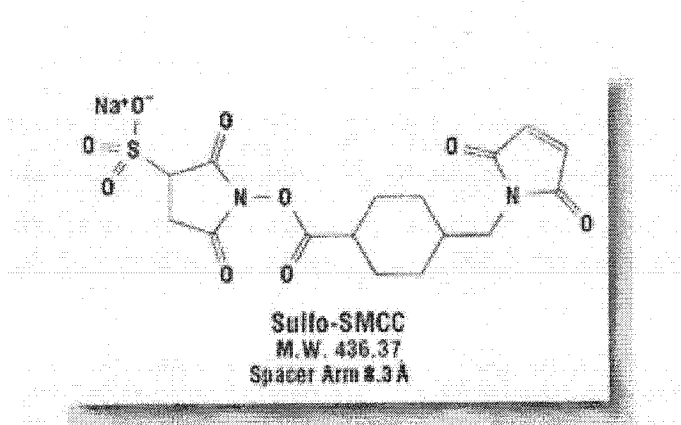


图 2

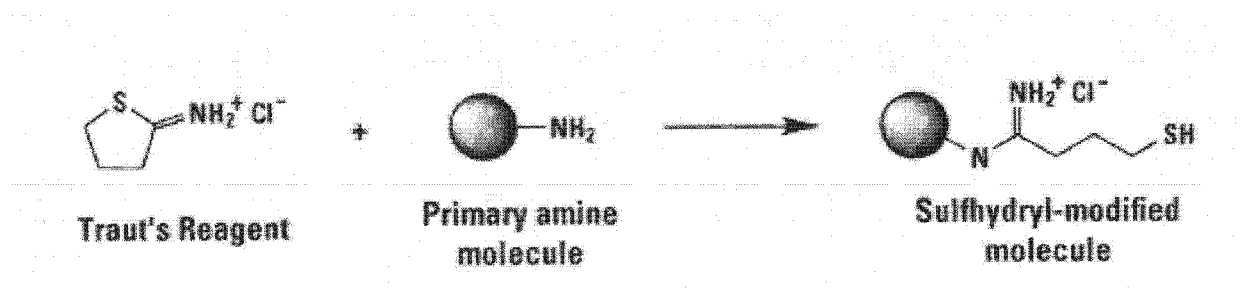


图 3

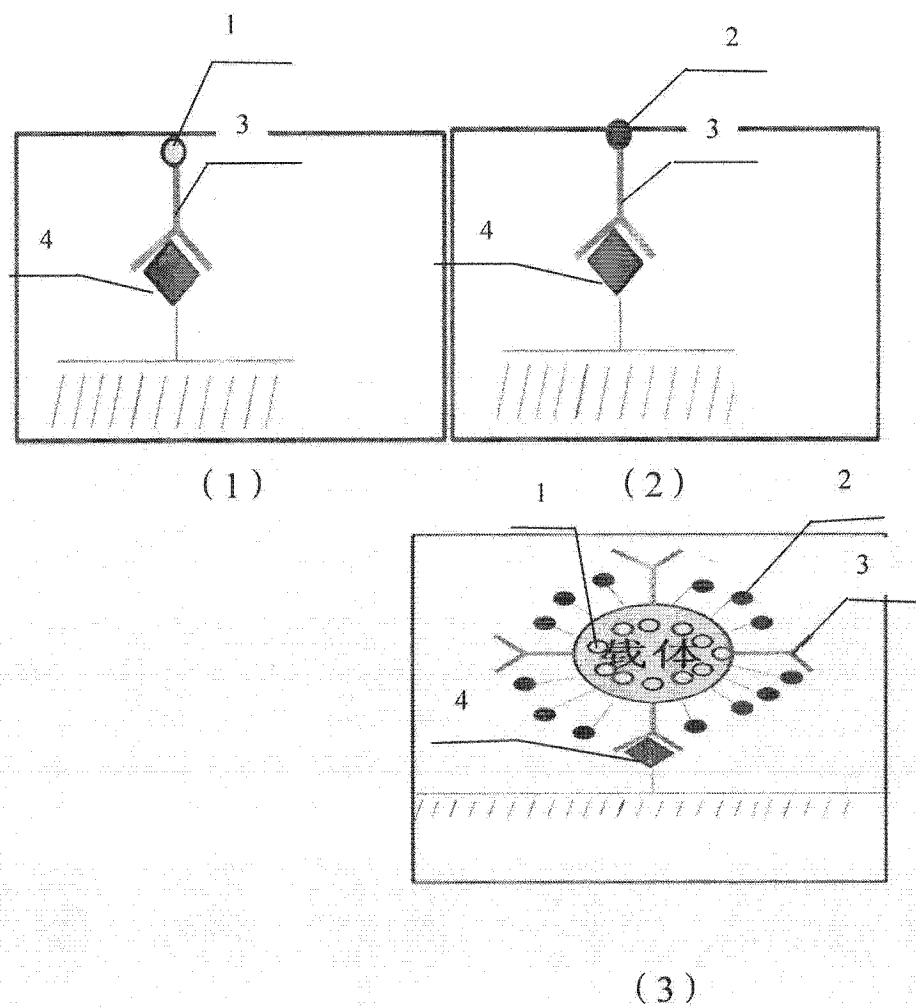


图 4

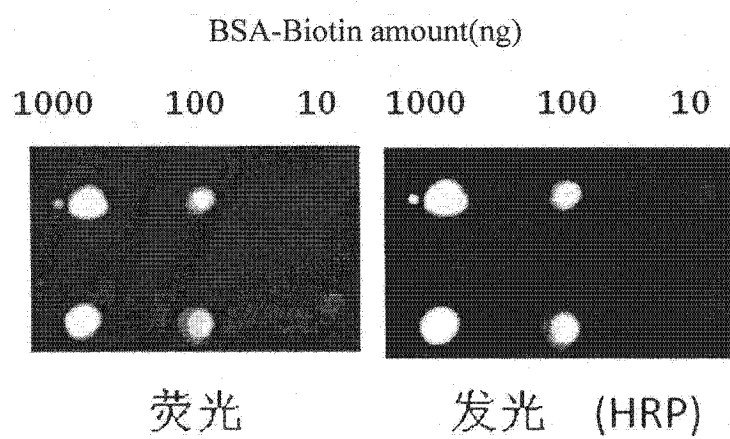


图 5

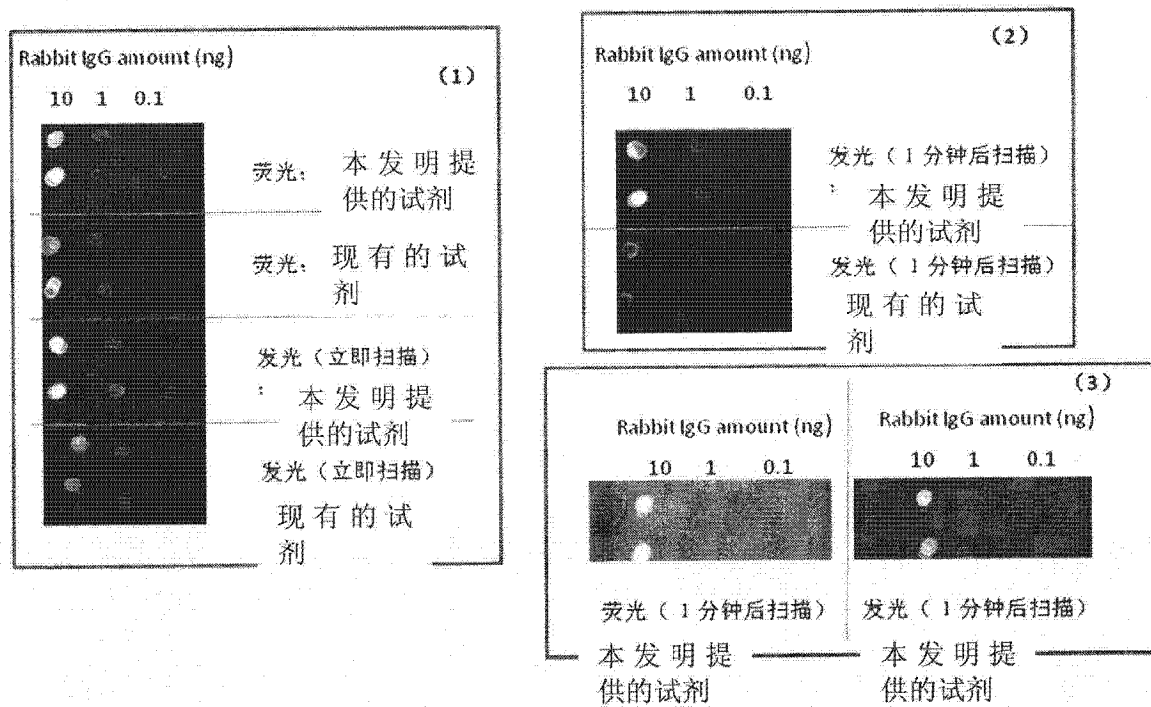


图 6

专利名称(译)	一种生物检测试剂		
公开(公告)号	CN102788879A	公开(公告)日	2012-11-21
申请号	CN201110131706.8	申请日	2011-05-20
[标]发明人	戴立军		
发明人	戴立军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/573 G01N33/53 G01N21/64 C12Q1/68		
代理人(译)	张华		
其他公开文献	CN102788879B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物检测领域，具体涉及一种生物检测试剂。为解决现有生物检测试剂灵敏度较低及信号稳定性较差的问题，本发明提供一种生物检测试剂，该试剂包括载体、靶物检测器和信号发生器，所述载体通过共价键或物理作用载有靶物检测器和信号发生器，且靶物检测器和信号发生器之间只通过载体间接相连，而不直接相连。该生物检测试剂灵敏度和稳定性较高，能够(1)检测到现有试剂所不能检测到的样品，(2)大幅提升数据的可靠性与可量化性；(3)能减少试剂用量，降低生物测试费用。

