



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111781345 A

(43) 申请公布日 2020.10.16

(21) 申请号 202010613916.X

(22) 申请日 2020.06.30

(71) 申请人 上海透景生命科技股份有限公司  
地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)  
自由贸易试验区碧波路572弄115号1  
幢

申请人 上海透景诊断科技有限公司

(72) 发明人 欧赛英 周小伟

(74) 专利代理机构 上海大视知识产权代理事务  
所(特殊普通合伙) 31314

代理人 顾小伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

(54) 发明名称

化学发光标记物标记抗原稳定剂及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种化学发光标记物标记抗原稳定剂,包括:10mM~100mM的MES、0.5%重量~2%重量的NaCl、0.1%重量~1%重量的BSA、0.1%重量~1%重量的表面活性剂、1%重量~10%重量的小牛血清、0.05%重量~1%重量的封闭剂、0.05%重量~0.5%重量的硫酸多聚糖和0.02%重量~0.1%重量的防腐剂。还提供上述的化学发光标记物标记抗原稳定剂的应用以及硫酸多聚糖的应用。本发明的化学发光标记物标记抗原稳定剂能够提高化学发光标记物标记抗原的稳定性,降低化学发光标记物标记抗原的假阳率,提高检测准确性,设计巧妙,配制简便,成本低廉,适于大规模推广应用。

1. 一种化学发光标记物标记抗原稳定剂,其特征在于,包括:10mM~100mM的MES、0.5%重量~2%重量的NaCl、0.1%重量~1%重量的BSA、0.1%重量~1%重量的表面活性剂、1%重量~10%重量的小牛血清、0.05%重量~1%重量的封闭剂、0.05%重量~0.5%重量的硫酸多聚糖和0.02%重量~0.1%重量的防腐剂。

2. 如权利要求1所述的化学发光标记物标记抗原稳定剂,其特征在于,所述MES为50mM,所述NaCl为1%重量,所述BSA为1%重量,所述表面活性剂为0.2%重量,所述小牛血清为5%重量,所述封闭剂为0.05%重量,所述硫酸多聚糖为0.05%重量,所述防腐剂为0.02%重量;或者,所述MES为10mM,所述NaCl为2%重量,所述BSA为0.5%重量,所述表面活性剂为1%重量,所述小牛血清为1%重量,所述封闭剂为0.5%重量,所述硫酸多聚糖为0.5%重量,所述防腐剂为0.06%重量;或者,所述MES为100mM,所述NaCl为0.5%重量,所述BSA为0.1%重量,所述表面活性剂为0.1%重量,所述小牛血清为10%重量,所述封闭剂为1%重量,所述硫酸多聚糖为0.2%重量,所述防腐剂为0.1%重量。

3. 如权利要求1所述的化学发光标记物标记抗原稳定剂,其特征在于,所述硫酸多聚糖是硫酸葡聚糖或硫酸戊聚糖。

4. 如权利要求1所述的化学发光标记物标记抗原稳定剂,其特征在于,所述硫酸多聚糖的分子量大于50kDa。

5. 如权利要求1所述的化学发光标记物标记抗原稳定剂,其特征在于,所述表面活性剂选自吐温20、Brij35、Triton100中的一种或几种。

6. 如权利要求1所述的化学发光标记物标记抗原稳定剂,其特征在于,所述封闭剂选自酪蛋白、明胶、脱脂奶粉中的一种或几种。

7. 如权利要求1所述的化学发光标记物标记抗原稳定剂,其特征在于,所述防腐剂选自NaN<sub>3</sub>、proclin300、硫柳汞中的一种或几种。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的化学发光标记物标记抗原稳定剂在稳定化学发光标记物标记蛋白中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述蛋白是抗原。

10. 硫酸多聚糖在稳定化学发光标记物标记蛋白中的应用。

## 化学发光标记物标记抗原稳定剂及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白稳定剂技术领域,特别涉及抗原稳定剂技术领域,具体是指一种化学发光标记物标记抗原稳定剂及其应用。

### 背景技术

[0002] 免疫分析技术经历了酶免分析技术(EIA)、放射免疫分析技术(RIA)、荧光免疫分析技术(FIA)、时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)和化学发光免疫分析技术(CLIA)几个阶段。其中,CLIA作为最先进的免疫分析技术,不仅自动化程度高、检测速度快,而且还具有较高的灵敏度和分析特异性。在临床检测中发挥着越来越重要的作用。化学发光诊断试剂使用效期受其各个组分稳定性的影响;而化学发光免疫试剂一般含磁珠试剂、化学发光结合物试剂两种组分。磁珠试剂主要有效成分为抗原或者抗体通过共价键与磁珠结合,及其相应的稀释液;而化学发光结合物试剂主要有效成分为化学发光标记物通过共价键与抗原/抗体相连的结合物,及其相应的稀释液。

[0003] 吖啶酯及其衍生物作为一种性能优越的化学发光标记物,最早于1979年便开始应用于化学发光免疫试剂中。当前应用于化学发光免疫分析的吖啶酯分为以雅培化学发光免疫试剂为代表的吖啶磺酰胺和以西门子化学发光免疫试剂为代表的吖啶酯,二者发光性能相近。吖啶化合物发光类型为闪光,加入启动剂0.4s后发射光强度达到最大,半衰期为0.9s,2s内发光基本结束,可以实现快速检测。吖啶化合物标记工艺简单,标记反应一步完成,发光过程只需要在碱性条件下,经过氢氧化化就可以直接发光,不需要其它发光催化剂。目前,国内体外诊断试剂生产研发企业也越来越多地采用吖啶化合物做标记物。

[0004] 一般而言,抗体分子量普遍较大,为150kDa,水溶性也较好,再交联若干个吖啶分子,抗体-吖啶结合物在一般的缓冲液中就能较好地稳定。而用于检测抗体的双抗原夹心法免疫诊断试剂,需要将抗原标记吖啶化合物。一些抗原本身分子量就比抗体小,而且水溶性也不好,虽然在试剂中使用浓度很低,但由于本身疏水性的特性,再交联含疏水性吖啶环的吖啶化合物,分子在液相运动中极易因疏水作用而发生聚集,聚集的标记抗原一来容易富集在固相及蛋白表面难以洗去,导致假阳的发生;另一方面则是标记抗原稳定性下降。在某些试剂中表现得十分突出,如双抗原夹心法测人类免疫缺陷病毒抗体(anti-HIV)试剂中,由于使用的融合抗原常用大肠杆菌表达系统,蛋白常以不溶性的包涵体表达出来,虽然在后续纯化及标记过程中使用了一些特殊方法使其恢复天然状态,但制备而成的发光结合物在长期的储存环境中容易发生聚集导致假阳和稳定性下降两大问题。寻找合适的缓冲组分来抑制或者减弱标记抗原的聚集,是提高发光免疫试剂稳定性的一大挑战。

[0005] 因此,希望提供一种化学发光标记物标记抗原稳定剂,其能够提高化学发光标记物标记抗原的稳定性,降低化学发光标记物标记抗原的假阳率,提高检测准确性。

## 发明内容

[0006] 为了克服上述现有技术中的缺点,本发明的一个目的在于提供一种化学发光标记物标记抗原稳定剂,其能够提高化学发光标记物标记抗原的稳定性,降低化学发光标记物标记抗原的假阳率,提高检测准确性,适于大规模推广应用。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种化学发光标记物标记抗原稳定剂,其设计巧妙,配制简便,成本低廉,适于大规模推广应用。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种化学发光标记物标记抗原稳定剂的应用,用于稳定化学发光标记物标记蛋白,例如化学发光标记物标记抗原,降低假阳率,提高检测准确性,适于大规模推广应用。

[0009] 本发明的另一目的在于提供一种化学发光标记物标记抗原稳定剂的应用,其设计巧妙,使用简便,适于大规模推广应用。

[0010] 为达到以上目的,在本发明的第一方面,提供一种化学发光标记物标记抗原稳定剂,其特点是,包括:10mM~100mM的MES、0.5%重量~2%重量的NaCl、0.1%重量~1%重量的BSA、0.1%重量~1%重量的表面活性剂、1%重量~10%重量的小牛血清、0.05%重量~1%重量的封闭剂、0.05%重量~0.5%重量的硫酸多聚糖和0.02%重量~0.1%重量的防腐剂。

[0011] 较佳地,所述MES为50mM,所述NaCl为1%重量,所述BSA为1%重量,所述表面活性剂为0.2%重量,所述小牛血清为5%重量,所述封闭剂为0.05%重量,所述硫酸多聚糖为0.05%重量,所述防腐剂为0.02%重量;或者,所述MES为10mM,所述NaCl为2%重量,所述BSA为0.5%重量,所述表面活性剂为1%重量,所述小牛血清为1%重量,所述封闭剂为0.5%重量,所述硫酸多聚糖为0.5%重量,所述防腐剂为0.06%重量;或者,所述MES为100mM,所述NaCl为0.5%重量,所述BSA为0.1%重量,所述表面活性剂为0.1%重量,所述小牛血清为10%重量,所述封闭剂为1%重量,所述硫酸多聚糖为0.2%重量,所述防腐剂为0.1%重量。

[0012] 较佳地,所述硫酸多聚糖是硫酸葡聚糖或硫酸戊聚糖。

[0013] 较佳地,所述硫酸多聚糖的分子量大于50kDa。

[0014] 较佳地,所述表面活性剂选自吐温20、Brij35、Triton100中的一种或几种。

[0015] 较佳地,所述封闭剂选自酪蛋白、明胶、脱脂奶粉中的一种或几种。

[0016] 较佳地,所述防腐剂选自NaN<sub>3</sub>、proclin300、硫柳汞中的一种或几种。

[0017] 在本发明的第二方面,提供上述的化学发光标记物标记抗原稳定剂在稳定化学发光标记物标记蛋白中的应用。

[0018] 较佳地,所述蛋白是抗原。

[0019] 在本发明的第三方面,提供硫酸多聚糖在稳定化学发光标记物标记蛋白中的应用。

[0020] 发明的有益效果主要在于:

[0021] 1、本发明的化学发光标记物标记抗原稳定剂包括:10mM~100mM的MES、0.5%重量~2%重量的NaCl、0.1%重量~1%重量的BSA、0.1%重量~1%重量的表面活性剂、1%重量~10%重量的小牛血清、0.05%重量~1%重量的封闭剂、0.05%重量~0.5%重量的硫酸多聚糖和0.02%重量~0.1%重量的防腐剂,能够提高化学发光标记物标记抗原的稳

定性,降低化学发光标记物标记抗原的假阳率,提高检测准确性,适于大规模推广应用。

[0022] 2、本发明的化学发光标记物标记抗原稳定剂包括:10mM~100mM的MES、0.5%重量~2%重量的NaCl、0.1%重量~1%重量的BSA、0.1%重量~1%重量的表面活性剂、1%重量~10%重量的小牛血清、0.05%重量~1%重量的封闭剂、0.05%重量~0.5%重量的硫酸多聚糖和0.02%重量~0.1%重量的防腐剂,设计巧妙,配制简便,成本低廉,适于大规模推广应用。

[0023] 3、本发明的化学发光标记物标记抗原稳定剂的应用,用于稳定化学发光标记物标记蛋白,例如化学发光标记物标记抗原,降低假阳率,提高检测准确性,设计巧妙,使用简便,适于大规模推广应用。

[0024] 4、本发明的硫酸多聚糖的应用,用于稳定化学发光标记物标记蛋白,例如化学发光标记物标记抗原,降低假阳率,提高检测准确性,设计巧妙,使用简便,适于大规模推广应用。

[0025] 本发明的这些和其它目的、特点和优势,通过下述的详细说明和权利要求得以充分体现,并可通过所附权利要求中特地指出的手段、装置和它们的组合得以实现。

### 具体实施方式

[0026] 为了抑制或者减弱化学发光试剂中化学发光标记物标记抗原的聚集,提高化学发光标记物标记抗原稳定性,本发明提供了一种化学发光标记物标记抗原稳定剂,包括:10mM~100mM的MES、0.5%重量~2%重量的NaCl、0.1%重量~1%重量的BSA、0.1%重量~1%重量的表面活性剂、1%重量~10%重量的小牛血清、0.05%重量~1%重量的封闭剂、0.05%重量~0.5%重量的硫酸多聚糖和0.02%重量~0.1%重量的防腐剂。

[0027] 所述MES、所述NaCl、所述BSA、所述表面活性剂、所述小牛血清、所述封闭剂、所述硫酸多聚糖、所述防腐剂的具体含量可以根据需要确定,较佳地,所述MES为50mM,所述NaCl为1%重量,所述BSA为1%重量,所述表面活性剂为0.2%重量,所述小牛血清为5%重量,所述封闭剂为0.05%重量,所述硫酸多聚糖为0.05%重量,所述防腐剂为0.02%重量;或者,所述MES为10mM,所述NaCl为2%重量,所述BSA为0.5%重量,所述表面活性剂为1%重量,所述小牛血清为1%重量,所述封闭剂为0.5%重量,所述硫酸多聚糖为0.5%重量,所述防腐剂为0.06%重量;或者,所述MES为100mM,所述NaCl为0.5%重量,所述BSA为0.1%重量,所述表面活性剂为0.1%重量,所述小牛血清为10%重量,所述封闭剂为1%重量,所述硫酸多聚糖为0.2%重量,所述防腐剂为0.1%重量。

[0028] 所述硫酸多聚糖可以是任何合适的硫酸多聚糖,较佳地,所述硫酸多聚糖是硫酸葡聚糖或硫酸戊聚糖。

[0029] 所述硫酸多聚糖的分子量可以根据需要确定,较佳地,所述硫酸多聚糖的分子量大于50kDa。

[0030] 所述表面活性剂可以是任何合适的表面活性剂,较佳地,所述表面活性剂选自吐温20、Brij35、Triton100中的一种或几种。

[0031] 所述封闭剂可以是任何合适的封闭剂,较佳地,所述封闭剂选自酪蛋白、明胶、脱脂奶粉中的一种或几种。

[0032] 所述防腐剂可以是任何合适的防腐剂,较佳地,所述防腐剂选自 $\text{NaN}_3$ 、

proclin300、硫柳汞中的一种或几种。

[0033] 跳孔:试剂对阴性样本初次检测阳性,而复测阴性的情况,是免疫试剂中普遍存在的一种现象;

[0034] 跳孔率:100份阴性样本的检测中,初检出现跳孔的概率。

[0035] 本发明还提供上述的化学发光标记物标记抗原稳定剂在稳定化学发光标记物标记蛋白中的应用。

[0036] 所述蛋白可以是任何合适的蛋白,较佳地,所述蛋白是抗原。

[0037] 本发明还提供硫酸多聚糖在稳定化学发光标记物标记蛋白中的应用。

[0038] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容,特举以下实施例详细说明。其中:

[0039] MES (2-(4-吗啉)乙磺酸):上海生工、分子生物级别,纯度大于99.0%

[0040] Casein (酪蛋白):上海生工、试剂纯;

[0041] 硫酸戊聚糖:默克、试剂纯;

[0042] 硫酸葡聚糖:BBI、试剂纯;

[0043] 硫酸软骨素:上海生工、生化试剂;

[0044] 硫酸化蔗糖:sigma、生化试剂;

[0045] HIV-I型融合抗原:深圳菲鹏生物、生物试剂;

[0046] HIV-II型抗原:深圳菲鹏生物、生物试剂;

[0047] 磁珠:默克、10mg/ml

[0048] 吡啶磺酰胺:深圳美凯特、生化试剂;

[0049] an-HIV校准品:高浓度阳性血清稀释配制;

[0050] HIV阴性质控:小牛血清;

[0051] HIV-I阳性质控:高浓度阳性样本稀释配制;

[0052] HIV-II阳性质控:高浓度阳性样本稀释配制;

[0053] HCV融合抗原:深圳菲鹏生物、生物试剂;

[0054] anti-HCV校准品:高浓度阳性血清稀释配制;

[0055] HCV阳性质控:高浓度阳性样本稀释配制;

[0056] HCV阴性质控:小牛血清。

[0057] 实施例1:化学发光标记物标记抗原缓冲液的配制和应用

[0058] 配制:配制MES溶液,用NaOH调节pH至6.5,分别加入NaCl、BSA、Tw20(吐温20)、小牛血清、casein、如表1所示的一种糖类、NaN<sub>3</sub>,使得MES、NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、NaN<sub>3</sub>的终浓度分别为50mM、1%重量、1%重量、0.2%重量、5%重量、0.05%重量、0.02%重量,糖类的终浓度见表1所示,硫酸葡聚糖的分子量为500kDa。对照为不加糖类,其余成分均与上述标记抗原缓冲液一致。因此,一共配制了7种标记抗原缓冲液。

[0059] 采用双抗原夹心法检测血清中的抗人类免疫缺陷病毒抗体(an-HIV),具体步骤如下:

[0060] 1、将HIV-I型融合抗原和HIV-II型抗原通过共价结合偶联羧基磁微粒即磁珠,按100ug抗原/mg磁珠的浓度进行偶联,然后进行封闭,并用20mM PB(pH6.5)+0.5%重量NaCl+1%重量BSA+5%重量小牛血清+0.02%重量NaN<sub>3</sub>稀释到0.1mg磁珠/ml的浓度,作为固相磁颗粒试剂;

[0061] 2、将另外的HIV-I型融合抗原和另外的HIV-II型抗原分别标记吡啶磺酰胺，抗原溶液浓度用0.1M MES (pH5.0) 调整至1mg/ml；用DMSO配制1mg/ml的吡啶磺酰胺溶液；然后在抗原溶液中加入抗原溶液体积1/100的吡啶磺酰胺溶液，混匀，避光反应半小时；之后装重力柱，并用0.01M硼酸 (pH8.5) 洗脱纯化，收集抗原-吡啶磺酰胺结合物，紫外分光光度计检测结合物浓度，HIV-I抗原结合物为0.5mg/ml，而HIV-II抗原结合物浓度为0.38mg/ml；之后用上述配制的各种标记抗原缓冲液分别将HIV-I型抗原结合物稀释2.5k和将HIV-II型抗原结合物稀释5k，作为发光免疫试剂的结合物试剂。

[0062] 3、将步骤2配制出的结合物试剂分别放置4℃和37℃7天，取出后放置4℃待用。

[0063] 4、将上述试剂在全自动化学发光分析仪上分别检测an-HIV校准品(高浓度anti-HIV阳性样本稀释配制，用于cutoff值的计算)、HIV-I阳性质控(高浓度anti-HIV-I型阳性样本稀释配制，用于监控试剂对HIV-I型阳性样本的检测)、HIV-II阳性质控(高浓度anti-HIV-II型阳性样本稀释配制，用于监控试剂对HIV-II型阳性样本的检测)、HIV阴性质控及100例新鲜血样，反应模式为100ul样本+50ul磁颗粒试剂在37摄氏度下反应16分钟，然后用PBS-T洗涤3次，之后加入100ul结合物试剂，反应16分钟，再次洗涤3次，之后分别加入预激发液(0.1M HNO<sub>3</sub>)及激发液(0.25M NaOH)各100ul；记录信号值并比较校准品及质控的信号下降程度及新鲜血样的跳孔率。结果见下表1：

[0064] 表1各种多糖对稳定性的改善作用

条件	4℃0天	4℃7天	置于37℃7天					
	不含糖	5%海藻糖	0.5%葡聚糖	0.5%硫酸戊聚糖	0.5%硫酸葡聚糖	0.5%硫酸软骨素	0.5%硫酸蔗糖	
分子量	/	/	342	约515kDa	约500kDa	约500kDa	479	679
校准品	70839	70997	50295	53837	60213	69280	57379	56742
	72516	71936	51487	55113	61639	70921	58738	58086
	69767	69209	49535	53023	59302	68233	56512	55884
	68203	67657	48424	51834	57972	66702	55244	54630
HIV-I 阳性质控	14728	14610	10678	11090	12696	14581	11930	11797
	15869	15742	11505	12061	13489	15520	12854	12537
HIV-II 阳性质控	15105	14984	10815	11510	13141	14954	12235	11782
	14983	14938	10728	11417	12735	14653	12136	11687
阴性质控	169	163	421	626	364	194	285	387
校准品下降	/	0.54%	29.00%	24.00%	15.00%	2.20%	20.40%	20.50%
HIV-I 下降		0.80%	27.50%	24.34%	14.42%	1.62%	22.48%	21.36%
HIV-II 下降		0.55%	28.40%	23.80%	14.00%	1.60%	21.25%	22.25%
100例新鲜血清样本跳孔率(%)	1	1	5	4	1	0	4	5

[0066] 备注：校准品、质控品的下降是以4℃放置0天即初始配制为对照计算的。比如4℃放置7天，校准品的下降率：用4℃放置0天的校准品发光值测值均值，减去4℃放置7天校准品测值测值均值，除以4℃放置的校准品发光值测值均值，得出的百分率即校准品的下降率。

[0067] 结论:即使不含任何糖类,试剂放在4℃下7天稳定性和跳孔率跟初始配制几乎没变化。在37℃下,分子量为500kDa的硫酸葡聚糖对稳定性和跳孔率的改善最为明显;其次是硫酸化戊聚糖;海藻糖这样的二糖没有改善作用;高分子量而没有硫酸化的葡聚糖也几乎没有改善效果;低分子量的硫酸化糖类效果也很不明显。高分子量的硫酸化多聚糖对抗原标记物的稳定性和跳孔率的改善都有一定的效果。

[0068] 实施例2

[0069] 实施例1配制的表1中第5种标记抗原缓冲液,其含有0.5%重量的硫酸化葡聚糖(分子量约500kDa)。对照不含有0.5%重量的硫酸化葡聚糖(分子量约500kDa),其余成分与第5种标记抗原缓冲液一致。一共配制了2种标记抗原缓冲液。

[0070] 血清中的抗人类免疫缺陷病毒抗体(an-HIV)检测过程跟实施例1一样,不同的是将配制的结合物试剂分别放置37摄氏度1天、3天及7天,取出后放置4摄氏度待用。结果见表2和表3。

[0071] 表2标记抗原缓冲液的37℃热稳定性

放置条件	对照				第5种标记抗原缓冲液			
	初始配制	37℃1天	37℃3天	37℃7天	初始配制	37℃1天	37℃3天	37℃7天
HIV 校准品	64526	56318	49236	42900	57520	55710	55039	56644
	66008	57636	47884	43738	56616	54868	55162	56885
	63580	54684	51454	44648	56702	55062	56410	56867
	62198	58822	52764	47290	56518	54434	54741	50842
[0072] HIV-I 阳性质控	14737	13658	10928	9547	11922	10170	9865	11326
	15727	13231	11498	9622	11243	11791	11437	10681
HIV-II 阳性质控	14949	13005	10208	9670	12555	10333	10023	11927
	14844	13508	11117	9610	12210	10951	10622	11600
HIV 阴性质控	222	315	212	129	216	261	253	205
HIV 校准品下降		12.07%	18.26%	31.67%		1.31%	2.25%	3.10%
HIV-I 下降	/	11.74%	19.39%	32.00%	/	1.20%	2.04%	2.80%
HIV-II 下降		11.32%	20.67%	31.20%		2.98%	2.56%	3.20%

[0073] 结论:不加糖类的标记抗原缓冲液,随着37℃放置时间越久,标记抗原稳定性下降越多;而加了0.5%硫酸化葡聚糖的标记抗原缓冲液,标记抗原在37℃下放置7天,稳定性基本没下降。

[0074] 表3抗原结合物试剂的跳孔率研究

[0075]

RLU (relative light units)	对照保存的标记抗原		第 5 种标记抗原缓冲液保存的标记抗原	
	初始配制	37°C 7 天	初始配制	37°C 7 天
HIV 校准品均值	61590	38094	57308	56434
HIV-I 均值	15832	9268	11922	10170
HIV-II 均值	14844	10112	12210	10951
HIV 阴性对照	345	1096	256	368
跳值 1	428	43682	272	514
跳值 2	689	109533	388	827
跳值 3	1102	86736	257	322
跳值 4	725	50914	273	470
跳值 5	640	42802	489	768
跳值率	0	5%	0	0

[0076] 结论:不加硫酸化葡聚糖的对照,4°C下放置虽不易跳孔,但在37°C下易跳孔,100例血清样本中出现了5例假阳;而硫酸化葡聚糖在标记抗原缓冲液中可以有效抑制37°C放置7天出现跳孔的现象。

[0077] 实施例3

[0078] 配制:配制MES溶液,用NaOH调节pH至6.5,分别加入NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、如表4所示的糖类或糖类组合、NaN<sub>3</sub>,使得MES、NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、NaN<sub>3</sub>的终浓度分别为50mM、1%重量、1%重量、0.2%重量、5%重量、0.05%重量、0.02%重量,糖类的终浓度见表4所示。对照为不加糖类,其余成分均与上述标记抗原缓冲液一致。因此,一共配制了6种标记抗原缓冲液。

[0079] 血清中的抗人类免疫缺陷病毒抗体(an-HIV)检测过程跟实施例1一样,不同的是将配制的结合物试剂分别放置37摄氏度7天,结果见表4。

[0080] 表4糖类组合对提高稳定性及抑制跳孔的影响

[0081]

条件	初始配制	置于 37°C 7 天				
	对照 不含糖	5%重量的海藻糖	0.5%重量的葡聚糖	5%重量的海藻糖	0.5%重量的葡聚糖	0.5%重量的硫酸葡聚糖
分子量	/	0.5%重量的硫酸化蔗糖		0.5%重量的硫酸化戊聚糖		糖
		342Da	约 515kDa	约 500kDa		约 500kDa

[0082]	HIV 校准品	68129	52053	53642	61997	62404	66766
		69740	53213	52863	61463	61950	67345
		67101	53313	50862	61062	61417	65759
		65599	52231	49724	59695	62975	64287
HIV-I 阳性质控	14263	11269	11811	12179	12692	14078	
	15358	11058	12642	13976	12744	15051	
HIV-II 阳性质控	14625	11530	11086	13909	13040	14132	
	14508	10445	11997	13202	13927	14217	
HIV 阴性质控	157	468	318	582	189	314	
HIV 校准品下降	/	22.09%	23.46%	9.74%	8.07%	2.37%	
HIV-I 下降		24.62%	17.45%	11.70%	14.13%	1.66%	
HIV-II 下降		24.57%	20.77%	6.94%	7.43%	2.69%	
100 例新鲜血清样本跳孔率 (%)	0	5	4	2	1	0	

[0083] 结论:将硫酸化糖类与二糖及葡聚糖组合,并没有出现硫酸化葡聚糖那样的提高稳定性和改善跳孔的效果。

[0084] 实施例4

[0085] 配制:配制MES溶液,用NaOH调节pH至6.5,分别加入NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、如表5所示的不同分子量的硫酸化葡聚糖、NaN<sub>3</sub>,使得MES、NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、NaN<sub>3</sub>的终浓度分别为50mM、1%重量、1%重量、0.2%重量、5%重量、0.05%重量、0.02%重量,糖类的终浓度见表1所示。对照为不加糖类,其余成分均与上述标记抗原缓冲液一致。因此,一共配制了6种标记抗原缓冲液。

[0086] 血清中的抗人类免疫缺陷病毒抗体(an-HIV)检测过程跟实施例1一样,不同的是将配制的结合物试剂分别放置4摄氏度和37摄氏度7天,结果见表5。

[0087] 表5不同分子量硫酸化葡聚糖稳定效果比对

放置条件	置于 4°C 7 天	置于 37°C 7 天						
	对照	对照	5kDa	15kDa	50kDa	150kDa	500kDa	
[0088]	HIV 校准品	63583	47806	53115	53676	61698	61922	61734
		65094	48943	54364	54946	63164	63388	63199
		62618	47081	52317	52865	60762	60986	60799
		61208	46021	51152	51680	59395	59619	59434

[0089]	HIV-I 阳性质控	12798	9844	11144	10999	12437	12661	12524
		13808	10621	11978	11848	13416	13640	13503
	HIV-II 阳性质控	13014	9640	10188	11181	12647	12871	12734
		12907	9561	11234	11091	12543	12767	12630
	HIV 阴性质控	208	684	315	212	386	429	215
	100 例新鲜血清样本跳孔率(%)	2	6	4	3	0	0	0
	HIV 校准品下降	/	24.81%	16.46%	15.58%	2.96%	2.61%	2.91%
	HIV-I 下降		23.08%	13.09%	14.12%	2.83%	1.14%	2.18%
	HIV-II 下降		25.93%	17.36%	14.08%	2.82%	1.09%	2.15%

[0090] 结论:标记抗原缓冲液中硫酸化葡聚糖的分子量高于50kDa时,能有效稳定标记抗原及抑制跳孔。

[0091] 实施例5

[0092] 配制:配制MES溶液,用NaOH调节pH至6.5,分别加入NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、如表6所示的不同浓度的硫酸化葡聚糖(分子量 500kDa)、NaN<sub>3</sub>,使得MES、NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、NaN<sub>3</sub>的终浓度分别为50mM、1%重量、1%重量、0.2%重量、5%重量、0.05%重量、0.02%重量,糖类的终浓度见表6所示。对照为不加糖类,其余成分均与上述 标记抗原缓冲液一致。因此,一共配制了6种标记抗原缓冲液。

[0093] 血清中的抗人类免疫缺陷病毒抗体(an-HIV)检测过程跟实施例1一样,不同的是将配制的结合物试剂分别放置4摄氏度和37摄氏度7天,结果见表6。表6不同浓度硫酸化葡聚糖(分子量500kDa)对于稳定性和跳孔的改善作用

条件	4℃ 7 天	37℃ 7 天					
	0.00%重量	0.00%重量	0.01%重量	0.03%重量	0.05%重量	0.10%重量	0.50%重量
[0094] 校准品	63819	46042	55351	57912	61934	62158	61970
	65330	47179	54600	58182	63400	63624	63435
	62854	47317	54553	58101	60998	61222	61035
	61444	46257	55388	57916	60631	59855	59670
HIV-I 阳性质控	13034	10180	10380	12235	12673	12897	12760
	14044	11857	11214	12084	13652	13876	13739
HIV-II 阳性质控	13250	9876	11424	12417	12883	13107	12970
	13143	9797	11470	12327	12779	13003	12866
阴性质控	248	527	189	332	259	316	412
校准品下降	/	26.30%	13.24%	8.42%	2.56%	2.60%	2.89%
[0095] HIV-I 下降		18.61%	20.25%	10.19%	2.78%	1.12%	2.14%
		25.46%	13.26%	6.25%	2.77%	1.07%	2.11%
100 例新鲜血清样本跳孔率(%)	1	5	4	3	0	0	0

[0096] 结论:硫酸化葡聚糖(500kDa)浓度在0.05%重量~0.5%重量时,可以有效改善稳定性和跳孔率。

[0097] 实施例6在人类丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒中的应用

[0098] 配制:配制MES (pH6.5),分别加入NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、如表7所示的不同浓度的硫酸化葡聚糖(分子量500kDa)、NaN<sub>3</sub>,使得MES、NaCl、BSA、Tw20、小牛血清、casein、NaN<sub>3</sub>的终浓度分别为20mM、1%重量、1%重量、0.2%重量、5%重量、0.05%重量、0.02%重量,糖类的终浓度见表7所示。对照为不加糖类,其余成分均与上述标记抗原缓冲液一致。因此,一共配制了6种标记抗原缓冲液。

[0099] 采用双抗原夹心法检测血清中的抗人类丙型肝炎病毒抗体(anti-HCV),具体步骤如下:

[0100] 1、将HCV融合抗原通过共价结合偶联羧基磁微粒即磁珠,按50ug抗原/mg磁珠的浓度进行偶联,然后进行封闭,并用20mM PB (pH6.5)+0.5%重量NaCl+1%重量BSA+5%重量小牛血清+0.02%重量NaN<sub>3</sub>稀释到0.1mg磁珠/ml的浓度,作为固相磁颗粒试剂;

[0101] 2、将另外的HCV融合抗原标记吖啶磺酰胺,抗原溶液浓度用0.1M MES (pH5.0)调整至1mg/ml;用DMSO配制1mg/ml的吖啶磺酰胺溶液;然后在抗原溶液中加入抗原溶液体积1/100的吖啶磺酰胺溶液,混匀,避光反应半小时;之后装重力柱,并用0.01M硼酸(pH8.5)洗脱纯化,收集抗原-吖啶磺酰胺结合物,紫外分光光度计检测结合物浓度,HCV抗原结合物为0.64mg/ml,之后用上述配制的各种抗原标记物缓冲液将抗原-吖啶磺酰胺结合物稀释3000倍,作为发光免疫试剂的结合物试剂。

[0102] 3、将步骤2配制出的结合物试剂分别放置37℃7天,取出后放置4℃待用。

[0103] 4、将上述试剂在全自动化学发光分析仪上分别检测anti-HCV校准品、HCV阳性质控、HCV阴性质控及100例新鲜血样,反应模式为50u1样本+50u1磁颗粒试剂在37摄氏度下反应16分钟,然后用PBS-T洗涤3次,之后加入100u1结合物试剂,反应16分钟,再次洗涤3次,之后分别加入预激发液(0.1M HNO<sub>3</sub>)及激发液(0.25M NaOH)各100u1;记录信号值并比较校准品及质控的信号下降程度及新鲜血样的跳孔率。结果见表7。

[0104] 表7不同浓度硫酸化葡聚糖(分子量500kDa)对于稳定性和跳孔的改善作用

放置条件	初始 配制	硫酸化葡聚糖 (500kDa) 置于 37°C 7 天					
		0.00%	0.01%	0.03%	0.05%	0.10%	0.50%
anti-HCV 校准品	43872	31983	35536	40362	42117	42468	43082
	44915	32743	36381	41322	43118	43478	44107
	43206	31497	35429	39750	41478	41824	42428
	42233	30788	34209	38855	40544	42882	42473
HCV 阳性质控	85617	62415	69178	78768	82192	82877	84932
	88372	63186	69814	81303	85014	85545	86782
	87064	62250	70521	80098	85409	84277	85496
	86347	61738	69941	79439	82893	83584	84793
HCV 阴性质控	208	684	315	212	386	429	215
anti-HCV 校准品下降	/	27.10%	18.75%	8.00%	4.00%	2.83%	2.80%
HCV 阳性质控下降		28.15%	19.56%	8.00%	3.42%	3.20%	1.55%
100 例新鲜血清样本 跳孔率(%)	1	4	3	0	0	0	0

[0106] 结论:0.05%以上的硫酸化葡聚糖(500kDa)可有效将稳定性提高到5%以内,并且抑制跳孔。

[0107] 实施例7其他配方的效果

[0108] 按以下配方配制两种抗原结合物稀释液,用于HCV抗体试剂盒的检测。

[0109] 配方一: MES为10mM, NaCl为2%重量, BSA为0.5%重量, 表面活性剂Triton100为1%重量, 小牛血清为1%重量, 封闭剂明胶为0.5%重量, 硫酸葡聚糖或硫酸戊聚糖(分子量均约500kDa)为0.5%重量, 防腐剂proclin300为0.06%重量。配方一的对照试剂为不加硫酸葡聚糖和硫酸戊聚糖, 其他成分均一样。按实施例6的检测步骤进行检测, 结果见表8。

[0110] 配方二: MES为100mM, NaCl为0.5%重量, BSA为0.1%重量, 表面活性剂Brij35为0.1%重量, 小牛血清为10%重量, 封闭剂脱脂奶粉为1%重量, 硫酸葡聚糖或硫酸戊聚糖(分子量均约500kDa)为0.2%重量, 防腐剂硫柳汞为0.1%重量。配方二的对照为不加硫酸葡聚糖和硫酸戊聚糖, 其他成分均一样。按实施例6的检测步骤进行检测, 结果见表9。

[0111] 表8

放置条件	配方一对照		配方一（戊聚糖）		配方一（葡聚糖）	
	初始配制	37°C 7 天	初始配制	37°C 7 天	初始配制	37°C 7 天
HCV 校准品	46504	33111	46318	41733	47109	45601
HCV 阳性质控	90154	64488	89793	81891	91326	89317
HCV 阴性质控	210	684	125	212	424	241
校准品下降	/	28.80%	/	9.90%	/	3.20%
阳性质控下降		28.47%		8.80%		2.20%
100 例新鲜血清样本跳孔率 (%)	0	3	0	0	0	0

[0112] 表9

放置条件	配方二对照		配方二（戊聚糖）		配方二（葡聚糖）	
	初始配制	37°C 7 天	初始配制	37°C 7 天	初始配制	37°C 7 天
HCV 校准品	56270	40796	55088	47872	58802	56627
HCV 阳性质控	109086	78520	106795	92147	113995	108637
HCV 阴性质控	155	97	146	225	162	156
校准品下降	/	27.50%	/	13.10%	/	3.70%
阳性质控下降		28.02%		13.72%		4.70%
100 例新鲜血清样本跳孔率 (%)	0	4	0	0	0	0

[0115] 结论：上述两种配方中，不加硫酸多聚糖的对照配方37°C 7天下，校准品和质控均下降了接近30%左右；而加入硫酸戊聚糖的配方，37°C下7天的下降率可控制在15%之内；跳孔率也得到较好的控制；加入硫酸葡聚糖的配方，稳定性最好，也不出现跳孔；可见硫酸葡聚糖和硫酸戊聚糖在稳定性和跳孔率改善上均是有效的。

[0116] 因此，本发明提供了一种防止抗原标记物聚集的稳定剂，该稳定剂是用于化学发光免疫试剂抗原标记物的缓冲液。该稳定剂主要成分为：10mM~100mM 的MES、0.5%重量~2%重量的NaCl、0.1%重量~1%重量的BSA、0.1%重量~1%重量的表面活性剂、1%重量~10%重量的小牛血清、0.05%重量~1%重量的封闭剂、0.05%重量~0.5%重量的硫酸葡聚糖和0.02%重量~0.1%重量的防腐剂。其中抑制抗原标记物聚集的主要有效成分为高分子量硫酸葡聚糖（分子量大于50kDa）。比起单纯的葡聚糖而言，硫酸化葡聚糖更能有效提高蛋白的热变性温度和抑制蛋白聚集，因而更有利于蛋白质的稳定性。比起低分子量的硫酸化葡聚糖而言，高分子量的硫酸化葡聚糖稳定抗原标记物试剂的效果更加显著。其具体作用机制一方面应该是由于这类硫酸化多聚糖含净负电荷，可以与抗原标记物表面的正电荷相互作用而降低抗原标记物之间的静电斥力，从而抑制抗原标记物聚集。另一方面硫酸化葡聚糖跟单糖类似，含大量的亲水性羟基基团，有助于抗原标记物的水溶性从

而抑制抗原标记物聚集,并且聚合分子数越大含羟基数越多,稳定效果越好。

[0117] 本发明能提高体外诊断试剂中化学发光双抗原夹心法测抗体免疫试剂的性能表现,包括提高试剂稳定性和降低试剂假阳率,减少由于跳孔带来的假阳问题尤为重要,可以减少用户的确认操作工作,减少终端客户由于初测错误带来的心理恐慌,给医院用户和终端客户带来更准确的检测结果和更好的体验。

[0118] 综上,本发明的化学发光标记物标记抗原稳定剂能够提高化学发光标记物标记抗原的稳定性,降低化学发光标记物标记抗原的假阳率,提高检测准确性,设计巧妙,配制简便,成本低廉,适于大规模推广应用。

[0119] 由此可见,本发明的目的已经完整并有效的予以实现。本发明的功能及结构原理已在实施例予以展示和说明,在不背离所述原理下,实施方式可作任意修改。所以,本发明包括了基于权利要求精神及权利要求范围的所有变形实施方式。