



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110878296 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 30

(21) 申请号 201910979979.4

(22) 申请日 2019.10.16

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110878296 A

(43) 申请公布日 2020.03.13

(73) 专利权人 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司

地址 430000 湖北省武汉市武汉东湖新技术开发区高新大道858号生物医药园二期A88栋第一、二层

(72) 发明人 冷毅斌 张念元 王长乐 骆祚琴

(74) 专利代理机构 武汉世跃专利代理事务所  
(普通合伙) 42273

代理人 倪娅

(51) Int. Cl.

G12N 11/096 (2020.01)

G01N 33/535 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1904616 A, 2007.01.31

CN 107084966 A, 2017.08.22

CN 109596835 A, 2019.04.09

CN 110272502 A, 2019.09.24

李志梁等. 链霉亲和素-生物素EILSA检测人心肌肌钙蛋白T.《第一军医大学学报》. 2000, 第20卷(第4期), 第293-295页.

罗淑芬等. 生物素-链霉亲和素信号放大的化学发光免疫分析方法检测鸡伽马干扰素.《第八届全国化学生物学学术会议论文摘要集》. 2013, 第364页.

Robert M. Hnasko. Bioconjugation of Antibodies to Horseradish Peroxidase (HRP).《ELISA》. 2015, 第1318卷第43-50页.

李昱等. 基于核酸的高灵敏蛋白质检测方法研究进展.《生命科学仪器》. 2016, 第14卷(第12期), 第25-29页.

审查员 范英程

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种高敏HRP酶及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种高敏HRP酶及其制备方法与应用, 本发明采用高碘酸钠先将辣根过氧化物酶表面的糖分子氧化成醛基, 然后利用多聚赖氨酸上的氨基与辣根过氧化物酶上的醛基发生缩合反应生成聚合酶HRP-PolyLysine, 再使用偶联剂使链霉亲和素与HRP-PolyLysine进行偶联, 得到HRP-PolyLysine-Streptavidin, 即为高敏HRP酶。本发明的高敏HRP酶具有灵敏度高、稳定性好、合成方便的优点, 可普遍应用于酶联免疫吸附试验实验、化学发光、免疫组化、胶体金、免疫印迹试验等免疫检测中。

1. 一种高敏HRP酶的制备方法,其特征在于,具体步骤如下:
  - 1) 称取HRP,加入高碘酸钠,室温反应,得到含醛基的HRP;
  - 2) 超滤,去除未反应的高碘酸钠;
  - 3) 将超滤后的HRP加入碳酸盐缓冲液中,然后加入多聚赖氨酸,室温反应;
  - 4) 超滤,去除未偶联的HRP,得到偶联好的HRP-PolyLysine,并用PBS进行复溶;
  - 5) 在复溶后的HRP-PolyLysine中加入SMCC,室温避光孵育;
  - 6) 取链霉亲和素溶解于PBS中,然后加入SPDP,室温避光孵育,在加入DTT,得到活化后的链霉亲和素溶液;
  - 7) 将步骤5)得到的HRP-PolyLysine和步骤6)得到的活化后的链霉亲和素溶液混匀,室温避光孵育;
  - 8) 超滤去除未反应的小分子物质,得高敏HRP酶。
2. 根据权利要求1所述高敏HRP酶的制备方法,其特征在于:所述多聚赖氨酸的分子量为1000-1500000Da。
3. 根据权利要求1所述高敏HRP酶的制备方法,其特征在于:所述超滤过程包含分子筛、离心、透析过程。

## 一种高敏HRP酶及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种高敏HRP酶及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 辣根过氧化物酶(简称HRP酶)标记链霉亲和素(HRP-Streptavidin)是配合生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin-System,BAS)而发展起来的酶,可以用于生物素(Biotin)标记的抗体、核酸、蛋白或其它生物素标记分子的检测起到信号放大的作用。它已成为目前广泛用于微量抗原、抗体定性、定量检测及定位观察研究的新技术。

[0003] 生物素-亲和素系统是70年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统。生物素-亲和素系统几乎可与目前研究成功的各种标记物结合,生物素与亲和素之间高亲和力的牢固结合以及多级放大效应,使BAS免疫标记和有关示踪分析更加灵敏。

[0004] 随着需求的不断增加,需要的HRP-Streptavidin灵敏度越来越高,即同一个链霉亲和素上面偶联的HRP的数量越来越多,这样才能在免疫检测中检测出更微量的待测物。目前普遍采用普通标记的HRP-Streptavidin,即一个链霉亲和素上面仅有及少量的HRP,这样检测的灵敏度不高,不能满足更高要求的免疫检测需要。在中国发明专利申请公开号CN1904616的说明书中提到使用碳二亚胺法将HRP偶联到多聚赖氨酸上,但是这种方法的灵敏度也不是很高,仍不能满足部分高敏试剂盒的需求。

### 发明内容

[0005] 基于此,本发明提供一种灵敏度极高,且可以在免疫检测中广泛应用的高敏HRP酶,该酶的制备方法简单,产品灵敏度高,可以显著降低免疫检测中的物质检出量。

[0006] 为实现上述目的,首先,本发明提供了一种高敏HRP酶,所述高敏HRP酶由辣根过氧化物酶、通过缩合反应结合在辣根过氧化物酶上多聚赖氨酸、偶联在辣根过氧化物酶上的链霉亲和素,这三个部分组成。

[0007] 其次,本发明还提供了上述高敏HRP酶的制备方法,其步骤如下:用高碘酸钠先将辣根过氧化物酶表面的糖分子氧化成醛基,然后利用多聚赖氨酸上的氨基与辣根过氧化物酶上的醛基发生缩合反应生成聚合酶HRP-PolyLysine,再使用偶联剂使链霉亲和素与HRP-PolyLysine进行偶联,得到HRP-PolyLysine-Streptavidin,即为高敏HRP酶。

[0008] 优选地,上述高敏HRP酶的制备方法,具体步骤如下:

[0009] 1) 称取HRP,加入高碘酸钠,室温反应,得到含醛基的HRP;

[0010] 2) 超滤,去除未反应的高碘酸钠;

[0011] 3) 将超滤后的HRP加入碳酸盐缓冲液中,然后加入多聚赖氨酸,室温反应;

[0012] 4) 超滤,去除未偶联的HRP,得到偶联好的HRP-PolyLysine,并用PBS进行复溶;

[0013] 5) 在复溶后的HRP-PolyLysine中加入SMCC,室温避光孵育;

[0014] 6) 取链霉亲和素溶解于PBS中,然后加入SPDP,室温避光孵育,在加入DTT,得到活化后的链霉亲和素溶液;

[0015] 7) 将步骤5)得到的HRP-PolyLysine和步骤6)得到的活化后的链霉亲和素溶液混匀,室温避光孵育;

[0016] 8) 超滤去除未反应的小分子物质,得高敏HRP酶。

[0017] 进一步优选地,上述高敏HRP酶的制备方法,其特征在于:所述多聚赖氨酸的分子量为1000-1500000Da。

[0018] 进一步优选地,上述高敏HRP酶的制备方法,其特征在于:所述超滤过程包含分子筛、离心、透析过程。

[0019] 再次,本发明还提供了上述高敏HRP酶在免疫检测中的应用。其中,所述免疫检测的类型包含酶联免疫吸附试验实验、化学发光、免疫组化、胶体金、免疫印迹试验。

[0020] 本发明选用的为多聚赖氨酸为骨架进行桥联HRP酶与链霉亲和素,多聚赖氨酸上面有很多的氨基,能够使一个多聚赖氨酸上偶联多个HRP;偶联反应选择的链霉亲和素,链霉亲和素是与亲和素有相似生物学特性的一种蛋白质,其分子量及结合生物素的能力与鸡蛋清中的亲和素相似,非特异性结合远比亲和素低。

[0021] 本发明的有益效果:所提供的高敏HRP酶通过多聚赖氨酸骨架上桥联HRP酶与链霉亲和素,大幅提高HRP酶的灵敏度;高敏HRP酶还具有稳定性好、合成方便的优点,适用于多种免疫检测中,如酶联免疫吸附试验实验、化学发光、免疫组化、胶体金、免疫印迹试验等;应用时,可以显著降低实验抗体用量。

### 具体实施方式

[0022] 下面结合实施例,对本发明的具体实施方法作进一步详细描述。以下实施例用于说明发明,但不用来限制发明的范围

[0023] 实施例1:高敏HRP酶的制备方法:

[0024] 1) 称取20mg HRP,加入1.5ml 0.1mol/L的高碘酸钠,室温反应20min,得到含醛基的HRP;

[0025] 2) 超滤,去除未反应的高碘酸钠;

[0026] 3) 将超滤后的HRP加入0.5mL pH 9.6的碳酸盐缓冲液(称取Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.33g;称取NaHCO<sub>3</sub> 0.58g,使用纯水定容50mL)中,然后加入4mg多聚赖氨酸,室温反应2小时;

[0027] 4) 超滤,去除未偶联的HRP,得到偶联好的HRP-PolyLysine,并用1mL的PBS缓冲液进行复溶;

[0028] 5) 在复溶后的HRP-PolyLysine中加入300μL浓度为10mg/mL SMCC【(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯】,室温避光孵育2h;

[0029] 6) 取2mg链霉亲和素溶解于100μL 0.1M的PBS中,然后加入20μL浓度为10mg/mL交联剂SPDP,室温避光孵育1.5h,在加入1mg的还原剂DTT,得到活化后的链霉亲和素溶液;

[0030] 7) 将步骤5)得到的HRP-PolyLysine和步骤6)得到的活化后的链霉亲和素溶液混匀,室温避光孵育2h;

[0031] 8) 超滤去除未反应的小分子物质,得高敏HRP酶。

[0032] 实施例2:本发明方案与常规HRP酶的活性性能比较

[0033] 1) 在酶标板中包被0.2μg/mL的生物素化小鼠IgG抗体,1%BSA溶液封闭。

[0034] 2) 分别按照0.1μg/mL,0.3μg/mL的比例将实施例1制得的高敏HRP酶与常规的HRP

酶加入到步骤1)已经包被抗体的酶标板中。

[0035] 3) TMB显色及2M浓硫酸终止,并测OD值。

[0036] OD测值结果见下表:

[0037]		本发明	常规HRP酶	活性比值
	0.1 $\mu$ g/mL	1.118	0.062	18.03
	0.3 $\mu$ g/mL	3.421	0.193	17.72

[0038] 从表格中可以看出,本发明的高敏HRP酶的活性约是常规HRP酶的活性的17-18倍,灵敏度显著提高。

[0039] 本实验中使用的常规HRP酶的制备方法为:

[0040] 1.称取2mg HRP加入150ul配制0.1mol/L的高碘酸钠,室温搅拌20min。。

[0041] 2.超滤,去除未反应的高碘酸钠

[0042] 3)将超滤后的HRP加入pH 9.6的碳酸盐缓冲液中(称取Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.33g;称取NaHCO<sub>3</sub> 0.58g,使用纯水定容50mL),然后加入2mg链霉亲和素,室温反应2小时;

[0043] 4)超滤,去除未偶联的HRP,得到偶联好的HRP-Streptavidin,并用1mL的PBS缓冲液进行复溶。

[0044] 实施例3:本发明方案与采用碳二亚胺法将HRP偶联到多聚赖氨酸上活性性能比较

[0045] 1)在酶标板中同时包被0.2 $\mu$ g/mL的生物素化小鼠IgG抗体,1%BSA溶液封闭。

[0046] 2)分别按照0.2 $\mu$ g/mL的比例加入将实施例1制得的高敏HRP酶与碳二亚胺法将HRP偶联到多聚赖氨酸上的HRP酶。

[0047] 3) TMB显色及2M浓硫酸终止,并测OD值。

[0048] OD测值结果见下表:

[0049]		本发明	常规HRP酶	活性比值
	0.2 $\mu$ g/mL	3.838	0.762	5.05

[0050] 从表格中可以看出,本发明的高敏HRP酶的活性约是常规HRP酶的活性的5.05倍,灵敏度显著提高。

[0051] 本实验中使用的碳二亚胺法将HRP偶联到多聚赖氨酸上的HRP酶的制备方法见中国发明专利“早期预测急性冠脉综合症诊断试剂盒”,申请公开号CN1904616。

[0052] 实施例4:本发明在心肌钙蛋白I(cTnI)定量化学发光法中的应用

[0053] 1)在酶标板中包被100 $\mu$ L浓度为0.5 $\mu$ g/mL的cTnI单克隆抗体a(厂家:Hyttest,货号:4T21,克隆号:19C7),1%BSA溶液封闭;

[0054] 2)加入浓度分别为0,0.010,0.050,0.125,0.500,2.00ng/mL的cTnI纯化抗原(厂家:Hyttest,货号:8RTT5),并将0浓度的纯化抗原加入18个孔,孵育30min,使用洗涤液洗涤三次;

[0055] 3)加入生物素化的cTnI单克隆抗体b(厂家:Hyttest,货号:4T21,克隆号:560),孵育30min,使用洗涤液洗涤三次;

[0056] 4)加入实施例1制备的高敏HRP酶,孵育30min,,使用洗涤液洗涤三次;

[0057] 5)加入发光底物液;

[0058] 6)测值及计算。

[0059] 实验排版见下表:

[0060]

	1	2	3	4	5
A	2.00ng/mL	2.00ng/mL	0ng/mL	0ng/mL	0ng/mL
B	0.500ng/mL	0.500ng/mL	0ng/mL	0ng/mL	0ng/mL
C	0.125ng/mL	0.125ng/mL	0ng/mL	0ng/mL	0ng/mL
D	0.050ng/mL	0.050ng/mL	0ng/mL	0ng/mL	0ng/mL
E	0.010ng/mL	0.010ng/mL	0ng/mL	0ng/mL	0ng/mL
F	0ng/mL	0ng/mL	0ng/mL	0ng/mL	0ng/mL

[0061] 测值结果见下表：

[0062]

	1	2	3	4	5
A	172640	172493	94	93	84
B	43162	43286	74	95	85

[0063]

C	10821	10934	93	90	84
D	4219	4361	83	91	91
E	863	872	82	84	73
F	95	83	92	79	84

[0064] 根据以上表格可计算得出,本发明的高敏HRP酶能将心肌肌钙蛋白I (cTnI) 定量化学发光法的灵敏度提高至0.0017ng/mL,即为1.7pg/mL,而临床上使用的常规的心肌肌钙蛋白I (cTnI) 定量的灵敏度仅仅能达到280pg/mL,可以显著提高心肌肌钙蛋白I的检出量。