

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
G01N 33/53
G01N 33/68



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94191748.7

[43] 授权公告日 2003 年 7 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1115563C

[22] 申请日 1994.12.21 [21] 申请号 94191748.7
[30] 优先权
[32] 1993.12.21 [33] DE [31] P4343479.7
[86] 国际申请 PCT/EP94/04264 1994.12.21
[87] 国际公布 WO95/17668 德 1995.6.29
[85] 进入国家阶段日期 1995.10.11
[71] 专利权人 罗赫诊断器材股份有限公司
地址 德国曼海姆
[72] 发明人 D·施里帕 F·施米德
M·考夫曼
审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘元金 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 24 页

[54] 发明名称 酰化蛋白凝聚物及其用来减少免疫测定中的干扰的用途

[57] 摘要

本发明的主题是用于免疫测定的含蛋白减干扰剂，其组成是用 -CO-R 基团酰化的蛋白凝聚物，式中 R 是一个支化或无支化的 C₁-C₄烷基，可以有羟基、羧基、SO₃H 或 PO₃H₂ 基团取代。这些减干扰物质可以与一种缓冲剂一起用来作为一种减干扰剂，或与一种免疫结合配偶体一起用来作为一种试剂以减少免疫测定中的非特定相互作用。本发明的另一个主题是一种免疫测试方法，其中使用所述减干扰物质。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 用来减少免疫测定中非特定相互作用的减干扰物质, 其特征在于该减干扰物质是一种用 $-\text{CO}-\text{R}$ 基团酰化的蛋白凝聚物, 式中 R 是一个支化或无支化 C_1-C_4 烷基, 该烷基是未取代的或者被羧基、羟基、 SO_3H 或 PO_3H_2 基团取代。

2. 按照权利要求1的减干扰物质, 其特征在于该蛋白是白蛋白。

3. 按照权利要求2的减干扰物质, 其特征在于该蛋白是牛血清白蛋白。

4. 按照权利要求1~3之一的减干扰物质, 其特征在于 R 是一个甲基基团或一个 $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$ 基团。

5. 按照权利要求1~3之一的减干扰物质, 其特征在于该蛋白凝聚物是用均质或非均质双官能连接物化学凝聚的。

6. 按照权利要求1~3之一的减干扰物质, 其特征在于该蛋白凝聚物是热凝聚的。

7. 按照权利要求6的减干扰物质, 其特征在于该减干扰物质是热凝聚乙酰化或琥珀酰化牛血清白蛋白。

8. 按照权利要求1~3之一的减干扰物质, 其特征在于该酰化蛋白凝聚物的粒度范围为 $10\sim 200\text{nm}$ 。

9. 按照权利要求8的减干扰物质, 其特征在于粒度范围为 $20\sim 50\text{nm}$ 。

10. 用来减少免疫测定中非特定相互作用的减干扰剂, 其中包含一种缓冲剂和一种含蛋白减干扰物质, 其特征在于它包含一种按照

权利要求 1~9 之一的减干扰物质。

1 1 . 按照权利要求 1 0 的减干扰剂, 其特征在于该缓冲剂的 pH 值为 4 ~ 9 。

1 2 . 免疫测定用特定结合试剂, 其中包含一个特定结合对的一种特定结合配偶体, 和一种含蛋白减干扰物质或减干扰剂, 其特征在于它含有一种按照权利要求 1 ~ 9 之一的减干扰物质或一种按照权利要求 1 0 或 1 1 之一的减干扰剂。

1 3 . 按照权利要求 1 2 的特定结合试剂, 其特征在于该结合配偶体是一种标记的或生物素基化的结合配偶体。

1 4 . 按照权利要求 1 2 或 1 3 的特定结合试剂, 其特征在于该结合配偶体是一种抗原、抗体或抗体片断。

1 5 . 按照权利要求 1 4 的特定结合试剂, 其特征在于该结合配偶体是一种有酶标记或电化学发光标记的抗体或抗体片断。

1 6 . 在减少非特定相互作用的情况下测定样品中免疫学配体的方法, 它借助于

1) 让该配体的待测样品接触

a) 一种或若干种含蛋白减干扰物质, 或者含有含蛋白减干扰物质和适用缓冲剂的若干种含蛋白减干扰剂之一, 和

b) 特定结合对的一种或若干种结合配偶体, 其中至少一种结合配偶体是标记的, 形成一个可检测结合对,

2) 测定标记结合对的存在或数量或一种特定结合对的自由标记结合配偶体, 作为样品中配体存在或浓度的量度,

其特征在于该减干扰物质是按照权利要求 1 ~ 9 之一的一种酰化蛋白凝聚物。

1 7 . 按照权利要求 1 6 的方法, 其特征在于该配体是一种病毒、病毒标记、肿瘤标记或一种激素。

1 8 . 按照权利要求 1 6 或 1 7 的方法, 其特征在于特定结合对的结合配偶体选自由抗原、抗体或抗体片段组成的这一组。

1 9 . 按照权利要求 1 6 或 1 7 的方法, 其特征在于一种结合配偶体携带一种酶标记或电化学发光标记。

2 0 . 按照权利要求 1 6 或 1 7 的方法, 其特征在于一种特定结合配偶体有另一个特定结合部位供一个结合到固相上的结合配偶体用。

2 1 . 按照权利要求 2 0 的方法, 其特征在于一种结合配偶体是生物素基化的, 并能结合到一个抗生蛋白链菌素表面上。

2 2 . 按照权利要求 1 ~ 9 之一的减干扰物质或按照权利要求 1 0 或 1 1 的减干扰剂在免疫测定中的用途。

2 3 . 按照权利要求 1 ~ 9 之一的减干扰物质或按照权利要求 1 0 或 1 1 的减干扰剂用来减少免疫测定中非特定相互作用的用途。

2 4 . 按照权利要求 1 的减干扰物质的制备方法, 其特征在于
a) 使蛋白质聚合生成一种凝聚物, b) 该蛋白凝聚物用对应酰化剂酰化。

2 5 . 按照权利要求 2 4 的方法, 其特征在于使该蛋白质发生热聚合。

2 6 . 按照权利要求 2 4 的方法, 其特征在于该蛋白凝聚物是用乙酰—O—琥珀酰亚胺或用琥珀酸酐酰化的。

酰化蛋白凝聚物及其用来减少 免疫测定中的干扰的用途

技术领域

本发明涉及酰化蛋白凝聚物、其制备方法、及其用作免疫测定法减干扰剂和结合剂，以及用来减少免疫测定中的干扰的用途以及相应的免疫检测方法。

背景技术

免疫检测方法近年来变得十分重要。它们用来以快速和准确的方式检测生物样品中药物、激素、蛋白、尤其传染性生物的存在。在所有免疫检测方法中，都是在第一特定结合配偶体，即待检测物质（被分析物或配体），和专一地与该配体反应并与之结合的第二特定结合配偶体之间有一种特定结合反应。配体和与该配体结合的特定配偶体形成一个特定结合对，一般是抗原和抗体或抗体片断之间的配合物。在每个反应中可能有不止一种配体或一种结合配偶体彼此反应。这些特定结合反应是用不同方式检测的。一般来说，该特定结合反应的一种参与者是有标记的。普通标记方法使用放射性同位素、色原、荧光团或酶标记。在非均相免疫测定中，结合配偶体之一被固定在固相上。

免疫测定中的一个难题是，在免疫测定的特定结合配偶体和样品、样品中所含附加成分与（可能）固相之间可能有所不希望的相互作用和非特定结合反应。这些相互作用一般导致背景信号增强和这些信号的较高散射，进而降低该测试的灵敏度和专一性。与标记结合配偶体

的非特定相互作用也可能导致假阳性结果，这意味着甚至当一种被分析物不存在时也错误地记录这样一种被分析物的存在。

为了减少免疫测定中的这些非特定相互作用，已经进行了各种尝试。一些时间以来已经知道，各种碳水化合物成分和各种蛋白质、蛋白质混合物或蛋白质部分以及它们的水解产物能减少免疫测定中测试部分与被分析物之间的非特定相互作用（例如，Robertson 等人，*Journal of Immun. Meth.* 26, 1985, EP-A-260903, US-A-4, 931, 385）。使用蛋白质原部分和原水解产物的缺点是，其中所含的污染也可能导致该测试中的干扰。此外，用酶法产生的水解产物也可能受到用于其制造的蛋白酶污染。它们的质量也往往不均匀，因为裂解步骤是非常难以控制的。蛋白酶污染物会攻击测试部分，甚至少许数量也会对该测试的性能及其稳定性产生不利影响。

EP-A-0331068 描述了使用聚合免疫球蛋白（IgG）来减少特定干扰因子，如类风湿因子。然而，非特定相互作用，尤其是标记结合配偶体和被分析物或固相之间的非特定相互作用，无法以一种令人满意的方式消除。此外，人体和动物 IgG 的产生是复杂和昂贵的。

为了减少免疫测定中的非特定相互作用，也已有人描述了化学改性蛋白、尤其琥珀酰化蛋白的使用（US-A-5,051,356, EP-A-525916）。然而，尤其在高分子被分析物如病毒抗原的测试中，先有技术尽管减少干扰物质的浓度非常高，也不能确保令人满意地减少干扰。

发明内容

因此，本发明的一个目的是提供新型减干扰物质和 / 或减干扰剂，它们与从先有技术已知的那些相比，改善了免疫测定中干扰的消除。本发明尤其旨在提供能产生低空白值、减少信号散射、尤其当分析高

分子被分析物时避免假阳性结果的减干扰物质。

这个目的是借助于专门酰化的蛋白凝聚物实现的。

本发明的主题是作为免疫测定法减干扰物质、用 $-CO-R$ 基团酰化的蛋白凝聚物，式中 R 是一个支化或非支化 $C_1 - C_4$ 烷基，可以有羧基、羟基、 SO_3H 或 PO_3H_2 基团取代。

本发明的另一个主题是一种相应的免疫测定用减干扰剂，包括一种含蛋白的减干扰物质和一种缓冲剂，其特征是它含有按照本发明的一种或若干种酰化蛋白凝聚物。

本发明的又一个主题是一种免疫测定用特定结合试剂，包括一个特定结合对中的一种配偶体，其特征是它还含有按照本发明的一种或若干种减干扰物质或减干扰剂。

本发明的又一个主题是一种通过让本发明的减干扰物质或减干扰剂与用于免疫测定的一个特定结合对的特定结合配偶体接触而减少免疫测定中非特定相互作用的方法。

本发明的一个具体主题是一种在减少非特定相互作用的同时测定样品中免疫配体的方法，它借助于

1) 让该配体的待测样品接触

a) 一种或若干种减干扰物质，或者一种或若干种含有减干扰物质和适当缓冲剂的减干扰剂，和

b) 特定结合对的一种或若干种特定结合配偶体，其中至少一种结合配偶体是有标记的，形成一种可检测结合对；

2) 测定标记结合对的存在或数量或一种特定结合对的自由标记结合配偶体，作为样品中配体存在或数量的量度，

其特征在于该减干扰物质是一种用 $CO-R$ 基团酰化的蛋白凝聚物，

式中 R 是一个支化或非支化 C_1-C_4 烷基, 可以有羧基、羟基、 SO_3H 或 PO_3H_2 基团取代。

具体实施方式

配体是一种能与一种或若干种对应特定结合配偶体发生特定反应生成配合物的化学物质或生物物质。实例包括蛋白、肽、碳水化合物、毒素、半抗原、药物、病毒、真菌和细菌, 它们的抗体或成分。本发明尤其适用于分析高分子配体, 例如病毒、病毒标记, 但也适用于分析激素, 尤其多价蛋白, 如 HIV 病毒、前列腺特有抗原 (PSA)、促甲状腺激素 (TSH)、癌胚抗原 (CEA)、B 型肝炎病毒 (B 型肝炎表面抗原, HBs)、 α -胎蛋白 (AFP)、人体绒毛膜促性腺激素 (HCG)、促黄体激素 (LH)、促滤泡激素 (FSH)、促乳素、铁蛋白、胰岛素。

样品一般是体液, 如血液、血清、或血浆, 唾液, 尿, 或其它体液。

特定结合配偶体可以是能与另一种生物物质发生特定反应而形成特定结合对的任何一种生物结合配偶体或化学结合配偶体。它们包括抗体、抗体片段、抗原、半抗原、激素、抗生物素蛋白、生物素, 或它们的衍生物。在本发明中, 特定结合对的较好配偶体是能与抗原特定结合的抗体或抗体片断。

免疫测定中特定结合配偶体的至少一种是有标记的。这种标记可以诸如通过放射性、化学发光、磷光、荧光、或电化学发光或一种可见颜色, 直接或间接提供一种可测信号。特定结合配偶体也可以是间接可检测的, 例如成为一种酶标记、生物素或抗生物素蛋白标记, 它们参与一个或若干个反应, 以产生一种可检测物质。酶标记较好, 特别是过氧化酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶或碱性磷酸酯酶。另一种较好的标记是有化学发光、尤其电化学发光分子的标记。

本发明的特征在于减干扰物质是用CO-R基团酰化的蛋白凝聚物。蛋白凝聚物要理解成这样一种凝聚物，其中相同或不同界定的蛋白单体聚合形成一种高分子颗粒。所谓界定，具体地说，就是把一种蛋白凝聚物理解成一种由至少2个、较好3~40,000个、尤其好的是30~600个蛋白单体组成的人造颗粒。它们以一种使之在水溶液中不会分解成单个分子的紧密方式相互结合。一种较好的方式是，这种蛋白凝聚物可溶于水。

蛋白质的聚合和凝聚可以用加热方法或化学方法进行。

在热聚合方法中，通过施加较高温度，使蛋白单体结合成凝聚物。蛋白质的热聚合详见EP-A-269092，用白蛋白作为实例。

蛋白单体的化学聚合是用不含蛋白的均质或非均质双官能连接物分子进行的。这些蛋白的连接方法是专家们已知的，例如详见，GB-A-1505400，EP-A-0122209或EP-A-269092。蛋白单体与非均质双官能连接物连接的实例是与下列物质的反应：二（顺丁烯二酰亚胺基）甲酯，辛二亚胺酸二甲酯，辛二酸二琥珀酰亚胺酯，戊二醛，3-（2-吡啶基连硫基）丙酸N-琥珀酰亚胺酯，N-（5-叠氮基-2-硝基苯甲酰）琥珀酰亚胺，4-（碘乙酰胺基）苯甲酸N-琥珀酰亚胺酯，或者顺丁烯二酰亚胺基-己酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯（MHS）或顺丁烯二酰亚胺基-苯甲酰-NHS（MBS）和3-乙酰硫代丙酸N-琥珀酰亚胺酯（SATP）的组合。均质双官能连接物的实例包括二氨基己烷、碳化二亚胺及其它。

较好的蛋白质是分子量在2000以上、尤其在10,000以上的蛋白。尤其好的是白蛋白或卵白蛋白，特别是血清白蛋白，甚至更好的是牛血清白蛋白。

一种较好的方式是，本发明的方法使用以热步骤结合成凝聚物的蛋白聚合物。尤其好的是发生了热聚合、然后酰化、尤其是乙酰化或琥珀酰化的白蛋白，较好是血清白蛋白，特别是牛血清白蛋白

(Thermo-RSA)。一种非酰化热聚牛血清白蛋白详见EP-A 269092。

较好是，聚合要进行和控制得能产生具有某种大致均匀粒度的聚合蛋白凝聚物颗粒。较好是粒度为 $10 \sim 200\text{nm}$ ，尤其好的是 $20 \sim 50\text{nm}$ 。这对应于分子量为 $240,000\text{ Da} \sim 2.2 \times 10^9\text{ Da}$ ，尤其好的 $2.2 \times 10^6 \sim 3.5 \times 10^6\text{ Da}$ 。粒度可以用人所共知的方法如PCS（光子修正光谱法）测定。如有必要，特别适合于本发明的粒度范围可采用凝胶过滤法从一种粗聚合产物混合物分离，以期获得一种特别均匀的粒度。

用于聚合的蛋白单体既可以相同也可以不同。较好是使均匀蛋白单体聚合。较好用白蛋白单体作为蛋白单体。可用的白蛋白单体是所有动物或人体白蛋白，特别是血清白蛋白。牛血清白蛋白(BAS)特别适用于本发明。

按照本发明，蛋白凝聚物是用 $\text{CO}-\text{R}$ 基团酰化的，式中R是一个支化或非支化的 $\text{C}_1 - \text{C}_4$ 烷基基团，可以有羧基、羟基、 PO_3H_2 或 SO_3H 取代。特别好的取代基是羧基基团。

酰基基团既可以引进到蛋白单体中，也可以在蛋白单体聚合之后引进到蛋白凝聚物中。蛋白质的酰化是按照已知方法、较好用酰基酐或酰基- O -琥珀酰亚胺进行。乙酰化或琥珀酰化的蛋白凝聚物已经证明是特别有利的，尤其是白蛋白凝聚物($\text{R}=\text{甲基和}/\text{或}\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$)。较好用乙酸- O -琥珀酰亚胺进行乙酰化。较好用琥珀酸酐进行琥珀酰化。

在酰化过程中，使蛋白凝聚物上基本上自由的氨基基团（如细胞溶素残部）酰化。酰化蛋白凝聚物这一术语系指所存在的自由氨基基团中至少一个被酰化。然而，较好是所有自由氨基基团几乎完全酰化。

本发明的另一个主题是一种用于免疫试验中减少干扰的药剂，其中包含一种免疫试验用缓冲剂和按照本发明用于减少干扰的物质。可能的缓冲剂是通常用于免疫测定的所有含水缓冲剂，包括磷酸盐、甘氨酸-HCl、或甘氨酸-NaOH、乙酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐或有机缓冲剂，如咪唑/HCl；三乙醇胺；MES =（4-吗啉代乙磺酸），TRIS =（三（羟甲基）-氨基甲烷），HEPES =（4-（2-羟基乙基）-1-哌嗪乙磺酸），MOPS =（3-N-吗啉代-丙磺酸）及其它类似缓冲剂。这些缓冲剂盐的pH和浓度取决于所涉及的免疫测定，例如，也取决于酶标记所用的酶。通常，pH值范围在4和9之间。常用缓冲剂浓度是在1 mM和1 M之间。

减干扰物质的浓度取决于免疫测试成分的数量及其中所含的、要与减少所述干扰的药剂接触的干扰成分。在普通免疫测定中，减干扰剂中减干扰物质的浓度应当如此之高，以致在与免疫测试成分接触之后其浓度仍在1 mg/ml和50 mg/ml之间，较好在5 mg/ml和20 mg/ml之间。在个别情况下，高达200 mg/ml的浓度也可能是必要的。

此外，本发明的减干扰剂也可以含有防腐剂等附加物质。为了用于免疫测定，这些减干扰剂较好存在于一种缓冲剂水溶液中。进而，也可以用它来浸渍诸如试条上的多孔载体材料（羊毛），并将其以诸如作为一种冻干物的固体形式贮存。

本发明的另一个主题是一种特定免疫结合试剂，其中有一个特定

结合对的一种配偶体，和按照本发明的减干扰物质或减干扰剂。

按照本发明，结合试剂是使免疫测定的一种或若干种特定结合配偶体与按照本发明的至少一种减干扰物质或减干扰剂一起混合而得到的。任选地，可以添加防腐剂或稳定剂等添加剂。特定结合配偶体的数量取决于所使用的免疫测定、所要结合的配偶体数量、所使用的标记类型及其它因素。一般来说，浓度范围为 $1 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 。

减干扰物质的数量取决于免疫测定的测试成分数量和结合试剂中所含的要与该结合试剂接触的干扰成分数量。较好的是，结合试剂中减干扰物质的浓度应当足够高，使得在与免疫测试成分接触之后其总浓度为 $1 \sim 50 \text{mg/ml}$ 、较好为 $5 \sim 20 \text{mg/ml}$ 。也有可能，在一些个别情况下，高达 200mg/ml 的浓度是有效减少干扰所需要的。

特定结合试剂可用于任何一种均相或非均相的、可利用一种特定结合配偶体检测一种特定结合配体的存在或不存在的免疫测定。实例包括夹层测定、竞争性免疫测定及专家已知的其它免疫测定。这些测试可以在溶液中或在固体载体上进行。一般来说，按照本发明的免疫测定是这样进行的：让一种含有配体的样品接触按照本发明的溶液状特定结合试剂。然后在配体和特定结合配偶体之间直接或间接生成一种特定结合配合物。然而，也有可能是，配体本身以按照本发明的一种结合试剂形式存在，然后使之接触一种特定结合配偶体或接触按照本发明的另一种结合试剂。配体和结合配偶体可以直接形成一种配合物。那么，该结合配偶体对该配体是专一的。然而，也有可能该结合配偶体通过一个或若干个特定结合分子与该配体间接形成一种配合物，然后这些结合分子与该配体结合。

如果本方法是作为一种非均相免疫测定而在试管、微滴板或试验

载体等固体载体上进行的，则可以把该配体的一种特定结合配偶体直接固定在该载体上。然而，较好的是把该配体结合配偶体的一种特定结合配偶体固定在该载体上。较好的实例是作为生物素基化结合配偶体的一种特定结合试剂的固定抗生蛋白链菌素。这类非均相免疫测定的各种变种是专家已知的。

在竞争性免疫测定中，配体和标记的配体类似物争夺非标记的配体结合配偶体，后者可以通过一个第二结合部位、较好是一个特定结合部位如生物素结合到固相上，如同非均相免疫测定中的情况那样。自由态和结合态配体类似物的标记用来作为待测配体的存在或数量的一种量度。

在夹层免疫测定中，配体以第一特定结合部位结合到一个有标记的配体结合配偶体上，并以第二结合部位结合到一个无标记的配体结合配偶体上，后者对固相有另一个特定结合部位，如同非均相免疫测定中的情况那样。然后，一种配合物在配体、标记和无标记结合配偶体之间形成。在非均相测试中，该配合物通过无标记结合配偶体结合到固相上，而且可以借助于诸如洗涤与自由态标记结合配偶体分离。自由态或结合态标记配体结合配偶体是作为要按照已知方法测定的配体的存在或数量的量度而测定的。当使用酶标记时，把一种生色酶基质添加到标记种中，测定所产生的颜色。

一个特定免疫结合对的至少一种配偶体（配体，标记配体类似物，或配体结合配偶体）是以按照本发明的一种结合试剂形式存在的，并与按照本发明的减干扰物质一起用于免疫测定。较好的是，这一般是一种配体结合配偶体，尤其是一种标记配体结合配偶体。

本发明的另一个主题是按照本发明的减干扰物质在免疫测定中的

应用。

本发明的一个具体主题是使用按照本发明的减干扰物质减少免疫测定中的非特定相互作用。

经验已经表明，按照本发明的减干扰物质显著减少了阴性样品的假阳性信号，因而也减少了阳性样品的空白值信号。此外，也减少了阳性样品空白值的散射，从而也减少了测量值的标准偏差。这扩大了动态测定范围，而且测定本身变得更灵敏也更精确。

此外，本发明的另一个主题是按照本发明的减干扰物质的制备方法。其特征在于，在第一步中，使一种蛋白、较好是白蛋白、尤其是牛血清白蛋白在与双官能连接物的化学凝聚反应中凝聚；该化学凝聚反应较好是一种热凝聚反应。较好的粒度范围是10~200nm，尤其好的是20~50nm。热凝聚较好是在50~100℃、尤其是在60~80℃的温度进行。然后，在第二步中，借助于一种适用酰化剂，进行-CO-R基团的酰化。酰化作用较好应当是彻底的，而且可以通过用诸如高效液相色谱法分析酰化剂的消耗情况进行监测。

然而，也可以把这个方法反过来进行，即先按照US-A-5,051,356使蛋白质酰化，然后进行酰化蛋白的热与化学聚合。

实例1

酰化热聚BSA（牛血清白蛋白）减少空白值与干扰的效果

HBsAg（B型肝炎表面抗原）夹层免疫测定是用Boehringer Mannheim公司制造的一种HBsAg Enzymuntest®进行的。

a）不使用酰化热聚BSA（牛血清白蛋白）的试验

有共轭物的温育缓冲剂：

4.0 mmol 磷酸盐缓冲剂 pH 7.0, 抗HBsAg 生物素 (单克隆, 小鼠) > 240 ng/ml

豚 (乳白蛋白的水解产物): 4.0 mg/ml

抗HBsAg-POD (单克隆, 小鼠), POD (过氧化酶): 0.04 U/ml

基质/色原缓冲剂:

磷酸盐/柠檬酸盐缓冲剂 100 mmol/l, pH 4.4;

H₂O₂: 3.2 mmol/l;

2,2'-连氨基-二[3-乙基苯并噻唑啉磺酸(6)]二铵盐 (ABTS): 1.9 mmol/l

试验是在Boehringer Mannheim 公司制造的ES600 仪器上进行的。

100 µl 样品和500 µl 有共轭物的温育缓冲剂注入涂布了抗生蛋白链菌素的试管 (Enzymuntest®, Boehringer Mannheim 公司) 中, 温育 (180 分钟, 37 °C)。用200 µl 洗涤溶液洗涤, 除去试管中未结合到固相上的标记抗体。

添加500 µl 基质/色原缓冲剂溶液, 60 分钟后用分光光度计在422 nm 测定色度。

b) 在不同实验中, 向温育缓冲剂中添加“减干扰剂”:

1. 按照本发明的乙酰化热聚-BSA (热聚牛血清白蛋白) (2 mg/ml, 粒度 30 nm)
2. 按照本发明的琥珀酰化热聚-BSA (2 mg/ml, 粒度 30 nm)
3. 按照先有技术的单体酰化BSA (2 mg/ml)
4. 按照先有技术的单体琥珀酰化BSA (2 mg/ml)。

表1 显示无 (实例 1a) 和有不同温育缓冲添加剂 1-4 (实例 1b) 时不同样品的测定结果。当使用减干扰剂 (实例 1b, 1. 和

2.)时, 测试结果的空白值显著降低, 而且与按照先有技术的其它添加剂相比, 阴性血清的标准偏差也有所降低。

1b, 1. 和 2. 以及与按照先有技术的其它添加剂相比时阴性血清 (NS) 标准偏差的降低

对照血清名单	ES 缓冲剂 无添加剂	乙酰化热聚 BSA[2mg/ml]	琥珀酰化热聚 BSA[2mg/ml]	乙酰化BSA [2mg/ml]	琥珀酰化BSA [2mg/ml]
阴性对照.	13	10	10	28	16
阳性对照.	2308	3552	3739	3650	3854
实验室标准 :					
1	19	18	107	51	34
2	123	192	214	209	213
3	342	551	555	5892	574
4	623	1137	1141	1195	1135
5	850	1332	1372	1384	1394
6	1053	1859	1791	1904	1748
7	1598	n.d.	2713	n.d.	2719
8	2463	4188	4091	4196	4196
阴性血清					
BB/2711-13	27	13	26	37	26
"-14	18	13	19	19	16
"-17	17	11	14	28	160
"-18	33	17	18	22	19
BB/2907-38	41	16	12	34	21
"-39	48	10	18	20	53
"-40	11	13	10	11	12
"-41	n.d.	14	19	19	42
"-42	15	12	17	n.d.	16
EM-91-3	18	10	15	18	17
"-4	15	15	10	20	16
"-29	16	16	41	33	19
"-37	10	14	15	16	17
平均(阴性血清):	19.0	5.6	13.4	23.1	21.7
标准偏差	14.6	4.7	10.4	8.0	18.9

实例 2

降低抗-HIV-P 24 试验中的空白值

用Boehringer Mannheim 公司制造的Enzymuntest® Anti-HIV 进行夹层免疫测定。

有共轭物的温育缓冲剂：

磷酸盐缓冲剂 40 mmol/l；pH 7.0

生物素基化的牛血清成分HIV-P 24 抗体（300ng/ml）

POD 标记的多克隆抗HIV 抗体（100mU/ml）

酰化热聚BSA，粒度 30 nm，2 mg/ml，见表 2 第 2 栏。

基质缓冲剂：

磷酸盐/柠檬酸盐 50 mmol/l；pH 4.4

H₂O₂：1.6mmol/l

ABTS：0.9mmol/l

200 μl 样品在抗生蛋白链菌素试管中用500 μl 温育缓冲剂温育 4 小时。样品血清不含HIV-P 24 抗原。随后，进行一个洗涤步骤，溶液再次用700 μl 基质缓冲剂温育 1 小时。然后在422nm 进行测定。结果列于表 2 中。

第 1 栏表示温育缓冲剂中不添加酰化热聚BSA 时测定的假阳性值（μg/ml）；第 2 栏表示温育缓冲剂中有酰化热聚BSA 时的测定值。第 2 栏表明，按照本发明的物质导致假阳性信号减少多达 64 %。

样品	有添加	无添加
	log/ml	log/ml
对照血清	52.25	51.87
Kassei 4	13.64	2.66
Kassei 5	12.32	3.99
Kassei 6	9.36	6.80
Kassei 10	18.73	5.47
Kassei 11	18.89	7.63
Kassei 13	12.65	2.81
Kassei 16	12.65	2.81
Kassei 18	20.87	12.56
Samura 27	20.17	0.74
33	9.32	2.66
44	10.53	0.00
72	12.64	0.00
92	12.79	0.00
97	9.63	0.00
130	11.73	3.55
151	28.22	12.71
154	36.16	17.59
171	13.75	4.43
188	62.77	28.52
194	8.46	0.30
200	55.92	26.45
214	19.65	6.65
220	56.05	24.24
251	24.92	14.33
252	12.83	3.40
293	21.82	11.23
300	8.81	1.03
354	31.59	9.90
465	44.43	28.52
496	8.17	0.15
512	17.00	3.99
假阳性	25	9

实例 3

借助于乙酰化热聚BSA 减少PSA（前列腺特有抗原）免疫测定中的干扰，与借助于按照先有技术的蛋白水解产物（肽）和特定减干扰蛋白减少干扰的比较

免疫测定是利用Boehringer Mannheim GmbH 制造的Enzymun-Test® PSA-II 进行的。

1. 有共轭物的温育缓冲剂：

磷酸盐缓冲剂 40 mmol/l, pH 7.3

MAB<PSA>小鼠-PR 1 2 -Eab-POD 70 mU/ml

MAB<PSA>小鼠-PR 1 -IgG-生物素 1 ng/ml

在此温育缓冲剂中添加各种减干扰蛋白（表3中添加剂1，2a - C）。

2. 基质缓冲剂：

磷酸盐/柠檬酸盐缓冲剂100mmol/l, pH 4.4

H₂O₂ : 3.2mmol/l

色原ABTS: 1.9mmol/l

用50 μl 样品、700ml 有共轭物的温育缓冲剂（温育时间90分钟）、200ml 洗涤溶液、700 μl 基质缓冲剂（温育时间30分钟），按照实例1进行试验。

阳性的女性血清（NS）中的干扰，在浓度为 0.1mg/ml 时是特别有效的。动态测定范围也因空白值（标准物质 A）降低而大大改善，对信号无不良影响（标定曲线：标准物质 A - E）。

添加剂 2 b 是用于固相、呈溶解形式的减干扰蛋白聚合物（热聚 BSA）。这种温育缓冲剂添加剂对无论是表中给出的实例（ 0.1mg/ml ）还是 $0.2\sim 1.6\text{mg/ml}$ 的更高浓度下的干扰信号都没有显示出任何影响。提高被分析物浓度（标准物质 A - E）导致标定曲线变平。

添加剂 2 c 按照先有技术的一种蛋白水解产物（乳白蛋白水解产物）。需要高浓度（ 5mg/ml ）才能显著减少干扰。

实例 4

本实例是对应于实例 3 进行的；然而，温育缓冲剂不含任何添加剂（表 4 中对照 1）或浓度为 0.35mg/ml 、范围为 $8\text{nm}\sim 74\text{nm}$ 的不同粒度的琥珀酰化热聚 BSA。

表 4 :

吸光率 _{nm}	对照	T-BSA-Succ 8 nm Ø	T-BSA-Succ 18 nm Ø	T-BSA-Succ 30 nm Ø	T-BSA-Succ 36 nm Ø	T-BSA-Succ 74 nm Ø
标准物质a	41	27	15	9	14	10
标准物质b	86	73	60	52	53	43
标准物质c	228	215	196	183	187	164
标准物质d	1602	1661	1586	1560	1535	1367
标准物质e	3610	3712	3616	3657	3506	3090
SL e/a	88	137	241	406	250	309
FS 8735	94	65	34	28	26	21
FS 9623	75	51	26	23	22	18
FS 9935	73	54	23	19	17	13
FS 10070	163	149	131	105	87	68
FS 10292	294	328	262	109	76	58
FS 10310	85	55	28	25	26	23
FS 10797	77	51	23	18	18	17
FS 11009	114	91	63	53	51	49
FS 11021	99	76	44	30	28	26
FS 11033	92	66	40	33	30	28
FS 720	64	37	16	15	15	14
FS 2249	63	39	17	13	15	13
FS 3006	108	71	44	37	33	28
FS 4740	81	53	29	26	26	22
FS 6532	79	53	27	25	23	19
FS 9076	70	51	34	31	27	29
FS 9196	89	77	32	26	23	22
FS 9570	82	62	43	40	39	33
FS 10942	69	46	18	15	17	14
FS 11008	63	42	18	14	15	12
平均	96.7	76.0	47.6	34.2	30.7	26.35

注：表中的T-BSA-SuCC表示琥珀酰化聚牛血清白蛋白

实例 5

乙酰化热凝聚牛血清白蛋白（乙酰化热聚BSA）的制备

1. 热凝聚BSA 的制备

1 g BSA 在100ml 5.0 mM 磷酸钾缓冲溶液（pH 7.0）中加热到70℃，并在这个温度保持4小时。然后使溶液冷却下来，过滤，并利用超离心机浓缩到50 mg/ml（排斥极限：30,000 Da）。然后对30倍体积的再蒸馏水进行渗析，随后冻干。所得到的产品的分子量

为大约700,000，粒度为 $30 \pm 8 \text{ nm}$ （用光子修正光谱法（PCS）测定）。

2. 热聚BSA 的酰化

4000 g 热凝聚BSA 在100mM 磷酸钾缓冲剂（pH 8.0）中加热到 25°C 。用OD 280nm 测定蛋白质浓度，然后调节蛋白质浓度为 10 mg/ml 。如有必要，可使用 10 mM 磷酸钾缓冲剂（pH 8.0）调节到正确值。把热聚BSA 溶液倾入搅拌容器中，并加热到 25°C 。浓度为 100 mg/ml 的乙酸羟基琥珀酰亚胺酯溶液在室温溶于无水DMSO（二甲基亚砜）中。每升乙酰化热聚BSA 溶液添加11.5ml 琥珀酰亚胺酯溶液。这样得到的、DMSO 中的最终浓度约为 1% 。在核查pH 值（目标为6.5–9）之后，乙酰化混合物在 25°C 搅拌120 分钟。用TSK3000 /HPLC（在260nm 检测）监测乙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯的减少。温育后，通过添加盐酸赖氨酸溶液至最终浓度为 5 mM ，使乙酰化过程停止。

停止的乙酰化反应通过压滤机过滤。随后用水洗涤压滤机。然后将滤液和洗涤液合并。

合并的滤液通过一种聚砜膜 10 KD 浓缩到 50 L 。浓缩溶液对10倍体积 20 mM 磷酸钾溶液pH 7.0 进行渗滤（diafiltrated）。然后，用渗滤缓冲剂把浓缩液稀释到2倍体积，然后再次浓缩到初始体积。通过TSK 3000 HPLC 分析测定渗滤结果。把溶液浓缩到 $80 \pm 10 \text{ mg/ml}$ ，随后用 0.1% 氯乙酰胺和 0.01% 甲基异噻唑酮（MIT）稳定。

PCS 测定给出粒度为 $30 \pm 15 \text{ nm}$ 。

实例 6

化学聚合琥珀酰化牛血清白蛋白 (P-BSA-Succ) 的制备

1. 牛血清白蛋白 (BSA) 的聚合

a) BSA 用顺丁烯二酰亚胺基己酰-N-羧基琥珀酰亚胺 (MHS) 活化

3 g BSA 溶于 30 ml 30 mM 磷酸钾缓冲剂 (pH 7.1) 中, 添加 0.6 ml 180 mg MHS/ml 二甲基亚砷 (DMSO) 溶液。在 25 °C 温育 1 小时后, 溶液补加 10 mM 赖氨酸, 并对 150 倍体积渗析缓冲剂 (15 mM 磷酸钾缓冲剂 / 50 mM NaCl / 1 mM 乙二胺四乙酸盐 (EDTA / pH 6.2) 进行渗析。

b) BSA 用 S-乙酰硫代丙酰-N-羧基琥珀酰亚胺 (SATP) 活化

3 g BSA 溶于 30 ml 30 mM 磷酸钾缓冲剂中并添加 0.6 ml 140 mg SATP/ml DMSO 溶液。在 25 °C 温育 1 小时后溶液补加 10 mM 赖氨酸, 并对 150 倍体积渗析缓冲剂 (15 mM 磷酸钾缓冲剂 / 50 mM NaCl / 1 mM EDTA / pH 6.2) 进行渗析。

c) 活化 BSA 成分的聚合

从 (b) 得到的含 SATP 活化 BSA 的溶液补加 25 mM 羟胺, 调到 pH 7.5, 在 25 °C 进行 1 小时温育。随后, 添加从 (a) 得到的含 MHS 活化 BSA 的溶液, 在 25 °C 再继续温育 45 分钟。添加 10 mM 半胱氨酸使聚合终止。再过 30 分钟后, 溶液补加 25 mM N-甲基顺丁烯二酰亚胺, 对 150 倍体积 50 mM 磷酸钾缓冲剂 / 0.15 M NaCl / pH 7.2 进行渗析。

2. 琥珀酰化

把2.6ml 含有0.1g 琥珀酐/ml DMSO 的溶液添加到从(1c)得到的渗析聚BSA 溶液中。在25℃温育60分钟后, 溶液补加50mM 赖氨酸, 对150 倍体积20mM 磷酸钾缓冲剂(pH 6.8)进行渗析, 冻干。

实例7

用聚琥珀酰化BSA(P-BSA-Succ)减少肌钙蛋白-T 夹层免疫测定中的干扰

试验是用Boehringer Mannheim GmbH 公司制造的Enzymuntest®肌钙蛋白T进行的。

1. 有共轭物的温育缓冲剂:

40mM 磷酸盐缓冲剂7.0

MAB<肌钙蛋白-T>M-7-Fab-POD 150mU/ml

MAB<肌钙蛋白-T>M-11-7-IGG-生物素2.5µg/ml

0.5mg/ml P-BSA-Succ; 在对比试验中, 温育缓冲剂不含P-BSA-Succ。

2. 基质缓冲剂

磷酸盐/柠檬酸盐缓冲剂100mM, pH 4.4

H₂O₂ : 3.2mM

色原ABTS 1.9mM

实验是按照实例1进行的, 采用140µl 样品和700µl 有共轭物的温育缓冲剂(温育30分钟); 200µl 洗涤溶液, 700µl 基质缓冲剂(温育时间15分钟)。

温育缓冲剂中不添加 P-BSA-Succ 时, 表 A 中所列干扰血清显著高于 0.2ng/ml 肌钙蛋白 T 的截止值。添加 0.5mg/ml P-BSA-Succ 使所有血清的非特定信号都降低到该截止值以下和/或完全消除某种干扰。这种减干扰蛋白的添加对标定曲线(表 A)的斜率不产生显著影响。因此, 阳性人体血清的回收率不受影响。

先有技术的单体琥珀酰化 BSA (BSA-Succ) 必须以高出 50 倍的浓度使用才能得到与聚合琥珀酰化 BSA (P-BSA-Succ) 大致相同的减干扰(表 B)。其后果是标定曲线变得非常扁平, 进而导致大大提高阳性人体血清的回收率(表 B)。因此, 在肌钙蛋白-T 试验中不能使用单体 BSA-Succ。

表 A :

用 P - BSA - Succ 减少肌钙蛋白 - T 免疫测定中的干扰

截止值 : 0.2 ng / ml

干扰血清	无 P-BSA-Succ		有 P-BSA-Succ (0.5 mg/ml)	
	mE	ng/ml	mE	ng/ml
H 93234	90	0.392	44	0.196
R 47015	98	0.432	27	0.063
U 05706	106	0.474	21	0.003
E 02179	95	0.414	28	0.071
N 26670	90	0.39	20	<0
X 91467	104	0.462	37	0.138
R 47004	71	0.289	19	<0
X 91325	129	0.596	10	<0
G 2943	90	0.388	39	0.154

标定曲线

标准	无 P-BSA-Succ mE	有 P-BSA-Succ mE
A 0	21	13
B 0.25	63	54
C 0.77	167	145
D 4.41	857	815
E 9.84	1921	1853
F 15.4	2865	2769

表 B :

用单体BSA-Succ 减少肌钙蛋白-T 免疫测定中的干扰

截止值: 0.2 ng/ml

干扰血清	参考值, 无succ	+10mg/ml BSA succ.	+25mg/ml BSA succ.	+50mg/ml BSA succ.
	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
11033	0.277	0.088	0.000	0.048
10292	0.443	0.195	0.147	0.129
4763	0.223	0.000	0.000	0.000
10912	0.343	0.145	0.000	0.104

	无 BSA	+25mg/ml BSA succ.	% 偏差
标定曲线	mE	mE	
标准物 a	16	4	25%
标准物 b	44	25	57%
标准物 c	162	89	60%
标准物 d	956	556	58%
标准物 e	1954	1768	60%
标准物 f	3279	2044	62%
阳性人体血清	ng/ml	ng/ml	
Panel 1	1.031	1.334	129%
Panel 2	1.749	2.599	149%
Panel 3	3.915	6.223	159%
Panel 4	6.000	9.950	166%
Panel 5	9.047	14.571	161%