

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 7 月 26 日 (26.07.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/133038 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/569 (2006.01) **G01N 21/76** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/071968

(22) 国际申请日: 2017 年 1 月 20 日 (20.01.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司 (SHENZHEN NEW INDUSTRIES BIOMEDICAL ENGINEERING CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉道 16 号, Guangdong 518122 (CN)。

(72) 发明人: 饶微(RAO, Wei); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉道 16 号, Guangdong 518122 (CN)。方中刚(FANG, Zhonggang); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉道 16 号, Guangdong 518122 (CN)。袁锦云(YUAN, Jinyun); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉道 16 号, Guangdong 518122 (CN)。王燕梅(WANG, Yanmei); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉道 16 号, Guangdong 518122 (CN)。李婷华(LI, Tinghua); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉道 16 号, Guangdong 518122 (CN)。王小莉(WANG, Xiaoli); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉道 16 号, Guangdong 518122 (CN)。

(74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司(KANGXIN PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区知春路甲 48 号盈都大厦 A 座 16 层, Beijing 100098 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: LABELLED COMPLEX AND PREPARATION METHOD THEREFOR, AND KIT, USE AND DETECTION SYSTEM THEREOF

(54) 发明名称: 标记复合物及其制备方法、试剂盒、应用和检测系统

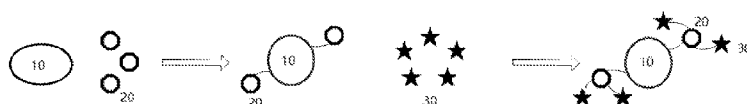


图 1

(57) Abstract: Disclosed are a labelled complex, a preparation method therefor, a kit comprising the labelled complex and the use thereof, and a detection system comprising the kit. The labelled complex comprises: an antigen; a labelled protein coupled with the antigen to form an intermediate of the labelled complex; and a signal product coupled with the intermediate of the labelled complex to form the labelled complex.

(57) 摘要: 本发明公开了一种标记复合物、其制备方法、包含所述标记复合物的试剂盒及应用和包括该试剂盒的检测系统。其中, 所述标记复合物包括: 抗原; 标记蛋白, 与抗原偶联形成标记复合物中间品; 以及信号生成物, 与标记复合物中间品偶联形成标记复合物。



WO 2018/133038 A1

标记复合物及其制备方法、试剂盒、应用和检测系统

技术领域

本发明涉及体外诊断试剂领域，具体而言，涉及一种标记复合物、其制备方法、包含其的试剂盒及应用和包括该试剂盒的检测系统。

背景技术

目前，临床上涉及免疫检测的方法主要包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、蛋白印迹试验(WB)、免疫胶体金技术(GICT)、放射免疫沉淀试验(RIPA)、化学发光法(CLIA)等。ELISA 和 CLIA 适用于临床上的大规模的初筛，但由于试剂组份的不稳定或者性能不足，导致检测结果出现假阳性和假阴性。因此，进一步提高试剂的灵敏度和稳定性是十分必要的。

ELISA 法是目前临床血液筛查中普遍使用检测技术，但是相对于 CLIA 全自动操作及高灵敏度的优势，ELISA 试验操作程序相对复杂，且出现假阳性或假阴性的概率较高。近几年国内外出现了以胶体金或乳胶颗粒为代表的快速检测试纸条，但是由于结果是肉眼目视观察，容易受观察者主观判断的影响，灵敏度低，结果准确度也不高。

免疫印迹法(WB)是目前临床检测的确认方法之一，结果准确可靠，但是其技术难度大，目前全世界也只有屈指可数的几家公司可以生产，高昂的使用成本使得它目前仅用于可疑标本的确认，而很少用于筛选。

化学发光分析法具有灵敏度高，线性范围宽，特异性好，仪器设备操作简单等优点，已成功应用于生命科学、食品科学、临床医学以及环境检测等领域，成为现代分析领域中一种有效的微量及痕量分析技术。用于化学发光反应的发光物质根据发光机理主要有以下几种：鲁米诺及其衍生物、光泽精 (Lucigenin)、过氧草酸酯 (Peroxyoxalate) 等。鲁米诺的衍生物主要有异鲁米诺、4-氨基己基-N-乙基异鲁米诺等，鲁米诺在碱性条件下可被一些氧化剂氧化发生化学发光反应，辐射出最大发射波长为 425 nm 的化学发光。光泽精 (N, N-二甲基吡啶硝酸盐, Lucigenin) 自身在碱性环境中产生微弱的化学发光，加入过氧化氢时化学发光强度会大大增加，被氧化而发出 420-500 nm 的光，具有较高的发光效率。过氧草酸酯 (peroxalate) 的化学发光反应涉及过氧化氢与芳基草酸酯之间的反应，是最有效的非生物化学发光反应。鲁米诺类和吡啶酯类化学发光试剂是最常用的化学发光标记试剂；常用的酶标记物有辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (ALP)，它们有各自的发光底物；而在实际应用中的电化学发光体系主要是钌联吡啶[Ru(bpy)₃]²⁺体系。

目前，在免疫检测中以双抗原（双抗体）夹心法的应用较为广泛。双抗原（双抗体）夹心法原理是：在固相材料上包被第一抗原（抗体），加入待检样本，加入有标记物的第二抗原（抗体）进行检测。如果待检样本中含有待检测物，则形成“包被抗原（抗体）-抗体（抗原）-标记抗原（抗体）”的三明治结构，通过检测标记物的信号来判定结果。应用双抗原夹心法的

关键之一在于标记抗原的质量，标记抗原的活性对免疫检测的灵敏度以及稳定性有着决定性的影响。而高活性的标记抗原需要具备两个条件：其一是标记抗原中单位抗原上结合的标记物要尽可能多；其二是标记过程对抗原的免疫学活性损失尽量小。很多抗原在和标记物偶联之后，标记抗原的活性会有很大损失。通常的解决方法就是在抗原上融合表达一段融合蛋白，形成融合蛋白-抗原的嵌合抗原的表达形式，使用该方法表达出来的重组抗原在可溶性和表达量方面均有更好的表现，从而具备优良的标记性能。但是融合蛋白的运用存在一定程度的不足，例如用原核表达系统往往存在包涵体，导致标记抗原后有假阳性较高的影响。

公开号为 CN1888901A 的中国专利中提出的采用磁分离直接化学发光试剂及其测试方法，采用异鲁米诺衍生物作为发光标记物，异鲁米诺发光标记物的单克隆抗体时通过将异鲁米诺发光标记物与二氯硫化碳或 N-羟基琥珀酸联接后再与单克隆抗体联接。该专利未涉及针对重组抗原通过二次标记提高发光标记物的稳定性和灵敏度。

公开号为 CN100582780A 的中国专利文献中曾提出一种“小分子间接标记的双抗原夹心法测定丙型肝炎病毒总抗体”，该试剂采用的是用小分子物质标记 HCV 抗原；将 HCV 抗原包被固相材料；以信号生成物质标记抗小分子抗体或其他能与小分子结合的物质。样本中的抗 HCV 抗体可与固相材料表面的 HCV 抗原及小分子标记的 HCV 抗原反应，形成双抗原夹心复合物，然后通过小分子与信号报告分子反应，使形成的复合物带有可检测的信号生成物质。该专利提出利用小分子标记有利于保持抗原活性、具有信号放大作用，从而提高 HCV 抗体检测的灵敏度和特异性。该专利需要合适的小分子物质和抗小分子抗体或能与小分子结合的物质，同时还需研究小分子标记抗原和信号生成物质标记抗小分子抗体后的稳定性。

在申请号为 EP20050714754 的 PCT 专利和公开号为 CN101363848A 的中国专利中提出“间接标记纳米颗粒的抗体检测双抗原夹心法及其试剂盒”中提出：纳米颗粒类标记物与标记抗原之间的标记是通过抗原上的标签和标记在纳米颗粒标记物上的可特异性识别该标签的配体相结合来完成的间接标记，其中的标记抗原为基因工程重组抗原。采用此种间接标记的方式，可以显著提高纳米颗粒的抗体检测双抗原夹心法的灵敏度并改善特异性。该专利需要将重组抗原在表达时标记上标签蛋白，同时还需要可特异性识别该标签的配体，并对配体进行标记。这样就需要做成两个试剂盒组份，并且需要研究两种组份的最适的反应比例。同时，该专利也为涉及标签蛋白或标签蛋白配体标记物的稳定性。

公开号为 CN102115737B 和公开号为 CN101561432B 的中国专利文献中曾提出一种“稳定碱性磷酸酶或其标记物的试剂和方法”和“一种能够维护酶标记物溶液高稳定性的稀释液”，以上两篇专利均是从优化标记物稀释液组份提高标记物的稳定性。通过优化稀释液中保护蛋白、溶液的离子强度、pH 值、增加多元醇、多糖、表面活性剂、蛋白酶抑制剂等使碱性磷酸酶或其标记物经过 37℃ 加速破坏两周基本无损失。有 0.05M pH7.2 的 PBS 磷酸盐生理盐水缓冲液、保护蛋白、复合氨基酸、多糖、芦荟提取液、鼠血清、葡萄糖酸钾、辛酸钠、吐温和防腐剂组成的稀释液能够是 HRP 标记物在 37℃ 保存一周以上。合适的稀释液组份是保证标记复合物稳定性的前提条件，但是通过优化稀释液组份不足以改变稳定性时需要改变标记复合物的标记工艺。

目前，现有的技术方案主要存在以下技术问题：

1) 针对抗原抗体标记的方法，目前大部分采用的是直接标记法，但有些抗原经过被检测信号物质直接标记，其免疫学活性会受到影响，从而影响标记物的稳定性和灵敏度；

2) 通过小分子或者标签蛋白间接标记法能改善标记部分抗原的灵敏度，但需要寻找合适的小分子或者标签蛋白及相对应的可识别的配体，同时会增加试剂组份，使其复杂化；

3) 通过融合蛋白-抗原的嵌合抗原的表达形式，使重组抗原有更好的可溶性，标记性能也有所提高，但是融合蛋白的运用存在一定程度的不足，例如用原核表达系统往往存在包涵体，抗原标记后会有假阳性较高的现象。

发明内容

本发明旨在提供一种标记复合物、其制备方法、包含其的试剂盒及应用和包括该试剂盒的检测系统，以提高标记复合物的灵敏度。

为了实现上述目的，根据本发明的一个方面，提供了一种标记复合物。该标记复合物包括：抗原；标记蛋白，与抗原偶联形成标记复合物中间品；以及信号生成物，与标记复合物中间品偶联形成标记复合物。

进一步地，抗原为重组抗原或天然抗原。

进一步地，抗原为 HIV-1 重组抗原、HIV-2 重组抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、人类 T 淋巴细胞病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、幽门螺旋杆菌抗原或人乳头瘤病毒抗原；优选的，抗原为 HIV-1 重组抗原或 HIV-2 重组抗原。

进一步地，标记蛋白表面带有功能基团，功能基团为羧基、氨基、羟基、巯基、醛基、糖基和咪唑基中的一种或多种，功能基团与抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联。

进一步地，标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵白蛋白、牛 IgG、鼠 IgG、羊 IgG、兔 IgG、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或 β -半乳糖苷酶；优选的，标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白或碱性磷酸酶。

进一步地，信号生成物为鲁米诺、异鲁米诺及异鲁米诺衍生物、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吖啶酯及其衍生物或三联吡啶钌；优选的，异鲁米诺衍生物为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺。

进一步地，标记蛋白和信号生成物为不同的物质。

根据本发明的另一个方面，提供一种上述标记复合物的制备方法。该制备方法包括以下步骤：将表面带有功能基团的标记蛋白与抗原进行偶联反应，得到标记复合物中间品；将信

号生成物质与标记复合物中间品进行偶联反应，得到标记复合物。

进一步地，偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法；优选的，偶联反应中用到的交联剂为基于 NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

进一步地，标记蛋白与抗原进行偶联反应时，标记蛋白和抗原的摩尔比为 1:1-3:1。

进一步地，偶联反应中用到的缓冲液为 pH 为 4.0-6.5 的 PBS 缓冲液、pH 为 8.0-9.8 的碳酸盐缓冲液、pH 为 7.0-8.0 的 0.5%-5% 的戊二醛溶液或 pH 为 4.0-6.0 的 MES 缓冲液。

进一步地，标记复合物中间品或标记复合物制备完成后放入储存液中保存，储存液包括：0.2-0.5 g/L 磷酸二氢钾、3.0-6.0 g/L 磷酸氢二钠、4.0-8.0 g/L 氯化钠、0.5-1.5 g/L BSA，0.25-0.5 g/L 叠氮钠和 0.25-0.5 mL/L 吐温-20。

根据本发明的再一个方面，提供一种检测试剂盒。该试剂盒包括上述任一种的标记复合物或上述任一种标记复合物的制备方法制备得到的标记复合物。

进一步地，试剂盒还包括：包被抗原的磁性微球溶液；或包被亲和素的磁性微球溶液和生物素化的抗原溶液；或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液和标记异硫氰酸荧光素的抗原溶液。

进一步地，检测试剂盒为检测 HIV-1 抗体的试剂盒，含有 HIV-1 重组抗原的标记复合物；优选的，试剂盒具体包括：包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液、HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液；或包被亲和素的磁性微球溶液、HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液和生物素化的 HIV-1 重组抗原溶液；或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液和标记异硫氰酸荧光素的 HIV-1 重组抗原溶液；优选的，包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$ ；优选的，磁性微球浓度为 0.25-1.25 mg/mL；优选的，HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$ ；优选的，HIV-1 重组抗原的标记复合物浓度为 0.1-1 mg/L；优选的，生物素化的 HIV-1 重组抗原溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$ ，生物素浓度为 0.1-1 mg/L；优选的，所述标记异硫氰酸荧光素的 HIV-1 重组抗原溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$ ，异硫氰酸荧光素浓度为 0.1-1 mg/L。

根据本发明的又一个方面，提供一种上述试剂盒在免疫检测中的应用，其中，标记蛋白与被检测蛋白为非同源性蛋白。

进一步地，试剂盒用于检测 HIV-1 抗体、HIV-2 抗体、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、庚型肝炎病毒、人类 T 淋巴细胞病毒、梅毒螺旋体抗体、幽门螺旋杆菌抗体或人乳头瘤病毒抗体。

进一步地，试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪。

根据本发明再一个方面，提供一种检测系统。该检测系统包括上述任一种试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。应用本发明的技术方案，通过标记蛋白与抗原的功能基团偶联，维持抗原的构象或者使构象改变但不会导致抗原表位被覆盖，能够保持抗原的免疫反应活性。另外，以标记蛋白标记抗原可以使一个抗原上带有多个标记蛋白，进行二次标记信号生成物质时，一个标记蛋白又与多个信号生成物质结合，产生有效的信号放大作用，从而进一步提高了检测的灵敏度。

附图说明

构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图1示出了根据本发明一实施方式的标记复合物的制备流程及结构示意图。

具体实施方式

需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

本发明中涉及的缩写及术语解释如下：

HIV（Human Immunodeficiency Virus，人类免疫缺陷病毒）、AIDS（Acquired Immune Deficiency Syndrome，获得性免疫缺陷综合症）、CLIA（化学发光免疫分析法）、BSA（牛血清白蛋白）、 NaN_3 （叠氮钠）、ABEI[N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺]、FITC（异硫氰酸荧光素）、Biotin（生物素）、SA（链霉亲和素）、HRP（Horseradish Peroxidase，辣根过氧化物酶）、吖啶酯（Acridinium Ester）、碱性磷酸酶（ALP）、抗FITC抗体（抗异硫氰酸荧光素抗体）、ELISA（酶联免疫吸附试验法）、蛋白印迹试验（WB）、免疫胶体金技术（GICT）、试剂放射免疫沉淀试验（RIPA）。

标记：本发明中使用的术语“标记”是指配体跟标记物的偶联。

标记物：本发明中使用的术语“标记物”指在免疫检测中可被检测到的物质，也可指包含该标记物的“标记复合物”。

融合蛋白：本发明中涉及的术语“融合蛋白”是指与标记抗原融合表达成融合抗原的蛋白，此融合抗原与标记物偶联，用于检测目的抗体。

标记蛋白：本发明中使用的术语“标记蛋白”是指用于第一次标记抗原的蛋白质。

标记抗原：本发明中使用的术语“标记抗原”为免疫检测中待测目的抗体结合的抗原；

间接标记：本发明中使用的术语“间接标记”是指标记抗原和标记物不是直接结合，而是通

过标记抗原上面的标签与其对应配体特异性识别，由配体直接标记标记物。

二次标记：本发明中使用的术语“二次标记”是指标记抗原通过第一次标记标记蛋白后，再将标记复合物进行第二次的可被检测信号物质的标记。

配体：本发明中涉及的术语“配体”为可以与标签特异性识别的分子，例如抗体，亲和素等。

标签：本发明中使用的术语“标签”包括但不限于多肽或蛋白、生物素或者为它们与肽或蛋白的组合物，这里所说的多肽或蛋白为除该试剂盒包被抗原里任意一段之外的多肽或蛋白。

交联剂：本发明中所述的“交联剂”一般为一类小分子化合物，具有 2 个或者更多的针对特殊基团（-NH₂、-COOH、-HS 等）的反应性末端，可以和 2 个或者更多的分子分别偶联，从而使这些分子结合在一起。

生物素：Biotin，下文可以简称为 Bio。

链霉亲和素：Streptavidin，下文可以简称为亲和素或 SA。

术语“信号生成物质”或“标记物”是指这样的部分：其连接至特异性结合配偶体，诸如抗原或分析物，以使得特异性结合的配偶体（诸如抗原和分析物）是可检测的，且如此标记的特异性结合配偶体（例如，抗原或分析物）被称作“可检测的”。标记可以产生通过视觉装置或仪器装置可检测的信号。各种标记物包括产生信号的物质，诸如色原体、荧光化合物、化学发光的化合物、放射性化合物等。标记物的代表性例子包括产生光的部分（例如，吖啶酯化合物）和产生荧光的部分（例如，荧光素）。

现有技术中，抗原直接标记后，标记复合物的稳定性不足和灵敏度不够，单独优化缓冲液的成份不足以满足试剂的性能；间接标记需要寻找合适的小分子或者标签蛋白及相对应的可识别的配体，同时增加重组抗原表达的难度和增加试剂组份。

为了提高标记复合物的灵敏度，本发明提供了如下技术方案：如图 1 所示，将表面带有功能基团的标记蛋白 20 与抗原 10 进行第一次标记，得到标记复合物中间品；将信号生成物质 30 与标记复合物中间品进行第二次标记，并通过分离纯化去除未结合物质，得到最终的标记复合物。

根据本发明一种典型的实施方式，提供一种该标记复合物。该标记复合物包括：抗原；标记蛋白，与抗原偶联形成标记复合物中间品；以及信号生成物，与标记复合物中间品偶联形成标记复合物。

分析本发明能达到技术效果的具体原因：蛋白质变性是指当蛋白质受到物理或化学因素影响时，其分子内部的一、二、三、和四级结构会发生变化，导致其生物功能丧失或物理化学性质改变。由温度导致的蛋白质变性主要为非共价相互作用的去稳定化。因此在一些抗原标记后的标记复合物在温度较高的条件下，抗原的构象发生改变，导致抗原表位被覆盖，引起抗原的免疫反应活性下降或者丧失。通过标记标记蛋白与抗原的功能基团偶联，维持抗原的构象或者使构象改变但不会导致抗原表位被覆盖，能够保持抗原的免疫反应活性。以标记蛋白

标记抗原可以使一个抗原上带有多个标记蛋白，进行二次标记信号生成物质时，一个标记蛋白又与多个信号生成物质结合，产生有效的信号放大作用，从而进一步提高了检测的灵敏度。

其中，抗原为重组抗原或天然抗原；优选的，抗原包括但不限于 HIV-1 重组抗原、HIV-2 重组抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、人类 T 淋巴细胞病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、幽门螺旋杆菌抗原或人乳头瘤病毒抗原；优选的，抗原为 HIV-1 重组抗原或 HIV-2 重组抗原。

理论上任何蛋白都可以作为本发明的标记蛋白，优选的，标记蛋白具有以下性质：1) 表面带有羧基(-COOH)、氨基(-NH₂)、羟基(-OH)、巯基(-SH)、氨基(-NH₂)、醛基(-CHO)、糖基(-C=O)、咪唑基等其他具有化学活性的功能基团的蛋白，以便与抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联；2) 具有偶联足够多分子容量的蛋白；3) 为防止非特异性结合的产生，标记蛋白应该选用与被检测对象非同源性蛋白；4) 应具有足够的稳定性，且应该是廉价易得的。

因此，标记蛋白包括但不限于：辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵白蛋白、牛 IgG、鼠 IgG、羊 IgG、兔 IgG、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或 β -半乳糖苷酶等。优选的，标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白或碱性磷酸酶。

所述的“信号生成物质”包括但不限于：化学发光物质如鲁米诺、异鲁米诺及异鲁米诺衍生物；碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吡啶酯及其衍生物、三联吡啶钌等；优选的，异鲁米诺衍生物为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(以下简称为 ABEI)。

优选的，标记蛋白和信号生成物为不同的物质，这是因为选择二次标记是因为信号生成物质一次标记不足以提高稳定性和灵敏度，如果标记蛋白和信号生成物质是同一物质，即使进行二次标记也只是有信号放大(灵敏度提高)而不能提高稳定性的作用。

根据本发明的另一个方面，提供一种上述标记复合物的制备方法。该制备方法包括以下步骤：将表面带有功能基团的标记蛋白与抗原进行偶联反应，得到标记复合物中间品；将信号生成物质与标记复合物中间品进行偶联反应，并分离纯化去除未结合的物质，得到标记复合物。

其中，标记蛋白表面带有的功能基团包括但不限于羧基(-COOH)、氨基(-NH₂)、羟基(-OH)、巯基(-SH)、醛基(-CHO)、糖基(-C=O)和咪唑基，功能基团与抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联(由于本发明已经限定标记蛋白表面带有的功能基团与抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联，所以本领域技术人员可以明显排除标记蛋白上的功能基团与抗原上游离的基团均为相同基团不能偶联的情况)。偶联反应完毕后通过处理，去除未结合和其他的物质，其中处理方法包括但不限于：透析、超滤、离子交换层析、凝胶过滤、盐溶与盐析、等电点沉淀法、亲和层析等；然后将得到的标记复合物中间品进行使用或将其分散于储存液中进行保存。

根据本发明一种典型的实施方式，该制备方法具体步骤如下：A.根据偶联官能团选择合适的方法将标记蛋白与抗原进行偶联反应；B.去除未结合物质，获得标记复合物中间品；C.根据偶联官能团选择合适的方法将信号生成物质与标记复合物中间品进行偶联反应；D.去除未结合物质，获得最终的标记复合物。

将信号生成物质根据偶联官能团选择合适的方法与标记复合物中间品进行偶联反应，偶联反应采用的方法包括但不限于混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法等。

所述的偶联反应用到的交联剂包括但不限于：

1) 氨基-氨基交联剂：基于 NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂，如：DSG（二琥珀酰亚胺基戊二酸酯）、DST（酒石酸二琥珀酰亚胺酯）、DMA（二甲基己二酰亚胺）等；

2) 巯基-糖类交联剂：基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的交联剂，适用于连接巯基和糖类，如：BMPH（N-β-马来酰亚胺基丙酸酰肼）、MPBH（4-（4-N-马来酰亚胺基苯基）丁酸酰肼）、PDPH（3-（2-吡啶基二硫代）丙酰肼）等；

3) 巯基-巯基交联剂：基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂，适用于与蛋白或多肽的硫醇（还原型半胱氨酸）进行特异性共价连接，以形成稳定的硫醚键，如：BMOE（双马来酰亚胺乙烷）、BMB（1,4-双马来酰亚胺丁烷）、BMH（双马来酰亚胺己烷）等；

4) 氨基-巯基交联剂：异型双功能蛋白交联剂适用于蛋白和其他分子的伯胺（赖氨酸）和巯基（半胱氨酸）基团之间的连接，如：SIA（琥珀酰亚胺基碘乙酸酯）、SPDP（琥珀酰亚胺基 3-（2-吡啶基二硫代）丙酸酯）、AMAS（N-α-马来酰亚胺基乙酰氧基琥珀酰亚胺酯）等；

5) 羧基-氨基交联剂：适用于羧基（谷氨酸、天冬氨酸、C 端）与伯胺（赖氨酸、N 端）连接的碳二亚胺交联剂 NHS（N-羟基琥珀酰亚胺）和 EDC（1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐）等；

6) 光反应性交联剂：芳香叠氮、双丫丙啶和其他光反应（光活化）的异型双功能交联剂，如：SDA（琥珀酰亚胺基-4,4'-氮杂戊酸酯）和 ANB-NOS（N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺）；

7) 化学选择性连接交联剂，如：ManNAz（N-叠氮基乙酰甘露糖胺四酰化）和 GalNAz（N-叠氮基乙酰半乳糖胺四酰化）等。

8) 双功能交联剂：如戊二醛的两个醛基分别与抗原和蛋白质上的氨基形成 schiff 键。

优选的，标记蛋白与抗原进行偶联反应时，标记蛋白和抗原的摩尔比为 1:1-3:1。

偶联反应用到的缓冲液包括但不限于：pH 为 4.0-6.5 的 PBS 缓冲液、pH 为 8.0-9.8 的碳酸盐缓冲液、pH 为 7.0-8.0 的 0.5%-5% 的戊二醛溶液、pH 为 4.0-6.0 的 MES 缓冲液等。

根据本发明一种典型的实施方式，标记复合物中间品或标记复合物制备完成后可放入储存液中保存，储存液包括但不限于：0.2-0.5 g/L 磷酸二氢钾、3.0-6.0 g/L 磷酸氢二钠、4.0-8.0 g/L 氯化钠、0.5-1.5 g/L BSA，0.25-0.5 g/L 叠氮钠和 0.25-0.5 mL/L 吐温-20。

根据本发明一种典型的实施方式，提供一种检测试剂盒。该试剂盒包括本发明中任一种标记复合物或本发明的任一种标记复合物制备方法制备得到的标记复合物。该检测试剂盒可以为酶联免疫诊断试剂盒、免疫胶体金试剂盒、放射免疫分析试剂盒或化学发光法免疫诊断试剂盒，当然也可以是其他能够使用本发明的标记复合物的检测试剂盒，提高该类型产品的稳定性和产品性能。

根据本发明一种典型的实施方式，检测试剂盒还包括：包被抗原的磁性微球溶液；或包被亲和素的磁性微球溶液和生物素化的抗原溶液；或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液和标记异硫氰酸荧光素的抗原溶液。例如，检测试剂盒为检测 HIV-1 抗体的试剂盒，则含有 HIV-1 重组抗原的标记复合物。优选的，试剂盒还包括试剂盒缓冲液。

优选的，本发明中采用的磁性微球为纳米级的 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体，并具有 0.1-5 μm 的粒径；并且，所述磁球通过表面改性而带有一种或多种活性基团。所述活性基团包括羧基、羟基、氨基中的至少一种。该磁性微球是具有超顺磁性和极大蛋白吸附容量的微米级的固相微球，具有在外加磁场作用下可迅速被磁化，在撤走磁场后剩磁为零的属性。采用该磁性微球，可以通过表面改性使磁球表面连接活性基团，不仅能够减少非特异性吸附，且增加体系的稳定性，不产生凝聚，同时显著提高结合率。

根据本发明一种典型的实施方式，检测试剂盒为化学发光法免疫诊断试剂盒，具体包括：包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液和 HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液；或包被亲和素的磁性微球溶液、HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液和生物素化的 HIV-1 重组抗原溶液；或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液、标记异硫氰酸荧光素的 HIV-1 重组抗原溶液和 HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液。优选的，试剂盒还包括试剂盒缓冲液。

根据本发明一种典型的实施方式，包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液中 HIV-1 重组抗原浓度、包被亲和素的磁性微球溶液中亲和素浓度或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液中抗异硫氰酸荧光素抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$ ，磁性微球浓度为 0.25-1.25 mg/mL，包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液、包被亲和素的磁性微球溶液、或包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液中含有 0.1-0.3 M 磷酸盐缓冲液，0.3-0.6 M NaCl，0.05%-0.15% BSA，0.05-0.10% TritonX-100，pH 值为 7.2-7.8。

根据本发明一种典型的实施方式，HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$ ，HIV-1 重组抗原的标记复合物浓度为 0.1-1 mg/L，HIV-1 重组抗原的标记复合物稀释液中含有 0.2-0.6 g/L 酪蛋白、1.0-3.0 g/L Tris-base、5.0-8.0 g/L 氯化钠、5.0-10.0 g/L 丙三醇、0.5-0.8 mL/L 吐温-20、200-300 mM/L 的 EDTA、1%-3% 的蔗糖、0.2-0.5 M/L 甘氨酸、20%-50% 的小牛血清，pH 为 7.5-8.0。

根据本发明一种典型的实施方式，试剂盒缓冲液含 1.0-3.0 g/L 的 Tris、0.8-1.6 g/L 的 NaCl、

0.05%-0.15% TritonX-100 和 0.5-1.5 g/L 的 BSA、0.05%-0.15% HCl, pH 为 7.2-7.8, Tris 的纯度 $\geq 99\%$, NaCl 为分析纯, BSA 的纯度 $\geq 99\%$, HCl 为分析纯, 纯度为 36%-38%。

根据本发明一种典型的实施方式, 生物素化的 HIV-1 重组抗原溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$, 生物素浓度为 0.1-1 mg/L; 或标记异硫氰酸荧光素的 HIV-1 重组抗原溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$, 异硫氰酸荧光素浓度为 0.1-1 mg/L。

根据本发明一种典型的实施方式, 包被亲和素的磁性微球溶液为包被链霉亲和素的磁性微球溶液。

根据本发明一种典型的实施方式, 提供一种检测 HIV-1 抗体的试剂或试剂盒 (化学发光免疫分析法), 含有上述 HIV-1 重组抗原标记复合物。该试剂盒包括以下组分:

1) 包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液

HIV-1 重组抗原浓度: 10-200 $\mu\text{g/L}$ 磁性微球浓度: 0.25-1.25 mg/mL

磁性微球溶液中含有 0.1-0.3 M 磷酸盐缓冲液, 0.3-0.6 M NaCl, 0.05%-0.15% BSA, 0.05-0.10% TritonX-100, 其 pH 值为 7.2-7.8。

2) HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液

HIV-1 重组抗原浓度: 10-200 $\mu\text{g/L}$ 标记复合物浓度: 0.1-1 mg/L

标记复合物稀释液中含有 0.2-0.6 g/L 酪蛋白、1.0-3.0 g/L Tris-base、5.0-8.0 g/L 氯化钠、5.0-10.0 g/L 丙三醇、0.5-0.8 mL/L 吐温-20、200-300 mM/L 的 EDTA、1%-3% 的蔗糖、0.2-0.5 M/L 甘氨酸、20%-50% 的小牛血清, pH 为 7.5-8.0。

3) 试剂盒缓冲液

试剂盒缓冲液含 1.0-3.0 g/L 的 Tris(纯度 $\geq 99\%$)、0.8-1.6 g/L 的 NaCl(分析纯)、0.05%-0.15% TritonX-100 和 0.5-1.5 g/L 的 BSA(纯度 $\geq 99\%$)、0.05%-0.15% HCl(分析纯, 纯度为 36%-38%), pH 为 7.2-7.8。

所述各组分均含有防腐剂, 防腐剂为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin 系列中的任一种或两种以上混合物。

根据本发明一种典型的实施方式, 提供一种检测 HIV-1 抗体的试剂或试剂盒 (化学发光免疫分析法), 含有上述 HIV-1 重组抗原标记复合物。该试剂盒包括以下组分:

1) 包被链霉亲和素 (SA) 的磁性微球溶液

链霉亲和素浓度: 10-200 $\mu\text{g/L}$ 磁性微球浓度: 0.25-1.25 mg/mL

磁性微球溶液中含有 0.1-0.3 M 磷酸盐缓冲液, 0.3-0.6 M NaCl, 0.05%-0.15% BSA, 0.05-0.10% TritonX-100, 其 pH 值为 7.2-7.8。

2) HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液

HIV-1 重组抗原浓度: 10-200 $\mu\text{g/L}$ 标记复合物浓度: 0.1-1 mg/L

标记复合物稀释液中含有 0.2-0.6 g/L 酪蛋白、1.0-3.0 g/L Tris-base、5.0-8.0 g/L 氯化钠、5.0-10.0 g/L 丙三醇、0.5-0.8 mL/L 吐温-20、200-300 mM/L 的 EDTA、1%-3% 的蔗糖、0.2-0.5 M/L 甘氨酸、20%-50% 的小牛血清, pH 为 7.5-8.0。

3) 生物素 (Biotin) 化的 HIV-1 重组抗原溶液

HIV-1 重组抗原浓度: 10-200 $\mu\text{g/L}$ 生物素浓度: 0.1-1 mg/L

稀释缓冲液含 1.0-3.0 g/L 的 Tris(纯度 $\geq 99\%$)、0.8-1.6 g/L 的 NaCl(分析纯)、0.05%-0.15% TritonX-100 和 0.5-1.5 g/L 的 BSA(纯度 $\geq 99\%$)、0.05%-0.15% HCl(分析纯, 纯度为 36%-38%), pH 为 7.2-7.8。

所述各组分均含有防腐剂, 防腐剂为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin 系列中的任一种或两种以上混合物。

根据本发明一种典型的实施方式, 提供一种检测 HIV-1 抗体的试剂或试剂盒 (化学发光免疫分析法), 含有上述 HIV-1 重组抗原标记复合物。该试剂盒包括以下组分:

1) 包被羊抗 FITC 的磁性微球溶液

羊抗 FITC 的浓度: 10-200 $\mu\text{g/L}$ 磁性微球浓度: 0.25-1.25 mg/mL

磁性微球溶液中含有 0.1-0.3 M 磷酸盐缓冲液, 0.3-0.6 M NaCl, 0.05%-0.15% BSA, 0.05-0.10% TritonX-100, 其 pH 值为 7.2-7.8。

2) HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液

HIV-1 重组抗原浓度: 10-200 $\mu\text{g/L}$ 标记复合物浓度: 0.1-1 mg/L

标记复合物稀释液中含有 0.2-0.6 g/L 酪蛋白、1.0-3.0 g/L Tris-base、5.0-8.0 g/L 氯化钠、5.0-10.0 g/L 丙三醇、0.5-0.8 mL/L 吐温-20、200-300 mM/L 的 EDTA、1%-3% 的蔗糖、0.2-0.5 M/L 甘氨酸、20%-50% 的小牛血清, pH 为 7.5-8.0。

3) FITC 标记的 HIV-1 重组抗原溶液

HIV-1 重组抗原浓度: 10-200 $\mu\text{g/L}$ FITC 浓度: 0.1-1 mg/L

稀释缓冲液含 1.0-3.0 g/L 的 Tris(纯度 $\geq 99\%$)、0.8-1.6 g/L 的 NaCl(分析纯)、0.05%-0.15% TritonX-100 和 0.5-1.5 g/L 的 BSA(纯度 $\geq 99\%$)、0.05%-0.15% HCl(分析纯, 纯度为 36%-38%), pH 为 7.2-7.8。

所述各组分均含有防腐剂, 防腐剂为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin 系列中的任一种或两种以上混合物。

本发明中当抗原是 HIV-2 重组抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、人类 T 淋巴细胞病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、幽门螺旋杆菌抗原或人乳头瘤病毒抗原时，遵循本发明公开的发明构思，参照抗原是 HIV-1 重组抗原的实施方式或实施例，本领域技术人员可以通过常规技术手段对上述溶液或反应条件进行适应性调整，从而实现本发明的技术方案。

下面将结合实施例进一步说明本发明的有益效果。

1. 原材料来源：

羊抗 FITC 多克隆抗体，来源：购自北京百浩生物科技有限公司。

磁性微球，来源：为深圳新产业生物医学股份有限公司生产。

FITC：购自上海纪宁实业有限公司。

ABEI 由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产。

生物素、链霉亲和素：均购自 Roche。

HIV-1 抗体校准品（货号：B65875G），来源：Meridian 公司。

用于包被的 HIV-1 重组抗原（货号：VTI310），来源：Meridian 公司。

用于标记的 HIV-1 重组抗原（货号：R18550），来源：Meridian 公司。

2、部分原材料来源的具体解释：

用于包被的 HIV-1 重组抗原（货号：VTI310）由毕赤酵母表达，为 HIV-1 跨膜蛋白 gp41 重组抗原，储存溶液中含 1M 尿素，0.5M 氯化钠，0.2M 磷酸钠，pH7.4±0.2。用于标记的 HIV-1 重组抗原（货号：R18550）由大肠杆菌表达，为 HIV-1 跨膜蛋白 gp41 片段大部分和 gp120 的 C 端融合表达，分子量为 27.3 kDa，储存溶液中含 0 mM Tris, pH 8.0，含有 0.1% SDS，5 mM DTT，2.5 mM EDTA。HIV-1 抗体校准品（货号：B65875G）用于灵敏度和稳定性评估的检测样本。

实施例 1

- 1) 称取 5 mg HRP（M=44000）溶解于 1 mL 蒸馏水中（5 mg/mL）。
- 2) 于上述溶液中加入 0.5 mL 新配的 0.06 M NaIO₄（M=213.89）溶液，混匀，4℃避光静置 30 min。
- 3) 加入 0.5 mL 0.16 M 乙二醇（去除多余的 NaIO₄），混匀，室温放置 30 min。
- 4) 1 mg HIV-1 重组抗原（2 mg/mL）用 0.05 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液 4℃透析 2 h，然后立即加 NaIO₄ 氧化的 HRP 1 mg，室温避光轻轻搅拌 2 h。
- 5) 加入 50 μL 新配的 2 mg/mL NaBH₄（M=37.83）溶液，混匀后 4℃静置 2 h。

6) 将上述液装入透析袋中, 对 0.01M pH7.4 PBS 4℃透析过夜。

7) 选用截留量 3500 的透析袋, 量取合适的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏 3 次 (以无漏液为宜);

8) 取 0.5 mg 经过一次标记 HRP 的 HIV-1 重组抗原, 用 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调体积至 0.5 mL, 扎紧透析袋另一端后放入 pH 9.5 碳酸盐缓冲液透析液中透析 1 h, 速度 400 转/分钟;

9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入 2 mL 容积的玻璃瓶中, 加入 25 µg ABEI 活化酯, 室温振摇反应 1.5 h。

10) 用 G25 凝胶柱纯化, 去除未结合的 ABEI 活化酯, 即可获得二次标记 HIV 的标记复合物。

将上述的标记复合物按照 1:400 的比例稀释到缓冲液中, 并按照以下描述的 HIV-1 抗体检测试剂盒, 利用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的全自动化学发光免疫分析仪 Maglumi 2000 Plus 进行评估。同时配制 7 份标记复合物溶液置于 37℃ 恒温恒湿箱中进行加速稳定性试验。

试剂盒组份主要包括以下:

a. 包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液

HIV-1 重组抗原浓度: 10 µg/mL 磁性微球浓度: 1.0 mg/mL

磁性微球溶液中含有 0.25 M 磷酸盐缓冲液, 0.3 M NaCl, 0.15% BSA, 0.05% TritonX-100, 其 pH 值为 7.4。

b. 二次标记 HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液

HIV-1 重组抗原浓度: 50 µg/L 标记复合物浓度: 0.2 mg/L

标记复合物稀释液中含有 0.2 g/L 酪蛋白、1.5 g/L Tris-base、6.0 g/L 氯化钠、10.0 g/L 丙三醇、0.6 mL/L 吐温-20、250 mM/L 的 EDTA、2% 的蔗糖、0.4 M/L 甘氨酸、25% 的小牛血清, pH 为 7.8。

c. 试剂盒缓冲液

试剂盒缓冲液含 2.0 g/L 的 Tris(纯度≥99%)、1.2 g/L 的 NaCl(分析纯)、0.1% TritonX-100 和 0.5 g/L 的 BSA(纯度≥99%)、0.1% HCl(分析纯, 纯度为 36%-38%), pH 为 7.5。

所述各组份均含有 0.2% 的 ProClin300 作为防腐剂。

实施例 2

1) 称取 5 mg HRP (M=44000) 溶解于 1 mL 蒸馏水中 (5 mg/mL)。

2) 于上述溶液中加入 1.0 mL 新配的 0.06 M NaIO_4 ($M=213.89$) 溶液, 混匀, 4°C 避光静置 30 min。

3) 加入 1.0 mL 0.16 M 乙二醇, 混匀, 室温放置 30 min。

4) 1 mg HIV-1 重组抗原 (2 mg/mL) 用 0.05 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液 4°C 透析 2 h, 然后立即加 NaIO_4 氧化的 HRP 2 mg, 室温避光轻轻搅拌 2 h。

5) 加入 100 μL 新配的 2 mg/mL NaBH_4 ($M=37.83$) 溶液, 混匀后 4°C 静置 2 h。

6) 将上述液装入透析袋中, 对 0.01M pH7.4 PBS 4°C 透析过夜。

7) 选用截留量 3500 的透析袋, 量取合适的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏 3 次 (以无漏液为宜);

8) 取 0.5 mg 经过一次标记 HRP 的 HIV-1 重组抗原, 用 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调体积至 0.5 mL, 扎紧透析袋另一端后放入 pH 9.5 碳酸盐缓冲液透析液中透析 1 h, 速度 400 转/分钟;

9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入 2 mL 容积的玻璃瓶中, 加入 25 μg ABEI 活化酯, 室温振摇反应 1.5 h。

10) 用 G25 凝胶柱纯化, 去除未结合的 ABEI 活化酯。

将上述的标记复合物按照实施例 1 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

实施例 3

1) 称取 5 mg HRP ($M=44000$) 溶解于 1 mL 蒸馏水中 (5 mg/mL)。

2) 于上述溶液中加入 1.5 mL 新配的 0.06 M NaIO_4 ($M=213.89$) 溶液, 混匀, 4°C 避光静置 30 min。

3) 加入 1.5 mL 0.16 M 乙二醇, 混匀, 室温放置 30 min。

4) 1 mg HIV-1 重组抗原 (2 mg/mL) 用 0.05 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液 4°C 透析 2 h, 然后立即加 NaIO_4 氧化的 HRP 3 mg, 室温避光轻轻搅拌 2 h。

5) 加入 150 μL 新配的 2 mg/mL NaBH_4 ($M=37.83$) 溶液, 混匀后 4°C 静置 2 h。

6) 将上述液装入透析袋中, 对 0.01M pH7.4 PBS 4°C 透析过夜。

7) 选用截留量 3500 的透析袋, 量取合适的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏 3 次 (以无漏液为宜);

8) 取 0.5 mg 经过一次标记 HRP 的 HIV-1 重组抗原, 用 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调体积至 0.5 mL, 扎紧透析袋另一端后放入 pH 9.5 碳酸盐缓冲液透析液中透析 1 h, 速度 400

转/分钟；

9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入 2 mL 容积的玻璃瓶中，加入 25 μg ABEI 活化酯，室温振摇反应 1.5 h。

10) 用 G25 凝胶柱纯化，去除未结合的 ABEI 活化酯。

将上述的标记复合物按照实施例 1 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

实施例 4

1) 称取 5 mg HRP ($M=44000$) 溶解于 1 mL 蒸馏水中 (5 mg/mL)。

2) 于上述溶液中加入 1.0 mL 新配的 0.06 M NaIO_4 ($M=213.89$) 溶液，混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置 30 min。

3) 加入 1.5 mL 0.16 M 乙二醇，混匀，室温放置 30 min。

4) 1 mg HIV-1 重组抗原 (2 mg/mL) 用 0.05 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 2 h，然后立即加 NaIO_4 氧化的 HRP 2 mg，室温避光轻轻搅拌 2 h。

5) 加入 100 μL 新配的 2 mg/mL NaBH_4 ($M=37.83$) 溶液，混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h。

6) 将上述液装入透析袋中，对 0.01M pH7.4 PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。

7) 选用截留量 3500 的透析袋，量取合适的尺寸，润湿后扎紧一端，纯化水试漏 3 次 (以无漏液为宜)；

8) 取 0.5 mg 经过一次标记 HRP 的 HIV-1 重组抗原，用 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调体积至 0.5 mL，扎紧透析袋另一端后放入 pH 9.5 碳酸盐缓冲液透析液中透析 1 h，速度 400 转/分钟；

9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入 2 mL 容积的玻璃瓶中，加入 25 μg ABEI 活化酯，室温振摇反应 1.5 h。

10) 用 G25 凝胶柱纯化，去除未结合的 ABEI 活化酯。

将上述的标记复合物按照实施例 1 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

试剂盒组份主要包括以下：

a. 包被链霉亲和素 (SA) 的磁性微球溶液

链霉亲和素浓度：20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 磁性微球浓度：1.0 mg/mL

磁性微球溶液中含有 0.25 M 磷酸盐缓冲液，0.3 M NaCl，0.15% BSA，0.05% TritonX-100，

其 pH 值为 7.4。

b. 二次标记 HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液

HIV-1 重组抗原浓度：10 $\mu\text{g/L}$ 标记复合物浓度：0.2 mg/L

标记复合物稀释液中含有 0.2 g/L 酪蛋白、1.5 g/L Tris-base、6.0 g/L 氯化钠、10.0 g/L 丙三醇、0.6 mL/L 吐温-20、250 mM/L 的 EDTA、2% 的蔗糖、0.4 M/L 甘氨酸、25% 的小牛血清，pH 为 7.8。

c. 生物素（Biotin）化的 HIV-1 重组抗原溶液

HIV-1 重组抗原浓度：10 $\mu\text{g/L}$ 生物素浓度：0.1 $\mu\text{g/L}$

生物素（Biotin）化的 HIV-1 重组抗原稀释液中含 2.0 g/L 的 Tris(纯度 $\geq 99\%$)、1.2 g/L 的 NaCl(分析纯)、0.1% TritonX-100 和 0.5 g/L 的 BSA (纯度 $\geq 99\%$)、0.1% HCl(分析纯，纯度为 36%-38%)，pH 为 7.5

所述各组份均含有 0.2% 的 ProClin300 作为防腐剂。

实施例 5

- 1) 称取 5 mg HRP ($M=44000$) 溶解于 1 mL 蒸馏水中 (5 mg/mL)。
- 2) 于上述溶液中加入 1.0 mL 新配的 0.06 M NaIO_4 ($M=213.89$) 溶液，混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置 30 min。
- 3) 加入 1.5 mL 0.16 M 乙二醇，混匀，室温放置 30 min。
- 4) 1 mg HIV-1 重组抗原 (2 mg/mL) 用 0.05 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 2 h，然后立即加 NaIO_4 氧化的 HRP 2 mg，室温避光轻轻搅拌 2 h。
- 5) 加入 100 μL 新配的 2 mg/mL NaBH_4 ($M=37.83$) 溶液，混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h。
- 6) 将上述液装入透析袋中，对 0.01M pH7.4 PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。
- 7) 选用截留量 3500 的透析袋，量取合适的尺寸，润湿后扎紧一端，纯化水试漏 3 次（以无漏液为宜）；
- 8) 取 0.5 mg 经过一次标记 HRP 的 HIV-1 重组抗原，用 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调体积至 0.5 mL，扎紧透析袋另一端后放入 pH 9.5 碳酸盐缓冲液透析液中透析 1 h，速度 400 转/分钟；
- 9) 将上述透析好的标记复合物中间品装入 2 mL 容积的玻璃瓶中，加入 25 μg ABEI 活化酯，室温振荡反应 1.5 h。
- 10) 用 G25 凝胶柱纯化，去除未结合的 ABEI 活化酯。

将上述的标记复合物按照实施例 1 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

试剂盒组份主要包括以下：

a. 包被羊抗 FITC 的磁性微球溶液

羊抗 FITC 的原浓度：20 $\mu\text{g/L}$ 磁性微球浓度：1.0 mg/mL

磁性微球溶液中含有 0.25 M 磷酸盐缓冲液，0.3 M NaCl，0.15% BSA，0.05% TritonX-100，其 pH 值为 7.4。

b. 二次标记 HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液

HIV-1 重组抗原浓度：10 $\mu\text{g/L}$ 标记复合物浓度：0.2 mg/L

标记复合物稀释液中含有 0.2 g/L 酪蛋白、1.5 g/L Tris-base、6.0 g/L 氯化钠、10.0 g/L 丙三醇、0.6 mL/L 吐温-20、250 mM/L 的 EDTA、2% 的蔗糖、0.4 M/L 甘氨酸、25% 的小牛血清，pH 为 7.8。

c. FITC 标记的 HIV-1 重组抗原溶液

HIV-1 重组抗原浓度：10 $\mu\text{g/L}$ FITC 的浓度：0.1 $\mu\text{g/L}$

d. 试剂盒缓冲液

试剂盒缓冲液含 2.0 g/L 的 Tris(纯度 $\geq 99\%$)、1.2 g/L 的 NaCl(分析纯)、0.1% TritonX-100 和 0.5 g/L 的 BSA(纯度 $\geq 99\%$)、0.1% HCl(分析纯，纯度为 36%-38%)，pH 为 7.5。

所述各组份均含有 0.2% 的 ProClin300 作为防腐剂。

实施例 6

将上述实施例 1 中的 HRP 的标记工艺替换为碱性磷酸酶的标记，并将标记复合物中间品二次标记 ABEI。具体标记步骤如下：

将 100 μL 碱性磷酸酯酶加入到 300 μL 10mM PBS (pH7.2)，再加入 40 μL 25% 的戊二醛，混匀，4 摄氏度反应 20 小时；透析至 10 mM PBS (pH7.2)，24 小时，换液 4 次；将 HIV-1 重组抗原用 10 mM PBS (pH7.2) 配成 2 mg/mL；将 250 μL HIV-1 重组抗原加入经过透析的碱性磷酸酶中（终浓度为 5000 U AP/mg HIV-1 重组抗原），混匀，4 摄氏度反应 24 小时。将上述透析好的标记复合物中间品装入 2 mL 容积的玻璃瓶中，加入 25 μg ABEI 活化酯，室温振荡反应 1.5 h。用 G25 凝胶柱纯化，去除未结合的 ABEI 活化酯。

将上述的标记复合物按照实施例 1 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

实施例 7

将上述实施例 1 中的 HRP 的标记工艺替换为牛血清白蛋白(BSA)的标记, 并将标记复合物中间品二次标记 ABEI。具体标记步骤如下:

将 100 μ L BSA 加入到 300 μ L 10mM PBS (pH7.2), 再加入 40 μ L 25%的戊二醛, 混匀, 4 摄氏度反应 20 小时; 透析至 10 mM PBS (pH7.2), 24 小时, 换液 4 次; 将 HIV-1 重组抗原用 10 mM PBS (pH7.2) 配成 2 mg/mL; 将 250 μ L HIV-1 重组抗原加入经过透析的 BSA 中(终浓度为 1mg BSA/mg HIV-1 重组抗原), 混匀, 4 摄氏度反应 24 小时。将上述透析好的标记复合物中间品装入 2 mL 容积的玻璃瓶中, 加入 25 μ g ABEI 活化酯, 室温振摇反应 1.5 h。用 G25 凝胶柱纯化, 去除未结合的 ABEI 活化酯。

将上述的标记复合物按照实施例 1 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

对比例 1

1) 选用截留量 3500 的透析袋, 量取合适的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏 3 次(以无漏液为宜);

2) 取 0.5 mg HIV-1 重组抗原 (2 mg/mL), 用 0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调体积至 0.5 mL, 扎紧透析袋另一端后放入 pH 9.5 碳酸盐缓冲液透析液中透析 1 h, 速度 400 转/分钟;

3) 将上述透析好的标记复合物中间品装入 2 mL 容积的玻璃瓶中, 加入 25 μ g ABEI 活化酯, 室温振摇反应 1.5 h;

4) 用 G25 凝胶柱纯化, 去除未结合的 ABEI 活化酯。

将上述的标记复合物按照实施例 1 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

对比例 2

将上述对比例 1 中的直接标记的标记复合物按照实施例 4 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

对比例 3

将上述对比例 1 中的直接标记的标记复合物按照实施例 5 中的方案配制成试剂盒并对其灵敏度和加速热稳定性进行评估。

实验数据和结果分析

利用 HIV 阴性样本 S6 对倍稀释中度阳性样本 S1 获得 S2, 并依次稀释获得 S3、S4、S5。将以上样本作为检测样本, 利用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的全自动化学发光免疫分析仪 Maglumi 2000 Plus 测定其光强度 (RLU)。

上述实施例及对比例中得到的产品的灵敏度检测结果见表 1 至表 3。

表 1

灵敏度 参考品	对比例 1	实施例 1		实施例 2		实施例 3	
	(RLU)	(RLU)	相对偏差	(RLU)	相对偏差	(RLU)	相对偏差
S1	215032	338917	58%	363668	69%	330832	54%
S2	126390	171963	36%	194806	54%	169737	34%
S3	70134	98012	40%	114540	63%	95831	37%
S4	38648	56675	47%	64515	67%	55820	44%
S5	23580	35466	50%	37336	58%	34896	48%
S6	11845	12135	2%	12657	7%	12302	4%

表 2

灵敏度 参考品	对比例 2	实施例 4		对比例 3	实施例 5	
	(RLU)	(RLU)	相对偏差	(RLU)	(RLU)	相对偏差
S1	206578	318345	54%	230434	343636	49%
S2	126395	174804	38%	137746	184701	34%
S3	64710	89725	39%	64193	103566	61%
S4	36257	48492	34%	39233	54586	39%
S5	21461	26130	22%	22650	34558	53%
S6	12399	11762	-5%	12456	12055	-3%

表 3

灵敏度 参考品	对比例 1	实施例 6		实施例 7	
	(RLU)	(RLU)	相对偏差	(RLU)	相对偏差
S1	215032	315787	47%	328770	53%
S2	126390	169209	34%	177332	40%
S3	70134	94173	34%	102532	46%
S4	38648	57626	49%	54657	41%
S5	23580	31023	32%	33609	43%
S6	11845	12036	2%	11785	-1%

由表 1 中结果可知，实施例 1、实施例 2 和实施例 3 对标记蛋白 HRP 投料比例的研究表明：HIV-1 重组抗原与 HRP 的投料比例为 1:2 时较两者投料比为 1:1 和 1:3 效果更优；同时，这三个实施例较对比例 1 均有较大幅度的提升。

表 2 中结果可知：实施例 4 与对比例 2 的结果和实施例 5 与对比例 3 的结果进一步表明 HIV-1 重组抗原通过二次标记的标记复合物对 HIV-1 抗体的检测灵敏度有较大幅度的提升。

表 3 中结果可知：实施例 6 和实施例 7 选择不同的标记蛋白 ALP 和 BSA 进行一次标记，再进行 ABEI 的二次标记，相对于对比例 1 的直接标记均有明显提高检测灵敏度的效果。

因此，通过二次标记的标记复合物其检测灵敏度要高于直接标记。由于标记蛋白标记抗原可以使一个抗原上带有多个标记蛋白，而进行二次标记信号生成物质时，一个标记蛋白又与多个信号生成物质结合，产生有效的信号放大作用，从而提高了 HIV-1 抗体检测的灵敏度，有利于缩短 HIV-1 抗体检测的窗口期。

将试剂分别置于 37℃ 恒温恒湿箱中进行加速实验，实验持续 8 天。以高值阳性样本作为检测样本，利用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的全自动化学发光免疫分析仪 Maglumi 2000 Plus 测定加速实验前后的光强度（RLU）。

不同实施例高温加速热稳定性对比见表 4 至表 6。

表 4

实施例	对比例 1		实施例 1		实施例 2		实施例 3	
37 °C 处理	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)
第 0 天	623002	-	1012527	-	1132528	-	972531	-
第 1 天	452922	-37.55%	1007465	-0.50%	1123468	-0.81%	957943	-1.52%
第 2 天	414424	-50.33%	998398	-1.42%	1114480	-1.62%	956027	-1.73%
第 3 天	389558	-59.93%	990410	-2.23%	1105564	-2.44%	947423	-2.65%
第 4 天	365016	-70.68%	982487	-3.06%	1098931	-3.06%	940791	-3.37%
第 5 天	338370	-84.12%	962837	-5.16%	1086842	-4.20%	923857	-5.27%
第 6 天	308932	-101.66%	955135	-6.01%	1081408	-4.73%	922009	-5.48%
第 7 天	284217	-119.20%	953224	-6.22%	1074920	-5.36%	921087	-5.59%

表 5

实施例	对比例 2		实施例 4		对比例 3		实施例 5	
37 °C 处理	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)
第 0 天	621248	-	1032362	-	603357	-	1089629	-

第 1 天	444814	-39.66%	1010683	-2.15%	432004	-39.66%	1076553	-1.21%
第 2 天	406115	-52.97%	999565	-3.28%	401331	-50.34%	1072247	-1.62%
第 3 天	378499	-64.13%	985571	-4.75%	368824	-63.59%	1051874	-3.59%
第 4 天	353140	-75.92%	979658	-5.38%	345588	-74.59%	1050822	-3.69%
第 5 天	329126	-88.76%	974760	-5.91%	316904	-90.39%	1028755	-5.92%
第 6 天	301809	-105.84%	966961	-6.76%	290601	-107.62%	1022582	-6.56%
第 7 天	287925	-115.77%	959226	-7.62%	274037	-120.17%	1017470	-7.09%

表 6

实施例	实施例 6		实施例 7		对比例 1	
37 °C 处理	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)	检测值 (RLU)	偏差 (%)
第 0 天	1042528	-	1072526	-	623002	-
第 1 天	1037315	-0.50%	1041423	-2.99%	452922	-37.55%
第 2 天	1015531	-2.66%	1009139	-6.28%	414424	-50.33%
第 3 天	986081	-5.72%	1002075	-7.03%	389558	-59.93%
第 4 天	981150	-6.26%	992054	-8.11%	365016	-70.68%
第 5 天	970358	-7.44%	976181	-9.87%	338370	-84.12%
第 6 天	969387	-7.54%	972277	-10.31%	308932	-101.66%
第 7 天	959694	-8.63%	963526	-11.31%	284217	-119.20%

由表 4、表 5 和表 6 中结果可知，通过二次标记的标记复合物，HIV-1 重组抗原仍保持较高的免疫反应活性，经过 37°C 高温加速 7 天下降幅度在 10% 左右；而直接标记的标记复合物在第一天就下降了 40% 左右，并且呈现持续下降的趋势；对比结果可知，经过二次标记的标记复合物的稳定性改善十分明显。

HIV-1 重组抗原受到物理或化学因素影响时，其分子内部的二、三、和四级结构会发生变化，抗原的构象发生改变，导致抗原表位被覆盖，引起抗原的免疫反应活性下降或者丧失。而通过标记蛋白与抗原的功能基团偶联，维持抗原的构象或者使构象改变但不会导致抗原表位被覆盖，从而能够保持抗原的免疫反应活性。

从以上的描述中，可以看出，本发明上述的实施例实现了如下技术效果：

- 1) 通过二次标记提高重组抗原经过标记后的标记复合物的稳定性,有利于保证试剂盒的性能;
- 2) 提高了检测的灵敏度,从而有利于缩短检测的窗口期,且有利于节省原料;
- 3) 避免了间接标记需要寻找合适的小分子或者标签蛋白及相对应的可识别的配体以及增加重组抗原表达的难度和增加试剂组份等难题。
- 4) 将 HIV 抗原进行二次标记, HIV 抗原保持较高的免疫反应活性,并且标记复合物的稳定性改善十分明显
- 5) 解决了 HIV 抗原直接标记后,标记复合物的稳定性不足和灵敏度不够,不足以满足试剂的性能的问题。

以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种标记复合物，其特征在于，包括：
 抗原；
 标记蛋白，与所述抗原偶联形成标记复合物中间品；以及
 信号生成物，与所述标记复合物中间品偶联形成所述标记复合物。
2. 根据权利要求 1 所述的标记复合物，其特征在于，所述抗原为重组抗原或天然抗原。
3. 根据权利要求 2 所述的标记复合物，其特征在于，所述抗原为 HIV-1 重组抗原、HIV-2 重组抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、人类 T 淋巴细胞病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、幽门螺旋杆菌抗原或人乳头瘤病毒抗原；优选的，所述抗原为 HIV-1 重组抗原或 HIV-2 重组抗原。
4. 根据权利要求 1 所述的标记复合物，其特征在于，所述标记蛋白表面带有功能基团，所述功能基团为羧基、氨基、羟基、巯基、醛基、糖基和咪唑基中的至少一种，所述功能基团与所述抗原上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联。
5. 根据权利要求 4 所述的标记复合物，其特征在于，所述标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵白蛋白、牛 IgG、鼠 IgG、羊 IgG、兔 IgG、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或 β -半乳糖苷酶，优选的，所述标记蛋白为辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白或碱性磷酸酶。
6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的标记复合物，其特征在于，所述信号生成物为鲁米诺、异鲁米诺及异鲁米诺衍生物、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光物质、稀土离子及其螯合物配基、吖啶酯及其衍生物或三联吡啶钌；优选的，所述异鲁米诺衍生物为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺。
7. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的标记复合物，其特征在于，所述标记蛋白和所述信号生成物为不同的物质。
8. 一种如权利要求 1 至 7 中任一项所述的标记复合物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：
 将表面带有功能基团的标记蛋白与抗原进行偶联反应，得到标记复合物中间品；
 将信号生成物质与所述标记复合物中间品进行偶联反应，得到所述标记复合物。
9. 根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，所述偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法；

优选的,所述偶联反应中用到的交联剂为基于 NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

10. 根据权利要求 8 所述的制备方法,其特征在于,所述标记蛋白与所述抗原进行偶联反应时,所述标记蛋白和所述抗原的摩尔比为 1:1-3:1。
11. 根据权利要求 8 所述的制备方法,其特征在于,所述偶联反应中用到的缓冲液为 pH 为 4.0-6.5 的 PBS 缓冲液、pH 为 8.0-9.8 的碳酸盐缓冲液、pH 为 7.0-8.0 的 0.5%-5%的戊二醛溶液或 pH 为 4.0-6.0 的 MES 缓冲液。
12. 根据权利要求 8 所述的制备方法,其特征在于,所述标记复合物中间品或所述标记复合物制备完成后放入储存液中保存,所述储存液包括: 0.2-0.5 g/L 磷酸二氢钾、3.0-6.0 g/L 磷酸氢二钠、4.0-8.0 g/L 氯化钠、0.5-1.5 g/L BSA, 0.25-0.5 g/L 叠氮钠和 0.25-0.5 mL/L 吐温-20。
13. 一种检测试剂盒,其特征在于,包括如权利要求 1 至 7 中任一项所述的标记复合物或权利要求 8 至 12 中任一项所述制备方法制备得到的标记复合物。
14. 根据权利要求 13 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒进一步包括:
 - 包被抗原的磁性微球溶液;或
 - 包被链霉亲和素的磁性微球溶液和生物素化的抗原溶液;或
 - 包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液和标记异硫氰酸荧光素的抗原溶液。
15. 根据权利要求 14 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒为检测 HIV-1 抗体的试剂盒,含有 HIV-1 重组抗原的标记复合物;

优选的,所述试剂盒具体包括:

包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液和 HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液;或

包被链霉亲和素的磁性微球溶液、HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液和生物素化的 HIV-1 重组抗原溶液;或

包被抗异硫氰酸荧光素抗体的磁性微球溶液、标记异硫氰酸荧光素的 HIV-1 重组抗原溶液和 HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液;

优选的,包被 HIV-1 重组抗原的磁性微球溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$;

优选的,磁性微球浓度为 0.25-1.25 mg/mL;

优选的, 所述 HIV-1 重组抗原的标记复合物溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$;

优选的, HIV-1 重组抗原的标记复合物浓度为 0.1-1 mg/L ;

优选的, 所述生物素化的 HIV-1 重组抗原溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$, 生物素浓度为 0.1-1 mg/L ;

优选的, 所述标记异硫氰酸荧光素的 HIV-1 重组抗原溶液中 HIV-1 重组抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$, 异硫氰酸荧光素浓度为 0.1-1 mg/L 。

16. 如权利要求 13 至 15 中任一项所述的试剂盒在免疫检测中的应用, 其特征在于, 标记蛋白与被检测蛋白为非源性蛋白。
17. 根据权利要求 16 所述的应用, 其特征在于, 所述试剂盒用于检测 HIV-1 抗体、HIV-2 抗体、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、庚型肝炎病毒、人类 T 淋巴细胞病毒、梅毒螺旋体抗体、幽门螺旋杆菌抗体或人乳头瘤病毒抗体。
18. 根据权利要求 16 或 17 所述的应用, 其特征在于, 所述试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪。
19. 一种检测系统, 其特征在于, 包括: 如权利要求 13 至 15 中任一项所述的试剂盒和半自动或全自动免疫分析仪。

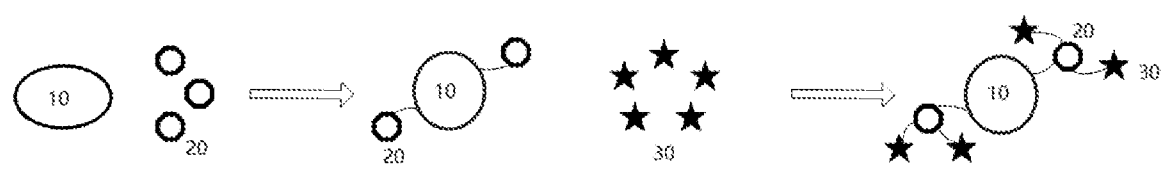


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/071968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/569 (2006.01) i; G01N 21/76 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTEXT, TWTEXT, CNABS, CNKI, WANFANG, DWPI, EPTXT, USTXT, WOTXT, NCBI, ISI-WEB OF KNOWLEDGE, GOOGLE SCHOLAR: 荧光, 化学发光, 底物, 酶, 两次标记, 标记, 双, 共同, 辣根过氧化物酶, 异鲁米, 标记蛋白, 二次标记, 偶联, 碱性磷酸酶, 鲁米诺, 抗原, 血清白蛋白, 复合物, ABEI 活化酯, 乙基异鲁米, 葡萄糖氧化酶, HIV, 信号, 吡啶钉, chemiluminescent, label, substrate, luminol, activator, trigger, couple, tracer, horse radish peroxidase, HRP, ABEI, conjugate, conjugation, enzyme, BSA, complex

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101051047 A (ZHANG, Wei), 10 October 2007 (10.10.2007), see entire document, particularly abstract, and claim 1	1-19
A	CN 102333885 A (BECKMAN COULTER, INC.), 25 January 2012 (25.01.2012), see entire document, particularly abstract	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 19 October 2017	Date of mailing of the international search report 26 October 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer TIAN, Yuan Telephone No. (86-10) 62411047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/071968

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101051047 A	10 October 2007	None	
CN 102333885 A	25 January 2012	MX 2011009020 A	29 September 2011
		EP 2401393 A1	04 January 2012
		CA 2753596 A1	02 September 2010
		KR 20110137324 A	22 December 2011
		US 2010273189 A1	28 October 2010
		WO 2010099479 A1	02 September 2010
		AU 2010217839 A1	15 September 2011
		JP 2012519284 A	23 August 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/071968

A. 主题的分类 G01N 33/569(2006.01)i; G01N 21/76(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类											
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNTXT, TWTXT, CNABS, CNKI, WANFANG, DWPI, EPTXT, USTXT, WOTXT, NCBI, ISI-WEB OF KNOWLEDGE, GOOGLE SCHOLAR: 荧光, 化学发光, 底物, 酶, 两次标记, 标记, 双, 共同, 辣根过氧化物酶, 异鲁米, 标记蛋白, 二次标记, 偶联, 碱性磷酸酶, 鲁米诺, 抗原, 血清白蛋白, 复合物, ABEI活化酯, 乙基异鲁米, 葡萄糖氧化酶, HIV, 信号, 吡啶钉, chemiluminescent, label, substrate, luminol, activator, trigger, couple, tracer, horse radish peroxidase, HRP, ABEI, conjugate, conjugation, enzyme, BSA, complex											
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 101051047 A (张薇) 2007年 10月 10日 (2007 - 10 - 10) 参见全文, 特别是摘要, 权利要求1</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102333885 A (贝克曼考尔特公司) 2012年 1月 25日 (2012 - 01 - 25) 参见全文, 特别是摘要</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 101051047 A (张薇) 2007年 10月 10日 (2007 - 10 - 10) 参见全文, 特别是摘要, 权利要求1	1-19	A	CN 102333885 A (贝克曼考尔特公司) 2012年 1月 25日 (2012 - 01 - 25) 参见全文, 特别是摘要	1-19
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
A	CN 101051047 A (张薇) 2007年 10月 10日 (2007 - 10 - 10) 参见全文, 特别是摘要, 权利要求1	1-19									
A	CN 102333885 A (贝克曼考尔特公司) 2012年 1月 25日 (2012 - 01 - 25) 参见全文, 特别是摘要	1-19									
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。											
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件											
国际检索实际完成的日期 2017年 10月 19日		国际检索报告邮寄日期 2017年 10月 26日									
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 田园 电话号码 (86-10)62411047									

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/071968

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101051047	A	2007年 10月 10日	无			
CN	102333885	A	2012年 1月 25日	MX	2011009020	A	2011年 9月 29日
				EP	2401393	A1	2012年 1月 4日
				CA	2753596	A1	2010年 9月 2日
				KR	20110137324	A	2011年 12月 22日
				US	2010273189	A1	2010年 10月 28日
				WO	2010099479	A1	2010年 9月 2日
				AU	2010217839	A1	2011年 9月 15日
				JP	2012519284	A	2012年 8月 23日