



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102645530 B

(45) 授权公告日 2014.06.18

(21) 申请号 201210099593.2

US 2010/0047825 A1, 2010.02.25, 全文.

(22) 申请日 2012.04.06

王晓静 等. 人促甲状腺激素酶联免疫吸附分析试剂盒的研制.《同位素》.2002, 第15卷(第2期), 97-99.

(73) 专利权人 上海蓝怡科技有限公司
地址 201100 上海市闵行区友东路 85 号

靳辉. 化学发光免疫分析在游离甲状腺素测定中的应用研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2012, E060-43.

(72) 发明人 李子樵 曹纹野

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

段学军. 游离甲状腺素 (FT₄) 酶联免疫分析方法的建立.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2003, E060-10.

代理人 崔佳佳 马莉华

(51) Int. Cl.

审查员 赵晓明

G01N 33/535 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101865916 A, 2010.10.20, 第 0030 段.

CN 101443445 A, 2009.05.27, 第 10 页第 4-7

行.

CN 1217194 C, 2005.08.31, 全文.

CN 101523220 A, 2009.09.02, 全文.

EP 2031390 A1, 2009.03.04, 全文.

EP 2144063 A1, 2010.01.13, 全文.

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物体外诊断试剂技术领域,具体涉及一种甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法,其步骤为:在 500ml 的蒸馏水中依次加入下列试剂,待前一种溶解后再加入后一种;Tris ;HCL ; 明胶 ;BSA ;ANS ; Tween-20 ;Proclin300 ;酚红 ;待充分溶解后补足蒸馏水至 1L ;用 NaO 或 HCL 调 PH 值为 7.4。将浓缩酶结合物以所需的比例加入到上述酶稀释液中充分混匀。本发明同现有技术相比,通过改进酶联免疫体外诊断试剂中的酶稀释液来提高酶结合物的稳定性,提高灵敏度。

1. 一种甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法,包括以下步骤,在 500ml 蒸馏水中依次加入下列物质:

- A) 配制缓冲液, pH 值为 7.0-8.0;
- B) 在上述缓冲液中加入明胶,终浓度为 0.3-1.3g/L,加热搅拌,使其充分溶解;
- C) 加入 BSA,浓度为 0.5-1.5g/L,搅拌,使其充分溶解;
- D) 加入解离剂,浓度为 0.2-1.2g/L,搅拌,使其充分溶解;
- E) 加入 Tween-20,浓度为 0.1ml/L-1.2ml/L,搅拌,使其充分溶解;
- F) 加入 Proclin300,浓度为 0.2-1.2g/L,搅拌,使其充分溶解;
- G) 加入酚红 1% 的无水乙醇溶液 1ml,终浓度为 1-2ml/L,搅拌,使其充分溶解;
- H) 待充分溶解后补足蒸馏水至 1L;
- I) 最后用 10M NaOH 或 10M HCl 调 pH 值为 7.0-8.0 得到酶稀释液;
- J) 将浓缩酶结合物以所需的比例加入到上述酶稀释液中充分混匀即可;

其中,所述缓冲液为浓度为 0.01-0.2M Tris-HCl 缓冲液;且所述解离剂为 ANS 解离剂。

2. 根据权利要求 1 所述的甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法,其特征在于:所述的酶结合物为使辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶与抗原或抗体通过化学交联而成的复合物。

甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法

[技术领域]

[0001] 本发明属于生物体外诊断试剂技术领域,具体涉及一种甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法。

[背景技术]

[0002] ELISA 试剂的具体检测方法很多,各种方法都不可缺少酶结合物。酶结合物在 ELISA 实际中非常关键,其灵敏度、显色背景和稳定性对试剂质量至关重要。高灵敏度、低显色背景和良好的稳定性是高品质 ELISA 试剂所要达到的基本要求。酶结合物的灵敏度在很大程度上是由其自身的性质决定的,但酶结合物所用稀释液对其灵敏度有一定的影响,酶稀释液的良好与否还对酶结合物的稳定性和显色背景有非常明显影响。因此,制备性能良好的酶稀释液是 ELISA 试剂生产的重要环节。

[0003] 常见的用于甲状腺素酶稀释液一般使用缓冲系统(如 PBS)、小牛血清(或牛血清白蛋白等)、解离剂、防腐剂及表面活性剂等制备而成。但用该稀释液制备的工作浓度酶结合物稳定性较差,有效期很短。为了保持酶结合物的稳定,传统的酶联免疫体外诊断试剂中的酶结合物是以浓缩液的形式储存的,当使用时用酶稀释液作适当倍数的稀释,现配现用,一般在 2-8℃ 保存不超过一周。用户使用比较麻烦,而且往往由于稀释液误差造成实验结果不准确。

[0004] 如何提高酶联免疫体外诊断试剂中的酶结合物的稳定性,又能方便检验人员的使用,是众多诊断试剂制造商长期以来努力解决的问题。

[发明内容]

[0005] 本发明为了克服现有技术的不足,提供了一种甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明设计了一种甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法,包括以下步骤,在 500ml 蒸馏水中依次加入下列物质:

[0007] A) 配制缓冲液, pH 值为 7.0-8.0;

[0008] B) 在上述缓冲液中加入明胶,终浓度为 0.3-1.3g/L,加热搅拌,使其充分溶解;

[0009] C) 加入 BSA,浓度为 0.5-1.5g/L,搅拌,使其充分溶解;

[0010] D) 加入解离剂,浓度为 0.2-1.2g/L,搅拌,使其充分溶解;

[0011] E) 加入 Tween-20,浓度为 0.1ml/L-1.2ml/L,搅拌,使其充分溶解;

[0012] F) 加入 Proclin300,浓度为 0.2-1.2g/L,搅拌,使其充分溶解;

[0013] G) 加入酚红 1% 的无水乙醇溶液 1ml,终浓度为 1-2ml/L,搅拌,使其充分溶解;

[0014] H) 待充分溶解后补足蒸馏水至 1L;

[0015] I) 最后用 10M NaOH 或 10M HCL 调 pH 值为 7.0-8.0 得到酶稀释液;

[0016] J) 将浓缩酶结合物以所需的比例加入到上述酶稀释液中充分混匀即可。

[0017] 所述缓冲液为浓度为 0.05M-0.2M PBS 或浓度为 0.01-0.2M Tris-HCL 缓冲液。

[0018] 所述解离剂为 ANS 解离剂。

[0019] 所述的酶结合物为使辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶与抗原或抗体通过化学交联而成的复合物。

[0020] 所述浓缩酶结合物与酶稀释液的比例为 1:2000。

[0021] 本发明同现有技术相比,通过改进酶联免疫体外诊断试剂中的酶稀释液来提高酶结合物的稳定性,提高灵敏度。

[0022] [具体实施方式]

[0023] 下面结合实施例对本发明作进一步描述。

[0024] 实施例 1:

[0025] 在 500ml 蒸馏水中依次加入下列物质。

[0026] A) 配置 Tris-HCL 缓冲液,其中 Tris 12.11g;HCL 49ml;缓冲液的 pH 值为 7.0-8.0。

[0027] B) 在上述缓冲液中加入明胶 0.5g,终浓度为 0.3-1.3g/L,加热搅拌,使其充分溶解。

[0028] C) 加入 BSA 0.5g,浓度为 0.5-1.5g/L,搅拌,使其充分溶解。

[0029] D) 加入 ANS 0.5g,浓度为 0.2-1.2g/L,搅拌,使其充分溶解。

[0030] E) 加入 Tween-200.5ml,浓度为 0.1ml/L-1.2ml/L,搅拌,使其充分溶解。

[0031] F) 加入 Proclin3000.5ml,浓度为 0.2-1.2g/L,搅拌,使其充分溶解。

[0032] G) 加入酚红(1%的无水乙醇溶液)1ml,终浓度为 1-2ml/L,搅拌,使其充分溶解。

[0033] H) 待充分溶解后补足蒸馏水至 1L。

[0034] I) 最后用 10M NaOH 或 10M HCL 调 pH 值为 7.4 得到酶稀释液。

[0035] J) 将浓缩酶结合物以 1:2000 的比例加入到上述酶稀释液中充分混匀即可。

[0036] 实验一:

[0037] 用抗 T4-HRP 酶结合物溶液(1:2000)检测血清或血浆标本中的 T4,采用如下步骤:

[0038] (1) 在已包被 T4-IgG 抗原的微孔板中依次加入标本 50u1,同时做两孔阴性对照、一孔阳性对照、一孔空白对照,然后每孔(除空白对照孔外)加入本发明实施例 1 制备的抗 T4-HRP 酶结合物溶液 50u1,置 37°C 孵育 30 分钟。

[0039] (2) 弃去孔内液体,用洗涤液洗板 5 次。

[0040] (3) 各孔加底物溶液 A 50u1,底物液 B 50u1,置 37°C 孵育 15 分钟。

[0041] (4) 各孔加终止液 50u1,终止反应。

[0042] (5) 将反应板置酶标仪比色计 450nm 波长处用空白孔校零,读取各孔 OD 值。

[0043] (6) 计算,CutOff 值=(阴性对照平均 OD 值+阳性对照平均 OD 值)X0.5。

[0044] (7) 结果判断:标本 OD 值小于 CutOff 值为阳性,大于或等于 CutOff 值为阴性。

[0045] 在已包被 T4-IgG 抗原的微孔板中加入经系列稀释的抗体,按照常规反应过程进行试验,分别对比传统甲状腺素酶结合物和本发明酶结合物,加显色剂显色,用 2M 硫酸溶液终止反应后,在酶标仪上读数,结果如下:

[0046]

项目	T4 含量 (ug/dl)	传统酶结合物 (1:2000)	本发明酶结合物 (1:2000)
灵敏度 (OD 值, $\lambda=450\text{nm}$)	0	2.453	2.667
	2	1.621	1.786
	5	0.932	1.060
	10	0.684	0.778
	15	0.462	0.591
	25	0.253	0.384
显色背景 (100 份阴性标本平均 OD 值)		0.898	0.932
储存形式		浓缩液	工作液
稳定性 (2-8°C 保存月数)		6	12

[0047] 以上数据表明,本发明同现有技术相比,通过改进酶联免疫体外诊断试剂中的酶稀释液来提高酶结合物的稳定性,提高灵敏度。

专利名称(译)	甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法		
公开(公告)号	CN102645530B	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201210099593.2	申请日	2012-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技有限公司		
[标]发明人	李子樵 曹纹野		
发明人	李子樵 曹纹野		
IPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	崔佳佳 马莉华		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN102645530A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物体外诊断试剂技术领域，具体涉及一种甲状腺素酶联免疫体外诊断试剂盒中酶结合物稀释液的制备方法，其步骤为：在500ml的蒸馏水中依次加入下列试剂，待前一种溶解后再加入后一种；Tris；HCL；明胶；BSA；ANS；Tween-20；Proclin300；酚红；待充分溶解后补足蒸馏水至1L；用NaO或HCL调PH值为7.4。将浓缩酶结合物以所需的比例加入到上述酶稀释液中充分混匀。本发明同现有技术相比，通过改进酶联免疫体外诊断试剂中的酶稀释液来提高酶结合物的稳定性，提高灵敏度。

项目	T4 含量 (ug/dl)	传统酶结合物 (1:2000)	本发明酶结合物 (1:2000)
灵敏度 (OD 值, $\lambda=450\text{nm}$)	0	2.453	2.667
	2	1.621	1.786
	5	0.932	1.060
	10	0.684	0.778
	15	0.462	0.591
	25	0.253	0.384
显色背景 (100 份阴性标本平均 OD 值)		0.898	0.932
储存形式		浓缩液	工作液
稳定性 (2-8°C 保存月数)		6	12