



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103913566 B

(45) 授权公告日 2016.01.06

(21) 申请号 201410143488.3 页 .
(22) 申请日 2014.04.11 US 3591341 ,1971.07.06,说明书第 2、3 栏 .
(73) 专利权人 苏州浩欧博生物医药有限公司 CN 103645181 A,2014.03.19,全文 .
地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街 WO 2010/077870 A2,2010.07.08,全文 .
218 号 审查员 苗君叶
(72) 发明人 李庆春 秦枫 王秀伟
(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103
代理人 孙仿卫 汪青
(51) Int. Cl.
G01N 33/531(2006.01)
G01N 21/78(2006.01)
(56) 对比文件
CN 102866249 A,2013.01.09,说明书
[0006]-[0010] 段 .
CN 101101294 A,2008.01.09,说明书第 2、3

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种酶联免疫显色底物及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种酶联免疫显色底物,所述的显色底物的 pH 为 4.0-4.5,由质量浓度为 0.9-1.5g/l 的一水合柠檬酸、质量浓度为 25-30g/l 的十二水磷酸氢二钠、质量浓度为 3-3.5g/l 的四甲基联苯胺盐酸盐、质量浓度为 0.15-0.3g/l 的乙二胺四乙酸二钠、与所述的显色底物的体积比为 0.01-0.02 的丙三醇、质量浓度为 0.095-0.1g/l 的焦磷酸钠、质量浓度为 0.008-0.01g/l 的锡酸钠、pH 调节剂和水组成。本发明采用四甲基联苯胺盐酸盐作为显色的主要成分,可以直接在水溶液条件下完全溶解,稳定性好、无需提前混合,简化了操作步骤,减少了批间差异。

1. 一种酶联免疫显色底物,其特征在于:所述的显色底物的 pH 为 4.0-4.5,由质量浓度为 0.9-1.5g/l 的一水合柠檬酸、质量浓度为 25-30g/l 的十二水磷酸氢二钠、质量浓度为 3-3.5g/l 的四甲基联苯胺盐酸盐、质量浓度为 0.15-0.3g/l 的乙二胺四乙酸二钠、与所述的显色底物的体积比为 0.01-0.02 的丙三醇、质量浓度为 0.095-0.1g/l 的焦磷酸钠、质量浓度为 0.008-0.01g/l 的锡酸钠、pH 调节剂和水组成。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫显色底物,其特征在于:所述的 pH 调节剂为浓度为 5-7M 的盐酸。

3. 一种如权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫显色底物的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

步骤(1)、将所述的一水合柠檬酸和所述的十二水磷酸氢二钠先溶解在部分所述的水中,用所述的 pH 调节剂调节 pH 为 4.0-4.5,然后再加入剩余的水定容至 1000ml,即得缓冲母液;

步骤(2)、将所述的四甲基联苯胺盐酸盐和所述的乙二胺四乙酸二钠加入到所述的缓冲母液中,搅拌溶解,得到混合溶液;

步骤(3)、将所述的丙三醇、所述的焦磷酸钠和所述的锡酸钠加入到所述混合溶液中,搅拌溶解 8-24 小时,即得所述的显色底物。

一种酶联免疫显色底物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物体外诊断试剂技术领域,具体涉及一种酶联免疫显色底物及其制备方法。

背景技术

[0002] 1971年瑞典学者 Engvail 和 Perlmann,荷兰学者 Van Weerman 和 Schuurs 分别报道将免疫技术发展为检测体液中微量物质的固相免疫测定方法,即酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)。ELISA 现在已成为目前分析化学领域中的前沿课题,它是一种特殊的试剂分析方法,是在免疫酶技术(immunoenzymatic techniques)的基础上发展起来的一种新型的免疫测定技术。

[0003] 基本原理:

[0004] 它采用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶连接,然后通过酶与底物产生颜色反应,用于定量测定。测定的对象可以是抗体也可以是抗原。

[0005] 在这种测定方法中有 3 种必要的试剂:

[0006] ①固相的抗原或抗体(免疫吸附剂)

[0007] ②酶标记的抗原或抗体(标记物)

[0008] ③酶作用的底物(显色剂)

[0009] 测量时,抗原(抗体)先结合在固相载体上,但仍保留其免疫活性,然后加一种抗体(抗原)与酶结合成的偶联物(标记物),此偶联物仍保留其原免疫活性与酶活性,当偶联物与固相载体上的抗原(抗体)反应结合后,再加上酶的相应底物,即起催化水解或氧化还原反应而呈颜色。

[0010] 其所生成的颜色深浅与欲测的抗原(抗体)含量成正比。这种有色产物可用肉眼、光学显微镜、电子显微镜观察,也可以用分光光度计(酶标仪)加以测定。其方法简单,方便迅速,特异性强。

[0011] 目前显色底物配制方法很多,市售的显色底物不仅价格昂贵,而且储存有效期短,在使用过程中对操作的准确性要求高;有很多实验室自行配制,但配制方法多种多样没有统一的标准和规范;在研究论文中使用的显色底物也是五花八门,对于检测数据的对比及验证造成了困难。并且,目前所用的显色底物多采用四甲基联苯胺(如 CN102866249A 和 CN103063661A),需要使用 DMSO 溶解四甲基联苯胺,并且目前的显色底物多是由两种溶液组成,使用时需要将两种溶液按照一定比例预先混合。因此需要研制用于生物体外诊断的灵敏高效、稳定、易用及配置简单的显色底物是当务之急。

发明内容

[0012] 本发明所要解决的技术问题是提供一种使用时不用预先混合的酶联免疫显色底物。

[0013] 本发明所要解决的另一技术问题是提供上述显色底物的制备方法。

[0014] 为解决以上技术问题,本发明采取如下技术方案:

[0015] 一种酶联免疫显色底物,所述的显色底物的 pH 为 4.0-4.5,由质量浓度为 0.9-1.5g/l 的一水合柠檬酸、质量浓度为 25-30g/l 的十二水磷酸氢二钠、质量浓度为 3-3.5g/l 的四甲基联苯胺盐酸盐、质量浓度为 0.15-0.3g/l 的乙二胺四乙酸二钠、与所述的显色底物的体积比为 0.01-0.02 的丙三醇、质量浓度为 0.095-0.1g/l 的焦磷酸钠、质量浓度为 0.008-0.01g/l 的锡酸钠、pH 调节剂和水组成。

[0016] 优选地,所述的 pH 调节剂为浓度为 5-7M 的盐酸。

[0017] 一种上述酶联免疫显色底物的制备方法,包括如下步骤:

[0018] 步骤(1)、将所述的一水合柠檬酸和所述的十二水磷酸氢二钠先溶解在部分所述的水中,用所述的 pH 调节剂调节 pH 为 4.0-4.5,然后再加入剩余的水定容至 1000ml,即得缓冲母液;

[0019] 步骤(2)、将所述的四甲基联苯胺盐酸盐和所述的乙二胺四乙酸二钠加入到所述的缓冲母液中,搅拌溶解,得到混合溶液;

[0020] 步骤(3)、将所述的丙三醇、所述的焦磷酸钠和所述的锡酸钠加入到所述混合溶液中,搅拌溶解 8-24 小时,即得所述的显色底物。

[0021] 由于以上技术方案的实施,本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0022] 本发明采用四甲基联苯胺盐酸盐作为显色的主要成分,取代了过去的四甲基联苯胺,其优势是,不用单独使用 DMSO 溶解四甲基联苯胺,四甲基联苯胺盐酸盐可以直接在水溶液条件下完全溶解而且其稳定性优于原来的 DMSO 溶解下的四甲基联苯胺;并且本发明的显色底物在检测中无需提前混合,简化了检测操作步骤,减少了显色底物的批间差异。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的说明,但本发明并不限于以下实施例。实施例中采用的实施条件可以根据具体使用的不同要求做进一步调整,未注明的实施条件为本行业中的常规条件。

[0024] 实施例 1

[0025] 将 1.0g 一水合柠檬酸和 26g 十二水磷酸氢二钠加入到 800ml 蒸馏水中,用浓度为 6M 的盐酸调节 pH 至 4.0,加入蒸馏水定容至 1000ml 制得缓冲母液;向缓冲母液中加入 3.2g 四甲基联苯胺盐酸盐和 0.2g 乙二胺四乙酸二钠,搅拌溶解,得到混合溶液;向混合溶液中加入 15ml 丙三醇、98mg 焦磷酸钠和 9mg 锡酸钠,进行避光过夜搅拌,即得显色底物。

[0026] 实施例 2

[0027] 将 1.5g 一水合柠檬酸和 30g 十二水磷酸氢二钠加入到 800ml 蒸馏水中,用浓度为 6M 的盐酸调节 pH 至 4.5,加入蒸馏水定容至 1000ml 制得缓冲母液;向缓冲母液中加入 3.5g 四甲基联苯胺盐酸盐和 0.3g 乙二胺四乙酸二钠,搅拌溶解,得到混合溶液;向混合溶液中加入 20ml 丙三醇、100mg 焦磷酸钠和 10mg 锡酸钠,进行避光过夜搅拌,即得显色底物。

[0028] 实施例 3

[0029] 将 1.2g 一水合柠檬酸和 28g 十二水磷酸氢二钠加入到 800ml 蒸馏水中,用浓度为 6M 的盐酸调节 pH 至 4.2,加入蒸馏水定容至 1000ml 制得缓冲母液;向缓冲母液中加入 3.4g 四甲基联苯胺盐酸盐和 0.25g 乙二胺四乙酸二钠,搅拌溶解,得到混合溶液;向混合溶液中

加入 17mL 丙三醇、99mg 焦磷酸钠和 10mg 锡酸钠,进行避光过夜搅拌,即得显色底物。

[0030] 实施例 4 :显色底物的显色性能测试

[0031] 将包被好的花生过敏原微孔板加入 100 μ l 质控血清及其稀释样本,在 25 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时 ;用洗涤液洗涤 3-5 次 ;加入酶结合物每孔 100 μ l,放入 25 $^{\circ}$ C 下反应 30 分钟 ;用洗涤液洗涤 3-5 次 ;分别加入北京某公司市售显色底物以及实施例 1 至 3 中的显色底物,每孔 100 μ l,每个检测样品重复 3 次,在 25 $^{\circ}$ C 下反应 30 分钟 ;用 2M 的硫酸溶液进行终止反应,每孔 50 μ l。表 1 为不同配方显色剂的试验结果 (表中数据为平均值)

[0032] 其中 :

[0033] 质控血清 :含花生过敏抗体阳性质控血清 ;

[0034] 花生过敏原 :按照 0.5ug/ 孔过夜包被 ;

[0035] 包被液 :Na₂CO₃15mM, NaHCO₃35mM, NaCl 0.2M ;

[0036] 封闭液 :1%BSA 用于稀释二抗,避免非特异性结合 ;

[0037] 洗涤液 :TBST,Tris12.1g+NaCl9.0g+H₂O600ml (定容至 1000ml)、使用 6M 盐酸调 pH 值到 7.5+0.5ml Tween-20 ;

[0038] 酶结合物 :Anti-IgE-AP (抗人 IgE 抗体与碱性磷酸酶偶联物),0.05mg/mL

[0039] 表 1

[0040]

样本	北京某公司产品	实施例 1	实施例 2	实施例 3
----	---------	-------	-------	-------

[0041]

质控血清	1.6823	1.8452	1.7938	1.8204
1/2 稀释	0.8636	0.9123	0.8944	0.9028
1/4 稀释	0.4239	0.4673	0.4558	0.4703
1/8 稀释	0.2247	0.2406	0.2338	0.2416

[0042] 由表 1 可以看出 :本明显色体系配制的三种显色底物基本相当,且与北京某公司市售产品相比灵敏度并无劣势,而四甲基联苯胺盐酸盐直接在水溶液条件下完全溶解使得显色底物在检测中无需提前混合,简化了检测操作步骤,减少了显色底物的批间差异。

[0043] 实施例 5 :显色底物的稳定性

[0044] 该稳定性试验是依照实施例 4 的方法步骤,每次按实施例 1、2、3 配制显色剂并用 1/4 稀释质控血清进行试验,每间隔半年进行一次,显色底物液分别储存半年、一年、一年半、两年,两年半及三年时,进行显色性能测试及结果记录,试验结果记录如表 2 (表中数据为平均值)所示,由此可查验本显色体系在三年的有效储存期内,其所制显色剂的性能是否均能满足使用要求。

[0045] 表 2

[0046]

检测时间(年)	实施例 1	实施例 2	实施例 3
---------	-------	-------	-------

0.5	0.4568	0.4467	0.4662
1.0	0.4512	0.4397	0.4658
1.5	0.4601	0.4485	0.4683
2.0	0.4493	0.4476	0.4589
2.5	0.4584	0.4503	0.4625
3.0	0.4537	0.4479	0.4592

[0047] 由表 2 可以看出：本显色体系储存液三年储存稳定性很好，按上述试验的稳定性考察已累积了 3 年，显色剂表现良好。

[0048] 以上对本发明做了详尽的描述，其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本发明的内容并加以实施，并不能以此限制本发明的保护范围，凡根据本发明的精神实质所作的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种酶联免疫显色底物及其制备方法		
公开(公告)号	CN103913566B	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	CN201410143488.3	申请日	2014-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	李庆春 秦枫 王秀伟		
发明人	李庆春 秦枫 王秀伟		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	汪青		
其他公开文献	CN103913566A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明涉及一种酶联免疫显色底物，所述的显色底物的pH为4.0-4.5，由质量浓度为0.9-1.5g/l的一水合柠檬酸、质量浓度为25-30g/l的十二水磷酸氢二钠、质量浓度为3-3.5g/l的四甲基联苯胺盐酸盐、质量浓度为0.15-0.3g/l的乙二胺四乙酸二钠、与所述的显色底物的体积比为0.01-0.02的丙三醇、质量浓度为0.095-0.1g/l的焦磷酸钠、质量浓度为0.008-0.01g/l的锡酸钠、pH调节剂和水组成。本发明采用四甲基联苯胺盐酸盐作为显色的主要成分，可以直接在水溶液条件下完全溶解，稳定性好、无需提前混合，简化了操作步骤，减少了批间差异。

质控血清	1.6823	1.8452	1.7938	1.8204
1/2 稀释	0.8636	0.9123	0.8944	0.9028
1/4 稀释	0.4239	0.4673	0.4558	0.4703
1/8 稀释	0.2247	0.2406	0.2338	0.2416

1 由表1可以看出：本发明显色体系配制的三种显色底物基本相当，且与北