

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/535 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610028623.5

[43] 公开日 2008年1月9日

[11] 公开号 CN 101101295A

[22] 申请日 2006.7.5

[21] 申请号 200610028623.5

[71] 申请人 上海华泰生物工程实业有限公司

地址 200333 上海市普陀区千阳路 271 弄 13 号

[72] 发明人 周兴华

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 王 巍

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物溶液的制备

[57] 摘要

本发明提供了一种酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物溶液的制备方法。本发明改进了酶稀释液的配制成分，在酶稀释液中加入了苦杏仁酸作为酶保护剂，改变了防腐剂及表面活性剂，将浓缩酶结合物按所需浓度加入到上述酶稀释液中制备成酶结合物溶液。有效地增加了酶结合物的稳定性，同时也降低了反应背景，提高了检测的灵敏度。使酶结合物可以稀释成工作液浓度提供给用户，既方便了检测人员的使用，又提高了检测结果的准确性。

1、一种酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物溶液的制备方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

(1) 配制 0.05-0.2M PBS 或 0.01-0.2M Tris-HCl 缓冲液，pH 值为 6.5~7.4；

(2) 在该缓冲系统中加入苦杏仁酸，终浓度为 0.2 g/L~1.2 g/L，搅拌，使充分溶解；

(3) 加入 Proclin 300 或 Proclin 950，终浓度为 0.2 g/L~1.2 g/L，搅拌，使充分溶解；

(4) 加入 Triton X-100，终浓度为 0.1 ml/L~1.0 ml/L，搅拌，使充分溶解；

(5) 加入酚红 1%无水乙醇溶液，终浓度为 2 ml/L~10 ml/L，搅拌，使充分溶解；

(6) 加入小牛血清，终浓度为 200 ml /L~400 mlg/L，搅拌，使充分溶解；

(7) 最后用 4M NaOH 或 4M HCl 调 pH 值为 6.5~7.4 得到酶稀释液；

(8) 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。

2、如权利要求 1 一种酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物溶液的制备方法，其特征在于其中所述的酶结合物可以是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。

酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物溶液的制备

技术领域：

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体外诊断试剂中酶结合物溶液的制备。

背景技术：

1971年 Engvall 和 Perlmann 首次报道建立了酶联免疫吸附检测法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)，由于 ELISA 具有快速、敏感、简便、易于标准化等优点，已被广泛应用于抗原、抗体、细胞因子以及生化物质等的检测。该方法的基本原理是：把抗原或抗体结合到某种固相载体表面，并保持其免疫学活性。将抗体或抗原与酶通过化学方法交联成酶结合物，酶结合物既有抗体或抗原的免疫学活性又有酶的催化活性。检测时，先把受检标本与固相载体上的抗原或抗体反应，洗涤，去掉未反应的物质，然后加入酶结合物进行反应，洗涤，再加入底物溶液及显色剂反应，生成有色产物，最后加终止液终止反应。有色产物的吸光度 (OD 值) 与受检标本中的抗原或抗体量直接相关，从而可以根据 OD 值进行定性或定量分析。

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 试剂中非常关键，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 (酶稀释液) 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 试剂生产中的重要环节。

常见的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）、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一定倍数稀释，现配现用，一般在 2~8℃ 保存不超过一周。这样，用户使用比较麻烦，而且往往由于稀释误差造成实验结果不准确。

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：

本发明所要解决的技术问题在于克服上述不足之处，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，同时降低显色背景，提高检测灵敏度。

本发明通过改变酶联免疫体外诊断试剂中的酶稀释液的成分来提高酶结合物的稳定性，使酶结合物能够以工作浓度提供给用户，方便用户使用，同时降低显色背景，提高检测灵敏度。

本发明提供了一种酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物的制备方法。

本发明改变了传统酶稀释液的组成成分，选择了一种合适的酶保护剂—苦杏仁酸，加入到酶稀释液中，显著提高了酶结合物的稳定性。将原来常用的防腐剂硫柳汞钠换成了 Proclin 300（或者 Proclin 950），后者的防腐性能明显优于前者，降低了酶稀释液被微生物污染的风险，可以防止酶结合物因微生物污染而导致显色异常降低或背景异常升高。将原来的表面活性剂吐温 20(Tween 20) 换成了曲拉通 X-100(Triton X-100)，明显降低了显色背景。在酶稀释液中加入了小牛血清，小牛血清是良好的蛋白保护剂，同时也减少了非特异性吸附。加入酚红溶液，用以指示酶稀释液的 PH 值在正常范围。

制备酶结合物时，将浓缩酶结合物以所需的比例（如 1:100~1:5000）加入到上述酶稀释液中即可。新配方的酶稀释液显著提高了酶结合物的稳定性，酶结合物能够以工作浓度提供给用户，在试剂盒保存条件下（2~8℃）一年内保持稳定。用户可以直接使用不必临时稀释，同时降低了显色背景，提高了检测灵敏度。

本发明的酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物的制备方法包括下列步骤：

（1）配制 0.05-0.2M PBS 或 0.01-0.2M Tris-HCl 缓冲液，pH 值为 6.5~7.4；

（2）在该缓冲系统中加入苦杏仁酸，终浓度为 0.2 g/L~1.2 g/L，搅拌，使充分溶解；

（3）加入 Proclin 300 或 Proclin 950，终浓度为 0.2 g/L~1.2 g/L，搅拌，使充分溶解；

（4）加入 Triton X-100，终浓度为 0.1 ml/L~1.0 ml/L，搅拌，使充分溶解；

（5）加入酚红 1%无水乙醇溶液，终浓度为 2 ml/L~10 ml/L，搅拌，使充分溶解；

（6）加入小牛血清，终浓度为 200 ml/L~400 ml/L，搅拌，使充分溶解；

（7）最后用 4M NaOH 或 4M HCl 调 pH 值为 6.5~7.4 得到酶稀释液；

（8）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。

上述酶结合物为辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶（AP）与抗原或抗体通过化学交联而成的复合物。

本发明的有益效果：

- (1) 提高了酶结合物的稳定性，在 2~8℃ 保存 12 个月保持稳定。
- (2) 酶结合物能够以工作浓度提供给用户，用户可以直接使用不必临时稀释，方便操作、减少差错。
- (3) 降低了显色背景，提高了检测灵敏度。

本发明酶结合物与传统酶结合物比较数据

以双抗体夹心 ELISA 法检测 HBsAg 为例，在已包被抗体的微孔板中加入经系列稀释的抗原，按照常规反应过程进行试验，分别对比传统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，在酶标仪上比色，结果如下：

项目	HBsAg 含量 (ng/ml)	传统酶结合物 (1:1000)	本发明酶结合物 (1:1000)
灵敏度(OD 值, $\lambda = 450\text{nm}$)	0.2	0.096	0.116
	0.5	0.288	0.320
	1	0.623	0.638
	2	1.187	1.204
	4	2.216	2.215
显色背景(100 份阴性标本平均 OD 值)		0.068	0.045
贮存形式		浓缩液	工作浓度溶液
稳定性 (2~8℃ 保存月数)		6	12

实施例 1:

配制 1L 抗 HBs-HRP 酶结合物溶液:

- (1) 先加入约 500 ml 蒸馏水，再依次加入下列试剂，待前一种溶解

后再加入后一种；NaCl 8 g；Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g；KH₂PO₄ 0.2 g；KCl 0.2 g；苦杏仁酸，0.3 g；Proclin 300，0.5 ml；Triton X-100，0.3 ml；酚红（1%无水乙醇溶液），5 ml；小牛血清，200 ml；待充分溶解后补足蒸馏水至 1L，用 4M NaOH 或 4M HCl 调 PH 值为 7.2。

（2）将浓缩酶结合物以 1:1000 比例加入到上述酶稀释液中充分混匀。

实施例 2：

用抗 HBs-HRP 酶结合物溶液（1:1000）检测血清或血浆标本中的 HBsAg。

（1）在已包被抗 HBs 的微孔板中依次加入标本 50 ul，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 HBs-HRP 酶结合物溶液 50 ul，置 37℃保温 30 分钟。

（2）弃去孔内液体，用洗涤液洗板 5 次。

（3）各孔加底物溶液 50 ul，显色剂 50 ul，置 37℃保温 15 分钟。

（4）各孔加终止液 50 ul，终止反应。

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

（6）计算，Cut Off 值 = 阴性对照平均 OD 值 × 2.1，阴性对照平均 OD 值小于 0.05 按 0.05 计算，大于等于 0.05 按实际 OD 值计算。

（7）结果判断：标本 OD 值大于或等于 Cut Off 值为阳性，小于 Cut Off 值为阴性。

专利名称(译)	酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物溶液的制备		
公开(公告)号	CN101101295A	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN200610028623.5	申请日	2006-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	上海华泰生物工程实业有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海华泰生物工程实业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海华泰生物工程实业有限公司		
[标]发明人	周兴华		
发明人	周兴华		
IPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	王巍		
其他公开文献	CN101101295B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种酶联免疫体外诊断试剂中酶结合物溶液的制备方法。本发明改进了酶稀释液的配制成分，在酶稀释液中加入苦杏仁酸作为酶保护剂，改变了防腐剂及表面活性剂，将浓缩酶结合物按所需浓度加入到上述酶稀释液中制备成酶结合物溶液。有效地增加了酶结合物的稳定性，同时也降低了反应背景，提高了检测的灵敏度。使酶结合物可以稀释成工作液浓度提供给用户，既方便了检测人员的使用，又提高了检测结果的准确性。

项目	HBsAg 含量 (ng/ml)	传统酶结合物 (1:1000)	本发明酶结合物 (1:1000)
灵敏度(OD值, $\lambda = 450\text{nm}$)	0.2	0.096	0.116
	0.5	0.288	0.320
	1	0.623	0.638
	2	1.187	1.204
	4	2.216	2.215
显色背景(100 份阴性标本平均 OD 值)		0.068	0.045
贮存形式		浓缩液	工作浓度溶液
稳定性 (2~8℃保存月数)		6	12