



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102662051 A

(43) 申请公布日 2012.09.12

(21) 申请号 201210116851.3

(22) 申请日 2012.04.19

(71) 申请人 上海蓝怡科技有限公司

地址 201100 上海市闵行区友东路 85 号

(72) 发明人 李子樵 李大军

(74) 专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限

公司 31253

代理人 何新平

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

酶联免疫体外诊断试剂中封闭液

(57) 摘要

本发明属于生物体外诊断试剂技术领域,具体涉及一种酶联免疫体外诊断试剂中封闭液,采用如下工艺步骤进行制备:配制 PBS 缓冲液;加入牛血清白蛋白,使其充分溶解;加入海藻糖,使其充分溶解;加入蛋白稳定剂,使其充分溶解;加入 L-赖氨酸,使其充分溶解;加入 Proclin 300,使其充分混匀;用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节 pH 值,混匀;室温静置 30min 以上,2℃~8℃保存。本发明同现有技术相比,具有广谱性,能在较长时间内抑制细菌、真菌和酵母菌等微生物的生长,同时又能保持体系中酶的活性。

1. 一种酶联免疫体外诊断试剂中封闭液,采用如下工艺步骤进行制备:
 - A) 配制 0.01M ~ 0.2M PBS 缓冲液, pH 值为 6.5 ~ 7.8;
 - B) 在步骤 A 中的缓冲液内加入牛血清白蛋白,终浓度为 1g/L ~ 30g/L,搅拌,使其充分溶解;
 - C) 加入海藻糖,终浓度为 0.2g/L ~ 25g/L,搅拌,使其充分溶解;
 - D) 加入蛋白稳定剂,终浓度 0.2g/L ~ 5g/L,搅拌,使其充分溶解;
 - E) 加入 L-赖氨酸,终浓度 0.2g/L ~ 10g/L,搅拌,使其充分溶解;
 - F) 加入 Proclin 300,终浓度为 0.01% ~ 1%,搅拌,使其充分混匀;
 - G) 用 5M 氢氧化钠溶液或 5M 盐酸溶液调节 pH 值至 6.5 ~ 7.4,混匀;
 - H) 室温静置 30min 以上,2°C ~ 8°C 保存。
2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫体外诊断试剂中封闭液,其特征在于:所述封闭液可用于聚苯乙烯或聚丙烯等材料制作的微孔板或微球固相载体。

酶联免疫体外诊断试剂中封闭液

[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体外诊断试剂中封闭液。

[背景技术]

[0002] ELISA 基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记,基本原理有:①抗原或抗体能以物理性地吸附于固相载体表面,并保持其免疫学活性;②抗原或抗体可通过共价键与酶连接形成酶结合物,而此种酶结合物仍能保持其免疫学和酶学活性;③酶结合物与相应抗原或抗体结合后,可根据加入底物的颜色反应来判定是否有免疫反应的存在,而且颜色反应的深浅是与标本中相应抗原或抗体的量成正比例的,可以按底物显色的程度显示试验结果。

[0003] 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的检测。市场上有很多相关产品用于多种疾病的血清学诊断,如 HIV、肝炎、心血管、癌症等。

[0004] 很生物检测分析中,多试剂或样本组分要吸附于固相载体或固定于载体表面,这种结合不是特异性配体/受体(如抗原-抗体)的识别过程,通常叫做非特异性结合(non-specific binding, NSB),这种非特异性结合,特别是在检测抗体时,可能会造成假阳性;另一方面,非特异性可能会干扰配体和受体的识别。假阳性会降低检测的特异性。另外,非特异性结合也有可能也会导致信噪比(signal-to-noise ratio)的降低,从而产生假阴性,这又会降低检测的灵敏度。一个非常普遍的避免非特异性结合的方法是加封闭试剂。通常,用于吸附生物材料的固相载体表面是很温和的,在分析的第一步是包被,一个分析组分结合到固相载体表面,这种包被组分通常不能将固相载体的整个表面都覆盖掉。因此,封闭这一步是非常必要的,用所谓的封闭试剂覆盖掉固相载体表面剩余的自由位点。包被之后,用封闭试剂处理过的固相载体表面应该是饱和的,这样就避免了后续材料的吸附。封闭效果很大程度上决定于分析中所用的封闭试剂。

[0005] 现今,体外诊断用的试剂盒不仅对特异性和灵敏度有要求,稳定性也是很重要的。单一成分的封闭试剂稳定性较差,有效期很短,这在一定程度上使得试剂盒的效期也变得很短。

[0006] 如何降低酶联免疫体外诊断试剂中非特异性结合,又能延长试剂盒的有效期,是众多体外诊断试剂制造商长期以来努力解决的问题之一。

[发明内容]

[0007] 本发明为了克服现有技术的不足,提供了一种酶联免疫体外诊断试剂中封闭液。

[0008] 为了实现上述目的,本发明设计了一种酶联免疫体外诊断试剂中封闭液,采用如下工艺步骤进行制备:

[0009] A) 配制 0.01M ~ 0.2M PBS 缓冲液, pH 值为 6.5 ~ 7.8;

[0010] B) 在步骤 A 中的缓冲液内加入牛血清白蛋白, 终浓度为 1g/L ~ 30g/L, 搅拌, 使其充分溶解;

[0011] C) 加入海藻糖, 终浓度为 0.2g/L ~ 25g/L, 搅拌, 使其充分溶解;

[0012] D) 加入蛋白稳定剂, 终浓度 0.2g/L ~ 5g/L, 搅拌, 使其充分溶解;

[0013] E) 加入 L- 赖氨酸, 终浓度 0.2g/L ~ 10g/L, 搅拌, 使其充分溶解;

[0014] F) 加入 Proclin 300, 终浓度为 0.01% ~ 1%, 搅拌, 使其充分混匀;

[0015] G) 用 5M 氢氧化钠溶液或 5M 盐酸溶液调节 pH 值至 6.5 ~ 7.4, 混匀;

[0016] H) 室温静置 30min 以上, 2°C ~ 8°C 保存。

[0017] 所述封闭液可用于聚苯乙烯或聚丙烯等材料制作的微孔板或微球固相载体。

[0018] 本发明同现有技术相比, 改变了传统的封闭液的组成成分, 选择了海藻糖的作为保护剂加入到封闭液中, 显著提高了封闭液的稳定性。加入了蛋白稳定剂和 L- 赖氨酸, 更有效的保持蛋白稳定。将防腐剂由常用的硫柳汞换成了 Proclin 300, 后者具有广谱性, 能在较长时间内抑制细菌、真菌和酵母菌等微生物的生长, 同时又能保持体系中酶的活性, 更适用于体外诊断试剂。

[具体实施方式]

[0019] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解这些实施例仅用于说明本发明不用于限制本发明的范围。

[0020] 实施例:

[0021] 本发明封闭液的制备步骤如下:

[0022] A) 配制 0.01M ~ 0.2M PBS 缓冲液, pH 值为 6.5 ~ 7.8;

[0023] B) 在步骤 A 中的缓冲液内加入牛血清白蛋白, 终浓度为 1g/L ~ 30g/L, 搅拌, 使其充分溶解;

[0024] C) 加入海藻糖, 终浓度为 0.2g/L ~ 25g/L, 搅拌, 使其充分溶解;

[0025] D) 加入蛋白稳定剂, 终浓度 0.2g/L ~ 5g/L, 搅拌, 使其充分溶解;

[0026] E) 加入 L- 赖氨酸, 终浓度 0.2g/L ~ 10g/L, 搅拌, 使其充分溶解;

[0027] F) 加入 Proclin 300, 终浓度为 0.01% ~ 1%, 搅拌, 使其充分混匀;

[0028] G) 用 5M 氢氧化钠溶液或 5M 盐酸溶液调节 pH 值至 6.5 ~ 7.4, 混匀;

[0029] H) 室温静置 30min 以上, 2°C ~ 8°C 保存。

[0030] 实验结果, 采用双抗体夹心法检测血清中 AFP 的含量, 验证封闭液, 具体步骤如下:

[0031] 1) 包被 AFP 抗体, 4 μ g/ml, 100 μ l/ 孔, 2°C ~ 8°C 冰箱过夜。

[0032] 2) 按照本实施例配制封闭液; 另配制单组份封闭液。

[0033] 3) 甩干包被液, 拍干, 分别用不同的封闭液封闭, 300 μ l/ 孔, 37°C 温育 2 小时。

[0034] 4) 洗板, 拍干, 真空干燥箱干燥 5 小时。

[0035] 5) 将板条真空封装后分别置于 37°C 恒温箱中, 分别经 3 天、5 天、7 天后取出, 与 2°C ~ 8°C 存放包被板平行比较。

[0036] 6) 配制 0ng/ml、5ng/ml、25ng/ml、100ng/ml、400ng/ml、800ng/ml 系列 AFP 标准品。

[0037] 7) 在酶标板孔中依次加入 AFP 标准品, 加入有值血清, 100 μ l/ 孔, 均设复孔, 37°C

温育 60min。

[0038] 8) 洗板, 拍干, 加入一定浓度的 HRP 标记 AFP 抗体, 100 μ l/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min。

[0039] 9) 洗板, 拍干, 加入显色液, 100 μ l/ 孔, 室温反应 15min。

[0040] 10) 加入终止液, 50 μ l/ 孔。

[0041] 11) 酶标仪读数, 检测波长 450nm, 参考波长 630nm, 结果如下表所示:

[0042]

	浓度 ng/ml	2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C		37 $^{\circ}$ C 3 天		37 $^{\circ}$ C 5 天		37 $^{\circ}$ C 7 天	
		本发明 封闭液	传统 单组 份封 闭液	本发 明封 闭液	传统 单组 份封 闭液	本发 明封 闭液	传统 单组 份封 闭液	本发 明封 闭液	传统 单组 份封 闭液
标准 品	0	0.021	0.98	0.018	0.101	0.027	0.097	0.031	0.104
	5	0.105	0.116	0.091	0.098	0.079	0.081	0.078	0.074
	25	0.354	0.288	0.350	0.286	0.328	0.244	0.316	0.161
	100	1.287	1.167	1.273	1.157	1.204	0.898	1.182	0.612
	200	2.44	2.254	2.435	2.156	2.306	1.894	2.240	1.791
	400	3.315	3.334	3.293	3.303	3.133	2.256	3.042	2.007
血清	7.09	0.120	0.108	0.108	0.094	0.099	0.089	0.100	0.081
	25.23	0.266	0.221	0.259	0.204	0.234	0.183	0.223	0.167
	55.73	0.693	0.489	0.676	0.413	0.650	0.364	0.637	0.321
	158.6	1.525	1.214	1.510	1.109	1.448	1.165	1.400	0.946
	256.8	2.342	2.367	2.324	2.056	2.214	1.951	2.135	1.462
	445.2	3.436	3.261	3.403	2.734	3.247	2.432	3.151	1.918

专利名称(译)	酶联免疫体外诊断试剂中封闭液		
公开(公告)号	CN102662051A	公开(公告)日	2012-09-12
申请号	CN201210116851.3	申请日	2012-04-19
[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 李大军		
发明人	李子樵 李大军		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/545		
代理人(译)	何新平		
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，具体涉及一种酶联免疫体外诊断试剂中封闭液，采用如下工艺步骤进行制备：配制PBS缓冲液；加入牛血清白蛋白，使其充分溶解；加入海藻糖，使其充分溶解；加入蛋白稳定剂，使其充分溶解；加入L-赖氨酸，使其充分溶解；加入Proclin 300，使其充分混匀；用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节pH值，混匀；室温静置30min以上，2°C~8°C保存。本发明同现有技术相比，具有广谱性，能在较长时间内抑制细菌、真菌和酵母菌等微生物的生长，同时又能保持体系中酶的活性。

浓度 ng/ml	2°C~8°C		37°C 3天		37°C 5天		37°C 7天		
	本发明 封闭液	传统 单组 份封 闭液	本发 明封 闭液	传统 单组 份封 闭液	本发 明封 闭液	传统 单组 份封 闭液	本发 明封 闭液	传统 单组 份封 闭液	
标准 品	0	0.021	0.98	0.018	0.101	0.027	0.097	0.031	0.104
	5	0.105	0.116	0.091	0.098	0.079	0.081	0.078	0.074
	25	0.354	0.288	0.350	0.286	0.328	0.244	0.316	0.161
	100	1.287	1.167	1.273	1.157	1.204	0.898	1.182	0.612
	200	2.44	2.254	2.435	2.156	2.306	1.894	2.240	1.791
	400	3.315	3.334	3.293	3.303	3.133	2.256	3.042	2.007
血清	7.09	0.120	0.108	0.108	0.094	0.099	0.089	0.100	0.081
	25.23	0.266	0.221	0.259	0.204	0.234	0.183	0.223	0.167
	55.73	0.693	0.489	0.676	0.413	0.650	0.364	0.637	0.321
	158.6	1.525	1.214	1.510	1.109	1.448	1.165	1.400	0.946
	256.8	2.342	2.367	2.324	2.056	2.214	1.951	2.135	1.462
	445.2	3.436	3.261	3.403	2.734	3.247	2.432	3.151	1.918