



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111060684 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201911404890.1

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 锐纳生物技术(杭州)有限公司

地址 310052 浙江省杭州市滨江区长河街  
道滨安路688号5幢24层2411室

(72)发明人 尹鹏

(74)专利代理机构 杭州伟知新盛专利代理事务  
所(特殊普通合伙) 33275

代理人 李成龙

(51)Int.Cl.

G01N 33/539(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

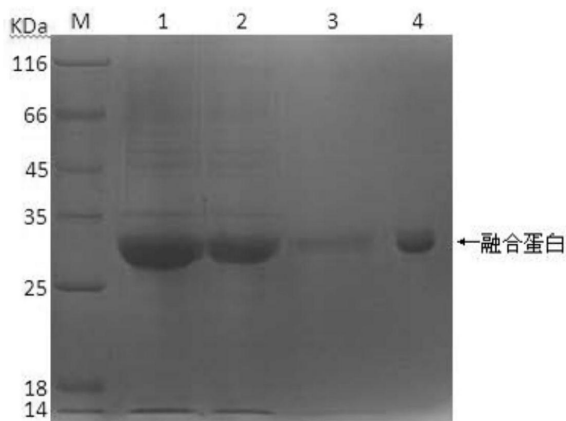
权利要求书1页 说明书10页 附图2页

### (54)发明名称

一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂

### (57)摘要

本发明提供了一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂,所述防腐剂为IgY免疫球蛋白溶液,其用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的0.45%至6.0%。本发明提供了具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂,不仅对试剂盒能够进行有效的防腐,且性质稳定、低毒安全、生产成本低,而且能够作为免疫试剂盒中抗体液的保护剂,使测定结果更准确,是一种较为理想的新的体外诊断试剂盒防腐剂。



1. 一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于,所述防腐剂为IgY免疫球蛋白溶液,其用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的0.45%至6.0%。

2. 根据权利要求1所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于,所述IgY免疫球蛋白溶液用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的0.5%至3.5%。

3. 根据权利要求1所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于,所述IgY免疫球蛋白溶液为抗HBsAg免疫球蛋白溶液。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于,所述IgY免疫球蛋白溶液是通过以下方法获得的:

(a) 制备HBsAg融合蛋白油佐剂疫苗;

(b) 用所述HBsAg融合蛋白油佐剂疫苗对健康母鸡进行三次免疫,每次免疫间隔2-3周,完成第三次免疫后3周,收集免疫母鸡生的免疫鸡蛋;

(c) 从所述免疫鸡蛋中分离得到蛋黄液,将所得蛋黄液与清水、白砂糖、麦芽糊精及变性淀粉以38:6:3:2:1的比例混合稀释,搅拌均匀;

(d) 将(c)步得到的混合液采用干燥塔喷雾瞬时干燥,以获得含有IgY免疫球蛋白的高免蛋粉;

(e) 将(d)步制得的高免蛋粉与纯水以1:10的比例制成用作防腐剂的IgY免疫球蛋白溶液。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于,将其应用于免疫比浊类试剂盒。

6. 根据权利要求5所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于,将其应用于胱抑素C测定试剂盒。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的体外诊断试剂盒防腐剂,其特征在于,将其应用于天门冬氨酸氨基转移酶测定试剂盒。

## 一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学体外诊断领域,尤其是一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂。

### 背景技术

[0002] 体外诊断 (IVD) 是指在人体外通过对人体的血液等组织及分泌物进行检测获取临床诊断信息的产品和服务,可提供80%左右的临床诊断信息,目前,已经成为人类疾病预防、诊断、治疗日益重要的组成部分。体外诊断试剂是按医疗器械管理要求的,包括在疾病的预测、预防、诊断、治疗监测、预后观察和健康状态评价的过程中,用于人体样本体外检测的试剂、试剂盒、校准品、质控品等产品。可以单独使用,也可以与仪器、器具、设备或者系统组合使用。

[0003] 防腐剂是体外诊断试剂盒必不可少的成份,它能够杀灭或抑制微生物,特别是细菌和真菌生长的化学物质,使试剂盒在规定的环境中具有一定的有效性。

[0004] 防腐剂的种类很多,如酸碱及其盐类、中性化合物类、汞化合物类、季胺化合物类等,常用的防腐剂有硫柳汞、叠氮钠、抗生素等。但采用的这些防腐剂中大部分都具有毒性,部分具有腐蚀性,对使用者及环境都潜在很大的危险性及污染。例如,叠氮钠是目前体外诊断试剂盒最常用的防腐剂,虽然其防腐效果尚好,但其对过氧化特酶、抗体的活性都有一定的抑制作用。此外,叠氮钠已纳入2008年的剧毒化学品来管理。叠氮钠和氰化物相似,对细胞色素氧化酶和其它酶有抑制作用,并能使体内氧合血红蛋白形成受阻,有显著的降压作用。对眼和皮肤有刺激性,如吸入、口服或经皮肤吸收,可引起中毒死亡;同时,受热、接触明火、或受到摩擦、震动、撞击时可发生爆炸。叠氮钠与酸类剧烈反应会产生爆炸性的叠氮酸,与重金属及其盐类会形成十分敏感的化合物。可见叠氮钠虽然为试剂盒最常用的防腐剂,但在使用过程中对人体、环境潜在着较大的危险性。硫柳汞作为防腐剂已有60多年历史,曾广泛用于生物制品中的疫苗及体外诊断试剂。硫柳汞稍有特殊臭味,微有引湿性,遇光易变质。抗生素(如庆大霉素)常用做防腐剂,较叠氮钠试剂毒性作用小,但试验过程中发现抗生素类药物根据其化学结构有着不同的抗菌谱,抗菌谱最广的也仅仅限于大部分的原核微生物,无法对全部微生物起效。因此,抗生素只是可以对抗细菌,但是不能对抗除细菌外的其它微生物,且长时间不能达到完全防腐的作用。ProClin是商品化的异噻唑啉酮类防腐剂,可以有效地控制体外诊断试剂中微生物的生长,但遇铵、亚硫酸盐、强还原剂和强碱性会降低其活性,而且因其价格昂贵,现在只少量用于临床研究。

[0005] 因此,日前寻找一种高效、性质稳定、低毒安全且降低生产成本的试剂盒防腐剂是非常必要的。

### 发明内容

[0006] 为了克服现有技术的不足,本发明提供了一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂,不仅对试剂盒能够进行有效的防腐,且性质稳定、低毒安全、生产成本低,而且能够作

为免疫试剂盒中试剂液的保护剂,使测定结果更准确,是一种较为理想的新的体外诊断试剂盒防腐剂。

[0007] 为了本发明的目的,本发明采用如下技术方案:一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂,所述防腐剂为IgY免疫球蛋白溶液,其用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的0.45%至6.0%。在一些实施方案中,所述IgY免疫球蛋白溶液用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的0.5%至3.5%。

[0008] 免疫球蛋白(IgY)是从鸡蛋中获得的抗体,具有良好的稳定性,对热、酸、碱环境有较强的耐受性,具有较高的安全性。珠海某公司生产的免疫球蛋白已通过美国食品药品监督管理局和GRAS验证,对人体无毒副作用;杀灭、抑制病菌效果比较显著。IgY免疫球蛋白是一种安全的生物防腐剂。IgY免疫球蛋白具有抗念球菌属菌、隐球菌属菌和须发癣菌等抗菌作用,是一种杀菌效果很理想的广杀菌剂,IgY免疫球蛋白的主要特点就是抗菌广谱,抑菌力强,且对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、霉菌都具有极强的杀灭作用,可有效地抑制试剂盒中细菌的生长。

[0009] 由于IgY免疫球蛋白具有显著的杀灭、抑制病菌作用,且适用的PH较为广泛,在PH4至PH12,活性均不改变,因此,IgY免疫球蛋白能够进行有效的防腐。本发明首次采用IgY免疫球蛋白溶液作为体外诊断试剂盒防腐剂,不仅对试剂盒能够进行有效的防腐、稳定,同时IgY免疫球蛋白溶液中的氨基酸对免疫比浊类试剂盒(如胱抑素C测定试剂盒)抗原、抗体起到一定的加速反应的作用,是免疫试剂盒的防护剂兼促凝剂,使测定结果准确;此外,IgY免疫球蛋白溶液对血清中的转氨酶能够起到一定的预活化的作用,使测定结果准确且病情相符。由此可见,IgY免疫球蛋白对于体外诊断试剂盒确实为一种具有双效功能的防腐剂,是种较为理想的新型体外诊断试剂盒防腐剂。此外,本发明的IgY免疫球蛋白是通过诱导母鸡免疫系统产生免疫球蛋白并然后经血液传递到鸡蛋中而获得含有IgY免疫球蛋白的鸡蛋。因此制造抗体的来源容易,价格便宜,使用安全,对使用者、环境无任何潜在危险,因此,易于应用在体外诊断试剂盒中。

[0010] 在一些实施方案中,所述IgY免疫球蛋白溶液为抗HBsAg免疫球蛋白溶液。在一些实施方案中,所述IgY免疫球蛋白溶液是通过以下方法获得的:(a)制备HBsAg融合蛋白油佐剂疫苗;(b)用所述HBsAg融合蛋白油佐剂疫苗对健康母鸡进行三次免疫,每次免疫间隔2-3周,完成第三次免疫后3周,收集免疫母鸡生的免疫鸡蛋;(c)从所述免疫鸡蛋中分离得到蛋黄液,将所得蛋黄液与清水、麦白砂糖、芽糊精及变性淀粉以38:6:3:2:1的比例混合稀释,搅拌均匀;(d)将(c)步得到的混合液采用干燥塔喷雾瞬时干燥,以获得含有所述IgY免疫球蛋白的高免蛋粉;(e)将(d)步制得的高免蛋粉与纯水以1:10的比例制成防腐剂混合液。

[0011] 本发明的体外诊断试剂盒防腐剂应用于免疫比浊类试剂盒,优选胱抑素C测定试剂盒,还可以应用于天门冬氨酸氨基转移酶测定试剂盒。

[0012] 本发明的有益效果在于:(1)本发明的体外诊断试剂盒防腐剂能够进行有效的防腐,且性质稳定、低毒安全、生产成本低,而且能够作为免疫试剂盒中试剂液的保护剂,使测定结果更准确,是一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂;

(2)本发明提供的方法制得的IgY免疫球蛋白溶液天然无公害,且不含有毒有害成分,对使用者、环境无任何潜在危险,并且进一步降低生产成本;

(3)本发明提供的方法制得的防腐剂具有显著的防腐效果,并且对免疫试剂盒中试剂

液起到保护作用,使得试剂盒的测量结果更准确。

### 附图说明

[0013] 图1为本发明的实施例一的镍琼脂糖亲和层析SDS-PAGE分析图,其中M:Protein marker;1:上样;2:流出;3:10mM Imidazole流穿组分;4:500mM Imidazole洗脱组分。

[0014] 图2为本发明的实施例一的蛋白最终纯化SDS-PAGE分析图,其中M:Protein marker;1:目的蛋白。

[0015] 图3为本发明的实施例一的蛋白Western Blot分析图,其中M:Protein marker;1:目的蛋白;

[0016] 图4为本发明的实施例一的蛋白浓度测定结果分析图。

### 具体实施方式

[0017] 实施例一 (一) IgY免疫球蛋白溶液的制备

[0018] 在本实施例中首先通过以下方法制备得到IgY免疫球蛋白溶液:

[0019] I.HBsAg融合蛋白佐剂疫苗的制备

[0021] 1.取1 $\mu$ L重组的pET32a-HBsAg质粒转化Rosetta-gami (DE3) 菌株,在42℃下热击90s,在冰上静置2min后涂平板(100ug/mL氨苄青霉素+34ug/mL氯霉素+15ug/mL卡那霉素),在37℃恒温箱中培养过夜。

[0022] 2.挑取平板上的单克隆菌株于4mL LB液体培养基中活化10h,再按1:100的比例转接到300mL LB液体培养基中,活化过夜。

[0023] 3.将活化过夜的菌液按1:100比例接种于20L的LB液体培养基中(100ug/mL氨苄青霉素+34ug/mL氯霉素+15ug/mL卡那霉素),在37℃下以220rpm震荡培养,当OD值达到0.6左右时,添加终浓度为0.5mM IPTG,在25℃下以220rpm诱导培养18h,离心收集细胞菌体。

[0024] 4.将收集的菌体用上清缓冲液(50mM Tris,300mM NaCl,0.1%Triton X-100,1mMDTT,pH8.0)混匀,冰浴中超声破碎菌体,功率500W,20min(超声3s,暂停5s为一个循环)。超声完毕,在4℃下以12000rpm离心20min。沉淀用溶解缓冲液(7M Gua-HCl,50mM Tris,300mM NaCl,0.2%Triton X-100,1mM DTT,pH8.0)混匀,冰浴中超声破碎菌体,功率500W,15min(超声3s,暂停5s为一个循环)。超声完毕,在4℃下以12000rpm离心20min,上清液用于下一步纯化。

[0025] 5.通过镍琼脂糖亲和层析进行纯化。取100mL Ni-IDA,用5倍柱床体积的结合缓冲液清洗平衡柱子,流速5mL/min。(包涵体溶解液上清)上柱,流速为2mL/min,收集穿透液。10倍柱床体积的结合缓冲液清洗柱子,流速5mL/min。清洗缓冲液洗杂,流速5mL/min,收集穿透液。洗脱缓冲液洗脱,流速2mL/min,收集洗脱液。将500mM咪唑洗脱组分透析到50mM Tris,300mM NaCl,0.2%SKL,1mMDTT,pH8.0缓冲液中,在4℃下透析24h之后再透析到1 $\times$  PBS,0.1%SKL,1mM DTT,pH7.4缓冲液中,在4℃下透析16h,离心分装4mL/管,于-80℃下保存。结果如图1所示。

[0026] 6.纯化蛋白的检测

[0027] SDA-PAGE检测准备12%的SDS-PAGE(Tris-甘氨酸电泳缓冲液),上样量10 $\mu$ L,浓缩胶80V 20min,分离胶120V 60min,凝胶电泳结束后进行考马斯亮蓝染色20min,脱色,结果

如图2所示。

[0028] Western blot检测制胶:制备聚丙烯酰胺凝胶:浓缩胶5%,分离胶8%。制样:上样量:1 $\mu$ g。电泳:浓缩胶80V,30min;分离胶120V,60min。转膜:湿转,250mA 90min。封闭:5%的脱脂奶粉,在37℃下缓慢振荡2h。孵育一抗:一抗为兔抗his标签,抗体公司:Sangon Biotech,编号:D110002,1:500稀释,37℃缓慢振荡60min。孵育二抗:二抗为羊抗兔,抗体公司:Sangon Biotech,编号:D110058,1:8000稀释,37℃缓慢振荡60min。显色:TMB显色。结果如图3所示。

[0029] 蛋白浓度测定用SK3071非干扰型蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白,测定融合蛋白浓度为2.11mg/mL,BSA浓度为2mg/mL,测定蛋白体积为20 $\mu$ L。结果下表1和图4所示。

表1蛋白浓度测定

| 测试1   | 测试2   | 平均值    | BSA ( $\mu$ g) |
|-------|-------|--------|----------------|
| 0.605 | 0.602 | 0.6035 | 50             |
| 0.682 | 0.675 | 0.6785 | 40             |
| 0.757 | 0.755 | 0.756  | 24             |
| 0.822 | 0.818 | 0.82   | 16             |
| 0.883 | 0.878 | 0.8805 | 8              |
| 0.937 | 0.937 | 0.937  | 0              |
| 0.785 | 0.799 | 0.792  | 目的蛋白           |

[0030] 7.疫苗制备将纯化HBsAg融合蛋白或载体对照所表达的硫氧还原蛋白与油佐剂按适当比例混合后,将油/蛋白水溶液的体积比控制在(1:1)~(3:1),要求每头份疫苗中HBsAg融合蛋白或载体对照硫氧还原蛋白的量约为1mg;每头份疫苗的体积约为1mL。其中油佐剂为由94%(V/V)矿物油(7号白油)、6%(V/V)的Span-80、2%(g/V)硬脂酸铝加热溶解后形成的淡黄色油状液体。

[0031] 8.疫苗的安全性试验将制备好的HBsAg融合蛋白油佐剂疫苗分为低(0.1mL,约1头份)、中(0.25mL,约2.5头份)、高(0.5mL,约5头份)三个不同剂量组,分别免疫BALB/c小鼠,另设pET-32载体疫苗和生理盐水对照组,每组5只小鼠,皮下多点注射。间隔3周,分别进行第二次和第三次免疫注射。疫苗注射后分别观察小鼠有无不良反应、过敏、死亡等现象。结果表明:小鼠接种疫苗后发育良好,精神状态和食欲基本正常;低剂量组,接种部位有一过性肿胀、无发热等不良反应;中剂量组,接种部位在10天内不同程度的轻度肿胀、有轻度发热等不良反应;高剂量组,接种部位在15天内不同程度的肿胀、有轻度发热等不良反应,反应程度最为明显。对于该油佐剂疫苗,高剂量组小鼠由于疫苗吸收较慢,有轻度肉芽肿反应。在正常使用剂量范围内(低-中剂量),不良反应很弱,可以使用。结果见表2。

表2

| 组别       | 0.1mL 疫苗<br>(低剂量组)                 | 0.25mL 疫苗<br>(中剂量组)             | 0.5mL 疫苗<br>(高剂量组)                      | 0.5mL 载体疫苗<br>(高剂量组)                    | 0.5mL<br>盐水 |
|----------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|
| 疫苗<br>反应 | 发育良好, 精神状态和食欲均正常, 接种部位有一过性肿胀、发热不明显 | 接种部位在 10 天内不同程度的轻度肿胀、有轻度发热等不良反应 | 接种部位在 15 天内不同程度的肿胀、有轻度发热等不良反应, 反应程度最为明显 | 接种部位在 15 天内不同程度的肿胀、有轻度发热等不良反应, 反应程度最为明显 | 无不良反应       |

[0032] II. 用HBsAg融合蛋白油佐剂疫苗免疫母鸡并收集高免蛋

[0033] 选用某某公司的100-130日龄的健康蛋鸡1000只, 每只注射油苗1mL, 分左右两侧胸肌两针注射, 每针0.5毫升。间隔2-3周, 免疫第二次和第三次。免疫后3周, 收集免疫鸡蛋。测定蛋黄特异性抗HBsAg抗体的效价, 当ELISA效价高于1:10000时, 开始规模化收集高免蛋, 用于制备含有抗HBsAg免疫球蛋白的高免蛋粉。

[0034] III. 收集蛋黄液

[0035] 1. 鸡蛋消毒使用二氧化氯作为消毒剂, 按照配比说明配制消毒液, 将鸡蛋倾倒入消毒液, 浸泡消毒10min以上。期间如有鸡蛋破损, 应及时清理。浸泡消毒后的鸡蛋使用洁净水对鸡蛋进行冲刷, 清洗后的鸡蛋进入风干系统, 保证鸡蛋进入打蛋设备前的干燥状态。

[0036] 2. 蛋液收集鸡蛋风干完毕即进入打蛋机, 机械手可对鸡蛋进行破壳、分开, 这时蛋液流出, 进入搅拌罐。此时应保证蛋液中无蛋壳。

[0037] IV. 含有IgY免疫球蛋白的高免蛋粉的制备

[0038] 1. 将打好的蛋黄液收集到搅拌罐中, 每罐250kg, 将所得蛋黄液与清水、白砂糖、麦芽糊精及变性淀粉以38:6:3:2:1的比例混合稀释, 搅拌约30min后再泵入到500kg罐中准备生产。将混匀的蛋液混合物转入500kg罐中再次搅拌, 确保生产前蛋液混合物均匀一致。将蛋液混合物打入干燥塔内进行雾化, 瞬时干燥。收集喷雾干燥后的蛋粉, 得到含有IgY免疫球蛋白的高免蛋粉。

[0039] 2. ELISA抗体效价检测取1g蛋粉, 溶解在10mL生理盐水中, 作为待测备用。检测步骤如下: 用包被缓冲液将已知抗原稀释至3~5 $\mu$ g/mL, 每孔加0.1mL, 4℃过夜; 次日洗涤三次、抛干; 加一定稀释的待检(未知抗体)0.1mL于上述已包被的反应孔中, 在37℃下孵育1-2h, 洗涤三次、抛干; (同时做空白、阴性及阳性孔对照) 于反应孔中, 加入新鲜稀释的酶标第二抗体(抗抗体)0.1mL; 在37℃下孵育1-2小时, 洗涤三次; 最后一遍用DDW洗涤、抛干; 加底物液,  $\rightarrow$ 37℃~30分钟, 加终止液; 用ELISA检测仪测定OD值, 并计算出P/N比值。

[0040] 结果表明: 已知阳性样品与已知阴性样品的比值(P/N)  $\geq$  2.1, 而且已知阳性样品的OD值  $\geq$  0.4; 在上述条件成立的情况下, 如果待检样品与已知阴性样品的比值(P/N)  $\geq$  2.1, 而且待检样品的OD值  $\geq$  0.4, 则判为阳性, 否则判为阴性。检测结果: ELISA结果在1:10000-1:30000之间(我们判为合格的标准是  $\geq$  1:10000)。

[0041] 对本实施例中制备好的高免蛋粉做成份鉴定。结果表明: 本次送检的用作制备免疫球蛋白样品的样品富含多种维生素及矿物质, 且未检测到有毒物质, 并且对病原微生物沙门氏菌、大肠杆菌和细菌总数的检测均符合国家和国际标准。

[0042] V. IgY免疫球蛋白溶液的制备

[0043] 将所得高免蛋粉与纯水以1:10的比例制成防腐剂混合液。

[0044] (二) 胰抑素C测定试剂盒的制备

[0045] 将所得的IgY免疫球蛋白溶液与体外诊断试剂混合,其中将IgY免疫球蛋白溶液与试剂的比例按0.45%、0.5%、1%、1.5%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%配制了12个试剂盒。防腐剂的用量不影响试剂盒的有效成份及性能指标作为前提,结果如下表3。

表3 IgY免疫球蛋白溶液对试剂盒的性能的影响

| 试剂盒性能<br>IgY 免疫球蛋白溶液<br>用量 | 空白吸光度值 | 分析灵敏度<br>(mg/L) | 准确度<br>(质控偏差) | 批内精密度 | 线性范围<br>(0-8.0mg/L<br>范围内, 相关系数 r 应<br>不小于 0.9900) |
|----------------------------|--------|-----------------|---------------|-------|----------------------------------------------------|
| 0.45%                      | 0.028  | 0.055           | 2.5%          | 3.7%  | 0.9997                                             |
| 0.5%                       | 0.029  | 0.065           | 3.7%          | 3.1%  | 0.9998                                             |
| 1.0%                       | 0.028  | 0.065           | 3.9%          | 3.5%  | 0.9996                                             |
| 1.5%                       | 0.027  | 0.063           | 6.2%          | 3.4%  | 0.9989                                             |
| 2.5%                       | 0.025  | 0.073           | 6.5%          | 3.3%  | 0.9987                                             |
| 3.0%                       | 0.028  | 0.074           | 7.6%          | 3.5%  | 0.9997                                             |
| 3.5%                       | 0.027  | 0.086           | 8.5%          | 3.9%  | 0.9995                                             |
| 4.0%                       | 0.026  | 0.156           | 5.6%          | 5.5%  | 0.9996                                             |
| 4.5%                       | 0.025  | 0.093           | 2.6%          | 4.5%  | 0.9989                                             |
| 5.0%                       | 0.028  | 0.087           | 5.6%          | 5.2%  | 0.9988                                             |
| 5.5%                       | 0.026  | 0.125           | 7.8%          | 3.5%  | 0.9998                                             |
| 6.0%                       | 0.027  | 0.178           | 6.5%          | 3.6%  | 0.9997                                             |
| 可接受范围                      | ≤0.05  | ≤0.2mg/L        | ±10%          | ≤6%   | 0.9900                                             |

[0046] 上述实验数据表明,IgY免疫球蛋白溶液的用量在0.45%~6.0%范围内,胰抑素C测定试剂盒的各项技术指标均在可接受范围内,但在0.5%~3.5%范围内各项指标测定结果为最理想状态。因此配制IgY免疫球蛋白溶液体积为0.5%、1.0%、1.5%、2.5%、3.0%、3.5%系列的胰抑素C测定试剂盒,效期后12个月,观察试剂盒的技术指标,直至效期后12个月,结果如下表4。

表4 12个月后IgY免疫球蛋白溶液对试剂盒的性能的影响

| 试剂盒性能<br>IgY 免疫球蛋白溶液<br>用量 | 空白吸光度值 | 分析灵敏度<br>(mg/L) | 准确度<br>(质控偏差) | 批内精密度 | 线性范围<br>(0-8.0mg/L<br>范围内, 相关系数 r 应<br>不小于 0.9900) |
|----------------------------|--------|-----------------|---------------|-------|----------------------------------------------------|
| 0.5%                       | 0.028  | 0.068           | 3.9%          | 3.2%  | 0.9995                                             |
| 1.0%                       | 0.027  | 0.072           | 4.5%          | 3.8%  | 0.9997                                             |
| 1.5%                       | 0.029  | 0.166           | 6.9%          | 4.3%  | 0.9989                                             |
| 2.5%                       | 0.035  | 0.162           | 5.7%          | 3.9%  | 0.9987                                             |
| 3.0%                       | 0.047  | 0.098           | 7.3%          | 5.3%  | 0.9998                                             |
| 3.5%                       | 0.049  | 0.159           | 6.8%          | 4.7%  | 0.9996                                             |
| 可接受范围                      | ≤0.05  | ≤0.2mg/L        | ±10%          | ≤6%   | 0.9900                                             |

[0047] 上述实验数据表明,直至效期后12个月,IgY免疫球蛋白溶液保持良好的防腐效果。采用IgY免疫球蛋白溶液作为防腐剂的防腐效果与叠氮钠的防腐效果进行了比较(胱抑素C测定试剂盒均为近效期批号,第12个月),结果如下表5。

表5 IgY免疫球蛋白溶液与叠氮钠的防腐效果的比较

| 防腐剂的比较结果       | IgY 免疫球蛋白溶液 (本申请)             | 叠氮钠 (同类试剂盒)                      |
|----------------|-------------------------------|----------------------------------|
| 试剂 2 (抗体液) 的外观 | 试剂为淡黄色透明液体, 清透, 无悬浮物          | 试剂为淡黄色液体, 混浊                     |
| 空白吸光度          | 0.044                         | 0.218                            |
| 灵敏度 (mg/L)     | 0.17                          | 2.2                              |
| 准确度 (质控偏差)     | 4.7%                          | 12.1%                            |
| 批内精密度          | 3.5%                          | 9.3%                             |
| 线性范围           | 0.2-8.0mg/L 范围内, 相关系数为 0.9997 | 0.2-8.0mg/L 范围内, 相关系数 r 为 0.9582 |

[0048] 上述实验数据表明,与叠氮钠相比,IgY免疫球蛋白溶液做防腐剂,试剂盒的外观及试剂盒的各项技术指标方面都较市场上采用叠氮钠作为防腐剂的同类产品优越。

[0049] 实施例二以如实施例一相同的方法制备IgY免疫球蛋白溶液,将IgY免疫球蛋白溶液作为防腐剂制备胱抑素C测定试剂盒,试剂盒配方:

R1: pH6.9 磷酸盐缓冲液 100 mmol/L

聚乙二醇 6000 1.60%

乙二胺四乙酸二钠 10.2 mmol/l

IgY 免疫球蛋白溶液 1.0%

R2: pH6.9 磷酸盐缓冲液 100 mmol/L

抗人朊抑素 C 抗体致敏乳胶颗粒 0.15 mL /L

牛血清白蛋白 0.01 g/m L

IgY 免疫球蛋白溶液 1.0%

[0050] 本实施例描述的朊抑素C测定试剂盒,适合于各种类型的全自动生化分析仪,以日立7060全自动生化分析仪为例,其操作如下表6。

表6操作条件

| 加入物                             | 空白管   | 校准管   | 质控管   | 样品管   |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 蒸馏水                             | 3u1   |       |       |       |
| 校准品                             |       | 3u1   |       |       |
| 质控品                             |       |       | 3u1   |       |
| 试剂 1                            | 240u1 | 240u1 | 240u1 | 240u1 |
| 混匀, 37℃孵育时间 5 分钟, 读取各管吸光度 $A_1$ |       |       |       |       |
| 试剂 2                            | 60u1  | 60u1  | 60u1  | 60u1  |
| 混匀, 反应 5 分钟, 读取各管吸光度 $A_2$      |       |       |       |       |

[0051] 结果计算:采用非线性定标中的Spline方程式,仪器自动生成定标曲线,根据定标曲线可自动计算出样品中的朊抑素C浓度,如表7所示。

[0052] 表7以本申请的IgY免疫球蛋白溶液为防腐剂的朊抑素C测定试剂盒血清反应曲线数据

| 反应时间 (秒) | 吸光度值 (ABS) | 反应平衡率的计算 (以 300 秒时为终点计算) |
|----------|------------|--------------------------|
| 0        | 0.009      | 0.83%                    |
| 60       | 0.135      | 12.1%                    |
| 90       | 0.411      | 38.1%                    |
| 120      | 0.803      | 74.4%                    |
| 150      | 0.103      | 95.4%                    |
| 180      | 1.047      | 96.9%                    |
| 210      | 1.056      | 97.8%                    |
| 240      | 1.068      | 98.8%                    |
| 270      | 1.071      | 99.1%                    |
| 300      | 1.080      | 100%                     |

[0053] 在表7中血清与试剂反应到150秒时已经完成了整个反应的95.4%,试剂盒的反应一般情况下以完成整个反应的95%以上即可认定达到平衡。所以,血清与试剂反应150秒就已经达到平衡,如表8所示。

表8以叠氮钠为防腐剂的朊抑素C测定试剂盒的血清反应曲线数据

| 反应时间 (秒) | 吸光度值 (ABS) | 反应平衡率的计算 (以 300 秒时为终点计算) |
|----------|------------|--------------------------|
| 0        | 0.009      | 0.83%                    |
| 60       | 0.101      | 9.35%                    |
| 90       | 0.152      | 14.07%                   |
| 120      | 0.211      | 19.5%                    |
| 150      | 0.312      | 28.9%                    |
| 180      | 0.744      | 68.9%                    |
| 210      | 0.952      | 88.1%                    |
| 240      | 1.032      | 95.6%                    |
| 270      | 1.056      | 97.8%                    |
| 300      | 1.079      | 99.9%                    |

[0054] 从表8中可以看出,同浓度的血清与试剂反应到240秒时才完成整个反应的95.6%与表1比较,反应速度明显减慢。

[0055] 采用的两种不同防腐剂的测定试剂盒与同浓度血清进行反应的数据及曲线图进行验证,采用IgY免疫球蛋白溶液作防腐剂,可以保持抗体的活性,加速抗原、抗体的反应。而采用叠氮钠作防腐剂,反应明显减慢,也同时说明叠氮钠在进行防腐的同时,对抗体、抗原的反应有一定的抑制作用。

[0056] 实施例三以如实施例一的方法制备IgY免疫球蛋白溶液,将IgY免疫球蛋白溶液作为防腐剂制备天门冬氨酸氨基转移酶测定试剂盒,试剂盒配方:

R1: Tris 缓冲液            50mmol/L;  
       MDH $\geq$ 3000U/L;  
       LDH $\geq$ 6500U/L;  
       IgY 免疫球蛋白溶液    2.0%;

R2: L—天门冬氨酸        15mmol/L;  
       NADH                    0.18mmol/L;  
        $\alpha$ -酮戊二酸            15mmol/L  
       IgY 免疫球蛋白溶液    2.0%

[0057] 本实施例描述的天门冬氨酸氨基转移酶测定试剂盒,适合于各种类型的全自动生化分析仪,以日立7060全自动生化分析仪为例,其操作如表9。

表9操作条件

| 加入物                                                    | 空白管   | 校准管   | 质控管   | 样品管   |
|--------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 蒸馏水                                                    | 15u1  |       |       |       |
| 校准品                                                    |       | 15u1  |       |       |
| 质控品                                                    |       |       | 15u1  |       |
| 试剂 1                                                   | 200u1 | 200u1 | 200u1 | 200u1 |
| 混合, 37℃孵育时间 3-5 分钟;                                    |       |       |       |       |
| 试剂 2                                                   | 100u1 | 100u1 | 100u1 | 100u1 |
| 混合, 37℃孵育 90 秒, 连续监测 1-3 分钟各管吸光度变化, 计算 $\Delta A/\min$ |       |       |       |       |

[0058] 结果计算：

$$\text{AST (U/L)} = (\Delta A_{\text{测定}}/\text{min} - \Delta A_{\text{空白}}/\text{min}) \times 3376$$

3376为在波长340nm/410nm,比色杯光径1cm下的理论K值,其中NADH在340nm处的毫摩尔消光系数取 $6.22 \times 10^3$ ,根据实测K值计算。如表10所示。

[0059] 表10以IgY免疫球蛋白溶液作防腐剂的试剂盒测定数据与叠氮钠作防腐剂的试剂盒测定数据对比表

| 标本号 | IgY 免疫球蛋白溶液作防腐剂测定结果 | 叠氮钠作防腐剂测定结果 |
|-----|---------------------|-------------|
| 1   | 29                  | 23          |
| 2   | 150                 | 111         |
| 3   | 65                  | 51          |
| 4   | 9                   | 7           |
| 5   | 48                  | 40          |
| 6   | 111                 | 96          |
| 7   | 96                  | 87          |
| 8   | 82                  | 68          |
| 9   | 197                 | 151         |
| 10  | 356                 | 284         |
| 11  | 895                 | 778         |
| 12  | 28                  | 26          |
| 13  | 61                  | 52          |
| 14  | 47                  | 42          |
| 15  | 59                  | 46          |
| 16  | 22                  | 18          |
| 17  | 19                  | 17          |
| 18  | 31                  | 25          |
| 19  | 13                  | 11          |
| 20  | 40                  | 36          |

[0060] 通过表10的两组测定结果进行比较,结果表明用IgY免疫球蛋白溶液作防腐剂的试剂盒的测定结果明显比用叠氮钠作防腐剂的试剂盒的测定结果高10%-35%,因此,进一步说明了IgY免疫球蛋白溶液对测定血清的天门冬氨酸氨基转移酶有预活化作用,使测定结果更为真实可靠,是酶应试剂盒的防护剂兼预活化剂。

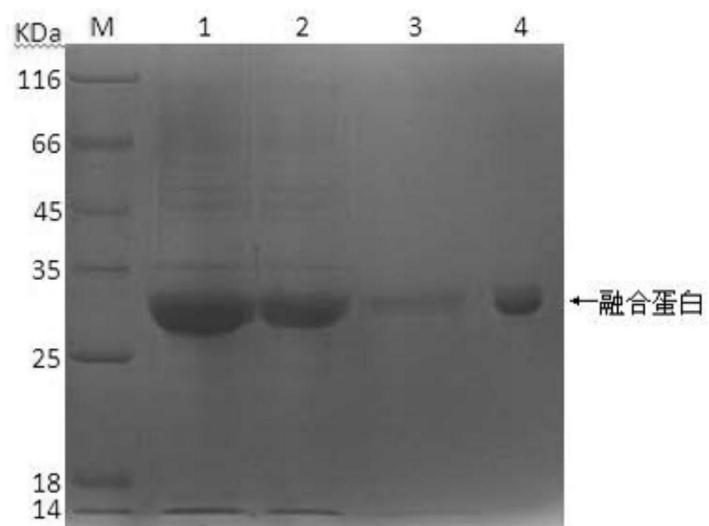


图1

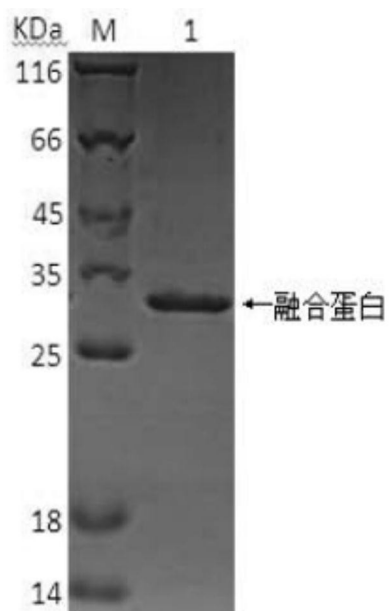


图2

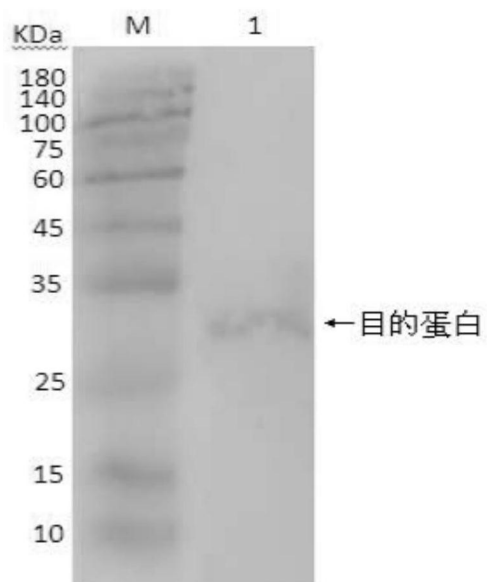


图3

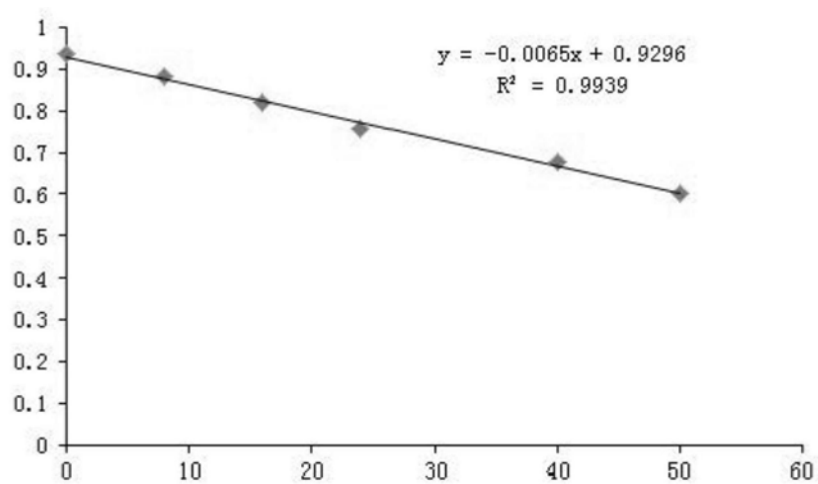


图4

|         |                                                |         |            |
|---------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂                            |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN111060684A</a>                   | 公开(公告)日 | 2020-04-24 |
| 申请号     | CN2019111404890.1                              | 申请日     | 2019-12-31 |
| [标]发明人  | 尹鹏                                             |         |            |
| 发明人     | 尹鹏                                             |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/539 C07K16/00                           |         |            |
| CPC分类号  | C07K16/00 G01N33/539                           |         |            |
| 代理人(译)  | 李成龙                                            |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供了一种具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂，所述防腐剂为IgY免疫球蛋白溶液，其用量为体外诊断试剂盒中试剂体积总量的0.45%至6.0%。本发明提供了具有双重功效的体外诊断试剂盒防腐剂，不仅对试剂盒能够进行有效的防腐，且性质稳定、低毒安全、生产成本低，而且能够作为免疫试剂盒中抗体液的保护剂，使测定结果更准确，是一种较为理想的新的体外诊断试剂盒防腐剂。

