



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104792981 B

(45)授权公告日 2016. 10. 05

(21)申请号 201410023932.8

审查员 贾静

(22)申请日 2014.01.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104792981 A

(43)申请公布日 2015.07.22

(73)专利权人 辽宁成大动物药业有限公司

地址 117000 辽宁省本溪市溪湖区石桥子
仙榆路1号

(72)发明人 苏文全 曾祥伟 赵森 汪婷

于铁富 袁德明 卫广森

(74)专利代理机构 沈阳亚泰专利商标代理有限

公司 21107

代理人 韩辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

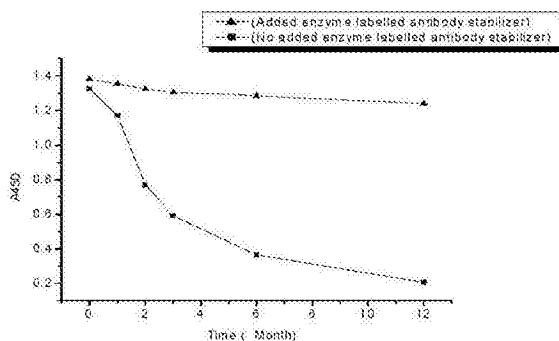
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种酶标记抗体结合物稳定剂及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种酶标记抗体结合物稳定剂及其应用,其特点在于该酶标记抗体结合物稳定剂含有鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖,半胱氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、谷氨酸钠的混合物、pH为7.0~7.6的缓冲盐粉末及水;该酶标记抗体结合物稳定剂用于保护酶标记抗体,提高其稳定性,进而提高酶联免疫检测的稳定性和准确性。本发明将生物表面活性剂用于酶标记抗体结合物稳定剂开发,研制出了一种新型、绿色、高效的酶标记抗体结合物稳定剂,可使酶标记抗体结合物在2~8℃环境下保藏依然保持较高的活性,明显提高了酶标记抗体的稳定性,提高了酶联免疫检测的稳定性和准确性,同时对其它蛋白质制品也有良好的保护作用。



1. 一种酶标记抗体结合物稳定剂,其特征在于含有生物表面活性剂鼠李糖脂,还含有右旋糖酐、海藻糖,半胱氨酸。

2. 根据权利要求1所述酶标记抗体结合物稳定剂,其特征在于,还包括丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、谷氨酸钠的混合物、pH 为7.0~7.6 的PBS 缓冲液。

3. 根据权利要求2所述酶标记抗体结合物稳定剂,其特征在于,酶标记抗体结合物稳定剂包括:配置pH7.0~7.6的PBS 缓冲液,PBS 缓冲液中加入鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖,半胱氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、谷氨酸钠的混合物,其中鼠李糖脂的终浓度为0.001%~0.1%;右旋糖酐终浓度为1%~10%;海藻糖终浓度为3%~10%;半胱氨酸终浓度为0.01%~1.0%;苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸钠的混合物终浓度为0.2%~5%,各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0.1:0.1:0.1:0.1。

4. 根据权利要求3所述酶标记抗体结合物稳定剂,其特征在于,酶标记抗体结合物稳定剂包括:配置pH7.4 的PBS 缓冲液,PBS 缓冲液中加入鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖,半胱氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、谷氨酸钠的混合物,所述的右旋糖酐为右旋糖酐40,其中鼠李糖脂的终浓度为0.005%;右旋糖酐40终浓度为2%;海藻糖终浓度为5%;半胱氨酸终浓度为0.05%;苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸钠的混合物该混合物终浓度为1.0%,各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0.1:0.1:0.1:0.1。

5. 根据权利要求3所述酶标记抗体结合物稳定剂,其特征在于,酶标记抗体结合物稳定剂包括:配置pH7.4 的PBS 缓冲液,PBS 缓冲液中加入鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖,半胱氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、谷氨酸钠的混合物,所述的右旋糖酐为右旋糖酐40,其中鼠李糖脂的终浓度为0.002%;右旋糖酐40终浓度为1%;海藻糖终浓度为5%;半胱氨酸终浓度为0.05%;苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸钠的混合物该混合物终浓度为1.0%,各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0.1:0.1:0.1:0.1。

6. 根据权利要求1或2或3所述酶标记抗体结合物稳定剂的用途,其特征在于,用于保护酶标记抗体,提高其稳定性,进而提高酶联免疫检测的稳定性和准确性。

7. 根据权利要求6所述酶标记抗体结合物稳定剂的用途,其特征在于,具体应用方法为,将固体酶标记抗体结合物稳定剂成分用超纯水溶解,按PBS 缓冲液的应用浓度进行稀释,然后用0.22微米的滤膜除菌过滤,制成应用液,备用。

一种酶标记抗体结合物稳定剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物表面活性剂,特别是涉及一种酶标记抗体结合物稳定剂及其应用,属于生物检测技术领域。具体说,本发明所述的稳定剂与酶联免疫检测中用的酶标记抗体结合物混合后,置2~8℃环境下存放,可长期保持酶标记抗体结合物的蛋白酶催化活性及抗体与抗原特异性结合的反应活性。

背景技术

[0002] 生物表面活性剂,是微生物在一定条件下培养时,在其代谢过程中分泌出的具有一定表面活性的代谢产物,如糖脂、多糖脂、脂肽或中性类脂衍生物等,其具有降低表面张力、稳定乳化液和增加泡沫等作用的同时,还具有一般化学合成表面活性剂所不具备的无毒、能生物降解等优点。具体如下:①选择性广,对环境友好;②庞大而复杂的化学结构使得表面活性和乳化能力更强;③分子结构类型多样,具有许多特殊的官能团,专一性强;④原料在自然界广泛存在且价廉;⑤发酵生产是典型的“绿色”工艺等。

[0003] 生物产生的生物表面活性剂包括许多不同的种类。依据他们的化学组成和微生物来源可分为糖脂、脂肽和脂蛋白、脂肪酸和磷脂、聚合物及全胞表面本身等五大类。

[0004] 不同种类微生物产生的生物表面活性剂种类各不相同,研究最多的是糖脂类,包括槐糖脂、海藻糖脂、鼠李糖脂、蔗糖酯等,其中鼠李糖脂因其化学结构种类多样,性能独特,应用前景广泛,成为当前研究的重点。鼠李糖脂(图1)是由铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)合成的一种重要的生物表面活性剂,不仅具有乳化、增溶、降低表界面张力、络合金属离子等功能,而且毒性小、易于生物降解,因而在石油开采、医药、食品、日化及环境保护等许多领域具有极大的应用潜力,又由于其较强的抗菌性能和抗毒活性,在活性污泥处理中也有应用。

[0005] 酶标记抗体在储存过程中,存在容易降解、蛋白酶催化活性及抗体与抗原特异性结合的反应活性下降等问题,常需添加保护剂,常用的保护剂有小分子糖类物质、化学合成表面活性剂等,但效果并不理想,蛋白类保护剂虽有明确保护效果,但可能会干扰酶联免疫检测结果,使其应用受到一定限制。目前,国内外有很多化学合成表面活性剂应用于酶标记抗体的蛋白酶催化活性及抗体与抗原特异性结合的反应活性保护方面的实例,但生物表面活性剂在此方面的研究却未见报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术存在的上述不足,经过深入研究和大量试验后给出了一种酶标记抗体结合物稳定剂及其应用。本发明所述的稳定剂与酶联免疫检测中用的酶标记抗体结合物混合后,置2~8℃环境下存放,可长期保持酶标记抗体结合物的蛋白酶催化活性及抗体与抗原特异性结合的反应活性。

[0007] 本发明给出的技术解决方案是:这种酶标记抗体结合物稳定剂,其特点在于含有生物表面活性剂。

[0008] 所述的生物表面活性剂为鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖、半胱氨酸。

[0009] 所述酶标记抗体结合物稳定剂还包括丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、谷氨酸钠的混合物、pH 为7.0~7.6 的PBS 缓冲液。

[0010] 所述酶标记抗体结合物稳定剂包括：配置pH7.0~7.6的PBS 缓冲液，PBS 缓冲液中加入鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖、半胱氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、谷氨酸钠的混合物，其中鼠李糖脂的终浓度为0.001%~0.1%；右旋糖酐终浓度为1%~10%；海藻糖终浓度为3%~10%；半胱氨酸终浓度为0.01%~1.0%；苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸钠的混合物终浓度为0.2%~5%，各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0~10:0~10:0~10:0~10。

[0011] 所述酶标记抗体结合物稳定剂用于保护酶标记抗体，提高其稳定性，进而提高酶联免疫检测的稳定性和准确性。

[0012] 所述酶标记抗体结合物稳定剂的应用，在于酶标记抗体结合物稳定剂对其它蛋白类制品有良好的保护作用。

[0013] 所述酶标记抗体结合物稳定剂的应用，其具体应用方法为，将固体酶标记抗体结合物稳定剂成分用超纯水溶解（按PBS 缓冲液的应用浓度进行稀释），然后用0.22微米的滤膜除菌过滤，制成应用液，备用。

[0014] 本发明用来被保护的酶标记抗体结合物是本领域技术人员所熟悉的酶标记抗体结合物，例如：辣根过氧化物酶标小鼠抗兔IgM抗体、碱性磷酸酶标记羊抗小鼠IgG等。

[0015] 本发明采用的生物表面活性剂鼠李糖脂来源于大庆沃太斯化工有限公司，经进一步纯化去除杂质后，用于酶标记抗体结合物稳定剂配制，其终浓度为0.001%~0.1%。鼠李糖脂在本发明中不仅起乳化、增溶、降低表界面张力作用，而且兼有防腐剂、络合金属离子、降低蛋白分解酶活性的作用。

[0016] 所述右旋糖酐来源于上海华贸药业有限公司，终浓度为1%~10%，与生物表面活性剂鼠李糖脂配合应用，起到类白蛋白作用。

[0017] 所述海藻糖为蛋白稳定剂，来源于广东天辰生物技术有限公司，海藻糖终浓度为3%~10%。

[0018] 所述半胱氨酸为抗氧化剂，半胱氨酸终浓度为0.01%~1.0%。

[0019] 所述苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸钠的混合物为常用稳定剂的成分，该混合物终浓度为0.2%~5%，各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0~10:0~10:0~10:0~10。

[0020] 所述PBS 缓冲液，采用PBS 缓冲盐粉末，由磷酸一氢钠、磷酸二氢钠、氯化钠组成。

[0021]

pH	7.0	7.2	7.4	7.6
H ₂ O	1000mI	1000mI	1000mI	1000mI
NaCl	8.5g	8.5g	8.5g	8.5g
Na ₂ HPO ₄	2.2g	2.2g	2.2g	2.2g
NaH ₂ PO ₄	0.4g	0.3g	0.2g	0.1g

[0022] 按需要的pH配方进行称取，定容至1000mI，然后用0.22微米的滤膜除菌过滤，制成应用液，备用。

[0023] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于。

[0024] 本发明将生物表面活性剂用于酶标记抗体结合物稳定剂开发,研制出了一种新型、绿色、高效的酶标记抗体结合物稳定剂,该稳定剂同时对其它蛋白类制品有良好的保护作用。

[0025] 本发明提供的稳定剂溶液经过配方优化,可以将酶标抗体活性稳定在12个月以上,而且在选定浓度下,提高酶结合物稳定性效果明显,延长了酶结合物溶液的保存期,且成本低、具有较大价格优势。

[0026] 本发明提供的稳定剂溶液的制备方法,操作简单,易于配制。本发明提供的酶结合物稳定剂可广泛用于生物分析,环境检测,食品检测,动物检测等领域。

附图说明

[0027] 图1酶标抗体稳定剂对辣根过氧化物酶标山羊抗鼠IgG抗体的保护作用。

[0028] 图2酶标抗体稳定剂对酶标记蛋白A的保护作用。

具体实施方式

[0029] 以下的实施例详细说明了本发明,但不用于限制本发明的范围。

[0030] 实施例1:保护辣根过氧化物酶标山羊抗鼠IgG抗体。

[0031] 该酶标记结合物稳定剂包括鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖,半胱氨酸,以及苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸钠的混合物、pH为7.0~7.6 的缓冲盐粉末及水。

[0032] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下。

[0033] 1、制备方法。

[0034] 1.1配置pH7.4 的磷酸缓冲液(PBS)。

[0035] 1.2向步骤1.1所得的缓冲液中加入上述组分,配置稳定剂溶液。鼠李糖脂的终浓度为0.005%;右旋糖酐40终浓度为2%;海藻糖终浓度为5%;半胱氨酸终浓度为0.05%;苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸钠的混合物该混合物终浓度为1.0%,各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0.1:0.1:0.1:0.1。

[0036] 1.3配置好的溶液4℃保存,用时取出恢复至室温使用。分别于0个月、1个月、2个月、3个月、6个月、12个月进行检测。

[0037] 2、检测方法。

[0038] 用0.05mol/L的pH9.6碳酸盐碳酸氢盐缓冲液,配制包被液100mL,终浓度为0.3-0.5μg/mL蛋白。酶标板上每孔加包被液200μL。用封口膜封好,4℃包被12小时后倒空板,加300μL/孔封闭液,再用封口膜封好置于湿盒中37℃ 1小时,最后倒空板。

[0039] 洗板:每孔加入稀释后的洗液300μL,静置数秒,弃去洗液,重复4次,拍干。

[0040] 加样:将阴性对照,阳性对照和空白(样品稀释液)加入到酶标板内,200μL/孔,均设1孔。取1mL稀释液,加入10μL待检样品,充分混合,按顺序各加入稀释后的待检标本200μL/孔。振荡混匀后贴上封口膜,置37℃温育30分钟。

[0041] 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗液300μL,静置数秒,弃去洗液,重复5次,拍干。

[0042] 加酶标记物:每孔加入200μL酶结合物,加盖封板膜,振荡混匀。置37℃温箱中,温

育30分钟。

[0043] 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗液300 μ I,静置数秒,弃去洗液,重复6次,拍干。

[0044] 显色:每孔依次加入底物A、B液各100 μ I,加盖封板膜,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟。

[0045] 终止:每孔加入终止液各50 μ I,振荡混匀终止反应。

[0046] 测定:用空白对照孔调零,并于30分钟内用酶标仪单波长450nm测定各孔OD值。

[0047] 结果判定。

[0048] 每个试验结果独立使用,通过(Cut off)值判定结果。阳性血清的 $A_{450} \geq$ 阴性对照孔的2.1倍并且 A_{450} 大于0.1。

[0049] 计算临界值。

[0050] $Cut\ off(C.O)=0.10 +$ 阴性对照平均值(NC) A_{450} 值(当阴性平均值 A_{450} 值小于0.1时,按0.1计算;当阴性平均值 A_{450} 值大于或等于0.1时按实际值计算)。

[0051] 结果如图1所示,从图1中可以看出,添加了酶标抗体稳定剂后,实验结果要明显好于未添加稳定剂的对照组。各组分配比为,鼠李糖脂的终浓度为0.005%;右旋糖酐40终浓度为2%;海藻糖终浓度为5%;半胱氨酸终浓度为0.05%;苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸的混合物该混合物终浓度为1.0%,各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0.1:0.1:0.1:0.1。该配比的组分对于保护辣根过氧化物酶标山羊抗鼠IgG抗体具有良好的效果。

[0052] 实施例2:酶标记蛋白A。

[0053] 该酶标记结合物稳定剂包括鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖,半胱氨酸,以及苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸的混合物、pH为7.0~7.6的pH缓冲盐粉末及水。

[0054] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下。

[0055] 1、制备方法。

[0056] 1.1配置pH7.4的磷酸缓冲液(PBS)。

[0057] 1.2向步骤1.1所得的缓冲液中加入上述组分,配置稳定剂溶液。鼠李糖脂的终浓度为0.002%;右旋糖酐40终浓度为1%;海藻糖终浓度为5%;半胱氨酸终浓度为0.05%;苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸的混合物该混合物终浓度为1.0%,各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0.1:0.1:0.1:0.1。

[0058] 1.3配置好的溶液4 $^{\circ}$ C保存,用时取出恢复至室温使用。分别于0个月、1个月、2个月、3个月、6个月、12个月进行检测。

[0059] 2、检测方法。

[0060] 用0.05mol/L的pH9.6碳酸盐碳酸氢盐缓冲液,配制包被液100mI,终浓度为0.3-0.5 μ g/mI蛋白。酶标板上每孔加包被液200 μ I。用封口膜封好,4 $^{\circ}$ C包被12小时后倒空板,加300 μ I/孔封闭液,再用封口膜封好置于湿盒中37 $^{\circ}$ C 1小时,最后倒空板。

[0061] 洗板:每孔加入稀释后的洗液300 μ I,静置数秒,弃去洗液,重复4次,拍干。

[0062] 加样:将阴性对照,阳性对照和空白(样品稀释液)加入到酶标板内,200 μ I/孔,均设1孔。取1mI稀释液,加入10 μ I待检样品,充分混合,按顺序各加入稀释后的待检标本200 μ I/孔。振荡混匀后贴上封口膜,置37 $^{\circ}$ C温育30分钟。

[0063] 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗液300 μ I,静置数秒,弃去洗液,重复5次,

拍干。

[0064] 加酶标记物:每孔加入200 μ I酶结合物,加盖封板膜,振荡混匀。置37 $^{\circ}$ C温箱中,温育30分钟。

[0065] 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗液300 μ I,静置数秒,弃去洗液,重复6次,拍干。

[0066] 显色:每孔依次加入底物A、B液各100 μ I,加盖封板膜,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟。

[0067] 终止:每孔加入终止液各50 μ I,振荡混匀终止反应。

[0068] 测定:用空白对照孔调零,并于30分钟内用酶标仪单波长450nm测定各孔OD值。

[0069] 结果判定。

[0070] 每个试验结果独立使用,通过(Cut off)值判定结果。阳性血清的 $A_{450} \geq$ 阴性对照孔的2.1倍并且 A_{450} 大于0.1。

[0071] 计算临界值。

[0072] $Cut\ off(C.O)=0.10 +$ 阴性对照平均值(NC) A_{450} 值(当阴性平均值 A_{450} 值小于0.1时,按0.1计算;当阴性平均值 A_{450} 值大于或等于0.1时按实际值计算)。

[0073] 结果如图2所示,从图2中可以看出,添加了酶标抗体稳定剂后,实验结果要明显好于未添加稳定剂的对照组,各组分配比,鼠李糖脂的终浓度为0.002%;右旋糖酐40终浓度为1%;海藻糖终浓度为5%;半胱氨酸终浓度为0.05%;苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酸钠的混合物该混合物终浓度为1.0%,各类氨基酸添加比例按上述排列顺序为1:0.1:0.1:0.1:0.1。该配比的组分对于保护酶标记蛋白A具有良好的效果。

[0074] 本发明的特点是:将生物表面活性剂用于酶标记抗体结合物稳定剂开发。生物表面活性剂鼠李糖脂与传统化学类表面活性剂产品相比具有产品稳定性好、适用范围广、绿色环保、可生物降解、不会带来二次污染等优点。鼠李糖脂在本发明中不仅起乳化、增溶、降低表界面张力、保护蛋白作用,而且兼有防腐剂、络合金属离子降低蛋白分解酶活性作用。鼠李糖脂、右旋糖酐与常用的蛋白稳定剂海藻糖、氨基酸等配合应用,进而研制出了一种新型、绿色、高效的酶标记抗体结合物稳定剂,可使于酶标记抗体结合物在2~8 $^{\circ}$ C环境下保藏依然保持较高的活性,明显提高了酶联免疫检测的稳定性和准确性并对其它蛋白类制品也有良好的保护作用。将此技术用于生产实践中,即利于环境保护,也具有巨大的商业价值。

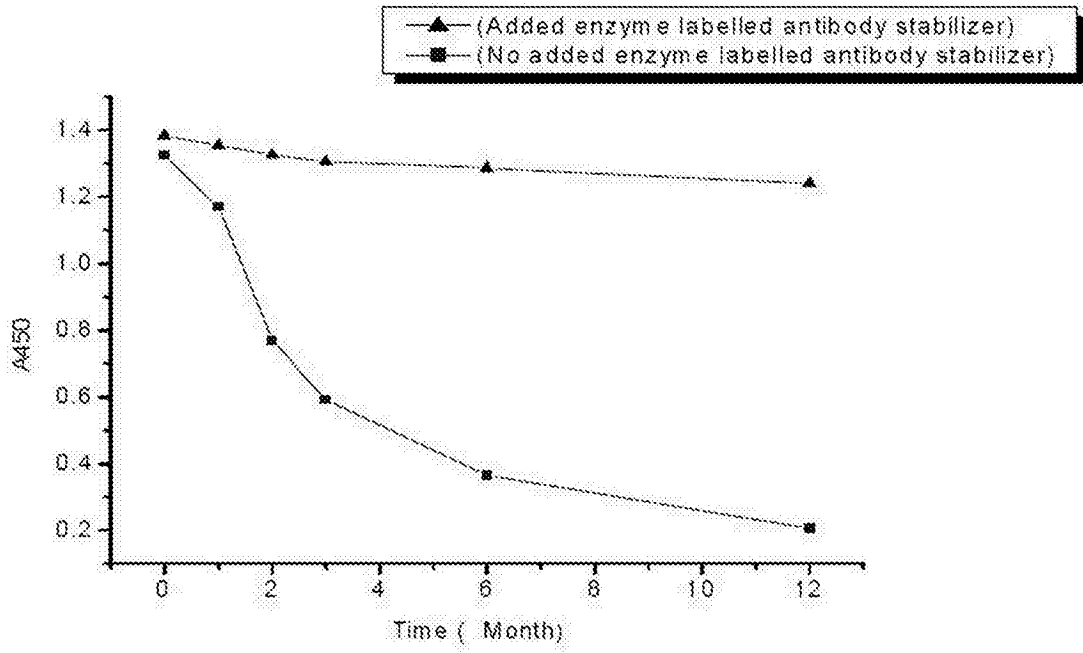


图1

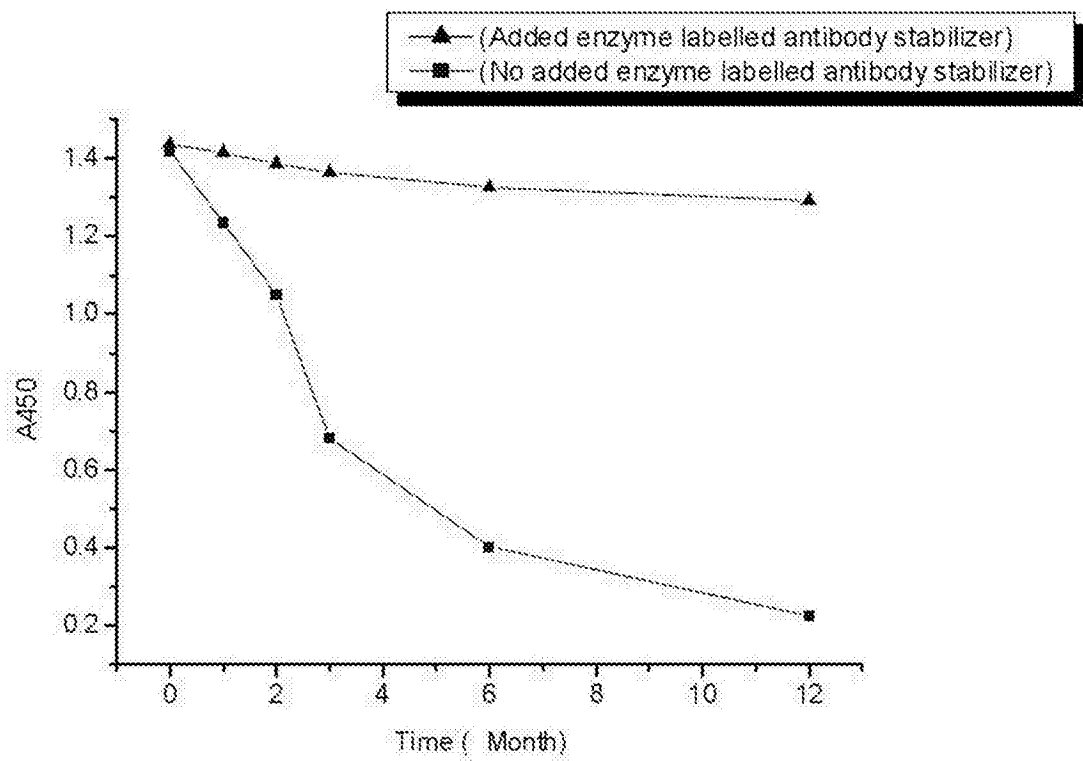


图2

专利名称(译)	一种酶标记抗体结合物稳定剂及其应用		
公开(公告)号	CN104792981B	公开(公告)日	2016-10-05
申请号	CN201410023932.8	申请日	2014-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	辽宁成大动物药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	辽宁成大动物药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	辽宁成大动物药业有限公司		
[标]发明人	苏文全 曾祥伟 赵森 汪婷 于铁富 袁德明 卫广森		
发明人	苏文全 曾祥伟 赵森 汪婷 于铁富 袁德明 卫广森		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	韩辉		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN104792981A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种酶标记抗体结合物稳定剂及其应用，其特点在于该酶标记抗体结合物稳定剂含有鼠李糖脂、右旋糖酐、海藻糖、半胱氨酸、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苏氨酸、谷氨酸钠的混合物、pH为7.0~7.6的缓冲盐粉末及水；该酶标记抗体结合物稳定剂用于保护酶标记抗体，提高其稳定性，进而提高酶联免疫检测的稳定性和准确性。本发明将生物表面活性剂用于酶标记抗体结合物稳定剂开发，研制出了一种新型、绿色、高效的酶标记抗体结合物稳定剂，可使酶标记抗体结合物在2~8°C环境下保藏依然保持较高的活性，明显提高了酶标记抗体的稳定性，提高了酶联免疫检测的稳定性和准确性，同时对其它蛋白类制品也有良好的保护作用。

