



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104531140 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201510025311. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2015. 01. 16

C09K 11/06(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(71) 申请人 王国平

地址 200032 上海市徐汇区东安路 230 弄 1
号 1 楼

申请人 丁士进

(72) 发明人 王国平 丁士进

(74) 专利代理机构 上海信好专利代理事务所
(普通合伙) 31249

代理人 张静洁 贾慧琴

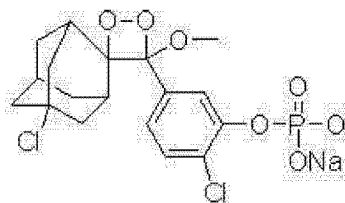
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种酶促化学发光试剂组合物

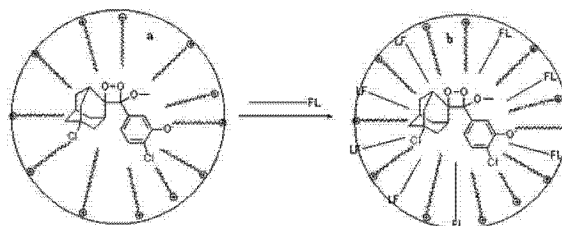
(57) 摘要

本发明公开了一种酶促化学发光试剂组合物,该组合物包含酶促化学发光底物 II、长链季盐表面活性剂及荧光表面活性剂,该酶促化学发光底物 II 具有如下的结构:

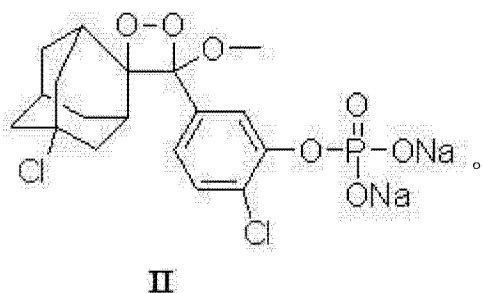


II

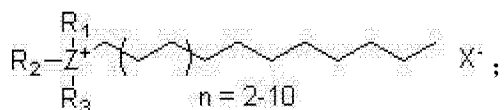
化学发光试剂组合物,应用于酶免疫检测,具有酶免疫检测所需的低噪音和高灵敏度的特点,可广泛应用于大型自动化酶免疫分析仪。本发明的化学发光试剂组合物用于酶免疫检测,底物用量减少到原传统配方用量的十分之一;检测波长范围更窄,在 530~540 纳米之间,避免了传统化学发光所发出的 460~470 纳米波长光的干扰,大大降低了检测噪音,提高了检测信噪比,比传统的化学发光试剂具有更优异的性能。



1. 一种酶促化学发光试剂组合物, 其特征在于, 该组合物包含酶促化学发光底物(II)、长链季盐表面活性剂及荧光表面活性剂, 该酶促化学发光底物(II) 具有如下的结构:



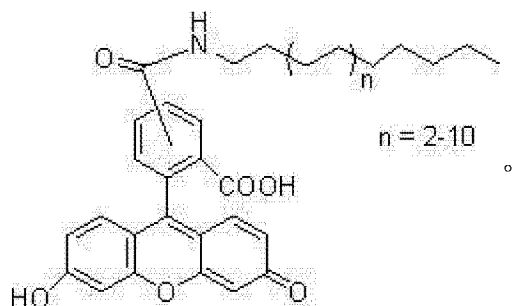
2. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述的长链季盐表面活性剂具有如下的通式:



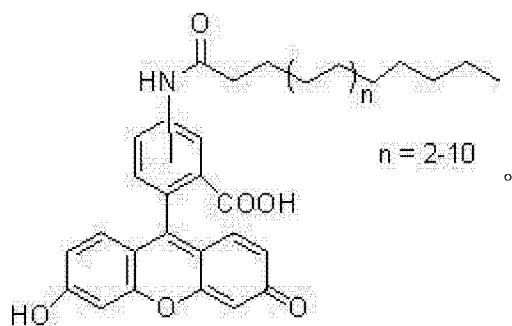
其中, R_1 、 R_2 和 R_3 为 C1-10 的烷基或苄基中的任意一种, R_1 、 R_2 和 R_3 相同或不同; X^- 为氟、氯、溴、碘或甲磺酸根; Z 为氮或磷原子。

3. 如权利要求2所述的组合物,其特征在于,所述的季盐表面活性剂通式中的R₁、R₂和R₃为甲基、乙基、丙基或苄基中的任意一种。

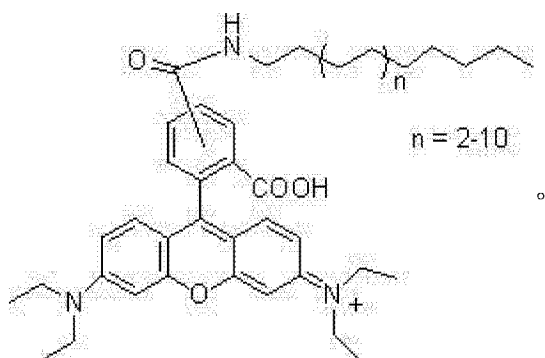
4. 如权利要求 1-3 中任意一项所述的组合物, 其特征在于, 所述的荧光表面活性剂具有如下的通式:



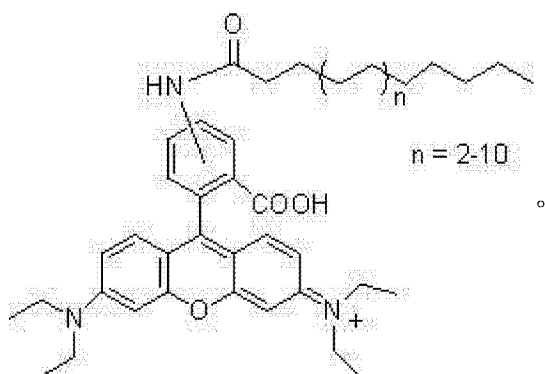
5. 如权利要求 1-3 中任意一项所述的组合物, 其特征在于, 所述的荧光表面活性剂具有如下的通式:



6. 如权利要求 1-3 中任意一项所述的组合物, 其特征在于, 所述的荧光表面活性剂具有如下的通式:



7. 如权利要求 1-3 中任意一项所述的组合物, 其特征在于, 所述的荧光表面活性剂具有如下的通式:



8. 如权利要求 1-3 中任意一项所述的组合物, 其特征在于, 所述的组合物还包含 pH 为 8-11 的磷酸缓冲液, 化学发光底物的浓度为 0.01-20 毫摩尔 / 升。

9. 如权利要求 8 所述的组合物, 其特征在于, 所述的组合物中, 还包含镁盐, 其中, 镁盐的浓度为 0.1-20 毫摩尔 / 升, 所述的长链季盐表面活性剂的浓度为 0.1-50 毫摩尔 / 升, 所述的荧光表面活性剂的浓度为 0.05-20 毫摩尔 / 升。

10. 如权利要求 9 所述的组合物,其特征在于,所述的组合物中,所述的镁盐包含醋酸镁、氯化镁或溴化镁。

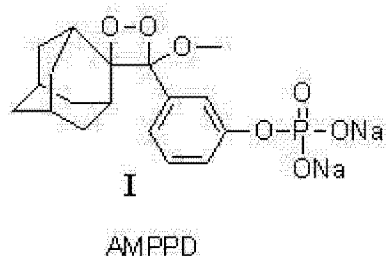
一种酶促化学发光试剂组合物

技术领域

[0001] 本发明属于酶免疫检测领域,涉及一种化学发光试剂,具体来说,涉及一种酶促化学发光试剂组合物。

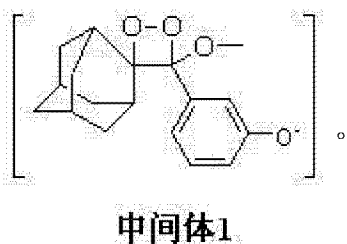
背景技术

[0002] AMPPD 作为国际公认的第三代化学发光底物,现在已有成熟稳定的配方,该配方试剂已经广泛地应用于大型自动化免疫分析仪上。然而,AMPPD 底物与碱性磷酸酶在室温下反应发光比较缓慢,通常需要在 37℃ 的条件下,反应 1 小时才能达到最大值。因此,该配方试剂在应用上受到一些限制。AMPPD (化学发光底物 I) 具有如下结构:

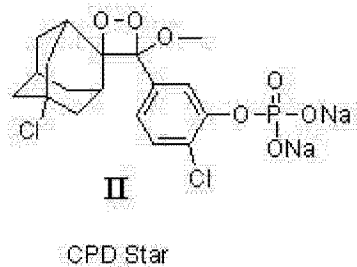


。该 AMPPD 化学发光反应的中间体为中间体 1,其结构

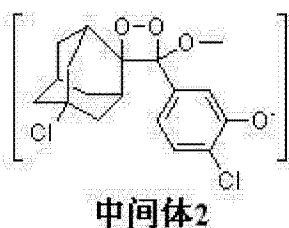
为:



[0003] 新一代的酶促化学发光底物 CPD Star (化学发光底物 II) 具有如下结构:



。其化学发光反应的中间体具有如下结构:



。对比上述 AMPPD 与 CPD Star 的分子结构可以看出,由于 CPD

Star 分子中多两个氯原子,它们具有拉电子的效应,当底物与酶反应脱去磷酸基后,其中间

体 2 能比 AMPPD 的中间体 1 更快速分解,使底物 CPD Star 具有更快的反应速率和更高的发光强度。

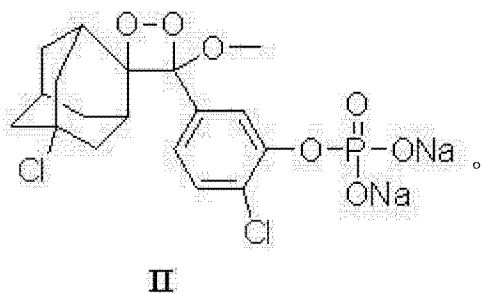
[0004] 虽然已知 CPD Star 具有比 AMPPD 更快的发光速度和更高的发光强度,目前已经也将其开始应用于自动化酶免疫分析仪上。但目前所使用的产品主要是用添加增强剂的配方技术,而没有发挥这个新颖化学发光底物的最佳性能。

[0005] 因此,亟需开发一种化学发光试剂组合物,以充分发挥 CPD Star 作为发光底物的最佳性能。

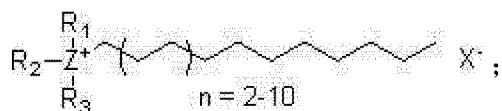
发明内容

[0006] 本发明的目的是通过能量转移的方法,提出一种与传统增强剂配方完全不同的配方技术,充分发挥 CPD Star 作为发光底物的最佳性能。

[0007] 为达到上述目的,本发明提供了一种酶促化学发光试剂组合物,该组合物包含酶促化学发光底物 II、长链季盐表面活性剂及荧光表面活性剂,该酶促化学发光底物 II 具有如下的结构:



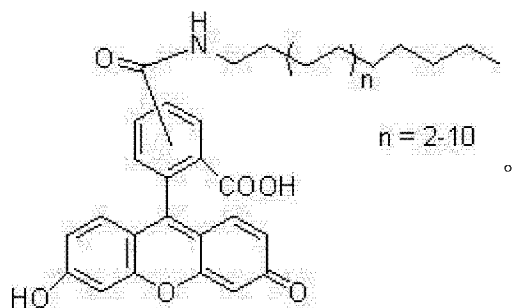
[0008] 上述的组合物,其中,所述的长链季盐表面活性剂具有如下的通式:



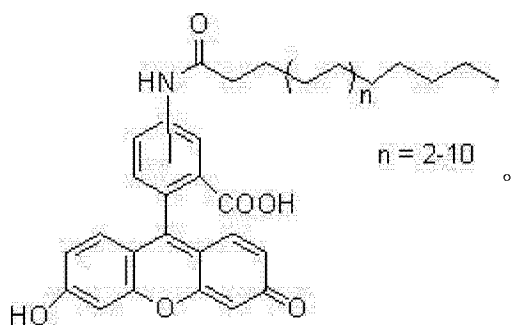
其中, R_1 、 R_2 和 R_3 为 C1-10 的烷基或苄基中的任意一种, R_1 、 R_2 和 R_3 相同或不同; X^- 为氟、氯、溴、碘或甲磺酸根; Z 为氮或磷原子。

[0009] 上述的组合物,其中,所述的季盐表面活性剂通式中的 R_1 、 R_2 和 R_3 为甲基、乙基、丙基或苄基中的任意一种。

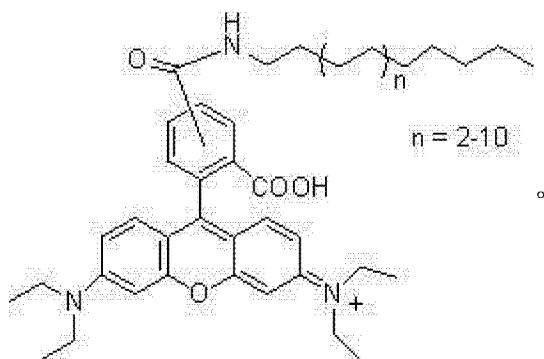
[0010] 上述的组合物,其中,所述的荧光表面活性剂具有如下的通式:



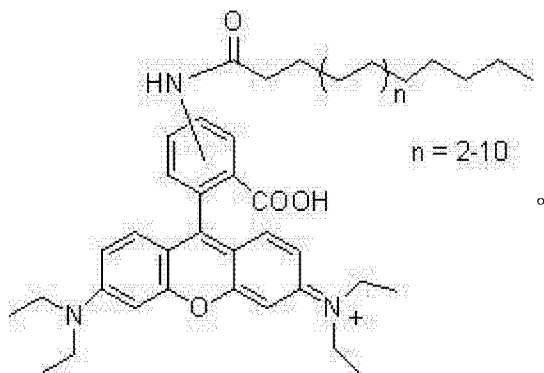
[0011] 上述的组合物,其中,所述的荧光表面活性剂具有如下的通式:



[0012] 上述的组合物,其中,所述的荧光表面活性剂具有如下的通式:



[0013] 上述的组合物,其中,所述的荧光表面活性剂具有如下的通式:



[0014] 上述的组合物,其中,所述的组合物还包含 pH 为 8-11 的磷酸缓冲液,化学发光底物的浓度为 0.01-20 毫摩尔 / 升。

[0015] 上述的组合物,其中,还包含镁盐,其中,镁盐的浓度为 0.1-20 毫摩尔 / 升,所述的长链季盐表面活性剂的浓度为 0.1-50 毫摩尔 / 升,所述的荧光表面活性剂的浓度为 0.05-20 毫摩尔 / 升。

[0016] 上述的组合物,其中,所述的组合物中,所述的镁盐包含醋酸镁、氯化镁或溴化镁。

[0017] 在酶免疫检测方法中,一个高灵敏、低噪声的检测试剂是非常重要的组成部分。本发明提供了一种新颖的化学发光试剂组合物,应用于酶免疫检测,其具有酶免疫检测所需的低噪音和高灵敏度的特点,可广泛应用于大型自动化酶免疫分析仪。本发明的化学发光试剂组合物具有如下优点:(1)底物用量减少到原传统配方用量的十分之一。(2)检测波长范围变窄,即为 530~540 纳米之间,避免了传统化学发光所发出的 460~470 纳米波长光的干扰,大大降低了检测噪音,提高了检测信噪比。因此,本发明的化学发光试剂比传统的化学发光试剂具有更优异的性能。

附图说明

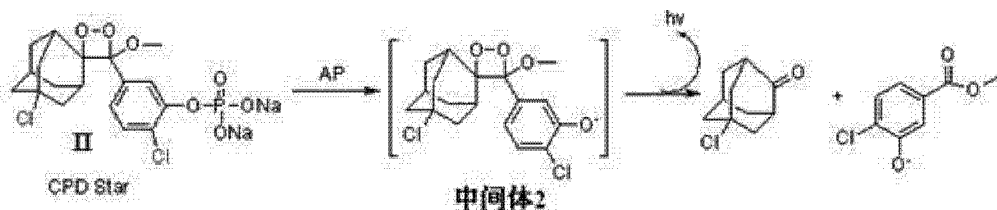
[0018] 图 1 为本发明的酶促化学发光试剂组合物用于酶免疫检测原理图。

[0019] 图 2 为本发明的实施例具体使用的一个表面活性剂的结构式。

[0020] 图 3 为本发明的实施例具体使用的 一个荧光表面活性剂的结构式。

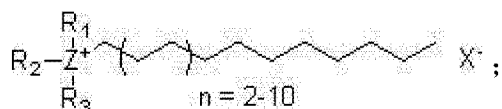
具体实施方式

[0021] 本发明提供的酶促化学发光试剂组合物,其包含酶促化学发光底物 II (CPD Star)、长链季盐表面活性剂及荧光表面活性剂。该 CPD Star 化学发光的反应路线如下:



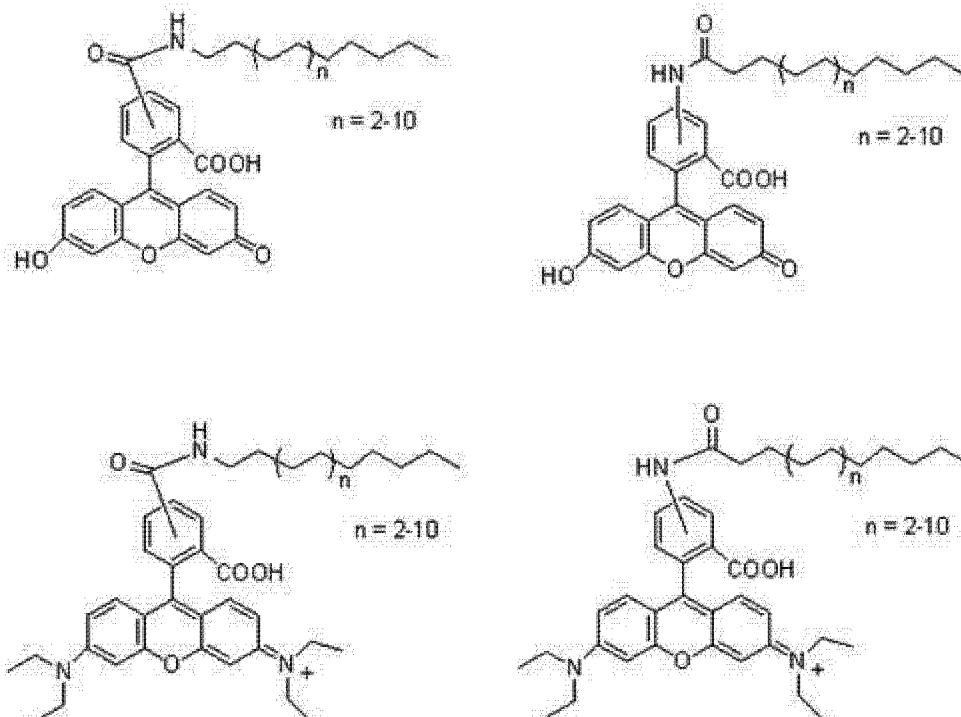
其中, AP 是指碱性磷酸酶。

[0022] 所述的长链季盐表面活性剂具有如下的通式：



其中, R_1 、 R_2 和 R_3 为 C1-10 的烷基或苄基中的任意一种, 优选地, 为甲基、乙基、丙基或苄基中的任意一种; R_1 、 R_2 和 R_3 相同或不同; X^- 为氟、氯、溴、碘或甲磺酸根; Z 为氮或磷原子。

[0023] 所述的荧光表面活性剂具有如下的通式的任意一种：



[0024] 由于中间体 2 表面具有大量的疏水性基团,如金刚烷、氯苯等,其表面微环境是非常疏水性的。根据胶束原理,加入表面活性剂,使表面活性剂的疏水端与中间体 2 的疏水表面结合在一起,而亲水一端则朝外,这样就形成一个新的亲水性表面,核心是疏水中间体

2 微环境,如图 1 的 a 所示。当加入荧光表面活性剂(FL)后,则进一步形成表面微环境,如图 1 的 b 所示。荧光表面活性剂长链疏水端朝胶束核心,亲水的荧光分子朝外。当中间体分解发光时,能量能够通过胶束链,从核心的疏水端传递至胶束亲水外端。该能量可作为荧光化合物的激发态能量,从而使荧光剂受激发而发射另一波长的光。然后通过检测特定波长荧光的强弱来检测酶的含量。

[0025] 以下结合附图通过具体实施例对本发明作进一步的描述,这些实施例仅用于说明本发明,并不是对本发明保护范围的限制。

[0026] 以下实施例中选择使用的长链季盐表面活性剂具有如图 2 所示的结构;选择使用的荧光表面活性剂具有如图 3 所示的结构。

[0027] 实施例 1

在 pH 为 8.5 的磷酸缓冲溶液中,加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 0.01 毫摩尔/升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂:如三甲基辛铵盐和醋酸镁,配成季盐的浓度为 10 毫摩尔/升,醋酸镁浓度为 0.1 毫摩尔/升。搅拌 2 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂,配成荧光剂的浓度为 1 毫摩尔/升。继续搅拌 8 小时,用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃的冷藏箱中保存。

[0028] 实施例 2

在 pH 为 9.2 的磷酸缓冲溶液中,加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 2 毫摩尔/升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂和醋酸镁,配成季盐的浓度为 50 毫摩尔/升,醋酸镁浓度为 10 毫摩尔/升。搅拌 5 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂,配成荧光剂的浓度为 0.05 毫摩尔/升。继续搅拌 9 小时,用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃的冷藏箱中保存。

[0029] 实施例 3

在 pH 为 9 的磷酸缓冲溶液中,加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 3 毫摩尔/升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂和醋酸镁,配成季盐的浓度为 0.1 毫摩尔/升,醋酸镁浓度为 20 毫摩尔/升。搅拌 4 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂,配成荧光剂的浓度为 20 毫摩尔/升。继续搅拌 10 个小时,用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃的冷藏箱中保存。

[0030] 实施例 4

在 pH 为 8.8 的硼酸-氢氧化钠缓冲溶液中,加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 0.1 毫摩尔/升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂和溴化镁,配成季盐的浓度为 1 毫摩尔/升,溴化镁的浓度为 4 毫摩尔/升。搅拌 2 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂,配成荧光剂的浓度为 10 毫摩尔/升。继续搅拌 8 小时,用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃的冷藏箱中保存。

[0031] 实施例 5

在 pH 为 10.3 的硼酸-氢氧化钠缓冲溶液中,加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 5 毫摩尔/升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂和溴化镁,配成季盐的浓度为 20 毫摩尔/升,溴化镁的浓度为 8 毫摩尔/升。搅拌 4.5 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂,配成荧光剂的浓度为 5 毫摩尔/升。继续搅拌 10 小时,用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃的冷藏箱中保存。

[0032] 实施例 6

在 pH 为 9.5 的硼酸 - 氢氧化钠缓冲溶液中, 加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 1.8 毫摩尔 / 升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂和溴化镁, 配成季盐的浓度为 40 毫摩尔 / 升, 溴化镁的浓度为 0.2 毫摩尔 / 升。搅拌 3 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂, 配成荧光剂的浓度为 0.1 毫摩尔 / 升。继续搅拌 9 小时, 用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃ 的冷藏箱中保存。

[0033] 实施例 7

在 pH 为 9.1 的三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液中, 加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 0.05 毫摩尔 / 升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂和氯化镁, 配成季盐的浓度为 0.5 毫摩尔 / 升, 氯化镁的浓度为 15 毫摩尔 / 升。搅拌 2 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂, 配成荧光剂的浓度为 0.5 毫摩尔 / 升。继续搅拌 8 小时, 用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃ 的冷藏箱中保存。

[0034] 实施例 8

在 pH 为 9.8 的三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液中, 加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 5 毫摩尔 / 升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂和氯化镁, 配成季盐的浓度为 30 毫摩尔 / 升, 氯化镁的浓度为 1 毫摩尔 / 升。搅拌 3 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂, 配成荧光剂的浓度为 2 毫摩尔 / 升。继续搅拌 10 小时, 用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃ 的冷藏箱中保存。

[0035] 实施例 9

在 pH 为 10.5 的三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液中, 加入化学发光底物 CPD star 配成浓度为 1.5 毫摩尔 / 升的溶液。再加入长链季盐表面活性剂和氯化镁, 配成季盐的浓度为 5 毫摩尔 / 升, 氯化镁的浓度为 2 毫摩尔 / 升。搅拌 5 小时至均匀。最后加入荧光表面活性剂, 配成荧光剂的浓度为 8 毫摩尔 / 升。继续搅拌 9 个小时, 用 0.2 微米的滤膜除去不溶的固体杂质。配方得到的化学发光试剂在 2-8℃ 的冷藏箱中保存。

[0036] 本发明提供的酶促化学发光试剂组合物用于酶免疫检测的使用方法为:

该发光试剂与 AP 酶在缓冲液中, 室温反应 15 分钟后用化学发光仪检测。实施例 1-9 用于酶免疫检测的条件和结果如表 1 所示。

[0037] 表 1: 实施例 1-9 用于酶免疫检测的条件和结果

项目	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	传统化学发光试剂
底物用量	0.01mM	2mM	3mM	0.1mM	5mM	1.8mM	0.05mM	5mM	1.5mM	50mM
检测波长	530	530	530	530	530	535	535	540	540	470

由上表可知, 本发明的化学发光试剂组合物用于酶免疫检测, 底物用量减少到原传统配方用量的十分之一甚至更少; 检测波长范围更窄, 在 530~540 纳米之间, 避免了传统化学发光所发出的 460~470 纳米波长光的干扰, 大大降低了检测噪音, 提高了检测信噪比, 比

传统的化学发光试剂具有更优异的性能。

[0038] 尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍,但应当认识到上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后,对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此,本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。

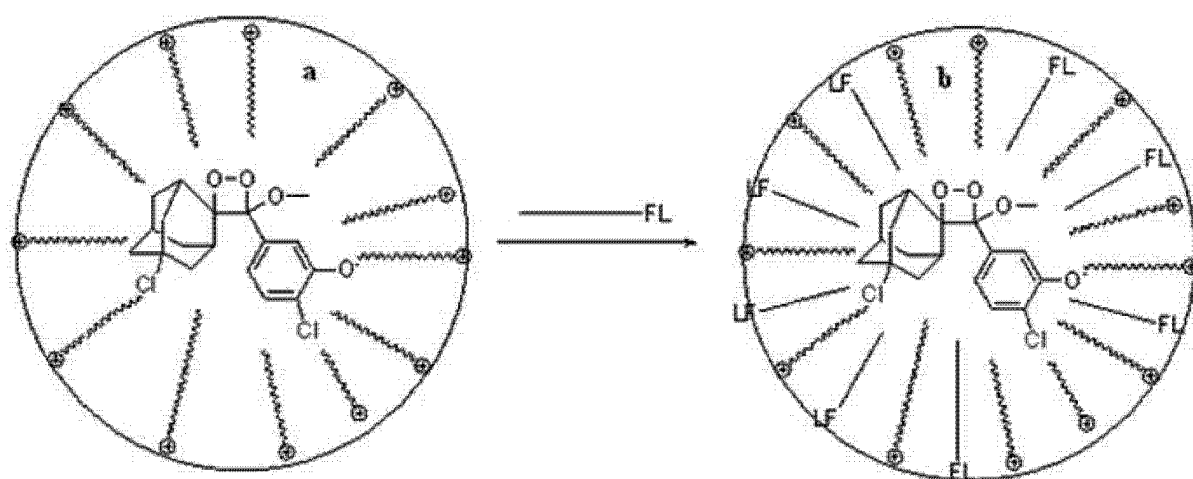


图 1



图 2

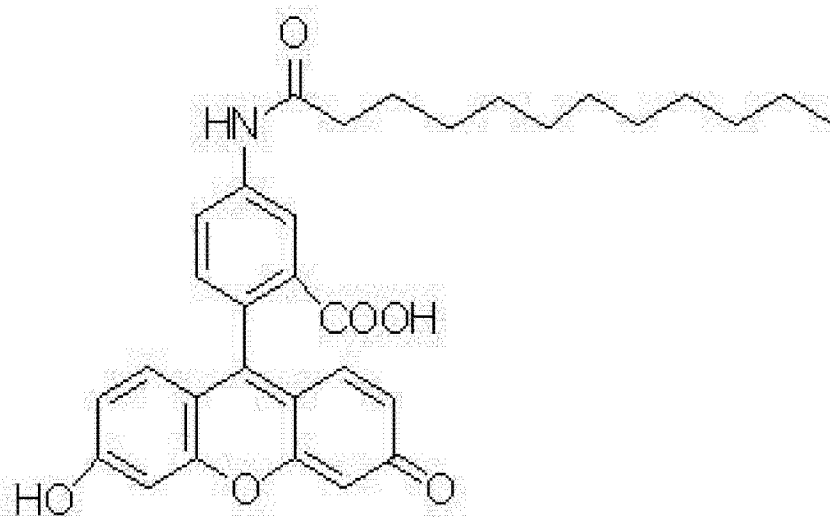


图 3

专利名称(译)	一种酶促化学发光试剂组合物		
公开(公告)号	CN104531140A	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	CN201510025311.8	申请日	2015-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	王国平 丁士进		
申请(专利权)人(译)	王国平 丁士进		
当前申请(专利权)人(译)	王国平 丁士进		
[标]发明人	王国平 丁士进		
发明人	王国平 丁士进		
IPC分类号	C09K11/06 G01N33/53		
代理人(译)	张静洁 贾慧琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种酶促化学发光试剂组合物，该组合物包含酶促化学发光底物II、长链季盐表面活性剂及荧光表面活性剂，该酶促化学发光底物II具有如下的结构：。本发明提供的化学发光试剂组合物，应用于酶免疫检测，具有酶免疫检测所需的低噪音和高灵敏度的特点，可广泛应用于大型自动化酶免疫分析仪。本发明的化学发光试剂组合物用于酶免疫检测，底物用量减少到原传统配方用量的十分之一；检测波长范围更窄，在530~540 纳米之间，避免了传统化学发光所发出的460~470纳米波长光的干扰，大大降低了检测噪音，提高了检测信噪比，比传统的化学发光试剂具有更优异的性能。

