



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680678 B

(45) 授权公告日 2014.06.04

(21) 申请号 201210189829.1

(22) 申请日 2012.06.08

(73) 专利权人 北京源德生物医学工程有限公司
地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开
发区永昌北路 24 号 1 号楼

(72) 发明人 刘宾 孙旭东 杨晓林 张鑫
李鹏翀 吴晓东

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 冯琼 李玉秋

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1122614 A, 1996.05.15, 全文.

WO 94/10571 A1, 1994.05.11, 全文.

CN 102419373 A, 2012.04.18, 全文.

US 5427953 A, 1995.06.27, 全文.

刘霞等. 滤纸干血片法筛查孕中期唐氏综合
征的可行性. 《山东大学学报(医学版)》. 2009, 第
47 卷 (第 12 期), 86-94 页.

Thorsteinn Loftsson et al. The
effect of hydroxypropyl methylcellulose
on the release of dexamethasone from
aqueous 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin
formulations. 《International Journal of
Pharmaceutics》. 1994, 第 104 卷

Pekka Jarho et al. Hydroxypropyl-
 β -cyclodextrin and its combination
with hydroxypropyl-methylcellulose
increases aqueous solubility of
 Δ^9 -tetrahydrocannabinol. 《Life
Sciences》. 1998, 第 63 卷 (第 26 期),

审查员 王在竹

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种用于滤纸干血片的蛋白洗脱液

(57) 摘要

本发明公开了一种高效蛋白洗脱液, 该洗脱
液包含表面活性剂、稳定剂、辅助稳定剂和缓冲
液。作为优选, 本发明所述蛋白洗脱液还包含防腐
剂。本发明所述蛋白洗脱液能有效洗脱滤纸干血
片上的蛋白, 并能显著降低全血中其他物质对免
疫检测的干扰, 而且具有针对性强、成本低、易于
配置的特点, 在以蛋白为检测标志物, 采用免疫检
测技术的新生儿疾病筛查上具有广泛应用前景。

1. 一种蛋白洗脱组合物,由 NP-40、(2-羟丙基)- β -环糊精、羟丙基甲基纤维素和小牛血清组成。
2. 一种蛋白洗脱液,包含表面活性剂、稳定剂、辅助稳定剂和缓冲液,所述表面活性剂为 NP-40,其工作浓度为 10% -65%,所述稳定剂为 (2-羟丙基)- β -环糊精,其工作浓度为 0.1% -1%,所述辅助稳定剂为羟丙基甲基纤维素,其工作浓度为 0.1% -1%,所述缓冲液为小牛血清。
3. 根据权利要求 2 所述的蛋白洗脱液,其特征在于:所述表面活性剂为 50%的 NP-40。
4. 根据权利要求 2 所述的蛋白洗脱液,其特征在于:所述稳定剂是 1%的 (2-羟丙基)- β -环糊精。
5. 根据权利要求 2 所述的蛋白洗脱液,其特征在于:所述辅助稳定剂为 1%的羟丙基甲基纤维素。
6. 根据权利要求 2 所述的蛋白洗脱液,其特征在于:还包含防腐剂。
7. 根据权利要求 6 所述的蛋白洗脱液,其特征在于:所述防腐剂为 1%的 Proclin-300。
8. 权利要求 2-7 任一项所述蛋白洗脱液在制备新生儿疾病筛查试剂中的应用。
9. 权利要求 1 所述蛋白洗脱组合物在制备新生儿疾病筛查试剂中的应用。

一种用于滤纸干血片的蛋白洗脱液

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种用于滤纸干血片的蛋白洗脱液。

背景技术

[0002] 新生儿疾病筛查的普及和推广使一些危害儿童生命、导致儿童体格及智能发育障碍的先天性遗传代谢疾病能够得以早期诊断,并且可以在新生儿临床症状未出现之前或症状不明显时就能给予及时治疗,避免或降低患儿机体各器官受到的不可逆损伤产生。

[0003] 目前,已有化学发光免疫检测、时间分辨荧光免疫检测、酶联免疫吸附、放射免疫分析等多项以免疫检测为基础的检测方法被应用在新生儿疾病筛查上。但由于新生儿采血的特殊性,新生儿疾病筛查都是对其足跟血滴在 S&S903 滤纸上形成的滤纸干血片中的标志物进行检测,因此需要将标志物重新从滤纸干血片上溶解到特定溶液中,再进行相关分析检测,比如:新生儿先天性甲状腺功能减低症的筛查,需要从滤纸干血片上将促甲状腺激素(TSH)溶解出来,再进行免疫检测。

[0004] 目前,新生儿疾病筛查试剂盒一般用 Tris-HCl 缓冲液作为滤纸干血片的蛋白洗脱液,将滤纸血片上蛋白洗脱下来以后,再进行免疫检测,不仅蛋白溶出率低,降低了免疫检测的灵敏度,而且干扰物质的存在,又降低了检测的准确性。此外,Tris-HCl 洗脱滤纸干血片需要时间也较长,一般要多次洗板,增加了检测时间。因此,用于滤纸干血片的高效蛋白洗脱液已经成为了提高用于新生儿疾病筛查的免疫检测试剂的灵敏度、准确性、检测速度的关键因素。

发明内容

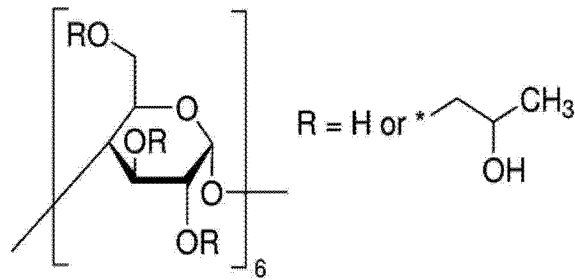
[0005] 本发明的目的是提供一种用于滤纸干血片的蛋白洗脱组合物及蛋白洗脱液。

[0006] 本发明所述蛋白洗脱组合物,由 NP40、(2-羟丙基)- β -环糊精、(羟丙基)甲基纤维素和小牛血清组成。由所述蛋白洗脱组合物配制的蛋白高效洗脱液,包含表面活性剂、稳定剂、辅助稳定剂,所述表面活性剂为 10%-65%的 NP40,所述稳定剂为 0.1%-1%的(2-羟丙基)- β -环糊精,所述辅助稳定剂为 0.1%-1%的(羟丙基)甲基纤维素。

[0007] NP40 是一种温和的非离子表面活性剂,一般由超过 97%的聚-(氧代-1,2-乙二亚甲基)- α -壬基苯基- ω -羟基,少于 1%的支链二壬基苯基聚氧乙烯醚,小于 3%的聚乙二醇构成。在生物医学上,常备用在细胞裂解液中,用于破坏细胞膜。1%浓度 NP40 的基本可以破坏掉胞膜,并且结合特定的缓冲液就可以获得胞浆蛋白。

[0008] (2-羟丙基)- β -环糊精是 β -环状糊精的一种羟烷基化衍生物,其结构式如下:

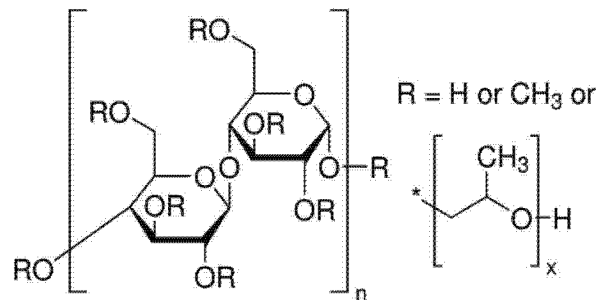
[0009]



[0010] (2-羟丙基)- β -环糊精具有优良的包络作用,能提高被包络物质的稳定性,而且具有水溶性,能够在生物体内提高被包络物质的释放速度。

[0011] (羟丙基)甲基纤维素是一种非离子型纤维素,具有保持溶液 pH 稳定性和提高分散性的能力,其水溶液也具有表面活性,是一种常用稳定剂,其结构式如下:

[0012]



[0013] 发明人经过大量实验研究发现, NP40、(2-羟丙基)- β -环糊精和(羟丙基)甲基纤维素的混合使用,可以有效提高滤纸干血片上蛋白的洗脱效率,并能降低干扰物质的影响。用含有 10%至 65%的 NP40、0.1%至 1%的(2-羟丙基)- β -环糊精、0.1%至 1%的(羟丙基)甲基纤维素的洗脱液,洗脱滤纸干血片上蛋白,采用化学发光免疫检测技术进行免疫检测,能够在已包被好抗体的包被板上直接进行检测,洗脱和检测能通过一步反应实现,检测时间只需 3 小时,并且在室温下就能实现检测,检测本底值比普通蛋白洗脱液低 24.8 到 52.7 倍,检测灵敏度能被显著提高。

[0014] 在本发明的具体实施方式中,所述表面活性剂为 10%、50%或 65%的 NP40,所述稳定剂为 0.1%或 1%的(2-羟丙基)- β -环糊精,所述辅助稳定剂为 0.1%或 1%的(羟丙基)甲基纤维素。

[0015] 作为优选,本发明所述蛋白高效洗脱液还包含防腐剂。在本发明的具体实施方式中,防腐剂为 1%的 Proclin-300。

[0016] 新生儿疾病筛查检测的是新生儿足跟血滤纸干血片中的目的蛋白,需要从滤纸干血片中将目的蛋白洗脱下来,再进行免疫分析检测,而全血中存在的大量血红蛋白、脂类、类脂类等物质,滤纸上的纤维物质等都会对滤纸干血片中蛋白的溶出率、免疫检测的准确性和灵敏度产生干扰,使免疫检测分析技术的优点不能完全体现。

[0017] 本发明所述蛋白洗脱液用于新生儿疾病筛查滤纸干血片的蛋白洗脱的洗脱率高且稳定,而且成本较低、易于配制,可广泛应用于以蛋白为检测标志物,并且是基于免疫检测技术的新生儿疾病筛查产品,从而大大缩短检测时间,提高检测灵敏度和准确性。经重复多次试验,证明本发明具有如下几个优点:

[0018] (1) 洗脱和免疫反应一步就能实现,检测总时间能在 3h 实现,能满足新生儿疾病筛查需要。

[0019] (2) 使检测在室温下就能进行,不需要额外设备。

[0020] (3) 能有效降低全血和滤纸中的干扰物质的干扰,本底比普通洗脱液低 24.8 到 52.7 倍。

[0021] 本发明是一种专门用于滤纸干血片的蛋白洗脱液,能有效提高滤纸干血片上蛋白的溶出率,并能屏蔽干扰物质,使免疫分析技术的优势充分发挥,提高新生儿疾病筛查的准确性和效率,适用于在以蛋白为检测标志物,采用免疫检测技术的新生儿疾病筛查项目,具有良好的应用前景

具体实施方式

[0022] 本发明公开了一种用于滤纸干血片的蛋白洗脱液,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明用于滤纸干血片的蛋白洗脱液及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0023] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明。以下是该发明的四个实例,该实例仅用于说明本发明,但发明的内容不限于以下实例。

[0024] 实施例 1:

[0025] 在 50% 的小牛血清中加入 10‰ NP40 作为基础蛋白洗脱剂,同时加入 0.1‰ 的 (2-羟丙基)- β -环糊精和 0.1‰ 的 (羟丙基)甲基纤维素分别作为稳定剂和辅助稳定剂,再加入 1‰ 的 Proclin-300 作为防腐剂。用新生儿疾病筛查专用打孔器分别打下直径 3mm 的 TSH 浓度为 0、3、6、15、50、150mIU/L 滤纸干血片样本,将打下的滤纸干血片样品放入相应的微孔中,分别加入本蛋白洗脱液 100 μ L/ 孔,同时也加入另一种标记有辣根过氧化物酶 (HRP) 的 TSH 抗体溶液 50 μ L/ 孔,在 96 孔板振荡器上震荡洗脱反应 3h,洗板 5 次后,加入鲁米诺发光液,用发光仪测量发光值。

[0026]

样本 TSH 浓度 (mIU/L)	0	3	6	15	50	150
发光计数 (RLU/ 秒)	730	1700	3541	9113	33338	97855

[0027] 实施例 2:

[0028] 在 50% 的小牛血清中加入 50‰ NP40 作为基础蛋白洗脱剂,同时加入 1‰ 的 (2-羟丙基)- β -环糊精和 1‰ 的 (羟丙基)甲基纤维素分别作为稳定剂和辅助稳定剂,再加入 1‰ 的 Proclin-300 作为防腐剂;用新生儿疾病筛查专用打孔器分别打下直径 3mm 的 TSH 浓度为 0、3、6、15、50、150mIU/L 滤纸干血片样本,将打下的滤纸干血片样品放入相应的微孔中,分别加入本蛋白洗脱液 100 μ L/ 孔,同时也加入另一种标记有辣根过氧化物酶 (HRP) 的 TSH 抗体溶液 50 μ L/ 孔,在 96 孔板振荡器上震荡洗脱反应 3h,洗板 5 次后,加入鲁米诺发光液,用发光仪测量发光值,见下表。

[0029]

样本 TSH 浓度 (mIU/L)	0	3	6	15	50	150
发光计数 (RLU/秒)	590	1595	3253	8040	27776	80008

[0030] 实施例 3：

[0031] 在 50% 的小牛血清中加入 65% NP40 作为基础蛋白洗脱剂,同时加入 1% 的 (2-羟丙基)- β -环糊精和 1% 的 (羟丙基)甲基纤维素分别作为稳定剂和辅助稳定剂,再加入 1% 的 Proclin-300 作为防腐剂;用新生儿疾病筛查专用打孔器分别打下直径 3mm 的 TSH 浓度为 0、3、6、15、50、150mIU/L 滤纸干血片样本,将打下的滤纸干血片样品放入相应的微孔中,分别加入本蛋白洗脱液 100 μ L/孔,同时也加入另一种标记有辣根过氧化物酶 (HRP) 的 TSH 抗体溶液 50 μ L/孔,在 96 孔板振荡器上震荡洗脱反应 3h,洗板 5 次后,加入鲁米诺发光液,用发光仪测量发光值,见下表。

[0032]

样本 TSH 浓度 (mIU/L)	0	3	6	15	50	150
发光计数 (RLU/秒)	635	1642	3477	8729	26394	77980

[0033] 实施例 4：

[0034] 参照本说明书所公开的内容和实施例 1、2、3,以新生儿先天性甲状腺功能减低筛查为例,检测标志物为 TSH,方法为化学发光免疫检测,将本发明与常规滤纸干血片的蛋白洗脱液 (0.1mol/l Tris-HCl 缓冲液, pH7.0, 在 4 $^{\circ}$ C 过夜)比较,重复多次试验,并观察结果,见下表。

[0035]

项目	洗脱时间	本底值 (RLU/秒)	温度	反应总时间
本发明	3 小时	535~1139	室温	洗脱、免疫反应一步完成,共需要 3 小时
常规洗脱液	18~20 小时	28195	4 $^{\circ}$ C	洗脱、免疫反应分两步完成,共需要 20~22 小时

[0036] 证明本发明具有如下几个优点：

[0037] (1) 洗脱和免疫反应一步就能实现,检测总时间能在 3h 实现,能满足新生儿疾病筛查需要。

[0038] (2) 使检测在室温下就能进行,不需要额外设备。

[0039] (3) 能有效降低全血和滤纸中的干扰物质的干扰,本底比普通洗脱液低 24.8 到 52.7 倍。

[0040] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种用于滤纸干血片的蛋白洗脱液		
公开(公告)号	CN102680678B	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	CN201210189829.1	申请日	2012-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京源德生物医学工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京源德生物医学工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京源德生物医学工程有限公司		
[标]发明人	刘宾 孙旭东 杨晓林 张鑫 李鹏翀 吴晓东		
发明人	刘宾 孙旭东 杨晓林 张鑫 李鹏翀 吴晓东		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	冯琼 李玉秋		
其他公开文献	CN102680678A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种高效蛋白洗脱液，该洗脱液包含表面活性剂、稳定剂、辅助稳定剂和缓冲液。作为优选，本发明所述蛋白洗脱液还包含防腐剂。本发明所述蛋白洗脱液能有效洗脱滤纸干血片上的蛋白，并能显著降低全血中其他物质对免疫检测的干扰，而且具有针对性强、成本低、易于配置的特点，在以蛋白为检测标志物，采用免疫检测技术的新生儿疾病筛查上具有广泛应用前景。

