

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410057389. X

[51] Int. Cl.  
G01N 33/535 (2006.01)  
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2006年3月8日

[11] 公开号 CN 1743846A

[22] 申请日 2004.8.30

[21] 申请号 200410057389. X

[71] 申请人 北京源德生物医学工程有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区（亦庄）永昌北路24号

[72] 发明人 杨晓林 孙旭东

权利要求书1页 说明书2页

[54] 发明名称

新型酶标记物稳定剂

[57] 摘要

一种可用于以酶标记物作为示踪剂的免疫检测产品中，以延长酶标记物溶液保存期的新型酶标记物稳定剂，由蛋白、血红蛋白、抗自由基物质以及缓冲液组成。可广泛应用于临床诊断、科学研究、环境及卫生检测、法医鉴定等诸多部门。

- 
1. 新型酶标记物稳定剂，由蛋白、血红蛋白、抗自由基物质以及缓冲液组成；其特征在于：该稳定剂使用了特定浓度的蛋白和特定浓度的血红蛋白。
  2. 根据权利要求 1，特定浓度的蛋白是指：在酶标记物溶液中蛋白浓度在 0.1%至 1%之间。
  3. 根据权利要求 1，特定浓度的血红蛋白是指：在酶标记物溶液中血红蛋白浓度在 50  $\mu$ g/ml 至 200  $\mu$ g/ml 之间。

## 新型酶标记物稳定剂

### 技术领域

本发明是一种可用于以酶标记物作为示踪剂的免疫检测产品中，以延长酶标记物溶液保存期的新型酶标记物稳定剂。

### 背景技术

免疫检测分析技术在当今生物学领域内得到了广泛的应用，并已经在临床诊断、科学研究、环境及卫生检测、法医鉴定等诸多部门中成为必备的常规技术手段，发挥着不可替代的作用，因此有关的检测产品也就具有巨大的市场。目前的检测技术大多均以酶标记物作为示踪剂，而其中又以过氧化物酶的联结物最为常见。由于该酶的主要生化活性是将反应体系中的过氧化物转变为超氧自由基，因此该酶标记物也会将其溶液中已经存在，或者在贮存、运输中逐渐产生的少量氧化性物质转化为超氧自由基，而后者则可强烈地攻击酶分子本身以及与其相联结的生物活性分子，从而导致其失活。由于这种“自杀”现象常常导致酶标记物率先失效，因此酶标记物的稳定性也就成了提高该类检测试剂产品可靠性和有效期的瓶颈。因此不少产品被迫使用冻干或浓缩冷藏的酶标记物，但这需要用户通过复溶或稀释的办法自行制备工作液，这不仅增加了用户的工作量，而且肯定也会造成新的操作误差，同时也不适合于自动化检测仪器的配套试剂。

近年来，由于人们发现了一些可以在酶标记物溶液中消耗超氧自由基或者稳定联结物分子，同时又不影响免疫反应和酶—底物反应的物质，如：某些具备抗氧化特性的维生素、某些多酚类或多羟基类物质、某些多聚氨基酸等，从而大大延长了酶标记物溶液的保存期，为该类检测产品直接采用室温保存的酶标记物工作液奠定了基础，这些物质被称为标记物稳定剂(Conjugator Stabilizer)。事实上，能否直接提供含稳定剂的酶标记物工作液，以实现产品的室温保存并保证该检测试剂的高可靠性和长有效期，目前已经成了衡量该类产品的技术含量以及生产厂家研发能力和水平的重要标志。

### 发明内容

但以往人们的注意力主要集中在如何发现和使用具有抗自由基或稳定联结物分子特性的特殊物质上，而忽略了通过其它途径消除酶标记物“自杀”现象的可能性。我们经过多年的研究和实践发现，有两种常见的试剂，即蛋白（如 BSA）和血红蛋白（HB）在某些特定的浓度条件下可以有效地延缓酶标记物的失活现象。

其中由于高浓度 BSA 可以大大降低非特异免疫反应，因此是目前最常用的封闭剂，被广泛添加于各类免疫检测试剂中，其使用浓度均在 1% 以上，而且为了进一步降低非特异反应，往往使用更高浓度的 BSA，例如在 3% 至 5% 左右。而我们发现 BSA 对于自由基的产生和消耗具有双相性，即它既可以代替酶标记物承受自由基的攻击，从而作为一种自由基清除剂保护酶标记物；同时又可以在自身降解的过程中释放出过氧化物乃至自由基，从而加速酶标记物的失活，因此选择适当的 BSA 浓度对于保护酶标记物活性非常重要。我们通过大量实验

证实：BSA 浓度在 1%以下时酶标记物活性下降速度相对稳定在一个较低水平上；而在该浓度以上时活性下降速度陡增，如到 3%时活性下降速度增加一倍，到 10%时活性下降速度增加十倍以上。同时，使用各类其它蛋白代替 BSA 进行的实验均显示出类似的结果，说明该效应与蛋白种类无关，而仅与其浓度密切相关。综合考虑抑制非特异反应及保护酶标记物活性的要求，实验证实各类蛋白在酶标记物溶液中的最佳浓度均在 0.1%至 1%之间。

而由于 HB 常常存在于商品化的粗制 BSA 中，同时被认为是可导致非特异信号的干扰物质，因此长期以来一直力求将其从相关免疫检测试剂中去除。众所周知，由于 HB 具有含铁卟啉，因此具有较强的自由基催化活性，即通过 Fanton 氏反应和 Haberweiss 氏反应导致超氧自由基和羟基自由基之间的转换，所以我们认为它在抗自由基过程中具有一定的作用。具体讲，就是通过上述反应将较长寿命的超氧自由基转换为较短寿命的羟基自由基，而后者通过攻击 HB 自身或附近的分子很快被消耗，在 HB 和酶标记物浓度均较低的情况下，酶标记物分子在 HB 分子附近的几率非常小，因此遭受攻击的可能性也小；同时由于上述反应降低了较长寿命的超氧自由基浓度，从而进一步减少了其攻击酶标记物分子的可能性。我们通过实验证实：HB 浓度在 50  $\mu$  g/ml 至 200  $\mu$  g/ml 时酶标记物活性下降速度比不加 HB 降低 50%左右，同时其非特异反应也较弱；而在 200  $\mu$  g/ml 以上或 50  $\mu$  g/ml 以下时效果不明显，且随着 HB 浓度增加非特异反应迅速增强。综合考虑抑制非特异反应及保护酶标记物活性的要求，我们认为 HB 在酶标记物溶液中的最佳浓度应当在 50  $\mu$  g/ml 至 200  $\mu$  g/ml 之间。

综上所述，我们认为上述两类物质在特定浓度下，对于提高标记物稳定性效果明显，且具有成本低、易于配制的特点，可广泛应用于以酶标记物作为示踪剂的免疫检测产品中，从而大大延长了酶标记物溶液的保存期。因此可广泛应用于临床诊断、科学研究、环境及卫生检测、法医鉴定等诸多部门。

### 具体实施方式

以下是该发明的一个实施例，该实施例仅用于说明本发明，但本发明的内容不限于以下实施例。

在 pH7.2 的磷酸等渗缓冲液（PBS）中加入 5mMol/L 维生素 C 作为抗氧化剂，同时分别加入 3%或 0.5%的 BSA，以及 50  $\mu$  g/ml 的 HB 作为酶标记物稳定剂。在加入 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶（HRP）与抗前列腺特异性抗原（PSA）抗体联结物后，将整个溶液置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中进行热加速实验，以验证其效果。四周后测定上述溶液中的酶标记物活性，其结果按加速实验前的活性为 100%计，分别算出各组剩余活性如下：

稳定剂种类	剩余活性（100%）
（1）3% BSA	26.7
（2）0.5% BSA	51.2
（3）0.5% BSA+50 $\mu$ g/ml HB	97.6

专利名称(译)	新型酶标记物稳定剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN1743846A</a>	公开(公告)日	2006-03-08
申请号	CN200410057389.X	申请日	2004-08-30
[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	杨晓林 孙旭东		
发明人	杨晓林 孙旭东		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/532		
其他公开文献	CN100353166C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种可用于以酶标记物作为示踪剂的免疫检测产品中，以延长酶标记物溶液保存期的新型酶标记物稳定剂，由蛋白、血红蛋白、抗自由基物质以及缓冲液组成。可广泛应用于临床诊断、科学研究、环境及卫生检测、法医鉴定等诸多部门。