



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104049080 B

(45)授权公告日 2016.07.20

(21)申请号 201410302775.4

(22)申请日 2014.06.27

(73)专利权人 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

地址 100080 北京市海淀区中关村南大街12号

(72)发明人 金茂俊 王静 杨丽华 杜鹏飞 金芬 邵华 余永新 王珊珊

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理事务所(普通合伙) 11371

代理人 吴开磊

(51)Int. Cl.

G01N 33/532(2006.01)

(56)对比文件

CN 102175865 A,2011.09.07,全文.

EP 0296752 A1,1988.06.15,实施例1.

CN 1257904 A,2000.06.28,全文.

CN 1743411 A,2006.03.08,全文.

Yannis Dotsikas et al..Employment of 4-(1-imidazolyl)phenol as a luminol signal enhancer in a competitive-type chemiluminescence immunoassay and its comparison with the conventional antigen-horseradish peroxidase conjugate-based assay.《Analytica Chimica Acta》.2004,第509卷第103-109页.

审查员 周露露

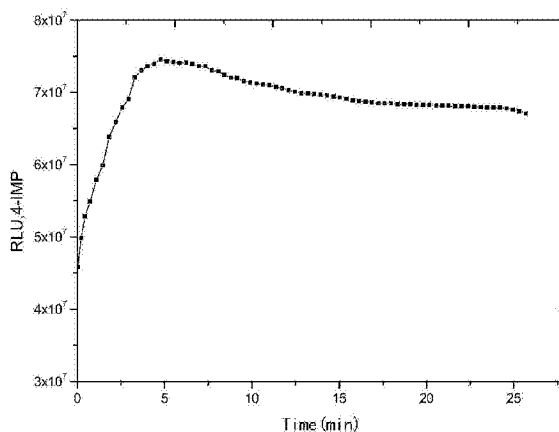
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

化学发光增敏液及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及化学发光免疫分析技术领域,具体而言,特别涉及一种化学发光增敏液及其制备方法。该化学发光增敏液,包括0.1-100mmol/L的4-咪唑苯酚、0.05-100mmol/L的过氧化氢、0.05-100mmol/L鲁米诺或鲁米诺衍生物、0.01-10mol/L的碱、体积分数为0.01%-20%有机溶剂、离子强度为0.01-10mol/L、pH值为7-11的缓冲液。通过实验发现,该增敏液可以显著的增强反应体系的发光强度、大大的延长其发光持续时间,其最大发光强度(化学发光值)可以达到 7.5×10^7 ,发光持续时间可以达到25分钟。



1. 一种化学发光增敏液的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)、在碱溶液中加入鲁米诺,得到既定浓度的鲁米诺的母液;

具体的,称取111mg鲁米诺,加入到0.1mol/LNaOH水溶液中,并定容至100mL,获得浓度为6.25mmol/L的鲁米诺母液;

(2)、将4-咪唑苯酚加入到有机溶剂中,得到既定浓度的4-咪唑苯酚母液;

具体的,称取160mg 4-咪唑苯酚,加入到2%DMF水溶液中,并定容至100mL,获得浓度为10mmol/L的4-咪唑苯酚母液;

(3)、按照既定体积比将所述鲁米诺的母液与所述4-咪唑苯酚母液混合后,在其中依次加入缓冲液和过氧化氢溶液,混匀,得到化学发光增敏液

具体的,所述鲁米诺母液和所述4-咪唑苯酚母液的体积比为1:1;分别吸取2mL鲁米诺母液和2mL4-咪唑苯酚母液,用16mL 0.05M, pH值为9的Tris-HCl缓冲液稀释,并加入10 μ L 30%的过氧化氢溶液,混匀即得。

2. 一种根据权利要求1所述的化学发光增敏液的制备方法所制备的化学发光增敏液。

化学发光增敏液及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光免疫分析技术领域,具体而言,特别涉及一种化学发光增敏液及其制备方法。

背景技术

[0002] 化学发光是在常温下,由化学反应产生的光的发射。其发光机理是:反应体系中的某些物质分子,如反应物、中间体或者荧光物质吸收了反应释放的能量而由基态跃迁到激发态,当中间体由激发态回到基态时会释放等能级的光子,对光子进行测定而实现定量分析。1977年,Halman等人通过将高特异性的抗原抗体反应与高灵敏度的化学发光反应结合起来,创建了化学发光免疫分析方法(Chemiluminescence Immunoassay,CLIA)。

[0003] 化学发光免疫分析方法是将化学发光与免疫反应相结合的产物,因化学发光具有荧光的特异性,同时不需要激发光,从而避免了荧光分析中激发光杂散光的影响。鲁米诺是化学发光免疫分析中应用广泛的标记物质,在碱性溶液中,鲁米诺可被许多氧化剂氧化发光,其中 H_2O_2 最为常用。在化学发光免疫分析的过程中,因发光反应速度较慢,因此,常需添加某些酶类或无机催化剂。酶类主要是辣根过氧化物酶(HRP),无机类包括 O_3 、卤素及 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 或它们的配合物。

[0004] 化学发光酶免疫分析(Chemiluminescent enzyme immunoassay,CLELA)是以酶标记生物活性物质进行免疫反应,反应的过程中,酶作用于发光底物(如鲁米诺),在信号试剂作用下发光,再利用发光信号测定仪进行发光测定。目前常用的标记酶为辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(ALP),两者有各自的发光底物。

[0005] 相关技术中,辣根过氧化物酶(HRP)最常用发光底物是鲁米诺。在化学发光酶免疫分析(CLEIA)中,使用辣根过氧化物酶标记抗体,进行免疫反应后,利用鲁米诺作为发光底物,在辣根过氧化物酶(HRP)和启动发光试剂($NaOH$ 和 H_2O_2)作用下,发光底物(鲁米诺)发光。在反应的过程中,该化学发光反应体系(HRP- H_2O_2 -luminol)通常为几秒内瞬时闪光,存在发光强度低、持续时间短的缺陷。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种化学发光增敏液,以克服现有技术中的化学发光反应体系(HRP- H_2O_2 -luminol)由于存在的发光强度低、持续时间短的技术问题。本发明的另一个目的在于提供一种上述化学发光增敏液的制备方法。

[0007] 本发明实施例提供的这种化学发光增敏液,包括:0.1-100mmol/L的4-咪唑苯酚、0.05-100mmol/L的过氧化氢、0.05-100mmol/L鲁米诺或鲁米诺衍生物、0.01-10mol/L的碱、体积百分数为0.01%-20%有机溶剂、离子强度为0.01-10mol/L、pH值为7-11的缓冲液。

[0008] 本发明提供的这种化学增敏液,其由4-咪唑苯酚、过氧化氢,鲁米诺或鲁米诺衍生物、碱、有机溶剂及缓冲液组成。在化学发光酶免疫分析(CLEIA)中,将该增敏液加入到含有辣根过氧化物酶(HRP)的化学发光体系中后,该增敏液以4-咪唑苯酚为增强剂,其优先与辣

根过氧化物酶作用形成自由基,并且作为电子转移中间体提高了鲁米诺或鲁米诺衍生物自由基的产率,进而实现增敏化学发光反应的效果,通过实验发现,该增敏液可以显著的增强反应体系的发光强度、大大的延长其发光持续时间,其最大发光强度(化学发光值)可以达到 7.5×10^7 ,发光持续时间可以达到25分钟。因此,可广泛用于以化学发光为检测手段的化学、生物、免疫等检测分析产品中,在检测的过程中,由于发光增强效果显著,其发光持续时间长,从而便于重复测量,进而可提高检测分析的灵敏度和准确性。

[0009] 可选的,所述化学发光增敏液包括:0.1-50mmol/L的4-咪唑苯酚、0.05-50mmol/L的过氧化氢、0.05-50mmol/L鲁米诺或鲁米诺衍生物、0.01-5mol/L的碱、体积百分数为0.01%-10%有机溶剂、离子强度为0.01-5mol/L的缓冲液。

[0010] 可选的,所述鲁米诺衍生物为鲁米诺钠盐、异鲁米诺或7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼。

[0011] 可选的,所述碱为氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化钙。

[0012] 可选的,所述有机溶剂为二甲基甲酰胺、丙酮、甲醇或乙腈;和/或;所述缓冲液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液。

[0013] 本发明提供的这种化学增敏液的制备方法,包括以下步骤:

[0014] (1)、在碱溶液中加入鲁米诺或鲁米诺衍生物,得到既定浓度的鲁米诺或鲁米诺衍生物的母液;

[0015] (2)、将4-咪唑苯酚加入到有机溶剂中,得到既定浓度的4-咪唑苯酚母液;

[0016] (3)、按照既定体积比将所述鲁米诺或鲁米诺衍生物的母液与所述4-咪唑苯酚母液混合后,在其中依次加入缓冲液和过氧化氢溶液,混匀,得到化学发光增敏液。

[0017] 可选的,在步骤(1)中,具体包括:称取111mg鲁米诺,加入到0.1mol/LNaOH水溶液中,并定容至100mL,获得浓度为6.25mmol/L的鲁米诺母液。

[0018] 可选的,在步骤(2)中,具体包括:称取160mg4-咪唑苯酚,加入到2%DMF水溶液中,并定容至100mL,获得浓度为10mmol/L的4-咪唑苯酚母液。

[0019] 可选的,在所述步骤(3)中,所述鲁米诺母液和所述4-咪唑苯酚母液的体积比为1:1。

附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。

[0021] 图1为本实施例五提供的化学发光增敏液的制备方法;

[0022] 图2为本发明实施例提供的化学发光增敏液加入到含有辣根过氧化物酶的免疫反应体系中后,体系的发光值和发光时间关系图。

[0023] 图3为本发明实施例的增敏液中,不同的增强剂在不同辣根过氧化物酶浓度下的化学发光值稳定的时间图。

具体实施方式

[0024] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明的技术方案进行清楚、完整的描述,基于本发明中的具体实施方式,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所得到的所有其它实施方式,都属于本发明所保护的范围。

[0025] 本发明提供的这种化学发光增敏液,其中包括0.1-100mmol/L的4-咪唑苯酚、0.05-100mmol/L的过氧化氢、0.05-100mmol/L鲁米诺或鲁米诺衍生物、0.01-10mol/L的碱、体积百分数为0.01%-20%有机溶剂、离子强度为0.01-10mol/L、pH值为7-11的缓冲液。另外,为了实现更好的增强效果,优选的,在增敏液中,各组份的含量范围可适当锁销,如:其可包括0.1-50mmol/L的4-咪唑苯酚、0.05-50mmol/L的过氧化氢、0.05-50mmol/L鲁米诺或鲁米诺衍生物、0.01-5mol/L的碱、体积百分数为0.01%-10%有机溶剂、离子强度为0.01-5mol/L的缓冲液;另外,优选的,对于各组份,所述鲁米诺衍生物为鲁米诺钠盐、异鲁米诺或7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼;所述碱为氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化钙;所述有机溶剂为二甲基甲酰胺、丙酮、甲醇或乙腈;和/或所述缓冲液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液。具体在制备的过程中,本发明的增敏液可以同时具备上述条件,或者只满足上述限定条件中的一项或多项。

[0026] 接下来,通过结合上述的内容,本发明对基于以4-咪唑苯酚作为增强剂的化学发光增敏液提供了以下具体的实施例,请参考以下内容:

[0027] 实施例一

[0028] 本实施例提供的这种化学发光增敏液,其包括:0.1mmol/L的4-咪唑苯酚、0.05mmol/L的过氧化氢、0.05mmol/L鲁米诺、0.01mol/L的氢氧化钠、体积百分数为0.01%二甲基甲酰胺、离子强度为0.01mol/L、pH值为7-11的磷酸盐缓冲液。

[0029] 实施例二

[0030] 本实施例提供的这种化学发光增敏液,其包括:10mmol/L的4-咪唑苯酚、10mmol/L的过氧化氢、8mmol/L的7-氨基-6-巯基邻苯二甲酰肼、5mol/L的氢氧化钾、体积百分数为10%二甲基甲酰胺、离子强度为5mol/L、pH值为7-11的Tris-HCl缓冲液。

[0031] 实施例三

[0032] 本实施例提供的这种化学发光增敏液,其包括:50mmol/L的4-咪唑苯酚、50mmol/L的过氧化氢、50mmol/L的异鲁米诺或鲁米诺钠盐、5mol/L的氢氧化钙、体积百分数为10%丙酮、甲醇或乙腈、离子强度为5mol/L、pH值为7-11的Tris-HCl缓冲液。

[0033] 实施例四

[0034] 本实施例提供的这种化学发光增敏液,其包括:100mmol/L的4-咪唑苯酚、100mmol/L的过氧化氢、100mmol/L的鲁米诺、10mol/L的氢氧化钠、体积百分数为20%丙酮、甲醇或乙腈、离子强度为10mol/L、pH值为7-11的Tris-HCl缓冲液。

[0035] 为了使得本发明上述实施例的化学发光增敏液得到更好的应用,更加有效应用到化学发光免疫分析的领域中,本发明还在上述实施例的基础之上提供了实施例五,实施例五给出了上述实施例的化学发光增敏液的制备方法,现做详细的阐述和解释。

[0036] 实施例五

[0037] 本发明实施例提供的化学发光增敏液的制备方法具体包括以下步骤,请参考图1:

[0038] 步骤101:在碱溶液中加入鲁米诺或鲁米诺衍生物,得到既定浓度的鲁米诺或鲁米诺衍生物的母液;

[0039] 具体的,在该步骤中,称取111mg鲁米诺,加入到0.1mol/LNaOH水溶液中,并定容至100mL,获得浓度为6.25mmol/L的鲁米诺母液,备用。

[0040] 步骤102:将4-咪唑苯酚加入到有机溶剂中,得到既定浓度的4-咪唑苯酚母液;

[0041] 具体的,称取160mg4-咪唑苯酚,加入到2%DMF水溶液中,并定容至100mL,获得浓度为10mmol/L的4-咪唑苯酚母液,备用。

[0042] 步骤103:按照既定体积比将所述鲁米诺或鲁米诺衍生物的母液与所述4-咪唑苯酚母液混合后,在其中依次加入缓冲液和过氧化氢溶液,混匀,得到化学发光增敏液。

[0043] 在该步骤中,所述鲁米诺或鲁米诺衍生物的母液与所述4-咪唑苯酚母液的体积比为1:1。在操作的过程中,分别吸取2mL鲁米诺母液和2mL4-咪唑苯酚母液,用16mL0.05M,pH值为9的Tris-HCl缓冲液稀释,并加入10 μ L30%的过氧化氢溶液,混匀即得。

[0044] 其中,缓冲液的配置方法包括:用1M盐酸溶液调整pH值至9.0,后用去离子水定容至1000mL,获得浓度为0.05mol/L、pH值为7.2的Tris-HCl缓冲液,在具体使用的时候根据特定的需求调至既定的pH和离子浓度。

[0045] 另外,具体的,在本实施例中,整个配置过程可以按照以下操作进行:称取111mg鲁米诺,用0.1mol/LNaOH水溶液定容至100mL,获得浓度为6.25mmol/L的鲁米诺母液;称取160mg4-咪唑苯酚,用2%DMF水溶液定容至100mL,获得浓度为10mmol/L的4-咪唑苯酚母液;称取三羟甲基氨基甲烷6.05g,先用900mL去离子水溶解后,用1M盐酸溶液调整pH值至9.0,后用去离子水定容至1000mL,获得浓度为0.05mol/L、pH值为7.2的Tris-HCl缓冲液;分别吸取2mL鲁米诺母液和2mL4-咪唑苯酚母液,用16mL0.05M,pH值为9.0的Tris-HCl缓冲液稀释,并加入10 μ L30%的过氧化氢溶液,混匀后得到化学发光增敏液。

[0046] 请参考图2,通过上述方法制成的化学发光增敏液,将其加入含有辣根过氧化物酶的免疫反应体系中,可出现化学发光反应,通过化学发光检测仪检测发光值与发光时间。

[0047] 检测结果如图2所示,从图2可知,基于增强剂4-咪唑苯酚的化学发光增敏液有效增强了鲁米诺-辣根过氧化物酶-过氧化氢化学发光体系的发光强度(最大发光强度可以达到 7.5×10^7),延长了其发光持续时间(可以达到25分钟);其具有明显的发光增强效果和提提高发光时间以及其发光稳定性的效果。

[0048] 另外,本发明还基于对增敏液中的增强剂进行替换,通过考察了在不同浓度的辣根过氧化物酶(HRP)的条件下,测定其在20分钟内的发光动力。具体结果请参考表1:

[0049] 表1辣根过氧化物酶浓度和不同增强剂对发光的影响

[0050]

| Enhancer | HRP concentration | 5ng/mL | 10ng/mL | 15ng/mL | 20ng/mL | 25ng/mL | 50ng/mL |
|----------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | | RLU(max) | 33,3639 | 655,3980 | 1508,9000 | 2330,8600 | 2796,3300 |
| 4-HIOP | Time(RLU max)(s) | 1160 | 640 | 420 | 280 | 220 | 140 |
| | Constant Time(s) | instability | instability | 360 - 420 (60) | 240 - 360 (120) | 200 - 280 (80) | 100 - 180 (80) |
| 4-IOP | RLU(max) | 365,1100 | 1433,3000 | 2282,5000 | 3266,2600 | 3437,5300 | 9534,4200 |
| | Time(RLU max)(s) | 825 | 725 | 575 | 400 | 475 | 175 |
| 4-IOP | Constant Time(s) | instability | 460 - 700 (240) | 400 - 560 (160) | 280 - 380 (150) | 320 - 440 (120) | 140 - 180 (40) |
| | RLU(max) | 129,4880 | 586,1040 | 1791,4200 | 2520,2400 | 2557,5500 | 8054,8700 |
| 4-BOP | Time(RLU max)(s) | 480 | 400 | 280 | 160 | 140 | 60 |
| | Constant Time(s) | 460 - 480 (20) | instability | 200 - 360 (160) | 180 - 240 (60) | 80 - 240 (160) | 60 - 80 (20) |
| 4-IMP | RLU(max) | 2193,4200 | 4314,0400 | 7592,8400 | 11325,4000 | 11281,3000 | 44702,3000 |
| | Time(RLU max)(s) | 220 | 160 | 180 | 200 | 80 | 40 |
| 4-IMP | Constant Time(s) | 200 - 300 (100) | 120 - 200 (80) | 80 - 140 (60) | 60 - 100 (40) | 80 - 100 (20) | 20 (20) |

[0051] 其中,在表1中,RLU(max):最大发光值;Time(RLU max):达到最大发光值的时间;Constant Time(s):发光值变化率小于1%时持续的时间;“instability”:发光值变化率小于1%时持续的时间小于10s。

[0052] 其中,H1OP、4-1OP、4-BOP和4-1MP依次代表:4-羟基-4-碘联苯、对碘苯酚、对溴苯酚、4-咪唑苯酚。

[0053] Constant Time(CT)定义为化学发光值变化率小于1%时持续的时间,CT值越大说明化学发光强度稳定时间越长,对检测方法稳定性更有利,例如CLE1A。实验结果表明(见表1),随着HRP浓度的增大,四种增强剂的最大化学发光值RLU(max)都逐渐增大,到达最大值的时间即Time(RLU max)也都逐渐缩短,变化趋势基本一致,但是CT值差异较大。

[0054] 例如,4-1OP,以它作为增强剂时,HRP浓度在10ng/ml、15ng/ml、20ng/ml和25ng/ml时,CT值较大,说明化学发光强度更具稳定性;而当HRP浓度在5和50ng/ml时,CT值低于40秒,化学发光稳定性较差。由此可知,不同的HRP浓度范围,选择不同化合物作为增强剂。

[0055] 为了得到更严格增强剂使用的HRP浓度范围,本发明以4-H1OP、4-1OP、4-1MP、4-BOP四种增强剂条件下对不同HRP浓度作进一步探讨。以HRP浓度为横坐标,CT值为纵坐标,

作出HRP与稳定时间的关系曲线,如图3所示。实验结果表明,在HRP浓度为0~6ng/mL(该范围为本领域中最常用的辣根过氧化物酶浓度)时,使用4-IMP(4-咪唑苯酚),CT值最大,从而稳定时间更长。因此,由4-咪唑苯酚作为增强剂制成的增敏液其可以广泛的应用到以辣根过氧化物酶为标记酶的化学发光酶免疫分析中,增强体系的发光效果、延长光持续时间,进而提高检测分析的灵敏度和准确性。

[0056] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

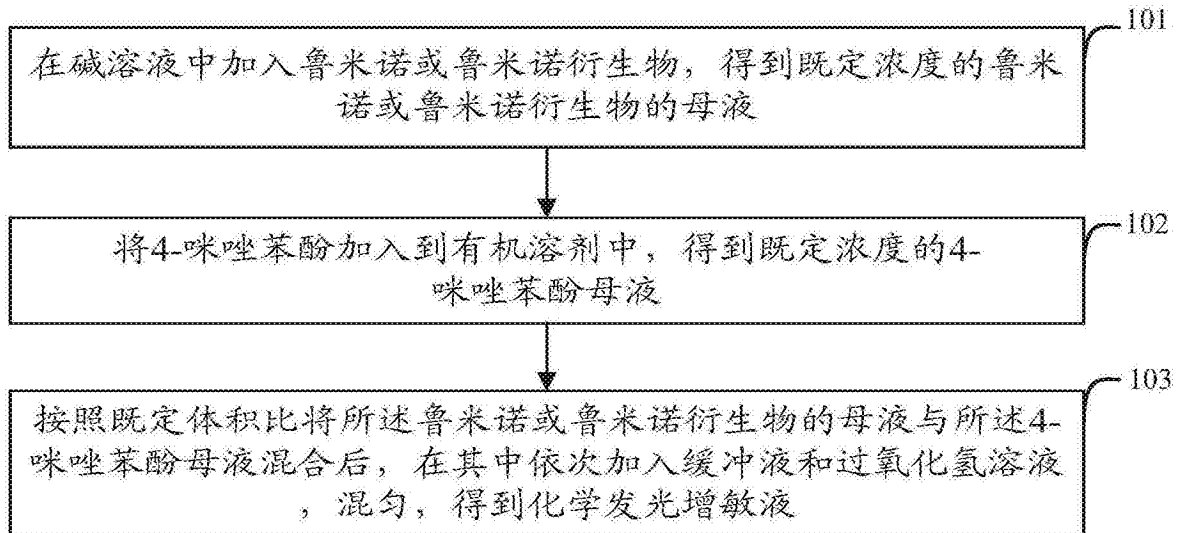


图1

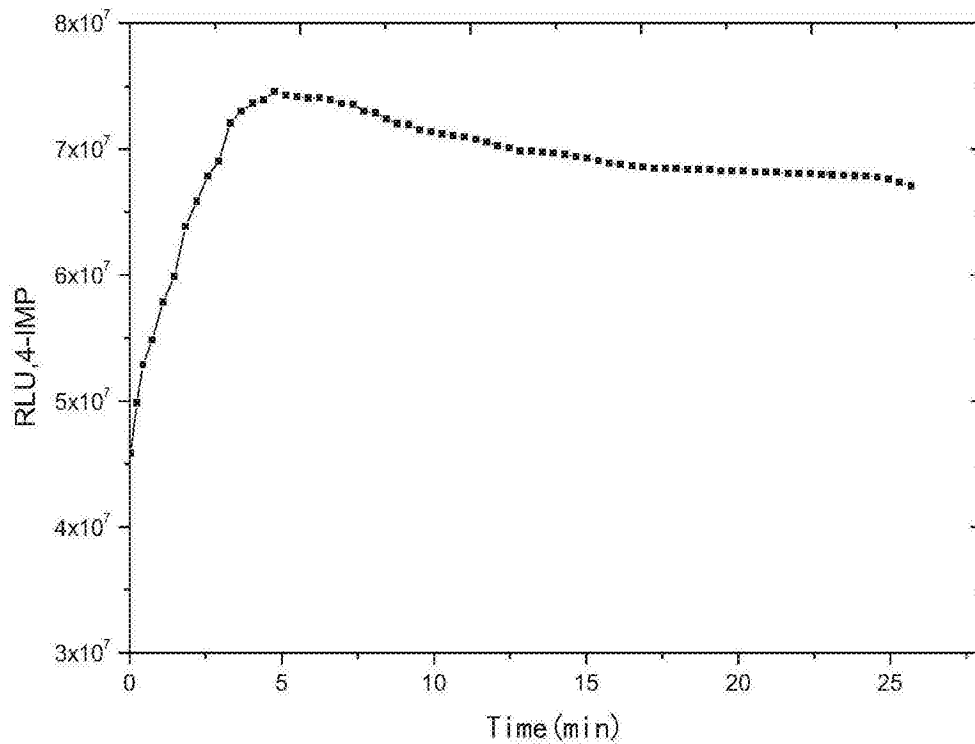


图2

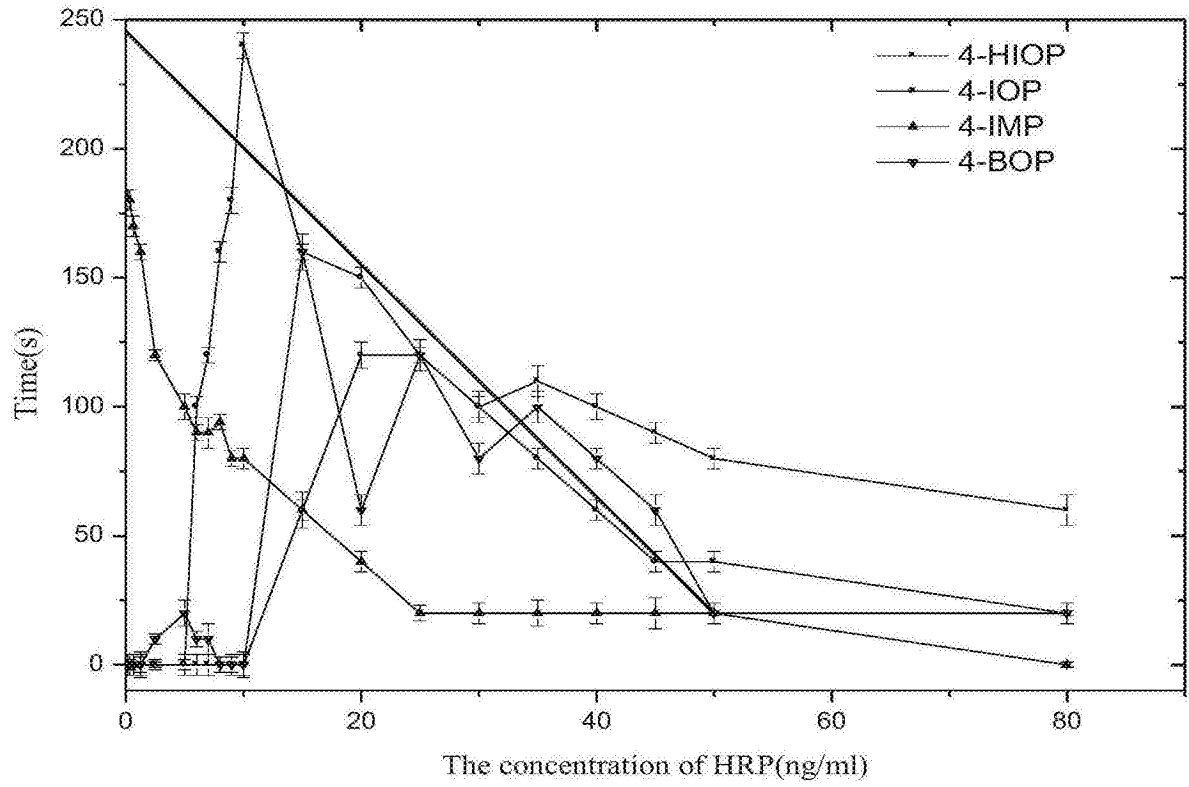


图3

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 化学发光增敏液及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN104049080B | 公开(公告)日 | 2016-07-20 |
| 申请号 | CN201410302775.4 | 申请日 | 2014-06-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 | | |
| [标]发明人 | 金茂俊 王静 杨丽华 杜鹏飞 金芬 邵华 余永新 王珊珊 | | |
| 发明人 | 金茂俊 王静 杨丽华 杜鹏飞 金芬 邵华 余永新 王珊珊 | | |
| IPC分类号 | G01N33/532 | | |
| CPC分类号 | G01N21/763 G01N33/535 | | |
| 代理人(译) | 吴开磊 | | |
| 审查员(译) | 周露露 | | |
| 其他公开文献 | CN104049080A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及化学发光免疫分析技术领域，具体而言，特别涉及一种化学发光增敏液及其制备方法。该化学发光增敏液，包括0.1?100mmol/L的4?咪唑苯酚、0.05?100mmol/L的过氧化氢、0.05?100mmol/L鲁米诺或鲁米诺衍生物、0.01?10mol/L的碱、体积百分数为0.01%?20%有机溶剂、离子强度为0.01?10mol/L、pH值为7?11的缓冲液。通过实验发现，该增敏液可以显著的增强反应体系的发光强度、大大的延长其发光持续时间，其最大发光强度(化学发光值)可以达到 7.5×10^7 ，发光持续时间可以达到25分钟。

