



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106124753 B

(45)授权公告日 2018.03.06

(21)申请号 201610538476.X

CN 102755166 A,2012.10.31,

(22)申请日 2016.07.08

CN 104568927 A,2015.04.29,

(65)同一申请的已公布的文献号

JP H0534345 A,1993.02.09,

申请公布号 CN 106124753 A

US 5811236 A,1998.09.22,

WO 9005302 A1,1990.05.17,

(43)申请公布日 2016.11.16

周明欣.Roche 电化学发光免疫分析系统试

(73)专利权人 广州东林生物科技有限公司

剂Proce11 及Cleance11 的配制及应用.《临床

地址 510730 广东省广州市经济技术开发区

区蓝玉四街九号科技园五号厂房四楼

肖静等.Roche 电化学发光免疫分析系统发

(72)发明人 张传春 屈兴翠

光缓冲液和清洗液配制及应用.《检验医学与临

(51)Int.Cl.

审查员 杨玉路

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

(56)对比文件

CN 104360051 A,2015.02.18,

CN 103443614 A,2013.12.11,

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

电化学发光缓冲液及清洗液

(57)摘要

本发明涉及一种适用于罗氏全自动免疫分析仪的电化学发光缓冲液和清洗液,缓冲液配方中大大减少毒性较大的三丙胺的用量,并添加增强化学发光的物质,减少了原装试剂的毒性,降低检验师的操作风险,试剂配制简单,结果准确;清洗液配方中增加对凝结块和纤维蛋白等成分的有效清洗成分,并加入Proclin 300防腐剂,进一步维护电极。清洗液清洗效果好,保存时间长。本发明具有极强的工业应用价值。

1. 一种配套使用的电化学发光缓冲液和清洗液,其特征在于,其中的化学发光缓冲液其组分和含量为:磷酸二氢钾 250~350mmol/L,三丙胺 1~10mmol/L, N, N-二[正]丁基氨基乙醇 1~3mmol/L,氯化钠 1~10mmol/L, PEG 300 1~10mmol/L, 丙二酰脲1~5mmol/L, Tween 20 0.05~0.2% (w%), Proclin 300 0.05~0.2%(w%),对甲酚 0.1~1 mmol/L,聚乙烯吡咯烷酮 0.1~1 mmol/L,甲基纤维素 0.1~1 mmol/L,pH值 6.6~7.0;其中的清洗液组分和含量为:氢氧化钾 150-200mmol/L,Trixton X-100 0.1~1%(w%),MES 0.1~1% (w%),硫脲 0.1~1% (w%), Proclin 300 0.1~0.5%(w%)。

2. 如权利要求 1 所述的缓冲液和清洗液,其特征在于,其中的缓冲液其组分和含量为:磷酸二氢钾 300mmol/L,三丙胺 5mmol/L, N, N-二[正]丁基氨基乙醇 3mmol/L,氯化钠 5mmol/L,PEG 300 3mmol/L,丙二酰脲 5mmol/L,Tween 20 0.1%(w%), Proclin 300 0.05%(w%),对甲酚 0.1mmol/L,聚乙烯吡咯烷酮 0.1 mmol/L, 甲基纤维素 0.1 mmol/L, pH 值6.8;其中的清洗液组分和含量为: 氢氧化钾 180mmol/L,Trixton X-100 0.8%(w%), MES 0.2%(w%),硫脲 0.5%(w%),Proclin 300 0.5%(w%)。

## 电化学发光缓冲液及清洗液

### 技术领域

[0001] 本发明涉及可用于罗氏全自动免疫分析仪的化学发光缓冲液及清洗液,属于医疗器械体外诊断试剂领域。

### 背景技术

[0002] 电致化学发光(ECL),也称电化学发光,是化学发光与电化学相结合的一种新颖的研究方法。是通过在电极施加一定的电压进行电化学反应,产物之间或产物与体系中的某种组分之间发生化学反应,使电子跃迁到激发态产生激发态物质,激发态物质回到基态产生发光;或者是发光物质利用电极提供能量直接进行氧化还原反应,生成不稳定的中间态物质,中间态物质能够迅速分解产生光辐射。

[0003] 瑞士Roche公司Cobas e411/e601电化学发光免疫分析系统,是应用先进的电化学发光(ECL)技术的全自动台式分析仪。已应用于甲状腺,激素,心肌损伤和肿瘤标志、传染病、贫血、骨代谢等广泛的测定项目。其电化学发光体系即为三联吡啶钌( $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ )-三丙胺(TPrA)体系,其配套使用的Procell和Cleancell用量较大,配套原装试剂特别是Procell价格昂贵且毒性较大。

[0004] 化学发光缓冲液Procell为三丙胺清洗液,用于维护电极、运送反应混合物、清洗链霉亲和素包被的微粒、产生反应信号;化学发光清洗液Cleancell,用于每次测量后管道系统和测量池的清洗以及电极维护。罗氏诊断进口注册证信息显示Procell配方为:磷酸盐缓冲液300mmol/L、三丙胺180mmol/L、去垢剂 $\leq 0.1\%$ ;防腐剂,pH6.8;Cleancell配方为:KOH 176mmol/L(相当于pH值13.2);清洁剂 $\leq 1\%$ 。三联吡啶钌( $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ )-三丙胺(TPrA)体系是一种常见的ECL体系,其中三联吡啶钌是电化学发光剂,它和电子供体TPrA在电极阳极表面同时失去电子发生氧化反应,2价的 $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ 标记物被氧化成3价的 $[Ru(bpy)_3^{3+}]$ 的标记物,TPrA被氧化成阳离子自由基 $TPrA^{+*}$ , $TPrA^{+*}$ 很不稳定,自发地失去一个质子而形成自由基 $TPrA^*$ ,其为强还原剂,将一个电子给3价的 $[Ru(bpy)_3^{3+}]$ ,使其成为激发态的 $Ru(bpy)_3^{2+}$ ,而TPrA自身被氧化成氧化产物。激发态的 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 衰减时发射一个波长620nm的光子,重新形成基态的 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 。这一过程在电极表面周而复始的进行,产生许多光子,使得光信号增强。

[0005] 由于TPrA自身氧化的不可逆性以及两者之间的相互作用产生的光较弱,该体系通常使用大大过量的TPrA(通常是 $TPrA:Ru(bpy)_3^{2+}=100000\mu mol/L:1\mu mol/L$ ),即100mmol/L,而原装试剂加入180mmol/L TPrA,超出了常用量,而TPrA毒性标识为高毒性,大鼠经口 $LD_{50}=72mg/kg$ ,其蒸气或雾对眼、粘膜、上呼吸道和皮肤有强烈的刺激性,对于检验师的健康影响较大。此外,全自动生化仪在多次使用后,由于清洗效果不佳,从测量池到管道,容易受到反应液的污染,长期蛋白质沉淀,导致空白吸光度增高,并出现报警。

[0006] 可见,进一步的研究可用于罗氏全自动免疫分析仪的化学发光缓冲液及清洗液,尤其是降低三丙胺的浓度,并保证检测结果的一致性,稳定性和准确性的缓冲液,以及具有更加优异的清洗效果的清洗液,仍然是亟待解决的技术问题,这也正是本发明得以完成的

基础所在和动力所倚。

### 发明内容

[0007] 如上所述,为了进一步的研究可用于罗氏全自动免疫分析仪的化学发光缓冲液及清洗液,尤其是降低三丙胺的浓度,并保证检测结果的一致性,稳定性和准确性的缓冲液,以及具有更加优异的清洗效果的清洗液,本发明人对此进行了深入的研究,在付出大量创造性劳动后,从而完成了本发明。

[0008] 本发明就TPrA与Ru(bpy) $3^{2+}$ 的相互作用产生的光较弱着手,对Procell配方进行改进,大大降低TPrA用量,同时在组方中加入N,N-二[正]丁基氨基乙醇、氯化钠、PEG 300、丙二酰脲、对甲酚等物质,增强化学发光,减少因三丙胺浓度降低导致的化学发光削弱,同时,保证与原装试剂的一致性和稳定性。

[0009] 本发明在Cleancell中加入尿素、硫脲Trixtion X-100、MES等成分,增加其对凝结核和纤维蛋白等成分的清洗效果,并加入Proclin 300防腐剂,进一步维护电极。

[0010] 研制改进配方的Procell和Cleancell替代原装的Procell和Cleancell,以降低毒性,提高清洗效果,进一步保护电极,减少成本,具有较大的利润空间。

[0011] 具体而言,本发明涉及如下四个方面,更具体而言,第一个方面,本发明涉及一种配套使用的电化学发光缓冲液和清洗液,缓冲液组分包括:磷酸二氢钠,三丙胺,氯化钠,草酸,Tween 20,Proclin 300;清洗液组分包括:氢氧化钾,Trixtion X-100,MES,Proclin 300。

[0012] 优选的,其中的缓冲液其组分和含量为:磷酸二氢钾250~350mmol/L,三丙胺60~90mmol/L,氯化钠1~10mmol/L,草酸3~10mmol/L,Tween 20 0.05~0.2% (w%),Proclin 300 0.05~0.2% (w%),pH值6.6~7.0;其中的清洗液组分和含量为:氢氧化钾150~200mmol/L,Trixtion X-100 0.1~1% (w%),MES 0.1~1% (w%),Proclin 300 0.1~0.5% (w%)。

[0013] 第二个方面,本发明涉及一种配套使用的电化学发光缓冲液和清洗液,缓冲液组分包括:磷酸二氢钠,三丙胺,氯化钠,PEG 300,Tween 20,Proclin 300,对甲酚;清洗液组分包括:氢氧化钾,Trixtion X-100,MES,尿素,Proclin 300。

[0014] 优选的,其中的缓冲液其组分和含量为:磷酸二氢钾250~350mmol/L,三丙胺20~30mmol/L,氯化钠1~10mmol/L,PEG300 1~10mmol/L,Tween 20 0.05~0.2% (w%),Proclin 300 0.05~0.2% (w%),对甲酚0.1~1mmol/L,pH值6.6~7.0;其中的清洗液组分和含量为:氢氧化钾150~200mmol/L,Trixtion X-100 0.1~1% (w%),MES/AES 0.1~1% (w%),尿素0.1~1% (w%),Proclin300 0.1~0.5% (w%)。

[0015] 第三个方面,本发明涉及一种配套使用的电化学发光缓冲液和清洗液,缓冲液组分包括:磷酸二氢钠,三丙胺,N,N-二[正]丁基氨基乙醇,氯化钠,PEG 300,丙二酰脲,Tween 20,Proclin 300,对甲酚,聚乙烯吡咯烷酮,甲基纤维素;清洗液组分包括:氢氧化钾,Trixtion X-100,MES,硫脲,Proclin 300。

[0016] 优选的,其中的缓冲液其组分和含量为:磷酸二氢钾250~350mmol/L,三丙胺1~10mmol/L,N,N-二[正]丁基氨基乙醇1~3mmol/L,氯化钠1~10mmol/L,PEG 300 1~10mmol/L,丙二酰脲1~5mmol/L,Tween 20 0.05~0.2% (w%),Proclin 300 0.05~0.2%

(w%),对甲酚0.1~1mmol/L,聚乙烯吡咯烷酮0.1~1mmol/L,甲基纤维素0.1~1mmol/L,pH值6.6~7.0;其中的清洗液组分和含量为:氢氧化钾150~200mmol/L,Trixton X-100 0.1~1% (w%),MES0.1~1% (w%),硫脲0.1~1% (w%),Proclin 300 0.1~0.5% (w%)。

[0017] 第四个方面,本发明涉及上述缓冲液及清洗液的配制方法,如下:

[0018] 一、化学发光缓冲液的配制:将除三丙胺之外的成分分别称量加入少量的水中搅拌使溶解,加入三丙胺搅拌静置待全溶后转移至容量瓶中,定容,摇匀,调节pH值,即得。

[0019] 二、清洗液的配制:按照配方中的成分称取适当的量,加水溶解混匀,放冷,转移至容量瓶,定容,摇匀,即得。

### 具体实施方式

[0020] 下面通过具体的实施例对本发明进行详细说明,但这些例举性实施方式的用途和目的仅用来例举本发明,并非对本发明的实际保护范围构成任何形式的任何限定,更非将本发明的保护范围局限于此。

[0021] 实施例1

[0022] A、化学发光缓冲液(Procell)的组分与制备:

[0023] 磷酸二氢钾 270mmol/L

[0024] 三丙胺 60mmol/L

[0025] 氯化钠 2mmol/L

[0026] 草酸 5mmol/L

[0027] Tween 20 0.05% (w%)

[0028] Proclin 300 0.05% (w%)

[0029] pH值用NaOH调至6.6

[0030] 将除三丙胺之外的其他成分分别称量加入少量的水中搅拌使溶解,加入三丙胺搅拌静置待全溶后移至容量瓶中,定容,摇匀即得。

[0031] B、清洗液(Cleancell)的组分与制备:

[0032] 氢氧化钾150mmol/L

[0033] Trixton X-100 0.5%

[0034] MES 0.5%

[0035] Proclin 300 0.3%

[0036] 按照配方中的成分称取适当的量,加水溶解混匀,放冷,转移至容量瓶,定容,摇匀即得。

[0037] 实施例2

[0038] A、缓冲液(Procell)的组分与制备:

[0039] 磷酸二氢钾 350mmol/L

[0040] 三丙胺 25mmol/L

[0041] 氯化钠 5mmol/L

[0042] PEG 300 5mmol/L

[0043] Tween 20 0.1% (w%)

[0044] Proclin 300 0.1% (w%)

- [0045] 对甲酚 0.2mmol/L
- [0046] pH值用NaOH调至7.0
- [0047] 将除三丙胺之外的其他成分分别称量加入少量的水中搅拌使溶解,加入三丙胺搅拌静置待全溶后移至容量瓶中,定容,摇匀即得。
- [0048] B、清洗液(Cleance11)的组分与制备:
- [0049] 氢氧化钾 200mmol/L
- [0050] Trixton X-100 0.2%
- [0051] AES 0.8%
- [0052] 尿素 0.1%
- [0053] Proclin 300 0.5%
- [0054] 按照配方中的成分称取适当的量,加水溶解混匀,放冷,转移至容量瓶,定容,摇匀即得。
- [0055] 实施例3
- [0056] A、缓冲液(Proce11)的组分与制备:
- [0057] 磷酸二氢钾 300mmol/L
- [0058] 三丙胺 5mmol/L
- [0059] N,N-二[正]丁基氨基乙醇3mmol/L
- [0060] 氯化钠 5mmol/L
- [0061] PEG 300 3mmol/L
- [0062] 丙二酰脲 5mmol/L
- [0063] Tween 20 0.1% (w%)
- [0064] Proclin 300 0.05% (w%)
- [0065] 对甲酚 0.1mmol/L
- [0066] 聚乙烯吡咯烷酮 0.1mmol/L
- [0067] 甲基纤维素 0.1mmol/L
- [0068] pH值用NaOH调至6.8
- [0069] 将除三丙胺之外的其他成分分别称量加入少量的水中搅拌使溶解,加入三丙胺搅拌静置待全溶后移至容量瓶中,定容,摇匀即得。
- [0070] B、清洗液(Cleance11)的组分与制备:
- [0071] 氢氧化钾 180mmol/L
- [0072] Trixton X-100 0.8%
- [0073] MES 0.2%
- [0074] 硫脲 0.5%
- [0075] Proclin 300 0.5%
- [0076] 按照配方中的成分称取适当的量,加水溶解混匀,放冷,转移至容量瓶,定容,摇匀即得。
- [0077] 实施例4
- [0078] 一、测定准确性验证试验
- [0079] 1、将实施例1所配置的Proce11和Cleance11置于罗氏的Elecsys2010电化学发光

免疫分析系统相应的位置上进行验证试验,取30位患者血清进行试验,对比与原装配套试剂Procell、Cleancell检测结果的相关性。

[0080]

实施例 1	自配试剂与配套试剂检测结果线性相关方程	线性相关系数 r
促甲状腺素 (TSH)	$y=1.0096x+0.0096$	0.9997
血清游离三碘甲腺原氨酸 (FT3)	$y=0.9936x-0.0245$	0.9989
血清游离甲状腺素 (FT4)	$y=0.9998x-0.0266$	0.9996

[0081] 结果显示,自配实施例1的Procell、Cleancell与原装Procell、Cleancell性能一致性良好。

[0082] 2、将实施例2所配置的Procell和Cleancell置于罗氏的Elecsys2010电化学发光免疫分析系统相应的位置上进行验证试验,取30位患者血清进行试验,对比与原装配套试剂Procell、Cleancell检测结果的相关性。

[0083]

实施例 2	自配试剂与配套试剂检测结果线性相关方程	线性相关系数 r
促甲状腺素 (TSH)	$y=0.9996x-0.0083$	0.9991
血清游离三碘甲腺原氨酸 (FT3)	$y=1.0066x-0.1121$	0.9997
血清游离甲状腺素 (FT4)	$y=0.9975x-0.0075$	0.9998

[0084] 结果显示,自配实施例2Procell、Cleancell与原装Procell、Cleancell性能一致性良好。

[0085] 3、将实施例3所配置的Procell和Cleancell置于罗氏的Elecsys2010电化学发光免疫分析系统相应的位置上进行验证试验,取30位患者血清进行试验,对比与原装配套试剂Procell、Cleancell检测结果的相关性。

[0086]

实施例 3	自配试剂与配套试剂检测结果线性相关方程	线性相关系数 r
促甲状腺素 (TSH)	$y=1.0116x+0.0212$	0.9991
血清游离三碘甲状腺氨酸 (FT3)	$y=0.9990x-0.0084$	0.9995
血清游离甲状腺素 (FT4)	$y=0.9962x+0.0523$	0.9988

[0087] 结果显示,自配实施例3Procell、Cleancell与原装Procell、Cleancell性能一致性良好。

[0088] 综上所述可以看出,表明自配试剂在极大降低了三丙胺浓度的情况下,同时仍能完成全自动分析仪上的免疫测试,满足与原装试剂一致性的金标准,并且结果准确可靠,可见本发明的改进配方的Procell、Cleancell具有相当优异的安全性和可靠性。

[0089] 实施例5

[0090] 二、Cleancell清洗效果验证试验

[0091] Cleancell的作用主要是每次测量后管道系统和测量池的清洗以及电极维护,本发明在原装试剂的配方基础上,改进配方,以改进其对管道和测量池的清洗作用,对其中的反应液主要是残留的蛋白进行清洗,首先将大量空白血清与促甲状腺素试剂盒反应,再将以上反应液分装于空白比色杯中,静置30min,倒掉,使用自配Cleancell与原装配套试剂在相同的加入量的情况下进行比色杯清洗(各进行20组平行试验),清洗后加入等量的水,摇匀,在蛋白质最大吸收波长280nm下,测试吸光度,观察结果。

[0092] 1.将实施例1中所配置的Cleancell按照以上验证方法进行试验,结果见下表:

组别	实施例 1	原装配套 Cleancell
吸光度	$0.0531\pm 0.0052$	$0.0762\pm 0.0065$

[0094] 2.将实施例2中所配置的Cleancell按照以上验证方法进行试验,结果见下表:

组别	实施例 2	原装配套 Cleancell
吸光度	$0.0623\pm 0.0031$	$0.0835\pm 0.0073$

[0096] 3.将实施例3中所配置的Cleancell按照以上验证方法进行试验,结果见下表:

组别	实施例 3	原装配套 Cleancell
吸光度	$0.0508\pm 0.0046$	$0.0799\pm 0.0038$

[0098] 综上所述可以看出,自配实施例1-3,改进配方的Cleancell较原装配套试剂的Cleancell的蛋白清洗效果更优,因此本发明的改进配方的Cleancell,清洗作用增强。从而使得,本发明配套使用的电化学发光缓冲液和清洗液将会更具有实际的工业应用价值。

[0099] 应当理解,这些实施例的用途仅用于说明本发明而非意欲限制本发明的保护范围。此外,也应理解,在阅读了本发明的技术内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动、修改和/或变型,所有的这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的保护范围之内。

专利名称(译)	电化学发光缓冲液及清洗液		
公开(公告)号	<a href="#">CN106124753B</a>	公开(公告)日	2018-03-06
申请号	CN201610538476.X	申请日	2016-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	广州东林生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州东林生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州东林生物科技有限公司		
[标]发明人	张传春 屈兴翠		
发明人	张传春 屈兴翠		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/531		
其他公开文献	CN106124753A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种适用于罗氏全自动免疫分析仪的电化学发光缓冲液和清洗液，缓冲液配方中大大减少毒性较大的三丙胺的用量，并添加增强化学发光的物质，减少了原装试剂的毒性，降低检验师的操作风险，试剂配制简单，结果准确；清洗液配方中增加对凝结块和纤维蛋白等成分的有效清洗成分，并加入Proclin 300防腐剂，进一步维护电极。清洗液清洗效果好，保存时间长。本发明具有极强的工业应用价值。

实施例1	自配试剂与配套试剂检测结果线性相关方程	线性相关系数 r
促甲状腺素 (TSH)	$y=1.0096x+0.0096$	0.9997
血清游离三碘甲状腺氨酸 (FT3)	$y=0.9936x-0.0245$	0.9989
血清游离甲状腺素 (FT4)	$y=0.9998x-0.0266$	0.9996