

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C09K 11/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510083929.6

[43] 公开日 2006年1月11日

[11] 公开号 CN 1719254A

[22] 申请日 2005.7.15

[21] 申请号 200510083929.6

[71] 申请人 武汉赛文生物技术有限公司

地址 430074 湖北省武汉市洪山区关山街珞瑜路272号

[72] 发明人 刘振世 王法龙 周昊 王东
张波 陈海生 谢晶 胡晓焱
张小平 孙海涛 黄建梅 吴丹民
张玉庆

[74] 专利代理机构 北京科大华谊专利代理事务所
代理人 刘月娥

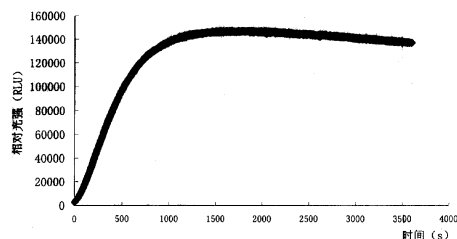
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

[54] 发明名称

一种化学发光底物增强剂

[57] 摘要

本发明提供了一种化学发光底物增强剂，属于免疫检测技术领域。其组分包括：氯化十六烷三甲基铵 CTAC，1, 2 肉蔻酰-Sn-甘油-3-磷酸二钠盐 DGPD，牛血清白蛋白 BSA，5'-18 烷氨基荧光素；各组分的工作浓度范围为：CTAC 为 4-10mg/L，DGPD 为 1-30mg/L，BSA 为 1-50g/L，5'-18 烷氨基荧光素为 5-100mg/L。该增强剂可以溶解在底物溶液中起作用，也可以单独配制，在反应时与 CSPD 底物分别加入。化学发光底物增强剂溶解的缓冲液为碳酸盐缓冲液或二乙醇胺缓冲液，pH 值范围为 9.0-10.0。本发明的优点在于：使用较低的 CSPD 底物的工作浓度可以较好的分析效果。并且增强剂溶液的配方所有相关的化学试剂均可以从商业途径采购，价格便宜。



1、一种化学发光底物增强剂，其特征在于：组分包括：氯化十六烷三甲基铵 CTAC，1,2 肉蔻酰-Sn-甘油-3-磷酸二钠盐 DGPD，牛血清白蛋白 BSA，5'-18 烷氨基荧光素；各组分的工作浓度范围为：CTAC 为 4-10 mg/L，DGPD 为 1-30 mg/L，BSA 为 1-50 g/L，5'-18 烷氨基荧光素为 5-100 mg/L。

2、按照权利要求 1 所述的化学发光底物增强剂，其特征在于：化学发光底物增强剂溶解的缓冲液为碳酸盐缓冲液或二乙醇胺缓冲液，pH 值范围为 9.0-10.0。

一种化学发光底物增强剂

技术领域

本发明属于免疫检测技术领域，特别是提供了一种化学发光底物增强剂。

背景技术

化学发光免疫分析在过去十年来，以其高灵敏度和宽检测范围在临床检测中发挥了越来越多的作用（尹东光等，几种主要化学发光物质的发光性能及其化学发光免疫分析体系，*标记免疫分析与临床*，2002，9：225-230）。在发光免疫分析中，最常用的发光物质包括鲁米诺/异鲁米诺， γ 吡啶酯和环二氧化乙烷衍生物（dioxetanes）等。鲁米诺/异鲁米诺及 γ 吡啶酯化学发光系统均属于闪光型发光，需要相对复杂的检测仪器。这些系统具有很多优点，但是与放免相比，它们的系统相对复杂。从技术上讲，优化十分困难，许多化学成分的使用都影响信噪比。而环二氧化乙烷衍生物如 AMPPD[®]、CSPD[®]和 CDP-Star[®]等系统的发光属于辉光型，利用酶的催化反应来引发发光，同时发光底物本身的化学结构具有较好的热力学稳定性（Stephan Beck 等，Perspective: an analytical biotechnology, *Anal. Chem.* 1990, 62:2258-2270.）。因此，其使用受到越来越多的重视。

为了增强发光强度，延迟发光时间，常在底物溶液中使用水溶性大分子如牛血清白蛋白（BSA）和表面活性剂（如 CTAB、SDS 等）。此外，还发现一些荧光素可以增强发光（1, 2-Dioxetanes: novel chemiluminescent enzyme substrate. Applications to immunoassays, *Journal of bioluminescence and chemiluminescence*, 1989, 4:99-111.）。

发明内容

本发明的目的提供一种化学发光底物增强剂，一种新的 CSPD[®]底物增强剂溶液的配方，该增强剂可以溶解在底物溶液中起作用，也可以单独配制，在反应时与 CSPD[®]底物分别加入。在化学发光免疫分析中，CSPD[®]底物增强剂溶液可以与碱性磷酸酶作用而发光，其发光强度与碱性磷酸酶的量成正比。

本发明的组分包括氯化十六烷三甲基铵（CTAC），1, 2 肉蔻酰-Sn-

甘油-3-磷酸二钠盐 (DGPD)，牛血清白蛋白(BSA)，5'-18 烷氨基荧光素。

本发明配方中 CTAC 的工作浓度范围为 4-10 mg/L，DGPD 的工作浓度范围为 1-30 mg/L，BSA 的工作浓度范围为 1-50 g/L，5'-18 烷氨基荧光素的工作浓度范围为 5-100 mg/L。

本发明配方溶解的缓冲液为碳酸盐缓冲液或二乙醇胺缓冲液，pH 值范围为 9.0-10.0。

本发明的优点在于提供一种简单的 CSPD®发光底物增强剂溶液的配方。此外，在使用本发明的增强剂溶液时，使用较低的 CSPD®底物的工作浓度可以较好的分析效果。

本发明的另一个优点在于增强剂溶液的配方所有相关的化学试剂均可以从商业途径采购，价格便宜。

附图说明

图 1 为本发明测量发光反应的时间曲线。其中，横坐标为时间，纵坐标为相对光强。

图 2 为测量发光反应的时间曲线，无增强剂。

图 3 为本发明 PRL 剂量反应曲线，其中，横坐标为浓度，纵坐标为相对发光强度。

具体实施方式

实施例 1 增强剂溶液的配制：

1.06g 二乙醇胺，溶解在 80 ml 的去离子水中调 pH 至 9.5，加入 0.02 g MgCl₂，0.4 mg CTAC，0.2 mg DGPD，0.5 g BSA 和 1.2 mg 5'-18 烷氨基荧光素，搅拌使其溶解，定容 100 ml。使用 0.2um 过滤器过滤溶液，于 4 °C 贮存。使用时，用增强剂溶液稀释底物至 0.10 mM。

增强发光反应的时间曲线：

使用 2.96×10^{-15} 摩尔的碱性磷酸酶，加入 200 ul 的底物增强剂工作液，混匀后，室温反应，使用 BPCL 发光测定仪（中科院生物物理所研制）测量发光反应的时间曲线（见图 1）。

使用二乙醇胺溶液稀释的底物溶液作为对照溶液，该溶液与碱性磷酸酶的发光反应的时间曲线见图 2。

实施例 2 人催乳素 (PRL) 化学发光免疫分析

试剂:

磁分离试剂: 包被羊抗异硫氰酸荧光素的磁珠, 直径 1 μm , 工作浓度 6 mg/ml;

PRL 单抗-异硫氰酸荧光素工作液: 0.75 $\mu\text{g/ml}$;

PRL 单抗-碱性磷酸酶工作液: 1.0 $\mu\text{g/ml}$;

PRL 标准品: 0, 40, 200, 500, 2000 和 5000 uIU/ml;

以上试剂由北京倍爱康生物技术股份有限公司提供。

清洗液: 氯化钠 (NaCl) 2 g, 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.9 g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 0.2 g, 氯化钾 (KCl) 0.2 g, 曲拉通 X-100 0.5 ml, 吐温 20 0.2 ml, 布兰尼道克斯 (Bronidox-L) 5 g, 用纯化水配成 1 000 ml, 用 0.2 μm 过滤器过滤, 于室温保存。

发光底物增强剂溶液: 配制 0.05 mmol/l, pH9.8 碳酸盐缓冲液 100 ml。取 80 ml 加入 0.02g MgCl_2 , 0.5mg CTAC, 1.0 mg DGPD, 1.0 g BSA 和 1.0 mg 5'-18 烷氨基荧光素, 搅拌使其溶解, 定容 100ml。使用 0.2 μm 过滤器过滤溶液, 于 4 $^\circ\text{C}$ 贮存。使用时, 用增强剂溶液稀释 CSPD®底物原液至 0.06 mM。

操作步骤:

1、加样与免疫反应: 在平底试管中加入 15 μl 标准品, 30 μl PRL 单抗-异硫氰酸荧光素工作液, PRL 单抗-碱性磷酸酶工作液, 以及 60 μl 10mg/ml 磁分离试剂, 混匀后, 37 $^\circ\text{C}$ 温育 30 分钟。

2、洗涤: 将平底试管放在磁分离器上分离 2 分钟, 然后用一大而缓慢的圆周运动倒转分离器倒出上清液, 把倒转的试管放在滤纸上, 拍击分离器以除去挂壁液体。每管中加入清洗液 150 μl , 充分混匀后, 将平底试管放在磁分离器上分离 2 分钟, 然后用一大而缓慢的圆周运动倒转分离器倒出上清液, 把倒转的试管放在滤纸上, 拍击分离器以除去挂壁液体。重复两次。

3、加入 200 μl 发光底物增强剂溶液, 室温下震荡反应 15 分钟。

4、在 BPCL 化学发光测定仪上读取发光值, 并进行曲线拟合。

结果: 见图 3。

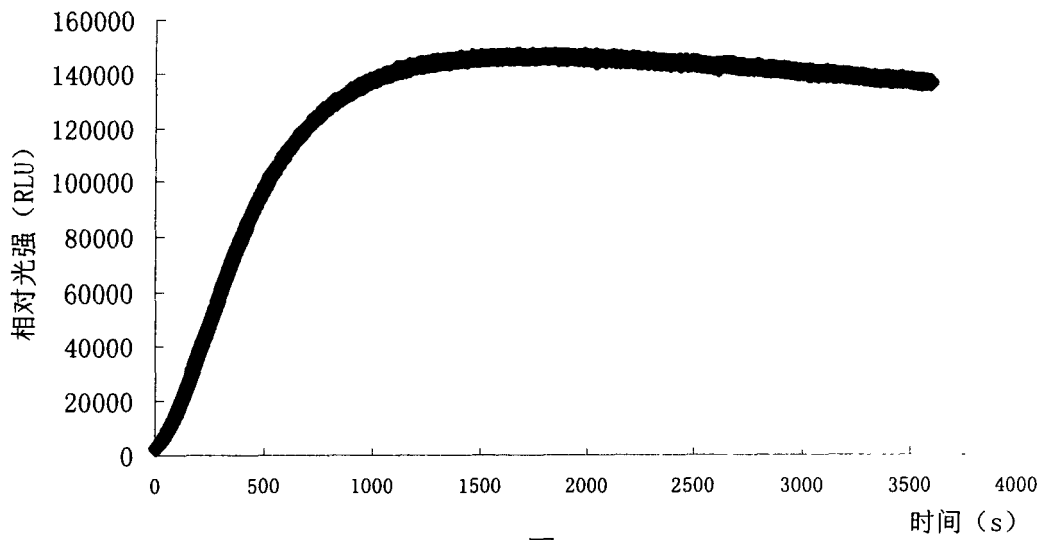


图1

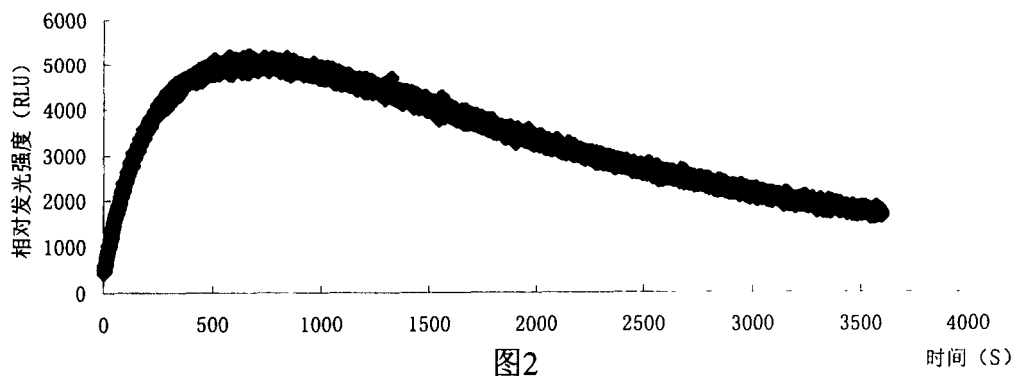


图2

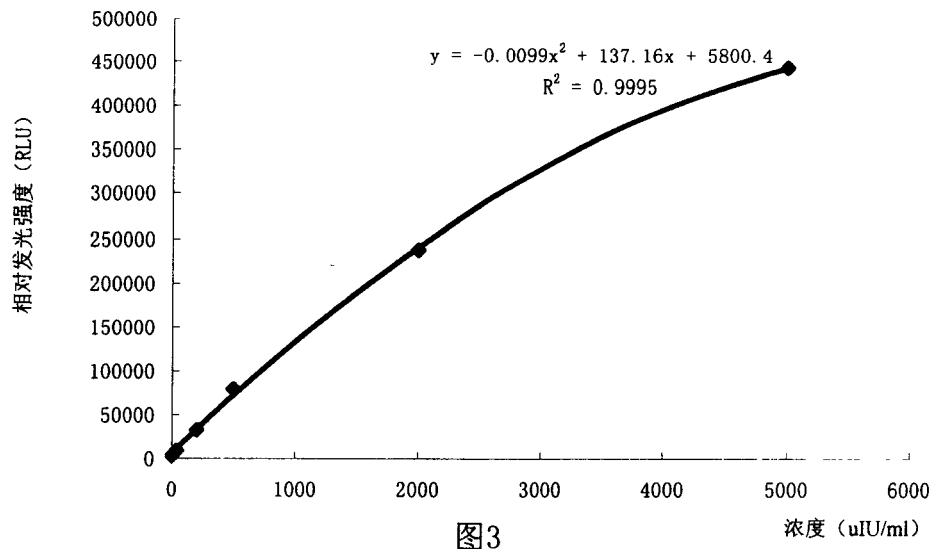


图3

专利名称(译)	一种化学发光底物增强剂		
公开(公告)号	CN1719254A	公开(公告)日	2006-01-11
申请号	CN200510083929.6	申请日	2005-07-15
[标]发明人	刘振世 王法龙 周昊 王东 张波 陈海生 谢晶 胡晓焱 张小平 孙海涛 黄建梅 吴丹民 张玉庆		
发明人	刘振世 王法龙 周昊 王东 张波 陈海生 谢晶 胡晓焱 张小平 孙海涛 黄建梅 吴丹民 张玉庆		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/53 C09K11/00		
代理人(译)	刘月娥		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种化学发光底物增强剂，属于免疫检测技术领域。其组分包括：氯化十六烷三甲基铵CTAC，1,2肉蔻酰-Sn-甘油-3-磷酸二钠盐DGPD，牛血清白蛋白BSA，5'-18烷氨基荧光素；各组分的工作浓度范围为：CTAC为4-10mg/L，DGPD为1-30mg/L，BSA为1-50g/L，5'-18烷氨基荧光素为5-100mg/L。该增强剂可以溶解在底物溶液中起作用，也可以单独配制，在反应时与CSPD底物分别加入。化学发光底物增强剂溶解的缓冲液为碳酸盐缓冲液或二乙醇胺缓冲液，pH值范围为9.0-10.0。本发明的优点在于：使用较低的CSPD底物的工作浓度可以较好的分析效果。并且增强剂溶液的配方所有相关的化学试剂均可以从商业途径采购，价格便宜。

