



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106596920 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201611043729.2

(22)申请日 2016.11.24

(71)申请人 上海透景诊断科技有限公司

地址 201400 上海市奉贤区正琅路19号4幢
1004室

(72)发明人 李志甲 郭安亮 姚见儿 朱凤
左红伟

(74)专利代理机构 上海唯源专利代理有限公司
31229

代理人 曾耀先

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

(54)发明名称

链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,包括:聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液。较佳地,聚乙烯吡咯烷酮类物质的含量为0.1%(v/v)-10%(v/v),优选为0.5%(v/v)-1%(v/v)。碱性缓冲液的浓度为0.01M-0.05M。还包括:蛋白、表面活性剂、以及防腐剂(液体和/或固体)。还提供链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法和应用。本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂能够使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定,减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减,避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果,且设计巧妙,配制简便,成本低廉,适于大规模推广应用。

1. 一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其特征在於,所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂包括:聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液。

2. 如权利要求1所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其特征在於,所述聚乙烯吡咯烷酮类物质的含量为0.1% (v/v) -10% (v/v),优选为0.5% (v/v) -1% (v/v)。

3. 如权利要求1所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其特征在於,所述碱性缓冲液的浓度为0.01M-0.05M。

4. 如权利要求1所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其特征在於,所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂还包括:蛋白、表面活性剂、以及液体防腐剂和/或固体防腐剂。

5. 如权利要求4所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其特征在於,所述蛋白的浓度为0.05mg/ml-1mg/ml。

6. 如权利要求4所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其特征在於,所述表面活性剂的含量为0.00001% (v/v) -0.01% (v/v)。

7. 如权利要求4所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其特征在於,所述液体防腐剂的含量为0.001% (v/v) -0.5% (v/v),所述固体防腐剂的含量为0.001% (v/v) -0.5% (v/v)。

8. 一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法,其特征在於,所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂是根据权利要求1所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法包括步骤:将所述聚乙烯吡咯烷酮类物质和所述碱性缓冲液混合均匀。

9. 如权利要求8所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法,其特征在於,所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂还包括:蛋白、表面活性剂、以及液体防腐剂和/或固体防腐剂,所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法还包括步骤:与所述蛋白、所述表面活性剂、以及所述液体防腐剂和/或所述固体防腐剂与所述聚乙烯吡咯烷酮类物质和所述碱性缓冲液一起混合均匀。

10. 根据权利要求1-7任一项所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂或根据权利要求8-9任一项所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法制备的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂在稳定冷冻状态的链霉亲和素藻红蛋白中的应用。

链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白稳定剂技术领域,特别涉及蛋白冷冻稳定剂技术领域,具体是指一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 藻红蛋白是从红藻中分离纯化的、目前普遍使用的新型荧光标记试剂。在特定波长激发下,藻胆蛋白能发射强烈的荧光,其荧光强度是荧光素的30-100倍。具有很好的吸光性能和很高的量子产率,在可见光谱区有很宽的激发及发射范围。

[0003] 藻红蛋白易与抗体、生物素、亲合素、免疫蛋白等物质结合,制成荧光探针。通过检测其发出的荧光,可以用于荧光显微检测、荧光免疫测定、双色或多色荧光分析、癌细胞表面抗原检测、蛋白质和核酸等生物大分子的分析。用于免疫检测、荧光显微技术和流式细胞荧光测定等临床诊断及生物工程技术。

[0004] 然而,链霉亲和素藻红蛋白(streptavidin phycoerythrin,简称SA-PE)具有在传统保存液中逐渐变性的性质,此外运输过程中往往由于外界温度而使其进入冷冻状态下,从而导致其加速变性和荧光值急剧下降,因此在荧光免疫等测定方法中会导致错误的诊断结果。

[0005] 目前,常用的方式是在制备链霉亲和素藻红蛋白过程中进行修饰,以获得稳定的荧光信号,对于在实际应用中如何进一步保障荧光信号的稳定性,特别是冷冻状态下的荧光信号稳定性措施,未见报道。

[0006] 因此,需要提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其能够使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定,减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减,避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果。

发明内容

[0007] 为了克服上述现有技术中的缺点,本发明的一个目的在于提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其能够使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定,减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减,避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果,适于大规模推广应用。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其设计巧妙,配制简便,成本低廉,适于大规模推广应用。

[0009] 本发明的另一目的在于提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法,制备的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂能够使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定,减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减,避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果,适于大规模推广应用。

[0010] 本发明的另一目的在于提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法,其设计巧妙,操作简便,适于大规模推广应用。

[0011] 本发明的另一目的在于提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的应用,用于使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定,减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减,避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果,适于大规模推广应用。

[0012] 本发明的另一目的在于提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的应用,其设计巧妙,使用简便,适于大规模推广应用。

[0013] 为达到以上目的,在本发明的第一方面,提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,其特点是,所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂包括:聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液。

[0014] 较佳地,所述聚乙烯吡咯烷酮类物质的含量为0.1% (v/v) -10% (v/v)。

[0015] 更佳地,所述聚乙烯吡咯烷酮类物质的含量为0.5% (v/v) -1% (v/v)。

[0016] 较佳地,所述聚乙烯吡咯烷酮类物质选自PVP-K30、PVP-K40、PVP-K15、PVP-K17、PVP-K90及其类似物中的至少一种。

[0017] 较佳地,所述碱性缓冲液的浓度为0.01M-0.05M。

[0018] 较佳地,所述碱性缓冲液选自磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、硼酸缓冲液、TE缓冲液及其类似物中的至少一种。

[0019] 较佳地,所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂还包括:蛋白、表面活性剂、以及液体防腐剂和/或固体防腐剂。

[0020] 更佳地,所述蛋白的浓度为0.05mg/ml-1mg/ml。

[0021] 更佳地,所述蛋白选自牛血清白蛋白、水解酪蛋白、胰蛋白胨、鱼明胶、鲑鱼胶及其类似物中的至少一种。

[0022] 更佳地,所述表面活性剂的含量为0.00001% (v/v) -0.01% (v/v)。

[0023] 更佳地,所述表面活性剂选自曲拉通x-100、吐温20、吐温80及其类似物中的至少一种。

[0024] 更佳地,所述液体防腐剂的含量为0.001% (v/v) -0.5% (v/v),所述固体防腐剂的含量为0.001% (v/v) -0.5% (v/v)。

[0025] 更佳地,所述液体防腐剂是Proclin300,所述固体防腐剂选自叠氮钠、硫柳汞钠及其类似物中的至少一种。

[0026] 在本发明的第二方面,提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法,其特点是,所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂是上述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂,所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法包括步骤:将所述聚乙烯吡咯烷酮类物质和所述碱性缓冲液混合均匀。

[0027] 较佳地,所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂还包括:蛋白、表面活性剂、以及液体防腐剂和/或固体防腐剂,所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法还包括步骤:将所述蛋白、所述表面活性剂、以及所述液体防腐剂和/或所述固体防腐剂与所述聚乙烯吡咯烷酮类物质和所述碱性缓冲液一起混合均匀。

[0028] 在本发明的第三方面,提供一种上述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂或上述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法制备的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂在稳定冷冻状态的链霉亲和素藻红蛋白中的应用。

[0029] 发明的有益效果主要在于:

[0030] 1、本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂包括：聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液，其能够使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定，减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减，避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果，适于大规模推广应用。

[0031] 2、本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂包括：聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液，设计巧妙，配制简便，成本低廉，适于大规模推广应用。

[0032] 3、本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法包括步骤：将聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液混合均匀，制备的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂能够使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定，减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减，避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果，适于大规模推广应用。

[0033] 4、本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法包括步骤：将聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液混合均匀，设计巧妙，操作简便，适于大规模推广应用。

[0034] 5、本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂或链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法制备的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂用于稳定冷冻状态的链霉亲和素藻红蛋白，用于使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定，减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减，避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果，适于大规模推广应用。

[0035] 6、本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂或链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法制备的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂用于稳定冷冻状态的链霉亲和素藻红蛋白，设计巧妙，使用简便，适于大规模推广应用。

[0036] 本发明的这些和其它目的、特点和优势，通过下述的详细说明和权利要求得以充分体现，并可通过所附权利要求中特地指出的手段、装置和它们的组合得以实现。

具体实施方式

[0037] 为了稳定链霉亲和素藻红蛋白，特别是处于冷冻状态的链霉亲和素藻红蛋白，本发明提供了一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂，包括：聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液。

[0038] 所述聚乙烯吡咯烷酮类物质可以具有任何合适的含量，较佳地，所述聚乙烯吡咯烷酮类物质的含量为0.1% (v/v) -10% (v/v)。更佳地，所述聚乙烯吡咯烷酮类物质的含量为0.5% (v/v) -1% (v/v)。

[0039] 所述聚乙烯吡咯烷酮类物质是指聚乙烯吡咯烷酮或其类似物，所述聚乙烯吡咯烷酮类物质可以是任何合适的聚乙烯吡咯烷酮类物质，较佳地，所述聚乙烯吡咯烷酮类物质选自PVP-K30、PVP-K40、PVP-K15、PVP-K17、PVP-K90及其类似物中的至少一种。优选PVP-K40。

[0040] 所述碱性缓冲液可以具有任何合适的浓度，较佳地，所述碱性缓冲液的浓度为0.01M-0.05M。

[0041] 所述碱性缓冲液可以是任何合适的碱性缓冲液，较佳地，所述碱性缓冲液选自磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、硼酸缓冲液、TE缓冲液及其类似物中的至少一种。优选TE缓冲液，TE缓冲液即为Tris+EDTA缓冲液。

[0042] 为了提高对链霉亲和素藻红蛋白的稳定性，较佳地，所述链霉亲和素藻红蛋白冷

冻稳定剂还包括：蛋白、表面活性剂、以及液体防腐剂和/或固体防腐剂。

[0043] 这里的“液体防腐剂和/或固体防腐剂”是指液体防腐剂、或者固体防腐剂、或者液体防腐剂和固体防腐剂三种情况。

[0044] 所述蛋白可以具有任何合适的浓度，更佳地，所述蛋白的浓度为0.05mg/ml-1mg/ml。

[0045] 所述蛋白可以是任何合适的蛋白，更佳地，所述蛋白选自牛血清白蛋白BSA、水解酪蛋白、胰蛋白胨、鱼明胶、鲑鱼胶及其类似物中的至少一种。优选牛血清白蛋白。

[0046] 所述表面活性剂可以具有任何合适的含量，更佳地，所述表面活性剂的含量为0.00001% (v/v) -0.01% (v/v)。

[0047] 所述表面活性剂可以是任何合适的表面活性剂，更佳地，所述表面活性剂选自曲拉通x-100、吐温20、吐温80及其类似物中的至少一种。优选吐温20。

[0048] 所述液体防腐剂可以具有任何合适的含量，所述固体防腐剂可以具有任何合适的含量，更佳地，所述液体防腐剂的含量为0.001% (v/v) -0.5% (v/v)，所述固体防腐剂的含量为0.001% (v/v) -0.5% (v/v)。

[0049] 所述液体防腐剂可以是任何合适的液体防腐剂，所述固体防腐剂可以是任何合适的固体防腐剂，更佳地，所述液体防腐剂是Proclin300，所述固体防腐剂选自叠氮钠、硫柳汞钠及其类似物中的至少一种。优选Proclin300。

[0050] 本发明还提供上述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法，在所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂包括：聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液的情况下，所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法包括步骤：将所述聚乙烯吡咯烷酮类物质和所述碱性缓冲液混合均匀。

[0051] 在所述链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂还包括：蛋白、表面活性剂、以及液体防腐剂和/或固体防腐剂的情况下，所述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法还包括步骤：将所述蛋白、所述表面活性剂、以及所述液体防腐剂和/或所述固体防腐剂与所述聚乙烯吡咯烷酮类物质和所述碱性缓冲液一起混合均匀。也就是说，将所述聚乙烯吡咯烷酮类物质、所述碱性缓冲液、所述蛋白、所述表面活性剂、以及所述液体防腐剂和/或所述固体防腐剂混合均匀。

[0052] 本发明还提供上述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂或上述的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法制备的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂在稳定冷冻状态的链霉亲和素藻红蛋白中的应用。

[0053] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容，特举以下实施例详细说明。其中：

[0054] 链霉亲和素藻红蛋白(购买自Life Technology公司，货号：S866规格：1mg)

[0055] 其它常规试剂均购自Sigma公司，例如鱼明胶(购买自Sigma公司)、鲑鱼胶(购买自Sigma公司)

[0056] 流式荧光仪(Luminex 200)

[0057] 实施例1 比较不同的碱性缓冲液对链霉亲和素藻红蛋白的稳定化效果的影响

[0058] 将链霉亲和素藻红蛋白加入到表1中的各组中，即分别添加到不同的缓冲液中，缓冲液成分见表1，链霉亲和素藻红蛋白的终浓度为2.5ug/ml。各组分分成4份，分别在0h和4℃、-20℃、-40℃冷冻96h后，采用Luminex 200流式荧光仪检测荧光信号强度。

[0059] 各缓冲液配制如下:

[0060] 0.01M TE缓冲液:10mMTris+1mM EDTA,用HCl调PH至8.0

[0061] 0.42M硼酸缓冲液:0.42M硼酸,用NaOH调PH至8.0

[0062] 1×PBS缓冲液:5.3ml 0.2M磷酸二氢钠溶液+94.7ml 0.2M磷酸氢二钠溶液

[0063] 表1 在不同温度保存条件下不同的缓冲液对SA-PE的稳定化效果的影响

[0064]

组别	组成	Globin 平均荧光信号强度						
		4℃			-20℃		-40℃	
		0h	96h	信号衰	96h	信号衰	96h	信号衰

[0065]

				减百分 比%		减百分 比%		减百分 比%
组 1	0.01M TE 缓冲液 (pH=8.0)	1837	1372	25.31%	856	53.40%	905	50.73%
组 2	0.42M 硼酸缓冲液 (pH=8.0)	1878	1354	27.90%	644	65.71%	804	57.19%
组 3	1×PBS 缓冲 液 (pH=8.0)	1403	989	29.51%	396	71.78%	474	66.22%

[0066] 从表1中可以看出,保存96h后,4℃、-20℃、-40℃,链霉亲和素藻红蛋白都有不同程度的信号衰减(虽然每次检测绝对数据不完全相同,但其信号衰减的百分比可作为一个趋势判断),特别是在-20℃,衰减最多。比较3个温度下SA-PE保存96h之后的荧光信号,发现TE缓冲液比硼酸缓冲液和PBS缓冲液更适合链霉亲和素藻红蛋白的保存,虽然三者荧光信号都有所衰减,但相比之下TE缓冲液可使链霉亲和素藻红蛋白观察到最优的稳定效果,说明TE缓冲液可使链霉亲和素藻红蛋白更加稳定,其荧光信号衰减更少。

[0067] 实施例2 不同物质对SA-PE的稳定化效果

[0068] 选择不同物质,如PVP类(聚乙烯吡咯烷酮类)、醇胺类、海藻糖、甘油、DMSO(二甲基

亚矾)、蔗糖等物质,分别添加在含有2.5ug/ml链霉亲和素藻红蛋白的0.01M TE缓冲液(0.01M TE缓冲液的配制同实施例1,pH=8.0)中,并设置空白对照(没有添加相应物质的含有2.5ug/ml链霉亲和素藻红蛋白的0.01M TE缓冲液),形成不同组成的稳定剂,如表2所示,均分成6份,3份在配制后直接进行检测(0h),取平均值,另3份则在4℃、-20℃、-40℃分别保存96h后,用Luminex 200流式荧光仪检测荧光信号强度。

[0069] 表2 在不同温度保存条件下不同物质对链霉亲和素藻红蛋白的稳定化效果
[0070]

组别	组合物 组分	Globin 平均荧光信号强度						
		4℃			-20℃		-40℃	
		0h	96h	信号衰减 比例%	96h	信号衰减 百分比%	96h	信号衰减 百分比%
2-0	2.5ug/ml SA-PE	1652	1223	25.97%	582	64.77%	925	44.01%
2-1	2.5ug/ml SA-PE +1% (v/v)乙醇胺	1433	1167	18.56%	565	60.57%	759	47.03%
2-2	2.5ug/ml SA-PE +1% (v/v) 三乙 醇胺	1685	1489	11.63%	663	60.65%	890	47.18%
2-3	2.5ug/ml SA-PE +1% (v/v) N,N- 二甲基乙醇胺	1552	1319	15.01%	535	65.53%	694	55.28%
2-4	2.5ug/ml SA-PE +1%海	1649	1376	16.56%	670	59.37%	892	45.91%

[0071]

	藻糖							
2-5	2.5ug/ml SA-PE +1% 蔗糖	1728	1307	24.36%	688	60.19%	909	47.40%
2-6	2.5ug/ml SA-PE +1% 甘油	1635	1321	19.20%	624	61.83%	823	49.66%
2-7	2.5ug/ml SA-PE +1% DMSO	1711	1265	26.07%	536	68.67%	878	48.68%
2-8	2.5ug/ml SA-PE +1% (v/v) PVP-K30	1741	1559	10.45%	818	53.02%	1018	41.53%
2-9	2.5ug/ml SA-PE +1% (v/v) PVP-K40	1566	1467	6.32%	1147	26.76%	1231	21.39%

[0072] 根据表2的检测结果显示,组2-1、2-2、2-3添加了不同的醇胺类物质,发现添加此类物质在4℃保存96h,有一定缓解荧光信号衰减的效果,但是其对-20℃、-40℃下保存的荧光信号稳定作用不大。

[0073] 组2-4、2-5分别添加了海藻糖和蔗糖,结果发现,海藻糖对4℃保存的SA-PE有一定稳定作用,但是在-20℃、-40℃保存,几乎没有效果。而蔗糖对3个温度下保存96h的SA-PE几乎没有效果。

[0074] 组2-6添加了甘油,分别在4℃、-20℃、-40℃各保存96h后,有一定缓解荧光信号衰减的效果,但差异不大,而组2-7增加DMSO后,对SA-PE没有任何效果。

[0075] 组2-8、2-9添加了PVP(聚乙烯吡咯烷酮)系列物质,发现分别在3个温度下保存96h后,两组都有作用,其中,组2-9对SA-PE的稳定化效果显著,4℃96h后荧光信号衰减只有6.32%, -20℃衰减26.76%, -40℃衰减21.39%,大大优于对照组,也比其它组信号稳定效果更优。可以认为1%的PVP-K40可以显著减缓经低温冷冻(4~-40℃)的链霉亲和素藻红蛋白荧光信号衰减。

[0076] 实施例3 比较不同浓度的PVP-K40产生的链霉亲和素藻红蛋白的稳定化效果

[0077] 为进一步比较不同保存温度下,寻找更为合适的PVP-K40浓度,按表3设置组3-1~3-7,进行不同浓度PVP-K40的配制(对照组不加入PVP-K40,仅含有2.5ug/ml链霉亲和素藻红蛋白的0.01M TE缓冲液),所有组分都添加在0.01M TE缓冲液(0.01M TE缓冲液的配制同实施例1, pH=8.0)中。每组分成6份,3份在0h测定,取平均值,另3份分别在4℃、-20℃、-40℃分别保存96h后,用Luminex 200流式荧光仪检测荧光信号强度,检测结果见表3-表5。

[0078] 表3 4℃保存条件下比较不同浓度的PVP-K40使SA-PE观察到的稳定化效果

[0079]

组别	组合物组分	Globin 平均荧光信号强度		信号衰减百分数%
		0h	96h	
对照组	2.5ug/ml SA-PE	1714	1259	26.55%
组 3-1	2.5ug/ml SA-PE +0.1% (v/v) PVP-K40	1545	1371	11.26%
组 3-2	2.5ug/ml SA-PE +0.3% (v/v) PVP-K40	1696	1482	12.62%
组 3-3	2.5ug/ml SA-PE +0.5% (v/v) PVP-K40	1742	1562	10.33%
组 3-4	2.5ug/ml SA-PE +0.7% (v/v) PVP-K40	1831	1746	4.64%
组 3-5	2.5ug/ml SA-PE +1% (v/v) PVP-K40	1788	1680	6.04%
组 3-6	2.5ug/ml SA-PE +5% (v/v) PVP-K40	1693	1568	7.38%

[0080]

组 3-7	2.5ug/ml SA-PE +10% (v/v) PVP-K40	1703	1528	10.28%
-------	-----------------------------------	------	------	--------

[0081] 从表3中可见,增加PVP-K40,对2.5ug/ml SA-PE在4℃保存条件下的信号衰减都有所减缓,PVP-K40在0.1%至10%的浓度范围内均对保持SA-PE的稳定性有一定的效果,其中组3-4、3-5、3-6,即0.7%~5% (v/v) 的PVP-K40的稳定效果更好,信号下降在8%以内,其中组3-4最优,即0.7%的PVP-K40在0.01M TE缓冲液(PH=8.0)中可使链霉亲和素藻红蛋白得到最优的稳定化效果。

[0082] 表4 -20℃保存条件下比较不同浓度的PVP-K40使链霉亲和素藻红蛋白观察到的稳定化效果

[0083]

组别	组合物组分	Globin 平均荧光信号强度		信号衰减百分数%
		0h	96h	
对照组	2.5ug/ml SA-PE	1714	664	61.26%
组 3-1	2.5ug/ml SA-PE +0.1% (v/v) PVP-K40	1545	645	58.25%
组 3-2	2.5ug/ml SA-PE +0.3% (v/v) PVP-K40	1696	698	58.84%
组 3-3	2.5ug/ml SA-PE +0.5% (v/v) PVP-K40	1742	1212	30.42%
组 3-4	2.5ug/ml SA-PE +0.7% (v/v) PVP-K40	1831	1434	21.68%
组 3-5	2.5ug/ml SA-PE +1% (v/v) PVP-K40	1788	1318	26.29%
组 3-6	2.5ug/ml SA-PE +5% (v/v) PVP-K40	1693	981	42.06%
组 3-7	2.5ug/ml SA-PE +10% (v/v) PVP-K40	1703	784	53.96%

[0084] 从表4中可见,增加PVP-K40 (0.1%至10%的浓度范围),对2.5ug/ml SA-PE经冷冻后的信号衰减都有所减缓,PVP-K40在0.5%至1% (v/v) 的浓度范围内均对保持SA-PE的稳定性有较好的效果,信号衰减在31%以内,其中以0.7%的PVP-K40在0.01M TE缓冲液 (PH=8.0) 中可使链霉亲和素藻红蛋白最优,荧光信号衰减的最少。

[0085] 表5 -40℃保存条件下比较不同浓度的PVP-K40使链霉亲和素藻红蛋白观察到的稳定化效果

[0086]

组别	组合物组分	Globin 平均荧光信号强度	信号衰减百分数%
----	-------	-----------------	----------

[0087]

		0h	96h	数%
对照组	2.5ug/ml SA-PE	1714	780	54.49%
组 3-1	2.5ug/ml SA-PE +0.1% (v/v) PVP-K40	1545	775	49.84%
组 3-2	2.5ug/ml SA-PE +0.3% (v/v) PVP-K40	1696	813	52.06%
组 3-3	2.5ug/ml SA-PE +0.5% (v/v) PVP-K40	1742	1306	25.03%
组 3-4	2.5ug/ml SA-PE +0.7% (v/v) PVP-K40	1831	1574	14.04%
组 3-5	2.5ug/ml SA-PE +1% (v/v) PVP-K40	1788	1427	20.19%
组 3-6	2.5ug/ml SA-PE +5% (v/v) PVP-K40	1693	1041	38.51%
组 3-7	2.5ug/ml SA-PE +10% (v/v) PVP-K40	1703	913	46.39%

[0088] 从表5中可见,增加PVP-K40 (0.1%至10%的浓度范围),对2.5ug/ml SA-PE经冷冻后的信号衰减都有所减缓,PVP-K40在0.5%至1%的浓度范围内均对保持SA-PE的稳定性有

较好的效果,信号下降在25%以内,其中0.7%的PVP-K40在0.01M TE缓冲液(PH=8.0)中可使链霉亲和素藻红蛋白达到最优的稳定化效果。

[0089] 结合表3-表5,可见,在不同温度下,添加PVP-K40(0.1%至10%的浓度范围)都对链霉亲和素藻红蛋白的荧光信号有稳定作用。在4℃,PVP-K40的最佳浓度范围在0.7%~5%, -20℃保存,PVP-K40的最佳浓度范围在0.5%至1%,而在-40℃,PVP-K40的最佳范围在0.5%至1%。

[0090] 实施例4比较不同的保存液组合对链霉亲和素藻红蛋白的稳定化效果的影响

[0091] 将不同组合的保存液添加在含有2.5ug/ml链霉亲和素藻红蛋白的0.01MTE缓冲液(0.01M TE缓冲液的配制同实施例1,pH=8.0)中,并设置空白对照(仅含有2.5ug/ml链霉亲和素藻红蛋白的0.01M TE缓冲液),形成不同组成的稳定剂,如表6所示,均分成6份,3份在配制后直接进行检测(0h),取平均值,分别在4℃、-20℃、-40℃分别保存96h后,用Luminex 200流式荧光仪检测荧光信号强度,见表6-表7所示。

[0092] 表6 不同保存液组分

保存液编号	组分
[0093] 0#	0.01M TE 缓冲液 (8.0)
1#	0.01M TE 缓冲液 (8.0) +0.7%PVP-K40
2#	0.01M TE 缓冲液 (8.0) +0.7%PVP-K40+0.1mg/ml
	BSA+0.0001%Tween 20+0.02%Proclin300
[0094] 3#	0.01M TE 缓冲液 (8.0) +0.7%PVP-K40+1.0mg/ml BSA+0.005%Tween 20+0.1%Proclin300
4#	0.01M TE 缓冲液 (8.0) +0.7%PVP-K40+0.2mg/ml BSA+0.001%Tween 20+0.05%Proclin300

[0095] 表7 不同保存温度条件下不同的保存液组合对链霉亲和素藻红蛋白的稳定化效果的影响

[0096]

保存液 编号	Globin 平均荧光信号强度						
	4℃			-20℃		-40℃	
	0h	96h	信号衰减 百分比%	96h	信号衰减 百分比%	96h	信号衰减 百分比%
0#	1584	1183	25.32%	750	52.65%	816	48.48%
1#	1751	1668	4.74%	1380	21.19%	1531	12.56%
2#	1699	1602	5.71%	1298	23.60%	1514	10.89%
3#	1748	1650	5.61%	1347	22.94%	1602	8.35%
4#	1739	1721	1.03%	1662	4.43%	1694	2.59%

[0097] 表7的实验结果表明保存液1-4#四种组合都可以改善链霉亲和素藻红蛋白在4℃、-20℃和-40℃保存条件下的稳定性,其中4#保存液为最优组,使链霉亲和素藻红蛋白的荧光信号衰减程度大大减少,能够最大限度地维持其稳定性。

[0098] 实施例5 对链霉亲和素藻红蛋白的长期稳定化效果的影响

[0099] 将实施例4的最佳稳定剂4#组、以及1#组和0#组,都均分成4份,分别在-20℃下保存4天、8天及12天后取出,其中0d在配制后直接进行检测,用Luminex 200流式荧光仪检测荧光信号强度,见表8-表10所示。

[0100] 表8 4℃保存条件下4#组稳定剂对链霉亲和素藻红蛋白的长期稳定化效果的影响

[0101]

稳定剂组号	Globin 平均荧光信号强度			
	0d	4d	8d	12d
0#	1817	1356	934	218
1#	1759	1683	1551	1314
4#	1809	1785	1745	1677
0#组稳定剂信号衰减百分比	—	25.37%	48.60%	88.00%
1#稳定剂信号衰减百分比	—	4.32%	11.82%	25.30%
4#稳定剂信号衰减百分比	—	1.33%	3.54%	7.30%

[0102] 从表8的实验数据表明,0#组在4℃保存条件下随着时间的延长,信号衰减程度逐渐大幅度增加,12天后,衰减程度分别接近90%左右,1#和4#组稳定剂随着4℃保存时间的延长,信号衰减也逐渐增加,但分别可以保持74%和90%以上的荧光信号。可见,添加1#、4#组稳定剂,对4℃保存条件下延缓链霉亲和素藻红蛋白的荧光信号衰减,保持其稳定,有非常显著的效果。

[0103] 表9 -20℃保存条件下4#稳定剂对链霉亲和素藻红蛋白的长期稳定化效果的影响

[0104]

[0105]

稳定剂组号	Globin 平均荧光信号强度			
	0d	4d	8d	12d
0#	1817	881	543	183
1#	1759	1344	854	419
4#	1809	1720	1636	1550
0#组稳定剂信号衰减百分比	—	51.51%	70.11%	89.93%
1#稳定剂信号衰减百分比	—	23.59%	51.45%	76.18%
4#稳定剂信号衰减百分比	—	4.92%	9.56%	14.32%

[0106] 从表9的实验数据表明,0#组在-40℃保存条件下随着冷冻时间的延长,信号衰减逐渐大幅度增加,12天后,衰减程度接近90%,而1#、4#组稳定剂随着冷冻时间的延长,信号衰减也逐渐增加,在冷冻12天后,1#保持20%以上荧光信号,而4#还可以保持85%以上的荧光信号。可见,添加4#组稳定剂,对低温冷冻状态下延缓链霉亲和素藻红蛋白的荧光信号衰减,保持其稳定,有非常显著的效果。

[0107] 表10 -40℃保存条件下4#稳定剂对链霉亲和素藻红蛋白的长期稳定化效果的影

响

[0108]

稳定剂组号	Globin 平均荧光信号强度			
	0d	4d	8d	12d
0#	1817	942	696	458
1#	1759	1545	1220	637
4#	1809	1761	1693	1654
0#组稳定剂信号衰减百分比	—	48.16%	61.70%	74.79%
1#稳定剂信号衰减百分比	—	12.17%	30.64%	63.79%
4#稳定剂信号衰减百分比	—	2.65%	6.41%	8.57%

[0109] 从表10的实验数据表明,空白对照0#组在-40℃保存条件下随着冷冻时间的延长,信号衰减逐渐大幅度增加,12天后,衰减程度接近75%,1#、4#组稳定剂随着冷冻时间的延长,信号衰减也逐渐增加,在冷冻12天后,1#还保持35%以上的荧光信号,而4#还可以保持90%以上的荧光信号。可见,添加4#组稳定剂,对低温冷冻状态下延缓链霉亲和素藻红蛋白的荧光信号衰减,保持其稳定,有非常显著的效果。

[0110] 综合表8-表10的结果,可以发现,4#组稳定剂可对4℃、-20℃和-40℃的SA-PE的荧光信号有很强的稳定效果。

[0111] 实施例6 比较不同的稳定剂对链霉亲和素藻红蛋白的稳定化效果的影响

[0112] 采用不同稳定剂保存2.5ug/ml链霉亲和素藻红蛋白,并采用传统保存液0.01M TE缓冲液保存2.5ug/ml链霉亲和素藻红蛋白作为对照,如表11所示,均分成6份,3份在配制后直接进行检测(0h),取平均值,另3份则在4℃、-20℃、-40℃分别保存96h后,用Luminex 200流式荧光仪检测荧光信号强度,见表12所示。

[0113] 各缓冲液配制如下:

[0114] 0.01M TE缓冲液:10mM Tris+1mM EDTA,用HCl调PH至8.0

[0115] 0.03M磷酸盐缓冲液:94.7ml 0.03M磷酸氢二钠+5.3ml 0.03M磷酸二氢钠

[0116] 0.05M三羟甲基氨基甲烷缓冲液:0.05M Tris,用HCl调PH至8.0

[0117] 0.02M硼酸缓冲液:0.02M硼酸,用NaOH调PH至8.0

[0118] 0.05M TE缓冲液:0.05M Tris 5mM EDTA,用HCl调PH至8.0

[0119] 0.03M TE缓冲液:0.03M Tris 3mM EDTA,用HCl调PH至8.0

[0120] 0.05M硼酸缓冲液:0.05M硼酸,用NaOH调PH至8.0

[0121] 0.02M三羟甲基氨基甲烷缓冲液:0.02M Tris,用HCl调PH至8.0

[0122] 0.05M磷酸盐缓冲液:94.7ml 0.05M磷酸氢二钠+5.3ml 0.05M磷酸二氢钠

[0123] 表11 不同稳定剂组分

[0124]

稳定剂 组编号	组分
组 6-0	0.01M TE 缓冲液 (8.0)
组 6-1	0.01M TE 缓冲液 (8.0) +0.7%PVP-K40
组 6-2	0.03M 磷酸盐缓冲液 (8.0) +0.1%PVP-K15
组 6-3	0.05M 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (8.0) +10%PVP-K17
组 6-4	0.02M 硼酸缓冲液 (8.0) +5% PVP-K40
组 6-5	0.05M TE 缓冲液 (8.0) +4%PVP-K30
组 6-6	0.01M TE 缓冲液 (8.0) +0.7%PVP-K40+0.2mg/ml BSA+0.001%Tween 20+0.05%Proclin300
组 6-7	0.03M TE 缓冲液 (8.0) +10% PVP-K30+1.0mg/ml 水解 酪蛋白+0.00001%曲拉通 x-100+0.5%叠氮钠
组 6-8	0.05M 硼酸缓冲液 (8.0) +0.1%PVP-K15+0.05mg/ml 胰 蛋白胨+0.01%吐温 80+0.001%硫柳汞钠
组 6-9	0.02M 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (8.0) +5%PVP-K17+0.5mg/ml 鱼明胶+0.0001%Tween

[0125]

	20+0.01%Proclin300
组 6-10	0.05M 磷酸盐缓冲液 (8.0) +4%PVP-K90+0.1mg/ml 鲑 鱼肝油+0.005%吐温 80+0.005%硫柳汞钠

[0126] 表12 不同保存温度下不同的稳定剂对链霉亲和素藻红蛋白的稳定化效果的影响

[0127]

稳定剂 组编号	Globin 平均荧光信号强度						
	4℃			-20℃		-40℃	
	0h	96h	信号衰 减百分 比%	96h	信号衰 减百分 比%	96h	信号衰 减百分 比%
组 6-0	1758	1377	21.67%	783	53.14%	1025	42.32%
组 6-1	1877	1790	4.64%	1442	21.29%	1570	14.49%
组 6-2	1619	1322	18.34%	1258	30.27%	1358	25.47%
组 6-3	1839	1702	7.45%	1189	24.07%	1541	10.67%
组 6-4	1745	1451	16.85%	1126	32.00%	1176	27.99%
组 6-5	1816	1658	8.70%	1161	25.43%	1488	14.92%
组 6-6	1785	1779	0.34%	1635	4.72%	1736	1.86%
组 6-7	1769	1732	2.09%	1312	20.15%	1729	5.67%
组 6-8	1742	1698	2.53%	1358	22.93%	1742	7.68%
组 6-9	1644	1438	12.53%	1405	25.54%	1368	17.29%
组 6-10	1701	1467	13.76%	1231	27.97%	1342	21.70%

[0128] 表12的实验结果表明0.1% (v/v) -10% (v/v) 的聚乙烯吡咯烷酮类物质和0.01M-0.05M的碱性缓冲液配制成的稳定剂,以及0.1% (v/v) -10% (v/v) 的聚乙烯吡咯烷酮类物质、0.01M-0.05M的碱性缓冲液、0.05mg/ml-1mg/ml的蛋白、0.00001% (v/v) -0.01% (v/v) 的表面活性剂、以及防腐剂(液体防腐剂0.001% (v/v) -0.5% (v/v)、固体防腐剂0.001% (w/v) -0.5% (w/v)) 配制成的稳定剂都可以极大改善链霉素亲和素藻红蛋白在4℃-40℃保存条件下的稳定性。

[0129] 本发明通过在链霉亲和素藻红蛋白中增加复合稳定剂的方式,解决链霉亲和素藻红蛋白在传统保存液中逐渐变性和荧光值下降的问题,尤其解决链霉亲和素藻红蛋白进入冷冻状态加速变性和荧光值急剧下降的问题。使得链霉亲和素藻红蛋白在冷冻状态下保持稳定,减少荧光值下降。

[0130] 综上,本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂能够使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定,减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减,避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果,且设计巧妙,配制简便,成本低廉,适于大规模推广应用。

[0131] 由此可见,本发明的目的已经完整并有效的予以实现。本发明的功能及结构原理已在实施例中进行展示和说明,在不背离所述原理下,实施方式可作任意修改。所以,本发明包括了基于权利要求精神及权利要求范围的所有变形实施方式。

专利名称(译)	链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN106596920A	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201611043729.2	申请日	2016-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	上海透景诊断科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海透景诊断科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海透景诊断科技有限公司		
[标]发明人	李志甲 郭安亮 姚见儿 朱凤 左红伟		
发明人	李志甲 郭安亮 姚见儿 朱凤 左红伟		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
代理人(译)	曾耀先		
其他公开文献	CN106596920B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂，包括：聚乙烯吡咯烷酮类物质和碱性缓冲液。较佳地，聚乙烯吡咯烷酮类物质的含量为0.1% (v/v)-10%(v/v)，优选为0.5%(v/v)-1%(v/v)。碱性缓冲液的浓度为0.01 M-0.05M。还包括：蛋白、表面活性剂、以及防腐剂(液体和/或固体)。还提供链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂的制备方法和应用。本发明的链霉亲和素藻红蛋白冷冻稳定剂能够使链霉亲和素藻红蛋白在冷冻条件下保持稳定，减少链霉亲和素藻红蛋白荧光信号的衰减，避免在荧光免疫等测定方法中导致错误的诊断结果，且设计巧妙，配制简便，成本低廉，适于大规模推广应用。

组 别	组成	Globin 平均荧光信号强度					
		4℃			-20℃		-40℃
		0h	96h	信号衰	96h	信号衰	96h