



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771133 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611089701.2

(22)申请日 2016.11.30

(71)申请人 三诺生物传感股份有限公司

地址 410205 湖南省长沙市高新技术开发  
区谷苑路265号

(72)发明人 刘萌萌

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限  
公司 11227

代理人 赵青朵

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

一种组合物及其作为酶标复合物保存液的应用

(57)摘要

本发明涉及化学发光免疫分析技术领域,尤其涉及一种组合物及其作为酶标复合物保存液的应用,本发明提供的组合物能够提高酶标复合物的稳定性,延长酶标复合物的保存期,同时可以长期稳定保存多种酶标复合物。实验表明, $\beta$ 2-微球蛋白、C反应蛋白或NT-proBNP的酶标复合物通过加速老化,未老化和老化6天的稳定性偏差在 $\pm 10\%$ 以内。

1. 一种组合物,其特征在于,包括:缓冲盐、稳定剂、盐类、糖类、表面活性剂、防腐抑菌剂和水;

所述缓冲盐选自Tris、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MOPS、MES或HEPES;

所述稳定剂选自氨基比林、酪蛋白、牛血清白蛋白、明胶、小牛血清、羊血清、甘油、山梨醇或木糖醇;

所述盐类选自NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>或ZnSO<sub>4</sub>;

所述糖类选自蔗糖、海藻糖、果糖、壳聚糖、麦芽糖或琼脂糖;

所述表面活性剂选自吐温、曲拉通、Brij35、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠或十二烷基苯磺酸钠;

所述防腐抑菌剂选自叠氮化钠、Proclin300、氯霉素或庆大霉素。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,

所述缓冲盐的浓度为0.01mol/L~0.5mol/L;

所述盐类的浓度为0.001mol/L~0.2mol/L;

所述稳定剂的质量分数为0.1%~20%;

所述糖类的质量分数为1%~10%;

所述表面活性剂的质量分数为0.01%~0.1%;

所述防腐抑菌剂的质量分数为0.01%~0.1%。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,

所述缓冲盐选自Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MOPS或MES;

所述稳定剂选自氨基比林、酪蛋白、BSA、明胶或甘油;

所述盐类选自NaCl、KCl或CaCl<sub>2</sub>;

所述糖类选自蔗糖或海藻糖;

所述表面活性剂选自吐温或聚乙二醇;

所述防腐抑菌剂为Proclin300。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的组合物,其特征在于,其pH值为6.0~8.0。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,包括水和

|            |           |
|------------|-----------|
| MES        | 3.91g/L;  |
| NaCl       | 8.8g/L;   |
| KCl        | 0.2g/L;   |
| 氨基比林       | 1g/L;     |
| BSA        | 2.5g/L;   |
| 酪蛋白        | 2.5 g/L;  |
| 蔗糖         | 20 g/L;   |
| 甘油         | 100 mL/L; |
| 吐温 20      | 0.5 mL/L; |
| Proclin300 | 0.5 mL/L。 |

6. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,包括水和

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| MOPS              | 4.18g/L;  |
| NaCl              | 8.8 g/L;  |
| CaCl <sub>2</sub> | 0.55g/L;  |
| 氨基比林              | 5 g/L;    |
| 酪蛋白               | 10 g/L;   |
| 明胶                | 5 g/L;    |
| 海藻糖               | 30 g/L;   |
| 甘油                | 50 mL/L;  |
| PEG20000          | 0.5 mL/L; |
| Proclin300        | 0.5 mL/L。 |

7. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,包括水和

|  |           |
|--|-----------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 2g/L;     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0.2g/L;   |
| NaCl   | 8.8g/L;   |
| KCl  | 0.2g/L;   |
| 氨基比林   | 10 g/L;   |
| 酪蛋白  | 5 g/L;    |
| 海藻糖  | 20 g/L;   |
| 甘油   | 60 mL/L;  |
| 吐温 20  | 0.5 mL/L; |
| Proclin300   | 0.5 mL/L。 |

8. 权利要求1~7任一项所述的组合物作为酶标复合物保存液的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述酶标复合物中的蛋白为β<sub>2</sub>-微球蛋白、C反应蛋白或NT-proBNP。

10. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述酶标复合物中标记的酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

## 一种组合物及其作为酶标复合物保存液的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光免疫分析技术领域,尤其涉及一种组合物及其作为酶标复合物保存液的应用。

### 背景技术

[0002] 化学发光免疫分析是将高灵敏的化学发光检测与高特异性的免疫反应相结合,用于检测各种半抗原,抗原,抗体,酶,激素,脂肪酸,药物和维生素等的分析技术。而酶促化学发光(也称间接化学发光)是指相关酶标记在抗体或抗原上,酶标记的抗体抗原复合物在发光底物作用下,持续发出可见光,典型的标记物有碱性磷酸酶(AP)和辣根过氧化物酶(HRP),对应标记物的底物分别为鲁米诺及其衍生物和1,2-二氧环己烷衍生物(AMPPD)。化学发光产品凭借灵敏度高,特异性好,自动化程度高,精密度好,准确度高等优势在临床应用中迅速推广,已经成为免疫定量分析领域的主流产品。在欧美发达国家化学发光免疫分析技术已经基本取代酶联免疫分析成为免疫诊断的主流,占免疫诊断90%以上市场份额。

[0003] 生物素-亲合素系统(Biotin-Avidin-System,BAS)是70年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统。随着各种生物素衍生物问世,BAS很快被广泛应用于医学各领域。近年大量研究证实,生物素-亲合素系统几乎可与目前研究成功的各种标记物结合。生物素与亲和素之间高亲合力的牢固结合以及多级放大效应,使BAS免疫标记和有关示踪分析更加灵敏。它已成为目前广泛用于微量抗原、抗体定性、定量检测及定位观察研究的新技术。在化学发光免疫分析技术中,研究人员为了增加化学发光强度,提高待测物的检出限,目前市场上试剂盒大多采用BAS生物素放大系统来连接酶与抗体。

[0004] 酶标复合物就是指酶通过生物素-链霉亲和素耦联体系与抗体结合形成的化合物。在结构上,与酶直接与抗体相连存在差异。这种复合物放置在2℃~8℃保存时,活性降低很快。因此市面上的试剂盒酶标复合物的保存是试剂研发成败的关键点。目前,为了维持酶标复合物的稳定,通常需要采用具有稳定功能的缓冲液,然而,现有的缓冲液对酶标复合物的稳定效果并不理想,通常仅能在短时间内维持酶标复合物的活性,远远不能满足稳定性要求。为了进一步提高酶标复合物的稳定效果,应继续研发适用于酶标复合物的保存液。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种组合物及其作为酶标复合物保存液的应用。本发明提供的组合物用于保存酶标复合物,能够在37℃加速老化的条件下,维持酶标复合物的活性。

[0006] 本发明提供的组合物,包括:缓冲盐、稳定剂、盐类、糖类、表面活性剂、防腐抑菌剂和水;

[0007] 所述缓冲盐选自Tris、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MOPS、MES或HEPES;

[0008] 所述稳定剂选自氨基比林、酪蛋白、牛血清白蛋白、明胶、小牛血清、羊血清、甘油、山梨醇或木糖醇;

- [0009] 所述盐类选自NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>或ZnSO<sub>4</sub>；
- [0010] 所述糖类选自蔗糖、海藻糖、果糖、壳聚糖、麦芽糖或琼脂糖；
- [0011] 所述表面活性剂选自吐温、曲拉通、Brij35、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠或十二烷基苯磺酸钠；
- [0012] 所述防腐抑菌剂选自叠氮化钠、Proclin300、氯霉素或庆大霉素。
- [0013] 所述吐温为吐温-20或吐温-80；所述聚乙二醇的聚合度为6000~20000。
- [0014] 所述NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>或KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>携带一个或多个配位的水形成水合物。
- [0015] 本发明提供的组合物中：
- [0016] 所述缓冲盐的浓度为0.01mol/L~0.5mol/L；
- [0017] 所述盐类的浓度为0.001mol/L~0.2mol/L；
- [0018] 所述稳定剂的质量分数为0.1%~20%；
- [0019] 所述糖类的质量分数为1%~10%；
- [0020] 所述表面活性剂的质量分数为0.01%~0.1%；
- [0021] 所述防腐抑菌剂的质量分数为0.01%~0.1%。
- [0022] 一个具体实施例中，本发明提供的组合物中
- [0023] 所述缓冲盐的浓度为2.2g/L~4.18g/L；
- [0024] 所述盐类的浓度为9g/L~9.35g/L；
- [0025] 所述稳定剂的质量分数为90.6g/L~132g/L；
- [0026] 所述糖类的质量分数为20g/L~30g/L；
- [0027] 所述表面活性剂的质量分数为0.5mL/L；
- [0028] 所述防腐抑菌剂的质量分数为0.5mL/L。
- [0029] 此实施例中，甘油作为稳定剂的质量根据其20℃时的密度计算获得。
- [0030] 本发明提供的组合物中：
- [0031] 所述缓冲盐选自Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MOPS或MES；
- [0032] 所述稳定剂选自氨基比林、酪蛋白、BSA、明胶或甘油；
- [0033] 所述盐类选自NaCl、KCl或CaCl<sub>2</sub>；
- [0034] 所述糖类选自蔗糖或海藻糖；
- [0035] 所述表面活性剂选自吐温、聚乙二醇；
- [0036] 所述防腐抑菌剂为Proclin300。
- [0037] 本发明提供的组合物的pH值为6.0~8.0。
- [0038] 一些实施例中，
- [0039] 所述缓冲盐为MES；
- [0040] 所述稳定剂为氨基比林、酪蛋白、BSA和甘油；
- [0041] 所述盐类为NaCl和KCl；
- [0042] 所述糖类为蔗糖；
- [0043] 所述表面活性剂为吐温；
- [0044] 所述防腐抑菌剂为Proclin300。
- [0045] 一些实施例中，
- [0046] 所述缓冲盐为MOPS；

- [0047] 所述稳定剂为氨基比林、酪蛋白、明胶和甘油；
- [0048] 所述盐类为NaCl和CaCl<sub>2</sub>；
- [0049] 所述糖类为海藻糖；
- [0050] 所述表面活性剂选自聚乙二醇；
- [0051] 所述防腐抑菌剂为Proclin300。
- [0052] 一些实施例中，
- [0053] 所述缓冲盐为Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>；
- [0054] 所述稳定剂为氨基比林、酪蛋白和甘油；
- [0055] 所述盐类为NaCl和KCl<sub>2</sub>；
- [0056] 所述糖类为海藻糖；
- [0057] 所述表面活性剂为吐温；
- [0058] 所述防腐抑菌剂为Proclin300。
- [0059] 一个具体实施例中，本发明提供的组合物包括水和
- |            |           |
|------------|-----------|
| MES        | 3.91g/L;  |
| NaCl       | 8.8g/L;   |
| KCl        | 0.2g/L;   |
| 氨基比林       | 1g/L;     |
| BSA        | 2.5g/L;   |
| 酪蛋白        | 2.5 g/L;  |
| 蔗糖         | 20 g/L;   |
| 甘油         | 100 mL/L; |
| 吐温 20      | 0.5 mL/L; |
| Proclin300 | 0.5 mL/L。 |
- [0060]
- [0061] 此实施例中，组合物的pH值为6.2。
- [0062] 另一个具体实施例中，本发明提供的组合物包括水和

|        |  |           |
|--------|--|-----------|
|        | MOPS   | 4.18g/L;  |
|        | NaCl   | 8.8 g/L;  |
|        | CaCl <sub>2</sub>                                    | 0.55g/L;  |
|        | 氨基比林   | 5 g/L;    |
| [0063] | 酪蛋白  | 10 g/L;   |
|        | 明胶   | 5 g/L;    |
|        | 海藻糖  | 30 g/L;   |
|        | 甘油   | 50 mL/L;  |
|        | PEG20000   | 0.5 mL/L; |
|        | Proclin300   | 0.5 mL/L。 |
| [0064] | 此实施例中,组合物的pH值为7.8。                                   |           |
| [0065] | 另一个具体实施例中,本发明提供的组合物包括水和                              |           |
| [0066] | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 2g/L;     |
|        | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0.2g/L;   |
|        | NaCl   | 8.8g/L;   |
|        | KCl  | 0.2g/L;   |
|        | 氨基比林   | 10 g/L;   |
| [0067] | 酪蛋白  | 5 g/L;    |
|        | 海藻糖  | 20 g/L;   |
|        | 甘油   | 60 mL/L;  |
|        | 吐温 20  | 0.5 mL/L; |
|        | Proclin300   | 0.5 mL/L。 |

[0068] 此实施例中,组合物的pH值为6.9。

[0069] 本发明提供的组合物的制备方法为:以灭菌纯化水溶解配方量的缓冲盐、稳定剂、糖类、表面活性剂和防腐抑菌剂,经超声或者搅拌溶清后,以灭菌纯化水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤得酶标复合物保存液组合物。

[0070] 本发明提供的组合物作为酶标复合物保存液的应用。

[0071] 一些实施例中,所述酶标复合物中的蛋白为β<sub>2</sub>-微球蛋白、C反应蛋白或NT-proBNP。

[0072] 一些实施例中,所述酶标复合物中标记的酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

[0073] 其中,如下配方的组合物用于β<sub>2</sub>-微球蛋白酶标复合物的保存。

- |        |                                 |           |
|--------|---------------------------------|-----------|
|        | MES                             | 3.91g/L;  |
|        | NaCl                            | 8.8g/L;   |
|        | KCl                             | 0.2g/L;   |
|        | 氨基比林                            | 1g/L;     |
| [0074] | BSA                             | 2.5g/L;   |
|        | 酪蛋白                             | 2.5 g/L;  |
|        | 蔗糖                              | 20 g/L;   |
|        | 甘油                              | 100 mL/L; |
|        | 吐温 20                           | 0.5 mL/L; |
|        | Proclin300                      | 0.5 mL/L。 |
| [0075] | 其中,如下配方的组合物用于C反应蛋白酶标复合物的保存。     |           |
|        | MOPS                            | 4.18g/L;  |
|        | NaCl                            | 8.8 g/L;  |
|        | CaCl <sub>2</sub>               | 0.55g/L;  |
|        | 氨基比林                            | 5 g/L;    |
| [0076] | 酪蛋白                             | 10 g/L;   |
|        | 明胶                              | 5 g/L;    |
|        | 海藻糖                             | 30 g/L;   |
|        | 甘油                              | 50 mL/L;  |
|        | PEG20000                        | 0.5 mL/L; |
|        | Proclin300                      | 0.5 mL/L。 |
| [0077] | 其中,如下配方的组合物用于NT-proBNP酶标复合物的保存。 |           |

|        |  |           |
|--------|--|-----------|
|        | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 2g/L;     |
|        | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0.2g/L;   |
|        | NaCl   | 8.8g/L;   |
|        | KCl  | 0.2g/L;   |
| [0078] | 氨基比林   | 10 g/L;   |
|        | 酪蛋白  | 5 g/L;    |
|        | 海藻糖  | 20 g/L;   |
|        | 甘油   | 60 mL/L;  |
|        | 吐温 20  | 0.5 mL/L; |
|        | Proclin300   | 0.5 mL/L。 |

[0079] 本发明提供了一种组合物,及其作为酶标复合物保存液的应用,本发明提供的组合物能够提高酶标复合物的稳定性,延长酶标复合物的保存期,同时可以长期稳定保存多种酶标复合物。实验表明, $\beta_2$ -微球蛋白、C反应蛋白或NT-proBNP的酶标复合物通过加速老化,未老化和老化6天的稳定性偏差在 $\pm 10\%$ 以内。

#### 附图说明

- [0080] 图1示 $\beta_2$ -微球蛋白AP酶标复合物化学发光标准曲线;  
 [0081] 图2示 $\beta_2$ -微球蛋白HRP酶标复合物化学发光标准曲线;  
 [0082] 图3示C反应蛋白AP酶标复合物化学发光标准曲线;  
 [0083] 图4示C反应蛋白HRP酶标复合物化学发光标准曲线;  
 [0084] 图5示NT-proBNP的AP酶标复合物化学发光标准曲线;  
 [0085] 图6示NT-proBNP的HRP酶标复合物化学发光标准曲线;  
 [0086] 图1~4中,横坐标为样本浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),纵坐标为发光值;图5~6中,横坐标为样本浓度( $\text{pg}/\text{mL}$ )。

#### 具体实施方式

[0087] 本发明提供了一种组合物及其作为酶标复合物保存液的应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0088] 本发明采用的材料皆为普通市售品,皆可于市场购得。

[0089] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0090] 实施例1

[0091] 1、配置保存液

[0092] 1L具体配方: MES 3.91g, NaCl 8.8g、KCl 0.2g, 氨基比林1g, BSA 2.5g, 酪蛋白

2.5g,蔗糖20g,甘油100mL,吐温20、0.5mL,Proclin300、0.5mL。使用灭菌水配制,调节pH至6.2,0.22 $\mu$ m滤膜过滤后2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

[0093] 将制备好的 $\beta_2$ -微球蛋白酶标复合物(标记HRP或AP)加入到以上描述的稳定性溶液中,配制成工作溶液。

[0094] 2.酶标复合物性能测试:

[0095] 2.1、AP酶标复合物测试方法:

[0096] (1)用移液枪精确移取150 $\mu$ L磁珠工作液至1.5mL离心管,依次向其中加入10 $\mu$ L $\beta_2$ -MG 0.12 $\mu$ g/mL样本或19.5 $\mu$ g/mL样本,30 $\mu$ L酶标复合物,然后用移液枪将混合液打散均匀,开始计时。5min后将离心管置于磁力架,30s后吸去清液,用400 $\mu$ L 0.02M PB7.4含0.05%吐温20洗涤三次。

[0097] (2)用100 $\mu$ L 0.2M Tris-HCl pH=8.8缓冲液将洗好的磁珠分散均匀,加20 $\mu$ L CDPStar,混合均匀后开始计时,加入至96孔白色酶标板,用Promega半自动发光检测仪测试3min的发光值。整个实验平行三组,取其发光值平均值。

[0098] 表1 AP酶标复合物性能测试

[0099]

| Promega测试值                     | 1        | 2        | 3        | 平均值      |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| 空白对照                           | 1078     | 1123     | 1064     | 1088     |
| $\beta_2$ -MG样本0.12 $\mu$ g/mL | 154355   | 155664   | 152204   | 154074   |
| $\beta_2$ -MG样本19.5 $\mu$ g/mL | 25789718 | 26861492 | 26036694 | 26229301 |

[0100] 拟合的线性方程如图1。

[0101] 2.2、HRP酶标复合物测试方法

[0102] (1)步骤同2.1(1),其中酶标复合物为HRP酶标复合物。

[0103] (2)使用100 $\mu$ L鲁米诺溶液将洗好的磁珠分散均匀,加50 $\mu$ L双氧水,混合均匀后开始计时,加入至96孔白色酶标板,用Promega半自动发光检测仪测试3min的发光值。整个实验平行三组,取其发光值平均值。

[0104] 表2 HRP酶标复合物性能测试

[0105]

| Promega测试值                      | 1       | 2       | 3       | 平均值     |
|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 空白对照                            | 856     | 912     | 897     | 888     |
| $\beta_2$ -MG样本0.38 $\mu$ g/mL  | 59229   | 57187   | 57500   | 57972   |
| $\beta_2$ -MG样本19.35 $\mu$ g/mL | 3979309 | 4039405 | 3941022 | 3986579 |

[0106] 拟合的线性方程如图2。

[0107] 3.酶标复合物保存状态:

[0108] 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C环境,溶液透明,无沉淀物;

[0109] 37 $^{\circ}$ C环境,溶液透明,无沉淀物。

[0110] 4.加速稳定性试验:

[0111] 取100 $\mu$ L酶标复合物工作液加至1.5mL离心管,制作40个,20个置于2-8 $^{\circ}$ C冰箱保存,另外20个置于37 $^{\circ}$ C烘箱加速老化。测试方法同性能测试。

[0112] 偏差=(加速老化6天平均值-未老化平均值)/未老化平均值

[0113] 实验结果见下表。

[0114] 表3 AP酶标复合物稳定性测试

[0115]

| Promega 测试值             |          | 1        | 2        | 3        | 平均值      | 偏差     |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|
| 空白对照                    | 未老化      | 1256     | 1123     | 1092     | 1157     |        |
|                         | 加速老化 6 天 | 1205     | 1189     | 1221     | 1205     | 4.15%  |
| β2-MG 样本<br>0.12 μg/mL  | 未老化      | 182347   | 181540   | 179660   | 181182   |        |
|                         | 加速老化 6 天 | 176854   | 189903   | 164915   | 177224   | -2.18% |
| β2-MG 样本<br>19.50 μg/mL | 未老化      | 26688305 | 26385535 | 26565894 | 26546578 |        |
|                         | 加速老化 6 天 | 26229301 | 25273331 | 23508987 | 25003873 | -5.81% |

[0116] 表4 HRP酶标复合物稳定性测试

[0117]

| Promega 测试值             |          | 1       | 2       | 3       | 平均值     | 偏差     |
|-------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 空白对照                    | 未老化      | 1056    | 933     | 987     | 992     |        |
|                         | 加速老化 6 天 | 982     | 901     | 958     | 947     | -4.54% |
| β2-MG 样本<br>0.38 μg/mL  | 未老化      | 56972   | 57915   | 56722   | 57203   |        |
|                         | 加速老化 6 天 | 55070   | 56881   | 55367   | 55773   | -2.50% |
| β2-MG 样本<br>19.35 μg/mL | 未老化      | 3974146 | 4052901 | 3872145 | 3966397 |        |
|                         | 加速老化 6 天 | 3879270 | 3715266 | 3689618 | 3761385 | -5.17% |

[0118] 结果显示:由表3和表4可知,在本例稳定剂中,酶标复合物通过加速老化,未老化和老化6天的稳定性偏差在±10%以内。

[0119] 实施例2

[0120] 1、C-反应蛋白酶标复合物保存液

[0121] 1L具体配方:MOPS 4.18g,NaCl 8.8g、CaCl<sub>2</sub> 0.55g,氨基比林5g,酪蛋白10g,明胶5g,海藻糖30g,甘油50mL,PEG20000、0.5mL,Proclin300、0.5mL。使用灭菌水配制,调节pH至7.8,0.22μm滤膜过滤后2-8℃保存

[0122] 将制备好的酶标复合物(HRP或AP)加入到以下描述的稳定性溶液中,配制成工作溶液溶液。

[0123] 2.酶标复合物性能测试:

[0124] 2.1、AP酶标复合物测试方法:

[0125] (1)用移液枪精确移取150μL磁珠工作液至1.5mL离心管,依次向其中加入10μL 1.15μg/mL CRP样本或20.34μg/mL样本,30μL酶标复合物,然后用移液枪将混合液打散均匀,开始计时。5min后将离心管置于磁力架,30s后吸去清液,用400μL 0.02M PB7.4含0.05%吐温20洗涤三次。

[0126] (2)用100μL 0.2M Tris-HCl pH=8.8缓冲液将洗好的磁珠分散均匀,加20μL

CDPStar,混合均匀后开始计时,加入至96孔白色酶标板,用Promega半自动发光检测仪测试3min的发光值。整个实验平行三组,取其发光值平均值。

[0127] 表5 AP酶标复合物性能测试

[0128]

| Promega测试值      | 1        | 2        | 3        | 平均值      |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|
| 空白对照            | 892      | 857      | 809      | 853      |
| CRP样本1.15μg/mL  | 790332   | 791313   | 782108   | 787918   |
| CRP样本20.34μg/mL | 15768233 | 15935851 | 14980240 | 15561441 |

[0129] 拟合的线性方程如图3。

[0130] 2.2、HRP酶标复合物测试方法

[0131] (1) 步骤同2.1(1),其中酶标复合物为HRP酶标复合物。

[0132] (2) 使用100μL鲁米诺溶液将洗好的磁珠分散均匀,加50μL双氧水,混合均匀后开始计时,加入至96孔白色酶标板,用Promega半自动发光检测仪测试3min的发光值。整个实验平行三组,取其发光值平均值。

[0133] 表6 HRP酶标复合物性能测试

[0134]

| Promega测试值      | 1       | 2       | 3       | 平均值     |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|
| 空白对照            | 738     | 833     | 820     | 797     |
| CRP样本1.15μg/mL  | 551560  | 561965  | 541223  | 551583  |
| CRP样本20.34μg/mL | 9513948 | 9824603 | 9497437 | 9611996 |

[0135] 拟合的线性方程如图4。

[0136] 3. 酶标复合物保存状态:

[0137] 2℃~8℃环境,溶液透明,无沉淀物;

[0138] 37℃环境,溶液透明,无沉淀物。

[0139] 4. 加速稳定性试验:

[0140] 取100μL酶标复合物工作液加至1.5mL离心管,制作40个,20个置于2-8℃冰箱保存,另外20个置于37℃烘箱加速老化。测试方法同性能测试。

[0141] 偏差 = (加速老化6天平均值 - 未老化平均值) / 未老化平均值

[0142] 实验结果见下表。

[0143] 表7 AP酶标复合物稳定性测试

[0144]

| Promega 测试值           |          | 1        | 2        | 3        | 平均值      | 偏差     |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|
| 空白对照                  | 未老化      | 798      | 712      | 723      | 744      |        |
|                       | 加速老化 6 天 | 717      | 743      | 733      | 731      | -1.79% |
| CRP 样本<br>1.15 µg/mL  | 未老化      | 825361   | 795442   | 745862   | 788888   |        |
|                       | 加速老化 6 天 | 721702   | 750374   | 729547   | 733874   | -6.97% |
| CRP 样本<br>20.34 µg/mL | 未老化      | 15589542 | 15875123 | 14965452 | 15476706 |        |
|                       | 加速老化 6 天 | 14817326 | 14735067 | 14723990 | 14758794 | -4.64% |

[0145] 表8 HRP酶标复合物稳定性测试

| Promega 测试值                 |          | 1       | 2       | 3       | 平均值     | 偏差     |
|-----------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 空白对照                        | 未老化      | 745     | 721     | 702     | 723     |        |
|                             | 加速老化 6 天 | 683     | 677     | 692     | 684     | -5.35% |
| [0146] CRP 样本<br>1.15 µg/mL | 未老化      | 590397  | 576960  | 560230  | 575862  |        |
|                             | 加速老化 6 天 | 553948  | 564603  | 547437  | 555329  | -3.51% |
| CRP 样本<br>20.34 µg/mL       | 未老化      | 9513948 | 9824603 | 9497437 | 9611996 |        |
|                             | 加速老化 6 天 | 9414313 | 9414097 | 9313862 | 9380757 | -2.41% |

[0147] 结果显示:由表7和表8可知,在本例稳定剂中,酶标复合物通过加速老化,未老化和老化6天的稳定性偏差在±10%以内。

[0148] 实施例3

[0149] 1、NT-proBNP酶标复合物保存液

[0150] 1L具体配方:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g,NaCl 8.8g,KCl 0.2g,氨基比林10g,酪蛋白5g,海藻糖20g,甘油60mL,吐温20、0.5mL,Proclin300、0.5mL。使用灭菌水配制,调节pH至6.9,0.22µm滤膜过滤后2-8℃保存

[0151] 将制备好的酶标复合物(HRP或AP)加入到以下描述的稳定性溶液中,配制成工作溶液。

[0152] 2.酶标复合物性能测试:

[0153] 2.1、AP酶标复合物测试方法:

[0154] (1)用移液枪精确移取150µL磁珠工作液至1.5mL离心管,依次向其中加入10µL 300.21pg/ml或3000.08pg/mL NT-proBNP样本,30µL酶标复合物,然后用移液枪将混合液打散均匀,开始计时。5min后将离心管置于磁力架,30s后吸去清液,用400µL 0.02M PB7.4含0.05%吐温20洗涤三次。

[0155] (2)用100µL 0.2M Tris-HCl pH=8.8缓冲液将洗好的磁珠分散均匀,加20µL CDPStar,混合均匀后开始计时,加入至96孔白色酶标板,用Promega半自动发光检测仪测试3min的发光值。整个实验平行三组,取其发光值平均值。

[0156] 表9 AP酶标复合物性能测试

| Promega 测试值                   | 1       | 2       | 3       | 平均值     |
|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 空白对照                          | 1074    | 1178    | 1078    | 1110    |
| NT-proBNP 样本<br>300.21 pg/mL  | 412044  | 412202  | 412753  | 412333  |
| NT-proBNP 样本<br>3000.08 pg/mL | 4514074 | 4511781 | 4613778 | 4546544 |

[0158] 2.2、HRP酶标复合物测试方法

[0159] (1) 步骤同2.1 (1), 其中酶标复合物为HRP酶标复合物。

[0160] (2) 使用100 $\mu$ L鲁米诺溶液将洗好的磁珠分散均匀, 加50 $\mu$ L双氧水, 混合均匀后开始计时, 加入至96孔白色酶标板, 用Promega半自动发光检测仪测试3min的发光值。整个实验平行三组, 取其发光值平均值。

[0161] 表10 HRP酶标复合物性能测试

| Promega 测试值                   | 1       | 2       | 3       | 平均值     |
|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 空白对照                          | 1023    | 1012    | 1046    | 1027    |
| NT-proBNP 样本<br>300.21 pg/mL  | 132582  | 135895  | 135878  | 134785  |
| NT-proBNP 样本<br>3000.08 pg/mL | 1258745 | 1254788 | 1145687 | 1219740 |

[0164] 3. 酶标复合物保存状态:

[0165] 2-8 $^{\circ}$ C环境, 溶液透明, 无沉淀物;

[0166] 37 $^{\circ}$ C环境, 溶液透明, 无沉淀物。

[0167] 4. 加速稳定性试验:

[0168] 取100 $\mu$ L酶标复合物工作液加至1.5mL离心管, 制作40个, 20个置于2-8 $^{\circ}$ C冰箱保存, 另外20个置于37 $^{\circ}$ C烘箱加速老化。测试方法同性能测试。

[0169] 偏差 = (加速老化6天平均值 - 未老化平均值) / 未老化平均值

[0170] 实验结果见下表。

[0171] 表11 AP酶标复合物稳定性测试

[0172]

| Promega 测试值                   |          | 1       | 2       | 3       | 平均值     | 偏差     |
|-------------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 空白对照                          | 未老化      | 968     | 1025    | 998     | 997     |        |
|                               | 加速老化 6 天 | 923     | 956     | 935     | 938     | -5.92% |
| NT-proBNP 样本<br>300.21 pg/mL  | 未老化      | 409866  | 415896  | 415852  | 413871  |        |
|                               | 加速老化 6 天 | 389856  | 389756  | 390145  | 389919  | -5.79% |
| NT-proBNP 样本<br>3000.08 pg/mL | 未老化      | 4258960 | 4158952 | 4258963 | 4225625 |        |
|                               | 加速老化 6 天 | 4085624 | 4099952 | 3975869 | 4053815 | -4.07% |

[0173] 表12 HRP酶标复合物稳定性测试

[0174]

| Promega 测试值                   |          | 1       | 2       | 3       | 平均值     | 偏差     |
|-------------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 空白对照                          | 未老化      | 1112    | 1123    | 1098    | 1111    |        |
|                               | 加速老化 6 天 | 1085    | 1102    | 1034    | 1074    | -3.36% |
| NT-proBNP 样本<br>300.21 pg/mL  | 未老化      | 125985  | 126912  | 124598  | 125832  |        |
|                               | 加速老化 6 天 | 122235  | 119896  | 120098  | 120743  | -4.04% |
| NT-proBNP 样本<br>3000.08 pg/mL | 未老化      | 1265898 | 1275684 | 1256896 | 1266159 |        |
|                               | 加速老化 6 天 | 1223642 | 1235621 | 1245566 | 1234943 | -2.46% |

[0175] 结果显示：由表11和表12可知，在本例稳定剂中，酶标复合物通过加速老化，未老化和老化6天的稳定性偏差在±10%以内。

[0176] 以上仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

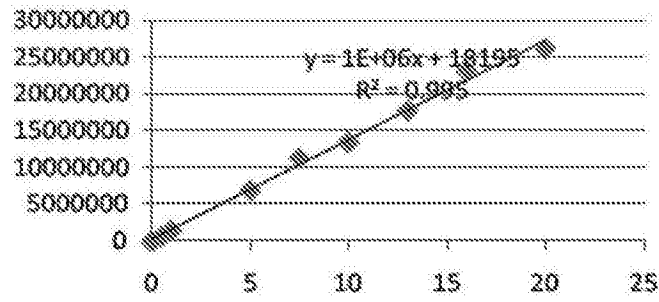


图1

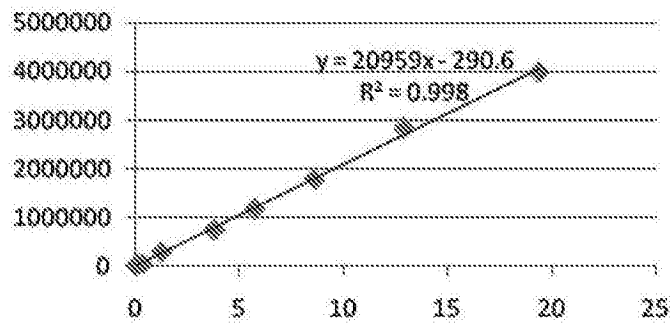


图2

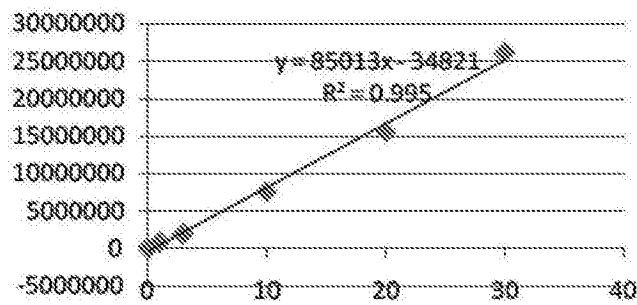


图3

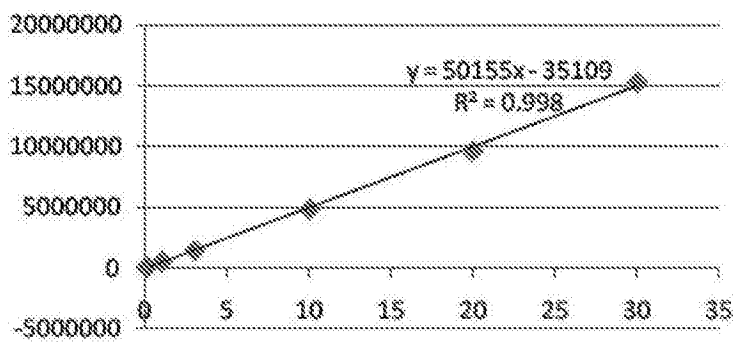


图4

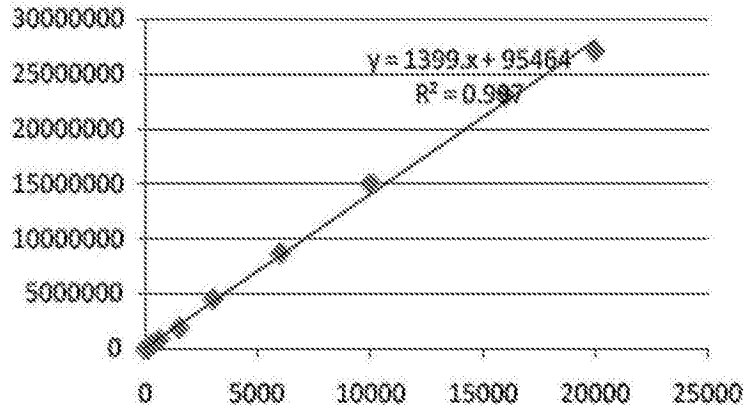


图5

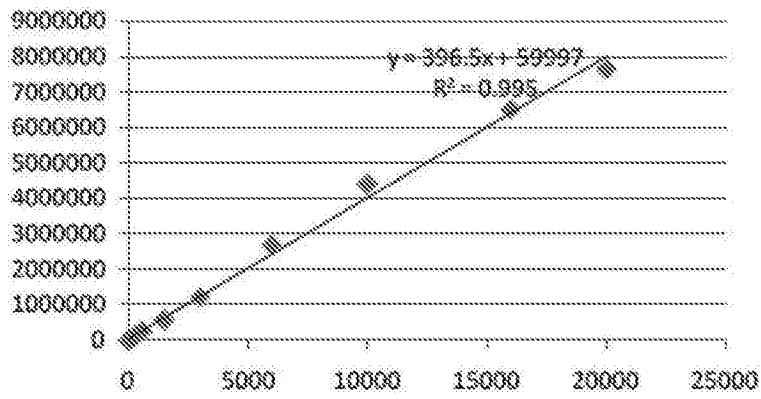


图6

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种组合物及其作为酶标复合物保存液的应用                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN106771133A</a>                   | 公开(公告)日 | 2017-05-31 |
| 申请号            | CN201611089701.2                               | 申请日     | 2016-11-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 三诺生物传感股份有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 三诺生物传感股份有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 三诺生物传感股份有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 刘萌萌  |         |            |
| 发明人            | 刘萌萌  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/535 G01N21/76                           |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/535 G01N21/76                           |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

|  |            |           |
|--|------------|-----------|
| 摘要(译)  | MES        | 3.91g/L;  |
| <p>本发明涉及化学发光免疫分析技术领域，尤其涉及一种组合物及其作为酶标复合物保存液的应用，本发明提供的组合物能够提高酶标复合物的稳定性，延长酶标复合物的保存期，同时可以长期稳定保存多种酶标复合物。实验表明，β2-微球蛋白、C反应蛋白或NT-proBNP的酶标复合物通过加速老化，未老化和老化6天的稳定性偏差在±10%以内。</p> | NaCl       | 8.8g/L;   |
|  | KCl        | 0.2g/L;   |
|  | 氨基比林       | 1g/L;     |
|  | BSA        | 2.5g/L;   |
|  | 酪蛋白        | 2.5 g/L;  |
|  | 蔗糖         | 20 g/L;   |
|  | 甘油         | 100 mL/L; |
|  | 吐温 20      | 0.5 mL/L; |
|  | Proclin300 | 0.5 mL/L。 |