



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103868913 B

(45)授权公告日 2017.07.14

(21)申请号 201410047286.9

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2014.02.11

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103868913 A

CN 103344633 A, 2013.10.09,

CN 1312252 A, 2001.09.12,

JP 特开平8-292 A, 1996.01.09,

(43)申请公布日 2014.06.18

WO 01/09372 A1, 2001.02.08,

(73)专利权人 中生北控生物科技股份有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区超前路27号

CN 1180349 A, 1998.04.29,

CN 1156506 A, 1997.08.06,

CN 101493462 A, 2009.07.29,

(72)发明人 张志栋 赵文姬 陈志强 高芬  
陈欢

CN 102706869 A, 2012.10.03,

WO 93/05108 A1, 1993.03.18,

CN 101784897 A, 2010.07.21,

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

审查员 张若剑

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

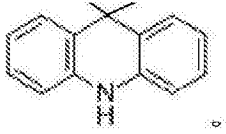
碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液

(57)摘要

本发明提供一种碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液,含有0.4mg/mL的9,10-二氢吡啶衍生物,0.05mol/L的三羟基甲烷和0.5%的十二烷基磺酸钠。本发明的酶促化学发光底物液发光快,强度高,持续时间长,可达30~60分钟,可完全满足临床检测的需要,其主要性能指标达到了国外产品水平,大大降低了发光底物的成本。本发明的酶促化学发光底物液本底值相对发光强度不高于3000,AP浓度在0.1U/mL时,发光强度RLU值可达315000±65000,信号强,灵敏度高,特异性强。

1. 碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液,其特征在于,含有0.4mg/mL的9,10-二氢吲哚衍生物,0.05mol/L的三羟基甲烷和5g/L的十二烷基磺酸钠;

其中,所述9,10-二氢吲哚衍生物分子式如下:



2. 权利要求1所述底物液的制备方法,其特征在于,先配制0.05mol/L的三羟基甲烷溶液,其中含有5g/L的十二烷基磺酸钠,调节pH值后,加入9,10-二氢吲哚衍生物,搅拌均匀,避光保存。

3. 权利要求1所述底物液在化学发光免疫分析中的应用,其特征在于,在18°C-26°C温度范围内pH值为 $9.3 \pm 0.2$ ,相对发光强度RLU $\leq 3000$ ,碱性磷酸酶浓度为0.1U/mL时,发光强度RLU值达 $315000 \pm 65000$ 。

## 碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体地说,涉及碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液。

### 背景技术

[0002] 酶促化学发光底物液属于免疫诊断技术领域。本世纪70年代中期Arakawe首次报道用发光信号进行酶免疫分析,利用发光的化学反应分析超微量物质,特别是用于临床免疫分析中检验超微量活性物质。目前,这一技术已成为临床医学的常规检测手段。化学发光免疫分析(Chemiluminescence Immunoassay,CLIA)是将化学发光或生物发光体系与免疫反应相结合,用于检测微量抗原或抗体的一种新型标记免疫测定技术。其检测原理与放射免疫(RIA)和酶免疫(EIA)相似,不同之处是以发光物质代替放射性核素或酶作为标记物,并借助其自身的发光强度直接进行测定。

[0003] 化学发光免疫分析既具有放射免疫的高灵敏度,又具有酶联免疫的操作简便、快速的特点,易于标准化操作。且测试中不使用有毒有害的试剂,试剂保持期长,应用于生物学、医学研究和临床实验诊断工作,成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。

[0004] 化学发光系统的原理在于免疫反应中的酶作用于发光底物。发光底物在酶的作用下,底物发生化学反应并释放出大量的能量,产生激发态的中间体。这种激发态中间体,当其回到稳定的基态时,可同时发射出光子。利用发光信号测量仪器即可测量光量子产额,该光量子产额与样品中的待测物质的量成正比。由此可以建立标准曲线并计算样品中待测物质的含量。

[0005] 与放射免疫试剂(RIA)相比,化学发光避免了放射性核素的污染以及对操作人员的伤害,大大缩短了反应时间,同时兼具高灵敏度的优势。

[0006] 与酶免(ELISA)产品相比,灵敏度与可测范围远远高于酶免产品,兼具ELISA法简便的操作方法与较短的反应时间。

[0007] 与进口全自动发光相比,试剂成本远远低于进口全自动发光试剂,为开放体系,也可适用其他发光检测仪器检测。

### 发明内容

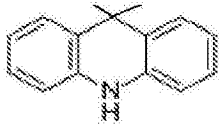
[0008] 本发明的目的是提供碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液。

[0009] 为了实现本发明目的,本发明提供的碱性磷酸酶(AP)的酶促化学发光底物液,含有0.05-1.0mg/mL的9,10-二氢吡啶衍生物,0.01-0.2mol/L的三羟基甲烷(Tris)和5g/L的十二烷基磺酸钠(SDS)。

[0010] 优选地,所述底物液中含有0.4mg/mL的9,10-二氢吡啶衍生物,0.05mol/L的三羟基甲烷和5g/L的十二烷基磺酸钠。

[0011] 其中,所述9,10-二氢吡啶衍生物分子式如下:

[0012]



[0013] 本发明还提供所述底物液的制备方法:先配制0.01-0.2mol/L的三羟基甲烷溶液,其中含有0.05-10g/L的十二烷基磺酸钠,调节pH值后,加入9,10-二氢吡啶衍生物,搅拌均匀,避光保存。

[0014] 本发明进一步提供所述底物液在化学发光免疫分析中的应用:在18℃-26℃温度范围内pH值为 $9.3 \pm 0.2$ ,相对发光强度RLU $\leq 3000$ ,碱性磷酸酶(AP)浓度为0.1U/mL时,发光强度RLU值可达 $315000 \pm 65000$ 。

[0015] 化学发光免疫分析技术作为一种非放射性免疫分析技术,除了具有灵敏、特异、标记物稳定等特点外,其检测程序亦简便、快速,只需微量标本,近年来临床上已应用于检测各种激素、肿瘤标志物、药物及其他微量生物活性物质,亦可用于细菌和病毒感染的快速诊断。

[0016] 本发明提供的碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液发光快,强度高,持续时间长,可达30~60分钟,可完全满足临床检测的需要,其主要性能指标达到了国外产品水平,大大降低了发光底物的成本。本发明的酶促化学发光底物液本底值相对发光强度不高于3000,AP浓度在0.1U/mL时,发光强度RLU值可达 $315000 \pm 65000$ ,信号强,灵敏度高,特异性强。

## 附图说明

[0017] 图1为本发明实施例1中制备的碱性磷酸酶(AP)的酶促化学发光底物液,其发光平台期测定结果。

[0018] 图2为本发明实施例2中对t-PSA临床样本浓度与发光强度RLU值做线性回归图。

## 具体实施方式

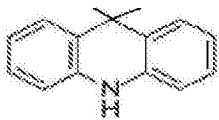
[0019] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0020] 实施例1 碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液及其制备

[0021] 本发明的碱性磷酸酶(AP)的酶促化学发光底物液,含有0.4mg/mL的9,10-二氢吡啶衍生物,0.05mol/L的三羟基甲烷(Tris)和5g/L的十二烷基磺酸钠(SDS)。

[0022] 其中,所述9,10-二氢吡啶衍生物分子式如下:

[0023]



[0024] 所述底物液的制备方法:先配制0.05mol/L的三羟基甲烷溶液,其中含有5g/L的十二烷基磺酸钠,调节pH值后,加入9,10-二氢吡啶衍生物,搅拌均匀,避光保存。

[0025] 该底物液发光快,强度高,发光平台期长,可达30~60分钟,因此,可完全满足临床检测的需要,其发光平台期测定结果如图1所示。

[0026] 实施例2 酶促化学发光底物液在促甲状腺激素(TSH)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)中的应用

[0027] 应用双抗体夹心法检测人血清中TSH的含量,试验步骤如下:

[0028] 1、在反应管中分别加入生物素标记的TSH抗体50 $\mu$ L、碱性磷酸酶标记的TSH抗体50 $\mu$ L、人血清样本30 $\mu$ L或TSH标准品,混匀;37 $^{\circ}$ C反应20分钟;

[0029] 2、加入300 $\mu$ L洗液清洗,清洗5次;

[0030] 3、加入链霉亲和素标记的磁微粒50 $\mu$ L;37 $^{\circ}$ C反应15分钟;

[0031] 4、加入300 $\mu$ L洗液清洗,清洗5次;

[0032] 5、加入实施例1中制备的化学发光底物液200 $\mu$ L;

[0033] 6、化学发光检测仪检测发光强度RLU值。

[0034] TSH标准品的浓度及对应的发光值见表1:

[0035] 表1 TSH标准品的浓度及对应的发光值

[0036]

TSH标准品浓度 $\mu$ IU/mL	发光强度RLU值
0.00	1179
0.50	4996
6.00	61427
12.00	125006
25.00	259103
50.00	470393

[0037] 对TSH标准品浓度与发光强度RLU值做线性回归图,得TSH标准品浓度与相应发光值间的相关系数 $R^2=0.9974$ 。

[0038] 实施例3 酶促化学发光底物液在总前列腺特异性抗原(t-PSA)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)中的应用

[0039] 应用双抗体夹心法检测人血清中t-PSA的含量,试验步骤如下:

[0040] 1、在反应管中分别加入生物素标记的t-PSA抗体50 $\mu$ L、碱性磷酸酶标记的t-PSA抗体50 $\mu$ L、人血清样本30 $\mu$ L,混匀;37 $^{\circ}$ C反应20分钟;

[0041] 2、加入300 $\mu$ L洗液清洗,清洗5次;

[0042] 3、加入链霉亲和素标记的磁微粒50 $\mu$ L;37 $^{\circ}$ C反应15分钟;

[0043] 4、加入300 $\mu$ L洗液清洗,清洗5次;

[0044] 5、加入实施例1中制备的化学发光底物液200 $\mu$ L;

[0045] 6、化学发光检测仪检测发光强度RLU值。

[0046] t-PSA临床样本的浓度及对应的发光值见表2:

[0047] 表2 t-PSA临床样本的浓度及对应的发光值

[0048]

t-PSA临床样本的浓度 $\mu$ IU/mL	发光强度RLU值
0.00	2105
0.01	5692
0.02	8883
0.04	7396
0.08	9530

0.16	10504
0.32	16522
0.64	30460
1.28	59235
2.56	109546
5.12	193769
10	328232
15	429475
20	561153
30	658695
38	703231
77	878994
154	958174
205	908497
308	774883

[0049] 对t-PSA临床样本浓度与发光强度RLU值做线性回归图,如图2所示。t-PSA的浓度线性范围为0.01-150 $\mu$ IU/mL,对低值的分辨率高。

[0050] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

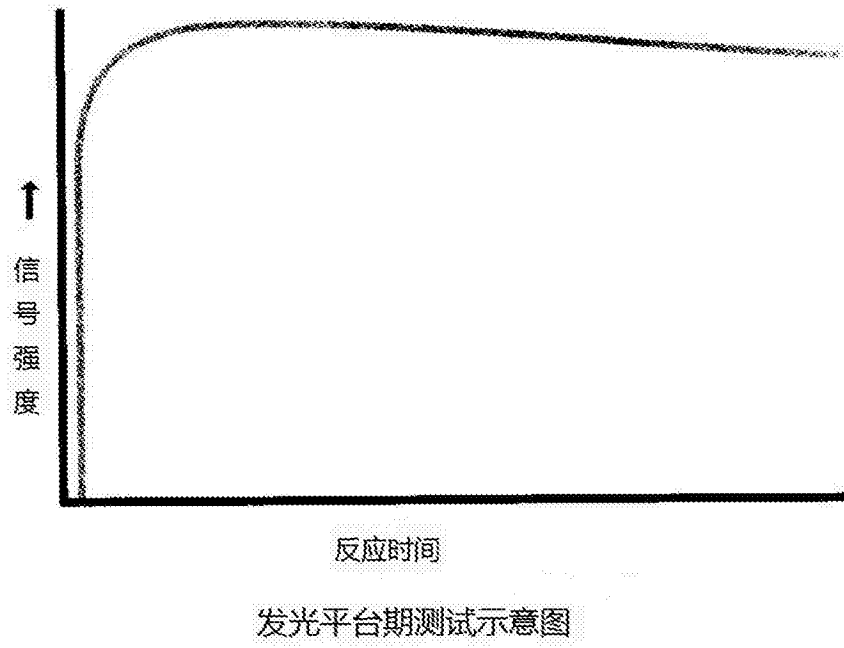


图1

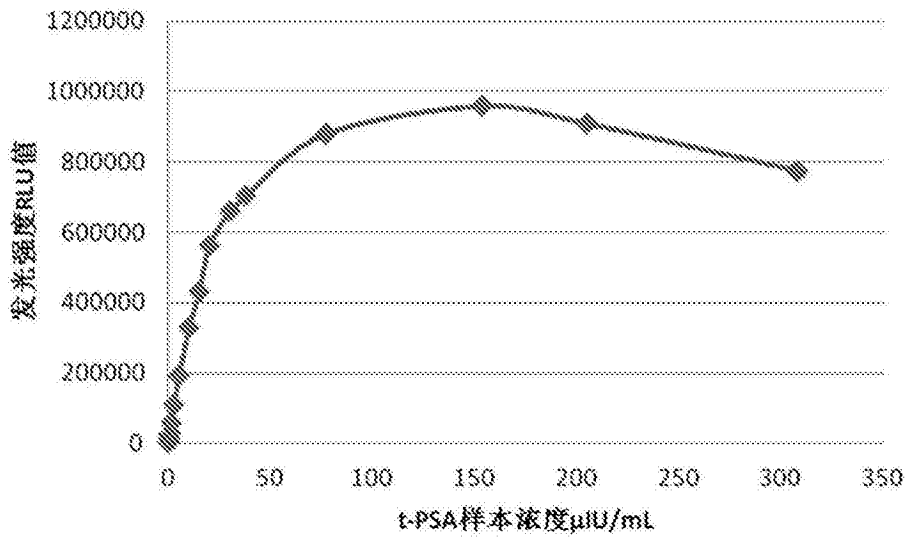


图2

专利名称(译)	碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液		
公开(公告)号	<a href="#">CN103868913B</a>	公开(公告)日	2017-07-14
申请号	CN201410047286.9	申请日	2014-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
[标]发明人	张志栋 赵文姬 陈志强 高芬 陈欢		
发明人	张志栋 赵文姬 陈志强 高芬 陈欢		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53		
代理人(译)	王文君		
其他公开文献	CN103868913A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种碱性磷酸酶的酶促化学发光底物液，含有0.4mg/mL的9,10-二氢吲哚衍生物，0.05mol/L的三羟基甲烷和0.5%的十二烷基磺酸钠。本发明的酶促化学发光底物液发光快，强度高，持续时间长，可达30~60分钟，可完全满足临床检测的需要，其主要性能指标达到了国外产品水平，大大降低了发光底物的成本。本发明的酶促化学发光底物液本底值相对发光强度不高于3000，AP浓度在0.1U/mL时，发光强度RLU值可达315000±65000，信号强，灵敏度高，特异性强。

