



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106483282 A

(43)申请公布日 2017.03.08

(21)申请号 201610868301.5

(22)申请日 2016.09.29

(71)申请人 北京世纪沃德生物科技有限公司  
地址 102200 北京市昌平区火炬街21号莱  
特默勒大厦五层

(72)发明人 郑文果 李国伟 刘学仁

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限  
公司 11245  
代理人 关畅 王春霞

(51) Int. Cl.  
G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种抗原稳定剂及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种抗原稳定剂及其制备方法与应用。它包括如下重量份的组分:Tris-HCl 缓冲液100份;牛血清白蛋白1~5份;甘油1~10份;甘露醇1~10份; $\beta$ -巯基乙醇0.1~0.5份;Proclin-300 0.01~1份。本发明具有能够稳定蛋白,能抑制蛋白的氧化,以及防腐作用;同时避免了生物源性的污染,还降低了成本。

1. 一种抗原稳定剂,它包括如下重量份的组分:  
Tris-HCl缓冲液 100份;  
牛血清白蛋白 1~5份;  
甘油 1~10份;  
甘露醇 1~10份;  
 $\beta$ -巯基乙醇 0.1~0.5份;  
Proclin-300 0.01~1份。
2. 根据权利要求1所述的抗原稳定剂,其特征在于:所述Tris-HCl缓冲液的摩尔浓度为10~100mM;  
所述Tris-HCl缓冲液的pH值为8.0。
3. 权利要求1或2所述的抗原稳定剂的制备方法,包括如下步骤:将所述Tris-HCl缓冲液、所述牛血清白蛋白、所述甘油、所述甘露醇、所述 $\beta$ -巯基乙醇和所述Proclin-300混合,即得到所述抗原稳定剂。
4. 根据权利要求3所述的抗原稳定剂,其特征在于:所述Tris-HCl缓冲液按照如下方法制备:将三羟甲基氨基甲烷溶液用盐酸调节其pH值制得。
5. 根据权利要求3或4所述的抗原稳定剂,其特征在于:所述三羟甲基氨基甲烷溶液为三羟甲基氨基甲烷溶于水的溶液。
6. 权利要求1或2所述的抗原稳定剂在作为酶联免疫体外诊断试剂的抗原稀释液中的应用。

## 一种抗原稳定剂及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗原稳定剂及其制备方法与应用,属于生物技术体外诊断试剂领域。

### 背景技术

[0002] 在体外诊断试剂中,酶联免疫诊断试剂因为高灵敏度和准确性受到研究人员和医护人员的认可,在临床诊断中的应用越来越广泛,促使酶联免疫体外诊断试剂的迅速发展。但是,由于灵敏度的要求,酶联免疫诊断试剂中的抗原往往需要被稀释至很低的浓度,比如小于100ng/ml。在很低的浓度下,大部分抗原的稳定性都会受到影响,发生活性降低或者保持期限缩短的情况,影响了体外诊断试剂盒的稳定性。单一的缓冲液很难使抗原在低浓度下保持稳定,有些制造商加入动物血清来保持抗原稳定,这增加了安全风险,且不易保持批间的一致性。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种抗原稳定剂及其制备方法与应用,本发明具有能够稳定蛋白,能抑制蛋白的氧化,以及防腐作用;同时避免了生物源性的污染,还低了成本。

[0004] 本发明提供的抗原稳定剂,它包括如下重量份的组分:

[0005] Tris-HCl缓冲液100份;

[0006] 牛血清白蛋白1~5份;

[0007] 甘油1~10份;

[0008] 甘露醇1~10份;

[0009]  $\beta$ -巯基乙醇0.1~0.5份;

[0010] Proclin-300 0.01~1份。

[0011] 本发明中,所述牛血清白蛋白又简称为BSA。

[0012] 本发明中,所述抗原稳定剂具体可包括如下重量份的组分:

[0013] Tris-HCl缓冲液100份,分别加入BSA 2.5份,甘油5份,甘露醇5份, $\beta$ -巯基乙醇0.25份,Proclin-300 0.05份。

[0014] 上述的抗原稳定剂中,所述Tris-HCl缓冲液的摩尔浓度可为10~100mM,具体可为50mM、10~100mM、10~100mM或10~100mM;

[0015] 所述Tris-HCl缓冲液的pH值为8.0。

[0016] 本发明还提供了上述的抗原稳定剂的制备方法,包括如下步骤:将所述Tris-HCl缓冲液、所述牛血清白蛋白、所述甘油、所述甘露醇、所述 $\beta$ -巯基乙醇和所述Proclin-300混合,即得到所述抗原稳定剂。

[0017] 上述的抗原稳定剂中,所述Tris-HCl缓冲液按照如下方法制备:将三羟甲基氨基甲烷溶液用盐酸调节其pH值制得。

[0018] 上述的抗原稳定剂中,所述三羟甲基氨基甲烷溶液为三羟甲基氨基甲烷溶于水的

溶液。

[0019] 本发明所述抗原稳定剂应用于作为酶联免疫体外诊断试剂的抗原稀释液。

[0020] 本发明具有以下优点：

[0021] 本发明能够稳定蛋白，能抑制蛋白的氧化，以及具有不影响抗原抗体结合反应防腐作用；同时没有使用动物血清，避免了生物源性的污染，也降低了成本，适合用于酶联免疫体外诊断试剂，本发明能够使抗原在较低浓度（小于100ng/ml）下长期保持稳定。

### 具体实施方式

[0022] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0023] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0024] 下述实施例中，BSA商购于北京拜尔迪生物技术有限公司，原厂品牌Amersco，产品目录号为0332；

[0025] Proclin-300商购于厦门市裕泰康进出口有限公司，原厂品牌sigma，产品目录号48918-U；

[0026] 甘油商购于国药集团化学试剂北京有限公司，原厂品牌国药，产品目录号10010618；

[0027] 甘露醇商购于北京拜尔迪生物技术有限公司，原厂品牌sigma，产品目录号m4125；

[0028] Tris商购于北京经科宏达生物技术有限公司，原厂品牌Amersco，产品目录号为0497；

[0029]  $\beta$ -巯基乙醇商购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司，原厂品牌genview，产品目录号为gm195；

[0030] 下述实施例中所描述的份数均为重量份。

[0031] 实施例1、抗原稳定剂的制备与应用

[0032] 1) 称取三羟甲基氨基甲烷0.6份溶于100份纯化水中，配成溶液A，用盐酸调节溶液A的pH至8.0，得到摩尔浓度为50mM Tris-HCl缓冲液。

[0033] 2) 取步骤1) 制备得到的Tris-HCl缓冲液100份，分别加入BSA 2.5份，甘油5份，甘露醇5份， $\beta$ -巯基乙醇0.25份，Proclin-300 0.05份，搅拌均匀，即得到抗原稳定剂。

[0034] 采用双抗体夹心法检测血清中CRP的含量，具体步骤如下：

[0035] 1、包被CRP (C反应蛋白) 抗体，1mg/L，100 $\mu$ l/孔，4 $^{\circ}$ C包被过夜（包被液为碳酸钠0.159份、碳酸氢钠0.293份溶于100份纯化水中）；

[0036] 2、甩干包被液，用封闭液封闭，200 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C，2小时；

[0037] 3、甩干封闭液（封闭液为磷酸二氢钾0.02份，十二水合磷酸氢二钠0.29份，氯化钠0.8份，氯化钾0.02份，Tween-20 0.05份，牛血清白蛋白1份，加蒸馏水至100份）；

[0038] 4、用本发明抗原稳定剂和普通单一缓冲液分别配制浓度为0、3ng/ml、6ng/ml、12.5ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml的CRP系列标准品；

[0039] 5、将4中两种溶液分别配制的不同浓度CRP系列标准品分别放置于4 $^{\circ}$ C 1天、4 $^{\circ}$ C 3天、4 $^{\circ}$ C 7天后取出待用；37 $^{\circ}$ C 1天、37 $^{\circ}$ C 3天、37 $^{\circ}$ C 7天后取出待用；

[0040] 6、在酶标板孔中依次加入5种不同条件放置的两种溶液分别配制的不同浓度CRP系列标准品，100 $\mu$ l/孔；

[0041] 7、在加入标准品的酶标孔中依次再加入CRP酶标抗体,100 $\mu$ l/孔,混合均匀后,室温(25 $^{\circ}$ C)反应60分钟。

[0042] 8、洗板,排干,加入底物(A液:柠檬酸1.92份,加蒸馏水100份。B液Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 7.17份,加蒸馏水100份。临用前取A液4.86份与B液5.14份混合,加入邻苯二胺OPD 4mg,待充分溶解后加入30%(V/V)的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 $\mu$ l,即成底物应用液。),避光室温(25 $^{\circ}$ C)显示10分钟;

[0043] 9、加入终止液(2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),50 $\mu$ l/孔,酶标仪读数,检测波长405nm,参比波长630nm。检测波长405nm时,酶标仪读数如下表1所示。检测波长630nm时,酶标仪读数如下表2所示。

[0044] 由表1和表2结果可知,本发明能够使抗原在较低浓度(小于100ng/ml)下长期保持稳定,本发明能够稳定蛋白,能抑制蛋白的氧化,以及具有不影响抗原抗体结合反应防腐作用;同时没有使用动物血清,避免了生物源性的污染,也降低了成本,适合用于酶联免疫体外诊断试剂,本发明

[0045] 表1不同条件下酶标孔中酶标仪读数(检测波长405nm)

[0046]

		4 $^{\circ}$ C1天		4 $^{\circ}$ C3天		4 $^{\circ}$ C7天		37 $^{\circ}$ C1天		37 $^{\circ}$ C3天		37 $^{\circ}$ C7天	
		普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂
		Measurement count: 1		Filter: 405									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	0.066	0.065	0.063	0.068	0.062	0.058	0.053	0.061	0.059	0.065	0.061	0.064
3ng/ml	B	0.032	0.107	0.080	0.132	0.095	0.123	0.129	0.129	0.059	0.070	0.062	0.091

[0047]

6ng/ml	C	0.032	0.207	0.234	0.189	0.195	-0.179	0.181	0.224	0.169	0.175	0.095	0.183
12.5ng/ml	D	0.365	0.343	0.397	0.281	0.279	0.309	0.441	0.445	0.383	0.355	0.223	0.285
25ng/ml	E	0.740	0.820	0.820	0.650	0.610	-0.810	0.620	0.630	0.610	0.700	0.520	0.650
50ng/ml	F	1.495	1.480	1.380	1.690	1.300	1.590	1.390	1.550	1.470	1.600	1.171	1.530
100ng/ml	G	2.978	3.160	2.870	3.190	2.660	3.080	3.050	3.181	2.710	3.138	2.510	3.070
	H	0.059	0.066	0.073	0.065	0.061	0.065	0.065	0.068	0.063	0.059	0.066	0.069

[0048] 表2不同条件下酶标孔中酶标仪读数(检测波长630nm)

[0049]

		4 $^{\circ}$ C1天		4 $^{\circ}$ C3天		4 $^{\circ}$ C7天		37 $^{\circ}$ C1天		37 $^{\circ}$ C3天		37 $^{\circ}$ C7天	
		普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂
		Measurement count: 1		Filter: 630									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	0.036	0.039	0.044	0.037	0.040	0.039	0.040	0.037	0.039	0.042	0.049	0.037
3ng/ml	B	0.038	0.040	0.039	0.043	0.043	0.037	0.039	0.041	0.038	0.036	0.046	0.038
6ng/ml	C	0.040	0.039	0.045	0.040	0.049	0.044	0.042	0.040	0.042	0.037	0.040	0.043
12.5ng/ml	D	0.048	0.044	0.044	0.045	0.049	0.049	0.048	0.047	0.048	0.049	0.042	0.038
25ng/ml	E	0.044	0.045	0.046	0.046	0.054	0.050	0.048	0.045	0.055	0.045	0.039	0.053
50ng/ml	F	0.048	0.052	0.050	0.047	0.054	0.055	0.053	0.046	0.054	0.055	0.054	0.051
100ng/ml	G	0.055	0.055	0.050	0.051	0.054	0.055	0.054	0.054	0.054	0.055	0.055	0.054
	H	0.038	0.040	0.037	0.043	0.051	0.040	0.037	0.055	0.053	0.055	0.040	0.043

[0050] 对表1和表2检测结果分析:

[0051] 1、对630nm波长的检测结果,采用双尾配对T检验分析不加稳定剂样本和加入稳定剂样本是否存在显著性差异,置信区间为95%,spss软件计算结果如下表3、4、5所示:

[0052] 表3样本630nm波长检测结果的偏差

	平均数	N	标准偏差	标准错误平均值
[0053] 不加稳定剂	0.04725	36	0.005774	0.000962
加稳定剂	0.04622	36	0.006104	0.001017

[0054] 表4样本630nm波长检测结果的显著性差异

	N	相关	显著性
[0055] 不加稳定剂 & 加稳定剂	36	0.748	0.000

[0056] 表5样本630nm波长检测结果的程对差异数

[0057]

	程对差异数		95% 差异数的信赖区间			T	df	显著性 (双尾)
	平均数	标准偏差	平均值	标准错误				
				下限	上限			
不加稳定剂 - 加稳定剂	0.001028	0.004226	0.000704	-.000402	.002458	1.459	35	.153

[0058] 由上述结果可知,本发明在630nm参比波长下,不加稳定剂的样本和加入本发明稳定剂的样本整体上无显著性差异,即不存在明显干扰因素影响405nm的检测结果。

[0059] 2、对4℃1天、3天、7天的405nm波长的检测结果,采用双尾配对T检验分析显著性差异,置信区间为95%,spss软件计算结果如表6、7、8所示:

[0060] 表6 4℃样本检测结果的偏差

	平均数	N	标准偏差	标准错误平均值
[0061] 不加稳定剂 (4℃)	0.92011	18	0.995359	0.234608
加稳定剂 (4℃)	1.01889	18	1.104376	0.260304

[0062] 表7 4℃样本检测结果的显著性差异

	N	相关	显著性
[0063] 不加稳定剂 (4℃) & 加稳定剂 (4℃)	18	0.993	0.000

[0064] 表8 4℃样本检测结果的程对差异数

[0065]

	程对差异数		95%差异数的信赖区间			T	df	显著性 (双尾)
	平均数	标准偏差	标准错误平均值	区间				
				下限	上限			
不加稳定剂 (4℃) - 加稳定剂 (4℃)	-.09877	.162495	.038301	-.179585	-.017971	-2.579	17	.020

[0066] 由表6-8说明在4℃保存条件下,不加稳定剂的样本浓度整体低于加入本发明稳定剂的样本浓度;不加稳定剂的样本和本发明加入稳定剂的样本浓度有显著性差异。

[0067] 3、对37℃1天、3天、7天的405nm波长的检测结果,采用双尾配对T检验分析显著性差异,置信区间为95%,spss软件计算结果如表9、10、11所示:

[0068] 表9 37℃样本检测结果的偏差

	平均数	N	标准偏差	标准错误平均值
[0069] 不加稳定剂 (37℃)	.87739	18	0.972155	0.229139
加稳定剂 (37℃)	1.00033	18	1.099221	0.259089

[0070] 表10 37℃样本检测结果的显著性差异

	N	相关	显著性
[0071] 不加稳定剂 (37℃) & 加稳定剂 (37℃)	18	0.995	0.000

[0072] 表11 37℃样本检测结果的程对差异数

[0073]

		程对差异数		95% 差异数的信赖区		T	df	显著性 (双尾)
平均数	标准偏差	标准错误平均值	下限	上限				
不加稳定剂 (37℃)	-.12294	0.16334	-0.20417	-0.04171	-3.193	17	0.005	
加稳定剂 (37℃)	4	5	0.038501	4	5			

[0074] 由表9-11说明在37℃保存条件下,不加稳定剂的样本浓度整体低于加入本发明稳定剂的样本浓度;不加本发明稳定剂的样本和加入本发明稳定剂的样本浓度有显著性差异。

专利名称(译)	一种抗原稳定剂及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106483282A</a>	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	CN201610868301.5	申请日	2016-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京世纪沃德生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京世纪沃德生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京世纪沃德生物科技有限公司		
[标]发明人	郑文果 李国伟 刘学仁		
发明人	郑文果 李国伟 刘学仁		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306		
代理人(译)	关畅 王春霞		
其他公开文献	CN106483282B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种抗原稳定剂及其制备方法与应用。它包括如下重量份的组分：Tris-HCl缓冲液100份；牛血清白蛋白1~5份；甘油1~10份；甘露醇1~10份；β-巯基乙醇0.1~0.5份；Proclin-300 0.01~1份。本发明具有能够稳定蛋白，能抑制蛋白的氧化，以及防腐作用；同时避免了生物源性的污染，还降低了成本。

		4℃1天		4℃3天		4℃7天		37℃1天		37℃3天		37℃7天	
		普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂	普通	稳定剂
		Measurement count: 1 Filter: 405											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	A	0.066	0.065	0.063	0.068	0.062	0.058	0.053	0.061	0.059	0.065	0.061	0.064
3ng/ml	B	0.032	0.107	0.080	0.132	0.095	0.123	0.129	0.129	0.059	0.070	0.062	0.091