



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104391110 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201410709518. 2

第 206-208 页 .

(22) 申请日 2014. 11. 28

审查员 胡玉连

(73) 专利权人 天津华信康达科技有限公司

地址 300384 天津市滨海新区华苑产业区梅  
苑路九号 6-701

专利权人 张静 李小永

(72) 发明人 刘军 田恩江 张静 李小永

(74) 专利代理机构 北京中企鸿阳知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11487

代理人 刘葛 郭鸿雁

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

JP 9-322769 A, 1997. 12. 16, 全文 .

CN 101183075 A, 2008. 05. 21, 全文 .

杨梅 等. 荧光法测定碱性磷酸酶及其标记物. 《分析科学学报》. 1996, 第 12 卷 (第 3 期),

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

双波长酶免疫化学发光底物及其应用

(57) 摘要

本发明双波长酶免疫化学发光底物及其应用, 一种利用酶免疫化学发光来测试或分析材料的组合物应用。其目的是为了提供一种制备方法简单、使用方便, 样品检测准确性和精密度高, 保存时间长的酶免疫双波长酶免疫化学发光底物及其应用。本发明的酶免疫化学发光底物制备简单、使用方便; 本发明制得的发光底物不仅检测数据的准确性、精密度和重复性高, 且成本低。本发明用于酶免疫化学发光分析领域。



1. 一种双波长酶免疫化学发光底物,其特征在于包括两部分 :A 组分和 B 组分 ; 其中,所述 A 组分按以下步骤制备 : 将 5g 甘露醇和 60mg 4- 甲基伞形酮磷酸酯加入 10mL 的 0.01mol/L 、 PH 9.5 的碳酸盐缓冲液中,混匀后进行真空冷冻干燥,即制得 A 组分,4℃保存 ; 所述 B 组分按以下步骤制备 : 将 4.5ml 2- 氨基 -2- 甲基 -1- 丙醇、 30mg 5- 羟色胺、 20mg MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 和 100mg NaN<sub>3</sub> 加入 100ml 的 0.01mol/L 、 PH 9.5 的碳酸盐缓冲液,混匀,即制得 B 组分。

2. 一种权利要求 1 所述的双波长酶免疫化学发光底物的应用,其特征在于 : 用于化学发光酶免疫分析。

3. 根据权利要求 2 所述的双波长酶免疫化学发光底物的应用,其特征在于 : 作为化学发光酶免疫分析仪中的基质液。

4. 根据权利要求 3 所述的双波长酶免疫化学发光底物的应用,其特征在于 : 所述的化学发光酶免疫分析仪为日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪。

5. 根据权利要求 4 所述的双波长酶免疫化学发光底物的应用,其特征在于 : 按以下步骤进行 :

一、在室温条件下,将所述 B 组分直接加入盛放所述 A 组分的容器中,混均后即为基质液,室温条件下静置 3-5 分钟 ;

二、将步骤一中制得的基质液放置在日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪的基质液位置上 ;

三、将待测样本和诊断试剂放在日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪的指定位置上,启动日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪的自动检测程序,进行检测 ;

四、检测完毕,读取结果。

## 双波长酶免疫化学发光底物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用化学发光来测试或分析材料的组合物及其应用,特别是涉及一种双波长免疫化学发光底物及其应用。

### 背景技术

[0002] 化学发光免疫分析 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合的分析方法,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析,也是继放射免疫分析、酶联免疫分析、时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术,广泛应用于医学临床检验等领域中。

[0003] 化学发光免疫分析包含两个部分,即免疫反应系统和化学发光分析系统。免疫反应系统是将发光物质或酶直接标记在抗原或抗体上(免疫标记物),再与相应的抗原或抗体特异性结合,作用于底物发光。免疫标记物作用于底物发光是利用化学发光物质经催化剂的催化和氧化剂的氧化,形成一个激发态的中间体,当这种激发态中间体回到稳定的基态时,同时发射出光子( $h\nu$ ),利用发光信号测量仪器测量光量子产额,根据光量子的数量,可对待测物质进行高灵敏度和特异性的定量。

[0004] 化学发光免疫分析已成为当今世界和我国医学临床检验中必备的分析方法之一,其化学发光酶免疫分析底物的研制引起国内外的广泛关注。

[0005] 目前,我国医学临幊上,应用的化学发光免疫分析仪器和其诊断试剂,基本来自于国外,如德国的罗氏 (Roche)、美国的贝克曼 (Beckman)、德国的西门子 (Siemens)、德国的索林 (Liaison)、美国的雅培 (Abbott)、日本的东曹 (AIA) 等,虽化学发光免疫分析诊断试剂的底物各异,但其价格均较昂贵,特别是日本东曹 (AIA) 的化学发光酶 (碱性磷酸酶) 免疫分析诊断试剂的基质液 (底物) 一套 (200ml) 约需 3000 元左右,其基质液是双波长底物 (专利保密)。双波长底物即在底物中除含有能发出待测的特异性激发荧光物,还加入能发出非特异性激发荧光参照物,以消除非特异性激发荧光等其它干扰,降低仪器读数带来的误差,保证实验数据的准确性,双波长底物具有灵敏度高、稳定、可重复性强等特点。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种制备方法简单、使用方便,样品检测准确性和精密度高,成本低、保存时间长的双波长酶免疫化学发光底物及其应用。

[0007] 本发明双波长酶免疫化学发光底物,包括两部分:A组分和B组分;其中,所述A组分按以下步骤制备:将5g甘露醇和60mg4-甲基伞形酮磷酸酯加入10mL的0.01mol/L、PH9.5的碳酸盐缓冲液中,混匀后进行真空冷冻干燥,即制得A组分,4℃保存;所述B组分按以下步骤制备:将4.5ml2-氨基-2-甲基-1-丙醇、30mg5-羟色胺、20mgMgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O和100mgNaN<sub>3</sub>加入100mL的0.01mol/L、PH9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,即制得B组分。

[0008] 本发明双波长酶免疫化学发光底物中所述的4-甲基伞形酮磷酸酯(4-MUP)作为

特异性激发荧光物,5-羟色胺作为发出非特异性激发荧光的参照物,甘露醇作为干燥赋形剂。

- [0009] 本发明双波长酶免疫化学发光底物的应用,用于化学发光酶免疫分析。
- [0010] 本发明双波长酶免疫化学发光底物的应用,作为化学发光酶免疫分析仪中的基质液。
- [0011] 本发明双波长酶免疫化学发光底物的应用,所述的化学发光酶免疫分析仪为日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪。
- [0012] 本发明双波长酶免疫化学发光底物的应用,作为日本 AIA 化学发光酶免疫分析中的 AIA 基质液,按以下步骤进行:将本发明的 B 组分直接加入 A 组分中,混均后,置于日本 AIA 化学发光酶免疫分析仪放基质液的位置,检测步骤按日本 AIA 化学发光酶免疫分析仪说明书要求进行。
- [0013] 本发明双波长酶免疫化学发光底物的应用,作为日本 AIA 化学发光酶免疫分析中的 AIA 基质液,按以下步骤进行:
- [0014] 一、在室温条件下,将所述 B 组分直接加入盛放所述 A 组分的容器中,混均后即为基质液,室温条件下静置 3-5 分钟;
- [0015] 二、将步骤一中制得的基质液放置在日本 AIA 化学发光酶免疫分析仪的基质液位置上;
- [0016] 三、将待测样本和诊断试剂放在日本 AIA 化学发光酶免疫分析仪的指定位置上,启动日本 AIA 化学发光酶免疫分析仪的自动检测程序,进行检测;
- [0017] 四、检测完毕,读取结果。
- [0018] 碱性磷酸酶化学发光免疫分析系统中是将碱性磷酸酶直接标记在抗原或抗体上(免疫标记物),再与相应的抗原或抗体特异性结合,作用于底物发光,碱性磷酸酶标记物作用的底物有 3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-(3-磷氧酰)-苯基 1,2-二氧环乙烷 (AMPPD) 和 4-甲基伞形酮磷酸酯 (4-MUP) 等。本发明是采用 4-MUP 作为碱性磷酸酶标记物的特异性底物,同时还加入 5-羟色胺作为发出非特异性激发荧光的参照物,在 350-380nm 同一个波长的激发光作用下,可同时发射出 420-485nm 和 525-630nm2 种荧光光束,即碱性磷酸酶的双波长免疫化学发光底物,可以消除非特异性激发荧光等其它干扰,降低仪器读数带来的误差,保证实验数据的准确性。
- [0019] 本发明的双波长免疫化学放光底物与现有技术的不同之处在于:
- [0020] 1、本发明的双波长免疫化学发光底物制备方法简单、使用方便。
- [0021] 2、本发明的双波长免疫化学放光底物,可替代日本东曹 (AIA) 的化学发光酶(碱性磷酸酶)免疫分析诊断试剂中的基质液(底物),亦可应用于化学发光酶(碱性磷酸酶)免疫分析,不仅检测数据的准确性、精密度和重复性高,且成本也仅是日本东曹的化学发光酶(碱性磷酸酶)免疫分析底物的 1/10。
- [0022] 3、本发明的双波长免疫化学放光底物保存时间长,可达到 6 个月以上。

## 附图说明

- [0023] 图 1 为实施例 3 中采用双波长免疫化学发光底物使用荧光光度仪对血清雌二醇(E2) 进行检测的流程图。

## 具体实施方式

[0024] 结合以下实施例和验证试验对本发明的双波长免疫化学发光底物作进一步的说明。

[0025] 实施例 1

[0026] 本实施例碱性磷酸酶的双波长免疫化学发光底物的制备按以下步骤进行：

[0027] 一、制备 A 组分：将甘露醇（干燥赋形剂）5g、4-甲基伞形酮磷酸酯（4-MUP）60mg 和

0.01mol/L PH 9.5 的碳酸盐缓冲液 10ml 混合均匀，进行真空冷冻干燥，干燥后 4℃保存；

[0028] 二、制备 B 组分：将 2-氨基-2-甲基-1-丙醇 4.5ml、5-羟色胺（Serotonin）30mg、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  20mg、NaN3 100mg 和 0.01mol/L、PH 9.5 碳酸盐缓冲液 100ml，混合致全部溶解后，待用。

[0029] 实施例 2

[0030] 本实施例的双波长免疫化学发光底物的使用方法，按以下步骤进行：

[0031] 将本发明的 B 组分直接加入 A 组分中，混均后，替代日本东曹（AIA）的基质液（底物），使用时将 A 和 B 混合液，放置在日本 AIA 化学发光酶免疫分析仪的基质液位置上，检测步骤按日本 AIA 化学发光酶免疫分析仪说明书要求进行。

[0032] 具体包括以下步骤：

[0033] 一、在室温条件下，将实施例 1 中的 B 组分直接加入盛放 A 组分的瓶子中，混均后即为基质液，室温条件下静置 3-5 分钟；

[0034] 二、将步骤一中制得的液体放置在日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪的基质液位置上；

[0035] 三、将待测样本和诊断试剂放在日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪的指定位置上，启动日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪的自动检测程序，进行检测；

[0036] 四、检测时间约 20 分钟，报告结果。

[0037] 本实施例中所述的日本东曹 AIA 化学发光酶免疫分析仪（型号 360）购自合肥博氏生物科技有限公司。

[0038] 实施例 3

[0039] 本实施例采用实施例 1 中的双波长免疫化学发光底物使用荧光光度仪对血清雌二醇（E2）进行检测，其操作步骤如图 1 所示。

[0040] 验证试验 1

[0041] 标准曲线的比较：

[0042] 在日本 AIA 化学发光免疫分析仪（型号 360）上，分别使用 AIA 基质液（底物液）和本发明双波长免疫化学发光底物液，同时进行 E2 标准曲线的制备，并进行相关系数的数学统计，结果见表 1。

[0043] 表 1AIA 基质液（底物液）与实施例双波长底物液制备 E2 标准曲线的比较

[0044]

E2 浓度 (pg/ml)	荧光比值 (rate)	
	AIA 基质液	实施例 1
0	76.810	78.240
38	64.685	67.430
95	54.975	54.733
483	26.476	27.222
975	17.895	18.823
3180	8.778	9.044

[0045] E2 的浓度值与 AIA 基质液和本发明底物液的相对荧光值, 进行相关系数的数学统计, 结果显示分别为 -0.8342、-0.8323。AIA 基质液和本发明底物液的相对荧光比值进行比较, 其相关系数为 0.9995, 呈良好正相关性。表明 AIA 基质液和本发明底物液在相同条件下反应, 保持良好的一致性, 可以忽略因替换本发明底物液造成的系统误差。

[0046] 验证试验 2

[0047] 样品测定的准确性对比试验:

[0048] 在日本 AIA 化学发光免疫分析仪 (型号 360) 上分别使用 AIA 基质液 (底物液) 和本发明双波长底物液, 各测定同 1 组样本 (30 例), 为使测定项目有代表性, 每个样本测定项目选择免疫反应为夹心法的促甲状腺素 (TSH) 和甲胎蛋白 (AFP), 免疫反应为竞争法的三碘甲状腺原氨酸 (T3) 和雌二醇 (E2)。结果表明 4 项指标的测定值均较接近, 2 组样本进行 t 检验, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 相关系数 (r) 均  $> 0.98$ , 呈高度正相关性, 见表 2。

[0049] 表 2 日本 AIA 基质液 (底物液) 与实施例 1 双波长底物液检测样品的比较 ( $\bar{X} \pm s$ )

[0050]

	N	TSH (uIU/ml)	T3 (mmol/L)	AFP (IU/ml)	E2 (pmol/L)
AIA 基质液	30	$3.86 \pm 0.08$	$4.14 \pm 0.23$	$13.5 \pm 0.24$	$204 \pm 3.81$
实施例 1	30	$3.91 \pm 0.09$	$4.40 \pm 0.24$	$13.1 \pm 0.22$	$198 \pm 3.47$
P 值		$> 0.05$	$> 0.05$	$> 0.05$	$> 0.05$
r 值		0.988	0.993	0.991	0.990

[0051] 验证试验 3

[0052] 精密度试验:

[0053] 取 10 份血清混合的样本, 在日本 AIA 化学发光免疫分析仪 (型号 360) 上, 分别使用 AIA 基质液 (底物液) 与本发明双波长底物液, 各重复测定 20 次。同时在 30 天内对上述样本, 再各重复测定 20 次, 测定项目相同, 进行批内和批间变异系数 (C V) 观察。结果表明 AIA 基质液 (底物液) 与本发明双波长底物液二者所做的各检测项目均值和标准差, 在同一项目间, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。且本发明双波长底物液所做的各项目批内变

异系数 (CV) 均 <4.1%，批间变异系数 (CV) 均 <7.0%，符合一般诊断试剂批内变异系数 (CV) <5%，批间变异系数 (CV) <10% 的要求。

[0054] 验证试验 4

[0055] 试剂保存稳定性观察：

[0056] 将本发明双波长底物 A 和 B，放置 4℃ 条件下，可保存 6 个月以上，6 个月后，其 pH 值及含量无明显变化，外观仍保持无色透明、无沉淀、无霉变。表明本发明双波长底物的稳定性可达 6 个月以上。

[0057] 经以上实施例和验证试验，证明本发明的双波长免疫化学发光底物制备方法简单、使用方便；与 AIA 基质液在相同条件下反应，能够保持良好的一致性，可以忽略因替换本发明底物液造成的系统误差，因而可以在实际应用中替代日本东曹 (AIA) 的化学发光酶 (碱性磷 酸酶) 免疫分析诊断试剂中的基质液 (底物)；且样品检测准确性和精密度高；保存时间长，可达到 6 个月以上。

[0058] 虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，本发明的保护范围是由所附权利要求书限定的。本领域的技术人员在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式作出多种变更或修改，但这些变更和修改均落入本发明的保护范围。

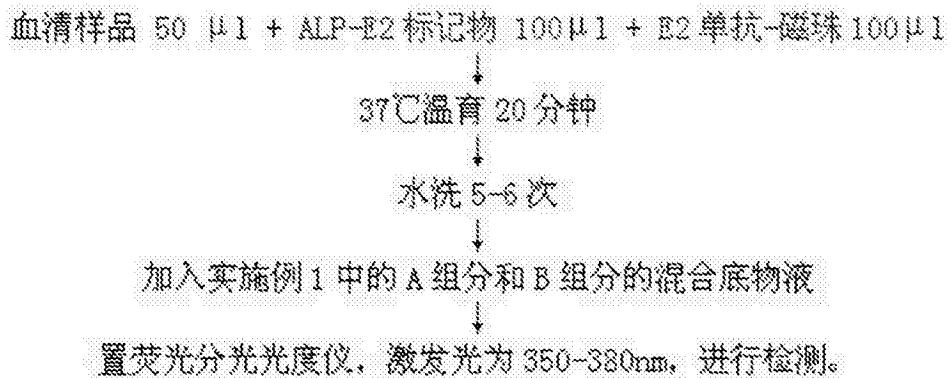


图 1

专利名称(译)	双波长酶免疫化学发光底物及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104391110B</a>	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201410709518.2	申请日	2014-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	张静 李小永		
申请(专利权)人(译)	张静 李小永		
当前申请(专利权)人(译)	张静 李小永		
[标]发明人	刘军 田恩江 张静 李小永		
发明人	刘军 田恩江 张静 李小永		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	郭鸿雁		
其他公开文献	<a href="#">CN104391110A</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明双波长酶免疫化学发光底物及其应用，一种利用酶免疫化学发光来测试或分析材料的组合物应用。其目的是为了提供一种制备方法简单、使用方便，样品检测准确性和精密度高，保存时间长的酶免疫双波长酶免疫化学发光底物及其应用。本发明的酶免疫化学发光底物制备简单、使用方便；本发明制得的发光底物不仅检测数据的准确性、精密度和重复性高，且成本低。本发明用于酶免疫化学发光分析领域。

