



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702907 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201911000587.5

(22)申请日 2019.10.21

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450000 河南省郑州市经济技术开发区  
经北一路87号

(72)发明人 马建军 李双法 于林 金湘东  
吕萌萌 王湘雨 郑业焕 付光宇

(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 刘伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法

(57)摘要

本发明属于生物检测技术领域,公开了一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法,在进行酶促化学发光免疫检测时,在化学发光酶的发光底物的A液与B液相接触混合前向反应容器中加入密度为0.75-0.98kg/m<sup>3</sup>的隔绝液体,反应后读取发光信号值。本发明所述检测方法可以避免发光底物自身本底信号受外界空气中的氧化性物质或还原性物质影响,降低发光底物本底信号的波动效果极其显著。与不隔绝空气相比,试剂盒灵敏度及低值精密性大幅提升,对临床结果判断意义重大。

1. 一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法,在进行酶促化学发光免疫检测时,在化学发光酶的发光底物的A液与B液相接触混合前向反应容器中加入密度为0.75-0.98kg/m<sup>3</sup>的隔绝液体,反应后读取发光信号值。
2. 根据权利要求1所述的检测方法,所述化学发光酶为辣根过氧化物酶,所述发光底物的A液与B液分别为含过氧化氢的氧化剂与含鲁米诺的还原剂。
3. 根据权利要求1所述的检测方法,所述隔绝液体为轻质石蜡油、轻质矿物油或轻质白油。
4. 根据权利要求3所述的检测方法,所述轻质石蜡油、轻质矿物油的型号为3#、5#、7#、10#、15#、26#、32#、46#、68#、90#、100#或150#。
5. 根据权利要求3所述的检测方法,所述轻质白油的型号为D80、D85、D95、D100、D120或D130。

## 一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法,尤其是一种降低磁微粒化学发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法。

### 背景技术

[0002] 酶促化学发光免疫分析(chemiluminescence enzyme immunoassay,CLEIA)是利用标记酶的催化作用,使发光剂(底物)发光,这一类需酶催化后发光的发光剂称为酶促反应发光剂或酶促发光底物。酶促反应的发光底物是指经酶的降解作用而发出光的一类发光底物,目前化学发光酶免疫技术中常用的酶有辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AP)。利用酶如辣根过氧化物酶(HRP)来标记抗原或抗体,在与待测标本中相应的抗原(抗体)发生免疫反应后,形成固相包被抗体-待测抗原-酶标记抗体复合物,经洗涤后,加入底物(发光剂),HRP酶催化和分解底物发光,由光量子阅读系统接收,光电倍增管将光信号转变为电信号并加以放大,再把它们传送至计算机数据处理系统,计算出测定物的浓度。

[0003] 基于HRP的发光底物多为双组分(如安图生物全自动发光底物)系统,其中一种成分为氧化剂含过氧化氢,另一种成分为还原剂含发光剂鲁米诺。因而宜分别配制成2瓶试剂溶液,存放于两个容器中,底物非常稳定,HRP底物系统通常使用发光增强剂,如某些酚试剂(如邻-碘酚)可增强HRP催化鲁米诺氧化的反应和延长发光时间,发光敏感度非常高。有效期可达两年左右。两种成份底物使用时按等比例混合后使用。因使用混合后鲁米诺和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在无HRP催化时也能缓慢自发发光,我们称之为发光底物自身本底。底物自身本底在最后光强度测定中造成空白干扰,底物本底维持信号低且稳定是底物性能好坏的主要指标。因两种成分混合过程中会接触空气,且含鲁米诺的发光底物系统极其灵敏,空气中的氧化还原物质会造成鲁米诺底物本底信号值忽高忽低,有时相差几十到几百倍。底物自身本底变异较大对试剂盒灵敏度及低值精密性会造成极大干扰。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于针对现有技术中存在的问题,提供一种降低发光底物自身本底的方法。

[0005] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法,在进行酶促化学发光免疫检测时,在化学发光酶的发光底物的A液与B液相接触混合前向反应容器中加入密度为0.75-0.98kg/m<sup>3</sup>的隔绝液体,反应后读取发光信号值。

[0007] 本发明所述检测方法中所述隔绝液体密度小且具有化学惰性的特性,在发光底物的A液与B液相接触混合前加入,与发光底物共存于容器中而分层,能隔绝下层的发光底物与空气接触,从而避免发光底物自身本底信号受外界空气中的氧化性物质或还原性物质影响,降低发光底物本底信号的波动。

[0008] 本领域技术人员可以理解,所述检测方法具体操作可以为发光底物的A液与B液通过机器两个管道分别加入检测反应的容器,所述隔绝液体通过第三个管道加入检测反应的容器中机器立即读取发光信号值。如在安图生物全自动磁微粒发光仪A2000或A2000 PLUS原有的分别加入底物A液、B液两个管路的基础上,再增加一个管路用于加入隔绝液体。

[0009] 在一些实施方案中,所述化学发光酶为辣根过氧化物酶,所述发光底物的A液与B液分别为含过氧化氢的氧化剂与含鲁米诺的还原剂。

[0010] 在一些实施方案中,本发明所述检测方法中所述隔绝液体为轻质石蜡油、轻质矿物油或轻质白油。

[0011] 进一步的,作为优选,所述轻质石蜡油、轻质矿物油的型号为3#、5#、7#、10#、15#、26#、32#、46#、68#、90#、100#或150#。

[0012] 作为优选,所述轻质白油的型号为D80、D85、D95、D100、D120或D130。

[0013] 由上述技术方案可知,本发明提供了一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法,在进行酶促化学发光免疫检测时,在化学发光酶的发光底物的A液与B液相接触混合前向反应容器中加入密度为0.75~0.98kg/m<sup>3</sup>的隔绝液体,反应后读取发光信号值。本发明所述检测方法可以避免发光底物自身本底信号受外界空气中的氧化性物质或还原性物质影响,降低发光底物本底信号的波动效果极其显著。与不隔绝空气相比,试剂盒灵敏度及低值精密性大幅提升,对临床结果判断意义重大。

## 附图说明

[0014] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0015] 图1示实施例1中发光底物自身本底在不同时间加入7#轻质石蜡油与否的信号值比较;

[0016] 图2示实施例3中加入D80轻质白油对发光底物作用于辣根过氧化物酶的检测灵敏度及线性范围影响。

## 具体实施方式

[0017] 本发明公开了一种降低发光底物自身本底的方法。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。本发明的方法及产品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所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0018] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0019] 如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂或仪器均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。

[0020] 实施例1、

[0021] 分四天8次测量发光底物不同时间自身本底信号值,每次取96孔发光板的10个孔,分别加入安图生物全自动免疫检验系统用底物试剂盒中的底物A、B液各50 $\mu$ l,并向其中的5孔加入50 $\mu$ l 7#轻质石蜡油,另5孔不加。立即测量10孔的发光信号值,分别各取5孔均值,如表1、图1。

[0022] 表1发光底物自身本底在不同时间加入7#轻质石蜡油与否的信号值比较

光源检测日期	检测时间	加入 7#轻质石蜡油 的发光信号值	未加入 7#轻质石蜡油 的发光信号值
19 日	15:10	491	3720
	17:30	486	4771
24 日	10:23	399	13635
	10:34	482	8931
29 日	14:20	426	16632
	17:20	436	14834
30 日	9:22	499	13622
	17:16	429	8683
均值		456.0	10603.5
变异系数 (CV)		8.3%	45.1%

[0024] 注:各检测仪器均为安图A2000PLUS (JC-147) ,各组发光信号值为5孔均值。

[0025] 结果显示加入7#轻质石蜡油各检测孔底物自身本底不同时间测均值在500以下,变异系数在8.3%;而未加入7#轻质石蜡油各检测孔底物本底发光值较高,且不稳定,发光信号值从3720到16632变异较大,变异系数达45.1%,低值区信号值精密性较差。

[0026] 实施例2、加入3#轻质矿物油对四种检测试剂盒的发光信号值影响

[0027] 采用安图全自动磁微粒化学发光仪A2000PLUS (JC-147) ,分别针对促甲状腺激素(TSH)检测试剂盒、甲状旁腺激素(PTH)检测试剂盒、心机肌钙蛋白I(CTNI)检测试剂盒、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)检测试剂盒(购自安图)及其中的发光底物进行检测。每个试剂盒每个0标或校准品取96孔反光板的10个孔,加入发光底物A、B液各50 $\mu$ l,并向其中的5孔加入50 $\mu$ l 3#轻质矿物油,另5孔不加。立即测量10孔的发光信号值,分别各取5孔均值如表2。

[0028] 表2加入3#轻质矿物油对四种检测试剂盒的发光信号值影响

项目	0 标及校准品	发光信号值		加入 3#轻质矿物油的发光信号值/未加入 3#轻质矿物油的发光信号值	
		加入 3#轻质矿物油	未加入 3#轻质矿物油		
[0029]	TSH	S0	2767	12941	0.21
		S1	674444	650510	1.04
		S2	1874322	1853129	1.01
		S3	8575853	8646160	0.99
		S4	50598940	52508041	0.96
		S5	206549476	208938289	0.99
		S6	342293207	340627599	1.00
[0030]	PTH	S0	1044	21829	0.05
		S1	8140	37232	0.22
		S2	51159	87974	0.58
		S3	644285	699794	0.92
		S4	4273526	4674197	0.91
		S5	12931636	15149477	0.85
[0031]	CTNI	S0	6149	20750	0.30
		S1	155043	158978	0.98
		S2	1146923	956272	1.20
		S3	9262408	8844597	1.05
		S4	108567819	109355280	0.99
		S5	418265303	483149657	0.87
[0032]	HBsAg	S0	7322	23046	0.32
		S1	119283	151612	0.79
		S2	924757	1111483	0.83
		S3	12323086	14098394	0.87
		S4	113141353	124834536	0.91
		S5	384798282	434212011	0.89

[0030] 注:各组发光信号值为5孔均值。

[0031] 结果显示,加入3#轻质矿物油各检测孔发光信号值与未加入3#轻质矿物油各检测孔相比0值校准品S0本底大幅降低,四个项目分别为原来的21%,5%,30%,32%。而加入3#轻质矿物油对试剂盒的系列校准品发光信号值影响不大。不同项目加入3#轻质矿物油后信噪比S1/S0均有显著提升,表明加入3#轻质矿物油后排除了空气对试剂的影响,发光信号值为试剂的真实信号值。

[0032] 实施例3、加入D80轻质白油对发光底物作用于辣根过氧化物酶的检测灵敏度及线性范围影响

[0033] 使用安图生物的乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)磁微粒检测试剂盒内HRP工作酶(10ml/100人份,含HRP标记抗体,蛋白保护剂,稳定剂等)用纯化水(例如体积比1:3)系列稀释(50μl酶加入100μl蒸馏水)8个浓度,第8个最大稀释HRP酶的浓度定为1,则梯度酶浓度反

向定义为1.00、3.00、9.00、45.00、418.50、3892.05、36196.07、336623.40。在96孔微孔板中每孔加入系列梯度酶个 $10\mu\text{l}$ ,然后分别加入底物A、B液各 $50\mu\text{l}$ ,并向其中的一列加入 $50\mu\text{l}$ D80轻质白油,另一列不加。立即测量发光信号值如表3,梯度酶浓度值与发光值取 $\log-\log$ 作图,见图2。

[0034] 表3加入D80轻质白油对发光底物作用于梯度浓度辣根过氧化物酶的检测信号值

[0035]	梯度酶 ( HRP )	未添加 D80 轻 质白油的发光 信号值	添加 $50\mu\text{l}$ D80 轻 质白油的发光信 号值	梯度酶 ( log )	未添加 D80 轻质白油 (log)	添加 $50\mu\text{l}$ D80 轻质白油 (log)
	1.00	54.95	0.69	0.00	1.74	-0.16
	3.00	44.85	2.15	0.48	1.65	0.33
	9.00	43.35	7.03	0.95	1.64	0.85
	45.00	79.70	36.79	1.65	1.90	1.57
	418.50	393.17	313.64	2.62	2.59	2.50
	3892.05	2800.41	3230.93	3.59	3.45	3.51
	36196.07	32768.71	32459.47	4.56	4.52	4.51
	336623.40	251593.93	252172.04	5.53	5.40	5.40

[0036] 结果显示,用梯度浓度HRP酶检测,加入D80轻质白油发光底物对辣根过氧化物酶HRP检测灵敏度大幅提升 $3^4$ (81)倍,且线性范围更宽。在如表所示的梯度酶(1-336623.40的浓度范围内与信号值的 $R^2=0.9998$ ),更低浓度的辣根过氧化物酶也能检测出来,因此使用液体隔离剂的发光底物检测灵敏度更高,检测线性范围更宽。磁微粒化学发光检测技术中,隔离液体的应用意义重大。

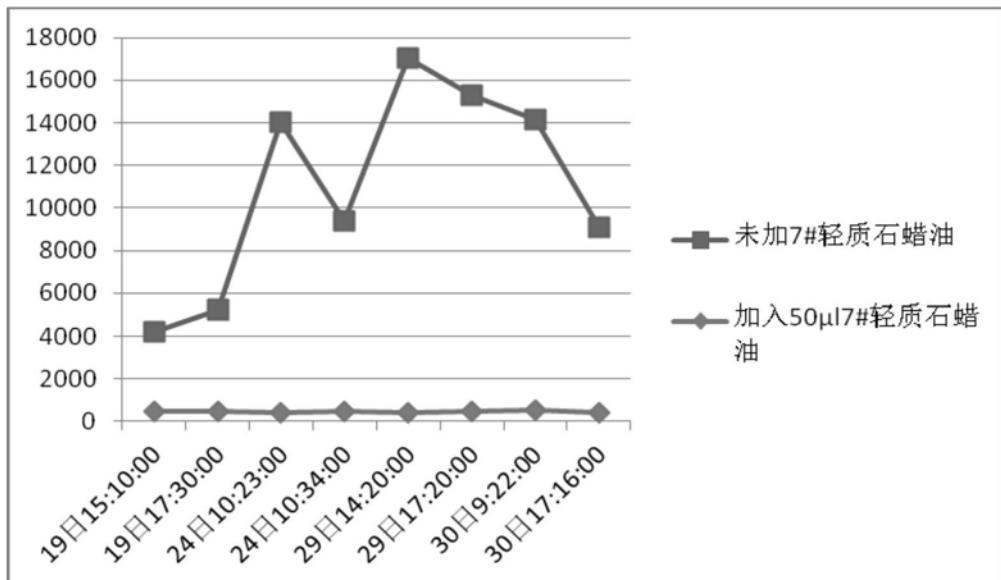


图1

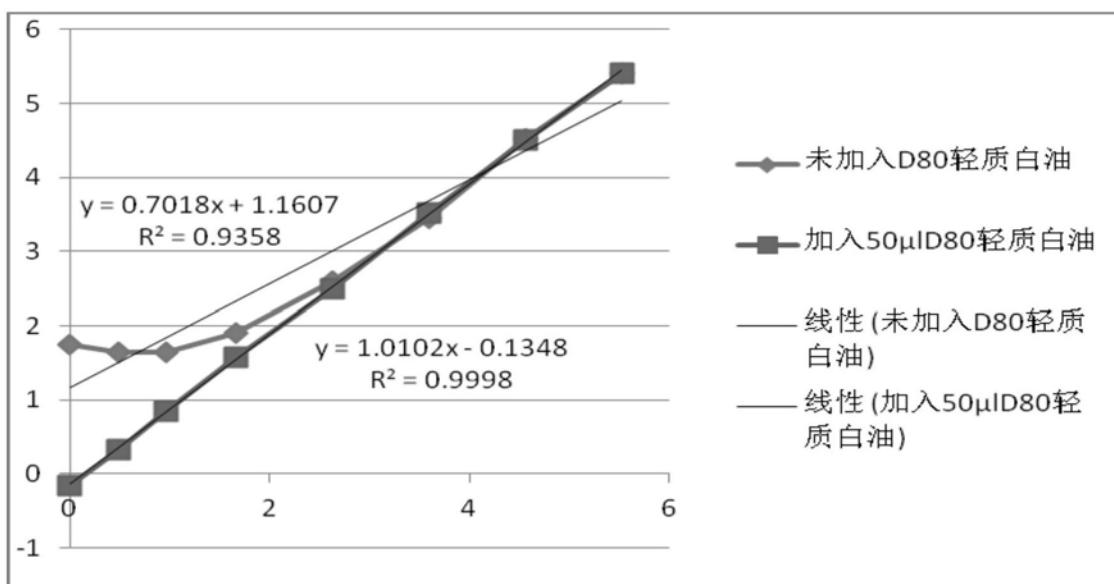


图2

专利名称(译)	一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110702907A</a>	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201911000587.5	申请日	2019-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	马建军 李双法 于林 金湘东 吕萌萌 王湘雨 郑业焕 付光宇		
发明人	马建军 李双法 于林 金湘东 吕萌萌 王湘雨 郑业焕 付光宇		
IPC分类号	G01N33/535 G01N21/76 G01N33/543		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/54326		
代理人(译)	刘伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明属于生物检测技术领域，公开了一种降低发光底物自身本底的酶促化学发光免疫检测方法，在进行酶促化学发光免疫检测时，在化学发光酶的发光底物的A液与B液相接触混合前向反应容器中加入密度为0.75-0.98kg/m<sup>3</sup>的隔绝液体，反应后读取发光信号值。本发明所述检测方法可以避免发光底物自身本底信号受外界空气中的氧化性物质或还原性物质影响，降低发光底物本底信号的波动效果极其显著。与不隔绝空气相比，试剂盒灵敏度及低值精密性大幅提升，对临床结果判断意义重大。

光源检测日期	检测时间	加入 7#轻质石蜡油 的发光信号值	未加入 7#轻质石蜡油 的发光信号值
19 日	15:10	491	3720
	17:30	486	4771
24 日	10:23	399	13635
	10:34	482	8931
29 日	14:20	426	16632
	17:20	436	14834
30 日	9:22	499	13622
	17:16	429	8683
均值		456.0	10603.5
变异系数 (CV)		8.3%	45.1%