



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110041913 A

(43)申请公布日 2019. 07. 23

(21)申请号 201910284013.9

(22)申请日 2019.04.10

(71)申请人 武汉赛维尔生物科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开  
发区高新二路388号武汉光谷国际生  
物医药加速器1.2期22栋5层2室(Y)

(72)发明人 赵红洲 张高英

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限  
公司 11212

代理人 杨立 姜展志

(51)Int.Cl.

G09K 11/06(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

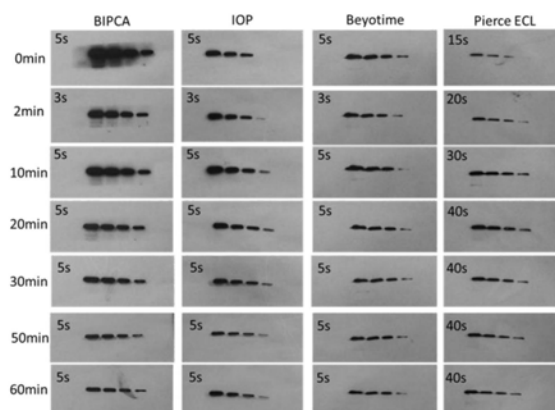
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

### (54)发明名称

一种增强型化学发光底物及其应用

### (57)摘要

本发明涉及免疫检测分析领域,具体涉及一种增强型化学发光底物,其为由分开保存的A液和B液组成的2液型化学发光底物,所述A液包含发光剂、增强剂和稳定剂,所述发光剂为鲁米诺,所述增强剂为4'-羟基联苯基4-羧酸,所述稳定剂包含焦亚硫酸钠;所述B液包含过氧化氢。本发明的增强型化学发光底物的信号响应速度快,化学发光本底值低,发光信号强度高,检测灵敏度高,信号平台期长。



1. 一种增强型化学发光底物,其特征在于,其为由分开保存的A液和B液组成的2液型发光底物;

所述A液包括发光剂、增强剂和稳定剂,所述发光剂为鲁米诺,所述增强剂为4'-羟基联苯基4-羧酸,所述稳定剂包括焦亚硫酸钠;

所述B液包括过氧化氢。

2. 根据权利要求1所述的一种增强型化学发光底物,其特征在于,所述稳定剂还包括木糖和原钒酸钠。

3. 根据权利要求2所述的一种增强型化学发光底物,其特征在于,所述A液还包括碳酸盐缓冲液。

4. 根据权利要求3所述的一种增强型化学发光底物,其特征在于,所述A液中鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠的浓度分别为2~7M、0.3~1mM、30~100 $\mu$ M、10~100mM、100~500 $\mu$ M,余量为碳酸盐缓冲液,所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.2M,pH为9~10。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的一种增强型化学发光底物,其特征在于,所述B液还包括醋酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求5所述的一种增强型化学发光底物,其特征在于,所述B液中过氧化氢的浓度为3~5mM,余量为醋酸盐缓冲液,所述醋酸盐缓冲液的浓度为0.05M,pH为4.5~5.5。

7. 根据权利要求6所述的一种增强型化学发光底物,其特征在于,所述A液与所述B液的体积比为1:1。

8. 一种如权利要求1-7任一项所述的增强型化学发光底物在免疫检测分析中的应用,其特征在于,所述免疫检测分析为使用过氧化物酶标记的免疫检测分析。

## 一种增强型化学发光底物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测分析领域,具体涉及一种增强型化学发光底物及其应用。

### 背景技术

[0002] 化学发光免疫分析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,主要具有灵敏度高、特异性强、试剂价格低廉、方法稳定快速、检测范围宽、操作简单自动化程度高等优点,使其在免疫检测分析领域中得到广泛推广。在化学发光免疫分析中,通过酶结合物引起的化学发光信号强度(RLU)反应了免疫结合的效率,直接揭示了待测抗原(抗体)浓度的变化。在免疫检测分析中,过氧化物酶是经常使用的一种标记酶,通常使用辣根过氧化物酶,在化学发光免疫分析中,通常使用含有鲁米诺和过氧化氢的溶液作为辣根过氧化物酶的发光底物,但是现有的发光底物的信号响应速度慢本底高、信号平台期短。

### 发明内容

[0003] 本发明为解决上述技术问题提供了一种反应时间短、本底值低、化学发光信号稳定的化学发光底物及其应用。

[0004] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:一种增强型化学发光底物,其为由分开保存的A液和B液组成的2液型化学发光底物;所述A液包括发光剂、稳定剂和增强剂,所述发光剂为鲁米诺,所述增强剂为4'-羟基联苯基4-羧酸,所述稳定剂包括焦亚硫酸钠;所述B液包括过氧化氢。

[0005] 在上述技术方案的基础上,本发明还可以做如下改进。

[0006] 进一步,所述稳定剂还包括木糖和原钒酸钠。

[0007] 进一步,所述A液还包括碳酸盐缓冲液。

[0008] 进一步,所述A液中鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠的浓度分别为2~7mM、0.3~1mM、30~100 $\mu$ M、10~100mM、100~500 $\mu$ M,余量为碳酸盐缓冲液,所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.2M,pH为9~10。

[0009] 进一步,所述B液还包括醋酸盐缓冲液。

[0010] 进一步,所述B液中过氧化氢的浓度为3~5mM,余量为醋酸盐缓冲液,所述醋酸盐缓冲液的浓度为0.05M,pH为4.5~5.5。

[0011] 进一步,所述A液与所述B液的体积比为1:1。

[0012] 本发明还提供了上述增强型化学发光底物在免疫检测分析中的应用,所述免疫检测分析为使用过氧化物酶标记的免疫检测分析。

[0013] 本发明的有益效果是:本发明的增强型化学发光底物的信号响应速度快,化学发光本底值低,发光信号强度高,检测灵敏度高,信号平台期长。

## 附图说明

[0014] 图1为本发明试验例2pH对增强型化学发光底物的发光强度的影响,其中横坐标为时间,纵坐标为发光强度;

[0015] 图2为本发明实施例1制备的化学发光底物在不同时间点的发光强度与Thermo Pierce™ ECLWestern Blotting Substrate(货号32209)在不同时间点的发光强度的比较;

[0016] 图3为本发明试验例3与以对碘苯酚为增强剂的化学发光底物液、碧云天 BeyoECLPlus(超敏ECL化学发光试剂盒货号P0018S)、Thermo Pierce™ ECLWesternBlotting Substrate(货号32209)在不同时间点获得的蛋白质印迹图(Westernblot),自上至下代表曝光的时间点;

[0017] 图4为本发明试验例3的化学发光底物以及市售的一种化学发光底物(碧云天 BeyoECLPlus)灵敏度测试的蛋白质印迹图(Westernblot)。

## 具体实施方式

[0018] 以下结合附图及具体实施例对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0019] 本发明提供了一种增强型化学发光底物,其为由分开保存的A液和B液组成的2液型发光底物;所述A液包括发光剂、稳定剂和增强剂,所述发光剂为鲁米诺,所述增强剂为4'-羟基联苯基4-羧酸,所述稳定剂包括焦亚硫酸钠;所述B液包括过氧化氢。

[0020] 作为优选的,所述稳定剂还包括木糖和原钒酸钠。

[0021] 作为优选的,所述A液还包括碳酸盐缓冲液。

[0022] 作为优选的,所述A液中鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠的浓度分别为2~7mM、0.3~1mM、30~100μM、10~100mM、100~500μM,余量为碳酸盐缓冲液,所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.2M,pH为9~10。

[0023] 作为优选的,所述B液还包括醋酸盐缓冲液。

[0024] 作为优选的,所述B液中过氧化氢的浓度为3~5mM,余量为醋酸盐缓冲液,所述醋酸盐缓冲液的浓度为0.05M,pH为4.5~5.5。

[0025] 作为优选的,所述A液与所述B液的体积比为1:1。

[0026] 实施例1配制增强型化学发光底物

[0027] 1、用碳酸氢钠和碳酸钠配制pH为9.6的碳酸盐缓冲液,碳酸盐的浓度为0.2M,用醋酸和氢氧化钠配制pH为5.0的醋酸盐缓冲液,醋酸盐的浓度为0.05M。

[0028] 2、制备A液:分别称取鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠溶于配制好的碳酸盐缓冲液中,配制好的A液中鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠的浓度分别为3mM、0.5mM、50μM、50mM、300μM。

[0029] 3、制备B液:取过氧化氢溶于配制好的醋酸盐缓冲液中,过氧化氢的浓度为4mM。

[0030] 使用时将A液和B液以1:1的体积比混合。

[0031] 实施例2配制增强型化学发光底物

[0032] 1、用碳酸氢钠和碳酸钠配制pH为10的碳酸盐缓冲液,碳酸盐的浓度为0.2M,用醋酸和氢氧化钠配制pH为5.5的醋酸盐缓冲液,醋酸盐的浓度为0.05M。

[0033] 2、制备A液:分别称取鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸

钠溶于配制好的碳酸盐缓冲液中,配制好的A液中鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠的浓度分别为2mM、1mM、30μM、100mM、100μM。

[0034] 3、制备B液:取过氧化氢溶于配制好的醋酸盐缓冲液中,过氧化氢的浓度为3mM。

[0035] 使用时将A液和B液以1:1的体积比混合。

[0036] 实施例3配制增强型化学发光底物

[0037] 1、用碳酸氢钠和碳酸钠配制pH为9的碳酸盐缓冲液,碳酸盐的浓度为0.2M,用醋酸和氢氧化钠配制pH为4.5的醋酸盐缓冲液,醋酸盐的浓度为0.05M。

[0038] 2、制备A液:分别称取鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠溶于配制好的碳酸盐缓冲液中,配制好的A液中鲁米诺、4'-羟基联苯基4-羧酸、焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠的浓度分别为7mM、0.3mM、100μM、10mM、500μM。

[0039] 3、制备B液:取过氧化氢溶于配制好的醋酸盐缓冲液中,过氧化氢的浓度为5mM。

[0040] 使用时将A液和B液以1:1的体积比混合。

[0041] 试验例1稳定剂对增强型化学发光底物本底值的影响

[0042] 采用实施例1中制备的增强型化学发光底物,将A液和B液混合后,在不同时间利用Synergy-H1全功能微孔板检测仪连续测定在不同时间点的实施例1的化学发光底物的本底值。对照组在实施例1配方的基础上不添加稳定剂焦亚硫酸钠、木糖和原钒酸钠。每组做3个平行,结果如下:

时间 (min)	实施例1中发光底物 的本底值			不加稳定剂的发光底物 的本底值		
0	38	39	55	751	772	716
3	39	47	38	890	978	802
6	43	45	60	982	1158	868
9	53	46	35	1048	1241	989
12	39	31	34	1071	1265	1023
15	41	33	44	1071	1240	1018
18	40	46	53	1071	1278	1123
21	41	39	49	1079	1308	1080
24	48	45	57	1081	1328	1066
27	46	40	49	1098	1307	1050
30	50	53	55	1155	1283	1090
平均值	43.45	42.18	48.09	1027.00	1196.18	984.09

[0044] 结果表明,本发明实施例1制备的增强型化学发光底物的发光本底值低。

[0045] 试验例2pH以及缓冲体系对增强型化学发光底物发光强度的影响

[0046] 配制不同pH值以及不同缓冲体系的化学发光底物,其中A液的缓冲体系分别为0.2M pH为9.00的Tris-HCL缓冲液以及pH为9.00、9.60、10.00、11.00的浓度为0.2M的碳酸盐缓冲液,其他同实施例1,取A液和B液各75μL混合,取10μL 500ng/mL的辣根过氧化物酶加入A液和B液的混合溶液中,利用Synergy-H1全功能微孔板检测仪连续测定在不同时间点的不同pH值的化学发光底物发光信号强度,结果如图1所示,本发明的化学发光底物的最适pH为9~10,优选pH 9.60。

[0047] 试验例3增强型化学发光底物的发光强度比较

[0048] 1、比较实施例1制备的化学发光底物与赛默飞的Thermo Pierce ECL的发光强度。

[0049] 取实施例1中A液和B液各75 $\mu$ L混合,取10 $\mu$ L 500ng/mL的辣根过氧化物酶加入A液和B液的混合溶液中,同时取赛默飞的Thermo Pierce ECL的A液和B液各75 $\mu$ L同时混合,取10 $\mu$ L 500ng/mL的辣根过氧化物酶加入A液和B液的混合溶液中。利用Synergy-H1全功能微孔板检测仪连续测定在不同时间点两种发光底物的发光强度结果如图2所示,本发明实施例1中制备的增强型化学发光底物的发光强度远远高于Thermo Pierce ECL的发光强度,且其信号响应速度快,信号平台期长。

[0050] 2、免疫检测分析

[0051] 本发明的化学发光底物可以应用于过氧化物酶标记的免疫检测分析中。用本发明实施例1中制备的化学发光底物进行Westernbot实验,同时选用市面上的碧云天、赛默飞公司的以鲁米诺作为发光剂的发光底物以及文献中的配方配制的发光底物作为对照,碧云天和赛默飞的产品按照产品操作说明书进行配制,采用文献中的配方配制的发光底物增强剂为对碘苯酚不含稳定剂,其他同实施例1。

[0052] 其中碧云天的产品Beyo ECL Plus (超敏ECL化学发光试剂盒) 货号P0018S。

[0053] 具体实验过程如下:

[0054] 1) 提取小鼠脑组织的总蛋白;2) 用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定;3) 沸水浴进行蛋白变性;4) SDS-PAGE电泳,电泳时将蛋白进行梯度稀释,使得每个孔中自左至右蛋白量分别为20 $\mu$ g、10 $\mu$ g、5 $\mu$ g和2.5 $\mu$ g;5) 转膜;6) 免疫反应:a、将转好的膜于室温下脱色摇床上用5%的脱脂牛奶(5%的TBST配),封闭1h;b、稀释一抗,选取一抗为Actin,浓度为1mg/ml,2000倍稀释(稀释液为TBST溶解的5%脱脂牛奶),每8 $\times$ 1cm<sup>2</sup>的膜加3.5ml一抗稀释液,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;c、用TBST在室温下脱色摇床上洗三次,每次5min;d、将连接有辣根过氧化物酶的二抗用TBST稀释3000倍,每8 $\times$ 1cm<sup>2</sup>的膜加3ml二抗稀释液,室温下孵育30min后,用TBST在室温下脱色摇床上洗三次,每次5min;

[0055] 7) 化学发光:在暗室中将A液和B液两种试剂在离心管中等体积混合,在曝光匣上贴双层手套或者其他透明薄膜,将PVDF膜的蛋白面朝上放在曝光匣两层薄膜之间,每8 $\times$ 1cm<sup>2</sup>的PVDF膜上加入混合好的400 $\mu$ LA液和B液的混合溶液开始曝光,曝光后的胶片用显影、定影试剂进行显影和定影。结果如图3所示,其中BIPCA为采用本发明实施例1的发光底物,IOP为根据文献配制的发光底物组,Beyotime为使用碧云天的发光底物组,PierceECL为使用赛默飞的发光底物组,相同的曝光时间的情况下,BIPCA组的条带相比IOP组和Beyotime组更明显,Pierce ECL组的曝光时间比BIPCA的更长,但是条带不如BIPCA明显,说明实施例1中制备的增强型化学发光底物其发光强度更高,检测的灵敏度更高,且曝光反应时间短。

[0056] 3、增强型化学发光底物的检测灵敏性分析

[0057] 用本发明实施例1中制备的化学发光底物与市售的发光底物对比,提取小鼠脑组织总蛋白进行Westernblot实验,图中自左至右每个条带所含总蛋白量分别为5 $\mu$ g、2.5 $\mu$ g、1.25 $\mu$ g和0.625 $\mu$ g,一抗为Actin,按照1:2000稀释,二抗按照1:3000稀释,连续曝光不同的时间,结果如图4所示,其中每张图片中上下两条条带分别为用本实施例1制备的化学发光底物和市售的发光底物(碧云天),右上角为曝光的序号以及时长,本发明制备的化学发光底物的灵敏度比市售的发光底物高,并且化学发光的光信号稳定,在本试验例的浓度下,市

售的发光底物在第4次检测时已经不到光信号,只有曝光时间30s才能检测到非常微弱的光信号。

[0058] 实施例2和实施例3制备的化学发光底物的本底发光值低,检测灵敏度也高于对照组,且发光持续时间长,稳定性好。

[0059] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

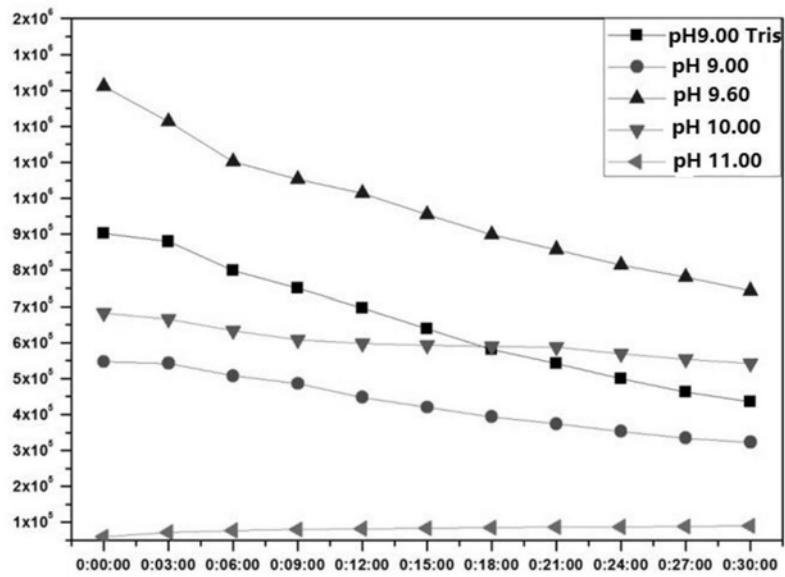


图1

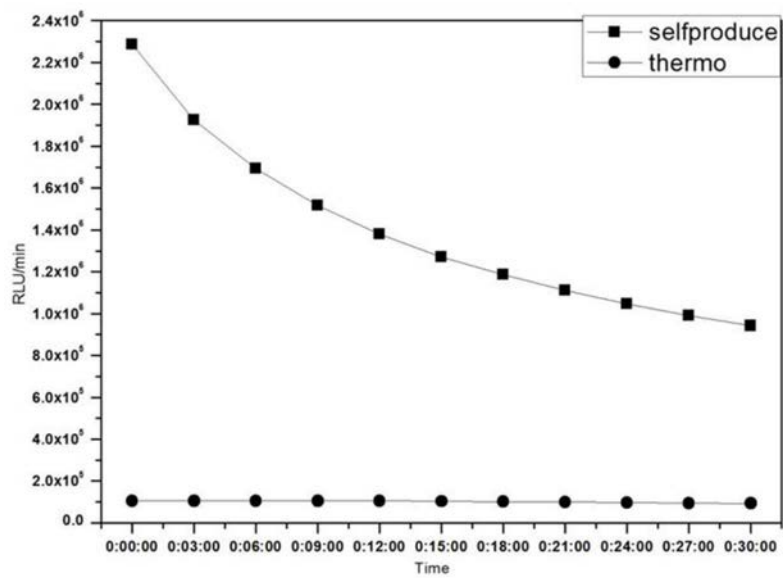


图2



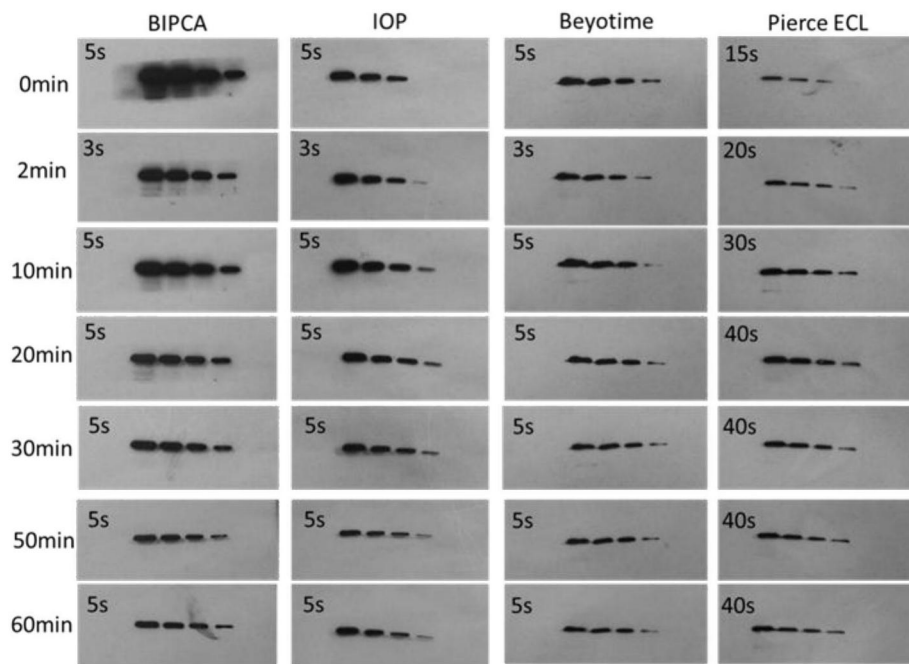


图3

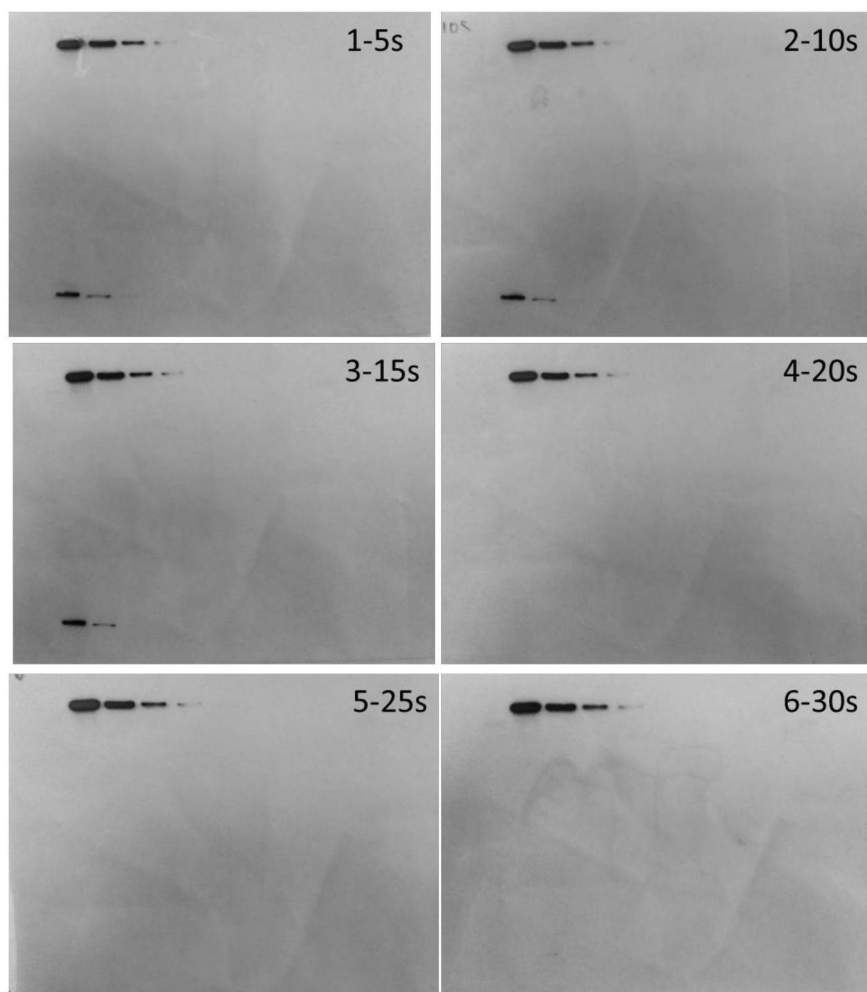


图4

专利名称(译)	一种增强型化学发光底物及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110041913A</a>	公开(公告)日	2019-07-23
申请号	CN201910284013.9	申请日	2019-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	武汉赛维尔生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉赛维尔生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉赛维尔生物科技有限公司		
[标]发明人	赵红洲 张高英		
发明人	赵红洲 张高英		
IPC分类号	C09K11/06 G01N21/76 G01N33/535		
CPC分类号	C09K11/06 C09K2211/1044 G01N21/76 G01N33/535		
代理人(译)	杨立		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及免疫检测分析领域，具体涉及一种增强型化学发光底物，其为由分开保存的A液和B液组成的2液型化学发光底物，所述A液包含发光剂、增强剂和稳定剂，所述发光剂为鲁米诺，所述增强剂为4'-羟基联苯基4-羧酸，所述稳定剂包含焦亚硫酸钠；所述B液包含过氧化氢。本发明的增强型化学发光底物的信号响应速度快，化学发光本底值低，发光信号强度高，检测灵敏度高，信号平台期长。

