



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111024959 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911324583.2

(22)申请日 2019.12.20

(71)申请人 深圳市蔚景生物科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市坪山区龙田街  
道竹坑社区聚龙山片区金威源工业厂  
区C栋厂房801

(72)发明人 董婷 王亚磊

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有  
限公司 44281

代理人 彭愿洁 彭家恩

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

一种稳定的蛋白质溶液、其制备方法及检测  
试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种稳定的蛋白质溶液,该蛋白质溶液包含缓冲液及含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物,该血红素辅基中的亚铁离子与一氧化碳结合,可以防止该蛋白质或者蛋白质缀合物在储存过程中被氧化而变性,从而提高该蛋白质溶液的稳定性。该蛋白质溶液还可包含其他稳定剂。本发明的蛋白质溶液在2-8℃下可以稳定保存至少1年,具有良好的稳定性,可以用于制备化学发光检测试剂盒或者酶联免疫检测试剂盒,例如检测胃泌素17、胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的检测试剂盒。

1. 一种稳定的蛋白质溶液,其特征在于,所述蛋白质溶液包含缓冲液及含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物,所述血红素辅基中的亚铁离子与一氧化碳结合。

2. 根据权利要求1所述的蛋白质溶液,其特征在于,所述蛋白质溶液还包含具有稳定作用的蛋白质稳定剂、金属盐、碱性或中性氨基酸、多羟基化合物、多羟基聚合物及防腐剂中的一种或者多种。

3. 根据权利要求2所述的蛋白质溶液,其特征在于,所述具有稳定作用的蛋白质稳定剂为氨基比林、纤维蛋白原、白蛋白或明胶,所述具有稳定作用的金属盐为 $MgSO_4$ 或 $ZnSO_4$ ,所述具有稳定作用的碱性或中性氨基酸为精氨酸、组氨酸、赖氨酸或甘氨酸,所述具有稳定作用的多羟基化合物为甘油、糖醇或低聚糖,所述具有稳定作用的多羟基聚合物为聚乙二醇,所述具有稳定作用的防腐剂为 $NaN_3$ 或Procline。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的蛋白质溶液,其特征在于,所述含有血红素辅基的蛋白质为血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素C氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶。

5. 根据权利要求4所述的蛋白质溶液,其特征在于,所述过氧化物酶为辣根过氧化物酶。

6. 根据权利要求5所述的蛋白质溶液,其特征在于,所述辣根过氧化物酶与抗体缀合形成辣根过氧化物酶-抗体缀合物。

7. 根据权利要求6所述的蛋白质溶液,其特征在于,所述抗体为抗胃泌素17抗体、抗胃蛋白酶原I抗体或抗胃蛋白酶原II抗体。

8. 一种制备根据权利要求1-7中任一项所述的蛋白质溶液的方法,其特征在于,所述方法包括:

将所述含有血红素辅基的蛋白质或者所述含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物溶于所述缓冲液中;

向所得溶液充入一氧化碳;

任选地,还加入所述蛋白质稳定剂、所述金属盐、所述碱性或中性氨基酸、所述多羟基化合物、所述多羟基聚合物及所述防腐剂中的一种或者多种,得到所述蛋白质溶液。

9. 一种检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包含根据权利要求1-7中任一项所述的蛋白质溶液。

10. 根据权利要求9所述的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒为化学发光检测试剂盒或酶联免疫检测试剂盒。

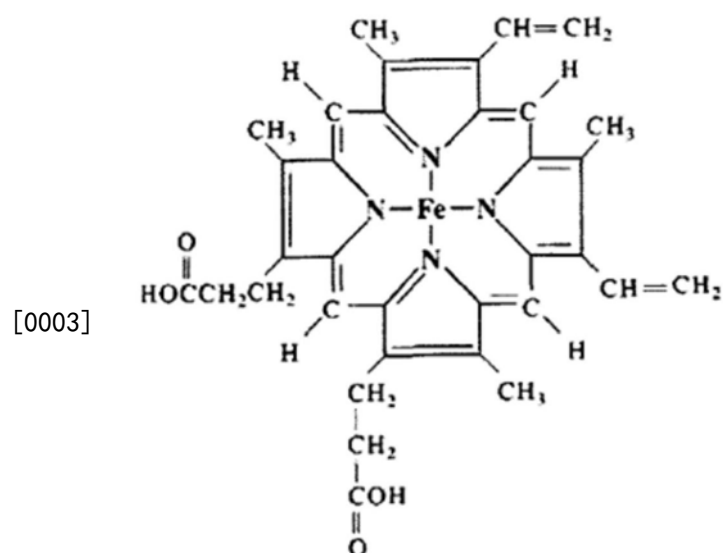
## 一种稳定的蛋白质溶液、其制备方法及检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生化检测技术领域,具体涉及一种稳定的蛋白质溶液,其中蛋白质为含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物,本发明还涉及该蛋白质溶液的制备方法,以及包含该蛋白质溶液的检测试剂盒,例如化学发光检测试剂盒或者酶联免疫检测试剂盒。

### 背景技术

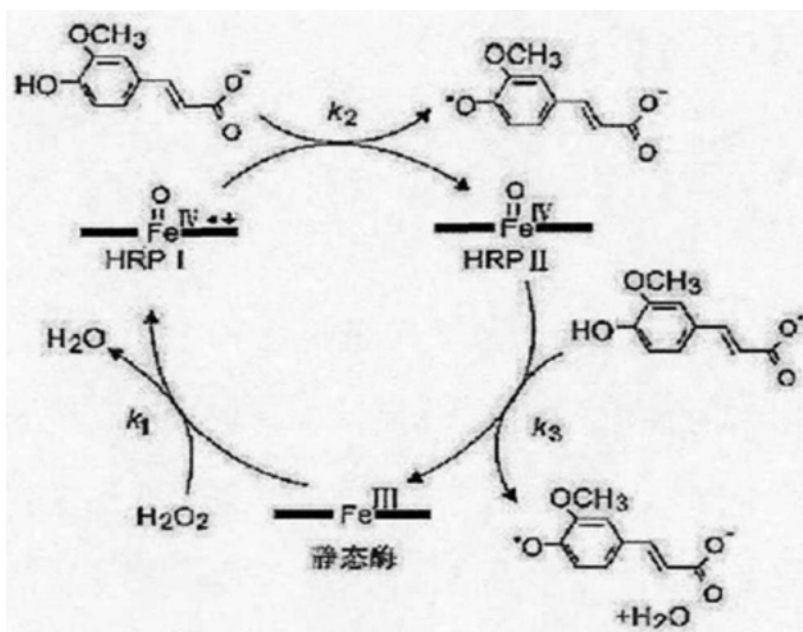
[0002] 血红素是一些蛋白质的重要组成成分,如血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素C氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶等都含有血红素,这些蛋白质在生物体内都有重要的生理功能。血红素是一个由亚铁(II)离子和原卟啉IX形成的金属卟啉配位化合物(参见以下所示的血红素结构式)。亚铁(II)离子被卟啉环的4个氮原子以配位键键合,配位数为4。



血红素结构式

[0004] 以辣根过氧化物酶(HRP)为例。HRP是一种十分常见的过氧化物酶,可以由多种来源提取得到,其催化活性中心含有一个血红素辅基结构。HRP的分子量大约在44000道尔顿左右,通常在pH=5的条件下有最佳的催化活性。在HRP的催化反应过程中,HRP首先与过氧化物(例如过氧化氢)结合,此时HRP分子上含有亚铁卟啉结构的活性中心被氧化,生成中间体(HRP I)。该中间体与还原性底物(例如阿魏酸)反应,最终被还原为原始的HRP,完成一个反应循环(参见以下所示的HRP反应循环,其中以阿魏酸为还原性底物)。值得注意的是,过氧化氢虽然是HRP的底物,但是高浓度的过氧化氢会对HRP的活性产生抑制作用。

[0005]



[0006] HRP反应循环(其中以阿魏酸为还原性底物)

[0007] HRP的用途十分广泛,可以应用于酶分析、化学发光测试、免疫测定以及废水处理等方面。HRP最常见的用途之一是免疫检测方面的应用,即可用于化学发光测定和酶联免疫吸附测定中。在制备化学发光测定以及酶联免疫吸附测定的检测试剂盒时,需要将HRP与抗体偶联,生成HRP标记抗体(即HRP-抗体结合物),然后再将HRP标记抗体加入稀释液中配制成HRP标记抗体溶液,作为试剂盒的一部分。

[0008] 在上述HRP应用中,HRP需要在不同的环境条件(例如各种体外环境)下进行催化反应,而这些环境通常不是HRP发挥其天然功能的环境。影响HRP在体外环境中发挥功能的一个主要限制因素在于其稳定性,而影响HRP的稳定性原因一是酶蛋白三维结构不稳定,二是其血红素辅基结构中的亚铁离子易与空气中的氧气结合而被氧化,造成酶变性甚至失活。可以预见,含有血红素的蛋白质(酶)如血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素C氧化酶、过氧化氢酶以及HRP之外的过氧化物酶等也因同样的原因而存在稳定性问题,进而影响蛋白质的功能,例如酶的催化功能。

[0009] 因此,如何尽可能保持含有血红素辅基的蛋白质(例如HRP)在体外环境的稳定性和催化功能,这是酶学领域一个极为重要的课题。目前已有许多用于提高稳定性的方法,例如加入抗氧化剂、蛋白质稳定剂、金属盐、碱性或中性氨基酸、多羟基化合物、多羟基聚合物来使蛋白质稳定。但是,这些方法在应用于一些需要长期保持蛋白质的高活性的场合仍然具有一定的局限。例如,市售的加入了抗体保护剂和稳定剂的HRP标记抗体稀释液一般只能使HRP标记抗体在2-8℃稳定保存半年。

## 发明内容

[0010] 本发明的目的在于提高含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物的溶液的稳定性,提供稳定的蛋白质溶液,并将该稳定的蛋白质溶液应用于检测试剂盒。

[0011] 本发明的目的通过以下技术方案来实现:

[0012] 在第一方面,本发明提供一种稳定的蛋白质溶液,该蛋白质溶液包含缓冲液及含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物,该血红素辅基中的亚铁离子与一氧化碳结合。

[0013] 进一步地,该蛋白质溶液还包含具有稳定作用的蛋白质稳定剂、金属盐、碱性或中性氨基酸、多羟基化合物、多羟基聚合物及防腐剂中的一种或者多种。

[0014] 进一步地,该具有稳定作用的蛋白质稳定剂为氨基比林、纤维蛋白原、白蛋白或明胶,该具有稳定作用的金属盐为 $MgSO_4$ 或 $ZnSO_4$ ,该具有稳定作用的碱性或中性氨基酸为精氨酸、组氨酸、赖氨酸或甘氨酸,该具有稳定作用的多羟基化合物为甘油、糖醇或低聚糖,该具有稳定作用的多羟基聚合物为聚乙二醇,该具有稳定作用的防腐剂为 $NaN_3$ 或Procline。

[0015] 进一步地,该含有血红素辅基的蛋白质为血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素C氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶。

[0016] 进一步地,该过氧化物酶为辣根过氧化物酶。

[0017] 进一步地,该辣根过氧化物酶与抗体缀合形成辣根过氧化物酶-抗体缀合物。

[0018] 进一步地,该抗体为抗胃泌素17抗体、抗胃蛋白酶原I抗体或抗胃蛋白酶原II抗体。

[0019] 在第二方面,本发明提供一种制备本发明第一方面的蛋白质溶液的方法,该方法包括:

[0020] 将该含有血红素辅基的蛋白质或者该含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物溶于该缓冲液中;

[0021] 向所得溶液充入一氧化碳;

[0022] 任选地,还加入该蛋白质稳定剂、该金属盐、该碱性或中性氨基酸、该多羟基化合物、该多羟基聚合物及该防腐剂中的一种或者多种,得到该蛋白质溶液。

[0023] 在第三方面,本发明提供一种检测试剂盒,该检测试剂盒包含本发明第一方面的蛋白质溶液。

[0024] 作为具体的例子,该检测试剂盒为化学发光检测试剂盒或酶联免疫检测试剂盒。

[0025] 本发明的有益效果:

[0026] 本发明的蛋白质溶液中的含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物经过一氧化碳处理,血红素辅基中的亚铁离子与一氧化碳结合,可以防止该蛋白质或者蛋白质缀合物在储存过程中被氧化而变性,从而提高本发明的蛋白质溶液的稳定性。

[0027] 本发明的蛋白质溶液还可以包含具有稳定作用的蛋白质稳定剂、金属盐、碱性或中性氨基酸、多羟基化合物、多羟基聚合物及防腐剂中的一种或者多种,与一氧化碳的稳定作用协同作用,进一步提高本发明蛋白质溶液的稳定性。

[0028] 经测定,本发明的蛋白质溶液在2-8℃下可以稳定保存至少1年,具有良好的稳定性,可以用于制备化学发光检测试剂盒或者酶联免疫检测试剂盒,例如检测胃泌素17、胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的试剂盒。

## 具体实施方式

[0029] 下面通过具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0030] 蛋白质尤其是具有催化活性的酶的稳定性是生物化学领域关注的问题之一。蛋白质的稳定性关系到蛋白质功能活性的发挥和蛋白质应用的有效性。例如,一些检测试剂盒包含酶,而检测试剂盒可能在使用之前经历长期储存,因为酶溶液的微环境或者试剂盒所处的环境条件,酶的活性会随时间推移而下降,影响试剂盒的检测效果。

[0031] 蛋白质溶液在储存过程中会发生多种物理和/或化学变化而影响蛋白质的稳定性,这些物理和/或化学变化包括脱酰胺反应、氧化、水解、消旋、 $\beta$ -消除、变性、吸附、聚集或沉淀等。通常,可以通过在蛋白质溶液中加入具有稳定作用的蛋白质稳定剂、金属盐、碱性或中性氨基酸、多羟基化合物、多羟基聚合物及防腐剂中的一种或者多种来提高蛋白质溶液的稳定性。

[0032] 有一些蛋白质含有血红素辅基,如血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素C氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶。本文所用的术语“含有血红素辅基的蛋白质”是指在其结构中含有血红素辅基的蛋白质。这些蛋白质在生物体内都有重要的生理功能,并且也是生化检测中常用的试剂,例如过氧化氢酶和过氧化物酶。过氧化物酶是由微生物或植物所产生的一类氧化还原酶,以铁卟啉为辅基,可催化过氧化氢,氧化酚类和胺类化合物和烃类氧化产物,具有消除过氧化氢和酚类、胺类、醛类、苯类毒性的双重作用,可应用于污水处理,而在生化检测领域,过氧化物酶在多种试剂盒(如ELISA试剂盒)中作为显示体系的关键成分,对试剂盒的质量有重要影响。过氧化物酶通常来自辣根,所以也常称为辣根过氧化物酶。

[0033] 在蛋白质领域,例如酶学领域,通常将一种蛋白质与另一种蛋白质缀合以形成蛋白质缀合物。本文所用的术语“含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物”即含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质缀合形成的蛋白质缀合物。例如,其他蛋白质可以为抗体,含有血红素辅基的蛋白质可以作为抗体标记物,从而形成含有血红素辅基的蛋白质标记的抗体,即含有血红素辅基的蛋白质与抗体的缀合物。更具体地,含有血红素辅基的蛋白质可以为辣根过氧化物酶,抗体可以为抗胃泌素17(G17)抗体,由此形成辣根过氧化物酶标记的抗胃泌素17抗体,即辣根过氧化物酶-抗胃泌素17抗体缀合物,简称HRP-G17缀合物。或者,含有血红素辅基的蛋白质可以为辣根过氧化物酶,抗体可以为胃蛋白酶原I或胃蛋白酶原II,由此形成辣根过氧化物酶标记的抗胃蛋白酶原I抗体或抗胃蛋白酶原II抗体。

[0034] 血红素是一个由亚铁(II)离子和原卟啉IX形成的金属卟啉配位化合物,亚铁(II)离子被卟啉环的4个氮原子以配位键键合。亚铁(II)离子易被氧化,从而影响血红素的稳定性,进而影响包含血红素辅基的蛋白质的稳定性。一氧化碳极易与亚铁(II)离子结合,形成牢固的化学键,结合后使得亚铁(II)离子不易被氧化,从而保持了蛋白的稳定。由此,本发明人开发了本发明。

[0035] 本发明首先提供一种稳定的蛋白质溶液,该蛋白质溶液包含缓冲液及含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物,该血红素辅基中的亚铁离子与一氧化碳结合。

[0036] 本发明的蛋白质溶液通过血红素辅基中的亚铁离子与一氧化碳结合而提高了稳定性。

[0037] 本发明对该缓冲液没有具体的限制,可以使用各种通常用于配制蛋白质溶液的缓冲液,例如柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液。本发明对缓冲液的浓度也没有具体的限制,可以按照蛋白质的性质、缓冲液的性质、蛋白质溶液的应用来设定。作为非限制

性例子,HRP-G17缀合物的溶液采用柠檬酸盐缓冲液,浓度在5-40mM之间,优选10-30mM之间,pH可在6.0-7.5之间,优选6.5-7.0之间。

[0038] 为了进一步提高本发明的蛋白质溶液的稳定性,蛋白质溶液还包含具有稳定作用成分,例如具有稳定作用的蛋白质稳定剂、金属盐、碱性或中性氨基酸、多羟基化合物、多羟基聚合物及防腐剂中的一种或者多种。

[0039] 这些具有稳定作用的成分和浓度是本领域熟知的,或者可以根据需要来确定。作为非限制性的例子,具有稳定作用的蛋白质稳定剂可以为氨基比林、纤维蛋白原、白蛋白或明胶,其中氨基比林的浓度可以在1-5g/L之间,优选1-2g/L之间,纤维蛋白原的浓度可以在0.2-0.6g/L之间,优选0.3-0.5g/L之间,白蛋白或明胶的浓度可以在0.05-0.15g/L之间,优选0.075-0.12g/L之间。具有稳定作用的金属盐可以为MgSO<sub>4</sub>或ZnSO<sub>4</sub>,其浓度可以在0.05-0.25mol/L之间,优选0.15-0.20mol/L。金属离子可以改变蛋白质的表面自由能,在一定条件下可以使蛋白质的结构更加紧密,硫酸盐对蛋白质-水表面自由能的作用最强。具有稳定作用的碱性或中性氨基酸可以为精氨酸、组氨酸、赖氨酸或甘氨酸,其浓度可以在1-20mM之间,优选4-16mM之间。具有稳定作用的多羟基化合物可以为甘油、糖醇(如甘露醇、木糖醇、山梨醇)或低聚糖(如海藻糖、甘露糖、木糖)等,优选甘油、甘露醇和海藻糖,具有稳定作用的多羟基聚合物可以为聚乙二醇聚合物,如PEG8000、PEG10000、PEG20000等,优选PEG10000、PEG20000。甘油的浓度可在2-6%之间,优选3-5%之间;甘露醇、海藻糖和PEG的浓度可在0.2-0.8%之间,优选0.4-0.6%之间。防腐剂可以为NaN<sub>3</sub>或Procline,浓度可以在0.05%-0.10%之间。

[0040] 本发明还提供一种制备本发明的蛋白质溶液的方法,该方法包括:

[0041] 将该含有血红素辅基的蛋白质或者该含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物溶于该缓冲液中;

[0042] 向所得溶液充入一氧化碳;

[0043] 任选地,还加入该蛋白质稳定剂、该金属盐、该碱性或中性氨基酸、该多羟基化合物、该多羟基聚合物及该防腐剂中的一种或者多种,得到该蛋白质溶液。

[0044] 缓冲液、蛋白质稳定剂、金属盐、碱性或中性氨基酸、多羟基化合物、多羟基聚合物及防腐剂可根据所配制的蛋白质溶液的具体情况了选择其种类和浓度。向所得溶液充入一氧化碳则可通过将一氧化碳鼓泡通过该所得溶液来实现。一氧化碳鼓泡的速度可以为2-4个泡/秒,鼓泡的时间可以在0.5-2小时之间,优选0.75-1.25小时之间。

[0045] 制备得到的蛋白质溶液可在2-8℃下稳定保存12个月,满足产品稳定性要求。

[0046] 基于本发明的蛋白质溶液,本发明还提供一种检测试剂盒,该检测试剂盒包含该蛋白质溶液。该检测试剂盒除了包含该蛋白质溶液,还包含酶标板(包被有胃蛋白酶原I、胃蛋白酶原II和胃泌素-17抗体)、20×浓缩洗涤液、校准品、底物液、终止液等。在本发明的一些实施方案中,该检测试剂盒为化学发光检测试剂盒。在本发明的另一些实施方案中,该检测试剂盒为酶联免疫检测试剂盒。

[0047] 在本发明的一个实施方案中,该蛋白质溶液包含HRP标记的抗体,如HRP标记的抗胃泌素17抗体、HRP标记的胃蛋白酶原I和HRP标记的胃蛋白酶原II,可用于检测胃分泌物中的胃泌素17、胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II,以进行胃病(如胃癌)的检测。

[0048] 以下通过具体实施例对本发明作进一步的举例说明。这些实施例是示例性的,并

不意在以任何方式限制本发明。

[0049] 实施例1

[0050] 本实施例采用HRP (国药集团化学试剂有限公司) 标记的抗胃泌素17抗体 (HRP标记抗体试剂原液) 进行试验。以2-4个泡/秒的流量向该HRP标记抗体试剂原液中通入一氧化碳(CO) 1小时, 对HRP中的血红素进行处理。然后, 将经处理的该HRP标记抗体试剂原液以1:2000 (体积比) 的比例加入到表1所示的蛋白质稀释液配方1中, 配制成HRP标记抗体稀释溶液。

[0051] 表1: 蛋白质稀释液配方1

| 组分                                                    | 每升用量    |
|-------------------------------------------------------|---------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O | 5.2g    |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O  | 0.62g   |
| 氯化钠                                                   | 8.5g    |
| 酪蛋白                                                   | 1g      |
| BSA                                                   | 20g     |
| Proclin-300                                           | 0.5mL   |
| 纯化水                                                   | 1000    |
| pH                                                    | 7.4±0.2 |

[0053] 将配制好的HRP标记抗体稀释溶液在37℃环境下做加速稳定性试验, 在第0天、第7天和第14天, 用胃泌素17抗原的在K3酶标仪 (Labserve) 上进行检测, 检测步骤如下所示:

[0054] 配液: 将20×浓缩洗涤液 (自制) 用纯化水1:20稀释成洗涤液备用;

[0055] 编号: 将样本对应酶标仪微孔按顺序编号;

[0056] 加入抗原: 分别在相应微孔中加入胃泌素17抗原的系列稀释液和空白液 (胃泌素17抗原浓度分别为1000、500、250、100、20、0pg/mL) 50μL, 轻轻振荡混匀;

[0057] 温育: 用盖板膜封板后, 将酶标仪置于37℃温育60分钟;

[0058] 洗涤: 将微孔内液体甩干, 用洗涤液充分洗涤4遍;

[0059] 加入抗体: 每个微孔加入HRP标记抗体稀释溶液100μL, 轻轻振荡混匀;

[0060] 温育: 用盖板膜封板后, 将酶标仪置于37℃温育30分钟;

[0061] 洗涤: 将微孔内液体甩干, 用洗涤液充分洗涤4遍;

[0062] 显色: 每个微孔加入显色液A (主要成分为柠檬酸缓冲液、过氧化氢脲)、B液 (主要成分为四甲基联苯胺 (TMB) 溶液) 各50μL, 轻轻振荡混匀, 37℃避光显色15分钟;

[0063] 测定: 每个微孔加终止液 (主要成分为硫酸) 50μL, 轻拍混匀, 酶标仪设定450nm处, 用空白微孔调零后测定OD值, 测定结果如表2所示。

[0064] 表2: 实施例1的37℃加速稳定性试验结果

|        |                        |       |       |       |
|--------|------------------------|-------|-------|-------|
| [0065] | 胃泌素 17 抗原<br>浓度(pg/mL) | 0 天   | 7 天   | 14 天  |
|        |                        | OD 值  |       |       |
|        | 0                      | 0.055 | 0.053 | 0.056 |
|        | 20                     | 0.386 | 0.356 | 0.312 |
|        | 100                    | 1.015 | 0.946 | 0.938 |
|        | 250                    | 1.806 | 1.678 | 1.702 |
|        | 500                    | 2.272 | 2.124 | 2.217 |
|        | 1000                   | 2.506 | 2.450 | 2.380 |

[0066] 由表2可见,本实施例中HRP标记抗体试剂原液经过一氧化碳(CO)处理,配制的HRP标记抗体稀释溶液在37℃加速稳定性试验中,直到第14天,测得的OD值都没有明显降低,表明一氧化碳(CO)处理能使HRP标记抗体稳定,HRP的酶活性得到保持。

[0067] 对比例1

[0068] 本对比例与实施例1基本相同,不同的是HRP标记抗体试剂原液不经一氧化碳处理,直接以1:2000(体积比)的比例加入到表1所示的蛋白质稀释液配方1中,配制成HRP标记抗体稀释溶液。按同样的方法检测配制好的HRP标记抗体稀释溶液,结果如表3所示。

[0069] 表3:对比例1的37℃加速稳定性试验结果

|        |                        |       |       |       |
|--------|------------------------|-------|-------|-------|
| [0070] | 胃泌素 17 抗原<br>浓度(pg/mL) | 0 天   | 7 天   | 14 天  |
|        |                        | OD 值  |       |       |
|        | 0                      | 0.058 | 0.052 | 0.071 |
|        | 20                     | 0.405 | 0.064 | 0.058 |
|        | 100                    | 1.053 | 0.172 | 0.067 |
|        | 250                    | 1.845 | 0.431 | 0.095 |
|        | 500                    | 2.308 | 0.754 | 0.145 |
|        | 1000                   | 2.514 | 1.622 | 0.248 |

[0071] 由表3可见,对比例中的HRP标记抗体稀释溶液不经过一氧化碳(CO)处理,配制的HRP标记抗体稀释溶液在37℃加速稳定性试验中,第7天测得的OD值与第0天测得的OD值相比就显示出大幅降低,表明不经过一氧化碳(CO)处理,HRP标记抗体稀释溶液不稳定,HRP的酶活性很快下降。

[0072] 实施例2

[0073] 本实施例与实施例1相同,包括对HRP标记抗体试剂原液进行一氧化碳(CO)处理,

不同的是蛋白质稀释液采用表4所示的蛋白质稀释液配方2来配制成HRP标记抗体稀释溶液。

[0074] 表4:蛋白质稀释液配方2

|        |              |         |
|--------|--------------|---------|
| [0075] | 组分           | 每升用量    |
|        | 氨基比林         | 1.0g    |
|        | 纤维蛋白原        | 0.3g    |
|        | 无水硫酸镁        | 18.0g   |
|        | 明胶           | 0.1g    |
|        | 甘氨酸          | 0.75g   |
|        | 海藻糖          | 5.0g    |
|        | Procline-300 | 0.5mL   |
|        | 一水合柠檬酸       | 0.294g  |
| [0076] | 二水柠檬酸三钠      | 5.471g  |
|        | 纯化水          | 1000    |
|        | pH           | 6.5-7.0 |

[0077] 按与实施例1相同的方式,对配制的HRP标记抗体稀释溶液进行37℃加速稳定性试验,结果如表5所示。

[0078] 表5:实施例2的37℃加速稳定性试验结果

|        |                        |       |       |       |
|--------|------------------------|-------|-------|-------|
| [0079] | 胃泌素 17 抗原<br>浓度(pg/mL) | 0 天   | 7 天   | 14 天  |
|        |                        | OD 值  |       |       |
|        | 0                      | 0.052 | 0.053 | 0.053 |
|        | 20                     | 0.413 | 0.385 | 0.345 |
|        | 100                    | 1.047 | 1.032 | 0.968 |
|        | 250                    | 1.934 | 1.893 | 1.814 |
|        | 500                    | 2.294 | 2.228 | 2.209 |
|        | 1000                   | 2.518 | 2.467 | 2.406 |

[0080] 由表5可见,本实施例中HRP标记抗体试剂原液经过一氧化碳(CO)处理,配制的HRP标记抗体稀释溶液在37℃加速稳定性试验中,直到第14天,测得的OD值都没有明显降低,表明一氧化碳(CO)处理能使HRP标记抗体稳定,HRP的酶活性得到保持。

[0081] 实施例3

[0082] 本实施例同样对HRP标记抗体试剂原液进行一氧化碳(CO)处理,并且采用实施例2的蛋白质稀释液配方2配制HRP标记抗体稀释溶液,是在实施例2加速稳定性基础上的试验。加速稳定性用来快速筛选最佳配方,长期稳定性是对配方的最终确认,可以更加具体地对各个性能指标进行确认。在2-8℃环境下进行长期稳定性试验,考察试验的准确度(回收率)、最低检测限、精密度和线性关系。

[0083] 1.准确度

[0084] 选择低浓度检测样本3mL,分为3份,每份1mL。在其中2份样本中加入0.1mL不同浓度待测物高值标准液(400pg/mL、800pg/mL),使终浓度在50-1000pg/mL间,制成待回收分析样本。在另一份样本中加入同样体积的无待测物的溶剂,制成基础样本。用HRP标记抗体稀释溶液对待回收分析样本和基础样本进行测定,重复测定3次,取其均值计算回收率R。要求回收率应在85%-115%范围内。

$$[0085] \quad R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

[0086] 式中:

[0087] R-回收率;

[0088] V-加入待测物标准液的体积;

[0089]  $V_0$ -基础样本的体积;

[0090] C-基础样本加入待测物质后的检测浓度;

[0091]  $C_0$ -基础样本的检测浓度;

[0092]  $C_s$ -待测物标准液的浓度。

[0093] 2.最低检测限

[0094] 用零浓度参考品作为样品重复测量20次,计算20次测量的OD均值(M)和标准差(SD),得出 $M+2SD$ 所对应的OD值,根据试剂盒标准曲线计算方程或者根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-A值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将 $M+2SD$ 对应OD值代入上述方程中,得出相应的浓度值,即为试剂盒的最低检测限。要求最低检测限应 $\leq 5\text{pg/mL}$ 。

[0095] 3.精密度

[0096] 取同一批号试剂盒,用两个不同浓度内部参考品作为样本进行检测(P1:40pg/mL、P2:100pg/mL),分别重复检测10次,计算测量值的平均值(M)和标准差(SD)。按式(4)计算变异系数(CV)。要求精密度应 $\leq 12.0\%$ 。

$$[0097] \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$[0098] \quad CV = SD/M \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

[0099] 式中:

[0100] CV-变异系数;

[0101] SD-标准差;

[0102] M-平均值。

[0103] 4.线性关系

[0104] 取浓度为1000pg/mL的高浓度内部参考品,用零浓度参考品按照1:1、1:3、1:9、1:

49的比例稀释至5个浓度,用HRP标记抗体稀释溶液分别测定这5个浓度梯度的样本,平行检测2次,计算其浓度的平均值,以稀释比例为横坐标x,浓度平均值为纵坐标y,进行最小二乘法直线拟合,并计算线性相关系数r。要求在20-1000pg/mL范围内,相关系数r值 $\geq 0.9900$ 。

$$[0105] \quad r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n})(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n})}} \dots\dots\dots (2)$$

[0106] 式中:

[0107] r-相关系数

[0108] X-稀释比例:

[0109] Y-浓度平均值:

[0110] n-稀释比例的数量。

[0111] 表6.HRP标记抗体稀释溶液在2-8℃环境下的长期稳定性试验结果

| 检测项目         | 浓度       | 技术要求     | 第0个月   | 第3个月   | 第6个月   | 第9个月   | 第12个月  | 第13个月  | 结论 |
|--------------|----------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
| 准确度          | 400pg/mL | 85%-115% | 97.8%  | 107.8% | 105.1% | 96.1%  | 108.9% | 97.1%  | 合格 |
|              | 800pg/mL | 85%-115% | 92.9%  | 89.7%  | 91.8%  | 93.4%  | 91.3%  | 91.6%  | 合格 |
| [0112] 最低检测限 | 空白样本     | <5pg/mL  | 2.28   | 3.39   | 2.91   | 4.68   | 3.75   | 1.02   | 合格 |
| 精密度          | 40pg/mL  | <12%     | 7.9%   | 8.1%   | 9.4%   | 8.9%   | 9.0%   | 9.3%   | 合格 |
|              | 100pg/mL | <12%     | 5.1%   | 3.6%   | 5.4%   | 4.0%   | 4.0%   | 5.5%   | 合格 |
| 线性关系         | 相关系数     | >0.9900  | 0.9992 | 0.9987 | 0.9997 | 0.9988 | 0.9992 | 0.9994 | 合格 |

[0113] 由表6可见,HRP标记抗体稀释溶液可在2-8℃的温度下稳定保存至少12个月。

[0114] 综上,实施例1和对比例1表明,HRP标记抗体试剂原液经过一氧化碳(CO)处理,配制的HRP标记抗体稀释溶液在37℃加速稳定性试验14天,HRP标记抗体保持稳定,HRP的酶活性得到保持。实施例2和实施例3表明,HRP标记抗体试剂原液经过一氧化碳(CO)处理,配制的HRP标记抗体稀释溶液在37℃加速稳定性试验14天,显示HRP标记抗体保持稳定,HRP的酶活性得到保持,并且在2-8℃环境下的长期稳定性试验13个月,显示可以稳定保存至少12个月。

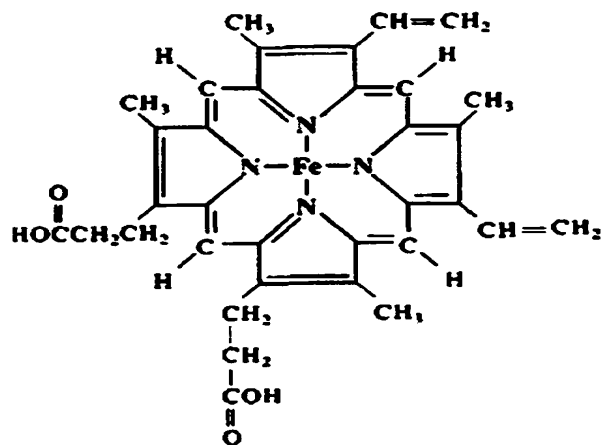
[0115] 本发明的核心在于用一氧化碳对血红素辅基进行处理,使血红素辅基中的亚铁离子与一氧化碳结合,避免亚铁离子氧化。因此,本发明的蛋白质溶液中的含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物能够稳定保存,包含本发明的蛋白质溶液的检测试剂盒如化学发光检测试剂盒或酶联免疫检测试剂盒具有长时间稳定的货架期。

[0116] 以上应用了具体实例对本发明进行了阐述,只是用于帮助理解本发明,并不用以限制本发明。本发明所属技术领域的技术人员依据本发明的构思,还可以做出若干简单推演、变形或替换。这些推演、变形或替换方案也落入本发明的权利要求范围内。

|         |                                                              |         |            |
|---------|--------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种稳定的蛋白质溶液、其制备方法及检测试剂盒                                       |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN111024959A</a>                                 | 公开(公告)日 | 2020-04-17 |
| 申请号     | CN201911324583.2                                             | 申请日     | 2019-12-20 |
| [标]发明人  | 董婷<br>王亚磊                                                    |         |            |
| 发明人     | 董婷<br>王亚磊                                                    |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/74 G01N33/573 G01N33/53                               |         |            |
| CPC分类号  | G01N33/5306 G01N33/573 G01N33/74 G01N2333/595 G01N2333/96477 |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>               |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供一种稳定的蛋白质溶液，该蛋白质溶液包含缓冲液及含有血红素辅基的蛋白质或者含有血红素辅基的蛋白质与其他蛋白质的蛋白质缀合物，该血红素辅基中的亚铁离子与一氧化碳结合，可以防止该蛋白质或者蛋白质缀合物在储存过程中被氧化而变性，从而提高该蛋白质溶液的稳定性。该蛋白质溶液还可包含其他稳定剂。本发明的蛋白质溶液在2-8℃下可以稳定保存至少1年，具有良好的稳定性，可以用于制备化学发光检测试剂盒或者酶联免疫检测试剂盒，例如检测胃泌素17、胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的检测试剂盒。



血红素结构式