



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110988367 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911129848.3

(22)申请日 2019.11.18

(71)申请人 迈克生物股份有限公司

地址 611731 四川省成都市高新区百川路
16号

(72)发明人 胡容 张凌燕

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有
限公司 11270

代理人 陈万青 张颖玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

权利要求书4页 说明书16页

(54)发明名称

一种贮存剂、用于检测LH的校准品及检测试剂盒

(57)摘要

本申请公开了一种贮存剂、用于检测LH的校准品及检测试剂盒。所述贮存剂用于稳定贮存抗原,包括:10-50mmol/L、pH为5.5~8的缓冲液,0.5-3g/L的8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐,5-70g/L的保护剂,和0.05-1mL/L的表面活性剂。本发明的贮存剂能够稳定贮存多种抗原,在加速稳定性试验中显示出优异的信号保留率,解决了诸如LH不能以溶液形式长期保存的问题,避免了以冻干形式提供校准品造成的检测步骤繁琐的问题。

1. 一种用于稳定贮存抗原的贮存剂,所述贮存剂包括:
10-50mmol/L, pH为5.5~8的缓冲液,
0.5-3g/L的8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐,
5-70g/L的保护剂,和
0.05-1mL/L的表面活性剂。
2. 根据权利要求1所述的贮存剂,其中所述8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐的用量为1.0~1.5g/L。
3. 根据权利要求1所述的贮存剂,其中所述缓冲液可选自Tris缓冲液、HEPES缓冲液、Mes缓冲液、磷酸缓冲液、醋酸缓冲液中的一种或多种,且所述缓冲液的pH值在5.5~8的范围内;优选地,所述保护剂为选自糖类、蛋白质类和醇类中的一种或多种。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的贮存剂,其中所述贮存剂还包括防腐剂和/或色素。
5. 一种校准品,所述校准品含有:抗原和根据权利要求1~4中任一项所述的贮存剂,其中所述抗原选自促黄体生成素LH、细胞白介素-6IL-6、 β -绒毛膜促性腺激素 β -HCG和抗穆勒试管激素AMH中的一种;优选地,所述抗原为浓度在0.1~200IU/L范围内的LH抗原。
6. 一种促黄体生成素免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:
校准品,所述校准品含有在0.1~200IU/L范围内的LH抗原和根据权利要求1~4中任一项所述的贮存剂。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,所述试剂盒为化学发光免疫检测试剂盒;
优选地,所述化学发光免疫检测试剂盒还包括:
含有第一抗体的试剂R1;和
含有第二抗体的试剂R2,
其中,所述第一抗体为包被于固相载体上的LH抗体,所述第二抗体为偶联有标记物的LH抗体;优选地,所述第一抗体为鼠抗LH单克隆抗体,且所述第二抗体为吖啶酯标记的鼠抗LH α -亚单位单克隆抗体;
更优选地,所述固相载体磁微粒,优选为链霉亲和素磁微粒、甲苯磺酰基磁微粒、羧基磁微粒或氨基磁微粒的一种,和所述标记物选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、吖啶酯或吖啶酯衍生物中的一种。
8. 根据权利要求7所述的试剂盒,所述试剂R2进一步含有:
缓冲液10-50mmol/L;
氯化钠20-60g/L;
保护剂5-90g/L;和
表面活性剂0.05-2mL/L。
9. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中所述试剂盒包括:校准品、试剂R1、试剂R2和可选的缓冲试剂R3,其中
所述校准品,包含:
0.1~200IU/L的LH抗原,
10-50mmol/L, pH为5.5~8的缓冲液,
0.5-3g/L的8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐,

5-20g/L的酪蛋白；

15-50g/L的海藻糖；

0.05-1mL/L的表面活性剂，

0.5-5mL/L的防腐剂；和

0.01-0.4g/L的色素，

所述试剂R1，包含：

1~10 μ g/mL的鼠抗LH单克隆抗体；

10-50mmol/L的缓冲液；

1-20g/L的氯化钠；

5-40g/L的甘露醇；

5-20g/L的牛血清白蛋白；

0.05-1mL/L的表面活性剂；

5-20mL/L的丙三醇；和

0.5-5mL/L的防腐剂，

所述试剂R2，包含：

0.01~0.5 μ g/mL的吡啶酯标记的鼠抗LH α -亚单位单克隆抗体；

10-50mmol/L的缓冲液；

20-60g/L的氯化钠；

5-30g/L的酪蛋白；

5-40g/L的海藻糖；

0.05-2mL/L的表面活性剂；

5-20mL/L的丙三醇；

0.5-5mL/L的防腐剂；和

0.01-0.3g/L的色素，以及

所述缓冲试剂R3，包含：

10-50mmol/L的缓冲液；

1-20g/L的氯化钠；

5-40g/L的甘露醇；

5-20g/L的牛血清白蛋白；

0.05-1mL/L的表面活性剂；

5-20mL/L的丙三醇；

0.5-5mL/L的防腐剂；和

0.01-0.3g/L的色素；

优选地，所述校准品和各试剂中的缓冲液为磷酸缓冲液；所述校准品中的色素为0.01-0.3g/L的日落黄色素和0.01-0.3g/L的苋菜红色素，所述试剂R2和R3中的色素为果绿色素；所述校准品、试剂R2和试剂R1中的表面活性剂为吐温20，所述试剂R1中的表面活性剂为TX-100；和所述校准品和各试剂中的防腐剂为PC-300。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒，其中，所述试剂盒包括：第一校准品、第二校准品、试剂R1、试剂R2和缓冲试剂R3，其中

所述第一和第二校准品分别由浓度为1IU/L和100IU/L的LH抗原,以及以下组分组成:

磷酸缓冲液20mmol/L;

8-苯胺-1-萘磺酸1g/L;

海藻糖20g/L;

酪蛋白10g/L;

日落黄色素0.2g/L;

苋菜红色素0.1g/L;

Tween-20 0.5mL/L;和

生物防腐剂PC-300 3mL/L,

所述试剂R1由以下组分组成:

包被于磁微粒上的鼠抗LH单克隆抗体2 μ g/mL;

磷酸缓冲液20mmol/L;

氯化钠9g/L;

甘露醇20g/L;

牛血清白蛋白10g/L;

4-氨基比林0.02g/L;

TX-100 0.10mL/L;

丙三醇10mL/L;和

生物防腐剂PC-300 3mL/L,

所述试剂R2由以下组分组成:

吡啶标记的鼠抗 α -亚单位单克隆抗体0.1 μ g/mL;

磷酸缓冲液20mmol/L;

氯化钠49g/L;

酪蛋白10g/L;

海藻糖10g/L;

4-氨基比林0.02g/L;

Tween-20 0.5mL/L;

丙三醇10mL/L;

生物防腐剂PC-300 3mL/L;和

果绿色素0.2g/L,

所述缓冲试剂R3由以下组分组成:

磷酸缓冲液20mmol/L;

氯化钠9g/L;

甘露醇20g/L;

牛血清白蛋白10g/L;

4-氨基比林0.02g/L;

TX-100 0.10mL/L;

丙三醇10mL/L;

生物防腐剂PC-300 3mL/L;和

果绿色素0.2g/L。

一种贮存剂、用于检测LH的校准品及检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生化检测中稳定保存抗原的贮存剂,特别涉及促黄体生成素的检测中用于该检测的稳定贮存的校准品及试剂盒。

背景技术

[0002] 促黄体生成素(LH)是由垂体前叶合成并分泌的糖蛋白激素,由 α 和 β 两个亚单位组成。LH合成受下丘脑的性激素释放激素(GnRH)调节,并受类固醇性激素的反馈。LH刺激女性排卵和卵巢分泌雌激素及孕激素;控制男性睾丸间质(Leydig)细胞分泌睾丸酮。在女性体内,LH含量在卵泡期较低;月经中期出现高峰,引起排卵,排卵后降至最低。LH在绝经后女性中最高,甚至高于月经中期的LH含量高峰;在去除性腺的男性中LH水平也很高。LH对于分析性腺异常、青春期发育迟缓、垂体原因的性激素低下、某些垂体肿瘤、以及下丘脑-垂体-性腺功能轴的异常有重要意义。联合检测LH和FSH,对于分析男、女不育症的原因有显著意义。

[0003] 然而,LH抗原稳定性很不好,难以以溶液形式保存。因此,免疫检测中校准品需要现场配制,特别是在检测试剂盒中LH的校准品难以以溶液形式直接提供。许多厂家校准品都是冻干品的形式,但是采用冻干品的形式导致生产工艺更为复杂,检测步骤也相应繁琐。此外,除了LH存在这样的问题,还有一些常用检测项目也存在校准品难以长期以溶液形式保存的情况。

发明内容

[0004] 有鉴于上述情况,本发明的目的是提供一种能够稳定贮存多种抗原的贮存剂,以及作为检测促黄体生成素LH的校准品的LH抗原的缓冲体系,以及包括校准品溶液的促黄体生成素LH检测试剂盒。

[0005] 为此,本发明的第一方面提供一种用于稳定贮存多种抗原的贮存剂,所述贮存剂包括:

[0006] 10-50mmol/L,pH为5.5~8的缓冲液,

[0007] 0.5-3g/L的8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐,

[0008] 5-70g/L的保护剂,和

[0009] 0.05-1mL/L的表面活性剂。

[0010] 其中,一定量的8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐能够使多种抗原,特别是具有 α 和 β 两个亚基的抗原稳定地存在于溶液中。

[0011] 根据一种实施方式,所述8-苯胺-1-萘磺酸的盐可为镁盐、铵盐、钠盐等。所述8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐的用量优选为1.0~1.5g/L。通常来说,8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐的用量增加,其稳定被贮存蛋白质的作用也更佳。但是其用量过高则溶解度不够,容易析出。

[0012] 根据以下将详述的实施例,LH、细胞白介素-6(IL-6)、 β -绒毛膜促性腺激素(β -

HCG)、抗穆勒试管激素 (AMH) 等具有 α 和 β 两个亚基的蛋白质 (抗原) 在含有上述量的8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐缓冲体系中可在37°C的温度下的加速稳定性试验中稳定保存约7天,对于不同浓度的待测物,检测信号的保留率仍在90%以上,优选在92%以上,更佳地在95%以上,最佳地甚至可达97%以上。在常规保存条件下(4°C)甚至可稳定保存约15个月;在-20°C的条件下,在保存24个月后信号保留率仍在90%以上,为满足试剂盒准确度标准提供必要前提。

[0013] 本发明的贮存剂中的所述缓冲液为基础溶液,以提供适宜的pH值以及等渗离子环境。缓冲液的种类没有特别限制,只要能够与被贮存的蛋白质相容,不改变所述蛋白质的特性的常规缓冲液都可用于本发明。例如,所述缓冲液可选自Tris缓冲液、HEPES缓冲液、Mes缓冲液、磷酸缓冲液、醋酸缓冲液中的一种或多种,但不限于此。优选磷酸缓冲液。

[0014] 缓冲液的pH值与被贮存物有关,通常在5.5~8的范围内。

[0015] 所述表面活性剂有助于使抗原稳定分散在缓冲体系中。本发明没有特别的限制,可以使用诊断试剂领域中任何常见的表面活性剂。示例性的表面活性剂可选自Tween、SPAN、TRITON、EMULGEN系列表面活性剂(如吐温20、吐温40和曲拉通100)以及月桂酸聚乙二醇甘油酯、阴离子烷基多苷、十二烷基二甲基甜菜碱、3ARAMT1、SH062C和AM PHITOL中的一种或几种。

[0016] 对于表面活性剂的使用剂量,本领域技术人员能够根据表面活性剂的种类进行选择,比如,在0.05-1mL/L的范围内。

[0017] 所述保护剂进一步有助于抗原的稳定。常规用于保护生物分子活性,提高微粒稳定性的保护剂有:糖类,如蔗糖、海藻糖、葡聚糖、葡萄糖、果糖;蛋白质类,如酪蛋白、牛血清白蛋白、脱脂奶粉;醇类,如甘露醇、丙三醇。本发明的贮存剂中可含有至少一种上述保护剂,也可含有两种或更多种所述保护剂。

[0018] 对于保护剂的使用剂量,本领域技术人员能够根据保护剂的种类进行选择。保护剂的用量根据具体保护剂种类不同而不同。本发明的贮存剂中蛋白类保护剂的用量通常为5~30g/L;糖类保护剂的用量通常为5~40g/L;醇类保护剂的用量通常为5~40g/L。本领域技术人员可根据具体需要选择适宜的保护剂。

[0019] 本发明中,优选采用蛋白类保护剂,也可以采用蛋白类和糖类两者、蛋白类和醇类两者、或者蛋白类、糖类和醇类三者的混合物。根据具体的实施方式,例如可采用5-30g/L的酪蛋白和5-40g/L的海藻糖。

[0020] 本发明的贮存剂还可包括防腐剂,用于延长试剂的保存时间。对于防腐剂的种类,本发明没有特别的限制,可以使用诊断试剂领域中任何常见的防腐剂。例如,选自叠氮钠、苯酚、对羟基苯甲酸、苯甲酸、苯甲酸钠、山梨酸、山梨酸钾、丙酸钙、二甲苯酚、尼泊金酯、高锰酸盐、抗生素类(如庆大霉素、二氯乙酰胺、SUPELCO公司推出的ProClin系列等)、对羟基苯甲酸乙酯、乙基汞硫代硫酸钠和咪唑烷基脲中的一种或多种生物防腐剂,但不限于此。

[0021] 防腐剂的用量根据不同的防腐剂种类而不同。例如可在0.5-5mL/L的范围内调节。

[0022] 另外,根据需要,本发明的贮存剂还可包括色素。色素可以起到一定程度的避光作用,可避免或者减缓因光不稳定性造成被贮存物的分解。

[0023] 用于本发明的色素没有特别限制。举例来说,用于校准品的色素可以选自果绿、苋菜红、胭脂红、赤藓红、新红、柠檬黄、日落黄、靛蓝、亮蓝中的一种或多种。

[0024] 色素的用量通常为0.01-0.4g/L,可根据所需颜色及颜色的深浅进行调节。根据一种实施方式,色素由0.01-0.3g/L的日落黄色素和0.01-0.3g/L的苋菜红色素组成。

[0025] 本发明的第二方面提供一种校准品,所述校准品含有:抗原和上述的贮存剂,其中所述抗原选自促黄体生成素LH、细胞白介素-6IL-6、 β -绒毛膜促性腺激素 β -HCG和抗穆勒氏管激素AMH中的一种。

[0026] 更具体地,本发明提供一种用于免疫检测促黄体生成素LH的校准品,所述校准品包括:浓度在0.1~200IU/L范围内的LH抗原。

[0027] 所述校准品中,LH抗原的浓度根据检测方法不同而不同。通常,浓度在0.1~200IU/L范围内的LH均可稳定保存在本发明的贮存剂中。优选的,校准品中LH抗原的浓度为0.5~150IU/L。例如,校准品中LH抗原的浓度可为1、5、10、20、50、100、150IU/L等中的两个或更多个。

[0028] 本发明的第三方面提供一种促黄体生成素免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:

[0029] 本发明的含LH抗原的校准品。

[0030] 本发明的试剂盒可为化学发光免疫(CLIA)试剂盒,荧光免疫(FIA)试剂盒、时间分辨荧光免疫(TRFIA)试剂盒中的一种。优选为化学发光免疫检测试剂盒。

[0031] 所述化学发光免疫检测试剂盒还包括:

[0032] 含有第一抗体的试剂R1;和

[0033] 含有第二抗体的试剂R2。

[0034] 根据一种实施方式,第一抗体为包被于固相载体上的LH抗体,所述第二抗体为偶联有标记物的LH抗体。

[0035] 所述固相载体可以是由蛋白质偶联表面组成,例如,微孔板、胶态金属颗粒、氧化铁颗粒、聚合物小球、纳米颗粒或磁微粒。另外,固相可以由在分离系统(例如分馏、沉淀、或离心)中起固相作用的化合物或分子聚集物组成。

[0036] 优选地,所述固相载体为磁微粒。所述磁微粒为链霉亲和素磁微粒、甲苯磺酰基磁微粒、羧基磁微粒或氨基磁微粒的一种,但不限于此。优选的磁微粒粒径可为0.5~3.0 μ m,更优选为1.0 μ m。

[0037] 根据更具体地实施方式,所述第一抗体可为鼠抗LH单克隆抗体。

[0038] 所述鼠抗LH单克隆抗体含量为1~10 μ g/mL,优选为2 μ g/mL。

[0039] 根据一种实施方式,第二抗体为标记抗体,其中标记物为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、吖啶酯或吖啶酯衍生物中的一种,优选为吖啶酯。

[0040] 具体地,第二抗体可为鼠抗 α -亚单位单克隆。所述鼠抗 α -亚单位单克隆抗体含量可为0.01~0.5 μ g/mL,优选为0.1 μ g/mL。

[0041] 根据一种优选的实施方式,含所述标记抗体的试剂R2还含有:

[0042] 缓冲液10-50mmol/L;

[0043] 氯化钠20-60g/L;

[0044] 保护剂5-90g/L;和

[0045] 表面活性剂0.05-2mL/L。

[0046] 其中,缓冲液、稳定剂、表面活性剂和保护剂如上定义。

[0047] 所述试剂R2还可包括防腐剂和色素。试剂R2中的防腐剂和色素可如上所定义。

- [0048] 根据一种优选的实施方式,除所述标记抗体外,所述试剂R2包含:
- [0049] 缓冲液10-50mmol/L;
- [0050] 氯化钠20-60g/L;
- [0051] 酪蛋白5-30g/L;
- [0052] 海藻糖5-40g/L;
- [0053] 表面活性剂0.05-2mL/L;
- [0054] 丙三醇5-20mL/L;
- [0055] 防腐剂0.5-5mL/L;和
- [0056] 色素0.01-0.3g/L。
- [0057] 本发明试剂盒中的所述校准品如前文所定义。优选,所述试剂盒包括至少两种LH浓度的校准品。所述LH浓度分别可为1和100IU/L。
- [0058] 所述试剂盒还可包括用作稀释剂的缓冲试剂R3。
- [0059] 根据一种优选的实施方式,除所述第一抗体外,所述试剂R1还可包含:
- [0060] 缓冲液10-50mmol/L
- [0061] 氯化钠1-20g/L;
- [0062] 甘露醇5-40g/L;
- [0063] 牛血清白蛋白5-20g/L;
- [0064] 表面活性剂0.05-1mL/L;
- [0065] 丙三醇5-20mL/L;和
- [0066] 防腐剂0.5-5mL/L。
- [0067] 所述缓冲试剂R3包含:
- [0068] 缓冲液10-50mmol/L;
- [0069] 氯化钠1-20g/L;
- [0070] 甘露醇5-40g/L;
- [0071] 牛血清白蛋白5-20g/L;
- [0072] 表面活性剂0.05-1mL/L;
- [0073] 丙三醇5-20mL/L;
- [0074] 防腐剂0.5-5mL/L;和
- [0075] 色素0.01-0.3g/L。
- [0076] 根据一种具体实施方式,本发明的试剂盒包括:校准品、试剂R1、试剂 R2,或者包括:校准品、试剂R1、试剂R2和缓冲试剂R3,其中
- [0077] 所述校准品,包含:
- [0078] 0.1~200IU/L的LH抗原,
- [0079] 10-50mmol/L,pH为5.5~8的缓冲液,
- [0080] 0.5-3g/L的8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐,
- [0081] 5-20g/L的酪蛋白;
- [0082] 15-50g/L的海藻糖;
- [0083] 0.05-1mL/L的表面活性剂,
- [0084] 0.5-5mL/L的防腐剂;和

- [0085] 0.01-0.4g/L的色素，
- [0086] 所述试剂R1，包含：
- [0087] 1~10 μ g/mL的鼠抗LH单克隆抗体；
- [0088] 10-50mmol/L的缓冲液；
- [0089] 1-20g/L的氯化钠；
- [0090] 5-40g/L的甘露醇；
- [0091] 5-20g/L的牛血清白蛋白；
- [0092] 0.05-1mL/L的表面活性剂；
- [0093] 5-20mL/L的丙三醇；和
- [0094] 0.5-5mL/L的防腐剂，
- [0095] 所述试剂R2，包含：
- [0096] 0.01~0.5 μ g/mL的吡啶酯标记的鼠抗LH α -亚单位单克隆抗体；
- [0097] 10-50mmol/L的缓冲液；
- [0098] 20-60g/L的氯化钠；
- [0099] 5-30g/L的酪蛋白；
- [0100] 5-40g/L的海藻糖；
- [0101] 0.05-2mL/L的表面活性剂；
- [0102] 5-20mL/L的丙三醇；
- [0103] 0.5-5mL/L的防腐剂；和
- [0104] 0.01-0.3g/L的色素，以及
- [0105] 所述缓冲试剂R3，包含：
- [0106] 10-50mmol/L的缓冲液；
- [0107] 1-20g/L的氯化钠；
- [0108] 5-40g/L的甘露醇；
- [0109] 5-20g/L的牛血清白蛋白；
- [0110] 0.05-1mL/L的表面活性剂；
- [0111] 5-20mL/L的丙三醇；
- [0112] 0.5-5mL/L的防腐剂；和
- [0113] 0.01-0.3g/L的色素。
- [0114] 优选地，所述校准品和各试剂中的缓冲液为磷酸缓冲液。优选地，所述校准品中的色素为0.01-0.3g/L的日落黄色素和0.01-0.3g/L的苋菜红色素，所述试剂R2和R3中的色素为果绿色素。优选地，所述校准品、试剂R2和试剂R1 中的表面活性剂为吐温20，所述试剂R1中的表面活性剂为TX-100。优选地，所述校准品和各试剂中的防腐剂为PC-300。
- [0115] 根据一个具体的实施方式，本发明的促黄体生成素免疫检测试剂盒包括：
- [0116] 校准品、试剂R1、试剂R2和缓冲试剂R3，其中
- [0117] 所述校准品包括第一校准品和第二校准品，所述第一和第二校准品分别由浓度为1IU/L和100IU/L的LH抗原，以及以下组分组成：
- [0118] 磷酸缓冲液20mmol/L；
- [0119] 8-苯胺-1-萘磺酸1g/L；

- [0120] 海藻糖20g/L;
- [0121] 酪蛋白10g/L;
- [0122] 日落黄色素0.2g/L;
- [0123] 苋菜红色素0.1g/L;
- [0124] Tween-20 0.5mL/L;和
- [0125] 生物防腐剂PC-300 3mL/L,
- [0126] 所述试剂R1由以下组分组成:
- [0127] 包被于磁微粒上的鼠抗LH单克隆抗体2 μ g/mL;
- [0128] 磷酸缓冲液20mmol/L;
- [0129] 氯化钠9g/L;
- [0130] 甘露醇20g/L;
- [0131] 牛血清白蛋白10g/L;
- [0132] 4-氨基比林0.02g/L;
- [0133] TX-100 0.10mL/L;
- [0134] 丙三醇10mL/L;和
- [0135] 生物防腐剂PC-300 3mL/L,
- [0136] 所述试剂R2由以下组分组成:
- [0137] 吡啶标记的鼠抗 α -亚单位单克隆抗体;
- [0138] 磷酸缓冲液20mmol/L;
- [0139] 氯化钠49g/L;
- [0140] 酪蛋白10g/L;
- [0141] 海藻糖10g/L;
- [0142] 4-氨基比林0.02g/L;
- [0143] Tween-20 0.5mL/L;
- [0144] 丙三醇10mL/L;
- [0145] 生物防腐剂PC-300 3mL/L;和
- [0146] 果绿色素0.2g/L,
- [0147] 所述试剂R3由以下组分组成:
- [0148] 磷酸缓冲液20mmol/L;
- [0149] 氯化钠9g/L;
- [0150] 甘露醇20g/L;
- [0151] 牛血清白蛋白10g/L;
- [0152] 4-氨基比林0.02g/L;
- [0153] TX-100 0.10mL/L;
- [0154] 丙三醇10mL/L;
- [0155] 生物防腐剂PC-300 3mL/L;和
- [0156] 果绿色素0.2g/L。
- [0157] 本发明的贮存剂能够提供稳定贮存多种抗原(蛋白质)的溶液环境中,从而不必(特别是在免疫检测试剂盒中)以冻干形式提供所述抗原,也可获得足够长的货架期,从而

简化和方便了试剂盒的操作。

[0158] 此外,本发明还特别提供了促黄体生成素免疫检测用的LH校准品,以及包括该校准品的促黄体生成素免疫试剂盒。由于本发明的校准品稳定性大幅度提高,得以以溶液形式提供各试剂,从而可在足够长的货架期内获得准确的检测结果。而且与校准品以冻干形式提供相比,本发明的试剂盒操作更为简便,检测结果的准确性和一致性得到提高,并具有同样的稳定性,特异性和抗干扰能力。

具体实施方式

[0159] 下面将结合具体实施例对本发明实施方式中的技术方案进行更进一步的描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明的部分实施方式,而不是全部的实施方式。基于以下公开的具体实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施方式,都属于本发明保护的范围。

[0160] 材料和方法:

[0161] 涉及的试剂:

	鼠抗 LH 单克隆抗体 1	四川迈克生物新材料技术有限公司
	鼠抗 α -亚单位单克隆抗体	四川迈克生物新材料技术有限公司
	重组 LH 抗原	四川迈克生物新材料技术有限公司
	磷酸二氢钠	成都科龙(科隆)化工
	磷酸氢二钠	成都科龙(科隆)化工
	氯化钠	成都科龙(科隆)化工
[0162]	牛血清白蛋白	Bovgen
	酪蛋白	Sigma
	甘露醇	AMRESCO,LLC
	海藻糖	Amresco
	4-氨基比林	Sigma
	8-苯胺-1-萘磺酸-镁盐	Sigma
	吐温 20	Amresco
	TX-100	Wako
	ProClin300	Sigma
	丙三醇	广东光华科技股份有限公司
[0163]	果绿色素	英国凯锐有限公司
	日落黄色素	英国凯锐有限公司
	苋菜红色素	英国凯锐有限公司

[0164] 仪器设备:

[0165] 标准型滚轴混匀仪 大龙兴创实验仪器(北京)有限公

[0166] i3000全自动化学发光免疫分析仪 四川迈克生物科技股份有限公司

[0167] 以下实施例中,除非另有说明,否则试剂R1~R3的配方如下:

[0168] 试剂R1:

[0169] 包被于磁微粒的鼠抗LH单克隆抗体 $2\mu\text{g}/\text{mL}$;

- [0170] 磷酸缓冲液20mmol/L;
- [0171] 氯化钠9g/L;
- [0172] 甘露醇20g/L;
- [0173] 牛血清白蛋白10g/L;
- [0174] TX-100 0.10mL/L;
- [0175] 丙三醇10mL/L;和
- [0176] 生物防腐剂PC-300 3mL/L。
- [0177] 试剂R2:
- [0178] 吖啶标记的鼠抗 α -亚单位单克隆抗体0.1 μ g/mL;
- [0179] 磷酸缓冲液20mmol/L;
- [0180] 氯化钠9g/L;
- [0181] 酪蛋白10g/L;
- [0182] 海藻糖10g/L;
- [0183] Tween-20 0.5mL/L;
- [0184] 丙三醇10mL/L;
- [0185] 生物防腐剂PC-300 3mL/L;和
- [0186] 果绿色素0.2g/L。
- [0187] 缓冲试剂R3:
- [0188] 磷酸缓冲液20mmol/L;
- [0189] 氯化钠9g/L;
- [0190] 甘露醇20g/L;
- [0191] 牛血清白蛋白10g/L;
- [0192] TX-100 0.10mL/L;
- [0193] 丙三醇10mL/L;
- [0194] 生物防腐剂PC-300 3mL/L;和
- [0195] 果绿色素0.2g/L。
- [0196] 实施例1
- [0197] 用本发明的贮存剂 (pH7.4) 制备校准品,本实施例的校准品所用贮存剂的配方如下:

组分	含量
磷酸氢二钠	2.56g/L
磷酸二氢钠	0.436g/L
8-苯胺-1-萘磺酸-镁盐	1.00g/L
海藻糖	20.00g/L
[0198] 酪蛋白 (A)	10.00 g/L
Tween-20	0.5mL/L
PC-300	3mL/L
日落黄色素	0.2g/L
苋菜红色素	0.2g/L
纯化水	定容至 1L。

[0199] 分别配制具有不同LH浓度(0(对照)、0.2、1、5、20、100、200IU/L) 的校准品备用。

[0200] 比较例1

[0201] 用常规方法制备校准品(pH7.4),本比较例的校准品除LH抗原外其他组分的配方如下:

组分	含量
磷酸氢二钠	2.56g/L
磷酸二氢钠	0.436g/L
氯化钠	1.00g/L
海藻糖	20.00g/L
[0202] 酪蛋白	10.00 g/L
Tween-20	0.5mL/L
生物防腐剂 PC-300	3mL/L
日落黄色素	0.2g/L
苋菜红色素	0.2g/L
纯化水	定容至 1L。

[0203] 分别配制具有不同LH浓度(0(对照)、0.2、1、5、20、100、200IU/L) 的校准品备用。

[0204] 试验例1

[0205] 将实施例1和比较例1分别配制的校准品于37℃水浴放置7天,取出平衡至室温。采用磁微粒化学发光免疫分析法,利用双抗体夹心法对4℃保存以及在37℃水浴中放置7天进行加速稳定性试验后的实施例1和比较例1的校准品作为样品分别进行检测,包括如下步骤:

[0206] 第一步,将样本、缓冲试剂R3和试剂R1混合,形成抗原-抗体复合物;

[0207] 第二步,洗涤后加入试剂R2,形成抗体-抗原-抗体免疫复合物;再次洗涤,加入吖啶酯底物液发生化学发光反应,测量相对发光值(RLU)。其中,R1、R2和R3以等比例添加。所测相对发光值与样本中LH的浓度呈正比例关系。

[0208] 按上述促黄体生成素检测的方法对含有不同LH浓度的样品1~7分别用37℃水浴保存前以及在37℃保存后的校准品进行LH检测试验记录发光信号,并计算经37℃水浴放置

和未经37℃水浴放置的发光信号的保留率,结果见表1。

[0209] 表1:

样品 编号	比较例 1			实施例 1		
	4℃	37℃	信号保留率	4℃	37℃	信号保留率
1	110	80	72.73%	90	88	97.78%
2	1839	1343	73.05%	1800	1775	98.61%
[0210] 3	8998	6408	71.21%	8921	8794	98.57%
4	42746	30302	70.89%	41038	39968	97.39%
5	170606	119451	70.02%	178366	175722	98.52%
6	771911	556243	72.06%	774618	758613	97.93%
7	1406829	985919	70.08%	1410159	1392532	98.75%

[0211] 将比较例1中的常规盐类物质(氯化钠)更换为8-苯胺-1-萘磺酸-镁盐(实施例1)后,校准品37℃下保存7天稳定性由信号保留率为70%提高至98%左右。

[0212] 实施例2:

[0213] 用本发明的贮存剂(pH6.0)制备校准品,本实施例的校准品配方如下:

[0214] 组分	含量
MES	4.88g/L
8-苯胺-1-萘磺酸-镁盐	1.00g/L
海藻糖	20.00g/L
酪蛋白	10.00 g/L
[0215] Tween-20	0.5mL/L
生物防腐剂 PC-300	3mL/L
日落黄色素	0.2g/L
苋菜红色素	0.2g/L
纯化水	定容至 1L。

[0216] 分别配制具有不同LH浓度(0(对照)、0.2、1、5、20、100、200IU/L)的校准品备用。

[0217] 试验例2

[0218] 以实施例2配制的校准品,按照试验例1相同的方法测试,并计算经37℃水浴放置和未经37℃水浴放置的发光信号的保留率,结果见表2。

[0219] 表2

样品 编号	4℃	37℃	信号保留率
1	101	100	99.01%
2	1714	1658	96.73%
[0220] 3	9085	8988	98.93%
4	41655	41276	99.09%
5	178654	174387	97.61%
6	7706514	7550090	97.97%
7	1460107	1442567	98.80%

[0221] 由上表2可见,在弱酸性的环境下,LH抗原稳定性也较好。

[0222] 实施例3~4

[0223] 用本发明的贮存剂 (pH7.4) 制备校准品, 本实施例3和4的校准品配方分别如下:

组分	实施例 3	实施例 4
[0224] 磷酸氢二钠	2.56g/L	2.56g/L
磷酸二氢钠	0.436g/L	0.436g/L
8-苯胺-1-萘磺酸-镁盐	0.5g/L	1.5g/L
海藻糖	20.00g/L	20.00g/L
酪蛋白	10.00 g/L	10.00 g/L
Tween-20	0.5mL/L	0.5mL/L
[0225] 生物防腐剂 PC-300	3mL/L	3mL/L
日落黄色素	0.2g/L	0.2g/L
苋菜红色素	0.2g/L	0.2g/L
纯化水	定容至 1L	定容至 1L

[0226] 分别配制具有不同LH浓度 (0 (对照)、0.2、1、5、20、100、200IU/L) 的实施例3和实施例4的校准品备用。

[0227] 试验例3

[0228] 以实施例3和4配制的校准品, 按上述试验例1相同的方法LH进行测试, 并计算经37℃水浴放置和未经37℃水浴放置的发光信号的保留率, 结果见表3。

[0229] 表3:

样品 编号	实施例 3			实施例 4		
	4℃	37℃	信号保留率	4℃	37℃	信号保留率
1	99	93	93.94%	87	89	102.30%
2	1817	1716	94.44%	1785	1769	99.10%
[0230] 3	8994	8541	94.96%	8694	8641	99.39%
4	42642	39696	93.09%	40243	39948	99.27%
5	179573	170113	94.73%	175347	175160	99.89%
6	781569	741622	94.89%	764824	760746	99.47%
7	1445783	1331798	92.12%	1394832	1390064	99.66%

[0231] 比较例2

[0232] 大体按照本发明的贮存剂 (pH7.4) 配方制备LH校准品, 区别在于用十二烷基苯磺酸钠替代8-苯胺-1-萘磺酸镁盐。本比较例的校准品配方如下:

	组分	含量
	磷酸氢二钠	2.56g/L
	磷酸二氢钠	0.436g/L
[0233]	十二烷基苯磺酸钠	1.00g/L
	海藻糖	20.00g/L
	酪蛋白	10.00 g/L
	Tween-20	0.5mL/L
	生物防腐剂 PC-300	3mL/L
[0234]	日落黄色素	0.2g/L
	苋菜红色素	0.2g/L
	纯化水	定容至 1L。

[0235] 分别配制具有不同LH浓度(0(对照)、0.2、1、5、20、100、200IU/L)的校准品备用。

[0236] 试验例4

[0237] 用比较例2的LH校准品按照试验例1的方法进行测试,并计算经37℃水浴放置和未经37℃水浴放置的发光信号的保留率,结果见表4。

[0238] 表4:

样品编号	4℃	37℃	信号保留率
1	126	126	100.00%
2	1725	1314	76.17%
3	8704	6571	75.49%
4	39657	29457	74.28%
5	153434	114215	74.44%
6	733582	557594	76.01%
7	1421328	1054574	74.20%

[0240] 实施例5和试验例5

[0241] 其他抗原的贮存稳定性:

[0242] 按照实施例1的方法配制IL-6、 β -HCG和降钙素(CT)的校准品,其中贮存剂的配方与实施例1相同,IL-6、 β -HCG和CT的浓度分别为:

[0243] IL-6:0、1.6、8、40、200、1000、5000pg/mL,L

[0244] HCG:0、5、25、125、500、3000、10000IU/L,

[0245] CT:0、5、20、50、250、500、2000pg/mL。

[0246] 按照类似与试验例1的方法对上述不同的样本进行检测,同样使用试剂 R1~R2,区别在于分别使用相应与不同样品的第一抗体和第二抗体(标记抗体)。其中,对IL-6的检测使用2 μ g/mL鼠抗人IL-6单克隆抗体和0.25 μ g/ml的吡啶酯标记的鼠抗人IL-6抗体;HCG的检测使用2 μ g/mL鼠抗人 β -HCG单克隆抗体和0.05 μ g/ml的吡啶酯标记的鼠抗人 β -HCG单克隆抗体;CT的检测使用 2 μ g/mL鼠抗人CT单克隆抗体和0.25 μ g/ml的吡啶酯标记的重组鼠抗人CT单克隆Fab抗体。

[0247] 对于IL-6校准品的检测直接将IL-6校准品与试剂R1混合,而未使用试剂 R3;对于

HCG校准品的检测同样未使用试剂R3;而对于CT校准品的检测则是将CT校准品与试剂R3和R1以等比例体积混合。之后的操作与试验例1相同。

[0248] 记录各样本的发光信号,并计算经37℃水浴放置和未经37℃水浴放置的发光信号的保留率,结果见表5~7。

[0249] 表5

IL-6			
样品编号	4℃	37℃	信号保留率
1	173	168	97.10%
2	1278	1234	96.56%
[0250] 3	5487	5393	98.29%
4	26229	25346	96.64%
5	131161	127499	97.21%
6	651915	644385	98.84%
7	2844889	2792275	98.15%

[0251] 表6

β-HCG			
样品编号	4℃	37℃	信号保留率
1	107	100	93.46%
2	3907	3844	98.39%
[0252] 3	18235	17524	96.10%
4	82693	81564	98.63%
5	398933	387873	97.23%
6	1522694	1468764	96.46%
7	2756132	2642715	95.88%

[0253] 表7

CT			
样品编号	4℃	37℃	信号保留率
[0254] 1	193	93	48.19%
2	1254	674	53.75%
3	3878	2146	55.34%
4	15056	7845	52.11%
[0255] 5	76769	42974	55.98%
6	197399	104471	52.92%
7	1196017	644756	53.91%

[0256] 由以上实验结果可以看出,本发明的贮存剂对于同时具有α和β亚基的IL-6、β-HCG具有良好的保护作用,可以以溶液形式进行稳定贮存。而对于仅具有一个亚基的CT则贮存效果并不理想。

[0257] 实施例6

[0258] 按照以下配方配制吡啶酯标记的鼠抗 α -亚单位单克隆抗体的标记物溶液:

	组分	用量
	磷酸氢二钠	2.56g/L
	磷酸二氢钠	0.436g/L
	氯化钠	49.00g/L
	酪蛋白	10.00 g/L
[0259]	海藻糖	10.00 g/L
	Tween-20	0.5mL/L
	生物防腐剂 PC-300	3mL/L
	果绿色素	0.2g/L
	丙三醇	10mL/L
	纯化水	定容至 1L。

[0260] 其中标记抗体的浓度为:0.1 μ g/ml,将配制的标记物溶液保存备用。

[0261] 比较例3

[0262] 按照以下配方配制吡啶酯标记的鼠抗 α -亚单位单克隆抗体的标记物溶液:

	组分	用量
	磷酸氢二钠	2.56g/L
	磷酸二氢钠	0.436g/L
	氯化钠	9.00g/L
	酪蛋白	10.00 g/L
[0263]	海藻糖	10.00 g/L
	Tween-20	0.5mL/L
	生物防腐剂 PC-300	3mL/L
	丙三醇	10mL/L
	果绿色素	0.2g/L
[0264]	纯化水	定容至 1L。

[0265] 其中标记抗体的浓度为:0.1 μ g/mL,将配制的标记物溶液保存备用。

[0266] 试验例6

[0267] 以比较例3和实施例6分别配制标记物溶液(试剂R2),并与上述R1和 R3以及实施例1方法配制的校准品(LH浓度为1和100IU/L)组成试剂盒。将试剂盒整体于37 $^{\circ}$ C水浴放置7天,取出平衡至室温。两组试验试剂盒分别对未在37 $^{\circ}$ C水浴放置的和在37 $^{\circ}$ C水浴放置7天的试剂盒对7个不同样品进行检测,其中用各自试剂盒中的校准品首先对全自动生化仪仪器进行校准,然后按照试验例1中的方法测定化学发光信号,并计算经37 $^{\circ}$ C水浴放置和未经37 $^{\circ}$ C水浴放置的发光信号的保留率,结果见表8。

[0268] 表8

样品 编号	比较例 3			实施例 6		
	4℃	37℃	信号保留率	4℃	37℃	信号保留率
1	92	85	92.39%	90	83	92.22%
2	1798	1285	71.47%	1765	1636	92.69%
3	8894	6369	71.61%	8921	8253	92.51%
4	41964	29468	70.22%	42096	39002	92.65%
5	169755	117987	69.50%	173698	160805	92.58%
6	769742	539647	70.11%	769857	710704	92.32%
7	1398428	992314	70.96%	1380159	1272274	92.18%

[0270] 在以上实施例6中的氯化钠浓度相对于常规的标记物溶液(比较例3)大幅提高之后,检测结果的信号保留率由70%升高至92%左右。

[0271] 比较例4:

[0272] 按比较例1和比较例3的配方分别配制LH校准品(LH浓度为1和100IU/L)和试剂R2,其他按照前述配方配制试剂R1,制成不含试剂R3的比较例4的试剂盒。

[0273] 实施例7-8:

[0274] 按实施例1和实施例6的配方分别配制LH校准品(LH浓度为1和100IU/L)和试剂R2,其他按照前述配方配制试剂R1和缓冲试剂R3,分别制备两个根据本发明的试剂盒作为实施例7(不包括缓冲试剂R3)和实施例8(包括缓冲试剂R3)的试剂盒。

[0275] 试验例7

[0276] 以比较例4和实施例7和8的试剂盒分别于37℃水浴放置7天,取出平衡至室温。用4℃和37℃下保存的三组试剂盒分别用各自试剂盒中的校准品对全自动生化仪进行校准,然后按照试验例1的方法分别对7个不同样品进行检测(其中比较例4和实施例7这组的试剂盒在检测中不加入试剂R3,其他均与实施例8的试剂盒的检测方法相同)。记录各检测中的发光信号,并计算经37℃水浴放置和未经37℃水浴放置的发光信号的保留率,结果见表9。

[0277] 表9

比较例 4			实施例 7			实施例 8		
4℃	37℃	信号保留率	4℃	37℃	信号保留率	4℃	37℃	信号保留率
92	45	48.91%	87	80	91.95%	89	81	90.82%
1798	915	50.89%	1797	1637	91.10%	1879	1706	90.83%
8894	4375	49.19%	8359	7600	90.92%	8905	8089	90.84%
41964	21347	50.87%	41875	38005	90.76%	44241	40227	90.93%
169755	86458	50.93%	162709	147402	90.59%	172374	157264	91.23%
769742	379959	49.36%	769226	705743	91.75%	787337	731011	92.85%
1398428	701258	50.15%	1414606	1341111	94.80%	1419311	1345778	94.82%

[0279] 由上表可见,从稳定性来看,改良标记物和校准品的保存溶液的配方之后,试剂盒整体稳定性大幅度提高,从比较例4的50%左右提高至实施例7-8的90%左右。

[0280] 试验例8

[0281] 用上述比较例4和实施例7和8的试剂盒分别于37℃水浴放置7天,取出平衡至室温。首先用各自试剂盒中的校准品对全自动生化仪进行校准,然后用试验例1的方法分别测定含有浓度为约200IU/L的促卵泡生成素(FSH)、含有浓度为约200mIU/L的促甲状腺素(TSH)和含有浓度为约1000IU/L的人绒毛膜促性腺激素(HCG)的样品,具体请见下表10。

[0282] 表10:(单位:IU/L)

[0283]

	比较例4	实施例7	实施例8
FSH	0.04	0.02	0.00
TSH	0.08	0.05	0.01
HCG	0.78	0.19	0.06

[0284] 从特异性来看,改进的标记抗体试剂和校准品对特异性影响较大,相对于比较例4,实施例7使得整体试剂盒的特异性(抗干扰能力)提高,FSH、TSH、HCG检出浓度均得到显著降低;进一步在增加试剂R3,优化反应体系之后,实施例8的整体试剂盒灵敏度及抗干扰能力得到进一步提高。

[0285] 以上所述仅为本发明的优选实施方式,并非因此限制本发明的专利范围,凡是在本发明的发明构思下,利用本发明说明书内容所作的等效结构变换,或直接/间接运用在其他相关的技术领域均包括在本发明的专利保护范围内。

专利名称(译)	一种贮存剂、用于检测LH的校准品及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110988367A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911129848.3	申请日	2019-11-18
[标]发明人	胡容 张凌燕		
发明人	胡容 张凌燕		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/577 G01N33/76		
代理人(译)	陈万青		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	鼠抗 LH 单克隆抗体 1 鼠抗 α -亚单位单克隆抗体 重组 LH 抗原 磷酸二氢钠 磷酸氢二钠 氯化钠 牛血清白蛋白 酪蛋白 甘露醇 海藻糖 4-氨基比林 8-苯胺-1-萘磺酸-镁盐 吐温 20 TX-100	四川迈克生物新材料技术有限公司 四川迈克生物新材料技术有限公司 四川迈克生物新材料技术有限公司 成都科龙(科隆)化工 成都科龙(科隆)化工 成都科龙(科隆)化工 Bovgen Sigma AMRESKO,LLC Amresco Sigma Sigma Amresco Wako
-------	--	---

本申请公开了一种贮存剂、用于检测LH的校准品及检测试剂盒。所述贮存剂用于稳定贮存抗原，包括：10-50mmol/L、pH为5.5~8的缓冲液，0.5-3g/L的8-苯胺-1-萘磺酸和/或其盐，5-70g/L的保护剂，和0.05-1mL/L的表面活性剂。本发明的贮存剂能够稳定贮存多种抗原，在加速稳定性试验中显示出优异的信号保留率，解决了诸如LH不能以溶液形式长期保存的问题，避免了以冻干形式提供校准品造成的检测步骤繁琐的问题。