



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102866248 A

(43) 申请公布日 2013.01.09

(21) 申请号 201210367265.6

(22) 申请日 2012.09.28

(71) 申请人 北京鸿天志远科技有限公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开
发区同济中路甲7号18幢A-406

(72) 发明人 孙旭东 孙中锋

(74) 专利代理机构 北京航忱知识产权代理事务
所(普通合伙) 11377

代理人 张华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

稳定剂溶液及其制备方法,酶结合物混合液
和蛋白质混合液

(57) 摘要

本发明涉及生物免疫分析技术领域,具体涉
及一种稳定剂溶液及其制备方法。为了进一步提
高酶结合物、蛋白质等物质的稳定性,延长其保存
期,本发明提供一种稳定剂溶液及其制备方法。本
发明提供的稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休
克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。本发明提供的
稳定剂溶液对于提高酶结合物及蛋白等物质的稳
定性效果明显,且成本低、具有较大价格优势。本
发明提供的稳定剂溶液的制备方法工艺简单,易
于配制。

1. 一种稳定剂溶液,其特征在于,所述稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液;所述热休克蛋白选自 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 或其组合。

2. 根据权利要求 1 所述的稳定剂溶液,其特征在于,所述蛋白质稳定剂选自牛血清白蛋白,水解明胶,或其组合物。

3. 根据权利要求 1 所述的稳定剂溶液,其特征在于,所述蛋白质稳定剂的浓度为 8-10% (w/v),所述热休克蛋白浓度为 16-50ng/ml;所述抗氧化剂的浓度为 1-5mmol/L,所述络合剂的浓度为 1-5mmol/L。

4. 根据权利要求 1 所述的稳定剂溶液,其特征在于,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成或由 HSP100 和 HSP60 组成,所述抗氧化剂为维生素 C,所述络合剂为 EDTA。

5. 根据权利要求 1 所述的稳定剂溶液,其特征在于,所述蛋白质稳定剂为水解明胶,浓度为 8-10% (w/v);所述热休克蛋白的浓度为 20-30ng/ml。

6. 根据权利要求 1 所述的稳定剂溶液,其特征在于,所述蛋白质稳定剂为水解明胶,浓度为 8-10% (w/v);所述热休克蛋白的浓度为 20-40ng/ml,由 HSP60 和 HSP40 组成;所述抗氧化剂为维生素 C,浓度为 3-4mmol/L;所述络合剂为 EDTA,浓度为 3-4mmol/L。

7. 根据权利要求 1-6 之一所述的稳定剂溶液的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括下述步骤:

(1) 配置缓冲液;

(2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入蛋白质稳定剂、抗氧化剂、络合剂、热休克蛋白、搅拌均匀,得到稳定剂溶液。

8. 根据权利要求 1-6 之一所述的稳定剂溶液的应用,其特征在于,所述稳定剂溶液用于保护酶,酶标记的抗体 / 抗原,抗体 / 抗原,蛋白质或其组合。

9. 一种酶结合物混合液,包括酶结合物,其特征在于,所述酶结合物分散于根据权利要求 1-6 之一所述的稳定剂溶液中。

10. 一种蛋白质混合液,包括蛋白质,其特征在于,所述蛋白质分散于根据权利要求 1-6 之一所述的稳定剂溶液中。

稳定剂溶液及其制备方法,酶结合物混合液和蛋白质混合液

技术领域

[0001] 本发明涉及生物免疫分析技术领域,具体涉及一种延长免疫分析中蛋白质和酶结合物溶液保存期的稳定剂溶液及其制备方法,酶结合物混合液和蛋白质混合液。

背景技术

[0002] 免疫分析技术在生物医学领域内的应用非常广泛,已经在临床诊断、环境及卫生检测、法医鉴定、食品安全等诸多领域中成为必备的常规技术手段,并且发挥着不可替代的作用,具有巨大的市场。免疫分析技术主要使用抗原和抗体以及它们的各种结合物,而这些生物大分子蛋白在常温下是不稳定的,因此提高它们的稳定性是免疫分析技术产品必须解决的问题。

[0003] 蛋白质在高浓度时更不容易降解,而在较低浓度时极易因降解而失活,所以通常都会加入牛血清白蛋白(BSA)之类的无关蛋白作为稳定剂,同时,加入的蛋白也可以减少由于容器壁吸附所造成的损失。

[0004] 在免疫分析产品中,常以抗体酶结合物作为示踪剂,而其中又以过氧化物酶的结合物最为常见。过氧化物酶是将反应体系中的过氧化物转变为自由基,因此该酶结合物在贮存、运输中会逐渐产生少量氧化性物质并转化为自由基,而后者则可强烈地攻击酶分子本身以及与其相联结的生物活性分子,从而导致其失活。由于这种“自杀”现象常常导致酶结合物率先失效,因此,如何提高酶结合物的稳定性也就成了提高该类检测试剂产品可靠性和有效期的瓶颈。现有技术中,很多产品使用冻干或浓缩冷藏的酶结合物,但这需要使用者通过复溶或稀释的办法自行制备工作液,不仅增加了使用者的工作量,还会造成新的操作误差。

[0005] 近年来,由于人们发现了一些可以在酶结合物溶液中消耗超氧自由基或稳定结合物分子,同时又不影响免疫反应和酶与底物反应的物质,如:某些具备抗氧化特性的维生素、某些多酚类或多羟基类物质、某些多聚氨基酸等,从而大大延长了酶结合物溶液的保存期,使得生产直接采用室温保存的酶结合物溶液成为可能,这些物质被称为标记物稳定剂(Conjugator Stabilizer)。事实上,能否直接提供含稳定剂的酶结合物溶液,实现产品的室温保存并保证该检测试剂的高可靠性和长有效期,已经成为衡量该类产品的技术含量以及生产厂家的研发能力和水平的重要标志。

发明内容

[0006] 为了进一步提高酶结合物、蛋白质等物质的稳定性,延长其保存期,本发明提供一种稳定剂溶液及其制备方法。本发明提供的稳定剂溶液能够消除酶结合物“自杀”的现象,本发明提供的稳定剂溶液制备方法工艺简单,易于操作。

[0007] 实验证明,两种常见的试剂蛋白(如牛血清白蛋白,水解明胶等)和热休克蛋白(HSP)在某些特定的浓度条件下可以有效地延缓酶结合物的失活现象。

[0008] 高浓度牛血清白蛋白(BSA)可以大大降低非特异免疫反应,因此是目前最常用的封闭剂,被广泛添加于各类免疫检测试剂中,但其成本较高,这使得不含BSA的免疫分析系统应用的越来越多。

[0009] 实验证明,BSA或水解明胶浓度在1%左右时酶结合物活性下降速度相对稳定在一个水平上;而当该浓度达到8%-10%时酶结合物活性下降速度陡降,并维持在很低的水平上。该效应与试剂蛋白种类无关,而仅与其浓度密切相关。当这些试剂蛋白的浓度增加到8%-10%时,对于抗体和酶结合物的生物活性的保护作用非常强,能够消除自由基的不良影响。

[0010] BSA或水解明胶可以代替酶结合物承受自由基的攻击,从而作为一种自由基清除剂保护酶结合物。同时当酶促反应发生时,因为过氧化物酶的反应是在酶活性中心附近发生的,所以其自由基传递到溶液中对抗体和酶分子自身造成损伤的几率非常小,可以忽略不计。另外,免疫分析反应体系中,蛋白质浓度的升高会使反应速度更快,更有利于免疫反应。而HSP可以使抗体及其标记物在高温下保持稳定。

[0011] 本发明提供了一种稳定剂溶液,所述稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液;所述热休克蛋白选自HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40或其组合。

[0012] 进一步的,所述蛋白质稳定剂选自牛血清白蛋白,水解明胶,或其组合物。

[0013] 进一步的,所述蛋白质稳定剂的浓度为8-10% (w/v),所述热休克蛋白浓度为16-50ng/ml;所述抗氧化剂的浓度为1-5mmol/L,所述络合剂的浓度为1-5mmol/L。蛋白质稳定剂的浓度(w/v):是指每100毫升溶液中所含溶质的克数。

[0014] 进一步的,所述热休克蛋白为HSP60和HSP40的组合物,所述抗氧化剂为维生素C,所述络合剂为EDTA。优选的,HSP60:HSP40=1:1-3(摩尔比)。

[0015] 进一步的,所述热休克蛋白由HSP100和HSP60组成。优选的,HSP100:HSP60=1:1-3(摩尔比)。

[0016] 进一步的,所述蛋白质稳定剂为水解明胶,浓度为8-10% (w/v);所述热休克蛋白的浓度为20-30ng/ml。

[0017] 进一步的,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液,其PH值为6.5-8.0。

[0018] 进一步的,所述蛋白质稳定剂为水解明胶,浓度为8-10% (w/v);所述热休克蛋白的浓度为20-40ng/ml,由HSP60和HSP40组成;所述抗氧化剂为维生素C,浓度为3-4mmol/L;所述络合剂为EDTA,浓度为3-4mmol/L;优选的HSP60:HSP40=1:1-3(摩尔比)。优选的,上述水解明胶的浓度为9-10% (w/v)。

[0019] 进一步的,本发明还提供一种上述稳定剂溶液的制备方法,所述制备方法包括下述步骤:

[0020] (1) 配置缓冲液;

[0021] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入蛋白质稳定剂、抗氧化剂、络合剂、热休克蛋白、搅拌均匀,得到稳定剂溶液。

[0022] 一般情况下,为了使稳定剂溶液具有良好的稳定性,最后加入热休克蛋白。磷酸盐缓冲液可以在市场上购买,也可以按照常见方法配置。

[0023] 本发明还提供上述稳定剂溶液的应用,所述稳定剂溶液用于保护酶,酶标记的抗

体 / 抗原, 抗体 / 抗原, 蛋白质或其组合。

[0024] 本发明还提供一种酶结合物混合液, 包括酶结合物, 它的特点是, 所述酶结合物分散于上述的稳定剂溶液中。

[0025] 本发明还提供一种蛋白质混合液, 包括蛋白质, 它的特点是, 所述蛋白质分散于上述的稳定剂溶液中。

[0026] 与现有技术相比, 本发明提供的稳定剂溶液经过配方优化, 可以使抗体和蛋白的活性稳定在 12 个月以上, 且可以常温保存。而且, BSA 或水解明胶, 及热休克蛋白在选定浓度下, 对于提高酶结合物稳定性效果明显, 延长了酶结合物溶液的保存期, 且成本低、具有较大价格优势。本发明提供的稳定剂溶液的制备方法, 操作简单, 易于配制。本发明提供的稳定剂溶液可应用于以酶结合物作为示踪剂的免疫分析产品中, 用于微孔板条的封闭稳定、抗体稀释液、封稳液、蛋白稀释液等方面。本发明提供的酶结合物混合液和蛋白质混合液可广泛用于生物分析, 环境检测, 食品检测, 动物检测等领域。

具体实施方式

[0027] 本发明所用的材料和设备均为现有材料和设备, 例如: 可以选用美国西格马 - 奥利奇有限公司生产的维生素 C 和 HSP60 等产品; 乙二胺四乙酸(EDTA)和磷酸二氢钠可以购自国药集团; 牛血清白蛋白、水解明胶和显色液等产品也均为市场上常见的产品。

[0028] 本发明提供的稳定剂溶液的制备方法包括如下步骤:

[0029] (1) 配置缓冲液;

[0030] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 8-10% 的蛋白质稳定剂、1-5mmol/L 抗氧化剂和 1-5mmol/L 络合剂, 搅拌均匀, 再加入 16-50ng/ml 的热休克蛋白, 搅拌均匀, 得到稳定剂溶液。

[0031] 本发明提供稳定剂溶液的检测方法为向稳定剂溶液中加入酶, 酶标记的抗体 / 抗原, 抗体 / 抗原, 蛋白质或其组合, 将整个溶液置于 37°C 水浴中进行热加速实验, 一定期间(例如 15 分钟, 或 4 周)后测定所加物质(酶, 酶标记的抗体 / 抗原, 抗体 / 抗原)的活性。采用的活性检测方法为现有的检测方法, 其结果按照热加速实验前的活性为 100% 计算, 分别算出各组剩余活性数据。比较例 1 一种酶结合物稳定剂溶液

[0032] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS);

[0033] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸, 同时加入 1.0% 的 BSA, 配置得到酶结合物稳定剂溶液。

[0034] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1 : 1000 稀释(稀释剂为蒸馏水)的辣根过氧化物酶(HRP)与抗促甲状腺激素(TSH)抗体结合物, 所述 HRP 标记的 TSH 抗体结合物在稳定剂溶液中的浓度为 5ng/ml。

[0035] (4) 将步骤(3)所得的含有 HRP 标记的 TSH 抗体结合物的溶液置于 37°C 水浴中进行热加速实验, 热加速实验进行 4 周。

[0036] 将步骤(3)(4)各取 50ul 加入微孔板, 加入 TMB 显色液, 37°C 反应 15 分钟, 加入 50ul 2M 浓硫酸, 酶标仪测定 OD 值。前述活性检测方法为现有的检测方法, 可以在 450nm 的波长下测定 OD 值。

[0037] 结果按照实验前的活性为 100% 计算, 分别算出各组剩余活性数据。实验结果如表

1 所示。

[0038] 比较例 2 一种酶结合物稳定剂溶液

[0039] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；

[0040] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 1.0% 的水解明胶，配置酶结合物稳定剂溶液。

[0041] 其余步骤如比较例 1 中所示，实验结果如表 1 所示。

[0042] 比较例 3 一种酶结合物稳定剂溶液

[0043] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；

[0044] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 8.0% 的 BSA，配置酶结合物稳定剂溶液。

[0045] 其余步骤如比较例 1 中所示，实验结果如表 1 所示。

[0046] 比较例 4 一种酶结合物稳定剂溶液

[0047] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；

[0048] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 8.0% 的水解明胶，配置酶结合物稳定剂溶液。

[0049] 其余步骤如比较例 1 中所示，实验结果如表 1 所示。

[0050] 比较例 5 一种酶结合物稳定剂溶液

[0051] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；

[0052] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 10% 的 BSA，配置酶结合物稳定剂溶液。

[0053] 其余步骤如比较例 1 中所示，实验结果如表 1 所示。

[0054] 比较例 6 一种酶结合物稳定剂溶液

[0055] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；

[0056] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 10% 的水解明胶，配置酶结合物稳定剂溶液。

[0057] 其余步骤如比较例 1 中所示，实验结果如表 1 所示。

[0058] 比较例 7 一种酶结合物稳定剂溶液

[0059] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；

[0060] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 5ng/ml 的 HSP70，配置酶结合物稳定剂溶液。

[0061] 其余步骤如比较例 1 中所示，实验结果如表 1 所示。

[0062] 比较例 8 一种酶结合物稳定剂溶液

[0063] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；

[0064] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 20ng/ml 的 HSP40，配置酶结合物稳定剂溶液。

[0065] 其余步骤如比较例 1 中所示，实验结果如表 1 所示。

[0066] 比较例 9 一种稳定剂溶液

[0067] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；

[0068] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同

时加入 10% 的水解明胶和 5ng/ml 的 HSP60, 搅拌均匀, 配置得稳定剂溶液。

[0069] 其余步骤如比较例 1 中所示, 实验结果如表 1 所示。

[0070] 比较例 10 一种稳定剂溶液

[0071] (1) 配置 pH7.5 的磷酸盐缓冲液 (PBS);

[0072] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 4mmol/L 维生素 C、3mmol/L 乙二胺四乙酸, 同时加入 9% 的水解明胶和 10ng/ml 的 HSP60, 配置稳定剂溶液。

[0073] (3) 向步骤 (2) 所得的稳定剂溶液中加入 1 : 1000 稀释的碱性磷酸酶标记 TSH (促甲状腺激素) 抗原, 该酶标抗原在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。上述碱性磷酸酶可以采用北京康为世纪生物科技有限公司生产的产品。

[0074] 将步骤 (3) 所制得的溶液置于 37°C 水浴中进行热加速实验 15 分钟。实验结果如表 1 所示。

[0075] 表 1 比较例 1-10 提供的酶结合物稳定剂溶液主要成份及酶结合物活性测试结果

[0076]

	稳定剂溶液主要成份	剩余活性 (100%)
比较例 1	1.0%BSA	30.7
比较例 2	1.0% 水解明胶	31.8
比较例 3	8.0%BSA	56.7
比较例 4	8.0% 水解明胶	51.2
比较例 5	10%BSA	58.7
比较例 6	10% 水解明胶	59.2
比较例 7	5ng/ml HSP60	49.7
比较例 8	20ng/ml HSP40	79.2
比较例 9	10% 水解明胶 +5ng/ml HSP	57.6
比较例 10	9% 水解明胶 +10ng/ml HSP	65.0%

[0077] 实施例 1 本发明提供一种稳定剂溶液

[0078] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶。所述热休克蛋白为 HSP60 和 HSP40 的组合物, HSP60:HSP40=1:2 (摩尔比)。

[0079] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0080] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS);

[0081] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸, 同时加入 10% 的水解明胶和 50ng/ml 的 HSP, 搅拌均匀, 配置得稳定剂溶液。

[0082] 其余步骤如比较例 1 中所示,实验结果如表 2 所示。

[0083] 实施例 2 本发明提供一种稳定剂溶液

[0084] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶。所述热休克蛋白为 HSP60 和 HSP40 的组合物, HSP60:HSP40=1:3 (摩尔比)。

[0085] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0086] (1) 配置 pH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS);

[0087] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 20ng/ml 的 HSP,搅拌均匀,配置得稳定剂溶液。

[0088] 其余步骤如比较例 1 中所示,实验结果如表 1 所示。

[0089] 实施例 3 本发明提供一种稳定剂溶液

[0090] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成。

[0091] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0092] (1) 配置 pH7.5 的磷酸盐缓冲液(PBS);

[0093] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、1mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 50ng/ml 的 HSP60 和 HSP40 的组合物(摩尔比为 1:1),配置稳定剂溶液。

[0094] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 EGFR 抗原蛋白,EGFR 抗原蛋白在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。

[0095] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验,4 周后测定上述溶液中的物质(EGFR 抗原)的活性,其结果按照实验前的活性为 100% 计,分别算出各组剩余活性如表 2 所示。

[0096] 实施例 4 本发明提供一种稳定剂溶液

[0097] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成。

[0098] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0099] (1) 配置 pH7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS);

[0100] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 3mmol/L 维生素 C、4mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 9% 的水解明胶和 30ng/ml 的 HSP60 和 HSP40 的组合物(摩尔比为 1:1),配置稳定剂溶液。

[0101] 其余步骤如实施例 3 中所示,实验结果如表 2 所示。

[0102] 实施例 5 本发明提供一种稳定剂溶液

[0103] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶。

[0104] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0105] (1) 配置 pH8.0 的磷酸盐缓冲液(PBS);

[0106] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 40ng/ml 的 HSP90,配置稳定剂溶液。

- [0107] 其余步骤如实施例 3 中所示,实验结果如表 2 所示。
- [0108] 实施例 6 本发明提供一种稳定剂溶液
- [0109] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶。
- [0110] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下：
- [0111] (1) 配置 pH7.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)；
- [0112] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 8% 的水解明胶和 25ng/ml 的 HSP100,配置稳定剂溶液。
- [0113] 其余步骤如实施例 3 中所示,实验结果如表 2 所示。
- [0114] 实施例 7 本发明提供一种稳定剂溶液
- [0115] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶。
- [0116] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下：
- [0117] (1) 配置 pH7.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)；
- [0118] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、2mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 9% 的水解明胶和 30ng/ml 的 HSP100 和 HSP60 的组合物(摩尔比为 1:1),配置稳定剂溶液。
- [0119] 其余步骤如实施例 3 中所示,实验结果如表 2 所示。
- [0120] 实施例 8 本发明提供一种稳定剂溶液
- [0121] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶。
- [0122] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下：
- [0123] (1) 配置 pH6.8 的磷酸盐缓冲液(PBS)；
- [0124] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 3mmol/L 维生素 C、3mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 20ng/ml 的 HSP60 和 HSP40 的组合物(摩尔比为 1:1),配置稳定剂溶液。
- [0125] 其余步骤如实施例 3 中所示,实验结果如表 2 所示。
- [0126] 实施例 9 本发明提供一种稳定剂溶液
- [0127] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶。
- [0128] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下：
- [0129] (1) 配置 pH7.5 的碳酸缓冲液(PBS)；
- [0130] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 3mmol/L 维生素 C、4mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 40ng/ml 的 HSP40,配置稳定剂溶液。
- [0131] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1:1000 稀释的 EGFR 抗原,该抗原蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。
- [0132] 其余步骤如实施例 3 中所示,实验结果如表 2 所示。
- [0133] 实施例 10 本发明提供一种稳定剂溶液
- [0134] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋

白质稳定剂为水解明胶。

[0135] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下：

[0136] (1) 配置 pH7.5 的碳酸缓冲液 (PBS)；

[0137] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 10% 的水解明胶和 30ng/ml 的 HSP60 和 HSP70 的组合物 (摩尔比为 1:1)，配置稳定剂溶液。

[0138] (3) 向步骤 (2) 所得的稳定剂溶液中加入 1:1000 稀释的 Anti-TSH 抗体，该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。

[0139] 其余步骤如实施例 3 中所示，实验结果如表 2 所示。

[0140] 表 2 实施例 1-10 所提供的稳定剂溶液中所加物质的剩余活性百分数

[0141]

实施例	稳定剂溶液主要成份	剩余活性 (100%)
实施例 1	10% 水解明胶 +50ng/ml HSP	90.7
实施例 2	10% 水解明胶 +20ng/ml HSP	93.4
实施例 3	10% 水解明胶 +50ng/ml HSP	93.1%
实施例 4	9% 水解明胶 +30ng/ml HSP	89.6%
实施例 5	10% 水解明胶 +40ng/ml HSP	90.5%
实施例 6	8% 水解明胶 +25ng/ml HSP	97.8%
实施例 7	9% 水解明胶 +30ng/ml HSP	95.0%
实施例 8	10% 水解明胶 +20ng/ml HSP	110.6%
实施例 9	10% 水解明胶 +40ng/ml HSP	89.2%
实施例 10	10% 水解明胶 +30ng/ml HSP	93.6%

[0142] 实施例 11 本发明提供一种稳定剂溶液

[0143] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶，所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成，HSP60 的浓度为 8ng/ml，HSP40 的浓度为 8ng/ml。

[0144] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下：

[0145] (1) 配置 pH8.0 的碳酸缓冲液 (PBS)；

[0146] (2) 向步骤 (1) 所得的缓冲液中加入 3mmol/L 维生素 C、3mmol/L 乙二胺四乙酸，同时加入 9% 的水解明胶和 16ng/ml 的 HSP，配置稳定剂溶液。

[0147] (3) 向步骤 (2) 所得的稳定剂溶液中加入 1 : 1000 稀释的 Anti-TSH 抗体，该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马 - 奥利奇有限公司生产

的,型号为 HPA026680 的产品。

[0148] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0149] 实施例 12 本发明提供一种稳定剂溶液

[0150] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成,HSP60 的浓度为 20ng/ml, HSP40 的浓度为 20ng/ml。

[0151] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0152] (1) 配置 pH6.5 的碳酸缓冲液(PBS);

[0153] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 4mmol/L 维生素 C、4mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 40ng/ml 的 HSP,配置稳定剂溶液。

[0154] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1 : 1000 稀释的 Anti-TSH 抗体,该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马-奥利奇有限公司生产的,型号为 HPA026680 的产品。

[0155] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0156] 实施例 13 本发明提供一种稳定剂溶液

[0157] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成,HSP60 的浓度为 14ng/ml, HSP40 的浓度为 14ng/ml。

[0158] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0159] (1) 配置 pH7.2 的碳酸缓冲液(PBS);

[0160] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 3mmol/L 维生素 C、4mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 28ng/ml 的 HSP,配置稳定剂溶液。

[0161] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1:1000 稀释的 Anti-TSH 抗体,该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马-奥利奇有限公司生产的,型号为 HPA026680 的产品。

[0162] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0163] 实施例 14 本发明提供一种稳定剂溶液

[0164] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成,HSP60 的浓度为 8ng/ml, HSP40 的浓度为 17ng/ml。

[0165] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0166] (1) 配置 pH7.5 的碳酸缓冲液(PBS);

[0167] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 4mmol/L 维生素 C、3mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 9% 的水解明胶和 25ng/ml 的 HSP,配置稳定剂溶液。

[0168] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1:1000 稀释的 Anti-TSH 抗体,该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马-奥利奇有限公司生产

的,型号为 HPA026680 的产品。

[0169] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0170] 实施例 15 本发明提供一种稳定剂溶液

[0171] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成,HSP60 的浓度为 12ng/ml, HSP40 的浓度为 8ng/ml。

[0172] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0173] (1) 配置 pH7.5 的碳酸缓冲液(PBS);

[0174] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 22ng/ml 的 HSP,配置稳定剂溶液。

[0175] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1:1000 稀释的 Anti-TSH 抗体,该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马-奥利奇有限公司生产的,型号为 HPA026680 的产品。

[0176] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0177] 实施例 16 本发明提供一种稳定剂溶液

[0178] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。

[0179] 所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成,HSP60 的浓度为 10ng/ml, HSP40 的浓度为 15ng/ml。

[0180] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0181] (1) 配置 pH7.5 的碳酸缓冲液(PBS);

[0182] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 3mmol/L 维生素 C、4mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 8% 的水解明胶和 35ng/ml 的 HSP,配置稳定剂溶液。

[0183] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1 : 1000 稀释的 Anti-TSH 抗体,该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马-奥利奇有限公司生产的,型号为 HPA026680 的产品。

[0184] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0185] 实施例 17 本发明提供一种稳定剂溶液

[0186] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成,HSP60 的浓度为 18ng/ml, HSP40 的浓度为 12ng/ml。

[0187] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0188] (1) 配置 pH7.5 的碳酸缓冲液(PBS);

[0189] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 8% 的水解明胶和 30ng/ml 的 HSP,配置稳定剂溶液。

[0190] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1:1000 稀释的 Anti-TSH 抗体,该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 5ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马-奥利奇有限公司生产

的,型号为 HPA026680 的产品。

[0191] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0192] 实施例 18 本发明提供一种稳定剂溶液

[0193] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP40 组成, HSP60 的浓度为 8ng/ml, HSP40 的浓度为 20ng/ml。

[0194] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0195] (1) 配置 pH7.5 的碳酸缓冲液(PBS);

[0196] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 4mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 9% 的水解明胶和 28ng/ml 的 HSP60 和 HSP70 的组合物(摩尔比为 1:1),配置稳定剂溶液。

[0197] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1 : 1000 稀释的 Anti-TSH 抗体,该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 1ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马-奥利奇有限公司生产的,型号为 HPA026680 的产品。

[0198] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0199] 实施例 19 本发明提供一种稳定剂溶液

[0200] 该稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。所述蛋白质稳定剂为水解明胶,所述热休克蛋白由 HSP60 和 HSP70 组成, HSP60 的浓度为 20ng/ml, HSP70 的浓度为 10ng/ml。

[0201] 该稳定剂溶液的制备方法和检测方法如下:

[0202] (1) 配置 pH7.5 的碳酸缓冲液(PBS);

[0203] (2) 向步骤(1)所得的缓冲液中加入 5mmol/L 维生素 C、5mmol/L 乙二胺四乙酸,同时加入 10% 的水解明胶和 30ng/ml 的 HSP,配置稳定剂溶液。

[0204] (3) 向步骤(2)所得的稳定剂溶液中加入 1 : 1000 稀释的 Anti-TSH 抗体,该抗体蛋白质在稳定剂中的浓度为 2ng/ml。上述抗体可以采用美国西格马-奥利奇有限公司生产的,型号为 HPA026680 的产品。

[0205] 将步骤(3)所制得的溶液置于 37℃ 水浴中进行热加速实验。实验结果如表 3 所示。

[0206] 四周后测定上述实施例 11 至 19 所提供的溶液中的物质(Anti-TSH 抗体)的活性,其结果按照实验前的活性为 100% 计,分别算出各组剩余活性,如表 3 所示。

[0207] 表 3 实施例 11-19 中的酶结合物的剩余活性百分数

[0208]

实施例	稳定剂溶液主要成份	剩余活性(100%)
实施例 11	9% 水解明胶 +16ng/ml HSP	89.5%
实施例 12	10% 水解明胶 +40ng/ml HSP	86.9%

实施例 13	10% 水解明胶 +28ng/ml HSP	92.4%
实施例 14	9% 水解明胶 +25ng/ml HSP	93.3%
实施例 15	10% 水解明胶 +20ng/ml HSP	112.6%
实施例 16	8% 水解明胶 +35ng/ml HSP	89.8%
实施例 17	8% 水解明胶 +30ng/ml HSP	88.3%
实施例 18	9% 水解明胶 +28ng/ml HSP	92.6%
实施例 19	10% 水解明胶 +30ng/ml HSP	90.5%

[0209] 通过表 1、表 2 和表 3 中的剩余活性的数值可以得出,本申请提供的稳定剂溶液对于提高酶结合物或蛋白质的稳定性效果明显,延长了酶结合物或蛋白质溶液的保存期。而且,当所述蛋白质稳定剂为水解明胶,浓度为 9-10% (w/v);所述热休克蛋白的浓度为 20-30ng/ml 时,所述稳定剂溶液对于提高酶结合物或蛋白质的稳定性效果尤其明显,热加速实验后的剩余活性高于 89.6%。

[0210] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例而已,并非用于限定本发明的保护范围。凡是根据本发明内容所做的均等变化与修饰,均涵盖在本发明的专利范围内。

专利名称(译)	稳定剂溶液及其制备方法,酶结合物混合液和蛋白质混合液		
公开(公告)号	CN102866248A	公开(公告)日	2013-01-09
申请号	CN201210367265.6	申请日	2012-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京鸿天志远科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京鸿天志远科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京鸿天志远科技有限公司		
[标]发明人	孙旭东 孙中锋		
发明人	孙旭东 孙中锋		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	张华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物免疫分析技术领域，具体涉及一种稳定剂溶液及其制备方法。为了进一步提高酶结合物、蛋白质等物质的稳定性，延长其保存期，本发明提供一种稳定剂溶液及其制备方法。本发明提供的稳定剂溶液包括蛋白质稳定剂、热休克蛋白、抗氧化剂、络合剂、和缓冲液。本发明提供的稳定剂溶液对于提高酶结合物及蛋白等物质的稳定性效果明显，且成本低、具有较大价格优势。本发明提供的稳定剂溶液的制备方法工艺简单，易于配制。

	稳定剂溶液主要成份	剩余活性(100%)
比较例 1	1.0%BSA	30.7
比较例 2	1.0% 水解明胶	31.8
比较例 3	8.0%BSA	56.7
比较例 4	8.0% 水解明胶	51.2
比较例 5	10%BSA	58.7
比较例 6	10% 水解明胶	59.2
比较例 7	5ng/ml HSP60	49.7
比较例 8	20ng/ml HSP40	79.2
比较例 9	10% 水解明胶 +5ng/ml HSP	57.6
比较例 10	9% 水解明胶 +10ng/ml HSP	65.0%

实施例 1 本发明提供一种稳定剂溶液