

## • 检验仪器与试剂评价 •

## 酶联免疫吸附试验试剂盒稳定剂的研制与应用

武向丽<sup>1</sup>, 程 华<sup>2△</sup>, 史 蕾<sup>3</sup>, 崔 硕<sup>2</sup>, 闫静辉<sup>2</sup>

(1. 河北省邯郸市中心医院药剂科, 河北邯郸 056001; 2. 河北省科学院生物研究所, 河北石家庄 050081; 3. 河北师范大学生命科学学院, 河北石家庄 050024)

**摘要:**目的 研制酶联免疫吸附试验试剂盒中各组分的稳定剂, 使得试剂盒保存期达到国家相关规定。方法 采用经验法和正交法相结合的办法, 配制一系列稳定剂配方, 对酶标板、酶标抗体及标准品等进行处理, 通过对照试验, 筛选出稳定效果最好的配方。结果 筛选到一种包被稳定剂(质量分数: 牛血清清蛋白 0.5%, 明胶 0.25%, 海藻糖 5%, PEG4000 0.1%), 一种酶标抗体稳定剂(质量分数: 牛血清清蛋白 1%, 蛋白胨 1%, 蔗糖 10%, 海藻糖 5%, PEG4000 0.25%)。结论 在稳定剂作用下, 酶联免疫吸附试验试剂盒可在 4 ℃ 条件稳定放置 1 年。

**关键词:** 酶联免疫试剂盒; 酶标板; 酶标抗体; 稳定剂

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.045

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)18-2527-02

## The development and application of stabilizers for ELISA test kit

Wu Xiangli<sup>1</sup>, Cheng Hua<sup>2△</sup>, Shi Lei<sup>3</sup>, Cui Shuo<sup>2</sup>, Yan Jinghui<sup>2</sup>

(1. Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China; 2. Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang, Hebei 050081, China; 3. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024, China)

**Abstract:** Objective To develop ELISA kit stabilizer for each component, with which the shelf life of kit could meet the commercial need. Methods A series of stabilizers for microplate, enzyme-labeled antibody and standards were prepared by the means of experience and orthogonal approach, through controlled trials, screening out the best stabilizer formulations. Results A kind of coated stabilizer (mass fraction: bovine serum albumin 0.5%, gelatin 0.25%, trehalose 5%, PEG4000 0.1%) and a kind of enzyme labeled antibody stabilizer (mass fraction: Bovine serum albumin 1%, peptone 1%, sucrose 10%, trehalose 5%, PEG4000 0.25%) were screened out. Conclusion The ELISA kits can be stable at 4 ℃ for 1 year after treated with the obtained stabilizers.

**Key words:** enzyme-linked immunosorbent assay kit; coating plate; enzyme labeled antibody; stabilizer

酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒作为一种免疫诊断方法, 具有快速、操作简单和通量高等特点, 目前已广泛应用于临床。在 ELISA 检测试剂盒的使用当中, 酶标板及试剂的稳定性是衡量产品质量的一个关键指标<sup>[1]</sup>。目前, 国外已有商业化稳定剂产品, 国内在这方面也有相应的进展, 但效果仍不理想<sup>[2-4]</sup>。为此, 本研究以铁蛋白 ELISA 检测试剂盒为例, 筛选了包被及酶标抗体稳定剂, 并对其特性进行了评价和初步应用。

## 1 材料与与方法

**1.1 仪器与试剂** 铁蛋白标准品购自 Fitzgerald 公司; 牛血清蛋白(BSA)、Proclin 300、聚乙二醇 4000(PEG4000)均购自 Sigma 公司; 抗铁蛋白单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记抗铁蛋白单克隆抗体为本实验室制备; 可溶性单组分 TMB 底物溶液购自天根生物公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(二抗)购自华美生物工程公司; 明胶、聚乙烯吡咯烷酮(PVP, K-30)、吐温 20、蔗糖和海藻糖等均购于上海生物技术工程服务有限公司; 可拆式聚苯乙烯塑料酶标板购自 Costar 公司; 其他化学试剂均为分析纯。电子分析天平为 Mettler 公司产品; 高速冷冻离心机为 Beckman 公司产品; 酶标仪为美国伯乐公司产品; 洗板机为美国 Thermo 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 包被稳定剂的配制** 采用经验尝试法, 将 BSA、明胶、PEG4000 等试剂, 根据溶解度不同, 用 0.1 mol/L、pH=7.4 的磷酸盐缓冲液配制成不同配方溶液, 见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”), 防腐剂选取质量分数为 0.01% 的 Proclin300, 同时设磷酸盐缓冲液为空白对照。

**1.2.2 包被稳定剂的筛选** 用 0.05 mol/L、pH=9.6 的碳酸盐缓冲液将抗铁蛋白单克隆抗体 2A3 稀释为 5 μg/mL 进行包被, 每孔 100 μL, 置 4 ℃ 过夜; 取出后洗涤、甩干, 每孔加入 150 μL 预先配制好的不同配方稳定剂, 37 ℃ 下恒温孵育 2 h。取出后将酶标板垂直向下甩出内容物, 吸水纸上拍干残留液, 装入锡箔袋中真空密封。将上述处理后的酶标板置于 37 ℃ 恒温箱中, 每隔 2 天取出 2 条放入 4 ℃ 冰箱, 连续取样到第 14 天。最终按照 ELISA 法检测所有酶标板的吸光度(A)值, 选择 A 值降低最小的作为进一步试验的对象。

**1.2.3 酶标抗体及标准品稳定剂的配制** 采用经验尝试法, 将 BSA、蛋白胨、蔗糖、PEG4000 等试剂, 根据溶解度不同, 用含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液配制成不同配方溶液, 见附表 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”), 防腐剂选取质量分数为 0.01% 的 Proclin300, 同时设磷酸盐缓冲液为空白对照。

**1.2.4 酶标抗体及标准品稳定剂的筛选** 用 0.05 mol/L、pH=9.6 的碳酸盐缓冲液将抗铁蛋白单克隆抗体 2A3 稀释为 5 μg/mL 进行包被, 每孔 100 μL, 置 4 ℃ 过夜; 取出后洗涤、甩干备用。使用不同配方稳定剂对标准品及酶标抗体 5H5 进行适度比例的稀释, 分装置于 37 ℃ 恒温箱中, 每隔 2 天取出 1 套放入 4 ℃ 冰箱, 连续取样到第 14 天。以 ELISA 法检测 A 值, 选择 A 值降低最小的作为进一步试验的对象。

**1.2.5 试剂盒 37 ℃ 条件下加速破坏性试验** 用筛选到的包被、酶标抗体及标准品稳定剂应用到铁蛋白 ELISA 检测试剂盒中, 同时设立没有经稳定剂处理的试剂盒为对照, 37 ℃ 干燥条件下保存, 每天定时取出 1 套放入 4 ℃ 冰箱, 连续取样到第

12 天,测定标准阳性、阴性对照品的 A 值及试剂盒的灵敏度。本试验要求 37 °C 干燥条件下保存 12 d,试剂盒的整体活性能够保持最初的 80% 以上。

**1.2.6 试剂盒 4 °C 条件下稳定性试验** 将筛选到的包被、酶标抗体及标准品稳定剂应用到铁蛋白 ELISA 检测试剂盒中,同时设立没有经稳定剂处理的试剂盒为对照,4 °C 干燥条件下保存,每月定期抽检至 12 个月,测定标准阳性、阴性对照品的 A 值。

**2 结 果**

**2.1 包被稳定剂的筛选** 结果表明在 37 °C 加速破坏试验条件下,空白对照组包被抗体的活性迅速下降,第 8 天时已经基本没有活性,见图 1。总体而言,试验组中加入的不同配方稳定剂均具有一定的稳定作用,能够延缓包被抗体活性的衰退,其中配方 5 的效果最为明显,37 °C 加速破坏试验进行到 14 d 时,包被抗体的活性下降幅度小于 10% ( $A_{0d} = 2.863; A_{14d} = 2.566$ ),表明该配方可以用于包被抗体的稳定。

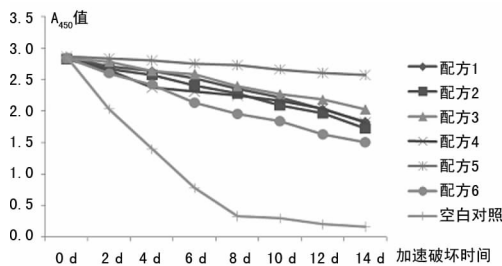


图 1 不同配方对包被抗体热稳定性的保护效果

**2.2 酶标抗体及标准品稳定剂的筛选** 结果表明在 37 °C 加速破坏试验条件下,空白对照组酶标抗体的活性迅速下降,第 10 天时已经基本没有活性,见图 2。总体而言,试验组中加入的不同配方稳定剂均具有一定的稳定作用,能够延缓酶标抗体和标准品活性的衰退,其中配方 4 的效果最为明显,37 °C 加速破坏试验进行到第 14 天时,包被抗体的活性下降幅度小于 12% ( $A_{0d} = 2.979; A_{14d} = 2.628$ ),表明该配方可以用于酶标抗体及标准品的稳定。

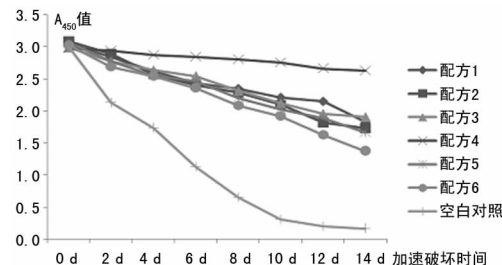


图 2 不同配方对酶标抗体及标准品热稳定性的保护效果

**2.3 试剂盒 37 °C 条件下加速破坏性试验** 经稳定剂处理后的整个检测系统在 37 °C 条件下保存 12 d 后,活性基本保持不变 ( $A_{0d} = 2.787; A_{12d} = 2.473$ ),同时检测灵敏度变化很小;未经稳定剂处理后的整个检测系统,37 °C 条件下保存 1 d 后,检测灵敏度已经降低了一半,3 d 后检测系统已经不能形成良好的线性关系,不具备检测特性了,见附表 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。课题组运用统计软件对每次检测的线性回归系数  $r^2$  作图,发现第 12 天的结果为 0.990,符合国家关于临床检测试剂的相关规定。

**2.4 试剂盒 4 °C 条件下稳定性试验** 经稳定剂处理后的整个检测系统,在 4 °C 条件下保存 12 个月后,活性基本保持不变 ( $A_{0d} = 2.785; A_{12月} = 2.651$ ),同时检测灵敏度变化很小;未经

稳定剂处理后的整个检测系统,4 °C 条件下保存 2 个月后,检测灵敏度已经降低了一半,5 个月后检测系统已经不能形成良好的线性关系,不具备检测特性了。见附表 3、4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**3 讨 论**

稳定性是诊断试剂盒质量的一个重要指标,是试剂盒安全、准确、有效的重要保障。现有的研究表明糖类物质、有机大分子和惰性蛋白质都具有稳定剂的作用。糖类物质含有多个羟基,可与蛋白结合的水分子相互作用,有利于保持蛋白表面的湿润,使蛋白不致因失水而失活<sup>[5]</sup>。其中,海藻糖是一种广泛存在于低等植物、藻类及真菌体内的非还原性双糖,结构稳定,无毒性,是一种天然的保护剂<sup>[6]</sup>; PEG 是一种多羟基聚合物,相对分子质量较大,当抗原蛋白或抗体吸附在酶标板上后,PEG 能够形成一层保护膜,使得蛋白结构不易破坏,很好的保护其活性,是一种较为理想的保护剂组分<sup>[7]</sup>; 惰性蛋白质能够在包被于酶标板上的抗体表面形成一层保护膜,使抗体蛋白处于塑料板与保护膜的夹层之中,从而保护蛋白结构免遭破坏<sup>[8-10]</sup>。

本研究选择了多种试剂用作铁蛋白检测试剂盒稳定剂配方筛选。为减少工作量,采用经验法和正交法相结合的手段来确定稳定剂的配方。最终筛选出稳定效果最为理想的稳定剂配方,包括适用于酶标板的稳定剂和适用于酶标抗体的稳定剂配方各一个。将稳定剂联合处理检测试剂盒,经加速贮存试验(37 °C, 12 d)和冷藏试验(4 °C, 12 个月),结果表明,试剂盒的整体活性、检测灵敏度等没有显著变化,满足商品化铁蛋白 ELISA 试剂盒货架期的要求。同时,笔者筛选出的稳定剂组分均为常用试剂,价格低廉、配制和使用简单方便,十分利于其推广使用。

抗原、抗体结构的复杂性,决定了针对不同类型的 ELISA 产品要做稳定剂配方的改良,在以后的研究中也将会尝试使用其他试剂,以期达到更佳稳定效果。

**参考文献**

- [1] 张丽. 关于体外诊断试剂的稳定性研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(22): 1899-1900.
- [2] 董林, 王金良, 张春玲, 等. PCV2 ELISA 诊断试剂盒稳定剂的筛选与应用[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(1): 8-12.
- [3] 张茂林, 段铭, 关振宏, 等. 一种包被抗原稳定剂的研制及其特性鉴定[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(7): 1667-1668.
- [4] 罗丽, 邹莉, 戴路, 等. 尿微量白蛋白 ELISA 诊断试剂盒稳定剂效果研究[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(6): 1170-1172.
- [5] 武华丽, 胡一桥. 冷冻干燥制剂的稳定性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(7): 436-438.
- [6] 孙东坡, 胡一桥. 蛋白质冷冻干燥制品中的保护剂及其保护机制[J]. 药学进展, 2003, 27(4): 201-205.
- [7] Park JW, Kurosawa S, Aizawa H, et al. Comparison of stabilizing effect of stabilizers for immobilized antibodies on QCM immunosensors[J]. Sens Actuators B Chem, 2003, 91(1/3): 158-162.
- [8] 张敬如, 黄复生, 王昆. 蛋白质药品的真空冷冻干燥技术及研究进展[J]. 中国药业, 2006, 15(13): 25-27.
- [9] 王永明, 黄耀凌, 王鹤佳, 等. 链霉素酶联免疫检测试剂盒的稳定性研究[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(7): 23-24.
- [10] 桂文君, 梁赤周, 王姝婷, 等. 三唑磷酶联免疫吸附测定法中包被抗体稳定剂的研究[J]. 农药学报, 2007, 9(2): 165-171.