

· 论 著 ·

## 一种灵敏稳定的酶联免疫吸附试验底物的研制及评价\*

刘志强, 段 山, 张玲华

(深圳市人口和计划生育科学研究所, 广东深圳 518040)

**摘要:**目的 研制一种灵敏、稳定的酶联免疫吸附试验底物并进行方法学评价。方法 制备了以四甲基联苯胺和过氧化氢脲为主要成分的底物体系, 并对其灵敏度、精密性和存放稳定性进行了方法学鉴定试验, 且与其他 3 种底物进行了比较。结果 本研究自制底物与 3 种商品化底物相比, 灵敏度高于其中 2 种, 精密性试验平均变异系数为 3.50%, 4℃ 存放自制底物第 1 天、7 天、1 月、6 月、12 月测定其酶联物反应所得吸光度值分别为 2.268、2.403、2.358、2.278、2.330, 标准差为 0.056 185, 变异系数为 2.40%。结论 本研究自制底物灵敏度和精密度高、稳定性强, 配制方法简便、重复性好。既能满足实验室科研需要, 作为检验试剂盒的一个重要组分也达到了研发商品化试剂盒的要求, 为科研实验及科研转化提供了一种经济、有效的选择。

**关键词:**底物; 四甲基联苯胺; 灵敏度; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1496-02

## Development and evaluation of a sensitive and stable enzyme-linked immunosorbent assay substrate\*

Liu Zhiqiang, Duan Shan, Zhang Linghua

(Shenzhen Population and Family Research Institute, Shenzhen, Guangdong 518040, China)

**Abstract:** Objective To develop a sensitive and stable substrate for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and carry out methodology evaluation tests on it. Methods A kind of substrate with tetramethyl benzidine and urea peroxide as its main components were made up, its sensitivity, precision and storage stability were evaluated and compared with other three kinds of substrate. Results This substrate was more sensitive than two of the three commercial substrates. The variable coefficient of precision test was 3.5%. The optical densities (OD) of the new substrate after stored one day, seven days, one month, six months, twelve months in 4℃ environment were 2.268, 2.403, 2.358, 2.278, 2.330 respectively, the standard deviation was 0.056 185, the variable coefficient was 2.4%. Conclusion The substrate proposed in this paper displays good sensitivity, precision and stability. The preparation method is simple, reproducible. This substrate not only satisfies the requirements of laboratory research, but also meets with the demands for commercial kit development due to its function as an important component of test kits. It is an economical and effective choice for both laboratories and research transformation.

**Key words:** substrate; tetramethyl benzidine; sensitivity; stability

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是一种得到广泛应用的免疫学检测技术, 其结果受很多因素的影响, 其中底物显色是影响试验成功与否的关键因素。很多科研院校在实验研究中经常会使用以辣根过氧化物酶作为标记酶的标记物, 3,3',5,5'-四甲基联苯胺-过氧化氢 (TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 是最为常用的底物体系<sup>[1]</sup>, 有的实验研究需要使用大量的显色剂, 商品化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物价格昂贵, 使研究成本大幅度上升, 由于涉及商业机密, 成熟的 TMB 底物配方不会对外公开, 国内外有关文献的配制方案无法满足现在科研工作和科研转化产品的需求, 本研究旨在解决这一技术难题。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 酶标板由丹麦 NUNC 公司提供, 辣根过氧化物酶标记物为兔抗人 IgG 酶联物, 由美国 Biorad 公司提供, TMB 由上海丽珠生化公司提供, 过氧化氢脲由 FLUKA 公司提供, 终止液为 2 mol/L 硫酸, 酶联物稳定剂由本室自制, 去离子水由 Millipore 纯水器制备。ELISA 底物由上海科华生物公司及美国 Dia-sorin 公司提供。酶标仪 680 由美国 Bio-rad 公司提供。乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na<sub>2</sub>)、柠檬酸、乙酸钠、二甲基亚砜、吐温-20。

## 1.2 方法

**1.2.1 自制底物配制过程** (1) 溶液 1 配制: 取棕色玻璃瓶加入去离子水 500 mL, 然后再加入柠檬酸 5 250 mg 和 EDTA-Na<sub>2</sub>

83 mg, 溶解后高压消毒, 取出后静置冷却至 50~60℃; 称取 TMB 25 mg 加入 4 mL 二甲基亚砜中进行溶解, 然后将次溶解物加入至前面配制的已冷却至 50~60℃ 的溶液中, 4℃ 冰箱保存备用。(2) 溶液 2 配制: 取棕色玻璃瓶加入去离子水 500 mL, 然后再分别加入柠檬酸 4.1 g 和乙酸钠 5.5 g, 溶解后高压消毒, 取出后静置冷却至室温, 分别加入过氧化氢脲 0.3 g 和吐温-20 1 mL, 溶解后 4℃ 冰箱保存备用。(3) 使用方法: 将溶液 1 和溶液 2 等量混合每个酶标板孔加 100 μL, 显色 10 min, 加入 2 mol/L 硫酸终止反应, 酶标仪 450 nm 测定吸光度 (OD) 值。

**1.2.2 辣根过氧化物酶联物的稀释和保存** 酶联物按 1:1 比例加甘油, 然后用酶联物稳定液将酶联物进行 1:3 000、1:6 000、1:12 000、1:24 000、1:48 000 稀释, 冷冻保存。

**1.2.3 方法学鉴定试验** (1) 灵敏度对比试验: 取 ELISA 板 3 条, 每条按顺序分别加入 1:3 000、1:6 000、1:12 000、1:24 000、1:48 000 稀释的酶联物, 然后每条分别加入自制底物 100 μL、上海科华底物 100 μL、Dia-sorin 底物 100 μL, 37℃ 反应 10 min, 再加入 2 mol/L 硫酸终止反应, 酶标仪 450 nm 测定 OD 值。(2) 稳定性试验: 将自制底物 4℃ 保存, 分别于保存后的第 1 天、7 天、1 月、6 月、12 月测定其与 5 μL 1:6 000 稀释的酶联物反应后的 OD 值, 每次各检测 4 孔取其均值。(3) 精密度试验: 配制稀释度分别为 1:3 000、1:12 000、1:48 000 的高、中、低 3 份浓度的酶联物, 做 10 次相同的测试, 以评价自

\* 基金项目: 广东省人口和计划生育委员会科研项目 (2012248)。

作者简介: 刘志强, 男, 副主任技师, 主要从事免疫学技术研究。

制底物批内变异系数(CV)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。

**2 结果**

**2.1 4 种底物灵敏度对比试验** 自制底物、厦门英科、上海科华和 Dia-sorin 公司 4 种底物与不同浓度的酶联物反应, 所测得的 OD 值随着酶联物浓度的增加而明显上升, 自制底物显色未见沉淀。比较 4 种底物与酶联物反应, 不同稀释度下, 自制底物反应灵敏度均低于厦门英科, 高于上海科华和 Dia-sorin, 见图 1。

**2.2 自制底物稳定性** 自制底物 4 °C 保存, 在配制第 1 天、7 天、1 月、6 月、12 月测定其酶联物反应所得 OD 值, 5 次结果的平均值分别为 2.268、2.403、2.358、2.278、2.330, 标准差为 0.056 185, CV 为 2.40%。

**2.3 自制底物精密度** 自制底物与 3 份高、中、低浓度的酶联物反应 10 次测定所得 CV 分别为 4.82%、3.27%、2.89%。

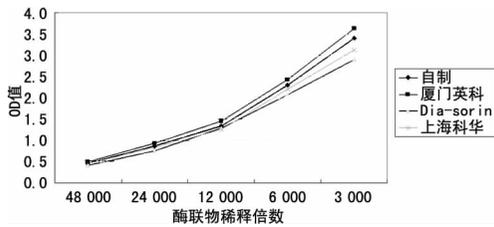


图 1 4 种底物与不同稀释倍数酶联物反应性

**3 讨论**

ELISA 显色底物质量的优劣对确保 ELISA 测定结果的准确性十分重要, 教科书及实验工具书上配方显色灵敏度差, 稳定性低, 不能长期保存。市面商品化底物价格每 100 mL 从 100 多元到几百元不等, 价格昂贵。在丁香园、生物通、基因酷等专业论坛中经常有实验工作者求助底物配方的帖子, 说明由于缺乏一个成熟稳定的底物配制方法, 在实验研究及技术转化产品中都困扰着广大实验工作者。

稳定灵敏的底物研制一直是国内医学领域一个较为热门的研究方向, 查阅近几年国内外已公开发表的论文, 研究结果并不令人满意。上海理工大学医疗器械与食品学院李红梅等<sup>[2]</sup>、南方医科大学基础医学院蒋小滔等<sup>[3]</sup>、中国农业大学农学与生物技术学院俞彩霞等<sup>[4]</sup>学者的研究结果相对较为理想。但这三位学者的配制方案都各有其缺陷, 前二者的配制溶液储存时间短, 分别是 2 月和 3 月, 后者的方案在 4 °C 能稳定保存 1 年, 使用起来比较麻烦。笔者检索到的国外报道也较少,

McKimm-Breschkin<sup>[5]</sup> 和 Frey 等<sup>[6]</sup> 使用四丁基硼氢化铵作为底物稳定剂得到高度敏感的显色底物, 不是即用型的, 用前需进行稀释。

本文所述底物灵敏度对比试验中 4 种底物与酶联物反应, 不同稀释度下, 自制底物反应灵敏度均低于厦门英科, 高于上海科华和 Dia-sorin。本文所配制的底物与国内外 3 种底物做了对比, 显色灵敏度高于其中 2 种, 比其中 1 种稍低, 国外的底物显色灵敏度最低, 应该是与其单组分有关。稳定性试验中, 配制当天的 OD 值略低于第 7 天所测得的 OD 值, 理论上由于自发氧化随时间延长底物显色应该降低, 但本底物反而在第 7 天后显色略高于当天的新鲜配制, 可能是放置一段时间后, 底物溶液达到平衡, 反应灵敏度达到最佳状态。精密密度试验 4 °C 保存在配制第 1 天、7 天、1 月、6 月、12 月测定其酶联物反应所得 OD 值 CV 为 2.40%, 低于 5.00%, 说明本底物稳定性强。精密密度试验 CV 分别为 4.82%、3.27%、2.89%, 均低于 5.00%, 说明本底物精密度高。

综上所述, 本文底物配制方法简便, 重复性好, 灵敏度和精密度高, 稳定性强, 符合显色剂评价的四合一标准<sup>[7]</sup>, 优于国内外文献报导<sup>[5-6]</sup>。本文自制底物既能满足实验室科研需要, 作为检验试剂盒的一个重要组分, 也达到了研发商品化试剂盒的要求, 为科研实验及科研转化提供了一种经济、有效的选择。

**参考文献**

[1] 李影林. 中华医学检验全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 2141-2150.  
 [2] 李红梅, 陈佳, 徐斐, 等. ELISA 测定中 TMB 显色体系的优化及其稳定性研究[J]. 生物技术通报, 2010, 26(2): 126-130.  
 [3] 蒋小滔, 吴砂, 左大明, 等. 新型双组分 3,3',5,5'-四甲基苯胺显色剂的配制[J]. 实用预防医学, 2008, 15(6): 1752-1754.  
 [4] 俞彩霞, 赵静, 王保民, 等. 硫代硫酸钠在四甲基苯胺贮液保存中的应用[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(2): 27-30.  
 [5] McKimm-Breschkin JL. The use of tetramethylbenzidine for solid phase immunoassays[J]. J Immunol Methods, 1990, 135(1/2): 277-280.  
 [6] Frey A, Meckelein B, Externest D, et al. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays[J]. J Immunol Methods, 2000, 233(1/2): 47-56.  
 [7] 周南. 再论显色剂的比较研究[J]. 化学试剂, 1995, 17(1): 24-28.

(收稿日期: 2015-02-18)

(上接第 1495 页)

加强对医生职业素质教育, 减少或避免经验用药情况发生。

**参考文献**

[1] 孙文静, 王秋玲. 尘肺肺部感染并发呼吸衰竭的病例分析[J]. 实用预防医学, 2011, 18(8): 1461.  
 [2] 李娟, 范雪云, 郝小惠, 等. 尘肺患者血清中 TGF-β、PDGF 的表达及意义[J]. 工业卫生与职业病, 2011, 37(5): 290-293.  
 [3] 张玲, 李济超, 李文芳, 等. 尘肺患者生存质量及其影响因素分析[J]. 工业卫生与职业病, 2011, 37(6): 341-344.  
 [4] 周宇燕, 高杰, 李智民. 尘肺病患者医院感染危险因素分析[J]. 第三军医大学学报, 2014(18): 1941-1944.  
 [5] 张道纪. 经纤支镜肺灌洗治疗煤工尘肺并肺部感染 35 例[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(3): 393-394.  
 [6] 帕提古丽·乃吉米丁, 帕它木·莫合买提, 热沙来提·瓦衣特, 等. 1985 年至 2006 年新疆新发尘肺诊断病例的分析[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(2): 70-73.

[7] 李光杰, 刘灿珍, 李文菊, 等. 尘肺合并肺部感染临床分析[J]. 中国职业医学, 2010, 37(6): 496-497.  
 [8] 李娟, 郑全辉, 刘亚楠, 等. 尘肺患者外周血中 T 淋巴细胞亚群及免疫球蛋白的改变[J]. 工业卫生与职业病, 2013, 39(1): 5-8.  
 [9] 张建芳, 崔玉芳, 王卿, 等. 超敏 C 反应蛋白与尘肺肺感染合并肺心病病情的相关性分析[J]. 职业与健康, 2014, 30(11): 1463-1465.  
 [10] 李冬红, 陈志军, 盛秋洁. 尘肺肺泡灌洗的院内感染控制[J]. 职业与健康, 2014, 30(2): 180-182.  
 [11] 李兴纪. 支气管肺泡灌洗治疗尘肺合并肺部感染 39 例分析[J]. 山东医药, 2014, 54(1): 86-88.  
 [12] 孙晓伟, 安秀红, 张华. 尘肺合并糖尿病患者肺内感染临床分析[J]. 职业卫生与应急救援, 2012, 30(4): 210-211.

(收稿日期: 2015-01-25)