

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610028624. X

[43] 公开日 2008 年 1 月 9 日

[11] 公开号 CN 101101294A

[22] 申请日 2006.7.5

[21] 申请号 200610028624. X

[71] 申请人 上海华泰生物工程实业有限公司

地址 200333 上海市普陀区千阳路 271 弄 13 号

[72] 发明人 周兴华

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司
代理人 王 巍

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备

[57] 摘要

本发明提供了一种酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备方法。本发明方法改变了酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的组成，使整个配制过程简化，提高了显色灵敏度，增加了显色剂的稳定性，并降低了显色背景。有较大的临床应用价值。

1、一种酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

(1) 配制 0.01-0.1M Tris-HCl 或柠檬酸-乙酸钠缓冲液，pH 值为 2.0~5.0；

(2) 在该缓冲系统中加入乙二胺四乙酸二钠盐，终浓度为 0.06 g/L~0.32 g/L，搅拌，使充分溶解；

(3) 加入青霉素钠或青霉素钾或氨苄青霉素，终浓度为 0.02 g/L~0.1 g/L，搅拌，使充分溶解；

(4) 加入羟胺，终浓度为 0.01 ml/L~0.06 ml/L，搅拌，使充分溶解；

(5) 加入 TMB 盐酸盐，终浓度为 0.3 g/L~2.4 g/L，使用时的具体浓度根据试剂所需灵敏度而定，搅拌，使充分溶解。

2、根据权利要求 1 所述的一种酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备方法，其特征在于该方法制得的显色剂适用于以过氧化物为酶促反应底物的显色系统中。

3、根据权利要求 2 所述的过氧化物为过氧化氢或过氧化脲，以此类物质为底物的酶为辣根过氧化物酶。

酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备

技术领域：

本发明属于生物体外诊断试剂技术领域。具体涉及一种酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备。

背景技术：

酶联免疫检测方法（ELISA）由于具有快速、敏感、简便、易于标准化等优点，已被广泛应用于抗原、抗体、细胞因子以及生化物质等的检测。ELISA 试剂的检测方法有很多种，但各种方法都离不开酶结合物和显色剂。在 ELISA 试剂中应用最广泛的酶是辣根过氧化物酶（HRP），HRP 的底物是过氧化物，如过氧化氢，而该系统的显色剂有多种，目前最常用的是 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺（TMB）。相对于其他显色剂来讲，TMB 有许多优点，如不致癌性、稳定性好等。检测时，HRP 催化过氧化物释放出氧，无色的 TMB 被氧化成蓝色的产物，加入酸性的终止液终止反应后，蓝色溶液变成橙黄色，在 450nm 波长有最大吸收峰。通过测量吸光度，便可定性或定量判断出被检测物的含量。

使用 TMB 作为显色剂，其制备过程比较复杂。通常的制备方法为，先将 TMB 溶于有机溶剂（如二甲基亚砷，二甲基甲酰胺等）中，然后加热使其充分溶解，配制成浓缩液，再边搅拌边缓慢加入到配制好的缓冲液中。整个制备过程要避光，不能有沉淀产生，操作比较繁琐。

由于 TMB 不溶于水，即使用有机溶剂助溶，在水中的溶解度也不高，配制的浓度不能过高，否则会有沉淀产生，因此制备的显色剂灵敏度不高。

除了灵敏度外，显色背景也是 ELISA 试剂的一个很重要的指标，较高的显色背景不仅使实验结果难以判断，而且容易造成错误的检测结果。

低显色背景是高品质试剂的基本要求。而直接用市售 TMB 制备的显色剂往往背景偏高。

发明内容：

本发明所要解决的技术问题在于克服上述不足之处，研究改进酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备。

本发明通过改变酶联免疫体外诊断试剂中的显色剂的配方来简化显色剂的配制过程并提高其灵敏度和改善显色背景。

本发明改变酶联免疫体外诊断试剂中的显色剂的组成，使用 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺盐酸盐（3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride, TMB 盐酸盐）代替 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺（TMB），使整个配制过程简化。TMB 盐酸盐可直接溶解到水溶液中，而不需要使用有机溶剂助溶。

TMB 盐酸盐在水中的溶解度可以达到 1%，很容易就可根据试剂需要配制成浓度较高的溶液，获得较高的灵敏度。而 TMB 即使使用有机溶剂助溶在水中的溶解度也比较低，通常在 0.1% 以下，为了获得稍高的溶解度，需要增加有机溶剂用量，反过来有机溶剂用量加大又影响了显色灵敏度。

本发明使用的缓冲液为 0.01-0.1M Tris-HCl 缓冲液，PH 为 2.0~5.0，或其他缓冲系统，如 0.01-0.1M 柠檬酸-乙酸钠，PH 为 2.0~5.0，在该缓冲系统中通过加入 EDTA 二钠盐，可以增加显色剂的稳定性，使显色剂的保存期延长。

本发明在显色剂中加入了青霉素钠（或青霉素钾、或氨苄青霉素）和羟胺来降低显色背景同时增加其稳定性。

本发明提供了一种酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备方法。

本发明的显色剂制备包括下列步骤：

（1）配制 0.01-0.1M Tris-HCl 或柠檬酸-乙酸钠缓冲液，pH 值为

2.0~5.0;

(2) 在该缓冲系统中加入乙二胺四乙酸二钠盐, 终浓度为 0.06 g/L~0.32 g/L, 搅拌, 使充分溶解;

(3) 加入青霉素钠或青霉素钾或氨苄青霉素, 终浓度为 0.02 g/L~0.1 g/L, 搅拌, 使充分溶解;

(4) 加入羟胺, 终浓度为 0.01 ml/L~0.06 ml/L, 搅拌, 使充分溶解;

(5) 加入 TMB 盐酸盐, 终浓度为 0.3 g/L~2.4 g/L, 使用时的具体浓度根据试剂所需灵敏度而定, 搅拌, 使充分溶解。

本发明的显色剂适用于以过氧化物为酶促反应底物的显色系统中。其中所述的过氧化物为过氧化氢或过氧化脲, 以此类物质为底物的酶为辣根过氧化酶 (HRP)。

本发明的有益效果:

(1) 使用 TMB 盐酸盐, 显色灵敏度高。

(2) 显色背景低。

(3) 配制过程简单, 去除了传统方法中的有机溶剂溶解和配制浓缩液的过程, 不用加热来进行溶解和稀释。

(4) 在试剂盒的保存温度 (2~8℃) 下, 稳定性增加。

本发明显色剂与传统显色剂比较数据

以双抗体夹心 ELISA 法检测 HBsAg 为例, 在已包被抗体的微孔板中加入系列稀释的抗原, 按照常规反应过程进行试验, 分别对比传统显色剂和本发明显色剂, 用 2M 硫酸溶液终止反应后, 在酶标仪上比色, 结果如下:

项目	HBsAg 含量 (ng/ml)	传统显色剂 (含 TMB 0.04%)	本发明显色剂 (含 TMB 盐酸盐 0.06%)
灵敏度(OD 值, $\lambda = 450\text{nm}$)	0.5	0.150	0.311
	1	0.322	0.657
	2	0.612	1.196
	4	1.157	2.129
	8	2.028	3.106
显色背景(100 份阴性标本平均 OD 值)		0.070	0.050
稳定性 (2~8℃ 保存月数)		9	15

实施例 1:

制备 1 L 显色剂, TMB 盐酸盐浓度为 0.04%:

1、在容量瓶中加入约 500 ml 蒸馏水, 再依次加入下列物质, 待前一种溶解后再加入后一种; Tris 2.42 g; HCl (36%-38%) 2.4 ml; EDTA 二钠盐 0.186 g; 青霉素钠 0.05 g; 羟胺 0.03 ml; TMB 盐酸盐 0.4 g。待溶解后补足蒸馏水至 1 L。

2、用 HCl 调整 pH 值为 2.5。

实施例 2:

制备 1 L 显色剂, TMB 盐酸盐浓度为 0.06%:

1、在容量瓶中加入约 500 ml 蒸馏水, 再依次加入下列物质, 待前一种溶解后再加入后一种; Tris 2.42 g; HCl (36%-38%) 2.4 ml; EDTA 二钠盐 0.186 g; 青霉素钠 0.05 g; 羟胺 0.03 ml; TMB 盐酸盐 0.6 g。待溶解后补足蒸馏水至 1 L。

2、用 HCl 调整 pH 值为 2.5。

实施例 3:

用浓度为 0.06% TMB 盐酸盐溶液为显色剂, 检测血清或血浆标本中的 HBsAg。

(1) 在已包被抗 HBs 的微孔板中依次加入标本 50 ul, 同时做两孔阴性对照、一孔阳性对照、一孔空白对照, 然后每孔 (除空白对照孔外) 加入抗 HBs-HRP 酶结合物溶液 50 ul, 置 37℃ 保温 30 分钟。

(2) 弃去孔内液体, 用洗涤液洗板 5 次。

(3) 各孔加底物溶液 50 ul, 本发明实施例 2 制备的显色剂 50 ul, 置 37℃ 保温 15 分钟。

(4) 各孔加终止液 50 ul, 终止反应。

(5) 将反应板置酶标比色计 450 nm 波长处用空白孔校零, 读取各孔 OD 值。

(6) 计算, Cut Off 值 = 阴性对照平均 OD 值 $\times$ 2.1, 阴性对照平均 OD 值小于 0.05 按 0.05 计算, 大于等于 0.05 按实际 OD 值计算。

(7) 结果判断: 标本 OD 值大于或等于 Cut Off 值为阳性, 小于 Cut Off 值为阴性。

专利名称(译)	酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备		
公开(公告)号	CN101101294A	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN200610028624.X	申请日	2006-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	上海华泰生物工程实业有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海华泰生物工程实业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海华泰生物工程实业有限公司		
[标]发明人	周兴华		
发明人	周兴华		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/78		
代理人(译)	王巍		
其他公开文献	CN101101294B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的制备方法。本发明方法改变了酶联免疫体外诊断试剂中显色剂的组成，使整个配制过程简化，提高了显色灵敏度，增加了显色剂的稳定性，并降低了显色背景。有较大的临床应用价值。

项目	HBsAg 含量 (ng/ml)	传统显色剂 (含 TMB 0.04%)	本发明显色剂 (含 TMB 盐酸盐 0.06%)
灵敏度(OD 值, $\lambda=450\text{nm}$)	0.5	0.150	0.311
	1	0.322	0.657
	2	0.612	1.196
	4	1.157	2.129
	8	2.028	3.106
显色背景(100 份阴性标本平均 OD 值)		0.070	0.050
稳定性 (2~8℃保存月数)		9	15