



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105823871 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201610239243.X

(22)申请日 2016.04.18

(71)申请人 苏州新赛美生物科技有限公司
地址 215000 江苏省苏州市吴中区东吴北路19号1502A号

(72)发明人 杨勇 刘永双

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411
代理人 刘刚

(51)Int.Cl.
G01N 33/535(2006.01)

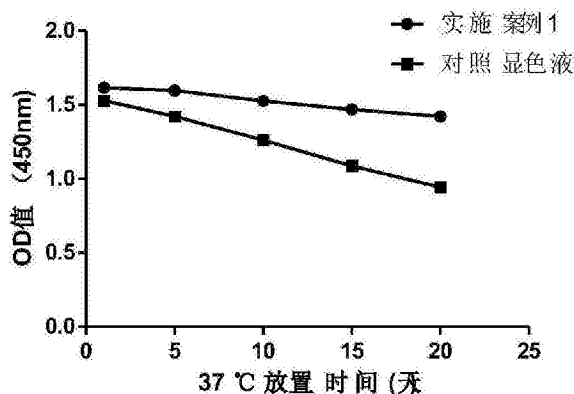
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液,其包括以下质量分数或摩尔浓度的各组分:聚乙烯醇的质量分数为0.1%-0.4%;核糖的浓度为10-100mM;柠檬酸的质量分数为0.1-0.5%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.2-0.6%;高硼酸钠的质量分数为0.01-0.05%;TMB的质量分数为0.01-0.05%。本发明是一种单组份TMB显色液,使用时无需再单独配制,操作更加方便,可以避免人为操作带来的误差,更客观地反应真实的数据。因该发明中加入高分子聚合物(PVA)和一种单糖分子(核糖),只有两者同时存在时,才能保证本发明的TMB显色液能够长时间的保存,而不影响其灵敏度,能够增加TMB的溶解性和稳定性,保证了TMB长时间的保存,保持单相溶液的存在。



1. 一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液,其特征在於,包括以下各组分:

聚乙烯醇的质量分数为0.1%-0.4%;核糖的浓度为10-100mM;柠檬酸的质量分数为0.1-0.5%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.2-0.6%;高硼酸钠的质量分数为0.01-0.05%;TMB的质量分数为0.01-0.05%。

2. 根据权利要求1所述的高效稳定的单组份酶联免疫显色液,其特征在於,包括以下各组分:

聚乙烯醇的质量分数为0.1%;核糖的浓度为10mM;柠檬酸的质量分数为0.1%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.2%;高硼酸钠的质量分数为0.01%;TMB的质量分数为0.01%。

3. 根据权利要求1所述的高效稳定的单组份酶联免疫显色液,其特征在於,包括以下各组分:

聚乙烯醇的质量分数为0.4%;核糖的浓度为100mM;柠檬酸的质量分数为0.5%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.6%;高硼酸钠的质量分数为0.05%;TMB的质量分数为0.05%。

4. 根据权利要求1所述的高效稳定的单组份酶联免疫显色液,其特征在於,包括以下各组分:

聚乙烯醇的质量分数为0.25%;核糖的浓度为75mM;柠檬酸的质量分数为0.21%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.42%;高硼酸钠的质量分数为0.03%;TMB的质量分数为0.025%。

5. 一种权利要求1~4任一所述的高效稳定的单组份酶联免疫显色液的制备方法,具体包括以下步骤:

(1) 制备含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液:取20ml N-甲基吡咯烷酮为溶剂,缓慢加入0.1g-0.5g的TMB,在磁力搅拌器上搅拌均匀使其充分溶解;

(2) 在1000ml的烧杯中,加入800ml双蒸水,缓慢加入1-4g的聚乙烯醇,加入核糖10-100mM,加入柠檬酸1-5g;加入乙二酸四乙酸2-6g,加入高硼酸钠0.1-0.5g,搅拌使其充分溶解。

(3) 将含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液加入到上述1000ml烧杯中,充分搅拌均匀,定容至1000ml;经0.45um的滤膜过滤,获得均一的溶液,保存在棕色的塑料瓶中,密封避光保存在2-8℃环境下。

6. 一种权利要求1~4任一所述的高效稳定的单组份酶联免疫显色液的使用方法,具体包括以下步骤:

(1) 待ELISA实验加入HRP结合物后,且温育一段时间,清洗3次ELISA板之后,每孔加入100u1上述TMB显色液;

(2) 根据反应体系避光孵育5-30分钟;

(3) 每孔加入50u1反应终止液终止

(4) 在波长450nm测定吸光度。

一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液及其制备方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assay),简称ELISA,是一种在免疫学反应基础上,将抗原-抗体的专一性反应和酶对底物高效催化作用相结合发展起来的一种高效简便的定性和定量的检测方法。由于ELISA检测方法简单、灵敏度高、快速等优点,自发明以来使其技术得到迅速发展,已被广泛地应用于各种生命科学和医药科学的许多领域。ELISA最终的检验方法有多种,但最常见的都是通过酶结合物和显色液进行反应来判定的。辣根过氧化物酶是ELISA实验中应用最广泛的,其偶联在抗体上,能通过反应底物过氧化物(如过氧化氢)和显色剂发生化学反应。目前该显色剂系统中有多种,但最常见的是3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)。

[0003] TMB是一种新型安全的过氧化物酶底物,其含有脂溶性较强的基团,易形成多聚体,和HRP活性部位反应,可产生一种可溶性的蓝色产物,目视对比明显。TMB性质稳定,在过氧化物做底物时和HRP反应后,应用HCl或者H₂SO₄终止后,TMB产物由蓝色呈黄色,在比色计中可定量,最佳吸收波长为450nm,通过测定吸光值,我们可以定量地判断免疫反应强度。

[0004] 目前国内市场上的ELISA试剂盒还多采用双组份TMB显色液底物,分为A液和B液,A液中主要成为TMB,B液组要成为是过氧化物,使用前需将A液和B液等体积混匀。还有部分TMB显色液由多种组分组成,要现配现用才可。这些使用过程中有许多明显的缺点:操作比较繁琐,使用不方便;每次配制都会有差异发生,从而导致批次差异大,影响准确的结果;因为多种成分分开存在,在包装运输等方面都会增加成本等。目前市场上有些厂家生产的单组份TMB显色液,因TMB显色液如果没有稳定剂等存在,长时间保存会导致稳定性不高,保存时间较短,灵敏度低,显色背景高,而且进口的TMB显色液价格贵等缺点。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的缺陷,提供一种单一组分的,且高效稳定的单组份酶联免疫显色液(TMB显色液)及其制备方法,能够显著提高TMB显色液的长期保存时间。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 本发明一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液,其包括以下各组分:

[0008] 聚乙烯醇的质量分数为0.1%-0.4%;核糖的浓度为10-100mM;柠檬酸的质量分数为0.1-0.5%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.2-0.6%;高硼酸钠的质量分数为0.01-0.05%;TMB的质量分数为0.01-0.05%。

[0009] 进一步地,包括以下各组分:

[0010] 聚乙烯醇的质量分数为0.1%;核糖的浓度为10mM;柠檬酸的质量分数为0.1%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.2%;高硼酸钠的质量分数为0.01%;TMB的质量分数为0.01%。

[0011] 进一步地,包括以下各组分:

[0012] 聚乙烯醇的质量分数为0.4%;核糖的浓度为100mM;柠檬酸的质量分数为0.5%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.6%;高硼酸钠的质量分数为0.05%;TMB的质量分数为0.05%。

[0013] 进一步地,包括以下各组分:

[0014] 聚乙烯醇的质量分数为0.25%;核糖的浓度为75mM;柠檬酸的质量分数为0.21%;乙二酸四乙酸的质量分数为0.42%;高硼酸钠的质量分数为0.03%;TMB的质量分数为0.025%。

[0015] 本发明的另一个方面公开了一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液的制备方法,具体包括以下步骤:

[0016] (1)制备含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液:取20ml N-甲基吡咯烷酮为溶剂,缓慢加入0.1g-0.5g的TMB,在磁力搅拌器上搅拌均匀使其充分溶解;

[0017] (2)在1000ml的烧杯中,加入800ml双蒸水,缓慢加入1-4g的聚乙烯醇,加入核糖10-100mM,加入柠檬酸1-5g;加入乙二酸四乙酸2-6g,加入高硼酸钠0.1-0.5g,搅拌使其充分溶解。

[0018] (3)将含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液加入到上述1000ml烧杯中,充分搅拌均匀,定容至1000ml;经0.45um的滤膜过滤,获得均一的溶液,保存在棕色的塑料瓶中,密封避光保存在2-8℃环境下。

[0019] 本发明的另一个方面公开了一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液的使用方法,具体包括以下步骤:

[0020] (1)待ELISA实验加入HRP结合物后,且温育一段时间,清洗3次ELISA板之后,每孔加入100u1上述TMB显色液;

[0021] (2)根据反应体系避光孵育5-30分钟;

[0022] (3)每孔加入50u1反应终止液(2M H₂SO₄或1N HCl)终止

[0023] (4)在波长450nm测定吸光度。

[0024] 聚乙烯醇外观为白色粉末,是一种广泛应用的水溶性高分子聚合物,具有极高的安全性的有机物,对人体无毒,无副作用。在本发明中加入了聚乙烯醇,能提高TMB的溶解度和增强稳定性。核糖是一种五碳醛糖,一般常见的型态为D-核糖,加入核糖能够和聚乙烯醇协同增强TMB显色液的稳定性。柠檬酸能够为TMB显色液提供一个酸性环境,使其pH值维持在4.0-6.0之间。EDTA具有螯合的作用,使得TMB显色液更加稳定。本发明中所使用的过氧化物底物为高硼酸钠,比过氧化氢更稳定,更好的氧化性,该物质的底物的酶是辣根过氧化物酶(HRP)。TMB外观是白色结晶粉末,难溶于水,因此需要N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺等有机溶剂溶解。

[0025] 本发明所达到的有益效果是:

[0026] 本发明是一种单组份TMB显色液,使用时无需再单独配制,操作更加方便,可以避免人为操作带来的误差,更客观地反应真实的数据。因该发明中加入高分子聚合物(PVA)和一种单糖分子(核糖),只有两者同时存在时,才能保证本发明的TMB显色液能够长时间的保存,而不影响其灵敏度,能够增加TMB的溶解性和稳定性,保证了TMB长时间的保存,保持单相溶液的存在。

附图说明

[0027] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0028] 图1是本发明实施例1与对照显色液稳定性实验的曲线图。

具体实施方式

[0029] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0030] 实施例1

[0031] (1)制备含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液:取20ml N-甲基吡咯烷酮为溶剂,缓慢加入0.25g的TMB,搅拌均匀使其充分溶解。

[0032] (2)在1000ml的烧杯中,加入800ml双蒸水,缓慢加入2.5g的聚乙烯醇,加入核糖7.5g,加入柠檬酸2.1g;加入乙二酸四乙酸4.2g,加入高硼酸钠0.3g,搅拌使其充分溶解。

[0033] (3)将含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液加入到上述1000ml烧杯中,充分搅拌均匀,定容至1000ml。经0.45um的滤膜过滤,获得均一的溶液,保存在棕色的塑料瓶中,密封避光保存在2-8°C。

[0034] 实施例2

[0035] (1)制备含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液:取20ml N-甲基吡咯烷酮为溶剂,缓慢加入0.1g的TMB,在磁力搅拌器上搅拌均匀使其充分溶解;

[0036] (2)在1000ml的烧杯中,加入800ml双蒸水,缓慢加入1g的聚乙烯醇,加入核糖0.01mol,加入柠檬酸1g;加入乙二酸四乙酸2g,加入高硼酸钠0.1g,搅拌使其充分溶解。

[0037] (3)将含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液加入到上述1000ml烧杯中,充分搅拌均匀,定容至1000ml;经0.45um的滤膜过滤,获得均一的溶液,保存在棕色的塑料瓶中,密封避光保存在2-8°C环境下。

[0038] 实施例3

[0039] (1)制备含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液:取20ml N-甲基吡咯烷酮为溶剂,缓慢加入0.5g的TMB,在磁力搅拌器上搅拌均匀使其充分溶解;

[0040] (2)在1000ml的烧杯中,加入800ml双蒸水,缓慢加入4g的聚乙烯醇,加入核糖0.1mol,加入柠檬酸5g;加入乙二酸四乙酸6g,加入高硼酸钠0.5g,搅拌使其充分溶解。

[0041] (3)将含TMB的N-甲基吡咯烷酮溶液加入到上述1000ml烧杯中,充分搅拌均匀,定容至1000ml;经0.45um的滤膜过滤,获得均一的溶液,保存在棕色的塑料瓶中,密封避光保存在2-8°C环境下。

[0042] (一)使用实施例1~3的制备方法获得的TMB显色液与现有技术中某公司商品化的TMB显色液经行比较(简称:对照显色液),以PD-1(Human)ELISA Kit为例经行测试。显色时间为20分钟,在吸光值为450nm处测得OD值如下表:

[0043]

PD-1 (human) 10ng/ml	实施案例 1	实施例 2	实施例 3	对照显色液
10.00	2.71360	2.71870	2.71753	2.57215
8.00	2.54092	2.55120	2.54793	2.47729
6.00	2.06257	2.06342	2.06562	1.92237
4.00	1.54574	1.54657	1.54645	1.49996
2.00	0.80855	0.80923	0.80932	0.72941
1.00	0.28414	0.28324	0.28532	0.25519
0.50	0.19946	0.19932	0.19956	0.19601
0.00	0.05958	0.05946	0.05932	0.06489

[0044] 从表1中可以得出：实施案例1~3中的TMB显色液要比对照显色液灵敏度要高的多；此外实施案例1~3中的显色液在PD-1(human)浓度为1.00ng/u1时的信噪比是0.28414/0.05958=4.77左右，而对照显色液在PD-1(human)浓度为1.00ng/u1时的信噪比是0.25519/0.06489=3.93，实施案例1~3中的TMB显色液显著优于对照TMB显色液。

[0045] (二)稳定性试验：分别将使用实施案例1制备的TMB显色液和现有技术中某公司商品化的TMB显色液(简称：对照显色液)避光放置37℃温箱中，分别在1、5、10、15、20天后取出观察物理变化，并以PD-1(Human)ELISA Kit为例，测试PD-1(human)抗原的标准品(浓度为4ng/ml)，经行灵敏度检测。对比结果如图1所示。

[0046] 由图1可知，相对于市场上商品化的某公司TMB显色液，本发明单组份TMB显色液更加稳定，在温度加速试验可以看出，本发明的TMB显色液可以长期稳定存在，且不影响其灵敏度。

[0047] 最后应说明的是：以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对于本领域的技术人员来说，其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

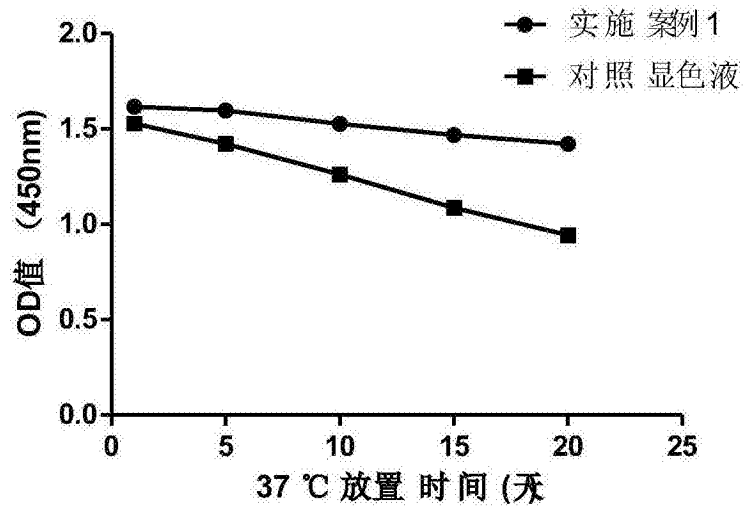


图1

专利名称(译)	一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液及其制备方法		
公开(公告)号	CN105823871A	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	CN201610239243.X	申请日	2016-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	苏州新赛美生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州新赛美生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州新赛美生物科技有限公司		
[标]发明人	杨勇 刘永双		
发明人	杨勇 刘永双		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	刘刚		
其他公开文献	CN105823871B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种高效稳定的单组份酶联免疫显色液，其包括以下质量分数或摩尔浓度的各组分：聚乙烯醇的质量分数为0.1%-0.4%；核糖的浓度为10-100mM；柠檬酸的质量分数为0.1-0.5%；乙二酸四乙酸的质量分数为0.2-0.6%；高硼酸钠的质量分数为0.01-0.05%；TMB的质量分数为0.01-0.05%。本发明是一种单组份TMB显色液，使用时无需再单独配制，操作更加方便，可以避免人为操作带来的误差，更客观地反应真实的数据。因该发明中加入高分子聚合物(PVA)和一种单糖分子(核糖)，只有两者同时存在时，才能保证本发明的TMB显色液能够长时间的保存，而不影响其灵敏度，能够增加TMB的溶解性和稳定性，保证了TMB长时间的保存，保持单相溶液的存在。

