

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/532

G01N 33/547



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410000689.4

[43] 公开日 2004 年 12 月 29 日

[11] 公开号 CN 1558238A

[22] 申请日 2004.1.16

[21] 申请号 200410000689.4

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号
农学与生物技术学院

[72] 发明人 王保民 赵 静 李召虎 何钟佩
段留生 田晓莉 李 刚 殷俐娜
俞彩霞

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液

[57] 摘要

本发明公开了一种酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液。本发明所提供的酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液是四甲基联苯胺和硫代硫酸钠的二甲基亚砜(DMSO)溶液。本发明的四甲基联苯胺贮液可在 4℃ 贮存 6 个月, 不仅方便了酶联免疫测定的操作, 也节约了资金, 具有重要的意义。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液，是四甲基联苯胺和硫代硫酸钠的二甲基亚砷（DMSO）溶液。

2、根据权利要求1所述的四甲基联苯胺贮液，其特征在于：所述四甲基联苯胺和硫代硫酸钠的摩尔比为72：1-360：1。

3、根据权利要求2所述的四甲基联苯胺贮液，其特征在于：所述四甲基联苯胺和硫代硫酸钠的摩尔比为120：1。

4、根据权利要求1、2或3所述的四甲基联苯胺贮液，其特征在于：所述硫代硫酸钠为无水硫代硫酸钠或五水硫代硫酸钠。

5、根据权利要求1、2或3所述的四甲基联苯胺贮液，其特征在于：所述四甲基联苯胺的浓度为0.00203-0.00377 mol/l，所述硫代硫酸钠的浓度为 0.806×10^{-7} mol/l- 4.03×10^{-7} mol/l。

6、根据权利要求5所述的四甲基联苯胺贮液，其特征在于：所述四甲基联苯胺的浓度为0.0029mol/l，所述硫代硫酸钠的浓度为 2.418×10^{-7} mol/l。

酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液

技术领域

本发明涉及酶联免疫测定中的一种底物贮液，特别涉及一种酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液。

背景技术

在酶联免疫检测中，目前国内外使用最多的酶底物是邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)。邻苯二胺着色背景深，用时需现配现用，且有致癌性，作为底物使用时会对人体造成危害。用四甲基联苯胺作为底物时，背景着色低，显色灵敏，且对人体无毒。TMB贮液为TMB的二甲基亚砷(DMSO)溶液。但是TMB贮液在4℃下最多保存1个月，其后就会自动变蓝色。其间如果多次取贮液使用，变蓝的时间会更短。使用变蓝的TMB贮液会影响到测定结果的可靠性。因而通常不使用变蓝的TMB贮液而是重配，由于四甲基联苯胺的价格较高，常造成较大的经济损失。

发明创造内容

本发明的目的是提供一种可以延长贮存时间的酶联免疫测定中的四甲基联苯胺(TMB)贮液。

本发明所提供的酶联免疫测定中的四甲基联苯胺(TMB)贮液，是四甲基联苯胺和硫代硫酸钠的二甲基亚砷(DMSO)溶液。

四甲基联苯胺和硫代硫酸钠的摩尔比可为72:1-360:1。其中，四甲基联苯胺和硫代硫酸钠的摩尔比优选为120:1。

上述硫代硫酸钠可为无水硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)或五水硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。

上述四甲基联苯胺贮液中所述四甲基联苯胺的浓度可为0.00203-0.00377 mol/l，所述硫代硫酸钠的浓度可为 0.806×10^{-7} mol/l- 4.03×10^{-7} mol/l，其中，所述四甲基联苯胺的浓度优选为0.0029 mol/l，所述硫代硫酸钠的浓度优选为 2.418×10^{-7} mol/l。

本发明的四甲基联苯胺贮液可在4℃贮存6个月，不仅方便了酶联免疫测定的操作，也节约了资金，具有重要的意义。

附图说明

图1A为间接酶联免疫测定法中的底物溶液1显色的ZR标准曲线

图 1B 为间接酶联免疫测定法中的底物溶液 2 显色的 ZR 标准曲线

图 2A 为直接酶联免疫测定法中的底物溶液 1 显色的 ZR 标准曲线

图 2B 为直接酶联免疫测定法中的底物溶液 2 显色的 ZR 标准曲线

具体实施方式

实施例 1、用间接酶联免疫法测定细胞分裂素类物质—玉米素核苷(ZR)验证 TMB 贮液的可靠性

试剂和材料

(1) 抗原及抗体

①包被抗原 玉米素核苷与卵清白蛋白的联接物(ZR-OVA)。

②ZR 抗体 按照常规方法用玉米素核苷与牛血清白蛋白的联接物免疫新西兰大白兔制备得到抗玉米素核苷(ZR)的多克隆抗体

③酶标抗体 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (购于 sigma 公司)。

(2) 底物溶液

①A 液 过氧化脲 1.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g, 柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 10.3g, 吐温-80 100 μl , 加 1000ml 蒸馏水, 用时现配。

② TMB 液

a. 对照 TMB 液 TMB 700mg, DMSO 40ml, 充分溶解, 然后加蒸馏水 960ml, 柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 10.3g, 用时现配。

b. TMB 贮液 TMB 700mg, DMSO 40ml, 充分溶解, 然后加蒸馏水 960ml, 柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 10.3g, 再加入 3 μl 2mg/ml 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 混匀, 4℃贮存 6 个月。

③底物溶液

各取一定量 a、b 两种 TMB 液, 再和相同体积的 A 液混合得到含有对照 TMB 液的底物溶液 1 和含有 TMB 贮液的底物溶液 2。

(3) 包被缓冲液: 称取 1.5g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3 , 用蒸馏水定容至 1 000 ml, pH 为 9.6。

(4) 磷酸盐缓冲液(PBS): 称取 8.0g NaCl , 0.2g KH_2PO_4 , 2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 用蒸馏水定容至 1000 ml, pH 为 7.5。

(5) 样品稀释液: 1000 ml PBS 中加 1 ml Tween-20, 1g 明胶(稍加热溶解)。

(6) 洗涤液: 1000ml PBS 加 1ml Tween-20。

(7) 终止液: 2mol/L 的硫酸 (H_2SO_4)。

(8) 酶标板: 96 孔酶标板(购于天津有机玻璃厂)

(9)酶联免疫分光光度计 (DG3022A, 南京华东电子管厂生产)

1、包被

将包被抗原 (ZR-OVA) 按 1: 4000 的比例用包被缓冲液稀释, 混匀, 在酶标板每小孔中加 100 μ l。然后将酶标板放入内铺湿纱布的带盖瓷盘内, 置于 37℃ 下 3h。

2、洗板

将包被好的板取出, 放在室温下平衡。然后甩掉包被液, 把洗涤液均匀加入板上, 使每孔都充满洗涤液, 放置约 0.5min, 再甩掉洗涤液。重复 4 次, 将板内残留洗涤液在吸水纸上甩干。

3、竞争

(1) 加标样: 首先将 ZR 标准物用样品稀释液稀释成 2000ng/ml, 然后再依次稀释成 1000ng/ml, 500ng/ml, 250ng/ml, 125ng/ml, 62.5ng/ml, 31.25 ng/ml, 0 ng/ml, 共 8 个浓度。将系列溶液加入 96 孔酶标板中, 每个浓度加 6 个孔, 每孔 50 μ l。

(2) 加抗体: 把 ZR 抗体按 1: 500 的比例用样品稀释液稀释, 混匀后每孔加 50 μ l。然后将酶标板加入湿盒内开始竞争, 竞争条件 37℃ 下 0.5h。

4、洗板

方法同步骤 2, 洗板 4 次。

5、加酶标二抗

将一定量的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 用样品稀释液稀释 (稀释倍数为 1: 1000), 混匀后, 在酶标板每孔中加 100 μ l, 然后将其放入湿盒内, 置 37℃ 下, 温育 0.5h。

6、洗板

方法同步骤 2, 洗五次。

7、显色

将现配制 TMB 液的底物溶液 1 和底物溶液 2 分别加入到酶标板中, 每孔 100 μ l, 常温下显色 5 分钟。

8、比色

当显色 5 分钟后, 每孔加入 50 μ l 2mol/L 硫酸终止反应。然后用 2000ng/ml 浓度孔 (即标准曲线最高浓度孔) 调零, 在酶联免疫分光光度计上依次测定标准物各浓度 450nm 处的 OD 值。

9、用于 ELISA 结果计算的是 logit 曲线, 曲线的横坐标用激素标样各浓度 (ng/ml) 的自然对数表示, 纵坐标用各浓度显色值的 logit 值表示。Logit 值

的计算方法如下：

$$\text{Logit } (B/B_0) = \ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0} = \ln \frac{B}{B_0-B}$$

其中 B_0 是 0ng/ml 孔的显色值， B 是其它浓度孔的显色值。

结果如表 1, 图 1A 和图 1B 所示, 表明从在其他条件都相同的情况下, 含有 $3 \mu\text{l}$ 2mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液并在 4°C 下贮存 6 个月的底物溶液 2 与对照底物溶液 1 的显色效果是一样的, 无论显色的速度还是显色深浅都与现配制 TMB 液的底物溶液 1 一致, 从标准曲线上看更直观的证明了这一结论。

表 1、间接酶联免疫测定法测定玉米素核苷 (ZR) 的标准曲线 (logit 曲线) 及 OD 值

ZR 浓度 (ng/ml)	底物溶液 1	底物溶液 2
	OD 值	OD 值
2000	0.00	0.00
1000	0.05	0.07
500	0.19	0.20
250	0.28	0.30
125	0.48	0.48
62.5	0.63	0.68
31.25	0.86	0.90
0.00	1.36	1.37

实施例 2、用直接酶联免疫法测定细胞分裂素类物质—玉米素核苷 (ZR) 验证 TMB 贮液的可靠性

试剂和材料

(1) 抗原及抗体

①蛋白 A 金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA, 购于 sigma 公司)

②ZR 抗体 (同实施例 1)

③酶标 ZR 辣根过氧化物酶标记的玉米素核苷

(2) 底物溶液 同实施例 1

(3) 包被缓冲液 同实施例 1

(4) 磷酸盐缓冲液 (PBS) 同实施例 1

(5) 样品稀释液 同实施例 1

(6) 洗涤液 同实施例 1

(7) 终止液 同实施例 1

(8) 酶标板 同实施例 1

(9) 酶联免疫分光光度计 同实施例 1

1、包被

用包被缓冲液把金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 稀释成 $20\mu\text{g}/\text{ml}$, 在酶标板每小孔中加 $100\mu\text{l}$, 然后将酶标板放入内铺湿纱布的带盖瓷盘内, 置 4°C 下 12h。

2、洗板

将包被好的板取出, 放在室温下平衡。然后甩掉包被液, 把洗涤液均匀加入板上, 使每孔充满洗涤液, 放置约 0.5min, 再甩掉洗涤液。重复 4 次, 将板内残留洗涤液在吸水纸上甩干。

3、加抗体

把 ZR 抗体按 1: 1000 的比例用样品稀释液稀释, 混匀后每孔加 $100\mu\text{l}$ 。然后将酶标板加入湿盒内, 置 4°C 下 12h。

4、洗板

方法同步骤 2, 洗板 4 次。

5、竞争

(1) 加标样: 首先将 ZR 标准物用样品稀释液稀释成 $2000\text{ng}/\text{ml}$, 然后再依次稀释成 $100\text{ng}/\text{ml}$, $10\text{ng}/\text{ml}$, $1\text{ng}/\text{ml}$, $0.2\text{ng}/\text{ml}$, $0\text{ng}/\text{ml}$ 共 8 个浓度。将系列溶液加入 96 孔酶标板中, 每个浓度加 6 个孔, 每孔 $50\mu\text{l}$ 。

(2) 加辣根过氧化物酶标记的玉米素核苷 (ZR-HRP): 将 ZR-HRP 按 1: 50 的比例用样品稀释液稀释, 然后加入到酶标板中, 每孔 $50\mu\text{l}$ 。然后将酶标板加入湿盒内开始竞争, 竞争条件 37°C 下 0.5h。

6、洗板

方法同步骤 2, 洗板 4 次。

7、显色

将现配制的底物溶液 1 和底物溶液 2 分别加入到酶标板中, 每孔 $100\mu\text{l}$, 在常温下显色 10 分钟。

8、比色

当显色 10 分钟后, 每孔加入 $50\mu\text{l}$ $2\text{mol}/\text{L}$ 硫酸终止反应。然后用 $2000\text{ng}/\text{ml}$ 浓度孔 (即标准曲线最高浓度孔) 调零, 在酶联免疫分光光度计上依次测定标准物各浓度 450nm 处的 OD 值。

结果如表 2, 图 2A 和图 2B 所示, 表明从在其他条件都相同的情况下, 含有 $3\mu\text{l}$ $2\text{mg}/\text{ml}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液并在 4°C 下贮存 6 个月的底物溶液 2 与对照底物溶液 1 的显色效果是一样的, 无论显色的速度还是显色深浅都与现配制 TMB 液的底物溶

液 1 一致，从标准曲线上看更直观的证明了这一结论。

表 2、直接酶联免疫测定法测定玉米素核苷（ZR）的标准曲线（logit 曲线）及 OD 值

ZR 浓度 (ng/ml)	底物溶液 1	底物溶液 2
	OD 值	OD 值
2000	0.00	0.00
100	0.07	0.07
10	0.32	0.30
1	0.70	0.75
0.2	0.80	1.00
0	1.01	1.06

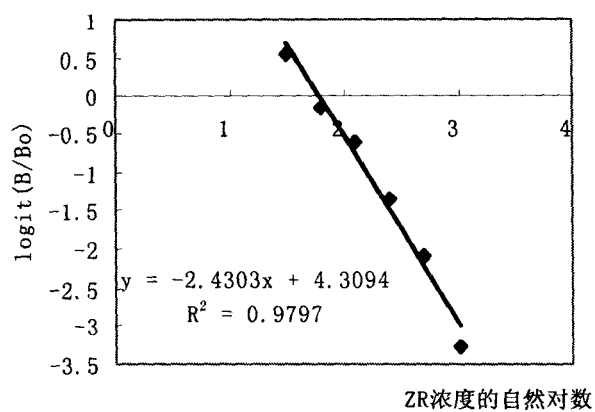


图 1A

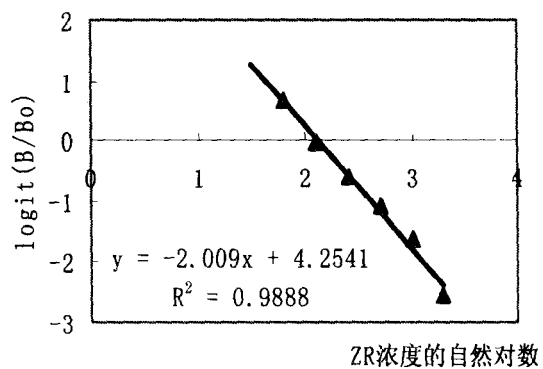


图 1B

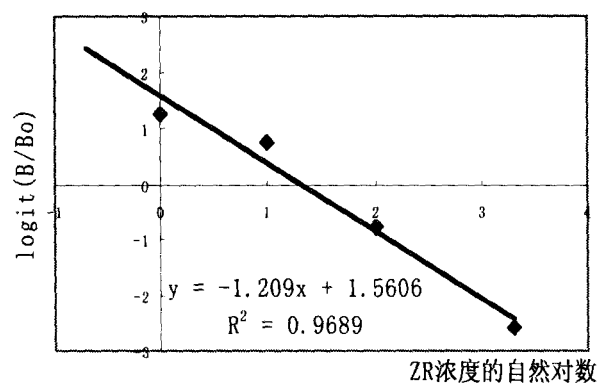


图 2A

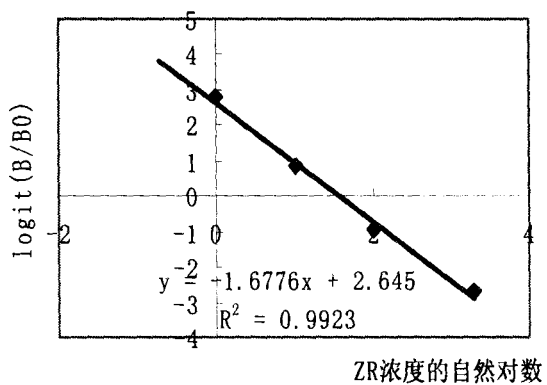


图 2B

专利名称(译)	酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液		
公开(公告)号	CN1558238A	公开(公告)日	2004-12-29
申请号	CN200410000689.4	申请日	2004-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王保民 赵静 李召虎 何钟佩 段留生 田晓莉 李刚 殷俐娜 俞彩霞		
发明人	王保民 赵静 李召虎 何钟佩 段留生 田晓莉 李刚 殷俐娜 俞彩霞		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/547		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1262840C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液。本发明所提供的酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液是四甲基联苯胺和硫代硫酸钠的二甲基亚砜(DMSO)溶液。本发明的四甲基联苯胺贮液可在4℃贮存6个月，不仅方便了酶联免疫测定的操作，也节约了资金，具有重要的意义。

$$\text{Logit} (B/B_0) = \ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0} = \ln \frac{B}{B_0-B}$$