



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107589250 A

(43)申请公布日 2018.01.16

(21)申请号 201710896673.3

(22)申请日 2017.09.28

(71)申请人 国家食品安全风险评估中心

地址 100022 北京市朝阳区广渠路37号院2
号楼

申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

(72)发明人 骆鹏杰 王华丽 陈霞 赵云峰

李敬光 蒋双勤 李湖中

(74)专利代理机构 北京华进京联知识产权代理

有限公司 11606

代理人 马敬

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

TMB双组份显色液及其试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种TMB双组份显色液,包括TMB储液以及TMB底物缓冲液,所述TMB储液的溶剂为水;每1000mL所述TMB储液含有乙二胺四乙酸二钠0.18~0.22g,柠檬酸1.52~2.28g,甘油40~60mL,四甲基联苯胺盐酸盐0.18~0.22g,维生素C 0.80~1.20g。TMB储液以TMB的盐酸盐形成作为显色剂,配置而成的TMB储液能够以水溶液的形式存在。维生素C能够提高TMB的稳定性,在将TMB储液与TMB底物缓冲液混合室容易混合均匀,降低批次间差异;维生素C提高TMB的稳定性,确保混合后有效显色成分含量,提高了显色过程中的灵敏度。

1. 一种TMB双组份显色液,其特征在于,所述显色液包括TMB储液以及TMB底物缓冲液,所述TMB储液的溶剂为水;

每1000mL所述TMB储液含有乙二胺四乙酸二钠0.18~0.22g,柠檬酸1.52~2.28g,甘油40~60mL,四甲基联苯胺盐酸盐0.18~0.22g,维生素C0.80~1.20g。

2. 根据权利要求1所述的TMB双组份显色液,其特征在于,所述TMB底物缓冲液的溶剂为水;

每1000mL所述TMB底物缓冲液含有过氧化物0.48~0.72g,柠檬酸7.52~11.28g,十二水磷酸氢二钠14.88~22.32g。

3. 根据权利要求2所述的TMB双组份显色液,其特征在于,所述过氧化物为过氧化脲。

4. 根据权利要求3所述的TMB双组份显色液,其特征在于,每1000mL所述TMB底物缓冲液含有过氧化物0.60g,柠檬酸9.40g,十二水磷酸氢二钠18.60g;

每1000mL所述TMB储液含有乙二胺四乙酸二钠0.20g,柠檬酸1.90g,甘油50mL,四甲基联苯胺盐酸盐0.20g,维生素C 1.0g。

5. 根据权利要求1至4任意一项所述的TMB双组份显色液,其特征在于,所述TMB底物缓冲液以及所述TMB储液的溶剂为双蒸水。

6. 根据权利要求5所述的TMB双组份显色液,其特征在于,使用时所述TMB底物缓冲液与所述TMB储液的混合比为1:0.9~0.9:1。

7. 根据权利要求6所述的TMB双组份显色液,其特征在于,使用时所述TMB底物缓冲液与所述TMB储液的混合比为1:1。

8. 根据权利要求6所述的TMB双组份显色液,其特征在于,所述TMB储液的pH为1.5~2.5。

9. 根据权利要求6所述的TMB双组份显色液,其特征在于,所述TMB底物缓冲液与所述TMB储液混合后的pH为3.5~4.5。

10. 一种酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括如权利要求1至9任意一项所述的显色液。

TMB双组份显色液及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫法,特别是涉及一种TMB双组份显色液及其试剂盒。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附检测方法(ELISA)具有快速、敏感、简便、易于标准化等优点。ELISA虽然有多种,但是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),相应的显色剂最为常用的是3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl Benzidine,TMB),显色后产生蓝色物质,加入终止液终止显色反应,溶液从蓝色变为黄色,颜色强度与抗体含量呈正比。检测过程中,用酶标仪在450nm/630nm波长进行读数,记录结果,根据所得的吸光度值数据,与对照品进行比较,从而判断待测样本中抗体的水平。TMB具有高效、无毒、不致癌、稳定性佳等特点,为ELISA检测中常用的显色底物。

[0003] ELISA试剂盒有单组份TMB显色液和双组份TMB显色液。单组份TMB显色液稳定性差,保存时间短,大部分保存时间在3~6个月,且显色背景高,均一性不好。双组份TMB显色液将过氧化物与TMB分开两瓶,分别作为TMB底物缓冲液和TMB储液,具有稳定、灵敏的特点。但是TMB常用有机溶剂溶解,一方面使用时安全性低,容易刺激皮肤,另一方面TMB底物缓冲液与TMB储液混合时容易混合不均,造成批量差异及降低灵敏度。

发明内容

[0004] 基于此,有必要针对传统地双组份TMB显色液安全性低,易混合不均匀,降低反应灵敏度的问题,提供一种TMB双组份显色液及其试剂盒。

[0005] 本发明提供了一种TMB双组份显色液,所述显色液包括TMB储液以及TMB底物缓冲液,所述TMB储液的溶剂为水;

[0006] 每1000mL所述TMB储液含有乙二胺四乙酸二钠0.18~0.22g,柠檬酸1.52~2.28g,甘油40~60mL,四甲基联苯胺盐酸盐0.18~0.22g,维生素C0.80~1.20g。

[0007] 在其中的一个实施例中,所述TMB底物缓冲液的溶剂为水;

[0008] 每1000mL所述TMB底物缓冲液含有过氧化物0.48~0.72g,柠檬酸7.52~11.28g,十二水磷酸氢二钠14.88~22.32g。

[0009] 在其中的一个实施例中,所述过氧化物为过氧化脲。

[0010] 在其中的一个实施例中,每1000mL所述TMB底物缓冲液含有过氧化物0.60g,柠檬酸9.40g,十二水磷酸氢二钠18.60g;

[0011] 每1000mL所述TMB储液含有乙二胺四乙酸二钠0.20g,柠檬酸1.90g,甘油50mL,四甲基联苯胺盐酸盐0.20g,维生素C 1.0g。

[0012] 在其中的一个实施例中,所述TMB底物缓冲液以及所述TMB储液的溶剂为双蒸水。

[0013] 在其中的一个实施例中,使用时所述TMB底物缓冲液与所述TMB储液的混合比为1:0.9~0.9:1。

[0014] 在其中的一个实施例中,使用时所述TMB底物缓冲液与所述TMB储液的混合比为1:

1。

[0015] 在其中的一个实施例中,所述TMB储液的pH为1.5~2.5。

[0016] 在其中的一个实施例中,所述TMB底物缓冲液与所述TMB储液混合后的pH为3.5~4.5。

[0017] 本发明还提供一种酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括如上所述的显色液。

[0018] 上述TMB双组份显色液,TMB储液以TMB的盐酸盐形成作为显色剂,配置而成的TMB储液能够以水溶液的形式存在。维生素C能够提高TMB的稳定性,在将TMB储液与TMB底物缓冲液混合室容易混合均匀,降低批次间差异;进一步的,维生素C提高TMB的稳定性,确保混合后有效显色成分含量,并且维生素C自身不会对检测造成影响,提高了显色过程中的灵敏度。

具体实施方式

[0019] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下通过实施例,对本发明的TMB双组份显色液及其具有的试剂盒进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0020] 本发明提供了一种TMB双组份显色液,显色液包括TMB储液以及TMB底物缓冲液。

[0021] 其中,TMB储液的溶剂为水,每1000mL TMB储液含有乙二胺四乙酸二钠0.18~0.22g,柠檬酸1.52~2.28g,甘油40~60mL,四甲基联苯胺盐酸盐0.18~0.22g,维生素C 0.80~1.20g。

[0022] TMB储液以TMB的盐酸盐形成作为显色剂,配置而成的TMB储液能够以水性溶液的形式存在。维生素C能够提高TMB的稳定性,在将TMB储液与TMB底物缓冲液混合室容易混合均匀,降低批次间差异;进一步的,维生素C提高TMB的稳定性,确保混合后有效显色成分含量,并且维生素C自身不会对检测造成影响,提高了显色过程中的灵敏度。

[0023] 进一步地,通过添加维生素C以及乙二胺四乙酸二钠,能够对添加终止液后TMB具有强稳定作用,从而延长读数时间,克服现有的读数时间过晚结果不准确的缺陷,从而能够提高同批次检测的样本量。

[0024] 可选地,每1000mL TMB底物缓冲液含有过氧化物0.48~0.72g,柠檬酸7.52~11.28g,十二水磷酸氢二钠14.88~22.32g。

[0025] TMB底物缓冲液也是水性溶液,进一步使TMB储液与TMB底物缓冲液更易混合均匀,避免了因混合不均匀导致批次间差异。

[0026] 作为一种可选实施方式,所述过氧化物为过氧化脲。

[0027] 过氧化脲活性氧含量高,在水中的溶解度大,水溶液pH值近中性,稳定性好,能够提高TMB底物缓冲液的储存期限,并且上述浓度的过氧化脲在酶的作用下稳定释放O₂与TMB反应,提高检测的稳定性。

[0028] 作为一种可选实施方式,每1000mL所述TMB底物缓冲液含有过氧化物0.60g,柠檬酸9.40g,十二水磷酸氢二钠18.60g;每1000mL所述TMB储液含有乙二胺四乙酸二钠0.20g,柠檬酸1.90g,甘油50mL,四甲基联苯胺盐酸盐0.20g,维生素C 1.0g。

[0029] 作为一种可选实施方式,TMB底物缓冲液以及TMB储液的溶剂为双蒸水。双蒸水中除去了水中溶解的氧气,能够提高TMB双组份显色液的检测的准确度。

[0030] 作为一种可选实施方式,使用时TMB底物缓冲液与TMB储液的混合比为1:0.9~0.9:1。本发明的TMB底物缓冲液与TMB储液的混合比在该范围内均能得到较好的满足测定精度的测试结果。

[0031] 进一步可选地,使用时TMB底物缓冲液与TMB储液的混合比为1:1。通过上述TMB底物缓冲液以TMB储液的配方,使使用时TMB底物缓冲液与TMB储液的混合比为1:1,等体积混合即可,能够避免分别量取不同体积的TMB底物缓冲液和TMB储液容易造成混淆,从而减少混合二者时产生误操作的可能性。

[0032] 作为一种可选实施方式,TMB储液的pH为1.5~2.5,使TMB储液的pH为1.5~2.5,能够使TMB在维生素C的作用下进一步提高其稳定性,提高TMB储液的保存期限。更优地,TMB储液的pH为2。

[0033] 作为一种可选实施方式,TMB底物缓冲液与TMB储液混合后的pH为3.5~4.5,使混合后的显色液保持pH为3.5~4.5,能够使混合后的显色液继续在维生素C以及乙二胺四乙酸二钠的作用下保持稳定,提高混合后显色液的灵敏性。更优地,TMB底物缓冲液与TMB储液混合后的pH为4。

[0034] 本发明的第二大方面提供一种酶联免疫试剂盒,试剂盒包括如上所述的显色液。由于上述显色液具有上述技术效果,具有上述显色液的试剂盒也应具有同样的技术效果,在此不再详细介绍。

[0035] 以下通过对比实验进一步验证本发明提供的显色液的效果。

[0036] 实施例1

[0037] 称取乙二胺四乙酸二钠0.20g,柠檬酸1.90g,甘油50mL,维生素C 1.0g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后加入四甲基联苯胺盐酸盐0.20g,定容至1L,充分混合均匀,制得TMB储液。

[0038] 称取过氧化脲0.60g,柠檬酸9.40g,十二水磷酸氢二钠18.60g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后定容至1L,充分混合均匀,制得TMB底物缓冲液。

[0039] 以制备的TMB储液、TMB底物缓冲液替代采购自深圳芬德生物技术有限公司的黄曲霉毒素M1检测试剂盒中的TMB显色液,按照试剂盒使用方法测定基于上述试剂进行测定的灵敏度、最低检测限、准确性、精密性以及稳定性实验。

[0040] 1.1灵敏度

[0041] 配置不同浓度的标准品绘制标准曲线,取 $R^2 > 0.99$ 曲线段安排合理的浓度作标准曲线,根据标准曲线确定试剂盒的灵敏度。

[0042] 以 $0\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 1.62\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准品浓度绘制标准曲线,确定该试剂盒的线性范围为 $0.02\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 1.62\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{50} 为 $0.1074\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,从而灵敏度为 $0.020\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,线性相关系数为0.9996。

[0043] 1.2最低检测限

[0044] 取空白样本,按下式计算最低检测限值。

[0045] $\text{LOD} = \text{MN} + 3\text{SD}$

[0046] 式中,LOD表示最低检测限值,MN表示平均值,SD表示标准偏差。

[0047] 取空白样本20批次进行测定并按照上式进行计算,最低检测限为 $0.05\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

[0048] 1.3准确性和精密性

[0049] 试剂盒的准确性和精密性通过样本添加回收实验来评定,样本的添加回收率及其变异系数分别代表了试剂盒的准确性与精密性。

[0050] 取空白牛奶7个批次,每个批次做3个平行,每个样本的每个批次添加浓度为 $0.05\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,经检测计算样本添加回收率、批内变异系数及批间变异系数以评价试剂盒的准确性和精密性。结果如表1所示,添加回收率为80.3%~101.2%;各样本的批内变异系数和批间变异系数均小15%。该试剂盒的准确性和精密性符合要求。

[0051] 表1 实施例1添加回收实验测定结果

[0052]

样本批号	添加浓度($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率(%)	批内变异(%)	平均回收率($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	批间变异系数(%)
1	0.05	85.8	4.0	89.7	9.9
2		92.2	4.8		

[0053]

3		80.3	3.8		
4		96.5	4.6		
5		101.2	5.7		
6		80.3	1.1		
7		91.5	7.0		
1	0.5	94.1	7.7	91.3	9.6
2		88.9	4.9		
3		88.3	6.1		
4		89.2	4.5		
5		92.4	5.3		
6		92.7	4.9		
7		93.3	4.4		

[0054] 1.4稳定性

[0055] 考虑到运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将实施例1制备的TMB储液以及TMB底物缓冲液于 37°C 保存14天,于 4°C 保存40周、52周,于 -20°C 保存7天,按照1.1灵敏度、1.2最低检测限、1.3准确性和精密性的方法测定灵敏度、最低检测限、准确性以及精密性,测定结果无变化。从测定结果可以得知,该TMB储液以及TMB底物缓冲液可以在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下至少可保存12个月。

[0056] 实施例2

[0057] 称取乙二胺四乙酸二钠0.18g,柠檬酸1.52g,甘油40mL,维生素C 0.18g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后加入四甲基联苯胺盐酸盐0.18g,定容至1L,充分混合均匀,制得TMB储液。

[0058] 称取过氧化脲0.48g,柠檬酸7.52g,十二水磷酸氢二钠14.88g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后定容至1L,充分混合均匀,制得TMB底物缓冲液。

[0059] 以与实施例1相同的方法进行灵敏度、最低检测限、准确性、精密性以及稳定性实

验,实验结果请参见表2所示。

[0060] 实施例3

[0061] 称取乙二胺四乙酸二钠0.22g,柠檬酸2.28g,甘油60mL,维生素C 0.22g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后加入四甲基联苯胺盐酸盐0.22g,定容至1L,充分混合均匀,制得TMB储液。

[0062] 称取过氧化脲0.72g,柠檬酸11.28g,十二水磷酸氢二钠22.32g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后定容至1L,充分混合均匀,制得TMB底物缓冲液。

[0063] 以与实施例1相同的方法进行灵敏度、最低检测限、准确性、精密性以及稳定性实验,实验结果请参见表2所示。

[0064] 对比例1

[0065] 称取柠檬酸1.90g,甘油50mL,置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后加入四甲基联苯胺盐酸盐0.20g,定容至1L,充分混合均匀,制得TMB储液。

[0066] 称取过氧化脲0.60g,柠檬酸9.40g,十二水磷酸氢二钠18.60g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后定容至1L,充分混合均匀,制得TMB底物缓冲液。

[0067] 以与实施例1相同的方法进行灵敏度、最低检测限、准确性、精密性以及稳定性实验,实验结果请参见表2所示。

[0068] 对比例2

[0069] 称取乙二胺四乙酸二钠0.20g,柠檬酸1.90g,甘油50mL,置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后加入四甲基联苯胺盐酸盐0.20g,定容至1L,充分混合均匀,制得TMB储液。

[0070] 称取过氧化脲0.60g,柠檬酸9.40g,十二水磷酸氢二钠18.60g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后定容至1L,充分混合均匀,制得TMB底物缓冲液。

[0071] 以与实施例1相同的方法进行灵敏度、最低检测限、准确性、精密性以及稳定性实验,实验结果请参见表2所示。

[0072] 对比例3

[0073] 称取柠檬酸1.90g,甘油50mL,维生素C 0.2g,置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后加入四甲基联苯胺盐酸盐0.20g,定容至1L,充分混合均匀,制得TMB储液。

[0074] 称取过氧化脲0.60g,柠檬酸9.40g,十二水磷酸氢二钠18.60g置于预先加入适量双蒸水1L的容量瓶中,溶解充分后定容至1L,充分混合均匀,制得TMB底物缓冲液。

[0075] 以与实施例1相同的方法进行灵敏度、最低检测限、准确性、精密性以及稳定性实验,实验结果请参见表2所示。

[0076] 表2 实施例及对比例灵敏度、最低检测限、准确性、精密性、稳定性实验结果

[0077]

编号	灵敏度 (ng·mL ⁻¹)	最低检测 限(ng·kg ⁻¹)	添加回收率 (%)	批间变异 系数(%)	稳定性
实施例 1	0.020	0.05	80.3%~101.2%	< 10	无变化
实施例 2	0.018	0.05	80.3%~101.2%	< 10	无变化
实施例 3	0.020	0.05	80.3%~101.2%	< 10	无变化
对比例 1	0.42	0.3	63.4%~91.5%	23	灵敏度降低, 批 间变异系数增 大
对比例 2	0.30	0.2	69.1%~98.2%	19	灵敏度降低, 批 间变异系数增 大
对比例 3	0.08	0.1	76.3%~99.7%	16	灵敏度降低, 批 间变异系数增 大

[0078] 从表2可以看出,本发明实施例制备的显色液与对比例制备的显色液相比,灵敏度、最低检测限、添加回收率、批间变异系数以及稳定性均有所改善。并且分别比较对比例1与对比例2、对比例1与对比例3以及对比例2与对比例3,可以发现虽然TMB储液中添加乙二胺四乙酸二钠能够提高TMB储液的灵敏度等性能参数,但是维生素C相比于乙二胺四乙酸二钠具有更好的效果,并且当TMB储液中同时添加维生素C和乙二胺四乙酸二钠,二者可以协同发挥作用,更进一步改善TMB储液的性能参数。

[0079] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

专利名称(译)	TMB双组份显色液及其试剂盒		
公开(公告)号	CN107589250A	公开(公告)日	2018-01-16
申请号	CN201710896673.3	申请日	2017-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
[标]发明人	骆鹏杰 王华丽 陈霞 赵云峰 李敬光 蒋双勤 李湖中		
发明人	骆鹏杰 王华丽 陈霞 赵云峰 李敬光 蒋双勤 李湖中		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	马敬		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种TMB双组份显色液，包括TMB储液以及TMB底物缓冲液，所述TMB储液的溶剂为水；每1000mL所述TMB储液含有乙二胺四乙酸二钠0.18~0.22g，柠檬酸1.52~2.28g，甘油40~60mL，四甲基联苯胺盐酸盐0.18~0.22g，维生素C 0.80~1.20g。TMB储液以TMB的盐酸盐形成作为显色剂，配置而成的TMB储液能够以水溶液的形式存在。维生素C能够提高TMB的稳定性，在将TMB储液与TMB底物缓冲液混合室容易混合均匀，降低批次间差异；维生素C提高TMB的稳定性，确保混合后有效显色成分含量，提高了显色过程中的灵敏度。

样本批号	添加浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率(%)	批内变异(%)	平均回收率 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	批间变异系数(%)
1	0.05	85.8	4.0	89.7	9.9
2		92.2	4.8		