



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702897 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910892243.3

(22)申请日 2019.09.20

(71)申请人 北京贝尔生物工程股份有限公司  
地址 102612 北京市大兴区黄村芦城工业  
区创新路99号

(72)发明人 王玲 邵豪锋 刘瑞鑫 刘爽  
霍晓飞 李金雨

(74)专利代理机构 北京悦和知识产权代理有限  
公司 11714

代理人 司丽春

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种稳定高效的HRP酶促底物液及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明实施例涉及临床体外检测技术领域,具体涉及一种稳定高效的HRP酶促底物液及其制备方法与应用。本发明实施例提供的HRP酶促底物液,包括底物液A:无水乙酸钠6-30g/L,吐温20-100mL/L,柠檬酸钠3-15g/L,柠檬酸4-20g/L,乙酸0.5-2.5mL/L,双氧水0.5-2mL/L,过氧化钠0.006-0.03g/L;和底物液B:TMB 0.2-3g/L,二甲基亚砷2-10mL/L,盐酸0.5-5mL/L,甘油10-100mL/L,硫代硫酸钠2-20g/L。本发明实施例中提供的HRP酶促底物液,显色强度高,同时没有增加本底,检测灵敏度高;显色效果可以持续1小时;并可在2-8℃条件下稳定放置3年,且抗高温能力强,可抵抗高温天气运输对试剂盒的影响;稳定高效,可满足酶联免疫试剂盒对显色底物液的各项要求。

1. 一种HRP酶促底物液,包括底物液A和底物液B,其中,底物液A包括下述终浓度的组分:

无水乙酸钠6-30g/L,吐温20 20-100mL/L,柠檬酸钠3-15g/L,柠檬酸4-20g/L,乙酸0.5-2.5mL/L,双氧水0.5-2mL/L,过氧化钠0.006-0.03g/L;

底物液B包括下述终浓度的组分:

四甲基联苯胺(TMB) 0.2-3g/L,二甲基亚砷2-10mL/L,盐酸0.5-5mL/L,甘油10-100mL/L,硫代硫酸钠2-20g/L。

2. 根据权利要求1所述的HRP酶促底物液,其特征在于:底物液A包括下述终浓度的组分:

无水乙酸钠12-18g/L,吐温20 50-70mL/L,柠檬酸钠6-10g/L,柠檬酸8-12g/L,乙酸1-1.5mL/L,双氧水0.8-1.2mL/L,过氧化钠0.01-0.02g/L;

底物液B包括下述终浓度的组分:

TMB 0.8-1.2g/L,二甲基亚砷3-7mL/L,盐酸1.5-2.5mL/L,甘油40-60mL/L,硫代硫酸钠8-12g/L。

3. 根据权利要求2所述的HRP酶促底物液,其特征在于:底物液A包括下述终浓度的组分:

无水乙酸钠15g/L,吐温20 60mL/L,柠檬酸钠8g/L,柠檬酸10g/L,乙酸1.25mL/L,双氧水1mL/L,过氧化钠0.015g/L;

底物液B包括下述终浓度的组分:

TMB 1g/L,二甲基亚砷5mL/L,盐酸2mL/L,甘油50mL/L,硫代硫酸钠10g/L。

4. 利用权利要求1-3任一项所述的HRP酶促底物液制备HRP酶促底物液的制备方法。

5. 根据权利要求4所述的HRP酶促底物液,其特征在于:底物液A的制备方法包括下述步骤:按上述比例称取各组分,分别溶于蒸馏水中,定容,即得;

底物液B的制备方法包括下述步骤:按上述比例称取各组分,先将TMB溶解到二甲基亚砷中,再将其它组分依次加入蒸馏水中搅拌至溶解,最后加入溶解有TMB的二甲基亚砷混匀,蒸馏水定容,即得。

6. 权利要求1所述的HRP酶促底物液或权利要求4所述的制备方法在酶联免疫领域中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:进行所述酶联免疫吸附时,在酶标仪的OD值读数为0-2的范围使用。

## 一种稳定高效的HRP酶促底物液及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及临床体外检测技术领域,具体涉及一种稳定高效的HRP酶促底物液及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 酶联免疫吸附实验(ELISA)是将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面,使酶标记的抗原抗体在固相表面进行反应的技术。该技术可用于检测大分子抗原和特异性抗体等,具有快速、灵敏、简便、载体易于标准化等优点。1971年Engvall和Perlmann发表了酶联免疫吸附剂测定(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)用于IgG定量测定的文章,使得1966年开始用于抗原定位的酶标抗体技术发展成液体标本中微量物质的测定方法。这一方法的基本原理是:①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。②使抗原或抗体与辣根过氧化物酶(HRP)连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入与辣根过氧化物酶(HRP)反应的底物液后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关。由于酶的催化频率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。该检测体系中,底物显色液最终决定了最后检测的显色程度,理想的显色底物液应该具有稳定性好、保存时间长、显色背景低、酶促显色强度高的特点。

[0003] HRP催化过氧化物的氧化反应,最具代表性的过氧化物为 $H_2O_2$ ,其反应式如下: $DH_2 + H_2O_2 \rightarrow D + H_2O$ ,上式中, $DH_2$ 为供氢体, $H_2O_2$ 为受氢体。在ELISA中, $DH_2$ 一般为无色化合物,经酶作用后成为有色的产物,以便作比色测定。常用的供氢体有邻苯二胺(0-phenylenediamine,OPD)、四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine,TMB)和ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]。

[0004] 各种供氢体的性质各不相同,市场上常见的供氢体为TMB。TMB经HRP作用后共产物显蓝色,目视对比鲜明。TMB性质较稳定,可配成溶液试剂,只需与 $H_2O_2$ 溶液混和即成应用液,可直接作底物使用。酶反应用HCL或 $H_2SO_4$ 终止后,TMB产物由蓝色变成黄色,可在酶标仪中定量,最适吸收波长为450nm/630nm。

[0005] 但是TMB比较难溶于水中,而且在溶液状态中性质不稳定,比较难存放,这就造成了市场上常规TMB显色液稳定性差,显色不够持久,经过长时间放置后显色强度降低等问题。

[0006] 公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不应当被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

## 发明内容

### [0007] 发明目的

[0008] 为解决上述技术问题,本发明的目的在于提供一种稳定高效的HRP酶促底物液及其制备方法与应用。本发明实施例中提供的HRP酶促底物液,显色强度高,同时没有增加本底,检测灵敏度高;显色效果可以持续1小时;并可在2-8℃条件下稳定放置3年,且抗高温能力强,可抵抗高温天气运输对试剂盒的影响;稳定高效,可满足酶联免疫试剂盒对显色底物液的各项要求。

### [0009] 解决方案

[0010] 为实现本发明目的,本发明实施例提供了一种HRP酶促底物液,包括底物液A和底物液B,其中,底物液A包括下述终浓度的组分:

[0011] 无水乙酸钠6-30g/L,吐温20 20-100mL/L,柠檬酸钠3-15g/L,柠檬酸4-20g/L,乙酸0.5-2.5mL/L,双氧水0.5-2mL/L,过氧化钠0.006-0.03g/L;

[0012] 底物液B包括下述终浓度的组分:

[0013] 四甲基联苯胺(TMB) 0.2-3g/L,二甲基亚砷2-10mL/L,盐酸0.5-5mL/L,甘油10-100mL/L,硫代硫酸钠2-20g/L。

[0014] 上述HRP酶促底物液在一种可能的实现方式中,底物液A包括下述终浓度的组分:

[0015] 无水乙酸钠12-18g/L,吐温20 50-70mL/L,柠檬酸钠6-10g/L,柠檬酸8-12g/L,乙酸1-1.5mL/L,双氧水0.8-1.2mL/L,过氧化钠0.01-0.02g/L;

[0016] 底物液B包括下述终浓度的组分:

[0017] TMB 0.8-1.2g/L,二甲基亚砷3-7mL/L,盐酸1.5-2.5mL/L,甘油40-60mL/L,硫代硫酸钠8-12g/L。

[0018] 上述HRP酶促底物液在一种可能的实现方式中,底物液A包括下述终浓度的组分:

[0019] 无水乙酸钠15g/L,吐温20 60mL/L,柠檬酸钠8g/L,柠檬酸10g/L,乙酸1.25mL/L,双氧水1mL/L,过氧化钠0.015g/L;

[0020] 底物液B包括下述终浓度的组分:

[0021] TMB 1g/L,二甲基亚砷5mL/L,盐酸2mL/L,甘油50mL/L,硫代硫酸钠10g/L。

[0022] 本发明实施例还提供了利用上述原料制备上述HRP酶促底物液的制备方法。

[0023] 上述制备方法在一种可能的实现方式中,底物液A的制备方法包括下述步骤:按上述比例称取各组分,分别溶于蒸馏水中,定容,即得;

[0024] 底物液B的制备方法包括下述步骤:按上述比例称取各组分,先将TMB溶解到二甲基亚砷中,再将其它组分依次加入蒸馏水中搅拌至溶解,最后加入溶解有TMB的二甲基亚砷混匀,蒸馏水定容,即得。

[0025] 本发明实施例还提供了上述HRP酶促底物液、制备方法在酶联免疫领域中的应用。

[0026] 上述应用在一种可能的实现方式中,所述应用为:进行所述酶联免疫吸附时,在酶标仪的OD值读数为0-2的范围使用。

### [0027] 有益效果

[0028] (1) 本发明实施例中提供的HRP酶促底物液,对现有的TMB底物液进行了优化,提供了特定组分和终浓度的HRP酶促底物液,显色强度高,同时没有增加本底,检测灵敏度高;显色效果可以持续1小时;并可在2-8℃条件下稳定放置3年,且抗高温能力强,可抵抗高温天

气运输对试剂盒的影响;稳定高效,可满足酶联免疫试剂盒对显色底物液的各项要求。

[0029] (2) 本发明实施例中提供的HRP酶促底物液,通过对各成分用量的进一步选择,HRP酶促底物液的检测灵敏度、稳定性等各项性能进一步提高。

[0030] (3) 本发明实施例中提供的HRP酶促底物液,首次在底物液A中加入了吐温20,可提高TMB的活性,从而提高HRP酶促底物液的检测灵敏度;

[0031] 底物液A中加入了过氧化钠,可有效保护双氧水的稳定性,提高HRP酶促底物液的稳定性;

[0032] 并首次在底物液B中加入了硫代硫酸钠,可抑制非特异性反应,增强HRP酶促底物液的特异性;因此,TMB用量较高时,特异性不受影响;而现有的底物液,TMB用量较高时,特异性会受到极大的影响;

[0033] 底物液B中加入了二甲基亚砷,用于溶解TMB,提高了底物液的均一性,配制得到的HRP酶促底物液稳定性好;

[0034] 此外,底物液B中加入了甘油,因甘油粘度大,HRP酶促底物液的张力大,使用时加入的量更准确。

## 附图说明

[0035] 一个或多个实施例通过与之对应的附图中的图片进行示例性说明,这些示例性说明并不构成对实施例的限定。在这里专用的词“示例性”意为“用作例子、实施例或说明性”。这里作为“示例性”所说明的任何实施例不必解释为优于或好于其它实施例。

[0036] 图1是本发明实施例3的HRP酶促底物液与市售底物液不同检测时间的检测结果对比图。

## 具体实施方式

[0037] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。除非另有其它明确表示,否则在整个说明书和权利要求书中,术语“包括”或其变换如“包含”或“包括有”等等将被理解为包括所陈述的元件或组成部分,而并未排除其它元件或其它组成部分。

[0038] 另外,为了更好的说明本发明,在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。本领域技术人员应当理解,没有某些具体细节,本发明同样可以实施。在一些实施例中,对于本领域技术人员熟知的原料、元件、方法、手段等未作详细描述,以便于凸显本发明的主旨。

[0039] 实施例1

[0040] 一种稳定高效的HRP酶促底物液,包括底物液A和底物液B,其中,底物液A包括下述终浓度的组分:

[0041] 无水乙酸钠30g/L,吐温20 100mL/L,柠檬酸钠15g/L,柠檬酸20g/L,乙酸2.5mL/L,双氧水2mL/L,过氧化钠0.03g/L;

[0042] 底物液B包括下述终浓度的组分:

[0043] TMB 3g/L, 二甲基亚砷10mL/L, 盐酸5mL/L, 甘油100mL/L, 硫代硫酸钠20g/L。

[0044] 其中, 底物液A的制备方法包括下述步骤: 以1L的量计, 按上述比例称取各组分, 分别溶于蒸馏水中, 用蒸馏水定容至1L, 制备完成;

[0045] 底物液B的制备方法包括下述步骤: 以1L的量计, 按上述比例称取各组分, 先将TMB溶解到二甲基亚砷中, 再将其它组分依次加入蒸馏水中搅拌至溶解, 最后加入溶解有TMB的二甲基亚砷混匀, 蒸馏水定容至1L, 制备完成。

[0046] 实施例2

[0047] 一种稳定高效的HRP酶促底物液, 包括底物液A和底物液B, 其中, 底物液A包括下述终浓度的组分:

[0048] 无水乙酸钠6g/L, 吐温20 20mL/L, 柠檬酸钠3g/L, 柠檬酸20g/L, 乙酸0.5mL/L, 双氧水0.5mL/L, 过氧化钠0.006g/L;

[0049] 底物液B包括下述终浓度的组分:

[0050] TMB 0.2g/L, 二甲基亚砷2mL/L, 盐酸0.5mL/L, 甘油10mL/L, 硫代硫酸钠2g/L。

[0051] 其中, 底物液A的制备方法包括下述步骤: 以1L的量计, 按上述比例称取各组分, 分别溶于蒸馏水中, 用蒸馏水定容至1L, 制备完成;

[0052] 底物液B的制备方法包括下述步骤: 以1L的量计, 按上述比例称取各组分, 先将TMB溶解到二甲基亚砷中, 再将其它组分依次加入蒸馏水中搅拌至溶解, 最后加入溶解有TMB的二甲基亚砷混匀, 蒸馏水定容至1L, 制备完成。

[0053] 实施例3

[0054] 一种稳定高效的HRP酶促底物液, 包括底物液A和底物液B, 其中, 底物液A包括下述终浓度的组分:

[0055] 无水乙酸钠15g/L, 吐温20 60mL/L, 柠檬酸钠8g/L, 柠檬酸10g/L, 乙酸1.25mL/L, 双氧水1mL/L, 过氧化钠0.015g/L;

[0056] 底物液B包括下述终浓度的组分:

[0057] TMB 1g/L, 二甲基亚砷5mL/L, 盐酸2mL/L, 甘油50mL/L, 硫代硫酸钠10g/L。

[0058] 其中, 底物液A的制备方法包括下述步骤: 以1L的量计, 按上述比例称取各组分, 分别溶于蒸馏水中, 用蒸馏水定容至1L, 制备完成;

[0059] 底物液B的制备方法包括下述步骤: 以1L的量计, 按上述比例称取各组分, 先将TMB溶解到二甲基亚砷中, 再将其它组分依次加入蒸馏水中搅拌至溶解, 最后加入溶解有TMB的二甲基亚砷混匀, 蒸馏水定容至1L, 制备完成。

[0060] 对比例1

[0061] 一种稳定高效的HRP酶促底物液, 包括底物液A和底物液B, 其中, 底物液A包括下述终浓度的组分:

[0062] 无水乙酸钠15g/L, 吐温20 60mL/L, 柠檬酸钠8g/L, 柠檬酸10g/L, 乙酸1.25mL/L, 双氧水1mL/L, 过氧化钠0.015g/L;

[0063] 底物液B包括下述终浓度的组分:

[0064] TMB 1g/L, 二甲基亚砷5mL/L, 盐酸2mL/L, 甘油50mL/L。

[0065] 其中, 底物液A的制备方法包括下述步骤: 以1L的量计, 按上述比例称取各组分, 分别溶于蒸馏水中, 用蒸馏水定容至1L, 制备完成;

[0066] 底物液B的制备方法包括下述步骤：以1L的量计，按上述比例称取各组分，先将TMB溶解到二甲基亚砷中，再将其它组分依次加入蒸馏水中搅拌至溶解，最后加入溶解有TMB的二甲基亚砷混匀，蒸馏水定容至1L，制备完成。

[0067] 对比例2

[0068] 一种稳定高效的HRP酶促底物液，包括底物液A和底物液B，其中，底物液A包括下述终浓度的组分：

[0069] 无水乙酸钠15g/L，柠檬酸钠8g/L，柠檬酸10g/L，乙酸1.25mL/L，双氧水1mL/L，过氧化钠0.015g/L；

[0070] 底物液B包括下述终浓度的组分：

[0071] TMB 1g/L，二甲基亚砷5mL/L，盐酸2mL/L，甘油50mL/L，硫代硫酸钠10g/L。

[0072] 其中，底物液A的制备方法包括下述步骤：以1L的量计，按上述比例称取各组分，分别溶于蒸馏水中，用蒸馏水定容至1L，制备完成；

[0073] 底物液B的制备方法包括下述步骤：以1L的量计，按上述比例称取各组分，先将TMB溶解到二甲基亚砷中，再将其它组分依次加入蒸馏水中搅拌至溶解，最后加入溶解有TMB的二甲基亚砷混匀，蒸馏水定容至1L，制备完成。

[0074] 试验例1

[0075] 利用北京贝尔生物工程股份有限公司生产的人类巨细胞病毒IgG抗体检测试剂盒(酶联免疫法)对实施例1-3的HRP酶促底物液进行检测验证。

[0076] 具体操作步骤为：(1) 设定好加样孔，将10 $\mu$ L系列浓度的巨细胞病毒IgG质控品(如表1所示，S1-S5为不同浓度的巨细胞病毒IgG，其中S5是稀释液)加在CMV-IgG试剂盒的包被板上，37 $^{\circ}$ C反应0.5小时后，洗板5次，拍干；(2) 再加100 $\mu$ L鼠抗人IgG单抗-HRP酶结合物，37 $^{\circ}$ C反应0.5小时后，洗板5次，拍干；(3) 每孔加入底物液A和底物液B各50 $\mu$ L，避光37 $^{\circ}$ C显色15min；(4) 每孔加入终止液各50 $\mu$ L，用酶标仪(北京拓普分析仪器有限公司)在波长450nm/630nm处读取吸光度(OD)值。

[0077] 对比市售显色底物液(安图生物生产的人类巨细胞病毒IgG抗体检测试剂盒(酶联免疫法)中的显色底物液)进行检测，获得不同浓度质控品所得的OD值( $\lambda=450\text{nm}/630\text{nm}$ ，即检测波长为450nm，参比波长为630nm)如下表1所示：

[0078] 表1质控品检测结果

质控品编号	实施例 1		实施例 2		实施例 3		市售显色底物液	
	OD 值	信噪比	OD 值	信噪比	OD 值	信噪比	OD 值	信噪比
S1 (10.8 U/ml)	2.013	33.00	1.912	34.76	1.998	35.68	1.643	19.80
S2 (3.6 U/ml)	1.365	22.38	1.299	23.62	1.325	23.66	1.133	13.65

S3 (1.2 U/ml)	0.663	10.87	0.634	11.53	0.658	11.75	0.589	7.10
S4 (0.4 U/ml)	0.259	4.25	0.246	4.47	0.253	4.51	0.221	2.66
S5 (0 U/ml)	0.061	/	0.055	/	0.056	/	0.083	/

[0081] 测定S5时的OD值为本底强度，由表1结果可知，实施例3的本底为0.056，而市售显色底物液的本底为0.083，本发明配制的显色底物液本底较低。且实施例3检测的信噪比大于市售显色液，检测的显色强度较大，应用到试剂盒中检测样本的灵敏度更高。以对质控品S4(OD值最弱)的检测结果为例，同一浓度下实施例3检测的信噪比(S/N)  $0.253/0.056=$

4.51, 大于市售显色底物液测定的信噪比 $0.221/0.083=2.66$ ; 并且大于实施例1显色底物液测定的信噪比 $0.259/0.061=4.25$ , 大于实施例2显色底物液测定的信噪比 $0.246/0.055=4.47$ 。所以在检测低浓度样品时, 本发明显色底物液的信噪比更高, 灵敏度更高。

[0082] 由于任何酶标仪都有一定的读数限, 对于本试验中使用的酶标仪而言, 当巨细胞病毒IgG的浓度为 $10.8\text{U/ml}$ 时, 使用本发明的显色底物液所检测的OD读数已接近该酶标仪的最大读数限, 故本试验中只检测至 $10.8\text{U/ml}$ 的巨细胞病毒IgG, 不再进行更高浓度的巨细胞病毒IgG试验。即在本试验中, 本发明显色底物液在酶标仪的全量程范围内都有更好的灵敏度。对于需要进行定量检测的试剂盒而言, 选择合适的线性范围即可, 由于本发明显色底物液在酶标仪的全量程范围内都有更好的灵敏度, 所以对于定量试剂盒的线性范围也具有更好的灵敏度。

[0083] 试验例2

[0084] 将实施例3配制的HRP酶促底物液与市售显色底物液同时等量放置到 $37^\circ\text{C}$ 恒温箱中, 放置7天后, 同时取出对比进行验证, 检测流程与试验例1相同。检测结果如表2所示:

[0085] 表2底物液 $37^\circ\text{C}$ 放置7天后检测结果

质控品编号	初始检测 OD 值		放置 7 天后检测 OD 值	
	实施例 3	市售显色底物液	实施例 3	市售显色底物液
[0086] S1 ( $10.8\text{U/ml}$ )	1.998	1.643	1.986	1.433
S2 ( $3.6\text{U/ml}$ )	1.325	1.133	1.316	0.821
S3 ( $1.2\text{U/ml}$ )	0.658	0.589	0.637	0.362
S4 ( $0.4\text{U/ml}$ )	0.253	0.221	0.249	0.157
S5 ( $0\text{U/ml}$ )	0.056	0.083	0.049	0.051

[0087] 由表2数据可知, 经过 $37^\circ\text{C}$ 恒温放置7天, 市售显色底物液检测的OD值明显出现下滑, 而实施例3配制的显色底物液变化不大, 表明本发明配制的显色底物液具有更强的抗高温能力, 可减少高温天气运输对试剂盒的影响。

[0088] 将实施例3配制的HRP酶促底物液与市售显色底物液同时等量放置到 $2-8^\circ\text{C}$ 冰箱中, 放置3年, 每年做1次对比验证, 检测流程与试验例1相同。检测结果如表3所示:

[0089] 表3底物液 $2-8^\circ\text{C}$ 放置3年检测结果

质控品编号	第 1 年检测结果 (OD 值)		第 2 年检测结果 (OD 值)		第 3 年检测结果 (OD 值)	
	实施例 3	市售显色底物液	实施例 3	市售显色底物液	实施例 3	市售显色底物液
[0090] S1 ( $10.8\text{U/ml}$ )	1.993	1.533	1.983	1.415	1.981	1.332
S2 ( $3.6\text{U/ml}$ )	1.386	0.858	1.336	0.713	1.316	0.624
S3 ( $1.2\text{U/ml}$ )	0.677	0.367	0.637	0.262	0.628	0.211
S4 ( $0.4\text{U/ml}$ )	0.268	0.163	0.254	0.147	0.248	0.131
S5 ( $0\text{U/ml}$ )	0.036	0.049	0.041	0.051	0.046	0.056

[0091] 由表3数据可知, 在 $2-8^\circ\text{C}$ 条件下放置3年, 市售显色底物液检测的OD值明显出现下滑, 而实施例3配制的显色底物液变化不大, 表明本发明配制的显色底物液具有更好的稳定性。

[0092] 试验例3

[0093] 利用实施例3的HRP酶促底物液与市售显色底物液, 对CMV-IgG质控品S1进行检测,

检测流程与试验例1的流程相同,分不同时间对检测结果记录,跟踪检测随着时间的变化显色液的显色强度的变化趋势,具体结果如图1所示。由于ELISA试剂盒各个反应孔不是同时加入显色液,因此整个96孔板的显色反应时间不统一,如果显色强度有变化会造成检测结果出现偏差。由图1可知,市售显色底物液随着检测时间的延长,显色强度在减小,这不利于试剂盒的应用。而实施例3配制的显色底物液能在60分钟内保持显色液几乎没有衰减,有效保证了检测结果的准确性。

[0094] 试验例4

[0095] 将实施例3配制的HRP酶促底物液与对比例1、对比例2配制的显色底物液同时取出对比进行验证,检测流程与试验例1相同。检测结果如表4所示:

[0096] 表4不同底物液检测结果对比

质控品编号	OD 值		
	实施例 3	对比例 1	对比例 2
[0097] S1 (10.8 U/ml)	1.988	1.933	1.731
S2 (3.6 U/ml)	1.312	1.323	1.121
S3 (1.2 U/ml)	0.638	0.636	0.532
S4 (0.4 U/ml)	0.248	0.251	0.201
S5 (0 U/ml)	0.047	0.181	0.048

[0098] 由表4数据可知,与实施例3配制的显色底物液相比,对比例1不加硫代硫酸钠,其检测质控品S5的OD值明显出现上升,特异性变差;表明硫代硫酸钠配制的显色底物液可以提高底物液的特异性。

[0099] 与实施例3配制的显色底物液相比,对比例2不加吐温20,其检测S1-S4的OD值明显出现下滑,灵敏度变差;表明吐温20配制的显色底物液可以提高底物液的灵敏度。

[0100] 本发明配制的稳定高效的HRP酶促底物液,能在2-8℃条件下稳定放置3年,且抗高温能力强;显色效果可以持续1小时,而且显色的强度明显增强,同时没有增加本底,提高了检测的灵敏度,达到了稳定高效的目的,可满足酶联免疫试剂盒对显色底物液的各项要求。

[0101] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解: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;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

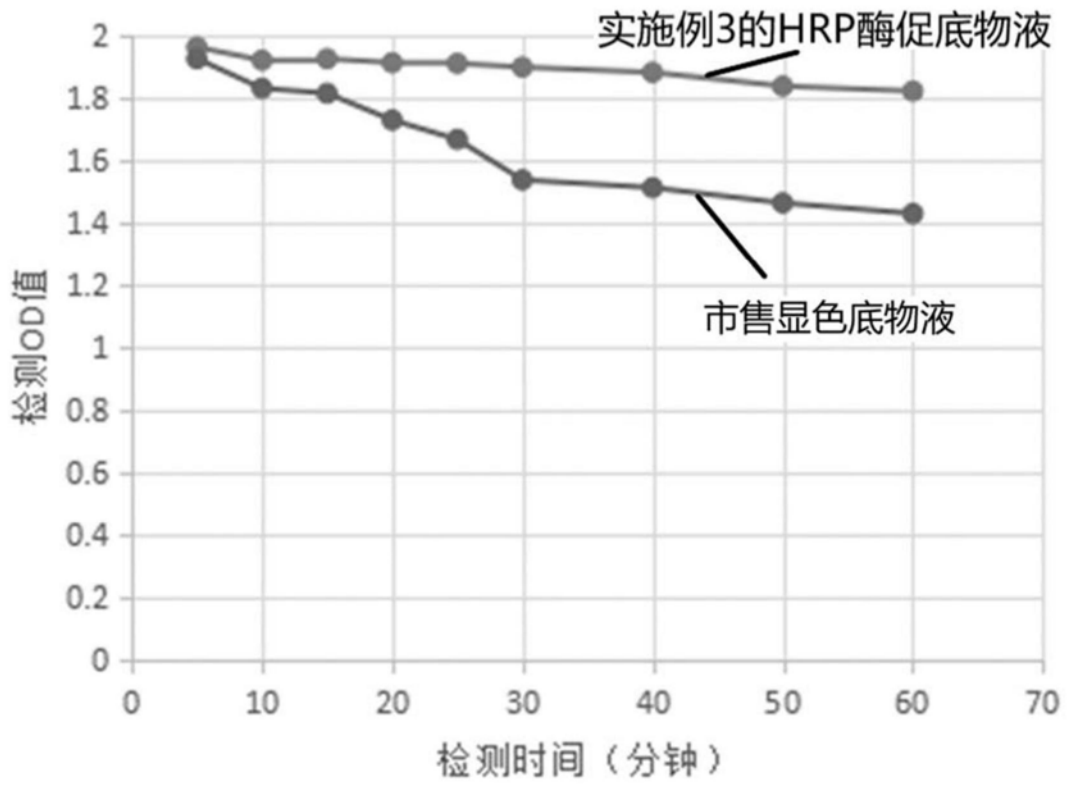


图1

专利名称(译)	一种稳定高效的HRP酶促底物液及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110702897A</a>	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910892243.3	申请日	2019-09-20
[标]发明人	王玲 刘瑞鑫 刘爽 霍晓飞 李金雨		
发明人	王玲 邵豪锋 刘瑞鑫 刘爽 霍晓飞 李金雨		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明实施例涉及临床体外检测技术领域，具体涉及一种稳定高效的HRP酶促底物液及其制备方法与应用。本发明实施例提供的HRP酶促底物液，包括底物液A：无水乙酸钠6-30g/L，吐温20 20-100mL/L，柠檬酸钠3-15g/L，柠檬酸4-20g/L，乙酸0.5-2.5mL/L，双氧水0.5-2mL/L，过氧化钠0.006-0.03g/L；和底物液B：TMB 0.2-3g/L，二甲基亚砜2-10mL/L，盐酸0.5-5mL/L，甘油10-100mL/L，硫代硫酸钠2-20g/L。本发明实施例中提供的HRP酶促底物液，显色强度高，同时没有增加本底，检测灵敏度高；显色效果可以持续1小时；并可在2-8°C条件下稳定放置3年，且抗高温能力强，可抵抗高温天气运输对试剂盒的影响；稳定高效，可满足酶联免疫试剂盒对显色底物液的各项要求。

质控品编号	实施例1		实施例2		实施例3		市售显色底物液	
	OD值	信噪比	OD值	信噪比	OD值	信噪比	OD值	信噪比
S1 (10.8 U/ml)	2.013	33.00	1.912	34.76	1.998	35.68	1.643	19.80
S2 (3.6 U/ml)	1.365	22.38	1.299	23.62	1.325	23.66	1.133	13.65