

硫代硫酸钠在四甲基联苯胺贮液保存中的应用

俞彩霞¹ 赵静¹ 王保民^{1,2} 李刚¹ 何素平¹ 刘威¹ 李召虎¹ 何钟佩¹

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学 国家植物生理生化重点实验室, 北京 100094)

摘要 为解决试剂四甲基联苯胺(TMB)贮液在储藏时容易变色的问题,本研究改良了TMB贮液的配方,即在原有每毫升TMB贮液中加入3 μ L 2 mg/mL的抗氧化剂五水硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶液。试验结果表明,新配方TMB贮液至少能在4 下贮存3个月不变色且不影响显色效果。同时,对照原有配方中已经变色的TMB贮液,发现根据变色深浅,每毫升中加入2~6 μ L 2 mg/mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液,3~6 h后会变回无色,颜色消失的TMB贮液可重新利用而不影响显色效果。

关键词 ELISA; 四甲基联苯胺(TMB); 硫代硫酸钠; 变色

中图分类号 Q 503

文章编号 1007-4333(2006)02-0027-04

文献标识码 A

Application of sodium thiosulfate pentahydrate in the storage of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine stock solution

Yu Caixia¹, Zhao Jing¹, Wang Baomin^{1,2}, Li Gang¹, He Suping¹,
Liu Wei¹, Li Zhaohu¹, He Zhongpei¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) stock solutions easily change from brownish to dark color and affect the stability of the detection system. To solve this problem, we have developed an optimized reagent. Three μ L 2mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate was added to 1 mL conventional TMB stock solution which can prevent the usual discoloration for at least 3 months at 46 without compromising the performance of the substrate in immunoassay applications. For the discolored TMB stock solutions, 2-6 μ L sodium thiosulfate pentahydrate was added to the discolored TMB solution. After 3-6 hours, the discoloration of TMB stock solution could be eliminated and the treated TMB stock solution utilized again.

Key words ELISA; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); sodium thiosulfate pentahydrate; discolor

在酶联免疫检测中,目前使用最多的供氢体是邻苯二胺(OPD)和四甲基联苯胺(TMB)。与OPD相比,TMB无致癌性且氧化产物吸光系数高^[1],作为供氢体使用时,相应的抗原抗体可以加大稀释倍数,节约抗原。现有的配方是把TMB溶解在二甲基亚砷(DMSO)、甲醇、乙醇或丙酮等有机溶剂中后再加水稀释作为B液,A液为含过氧化物pH 5.0~5.4的柠檬酸缓冲液,与抗原抗体的结合物显色时A液和B液等体积混合^[2-4]。但是,B液在保存过

程中容易变色,影响测定结果的稳定性,因而B液通常需现配现用。由于TMB价格较高,现配现用操作麻烦造成浪费。为了解决这一问题,迫切需要对原有配方进行改进。对于B液配方的研究,国内几乎未见报道。国外的报道也非常少,仅有Andreas Frey^[5]对B液进行了改进,即用无水二甲基乙酰胺溶解TMB后再加入四丁基硼氢化铵(TBABH),显色时A液和B液按40:1混合。该配方显著减缓B液变色的问题并能在4 条件下保存1年不影响试

收稿日期: 2005-05-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(2001AA249061); 农业科技成果转化资金资助项目(03EFN217100316)

作者简介: 俞彩霞,硕士研究生;王保民,副教授,通讯作者,主要从事免疫技术在植物研究上的应用研究,E-mail: wbaomin@

263.net

验结果,但无水二甲基乙酰胺和四丁基硼氢化铵价格昂贵。国外已有可直接使用并能4 贮存1年的TMB商品化显色液,该显色液把TMB与过氧化物配在一起,而不是A、B液分开保存,但该技术属公司机密,具体配方不祥。由于把TMB与过氧化物配在一起而又需耐储藏的难度太大,本研究目的旨在对2种原液的配方进行经济可行的改良。

1 试剂和材料

玉米素核苷(ZR)和异戊烯基腺嘌呤核苷(iPA)免疫检测试剂盒(本实验室制备);包被缓冲液:称取1.5 g Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 ,用蒸馏水定容至1 000 mL, pH 9.6;磷酸盐缓冲液(PBS):称取8.0 g NaCl , 0.2 g KH_2PO_4 , 2.96 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,用蒸馏水定容至1 000 mL, pH 7.5;样品稀释液:1 000 mL PBS中加1 mL Tween-20, 1 g 明胶(稍加热溶解);洗涤液:1 000 mL PBS加1 mL Tween-20;终止液:2 mol/L的硫酸;酶标板(Costar公司);酶联免疫分光光度计(MULTISKAN MK3, Thermo);紫外分光光度计(Pharmacia Biochrom4060)。

2 实验方法

2.1 改进配方的B液贮存试验

2.1.1 改进的B液配方 对照B液的配制参照杨利国等方法^[4],配制如下:TMB 700 mg, DMSO 40 mL,充分溶解,然后加蒸馏水960 mL,柠檬酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 10.3 g,现配现用。

改进B液的配制:在对照B液的基础上,再加入3 mL 2 mg/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3个月。

A液的配制参照杨利国等方法^[4],配制如下:过氧化脲1.0 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8 g,柠檬酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 10.3 g, Tween-20 100 μL ,加1 000 mL蒸馏水,现配现用。

显色时分别取一定量对照B液及改进B液,与等体积的A液混合作为底物溶液。

2.1.2 改进配方对酶联免疫测定结果的影响试验

改进B液配制的底物溶液对酶联免疫测定结果是否有影响用本实验室研制的玉米素核苷(ZR)试剂盒进行检测,具体步骤如下:

1)包被抗原(ZR-OVA)用包被缓冲液1 4 000稀释,每孔加100 μL ,37 温育3 h,洗板4次。2)ZR标准样品用样品稀释液稀释成2 000.00、

1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50和31.25 ng/mL,样品稀释液用作空白对照,即0 ng/mL,每含量加6个孔,每孔50 μL ;ZR抗体1 500稀释后每孔加50 μL ,37 竞争30 min,洗板4次。3)加酶标记抗体(稀释倍数为1 1 000),每孔100 μL ,37 温育30 min,洗板4次。4)将含有改进B液和对照B液的底物溶液加到酶标板中,每孔加100 μL ,常温下显色5 min,每孔加50 μL 2 mol/L硫酸终止反应。5)在酶联免疫分光光度计上依次测定标准物各含量450 nm处的OD值。

ELISA结果用Logit曲线计算:曲线的横坐标用ZR标样各含量(ng/mL)的自然对数表示,纵坐标用各含量显色值的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ZR标准样品含量为0 ng/mL孔的显色值; B 是ZR标准样品其他含量孔的显色值。

2.2 变色B液的重新利用

2.2.1 变色B液的处理方法 改良B液的方法设3种处理,通过3 d的常温储藏使其自然变色,颜色深浅用650 nm的吸光度值表示,吸光度值分别为0.10、0.20和0.32。采用2种方法加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液,方法1:从各处理B液中分别取出1 mL,加入一定量的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液,使B液立即变回无色(肉眼可见B液颜色马上变成无色),然后使用。1 mL B液中加入2 mg/mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液的量分别是:(6.5 \pm 4)、(15 \pm 6)和(18 \pm 8) μL 。方法2:从各处理B液中分别取出1 mL,加入一定量的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液,加的量与方法1中加入量的1/3左右,B液没有马上变成无色,3~6 h后待B液变回无色后使用。1 mL B液中加入2 mg/mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液的量分别是:(2 \pm 1)、(5 \pm 3)和(6 \pm 3) μL 。

显色时各取一定量对照B液及处理B液,与相同体积的A液混合,得到2种底物溶液。

2.2.2 变色B液重新利用对酶联免疫测定结果的影响 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液使变色的B液颜色消失后配制的底物溶液对酶联免疫测定结果是否有影响,用本实验室研制的异戊烯基腺嘌呤核苷(iPA)试剂盒进行检测,具体步骤同2.1.2。

2.3 数据统计

结果的显著性差异分析采用SAS统计的ANO-

VA 分析, SNK 多重范围检验法(q 检验法)。

3 试验结果

3.1 改进配方的 B 液贮存后对酶联免疫测定的影响

以 ZR 标准样品各含量的对数值为横坐标, 相应吸光度值的 Logit 值为纵坐标建立标准曲线, 得到回归方程(图 1)。

图中对照是用含有对照 B 液的底物溶液显色得到的 ZR 标准曲线, IC_{50} (50%抑制质量浓度) 为 51.8 ng/mL, 图中处理是用含有改进 B 液的底物溶液显色得到的 ZR 标准曲线, IC_{50} 为 63.9 ng/mL。SNK 统计分析结果表明, 两者的 IC_{50} 没有显著性差异。说明用每毫升含有 3 μ L 2 mg/mL $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶液并在 4 $^{\circ}C$ 下贮存 3 个月的 B 液配制的底物溶液与用对照 B 液配制的底物溶液的显色效果是一样的, 显色速度和显色深浅都没有区别。因此, 改进的 B 液配方是成功的。

3.2 变色 B 液加入 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶液后对酶联免疫测定的影响

以 iPA 标准样品各含量的对数值为横坐标, 相

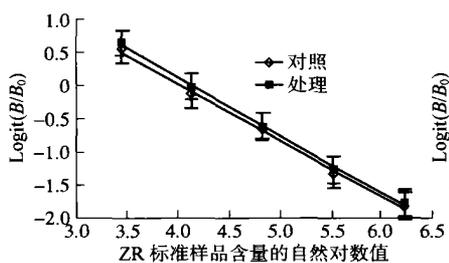


图 1 ZR 标准曲线

Fig. 1 The standard curve of ZR

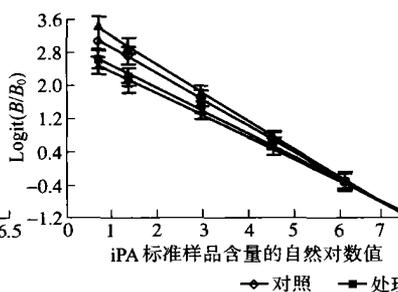


图 2 iPA 标准曲线(方法 1)

Fig. 2 The standard curve of iPA (1)

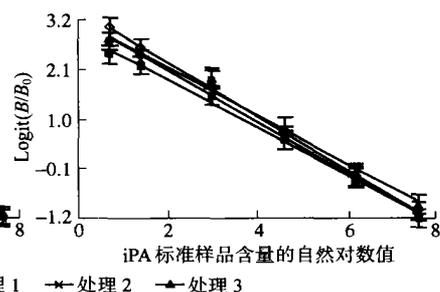


图 3 iPA 标准曲线(方法 2)

Fig. 3 The standard curve of iPA (2)

对照的回归方程为 $y = -0.5927x + 3.4304$, $R^2 = 0.9987$, $IC_{50} = 272.0$ ng/mL。处理 1、2、3 的回归方程分别为: 处理 1, $y = -0.5278x + 2.9292$, $R^2 = 0.9939$, $IC_{50} = 220.0$ ng/mL; 处理 2, $y = -0.5662x + 3.2117$, $R^2 = 0.9866$, $IC_{50} = 237.6$ ng/mL; 处理 3, $y = -0.5344x + 3.2202$, $R^2 = 0.9863$, $IC_{50} = 337.5$ ng/mL。SNK 统计分析结果表明, 各处理和对照的 IC_{50} 没有显著性差异。同时在试验中发现, 各处理 B 液配制的底物溶液与对照 B 液配制的底物溶液的 B_0 值没有差别, 显色效果几乎一样。说明在变色的 B 液中加入 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶液过 3 ~ 6 h 后使 B 液又变回无色的方法是可行的。

应吸光度值的 Logit 值为纵坐标建立标准曲线(图 2)。对照的回归方程为 $y = -0.6185x + 3.5513$, $R^2 = 0.9996$, $IC_{50} = 256.1$ ng/mL, 用方法 1 处理(变色 B 液退色)的 B 液配制的底物溶液显色得到各标准曲线的回归方程分别为: 处理 1, $y = -0.5437x + 3.0522$, $R^2 = 0.9955$, $IC_{50} = 232.7$ ng/mL; 处理 2, $y = -0.5209x + 2.8553$, $R^2 = 0.9963$, $IC_{50} = 296.3$ ng/mL; 处理 3, $y = -0.6677x + 3.8656$, $R^2 = 0.9984$, $IC_{50} = 268.0$ ng/mL。SNK 统计分析结果表明, 各处理和对照的 IC_{50} 没有显著性差异。尽管如此, 但是在试验中发现, 处理 3 中 0 孔的 OD 值(B_0 值)比对照减少了 10% 左右, 并且处理 1 到处理 3, B_0 值有降低的趋势。说明在变色的 B 液中加入 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶液使 B 液立即变回无色这一方法虽然可用, 但显色速度比对照减慢, 对试验结果还是有一定影响。

图 3 是用方法 2 处理的不同 B 液配制的底物溶液和用对照 B 液配制的底物溶液显色得到的 iPA 标准曲线。

4 讨论

为解决 B 液在保存过程中容易变色的问题, 试验了各种抗氧化剂如 VC、BHT、硼氢化钾、 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 但是发现, VC 在贮存中容易变色、BHT 水溶性太差、硼氢化钾不稳定易分解, 因此不能应用在 B 液的贮存试验中, 只有 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 有效。1 mL 中含有 3 μ L 2 mg/mL $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶液的 B 液在 4 $^{\circ}C$ 下贮存 3 个月期间, 笔者多次检验了贮存 B 液配制的底物溶液与对照 B 液配制的底物溶液的显色效果, 结果都相同, 即 IC_{50} 没有显著性差异, 显色速度也没有受影响。说明用 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 贮存

酶联免疫测定中的四甲基联苯胺贮液是可行的。在试验中同时发现,如果加入的量小于 $2.5\ \mu\text{L}$,保存的时间减少;加入的量大于 $3.5\ \mu\text{L}$,显色时间延长,0孔吸光度值降低,甚至显不出颜色。加入的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液量在 $\pm 0.5\ \mu\text{L}$ 的范围内不影响试验结果。而这种处理后的B液4 贮存3个月,颜色开始发生变化,6个月以后,颜色明显加深。

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液能使变色的B液变回无色,并且用于显色与用现配制的底物溶液显色得到的 IC_{50} 没有显著性差异。但从B液变色后重新利用试验的2种不同方法中可以看出,使B液立即变回无色的方法会轻微影响0孔的OD值,如果在试验中不要求变色的B液立即变回无色,而是B液放置一段时间后慢慢变成无色,这种处理不仅 IC_{50} 没有差异,而且0孔的OD值也不会降低。

试验中所用的玉米素核苷(ZR)和异戊烯基腺嘌呤核苷(iPA)免疫检测试剂盒是本实验室研制的2种植物激素免疫检测试剂盒,现已得到广泛应用。因此,本试验用此来验证硫代硫酸钠在B液保存中的作用。

本试验在B液的贮存方面虽取得了一些进展,能减少由于B液变色造成的损失。但是,由于国外TMB的研制水平较高,已经有可调控显色快慢,不需显色前A、B液混合的商品化显色液。因此,如何把A、B液配在一起保存,仍是今后研究的方向。

参 考 文 献

- [1] Bos E S, van der Doelen A A, van Rooy N, et al. 3,3,5,5-Tetramethyl-Benzidine as an Amestest negative chromogen for horse radish peroxidase in enzyme-immunoassay[J]. J Immunoassay, 1981(2):187
- [2] 朱立平. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000:352
- [3] 沈关心. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1997:119
- [4] 杨利国. 酶免疫测定技术[M]. 南京:南京大学出版社,1998:411
- [5] Frey A, Meckelein B, Externest D, et al. A stable and highly sensitive 3,3,5,5-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. Journal of Immunological Methods [J]. J Immunol Methods, 2000, 233(1-2):47-56