

## 市售单组分 TMB 显色液质量比较\*

潘庆军<sup>1</sup>, 朱学芝<sup>2</sup> (1. 广东医学院附属医院, 广东湛江 524001; 2. 广东粤海饲料集团有限公司, 广东湛江 524017)

**【摘要】** 目的 比较市售单组分 TMB 显色液的质量。方法 选购 4 种国内外代表性产品, 从外观、灵敏度、稳定性等几个方面进行对比。结果 两种进口试剂的灵敏度高于两种国产试剂, 但本底高于国产试剂。37 ℃ 5 d 加速稳定试验发现, 进口试剂和国产试剂均保持稳定, 但进口试剂本底显著升高。结论 市售单组分 TMB 显色液质量参差不齐, 价格相差甚远。

**【关键词】** 单组分; TMB 显色液; 质量比较

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.23.007 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)23-3102-02

Comparison of the quality of commercially available 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine liquid substrate\* PAN Qing-jun<sup>1</sup>, ZHU Xue-zhi<sup>2</sup> (1. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China; 2. Guangdong feed Group Co., Ltd., Zhanjiang, Guangdong 524017, China)

**【Abstract】** Objective To compare the quality of commercially available 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine liquid substrate. Methods The appearance, sensitivity and stability of four representative products made in China and other countries were compared. Results The sensitivity of two kinds of domestic reagent were higher than that of foreign reagents, but the background was also higher than the domestic reagents. All the reagents were stable after accelerated stability test at 37 ℃ for 5 days, but the background of the foreign reagents increased significantly compared to that of the domestic reagents. Conclusion The quality of the commercially available 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine liquid substrate is far different, and the price is very different.

**【Key words】** single porckage; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine liquid substrate; quality

辣根过氧化物酶(HRP)是酶联免疫吸附试验(ELISA)中应用最为广泛的一种标记酶,其催化过氧化物的氧化反应,最具代表性的过氧化物为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 反应式为 DH<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = D + 2H<sub>2</sub>O (其中 DH<sub>2</sub> 为供氧体, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为受氢体)。在 ELISA 中, DH<sub>2</sub> 一般为无色化合物, 经酶作用后成为有色产物, 以便进行比色测定。常用的供氢体有邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)和 ABTS[2,2-azino-di-(3-ethylbenziazobine sulfonate-6)]<sup>[1-3]</sup>。同时, HRP 对氢受体的专一性很高, 仅作用于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、小分醇的过氧化物和尿素过氧化物<sup>[4]</sup>。

供氢体中 TMB 因其灵敏度较高且无致癌性(OPD 和 ABTS 有潜在致癌作用)而得到广泛应用。氢受体中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 应用最多, 但尿素过氧化物为固体较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 稳定、方便。在 HRP 的催化作用下, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺生成蓝色偶氮化合物, 用盐酸(HCl)或硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止后, TMB 产物由蓝色变黄色, 最适吸收波长为 405 nm, 可在酶标仪等仪器上定量检测<sup>[5]</sup>。

目前随着技术的发展, 将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 TMB 同时配置在一种溶液中, 即单组分 TMB 显色液(混合型显色液, 二合一显色液等), 为一步即用型溶液, 无需混合, 方便快捷, 已被广大教学和科研人员选用, 成长为市场的主流产品<sup>[6-8]</sup>。本研究选购 4 种国内外代表性厂家的产品, 从外观、灵敏度、稳定性等几个方面进行对比分析, 报道如下。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 单组分 TMB 显色液购自广州博特生物工程有限公司, ELISA 用 TMB(单组分 TMB 过氧化物酶底物)购自武汉博士德生物工程有限公司, SureBlue TMB Microwell Peroxi-

dase Substrate 购自 KPL 公司, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate(Supersensitive) for ELISA 购自 Sigma 公司, HRP 标记抗人 IgG 购自广州博特生物工程有限公司, 酶标仪和洗板机为 Thermo 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 灵敏度试验** 将 2、4、5、8、10 ng/mL 的 HRP-Anti-Human IgG 取 5 微升/孔, 分别加入以上 4 种单组分 TMB 显色液 100 μL, 37 ℃ 避光显色 5 min, 以等体积 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止, 酶标仪测 A450。每次三复孔重复 3 次。

**1.2.2 稳定性试验** 将以上 4 种商品化 TMB 单组分显色液避光放置于 37 ℃ 温箱, 分别在 1、3、5、7 d 后取出观察物理外观变化, 进行灵敏度检测, 方法同 1.2.1。

**1.3 统计学方法** 数据分析采用 Repeated measures one-way ANOVA, 相同浓度 HRP 或时间点各组比较使用两独立样本 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 灵敏度试验** 结果显示, 在 TMB 单组分显色液显色灵敏度方面武汉博士德与广州博特, KPL 和 Sigma 公司产品相比较差异有统计学意义(图 1, *P* < 0.05), 而广州博特、KPL 和 Sigma 公司产品相比, 差异无统计学意义(图 1, *P* > 0.05)。在空白对照组(HRP-Anti-Human IgG 为 0)的本底方面, 武汉博士德与广州博特产品优于 KPL 和 Sigma 公司, 差异有统计学意义(图 1, *P* < 0.05)。广州博特、KPL 和 Sigma 公司产品在与 4 mg/mL 的 HRP-Anti-Human IgG 反应后, 基本在 0~12 min 左右达到显色平台期, 而武汉博士德仍呈缓慢升高趋势(图 2)。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202346); 广东省自然科学基金资助项目(S2012040006216)。

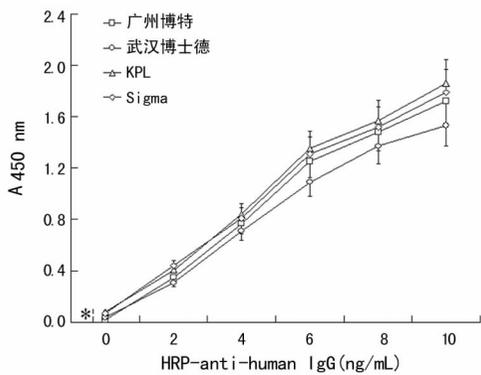
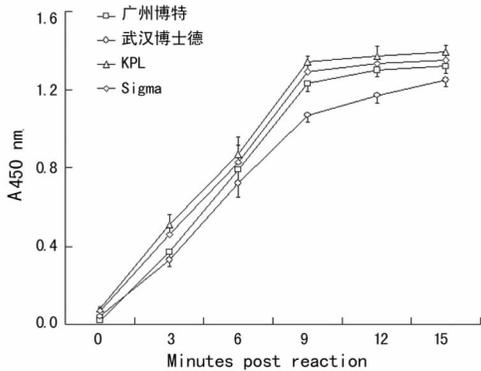


图 1 TMB 单组分显色液灵敏度比较



4 mg/mL HRP- Anti-Human IgG.

图 2 不同时间点 TMB 单组分显色液显色情况

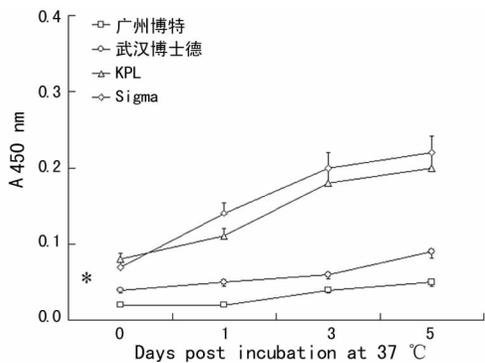


图 3 不同时间点 37 °C 加速稳定实验 TMB 单组分显色液本底比较

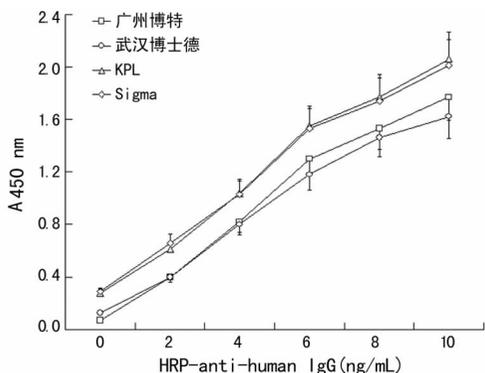


图 4 37 °C 5 d 加速稳定试验后 TMB 单组分显色液灵敏度比较

生变异。因此,在显色液研制过程中,常用 37 °C 加速稳定试验来代替 4 °C 或室温较长时间保存的稳定结果。结果显示,武汉博士德和广州博特产品经 37 °C 加速稳定试验处理甚至 5 d,显色液较稳定,基本无自发氧化显色,而 KPL 和 Sigma 公司产品略显淡蓝色,则本底显著升高,差异有统计学意义(图 3,  $P < 0.05$ )。经 37 °C 加速稳定试验处理甚至 5 d 后,KPL 和 Sigma 公司产品的灵敏度显著高于武汉博士德和广州博特产品,差异也有统计学意义(图 4)。

### 3 讨论

本研究全面地对市售单组分 TMB 显色液的灵敏度和稳定性等质量进行了对比,可望为单组分 TMB 显色液的选购提供参考。在选择单组分 TMB 显色液时,最主要考虑的是其灵敏度和稳定性指标<sup>[9]</sup>。本研究发现,灵敏度方面,两种进口试剂灵敏度高于两种国产试剂,进口试剂的本底则高于国产试剂。稳定性方面,37 °C 5 d 加速稳定试验检测,进口试剂和国产试剂均保持稳定,但进口试剂的本底显著升高。同时,酶促动力学显示,单组分 TMB 显色液产品基本在 9~12 min 左右达到显色平台期。

价格方面, Sigma 报价为 1 175 RMB/100 mL (<http://www.sigmaaldrich.com/>), KPL 报价为 \$ 43.90/100 mL (<http://www.kpl.com/>), 而国产试剂武汉博士德为 120 RMB/10 mL (<http://www.boster.com.cn/>), 广州博特则为 100 RMB/100mL (<http://stilwa.diytrade.com>)。当教学或科研需要使用大量 TMB 显色液时,如单克隆抗体制备过程中阳性克隆的筛选,其实验成本将大幅度上升。所以,价格低廉、质量可靠的单组分 TMB 显色液会有比较大的市场需求。

目前,进口 ELISA 试剂盒基本都采用了单组分 TMB 显色液,而国内 ELISA 生产试剂厂家基本都采用底物和显色液分开,即双组分 TMB 显色液。双组分 TMB 显色液的缺点在于:(1)存在漏加底物或显色液的可能,导致假阴性或漏检的可能性;(2)如果标本量大,需临时混合底物和显色液,存在混匀不均一的可能,  $H_2O_2$  和 TMB 比例不适宜则相互抑制导致假阴性或漏检;(3)增加了劳动强度,降低了检测效率等。造成这种现状的主要原因是国内大部分厂家生产 TMB 单组分试剂的灵敏度和稳定性技术尚未完全解决,主流 ELISA 试剂生产厂家仍在采用双组分 TMB 显色液。

### 参考文献

- [1] Josephy PD, Eling T, Mason RP. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3, 5, 3', 5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates[J]. J Biol Chem, 1982, 257(7): 3669-3675.
- [2] Josephy PD, Eling TE, Mason RP. Co-oxidation of benzidine by prostaglandin synthase and comparison with the action of horseradish peroxidase[J]. J Biol Chem, 1983, 258(9): 5561-5569.
- [3] Voogd CE, Van der Stel JJ, Jacobs JJ. On the mutagenic action of some enzyme immunoassay substrates[J]. J Immunol Methods, 1980, 36(1): 55-61.
- [4] Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme[J]. Phytochemistry, 2004, 65(3): 249-259.
- [5] Bos ES, van der Doelen AA, van Rooy N, et al. 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine as an Ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-

2.2 稳定性试验 通常 TMB 单组分显色液不太稳定,在保存过程中易自发氧化而使本底升高,使不同时间的检测结果产

手术组手术时间较传统手术组明显缩短,小切口手术组术中失血量较传统手术组明显减少,小切口手术组平均切口长度也明显小于传统手术组,小切口手术组住院时间较传统手术组明显缩短,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 2 两组患者各项指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	手术时间 (min)	术中失血量 (mL)	切口长度 (cm)	住院时间 (d)
小切口手术组	89	27.68±11.10	17.6±6.1	2.73±0.50	2.0±0.5
传统手术组	78	38.20±17.15	26.6±8.3	4.02±0.80	3.5±1.2

2.2 两组患者随访项目比较 见表 3。由表 3 可见,小切口手术组术后患者颈部紧缩感、颈部疼痛发生率明显低于传统手术组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );咽喉部不适感发生率也低于传统手术组,差异也有统计学意义( $P < 0.05$ );颈部麻木发生率两组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 3 两组患者术后随访比较[n(%)]

组别	n	颈部麻木	颈部紧缩感	颈部疼痛	咽喉部不适感
小切口手术组	89	4(4.49)	2(2.24)	5(5.62)	3(3.37)
传统手术组	78	3(3.85)	11(14.10)	26(33.33)	5(6.41)

### 3 讨 论

甲状腺结节是一种常见疾病,其发病率近年来有增加趋势<sup>[3]</sup>;其中女性多于男性,绝大多数患者为良性<sup>[4-5]</sup>。传统甲状腺切除术切口较长,对颈部肌肉、血管等损伤较大,易出现颈部疼痛、咽喉部不适等术后并发症,而且容易给患者颈部留下明显的手术疤痕,影响外观<sup>[6]</sup>。近 10 年来,微创手术在甲状腺外科有了很大的进展<sup>[7-8]</sup>。2000 年 Ohgami 等<sup>[9]</sup>报道经双乳径路的腔镜甲状腺手术无颈部疤痕。腔镜甲状腺手术具有出血少、美容效果好、术后恢复快等优势,但是受手术操作、设备、费用等因素的影响,尚不能在中、小型医院普及。

小切口甲状腺切除术的主要优势:小切口甲状腺切除术术中利用甲状腺拉钩牵拉患侧带状肌及皮肤,可额外增加手术野操作范围 3~4 cm,与传统甲状腺切除术显露并无差别,未增加操作难度,且不需要特殊设备。并且由于切口小,未离断颈前静脉及颈前肌群,减轻了切口处组织水肿,增加了美容效果。黄天立等<sup>[10]</sup>报道颈前肌群离断术后切口粘连发生率为 22%~50%,患者手术时间、术中失血量、切口长度、住院时间等指标均明显优于传统甲状腺切除术,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),减轻了患者的经济负担,降低了术后并发症的发生率。有文献报道,喉上神经及喉返神经损伤等手术并发症发生率为 1.7%,与传统甲状腺切除术相比,小切口甲状腺切除术手术并

发症并未增多,两组患者手术均未出现喉上神经及或喉返神经损伤<sup>[11]</sup>。

小切口甲状腺切除术手术要点:(1)本术式适合于术前超声、CT 检查提示甲状腺结节直径小于 5 cm 者;(2)术前充分准备,鉴于无瘤原则及甲状腺癌根治术要求,术前怀疑为甲状腺恶性肿瘤患者不建议采取小切口甲状腺切除术;(3)术者应熟悉喉返神经、喉上神经及周围血管解剖情况,术中利用甲状腺拉钩牵拉患侧带状肌及皮肤,保证术野暴露。

综上所述,小切口甲状腺切除术手术技巧易掌握,其创伤小、出血少、恢复快、手术安全性好,能有效降低术后并发症发生,在尚未普及腔镜甲状腺手术的中、小型医院值得推广应用。

### 参考文献

- [1] 丁纪伟,汤治平. 甲状腺瘤外科手术治疗临床研究[J]. 中国医药指南,2011,9(31):329-330.
- [2] Ferzli GS, Savad P, Abodo Z, et al. Minimally invasive nonendoscopic thyroid surgery[J]. J Am Coll Surg,2001,192(5):665-668.
- [3] 李静,王恩彤. 2011 年全国甲状腺肿瘤外科治疗专题学术会议纪要[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2011,46(11):954-956.
- [4] 李德祥,王希,陈超,等. 非窥镜微创低位小切口入路行甲状腺手术 2 336 例分析[J]. 临床和实验医学杂志,2008,7(7):148-149.
- [5] 张愈伟. 治疗单纯性甲状腺肿瘤 85 例的疗效分析[J]. 中外健康文摘,2009,6(18):136.
- [6] 檀谊洪,肖玉根,严国标,等. 甲状腺切口疤痕最小化综合技术的应用[J]. 中国美容医学,2012,21(1):16-18.
- [7] Youben F, Bomin G, Bo W, et al. Trans-areola single-incision endoscopic thyroidectomy[J]. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech,2011,21(4):192-196.
- [8] Lukas J, Paska J. Minimally invasive thyroidectomy[J]. Cas Lek Cesk,2009,148(5):194-196.
- [9] Ohgami M, Ishii S, Arisawa Y, et al. Scarless endoscopic thyroidectomy: breast approach for better cosmesis [J]. Surg Laparosc Endosc PercutanTech,2000,10(1):1-4.
- [10] 黄天立,陈声乐. 甲状腺术后切口粘连的防治探讨[J]. 广东医学,2002,19(8):585.
- [11] 姚榛祥. 重视甲状腺切除术的并发症[J]. 中国普通外科杂志,2005,9(14):641-643.

(收稿日期:2013-05-17 修回日期:2013-07-12)

(上接第 3103 页)

immunoassay[J]. J Immunoassay,1981,2(3-4):187-204.

- [6] Grandke J, Oberleitner L, Resch-Genger U, et al. Quality assurance in immunoassay performance-comparison of different enzyme immunoassays for the determination of caffeine in consumer products[J]. Anal Bioanal Chem, 2013,405(5):1601-1611.
- [7] ten Have R, Thomassen YE, Hamzink MR, et al. Development of a fast ELISA for quantifying polio D-antigen in in-process samples[J]. Biologicals,2012,40(1):84-87.

- [8] Lexmond W, der Mee Jv, Ruiter F, et al. Development and validation of a standardized ELISA for the detection of soluble Fc-epsilon-RI in human serum [J]. J Immunol Methods,2011,373(1-2):192-199.
- [9] Frey A, Mecklein B, Externest D, et al. A stable and highly sensitive 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays[J]. J Immunol Methods,2000,233(1-2):47-56.

(收稿日期:2013-04-27 修回日期:2013-07-11)