

董林, 谢金文, 孟卫芹, 等. 可变色 ELISA 样品稀释液制备及其性能检测 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 57-62.

DONG L, XIE J W, MENG W Q, et al. Dilution preparation and performance testing of colorable ELISA samples [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 57-62.

## 可变色 ELISA 样品稀释液制备及其性能检测

董林<sup>1,2</sup>, 谢金文<sup>1</sup>, 孟卫芹<sup>1</sup>, 王艳萍<sup>1\*</sup>, 刘吉山<sup>1</sup>, 王金良<sup>1</sup>, 曲光刚<sup>1</sup>

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600;

2. 山东绿都生物科技有限公司, 山东 滨州 256600)

**摘要:** 为解决酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测过程中样品错加、漏检问题, 研制开发了一种可变色 ELISA 试剂盒样品稀释指示剂, 明确了其制备方法, 并开展了性能检测评价及其在检测过程的应用特性。可变色稀释指示剂制备方法为: 在 0.01 mol/L PBS (pH=7.2) 基础缓冲液中, 加入血清蛋白组分、0.01%可变色指示剂和特效稳定剂, 充分溶解后再添加 Krovin750 防腐剂, 定容后即可。结果: 制备的可变色 ELISA 样品稀释显色反应明显, 可用于 ELISA 试剂盒检测中的血清或血浆样本稀释, 有效避免检测过程样品跳孔和错加现象; 同时对样品具有良好保护, 显著提高了检测结果的准确性和稳定性, 实现了对样品的有效保护, 降低了样品基质背景干扰, 提高了检测结果的准确性和稳定性。

**关键词:** 可变色; ELISA; 样品稀释液; 性能评价

中图分类号: S854.4 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)10-0057-06

## Dilution preparation and performance testing of colorable ELISA samples

DONG Lin<sup>1,2</sup>, XIE Jinwei<sup>1</sup>, MENG Weiqin<sup>1</sup>, WANG Yanping<sup>1\*</sup>,

LIU Jishan<sup>1</sup>, WANG Jinliang<sup>1</sup>, QU Guanggang<sup>1</sup>

(1. Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Institute, Binzhou 256600, China;

2. Shandong Lvdu Bio-Sciences & Technology Co., Ltd., Binzhou 256600, China)

**Abstract:** In order to solve the problem of sample mis-addition and missed detection in the ELISA detection process, a color changing ELISA kit sample dilution indicator was developed to clarify its preparation method, conduct performance testing evaluation, and its application characteristics in the detection process. The dis-colorable dilution indicators consisted of basic buffer, serum protein components, dis-colorable indicator, special stabilizer, high-efficiency antibacterial and preservative, and purified water. The preparation method was to first prepare a 0.01 mol/L PBS (pH=7.2) base buffer solution; then serum protein components, 0.01% color changing indicator, and special stabilizer were added. After sufficient dissolution, Krovin750 preservative was added, and after constant dissolution, the ELISA kit sample dilution indicator was obtained. The results showed that the prepared dis-colorable ELISA sample exhibited obvious color reaction at dilution, and could be used for diluting serum or plasma samples in ELISA kit detection, effectively avoiding sample jumping and mis-addition in the detection process. At the same time, this method had good protection for the sample, significantly improving the accuracy and stability of the detection results, achieving effective protection for the sample, reducing the background interference of the sample matrix, and improving the accuracy and stability of the detection results.

**Keywords:** colorability; ELISA; sample diluent; performance evaluation

酶联免疫吸附法 (ELISA) 由于具有敏感、特异、操作简便且可定性定量检测、安全性好等优点, 广泛应用于疫病诊断和体内多种免疫成分的检

测<sup>[1]</sup>, 同时由于易于试剂盒化, 特别适宜临床大样本的现场快速检测, 在药物残留筛查等食品安全领域具有重要意义<sup>[2]</sup>。ELISA 试剂盒产品的商品化和推广应用很大程度上依赖于其产品质量的好坏, 其中产品稳定性、结果准确性和操作的便易性是其影响因素<sup>[3]</sup>。血清或血浆作为 ELISA 检测中最常用的样品, 在 ELISA 抗原或抗体检测过程中常常需要进行不同比例的稀释。目前市场常见的 ELISA 试剂盒稀释液均不能对样品进行有效保护, 稀释液中样品环境与血清或血浆存在明显差异, 无法有效降低基质背景干

收稿日期: 2023-10-13; 修回日期: 2024-07-31

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2023MC212); 山东省现代农业产业技术体系牛创新团队滨州综合试验站项目 (SDAIT-09-12)

第一作者: 董林, 男, 兽医博士, 副研究员

\* 通信作者: 王艳萍, 副研究员, 主要从事中兽药与动物疫病防控技术方面的研究, E-mail: xiaowangyanping213@163.com。

扰,影响检测结果准确性<sup>[4]</sup>。

现有的试剂盒产品样品稀释液为无色或者呈单一组分颜色,在大规模样品检测中,使用无色样品稀释液在加样过程中存在跳孔或错加的现象,而使用单一颜色样品稀释液时,由于加入血液样品先后颜色无明显变化,易发生漏加的现象<sup>[5]</sup>。另外,在 ELISA 试剂盒推广中,常需要一定时间的产品保存期,这就需要开发具有长时间稳定性的试剂盒样品稀释液<sup>[6]</sup>。因此,研制一种易于区分样品稀释液中是否加入血清或血浆样品的稀释液指示剂,同时具有一定保存期和显著降低样品基质背景干扰的 ELISA 试剂盒样品稀释液具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 主要试剂

NaCl、KCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、NaOH 和甘油购自国药集团; Triton X-100 (货号: 9036-19-5)、甲酚红 (货号: 1733-12-6) 购自 Sigma-Aldrich; TREHA<sup>®</sup>海藻糖为日本 NAGASE 公司产品; KroVin750 购自西宝生物科技(上海)股份有限公司; 小牛血清为天津康源生物技术有限公司产品; 牛 A 型口蹄疫 ELISA 抗原检测试剂盒、猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒均为兰州兽研生物科技有限公司产品; 猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 抗体 ELISA 检测试剂盒为韩国金诺 (MEDIAN) 公司产品。PBST 缓冲液 (0.01 mol/L PBS+0.05% Tween-20, pH=7.2) 由山东绿都生物科技有限公司提供。

#### 1.1.2 血清样品

40 份牛血清样品为山东亿利源养殖场送检样品,其中牛 A 型口蹄疫血清抗原阳性样品 28 份,牛 A 型口蹄疫血清抗原阴性样品 12 份。40 份猪血清样品由山东省滨州畜牧兽医研究院重点实验室保存,其中 PCV2 血清抗体阳性样品 22 份,PCV2 血清抗体阴性样品 18 份。

#### 1.1.3 主要仪器与设备

1575 型自动洗板机为美国 BIO-RAD 产品, Multiskan FC 酶标仪为 Thermo Fisher 产品, Cary 60 紫外-可见分光光度计为 Agilent 产品。

### 1.2 基础缓冲液配制

准确称取 NaCl 8 g, KCl 0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g, 充分搅拌溶解,用 2 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 7.2,用超纯水定容至 1 L。

### 1.3 稀释液指示剂配制

首选配制质量百分比为 10% 甲酚红浓缩液,其溶解介质为纯化水,充分搅拌溶解后,用 0.45  $\mu\text{m}$

滤膜过滤去除不溶性沉淀,室温保存。将配制的浓缩 10% 甲酚红按一定体积比加入基础缓冲液中,使其终浓度控制在 0.005%~0.02% 之间。

### 1.4 特效稳定剂的制备

按 2% 海藻糖、1% 甘油、5% NaCl 和 5% Triton X-100 的质量百分比,分别称取适量海藻糖、甘油、NaCl 和 Triton X-100,放入同一个烧杯中,配制复合溶液,用 1.2 配制基础缓冲液作为溶剂相,待稳定剂组分充分溶解后,需经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,4  $^{\circ}\text{C}$  低温保存。

### 1.5 可变色 ELISA 样品稀释液的制备

在加入稀释指示剂和特效稳定剂的基础缓冲液中,加入 10% 小牛血清、0.001%~0.005% 防腐剂 KroVin750,制备完成后 4  $^{\circ}\text{C}$  低温避光保存。

### 1.6 性能指标平行验证

分别选取牛 A 型口蹄疫 ELISA 抗原检测试剂盒和 PCV2 抗体 ELISA 检测试剂盒,用制备可变色 ELISA 样品稀释液替换原来试剂盒中的样品稀释液,进行血清样品中抗原和抗体检测,同时用原试剂盒进行平行检测,对 80 份血清样品进行检测,测定 OD 值。按试剂盒判定标准,采用敏感性和特异性指标评价可变色样品稀释液的实际检测特性,其中:敏感性 = 阳性样品相符数/真阳性样品数 $\times 100\%$ ,特异性 = 阴性样品相符数/真阴性样品数 $\times 100\%$ 。

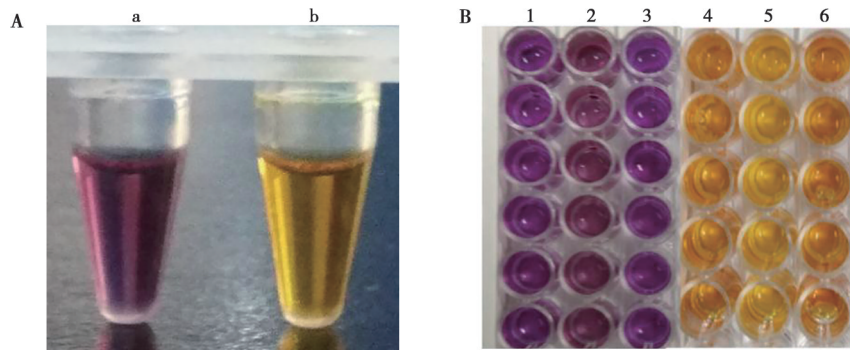
### 1.7 样品稀释液稳定性试验

选用商品化的猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,取 8 份血清样品,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行保存,分别于第 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 月取出用商品化试剂盒进行检测,评价样品稀释液稳定性,设置 PBST 缓冲液作为可变色样品稀释液对照。同时制备的可变色 ELISA 稀释液放置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中,分别于放置后 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 d 取出,测定其  $OD_{450}$  值,计算差异性数值  $R^2$  以评价其热加速稳定性。其中, $R^2$  为不同时间试剂盒对 8 份样品检测均值相对于 0 d 对照组均值的变异性变量,采用 SPSS 17.0 软件进行计算分析, $R^2$  越接近 1 表示检测结果差异性越小,即稳定性越好。

## 2 结果

### 2.1 可变色 ELISA 样品稀释液的制备

制备完成的样品稀释液成品在未加入血清样品时颜色为紫红色,加入后变为橙黄色,显色反应明显(图 1A)。ELISA 反应孔验证显色,采用可变色样品稀释液,加样孔和漏加孔颜色反差明显(图 1B),能完全避免 ELISA 检测过程样品的跳孔和错加现象。



a. 未加入样品时颜色; b. 加入血清样品后颜色; 1~3. 未加入样品时颜色; 4~6. 加入血清样品后颜色。

图1 可变色样品稀释液外观观察 (A) 和酶标板验证 (B)

## 2.2 性能指标平行试验比较

用制备的可变色 ELISA 试剂盒样品稀释液替换商品化的牛 A 型口蹄疫 ELISA 抗原检测试剂盒中的样品稀释液对临床上 40 份牛血清样品进行检测, 2 种处理试验结果均为阳性 28 份, 阴性 12, 检测结果完全一致, 敏感性、特异性达到 100% (表 1 和图

2)。可变色样品稀释液替换 PCV2 抗体 ELISA 检测试剂盒中的样品稀释液, 对临床上 40 份猪血清样品检测结果显示, 2 种处理均为阳性样品 22 份, 阴性样品 18 份, 检测结果完全一致, 其特异性 100%, 敏感性 100% (表 2 和图 3)。平行试验结果表明可变色样品稀释液替换对试剂盒检测结果判定无影响。

表 1 牛 A 型口蹄疫 ELISA 抗原检测试剂盒比较试验 (OD 值)

编号	原试剂盒	可变色样品稀释液	结果	编号	原试剂盒	可变色样品稀释液	结果
1	1.825	1.714	一致	21	1.248	1.238	一致
2	1.021	1.032	一致	22	1.487	1.485	一致
3	0.415	0.398	一致	23	1.574	1.489	一致
4	0.152	0.143	一致	24	2.074	2.105	一致
5	0.852	0.834	一致	25	2.541	2.367	一致
6	0.347	0.340	一致	26	0.854	0.845	一致
7	0.741	0.715	一致	27	0.821	0.814	一致
8	1.412	1.398	一致	28	0.562	0.559	一致
9	1.321	1.304	一致	29	0.452	0.460	一致
10	0.471	0.467	一致	30	0.357	0.361	一致
11	1.047	1.102	一致	31	0.304	0.320	一致
12	0.952	1.025	一致	32	0.182	0.175	一致
13	1.204	1.187	一致	33	0.102	0.112	一致
14	0.251	0.215	一致	34	0.138	0.142	一致
15	0.657	0.631	一致	35	0.157	0.149	一致
16	1.102	1.108	一致	36	0.874	0.872	一致
17	1.321	1.301	一致	37	0.841	0.832	一致
18	0.414	0.398	一致	38	0.152	0.147	一致
19	0.312	0.296	一致	39	0.741	0.735	一致
20	0.257	0.241	一致	40	0.341	0.335	一致

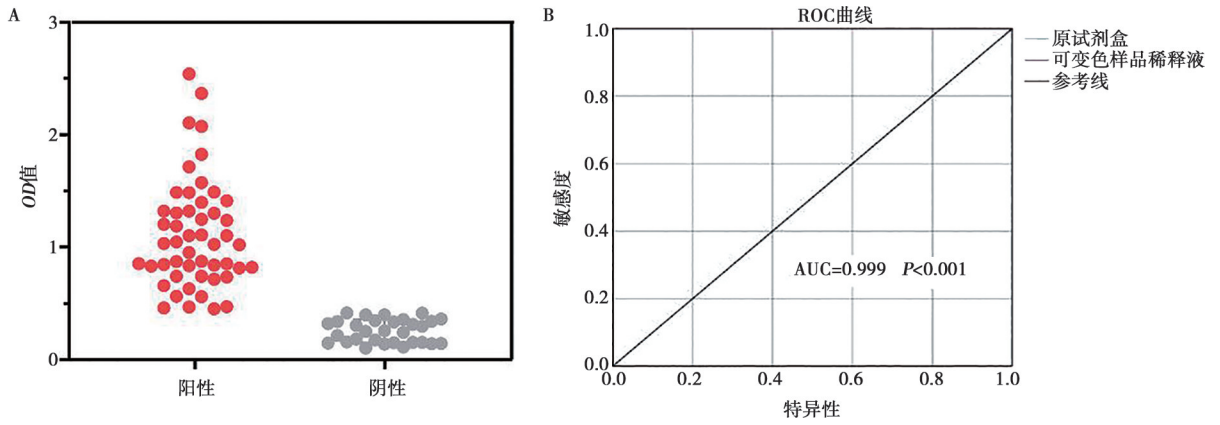


图2 牛A型口蹄疫抗原ELISA检测结果散点图(A)和ROC分析(B)

表2 PCV2血清抗体ELISA检测试剂盒比较试验(OD值)

编号	原试剂盒	可变色样品稀释液	结果	编号	原试剂盒	可变色样品稀释液	结果
1	0.741	0.725	一致	21	0.174	0.168	一致
2	0.612	0.598	一致	22	0.254	0.251	一致
3	1.251	1.205	一致	23	0.325	0.314	一致
4	1.851	1.801	一致	24	1.147	1.089	一致
5	2.314	2.241	一致	25	1.324	1.358	一致
6	0.254	0.251	一致	26	1.258	1.204	一致
7	0.244	0.234	一致	27	0.894	0.874	一致
8	0.184	0.174	一致	28	0.541	0.536	一致
9	0.257	0.246	一致	29	0.254	0.261	一致
10	0.348	0.319	一致	30	0.362	0.372	一致
11	1.452	1.501	一致	31	2.541	2.405	一致
12	1.305	1.285	一致	32	1.874	1.857	一致
13	0.524	0.498	一致	33	0.124	0.129	一致
14	0.359	0.364	一致	34	0.364	0.384	一致
15	0.458	0.425	一致	35	0.287	0.278	一致
16	1.258	1.225	一致	36	1.632	1.587	一致
17	0.895	0.854	一致	37	0.358	0.341	一致
18	0.625	0.598	一致	38	0.398	0.374	一致
19	0.251	0.210	一致	39	0.874	0.869	一致
20	0.132	0.142	一致	40	0.521	0.532	一致

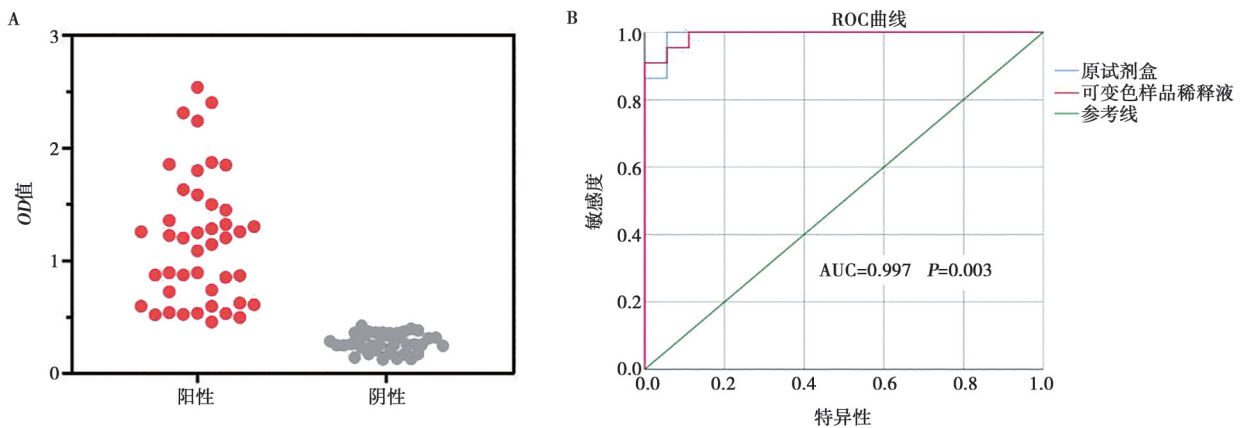


图3 PCV2血清抗体ELISA检测结果散点图(A)和ROC分析(B)

### 2.3 可变色 ELISA 样品稀释液稳定性

2种稀释液对同一样品在不同时间检测结果存在显著差异,使用PBST稀释的样品,在37℃下放置2d后,检测结果开始明显降低;而用可变色样品稀释液稀释样品的检测结果在1~7d时基本一致,无明显差异,8d时开始有所降低。说明制备的试剂盒稀释液对样品具有良好保护作用,显著提高检测结果的准确性和稳定性,有利于ELISA试剂盒的推广应用。

结合图4、表3和图5可知:置于4℃条件下,样品稀释液对血清样品检测结果,1~12个月之间,OD值检测结果一致,无明显表变化,其样品检测值相关系数 $R^2$ 均在0.95以上,13个月开始有所降低,到14个月降低明显。而37℃热加速试验显示,1~10d内,检测结果基本一致,无显著变化,其检测值相关系数 $R^2$ 均在0.95以上,从11d开始OD值变化明显。由此可见,制备的可变色ELISA试剂盒样品稀释液具有良好稳定性,能够延长试剂盒有效期。

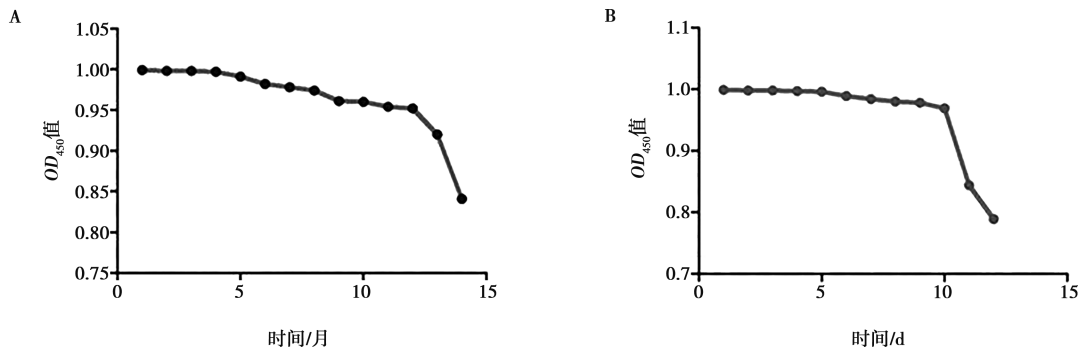


图4 4℃样品(A)和37℃样品(B)稀释液稳定性检测

表3 ELISA试剂盒样品稀释液指示剂稳定性试验(37℃)

试剂种类	编号	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
PBST	1	1.512	1.325	1.025	0.812	0.632	0.415	0.258	0.132	0.111	0.102
	2	1.257	1.054	0.741	0.541	0.452	0.258	0.187	0.154	0.104	0.098
	3	1.025	0.798	0.562	0.325	0.258	0.154	0.102	0.074	0.054	0.051
	4	0.647	0.512	0.325	0.210	0.154	0.11	0.054	0.054	0.045	0.042
	5	0.548	0.418	0.387	0.352	0.302	0.241	0.182	0.152	0.107	0.054
	6	0.454	0.325	0.215	0.141	0.105	0.102	0.055	0.053	0.051	0.050
	7	0.243	0.185	0.125	0.105	0.059	0.065	0.051	0.041	0.035	0.031
	8	0.187	0.147	0.110	0.087	0.054	0.045	0.041	0.040	0.032	0.028
可变色样品 稀释液	1	1.725	1.689	1.615	1.515	1.432	1.289	1.087	0.941	0.891	0.874
	2	1.487	1.325	1.297	1.141	0.989	0.854	0.741	0.621	0.612	0.604
	3	1.114	0.903	0.874	0.832	0.702	0.685	0.635	0.625	0.575	0.502
	4	0.678	0.625	0.612	0.585	0.542	0.512	0.485	0.398	0.338	0.294
	5	0.616	0.611	0.603	0.589	0.467	0.454	0.372	0.289	0.224	0.180
	6	0.487	0.457	0.425	0.410	0.387	0.355	0.341	0.301	0.214	0.204
	7	0.254	0.225	0.214	0.207	0.200	0.174	0.157	0.152	0.147	0.132
	8	0.197	0.189	0.175	0.172	0.168	0.164	0.142	0.138	0.125	0.111

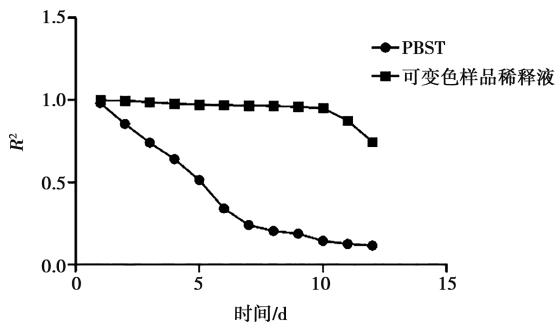


图5 37 °C样品稀释液稳定性试验 ( $R^2$ )

### 3 讨论

ELISA 方法是一种基于生物活性物质的微量型快速检测技术, 现阶段在多种病原微生物所引起的传染性疫病、寄生虫病和非传染性病的诊断与检测中获得成功应用<sup>[7]</sup>。临床推广应用证实, ELISA 法以其灵敏度高 (可达 ng 甚至 pg 水平)、特异性好等优点在生命科学领域得到广泛应用, 特别适用于血清流行病学的调查<sup>[8-9]</sup>。国内外相关学者研究报道了多种基于 ELISA 的快速检测方法和基于量子点、显色增强技术的改进性 ELISA 检测技术, 但商品化试剂盒却较少, 特别是国内质量稳定、成熟可靠的 ELISA 商品化试剂盒更少。虽然, ELISA 检测方法操作步骤相对简单, 但影响因素众多, 导致检测方法的敏感性和特异性等性能指标对试剂盒的质量稳定具有重大影响<sup>[10-11]</sup>。因此, 在检测过程中如何避免待检样品中背景本底对检测结果判定的影响, 减低其非特异性反应, 是评价 ELISA 检测方法性能水平的重要指标<sup>[12]</sup>。同时, 在检测操作中如何避免由于人员操作失误导致的结果误差或稳定性不高, 也是影响其结果评价的重要因素之一, 特别是在待检样品数量和种类较多的时候, 如何避免样品的漏加或错加显得十分重要, 因此本试验研制和制备的可变色 ELISA 样品稀释液有效避免检测过程中样品跳孔和错加现象, 显著提高检测结果的稳定性, 为试剂盒商品化生产奠定了良好基础。

本试验中基于可变色指示剂显色原理, 以甲酚红为指示剂, 通过优化, 组成式加入基础缓冲液、血清蛋白组分、特效稳定剂和高效抑菌防腐剂, 制备可变色 ELISA 样品稀释液, 实现了未加血清和加入血清样品稀释液外观色差的显著性变化, 完全避免 ELISA 检测过程样品的跳孔和错加现象。现阶段, 市场商品化 ELISA 试剂盒多数仅能实现样品稀释, 对待检血清样品的稳定性保护和阴性本底背景值的降低效果不理想, 无法有效避免由于人员操作导致的稳定性差异, 因此本试验研制的试剂盒样品稀释液具有很好的

实际操作便利性。同时, 检测样品的平行试验结果表明, 经与商品化试剂盒比, 样品检测结果完全一致, 符合率 100%, 结果判定无明显差异, 说明制备的可变色样品稀释液可用于临床样品的检测。

可变色样品稀释液稳定性检测显示, 对样品具有良好保护作用, 显著提高检测结果的准确性和稳定性, 能够有效延长试剂盒有效期。本试验制备的可变色样品稀释液为今后 ELISA 检测试剂盒的研制提供了重要的参考, 对动物疫病防控和疫苗监测具有重要作用。

### 参考文献:

- [1] 李艺涵, 猪传染性胃肠炎病毒间接 ELISA 抗体检测试剂盒的研制及生产工艺研究 [D]. 延边: 延边大学, 2022.
- [2] 顾志冬, 施新明, 陆秋涯, 等. 不同检测系统和样品稀释液对环孢素检测结果的影响 [J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28 (8): 862-864.
- [2] 杜改梅, 刘茂军, 陈熠夕, 等. ELISA 检测方法中最佳封闭液和样品稀释液的筛选研究 [C]. 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第八届全国会员代表大会暨第十五次学术研讨会论文集, 徐州, 2013.
- [4] 倡传彪. 马流产沙门菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒规模化生产工艺研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
- [5] LIU Y, ZHANG D F, ZHOU X, et al. Comprehensive analysis reveals two distinct evolution patterns of *Salmonella* flagellin gene clusters [J]. Front Microbiol, 2017, 8 (8): 2604-2605.
- [6] 方一臻. 沙门氏菌间接 ELISA 抗体检测方法的建立及重组猪痘活载体疫苗的研制 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [7] ELHOSSEINY N M, SAMIR T M, ALI A, et al. Development of an immunochromatographic strip using conjugated gold nanoparticles for the rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* causing neonatal sepsis [J]. Pharmaceutics, 2021, 13 (8): 2-3.
- [8] DOMAŃSKA Blicharz K, Tyborowska J, Sajewicz - Krukowska J, et al. Development of a recombinant NP protein based indirect ELISA for the detection of antibodies against Newcastle disease virus and differentiation of infected or recombinant vaccine immunized chickens [J]. Pol J Vet Sci, 2019, 22 (3): 531-540.
- [9] WALRAPH J, ZOCHE-GOLOB V, WEBER J, et al. Decline of antibody response in indirect ELISA tests during the periparturient period caused diagnostic gaps in *Coxiella burnetii* and BVDV serology in pluriparous cows within a Holstein dairy herd [J]. Res Vet Sci, 2018, 118: 91-96.
- [10] 李婵. 雌性秦岭大熊猫尿液中类固醇激素 ELISA 试剂盒的研发及应用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [11] 李炜. 鸡鲍氏志贺氏菌双抗夹心 ELISA 检测方法的建立及应用 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [12] TAN Y, DONG G, NIU J, et al. Development of an indirect ELISA based on glycoprotein B gene for detecting of feline herpesvirus type 1 [J]. Pol J Vet Sci, 2019, 22 (3): 631-633.