(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105738611 A
(43)申请公布日 2016.07.06

(21)申请号 201510814308.4

(22)申请日 2015.11.23

(71)申请人 轻工业环境保护研究所
地址 100089 北京市海淀区西三环北路27号北科大厦六层

(72)发明人 许丽 张雪春 赵鲁 程言君

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 21/31(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种苯并(a)芘酶联免疫检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测苯并(a)芘残留的酶联免疫试剂盒，包括：包被有苯并(a)芘抗原的酶标板(96孔)、苯并(a)芘特异性抗体、酶标二抗、苯并(a)芘标准品溶液、样品稀释液、抗体稀释液、显色液、终止液。本发明还公开了使用所述试剂盒检测水和土壤样品中苯并(a)芘的方法，包括样品的前处理，利用试剂盒进行检测，结果的处理与分析。本发明提供的检测苯并(a)芘的试剂盒采用间接竞争酶联免疫吸附分析技术，灵敏度高，稳定性好，成本低，非常适合大量样品的筛查，具有重要的推广应用价值。

CN 105738611 A

1.一种检测苯并 (a) 芘的酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述试剂盒包括如下组分：

(1) 包被有苯并 (a) 芘抗原的酶标板 (96 孔)；

(2) 苯并 (a) 芘特异性抗体；

(3) 苯并 (a) 芘标准品溶液；

(4) 酶标二抗；

(5) 样品稀释液；

(6) 抗体稀释液；

(7) 显色液；

(8) 终止液。

2.根据权利要求 1 所述的苯并 (a) 芘酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述苯并 (a) 芘抗原由苯并 (a) 芘半抗原和载体蛋白通过活性脂法偶联得到，所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清白蛋白。

3.根据权利要求 1 所述的苯并 (a) 芘酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述样品稀释液为含有 30％甲醇、1％～ 5％牛血清白蛋白和 0.05％吐温 20，pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中磷酸盐缓冲液主要成分含量为 $KH_2PO_4$0.2％，$Na_2HPO_4$3％，NaCl 8％，KCl 0.2％。

4.根据权利要求 1 所述的苯并 (a) 芘酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述抗体稀释液为含有 1％牛血清白蛋白和 0.01％吐温 20，pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中磷酸盐缓冲液主要成分含量为 KH_2PO_4 0.2％，$Na_2HPO_4$3％，NaCl 8％，KCl 0.2％。

5.根据权利要求 1 所述的苯并 (a) 芘酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述苯并 (a) 芘特异性抗体为权利要求 2 中所述苯并 (a) 芘抗原按常规免疫方法制备得到的单克隆抗体或多克隆抗体。其工作液为特异性抗体与上述抗体稀释液按照 1 ∶ 5000 ～ 10000 的比例混合。

6.根据权利要求 1 所述的苯并 (a) 芘酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述酶标二抗为羊抗鼠或羊抗兔抗体，所用工作液为酶标抗体与上述抗体稀释液按照 1 ∶ 100 ～ 200 的比例混合。

7.根据权利要求 1 所述的苯并 (a) 芘酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述苯并 (a) 芘标准品溶液浓度为 0ppb、4ppb、20ppb、100ppb、500ppb 的一系列标准品溶液。

8.根据权利要求 1 所述的苯并 (a) 芘酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述终止液为 1 ～ 2mol/L 硫酸溶液。

9.权利要求 1 ～ 8 任一所述苯并 (a) 芘酶联免疫试剂盒在检测苯并 (a) 芘残留时的使用方法，其特征在于包括如下步骤：

(1) 将试剂盒从冷藏环境中取出，平衡至室温；

(2) 将标准品或经过前处理的待测样品加入已经包被有苯并 (a) 芘抗原的酶标板孔内，再依次加入抗体工作液和酶标二抗工作液，轻拍混匀，室温孵育；

(3) 用蒸馏水或去离子水进行洗涤；

(4) 在每孔中加入显色液，轻拍混匀，室温避光孵育；

(5) 在每孔中加入终止液，混合均匀，在 450nm 波长下酶标仪读取吸光值；

(6) 检测结果分析，根据标准品浓度和相对吸光值绘制标准曲线，计算加样孔中样品浓

度，确定实际样品中苯并(a)芘含量。

10.根据权利要求9所述苯并(a)芘酶联免疫检测试剂盒的使用方法，其特征在于，(2)所述的前处理是指浓度含量较低的水样和土壤样品需要经过前处理过程才可用于检测。

一种苯并（a）芘酶联免疫检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术，具体涉及一种用于检测土壤和水中苯并（a）芘残留的酶联免疫试剂盒，其特别适用于生活饮用水，地下水，江河湖水，工业废水等水样和污染土壤中苯并（a）芘残留的检测。

技术背景

[0002] 苯并（a）芘（Benzoapyrene，BaP）是含有5个苯环的多环芳烃，是多环芳烃中毒性最大的一种致癌物质，在300到600℃之间的不完全燃烧状态下产生。因此，苯并（a）芘成为世界各国所面临的重大环境与公共健康问题之一。美国国家环保局（USEPA）将苯并（a）芘列为优先控制污染物，对其进行严格的监管和控制。我国地表水环境质量标准（GB3838-2002）中严格规定了地表水中苯并（a）芘的浓度限量。

[0003] 环境样品中苯并（a）芘的监测和分析主要包括以下几个步骤：样品采集，苯并（a）芘提取，净化和浓缩，最后采用气相色谱法或高效液相色谱法等仪器分析方法进行检测。整个过程步骤繁琐，耗时较长，仪器设备昂贵，不适合对大量样品在短时间的分析和监测。除以上两种主要的仪器分析方法外，用于测定苯并（a）芘的方法还有荧光法和酶联免疫吸附分析法。与其它方法相比，酶联免疫吸附分析法应用于环境污染物的检测分析在国外早有先例，并得到了国外环境保护部门的认可。酶联免疫吸附分析法（Enzyme-Linked lmmunoSorbent Assay，ELlSA）是将抗原-抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机结合形成的一种综合性技术。同时具有特异性好，灵敏度高，操作简便快捷，且可同时处理大批量样品等优点。因此，研究应用该方法对苯并（a）芘进行检测分析越来越受到研究人员的关注。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有检测苯并（a）芘的方法对设备的依赖性高，并且不能实现对大批量样品的快速检测的缺点，提供一种检测环境中土壤和水中苯并（a）芘的酶联免疫检测试剂盒及其检测方法，本发明不受检测设备的限制并且能够实现对大批量的苯并（a）芘残留样品进行快速筛查。

[0005] 本发明的另一目的在于提供一种检测样品中苯并（a）芘的快速、简便的定性或定量的方法。

[0006] 为了实现上述目的，本发明采用如下测定原理：首先将苯并（a）芘抗原吸附于酶标板孔内，然后加入待测样品和人工制备的苯并（a）芘抗体，和酶标记的针对第一抗体的第二抗体（酶标二抗，若一抗为兔抗体，则酶标二抗为酶标羊抗兔lgG抗体；若一抗为鼠抗体，则酶标二抗为酶标羊抗鼠lgG抗体），酶标板孔内的抗原与样品中的待测物相互竞争与加入的苯并（a）芘抗体结合，通过洗涤后，酶标板孔内留下抗原-苯并（a）芘抗体一酶标二抗的结合物。洗去未结合的苯并（a）芘抗体和酶标二抗，再加入底物，酶催化底物反应而显色。酶标板上固定的抗原及加入的一抗、酶标二抗的量是一定的，若样品中待测物浓度较

高，则与之结合所需的抗体量就较多，与载体上抗原结合的抗体量就相对较少，发色反应减弱，吸光度值降低；反之，则发色反应增强，吸光度值增高。因而，根据已知浓度的苯并(a)芘的标准曲线和待测样品的吸光度，再根据吸光度与苯并(a)芘浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线，并推算出待测样品中苯并(a)芘的浓度。

[0007]　本发明上述目的可通过以下技术方案实现：

[0008]　本发明提供的酶联免疫试剂盒包括以下组分：

[0009]　已包被苯并(a)芘抗原的酶标板

[0010]　苯并(a)芘标准品溶液

[0011]　苯并(a)芘抗体工作液

[0012]　酶标二抗

[0013]　抗体稀释液

[0014]　样品稀释液

[0015]　显色液

[0016]　终止液

[0017]　所述苯并(a)芘抗原由苯并(a)芘半抗原和载体蛋白通过活性脂法偶联得到，所述载体蛋白为牛血清白蛋白，卵清白蛋白；所用的包被液为pH9.6，0.05M的碳酸盐缓冲液，苯并(a)芘抗原的包被浓度为0.5～1μg/ml，封闭液优选为含有2％ BSA的磷酸盐缓冲液(PBS溶液)。所述PBS溶液浓度为0.01mol/L，pH值7.4，其中主要成分含量为$KH_2PO_4$0.2％，$Na_2HPO_4$3％，NaCl 8％，KCl 0.2％。

[0018]　所述酶标板为96孔聚苯乙烯酶标板，包被有能与抗苯并(a)芘抗体特异性结合的苯并(a)芘抗原，并封闭微孔板表面未吸附苯并(a)芘抗原的位点。

[0019]　所述特异性抗体为苯并(a)芘多克隆抗体或单克隆抗体中的一种，为本实验室前期按常规免疫方法制备得到，收集腹水采用亲和层析柱进行纯化。

[0020]　所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠或羊抗兔抗体。

[0021]　所述苯并(a)芘标准品溶液浓度分别为0ppb、4ppb、20ppb、100ppb、500ppb。

[0022]　所述抗体稀释液为含有1％牛血清白蛋白和0.01％吐温20，pH7.4的磷酸盐缓冲液，其中磷酸盐缓冲液主要成分含量为$KH_2PO_4$0.2％，$Na_2HPO_4$3％，NaCl 8％，KCl 0.2％。

[0023]　所述样品稀释液为含有30％甲醇、1％～5％牛血清白蛋白和0.05％吐温20，pH7.4的磷酸盐缓冲液，其中磷酸盐缓冲液主要成分含量为$KH_2PO_4$0.2％，$Na_2HPO_4$3％，NaCl 8％，KCl 0.2％。

[0024]　所述底物显色液为含有3,3',5,5'－四甲基联苯胺(TMB)的单组份显色液。所述终止液为1～2mol/L硫酸溶液。

[0025]　本发明所述包被有苯并(a)芘抗原的酶标板的制备方法：

用包被液将苯并(a)芘抗原按需要稀释，向酶标板孔中加入抗原稀释液，放入4℃环境过夜孵育，清去包被液，洗涤，然后再每孔中加入封闭液，室温25℃孵育1小时，干燥后用铝箔袋真空密封保存。

[0026]　所述苯并(a)芘抗体具体制备方法陈述如下：

[0027]　(1)苯并(a)芘抗原的合成：将苯并(a)芘衍生物做为半抗原分别与牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)等载体蛋白通过活性脂法偶联，得到免疫原BAP-BSA和包被

原 BAP-OVA。

[0028] (2) 动物免疫 :采用 Balb/C 小鼠作为免疫动物,以免疫原 BAP-BSA 对小鼠进行免疫,可以得到血液里含有苯并 (a) 芘特异性抗体的小鼠脾脏。

[0029] (3) 细胞融合和克隆 :取免疫 Balb/C 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争酶联免疫法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆,得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0030] (4) 细胞冻存和复苏 :取处于生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏室取出冻存管,立即放入 37℃水浴中速溶,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0031] (5) 单克隆抗体的制备与纯化 :采用体内诱生法,将 Balb/C 周龄小鼠腹腔注射灭菌石蜡油,7 ～ 14 天后腹腔注射杂交瘤细胞,7 ～ 10 天后采集腹水,经亲和层析柱纯化后,小瓶分装,-20℃保存。

[0032] 苯并 (a) 芘多克隆抗体的制备 :采用新西兰大白兔作为免疫动物,以苯并 (a) 芘与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫,多次免疫后测定血清抗体效价,心脏采血,经亲和层析柱纯化后,得到多克隆抗体,小瓶分装,-20℃保存。

[0033] 本发明还提供了所述苯并苯并 (a) 芘芘酶联免疫检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤 :

1、将试剂盒从冷藏环境中取出,平衡至室温 ;

2、将标准品或(经过前处理的)待测样品加入已经包被有并苯并 (a) 芘抗原的酶标板孔内,随后加入抗体工作液和酶标二抗工作液,轻拍混匀,室温孵育 ;

3、用蒸馏水或超纯水进行洗涤 ;

4、在每孔中加入显色液,轻拍混匀,室温避光孵育 ;

5、在每孔中加入终止液,混合均匀,在 450nm 波长下酶标仪读取吸光值 ;

6、检测结果分析,以所获标准品吸光值的平均值计算相对吸光度值,以相对吸光度值为纵坐标,苯并 (a) 芘浓度的半对数值为横坐标绘制标准曲线,得出直线方程,用同样的方法计算样品溶液的相对吸光度值,根据方程式求出对应样品的苯并 (a) 芘浓度。所述相对吸光度值的计算式为 :

[0034] 相对吸光度值(%)= $(B/B_0)\times 100\%$

[0035] 其中,B 为标准溶液或样品溶液的平均吸光度值,B_0为 0 浓度标准溶液的平均吸光度值。所述检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算和分析。

[0036] 步骤 1 所述的置于室温平衡是指在室温(25 ～ 27℃)放置 30min 以上,使试剂盒的温度恢复至室温。

[0037] 步骤 2 所述前处理方法如下 :

[0038] 水样 :

[0039] 制备方法 1 :取 10ml 水样,用 0.1M HCL 或 0.1M NaOH 调整 pH 值到 6-8,将水样混匀后取 50μl 进行 ELlSA 检测 ;按照上述制备方法得到水中苯并 (a) 芘的最低检测限为 5μg/L。

[0040] 制备方法 2 :取 10ml 水样,加入等体积的二氯甲烷,混匀后静止 3min,上清用等体积的二氯甲烷再提取一次,弃去上层水相,合并两次的提取液,氮气吹干后,复溶于 500μl

样品稀释液中，每孔取出 50μl 进行 EL1SA 检测；浓缩倍数：20，按照上述制备方法得到水中苯并(a)芘的最低检测限为 0.5μg/L。

[0041]　土壤样品：取 100～200g 土壤混匀后，4 度冷藏保存；检测前将土壤混匀准确称取 5g 样品于 50ml 离心管中，加入 25ml 甲醇，涡旋振荡 3～5min，4000rpm 离心 5min，取 50μl 进行 EL1SA 检测。

[0042]　与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0043]　本发明提供的试剂盒采用间接竞争 ELS1A 检测方法，采用的抗体特异性高，亲合力强，提高了检测的灵敏度、准确度；利用包被抗原对酶标板进行包被，相比于抗体包被，本发明抗原包被的包被效果更好，保存时间更长，从而提高了试剂盒检测的精密度和稳定性。

[0044]　另外，无论针对水或是土壤样本，与传统的仪器分析法相比本发明提供的试剂盒无需复杂的前处理过程，经简单处理的样品可直接进行测定，在根据计算公式和样本的稀释倍数计算出样本中苯并(a)芘的含量。

[0045]　本发明试剂盒具有操作简单快速，稳定性高，高度准确灵敏，检测限低等优点，且对设备和操作人员要求低，成本低廉，非常适用于苯并(a)芘的含量的痕量分析与批量检测，适合大量样品的筛查，解决了目前苯并(a)芘检测对大型设备依赖的问题，具有重要的推广应用价值。

附体说明

[0046]　图 1 是苯并(a)芘标准曲线图

具体实施方式

[0047]　下面通过具体实施方案对本发明做进一步说明，但不意味着对本发明保护范围的限制。

[0048]　下述方案中所述方法，如无特殊说明，均为常规方法；所述试剂和材料，如无特殊说明，均可从商业渠道购买。

[0049]　实例 1：抗原制备

[0050]　苯并(a)芘抗原制备

[0051]　1、分别称取 0.01mmolBAP 衍生物，0.01mmol NHS，0.01mmol DCC，溶解于 4mlDMF 中，室温放置过夜，12000rpm，离心 15min，分离上清液。

[0052]　2、称取 0.2g BSA 溶于 10ml 0.05mol/L，pH9.6 的碳酸钠－碳酸氢钠缓冲液中。

[0053]　3、在 4℃条件下，将步骤 1 中制备的上清液缓慢加入 8ml 步骤 2 所述溶液中，继续搅拌 5h

[0054]　4、将步骤 3 中所得的反应混合物装入透析袋中，用蒸馏水透析 2d 后，用 pH7.4，0.01mol/L 磷酸氢二钠－磷酸二氢钠缓冲液继续透析，每天更换透析液。

[0055]　5、每天对上述透析液进行吸收光谱扫描，直到检测不到 BaP 的特征吸收峰为止

[0056]　6、离心分离步骤 5 中的透析液，上清液即为免疫原 BAP-BSA

[0057]　按照上述 1～6 步骤同样方法制备包被抗原 BAP-OVA

[0058]　实例 2：抗体制备

[0059]　苯并(a)芘单克隆抗体制备

[0060]　动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以实例 1 中制备的苯并(a)芘抗

原为免疫原，免疫剂量为60μg/只，之后每隔两周进行一次加强免疫，免疫量为30μg蛋白/只小鼠。第四次加强免疫后，ELISA法检测效价，选择效价较高的两只小鼠，免疫剂量为50μg蛋白/只小鼠，腹腔冲击免疫一次，免疫后一周，取小鼠脾细胞。

[0061] 细胞融合和克隆化：取免疫小鼠Balb/c脾细胞与SP2/0细胞，采用PEG法进行融合，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。对已筛选的阳性细胞株进行亚克隆后再次筛选，直到阳性率为100%，最终得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0062] 细胞冻存和复苏：取处于生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液，分装于冻存管，在液氮中长期保存。复苏室取出冻存管，立即放入37℃水浴中速溶，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

[0063] 单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将Balb/C周龄小鼠腹腔注射灭菌石蜡油，7～14天后腹腔注射杂交瘤细胞，7～10天后采集腹水，经亲和层析柱纯化后，小瓶分装，-20℃保存。

[0064] 实例3：酶联免疫试剂盒组分的配制

[0065] (1)酶标板的包被：抗原用pH9.6，0.05mol/L的碳酸盐缓冲液稀释成0.5～1ug/ml，其中碳酸盐缓冲液含0.1～0.2%碳酸钠和0.2%～0.3%碳酸氢钠，在酶标板的每孔中加入100μl，4℃包被过夜或37℃包被2h，倾去包被液用超纯水洗涤3次，拍干然后在每孔中加入100μl封闭液，放入37℃温箱中2h后用超纯水洗涤3次，干燥后封入铝箔袋中，4℃保存。

[0066] (2)封闭液：含有2% BSA的pH7.4的磷酸盐缓冲液，其中磷酸盐缓冲液主要成分含量为$KH_2PO_4$0.2%，$Na_2HPO_4$3%，NaCl 8%，KCl 0.2%。

[0067] (3)苯并(a)芘标准品溶液：准确称取苯并(a)芘标样10mg，溶于10ml甲醇中，再超纯水稀释到10μg/ml后分装4℃保存。使用时，用超纯水将标准品溶液逐级稀释成浓度为0.5μg/ml、0.1μg/ml、0.02μg/ml、0.004μg/ml的一系列苯并(a)芘标准品溶液。

[0068] (4)样品稀释液：为含有30%甲醇、1%～5%牛血清白蛋白和0.05%吐温20，pH7.4的磷酸盐缓冲液，其中磷酸盐缓冲液主要成分含量为$KH_2PO_4$0.2%，$Na_2HPO_4$3%，NaCl 8%，KCl 0.2%。

[0069] (5)抗体稀释液：为含有1%牛血清白蛋白和0.01%吐温20，pH7.4的磷酸盐缓冲液，其中磷酸盐缓冲液主要成分含量为$KH_2PO_4$0.2%，$Na_2HPO_4$3%，NaCl 8%，KCl 0.2%。

[0070] (6)苯并(a)芘抗体工作液：苯并(a)芘单克隆抗体为实验室前期制得，见实例2：抗体制备；在用上述稀释液稀释到工作浓度后分装。

[0071] (7)酶标二抗：为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗或样抗兔二抗，商业化试剂。

[0072] (8)显色液：含有3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的商业化单组份显色液。

[0073] (9)终止液：为1～2mol/L硫酸溶液。

[0074] (10)试剂分装：各种试剂按要求配制，测定合格后无菌分装。抗体稀释液、显色液、苯并(a)芘抗体工作液均为12ml/瓶；样品稀释液、终止液均为10ml/瓶；苯并(a)芘标准溶液1ml/瓶；酶标二抗为150ul/管。分装后贴标签注明批号和有效期，4℃保存。

[0075] (11)试剂盒组装：分别将可拆卸包被好抗原的微孔板1块，苯并(a)芘抗体工作液，酶标二抗，样品稀释液，苯并(a)芘标准溶液，抗体稀释液，显色液和终止液各一瓶/管，使用说明书一份，至试剂盒内指定位置，试剂盒检验合格后封装，4℃保存。

[0076] 实例 4 :组建检测苯并 (a) 芘的酶联免疫试剂盒,包含下述组分 :

[0077] (1) 包被苯并 (a) 芘抗原的 96 孔酶标板,12×8/ 块,1 块

[0078] (2) 苯并 (a) 芘抗体工作液,12ml/ 瓶,1 瓶

[0079] (3) 酶标记二抗,150μl/ 管,1 管

[0080] (4) 苯并 (a) 芘标准品溶液,浓度为 0ppb、4ppb、20ppb、100ppb、500ppb,1ml/ 瓶,1 瓶

[0081] (5) 样品稀释液,10ml/ 瓶,1 瓶

[0082] (7) 抗体稀释液,12ml/ 瓶,1 瓶

[0083] (8) 显色液,12ml/ 瓶,1 瓶

[0084] (9) 终止液,10ml/ 瓶,1 瓶

[0085] (12) 使用说明书,1 份

[0086] (14) 自封袋 (含干燥剂),1 个

[0087] 实例 5 :待测样品前处理

[0088] 1、水样 :

制备方法 1 :取 10ml 水样,用 0.1M HCL 或 0.1M NaOH 调整 pH 值到 6-8,将水样混匀后取 50μl 进行 ELlSA 检测 ;按照上述制备方法得到水中苯并 (a) 芘的最低检测限为 5μg/L。

制备方法 2 :取 10ml 水样,加入等体积的二氯甲烷,混匀后静止 3min,上清用等体积的二氯甲烷再提取一次,弃去上层水相,合并两次的提取液,氮气吹干后,复溶于 500μl 样品稀释液中,每孔取出 50μl 进行 ELlSA 检测 ;浓缩倍数 :20,按照上述制备方法得到水中苯并 (a) 芘的最低检测限为 0.5μg/L。

[0089] 2、土壤样品 :取 100 ~ 200g 土壤混匀后,4 度冷藏保存 ;检测前将土壤混匀准确称取 5g 样品于 50ml 离心管中,加入 25ml 甲醇,涡旋振荡 3 ~ 5min,4000rpm 离心 5min,取 50μl 进行 ELlSA 检测。

[0090] 实例 6 :使用试剂盒进行检测的方法

[0091] 1、将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温 (25 ~ 27℃) 平衡 30min 以上,将足够标准品和样品所用数量的板条固定在板框上,标准品和样品及质控做两个平行实验,按顺序编号。

[0092] 2、酶标二抗工作液制备 :1 体积二抗同 99 体积抗体稀释液混合 (100 倍稀释)

[0093] 3、加入 50μl 的标准品于所设定的孔中 ;

[0094] 4、加入 50μl 的样品于所设定的孔中

[0095] 5、在每孔中加入 100μl 一抗工作液,100μl 的二抗工作液,轻敲微孔板边缘混匀 1 分钟 ;

室温 (25±2)℃避光孵育 30 分钟 ;

[0096] 6、洗板 2 次,每次应该加入 300ul 蒸馏水或去离子水,最后一次使板尽量甩干并在吸水纸上吸干 ;

[0097] 7、加入 100μl 的显色液 ;计时,混匀一分钟 ;

[0098] 8、在室温 (25±2)℃避光孵育 15min,加入 50μl 的终止液终止反应,

[0099] 9、在 450nm 和 630nm 双波长下读 OD 值 (读数前,用无绒布擦拭除去微孔底部的水

分和指痕）

[0100] 10、检测结果计算与分析：

[0101] 以所获标准溶液吸光度值的平均值计算相对吸光度值，以相对吸光度值为纵坐标，苯并（a）芘标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线，求出直线方程。用同样的方法计算样品溶液的相对吸光度值，根据方程式求出对应每一样品孔中的苯并（a）芘浓度，再乘以相应稀释倍数，既得样品中苯并（a）芘的实际浓度。

[0102] 所述相对吸光度值（%）＝（B/B_0）×100

[0103] 其中，B为标准溶液或样品的平均吸光度值，B_0为0μg/L标准溶液的平均吸光度值。

[0104] 实例7 试剂盒标准曲线测定

[0105] 利用苯并（a）芘标准溶液进行反应，根据实验结果绘制标准曲线，见附图1，直线方程为y＝-0.383x+0.0806，相对吸光度值（%）与苯并（a）芘浓度的对数值在浓度0.004～0.5mg/L范围内呈显著的线性关系，相关系数为R^2＝0.9916，试剂盒的灵敏度为0.005mg/L，对未经浓缩水样的最低检测限为5μg/L。

[0106] 实例8 试剂盒精密度和准确度试验

准确度是指测得值与真值的符合程度，在ELISA测定中，准确度以添加回收率表示，精密度以变异系数（CV）表示。在不含苯并（a）芘的自来水样本中添加终浓度为5μg/L、10μg/L、20μg/L的苯并（a）芘标准溶液，每个批次每种添加浓度做8个平行，计算添加回收率平均值和CV值。

自来水样本添加回收率测定结果见表1

表1、自来水添加回收率测定结果

样品	添加水平(μg/L)	平均回收率(n=8，%)	批内变异系数(n=8，%)
自来水	5	70.0	5.7
	10	106.1	3.5
	20	82.2	8.6

结果表明，以上3个添加水平的平均回收率范围为70.0%～106.1%，批内变异系数为3.5%～8.6%。

[0107] 水样检测与标准方法的比对

该试剂盒方法与GB/T 5750.8-2006（生活饮用水标准检验方法有机物指标）进行比较，对添加已知浓度的样品进行分析。在不含苯并（a）芘的自来水样本中添加终浓度为5μg/L、10μg/L、20μg/L的苯并（a）芘标准溶液。

试剂盒与标准方法比较结果见表2。

表 2、试剂盒与标准方法比较结果			
添加标准量（μg/L）	采用方法	平均检测结果（μg/L）(n=8)	平均回收率（%）
5	试剂盒	3.50	70.0
	标准方法	4.43	88.0
10	试剂盒	10.61	106.1
	标准方法	9.22	92.2
20	试剂盒	16.4	82.2
	标准方法	18.78	93.9

[0108] 土壤检测与标准方法的比对

该试剂盒方法与 EPA 8270D 气相色谱-质谱联用仪测定半挥发性有机化合物 (GC/MS) 进行比较，对实际污染土壤样本进行分析，分别选择两家不同检测机构的实验室进行仪器分析 (GC/MS) 方法检测。结果见表 3。

表 3、试剂盒与标准方法比较结果			
样品编号	实验室 1（GC/MS）	实验室 2（GC/MS）	试剂盒 (ELISA)
1	<0.1 mg/kg	<0.1 mg/kg	0.027 mg/kg
2	0.19 mg/kg	0.11 mg/kg	0.214 mg/kg
3	1.53 mg/kg	2.35 mg/kg	2.07 mg/kg
4	1.77 mg/kg	3.66 mg/kg	2.46 mg/kg

[0109] 自来水和土壤样本的试剂盒检测结果与国家标准方法和 EPA 标准方法检测结果基本一致。

[0110] 综上所述，本发明酶联免疫检测试剂盒具有非常好的精密度和准确度，且符合国家对试剂盒各类指标的质量要求。

[0111] 实例 9 试剂盒保存期试验

1、将试剂盒放置于 2 ～ 8℃，分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月后的试剂盒，对苯并 (a) 芘标准品 (0.005mg/L) 的吸光度值，50％抑制浓度，添加回收率，批内变异系数等各参数进行测定。

2、将试剂盒在 37℃保存的条件下放置 12 天，每天对苯并 (a) 芘标准样品 (0.005mg/L) 的吸光度值，50％抑制浓度、添加回收率、批内变异系数进行测定。

3、将试剂盒在 -20℃冰箱保存 12 天，每天对苯并 (a) 芘标准样品 (0.005mg/L) 的吸光度值，50％抑制浓度、添加回收率、批内变异系数进行测定。

4、结果表明，经过三种条件保存试验，苯并 (a) 芘标准品 (0.005mg/L) 的吸光度值下降

小于5%，50%抑制率在0.05～0.2mg/L之间，添加回收率在70～110%之间，批内变异系数小于10%，各项指标符合质量要求，因此，本发明试剂盒可以在2～8℃保存12月。

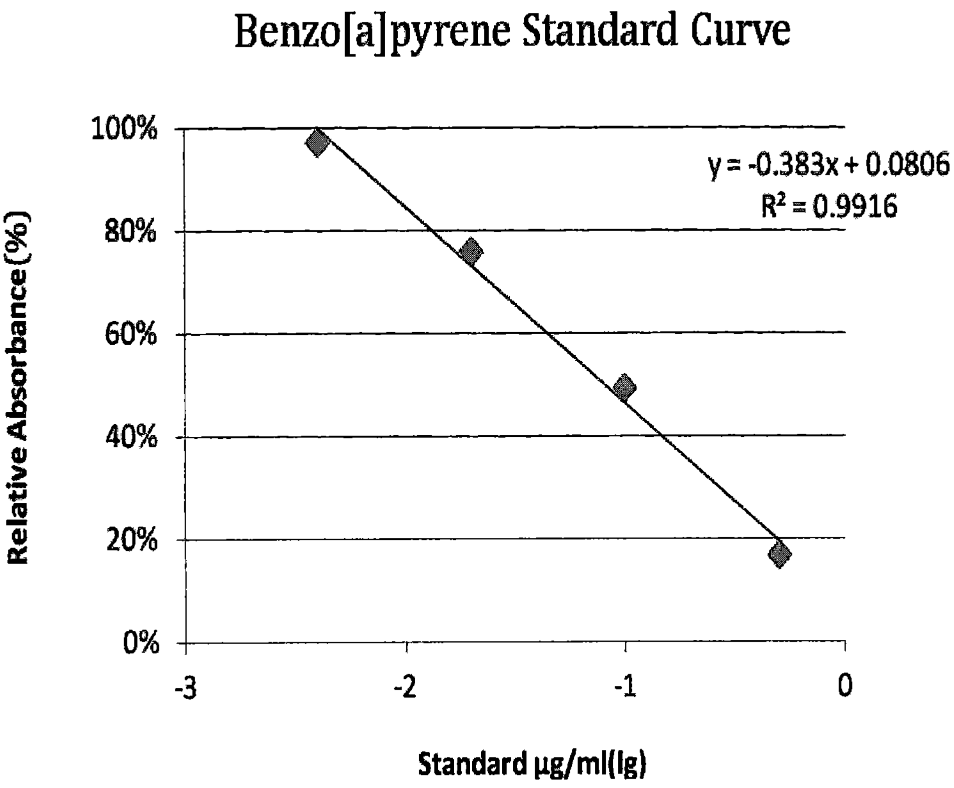
Benzo[a]pyrene Standard Curve
y = -0.383x + 0.0806
R² = 0.9916
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Relative Absorbance(%)
-3
-2
-1
0
Standard μg/ml(lg)

图 1

patsnap

专利名称(译)	一种苯并(a)芘酶联免疫检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN105738611A	公开(公告)日	2016-07-06
申请号	CN201510814308.4	申请日	2015-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	轻工业环境保护研究所		
申请(专利权)人(译)	轻工业环境保护研究所		
当前申请(专利权)人(译)	轻工业环境保护研究所		
[标]发明人	许丽 张雪春 赵鲁 程言君		
发明人	许丽 张雪春 赵鲁 程言君		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/53 G01N21/3103		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测苯并(a)芘残留的酶联免疫试剂盒，包括：包被有苯并(a)芘抗原的酶标板(96孔)、苯并(a)芘特异性抗体、酶标二抗、苯并(a)芘标准品溶液、样品稀释液、抗体稀释液、显色液、终止液。本发明还公开了使用所述试剂盒检测水和土壤样品中苯并(a)芘的方法，包括样品的前处理，利用试剂盒进行检测，结果的处理与分析。本发明提供的检测苯并(a)芘的试剂盒采用间接竞争酶联免疫吸附分析技术，灵敏度高，稳定性好，成本低，非常适合大量样品的筛查，具有重要的推广应用价值。

表 1、自来水添加回收率测定结果

样品	添加水平(μg/L)	平均回收率(n=8，%)	批内变异系数(n=8，%)
自来水	5	70.0	5.7
	10	106.1	3.5
	20	82.2	8.6