



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105319352 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201410349858. 9

(22) 申请日 2014. 07. 23

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科
技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 薛永来 邢海龙

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

检测塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种检测塑化剂的化学发光免
疫检测试剂盒，属于免疫学检测领域。本发明的试
剂盒由包被有塑化剂-载体蛋白偶联物的不透明
白色酶标板、塑化剂标准品、塑化剂-过氧化物酶
标记抗体工作液、发光底物液、浓缩样品稀释液、
浓缩洗涤液组成。所述塑化剂-载体蛋白偶联物
是将塑化剂与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚
胺法偶联得到，浓缩洗涤液含有 0.05% 吐温-20。
与传统的酶联免疫吸附分析法比较，本发明的试
剂盒具有更高的灵敏度，且检测时间短、费用低，
可用于白酒等样品中塑化剂的残留量检测。

1. 一种检测塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于试剂盒中的以下成份 :

(1) 包被有塑化剂 - 载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板 ; 所述塑化剂 - 载体蛋白偶联物是将塑化剂与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到, 所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白 ;

(2) 塑化剂标准品 ;

(3) 塑化剂 - 过氧化物酶标记抗体 : 该成分为用过氧化物酶标记的塑化剂抗体, 所述塑化剂抗体为单克隆抗体 ;

(4) 发光底物液 : 该发光底物液是以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液, 分为 A 液和 B 液保存, 在使用前按 1:1 混合使用 ; 其中 A 液为发光增强剂加鲁米诺货发光增强剂加异鲁米诺, B 液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液 ;

(5) 2 倍浓缩稀释液 ;

(6) 20 倍浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求 1 的塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒, 其中, 所述不透明白色酶标板为 96 孔的可拆卸或不可拆卸的不透明白色酶标板。

3. 根据权利要求 1 的塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒, 其中, 所述塑化剂标准品的浓度为 0.02~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度区间。

4. 根据权利要求 1 的塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒, 其中, 所述塑化剂 - 过氧化物酶标记抗体工作液是用抗体稀释液稀释成 1:40000 比例。

5. 根据权利要求 1 的塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒, 其中, 所述发光底物液为商品化的任一种以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液。

6. 根据权利要求 1 的塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒, 其中, 所述 2 倍浓缩稀释液, 其成分为 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸缓冲液、甘氨酸 -HCl 缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液, 使用前请按 1:1 稀释 (1 份浓缩样品稀释液 +1 份去离子水)。

7. 根据权利要求 1 的塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒, 其中, 所述 20 倍浓缩洗涤液, 其包含 0.05% 吐温 -20, 0.01mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0~7.5 之间, 使用前请按 1:19 稀释 (1 份浓缩稀释液 +19 份去离子水)。

检测塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒,用于检测白酒中的塑化剂含量或残留量。属于免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 塑化剂是一种增加材料的柔软性或是材料液化的添加剂。邻苯二甲酸酯类塑化剂被归为疑似环境荷尔蒙,其生物毒性主要属雌激素与抗雄激素活性,会造成内分泌失调损害生物体生殖机能,包括升值率降低、流产、天生缺陷、异常的精子数、睾丸损害,还会引发恶性肿瘤、造成畸形婴儿。

[0003] 邻苯二甲酸酯类塑化剂是一种有毒的化工业用塑料软化剂,属无色、无味液体,添加后可让微粒分子更均匀散布,因此能增加延展性、弹性及柔软度,常作为沙发、汽车座椅、橡胶管、化妆品及玩具的原料,属于工业添加剂。

[0004] 本发明通过特有的免疫动物制备具有高亲和力、高特异性的塑化剂抗体,并采用酶标记抗体,建立一种可以检测塑化剂的化学发光免疫试剂盒,将为白酒产品中塑化剂药物留检测提供新方法,对保证白酒产品安全提供重要的理论和实践依据,维护白酒业健康发展具有重要意义。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的问题,本发明主要是利用抗原与抗体的特异性免疫反应的基本原理来实现的。化学发光免疫分析是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的高特异性。在整个反应过程中,样品中塑化剂含量越高,反应体系中发光强度越弱;反之,样品中塑化剂含量越少,发光强度越高。

[0006] 本发明是一种检测塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于含有以下成份:

1、包被有塑化剂-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板;所述塑化剂-载体蛋白偶联物是将塑化剂与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白;

2、塑化剂标准品;

3、塑化剂-过氧化物酶标记抗体:该成分为用过氧化物酶标记的塑化剂抗体,所述塑化剂抗体为单克隆抗体或多克隆抗体;

4、发光底物液:该发光底物液是以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液,分为A液和B液保存,在使用前按1:1混合使用;其中A液位发光增强剂加鲁米诺货发光增强剂加异鲁米诺,B液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液;

5、2倍浓缩稀释液;

6、20倍浓缩洗涤液。

[0007] 本发明中,所述的不透明白色酶标板为96孔的可拆卸或不可拆卸的不透明白色

酶标板。

[0008] 本发明中,所述的塑化剂标准品,由一系列不同浓度的塑化剂标准品组成,浓度为0.02~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度区间。

[0009] 本发明中,所述的塑化剂-过氧化物酶标记抗体为用过氧化物酶标记的塑化剂抗体,如辣根过氧化物酶(HRP)标记的塑化剂抗体。

[0010] 本发明中,所述的发光底物液为商品化的任一种以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液。

[0011] 本发明中,所述所述2倍浓缩稀释液,其成分为0.01mol/L, pH7.4的磷酸缓冲液、甘氨酸-HCl缓冲液或Tris-HCl缓冲液,使用前请按1:1稀释(1份浓缩样品稀释液+1份去离子水)。

[0012] 本发明中,所述20倍浓缩洗涤液,其包含0.05%吐温-20,0.01mol/L的PBST, pH值范围7.0~7.5之间,使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)。

[0013] 本发明的塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒应用于塑化剂的检测时,检测步骤为:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,氮气吹干并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25°C)平衡30 min以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被塑化剂抗原的酶标板,加标准品/待测样品50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 到对应的微孔中,标准品和样品每个浓度做两个平行实验;

(4) 加入塑化剂抗体工作液,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25°C避光环境中反应45 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 $\mu\text{L}/\text{孔}$,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);

(6) 加入发光底物液混合液(A液与B液在使用前按1:1混合)100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,轻轻振荡混匀,混合好后在化学发光检测仪内检测发光强度(RLU);

(7) 检测结果的计算:用所获得的标准溶液和试样溶液发光值与空白溶液的比值进行计算。见下式:

$$\text{相对发光强度} = \text{RLU}/\text{RLU}_{\text{max}}$$

式中:

RLU=标准(或样品)溶液的发光强度值;

RLU_{max}=空白(浓度为0的标准溶液)的发光强度值;

将计算的相对发光强度值对应塑化剂($\mu\text{g}/\text{L}$)的自然对数作半对数坐标系统曲线图。各待测样品的塑化剂浓度根据其RLU值在标准曲线上查出,或通过标准曲线相应的方程计算得出。如样品处理中有稀释,应根据标准曲线所得出的样品浓度要再乘以其稀释倍数。即为样本中塑化剂的实际浓度。

[0014] 本发明的试剂盒可用于白酒等样品中塑化剂的残留量检测。与现有的其它检测塑化剂残留量的实验方法比较,本发明的试剂盒有以下优点:

(1) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,比色谱方法(高效液相、液质联用、气质联

用)、毛细管电泳方法更为快速简便,所需仪器更为简单,检测成本更为低廉,同时具有高通量的特点;

(2) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,比 ELISA 方法更为灵敏,可以检测出更低浓度和含量的塑化剂残留,同时线性范围更宽;

(3) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,减少了二抗的使用环节,从而缩短了检测时间;不透明白色酶标板增加了化学发光检测仪灵敏度。另外,用塑化剂-载体蛋白偶联物而非塑化剂抗体来包被不透明白色酶标板,减少了塑化剂抗体的不稳定性,保证了试剂盒的长期有效性。

具体实施方式

[0015] 以下通过具体的实施例对本发明作进一步描述。这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0016] 实施例

1、试剂盒各组分的制备

(1) 塑化剂半抗原的制备:将塑化剂酸化,在 4℃ 无光低温环境中与亚硝酸钠作用,生成含重氮基正离子的中间体。重氮化的塑化剂作为半抗原,用于后面合成免疫抗原与包被抗原;

(2) 塑化剂-牛血清白蛋白 (BSA) 免疫原的制备:将塑化剂与牛血清白蛋白 (BSA) 采用重氮化法进行偶联得到免疫抗原;

塑化剂-卵血清白蛋白 (OVA) 包被抗原的制备:将塑化剂与卵血清白蛋白 (OVA) 采用重氮化法进行偶联得到包被抗原;

塑化剂-过氧化物酶标记抗体的制备:对 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠(体重 18~20 g),大剂量免疫方案为,首次免疫用 160 μ g 塑化剂-BSA 与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。3 周后,再用 80 μ g 塑化剂-BSA 与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。此后每隔 3 周用 80 μ g 塑化剂-BSA 与等量弗氏完全佐剂混匀,腹腔注射。最后一次脾内免疫 80 μ g 塑化剂-BSA 作为加强免疫。三天后处死小鼠,取其脾脏,与骨髓瘤细胞融合。用间接 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞。通过小鼠腹腔注射杂交瘤细胞来大量制备小鼠腹水,腹水经过过滤、离心初步纯化后,采用辛酸法和亲和层析法纯化腹水,再经透析得到纯化的塑化剂单克隆抗体。塑化剂单克隆抗体与辣根过氧化物酶偶联,从而得到塑化剂-过氧化物酶标记抗体;

包被有塑化剂-OVA 偶联物的不透明白色酶标板制备:用缓冲液将塑化剂-OVA 偶联物稀释后用于包被不透明白色酶标板的检测孔,4℃ 过夜后用 PBST 缓冲液洗涤,然后加入 180 μ L 封闭液(5% 脱脂奶粉溶液),37℃ 温育 1.5 h,倾去孔内液体,吸水纸拍干后密封保存。

[0017] 2、检测塑化剂的化学发光检测试剂盒的组建

组建的检测塑化剂的化学发光检测试剂盒,包含了以下组成部分:

(1) 96 孔不透明白色酶标板(8 孔 \times 12 条)包被有塑化剂-OVA 偶联物,用铝箔袋真空密封包装;

(2) 塑化剂标准溶液 6 瓶,浓度分别为:

0 μ g/mL、0.02 μ g/mL、0.08 μ g/mL、0.5 μ g/mL、5 μ g/mL、50 μ g/mL

(3) 塑化剂-辣根过氧化物酶标记抗体溶液;

(4) 发光底物 A 液(鲁米诺及增强剂), 发光底物 B 液(尿素过氧化氢)；

(5) 2 倍浓缩样品稀释液。使用前请按 1:1 稀释(1 份浓缩稀释液 +1 份去离子水)成为工作样品稀释液, 其稀释后的工作样品稀释液为 0.05 mol/L, pH 7.4 的 PBST 缓冲液；

(6) 20 倍浓缩洗涤液。使用前请按 1:19 稀释(1 份浓缩稀释液 +19 份去离子水)成为工作洗涤液, 其稀释后的工作洗涤液为 pH 值范围 7.0-7.5 之间, 含 0.05% 吐温-20, 0.01mol/L 的 PBST 缓冲液。

[0018] 3、塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒的使用

取 5 mL 样品于干净的玻璃试管中, 加入 2 mL 色谱纯的正己烷, 盖上盖后振荡 3 min, 然后静置, 待分层后取上层清液 1 mL, 于干净的玻璃器皿室温氮气吹干, 吹干后用 1mL 35% 的甲醇复溶后待测。

[0019] 配制 35% 的甲醇溶液 :取 35 mL 甲醇加入 65ml 去离子水中混匀

2) 塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒操作步骤

将标准和试样所需数量的孔条插入微孔板框架中, 记录标准和样品的位置。于适当微孔中分别加入 50 μ L/孔塑化剂标准溶液和待测样品。加入 50 μ L/孔塑化剂 - 辣根过氧化物酶标记抗体到每一个微孔中, 充分混合后于室温下避光静置温育 45 min。将孔内液体甩干, 用洗涤工作液充分洗涤 4~5 次。完全除去孔中的液体, 用吸水纸拍干, 加入发光底物液混合液 (A 液与 B 液在使用前按 1:1 混合) 100 μ L/孔。混合好后立即在化学发光检测仪内检测发光强度 (RLU)。

[0020] 3) 检测结果的计算分析

用所获得的标准溶液和试样溶液发光值与空白溶液的比值进行计算。见下式：

相对发光强度 = RLU/RLU_{max}

式中：

RLU = 标准(或样品)溶液的发光强度值；

RLU_{max} = 空白(浓度为 0 的标准溶液)的发光强度值。

[0021] 将计算的相对发光强度值对应塑化剂 (μ g/L) 的自然对数作半对数坐标系统曲线图。各待测样品的塑化剂浓度根据其 RLU 值在标准曲线上查出, 或通过标准曲线相应的方程计算得出。如样品经过了预先稀释, 应根据标准曲线所得出的样品浓度要再乘以其稀释倍数。

专利名称(译)	检测塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105319352A	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201410349858.9	申请日	2014-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 薛永来 邢海龙		
发明人	洪霞 薛永来 邢海龙		
IPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供了一种检测塑化剂的化学发光免疫检测试剂盒，属于免疫学检测领域。本发明的试剂盒由包被有塑化剂-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板、塑化剂标准品、塑化剂-过氧化物酶标记抗体工作液、发光底物液、浓缩样品稀释液、浓缩洗涤液组成。所述塑化剂-载体蛋白偶联物是将塑化剂与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到，浓缩洗涤液含有0.05%吐温-20。与传统的酶联免疫吸附分析法比较，本发明的试剂盒具有更高的灵敏度，且检测时间短、费用低，可用于白酒等样品中塑化剂的残留量检测。