



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108709992 A

(43)申请公布日 2018.10.26

(21)申请号 201810540617.0

(22)申请日 2018.05.30

(71)申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

申请人 北京勤邦生物技术有限公司

(72)发明人 陈黎 刘惠民 鲁亚辉 李旭

赵乐 崔华鹏 樊美娟 王晓瑜

贾芳芳 余晶晶

(74)专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司

41110

代理人 姜振东

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

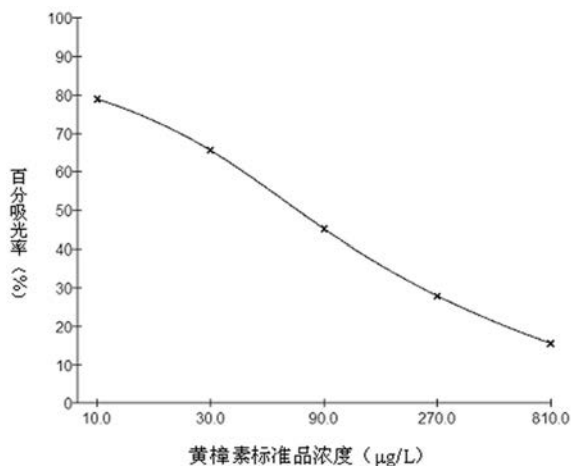
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

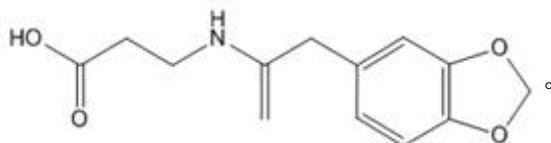
一种检测黄樟素的酶联免疫试剂盒及其应用

(57)摘要

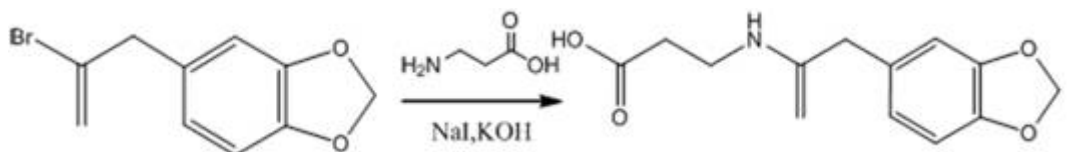
本发明公开了一种检测黄樟素的酶联免疫试剂盒,包括:包被有包被原的酶标板、黄樟素标准品溶液、黄樟素特异性抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;包被原为黄樟素偶联抗原,酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体,黄樟素特异性抗体是以黄樟素偶联抗原作为免疫原制备获得;所述黄樟素偶联抗原是由黄樟素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述黄樟素半抗原是由5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环与氨基丙酸反应得到。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测黄樟素的方法。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测样品中黄樟素的含量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。



1. 一种检测黄樟素的酶联免疫试剂盒,包括:包被有包被原的酶标板、黄樟素标准品溶液、黄樟素特异性抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,其特征在于:所述包被原为黄樟素偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体,所述黄樟素特异性抗体是以黄樟素偶联抗原作为免疫原制备获得;所述黄樟素偶联抗原是由黄樟素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述黄樟素半抗原是由5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环与氨基丙酸反应得到,其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述黄樟素半抗原的制备反应过程如下:



3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述黄樟素特异性抗体为黄樟素单克隆抗体或黄樟素多克隆抗体,其中优选黄樟素单克隆抗体。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标二抗的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶。

6. 如权利要求1或5所述的试剂盒,其特征在于:当所述标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物显色液A液和底物显色液B液组成,底物显色液A液为过氧化氢或过氧化脲,底物显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1~2 mol/L的硫酸或盐酸溶液;当所述标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1~2 mol/L氢氧化钠溶液。

7. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液。

8. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述复溶液优选为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

9. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述黄樟素标准品溶液的浓度分别为0 μg/L,10 μg/L,30 μg/L,90 μg/L,270 μg/L,810 μg/L。

10. 一种应用权利要求1-9任一项所述的酶联免疫试剂盒检测黄樟素的方法,其特征在于:包括以下步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用所述试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

一种检测黄樟素的酶联免疫试剂盒及其应用

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黄樟素的酶联免疫试剂盒,可定性、定量检测烟用香精香料、烟草及烟草制品中黄樟素的残留量。

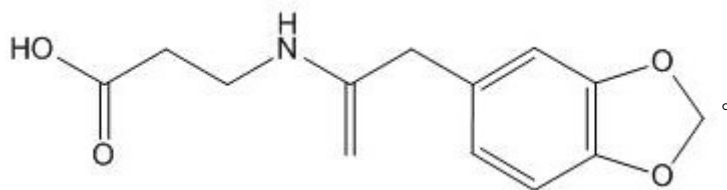
背景技术

[0002] 黄樟素又称黄樟油素、黄樟脑,无色或微黄色液体,不溶于水,易溶于氯仿、乙醚和其他非极性有机溶剂,有樟木气味,天然存在于肉桂、肉豆蔻、黑胡椒和紫苏等植物中,是许多食用天然精油如黄樟精油、八角精油和樟脑油的主要成分。由于其舒适的气味,黄樟油曾经在食品、洗涤用品和化妆品中作为调味剂和调香剂。黄樟素类化合物主要包括黄樟素、异黄樟素、二氢黄樟素等。黄樟素也是非法生产毒品摇头丸的一个重要组成部分。由于试验表明黄樟素对老鼠有致肝肿瘤的效果,因此,各国对黄樟素进行了限量规定。2001年,欧盟委员会规定黄樟素和异黄樟素的总使用限量,食品和饮料中为1 mg/kg,含酒精饮料为5 mg/kg。2005年,欧洲委员会将黄樟素列为怀疑弱致癌物质,虽然没有规定每日限量,但要求设置的尽可能低。我国于2005年实施的《易制毒化学品管理条例》将黄樟素列为第一类易制毒化学品。由于黄樟素类化合物的毒副作用,建立准确、快速、简便的黄樟素类化合物分析检测方法,对于评估食品、化妆品、烟草等安全性有着重要作用。目前,常用检测方法有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱联用法等。由于以上方法均需先进检测仪器、检测费用昂贵、步骤繁琐、耗时,且对操作人员专业性要求较高,不适用于基层企事业单位的大通量快速筛查检测。本发明应用酶联免疫法,测定烟用香精香料、烟草及烟草制品中黄樟素的残留量,具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低、非常容易推广等优点。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种能够检测烟用香精香料、烟草及烟草制品中黄樟素残留量的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

[0004] 本发明试剂盒,包括:包被有包被原的酶标板、黄樟素标准品溶液、黄樟素特异性抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;所述包被原为黄樟素偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体,所述黄樟素特异性抗体是以黄樟素偶联抗原作为免疫原制备获得;所述黄樟素偶联抗原是由黄樟素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述黄樟素半抗原是由5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环与氨基丙酸反应得到,其分子结构式为:



[0005] 所述黄樟素半抗原的制备具体包括以下步骤:

取5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环1.0 g,加无水二甲基亚砷(DMSO) 50 mL溶解,搅拌澄清,加氢氧化钾0.48 g,加无水碘化钠0.20 g,剧烈搅拌后,加氨基丙酸0.41 g,100℃反应4h。停止反应,加水50 mL,加1mol/L盐酸调节pH值到6,加乙酸乙酯80 mL,萃取三次,合并有机相,旋蒸蒸干,上硅胶柱,用体积比为1:5的乙酸乙酯/石油醚洗脱分离,得到半抗原产物丙酸黄樟素0.91g。

[0006] 所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

[0007] 所述黄樟素特异性抗体为黄樟素单克隆抗体或黄樟素多克隆抗体,其中优选黄樟素单克隆抗体。

[0008] 所述酶标二抗的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶;酶标二抗是由标记酶和抗抗体偶联得到的。

[0009] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括黄樟素标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

[0010] 所述黄樟素标准品溶液6瓶,浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$,10 $\mu\text{g/L}$,30 $\mu\text{g/L}$,90 $\mu\text{g/L}$,270 $\mu\text{g/L}$,810 $\mu\text{g/L}$ 。

[0011] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物显色液A液和底物显色液B液组成,底物显色液A液为过氧化氢或过氧化脲,底物显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1~2 mol/L的硫酸或盐酸溶液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1~2 mol/L氢氧化钠溶液。

[0012] 所述洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液。所述百分比为重量体积百分比,单位g/L。

[0013] 所述复溶液优选为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0014] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被原稀释成20 $\mu\text{g/mL}$,每孔加入100 μL ,25℃避光孵育2h或4℃过夜,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30 s,拍干,然后在每孔中加入150~200 μL 封闭液,25℃避光孵育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0015] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液优选为pH值为9.6,0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭液优选为pH值为7.1~7.5,含有1%~3%酪蛋白、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液。所述百分比为重量体积百分比,单位g/L。

[0016] 本发明的检测原理为:

在微孔条上预包被黄樟素偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入黄樟素特异性抗体溶液,样本中的黄樟素与酶标板上包被的黄樟素偶联抗原竞争黄樟素特异性抗体,加入酶标二抗进行放大作用,用底物显色液显色,样本吸光度值与黄樟素的残留量呈负相关,与标准曲线比较即可得到样本中黄樟素的残留量;同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的标准品溶液颜色的比较可粗略判断样本中黄樟素残留量的浓度范围。。

[0017] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测黄樟素的方法,它包括步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用试剂盒进行检测;

(3) 分析检测结果。

[0018] 本发明检测黄樟素的酶联免疫试剂盒主要采用ELISA方法定性或定量检测样品中黄樟素的含量；对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批量样品；主要试剂以工作液的形式提供，检验方法方便易行，检测速度快、检测成本低，非常容易推广。本发明的半抗原具有适当末端活性基团，修饰位点及间隔臂长度选择合适，且能最大程度模拟黄樟素的分子结构，以此半抗原为基础开发的试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒，结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

[0019] 图1：黄樟素半抗原合成路线图，

图2：试剂盒标准曲线图（该图为摘要附图）。

具体实施方式

[0020] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解，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。

[0021] 实施例1 检测黄樟素的酶联免疫试剂盒各组分的制备

1、黄樟素半抗原的制备

取5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环1.0 g，加无水DMSO 50 mL溶解，搅拌澄清，加KOH 0.48 g，加无水碘化钠0.2 g，剧烈搅拌后，加氨基丙酸0.41 g，100℃反应4h。停止反应，加水50 mL，加1mol/L盐酸调节pH值到6，加乙酸乙酯80 mL，萃取三次，合并有机相，旋蒸蒸干，上硅胶柱，乙酸乙酯/石油醚(v/v, 1/5)洗脱分离，得到丙酸黄樟素半抗原产物0.91g，收率87.37%。

[0022] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定，¹H-NMR(CDC1₃, 300MHz) δ: 11.0 (1H, -COOH), 6.90 (1H, ArH, J=6.864), 6.68 (1H, ArH), 6.76 (1H, ArH), 6.07 (2H, s, -CH₂-), 4.16 (2H, s, -CH₂-), 3.75 (1H, dd, =CH₂), 3.12 (2H, t, -CH₂-), 2.49 (2H, t, -CH₂-), 2.0 (1H, s, -NH-)。图谱中化学位移δ=11.0的为羧基氢的共振吸收峰，δ=3.12、2.49的为间隔臂上亚甲基氢的共振吸收峰，这些峰的存在，证明间隔臂偶联成功，黄樟素半抗原结构正确。

[0023] 2、抗原的制备

免疫原制备——黄樟素半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0024] 取丙酸黄樟素半抗原9 mg，加N,N-二甲基甲酰胺0.3 mL溶解，澄清，加碳化二亚胺(EDC)8.3 mg，搅拌20 min，加N-琥珀酰亚胺7 mg，继续搅拌30 min，得到半抗原活化液A液；取牛血清白蛋白50 mg，加0.8%氯化钠水溶液4 mL溶解，得到B液；将A液缓慢滴加到B液中，4℃搅拌4h，0.02 mol/L PB缓冲液透析纯化3天，得到黄樟素-BSA免疫原，分装，-20℃保存备用。

[0025] 包被原制备——黄樟素半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0026] 取丙酸黄樟素半抗原6 mg，加二甲基亚砷0.2 mL溶解，加三乙胺20 μL，加氯甲酸异丁酯18 μL，混匀，4℃反应30 min，得到半抗原活化液A液；取卵清蛋白(OVA)50 mg，加

0.8%氯化钠水溶液4 mL溶解,得到B液;将A液缓慢滴加到B液中,4℃搅拌4 h,0.02 mol/L PB缓冲液透析纯化3天,得到黄樟素-OVA包被原,分装,-20℃保存备用。

[0027] 3、黄樟素单克隆抗体的制备

(1) 单克隆抗体的制备

动物免疫:将上述步骤得到的免疫原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150 μg/只,使其产生抗血清。

[0028] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按8:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到分泌黄樟素单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0029] 细胞冻存和复苏:将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0030] 单克隆抗体的生产与纯化:将Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只,7天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,-20℃保存。

[0031] (2) 单克隆抗体效价的测定

用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1: (50000~100000)。

[0032] 间接竞争ELISA方法:用黄樟素半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入黄樟素标准品溶液、黄樟素单克隆抗体溶液和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体溶液,25℃反应30 min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃反应15 min后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长450 nm处测定每孔吸光度值。

[0033] (3) 单克隆抗体特异性的测定

抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。

[0034] 本实验将黄樟类似物做系列稀释,分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA,制作标准曲线,分析得到 IC_{50} ,然后按下式计算交叉反应率:

$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制的黄樟素浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他类似物浓度}} \times 100\%$
--

该抗体与黄樟素类似物的交叉反应率结果见表1。

[0035] 表1 交叉反应率试验

化合物	交叉反应率 (%)
黄樟素	100
异黄樟素	13.2
二氢黄樟素	6.7
香豆素	<1
香兰素	<1
突厥烯酮	<1

从表1可以看出,黄樟素单克隆抗体与异黄樟素、二氢黄樟素、香豆素、香兰素、突厥烯

酮均无交叉反应。

[0036] 4、酶标二抗的制备

以山羊作为免疫动物,以黄樟素单克隆抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。将羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行偶联得到酶标二抗。

[0037] 5、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成20 $\mu\text{g/mL}$,每孔加入100 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30 s,拍干,然后在每孔中加入200 μL 封闭液,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0038] 实施例2 检测黄樟素的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测黄樟素的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- (1) 包被黄樟素偶联抗原的酶标板;
- (2) 黄樟素标准品溶液6瓶,浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$,10 $\mu\text{g/L}$,30 $\mu\text{g/L}$,90 $\mu\text{g/L}$,270 $\mu\text{g/L}$,810 $\mu\text{g/L}$;
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (4) 底物显色液由底物显色液A液和底物显色液B液组成,A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺;
- (5) 终止液为2 mol/L硫酸;
- (6) 洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液;
- (7) 复溶液为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0039] 实施例3 烟草中黄樟素的检测

1、样品前处理

称取 1.0 ± 0.05 g粉碎的烟草样本至50 mL聚苯乙烯离心管中,加入5 mL甲醇,用涡旋仪涡动3 min,混匀;3000 rpm离心5 min;取100 μL 上层澄清液,加入150 μL 复溶液,用涡旋仪涡动30 s,充分混匀;取50 μL 用于分析。

[0040] 2、用试剂盒检测

向包被黄樟素偶联抗原的酶标板微孔中加入黄樟素标准品溶液或经前处理的样本溶液50 μL /孔,然后加入黄樟素特异性抗体工作液50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤液250 μL /孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体100 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30 min,取出重复洗板步骤;每孔加入底物显色液A液50 μL ,底物显色液B液50 μL ,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中显色15 min;每孔加入终止液50 μL ,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处(建议用双波长450/630 nm检测,5 min内读完数据),测定每孔OD值。

[0041] 3、检测结果分析

标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值,再乘以100%。以标准品百分吸光率为纵坐标,黄樟素标准品浓度($\mu\text{g/L}$)的对数为横坐标,绘制标准曲线,见图2。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中黄樟

素的实际浓度。

[0042] 实施例4 样品检测实例

1、试剂盒灵敏度和检测限

按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为10~810 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} (50%抑制浓度)浮动范围为45~73 $\mu\text{g/L}$;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光率的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对烟草中黄樟素的检测限为40 $\mu\text{g/kg}$ 。

[0043] 2、样本精密度和准确度试验

以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%)=实际测定值/理论值 $\times$ 100%,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差 $\text{RSD}\% = \text{SD}/\bar{X} \times 100\%$,其中SD为标准偏差, $\bar{X}$ 为测定数据的平均值。

[0044] 按50 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ 两个浓度的黄樟素分别对烟草样品进行添加回收测定,每个样品做6个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0045] 表2 烟草样本精密度及准确度试验

黄樟素	添加浓度($\mu\text{g/kg}$)	回收率 ($n=6$)%	批内RSD($n=6$)%	批间RSD($n=3$)%
烟草	50	78.1	8.9	9.6
	100	83.6	9.2	9.8

以50 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ 两个浓度的黄樟素分别对烟草进行添加,平均回收率在78.1%~83.6%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0046] 3、试剂盒稳定性试验

试剂盒保存条件为2~8 $^{\circ}\text{C}$,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、黄樟素添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 至少保存12个月以上。

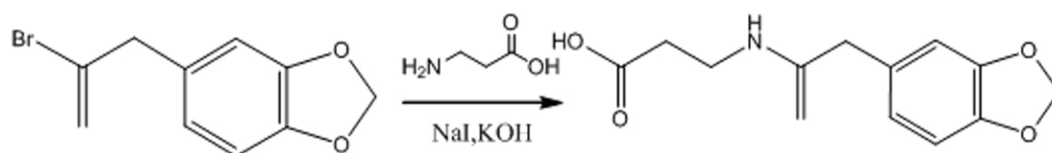


图1

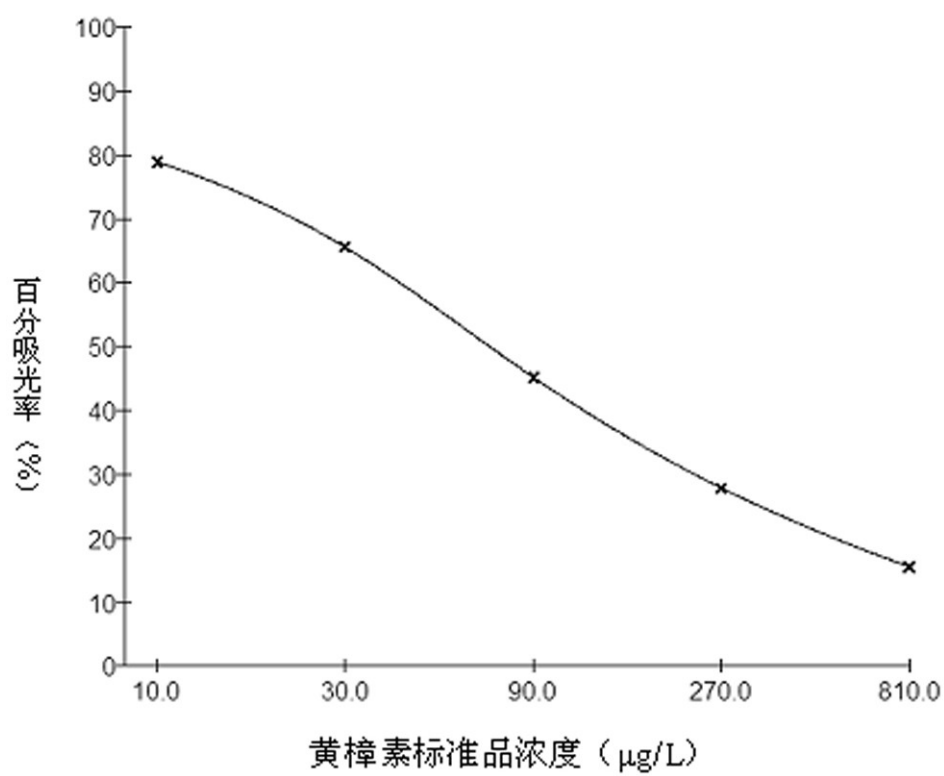


图2

专利名称(译)	一种检测黄樟素的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN108709992A	公开(公告)日	2018-10-26
申请号	CN201810540617.0	申请日	2018-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	陈黎 刘惠民 鲁亚辉 李旭 赵乐 崔华鹏 樊美娟 王晓瑜 贾芳芳 余晶晶		
发明人	陈黎 刘惠民 鲁亚辉 李旭 赵乐 崔华鹏 樊美娟 王晓瑜 贾芳芳 余晶晶		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测黄樟素的酶联免疫试剂盒，包括：包被有包被原的酶标板、黄樟素标准品溶液、黄樟素特异性抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液；包被原为黄樟素偶联抗原，酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗体，黄樟素特异性抗体是以黄樟素偶联抗原作为免疫原制备获得；所述黄樟素偶联抗原是由黄樟素半抗原与载体蛋白偶联得到，所述黄樟素半抗原是由5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环与氨基丙酸反应得到。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测黄樟素的方法。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测样品中黄樟素的含量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

