



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103760337 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201310675076. X

(22) 申请日 2013. 12. 11

(71) 申请人 安徽师范大学

地址 241000 安徽省芜湖市弋江区花津南路
安徽师范大学

(72) 发明人 张明翠 钟君亚

(74) 专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限
公司 34107

代理人 马荣

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书3页 说明书6页

(54) 发明名称

邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,间接竞争酶联免疫法属于光度酶联免疫分析,利用抗原抗体的特异性反应,可以高效快速地检测环境激素邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。首先要合成易与蛋白质结合的4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯,再将蛋白质结合上去,制得免疫原,再将免疫原注射到大白兔体内得到抗体。然后建立起间接竞争酶联免疫法检测邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。邻苯二甲酸(2-乙基己)酯是危害生物体健康的环境激素,间接竞争酶联免疫法建立,可以高效快速地检测河水,湖泊,食品,化妆品等物品中邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的含量。

1. 一种邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

- (1) 合成易与蛋白质结合的 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯;
- (2) 将蛋白质结合上去,制得免疫原;
- (3) 将免疫原注射到实验动物体内得到抗体;
- (4) 建立起间接竞争酶联免疫法检测邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。

2. 如权利要求 1 所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,步骤(4)中进一步包括如下步骤:

- (4-1) 包被:将包被抗原 DEHAP-OVA 稀释一定倍数包被 96 孔酶标板,温育并洗涤;
- (4-2) 封闭:加入 OVA 溶液,封闭没有包被抗原的多余的部分,温育并洗涤;
- (4-3) 竞争:每孔加入邻苯二甲酸(2-乙基己)酯标准溶液或样品溶液和邻苯二甲酸(2-乙基己)酯抗体,使之发生竞争反应,温育并洗涤;
- (4-4) 加酶:每孔加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,温育并洗涤;
- (4-5) 检测:加入底物液显色,温育后,加入终止液终止反应,在多功能酶标仪上测定吸光值。

3. 如权利要求 2 所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,

步骤(4-1)中,将包被抗原 DEHAP-OVA 稀释一定倍数包被 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,放置培养箱 37 $^{\circ}$ C 温育 2h 后,取出用洗涤液 PBST 洗涤 3 次,每次 3min;和/或,

步骤(4-2)中加入 1%OVA 溶液,每孔 150 μ L,封闭没有包被抗原的多余的部分,避免抗体的非特异吸附在酶标板上,37 $^{\circ}$ C 温育 30min 后,取出同上洗涤 3 次;

和/或,

步骤(4-3)中每孔加入 50 μ L 邻苯二甲酸(2-乙基己)酯标准溶液或样品溶液和 50 μ L 邻苯二甲酸(2-乙基己)酯抗体,使之发生竞争反应,37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,同上洗涤;

和/或,

步骤(4-4)中每孔加入 100 μ L HRP 标记的羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 下温育 2h 后取出同上洗涤 3 次;和/或,

步骤(4-5)中加入底物液显色,每孔 100 μ L,温育 30min 后,加入终止液终止反应,在多功能酶标仪上测定吸光值。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,步骤(1)中首先由 4-硝基邻苯二甲酸合成 4-硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯,再还原得到半抗原 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,步骤(2)中将 BSA 偶联上去制得免疫抗原,将免疫抗原注射到动物体内。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,步骤(3)中动物经过一定时间生长反应获得抗体。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,步骤(4)中通过抗原、抗体及酶标二抗之间的特异反应建立起测定

邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的方法。

8. 如权利要求 2-7 中任一项所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,

所述饱和硫酸铵溶液的配制采用如下步骤:取 500mL 蒸馏水,加热至 70 ~ 80℃,将 400g 硫酸铵粉剂溶于水中,搅拌 20min,硫酸铵结晶沉于瓶底,上清即为饱和硫酸铵,室温冷却后用脱脂棉过滤,再取 28% 氨水将饱和硫酸铵调节至 pH7.0 ;和 / 或

生理盐水的配制采用如下步骤:0.85gNaCl 加蒸馏水至 100mL ;

和 / 或

0.01mol/LpH7.2 磷酸缓冲液(PB)的配制采用如下步骤:0.2mol/LNa₂HPO₄36.0mL, 0.2mol/LNaH₂PO₄14.0mL 混合,蒸馏水定容到 1000mL ;

和 / 或

包被缓冲液的配制采用如下步骤:称取 1.59gNa₂CO₃, 2.94gNaHCO₃, 蒸馏水定容到 1000mL ;

和 / 或

封闭液的配制采用如下步骤:用 PBS 配制 1% (w/v) 卵清蛋白(OVA)溶液 ;

和 / 或

稀释液的配制采用如下步骤:称取 8.0gNaCl, 2.96gNa₂HPO₄ · 12H₂O, 0.29gNaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.1gKCl, 蒸馏水定容到 1000mL ;

和 / 或

洗涤液的配制采用如下步骤:PBS 中加入 0.05% 吐温 -20 ;

和 / 或

底物液的配制采用如下步骤:邻苯二胺 4mg 溶于 10mL 柠檬酸 - 磷酸氢二钠缓冲液中,临用前加入 15 μ L30% 过氧化氢 ;

和 / 或

柠檬酸 - 磷酸氢二钠缓冲液的配制采用如下步骤:称取 Na₂HPO₄ · 12H₂O1.84g, 柠檬酸 0.51g, 然后用蒸馏水定容至 50mL ;

和 / 或

终止液为 2mol/L 硫酸溶液。

9. 如权利要求 2-8 中任一项所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,所述抗原的制备具体采用如下步骤:

4- 硝基邻苯二甲酸中加入过量氯化亚砷 (SOCl₂), 氮气保护, 搅拌反应 4 小时, 再将过量氯化亚砷减压抽走, 制得 4- 硝基邻苯二甲酸二酰氯, 再加入 2- 乙基己醇冰浴反应 30min 后, 40℃ 反应 12 小时, 得 4- 硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯 ;

将 4- 硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于苯中, 加入纯锌粉, 加入浓盐酸后, 再次加入纯锌粉, 室温搅拌 12h ;

向反应体系中加入冷水, 并用 NaOH 溶液中和至碱性, 分离出苯层, 水层用苯再萃取 ;

合并萃取液, 水洗后干燥 ;

蒸馏除去苯, 得黄色固体, 用乙醇重结晶得 4- 氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯 ;

称取 4- 氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于少量浓盐酸, 再加二次水, 4℃ 低温搅拌下,

滴入 NaNO_2 溶液；

反应 30min 后,加少量尿素除去未反应的 NaNO_2 ；

将 BSA 溶于四硼酸钠缓冲液中,然后逐滴加入上述的混液中,并调节溶液 pH 至 9.2 左右,橙黄色溶液出现,继续反应 4h,得到抗原粗品；

将反应液装入透析袋中,置二次水中透析 5 天,得到邻苯二甲酸(2-乙基己)酯免疫全抗原；称取 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于少量浓盐酸,再加二次水,4℃低温搅拌下,滴入 NaNO_2 溶液；

反应 30min 后,加少量尿素除去未反应的 NaNO_2 ；

将 OVA 溶于四硼酸钠缓冲液中,然后逐滴加入上述的混液中,并调节溶液 pH 至 9.2 左右,橙黄色溶液出现,继续反应 4h,得到抗原粗品；

将反应液装入透析袋中,置二次水中透析 5 天,得到邻苯二甲酸(2-乙基己)酯包被全抗原。

10. 如权利要求 2-9 中任一项所述的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,其特征在于,所述抗体的制备具体采用如下步骤：

佐剂：先于抗原或与抗原混溶后注入动物体内,能非特异性地改变或增强机体的免疫应答,发挥辅助作用；

将液体石蜡和羊毛脂一定体积比混匀,在水面上不扩散,此时即为不完全弗氏佐剂,加入卡介苗以后为弗氏完全佐剂；

将邻苯二甲酸(2-乙基己)酯免疫抗原稀释到一定浓度,与佐剂 1:1 混溶,对 4 只新西兰大白兔进行多次免疫；

第一次免疫是将免疫抗原与弗氏完全佐剂混溶,之后的加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶；

选用大白兔作为免疫对象,采用背部皮下多点注射的方法；

第一次免疫 3 周之后加强免疫,以后每 2 周再次加强免疫,从第二次加强免疫开始,每次免疫后第 7 天耳静脉采血,测定血清效价,当效价不再变化时,加强一次免疫,1 周后心脏采血,纯化,得到抗体。

邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸酯类物质主要用于聚氯乙烯材料,令聚氯乙烯由硬塑胶变为有弹性的塑胶,起到增塑剂的作用。它被普遍应用于玩具、食品包装材料、医用血袋和胶管、乙烯地板和壁纸、清洁剂、润滑油、个人护理用品等数百种产品中。由于邻苯二甲酸酯作为可增塑剂被添加到塑料生产过程中时并不与塑料分子发生结合,这类物质可以从塑料制品中渗出,人类在使用塑料产品的过程中可通过皮肤接触、吸入、直接摄取此类物质,从而对人体的健康造成极大的危害。

[0003] 邻苯二甲酸酯在人体和动物体内发挥着类似雌性激素的作用,可干扰内分泌,使男子精液量和精子数量减少,精子运动能力低下,精子形态异常,严重的会导致睾丸癌,是造成男子生殖问题的“罪魁祸首”。在化妆品中,指甲油的邻苯二甲酸酯含量最高,很多化妆品的芳香成分也含有该物质。化妆品中的这种物质会通过女性的呼吸系统和皮肤进入体内,如果过多使用,会增加女性患乳腺癌的几率,还会危害到她们未来生育的男婴的生殖系统。

[0004] 邻苯二甲酸(2-乙基己)酯(DEHP)是最广泛使用的增塑剂,除了乙酸纤维素、聚乙烯酸乙烯外,与绝大多数工业上使用的合成树脂和橡胶均有良好的相容性。塑化剂DEHP作用类似人工荷尔蒙,体内长期累积高剂量,可能会造成小孩性别错乱,包括生殖器变短小、性征不明显,目前虽无法证实对人类是否致癌,但对动物会产生致癌反应。

[0005] 所以对邻苯二甲酸酯类的检测显得十分重要。目前邻苯二甲酸酯类的检测方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱法和液相色谱-串联质谱法、固相微萃取法等,其中最常采用的是气相和高效液相色谱法。这些方法测定污染物灵敏度较高,精确度好,但是这类分析方法体系中将待测污染物从样品中分离提取并去除杂质干扰的处理过程十分复杂,操作费时繁琐,仪器和分析成本昂贵。所以开发一种简单、快速、适用于现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。

[0006] 免疫分析技术是基于抗原和抗体的特异性反应进行检测的一种技术手段,一种以抗体作为生物化学检测器,对化合物、酶或蛋白质等物质进行定性和定量的分析技术。间接酶联免疫反应是利用抗原抗体的特异性反应实现的,首先制得免疫原,再将此免疫原注射到兔子体内,制得高特异性抗体,利用间接竞争酶联免疫法将标准品与待测样竞争与抗体的反应,酶标二抗体的酶可以促使底物液发光,测得吸光度值,即可建立标准曲线求得待测样浓度。

[0007] 间接竞争酶联免疫法属于光度酶联免疫分析,利用抗原抗体的特异性反应,可以高效快速地检测环境激素邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。

[0008] 间接竞争酶联免疫法是酶联免疫吸附分析技术的一种。酶联接免疫吸附剂测定

(ELISA) 已广泛应用于临床医学、动物检疫、药物残留等分析领域。目前酶联接免疫吸附剂测定邻苯二甲酸酯类已有一些报导,但对邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的酶联分析还尚未报导过。测定邻苯二甲酸(2-乙基己)酯主要有相相色谱法、高效液相色谱法等,此类方法从样品中分离提取并去除杂质干扰的处理过程十分复杂,操作费时繁琐。所以在此我们探寻能够快速简便地检测邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,解决邻苯二甲酸(2-乙基己)酯属于半抗原,不能直接作用生物体使其产生抗体的问题。

[0010] 首先要合成易与蛋白质结合的 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯,再将蛋白质结合上去,制得免疫原,再将免疫原注射到大白兔体内得到抗体。然后建立起间接竞争酶联免疫法检测邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。

[0011] 具体技术方案如下:

[0012] 一种邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,包括如下步骤:

[0013] (1) 合成易与蛋白质结合的 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯;

[0014] (2) 将蛋白质结合上去,制得免疫原;

[0015] (3) 将免疫原注射到实验动物体内得到抗体;

[0016] (4) 建立起间接竞争酶联免疫法检测邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。

[0017] 进一步地,步骤(4)中进一步包括如下步骤:

[0018] (4-1)包被:将包被抗原 DEHAP-OVA 稀释一定倍数包被 96 孔酶标板,温育并洗涤;

[0019] (4-2)封闭:加入 OVA 溶液,封闭没有包被抗原的多余的部分,温育并洗涤;

[0020] (4-3)竞争:每孔加入邻苯二甲酸(2-乙基己)酯标准溶液或样品溶液和邻苯二甲酸(2-乙基己)酯抗体,使之发生竞争反应,温育并洗涤;

[0021] (4-4)加酶:每孔加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,温育并洗涤;

[0022] (4-5)检测:加入底物液显色,温育后,加入终止液终止反应,在多功能酶标仪上测定吸光值。

[0023] 进一步地,

[0024] 步骤(4-1)中,将包被抗原 DEHAP-OVA 稀释一定倍数包被 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,放置培养箱 37 $^{\circ}$ C 温育 2h 后,取出用洗涤液 PBST 洗涤 3 次,每次 3min ;和 / 或,

[0025] 步骤(4-2)中加入 1%OVA 溶液,每孔 150 μ L,封闭没有包被抗原的多余的部分,避免抗体的非特异吸附在酶标板上,37 $^{\circ}$ C 温育 30min 后,取出同上洗涤 3 次;

[0026] 和 / 或,

[0027] 步骤(4-3)中每孔加入 50 μ L 邻苯二甲酸(2-乙基己)酯标准溶液或样品溶液和 50 μ L 邻苯二甲酸(2-乙基己)酯抗体,使之发生竞争反应,37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,同上洗涤;

[0028] 和 / 或,

[0029] 步骤(4-4)中每孔加入 100 μ L HRP 标记的羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 下温育 2h 后取出同上洗涤 3 次 ;和 / 或,

[0030] 步骤(4-5)中加入底物液显色,每孔 100 μ L,温育 30min 后,加入终止液终止反应,

在多功能酶标仪上测定吸光值。

[0031] 进一步地,步骤(1)中首先由 4-硝基邻苯二甲酸合成 4-硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯,再还原得到半抗原 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。

[0032] 进一步地,步骤(2)中将 BSA 偶联上去制得免疫抗原,将免疫抗原注射到动物体内。

[0033] 进一步地,步骤(3)中动物经过一定时间生长反应获得抗体。

[0034] 进一步地,步骤(4)中通过抗原、抗体及酶标二抗之间的特异反应建立起测定邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的方法。

[0035] 进一步地,

[0036] 所述饱和硫酸铵溶液的配制采用如下步骤:取 500mL 蒸馏水,加热至 70 ~ 80℃,将 400g 硫酸铵粉剂溶于水中,搅拌 20min,硫酸铵结晶沉于瓶底,上清即为饱和硫酸铵,室温冷却后用脱脂棉过滤,再取 28% 氨水将饱和硫酸铵调节至 pH7.0 ;和 / 或

[0037] 生理盐水的配制采用如下步骤:0.85gNaCl 加蒸馏水至 100mL ;

[0038] 和 / 或

[0039] 0.01mol/LpH7.2 磷酸缓冲液(PB)的配制采用如下步骤:0.2mol/LNa₂HPO₄36.0mL, 0.2mol/LNaH₂PO₄14.0mL 混合,蒸馏水定容到 1000mL ;

[0040] 和 / 或

[0041] 包被缓冲液的配制采用如下步骤:称取 1.59gNa₂CO₃, 2.94gNaHCO₃, 蒸馏水定容到 1000mL ;

[0042] 和 / 或

[0043] 封闭液的配制采用如下步骤:用 PBS 配制 1% (w/v) 卵清蛋白(OVA)溶液 ;

[0044] 和 / 或

[0045] 稀释液的配制采用如下步骤:称取 8.0gNaCl, 2.96gNa₂HPO₄ · 12H₂O, 0.29gNaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.1gKCl, 蒸馏水定容到 1000mL ;

[0046] 和 / 或

[0047] 洗涤液的配制采用如下步骤:PBS 中加入 0.05% 吐温 -20 ;

[0048] 和 / 或

[0049] 底物液的配制采用如下步骤:邻苯二胺 4mg 溶于 10mL 柠檬酸 - 磷酸氢二钠缓冲液中,临用前加入 15 μ L30% 过氧化氢 ;

[0050] 和 / 或

[0051] 柠檬酸 - 磷酸氢二钠缓冲液的配制采用如下步骤:称取 Na₂HPO₄ · 12H₂O1.84g, 柠檬酸 0.51g, 然后用蒸馏水定容至 50mL ;

[0052] 和 / 或

[0053] 终止液为 2mol/L 硫酸溶液。

[0054] 进一步地,所述抗原的制备具体采用如下步骤:

[0055] 4-硝基邻苯二甲酸中加入过量氯化亚砷(SOCl₂),氮气保护,搅拌反应 4 小时,再将过量氯化亚砷减压抽走,制得 4-硝基邻苯二甲酸二酰氯,再加入 2-乙基己醇冰浴反应 30min 后,

[0056] 40℃ 反应 12 小时,得 4-硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯 ;

- [0057] 将 4-硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于苯中,加入纯锌粉,加入浓盐酸后,再次加入纯锌粉,室温搅拌 12h;
- [0058] 向反应体系中加入冷水,并用 NaOH 溶液中和至碱性,分离出苯层,水层用苯再萃取;
- [0059] 合并萃取液,水洗后干燥;
- [0060] 蒸馏除去苯,得黄色固体,用乙醇重结晶得 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯;
- [0061] 称取 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于少量浓盐酸,再加二次水,4℃低温搅拌下,滴入 NaNO₂ 溶液;
- [0062] 反应 30min 后,加少量尿素除去未反应的 NaNO₂;
- [0063] 将 BSA 溶于四硼酸钠缓冲液中,然后逐滴加入上述的混液中,并调节溶液 pH 至 9.2 左右,橙黄色溶液出现,继续反应 4h,得到抗原粗品;
- [0064] 将反应液装入透析袋中,置二次水中透析 5 天,得到邻苯二甲酸(2-乙基己)酯免疫全抗原;称取 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于少量浓盐酸,再加二次水,4℃低温搅拌下,滴入 NaNO₂ 溶液;
- [0065] 反应 30min 后,加少量尿素除去未反应的 NaNO₂;
- [0066] 将 OVA 溶于四硼酸钠缓冲液中,然后逐滴加入上述的混液中,并调节溶液 pH 至 9.2 左右,橙黄色溶液出现,继续反应 4h,得到抗原粗品;
- [0067] 进一步地,所述抗体的制备具体采用如下步骤:
- [0068] 佐剂:先于抗原或与抗原混溶后注入动物体内,能非特异性地改变或增强机体的免疫应答,发挥辅助作用;
- [0069] 将液体石蜡和羊毛脂一定体积比混匀,在水面上不扩散,此时即为不完全弗氏佐剂,加入卡介苗以后为弗氏完全佐剂;
- [0070] 将邻苯二甲酸(2-乙基己)酯免疫抗原稀释到一定浓度,与佐剂 1:1 混溶,对 4 只新西兰大白兔进行多次免疫;
- [0071] 第一次免疫是将免疫抗原与弗氏完全佐剂混溶,之后的加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶;
- [0072] 选用大白兔作为免疫对象,采用背部皮下多点注射的方法;
- [0073] 第一次免疫 3 周之后加强免疫,以后每 2 周再次加强免疫,从第二次加强免疫开始,每次免疫后第 7 天耳静脉采血,测定血清效价,当效价不再变化时,加强一次免疫,1 周后心脏采血,纯化,得到抗体。
- [0074] 与目前现有技术相比,本发明可以高效快速地检测河水,湖泊,食品,化妆品等物品中邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的含量。间接竞争酶联免疫法测定邻苯二甲酸(2-乙基己)酯,线性范围为 0.0001-1000ng/mL,加标回收率在 95%-105% 之间,准确度好,结果可靠。该方法建立后可以测定环境水样,食品,日用品中的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯含量,也可用于商业生产,获得经济效益。

具体实施方式

- [0075] 下面为本发明多种实施方式中的一种优选实施例。
- [0076] 间接竞争酶联免疫法测定邻苯二甲酸(2-乙基己)酯特异性好,灵敏度高,方便快

速,首次制得了邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的特异性抗体,通过抗原抗体反应的方式来检测邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。首先由4-硝基邻苯二甲酸合成了4-硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯,再还原得到半抗原4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯,将BSA偶联上去制得免疫抗原,将免疫抗原注射到动物体内,动物经过一定时间生长反应获得抗体。通过抗原、抗体及酶标二抗之间的特异反应建立起测定邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的方法。

[0077] 1. 实验药品及仪器

[0078] (1) 药品

[0079] 4-硝基邻苯二甲酸,氯化亚砷,锌粉,浓盐酸,苯,牛血清蛋白,卵清蛋白,液体石蜡,羊毛脂,硫酸铵,磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,柠檬酸,30%过氧化氢,吐温-20,氯化钠,氨水,无水乙醇,液体卡介苗,25%戊二醛,HRP标记的羊抗兔IgG,邻苯二胺。

[0080] (2) 实验仪器

[0081] 多功能酶标仪,SCQ50超声波清洗器,TGL-16G高速台式离心机,96孔酶标板。

[0082] (3) 溶液的配制

[0083] 1) 饱和硫酸铵溶液:取500mL蒸馏水,加热至70~80℃,将400g硫酸铵粉剂溶于水中,搅拌20min,硫酸铵结晶沉于瓶底,上清即为饱和硫酸铵,室温冷却后用脱脂棉过滤。再取28%氨水将饱和硫酸铵调节至pH7.0。

[0084] 2) 生理盐水:0.85gNaCl加蒸馏水至100mL。

[0085] 3) 0.01mol/L pH7.2 磷酸缓冲液(PB):0.2mol/LNa₂HPO₄36.0mL,0.2mol/LNaH₂PO₄14.0mL混合,蒸馏水定容到1000mL。

[0086] 4) 包被缓冲液(0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液,CB):称取1.59g Na₂CO₃,2.94g NaHCO₃,蒸馏水定容到1000mL。

[0087] 5) 封闭液:用PBS配制1%(w/v)卵清蛋白(OVA)溶液。

[0088] 6) 稀释液(0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液,PBS):称取8.0g NaCl,2.96g Na₂HPO₄·12H₂O,0.29g NaH₂PO₄·2H₂O,0.1g KCl,蒸馏水定容到1000mL。

[0089] 7) 洗涤液(0.01mol/L pH7.4, PBST):PBS中加入0.05%吐温-20。

[0090] 8) 底物液:邻苯二胺4mg溶于10mL柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中,临用前加入15μL30%过氧化氢。

[0091] 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液:称取Na₂HPO₄·12H₂O1.84g,柠檬酸0.51g。然后用蒸馏水定容至50mL。

[0092] 9) 终止液:2mol/L硫酸溶液。

[0093] 2. 实验方法

[0094] (1) 抗原的制备

[0095] 4-硝基邻苯二甲酸中加入过量氯化亚砷(SOCl₂),氮气保护,搅拌反应4小时,再将过量氯化亚砷减压抽走,制得4-硝基邻苯二甲酸二酰氯,再加入2-乙基己醇冰浴反应30min后,40℃反应12小时,得4-硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。将4-硝基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于苯中,加入纯锌粉,加入浓盐酸后,再次加入纯锌粉,室温搅拌12h。向反应体系中加入冷水,并用NaOH溶液中和至碱性,分离出苯层,水层用苯再萃取。合并萃取液,水洗后干燥。蒸馏除去苯,得黄色固体,用乙醇重结晶得4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。

[0096] 称取 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于少量浓盐酸,再加二次水,4℃低温搅拌下,滴入 NaNO_2 溶液。反应 30min 后,加少量尿素除去未反应的 NaNO_2 。将 BSA 溶于四硼酸钠缓冲液中,然后逐滴加入上述的混液中,并调节溶液 pH 至 9.2 左右,橙黄色溶液出现,继续反应 4h,得到抗原粗品。将反应液装入透析袋中,置二次水中透析 5 天,得到邻苯二甲酸(2-乙基己)酯免疫全抗原。

[0097] 称取 4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯溶于少量浓盐酸,再加二次水,4℃低温搅拌下,滴入 NaNO_2 溶液。反应 30min 后,加少量尿素除去未反应的 NaNO_2 。将 OVA 溶于四硼酸钠缓冲液中,然后逐滴加入上述的混液中,并调节溶液 pH 至 9.2 左右,橙黄色溶液出现,继续反应 4h,得到抗原粗品。将反应液装入透析袋中,置二次水中透析 5 天,得到邻苯二甲酸(2-乙基己)酯包被全抗原。

[0098] (2) 抗体的制备

[0099] 佐剂:先于抗原或与抗原混溶后注入动物体内,能非特异性地改变或增强机体的免疫应答,发挥辅助作用。将液体石蜡和羊毛脂一定体积比混匀,在水面上不扩散,此时即为不完全弗氏佐剂,加入卡介苗以后为弗氏完全佐剂。

[0100] 将邻苯二甲酸(2-乙基己)酯免疫抗原稀释到一定浓度,与佐剂 1:1 混溶,对 4 只新西兰大白兔进行多次免疫。第一次免疫是将免疫抗原与弗氏完全佐剂混溶,之后的加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶。这里我们选用 3 个月大小,1-2kg 的新西兰健康雄兔作为免疫对象,采用背部皮下多点注射的方法。第一次免疫 3 周之后加强免疫,以后每 2 周再次加强免疫,从第二次加强免疫开始,每次免疫后第 7 天耳静脉采血,测定血清效价,当效价不再变化时,加强一次免疫,1 周后心脏采血,纯化,得到抗体。

[0101] 3. 间接竞争酶联免疫测定邻苯二甲酸(2-乙基己)酯方法的建立

[0102] (1) 包被:将包被抗原 DEHAP-OVA 稀释一定倍数包被 96 孔酶标板,每孔 100 μL ,放置培养箱 37℃温育 2h 后,取出用洗涤液 PBST 洗涤 3 次,每次 3min。

[0103] (2) 封闭:加入 1%OVA 溶液,每孔 150 μL ,封闭没有包被抗原的多余的部分,避免抗体的非特异吸附在酶标板上,37℃温育 30min 后,取出同上洗涤 3 次。

[0104] (3) 竞争:每孔加入 50 μL 邻苯二甲酸(2-乙基己)酯标准溶液或样品溶液和 50 μL 邻苯二甲酸(2-乙基己)酯抗体,使之发生竞争反应。37℃下温育 2.5h 后,同上洗涤。

[0105] (4) 加酶:每孔加入 100 μL HRP 标记的羊抗兔 IgG,37℃下温育 2h 后取出同上洗涤 3 次。

[0106] (5) 检测:加入底物液显色,每孔 100 μL ,温育 30min 后,加入终止液终止反应,在多功能酶标仪上测定吸光值。

[0107] 线性方程

[0108] $Y=0.741-0.03781g X$ (Y—吸光度值,X—待测液中 DEHP 浓度 ng/mL), 相关系数: $R^2=0.9015$,线性范围 0.0001-1000ng/mL。

[0109] 间接竞争酶联免疫法测定邻苯二甲酸(2-乙基己)酯灵敏度高、选择性好、特异性强、简单易操作,可实现高通量检测。该方法建立后可以测定环境水样,食品,日用品等物品中的邻苯二甲酸(2-乙基己)酯含量,实用性强,应用前景好。

专利名称(译)	邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法		
公开(公告)号	CN103760337A	公开(公告)日	2014-04-30
申请号	CN201310675076.X	申请日	2013-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
[标]发明人	张明翠 钟君亚		
发明人	张明翠 钟君亚		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/535		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/558		
代理人(译)	马荣		
其他公开文献	CN103760337B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的间接竞争酶联免疫法检测方法,间接竞争酶联免疫法属于光度酶联免疫分析,利用抗原抗体的特异性反应,可以高效快速地检测环境激素邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。首先要合成易与蛋白质结合的4-氨基邻苯二甲酸(2-乙基己)酯,再将蛋白质结合上去,制得免疫原,再将免疫原注射到大白兔体内得到抗体。然后建立起间接竞争酶联免疫法检测邻苯二甲酸(2-乙基己)酯。邻苯二甲酸(2-乙基己)酯是危害生物体健康的环境激素,间接竞争酶联免疫法建立,可以高效快速地检测河水,湖泊,食品,化妆品等物品中邻苯二甲酸(2-乙基己)酯的含量。