



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105884609 A

(43) 申请公布日 2016. 08. 24

(21) 申请号 201410630814. 3

(22) 申请日 2014. 11. 06

(71) 申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路 94 号

(72) 发明人 孙红文 刘婧婷 张彦峰

(51) Int. Cl.

C07C 59/68(2006. 01)

C07C 51/09(2006. 01)

C07D 213/64(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于四溴联苯醚快速检测的酶联免疫吸
附分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 2,2',4,4' - 四溴联苯醚 (BDE-47) 的酶联免疫检测方法,改造 BDE-47 分子结构,设计合成半抗原 $C_{15}H_9Br_3O_3$ 和 $C_{11}H_{13}Br_2O_3N$, 分别与牛血清白蛋白、卵清白蛋白偶联得到免疫原和包被原。对新西兰大白兔进行 7 次免疫后取得特异性抗血清。ELISA 法测定抗体效价为 1 : 400000, 检出限为 0.01mg/L, 定量限为 0.023mg/L, IC_{50} 为 0.108mg/L。所建立的对 BDE-47 的间接竞争抑制 ELISA 方法,具有灵敏、快速、特异性强等优点,在对大量环境样品的进行初期筛选时很有优势,可大幅提高监测工作效率,降低监测成本,为仪器检测提供有效依据。

1. 一种 2,2',4,4'-四溴联苯醚 (BDE-47) 半抗原及其合成方法,其特征在于:选择 $C_{15}H_9O_3Br_3$ 为半抗原,其合成步骤为:

(1) 称取 1201.2mg (5mmol) 的磷酸基乙酸三乙酯于 250ml 锥形瓶,加入 10ml THF,另加入 280mg 氢化钠,在冰浴器中搅动反应 20min;

(2) 称取 3-溴-4-氟苯甲醛 3.24g (16mmol),再称取 2,4-二溴苯酚 4g, (16mmol) 溶于 20ml 二甲基乙酰胺中,反应 2h;

(3) 称取已制得的 3-溴-4-(2,4-二溴苯氧基)苯甲醛 2000mg (4.6mmol),与上步骤冷却过后的混合物进行反应 3-4h;

(4) 称取 1570mg (37.5mmol) 的 $LiOH \cdot H_2O$ 加入 1,4-二氧六环与水的混合液 50ml (体积比 1 : 1) 中,将合成物质水解 24h;分离纯化后得到白色晶体态半抗原 $C_{15}H_9O_3Br_3$ 。

2. 一种 2,2',4,4'-四溴联苯醚 (BDE-47) 半抗原及其合成方法,其特征在于:选择 $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ 为半抗原,其合成步骤为:

(1) 称取 3,5-二溴-2-羟基吡啶 200mg (0.79mmol),加入 6-溴己酸乙酯 52.53mg (1.58mmol) 以及适量无水 K_2CO_3 ,混合溶于 2mL 二甲基甲酰胺中,100℃下反应 5h;

(2) 称取 1570mg (37.5mmol) 的 $LiOH \cdot H_2O$ 加入 1,4-二氧六环与水的混合液 50ml (体积比 1 : 1) 中,将合成物质水解 24h;

(3) 分离纯化后得到淡黄色晶体态的半抗原 $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ 。

3. 一种 2,2',4,4'-四溴联苯醚 (BDE-47) 的全抗原及其合成方法,其特征在于:以 $C_{15}H_9O_3Br_3$ 与 BSA 偶联, $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ 与 OVA 偶联得到两种抗原,其合成步骤为:

(1) $C_{15}H_9O_3Br_3$ -BSA 的合成:取半抗原 $C_{15}H_9O_3Br_3$ 0.50mmol (0.239g) 溶于 10ml N,N-二甲基甲酰胺;取 N-羟基琥珀酰亚胺 0.50mmol (0.0584g), N,N'-二环己基碳 0.55mmol (0.1035g),溶于 10ml N,N-二甲基甲酰胺中,在磁力搅拌下逐滴加到溶有半抗原的 N,N-二甲基甲酰胺中,室温搅拌反应 8h,4℃过夜;

(2) 将反应产物以 9000r/min 离心 15min,上层清液为活性酯;

(3) 将适量的牛血清白蛋白溶解于 pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液配制成 15mg/mL 的溶液 10mL;4℃搅拌下,取 10mL 活性酯缓慢地滴加入 10mL 的蛋白溶液中,继续搅拌 4h;

(4) 反应后的溶液用 0.9%生理盐水透析 5d;将透析完成后,将最后透析液冷冻干燥后保存于 -20℃。

(5) $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ -OVA 的合成:除蛋白使用卵白蛋白外,步骤与免疫原合成相同。

4. 一种 2,2',4,4'-四溴联苯醚 (BDE-47) 的抗血清及其制备,其特征在于:以 $C_{15}H_9O_3Br_3$ -BSA 作为免疫原,新西兰大白兔作为免疫对象,进行多次免疫,免疫方法为:

(1) 选取体型均一,健康状况良好的两制新西兰大白兔作为免疫对象,用生理盐水稀释适量免疫原 $C_{15}H_9O_3Br_3$ -BSA,并将免疫原溶液与弗氏完全佐剂混合,使免疫原充分乳化。

(2) 取弗氏完全佐剂乳化后的免疫原溶液对兔子进行皮下注射,注射后轻柔免疫部位使免疫原被充分吸收,避免皮下局部组织硬化。

(3) 在第 3 次加强免疫后,通常将兔耳缘静脉取血部位周围的兔毛拔净,摩擦刺激局部,使兔耳发热,静脉充血,手术刀割小口后取约 2 ~ 3mL 血液,静置离心后,取上清液对现有抗血清进行效价检测。待效价达到预期后,在颈动脉进行大量采血。

表 1 人工抗原生物免疫实施方案

免疫日期 (d)	免疫顺序	抗原剂量 (ug)	佐剂类型	免疫部位
0	免疫前	收集 0.5~1mL 阴性血清		耳部
1	首次免疫	500	弗氏完全佐剂	背部、四肢
15	一次加强免疫	500	弗氏完全佐剂	背部、四肢
29	二次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
35	效价预试	收集血清 2~3mL		耳部
36	三次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
43	四次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
50	效价预试	收集血清 2~3mL		耳部
57	冲击免疫	250	弗氏不完全佐剂	腹部
63		采血		颈动脉

5. 一种间接竞争抑制 ELISA 检测 BDE-47 方法的建立, 其特征在于: 将权利要求 1、2、3、4 中所述的 BDE-47 的半抗原、抗原及抗体应用于免疫分析, 具体方法为:

(1) 以 $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ -OVA 作为包被原, 以每孔 100 μ L 的 5 μ g/mL 的包被原稀释液包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜;

(2) 将包被液倒净, 向每孔加入 350 μ L 洗涤液, 浸泡 1min, 吸去洗涤液, 此步骤重复 3 次;

(3) 以每孔 200 μ L 封闭液进行封闭, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 30min 后, 将封闭液倒净, 如上洗涤 3 次;

(4) 加入 50 μ L BDE-47 标准系列浓度溶液 (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 μ g/L,) 和 50 μ L 抗血清溶液, 震荡 30s 后, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 60min;

(5) 如上封闭后洗涤, 加入 100 μ L 羊抗兔 IgG-HRP 溶液, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 60min;

(6) 如上封闭后洗涤, 加入 100 μ L 底物液, 37 $^{\circ}$ C 避光振荡温育 15min;

(7) 加入 50 μ L 的 2mol/L 的硫酸溶液, 终止反应;

(8) 酶标仪在 450nm 波长下测定各板孔中溶液的吸光度。

6. 一种使用权利要求 5 中建立的检测方法进行实际样品添加回收实验的方法, 其特征在于: 选择水、底泥和鲈鱼肌肉三种环境样品进行添加回收分析, 比较间接竞争抑制 ELISA 检测和传统 GC-MS 检测的结果, 具体方法如下:

(1) 水样经过 0.7 μ m 的 Watman GF/F 玻璃纤维滤纸过滤后, 加入 50% (体积比) 的甲醇后在超声清洗器上超声 10min, 静置 30min, 离心后取上层清液, 进行 ELISA 检测;

(2) 底泥 (鱼样) 经过充分干燥、研磨、筛选后与无水硫酸 1 : 1.2 (质量比) 充分混合; 加入合适比例的正己烷与二氯甲烷混合溶剂 (V/V = 2 : 1), 超声萃取 30min, 重复萃取两次; 高纯氮气吹干萃取溶剂后用正己烷作替换溶剂, 并用浓硫酸纯化至无色; 再用高纯氮气吹干后溶于 1mL 的甲醇中进行 ELISA 检测。

一种用于四溴联苯醚快速检测的酶联免疫吸附分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可用于 BDE-47 的快速检测的 ELISA 方法,属于免疫化学和残留分析的检验技术领域,建立的间接竞争抑制 ELISA 检测方法可以用于研制 BDE-47 免疫速测试剂盒。

背景技术

[0002] 多溴联苯醚 (polybrominateddiphenyl ethers, PBDEs), 是一类含溴原子的芳香族化合物,属于溴系阻燃剂,其化学通式为 $C_{12}H_{(0\sim 9)}Br_{(1\sim 10)}O$, 依据苯环上溴原子取代数目和取代位置的不同,可分为 10 个不同组分,共有 209 种同系物。BDE-47 全称 2,2',4,4'-四溴联苯醚,为多溴联苯醚中使用和环境分布最为广泛的同系物质。分子式为 $C_{12}H_6Br_4O$, 分子量为 485.79,熔点 $-107^{\circ}C$,沸点 $98-99^{\circ}C$ 。化学结构和化学性质稳定,亲脂疏水性极强,具有生物积累性。

[0003] 多溴联苯醚多用于阻燃剂的生产,属于溴代阻燃剂的一种,被广泛应用于电子、电器、纺织、家居建材等多个工业领域中。市场上现行使用的 PBDEs 商用阻燃剂主要可分为三种:五溴联苯醚混合物、八溴联苯醚混合物以及十溴联苯醚, BDE-47 主要应用于五溴联苯醚,另外高溴代化合物也可脱溴成为低溴代化合物。在多溴联苯醚的生产、使用和处置过程中都会对环境造成不同程度的污染,根据目前已有的相关研究,PBDEs 会对人体产生肝脏毒性,甲状腺激素毒性,神经毒性,生殖系统毒性等方面的危害。多溴联苯醚的严重危害问题已经引起人们的高度重视,美国、加拿大等国已开始限制其生产和使用,因此必须建立快速、灵敏的检测分析方法,以确保环境安全和人类健康。

[0004] BDE-47 测定最常采用的是气相色谱-质谱联用法。但是这些仪器方法前处理费事、成本高、不适合现场检测,而 ELISA 具有灵敏度高、选择性好等优点,避免了经典仪器测试手段的不足,能够用于现场快速监测和大量样品的快速筛查。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种用于 BDE-47 间接竞争抑制 ELISA 快速检测。

[0006] 本发明的技术方案概述如下:

[0007] 一种用于 BDE-47 快速检测的间接竞争抑制 ELISA 方法,具体步骤如下:

[0008] 1. 半抗原的合成

[0009] 半抗原 $C_{15}H_9O_3Br_3$ 的合成:称取 1201.2mg (5mmol) 的磷酸基乙酸三乙酯于 250ml 锥形瓶,加入 10ml THF,另加入 280mg 氢化钠,在冰浴器中搅动反应 20min;称取 3-溴-4-氟苯甲醛 3.24g (16mmol),再称取 2,4-二溴苯酚 4g, (16mmol) 溶于 20ml 二甲基乙酰胺中,反应 2h;称取已制得的 3-溴-4-(2,4-二溴苯氧基)苯甲醛 2000mg (4.6mmol),与上步骤冷却过后的混合物进行反应 3-4h;称取 1570mg (37.5mmol) 的 $LiOH \cdot H_2O$ 加入 1,4-二氧六环与水的混合液 50ml (体积比 1:1) 中,将合成物质水解 24h;分离纯化后得到白色晶体态半抗原 $C_{15}H_9O_3Br_3$ 为 573mg,产率为 61%。

[0010] 半抗原 $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ 的合成:称取 3,5-二溴-2-羟基吡啶 200mg (0.79mmol), 加入 6-溴己酸乙酯 352.53mg (1.58mmol) 以及适量无水 K_2CO_3 , 混合溶于 2mL 二甲基甲酰胺中, 100℃ 下反应 5h; 称取 1570mg (37.5mmol) 的 $LiOH \cdot H_2O$ 加入 1,4-二氧六环与水的混合液 50ml (体积比 1 : 1) 中, 将合成物质水解 24h; 分离纯化后得到淡黄色晶体态的半抗原 $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ 为 138mg, 产率为 93%。

[0011] 2. 全抗原的合成

[0012] 免疫原 $C_{15}H_{25}O_3Br_3$ -BSA 的合成:取半抗原 $C_{15}H_{25}O_3Br_3$ 0.50mmol (0.239g) 置于溶于 10ml N, N-二甲基甲酰胺; 取 N-羟基琥珀酰亚胺 0.50mmol (0.0584g), N, N'-二环己基碳 0.55mmol (0.1035g), 溶于 10ml N, N-二甲基甲酰胺中, 在磁力搅拌下逐滴加到溶有半抗原的 N, N-二甲基甲酰胺中, 室温搅拌反应 8h, 4℃ 过夜; 将反应产物以 9000r/min 离心 15min, 上层清液为活性酯; 将适量的牛血清白蛋白溶解于 pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液配制成 15mg/mL 的溶液 10mL; 4℃ 搅拌下, 取 10mL 活性酯缓慢地滴加入 10mL 的蛋白溶液中, 继续搅拌 4h; 反应后的溶液用 0.9% 生理盐水透析 5d; 将透析完成后, 将最后透析液冷冻干燥后保存于 -20℃。

[0013] 包被原 $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ -OVA 的合成:除蛋白使用卵白蛋白外, 步骤与免疫原合成相同。

[0014] 3. 抗血清的合成

[0015] 选取体型均一, 健康状况良好的两制新西兰大白兔作为免疫对象, 用生理盐水稀释适量免疫原 $C_{15}H_{25}O_3Br_3$ -BSA, 并将免疫原溶液与弗氏完全佐剂混合, 使免疫原充分乳化。取弗氏完全佐剂乳化后的免疫原溶液对兔子进行皮下注射, 注射后轻柔免疫部位使免疫原被充分吸收, 避免皮下局部组织硬化。在第 3 次加强免疫后, 通常将兔耳缘静脉取血部位周围的兔毛拔净, 摩擦刺激局部, 使兔耳发热, 静脉充血, 手术刀割小口后取约 2 ~ 3mL 血液, 静置离心后, 取上清液用 (测试效价的具体方法) 对现有抗血清进行效价检测。待效价达到预期后, 在颈动脉进行大量采血。

[0016] 表 1 人工抗原生物免疫实施方案

[0017]

免疫日期 (d)	免疫顺序	抗原剂量 (ug)	佐剂类型	免疫部位
0	免疫前	收集 0.5~1mL 阴性血清		耳部
1	首次免疫	500	弗氏完全佐剂	背部、四肢
15	一次加强免疫	500	弗氏完全佐剂	背部、四肢
29	二次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
35	效价预试	收集血清 2~3mL		耳部
36	三次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
43	四次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
50	效价预试	收集血清 2~3mL		耳部
57	冲击免疫	250	弗氏不完全佐剂	腹部
63		采血		颈动脉

[0018] 4. 间接竞争抑制 ELISA 检测 BDE-47 方法的建立

[0019] 以每孔 100 μ L 的 5 μ g/mL 的包被原稀释液包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜; 将包被液倒净, 向每孔加入 350 μ L 洗涤液, 浸泡 1min, 吸去洗涤液, 此步骤重复 3 次; 以每孔 200 μ L 封闭液进行封闭, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 30min 后, 将封闭液倒净, 如上洗涤 3 次; 加入 50 μ L BDE-47 标准系列浓度溶液 (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 μ g/L,) 和 50 μ L 抗血清溶液, 震荡 30s 后, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 60min; 如上封闭后洗涤, 加入 100 μ L 羊抗兔 IgG-HRP 溶液, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 60min; 如上封闭后洗涤, 加入 100 μ L 底物液, 37 $^{\circ}$ C 避光振荡温育 15min; 加入 50 μ L 的 2mol/L 的硫酸溶液, 终止反应; 酶标仪在 450nm 波长下测定各板孔中溶液的吸光度。

[0020] 本发明的有益效果: 间接竞争抑制 ELISA 用于 BDE-47 的检测方法具有较高的灵敏度, 通过实际样品加标回收分析, 间接竞争抑制 ELISA 方法表现出较高的稳定性和精确度, 该方法相比传统气相色谱-质谱检测 (GC-MS) 方法相比更简单快速。

附图说明

[0021] 图 1 半抗原 $C_{15}H_9O_3Br_3$ 合成路线

[0022] 图 2 半抗原 $C_{11}H_{13}O_3NBr_2$ 合成路线

[0023] 图 3 免疫原合成路线

[0024] 图 4 包被原合成路线

具体实施方式

[0025] 以下的实施例便于更好地理解本发明, 但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法。下述实施例中所用的试剂与材料, 如无特殊说明, 均可从常规试剂公司购买得到。

[0026] 间接竞争抑制 ELISA 检测方法的建立与评估

[0027] 一、方法的灵敏度

[0028] 表 2 K1-BSA 抗血清 ELISA 法测定 BDE-47 标样数据

[0029]

C(ug/L)	A ₄₅₀ (n=4)		B/B ₀ (%)(n=4)		RSD(%)
	Mean	SD	Mean	SD	
1000	0.051	0.019	3.87	1.44	37.3
500	0.379	0.025	28.73	1.89	6.6
200	0.538	0.018	40.79	1.35	3.3
100	0.742	0.020	56.25	1.52	2.7
50	0.879	0.149	66.64	11.33	17.0
20	1.012	0.236	76.72	17.88	23.3
10	1.113	0.042	84.38	3.21	3.8
5	1.241	0.189	94.09	14.30	15.2
1	1.398	0.100	105.99	7.53	7.1
0.5	1.247	0.228	94.54	17.30	18.3
0.25	1.156	0.017	87.64	1.32	1.5
0.1	1.326	0.171	100.53	12.97	12.9
0.05	1.256	0.505	95.22	38.28	40.2
0.025	1.321	0.323	100.15	24.54	24.5
0	1.319	0.179	100.00	13.60	13.6

[0030] 以每孔 100 μ L 的 5 μ g/mL 的包被原稀释液包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜; 将包被液倒净, 向每孔加入 350 μ L 洗涤液, 浸泡 1min, 吸去洗涤液, 此步骤重复 3 次; 以每孔 200 μ L 封闭液进行封闭, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 30min 后, 将封闭液倒净, 如上洗涤 3 次; 加入 50 μ L 的 BDE-47 标准系列浓度溶液 (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000ug/L,) 和 50 μ L 抗血清溶液, 震荡 30s 后, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 60min; 如上封闭后洗涤, 加入 100 μ L 羊抗兔 IgG-HRP 溶液, 37 $^{\circ}$ C 振荡温育 60min; 如上封闭后洗涤, 加入 100 μ L 底物液, 37 $^{\circ}$ C 避光振荡温育 15min; 加入 50 μ L 的 2mol/L 的硫酸溶液, 终止反应; 酶标仪在 450nm 波长下测定各板孔中溶液的吸光度。计算可得间接竞争抑制 ELISA 检测 BDE-47 的 IC₅₀ 值为 0.108mg/L, 检出限为 0.01mg/L, 定量限为 0.023mg/L, 在 0.01 ~ 0.5mg/L 范围内检测结果准确。

[0031] 二、实际样品添加回收试验

[0032] 选择水、底泥和鲈鱼肌肉三种环境样品进行添加回收分析, 比较间接竞争抑制 ELISA 检测和传统 GC-MS 检测结果。样品前处理过程如下: 水样经过 0.7 μ m 的 Watman GF/F 玻璃纤维滤纸过滤后, 加入 50% (体积比) 的甲醇后在超声清洗器上超声 10min, 静置 30min, 离心后取上层清液即可进行 ELISA 检测。底泥 (鱼样) 经过充分干燥、研磨、筛选后与无水硫酸 1 : 1.2 (质量比) 充分混合; 加入合适比例的正己烷与二氯甲烷混合溶剂 (V/V = 2 : 1), 超声萃取 30min, 重复萃取两次; 高纯氮气吹干萃取溶剂后用正己烷作替换溶剂, 并用浓硫酸纯化至无色; 再用高纯氮气吹干后溶于 1mL 的甲醇中进行 ELISA 分析。

[0033] 表 3 ELISA 方法检测各加标环境样品中 BDE-47

[0034]

样品种类	加标浓度(ug/L)	平行次数	平均回收率 (%)	SD (%)	RSD(%)
水样	10	5	66.20	7.80	11.78
	20	5	74.12	6.80	9.17
	50	5	88.57	4.20	4.74
底泥	10	4	78.32	12.20	15.57
	20	4	84.15	3.40	4.04
	50	4	80.26	4.90	6.10
鲈鱼	10	4	75.23	6.20	8.24
	20	4	78.15	4.10	5.24
	50	4	80.20	3.00	3.74

[0035] 对水样、底泥及鲈鱼肌肉样品进行平行样品提取 ($n \geq 4$)、纯化和分析, 数据处理结果见表 3。水样的相对标准偏差为 4.8 ~ 11.8%, 底泥相对标准偏差结果为 4.04 ~ 15.57%, 鱼样为 3.74 ~ 8.24%。该检测方法中各样品加标回收率处分别在 66.20 ~ 88.57%, 78.32 ~ 84.15%, 75.23 ~ 80.20%, 基本满足针对于复杂基质中微量或是痕量目标物的回收率要求, 证明该方法具有较好的准确度和稳定性, 可以满足对富集后环境样品中 PBDEs 的检测要求。

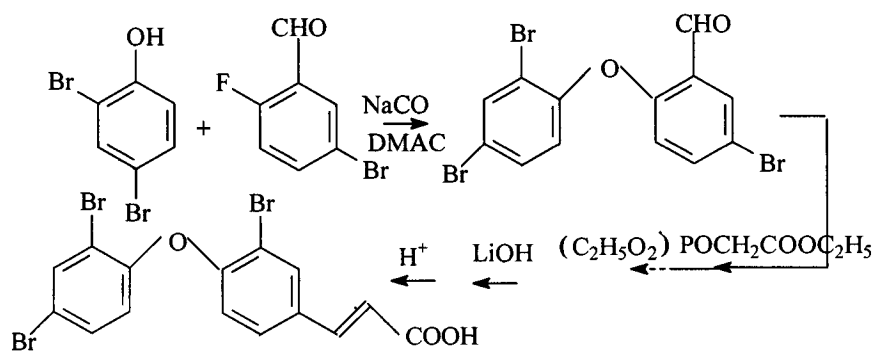


图 1

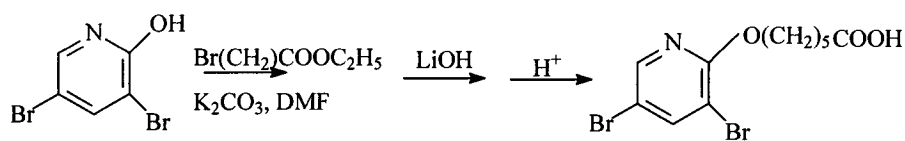


图 2

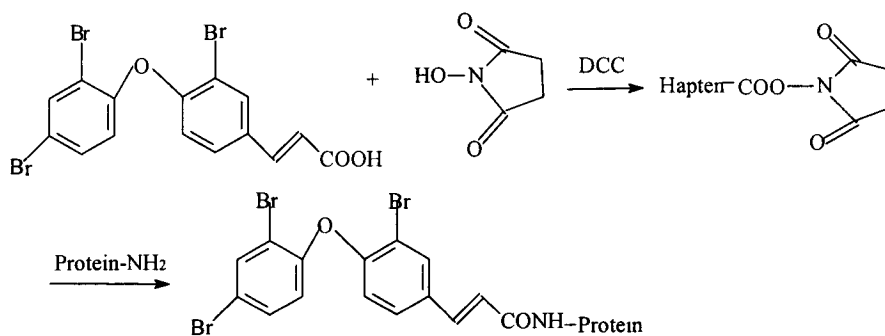


图 3

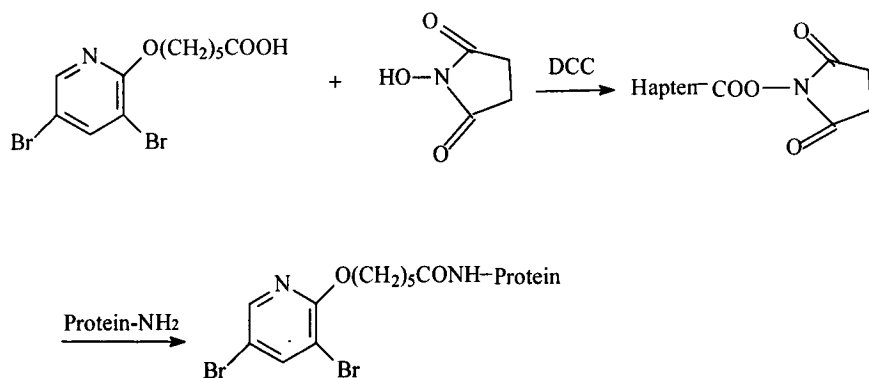


图 4

专利名称(译)	一种用于四溴联苯醚快速检测的酶联免疫吸附分析方法		
公开(公告)号	CN105884609A	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	CN201410630814.3	申请日	2014-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	孙红文 刘婧婷 张彦峰		
发明人	孙红文 刘婧婷 张彦峰		
IPC分类号	C07C59/68 C07C51/09 C07D213/64 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/107 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚(BDE-47)的酶联免疫检测方法, 改造BDE-47分子结构, 设计合成半抗原C15H9Br3O3和C11H13Br2O3N, 分别与牛血清白蛋白、卵清白蛋白偶联得到免疫原和包被原。对新西兰大白兔进行7次免疫后取得特异性抗血清。ELISA法测定抗体效价为1:400000, 检出限为0.01mg/L, 定量限为0.023mg/L, IC50为0.108mg/L。所建立的对BDE-47的间接竞争抑制ELISA方法, 具有灵敏、快速、特异性强等优点, 在对大量环境样品的进行初期筛选时很有优势, 可大幅提高监测工作效率, 降低监测成本, 为仪器检测提供有效依据。

免疫日期 (d)	免疫顺序	抗原剂量 (ug)	佐剂类型	免疫部位
0	免疫前	收集 0.5~1mL 阴性血清		耳部
1	首次免疫	500	弗氏完全佐剂	背部、四肢
15	一次加强免疫	500	弗氏完全佐剂	背部、四肢
29	二次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
35	效价预试	收集血清 2~3mL		耳部
36	三次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
43	四次加强免疫	250	弗氏不完全佐剂	背部、四肢
50	效价预试	收集血清 2~3mL		耳部
57	冲击免疫	250	弗氏不完全佐剂	腹部
63		采血		颈动脉