



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103698504 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201310752662. X

(22) 申请日 2013. 12. 31

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483 号

(72) 发明人 柳春红 孙远明 沈玉栋 杨金易
羿利华 雷红涛 徐振林 王弘
肖治理

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 任重

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

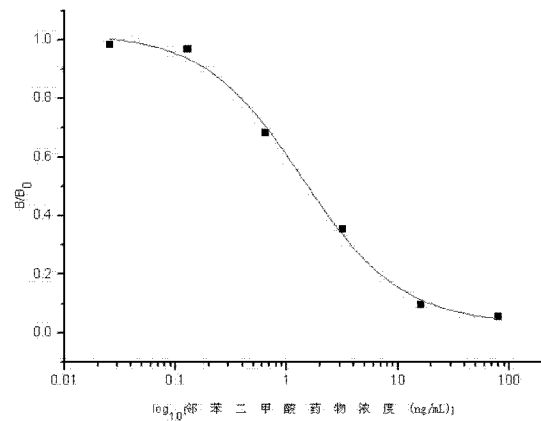
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒及其使用方法,属于酶联免疫检测技术领域。所述试剂盒包括如下组分:包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板、邻苯二甲酸抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的二抗、邻苯二甲酸标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液。本发明同时公开了利用所述试剂盒检测样品中邻苯二甲酸酯类总量的方法,样品经过前处理后,利用试剂盒进行检测,对检测结果进行处理,分析出样品中邻苯二甲酸酯类总量。本发明提供的检测邻苯二甲酸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。



1. 一种邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 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) 包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板;
- (2) 邻苯二甲酸抗体工作液;
- (3) 辣根过氧化物酶标记的二抗;
- (4) 邻苯二甲酸标准溶液;
- (5) 底物液;
- (6) 底物缓冲液;
- (7) 反应终止液;
- (8) 浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的邻苯二甲酸抗原为半抗原 4-氨基邻苯二甲酸与卵清蛋白的偶联物;

所述酶标板是 96 或 40 孔酶标板,材质为聚苯乙烯,包被有邻苯二甲酸抗原,并封闭微孔表面未吸附邻苯二甲酸抗原的位点。

3. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的邻苯二甲酸抗体为邻苯二甲酸单克隆抗体或邻苯二甲酸兔多克隆抗体。

4. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的邻苯二甲酸标准溶液的浓度为 1mg/mL,使用时用磷酸盐缓冲液将标准溶液稀释成邻苯二甲酸标准品溶液。

5. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述底物液为含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺或邻苯二胺的 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲溶液。

6. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 的磷酸柠檬酸缓冲溶液。

7. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述反应终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 氢氧化钠溶液。

8. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述浓缩洗涤液为含有 0.5 ~ 1.5% (v/v) 吐温-20 的磷酸盐缓冲液,浓缩洗涤液的 pH 值为 7.4、浓度为 0.1mol/L。

9. 权利要求 1 ~ 8 任一所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

- S1. 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温平衡;
- S2. 将标准品或经过前处理的待测样品加入已经包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板孔内,然后每孔加入抗体,轻拍混匀,孵育;
- S3. 用洗涤液进行洗涤;
- S4. 加入辣根过氧化物酶标记的二抗,轻拍混匀,孵育;
- S5. 用洗涤液进行洗涤;
- S6. 将底物缓冲液与底物液等体积混合得到显色液,在每孔加入显色液,轻拍混匀,避光孵育;
- S7. 每孔加入反应终止液,混合均匀,在波长 450nm 或 492nm 下,以空气为空白,测定各

孔吸光值；

S8. 检测结果处理与分析：确定样品中邻苯二甲酸的含量，根据邻苯二甲酸的含量计算样品中邻苯二甲酸酯类的总含量。

10. 根据权利要求9所述邻苯二甲酸酯类总量ELISA酶联免疫检测试剂盒的使用方法，其特征在于，S2所述的前处理是指将待测样品中的邻苯二甲酸酯类物质转化为邻苯二甲酸。

邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及 ELISA 酶联免疫检测技术领域。更具体地,涉及一种邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸酯(phthalate acid esters,PAEs)类化合物又称为酞酸酯,邻苯二甲酸酯的一般化学结构是由一个刚性平面芳烃和两个可塑的非线性脂肪侧链组成,常温下呈无色油状粘稠液体,难溶于水且不易挥发,凝固点低,易溶于甲醇、乙醇、乙醚等有机溶剂,主要应用于塑料制品,用来提高可塑性和韧性,还用作农药、染料、化妆品、香料和医疗器材的生产原料。PAEs 与塑料分子以氢键或范德华力连接,并非以共价键形式牢固结合,因此很容易通过淋洗迁移或蒸发等方式进入室内空气、大气、食品、饮用水及其他物质中,也可以在塑料生产或燃烧过程中通过烟尘沉降释放到环境中。过去一直认为 PAEs 的毒性很低,因而毫无限制地生产。但后来研究表明,它具有种类多、难以降解、生物富集性强的特点,对人体、生物体及植物均有较大的毒性。研究发现多种 PAEs 都具有一般毒性和特殊毒性,部分 PAEs 对动物有致畸和致突变的作用,并显示出较强的内分泌干扰性。邻苯二甲酸酯类污染物对人类的危害主要表现在致癌性、致畸性以及免疫抑制性,尤以造成人体生殖功能异常最为引人注目。PAEs 类化合物伴随着烟尘、废弃物、工业和生活垃圾、废水等大量地进入我们生存的环境中,威胁着人类的健康,从而引起越来越多人的关注。

[0003] 由于人类社会的大量生产和广泛使用,邻苯二甲酸酯已成为地球上最广泛存在的环境污染物之一,PAEs 引起的环境污染已受到全球性关注,邻苯二甲酸酯类化合物被人们称为“第二个全球性 PCB 污染物”,1977 年美国国家环保局(EPA)将 DEHP、DOP、BBP、DBP、DEP 和 DMP 这 6 种 PAEs 化合物列为优先控制的有毒污染物,我国也将 DEP、DMP 和 DOP 这 3 种 PAEs 化合物确定为环境优先控制污染物。食品中邻苯二甲酸酯的测定的国家标准 GB/T 21911-2008 中规定含油脂样品中各邻苯二甲酸酯化合物的检出限为 1.5mg/kg,不含油脂样品中各邻苯二甲酸酯化合物的检出限为 0.05mg/kg。2011 年 5 月,台湾发生全球首例塑化剂污染案,一些食品及饮料制品中检出大量 DEHP,经研究发现,食品添加剂生产商将 DEHP 添加到食品性乳化剂中,以提高食品均匀度。于 2012 年爆出的白酒塑化剂风波更加重了人们对塑化剂的恐惧。

[0004] 目前,PAEs 的分析多采用仪器分析法,液相-质谱联用,气相-质谱联用,关皓月(中国新药杂志,2013)等人用气质联用色谱法测定明胶空心胶囊中的邻苯二甲酸酯类化合物,杨荣静(环境化学,2012)等人用高效液相色谱-串联质谱法检测食品接触材料中 17 种邻苯二甲酸酯类增塑剂。仪器分析方法可以实现多残留检测,其优点是检测精确度高,但因其仪器化程度高、检测时间长、过程繁琐、检测费用昂贵等而阻碍其推广应用,通常是作为实验室的确证方法。

[0005] 酶联免疫分析(ELISA)快速检测技术因成本低、操作简单、速度快、一次检测样本

量大、仪器化程度低,值得我们推广成为常用的筛选方法。ELISA 免疫分析方法的基本原理是:使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化频率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。

[0006] 但是免疫分析方法多为单一酯类的检测,由于邻苯二甲酸酯种类繁多,且多个化合物同时被检测出来的现象十分普遍,但是同时检测所用的方法都为仪器分析法,因此,非常有必要建立可同时检测多个 PAEs 的多残留检测方法(multi-residues analysis)。目前国内外未有商品化的邻苯二甲酸酯 ELISA 检测试剂盒,有关邻苯二甲酸酯免疫分析技术(IA)的报道也极少,目前国内外主要集中在针对单一邻苯二甲酸酯建立特异性免疫检测方法研究,尚无检测邻苯二甲酸酯类总量的全抗原设计与抗体制备的相关研究。

[0007] 综上所述,目前国内外现有邻苯二甲酸酯类采用的仪器检测方法复杂、繁琐,很难应用于实际批量检测,且现有其他免疫分析检测方法无法实现多残留检测,严重影响了邻苯二甲酸酯类的检测与监控。因此研制稳定性高、操作简单、设备要求低、廉价且高度灵敏、低检测限的 ELISA 试剂盒,对于准确快速、高通量检测邻苯二甲酸酯类具有非常重要的经济和社会意义。

发明内容

[0008] 本发明要解决的技术问题是克服现有邻苯二甲酸酯类多残留检测的技术不足,提供一种高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单,能大批量快速检测邻苯二甲酸酯类总量的酶联免疫检测试剂盒。

[0009] 本发明的目的是提供一种邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒。

[0010] 本发明另一目的是提供所述试剂盒的应用和使用方法。

[0011] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

本发明提供了一种邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒,包括下列各组分:

- (1) 包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板;
- (2) 邻苯二甲酸抗体工作液;
- (3) 辣根过氧化物酶标记的二抗;
- (4) 邻苯二甲酸标准溶液;
- (5) 底物液;
- (6) 底物缓冲液;
- (7) 反应终止液;
- (8) 浓缩洗涤液。

[0012] 其中,所述的邻苯二甲酸抗原为半抗原 4-氨基邻苯二甲酸与 OVA 的偶联物,是使

用戊二醛法将邻苯二甲酸与卵清蛋白(OVA)共价偶联合成得到的；

包被邻苯二甲酸抗原的包被液优选为将 1.69g 碳酸钠和 2.95g 碳酸氢钠溶于 1L 双蒸水中得到,邻苯二甲酸抗原的包被浓度为 0.5mg/L;封闭液优选为取 0.1g 牛血清白蛋白(BSA)、5g 甘氨酸溶、5g 蔗糖于 100mL 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)得到。所述 PBS 溶液的浓度为 0.01mol/L, pH 值为 7.4, 配制方法为:准确称取 2.9g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.5g 的 NaCl、0.2g 的 KCl、0.2g 的 KH_2PO_4 , 用水定容至 1L, 灭菌。

[0013] 所述酶标板是 96 或 40 孔酶标板, 材质为聚苯乙烯, 包被有能与抗邻苯二甲酸抗体特异性结合的邻苯二甲酸抗原, 并封闭微孔表面未吸附邻苯二甲酸抗原的位点。

[0014] 另外, 可以作为固定邻苯二甲酸二丁酯抗原固相载体的物质较多, 例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。

[0015] 所述的邻苯二甲酸抗体为邻苯二甲酸单克隆抗体、兔多克隆抗体中的任意一种; 所述的邻苯二甲酸抗体为本实验室前期制备: 采用戊二醛法将邻苯二甲酸与牛血清白蛋白(BSA)共价偶联合成物免疫 SPF 级 Ba1b/c 鼠所得, 使用时优选为 T 液稀释 8000 倍; 所述 T 液的配方为: 称取 1.21g 的 Tris, 用 800mL 去离子水溶解, 用 1mol/L 盐酸溶液调节溶液到所需 pH 值, 用去离子水定容至 1L。

[0016] 所述的辣根过氧化物酶标记的二抗为辣根过氧化物酶标记的鼠二抗或兔二抗。

[0017] 所述的邻苯二甲酸标准溶液的浓度为 1mg/mL, 使用时用 PBS 溶液将标准溶液稀释成邻苯二甲酸标准品溶液; 具体是用 0.01mol/L、pH5.4 的 PBS 将标准溶液稀释成浓度为 0.0256 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.128 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.64 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、3.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的一系列邻苯二甲酸标准品溶液。

[0018] 所述底物液为含有 3,3,5,5-四甲基联苯胺(TMB)或邻苯二胺(OPD)的 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲溶液。

[0019] 所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲溶液。

[0020] 所述反应终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0021] 所述浓缩洗涤液为含有 0.5~1.5% (v/v) 吐温-20 的磷酸盐缓冲液; 所述浓缩洗涤液 pH 值为 7.4, 浓缩洗涤液浓度为 0.1mol/L。所述浓缩洗涤液使用时用去离子水稀释 15~25 倍。

[0022] 本发明所述包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板的制备方法为:

用包被液将邻苯二甲酸抗原按需要稀释, 向酶标板微孔中加入抗原稀释液, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境进行孵育, 再放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中过夜孵育(得到的酶标板的稳定性好), 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 然后在每孔中加入封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0023] 本发明还提供了所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒的使用方法, 包括如下步骤:

S1. 将试剂盒从冷藏环境中取出, 置于室温平衡;

S2. 将标准品或经过前处理的待测样品加入已经包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板孔内, 然后每孔加入抗体, 轻拍混匀, 孵育;

S3. 用洗涤液进行洗涤;

S4. 加入辣根过氧化物酶标记的二抗,轻拍混匀,孵育;

S5. 用洗涤液进行洗涤;

S6. 将底物缓冲液与底物液等体积混合得到显色液,在每孔加入显色液,轻拍混匀,避光孵育;

S7. 每孔加入反应终止液,混合均匀,在波长 450nm 或 492nm 下,以空气为空白,测定各孔吸光值;

S8. 检测结果处理与分析:

抑制率(%)= $B/B_0 \times 100$ (%),式中, B 为不同浓度邻苯二甲酸标准品孔或样品孔的发光值; B_0 为 0 $\mu\text{g/L}$ 浓度邻苯二甲酸标准溶液发光值;以抑制率为纵坐标,邻苯二甲酸浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定待测样品中邻苯二甲酸的含量。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与分析。

[0024] 其中,S1 所述的置于室温平衡是指在室温(20 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$)放置 30min 以上,使试剂盒的温度恢复至室温。

[0025] S2 所述的前处理是指将待测样品中的邻苯二甲酸酯类物质转化为邻苯二甲酸。

[0026] 优选地,步骤 S2 所述待测样品为食用油或酱油;

优选地,食用油或酱油样本的前处理方法如下:

S1. 称取样品 2.0g,放于回流瓶中,加入 10mL 甲醇混匀,再加 10mL 浓度为 2mol/L 的 KOH 溶液,于 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 2.5h,将甲醇蒸干,取出冷却至室温;

S2. 用体积浓度为 50% 的盐酸将水解液 pH 调为 1 ~ 2,漩涡震荡 3min 后,超声波震荡 20min;

S3. 加入 3 倍体积的正己烷,漩涡震荡 3min,静置 20min,弃去正己烷层,加入 3 倍体积的乙酸乙酯,漩涡震荡 3min,静置 20min,取乙酸乙酯层,剩余液体中再加入 3 倍体积的乙酸乙酯;

S4. 重复三次 S3 操作,将三次萃取液合并,于旋转蒸发器中蒸发至尽干;

S5. 甲醇复溶,用 0.01mol/L、pH5.4 的 PBS 稀释 15 ~ 20 倍后直接用于检测,在计算结果时应将稀释倍数计算在内。

[0027] 更具体地,所述邻苯二甲酸酯类总量 ELISA 酶联免疫检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

S1. 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温(20 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$)平衡 30min 以上,将足够标准品和待测样品使用数量的条板固定于支架,标准品和待测样品做两个平行实验,按顺序编号;

S2. 在标准品孔中加入 50 μL 不同浓度的邻苯二甲酸标准品,样品孔加入 50 μL 经过前处理的待测样品;然后每孔加入 50 μL 用 T 液稀释的抗体,盖上盖板膜在微量振荡器上振摇混匀,在室温孵育 30min;

S3. 倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每轮洗板拍打 3 次)以保证完全除去孔中的液体;用 300 μL 洗涤液充入孔中,再次倒掉微孔中的液体,再重复操作 5 遍;

S4. 每孔中加入 100 μL 用抗体稀释液 PBST (配方为 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、NaCl 8.5g、KCl 0.2g、 KH_2PO_4 0.2g,500 μL Tween-20,定容至 1L)稀释的酶标二抗,盖上盖板膜在微量振荡器上振摇混匀,室温孵育 30min;

S5. 重复步骤 S3 ;

S6. 每孔加入 100 μ L 显色液(底物缓冲液与底物液等体积混合得到),轻拍混匀,盖上盖板膜,暗处室温孵育 10min ;

S7. 加入 50 μ L 反应终止液到微孔中 ;混合后,在波长 450nm (以空气为空白)处测定各孔吸光值,必须在加入终止液后 60min 内读取吸光值 ;

S8. 检测结果计算与分析 :

抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%)

式中 :B 为不同浓度标准品孔(或样品孔)的发光值 ; B_0 为 0 μ g/L 标准溶液的平均吸光度值。以抑制率为纵坐标,邻苯二甲酸标准品溶液浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定待测样品中邻苯二甲酸的含量 ;

根据待测样品中邻苯二甲酸的含量,计算待测样品中邻苯二甲酸酯类总含量的计算公式如下 :

$$X = \frac{C * N}{166.13.m} \times V \times 10^{-6}$$

式中 :X 为待测样品中 PAEs 的总含量,单位为 mol/g ;

C 为 ELISA 检测得到的邻苯二甲酸的浓度,单位为 ng/mL ;

m 为待测样品的质量,单位为 g ;

N 为用 0.01mol/L、pH5.4 的 PBS 稀释待测样品的稀释倍数 ;

V 为复溶用甲醇体积,单位为 mL ;

166.13 为邻苯二甲酸的相对分子质量,单位为 g/mol。

[0028] 本发明所述抗原的制备方法具体如下 :

S1. 半抗原的合成 :以 4- 硝基邻苯二甲酸为原料,在钨碳催化下通入氢气(H_2)还原成 4- 氨基邻苯二甲酸即得半抗原 4-APA。

[0029] S2. 人工抗原的合成 :采用戊二醛法将上述得到的邻苯二甲酸半抗原分别与牛血清蛋白(BSA)或卵白蛋白(OVA)偶联制备人工抗原 4-APA-BSA 或 4-APA-OVA。

[0030] 本发明所述邻苯二甲酸单克隆抗体的制备方法具体如下 :

S1. 动物免疫 :以人工抗原(半抗原与载体蛋白偶联物)为免疫原对 Balb/c 小鼠进行间隔免疫,间接 ELISA 检测并得到血液里含有邻苯二甲酸特异性抗体的小鼠脾脏。

[0031] S2. 细胞融合与克隆 :取产生特异性抗体的 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP20 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 ;利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0032] S3. 细胞冻存和复苏 :取处于对数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 ;复苏时取出冻存管,立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中速融,离心后去除冻存液,移入培养瓶内培养。

[0033] S4. 单克隆抗体的制备与纯化 :采用体内诱生法,将 Balb/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,7 ~ 14 天后腹腔注射杂交瘤细胞,7 ~ 10 天后采集腹水 ;经辛酸-饱和硫酸胺法或亲和层析法进行腹水纯化,纯度经 SDS - PAGE 电泳鉴定,小瓶分装,-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0034] 本发明所述邻苯二甲酸兔多克隆抗体的制备方法具体如下 :

采用新西兰大白兔作为免疫动物,以半抗原 4- 氨基邻苯二甲酸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,经硫酸胺分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0035] 本发明设计检测的思路如下:

首先将邻苯二甲酸抗原包被于固相载体(酶标板)上,然后加入标样或预处理过的待测样品,再加入邻苯二甲酸抗体,孵育一段时间后,再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,包被抗原与待测样品中的邻苯二甲酸竞争抗体,待测样品邻苯二甲酸含量高时,则与固相抗原结合的抗体就少,反之结合在固相抗原上的抗体就多。酶标二抗与固相抗原结合的抗体结合,反应后加入底物进行显色加以测定,当抗体量一定时,加入的待测样品含邻苯二甲酸越多,与固相抗原结合的抗体就越少,发色反应减弱,百分吸光度值低,反之,则发色反应增强,百分吸光度增高,因而根据百分吸光度值与邻苯二甲酸浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线,再根据邻苯二甲酸的标准曲线和待检样品的百分吸光度值,即可推算出待测样品中邻苯二甲酸的浓度。

[0036] 本发明根据邻苯二甲酸酯类增塑剂水解后能得到共有物质邻苯二甲酸的设想,设计能够检测邻苯二甲酸总含量的试剂盒,从而计算出邻苯二甲酸酯类总量,通过邻苯二甲酸酯类总量的检测来反映食品是否受塑化剂污染以及污染的情况。待测样品中邻苯二甲酸总量的计算方法为:以邻苯二甲酸的吸光值代入标准曲线中求出待测液中邻苯二甲酸的含量;通过邻苯二甲酸的摩尔量计算样品中邻苯二甲酸酯类总摩尔量。

[0037] 待测样品(如食用油或酱油)中邻苯二甲酸酯类的总含量的计算公式如下:

$$X = \frac{C * N}{166.13 * m} * V * 10^{-6}$$

式中:X为待测样品中PAEs的总含量,单位为mol/g;

C为ELISA检测得到的邻苯二甲酸的浓度,单位为ng/mL;

m为待测样品的质量,单位为g;

N为用0.01mol/L、pH5.4的PBS稀释待测样品的稀释倍数;

V为复溶用甲醇体积,单位为mL;

166.13为邻苯二甲酸的相对分子质量,单位为g/mol。

[0038] 本发明具有以下有益效果:

与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

本发明提供的试剂盒采用间接竞争ELISA检测方法,采用的抗体特异性高、亲合力高,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与稳定性。

[0039] 另外,对样品进行简单的前处理,将酯类水解为邻苯二甲酸之后,可直接利用本发明试剂盒检测邻苯二甲酸的含量,根据公式即可计算出样品中邻苯二甲酸酯类总量。实验结果显示,本发明试剂盒对邻苯二甲酸酯类总量的最大检测范围为0.36~5.29ng/mL,灵敏度为1.38ng/mL,检出限为0.17ng/mL。

[0040] 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,且对设备要求低、成本低廉,非常适用于邻苯二甲酸酯类总量的痕量分析与批量检测,适合大量样品的筛查,具有重要的推广应用价值。

附图说明

[0041] 图 1 是邻苯二甲酸标准曲线图。

具体实施方式

[0042] 以下结合附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0043] 实施例中所使用试剂的制备方法如下:

包被液:将 1.69g 碳酸钠和 2.95g 碳酸氢钠溶于 1L 双蒸水中得到。

[0044] 封闭液:取 0.1gBSA (牛血清白蛋白)、5g 甘氨酸、5g 蔗糖于 100mLPBS (0.01mol/L, pH7.4) 溶液得到。

[0045] 浓缩洗涤液为含 0.5 ~ 1.5% (v/v) 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;浓缩洗涤液 pH 值为 7.4,浓缩洗涤液浓度为 0.1mol/L,使用时用去离子水稀释 15 ~ 25 倍。

[0046] 邻苯二甲酸标准溶液:用色谱级甲醇将邻苯二甲酸标准溶液稀释成 1mg/mL 备用,使用时用 0.01mol/L、pH5.4 的 PBS 将标准溶液稀释成浓度为 0.0256 μ g/L、0.128 μ g/L、0.64 μ g/L、3.2 μ g/L、16 μ g/L、80 μ g/L 的一系列邻苯二甲酸标准品溶液,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0047] 底物显色液:为含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)或邻苯二胺(OPD)的 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲溶液。

[0048] 底物缓冲液:为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲溶液。

[0049] 终止液:为 1 ~ 2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0050] 邻苯二甲酸单克隆抗体:实验室前期制得,见实施例 1 步骤(3)。

[0051] 辣根过氧化物酶标二抗:商品化试剂。

[0052] 实施例 1 半抗原、人工抗原的制备

1、半抗原的合成

(1)称取 0.845g (4mmol)4-硝基邻苯二甲酸和 1.8g 钯碳溶于 20mL 乙醇,缓慢通入氢气(H_2),常温下搅拌,反应 2h。

[0053] (2)反应结束后过滤,上清液旋转蒸发浓缩。

[0054] (3)用乙酸乙酯溶解后再次过滤,滤液减压蒸干后得到灰色固体(即半抗原 4-APA) 0.72g,产率 > 99%。

[0055] 2、人工抗原的合成

(1)取 0.0025mmol 的 BSA (或 OVA) 溶于 5mLPBS 中,再另取 0.1mmol 半抗原 4-APA 溶于 0.5mL 二甲基甲酰胺(DMF)中,并逐滴滴加至 PBS 中,称为 A 液;

(2)将体积浓度为 25% 的戊二醛用 PBS 稀释 10 倍后吸取 200 μ L,磁力搅拌下,逐滴缓慢加入 A 液中,滴加时间为 2h。4 $^{\circ}$ C 下反应 12h;

(3)装入透析袋,用 PBS 透析 3d,每天换水三次。分别得到免疫原 4-APA-BSA 及包被原 4-APA-OVA。

[0056] (4)分装于 0.5mL 离心管中,冻存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

[0057] 实施例 2 邻苯二甲酸单克隆抗体的制备

1、动物免疫

(1)本实施例选用 4 只 7 周龄,健康的雌性 SPF 级 Balb/c 小鼠(购自广东省医学实验动物中心),分别编号;用实施例 1 制备得到的免疫原 4-APA-BSA 进行免疫。

[0058] (2)首次免疫:以 4-APA-BSA 为免疫原,免疫剂量为 50 μ g/只,将免疫原用生理盐水稀释至 1mg/mL(以蛋白浓度计),加等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,采用腹部多点免疫。

[0059] (3)加强免疫:间隔三周后取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂乳化,加强免疫一次,重复四次免疫之后,腹腔加强免疫一次,3 天后取脾细胞。

[0060] (4)细胞融合与克隆化:取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用显微克隆法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0061] (5)细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液(配方为 1mL 二甲基亚砷(DMSO),9mLRPMI-1640 培养基)制成 5 \times 10⁶个/mL 的细胞悬液,分装于冻存管,在-70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0062] (6)单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 Balb/c 小鼠(8 周龄)腹腔注射杂交瘤细胞 5 \times 10⁶个/只,14 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸胺法进行腹水纯化,并用紫外分光光度法测定抗体浓度,小瓶分装,-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0063] 实施例 3 本发明酶联免疫检测试剂盒组分的配制

1、试剂盒的组成

(1)包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板:96 孔可拆酶标板,已包被邻苯二甲酸抗原及封闭液,邻苯二甲酸抗原为 4-APA-OVA(邻苯二甲酸与 OVA 偶联物),包被浓度为 0.5mg/L。

[0064] 酶标板微孔板的包被:包被抗原用包被液稀释至 0.5mg/L,每孔内加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,倾去孔内液体,洗涤液洗涤 2 次,拍干。然后每孔中加入 120 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育 3h 后,倾去孔内液体,置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱中烘干,用铝箔袋真空密封,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0065] (2)邻苯二甲酸标准溶液:准确称取邻苯二甲酸标准样品用色谱级甲醇稀释成 1mg/mL;使用时用 0.01mol/L、pH5.4 的 PBS 缓冲液分别配制成 0.0256 μ g/L、0.128 μ g/L、0.64 μ g/L、3.2 μ g/L、16 μ g/L、80 μ g/L 邻苯二甲酸标准品溶液,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0066] (3)辣根过氧化物酶标记的二抗,用 pH7.4、0.01mol/L 的 PBST 缓冲液(配方为:称取 8.5g 的 NaCl,2.9g 的 Na₂HPO₄·12H₂O,0.2g 的 KCl,0.2g 的 KH₂PO₄,500 μ L 吐温 20,再用去离子水定容至 1L)稀释;工作浓度为 1:5000。

[0067] (4)邻苯二甲酸单克隆抗体 3mg/mL,使用时用 T 液(配方为 1.21g 的 Tris,用 800mL 去离子水溶解;用 1mol/L 盐酸溶液调节溶液到所需 pH 值;用去离子水定容至 1L)稀释,工作浓度为 1:8000。

[0068] (5)底物缓冲液:30%过氧化氢 30 μ L 溶于 19mL 的 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲液(配方为 25.7mL 0.2M 的 Na₂HPO₄,24.3mL 0.1M 的柠檬酸,加蒸馏水 50mL)中,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0069] (6)底物液:将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)80mg 溶于 10mL pH5.0 的磷酸柠檬酸缓冲液中,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0070] (7)浓缩洗涤液为含 0.5~1.5%(v/v)吐温-20 的磷酸盐缓冲液(pH7.4,0.1mol/L),所述浓缩洗涤液 pH 值为 7.4,浓缩洗涤液浓度为 0.1mol/L;

所述浓缩洗涤液使用时用去离子水稀释 15~25 倍。

[0071] (8) 反应终止液:为 1 ~ 2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0072] 2、试剂分装:上述各种试剂按要求配制,测定合格后无菌分装。邻苯二甲酸单克隆抗体工作液 7mL/ 瓶,辣根过氧化物酶标二抗 7mL/ 瓶,邻苯二甲酸标准溶液 1mL/ 瓶,底物液 7mL/ 瓶,底物缓冲液 7mL/ 瓶,反应终止液 7mL/ 瓶,浓缩洗涤液 50mL/ 瓶。分装后贴标签,注明批号和有效期,4℃ 保存。

[0073] 3、试剂盒的组装:分别将包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板 1 块和邻苯二甲酸抗体工作液、辣根过氧化物酶标二抗、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液各 1 瓶,邻苯二甲酸标准溶液 6 瓶,使用说明书 1 份,置于试剂盒内指定位置,试剂盒检验合格后封装,4℃ 保存。

[0074] 实施例 4 本发明酶联免疫检测试剂盒的应用

1、样品前处理

酱油和食用油样本处理:称取样品 2.0g,放于回流瓶中,加入 10mL 甲醇混匀,再加 10mL 浓度为 2mol/L 的 KOH 溶液,于 85℃ 水浴加热 2.5h,最后将甲醇蒸干,取出冷却至室温。用 1:1 盐酸将水解液 PH 调为 1 ~ 2,漩涡震荡 3min 后,超声波震荡 20min。加入 3 倍体积的正己烷,漩涡震荡 3min,静置 20min,弃去正己烷层,加入 3 倍体积的乙酸乙酯,漩涡震荡 3min,静置 20min,取乙酸乙酯层,剩余液体中再加入 3 倍体积的乙酸乙酯,重复上述操作,将三次萃取液合并,于旋转蒸发器中蒸发至尽干。甲醇复溶,用 0.01mol/L、pH5.4 的 PBS 稀释 15 ~ 20 倍后直接用于检测,在计算结果时应将稀释倍数计算在内。

[0075] 2、利用本发明试剂盒进行检测

(1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温(20 ~ 24℃)平衡 30min 以上,将足够标准品和待测样品使用数量的条板固定于支架,标准品和待测样品做两个平行实验,按顺序编号。

[0076] (2) 在标准品孔加入 50μL 不同浓度的邻苯二甲酸标准品,样品孔加入 50μL 经过前处理的待测样品。然后每孔加入 50μL 用 T 液稀释的抗体,盖上盖板膜在微量振荡器上振摇混匀,在室温孵育 30min。

[0077] (3) 倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每轮洗板拍打 3 次)以保证完全除去孔中的液体。用 300μL 洗涤液充入孔中,再次倒掉微孔中的液体,再重复操作 5 遍。

[0078] (4) 每孔中加入 100μL 用 PBST 稀释的酶标二抗,盖上盖板膜在微量振荡器上振摇混匀,在室温孵育 30min。

[0079] (5) 重复步骤(3)。

[0080] (6) 每孔加入 100μL 显色液(底物缓冲液与底物液等体积混合得到),轻拍混匀,盖上盖板膜,暗处室温孵育 10min。

[0081] (7) 加入 50μL 反应终止液到微孔中,混合后,在波长 450nm (以空气为空白)处测定各孔吸光值,必须在加入终止液后 60min 内读取吸光值。

[0082] 3、检测结果计算与分析

抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}(\%) = B/B_0 \times 100(\%)$$

式中:B 为不同浓度标准溶液孔(或样品孔)的发光值;B₀ 为 0μg/L 标准溶液的平均吸光度值。以抑制率为纵坐标,邻苯二甲酸标准品溶液浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而

确定待测样品中邻苯二甲酸的含量。检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析。

[0083] 4、检测结果

(1)通过对标准品的检测结果分析得到邻苯二甲酸标准曲线图(如附图1所示),表明了本发明试剂盒对邻苯二甲酸线性检测范围为0.36~5.29ng/mL,灵敏度为1.38ng/mL,检出限为0.17ng/mL。

[0084] (2)以邻苯二甲酸的吸光值代入上述标准曲线中求出待测样品中邻苯二甲酸的含量。

[0085] 结果显示,样品酱油中的邻苯二甲酸含量为1.2ng/mL。样品食用油中的邻苯二甲酸含量为3.2ng/mL。

[0086] 5、待测样品中邻苯二甲酸酯类总量的计算

(1)计算方法

以邻苯二甲酸的吸光值代入上述标准曲线中求出待测样品中邻苯二甲酸的含量;通过邻苯二甲酸的摩尔量计算样品中邻苯二甲酸酯类总摩尔量。

[0087] 待测样品(如食用油或酱油)中邻苯二甲酸酯类的总含量的计算公式如下:

$$X = \frac{C * N}{166.13 * m} * V * 10^{-6}$$

式中:X为待测样品中PAEs的总含量,单位为mol/g;

C为ELISA检测得到的邻苯二甲酸的浓度,单位为ng/mL;

m为待测样品的质量,单位为g;

N为用0.01mol/L、pH5.4的PBS稀释待测样品的稀释倍数;

V为复溶用甲醇体积,单位为mL;

166.13为邻苯二甲酸的相对分子质量,单位为g/mol。

[0088] (2)计算结果显示,样品酱油中的邻苯二甲酸酯类总量为 1.44×10^{-7} mol/g。样品食用油中的邻苯二甲酸酯类总量为 3.85×10^{-7} mol/g。

[0089] 实施例5 本发明酶联免疫检测试剂盒精密度与准确度试验

1、邻苯二甲酸标准品溶液的重复性试验

从3批按照实施例3中的方法制备的酶标板中,各抽出20个微孔,按照实施例4试剂盒的检测方法测定1 μ g/L邻苯二甲酸标准溶液的发光值,重复20次,计算变异系数CV%,结果如表1所示。

[0090] 表1 邻苯二甲酸标准品溶液重复性试验

样品	浓度 μ g/L	第1批	第2批	第3批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准溶液	1	6.7	7.1	5.4	7.8

结果表明,本发明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在5.4~7.1%之间,批间变异系数为7.8%。

[0091] 2、待测样品重复性与准确度试验

准确度是指测得值与真值的符合程度,在酶联免疫测定中,准确度常以回收率表示,精密度常以变异系数来表示。在空白样品中,添加邻苯二甲酸至终浓度为 1、2、4 $\mu\text{g/L}$,每个浓度各 10 个平行,测定 3 批。计算平均值、添加回收率、批内变异系数、批间变异系数。结果如表 2 所示。

[0092] 表 2 样本重复性与准确度试验结果

样品	添加浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批			第 2 批			第 3 批			批间	
		含量	回收率%	CV%	含量	回收率%	CV%	含量	回收率%	CV%	CV%	
食用油	1	0.89	89	7.3	1.04	104	6.1	0.96	96	6.5	9.7	
	2	1.84	92	5.7	1.93	96.5	4.7	2.01	100.5	5.8	7.6	
	4	4.02	101	6.9	3.46	86.5	7.4	3.79	94.5	7.9	9.8	
酱油	1	1.09	109	5.8	0.91	91	8.3	0.87	87	3.8	9.6	
	2	1.78	89	6.4	1.98	99	4.6	1.62	81	7.9	8.4	
	4	3.82	95.5	8.9	4.12	103	5.4	3.64	91	6.1	10.8	

结果表明,食用油、酱油样本的添加回收率在 81 ~ 109% 之间,批内变异系数在 3.8 ~ 8.9% 之间,批间变异系数在 7.6 ~ 10.8% 之间。

[0093] 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与准确度,且符合国家对于试剂盒各类指标的标准。

[0094] 实施例 6 本发明酶联免疫检测试剂盒保存期试验

1、将实施例 3 制备的试剂盒放置于 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$,分别取存放 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月后的试剂盒,对邻苯二甲酸标准样品(1 $\mu\text{g/L}$)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。

[0095] 2、将试剂盒在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存的条件下放置 12 天,每天对邻苯二甲酸标准样品(1 $\mu\text{g/L}$)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。

[0096] 3、将试剂盒在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 12 天,每天对邻苯二甲酸标准样品(1 $\mu\text{g/L}$)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。

[0097] 4、结果表明,经过三种条件保存试验,邻苯二甲酸标准样品(1 $\mu\text{g/L}$)的吸光度值下降小于 8%,各项指标均符合质量要求,因此,试剂盒可以在 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存 12 个月。

[0098] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

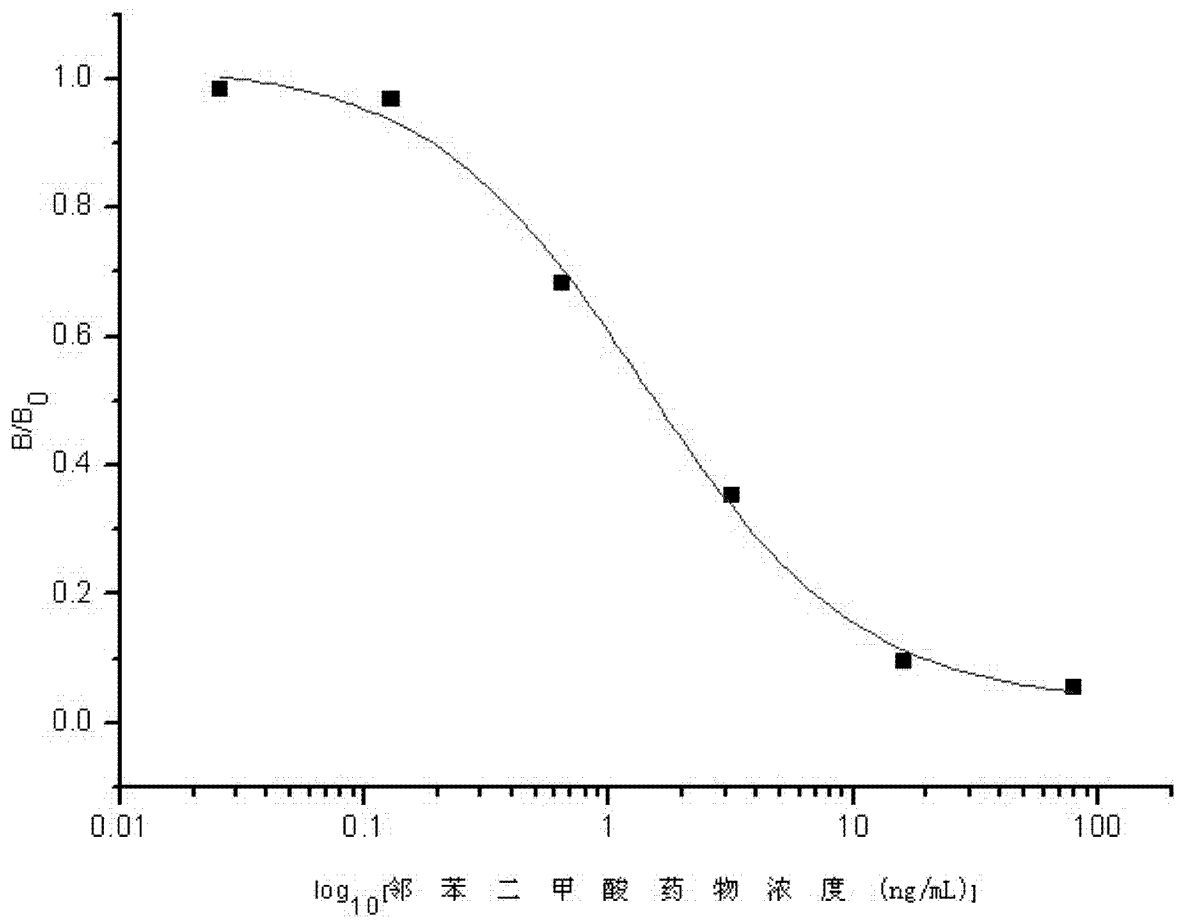


图 1

专利名称(译)	邻苯二甲酸酯类总量ELISA酶联免疫检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN103698504A	公开(公告)日	2014-04-02
申请号	CN201310752662.X	申请日	2013-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	柳春红 孙远明 沈玉栋 杨金易 羿利华 雷红涛 徐振林 王弘 肖治理		
发明人	柳春红 孙远明 沈玉栋 杨金易 羿利华 雷红涛 徐振林 王弘 肖治理		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/53		
代理人(译)	任重		
其他公开文献	CN103698504B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种邻苯二甲酸酯类总量ELISA酶联免疫检测试剂盒及其使用方法，属于酶联免疫检测技术领域。所述试剂盒包括如下组分：包被有邻苯二甲酸抗原的酶标板、邻苯二甲酸抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的二抗、邻苯二甲酸标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液。本发明同时公开了利用所述试剂盒检测样品中邻苯二甲酸酯类总量的方法，样品经过前处理后，利用试剂盒进行检测，对检测结果进行处理，分析出样品中邻苯二甲酸酯类总量。本发明提供的检测邻苯二甲酸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。

