



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103822913 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410066333. 4

G01N 33/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 02. 26

(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 杨金易 沈玉栋 孙远明 柳春红
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 21/76 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

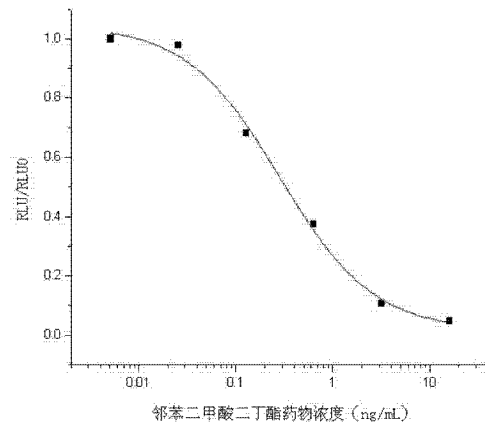
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

邻苯二甲酸二丁酯化学发光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二丁酯的化学发光酶联免疫试剂盒及其使用方法。该试剂盒包括包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的化学发光酶标板、辣根过氧化物酶标记的邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体、邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液、化学发光液、浓缩洗涤液。本发明还公开了利用所述试剂盒检测邻苯二甲酸二丁酯残留的方法。本发明提供的检测邻苯二甲酸二丁酯的试剂盒采用直接竞争化学发光酶联免疫吸附分析技术,最大检测范围为 0. 075 ~ 1. 52ng/mL,灵敏度为 0. 286ng/mL,检出限为 0. 039ng/mL,回收率为 79. 2 ~ 110. 6%,检出限低、灵敏度高、稳定性好,成本低,非常适合大量样品的筛查,具有重要的实际应用推广意义。



1. 一种邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,包含以下成分:

- (1) 包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的化学发光酶标板;
- (2) 邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体;
- (3) 邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液;
- (4) 化学发光液;
- (5) 浓缩洗涤液;

所述的邻苯二甲酸二丁酯抗原为 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯与卵清蛋白的偶联物。

2. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体或辣根过氧化物酶标记的免多克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液的浓度为 1mg/mL,使用时用磷酸盐吐温缓冲液将标准品溶液稀释成不同浓度的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液。

4. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光液由 A 液和 B 液组成;

A 液的配方为:将对碘苯酚、鲁米诺、Tris 溶于去离子水,用盐酸调 pH 至 8.2 ~ 8.6 得到;

B 液的配方为:将体积分数 0.40% 的 H_2O_2 、Tris 溶于去离子水,用盐酸调 pH 至 6.8 ~ 7.2 得到;

使用时将 A 液和 B 液按体积比 1:1 的比例混合。

5. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述浓缩洗涤液为含有体积浓度 0.5% Tween-20 的 pH7.4 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液为 20 倍浓缩洗涤液,使用时用去离子水稀释成 1 倍洗涤液。

6. 根据权利要求 3 所述邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述磷酸盐吐温缓冲液的浓度为 0.01mol/L, pH5.4。

7. 权利要求 1 ~ 6 任一所述的邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包含如下步骤:

S1. 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于 15 ~ 35°C 平衡 30 min ~ 45min;

S2. 取出化学发光酶标板,往标准孔中加入不同浓度的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液,样品孔中加入待测样品,然后每孔加入邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体,盖上盖板膜振摇混匀,孵育;

S3. 吸除板孔中的反应液,用洗涤液进行洗涤,将酶标板拍干;

S4. 每孔加入化学发光液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1 ~ 2min 后测定各孔的发光值 RLU;

S5. 检测结果的计算与分析:确定样品中邻苯二甲酸二丁酯的含量。

8. 根据权利要求 7 所述的邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于 S2 所述的待测样品为酱油、果汁或白酒。

邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学发光酶联免疫检测技术领域。更具体地,涉及一种邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate, DBP)是聚氯乙烯最常用的增塑剂,可使制品具有良好的柔软性、稳定性、耐挠曲性、黏结性和防水性均优于其他增塑剂,因此广泛存在于食品包装、化妆品、医疗器材以及环境水体中。

[0003] 邻苯二甲酸二丁酯长期以来被认为是无害物质,但近年来研究发现,邻苯二甲酸二丁酯作为重要的环境化学污染物对生殖系统、内分泌系统、神经系统等存在毒性效应,对神经系统的主要毒性效应机制可能是:直接损伤神经细胞,致使细胞膜损伤;降低脂质过氧化物酶得活性,产生氧化应激反应;干扰神经细胞的代谢和诱导其细胞凋亡。由于神经的损失是不可逆的,这样的威胁引起了人们的高度关注;而且大量的生产加工使其在环境中分布广泛,不易清除,且邻苯二甲酸二丁酯能通过多种暴露途径,如食物、室内空气、饮用水、化妆品等进入人体,形成富集。因此对邻苯二甲酸二丁酯的检测及治理研究也尤其迫切和重要。

[0004] 1977年美国国家环保局(EPA)将DEHP、DOP、BBP、DBP、DEP、DMP 6种PAEs化合物列为优先控制的有毒污染物。2013年9月中国出口韩国食品中邻苯二甲酸二丁酯含量超标,2012年11月某知名高端酒的检测报告显示,酒中共检测出3种塑化剂成分。其中,邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的含量为1.08mg/kg,超标达260%。各种塑化剂风波加重了民众对塑化剂的恐惧,建立一种快速、有效的检测方法显得尤为重要。

[0005] 邻苯二甲酸二丁酯的检测最常使用的方法为仪器分析法,颜流水(分析实验室,2007)等人用固相萃取-液质联用法对饮用水中邻苯二甲酸二丁酯进行检测,检出限可以达到0.1ng/L,王少杰(山东农业科学,2012)等人采用高效液相色谱法检测蔬菜中邻苯二甲酸二丁酯的含量,方法的检出限达到0.025 μ g/mL,努那帕(东华大学,2011)建立荧光定量PCR的方法对邻苯二甲酸二丁酯浓度进行检测,该方法的检测下限可达8.439pg/L。行标SN/T3147-2012中采用气质联用(GC-MS)方法对出口食品中的邻苯二甲酸酯类进行检测,该方法对邻苯二甲酸二丁酯的定量限为0.1mg/kg。上述几种方法中均需要使用价格昂贵的仪器,虽然上述几种仪器分析法的检测精确度高,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,从而阻碍了其推广应用,因而通常作为实验室确证方法,但是无法满足现场或者大批量的快速筛查检测。而免疫分析法因成本低、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。目前关于邻苯二甲酸二丁酯的免疫分析方法也有报道,申请号为CN201210010889.2的专利对邻苯二甲酸二丁酯的检测采用胶体金免疫试纸的方法进行了描述,申请号为CN201220694025.2的专利公开了一种检测邻苯二甲酸二丁酯的化学发光试剂盒,采用酶标抗原和磁标抗体的免疫反应模

式,但是均存在灵敏度不够好、检测限不够低的缺陷,仍然满足不了许多邻苯二甲酸二丁酯含量不是特别高的环境及农产品的检测。另外,申请号为CN201220694102.4的专利对检测邻苯二甲酸二丁酯采用间接ELISA试剂盒的方法进行了描述,但存在操作时间长,灵敏度不够高的缺点。

[0006] 研制稳定性高、操作简单、设备要求低、廉价的CLIA试剂盒对于准确快速、高通量检测邻苯二甲酸二丁酯类具有非常重要的经济和社会意义。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是克服现有邻苯二甲酸二丁酯类检测技术的缺陷和不足,提供一种准确、灵敏、快速、能够高通量检测邻苯二甲酸二丁酯类的方法。

[0008] 本发明目的是提供一种邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒。

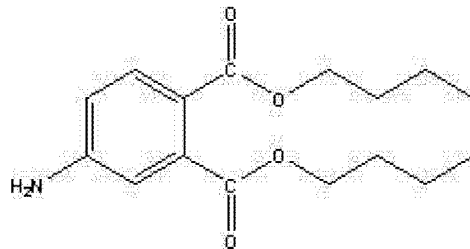
[0009] 本发明另一目的是提供所述试剂盒的应用和使用方法。

[0010] 本发明上述目的通过以下技术方案予以实现:

本发明提供了一种邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒,包含以下成分:

- (1) 包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的化学发光酶标板;
- (2) 邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体;
- (3) 邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液;
- (4) 化学发光液;
- (5) 浓缩洗涤液;

其中,所述的邻苯二甲酸二丁酯抗原是4-氨基邻苯二甲酸二丁酯与卵清蛋白(OVA)共价偶联合成得到的偶联物;而4-氨基邻苯二甲酸二丁酯是以邻苯二甲酸和正丁醇为原料通过重氮化法合成得到的,4-氨基邻苯二甲酸二丁酯的结构式如式(I)所示:



式(I)。

[0011] 本发明选择使用4-氨基邻苯二甲酸二丁酯作为半抗原与载体蛋白偶联,结合酶联免疫方法用来检测邻苯二甲酸二丁酯,现有技术中未曾使用过该半抗原,其效果突出可见。原因在于:不同的抗原及其检测体系对于检测的灵敏度是至关重要的,差别也是非常大的。

[0012] 所述包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的化学发光酶标板是96孔或40孔可拆不透明酶标板,材质为聚苯乙烯,包被有能与抗邻苯二甲酸二丁酯抗体特异性结合的邻苯二甲酸二丁酯抗原,并封闭微孔表面未吸附邻苯二甲酸二丁酯抗原的位点。

[0013] 所述包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的化学发光酶标板的制备方法为:用包被液将邻苯二甲酸二丁酯抗原按需要稀释,向发光板微孔中加入包被液,放入37℃环境进行孵育过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤,然后在每孔中加入封闭液,37℃孵育,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[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] 包被邻苯二甲酸二丁酯抗原的包被液优选为按比例将 1.69g 碳酸钠和 2.95g 碳酸氢钠溶于 1L 双蒸水中得到,邻苯二甲酸二丁酯抗原的包被浓度为 0.05 mg/L;封闭液优选为取 0.1g BSA (牛血清白蛋白)、5g 甘氨酸、5g 蔗糖溶于 100mL PBS (0.01mol/L pH7.4) 溶液得到。

[0016] 所述的邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体或辣根过氧化物酶标记的兔多克隆抗体;

所述的邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体为本实验室制备,制备方法如下:

(1) 所用的免疫原为采用重氮化法将邻苯二甲酸二丁酯半抗原与载体蛋白共价偶联合成得到,以免疫原免疫兔子或小鼠,制备邻苯二甲酸二丁酯多克隆抗体、利用杂交瘤技术制备邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体,最后收集抗血清、腹水,用辛酸硫酸铵沉淀纯化或过亲和层析柱进行纯化得到邻苯二甲酸二丁酯抗体;

(2) 采用戊二醛法将标记酶与邻苯二甲酸二丁酯抗体进行偶联;所用标记酶为辣根过氧化物酶,原浓度为 1mg/mL,辣根过氧化物酶优选使用浓度为 0.01 mol/L (用磷酸盐吐温缓冲液稀释 5000 倍)。

[0017] 所述邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液的浓度为 1mg/mL,使用时用 0.01mol/L pH5.4 的磷酸盐吐温缓冲液(PBST) 将标准品溶液稀释成浓度为 0.0 μ g/L、0.00512 μ g/L、0.0256 μ g/L、0.128 μ g/L、0.64 μ g/L、3.2 μ g/L、16 μ g/L 的一系列邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液;

所述磷酸盐吐温缓冲液(PBST)的配方为:NaH₂PO₄·12H₂O 2.9g、NaCl 8.5g、KCl 0.2g、KH₂PO₄ 0.2g、500 μ l Tween-20,定容至 1L。

[0018] 所述化学发光液由 A 液和 B 液组成;

A 液的配制方法为:将对碘苯酚、鲁米诺、Tris 溶于去离子水,用盐酸调 pH 至 8.2~8.6 得到;优选为调 pH 至 8.4;

B 液的配制方法为:将体积分数 0.40% 的 H₂O₂ Tris 溶于去离子水,用盐酸调 pH 至 6.8~7.2 得到;优选为调 pH 至 7.0;

使用时将 A 液和 B 液按体积比 1:1 的比例混合。

[0019] 所述浓缩洗涤液为含有体积浓度 0.5% Tween20 的 pH7.4 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液为 20 倍浓缩洗涤液,使用时用去离子水稀释成 1 倍洗涤液。

[0020] 本发明还提供了上述邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,包含如下步骤:

(1) 将试剂盒置于 15~35 $^{\circ}$ C 平衡 30 min~45min;

(2) 取出化学发光酶标板,往标准孔中加入不同浓度的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液,样品孔中加入待测样品,然后每孔加入邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体,盖上盖板膜振摇混匀,孵育;

(3) 吸除板孔中的反应液,加入洗涤液进行洗涤后,将酶标板拍干;

(4) 每孔加入化学发光液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1~2min 后用化学发光免疫分析仪

测定各孔的发光值 RLU；

(5) 检测结果的计算与分析：

抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%)，式中：B 为不同浓度邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液孔或待测样品孔的发光值； B_0 为 0 浓度邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液发光值；

以抑制率为纵坐标，邻苯二甲酸二丁酯浓度的对数为横坐标绘制标准曲线，从而确定样品中邻苯二甲酸二丁酯的含量。

[0021] 其中，步骤(2)中所述待测样品为酱油、果汁、白酒等；

待测样品前处理方法如下：

酱油样本处理：称取样品 2.0g，放于玻璃离心管中，加 10mL 乙腈，涡旋 2min，4000r/min 离心 10min，取上清液于梨形瓶，加 5mL 乙腈重复提取一次，合并上清液，于旋转蒸发器中蒸发至干，甲醇复溶用于分析。

[0022] 果汁样本处理：取适量样品 4000r/min 离心 10min，称取样品 2g 至具塞玻璃管，加入 2mL 乙腈，涡旋 2min，静置 10min，取上清液，于旋转蒸发器中蒸发至尽干，甲醇复溶用于分析。

[0023] 白酒样本处理：取适量样品，氮吹至干，甲醇复溶用于分析。

[0024] 更具体地，本发明提供了一个邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒的具体实施方式，包含如下步骤：

(1) 将试剂盒置于室温平衡 30 min 以上，用 0.01 mol/L pH5.4 的 PBST 缓冲液(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)将邻苯二甲酸二丁酯标准品稀释成浓度分别为 0.0 $\mu\text{g/L}$ 、0.00512 $\mu\text{g/L}$ 、0.0256 $\mu\text{g/L}$ 、0.128 $\mu\text{g/L}$ 、0.64 $\mu\text{g/L}$ 、3.2 $\mu\text{g/L}$ 、16 $\mu\text{g/L}$ 的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液；

(2) 取出化学发光酶标板，在标准孔加入 50 μL 不同浓度的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液，样品孔加入 50 μL 待测样品，然后每孔加入 50 μL 稀释好的邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体，盖上盖板膜在微量振荡器上振摇 10 min 后，置于 37°C 孵育 30 min；

(3) 吸除板孔中的反应液，各孔加入洗涤液约 300 μL ，静置 20 秒左右，除去其中液体，如此共洗 5 次，最后一次将板拍干；也可用自动洗板机洗板 5 次，洗完后将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体；

(4) 每孔加入 100 μL A 液与 B 液等体积混合后的化学发光液，轻拍混匀，盖上盖板膜，1 ~ 2min 后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值 RLU，保存数据；

(5) 检测结果计算与分析：

抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%)，

式中：B 为不同浓度邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液孔或待测样品孔的发光值； B_0 为 0 浓度邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液发光值；以抑制率为纵坐标，邻苯二甲酸二丁酯浓度的对数为横坐标绘制标准曲线，从而确定样品中邻苯二甲酸二丁酯的含量。

[0025] 本发明方法应用以下原理：

本文采用直接竞争化学发光酶联免疫法(dc-CLIA)，设计了使用该方法检测邻苯二甲酸二丁酯的试剂盒，不仅弥补了现有技术的缺点，同时填补了检测邻苯二甲酸二丁酯在化学发光检测领域的空白。

[0026] 首先将邻苯二甲酸二丁酯抗原包被于固相载体(化学发光酶标板)上，然后加入标

准品溶液或待测样品,再加入酶标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体,包被抗原与待测样品中的邻苯二甲酸二丁酯竞争酶标抗体,待测样品邻苯二甲酸二丁酯含量高时,则与固相抗原结合的酶标抗体就少,反之结合在固相抗原上的酶标抗体就多,反应后加入发光液加以测定,当酶标抗体量一定时,加入的待测样品含邻苯二甲酸二丁酯越多,与固相抗原结合酶标抗体就越少,发光反应减弱,百分发光值低,反之,则发光反应增强,百分发光值增高,因而根据百分发光值与邻苯二甲酸二丁酯浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线,再根据邻苯二甲酸二丁酯的标准曲线和待检样品的百分发光值,即可计算出待测样品中邻苯二甲酸二丁酯的浓度。

[0027] 化学发光免疫分析是将化学发光体系与免疫反应相结合,用于检测微量抗原或抗体的一种新型标记免疫测定技术。其检测原理是:(1)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。(2)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。(3)洗涤后加入发光底物,酶促使发光底物发光,通过专用的仪器检测光子的数量,从而反算出未知抗原或抗体的浓度。此方法的突出优点表现为灵敏度高,线性动力学范围宽,光信号持续时间长,分析方法简便快速,结果稳定、误差小,安全性好且使用期长。发光检测仪比吸收光谱仪灵敏 100,000 倍,比荧光仪至少灵敏 1,000 倍。相比 ELISA 免疫分析方法,检测限至少低一个数量级,因此更灵敏。相比仪器分析方法的优势表现在:能实现大批量检测,且更经济、省时。

[0028] 本领域公知,酶联免疫检测方法的关键在于抗原和抗体的设计与选择,以及灵敏度的高低,而灵敏度受检测过程中的每一个环节的制约,如何设计合适的抗原和抗体及其制备方法,如何选择检测方法及协调每一步骤从而达到最优效果,是酶联免疫检测方法建立的技术难题所在,本发明为了克服现有技术的缺陷,针对邻苯二甲酸二丁酯,通过大量的探索和研究,总结出一套优化的邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测方法,并制备成试剂盒予以推广。本发明所述邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒的最大检测范围为 0.075 ~ 1.52 ng/mL,灵敏度为 0.286 ng/mL,检出限为 0.039ng/mL。

[0029] 本发明具有以下有益效果:

本发明提供了一种邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒及其使用方法,选择使用 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯作为半抗原与载体蛋白偶联,结合酶联免疫方法来检测邻苯二甲酸二丁酯,现有技术中未曾使用过该半抗原,其效果突出可见。原因在于:不同的抗原及其检测体系对于检测的灵敏度是至关重要的,差别也是非常大的。

[0030] 该试剂盒克服了现有检测邻苯二甲酸二丁酯技术的缺陷和步骤,对邻苯二甲酸二丁酯的最大检测范围为 0.075 ~ 1.52 ng/mL,灵敏度为 0.286 ng/mL,检出限为 0.039ng/mL,回收率为 79.2 ~ 110.6%。该试剂盒检测快速、大大缩短了检测时间,不考虑检测人员操作熟练程度的影响,整个检测过程仅仅需要 70min 左右即可完成,且检出限更低、灵敏度更高。同时,采用包被抗原的包被板大大提升了试剂盒的稳定性和精密度,检测更稳定、更准确。

[0031] 另外,本发明所述试剂盒采用化学发光方法,不使用浓硫酸等有强腐蚀性的试剂、以及有强致癌性的底物,更加环保安全。且操作简单、成本低,非常适合大量样品或现场筛查,具有重要的实际应用推广意义。

附图说明

- [0032] 图 1 为半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯核磁(NMR)谱图。
[0033] 图 2 为人工抗原紫外全波长扫描图。
[0034] 图 3 为邻苯二甲酸二丁酯标准曲线。

具体实施方式

[0035] 以下结合说明书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、设备和方法为本技术领域常规试剂、设备和方法。

[0036] 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。

[0037] 20 倍浓缩洗涤液:包含有体积分数 0.5% Tween20 的 pH7.4 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释成 1 倍。

[0038] 封闭液:取 0.1g BSA (牛血清白蛋白)、5g 甘氨酸、5g 蔗糖溶于 100mL PBS 溶液(0.01mol/L pH7.4)得到。

[0039] 邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液:用色谱级甲醇将邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液稀释成 1mg/mL 备用;再用 0.01 mol/L pH5.4 的 PBST 稀释为浓度分别为 0.0 μ g/L、0.00512 μ g/L、0.0256 μ g/L、0.128 μ g/L、0.64 μ g/L、3.2 μ g/L、16 μ g/L 的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0040] 化学发光液:化学发光液由 A 液和 B 液组成,A 液为将 20mg 对碘苯酚、8mg 鲁米诺、1.21g Tris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 8.2 ~ 8.6 得到;B 液为将体积分数 0.40% 的 H₂O₂、1.21g 的 Tris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 6.8 ~ 7.2 得到;使用时将 A 液和 B 液按体积比 1:1 的比例混合。

[0041] 邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体(2.5mg/mL):实验室前期制备,见实施例 1 步骤(3)。

[0042] 辣根过氧化酶标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体(1mg/mL):实验室前期制备,见实施例 1 步骤(5)。

[0043] 实施例 1 半抗原、人工抗原及抗体的制备

1、半抗原的合成

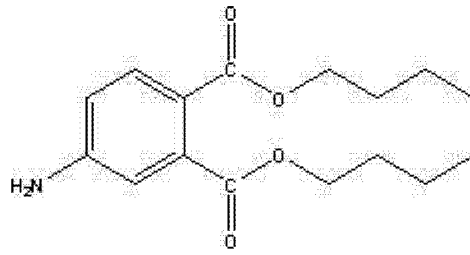
(1) 装反应柱:在 50mL 圆底烧瓶中加入 0.5481g 的 4-氨基邻苯二甲酸,加入 12mL 正丁醇,在搅拌的状态下加入 4mL 氯化亚砷,回流反应 8h。

[0044] (2) 萃取:用饱和 Na₂CO₃ 洗(摇匀静置),将反应液调碱。再用饱和食盐水和乙酸乙酯进行萃取纯化,点板证实目标物在有机相,弃去水相。对有机相加无水硫酸钠以去除水,过滤。

[0045] (3) 旋转蒸发:对过滤后的滤液进行旋转蒸发以除去有机相。旋转蒸发后的液体在石油醚:乙酸乙酯=4:1.5 的展开剂中跑板显示有两个点,证明有两种物质,进行过柱纯化。

[0046] (4) 过柱纯化:对跑板进行茚三酮显色,显示极性小的点显色,为目标物,故需分离出极性小的点,并成功收集到目标物,对收集到的目标物用不同展开剂展开,均只出现一个点,证明物质较纯。

[0047] (5) 旋转蒸发：目的是蒸去淋洗剂，得到干燥的样品，即半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯(4-DBP)。半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯的结构式如式(I)所示：



式(I)。

[0048] 半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯的核磁鉴定谱图如附图 1 所示。

[0049] 2、人工抗原的合成

(1) 称取 0.03mmol 的 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯溶于 1mL 的 1mol/L HCl 中，得 A 液；称取 10.5mg 的 NaNO₂ 溶于 0.5mL 蒸馏水中，得 B 液；0 ~ 4℃ 搅拌 A 液，将 B 液逐滴加入到 A 液中，避光反应 1h。

[0050] (2) 称取 45mg 的 BSA 溶于 5mL pH9.6 的 CB 液 (CB 液的配制：称取 NaHCO₃ 1.475 g, Na₂CO₃ 0.845 g, 用去离子水定容至 500 mL) 中，0 ~ 4℃ 搅拌，将反应液逐滴加入到 BSA 溶液中，避光反应过夜。与 BSA 偶联物的颜色为橘黄色。

[0051] (3) 最后用 PBS 透析三天。紫外扫描证实偶联成功。偶联后的紫外全波长扫描图如附图 2 所示。

[0052] (4) 分装于 0.5 mL 离心管中，冻存于 -20 °C 冰箱中备用。

[0053] 3、邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体的制备

(1) 以 4-DBP-BSA 作为免疫原，免疫剂量为 50 μg/只 (Balb/c 小鼠，广东省医学实验动物中心)，将免疫原用生理盐水稀释至 1mg/mL (以蛋白浓度计)，首次免疫加等体积的弗氏完全佐剂 (购自 Sigma) 充分乳化，间隔三周后取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂 (购自 Sigma) 乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

[0054] (2) 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。

[0055] (3) 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 5 × 10⁶ 个 / mL 的细胞悬液，分装于冻存管，在 -70℃ 超低温冰箱中长期保存。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。所述冻存液的配方为：以体积比计，50% 胎牛血清，40% RPMI-1640 基础培养基，10% 二甲基亚砷 (DMSO)。

[0056] (4) 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 × 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℃ 保存。

[0057] 4、邻苯二甲酸二丁酯兔多克隆抗体的制备

本发明采用新西兰大白兔作为免疫动物，以邻苯二甲酸二丁酯与载体蛋白 BSA 的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。

[0058] 5、酶标邻苯二甲酸二丁酯抗体的制备

将邻苯二甲酸二丁酯抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用过碘酸钠法进行偶联。具体方法为：

(1)溶解 5mg 的 HRP 于 1mL 超纯水中,加入新配置的 0.1mol/L 过碘酸钠 75 μ L,置室温或 4℃冰箱反应 20min 或 30min。

[0059] (2)反应完后装入透析袋,加入 0.001mol/L pH4.0 醋酸缓冲溶液,4℃透析过夜,期间需更换几次透析液(透析液为 PBS 溶液:称取 8.5g NaCl,2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.2g KCl,0.2g KH_2PO_4 ,用去离子水定容至 1L)。

[0060] (3)将抗体用 0.1mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL,另外用 0.1mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5mL 抗体加入 HRP 溶液中,置室温或 4℃冰箱反应 2h。

[0061] (4)加入 100 μ L 的 4mg/mL 硼氢化钠,4℃冰箱反应 2h。

[0062] (5)用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液透析过夜,加入保存液(甘油) -20℃保藏备用。

[0063] 实施例 2 酶联免疫试剂盒的制备

1、准备试剂

(1)包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的酶标板:96 孔可拆酶标板,已包被邻苯二甲酸二丁酯抗原及封闭液,包被浓度为 0.05mg/L。所述邻苯二甲酸二丁酯抗原为邻苯二甲酸二丁酯与 OVA 的偶联物。

[0064] 酶标板微孔板的包被:包被抗原用包被液稀释至 0.05mg/L,每孔内加入 100 μ L 包被液,37℃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℃孵育 3h,倾去孔内液体,置于 37℃烘箱中烘干后,用铝箔袋真空密封 4℃保存。

[0065] (2)邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液的配制:准确称取邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液,用色谱级甲醇稀释成 1mg/mL,再用 0.01mol/L PBST 缓冲液(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 μ l Tween-20,定容至 1L)分别配制 0.0 μ g/L、0.00512 μ g/L、0.0256 μ g/L、0.128 μ g/L、0.64 μ g/L、3.2 μ g/L、16 μ g/L 邻苯二甲酸二丁酯溶液,4℃保存。

[0066] (3)辣根过氧化物酶标记的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体,浓度为 1mg/mL;其工作浓度为 1:8000,用 PBST 进行稀释。

[0067] (4)化学发光液:由 A 液和 B 液组成;使用时将 A 液和 B 液按体积比 1:1 的比例混合。

[0068] A 液的配制方法为:将 20mg 对碘苯酚、8mg 鲁米诺、1.21gTris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 8.2 ~ 8.6 得到;

B 液的配制方法为:将体积分数 0.40% H_2O_2 、1.21gTris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 6.8 ~ 7.2 得到。

[0069] (5)20 倍浓缩洗涤液;使用时用去离子水稀释成 1 倍洗涤液。

[0070] 2、试剂分装

将各试剂测定合格后无菌分装,已稀释好的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液 1 mL/瓶,已稀释的辣根过氧化物酶标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体 7mL/瓶,A 液 7mL/瓶,B 液 7mL/瓶,20 倍浓缩洗涤液 50mL/瓶。分装后贴标签,注明批号和有效期,4℃保存。

[0071] 3、试剂盒的组装

分别将上述包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的化学发光酶标板 1 块,辣根过氧化物酶标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体、A 液、B 液、20 倍浓缩洗涤液各 1 瓶,邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液 6 瓶和使用说明书 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。

[0072] 实施例 3 邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒的应用

1、利用本发明试剂盒进行检测

(1) 取出试剂盒,置于室温(20 ~ 24℃)平衡 30 min 以上,取出化学发光酶标板,用 0.01 mol/L PBST 缓冲液将邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液稀释成一系列不同浓度的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液(0.0 μg/L、0.00512 μg/L、0.0256 μg/L、0.128 μg/L、0.64 μg/L、3.2 μg/L、16 μg/L)。

[0073] (2) 在标准孔加入 50 μL 不同浓度的邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液,样品孔加入 50 μL 待测样品,然后每孔加入 50 μL 用 0.01 mol/L PBST 稀释好的邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体,盖上盖板膜在微量振荡器上振摇 10 min 后,置于 37℃ 孵育 30 min。

[0074] (3) 吸除板孔中的反应液,各孔加入洗涤液约 300 μL,静置 20 秒左右,除去其中液体,如此共洗 5 次,最后一次将板拍干;也可用自动洗板机洗板 5 次,洗完后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。

[0075] (4) 每孔加入 100 μL 化学发光液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1 ~ 2min 后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值 RLU,保存数据。

[0076] 2、检测结果计算与分析

抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%) ,

式中 :B 为不同浓度标准品溶液孔(或待测样品孔)的发光值 ; B_0 为 0 浓度标准品溶液发光值。

[0077] 以抑制率为纵坐标,邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,以邻苯二甲酸二丁酯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二丁酯的含量。不考虑检测人员操作熟练程度的影响,整个检测过程仅仅需要 80min 左右即可完成。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。

[0078] 3、标准曲线

通过对标准品溶液的检测结果显示得到邻苯二甲酸二丁酯标准曲线图(如附图 3 所示),表明了本发明试剂盒对邻苯二甲酸二丁酯的线性检测范围为 0.075 ~ 1.52 ng/mL,灵敏度 0.286 ng/mL,检出限 0.039 ng/mL。

[0079] 实施例 4 邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒的应用及精密度、准确度试验

检测方法同实施例 3。

[0080] 1、待测样品前处理

(1) 酱油样本处理 :

称取样品 2.0g,放于玻璃离心管中,加 10mL 乙腈,涡旋 2min,4000r/min 离心 10min,取上清液于梨形瓶,加 5mL 乙腈重复提取一次,合并上清液,于旋转蒸发器中蒸发至干,甲醇复溶用于分析。

[0081] (2) 果汁样本处理 :

取适量果汁样品,4000r/min 离心 10min,称取 2g 上清样品至具塞玻璃管,加入 2mL 乙

臍,涡旋 2min,静置 10min,取上清液,于旋转蒸发器中蒸发至尽干。甲醇复溶用于分析。

[0082] (3) 白酒样本处理:

取适量样品,氮吹至干,甲醇复溶用于分析。

[0083] 2、邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液的重复性试验

从 3 批按照实施例 2 中的方法制备的酶标板中,各随机抽出 20 个微孔,按照实施例 3 中试剂盒的检测方法测定 $0.3 \mu\text{g/L}$ 邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液的发光值,重复 20 次,计算变异系数 CV%,结果如表 1 所示。

[0084] 表 1 邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液重复性试验

样品	浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准溶液	0.3	7.3	4.7	6.8	8.2

结果表明,本发明试剂盒标准品溶液检测的批内变异系数范围在 4.7 ~ 7.3% 之间,批间变异系数为 8.2%。

[0085] 2、样本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,精密密度常以变异系数来表示。在空白样品中,添加邻苯二甲酸二丁酯至终浓度为 0.2、0.6、1.2 $\mu\text{g/L}$,每个浓度各 10 个平行,测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表 2。

[0086] 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 CV%
		含量	回收率%	CV%	含量	回收率%	CV%	含量	回收率%	CV%	
酱油	0.2	0.173	86.5	3.7	0.217	108.5	6.5	0.196	98	7.3	8.9
	0.6	0.475	79.2	5.2	0.541	90.2	3.6	0.590	98.3	7.8	9.2
	1.2	1.177	98.1	7.3	0.982	81.8	5.7	1.065	88.7	6.9	7.8
果汁	0.2	0.183	91.5	6.8	0.193	96.5	4.3	0.186	93	7.9	8.4
	0.6	0.547	91.2	7.5	0.618	103	8.3	0.596	99.3	4.7	9.3
	1.2	1.260	105	3.6	1.072	89.3	5.4	1.112	92.7	6.4	6.9
白酒	0.2	0.207	103.5	4.9	0.177	88.5	5.3	0.193	96.5	7.5	8.1
	0.6	0.627	104.5	8.3	0.566	94.3	5.7	0.497	82.8	4.9	9.1
	1.2	1.327	110.6	7.4	0.997	83.1	3.5	1.165	97.1	6.8	8.3

结果表明,酱油、果汁、白酒样品的添加回收率在 79.2 ~ 110.6% 之间,批内变异系数在 3.5 ~ 8.3%,批间变异系数 6.9 ~ 9.3% 之间,符合国家对于试剂盒各项指标的标准。

[0087] 实施例 5 邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒保存期实验

1、将实施例 2 的试剂盒放置于 2 ~ 8°C,分别取储存了 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒,对邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液 ($0.3 \mu\text{g/L}$) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回

收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0088] 2、将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 12 天,每天对邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液(0.3 μg/L)的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0089] 3、将试剂盒在 -20℃ 冰箱保存 12 天,每天对邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液(0.3 μg/L)的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0090] 结果表明,经过三种条件保存试验,邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液(0.3 μg/L)的吸光度值下降小于 10%,各项指标均符合质量要求,因此,试剂盒可以在 2 ~ 8℃ 保存 12 个月。

[0091] 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。

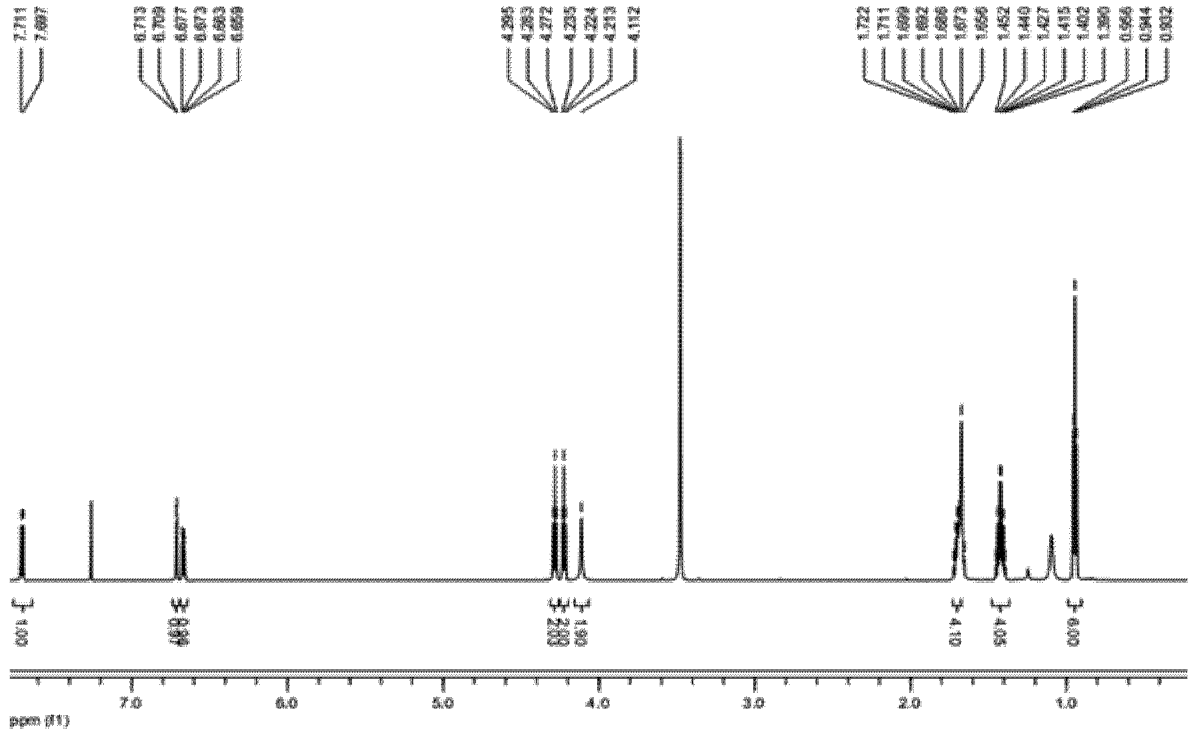


图 1

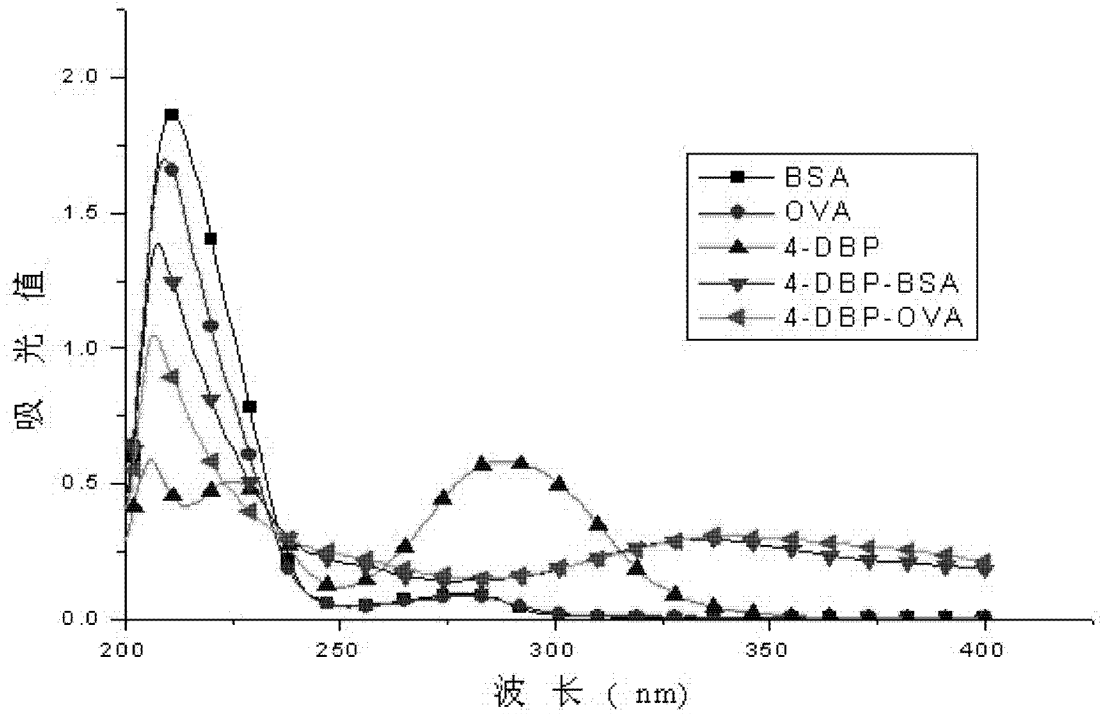


图 2

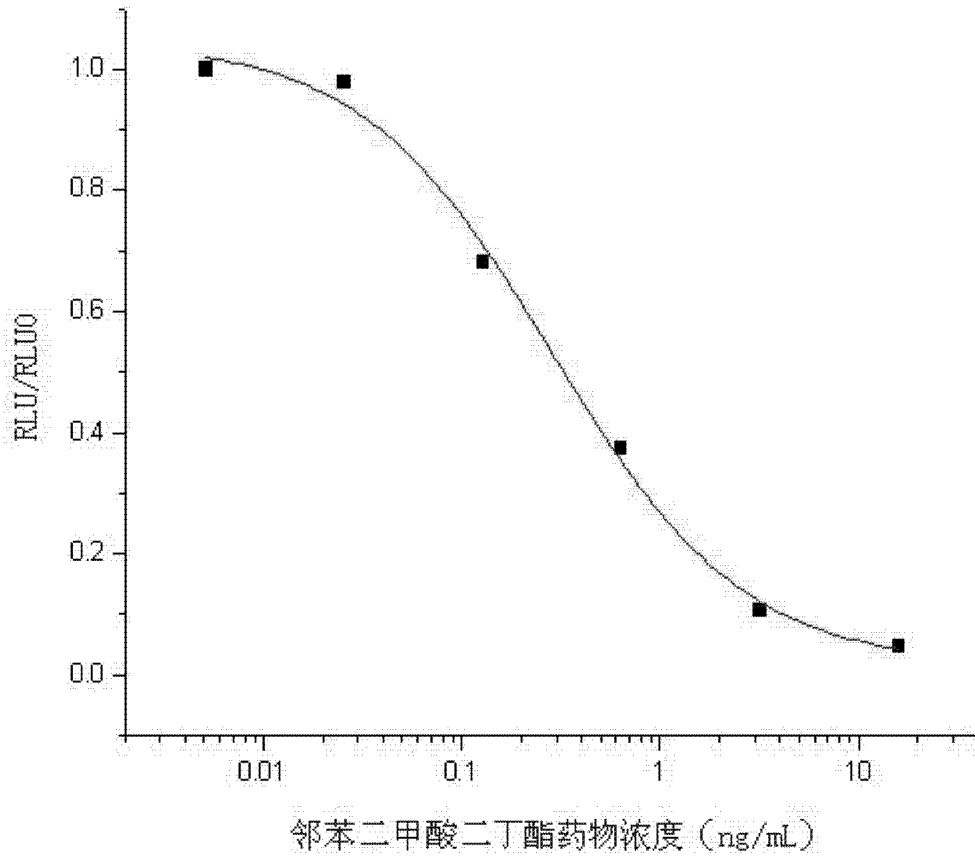


图 3

专利名称(译)	邻苯二甲酸二丁酯化学发光酶联免疫检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN103822913A	公开(公告)日	2014-05-28
申请号	CN201410066333.4	申请日	2014-02-26
[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	杨金易 沈玉栋 孙远明 柳春红 羿利华 雷红涛 徐振林 王弘 肖治理		
发明人	杨金易 沈玉栋 孙远明 柳春红 羿利华 雷红涛 徐振林 王弘 肖治理		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种邻苯二甲酸二丁酯的化学发光酶联免疫试剂盒及其使用方法。该试剂盒包括包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的化学发光酶标板、辣根过氧化物酶标记的邻苯二甲酸二丁酯酶标抗体、邻苯二甲酸二丁酯标准品溶液、化学发光液、浓缩洗涤液。本发明还公开了利用所述试剂盒检测邻苯二甲酸二丁酯残留的方法。本发明提供的检测邻苯二甲酸二丁酯的试剂盒采用直接竞争化学发光酶联免疫吸附分析技术，最大检测范围为0.075~1.52ng/mL，灵敏度为0.286ng/mL，检出限为0.039ng/mL，回收率为79.2~110.6%，检出限低、灵敏度高、稳定性好，成本低，非常适合大量样品的筛查，具有重要的实际应用推广意义。

