



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108409865 A

(43)申请公布日 2018.08.17

(21)申请号 201810053687.3

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2018.01.19

(71)申请人 鄞州出入境检验检疫局综合技术服务中心

地址 315100 浙江省宁波市鄞州区惠康路8号

(72)发明人 吕晓玲 保琦蓓 冯云 许建林 杨东彪

(74)专利代理机构 宁波市鄞州甬致专利代理事务所(普通合伙) 33228

代理人 沈春红

(51)Int.Cl.

C07K 16/44(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

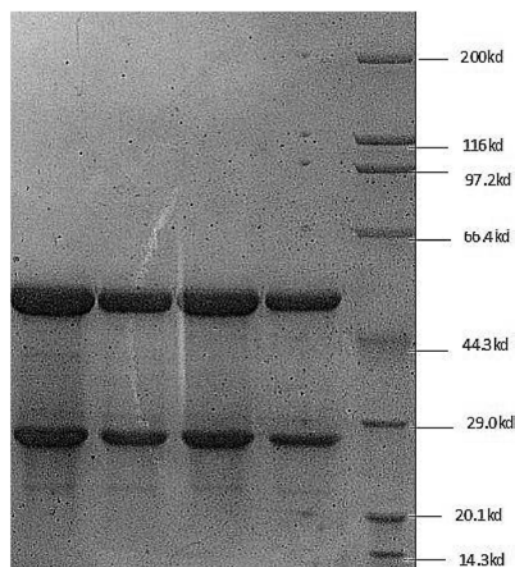
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

特异性双酚A羊多克隆抗体及其应用

(57)摘要

本发明公开一种特异性双酚A羊多克隆抗体及其应用,该抗体主要通过如下步骤获得:(1)将双酚A通过琥珀酸酐和载体蛋白进行偶联,制备免疫原;(2)将上述免疫原免疫波尔山羊,制备羊抗血清;(3)从羊抗血清中纯化分离制备特异性双酚A羊多克隆抗体。本发明首次通过制备双酚A完全抗原,免疫山羊获得特异性双酚A羊多克隆抗体,快速、简单,生产效率高,生产成本低,亲和力强,特异性强,可用于后续双酚A的ELISA检测;而且本发明还提供了特异性多克隆抗体的纯化方法,获得的抗体直接采用抗血清用于检测,就可以排除动物血清中白蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白的干扰,检测结果更加准确,能准确反映样本中双酚A的真实含量。



1. 一种特异性双酚A羊多克隆抗体,其特征在于,该抗体主要通过如下步骤获得:
 - (1) 将双酚A通过琥珀酸酐和载体蛋白进行偶联,制备免疫原;
 - (2) 将上述免疫原免疫波尔山羊,制备羊抗血清;
 - (3) 从羊抗血清中纯化分离制备特异性双酚A羊多克隆抗体。
2. 根据权利要求1所述的特异性双酚A羊多克隆抗体,其特征在于:步骤(1)中所述的载体蛋白包括牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、人血清蛋白、多聚赖氨酸中的一种或几种。
3. 根据权利要求1所述的特异性双酚A羊多克隆抗体,其特征在于:步骤(2)制备羊抗血清:
 - (2.1) 用0.1mg~10mg的步骤(1)获得的双酚A免疫原,加入弗氏完全佐剂,采用皮下、皮内多点注射的方法免疫波尔山羊;
 - (2.2) 每隔7~14天,加强免疫一次,加强免疫用弗氏不完全佐剂,采用皮下、皮内多点注射方式免疫;
 - (2.3) 三免结束后,采血进行抗体滴度测定,当抗体滴度达到1比32以上时,终止免疫;
 - (2.4) 终止免疫后,采集波尔山羊血液,待自然凝固后,离心上清即获得双酚A抗血清。
4. 根据权利要求1所述的特异性双酚A羊多克隆抗体,其特征在于:步骤(3)中所述的分离制备得到特异性双酚A羊多克隆抗体:
 - (3.1) 向步骤(2)方法获得的抗血清中加入20%~50%的硫酸铵进行沉淀,离心取沉淀,将沉淀复溶于20mM~100mM、pH7.2~8.0的PBS中;
 - (3.2) 将步骤(1)复溶了沉淀的PBS上样于双酚A亲和填料中,再用20mM~100mM、pH7.2~8.0的PBS缓冲液洗涤柱子;
 - (3.3) 用10mM~1M、pH2.5~4.0的柠檬酸缓冲液,洗涤亲和填料,直至有洗脱峰出现;
 - (3.4) 收集洗脱峰液体,同时加入pH8.0、1M的Tris-HCl做中和缓冲液,直至pH为6.5~7.5之间;
 - (3.5) 然后将收集的洗脱液透析于20mM~500mM、pH7.4的PBS缓冲液中,即制备特异性双酚A羊多克隆抗体。
5. 根据权利要求4所述的特异性双酚A羊多克隆抗体,其特征在于:步骤(3.2)中的双酚A亲和填料为已用10倍填料体积的、20mM~100mM、pH7.2~8.0的PBS缓冲液洗涤过。
6. 根据权利要求4所述的特异性双酚A羊多克隆抗体,其特征在于:步骤(3.2)中洗涤柱子用的缓冲液为双酚A亲和填料体积的5倍。
7. 一种特异性双酚A羊多克隆抗体在间接竞争ELISA方法测定双酚A中的应用。

特异性双酚A羊多克隆抗体及其应用

技术领域：

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域，具体的涉及一种特异性双酚A羊多克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 双酚A (BPA) 学名为2,2-二(4-羟基苯基)丙烷，主要用于合成聚碳酸酯、环氧树脂等多种高分子材料。聚碳酸酯是一种透明的硬塑料，常用于制造婴儿奶瓶的瓶体，环氧树脂则常被用作婴儿奶粉罐、饮料纸盒内部材质。多数研究发现双酚A具有类雌激素的特点，对哺乳动物的神经系统、免疫系统、生殖系统都会产生一系列的不良影响，对人类的健康存在着较大的风险，而且双酚A易通过食品包装材料、容器以及塑料薄膜等渗入食品而进入体内。加拿大2008年成为首个将双酚A视为有毒物质的国家；日本《食品卫生法》规定聚碳酸酯食品容器中的双酚A溶出限量为2.5mg/kg；欧盟2011年禁止所有含双酚A的奶瓶进入欧盟市场，2014年又公布玩具中双酚A的限量指令，并于2017年最新修订了双酚A的迁移量限值由0.1mg/L降低至0.04mg/L；GB5749-2006《生活饮用水卫生标准》明确规定了饮用水中双酚A含量不得超过0.01mg/kg。

[0003] 鉴于双酚A的广泛残留风险和对人体的伤害风险，建立快速、有效、准确的双酚A检测方法具有重要的意义。目前双酚A的检测方法主要有：液相色谱法、液相色谱质谱联用法、气相色谱法、极谱法、荧光法等。上述方法选择性好、检测灵敏度高，可用于微量检测，但是均存在对设备仪器要求高、投入成本大、分析成本高，样本需要复杂前处理过程，难以做到快速、自动化检测，特别是无法适合大批量样品的高通量快速检测。

[0004] 酶联免疫分析法是一种基于抗原抗体结合特异性反应和酶反应的灵敏性而建立的进行定性、定量快速检测的方法。它具有特异性强、灵敏度高的特点，可以快速进行高通量检测，特别适合于大批量样品的快速筛查。目前，有报道用BPA与牛血清蛋白 (BSA) 偶联制备免疫抗原，并免疫新西兰大白兔获得抗血清，制备兔多克隆抗体的，如有的文献中介绍了兔抗双酚A多克隆抗体的制备新西兰大白兔免疫，第4次免疫7d后从耳缘静脉采血，采用间接酶联免疫法测定抗血清效价；此外也有文献报道采用新西兰长耳兔免疫后，心脏采血，并离心获得抗血清；但上述的兔多克隆抗体具有产量低、生产工作量大、成本高，尤其是所获得抗体具有亲和力低、检测灵敏度低的缺点，同时报道中也没有提出特异性多克隆抗体的纯化方法，而是直接采用抗血清用于检测，难以排除动物血清中白蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白的干扰，往往导致检测结果异常，不能准确反映样本中双酚A的真实含量。总之，上述抗体不足以满足大批量双酚A待检样品的快速处理。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的上述不足，提出了一种特异性双酚A羊多克隆抗体 (的制备方法)，该抗体生产工艺简单，生产量大、成本低，抗干扰能力强，获得的羊多克隆抗体具有特异性强，只与双酚A进行免疫结合，抗体亲和力高、检测灵敏度高的优点。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:一种特异性双酚A羊多克隆抗体,该抗体主要通过如下制备步骤获得:

[0007] (1) 将双酚A通过琥珀酸酐(丁二酸酐)和载体蛋白进行偶联,制备免疫原(双酚A免疫原);

[0008] (2) 将上述步骤(1)制备的免疫原免疫波尔山羊,制备羊抗血清;

[0009] (3) 从羊抗血清中纯化分离制备得到特异性双酚A羊多克隆抗体。

[0010] 具体的,步骤(1)的载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、人血清蛋白、多聚赖氨酸中的一种或几种。

[0011] 具体的,步骤(2)制备羊抗血清(双酚A抗血清):

[0012] (2.1) 用0.1mg~10mg的步骤(1)获得的双酚A免疫原,加入弗氏完全佐剂,采用皮下、皮内多点注射的方法免疫波尔山羊;

[0013] (2.2) 每隔7~14天,加强免疫一次,加强免疫用弗氏不完全佐剂,采用皮下、皮内多点注射方式免疫;

[0014] (2.3) 三免结束后,采血进行抗体滴度测定,当抗体滴度达到1比32以上时,终止免疫;

[0015] (2.4) 终止免疫后,采集波尔山羊血液,待自然凝固后,离心上清即获得双酚A抗血清。

[0016] 本发明上述的步骤(2.3)中的三免为一次加入弗氏完全佐剂免疫,两次弗氏不完全佐剂加强免疫。

[0017] 具体的,步骤(3)中所述的分离制备得到特异性双酚A羊多克隆抗体:

[0018] (3.1) 向步骤(2)方法获得的抗血清中加入20%~50%(质量百分比)的硫酸铵进行沉淀,离心取沉淀,将沉淀复溶于20mM~100mM(mmol/L)、pH7.2~8.0的PBS中;

[0019] (3.2) 将复溶了沉淀的PBS上样于双酚A亲和填料中,再用20mM~100mM、pH7.2~8.0的PBS缓冲液洗涤柱子;

[0020] (3.3) 用10mM~1M、pH2.5~4.0的柠檬酸缓冲液,洗涤亲和填料,直至有洗脱峰出现;

[0021] (3.4) 收集洗脱峰液体,同时加入pH8.0、1M的Tris-HCl做中和缓冲液,直至pH为6.5~7.5之间;

[0022] (3.5) 然后将收集的洗脱液透析于20mM~500mM、pH7.4的PBS缓冲液中,即制备双酚A多克隆抗体。

[0023] 本发明步骤(3.2)中的双酚A亲和填料为已用10倍填料体积的、20mM~100mM、pH7.2~8.0的PBS缓冲液洗涤过。

[0024] 本发明步骤(3.2)中洗涤柱子用的缓冲液为双酚A亲和填料体积的5倍。

[0025] 本发明主要采用双酚A偶联载体蛋白,作为完全抗原免疫羊获得抗血清,然后用硫酸铵沉淀粗提抗体,硫酸铵沉淀具有适用性广、对蛋白无损伤、生产成本低等优点,用抗原亲和纯化精提抗体,亲和纯化具有特异性强、纯化效率高等优点,纯化得到的抗体为特异性双酚A抗体,可排除其他杂抗体的干扰。将二者结合起来,可以快速、简单地获得特异性强的双酚A羊多克隆抗体。

[0026] 通过上述方法,制备的羊双酚A多克隆抗体,对其进行产量测定和效价检测显示,

每升羊抗血清可获得1.5g以上双酚A抗体,抗体经SDS-PAGE电泳检测,纯度可达95%以上,效价测定结果到1:729000以上,亲和力达到 2.34×10^{-10} mol。该方法制备工艺简单,生产量大、成本低,获得的特异性羊多克隆抗体具有特异性强,抗体亲和力高、检测灵敏度高的优点。

[0027] 上述特异性双酚A羊多克隆抗体制备完成后,可用于间接竞争ELISA方法测定双酚A,间接竞争ELISA方法主要原理为:包被抗原,然后抗体与样品中待测抗原同时加入;样本中的抗原与包被抗原竞争相应抗体,然后用辣根过氧化物酶标记的二抗对结合到酶标板抗原的抗体进行检测,吸光度与样本中的抗原浓度成反比,结合标准品定标曲线,可以确定待测样本中的抗原浓度。

[0028] 本发明利用特异性双酚A羊多克隆抗体通过间接竞争ELISA方法测定样品中的双酚A的方法,具体的测定步骤包括:

[0029] (1) 包被双酚A抗原;

[0030] (2) 加入封闭液进行封闭;

[0031] (3) 分别加入双酚A标准品溶液和待测样本溶液,同时分别加入双酚A抗体溶液;

[0032] (4) 加入辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊IgG;

[0033] (5) 加入四甲基联苯胺显色液,测定吸光度;

[0034] (6) 根据标准曲线计算双酚A待测样品溶液浓度。

[0035] 本发明上述的步骤(1)包被抗原:用0.01~0.5M、pH7.5~10.0的碳酸盐缓冲液,稀释双酚A抗原到0.1~10mg/L之间,每孔加入100 μ L,置于4℃冰箱内过夜或37℃1~2h,每孔加入200 μ L PBST洗涤液洗涤3次。

[0036] 本发明上述的步骤(2)对酶标板进行封闭处理:加入0.1~5% (质量百分比)的酪蛋白溶液,每孔加入200 μ L,37℃孵育0.5~2h,每孔加入200 μ L PBST洗涤液洗涤3次。

[0037] 本发明上述的步骤(3)加入双酚A抗原和抗体进行竞争抑制:用PBST将双酚A标准品溶液及待测样品稀释,每孔加入100 μ L;以封闭液稀释抗体溶液至浓度达到1~2mg/L之间,每孔加入100 μ L,37℃孵育0.5~2h,然后以PBST洗涤3次;此时,加入的双酚A标准品或者待测样本中的双酚A将与加入的双酚A多克隆抗体结合,多余的抗体将和酶标板上包被的双酚A抗原结合,即形成竞争抑制作用。

[0038] 本发明上述的步骤(4)以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊IgG至2000~8000倍,每孔加入100 μ L,37℃孵育0.5~2h,然后用PBST洗涤3次。

[0039] 本发明上述的步骤(5)加入四甲基联苯胺显色液,测定吸光度为:每孔加入四甲基联苯胺显色液100 μ L,37℃显色2~10min,每孔加入2M硫酸溶液50 μ L终止反应,用酶标仪在450nm波长下测吸光值OD₄₅₀。根据吸光度与抗原浓度,logic-log方式绘制校准曲线,计算双酚A待测样品溶液浓度。

[0040] 本发明的间接竞争ELISA方法测定样品中的双酚A,具有特异性强、灵敏度高,检测下限可达5ng/mL左右,在5~800ng/mL,线性关系良好, R^2 可达0.995以上,与HPLC方法进行比较,相关性良好,相关系数可达0.90以上,但与HPLC方法相比,样本处理简单,可以快速处理大批量样品,适合样品中双酚A的高通量快速检测。

[0041] 本发明的优点和有益效果:

[0042] 1、本发明首次通过制备双酚A完全抗原,免疫山羊,然后利用硫酸铵沉淀、亲和纯

化方法,获得特异性双酚A羊多克隆抗体,快速、简单,生产效率高,生产成本低,获得的双酚A抗体亲和力强,特异性强,可用于后续双酚A的ELISA检测;而且本发明还提供了特异性多克隆抗体的纯化方法,获得的抗体直接采用抗血清用于检测,就可以排除动物血清中白蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白的干扰,检测结果更加准确,能准确反映样本中双酚A的真实含量。

[0043] 2、本发明间接竞争ELISA方法,用于双酚A样品的检测,特异性强、灵敏度高,检测下限低、线性范围广,并且适合于样品的高通量快速检测。

[0044] 3、本发明的间接竞争ELISA方法,可用于玩具、食品包装材料等中双酚A的快速检测。

附图说明

[0045] 附图1实施例5双酚A标准曲线。

[0046] 附图2实施例7双酚A标准曲线。

[0047] 附图3特异性双酚A羊多克隆抗体经SDS-PAGE电泳检测图谱。

[0048] 具体实施案例:

[0049] 下面结合实施例对本发明的具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。

[0050] 实施例1:羊多克隆抗体的制备:

[0051] 1) 用0.1M的琥珀酰酐将0.1M双酚A溶液加入到等体积的10g/L、pH6.0的人血清蛋白PBS缓冲液中,偶联反应温度为40℃,反应时间为1h,制备得到双酚A-人血清蛋白完全抗原。

[0052] 2) 首次采用1mg的双酚A完全抗原(即步骤(1)的双酚A-人血清蛋白完全抗原),加入弗氏完全佐剂,乳化30min后成油包水状,采用皮下注射3点、皮内注射2点的方法免疫10月龄的健康波尔山羊。每隔12天,加强免疫一次,用弗氏不完全佐剂,乳化20min后成油包水状,采用皮下注射2点、皮内注射3点方式加强免疫;当三免结束后,通过耳静脉少量采血,双向免疫扩散法测定滴度,达到1比64,终止继续免疫。通过颈动脉对免疫山羊进行血液采集,每只波尔山羊可采集双酚A抗血清900ml(待自然凝固后,离心取上清即获得双酚A抗血清)。

[0053] 3) 取900ml抗血清,缓慢加入60%固体粉末硫酸铵,在室温下沉淀过夜,8000rpm离心40min后取沉淀,将沉淀复溶于900ml、50mM、pH7.5的PBS中;取500mL双酚A亲和填料(置于填料柱中),用5000mL 50mM PBS, pH7.5洗涤填料,然后将复溶了沉淀的PBS上样到填料上,上样结束后,再用2500mL 50mM PBS, pH7.5洗涤亲和填料,直至洗脱峰降为0.08;然后用100mM柠檬酸缓冲液, pH 3.0洗涤亲和填料,当出现洗脱峰时即开始收集,共收集500ml,加入65ml pH8.0、1M的Tris-HCl进行中和,测定pH为6.9;将洗脱液透析于5000mL、100mM的pH7.4的PBS缓冲液中,更换5次,即制备获得双酚A多克隆抗体。透析结束后,抗体溶液体积为700ml,测定抗体浓度为2.6g/L,共获得1.82g双酚A多克隆抗体。

[0054] 实施例2:羊多克隆抗体的制备:

[0055] 1) 用0.1M的琥珀酰酐将0.03M双酚溶液加入到1/2体积的5g/L的卵清蛋白PB缓冲液, pH5.5中,偶联反应温度为37℃,反应时间为0.5h,即制备双酚A-卵清蛋白完全抗原。

[0056] 2) 首次采用5mg双酚A完全抗原,加入弗氏完全佐剂,乳化10min后成油包水状,采

用皮下注射6点、皮内注射4点的方法免疫12月龄的健康,无异常的波尔山羊。每隔8天,加强免疫一次,用弗氏不完全佐剂,乳化10min后成油包水状,采用皮下注射4点、皮内注射4点方式加强免疫;当三免结束后,通过耳静脉少量采血,双向免疫扩散法测定滴度,达到1比128,终止免疫。通过颈动脉对免疫山羊进行血液采集,每只波尔山羊可采集双酚A抗血清800ml。

[0057] 3) 取800ml抗血清,缓慢加入25%固体粉末硫酸铵,在室温下沉淀4h,8000rpm离心50min后取沉淀,将沉淀复溶于800ml 100mM PBS, pH8.0中。取500mL双酚A亲和填料,用5000mL 100mM PBS, pH8.0洗涤,然后上样,上样结束后,再用2500mL 100mM PBS, pH8.0洗涤亲和填料,直至洗脱峰降为0.1。然后用200mM柠檬酸缓冲液, pH2.7洗涤亲和填料,当出现洗脱峰时即开始收集,共收集700ml,加入140ml pH8.0, 1M Tris-HCl进行中和,测定pH为7.2。将洗脱液透析于的3000mL 100mM PBS缓冲液, pH7.4中,更换5次,即制备获得双酚A多克隆抗体。透析结束后,抗体溶液体积为950ml,测定抗体浓度为1.8g/L,共获得1.65g双酚A多克隆抗体。

[0058] 附图3为本发明实施例制备的特异性双酚A羊多克隆抗体SDS-PAGE电泳图谱,从左到右:1、批次1, 10 μ g/L; 2、批次1, 5 μ g/L; 3、批次2 10 μ g/L; 4、批次2, 5 μ g/L; 5、Mark。

[0059] 如图3所示,制备获得的特异性双酚A羊多克隆抗体经SDS-PAGE电泳检测,其纯度达到95%以上。

[0060] 实施例3:特异性羊多克隆抗体效价检测

[0061] 对上述获得的特异性羊多克隆抗体的效价进行检测。

[0062] 1) 包被双酚A抗原和封闭,用0.5M碳酸盐缓冲液, pH9.0, 稀释双酚A抗原到2mg/L, 每孔加入100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 1h, 然后每孔加入200 μ L PBST洗涤液洗涤3次。加入0.5%的酪蛋白溶液, 每孔加入200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育0.2h, 最后每孔加入200 μ L PBST洗涤液洗涤3次。

[0063] 2) 以封闭液稀释双酚A特异性羊特异性多克隆抗体抗体, 稀释倍数依次为1000、3000、9000、27000、81000、243000、729000、2187000, 每孔加入100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育1.5h, 然后以PBST洗涤3次。

[0064] 3) 以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊IgG至5000倍, 每孔加入100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育1.5h, 然后用PBST洗涤3次后, 每孔加入四甲基联苯胺显色液100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 显色3min, 每孔加入2M硫酸溶液50 μ L终止反应, 用酶标仪在450nm波长下测吸光值OD450。

[0065] 表1:特异性双酚A羊多克隆抗体效价测定OD450吸光度

[0066]

稀释倍数	批次 1		批次 2		阴性	
1: 1000	3.2195	3.3948	2.7167	2.813	0.0913	0.0836
1: 3000	2.6041	2.5486	2.5002	2.8023	0.0874	0.0853
1: 9000	2.7475	2.7169	2.4591	2.2411	0.0842	0.0964
1: 27000	1.8324	2.1927	1.589	1.8568	0.0882	0.0954
1: 81000	1.1936	1.5277	1.1428	1.1138	0.0882	0.0944
1: 243000	0.5538	0.6687	0.5655	0.562	0.0815	0.0941
1: 729000	0.3372	0.3698	0.2727	0.296	0.0848	0.0812
1: 2187000	0.1581	0.1821	0.1359	0.151	0.0794	0.0816

[0067] 以吸光度大于阴性对照2.1倍为标准,可判定上述特异性双酚A羊多克隆抗体的效价为1:729000。

[0068] 实施例4:特异性羊多克隆抗体的亲和力测定

[0069] 对上述获得的特异性羊多克隆抗体的亲和力进行测定

[0070] 1) 包被抗原和封闭,用0.4M碳酸盐缓冲液,pH8.5,分别稀释双酚A抗原到4.2mg/L,每孔加入100μL,置于4℃冰箱内过夜,然后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。加入0.5%的酪蛋白溶液,每孔加入200μL,37℃孵育1h,最后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。

[0071] 2) 以封闭液稀释抗体溶液,至浓度分别为625、312.5、156.25、78.13、39.06、19.53、9.77、4.88、2.44、1.22μg/L,每孔加入100μL,37℃孵育1.5h,然后以PBST洗涤3次。

[0072] 3) 以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊IgG至5000倍,每孔加入100μL,37℃孵育1.5h,然后用PBST洗涤3次后,每孔加入四甲基联苯胺显色液100μL,37℃显色3min,每孔加入2M硫酸溶液50μL终止反应,用酶标仪在450nm波长下测吸光值OD450。

[0073] 表2特异性双酚A羊多克隆抗体效价测定OD450吸光度

[0074]

抗体浓度 (μg/L)	4mg/L		2mg/L		阴性	
625	1.6508	1.7442	1.5535	1.4682	0.073	0.0976
312.5	1.64	1.6145	1.5508	1.4483	0.0907	0.0715
156.25	1.5257	1.511	1.2896	1.2971	0.0916	0.0635
78.13	1.3772	1.3959	1.2751	1.2392	0.0913	0.058
39.06	1.0385	1.1031	1.1591	1.0871	0.0987	0.0616
19.53	0.7825	0.8883	0.7863	0.7545	0.0895	0.0668
9.77	0.4745	0.4759	0.4372	0.4017	0.0887	0.0820
4.88	0.2813	0.2779	0.2666	0.2311	0.0775	0.0799
2.44	0.1835	0.1747	0.1329	0.1376	0.0817	0.0619
1.22	0.1207	0.1216	0.1013	0.0987	0.0765	0.0707

[0075] 由表中数据可知,4、2mg/L浓度包被抗原,50%OD时,抗体浓度分别为20、18μg/L,根据公式 $K = (n-1) / 2 * (nC1-C2)$,其中 $n=4/2=2$,C1为4mg/L浓度包被抗原时,50%OD时,抗体浓度为20μg/L,C2为2mg/L浓度包被抗原时,50%OD时,抗体浓度为18μg/L,计算得到 $K=4.33*10^9/\text{mol}$,则亲和力为 $1/K=2.34*10^{-10}\text{mol}$ 。

[0076] 实施例5:间接竞争ELISA方法测定双酚A样本标准曲线的制作

[0077] 1) 包被抗原和封闭,用0.5M碳酸盐缓冲液,pH8.5,稀释双酚A抗原到1mg/L,每孔加入100μL,置于4℃冰箱内过夜,然后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。加入0.5%的酪蛋白溶液,每孔加入200μL,37℃孵育1h,最后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。

[0078] 2) 用PBST将双酚A标准品溶液稀释到500、200、100、50、20、10、8、5、4ng/mL,并加入对照,即不含双酚A的稀释液,每孔加入100μL;以封闭液稀释抗体溶液,至浓度达到1mg/L,每孔加入100μL,37℃孵育1h,然后以PBST洗涤3次。

[0079] 3) 以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊IgG至4000倍,每孔加入100μL,37℃孵育1h,然后用PBST洗涤3次后,每孔加入四甲基联苯胺显色液100μL,37℃显色2min,每孔加入2M硫酸溶液50μL终止反应,用酶标仪在450nm波长下测吸光值OD450。测定吸光度结果如下表:

[0080] 表3:不同双酚A标准品浓度间接竞争ELISA法测定吸光度

[0081]

双酚A浓度 (ng/mL)	500	200	100	50	20
吸光度 (OD450)	0.2102	0.2551	0.299	0.3562	0.4126
双酚A浓度 (ng/mL)	10	8	5	4	0
吸光度 (OD450)	0.5050	0.5424	0.5792	0.6051	1.8499

[0082] 利用logit-log方式计算校准曲线,获得校准曲线为: $Y=-0.3380X-0.6467$,相关系数 $R^2=0.9959$,曲线拟合良好,具体见附图1。

[0083] 实施例6:间接竞争ELISA方法测定样品中双酚A的含量

[0084] 1) 包被抗原和封闭,用0.5M碳酸盐缓冲液,pH8.5,稀释双酚A抗原到1mg/L,每孔加入100μL,置于4℃冰箱内过夜,然后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。加入0.5%的酪蛋白溶液,每孔加入200μL,37℃孵育1h,最后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。

[0085] 2) 用PBST将10份样品中双酚A稀释5倍,每孔加入100μL;以封闭液稀释抗体溶液,至浓度达到1mg/L,每孔加入100μL,37℃孵育1h,然后以PBST洗涤3次。

[0086] 3) 以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊IgG至4000倍,每孔加入100μL,37℃孵育1h,然后用PBST洗涤3次后,每孔加入四甲基联苯胺显色液100μL,37℃显色2min,每孔加入2M硫酸溶液50μL终止反应,用酶标仪在450nm波长下测吸光值OD450。测定吸光度结果如下表,并根据上述标准曲线 $Y=-0.3380X-0.6467$ 计算样品中双酚A含量。

[0087] 表4:10份样品中双酚A含量间接竞争ELISA法测定吸光度和结果计算

[0088]

样品序号	1	2	3	4	5
吸光度 (OD450)	0.3211	0.6125	0.4038	0.5016	0.3395
双酚A含量 (ng/mL)	505.25	1.47	72.607	10.287	318.297
样品中双酚A含量 (ng/mL)	2526.26	7.35	363.02	51.42	1591.47

样品序号	6	7	8	9	10
吸光度 (OD450)	0.3421	0.5654	0.4552	0.3720	0.5031
双酚A含量 (ng/mL)	298.65	3.27	25.087	147.237	10.00
样品中双酚A含量 (ng/mL)	1493.24	16.35	125.42	736.15	50.00

[0089] 实施例7:间接竞争ELISA方法测定双酚A样本标准曲线的制作

[0090] 1) 包被抗原和封闭,用0.02M碳酸盐缓冲液,pH9.2,稀释双酚A抗原到5mg/L,每孔加入100μL,37℃包被2h,然后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。加入2%的酪蛋白溶液,每孔加入200μL,37℃孵育1h,最后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。

[0091] 2) 用PBST将双酚A标准品溶液稀释到400、300、200、100、50、20、10、8、5、4、2ng/mL,并加入不含双酚A的稀释液作为对照,每孔加入100μL;以封闭液稀释抗体溶液,至浓度达到2mg/L,每孔加入100μL,37℃孵育2h,然后以PBST洗涤3次。

[0092] 3) 以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊IgG至6000倍,每孔加入100μL,37℃孵育5h,然后用PBST洗涤3次后,每孔加入四甲基联苯胺显色液100μL,37℃显色5min,每孔加入2M硫酸溶液50μL终止反应,用酶标仪在450nm波长下测吸光值OD450。测定吸光度结果如下表:

[0093] 表5:不同双酚A标准品浓度间接竞争ELISA法测定吸光度

[0094]

双酚A浓度 (ng/mL)	400	300	200	100	50	20
吸光度 (OD450)	0.2442	0.2671	0.2845	0.3352	0.3529	0.4316
双酚A浓度 (ng/mL)	10	8	5	4	2	0
吸光度 (OD450)	0.4837	0.4816	0.5402	0.5595	0.6201	1.7217

[0095] 利用logit-log方式计算校准曲线,获得校准曲线为: $Y = -0.5718X - 0.4303$,相关系数 $R^2 = 0.9933$,曲线拟合良好,具体见附图2。

[0096] 实施例8:间接竞争ELISA方法测定样品中双酚A的含量

[0097] 1) 包被抗原和封闭,用0.02M碳酸盐缓冲液,pH9.2,稀释双酚A抗原到5mg/L,每孔加入100μL,37℃包被2h,然后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。加入2%的酪蛋白溶液,每孔加入200μL,37℃孵育1h,最后每孔加入200μL PBST洗涤液洗涤3次。

[0098] 2) 用PBST将10份样品中双酚A稀释20倍,每孔加入100μL;以封闭液稀释抗体溶液,至浓度达到2mg/L,每孔加入100μL,37℃孵育2h,然后以PBST洗涤3次。

[0099] 3) 以封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的鼠抗山羊IgG至6000倍,每孔加入100μL,37℃孵育5h,然后用PBST洗涤3次后,每孔加入四甲基联苯胺显色液100μL,37℃显色5min,每孔加入2M硫酸溶液50μL终止反应,用酶标仪在450nm波长下测吸光值OD450。测定吸光度结果如下表,并根据上述标准曲线 $Y = -0.5718X - 0.4303$,计算样品中双酚A含量。

[0100] 表6:10份样品中双酚A含量间接竞争ELISA法测定吸光度和结果计算

[0101]

样品序号	1	2	3	4	5
吸光度 (OD450)	0.5211	0.3778	0.2959	0.3601	0.432

[0102]

双酚 A 含量 (ng/mL)	5.86	27.51	81.07	34.20	14.74
样品中双酚A含量 (ng/mL)	117.21	550.29	1621.44	683.95	294.88
样品序号	6	7	8	9	10
吸光度 (OD450)	0.4109	0.4907	0.597	0.2783	0.4706
双酚 A 含量 (ng/mL)	18.67	7.94	2.86	105.36	9.76
样品中双酚A含量 (ng/mL)	373.39	158.71	57.25	2107.14	195.13

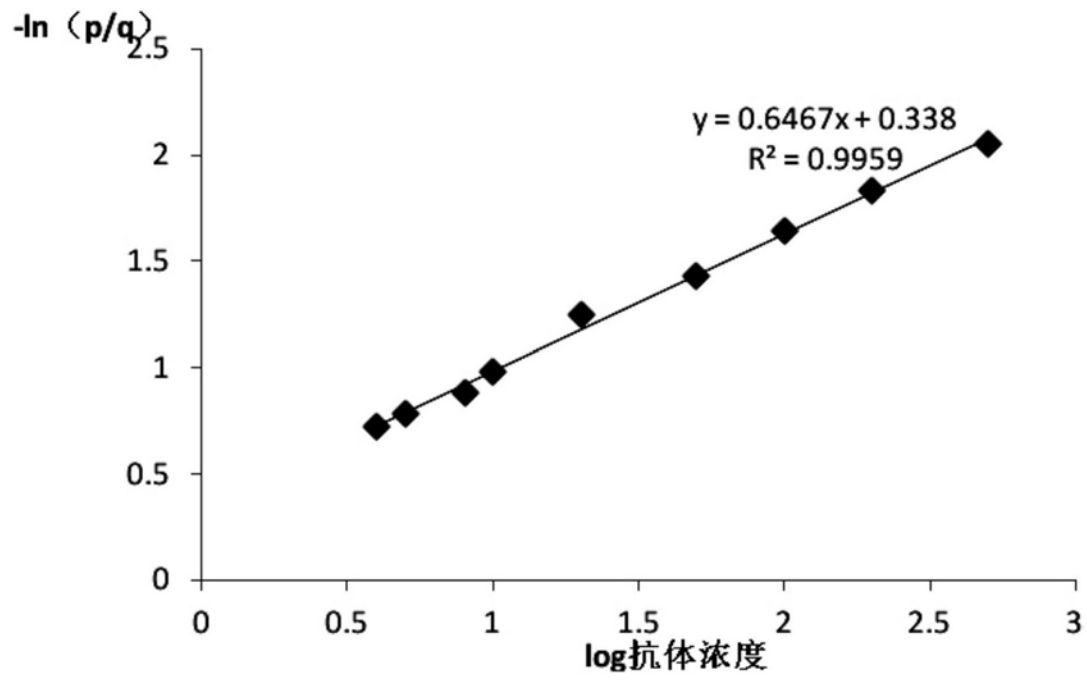


图1

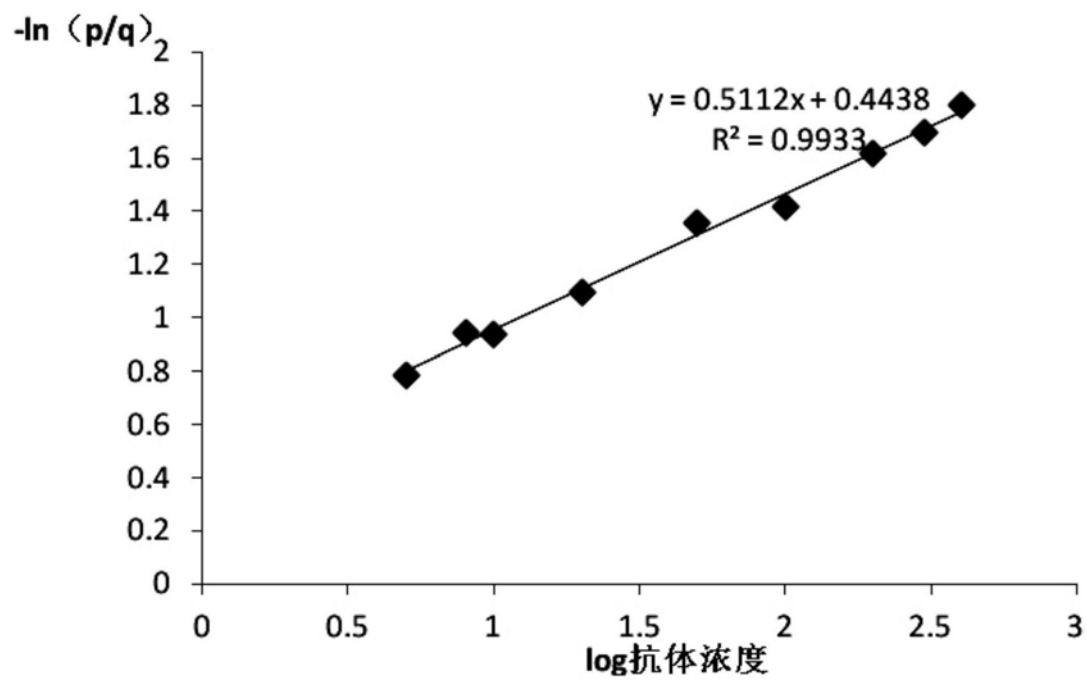


图2

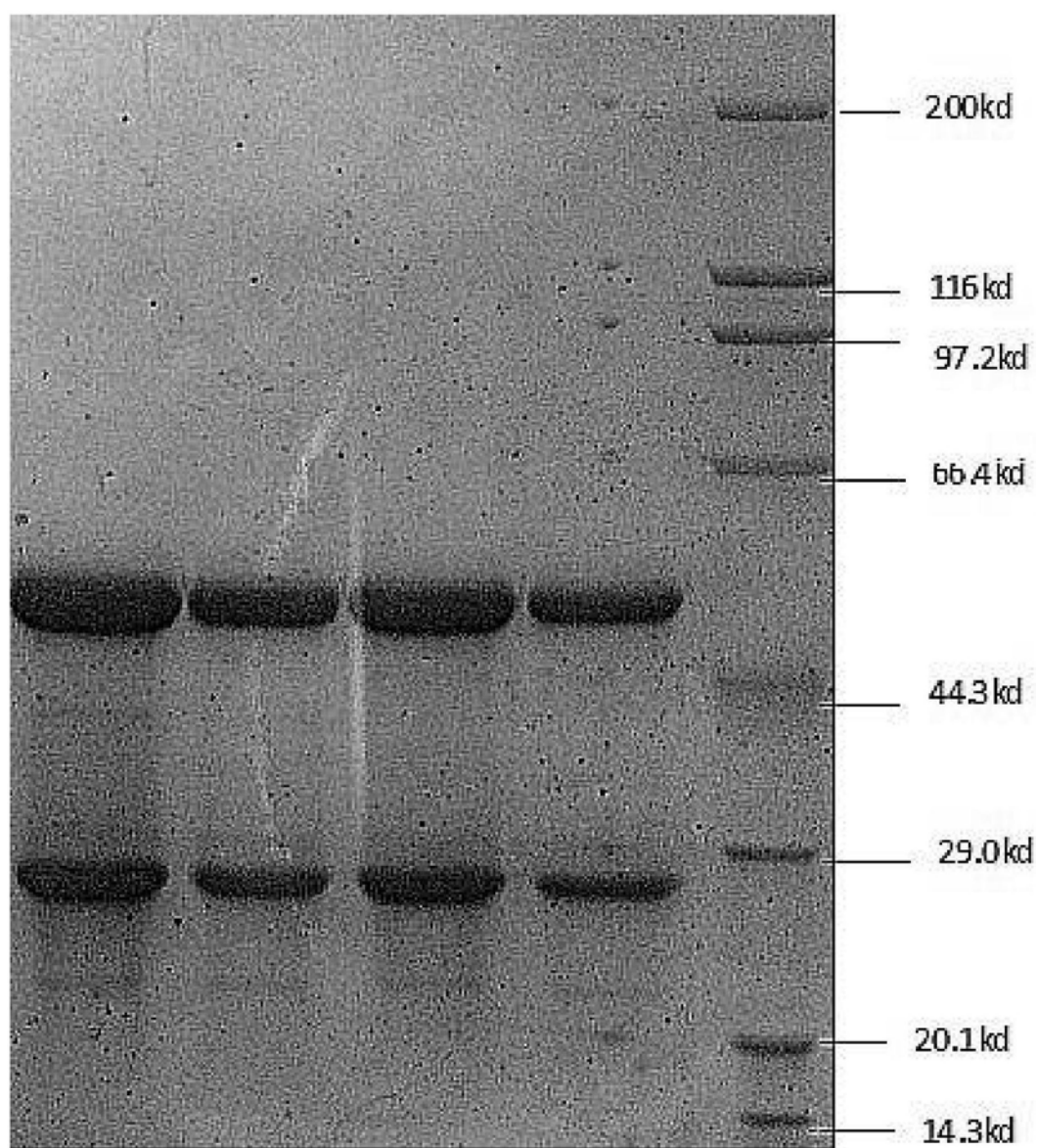


图3

专利名称(译)	特异性双酚A羊多克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN108409865A	公开(公告)日	2018-08-17
申请号	CN201810053687.3	申请日	2018-01-19
[标]发明人	吕晓玲 保琦蓓 冯云 许建林 杨东彪		
发明人	吕晓玲 保琦蓓 冯云 许建林 杨东彪		
IPC分类号	C07K16/44 C07K16/06 G01N33/531 G01N33/558		
CPC分类号	C07K16/44 C07K2317/10 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	沉春库雷尼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种特异性双酚A羊多克隆抗体及其应用，该抗体主要通过如下步骤获得：(1)将双酚A通过琥珀酸酐和载体蛋白进行偶联，制备免疫原；(2)将上述免疫原免疫波尔山羊，制备羊抗血清；(3)从羊抗血清中纯化分离制备特异性双酚A羊多克隆抗体。本发明首次通过制备双酚A完全抗原，免疫山羊获得特异性双酚A羊多克隆抗体，快速、简单，生产效率高，生产成本低，亲和力强，特异性强，可用于后续双酚A的ELISA检测；而且本发明还提供了特异性多克隆抗体的纯化方法，获得的抗体直接采用抗血清用于检测，就可以排除动物血清中白蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白的干扰，检测结果更加准确，能准确反映样本中双酚A的真实含量。

