



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212187 A
(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201811038023.6

(22)申请日 2018.09.06

(71)申请人 东华大学

地址 201620 上海市松江区松江新城人民
北路2999号

(72)发明人 赵晓祥 张璐璐 程晨 亢昕
张紫琴 冯璐

(74)专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务
所 31233

代理人 黄志达

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 30/74(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

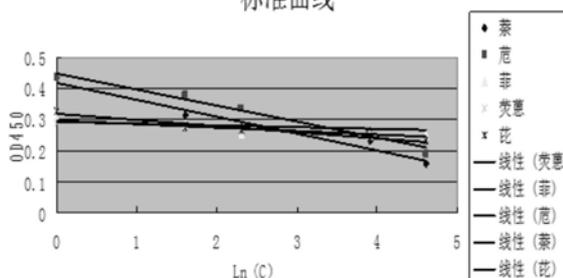
(54)发明名称

一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒及其应用,包括一抗芳烃受体AhR、酶标二抗、多环芳烃PAHs标准品溶液、洗涤液、封闭液、显色液、终止液。检测方法包括:采用试剂盒检测并通过标准曲线法确定检测浓度。本发明可以对环境痕量PAHs进行检测;检测特异性强,操作简便,灵敏度高,样品用量少,可用于现场检测。

标准曲线



1. 一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒,其特征在于,包括一抗芳烃受体AhR、酶标二抗、多环芳烃PAHs标准品溶液、洗涤液、封闭液、显色液、终止液。

2. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述芳烃受体AhR为:取喂养于含多环芳烃PAHs水中的鲤鱼的肝脏,清洗后吸干水分,然后加入HEDG缓冲液匀浆,离心取上清,纯化,得到芳烃受体AhR。

3. 根据权利要求2所述试剂盒,其特征在于,所述纯化为采用离子交换层析法进行纯化。

4. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗为葱。

5. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述洗涤液为PBS-T;封闭液为质量体积百分比1%明胶,终止液为2M硫酸溶液。

6. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述显示液为底物溶液A、底物液B;其中底物溶液A为3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB底物溶液,底物溶液B为双氧水。

7. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述多环芳烃标准溶液的浓度分别为:1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、50ng/ml、100ng/mL。

8. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括酶标板。

9. 一种样品中多环芳烃的类酶联免疫检测方法,包括:

采用权利要求1所述试剂盒,将芳烃受体AhR吸附在固体载体上,然后加入待测PAHs样品、酶标二抗,酶标二抗和待测PAHs与进行竞争反应,反应后用显色液显色,终止液终止反应,采用酶标仪测定OD值,通过标准曲线,确定待测PAHs浓度。

10. 根据权利要求9所述检测方法,其特征在于,所述酶标仪于450nm处测定OD值。

一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于类酶联检测领域,特别涉及一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons,PAHs)多环芳烃是指分子中含有两个或者两个以上苯环的,以线性、角状和簇状等方式连接而成的性质稳定的化合物。多环芳烃具有超过10000种单体,而其中已发现的400多种多环芳烃及其衍生物可以诱导人体产生癌症。PAHs是一类惰性很强的化合物,在自然环境条件下降解缓慢甚至不分解,因此可以稳定存在并且不断蓄积,可以持久的存在于环境中。同时多环芳烃具有半挥发性,可以以蒸汽形式、借助吸附于颗粒物来实现在大气环境中进行远距离的迁移,从而造成全球环境的极大污染。同时PAHs够通过生物链的富集、皮肤接触以及室内取暖等多种渠道进入体内,而PAHs的高脂溶性使其极易在生物体内,尤其是在脂肪中蓄积富集,进而可长期导致生物体产生不良或毒性反应。

[0003] 酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)是基于抗体与抗原或半抗原之间的高选择性反应,同时利用酶催化作用的高效性,通过酶的催化作用于底物后的显色反应判定结果,是目前应用最为广泛的综合性免疫学检测技术。

[0004] Gomes和Samella以苯并[a]芘-6-异氰酸酯作为半抗原制备单克隆抗体,用于分析检测尿液中的苯并[a]芘及其代谢物。张彦峰等以PBA为半抗原制备抗血清,在此基础上建立了测定多环芳烃类物质的酶联免疫测定方法,对10种PAHs与该抗血清的交叉反应进行了研究,结果表明芘和芘丁酸的半抑制浓度值分别为0.132mg/L和0.253mg/L,检出限分别达到0.1mg/L和0.01mg/L。D.Knopp等以苯并[a]芘丁酸(BaPBA)的四类异构体分别作为半抗原用于制备相应的单克隆抗体,以1-苯并[a]芘丁酸为半抗原所建立的酶联免疫方法对苯并[a]芘的检出限达到0.3 μ g/L,与高效液相分析方法相比较,酶联免疫对大气颗粒物中的PAHs总量的测定结果呈现出较好的相关性。

[0005] 目前检测环境中多环芳烃的酶联免疫法,需培养单克隆抗体或多克隆抗体,且检验单一多环芳烃。本发明方法涉及的AHR蛋白可在动物肝脏中提取,简单易得,其次该方法可检测环境中多环芳烃总量,为以后建立判定环境中多环芳烃类物质污染程度标准体系提供依据。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒及其应用,克服现有技术的多环芳烃的酶联免疫法中,需要培养单克隆抗体或多克隆抗体,单克隆和多克隆抗体培养周期时间较长的技术,且检测单一的缺陷,构建一种芳香烃受体与酶标蕙,即配体与受体反应的类酶联免疫检测方法,本发明中应用一种芳香烃受体蛋白,并建立与受体的免疫检测方法,该受体与配体的结合特异性好,可以对水体痕量PAHs进行检测;

操作简便,灵敏度高,样品用量少,便于筛选样品中是否PAHs,并且检测环境中多环芳烃类物质的总量,为以后建立判定环境中多环芳烃类物质污染程度标准体系提供依据。

[0007] 本发明的一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒,其特征在于,包括一抗芳烃受体AhR、酶标二抗、多环芳烃PAHs标准品溶液、洗涤液、封闭液、显色液、终止液。

[0008] 所述芳烃受体AhR为:取喂养于含多环芳烃PAHs水中的鲤鱼的肝脏,清洗后吸干水分,然后加入HEDG缓冲液匀浆,离心取上清,得到粗提取的AhR,纯化,得到芳烃受体AhR。

[0009] 所述肝脏和HEDG缓冲液匀浆的比例为1g:4mL;HEDG缓冲液为 $25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes, $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 10%甘油,调pH7.5。

[0010] 所述纯化为采用离子交换层析法进行纯化。

[0011] 采用离子交换层析法进行纯化具体为:选取取适量经过预处理的中性大孔强碱性苯乙烯系树脂、将洗净后的玻璃层析柱(长50cm,内径1cm)垂直安装于支架上,装入约50mL起始缓冲液,同时将经起始缓冲液预处理过的树脂倒入层析柱中,打开下嘴阀使溶液滴出,使树脂自然沉降,此过程中需保证柱床不分层,柱面平整且柱中无气泡。待液面高出树脂填料沉降面约1cm时,关闭下嘴阀;连接梯度混合器及恒流泵,用起始缓冲液以1.0mL/min的流速平衡层析柱,直到流出液pH与起始缓冲液pH相同为止;

[0012] 将粗提取的AhR用流动相A平衡过夜后滴加到树脂表面上,再滴加HEDG缓冲液至液面高过树脂1cm,开始进行洗脱:将流速调整为2.0mL/min,调节流动相由100%A液逐渐变为100%B液,用核酸蛋白检测仪检测 A_{280} ,部分收集器收集流出的组分,收集纯化后的受体蛋白质电泳鉴定;其中A液为 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的TEA;B液为TEA $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,NaCl $500\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

[0013] 所述酶标二抗为葱。

[0014] 所述洗涤液为PBS-T,为用PBS配置的体积比0.5%的Tween-20。

[0015] 所述封闭液为质量体积百分比1%明胶,为:称取1g明胶,用PBS定容到100mL。

[0016] 所述终止液为2M硫酸溶液。

[0017] 所述显示液为底物溶液A、底物液B;其中底物溶液A为3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB底物溶液,底物溶液B为双氧水。

[0018] 显示液具体为:称取TMB 10mg,加入4mL乙醇溶解,得到TMB储存液;使用时,取TMB储存液0.4mL,底物缓冲液(2.1%的柠檬酸2.43ml和3.04%磷酸氢二钠2.57ml,定容至10ml,调pH至5.0,临用现配)10mL和30% H_2O_2 10 μL ,混合均匀,该试剂需临用现配。

[0019] 所述多环芳烃标准溶液的浓度分别为:1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、50ng/ml、100ng/mL,标准液的溶剂为乙腈。

[0020] 标准品分别用乙腈配置的浓度梯度1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、50ng/ml、100ng/mL,萘、蒽、菲、荧蒹、芘溶液,用于绘制标准曲线。

[0021] 所述试剂盒包括酶标板。

[0022] 本发明的一种样品中多环芳烃的类酶联免疫检测方法,包括:

[0023] 采用权利要求1所述试剂盒,将芳烃受体AhR吸附在固体载体上,然后加入待测PAHs样品、酶标二抗,酶标二抗和待测PAHs与进行竞争反应,反应后用底物显色,采用酶标仪测定OD值,通过标准曲线法,确定待测PAHs浓度。

[0024] 根据已知PAHs的标准系列和待测样品的OD值计算抑制率,根据抑制率与PAHs浓度之间的对数关系作图即得标准曲线,并推算出待测PAHs的浓度。

[0025] 其中抑制率(%) = $(1-B/B_0) \times 100\%$; (B=OD₄₅₀下同)

[0026] 所述酶标仪于450nm处测定OD值。

[0027] 所述标准曲线具体为:向96孔酶标板中每孔加入AhR稀释液100 μ L,4 $^{\circ}$ C包被12h,倒出孔内液体,用洗涤液振荡洗涤,拍干,每孔加封闭液200 μ L,37 $^{\circ}$ C封闭120min,倒出孔内液体,洗涤,拍干,每孔加入酶标葱稀释液100 μ L和不同浓度的PAHs 10 μ L,同时设置空白对照,于37 $^{\circ}$ C温育120min,重复上述洗涤步骤,拍干待用,每孔加入TMB 100 μ L底物溶液,室温下显色15min,每孔加入终止液50 μ L终止反应,采用酶标仪测定OD值;以PAHs浓度的对数为横坐标,抑制率纵坐标,绘制标准曲线。

[0028] AhR原液浓度为2mg \cdot mL⁻¹。

[0029] 所述不同浓度的PAHs是为多环芳烃PAHs标准溶液,用于绘制标准曲线。

[0030] 所述AhR溶液的溶剂为碳酸盐缓冲液,其中碳酸盐缓冲液为0.05M磷酸盐缓冲液,调pH为7.4;所述AhR稀释液为AhR稀释2000倍,稀释浓度为1 μ g \cdot mL⁻¹;

[0031] 所述酶标二抗稀释液(酶标葱)浓度为2.5 μ g \cdot mL⁻¹,溶剂为0.02M PBS。

[0032] PAHs溶液的溶剂为乙腈溶液。

[0033] 有益效果

[0034] 本发明提供了一种芳香烃受体与多环芳烃反应的类酶联免疫检测试剂盒及检测方法,利用受体与配体结合,可以对水体痕量PAHs进行检测;操作简便,灵敏度高,样品用量少,便于筛选样品中是否PAHs,本发明的类ELISA的检出限范围在1.24-3.1ng/ml,板内、板间的变异系数均小于10%,加标回收率大致在80%到120%,而现有HPLC的检出限范围在2.7-10.71ng/mL,变异系数均小于10%,加标回收率大致在60%到110%。

附图说明

[0035] 图1为实施例2的类ELISA方法的标准曲线;

[0036] 图2为实施例1的类ELISA方法的条件优化;

[0037] 图3为实例2的HPLC方法的标准曲线。

具体实施方式

[0038] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。AHR蛋白从鲤鱼的肝脏中分离提取。酶标葱从北京翰谱医药生物研究所购买。

[0039] 实施例1

[0040] 一、类ELISA方法的建立及优化

[0041] 1. AhR和酶标葱的工作浓度

[0042] 将芳香烃受体蛋白用碳酸盐缓冲液(pH为7.4)按1:200、1:400、1:600、1:800、1:1000、1:2000和1:3000倍向96孔酶标板中每孔加入100 μ L,于4 $^{\circ}$ C条件下包被过夜12h。倒出孔内液体,用洗涤液PBS-T振荡洗涤3min,重复3次,拍干待用;每孔加封闭液1%明胶200 μ L,于37 $^{\circ}$ C封闭120min,倒出孔内液体,重复上述洗涤步骤,拍干待用;将酶标葱稀释用PBS按1:400、1:800、1:1000、1:1600、1:2000和1:3000倍,每孔加入100 μ L同时设置空白对照,于37 $^{\circ}$ C

温育120min。重复上述洗涤步骤，拍干待用；每孔加入TMB底物溶液100 μ L，室温下显色40min；每孔加入50 μ L终止液终止反应；采用酶标仪于450nm处测定OD值。

[0043] 计算结果如下：

[0044] 表1：

受体蛋白 (稀释倍数)		3000	2000	1000	800	600	400	200
酶标葱 (稀释倍数)								
3000		0.218	0.226	0.219	0.241	0.213	0.236	0.305
2000		0.184	0.24	0.22	0.226	0.25	0.29	0.302
1000		0.199	0.231	0.234	0.201	0.233	0.279	0.232
1600		0.149	0.152	0.177	0.145	0.173	0.177	0.182
800		0.15	0.159	0.171	0.214	0.155	0.19	0.155
400		0.354	0.436	0.22	0.251	0.225	0.263	0.403

[0046] 试验中采用方阵滴定法可在较大的范围内显示出芳香烃受体蛋白和酶标葱的工作浓度情况，结果见表1。从表1可见当芳香烃受体蛋白的稀释倍数为2000，酶标葱的稀释倍数为400时，吸收值达到峰值(OD₄₅₀=0.436)。因此选择此稀释倍数为芳香烃受体蛋白和酶标葱的最适合浓度组合。

[0047] 实施例2

[0048] 一、类ELISA法标准曲线绘制以及检出限：

[0049] 向96孔酶标板中每孔加入100 μ L稀释2000倍的包被抗原，于4 $^{\circ}$ C条件下包被过夜12h。倒出孔内液体，用洗涤液PBS-T振荡洗涤3min，重复3次，拍干待用；每孔加封闭液胶200 μ L，于37 $^{\circ}$ C封闭120min，倒出孔内液体，重复上述洗涤步骤，拍干待用；将酶标葱稀释至400倍，每孔加入100 μ L，将五种PAHs(萘、芘、菲、荧葱、芘)分别用乙腈稀释配制为1、5、10、50、100ng/mL系列浓度，每孔加入10 μ L，同时设置空白对照，于37 $^{\circ}$ C温育120min。重复上述洗涤步骤，拍干待用；每孔加入TMB底物溶液100 μ L，室温下显色15min；每孔加入50 μ L终止液终止反应；采用酶标仪于450nm处测定OD值。以PAHs浓度的对数为横坐标，抑制率为纵坐标，绘制标准曲线；求抑制浓度IC₈₀；可计算检出限。

[0050] IC₈₀为抑制率为80%时对应的PAHs的浓度；

[0051] 其中萘、芘、菲、荧葱、芘这几种物质的作用是在实验室条件下，与HPLC方法(常用方

[0052] 法)作比较，检验新方法的检出限、加标回收率等指标是否合理。

[0053] 二、精密度及准确度的测试

[0054] 将1ng/mL、5ng/mL水平分别加标至5ng/mL和10ng/mL，按上述建立的间接ELISA法操作步骤，在相同条件下测定同一浓度在同一板内、不同时间的OD值，重复5次，计算其板内变异系数(Coefficient Of Variation, CV)，即板内精密度。

[0055] 将1ng/mL、5ng/mL水平分别加标至5ng/mL和10ng/mL，按上述建立的间接ELISA法操作步骤，在相同条件下测定同一浓度在不同板内、相同时间的OD值，重复5次，计算其板间变异系数(Coefficient Of Variation, CV)，即板间精密度。

[0056] 变异系数(CV) = (标准偏差SD/平均值Mean) × 100%

[0057] 回收率(%) = (加标后测定值-加标前测定值)/已知加标量 × 100%。

[0058] 计算结果如下:

[0059] 表2:类ELISA标准曲线、检出限

PAHs	线性范围	线性回归方程	相关系数	检出限
	(ng/mL)	$Y=a+bx$	(r^2)	(ng/mL)
萘	1-100	$y = -0.0546x + 0.4201$	0.9629	1.24
芴	1-100	$y = -0.052x + 0.4498$	0.9681	1.92
菲	1-100	$y = -0.0183x + 0.3045$	0.9394	1.74
荧蒽	1-100	$y = -0.0055x + 0.2918$	0.9781	1.4
芘	1-100	$y = -0.0196x + 0.3177$	0.9536	3.1

[0062] 表3:类ELISA变异系数(板内、板间)、加标回收率

[0063]

PAHs	加标回收率(%)	变异系数(%n=5)
萘	86.87-117.17	5.88-8.16
芴	94.02-104.7	4.72-8.03
菲	74.67-120.13	5.68-7.18
荧蒽	87.2-104.484	2.56-7.43
芘	88.24-121.84	4.14-4.67

[0064] 由表2和3可知类ELISA的检出限范围在1.24-3.1ng/ml,板内、板间的变异系数均小于10%,加标回收率大致在80%到120%。

[0065] 三、高效液相检测PAHs

[0066] 1. HPLC的工作条件

[0067] 梯度洗脱程序:80%乙腈+20%蒸馏水

[0068] 进样量:20ul,流动相流量为 $1.2\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$

[0069] 检测器:紫外检测器的波长:232nm

[0070] 2. HPLC的标准曲线、检出限

[0071] 用乙腈分别制备质量浓度分别为0、1、5、10、50、100ppm的多环芳烃准溶液,按上述液相色谱条件,对5种PAHs(萘、芴、菲、荧蒽、芘)的一系列标准溶液进样20μL进行测定。以峰面积(S)对化合物浓度(mg/L)求得线性回归方程,计算相关性。同时均以3倍信噪比计算检出限。

[0072] 3. HPLC的准确度、精密度的检测

[0073] 将1ppm、5ppm水平分别加标至5ppm和10ppm,用HPLC重复检测5次,计算加标回收率和相对标准误差。

[0074] 测定结果如下:

[0075] 表4:HPLC标准曲线、检出限

PAHs	线性范围 (ug/mL)	线性回归方程 $Y=a+bx$	相关系数 (r^2)	检出限 (ng/mL)
萘	0~100	$y=0.0629x+0.0843$	0.9963	10.71
蒽	0~100	$y=0.3418x+0.6713$	0.9926	2.7
菲	0~100	$y=0.2377x+0.2179$	0.9977	8.04
荧蒽	0~100	$y=0.5009x+0.4501$	0.9977	3.45
芘	0~100	$y=0.4508x+0.4027$	0.9977	5.2

[0077] 表5:HPLC变异系数、加标回收率

[0078]

PAHs	加标回收率(%)	变异系数(%n=5)
萘	58.03-74.24	4.82—8.3
蒽	71.53-98.51	5.13-6.85
菲	84.6-87.72	5.03-9.03
荧蒽	73.17-106.69	4.26-8.8
芘	76.4-103.93	5.19-9.03

[0079] 由表4和5可知HPLC的检出限范围在2.7-10.71ng/mL,变异系数均小于10%,加标回收率大致在60%到110%。

[0080] 综上所述,两种方法的变异系数均小于15%,符合标准;其次加标回收率也基本在80%-120%的规则范围内,而类ELISA方法的检出限明显低于HPLC方法,具有优势。因此本发明提供了一种芳香烃受体与多环芳烃反应的类酶联免疫检测方法,可以对水体痕量PAHs进行检测;操作简便,灵敏度高,样品用量少,便于初筛大量样品中是否PAHs。

标准曲线

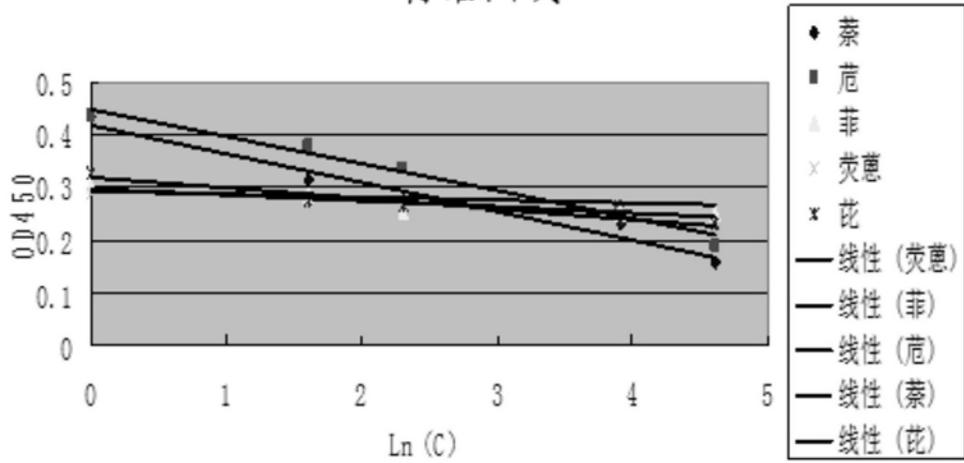


图1

工作浓度

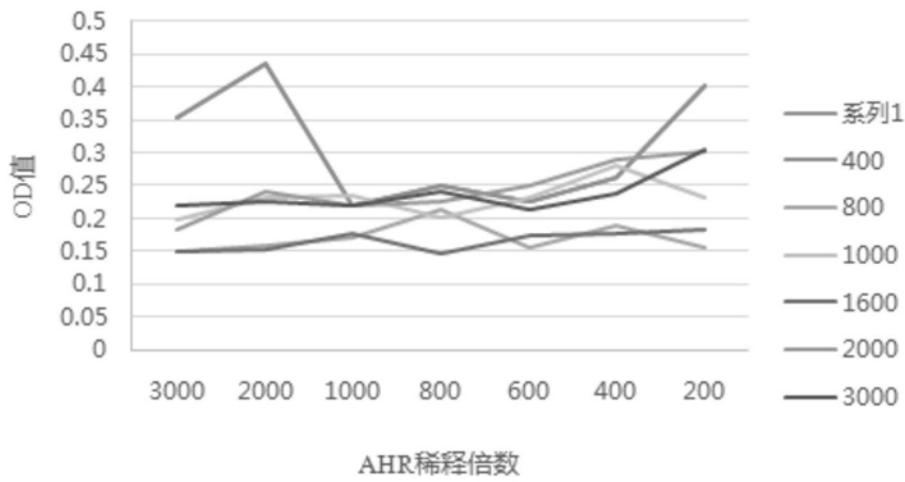


图2

标准曲线

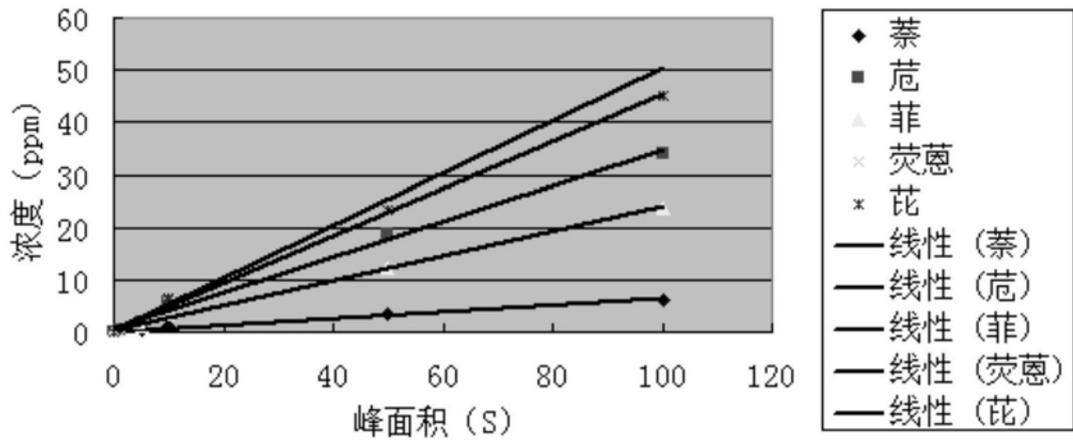


图3

专利名称(译)	一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109212187A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201811038023.6	申请日	2018-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	东华大学		
申请(专利权)人(译)	东华大学		
当前申请(专利权)人(译)	东华大学		
[标]发明人	赵晓祥 张璐璐 程晨 亢昕 张紫琴 冯璐		
发明人	赵晓祥 张璐璐 程晨 亢昕 张紫琴 冯璐		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/58 G01N30/74 G01N30/02		
CPC分类号	G01N33/535 G01N30/02 G01N30/74 G01N33/581 G01N2030/027		
代理人(译)	黄志达		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测多环芳烃的类酶联免疫试剂盒及其应用，包括一抗芳烃受体AhR、酶标二抗、多环芳烃PAHs标准品溶液、洗涤液、封闭液、显色液、终止液。检测方法包括：采用试剂盒检测并通过标准曲线法确定检测浓度。本发明可以对环境痕量PAHs进行检测；检测特异性强，操作简便，灵敏度高，样品用量少，可用于现场检测。

标准曲线

