

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610011933.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月23日

[11] 公开号 CN 1967247A

[22] 申请日 2006.5.18

[21] 申请号 200610011933.6

[71] 申请人 李 季

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学资源环境学院

[72] 发明人 王文君 李 季 许 艇

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 顾筑华

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称

一种适用于己烯雌酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种适用于己烯雌酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，其特征在于包括包被有己烯雌酚抗原的酶标板、海绵支架、浓缩洗涤液(PBST)、己烯雌酚标准品、己烯雌酚单克隆抗体、酶标二抗、显色液和反应终止液。检测过程中，酶标板孔壁上吸附的包被抗原和待测己烯雌酚相互竞争与抗体反应，竞争结果通过显色反应出来。检测已知浓度的己烯雌酚并绘制标准曲线，可以推算出待测己烯雌酚的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测水、肉类中己烯雌酚残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法，而且本发明试剂保存时间长，无放射性污染。

1.一种己烯雌酚单克隆抗体，其特征在于，用正丁酸己烯雌酚单醚与牛血清白蛋白的偶联复合物作为免疫原来制备所述抗体。

2.一种适用于己烯雌酚残留分析的酶联免疫检测试剂盒，其特征在于包含如权利要求1所述的己烯雌酚单克隆抗体、包被了己烯雌酚抗原的酶标板、海绵支架、己烯雌酚标准品、酶标二抗、浓缩洗涤液、显色液和反应终止液。

3.根据权利要求2所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，所述己烯雌酚包被抗原为正丁酸己烯雌酚单醚与卵清蛋白的偶联复合物。

4.根据权利要求2或3所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，酶标二抗是辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体。

5.根据权利要求2或3所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，浓缩洗涤液的配方为每20mL蒸馏水中加入氯化钠7~9g、磷酸二氢钾0.1~0.3g、磷酸氢二钠2~4g、氯化钾3~6g、吐温-20 0.5~3mL。

6.根据权利要求2或3所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，显色液包括A液和B液，A液配方为每1000mL水中加入过氧化脲1g，10.3g柠檬酸，35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，吐温-20 100 μL ，pH5；B液配方为每1000mL蒸馏水中加入四甲基联苯胺700mg，10.3g柠檬酸，pH2.4。

7.根据权利要求2或3所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，终止液为2mol/L的硫酸液。

一种适用于己烯雌酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒 技术领域

本发明涉及一种酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒,具体地说,涉及一种适用于己烯雌酚(DES)残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒。

背景技术

人工激素残留常规的分析主要是应用气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)等仪器在实验室进行。应用这些理化分析技术对环境、生物、食品等样品中痕量己烯雌酚残留进行分析,不仅仪器化程度要求较高,并且需要经过繁复的分离、提取、净化、衍生等前处理过程,无法实现大样本的同时检测,对操作人员专业要求较高,前处理过程需要使用大量的有机溶剂,又造成了新的环境污染。与理化分析技术相比,酶联免疫吸附分析一般能达到更高的灵敏度。随着待检样品、特别是要求现场快速检测样品量的迅速增加,传统的分析手段难以适应要求,因此,迫切需要开发和应用高效率、快速酶联免疫吸附分析技术。

发明内容

(一)要解决的技术问题

本发明的目的在于提供一种具有高灵敏度、高特异性、高准确度、高精度、操作方法简单的酶联免疫吸附检测试剂盒,用于己烯雌酚残留的批量、快速检测。

本发明的另一个目的在于提供一种特异性的己烯雌酚单克隆抗体的制备方法。

(二)技术方案

为实现上述目的,本发明提供了一种己烯雌酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒,该试剂盒包括包被了己烯雌酚抗原的酶标板、海绵支架、浓缩洗涤液、己烯雌酚标准品、己烯雌酚单克隆抗体、酶标二抗、显色液、反应终止液。

其中,包被了己烯雌酚抗原的酶标板的制备过程中,所用的包被原是己烯雌酚的半抗原正丁酸己烯雌酚单醚(DES-CP)与卵清蛋白的偶联复合物,所用包被液是0.05 M pH 9.6 碳酸钠缓冲液,所用封闭液是含1%明胶的上述包被液。

其中,己烯雌酚单克隆抗体的制备过程中所用的免疫原是半抗原正丁酸己烯雌酚单醚与牛血清白蛋白(BSA)的偶联复合物。

己烯雌酚单克隆抗体的制备方法是用上述免疫原免疫 Balb/c 雌性小鼠,再将免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤融合,经过多次亚克隆,筛选到能稳定分泌己烯雌酚单克隆抗体的杂交瘤细胞。采用体内诱生腹水法,挑选经产 Balb/c 小鼠,腹腔注射灭菌石蜡油,向预处理后的小鼠腹腔注射阳性克隆杂交瘤细胞,待 7-10 天后,小鼠腹部明显增大,刺穿腹腔,采集腹水。将腹水离心,弃脂肪层和细胞层,收集中间的澄清层, -20°C 保存备用。用 35% 的饱和硫酸铵盐析法粗提细胞培养上清和腹水,最后用 DE-52 阴离子交换层析法进一步纯化,获得纯化的己烯雌酚单克隆抗体。

其中,酶标二抗是辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体。

其中,浓缩洗涤液的配方为每 20mL 蒸馏水中加入氯化钠 7~9g、磷酸二氢钾 0.1~0.3g、磷酸氢二钠 2~4g、氯化钾 3~6g、吐温-200.5~3mL。浓缩洗涤液的浓度是正常使用时的 50 倍。

其中,显色液包括 A 液和 B 液, A 液配方为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 吐温-20 100 μL , pH5; B 液配方为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺(TMB)

700mg (40mL DMSO 溶解), 10.3g 柠檬酸, pH2.4。

本发明试剂盒的检测分析原理是:

酶标板上的每个孔均包被有相同量的抗原, 加入待测己烯雌酚样品和己烯雌酚单克隆抗体后, 固相包被抗原和待测己烯雌酚相互竞争与抗体反应, 由于每个孔中的固相抗原和加入的抗体含量均一致, 所以当待测的己烯雌酚浓度高时, 则被结合在固相抗原上的抗体少, 加入的酶标二抗与被固定抗体结合量少, 用洗涤液洗涤后加入底物液 (即显色液 A 液) 和显色液 (即 B 液), 显色反应浅, 用酶标仪检测的 OD 值低, 表明抑制率高; 反之, 当待测己烯雌酚浓度低时, 则所测的 OD 值高, 抑制率低。根据用已知的己烯雌酚浓度检测所作的标准曲线, 可以推算出待测己烯雌酚的浓度。

(三) 有益效果

本发明提供的己烯雌酚残留检测试剂盒采用了高特异性的己烯雌酚单克隆抗体, 能准确灵敏地检测水、肉类中己烯雌酚残留, 样品的前处理过程简单, 耗时少, 能同时检测大量的样品, 样品检测成本远低于传统的仪器检测方法, 而且本发明试剂保存时间长, 无放射性污染。本发明对解决大批量样品的己烯雌酚残留现场监控技术具有重要的现实意义。

附图说明

附图为己烯雌酚的标准抑制曲线。

具体实施方式

以下是实施例用于对本发明的进一步说明, 但不用来限制本发明所要保护的范围。

实施例 1 试剂盒操作及结果计算

待测样品经前处理后, 用 PBST 定容备用。拆开真空包装袋并取

出酶标板，在室温下平衡 5 分钟备用。配制 0ng/mL, 1 ng/mL, 2.5 ng/mL, 5 ng/mL, 12.5 ng/mL, 25 ng/mL, 50ng/mL, 100 ng/mL 的己烯雌酚标准液，加入 50 μ L 标样或处理好的样品到各孔中，标样和样品做 4 个重复，加入 50 μ L 稀释的抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟；倒出孔中的液体，用稀释好的 PBST 洗 5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍干；加入按 1:1000 稀释好的酶标羊抗鼠二抗 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟；倒出孔中的液体，用 PBST 洗板 5 次，拍干；取 A 液和 B 液等体积混匀，每孔加 100 μ L，在暗处显色 10~15 分钟，每孔加入 50 μ L 的终止液终止反应，酶标仪上测定各孔在波长为 450nm 处的 OD 值。

将含 0 ng/mL 标准品孔的 OD 值减去含最大浓度标准品孔的 OD 值定为 B_0 ，其余孔经同样方法校正后的 OD 值定为 B；以 B/B_0 值为纵坐标，相应标准品浓度的 log 值为横坐标，绘制己烯雌酚标准抑制曲线。根据曲线的回归方程可以求出对应样品的浓度，也可以求出己烯雌酚抑制中浓度 IC_{50} ($B/B_0=50\%$) 及最小检测限 IC_{20} ($B/B_0=80\%$)。曲线回归方程为 $Y=-0.4787X+0.9766$ ， $R^2=0.9698$ 计算抑制中浓度 $IC_{50}=9.8$ ng/mL，最低检测限 $IC_{20}=2.3$ ng/mL。

实施例 2 半抗原正丁酸己烯雌酚单醚 (DES-CP) 的合成

酚钾盐的制备: 在 100 mL 三口瓶中加入 0.96 g (0.0036 mol) DES, 15 mL 甲醇溶解，在氮气保护下，加入 0.44 g (0.0079 mol) KOH, 加热至 40-45 $^{\circ}$ C, 搅拌 20 min, TLC 监测。反应完毕，减压蒸除甲醇，得到钾盐。

中间体的制备: 钾盐在室温下加 10 mL 二甲基甲酰胺 (DMF), 升温至 60-80 $^{\circ}$ C, 滴加 γ -溴丁酸乙酯的 15 mL DMF 溶液, 约 10 min 滴完, 在此温度下反应 2h, TLC 监测。反应完毕, 冷却至室温, 倒入 50 g 冰水中, 用稀 HCl 调至 pH7, 50 mL 乙醚分两次萃取水相, 合并有机相, 再用 100mL 水分两次洗有机相, 干燥, 脱溶, 得 1.3 g

粗产物，用柱色谱分离得纯品单脂。

目标化合物的生成：在反应容器中加入 1.15 g 单脂，含 0.24 g NaOH 的 5%NaOH 水溶液，再加入 15 mL 乙醇，加热至 60⁰C 反应三小时，TLC 监测。反应完毕，在氮气保护下蒸除乙醇，水溶液中出现固体即为目标物 (DES-CP)，过滤，干燥，得白色固体，产率 68%。

实施例 3 己烯雌酚单克隆抗体制备

以混合酸酐法将半抗原与牛血清白蛋白偶联，将 80 μg 免疫原溶于 80 μL 无菌生理盐水中，和 80 μL 完全弗氏佐剂混合，充分乳化后 Balb/c 雌性小鼠腹部皮下多点注射，以后每隔两周加强免疫一次，换用不完全弗氏佐剂与免疫原混合，免疫部位为颈背部皮下，从第三次免疫开始，每次免疫后一周从小鼠眼眶采血检测血清效价。总共免疫 5 次，最后一次免疫后一周将免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤融合，再经过 4 次亚克隆，筛选到能稳定分泌己烯雌酚单克隆抗体的杂交瘤细胞。通过体外培养法，收集细胞培养上清，经离心后去除细胞碎片，上清液 -20⁰C 保存备用。体内诱生腹水法，挑选经产 Balb/c 小鼠，腹腔注射灭菌石蜡油 0.5 mL/只，将不完全培养液中细胞浓度调至 10⁶/mL，每只预处理后的小鼠腹腔注射 1mL 阳性克隆杂交瘤细胞，待 7-10 天后，小鼠腹部明显增大，刺穿腹腔，采集腹水。将腹水离心，弃脂肪层和细胞层，收集中间的澄清层，-20⁰C 保存备用。用 35% 的饱和硫酸铵盐析法粗提细胞培养上清和腹水，最后用 DE-52 阴离子交换层析法进一步纯化，获得较纯的己烯雌酚单克隆抗体。

实施例 4 己烯雌酚酶残留分析酶联免疫吸附检测试剂盒的组建

本例中，试剂盒包含如下部分：(1) 包被了己烯雌酚抗原的酶标板

(2) 海绵支架

(3) 1 mg/mL 己烯雌酚标准品

(4) 己烯雌酚单克隆抗体

(5) 辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体

(6) 浓缩洗涤液配方为：氯化钠 8g、磷酸二氢钾 0.2g、磷酸氢二钠 3g、氯化钾 5g、吐温-20 2mL、蒸馏水 20 mL。

(7) 显色液 A 液配方：过氧化脲 1g，10.3g 柠檬酸，35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，吐温-20 100 μL ，蒸馏水 1000 mL，pH5。

(8) 显色液 B 液配方：四甲基联苯胺(TMB)700mg (40mL DMSO 溶解)，10.3g 柠檬酸，蒸馏水 1000 mL，pH2.4。

实施例 5 保存期实验

将试剂盒放置于 4⁰C 保存，分别取 0、10、20、30、60、90、120、150 和 180d 的试剂盒，以 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原工作浓度和 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗体工作浓度为工作浓度，进行标准样品检测以测定其检测效果。保存期测定结果如下表：

表 1 试剂盒保存实验结果

Tab 1 Preservation Test Results of ELISA Kit

时间 (d)	0	10	20	30	60	90	120	150	180
B_0 (450nm)	1.09	1.15	1.07	1.16	1.21	1.13	1.04	1.10	1.15
IC_{50} (ng/mL)	9.8	9.9	9.6	10.1	9.8	10.3	9.8	9.7	10.0

从以上结果可以看出， IC_{50} 变化不大，试剂盒在 4⁰C 下至少可保存 6 个月以上。

实施例 6 试剂盒特异性实验

选择己烯雌酚的结构类似物和雌激素己烷雌酚、双烯雌酚、17 β -雌二醇、孕酮、雌酮作为待测物，测得各种物质的抑制中浓度 (IC_{50})，再用下式计算抗体对这些物质的交叉反应性；交叉反应率愈小，则抗体对己烯雌酚的特异性愈强，反之则抗体的特异性差。

$$\text{交叉反应 (CR\%)} = \text{IC}_{50}(\text{己烯雌酚}) / \text{IC}_{50}(\text{供试物}) \times 100\%。$$

实验测定结果见表 2，采用间接 ELISA 法，单克隆抗体与己烯雌酚结构类似物存在一定的交叉反应，如检测样本中己烷雌酚和双烯雌酚浓度不是很高的话，不会对检测造成干扰，而且己烷雌酚和双烯雌酚都是不太常用的人工雌性激素，在动物较短的生长周期内不会有机会全部接触这些激素。因此可保证对样品中己烯雌酚残留测定结果的可靠性。

表 2 交叉反应

Tab 2 Cross Reactivities of Indirect ELISA Kit

化合物名称	IC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	交叉反应 (%)
己烯雌酚	9.8	100
己烷雌酚	22.2	44.2
双烯雌酚	45.2	21.7
17 β -雌二醇	$>1.0 \times 10^4$	<0.1
孕酮	$>1.0 \times 10^4$	<0.1
雌酮	$>1.0 \times 10^4$	<0.1

实施例 7 添加回收实验

水样：取适量己烯雌酚标样添加到样品中，设置 5 $\mu\text{g/kg}$ 、10 $\mu\text{g/kg}$ 、25 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度，每个浓度设 4 个重复，进行测定。测定结果与 HPLC 结果比较。

ELISA 检测样品的前处理：调节 pH 值和盐离子浓度后进行 ELISA 分析。盐离子的调节的具体方法是在 1 体积 10 倍浓度的 PBS 加入到 9 体积的水样中。

肉样：取适量己烯雌酚标样添加到样品中，设置 80 $\mu\text{g/kg}$ 和 120 $\mu\text{g/kg}$ 两个浓度，每个浓度设 4 个重复，进行测定。测定结果与 HPLC 结果比较。

ELISA 检测样品的前处理：取两等分绞碎的肉样（5 克/份），充分研磨，每份加入 80 $\mu\text{g/kg}$ 和 120 $\mu\text{g/kg}$ 甲醇定容到 10 mL，提取 3 次，

合并上清, 60⁰C 水浴, 氮气吹干, 加入 0.5 mL 甲醇, 然后再加 PBST 定容到 50 mL 后直接用于 ELISA 测定。

试剂盒的检测结果见表 3, 水样回收率为 77.0~83.6%, 变异系数 5.9~8.5%, 肉样样品回收率为 71.31~77.6%, 变异系数 7.4~9.8%。试剂盒的回收率在允许范围内, 符合农药残留分析对精确度的要求。

表 3 试剂盒测定结果与 HPLC 测定结果的比较

Tab 3 Comparison of Results between Indirect ELISA and HPLC

样品	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)		变异系数 (%)	
		ELISA 试剂盒	HPLC	ELISA 试剂盒	HPLC
自来水	5	77.0	81.2	5.9	5.4
	10	83.6	80.3	8.5	6.9
	25	79.2	75.5	7.9	8.2
肉类	80	71.31	73.67	7.4	10.2
	120	77.6	74.13	9.8	5.1

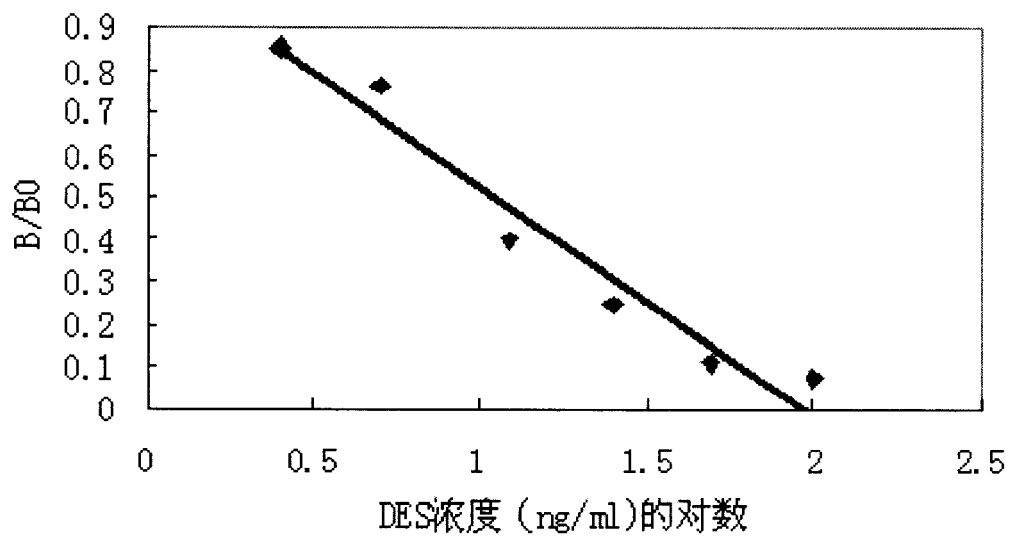


图1

专利名称(译)	一种适用于己烯雌酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1967247A	公开(公告)日	2007-05-23
申请号	CN200610011933.6	申请日	2006-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	李季		
申请(专利权)人(译)	李季		
当前申请(专利权)人(译)	李季		
[标]发明人	王文君 李季 许艇		
发明人	王文君 李季 许艇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于己烯雌酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，其特征在于包括包被有己烯雌酚抗原的酶标板、海绵支架、浓缩洗涤液(PBST)、己烯雌酚标准品、己烯雌酚单克隆抗体、酶标二抗、显色液和反应终止液。检测过程中，酶标板孔壁上吸附的包被抗原和待测己烯雌酚相互竞争与抗体反应，竞争结果通过显色反应出来。检测已知浓度的己烯雌酚并绘制标准曲线，可以推算出待测己烯雌酚的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测水、肉类中己烯雌酚残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法，而且本发明试剂保存时间长，无放射性污染。

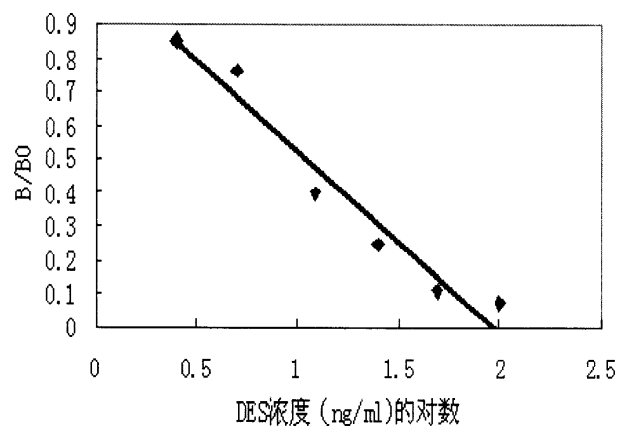


图1