

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510086780.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 5 月 3 日

[11] 公开号 CN 1766633A

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086780.7

[71] 申请人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号
中国农业大学西区动医学院国家兽药
安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平
吴小平 冯才茂 汪善良 李 军
赵正苗 张照亮 史为民 张素霞
丁双阳 罗晓琴 孙 倩

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 向 华

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

检测己烯雌酚残留的酶联免疫试剂盒及方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测动物源性食品中己烯雌酚的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有己烯雌酚抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板，酶标记物，己烯雌酚特异性抗体，己烯雌酚标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用这种酶联免疫试剂盒检测己烯雌酚的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的检测动物源性食品中己烯雌酚残留的酶联免疫试剂盒及方法，灵敏度高，特异性强，样品前处理过程简单，费用低廉，且能同时检测大批样品。

1、 一种检测动物源性食品中己烯雌酚残留的酶联免疫试剂盒，其特征
在于它含有：

- (1) 包被有己烯雌酚抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板；
- 5 (2) 酶标记物；
- (3) 己烯雌酚特异性抗体；
- (4) 己烯雌酚标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 终止液；
- 10 (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 浓缩复溶液。

2、 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：己烯雌酚包被抗原是采用活性酯法将己烯雌酚与卵清蛋白进行偶联得到的；包被原或酶标记物所用抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

15 3、 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记己烯雌酚抗原，标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶。

4、 如权利要求 1-3 之任一所述的试剂盒，其特征在于：当标记酶为辣根过氧化物酶时底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为
20 邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠、浓缩洗涤液为含有 0.8%~1.2%吐温 20 和 1‰叠氮化钠的磷酸盐缓冲液、浓缩复溶液为含有 50% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

5、 如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于：己烯雌酚标准品溶液为
25 六个浓度梯度的己烯雌酚溶液，己烯雌酚稀释液为含有 50% 甲醇的磷酸盐缓

冲液。

6、如权利要求 1 或 5 所述的试剂盒，其特征在于：己烯雌酚特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔多克隆抗体，免疫原是采用活性酯法将己烯雌酚和兔血清白蛋白进行偶联得到的。

5 7、一种检测动物源性食品中己烯雌酚的方法，包括步骤：

（1）样品前处理；

（2）用权利要求 1-6 之任一所述的试剂盒进行检测；

（3）分析检测结果。

检测己烯雌酚残留的酶联免疫试剂盒及方法

技术领域

5 本发明涉及一种检测动物源性食品中己烯雌酚的酶联免疫试剂盒及方法。

背景技术

己烯雌酚（Diethylstilbestrol, DES）是一种人工合成的非甾体雌激素，因能够促进蛋白质的合成代谢，提高动物日益增重和饲料功效，而被非法应用。

10 研究发现长期摄入己烯雌酚药品或是含有己烯雌酚成分的食品会导致女性化、性早熟、抑制骨骼和精子发育，特别是此类物质具有明显的致癌效应，可导致女性及其女性后代的生殖器官畸形和癌变。2002年农业部发布《食品动物标用的兽药及其它化合物清单》明确规定，己烯雌酚及其盐、酯、制剂不得用于食品动物。

15 目前，己烯雌酚的测定方法主要有生物测定法和气相色谱法（GC）等。微生物检测法虽然经济、操作简便，但在样本中有其他微生物抑制剂存在时，其灵敏度和特异性受到限制；气象色谱分析法虽然灵敏度高，但样本前处理及测定操作烦琐，费用高，不适宜于大量样本筛查，只能用作残留的确证分析，推广使用受到限制。

20 发明内容

（一）要解决的技术问题

本发明的目的是提供一种操作简便、费用低廉、适用于大量样本筛查的检测动物源性食品中己烯雌酚残留的酶联免疫试剂盒及方法。

（二）技术方案

25 本发明的检测原理：当包被原为己烯雌酚偶联抗原时，是将己烯雌酚偶联抗原（DES - OVA）吸附于固相载体上，加入样本或己烯雌酚标准品，并

加入己烯雌酚抗体，待测样品中残留的己烯雌酚和酶标板上包被的己烯雌酚抗原竞争己烯雌酚特异性抗体，再加入酶标记抗抗体进行酶活性的放大作用，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中己烯雌酚残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中己烯雌酚的浓度。

5 当包被原为抗抗体时是将抗抗体吸附于固相载体上，加入己烯雌酚抗体后，再加入样本或标准品溶液和酶标记己烯雌酚抗原，待测样本中残留的己烯雌酚和酶标记己烯雌酚抗原竞争己烯雌酚抗体，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中己烯雌酚残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中己烯雌酚的浓度。而与标准溶液颜色比较则可判断样品的浓度范围。

10 本发明提供了一种检测动物源性食品中己烯雌酚的酶联免疫试剂盒，它含有：

（1）包被有己烯雌酚抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板；

（2）酶标记物；

（3）己烯雌酚特异性抗体；

15 （4）己烯雌酚标准品溶液；

（5）底物显色液；

（6）终止液；

（7）浓缩洗涤液；

（8）浓缩复溶液。

20 本发明所述试剂盒中包被原是己烯雌酚抗原时是采用活性酯法将己烯雌酚与卵清蛋白进行偶联得到的；包被原是抗抗体时可为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体对无病原体山羊进行免疫得到的，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体对无病原体山羊进行免疫得到的。

25 制备酶联板过程中所用的包被缓冲液为 pH 6.0，0.02 ~ 0.05mol/L 的柠檬酸钠缓冲液；包被己烯雌酚抗原或抗抗体的载体物质可为聚苯乙烯、纤维素、

聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等；载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等；所用的洗涤液为含有 0.8% ~ 1.2% 吐温 20 和 1% 叠氮化钠 (NaN_3) 防腐剂的按照 20 倍比例稀释的浓缩磷酸盐缓冲液；所用的封闭液为含有 3 ~ 10% 的小牛血清、1% 惰性蛋白和 1% 叠氮化钠 (NaN_3) 防腐剂的溶液。

本发明所述试剂盒中包被有己烯雌酚抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板的制备步骤为：

(1) 用包被缓冲液将己烯雌酚与卵清蛋白 (OVA) 偶联物或抗抗体以 0.05 ~ 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度稀释成抗原稀释液或抗抗体稀释液；

10 (2) 向酶联板的每孔中加入 100 μl 已经稀释好的抗原稀释液或抗抗体稀释液，37°C 温育 2h，并 4°C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 1 次，拍干；

(3) 向酶联板的每孔中加入 150 ~ 200 μl 封闭液，37°C 温育 1 ~ 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

以上方法制备的酶联板具有很好的稳定性，经过冷热稳定性试验，酶联板的相关技术参数均在正常范围，且包被原有良好的特异性。

本发明所述试剂盒中酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记己烯雌酚抗原，标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶；酶标记物形式可为冻干粉、浓缩液和工作液；酶标记物工作液所用的稀释液为含有 50% 甘油（可防止放入 -20°C 环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性）、1% 的叠氮化钠防腐剂（便于保存）溶液。

本发明所述试剂盒中酶标记抗抗体的制备步骤为：

(1) 抗抗体的制备：以鼠源性抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体；或以兔源性抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

25 (2) 酶标记抗抗体的制备：将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行偶联，采用的方法是过碘酸钠法，采用过碘酸钠法使得抗抗体与辣根过氧化物酶的结合率升高，传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与 IgG 的摩尔浓度比

为 4: 1, 制备的偶联物中混有许多聚合体, 因为辣根过氧化物酶 (HRP) 在强氧化的作用下产生许多与 IgG 结合的位点。这样活化的辣根过氧化物酶 (HRP) 分子充当了连接各分子的桥梁, 从而降低酶标记物的酶活性。为了解决这个问题, 本发明将传统的方法进行了改良, 即: 省去了氨基的封闭过程, 因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少; 同时降低辣根过氧化物酶 (HRP) /IgG 的摩尔浓度比至 2: 1, 改良后的方法比传统的方法简便, 对酶活性的损失也减少。

本发明所述试剂盒中酶标记己烯雌酚抗原是采用水溶性碳化二亚胺法将己烯雌酚半抗原与标记酶进行偶联得到的。

10 本发明所述试剂盒中己烯雌酚特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔多克隆抗体, 免疫原是采用活性酯法 (DCC、NHS) 将己烯雌酚和兔血清白蛋白 (RSA) 进行偶联得到的; 抗体形式可为冻干粉和工作液; 抗体稀释液为 pH 值 8.2、0.05mol/L、含有 3% 小牛血清和 20% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

15 本发明所述试剂盒中己烯雌酚特异性抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体, 其制备方法如下:

(1) 己烯雌酚单克隆抗体制备的步骤为:

a. 动物免疫程序: 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物, 免疫原 (己烯雌酚与兔血清白蛋白的偶联物) 免疫剂量为 80 ~ 100 μ g /只, 首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 颈背部皮下多点注射, 间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化, 加强免疫一次, 四免后腹腔加强免疫一次, 3 天后取脾细胞。

20 b. 细胞融合与克隆化: 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 5 ~ 10: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液, 筛选阳性孔, 利用有限稀释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。

25 c. 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 1 ~ 5 $\times 10^6$ 个/ml 的细胞悬液, 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, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

d. 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 0.5ml/只, 7~14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ 个/只, 7~10 天后采集腹水, 用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, 小瓶分装, -20°C 保存。

5 e. 抗体冻干粉可将腹水在 37°C 环境下烘干, 放入 -20°C 保存。

f. 抗体工作液是用抗体稀释液将抗体以 $0.02 \sim 0.08 \mu\text{g/ml}$ 浓度进行稀释。

(2) 己烯雌酚多克隆抗体制备的步骤为:

10 采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以免疫原 (己烯雌酚半抗原与兔血清白蛋白的偶联物) 免疫剂量为 1mg/kg , 首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 颈背部皮下多点注射, 间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化, 加强免疫一次, 共免疫 5 次, 最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7~10d 后采血, 测定血清抗体效价, 心脏采血, 经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

15 本发明所述试剂盒中底物显色液: 当标记酶为辣根过氧化物酶时底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为 $1 \sim 2\text{mol/L}$ 的硫酸或盐酸缓冲液; 当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠; 浓缩洗涤液为含有 $0.8\% \sim 1.2\%$ 吐温和 1% 叠氮化钠 (NaN_3) 防腐剂的磷酸盐缓冲液、浓缩复溶液为含有 50% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

20 本发明所述试剂盒中己烯雌酚标准品溶液为六个浓度梯度的己烯雌酚溶液, 己烯雌酚稀释液为含有 50% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中试剂的配制具体为:

a. 己烯雌酚标准溶液: 己烯雌酚系列标准溶液 6 瓶, 浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$, $0.05\mu\text{g/L}$, $0.15\mu\text{g/L}$, $0.45\mu\text{g/L}$, $1.35\mu\text{g/L}$, $4.05\mu\text{g/L}$, 1-3ml/瓶。

25 b. 包被缓冲液: $\text{pH } 9.2$, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。

c. 封闭液: 含有 $3\% \sim 10\%$ 小牛血清、 1% 惰性蛋白和 1% 叠氮化钠 (NaN_3) 防腐剂的溶液。

d. 浓缩洗涤液: 含有 $0.8\% \sim 1.2\%$ 吐温 20 和 1% 叠氮化钠 (NaN_3) 防腐

剂的磷酸盐缓冲液 (0.01M, pH7.4), 为正常使用浓度的 15-25 倍, 30-50ml/瓶, 1 瓶。

e. 酶标记物: 酶标记抗抗体工作液或酶标记己烯雌酚抗原工作液, 7~12ml/瓶, 1 瓶。

5 f. 底物显色液 A 液: 过氧化氢或过氧化脲。

g. 底物显色液 B 液: 邻苯二胺 (OPD) 或四甲基联苯胺 (TMB)。

h. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液: pH 8.1、含有 MgCl_2 0.01% 100mmol Tris-HCl。

i. 终止液: 1~2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液。

10 j. 浓缩复溶液: 含有 50% 甲醇的磷酸盐缓冲液, 为正常使用浓度的 5~10 倍, 30~50ml/瓶, 1 瓶。

本发明所述检测动物源性食品中己烯雌酚的方法, 包括了以下步骤:

(1) 样品前处理;

(2) 检测方法

15 a. 向包被安定抗原的酶标板微孔中加标准品溶液或样品溶液并加入安定抗体工作液, 温育后洗涤拍干, 然后加入酶标记抗抗体, 温育洗板后显色, 终止, 用酶标仪测定吸光度值;

b. 向包被抗抗体的酶标板微孔中加安定抗体工作液, 温育后洗涤拍干, 然后加入酶标记安定抗原并加入安定系列标准品或样品溶液, 温育洗板后显色, 终止, 用酶标仪测定吸光度值。

20

(3) 分析检测结果。

本发明的样本前处理方法用来定量检测动物组织、饲料、尿液和胆汁等样品中己烯雌酚的残留量。

本发明中样品前处理方法为:

25 (1) 饲料样本

称取 2g 饲料, 加入 8ml 乙腈, 震荡 10min, 15℃, 3000g 以上离心 5min。取 2ml 上清液, 60℃ 氮气/空气吹干。加入 0.5ml 氯仿, 涡动 20s, 加入 2ml 1mol/L

的 NaOH, 涡动 30s, 静止 1min, 再涡动 30s, 6000rpm 离心 5min。取 1ml 上清液, 加入 100ul 6mol/L 的 H_3PO_4 , 涡动 5s, 即可进行分析。

(2) 尿液

取 2ml 尿液到离心管中, 加入葡萄糖苷酸酶, 室温 3000g 离心 10min, 直至清亮; 移取 1ml 尿液到离心管中, 加入 5ml 三氯甲烷进行萃取, 振荡 10min, 室温 3000g 以上离心 10min (反复两次), 合并下层有机相在氮气流下完全干燥, 用 2ml 复溶液溶解干燥的残留物, 即可进行分析。

(3) 动物组织

称取 2g 动物组织, 加入 6ml 乙腈-丙酮(80ml+20ml 混合), 振摇 10min, 15℃, 3000g 以上离心 5min。取 3ml 上清液, 60℃氮气/空气吹干。加入 0.5ml 氯仿, 涡动 20s, 加入 2ml 2mol/L 的 NaOH, 涡动 30s, 静止 1min, 再涡动 30s, 6000rpm 离心 5min。取 1ml 上清液, 加入 200ul 6mol/L 的 H_3PO_4 , 涡动 5s。加入 3ml 乙腈进行萃取, 振荡 10min, 室温 6000g 以上离心 10min, 取上层有机相在氮气流下完全干燥; 用 1ml 复溶液溶解干燥的残留物, 即可进行分析。

(三) 有益效果

本发明提供的检测动物源性食品中己烯雌酚残留的酶联免疫试剂盒及方法, 灵敏度高, 特异性强, 样品前处理过程简单, 费用低廉, 且能同时检测大批样品。

附图说明

图1 己烯雌酚的检测标准曲线图。

具体实施方式

下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明, 而不用来限制本发明的范围。

实施例1 检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒的组分制备

1. 抗原的合成

a. 包被原的合成

将己烯雌酚和氯乙酸钠通过卤取代反应合成半抗原，给己烯雌酚接出了一个含 2 个碳链的间隔臂，这样突出了己烯雌酚分子结构中的特征基团—己烯雌酚苯酚。制备的己烯雌酚抗体对己烯雌酚均有很高的识别能力。将半抗原和卵清蛋白（OVA）载体蛋白，采用活性酯法（DCC、NHS）进行偶联得到。

b. 免疫原的合成

将己烯雌酚和氯乙酸钠通过卤取代反应合成半抗原，给己烯雌酚接出了一个含2个碳链的间隔臂，这样突出了己烯雌酚分子结构中的特征基团—己烯雌酚苯酚。制备的己烯雌酚抗体对己烯雌酚均有很高的识别能力。将半抗原和兔血清白蛋白（RSA）载体蛋白，采用活性酯法（DCC、NHS）进行偶联得到。

本发明合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为91.2%。

2. 己烯雌酚鼠单克隆抗体的制备

15 a. 动物免疫

采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以己烯雌酚半抗原与兔血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 100 μ g/只，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 2 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

b. 细胞融合和克隆化

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 ELISA 测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释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。

25 c. 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 5×10^6 个/ml 的细胞悬液，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，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

d. 单克隆抗体的制备与纯化

采用体内诱生法，将8周龄的Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5ml/只，7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只，7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装， -20°C 保存。

5 3. 己烯雌酚兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以己烯雌酚半抗原与兔血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为1mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔3周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫5次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

4. 酶标板的制备

用包被缓冲液将己烯雌酚半抗原与卵清蛋白（OVA）偶联物稀释成0.05 $\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入100 μl ， 37°C 温育2h，倾去包被液，用洗涤液洗涤2次，每次1min，拍干，然后在每孔中加入150 μl 封闭液， 37°C 温育1h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例2 检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒的的组建

组建检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- 20 (1) 包被有己烯雌酚抗原的酶联板；
- (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；
- (3) 己烯雌酚鼠单克隆抗体；
- (4) 己烯雌酚标准品溶液6瓶，浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ ，0.05 $\mu\text{g/L}$ ，0.15 $\mu\text{g/L}$ ，0.45 $\mu\text{g/L}$ ，1.35 $\mu\text{g/L}$ ，4.05 $\mu\text{g/L}$ ；
- 25 (5) 底物显色液A液为过氧化氢，底物显色液B液为邻苯二胺；
- (6) 终止液为2 mol/L的硫酸缓冲液；

(7) 浓缩洗涤液为pH7.4, 含有0.8%吐温20和1%叠氮化钠(NaN_3)防腐剂的磷酸盐缓冲液;

(8) 浓缩复溶液为含有50%甲醇的磷酸盐缓冲液。

5 实施例3 检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒的的组建

组建检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

(1) 包被有羊抗兔抗抗体的酶联板;

(2) 用碱性磷酸酯酶标记的己烯雌酚抗原;

(3) 己烯雌酚兔多克隆抗体;

10 (4) 己烯雌酚标准品溶液6瓶, 浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$, $0.05\mu\text{g/L}$, $0.15\mu\text{g/L}$, $0.45\mu\text{g/L}$, $1.35\mu\text{g/L}$, $4.05\mu\text{g/L}$;

(5) 底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液;

(6) 终止液为2 mol/L的氢氧化钠缓冲液;

15 (7) 浓缩洗涤液为pH 7.4, 含有0.8%吐温20和1%叠氮化钠(NaN_3)防腐剂的磷酸盐缓冲液;

(8) 浓缩复溶液为含有50%甲醇的磷酸盐缓冲液。

实施例4 样品中己烯雌酚残留的检测

1. 样品前处理

20 称取 2g 饲料, 加入 8ml 乙腈, 振摇 10min, 15°C , 3000g 以上离心 5min。取 2ml 上清液, 60°C 氮气吹干。加入 0.5ml 氯仿, 涡动 20s, 加入 2ml 1mol/L 的 NaOH, 涡动 30s, 静止 1min, 再涡动 30s, 6000rpm 离心 5min。取 1ml 上清液, 加入 100ul 6mol/L 的 H_3PO_4 , 涡动 5s, 取 50ul 进行分析。

2. 用试剂盒检测

25 向己烯雌酚偶联抗原包被的 96 孔酶标板微孔中加己烯雌酚系列标准品

或样本溶液（各 2 孔）50 μ l，再加入己烯雌酚抗体工作液 50 μ l，用盖板膜封板，20~25℃恒温箱中反应 60min。倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体 100 μ l，用盖板膜封板，20~25℃
5 恒温箱中反应 30min，重复洗涤工作。底物显色液 A 液过氧化氢 50 μ l，再加底物显色液 B 液邻苯二胺 50 μ l，轻轻振荡混匀，20~25℃恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液 2 mol/L 硫酸 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

10 用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值（B）除以第一个标准溶液（0 标准）的吸光度值（B₀）再乘以 100%，得到百分吸光度值。以己烯雌酚浓度（ μ g/L）的半对数为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品中己烯雌酚溶液所对应的浓度，乘以其
15 对应的稀释倍数即为样品溶液中己烯雌酚实际浓度。

实施例 5 样品中己烯雌酚残留的检测

1. 样品前处理

取 2ml 尿液到离心管中，加入葡萄糖苷酸酶，室温 3000g 离心 10min，直至
20 清亮；移取 1ml 尿液到离心管中，加入 5ml 三氯甲烷进行萃取，振荡 10min，室温 3000g 以上离心 10min（反复两次），合并下层有机相在氮气流下完全干燥；用 2ml 复溶液溶解干燥的残留物；取 50 μ l 进行分析。

2. 用试剂盒检测

向羊抗兔抗抗体包被的 96 孔酶标板微孔中加入己烯雌酚多克隆抗体工
25 作液 100 μ l，用盖板膜封板，20~25℃恒温箱中反应 60min。倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入碱性磷酸酯酶标记的己烯雌酚抗原 50 μ l，再加入己烯雌酚系列标准品或样本溶液 50 μ l（各 2 孔），用盖板膜封板，20~25℃

恒温箱中反应 30min。加入底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液 100 μ l，轻轻振荡混匀，20~25℃恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液 2mol/L 氢氧化钠 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

- 5 用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%，得到百分吸光度值。以己烯雌酚浓度(μ g/L)的半对数为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液中所对应的己烯雌酚的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中己烯雌酚实际浓度。
- 10

实施例6 样品中己烯雌酚残留的检测

1. 样品前处理

- 称取2g动物组织，加入6ml乙腈-丙酮(80ml+20ml混合)，振摇10min，15℃，3000g以上离心5min。取3ml上清液，60℃空气吹干。加入0.5ml氯仿，涡动20s，加入2ml 2mol/L的NaOH，涡动30s，静止1min，再涡动30s，6000rpm离心5min。取1ml上清液，加入200 μ l 6mol/L 的 H_3PO_4 ，涡动5s。加入3ml乙腈进行萃取，振荡10min，室温6000g以上离心10min，取上层有机相在氮气流下完全干燥；用1ml复溶液溶解干燥的残留物，取50 μ l进行分析。
- 15

2. 用试剂盒检测

20

- 向己烯雌酚偶联抗原包被的 96 孔酶标板微孔中加己烯雌酚系列标准品或样本溶液(各 2 孔) 50 μ l，再加入己烯雌酚抗体工作液 50 μ l，用盖板膜封板，20~25℃恒温箱中反应 60min。倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体 100 μ l，用盖板膜封板，20~25℃恒温箱中反应 30min，重复洗涤工作。底物显色液 A 液过氧化氢 50 μ l，再加底物显色液 B 液邻苯二胺 50 μ l，轻轻振荡混匀，20~25℃恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液 2 mol/L 硫酸 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光
- 25

度值。

3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0标准)的吸光度值(B₀)再乘以100%，得到百分吸光度值。以己烯雌酚(μg/L)浓度的半对数为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中己烯雌酚实际浓度。

10 实验例1 标准品精密度试验

分别从三批试剂盒中抽取10个试剂盒，测定0.45μg/L标准溶液的吸光度值，计算变异系数。

表1 标准品可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	5.2	4.2	4.9	6.1	5.7	5.6	4.3	4.8	8.4	9.4
	03 批	3.9	4.5	8.1	7.6	9.4	5.2	6.4	5.8	6.3	5.1
	06 批	5.4	7.4	5.3	5.8	6.3	4.5	4.9	6.2	6.7	3.6

15 结果表明变异系数范围在3.6%~9.4%之间。

实验例2 样本可重复性试验

每个样本按2.5μg/kg(L)浓度的己烯雌酚标准品进行添加，分别取三个不同批次的试剂盒各三个，每个浓度重复5次，分别计算变异系数。

20 表2 动物组织样品可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)	变异系数
		CV%

	1.8	1.8	2.3	1.7	2	12.4
01	1.6	2.3	1.8	2.1	2	13.8
	1.7	2	2.3	2.4	1.9	14.0
	1.5	2.3	2.1	2.2	1.7	17.5
03	1.9	2.2	1.8	1.7	1.6	12.5
	1.7	1.7	1.9	1.8	2.2	11.1
	2	1.7	1.9	2.1	1.7	9.5
06	2.2	1.8	1.7	1.6	1.5	15.4
	2.2	2.1	1.7	1.6	2	13.5

表3 尿液样品可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数
						CV%
	1.8	1.6	1.9	2	2.2	11.9
01	2	2.1	1.9	1.7	2	7.1
	2.1	1.8	1.7	1.6	2	8.3
	2	1.9	2	1.8	1.7	11.7
03	2	1.9	1.6	2.1	2.2	11.2
	2.2	1.8	2.3	2.1	1.7	9.3
	1.7	1.9	2.1	2	1.8	12.1
06	2.1	1.7	1.9	2.3	2	13.5
	1.8	1.7	2	1.8	1.8	18.3

表4 饲料样品可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数
						CV%
01	32.4	36.5	40.3	46.8	40.1	13.6
	30.7	41.2	49.5	43.5	50.7	18.6
	34.1	39.5	43.2	47.1	30.5	17.2
03	49.2	41.6	36.2	37.2	38.4	13
	36.4	38.4	30.1	37.2	40.6	10.8
	46.5	41.2	43.2	47.2	41.5	6.36
06	34.1	39.5	42.6	36.5	40.2	8.6
	42.3	48.5	46.1	39.5	48.7	8.93
	46.2	31.6	38.5	46.2	49.5	17.1

结果表明动物组织样本变异系数均低于16%，尿液样本的变异系数均低于20%，胆汁样本的变异系数均小于20%。

5

实验例3 试剂盒的准确度试验

取两个浓度的己烯雌酚标准品溶液，分别为1μg/ L和2.5μg/L，分别对样品进行添加回收试验，每个浓度做4个平行，分别计算回收率。

表5 试剂盒的准确度试验

样本	动物组织、粪便		尿液		胆汁	
添加浓度 (μg/kg)	1	2.5	1	2.5	1	2.5
1	82.1	94.2	76.5	83.4	84.5	92.7

	1	82.1	94.2	76.5	83.4	84.5	92.7
回收	2	78.4	76.8	81.4	86.7	92.7	79.8
率%	3	82.4	84.7	72.4	92.5	81.7	73.4
	4	84.1	76.5	87.5	92.3	75.4	86.1
平均							
值		81.8	83.1	79.5	88.7	83.6	83.0

结果表明猪肉、动物组织、粪便添加的回收率在76.5%~94.2%之间，尿液添加回收率在72.4%~92.3%之间，胆汁中添加回收率在73.4%~92.7%之间。

实验例4

5 试剂盒保存条件为2-8℃，经过6个月的测定，试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、己烯雌酚添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在37℃保存的条件下放置6天，进行加速老化实验，结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生，将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻5天，测定结果也

10 表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2-8℃保存6个月以上。

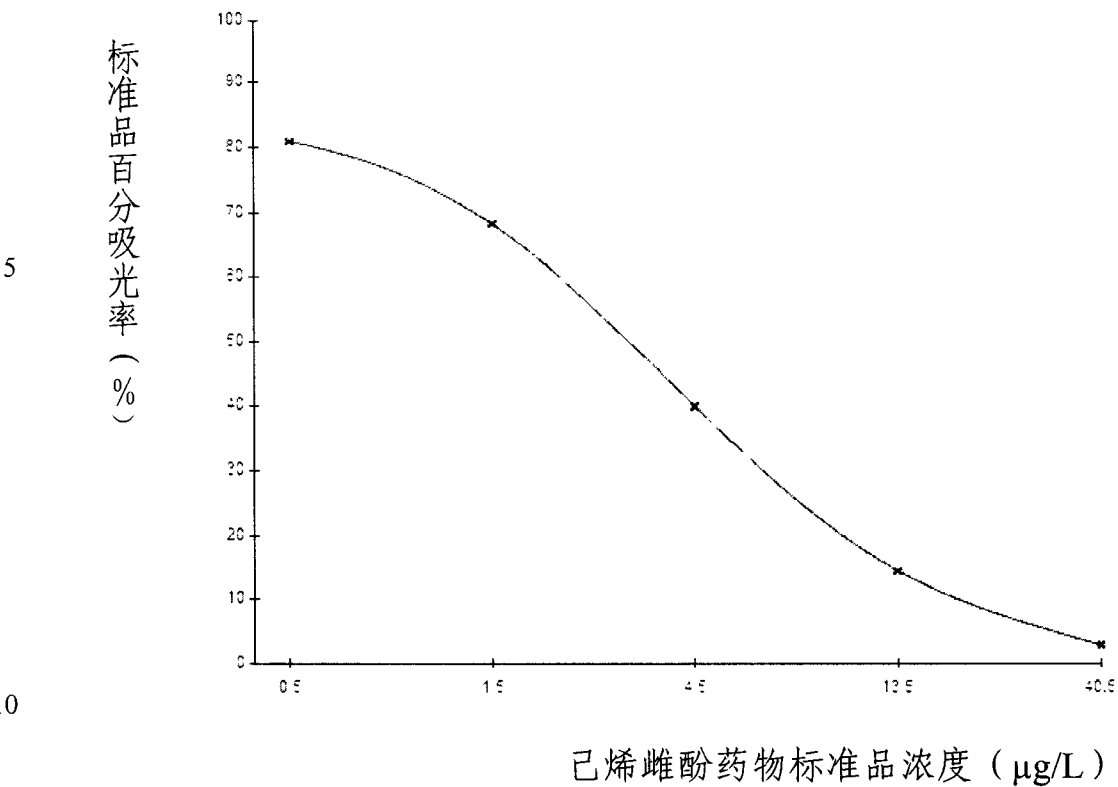


图 1

专利名称(译)	检测已烯雌酚残留的酶联免疫试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN1766633A	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510086780.7	申请日	2005-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
发明人	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/52 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	向华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测动物源性食品中己烯雌酚的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有己烯雌酚抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板，酶标记物，己烯雌酚特异性抗体，己烯雌酚标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用这种酶联免疫试剂盒检测己烯雌酚的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的检测动物源性食品中己烯雌酚残留的酶联免疫试剂盒及方法，灵敏度高，特异性强，样品前处理过程简单，费用低廉，且能同时检测大批样品。

