



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104101702 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201410317502. 7

(22) 申请日 2014. 07. 04

(71) 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路
238 号

(72) 发明人 潘鲁青 胡丰晓 张辉 修蒙
刘童

(74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有
限公司 37201

代理人 张中南 邱岳

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

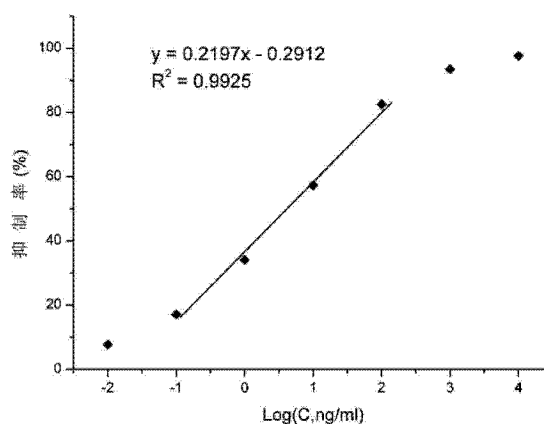
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法

(57) 摘要

一种四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法, 包括 1) 用四溴双酚 A 合成人工抗原; 2) 制备四溴双酚 A 多克隆抗体: 以四溴双酚 A 与 BSA 的偶联物为免疫抗原, 免疫昆明大白鼠并利用现有的多克隆抗体制备与纯化技术获得四溴双酚 A 多克隆抗体; 3) 间接竞争 ELISA 检测: 选择包被抗原浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$, 并用碳酸盐缓冲液稀释; 洗板, 加入缓冲液封闭, 再次洗板; 进行竞争, 洗板, 加二抗, 洗板; 进行显色反应; 最后酶标仪测定 450nm 的吸光值 (OD_{450})。本发明建立了四溴双酚 A 的间接竞争 ELISA 方法, 为环境中四溴双酚 A 残留检测提供了一种快速高效的检测手段。由于该方法采用的是多克隆抗体, 成本较低且准确性和稳定性较好。



1. 一种四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 用四溴双酚 A 合成人工抗原的步骤:

即首先将四溴双酚 A 衍生化制成半抗原,再将所述的半抗原与 BSA 制备成偶联物作为免疫抗原;然后将所述的四溴双酚 A 半抗原与 OVA 制备成偶联物,并将该偶联物作为包被抗原。

2) 四溴双酚 A 多克隆抗体的制备步骤:

以四溴双酚 A 与 BSA 的偶联物为免疫抗原,免疫昆明大白鼠并利用现有的多克隆抗体制备与纯化技术获得四溴双酚 A 多克隆抗体,该抗体可与四溴双酚 A 特异性结合;

3) 间接竞争 ELISA 检测步骤:

利用棋盘滴定法对包被抗原和抗体工作浓度进行筛选,选择包被抗原浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$,多克隆抗体稀释度为 1:2400,酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG (RAM-HRP)) 稀释度为 1:4000;

以 0.05M 的碳酸盐缓冲液稀释步骤 1 得到的包被抗原至 $10 \mu\text{g/mL}$,将稀释后的包被抗原加入酶标板中,每孔 $100 \mu\text{L}$,置于 4°C 冰箱内孵育过夜;

将孵育过夜后的酶标板甩干液体,然后加入 $200 \mu\text{L}$ /孔洗涤液洗涤 3 次后,加入封闭液,所述的封闭液是含 1%酪蛋白的上述 0.05M 的碳酸盐缓冲液, 37°C 封闭 2h;

用 PBST 将四溴双酚 A 标准品溶液及待测样品稀释后,分别加入到各自的酶标孔中,每孔加 $100 \mu\text{L}$;同时分别以抗体稀释液(所述的抗体稀释液是含 1%酪蛋白的 PBST 溶液)以 1:2400 的比例稀释步骤 2 得到的多克隆抗体,再加入酶标板中,每孔 $100 \mu\text{L}$; 37°C 孵育 30-60min 后以 PBST 洗涤 3 次;

以抗体稀释液 1:4000 的比例稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG (RAM-HRP),然后加入酶标板中,每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 30-60min 后以 PBST 洗涤 3 次;

将四甲基联苯胺显色液 A 液和 B 液 1:1 混合后加入酶标板中,每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 显色 20min;将加入 2M 硫酸溶液加入酶标板中终止反应,每孔 $50 \mu\text{L}$;

用酶标仪在 450nm 波长下测吸光值 OD_{450} ,得到四溴双酚 A 标准品溶液的标准曲线,以及待测样品的吸光值,将所得的待测样品的吸光值与所做标准曲线对比可计算出待测样品的四溴双酚 A 含量。

2. 如权利要求 1 所述的四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于上述步骤(1)的将四溴双酚 A 衍生化制成半抗原之后的操作如下:称取四溴双酚 A 半抗原、NHS 和 EDC 各 0.3mmol 于烧杯中,加入 3mL DMSO 溶解,磁力搅拌过夜。然后称取 0.12g BSA 或 OVA,溶解在 5mL 0.1mol/L NaHCO_3 (pH7.0),得到 BSA 或 OVA 溶液。将含有四溴双酚 A 半抗原的溶液加入 BSA 或 OVA 溶液中,边搅拌边缓慢滴加,反应过夜,所得溶液 4°C 透析后冷冻干燥, -20°C 保存。四溴双酚 A 半抗原与 BSA 制备成的偶联物为免疫抗原,四溴双酚 A 半抗原与 OVA 制备的偶联物为包被抗原。

3. 如权利要求 1 所述的四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于上述步骤 2 的四溴双酚 A 多克隆抗体的具体制备方法如下:

选取 4 周龄的雌性昆明大白鼠作为实验动物,实验前暂养一周;将免疫抗原用生理盐水稀释至 1mg/mL ,然后与等量的弗氏佐剂混合用搅拌法使其乳化,乳化完全的标准是将一滴乳化过的溶液滴入水中呈现球型不分散,静置后不出现油水分层;初次免疫将乳化好的

抗原溶液于大鼠背部皮下多点注射,每只注射 1mL;两周后进行第一次加强免疫,免疫抗原用不完全弗氏佐剂乳化,注射部位和剂量与初次免疫相同;两周后进行第二次加强免疫,生理盐水稀释抗原溶液,免疫部位为尾静脉;一周后进行最后一次加强免疫,操作与第二次加强免疫相同;从耳缘静脉采血,采用直接 ELISA 法测定抗体效价,确定抗体效价达到要求后采用摘眼球取血获得抗血清,收集于灭菌离心管中。将此抗血清高速离心并过滤纯化后于 -20℃ 保存。

4. 如权利要求 3 所述的四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于所述的采用直接 ELISA 法测定抗体效价的步骤如下:

1) 将步骤 1 的包被抗原用 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释,100 μ L/孔加入酶标孔中,置于 4℃ 冰箱内过夜;次日取出酶标板,200 μ L/孔加入 PBST 洗涤液洗涤 3 次,每次摇床震荡 3min,甩去水分,在吸水纸上拍干;以下洗涤方法相同;

2) 加封闭缓冲液 200 μ L/孔封闭酶标板,37℃ 孵育 2h;

3) 将封闭缓冲液扣掉,洗涤酶标板三次;

4) 将免疫过的大鼠的阳性血清稀释成系列浓度加入酶标孔,100 μ L/孔,另一行加入等量的未经过免疫的大鼠的阴性血清,37℃ 孵育 45min 后洗涤,拍干;

5) 抗体稀释液以 1:4000 的比例稀释酶标二抗 (RAM-HRP),然后 100 μ L 每孔加入酶标板中,37℃ 孵育 45min 后洗涤,拍干;

6) 加入 100 μ L TMB 显色液 (A 液:B 液的混合比例为 1:1),暗处静置显色反应 20min 后每孔加入 100 μ L 2M 浓硫酸终止反应,用酶标仪测定 450nm 的吸光值 (OD_{450}),从而得到抗体效价。

一种四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种四溴双酚 A 含量的检测方法,更具体的说是对四溴双酚 A 的一种间接竞争酶联免疫检测方法,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 四溴双酚 A (TBBPA) 是目前使用最常见的一种溴系阻燃剂,被广泛用作反应型阻燃剂以制造含溴环氧树脂和含溴聚碳酸酯以及作为中间体合成其他复杂的阻燃剂,也作为添加型阻燃剂用于 ABS、HIPS、不饱和聚酯、硬质聚氨酯泡沫塑料、胶黏剂以及涂料等。四溴双酚 A 可以从产品中释放到环境介质中,随着其大量使用,自然环境中四溴双酚 A 的含量在迅速增加。目前,TBBPA 在大气,水体,土壤,生物体内均已被检出。研究表明,TBBPA 是一种潜在的环境内分泌干扰物,具有潜在的持久性、细胞毒性、免疫毒性、甲状腺素干扰性以及雌激素干扰性,尤其对水生生物产生严重毒害作用。TBBPA 能够通过饮用水或者生物富集以及食物链的方式积累到人体内,从而危害到人类的健康。目前,挪威的 PoHS 禁令已从 2008 年起禁止在电子电气类消费品使用 TBBPA。

[0003] 常用的四溴双酚 A 的分析方法有高效液相色谱法,气质联用法和液质联用法。由于这些分析方法样品前处理复杂,且所需的仪器价格昂贵,检测成本高,分析速度慢,不适合现场监控和大量样品筛查。酶联免疫检测方法 (ELISA) 特异性强、灵敏度高、价格低廉、快速简便,能弥补传统色谱分析方法不足,已被大量应用于环境中有机污染物的检测,而目前国内针对四溴双酚 A 的 ELISA 检测方法尚未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法,是一种具有高灵敏性和特异性的快速检测方法,以克服现有技术的不足。

[0005] 一种四溴双酚 A 的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于包括以下步骤:

[0006] 1) 用四溴双酚 A 合成人工抗原的步骤:

[0007] 即首先将四溴双酚 A 衍生化制成半抗原,再将所述的半抗原与 BSA 制备成偶联物作为免疫抗原;然后将所述的四溴双酚 A 半抗原与 OVA 制备成偶联物,并将该偶联物作为包被抗原;

[0008] 具体的步骤是:

[0009] 首先将四溴双酚 A 衍生化制成半抗原。称取四溴双酚 A 半抗原、NHS 和 EDC 各 0.3mmol 于烧杯中,加入 3mL DMSO 溶解,磁力搅拌过夜。然后称取 0.12g BSA 或 OVA,溶解在 5mL 0.1mol/L NaHCO₃ (pH7.0),得到 BSA 或 OVA 溶液。将含有四溴双酚 A 半抗原的溶液加入 BSA 或 OVA 溶液中,边搅拌边缓慢滴加,反应过夜,所得溶液 4℃ 透析后冷冻干燥, -20℃ 保存。四溴双酚 A 半抗原与 BSA 制备成的偶联物为免疫抗原,四溴双酚 A 半抗原与 OVA 制备的偶联物为包被抗原;

[0010] 2) 四溴双酚 A 多克隆抗体的制备步骤:

[0011] 以四溴双酚 A 与 BSA 的偶联物为免疫抗原,免疫昆明大白鼠并利用现有的多克隆抗体制备与纯化技术获得四溴双酚 A 多克隆抗体,该抗体可与四溴双酚 A 特异性结合;

[0012] 3) 间接竞争 ELISA 检测步骤:

[0013] 利用棋盘滴定法对包被抗原和抗体工作浓度进行筛选,选择包被抗原浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$,多克隆抗体稀释度为 1:2400,酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG(RAM-HRP)) 稀释度为 1:4000;

[0014] 以 0.05M 的碳酸盐缓冲液稀释步骤 1 得到的包被抗原至 $10 \mu\text{g/mL}$,将稀释后的包被抗原加入酶标板中,每孔 $100 \mu\text{L}$,置于 4°C 冰箱内孵育过夜;

[0015] 将孵育过夜后的酶标板甩干液体,然后加入 $200 \mu\text{L}$ /孔洗涤液洗涤 3 次后,加入封闭液,所述的封闭液是含 1%酪蛋白的上述 0.05M 的碳酸盐缓冲液, 37°C 封闭 2h;

[0016] 用 PBST 将四溴双酚 A 标准品溶液及待测样品稀释后,分别加入到各自的酶标孔中,每孔加 $100 \mu\text{L}$;同时分别以抗体稀释液(所述的抗体稀释液是含 1%酪蛋白的 PBST 溶液)以 1:2400 的比例稀释步骤 2 得到的多克隆抗体,再加入酶标板中,每孔 $100 \mu\text{L}$; 37°C 孵育 30-60min 后以 PBST 洗涤 3 次;

[0017] 以抗体稀释液 1:4000 的比例稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG(RAM-HRP),然后加入酶标板中,每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 30-60min 后以 PBST 洗涤 3 次;

[0018] 将四甲基联苯胺显色液 A 液和 B 液 1:1 混合后加入酶标板中,每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 显色 20min;将加入 2M 硫酸溶液加入酶标板中终止反应,每孔 $50 \mu\text{L}$;

[0019] 用酶标仪在 450nm 波长下测吸光值 OD_{450} ,得到四溴双酚 A 标准品溶液的标准曲线,以及待测样品的吸光值,将所得的待测样品的吸光值与所做标准曲线对比可计算出待测样品的四溴双酚 A 含量。

[0020] 上述步骤 2 的四溴双酚 A 多克隆抗体的具体制备方法如下:

[0021] 选取 4 周龄的雌性昆明大白鼠作为实验动物,实验前暂养一周;将免疫抗原用生理盐水稀释至 1mg/mL ,然后与等量的弗氏佐剂混合用搅拌法使其乳化,乳化完全的标准是将一滴乳化过的溶液滴入水中呈现球型不分散,静置后不出现油水分层;初次免疫将乳化好的抗原溶液于大鼠背部皮下多点注射,每只注射 1mL ;两周后进行第一次加强免疫,免疫抗原用不完全弗氏佐剂乳化,注射部位和剂量与初次免疫相同;两周后进行第二次加强免疫,生理盐水稀释抗原溶液,免疫部位为尾静脉;一周后进行最后一次加强免疫,操作与第二次加强免疫相同;从耳缘静脉采血,采用直接 ELISA 法测定抗体效价,确定抗体效价达到要求后采用摘眼球取血获得抗血清,收集于灭菌离心管中。将此抗血清高速离心并过滤纯化后于 -20°C 保存。

[0022] 所述的采用直接 ELISA 法测定抗体效价的步骤如下:

[0023] 1) 将步骤 1 的包被抗原用 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释, $100 \mu\text{L}$ /孔加入酶标孔中,置于 4°C 冰箱内过夜;次日取出酶标板, $200 \mu\text{L}$ /孔加入 PBST 洗涤液洗涤 3 次,每次摇床震荡 3min,甩去水分,在吸水纸上拍干;以下洗涤方法相同;

[0024] 2) 加封闭缓冲液 $200 \mu\text{L}$ /孔封闭酶标板, 37°C 孵育 2h;

[0025] 3) 将封闭缓冲液扣掉,洗涤酶标板三次;

[0026] 4) 将免疫过的大鼠的阳性血清稀释成系列浓度加入酶标孔, $100 \mu\text{L}$ /孔,另一行加入等量的未经过免疫的大鼠的阴性血清, 37°C 孵育 45min 后洗涤,拍干;

[0027] 5) 抗体稀释液以 1:4000 的比例稀释酶标二抗 (RAM-HRP), 然后 100 μ L 每孔加入酶标板中, 37°C 孵育 45min 后洗涤, 拍干;

[0028] 6) 加入 100 μ L TMB 显色液 (A 液 :B 液的混合比例为 1:1), 暗处静置显色反应 20min 后每孔加入 100 μ L 2M 浓硫酸终止反应, 用酶标仪测定 450nm 的吸光值 (OD_{450}); 从而得到抗体效价。

[0029] 本发明的有益效果: 以四溴双酚 A 和 BSA 偶联物为免疫抗原, 以四溴双酚 A 和 OVA 偶联物为包被抗原, 建立了四溴双酚 A 的间接竞争 ELISA 方法, 为环境中四溴双酚 A 残留检测提供了一种快速高效的检测手段。由于该方法采用的是多克隆抗体, 成本较低且准确性和稳定性较好。

附图说明

[0030] 图 1 四溴双酚 A 的检测的标准抑制曲线

具体实施方式

[0031] 以下通过实施例进一步说明本发明

[0032] 一、主要仪器:

[0033] R015 型纯水机, 上海力申科学仪器有限公司

[0034] Neofuge15R 型台式离心机, 上海力申科学仪器有限公司

[0035] TS-1 型摇床, 江苏海门市麒麟医用仪器厂

[0036] SPECTRA MAX190 型酶标仪, Molecular Devices 公司

[0037] 可调式移液器, Eppendorf 公司

[0038] 二、试剂

[0039] 辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG (RAM-HRP), 使用北京翰谱医药生物研究所研制的市售产品

[0040] 四苯基联苯氨 (TMB) 显色液, 使用北京翰谱医药生物研究所研制的市售产品

[0041] 其他试剂均为分析纯试剂

[0042] 三、步骤:

[0043] 1、人工抗原的制备: 四溴双酚 A 衍生化后通过碳二亚胺法分别与牛血清蛋白 BSA 和卵清蛋白 OVA 偶联得到免疫抗原和包被抗原。(该人工抗原可直接选用北京翰谱医药生物研究所研制的市售产品)

[0044] 2、四溴双酚 A 多克隆抗体的制备

[0045] 选取 4 周龄的雌性昆明大白鼠作为实验动物, 实验前暂养一周。将免疫原用生理盐水稀释至 1mg/mL, 然后与等量的弗氏佐剂混合用搅拌法使其乳化, 搅拌使用自制工具, 即将金属环固定于细木棒顶端, 将木棒作为匀浆器的转轴, 可高速搅拌使混合液快速乳化, 乳化完全的标准是将一滴乳化过的溶液滴入水中呈现球型不分散, 静置后不出现油水分层。初次免疫将乳化好的抗原溶液于大鼠背部皮下多点注射, 每只注射 1mL。两周后进行第一次加强免疫, 用不完全弗氏佐剂乳化, 注射部位和剂量与初次免疫相同。两周后进行第二次加强免疫, 生理盐水稀释抗原溶液, 免疫部位为尾静脉。一周后进行最后一次加强免疫, 操作与第二次加强免疫相同。从耳缘静脉采血, 采用直接 ELISA 法测定抗体效价, 确定抗体

效价可用后采用摘眼球取血获得抗血清,收集于灭菌离心管中。将此抗血清高速离心并过滤纯化后于 -20°C 保存。

[0046] 3、抗体效价的测定步骤:

[0047] 1) 将包被抗原四溴双酚 A-OVA 偶联物用碳酸盐缓冲液稀释, $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标孔中,置于 4°C 冰箱内过夜。次日取出酶标板,将孵育后的酶标板中的液体扣掉,每孔加入 PBST 洗涤液 $200\ \mu\text{L}$,每次摇床震荡 3min ,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干,重复此洗涤过程 3 次;以下洗涤方法相同;

[0048] 2) 加封闭缓冲液 $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 封闭酶标板, 37°C 孵育 2h ;

[0049] 3) 将封闭缓冲液扣掉,洗涤 3 次;

[0050] 4) 将阳性血清稀释成系列浓度加入酶标孔, $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$,另一行加入等量的阴性血清, 37°C 孵育 45min 后洗涤 3 次;

[0051] 5) 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ $1:4000$ 稀释的酶标二抗 RAM-HRP, 37°C 孵育 45min 后洗涤 3 次;

[0052] 6) 加入 $100\ \mu\text{L}$ TMB 显色液 (A 液:B 液的混合比例为 $1:1$),暗处静置显色反应 20min 后每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 2M 浓硫酸终止反应,用酶标仪测定 450nm 的吸光值 (OD_{450});以阳性血清 OD 值:阴性血清 OD 值大于 2 对应的最大的抗血清稀释度为抗血清效价,本发明制备的抗血清的效价在 $1:10000$ 以上,满足实验要求。

[0053] 4、竞争 ELISA 反应过程

[0054] 1) 利用棋盘滴定法对包被抗原和抗体工作浓度进行筛选,选择包被抗原浓度为 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$,多克隆抗体稀释度为 $1:2400$,酶标二抗稀释度为 $1:4000$ 。

[0055] 2) 包被:将包被抗原即四溴双酚 A-OVA 偶联物用碳酸盐缓冲液稀释至 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标孔中,置于 4°C 冰箱内孵育过夜;

[0056] 3) 洗板:将酶标板中的液体扣掉,每孔加入 PBST 洗涤液 $200\ \mu\text{L}$,每次摇床震荡 3min ,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干;重复此洗涤过程 3 次;以下洗涤方法相同;

[0057] 4) 封闭:加入封闭液, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 封闭 2h ;所述的封闭液是含 1% 酪蛋白的上述 0.05M 的碳酸盐缓冲液,

[0058] 5) 洗板:同 b,即将孵育后的酶标板中的液体扣掉,每孔加入 PBST 洗涤液 $200\ \mu\text{L}$,每次摇床震荡 3min ,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干;重复此洗涤过程 3 次;

[0059] 6) 竞争:加入四溴双酚 A 标准溶液 (PBST 稀释成系列浓度) 或样品提取液至酶标板, $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$;另加入 $50\ \mu\text{L}$ PBST 稀释液至酶标板,此酶标孔作为阳性对照;然后加入 $50\ \mu\text{L}$ 抗体稀释液以 $1:2400$ 比例稀释的多克隆抗体至酶标板,充分混匀后 37°C 孵育 45min ;所述的抗体稀释液是含 1% 酪蛋白的 PBST 溶液;

[0060] 7) 洗板:同 b,即将孵育后的酶标板中的液体扣掉,每孔加入 PBST 洗涤液 $200\ \mu\text{L}$,每次摇床震荡 3min ,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干;重复此洗涤过程 3 次;

[0061] 8) 加二抗:加入 HRP 标记的二抗 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育 45min ;

[0062] 9) 洗板:同 b,即将孵育后的酶标板中的液体扣掉,每孔加入 PBST 洗涤液 $200\ \mu\text{L}$,每次摇床震荡 3min ,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干;重复此洗涤过程 3 次;

[0063] 10) 显色:加入 TMB 显色液 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$,避光静置显色反应 20min ,然后加入 2M 的浓硫酸 $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 终止反应;

[0064] 11) 测定 :酶标仪测定 450nm 的吸光值 (OD_{450})。根据所得数据计算抑制率 : (阳性对照吸光值 - 标准品或待测样品吸光值) / 阳性对照吸光值 $\times 100\%$, 根据标准品抑制率和标准品浓度制作标准曲线 (见附图 1), 以标准曲线对待测样品进行定量分析。标准抑制曲线见附图 1。从附图 1 可见本实验所获得的抗体的线性检测范围为 0.1-100ng/mL。灵敏度是所得 90% 最大吸光值所对应的标准品的浓度, IC_{90} 为 0.1ng/mL。

[0065] 本发明的关键之一在于酪蛋白的巧妙使用, 而酪蛋白在此类检测中尚未出现过相关记载, 经反复研究发现酪蛋白对于四溴双酚 A 间接竞争酶联免疫检测的过程有着至关重要的作用, 因此在上述步骤 5)、6) 中需要在所述的 0.05M 的碳酸盐缓冲液中添加含 1% 酪蛋白作为封闭液 ; 同时在接下来的抗体稀释步骤中也需要在所述的 PBST 溶液中添加含 1% 酪蛋白作为抗体稀释液 ; 并且发明人进一步的实验也表明若不添加适当含量的酪蛋白是难以实现本发明的检测效果的, 因此酪蛋白的使用是本发明能够取得预期效果的保证之一。

[0066] 5、回收率的测定

[0067] 通过计算加标回收率来测试本发明建立的四溴双酚 A 间接竞争 ELISA 检测方法的准确性。取超纯水加入不等量的四溴双酚 A 标准品, 利用本发明建立的方法进行 ELISA 检测, 通过比对标准曲线进行定量, 并计算加标回收率。结果见表 1。由表 1 可见, 本发明建立的四溴双酚 A 间接竞争 ELISA 检测方法对四溴双酚 A 的检测准确可靠。

[0068] 表 1 样品的加标回收率

[0069]

加标浓度 (ng/mL)	检测浓度 (ng/mL)	加标回收率 (%)
1	0.92	92.00
40	37.47	93.68
80	80.32	100.04

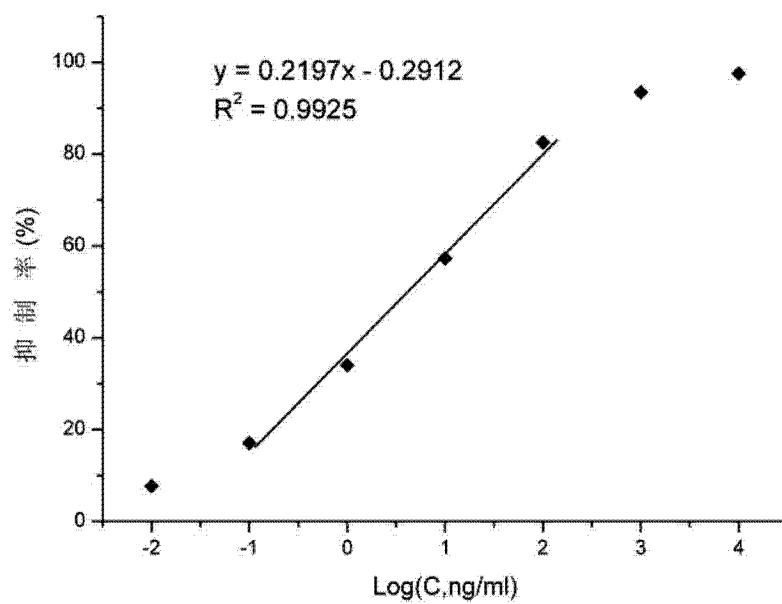


图 1

专利名称(译)	一种四溴双酚A的间接竞争酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN104101702A	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	CN201410317502.7	申请日	2014-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	潘鲁青 胡丰晓 张辉 修蒙 刘童		
发明人	潘鲁青 胡丰晓 张辉 修蒙 刘童		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/543		
代理人(译)	张中南 邱岳		
其他公开文献	CN104101702B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种四溴双酚A的间接竞争酶联免疫检测方法，包括1)用四溴双酚A合成人工抗原；2)制备四溴双酚A多克隆抗体：以四溴双酚A与BSA的偶联物为免疫抗原，免疫昆明大白鼠并利用现有的多克隆抗体制备与纯化技术获得四溴双酚A多克隆抗体；3)间接竞争ELISA检测：选择包被抗原浓度为10μg/mL，并用碳酸盐缓冲液稀释；洗板，加入缓冲液封闭，再次洗板；进行竞争，洗板，加二抗，洗板；进行显色反应；最后酶标仪测定450nm的吸光值(OD450)。本发明建立了四溴双酚A的间接竞争ELISA方法，为环境中四溴双酚A残留检测提供了一种快速高效的检测手段。由于该方法采用的是多克隆抗体，成本较低且准确性和稳定性较好。

