



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104101702 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201410317502. 7

(22) 申请日 2014. 07. 04

(73) 专利权人 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)

(56) 对比文件

CN 102830227 A, 2012. 12. 19,

CN 101863981 A, 2010. 10. 20,

CN 103048445 A, 2013. 04. 17,

CN 101413945 A, 2009. 04. 22,

Chuan Xu et al. Development of a
Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay for Tetrabromobisphenol
A. 《MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS
AND IMMUNOTHERAPY》. 2013, 第 32 卷 (第 2 期),
Chuan Xu et al. Development of a
Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay for Tetrabromobisphenol
A. 《MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS
AND IMMUNOTHERAPY》. 2013, 第 32 卷 (第 2 期),
Mei-Ping Zhao et al. A new competitive
enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
for determination of estrogenic bisphenols.
《Talanta》. 2002, 第 57 卷

审查员 舒霏霏

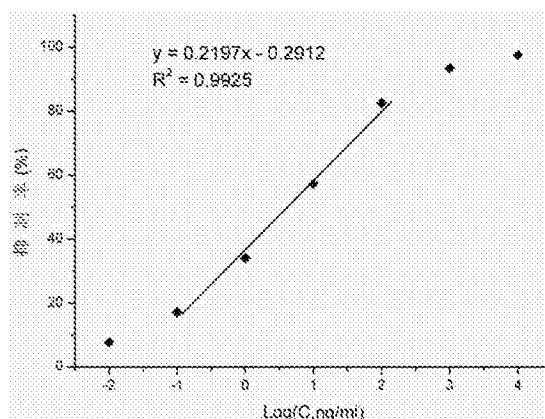
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(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,酶标二抗稀释度为1:4000;所述的酶标二抗是辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG;

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;所述的抗体稀释液是含1%酪蛋白的PBST溶液;

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,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且pH为7.0的 NaHCO_3 ,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,100μL/孔加入酶标孔中,置于4℃冰箱内过夜;次日取出酶标板,200μL/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200μL/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,100μL/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,然后100μL每孔加入酶标板中,37℃孵育45min后洗涤,拍干;

6)加入100μL TMB显色液,其中显色液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100μL 2M浓硫酸终止反应,用酶标仪测定450nm的吸光值(OD₄₅₀),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 μ 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 μ g/mL,将稀释后的包被抗原加入酶标板中,每孔100 μ L,置于4 $^{\circ}$ 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 μ 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 $^{\circ}$ 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 μ 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 μ L;37 $^{\circ}$ 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 μ L,37 $^{\circ}$ 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 μ L,37 $^{\circ}$ 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 μ L;

[0019] 用酶标仪在450nm波长下测吸光值OD₄₅₀,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 $^{\circ}$ 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 μ L/孔加入酶标孔中,置于4 $^{\circ}$ C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;

[0024] 2)加封闭缓冲液200 μ L/孔封闭酶标板,37 $^{\circ}$ 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 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 L2M浓硫酸终止反应,用酶标仪测定450nm的吸光值(OD₄₅₀);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] RO15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,Effendorf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℃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,100μL/孔加入酶标孔中,置于4℃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200μL,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200μL/孔封闭酶标板,37℃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,100μL/孔,另一行加入等量的阴性血清,37℃孵育45min后洗涤3次;

[0051] 5)每孔加入100μL1:4000稀释的酶标二抗RAM-HRP,37℃孵育45min后洗涤3次;

[0052] 6)加入100μL 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50μL2M浓硫酸终止反应,用酶标仪测定450nm的吸光值(OD₄₅₀);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10μg/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10μg/mL,100μL/孔加入酶标孔中,置于4℃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200μL,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,200μL/孔,37℃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200μL,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,50μL/孔;另加入50μLPBST稀释液至酶标板,此酶标孔作为阳性对照;然后加入50μL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℃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200μL,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100μL/孔,37℃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200μL,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100μL/孔,避光静置显色反应20min,然后加入2M的浓硫酸50μL/孔终止反应;

[0064] 11)测定:酶标仪测定450nm的吸光值(OD₄₅₀)。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,IC₉₀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

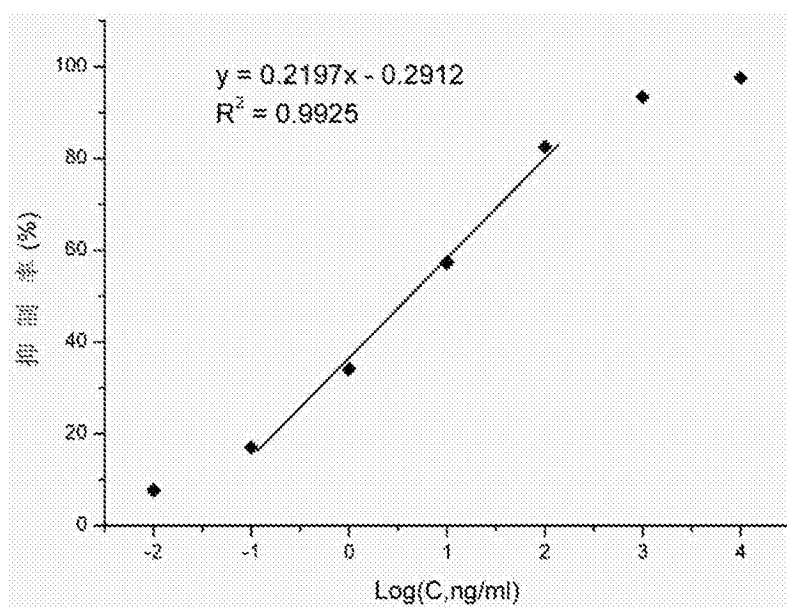


图1

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	CN104101702B	公开(公告)日	2016-04-20
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	CN104101702A		
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。

