



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102175846 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 07

(21) 申请号 201010604674. 4

(22) 申请日 2010. 12. 24

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学

(72) 发明人 王利兵 胥传来 吴晓玲 彭池方
马伟 李灼坤

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/52 (2006. 01)

G01N 33/536 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

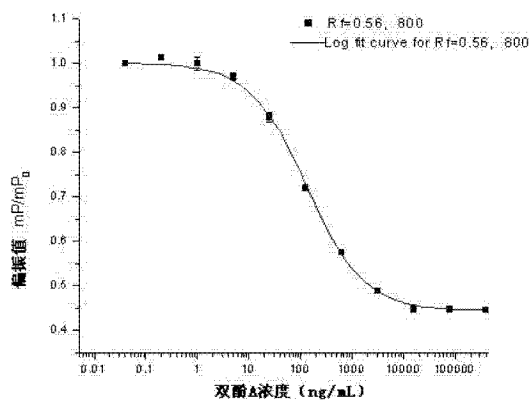
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种双酚 A 的荧光偏振免疫分析检测方法

(57) 摘要

一种双酚 A 的荧光偏振免疫分析检测方法，属于荧光偏振免疫检测技术领域。本发明利用双酚酸作为半抗原偶联 FITC 荧光素衍生物，合成荧光标记物，并以双酚 A 为标准品，双酚 A 多抗为抗体，建立了双酚 A 的荧光偏振免疫分析方法。本发明建立了双酚 A 的荧光偏振免疫分析方法，为双酚 A 的残留检测提供了一种快速高效的检测方法。本发明方法操作简便、快速、成本低，结果可靠。灵敏度为 2ng/mL，线性范围为 20 ~ 800ng/mL。免疫反应的高特异性和亲和性使荧光偏振免疫分析方法具有极高的选择性和灵敏度。



1. 一种双酚 A 的荧光偏振免疫分析检测方法,其特征在于利用双酚酸作为半抗原偶联 FITC 荧光素衍生物合成荧光标记物,并以双酚 A 为标准品,用双酚 A 多抗为抗体,建立双酚 A 的荧光偏振免疫分析检测方法;步骤如下:

(1) FITC 荧光素衍生物 EDF 的制备:

① 分别量取 200mg 乙二胺盐酸盐,500 μ L 三乙胺,溶解于 50mL 的甲醇中,得含乙二胺盐酸盐的三乙胺溶液;

② 117mg 的荧光素 FITC,100 μ L 的三乙胺,溶解于 10mL 的甲醇中,得 FITC 溶液;

③ 逐滴将 FITC 溶液滴加入含乙二胺盐酸盐的三乙胺溶液中;

④ 混合溶解,室温避光下搅拌反应 10h,然后过滤分离出沉淀,干燥,得 FITC 荧光素衍生物 EDF,避光保存;

(2) EDF 标记物的制备:

N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 9.2mg,二环己基碳二亚胺 DCC16.4mg,和双酚酸 1.4mg,溶解于 2.0mL 的 DMF 中,室温下搅拌过夜;

向反应溶液中加入 FITC 荧光素标记物的衍生物 EDF 2-3mg,室温下避光搅拌反应 3h,制得 EDF 标记物;

(3) EDF 标记物的纯化:

以 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=1:1$ 为展开液,室温下进行薄层层析,分离纯化 EDF 标记物,紫外透射仪下观察,选择 $R_f=0.56$ 的条带,用 300 μ L 甲醇萃取;

(4) EDF 标记物工作浓度的确定:

用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液稀释不同浓度的 EDF 标记物,上偏振仪检测偏振光强度,以 10 倍于空白溶液的偏振光强度作为其工作浓度;确定选取 1:1500 稀释作为工作浓度;空白溶液选用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液;

(5) 双酚 A 多抗的工作浓度的确定:

在每个试管中依次加入 500 μ L 用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液稀释成不同稀释浓度: 1:200,1:400,1:800,1:1600,1:3200,1:6400,1:12800 的双酚 A 多抗,并依次加入 500 μ L 的 EDF 标记物,室温下孵育 5min,上偏振仪检测偏振光值,确定选取 1:800 稀释作为抗体的工作浓度;

(6) 竞争:

双酚 A 用超纯水稀释成 1,5,25,125,625,3125,15625,78125ng/mL 系列浓度分别加入不同的试管中,另设一个超纯水空白对照,50 μ L/管;然后向每个试管中加入 500 μ L 稀释 1500 倍的 EDF 标记物,最后分别加入 500 μ L 稀释 800 倍的双酚 A 多抗于室温下孵育 5min,上偏振仪检测偏振光值;

(7) 建立双酚 A 的标准抑制对数曲线:将所测得的检测偏振光值为纵坐标,以双酚 A 浓度为横坐标作图建立双酚 A 的标准抑制对数曲线;

(8) 实际样品的检测:以实际样品按步骤(6)的方法进行检测,测得的偏振光值以双酚 A 的标准抑制对数曲线对照,确定样品的双酚 A 残留浓度。

一种双酚 A 的荧光偏振免疫分析检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及双酚 A 的一种荧光偏振免疫分析检测方法,属于荧光偏振免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 双酚 A (Bisphenol A, BPA) 学名 2, 2-二(4-羟基苯基)丙烷,是从食品包装材料中新发现的一种“破坏内分泌化学物质 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDC)”。BPA 是由苯酚、丙酮在酸性介质中合成的,是重要的有机化工原料,主要用于制造高分子材料,在容器内壁涂料、食品包装材料等方面有着重要的用途。在生产和生活中, BPA 可通过皮肤、呼吸道、消化道等途径进入人体, BPA 对皮肤、呼吸道、消化道和角膜均有中等强度刺激性。人类主要通过食用含有 BPA 材料包装的食物,使用婴儿奶瓶,牙科填充物和密封罐等摄入 BPA。BPA 在低剂量时即具有 DNA 氧化损伤作用。因此其食品包装材料中的残留也越来越引起了国内外的重视。现有的这些仪器检测法虽然有灵敏度高、适用范围广等优点,但是样品前处理复杂,所需的仪器昂贵,成本高,检测时间长,因此有必要研究特异性强,灵敏度高同时价格低廉,能快速简便的免疫检测技术。近年来,国内外已经开展了对双酚 A 免疫分析方法的研究。但目前为止,国内尚没有运用荧光偏振免疫分析技术检测双酚 A 的报道,为此设计合成了以双酚 A 的类似物双酚酸为半抗原合成了荧光素标记物。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种快速检测双酚 A 残留的荧光偏振免疫检测方法,并且有较高的灵敏度和特异性。

[0004] 本发明的技术方案:一种双酚 A 的荧光偏振免疫分析检测方法,利用双酚酸作为半抗原偶联 FITC 荧光素衍生物合成荧光标记物,并以双酚 A 为标准品,用双酚 A 多抗为抗体,建立双酚 A 的荧光偏振免疫分析检测方法;步骤如下:

(1) FITC 荧光素衍生物 EDF 的制备:

① 分别量取 200mg 乙二胺盐酸盐, 500 μ L 三乙胺, 溶解于 50mL 的甲醇中, 得含乙二胺盐酸盐的三乙胺溶液;

② 117mg 的荧光素 FITC, 100 μ L 的三乙胺, 溶解于 10mL 的甲醇中, 得 FITC 溶液;

③ 逐滴将 FITC 溶液滴加入含乙二胺盐酸盐的三乙胺溶液中;

④ 混合溶解, 室温避光下搅拌反应 10h, 然后过滤分离出沉淀, 干燥, 得 FITC 荧光素衍生物 (EDF), 避光保存;

(2) EDF 标记物的制备:

N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 9.2mg, 二环己基碳二亚胺 DCC16.4mg, 和双酚 A 1.4mg, 溶解于 2.0mL 的 DMF 中, 室温下搅拌过夜;

向反应溶液中加入 FITC 荧光素标记物的衍生物 EDF 2-3mg, 室温下避光搅拌反应 3h, 制得 EDF 标记物;

(3) EDF 标记物的纯化:

以 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=1:1$ 为展开液, 室温下进行薄层层析, 分离纯化 EDF 标记物, 紫外透射仪下观察, 选择 $R_f=0.56$ 的条带, 用 300 μL 甲醇萃取;

(4) EDF 标记物工作浓度的确定:

用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液稀释不同浓度的 EDF 标记物, 上偏振仪检测偏振光强度, 以 10 倍于空白溶液的偏振光强度作为其工作浓度; 确定选取 1:1500 稀释作为工作浓度; 空白溶液选用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液;

(5) 双酚 A 多抗的工作浓度的确定:

在每个试管中依次加入 500 μL 用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液稀释成不同稀释浓度: 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 的双酚 A 多抗, 并依次加入 500 μL 的 EDF 标记物, 室温下孵育 5min, 上偏振仪检测偏振光值, 确定选取 1:800 稀释作为抗体的工作浓度;

(6) 竞争:

双酚 A 用超纯水稀释成 1, 5, 25, 125, 625, 3125, 15625, 78125ng/mL 系列浓度分别加入不同的试管中, 另设一个超纯水空白对照, 50 μL /管; 然后向每个试管中加入 500 μL 稀释 1500 倍的 EDF 标记物, 最后分别加入 500 μL 稀释 800 倍的双酚 A 多抗于室温下孵育 5min, 上偏振仪检测偏振光值;

(7) 建立双酚 A 的标准抑制对数曲线: 将所测得的检测偏振光值为纵坐标, 以双酚 A 浓度为横坐标作图建立双酚 A 的标准抑制对数曲线;

(8) 实际样品的检测: 以实际样品按步骤(6)的方法进行检测, 测得的偏振光值以双酚 A 的标准抑制对数曲线对照, 确定样品的双酚 A 残留浓度。

[0005] 更详细的步骤为:

主要溶液配制

1) 配制 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液:

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 9.534g, 加超纯水稀释至 980 mL, 用 2M NaOH 调至 pH8.0, 加超纯水定容至 1000 mL。

[0006] 荧光偏振免疫分析检测方法的步骤如下:

预先将双酚 A 的标准品配制成 1mg/mL 的甲醇溶液作为工作母液, 在 4°C 保存待用。配制硼酸盐缓冲液 (0.025mol/L、pH8.0), 以此为基础配制系列反应液, 用以稀释荧光素标记物和双酚 A 多抗。

[0007] a、荧光素标记物工作浓度的确定: 稀释不同浓度的荧光素标记物, 上机检测偏振光强度, 以 10 倍于空白溶液 (0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液) 的偏振光强度作为其工作浓度。实验结果选取 1:5000 作为工作浓度。

[0008] b、双酚 A 抗体的工作浓度的确定: 在每个试管中依次加入 500 μL 用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液稀释成不同稀释浓度的双酚 A 抗体 (1:200, 1:400, 1:800, 1:1600,

1:3200, 1:6400, 1:12800), 并依次加入 500 μL 的荧光素标记物, 室温下孵育 5min, 上机检测偏振光值。实验结果选取 1:800 作为抗体的工作浓度。

[0009] c、竞争:

将双酚 A 用超纯水稀释成 1, 5, 25, 125, 625, 3125, 15625, 78125ng/mL 系列浓度分别加入不同的试管中, 另设一个超纯水空白对照, 50 μL /管。然后向每个试管中加入 500 μL 稀释 1500 倍的荧光素标记物, 最后分别加入 500 μL 稀释 800 倍的双酚 A 多抗, 于室温下孵育 5min。

[0010] d、测定: 上机检测偏振光值。

[0011] 本发明的有益效果: 本发明建立了双酚 A 荧光偏振免疫检测方法, 为双酚 A 残留检测提供了一种快速高效的检测手段, 由于采用的是多克隆抗体和便携式的荧光偏振仪器, 费用较低, 快速, 方便, 可靠。灵敏度为 2ng/mL, 线性范围为 20-800ng/mL。免疫反应的高特异性和高亲和性使荧光偏振免疫具有极高的选择性和灵敏性, 样本前处理过程简单, 操作方便, 快速。

附图说明

[0012] 图 1 用荧光偏振仪建立的双酚 A 的标准抑制对数曲线。

具体实施方案

[0013] 以下通过实施例进一步说明本发明。

[0014] 一、仪器:

KFLOW 纯水机, 凯佛隆公司,
AB104-N 型电子分析天平,
便携式荧光偏振仪, SENTARY 100,
可调试移液器, Thermo Labsystems 公司,
涡旋混合器, 上海沪西仪器分析厂。

[0015] 二、试剂:

双酚 A 多克隆抗体, 实验室自制,
其他试剂均为分析纯试剂。

[0016] 三、步骤

1. FITC 荧光素衍生物(EDF) 的制备, 步骤如下:

① 分别量取 200mg 乙二胺盐酸盐, 500 μL 三乙胺, 溶解于 50mL 的甲醇中, 得含乙二胺盐酸盐的三乙胺溶液。

[0017] ② 117mg 的荧光素 FITC, 100 μL 的三乙胺, 溶解于 10mL 的甲醇中, 得 FITC 溶液。

[0018] ③ 逐滴将 FITC 溶液滴加入含乙二胺盐酸盐的三乙胺溶液中。

[0019] ④ 混合溶解, 室温避光下搅拌反应 10h, 然后过滤分离出沉淀, 干燥, 得 FITC 荧光

素衍生物(EDF),避光保存。

[0020] 2. EDF 标记物的制备,步骤如下:

N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (9.2mg, 80 μ mol), 二环己基碳二亚胺(DCC) (16.4mg, 80 μ mol), 和双酚酸(1.4mg, 4.8 μ mol) 溶解于 2.0mL 的 DMF 中。室温下搅拌过夜。

[0021] 向反应溶液中加入 FITC 荧光素标记物的衍生物 EDF2-3mg, 室温下避光搅拌反应 3h, 制得 EDF 标记物。

[0022] 3、EDF 标记物的纯化:

以 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=1:1$ 为展开液, 室温下进行薄层层析, 分离纯化 EDF 标记物。紫外透射仪下观察, 选择 $R_f=0.56$ 的条带。用 300 μ L 甲醇萃取。

[0023] 4、EDF 标记物工作浓度的确定:

用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液稀释不同浓度的 EDF 标记物, 上机检测偏振光强度, 以 10 倍于空白溶液(0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液)的偏振光强度作为其工作浓度。实验结果选取 1:1500 作为工作浓度。

[0024] 5、双酚 A 抗体的工作浓度的确定:

在每个试管中依次加入 500 μ L 用 0.025M、pH8.0 硼酸盐缓冲液稀释成不同稀释浓度的双酚 A 抗体(1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800), 并依次加入 500 μ L 的 EDF 标记物, 室温下孵育 5min, 上偏振仪检测偏振光值。实验结果选取 1:800 作为抗体的工作浓度。

[0025] 6、竞争:

双酚 A 用超纯水稀释成 1, 5, 25, 125, 625, 3125, 15625, 78125ng/mL 系列浓度分别加入不同的试管中, 另设一个超纯水空白对照, 50 μ L/管。然后向每个试管中加入 500 μ L 稀释 1500 倍的 EDF 标记物, 最后分别加入 500 μ L 稀释 800 倍的双酚 A 多抗于室温下孵育 5min。上偏振仪检测偏振光值。

[0026] 试验结果如下:

1、标准曲线: 本发明所获得的抗体检测的线性范围是为 20 ~ 800ng/mL。

[0027] 2、灵敏度: 灵敏度是所得 90% 最大偏振光值所对应的标准品的浓度, 即 IC_{10} 为 2ng/mL。

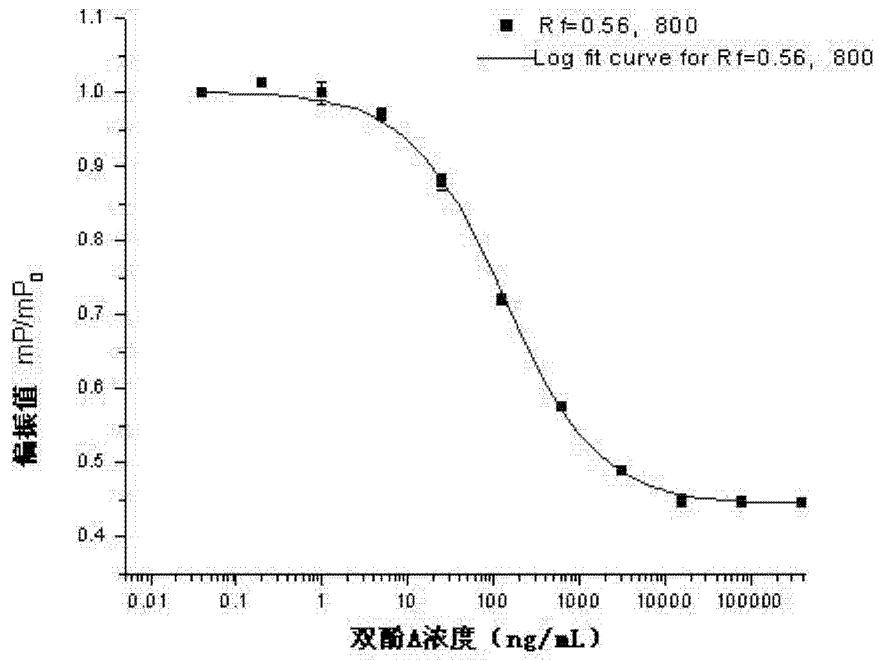


图 1

专利名称(译)	一种双酚A的荧光偏振免疫分析检测方法		
公开(公告)号	CN102175846A	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	CN201010604674.4	申请日	2010-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	王利兵 胥传来 吴晓玲 彭池方 马伟 李灼坤		
发明人	王利兵 胥传来 吴晓玲 彭池方 马伟 李灼坤		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/536 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种双酚A的荧光偏振免疫分析检测方法，属于荧光偏振免疫检测技术领域。本发明利用双酚酸作为半抗原偶联FITC荧光素衍生物，合成荧光标记物，并以双酚A为标准品，双酚A多抗为抗体，建立了双酚A的荧光偏振免疫分析方法。本发明建立了双酚A的荧光偏振免疫分析方法，为双酚A的残留检测提供了一种快速高效的检测方法。本发明方法操作简便、快速、成本低，结果可靠。灵敏度为2ng/mL，线性范围为20~800ng/mL。免疫反应的高特异性和亲和性使荧光偏振免疫分析方法具有极高的选择性和灵敏度。

