



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102721811 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201210167285. 9

(22) 申请日 2012. 05. 28

(71) 申请人 许昌学院

地址 461000 河南省许昌市八一路 88 号

(72) 发明人 肖付刚 吕春霞 王德国 张晓伟  
王加华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫试剂盒

### (57) 摘要

一种检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫试剂盒,属于免疫分析技术领域。本试剂盒采用特异性强的抗苯甲酸雌二醇单克隆抗体。微孔板包被有苯甲酸雌二醇与载体蛋白偶联物,加入苯甲酸雌二醇标准品或样品,再加入苯甲酸雌二醇单抗。游离的苯甲酸雌二醇与微孔板上的苯甲酸雌二醇与载体蛋白偶联物竞争苯甲酸雌二醇单抗,没有连接的苯甲酸雌二醇单抗被洗涤除去,加入 HRP-羊抗鼠抗体,标记免疫反应后没有连接的 HRP-羊抗鼠抗体被洗涤除去。加显色液、终止液后,用酶标仪测定其吸光度,吸光度的值与样品中的苯甲酸雌二醇浓度成反相关,对照标准曲线即可确定被测样品中苯甲酸雌二醇的含量。本试剂盒结构简单、使用方便、廉价、灵敏度高,检测限可达 10ng/mL,主要用于大批样品的现场快速筛查。

1. 一种检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫试剂盒,其中包括:96 或 48 孔包被板 (1), 苯甲酸雌二醇标准品 (2), 抗苯甲酸雌二醇的单抗冻干品 (3), 酶标记的羊抗鼠抗体冻干品 (4), 洗涤液 (5), 显色液 A(6), 显色液 B(7) 和终止液 (8)。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为 HRP- 羊抗鼠抗体冻干品,洗涤液为含有吐温的 Tris-HCl 缓冲溶液,显色液 A 为含有过氧化氢的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,显色液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇水溶液,终止液为硫酸溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的包被板 (1) 包被固相抗原苯甲酸雌二醇-BSA 或苯甲酸雌二醇-KLH 或苯甲酸雌二醇-OVA;用 50mmol/L pH9.6 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液将苯甲酸雌二醇-BSA 或苯甲酸雌二醇-KLH 或苯甲酸雌二醇-OVA 稀释至 10mg/L 做为包被液,96 或 48 孔微孔板每孔加 0.1mL 包被液,4℃放置过夜,弃去包被液,冲洗三次,每孔加 0.15mL 含 3g/L BSA 或 KLH 或 OVA 的 50mmol/L pH9.6 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液封闭,4℃放置过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20℃冷冻保存。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的苯甲酸雌二醇标准品 (2),共 6 瓶,浓度分别为:0ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,40ng/mL,80ng/mL,200ng/mL。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的抗苯甲酸雌二醇的单抗冻干品 (3),为抗苯甲酸雌二醇的单克隆抗体的冻干品。

6. 根据权利要求 5 所述的抗苯甲酸雌二醇的单克隆抗体,其制备方法如下:将苯甲酸雌二醇和 BSA 或 KLH 或 OVA 偶联作为抗原,免疫雌性 BalB/c 小鼠,检测多抗效价达到 1 : 2000 后,在 PEG-4000 作用下将免疫的小鼠脾细胞与 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞进行融合,经过 HAT 选择培养,用间接 ELISA 法检测培养上清,对检出的阳性克隆孔采用有限稀释法进行亚克隆,雌性小鼠 BalB/c 腹腔注射液体石蜡、杂交瘤细胞,经培养后抽取腹水,腹水中即含有抗苯甲酸雌二醇的特异性单克隆抗体。

7. 一种用权利要求 1 所述的试剂盒检测苯甲酸雌二醇的方法,其特征在于:取包被有苯甲酸雌二醇-BSA 或苯甲酸雌二醇-KLH 或苯甲酸雌二醇-OVA 的微孔包被板,加入苯甲酸雌二醇标准品或处理好的样品到各自的微孔中,再加入苯甲酸雌二醇抗体,暗处静置反应,洗涤液洗涤,加酶标记的羊抗鼠抗体,进行标记免疫反应,洗涤液洗涤,加显色液 A 和显色液 B,暗处静置后加终止液,在 450nm 处测量吸光度值,对照标准曲线计算样品中的苯甲酸雌二醇含量。

8. 根据权利要求 7 所述的检测苯甲酸雌二醇的方法,其操作为:样品前处理;取包被有苯甲酸雌二醇-BSA 或苯甲酸雌二醇-KLH 或苯甲酸雌二醇-OVA 的微孔包被板,加入 0.05mL 的苯甲酸雌二醇标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加 0.05mL 抗苯甲酸雌二醇抗体,37℃暗处静置 30min,洗涤液洗三次,加 0.1mL 酶标记的羊抗鼠抗体,37℃暗处静置 30min,用洗涤液洗三次,加 0.05mL 显色液 A 和 0.05L 显色液 B,暗处静置 15min 后加终止液,在 450nm 处测吸光度值,从标准曲线计算样品中的苯甲酸雌二醇含量。

## 一种检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 一种检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫试剂盒,属于免疫分析技术领域。

### 技术背景

[0002] 2008 年的三聚氰胺事件,使三鹿集团倒闭,我国乳品企业重新洗牌,使人们对牛奶及其制品质量安全问题愈发关注。2010 年 8 月某奶粉疑致女婴性早熟的激素门事件又将乳制品推上了风口浪尖。牛奶中是否有雌激素的存在和奶牛产奶数量是否受到雌激素的作用是目前人民大众急需了解的内容。无论是进口奶源,还是国内奶源,均有残留激素的隐患。奶业和食品营养专家指出,奶牛吃的饲料或草料含有激素的可能性最大,在奶粉业这是一种隐形的存在;此外,在奶牛饲养中使用的催产素、催奶素等,也可能导致激素残留。尤其近年来由于过量使用外源性性激素作为动物饲料添加剂和植物生长调节剂,导致大量食品中污染了性激素类物质。这些雌激素残留,通过食物链在人体内积累,可诱发癌变,对生殖与神经等系统带来影响,还造成严重的环境问题。

[0003] 虽然国家在 2008 年制定了《乳品质量安全监督管理条例》,要求加强奶畜养殖、生鲜乳收购、乳品生产、经营、进口等各环节的监督检查,明确规定禁止销售、收购和加工尚处于用药期和休药期内的奶畜产,不符合健康标准或者没有经过检疫合格的奶畜产的,以及不合法规标准的生鲜乳,从源头上控制生鲜乳的兽药残留。但是目前雌激素的检测尚未列入国标中,乳制品企业也未将其作为生鲜乳收购的检测项目,因此尚不能从源头上消除雌激素的隐患。

[0004] 要减小雌激素污染对食品安全和人体健康造成的威胁,必须加强市场监管,完善检测手段。而乳制品中雌激素的残留量一般较少,常规测定方法的应用受到限制,需要比较灵敏的检测方法。目前苯甲酸雌二醇的检测方法主要使用大型仪器,如 HPLC、GC-MS、LC-MS 等。但由于仪器设备价格昂贵,操作复杂、费时,不适用于大批量样品的快速检测,因此不能用于大批量样品的现场快速筛查,不能在基层单位和企业得到推广。而酶联免疫分析(ELISA)法,由于其特异性强、灵敏度高、操作简便、检测速度快,特别适于大批量样品的现场快速检测等优点而越来越被人们所重视和采用。目前在真菌毒素、藻毒素等的快速检测中 ELISA 法已经是最常用的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫分析试剂盒及其检测方法,用于对食品中苯甲酸雌二醇的检测。

[0006] 本发明的技术方案:该检测苯甲酸雌二醇的试剂盒是由(1)96 或 48 孔包被板,(2)苯甲酸雌二醇标准品,(3)苯甲酸雌二醇的单抗冻干品,(4)酶标记的羊抗鼠抗体冻干品,(5)洗涤液,(6)显色液 A,(7)显色液 B,(8)终止液所组成。

[0007] 所述的酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为 HRP-羊抗鼠抗体冻干品,洗涤液为含有吐温的 Tris-HCl 缓冲溶液,显色液 A 为含有过氧化氢的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,显色

液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇水溶液,终止液为硫酸溶液。

[0008] 本发明主要采用酶联免疫分析法 (ELISA) 来检测苯甲酸雌二醇。采用 ELISA 的技术主要有两个方面:第一,特异性单克隆抗体的制备,利用抗原免疫小鼠,经细胞融合、选择培养、腹腔注射,经培养后抽取腹水,得到抗苯甲酸雌二醇的单克隆抗体;第二,苯甲酸雌二醇-ELISA 试剂盒的制备。

[0009] 检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫分析试剂盒的制备详见实施例 1 和 2。

[0010] 苯甲酸雌二醇的测定方法为:取包被有苯甲酸雌二醇与载体蛋白偶联物的微孔包被板,加入苯甲酸雌二醇标准或处理好的样品到各自的微孔中,再加入苯甲酸雌二醇抗体,振荡反应,洗涤液洗涤,加酶标记的羊抗鼠抗体,进行标记免疫反应,洗涤液洗涤,加显色液 A 和显色液 B,暗处静置后加终止液,在 450nm 处测量吸光度,对照标准曲线计算样品中的苯甲酸雌二醇含量。

[0011] 本发明的有益效果:该试剂盒结构简单,使用方便、廉价、灵敏度高,检测限可达 10ng/mL,特别适于大批量样品的现场快速检测。

## 附图说明

[0012] 图 1 为苯甲酸雌二醇酶联免疫分析法的标准曲线。

## 具体实施方式

[0013] 提供以下实施例是为了更好地理解本发明,而决不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

[0014] 实施例 1 抗苯甲酸雌二醇的单克隆抗体的制备

[0015] 苯甲酸雌二醇是典型的半抗原,在免疫反应中只具有反应原性,需与大分子物质结合后才有免疫原性。我们采用多元酸酐法活化苯甲酸雌二醇,用混合酸酐法将活化的苯甲酸雌二醇与载体蛋白 (KLH, BSA) 偶联,制备了免疫抗原苯甲酸雌二醇-KLH 和包被抗原苯甲酸雌二醇-BSA。以合成的苯甲酸雌二醇-KLH 作为人工合成的免疫抗原进行动物免疫,制备抗体。

[0016] 1. 苯甲酸雌二醇-KLH 和苯甲酸雌二醇-BSA 抗原的制备

[0017] 称取苯甲酸雌二醇 75.2mg (约 0.2mmol),加入 4mL 含 22.8mg (约 0.2mmol) 戊二酸酐的吡啶溶液中,室温搅拌反应 22h。反应完成后,氮气吹干吡啶。残留物用 8mL 溶剂 (DMF 和 1,4-二噁烷 1:1 混合) 溶解,加入 0.0524mL (约 0.2mmol) 正三丁胺,冰中搅拌 10min,加入氯甲酸异丁酯 0.0288mL (约 0.2mmol),室温搅拌反应 1h。将活化的苯甲酸雌二醇溶液逐滴加入 10mL、0.1mol/L pH 8.5 冰冷载体蛋白硼酸钠溶液中,1h 内加完,室温搅拌反应过夜。载体用量:BSA 50mg, KLH 100mg。偶联物过 Sephadex G-25 层析柱提纯。用紫外吸收法测定载体浓度作为偶联物浓度。提纯的偶联物于 -20℃ 保存。

[0018] 2. 抗苯甲酸雌二醇单克隆抗体的制备

[0019] 将免疫抗原苯甲酸雌二醇-KLH 与等量的福氏完全佐剂乳化,以皮下多点及腹腔注射途径对 8 周龄左右的 Ba1B/c 雌性小鼠进行基础免疫。间隔 14 天后,改为福氏不完全佐剂追加免疫,14 天后再免疫一次。检测多抗效价达到 1:2000 后,经尾静脉用水剂抗原加强免疫一次,3~4 天后处死取出小鼠脾脏,得到脾细胞进行细胞融合。每次免疫抗原用

量为每只鼠 0.025 ~ 0.05mg。

[0020] 得到的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 (Sp2/0) 以 8 : 1 混合,用聚乙二醇 (PEG, MW 4000) 作融合剂。融合细胞悬于含 20% 小牛血清的 HAT 培养液内,分别于加有 Ba1B/c 小鼠腹腔渗出细胞作滋养层的 96 孔细胞培养板中,置 6% CO<sub>2</sub> 中在 37℃ 培养。以苯甲酸雌二醇-BSA 为包被抗原,用 iELISA 法对上清液中杂交瘤进行筛选,并用 icELISA 法确证。

[0021] 对检出的阳性克隆孔采用有限稀释法进行亚克隆。置 6% CO<sub>2</sub> 中在 37℃ 继续培养,直至所有细胞生长孔的培养液均呈阳性为止。当连续 3 次 100% 阳性时,即可进行单抗的扩大培养。

[0022] 采用小鼠腹腔内诱生单克隆抗体的方法进行扩大培养。取成年的 Ba1B/c 小鼠,于腹腔内注入液体石蜡 0.5mL,1 周后于腹腔内注入杂交瘤细胞。用生理盐水将杂交瘤细胞悬浮混匀,并将细胞数调至  $4 \times 10^5$  个/mL,每只 Ba1B/c 小鼠腹腔注射 0.5mL 杂交瘤细胞。10 ~ 14 天后收集腹水。

[0023] iELISA 法检测腹水效价,测定结果显示,腹水效价为 6400,ELISA 最适工作浓度为单抗稀释 4000 倍。稀释至工作浓度后分装冻干,于 -20℃ 长期冻存。

[0024] 实施例 2 96 孔 ELISA 试剂盒的制备

[0025] 1. 包被板固相抗原制备

[0026] 将苯甲酸雌二醇-BSA 用 50mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH9.6 缓冲液稀释至 10mg/L 的包被液,96 孔微孔板各孔加 0.1mL,4℃ 放置过夜。弃去包被液,冲洗三次,每孔加 0.15mL 含 3g/L BSA 的上述缓冲液封闭,4℃ 放置过夜。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20℃ 冷冻保存。

[0027] 2. 试剂的配制

[0028] (1) 标准品苯甲酸雌二醇:0ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,40ng/mL,80ng/mL,200ng/mL,从苯甲酸雌二醇纯品中稀释得到,稀释液为甲醇:水体积比为 1 : 9。

[0029] (2) 抗苯甲酸雌二醇抗体冻干品的制备见实施例 1。

[0030] (3) HRP 标记的羊抗鼠抗体冻干品 (HRP-羊抗鼠抗体):市售。

[0031] (4) 洗涤液:14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80 和 0.2% NaN<sub>3</sub> 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

[0032] (5) 显色液 A :0.2MNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25.7mL,0.1M 柠檬酸 24.3mL 和 0.04% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mL。

[0033] (6) 显色液 B :称取 20mg 四甲基联苯二胺 (TMB) 加入 10mL 无水酒精中,可加热至 37℃ ~ 40℃ 直到 TMB 完全溶解,加去离子水至 100mL。

[0034] (7) 终止液 :2mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

[0035] 3. 试剂盒的组成

[0036] (1) 96 孔板 (8 条 × 12 孔,可以拆分为单孔),包被有苯甲酸雌二醇-BSA。

[0037] (2) 苯甲酸雌二醇标准液,6 瓶,0.5mL/瓶,标准液浓度为 :0、10、20、40、80、200ng/mL。

[0038] (3) 苯甲酸雌二醇抗体冻干品,1 瓶,用时 6mL 蒸馏水溶解。

[0039] (4) HRP-羊抗鼠抗体冻干品,1 瓶,用时 12mL 蒸馏水溶解。

[0040] (5) 洗涤液,1 瓶,10mL,用时以蒸馏水 1 : 25 稀释。

[0041] (6) 显色液 A,1 瓶,6mL。

[0042] (7) 显色液 B, 1 瓶, 6mL。

[0043] (8) 终止液, 1 瓶, 6mL。

[0044] 实施例 3 牛奶及乳粉样品中苯甲酸雌二醇的检测

[0045] 1. 样品前处理

[0046] 量取 5mL 牛奶样品于小烧杯中, 加 20mL 石油醚, 将样品移于 125mL 分液漏斗中, 准确移取 15mL 提取液 (甲醇: 水为 1: 1) 分次洗小烧杯, 洗液一并移入分液漏斗中, 振摇 5min, 静置分层后, 放出下层提取液层, 再准确移取 5mL 提取液重复振摇提取一次, 合并下层提取液层。取 2mL 提取液 (提取液如果不清澈需过膜), 加水 8mL 摇匀即为待测液。

[0047] 乳粉样品水溶后前处理同牛奶。

[0048] 2. ELISA 操作

[0049] ELISA 试剂盒的制备见实施例 2。

[0050] 取苯甲酸雌二醇-BSA 板条室温下放置 10min。每孔加 0.25mL 洗涤液洗二次, 拍干。加入 0.05mL 的苯甲酸雌二醇标准或处理好的样品到各自的微孔中, 每个标准和样品必须使用新的吸头。加 0.05mL 苯甲酸雌二醇抗体, 移液器管尖不要接触到孔中的液体。37℃ 下暗处静置 30min 后, 甩掉反应液, 洗涤液洗三次, 拍干。每孔加 0.1mLHRP-羊抗鼠抗体, 37℃ 下暗处静置 30min 后, 甩掉反应液, 洗涤液洗三次, 拍干。每孔加 0.05mL 显色液 A 和 0.05mL 显色液 B, 暗处静置 15min 后, 每孔加 0.05mL 终止液测量吸光度值, 从标准曲线计算样品中的苯甲酸雌二醇含量。

[0051] 3. 结果计算

[0052] (1) 定量

[0053] 苯甲酸雌二醇标准溶液浓度为 0、10、20、40、80、200ng/mL, 用酶标仪 (450nm) 测得每孔的吸光度值 (A), 绘制标准曲线。通过标准曲线, 可准确定量样品中苯甲酸雌二醇含量。

[0054] 标准曲线: 用坐标纸进行绘制, 横坐标为苯甲酸雌二醇标准溶液浓度的对数, 纵坐标为百分比, 即各标准品孔和样品孔吸光度值除以 0ng/mL 标准品孔吸光度值 (A<sub>0</sub>) 再乘以 100% 所得。

[0055] 相应每个样品的苯甲酸雌二醇浓度可从曲线上获得, 乘以样品稀释倍数可计算样品中苯甲酸雌二醇含量。

[0056] 有计算机软件可对 ELISA 数据进行处理, 特别适用于大量数据的处理。用免疫测定软件 Ridasoft Win 所得标准曲线见附图 1。

[0057] (2) 半定量

[0058] 半定量的结果可通过对比样品与某一标样孔的颜色获得: 样品的颜色比标样孔的颜色浅则苯甲酸雌二醇的浓度比标样孔的浓度高, 样品的颜色比标样孔的颜色深则苯甲酸雌二醇的浓度比标样孔的浓度低。可根据质控限直接判定是否为阳性, 无需仪器测定吸光度值和数据计算。

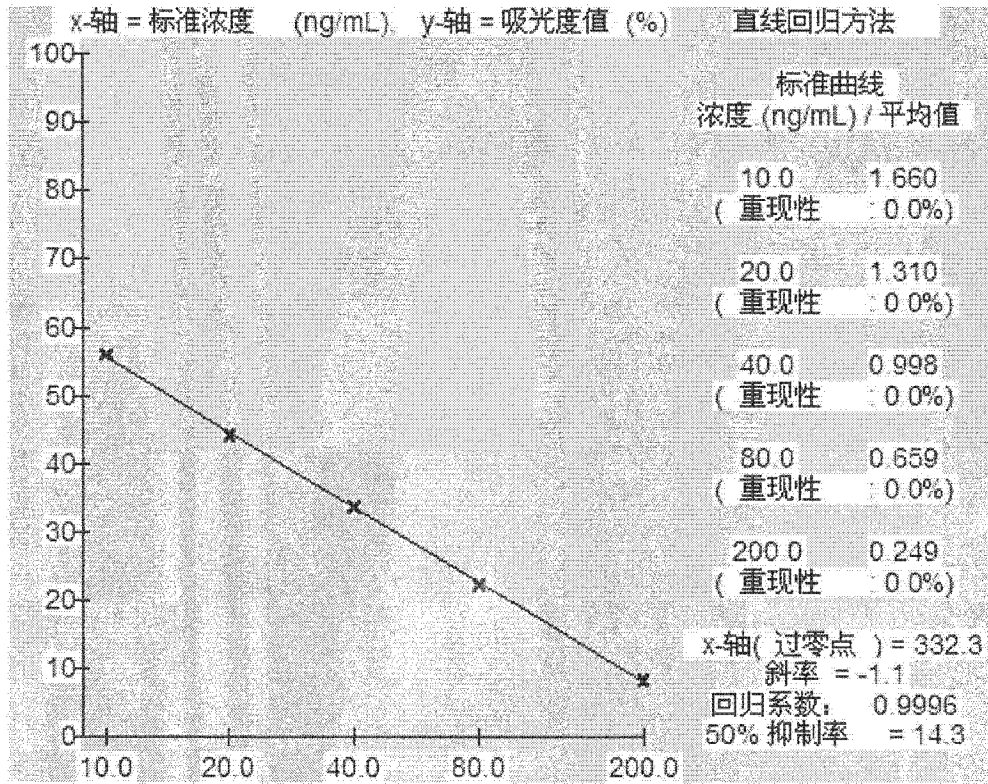


图 1

专利名称(译)	一种检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102721811A</a>	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN201210167285.9	申请日	2012-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	许昌学院		
申请(专利权)人(译)	许昌学院		
当前申请(专利权)人(译)	许昌学院		
[标]发明人	肖付刚 吕春霞 王德国 张晓伟 王加华		
发明人	肖付刚 吕春霞 王德国 张晓伟 王加华		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测苯甲酸雌二醇的酶联免疫试剂盒，属于免疫分析技术领域。本试剂盒采用特异性强的抗苯甲酸雌二醇单克隆抗体。微孔板包被有苯甲酸雌二醇与载体蛋白偶联物，加入苯甲酸雌二醇标准品或样品，再加入苯甲酸雌二醇单抗。游离的苯甲酸雌二醇与微孔板上的苯甲酸雌二醇与载体蛋白偶联物竞争苯甲酸雌二醇单抗，没有连接的苯甲酸雌二醇单抗被洗涤除去，加入HRP-羊抗鼠抗体，标记免疫反应后没有连接的HRP-羊抗鼠抗体被洗涤除去。加显色液、终止液后，用酶标仪测定其吸光度，吸光度的值与样品中的苯甲酸雌二醇浓度成反相关，对照标准曲线即可确定被测样品中苯甲酸雌二醇的含量。本试剂盒结构简单、使用方便、廉价、灵敏度高，检测限可达10ng/mL，主要用于大批样品的现场快速筛查。

