

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/573

G01N 33/74 G01N 21/25



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03131857.6

[43] 公开日 2003 年 11 月 19 日

[11] 公开号 CN 1456894A

[22] 申请日 2003.6.9 [21] 申请号 03131857.6

[71] 申请人 江南大学

地址 214036 江苏省无锡市惠河路 170 号

[72] 发明人 胥传来 李相前 王武康 邵蔚蓝

徐保国 贺铁明 胡拥明

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利事务所

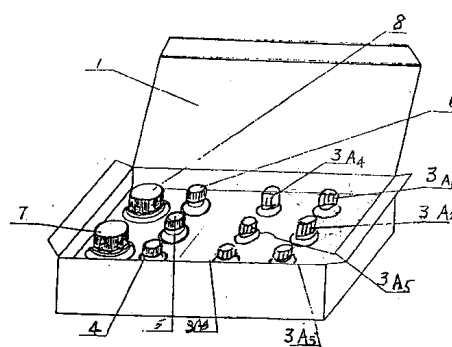
代理人 时旭丹

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

一种己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒及其检测方法，属于酶联免疫分析技术领域。本发明配制的试剂盒，采用酶联免疫吸附(ELISA)竞争法检测己烯雌酚。酶标板上包被兔 IgG 抗体，Diethylstilbestrol 抗体加入后经孵化、洗涤，加入样品稀释液及酶标抗原，使两者反应，洗涤，加酶底物显色，用酶标仪检测 A_{450nm} ，是一种简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法，尤其适用于动物性食品的己烯雌酚残留检测。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒，其特征是由盒体（1），酶标板（2），A 试剂瓶，标准液，为己烯雌酚水溶液，包括 A₁，A₂，A₃，A₄，A₅，A₆ 共六瓶（3），B 试剂瓶，己烯雌酚过氧化物酶标记物浓缩液（4），C 试剂瓶，己烯雌酚抗体浓缩液（5），D 试剂瓶，底物发色剂，四甲基联苯胺（6），E 试剂瓶，反应停止液，1M 硫酸（7），F 试剂瓶，缓冲液，酶标记及抗体浓缩液稀释用（8），海绵托架（9）所组成，海绵托架（9）上制有孔和凹槽，上述 A、B、C、D、E、F 试剂瓶安放在海绵托架的孔和凹槽内，海绵托架（9）和酶标板（2）安放在盒体（1）内。

2、根据权利要求 1 所述的检测试剂盒，其特征是所述的酶标板（2）上检测微孔均包被有 IgG 抗体。

3、一种己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒检测己烯雌酚的方法，先进行样品处理，其特征是应用抗原抗体反应，酶标板微孔包被有兔 IgG 抗体，Diethylstilbestrol 抗体被加入，经过孵育及洗涤后，加入 Diethylstilbestrol 酶标记物，标准或样品溶液，Diethylstilbestrol 与 Diethylstilbestrol 酶标记物竞争 Diethylstilbestrol 抗体，没有连接的 Diethylstilbestrol 酶标记物在洗涤步骤中被除去，发色剂（四甲基联苯胺）加入到孔中并且孵育，结合的酶标记物将无色的发色剂转化为蓝色的产物，加入反应停止液后使颜色由蓝转变为黄色，在 450nm 处测量，吸收光强度与样品中的 Diethylstilbestrol 浓度成反比。

4、根据权利要求 3 所述的检测方法，其特征是 Diethylstilbestrol 酶标记物浓缩液的稀释，只稀释实际需用量的酶标记物，在吸取浓缩液之前，要仔细地振摇，用缓冲液 10 份稀释 1 份酶标记物浓缩液的比例进行稀释。

5、根据权利要求 3 所述的检测方法，其特征是 Diethylstilbestrol 抗体浓缩液的稀释，只稀释实际需用量的 Diethylstilbestrol 抗体。在吸取浓缩液之前，要仔细地振摇。用缓冲液 10 份稀释 1 份抗体浓缩液的比例进行稀释。

6、根据权利要求 3 所述的检测方法，其特征是加抗体室温孵育为 15 分钟，加酶标记物后，室温孵育 30 分钟，加底物发色剂后，室温暗处孵育 15 分钟。

7、根据权利要求 3 所述的检测方法，其特征是测定吸光度 A_{450nm}，以空气为空白，在加入停止液后 60 分钟内读取光度值。

一种己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒及其检测方法

技术领域

一种己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒及其检测方法，用于对动物性食品中己烯雌酚含量的检测。属于酶联免疫分析技术领域。

背景技术

己烯雌酚（Diethylstilbestrol）是一种人工合成激素类药物，临床可应用于更年期综合症的治疗。近年来“食补”保健品替代药物渐成趋势，愈来愈为更多的人所接受，在家禽、家畜的喂料中添加某些药物以期在其卵和肉中含有这些微量药物，从而实现以食代药。

对己烯雌酚和其它一些甾类激素在牛肉及动物血液中含量的测定和仪器分析方法已有文献报导，而鸡蛋中己烯雌酚的测定鲜有报导。研制己烯雌酚的酶联免疫检测试剂盒，对己烯雌酚残留进行检测具有重要的经济和社会意义。

发明内容

本发明目的在于提供一种灵敏度高、结构简单、使用方便、价格便宜、携带方便的己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒。

本发明的另一目的是提供一种样品前处理简单，而且简便、快速、灵敏、准确、廉价的利用本试剂盒检测己烯雌酚残留的检测方法。

本发明试剂盒主要由盒体（1），酶标板（2），A 试剂瓶（标准液，为己烯雌酚水溶液，包括 A₁，A₂，A₃，A₄，A₅，A₆ 共六瓶）（3），B 试剂瓶（己烯雌酚过氧化物酶标记物浓缩液）（4），C 试剂瓶（己烯雌酚抗体浓缩液）（5），D 试剂瓶（底物发色剂，10ml 四甲基联苯胺）（6），E 试剂瓶（反应停止液，14ml 1M 硫酸）（7），F 试剂瓶（缓冲液，25ml，酶标记及抗体浓缩液稀释用）（8），海绵托架（9）所组成，海绵托架（9）上制有孔和凹槽，上述 A、B、C、D、E、F 试剂瓶安放在海绵托架的孔和凹槽内，海绵托架（9）和酶标板（2）安放在盒体（1）内。

酶标板（2）有 96 个标准检测微孔，12 条×8 孔，每个检测孔均包被有兔 IgG 抗体。

A 试剂瓶（3），包括 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅、A₆ 共 6 瓶己烯雌酚水溶液标准

液, 300ul/瓶, 分别为: 0ppt、100ppt、300ppt、900ppt、2700ppt、8100ppt。

用本试剂盒检测己烯雌酚的方法是应用抗原抗体反应。酶标板微孔包被有针对兔 IgG (Diethylstilbestrol 抗体) 的羊抗体。Diethylstilbestrol 抗体被加入, 经过孵育及洗涤步骤后, 加入 Diethylstilbestrol 酶标记物, 标准或样品溶液。Diethylstilbestrol 与 Diethylstilbestrol 酶标记物竞争 Diethylstilbestrol 抗体, 没有连接的 Diethylstilbestrol 酶标记物在洗涤步骤中被除去。将酶基质 (过氧化氢尿素) 和发色剂 (四甲基联苯胺) 加入到孔中并且孵育。结合的酶标记物将无色的发色剂转化为蓝色的产物。加入反应停止液后使颜色由蓝转变为黄色。在 450nm 处测量, 吸收光强度与样品中的 Diethylstilbestrol 浓度成反比。

样品前处理

1 尿样不用处理, 取 20ul 清亮尿样直接测定

(如果尿样浑浊一定要过滤或离心直至得到清亮尿样)

2.1 带有低脂肪的肝, 肉, 或组织

……5g 粉碎的样品与 25ml 50mM HCL 混合, 振荡 15 小时, 以达到均质的目的。

……称 6g 均质物(相当于 1g 肝脏), 加入离心瓶中,

……离心 15 分钟 / 4000g 或更高的转速, 在 10-15°C,

……转移上清液到另一个离心瓶中, 加 300ul 1M NaOH 混合 15 分钟,

……加入 4ml 500mM 磷酸二氢钾缓冲液 pH3.0, 简单的混合并在 4°C 保存至少 1.5 小时或过夜。

……离心 15 分钟 / 4000g 或更高的转速, 在 10-15°C, 分离全部上清液, 使其升至室温(20-24°C), 然后用柱纯化

2.2 肉和组织

……5g 粉碎的样品与 25ml 50mM Tris 缓冲液 pH8.5 混合, 振荡 0.5 小时, 以达到均质的目的。

……加入 15ml 庚烷((n-heptane)振荡 5 分钟以溶去脂肪,

……离心 5 分钟 / 4000g 或更高的转速/10-15°C

……用巴斯德吸管除去上面的庚烷层及中间薄薄的脂肪层

……再用 15ml 庚烷((n-heptane)重复步骤 2-4

……向均质的肉液中加入 0.5ml 半浓的盐酸, 振荡 1 小时

……称 6g 均质物(相当于 1g 肝脏), 加入离心瓶中,

……以下从 2.1 的第一个离心步骤开始。像处理肝脏一样继续进行处理,

柱纯化以下列方式

所有试剂和样品处理必须在室温条件下(20-24℃)并严格控制过柱时的流速。

- ……用 3ml 甲醇(100%)洗涤柱子, 流速为 1 滴 / 每秒
- ……用 2ml 洗涤液洗涤柱子(50mM 磷酸二氢钾缓冲液 pH3.0)
- ……样品进柱(肝, 肉, 或组织的全部上清液)
- ……用 2ml 洗涤液洗涤柱子(50mM 磷酸二氢钾缓冲液 pH3.0)
- ……用正压去除残留的流体并且用空气或氮气吹 2 分钟干燥柱子
- ……用 1ml 甲醇(100%)洗脱样品。流速为 15 滴/分钟
- ……在 50-60℃并且在弱空气或氮气流下完全蒸发溶剂
- ……用 1ml 蒸馏水溶解干燥的残留物, 取 20ul 进行分析

样品的保存

- ……未处理的样品冷冻保存
- ……HCL 均质后的样品在 2-8℃稳定 3 天
- ……以磷酸二氢钾缓冲液提取后的样品(RIDACI8 柱纯化之前)在 2-8℃稳定 2 天, 使用前离心
- ……柱纯化步骤 6 所获得的甲醇洗脱物可以冷冻保存数周, 在 2-8℃稳定 2 周

- ……用蒸馏水溶解的干燥残留物(步骤 8)在 2-8℃稳定 1 周

3 牛眼

- ……冷冻样品(-20℃)
 - ……解冻样品(破坏细胞)并且小心的切割眼球, 在两边切破视网膜
 - ……收留解冻液滴(约 0.5ml)
 - ……用蒸馏水 1:- 1 稀释(一份蒸馏水加一份解冻液), 取 20ul 测定
- 保存: 解冻液应该立即冷冻保存, 4 周内可以继续使用

酶标免疫检测

1 测定之前注意事项

- 1) 使用之前将所有试剂回升至室温 20-24℃.
- 2) 使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃.
- 3) 在使用中不要让微孔干燥
- 4) 在 EIA 分析中的再现性, 很大程度上取决于洗板的一致性, 仔细按照推荐的洗板顺序操作是 EIA 测定程序中的要点.

5) 在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用盖子盖住微孔板。

2 Diethylstilbestrol 酶标记物

提供的 Diethylstilbestrol 酶标记物(B 试剂瓶)为浓缩液, 由于稀释的酶标记物稳定性不好, 所以只稀释实际需用量的酶标记物。在吸取浓缩液之前, 要仔细地振摇, 用缓冲液以 1: 10 的比例稀释酶标记物浓缩液。

3 Diethylstilbestrol 抗体

提供的 Diethylstilbestrol 抗体(C 试剂瓶)为浓缩液, 由于稀释的 Diethylstilbestrol 抗体稳定性不好, 所以只稀释实际需用量的 Diethylstilbestrol 抗体。在吸取浓缩液之前, 要仔细地振摇。用缓冲液以 1: 10 的比例稀释抗体浓缩液(400ul 浓缩液加 4.0ml 缓冲液, 足够 4 个微孔板条 32 孔用)

4 包被有抗体的微孔板条

锡箔袋沿横向边压皱外沿剪开。取出需用数量的微孔板及框架, 将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封, 保存于 2-8℃, 不要冷冻。

5 标准液

提供的 Diethylstilbestrol 标准液浓度为

标准液 1 (A₁)0ppt(O)

标准液 2 (A₂)100ppt

标准液 3 (A₃)300ppt

标准液 4 (A₄)900ppt

标准液 5 (A₅)2700ppt

标准液 6 (A₆)8100ppt

6 测定程序(室温 20-24℃条件下操作)

1) 将足够标准和样品所用数量的孔条插入微孔架, 标准和样品做两个平行实验, 记录下标准和样品的位置。

2) 加入 100ul 稀释后的抗体溶液到每个微孔中底部。在室温孵育 15 分钟。

3) 倒出孔中的液体, 将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每行拍打 3 次)以保证完全除去孔中的液体。用 250ul 蒸馏水充入孔中, 再次倒掉微孔中液体, 再重复操作两遍。

4) 加入 20ul 的标准或处理好的样品到各自的微孔中, 标准和样品做两个平行实验。

5) 加入 100ul 稀释的酶标记物到微孔底部, 室温孵育 30 分钟,

6) 倒出孔中的液体, 将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每行拍打 3 次)以保证完全除去孔中的液体. 用 250ul 蒸馏水充入孔中, 再次倒掉微孔中液体, 再重复操作两次.

7) 加入 100ul 底物发色试剂(D 试剂瓶)到微孔中, 在室温暗处孵育 15 分钟.

8) 加入 100ul 反应停止液(E 试剂瓶)到微孔中混合好, 用酶标仪在 450nm 处测量吸光度值以空气为空白, 必须在加入停止液后 60 分钟内读取吸光度值.

结果: 所获得的标准和样品吸光度值的平均值除以第一个标准(0 标准)的吸光度值再乘以 100.因此 0 标准等于 100%并且以百分比的形式给出吸光度值.

$$\text{标准(或样品)的吸光度值} / \text{0 标准的吸光度值} \times 100 = \% \text{吸光度值}$$

计算的标准值绘成为一个对应 Diethylstilbestrol 浓度(ng / kg)的半对数坐标系统曲线图, 校正曲线在 200-2000ng/kg(ppt)范围内应当成为线性. 相对应每一个样品的浓度(ng/kg)可以从校正曲线上读出.

为了获得样品中的 Diethylstilbestrol 的实际浓度(ng / kg), 从标准曲线上读出的浓度值必须乘以相对应的稀释系数. 当样品处理过程是按指示进行的, 稀释系数如下:

- 尿液(没有样品处理)..... 1
- 组织..... 1
- 牛眼..... 2

灵敏度: 试剂盒的平均检测下限约为 100ng/kg, 根据样品处理记录, 尿液中的 Diethylstilbestrol 检测下限为 100ng/kg(100ppt), 组织中的检测下限为 100ng/kg(100ppt), 牛眼中的检测下限为 200ng/kg(200ppt).

特异性: 试剂盒的特异性通过对相应的物质进行交叉反应性分析而得到.

再现性: 由获得的标准吸收值的变异系数(%CV)对相应 Diethylstilbestrol 浓度作曲线, 可以看到在全部范围内变异系数如此之低, 可以得到很好的再现性.

回收率: 以尿液样品为例, 回收率为 90%±12%.

本发明的优点是: 该试剂盒是竞争酶标免疫法试剂盒, 用于定量测定尿、肌肉、肝脏及牛眼中的己烯雌酚残留. 检测前对于样品的前处理简单, 利用本试剂盒检测己烯雌酚残留, 是简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法. 最低检测限为己烯雌酚 0.1ppb.

附图说明

图 1 试剂盒的直观示意图

图 2 酶标板的直观示意图(重叠三层, 仅画出其中一层)

图中箱体 (1), 酶标板 (2), A 试剂瓶 (3), B 试剂瓶 (4), C 试剂瓶 (5), D 试剂瓶 (6), E 试剂瓶 (7), F 试剂瓶 (8), 海绵托架 (9)。

具体实施方式

实施例 1

1、按前述方法进行样品处理。

2、试剂配制

Diethylstilbestrol 抗体稀释溶液, (Diethylstilbestrol 抗体浓缩液:稀释液=1:10),
Diethylstilbestrol 过氧化物酶标记物稀释溶液, (酶标记物浓缩液:稀释液=1:10)。

3、加抗体, 室温孵育: 加入 100ul 稀释后的抗体溶液到每个微孔中底部。在室温孵育 15 分钟。

4、洗涤: 倒出孔中的液体, 将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每行拍打 3 次)以保证完全除去孔中的液体。用 250ul 蒸馏水充入孔中, 再次倒掉微孔中液体, 再重复操作两遍。

5、加标准液或待测样品: 加入 20ul 的标准或处理好的样品到各自的微孔中, 标准和样品做两个平行实验。

6、加酶标记物, 孵育: 加入 100ul 稀释的酶标记物到微孔底部, 室温孵育 30 分钟。

7、洗涤: 倒出孔中的液体, 将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每行拍打 3 次)以保证完全除去孔中的液体。用 250ul 蒸馏水充入孔中, 再次倒掉微孔中液体, 再重复操作两次。

8、加发色剂反应: 加入 100ul 底物发色试剂到微孔中, 在室温暗处孵育 15 分钟。

9、终止: 加入 100ul 反应停止液到微孔中混合好。

10、测定: 用酶标仪在 450nm 处测量吸光度值以空气为空白, 必须在加入停止液后 60 分钟内读取吸光度值。

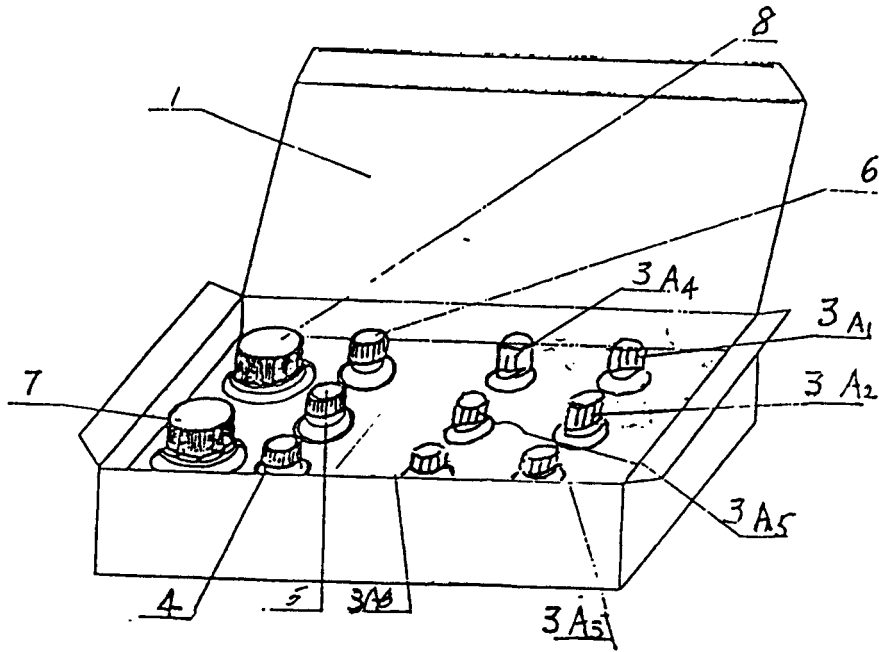


图 1

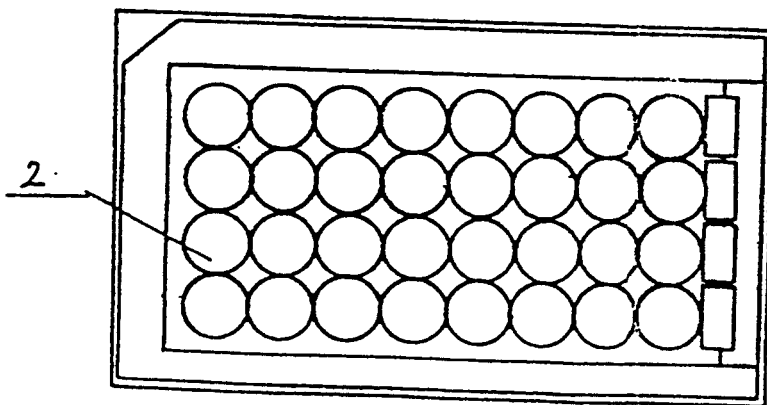


图 2

专利名称(译)	一种己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN1456894A	公开(公告)日	2003-11-19
申请号	CN03131857.6	申请日	2003-06-09
[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	胥传来 李相前 王武康 邵蔚蓝 徐保国 贺铁明 胡拥明		
发明人	胥传来 李相前 王武康 邵蔚蓝 徐保国 贺铁明 胡拥明		
IPC分类号	G01N21/25 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/573 G01N33/74		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种己烯雌酚酶联免疫检测试剂盒及其检测方法，属于酶联免疫分析技术领域。本发明配制的试剂盒，采用酶联免疫吸附(ELISA)竞争法检测己烯雌酚。酶标板上包被兔IgG抗体，Diethylstilbestrol抗体加入后经孵化、洗涤，加入样品稀释液及酶标抗原，使两者反应，洗涤，加酶底物显色，用酶标仪检测A450nm，是一种简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法，尤其适用于动物性食品的己烯雌酚残留检测。

