

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810101543.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101526525A

[22] 申请日 2008.3.7

[21] 申请号 200810101543.7

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路17号

[72] 发明人 李季 许艇 井宏宇

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司  
代理人 王朋飞

权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

一种适用于五氯酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种适用于五氯酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，包括包被了五氯酚抗原的酶标板、浓缩洗涤液、五氯酚标准品、五氯酚特异性抗体、酶标记物、显色液、反应终止液。检测已知浓度的五氯酚并绘制标准曲线，可以推算出待测五氯酚的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测环境中的五氯酚残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。

1. 一种适用于五氯酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，包括包被五氯酚抗原的酶标板、浓缩洗涤液、五氯酚标准品、五氯酚抗体、酶标记物、底物显色液和反应终止液。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫吸附检测试剂盒，其中，五氯酚抗体在制备过程中所用的免疫原是半抗原四氯对羟基苯氧丁酸与载体蛋白 BSA 的偶联复合物；所述五氯酚抗原是半抗原四氯对羟基苯氧丁酸与载体蛋白 OVA 的偶联复合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，所述酶标记物为酶标二抗。

4. 根据权利要求 3 所述的酶联免疫检测试剂盒，其中，所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫吸附检测试剂盒，其中，浓缩洗涤液的配方为每 20mL 蒸馏水中加入氯化钠 7~9g、磷酸二氢钾 0.1~0.3g、磷酸氢二钠 2~4g、氯化钾 3~6g、吐温-20 0.5~3mL。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫吸附检测试剂盒，其特征在于，当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液包括 A 液和 B 液，所述 A 液为过氧化氢或过氧化脲、所述 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠。

7. 根据权利要求 6 所述的酶联免疫吸附检测试剂盒，其中，所述 A 液配方为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g，10.3g 柠檬酸，35.8g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，吐温-20 100 $\mu\text{L}$ ，pH5；所述 B 液配方为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺 700mg，10.3g 柠檬酸，pH2.4-2.8。

8. 权利要求 1~7 任一项所述检测试剂盒在检测五氯酚残留中的应用。

## 一种适用于五氯酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒,具体地说,涉及一种适用于五氯酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒。

### 背景技术

五氯酚用途广泛,作为农药主要为其钠盐,可用作杀菌剂、防腐剂、除草剂,还可作为木材的防腐剂,还有一部分作为溶剂、热交换工业生产废弃物被释放到自然环境中。五氯酚具有强大的生物毒性是因为其具有生物解偶联作用,五氯酚的内分泌干扰作用表现在干扰机体正常的甲状腺素功能;干扰(模拟)雌激素和睾酮,从而影响人类生育。我国城镇污水处理厂污染物排放标准 GB 18918-2002 中规定,城镇污水处理厂排放五氯酚污染物浓度不得高于  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,我国 GHZB1-1999 地表水环境质量标准中规定地表水 I、II、III 类水域有机化学物质特定项目五氯酚含量标准值为  $0.00028\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

常用的五氯酚的检测方法包括气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、气质联用法(GC/MS)、薄层色谱法(TLC)、分光光度法(AAS)及上述方法的联用方法。应用这些理化分析技术对环境、生物、食品等样品中痕量五氯酚残留进行分析,不仅仪器化程度要求较高,并且需要经过繁复的分离、提取、净化、衍生等前处理过程,分析速度慢、成本高,前处理过程需要使用大量的有机溶剂,又造成了新的环境污染。随着待检样品、特别是要求现场快速检测样品量的迅速增加,传统的农药残留分析手段难以适应要求,因此,迫切需要开发和应用高效率农药残留快速分析技术。

### 发明内容

### (一) 要解决的技术问题

针对上述不足,本发明提供一种具有高特异性、高灵敏度、高准确度、高精确度、操作方法简单的酶联免疫吸附检测试剂盒,用于环境中五氯酚残留的批量、快速检测。

### (二) 技术方案

为实现上述目的,本发明提供了一种五氯酚残留分析酶联免疫吸附检测试剂盒,该试剂盒包括包被五氯酚抗原的酶标板、浓缩洗涤液、五氯酚标准品、五氯酚特异性抗体、酶标记物、底物显色液、反应终止液。

其中,五氯酚特异性抗体的制备过程中所用的免疫原是半抗原四氯对羟基苯氧丁酸与载体蛋白的偶联复合物,所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白(BCG)、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白等常用载体蛋白,优选为牛血清白蛋白;所述多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体,优选为兔源多克隆抗体。

其中,包被了包被抗原的酶标板的制备过程中,所用的包被抗原是五氯酚的半抗原四氯对羟基苯氧丁酸与卵清蛋白的偶联复合物,所用包被液可以是 0.05 M pH 9.6 碳酸钠缓冲液,所用封闭液是含 1% 明胶的上述包被液。

其中,酶标记物为酶标二抗,标记酶可以是辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

其中,浓缩洗涤液的配方为每 20mL 蒸馏水中加入氯化钠 7~9g、磷酸二氢钾 0.1~0.3g、磷酸氢二钠 2~4g、氯化钾 3~6g、吐温-20 0.5~3mL。浓缩洗涤液的浓度是正常使用时的 50 倍。

当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液由 A 液和 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液。具体地说, A

液配方可为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 吐温-20 100 $\mu\text{L}$ , pH5; B 液配方可为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺(TMB) 700mg (40mL DMSO 溶解), 10.3g 柠檬酸, pH2.4-2.8。当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时, 底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠。本发明试剂盒的分析原理是:

当酶标板预包被抗原时, 加入待测五氯酚样品和五氯酚多克隆抗体后, 固相包被抗原和待测五氯酚相互竞争与抗体反应, 由于每个孔中的固相抗原和加入的抗体含量均一致, 所以当待测的五氯酚浓度高时, 则被结合在固相抗原上的抗体少, 加入的酶标二抗与被固定抗体结合量少, 用洗涤液洗涤后加入底物显色液, 显色反应浅, 用酶标仪检测的 OD 值低, 表明抑制率高; 反之, 当待测五氯酚浓度低时, 则所测的 OD 值高, 抑制率低。根据用已知的五氯酚浓度检测所作的标准曲线, 可以推算出待测五氯酚的浓度。

### (三) 有益效果

本发明的优点是能准确灵敏地检测环境中的五氯酚残留, 样品的前处理过程简单, 耗时少, 能同时检测大量的样品, 样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。本发明对解决大批量样品的五氯酚残留现场监控技术具有重要的现实意义。

### 具体实施方式

以下实施例用于对本发明的进一步说明, 但不用来限制本发明所要保护的范围。

#### 实施例 1 试剂盒操作及结果计算

待测样品经前处理后, 用 PBST 定容备用。拆开真空包装袋并取出酶标板, 在室温下平衡 5 分钟备用。配制  $0\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $0.064\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $0.32\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $1.6\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $8\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $40\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $200\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,

1000 ng • mL<sup>-1</sup> 的五氯酚标准液，加入 50μL 标样或处理好的样品到各孔中，标样和样品做 4 个重复，加入 50μL 稀释的抗体，37℃ 孵育 30 分钟；倒出孔中的液体，用稀释好的 PBST 洗 5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍干；加入按 1:1000 稀释好的酶标羊抗兔二抗 100μL，37℃ 孵育 30 分钟；倒出孔中的液体，用 PBST 洗板 5 次，拍干；取 A 液和 B 液等体积混匀，每孔加 100μL，在 37℃ 显色 30 分钟，每孔加入 50μl 的终止液终止反应，酶标仪上测定各孔在波长为 450nm 处的 OD 值。

将含 0 ng • mL<sup>-1</sup> 标准品孔的 OD 值减去含最大浓度标准品孔的 OD 值定为 B<sub>0</sub>，其余孔经同样方法校正后的 OD 值定为 B；以 B/B<sub>0</sub> 值为纵坐标，相应标准品浓度的 log 值为横坐标，绘制五氯酚标准抑制曲线。根据曲线的回归方程可以求出对应样品的浓度，也可以求出五氯酚抑制中浓度 IC<sub>50</sub> (B/B<sub>0</sub>=50%) 及最小检测限 IC<sub>20</sub> (B/B<sub>0</sub>=80%)。标准抑制曲线的回归方程为  $Y = -0.25X + 0.049$ ， $R^2 = 0.98$ ，此曲线的抑制中浓度为 IC<sub>50</sub>=16ng • mL<sup>-1</sup>，IC<sub>20</sub> = 0.6ng • mL<sup>-1</sup>。

## 实施例2 半抗原四氯对羟基苯氧丁酸的合成

向 250mL 圆底三口烧瓶中加入丙酮溶剂约 100mL，在氮气保护下，加入 3g (12.15mmol) 四氯对二苯酚和 10g (72.5mmol) 碳酸钾，搅拌使尽量溶解，将 1.58g (8.1mmol) 4-溴丁酸乙酯溶于少量丙酮中，逐滴加入到反应液中，开始加热回流，大约 12h。

经薄层液相色谱 (TLC) 检测，反应完全，减压脱去丙酮溶剂。反应物用 50mL 去离子水溶解，再加入 30mL 乙酸乙酯，充分振荡，静置分层，保留水相。在水相中加入稀盐酸溶液调节 pH 至 3，用乙酸乙酯 50mL×2 萃取水相，合并有机相，有机相用 50mL 水洗涤，脱去溶剂，得到粗品对羟基四氯苯氧丁酸乙酯。

将制得的粗品对羟基四氯苯氧丁酸乙酯 0.5g 加入反应器中，加入 10% 的氢氧化钠溶液 10mL，再加入 20mL 甲醇溶液，在 38℃ 下加

热回流 4h，进行脱酯化。经 TLC 检测反应完成后，脱去溶剂，经柱层析分离得到目标产物。

### 实施例 3 五氯酚多克隆抗体制备

以活性酯法将半抗原四氯对羟基苯氧丁酸与牛血清白蛋白偶联，称 2mg 偶联物溶于 1mL 生理盐水中，和 1mL 完全弗氏佐剂混合，充分乳化后注射新西兰大耳白兔大腿，以后每隔两周加强免疫一次，换用不完全弗氏佐剂与免疫原混合，免疫部位为颈背部皮下，从第三次免疫开始，每次免疫后一周从兔耳静脉采血检测血清效价。总共免疫 5 次，最后一次免疫后一周从兔颈动脉采全血，用 35% 的饱和硫酸铵盐析法粗提兔抗血清，最后用 DE-52 阴离子交换层析法进一步纯化，获得较纯的五氯酚多克隆抗体。

DE-52 阴离子交换纯化抗体：

(1) DE-52 预处理：以 1mg 粗 IgG 需 5g 湿重纤维素计算，称适量 DE-52 加 0.5mol/L NaOH 浸泡 30min，蒸馏水反复洗至中性；接着用 0.5mol/L HCl 浸泡 30min，蒸馏水反复洗至中性；再用 0.5mol/L NaOH 浸泡 30min，蒸馏水反复洗至中性，最后用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 充分平衡过夜。

(2) 装柱：装柱前用真空泵抽去 DE-52 溶液中的气泡，装柱过程中不能产生气泡，上样前柱床用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 平衡。

(3) 上样：用 4~6mL 的 PBS 将适量的粗 IgG 稀释，然后沿柱臂缓慢加在柱床上表面，待样品进入柱床后开始洗脱。

(4) 洗脱：以 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 作洗脱液，流速 0.5mL/min，收集第一和第二吸收峰。

(5) 收集液冷冻干燥，4℃ 保存。

### 实施例 4 酶标板的制备

用包被缓冲液（0.05 M pH 9.6 碳酸钠缓冲液）将五氯酚抗原稀释成 1μg/mL，每孔加入 100μL，37℃ 温育 2h 并 4℃ 过夜，倾去包被

液,用洗涤液洗涤3次,每次30秒,拍干,然后在每孔中加入150-200 $\mu$ L封闭液,37 $^{\circ}$ C温育2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

### 实施例5 五氯酚残留分析酶联免疫吸附检测试剂盒的组建

本例中,试剂盒包含如下部分:

- (1) 包被五氯酚抗原的酶标板
- (2) 海绵支架
- (3) 1mg/mL 五氯酚标准品
- (4) 五氯酚多克隆抗体
- (5) 辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体
- (6) 浓缩洗涤液配方为:氯化钠 8g、磷酸二氢钾 0.2g、磷酸氢二钠 3g、氯化钾 5g、吐温-20 2mL、蒸馏水 20 mL。
- (7) 显色液 A 液配方: 过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 吐温-20 100 $\mu$ L, 蒸馏水 1000 mL, pH5。
- (8) 显色液 B 液配方: 四甲基联苯胺(TMB)700mg (40mL DMSO 溶解), 10.3g 柠檬酸, 蒸馏水 1000 mL, pH2.5。

### 实施例6 试剂盒特异性实验

使用实施例5中的试剂盒,进行实验。选择2-氯苯酚、2,5-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚、2,3,4,6-四氯苯酚、五氯硝基苯、六氯苯、2,4-D、PCBs作为待测物,测得各种物质的抑制中浓度( $\text{IC}_{50}$ ),再用下式计算抗体对这些物质的交叉反应性;交叉反应率愈小,则抗体对五氯酚的特异性愈强,反之则抗体的特异性差。

$$\text{交叉反应 (CR\%)} = \text{IC}_{50}(\text{五氯酚}) / \text{IC}_{50}(\text{供试物}) \times 100\%。$$

实验测定结果见表1,采用间接ELISA法,多克隆抗体对与五氯酚结构类似物存在一定的交叉反应,抗血清对五氯酚的特异性很强,对2,3,4,6-四氯苯酚交叉反应为5.6%,对结构类似物五氯硝基苯交叉反应率较低,为2.5%;对六氯苯交叉反应率则更低,为1.8%。

而对其它结构相近或相似物质则均无明显的交叉反应。说明该试剂盒的特异性好，可保证对样品中五氯酚残留测定结果的可靠性。

表 1 交叉反应

Table 1 Cross Reactivities of Indirect ELISA Kit

化合物名称	交叉反应 (%)
五氯酚	100
2-氯苯酚	<0.03
2, 5-二氯苯酚	0.4
2, 4, 6-三氯苯酚	0.5
2, 3, 4, 6-四氯苯酚	5.6
五氯硝基苯	2.5
六氯苯	1.8
2, 4-D	<0.2
PCBs	<0.2

### 实施例 7 回收试验

采用实施例 5 中的试剂盒，进行实验。取颐和园昆明湖水 100mL 三份，往其中添加五氯酚标准品，使样品中五氯酚终浓度分别为  $10\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，用建立的五氯酚间接竞争 ELISA 方法和气相色谱国家标准分析方法进行测定。水样的回收率在 76 ~ 114% 之间，试剂盒的回收率在允许范围内，符合农药残留分析对精确度的要求。说明此测定方法是可靠的，可用于五氯酚在水样中残留量的分析测定。见表 2。

表 2 试剂盒测定结果与 HPLC 测定结果的比较

Tab 2 Comparison of Results between Indirect ELISA and HPLC

实际添加五氯酚的浓度 ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率 (%)	
	ELISA 试剂盒	HPLC
2	114	99
5	84	100
10	76	97

专利名称(译)	一种适用于五氯酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101526525A</a>	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200810101543.7	申请日	2008-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	李季 许艇 井宏宇		
发明人	李季 许艇 井宏宇		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
代理人(译)	王朋飞		
其他公开文献	CN101526525B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种适用于五氯酚残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，包括包被了五氯酚抗原的酶标板、浓缩洗涤液、五氯酚标准品、五氯酚特异性抗体、酶标记物、显色液、反应终止液。检测已知浓度的五氯酚并绘制标准曲线，可以推算出待测五氯酚的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测环境中的五氯酚残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。

化合物名称	交叉反应 (%)
五氯酚	100
2-氯苯酚	<0.03
2, 5-二氯苯酚	0.4
2, 4, 6-三氯苯酚	0.5
2, 3, 4, 6-四氯苯酚	5.6
五氯硝基苯	2.5
六氯苯	1.8
2, 4-D	<0.2
PCBs	<0.2