

[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 200810223492.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12N 15/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101382550A

[22] 申请日 2008.10.6

[21] 申请号 200810223492.5

[71] 申请人 北京金达清创环境科技有限公司

地址 100084 北京市海淀区清华大学学研大厦 B-1203 室

共同申请人 清华大学

[72] 发明人 盛建武 何 苗 廖志民 施汉昌

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅 任凤华

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒及其应用。本发明试剂盒包括硝基苯乙胺和抗硝基苯乙胺的特异性抗体；所述特异性抗体为所述硝基苯乙胺的多克隆抗体或单克隆抗体。本发明的试剂盒，具有灵敏度高、结构简单、使用方便、快速、准确的特点，并且还适用于水中、土壤中、动植物水产品（如鱼类、蚌壳类、水藻类等）中硝基苯类物质的定量检测。因此，本发明试剂盒，对于硝基苯类物质大规模样品的快速筛查和预警监测具有非常重要的经济和社会意义。

1、一种检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒，包括硝基苯乙胺和抗硝基苯乙胺的特异性抗体；所述特异性抗体为所述硝基苯乙胺的多克隆抗体或单克隆抗体。

2、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于：所述硝基苯乙胺和抗硝基苯乙胺的特异性抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述硝基苯乙胺与载体蛋白进行偶联，得到硝基苯乙胺与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述特异性抗体为包被原，所述硝基苯乙胺进行酶标记后作为酶标记物。

3、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括抗抗体；所述硝基苯乙胺和抗抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述硝基苯乙胺与载体蛋白进行偶联，得到硝基苯乙胺与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述抗抗体为包被原，所述硝基苯乙胺进行酶标记后作为酶标记物。

4、根据权利要求1、2或3所述的试剂盒，其特征在于：所述单克隆抗体是由保藏编号为CGMCC No. 2771的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株NB11E7分泌产生的。

5、根据权利要求1-4中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括1,3-二硝基苯标准品溶液、显色液、终止液、洗涤液。

6、根据权利要求1-5中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶；当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液A液和显色液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硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液，终止液为1-2mol/L氢氧化钠溶液。

7、根据权利要求5或6所述的试剂盒，其特征在于：所述洗涤液为含0.05%（体积百分含量）吐温-20和8g/L氯化钠的0.01 mol/L pH=7.5磷酸盐缓冲液。

8、根据权利要求1-7中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述硝基苯类化合物为1,3-二硝基苯、1,4-二硝基苯、1,2-二硝基苯或2,4-二硝基甲苯；所述硝基

苯乙胺为 4-硝基苯乙胺。

9、权利要求 1-8 中任一所述试剂盒在检测硝基苯类化合物中的应用。

10、由保藏编号为 CGMCC No. 2771 的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株 NB11E7 分泌产生的单克隆抗体，或保藏编号为 CGMCC No. 2771 的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株 NB11E7。

一种检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

本发明涉及一种检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒及其应用。

背景技术

2005年吉林石化分公司双苯厂爆炸造成松花江重大水环境污染事件，使沿岸数百万居民的生活受到严重影响，涉及跨国界污染问题。主要污染物为硝基苯类、苯胺类物质。

硝基苯类化合物，主要包括硝基苯、二硝基苯、硝基甲苯等等，广泛用于医药、农药、炸药、染料、造纸、纺织等工业领域，是一类重要的苯类化合物。但是硝基苯类化合物大多属于难降解物质，会在环境中大量积累，使得地表水、地下水以及土壤中都有可能受到大面积的污染。同时，随着生产苯胺类物质的化工厂数量的不断增多、规模的不断扩大，这些污染物暴发突发性环境污染事故的潜在可能性也大大增加。所以开发用于硝基苯类物质大规模快速筛查的检测技术非常迫切。

硝基苯和二硝基苯均被列为美国饮用水中检出的有机污染物及EPA制订的“优先污染物”之一，也被列入我国环境优先污染物“黑名单”。2002年国家环境保护总局颁布了《中华人民共和国国家标准 地表水环境质量标准》(GB3838-2002)，在“集中式生活饮用水地表水源地特定项目”中规定了二硝基苯的标准为0.5mg/L，该标准值为1,2-二硝基苯(图1A)、1,3-二硝基苯(图1B)、1,4-二硝基苯(图1C)三种物质的总量。

目前这类化合物的检测方法多以气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)和气相色谱-质谱联用(GC/MS)、高效液相色谱-质谱联用(HPLC/MS)为主。但是这些常规的理化检测方法，特别是液相色谱和质谱分析方法具有仪器体积庞大、价格昂贵、需要条件较高的室内环境、而且还需要专门的技术人员操作、前处理复杂、检测费用昂贵等缺点，限制了其在硝基苯类物质大规模筛查中的应用。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒，包括硝基苯乙胺和抗硝基苯乙胺的特异性抗体；所述特异性抗体为所述硝基苯乙胺的多克隆抗体或单克

隆抗体。

所述硝基苯乙胺和抗硝基苯乙胺的特异性抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述硝基苯乙胺与载体蛋白进行偶联，得到硝基苯乙胺与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述特异性抗体为包被原，所述硝基苯乙胺进行酶标记后作为酶标记物。

其中，所述载体蛋白可为任意一种常用的载体蛋白，如牛血清白蛋白、人血清白蛋白（HSA）、钥孔虫戚血蓝蛋白（KLH）或卵清白蛋白（OVA）等。

所述试剂盒还包括抗抗体；所述抗抗体可为羊抗鼠 IgG 或羊抗兔 IgG；

所述硝基苯乙胺和抗抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述硝基苯乙胺与载体蛋白进行偶联，得到硝基苯乙胺与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述抗抗体为包被原，所述硝基苯乙胺进行酶标记后作为酶标记物。

其中，用于包被抗原的固相载体物质可为纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等；所用的载体的形式还可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等；微量反应板可为 24 孔、48 孔、或 96 孔。

所述单克隆抗体是由保藏编号为 CGMCC No. 2771 的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株 NB11E7 分泌产生的。

单抗还可以用如下方法制备：将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7 天后腹腔注射能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株 NB11E7 CGMCC No. 2771 5×10^7 个/只，7 天后采集腹水。用免疫亲和层析法进行腹水纯化，得到抗硝基苯的单克隆抗体， -20°C 保存。

所述试剂盒还包括 1,3-二硝基苯标准品溶液、显色液、终止液、洗涤液；所述洗涤液为含 0.05%（体积百分含量）吐温-20 和 8g/L 氯化钠的 0.01 mol/L pH=7.5 磷酸盐缓冲液。

所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶；当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液 A 液和显色液 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 硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液，终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

所述硝基苯类化合物具体可以为1,3-二硝基苯、1,4-二硝基苯、1,2-二硝基苯或2,4-二硝基甲苯；所述硝基苯乙胺具体可以为4-硝基苯乙胺。

上述任一所述试剂盒在检测硝基苯类化合物中的应用也属于本发明的保护范围。

由保藏编号为 CGMCC No. 2771 的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株 NB11E7 分泌产生的单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

保藏编号为 CGMCC No. 2771 的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株 NB11E7 也属于本发明的保护范围。

本发明的硝基苯类化合物酶联免疫检测试剂盒对 1,3-二硝基苯的半抑制浓度 $IC_{50}=0.80\pm 0.04\text{mg/L}$ ；该 ELISA 试剂盒对 1,3-二硝基苯的最低检测限为 0.02mg/L ；对 1,3-二硝基苯进行检测的定量检测区间为 $0.05\text{mg/L}-6.00\text{mg/L}$ ；批内误差小于 15%，准确度和精密度符合要求，能进行环境样品中硝基苯类化合物的大规模快速筛查和预警监测。而且本发明的硝基苯类物质酶联免疫检测试剂盒，具有灵敏度高、结构简单、使用方便、快速、准确的特点，并且还适用于水中、土壤中、动植物水产品(如鱼类、蚌壳类、水藻类等)中硝基苯类物质的定量检测。因此，本发明试剂盒，对于硝基苯类物质大规模样品的快速筛查和预警监测具有非常重要的经济和社会意义。

附图说明

图 1 为 1,2-二硝基苯、1,3-二硝基苯和 1,4-二硝基苯的结构式。

图 2 为竞争 ELISA 试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明均为常规方法。

实施例1、以硝基苯乙胺与载体蛋白的偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的制备及使用

一、检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒的原理

本发明的硝基苯类物质酶联免疫检测试剂盒的检测原理是，使用时将标准品或样品和抗体混合后加入酶标板中，标准品或样品中的抗原和固相载体上的包被抗原一起竞争性地与溶液中的抗体结合，洗涤去除游离的抗原以及抗原抗体复合物，与固相载体上包被抗原结合的抗体再与酶标二抗结合，用酶底物进行测定，结合的酶

标记物将无色的显色剂转化为有色的产物。加入反应终止液后用酶标仪测量吸光度，吸光度与样品中的硝基苯类物质浓度成反比。因此，本试剂盒是一种竞争性ELISA试剂盒。

二、以抗原与载体蛋白的偶联物作为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的制备

1、包被有抗原与载体蛋白偶联物的酶标板的制备

(1) 包被原的制备:

以抗原（即硝基苯乙胺）与载体蛋白（即牛血清白蛋白）的偶联物作为包被原；采用戊二醛法进行制备；原理是先用过量的戊二醛与载体蛋白反应，以保证载体蛋白分子仅与戊二醛的一个醛基结合，另一个醛基游离；然后用凝胶过滤层析除去多余的戊二醛，制成活性蛋白，再加入一定量的硝基苯乙胺，使之与活化蛋白上的醛基结合，制成完全抗原即包被原。

具体制备步骤如下：

- 1) 配置 0.05M pH=11.0-12.0 的磷酸盐缓冲液如下：70mg $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 与 112mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 混合，加入 10ml 蒸馏水，充分溶解；
- 2) 在上述缓冲液中加入 101mg 4-硝基苯乙胺（sigma 公司），充分溶解；再加入 35mg EDC（碳二亚胺）（Fluka G3450）干粉，充分搅拌；
- 3) 立即加入 20mg BSA（Sigma A3294）干粉，反应条件为 4℃，18h。
- 4) 纯化采用凝胶过滤层析，分装后-20℃保存。

(2) 酶标板

本实施例的酶标板为聚苯乙烯微量反应96孔板。

(3) 将包被原包被在酶标板上

包被浓度0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，取120 μL 包被抗原加入反应板孔中，4℃冰箱中过夜，倒出孔内液体，用洗涤液1×PBST洗涤3-5次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打，吸干，在已包被抗原的酶标板小孔中加入150 μL 1%（质量百分含量）的BSA 封闭，37℃温育1h，用洗涤液1×PBST洗涤3-5次，用吸水纸吸干，真空封装。

2、硝基苯乙胺多克隆抗体和单克隆抗体的制备

(1) 抗硝基苯乙胺的多克隆抗体的制备

以体重1.5-2kg临床健康的雄性新西兰大白兔为免疫动物，以步骤1制备的完全抗原作为免疫原，按1.2mg免疫原/只的剂量对新西兰大白兔进行免疫注射，首免时

将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，背部6点皮下注射，此后每间隔4周用相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合制成的乳化剂加强免疫一次，共免疫4次，最后一次不加佐剂，最后一次免疫后10天，宰杀、采血、分离得到多克隆抗体，冷藏备用。

(2) 硝基苯乙胺单克隆抗体的制备

a. 动物免疫

以步骤1制备的完全抗原作为免疫原，采用皮下多点注射方式将免疫原注入到Balb/c小鼠体内，免疫剂量为15-40 μ g/只，两次免疫的间隔时间为20-40天，使其产生多克隆抗体血清。

b. 细胞融合和克隆化

小鼠血清测定结果较高后，取其脾细胞，按7:1比例（数量配比）与SP2/0骨髓瘤细胞融合，采用间接竞争ELISA测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，直到得到能稳定分泌硝基苯乙胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株，将该细胞株命名为能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株NB11E7，该细胞株已于2008年09月19日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称CGMCC，地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所，邮编100101），保藏编号为CGMCC No. 2771。

c. 细胞冻存和复苏

将分泌硝基苯乙胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^9 个/ml的细胞悬液，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

d. 单克隆抗体的生产与纯化

增量培养法：将杂交瘤细胞CGMCC No. 2771置于细胞培养基中，在37 $^{\circ}$ C条件下进行培养，用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化，得到抗硝基苯的单克隆抗体，-20 $^{\circ}$ C保存。

所述细胞培养基为向RPMI-1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠，使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20%（质量百分含量），使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2%（质量百分含量）；所述细胞培养基的pH为7.4。

3、酶标二抗溶液配制：

本实施例的酶标二抗为辣根过氧化物酶-羊抗鼠 IgG, 购自Sigma公司 (Sigma, A4416)。

三、以抗原与载体蛋白的偶联物作为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的组成及性能检测:

(一) 组成

1、包被有包被原 (包被原为 4-硝基苯乙胺与牛血清白蛋白偶联物) 的 96 孔聚苯乙烯微量反应板; 包被原的浓度为 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 。

2、抗体溶液: 将由杂交瘤细胞 CGMCC No. 2771 分泌的抗硝基苯单克隆抗体用磷酸盐缓冲液稀释成工作浓度 1: 6000, 使抗体的最终工作浓度为 $0.3 \mu\text{g/mL}$, 再加入 1% (质量百分含量) 的牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.1% (质量百分含量) 的硫柳汞, 灌装入试剂瓶中。

3、酶标二抗溶液配制: 辣根过氧化物酶-羊抗鼠 IgG 原液 (Sigma, A4416), 灌装入试剂瓶中, 使用时用洗涤液按 1: 10000 配制成工作浓度。

4、标准品溶液: 采用从 Sigma 购买的 1,3-二硝基苯作为标准品 (产品编号 41980, 纯度 $\geq 99.0\%$ (HPLC)), 采用高纯水分别配制成 1,3-二硝基苯标准溶液, 浓度分别为 0 mg/L 、 0.1 mg/L 、 0.2 mg/L 、 0.5 mg/L 、 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L , 分别灌装入试剂瓶中。

5、洗涤液 ($10 \times \text{PBST}$): 含 0.5% (体积百分含量) 吐温-20 和 80 g/L 氯化钠的 0.1 mol/L pH=7.5 磷酸盐缓冲液, 灌装入试剂瓶中。使用时, 将该溶液用纯水稀释 10 倍再用。

6、底物显色溶液: 由 A 液和 B 液组成; A 液为 H_2O_2 溶液, 每 1 ml 0.1 mol/L pH5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液中加入 $50 \mu\text{L}$ 0.1% 的 H_2O_2 溶液得到 A 液, 灌装入试剂瓶中; B 液为四甲基联苯胺溶液, 先用丙酮配制成 10 mg/mL 的四甲基联苯胺溶液母液, 再用 0.1 mol/L pH5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液配制成 0.2 mg/mL 的四甲基联苯胺溶液, 灌装入试剂瓶中。

7、终止液配制: 2 mol/L H_2SO_4 溶液, 灌装入试剂瓶中。

(二) 试剂盒的性能检测

从按照步骤二中所述方法制备的不同批次 (01 批、03 批) 的试剂盒中各抽取 4 个试剂盒, 然后分别进行如下实验:

1、试剂盒标准曲线的获得

用不同浓度的 1,3-二硝基苯溶液做实验溶液，其浓度如下(单位：mg/L)：0、0.008、0.025、0.076、0.23、0.68、2.06、6.17、18.5、55.6、166.7、500。采用 8 组平行试验 (n=8) (即从 01 批试剂盒中抽取的 4 个，从 03 批试剂盒中抽取的 4 个，分别进行实验)。

将实验溶液与抗体溶液同时加入酶标板小孔中，同时设置空白孔 (将添加的抗体溶液换成高纯水，其它一致) 和阴性对照孔 (将添加的实验溶液用高纯水代替，即不含硝基苯类化合物，其它一致)，37℃温育 0.5h，倒出孔内液体，用洗涤液 (10×PBST) 洗涤 2-5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打；加入酶标二抗溶液于酶标板小孔中，37℃温育 0.5h，用洗涤液重复洗 3-5 次，吸干；加入底物显色溶液到酶标板小孔中，室温下反应 10-15min，用酶标仪在波长 450nm 处测定吸光度值 A，以不加抗体的小孔作为空白调零。以吸光度值 A 为纵坐标，以 1,3-二硝基苯实验溶液浓度的 \log_{10} 值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。结果如图 2 所示，表明标准曲线具有完整的反 S 形状，并具有上平台和下平台，标准曲线的平行测定次数 8 次，误差线为 n=8 次平行实验的标准偏差，实验重复性良好，相对标准偏差 (变异系数) 均在 15% 以内，表明试剂盒精密度良好。

2、试剂盒半抑制浓度、检测限、定量检测区间的检测

基于图 2 所示的标准曲线，利用四参数 Logistic 模型进行模型拟合，然后进一步评价试剂盒半抑制浓度、检测限、定量检测区间。

模型如下：

$$A = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (4 \text{ 参数 Logistic 模型})$$

其中：

x ：未标记抗原浓度 (质量浓度或物质的量浓度)，自变量；

A ： x 对应的吸光度 (Absorbance)，因变量；

A_1 ：上端渐近线 ($x=0$)，常数；

A_2 ：下端渐近线 ($x \rightarrow \infty$)，常数；

p ：与曲线的斜率有关，常数；

x_0 ：曲线的中点，或称拐点，常数；

图 2 的标准曲线表明， A_1 为 1.106， A_2 为 0.037， p 为 0.78， x_0 为 0.80。

进一步对图 2 中的标准曲线采用四参数的 Logistic 模型拟合，分析结果如下：

a、半抑制浓度 IC_{50} 是竞争 ELISA 一个很重要的评价指标。在竞争 ELISA 中， $IC_{50} \equiv x_0$ ， $IC_{50}=0.80 \pm 0.04\text{mg/L}$

b、在竞争 ELISA 中，依据上述 Logistic 模型，定义结合率 Y 如下式：

$$Y = \frac{A - A_2}{A_1 - A_2} \times 100\%$$

c、竞争 ELISA 标准曲线最低检测限和最高检测限的确定采用结合率法，即最低和最高检测限分别为 $Y=90\%$ 和 $Y=10\%$ 时对应的目标物质(待测物)的浓度；该间接竞争 ELISA 试剂盒对 1,3-二硝基苯的最低检测限为 0.02mg/L 。

d、竞争 ELISA 标准曲线的定量检测区间的确定采用结合率法，定量检测区间即 $Y=80\%-20\%$ 对应的目标物质(待测物)的浓度区间；该间接竞争 ELISA 试剂盒对 1,3-二硝基苯进行检测的定量检测区间为 $0.05\text{mg/L}-6.00\text{mg/L}$ 。

二硝基苯在地表水环境质量标准(GB3838-2002)中的限值为 0.5mg/L ，该标准值为 1,2-二硝基苯、1,3-二硝基苯、1,4-二硝基苯三种物质的总量。因此，本试剂盒完全达到了对水中二硝基苯定量检测和快速筛查的要求。

3、竞争 ELISA 试剂盒特异性的测定

按照步骤 1 中所述方法，检测其它不同的硝基苯类物质，按照如下浓度制备实验溶液(单位： mg/L)：0、0.008、0.025、0.076、0.23、0.68、2.06、6.17、18.5、55.6、166.7、500。采用 8 组平行试验($n=8$)，进行竞争 ELISA 试验，获得针对不同物质的标准曲线。进一步采用 Logistic 模型拟合获得 IC_{50} 值后，计算交叉反应率，结果如表 1 所示。结果表明，由保藏编号为 CGMCC No. 2771 的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株 NB11E7 分泌产生的单克隆抗体的特异性较好，针对硝基苯类物质有较高的交叉反应性；针对硝基苯胺类物质只有较弱的交叉反应；而针对苯胺类和苯类物质几乎没有交叉反应。

表 1、交叉反应结果

竞争抗原分类	竞争抗原名称	$IC_{50}(\text{mg/L})$	交叉反应率(%)
硝基苯类	1,3-二硝基苯	0.80	100
	1,4-二硝基苯	1.204	66.4
	1,2-二硝基苯	1.898	42.1
	2,4-二硝基甲苯	1.112	71.9
硝基苯胺类	4-硝基苯胺	6.526	12.3
	3-硝基苯胺	5.627	14.2

	2-硝基苯胺	7.416	10.8
	4-硝基苯乙胺	23.241	3.4
苯胺类	苯胺	50.123	1.6
	1, 2-苯二胺	——	——
	1, 3-苯二胺	——	——
	联苯胺	——	——
苯类	苯	——	——
	甲苯	——	——
	乙基苯	——	——

四、以抗原与载体蛋白的偶联物作为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的应用：

本发明试剂盒可用于检测水中、土壤中、动植物水产品(如鱼类、蚌壳类、水藻类等)中硝基苯类物质，使用方法如下：

将标准品溶液或样品溶液与抗体溶液工作液同时加入酶标板小孔中，同时设置空白和阴性对照孔，室温或 37℃温育 0.5-1h，倒出孔内液体，用洗涤液重复洗涤 2-5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打；加入酶标抗体溶液于酶标板小孔中，室温或 37℃温育 0.5-1h，用洗涤液重复洗 3-5 次，吸干；加入底物显色溶液到酶标板小孔中，室温下反应 10-15min，颜色显蓝色，再加入终止液，立即变成黄色；用酶标仪在波长 450nm 处测定吸光度值，以不加抗体的小孔作为空白调零。

测定 1, 3-二硝基苯标准品溶液孔的吸光度值，以各浓度标准品的吸光度值为纵坐标，以对应的 1, 3-二硝基苯的浓度的 \log 值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。根据待测样品溶液的吸光度，在标准曲线上查出相应的硝基苯类物质浓度(以 1, 3-二硝基苯计)，再换算出样品中硝基苯类物质的含量。

实施例 2、用于检测硝基苯类物质的试剂盒还可以有如下几种：

一、包被原为特异性抗体，酶标记物为酶标硝基苯乙胺的试剂盒

(一) 本试剂盒的工作原理为：

当在微孔条上预包被实施例 I 中所述单克隆抗体时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记硝基苯乙胺溶液。样本中的硝基苯类物质或标准品中的 1, 3-二硝基苯与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的单克隆抗体，用显色液显色，样本吸光值与样本中硝基苯类物质的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中硝基苯类物质的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅，通过与系列浓度的 1, 3-二硝基苯标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中硝基苯类物质的浓度范围。

(二) 本试剂盒的组成为:

(1) 包被有包被原的酶标板: 包被原为实施例1中所述单克隆抗体, 是由保藏编号为CGMCC No. 2771的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株NB11E7分泌产生的;

(2) 酶标记物: 酶标硝基苯乙胺工作液; 标记酶为辣根过氧化物酶。

(3) 1, 3-二硝基苯标准品, 浓度分别为0 mg/L、0. 1mg/L、0. 2mg/L、0. 5mg/L、1. 0mg/L和2. 0mg/L。

(4) 底物显色溶液: 由A液和B液组成; A液为 H_2O_2 溶液, B液为四甲基联苯胺溶液, 分别灌装入试剂瓶中。

(5) 终止液为1-2mol/L硫酸溶液。

(6) 洗涤液(10×PBST): 含0. 5% (体积百分含量) 吐温-20和80g/L氯化钠的0. 1 mol/L pH=7. 5磷酸盐缓冲液, 灌装入试剂瓶中。使用时, 将该溶液用纯水稀释10倍再用。

(7) 浓缩复溶液为含有0. 2-0. 5%的人血清蛋白、pH为9. 1-9. 9、0. 05-0. 1mol/L碳酸盐缓冲液; 400ml/瓶, 1瓶; 所述百分含量为质量百分含量。

二、包被原为硝基苯乙胺与载体蛋白偶联物、酶标记物为酶标特异性抗体的试剂盒

(一) 工作原理

当在微孔条上预包被硝基苯乙胺与载体蛋白偶联物时, 加入样本溶液或标准品溶液后, 再加入酶标实施例1中所述单克隆抗体。样本中的硝基苯类物质或标准品中的1, 3-二硝基苯与酶标板上包被的硝基苯乙胺竞争特异性抗体, 用显色液显色, 样本吸光值与样本中硝基苯类物质的含量成负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中硝基苯类物质的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅, 通过与系列浓度1, 3-二硝基苯标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中硝基苯类物质的浓度范围。

(二) 本试剂盒的组成

(1) 包被有包被原的酶标板: 包被原为硝基苯乙胺与牛血清白蛋白偶联物。

(2) 酶标记物: 酶标特异性抗体工作液, 标记酶为碱性磷酸酶; 特异性抗体是单克隆抗体, 是由保藏编号为CGMCC No. 2771的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株NB11E7分泌产生的。

(3) 1,3-二硝基苯标准品, 浓度分别为0 mg/L、0.1mg/L、0.2mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L和2.0mg/L。

(4) 显色溶液: 为硝基磷酸盐缓冲液(4-硝基酚磷酸盐缓冲液)。

(5) 终止液为1~2mol/L氢氧化钠溶液。

(6) 洗涤液(10×PBST): 含0.5%(体积百分含量)吐温-20和80g/L氯化钠的0.1 mol/L pH=7.5磷酸盐缓冲液, 灌装入试剂瓶中。使用时, 将该溶液用纯水稀释10倍再用。

三、包被原为抗抗体, 酶标记物为酶标硝基苯乙胺

(一) 工作原理

当在微孔条上预包被抗抗体时, 加入特异性抗体孵育后, 加入样本溶液或标准品溶液, 再加入酶标硝基苯乙胺溶液。样本中的硝基苯类物质或标准品中的1,3-二硝基苯与酶标硝基苯乙胺竞争特异性抗体, 用显色液显色, 样本吸光度值与样本中硝基苯类物质的含量成负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中硝基苯类物质的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅, 通过与系列浓度1,3-二硝基苯标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中硝基苯类物质的浓度范围。

(二) 试剂盒组成如下:

(1) 包被有包被原的酶标板: 包被原为羊抗兔 IgG。

(2) 酶标记物: 辣根过氧化物酶标记的硝基苯乙胺;

(3) 特异性抗体工作液: 单克隆抗体: 是由保藏编号为CGMCC No.2771的能分泌抗硝基苯单克隆抗体的杂交瘤细胞株NB11E7分泌产生的。

(4) 1,3-二硝基苯标准品, 浓度分别为0 mg/L、0.1mg/L、0.2mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L和2.0mg/L。

(5) 底物显色溶液: 由A液和B液组成; A液为H₂O₂溶液, 灌装入试剂瓶中; B液为四甲基联苯胺溶液, 灌装入试剂瓶中。

(6) 洗涤液(10×PBST): 含0.5%(体积百分含量)吐温-20和80g/L氯化钠的0.1 mol/L pH=7.5磷酸盐缓冲液, 灌装入试剂瓶中。使用时, 将该溶液用纯水稀释10倍再用。

(7) 终止液: 终止液为1~2mol/L盐酸溶液。

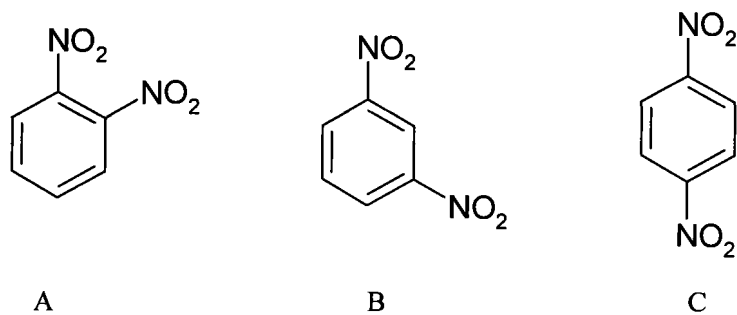


图 1

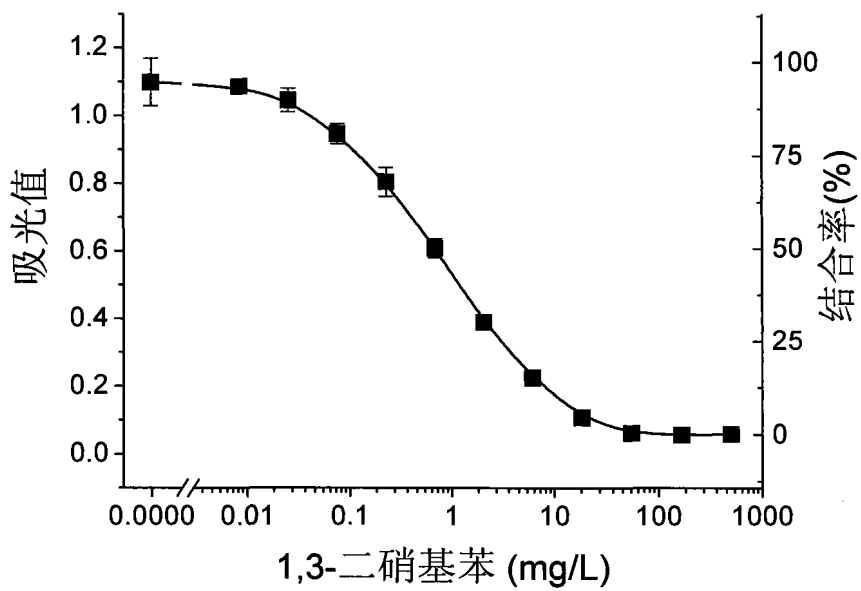


图 2

专利名称(译)	一种检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN101382550A	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN200810223492.5	申请日	2008-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	北京金达清创环境科技有限公司 清华大学		
申请(专利权)人(译)	北京金达清创环境科技有限公司 清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京金达清创环境科技有限公司 清华大学		
[标]发明人	盛建武 何苗 廖志民 施汉昌		
发明人	盛建武 何苗 廖志民 施汉昌		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/02		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101382550B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测硝基苯类化合物的酶联免疫试剂盒及其应用。本发明试剂盒包括硝基苯乙胺和抗硝基苯乙胺的特异性抗体；所述特异性抗体为所述硝基苯乙胺的多克隆抗体或单克隆抗体。本发明的试剂盒，具有灵敏度高、结构简单、使用方便、快速、准确的特点，并且还适用于水中、土壤中、动植物水产品(如鱼类、蚌壳类、水藻类等)中硝基苯类物质的定量检测。因此，本发明试剂盒，对于硝基苯类物质大规模样品的快速筛查和预警监测具有非常重要的经济和社会意义。

$$A = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$