



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103698506 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201310755464. 9

(22) 申请日 2013. 12. 31

(73) 专利权人 杭州爱贝亚检测技术有限公司
地址 310052 浙江省杭州市滨江区滨和路
988 号中赢国际大厦 -902/904

(72) 发明人 雷雅静 陈枢青

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224
代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102827934 A, 2012. 12. 19,

US 2002132233 A1, 2002. 09. 19,

CN 102898515 A, 2013. 01. 30,

黄明等. 免疫 PCR 检测技术及其在食品安

全领域中的应用. 《南京农业大学学报》. 2010, 第 33 卷 (第 6 期), 119-124.

Han-Yu Chen et al.. Real-time immuno-PCR assay for detecting PCBs in soil samples. 《Anal Bioanal Chem》. 2009, 第 394 卷 1205-1211.

陈寒玉等. 多溴联苯免疫 PCR 人工抗原的合成及表征. 《环境化学》. 2008, 第 27 卷 (第 5 期),

审查员 肖吉

权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

利用直接免疫 PCR 检测样品中污染物含量的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用直接免疫 PCR 检测样品中污染物含量的方法, 包括: 取待测物标准品, 制备标记 DNA- 标准品偶联物; 将可与待测物特异性结合的抗体固定在支持物上, 添加待测样品和标记 DNA- 标准品偶联物, 进行竞争性结合反应, 反应完成后洗涤; 洗涤完成后, 加入 PCR 反应体系, 以标记 DNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR, 得到 CT 值; 根据标准曲线, 利用 CT 值计算待测样品中待测物的含量。本发明只需“特异抗体包被—竞争结合—PCR 扩增”三个步骤即可完成对环境样品中待测物含量的检测, 并且预先将待测物标准品直接与 DNA 偶联, 抗原抗体特异结合, 大大提高了检测灵敏度和准确性。

1. 利用直接免疫 PCR 检测样品中污染物含量的方法,包括:
 - (1) 取待测物标准品,制备标记 DNA- 标准品偶联物;
 - (2) 将可与待测物特异性结合的抗体固定在支持物上,添加待测样品和标记 DNA- 标准品偶联物,进行竞争性结合反应,反应完成后洗涤;
 - (3) 洗涤完成后,加入 PCR 反应体系,以标记 DNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR,得到 CT 值;
 - (4) 根据标准曲线,利用 CT 值计算待测样品中待测物的含量。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述标记 DNA- 标准品偶联物的制备方法为:
 - (1.1) 在待测物标准品中引入易与羧基或氨基反应的基团,获得标准品衍生物;
 - (1.2) 将所述标准品衍生物与载体蛋白偶联,获得偶联蛋白;
 - (1.3) 在标记 DNA 序列中引入 5' 端羧基或 3' 端氨基,获得标记 DNA 衍生物;
 - (1.4) 将偶联蛋白与标记 DNA 衍生物偶联,获得所述标记 DNA- 标准品偶联物。
3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,标记 DNA 的碱基序列如 SEQ ID No. 1 所示。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,实时荧光定量 PCR 采用的引物为:

上游引物:5' -TGACCATGATTACGAATT-3' ;

下游引物:5' -AGTCACGACGTTGTAAAA-3' 。
5. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,实时荧光定量 PCR 反应程序为:94℃ 预变性 30s ;94℃ 变性 20s、52℃ 延伸 30s、72℃ 延伸 15s,总共 40 个循环 ;72℃ 继续延伸 10min。
6. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,步骤(1.2)和步骤(1.4)均采用 NHS 活性酯法。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,将标记 DNA- 标准品偶联物和经 10^{-1} 倍稀释的待测样品以体积比 1:1 混合后,加入到支持物中,进行竞争性结合反应。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述标准曲线的制备方法为:
 - (4.1) 制备一组浓度呈梯度分布的待测物标准品;
 - (4.2) 将所述待测物标准品与标记 DNA- 标准品偶联物以体积比 1:1 混合,加入到固定有可与待测物特异性结合的抗体的支持物中,进行竞争性结合反应,反应完成后洗涤;
 - (4.3) 洗涤完成后,加入 PCR 反应体系,以标记 DNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR,记录 CT 值;
 - (4.4) 绘制得到 CT 值与待测物标准品浓度的对数值呈正相关的标准曲线。

利用直接免疫 PCR 检测样品中污染物含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于环境污染物检测技术领域,具体涉及一种利用直接免疫 PCR 检测样品中污染物含量的方法。

背景技术

[0002] 环境污染物是随着人类活动而出现、会对人类生存环境以及身体健康产生影响的一类化学物质。比如,沙丁胺醇(SAL)是 β -兴奋剂家庭的成员,临床上常用于治疗支气管哮喘等呼吸系统疾病。由于其还可以促进动物生长,减少动物脂肪蓄积,增加瘦肉产量,因而被国内外许多养殖场用作饲料添加剂。然而,如果过多摄入 SAL 会对人体健康产生不利影响,包括出现心悸、头疼、目眩、恶心、呕吐,严重者甚至造成肝肾的损伤。因此,包括我国在内的多个国家已将该类药物列为禁用药物以及饲料添加剂。再比如,烟草中含有上千种对人体健康存在潜在威胁的物质,主动吸烟以及被动吸烟都会导致肺炎、肺癌、哮喘、心血管疾病、高血压以及生殖发育等。所有这些环境污染物虽然分子量小,但却会对人类健康造成巨大的潜在威胁。随着人们生活水平的提高,越来越多的人开始注重生活环境以及身体的健康,因此,为了更准确的反应人体是否暴露于各种环境物质污染中,有必要建立一些快速、简便、高灵敏度的方法来测定生物样品(如尿样、血样等)以及环境样品(如水体、土壤等)中的污染物质的含量。

[0003] 现有检测环境污染物含量的方法有毛细管区带电泳法、气相色谱法、液相色谱法、高效液相色谱法和高效液相色谱-质谱联用法。但是这些仪器分析方法前处理复杂、耗时多且成本高。相比之下,酶联免疫法具有特异性好、灵敏度高、操作简便、检测成本低和样本前处理相对简单等优点。但是,随着人们对健康要求的不断提高,有必要建立一些更高灵敏度的检测方法。

[0004] 免疫 PCR (Immuno-PCR, IPCR)由 Sano 等人提出,是利用抗原抗体反应的特异性和 PCR 扩增反应的极高灵敏性而建立的一种微量抗原检测技术,其主要程序包括:

[0005] (一) 抗原 + 生物素化抗体 \rightarrow 抗原 - 生物素化抗体复合物;

[0006] (二) 加亲合素 \rightarrow 抗原 - 生物素化抗体 - 亲合素复合物;

[0007] (三) 加生物素化 DNA \rightarrow 抗原 - 生物素化抗体 - 亲合素 - 生物素化 DNA 复合物;

[0008] (四) PCR 扩增产生物素化 DNA 部分。

[0009] 将与抗原结合的特异性抗体通过连接分子与标记 DNA 结合,再进行 PCR 扩增,由此定量检测抗原,使敏感性高于 ELISA 和 RIA。但目前免疫 PCR 技术大多被应用于多种微量蛋白及毒素的检测,用于小分子物质(分子量小于 1000 道尔顿)检测的研究相对较少。

[0010] 文献(H.-Y. Chen and H.-S. Zhuang, A Real-Time Immuno-Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting Polychlorinated Biphenyls in the Environment. Analytical and bioanalytical chemistry, 2009, 394, 1205-1211.)公开了采用免疫 PCR 检测环境样品中多氯联苯,其主要步骤包括:抗原包被-特异抗体与小分子(即多氯联苯)竞争-加生物素标记二抗-加亲和素-加生物素标记 DNA-PCR 扩增。

[0011] 该方法属于间接免疫 PCR 法,与现有技术中其他免疫 PCR 方法相同,均是通过生物素与亲和素系统使特异抗体与 DNA 连接,但一个亲和素分子可以结合四个生物素分子,难以排除检测结果中会存在误差的可能性,而且整个过程步骤繁琐,不利于实际应用。

发明内容

[0012] 本发明提供了一种利用直接免疫 PCR 检测样品中污染物含量的方法,该方法步骤简单,且检测结果灵敏性和准确性均较高。

[0013] 利用直接免疫 PCR 检测样品中污染物含量的方法,包括:

[0014] (1) 取待测物标准品,制备标记 DNA- 标准品偶联物;

[0015] (2) 将可与待测物特异性结合的抗体固定在支持物上,添加待测样品和标记 DNA- 标准品偶联物,进行竞争性结合反应,反应完成后洗涤;

[0016] (3) 洗涤完成后,加入 PCR 反应体系,以标记 DNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR,得到 CT 值;

[0017] (4) 根据标准曲线,利用 CT 值计算待测样品中待测物的含量。

[0018] 本发明针对待测样品中污染物建立了一套直接免疫 PCR 检测体系,只需“特异抗体包被—竞争结合—PCR 扩增”三个步骤即可完成对待测样品中待测物含量的检测,并且预先将待测物标准品直接与 DNA 偶联,未在反应体系中引入其他连接分子,抗原抗体特异结合,大大提高了检测灵敏度和准确性。

[0019] 所述待测样品可以是生物样品,如尿样、血样等,可以是环境样品,如水样,土样等。所述污染物是指分子量小于 1000 道尔顿的化合物,这类化合物由于不能直接包被到 ELISA 板上,因此无法用现有的 ELISA 技术进行含量检测。

[0020] 步骤(1)中,所述标记 DNA- 标准品偶联物的制备方法为:

[0021] (1.1) 在待测物标准品中引入易与羧基或氨基反应的基团,获得标准品衍生物;

[0022] 引入易与羧基或氨基反应的基团,便于标准品衍生物与载体蛋白上的氨基或羧基偶联,而且增加了待测物标准品暴露在载体蛋白外表面的几率。基团的引入方式一般是:选择可与待测物标准品反应的小分子物质作为连接臂,该小分子物质上带有易与羧基或氨基反应的基团且反应后该基团保持游离状态。

[0023] 作为优选,所述基团为羧基、氨基或巯基。

[0024] (1.2) 将所述标准品衍生物与载体蛋白偶联,获得偶联蛋白;

[0025] 作为优选,采用 NHS 活性酯法进行偶联,所述载体蛋白可选用 BSA、OVA 或 KLH。

[0026] (1.3) 在标记 DNA 序列中引入 5' 端羧基或 3' 端氨基,获得标记 DNA 衍生物;

[0027] 标准品衍生物与载体蛋白偶联后,载体蛋白的氨基或羧基被占有,为便于在偶联蛋白上连接标记 DNA 序列,需在标记 DNA 序列中引入 5' 端羧基或 3' 端氨基。

[0028] 免疫 PCR 中的标记 DNA 分子可以选择任何 DNA,但要保证 DNA 纯度,且应有较好的均质性,且尽可能不选用受检样品中可能存在的 DNA,一般可选用质粒 DNA 或 PCR 产物。本发明的标记 DNA 的碱基序列如 SEQ ID No. 1 所示(本发明标记 DNA 衍生物是带有 5' 端羧基的标记 DNA),是以 HSA 基因为模板,以 SEQ ID No. 2 所示的上游引物(上游引物的 5' 端带有羧基)和 SEQ ID No. 3 所示的下游引物进行 PCR 扩增获得的 PCR 产物。

[0029] (1.4) 将偶联蛋白与标记 DNA 衍生物偶联,获得所述标记 DNA- 标准品偶联物。

[0030] 作为优选,采用 NHS 活性酯法进行偶联。

[0031] 例如,利用本发明方法对待测样品中沙丁胺醇(SAL)的含量进行测定时,标记 DNA-SAL 偶联物的构建方法包括:

[0032] (a) 在 SAL 上引入羧基,得到 SAL 衍生物;其中,可以选用对氨基苯甲酸或溴乙酸乙酯作为连接臂引入羧基;

[0033] (b) 使 SAL 衍生物上的羧基与 BSA 蛋白上的氨基反应,获得 BSA-SAL 偶联物;

[0034] (c) 制备带 5' 端羧基的标记 DNA 衍生物,并将 BSA-SAL 偶联物与标记 DNA 衍生物偶联,得到标记 DNA-SAL 偶联物。

[0035] 获得标记 DNA-标准品偶联物后,将标记 DNA-标准品偶联物和经 10-1 倍稀释的待测样品以体积比 1:1 混合后,加入到固定有特异抗体的支持物中,进行竞争性结合反应。所述支持物可选用免疫 PCR 管或微孔板。竞争反应完成后进行洗涤,除去未反应的待测样品和标记 DNA-标准品偶联物,便于准确地对已结合的标记 DNA-标准品偶联物的含量进行检测。

[0036] 洗涤完成后加入 PCR 反应体系,以标记 DNA 为模板,以 SEQ ID No. 4 所示的上游引物和 SEQ ID No. 5 所示的下游引物进行实时荧光定量 PCR,得到 CT 值;并根据标准曲线,利用 CT 值计算待测样品中待测物的含量。

[0037] 实时荧光定量 PCR 反应程序为:94℃ 预变性 30s;94℃ 变性 20s、52℃ 延伸 30s、72℃ 延伸 15s,总共 40 个循环;72℃ 继续延伸 10min。

[0038] 所述标准曲线的制备方法为:

[0039] (4.1) 制备一组浓度呈梯度分布的待测物标准品;

[0040] (4.2) 将所述待测物标准品与标记 DNA-标准品偶联物以体积比 1:1 混合,加入到固定有可与待测物特异性结合的抗体的支持物中,进行竞争性结合反应,反应完成后洗涤;

[0041] (4.3) 洗涤完成后,加入 PCR 反应体系,以标记 DNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR,记录 CT 值;

[0042] (4.4) 绘制得到 CT 值与待测物标准品浓度的对数值呈正相关的标准曲线。

[0043] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0044] 本发明建立了利用直接免疫 PCR 法检测环境样品中某一污染物含量的方法,只需“特异抗体包被—竞争结合—PCR 扩增”三个步骤即可完成对环境样品中待测物含量的检测,并且预先将待测物标准品直接与 DNA 偶联,未在反应体系中引入其他连接分子,抗原抗体特异结合,大大提高了检测灵敏度和准确性。

附图说明

[0045] 图 1 为沙丁胺醇衍生物的制备流程图;

[0046] 图 2 为 BSA 蛋白-沙丁胺醇偶联物的制备流程图;

[0047] 图 3 为不同浓度沙丁胺醇标准品竞争结合后的 PCR 扩增曲线,其中,△ Rn 表示荧光强度, cycle 表示 PCR 循环数;

[0048] 图 4 为直接免疫 PCR 中待测样品中沙丁胺醇含量的标准曲线,其中, CT 表示每个 PCR 免疫管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数;log (C)表示待测样品中待测物

浓度的对数值。

具体实施方式

[0049] 实施例 1 直接免疫 PCR 检测 SAL 的含量

[0050] 1SAL 衍生物的制备

[0051] 以对氨基苯甲酸为连接臂, 在 SAL 上引入羧基, 衍生过程如图 1 所示, 包括以下步骤:

[0052] (1) 将 1mL、2.5mmol 对氨基苯甲酸溶于 5mL、5%NaOH 溶液中, 4℃ 搅拌预冷, 获得对氨基苯甲酸溶液;

[0053] (2) 将 3mL、3mmol 的 NaNO_2 与 2.5mL、12% HCl 溶液混匀后, 逐滴滴加到对氨基苯甲酸溶液中形成重氮化溶液, 0-4℃ 反应至 KI-淀粉试纸变蓝后, 加少量尿素中止反应;

[0054] (3) 将 2.5mmol 的 SAL 溶于 3mL 乙腈中, 再加入 1.5mL、10%NaOH 溶液, 4℃ 搅拌预冷, 得到 SAL 溶液;

[0055] (4) 将得到的重氮化溶液逐滴滴加到 SAL 溶液中, 搅拌 5min 后再加入两相催化剂四丁基溴化铵, 反应 30min, 反应液分层, 下层水相变为棕黄色的浑浊液, 抽滤后得到棕黄色沉淀, 用乙醇/水(1:1, v/v) 重结晶, 得到带羧基的 SAL 衍生物。

[0056] 2BSA-SAL 偶联物的制备

[0057] 采用活性酯法使 SAL 衍生物上的羧基与 BSA 蛋白上的氨基反应, 获得 BSA-SAL 偶联物, 偶联过程如图 2 所示, 包括以下步骤:

[0058] (1) 按照 EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐):NHS (N-羟基琥珀酰亚胺):SAL 衍生物 =1:1.2:1 的比例, 分别称取 EDC3.8mg、NHS4.2mg、SAL 衍生物 5.0mg, 用尽量少的 DMF (二甲基甲酰胺) 溶解, 37℃ 下活化 1.5h 得到 A 液;

[0059] (2) 称取 3mg BSA 蛋白用 8mL PBS 溶解, 室温下搅拌, 得到 B 液;

[0060] (3) 加大 B 液的搅拌速度(尽量不产生泡沫的情况下所能达到的最大速度), 将 A 液沿壁缓慢地加入到 B 液中, 待 A 液加入完全后, 降低转速, 放入 4℃ 条件下反应过夜;

[0061] (4) 利用 0.01M 的 PBS 缓冲液 (pH7.4) 进行透析, 透析完全后, 得到 BSA-SAL 溶液。

[0062] 3 带 5' 端羧基的标记 DNA 衍生物的制备

[0063] 以 HSA 基因为模板, 以 a1/a2 为引物, 用 PCR 仪进行扩增, 其中,

[0064] 上游引物 a1 :5' -COOH-AAACAGCTATGACCATGA-3' ;

[0065] 下游引物 a2 :5' -AGTCACGACGTTGTAAAA-3' 。

[0066] 扩增体系为:

[0067] PCR 反应体系为:

	组分	体积
[0068]	10×PCR 缓冲液 (含镁离子)	10 μL
	dNTP Mixture (各 2.5 mM)	10 μL
	a1	2 μL
	a2	2 μL
	模板 DNA	2 μL

[0069]	Taq 酶 (5 U/ μ L)	0.5 μ L
	ddH ₂ O	72.5 μ L

[0070] 扩增程序为:94℃预变性 4min;94℃变性 1min、52℃延伸 30s、72℃延伸 15s,循环 30 次;72℃继续延伸 10min,最后在 4℃保持。

[0071] 通过 DNA 凝胶电泳确定条带正确后,采用胶回收试剂盒进行纯化回收,得到带 5' 端羧基的标记 DNA,长度约 200bp,标记 DNA 的碱基序列如 SEQ ID No. 1 所示。

[0072] 4 标记 DNA-SAL 偶联物的制备

[0073] 采用活性酯法将 BSA-SAL 与标记 DNA 衍生物偶联,包括以下步骤:

[0074] (1) 取 20 μ L 标记 DNA 衍生物至 180 μ L 硼酸盐缓冲液中,加入 10mg/mL NHS 及 5 μ L EDC 各 4 μ L,4℃活化 10min,获得活化液;

[0075] (2) 取 20 μ L 16.5mg/mL 的 BSA-SAL 溶液加入活化液中,于 4℃下温和搅拌 2h;

[0076] (3) 用截留分子量为 100KD 的超滤管对反应物进行超滤,除去多余的偶联剂和未偶联上的反应物,超滤后的截留物用含有 5mM EDTA 的 100mMPBS 缓冲液溶解,得到偶联好的标记 DNA-SAL 偶联物。

[0077] 5 直接竞争免疫 PCR 方法的建立

[0078] (1) 用碳酸盐缓冲液将 SAL 单克隆抗体稀释至 1 μ g/mL,取 30 μ L/孔加入免疫 PCR 管中,于 37℃包被 2h;

[0079] (2) 用 pH7.4 的 PBST 缓冲液(含 0.05%Tween-20 的 10mM PBS)洗涤 3 次,每次 3min,再用 pH7.4、含 0.4% 明胶、1mg/mL 鲑鱼精 DNA 的 10mM PBS 封闭缓冲液于 37℃封闭 1h;

[0080] (3) 于包被以及封闭好的免疫 PCR 管中,加入 30 μ L 经 10⁻⁴倍稀释的步骤 4 中合成的标记 DNA-SAL 偶联物以及 30 μ L 不同浓度(10fg/mL ~ 10ng/mL) SAL 标准品,于 37℃反应 1h 后,用 PBST 缓冲液(pH7.4)洗涤 5 次,每次 3min;

[0081] (4) 向洗净的免疫 PCR 管中加入定量 PCR 反应体系,用荧光定量 PCR 仪进行测定;

[0082] 定量 PCR 反应体系为:

[0083]	组分	体积
	SYBR <i>Premix Ex Taq</i> TM (2 \times)	10 μ L
	b1	0.4 μ L
[0084]	b2	0.4 μ L
	Rox Reference Dye (50 \times)	0.4 μ L
	ddH ₂ O	8.8 μ L

[0085] 其中,上游引物 b1 的碱基序列为:5' -TGACCATGATTACGAATT-3' ;

[0086] 下游引物 b2 的碱基序列为:5' -AGTCACGACGTTGTA AAAA-3'。

[0087] 扩增程序为:首先 94℃预变性 30s,然后 94℃变性 20s、52℃延伸 30s、72℃延伸 15s,总共 40 个循环;72℃继续延伸 10min,最后在 4℃保持。

[0088] 实时荧光定量 PCR 分析的结果如图 3 和图 4。

[0089] 由图 3 和图 4 得出本实施例的免疫 PCR 标准曲线为:y=12.82+1.05x(r=0.997,

$n=3$), 其中 y 为 PCR 循环次数, x 为待测样品中 SAL 浓度 (fg/mL) 的对数值。本实施例对 SAL 的检测灵敏度达到 46fg/mL。

[0090] 对比例 1

[0091] 按照文献 (H. Wang, Y. Zhang, H. Li, B. Du, H. Ma, D. Wu and Q. Wei. A silver-palladium alloy nanoparticle-based electrochemical biosensor for simultaneous detection of ractopamine, clenbuterol and salbutamo. Biosens Bioelectron, 2013, 49:14-19.) 公开的方法, 检测 SAL 的含量, 其灵敏度为 1.44pg/mL。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 杭州爱贝亚检测技术有限公司

<120> 利用直接免疫 PCR 检测样品中污染物含量的方法

<130>

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 211

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 1

aaacagctat gaccatgatt acgaattcga gctcgggtacc eggggatcct ctagagattc	60
tcagtatctt cagcagtgtc catttgaaga tcatgtaaaa ttagtgaatg aagtaactga	120
atttgcaaaa acatgtgttg ctgatgagtc aaatcgtcga cctgcaggca tgcaagcttg	180
gcactggccg tcgttttaca acgtcgtgac t	211

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

[0002]

<400> 2	
aaacagctat gaccatga	18
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<400> 3	
agtcacgacg ttgtaaaa	18
<210> 4	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<400> 4	
tgaccatgat tacgaatt	18
<210> 5	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<400> 5	
agtcacgacg ttgtaaaa	18

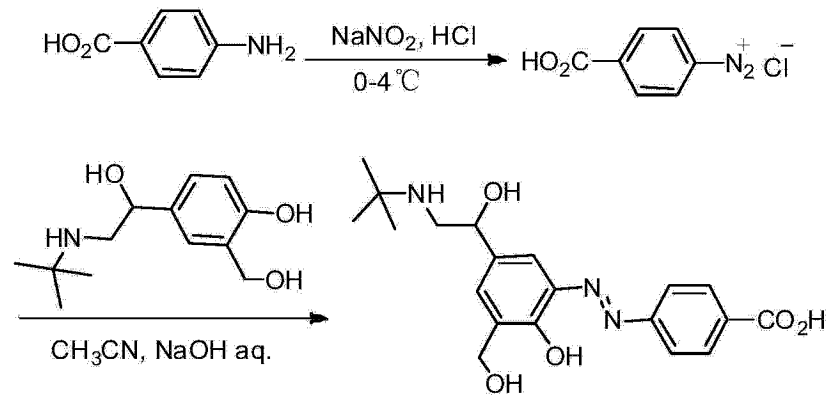


图 1

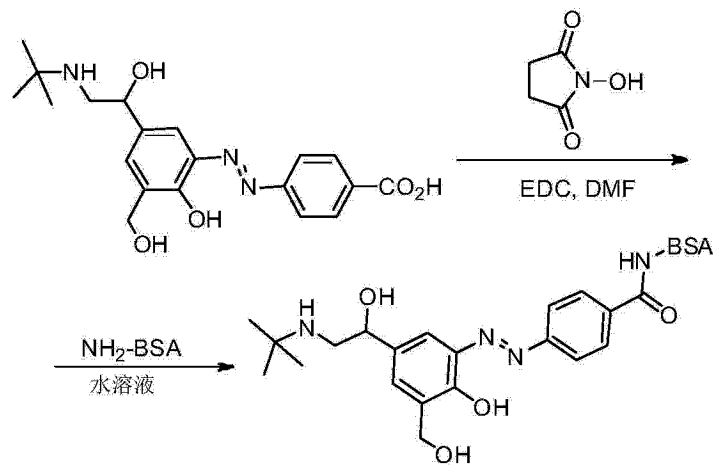


图 2

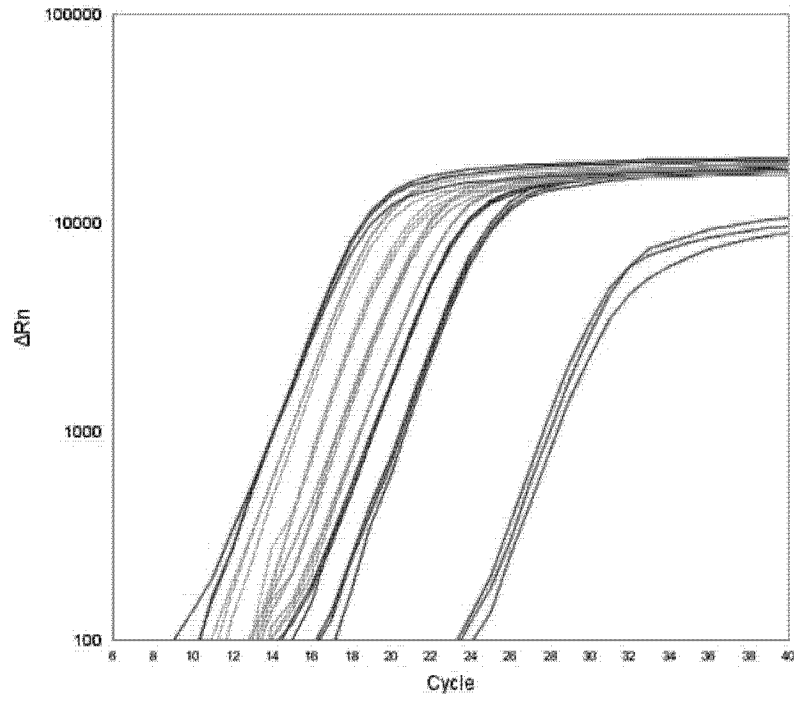


图 3

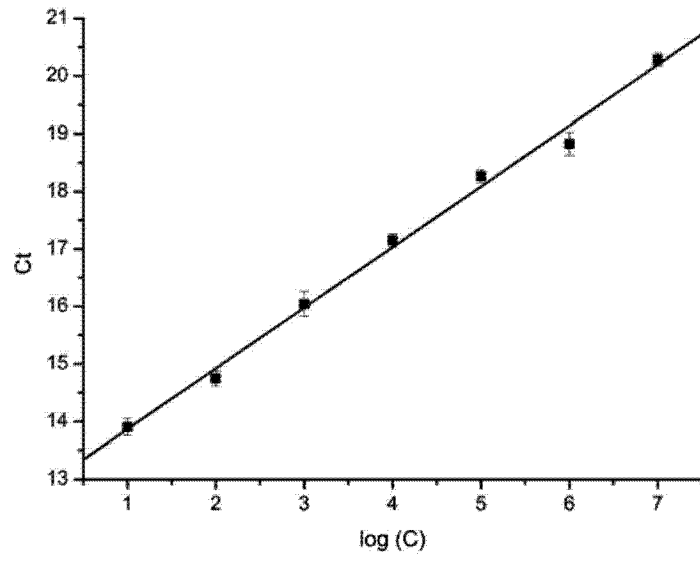


图 4

专利名称(译)	利用直接免疫PCR检测样品中污染物含量的方法		
公开(公告)号	CN103698506B	公开(公告)日	2015-07-29
申请号	CN201310755464.9	申请日	2013-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	杭州爱贝亚检测技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州爱贝亚检测技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州爱贝亚检测技术有限公司		
[标]发明人	雷雅静 陈枢青		
发明人	雷雅静 陈枢青		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	胡红娟		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN103698506A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用直接免疫PCR检测样品中污染物含量的方法，包括：取待测物标准品，制备标记DNA-标准品偶联物；将可与待测物特异性结合的抗体固定在支持物上，添加待测样品和标记DNA-标准品偶联物，进行竞争性结合反应，反应完成后洗涤；洗涤完成后，加入PCR反应体系，以标记DNA为模板，进行实时荧光定量PCR，得到CT值；根据标准曲线，利用CT值计算待测样品中待测物的含量。本发明只需“特异抗体包被—竞争结合—PCR扩增”三个步骤即可完成对环境样品中待测物含量的检测，并且预先将待测物标准品直接与DNA偶联，抗原抗体特异结合，大大提高了检测灵敏度和准确性。

组分	体积
10×PCR 缓冲液 (含镁离子)	10 μL
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	10 μL
a1	2 μL
a2	2 μL
模板 DNA	2 μL