

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/577 (2006.01)  
G01N 33/532 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610014167.9

[43] 公开日 2006年11月22日

[11] 公开号 CN 1866020A

[22] 申请日 2006.6.8  
[21] 申请号 200610014167.9  
[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫生  
学环境医学研究所  
地址 300050 天津市和平区大理道1号  
[72] 发明人 高志贤 王 涛

[74] 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事  
务所  
代理人 陆 艺

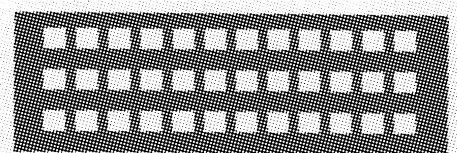
权利要求书3页 说明书6页 附图1页

## [54] 发明名称

同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒  
及制备方法

## [57] 摘要

本发明公开了一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒及其制备方法，试剂盒包括免疫芯片、检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂，所述免疫芯片为通过醛基表面分别与壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体、雌二醇单克隆抗体连接并用牛血清白蛋白封闭的载玻片；所述检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂是壬基酚、阿特拉津和雌二醇分别经化学衍生后与卵清蛋白偶联再用 Cy3 标记制成，本发明可以简便、有效的检测食品与水中壬基酚、阿特拉津和雌二醇，并且节省检测成本，改善现有的检测技术处理过程繁琐和不能同时进行多元检测的不足。



1 12

1. 一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒，其特征是包括免疫芯片、检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂，所述免疫芯片为通过醛基表面分别与壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体、雌二醇单克隆抗体连接并用牛血清白蛋白封闭的载玻片；所述检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂是壬基酚、阿特拉津和雌二醇分别经化学衍生后与卵清蛋白偶联再用 Cy3 标记制成。
2. 根据权利要求 1 所述的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒，其特征是所述免疫芯片是用下述方法制成：
  - (1) 准备具有醛基表面的载玻片；
  - (2) 配制溶液：①用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液分别稀释壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体和雌二醇单克隆抗体，使各抗体的浓度为 0.01~1.0mg/ml；②用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液配制质量百分比为 2%~3%的牛血清白蛋白溶液；
  - (3) 抗体的固定：用点样仪将步骤 (2) 的步骤①所制成的溶液点样于所述具有醛基表面的载玻片表面的不同区域，36~38℃，饱和湿度放置 0.5~4 小时，用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，用蒸馏水冲洗，晾干；
  - (4) 载玻片的封闭：在经步骤 (3) 处理后的载玻片上的各区域滴加 10μl 由所述步骤 (2) 中步骤②配制的所述牛血清白蛋白溶液进行封闭，36~38℃，饱和湿度放置 0.5~4 小时，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，再用蒸馏水冲洗，晾干，即得到免疫芯片；4℃密闭保存。
3. 根据权利要求 1 所述的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒，其特征是所述检测壬基酚用试剂是用下述方法制成：
  - ①将壬基酚与卵清蛋白进行偶联；
  - ②用 Cy3 标记步骤①得到的偶联物，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 A，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 100~400 为试剂 A'；
  - ③将壬基酚加至试剂 A 中，分别制备浓度范围为 0.1~6.5μg/ml 的溶液系列，为壬基酚检测用试剂。
4. 根据权利要求 1 所述的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒，其特征是所述检测阿特拉津用试剂是用下述方法制成：
  - ①将阿特拉津羧化后与卵清蛋白进行偶联；
  - ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 B，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 100~400 倍为试剂 B'；
  - ③将阿特拉津加至试剂 B 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0μg/ml 溶液系列，为阿特拉津检测用试剂。
5. 根据权利要求 1 所述的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒，其特征是

所述检测雌二醇用试剂是用下述方法制成：

①将雌二醇与卵清蛋白进行偶联；

②用 Cy3 标记①得到的偶联物，并用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 C，用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释至 100~400 倍，为试剂 C'；

③将雌二醇先溶解于二甲基甲酰胺中，再加至试剂 C 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0 $\mu$ g/ml 溶液系列，为雌二醇检测用试剂。

6. 一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒的制备方法，其特征是包括如下步骤：

制备免疫芯片、检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂放信盒体内，所述免疫芯片为通过醛基表面分别与壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体、雌二醇单克隆抗体连接并用牛血清白蛋白封闭的载玻片；所述检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂是壬基酚、阿特拉津和雌二醇分别经化学衍生后与卵清蛋白偶联再用 Cy3 标记制成。

7. 根据权利要求 6 所述的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒的制备方法，其特征是所述免疫芯片是用下述方法制成：

(1) 准备具有醛基表面的载玻片；

(2) 配制溶液：①用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液分别稀释壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体和雌二醇单克隆抗体，使各抗体的浓度为 0.01~1.0mg/ml；②用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液配制质量百分比为 2%~3%的牛血清白蛋白溶液；

(3) 抗体的固定：用点样仪将步骤 (2) 的步骤①所制成的溶液点样于所述具有醛基表面的载玻片表面的不同区域，36~38 $^{\circ}$ C，饱和湿度放置 0.5~4 小时，用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，用蒸馏水冲洗，晾干；

(4) 载玻片的封闭：在经步骤 (3) 处理后的载玻片上的各区域滴加 10 $\mu$ l 由所述步骤 (2) 中步骤②配制的所述牛血清白蛋白溶液进行封闭，36~38 $^{\circ}$ C，饱和湿度放置 0.5~4 小时，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，再用蒸馏水冲洗，晾干，即得到免疫芯片；4 $^{\circ}$ C 密闭保存。

8. 根据权利要求 6 所述的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒的制备方法，其特征是所述检测壬基酚用试剂是用下述方法制成：

①将壬基酚与卵清蛋白进行偶联；

②用 Cy3 标记步骤①得到的偶联物，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 A，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 100~400 为试剂 A'；

③将壬基酚加至试剂 A 中，分别制备浓度范围为 0.1~6.5 $\mu$ g/ml 的溶液系列，为壬基酚检测用试剂。

9. 根据权利要求 6 所述的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒，其特征是所述检测阿特拉津用试剂是用下述方法制成：

①将阿特拉津羧化后与卵清蛋白进行偶联；

②用 Cy3 标记①得到的偶联物,用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 B,用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 100~400 倍为试剂 B';

③将阿特拉津加至试剂 B 中,分别制备浓度范围为 0.001~5.0 $\mu$ g/ml 溶液系列,为阿特拉津检测用试剂。

10. 根据权利要求 6 所述的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒的制备方法,其特征是所述检测雌二醇用试剂是用下述方法制成:

①将雌二醇与卵清蛋白进行偶联;

②用 Cy3 标记①得到的偶联物,并用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 C,用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释至 100~400 倍,为试剂 C';

③将雌二醇先溶解于二甲基甲酰胺中,再加至试剂 C 中,分别制备浓度范围为 0.001~5.0 $\mu$ g/ml 溶液系列,为雌二醇检测用试剂。

## 同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒及制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种试剂盒及制备方法，特别是涉及一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒及制备方法。

### 背景技术

生物免疫芯片是指包被在固相载体上的高密度抗原或抗体的微阵列，是继基因芯片之后的一种新型的生物芯片。免疫芯片是由固定于不同种类支持介质上的抗原或抗体微阵列组成，阵列中固定分子的位置及组成是已知的，用标记物（荧光物质、酶或化学发光物质等）标记的抗体或抗原与芯片上的识别分子进行反应，然后通过特定的扫描装置进行检测，结果由计算机分析处理。与传统检测技术相比，免疫芯片具有高通量、自动化、灵敏度高和多元分析等优点，而且每次检测仅需要少量的试剂和样品。如能将此项技术应用于食品卫生和水质检测中，将会使卫生监督工作水平得到明显的提高。

在环境中存在一些对动物特别是对人类的内分泌系统进行干扰的物质，它们分布范围广，对人类及生态环境危害很大，可干扰人体正常内分泌物质的合成、释放、转运、代谢和结合等过程，能够激活或抑制人体内分泌系统的机能，从而导致生殖及发育机能下降、免疫力降低和神经系统紊乱等，还可能造成生态失衡，甚至影响人类和动物的繁衍。这类物质的危害业已成为世界各国普遍关注的问题。如不及时检出并加以控制，势必带来严重的远期危害，而严重威胁了人民群众的生命健康。目前，国际上对这类物质的检测技术主要为高效液相色谱法、气相色谱法、化学分析法、免疫荧光法、酶联免疫法等，这些方法具有灵敏度高、特异性强等优点，在检测中发挥了重要作用。然而，这些技术一次只能检测一种或一类污染物，而污染物特别是在食品中的污染物都是未知的，有时是多种并存，因此上述方法很难满足多元检测的需要。

### 发明内容

本发明的目的是克服现有技术中的不足，提供了一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒。

本发明的第二个目的是提供一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒的制备方法。

本发明的技术方案概述如下：

一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒，包括免疫芯片、检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂，所述免疫芯片为通过醛基表面分别与壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体、雌二醇单克隆抗体连接并用牛血清白蛋白封闭的载玻片；所述检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂是壬基酚、阿特

拉津和雌二醇分别经化学衍生后与卵清蛋白偶联再用 Cy3 标记制成。

所述免疫芯片是用下述方法制成：

- (1) 准备具有醛基表面的载玻片；
- (2) 配制溶液：①用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液分别稀释壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体和雌二醇单克隆抗体，使各抗体的浓度为 0.01~1.0mg/ml；②用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液配制质量百分比为 2%~3%的牛血清白蛋白溶液；
- (3) 抗体的固定：用点样仪将步骤 (2) 的步骤①所制成的溶液点样于所述具有醛基表面的载玻片表面的不同区域，36~38℃，饱和湿度放置 0.5~4 小时，用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，用蒸馏水冲洗，晾干；
- (4) 载玻片的封闭：在经步骤 (3) 处理后的载玻片上的各区域滴加 10μl 由所述步骤 (2) 中步骤②配制的所述牛血清白蛋白溶液进行封闭，36~38℃，饱和湿度放置 0.5~4 小时，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，再用蒸馏水冲洗，晾干，即得到免疫芯片；4℃密闭保存。

所述检测壬基酚用试剂是用下述方法制成：

- ①将壬基酚与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记步骤①得到的偶联物，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 A，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 100~400 为试剂 A'；
- ③将壬基酚加至试剂 A 中，分别制备浓度范围为 0.1~6.5μg/ml 的溶液系列，为壬基酚检测用试剂。

所述检测阿特拉津用试剂是用下述方法制成：

- ①将阿特拉津羧化后与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 B，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 100~400 倍为试剂 B'；
- ③将阿特拉津加至试剂 B 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0μg/ml 溶液系列，为阿特拉津检测用试剂。

所述检测雌二醇用试剂是用下述方法制成：

- ①将雌二醇与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，并用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 C，用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释至 100~400 倍，为试剂 C'；
- ③将雌二醇先溶解于二甲基甲酰胺中，再加至试剂 C 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0μg/ml 溶液系列，为雌二醇检测用试剂。

一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒的制备方法，包括如下步骤：制备免疫芯片、检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂放信盒体内，所述免疫芯片为通过醛基表面分别与壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体、雌二醇单克隆抗体连接并用牛血清白蛋白封闭的载玻片；所述检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂是壬基酚、阿特拉津和雌二醇分别经化学衍生后与卵清蛋白偶联再

用 Cy3 标记制成。

所述免疫芯片是用下述方法制成：

- (1) 准备具有醛基表面的载玻片；
- (2) 配制溶液：①用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液分别稀释壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体和雌二醇单克隆抗体，使各抗体的浓度为 0.01~1.0mg/ml；②用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液配制质量百分比为 2%~3%的牛血清白蛋白溶液；
- (3) 抗体的固定：用点样仪将步骤 (2) 的步骤①所制成的溶液点样于所述具有醛基表面的载玻片表面的不同区域，36~38℃，饱和湿度放置 0.5~4 小时，用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，用蒸馏水冲洗，晾干；
- (4) 载玻片的封闭：在经步骤 (3) 处理后的载玻片上的各区域滴加 10μl 由所述步骤 (2) 中步骤②配制的所述牛血清白蛋白溶液进行封闭，36~38℃，饱和湿度放置 0.5~4 小时，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，再用蒸馏水冲洗，晾干，即得到免疫芯片；4℃密闭保存。

所述检测壬基酚用试剂是用下述方法制成：

- ①将壬基酚与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记步骤①得到的偶联物，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 A，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 100~400 为试剂 A'；
- ③将壬基酚加至试剂 A 中，分别制备浓度范围为 0.1~6.5μg/ml 的溶液系列，为壬基酚检测用试剂。

所述检测阿特拉津用试剂是用下述方法制成：

- ①将阿特拉津羧化后与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 B，用 pH 为 5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 100~400 倍为试剂 B'；
- ③将阿特拉津加至试剂 B 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0μg/ml 溶液系列，为阿特拉津检测用试剂。

所述检测雌二醇用试剂是用下述方法制成：

- ①将雌二醇与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，并用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释 50~100 倍为试剂 C，用 pH5.7~8.0 的磷酸盐缓冲液稀释至 100~400 倍，为试剂 C'；
- ③将雌二醇先溶解于二甲基甲酰胺中，再加至试剂 C 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0μg/ml 溶液系列，为雌二醇检测用试剂。

利用本发明的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒可以简便、有效的检测食品与水中壬基酚、阿特拉津和雌二醇，并且节省检测成本，改善现有的检测技术处理过程繁琐和不能同时进行多元检测的不足。

#### 附图说明

图 1 为本发明的一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒中免疫芯片示意图。

## 具体实施方式

### 试剂盒使用方法：

- (1) 取壬基酚、阿特拉津和雌二醇检测用系列试剂各 20 $\mu$ l 分别滴加至图 1 中相对应带的 1-10 区，浓度由高到低；
- (2) 取 10 $\mu$ l 待测液 3 份，分别与 10 $\mu$ l 试剂 A'、B'、C' 混合摇匀。然后将混合液加至芯片中未加样的壬基酚带，阿特拉津带，雌二醇带内；
- (3) 将加完样的芯片放到湿盒内，37 $^{\circ}$ C 水浴反应 2 小时后，用洗液轻轻滴洗 3 次，再用蒸馏水滴洗 3 次，洗的过程中轻轻平摆动；洗过的芯片室温下晾干，备用。
- (4) 将芯片至入芯片扫描仪内进行扫描，扫描波长为 532nm，信号值=F532mean-B532；
- (5) 将每一带前 10 区的信号均值与其对应的浓度分别作为坐标轴的 y 轴和 x 轴绘制标准曲线或用统计软件分析标准曲线计算公式；
- (6) 将每一带后两区的信号均值作为 y 值，在标准曲线上读取对应的浓度或代入标准曲线计算公式计算浓度。

图 1 中第一行为壬基酚带，第二行为阿特拉津带，第三行为雌二醇带。

下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明：

### 实施例 1

#### 免疫芯片的制备：

- (1) 准备具有醛基表面的载玻片；
- (2) 配制溶液：①用 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液分别稀释壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体和雌二醇单克隆抗体，使各抗体的浓度为 0.01mg/ml；②用 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液配制质量百分比为 2% 的牛血清白蛋白溶液；
- (3) 抗体的固定：用点样仪将步骤 (2) 的步骤①所制成的溶液点样于所述具有醛基表面的载玻片表面的不同区域，37 $^{\circ}$ C，饱和湿度放置 3 小时，用 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，用蒸馏水冲洗，晾干；
- (4) 载玻片的封闭：在经步骤 (3) 处理后的载玻片上的各区域滴加 10 $\mu$ l 由所述步骤 (2) 中步骤②配制的所述牛血清白蛋白溶液进行封闭，37 $^{\circ}$ C，饱和湿度放置 3 小时，用 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液冲洗，再用蒸馏水冲洗，晾干，即得到免疫芯片；4 $^{\circ}$ C 密闭保存。

### 实施例 2

#### 免疫芯片的制备：

- (1) 准备具有醛基表面的载玻片；
- (2) 配制溶液：①用 pH 为 8.0 的磷酸盐缓冲液分别稀释壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体和雌二醇单克隆抗体，使各抗体的浓度为 1.0mg/ml；②用 pH 为 8.0 的磷酸盐缓冲液配制质量百分比为 3% 的牛血清白蛋白溶液；
- (3) 抗体的固定：用点样仪将步骤 (2) 的步骤①所制成的溶液点样于所述具有醛基表面

的载玻片表面的不同区域，36℃，饱和湿度放置4小时，用pH8.0的磷酸盐缓冲液冲洗，用蒸馏水冲洗，晾干；

(4) 载玻片的封闭：在经步骤(3)处理后的载玻片上的各区域滴加10μl由所述步骤(2)中步骤②配制的所述牛血清白蛋白溶液进行封闭，36℃，饱和湿度放置4小时，用pH为8.0的磷酸盐缓冲液冲洗，再用蒸馏水冲洗，晾干，即得到免疫芯片；4℃密闭保存。

### 实施例3

免疫芯片的制备：

(1) 准备具有醛基表面的载玻片；

(2) 配制溶液：①用pH为5.7的磷酸盐缓冲液分别稀释壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体和雌二醇单克隆抗体，使各抗体的浓度为0.5mg/ml；②用pH为5.7的磷酸盐缓冲液配制质量百分比为2%的牛血清白蛋白溶液；

(3) 抗体的固定：用点样仪将步骤(2)的步骤①所制成的溶液点样于所述具有醛基表面的载玻片表面的不同区域，38℃，饱和湿度放置0.5小时，用pH5.7的磷酸盐缓冲液冲洗，用蒸馏水冲洗，晾干；

(4) 载玻片的封闭：在经步骤(3)处理后的载玻片上的各区域滴加10μl由所述步骤(2)中步骤②配制的所述牛血清白蛋白溶液进行封闭，38℃，饱和湿度放置0.5小时，用pH为5.7的磷酸盐缓冲液冲洗，再用蒸馏水冲洗，晾干，即得到免疫芯片；4℃密闭保存。

### 实施例4

检测壬基酚用试剂是用下述方法制成：

①应用曼尼希反应原理将壬基酚与卵清蛋白进行偶联；

②用Cy3标记步骤①得到的偶联物，用pH为8.0的磷酸盐缓冲液稀释至50倍，为试剂A；

③将壬基酚加至试剂A中，分别制备浓度范围为0.1~6.5μg/ml的溶液系列，为壬基酚检测用试剂。

### 实施例5

检测壬基酚用试剂是用下述方法制成：

①将壬基酚与卵清蛋白进行偶联；

②用Cy3标记步骤①得到的偶联物，用pH为5.7的磷酸盐缓冲液稀释至50倍为试剂A，稀释至400倍为试剂A'；

③将壬基酚加至试剂A中，分别制备浓度范围为0.1~6.5μg/ml的溶液系列，为壬基酚检测用试剂。

### 实施例6

检测壬基酚用试剂是用下述方法制成：

①将壬基酚与卵清蛋白进行偶联；

②用Cy3标记步骤①得到的偶联物，用pH为7.0的磷酸盐缓冲液稀释至50倍，为试剂A，稀释至300倍为试剂A'；

③将壬基酚加至试剂A中，分别制备浓度范围为0.1~6.5μg/ml的溶液系列，为壬基酚

检测用试剂。

#### 实施例 7

检测阿特拉津用试剂是用下述方法制成：

- ①将阿特拉津羧化后与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，用 pH 为 8.0 的磷酸盐缓冲液稀释至 100 倍，为试剂 B；
- ③将阿特拉津加至试剂 B 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0 $\mu\text{g/ml}$  溶液系列，为阿特拉津检测用试剂。

#### 实施例 8

阿特拉津用试剂是用下述方法制成：

- ①将阿特拉津羧化后与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，用 pH 为 5.7 的磷酸盐缓冲液稀释至 100 倍为试剂 B，稀释至 500 倍为试剂 B'；
- ③将阿特拉津加至试剂 B 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0 $\mu\text{g/ml}$  溶液系列，为阿特拉津检测用试剂。

#### 实施例 9

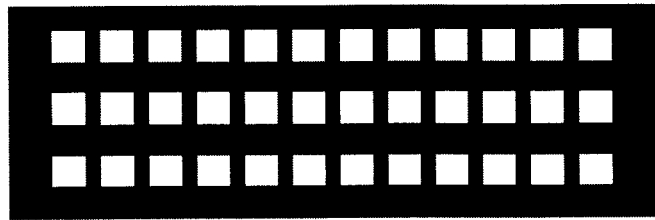
阿特拉津用试剂是用下述方法制成：

- ①将阿特拉津羧化后与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，用 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液稀释至 200 倍，为试剂 B；
- ③将阿特拉津加至试剂 B 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0 $\mu\text{g/ml}$  溶液系列，为阿特拉津检测用试剂。

#### 实施例 10

所述检测雌二醇用试剂是用下述方法制成：

- ①利用氯甲酸异丁酯法将雌二醇与卵清蛋白进行偶联；
- ②用 Cy3 标记①得到的偶联物，并用 pH8.0 的磷酸盐缓冲液稀释至 100 倍为试剂 C，稀释至 500 倍为试剂 C'；
- ③将雌二醇先溶解于二甲基甲酰胺中（加入二甲基甲酰胺的量控制在雌二醇溶解即可），再加至试剂 C 中，分别制备浓度范围为 0.001~5.0 $\mu\text{g/ml}$  溶液系列，为雌二醇检测用试剂。



1                      →                      12

图 1

专利名称(译)	同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1866020A</a>	公开(公告)日	2006-11-22
申请号	CN200610014167.9	申请日	2006-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	高志贤 王涛		
发明人	高志贤 王涛		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	陆艺		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种同时检测壬基酚、阿特拉津和雌二醇的试剂盒及其制备方法，试剂盒包括免疫芯片、检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂，所述免疫芯片为通过醛基表面分别与壬基酚单克隆抗体、阿特拉津单克隆抗体、雌二醇单克隆抗体连接并用牛血清白蛋白封闭的载玻片；所述检测壬基酚用试剂、检测阿特拉津用试剂和检测雌二醇用试剂是壬基酚、阿特拉津和雌二醇分别经化学衍生后与卵清蛋白偶联再用Cy3标记制成，本发明可以简便、有效的检测食品与水中壬基酚、阿特拉津和雌二醇，并且节省检测成本，改善现有的检测技术处理过程繁琐和不能同时进行多元检测的不足。

