



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101713783 A

(43) 申请公布日 2010.05.26

(21) 申请号 200910232656.5

(22) 申请日 2009.12.04

(71) 申请人 江苏省微生物研究所有限责任公司
地址 214063 江苏省无锡市钱荣路7号

(72) 发明人 宓晓黎 黄丽俊 陆茂林 肖华龙
李利东 杜妹莲

(51) Int. Cl.

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

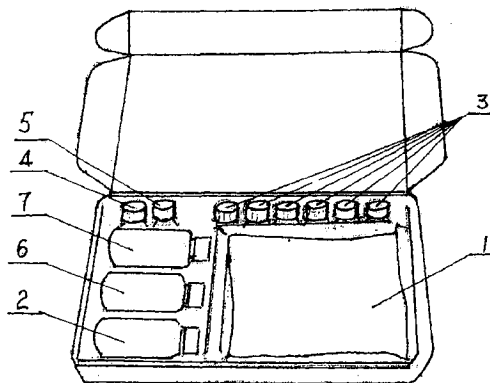
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种双烯雌酚的检测试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

一种检测双烯雌酚的试剂盒及其检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术领域,用于食品和饲料中双烯雌酚 (DEN) 含量的检测。本发明配制的试剂盒,采用 TRFIA 检测 DEN,测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有 DEN-载体蛋白,加入 DEN 标准溶液或样品处理液,再加入 DEN 抗体。游离的 DEN 与微孔板上的 DEN-载体蛋白竞争 DEN 抗体,没有连接的 DEN 抗体被洗涤除去,加入 Eu^{3+} -羊抗兔抗体,标记免疫反应后没有连接的 Eu^{3+} -羊抗兔抗体被洗涤除去。加增强液后,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,荧光强度与样品中的 DEN 浓度成反比,对照标准曲线即可确定被测样品中 DEN 的含量。本发明提供的检测 DEN 试剂盒结构简单,使用方便、廉价、灵敏度高,可以达到 0.01ng/mL 以上。



1. 一种检测双烯雌酚的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征是由多孔包被板(1),缓冲液(2),双烯雌酚标准溶液(3),双烯雌酚的抗体(4),铕标记的羊抗兔抗体(5),洗涤液(6)和增强液(7)所组成。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的包被板(1)包被固相抗原,用50mmol/L pH9.6 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 的缓冲液将 DEN-OVA 稀释至 10mg/L 做为包被液,96 或 48 孔微孔板各孔加 100 μL ,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜,弃去包被液,冲洗三次,加 150 μL 含 3g/L OVA 的上述缓冲液封闭,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的双烯雌酚标准溶液(3),从 DEN 纯品中稀释得到,稀释液为 0.1mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液,共 6 瓶, DEN 浓度分别为 :0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1000ng/mL。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的双烯雌酚的抗体冻干品(4),用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2mL 混合 2mgDEN-BSA,用匀浆器混合 2 小时,制得油包水抗原乳化剂,取 600 μL 制备好的油包水抗原乳化剂,在新西兰大白兔和 BALB/c 小白鼠身上多位点地进行皮下注射,在免疫 3~4 次后,可进行鉴定,血清和腹水合格后稀释、分装、冻干备用。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的铕标记的羊抗兔抗体(5),将购得的羊抗兔抗体,经 PD-10 柱转换缓冲条件至 pH9.0,收集蛋白峰,取已转换的羊抗兔抗体加入 $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸}$,反应过夜,反应液经柱层析,收集蛋白峰,稀释、分装备用。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其中的铕标记的羊抗兔抗体(5),取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1mL~2mL,经 PD-10 柱转换缓冲条件,洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ pH8.5-9.0 缓冲液,收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量,用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L,取 500-1000 μL 稀释后的羊抗兔抗体加入含 0.2-0.4mg 的 $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸}$ 的小瓶中,28-30 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌反应 16 小时,反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sephadex-G50 柱 (1 \times 40cm) 层析,收集蛋白峰,稀释、分装备用。

7. 一种用权利要求1所述的试剂盒检测双烯雌酚的方法,其特征是取包被有 DEN-OVA 的微孔包被板,加入 DEN 标准溶液或处理好的样品处理液到各自的微孔中,再加入 DEN 抗体,振荡反应,洗涤液洗涤,加铕标记的羊抗兔抗体,进行标记免疫反应,洗涤液洗涤,加增强液振荡后测量荧光强度 cps,对照标准曲线计算样品中的 DEN 含量。

8. 根据权利要求8所述的检测双烯雌酚的方法,其操作为:取包被有 DEN-OVA 的微孔包被板,加入 50 μL 的 DEN 标准或处理好的样品到各自的微孔中,加 50 μL 以缓冲液(2)作稀释剂,1:20 稀释 DEN 抗体,25 $^\circ\text{C}$ ~37 $^\circ\text{C}$ 振荡 0.5~1 小时,洗涤液洗三次,加以缓冲液(2)1:20 稀释的 100 μL Eu^{3+} -羊抗兔抗体,25 $^\circ\text{C}$ ~37 $^\circ\text{C}$ 振荡 0.5~1 小时,用洗涤液洗六次,加 200 μL 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps,从标准曲线计算样品中的 DEN 含量。

一种双烯雌酚的检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测双烯雌酚 (dienoestrol, DEN) 的检测试剂盒及其检测方法, 属于时间分辨荧光免疫分析 (Time resolvedfluoroisnmunoassay, TRFIA) 技术领域, 用于食品和饲料中双烯雌酚药物残留量的检测。

背景技术

[0002] 双烯雌酚是一种与己烯雌酚结构类似的人工合成的具有酚羟基结构的二苯乙烯类雌性激素, 有与内源性激素相似的生物效应而被广泛地应用于临床中。近年来, 许多国家将其加入到动物饲料中, 以提高家禽家畜的饲养效率。动物通过食物获得的雌性激素一部分被排泄到环境中, 一部分在动物体内残留, 并通过食物链在人体内富集。激素类药物残留会使正常人的生理功能发生紊乱, 更严重的是影响儿童正常的生长发育, 引发动物和人的癌症和致畸毒性, 而且妊娠期间使用还能引起后代生殖系统疾病。

[0003] 由于其致癌作用, 我国和 FDA、欧盟、美国、日本、加拿大已禁止己烯雌酚在饲料中的使用。目前国内使用较多的为己烯雌酚, 国家规定动物组织中不得检出己烯雌酚, 双烯雌酚已证实为己烯雌酚的代谢产物。因此, 快速准确检测雌性激素对于估计食品安全的潜在因素是很必须的。

[0004] 双烯雌酚的检测方法主要有: 高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱/质谱法 (GC/MS) 和酶联免疫检测方法 (ELISA) 等。通常以 ELISA 作为在现场抽样快速筛选检验方法, HPLC 或 GC-MS 作为确证性检验方法, 目前, 我国检测机构所用双烯雌酚 ELISA 检测试剂盒多为国外进口, 其价格昂贵, 很难在国内推广应用。国产双烯雌酚 ELISA 试剂盒普遍存在灵敏度不高、假阳性率高、不稳定等问题。

[0005] 时间分辨荧光免疫分析检测技术是近来发展迅速的高灵敏检测手段。TRFIA 其原理是利用具有双功能基团结构的螯合剂, 其一端和镧系元素结合, 另一端和抗体 (抗原) 上的自由氨基连接, 制成 Eu^{3+} 标记抗体 (抗原), 它与待测样品中的抗原 (抗体) 结合成免疫复合物。理想情况下, 测定复合物中镧系元素的荧光强度就能确定样品中抗原的含量, 但实际上这种复合物的荧光强度相当弱, 只有再加入一种增强溶液 (Enhancement solution), 使镧系元素从复合物中解离下来, 并与增强液中所含的 β -奈甲酰三氟丙酮 (β -NTA) 重新形成微胶囊, 在紫外光的激发下发射很强的荧光, 增强效果上百万倍。用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps, 即可确定样品中抗原的量。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种双烯雌酚试剂盒及检测方法, 用于定性或定量地检测食品和饲料中双烯雌酚的残留量; 检测时间短、平均回收率高、批内、批间误差小, 并具有简便、快速、准确的特点。

[0007] 本发明的技术方案: 该检测双烯雌酚的试剂盒是由 1、多孔包被板, 2、缓冲液, 3、双烯雌酚标准溶液, 4、双烯雌酚的抗体, 5、钕标记的羊抗兔抗体, 6、洗涤液, 7、增强液所组

成。

[0008] 本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 来检测 DEN。采用 TRFIA 的技术主要有两个方面:第一,特异性多克隆抗体的制备,利用抗原免疫家兔,获得含有抗体的血清,经过生化提纯分离免疫球蛋白;第二, Eu^{3+} 标记抗体的制备。

[0009] 测定方法为:测定的基础是标记免疫反应。包被有 DEN-载体蛋白的微孔板,加入 DEN 标准溶液或已处理好的样品处理液到各自的微孔中、再加入 DEN 抗体,振荡反应,游离的 DEN 与微孔板上的 DEN-载体蛋白竞争 DEN 抗体,洗涤液洗涤,没有连接的 DEN 抗体在洗涤步骤中被除去。加入 Eu^{3+} -羊抗兔抗体,进行标记免疫反应,再用洗涤液洗涤,反应后没有连接的 Eu^{3+} -羊抗兔抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后,在紫外光的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,荧光强度与样品中的浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中 DEN 的量。

[0010] 本发明的有益效果:该试剂盒结构简单,使用方便、廉价、灵敏度高,可以达到 0.01ng/mL 以上。

附图说明

[0011] 图 1:检测双烯雌酚的试剂盒示意图。1、多孔包被板,2、缓冲液,3、双烯雌酚标准溶液,4、双烯雌酚的抗体,5、铕标记的羊抗兔抗体,6、洗涤液,7、增强液。

[0012] 图 2: DEN-TRFIA 标准曲线图。

具体实施方式

[0013] 实施例 1:制备试剂盒和检测动物组织样品

[0014] 免疫抗原的制备:

[0015] 本发明所述的人工免疫抗原为改造双烯雌酚 (DEN) 成为双烯雌酚半琥珀酸酯 (DEN-HS),再采用混合酸酐法与大分子载体蛋白结合,以合成的 DEN-HS-BSA 作为免疫抗原进行动物免疫。

[0016] 称取 20mg ~ 100mg 双烯雌酚 (DEN),加入 5mL 吡啶后,加入 10mg ~ 50mg 琥珀酸,室温,搅拌过夜,反应完成,用酸水洗涤,抽滤沉淀,干燥,得双烯雌酚半琥珀酸酯 (DEN-HS)。

[0017] 载体蛋白采用牛血清白蛋白 (BSA)。称取 30mg ~ 300mg 牛血清白蛋白,溶解于 50% 二氧六环水溶液 6mL ~ 10mL 中,调 pH 值为 9 ~ 10,为 A 液;称取 10mg ~ 50mg DEN-HS,溶于 2mL 二氧六环中,置 4℃ 10min,依次加入三正丁胺 20 μ L 和氯甲酸异丁酯 10 μ L,于 4℃ 搅拌 30min,作为 B 液。将 A 液在 4℃ 滴入 B 液,搅拌过夜。将反应液对蒸馏水透析 72 小时,期间换蒸馏水 5 次。或葡聚糖凝胶 G50 (SephadexG50) 柱提纯,以 0.05mol/L pH8.0 碳酸盐缓冲溶液洗脱。收集透析纯化液或第 1 峰的柱洗脱液,分装保存于 -20℃ 作免疫原用。

[0018] 双烯雌酚多克隆抗体的制备:

[0019] 将上述合成的双烯雌酚-牛血清白蛋白结合物 (DEN-BSA) 作免疫抗原,采用皮内或皮下多点注射方式,接种 1kg ~ 1.5kg 雄性新西兰兔;每隔 4 周免疫 1 次,第一次免疫时,在免疫原中加等量弗氏完全佐剂混匀制成乳剂,以后免疫均加等量弗氏不完全佐剂;自第二次免疫开始,每次免疫后 8 ~ 10 天采血测试抗血清效价。观察抗血清效价增长情况,达到满意效价时将取全血,分离血清。

[0020] 抗血清经过 3 次硫酸铵沉淀后,再用层析柱分离纯化,对磷酸盐缓冲溶液透析。吸取抗血清 10mL,平衡至室温,加入等量的 0.01mol/LpH7.8 磷酸盐缓冲溶液,充分混匀,加入 20mL 饱和硫酸铵溶液(以浓氨水调至 pH7.8),摇匀,4℃静止 1 小时后,以 5000 转/分钟离心 5 分钟,去上清液。沉淀物用 20mL 0.01mol/L pH7.8 磷酸盐缓冲溶液溶解,然后加入 10mL 饱和硫酸铵溶液(pH7.8),摇匀,4℃静止 30 分钟后,以 5000 转/分钟离心 5 分钟,去上清液。重复盐析两次。最终以 2mL0.01mol/L pH7.8 磷酸盐缓冲溶液溶解免疫球蛋白 IgG 沉淀物,装入透析袋,对 2000mL 0.01mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲溶液透析 12 小时。将上述透析液,加入到约 25 克湿重的纤维素 DEAE-52(取纤维素 DEAE-52 干粉 10 克,用 500mL 0.01mol/L pH8.0 的磷酸盐缓冲溶液浸泡过夜,4℃平衡 1 小时,每 10 分钟搅拌一次,倾入布氏漏斗中,用 pH8.0 的 0.2mol/L 磷酸盐缓冲溶液洗滤。收集滤液,再对 0.01mol/LpH7.4 磷酸盐缓冲溶液透析 12 小时,最后加入适量甘油 -20℃保存。

[0021] Eu^{3+} -羊抗兔抗体的制备:

[0022] 取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1mL ~ 2mL,经 PD-10 柱转换缓冲条件,洗脱液为含 0.15mol/L NaCl 的 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量(1.46 A_{280} -0.74 A_{260}),用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 500 μL ~ 1000 μL 稀释后的羊抗兔抗体加入含 0.2mg ~ 0.4mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸(Eu^{3+} -DTTA)的小瓶中,30℃磁力搅拌反应 20 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 SepharoseCL-6B 柱(1×40cm)层析, A_{280} 监测收集蛋白峰,稀释分装备用。

[0023] 固相抗原包被板制备:

[0024] 将双烯雌酚-卵清白蛋白结合物(DEN-OVA)用 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH9.6 缓冲液稀释至 10mg/L 的包被液,96(或 48)孔微孔板各孔加 100 μL ,4℃放置过夜。弃去包被液,冲洗三次,加 150 μL 含 3g/L BSA 的上述缓冲液封闭,4℃放置过夜。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20℃冷冻保存。

[0025] 试剂的配制:

[0026] (1) 双烯雌酚(DEN)标准溶液:(0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1000ng/mL),从 DEN 纯品中稀释得到,稀释液为 0.1mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液。

[0027] (2) 缓冲液:8mmol/L NaCl、0.2% OVA、50 $\mu\text{mol/L}$ 二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、0.1mL/L Tween-80 和 0.1% NaN_3 的 Tris-HCl pH7.8。

[0028] (3) 洗涤液:14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80 和 0.2% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

[0029] (4) 增强液的配制:1L pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μmol β -萘甲酰三氟丙酮(β -NTA),50 μmol 三正辛基氧化膦(TOPO),1mL 曲拉通 X-100(Triton X-100)。

[0030] 试剂盒提供的试剂:

[0031] 每一个盒中的试剂足够进行 96 个测量,盒中的材料如下:

[0032] (1) 1×96 孔板(8 条×12 孔,可以拆分为单孔)包被有 DEN-OVA。

[0033] (2) 6×DEN 标准液,1.0mL/瓶,标准液浓度为:0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1000ng/mL。

[0034] (3) 1×DEN 抗体,用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

- [0035] (4) $1 \times \text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体冻干品,用时 0.5mL 蒸馏水溶解。
- [0036] (5) $1 \times$ 增强液 :15mL。
- [0037] (6) $1 \times$ 洗涤液 :30mL,用时以蒸馏水 1 : 25 稀释。
- [0038] (7) $1 \times$ 缓冲液 :30mL。
- [0039] 实验室应自备的试剂 :
- [0040] (1) 蒸馏水或去离子水 ;
- [0041] (2) 无水乙醚 ;
- [0042] (3) 三氯甲烷 ;
- [0043] (4) 正己烷 ;
- [0044] (5) 氢氧化钠溶液 :0.01mol/L ;
- [0045] (6) 磷酸溶液 :磷酸 (85%)+ 水 (1+1) ;
- [0046] (7) 甲醇 ;
- [0047] (8) 磷酸盐缓冲液 :pH7.2,取 1.45g 磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)、0.1g 磷酸二氢钾 (无水)、8.0g 氯化钠,溶解于水中并定溶至 1000mL ;
- [0048] (9) 甲醇 -pH7.2 磷酸盐缓冲液 (1+4)。
- [0049] 测定之前注意事项 :
- [0050] (1) 使用之前将所有试剂回升至室温 ($18^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$)。
- [0051] (2) 使用之后立即将所有试剂放回 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 。
- [0052] (3) 如果样品量大,建议使用多通道移液器。
- [0053] (4) 在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖子盖住微孔。
- [0054] (5) 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 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 。
- [0055] 具体检测步骤如下 :
- [0056] 称取 4g 猪肉试样 (精确至 0.1g),置于试管中,加入 10mL 无水乙醚振摇 20min 后,以 3500r/min 离心 3min,将提取液转移至另一干净试管中,重复上述操作一次,合并乙醚提取液,于 40°C 水浴蒸发至近干。用 4mL 三氯甲烷溶解残渣,然后加 4mL 氢氧化钠溶液振摇 20min,静置分层后将氢氧化钠溶液层转移至另一干净试管内,重复上述操作一次,合并氢氧化钠溶液层。加入 8mL 正己烷,剧烈振摇,待分层后弃去正己烷层。用磷酸溶液调整溶液 pH 至 7.0。每次用 8mL 无水乙醚提取 2 次,合并乙醚层并蒸发至近干。用 4mL 甲醇 -pH7.2 磷酸盐缓冲液溶解残留物供测定。
- [0057] 取 DEN-OVA 板条,加入 $50 \mu\text{L}$ 的 DEN 标准溶液或处理好的样品处理液到各自的微孔中,每个标准溶液和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1 : 20 稀释的 DEN 抗体 $50 \mu\text{L}$, 25°C 振荡 1 小时,洗涤液洗三次,加缓冲液 1 : 20 稀释的 Eu^{3+} -羊抗兔抗体 $100 \mu\text{L}$, 25°C 振荡 1 小时,用洗涤液洗六次,加 $200 \mu\text{L}$ 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 DEN 含量,见表 1 和图 2,该例的样品浓度为 0.23ng/mL 。
- [0058] 表 1
- [0059]

DEN 标准点							
DEN 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	100	1000	猪肉 样品
荧光值 (cps)	904592	783472	662223	532183	395973	239612	721235

[0060] 实施实例 2 制备试剂盒和检测饲料样品。

[0061] DEN-BSA 抗原制备：

[0062] 称取 20mg ~ 100mg 双烯雌酚 (DEN)，加入 5mL 吡啶后，加入 10mg ~ 50mg 琥珀酸，室温，搅拌过夜，反应完成，用酸水洗涤，抽滤沉淀，干燥，得双烯雌酚半琥珀酸酯 (DEN-HS)。

[0063] 称取 12mg DEN-HS、40mgN- 羟基琥珀酰胺 (NHS)、35mg 碳二亚胺 (EDC) 溶于 N, N' - 二甲基甲酰胺 (DMF) 中，室温搅拌 24h，制成 A 液；称取 50mg BSA 溶于 3mL 0.01mol/mL pH7.4 PBS 中，制成 B 液。将 A 液逐滴加入 B 液，边加边搅拌，室温反应 3h，将反应液蒸馏水中透析 72 小时，期间换蒸馏水 5 次。或经葡聚糖凝胶 G50 (Sephadex G50) 柱提纯，以 0.05mol/L pH8.0 碳酸盐缓冲溶液洗脱。收集透析纯化液或第 1 峰的柱洗脱液，分装保存于 -20℃ 作免疫原用。

[0064] 多克隆双烯雌酚抗体的制备：与实施例 1 相同，略。

[0065] Eu^{3+} - 羊抗兔抗体的制备：与实施例 1 相同，略。

[0066] 固相抗原包被板的制备：与实施例 1 相同。

[0067] 试剂的配制：与实施例 1 相同。

[0068] 试剂盒提供的试剂：与实施例 1 相同。

[0069] 实验室应自备的试剂：与实施例 1 相同。

[0070] 测定之前注意事项：同实施例 1。

[0071] 具体检测步骤：同实施例 1。

[0072] 实验室应自备的试剂：

[0073] (1) 蒸馏水或去离子水；

[0074] (2) 无水乙醚；

[0075] (3) 三氯甲烷；

[0076] (4) 甲醇；

[0077] (5) 磷酸盐缓冲液：pH7.2，取 1.45g 磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）、0.1g 磷酸二氢钾（无水）、8.0g 氯化钠，溶解于水中并定容至 1000mL；

[0078] (6) 0.2mol/L 的乙酸铵缓冲液：15.4g 乙酸铵溶解于 900mL 水中，用冰乙酸调节 pH，使其至 pH5.2 \pm 0.2，定容至 1L；

[0079] (7) 1.0mol/L 氢氧化钠溶液；

[0080] (8) 0.1mol/L 氢氧化钠甲醇溶液 + 水 (7+3)；

[0081] (9) 甲基叔丁醚 + 甲醇 (9+1，含 2% 甲酸) 溶液；

[0082] (10) 固相萃取柱：Oasis MAX 柱 (60mg, 3mL) 或相当者。

[0083] (11) 甲醇 -pH7.2 磷酸盐缓冲液 (1+4)。

[0084] 测定之前注意事项：同实施例 1。

[0085] 具体检测步骤如下：

[0086] 准确称取 $5.0\text{g} \pm 0.1\text{g}$ 动物饲料于 50mL 具盖的离心管中，加入 10mL 0.2mol/L 的乙酸铵缓冲液，均质 1min，加入 10mL 乙醚，漩涡震荡提取 3min，于 3500r/min 离心 5min，吸取乙醚层于另一试管中。重复乙醚提取一次，合并乙醚层，常温下用氮气吹干。加入 2mL 三氯甲烷溶解残余物，加入 5mL 1.0mol/L 氢氧化钠溶液，漩涡震荡 1min，于 1500r/min 离心 5min，上层水相移入另一试管中，重复氢氧化钠溶液提取一次，合并氢氧化钠提取液。

[0087] 合并的氢氧化钠提取液过 MAX 固相萃取柱，流速 2mL/min，依次用 5mL 1.0mol/L 氢氧化钠溶液和 5mL 0.1mol/L 氢氧化钠甲醇溶液 + 水 (7+3) 淋洗小柱，待溶液流过固相萃取柱后，在 65kPa 的负压下，减压抽干。加入 5mL 甲基叔丁醚 + 甲醇 (9+1，含 2% 甲酸) 溶液洗脱，控制流速在 2mL/min，收集洗脱液，蒸发至近干。用 5mL 甲醇 -pH7.2 磷酸盐缓冲液溶解残留物供测定。

[0088] 取 DEN-OVA 板条，加入 50 μL 的 DEN 标准溶液或处理好的样品处理液到各自的微孔中，每个标准溶液和样品处理液必须使用新的吸头，加缓冲液 1 : 20 稀释的 DEN 抗体 50 μL ，25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 1 小时，洗涤液洗三次，加缓冲液 1 : 20 稀释的 Eu^{3+} -羊抗兔抗体 100 μL ，25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 1 小时，用洗涤液洗六次，加 200 μL 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 DEN 含量，见表 2 和图 2，该例的样品浓度为 0.17ng/mL。

[0089] 表 2

[0090]

DEN 标准点							
DEN 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	100	1000	饲料 样品
荧光值 (cps)	904592	783472	662223	532183	395973	239612	733093

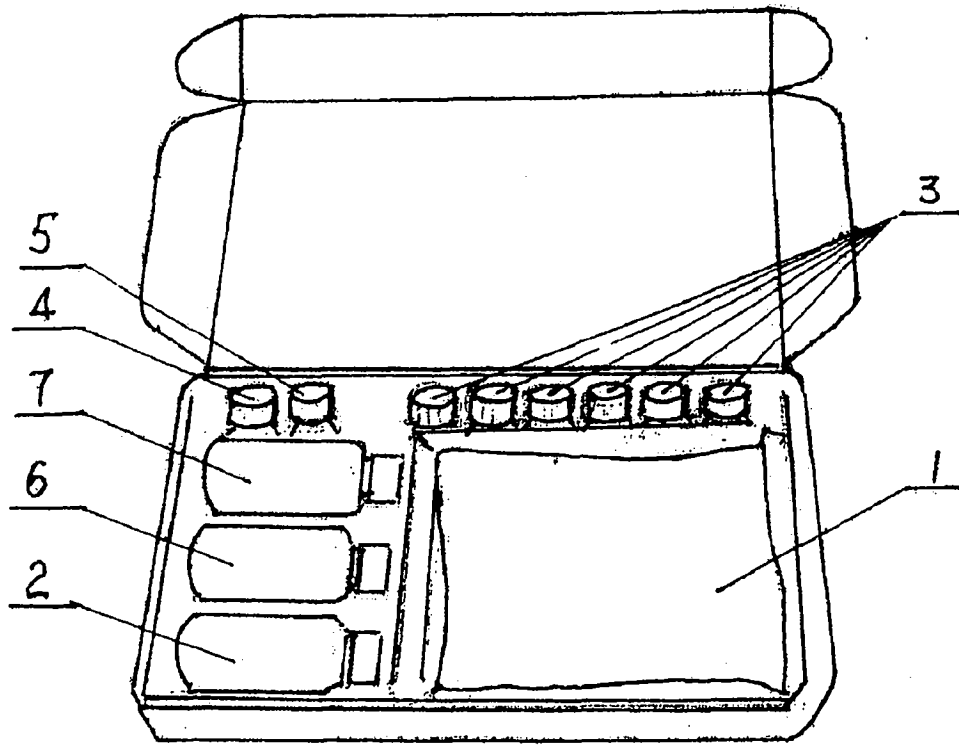


图 1

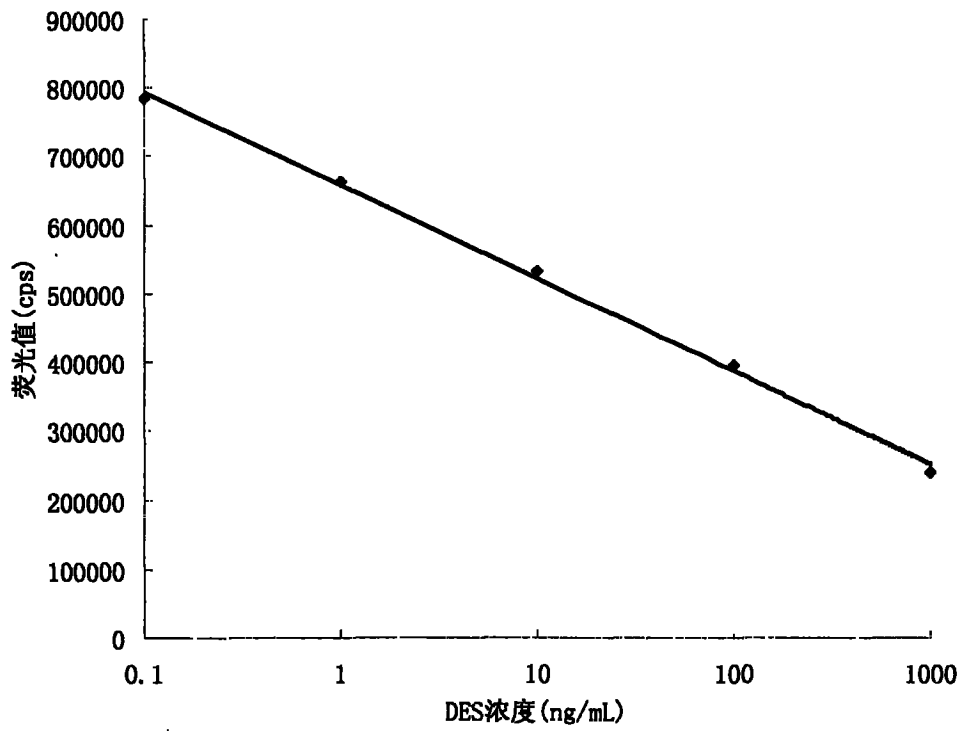


图 2

专利名称(译)	一种双烯雌酚的检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN101713783A	公开(公告)日	2010-05-26
申请号	CN200910232656.5	申请日	2009-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
[标]发明人	宓晓黎 黄丽俊 陆茂林 肖华龙 李利东 杜妹莲		
发明人	宓晓黎 黄丽俊 陆茂林 肖华龙 李利东 杜妹莲		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/543 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测双烯雌酚的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术领域，用于食品和饲料中双烯雌酚(DEN)含量的检测。本发明配制的试剂盒，采用TRFIA检测DEN，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有DEN-载体蛋白，加入DEN标准溶液或样品处里液，再加入DEN抗体。游离的DEN与微孔板上的DEN-载体蛋白竞争DEN抗体，没有连接的DEN抗体被洗涤除去，加入Eu3+-羊抗兔抗体，标记免疫反应后没有连接的Eu3+-羊抗兔抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的DEN浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中DEN的含量。本发明提供的检测DEN试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，可以达到0.01ng/mL以上。

