



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103048445 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 17

(21) 申请号 201210540608. 4

(22) 申请日 2012. 12. 14

(71) 申请人 广东工业大学

地址 510006 广东省广州市番禺区广州大学
城外环西路 100 号广东工业的学工
学四号馆 706 室

(72) 发明人 赵肃清 周剑青 张磊 张焜
周丽华

(74) 专利代理机构 广州市越秀区海心联合专
利代理事务所 (普通合伙)
44295

代理人 黄为

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

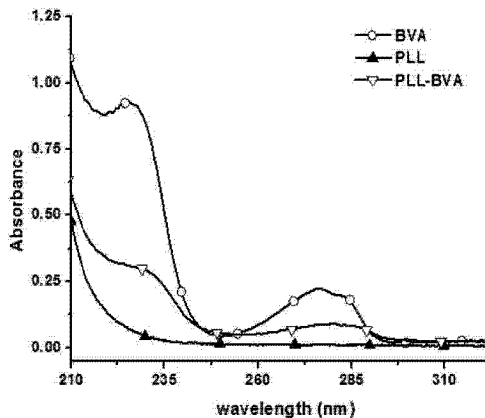
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开一种以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,旨在提供一种合成方法简单的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,并最终建立了双酚 A 检测的酶联免疫试剂盒,该试剂盒具有前处理简单、快速准确、成本低廉,可用于现场大批量检测;其技术要点是:以多聚赖氨酸为载体蛋白,与双酚酸偶联制备双酚 A 包被抗原;应用双酚 A 包被抗原制备双酚 A 酶联免疫检测试剂盒,所述的双酚 A 酶联免疫检测试剂盒由包被抗原的固相载体、抗体工作液、双酚 A 标准溶液、酶标二抗溶液、抗体稀释液、洗涤浓缩液、底物溶液和终止液组成;属于酶联免疫技术领域。



1. 一种以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,其特征在于,以多聚赖氨酸为载体蛋白,与双酚酸偶联制备双酚 A 包被抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,其特征在于,依次包括下述步骤:1)将双酚酸完全溶解在有机溶剂中;2)将 NHS 和 EDC·HCL 分别完全溶解在有机溶剂中;3)将步骤 2)制得的溶液滴加至步骤 1)制得的溶液中,室温避光搅拌 1-24h,离心分离取上清液得 A 液;4)将多聚赖氨酸溶于磷酸缓冲溶液中成 B 液;5)将步骤 3)制备的 A 液滴加 B 液中,室温避光搅拌 1-24h,离心分离,上清液转移到透析袋,用磷酸缓冲溶液透析 24-96h,每 12 h 换一次透析液,最后将透析液经冷冻干燥得到双酚 A 人工包被抗原即 BVA-PLL;

其中:双酚酸与 NHS、EDC·HCL、多聚赖氨酸的摩尔比为:30~200:30~400:30~400:1。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,其特征在于,所述的多聚赖氨酸为多聚左旋赖氨酸或者多聚右旋赖氨酸或者多聚左旋赖氨酸和多聚右旋赖氨酸混合使用。

4. 根据权利要求 2 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,其特征在于,步骤 1)和步骤 2)所述的有机溶剂为四氢呋喃或者 N,N-二甲基甲酰胺或者二甲基亚砷的其中之一。

5. 根据权利要求 2 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,其特征在于,步骤 4)和步骤 5)所述的磷酸缓冲溶液的 pH 值为 6-8。

6. 权利要求 1 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用,其特征在于,应用双酚 A 包被抗原作为双酚 A 酶联免疫检测试剂盒,所述的双酚 A 酶联免疫检测试剂盒由包被抗原的固相载体、抗体工作液、双酚 A 标准溶液、酶标二抗溶液、抗体稀释液、洗涤浓缩液、底物溶液和终止液组成;

其中:所述的固相载体为包被有双酚酸与多聚左旋赖氨酸偶联物的 96 孔聚苯乙烯酶标板,并封闭了微孔表面未吸附双酚 A 抗原的位点;所述的双酚 A 标准溶液的浓度分别为:0ng/mL, 3ng/mL, 8ng/mL, 25ng/mL, 75ng/mL, 224ng/mL, 673ng/mL, 2018ng/mL。

7. 根据权利要求 6 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用,其特征在于,所述的抗体工作液为兔源多克隆抗双酚 A 的抗体。

8. 根据权利要求 6 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用,其特征在于,所述的底物液为含有四甲基联苯胺和过氧化氢的 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲溶液;所述的终止液为 2mol/L 硫酸溶液。

9. 根据权利要求 6 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用,其特征在于,所述的洗涤浓缩液为 10X 含 5% 吐温 -20, pH7.0, 浓度为 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液。

10. 根据权利要求 6 所述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用,其特征在于,所述的酶标二抗溶液为羊抗兔-辣根过氧化物酶。

以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,属于酶联免疫技术领域。

背景技术

[0002] 双酚 A (Bisphenol A, BPA)为 2, 2- 双(4- 羟基苯基)丙烷,在体内通过与雌激素受体结合或影响细胞信号传导途径等方式模仿或干扰内源雌激素作用,对人的皮肤、呼吸道、消化道和角膜有刺激性。当体内的双酚 A 达到一定量时就会破坏肝细胞和肾细胞,造成慢性中毒,使人出现不同程度的头昏、头痛、皮疹、精神不安和腹泻等症状。近年来,世界各地桶装饮用水、婴儿奶瓶和各种水体中都发现有雌激素类似作用的双酚 A 存在(Science. 2007, 317(5840):884-885),由于仪器分析方法不适应现场和快速对桶装饮用水及婴儿奶瓶中双酚 A 进行检测,而免疫分析基于抗原-抗体间的特异性结合反应,选择性好,通过选用合适的标记体系,可实现对复杂体系中痕量物质的快速灵敏检测。酶联免疫分析方法灵敏度高、特异性强、快速、经济,非常适合 BPA 残留的筛选检测。

[0003] 研究双酚 A 的酶联免疫分析方法,首先必须制备得到双酚 A 的抗体。双酚 A 为小分子化合物,结构简单,不能直接免疫动物产生抗体,必须先将其与载体蛋白质偶联制备出完全抗原,利用免疫抗原注射动物诱发产生抗体。目前常用的方法是利用经典的碳二亚胺法或戊二醛法,选择牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体来合成双酚 A 人工抗原。申请号为 200810234850.2 的专利中,胥传来等介绍了以双酚酸为半抗原与 OVA 偶联制备包被抗原的方法。多聚左旋赖氨酸(PLL)是一种人工合成的多聚肽,自身免疫原性很差但可以增加半抗原的免疫性,且具有更多的自由氨基,可以大大提高载体蛋白质与半抗原的偶联率,所以近年来被越来越多的用以人工免疫抗原的制备中,如中国专利号为 200810051488.5 中公开的以多聚赖氨酸为载体制备三聚氰胺完全抗原的方法;中国专利号 200610041918.6 提供了伊维菌素人工抗原的合成新方法。但是均未见以多聚赖氨酸为载体制备双酚 A 人工包被抗原的专利。

发明内容

[0004] 针对上述不足,本发明的目的在于提供一种合成方法简单的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,并最终建立了双酚 A 检测的酶联免疫试剂盒。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明的前一技术方案是这样的:一种以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,以多聚赖氨酸为载体蛋白,与双酚酸偶联制备双酚 A 包被抗原。

[0006] 上述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用,依次包括下述步骤:1)将双酚酸完全溶解在有机溶剂中;2)将 NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和 EDC·HCL 分别完全溶解在有机溶剂中;3)将步骤 2)制得的溶液滴加至步骤 1)制得的溶液中,室温避光搅拌 1-24h,离心分离取上清液得 A 液;4)将多聚赖氨酸溶于磷酸缓冲溶液中成 B 液;5)将

步骤 3) 制备的 A 液滴加 B 液中, 室温避光搅拌 1-24h, 离心分离, 上清液转移到透析袋, 用磷酸缓冲溶液透析 24-96h, 每 12 h 换一次透析液, 最后将透析液经冷冻干燥得到双酚 A 人工包被抗原即 BVA-PLL;

[0007] 其中: 双酚酸与 NHS、EDC·HCL、多聚赖氨酸的摩尔比为: 30 ~ 200 : 30 ~ 400 : 30 ~ 400 : 1。

[0008] 进一步的, 上述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用, 所述的多聚赖氨酸为多聚左旋赖氨酸或者多聚右旋赖氨酸或者多聚左旋赖氨酸和多聚右旋赖氨酸混合使用。

[0009] 进一步的, 上述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用, 其特征在于, 步骤 1) 和步骤 2) 所述的有机溶剂为四氢呋喃或者 N, N- 二甲基甲酰胺或者二甲基亚砷的其中之一。

[0010] 进一步的, 上述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原制备方法及其应用, 步骤 4) 和步骤 5) 所述的磷酸缓冲溶液的 pH 值为 6-8。

[0011] 本发明的后一技术方案是这样的: 应用双酚 A 包被抗原作为双酚 A 酶联免疫检测试剂盒, 所述的双酚 A 酶联免疫检测试剂盒由包被抗原的固相载体、抗体工作液、双酚 A 标准溶液、酶标二抗溶液、抗体稀释液、洗涤浓缩液、底物溶液和终止液组成;

[0012] 其中: 所述的固相载体为包被有双酚酸与多聚左旋赖氨酸偶联物的 96 孔聚苯乙烯酶标板, 并封闭了微孔表面未吸附双酚 A 抗原的位点; 所述的双酚 A 标准溶液的浓度分别为: 0ng/mL, 3ng/mL, 8ng/mL, 25ng/mL, 75ng/mL, 224ng/mL, 673ng/mL, 2018ng/mL。

[0013] 进一步的, 上述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用, 其特征在于, 所述的抗体工作液为兔源多克隆抗双酚 A 的抗体。

[0014] 进一步的, 上述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用, 其特征在于, 所述的底物液为含有四甲基联苯胺和过氧化氢的 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲溶液; 所述的终止液为 2mol/L 硫酸溶液。

[0015] 进一步的, 上述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用, 其特征在于, 所述的洗涤浓缩液为 10X 含 5% 吐温 -20, pH7.0, 浓度为 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0016] 进一步的, 上述的以多聚赖氨酸为载体的双酚 A 包被抗原的应用, 其特征在于, 所述的酶标二抗溶液为羊抗兔 - 辣根过氧化物酶。

[0017] 与现有技术相比, 本发明具有如下优点:

[0018] 1、抗原合成方法的优点: 本发明的合成以多聚赖氨酸为载体, 多聚赖氨酸来源广泛, 价格便宜, 易溶于水; 在有机溶剂化学偶联过程中, 多聚赖氨酸能保持其结构稳定性, 不易变性, 合成后的包被抗原具有良好地可溶性; 多聚赖氨酸上含有的氨基数目远大于常用的白蛋白类物质(如 鸡卵清白蛋白, 牛血清白蛋白等), 这些官能团可以和更多的半抗原分子偶联, 进而增加了分子的偶联率, 有利于偶联反应; 多聚赖氨酸结构简单, 可有效的减少非特异性反应, 提高试剂盒的性能; 常用的包被载体(鸡卵清白蛋白) 属于生物大分子, 拥有复杂的三维结构, 其合成的包被抗原与酶标板发生疏水性接触时, 包被抗原易发生形变, 小分子半抗原被大分子蛋白质屏蔽, 进而不利于半抗原分子在酶标板上的呈现, 然而合成的多聚赖氨酸属于网状结构, 克服了这一缺点, 可以更有利于半抗原在酶标板上呈现, 提高了包被抗原与抗体之间的特异性识别;

[0019] 2、通过合成包被抗原,并将其按一定浓度包被在聚苯乙烯酶标板上,使用卵清蛋白封闭,制备了可以直接应用于酶联免疫分析的 ELISA 板条;通过制备好的双酚 A 抗体,建立了测定双酚 A 残留的试剂盒使用方法。

[0020] 3、本发明可用于地表水、地下水和饮用水中双酚 A 的检测,具有前处理简单、快速准确、成本低廉,可用于现场大批量检测等优点,并且最低检测限为 0.5ng/ml。

附图说明

[0021] 图 1 是 BVA、PLL 和 PLL-BVA 的紫外光谱

[0022] 图 2 是间接竞争 ELISA 法检测双酚 A 竞争抑制曲线;

[0023] 以系列浓度(2048ng/mL, 512ng/mL, 128ng/mL, 32ng/mL, 8ng/mL, 2ng/mL, 0.5ng/mL, 0.125ng/mL 和 0.0312 ng/mL)的双酚 A 进行间接竞争 ELISA 法测定,建立的标准工作曲线。

具体实施方式

[0024] 下面结合附图和具体实施方式对本发明的权利要求做进一步详细说明,但不构成对本发明的任何限制,任何人在本发明权利要求范围内所做的有限次的修改,仍在本发明的权利要求范围内。

[0025] 1、双酚 A 人工抗原的合成

[0026] 实施例 1

[0027] 称取双酚酸(BVA)61mg 溶于 2mLDMF 中;再称取 30.6mgNHS 与 53.2mg EDC·HCL 分别溶于 2mL (四氢呋喃)DMF 中,缓慢滴加到 BVA 溶液中,室温避光搅拌 24h 后,离心分离取上清液得 A 液。

[0028] 称取 126mg 多聚左旋赖氨酸溶于 5 mL pH= 7 的磷酸缓冲溶液中成 B 液,取 A 液 4mL 缓慢滴加 B 液中,室温避光搅拌 24h,离心分离,上清液转移到透析袋,用 pH =7.4 的磷酸缓冲溶液透析 72 h,每 12 h 换一次透析液,最后将透析液经冷冻干燥得到双酚 A 人工包被抗原即 PLL-BVA,经过紫外光谱鉴定其结构,参阅图 1。

[0029] 实施例 2

[0030] 称取双酚酸(BVA) 20.7mg 溶于 1mLDMF 中;再称取 6.6mgNHS 与 14.2mg EDC·HCL 分别溶于 1mL (四氢呋喃)DMF 中,缓慢滴加到 BVA 溶液中,室温避光搅拌 2h 后,离心分离取上清液得 A 液。

[0031] 称取 30.2mg 多聚混合赖氨酸溶于 5 mL pH= 7 的磷酸缓冲溶液中成 B 液,取 A 液 3mL 缓慢滴加 B 液中,室温避光搅拌 2h,离心分离,上清液转移到透析袋,用 pH =7.4 的磷酸缓冲溶液透析 72 h,每 12 h 换一次透析液,最后将透析液经冷冻干燥得到双酚 A 人工包被抗原即 PLL-BVA,经过紫外光谱鉴定其结构,参阅图 1。

[0032] 实施例 3

[0033] 称取双酚酸(BVA) 24mg 溶于 1mLDMF 中;再称取 10mg NHS 与 17.2mg EDC·HCL 分别溶于 1mL (四氢呋喃)DMF 中,缓慢滴加到 BVA 溶液中,室温避光搅拌 12h 后,离心分离取上清液得 A 液。

[0034] 称取 15mg 多聚左旋赖氨酸溶于 5 mL pH= 7 的磷酸缓冲溶液中成 B 液,取 A 液 2mL

缓慢滴加 B 液中,室温避光搅拌 12h,离心分离,上清液转移到透析袋,用 pH =7.4 的磷酸缓冲液透析 72 h,每 12 h 换一次透析液,最后将透析液经冷冻干燥得到双酚 A 人工包被抗原即 PLL-BVA,经过紫外光谱鉴定其结构,参阅图 1。

[0035] 选择牛血清白蛋白为载体,利用同法与双酚酸偶联制备免疫抗原。

[0036] 2、抗双酚 A 的抗体制备

[0037] 用 PBS 溶解免疫抗原 BSA-BVA,配制成 1mg/mL 溶液。取上述溶液 0.5mL 与等体积弗氏完全佐剂乳化油包水状态,对 2-3kg 雌性新西兰兔进行免疫。第一次免疫一个月后,换用不完全佐剂每两周免疫一次,免疫 5 次,最后一次免疫 15 天后取血纯化。

[0038] 间接 ELISA 法测定免疫血清的效价。(1)包被:用包被缓冲液 CBS 将包被抗原(PLL-BVA)稀释至一定浓度,以 100 μ L/孔加入到 96 孔酶标板中,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,甩干孔中液体,PBST 洗涤一次,吸水纸拍干。(2)封闭:30mg/mL 卵清蛋白(PBS 溶解)200 μ L/孔加入到孔中,37 $^{\circ}$ C 温育 1h。(3)甩干孔中液体,PBST 洗涤三次,吸水纸拍干。(4)加入免疫血清:以 PBS 稀释免疫血清,特定浓度倍比稀释,100 μ L/孔加到孔中,同时设阴性对照和空白对照各 2 孔。37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后,洗涤,拍干。(5)加入酶标二抗:以 PBS 稀释酶标二抗至特定浓度,100 μ L/孔加到孔中,37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后,洗涤,拍干。(6)显色和终止:配制底物缓冲液 10mL,加入 10 μ L 30% 过氧化氢,充分混匀。100 μ L/孔加到孔中温育 15min 后,2M 硫酸 50 μ L/孔终止反应。(7)读数:用酶标仪测定双波长 490nm 和 630nm 处的光密度值(OD 值)。若样品孔 OD 值大于或等于空白对照孔的 2.1 倍即为阳性。

[0039] 棋盘滴定法筛选合适的包被抗原浓度和最佳抗体工作浓度,采用间接竞争 ELISA 法检测免疫血清的竞争抑制率。

[0040] 通过动物免疫和血清检测,得到抗双酚 A 的抗体。

[0041] 3、双酚 A ELISA 标准工作曲线的建立和检测限的确定

[0042] 用适宜浓度的 PLL-BVA 包被 96 孔酶标板,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 冰箱包被过夜,用封闭液封闭后洗涤拍干;向酶标条中,先加入 50 μ L 的各浓度 BPA 标准溶液(0ng/mL, 3ng/mL, 8ng/mL, 25ng/mL, 75ng/mL, 224ng/mL, 673ng/mL, 2018ng/mL),再加入 50 μ L 适宜浓度的抗体,混合均匀,在空白对照孔中加入 100 μ L 10% 甲醇 PBS 缓冲液;37 $^{\circ}$ C 恒温温育 40min;洗涤三次,拍干;加入 100 μ L 酶标二抗工作液,37 $^{\circ}$ C 恒温温育 40min;洗涤三次,拍干;每孔加入 100 μ L 底物溶液显色,37 $^{\circ}$ C 温育避光反应 15min 后加 50 μ L 终止液终止反应,摇匀,15 分钟内读取光密度值。

[0043] 以抑制率 B/B_0 为纵坐标,双酚 A 浓度 BPA($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标作标准曲线,其 IC_{50} 为 14.5ng/ml,最低检测限为 0.5ng/ml,参阅图 2。

[0044] 4、双酚 A ELISA 试剂盒特异性的测定

[0045] 采用间接竞争 ELISA 法测定双酚 A 结构类似物(双酚酸、苯酚、苯、间甲苯酚和对苯二酚)与抗体混合物的交叉反应。将系列浓度(1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1mg/mL, 10 mg/mL)的上述物质分别与抗体同时加入到已包被封闭好的酶标板中。利用抗血清对双酚 A 的 IC_{50} 值与抗血清对各类似物的 IC_{50} 值的比值得到交叉反应率(CR%),交叉反应测定结果如下:

[0046] 双酚 A-100%,双酚酸-121%,苯酚、苯、间甲苯酚和对苯二酚均 < 0.01。实验结果表明,该法对双酚 A 具有良好的特异性。

[0047] 5、该试剂盒的使用方法

[0048] 步骤如下：

[0049] (1) 样品前处理；

[0050] 水样处理：将水性样品配成 10% 甲醇 -PBS 溶液用于检测，例：取 0.8 mL 水样，加 0.1 mL 的甲醇，再加 0.1 mL 浓缩后的 10X PBS 溶液。（如水样浑浊时，可 15000rpm 离心 10 分钟，取上清待测）。

[0051] (2) 使用试剂盒进行检测：

[0052] ①从冰箱里取出试剂盒，室温复温，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。取微孔板，预先标记空白对照孔、标准样品、样品的位置，推荐进行三孔平行检测。

[0053] ②向酶标条中，先加入 50 μ L 的各浓度 BPA 标准溶液，再加入 50 μ L 抗体工作液，混合均匀，在空白对照孔中加入 100 μ L 10% 甲醇 PBS 缓冲液。

[0054] ③向酶标条中，先加入 50 μ L 样品溶液，再加入 50 μ L 抗体工作液，混合均匀，与②中的酶标条共同于 37 $^{\circ}$ C 恒温温育 40min，微孔板敷上薄膜。

[0055] ④温育完后，去掉薄膜将微孔中的溶液快速甩入水槽中，用洗涤液（10X 浓缩液用蒸馏水稀释）清洗微孔板。

[0056] ⑤加入 100 μ L 酶标二抗工作液于全部孔中，37 $^{\circ}$ C 恒温温育 40min。

[0057] ⑥步骤同④，洗涤三次后于吸水纸拍干，每孔加入 100 μ L 底物溶液显色，37 $^{\circ}$ C 温育避光反应 15min。

[0058] ⑦每孔加 50 μ L 终止液终止反应，摇匀，15 分钟内读取光密度值。

[0059] ⑧在酶标仪上测定双波长 450nm 和 630nm 处的光密度值（OD 值）。

[0060] 6、双酚 A ELISA 试剂盒准确度测定

[0061] 向自来水、珠江水水样中添加 15 ng/mL、100 ng/mL 和 250 ng/mL 的双酚 A，重复三次，每次做三个平行，采用间接竞争 ELISA 法测定 B/B₀，计算回收率，结果分别为：109.2%，90.5%，95.9% 和 104.3%，87.6% 及 100%。

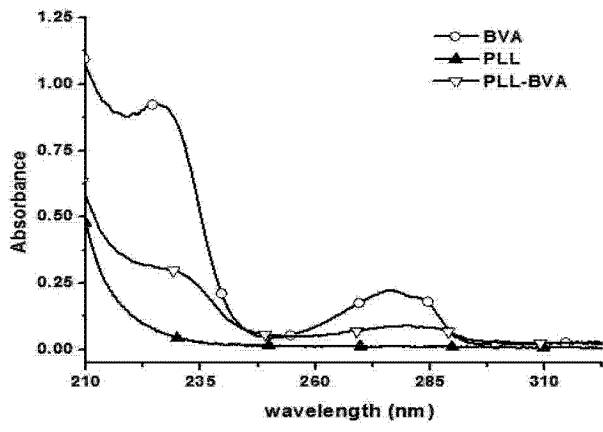


图 1

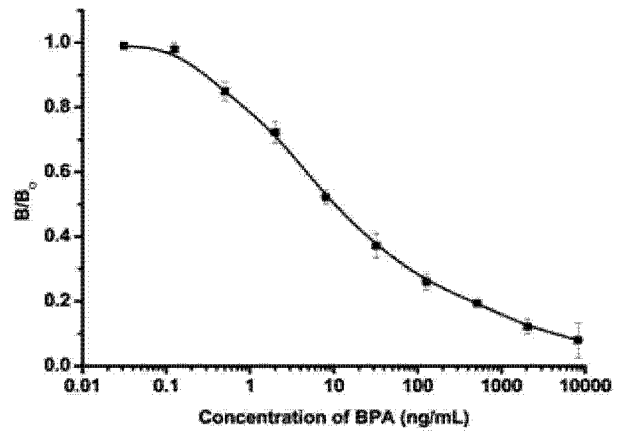


图 2

专利名称(译)	以多聚赖氨酸为载体的双酚A包被抗原制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN103048445A	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	CN201210540608.4	申请日	2012-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	赵肃清 周剑青 张磊 张焜 周丽华		
发明人	赵肃清 周剑青 张磊 张焜 周丽华		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	黄为		
其他公开文献	CN103048445B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种以多聚赖氨酸为载体的双酚A包被抗原制备方法及其应用及其应用，旨在提供一种合成方法简单的以多聚赖氨酸为载体的双酚A包被抗原制备方法及其应用，并最终建立了双酚A检测的酶联免疫试剂盒，该试剂盒具有前处理简单、快速准确、成本低廉，可用于现场大批量检测；其技术要点是：以多聚赖氨酸为载体蛋白，与双酚酸偶联制备双酚A包被抗原；应用双酚A包被抗原制备双酚A酶联免疫检测试剂盒，所述的双酚A酶联免疫检测试剂盒由包被抗原的固相载体、抗体工作液、双酚A标准溶液、酶标二抗溶液、抗体稀释液、洗涤浓缩液、底物溶液和终止液组成；属于酶联免疫技术领域。

