



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103901199 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201210578060. 2

(22) 申请日 2012. 12. 26

(71) 申请人 丹阳亿太生物科技发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丹阳市开发区八
纬路留学生创业园

(72) 发明人 杜道林 曾昆 洪霞 杜霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备

(57) 摘要

本发明为一种用于检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备, 其检测灵敏、准确、快速, 操作简便、特异性强, 适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括: 包被了塑化剂 (DBP) 抗原的酶标板、塑化剂 (DBP) 标准品、塑化剂 (DBP) 抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。塑化剂 (DBP) 检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应, 把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中, 孵育一段时间后, 洗板加入底物液 A、底物液 B, 在酶的作用下孔里将会出现蓝色, 加入终止液, 颜色由蓝色变为黄色, 显色的深浅与标准品或样品中塑化剂 (DBP) 的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测白酒样本中塑化剂 (DBP) 的含量。

1. 检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,包括酶标板、塑化剂 (DBP) 标准品、塑化剂 (DBP) 抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

2. 检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、DBP 标准品的制作、塑化剂 (DBP) 单克隆抗体及其工作液的制备、酶标二抗工作液的制备、洗涤液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备。

3. 根据权利要求 2 所述塑化剂 (DBP) 的检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,其特征在于:所述的塑化剂 (DBP) 包被抗原是将塑化剂 (DBP) 半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白 (BSA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐 (CBS) 缓冲液作为包被液,将塑化剂 (DBP) 抗原稀释成 1:20000 比例,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300 μ L/孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭,180 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间 (25 $^{\circ}$ C) 晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存。

4. 根据权利要求 2 所述塑化剂 (DBP) 的检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,其特征在于:所述的塑化剂 (DBP) 标准品浓度分别为 0 ppm、0.1 ppm、0.3 ppm、0.9 ppm、2.7 ppm、8.1 ppm。

5. 根据权利要求 2 所述塑化剂 (DBP) 的检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,其特征在于:所述的塑化剂 (DBP) 蛋白质偶联物单克隆抗体是采用塑化剂 (DBP) 人工抗原免疫兔所得,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:40000。

6. 根据权利要求 2 所述塑化剂 (DBP) 的检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,其特征在于:所述的酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成 1:5000 比例;所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为 2 mol/L 的硫酸;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其包含 0.5% 吐温-20,0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

7. 权利要求 2 所述的检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,基于抗原抗体进行间接竞争酶联免疫反应,该方法包括以下步骤:

- (1) 预处理待测样品,即将用有机溶剂提取待测样品,并将其复溶于样品稀释液中;
- (2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) 平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;
- (3) 取包被有塑化剂 (DBP) 抗原的酶标板,加标准品/样本 50 μ L/孔到对应的微孔中;
- (4) 加入酶标二抗工作液,50 μ L/孔,然后加入塑化剂 (DBP) 抗体工作液,50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;
- (5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 300 μ L/孔,充分洗涤 4 次,浸泡 15-30 s,用吸水纸拍干 (拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);
- (6) 加入底物液 A 50 μ L/孔,底物液 B 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 15 min;
- (7) 加入终止液 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值 (请在 5 min 内读完数据);
- (8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中塑化剂 (DBP) 的含量。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

取 5 mL 样品于干净的玻璃试管中,加入 2mL 色谱纯的正己烷,盖上盖后振荡 3 min,然后静置,待分层后取上层清液 1 mL,于干净的玻璃器皿室温氮气吹干,吹干后用 1mL 35% 的甲醇复溶后待测。

一种用于检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备

技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,具体地涉及一种用于定量检测白酒样本中的塑化剂 (DBP) 残留量的酶联免疫试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 塑化剂是一种增加材料的柔软性或是材料液化的添加剂。邻苯二甲酸酯类塑化剂被归类为疑似环境荷尔蒙,其生物毒性主要属雌激素与抗雄激素活性,会造成内分泌失调,损害生物体生殖机能,包括生殖率降低、流产、天生缺陷、异常的精子数、睾丸损害,还会引发恶性肿瘤、造成畸形儿,导致儿童性早熟。

[0003] 邻苯二甲酸二丁酯 (Dibutyl phthalate, DBP) 是一种常用的塑化剂,也用作胶粘剂和印刷油墨的添加剂,也可用作一种杀体外寄生虫药。它具有较强的生殖毒性,可引起男性生育能力下降,尤其对儿童的毒性更大。DBP 主要存在于人造革、塑料制品、化妆品、香精及农药中。

[0004] 目前,检测塑化剂的方法主要有高效液相色谱法 HPLC、气相色谱法 GC 等。其中,高效液相色谱法 HPLC、气相色谱法 GC 是定量的检测方法,结果准确可靠,缺点是检出限较高、仪器设备较为昂贵,以及复杂的样本前处理方法,限制了该方法的广泛应用。酶联免疫吸附 ELISA 法是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选,近年来已广泛应用。本发明旨在建立一种检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的问题,本发明提供了检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒,其检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。本发明提供了一种用于检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备。

[0006] 检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,包括酶标板、塑化剂 (DBP) 标准品、塑化剂 (DBP) 抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

[0007] 检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、塑化剂 (DBP) 标准品的制作、塑化剂 (DBP) 单克隆抗体及其工作液的制备、酶标二抗工作液的制备、洗涤液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备。

[0008] 其进一步特征在于:所述的塑化剂 (DBP) 包被抗原是将塑化剂 (DBP) 半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白 (BSA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐 (CBS) 缓冲液作为包被液,将塑化剂 (DBP) 抗原稀释成 1:20000 比例,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300 μ L/孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭,180 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间 (25 $^{\circ}$ C) 晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存。

[0009] 所述的塑化剂 (DBP) 标准品浓度分别为 0 ppm、0.1 ppm、0.3 ppm、0.9 ppm、2.7 ppm、8.1 ppm。

[0010] 塑化剂 (DBP) 蛋白质偶联物单克隆抗体工作液的制备:采用塑化剂 (DBP) 人工抗原免疫所得到,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:40000。

[0011] 所述酶标二抗工作液的制备:用酶标二抗稀释液稀释成 1:5000 比例;所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为 2 mol/L 的硫酸;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其包含 0.5% 吐温-20,0.01mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0012] 塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的检测方法,基于抗原抗体进行间接竞争酶联免疫反应,该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25℃)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有塑化剂 (DBP) 抗原的酶标板,加标准品/样本 50 μL/孔到对应的微孔中;

(4) 加入酶标二抗工作液,50 μL/孔,然后加入塑化剂 (DBP) 抗体工作液,50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25℃避光环境中反应 30 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 300 μL/孔,充分洗涤 4 次,浸泡 15-30 s,用吸水纸拍干;

(6) 加入底物液 A 50 μL/孔,底物液 B 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃避光环境中反应 15 min;

(7) 加入终止液 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据);

(8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中塑化剂 (DBP) 的含量。

[0013] 其中,所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

取 5 mL 样品于干净的玻璃试管中,加入 2mL 色谱纯的正己烷,盖上盖后振荡 3 min,然后静置,待分层后取上层清液 1 mL,于干净的玻璃器皿室温氮气吹干,吹干后用 1mL 35% 的甲醇复溶后待测。

[0014] 本发明采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法来检测。用于检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的测定原理:样品中的塑化剂 (DBP) 与酶标板上固定的抗原特异性竞争体,加入酶标二抗,与抗体反应,通过酶催化显色剂显色,根据显色的深浅来判断样品中塑化剂 (DBP) 的含量。如果样品中的塑化剂 (DBP) 含量少,显色深;反之,则显色浅。本发明的试剂盒检测方法操作简便,检测灵敏、准确、快速,适用于大批量样品的检测。

附图说明

[0015] 图 1 为塑化剂 (DBP) 标准曲线图。

具体实施方式

[0016] 检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒,其包括酶标板、塑化剂 (DBP) 标准品、塑化剂 (DBP) 抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

[0017] 下面具体描述本发明中检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒的制备,

塑化剂 (DBP) 蛋白质偶联物的制备:

将塑化剂 (DBP) 半抗原与载体蛋白 BSA 按 12:1 的结合比混合在 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 (CBS) 中, 然后加入入碳二亚胺, 搅拌 1~2h, 置室温反应 24 h, 最后用 0.2 mol/L pH 7.6 的 PBS 透析两天, 除去未反应的半抗原, 即可得到塑化剂 (DBP) 蛋白质偶联物。

[0018] 塑化剂 (DBP) 抗体的制备:

选用 3 月龄健康大白兔, 通过三次免疫, 每次塑化剂 (DBP) 蛋白质偶联物免疫原用量为 50 μ g/0.05 mL, 每次免疫间隔时间为 2 周。初次免疫分别将免疫抗原与费氏佐剂及不安全佐剂等量混合, 颈部皮下多点注射, 二次、三次免疫直接注入腹腔。融合前 3 天每只腹腔注入 25 μ g 塑化剂 (DBP) 蛋白质偶联物进行加强免疫, 免疫后第 6 d 耳静脉取血, 采用间接竞争 ELISA 法测定效价。取得较高效价后用半抗原直接在大腿肌肉注射, 8 d 后颈动脉采全血, 分离抗血清, 采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体, 制成冻干粉后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0019] 制备包被有塑化剂 (DBP) 包被抗原的酶标板:

酶标板包被塑化剂 (DBP) 抗原, 包被抗原是将塑化剂 (DBP) 半抗原与载体蛋白偶联得到的, 该载体蛋白为牛血清白蛋白 (BSA); 用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐 (CBS) 缓冲液作为包被液, 将塑化剂 (DBP) 抗原稀释成 1:20000 比例, 100 μ L

/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 取出酶标板甩掉板内液体, 用稀释后的浓缩洗涤液 300 μ L

/ 孔, 洗板 2 次, 30 s/ 次; 然后加入 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 180 μ L

/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h, 弃去封闭液, 拍干后的酶标板放置恒温间 (25 $^{\circ}$ C) 晾干; 抽检合格后酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存。

[0020] 所述的塑化剂 (DBP) 标准品配制浓度分别为 0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、150 ng/mL。

[0021] 所述的塑化剂 (DBP) 蛋白质偶联物单克隆抗体工作液的制备: 采用 DBP 人工抗原免疫兔所得, 该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:40000。

[0022] 所述酶标二抗工作液的制备: 用酶标二抗稀释液稀释成 1:5000 比例; 所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液; 所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液; 所述终止液为 2 mol/L 的硫酸; 所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液, 其包含 0.5% 吐温-20, 0.01mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0023] 基于上述制备的试剂, 本发明用于检测塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒包括如下材料:

- (1) 96 孔酶标板 \times 1 块;
- (2) 标准液 \times 6 瓶: (1mL/ 瓶) 0 ppm、0.1 ppm、0.3 ppm、0.9 ppm、2.7 ppm、8.1 ppm;
- (3) 酶标二抗工作液 7 mL;
- (4) 抗体工作液 7 mL;
- (5) 底物液 A 7 mL;
- (6) 底物液 B 7 mL;
- (7) 终止液 7 mL;
- (8) 20 \times 浓缩洗涤液 20 mL;

使用本试剂盒时的注意事项：

(1) 室温低于 20℃或试剂及样本没有回到室温 (20 ~ 25℃) 会导致所有标准的 OD 值偏低；

(2) 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况, 则会出现标准曲线不成线性, 重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作；

(3) 每加一种试剂前需将其摇匀；

(4) 反应终止液为 2M 盐酸, 避免接触皮肤；

(5) 不要使用过了有效日期的试剂盒；也不要使用过了有效期的试剂盒中的任何试剂, 掺杂使用过了有效期的试剂盒会引起灵敏度的降低；不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂；

(6) 储存条件：保存试剂盒于 2 ~ 8℃, 不要冷冻, 将不用的酶标板微孔板放进自封袋重新密封。标准物质和无色的发色剂对光敏感, 因此要避免直接暴露在光线下；

(7) 试剂变质的迹象：发色试剂有任何颜色表明发色剂变质, 应当弃之。0 标准的吸光度 (450/630 nm) 值小于 0.5 ($A_{450\text{ nm}} < 0.5$) 时, 表示试剂可能变质, 请勿使用；

(8) 该试剂盒最佳反应温度为 25℃, 温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化。

[0024] 本发明塑化剂 (DBP) 的 ELISA 试剂盒在检测白酒样品中的塑化剂 (DBP) 残留量中的应用：

本发明的试剂盒用于检测白酒中的塑化剂 (DBP) 残留量时, 通过以下步骤实施：样品预处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0025] (1) 样品预处理

取 5 mL 样品于干净的玻璃试管中, 加入 2 mL 色谱纯的正己烷, 盖上盖后振荡 3 min, 然后静置, 待分层后取上层清液 1 mL, 于干净的玻璃器皿室温氮气吹干, 吹干后用 1mL 35% 的甲醇复溶后待测。

[0026] 配制 35% 的甲醇溶液：取 35 mL 甲醇加入 65ml 去离子水中混匀。

[0027] (2) 用本发明试剂盒进行检测白酒样品中塑化剂 (DBP) 残留量

取包被有 DBP 抗原的酶标板, 加标准品 / 样本 50 μL / 孔到对应的微孔中；加入酶标二抗工作液, 50 μL / 孔, 然后加入塑化剂 (DBP) 抗体工作液, 50 μL / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置室温 25℃避光环境中反应 30 min；小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 用洗涤工作液 300 μL / 孔, 充分洗涤 4 次, 浸泡 15-30 s, 用吸水纸拍干；加入底物液 A 50 μL / 孔, 底物液 B 50 μL / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25℃避光环境中反应 15 min；加入终止液 50 μL / 孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测, 测定每孔吸光度值 (请在 5 min 内读完数据)；对比待测样品与标准品的吸光度值大小, 定量分析待测样品中的塑化剂 (DBP) 的残留量。

[0028] (3) 分析结果

用上述制备的试剂盒中的 6 个 DBP 标准品浓度 0 ppm、0.1 ppm、0.3 ppm、0.9 ppm、2.7 ppm、8.1 ppm, 在 450/630 nm 处测量吸光度值。

[0029] 百分吸光率的计算, 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值 (双孔) 除以第一个标准 (0 标准) 的吸光度值, 再乘以 100%, 即

百分吸光度值 (%) = $B/B_0 \times 100\%$

其中 B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 —0 ppb 标准溶液的平均吸光度值。

[0030] 以标准品百分吸光率为纵坐标, 以塑化剂 (DBP) 标准品浓度 (ppb) 的半对数为横坐标绘制标准曲线, 求出直线方程。标准曲线见附图 1。 $Y = -18.550X + 99.32$, $R^2 = 0.9967$ 。将样本的 B/B_0 值代入标准曲线中, 从标准曲线上读出所对应样本的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中塑化剂 (DBP) 的实际浓度。

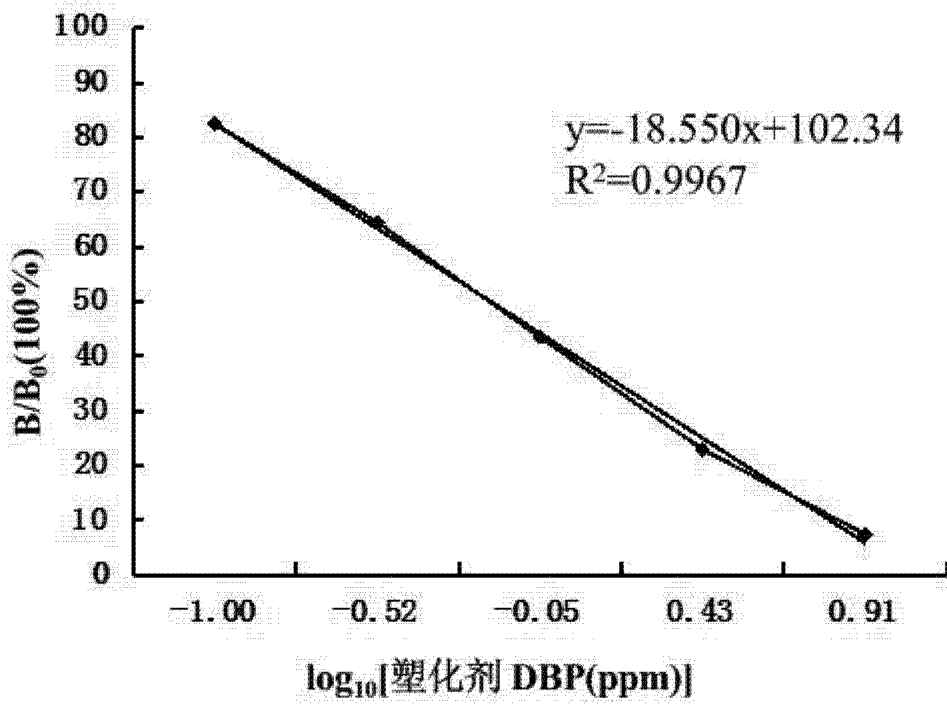


图 1

专利名称(译)	一种用于检测塑化剂(DBP)的ELISA试剂盒的制备		
公开(公告)号	CN103901199A	公开(公告)日	2014-07-02
申请号	CN201210578060.2	申请日	2012-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 曾昆 洪霞 杜霞		
发明人	杜道林 曾昆 洪霞 杜霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为一种用于检测塑化剂(DBP)的ELISA试剂盒的制备，其检测灵敏、准确、快速，操作简便、特异性强，适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括：包被了塑化剂(DBP)抗原的酶标板、塑化剂(DBP)标准品、塑化剂(DBP)抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液和浓缩洗涤液。塑化剂(DBP)检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应，把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中，孵育一段时间后，洗板加入底物液A、底物液B，在酶的作用下孔里将会出现蓝色，加入终止液，颜色由蓝色变为黄色，显色的深浅与标准品或样品中塑化剂(DBP)的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测白酒样本中塑化剂(DBP)的含量。

