



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572364 A

(43) 申请公布日 2016.05.11

(21) 申请号 201410534200.5

(22) 申请日 2014.10.11

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 张淑雅

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

检测邻苯二甲酸二丁酯的试剂盒制备及检测方法

(57) 摘要

本发明为检测邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butylphthalate, DBP)的ELISA试剂盒的制备及其检测方法,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:包被了邻苯二甲酸二丁酯抗原的酶标板、邻苯二甲酸二丁酯标准品、邻苯二甲酸二丁酯抗体工作液、邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。邻苯二甲酸二丁酯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邻苯二甲酸二丁酯的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测牛奶中的邻苯二甲酸二丁酯的含量。

1. 一种检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括酶标板、邻苯二甲酸二丁酯标准品、邻苯二甲酸二丁酯抗体工作液、邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

2. 检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括以下步骤:酶标板的制备、邻苯二甲酸二丁酯标准品的制作、邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体及其工作液的制备、邻苯二甲酸二丁酯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 所述的检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的邻苯二甲酸二丁酯包被抗原是将邻苯二甲酸二丁酯半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为鸡卵清白蛋白(OVA),取 0.2mol/L Na_2CO_3 8mL,与 0.2mol/L NaHCO_3 17mL 混合,再加 75mL 双蒸水,调 pH 值到 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将邻苯二甲酸二丁酯抗原稀释成 1:4000 比例,100 μL /孔,37 $^\circ\text{C}$ 放置 2 h,取出酶标板拍掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300 μL /孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 10%牛血清白蛋白(BSA)封闭,180 μL /孔,37 $^\circ\text{C}$ 放置 1.5h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^\circ\text{C}$)

晾干,抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^\circ\text{C}$ 下保存。

4. 根据权利要求 2 所述的检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的邻苯二甲酸二丁酯标准品浓度分别为 0 ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、1.5ng/mL、2ng/mL、2.5ng/mL。

5. 根据权利要求 2 所述的检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的邻苯二甲酸二丁酯蛋白质偶联物单克隆抗体是采用邻苯二甲酸二丁酯人工抗原免疫鼠所得,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:16000。

6. 根据权利要求 2 所述的检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成 1:33000 比例;所述底物液 A 为含有 0.5mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸一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 2mol/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 值范围为 7.0-7.5 之间。

7. 权利要求 2 所述的检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,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 $^\circ\text{C}$)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的酶标板,加标准品/样本 50 μL /孔到对应的微孔中;

(4) 加入邻苯二甲酸二丁酯抗体工作液,50 μL /孔,反应 30 min,再加入邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液,50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^\circ\text{C}$ 避光环境中反应 30min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 260 μ L/孔,充分洗涤 4-5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡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°C 避光环境中反应 15min;

(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 450/630nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5min 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邻苯二甲酸二丁酯的含量。

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:

称取奶粉 50g 放入具塞三角瓶中,加入 150mL 的正己烷,充分混匀;20°C 水浴超声萃取 1h,浸泡过夜。

9. 提取液经无水硫酸钠过滤,氮吹浓缩至 1 mL;将 SimonAldrich™ C8 (3mL/200mg) 固相萃取柱依次用 5mL 二氯甲烷、5mL 甲醇、5mL 纯净水淋洗进行活化,将待净化液过柱,流速小于 1 mL/min;E. 以 5 倍体积洗脱缓冲液洗脱,收集待用。

检测邻苯二甲酸二丁酯的试剂盒制备及检测方法

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牛奶中的邻苯二甲酸二丁酯残留量的 ELISA 试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸二丁酯(DBP)是一种无色、有芳香气味的油状液体,蒸气压较低,易溶于乙醇、乙醚、丙酮和苯等有机溶剂。邻苯二甲酸二丁酯主要用作硝化纤维、醋酸纤维、聚氯乙烯等的增塑剂,可使制品具有良好的柔软性,但因其与聚氯乙烯等塑料产品之间并非直接结合,而是由于范德华力和氢键等结合在一起,因此,易挥发进入环境造成污染,当前已在大部分生物介质和生物体中发现了 DBP 的存在。有研究显示,人体血液中已普遍发现了 DBP 的存在。各项研究表明,DBP 给人类带来越来越多的危害,造成的严重影响已经逐渐引起人们的重视。目前有关 DBP 的毒性研究引起人们最大关注的是 DBP 的生殖毒性和发育毒性。研究表明,DBP 可致雄性啮齿类动物睾丸标志酶活性下降、重量减轻、曲细精管变性萎缩、生殖道畸形等人体接触 DBP 的含量主要有空气、食物、饮水以及化妆品,长期接触 DBP 可使人患多发性神经炎,脊髓神经炎及脑多发神经炎等症状,误食过量 DBP,可出现恶心、呕吐、头昏头痛及眼部刺激等可逆性症状。随着工业现代化的发展,DBP 被广泛应用在塑料、油漆、涂料、香料等产品中,相关数据显示,仅国内 DBP 一年使用量就达 170 万吨。然而,作为一种环境内分泌干扰物,随着时间不断推移,DBP 逐渐从各种物质中释放出来,迁移至水体、土壤、人体中,对人类造成极大的威胁和伤害。有研究发现,DBP 具有一定的致癌、致畸、免疫抑制作用和神经毒性,尤其对人类生殖健康影响较大,DBP 可影响雄性动物精液量、精子数量、精子活性,对后代生殖发育具有较大危害。近年来,DBP 安全问题已经越来越多的引起卫生安全部门的重视。

[0003] 当前有关 DBP 含量的检测方法较多,主要有 GC、HPLC、LC-MS、GC-MS 等方法,国内主要集中在 GC 和 HPLC 方法,虽然检测 DBP 含量的技术近些年已逐渐成熟,但此类方法大多成本较高,且操作相对繁琐,如何建立一种快速、准确、灵敏、成本低廉的检测方法已经成为当前 DBP 检测的首要问题。本研究旨在通过制备 DBP 单克隆抗体检测食品中 DBP 含量,建立一种快速、高效、准确、灵敏且经济的检测 DBP 含量的方法,可有效满足当前 DBP 含量检测的需要,将具有非常广阔的前景。

发明内容

[0004] 针对现有技术中存在的问题,本发明提供了检测邻苯二甲酸二丁酯的 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。本发明提供了检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法。

[0005] 检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括酶标板、邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 标准品、邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 抗体工作液、邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

[0006] 检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括以下步骤:酶标板的制备、邻苯二甲酸二丁酯标准品的制作、邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体及其工作液的制备、邻苯二甲酸二丁酯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。

[0007] 其进一步特征在于:所述的邻苯二甲酸二丁酯包被抗原是将邻苯二甲酸二丁酯半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为鸡卵清白蛋白(OVA),用 0.2mol/L Na_2CO_3 8mL,与 0.2mol/L NaHCO_3 17mL 混合,再加 75mL 双蒸水,调 pH 值到 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将 0.2mol/L Na_2CO_3 8mL,与 0.2mol/L NaHCO_3 17mL 混合,再加 75mL 双蒸水,调 pH 值到 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,抗原稀释成 1:4000 比例,100 μL /孔,37 $^\circ\text{C}$ 放置 2 h,取出酶标板拍掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300 μL /孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 10%牛血清白蛋白(BSA)封闭,180 μL /孔,37 $^\circ\text{C}$ 放置 1.5h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^\circ\text{C}$)晾干,抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^\circ\text{C}$ 下保存。

[0008] 所述的邻苯二甲酸二丁酯标准品的浓度分别为 0 ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、1.5ng/mL、2ng/mL、2.5ng/mL。

[0009] 邻苯二甲酸二丁酯蛋白质偶联物单克隆抗体工作液的制备:采用邻苯二甲酸二丁酯人工抗原免疫鼠所得,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:16000。

[0010] 所述邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液的制备:用酶标二抗稀释液稀释成 1:33000。所述底物液 A 为含有 0.5mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸一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 2mol/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 值范围为 7.0-7.5 之间。

[0011] 邻苯二甲酸二丁酯的 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 $^\circ\text{C}$)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的酶标板,加标准品/样本 50 μL /孔到对应的微孔中,加入邻苯二甲酸二丁酯抗体工作液,50 μL /孔,反应 30 min;

(4) 再加入邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液,100 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^\circ\text{C}$ 避光环境中反应 30min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 260 μL /孔,充分洗涤 4-5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡用未使用过的枪头戳破);

(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 $^\circ\text{C}$ 避光环境中反应 15min;

(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 450/630nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5min 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

算样品中邻苯二甲酸二丁酯的含量。

[0012] 其中所述处理后的样品经过以下处理的样品：

称取奶粉 50g 放入具塞三角瓶中，加入 150mL 的正己烷，充分混匀；20℃水浴超声萃取 1h，浸泡过夜。提取液经无水硫酸钠过滤，氮吹浓缩至 1 mL；将 SimonAldrich™ C8 (3mL/200mg) 固相萃取柱依次用 5mL 二氯甲烷、5mL 甲醇、5mL 纯净水淋洗进行活化，将待净化液过柱，流速小于 1 mL/min；E. 以 5 倍体积洗脱缓冲液洗脱，收集待用。

[0013] 本明采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法检测。用于检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的测定原理：样品中的邻苯二甲酸二丁酯与酶标板上固定的抗原特异性竞争，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邻苯二甲酸二丁酯的含量。

[0014] 如果样品中的邻苯二甲酸二丁酯含量少，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 为邻苯二甲酸二丁酯标准曲线图。

具体实施方式

[0016] 检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒，包括酶标板、邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 标准品、邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 抗体工作液、邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液、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邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒的制备。

[0018] 邻苯二甲酸二丁酯蛋白质偶联物的制备：

选用 4-硝基邻苯二甲酸为原料，4-硝基邻苯二甲酸和正丁醇在浓硫酸催化下合成 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯，然后在酸性条件下，以锌为催化剂合成 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯，然后经重氮化并分别与 BSA 和 OVA 偶联，继而合成免疫原与检测原。

[0019] 邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体的制备：

本实验采用重氮化法合成 DBAP-BSA 人工抗原，取 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 3 只，免疫剂量 150ug/只，采用腹腔注射、背部皮下多点注射等方法，在三免、五免后一周断尾采血，用 ELISA 方法检测血清效价，待血清效价稳定，六免后 7d 加强免疫，3d 后可进行细胞融合实验。利用单克隆抗体技术及酶联免疫检测技术筛选出能够稳定分泌 DBP 单克隆抗体的杂交瘤细胞株，经过三次亚克隆筛选，进行扩大培养并冻存细胞株。采用体内诱生法制备腹水，建立 ELISA 方法，检测腹水和细胞培养上清中抗体的效价和特异性。

[0020] 酶标邻苯二甲酸二丁酯的制备：

将 25% 戊二醛用 0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液 (CBS) 稀释至 5%，称取 5 mg HRP 溶于 0.5 mL 5% 的戊二醛，37℃水浴结合 2 h，加入 0.15 mol/L NaCl 1.0 mL，充分混匀后，置 4℃预冷 10 min。加入无水乙醇 2.4 mL，颠倒混合，立即 1000 r/min 离心 10min；弃掉上清，沉淀用冷的 75% 乙醇洗一次，将离心管倒置，风干。加入 0.05mol/L pH 9.6 的 CBS 0.5mL 溶解沉淀物；将 5 mg PEA 抗体溶于 0.5mL 0.15mol/L NaCl，再与醛化 HRP 溶液混合，加入 1.0 mol/L pH9.6 的 CBS 溶液，调节 pH 至 9.0-9.5，于 4℃下，电磁搅拌结合 24h。

加入 0.1 mL 0.15 mol/L 赖氨酸, 以封闭残留的醛基, 终止反应, 放置于 4°C 下 2 h; 将反应物通过 Sephadex G-200 凝胶柱, 用 PBS 洗脱, 收集第一洗脱峰; 或将反应物装入透析袋, 用 0.01 mol/L pH7.2 PBS, 4°C 透析过夜并收集。即为酶标记抗体。

[0021] 制备包被有邻苯二甲酸二丁酯包被抗原的酶标板:

酶标板包被邻苯二甲酸二丁酯抗原, 包被抗原是将邻苯二甲酸二丁酯半抗原与载体蛋白偶联得到的, 该载体蛋白为鸡卵清白蛋白 (OVA), 用 0.2 mol/L Na_2CO_3 8 mL, 与 0.2 mol/L NaHCO_3 17 mL 混合, 再加 75 mL 双蒸水, 调 pH 值到 9.6 的碳酸盐 (CBS) 缓冲液作为包被液, 将 0.2 mol/L Na_2CO_3 8 mL, 与 0.2 mol/L NaHCO_3 17 mL 混合, 再加 75 mL 双蒸水, 调 pH 值到 9.6 的碳酸盐 (CBS) 缓冲液作为包被液, 抗原稀释成 1:4000 比例, 100 μL /孔, 37°C 放置 2 h, 取出酶标板拍掉板内液体, 用稀释后的浓缩洗涤液 300 μL /孔, 洗板 2 次, 30 s/次; 然后加入 10% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 180 μL /孔, 37°C 放置 1.5 h, 弃去封闭液, 拍干后的酶标板放置恒温间 (25°C) 晾干, 抽检合格后将酶标板真空密封后置 4°C 下保存。

[0022] 所述邻苯二甲酸二丁酯的标准品配制浓度分别为 0 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、1.5 ng/mL、2 ng/mL、2.5 ng/mL。

[0023] 邻苯二甲酸二丁酯蛋白质偶联物单克隆抗体工作液的制备: 采用邻苯二甲酸二丁酯人工抗原免疫鼠所得到, 该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:16000。

[0024] 所述邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液的制备: 用酶标二抗稀释液稀释成 1:33000。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 值范围为 7.0-7.5 之间。

[0025] 基于上述制备的试剂, 本发明用于检测邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒包括如下料:

(1) 96 孔酶标板 \times 1 块 (包被有偶联抗原);

(2) 标准液 \times 6 瓶: (1 mL / 瓶) 0 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、1.5 ng/mL、2 ng/mL、2.5 ng/mL;

(3) 酶标二抗工作液 12 mL;

(4) 抗体上作液 7 mL;

(5) 底物液 A 7 mL;

(6) 底物液 B 7 mL;

(7) 终止液 7 mL;

(8) 10 \times 浓缩洗涤液 40 mL;

使用本试剂盒时的注意事项:

(1) 室温低于 20°C 或试剂及样本没有回到室温 (20 ~ 25°C) 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存光线下；

(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。

[0026] 本发明邻苯二甲酸二丁酯的 ELISA 试剂盒用于检测塑料袋装奶粉中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。

[0027] (1) 样品预处理

称取奶粉 50g 放入具塞三角瓶中，加入 150mL 的正己烷，充分混匀；20℃ 水浴超声萃取 1h，浸泡过夜。提取液经无水硫酸钠过滤，氮吹浓缩至 1 mL；将 SimonAldrich™ C8 (3mL/200mg) 固相萃取柱依次用 5mL 二氯甲烷、5mL 甲醇、5mL 纯净水淋洗进行活化，将待净化液过柱，流速小于 1 mL/min；E. 以 5 倍体积洗脱缓冲液洗脱，收集待用。

[0028] (2) 用本发明试剂盒进行检测上述样品中邻苯二甲酸二丁酯残留量。

[0029] (3) 取包被有邻苯二甲酸二丁酯抗原的酶标板，加标准品 / 样本 50uL / 孔到对应的微孔中，加入邻苯二甲酸二丁酯抗体工作液，50uL / 孔，反应 30 min。

[0030] (4) 再加入邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液，100u L / 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 30min。

[0031] (5) 小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液 260 u L / 孔，充分洗涤 4-5 次，每次间隔 10 s，用吸水纸拍干（拍干后未被清除的气泡用未使用过的枪头戳破）。

[0032] (6) 加入底物液 A 50 u L / 孔，底物液 B 50 u L / 孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 25℃ 避光环境中反应 15min。

[0033] (7) 加入终止液 50 u L / 孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630nm 检测，测定每孔吸光度值（请在 5min 内读完数据）。

[0034] (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邻苯二甲酸二丁酯的含量。

[0035] 分析结果

用上述制备的试剂盒中的 6 个邻苯二甲酸二丁酯标准品浓度 0 ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、1.5ng/mL、2ng/ml、2.5ng/mL 处测量吸光度值。

[0036] 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 (%) = $B/B_0 \times 100\%$ 。

[0037] 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。

[0038] 以标准品百分吸光率为纵坐标，以药物浓度的对数 $Lg(1+C_{DBP})$ 为横坐标，以 $Ln(1+ B/B_0)$ 为纵坐标，绘制标准曲线，求出直线方程。标准曲线见附图 1。

$Y=-0.3015X+0.6461$, $R^2=1$ 。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 8 倍的稀释倍数即为样本中邻苯二甲酸二丁酯的实际浓度。

[0039] 添加回收率及重复性

在牛奶样品中添加高中低三个浓度的 DBP,使得终浓度为 0.5、1.5、2.5ng/mL。将样品做 4 倍稀释后,用图 1 建立的标准曲线测定添加回收率,检测结果见表 1。

[0040] 表 1 样品中 DBP 添加回收率测定

添加药物浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	SD	批内变异系数 (%)	批间变异系数 (%)
0.5	82.06	0.0114	5.14	4.04
1.5	90.11	0.0093	9.25	7.33
2.5	78.41	0.0521	6.27	5.25

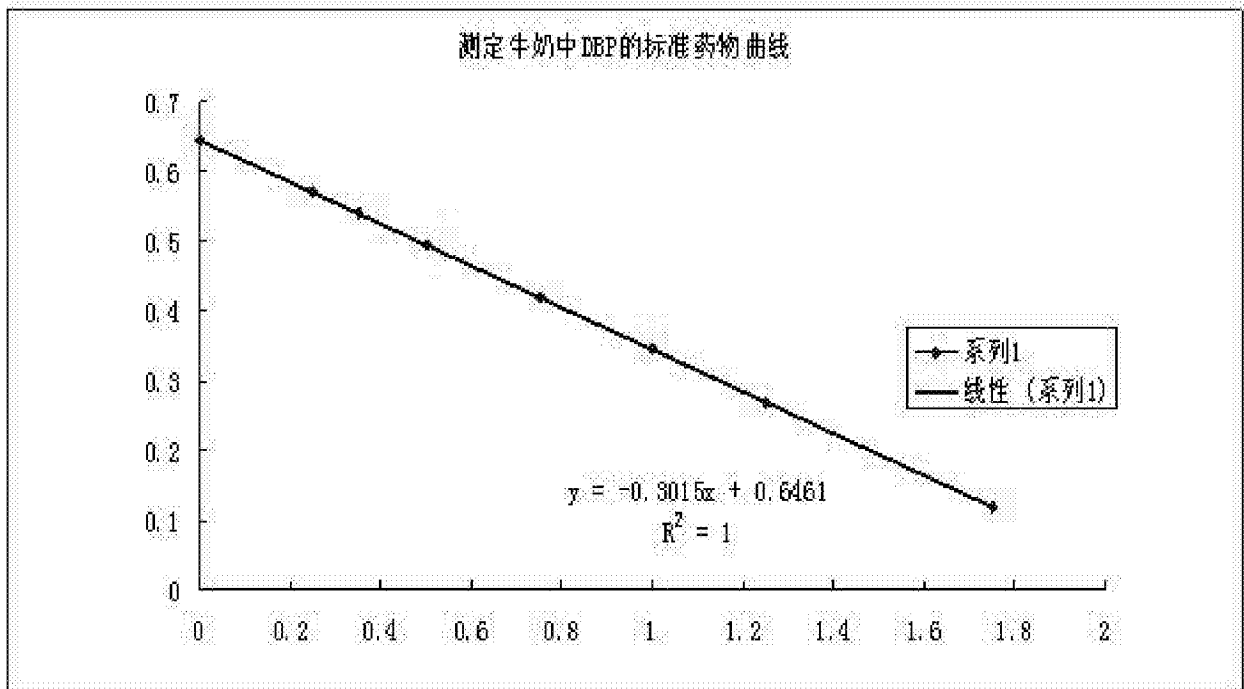


图 1

专利名称(译)	检测邻苯二甲酸二丁酯的试剂盒制备及检测方法		
公开(公告)号	CN105572364A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201410534200.5	申请日	2014-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 张淑雅		
发明人	洪霞 张淑雅		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为检测邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butylphthalate, DBP)的ELISA试剂盒的制备及其检测方法,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:包被了邻苯二甲酸二丁酯抗原的酶标板、邻苯二甲酸二丁酯标准品、邻苯二甲酸二丁酯抗体工作液、邻苯二甲酸二丁酯酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。邻苯二甲酸二丁酯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邻苯二甲酸二丁酯的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测牛奶中的邻苯二甲酸二丁酯的含量。

