

分类号_____

密级_____

UDC_____

编号_____

华中师范大学

硕士学位论文

邻苯二甲酸酯类物质残留检测
ELISA 方法的建立及试剂盒研制

学位申请人姓名: 赵静云

申请学位学生类别: 全日制硕士

申请学位学科专业: 生物化学与分子生物学

指导教师姓名: 袁均林 副教授



硕士学位论文
MASTER'S THESIS



Y2352450

硕士学位论文

邻苯二甲酸酯类物质残留检测 ELISA 方法的建立及试剂盒研制

论文作者：赵静云

指导教师：袁均林 副教授

学科专业：生物化学与分子生物学

研究方向：生物化学

华中师范大学生命科学学院

2013年5月



硕士学位论文
MASTER'S THESIS

Establishment of ELISA assay and development of ELISA test kit for detection of PAEs

A Thesis

*Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
For the M.S. Degree in Biochemistry and Molecular Biology*

By

Zhao Jingyun

Postgraduate Program

College of Life Sciences

Central China Normal University

Supervisor: Yuan Junlin

Academic Title: Associate Professor

Signature *Zhao Jingyun*

Approved

May, 2013



华中师范大学学位论文原创性声明和使用授权说明

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下，独立进行研究工作所取得的研究成果。除文中已经标明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

作者签名：赵静云

日期：2013年5月27日

学位论文授权使用授权书

学位论文作者完全了解华中师范大学有关保留、使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属华中师范大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以允许采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。（保密的学位论文在解密后遵守此规定）

保密论文注释：本学位论文属于保密，在____年解密后适用本授权书。

非保密论文注释：本学位论文不属于保密范围，适用本授权书。

作者签名：赵静云
日期：2013年5月27日

导师签名：袁时林
日期：2013年5月27日

本人已经认真阅读“CALIS 高校学位论文全文数据库发布章程”，同意将本人的学位论文提交“CALIS 高校学位论文全文数据库”中全文发布，并可按“章程”中的规定享受相关权益。同意论文提交后滞后：半年；一年；二年发布。

作者签名：赵静云
日期：2013年5月27日

导师签名：袁时林
日期：2013年5月27日



摘 要

邻苯二甲酸酯类化合物 (PAEs) 是目前广泛应用于工业生产的增塑剂, 随着增塑剂的广泛使用, 大量的 PAEs 暴露在环境中, 对生态系统和人类健康造成巨大的威胁。早在 1995 年, 世界卫生组织 (WHO) 就宣布必须加强对 PAEs 物质的监控, 继台湾增塑剂风波之后, 对增塑剂特别是邻苯二甲酸酯类物质的分析检测的相关报道越来越多。报道过的检测方法, 如荧光光度法、气相色谱法、液相色谱法、液质联用、气质联用等, 虽然能够在一定水平上实现对部分 PAEs 的检测, 但是多数样品前处理程序繁琐, 灵敏度较低, 不适用于实时定量的监控。因此建立一种快速简便, 高灵敏度的痕量检测方法对实现 PAEs 实时监控具有重要的意义, 酶联免疫吸附 (ELISA) 能够很好的解决这一问题, 它省去了前处理过程, 成本低, 特异性强, 成为检测 PAEs 的首选技术, 而免疫分析的关键问题是制备出相应的抗体。

本研究主要分为两个部分。第一部分主要是初步建立了 DMP 残留检测的 ELISA 方法。以四硝基邻苯二甲酸和甲醇为起始原料, 合成了具有 DMP 特征性结构的半抗原 DMAP, 采用重氮法将 DMAP 分别与卵清蛋白 (OVA) 和牛血清蛋白 (BSA) 偶联, 合成了免疫原 DMAP-OVA 与包被原 DMAP-BSA。用 DMAP-OVA 免疫 BALB/c 小鼠, 经过四次免疫, 断尾采血收集血清用于 ELISA 分析, 通过间接竞争 ELISA 建立了 DMP 检测的标准曲线, 标准曲线 IC_{50} 达到 311 ng/mL, 证明血清中抗体特异性良好, 能够用于 DMP 的检测, 为后续细胞融合, 杂交瘤细胞的筛选及单克隆抗体的大量制备做好了准备。

第二部分实验是 DBP 残留检测试剂盒的研制。首先复苏本实验室已制备出的 DBP 杂交瘤细胞株, 经过三次有限稀释法克隆化筛选之后, 得到一株高灵敏度高效价的细胞株, 采用小鼠体内诱生腹水法, 进行抗体的大量制备, 抗体用辛酸-硫酸铵法纯化后, 用于间接竞争 ELISA 条件的优化, 包括封闭液的选择, 竞争反应液中抗体稳定剂含量, 竞争反应时间, 二抗反应温度, 显色体系的选择, 生物素亲和素放大系统与常规 ELISA 的比较, 并在最优条件下建立了间接竞争 ELISA 标准曲线, 曲线回归方程 $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$, 其中 $A = 1.11$, $B = 0.9$, $C = 191$, $D = -0.05$, $R^2 = 0.9952$, DBP 浓度在 13 ng/mL ~ 1000 ng/mL ($IC_{20} \sim IC_{80}$) 范围内时, DBP 浓度的自然对数和抑制率之间呈现良好线性关系, 最低检测下限为 6.25 ng/mL。检测结果表明该 DBP 抗体可以满足对环境中 DBP 的检测, 进行 DBP 试剂盒的生产。

关键词: 邻苯二甲酸二甲酯 (DMP); 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP); PAEs 残留; 间接竞争 ELISA



Abstract

Phthalic acid esters (PAEs), which is now widely used as plasticizers in industrial production fields, when released in the environment, can be a great threat to human's health and ecological system. As early as in 1995, the World Health Organization (WHO) has announced that it is necessary to monitor PAEs to prevent of global environmental pollution. After the storm of plasticizer exposed in Taiwan, the detection of phthalate esters material has become a hot spot. Although the reported detection methods, such as fluorescence spectrophotometry, gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC), high performance liquid chromatography(HPLC), liquid chromatography-mass spectrography (LC-MS), gas chromatography-mass spectrography (GC-MS), can finish the detection for PAEs at a certain level, but the procedure is verbose, and sensitivity is low. Therefore it is imperative to establish a method which is simple, rapid and sensitive to realize the real-time monitoring of PAEs. ELISA can be a very good solution to solve this problem, but the key is preparation of the corresponding antigen and antibody.

This research is mainly divided into two parts. The first part the establishment of ELISA for detection of DMP residual. A hapten dimethyl 4-aminophthalate (DMAP) which possesses the structural feature of DMP was synthesized via esterification and reduction with 4-nitrophthalic acid and methanol. Then DMAP was linked to ovalbumin (OVA) and bovine serum albumin (BSA) through diazotization to make artificial antigen DMAP-OVA and DMAP-BSA. BALB/c mice were immunized with DMAP-OVA and the serum was collected for ELISA analysis after the fourth immunization. First phalanx titration was used to determine the optimum concentration of coating antigen and dilution multiple of antiserum, then an indirect competitive ELISA for DMP was developed and showed an IC_{50} with 311 ng/mL, which proved that antibody is high-specificity, can be used for detection of DMP. It is also a guarantee for the subsequent cell fusion, screening of hybridoma cell and large-scale preparation of monoclonal antibody.

The second part is the development of ELISA test kit for detection of DBP. First revived hybridoma cell line that secrete antibody aim at DBP, after three times' screening by limiting dilution assays, a hybridoma cell line whit high sensitivity and high titer was got. In vivo induced ascites method and octylic acid ammonium sulfate methods were used to prepared and purified monoclonal antibodies of DBP. Then indirect competitive ELISA was optimized, such as the confining liquid, the concentration of BSA, reaction time and temperature, coloration system, BA-ELISA. Under the optimal conditions, an indirect competitive standard curve was established, the regression equation $y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D$ with the value $A = 1.11$, $B = 0.9$, $C = 191$, $D = -0.05$,



correlation coefficient $R^2=0.9952$, when the concentration of DBP within the scope from 13 ng/mL to 1000 ng/mL ($IC_{20} \sim IC_{80}$), it showed good relationship between the natural logarithm of DBP concentration and inhibition rate, the minimum detection limit is 6.25 ng/mL. The results of this study can be used for detection of DBP in environment and the mass production of ELISA test kit.

Key words: Dimethyl phthalate (DMP); Dibutyl phthalate (DBP); PAEs residues; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)



目 录

摘 要	I
Abstract	II
1. 绪论	1
1.1 PAEs 的理化性质及应用	1
1.2 PAEs 的暴露评价	2
1.3 PAEs 检测方法	4
1.4 免疫分析技术	4
1.4.1 免疫分析技术简介	4
1.4.2 酶联免疫分析	5
1.4.3 生物素-亲和素放大酶联免疫分析	5
1.5 选题意义	6
2. DMP 残留检测 ELISA 方法的建立	7
2.1 实验材料、试剂及仪器	7
2.1.1 实验动物	7
2.1.2 主要试剂	7
2.1.3 主要溶液	7
2.1.4 实验仪器	8
2.2 实验方法	8
2.2.1 半抗原的合成及结构鉴定	8
2.2.2 人工抗原的合成及鉴定	9
2.2.3 小鼠的免疫	9
2.2.4 抗血清效价的测定	10
2.2.5 抗血清灵敏度的测定	11
2.3 实验结果	11
2.3.1 半抗原结构的鉴定	11
2.3.1 人工抗原的鉴定	12
2.3.2 方阵滴定确定最适包被浓度和抗血清稀释倍数	14
2.3.3 抗血清效价测定结果	15
2.3.4 抗血清灵敏度的测定结果	15
2.4 讨论	15



2.4.1 人工抗原的制备及免疫原的选择	15
2.4.2 动物免疫对产生抗体特性的影响	17
2.4.3 结论	17
2.4.4 后续研究工作	18
3. 环境中 DBP 残留检测 ELISA 试剂盒的研制	19
3.1 实验材料、试剂及仪器	19
3.1.1 实验材料	19
3.1.2 主要试剂	19
3.1.3 主要溶液	19
3.1.4 实验仪器	20
3.2 实验方法	20
3.2.1 单克隆抗体的制备及纯化	20
3.2.2 ELISA 检测条件的优化	23
3.2.3 人工抗原包被的间接竞争 ELISA 标准曲线的建立	24
3.3 实验结果	25
3.3.1 杂交瘤细胞的克隆化筛选	25
3.3.2 单克隆抗体的制备及纯化	25
3.3.3 间接竞争 ELISA 条件的优化	26
3.3.4 人工抗原包被的间接竞争 ELISA 标准曲线的建立	31
3.3.5 环境样品中 DBP 残留检测试剂盒原理及检测步骤	32
3.4 讨论	34
3.4.1 细胞的冻存与复苏	34
3.4.2 杂交瘤细胞的筛选	34
3.4.3 间接竞争 ELISA 注意事项	34
3.4.4 酶联免疫技术的改进—BA-ELISA	35
3.4.5 ELISA 显色反应	35
参考文献	37
附录一	43
附录二	44
致 谢	45



1. 绪论

1.1 PAEs 的理化性质及应用

邻苯二甲酸酯，又称为酞酸酯，是邻苯二甲酸形成的酯类的统称，英文简称 PAEs。由邻苯二甲酸酐与相应的醇在硫酸等催化剂的作用下酯化而形成，为挥发性较低的粘稠状液体，一般情况下，在水中溶解度小，气味较特殊，下表列出了常见的邻苯二甲酸酯类物质及其基本物理化学性质。

表 1.1 常见邻苯二甲酸酯类物质的理化性质

PAEs	熔点 (°C)	沸点 (°C)	水中溶解度 (mg/L)	蒸汽压 Vp (Pa)	比重 Specific Gravity(20°C)	Log Kow
DMP	5.5	—	4000	0.22	1.192	1.47
DEP	-40	298	1080	0.22	1.118	2.99
DPrP	—	317.5	108	—	—	3.27
DBP	-35	340	11.2	9.73×10^{-3}	1.042	3.74
DAP	—	350	182	—	—	3.23
DHP	-27.4	345	0.24	1.87×10^{-3}	1.011	5.65
BBP	-27.4	372	2.69	1.20×10^{-3}	1.011	3.57
DEHP	-47	384	0.135	9.47×10^{-3}	0.986	8.06
DnOP	-25	—	3	2.53×10^{-3}	0.978	8.06
DiNP	-48	—	0.2	7.20×10^{-3}	0.97	9
DiDP	—	—	0.17	6.80×10^{-3}	0.961	—

PAEs 的性质与其侧链有关，侧链长支链多则亲油性强，反之，则亲水性强。它在体内的代谢一般分为两步，首先水解成相应的单酯，接着单酯和羟基化产物在酶的催化作用下生成亲水的葡萄糖苷酸结合物^[1-3]，亲水性强的短链邻苯二甲酸酯，在尿液中的代谢物主要以自由态形式存在，如 DEP 的代谢物 MEP；亲油性强的邻苯二甲酸酯代谢物主要以葡萄糖苷酸结合态形式存在，如 DBP、BBP 和 DEHP 等，表 1.2 列出了几种主要的邻苯二甲酸酯类物质及其代谢物。



表 1.2 主要邻苯二甲酸酯及其代谢物

PAEs	英文缩写	代谢物	英文缩写
邻苯二甲酸二甲酯	DMP	邻苯二甲酸单甲酯	MMP
邻苯二甲酸二乙酯	DEP	邻苯二甲酸单乙酯	MEP
邻苯二甲酸二正丁酯	DBP	邻苯二甲酸单丁酯	MBP
邻苯二甲酸二异丁酯	DiBP	邻苯二甲酸单异丁酯	MiBP
邻苯二甲酸丁基苄酯	BBzP	邻苯二甲酸单苄基酯	MBzP
邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯	DEHP	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯	MEHP

PAEs 因能起到软化作用，可以增大产品的可塑性，被作为增塑剂被广泛应用于沐浴露、洗发水、指甲油、清洁剂、食品包装等数百种产品中。目前商业化使用的 PAEs 主要有十几种，其中 DBP 主要在纤维素聚合物、油墨、粘合剂以及化妆品中有应用，DEHP 主要用于医疗器械如静脉注射管和医用血袋等软性 PVC 产品，DINP 主要用于 PVC 地板、玩具、橡胶软管的制造，BBzP 则主要用于油漆和密封剂的生产。2006 年，世界增塑剂消费总量达 665 万吨，其中我国的消费量占 1/4，成为最大的增塑剂消费国^[4,5]，DEHP 和 DBP 是生产和消费量最大的邻苯二甲酸酯类物质。

1.2 PAEs 的暴露评价

PAEs 被作为增塑剂广泛使用，主要是通过氢键以及范德华力结合聚烯烃分子来够提高聚合物的柔韧度，随着其广泛使用，弊端也在凸显，PAEs 可以通过各种途径暴露到外环境中，对环境和人类造成危害^[6]。PAEs 可通过食入、饮水、呼吸和皮肤接触进入人体^[7]，如图 1.1，其急性毒性较低，摄入体内后不会有中毒的表现，但是其慢性毒性的危害很大。

PAEs 中有一半是环境类雌激素，具有干扰内分泌特性，已有研究表明 PAEs 会导致动物体重减轻、肝肾功能不全、存活率低下、血红细胞减少，有潜在的致突变和致癌性^[8]。Larsen 等^[9,10]对 BALB/c 进行毒理学研究，发现 DEHP 在过敏性哮喘



发生过程中起着佐剂作用。Yang 等^[11]采用口饲染毒的方法对大鼠进行毒理学试验,发现 DEHP 不但会使大鼠嗜酸性粒细胞数增加,同时会增加气道阻力,使肺部出现炎症反应,进一步证明了其佐剂作用。另有动物研究表明,PAEs 染毒后,会出现生殖系统畸形,包括睾丸发育不全,前列腺异常,肛殖距缩短和乳头残留等,孕期暴露 PAEs 后,对雄性后代的发育影响目前也被作为研究焦点^[12]。

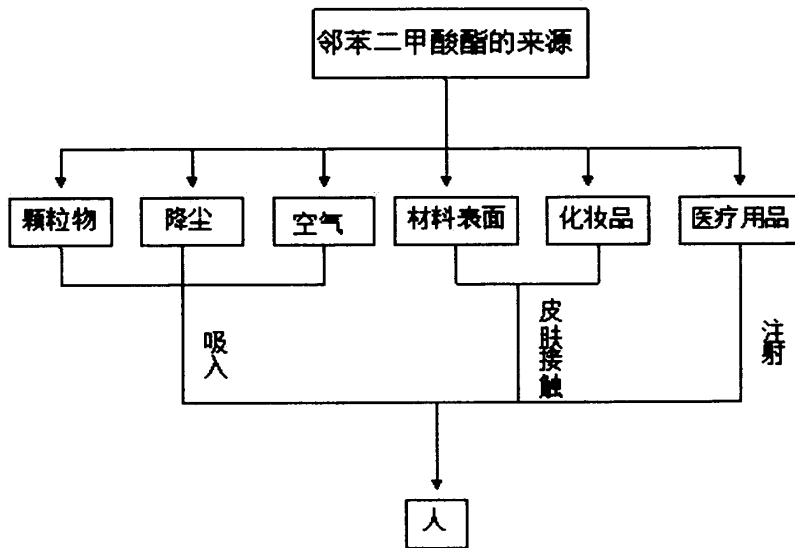


图 1.1 邻苯二甲酸酯的暴露途径

Hoppin 等^[13]于 2004 年对 240 名成人尿液中邻苯二甲酸酯代谢产物含量与肺功能相关指标作多元线性回归分析,发现邻苯二甲酸酯的暴露与成年男性肺功能减退有联系。2007 年 Stahlhut 等^[14]的数据调查显示邻苯二甲酸酯的暴露于肥胖症和糖尿病之间有统计学联系。Meeker 等^[15]以成年男性为研究对象,检测其尿液中 DEHP 和 MEHP 的含量以及血清中游离甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸和促甲状腺激素水平,结果表明邻苯二甲酸酯暴露可能与成年男性甲状腺功能减退有一定联系。

鉴于 PAEs 的危害之大,暴露途径之多,欧盟等已经将 DMP、DEP、DBP、DOP、BBP 和 DEHP 六种物质列为优先检测污染物,并不断增加监控种类^[16],并对 DBP、BBP、DEHP、DNOP、DINP、DIDP 六中认定的有害物质规定检出量必须低于 0.1%^[17]。我国也将 DMP、DBP 和 DOP 列入“环境污染物黑名单”,并决定近期重点对 DBP 和 DOP 等邻苯二甲酸酯进行实时监控^[18]。



1.3 PAEs 检测方法

由于 PAEs 的危害性日益显著, 对其在环境中和人体暴露水平的检测分析也越来越重要。常用的检测 PAEs 的方法为色谱法。气相色谱法 (GC) 是应用较早较广泛的一种分析方法, 气相色谱-质谱联用法 (GC-MS) 具备了两者的优势, 具有更高的灵敏度。高效液相色谱 (HPLC) 建立于经典液相色谱和气相色谱基础之上, 检测过程中省去了气相色谱必须经过衍生化的过程, 分离效果和灵敏度均较高, 广泛应用于生物、医药、环境分析、化工等领域。

李海燕等^[19]用电动毛细管色谱法分离测定了 DMP、DEP、DBP、BBP 和 DOP 的标准混合物, 用紫外检测器检测 200 nm 波长, 结果显示, 五种邻苯二甲酸酯在 30 min 内得到了较好的分离。该法可以用于对工业废水中邻苯二甲酸酯的定量测定, 质量浓度在 4 mg/L~50 mg/L 具有良好的线性关系, R^2 为 0.999, 相对标准差为 0.98%~6.16%。Koekemoer, Mark D^[20], Leeder J.F^[21]等用气质联用法对土壤中内分泌干扰物进行检测, 检测下限达到 0.01 pg/L。2003 年, Elefteria Psillakis^[22]采用 GC-MS 法对水中六种邻苯二甲酸酯类物质进行了检测, 该方法制作的标准曲线线性关系良好, 相关系数接近 0.999, 检出限为 0.24 ng/mL~0.93 ng/mL。郑和辉^[23]等于 2004 年用 Agilent6890 GC-MS 联用仪测定了水中几种邻苯二甲酸酯的浓度, 结果显示 DMP、DEP、DBP 的检出限为 0.3 ng/mL, DOP 和 DEHP 检出限为 0.8ng/mL。杨左军等^[24]等固相萃取-气相色谱法对 PVC 塑料中的 12 种邻苯二甲酸酯进行了测定, 检出限为 0.097 ng/mL~3.646 ng/mL。李满秀^[25]等于 2005 年采用荧光法对环境中的邻苯二甲酸二乙酯进行了定量检测, 通过 Fenton 反应使最终产物带上荧光, 测定荧光强度即可计算 DEP 浓度, 此方法检测较为便捷, 结果显示 DEP 在 0.112 mg/L~2.24 mg/L 浓度范围内呈线性关系, 检出限为 0.018 mg/L。Lu Jun-Ping^[26]等人曾用 HPLC 检测早熟患者血清中 DEHP、MEHP, 结果显示被测物浓度与相应指标线性关系良好, 检测下限 1 ng/mL。

1.4 免疫分析技术

1.4.1 免疫分析技术简介

免疫分析法 (Immunoassay, IA) 是以一种或几种抗体为分析试剂, 以抗原和抗体的特异性反应结合为基础, 实现对待测物定性或定量分析的方法^[27]。它不需要贵重仪器, 将生化技术、免疫学技术有机结合, 利用抗原抗体特异性反应和酶标记物的放大作用, 对样品中小分子化合物进行定量测量, 具有简便、灵敏、成本低、



快速等优点,其中最广泛应用的是酶联免疫吸附(ELISA)。免疫分析技术很早就 在生物化学、临床医学等领域有广泛的应用,直到 20 世纪 80 年代,才作为一种有效的方法被应用于环境化学物质的检测^[28,29]。在检测系统中,根据标记物的不同可以分为:荧光免疫分析(Fluorescence immunoassay, FIA),放射免疫分析(Radioimmunoassay, RIA)以及酶联免疫分析(Enzyme immunoassay, EIA)等。相比较而言,酶联免疫分析法因操作简单,适宜现场检测而成为最流行的检测方法^[30]。

1.4.2 酶联免疫分析

酶联免疫分析技术(EIA)是一种基于抗原和其抗体特异性反应与酶催化反应有机结合的分析方法。酶标记物制备简单,有效期长,被酶催化后可产生肉眼可见的有色产物,借助仪器进行测定后即可判定结果。酶联免疫分析方法如酶联免疫试验(Enzyme-monitored Immunotest, EMIT),酶联免疫吸附分析(Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA),免疫酶分析法(Immunoenzymometric, IEMA)和竞争结合酶免疫分析法(Competitive Binding Enzyme Immunoassay, EIA)。

辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)和碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, AP)是酶联免疫分析常用的标记酶,Bystryak 和 Maderabache 分别描述了以邻苯二胺和四甲基联苯胺为底物的 HRP 光化学放大过程。

1.4.3 生物素-亲和素放大酶联免疫分析

生物素亲和素放大酶联免疫分析法是目前应用前景广泛的检测方法,主要利用了生物素和亲和素之间的多级放大效应,并与后期间接 ELISA 结果联系起来,进行检测结果的分析。在此过程中,因为一个抗体分子可以和多个生物素和亲和素结合,形成了放大系统,所以检测结果的灵敏度大大提高。同时生物素和亲和素作为理想标记剂,可以与荧光素、蛋白质,如抗原抗体、酶等结合而不影响其活性。

生物素亲和素放大酶联免疫分析可以用于抗原、抗体、受体的定性定量,也可以用于反应体系中各物质的分离和纯化^[31,32],它与 ELISA 偶联应用有多种形式,如先将生物素包被在固相聚乙烯材料等的表面,抗原和抗体与之吸附结合,该方法的优点是包被抗原的量可以较大,而且免疫反应也因为结合位点的充分暴露而有效的进行。另外,生物素亲和素放大酶联免疫分析法也可以用于终级反应的放大,不用常规的酶标记抗体,而用生物素的抗体代替之后与亲和素-酶结合物(BA-ELISA)、或酶标记的生物素(BAB-ELISA)连接,从而放大反应信号,提高检测结果的灵敏度。



1.5 选题意义

环境中邻苯二甲酸酯的暴露危害日益凸显，其定性定量的检测也显得十分必要。常规的检测方法，如色谱法、气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱法虽然能够完成对邻苯二甲酸酯类物质的定性或定量检测，且能达到较低的检测下限，但存在一定的弊端，对实验设备要求高，样品前处理程序繁琐，耗费时间长。酶联免疫吸附（ELISA）克服了上述操作的缺点，它快速简便，费用低廉，灵敏度高，一次性能完成大量样本的检测，可重复性强，具有独特的优势，是对环境中 PAEs 适时定量检测的最佳选择。

ELISA 反应体系是基于抗原抗体特异性反应的测定方法，因此关键在于制备出邻苯二甲酸酯类物质的单克隆抗体。DMP 和 DBP 两种典型的邻苯二甲酸酯类物，目前对 DMP 的检测仍然采取色谱法，而对 DBP，虽然已有关于 DBP 多克隆抗体的相关研究，但是不能实现抗体的无限量生产。本研究分为两部分内容，前部分主要合成了 DMP 人工抗原，动物免疫证明了其有效性，为后期细胞融合及 DMP 单克隆抗体的制备和筛选打下了基础；后部分主要是在实验室已制备好的能分泌 DBP 抗体的细胞株基础上，经重新筛选和条件优化之后，完善了 DBP 残留检测试剂盒的步骤，实现了对抗体的大量制备和对 DBP 的检测，为 DBP 检测试剂盒的推广使用作了铺垫。



2. DMP 残留检测 ELISA 方法的建立

2.1 实验材料、试剂及仪器

2.1.1 实验动物

4~6 周龄，体重 20 ± 2 g，雌性 BALB/c 小鼠，购自湖北省疾病预防控制中心。

2.1.2 主要试剂

鸡卵清白蛋白 (Sigma)，牛血清蛋白 (Sigma)，丙烯酰胺 (Canalab)，甲叉双丙烯酰胺 (Canalab)，福氏完全佐，福氏不完全佐剂 (Sigma)，辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (Jackson)，过硫酸铵 (Sigma)，Tris-HCl (Promega)，低分子量蛋白质 Marker (武汉亦新生物科技有限公司)，邻苯二甲酸二甲酯 (Sigma)，四硝基邻苯二甲酸酐 (武汉亦新生物技术有限公司)，其他未特殊说明试剂均为国产分析纯。

2.1.3 主要溶液

30% 丙烯酰胺贮液：称取丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺，用双蒸水定容。

浓缩胶缓冲液：三羟基氨基甲烷用适量双蒸水溶解，1 mol/L HCl 调 pH 至 6.8。

分离胶缓冲液：双蒸水溶解 Tris，1 mol/L HCl 调 pH 至 8.8。

2×凝胶上样缓冲液：0.2 mol/L 二硫苏糖醇，0.1 mol/L pH 6.8 Tris-HCl，2% SDS，0.1% 溴酚蓝，10% 甘油。

电泳缓冲液：Tris，甘氨酸，10% SDS，用双蒸水定容。

脱色液：甲醇，冰醋酸，蒸馏水 (dH₂O) 混合配制。

染色液：考马斯亮蓝溶于脱色液后过滤使用。

包被缓冲液：称取 Na₂CO₃ 1.59g，NaHCO₃ 2.93 g，配制成 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液。

磷酸盐缓冲液 (PBS)：称取 NaCl 8 g，KCl 0.1 g，Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g，NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.29 g，用 1L 蒸馏水定容。

封闭液：5% 脱脂奶粉，称 5 g 脱脂奶粉用，100 mL PBS 配制。

洗涤缓冲液 (PBST)：含 0.05% Tween-20 的 PBS。

抗体稀释液：含 0.1% BSA 的 PBS。

底物显色液：邻苯二胺 (OPD)：1 mL (4mg/mL)。

0.2 mol/L Na₂HPO₄：2.57 mL



0.1 mol/L 柠檬酸: 2.43 mL

dH₂O: 4 mL

30% H₂O₂: 4 μL

终止液: 2 mol/L H₂SO₄, 107.8 mL 浓硫酸缓慢倒入蒸馏水中, 搅拌并加水至 1000 mL。

DMP 标准溶液 (1 g/L): DMP 50 mg, DMF 溶解并定容到 50 mL, 4℃ 保存。

实验用水为超纯水或重蒸去离子水 (DDW)。

2.1.4 实验仪器

Mercury VX-400MHz 型超导核磁共振仪 (Varian), Trace MS 2000GC/MS 气质联用仪 (Finnigan), DYY-6B 型稳压稳流电泳仪 (北京市六一仪器厂), 低温冷冻离心机 (Eppendorf 5415R, Beckman), S-3100 紫外/可见分光光度计 (Scinco), 全波长酶标仪 (Bio-tek), U570-超低温冰箱 (Premium), 低温冷冻离心机 (Eppendorf 5415R, Beckman), AB104-S 电子天平 (Metteler), ES-315 湿热灭菌锅 (TOMY)。

2.2 实验方法

2.2.1 半抗原的合成及结构鉴定

(一) 4-氨基邻苯二甲酸二甲酯 (DMAP) 的合成

本实验选择保留 DMP 的酯键, 在苯环上引入氨基合成半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二甲酯 (DMAP), 有效的提高了产生抗体的特异性。合成路线见下图 2.1, 合成步骤参考文献^[33]。

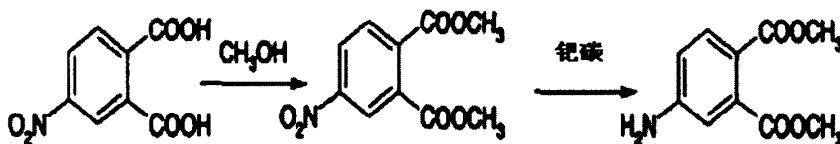


图 2.1 DMAP 合成方案

在装有温度计、分水器、冷凝管的三颈烧瓶中, 加入 10 g 4-硝基邻苯二甲酸和 10 mL 甲醇, 在磁力搅拌器的作用下, 加入适量浓硫酸作催化剂, 控制反应温度在 120 ℃ 左右, 回流 7 h。反应结束后, 继续升温, 蒸出剩余的甲醇。抽滤除去催化剂, 得到粗产品。粗产品用氢氧化钠中和, 减压蒸馏收集 180~185℃/7.3 kPa 的馏分,



得到纯净的 4-硝基邻苯二甲酸二甲酯，是一种淡黄色晶体，产率为 75.71%。用适量甲醇作溶剂，溶解 4-硝基邻苯二甲酸二甲酯，按照每 3 mmol 样品加 0.05g 钯碳，加氢气还原 24 小时。除去未参加反应的钯碳，得到 4-氨基邻苯二甲酸二甲酯晶体，产率 95.31%。

(二) 半抗原结构的鉴定

所得的半抗原 DMAP 采用氢谱 ($^1\text{H NMR}$) 及质谱 (MS) 鉴定其结构。

2.2.2 人工抗原的合成及鉴定

(一) 人工抗原的合成

本实验选用重氮化法 (见图 2.2) 将半抗原 DMAP 与载体蛋白 (BSA 或 OVA) 进行偶联。

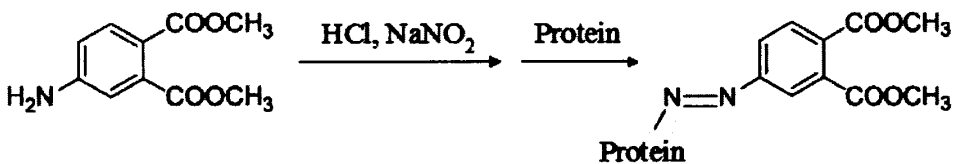


图 2.2 重氮法合成人工交联抗原

(二) 人工抗原结构的鉴定

1. 紫外光谱扫描法分析^[34]: 分别对半抗原 DMAP、载体蛋白 BSA、OVA 以及人工抗原 DMAP-BSA、DMAP-OVA (浓度均调整为 1 mg/mL) 进行紫外吸收光谱扫描, 比较 UV 光谱是否有明显移位现象。

2. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE)^[35], 观察人工抗原的条带与载体蛋白相比是否有所滞后, 并根据蛋白质的相对分子量与电泳迁移率之间的标准曲线计算出人工抗原与载体蛋白的偶联比。

2.2.3 小鼠的免疫

表2.1 BALB/C小鼠免疫方案

免疫次数	免疫时间	免疫剂量(μg /只)	佐剂	免疫部位
1	1 天	100	FCA	颈背部皮下
2	4 天	50	FCA	颈背部皮下
3	25 天	50	FIA	颈背部皮下
4	49 天	50	FIA	颈背部皮下



取人工抗原 DMAP-OVA, 用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 稀释到适当的浓度, 加入等体积的福氏完全或不完全佐剂, 用注射器反复抽吸多次, 使抗原和佐剂充分混匀, 抽吸过程中取适量抗原滴至水面, 观察 60 s, 若无扩散, 则表明研磨充分, 可以用于动物免疫。免疫用小鼠为 4~6 周龄的雌性 BALB/c。免疫方案如表 2.1。

2.2.4 抗血清效价的测定

第四次免疫之后 7~10 天, 对免疫小鼠断尾采血, 2400 rpm 离心 10 min 收集血清, 4℃ 保存备用, 用间接 ELISA^[36]测定抗血清的效价。

(一) ELISA 方阵滴定

(1) 包被: 用包被缓冲液将包被抗原 DMAP-BSA 从 1 μg/mL 2 倍数梯度稀释至 0.125 μg/mL, 100 μL/孔加入到酶标板中, 空白对照孔加等量的包被缓冲液, 4℃ 过夜。次日倒出酶标板孔内的液体, 拍干, 每孔加入 PBST 200 μL, 晃动 90 s, 倒出孔内液体, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(2) 封闭: 每孔加入封闭液 250 μL, 37℃ 孵育 1 h, 倒出孔内液体, 拍干。每孔加入 PBST 200 μL, 轻轻晃动 90 s, 倒出孔内液体, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(3) 加抗血清: 用抗体稀释液将抗血清从 1: 500 开始 2 倍梯度稀释到 1: 32000, 每孔加 100 μL。37℃ 孵育 1 h, 倒出孔内液体, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(4) 加酶标二抗: 用抗体稀释液 1: 10000 稀释 HRP 标记羊抗小鼠 IgG, 100 μL/孔加入酶标孔内, 37℃ 孵育 1 h, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(5) 加底物显色液: 取新鲜配置的底物显色液, 每孔加 100 μL 加入酶标孔内, 室温避光反应 20 min。

(6) 终止: 每孔加 2 mol/L H₂SO₄ 50 μL 终止反应。

(7) 判定结果: 用酶标仪测定 492 nm 处的 OD 值, 选取吸光值在 1.0 左右的抗原稀释倍数和抗血清稀释倍数作为最佳工作浓度, 测定抗血清效价, 是由酶标仪最适灵敏度范围决定的。

(二) 抗血清效价测定

(1) 包被: 用包被液将 DMAP-BSA 稀释至最佳浓度, 100 μL/孔加入到酶标板中, 空白对照孔加等量的包被缓冲液, 4℃ 过夜。次日倒出酶标板孔内的液体, 拍干, 每孔加入 200 μL PBST, 轻轻摇晃 90 s, 倒出空内液体, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(2) 封闭: 每孔加入 250 μL 封闭液, 37℃ 孵育 1 h, 倒出孔内液体, 拍干。每孔加入 PBST 200 μL, 轻轻晃动 90 s, 倒出孔内液体, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(3) 加抗血清: 用抗体稀释液将抗血清稀释至最佳工作浓度, 每孔加 100 μL。37℃ 孵育 1 h, 倒出孔内液体, 拍干, 连续洗涤 3 次。



(4) 后续加酶标二抗，底物显色液，终止反应，判定结果同 ELISA 方阵滴定 (4) ~ (7)。抗血清 OD 值大于等于对照孔的 2.1 倍时的血清稀释倍数即为其效价^[37]。

2.2.5 抗血清灵敏度的测定

(1) 包被：用包被缓冲液将包被抗原 DMAP-BSA 稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，100 μL /孔加入到酶标板中，空白对照孔加等量包被缓冲液，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，倒出酶标板孔内的液体，拍干，每孔加入 200 μL PBST，轻轻摇晃 90 s，拍干，连续洗涤 3 次。

(2) 封闭：每孔加入 250 μL 封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，倒出孔内液体，拍干。每孔加入 PBST 200 μL ，轻轻晃动 90 s，倒出孔内液体，拍干，连续洗涤 3 次。

(3) 竞争反应：用抗体稀释液将 DMP 标准溶液从 5000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 开始 2 倍梯度稀释到 9.765 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，50 μL /孔加入到 96 孔板中，然后向每孔加入 2 倍工作浓度的抗血清 50 μL ，充分混匀，阳性对照孔加 50 μL 抗体稀释液和 50 μL 2 倍工作浓度的抗血清，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。倒出孔内液体，拍干，每孔加入 PBST 200 μL ，轻轻晃动 90 s，倒出孔内液体，拍干，连续洗涤 3 次。

(4) 后续加酶标二抗，底物显色液，终止反应，判定结果同 ELISA 方阵滴定 (4) ~ (7)。

根据所测得 OD 值，计算抗血清的抑制率，抑制率按公式 2.1^[38]计算。

$$\text{Inhibition rate (\%)} = (\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\text{min}}) / (\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}) \quad \text{公式 2.1}$$

其中， OD_{max} 代表阳性孔的吸光值， OD_{min} 表示空白对照孔的吸光值， OD_x 为含有 x 浓度 DMP 的竞争孔的吸光值。以抑制率为纵坐标，DMP 浓度的自然对数值为横坐标，进行回归分析，计算产生 50% 抑制的 DBP 浓度 IC_{50} 。 IC_{50} 值越低，灵敏度越高。以 DMP 浓度 (ng/mL) 的自然对数为横坐标，抗血清抑制率为纵坐标，作出间接竞争 ELISA 标准曲线，并通过回归分析计算 IC_{50} 和 IC_{10} 。

2.3 实验结果

2.3.1 半抗原结构的鉴定

600M 核磁共振波谱仪对 4-氨基邻苯二甲酸二甲酯鉴定结果： H^1NMR (ppm): 7.72 (d, 1H, Ar-H), 6.66~6.72 (m, 2H, Ar-H), 4.19 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 3.90 (s, 3H, $-\text{O}-\text{CH}_3$), 3.83 (s, 3H, $-\text{O}-\text{CH}_3$)。

质谱鉴定结果：Full MS m/z: 209.11 (4-氨基邻苯二甲酸二甲酯分子量为 209.19)。

鉴定结果表明半抗原合成成功。

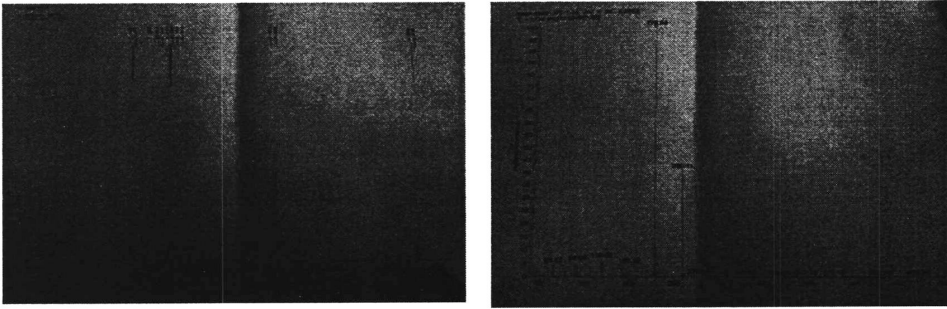


图 2.3 DMAP 氢谱和质谱鉴定结果

2.3.1 人工抗原的鉴定

(一) 紫外光谱扫描

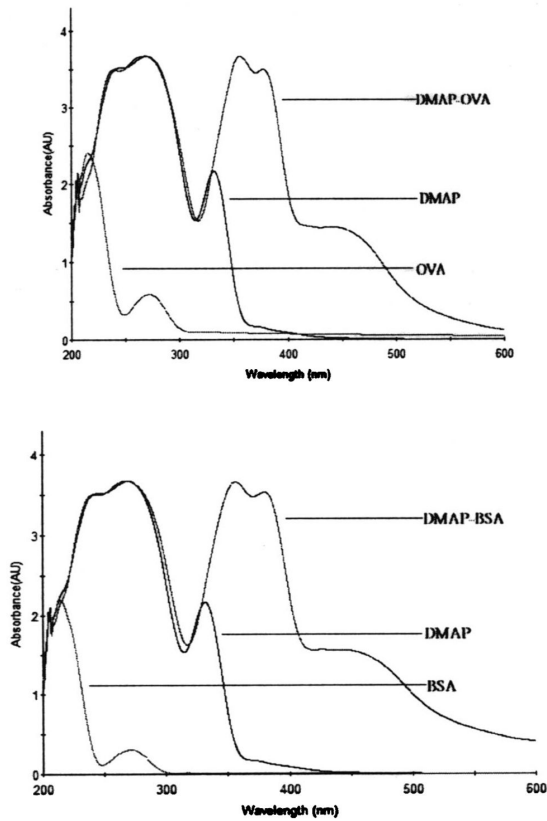


图 2.4 半抗原、载体蛋白、人工抗原紫外光谱扫描图



由紫外光谱扫描所得图谱可以看出，半抗原、载体蛋白、人工抗原三者吸收波峰有明显不同，半抗原 DMAP 在 237 nm~263 nm 有较强吸收带，同时在 332.9 nm 处呈现明显吸收波峰；OVA 在 223.6 nm 和 272.8 nm 处有较强吸收峰，BSA 在 221.7 nm 和 272.6 nm 处有较强吸收峰；人工抗原 DMAP-OVA 和 DMAP-BSA 均在 230 nm~270 nm 呈现吸收带，这与半抗原 DMAP 有相似特征，同时又在 360 nm~380 nm 有明显吸收峰，这与半抗原明显不同，表现为自身的特征吸收峰，是半抗原与载体蛋白偶联物所贡献，因而可以初步证明半抗原成功偶联上了载体蛋白，人工抗原合成成功。

(二) SDS-PAGE 鉴定

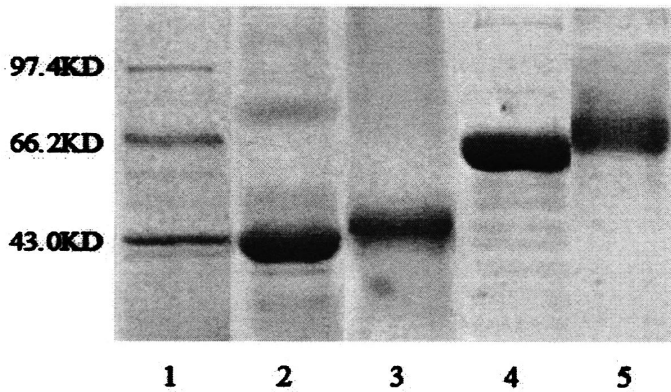


图 2.5 DMP 人工抗原 SDS-PAGE 图谱

1.Marker 2.OVA 3.DMAP-OVA 4.BSA 5.DMAP-BSA

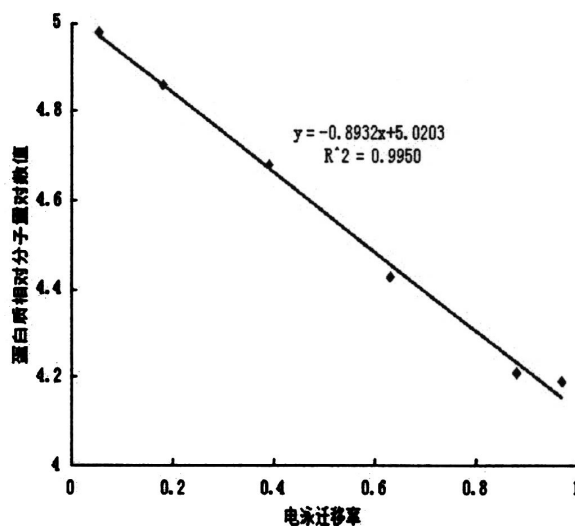




图 2.6 蛋白质相对分子量对数对应的电泳迁移率

由 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果可以看出, 免疫原与包被原与相应载体蛋白电泳条带相比, 有明显的滞后, 进一步证明半抗原与载体蛋白成功偶联。由图 2.6 的标准曲线计算出 DMAP-OVA 的相对分子量为 50.1 kD, DMAP-BSA 的相对分子量为 71.4 kD, 得出 DMAP-OVA 和 DMAP-BSA 中 DMAP 与相应载体蛋白的偶联比分别为 19:1 和 24:1。

2.3.2 方阵滴定确定最适包被浓度和抗血清稀释倍数

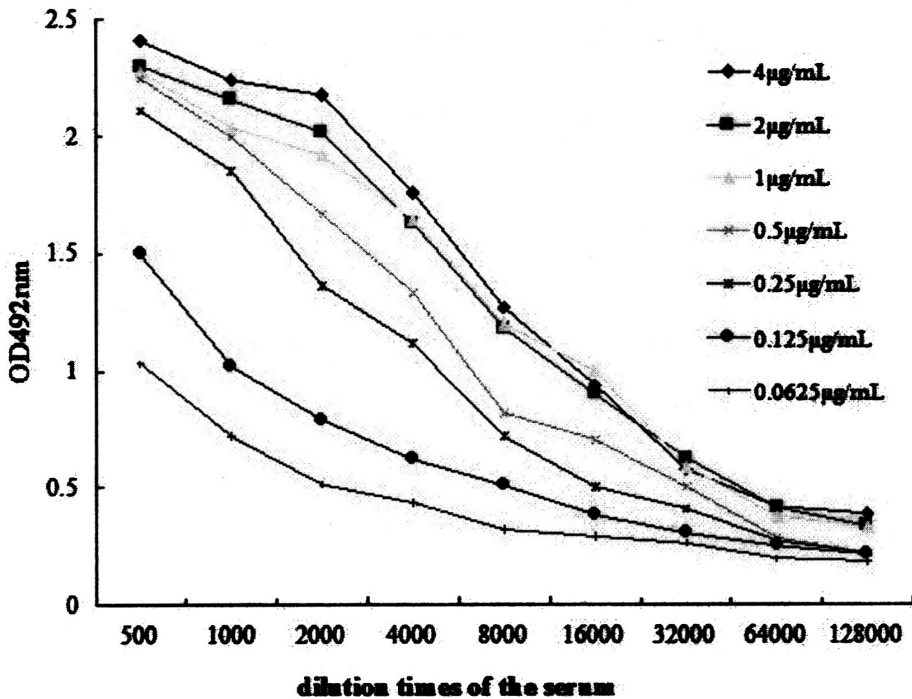


图 2.7 免疫小鼠抗血清方阵滴定结果

如上图所示, 抗原 1 μg/mL 包被, 抗血清稀释 16000 倍时, OD_{492 nm}=1.002; 抗原 0.25 μg/mL 包被, 抗血清稀释 4000 倍时, OD_{492 nm}=1.118; 0.125 μg/mL 包被, 抗血清稀释倍数为 1000 时, OD_{492 nm}=1.022。ELISA 方阵筛选最适包被浓度和抗体稀释度时, 由于酶标仪的灵敏度决定, 一般选取 OD 值在 1.0 附近为最佳条件^[39]。同时, 低的包被浓度对后期分析检测目标物有利, 但是如果太低, 会造成对抗血清的浪费, 并且无法排除抗血清的特异性吸附导致的误差。综合考虑, 选取 1 μg/mL 的抗原浓度作为包被浓度, 抗血清最佳稀释倍数为 16000。



2.3.3 抗血清效价测定结果

表 2.2 免疫小鼠效价测定结果

免疫原	小鼠编号	抗血清效价
DMP-OVA	1	2.56×10^5
DMP-OVA	2	1.28×10^5
DMP-OVA	3	1.28×10^5

经过 5 次免疫后，小鼠效价均达到 10^5 以上，说明人工抗原有效的刺激小鼠产生了免疫应答，获得了高效价的抗血清，满足后续制备抗体的需要。

2.3.4 抗血清灵敏度的测定结果

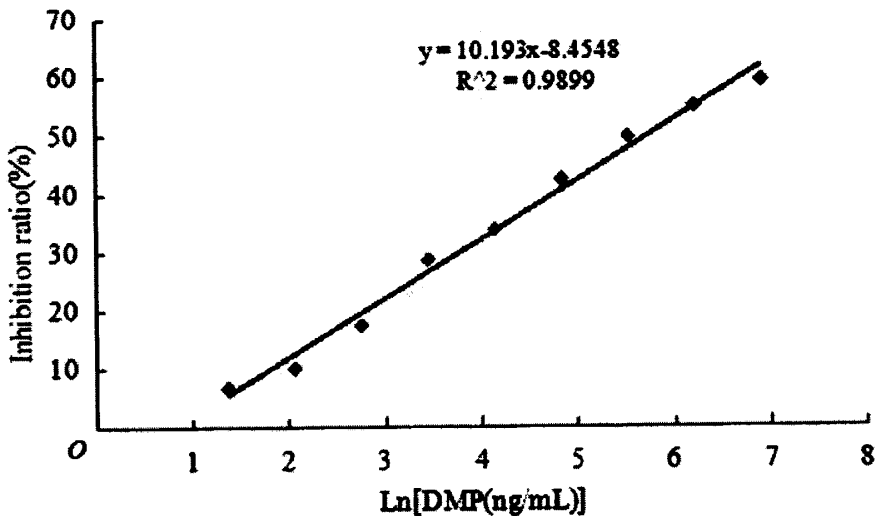


图 2.8 抗血清灵敏度标准曲线

在最佳抗原包被浓度和抗血清稀释度条件下，DMP 间接竞争 ELISA 灵敏度测定如图 2.8，随着 DMP 浓度的增加，结合抗体的包被抗原浓度越小，表明产生的抗体能很好的抑制 DMP， $IC_{50}=311$ ng/mL。

2.4 讨论

2.4.1 人工抗原的制备及免疫原的选择



人工抗原必须具备免疫原性和反应原性，既要能刺激机体产生抗体，又要能与相应的抗体在体外产生免疫反应。具有免疫原性的物质，分子量一般约为 1000 Da 以上，而邻苯二甲酸二甲酯分子量仅为 194.19 Da，仅具有反应原性，必须与相应的载体蛋白连接后才具备免疫原性，这样的小分子物质称为半抗原。小分子半抗原与载体蛋白的偶联效果受偶联物的浓度，缓冲液成分、离子强度等因素影响，通常在温和水溶液中进行，不宜在烈性如高温、强酸等条件下进行。半抗原与载体的偶联方法通常根据携带的活性官能团来决定，分子上含有羧基的半抗原，常采用混合酸酐法和碳二亚胺法合成；含有羟基半抗原的偶联采用琥珀酸酐法和羰基二咪唑法合成；含有氨基的半抗原常采用戊二醛或重氮法与载体偶联，戊二醛是一种双功能团试剂，可以使酶与蛋白质或其他抗原的氨基通过它而偶联，因操作简便而广泛应用。但戊二醛法易造成小分子与小分子之间、载体蛋白与载体蛋白之间的自身交联，专一性比较差。重氮化法用于活性基团是芳香胺基的半抗原与载体蛋白的偶联，芳香胺基与 NaNO_2 和 HCl 反应得到一个重氮盐，该重氮盐可以与蛋白质的羧基结合成偶氮化合物。本研究选用四硝基邻苯二甲酸作为和甲醇反应原料，后期经钯碳还原法将硝基还原为氨基后，采用重氮法成功的在苯环上引入与载体蛋白偶联的活性基团，为人工抗原的制备奠定了基础。

影响人工抗原质量的因素主要有偶联比和偶联桥等。过去人们认为，连接到蛋白质分子上的半抗原数目要尽可能多。但实验证明，过高的偶联比并不能得到预期的结果，这是因为载体上覆盖的半抗原分子过多时，可能不利于载体与淋巴细胞结合，不能引起免疫反应；关于偶联桥的长度，有研究者认为，一定长度的手臂的介入，有助于半抗原的暴露，利于所产生抗体特异性的增强，通常愈远离载体蛋白的基团，其特征反应也将愈明显。但也有一些研究者发现，连接臂结构对免疫检测经常有不利的影响，有时产生的抗体对连接臂亲和力特别强，对待测小分子亲和力却很弱，因此造成对抗体特异性检测的干扰^[40]，一般人工抗原与载体蛋白偶联比在 15~30 之间较好^[41]，本实验中人工抗原的偶联比为 19:1，产生了较好的免疫效果，验证了此结论。

人工抗原的鉴定常用紫外光谱法，如果其紫外吸收峰与载体蛋白和半抗原相比，出现了位移效应，则初步证明合成成功，同时还可以用朗伯-比尔定律计算偶联比^[42]。在 SDS-PAGE 鉴定中，人工抗原相对于载体蛋白条带一般会有所滞后^[41,43]。

合成的人工抗原若用于免疫，则为免疫原，若用于包被反应则为包被原，免疫原与包被原用两种不同的载体，是为了避免抗体对包被原的特异性结合，提高反应的灵敏性。本实验采用重氮法合成了人工抗原 DMAP-OVA 和 DMAP-BSA，以往的



研究表明,以 BSA 为载体的人工抗原被作为免疫原的首选^[44],但本实验室的研究^[45-47]与此结论并不一致,用 BSA 作载体的免疫原能产生高效价的抗体,但是抗体的灵敏度较低,明显低于以 OVA 作载体的免疫原。这说明以何种人工抗原做免疫原是不一定的,这主要取决于半抗原的性质以及人工抗原合成的路径等因素。需要分别进行免疫试验之后才能确定,为后期制备出高效价和高灵敏度的抗体打下基础。

2.4.2 动物免疫对产生抗体特性的影响

影响抗体特性的因素包括个体差异,免疫途径,免疫方案等。在制备抗体的过程中,对 BALB/C 小鼠的免疫效果,将直接影响分泌抗体的特性。一般情况下,免疫初期,B 细胞产生抗体类型为 IgM,随着免疫次数的增加,抗体类型由 IgM 转为 IgG,亲和力也不断增加。免疫过程中还是用了福氏完全和不完全佐剂,这类佐剂在提高抗原作用力方面远高于铝佐剂,是迄今为止使用最多的佐剂,常用于实验室制备高效价的动物抗体。常用的免疫方法有皮下注射、静脉注射、腹腔注射、脾内注射、肌肉注射、淋巴结内注射、后足垫注射等,皮下免疫周期较长,而脾内、静脉、肌肉、淋巴结内免疫操作技术较难掌握,故一般不常采用;后足垫免疫虽然有一定优点,但是实验证明免疫后产生抗血清效价往往较低,不利于后期细胞融合,故也不推荐使用此方法;腹腔免疫对小鼠有一定的伤害,如操作不当易导致小鼠的死亡,但是可用于融合前对小鼠的加强免疫,使脾细胞肿胀,利于融合时的操作;注射抗原时选用皮下注射能够增强抗原的作用力,产生好的免疫。

免疫方案的制定,必须考虑到所制备抗体的用途,本研究目的是为了建立 DMP 残留检测的 ELISA 检测方法,因此要求所产生的抗体必须对小分子有较强的针对性,抗体类型为 IgG 较佳,因此综合考虑,采用了皮下多点注射免疫方法,以 50 ug/mL 剂量间隔 3 周免疫一次,经过四次免疫之后,小鼠抗血清效价均达到 1.28×10^5 以上。证明了长周期、小剂量、多次数的免疫方案^[48]的有效性。

常用的免疫方案^[49,50]是在第一次用福氏完全佐剂免疫后,每隔 2~4 周用福氏不完全佐剂加强免疫,此方法一般三个月之后可以获得高效价的抗体。Hu^[51]等人研究发现,第一次免疫后隔三天重复第一次的免疫,能够在一个月内获得高效价的多抗。本实验也采用了上述免疫方案,经过四次免疫之后,获得了高效价的抗血清,验证了 Hu 等人研究的有效性。

2.4.3 结论

本研究采用自制 DMP 人工抗原免疫 BALB/c 小鼠,经过几次有效免疫后,经



间接竞争 ELISA 试验测定来显示抗体的特异性，即 DMP 分子对抗血清与包被原结合的抑制效果越明显，抗体的特异性越高。结果显示，在一定的范围内，在抗血清中加入 DMP 分子的浓度越高，越能抑制抗血清与 DMP-BSA 的结合，说明所制备的抗血清不仅能够与包被抗原上的 DMP 决定簇发生特异性结合，同时能够与游离的 DMP 分子结合，这表明血清内的抗体能够用于 DMP 残留的检测。本课题的研究仍然在继续，包括对多种样品的检测提高 DMP 的检测灵敏度、及试剂盒的制备等。

2.4.4 后续研究工作

本研究下一步工作是选取高灵敏度高效价的小鼠进行细胞融合、杂交瘤细胞株的建立、单克隆抗体的大量制备，为后期 DMP 残留检测试剂盒的研制做好铺垫。



3. 环境中 DBP 残留检测 ELISA 试剂盒的研制

3.1 实验材料、试剂及仪器

3.1.1 实验材料

杂交瘤细胞，实验室已制备的小鼠骨髓瘤细胞与 SP2/0 细胞的融合细胞。

3.1.2 主要试剂

辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (Jackson)，邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)，DMEM 粉剂、胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco；四甲基联苯胺 (Sigma)，二甲基亚砜 (Merck)，生物素化的羊抗小鼠 IgG (Proteintech Group)，氨苄青霉素、硫酸链霉素 (Amresco)，其它试剂均为国产分析纯。

3.1.3 主要溶液

包被缓冲液：称取 Na_2CO_3 1.59 g， NaHCO_3 2.93 g，配制成 0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液。

磷酸盐缓冲液 (PBS)：称取 NaCl 8 g，KCl 0.1 g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g， $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.29g，用 1L 蒸馏水定容。

封闭液：5%脱脂奶粉，称 5 g 脱脂奶粉用，100 mL PBS 配制。

洗涤缓冲液 (PBST)：含 0.05% Tween-20 的 PBS。

抗体稀释液：含 0.1% BSA 的 PBS。

竞争反应液：含 10%DMF，1.6%NaCl，0.02%KCl 的 0.01mol/L pH6.8 的磷酸盐缓冲液。

底物显色液：邻苯二胺 (OPD)：1 mL (4mg/mL)

0.2 mol/L Na_2HPO_4 ：2.57 mL

0.1 mol/L 柠檬酸：2.43 mL

dH₂O：4 mL

30% H₂O₂：4 μL

终止液：2 mol/L H₂SO₄。

DBP 标准溶液 (1 g/L)：DBP 50 mg，DMF 溶解并定容到 50 mL，4℃保存。

双抗溶液：称氨苄青霉素 0.625 g，硫酸链霉素 1g，溶于 100 mL 0.01mol/L pH7.4 PBS 中，正压抽滤除菌，Ep 管分装后-20℃冻存。



DMEM 培养基: DMEM 粉剂一袋, 加适量超纯水溶解, 用约 2.7 g NaHCO_3 调 pH7.4, 搅拌 4 h 后用超纯水定容至 1 L, 正压抽滤除菌, 4℃ 保存。

细胞冻存液: 9 mL 二甲基亚砷 (DMSO) 与 1 mL FBS 混匀后使用。

饱和硫酸铵溶液: 200 g 硫酸铵用 200 mL dH_2O 加热至完全溶解, 使用前吸用浓氨水调 pH 至 7.6。

醋酸盐缓冲液: 0.06 mol/L pH4.8 醋酸-醋酸钠缓冲液。

中性甘油: 100 mL 灭菌后的甘油中加入 2.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 沸水浴溶解。

3.1.4 实验仪器

倒置显微镜 (Nikon), 全波长酶标仪 (Bio-tek), CO_2 恒温培养箱 (Thermo), 低温冷冻离心机 (Eppendorf 5415R, Beckman)。

3.2 实验方法

3.2.1 单克隆抗体的制备及纯化

(一) 制备饲养细胞

选用 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞^[50], 细胞复苏前 1~2 天制备, 保证制备过程中无污染。

(1) 颈椎脱臼处死 10 周龄空白 BABL/c 小鼠, 75% 酒精浸泡体表消毒 5 min。

(2) 无菌操作, 小鼠腹部朝上固定, 剪开腹部皮肤, 暴露腹膜, 吸取 1~2 mL DMEM 培养基 (20% FBS) 培养基注入小鼠腹腔, 反复抽吸多次。

(3) 收集抽吸所得细胞悬液, 用适量 DMEM 培养基 (20% FBS) 补足至所需量, 100 μL /孔, 铺 4 块 96 孔板。

(4) 显微镜下粗略观察后, 将 96 孔板放入 5% CO_2 37℃ 的细胞培养箱中培养。

(二) 杂交瘤的复苏及克隆化

实验室制备出的能分泌抗 DBP 抗体的杂交瘤细胞, 因在液氮罐冻存, 复苏后部分细胞易转变成阴性细胞, 故不采取复苏后将细胞扩大培养, 选择复苏后立即计数进行有限稀释法克隆化培养。

(1) 从液氮中取出冻存细胞, 立刻 37~40 °C 温水中快速溶解, 尽量在 1 min 内溶解完全。

(2) 将细胞悬液移至离心管, 1000 rpm, 离心 5 min, 弃上清。

(3) 加入 1 mL DMEM 完全培养液, 轻轻吹匀, 取适量细胞悬液进行计数。

(4) 按每个 96 孔板所需 100 个细胞数, 用适量完全培养基悬浮后, 100 μL /孔,



接入已铺好饲养细胞的96孔板，5% CO₂ 37℃的细胞培养箱中培养。

前5天观察细胞是否有污染，污染孔用5 mol/L的NaOH封闭，第七天仔细观察，有杂交瘤细胞的孔进做好位置和数目标记，并补加完全培养基50 μL/孔，第15天左右细胞长至板底的1/10时进行阳性检测。

(三) 杂交瘤细胞的筛选

对杂交瘤细胞进行阳性检测，本实验采用间接ELISA，并用间接竞争ELISA检测阳性孔细胞的灵敏度，检测其分泌的抗体是否能与小分子进行结合的特异性^[52]。

a. 抗体的阳性检测

(1) 包被：用包被缓冲液将包被抗原DBAP-BSA稀释至1 μg/mL，100 μL/孔加入到酶标板中，空白对照孔加等量包被缓冲液，4℃过夜，次日倒出酶标板孔内的液体，拍干，每孔加入200 μL PBST，轻轻摇晃90秒，倒出空内液体，拍干，连续洗涤3次。

(2) 封闭：每孔加入250 μL 封闭液，37℃孵育1 h，倒出孔内液体，拍干。每孔加入PBST 200 μL，轻轻晃动90 s，倒出孔内液体，拍干，连续洗涤3次。

(3) 加DBP单抗：无菌条件下取细胞上清液体，每孔加入20 μL，37℃孵育1 h，倒出孔内液体，拍干，连续洗洗涤3次。

(4) 加酶标二抗：用抗体稀释液1:10000稀释HRP标记羊抗小鼠IgG，100 μL/孔加入酶标孔内，37℃孵育1 h，拍干，连续洗涤3次。

(5) 加底物显色液：取新鲜配置的底物显色液，每孔加100 μL加入酶标孔内，室温避光20 min，反应充分。

(6) 终止：每孔加50 μL 终止液终止反应。

(7) 结果：用酶标仪测定492 nm处的OD值，即吸光值大于1.0时的细胞孔判定为阳性，并测定其灵敏度。

b. 抗体灵敏度的检测

(1) 包被：用包被缓冲液将包被抗原DBAP-BSA稀释至1 μg/mL，100 μL/孔包被到酶标板中，空白对照孔加等量包被缓冲液，4℃过夜，倒出酶标板孔内的液体，拍干，每孔加入200 μL 洗涤液，轻轻摇晃90 s，拍干，继续洗板两次。

(2) 封闭：每孔加入250 μL 封闭液，37℃孵育1 h，倒出孔内液体，拍干。每孔加入PBST 200 μL，轻轻晃动90 s，倒出孔内液体，拍干，连续洗涤3次。

(3) 竞争反应：用抗体稀释液将DBP标准溶液稀释至1 μg/mL，20 μL/孔加入到96孔板中，然后向每孔加入20 μL细胞上清，充分混匀。阳性对照孔加20 μL抗体稀释液和20 μL细胞上清，37℃孵育1 h，拍干，连续洗涤3次。



(4) 加酶标二抗: 用抗体稀释液 1: 10000 稀释 HRP 标记羊抗小鼠 IgG, 100 μ L/孔加入酶标孔内, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(5) 加底物显色液: 取新鲜配置的底物显色液, 每孔加 100 μ L 加入酶标孔内, 室温避光 20 min, 反应充分。

(6) 终止: 每孔加 50 μ L 终止液终止反应。

(7) 结果: 用酶标仪测定 492 nm 处的 OD 值。

以 DBP 浓度的自然对数值为横坐标, 抑制率为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归分析, 计算产生 50%抑制的 DBP 浓度 IC_{50} 。 IC_{50} 值越低, 灵敏度越高。抑制率按公式 3.1^[38]计算。

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \quad \text{公式 3.1}$$

其中, OD_{\max} 表示阳性孔的吸光值, OD_{\min} 表示空白对照孔的吸光值, OD_x 为含有 x ng/mL 浓度 DBP 的竞争孔的吸光值。根据所测得 OD 值, 选取阳性值较高且抑制效果最好的孔继续进行克隆化, 每次克隆化后都同上进行阳性和灵敏度的检测, 直至克隆化后, 所有孔均判定为高阳性高灵敏度为止。

(四) 单克隆抗体的大量制备

经 3 次克隆化之后, 杂交瘤细胞株特性基本稳定, 阳性率达到 100%且都能对 DBP 产生很好的抑制效果, 选取抑制效果最好的阳性孔细胞进行扩大培养, 单克隆抗体的大量制备一般常采用小鼠体内诱生腹水法^[50]。

(1) 选取 10 周龄 BALB/c 小鼠, 为抑制巨噬细胞的生长, 腹腔注射 0.5 mL 液体石蜡。

(2) 14 天后, 选取生长状态良好的杂交瘤细胞两瓶, 将其从瓶壁吹下, 1000 rpm, 离心 5 min, 收集细胞, 用 0.01 mol/L 的 PBS 悬浮后计数。

(3) 取约 2×10^6 个细胞注入被打过石蜡的小鼠的腹腔。10 天后, 小鼠体内细胞大量增殖, 腹部胀大, 脱颈处死后无菌收集腹水。

(4) 收集的腹水 1500 rpm 离心 15 min, 取中层淡黄色液体, 即为腹水, 弃脂肪层及其他沉淀物。

(五) 单克隆抗体的纯化

采用二氧化硅吸附法处理腹水, 以除去细胞残渣及小颗粒物质, 之后用辛酸-硫酸铵沉淀法^[53]纯化腹水, 纯化的原理是根据蛋白质的亲水性和形成水化膜的程度, 改变条件, 是蛋白质析出, 得到纯净的抗体。



(1) 取一定量的腹水, 用 PBS 稀释, 再加入适量二氧化硅粉末吸附掉脂肪等杂质, 30 min 后, 2500 rpm 离心 20 min, 取上清即得到澄清腹水。

(2) 取 4 mL 腹水, 加入适量醋酸盐缓冲液, 混合后加正辛酸, 室温搅拌使辛酸与杂蛋白充分结合, 30 min 后 4℃ 静置 2 h。

(3) 收集腹水溶液, 4℃, 11000 rpm 离心 30min, 取上清, 调 pH 至 7.4。

(4) 向上清液中加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 边搅拌边加, 此时即为 50% 饱和度的硫酸铵, 搅拌 30 min, 4℃ 静置 2 h。

(5) 收集悬液, 4℃, 11000 rpm 离心 30 min, 弃上清, 溶于适量 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 中。

(6) 边搅拌边向悬液中加入适量饱和硫酸铵溶液, 使其饱和度为 30~40%, 缓慢搅拌 30 min, 4℃ 静置 2 h。

(7) 收集悬液 4℃, 12000 g 离心 30 min, 取沉淀溶于 pH7.4 PBS 中。

(8) 沉淀悬液装入透析袋, 4℃ 透析 48 h, 每 8 h 换一次液。

(9) Folin-酚法测定抗体的浓度, 纯化后的抗体用 PBS 适当稀释并加入一定浓度的 BSA 作抗体稳定剂, 与等体积中性甘油混匀, 于 -20℃ 长期保存。

3.2.2 ELISA 检测条件的优化

酶联免疫测定法(ELISA)是基于抗原抗体特异性吸附和酶反应结合一种免疫分析法^[54]。反应体系中包被抗原浓度、抗体稀释倍数、封闭剂的选择、反应温度、竞争反应液的离子强度、显色体系的选择等都会对实验结果产生影响, 因此本实验在原有优化条件的基础上, 采用单变量法又对一些条件进行了优化, 以确保抗体达到最高的灵敏度。

(一) 最适包被抗原浓度和抗体最佳工作浓度的确定

采用方阵法^[36]来确定最适包被抗原浓度和抗体最佳工作浓度。

(1) 包被: 用包被缓冲液将包被抗原 DBAP-BSA 从 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2 倍数梯度稀释至 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板中, 空白对照孔加等量的包被缓冲液, 4℃ 过夜。次日倒出酶标板孔内的液体, 拍干, 每孔加入 200 μL 洗涤液, 轻轻摇晃 90 s, 拍干, 继续洗板两次。

(2) 封闭: 每孔加入封闭液 250 μL , 37℃ 孵育 1 h, 倒出孔内液体, 拍干。每孔加入 PBST 200 μL , 轻轻晃动 90 s, 倒出孔内液体, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(3) 加 DBP 单抗: 用抗体稀释液将 DBP 单抗从 1: 1000 开始 2 倍梯度稀释到 1: 32000, 每孔加 100 μL 。37℃ 孵育 1 h, 倒出孔内液体, 拍干, 连续洗涤 3 次。

(4) 后续步骤加酶标二抗、显色、终止及结果测定同抗体阳性检测 (4)~(7)。



选择吸光值接近 1.0 的包被抗原浓度和单抗稀释倍数的所有组合，经间接竞争 ELISA 再次筛选，比较各个组合 IC_{50} 值，选取 IC_{50} 值最小所对应的包被抗原浓度和单抗稀释度作为最适包被抗原浓度和单抗的最佳工作浓度。

(二) 封闭剂的选择

在用 1%OVA, 1%BSA, 5%SMP 三种不同封闭剂条件下，通过间接竞争 ELISA，计算各条件下的 IC_{50} 值，选取 IC_{50} 值最低时所对应封闭剂为最优封闭剂。

(三) 竞争反应体系中抗体稳定剂浓度的选择

在实验室已经优化过的竞争反应体系 (10% DMF, 0.02% KCl, 1.6% NaCl, 0.01 mol/L pH 6.8 的 PBS) 基础上，比较体系中抗体稳定剂 BSA 含量对检测结果的影响。即其他条件一致，竞争反应液中 BSA 含量分别调整为 1%和 0.1%，比较两者检测灵敏度。

(四) 竞争反应时间的选择

在原来 25 °C 竞争反应 1.5 h 条件下，进一步延长反应竞争反应时间至 2 h，验证反应时间的加长对检测灵敏度的影响，选择 IC_{50} 值低的时间为最佳竞争反应时间，进行后续条件优化。

(五) 二抗反应温度的选择

二抗反应温度设置为 25 °C 和 37 °C，作用 1 h，比较间接竞争 ELISA 实验所得 IC_{50} 值， IC_{50} 值低的反应温度为最佳反应温度进行后续实验。

(六) 常规 ELISA 与 BA-ELISA 的比较

BA-ELISA 是用生物素化的抗体替代了常规 ELISA 的酶标记的抗体，包被，封闭，加一抗步骤均与常规 ELISA 相同。加二抗时，将生物素标记的羊抗小鼠 IgG 用抗体稀释液 1:10000 稀释，100 μ L 每孔，37 °C 孵育 1 h，用 PBST 洗板 5 次。再将过氧化物酶标记的亲合素用抗体稀释液 1:800 稀释，每孔加 100 μ L，37 °C 孵育 30 min，用 PBST 洗涤 7 次，充分洗掉非特异性结合物质。向反应孔加入新鲜配制的 TMB 显色液 150 μ L，室温避光显色 20 min，酶标仪检测 450 nm 处的吸光值。

(七) 显色体系的选择

ELISA 实验中显色步骤对结果的判定至关重要，可作为 HRP 供氢体系的主要有邻苯二胺和四甲基联苯胺等^[55-57]。本实验选用常用的 OPD 和 TMB 两种显色体系，对其实验结果进行比较，选择最适合的底物显色液。

3.2.3 人工抗原包被的间接竞争 ELISA 标准曲线的建立

依据 3.2.2 所优化的最佳反应条件，进行间接竞争 ELISA 测定，以 DBP 浓度的为横坐标，以相应的吸光值为纵坐标，进行回归分析并绘制标准曲线，计算该标准



曲线对 DBP 的线性检测范围 ($IC_{20} \sim IC_{80}$) 和最低检测下限 (IC_{10}) [58]。

3.3 实验结果

3.3.1 杂交瘤细胞的克隆化筛选

杂交瘤复苏后经有限稀释法克隆化培养一次后,采用间接竞争 ELISA 实验,选取被 DBP 很好抑制且阳性最强的孔继续进行克隆化。经过 3 次克隆化之后,最终获得了能稳定分泌高特异性抗 DBP 的杂交瘤细胞株,用来进行单克隆抗体的大量制备。

表 3.1 克隆化筛选杂交瘤细胞株结果

克隆次数	阳性孔 (%)	抑制孔 (%)
1	87.5%	30.3%
2	95.6%	47.2%
3	100%	98.4%

3.3.2 单克隆抗体的制备及纯化

将筛选得到的杂交瘤细胞株扩大培养后,小鼠腹水法得到了一定量的抗体,并用 Folin-酚法测定相应蛋白量,标准曲线如图 3.1,根据计算结果得,纯化前抗体浓度为 11.6 mg/mL,经辛酸-硫酸铵法纯化后,浓度为 1.43 mg/mL,蛋白总量为 7.2 mg,稀释至 1mg/mL 左右分装保存。

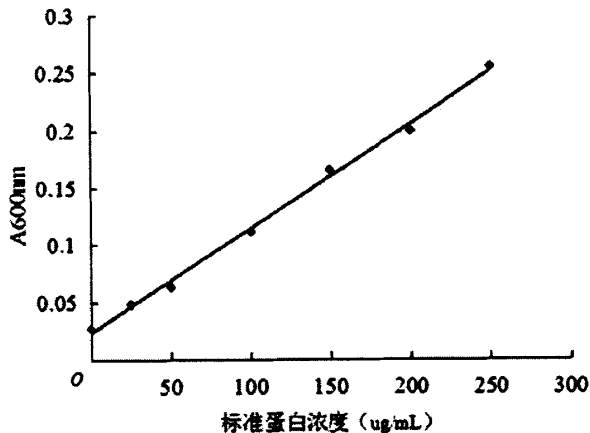


图 3.1 蛋白测定标准曲线



3.3.3 间接竞争 ELISA 条件的优化

(一) 最适包被抗原稀释度和抗体最佳工作浓度的确定

表 3.2 方阵滴定

抗体稀释倍数	1000×	2000×	4000×	8000×	16000×	32000×
抗原包被浓度						
1 μg/mL	2.165	1.771	1.534	1.025	0.651	0.343
0.5 μg/mL	1.657	1.401	1.026	0.722	0.493	0.242
0.25 μg/mL	1.355	1.164	0.819	0.509	0.267	0.159
0.625 μg/mL	0.982	0.743	0.495	0.311	0.163	0.103

根据方阵滴定结果，包被抗原浓度为 1 μg/mL，0.5 μg/mL，0.25 μg/mL，对应抗体稀释度为 8000×，4000×，2000×时，OD_{492 nm} 分别为 1.025，1.026，1.164。考虑到抗原浓度为 1 μg/mL 不利于 DBP 竞争结合抗体，且造成抗原的浪费；而抗体稀释倍数较大时，所有的 DBP 都与抗体结合难以判断参加竞争反应的 DBP 浓度，抗体稀释倍数过低时，参与竞争反应的 DBP 浓度较低，影响检测的灵敏度，综合考虑，选择抗原浓度为 0.5 μg/mL，单抗稀释倍数为 4000×为最佳包被浓度和抗体工作浓度。

(二) 封闭剂的选择

如图，不同封闭剂条件下，所显示检测信号的强度和灵敏度有一定差异，与 5% SMP 相比，1% BSA 和 1% OVA 能显著提高检测信号，但是灵敏度有所降低，因此选用 5% SMP 作为最佳封闭剂进行后续实验。

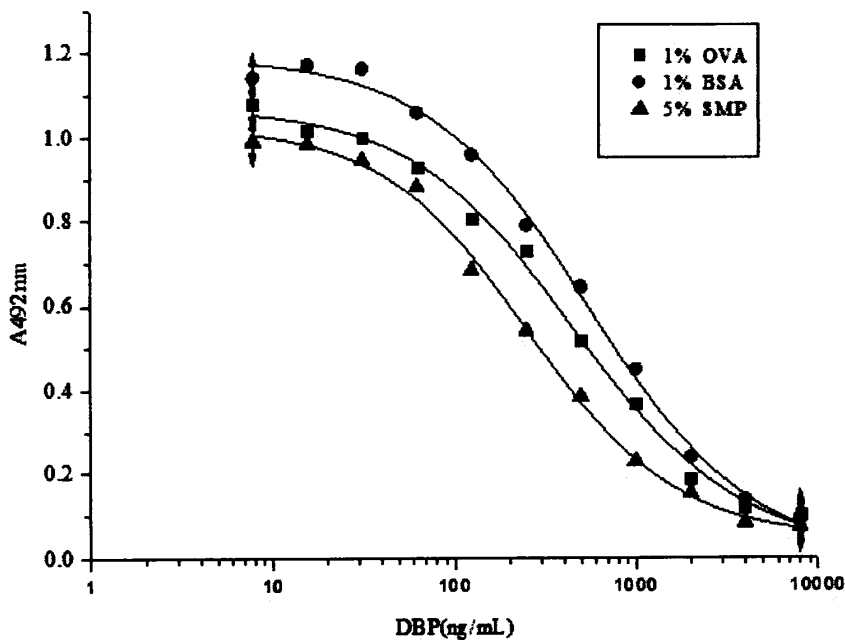


图 3.2 三种不同封闭剂检测灵敏度的比较

(三) 竞争反应体系中抗体稳定剂浓度的选择

如图，竞争反应体系中抗体稳定剂 BSA 浓度较高时，能够增加检测信号，但是检测灵敏度降低，且 BSA 浓度为 1%，造成对药品的浪费，综合考虑选用 0.1% 为最佳浓度进行后续检验。

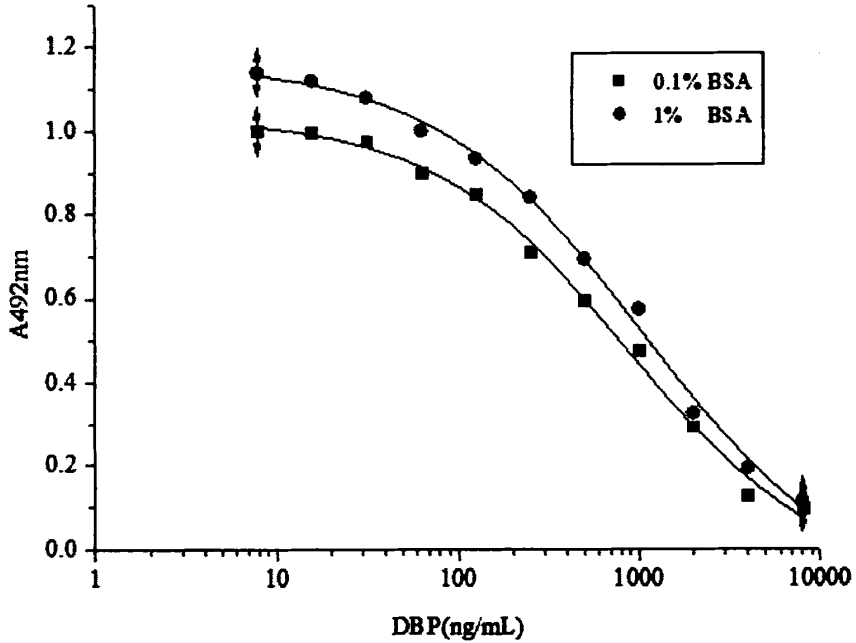


图 3.3 不同浓度抗体稳定剂检测结果比较

(四) DBP 单抗竞争反应时间的选择

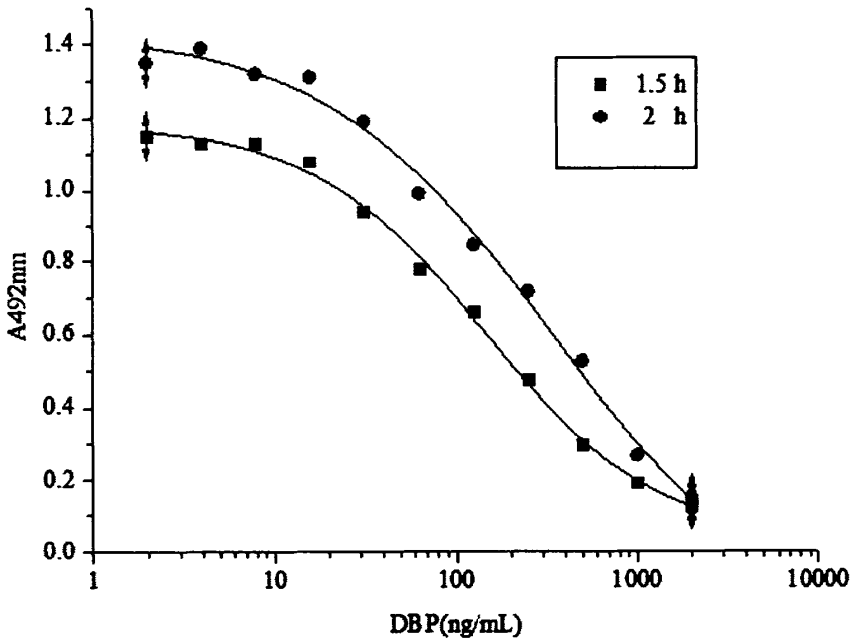


图 3.4 最佳竞争反应时间的筛选



实验结果表明，延长竞争反应时间为 2 h，虽然检测信号略有提高，但是检测灵敏度却不及 1.5 h 的效果，因此仍采用 1.5 h 为最佳竞争反应时间。

(五) 二抗反应温度的选择

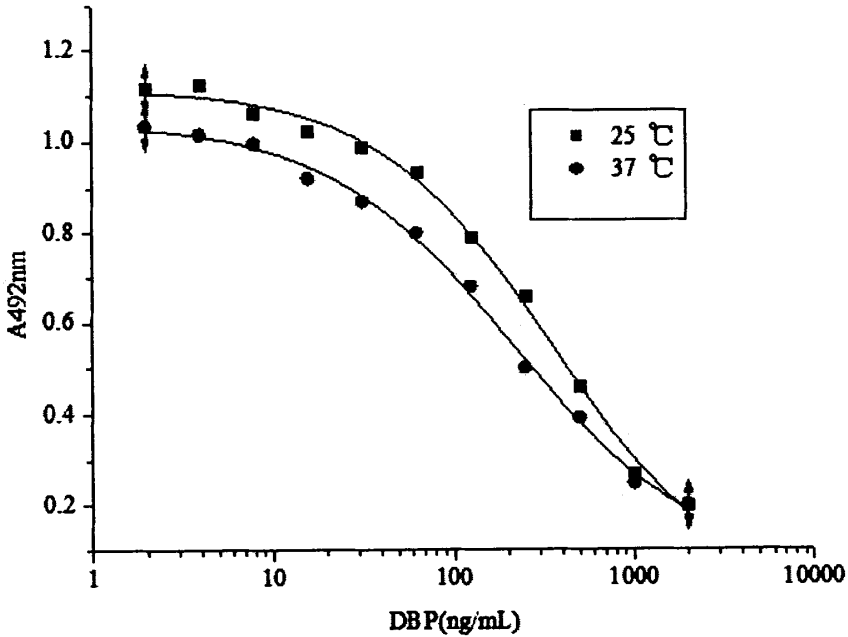


图 3.5 二抗反应温度的优化

二抗孵育温度为 37 °C 和 25 °C 时，检测信号和灵敏度差异不大，25 °C 检测信号有所提高，但是灵敏度不及 37 °C 时高，因此二抗最佳反应温度为 37 °C。

(六) 常规 ELISA 与 BA-ELISA

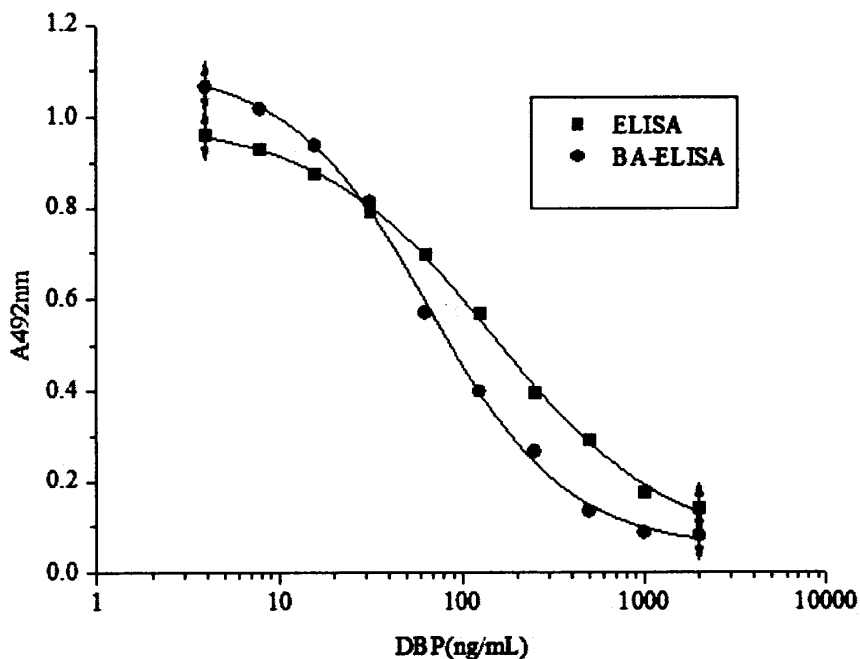


图 3.6 常规 ELISA 与 BA-ELISA 比较

由结果可知，与常规酶联免疫吸附试验相比，生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法由于生物素和亲和素之间多级放大效应，显著提高了检测信号，免疫分析的特异性有较大提高。最终选择 BA-ELISA 进行后续实验。

(七) 显色体系的选择

比较 OPD 和 TMB 两种显色剂的效果，TMB 系统 OD 值明显高于 OPD 系统，检测信号提高， IC_{50} 值也高于 OPD 系统，故选择 OPD 显色体系为最终检测用体系。

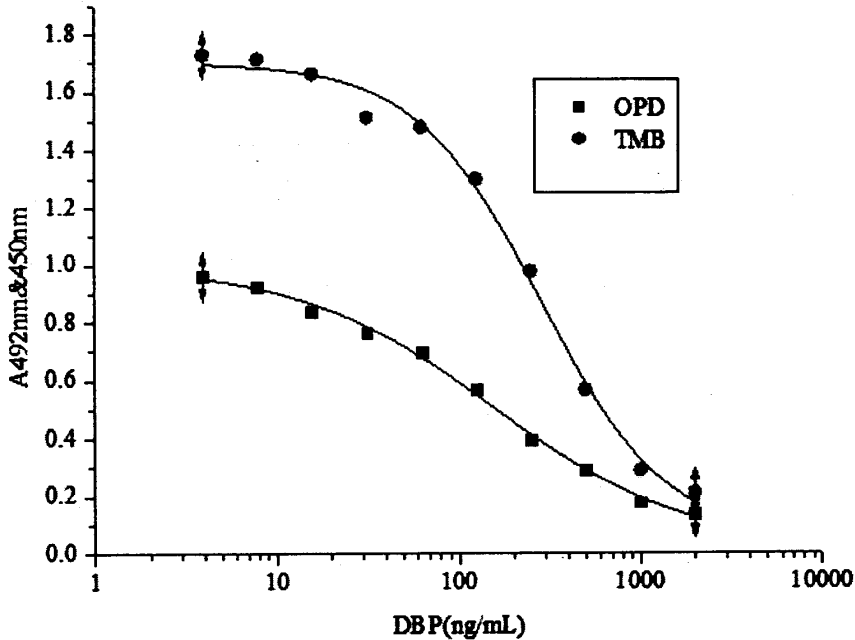


图 3.7 OPD 与 TMB 显色体系的比较

3.3.4 人工抗原包被的间接竞争 ELISA 标准曲线的建立

综合上述，人工抗原包被间接竞争 ELISA 检测 DBP 的步骤如下：

(1) 包被：人工抗原 DBAP-BSA 用包被缓冲液稀释至 $0.5 \mu\text{g/mL}$ ， $100 \mu\text{L}$ /孔包被，空白孔用等量的包被缓冲液替代， $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。次日倒出液体，拍干后，加 $200 \mu\text{L}$ PBST，轻轻摇动 90 s ，倒出液体，拍干，共洗涤三次。

(2) 封闭：每孔加 $250 \mu\text{L}$ 5% SMP， $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 封闭 1 h 。倒出液体，拍干后，加 $200 \mu\text{L}$ PBST，轻轻摇动 90 s ，倒出液体，拍干，共洗涤三次。

(3) 竞争：将 DBP 用竞争反应液（含有 10% DMF，0.1% BSA，1.6% NaCl，0.01% KCl 的 0.01 mol/L 的 PBS）从 $2000 \mu\text{g/mL}$ 梯度稀释到 $3.9 \mu\text{g/mL}$ ， $50 \mu\text{L}$ 每孔，然后每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 二倍最佳工作浓度的抗体，阳性孔加 $50 \mu\text{L}$ 竞争反应液和 $50 \mu\text{L}$ 二倍最佳工作浓度的抗体， $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 竞争反应 1.5 h 。倒出液体，拍干后，加 $200 \mu\text{L}$ PBST，轻轻摇动 90 s ，倒出液体，拍干，共洗涤三次。

(4) 加二抗：将生物素化的羊抗小鼠 IgG 用抗体稀释液 1:10000 稀释， $100 \mu\text{L}$ /孔加入酶标板， $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h 。倒出液体，拍干后，加 $200 \mu\text{L}$ PBST，轻轻摇动 90 s ，倒出液体，拍干，共洗涤三次。



(5) 加亲和素：用抗体稀释液将过氧化物酶标记的亲和素 1:800 稀释后，100 μL /孔加入酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。倒出液体，拍干后，加 200 μL PBST，轻轻摇动 90s，倒出液体，拍干，共洗涤三次。

(6) 显色：新鲜配制的 OPD 显色液，100 μL /孔加入酶标板，室温避光 20min，使显色充分。

(7) 终止：每孔加 50 μL 终止液终止反应。

(8) 结果：用酶标仪测定 492nm 处的 OD 值判定结果。

以 OD_{492 nm} 为纵坐标，DBP 浓度的为横坐标，进行逻辑斯底回归分析，如图 3.8，曲线回归方程 $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$ ，其中 $A = 1.11$ ， $B = 0.9$ ， $C = 191$ ， $D = -0.05$ ， $R^2 = 0.9952$ ，DBP 浓度在 13 ng/mL~1000 ng/mL ($IC_{20} \sim IC_{80}$) 范围内时，DBP 浓度和吸光值之间相关性良好，最低检测下限为 6.25 ng/mL。

3.3.5 环境样品中 DBP 残留检测试剂盒原理及检测步骤

原理：本试剂盒采用间接竞争 ELISA，在酶标板上预包被上 DBAP-BSA，加入 DBP 标准品或样品，再加入 DBP 单抗，DBP 标准品或样品与 DBAP-BSA 竞争结合抗体，再加入酶标记的二抗，用 OPD 底物显色，样本吸光值与 DBP 含量成负相关，通过标准曲线换算出相应的值，即可得出样品中 DBP 的残留量。

操作步骤：

一、标准曲线的制作

- 1、将所需试剂从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏环境中取出，液体试剂使用前均须摇匀。
- 2、取出需要数量的酶标板，将试剂 2 用试剂 2 稀释液稀释 2000 倍，100 μL /孔包被酶标板，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。
- 3、酶标板用试剂 3 洗涤 3 次，每孔加入 250 μL 试剂 4，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。
- 4、酶标板用试剂 3 洗涤 3 次，试剂 1 用试剂 1 稀释液稀释为从 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共 11 个不同浓度，试剂 5 用试剂 1 稀释液稀释 4000 倍。
- 5、每孔加入不同浓度的稀释后的试剂 1 各 50 μL ，再加入稀释后的试剂 5 各 50 μL ，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h。
- 6、酶标板用试剂 3 洗涤 3 次，加入 100 μL 试剂 6（用试剂 6 稀释液稀释 10000 倍），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。
- 9、酶标板用试剂 3 洗涤 3 次，加入 100 μL 试剂 7（用试剂 6 稀释液稀释 1000 倍），100 μL /孔加入酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- 10、酶标板用试剂 3 洗涤 3 次，每孔加入 100 μL 试剂 8，室温避光 20 min。
- 11、每孔加入 50 μL 试剂 9，用酶标仪测定 492 nm 处的吸光值。



以 OD492 nm 为纵坐标, DBP 浓度的为横坐标, 进行逻辑斯底回归分析, 根据曲线回归方程计算样本中 DBP 的浓度。

二、样品测定

样品取代试剂 1, 操作步骤与标准曲线操作步骤相同。

三、样品中 DBP 浓度计算

参照步骤 1 做出的标准曲线, 如图 3.8, 曲线回归方程 $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$, 其中 $A = 1.11$, $B = 0.9$, $C = 191$, $D = -0.05$, $R^2 = 0.9952$, 将测得的 OD 值代入方程, 计算出相应的 DBP 浓度。

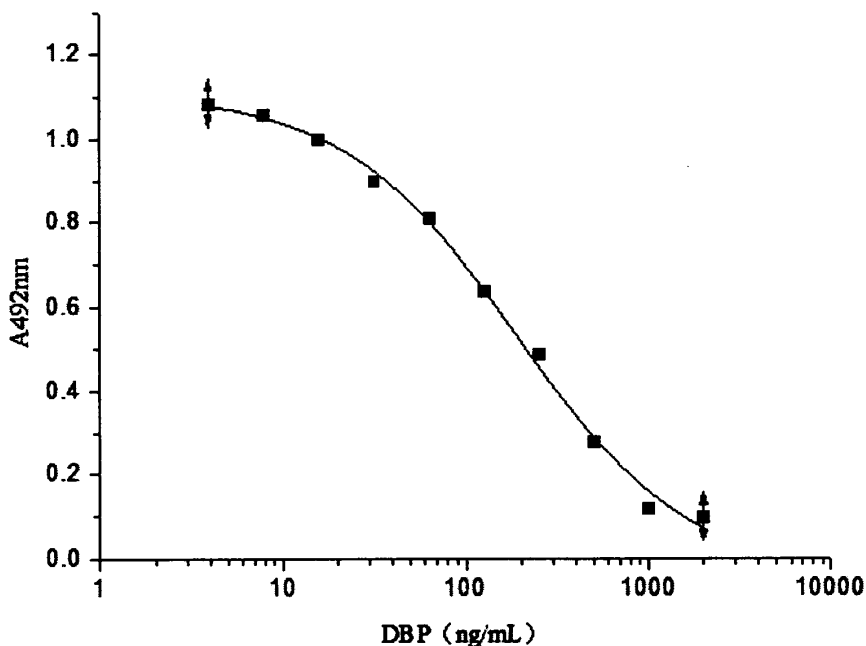


图 3.8 DBP 检测间接竞争 ELISA 标准曲线



3.4 讨论

3.4.1 细胞的冻存与复苏

及时冻存已筛选过的杂交瘤细胞株是抗体制备过程中非常重要的一环，一方面，可以避免某些阳性杂交瘤细胞株的丢失，另一方面，可以避免停电、培养条件改变、污染等带来的损失。

细胞冻存时要以一定梯度降低温度，先存放至-20℃，再放至-70℃，最后在-196℃长期保存，冻存液中 DMSO 浓度一般在 5%~10%^[59]。血清浓度 DMSO 浓度在各实验室略有不同，本实验室采用血清：DMSO 比例为 9：1，细胞复苏后活力较好。细胞复苏时应注意快速溶解，从液氮罐中取出冻存管后，迅速置于在 37℃ 水中，轻轻摇晃 1 min 内溶解完全，1000 rpm 离心 5 min，无菌操作，移入培养瓶。

3.4.2 杂交瘤细胞的筛选

对杂交瘤细胞的筛选，一般要进行 3~5 次克隆化，每次克隆化之前，将小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞进行铺板，同时设计好细胞的稀释梯度，尽量使每个孔只有一株细胞，稀释度过小可能得不到单克隆的细胞团，稀释度过大可能会导致细胞阳性的丢失。

抗体阳性检测的方法有很多，如间接 ELISA，夹心 ELISA 等，通常根据现实条件条件决定检测方法，但是杂交瘤细胞检测必须快速、简便、灵敏，以便对杂交瘤细胞取的取舍之后再次克隆或扩大培养^[60]。本实验室采用间接 ELISA 进行阳性检测和灵敏度的检测，很好的满足了实验要求。另外，每次对细胞株进行检测时，要等至细胞长至整个视野的 1/10 左右，若细胞长得太少，检测阳性值均低，不能进行取舍；若细胞长的太满，又会导致阳性的丢失，因为细胞在生长过程中，集落中间的细胞不断进行分裂，直至中间多数细胞因密度过大而死亡，造成二次检测时呈现阴性的现象。在本实验中，细胞长至整个视野的 1/10 左右，记录每孔的集落数，进行阳性和灵敏度检测后，吹散细胞继续进行克隆化和筛选工作，直至阳性和灵敏度均达到要求后，对细胞进行扩大培养。

3.4.3 间接竞争 ELISA 注意事项

在 ELISA 反应体系中，抗原浓度、抗体浓度、pH 值、温度、酶标记物浓度等至关重要，但实验操作中其他细节也不可忽略，只有在最佳条件下，才能测得好的标准曲线。首先，每次实验要使用同一厂家同一批次的酶标板，因为 ELISA 检测是



建立在物理吸附作用基础上的，现在使用的酶标板多为聚乙烯或聚苯乙烯材料，不同厂家不同批次之间的差异较大。其次，试验用试剂最好现用现配，放置时间不宜过长，因为试剂会随时间延长而降低，影响检测质量。在 ELISA 洗板过程中，确保每次洗涤时间达到 90 s，将未结合上的物质充分洗掉，防止影响显色反应。最后 ELISA 间接竞争标准曲线的建立，要通过多次重复实验确定，确保实验的可重复性、准确性和精确性。

3.4.4 酶联免疫技术的改进—BA-ELISA

为了提高检测的灵敏度，在常规 ELISA 基础上，还开展了 ELISA 与其他技术结合的新方法，例如捕获法测 IgM 抗体，双位点一步法，亲和素-生物素-ELISA 法，酶联免疫化学发光测量法^[58,61,62]，酶联免疫荧光测量法^[63-70]，同时也建立了几种放大系统，如碱性磷酸酶放大系统，生物素亲和素放大系统等^[71-76]，大大提高了检测的敏感性，其中生物素-亲和素系统是目前较为广泛使用的一种。BA-ELISA 是结合生物素和亲和素之间的高度放大作用而建立的一种检测系统。亲和素是一种碱性糖蛋白，分子量为 68 kDa，由四个亚单位组成，对生物素有非常高的亲和力，生物素容易与蛋白质如抗原抗体等共价结合，这样结合了酶的亲和素分子和结合有抗体的生物素分子之间发生反应，既起到了多级放大作用，又能在遇到相应底物时产生显色反应，达到检测未知样品分子的目的。

在 BA-ELISA 操作中要注意，控制好反应物的浓度，本法灵敏度高，因此生物素标记抗体的浓度更应该严格控制。生物素标记的抗体稳定性比酶标记的好，加入等量的甘油后可以保存两年，切记反复冻融，影响其活性。另外，要把握好反应的时间和温度，由于生物素和亲和素的高亲和力，二者标记物的反应时间应该较抗原抗体反应时间短，为了减少非特异性吸附，反应时间不宜过长，一般 37 °C 反应 30 min 为宜。生物素-亲和素系统与酶联免疫方法的结合，是以提高检测灵敏度为目标的，经验证，该方法灵敏度高，操作简便，在 ELISA 领域将有着广阔的应用前景。

3.4.5 ELISA 显色反应

显色反应是 ELISA 检测的最后一个步骤，即酶催化物色的底物产生有色产物的过程。酶标记反应物的好坏直接影响着实验结果，因此被认为是最关键的试剂。常用的酶有辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AP)、葡萄糖氧化酶、脲酶等。良好的酶标记需要能够对底物产生高催化率，酶催化底物产生的有色信号方便测定，重复性和敏感度好。免疫技术常见酶及其底物见表 3.3。



表 3.3 免疫技术常用酶及相应底物

酶	底物	显色	测定波长 (nm)
辣根过氧化物酶	邻苯二胺	橘红色	492
	四甲基联苯胺	黄色	450
	氨基水杨酸	棕色	449
	邻联苯甲胺	蓝色	425
碱性磷酸酶	4-硝基酚磷酸盐	黄色	400
	萘酚-AS-Mx 磷酸盐+重氮盐	红色	500
葡萄糖氧化酶	ABTS+HRP+葡萄糖	黄色	405, 420
	葡萄糖+甲硫酚嗪+噻唑蓝	深蓝色	405, 420

在用 ELISA 进行定性测定时, 显色反应温度和时间不需要严格控制, 可根据显色情况自行调整显色反应的时间; 在进行定量测定时, 要严格控制显色时间和温度, 以确保实验结果的可靠性和可重复性。

OPD 和 TMB 是 ELISA 领域较广泛应用的两种显色剂, OPD 底物见光敏感, 会自行变色, 显色反应需要避光进行, 一般在室温或 37 °C 反应 15~30 min 后显色稳定, 继续延长反应时间只是增加了本底显色。反应结束后用硫酸终止, 颜色由橙黄色变为橘红色, 测定 492 nm 处的 OD 值进行结果判定。TMB 受光的影响不大, 显色一般在室温进行, 37 °C 反应 15 min, 用硫酸终止后颜色由蓝变黄, 测定 450 nm 处吸光值即可。本实验比较了两种显色系统在间接竞争 ELISA 测定中的灵敏度, 虽然 TMB 无毒, 稳定性高, 而 OPD 具有易挥发和致突变特性^[77], 结果显示 TMB 系统显著提高了检测信号, 但是灵敏度却不及 OPD 系统高。



参考文献

- [1] Koch H M, Bolt H M, Preuss R, et al. New metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP [J]. *Archives of Toxicology*, 2005, 79:367-376.
- [2] Silva M J, Barr DB, Reidy JA, et al. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites [J]. *Archives of Toxicology*, 2003,77:561-567.
- [3] Albro PW, Moore B. Identification of Metabolites of Simple Phthalate Diesters in Rat Urine [J]. *Journal of Chromatography*, 1974, 94:209-218.
- [4] 俞晓雪. 增塑剂市场分析[J]. *精细石油化工进展*, 2002,3 (7): 24-27.
- [5] 陶缸, 梁诚, 国内外增塑剂市场分析与发展趋势[J]. *塑料科技*, 2008, 36(6):78-81.
- [6] 王伟, 魏光辉, 邓永继, 等. 邻苯二甲酸二(-2-乙基)己酯致小鼠隐睾丸和附睾的组织病理学改变 [J]. *中华男科科学杂志*, 2004, 10 (11): 807-810, 814.
- [7] 靳秋梅. 邻苯二甲酸酯类化合物的生殖发育毒性[J]. *天津医科大学学报*, 2004,10:15-18.
- [8] William M. Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. *Environmental Health Perspectives*, 1982, 45:3-10.
- [9] Larsen S T, Hansen E K, et al. Airway inflammation and adjuvant effect after repeated airborne exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and ovalbumin in BALB/c mice. [J]. *Toxicology*, 2007, 235: 119-129.
- [10] Larsen S T, Lund R M, Nielsen G D, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate possesses an adjuvant effect in a subcutaneous injection model with BALB/c mice [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 125:11-18.
- [11] Yang G, Qiao Y, Li B, et al. Adjuvant effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate on asthma-like pathological changes in ovalbumin-immunised rats [J]. *Food Agr Immunol*, 2008, 19:351-362.
- [12] Foster P M, Gray E, Leffers H, et al. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters [J]. *Int J Androl*, 2006, 29:140-147.
- [13] Hoppin J A, Ulemer R, London S J. Phthalate exposure and pulmonary function [J]. *Environ Health Persp*, 2004, 112:571-574.
- [14] Stahlhut R W, van Wijngaarden E, Dye T D, et al. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult US males [J]. *Environ Health Persp*, 2007, 115:876-882.



- [15] Meeker J D, Calafat A M, Hauser R. Di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men [J]. *Environ Health Persp*, 2007, 115: 1029-1034.
- [16] United States Environmental Protection Agency. Fate of priority pollutants in publicly owned treatment works final report. EPA440/1-82/303.
- [17] Jonsson S, Ledin A, Mersiosky I. M ono-and diesters from different European Landfills. *Water Research*, 2003, 37:6-9-617.
- [18] 中国环境优先监测研究课题组. 环境优先污染物. 北京: 中国科学出版社.
- [19] 李海燕, 施银桃, 曾庆福. 胶束电动毛细管电色谱分离测定水中邻苯二甲酸酯. *工业水处理*. 2004,24(8):55-57.
- [20] Koekemoer M D., Billiot E J., Waldbeser L., et al. Environmental endocrine disruptors in south Texas sediment sample. Abstracts of Papers, 222nd ACS National Meeting, Chicago, United States, August 2001, 26-30.
- [21] Leeder J F., Cullis P.J. A rapid high resolution capillary GC-MS screen for trace levels of EEDs in soils and water. ACS National Meeting, Boston, 1998, 216:23-27.
- [22] Psillakis E, Mantzavinos D, Kalogerakis N. Monitoring the sonochemical degradation of phthalate esters in water using solid-phase microextraction. *Chemosphere*, 2004, 54:849-857.
- [23] 郑和辉, 赵立文, 刘玉敏, 等. 饮用水中邻苯二甲酸酯的气相色谱-质谱测定法. *环境健康杂志*, 2002, 22 (5) :377-378.
- [24] 杨左军, 张伟亚. 溶胶-凝胶富勒烯固相萃取-气象色谱法测定塑料水浸泡液中多种邻苯二甲酸酯. *分析化学报告*, 2004,32 (5) :637-640.
- [25] 李满秀, 王华燕. 荧光法测定环境样品中的邻苯二甲酸酯. *分析化学研究简报*, 2005, 33 (9) : 1315-1317.
- [26] Lu Jun-Ping, Zheng Li-Xing, Cai De-Pei. Determination of four kinds of environmental endocrine disruptors in blood serum of precocious puberty patients by high performance liquid chromatography. *Journal of hygiene research*. 2006, 25 (3):288-290.
- [27] 林影, 叶茂, 韩双艳等. 免疫检测技术的研究进展. *食品与生物技术学报*, 2007, 26 (4): 117-120.
- [28] Vander M, Bruce EW, Larry S. Environmental monitoring by Immunoassay [J]. *Environmental Science and Technology*, 1988, 22 (3) :247-253.
- [29] Walter F.M.Stocklein., Manuela Rohde Gudrun Scharte et al. Sensitive detection of triazine and phenylurea pesticides in pure organic solvent by enzyme li



- nked immunosorbent assay (ELISA): Stabilities, solubilities and sensitivities. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 405, 255-265.
- [30] 许艇, 李季. 农药免疫分析技术的发展及应用[J]. *农药环境与发展*, 2002, 3 : 41-43.
- [31] John M. Walker: *The Protein Protocols Handbook* [M]. New Jersey: Human a Press Inc. 1996, 335-363.
- [32] 倪灿荣, 马大烈, 戴益民. 《免疫组织化学实验技术及应用》[M]. 北京: 北京化工出版社, 1993, 81-82.
- [33] Yanaihara N, Kato I, Nagasawa S, et al. Immunoassay for phthalic acid esters: United States Patent 6399318 [P]. 2002. <http://www.freepatentsonline.com/6399318.html>.
- [34] Chang C, Peng D P, Wu J E, et al. Development of an indirect competitive ELISA for the detection of furazolidone marker residue in animal edible tissues [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(5): 1525-1531.
- [35] Joseph Sambrook, David W. Russell 著, 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南 (第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1713-1720.
- [36] Crowther J R. *The ELISA guidebook* [M]. US: Humana Press, 2001: 1-44.
- [37] 刘凤权, 许志刚, 王金生. 定量测定甲胺磷残留的间接竞争ELISA的建立和初步应用. *农业生物技术学报*, 1998, 6 (2): 140-146.
- [38] Liu W, Zhao C, Zhang Y, et al. Preparation of polyclonal antibodies to a derivative of 1-aminohydantoin (AHD) and development of an indirect competitive ELISA for the detection of nitrofurantoin residue in water [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(17): 6829-6834.
- [39] 凌云, 赵渝, 发光细菌发在食品安全性检测中的应用[J]. *食品安全与生物技术学学报*, 2005, 24 (6):106-110.
- [40] 丁良君, 钱传范, 韩丽君, 等. 甲基对硫磷人工抗原的合成与鉴定. *食品科学*, 2003, 5 (2): 22-32.
- [41] K. V. Singh, Jasdeep Kaur, Grish C. Varshney, et al. Synthesis and characterization of hapten-Protein conjugates for antibody production against small molecules. *Bioconjugate Chem.*, 2004, 15: 168-173.
- [42] 颜春荣, 段振娟, 宋诗莹, 等. 甲胺磷人工抗原的合成及光谱特征. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27 (5): 881-885.
- [43] 杜福斌, 谭建华, 等. 洛美沙星人工抗原的合成及鉴定. *中兽医医药杂志*, 2007, (2): 5-7.
- [44] 周思祥, 刘福成. 农药人工抗原的合成研究进展[J]. *农药*, 2005, 44(8): 337-341.



- [45] 魏晨曦. 邻苯二甲酸二丁酯的酶联免疫吸附分析研究. 华中师范大学, 2011:16.
- [46] 张亚然. 乙噻酚磺酸酯单克隆抗体的制备及性质鉴定. 华中师范大学, 2012:34.
- [47] Chenxi Wei, Shumao Ding, Huihui You et al. An Immunoassay for Dibutyl Phthalate Based on Direct Hapten Linkage to the Polystyrene Surface of Microtiter Plates [J]. PLOS ONE, 2011 6(12):e29196.
- [48] 徐志凯, 张明杰, 薛采芳等. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安: 陕西科学出版社, 1992.
- [49] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2002: 9-16.
- [50] James W G. Monoclonal Antibodies: principles and practice (third edition) [M]. US: Academic Press, 1995:141-179.
- [51] Hu Y X, Guo J Y, Shen L, et al. Get effective polyclonal antisera in one month [J]. *Cell Res*, 2002, 12(2): 157-160.
- [52] Mercader J V, Suárez-Pantaleón C, Agulló C, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to the strobilurin pesticide pyraclostrobin [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17): 7682-7690.
- [53] 陆彦. 氨苄青霉素单克隆抗体制备及其残留检测试剂盒的初步研究[D]. 新疆农业大学, 2005: 30.
- [54] Shelver WL, Kim HJ, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immuosorbent assay for the β -adrenergic agonist ziplaterol. *Agric Food Chem*, 2005, 53 (9): 3273-3280.
- [55] Frey A, Meckelein B, Extermest D, et al. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunisorbent assays. *Immunol Methods*, 2000, 233 (1-2): 47-56.
- [56] Voogd C E, Van der Stel JJ, Jscobs JJ. On the mutagenic cation of some enzyme immunoassay substrates. *J Immunol Methods*, 1980,36 (1): 55-61.
- [57] Bos ES, van der Doelen AA, van Rooy N, et al. 3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine as an ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay. *Immunoassay and Immunochemistry*. 1981,3 (2): 187-204.
- [58] Pastor-Navarro N, Morais S, Maquieira A, et al. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 594(2): 211-218.
- [58] Bwkheit H K, Lukas A D, Szurdoki F, et al. AN enzyme immunoassay for the environmental monitoring of the herbicide bromacil [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 2 (41): 2220-2227.



- [59] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用[M].安徽科学技术出版社, 1994, 4-76.
- [60] Heddy Zola. 单克隆抗体技术手册[M].南京大学出版社, 1991, 68-74.
- [61] Beasley H L, Phongkham T, D aunt M H, et al. Development of a panel of immunoassays for monitoring DDT, its metabolites, and analogues in food and environmental matrices [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46 (5): 3339-3352.
- [62] Bocher M, Giersch T, Schmid R D, et al. A hapten carrier in immunoassays for s-triazines—a comparison with ELISAs based on hapten-protein conjugates [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1992, 15 (7): 1-8.
- [63] Long F, Shi H C, He M, et al. Sensitive and rapid chemiluminescence enzyme immunoassay for microcystin-LR in water samples. [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 649 (9): 123-127.
- [64] Zhang S X, Zhang Z, Shi W M, et al. Development of a chemiluminescent ELISA for determining chloramphenicol in chicken muscle [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (9): 5718-5722.
- [65] Xin T B, Liang S X, Wang X, et al. Determination of estradiol in human serum using magnetic particles-based chemiluminescence immunoassay [J]. *Analytica Acta*, 2008, 627 (2): 114-120.
- [66] Shen J Z, Zhang Z, Yao Y, et al. A monoclonal antibody-based time-resolved fluoroimmunoassay for chloramphenicol in shrimp and chicken muscle [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 575 (6): 262-266.
- [67] Yan W, Bin L, Conjugated polymer as a signal amplifier for novel silica nanoparticle-based fluoroimmunoassay [J]. *Biosens Bioelectron*. 2009, 24 (5): 3293-3298.
- [68] Zhao Y W, Liang Y, Qian J R. Determination of diethylstilbestrol by time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *Analytical Letters*. 2009, 42 (3): 216-227.
- [69] Bacigalupo M A, Meroni G. Quantitative determination of diuron in ground and surface water by time-resolved fluoroimmunoassay. Seasonal variations of diuron, carbofuran, and paraquat in an agricultural area [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55 (6): 3823-3828.
- [70] Caruhel P, Mazier C, Kunde J, et al. Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay for the measurement of midregional proadrenomedullin in plasma on the fully automated system [J]. *Clinical Biochemistry*, 2009, 42 (7): 725-728.
- [71] Bacigalupo M, Meroni G, Secundo F, et al. Time-resolved fluoroimmunoassay for quantitative determination of ampicillin in cow milk samples with different fat content [J]. *Talanta*, 2008, 77 (1): 126-130.
- [72] zeng Q, Zhang Y, Song K, et al. Enhancement of sensitivity and specificity



- of the fluoroimmunoassay of Hepatitis B virus surface antigen through “flexible” coupling between quantum dots and antibody [J]. *Talanta*, 2009, 80 (1): 307.
- [73] Jeon M, Paeng I R. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 626 (2): 180-185.
- [74] Jeon M, Kim J, Paeng K, et al. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk [J]. *Microchemical Journal*. 2008, 88 (1): 26-31.
- [75] Yan J, Wang J, Zhao M P, et al. Determination of papaverine by biotin-avidin amplified ELISA [J]. *Analytical Letters*, 2004, 37 (14): 2977-2989.
- [76] Kim S Y, Choi M J. Preparation and characterization of digoxin antibody and its application to immunoassay: comparison of performance characteristics between enzyme immunoassay and immunostrip test [J]. *Microchemical Journal*. 2000, 65 (3): 209-219.
- [77] 张喜悦, 徐天刚, 王志亮, 等. 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 三种底物显色的比较试验[J]. *中国动物检疫*, 2003, 20 (11): 2-24.



附录一

主要英文缩写词

英文缩写	英文全称	汉语全称
BSA	Bovine albumin	牛血清白蛋白
DBP	Dibutyl phthalate	邻苯二甲酸二丁酯
DMP	Dimethyl phthalate	邻苯二甲酸二甲酯
DMAP	Dimethyl-4amino phthalate	4-氨基邻苯二甲酸二甲酯
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FCA	Freund's complete adjuvant	福氏完全佐剂
FIA	Freund's incomplete adjuvant	福氏不完全佐剂
GC	Gas chromatography	气相色谱
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry	气相色谱质谱法
h	Hour	小时
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Ig-G	Immunoglobulin G	免疫球蛋白G
mg	Milligram	毫克
min	Minute(s)	分钟
OPD	O-phenylenediamine	邻苯二胺
OVA	Ovalbumin	鸡卵清蛋白
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PVC	Polyvinyl acetate	聚氯乙烯
rpm	Revolutions per minute	每分钟转数
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
Tris	Trihydroxy methylamino methane	三羟甲基氨基甲烷



附录二

攻读学位期间论文发表情况

1. **Jingyun Zhao**, Xiaowei Yu, Qing Luo, Chenxi Wei, et al. Anti-Bensulfuron-methyl Monoclonal Antibody Production and BSM Detecting Indirect Competitive Enzyme-linked Immunoassay Establishment. Food and Agricultural Immunology. 2013(SCI)
2. **Zhao Jingyun**, You Hui, Zhang Yaran, Yuan Junlin*. Toxic Effects of Nano-Fe₂O₃ on Liver and Kidney Cells of Rats. iCBBE 2011 (EI)
3. YouHuihui, **Jingyun Zhao**, Yaran Zhang, Junlin Yuan*. Effects of MnO₂ Nanoparticles on Liver and Kidney Cells of Rats. iCBBE 2011 (EI)
4. 尤会会, 赵静云, 袁焯, 魏晨曦, 杨旭, 袁均林*. DEHP与OVA联合染毒对小鼠肺功能和肺部IL-17表达的作用. 环境科学学报.2013;33(4)
5. 马萍, 杜娟, 罗清, 赵静云, 尤会会, 杨旭*. 纳米Fe₃O₄对小鼠肺细胞的氧化损伤. 生态毒理学报.2012;7(1)
6. 马萍, 焦铭, 尤会会, 赵静云, 杜鹃, 罗清, 杨旭*. 农药毒死蜱对小鼠脑细胞氧化损伤的研究. 环境科学学报.2013;33(3)



致 谢

读研究生涯即将结束，回想两年多的求学历程，有成功的喜悦，也有失败的悲伤，但更多的是成长过程中的历练与收获。

首先，我要感谢我的导师袁均林副教授，从学位论文的选题，开题，实验方案的确定，直至论文的撰写工作圆满完成，都离不开袁老师的悉心指导，袁老师为人谦和，学识渊博，有丰富的实践经验，他乐观开朗的生活态度让我获益颇丰，在此，谨向袁老师表达我深深的谢意。

感谢杨旭老师在文章修改和投稿工作中的大力帮助，杨老师忘我的工作精神和对科研事业的无私奉献深深的感染着我。

感谢丁书茂老师在日常生活中给予的关心指导。

感谢师兄武阳，叶新，师姐魏晨曦，张亚然，师妹可尘娟，杨尚悦，左浩晓等在生活和学习中给予的帮助。

感谢环境科学实验室的每一位同学。

最后感谢我的父母，是你们的辛勤培育让我有了今天的成果，感谢所有亲人和朋友，愿你们身体健康，事事顺心！

赵静云
2012年5月