

何方洋, 杨昌松, 韩 深, 等. 应用酶联免疫法测定环境水样中雌三醇的残留量[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1422-1426.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.032

## 应用酶联免疫法测定环境水样中雌三醇的残留量

何方洋<sup>1,2</sup>, 杨昌松<sup>1,2</sup>, 韩 深<sup>3</sup>, 崔海峰<sup>1,2</sup>, 崔廷婷<sup>1,2</sup>, 张荣华<sup>4</sup>, 鲁亚辉<sup>1,2</sup>,  
宋 灏<sup>1,2</sup>, 解 凡<sup>1,2</sup>

(1.北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206; 2.北京市食品安全免疫快速检测工程技术研究中心, 北京 102206; 3.北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 100026; 4.乐亭县畜牧兽医局, 河北 唐山 063600)

**摘要:** 通过对雌三醇分子结构的改造, 制备了雌三醇半抗原和人工抗原, 通过对动物进行免疫得到雌三醇的单克隆抗体, 该抗体灵敏度为 0.05  $\mu\text{g/L}$ , 对雌二醇和雌酮的交叉反应率小于 10.00%。基于该抗体建立了雌三醇间接竞争酶联免疫检测方法, 该方法检测环境水样品中雌三醇的检测限为 0.25  $\mu\text{g/L}$ , 回收率为 72.00%~108.00%, 变异系数小于 15.00%。

**关键词:** 雌三醇; 单克隆抗体; 酶联免疫检测

**中图分类号:** TS207.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2017)06-1422-05

## Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of estriol in environmental water sample

HE Fang-yang<sup>1,2</sup>, YANG Chang-song<sup>1,2</sup>, HAN Shen<sup>3</sup>, CUI Hai-feng<sup>1,2</sup>, CUI Ting-ting<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Rong-hua<sup>4</sup>, LU Ya-hui<sup>1,2</sup>, SONG Hao<sup>1,2</sup>, XIE Fan<sup>1,2</sup>

(1. Beijing Kwinbon Biotechnology Company, Beijing 102206, China; 2. Beijing Engineering Research Centre of Food Safety Immunodetection, Beijing 102206, China; 3. Inspection and Quarantine Technical Center of Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China; 4. Leting County Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Tangshan 063600, China)

**Abstract:** By transforming the molecular structure of the estriol, we obtained the hapten and artificial antigens. The monoclonal antibodies of estriol were obtained by immunizing animals. The sensitivity of the antibody was 0.05  $\mu\text{g/L}$ , and the cross-reaction rate to estradiol and estrone were less than 10.00%. An indirect competitive enzyme immunoassay was constructed based on the antibody for the quantitative analysis of estriol. The results showed that the limit of detection of environmental water sample was 0.25  $\mu\text{g/L}$ . The range of average recovery rate was 72.00%~108.00%, and the coefficients of variation were less than 15.00%.

**Key words:** estriol; monoclonal antibody; enzyme immunoassay

雌三醇是雌二醇和雌酮的代谢产物, 该激素不仅调控胎儿在宫内的发育, 影响妊娠子宫对催

产素的敏感性, 而且能够促进家畜的生长发育。然而, 如果使用不当, 则会引发雌三醇的污染残留问题, 使人感染激素相关性疾病, 并会对婴儿和青少年的生长发育产生严重影响<sup>[1-2]</sup>。农业部第 235 号公告修订了《动物性食品中兽药最高残留限量》, 规定在任何动物性食品中, 不允许添加雌三醇等雌激素。雌三醇性质稳定不易降解, 一般以微量或痕量残留于环境中, 如水样中会有部分残留<sup>[3]</sup>。国内外测定

收稿日期: 2017-04-20

基金项目: 北京市科技计划项目 (Z151100002115059)

作者简介: 何方洋 (1969-), 男, 贵州遵义人, 博士, 研究员, 主要从事食品安全快速检测技术研究。(Tel) 010-80700520-8505;  
(E-mail) qinbangjia@163.com

通讯作者: 韩 深, (E-mail) beijingqinbang@163.com

雌三醇的方法主要包括仪器检测法<sup>[4-14]</sup>和免疫分析检测法<sup>[14-17]</sup>,其中仪器检测法包括液相色谱-串联质谱法、固相萃取-气相色谱法、质谱联用法、超快速液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱-串联质谱法等。与酶联免疫法相比,仪器检测法所用仪器设备较为昂贵,对试验操作人员的技术水平要求较高,样品需要进行纯化处理,检测时间较长,不利于基层检测人员的现场批量筛查。酶联免疫法具有检测成本低、检测时间短和操作方法简单等优点,非常符合批量、快速检测的要求。对免疫学方法检测雌三醇残留的报道相对较少,检测样本主要涉及牛奶和血清。本研究拟采用酶联免疫法测定水样中雌三醇药物的残留量,以期对雌三醇的快速检测提供方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

雌三醇、雌二醇、雌酮、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)和辣根过氧化物酶(HRP)均购自Sigma公司,包被液(0.05 mol/L碳酸盐缓冲液,pH 9.6)、洗涤液(含1.00%吐温20的0.15 mol/L PBS,pH 7.4)、封闭液(含有1.00%~3.00%酪蛋白、0.10~0.30 mol/L的磷酸盐缓冲液)和样本复溶液(0.02 mol/L PBS,pH 7.0)均购自北京化学试剂公司,8周龄的雌性Balb/C小鼠和羊(无病原体)均购自北京勤邦生物技术有限公司,水样品购自北京安为天检测技术有限公司。

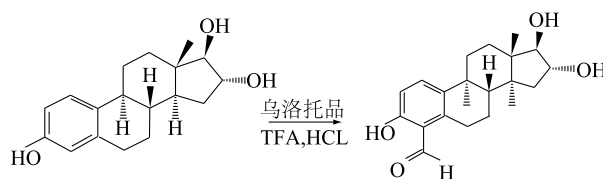
### 1.2 仪器与设备

MK3酶标仪购自上海雷勃分析仪器有限公司,Costar酶标板购自北京诺博莱德科技有限公司,TDL-40B离心机购自上海安亭科学仪器厂。

### 1.3 方法

**1.3.1 半抗原和人工抗原** 合成雌三醇半抗原(图1),具体步骤为:取1.00 g雌三醇,加20.0 ml三氟乙酸溶解,加1.46 g乌洛托品,加热,回流反应3 h,冷却至室温,加30.0 ml 1.00 mol/L的稀盐酸,搅拌2 h后停止反应,加水、氢氧化钠调节pH值为7.0,加乙酸乙酯,萃取,水洗,无水硫酸钠干燥蒸干,上硅胶柱,石油醚:乙酸乙酯(3:1,体积比),得到0.84 g半抗原产物,反应收率为75.57%。

将上述合成的半抗原与BSA和OVA进行偶联,分别得到雌三醇免疫抗原和包被抗原,具体合成过程如下:取12.00 mg醛基雌三醇半抗原,溶解于0.3 ml



TFA:三氟乙酸;HCl:稀盐酸。

图1 雌三醇半抗原的合成

Fig.1 Synthesis of estradiol hapten

二甲基甲酰胺(DMF)中,得到A液。称取BSA 50.00 mg,充分溶解于4.0 ml碳酸缓冲液(CB)(pH 9.5)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白质溶液中,并于室温下搅拌24 h,用0.02 mol/L PBS 4℃透析得到免疫抗原。取5.30 mg醛基雌三醇半抗原,溶解于0.2 ml乙醇中,得到B液。称取OVA 50.00 mg,使之充分溶解在4.0 ml CB(pH 9.5)中,将B液逐滴缓慢滴加到蛋白质溶液中,并于室温下搅拌4 h,用0.01 mol/L PBS 4℃透析得到包被抗原。

**1.3.2 单克隆抗体的制备及效价验证** 将免疫抗原与等量弗氏完全佐剂充分乳化,免疫8周龄Balb/c小鼠,取免疫后的鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。用体内诱生法<sup>[17]</sup>得到雌三醇单克隆抗体溶液,-20℃保存。

**1.3.3 酶标记抗体制备** 用得到的雌三醇单克隆抗体免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗体,然后将羊抗鼠抗体与HRP偶联,即得到酶标记抗体<sup>[17]</sup>。

**1.3.4 酶标板制备** 抗原稀释倍数依次为1:2 000、1:4 000、1:8 000,单克隆抗体稀释倍数依次为1:10 000、1:20 000、1:40 000、1:80 000,酶标记抗体液的稀释倍数为1:1 000,测定波长为450 nm,分别测定质量浓度为0 μg/L和0.05 μg/L的雌三醇标准品吸光度值(OD值),并按如下公式计算百分吸光率(抑制率):

百分吸光率=(标准品或样本溶液的平均吸光度值/0 μg/L标准溶液的平均吸光度值)×100%。

在酶标板包被1孔100.0 μl抗原包被液,37℃环境中避光孵育2 h或4℃过夜,随后清洗酶标板1~2次,再加入1孔150.0 μl封闭液,37℃避光孵育2 h,清除孔中液体拍干,即完成酶标板制备。

**1.3.5 样本的前处理方法** 取100.0 μl水样品加400.0 μl磷酸缓冲液,涡旋仪涡动30 s,取50.0 μl用于分析。

**1.3.6 标准曲线的建立** 用0.02 mol/L PBS将雌

三醇稀释成 0  $\mu\text{g/L}$ 、0.05  $\mu\text{g/L}$ 、0.15  $\mu\text{g/L}$ 、0.45  $\mu\text{g/L}$ 、1.35  $\mu\text{g/L}$ , 共 5 个质量浓度, 1 孔 50.0  $\mu\text{l}$  加入酶标板中, 然后加入酶标二抗 1 孔 50.0  $\mu\text{l}$ , 再加入抗体工作液 1 孔 50.0  $\mu\text{l}$ , 25  $^{\circ}\text{C}$  避光反应 30 min。洗板拍干后加入底物 1 孔 100.0  $\mu\text{l}$ , 25  $^{\circ}\text{C}$  避光反应 15 min, 最后每孔加入 50.0  $\mu\text{l}$  终止液, 用酶标仪测定 450 nm 吸光度。标准曲线的横坐标为雌三醇标准品质量浓度的对数值, 纵坐标为百分吸光度值 ( $B/B_0$ ),  $B$  为其他浓度孔的显色值,  $B_0$  为 0  $\mu\text{g/L}$  孔的显色值, 重复 2 次。

1.3.7 样品中雌三醇的检测 将水样品的  $OD_{450}$  值代入标准曲线, 即可得到其相应的质量浓度, 用该质量浓度乘以稀释倍数即得到样本中雌三醇的残留量。

### 1.3.8 检测性能

1.3.8.1 检测限 测定 20 份空白水样品, 计算其标准差, 以测定平均值加 3 倍的标准差作为检测限 ( $LOD$ ), 即可检测出被测物的最低浓度。

1.3.8.2 精密度及准确度 采用 0.25  $\mu\text{g/L}$ 、0.50  $\mu\text{g/L}$  2 个浓度的雌三醇对水样品进行添加回收测定, 每个样品做 5 个平行, 分别用 3 批不同试剂进行测定。以回收率作为准确度评价的指标, 以重复测定某一浓度样品的变异系数作为精密度评价的指标。

1.3.8.3 抗体的特异性 分别测定雌三醇、雌二醇、雌酮与抗体的结合反应。交叉反应率为雌三醇的半抑制率 ( $IC_{50}$ ) 与这些物质  $IC_{50}$  的百分比, 决定了它们对雌三醇检测的干扰程度。

## 2 结果与分析

### 2.1 雌三醇人工抗原的检测结果

将载体蛋白和偶联物进行 SDS-PAGE 电泳法检测, 结果显示, 偶联物的电泳条带比载体蛋白滞后, 所以免疫抗原和包被抗原偶联成功。

### 2.2 优选抗原包被浓度和单克隆抗体浓度

测定不同单克隆抗体稀释倍数和抗原稀释倍数条件下, 质量浓度为 0  $\mu\text{g/L}$  和 0.05  $\mu\text{g/L}$  的雌三醇标准品的  $OD_{450}$  值, 并计算百分吸光率 (表 1)。

抗原稀释倍数依次为 1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000, 单克隆抗体稀释倍数依次为 1 : 10 000、1 : 20 000、1 : 40 000、1 : 80 000, 酶标记抗体液的稀释倍数为 1 : 1 000, 测定波长为 450 nm, 分别测定质量浓度为 0  $\mu\text{g/L}$  和 0.05  $\mu\text{g/L}$  的雌三醇标准品溶液。

抗原、单克隆抗体的最佳稀释倍数为百分吸光率是 70.00%~85.00% 时的最大稀释倍数。由表 1 可知, 此次筛选的抗原稀释倍数为 4 000, 最佳单克隆抗体稀释倍数为 40 000。

表 1 抗原和抗体浓度优选的结果

Table 1 Concentration detection results of antigen and antibody

单克隆抗体 稀释倍数	标准品含量 ( $\mu\text{g/L}$ )	1 : 2 000 (抗原稀释倍数)		1 : 4 000 (抗原稀释倍数)		1 : 8 000 (抗原稀释倍数)	
		$OD_{450}$ 值	百分吸光率 (%)	$OD_{450}$ 值	百分吸光率 (%)	$OD_{450}$ 值	百分吸光率 (%)
1 : 10 000	0	3.099	99.60	3.094	95.40	3.049	102.10
	0.05	3.086		2.953		3.112	
1 : 20 000	0	2.568	90.50	2.540	97.00	2.601	96.20
	0.05	2.324		2.463		2.503	
1 : 40 000	0	1.764	79.60	1.885	80.60	1.678	92.60
	0.05	1.405		1.519		1.554	
1 : 80 000	0	0.879	85.60	0.827	95.60	0.799	91.10
	0.05	0.752		0.791		0.728	

### 2.3 标准曲线

图 2 显示, 按照常规方法测定试剂盒灵敏度试验, 试剂盒标准曲线测定的雌三醇标准品浓度最低为 0.05  $\mu\text{g/L}$ , 标准曲线测定的范围为 0.05~1.35  $\mu\text{g/L}$ 。

### 2.4 检测限

20 个空白水样品中雌三醇的检测结果如表 2 显示, 检测限以测定平均值加 3 倍标准差计算, 建立雌三醇间接竞争酶联免疫检测方法, 水样品中雌三醇的检测限为 0.25  $\mu\text{g/L}$ 。

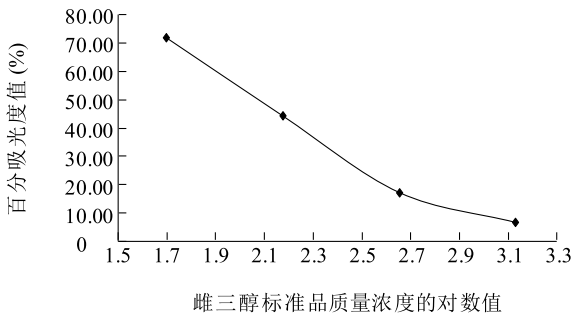


图2 雌三醇标准曲线  
Fig.2 The standard curve of estriol

2.5 精密度及准确度试验

表3显示,回收率范围为72.00%~108.00%,变异系数小于15.00%,符合农业部文件农医发[2005]17号《兽药残留酶联免疫试剂盒备案审查技术资料要求》附件2试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度和准确度的规定,说明此检测方法是可靠的,可用于水样品中雌三醇残留量的分析测定。

表3 精密度及准确度的试验结果  
Table 3 Results of precision and accuracy tests

添加浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	批次	雌三醇回收值 ( $\mu\text{g/kg}$ )					变异系数 (%)
		I	II	III	IV	V	
0.25	1	0.22	0.27	0.19	0.20	0.21	14.30
	2	0.19	0.23	0.22	0.20	0.21	8.10
	3	0.23	0.18	0.19	0.18	0.20	11.60
0.50	1	0.42	0.39	0.52	0.49	0.39	13.50
	2	0.41	0.54	0.49	0.39	0.51	13.80
	3	0.46	0.42	0.36	0.46	0.43	10.00

表4 抗体与其他物质的交叉反应率  
Table 4 Cross-reaction rate of monoclonal antibodies and estriol, estradiol and related analytes

化合物	交叉反应率 (%)
雌三醇	100.00
雌二醇	<10.00
雌酮	<10.00

3 讨论

邱凌等<sup>[14]</sup>采用胶体金免疫试纸法测得加标奶

表2 空白水样品检测限测定结果

Table 2 Detection limit results of blank samples

样品 编号	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	样品 编号	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	样品 编号	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )
1	0.20	9	0.13	17	0.20
2	0.18	10	0.17	18	0.12
3	0.10	11	0.11	19	0.19
4	0.16	12	0.12	20	0.15
5	0.14	13	0.20	平均值	0.15
6	0.16	14	0.15	标准差	0.03
7	0.18	15	0.12	检测限	0.25
8	0.14	16	0.16		

2.6 抗体的特异性测定

单克隆抗体与雌三醇、雌二醇、雌酮的交叉反应率如表4显示,单克隆抗体对雌二醇、雌酮的交叉反应率均较低,对雌三醇具有较好的特异性。

样的最低检测限为100.00  $\mu\text{g/L}$ ,梁祖培<sup>[15]</sup>将制备的单克隆抗体与一步电沉积免疫传感器方法结合,测得奶样中雌三醇的最低检测限为1.00  $\mu\text{g/kg}$ 。高素芹等<sup>[16]</sup>采用时间分辨荧光免疫分析法,测定血清中雌三醇的检测限为0.10  $\mu\text{g/kg}$ 。赵金富等<sup>[17]</sup>采用酶联免疫分析法并结合生物素-亲和素放大体系,测定血清中的雌三醇的检测限为0.06  $\mu\text{g/kg}$ 。酶联免疫分析法在小分子检测领域中已经得到了广泛应用,是目前检测药物残留最适合的方法之一<sup>[18]</sup>。本研究制备的单克隆抗体灵敏度为0.05  $\mu\text{g/L}$ ,对雌二醇的交叉反应率小于10.00%。基于该抗体建立

了雌三醇间接竞争酶联免疫检测方法检测水样品的检测限为 0.25  $\mu\text{g/L}$ ,回收率为 72.00%~108.00%,变异系数小于 15.00%。

#### 参考文献:

- [1] 李瑞霞. 环境雌激素对动物的影响与对策[J]. 四川动物, 2006, 25(3): 673-676.
- [2] 李艳霞,韩伟,林春野,等. 畜禽养殖过程中雌激素的排放及其环境行为[J]. 生态学报, 2010, 30(4): 1058-1065.
- [3] 杨彩霞,潘志彦,赵美蓉,等. 类雌激素农药对雌性哺乳动物的生殖毒理研究[J]. 浙江工业大学学报, 2008, 36(2): 122-128.
- [4] 张艳,陈剑刚,冯翠霞. 液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中 7 种雌激素类药物残留[J]. 实用预防医学, 2013, 20(6): 740-743.
- [5] 廖涛,吴晓翠,王少华,等. 固相萃取-气相色谱/质谱联用法同时检测水体中 9 种环境雌激素[J]. 分析化学, 2013, 41(3): 422-426.
- [6] 赵昂,张航,姚迪,等. 超快速液相色谱-串联质谱法检测人血清中雌酮、雌二醇及雌三醇的方法学研究[J]. 中国科技论文, 2016, 11(18): 2062-2068.
- [7] 魏瑞成,葛峰,郑勤,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定青菜中雌酮、雌二醇和雌三醇残留[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4): 880-884.
- [8] 尹江伟,刘红河,刘祖强,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定肉类食品 and 饲料中雌二醇和雌三醇[J]. 现代预防医学, 2010, 37(10): 1928-1930.
- [9] TSO J, AGA D S. A systematic investigation to optimize simultaneous extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of estrogens and their conjugated metabolites in milk[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(29): 4784-4795.
- [10] 赵怀鑫,孙志伟,夏莲,等. 新型荧光衍生试剂用于尿样中痕量游离雌二醇和雌三醇的反相高效液相色谱-荧光检测和质谱定性[J]. 色谱, 2009, 27(2): 164-168.
- [11] 孙林超. 高效液相色谱在牛奶中雌三醇含量检测中的应用[J]. 食品工业, 2009(5): 61-63.
- [12] 郭兰英,刘均生,李振勇. 应用化学发光法定量测定游离雌三醇[J]. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(2): 110-112.
- [13] 王丹,鄂志强,刘春波,等. 婴幼儿配方乳粉中激素检测技术研究进展[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(12): 30-35.
- [14] 邱凌,王佳妮,廖旭,等. 胶体金免疫试纸法快速测定雌三醇[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2015, 54(1): 47-51.
- [15] 梁祖培. 雌三醇抗体制备及快速检测技术研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [16] 高素芹,杜凌云,王术皓. 基于固相抗体模式时间分辨荧光免疫分析测定雌三醇[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 1089-1093.
- [17] 赵金富,王永成,米健秋,等. 酶联免疫分析结合生物素-亲和素放大体系测定血清中的雌三醇[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(6): 1019-1022.
- [18] 万宇平,韩黎,吴鹏,等. 玉米赤霉烯酮残留检测 ELISA 试剂盒的研制[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(3): 659-663.

(责任编辑:王妮)