

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810046008.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月4日

[11] 公开号 CN 101358978A

[22] 申请日 2008.9.9

[21] 申请号 200810046008.6

[71] 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市一环路南一段 24 号

[72] 发明人 邓安平 王玉珍 杨 红

[74] 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任公  
司

代理人 邓继轩

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称

测定食品中苏丹红 1 号的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法

[57] 摘要

本发明公开了测定食品中苏丹红 1 号含量的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法(ELISA),其特点是合成苏丹红 1 号的修饰物并将其与蛋白联接,制得免疫原及包被抗原。通过杂交瘤技术包括免疫、融合、筛选等步骤获得抗苏丹红 1 号的单克隆抗体。该抗体用于苏丹红 1 号的免疫分析,标准曲线的浓度范围为 0.1~100ng/mL, IC<sub>50</sub> 为 1.1~2.0ng/mL; 抗体与苏丹红 2-4 号的交叉反应率为 0.95~33.9%, 与其他 6 种食品可添加色素几乎没有交叉反应; 说明所建立的 ELISA 不仅灵敏度高而且特异性强。6 种市售食品加标后用甲醇萃取, 萃取液经适当稀释用 ELISA 测定, 苏丹红 1 号的加标回收率为 88.2~110.5%, 相对标准偏差为 1.5~17.4%。

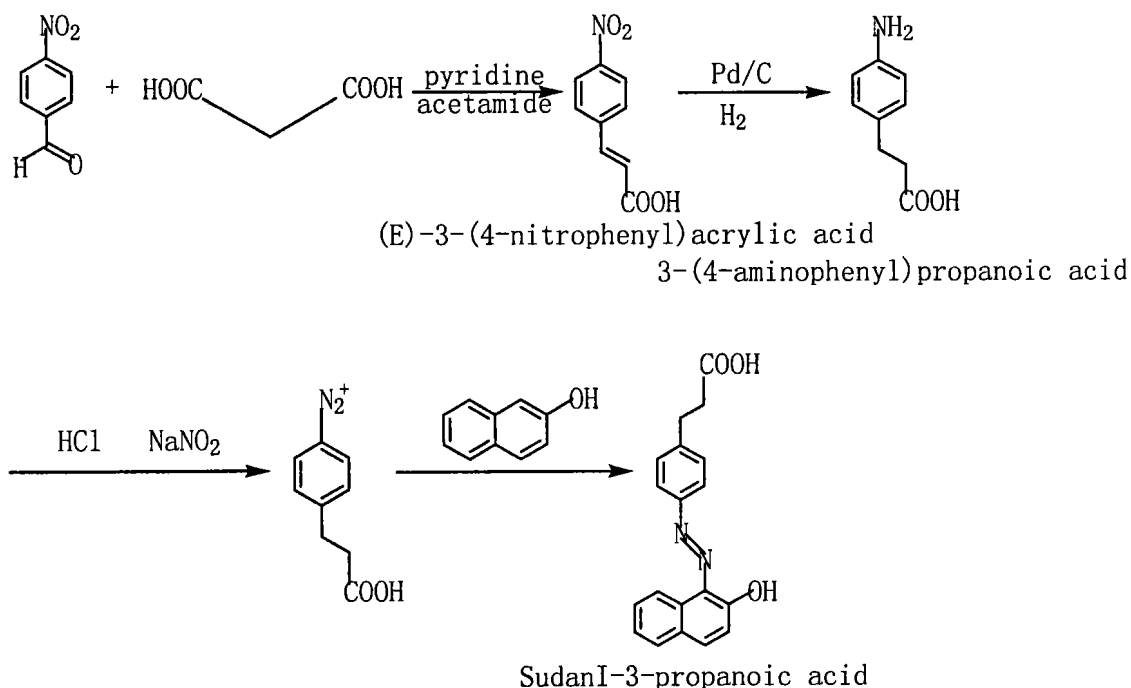
1. 测定食品中苏丹红 1 号含量的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法, 其特征在于该方法包括以下步骤:

(1) 苏丹红 1 号修饰物的制备

步骤 1: 将 0.02~0.08 mol 丙二酸溶于 20~80 mL 新蒸吡啶中, 加入 0.02~0.1mol 对硝基肉桂酸和 0.001~0.004 mol 醋酸胺, 此混合物在温度 100~150℃回流 1~7 小时, 冷却后, 将反应物用醋酸重结晶, 得到步骤 1 产物 4~10g, 熔程: 275~280℃;

步骤 2: 将步骤 1 产物 0.15~0.65g, 5~35mg 钯碳, 2~15mL 甲醇加入反应釜中, 通入氢气, 于温度 100~120℃反应 1~5 小时, 过滤反应物, 收集滤液, 用旋转蒸发仪旋干溶液, 用二氯甲烷:甲醇=5:1 的体积比过柱, 收集 TLC 板实验中 Rf 值为 0.3 的产物, 旋干溶液, 得到乳白色固体;

步骤 3: 将步骤 2 产物 0.1g 溶解在 1.5~2.5 mL 浓盐酸中, 在温度 5~10℃加入含 0.01~0.06g 亚硝酸钠的水溶液 0.5 mL, 搅拌数分钟, 得到淡黄色重氮盐溶液, 将 0.04~0.12g 2-萘酚溶解于 8~12%的氢氧化钠水溶液 3~5mL 中, 冷却至 5℃, 再缓慢加入重氮盐溶液中, 得到 0.12~0.30g 苏丹红 1 号-3-丙酸, 简写为 Sudan 1-C3, 其反应式如下:



## (2) 免疫原和包被抗原的制备

将 0.10~0.45 mmol 的 Sudan 1-C3, 0.10~0.80 mmol 的二环己基碳二亚胺, 0.10~0.80 mmol 的 N-羟基琥珀酰亚胺, 溶解于 100~600 $\mu$ L 的二甲基甲酰胺, 室温搅拌过夜, 将混合物离心 5~20 分钟, 取上层清液, 缓慢加入 0.01~0.02% 的牛血清白蛋白或卵清蛋白, 搅拌 1~10 小时, 离心分离, 取上层清液, 透析数天, 其中, Sudan 1-C3-牛血清白蛋白为免疫原, Sudan 1-C3-卵清蛋白为包被抗原;

## (3) 苏丹红 1 号单克隆抗体的制备

免疫: 将免疫原溶解于生理盐水中, 再与等体积的完全福氏佐剂混合, 皮下多点免疫 BALB/C 小鼠, 每只小鼠免疫原剂量在 50~100  $\mu$ g, 第一次免疫后, 每隔两周再次免疫, 将完全福氏佐剂换成不完全福氏佐剂, 第三次免疫后一周, 尾部取血测鼠的抗血清效价, 最后一次腹腔加强免疫, 不加佐剂;

融合: 最后一次对小鼠加强免疫, 三天后取脾细胞, 将脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5:1~10:1 的比例混合, 在 50% 聚乙二醇 4000 的作用下融合, 杂交瘤细胞用 HAT 培养液混悬, 加入预先含有饲养细胞的 96 孔培养板, 置于温度 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;

筛选: 融合后 2 周, 用间接 ELISA 法筛选, 将阴性孔无色或接近无色, 而阳性孔明确显色的细胞用有限稀释法进行亚克隆 2~3 次, 及时进行检测;

单克隆抗体的大量生产: 先腹腔注射液体石蜡于 BALB/C 小鼠, 7-10 天后腹腔接种杂交瘤细胞, 观察小鼠腹水情况, 待腹水尽可能多, 濒于死亡之前, 收集腹水, 用硫酸铵沉淀法纯化腹水中的单克隆抗体, 纯化抗体与等体积甘油 1:1 混合并置于温度 -20 $^{\circ}$ C 保存;

## (4) 建立测定苏丹红 1 号含量的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法

对所得抗体性能进行表征, 在最优试验条件下, 建立测定食品中苏丹红 1 号含量的 ELISA;

## (5) 溶剂效应

选用常用的萃取溶剂甲醇和乙腈, 测试了它们对 ELISA 的影响; 用含 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50% 的甲醇或乙腈水溶液, 配置浓度为 0.1~100ng/mL 的苏丹红 1 号的标准溶液, 进行 ELISA 操作过程并作出标准曲线; 结果表明, 10% 以下的甲醇和 30% 以下的乙腈对 ELISA 的灵敏度影响较小;

#### (6) ELISA 对加标样品中苏丹红 1 号含量的测定

随机选择了 10 种食品：辣椒面 I，辣椒面 II，辣椒酱 I，辣椒酱 II，番茄酱 I，番茄酱 II，火锅料 I，火锅料 II，香肠 I，香肠 II，经 ELISA 检测，辣椒酱 II 为阳性样品，苏丹红 1 号含量为  $1.03\mu\text{g/g}$  样品，其余样品中的苏丹红 1 号含量 ELISA 均无法测出，为阴性样品，最后选择 6 种样品即辣椒面 I，辣椒酱 I，辣椒酱 II，番茄酱 I，火锅料 I 和香肠 I 做加标实验，同一样品取两份，一份加入适量的苏丹红 1 号的甲醇溶液，一份加入等体积的甲醇，静置过夜，超声震荡 30 分钟，涡旋混合 1 分钟，静置后，取上层清液离心 20 分钟，上层清液用 5% 甲醇稀释后用 ELISA 直接测定，回收率在 88.2-110.5%，相对标准偏差为 1.5-17.4%，说明该方法的准确性和精密度都较好；

#### (7) ELISA 和 HPLC 的比较

苏丹红 1 号的 HPLC 条件为：色谱条件：Hypersil Gold 柱，柱温为室温，流动相为甲醇:2%的乙酸水溶液=90:10，流量 1 mL/min，进样  $20\mu\text{L}$ ，紫外检测波长：480nm，标准溶液的浓度为：0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0  $\mu\text{g/mL}$ ，样品萃取液用  $0.45\mu\text{m}$  的滤膜过滤后直接测定；

所建立的 ELISA 的可靠性用 HPLC 进行进一步验证，9 种加标样品，即辣椒面 I，加标浓度  $5\mu\text{g/g}$  和  $20\mu\text{g/g}$ ；辣椒酱 I，加标浓度  $2\mu\text{g/g}$ ,  $10\mu\text{g/g}$ ；辣椒酱 II，加标浓度  $0\mu\text{g/g}$ ,  $2\mu\text{g/g}$ ；番茄酱 I，加标浓度  $5\mu\text{g/g}$ ；火锅料 I，加标浓度  $10\mu\text{g/g}$  和香肠 I，加标浓度  $5\mu\text{g/g}$ ；加标样品用甲醇萃取并用 ELISA 和 HPLC 测定，测定结果以 ELISA 为横坐标，HPLC 为纵坐标作图得两者的相关曲线，回归方程为  $Y=0.8492X+0.3525$ ，相关系数为 0.9840,  $n=9$ ，说明二者的相关性很好。

## 测定食品中苏丹红 1 号的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法

### 一、技术领域

本发明涉及一种测定食品中苏丹红 1 号含量的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法 (ELISA)，属于食品安全监督或食品分析的研究领域。

### 二、背景技术

苏丹红属于一类人工合成的偶氮类化合物，为红色油溶性染料，主要用于石油、机油和其他的一些工业溶剂中，目的是使其增色，也方用于鞋、地板等的增光。苏丹红染料包括苏丹红 1-4 号四种物质，均含偶氮及萘的化合物结构，对人体的肝肾器官有明显的毒性作用，具有致癌性。由于苏丹红价格低廉且不容易褪色，因此被一些不法商家用于食品染色，对人体健康造成较大威胁。我国及其他许多国家都禁止将其用于食品生产。2007 年初，国家质检总局公布了辣椒粉、辣椒酱、油辣椒、豆瓣酱等预包装辣椒制品和散装辣椒粉的产品质量调查结果，结果显示，不合格项目全部集中在苏丹红 1-4 号，尤其是苏丹红 1 号。

检测苏丹红的方法主要是高效液相色谱法 (HPLC)，欧盟的标准方法 (European Commission. NEWS notification: 03/99: Corrected method for the detection of Sudan.2005) 是将检测物经过乙腈萃取，过滤，滤液用高效液相色谱法分析，以波长可变的紫外-可见光度检测器定性与定量，确证苏丹红可以使用液相色谱-电喷雾离子化质谱联用技术。我国质检总局发布的国家标准 (GB/T 19681-2005)，采用正相吸附和固相萃取原理，对苏丹红染料用高效液相色谱进行了检测。目前，还报道了一些与高效液相色谱联用的技术，均可以用于苏丹红的检测。但是色谱法仪器昂贵、样品预处理复杂、费时、检测成本高。

酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 具有灵敏度高、特异性强、分析快速的优点，常被用于临床、药物、食品和环境等分析领域。本发明者以多克隆抗体为基础的测定食品中苏丹红 1 号含量的酶联免疫吸附分析法已申请中国专利，200710049361.5，但多克隆抗体存在一些不足，如与待测物的免疫亲和力不一致，抗体的总量有限，不能源源不断提供性能相同的抗体等。

### 三、发明内容

本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种测定食品中苏丹红 1 号含量的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法,其特点是以单克隆抗体和抗原与抗体之间特异性反应为基础而建立的分析方法。

本发明的目的由以下技术措施实现,其中所述原料份数除特殊说明外均为重量份数。

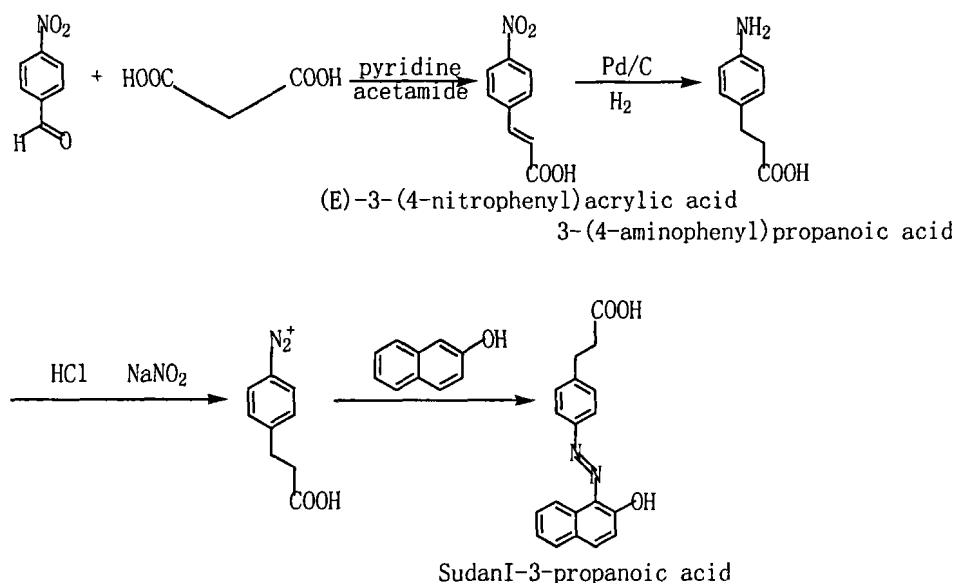
#### 测定食品中苏丹红 1 号含量的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法

##### (1) 苏丹红 1 号修饰物的制备

步骤 1: 将 0.02~0.08 mol 丙二酸溶于 20~80 mL 新蒸吡啶中,加入 0.02~0.1mol 对硝基肉桂酸和 0.001~0.004 mol 醋酸胺,此混合物在温度 100~150℃回流 1~7 小时,冷却后,将反应物用醋酸重结晶,得到产物 4~10g,熔程: 275~280℃;

步骤 2: 将步骤 1 产物 0.15~0.65g, 5~35mg 钯碳, 2~15mL 甲醇加入反应釜中,通入氢气,于温度 100~120℃反应 1~5 小时,过滤反应物,收集滤液,用旋转蒸发器旋干溶液,用二氯甲烷:甲醇=5: 1 的体积比过柱,收集 TLC 板实验中 Rf 值为 0.3 的产物,旋干溶液,得到乳白色固体;

步骤 3: 将步骤 2 产物 0.1g 溶解在 1.5~2.5 mL 浓盐酸中,在温度 5~10℃加入含 0.01~0.06g 亚硝酸钠的水溶液 0.5 mL,搅拌数分钟,得到淡黄色重氮盐溶液,将 0.04~0.12g 2-萘酚溶解于 8~12%的氢氧化钠水溶液 3~5mL 中,冷却至 5℃,再缓慢加入重氮盐溶液,得到 0.12~0.30g 苏丹红 1 号-3-丙酸,简称为 Sudan 1-C3,其反应式如下:



##### (2) 免疫原和包被抗原的制备

将 0.10~0.45 mmol 的 Sudan 1-C3, 0.10~0.80 mmol 的二环己基碳二亚胺, 0.10~0.80 mmol 的 N-羟基琥珀酰亚胺, 溶解于 100~600 $\mu$ L 的二甲基甲酰胺, 室温搅拌过夜, 将混合物离心 5~20 分钟, 取上层清液, 缓慢加入 0.01~0.02% 的牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清蛋白 (OVA), 搅拌 1~10 小时, 离心分离, 取上层清液, 透析数天, 其中, Sudan 1-C3- BSA 为免疫原, Sudan 1-C3- OVA 为包被抗原;

### (3) 苏丹红 1 号单克隆抗体的制备

免疫: 将免疫原溶解于生理盐水中, 再与等体积的完全福氏佐剂混合, 皮下多点免疫 BALB/C 小鼠, 每只小鼠免疫原剂量在 50~100  $\mu$ g, 第一次免疫后, 每隔两周再次免疫, 将完全福氏佐剂换成不完全福氏佐剂, 第三次免疫后一周, 尾部取血测鼠的抗血清效价, 最后一次腹腔加强免疫, 不加佐剂;

融合: 最后一次对小鼠加强免疫, 三天后取脾细胞, 将脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5:1~10:1 的比例混合, 在 50% 聚乙二醇 4000 的作用下融合, 杂交瘤细胞用 HAT 培养液混悬, 加入预先含有饲养细胞的 96 孔培养板, 置于温度 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;

筛选: 融合后 2 周, 用间接 ELISA 法筛选, 将阴性孔无色或接近无色, 而阳性孔明确显色的细胞用有限稀释法进行亚克隆 2~3 次, 及时进行检测;

单克隆抗体的大量生产: 先腹腔注射液体石蜡于 BALB/C 小鼠, 7-10 天后腹腔接种杂交瘤细胞, 观察小鼠腹水情况, 待腹水尽可能多, 濒于死亡之前, 收集腹水, 用硫酸铵沉淀法纯化腹水中的单克隆抗体, 纯化抗体与等体积甘油 1:1 混合并置于温度 -20 $^{\circ}$ C 保存;

### (4) 建立基于单克隆抗体测定苏丹红 1 号的酶联免疫吸附分析方法 (ELISA)

对所得单克隆抗体性能进行表征, 在最优试验条件下, 建立测定食品中苏丹红 1 号含量的 ELISA。

本发明的优点:

1. 对苏丹红 1 号的分子结进行合理修饰。
2. 成功制备出抗苏丹红 1 号的单克隆抗体并建立测定食品中苏丹红 1 号含量的 ELISA。
3. 灵敏度高、特异性强。
4. 样品处理简单、测试量大、测试费用低。
5. 对样品的测定, ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

#### 四、附图说明

图 1. 为免疫原的紫外-可见光谱图

- a. BSA;
- b. Sudan 1 号;
- c. Sudan I-C3-BSA

由图 1 得知, 在 280nm(BSA), 320nm 和 492nm 处(Sudan 1 号)均有特征吸收, 表明苏丹红 1 号已成功与蛋白交联。

图 2. 为测定苏丹红 1 号的 ELISA 标准曲线

由图 2 得知, 9 次 ELISA 测定的平均标准曲线,  $IC_{50}$  值(标准曲线中吸光度降低 50% 所对应的苏丹红 1 号的浓度,  $IC_{50}$  值越小, 灵敏度越高)为 1.1~2.0ng/mL, 检出限(LOD)为 0.07~0.14ng/mL.

图 3. 为有机溶剂甲醇和乙腈对 ELISA 灵敏度( $IC_{50}$ )的影响

由图 3 得知, 10%以下的乙腈和 30%以下的甲醇对免疫测定影响较小, 表明抗体对有机溶剂的耐受性较好。

图 4. 为 ELISA 和 HPLC 对 9 个加标样品中苏丹红 1 号的检测结果的相关曲线

由图 4 得知, 两种方法相关性较好, 回归方程为  $Y=0.8492X+0.3525$  ( $r=0.9840$ ,  $n=9$ ),

#### 五、具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行具体的描述, 有必要在此指出的是本实施只用于对发明进行进一步说明, 但不能理解为对本发明保护范围的限制, 该领域的技术熟练人员可以根据上述发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

实施例:

##### 1. 苏丹红 1 号修饰物的制备

苏丹红 1 号是小分子化合物, 没有免疫原性, 不能直接免疫动物产生抗体, 必须对苏丹红 1 号的分子结构进行合理、有效的化学修饰。一般要求尽量保持小分子化合物的原有结构, 但要在小分子化合物的某个位置上连上一个 3-5 个碳原子的手臂, 且在手臂的终端带有活性基团, 使之与载体蛋白交联, 制得免疫原和包被抗原。本发明在苏丹红 1 号苯环上与偶氮基相对的位置连接上一个终端带羧基 3 个碳原子的手臂。

苏丹红 1 号修饰物的制备:

步骤 1: 将 0.02~0.08 mol 丙二酸溶于 20~80 mL 新蒸吡啶中, 加入 0.02~0.1mol 对硝基肉桂酸和 0.001~0.004 mol 醋酸胺, 此混合物在温度 100~150℃回流 1~7 小时, 冷

却后, 将反应物用醋酸重结晶, 得到产物 4~10g, 熔程: 275~280℃;

步骤 2: 将步骤 1 产物 0.15~0.65g, 5~35mg 钨碳, 2~15mL 甲醇加入反应釜中, 通入氢气, 于温度 100~120℃ 反应 1~5 小时, 过滤反应物, 收集滤液, 用旋转蒸发器旋干溶液, 用二氯甲烷: 甲醇=5:1 的体积比过柱, 收集 TLC 板实验中 Rf 值为 0.3 的产物, 旋干溶液, 得到乳白色固体;

步骤 3: 将步骤 2 产物 0.1g 溶解在 1.5~2.5 mL 浓盐酸中, 在温度 5~10℃ 加入含 0.01~0.06g 亚硝酸钠的水溶液 0.5 mL, 搅拌数分钟, 得到淡黄色重氮盐溶液, 将 0.04~0.12g 2-萘酚溶解于 8~12% 的氢氧化钠溶液 3~5mL 中, 冷却至 5℃, 再缓慢加入重氮盐溶液中, 得到 0.12~0.30g Sudan 1-C3。

Sudan 1-C3 的表征:

<sup>1</sup>H-NMR 用 Bruker AMX-300 核磁共振仪测试 Sudan I-C3 的核磁谱, 以氘代氯仿溶液为溶剂, 内标为 TMS。<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.30 (b, 1 H), 8.55 (d, J = 4.2 Hz, 1 H), 7.73-7.50 (m, 4 H), 7.41-7.14 (m, 4 H), 6.89 (d, J = 3.96, 1 H), 3.45 (b, 1 H), 3.05 (t, J = 7.50 Hz, 2 H), 2.76 (t, J = 7.46 Hz, 2 H)。6.8~8.0 之间的峰表明物质结构中有苯环和萘环; 3.0 以下的峰表示有脂肪族烷烃结构, 有两个峰, 表明有两种不同的氢, 谱图信息符合目标产物 Sudan 1-C3 结构;

## 2. 免疫原和包被抗原的制备

带有活性基团的苏丹红 1 号修饰物与载体蛋白交联, 形成苏丹红 1 号-载体蛋白结合物, 用作免疫原和包被抗原: 称取 0.10-0.45mmol 的 Sudan 1-C3, 0.10-0.80mmol 的二环己基碳二亚胺, 0.10-0.80mmol 的 N-羟基琥珀酰亚胺, 溶于 100-600μL 的二甲基甲酰胺, 室温下搅拌过夜, 将混合物离心 5-20 分钟, 取上层清液, 缓慢加入 0.01-0.02% 的牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清蛋白 (OVA), 搅拌 1-10 小时, 离心分离, 取上层清液, 透析数天, 其中, Sudan I -C3-BSA 为免疫原, Sudan I -C3-OVA 为包被抗原。

图 1 为 BSA、Sudan 1 号和 Sudan 1-C3-BSA 的紫外-可见光谱图, a. BSA; b. Sudan 1 号; c. Sudan I-C3-BSA; 包被抗原 Sudan 1-C3-OVA 的紫外-可见光谱图与图 1 相似。

## 3. 苏丹红 1 号单克隆抗体的制备

免疫: 将免疫原溶于生理盐水中, 再与等体积的完全福氏佐剂混合, 皮下多点免疫 BALB/C 小鼠, 每只小鼠免疫原剂量在 50~100 μg, 第一次免疫后, 每隔两周再次免疫, 将完全福氏佐剂换成不完全福氏佐剂, 第三次免疫后一周, 尾部取血测鼠的抗血清效价, 最后一次腹腔加强免疫, 不加佐剂。

融合：最后一次对小鼠加强免疫，三天后取脾细胞，将脾细胞与骨髓瘤细胞（SP2/0）按 5:1~10:1 的比例混合，在 50%聚乙二醇 4000 的作用下融合，杂交瘤细胞用 HAT 培养液混悬，加入预先含有饲养细胞的 96 孔培养板，置于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

筛选：融合后 2 周左右，用间接 ELISA 法筛选，将阴性孔无色或接近无色，而阳性孔明确显色的细胞用有限稀释法进行亚克隆 2-3 次，及时进行检测。

单克隆抗体的大量生产：先腹腔注射液体石蜡于 BALB/C 小鼠，7-10 天后腹腔接种杂交瘤细胞，观察小鼠腹水情况，待腹水尽可能多，濒于死亡之前，收集腹水。用硫酸铵沉淀法纯化腹水中的单克隆抗体，纯化抗体与等体积甘油 1:1 混合并置于 -20℃ 保存。

#### 4. 优化实验条件，建立测定苏丹红 1 号的酶联免疫吸附分析方法（ELISA）

对所得抗体性能进行表征，在最优试验条件下，建立测定食品中苏丹红 1 号含量的 ELISA。

##### （1）溶液配制

###### （a）碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液

称取 2.606g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · 10H<sub>2</sub>O, 3.434g NaHCO<sub>3</sub>, 用 800mL 超纯水混匀溶解后，调节 pH 值，加水至 1L，配成 0.05mol/L, pH=9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液；

###### （b）磷酸缓冲液（储备液，PBS×10）

称取 21.961g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 6.031g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 87.666g NaCl, 加 800mL 超纯水混合，加热溶解；用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH=7.4，加超纯水至 1L，配成含 0.15 mol/L NaCl, pH=7.4 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（储备液）；

###### （c）酪蛋白溶液

称取酪蛋白加热溶解于 0.01mol/L 的 PBS 中，配成 0.5-2%酪蛋白溶液；

###### （d）磷酸缓冲液-吐温储备液（含 1%Tween20 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲储备液，PBST ×10, pH=7.4）；

###### （e）甲醇溶液

移取分析纯甲醇溶液 10mL 于 200mL 容量瓶，加超纯水定容，配成 5%的甲醇溶液；

###### （f）苏丹红 1 号储备液

称取 0.380g 苏丹红 1 号标准品（sigma），溶于 3.80mL 的二甲基甲酰胺中，配成 0.1mg/mL 的苏丹红 1 号储备液；

###### （g）底物溶液（20mL 纯水；1mL 醋酸钠缓冲液；200μL 四甲基联苯胺（TMB）（1%）；

20 $\mu$ L 过氧化氢 (5%) ) ;

① 醋酸钠缓冲液

称取 3.450g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 用 100mL 超纯水溶解, 再用 1mol/L 柠檬酸 (21.031g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  溶解于 100mL 水中) 调节 pH=5.8 后, 再用水定容到 250mL, 配成 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液;

② TMB: 称取 0.0717g TMB, 用 7.17mL 二甲基亚砷溶解, 混匀, 配成 1%, w/v;

③ 过氧化氢: 取 20 $\mu$ L 30% 的过氧化氢加入 100 $\mu$ L 超纯水中, 混匀, 配成 5%;

(h)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液: 移取 25mL 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 溶解于 475mL 的超纯水中, 配成 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。

(i) RPMI-1640 培养液: RPMI-1640 固体粉末 10.4g 溶于 800ml 超纯水中, 加入 HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸) 4.67g, 并按终体积 1L 计算加入 200 mmol/L L-谷氨酸、100 mmol/L 2-巯基乙醇及 1 mmol/L (即 0.1g/L) 丙酮酸钠, 再加入  $10^7$  IU 青霉素以及  $10^5$  IU 链霉素, 补加超纯水使终体积达 1000 mL, 磁力搅拌 3~4 小时, 充分溶解后再加入  $\text{NaHCO}_3$  约 2g 调节培养液 pH 至 7.2~7.4, 0.22  $\mu$ m 滤器过滤除菌, 无菌分装, -20 $^\circ\text{C}$  密封保存。

(2) 主要仪器

洗板机: A5082, Tecan, Austria; 酶标仪: A2082, Tecan, Austria; 高效液相色谱仪: Alltech-001

(3) 间接 ELISA 筛选单克隆抗体

(a) 用包被抗原包板, 每孔 100 $\mu$ L, 4 $^\circ\text{C}$  过夜;

(b) PBST 缓冲液 (PBST 储备液 1: 10 稀释) 满孔洗涤三次;

(c) 加入酪蛋白封阻, 每孔 120 $\mu$ L, 4 $^\circ\text{C}$  过夜;

(d) 加入杂交瘤细胞上清, 每孔 50 $\mu$ L, 37 $^\circ\text{C}$  放置 2 小时;

(e) PBST 缓冲液洗板三次;

(f) 加入酶标二抗 (羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶), 每孔 100 $\mu$ L, 37 $^\circ\text{C}$  放置 1 小时;

(g) PBST 缓冲液洗板三次;

(h) 加入底物液显色, 每孔 100 $\mu$ L, 振摇 15-20 分钟;

(i) 加入 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液, 每孔 50 $\mu$ L, 终止反应;

(j) 用酶标仪测定吸光度值，做出标准曲线，进行结果分析与讨论。

#### (4) 间接竞争 ELISA 步骤

(a) 用包被抗原包板，每孔 200 $\mu$ L，4 $^{\circ}$ C 过夜；

(b) PBST 缓冲液（PBST 储备液 1: 10 稀释）满孔洗涤三次；

(c) 加入酪蛋白封阻，每孔 280 $\mu$ L，室温放置 1 小时；

(d) PBST 缓冲液洗板三次；

(e) 依次每孔加入 100 $\mu$ L 的标准溶液和 100 $\mu$ L 的一定稀释度的单克隆抗体，室温放置 1 小时；

(f) PBST 缓冲液洗板三次；

(g) 加入酶标二抗（羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶），每孔 200 $\mu$ L，室温放置 1 小时；

(h) PBST 缓冲液洗板三次；

(i) 加入底物液显色，每孔 200 $\mu$ L，振摇 15-20 分钟；

(j) 加入 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，每孔 80 $\mu$ L，终止反应；

(k) 用酶标仪测定吸光度值，做出标准曲线，进行结果分析与讨论。

#### (5) ELISA 实验条件的优化

本发明中的包被抗原为 Sudan I-C3-OVA, 实验中对包被抗原的浓度、抗体的稀释度、酶标二抗的稀释度等作了优化，优化结果为：包被抗原的浓度为 20ng/mL，单克隆抗体的稀释度为 1: 50000，酶标二抗的稀释度为 1: 20000，实验温度在室温下进行。以后的实验均在此条件下进行。

#### (6) ELISA 的标准曲线及灵敏度

苏丹红 1 号标准溶液的浓度为：0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 100ng/mL，由苏丹红 1 号的储备液（1.0mg/mL）经过 5% 的甲醇稀释而得。平行做 9 次，以苏丹红 1 号浓度的对数为横坐标，以相对信号  $B/B_0 \times 100\%$  为纵坐标做标准曲线（ $B_0$ ：标液浓度为 0 ng/mL 所对应的吸光度值；B：其他各浓度对应的吸光度值）。图 2 为 9 次 ELISA 测定的平均标准曲线， $IC_{50}$  在 1.1-2.0 ng/mL 之间。

#### (7) 溶剂效应

选用常用的萃取溶剂甲醇和乙腈，测试了它们对 ELISA 的影响。用含 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50% 的甲醇或乙腈水溶液，配置浓度为 0.1~100 ng/mL 的苏丹红 1 号标准溶液，进行 ELISA 操作过程并作出标准曲线，如图 3 所示，结果表明，

10%以下的乙腈和 30%以下的甲醇对 ELISA 的灵敏度影响较小。由于甲醇较乙腈价廉且 ELISA 对甲醇的耐受性更高，本发明选用甲醇做样品处理的萃取溶剂。

#### (8) ELISA 的特异性

ELISA 特异性可用交叉反应率来表示。交叉反应率 (CR%) = (苏丹红 1 号的  $IC_{50}$ /测试物质的  $IC_{50}$ ) × 100%。交叉反应率越小，ELISA 的特异性越高。

在本发明选择苏丹红 2-4 号和其他 6 种食品常用色素（柠檬黄，日落黄，靛蓝，亮兰，苋菜红，胭脂红）进行交叉反应实验，结果如表 1 所示。该单克隆抗体与苏丹红 2-4 号的交叉反应率为 0.95~33.9%，与其他 6 种食用色素的交叉反应率均小于 0.01%，说明所得抗体对苏丹红 1 号的特异性较高。

#### 5. ELISA 对加标样品中苏丹红 1 号含量的测定

随机选择了 10 种食品：辣椒面 I，辣椒面 II，辣椒酱 I，辣椒酱 II，番茄酱 I，番茄酱 II，火锅料 I，火锅料 II，香肠 I，香肠 II，经 ELISA 检测，辣椒酱 II 为阳性样品，苏丹红 1 号含量为 1.03  $\mu\text{g/g}$  样品；其余样品中的苏丹红 1 号含量 ELISA 均无法检出，为阴性样品。最后选择 6 种样品即辣椒面 I，辣椒酱 I，辣椒酱 II，番茄酱 I，火锅料 I 和香肠 I 做加标实验。同一样品取两份，一份加入适量的苏丹红 I 的甲醇溶液，一份加入等体积的甲醇，静置过夜，超声 30 分钟左右，涡旋混合 1 分钟，静置后，取上清离心 20 分钟，上清用 5% 甲醇稀释后用 ELISA 直接测定，结果如表 2 所示，回收率在 88.2-110.5%，相对标准偏差为 1.5-17.4%，说明该 ELISA 方法的准确性和精密度都较好。

#### 6. ELISA 和 HPLC 的比较

苏丹红 1 号的 HPLC 条件为：色谱条件：Hypersil Gold 柱，柱温为室温，流动相为甲醇：2%的乙酸水溶液=90：10，流量 1mL/min，进样 20 $\mu\text{L}$ ，紫外检测波长：480nm，标准溶液的浓度为：0.01，0.05，0.1，0.5，1.0，2.0，5.0  $\mu\text{g/mL}$ ，样品萃取液用 0.45 $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后直接测定；

所建立的 ELISA 的可靠性用 HPLC 进行进一步验证。9 种加标样品【即辣椒面 I，加标浓度 5  $\mu\text{g/g}$  和 20  $\mu\text{g/g}$ ；辣椒酱 I，加标浓度 2  $\mu\text{g/g}$  和 10  $\mu\text{g/g}$ ；辣椒酱 II，加标浓度 0  $\mu\text{g/g}$  和 2  $\mu\text{g/g}$ ；番茄酱 I，加标浓度 5  $\mu\text{g/g}$ ；火锅料 I，加标浓度 10  $\mu\text{g/g}$ ；香肠 I，加标浓度 5  $\mu\text{g/g}$ 】用甲醇萃取并用 ELISA 和 HPLC 测定，测定结果以 ELISA 为横坐标，HPLC 为纵坐标作图得两者的相关曲线，如如图 4 所示，回归方程为  $Y=0.8492X+0.3525$  ( $r=0.9840$ ,  $n=9$ )，说明二者的相关性很好。

表 1 抗体与苏丹红 II, III, IV 及其他 6 种食品常用色素的交叉反应率

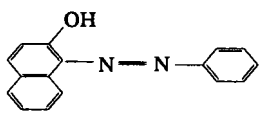
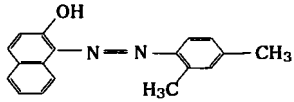
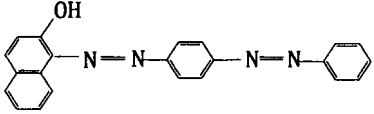
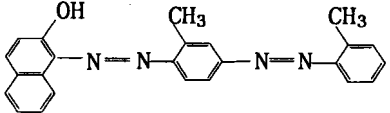
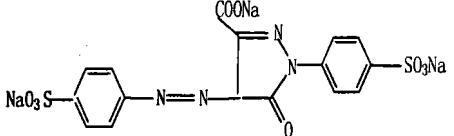
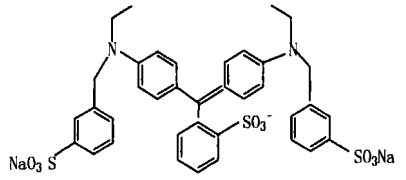
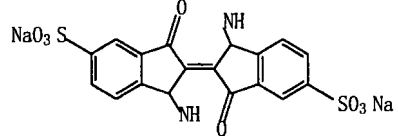
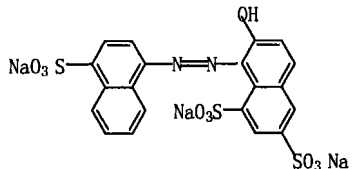
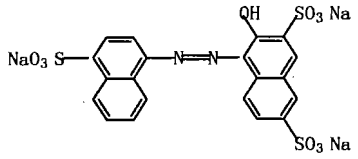
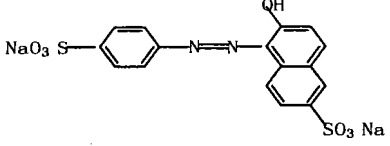
| 化合物     | 化学结构式   | IC50   | CR(%) |
|---------|---|--------|-------|
| 苏丹红 I   |    | 1.9    | 100   |
| 苏丹红 II  |    | 20     | 9.5   |
| 苏丹红 III |    | 5.6    | 33.9  |
| 苏丹红 IV  |    | 200    | 0.95  |
| 柠檬黄     |    | >10000 | <0.01 |
| 亮兰      |  | >10000 | <0.01 |
| 靛蓝      |  | >10000 | <0.01 |
| 胭脂红     |  | >10000 | <0.01 |
| 苋菜红     |  | >10000 | <0.01 |
| 日落黄     |  | >10000 | <0.01 |

表 2 加标实验的回收结果

| 样品                  | 加标浓度<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | 测定浓度<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | 回收率 (%) | RSD(%) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|--------|
| 辣椒面 I               | 10                          | 9.21±0.38                   | 92.1    | 4.1    |
|                     | 5                           | 5.03±0.23                   | 100.6   | 4.6    |
|                     | 2                           | 1.98±0.05                   | 99.0    | 2.5    |
| 辣椒酱 I               | 10                          | 9.99±1.38                   | 99.9    | 13.8   |
|                     | 5                           | 5.30±0.56                   | 106.0   | 10.6   |
|                     | 2                           | 1.97±0.03                   | 98.5    | 1.5    |
| 番茄酱 I               | 10                          | 9.28±0.87                   | 92.8    | 9.4    |
|                     | 5                           | 4.41±0.19                   | 88.2    | 4.3    |
|                     | 2                           | 1.90±0.15                   | 95.0    | 7.9    |
| 火锅料 I               | 10                          | 10.30±0.47                  | 103.0   | 4.6    |
|                     | 5                           | 4.97±0.45                   | 99.4    | 9.1    |
|                     | 2                           | 1.95±0.09                   | 97.5    | 4.6    |
| 香肠 I                | 10                          | 10.02±0.49                  | 100.2   | 4.9    |
|                     | 5                           | 4.78±0.37                   | 95.6    | 7.7    |
|                     | 2                           | 2.19±0.38                   | 109.5   | 17.4   |
| 辣椒酱 II <sup>a</sup> | 10                          | 11.55±0.87                  | 105.2   | 7.5    |
|                     | 5                           | 6.43±0.48                   | 108.0   | 7.5    |
|                     | 2                           | 3.24±0.18                   | 110.5   | 5.6    |

<sup>a</sup> 辣椒酱 II 的未加标样品中苏丹红 1 号的测定值为 1.03 $\mu\text{g/g}$ , 加标后回收率(R%)=(加标后测定浓度-1.03)/加标浓度 × 100%。

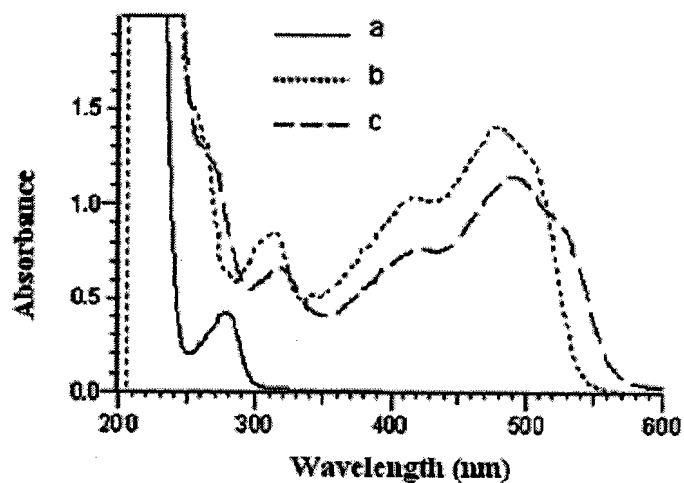


图 1

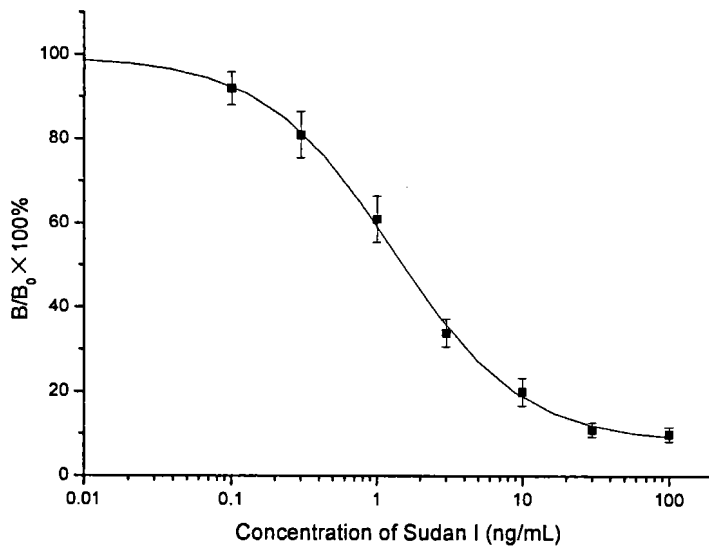


图 2

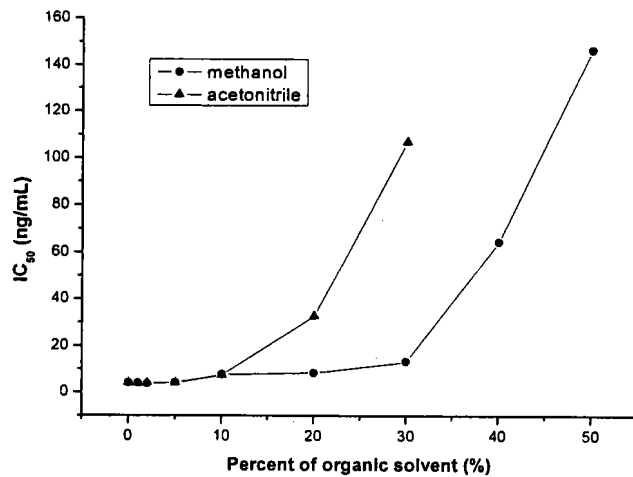


图 3

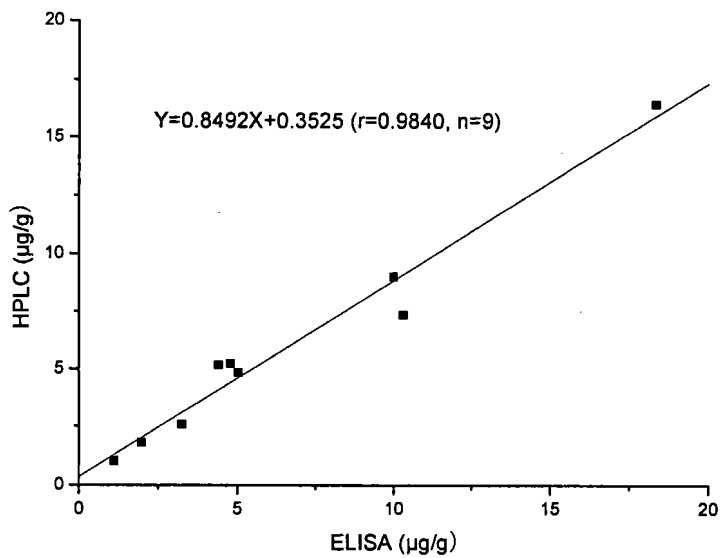


图 4

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 测定食品中苏丹红1号的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法                     |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101358978A</a>                   | 公开(公告)日 | 2009-02-04 |
| 申请号            | CN200810046008.6                               | 申请日     | 2008-09-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 四川大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 四川大学   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 四川大学   |         |            |
| [标]发明人         | 邓安平<br>王玉珍<br>杨红                               |         |            |
| 发明人            | 邓安平<br>王玉珍<br>杨红                               |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N33/535                          |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了测定食品中苏丹红1号含量的单克隆抗体酶联免疫吸附分析方法(ELISA)，其特点是合成苏丹红1号的修饰物并将其与蛋白联接，制得免疫原及包被抗原。通过杂交瘤技术包括免疫、融合、筛选等步骤获得抗苏丹红1号的单克隆抗体。该抗体用于苏丹红1号的免疫分析，标准曲线的浓度范围为0.1~100ng/mL，IC50为1.1~2.0ng/mL；抗体与苏丹红2-4号的交叉反应率为0.95~33.9%，与其他6种食品可添加色素几乎没有交叉反应；说明所建立的ELISA不仅灵敏度高而且特异性强。6种市售食品加标后用甲醇萃取，萃取液经适当稀释用ELISA测定，苏丹红1号的加标回收率为88.2~110.5%，相对标准偏差为1.5~17.4%。用HPLC和ELISA对9种加标样品进行分析，两种方法相关性较好(r=0.9840，n=9)。

