



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102539762 B

(45) 授权公告日 2015.03.25

(21) 申请号 201010588163.8

(22) 申请日 2010.12.07

(73) 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇国际信
息产业基地高新四街8号

(72) 发明人 汪善良 冯静 扶胜 余厚美
段盈盈 何丽霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56) 对比文件

- WO 9964431 A2, 1999.12.16,
- CN 101839907 A, 2010.09.22,
- CN 101643436 A, 2010.02.10,
- CN 101358978 A, 2009.02.04,
- CN 1844926 A, 2006.10.11,
- CN 101393218 A, 2009.03.25,
- CN 101078723 A, 2007.11.28,
- CN 201488998 U, 2010.05.26,

何方洋等. 苏丹红残留酶联免疫检测技术研究. 《食品研究与开发》. 2009, 第30卷(第6期), 139-143.

唐勇等. 苏丹红 I、III 和对位红竞争 ELISA 检测方法的初步建立. 《食品科学》. 2008, 第29卷(第8期), 523-525.

YuzhenWang et al..Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Sudan I in food samples. 《Talanta》. 2008, 第77卷(第5期), 1783-1789.

Chunmei Ju et al..Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a specific monoclonal antibody as a new tool to detect Sudan dyes and Para red. 《Analytica Chimica Acta》. 2008, 第621卷(第2期), 200-206.

审查员 周洋

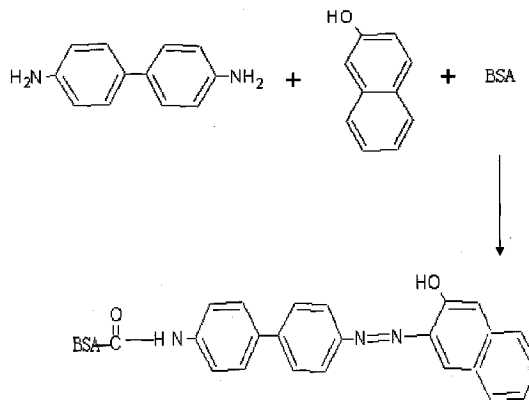
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

检测苏丹红和对位红药物的酶联免疫试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测苏丹红和对位红药物的酶联免疫试剂盒,它含有:包被有包被原的酶标板,酶标记物,苏丹红特异性抗体工作液(当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗体或酶标板上包被抗体且酶标记物为酶标记抗原时含有),苏丹红标准品溶液,底物显色液,终止液,浓缩洗涤液,浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测苏丹红和对位红的方法,它包括:首先进行样品前处理,然后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测辣椒酱、辣椒油、饲料等样品中苏丹红和对位红的含量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。



1. 一种检测苏丹红和对位红药物的酶联免疫试剂盒,其特征在于它含有:

- (1) 包被有包被原的酶标板;
- (2) 酶标记物;
- (3) 苏丹红标准品溶液;
- (4) 底物显色液;
- (5) 终止液;
- (6) 浓缩洗涤液;
- (7) 浓缩复溶液,

所述包被原为苏丹红抗原、抗体或抗抗体,所述酶标记物为酶标记苏丹红抗原、酶标记苏丹红抗体或酶标记抗抗体,

当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗抗体或酶标板上包被抗抗体且酶标记物为酶标记抗原时还含有苏丹红特异性抗体工作液,

所述苏丹红抗原是由苏丹红半抗原与载体蛋白偶联得到,所述苏丹红抗体是由所述抗原制备获得,

所述苏丹红抗原是通过下述步骤得到的:

- 1) 取对二氨基联苯 25mg,加入 0.2M 盐酸 4.5ml 溶解,冰浴;
- 2) 取亚硝酸钠 10-20mg 用 0.5ml 水溶解后加入 1) 中,在冰上搅拌反应 0.5-1 小时,取一部分用于下步反应,其余分装 -20 度保存;
- 3) 取 20-100mg 载体蛋白用 pH9.0、5ml 硼酸缓冲液溶解,制备成 BSA 溶液;
- 4) 取 5-20mg β -萘酚用 pH9.0、5ml 硼酸缓冲液溶解,制备成 β -萘酚溶液;
- 5) 将载体蛋白溶液和 β -萘酚溶液混合后放在冰上,加入 1-3ml 重氮化的对二氨基联苯溶液,避光反应 12-24h;
- 6) 用 pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液透析三天,每天换液 3 次,得到苏丹红抗原。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述苏丹红抗体为单克隆抗体。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述载体蛋白为牛血清蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 1~2mol/L 氢氧化钠。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:浓缩洗涤液为 pH 值为 7.2~7.6、含有 1.0%~3.0%吐温 -20、0.02~0.04%硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液;浓缩复溶液为含有 pH 值为 7.0~7.4、4-7%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液,苏丹红标准品溶液的浓度分别为 0 μ g/L、0.5 μ g/L、1.5 μ g/L、4.5 μ g/L、13.5 μ g/L、40.5 μ g/L。

6. 权利要求 1~5 任一项所述的试剂盒在检测苏丹红药物残留中的应用。

7. 一种检测样品苏丹红药物残留的方法,包括步骤:

- 1) 样品前处理;
- 2) 用权利要求 1-6 任一项所述的试剂盒进行检测;
- 3) 分析检测结果。

检测苏丹红和对位红药物的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测苏丹红和对位红药物的酶联免疫试剂盒,其特别适于辣椒酱、辣椒油、饲料样本中苏丹红和对位红药物残留的检测。

技术背景

[0002] 苏丹红(SudanI)属于人工合成偶氮类化工染料之一,主要用于机油、蜡和鞋油等工业产品的染色。国外动物实验表明,苏丹红染料会导致鼠类患癌,其代谢产物苯胺可直接作用于人体肝细胞,从而引起中毒性肝病,长期摄入苯胺可造成人体的神经系统损害,为此国际癌症研究机构将其列为第三类可致癌物质。这类物质虽缺乏足够的直接使人类致癌的证据,但是所具有的潜在致癌危险是无可置疑的,如果短期内大量食用则会引起死亡。因此世界各国都禁止将苏丹红作为食品生产中的添加剂,1995年欧盟禁止将苏丹红作为食用色素在食品中添加,我国《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760-1996)也不允许在食品中添加苏丹红。

[0003] 目前国内外有关食品中苏丹红检测方法大都采用液相色谱法或液相与质谱联用的方法进行检测,但上述几种检测方法所使用的设备价格昂贵,检测过程繁琐,不适合现场监控和大量样本筛查。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对上述不足提供一种用于苏丹红和对位红药物检测的酶联免疫试剂盒,其操作简单适,适合现场大批量样品的筛选。

[0005] 本发明试剂盒,它含有:

[0006] (1) 包被有包被原的酶标板(包被原为抗原、抗体或抗抗体);

[0007] (2) 酶标记物(为酶标记半抗原、酶标记抗体或酶标记抗抗体);

[0008] (3) 苏丹红特异性抗体工作液(当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗抗体或酶标板上包被抗抗体且酶标记物为酶标记抗原时含有);

[0009] (4) 苏丹红标准品溶液;

[0010] (5) 底物显色液;

[0011] (6) 终止液;

[0012] (7) 浓缩洗涤液;

[0013] (8) 浓缩复溶液。

[0014] 本发明所提供的检测苏丹红和对位红药物的酶联免疫试剂盒,包括苏丹红特异性抗体工作液及预包被包被原的酶标板和酶标记物工作液;所述酶标记物为酶标记的抗抗体,酶标记苏丹红半抗原或酶标记苏丹红特异性抗体;所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

[0015] 所述苏丹红抗原是由苏丹红半抗原与载体蛋白偶联得到,所述苏丹红抗体是由苏丹红抗原制备获得。

[0016] 所述苏丹红抗原是通过下述步骤得到的：

[0017] 1) 取对二氨基联苯 25mg, 加入 0.2mol/L 盐酸 4.5ml 溶解, 冰浴；

[0018] 2) 取亚硝酸钠 10-20mg 用 0.5ml 水溶解后加入 (1) 中, 在冰上搅拌反应 0.5-1 小时, 取一部分用于下步反应, 其余分装 -20℃ 保存；

[0019] 3) 取 20-100mg BSA 用 PH9.0, 5ml 硼酸缓冲液溶解, 制备成 BSA 溶液；

[0020] 4) 取 5-20mg β -萘酚用 PH9.0, 5ml 硼酸缓冲液溶解, 制备成 β -萘酚溶液；

[0021] 5) 将 BSA 溶液和 β -萘酚溶液混合后放在冰上, 加入 1-3ml 重氮化的对二氨基联苯溶液, 避光反应 12-24h；

[0022] 6) 用 PH7.4, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液透析三天, 每天换液 3 次, 得到苏丹红完全抗原。

[0023] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶, 其中优选辣根过氧化物酶；酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗抗体进行偶联得到的；酶标记苏丹红半抗原是采用混合酸酐或碳化二亚胺法将标记酶与苏丹红半抗原偶联得到的；酶标记特异性抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与特异性抗体偶联得到的, 辣根过氧化物酶可采用现有技术中的多种方法将其与抗抗体进行偶联, 如戊二醛法, 过碘酸钠法等, 本发明经过长期的劳动创造将过碘酸钠法进行了改良, 使其省时、降低辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗抗体的浓度比率, 节省了原材料。

[0024] 所述苏丹红特异性抗体可为苏丹红单克隆抗体或苏丹红多克隆抗体；它们均是用苏丹红半抗原与载体蛋白偶联物作为免疫原得到的；所述苏丹红多克隆抗体可为鼠源、马源、兔源抗体, 所述苏丹红单克隆抗体优选为苏丹红鼠单克隆抗体, 所述苏丹红多克隆抗体优选为苏丹红兔多克隆抗体。

[0025] 以上抗体均可以用苏丹红半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原制备。所述载体蛋白可为牛血清蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白；所述苏丹红半抗原与载体蛋白的偶联物通过将苏丹红半抗原和载体蛋白用重氮化法偶联得到。

[0026] 为了方便现场监控和大量样本筛查, 所述试剂盒还包括苏丹红标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

[0027] 所述浓缩洗涤液为 pH 值为 7.2 ~ 7.6, 含有 1.0 ~ 3.0% 吐温 -20, 0.02 ~ 0.04% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液。

[0028] 当标记酶为辣根过氧化物酶时, 显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成, 显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲, 所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺, 终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时, 显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 1 ~ 2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0029] 所述浓缩复溶液为含有 pH 值为 7.0 ~ 7.4, 4-7% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0030] 酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液优选为 pH 值为 9.6, 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液, 所述封闭液为 pH 值为 7.2 ~ 7.6, 含有 4 ~ 8% 酪蛋白, 5% 奶粉, 0.02 ~ 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0031] 本发明中酶标板的制备过程为：用包被缓冲液将包被原稀释成 0.10 ~ 0.20 μ g/ml, 每孔加入 100 μ l, 37℃ 温育 2h, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次 30s, 拍干, 然后在每孔中加入 150 ~ 200 μ l 封闭液, 37℃ 温育 1 ~ 2h, 倾去孔内液体拍干, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0032] 苏丹红抗体的制备

[0033] 将苏丹红半抗原与载体蛋白偶联物作为免疫原。

[0034] 免疫原的具体制备方法:苏丹红是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。因此将对氨基联苯进行改造突出分子结构中的特征集团,使制备的苏丹红抗体检测的特异性较高。

[0035] 苏丹红鼠单克隆抗体的制备

[0036] 动物免疫程序:采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以苏丹红半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原,得到较好的多抗血清后,取出脾脏进行细胞融合。

[0037] 细胞融合与克隆化:取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选细胞株,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0038] 苏丹红兔多克隆抗体的制备

[0039] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以苏丹红半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫,多次免疫后测定血清抗体效价得到多克隆抗体。

[0040] 本发明抗抗体的制备过程:羊抗鼠抗抗体是以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体;羊抗兔抗抗体是以羊作为免疫动物,以兔源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫,得到羊抗兔抗抗体。

[0041] 本发明所述试剂盒中苏丹红标准品溶液 6 瓶,0 μ g/L,0.5 μ g/L,1.5 μ g/L,4.5 μ g/L,13.5 μ g/L,40.5 μ g/L。

[0042] 本发明的检测原理为:

[0043] 当在微孔条上预包被苏丹红偶联抗原时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入苏丹红特异性抗体溶液,样本中残留的苏丹红药物与酶标板上包被的苏丹红偶联抗原竞争苏丹红特异性抗体,加入酶标记抗抗体进行放大作用,用显色液显色,样本吸光值与苏丹红药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中苏丹红的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的苏丹红标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中苏丹红含量的浓度范围。

[0044] 当在微孔条上预包被苏丹红特异性抗体时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记苏丹红半抗原溶液,样本中苏丹红药物与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的苏丹红特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与苏丹红药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中苏丹红的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的苏丹红标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中苏丹红含量的浓度范围。

[0045] 当在微孔条上预包被苏丹红偶联抗原时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记苏丹红特异性抗体溶液,样本中苏丹红药物与酶标板上包被的苏丹红偶联抗原竞争苏丹红特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与苏丹红的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中苏丹红的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的苏丹红标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中苏丹红含量的浓度范围。

[0046] 当在微孔条上预包被抗抗体时,加入苏丹红抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记苏丹红偶联抗原溶液,样本中的苏丹红药物与酶标记苏丹红偶联抗原竞争苏丹红特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与苏丹红药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中苏丹红的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的

苏丹红标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中苏丹红含量的浓度范围。

[0047] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测苏丹红药物的方法,它包括步骤:

[0048] (1) 样品前处理;

[0049] (2) 用试剂盒进行检测;

[0050] (3) 分析检测结果。

[0051] 样品的前处理主要是为了从样品中获得苏丹红溶液,从而用于后续的检测。

[0052] 本发明中用试剂盒检测时:当包被原为苏丹红偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体,温育后洗涤拍干,再加入酶标抗抗体,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为苏丹红偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记抗体,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为苏丹红特异性抗体时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记苏丹红半抗原,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为抗抗体时,向酶标板微孔中加入苏丹红抗体,温育后洗涤拍干,再加入标准品溶液或样品溶液后加入酶标苏丹红半抗原,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值。

[0053] 本发明中检测结果分析过程为:用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,即百分吸光度值。计算公式为:

[0054] 百分吸光度值(%) = $(B/B_0) \times 100\%$

[0055] 以苏丹红标准品溶液的浓度($\mu\text{g/L}$)的半对数值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中苏丹红的含量。

[0056] 本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法,计算出样品溶液浓度。

[0057] 本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件,此法更便于大量样品的快速分析。

[0058] 本发明检测的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争ELISA方法定性或定量检测样品中苏丹红的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品;采用高特异性的苏丹红单克隆抗体,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。本发明的试剂盒将在苏丹红的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0059] 图1:苏丹红抗原合成技术路线;

[0060] 图2:标准品苏丹红浓度。

具体实施方式

[0061] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0062] 实施例 1 试剂盒组分的制备

[0063] 1. 免疫原的合成

[0064] 将苏丹红半抗原与牛血清白蛋白采用重氮化法进行偶联得到免疫原。

[0065] 免疫原制备过程：

[0066] 1) 取对二氨基联苯 25mg, 加入 0.2mol/L 盐酸 4.5ml 溶解, 冰浴；

[0067] 2) 取亚硝酸钠 10-20mg 用 0.5ml 水溶解后加入 (1) 中, 在冰上搅拌反应 0.5-1 小时, 取一部分用于下步反应, 其余分装 -20℃ 保存；

[0068] 3) 取 20-100mgBSA 用 PH9.0, 5ml 硼酸缓冲液溶解, 制备成 BSA 溶液；

[0069] 4) 取 5-20mg β -萘酚用 PH9.0, 5ml 硼酸缓冲液溶解, 制备成 β -萘酚溶液；

[0070] 5) 将 BSA 溶液和 β -萘酚溶液混合后放在冰上, 加入 1-3ml 重氮化的对二氨基联苯溶液, 避光反应 12-24h；

[0071] 6) 用 PH7.4, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液透析三天, 每天换液 3 次, 得到免疫原。

[0072] 将苏丹红半抗原与卵清蛋白偶联得到包被原。

[0073] 包被原的制备过程：

[0074] 1) 取对二氨基联苯 25mg, 加入 0.2mol/L 盐酸 4.5ml 溶解, 冰浴；

[0075] 2) 取亚硝酸钠 10-20mg 用 0.5ml 水溶解后加入 (1) 中, 在冰上搅拌反应 0.5-1 小时, 取一部分用于下步反应, 其余分装 -20℃ 保存；

[0076] 3) 取 20-100mgOVA 用 PH9.0, 5ml 硼酸缓冲液溶解, 制备成 BSA 溶液；

[0077] 4) 取 5-20mg β -萘酚用 PH9.0, 5ml 硼酸缓冲液溶解, 制备成 β -萘酚溶液；

[0078] 5) 将 OVA 溶液和 β -萘酚溶液混合后放在冰上, 加入 1-3ml 重氮化的对二氨基联苯溶液, 避光反应 12-24h；

[0079] 6) 用 PH7.4, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液透析三天, 每天换液 3 次, 得到免疫原。

[0080] 单克隆抗体的制备

[0081] a. 动物免疫

[0082] 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内, 免疫剂量为 100 μ g/ 只, 使其产生多克隆抗体血清。

[0083] b. 细胞融合和克隆化

[0084] 小鼠血清测定结果较高后, 取其脾细胞, 按 7 : 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液, 筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化, 直到得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0085] 苏丹红的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量的产生苏丹红特异性抗体, 灵敏度能达到 0.5 μ g/L。

[0086] c. 细胞冻存和复苏

[0087] 将苏丹红的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个 /ml 的细胞悬液, 在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管, 立即放入 37℃ 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

[0088] d. 单克隆抗体的生产与纯化

[0089] 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/ 只, 7 天后腹腔注射苏丹红的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^7 个 / 只, 7 天后采集腹水。用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行腹水纯化, -20℃

保存。

[0090] 2. 多克隆抗体的制备

[0091] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以苏丹红与牛血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 1.5mg/kg,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,共免疫 5 次,最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血,测定血清抗体效价,心脏采血,用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0092] 3. 羊抗鼠抗抗体的制备过程:以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体;羊抗兔抗抗体的制备:以羊作为免疫动物,以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗兔抗抗体。

[0093] 4. 酶标板的制备

[0094] 用包被缓冲液将苏丹红偶联抗原稀释成 0.20 μg/ml,每孔加入 100 μl,37℃温育 2h,倾去包被液,用稀释 20 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后再每孔中加入 200 μl 封闭液,37℃温育 2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0095] 5. 酶标记羊抗鼠抗抗体的置备

[0096] 将抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4:1;由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点,这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚合物,为了解决这个问题,我们将传统的方法进行了改良,即:

[0097] 1) 省去了氨基的封闭过程,因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。

[0098] 2) 降低了辣根过氧化物酶:抗抗体的摩尔浓度比率至 2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶的活性的损失减少。

[0099] 实施例 2 检测苏丹红的酶联免疫试剂盒的组建

[0100] 组建检测苏丹红的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0101] (1) 包被苏丹红偶联抗原的酶标板;

[0102] (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0103] (3) 苏丹红单克隆抗体工作液;

[0104] (4) 苏丹红标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μg/L、0.5 μg/L、1.5 μg/L、4.5 μg/L、13.5 μg/L、40.5 μg/L;

[0105] (5) 底物显色液由 A 液和 B 液组成,底物显色液 A 液为过氧化脲,底物显色液 B 液四甲基联苯胺;

[0106] (6) 终止液为 2mol/L 硫酸;

[0107] (7) 浓缩洗涤液为 pH 值为 7.2~7.6,含有 1.0%~3.0%吐温-20,0.02~0.04% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液;

[0108] (8) 浓缩复溶液为含有 pH 值为 7.0~7.4,4~7%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0109] 实施例 3 样品中苏丹红的检测

[0110] 1. 样品前处理

[0111] a) 辣椒酱

[0112] 称取匀质样本 $3 \pm 0.05\text{g}$ 于离心管中,加入 6ml 乙腈,涡旋 30s,,室温 4000rpm 离心 3min ;移取 2ml 上清液于 50°C 环境下氮气吹干 ;加入 1ml 2mol/L 氢氧化钠溶液,涡旋 30s ;加入 2ml 正己烷涡旋 10s 溶解残留物 ;室温 4000rpm 离心 3min ;移取 1ml 上清液于 50°C 环境下氮气吹干 ;加入 0.5ml DMF 充分溶解残留物 ;取 $50\ \mu\text{l}$ 加入 $950\ \mu\text{l}$ 复溶液混匀 ;取 $50\ \mu\text{l}$ 用于分析。

[0113] b) 辣椒油、饲料样本

[0114] 称取 $1 \pm 0.05\text{g}$ 样品于离心管中,加入 2ml 2mol/L 氢氧化钠,加入 8ml 乙腈,涡旋 30s,,3800rpm 离心 3min ;吸取 1ml 上层清液,加入 1.5ml 水,混匀,C18 柱净化(将固相萃取装置连接循环水式真空泵加压过柱 15 滴/分),洗脱液于 50°C 环境下氮气吹干 ;加入 $200\ \mu\text{l}$ DMF 溶解残留物,移取 $50\ \mu\text{l}$ 加入 $950\ \mu\text{l}$ 复溶液混匀 ;取 $50\ \mu\text{l}$ 用于分析。

[0115] C18 柱净化步骤 :

[0116] a、加入 6ml 甲醇活化柱子,待甲醇流干(加压过柱 15 滴/分) ;

[0117] b、加 3ml 水平衡,待水流干(加压过柱 15 滴/分) ;

[0118] c、上样,待样品液流干(加压过柱 15 滴/分) ;

[0119] d、加入 5ml 40%乙腈-水淋洗(加压过柱 15 滴/分) ;

[0120] e、加入 2ml 90%乙腈-水洗脱,收集洗脱液。

[0121] 2. 用试剂盒检测

[0122] 向包被有苏丹红偶联抗原的酶标板微孔中加入苏丹红标准品溶液或样品溶液 $50\ \mu\text{l}$,再加入苏丹红单克隆抗体工作液 $50\ \mu\text{l}$,用盖板模封板, 25°C 恒温箱中反应 30min,倒出孔内液体,每孔加入 $250\ \mu\text{l}$ 洗涤液,30s 后倒出孔内液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 $100\ \mu\text{l}$, 25°C 恒温箱中反应 30min,倒出孔内液体,重复洗板步骤,每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲,底物显色液 B 液四甲基联苯胺 (TMB),轻轻振荡混匀, 25°C 恒温箱避光显色 15min,每孔加入 2mol/L 终止液硫酸 $50\ \mu\text{l}$,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在 450nm 处,测定每孔吸光度值 (OD 值)。

[0123] 3. 检测结果分析

[0124] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%,得到百分吸光度值。以苏丹红标准品浓度 ($\mu\text{g/L}$) 的半对数值为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出苏丹红的含量。

[0125] 实验例 1 标准品精密度试验 :

[0126] 分别从三个不同的时间段制备的酶标板中各抽出一批酶标板,每批各抽取 10 个试剂盒,每板各抽出 20 个微孔,测定 $4.5\ \mu\text{g/L}$ 标准溶液的吸光度值,计算变异系数。

[0127] 表 1 标准可重复性试验 (CV%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0128] 01 批	4.6	5.3	4.2	5.8	6.4	9.7	4.5	5.6	5.3	4.6
CV% 02 批	3.1	4.8	5.6	6.4	5.7	3.8	4.2	4.6	4.8	4.2
03 批	5.6	3.7	4.6	5.5	6.0	7.4	4.3	6.1	4.1	3.2

[0129] 通过上述试验结果可以得出, 每批试剂盒各 10 次标准品变异系数在 3.1% -9.7% 之间, 符合精密度小于或等于 25% 的规定。

[0130] 实验例 2 样本精密度和准确度试验

[0131] 准确度是指测得值与真值的符合程度, 在 ELSIA 中, 试剂盒的准确度常以回收率表示, 而精密度常以变异系数来表示。按照试剂盒提取方法, 以 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 两个浓度的苏丹红、对位红分别进行辣椒油添加, 以 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 两个浓度的苏丹红、对位红分别进行辣椒酱、饲料的添加回收率, 每种样本每个浓度各做 4 个平行, 并计算出变异系数。实验结果见表 2、3。

[0132] 表 2 添加苏丹红的试剂盒准确度和精密度 $\mu\text{g}/\text{kg}$

[0133]

试样	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (n=4)%	批内变异系数 (n=4)%	批间变异系数 (n=3)%
辣椒酱	20	64.6	11.5	12.3
	50	82.2	14.3	16.6
辣椒油	50	63.9	13.8	14.1
	100	64.5	9.8	12.2
饲料	20	69.1	10.2	11.6
	50	68.3	14.7	15.9

[0134] 表 2 添加对位红的试剂盒准确度和精密度 $\mu\text{g}/\text{kg}$

[0135]

试样	添加浓度 (µg/kg)	回收率 (n=4)%	批内变异系 数(n=4)%	批间变异系数 (n=3)%
辣椒酱	20	62.1	10.2	11.6
	50	82.5	9.7	12.0
辣椒油	50	70.5	11.3	13.5
	100	76.9	12.4	15.2
饲料	20	74.1	8.7	9.0
	50	60.1	10.0	11.6

[0136] 从表2、3可知,辣椒酱(水基质)、辣椒油、饲料三种样本苏丹红两个添加浓度的平均回收率范围为63.9~82.2%,批内变异系数范围为9.8~14.7%之间,批间变异系数在11.6~15.9%。

[0137] 辣椒酱(水基质)、辣椒油、饲料三种样本对位红两个添加浓度的平均回收率范围为60.1~82.5%,批内变异系数范围为8.7~12.4%之间,批间变异系数在9.0~15.2%。

[0138] 符合农医发【2005】17号附件2试剂盒备案参考评判标准中精密度和准确度标准。

[0139] 实验例3交叉反应率试验:

[0140] 选择与苏丹红结构和功能类似的三种药物,通过各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。

[0141] $\text{交叉反应率}(\%) = (\text{引起}50\% \text{抑制苏丹红的浓度} / \text{引起}50\% \text{抑制的类似物浓度}) \times 100\%$

[0142] 表4试剂盒的特异性

[0143]

[0144] 药物名称 交叉反应率(%)

[0145]

[0146] 苏丹红 100

[0147] 对位红 110

[0148]

[0149] 实验例4

[0150] 试剂盒保存条件为2~8℃,经过6个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、苏丹红添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37℃保存条件下放置6天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻5天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8℃至少可以保存6个月以上。

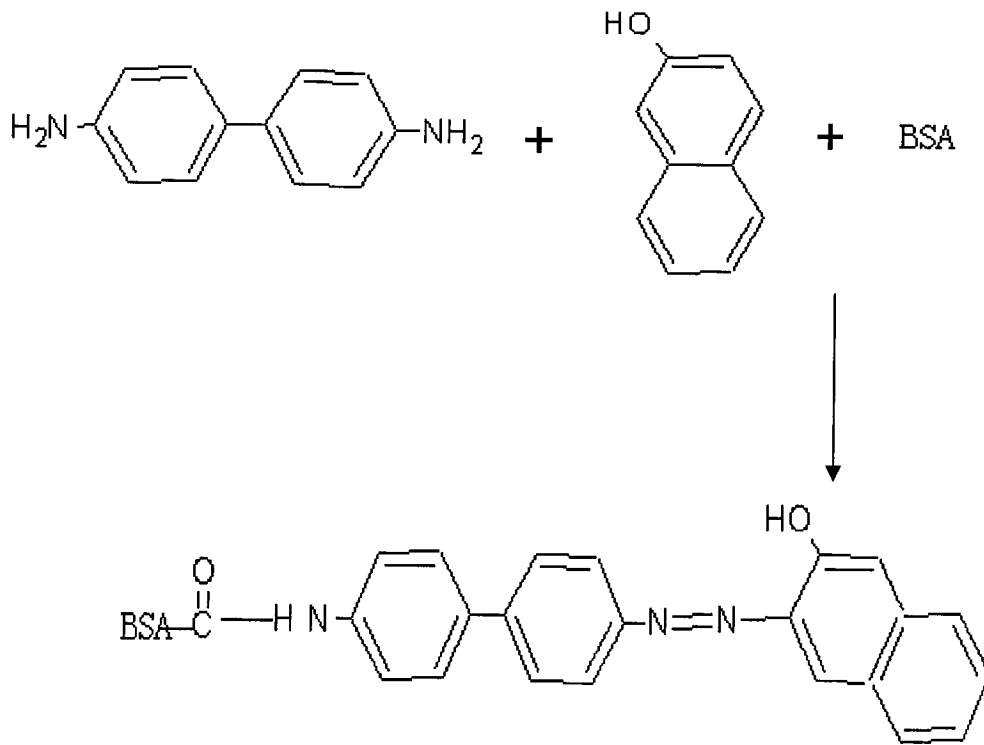


图 1

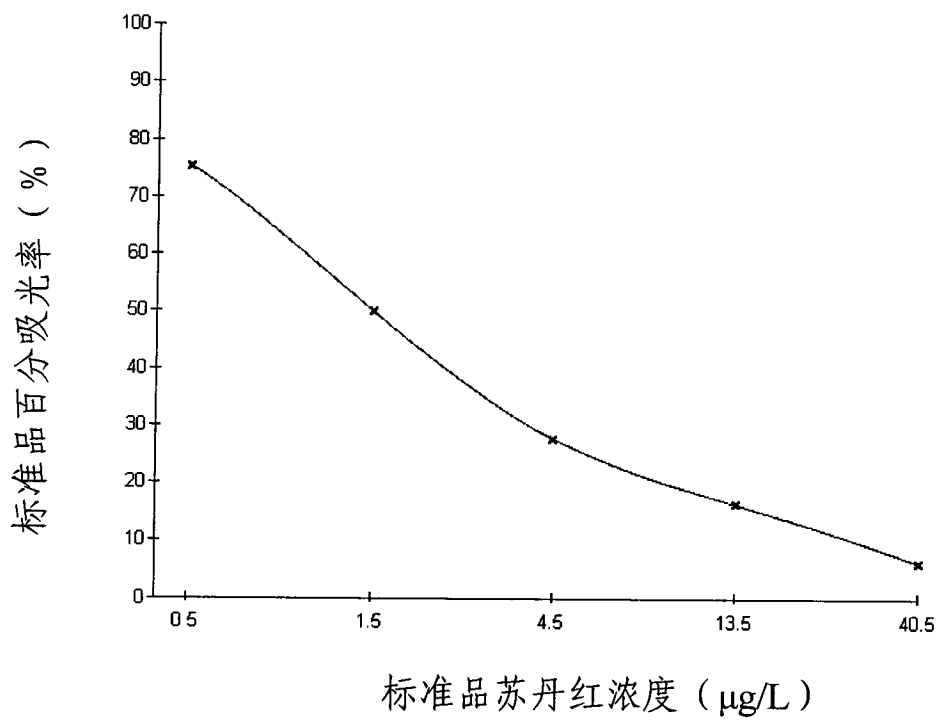


图 2

专利名称(译)	检测苏丹红和对位红药物的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN102539762B	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201010588163.8	申请日	2010-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	汪善良 冯静 扶胜 余厚美 段盈盈 何丽霞		
发明人	汪善良 冯静 扶胜 余厚美 段盈盈 何丽霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN102539762A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测苏丹红和对位红药物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶标板，酶标记物，苏丹红特异性抗体工作液(当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗体或酶标板上包被抗体且酶标记物为酶标记抗原时含有)，苏丹红标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测苏丹红和对位红的方法，它包括：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测辣椒酱、辣椒油、饲料等样品中苏丹红和对位红的含量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

