



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103454429 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201310333731. 3

CN 103145830 A, 2013. 06. 12,

(22) 申请日 2013. 08. 03

CN 101871936 A, 2010. 10. 27,

(73) 专利权人 河南百奥生物工程有限公司

CN 103175798 A, 2013. 06. 26,

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业开发区冬青街 22 号

CN 101671391 A, 2010. 03. 17,

专利权人 河南省农业科学院

审查员 苗君叶

(72) 发明人 张改平 胡晓飞 王栋 张静

职爱民 王方雨

(74) 专利代理机构 郑州金成知识产权事务所

(普通合伙) 41121

代理人 郭增欣

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101381410 A, 2009. 03. 11,

CN 101381410 A, 2009. 03. 11,

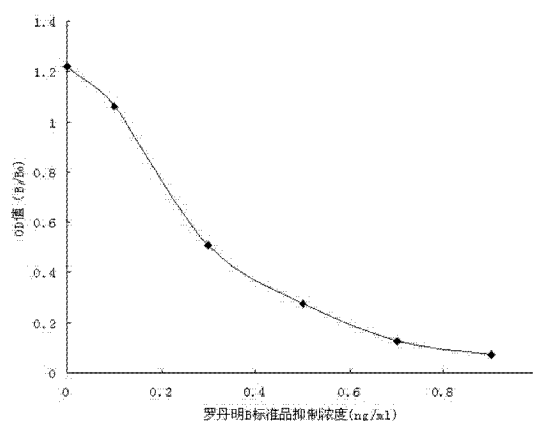
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒,其中包括罗丹明 123 特异性抗体、罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被罗丹明 123 抗原或特异性抗体的酶标板,罗丹明 B 标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液;其中罗丹明 123 特异性抗体为罗丹明 123 的多克隆抗体。本发明的罗丹明 B 酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便、价格低廉;对样品的前处理要求低且处理过程简单,能同时快速用于大批样品的筛查;与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。



1. 一种检测罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒,其中包括:罗丹明 123 特异性抗体、罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被罗丹明 123 抗原或特异性抗体的酶标板,罗丹明 B 标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液;其中罗丹明 123 特异性抗体为罗丹明 123 的多克隆抗体;

所述罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物是由以下方法得到的:

(1)称取 3mg 的罗丹明 123 和 3mg 的琥珀酸酐溶于 3 mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,室温下反应 3 小时后,向反应液加入 7.3 mg 二环己基碳二亚胺和 4.5 mg N-羟基琥珀酰亚胺,在 4℃反应条件下过夜反应,得到的反应液为 A 液;

(2)称取 40 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到 B 液;

(3)在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应 9 h;

(4)用 PBS 透析 3 天,换液 3 次/天;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物;

所述罗丹明 123 的多克隆抗体是由以下方法制备的:

将制得的罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物用生理盐水稀释成 1mg/mL 的溶液,将其与等量弗氏完全佐剂混合,然后用匀浆仪以 20000r/min 的转速充分乳化;

选体重在 2-3kg 的健康雄性新西兰大白兔,用乳化液在大白兔背部皮下多点注射进行首次免疫;每隔 2 周加强免疫,除用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂外,其他剂量和方法同首次免疫;三免后每次免疫后 10 天,耳缘静脉采血 1mL,进行抗体效价检测;当效价停止继续升高时,直接用免疫原进行最后一次免疫,腿部肌肉注射,第 8 天颈动脉采集血液,室温凝固 2h 后 4℃过夜,6000r/min 离心 10min,取血清部分用 50% 的饱和硫酸铵溶液沉淀,离心去上清液,沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,再用 33% 饱和硫酸铵溶液进行 2 次沉淀,沉淀物用磷酸盐缓冲液溶解,透析后即得到罗丹明 123 的多克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述的洗涤液为含有 0.05%-0.5% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液,所述终止液为 2mol/L 的盐酸。

4. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述的底物显色液由显色剂 A 和显色剂 B 组成,显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述试剂盒还包括浓缩样品稀释液,浓缩样品稀释液为含 0.1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;

用于制备酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

6. 一种如权利要求 1 所述的检测罗丹明 B 酶联免疫试剂盒的组建方法,其特征在于:该方法包括盒体内的罗丹明 123 多克隆抗体的制备;罗丹明 123 与载体蛋白偶联物的制备;

所述罗丹明 123 与载体蛋白偶联物的制备方法如下:

(1)称取 3mg 的罗丹明 123 和 3mg 的琥珀酸酐溶于 3 mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,室温下反应 3 小时后,向反应液加入 7.3 mg 二环己基碳二亚胺和 4.5 mg N-羟基琥珀酰亚胺,在 4℃反应条件下过夜反应,得到的反应液为 A 液;

(2) 称取 40 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到 B 液;

(3) 在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应 9 h;

(4) 用 PBS 透析 3 天,换液 3 次 / 天;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物。

7. 一种检测样品中罗丹明 B 含量的方法,包括步骤:

(1) 样品前处理;

(2) 用权利要求 1-5 任一项所述的试剂盒进行检测,向包被有罗丹明 123 抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入罗丹明 123 多克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入酶标记二抗,孵育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测吸光度值;

(3) 分析检测结果。

罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及到酶联免疫和食品添加剂残留检测领域。特别是涉及一种用于食品中罗丹明 B 残留检测的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法。

技术背景

[0002] 罗丹明 B (Rhodamine B), 中文别名 : 罗丹明 610、玫瑰红 B、蕊香红 B、玫瑰精 B、若丹明 B 或蓝光碱性蕊香红, 分子式 $C_{28}H_{31}N_2O_3$, 绿色结晶或红紫色粉末, 易溶于水、乙醇, 微溶于丙酮、氯仿、盐酸和氢氧化钠溶液。罗丹明 B 是一种具有鲜桃红色的人工合成的碱性荧光染料, 主要用于造纸工业, 也可用于腈纶、麻、蚕丝等织物以及麦秆、皮革、羽毛制品的染色。罗丹明 B 在溶液中有强烈的荧光, 常用作实验室中细胞荧光染色剂、有色玻璃、特色烟花爆竹等行业。

[0003] 罗丹明 B 是卫生部首批公布的 17 种违禁食品添加剂物质之一。2008 年我国将其列入第一批《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单》中, 明确规定不允许将其用作食品添加剂及食品染色。罗丹明 B 属于非食品原料, 因其价格低廉、色泽红艳、稳定性强等特点, 部分不良商贩将其作为苏丹红替代品用于食用农产品中, 如用作调味品 (主要是辣椒粉和辣椒油) 及染色剂 (腊肠等)。实验证明, 罗丹明 B 食用后导致人体皮下组织生肉瘤, 具有致癌和致突变性, 给社会带来极大危害。

[0004] 目前用于罗丹明 B 残留检测的方法较多, 如高效液相色谱法 (HPLC)、液相色谱 / 质谱联用分析法 (LC/MS)、气相色谱 / 质谱联用分析法 (GC/MS)、荧光探针法、薄层色谱扫描法、酶联免疫吸附实验 (ELISA) 等。但常用的理化分析方法需要昂贵的仪器设备、熟练的专业人员等条件, 而且操作过程复杂, 检测时间较长, 故限制了其应用范围, 难以在生产实际中推广应用。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题 : 克服背景技术中的问题, 提供一种特异、灵敏、快速、简便的快速检测罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒 ;

[0006] 还提供了罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒的组建方法和检测方法。

[0007] 本发明的技术方案 :

[0008] 一种检测罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒, 其中包括 : 罗丹明 123 特异性抗体、罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被罗丹明 123 抗原或特异性抗体的酶标板, 罗丹明 B 标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液 ; 其中罗丹明 123 特异性抗体为罗丹明 123 的多克隆抗体。

[0009] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白或钥孔铜蓝蛋白 ; 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶或羊抗兔 IgG 抗体。

[0010] 所述的洗涤液为含有 0.05%-0.5% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液, 所述终止液为

[0011] 2mol/L 的盐酸。

[0012] 所述的底物显色液由显色剂 A 和显色剂 B 组成,显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺。

[0013] 所述试剂盒还包括浓缩样品稀释液,浓缩样品稀释液为含 0.1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;用于制备酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

[0014] 所述罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物是由以下方法得到的:

[0015] (1)称取 3mg 的罗丹明 123 和 3mg 的琥珀酸酐溶于 3 mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,室温下反应 3 小时后,向反应液加入 7.3 mg 二环己基碳二亚胺和 4.5 mg N-羟基琥珀酰亚胺,在 4℃ 反应条件下过夜反应,得到的反应液为 A 液;

[0016] (2)称取 40 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到 B 液;

[0017] (3)在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃ 反应 9 h;

[0018] (4)用 PBS 透析 3 天,换液 3 次/天;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物。

[0019] 所述罗丹明 123 的多克隆抗体是由以下方法制备的:

[0020] 将制得的罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物用生理盐水稀释成 1mg/mL 的溶液,将其与等量弗氏完全佐剂混合,然后用匀浆仪以 20000r/min 的转速充分乳化;

[0021] 选体重在 2-3kg 的健康雄性新西兰大白兔,用所述的乳化液在大白兔背部皮下多点注射进行首次免疫;每隔 2 周加强免疫,除用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂外,其他剂量和方法同首次免疫;三免后每次免疫后 10 天,耳缘静脉采血 1mL,进行抗体效价检测;当效价停止继续升高时,直接用免疫原进行最后一次免疫,腿部肌肉注射,第 8 天颈动脉采集血液,室温凝固 2h 后 4℃ 过夜,6000r/min 离心 10min,取血清部分用 50% 的饱和硫酸铵溶液沉淀,离心去上清液,沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,再用 33% 饱和硫酸铵溶液进行 2 次沉淀,沉淀物用磷酸盐缓冲液溶解,透析后即得到罗丹明 123 的多克隆抗体。

[0022] 一种检测罗丹明 B 酶联免疫试剂盒的组建方法,包括盒体内的罗丹明 123 多克隆抗体的制备;罗丹明 123 与载体蛋白偶联物的制备;所述罗丹明 123 与载体蛋白偶联物的制备方法如下:

[0023] (1)称取 3mg 的罗丹明 123 和 3mg 的琥珀酸酐溶于 3 mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,室温下反应 3 小时后,向反应液加入 7.3 mg 二环己基碳二亚胺和 4.5 mg N-羟基琥珀酰亚胺,在 4℃ 反应条件下过夜反应,得到的反应液为 A 液;

[0024] (2)称取 40 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到 B 液;

[0025] (3)在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃ 反应 9 h;

[0026] (4)用 PBS 透析 3 天,换液 3 次/天;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物。

[0027] 一种检测样品中罗丹明 B 含量的方法,包括步骤:

[0028] (1)样品前处理;

[0029] (2)用所述的试剂盒进行检测,向包被有罗丹明 123 抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入罗丹明 123 多克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入酶标记二抗,孵育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测吸光度值;

[0030] (3) 分析检测结果。

[0031] 本发明试剂盒的检测原理：

[0032] 由于罗丹明 B 的化学结构不易合成人工抗原，本发明采用罗丹明 B 的同系物罗丹明 123 合成人工抗原，制备的罗丹明 123 抗体能与罗丹明 B 发生特异性结合，从而达到检测食品中违禁成分罗丹明 B 的目的。

[0033] 将罗丹明 123 抗原吸附于固相载体上，加入样本或罗丹明 B 标准品溶液，并加入抗罗丹明 B 的罗丹明 123 多克隆抗体工作液，待测样品中罗丹明 B 与固相载体上包被的罗丹明 123 抗体抗原竞争罗丹明 123 抗体，再加入酶标记抗体进行酶活性的放大作用，显色后终止，测定样品吸光度值，该值与样品中罗丹明 B 的量呈负相关，通过标准曲线比较即可得出罗丹明 B 的浓度范围。

[0034] 本发明的积极有益效果：

[0035] (1) 本发明的罗丹明 B 酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便、价格低廉；与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。

[0036] (2) 本发明的试剂盒采用间接竞争酶联免疫测定法定性或定量样品中罗丹明 B 的含量，对样品的前处理要求低且处理过程简单，能同时快速用于大批样品的筛查。

[0037] (3) 本发明的试剂盒检测操作步骤较少，节省检测时间，降低操作误差。

[0038] (4) 本发明基于抗原抗体免疫反应的免疫学快速检测技术进行检测，为罗丹明 B 残留检测提供一个新途径，该方法稳定性好，可在违禁食品成分罗丹明 B 的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0039] 图 1 罗丹明 B 标准品的抑制浓度曲线 (ng/ml)。

[0040] 该图详细列出了在不同标准品浓度下利用本试剂盒测定的读值结果。可以观察出标准浓度和显色值之间的关系。

具体实施方式

[0041] 为进一步理解本发明，提供了以下实施例，但这并不表示对本发明内容的任何限制。如没有特别说明，其中的百分含量均为重量含量。

[0042] 实施例 1 免疫原的合成及免疫血清的制备

[0043] 1.1 试剂与仪器

[0044] 罗丹明 123、罗丹明 B 购自 Sigma 公司，琥珀酸酐、二环己基碳二亚胺、N- 羟基琥珀酰亚胺购自上海化学试剂公司，牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂来自 Pierce 产品。

[0045] Bio-Rad imark 680 型酶标仪、AE260 电子天平，购自德国 METTLER 公司；HI9321 酸度计，购自美国 HANNA 公司；手持式匀浆器，购自德国 IKA 公司；93-3 定时恒温双向磁力搅拌器，购自上海亚荣生化仪器厂。

[0046] 1.2 罗丹明 123 人工抗原的合成

[0047] (1) 称取 3mg 的罗丹明 123 和 3mg 的琥珀酸酐溶于 3 mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中，室温下反应 3 小时后，向反应液加入 7.3 mg 二环己基碳二亚胺和 4.5 mg N- 羟

基琥珀酰亚胺,在 4℃ 反应条件下过夜反应,得到的反应液为 A 液;

[0048] (2) 称取 40 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到 B 液;

[0049] (3) 在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃ 反应 9 h;

[0050] (4) 用 PBS 透析 3 天,换液 3 次/天;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物,贮藏于 -20℃,备用。

[0051] 通过紫外扫描鉴定偶联物。具体操作为:将罗丹明 123 和牛血清白蛋白溶于的 PBS 缓冲液(0.01M, pH7.4)中,浓度为 1mg/mL;将偶联物同样用 PBS 缓冲液(0.01M, pH7.4)稀释使其浓度与牛血清白蛋白浓度接近。在 200-400nm 间扫描这三种溶液,得出各物质的紫外扫描波谱。通过紫外扫描波谱来鉴定人工合成抗原是否偶联成功。

[0052] 1.3 免疫及特异性抗体的制备

[0053] 将制得的罗丹明 123 与载体蛋白的偶联物用生理盐水稀释成 1mg/mL 的溶液,将其与等量弗氏完全佐剂混合,然后用匀浆仪以 20000r/min 的转速充分乳化;

[0054] 选体重在 2-3kg 的健康雄性新西兰大白兔,用乳化液在大白兔背部皮下多点注射进行首次免疫;每隔 2 周加强免疫,除用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂外,其他剂量和方法同首次免疫;三免后每次免疫后 10 天,耳缘静脉采血 1mL,进行抗体效价检测;当效价停止继续升高时,直接用免疫原进行最后一次免疫,腿部肌肉注射,第 8 天颈动脉采集血液,室温凝固 2h 后 4℃ 过夜,6000r/min 离心 10min,取血清部分用 50% 的饱和硫酸铵溶液沉淀,离心去上清液,沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,再用 33% 饱和硫酸铵溶液进行 2 次沉淀,沉淀物用磷酸盐缓冲液溶解,透析后即得到罗丹明 123 的多克隆抗体。

[0055] 实施例 2 免疫检测方法的建立

[0056] 2.1 ELISA 方法确定最佳包被浓度

[0057] 将 1000 μ g/mL、100 μ g/mL、10 μ g/mL、5 μ g/mL、3 μ g/mL、1 μ g/mL 系列浓度的卵清蛋白-罗丹明 123 偶联物,以每孔 50 μ L 的用量包被酶标板,4℃ 包被 2h,洗涤 4 次,拍干,加入封闭液,4℃ 封闭 24h,洗涤 4 次,拍干。加入 1:600 稀释的抗血清 50 μ L/孔,室温孵育 30min,洗涤 4 次,立即加入 50 μ L/孔的酶标羊抗兔抗体。室温作用 30min,洗涤 4 次,加显色液,50 μ L/孔,室温显色反应 15min,加 50 μ L/孔终止液终止反应,用酶标仪(450nm)检测 A 值。同时设置空白对照孔(不加抗血清,只加其稀释液)和平行重复孔,取 OD 值为 1.0 左右的包被浓度为最佳浓度,实验数据见表 1。由表 1 可以确定,偶联物最佳包被浓度为 3 μ g/mL。

[0058] 表 1 不同包被浓度的 OD 值

[0059]

包被浓度 μ g/mL	1000	100	10	5	3	1	0.5	0.25	空白
OD 值	2.127	1.955	1.824	1.366	1.077	0.836	0.723	0.347	0.031

[0060] 2.2 间接 ELISA 检测抗体效价

[0061] 以 3 μ g/mL 的浓度包被酶标板,从 400 倍开始倍比稀释抗血清,按 2.1 的 ELISA 步骤操作。以两倍于阴性血清 OD 值的抗血清 OD 值对应的抗血清稀释度为抗血清效价,其效价检测结果见表 2。从表 2 可以确定本发明制备的抗血清的效价在 6000 以上。

[0062] 表 2 抗血清效价检测结果

[0063]

稀释倍数	400	800	1600	3200	6400	12800	阴性血清	空白
OD 值	1.678	1.123	0.808	0.632	0.355	0.176	0.154	0.037

[0064] 2.3 间接竞争 ELISA 检测抗体特异性

[0065] ELISA 操作方法同 2.1。区别是每孔加入 50 μ l 不同浓度的游离罗丹明 B 与卵清蛋白-罗丹明 123 偶联物竞争抗体,随后加入抗血清,得出不同的 OD 值。根据 2.1 的结果,所用抗血清的最佳浓度为 1:600,罗丹明系列浓度和实验孔排序见表 3,同时设置平行重复孔和空白对照孔。以 0 抑制孔的 OD 值为最大值 B_0 ,其他抑制浓度孔 OD 值为 B, $B/B_0=50\%$ 时对应的罗丹明 B 的浓度为此抗体的 IC_{50} 值。抗体特异性检测结果见表 3,用所得数据绘制的罗丹明 B 抑制曲线见图 1。

[0066] 表 3 抗体特异性检测结果

[0067]

罗丹明 B 抑制 浓度 (ng/mL)	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
OD 值	1.223	1.060	0.513	0.280	0.130	0.072

[0068] 由表 3 数据可得,罗丹明 123 抗血清 IC_{50} 值在 0.1 ng/mL 左右,表明本发明的抗血清是具有良好特异性的罗丹明特异性抗体。

[0069] 实施例 3 检测罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒的组建

[0070] 组建罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0071] (1) 包被罗丹明 123 人工合成抗原的酶标板;

[0072] (2) 蛋白浓度为 0.05mg/L 的抗罗丹明 B 的多克隆抗体;

[0073] (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体;

[0074] (4) 罗丹明 B 标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.5 μ g/L、0.7 μ g/L、1 μ g/L;

[0075] (5) 底物显色液 A 为过氧化脲,底物显色液 B 为四甲基联苯胺;

[0076] (6) 洗涤液为含 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;

[0077] (7) 浓缩样品稀释液为 0.1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;

[0078] (8) 终止液为 2mol/L 的盐酸溶液。

[0079] 实施例 4 检测罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒的组建

[0080] 组建罗丹明 B 的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0081] (1) 包被羊抗兔抗抗体的酶标板;

[0082] (2) 蛋白浓度为 0.1mg/L 的抗罗丹明 B 的多克隆抗体;

[0083] (3) 用辣根过氧化物酶标记的罗丹明 123;

[0084] (4) 罗丹明 B 标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.5 μ g/L、0.7 μ g/L、1 μ g/L;

[0085] (5) 底物显色液 A 为过氧化脲,底物显色液 B 为邻苯二胺;

[0086] (6) 洗涤液为含 0.5% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液；

[0087] (7) 浓缩样品稀释液为 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液；

[0088] (8) 终止液为 2mol/L 的盐酸溶液。

[0089] 实施例 5 样品中罗丹明 B 残留的检测

[0090] 样品前处理：称取 5g 调味品溶于 40mL 离心管中，加入 20ml 样品稀释液（0.01% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液），充分震荡 30min，5000r/min 离心 10min，取上清 5mL。

[0091] 用试剂盒进行检测：向罗丹明 123- 卵清蛋白偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准品或样品溶液 50 μ L，再加入抗体工作液（0.05mg/L）50 μ L，室温反应 30min，倒出孔中液体，每孔加入 250 μ L 经 10 倍稀释的洗涤液，30s 后倒出孔中液体，共洗板 4 次，拍干。每孔加入酶标记抗体 50 μ L，避光室温孵育 30min，加底物显色液 A（过氧化脲）50 μ L、底物显色液 B（四甲基联苯胺）50 μ L，混匀，避光室温显色 15min，加入 50 μ L/ 孔的终止液，用酶标仪测定吸光度值。

[0092] 结果分析：计算百分比吸光度值并绘制标准曲线，相对应每一个样品的罗丹明 B 浓度可以从标准曲线上读出；也可以用回归方程法计算出样品中罗丹明 B 的含量。利用专业电脑软件便于大量样品的快速分析，根据酶标板上样本显色深浅和系列浓度标准溶液颜色的比较，可以判断出样本中罗丹明 B 的浓度范围。

[0093] 实施例 6 试剂盒精密度的试验

[0094] 本实验为标准可复性试验。从制备的酶标板中各取 10 个孔，测定 0.1 μ g/L 的标准溶液的 OD 值，重复 3 次，计算变异系数 CV%。结果表明变异系数范围在 4.6-7.2 之间，符合变异系数小于 20% 的规定，说明本试剂盒标准品的精密度达到要求。

[0095] 实施例 7 试剂盒回收率的实验

[0096] 取两个浓度的罗丹明 B 标样，对样品进行添加回收实验，每个浓度做 3 个平行实验，分别计算回收率。结果表明其添加回收率为 77%-89%。

[0097] 实施例 8 试剂盒保存期试验

[0098] 试剂盒保存条件为 2-8 $^{\circ}$ C，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值、50% 抑制浓度、罗丹明 B 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 $^{\circ}$ C 和 -20 $^{\circ}$ C 保存条件下分别放置 5 天，进行加速老化试验，结果表明各项指标符合要求。可以看出本发明的试剂盒可以在 2-8 $^{\circ}$ C 条件下保存 6 个月以上。

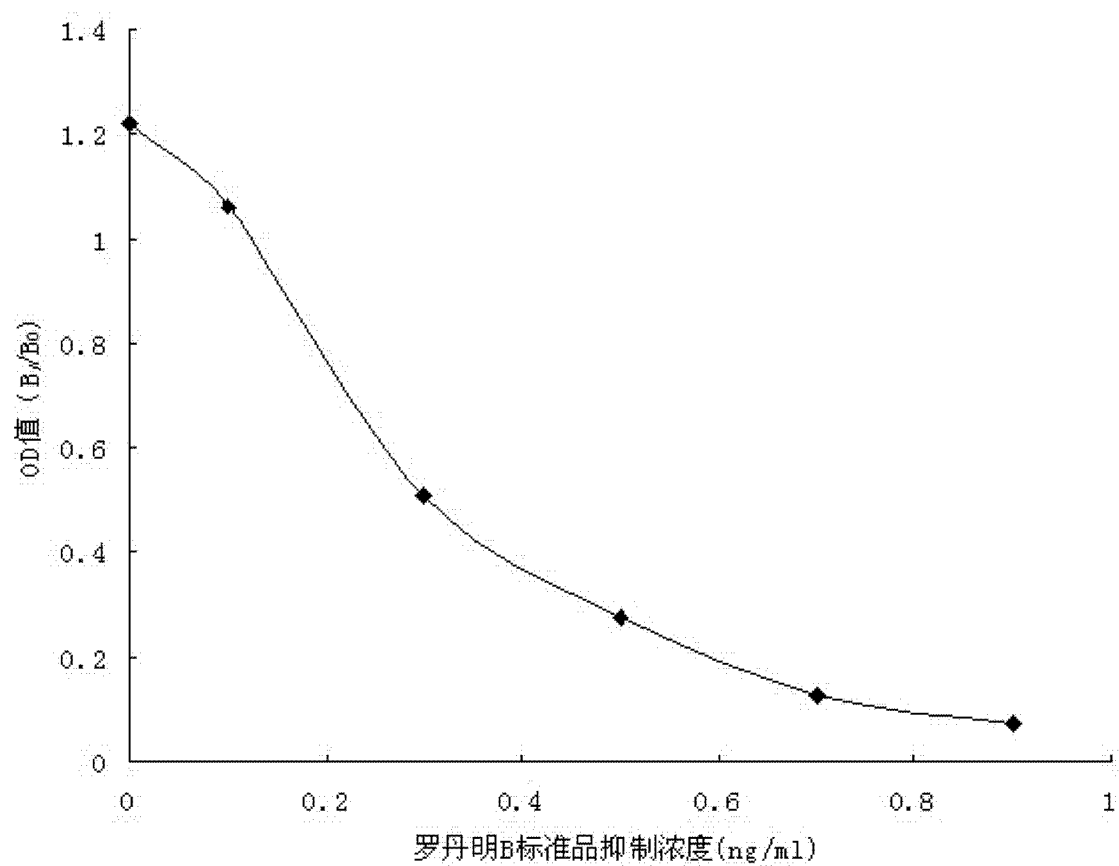


图 1

专利名称(译)	罗丹明B的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法		
公开(公告)号	CN103454429B	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201310333731.3	申请日	2013-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	河南百奥生物工程有限公司 河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南百奥生物工程有限公司 河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南百奥生物工程有限公司 河南省农业科学院		
[标]发明人	张改平 胡晓飞 王栋 张静 职爱民 王方雨		
发明人	张改平 胡晓飞 王栋 张静 职爱民 王方雨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
其他公开文献	CN103454429A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测罗丹明B的酶联免疫试剂盒，其中包括罗丹明123特异性抗体、罗丹明123与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被罗丹明123抗原或特异性抗体的酶标板，罗丹明B标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液；其中罗丹明123特异性抗体为罗丹明123的多克隆抗体。本发明的罗丹明B酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便、价格低廉；对样品的前处理要求低且处理过程简单，能同时快速用于大批样品的筛查；与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。

