



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105301244 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201410240858. 5

(22) 申请日 2014. 06. 03

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 万宇平 罗晓琴 何方洋 冯静
杨秀贤 吴鹏 刘春雪 张芝

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

检测酸性橙的酶联免疫试剂盒及其应用

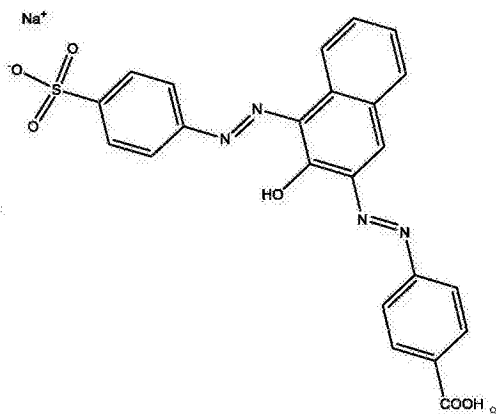
(57) 摘要

本发明提供了一种检测酸性橙的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、酸性橙单克隆抗体、酶标记物、酸性橙标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为酸性橙偶联抗原,所述酶标记物为酶标记抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测酸性橙的方法,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腌卤肉、豆瓣酱和辣酱中酸性橙的含量,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. 一种检测酸性橙的酶联免疫试剂盒,其特征在于包括:包被有包被原的酶标板、酸性橙单克隆抗体、酶标记物、酸性橙标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为酸性橙偶联抗原,所述酶标记物为酶标记抗抗体。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述酸性橙偶联抗原是由酸性橙半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

3. 如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于所述酸性橙半抗原是由酸性橙 II 与对氨基苯甲酸反应得到,分子结构式为:



4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述酸性橙单克隆抗体是以酸性橙偶联抗原作为免疫原制备获得。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

6. 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 氢氧化钠溶液。

7. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述洗涤液为 pH 值为 7.4,含有 0.5% ~ 1.0% 吐温-20、0.01% ~ 0.03% 叠氮化钠防腐剂、0.1 ~ 0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述复溶液为 pH 值为 7.0、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为质量体积百分比。

8. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述酸性橙标准品溶液的浓度分别为 0 μg/L、0.5 μg/L、1.5 μg/L、4.5 μg/L、13.5 μg/L、40.5 μg/L。

9. 一种检测样品中酸性橙含量的方法,包括步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用权利要求1 ~ 8 任一项所述的试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

检测酸性橙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酸性橙的酶联免疫试剂盒,其特别适于腌卤肉、豆瓣酱和辣酱中酸性橙含量的检测。

背景技术

[0002] 酸性橙 (Acid orange),又名金橙 II、橙黄 II、二号橙、桔黄橙、酸性金黄或酸性艳橙,俗名为“金黄粉”,化学名称为 2- 萘酚偶氮对苯磺酸钠。酸性橙是一种化工染料,主要用于皮革、蚕丝和羊毛等纺织物染色,该染料中有大量的化学助剂,如果长时间在那种环境下,有可能对将来的生育造成影响,比如不孕或者畸形儿,对自身健康也可能有影响,为中等毒性致癌化合物,被禁止作为食品添加剂使用。但由于其具有色泽鲜艳、着色稳定、价格低廉等特点,一些不法商贩为牟取暴利,将其作为食用色素用于食品、药材的生产和加工。在我国市售和出口的蜜饯、辣椒面、豆制品、红瓜子和卤制品等农产品中均检出过含有酸性橙等非食用色素,严重危害了消费者的健康。因此,建立一套快速、有效地检测食品中添加的非食用色素酸性橙的方法具有重要意义。

[0003] 目前文献报道有关酸性橙的检测方法有高效液相色谱法 (HPLC)、反向高效液相色谱法 (Re-HPLC)、高效液相色谱-质谱法 (HPLC-MS)、超高效液相色谱法 (UPLC)、薄层色谱扫描法、荧光光谱检测法等。在这些方法中,薄层色谱扫描法灵敏度不高,不适合作痕量酸性橙分析;荧光光谱检测法刚开始用于酸性橙的检测,应用较少。UPLC 法检测速度最快,但设备要求也最高;HPLC 以及 HPLC-MS 法是应用最广泛的方法,准确、稳定、可靠,也是目前测定酸性橙的标准方法,但仪器设备价格昂贵,且样品前处理繁琐、耗时,需要大型仪器设备和专业的技术人员,难于实现现场操作,不宜推广应用。而基于抗原抗体特异性反应的酶联免疫吸附法 (ELISA) 具有特异性好、灵敏度高、操作简便、检测成本低、适合于批量样本的筛选检测等优点,而且所需设备少,操作简单易学,成本低廉,能够更好地满足我国食品企业、政府职能监管部门等开展检测工作,极具发展潜力。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的用于酸性橙检测的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样本筛选的定性、定量检测方法。

[0005] 本发明试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、酸性橙单克隆抗体、酶标记物、酸性橙标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为酸性橙偶联抗原,所述酶标记物为酶标记抗体。

[0006] 所述酸性橙偶联抗原是由酸性橙半抗原与载体蛋白偶联得到,所述酸性橙半抗原是由酸性橙 II 与对氨基苯甲酸反应得到,所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

[0007] 所述酸性橙单克隆抗体是以酸性橙偶联抗原作为免疫原制备获得。

[0008] 所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

[0009] 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,其中优选辣根过氧化物酶;酶标记的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。

[0010] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括酸性橙标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

[0011] 所述酸性橙标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1.5\mu\text{g/L}$ 、 $4.5\mu\text{g/L}$ 、 $13.5\mu\text{g/L}$ 、 $40.5\mu\text{g/L}$ 。

[0012] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物液 A 液和底物液 B 液组成, A 液为过氧化氢或过氧化脲, B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为 $1\sim 2\text{mol/L}$ 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,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为 $1\sim 2\text{mol/L}$ 氢氧化钠溶液。

[0013] 所述洗涤液优选为 pH 值为 7.4,含有 $0.5\%\sim 1.0\%$ 吐温-20、 $0.01\%\sim 0.03\%$ 叠氮化钠防腐剂、 $0.1\sim 0.3\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为质量体积百分比。

[0014] 所述复溶液优选为 pH 值为 7.0、 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0015] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为 pH 值为 9.6、 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液,封闭液为 pH 值为 7.1 ~ 7.5 ,含有 $1\%\sim 3\%$ 酪蛋白、 $0.1\sim 0.3\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为质量体积百分比。

[0016] 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 $20\mu\text{g/mL}$,每孔加入 $100\mu\text{L}$, 37°C 避光孵育 2h 或 4°C 过夜,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤 2 次,每次 30s,拍干,然后在每孔中加入 $150\sim 200\mu\text{L}$ 封闭液, 37°C 避光孵育 1 $\sim 2\text{h}$,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0017] 本发明的检测原理为:

[0018] 在微孔条上预包被酸性橙偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酸性橙单克隆抗体溶液,样本中的酸性橙与酶标板上包被的酸性橙偶联抗原竞争抗酸性橙单克隆抗体,加入酶标记抗抗体进行放大作用,用显色液显色,样本吸光度值与酸性橙的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得到样本中酸性橙的残留量;同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的标准品溶液颜色的比较可粗略判断样本中酸性橙残留量的浓度范围。

[0019] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测酸性橙的方法,它包括步骤:

[0020] (1) 样本前处理;

[0021] (2) 用试剂盒进行检测;

[0022] (3) 分析检测结果。

[0023] 本发明检测酸性橙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本中酸性橙的含量;对样本的前处理要求低,样本前处理过程简单,能同时快速检测大批量样本;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、适于大批量样本筛选的定性、定量。

附图说明

[0024] 图 1 :酸性橙半抗原合成路线图

[0025] 图 2 :酸性橙半抗原核磁共振氢谱图

[0026] 图 3 :试剂盒标准曲线图

具体实施方式

[0027] 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。

[0028] 实施例 1 试剂盒组分的制备

[0029] 1、酸性橙半抗原的制备

[0030] 将 280mg 对氨基苯甲酸溶于 20mL 0.2mol/L 的 HCl 溶液中,0 ~ 4℃ 下滴加 140mg NaNO_2 的 5mL 水溶液,避光反应 0.5 ~ 1h,然后缓慢滴加 240mg 酸性橙 II 在 5mL 0.5mol/L 醋酸钠溶液中的混合物,避光反应 1 ~ 3h;加入适量浓盐酸酸化,产生沉淀,离心,水洗,乙酸乙酯提取,除去溶剂后得到在乙醇-水中重结晶的酸性橙 II 偶氮衍生物,即为酸性橙半抗原。

[0031] 取上述产物经核磁共振氢谱测定,如图 2 所示,12.7ppm 附近增加的羧基信号峰,8.1-8.4ppm 左右增加的芳环信号峰,说明半抗原合成成功。

[0032] 2、抗原的制备

[0033] 免疫原制备——酸性橙半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联得到免疫原。

[0034] 取 15mg 半抗原,溶解于 1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中;各取 30mg 碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 用 0.2mL 水充分溶解后加入半抗原溶液中,室温下搅拌 24h,即可得到反应液 A;称取 BSA 50mg,使之充分溶解在 3.8mL PBS (pH7.2) 中,将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌 24h,用 0.01mol/L PBS 4℃ 透析 3d,每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质;分装,于 -20℃ 保存备用。

[0035] 包被原制备——酸性橙半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联得到免疫原。

[0036] 将 BSA 换为卵清蛋白 (OVA) 按上述方法制备得到包被原。

[0037] 3、酸性橙单克隆抗体的制备

[0038] 动物免疫:将上述步骤得到的免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 150 μg /只,使其产生抗血清。

[0039] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按 8:1 (数量配比) 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,直到得到分泌酸性橙单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0040] 细胞冻存和复苏:将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。

[0041] 单克隆抗体的生产与纯化:将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5mL/只,7 天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 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。

[0042] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0043] 以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体。

[0044] 5、酶标记抗抗体的制备

[0045] 将羊抗鼠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体的摩尔浓度比为 4:1, 由于辣根过氧化物酶在强氧化作用下产生许多与抗体结合的位点, 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体。为了解决这个问题, 我们将传统的方法进行了改良, 即:

[0046] (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;

[0047] (2) 降低辣根过氧化物酶与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, 对酶活性的损失减少。

[0048] 6、酶标板的制备

[0049] 用包被缓冲液将包被原稀释成 $20 \mu\text{g/mL}$, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 37°C 避光孵育 2h, 倾去孔中液体, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次 30s, 拍干, 然后在每孔中加入 $200 \mu\text{L}$ 封闭液, 37°C 避光孵育 2h, 倾去孔内液体拍干, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0050] 实施例 2 检测酸性橙的酶联免疫试剂盒的组建

[0051] 组建检测酸性橙的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

[0052] (1) 包被酸性橙偶联抗原的酶标板;

[0053] (2) 酸性橙标准品溶液 6 瓶, 浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1.5 \mu\text{g/L}$ 、 $4.5 \mu\text{g/L}$ 、 $13.5 \mu\text{g/L}$ 、 $40.5 \mu\text{g/L}$;

[0054] (3) 酸性橙单克隆抗体工作液;

[0055] (4) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0056] (5) 底物显色液由 A 液和 B 液组成, A 液为过氧化脲, B 液为四甲基联苯胺;

[0057] (6) 终止液为 2mol/L 硫酸;

[0058] (7) 洗涤液为 pH 值为 7.4, 含有 $0.5\% \sim 1.0\%$ 吐温-20、 $0.01\% \sim 0.03\%$ 叠氮化钠防腐剂、 $0.1 \sim 0.3\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液, 所述百分比为质量体积百分比;

[0059] (8) 复溶液为 pH 值为 7.0、 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0060] 实施例 3 腌卤肉、豆瓣酱和辣酱样本中酸性橙的检测

[0061] 1、样本前处理

[0062] 腌卤肉、辣酱样本:

[0063] 称取 $2.0\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 样本至 50mL 聚苯乙烯离心管中, 加入 4mL 乙腈, 再加入 6mL 去离子水, 用涡旋仪涡动至均匀, 3000g 以上, 室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) 离心 5min ; 取 $100 \mu\text{L}$ 上清液于 2mL 聚苯乙烯离心管中, 加入 $900 \mu\text{L}$ 复溶液, 再加入 $800 \mu\text{L}$ 正己烷, 用涡旋仪涡动 30s, 3000g 以上, 室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) 离心 5min ; 除去上层有机相, 取下层 $50 \mu\text{L}$ 用于分析。

[0064] 豆瓣酱样本:

[0065] 称取 $2.0\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 样本至 50mL 聚苯乙烯离心管中, 加入 6mL 乙腈, 再加入 4mL 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.1), 用涡旋仪涡动至均匀, 3000g 以上, 室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) 离心 5min ; 取 $100 \mu\text{L}$ 上清液于 2mL 聚苯乙烯离心管中, 加入 $900 \mu\text{L}$ 复溶液, 再加入 $800 \mu\text{L}$ 正己烷, 用涡旋仪涡动 30s, 3000g 以上, 室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) 离心 5min ; 除去上层有机相, 取下层 $50 \mu\text{L}$ 用于分析。

[0066] 2、用试剂盒检测

[0067] 向包被有酸性橙偶联抗原的酶标板微孔中加入酸性橙标准品溶液或经前处理的样本溶液 50 μ L/ 孔, 再加入酸性橙单克隆抗体工作液 50 μ L/ 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光反应 30min; 倒出孔内液体, 每孔加入 250 μ L 洗涤液充分洗涤 4~5 次, 每次间隔 10s, 用吸水纸拍干; 再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体 100 μ L/ 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光反应 30min, 取出重复洗板步骤; 每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲 50 μ L, 底物显色液 B 液四甲基联苯胺 (TMB) 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光显色 10min, 每孔加入终止液 2mol/L 硫酸 50 μ 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)。

[0068] 3、检测结果分析

[0069] 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。以酸性橙标准品浓度 (μ g/L) 的对数值为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线, 如图 3 所示。用同样的办法计算样本溶液的百分吸光度值, 相对应每一个样本的酸性橙含量则可从标准曲线上读出。

[0070] 实施例 4 酸性橙酶联免疫试剂盒技术参数的确定试验

[0071] 1、试剂盒灵敏度和检测限

[0072] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度, 试剂盒标准曲线最低点为 0.5 μ g/L, 标准曲线的范围为 0.5~40.5 μ g/L, IC_{50} (50% 抑制浓度) 浮动范围为 1.5~3.0 μ g/L; 对空白烧鸡、烧鸭、酱牛肉、猪头肉、豆瓣酱、辣酱样本各 20 份进行检测, 从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度, 以 20 份样本浓度的平均值加上 3 倍标准差表示检测限, 结果得该方法对样本的检测限为 40 μ g/kg。

[0073] 2、样本精密度和准确度试验

[0074] 以回收率作为准确度评价指标, 以重复测定某一浓度样本的检测结果相对标准偏差 (RSD%) 作为精密度评价指标。计算公式为: 回收率 (%) = 实际测定值 / 理论值 $\times$ 100%, 其中理论值为样本的添加浓度; 相对标准偏差 $RSD\% = SD/X \times 100\%$, 其中 SD 为标准偏差, X 为测定数据的平均值。

[0075] 按 40 μ g/kg、80 μ g/kg、160 μ g/kg 三个浓度酸性橙对空白烧鸡、烧鸭、酱牛肉、猪头肉、豆瓣酱、辣酱样本进行添加回收测定, 每个样本做 4 个平行, 用三批不同试剂盒进行测定, 计算样本的平均回收率及精密度结果见下表。

[0076] 表 1 精密度及准确度试验

[0077]

样本	添加浓度($\mu\text{g/kg}$)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
烧鸡	40	92.8	7.4	11.2
	80	84.3	5.8	9.5
	160	102.1	6.3	10.6
烧鸭	40	77.9	6.9	9.3
	80	93.6	8.5	12.1
	160	90.4	5.2	8.7
酱牛肉	40	86.5	7.8	11.4
	80	103.7	6.3	9.9
	160	79.3	8.0	9.0

[0078]

猪头肉	40	91.8	5.3	8.6
	80	96.2	6.1	7.8
	160	100.6	6.7	10.5
豆瓣酱	40	89.4	8.4	8.8
	80	76.3	6.2	10.3
	160	97.9	7.6	9.6
辣酱	40	90.1	9.3	13.0
	80	102.8	7.4	10.5
	160	87.2	5.1	8.9

[0079] 以 40、80、160 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度的酸性橙对空白烧鸡、烧鸭、酱牛肉、猪头肉、豆瓣酱、辣酱样本进行添加,平均回收率在 70%~110%之间;批内、批间相对标准偏差均小于 15%。

[0080] 3、交叉反应率试验

[0081] 选择与酸性橙具有类似结构和类似功能的药物进行 ELISA 测定,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。

[0082]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制的酸性橙浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他物质浓度}} \times 100\%$$

[0083] 表 2 交叉反应率试验

[0084]

药物名称	交叉反应率 (%)
酸性橙	100
酸性橙 II	92
日落黄	16
诱惑红	2

[0085] 4、试剂盒稳定性试验

[0086] 试剂盒保存条件为 2 ~ 8℃, 经过 12 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零标准)、50%抑制浓度、酸性橙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 7 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 7 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℃至少保存 12 个月以上。

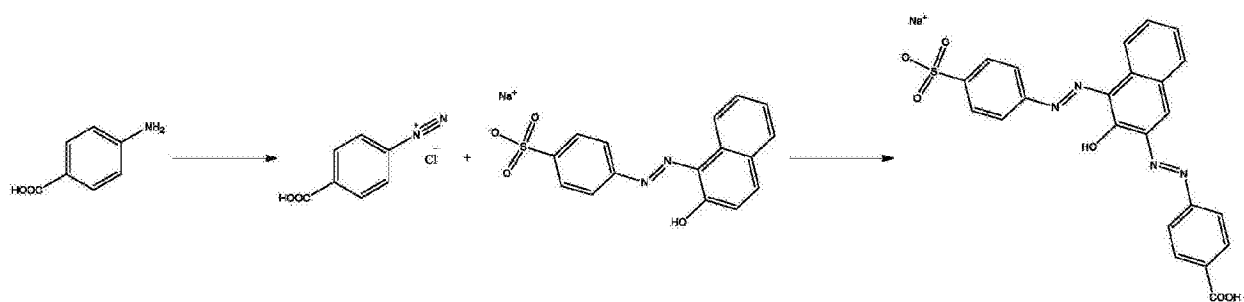


图 1

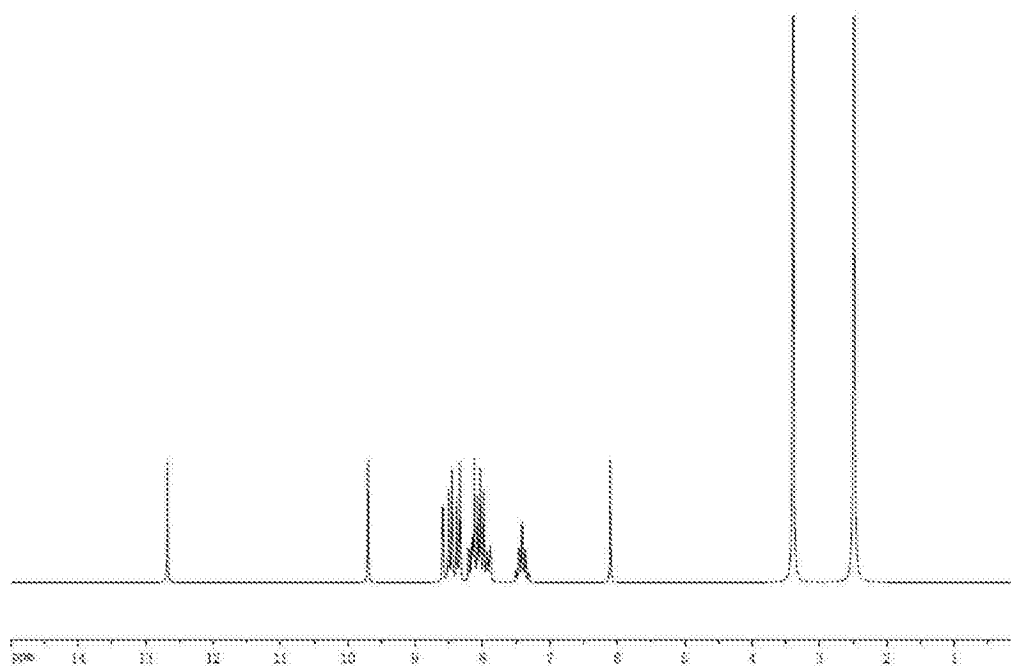


图 2

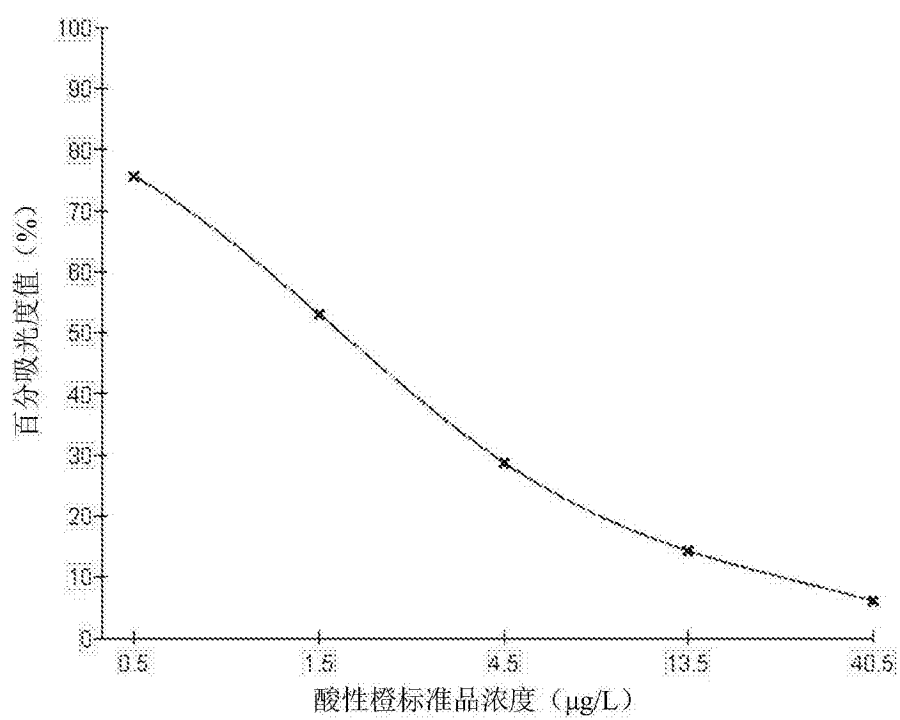


图 3

专利名称(译)	检测酸性橙的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105301244A	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201410240858.5	申请日	2014-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	万宇平 罗晓琴 何方洋 冯静 杨秀贤 吴鹏 刘春雪 张芝		
发明人	万宇平 罗晓琴 何方洋 冯静 杨秀贤 吴鹏 刘春雪 张芝		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN105301244B		
外部链接	SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测酸性橙的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有包被原的酶标板、酸性橙单克隆抗体、酶标记物、酸性橙标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液，所述包被原为酸性橙偶联抗原，所述酶标记物为酶标记抗抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测酸性橙的方法，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腌卤肉、豆瓣酱和辣酱中酸性橙的含量，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。

样本	添加浓度(ug/kg)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
烧鸡	40	92.8	7.4	11.2
	80	84.3	5.8	9.5
	160	102.1	6.3	10.6
烧鸭	40	77.9	6.9	9.3
	80	93.6	8.5	12.1
	160	90.4	5.2	8.7
酱牛肉	40	86.5	7.8	11.4
	80	103.7	6.3	9.9
	160	79.3	8.0	9.0