



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104634960 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201310556986. 6

(22) 申请日 2013. 11. 11

(71) 申请人 北京普析通用仪器有限责任公司

地址 101200 北京市平谷区平三路 3 号

(72) 发明人 王琳 田静秒 王雪 万渝平

周浩 叶敏 梁恒兴 张敏

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 于宝庆 刘春生

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

### (54) 发明名称

一种免疫磁性微球的制备方法、以及含有免疫磁性微球的苏丹红检测试剂盒和检测方法

### (57) 摘要

本发明提供了一种免疫磁性微球的制备方法,其采用包含 0.01%~0.1% 的吐温-20 以及 0.01%~0.1% 的聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液作为活化缓冲液和/或偶联缓冲液。本发明还公开了一种含有免疫磁性微球的苏丹红检测试剂盒以及采用所述试剂盒进行检测的检测方法。本发明提供的免疫磁性微球制备方法偶联率明显提高,所得免疫磁性微球稳定性好。本发明提供的试剂盒使用了苏丹红单克隆抗体包被的免疫磁性微球,灵敏度高,可用于大批量样品的快速筛查,能够避开待测样品中基质的影响,准确度高。本发明提供的检测方法可以在食品安全检测中发挥重要作用,有重大的社会意义和广阔的市场前景。

1. 一种免疫磁性微球的制备方法,包括磁性微球活化的步骤以及磁性微球与抗体或抗原偶联的步骤,其特征在于,所述活化和 / 或偶联的步骤中采用以下缓冲液:包含体积百分比为 0.01% ~ 0.1% 的吐温-20 以及质量百分比为 0.01% ~ 0.1% 的聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液。

2. 根据权利要求 1 的制备方法,其特征在于,所述磷酸盐缓冲液的浓度为 10 ~ 20mM, pH 值为 5.8 ~ 6.2;优选地,所述磁性微球为表面带有羧基的磁性微球;所述抗体为苏丹红单克隆抗体。

3. 一种含有免疫磁性微球的苏丹红检测试剂盒,其特征在于,包括以下组分:

(1) 按照权利要求 1 或 2 所述制备方法制得的苏丹红单克隆抗体结合免疫磁性微球;  
(2) 苏丹红酶结合物;(3) 样品稀释液;(4) 苏丹红标准品溶液;(5) 底物显色液;(6) 终止液;(7) 洗涤液。

4. 根据权利要求 3 的试剂盒,其特征在于,所述苏丹红酶结合物为辣根过氧化酶标记的苏丹红抗原。

5. 根据权利要求 3 的试剂盒,其特征在于,所述样品稀释液为包含 5% ~ 10% 体积的甲醇、0.05% ~ 0.1% 体积的乳化剂 TX-100 的 0.01 ~ 0.02M 磷酸盐缓冲生理盐水,其 pH 值为 7.2 ~ 7.4。

6. 根据权利要求 3 的试剂盒,其特征在于,所述苏丹红标准品溶液为苏丹红标准品溶于所述样品稀释液所得的溶液,浓度分别为:0ng/mL、0.2ng/mL、0.6ng/mL、1.8ng/mL 和 5.4ng/mL。

7. 根据权利要求 3 的试剂盒,其特征在于,所述底物显色液由 A 液和 B 液组成,A 液为过氧化脲显色液,B 液为四甲基联苯胺显色液。

8. 根据权利要求 3 的试剂盒,其特征在于,所述终止液为 1.8 ~ 2.0M 的硫酸溶液。

9. 根据权利要求 3 的试剂盒,其特征在于,所述洗涤液为包含 0.1% ~ 0.5% 体积的吐温-20 的 10 ~ 20mM 磷酸盐缓冲生理盐水,其 pH 值为 7.0 ~ 7.4。

10. 一种苏丹红的检测方法,其特征在于,采用权利要求 3-9 任一项所述的试剂盒检测待测样品中的苏丹红。

## 一种免疫磁性微球的制备方法、以及含有免疫磁性微球的 苏丹红检测试剂盒和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分析检测领域,具体涉及一种免疫磁性微球的制备方法、以及含有免疫磁性微球的苏丹红检测试剂盒和检测方法。

### 背景技术

[0002] 苏丹红是一种化学染色剂,被广泛用于溶剂、油、蜡、汽油的增色以及鞋、地板等的增光方面。它并非食品添加剂,但由于其染色鲜艳,常被非法添加到辣椒粉等调味品中。它的化学成份中具有偶氮结构,由于这种化学结构的性质决定了它具有致癌性,对人体的肝肾器官具有明显的毒性作用,因此被严禁添加到食品中。

[0003] 目前苏丹红的检测方法有高效液相色谱法、液质联用等,虽然这些方法灵敏度高,但前处理操作复杂,仪器价格昂贵,且需要专业的技术人员进行检测,不适合快速筛查大批量样品。目前可用于现场快速检测的方法如酶联免疫吸附试验(ELISA),相比之下应用起来较为灵活,但检测复杂样品时,待测样品中的基质影响较大,不利于低含量苏丹红样品的检测。因此,急需开发一种能够避免处理复杂样品时受基质影响较大的检测方法,从而可以避免检测样品时基质的影响,准确检测到待测样品中苏丹红的浓度。

[0004] 磁性微球表面带不同的化学官能团,如羧基  $\text{COOH}$ 、氨基  $\text{NH}_2$ 、二氧化硅  $\text{SiO}_2$ 、 $\text{C}_{18}$ 、环氧基、链霉亲和素、Protein A 等。磁性微球具有单分散性好、磁响应强、稳定性好、亲水性强、表面官能团含量高等特点。近年来,免疫磁性微球越来越广泛地应用于生物分离纯化、免疫分析、生物检测等领域,显示出灵敏度高、方便、快捷、高效、复杂样品基质影响小等特点。免疫磁性微球的制备一般为通过化学共价偶联,如 EDC(碳二亚胺)法等,通过活化磁性微球,使磁性微球上活化的基团与抗体或抗原共价结合,将抗体或抗原偶联到磁性微球上,从而形成免疫磁性微球(或免疫磁珠)。但是,某些免疫磁性微球的制备过程中,偶联效率较低,贮存稳定性较差,严重影响了免疫磁性微球的应用。

### 发明内容

[0005] 为克服免疫磁性微球制备过程中偶联率低、稳定性差的缺陷,本发明的目的是提供一种免疫磁性微球的制备方法。

[0006] 本发明提供的免疫磁性微球制备方法,包括磁性微球活化的步骤以及磁性微球与抗体或抗原偶联的步骤,其中,所述活化和 / 或偶联的步骤中采用以下缓冲液:包含体积百分比为 0.01%~0.1% 的吐温-20 以及质量百分比为 0.01%~0.1% 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的磷酸盐缓冲液(PB 缓冲液)。

[0007] 优选地,所述缓冲液为包含体积百分比为 0.01%~0.05% 的吐温-20 以及质量百分比为 0.01%~0.05% 的聚乙烯吡咯烷酮的 PB 缓冲液。

[0008] 优选地,所述 PB 缓冲液的浓度为 10~20mM(毫摩尔/升),pH 值为 5.8~6.2。

[0009] 其中,所述磁性微球为表面带有羧基的磁性微球;所述抗体为苏丹红单克隆抗体;

优选地,所述磁性微球的粒径为  $1 \sim 3 \mu\text{m}$ ,羧基含量为  $200 \sim 300 \mu\text{mol/g}$ 。

[0010] 为克服现有苏丹红检测过程中易受样品基质影响的缺陷,提供一种快速、准确的苏丹红检测方案,本发明的另一目的是提供一种含有免疫磁性微球的苏丹红检测试剂盒。

[0011] 此外,本发明的还一目的是提供苏丹红的检测方法。

[0012] 本发明提供的含有免疫磁性微球的苏丹红检测试剂盒,包括以下组分:

[0013] (1) 按照以上技术方案任一项所述免疫磁性微球制备方法制得的苏丹红单克隆抗体结合的免疫磁性微球;(2) 苏丹红酶结合物;(3) 样品稀释液;(4) 苏丹红标准品溶液;(5) 底物显色液;(6) 终止液;(7) 洗涤液。

[0014] 其中,所述苏丹红酶结合物为辣根过氧化酶(HRP)标记的苏丹红抗原。

[0015] 其中,所述样品稀释液为包含  $5\% \sim 10\%$  体积的甲醇、 $0.05\% \sim 0.1\%$  体积的乳化剂 TX-100 (Triton X-100) 的  $0.01 \sim 0.02\text{M}$  磷酸盐缓冲生理盐水(PBS),其 pH 值为  $7.2 \sim 7.4$ 。

[0016] 其中,所述苏丹红标准品溶液为苏丹红标准品溶于所述样品稀释液所得溶液,浓度分别为:  $0\text{ng/mL}$ 、 $0.2\text{ng/mL}$ 、 $0.6\text{ng/mL}$ 、 $1.8\text{ng/mL}$  和  $5.4\text{ng/mL}$ 。

[0017] 其中,所述底物显色液由 A 液和 B 液组成,显色液的 A 液为过氧化脲显色液, B 液为四甲基联苯胺(TMB)显色液。

[0018] 其中,所述终止液为  $1.8 \sim 2.0\text{M}$  的硫酸溶液。

[0019] 其中,所述洗涤液为包含  $0.1\% \sim 0.5\%$  体积的吐温-20 的  $10 \sim 20\text{mM}$  磷酸盐缓冲生理盐水(PBS),其 pH 值为  $7.0 \sim 7.4$ 。

[0020] 本发明提供的苏丹红检测方法为:采用以上技术方案任一项所述的试剂盒检测待测样品中的苏丹红。

[0021] 本发明提供的免疫磁性微球制备方法使用了含有吐温-20 以及聚乙烯吡咯烷酮的 PB 缓冲液,相对于目前常用的缓冲液,能够起到良好的增溶、分散和保护作用,有利于磁性微球与抗体或抗原进行偶联,偶联率明显提高。所得免疫磁性微球稳定性好,能在  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  条件下保存一年以上,也不发生脱落现象。

[0022] 本发明提供的试剂盒采用了酶联免疫检测原理的直接竞争法,检测时间短,能同时检测大批量样品。本发明提供的试剂盒使用了苏丹红单克隆抗体包被的免疫磁性微球,灵敏度高、方便快捷,可用于大批量样品的快速筛查。

[0023] 本发明提供的检测方法与常规的微孔板 ELISA 法相比,由于采用磁性微球进行了磁分离,故可避开待测样品时基质的影响,准确检测到样品中苏丹红的浓度。此外,本发明的检测方法还有对待测样品需求量少、对仪器设备要求低、试剂保存时间长等优点,可以在食品安全检测中发挥重要作用,有重大的社会意义和广阔的市场前景。

## 附图说明

[0024] 图 1 为实施例 3 中采用本发明试剂盒检测得到的苏丹红标准曲线图;

[0025] 图 2 为实施例 3 中采用微孔板 ELISA 检测得到的苏丹红标准曲线图;

[0026] 图 3 为实施例 7 中本发明试剂盒的稳定性检测结果,时间间隔为 7 天,在  $37^\circ\text{C}$  条件下保存。

## 具体实施方式

[0027] 本发明实施方式中涉及到的百分号“%”，若未特别说明，是指质量百分比；但溶液的百分比，除另有规定外，是指溶液 100mL 中含有溶质若干克；液体之间的百分比，是指在 20℃ 时的体积比例。如无特别说明，本发明实施方式中涉及到的操作均为本领域的常规操作，涉及的试剂均为常见市售试剂。

[0028] 本发明的一个方面提供了一种免疫磁性微球的制备方法，包括磁性微球活化的步骤以及磁性微球与抗体或抗原偶联的步骤，其中，所述活化和 / 或偶联的步骤中采用以下缓冲液：包含体积百分比为 0.01% ~ 0.1% 的吐温 -20 以及质量百分比为 0.01% ~ 0.1% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 的磷酸盐缓冲液 (PB 缓冲液)。

[0029] 免疫磁性微球的制备过程通常为：将表面带有化学官能团的磁性微球在活化缓冲液中通过活化剂进行活化，再将活化后的磁性微球置于偶联缓冲液中，在其中与抗体或抗原进行偶联反应，偶联反应完毕后封闭磁性微球表面未反应的位点，然后将得到的免疫磁性微球进行使用或将其分散于贮存液中进行保存。磁性微球的活化多使用 MES (2- 吗啉乙磺酸) 作为缓冲液，但本发明人发现，在某些磁性微球与抗体或抗原的偶联反应中，使用 MES 缓冲液所得的偶联率较差，且所得免疫磁性微球稳定性较差，容易产生凝集现象。经过大量实验，本发明人采用了上述 PB 缓冲液作为活化和 / 或偶联缓冲液，能够起到良好的增溶、分散和保护作用，从而有效提高了偶联率，并提高了免疫磁性微球的稳定性。

[0030] 优选地，所述 PB 缓冲液包含体积百分比为 0.01% ~ 0.05% 的吐温 -20 以及质量百分比为 0.01% ~ 0.05% 的聚乙烯吡咯烷酮。

[0031] 优选地，PB 缓冲液的浓度为 10 ~ 20mM，pH 值为 5.8 ~ 6.2。

[0032] 在一个具体的实施方式中，免疫磁性微球的制备方法包括以下步骤：

[0033] (1) 将磁性微球用活化缓冲液洗涤 2 ~ 3 次后，分散在活化缓冲液中。

[0034] (2) 加入活化剂混合反应，其中所述活化剂为 EDC 和 NHS (N- 羟基琥珀酰亚胺) 的混合物。

[0035] (3) 将活化后的磁性微球用偶联缓冲液洗涤 2 ~ 3 次后，分散在偶联缓冲液中。

[0036] (4) 加入抗体或抗原，进行偶联反应。

[0037] (5) 加入封闭液，封闭免疫磁性微球表面未反应的位点。

[0038] (6) 使用所得的免疫磁性微球，或将其用贮存液洗涤 2 ~ 3 次后，分散在贮存液中。

[0039] 其中，EDC 和 NHS 的加入量可由本领域技术人员根据具体需要确定。EDC 和 NHS 可以为任意组成比例。

[0040] 其中，抗体或抗原可以通过本领域已知的方法制备，例如杂交瘤技术等；也可以通过商购获得。

[0041] 其中，磁性微球与抗体或抗原之间的比例可由本领域技术人员根据具体需要确定。

[0042] 其中，封闭液可以是通常用于封闭磁性微球表面未反应位点的任何试剂，例如 BSA (牛血清白蛋白)，优选 0.5% ~ 1%BSA，更优选 1%BSA。

[0043] 由上述方法制备的免疫磁性微球溶液可以现配现用。也可以分散在贮存液中，并于 2 ~ 8℃ 条件下贮存。其中，贮存液可以为包含 0.1% ~ 0.5%BSA、0.01% ~ 0.05% 吐温 -20、0.01% ~ 0.05% 叠氮钠的 10 ~ 20mM 的 PBS 缓冲液，其 pH 值为 7.2 ~ 7.4。优选为

包含 0.1%BSA、0.05% 吐温 -20、0.05% 叠氮钠的 10mM PBS 缓冲液,其 pH 值为 7.4。

[0044] 在一个优选的实施方式中,磁性微球为表面带有羧基的磁性微球,抗体为苏丹红单克隆抗体,免疫磁性微球的制备方法包括以下步骤:

[0045] (1) 使用活化缓冲液将粒径为 1 ~ 3  $\mu\text{m}$ 、优选为 1.8 ~ 2.2  $\mu\text{m}$ 、羧基含量 200 ~ 300  $\mu\text{mol/g}$ 、优选为 250 ~ 260  $\mu\text{mol/g}$  的羧基磁性微球洗涤 2 ~ 3 次,磁分离去除上清,并分散在活化缓冲液中,其中所述活化缓冲液为包含体积百分比为 0.01% ~ 0.1% 的吐温 -20、重量百分比为 0.01% ~ 0.1% 的 PVP 的 10 ~ 20mM PB 缓冲液,其 pH 值为 5.8 ~ 6.2。

[0046] (2) 向上述活化缓冲液中加入摩尔量为羧基含量 15%~25% 的 EDC 和 NHS 混合物,混匀后,室温下震荡 10 ~ 50min 进行活化。

[0047] (3) 使用偶联缓冲液将活化后的磁性微球洗涤 2 ~ 3 次,磁分离去除上清,其中所述活化缓冲液为包含体积百分比为 0.01% ~ 0.1% 的吐温 -20、重量百分比为 0.01% ~ 0.1% 的 PVP 的 10 ~ 20mM PB 缓冲液,其 pH 值为 5.8 ~ 6.2。

[0048] (4) 以磁性微球和苏丹红单克隆抗体的质量比为 10:1 ~ 20:1、优选为 15:1 的比例加入苏丹红单克隆抗体,并在室温下震荡 1 ~ 2 小时。

[0049] (5) 加入 0.5% ~ 1%BSA,室温下震荡从而封闭免疫磁性微球表面未反应的位点。

[0050] (6) 使用所得的免疫磁性微球,或者用贮存液将封闭后的免疫磁性微球洗涤 2 ~ 3 次,磁分离去除上清,并将免疫磁性微球分散在贮存液中,并于 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$  条件下贮存,其中所述贮存液为包含 0.1% ~ 0.5%BSA、0.01% ~ 0.05% 吐温 -20、0.01% ~ 0.05% 叠氮钠的 10 ~ 20mM 的 PBS 缓冲液,其 pH 值为 7.2 ~ 7.4。

[0051] 本发明的另一个方面提供了用于检测苏丹红的免疫磁性微球试剂盒,包括以下组分:

[0052] (1) 按照以上技术方案任一项所述免疫磁性微球制备方法制得的苏丹红单克隆抗体结合的免疫磁性微球;(2) 苏丹红酶结合物;(3) 样品稀释液;(4) 苏丹红标准品溶液;(5) 底物显色液;(6) 终止液;(7) 洗涤液。

[0053] 上述试剂盒的检测原理为:将待测样品、包被有苏丹红单克隆抗体的免疫磁性微球和苏丹红酶结合物一起加入到测试管中,样品中的苏丹红和苏丹红酶结合物相互竞争免疫磁性微球上的苏丹红抗体结合位点;通过磁分离把没有结合的试剂处理掉;通过酶催化底物显色,显色终止后,测定样品的吸光度值;待测样品的吸光度值与苏丹红的浓度呈负相关,与标准曲线比较计算可得出待测样品中苏丹红的浓度。

[0054] 其中,苏丹红酶结合物为辣根过氧化酶(HRP)标记的苏丹红抗原。

[0055] 其中,样品稀释液为包含 5% ~ 10% 甲醇、0.05% ~ 0.1%Triton X-100 的浓度为 0.01 ~ 0.02M PBS 缓冲液,其 pH 值为 7.2 ~ 7.4。优选地,样品稀释液为包含 10% 甲醇、0.1%Triton X-100 的 0.01M PBS 缓冲液,pH 值为 7.4。苏丹红为脂溶性物质,样品稀释液中的甲醇和 Triton X-100 能起到很好的助溶作用,使苏丹红较好地溶解在样品稀释液中,而又不影响后续检测。

[0056] 其中,苏丹红标准品溶液为苏丹红标准品溶于所述样品稀释液所得的溶液,浓度分别为:0ng/mL、0.2ng/mL、0.6ng/mL、1.8ng/mL 和 5.4ng/mL。

[0057] 其中,底物显色液由 A 液和 B 液组成,显色液的 A 液为 0.5% ~ 1% 的过氧化脲显色液,B 液为 0.3% ~ 0.5% 的四甲基联苯胺显色液;优选地,显色液的 A 液为 0.5% 的过氧

化脲显色液, B 液为 0.3% 的四甲基联苯胺显色液。

[0058] 其中, 终止液为 1.8 ~ 2.0M 的硫酸溶液。

[0059] 其中, 洗涤液为包含 0.1% ~ 0.5% 吐温 -20 的 10 ~ 20mM PBS 缓冲液, 其 pH 值为 7.0 ~ 7.4。优选地, 洗涤液为包含 0.2% 吐温 -20 的 10mM PBS 缓冲液, 其 pH 值为 7.4。

[0060] 本发明的另一个方面提供了用于检测苏丹红的检测方法, 其采用上述技术方案任一项所述的试剂盒检测待测样品中的苏丹红。

[0061] 在一个具体的实施方式中, 上述检测方法包括: (1) 将试剂盒从保存条件下恢复至室温; (2) 提取待测样品中的苏丹红; (3) 依次在测试管中加入苏丹红标准品或待测样品、免疫磁性微球和苏丹红酶结合物; (4) 室温孵育; (5) 用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 磁分离去除上清; (6) 加入底物显色液; (7) 室温显色; (8) 加入终止液; (9) 在酶标仪上于 450nm 处读数; (10) 根据标准曲线公式计算出样品中苏丹红的含量。

[0062] 步骤(2) 对于待测样品的提取可以为以下过程:

[0063] (1) 加入提取液样品质量与提取液体积比为 1:5 ~ 1:10, 提取 5 ~ 15min; (2) 离心或静置后, 取上清用氮气吹干; (3) 加入如步骤(1) 的提取液, 样品质量与提取液体积比为 1:4 ~ 1:8, 提取为 1 ~ 3min; (4) 离心或静置后, 取上清用氮气吹干; (5) 加入所述试剂盒中的样品稀释液复溶, 氮气吹干前后溶液的体积比为 1:1 ~ 1:2。

[0064] 所述提取液为碱性溶液与有机溶剂的混合溶液, 其中, 有机溶剂能够溶解样品中的有机物, 碱性溶液能除去待测样品中油脂的干扰。其中, 碱性溶液可以为浓度 1 ~ 3M 的氢氧化钠或氢氧化钾溶液, 有机溶剂可以为乙腈、甲醇、正己烷等。碱性溶液与有机溶剂的体积比可以为 1:2 ~ 10。

[0065] 以下实施例用于说明本发明, 但不用来限制本发明的范围。

[0066] 实施例 1 包被有苏丹红抗体的免疫磁性微球的制备

[0067] 1. 试剂的制备

[0068] 1) 活化 / 偶联缓冲液:

[0069] 10mM PB 缓冲液(pH6.0) 的配制: ①称取磷酸二氢钠 1.56g, 用去离子水定容至 1000mL; ②称取磷酸氢二钠 0.358g, 用去离子水定容至 100mL; 加入①试剂 17.54mL 和②试剂 2.46mL, 随后在所得的 10mPB 缓冲液中加入吐温 -20 及 PVP, 吐温 -20 的体积百分比为 0.05%, PVP 的质量百分比为 0.05%, 有效期为 12 个月。

[0070] 2) 封闭液:

[0071] 称量 0.1g BSA 固体, 溶解于 10mL 偶联缓冲液中。该试剂为淡黄色澄清透明的液体, 配好的封闭液可在 2 ~ 8℃条件下保存 30 天。

[0072] 3) 贮存液:

[0073] 称量 0.24g 磷酸二氢钾、3.58g 磷酸氢二钠、8.0g 氯化钠、0.2g 氯化钾、1g BSA, 0.5g 叠氮钠和 0.5mL 吐温 -20 溶解于 800mL 去离子水中, 然后用去离子水定容至 1000mL, 配好的贮存液为无色澄清透明液体, 在 2 ~ 8℃条件下保存, 有效期为 12 个月。

[0074] 2. 免疫磁性微球的制备

[0075] 1) 活化

[0076] 取 1.5mL 离心管, 用移液器取 500  $\mu$ L 摇匀的羧基磁性微球(购自郑州英诺生物科技有限公司, 粒径大小 1.8 ~ 2.2  $\mu$ m, 羧基含量 250 ~ 260  $\mu$ mol/g, 磁性微球质量浓度为

20mg/mL), 加入到离心管中, 用 500  $\mu$ L 活化缓冲液洗涤 2 次, 然后分散在 300  $\mu$ L 活化缓冲液中。

[0077] 称量固体 EDC (购自上海共价化学科技有限公司) 和 NHS (购自 J&KScientific) 溶解在活化缓冲液中, 浓度都为 100mg/mL, 在上述磁性微球溶液中加入 100  $\mu$ L EDC 溶液和 100  $\mu$ L NHS 溶液, 室温下震荡 30min。

[0078] 使用偶联缓冲液将活化好的磁性微球洗涤 2 次, 然后分散在 300  $\mu$ L 偶联缓冲液中。

[0079] 2) 偶联

[0080] 在活化好的磁性微球溶液中加入苏丹红 I 号单克隆抗体(购自广州优抗多生物技术有限公司(10.5mg/mL)), 加入量为 62  $\mu$ L, 在室温下 震荡 1 ~ 2 小时。

[0081] 3) 封闭

[0082] 磁分离去除上清后, 将磁性微球重悬于 500  $\mu$ L 封闭液中, 室温下震荡 30min。

[0083] 4) 贮存

[0084] 使用 500  $\mu$ L 贮存液将封闭后的免疫磁性微球洗涤 3 次, 磁分离去除上清, 并将免疫磁性微球分散在贮存液中, 并于 2 ~ 8°C 条件下贮存。

[0085] 实施例 2 基于磁性微球的苏丹红快速检测试剂盒的组建

[0086] 组建基于磁性微球的苏丹红快速检测试剂盒, 使其包含下述组分:

[0087] (1) 实施例 1 制得的包被有苏丹红抗体 I 号单克隆的免疫磁性微球。

[0088] (2) 苏丹红酶结合物, 为 HRP 标记的苏丹红 I 号抗原(苏丹红抗原购自广州优抗多生物技术有限公司(13mg/mL), HRP 标记的苏丹红抗原来自北京天恩泽基因科技有限公司(1mg/mL))。

[0089] (3) 样品稀释液, 所述样品稀释液为含 10% 甲醇、0.1%Triton X-100 的 0.01M PBS (磷酸盐) 缓冲液, pH 为 7.4。

[0090] (4) 苏丹红标准品: 购自北京北纳创联生物技术研究院(100mg/瓶), 用样品稀释液配制浓度为 0、0.2、0.6、1.8、5.4ng/mL 的苏丹红标准品溶液。

[0091] (5) 显色液 A: 浓度为 0.5% 的过氧化脲。

[0092] (6) 显色液 B: 浓度为 0.3% 的 TMB (四甲基联苯胺)。

[0093] (7) 终止液: 浓度为 2.0M 的硫酸溶液。

[0094] (8) 10 $\times$  洗涤液: 包含 0.2% 吐温 -20 的 10mM PBS 缓冲液, pH 为 7.4。

[0095] 实施例 3 待测样品中苏丹红的检测

[0096] 1. 待测样品前处理

[0097] (1) 称取 1g 均质的待测样品(如番茄酱、辣椒酱、豆瓣酱等)于 50mL 离心管中; (2) 加入 1mL 2M 的氢氧化钠溶液和 4mL 乙腈作为提取液, 涡旋振荡 5min; (3) 4000rpm 离心, 取上清用氮气吹干; (4) 加入 2mL 2M 的氢氧化钠溶液和 2mL 正己烷作为提取液, 涡旋振荡 2min; (5) 4000rpm 离心, 取上清用氮气吹干; (6) 加入 1mL 样品稀释液复溶; (7) 取复溶后的溶液检测。

[0098] 2. 用试剂盒进行检测

[0099] (1) 将实施例 2 所得试剂盒从保存条件下恢复至室温; (2) 依次在测试管中加入苏丹红标准品溶液(浓度分别为 0、0.2、0.6、1.8、5.4ng/mL) 和待测样品溶液, 向各个测试



管中加入包被有苏丹红抗体的免疫磁性微球和苏丹红酶结合物,各 200  $\mu$  L;(3) 室温孵育 30min;(4) 用洗涤液洗涤 2~3 次,磁分离去除上清;(5) 显色:每个测试管中加入显色液 A 与显色液 B 各 200  $\mu$  L,室温避光显色 15min;(6) 每个测试管中加入 200  $\mu$  L 终止液,用酶标仪读数( $OD_{450nm}$ )。

### [0100] 3. 结果分析

[0101] 首先计算百分吸光率:标准品或待测样品的吸光度值的平均值(两个复孔)除以阴性标准品(即苏丹红的浓度为 0ng/mL)的吸光度值,再乘以 100%,即

[0102] 百分吸光率(%) =  $B/B_0 \times 100\%$

[0103] 其中:B—标准溶液或待测样品溶液的平均吸光度值;B<sub>0</sub>—苏丹红的浓度为 0ng/mL(ppb)的标准溶液的平均吸光度值。

[0104] 绘制标准曲线并计算结果:以苏丹红标准品百分吸光率为纵坐标,苏丹红标准品浓度(ng/mL)的对数为横坐标,绘制半对数标准曲线图(参见图 1)。将待测样品的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出待测样品中所对应的苏丹红浓度,乘以其对应的稀释系数即为待测样品中苏丹红的实际量。使用试剂盒专业分析软件,可以进行大量样本的准确、快速分析。每个标准品浓度做两组平行测试,然后取吸光度值的平均值 A,计算变异系数(如图 1 所示)。

[0105] 图 2 所示为微孔板 ELISA 所得的标准曲线图,从 50% 抑制(50% 抑制=9.1)来看,明显高于本发明试剂盒的 50% 抑制(参见图 1,50% 抑制=1.3),表明本发明试剂盒的灵敏度明显高于微孔板 ELISA 的灵敏度。每个标准品浓度做两组平行测试,然后取吸光度值的平均值 A,计算变异系数(如图 2 所示)。

### [0106] 实施例 4 试剂盒检测限的检测

[0107] 按照实施例 2 的方法制备两批试剂盒,每批各取一个,按照实施例 3 所述检测方法检测试剂盒的样品稀释液,重复检测 10 次,计算 20 次检测 OD 值的平均值(M)和标准差(SD),以及 M-2SD 所对应的吸光度值,将 M-2SD 所对应的吸光度值带入标准曲线,计算得到的浓度则为试剂盒最低检测限,结果为 0.5ng/mL。

[0108] 现有的酶联免疫试剂盒的最低检测限约为 4ng/mL,说明本发明所述试剂盒的灵敏度优于酶联免疫试剂盒,灵敏度更好。

### [0109] 实施例 5 试剂盒精密度的检测

[0110] 本实施例为试剂盒检测可重复性实验。具体操作为:

[0111] 按照实施例 3 所述检测方法检测浓度为 5 和 10ng/mL 的样品溶液(前处理方法同实施例 3)的检测值,每个浓度重复检测 10 次,计算变异系数,结果如表 1 所述。

[0112] 表 1 试剂盒精密度检测结果

[0113]

添加苏丹红的浓度 (ng/g)	检测值 (ng/g)	平均值 (ng/g)	CV (%)
5	4.7, 5.1, 4.1, 4.3, 4.9	4.61	9.23
	4.5, 5.2, 4.2, 4.1, 5.0		
10	9.8, 10.7, 10.2, 9.6, 9.3	9.95	6.20
	9.9, 11.0, 10.4, 9.5, 9.1		

[0114] 表 1 结果表明变异系数在 6.20% ~ 9.23% 之间,符合了变异系数不大于 10% 的规定,说明本发明试剂盒的精密度达到了要求。

[0115] 实施例 6 试剂盒回收率的检测

[0116] 在实际样品(如番茄酱、辣椒酱、豆瓣酱等)中添加苏丹红标准品,添加 3 个浓度,每个浓度做 2 个平行,计算回收率,结果如表 2 所示。

[0117] 表 2 试剂盒回收率的检测结果

[0118]

添加苏丹红的浓度 (ng/g)	检测值 (ng/g)	回收率 (%)
0	0.2	
0	0.1	
5	4.3	83
5	4.9	95
10	10.8	106.5
10	9.8	96.5
平均值		95.25

[0119]

[0120] 表 3 微孔板 ELISA 试剂盒回收率的检测结果

[0121]

添加苏丹红的浓度 (ng/g)	检测值 (ng/g)	回收率 (%)
0	14.3	
0	16.8	
20	32.7	85.75
20	28.4	64.25
平均值		75

[0122] 如表 2 所示,添加 5 和 10ng/g 的苏丹红样品的回收率为 83% 到 106.5%,样品的本底值较低,为 0.1 ~ 0.2ng/g,明显低于微孔板 ELISA 的本底值(见表 3,14.3 ~ 16.8ng/g)。结果表明,本发明试剂盒几乎无本底干扰的影响,对检测结果亦无影响。

[0123] 实施例 7 试剂盒稳定性的检测

[0124] 实施例 2 所述试剂盒保存条件为 2 到 8℃,通过加速稳定性实验,即:将试剂盒置于 37℃ 下存放 7 天(模拟加速老化实验,相当于 4℃ 下存放 1 年)后,对试剂盒检测后发现,试剂盒各项指标仍然符合要求,结果见图 3。

[0125] 如图 3 所示,结果两条曲线几乎重合,这证实,免疫磁性微球没有脱落,抗体活性较好,本发明的试剂盒稳定性良好。以上结果可以得出试剂盒可以在 2 到 8℃ 保存 12 个月。

[0126] 对比例 1 不同缓冲液对磁性微球偶联率及稳定性的影响

[0127] 使用 MES 缓冲液活化和偶联磁性微球,封闭液、贮存液同实施例 1。

[0128] 取 1.5mL 离心管,用移液器取 500  $\mu$ L 摇匀的羧基磁性微球(购自郑州英诺生物科技有限公司,粒径大小 1.8 ~ 2.2  $\mu$ m,羧基含量 250 ~ 260  $\mu$ mol/g),加入到离心管中,用 500  $\mu$ L MES 缓冲液(浓度为 50mM, pH 值为 6.0 左右)洗涤 2 次,然后分散在 300  $\mu$ L MES 缓冲液中。称量固体 EDC(购自上海共价化学科技有限公司)和 NHS(购自 J&K Scientific)溶解在 MES 缓冲液中,浓度都为 100 mg/mL,在上述磁性微球溶液中加入 100  $\mu$ L EDC 溶液和 100  $\mu$ L NHS 溶液,室温下震荡 30min。使用 MES 缓冲液将活化好的磁性微球洗涤 2 次,然后分散在 300  $\mu$ L MES 缓冲液中。

[0129] 在活化好的磁性微球溶液中加入苏丹红 I 号单克隆抗体(购自广州优抗多生物技术有限公司(10.5mg/mL)),加入量为 62  $\mu$ L,在室温下震荡 1 ~ 2 小时。磁分离去除上清后,将磁性微球重悬于 500  $\mu$ L 封闭液(包含 1% BSA 的 MES 缓冲液)中,室温下震荡 30 min。

[0130] 使用 500  $\mu$ L 贮存液将封闭后的免疫磁性微球洗涤 3 次,磁分离去除上清,并将免疫磁性微球分散在贮存液中,并于 2 ~ 8℃ 条件下贮存。

[0131] 结果发现,在放置一星期后该体系出现凝集现象,产生了沉淀。

[0132] 使用 BCA 蛋白定量试剂盒(购自北京百泰克生物技术有限公司)检测了不同缓冲液下对比例 1 和实施例 1 中所得磁性微球的偶联率,结果如表 4 所示。

[0133] 表 4 不同缓冲体系对磁性微球偶联率的影响

[0134]

	抗体加入量	抗体偶联量	偶联率
实施例 1	650 $\mu$ g	400 $\mu$ g	61.5%
对比例	650 $\mu$ g	240 $\mu$ g	36.9%

[0135] 如表 4 所示,使用 MES 作为缓冲体系,磁性微球的偶联率明显低于使用实施例 1 所述的缓冲体系。

[0136] 对比例 2 缓冲液中添加剂成分对磁性微球偶联率及稳定性的影响

[0137] (1)按照实施例 1 方式制备包被有苏丹红抗体的免疫磁性微球,不同的是,PB 缓冲液中仅添加体积百分比为 0.1% 的吐温 -20。

[0138] (2)按照实施例 1 方式制备包被有苏丹红抗体的免疫磁性微球,不同的是,PB 缓冲液中仅添加重量百分比为 0.1% 的聚乙烯吡咯烷酮。

[0139] 使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测了对比例 2 和实施例 1 中所得磁性微球的偶联率，结果如表 5 所示。

[0140] 表 5 不同添加剂对磁性微球偶联率的影响

[0141]

	抗体加入量	抗体偶联量	偶联率
实施例 1	650 $\mu\text{g}$	400 $\mu\text{g}$	61.5%
对比例 2- (1)	650 $\mu\text{g}$	330 $\mu\text{g}$	50.7%
对比例 2- (2)	650 $\mu\text{g}$	270 $\mu\text{g}$	41.5%

[0142]

[0143] 如表 5 所示，在 PB 缓冲液中仅使用同样含量的吐温 -20 或聚乙烯吡咯烷酮，都无法取得实施例 1 的高偶联率，本发明所述的 PB 缓冲体系中，吐温 -20 与聚乙烯吡咯烷酮产生了协同增效作用，使缓冲体系的分散性和增容性更好，从而明显提高了磁性微球和抗体的偶联率，增加了所得免疫磁性微球的稳定性。

[0144] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

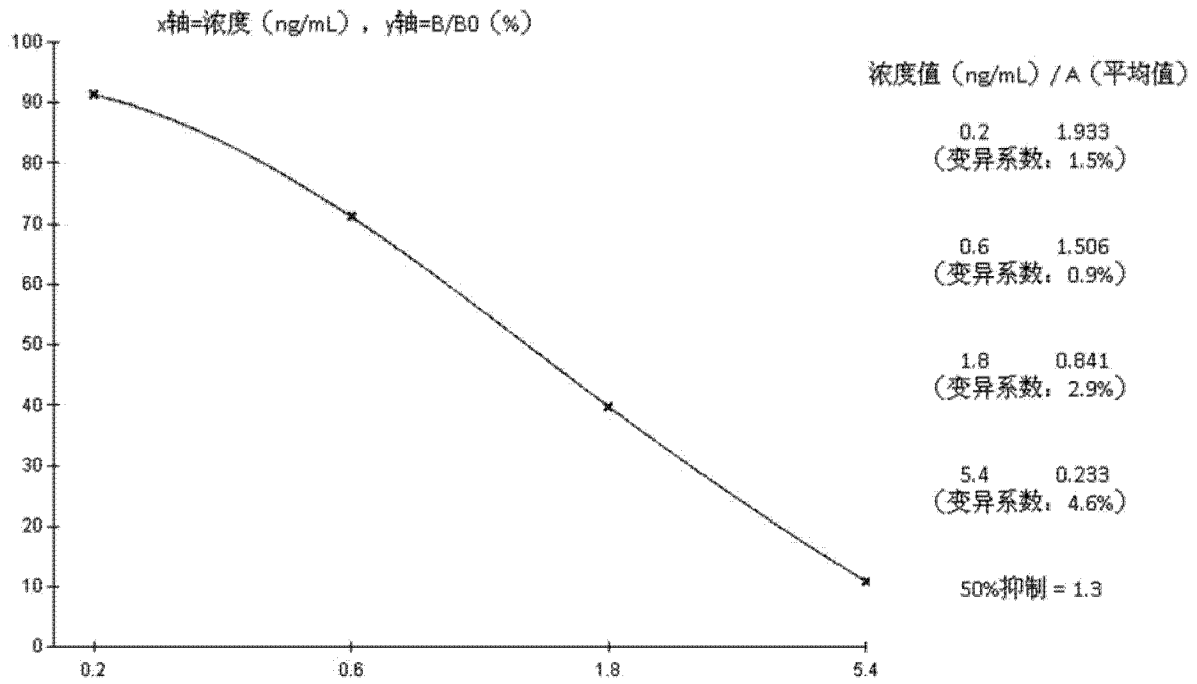


图 1

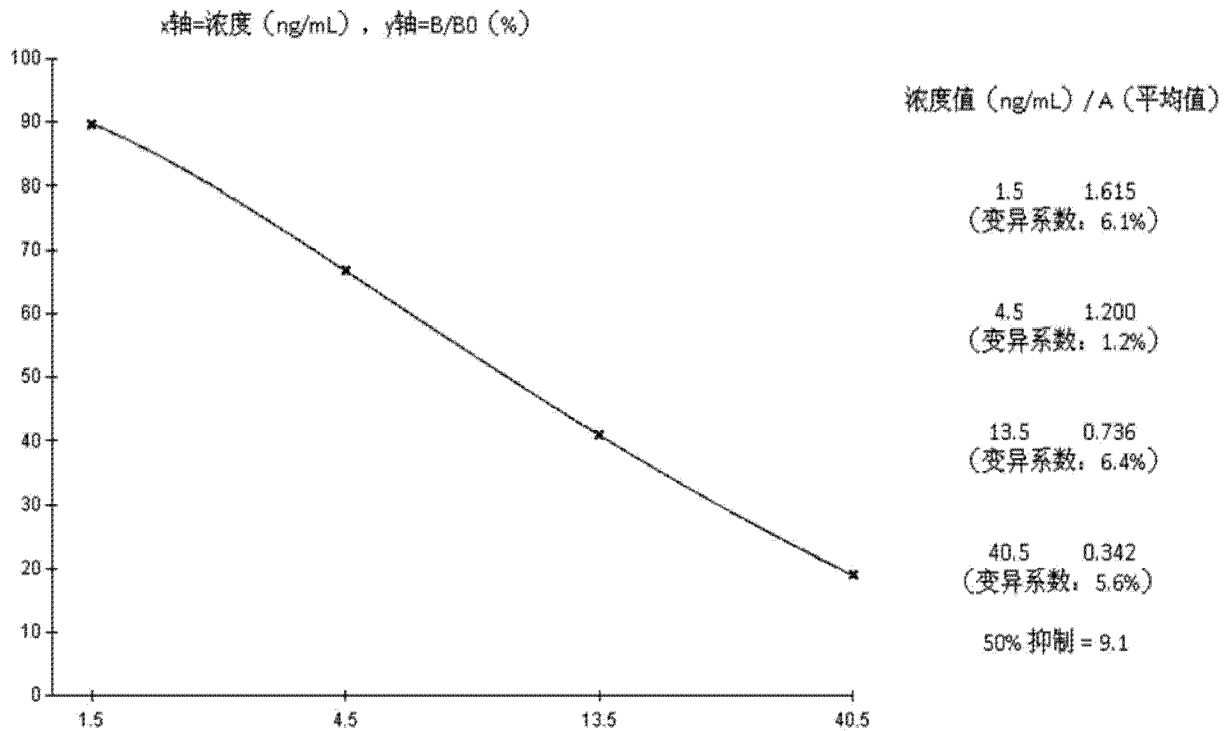


图 2

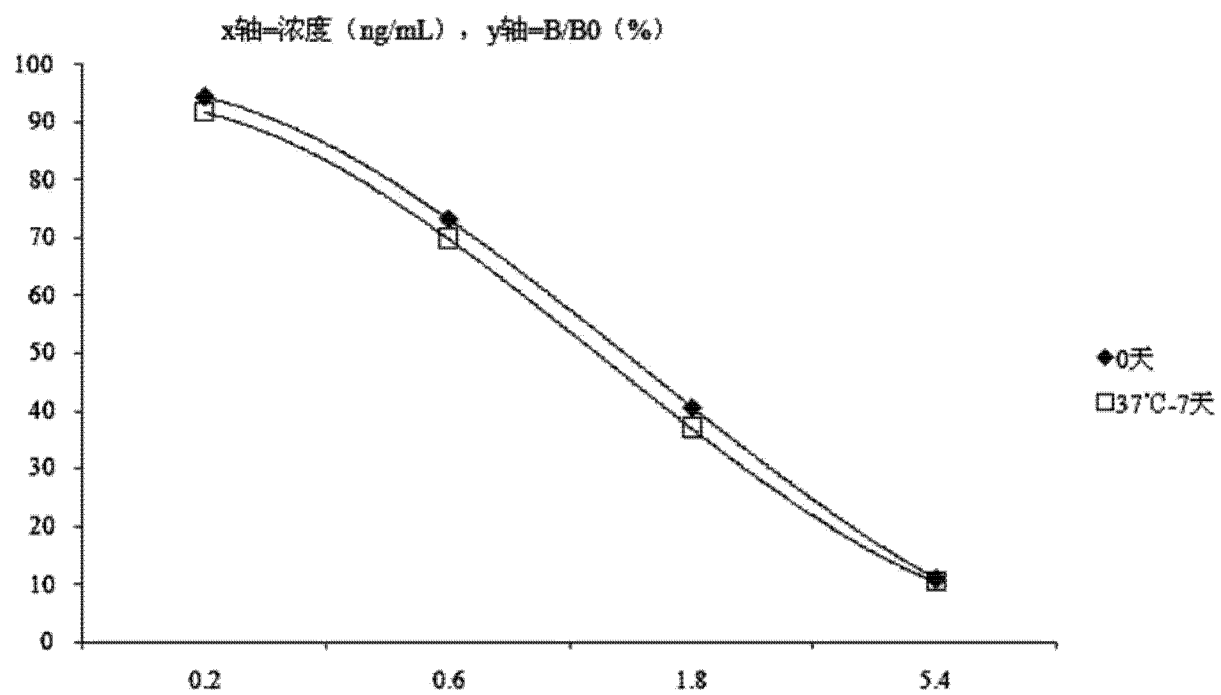


图 3

专利名称(译)	一种免疫磁性微球的制备方法、以及含有免疫磁性微球的苏丹红检测试剂盒和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104634960A</a>	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201310556986.6	申请日	2013-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	北京普析通用仪器有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京普析通用仪器有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京普析通用仪器有限责任公司		
[标]发明人	王琳 田静秒 王雪 万渝平 周浩 叶敏 梁恒兴 张敏		
发明人	王琳 田静秒 王雪 万渝平 周浩 叶敏 梁恒兴 张敏		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	刘春生		
其他公开文献	CN104634960B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种免疫磁性微球的制备方法，其采用包含0.01%~0.1%的吐温-20以及0.01%~0.1%的聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液作为活化缓冲液和/或偶联缓冲液。本发明还公开了一种含有免疫磁性微球的苏丹红检测试剂盒以及采用所述试剂盒进行检测的检测方法。本发明提供的免疫磁性微球制备方法偶联率明显提高，所得免疫磁性微球稳定性好。本发明提供的试剂盒使用了苏丹红单克隆抗体包被的免疫磁性微球，灵敏度高，可用于大批量样品的快速筛查，能够避开待测样品中基质的影响，准确度高。本发明提供的检测方法可以在食品安全检测中发挥重要作用，有重大的社会意义和广阔的市场前景。

添加苏丹红的浓度 (ng/g)	检测值 (ng/g)	平均值 (ng/g)	CV (%)
5	4.7, 5.1, 4.1, 4.3, 4.9	4.61	9.23
	4.5, 5.2, 4.2, 4.1, 5.0		
10	9.8, 10.7, 10.2, 9.6, 9.3	9.95	6.20
	9.9, 11.0, 10.4, 9.5, 9.1		