



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102346185 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 08

(21) 申请号 201010240053. 2

(22) 申请日 2010. 07. 29

(71) 申请人 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12 号

(72) 发明人 杨曙明 于洪侠 邱静 陈刚
陈爱亮 张妍 邓省亮 张薇薇

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 张瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种罗丹明 B 的免疫亲和层析柱及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明提供了一种直接检测罗丹明 B 免疫亲和层析柱。本发明所提供的免疫亲和层析柱用来提取和检测食品中的违禁添加剂罗丹明 B, 包括罗丹明 B 的特异性抗体、偶联有罗丹明 B 特异性抗体 Sepharose4B、装载亲和材料的塑料柱、氧化铝柱, 上样缓冲液、淋洗液及洗脱液。本发明的罗丹明 B 免疫亲和层析柱使用方便, 具有高特异性、高灵敏性, 可快速检测食品中残留的罗丹明 B。

1. 一种制备罗丹明 B 免疫亲和层析柱的方法,该方法包括下列步骤:

a) 将罗丹明 B 特异性抗体与溴化氰活化的 Sepharose4B 胶混合,用转鼓搅拌,偶联过夜;烧结玻璃滤器抽滤偶联胶,PBS 洗脱未结合抗体,每次 5 毫升,洗 4 次;用 1M 乙醇胺封闭未结合位点,加过量乙醇胺孵育 2.5 小时,抽滤乙醇胺,用偶联缓冲液抽洗,然后再用 HAC, Tris-HCl 缓冲液交替洗涤共 4 次,每次 5ml;

b) 将偶联后的胶装入塑料柱中,装注 1ml/柱,稍用力压紧,即得所述的罗丹明 B 免疫亲和层析柱。

c) 将所制备的罗丹明 B 免疫亲和层析柱与氧化铝柱串联,及得直接检测罗丹明 B 的免疫亲和层析柱。

2. 根据权利要求 1 所述方法制备的罗丹明 B 免疫亲和层析柱,该免疫亲和层析柱包括偶联有罗丹明 B 特异性抗体的 Sepharose4B 与装载该亲和材料的塑料柱,还进一步包括串联的氧化铝柱。

3. 权利要求 2 所述的罗丹明 B 免疫亲和柱,其中所述的罗丹明 B 特异性抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

4. 权利要求 2 或 3 所述的罗丹明 B 免疫亲和层析柱,其进一步还包括上样缓冲液、淋洗液及洗脱液。

5. 权利要求 4 所述的罗丹明 B 免疫亲和层析柱,其中所述的上样缓冲液为 PBS,所述淋洗液为 PBST,所述的洗脱液为体积比为 97 : 3 的甲醇 /1M 乙酸混合物。

6. 权利要求 2 所述的罗丹明 B 免疫亲和层析柱的使用方法,该方法包括:

a) 取出 4℃ 保存的免疫亲和层析柱及上样缓冲液、淋洗液及洗脱液,回至室温,用上样缓冲液充分淋洗亲和层析柱,除去储存 Buffer 中含的蛋白和防腐剂;

b) 将处理好的待检样品用上样缓冲液稀释至所需体积,上样,上样液滴干后,淋洗液淋洗柱体,弃去,吸耳球吹干柱内溶液;

c) 用洗脱液洗脱特异性结合的罗丹明 B;

d) 洗脱下的罗丹明 B 流经串联的氧化铝柱,利用其荧光检测罗丹明 B。

一种罗丹明 B 的免疫亲和层析柱及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域中违禁添加剂检测分析技术领域。具体而言,本发明涉及一种罗丹明 B 免疫亲和层析柱其制备方法及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] 罗丹明是一系列邻苯二酚类的工业和生物染料,并具有较强的荧光,有罗丹明 B、罗丹明 6G、罗丹明 110 等十几种产品。罗丹明 B 是一种广泛应用于纤维、纸张、皮革、木材着色的工业染料,此外也用于墨水、印油和涂料。由于其具有荧光的特性,罗丹明 B 作为指示剂或标记物应用于生物学、医学研究。

[0004] 由于罗丹明 B 可能诱发癌症和遗传问题,也能损害肝脏和肾脏。国际癌症研究所(IARC)的实验表明,通过皮下注射小鼠产生肉瘤表现出致癌性。人的急性 LD50 为 900mg/kg/day (IARC 1987),鼠 LD50 为 60-140mg/kg。因此,大多数国家不允许其用于食品和化妆品。

[0005] 除主动在食品生产加工过程中添加罗丹明类工业染料以增加食品的色泽外,食品中罗丹明的来源分析有以下三个途径:一是在装有调味品的麻包上喷印标签时,由于喷印墨汁中含有罗丹明 B 而交叉污染到其中的调味品上。二是在农作物生产时,使用的化学制剂带入罗丹明 B。三是来自于纺织工业废水的污染。

[0006] 目前欧盟的食品中罗丹明 B 的 MRL 为 10 μ g/kg,以液相色谱-串联质谱的方法进行检测。

[0007] 我国已建立了食品中罗丹明 B 的液相色谱检测方法,检出限达到 1 μ g/kg。采用非极性有机溶剂将罗丹明 B 从食品中溶解并提取出,提取液流过中性氧化铝固相萃取小柱吸附罗丹明 B,用非极性有机溶剂(例正己烷)洗脱样品油脂和食品内源性干扰物,再用极性有机溶剂(例甲醇)将罗丹明 B 从小柱上洗脱并收集,用反相高效液相色谱仪-紫外/可见光检测器进行定性定量检测。

[0008] 现场快速检测方法,也是使用非极性有机溶剂将其溶解并提取出,提取液流过中性氧化铝固相萃取小柱吸附罗丹明 B,用非极性有机溶剂淋洗小柱,洗脱样品油脂和食品内源性干扰物,用肉眼可观测到在小柱上出现鲜亮的粉红色条带,判定为可疑样品。

[0009] 免疫亲和层析技术是一种将免疫反应和层析技术相结合的分析方法,在提纯物质上是一项效率高、提纯物质纯度高、快速的技术,可以使免疫检测技术(如 ELISA 等)和层析技术在特异性、分离能力、速度和灵敏度方面得到互补,避免了免疫分析法直接测定样品的不足。

[0010] 免疫亲和柱是上个世纪 90 年代在分析领域中得到应用的技术,但用免疫亲和柱串联氧化铝柱直接检测食品样品中的罗丹明尚未见报道。因此,本发明人通过大量试验,研制成功了一种具有高特异性和灵敏度且操作快捷的直接检测罗丹明 B 免疫亲和层析柱。

发明内容

[0011] 本发明目的是提供一种直接检测罗丹明 B 的免疫亲和层析柱。

[0012] 本发明的原理是根据抗原抗体的特异性反应和可解离的特性,用罗丹明抗体提取食品中的罗丹明 B 残留,然后串联氧化铝柱,用其荧光直接检测罗丹明 B。

[0013] 一方面,本发明提供了一种制备罗丹明 B 免疫亲和层析柱的方法,该方法包括下列步骤:

[0014] a) 将罗丹明 B 特异性抗体与溴化氰活化的 Sepherose4B 胶混合,转鼓搅拌,偶联过夜;

[0015] 烧结玻璃滤器抽滤偶联胶, PBS 洗脱未结合抗体,每次 5 毫升,洗 4 次;用 1M 乙醇胺封闭未结合位点,加过量乙醇胺孵育 2.5 小时,抽滤乙醇胺,用偶联缓冲液抽洗,然后再用 HAC, Tris-HCl 缓冲液交替洗涤共 4 次,每次 5ml;

[0016] b) 将偶联后的胶装入亲和层析塑料柱中,装注 1ml/ 柱,稍用力压紧,即得所述的罗丹明 B 免疫亲和层析柱。

[0017] 在本发明的一个优选实施方案中,所述的罗丹明 B 免疫亲和层析柱的制备方法具体操作为:

[0018] 取 Sepherose 4B(100-120 目) 湿重 4g(6ml),用 0.1M pH9.5Na₂CO₃ 溶液浸泡 4 小时。通风厨中称取溴化氰 0.8g 溶于 1.2ml Na₂CO₃(2g 溶液 3ml 缓冲液),电磁搅拌 10 分钟。冰浴电磁搅拌下,将溴化氰溶液加入 Sepherose4B 中,2 分钟内完成,滴加 2N NaOH,使 pH 值保持在 11,冰浴反应 10 分钟。

[0019] 将反应后的 Sepherose4B 倒入布氏漏斗中,用预冷的 Na₂CO₃ 溶液 4-10℃洗 2-3 分钟内完成,抽洗 25 倍体积的液体准备交联蛋白。

[0020] 4℃下,将实施例 1 制备的抗体(多克隆或单克隆抗体)溶液与溴化氰活化的 Sepherose4B 胶混合,转鼓搅拌,偶联反应过夜。

[0021] 烧结玻璃滤器抽滤偶联胶, PBS 洗脱未结合抗体,每次 5 毫升,洗 4 次。分别测定抗体含量。

[0022] 用 1M 乙醇胺(ethanolamine) 封闭未结合位点,加过量乙醇胺孵育 2.5 小时。抽滤乙醇胺,用偶联缓冲液抽洗。然后再用交替的 HAC, Tris-HCl 缓冲液洗 4 次,每次 5ml。

[0023] 最后,将偶联后的胶装入亲和层析塑料柱中,装注 1ml/ 柱,稍用力压紧,即得到本发明所述的罗丹明 B 免疫亲和柱。

[0024] 另一方面,本发明提供了一种罗丹明 B 免疫亲和层析柱,该免疫亲和层析柱包括偶联有罗丹明 B 特异性抗体的 Sepharose4B 与装载该亲和材料的塑料柱,以及与此亲和材料塑料柱串联的氧化铝柱。

[0025] 其中所述的罗丹明 B 特异性抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。本发明所述的罗丹明 B 特异性抗体通过下述方法制备:1) 按小分子半抗原的偶联方法制备罗丹明 B 与载体蛋白偶联物;以及,2) 用该偶联物作为免疫原免疫动物(例如,兔),分离血清,纯化得到多克隆抗体;或者 3) 免疫小鼠,通过杂交瘤技术获得单克隆抗体;4) 用不同载体蛋白的偶联物为包被原用于检测抗体质量。

[0026] 其中所述的载体蛋白包括但不限于,例如牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白、卵清蛋白和钥孔铜兰蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)。所述的罗丹明 B 与载体蛋白的偶联物采用重氮化法、戊二醛法、活性酯法或多元酸酐法与混合酸酐法联合方法偶联。

[0027] 本发明所述免疫亲和层析柱的保存条件为:0.01% 硫柳汞钠的磷酸盐缓冲液

(PBS, 0.01mol/L, pH7.4), 4℃保存。

[0028] 另外, 为方便现场应用, 本发明所述免疫亲和柱还可以进一步包括上样缓冲液、淋洗液及洗脱液。

[0029] 在本发明的一个优选实施方案中, 所述的上样缓冲液为 PBS(0.02MPB-0.05MNaCl, PH7.2), 所述的淋洗液为 PBST(0.02MPB-0.05MNaCl-0.2% Tween20, PH7.2); 所述的亲和层析柱洗脱液为甲醇/1M 乙酸 (V/V 为 97/3)。

[0030] 另一方面, 本发明提供了一种罗丹明 B 免疫亲和层析柱的使用方法, 该方法包括:

[0031] a) 取出 4℃保存的免疫亲和柱及上样缓冲液、淋洗液及洗脱液, 回至室温, 用上样缓冲液充分淋洗亲和柱, 除去储存 Buffer 中含的蛋白和防腐剂;

[0032] b) 将处理好的待检样品用上样缓冲液稀释至所需体积, 上样, 上样液滴干后, 淋洗液淋洗柱体, 弃去, 吸耳球吹干柱内溶液;

[0033] c) 用洗脱液洗脱特异性结合的罗丹明 B。

[0034] d) 洗脱的罗丹明 B 流过串联的氧化铝柱, 通过荧光进行检测。

[0035] 本发明使用腊肠进行了回收率实验, 结果表明罗丹明 B 免疫亲和层析柱的回收率在 80% -110%之间, 回收率达到了分析方法的回收率要求。

[0036] 因此, 另一方面, 本发明提供了所述罗丹明 B 免疫亲和层析柱在提取腊肠等食品中罗丹明 B 残留的用途。

[0037] 一个具体实施方案中, 所述的食物为腊肠。

[0038] 提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明, 而决不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

实施例

[0039] 实施例 1 抗罗丹明多克隆抗体的制备

[0040] 1.1 抗罗丹明多克隆抗体的制备

[0041] 参考现有技术中偶联物合成方法, 用 EDC 法直接合成罗丹明 B-载体蛋白偶联物。具体操作如下, 称取罗丹明 49.5mg (约 0.1mmol), 溶解于 4ml 去离子水中, 将罗丹明 B 溶液逐滴加入到 10ml、0.1M pH 7.5 冰冷载体蛋白 PB 溶液中, 随后加入 EDC 100mg。载体用量: BSA :50mg, KLH :50mg。偶联物过 SephadexG-25M 层析柱提纯。用紫外吸收法测定载体浓度作为偶联物浓度。提纯的偶联物加等量甘油 -20℃保存。

[0042] 选择健康、无病、雄性、体重 1.5kg 纯种新西兰白兔 5 只。首免用注射器对抽法将弗氏完全佐剂与免疫原按 1 : 1 混合成油包水的乳浊液, 每只兔 0.25mg 免疫原, 背部皮下多点注射, 注射剂量多点平均分配。每隔两周加强免疫一次, 用弗氏不完全佐剂, 剂量、方法同首免。从第三次免疫开始, 免疫后 10 天, 耳缘静脉取血 1ml, 室温凝固 2h 后 4℃过夜, 8000r/min 分离血清, 用以检测抗体效价。效价不再升高时, 不加佐剂末次免疫 (第八次) 后 7 天, 颈动脉放血, 分离出抗全血清, 用 40% 的饱和硫酸铵溶液沉淀, 得粗多克隆抗体, 然后用 DE-52 离子交换层析分离除去其他血清蛋白, 得纯多克隆抗体。

[0043] 通过间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 测定, 结果表明本发明制备的多克隆抗体具有很高的效价和良好的特异性。

[0044] 1.2 抗罗丹明 B 单克隆抗体的制备

[0045] 1.2.1 免疫动物及细胞融合

[0046] 对 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠 (体重 18 ~ 22g), 首次免疫用 100 μ g 罗丹明 B-KLH 与等量福氏完全佐剂混匀, 腹腔注射。3 周后第一批用 10 μ g 罗丹明 B-KLH 脾内注射, 3 天后取脾融合。第二批再用 100 μ g 罗丹明 B-KLH 与等量福氏不完全佐剂混匀后, 腹腔注射追加免疫, 3 周后用 10 μ g 罗丹明 B-KLH 脾内注射, 3 天后按常规方法取脾融合。当镜检杂交瘤克隆生长达 1/3 ~ 1/2 视野时, 取上清液进行筛选。

[0047] 1.2.2 杂交瘤筛选及抗体检测

[0048] 以罗丹明 B-BSA 为包被抗原, 用间接非竞争性 ELISA 法筛选分泌抗罗丹明 B 抗体的细胞孔, 用间接竞争抑制 ELISA 法确证。以免疫小鼠的血清为阳性对照, 以 Sp2/0 细胞培养的上清液为阴性对照, 阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$ 。

[0049] 1.2.3 杂交瘤细胞的克隆化

[0050] 采用培养瓶内准确计数稀释法, 将阳性克隆细胞吹匀, 取一微滴至培养瓶内, 倒置显微镜下准确计数细胞个数, 稀释为 70 个 /ml, 再取 1ml 稀释 20 倍, 接种入 96 孔培养板中进行亚克隆。直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止。

[0051] 1.2.4 单克隆抗体的生产

[0052] 采用动物体内诱生单克隆抗体的方法。吹打培养的杂交瘤细胞, 1000r/min 离心 10min, 弃上清, 用生理盐水将杂交瘤细胞悬浮混匀, 并将细胞数调至 2×10^6 /ml, 每只 Balb/c 小鼠腹腔注射 0.5ml 杂交瘤细胞, 并同时于对侧腹腔注射 0.5ml 降植烷和不完全福氏佐剂混合物 (1 : 1 混合), 10 ~ 14 天后收集腹水。

[0053] 1.2.5 单克隆抗体的纯化

[0054] 采用硫酸铵沉淀法对腹水进行纯化或用离子交换法提纯。

[0055] 实施例 2 罗丹明 B 免疫亲和层析柱制备

[0056] 本实施例是罗丹明 B 免疫亲和层析柱的制备

[0057] 取 Sepherose 4B (100-120 目) 湿重 4g (6ml), 用 0.1M pH9.5 Na_2CO_3 溶液浸泡 4 小时。通风厨中称取溴化氰 0.8g 溶于 1.2ml Na_2CO_3 (2g 溶液 3ml 缓冲液), 电磁搅拌 10 分钟。冰浴电磁搅拌下, 将溴化氰溶液加入 Sepherose4B 中, 2 分钟内完成, 滴加 2N NaOH, 使 pH 值保持在 11, 冰浴反应 10 分钟。

[0058] 将反应后的 Sepherose4B 倒入布氏漏斗中, 用预冷的 Na_2CO_3 溶液 4-10 $^\circ\text{C}$ 洗 2-3 分钟内完成, 抽洗 25 倍体积的液体准备交联蛋白。

[0059] 4 $^\circ\text{C}$ 下, 将实施例 1 制备的抗体 (多克隆抗体或单克隆抗体) 溶液与溴化氰活化的 Sepherose4B 胶混合, 转鼓搅拌, 偶联反应过夜。

[0060] 烧结玻璃滤器抽滤偶联胶, PBS 洗脱未结合抗体, 每次 5 毫升, 洗 4 次。分别测定抗体含量。

[0061] 用 1M 乙醇胺 (ethanolamine) 封闭未结合位点, 加过量乙醇胺孵育 2.5 小时。抽滤乙醇胺, 用偶联缓冲液抽洗。然后再用交替的 HAC, Tris-HCl 缓冲液洗 4 次, 每次 5ml。

[0062] 最后, 将偶联后的胶装入亲和层析塑料柱中, 装柱, 1ml / 柱, 稍用力压紧, 即得所述的罗丹明 B 免疫亲和层析柱。

[0063] 将此制备的罗丹明 B 免疫亲和柱与氧化铝柱串联, 即得到直接检测罗丹明 B 的免疫亲和层析柱

- [0064] 保存条件:0.01%硫柳汞钠的磷酸盐缓冲液(PBS,0.01mol/L,pH7.4),4℃保存。
- [0065] 实施例 3
- [0066] 取阴性(事先经检测确定为克仑特罗阴性)腊肠 12 份,每 5 份 5g;先将腊肠匀浆后,取 9 份,分 3 组,每组添加罗丹明 B 浓度分别为 50ug/kg、80ug/kg、100ug/kg 作为阳性样品,另外 3 份作为阴性对照。
- [0067] 将上述腊肠样本用 10ml80%甲醇溶解,离心取上清,氮气吹干后用上样缓冲液溶解,准备上亲和层析柱。
- [0068] 将从 4℃冰箱中取出的免疫亲和柱及所有试剂室温放置 1 小时,用上样缓冲液充分淋洗亲和柱 5ml×6 次,除去储存 Buffer 中含的蛋白和防腐剂。
- [0069] 将待检阴性腊肠提取液和添加样品提取液各 5ml,循环上样 5 次,(接取上样流出液再次上此亲和柱)。上样液滴干后,用淋洗液淋洗 5 次,每次 1ml,吸耳球吹干柱内溶液。
- [0070] 先加 1ml 洗脱液浸泡亲和层析柱 10 分钟,然后用吸耳球吹干柱内溶液;再加 1ml 洗脱液浸泡 3 分钟,最后用 2ml 洗脱液分 4 次洗脱,即每次 0.5ml。整个洗脱过程共用洗脱液 4ml。
- [0071] 洗脱液流过串联的氧化铝柱,根据荧光强度测定腊肠中罗丹明 B 含量。测定腊肠添加样品的平均回收率为 75-110%之间,表明该方法满足分析方法要求。

专利名称(译)	一种罗丹明B的免疫亲和层析柱及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN102346185A	公开(公告)日	2012-02-08
申请号	CN201010240053.2	申请日	2010-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	杨曙明 于洪侠 邱静 陈刚 陈爱亮 张妍 邓省亮 张薇薇		
发明人	杨曙明 于洪侠 邱静 陈刚 陈爱亮 张妍 邓省亮 张薇薇		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
代理人(译)	张瑾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种直接检测罗丹明B免疫亲和层析柱。本发明所提供的免疫亲和层析柱用来提取和检测食品中的违禁添加剂罗丹明B，包括罗丹明B的特异性抗体、偶联有罗丹明B特异性抗体Sephrose4B、装载亲和材料的塑料柱、氧化铝柱，上样缓冲液、淋洗液及洗脱液。本发明的罗丹明B免疫亲和层析柱使用方便，具有高特异性、高灵敏性，可快速检测食品中残留的罗丹明B。