



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102435729 A

(43) 申请公布日 2012.05.02

(21) 申请号 201110396713.0

(22) 申请日 2011.12.02

(71) 申请人 杭州迪恩科技有限公司

地址 310013 浙江省杭州市天目山路 313 号  
18 号楼 3 楼

(72) 发明人 张明洲 王旻子 陈慧华 朱聪英  
应永飞 程晔 魏建良

(74) 专利代理机构 杭州宇信知识产权代理事务  
所(普通合伙) 33231

代理人 张宇娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

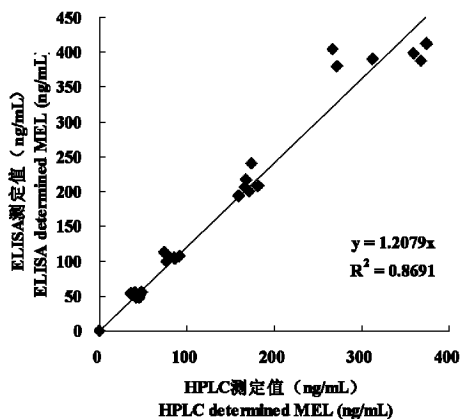
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 3 页

## (54) 发明名称

一种快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法及其试剂盒

## (57) 摘要

本发明提供了一种用于快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法及其试剂盒。该试剂盒包括三聚氰胺特异性抗体、三聚氰胺标准品溶液和三聚氰胺酶标记物,所述的抗体为兔抗三聚氰胺的多克隆抗体,三聚氰胺酶标记物为三聚氰胺辣根氧化酶标记物。还提供了一种用上述试剂盒快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法。所述试剂盒中主要试剂以工作液形式提供,可以减少试剂盒的操作步骤,为使用者节省时间并降低因操作步骤冗繁造成的误差。本发明方法具有灵敏度高、特异性强、高精度、高准确度、对仪器设备要求低、试剂保存时间长、自动化程度高、无放射性同位素污染的等优点,可在饲料及动物源性产品检测中发挥重要作用。



1. 一种快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其中包括:三聚氰胺特异性抗体、三聚氰胺标准品和三聚氰胺酶标记物。

2. 根据权利要求1所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括包被有三聚氰胺特异性抗体的酶标板、三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物工作液、三聚氰胺标准品溶液、显色剂、酶标物稀释液、洗涤液、终止液、浓缩样品稀释液。

3. 根据权利要求1或2所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述三聚氰胺特异性抗体为多克隆抗体,优选兔抗三聚氰胺的多克隆抗体。

4. 根据权利要求1或2所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的三聚氰胺酶标记物所用的酶为辣根过氧化物酶。

5. 根据权利要求2所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的洗涤液为含有0.05% -0.5%吐温-20磷酸盐缓冲液,所述的终止液为2mol/L的盐酸溶液。

6. 根据权利要求2所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的显色剂由过氧化氢或过氧化脲、邻苯二胺或四甲基联苯胺与稳定剂K按5:5:1的体积比混合而成,可在4℃下可以保存两年不变色。

7. 根据权利要求2所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的浓缩样品稀释液为含0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求2所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的酶标物稀释液为含酶稳定剂AH与酶保护剂KEN的磷酸盐缓冲液;所述的三聚氰胺酶标记物为三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物冻干粉,使用时用酶标物稀释液溶解为工作液即可直接可以应用。

9. 一种快速检测样品中三聚氰胺含量的一步法酶联免疫检测方法,包括步骤:

(1) 样品前处理:液态奶样品,取1.00mL到Eppendorf离心管中,4℃ 12000rpm离心5min后取中间的清液,直接用于后续实验,稀释倍数为1;奶粉取样品,准确称取2.00g到50mL离心管中,取10mL PBS加入到奶粉中,40℃水浴加热至奶粉完全溶解,4℃ 4000rpm离心10min后取中间的清液,直接用于后续实验,稀释倍数为5;奶制品与饲料样品,粉碎后准确称取2.00g到50mL离心管中,加入10mL 0.1M HCl,剧烈漩涡振荡后超声裂解样品25min,室温5000rpm离心10min,用1M NaOH调整pH值到8.0左右,室温5000rpm离心5min或0.4μm过滤器过滤至干净的管子中,上清液或过滤液用PBS按1:1进一步稀释后,用于后续实验,稀释倍数为10;

(2) 用权利要求1-9任一所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒进行检测,向包被有三聚氰胺抗体的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物工作液,按照说明书中说明的时间、温度和操作注意事项操作后,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值,(3) 分析检测结果。

10. 如权利要求9所述的快速检测样品中三聚氰胺含量的一步法酶联免疫检测方法,其中(2)为将包被液稀释成1.8μg/mL浓度的三聚氰胺抗体按每孔100μL包被酶标板,4℃包被过夜,洗涤液洗涤3次,拍干;按每孔200μL封闭液4℃下封闭过夜,洗涤3次,拍干备用。标准品孔每孔加入50μL系列浓度的三聚氰胺标准品(0、1、3、9、27、81ng/mL),样

品孔每孔加入 50  $\mu$  L 待测稀释好的样品,每孔加入 50  $\mu$  L 1 : 16000 稀释的三聚氰胺辣根过氧化物酶标物,室温作用 30min,洗涤 3 次,拍干;每孔加 100  $\mu$  l 显色剂,室温作用 10min,每孔加入 100  $\mu$  L 终止液终止反应,酶标仪检测 A 值 (450nm)。以结合率为纵坐标、三聚氰胺标准品浓度的对数为横坐标建立标准曲线,根据标准曲线计算并乘以其对应的稀释倍数即可得样品中三聚氰胺的含量。

## 一种快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法及其试剂盒

### 发明领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫和食品非法添加剂残留检测领域。具体而言,本发明涉及一种用于快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法及其试剂盒。

### 背景技术

[0002] 三聚氰胺 (Melamine), 分子式  $C_3N_6H_6$ , 简称三胺, 化学名称为 2,4,6-三氨基-1,3,5-三嗪, 俗称密胺、蛋白精, 是一种重要的三嗪类含氮杂环有机化工原料, 白色单斜晶体, 几乎无味, 微溶于水, 可溶于甲醇、甲醛、乙酸、热乙二醇、甘油、吡啶等, 不溶于丙酮、醚类, 广泛应用于木材、塑料、涂料、造纸、纺织、皮革、电气和医药等行业。MEL 含氮量极高, 不法商贩把廉价的三聚氰胺添加入食品中, 以虚假提高食品中的蛋白质含量。2007 年 3 月, 美国发生 4000 多起猫狗中毒死亡事件; 2008 年 9 月, 我国爆发三鹿婴幼儿奶粉受污染事件, 导致食用了受污染奶粉的婴幼儿产生肾结石病症甚至死亡, 以及 2010 年初再度爆发的问题奶粉事件, 其原因都是饲料或奶粉中含有三聚氰胺。目前欧盟、美国、加拿大、日本和中国都禁止向食品和饲料中人为添加三聚氰胺, 考虑到三聚氰胺也有可能从包装材料中迁移到食品中, 为确保人体健康与食品安全, 2011 年 4 月 6 日, 卫生部等五部委联合发布 2011 年第 10 号公告, 规定婴儿配方食品 (包括乳及乳制品) 中三聚氰胺的限量值为 1mg/kg, 其他食品中三聚氰胺的限量值为 2.5mg/kg, 高于上述限量的食品一律不得销售。

[0003] 因此建立一种快速、灵敏、易行的三聚氰胺快速检测方法以确保食品和饲料安全具有重要意义。目前三聚氰胺的检测方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)、气-质联用色谱法 (GC-MS) 和液-质联用色谱法等, 检测灵敏度高、准确性好; 但这些方法需要有完善的实验室, 有经验的技术人员, 复杂的仪器设备, 且检测过程繁琐, 不适应现场大量样本的筛查。基于抗原抗体免疫反应的免疫学检测技术为小分子残留物的分析检测提供了一个新的途径。基于此原理建立的一步法直接竞争酶联免疫检测技术较间接竞争法大大缩短了检测时间。该技术的关键是完全抗原和酶标记抗原的合成及抗体的制备。

[0004] 目前, 未见有国产的三聚氰胺一步法酶联免疫检测试剂盒。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒。

[0006] 本发明提供了一种快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒, 其包括三聚氰胺特异性抗体、三聚氰胺标准品溶液和三聚氰胺酶标记物。其中所述的三聚氰胺抗体为多克隆抗体, 优选为兔抗三聚氰胺的多克隆抗体, 其是用三聚氰胺与载体蛋白偶联物作为免疫原通过免疫动物例如兔制得; 所述的三聚氰胺标准品溶液为三聚氰胺标准品储备液 (精确称取 100mg 三聚氰胺标准品, 用超纯水溶解并定容至 100mL 配制而成) 用磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L, pH 7.4) 配制成浓度分别为 0、1、3、9、27、81ng/mL; 所述的三聚氰胺酶标记物中所用的标记酶为辣根过氧化物酶, 所述的三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物采用化学方

法偶联得到,所述偶联方法为甲醛树脂法。

[0007] 本发明提供了一种快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,该试剂盒包括:包被有三聚氰胺特异性抗体的酶标板和三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物工作液。其中三聚氰胺特异性抗体为兔抗三聚氰胺的多克隆抗体,其是用三聚氰胺与载体蛋白偶联物作为免疫原通过免疫动物例如兔制得;所述的三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物采用化学方法偶联得到,标记酶为辣根过氧化物酶,所述偶联方法为甲醛树脂法。

[0008] 用于制备所述酶标板的固相材料,包括但不限于,例如,聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯。载体的形式是微量反应板凹孔。

[0009] 本发明还提供了一种快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,其除了包括包被有三聚氰胺特异性抗体的酶标板和三聚氰胺酶标记物外,还进一步包括三聚氰胺标准溶液、显色剂、酶标物稀释液、洗涤液、终止液和浓缩样品稀释液。以方便现场检测和大量样本筛查。所述的洗涤液为 0.05% -0.5% 吐温 -20 磷酸盐缓冲液。所述的显色剂由过氧化氢或过氧化脲、邻苯二胺或四甲基联苯胺与稳定剂 K 按 5 : 5 : 1 (体积比) 混合而成,在 4℃ 下可以保存两年不变色。所述的浓缩样品稀释液为含 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液。所述的酶标物稀释液为含酶稳定剂 AH 与酶保护剂 KEN 的磷酸盐缓冲液。所述的稳定剂 K、含酶稳定剂 AH 与酶保护剂购自美国 International Diagnostica System 公司。所述的三聚氰胺酶标记物为三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物冻干粉,使用时用酶标物稀释液溶解为工作液即可直接可以应用。所述的三聚氰胺标准品溶液为三聚氰胺标准品储备液(精确称取 100mg 三聚氰胺标准品,用超纯水溶解并定容至 100mL 配制而成)用磷酸盐缓冲液(0.01mol/L, pH 7.4) 配制成浓度分别为 0、1、3、9、27、81ng/mL。所述的终止液为 2mol/L 的盐酸溶液。所述的浓缩样品稀释液为含 1% BSA 的 10 倍浓缩磷酸盐缓冲液。

[0010] 本发明所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒,还包括指导进行本发明所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法的说明书。

[0011] 另一方面,本发明还提供了一种快速检测液体奶、奶粉、奶制品与饲料样品中的三聚氰胺含量的一步法酶联免疫检测方法,包括步骤:

[0012] (1) 样品前处理:液态奶样品,取 1.00mL 到 Eppendorf 离心管中,4℃ 12000rpm 离心 5min 后取中间的清液,直接用于后续实验,稀释倍数为 1;奶粉取样品,准确称取 2.00g 到 50mL 离心管中,取 10mL PBS 加入到奶粉中,40℃ 水浴加热至奶粉完全溶解,4℃ 4000rpm 离心 10min 后取中间的清液,直接用于后续实验,稀释倍数为 5;奶制品与饲料样品,粉碎后准确称取 2.00g 到 50mL 离心管中,加入 10mL 0.1M HCl,剧烈漩涡振荡后超声裂解样品 25min,室温 5000rpm 离心 10min,用 1M NaOH 调整 pH 值到 8.0 左右,室温 5000rpm 离心 5min 或 0.4 μ m 过滤器过滤至干净的管子中,上清液或过滤液用 PBS 按 1 : 1 进一步稀释后,用于后续实验,稀释倍数为 10。

[0013] (2) 用本发明所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒进行检测,向包被有三聚氰胺特异性抗体的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物工作液,按照说明书中说明的时间、温度和操作注意事项操作后,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值。这些反应的时间、温度和操作步骤以及操作注意事项是本领域公知的。优选地,将包被液稀释成 1.8 μ g/mL 浓度的三聚氰胺抗体按每孔 100 μ L 包被酶标板,4℃ 包被过夜,洗涤液洗涤 3 次,拍干;按每孔 200 μ L 封闭液 4℃ 下封闭过夜,洗涤 3

次,拍干备用。标准品孔每孔加入 50  $\mu$  L 系列浓度的三聚氰胺标准品 (0、1、3、9、27、81ng/mL),样品孔每孔加入 50  $\mu$  L 待测稀释好的样品,每孔加入 50  $\mu$  L 1 : 16000 稀释的三聚氰胺辣根过氧化物酶标物,室温作用 30min,洗涤 3 次,拍干;每孔加 100  $\mu$  l 显色剂,室温作用 10min,每孔加入 100  $\mu$  L 终止液终止反应,酶标仪检测 A 值 (450nm)。以结合率为纵坐标、三聚氰胺标准品浓度的对数为横坐标建立标准曲线,根据标准曲线计算并乘以其对应的稀释倍数即可得样品中三聚氰胺的含量。其中所述的快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测试剂盒包括包被有三聚氰胺特异性抗体的酶标板和三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物工作液,或者进一步包括三聚氰胺标准溶液、显色剂、酶标物稀释液、洗涤液、终止液和浓缩样品稀释液,其中所述的洗涤液为 0.05% -0.5%吐温 -20 磷酸盐缓冲液。所述的显色剂由过氧化氢或过氧化脲、邻苯二胺或四甲基联苯胺与稳定剂 K 按 5 : 5 : 1 (体积比) 混合而成,在 4 $^{\circ}$ C 下可以保存两年不变色。所述的浓缩样品稀释液为含 0.1%吐温 -20 的磷酸盐缓冲液。所述的酶标物稀释液为含 10%酶稳定剂 AH 与 5%酶保护剂 KEN 的磷酸盐缓冲液。所述的三聚氰胺酶标记物为三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物冻干粉,使用时用酶标物稀释液溶解为工作液即可直接可以应用。所述的三聚氰胺标准品溶液为三聚氰胺标准品储备液 (精确称取 100mg 三聚氰胺标准品,用超纯水溶解并定容至 100mL 配制而成) 用磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L, pH 7.4) 配制成浓度分别为 0、1、3、9、27、81ng/mL。所述的终止液为 2mol/L 的盐酸溶液。所述的浓缩样品稀释液为含 1% BSA 的 10 倍浓缩磷酸盐缓冲液。所述的封闭液为含 1% OVA 的磷酸盐缓冲液。

[0014] (3) 分析检测结果。分析检测结果的方法是本领域公知的,使用的检测和分析仪器是本领域公知的,包括但不限于酶标仪如 Thermo MK3 等。

[0015] 本发明试剂盒的检测原理为:

[0016] 将三聚氰胺抗体包被于固相载体上,加入样本或三聚氰胺标准品溶液并加入酶标记三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物工作液,待测样品中的三聚氰胺与酶标记三聚氰胺竞争固相化的三聚氰胺抗体,通过洗涤除去未结合的酶标记物,显色后终止,测定样品的吸光度值,该值与样品中三聚氰胺的量呈负相关,与标准曲线比较即可得出三聚氰胺浓度范围。

[0017] 有益效果:

[0018] 本发明检测三聚氰胺的试剂盒主要采用直接竞争酶联免疫测定法定性或定量检测样品中三聚氰胺含量;进一步缩短了检测时间为 20 分钟以内,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样品。

[0019] 本发明该试剂盒采用一步反应法与高特异性的三聚氰胺多克隆抗体,主要试剂以工作液形式提供,可以减少试剂盒的操作步骤,为使用者节省时间并降低因操作步骤冗繁造成的误差,本发明具有灵敏度高、特异性强、高精度、高准确度、对仪器设备要求低、试剂保存时间长、自动化程度高、无放射性同位素污染的等优点,可在饲料及动物源性产品检测中发挥重要作用。

## 附图说明

[0020] 图 1 是三聚氰胺标准曲线;

[0021] 图 2 是三聚氰胺试剂盒实际检测结构图 (终止前),1、2 两条为标准品对照曲线,其余孔为样品检测结果;

- [0022] 图 3 是 ELISA 与 HPLC 方法检测牛奶样品中三聚氰胺含量的相关性；  
[0023] 图 4 是 ELISA 与 HPLC 方法检测奶粉样品中三聚氰胺含量的相关性；  
[0024] 图 5 是 ELISA 与 HPLC 方法检测饲料样品中三聚氰胺含量的相关性。

## 具体实施方式

[0025] 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。

[0026] 实施例 1 三聚氰胺免疫原的合成及免疫血清的制备

[0027] 1.1 试剂与仪器

[0028] 三聚氰胺 (Melamine, 纯度 99.5%)、辣根过氧化物酶 (HRP)、牛血清白蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 均为 Sigma 产品；Sephacryl™ S-200 High Resolution 购自 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司；其他试剂为国产分析纯化学试剂。

[0029] 凝胶成像分析系统 (GeneGenius)、紫外可见分光光谱仪 (Shimadzu UV-2501PC)、傅里叶变换红外光谱仪 (Bruker Tensor 27)、超纯水系统 (Millipore)、垂直电泳系统 (Bio-Rad)、全自动蛋白层析系统 (Amersham) 和压片机 (Shimadzu) 等。

[0030] 1.2 三聚氰胺人工抗原的合成

[0031] 称取 12mg 三聚氰胺溶于 2mL 的吡啶中制备三聚氰胺溶液，称取 20mg BSA 溶解于 2mL 的 PBS 缓冲液中并将其加入上述三聚氰胺溶液中，再向溶液内缓缓滴入 1mL 0.3% 戊二醛溶液，于室温条件下搅拌 4h，然后加入 1mol/L 的甘氨酸 750  $\mu$ L 以终止反应。三聚氰胺-甲醛树脂法合成包被原 (MEL-OVA)：称取 0.0126g 的三聚氰胺 (MEL)、0.082mL 的 37% 的甲醛于有盖试管中，加入 5mL 的 PBS 缓冲液，再置入三颈烧瓶中于 65°C 的水浴中缓慢加热，待 MEL 全部溶解时，用三乙胺调 pH 为 8.5 ~ 9.0。30min 后，加入 0.012g 的氯乙酸钠（预先溶解于 1mL PBS 缓冲液），65°C 水浴中继续反应 9h。反应完毕后，加入 48mg 的 NHS (N-羟基琥珀酰胺) 和 62mg 的 DDC (N,N-二环己基碳二亚胺)，此混合液记为 A 液。将 A 液滴加入预先配置好的 B 液 (30mg 的 OVA 溶于 3mL 的 PBS)，室温 (RT) 下搅拌 3h。将以上产物分别装入透析袋中，在 4°C 条件下对 PBS 缓冲液 1000mL 透析 72h，-20°C 冻存备用。选择 Sephacryl TMS-200 High Resolution 填料装柱、平衡，取合成的免疫原加入到平衡好的层析柱中层析纯化，洗脱液为 pH 7.4 0.01M PBS，设置流速为 0.5mL/min，280nm 处紫外检测。

[0032] 免疫及特异性多克隆抗体的制备

[0033] 将上述免疫原三聚氰胺-BSA 偶联物用生理盐水稀释成 1mg/ml 溶液备用。

[0034] 选取 6 只体重 2 ~ 2.5Kg 健康雄性新西兰大白兔。将免疫原三聚氰胺-BSA 偶联物与等量弗氏完全佐剂通过注射器对抽法混合成油包水的乳浊液，按 1mg/Kg 体重的量进行首次免疫，采取背部皮下多点注射。每隔两周加强免疫一次，用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂，剂量及方法同首次免疫。从第三次免疫开始，每次免疫后 10 天，耳缘静脉取血 1mL，进行抗体效价检测，当抗体效价不再升高时，不加佐剂进行最后一次（第 7 次）免疫，大腿肌肉注射，7 天后颈动脉放血，室温凝固 2h 后 4°C 过夜，8000r/min 离心 10 分钟，除去血块，血清部分用 50% 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% 饱和硫酸铵溶液沉淀两次，沉淀物用尽可能少的磷酸缓冲液溶解，经透析后用 Sephadex G-25M 层析，即得三聚氰胺多克隆抗体。

- [0035] 实施例 2 检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒的组建
- [0036] 组建检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:
- [0037] (1) 包被实施例 1 中所述的三聚氰胺抗体的酶标板;
- [0038] (2) 三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物冻干粉;
- [0039] (3) 三聚氰胺标准品溶液 6 瓶,浓度分别为  $0 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $3 \mu\text{g/L}$ 、 $9 \mu\text{g/L}$ 、 $27 \mu\text{g/L}$ 、 $81 \mu\text{g/L}$ ;
- [0040] (4) 显色剂,所述的显色剂由过氧化氢或过氧化脲、邻苯二胺或四甲基联苯胺与稳定剂 K 按 5 : 5 : 1 (体积比) 混合而成;
- [0041] (5) 酶标物稀释液为含 10% 酶稳定剂 AH 与 5% 酶保护剂 KEN 的磷酸盐缓冲液;
- [0042] (6) 洗涤液为含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液;
- [0043] (7) 样品稀释液为 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液;
- [0044] (8) 终止液为 2mol/L 的盐酸溶液。
- [0045] 该试剂盒及其中各组分用于下面的实施例中。
- [0046] 实施例 3 免疫检测方法的建立
- [0047] 2.1 ELISA 方阵法确定最佳反应浓度
- [0048] 将  $3.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.4 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.8 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.2 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.6 \mu\text{g/ml}$  系列浓度的三聚氰胺抗体按每孔  $100 \mu\text{l}$  包被酶标板,  $4^\circ\text{C}$  包被过夜,洗涤 3 次,拍干,按每孔  $200 \mu\text{l}$  封闭液 (本实施例用含 1% OVA 的磷酸盐缓冲液)  $4^\circ\text{C}$  下封闭过夜,洗涤 3 次,拍干。加入从 1 : 4000 开始倍比稀释的三聚氰胺辣根过氧化物酶标物  $50 \mu\text{L}$ /孔,室温作用 30 分钟,洗涤三次,加  $100 \mu\text{l}$  显色剂,室温作用 10min,  $100 \mu\text{l}$  终止液终止反应,酶标仪检测 A 值 (450nm)。同时设置 6 个平行,取 OD 值为 2.0 左右时的包被浓度为最佳浓度。试验数据列于表 1。
- [0049] 表 1 三聚氰胺多克隆抗体和酶标物最佳工作浓度的确定 (n = 6)
- [0050]

包被抗体 ( $\mu\text{g/mL}$ )	酶标物倍数					
	1: 4000	1: 8000	1: 16000	1: 32000	1: 64000	PBS
3.0	$3.973 \pm 0.109$	$3.847 \pm 0.081$	$3.234 \pm 0.087$	$1.625 \pm 0.107$	$0.722 \pm 0.056$	$0.053 \pm 0.007$
2.4	$3.543 \pm 0.087$	$3.303 \pm 0.137$	$2.776 \pm 0.087$	$1.136 \pm 0.056$	$0.347 \pm 0.043$	$0.069 \pm 0.011$
1.8	$3.156 \pm 0.113$	$2.926 \pm 0.182$	<b><math>2.029 \pm 0.087</math></b>	$0.633 \pm 0.098$	$0.110 \pm 0.044$	$0.073 \pm 0.027$
1.2	$2.787 \pm 0.187$	$2.565 \pm 0.097$	$1.207 \pm 0.087$	$0.259 \pm 0.043$	$0.064 \pm 0.012$	$0.063 \pm 0.010$
0.6	$2.301 \pm 0.125$	$2.215 \pm 0.065$	$0.473 \pm 0.087$	$0.101 \pm 0.074$	$0.063 \pm 0.013$	$0.045 \pm 0.009$

[0051]

[0052] 由表 1 的数据中可以确定,最佳抗体包被浓度为  $1.8 \mu\text{g/ml}$ ,酶标抗原稀释倍数 1 : 16000 达到最佳反应浓度。

[0053] 2.2 ELISA 检测抗体  $\text{IC}_{50}$  值

[0054] ELISA 操作方法同 2.1,最佳抗体包被浓度为  $1.8 \mu\text{g/ml}$ ,三聚氰胺辣根过氧化物酶标物稀释倍数 1 : 16000,准备 0、1、3、9、27、81ng/mL 系列浓度的游离三聚氰胺标准品,每孔加入  $50 \mu\text{l}$  标准品,随后加入  $50 \mu\text{L}$  三聚氰胺辣根过氧化物酶标记物工作液,室温反应 30 分钟,洗板 3 次,加显色剂温育 10 分钟,终止反应,酶标仪读数。以结合率为纵坐标、三聚

氰胺浓度的对数为横坐标,三聚氰胺系列标准品浓度 0、1、3、9、27、81ng/mL 的标准曲线呈较典型的 S 型,如图 1 所示。在 1-81ng/mL 浓度范围内,结合率与浓度呈线性关系,线性回归方程为  $y = -0.5092x + 0.8822$ ,  $R^2 = 0.9922$ 。通过抑制率计算确定:50%抑制率  $IC_{50} = 10.15\text{ng/mL}$ ,方法的检测灵敏度  $IC_{10} = 1.23\text{ng/mL}$ ,表明本发明制备的抗血清是具有较好的特异性的抗三聚氰胺多克隆抗体,能满足三聚氰胺检测要求。

[0055] 实验例 4 试剂盒精密度试验

[0056] 本实验例为标准可重复性试验。具体操作为:通过对同一生产批次和三个生产批次的试剂盒进行板内与板间变异系数分析确定:在同一酶标 96 孔板、同一批次不同酶标 96 孔板与不同批次不同酶标 96 孔板上做 6 组平行的标准曲线,在 450nm 下测的 OD 值,根据所测定的数据计算变异系数。结果表明,板内变异系数 (CV%) 在 2.7-7.9% 之间,平均变异系数为 5.4%,板间变异系数 (CV%) 在 5.7-10.2% 之间,平均变异系数为 7.9% (表 2)。说明该方法的准确性较高,可以满足食品中三聚氰胺含量分析要求。

[0057] 表 2 板内与批间变异系数

		标准溶液 (ng/mL)	重复次数	变异系数 (CV%)
[0058]	板	0	6	3.8
		1	6	5.3
		3	6	2.7
		9	6	7.9
		27	6	8.2
[0059]		81	6	4.3
		平均值		5.4
	板	0	10	9.3
		1	10	5.9
		3	10	7.5
		9	10	5.7
		27	10	10.2
		81	10	8.7
		平均值		7.9

[0060] 实验例 5 试剂盒的回收率试验

[0061] 取浓度为 50-500  $\mu\text{g/kg}$  ( $\mu\text{g/L}$ ) 三个浓度的三聚氰胺标样,对液态奶、奶粉与饲料样品进行添加回收试验,每个浓度做 6 个平行,分别计算回收率。检测方法与实施例 3 中的相同。结果表明 (表 3),三聚氰胺在牛奶、奶粉和饲料中的样品添加回收率在 83%~

105%，回收率良好，变异系数在 4%~9.5%，方法可靠。说明本研究研制的试剂盒可以用来检测牛奶、奶粉和饲料中的三聚氰胺残留。

[0062] 表 3 三聚氰胺在牛奶、奶粉和饲料中的样品添加回收试验 (n = 6)

样品	添加量 (ng/g)	实测值 (ng/g)	回收率 (%)	CV (%)
牛奶	50	52.47 ± 2.05	104.94	4.1
	100	84.74 ± 5.44	84.74	5.44
	200	184.57 ± 17.93	92.29	8.97
奶粉	50	48.78 ± 3.49	97.56	6.98
	100	104.05 ± 9.45	104.05	9.45
	200	169.04 ± 18.32	84.52	9.16
饲料	100	94.35 ± 6.72	94.35	6.72
	200	186.60 ± 16.17	83.3	8.09
	500	428.35 ± 36.71	85.67	7.34

[0064] 实验例 6 试剂盒保存期试验

[0065] 试剂盒加速试验 (表 4) 表明, 4℃ 和 -20℃ 条件下保存 210 天, 三聚氰胺 ELISA 间接竞争法检测的  $B_0$  值基本不变; 37℃ 保存时间延长, 对标准曲线影响变大, 标准曲线斜率、 $IC_{50}$  变差。当前试验结果表明 4℃ 条件下至少可保存 6 个月。

[0066] 表 4 试剂盒稳定性试验 (n = 3)

[0067]

保存温度 (°C)	保存时间 (d)								
	$B_0$ 值	0	30	60	90	120	150	180	210
-20	1.974	1.965	1.954	1.927	1.935	1.949	1.936	1.838	
	±0.067	±0.112	±0.097	±0.068	±0.117	±0.067	±0.097	±0.065	
4	1.981	1.974	1.963	1.922	1.921	1.932	1.897	1.626	
	±0.089	±0.097	±0.066	±0.056	±0.103	±0.053	±0.107	±0.077	
37	1.995	1.361	1.143	1.005	0.987	0.825	0.743	0.613	
	±0.053	±0.087	±0.106	±0.093	±0.057	±0.103	±0.065	±0.032	

[0068] 实施例 7 HPLC 比对试验

[0069] 通过对经 HPLC 检测的阴性样品 (牛奶、奶粉和饲料) 进行人工污染, 再用本发明的三聚氰胺一步法酶联免疫试剂盒和国标 HPLC 方法进行检测比对。

[0070] 参照国家标准《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》(GB/T22388-2008)、《原料

乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法》(GB/T 22400-2008) 与农业行业标准《饲料中三聚氰胺的测定》(NY/T 1372-2007) 建立三聚氰胺的 HPLC 检测方法, 在 0.016-2.56  $\mu\text{g/mL}$  范围内进行测定, 以样品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 具有很好的线性关系, 线性方程为  $Y = 85.107X - 0.9714$ ,  $R^2 = 0.99998$ , 保留时间  $t_r$  为  $6.6662 \pm 0.0188\text{min}$ , 最低检测限为  $50.2 \mu\text{g/kg}$ 。在此基础上, 添加了 50、100、200、400  $\mu\text{g/kg}$  三聚氰胺标准品的牛奶、奶粉与饲料样品分别采用 ELISA 和 HPLC 方法进行检测, 结果 (图 3-5) 表明, 用于牛奶、奶粉与饲料样品中三聚氰胺检测时 2 种方法的相关系数 ( $R^2$ ) 分别为 0.869、0.895 与 0.820, 表明本研究建立的 ELISA 方法与 HPLC 方法具有很好的相符性, 可用于牛奶、奶粉与饲料样品中三聚氰胺分析的大量样品的筛查。

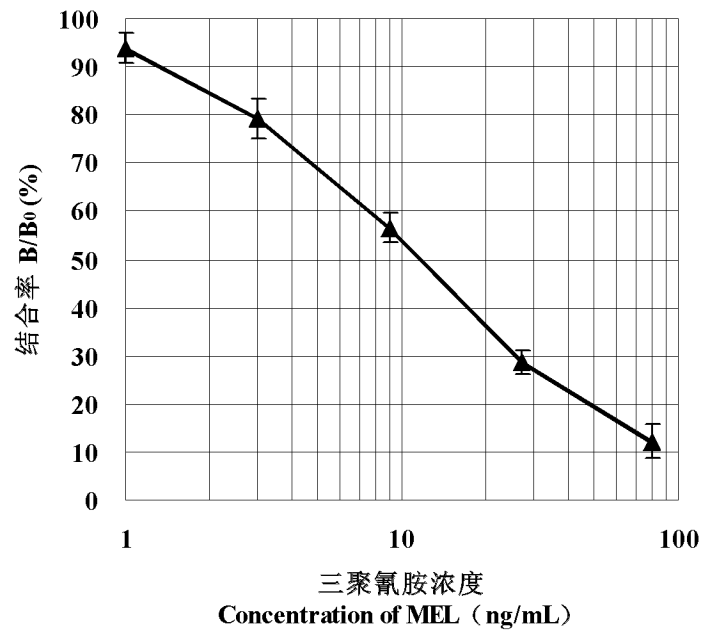


图 1

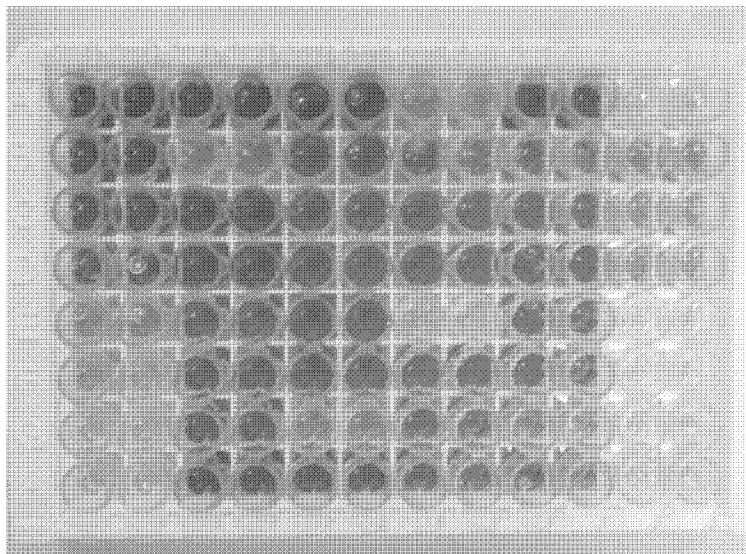


图 2

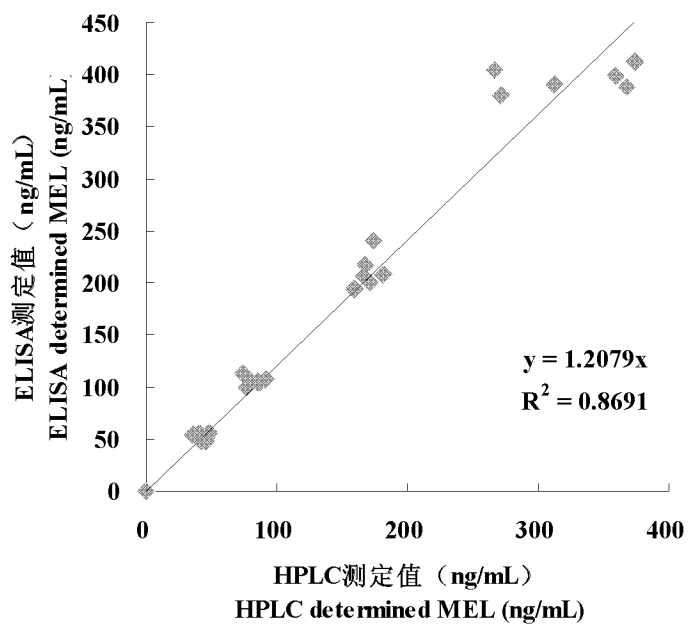


图 3

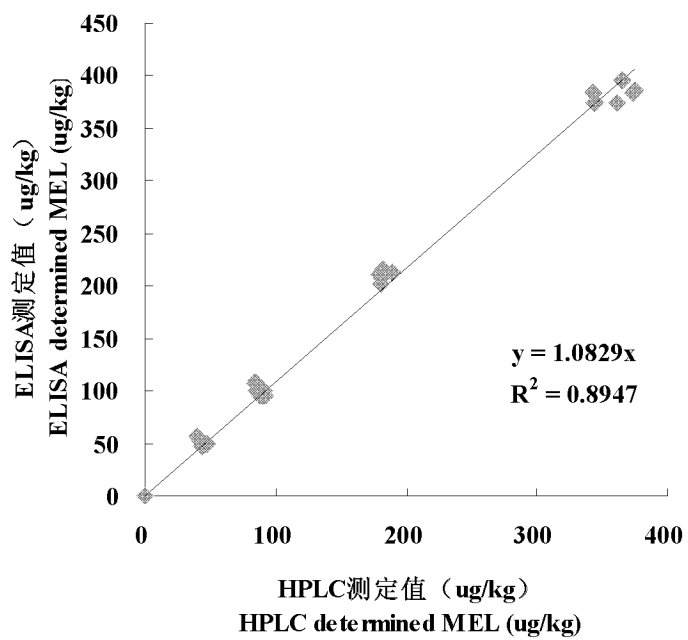


图 4

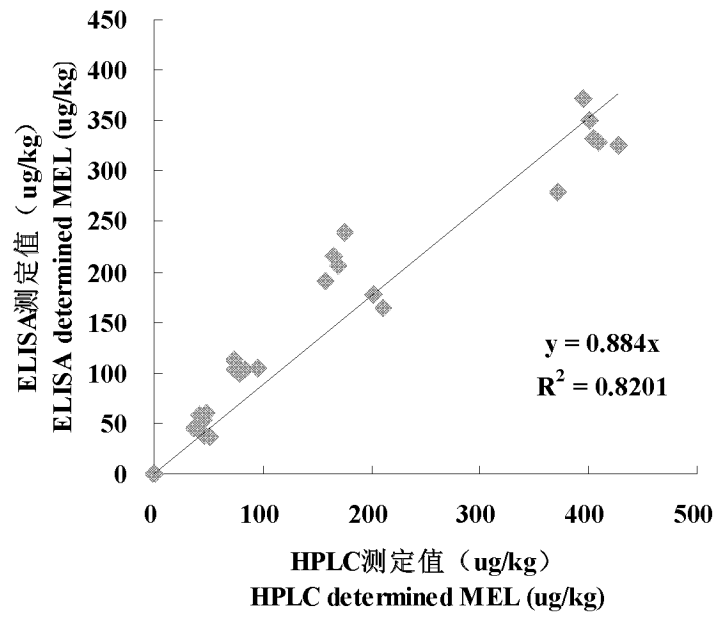


图 5

专利名称(译)	一种快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法及其试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102435729A</a>	公开(公告)日	2012-05-02
申请号	CN201110396713.0	申请日	2011-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	杭州迪恩科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州迪恩科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州迪恩科技有限公司		
[标]发明人	张明洲 王旻子 陈慧华 朱聪英 应永飞 程晔 魏建良		
发明人	张明洲 王旻子 陈慧华 朱聪英 应永飞 程晔 魏建良		
IPC分类号	G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种用于快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法及其试剂盒。该试剂盒包括三聚氰胺特异性抗体、三聚氰胺标准品溶液和三聚氰胺酶标记物，所述的抗体为兔抗三聚氰胺的多克隆抗体，三聚氰胺酶标记物为三聚氰胺辣根氧化酶标记物。还提供了一种用上述试剂盒快速检测三聚氰胺的一步法酶联免疫检测方法。所述试剂盒中主要试剂以工作液形式提供，可以减少试剂盒的操作步骤，为使用者节省时间并降低因操作步骤冗繁造成的误差。本发明方法具有灵敏度高、特异性强、高精度、高准确度、对仪器设备要求低、试剂保存时间长、自动化程度高、无放射性同位素污染的等优点，可在饲料及动物源性产品检测中发挥重要作用。

