



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102313807 A

(43) 申请公布日 2012.01.11

(21) 申请号 201110035543.3

G01N 33/535 (2006.01)

(22) 申请日 2011.02.01

(71) 申请人 天津百鸥瑞达生物科技有限公司

地址 300457 天津市经济技术开发区洞庭路

220 号天津国际生物医药联合研究院

N1003

(72) 发明人 张波 王飞 郝日沫 王鹏 易建

张霞 薛秋艳 徐德顺

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军 尚继栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

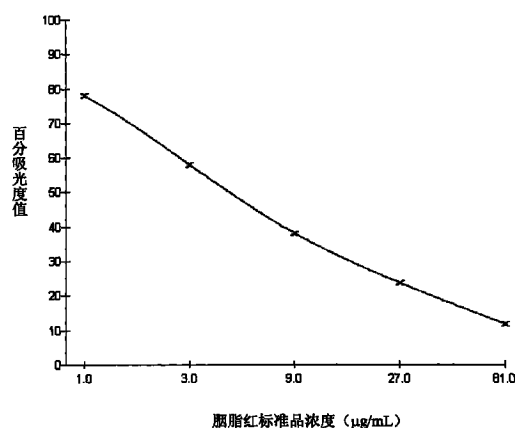
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于检测胭脂红的方法及酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了用于检测胭脂红的方法及酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测胭脂红的酶联免疫试剂盒,包括胭脂红半抗原和胭脂红的特异性抗体;所述特异性抗体为所述胭脂红的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的胭脂红单克隆抗体,保证了检测结果的可靠性,实验结果表明,本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点;本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式,使用方便,成本低廉。用本发明试剂盒检测胭脂红的方法,操作简便,对样品的前处理要求低,能同时快速检测大批量样品。因此,利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法,能够进行现场监控且适合大量样品的定性和定量筛查。



1. 一种检测胭脂红的酶联免疫试剂盒,包括胭脂红半抗原和胭脂红的特异性抗体;所述特异性抗体为胭脂红的多克隆抗体或单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:

1) 所述胭脂红半抗原与载体蛋白偶联,得到的半抗原-载体蛋白偶联物作为包被原,所述特异性抗体为酶标记的;或者

2) 所述特异性抗体作为包被原,所述半抗原为酶标记的。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括抗抗体,如羊抗鼠抗体或羊抗兔抗抗体;并且:

1) 所述胭脂红半抗原与载体蛋白偶联,得到的半抗原-载体蛋白偶联物作为包被原,所述抗抗体为酶标记的;或者

2) 所述抗抗体作为包被原,所述半抗原为酶标记的。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括酶标板、胭脂红标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液中的至少一种。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的试剂盒,其特征在于:所述胭脂红半抗原或胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物、所述胭脂红特异性抗体、所述抗抗体中的任一种已包被在酶标板上。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;当标记酶为辣根过氧化物酶时,使用的底物显色液为过氧化氢或过氧化脲、四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液,终止液为1-2mol/L 硫酸溶液或盐酸溶液;当标记酶为碱性磷酸酶时,使用的底物显色液为硝基磷酸盐缓冲液,终止液为1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

7. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为pH值为6-9、含有终浓度为0.02-0.05% (质量) 的防腐剂、终浓度为1.0-2.0% (质量) 的吐温-20的0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液,优选地,所述浓缩洗涤液为pH值为7.4、含有终浓度为0.03% (质量) 的防腐剂、终浓度为1.5% (质量) 的吐温-20的0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有终浓度为5-10% (质量) 的DMSO、pH为6-8的0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液,优选地,所述浓缩复溶液为含有终浓度为8% (质量) 的DMSO、pH为7.4的0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;所述底物显色液为过氧化氢或过氧化脲、四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液;所述终止液为2mol/L 硫酸溶液或盐酸溶液。

8. 一种检测样品中的胭脂红含量的方法,包括以下步骤:

1) 用胭脂红半抗原或胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物包被酶标板;

2) 将胭脂红标准品或待测样品加入所述包被的酶标板孔内,然后每孔加入酶标记的胭脂红特异性抗体,孵育,洗涤;

3) 加入底物显色液显色;

4) 加入反应终止液终止反应;

5) 通过比较胭脂红标准品与待测样品的颜色,推测出待测样品中的胭脂红含量;或者,测定各孔的吸光度,建立胭脂红浓度相对于吸光度的标准曲线,并根据该标准曲线由待测样品的吸光度推算出待测样品中的胭脂红含量。

9. 一种检测样品中的胭脂红含量的方法,包括以下步骤:

- 1) 用抗抗体包被酶标板；
- 2) 加入胭脂红特异性抗体, 孵育, 洗涤；
- 3) 加入胭脂红标准品或待测样品以及酶标记的胭脂红半抗原, 孵育, 洗涤；
- 4) 加入底物显色液显色；
- 5) 加入反应终止液终止反应；

6) 通过比较胭脂红标准品与待测样品的颜色, 推测出待测样品中的胭脂红含量; 或者, 测定各孔的吸光度, 建立胭脂红浓度相对于吸光度的标准曲线, 并根据该标准曲线由待测样品的吸光度推算出待测样品中的胭脂红含量。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的检测样品中胭脂红含量的方法, 还包括样品前处理步骤, 其中:

当所述样品为液体食品时, 所述样品前处理方法为: 将液体食品与样本稀释液以体积比 1 : 3-8, 取混合后样品用于分析;

当所述样品为固体汤类时, 所述样品前处理方法为: 将固体汤类与样本稀释液以质量体积比为 1 : 10-15, 再加入一定体积的正己烷脱脂, 离心, 取上清检测;

当所述样品为果酱类食品时, 所述样品前处理方法为: 将果酱与样本稀释液以体积比为 1 : 10-15, 混匀, 离心后取上清检测。

用于检测胭脂红的方法及酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测胭脂红的方法及酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 胭脂红色素是目前我国批准使用的六种食用合成色素之一,被广泛应用于食品、药品、化妆品、医疗器具、烟草、饲料、食用包装、日化品、玩具等领域。其分子结构为偶氮化合物,在体内代谢的产物为对人体具有潜在危害的芳香胺类化合物,芳香胺在体内经过代谢活动后与靶细胞作用而可能引起癌肿。如果人们长期或一次性大量食用胭脂红含量超标的食品,可能诱发各种疾病,如肿瘤病变、牙龈出血、口角神经炎以及影响到后代畸形和遗传突变等,当摄入量过大,超过肝脏负荷时,会在体内蓄积,甚至会对肾脏、肝脏产生一定伤害。因此我国对在食品中的胭脂红色素有严格限制,凡是肉类及其加工品、鱼类及其加工品、醋、酱油、腐乳等调味品、水果及其制品、乳类及乳制品、婴儿食品、饼干、糕点都不能使用人工合成色素。只有汽水、冷饮食品、糖果、配制酒和果汁露可以少量使用,一般不得超过1/10000。目前,胭脂红国家标准所采取的检测方法是薄层分析、分光光度计法以及高效液相分析法,这些方法的检测限基本上能满足现行的检测标准,但这些检测方法比较耗时间,且检测花费比较昂贵,不适宜大批量快速检测,不能满足市场上快速检测的要求。

[0003] 酶联免疫吸附分析法(ELISA)具有灵敏度高、线性范围宽、分析速度快以及仪器设备简单等特点,已被用于药物分析、临床检验、食品安全等领域中许多重要的有机物的分析。利用酶联免疫吸附分析法测定胭脂红尚未曾见文献报道。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测胭脂红的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测胭脂红的酶联免疫试剂盒,包括胭脂红半抗原和胭脂红的特异性抗体;所述特异性抗体为胭脂红的多克隆抗体或单克隆抗体;其中,所述半抗原和胭脂红的特异性抗体可以以下述任一种形式存在:

[0005] 1) 将胭脂红半抗原与载体蛋白进行偶联,得到胭脂红半抗原与载体蛋白的偶联物(以下称为半抗原-载体蛋白偶联物),将其作为包被原,所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物;

[0006] 2) 所述特异性抗体为包被原,所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

[0007] 所述试剂盒还可以既包括半抗原和胭脂红的特异性抗体,又包括抗抗体;所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;其中,所述半抗原和抗抗体以下述任一形式存在:

[0008] 1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联,得到半抗原-载体蛋白偶联物,将其作为包被原,所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物;

[0009] 2) 所述抗抗体为包被原,所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

[0010] 所述胭脂红多克隆抗体或胭脂红单克隆抗体,均是用所述胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原得到的;所述载体蛋白可为甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、牛

血清蛋白、兔血清蛋白、血蓝蛋白或卵清蛋白等。

[0011] 所述单克隆抗体是通过杂交瘤细胞技术得到的。所述胭脂红多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

[0012] 为了方便检测,所述试剂盒还包括酶标板,当所述胭脂红特异性抗体或抗抗体用酶进行标记时,所述酶标板上包被有所述胭脂红半抗原或胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物;当所述半抗原用酶进行标记时,所述酶标板上包被有所述胭脂红特异性抗体或所述抗抗体。

[0013] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还可包括胭脂红标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液中的至少一种;

[0014] 其中,所述浓缩洗涤液为 pH 值为 6-9、含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.02-0.05% (质量百分含量) 叠氮化钠、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 1.0-2.0% (质量百分含量) 吐温-20、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有在所述浓缩复溶液中的终浓度为 5-10% (质量百分含量) 的 DMSO、PH 为 6-8、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0015] 所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液为过氧化氢或过氧化脲、四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液,所述终止液为 1-2mol/L 硫酸溶液或盐酸溶液。当标记为碱性磷酸酶时,显色剂为硝基磷酸盐缓冲液,终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0016] 所述浓缩洗涤液具体可以为 pH 值为 7.4、含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度 0.03% 叠氮化钠、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 1.50% 的吐温-20、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液具体可以为含有在所述浓缩复溶液中的终浓度为 8% 的 DMSO、pH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;所述底物显色液为过氧化氢或过氧化脲,四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液,所述终止液为 2mol/L 硫酸溶液或盐酸溶液。

[0017] 胭脂红是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。将胭脂红半抗原与牛血清蛋白采用碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原,胭脂红半抗原与载体蛋白的比例过低或过高都对免疫不利,半抗原与牛血清蛋白的结合摩尔比为 23-28 : 1 较合适。在制备包被原时,胭脂红半抗原与所述载体蛋白的摩尔配比为 26 : 1 比较合适。胭脂红半抗原是通过将胭脂红与二乙酸叔丁酯通过化学反应得到的。

[0018] 制作包被有包被原的酶标板时,所述包被缓冲液可以为 pH 值为 9.0-9.6、0.05mol/L 碳酸盐缓冲液,封闭液为 pH6-8,含有 5% 山羊血清、10g/L 酪蛋白的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0019] 本发明的另一个目的是提供一种检测胭脂红的方法。

[0020] 本发明所提供的一种检测样品中的胭脂红含量的方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 用胭脂红半抗原或胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物包被酶标板;

[0022] 2) 将胭脂红标准品或待测样品加入所述包被的酶标板孔内,然后每孔加入酶标记的胭脂红特异性抗体,孵育,洗涤;

[0023] 3) 加入底物显色液显色;

[0024] 4) 加入反应终止液终止反应;

[0025] 5) 通过比较胭脂红标准品与待测样品的颜色,推测出待测样品中的胭脂红含量;或者,测定各孔的吸光度,建立胭脂红浓度相对于吸光度的标准曲线,并根据该标准曲线由待测样品的吸光度推算出待测样品中的胭脂红含量。

[0026] 本发明所提供的另一种检测样品中的胭脂红含量的方法,包括以下步骤:

[0027] 1) 用抗抗体包被酶标板;

[0028] 2) 加入胭脂红特异性抗体,孵育,洗涤;

[0029] 3) 加入胭脂红标准品或待测样品以及酶标记的胭脂红半抗原,孵育,洗涤;

[0030] 4) 加入底物显色液显色;

[0031] 5) 加入反应终止液终止反应;

[0032] 6) 通过比较胭脂红标准品与待测样品的颜色,推测出待测样品中的胭脂红含量;或者,测定各孔的吸光度,建立胭脂红浓度相对于吸光度的标准曲线,并根据该标准曲线由待测样品的吸光度推算出待测样品中的胭脂红含量。

[0033] 在本发明所提供的检测样品中的胭脂红含量的方法,还可以包括样品前处理步骤:

[0034] 当所述样品为液体食品时,所述样品前处理方法为:将液体食品与样本稀释液以体积比 1 : 3-8,取混合后样品用于分析;

[0035] 当所述样品为可可,果冻类时,所述样品前处理方法为:将待测品水浴溶解,然后与样本稀释液以质量体积比为,1 : 10-15,再加入一定体积的正己烷脱脂,离心,取上清检测。

[0036] 当所述样品为果酱,水果调味糖浆类食品时,所述样品前处理方法为:将待测品与样本稀释液以体积比 1 : 20-25 混匀,离心后去上清检测。

[0037] 本发明的另一个目的是上述酶联免疫试剂盒在检测样品中是否含有胭脂红及其含量方面的应用。

[0038] 本发明的检测胭脂红的酶联免疫试剂盒采用直接竞争及间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中胭脂红的含量。本试剂盒中采用高特异性的胭脂红单克隆抗体,保证了检测结果的可靠性。实验结果表明,本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点;本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式,使用方便,成本低廉。用本发明试剂盒检测胭脂红的方法,操作简便,简化了传统检测方法的步骤,缩短了检测的时间,对样品的前处理要求低,能同时快速检测大批样品。因此,利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法,能够进行现场监控且适合大量样品的定性和定量筛查,将在胭脂红的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0039] 图 1 为胭脂红 ELISA 检测标准曲线。

具体实施方式

[0040] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0041] 实施例 1、以半抗原-载体蛋白偶联物为包被原、酶标抗体为酶标记物的试剂盒及 ELISA 检测方法

[0042] 一、以胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物为包被原、酶标抗体为酶标记物的 ELISA 检测原理：

[0043] 当在酶标板微孔条上的包被原为胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物时，向酶板微孔中加入标准品溶液或样品溶液后，样品中的胭脂红与酶标板上胭脂红偶联抗原竞争酶标胭脂红特异性抗体，洗板，显色，样品吸光值与胭脂红的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中胭脂红的含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅，通过与系列浓度胭脂红标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中胭脂红的含量。

[0044] 二、以胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物为包被原、酶标抗体为酶标记物的试剂盒一般可以包括：

[0045] 1、包被有胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物的酶标板，包被原的浓度可以为 0.15-0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0046] 2、酶标抗体工作液：酶标抗体为用辣根过氧化物酶标记的胭脂红特异性抗体；酶标抗体的稀释液为含有在稀释液中的终浓度为 6-8%（质量百分含量）的山羊血清、pH 为 6-8、0.2-0.3mol/L 磷酸盐缓冲液，酶标抗体工作稀释度为 1：800。

[0047] 3、胭脂红标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、9 $\mu\text{g/mL}$ 、27 $\mu\text{g/mL}$ 、81 $\mu\text{g/mL}$ ，配制标准品的溶液为含有在配制标准品的溶液中终浓度为 pH 为 7.0-7.5、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0048] 4、底物显色液：底物显色液为过氧化氢或过氧化脲，四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液，7ml/瓶，1 瓶。

[0049] 5、终止液：1-2mol/L 盐酸或硫酸。

[0050] 6、浓缩洗涤液：pH 值为 6-9、含有在洗涤液中的终浓度为 0.02-0.05%（质量百分含量）防腐剂和洗涤液中的终浓度为 1.0-2.0%（质量百分含量）的吐温-20、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液；40ml/瓶，1 瓶。

[0051] 7、浓缩复溶液：含有在复溶液中的终浓度为 5-10%（质量百分含量）的 DMSO、pH 为 6-8、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液；200ml/瓶，1 瓶。

[0052] 三、以胭脂红半抗原-载体蛋白偶联物为包被原、酶标抗体为酶标记物的试剂盒的具体组成及其制备：

[0053] （一）组成

[0054] 1、包被有胭脂红半抗原-牛血清白蛋白偶联物的酶标板，包被原的浓度可以为 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0055] 2、酶标抗体工作液：酶标抗体为用辣根过氧化物酶标记的胭脂红特异性抗体；酶标抗体的稀释液为含有在稀释液中的终浓度为 6%（质量百分含量）的山羊血清、pH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液，酶标抗体工作稀释度为 1：500。

[0056] 3、胭脂红标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、9 $\mu\text{g/mL}$ 、27 $\mu\text{g/mL}$ 、81 $\mu\text{g/mL}$ ，配制标准品的溶液为在配制标准品溶液中终浓度为 pH 为 7.2、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0057] 4、底物显色液：底物显色液为过氧化氢或过氧化脲，四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液，7ml/瓶，1 瓶。

[0058] 5、终止液：2mol/L 盐酸。

[0059] 6、浓缩洗涤液：pH 值为 7.4，含有在洗涤液中的终浓度为 0.03%（质量百分含量）防腐剂、在洗涤液中的终浓度为 1.5%（质量百分含量）吐温-20、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液；40ml/瓶，1 瓶。

[0060] 7、浓缩复溶液：含有在复溶液中的终浓度为 8%（质量百分含量）DMSO、PH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液；200ml/瓶，1 瓶。

[0061] （二）制备

[0062] 1、包被有半抗原-牛血清白蛋白偶联物的酶标板的制备

[0063] 1) 胭脂红包被原的制备：

[0064] a. 100mg 纯化的胭脂红溶到 5mL 0.01mol/L 磷酸缓冲液 PBS，使其充分溶解；

[0065] b. 在室温的条件下加入 500 μ mol 碳化二亚胺 (EDC) 和 500 μ mol N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，使胭脂红上的羧基活化；

[0066] c. 室温条件下，100mg 卵清蛋白溶入 10ml PBS 溶液中，充分溶解；

[0067] d. 将 b 中所述的活化的胭脂红滴加到 c 中所述的溶液中，室温下搅拌反应 2 小时。

[0068] e. 于 4℃ 条件下，先用 pH 值较低的稀 HCL (0.01mol/L) 溶液透析，然后用 0.1mol/L pH7.2 的 PBS 透析 3 天，每天换透析液 3 次，分装冻干后，-20℃ 保存。

[0069] 2) 包被有包被原的酶标板的制备

[0070] 用包被缓冲液将包被原稀释成 0.15-0.25 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37℃ 温育 2 小时，再 4℃ 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 5 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中入 200-300 μ l 封闭液，37℃ 温育 1-2 小时，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密保存。

[0071] 其中，所用的包被缓冲液是 pH 值为 9.5、0.05mol/L 碳酸盐缓冲液；所用封闭液为 pH7.4，含有 5% 山羊血清、10g/L 酪蛋白的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0072] 2、胭脂红单克隆抗体的制备

[0073] 1) 免疫原的制备

[0074] 胭脂红是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

[0075] 将半抗原胭脂红与牛血清蛋白采用碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原，具体步骤如下：

[0076] 将胭脂红半抗原 10mg、40mg 碳化二亚胺 (DEC) 和 15mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 充分溶解于 1mL 0.1M PBS 中，室温条件下搅拌反应半小时，得到反应液 a 液；称取牛血清蛋白 25mg，使之充分溶解在 3.0mL PBS (PH 8.2) 中，得到反应液 b 液；将 a 液缓慢加入到 b 液中，并于室温下搅拌 5 小时，半抗原与牛血清蛋白的摩尔比为 25 : 1，用 0.01mol/L PBS 缓冲液透析 3 天，每天换 2 次透析液，以除去未应的小分子物质，以 12000rpm 的速度离心 30 分钟，收集上清，得到半抗原与牛血清蛋白的偶联物，分装，于 -20℃ 保存备用。

[0077] 2) 胭脂红单克隆抗体的制备

[0078] 动物免疫：以半抗原-载体蛋白偶联物为免疫原对 Balb/c 小鼠进行间隔免疫，间接 ELISA 检测并得到血液里含有胭脂红特异性抗体的小鼠脾脏。

[0079] 细胞融合与克隆：取产生特异性抗体的 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化，得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0080] 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,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。

[0081] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 Balb/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭茵石蜡油,7~14 天后腹腔注射杂交瘤细胞,7~10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法或亲和层析法进行腹水纯化。纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定,小瓶分装,-20℃ 保存。

[0082] 3、胭脂红多克隆抗体的制备

[0083] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以半抗原-牛血清蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 1.5mg/kg,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,大腿内侧皮下多点注射,间隔 3-4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,共免疫 5 次,最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血,测定血清抗体效价,心脏采血,用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0084] 4、辣根过氧化物酶标记抗体:

[0085] 使用辣根过氧化物酶标记上述制备的胭脂红单克隆抗体或多克隆抗体。

[0086] 将胭脂红抗体与辣根过氧化物(HRP)采用过碘酸钠法进行偶联。具体方法为:

[0087] a) 溶解 5mg 辣根过氧化物酶 HRP 于 1ml 超纯水中,加入新配制的 0.1mol/L 多碘酸钠 75 μ L,置室温或 4℃ 冰箱反应 20 分钟或 30 分钟。

[0088] b) 反应完后装入透析袋,对 0.001mol/L pH = 4.0 醋酸缓冲液 4℃ 透析过夜,期间需要更换透析液几次。

[0089] c) 将抗体用 0.01mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL,另外用 0.01mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5ml 抗体加入 HRP 溶液中,置室温或 4℃ 冰箱反应 2 小时。

[0090] d) 加入 100 吐 4mg/mL 硼氢化钠,4℃ 冰箱反应 2 小时。

[0091] e) 对 0.01mol/L PBS 透析过夜,加入保存液 -20℃ 保藏备用。

[0092] 四、以半抗原-载体蛋白偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒的应用

[0093] 1、本发明试剂盒可以用于检测液体食品。

[0094] 1) 饮料类食品(稀释倍数:5):

[0095] 如汽水、饮料等,取适量液体食品样品,取 2ml 加热除去酒精或者二氧化碳,加入 8ml 样本稀释液,混匀,取 50 μ L 进行检测

[0096] 2) 可可,果冻类食品(稀释倍数:10)

[0097] a、取 1g 样品,置于 60℃ 水浴中溶解,

[0098] b、加入 19ml 样本稀释液,混匀 10 分钟;

[0099] c、5000rpm 下离心 10 分钟,取上清 50 μ L 检测。

[0100] 3) 果酱,水果类调味糖浆(稀释倍数:20)

[0101] a、取 1g 样品,加入 19ml 样本稀释液,混匀 10 分钟;

[0102] b、5000rpm,离心 10 分钟,取上清 50 μ L 检测。

[0103] 2、检测

[0104] 向包被有胭脂红偶联抗原的酶标板微孔中加入胭脂红标准品溶液或样品溶液 50 μ L,再加入酶标记胭脂红特异性抗体工作液 50 μ L,用盖板模封板,25℃ 恒温中反应 30

分钟,倒出孔内液体,每孔加入 300 μ l 洗涤液,30 秒后倒出孔内液体,重复操作 5 次,用吸水纸拍干;加入显色底物液 100 μ l,轻轻振荡混匀,25℃恒温中反应 30 分钟,每孔加入 50 μ l 2mol/L 终止液硫酸,混匀,用酶标仪波长设定在 450nm 处,测定每孔吸光度值(OD 值)。

[0105] 3、检测结果分析

[0106] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品液(0 标准)的吸光度值(B_0),再乘以 100%,得到百分吸光度值。

[0107]

$$\text{百分吸光度}(\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0108] 公式中 B 为标准品溶液或样品溶液的平均吸光度值, B_0 为 0 μ g/L 标准品溶液的平均吸光度值。

[0109] 以胭脂红标准品浓度(μ g/L)值为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出样品中胭脂红的含量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法,计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可利用计算机专业软件,此法更便于大量样品的快速分析,整个检测过程只需 60 分钟就可以完成。

[0110] 实施例 2、以抗抗体为包被原、酶标抗原为酶标记物的试剂盒及 ELISA 检测方法

[0111] 一、以抗抗体为包被原、酶标抗原为酶标记物的 ELISA 检测原理:

[0112] 当在酶标板微孔条上包被抗抗体时,向酶标板微孔中加入胭脂红特异性抗体孵育,洗板,加入标准品/样品和酶标抗原,样品中的胭脂红与酶标抗原竞争胭脂红特异性抗体,洗板,再加入显色液显色,样品吸光度值与胭脂红的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样品中胭脂红的含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅,通过与系列浓度胭脂红标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中胭脂红的浓度范围。

[0113] 二、以抗抗体为包被原、酶标抗原为酶标记物的试剂盒可以包括:

[0114] 1、包被抗抗体的酶标板,包被原的浓度可以为 0.15-0.25 μ g/ml。

[0115] 2、胭脂红特异性抗体工作液:可以为胭脂红多克隆抗体或胭脂红单克隆抗体工作液;用稀释液将胭脂红单克隆抗体稀释 5000 倍,得到特异性抗体工作液,所述稀释液为 pH 值为 7.4、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0116] 3、酶标抗原工作液:酶标抗原为用辣根过氧化物酶标记的胭脂红半抗原;酶标抗原的稀释液为含有在稀释液中的终浓度为 6% (质量百分含量) 的山羊血清、pH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液,酶标抗原工作稀释度为 1 : 2000。

[0117] 4、胭脂红标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μ g/mL、1 μ g/mL、3 μ g/mL、9 μ g/mL、27 μ g/mL、81 μ g/mL。配制标准品的溶液为在配制标准品溶液中终浓度为 pH 为 7.4、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0118] 5、底物显色液:底物显色液为过氧化氢或过氧化脲,四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液,7ml/瓶,1 瓶。

[0119] 6、终止液:2mol/L 盐酸或硫酸。

[0120] 7、浓缩洗涤液:pH 值为 7.4,含有在洗涤液中的终浓度为 0.03% (质量百分含量)

叠氮化钠、在洗涤液中的终浓度为 0.05%（质量百分含量）吐温-20、0.02mol/L 磷酸盐缓冲液；40ml/瓶，1 瓶。

[0121] 8、浓缩复溶液：含有在复溶液中的终浓度为 8%（质量百分含量）DMSO、pH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液；200ml/瓶，1 瓶。

[0122] 三、以抗抗体为包被原、酶标抗原为酶标记物的试剂盒的制备：

[0123] 1、以 0.15-0.25 $\mu\text{g/ml}$ 的抗抗体作为包被原，基本如实施例 1 所述，包被酶标板。

[0124] 2、胭脂红单克隆抗体和多克隆抗体的制备如实施例 1 所述进行。

[0125] 3、采用过碘酸钠法，用辣根过氧化物酶标记胭脂红半抗原，标记步骤基本如实施例 1 所述。

[0126] 四、以抗抗体为包被原、酶标抗原为酶标记物的酶联免疫试剂盒的应用

[0127] 1、如实施例 1 所述对样品进行前处理。

[0128] 2、检测

[0129] 向包被有抗抗体的酶标板微孔中加入胭脂红特异性抗体，孵育，洗板，加入胭脂红标准品溶液或样品溶液 50 μl 和酶标记胭脂红半抗原 50 μl ，用盖板模封板，25℃恒温中反应 30 分钟，倒出孔内液体，每孔加入 300 μl 洗涤液，30 秒后倒出孔内液体，重复操作 5 次，用吸水纸拍干；加入显色底物液 100 μl ，轻轻振荡混匀，25℃恒温中反应 30 分钟，每孔加入 50 μl 2mol/L 终止液硫酸，混匀，用酶标仪波长设定在 450nm 处，测定每孔吸光度值（OD 值）。

[0130] 3、如实施例 1 所述对检测结果进行分析。

[0131] 实施例 3、试剂盒精密度、准确度、保存性试验

[0132] 1、试剂盒的精密度实验

[0133] 1) 标准品溶液重复性试验

[0134] 从 3 批按照实施例 1 中的方法制备的酶标板中，各抽出 10 个微孔，测定 9 $\mu\text{g/mL}$ 标准品溶液的吸光度值（OD 值），计算批内变异系数和批间变异系数 CV，结果见表 1。

[0135] 表 1 标准品溶液重复性试验

[0136]

cv%		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CV%
实 测 值	01 批	8.5	7.4	9.1	8.5	8.1	8.6	8.5	7.9	8.5	9.0	6.0
	04 批	7.8	8.1	8.8	8.1	8.4	9.2	8.6	8.7	7.9	8.6	5.2
	05 批	8.7	9.3	8.4	8.9	8.5	9	9.1	9.0	9.1	9.3	3.5

[0137] 2) 样本的可重复性实验

[0138] 向阴性饮料、果冻中添加胭脂红，添加终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。分别取三个不同批次的试剂盒各三个，每个浓度重复五次，分别计算变异系数，结果见表 2，表 3。

[0139] 表 2 饮料类食品的可重复性试验

[0140]

批号	实测值 ($\mu\text{g/ml}$)					变异系数(%)
01 批	9.4	8.9	7.8	9.4	9.5	7.9
	8.8	8.5	8.2	8.7	9.4	5.1
	7.9	9.3	7.7	8.9	8.3	7.9
04 批	7.9	8.5	9.4	8.1	9.0	7.3
	8.9	9.1	9.7	8.7	9.3	4.2
	8.2	9.1	7.3	8.8	8.1	8.4
05 批	9.2	8.7	9	8.2	9.3	5.7
	8.9	9.2	7.9	8.5	8.6	5.7
	8.8	7.8	8.7	9.2	7.9	7.2

[0141] 表 3 果冻类食品的可重复性试验

[0142]

批号	实测值 ($\mu\text{g/ml}$)					变异系数
01 批	7.9	8.3	8.1	9.2	8.7	5.5
	8.8	7.6	7.8	9.1	8.9	7.3
	9.1	8.5	7.8	8.5	8.9	5.3
04 批	8.9	8.5	9.3	8	8.4	5.1
	8.1	8.8	9.1	8.6	9.1	4.2
	8.5	8.6	8.5	7.9	8.9	3.8
05 批	8.4	9.2	7.9	8.4	8.7	5
	8.1	8.3	9.1	8.5	7.8	5.3
	8.3	9.1	8.5	8.3	8.7	3.5

[0143] 结果表明饮料类, 果冻类食品的变异系数均小于 20%, 符合农业部关于酶免试剂盒精密度的相关规定。

[0144] 2、试剂盒的准确度试验

[0145] 向阴性饮料、果冻、果酱中添加胭脂红, 添加终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$, $15 \mu\text{g/ml}$, 每个浓度做三孔平行, 计算其添加回收率,

样本		饮料		果冻		果酱	
添加终浓度 ($\mu\text{g/ml}$)		5	15	5	15	5	15
回收率%	1	88.6	79.9	80	75	97.3	79.7
	2	87	87	77.4	77	90	85.7
	3	87.9	77.2	80.1	69.3	70.8	86
平均值		87.8	81.4	79.1	73.77	86.03	83.8
CV%		1.3	6.4	1.9	5.4	15.8	4.2

[0146]

[0147] 3、试剂盒保存期试验

[0148] (1) 将试剂盒放置于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$, 分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒, 对胭脂红标准样品 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0149] (2) 将试剂盒在 37°C 保存的条件下放置 12 天, 每天对胭脂红标准样品 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0150] (3) 将试剂盒在 -20°C 冰箱保存 12 天, 每天对胭脂红标准样品 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0151] 从结果可看出, 经过三种条件保存试验, 胭脂红标准样品 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的吸光度值下降小于 5%, 且 OD 不低于 1.5; 50%抑制率在 $20 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ 之间; 添加回收率在 70 ~

105%之间 ;批内变异系数系数小于 10% ;各项指标均符合质量要求,因此,试剂盒可以在 2 ~ 8℃,保存 12 个月。

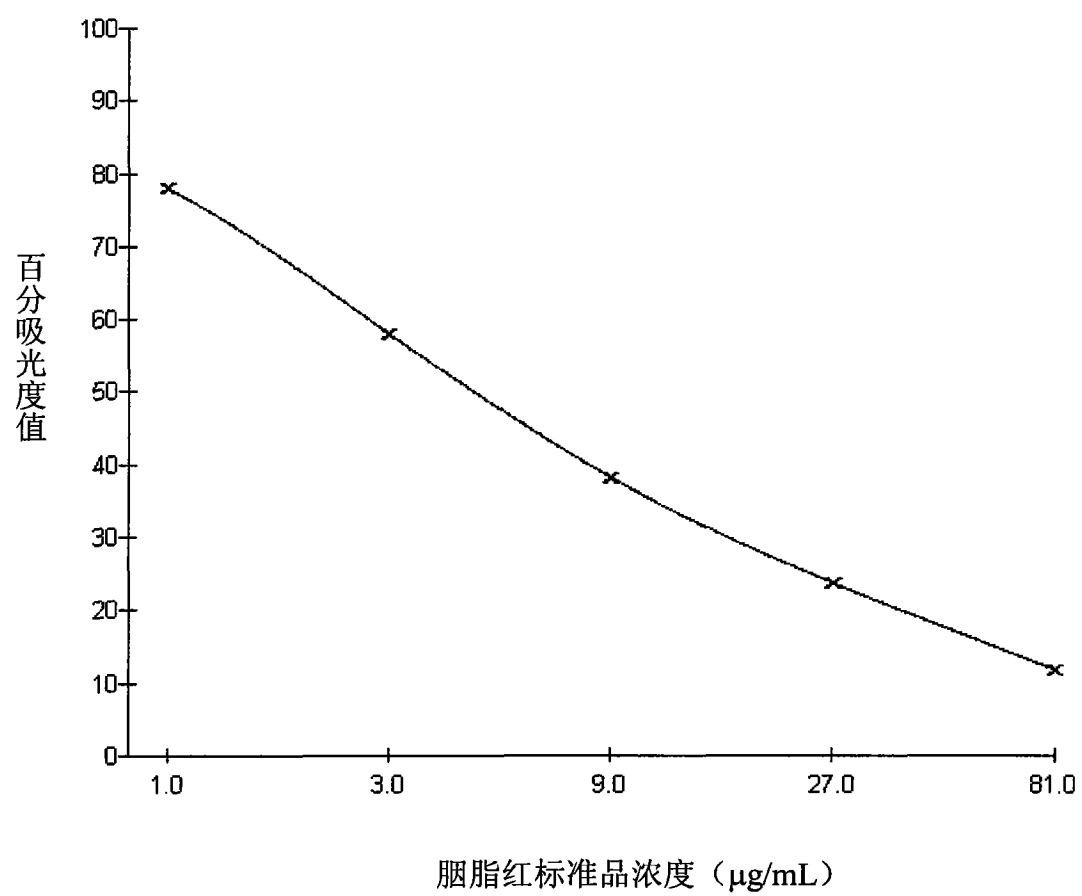


图 1

专利名称(译)	用于检测胭脂红的方法及酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN102313807A	公开(公告)日	2012-01-11
申请号	CN201110035543.3	申请日	2011-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	天津百鸥瑞达生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津百鸥瑞达生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津百鸥瑞达生物科技有限公司		
[标]发明人	张波 王飞 郝日沐 王鹏 易建 张霞 薛秋艳 徐德顺		
发明人	张波 王飞 郝日沐 王鹏 易建 张霞 薛秋艳 徐德顺		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	杨宏军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于检测胭脂红的方法及酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测胭脂红的酶联免疫试剂盒，包括胭脂红半抗原和胭脂红的特异性抗体；所述特异性抗体为所述胭脂红的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的胭脂红单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性，实验结果表明，本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高特点；本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式，使用方便，成本低廉。用本发明试剂盒检测胭脂红的方法，操作简便，对样品的前处理要求低，能同时快速检测大批量样品。因此，利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法，能够进行现场监控且适合大量样品的定性和定量筛查。

