



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102313809 A

(43) 申请公布日 2012.01.11

(21) 申请号 201110035547.1

(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 郭日沫 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)

G01N 33/535(2006.01)

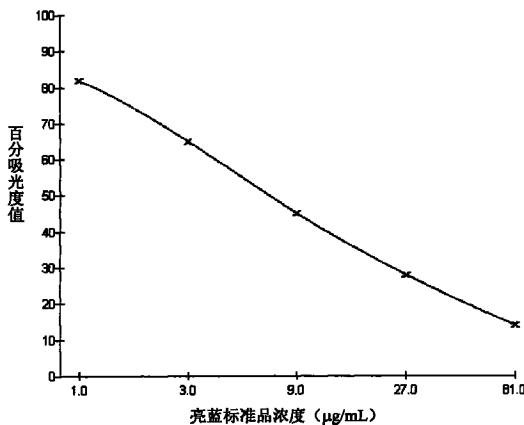
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于检测亮蓝的方法及酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了用于检测亮蓝的方法及酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测亮蓝的酶联免疫试剂盒，包括亮蓝半抗原和亮蓝的特异性抗体；所述特异性抗体为所述亮蓝的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的亮蓝单克隆抗体，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亮蓝的方法，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. 一种检测亮蓝的酶联免疫试剂盒,包括亮蓝半抗原和亮蓝的特异性抗体;所述特异性抗体为亮蓝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) 所述亮蓝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;

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,如羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;并且:

1) 所述亮蓝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;

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、亮蓝标准品溶液、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:所述亮蓝半抗原或亮蓝半抗原 - 载体蛋白偶联物、所述亮蓝特异性抗体、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、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液,优选地,所述浓缩洗涤液为 pH 值为 7.4、含有在终浓度为 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. 一种检测样品中的亮蓝含量的方法,包括以下步骤:

1) 用亮蓝特异性抗体包被酶标板;

2) 加入标准品或待测样品以及酶标记的亮蓝半抗原,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) 通过比较亮蓝标准品与待测样品的颜色,推测出待测样品中的亮蓝含量;或者,测定各孔的吸光度,建立亮蓝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亮蓝含量。

9. 一种检测样品中的亮蓝含量的方法,包括以下步骤:

1) 用亮蓝半抗原或亮蓝半抗原 - 载体蛋白偶联物包被酶标板;

2) 加入亮蓝标准品或待测样品;

- 3) 加入亮蓝特异性抗体, 孵育, 洗涤;
- 4) 加入酶标记的抗抗体, 孵育, 洗涤;
- 5) 加入底物显色液显色;
- 6) 加入反应终止液终止反应;
- 7) 通过比较亮蓝标准品与待测样品的颜色, 推测出待测样品中的亮蓝含量; 或者, 测定各孔的吸光度, 建立亮蓝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亮蓝含量。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的检测样品中亮蓝含量的方法, 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: 将液体食品除去气体, 将样本与样本稀释液以体积比 1 : 3-8 混合, 取混合后样品用于分析;

当所述样品为可可、果冻类时, 所述样品前处理方法为: 将待检物水浴溶解, 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、水果类调味糖浆时, 所述样品前处理方法为: 将待测物与样本稀释液以体积比为 1 : 20-25 混匀, 再加入一定量的正己烷脱脂, 离心后取上清检测。

用于检测亮蓝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亮蓝的方法及酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 亮蓝合成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、日用品、玩具等领域。目前虽然对亮蓝这类非偶氮类的合成色素的危害性没有定论,但它们没有任何的营养价值,对人的身体健康也没有任何帮助,故要尽量不要食用。我国对亮蓝这类合成食用色素也有明确的食用规定,我国对在食品中添加合成色素也有严格的限制:含乳饮料,植物蛋白饮料,碳酸饮料,可食用动物肠衣类,胶原蛋白肠衣等的限量是0.025g/kg,可可制品、巧克力和巧克力制品、冷冻饮料、果冻、调味炼乳(包括甜炼乳、调味乳及其它使用了非乳原料的调制炼乳)等的限量是0.05g/kg,水果调味糖浆、果酱、半固体复合调味料等的限量是0.5g/kg。目前,亮蓝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。这些方法虽能达到国家标准检测要求,但检测花费比较昂贵,且不能大批量快速的检测,不能满足市场上实地检测的要求。近年来,我国科研工作者在亮蓝检测方面做了大量的工作,但都主要集中在理化检测方面,文献检索尚未发现关于亮蓝的ELISA检测方法的报道,鉴于此,本发明研究和建立了亮蓝的竞争ELISA检测方法,制作和研制了亮蓝酶联免疫试剂盒及其检测方法。

发明内容

[0003] 本发明的一个目的是提供一种检测亮蓝的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测亮蓝的酶联免疫试剂盒,包括亮蓝半抗原和亮蓝的特异性抗体;所述特异性抗体为亮蓝的多克隆抗体或单克隆抗体;其中,所述半抗原和亮蓝的特异性抗体可以以下述任一种形式存在:

[0004] 1) 亮蓝半抗原与载体蛋白进行偶联,得到亮蓝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;

[0005] 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。

[0006] 所述试剂盒还可以既包括半抗原和亮蓝的特异性抗体,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:

[0007] 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;

[0008] 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。

[0009] 所述亮蓝多克隆抗体或亮蓝单克隆抗体,均是用所述亮蓝半抗原-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。

[0010] 所述单克隆抗体是通过杂交瘤细胞技术得到的。所述亮蓝多克隆抗体可为鼠源、

马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

[0011] 为了方便检测,所述试剂盒还可包括酶标板,当所述亮蓝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亮蓝半抗原或亮蓝半抗原-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亮蓝特异性抗体或所述抗抗体。

[0012] 为了更方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还可包括亮蓝标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液中的至少一种;

[0013] 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。

[0014] 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,显色液为硝基磷酸盐缓冲液,终止液为1-2mol/L氢氧化钠溶液。

[0015] 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%防腐剂、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。

[0016] 亮蓝是小分子物质,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。将亮蓝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,亮蓝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,亮蓝半抗原与所述载体蛋白的摩尔配比为26:1比较合适。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。

[0017] 本发明的另一个目的是提供一种检测亮蓝的方法。

[0018] 本发明所提供的一种检测样品中的亮蓝含量的方法,包括以下步骤:

[0019] 1) 用亮蓝特异性抗体包被酶标板;

[0020] 2) 加入标准品或待测样品以及酶标记的亮蓝半抗原,孵育,洗涤;

[0021] 3) 加入底物显色液显色;

[0022] 4) 加入反应终止液终止反应;

[0023] 5) 通过比较亮蓝标准品与待测样品的颜色,推测出待测样品中的亮蓝含量;或者,测定各孔的吸光度,建立亮蓝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亮蓝含量。

[0024] 本发明所提供的另一种检测样品中的亮蓝含量的方法,包括以下步骤:

[0025] 1) 用亮蓝半抗原或亮蓝半抗原-载体蛋白偶联物包被酶标板;

[0026] 2) 加入亮蓝标准品或待测样品;

[0027] 3) 加入亮蓝特异性抗体, 孵育, 洗涤 ;
[0028] 4) 加入酶标记的抗抗体, 孵育, 洗涤 ;
[0029] 5) 加入底物显色液显色 ;
[0030] 6) 加入反应终止液终止反应 ;
[0031] 7) 通过比较亮蓝标准品与待测样品的颜色, 推测出待测样品中的亮蓝含量 ; 或者, 测定各孔的吸光度, 建立亮蓝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亮蓝含量。
[0032] 在本发明所提供的检测样品中的亮蓝含量的方法, 还可以包括样品前处理步骤 :
[0033] 当所述样品为液体食品时, 所述样品前处理方法为 : 将液体食品除去气体, 将样本与样本稀释液以体积比 1 : 3-8 混合, 取混合后样品用于分析 ;
[0034] 当所述样品为可可、果冻类时, 所述样品前处理方法为 : 将待检物水浴溶解, 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。
[0035] 当所述样品为果酱、水果类调味糖浆时, 所述样品前处理方法为 : 将待测物与样本稀释液以体积比为 1 : 20-25 混匀, 再加入一定量的正己烷脱脂, 离心后取上清检测。
[0036] 本发明检测亮蓝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亮蓝的含量。本试剂盒中采用高特异性的亮蓝单克隆抗体, 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亮蓝的方法, 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, 将在亮蓝的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0037] 图 1 为亮蓝 ELISA 检测标准曲线。

具体实施方式

[0038] 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。
[0039] 实施例 1、以亮蓝特异性抗体为包被原、抗原为酶标记物的试剂盒的制备及 ELISA 检测方法
[0040] 一、以亮蓝特异性抗体为包被原、抗原为酶标记物的 ELISA 检测原理 :
[0041] 当在酶标板微孔条上的包被原为亮蓝特异性抗体时, 向酶板微孔中加入标准品溶液或样品溶液后, 及酶标记物, 样品中的亮蓝与酶标记物竞争结合微孔板上亮蓝特异性抗体, 洗板, 显色, 样品吸光值与样品或标准品中亮蓝的含量呈负相关, 与标准曲线比较即可得出样品中亮蓝的含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅, 通过与系列浓度亮蓝标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中亮蓝的含量。
[0042] 二、以亮蓝特异性抗体为包被原、抗原为酶标记物的试剂盒一般可以包括 :
[0043] 1、包被有亮蓝特异性抗体的酶标板, 包被原的浓度可以为 0.15-0.25 μg/ml。
[0044] 2、酶标抗原工作液 : 酶标抗原为用辣根过氧化物酶标记的亮蓝抗原 ; 酶标抗原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,酶标抗原工作稀释度为 1 : 1000。

[0045] 3、亮蓝标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μg/mL、1 μg/mL、3 μg/mL、9 μg/mL、27 μg/mL、81 μg/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。

[0046] 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。

[0047] 5、终止液:1-2mol/L 盐酸或硫酸。

[0048] 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) 的防腐剂和在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。

[0049] 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。

[0050] 三、以亮蓝特异性抗体为包被原、抗原为酶标记物的试剂盒的具体组成及其制备:

[0051] (一) 组成

[0052] 1、包被有亮蓝特异性抗体的酶标板,包被原的浓度可以为 0.20 μg/ml。

[0053] 2、酶标抗原工作液:酶标抗原为用辣根过氧化物酶标记的亮蓝与载体蛋白的偶联物;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,酶标抗抗体工作稀释度为 1 : 1000。

[0054] 3、亮蓝标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μg/mL、1 μg/mL、3 μg/mL、9 μg/mL、27 μg/mL、81 μg/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。

[0055] 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。

[0056] 5、终止液:2mol/L 盐酸。

[0057] 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) 的防腐剂、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。

[0058] 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) 的 DMSO、pH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;200ml/瓶,1 瓶。

[0059] (二) 制备

[0060] 1、亮蓝单克隆抗体的制备

[0061] 1) 免疫原的制备

[0062] 亮蓝是小分子物质,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。

[0063] 将上述得到的半抗原与卵清蛋白如下方法进行偶联得到免疫原,体步骤如下:

[0064] a. 10mg 纯化的亮蓝和 1.4mg 无水碳酸钾溶于 0.5ml 无水丙酮,加入 3mg 6-溴己酸乙酯,混合过夜,氮气吹干;

[0065] b. 上述样品用 3ml 乙酸乙酯溶解,依次用 1mol/L NaOH 溶液,4mol/L 溶液和蒸馏

水多次洗涤,取上层液体,室温氮气吹干;

[0066] c. 上述残余物再用 3ml 1mol/L NaOH 溶解,50℃搅拌 30 分钟,后用 5ml 浓盐酸酸化,再用 3ml 乙酸乙酯萃取两次,取有机层氮气吹干;

[0067] d. 将上述六溴己酸乙酯法合成的半抗原溶于 1ml DMF,加入 50 μ mol DCC 和 50 μ mol NHS,4℃条件下反应过夜。

[0068] e. 将上述反应液离心,取上清缓慢滴入到 4ml 0.25mg/ml 卵清蛋白磷酸缓冲液中,4℃下反应 4h,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) 亮蓝单克隆抗体的制备

[0070] 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亮蓝特异性抗体的小鼠脾脏。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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)腹腔注入灭菌石蜡油,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。

[0074] 2、亮蓝多克隆抗体的制备

[0075] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以半抗原 - 甲状腺蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 1.5m g/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。

[0076] 3、包被有亮蓝特异性抗体的酶标板的制备

[0077] 用包被缓冲液将抗体稀释成 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。

[0078] 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。

[0079] 4、辣根过氧化物酶标记抗原:

[0080] 将亮蓝半抗原与辣根过氧化物(HRP)采用过碘酸钠法进行偶联。具体方法为:

[0081] a) 称取 3mg 亮蓝,溶于 400ul 水中,加入 100 μ l 1M HCL 于该溶液中, pH < 1.5

[0082] b) 称取 3mg NaNO₂,溶于 200 μ l 水中

[0083] c) 将 b) 缓慢加入 a) 中,在水浴条件下反应 1 小时,溶液由无色慢慢变为浅黄色

[0084] d) 称 25mg HRP,溶于 5ml PBS 中,

[0085] e) 将 c) 所得溶液分批滴加到 d) 中,保持 pH7-8 之间

[0086] f) PBS 透析过夜

[0087] g) 加入保存液, 分装, -20℃备用。

[0088] 使用辣根过氧化物酶标记单克隆抗体或多克隆抗体。

[0089] 四、以亮蓝特异性抗体为包被原的酶联免疫试剂盒的应用

[0090] 1、本发明提供待测样品前处理方法为：

[0091] 1) 饮料类食品 (稀释倍数 :5) :

[0092] 如汽水、饮料等, 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 μl 进行检测

[0093] 2) 可可、果冻类食品 (稀释倍数 :10)

[0094] 取 1g 样品, 置于 60℃水浴中溶解, 加入 9ml 样本稀释液, 混匀, 再加入 5ml 正己烷, 充分混匀 10 分钟 ;5000rpm, 离心 10 分钟, 取中间层 50 μl 检测。

[0095] 3) 果酱、水果类调味糖浆 (稀释倍数 :20)

[0096] 取 1g 样品, 加入 19ml 样本稀释液, 混匀, 再加入 10ml 正己烷, 充分混匀 10 分钟 ;5000rpm, 离心 10 分钟, 取上清 50ul 检测。

[0097] 2、检测

[0098] 向包被有亮蓝特异性抗体的酶标板微孔中加入亮蓝标准品溶液或样品溶液 50 μl, 再加入酶标记亮蓝抗原工作液 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)。

[0099] 3、检测结果分析

[0100] 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 (B₀), 再乘以 100%, 得到百分吸光度值。

[0101]

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

[0102] 公式中 B 为标准品溶液或样品溶液的平均吸光度值, B₀ 为 0 μg/L 标准品溶液的平均吸光度值。

[0103] 以亮蓝标准品浓度 (μg/mL) 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亮蓝的含量。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。

[0104] 实施例 2、以半抗原 - 载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的制备及 ELISA 检测方法

[0105] 一、以亮蓝半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的 ELISA 试剂盒的检测原理 :

[0106] 当在酶标板微孔条上的包被原为亮蓝半抗原 - 载体蛋白偶联物时, 向酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液后, 加入亮蓝特异性抗体, 样品中的亮蓝与酶标板上亮蓝偶

联抗原竞争亮蓝特异性抗体，洗板，再加入酶标抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样品吸光度值与亮蓝的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中亮蓝的含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅，通过与系列浓度亮蓝标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中亮蓝的浓度范围。

[0107] 二、以亮蓝半抗原 - 载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒一般可以包括：

[0108] 1、包被有亮蓝半抗原 - 载体蛋白偶联物的酶标板，包被原的浓度可以为 0.15 μ g/ml。

[0109] 2、酶标抗抗体工作液：酶标二抗为用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；酶标二抗的稀释液为含有在稀释液中的终浓度为 8%（质量百分含量）的山羊血清、pH7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液，酶标抗抗体工作液稀释度为 1 : 500。

[0110] 3、亮蓝特异性抗体工作液：可以为亮蓝多克隆抗体或亮蓝单克隆抗体工作液；用稀释液将亮蓝单克隆抗体稀释 3000 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。

[0111] 4、亮蓝标准品溶液 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。

[0112] 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。

[0113] 6、终止液：2mol/L 盐酸或硫酸。

[0114] 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。

[0115] 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）的 DMSO、pH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液；200ml/瓶，1 瓶。

[0116] 实施例 3、试剂盒精密度、准确度、保存性试验

[0117] 1、试剂盒的精密度实验

[0118] (1) 标准品溶液重复性试验

[0119] 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 20 μ g/mL 标准品溶液的吸光度值 (OD 值)，重复 10 次，计算变异系数 CV，结果见表 1。

[0120] 表 1 标准品溶液重复性试验

[0121]

| cv% | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 01 批 | 8.5 | 6.2 | 6.4 | 6.5 | 7.0 | 8.1 | 8.2 | 8.3 | 7.9 | 8.4 |
| 02 批 | 7.7 | 7.3 | 7.9 | 8.2 | 8.0 | 9.0 | 8.3 | 7.8 | 7.6 | 7.3 |
| 03 批 | 7.6 | 7.2 | 7.3 | 8.7 | 6.5 | 7.2 | 6.3 | 8.1 | 8.2 | 8.5 |

[0122] 结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 6.2 ~ 9.0% 之间，批间变异

系数为 9.1%，符合变异系数批内小于 10%，批间小于 20% 的规定

[0123] (2) 样本重复性试验

[0124] 向阴性果汁、固体汤类、果浆类食品添加标准品，添加终浓度为 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。分别取三个不同批次的试剂盒各五个，每个浓度重复 3 次，分别计算变异系数，结果见表 2-4。

[0125] 表 2 果汁样本可重复性试验

[0126]

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | 变异系数 |
|------|---------------------------------|------|------|------|------|------|
| 01 批 | 19.3 | 19.6 | 18.5 | 19.9 | 19.7 | 2.8% |
| | 18.5 | 18.6 | 17.7 | 19.1 | 17.5 | 3.9% |
| | 16.5 | 17.4 | 18.1 | 19.2 | 17.8 | 5.9% |
| 03 批 | 17 | 18.9 | 19.5 | 17.9 | 16.5 | 7.0% |
| | 16.4 | 19.9 | 17.9 | 18.3 | 17.1 | 7.4% |
| | 16.8 | 19.5 | 16.9 | 17.3 | 18.1 | 6.3% |
| 05 批 | 16.2 | 18.8 | 19.6 | 17.1 | 18.5 | 7.6% |
| | 19.7 | 17.3 | 18.9 | 18.1 | 16.5 | 7.0% |
| | 16.7 | 18.9 | 16.1 | 17.7 | 18.2 | 6.4% |

[0127] 表 3 固体汤类可重复性试验

[0128]

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | 变异系数 |
|------|---------------------------------|------|------|------|------|-------|
| 01 批 | 17.1 | 14.8 | 17.7 | 15.6 | 18.8 | 9.6% |
| | 14.8 | 16.8 | 17.6 | 15.7 | 18.1 | 8.2% |
| | 16.4 | 15.2 | 17.9 | 16.9 | 18.4 | 7.4% |
| 03 批 | 18.7 | 16.4 | 19.7 | 15.8 | 17.5 | 9.1% |
| | 18.8 | 19.5 | 15.9 | 17.1 | 15.3 | 10.4% |
| | 17.4 | 18.2 | 15.9 | 16.8 | 17.3 | 4.9% |
| 05 批 | 18.5 | 17.3 | 16.9 | 19.2 | 16.1 | 7.1% |
| | 17.2 | 16.8 | 18.1 | 16.6 | 19.9 | 7.6% |
| | 17.7 | 18.7 | 19.7 | 16.1 | 19.4 | 8% |

[0129] 表 4 果酱类可重复性试验

[0130]

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | 变异系数 |
|------|---------------------------------|------|------|------|------|------|
| 01 批 | 18.1 | 19.2 | 17.2 | 19.2 | 16.7 | 6.3% |
| | 14.2 | 15.4 | 16.2 | 18 | 17.3 | 9.3% |
| | 17.8 | 18.2 | 16.9 | 18.1 | 15.9 | 5.6% |
| 03 批 | 18.9 | 16.4 | 17.3 | 19.8 | 16.4 | 8.1% |
| | 17.3 | 16.5 | 15.9 | 16.3 | 18.2 | 5.4% |
| | 16.3 | 16.4 | 15.8 | 16.8 | 17.2 | 3.2% |
| 05 批 | 18.1 | 19.4 | 16.8 | 16.9 | 18.3 | 6.9% |
| | 15.2 | 18.9 | 18.4 | 17.7 | 16.8 | 8.4% |
| | 17.1 | 15.6 | 15.2 | 16.7 | 16.8 | 5.1% |

[0131] 2、试剂盒的准确度试验

[0132] 对样本进行添加回收试验，添加终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。每个浓度做 3 个孔平行，分别计算回收率，见表 5。

[0133] 表 5

| 样本 | | 饮料 | | 固体汤类 | | 果酱 | |
|-------------------------------|---|------|------|------|------|------|------|
| 添加终浓度 ($\mu\text{g/ml}$) | | 10 | 30 | 10 | 30 | 10 | 30 |
| [0134] 回收率% | 1 | 71.3 | 77 | 82.3 | 71.9 | 69.4 | 72.4 |
| | 2 | 81.3 | 86 | 79.4 | 88.4 | 74.9 | 79.1 |
| | 3 | 79 | 85.1 | 89.1 | 91.2 | 85.7 | 88.1 |
| 平均值 | | 79 | 83 | 84 | 84 | 77 | 80 |
| CV% | | 3.6 | 6 | 5.9 | 12.4 | 10.5 | 9.9 |

[0135] 3、试剂盒保存期试验

[0136] (1) 将试剂盒放置于 2 ~ 8°C, 分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒, 对亮蓝标准样品 (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。

[0137] (2) 将试剂盒在 37°C 保存的条件下放置 12 天, 每天对亮蓝标准样品 (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。

[0138] (3) 将试剂盒在 -20°C 冰箱保存 12 天, 每天对亮蓝标准样品 (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。

[0139] 从结果可看出, 经过三种条件保存试验, 亮蓝标准样品 (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 ~ 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°C 保存 12 个月。

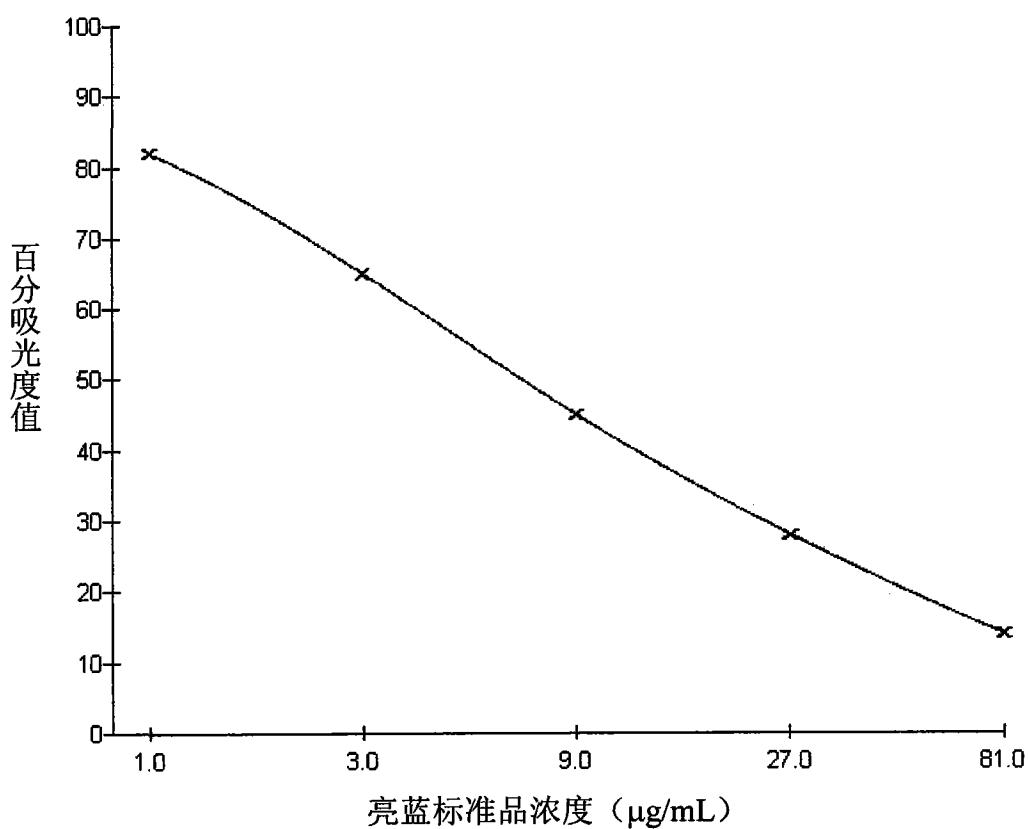


图 1

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于检测亮蓝的方法及酶联免疫试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN102313809A | 公开(公告)日 | 2012-01-11 |
| 申请号 | CN201110035547.1 | 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 郗日沫 王鹏 易建 张霞 薛秋艳 徐德顺 | | |
| 发明人 | 张波 王飞 郗日沫 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亮蓝的方法及酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测亮蓝的酶联免疫试剂盒，包括亮蓝半抗原和亮蓝的特异性抗体；所述特异性抗体为所述亮蓝的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的亮蓝单克隆抗体，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亮蓝的方法，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。

