



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105181680 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510626655. 4

(22) 申请日 2015. 09. 28

(71) 申请人 成都博奥新景医学科技有限公司

地址 610000 四川省成都市温江区永宁镇
八一路北段 8 8 号

申请人 博奥生物集团有限公司

(72) 发明人 韩学栋 郭健夫 高云 邢婉丽

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

一种三聚氰胺的磁珠分离化学发光免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种三聚氰胺的定量检测试剂盒。本发明提供了一种三聚氰胺定量检测试剂盒,包括如下 8 种组分:校准品、质控品、异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺抗体溶液、碱性磷酸酶标记的三聚氰胺抗体溶液、样本稀释液、磁分离试剂、清洗液、底物溶液;本发明所采用的检测方法是磁珠分离化学发光免疫检测,酶标记技术,磁分离技术和化学发光技术相结合,其操作方便、简单,反应条件温和,发光值稳定且受外界条件影响较小。相比于现有检测方法,本发明具有样本处理过程简单,检测成本低,检测快速,测试结果准确、重复性好等优点。

1. 一种三聚氰胺定量检测试剂盒, 为 1) 或 2) :

1) 包括异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体溶液、碱性磷酸酶标记的三聚氰胺抗原溶液和磁分离试剂 ;

所述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体溶液和所述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原溶液的溶剂均为抗试剂缓冲液 ;

所述抗试剂缓冲液按照如下方法制备 : 将溶液 A、动物血清和防腐剂混匀得到抗试剂缓冲液 ;

所述溶液 A 由 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、Trizma base、动物血清白蛋白和水组成 ;

2) 包括所述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体、所述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原和所述抗试剂缓冲液。

2. 根据权利要求 1 所述试剂盒, 其特征在于 :

所述抗试剂缓冲液中, 所述动物血清为牛血清, 所述防腐剂为 ProcLin-300 ;

所述溶液 A、所述牛血清和所述 ProcLin-300 的配比为 1000g : 2.0-10ml : 0.2-1.0ml ;

所述溶液 A 中, 所述 Na^+ 的浓度为 0.1-0.5mol/L, 所述 Mg^{2+} 的浓度为 1mmol/L, 所述 Zn^{2+} 的浓度为 0.1mmol/L, 所述牛血清白蛋白的质量百分含量为 0.2-1.0% ; 所述 Trizma base 浓度为 20-100mmol/L。

3. 根据权利要求 2 所述试剂盒, 其特征在于 :

所述抗试剂缓冲液中, 所述溶液 A、所述牛血清和所述 ProcLin-300 的配比为 1000g : 5mL : 0.5mL ;

所述溶液 A 中, 所述 Na^+ 源于 NaCl, 所述 NaCl 浓度为 0.1mol/L ;

所述牛血清白蛋白的质量百分含量为 0.5% ;

所述 Trizma base 的浓度为 50mmol/L。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述试剂盒, 其特征在于 :

所述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体溶液由异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体和所述抗试剂缓冲液组成, 所述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体的浓度为 0.1-0.5 $\mu\text{g/mL}$;

所述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原溶液由碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原和所述抗试剂缓冲液组成, 所述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原的浓度为 0.2-1 $\mu\text{g/mL}$ 。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述试剂盒, 其特征在于 :

所述试剂盒还包括磁分离试剂 ;

所述磁分离试剂为将抗异硫氰酸荧光素抗体共价连接在磁珠表面, 得到磁分离试剂 ;

所述抗异硫氰酸荧光素抗体为多克隆抗体 ;

所述抗异硫氰酸荧光素抗体和所述磁珠的配比为 30 μg -200 μg : 1mg ;

所述磁珠的直径为 0.5-1.5 μm 。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述试剂盒, 其特征在于 : 所述试剂盒还包括校准品 ;

所述校准品由 n 个不同浓度的校准品溶液组成, 所述校准品溶液由三聚氰胺抗原和校准品缓冲液组成, 且所述三聚氰胺抗原在所述校准品中为不同浓度 ;

所述校准品缓冲液按照如下方法制备 : 将溶液 B 和防腐剂混匀得到 ;

所述溶液 B 由二水磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、NaCl 和水组成,

所述溶液 B 和所述防腐剂的配比为 1000g :0.2-1.0mL ;

所述溶液 B 中,所述二水磷酸二氢钠的浓度为 2mmol/L,所述磷酸氢二钠浓度为 8mmol/L,所述 NaCl 质量百分含量为 0.2% -1.0%。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:

所述防腐剂为 ProcLin-300 ;

所述溶液 B 和 ProcLin-300 的配比为 1000g :0.5mL ;

所述溶液 B 中,

所述 NaCl 的质量百分含量为 0.9%。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的试剂盒,其特征在于:

所述校准品由 n 个不同浓度的校准品溶液组成,n 小于等于 6 ;

所述试剂盒还包括质控品、样本稀释液、清洗液和底物溶液 ;

所述质控品为 2 个不同浓度的校准品 ;

所述清洗液由吐温 -20、氯化钠和浓度为 0.15M、pH 为 8.0 ± 0.05 的 Tris-HCl 缓冲液组成,其中,所述吐温 -20 的体积百分含量为 0.04%,所述氯化钠的浓度为 0.25mol/L ;

所述底物溶液由二氢吡啶和浓度为 0.25mol/L、pH 为 8.0 ± 0.05 的 Tris-HCl 缓冲液组成,其中,所述二氢吡啶的浓度为 0.25g/mL ;

所述样本稀释液为校准品缓冲液。

9. 一种制备权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒的方法,包括如下步骤:将权利要求 1-8 中任一所述试剂盒中 8 种组分均独立包装 ;再整体包装为试剂盒。

10. 权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒在三聚氰胺定量检测中的应用 ;

或权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒在制备三聚氰胺定量检测产品中的应用 ;

或权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒中 8 种组分在制备三聚氰胺定量检测产品中的应用 ;

或一种待测样本中三聚氰胺定量检测方法,包括如下步骤:

1) 权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒中样本稀释液稀释待测样本,得到稀释待测样本 ;

2) 将权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒中的校准品、质控品和所述稀释待测样本分别与权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒中的异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体溶液和碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原溶液混匀,反应,得到免疫反应产物 ;

3) 将所述免疫反应产物与权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒中的磁分离试剂混匀,反应,得到反应产物,将所述反应产物中的沉淀与磁珠清洗液混悬,收集沉淀,即为磁分离产物 ;

4) 将所述磁分离产物和权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒中的底物溶液混匀,得到混合产物,用化学发光仪检测所述混合产物的发光强度,通过发光强度计算待测样本中全量程三聚氰胺定量 ;

所述磁珠清洗液为将权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒中清洗液与水按 1:7 混匀,得到溶液 ;

或权利要求 1-8 中任一所述的试剂盒中磁分离试剂在三聚氰胺定量检测中的应用。

一种三聚氰胺的磁珠分离化学发光免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,涉及到食品安全相关的免疫分析检测技术,提供了一种三聚氰胺的磁珠分离化学发光免疫检测方法,适用于牛奶、奶粉及饲料等样本中三聚氰胺的定量检测。

背景技术

[0002] 三聚氰胺 (Melamine, MEL) 俗称密胺、蛋白精,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,被用作化工原料,可用于塑料、涂料、粘合剂、食品包装材料的生产。它是白色单斜晶体,几乎无味,微溶于水,可溶于甲醇、乙酸、甘油等,对身体有害,不可用于食品加工或食品添加物。对在食品中人为添加三聚氰胺的,依法追究法律责任。

[0003] 食品工业中常常需要检查蛋白质含量,业界常使用一种叫做“凯氏定氮法 (Kjeldahl method)”的方法,通过食品中氮原子的含量来间接推算蛋白质的含量。也就是说,食品中氮原子含量越高,这蛋白质含量就越高。三聚氰胺的最大的特点是含氮量很高(66%),所以常被不法商人添加到食品和饲料中以虚假提高蛋白质的含量,对人类及动物健康造成了严重危害,三聚氰胺在生物体内无代谢转化,急性毒性很低,但长期食用会形成泌尿结石,造成肾结石、肾损伤、肾功能衰竭,甚至膀胱癌。近年来,三聚氰胺污染食品导致中毒事件时有发生。2008 年的“问题奶粉”事件造成上万婴儿肾损伤甚至死亡,为确保人体健康,确保乳与乳制品质量安全,卫生部发布 25 号公告制定三聚氰胺在乳与乳制品中的临时管理限量值,随后国务院发布施行《乳品质量安全监督管理条例》,加强乳品质量监管。

[0004] 目前市场上常用检测三聚氰胺试剂主要是采用胶体金免疫层析技术、酶联免疫技术等分析方法,而实验室及检验中心多采用高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱-质谱联用法检测样本中三聚氰胺含量。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种三聚氰胺定量检测试剂盒。

[0006] 本发明提供的试剂盒,

[0007] 为 1) 或 2) :

[0008] 1) 包括异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体溶液、碱性磷酸酶标记的三聚氰胺抗原溶液和磁分离试剂;

[0009] 所述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体溶液和所述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原溶液的溶剂均为抗试剂缓冲液;

[0010] 所述抗试剂缓冲液按照如下方法制备:将溶液 A、动物血清和防腐剂混匀得到抗试剂缓冲液;

[0011] 所述溶液 A 由 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、Trizma base、动物血清白蛋白和水组成;

[0012] 2) 包括所述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体、所述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原和所述抗试剂缓冲液。

[0013] 上述试剂盒中,所述抗试剂缓冲液中,所述动物血清为牛血清,所述防腐剂为 ProcLin-300;

[0014] 所述溶液 A、所述牛血清和所述 ProcLin-300 的配比为 1000g:2.0-10mL:0.2-1.0mL;

[0015] 所述溶液 A 中,所述 Na^+ 的浓度为 0.1-0.5mol/L,所述 Mg^{2+} 的浓度为 1mmol/L,所述 Zn^{2+} 的浓度为 0.1mmol/L,所述牛血清白蛋白的质量百分含量为 0.2-1.0%;所述 Trizma base 浓度为 20-100mmol/L。

[0016] 上述试剂盒中,所述抗试剂缓冲液中,所述溶液 A、所述牛血清和所述 ProcLin-300 的配比为 1000g:5mL:0.5mL;

[0017] 所述溶液 A 中,所述 Na^+ 源于 NaCl,所述 NaCl 浓度为 0.1mol/L;

[0018] 所述牛血清白蛋白的质量百分含量为 0.5%;

[0019] 所述 Trizma base 的浓度为 50mmol/L。

[0020] 上述试剂盒中,所述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体溶液由异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体和所述抗试剂缓冲液组成,所述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体的浓度为 0.1-0.5 $\mu\text{g/mL}$;

[0021] 所述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原溶液由碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原和所述抗试剂缓冲液组成,所述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原的浓度为 0.2-1 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0022] 上述试剂盒还包括磁分离试剂;

[0023] 所述磁分离试剂为将抗异硫氰酸荧光素抗体共价连接在磁珠表面,得到磁分离试剂;

[0024] 所述抗异硫氰酸荧光素抗体为多克隆抗体;

[0025] 所述抗异硫氰酸荧光素抗体和所述磁珠的配比为 30 μg -200 μg :1mg;

[0026] 所述磁珠的直径为 0.5-1.5 μm 。

[0027] 上述试剂盒还包括校准品;

[0028] 所述校准品由 n 个不同浓度的校准品溶液组成,所述校准品溶液由三聚氰胺抗原和校准品缓冲液组成,且所述三聚氰胺抗原在所述校准品中为不同浓度;n 小于等于 6;

[0029] 所述校准品缓冲液按照如下方法制备:将溶液 B 和防腐剂混匀得到;

[0030] 所述溶液 B 由二水磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、NaCl 和水组成,

[0031] 所述溶液 B 和所述防腐剂的配比为 1000g:0.2-1.0mL;

[0032] 所述溶液 B 中,所述二水磷酸二氢钠的浓度为 2mmol/L,所述磷酸氢二钠浓度为 8mmol/L,所述 NaCl 质量百分含量为 0.2%-1.0%。

[0033] 上述试剂盒中,所述防腐剂为 ProcLin-300;

[0034] 所述溶液 B 和 ProcLin-300 的配比为 1000g:0.5ml;

[0035] 所述溶液 B 中,所述 NaCl 的质量百分含量为 0.9%。

[0036] 上述试剂盒还包括质控品、样本稀释液、清洗液和底物溶液;

[0037] 所述质控品为 2 个不同浓度的校准品;

[0038] 所述清洗液由吐温-20、氯化钠和浓度为 0.15M、pH 为 8.0 $\pm$ 0.05 的 Tris-HCl 缓冲液组成,其中,所述吐温-20 的体积百分含量为 0.04%,所述氯化钠的浓度为 0.25mol/L;

[0039] 所述底物溶液由二氢吡啶和浓度为 0.25mol/L、pH 为 8.0 $\pm$ 0.05 的 Tris-HCl 缓冲

液组成,其中,所述二氢吡啶的浓度为 0.25g/mL;

[0040] 所述样本稀释液为校准品缓冲液。

[0041] 上述抗试剂缓冲液的 pH 值为 7.0 ± 0.05 。

[0042] 上述校准品缓冲液的 pH 值为 7.2 ± 0.05 。

[0043] 上述异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体为用异硫氰酸荧光素标记三聚氰胺单克隆抗体得到的产物;

[0044] 上述碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原为用碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原得到的产物。

[0045] 上述校准品为浓度为 0、1、3、9、27、100ng/mL 三聚氰胺抗原溶液。

[0046] 上述质控品为浓度为 3ng/mL 和 27ng/mL 的校准品。

[0047] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述的试剂盒的方法。

[0048] 本发明提供的方法,包括如下步骤:将上述试剂盒中 8 种组分均独立包装;再整体包装为试剂盒。

[0049] 上述的试剂盒在三聚氰胺定量检测中的应用也是本发明保护的范围;

[0050] 或上述的试剂盒在制备三聚氰胺定量检测产品中的应用也是本发明保护的范围;

[0051] 或上述的试剂盒中 8 种组分在制备三聚氰胺定量检测产品中的应用也是本发明保护的范围;

[0052] 或本发明还保护一种待测样本中三聚氰胺定量检测方法,包括如下步骤:

[0053] 1) 上述的试剂盒中样本稀释液稀释待测样本,得到稀释待测样本;

[0054] 2) 将上述的试剂盒中的校准品、质控品和所述稀释待测样本分别与上述的试剂盒中的异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺单克隆抗体溶液和碱性磷酸酶标记三聚氰胺抗原溶液混匀,反应,得到免疫反应产物;

[0055] 3) 将所述免疫反应产物与上述的试剂盒中的磁分离试剂混匀,反应,得到反应产物,将所述反应产物中的沉淀与磁珠清洗液混悬,收集沉淀,即为磁分离产物;

[0056] 4) 将所述磁分离产物和上述的试剂盒中的底物溶液混匀,得到混合产物,用化学发光仪检测所述混合产物的发光强度,通过发光强度计算待测样本中全量程三聚氰胺定量;

[0057] 所述磁珠清洗液为将上述的试剂盒中清洗液与水按 1:7 混匀,得到溶液;

[0058] 或上述的试剂盒中磁分离试剂在三聚氰胺定量检测中的应用也是本发明保护的范围。

[0059] 将如下 8 种组分独立包装后再整体包装为试剂盒,即为三聚氰胺定量检测试剂盒:1、校准品(含一系列浓度的 MEL,用于建立标准曲线);2、质控品(含一定浓度的 MEL);3、试剂 A(含一定浓度的异硫氰酸荧光素标记的 MEL 抗体溶液);4、试剂 B(含一定浓度的碱性磷酸酶标记的 MEL 抗原溶液);5、样本稀释液(10mmol/L 磷酸盐(PBS)缓冲液,配方同校准品缓冲液);6、磁分离试剂(结合有抗异硫氰酸荧光素抗体的磁珠混悬液);7、清洗液(用于配制磁珠清洗液);8、底物溶液。试剂盒中 1、2、3、4、5、6、8 为必备试剂。

[0060] 本发明的实验证明,本发明具有以下优点:

[0061] 1、本发明中样本处理方法简单。样本稀释、提取等简单处理后即可用于检测,不需

过夜处理、过纯化柱、吹干等复杂的过程；

[0062] 2、本发明利用磁珠子与化学发光技术相结合，提供了一种检测范围宽、灵敏度高、精密度好、测值稳定的定量检测方法，操作简单，检测快速，可满足快速、大量检测样本的需求。

[0063] 本发明所采用的检测方法是磁珠分离化学发光免疫检测法，是酶标记技术，磁分离技术和化学发光技术相结合，其操作方便、简单，反应条件温和，发光值稳定且受外界条件影响较小。相比于现有检测方法，本发明具有样本处理过程简单，检测成本低，检测快速，测试结果准确、重复性好等优点。

附图说明

[0064] 图 1 为磁珠分离化学发光免疫法检测三聚氰胺示意图。

具体实施方式

[0065] 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。

[0066] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0067] 本发明检测试剂盒中的所有组分均能通过商业途径从生物试剂或化学试剂公司购买得到。本发明中所用标记异硫氰酸荧光素单克隆抗体为 Fitzgerald 公司生产，货号为：10R-2227；标记碱性磷酸酶抗体为 Fitzgerald 公司生产，货号为：10-1514；抗原为 Fitzgerald 公司生产，货号为：30R-1048；碱性磷酸酶购自英国 BBI 公司，批号为：1693AA；羧基磁珠胶体溶液购自 merk 公司；羊抗异硫氰酸荧光素抗体血清血清购自解放军总医院第一附属医院实验动物科；异硫氰酸荧光素 (FITC) 购自 SIGMA 公司，CAT：3326-32-7，货号为：F7250；SMCC 购自 thermo fisher scientific 公司，货号为：22360；2-IT 购自 thermo fisher scientific 公司，CAS：4781-83-3；货号为：26101；NHS 购自 SIMGA 公司，CAS：6066-82-6，货号：130672；EDC 购自 SIMGA 公司，CAS：25952-53-8，货号：E7750。磁微粒试剂、底物溶液、清洗液均来自博奥生物集团有限公司成品试剂盒。

[0068] 实施例 1、三聚氰胺定量检测试剂盒组分及其方法

[0069] 一、三聚氰胺定量检测试剂盒的制备

[0070] 将如下 8 种组分独立包装后再整体包装为试剂盒，即为三聚氰胺定量检测试剂盒：1、校准品（含一系列浓度的 MEL，用于建立标准曲线）；2、质控品（含一定浓度的 MEL）；3、试剂 A（含一定浓度的异硫氰酸荧光素标记的 MEL 抗体溶液）；4、试剂 B（含一定浓度的碱性磷酸酶标记的 MEL 抗原溶液）5、样本稀释液（10mmol/L 磷酸盐 (PBS) 缓冲液，配方同校准品缓冲液）；6、磁分离试剂（结合有抗异硫氰酸荧光素抗体的磁珠混悬液）；7、清洗液（用于配制磁珠清洗液）；8、底物溶液。试剂盒中 1、2、3、4、5、6、8 为必备试剂，7 可通过购买其他公司类似产品代替使用。具体如下：

[0071] 具体如下：

[0072] 1、校准品

[0073] 1) 校准品缓冲液的配制

[0074] 校准品缓冲液为将溶液 B 和 ProcLin-300 混匀得到的溶液；溶液 B 由二水磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、NaCl 和水组成，溶液 B 和 ProcLin-300 的配比为 1000g：0.5mL；溶液 B

中,二水磷酸二氢钠的浓度为 2mmol/L,磷酸氢二钠浓度为 8mmol/L, NaCl 质量百分含量为 0.9%。校准品缓冲液的 pH 值为 7.2 ± 0.05 。

[0075] 校准品缓冲液的配置方法具体如下:

[0076] a) 取二水磷酸二氢钠 0.32g,磷酸氢二钠 1.13g, NaCl 9g 于 1L 试剂瓶中;

[0077] b) 取 800mL 纯化水于 1L 试剂瓶中,充分搅拌直至完全溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.05 ;

[0078] c) 加入纯化水定重至 1000g,得到溶液 B;加入 ProcLin-300(购自 SIGMA,货号:48914-U)0.5mL,充分混匀 1h;

[0079] d) 验证 pH 值为 7.2 ± 0.05 ;

[0080] e) 使用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤并收集滤液,贴好标签, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 保存。

[0081] 2) 校准品的制备

[0082] 将 MEL 抗原(购自 sigma 公司,货号:52549)用校准品缓冲液稀释成 6 个浓度梯度的校准品,等量分装成浓度为 0、1、3、9、27、100ng/mL 的校准品。

[0083] 2、质控品(含一定浓度的 MEL)

[0084] 以上述浓度为 3ng/mL 和 27ng/mL 的校准品作为质控品;

[0085] 3、试剂 A(异硫氰酸荧光素标记的 MEL 单克隆抗体溶液)

[0086] 1)、抗试剂缓冲液的配制

[0087] 抗试剂缓冲液由溶液 A、ProcLin-300 和牛血清组成;溶液 A 由 Trizma base、NaCl、水、 MgCl_2 、 ZnCl_2 和牛血清白蛋白组成;其中 Trizma base 的浓度为 50mmol/L;NaCl 浓度为 0.1mol/L; MgCl_2 浓度为 1mmol/L; ZnCl_2 浓度为 0.1mmol/L,牛血清白蛋白浓度为 0.5%(质量百分含量);溶液 A、ProcLin-300 和牛血清的配比为 1000g:0.5mL:5mL;抗试剂缓冲液的 pH 值为 7.0 ± 0.05 。抗试剂缓冲液的配置方法具体如下:

[0088] a) 取 Trizma base 6.05g, NaCl 5.85g 于 1L 烧杯中;

[0089] b) 取 800ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解;

[0090] c) 加入 1mol/L 的 MgCl_2 1ml, 0.1mol/L ZnCl_2 1ml,充分溶解混匀,调节 pH 至 8.0 ± 0.05 ;

[0091] d) 加入牛血清白蛋白 5g,充分搅拌混匀,放置 2 小时;

[0092] e) 加入纯化水定重至 1000g,充分搅拌混匀后,调节 PH 至 7.0 ± 0.05 ;得到溶液 A;

[0093] f) 吸取牛血清 5mL, ProcLin-300 0.5mL,充分混匀 1 小时;

[0094] g) 验证 pH 值至 7.0 ± 0.05 ;

[0095] h) 使用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤并收集滤液,贴好标签, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 保存。

[0096] 2)、异硫氰酸荧光素标记 MEL 单克隆抗体

[0097] 异硫氰酸荧光素标记 MEL 单克隆抗体为用异硫氰酸荧光素标记 MEL 单克隆抗体得到的产物,具体方法如下:

[0098] 取 1mg MEL 单克隆抗体(购自北京华安麦科生物技术有限公司,编号:HF08A020),上 PD10 柱子更换缓冲液(脱去原抗体保存缓冲液,更换为 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.5, 16.8g 碳酸氢钠溶于 1000g 纯化水中, PH9.5),并通过离心浓缩至 5mg/mL,加入浓度为 0.5mg/mL 的异硫氰酸荧光素溶液(溶剂为 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.5) 100 μL (MEL 单克隆抗体与异硫氰酸荧光素的配比为 1mg:0.05mg),混合均匀。室温避光反应 20 小时,得到

异硫氰酸荧光素标记 ME 单克隆抗体。

[0099] 再使用 PD10 柱子纯化,用 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 PH9.5 洗脱,收集黄色液体,保存于 -20℃,得到纯化后异硫氰酸荧光素标记 MEL 抗体。

[0100] 3)、试剂 A 的制备

[0101] 将上述 2) 的纯化后异硫氰酸荧光素标记 MEL 单克隆抗体与上述 1) 的抗试剂缓冲液混匀,得到试剂 A,其中异硫氰酸荧光素标记 MEL 单克隆抗体的浓度为 0.1 μg/mL。

[0102] 4、试剂 B(含一定浓度的碱性磷酸酶标记的 MEL 抗体)

[0103] 1) 碱性磷酸酶标记 MEL 抗原

[0104] 碱性磷酸酶标记 MEL 抗原为用碱性磷酸酶标记 MEL 抗原衍生物(三聚氰胺-BSA)得到的产物,具体方法如下:

[0105] 取 1mg MEL 抗原衍生物(购自北京华安麦科生物技术有限公司,编号:HF08AB20),上 PD10 柱子更换缓冲液(0.05mol/L 三乙醇胺缓冲液,溶剂是水 PH8.6),并通过离心浓缩至 3mg/mL,加入浓度为 13.76mg/mL 的活化剂 2-Iminoethanol hydrochloride(2-IT) 溶液(2-IT 购自 thermo fisher scientific 公司,货号为:26101 溶剂为 0.05mol/L 三乙醇胺缓冲液 PH10.5)4.5 μL,室温放置 20 分钟后加 1M 甘氨酸溶液 3 μL 终止活化反应,室温下放置 10 分钟。再用 PD10 柱子纯化后,收集洗脱蛋白,得到活化后 MEL 抗原。

[0106] 取 1.5mg 碱性磷酸酶(碱性磷酸酶购自英国 BBI 公司,批号:1696AA),上 PD10 柱子更换缓冲液(0.05mol/L 三乙醇胺缓冲液 PH8.6),并通过离心浓缩至 5mg/mL,加入浓度为 6.69mg/mL 的 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate(SMCC) 溶液(SMCC 购自 thermo fisher scientific 公司,货号为:22360,溶剂为 DMF,购自 sigma 公司,货号:227056)8 μL,室温放置 15 分钟,加入 1M 甘氨酸溶液 3 μL 终止活化反应,室温放置 10 分钟。使用 PD10 柱子纯化后,得到活化后碱性磷酸酶。

[0107] 将活化后 MEL 抗原(是以溶液的形式加入)与活化后碱性磷酸酶(是以溶液的形式加入)按 1mg MEL 加入 1mg 碱性磷酸酶的比例混合,同时加入 5 μL 1M 氯化镁水溶液加入混匀,放置 4℃反应 20 小时。

[0108] 使用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化,除去未连接的 MEL 抗原衍生物和碱性磷酸酶,用 0.05mol/L 三乙醇胺缓冲液 PH7.0 洗脱,洗脱流速为 0.75ml/min,柱子直径/长度为 1.6/60cm,观察出峰位置并比对标准分子图谱收集连接物,将连接物保存于 4℃,得到碱性磷酸酶标记 MEL 抗原。

[0109] 2)、试剂 B 的制备

[0110] 将上述 1) 的碱性磷酸酶标记 MEL 抗原与上述 3 中 1) 的抗试剂缓冲液混匀,得到试剂 B,其中碱性磷酸酶标记 MEL 抗原的浓度为 0.2 μg/mL。

[0111] 5、样本稀释液

[0112] 样本稀释液为校准品缓冲液。

[0113] 6、磁分离试剂(结合有抗异硫氰酸荧光素抗体的磁珠混悬液)

[0114] 磁分离试剂为将羊抗异硫氰酸荧光素抗体(多克隆抗体,厂家:解放军总医院第一附属医院实验动物科货号:Y11005)共价连接在磁珠表面,得到磁分离试剂;其中,羊抗异硫氰酸荧光素抗体和磁珠的配比为 150 μg:1mg。

[0115] 磁珠的直径在 0.5-1.5 μm 之间(厂家:merck 公司,货号:EM1-100/40),具有超顺

磁性,表面含有羧基(COOH-)活性基团。

[0116] 磁分离试剂的具体制备方法:

[0117] (1) 将磁珠与活化剂 EDC(购自 SIMGA 公司, CAS :25952-53-8, 货号 :E7750) 和 NHS(购自 SIMGA 公司, CAS :6066-82-6, 货号 :130672) 以一定比例混合, 室温反应 120 分钟, 得到活化磁珠; 上述磁珠与活化剂混合比例为:1000mg 磁珠中加入 5mg EDC 和 5mg NHS; (2) 将活化后磁珠与羊抗异硫氰酸荧光素抗体以一定比例混合, 混合比例为:1000mg 磁珠中加入 150mg 羊抗异硫氰酸荧光素抗体, 4 度振荡反应 10 小时, 得到连接蛋白的磁珠; (3) 将连接蛋白后的磁珠用封闭液进行处理, 室温封闭 1 小时, 得到磁珠溶液; 封闭液为含有 1g/100mL BSA 的 pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液; (4) 将 (3) 得到的磁珠溶液在磁场作用下沉降 20 分钟后弃上清; 将磁珠悬浮于 100ml pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液后过 1500 目材质为 304 钢的不锈钢筛, 过筛过程中, 不断振荡并用 pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液反复冲洗, 直至筛面上剩余不能过筛的团聚颗粒, 过筛后的磁珠重新混悬后应颗粒均一, 无凝集; (5) 将过筛后的磁珠用保存液稀释至 5mg/ml, 室温混悬 2 小时后 4℃ 保存, 得到结合有抗异硫氰酸荧光素抗体的磁珠; 保存液为含 1% 牛血清白蛋白的 trizma base 缓冲液; 再将结合有抗异硫氰酸荧光素抗体的磁珠悬浮在含 1% 牛血清白蛋白的 trizma base 缓冲液中, 得到磁分离试剂;

[0118] 含 1% 牛血清白蛋白的 trizma base 缓冲液为将牛血清白蛋白、trizma base 和水混匀, 得到含牛血清白蛋白的 trizma base 缓冲液, 其中, 牛血清白蛋白的浓度为 1% (为质量百分含量)、trizma base 的浓度为 0.1mol/L。

[0119] 7、清洗液

[0120] 清洗液: 将吐温 -20、氯化钠和 pH 为 8.0 ± 0.05 浓度为 0.15mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液混合, 得到清洗液, 其中吐温 -20 的浓度为 0.04% (为体积百分含量), 氯化钠的浓度为 0.25mol/L。

[0121] 8、底物溶液

[0122] 底物溶液: 将二氢吡啶与浓度为 0.25M、pH 为 8.0 ± 0.05 的 Tris-HCl 缓冲液混匀, 溶解, 使二氢吡啶终浓度为 0.25g/mL, 得到的溶液。

[0123] 二、利用磁珠子化学发光免疫试剂盒对样本中三聚氰胺含量进行定量测定

[0124] 1、原理

[0125] 本发明为竞争法。利用磁珠子化学发光免疫分析方法对样本中三聚氰胺含量进行定量测定。反应的技术原理为: 碱性磷酸酶 (AP) 标记的三聚氰胺抗原与同样本、校准品或质控品中的三聚氰胺竞争结合异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的三聚氰胺抗体, 形成抗原抗体复合物。随后加入连有抗荧光素抗体的磁性微粒, 通过抗荧光素抗体与荧光素的特异性结合使抗原抗体复合物连接在磁珠上, 在外加磁场中直接沉淀, 将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离。弃上清后清洗沉淀复合物, 加入酶促化学底物溶液。底物在酶作用下便催化裂解, 形成不稳定的激发态中间体, 当激发态中间体回到基态时便发出光子, 形成发光反应。使用分析仪检测反应的发光强度。发光强度与样本中三聚氰胺的含量呈反比。

[0126] 2、三聚氰胺磁珠分离化学发光免疫检测方法

[0127] (1) 样本稀释: 牛奶样品: 用样本稀释液稀释牛奶, 牛奶与样本稀释液的体积比为

1:5-20,取混匀后的样品用于分析;奶粉样品:用磷酸缓冲液超声溶解奶粉,磷酸缓冲液与奶粉的配比为5mL:0.5-1.0g,离心取上清液,将所述上清液以1:5-20的体积比与样本稀释液混匀,取样用于分析;饲料样品:将甲醇加入饲料中并剧烈震荡,甲醇与饲料的配比为5mL:0.5-1.0g,然后超声提取3-5min,离心取上清液;将所述上清液以1:10-20的体积比与样本稀释液混匀,取样用于分析。

[0128] (2) 免疫反应:分别将15 μL上述一的试剂盒中的MEL校准品、15 μL质控品、15 μL步骤(1)稀释后待测样本加至不同反应管内,再分别向各个反应管中加入30 μL试剂B和30 μL试剂A,置于振荡器上混匀,37℃温育15min;

[0129] (3) 磁分离:向经过(2)处理的各个反应管中再加入30 μL磁分离试剂,置于振荡器上混匀,37℃温育5min,温育后使磁珠在磁场中沉降2min,去上清,加入200 μL磁珠清洗液(将上述一的试剂盒中的清洗液与纯化水按1:7稀释配制成磁珠清洗液),去除磁场,震荡使磁珠充分混悬30秒,然后再次使磁珠在磁场中沉降2min,去除上清液;如此重复2-4次;

[0130] (4) 读值:向经过(3)处理的各个反应管每管加入150 μL底物溶液,用化学发光仪检测发光强度。

[0131] 具体如下:

[0132] 在样品杯中加入校准品、样本或定标液,样本单管反应加样量为15 μL,根据重复管数计算样品杯中加入量,最少加样量不小于50 μL,加入充足量的试剂。

[0133] 将各试剂瓶、样品杯及反应管置于仪器中,严格按照ChemLite™1200全自动化学发光免疫分析仪的操作程序进行实验操作并计算样本浓度。仪器已具备了实验所需要的反应温度37℃±1℃,项目的反应时间及操作步骤已输入到全自动的操作程序中,选定项目后即可获得该此项目每一步试验所需的时间,仪器光谱测定范围300nm~650nm。

[0134] MEL试剂盒在测定范围内,发光强度与待测样本中MEL浓度成反比,使用改良的四参数Logistic方程拟合计算出样本中MEL浓度。

[0135] 反应方程式:

$$[0136] \quad y = (A1-A0) / (1+(x/X0)^P) + A0$$

[0137] 式中:

[0138] y——发光强度

[0139] x——浓度值

[0140] A1——曲线上渐近线估值

[0141] A0——曲线下渐近线估值

[0142] X0——曲线拐点对应的浓度值

[0143] P——曲线斜率相关的参数

[0144] 实施例2、试剂盒性能评价

[0145] 根据体外诊断试剂的特点,按惯例检测实施例1制备的试剂盒的线性范围、灵敏度、准确性、精密度。具体操作步骤如下:

[0146] 一、试剂准备:

[0147] 实验前,先取出试剂A(异硫氰酸荧光素标记MEL单克隆抗体的浓度为0.1 μg/mL)、试剂B(碱性磷酸酶标记MEL抗原的浓度为0.2 μg/mL)、校准品、磁分离试剂、底物溶

液、样品稀释液、清洗液（由清洗液浓缩液与纯化水以 1:7 混合后得到）、质控品，平衡至室温。

[0148] 二、仪器准备：

[0149] 本试剂盒采用博奥生物集团有限公司的 ChemLite™1200 全自动化学发光免疫分析仪。

[0150] 具体如下：

[0151] 在样品杯中加入校准品、样本或质控品，样本单管反应加样量为 15 μL，根据重复管数计算样品杯中加入量，最少加样量不小于 50 μL，加入充足量的试剂。

[0152] 将各试剂瓶、样品杯及反应管置于仪器中，严格按照 ChemLite™1200 全自动化学发光免疫分析仪的操作程序进行实验操作并计算样本浓度。仪器已具备了实验所需要的反应温度 37℃ ±1℃，项目的反应时间及操作步骤已输入到全自动的操作程序中，选定项目后即可获得该此项目每一步试验所需的时间，仪器光谱测定范围 300nm ~ 650nm。

[0153] 四、性能指标检测结果：

[0154] 1、线性范围：

[0155] 剂量 - 反应曲线线性：使用改良的四参数 Logistic 方程拟合，在 0.05ng/mL-100ng/mL 范围内，剂量 - 反应曲线相关系数 $r \geq 0.99$ 。

[0156] 待测样本为超出线性范围上限浓度的样本和超出或等于线性范围下段的样本，混合成至少 5 个稀释浓度 (X_i)，具体如表 1 所示，其中稀释比例为 1 的待测样本为浓度为 100ng/mL 的 MEL 溶液。

[0157] 用实施例 1 中的一制备的试剂盒和二的检测方法对待测样本进行检测，测定线性范围。每个稀释浓度测试 3 次。

[0158] 分别求出测定结果的均值 (Y_i)，以稀释浓度 (X_i) 为自变量，以测定结果均值 (Y_i) 为因变量，求出线性回归方程，按公式 (1) 计算线性回归系数 (r)。

[0159]

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \sum (Y_i - \bar{Y})^2}} \dots\dots\dots (1)$$

[0160] 使用改良的四参数 Logistic 方程拟合，在 0.05ng/mL-100ng/mL 范围内，剂量 - 反应曲线相关系数 $r \geq 0.99$ 。此检测范围远远优于有专利报道过的同类产品。

[0161] 表 1 线性范围实验结果

[0162]

稀释比例	理论浓度 (ng/mL)	拟合浓度 (ng/mL)
1	100.00	96.52
1/5	20.00	21.85
1/25	4.00	4.31
1/125	0.80	0.72
1/625	0.16	0.13
1/3125	0.03	0.03
相关系数	0.9996	

[0163] 2、准确度：

[0164] 待测样本为将浓度接近检测范围上限的三聚氰胺高值样本 (A) 加入到低值样本 (B) 中, 所加入 A 的体积不超过总体积 (A+B) 的 10%, 根据公式 (1) 计算回收率 R。

$$[0165] \quad R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

[0166] 式中：

[0167] R——回收率；

[0168] V——加入 A 液的体积；

[0169] V_0 ——B 液的体积；

[0170] C——B 液加入 A 液后的检测浓度；

[0171] C_0 ——B 液的检测浓度；

[0172] C_s ——A 液的检测浓度。

[0173] 通过加样回收评价其准确度, 所得结果稀释回收率在 90% -110% 之间, 具体数据见表 2。

[0174] 表 2 准确度实验结果

[0175]

	低值样本 (ng/mL)	高值样本 (ng/mL)	低值添加高值后 样本 (ng/mL)	加样回收 率
1	1.05	50.27	5.78	96.18%
2	1.01	49.62	6.02	103.00%
3	0.96	50.38	6.13	104.53%
4	1.03	50.36	5.68	94.38%
5	1.00	50.69	5.95	99.63%
6	0.97	50.22	6.32	108.46%
7	0.98	49.35	5.58	95.20%
8	1.03	50.03	5.56	92.60%
9	1.05	49.26	6.12	105.05%
10	1.01	50.75	6.35	107.21%

[0176] 3、最低检测限（灵敏度）：

[0177] 用试剂盒中 0ng/mL 校准品作为待测样本，重复测定 20 次，得出 20 次测量结果的 RLU 值（相对发光值），计算其平均值（M）和标准差（SD），得出 M-2SD 所对应 RLU 值，根据零浓度校准品与相邻校准品之间的浓度-RLU 值结果进行两点回归拟合得出一次方程，将 M-2SD 的 RLU 值带入上述方程中，求出对应的浓度值。

[0178] 按检测方案中最低检测限检测方法，重复 3 次实验，具体数据见表 3。

[0179] 表 3 最低检测限实验结果

[0180]

	灵敏度 (ng/mL)
实验 1	0.02
实验 2	0.03
实验 3	0.02
实验 4	0.02
实验 5	0.03

[0181] 此结果优于已报道的三聚氰胺试剂盒最低检测限指标。

[0182] 4、精密度：

[0183] 批内：使用 MEL (3 ± 0.6) ng/mL 和 (27 ± 5.4) ng/mL 两个浓度范围内的样本作为待测样本。按说明书的操作方法，用化学发光测定仪器分别对待测样本进行 10 次重复测定。按公式 (3) 计算重复性 (CV)。

[0184] $CV = SD / \bar{X} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$

[0185] $SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (n=10)$

[0186] $\bar{X}$: 10 次测定浓度的平均值

[0187] X_i : 每次测定浓度值

[0188] 批间: 使用 MEL 浓度为 (27 ± 5.4) ng/mL 浓度范围的样本作为待测样本。使用 3 个不同批次的试剂盒, 按说明书的操作方法, 用化学发光测定仪器对待测样本进行 30 次重复测定 (每批次试剂盒测定 10 次)。按公式 (4) 计算批间差 (CV)。

[0189] $CV = SD / \bar{X} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$

[0190] 式中:

[0191] $\bar{X}$: 30 次测定浓度的平均值

[0192] SD: 30 次测定浓度的标准差

[0193] 按检测方案中精密度检测方法检测精密度, 具体数据见表 4。

[0194] 表 4 精密度实验结果

[0195]

序号	第一批	第二批	第三批
----	-----	-----	-----

[0196]

	样本 1	样本 2	样本 1	样本 2	样本 1	样本 2
1	3.03	26.59	3.25	26.56	2.86	28.02
2	3.06	26.98	3.12	26.32	2.95	27.65
3	2.81	27.35	3.23	27.89	3.13	27.38
4	3.07	27.92	3.07	25.63	2.65	26.65
5	2.95	27.02	2.78	26.01	3.02	26.03
6	2.86	26.87	2.96	27.56	2.77	27.16
7	3.12	25.03	2.77	26.12	2.85	27.58
8	2.76	26.45	3.19	25.33	3.05	25.95
9	2.98	28.32	3.03	25.68	2.97	26.87
10	3.11	26.66	2.85	27.85	2.92	25.66
批内精密 度	4.28%	3.31%	5.94%	3.58%	4.82%	2.99%
批间精密 度	3.27%					

[0197] 实施例 3、试剂盒的应用

[0198] 样本添加回收试验：向不含三聚氰胺的奶粉和饲料中分别添加 50ng/mL、250ng/mL 的三聚氰胺标准品，按实施例 1 的一的试剂盒和二的方法进行检测，奶粉回收率 77.0% -97.2%，饲料回收率 78.0% -93.6%。测试数据见表 5。

[0199] 可以看出，本发明的试剂盒和方法可以检测待测样本中的三聚氰胺。

[0200] 表 5 添加回收率

[0201]

样本	添加后终浓度(ng/mL)	回收率
奶粉	1	77.0%
		83.0%
		85.0%
	5	90.8%
		84.8%
		97.2%
饲料	1	82.0%
		89.0%
		78.0%
	5	81.6%
		93.6%

[0202]

		89.4%
--	--	-------

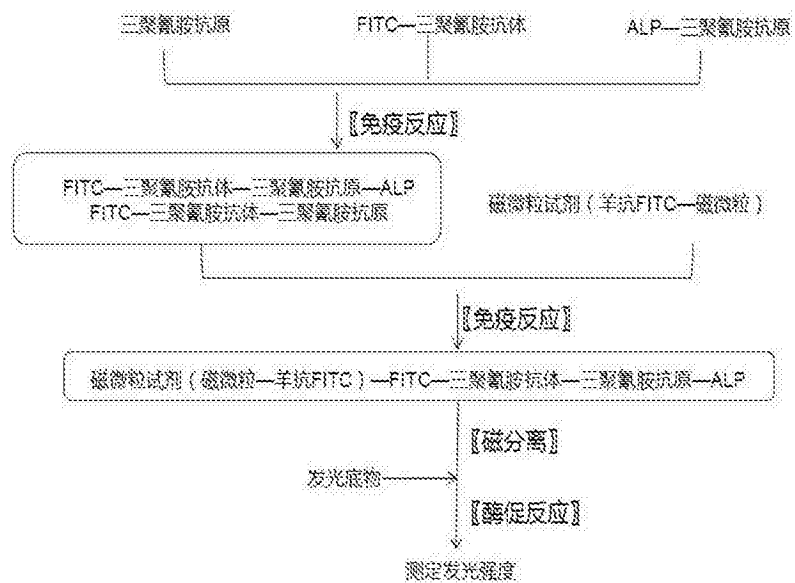


图 1

专利名称(译)	一种三聚氰胺的磁珠分离化学发光免疫检测方法		
公开(公告)号	CN105181680A	公开(公告)日	2015-12-23
申请号	CN201510626655.4	申请日	2015-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	成都博奥新景医学科技有限公司 博奥生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	成都博奥新景医学科技有限公司 博奥生物集团有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	成都博奥新景医学科技有限公司 博奥生物集团有限公司		
[标]发明人	韩学栋 郭健夫 高云 邢婉丽		
发明人	韩学栋 郭健夫 高云 邢婉丽		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	关畅 白艳		
其他公开文献	CN105181680B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种三聚氰胺的定量检测试剂盒。本发明提供了一种三聚氰胺定量检测试剂盒，包括如下8种组分：校准品、质控品、异硫氰酸荧光素标记的三聚氰胺抗体溶液、碱性磷酸酶标记的三聚氰胺抗体溶液、样本稀释液、磁分离试剂、清洗液、底物溶液；本发明所采用的检测方法是磁珠分离化学发光免疫检测，酶标记技术，磁分离技术和化学发光技术相结合，其操作方便、简单，反应条件温和，发光值稳定且受外界条件影响较小。相比于现有检测方法，本发明具有样本处理过程简单，检测成本低，检测快速，测试结果准确、重复性好等优点。

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \sum (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (1)$$