



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105181680 B

(45)授权公告日 2018.05.04

(21)申请号 201510626655.4

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2015.09.28

G01N 33/535(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105181680 A

(56)对比文件

CN 104330577 A, 2015.02.04,

CN 102565400 A, 2012.07.11,

CN 103439320 A, 2013.12.11,

CN 102590495 A, 2012.07.18,

CN 102654453 A, 2012.09.05,

(43)申请公布日 2015.12.23

(73)专利权人 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88号

专利权人 博奥生物集团有限公司

审查员 樊凯利

(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

公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书12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、牛血清和ProcLin-300混匀得到抗试剂缓冲液;

所述溶液A由 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、Trizma base、牛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;

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^+ 的浓度为0.1mol/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0.5%; 所述Trizma base浓度为50mmol/L;

所述溶液A中, 所述 Na^+ 源于NaCl,

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;

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

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 ;

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ProcLin-300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ProcLin-300的配比为1000g: 0.5mL;

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0.9%;

所述溶液B中,

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。

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

3. 权利要求1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Mg²⁺的浓度为1mmol/L,所述Zn²⁺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0.1-0.5μg/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0.2-1μg/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30μg-200μg:1mg;

[0026] 所述磁珠的直径为0.5-1.5μm。

[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±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±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BB1公司,批号为:1693AA;羧基磁珠胶体溶液购自merck公司;羊抗异硫氰酸荧光素抗体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SIGMA公司,CAS:6066-82-6,货号为:130672;EDC购自SIGMA公司,CAS:25952-53-8,货号为: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 μ m滤膜过滤并收集滤液,贴好标签,2~8℃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、MgCl₂、ZnCl₂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；MgCl₂浓度为1mmol/L；ZnCl₂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MgCl₂1ml,0.1mol/L ZnCl₂1ml,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-3000.5mL,充分混匀1小时；

[0094] g) 验证pH值至 7.0 ± 0.05 ；

[0095] h) 使用0.22 μ m滤膜过滤并收集滤液,贴好标签,2~8℃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 μ L (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0.1μg/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-lminothiolane hydrochloride (2-lT) 溶液(2-lT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) 4.5μL,室温放置20分钟后加1M甘氨酸溶液3μL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BB1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) 8μL,室温放置15分钟,加入1M甘氨酸溶液3μL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5μL 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0.2μg/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150μg:1mg。

[0115] 磁珠的直径在0.5-1.5μm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S1MGA公司,CAS:25952-53-8,货号:E7750)和NHS(购自S1MGA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15μL上述一的试剂盒中的MEL校准品、15μL质控品、15μL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30μL试剂B和30μL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30μL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200μL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150μL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15μL,根据重复管数计算样品杯中加入量,最少加样量不小于50μL,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0.1μg/mL)、试剂B(碱性磷酸酶标记MEL抗原的浓度为0.2μg/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15μL,根据重复管数计算样品杯中加入量,最少加样量不小于50μL,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)。

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

[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

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

[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%
		89.4%

[0202]

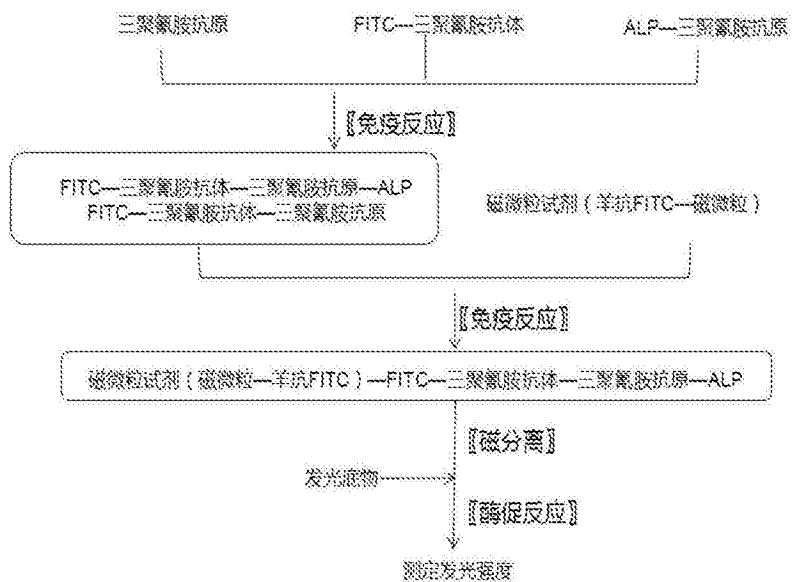


图1

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	CN105181680B	公开(公告)日	2018-05-04
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	CN105181680A		
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。

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$