



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103760362 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201410006330. 1

(22) 申请日 2014. 01. 07

(71) 申请人 昆明理工大学

地址 650093 云南省昆明市五华区学府路
253 号

(72) 发明人 陈朝银 方娟 赵声兰 葛锋
刘迪秋 熊向峰 韩本勇

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒
及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒及其检测方法，该试剂盒包括一抗包被的 ELISA 酶标板、阳性抗原核桃蛋白、酶标二抗、稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液。固定在酶标板微孔表面上的抗体捕获标准液或样品液中的核桃蛋白，酶标抗体识别核桃蛋白并与之结合，形成抗体 - 核桃蛋白 - 抗体 - 酶的复合物，酶与底物反应显色后测出吸光度，从标准曲线中定量计算出样本中的核桃蛋白浓度进而对核桃蛋白进行定量检测及掺假检验；本发明的优点在于使用本发明试剂盒检测准确、过程简单快速、灵敏度高，可满足相关企业单位批量检测核桃及相关产品中核桃蛋白含量和掺假检验的需要。

1. 一种用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒, 包括 ELISA 酶标板、阳性抗原核桃蛋白、酶标二抗、稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液; 其特征在于: ELISA 酶标板为一抗包被的 ELISA 酶标板, 一抗为豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体, 酶标二抗为 HRP 酶标记的兔抗核桃蛋白多克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒, 其特征在于豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

1) 将纯化的核桃蛋白抗原与弗氏完全佐剂以质量:体积 ≥ 0.0001 的比例混合乳化 15~60 分钟, 乳化完全后免疫豚鼠, 此为基础免疫;

2) 之后分别间隔三周、两周、两周使抗原与弗氏不完全佐剂以质量:体积 ≥ 0.00005 的比例混合乳化, 进行三次加强免疫; 第三次加强免疫前, 采集血清 2mL, ELISA 法检测效价; 两周后静脉注射纯抗原, 冲刺免疫两次, 两次冲刺免疫间隔一周;

3) 最后一次免疫 7 天后, 按公知的血清制备方法采血, 置于 37°C 恒温箱中 2h, 4°C 过夜 \rightarrow 4°C 10000g 离心 \rightarrow 收集上清, 即得抗核桃蛋白多克隆抗体, 分装, 于 -20°C 以下保存备用。

3. 根据权利要求 1 所述的用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒, 其特征在于兔抗核桃蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

1) 将纯化的核桃蛋白抗原与弗氏完全佐剂以质量:体积 ≥ 0.0001 的比例混合乳化 15~60 分钟, 乳化完全后免疫新西兰大白兔, 此为基础免疫;

2) 之后每隔两周抗原与弗氏不完全佐剂以质量:体积 ≥ 0.00005 混合、乳化, 进行两次加强免疫; 第二次加强免疫前, 采集血清 2mL, ELISA 法检测效价; 两周后静脉注射纯抗原, 冲刺免疫一次;

3) 最后一次免疫 7 天后, 按公知的血清制备方法采血, 置于 37°C 恒温箱中 2h, 4°C 过夜 \rightarrow 4°C 10000g 离心 \rightarrow 收集上清, 即得抗核桃蛋白多克隆抗体, 分装, 于 -20°C 以下保存备用。

4. 权利要求 1 所述用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒的检测方法, 其特征在于按如下检测步骤进行:

1) 加样: 将标准核桃蛋白和样品核桃制品用稀释液分别稀释成为不同的浓度, 并加入酶标板, 100 μ L/ 孔, 37°C 孵育 1h;

2) 洗涤: 弃样品液, 在吸水纸上拍干, 加洗涤液 300 μ L/ 孔, 微震荡 3min/ 次, 洗涤 3 次;

3) 加酶标二抗: 按体积比 1:1000 的比例稀释酶标二抗, 加稀释过的酶标二抗溶液, 100 μ L/ 孔, 37°C 孵育 1h;

4) 之后采用公知的洗涤 \rightarrow 加底物显色液 \rightarrow 加终止液 \rightarrow OD 值检测等 ELISA 常规方法进

5) 建立标准曲线: 用不同稀释度的核桃蛋白标准溶液经上述步骤测定得到的 OD₄₅₀, 建立标准曲线及回归方程;

6) 用不同稀释度的核桃制品溶液经上述步骤测定得到的 OD₄₅₀ 中有线性关系的数据代入标准曲线回归方程计算出核桃制品中核桃蛋白的含量, 从而分析出样品中核桃蛋白的浓度, 再根据核桃制品凯氏定氮法测定得到总蛋白含量, 即可计算出核桃制品中是否掺有非核桃蛋白以及掺入程度。

用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于核桃蛋白定性定量检测的夹心 ELISA 试剂盒及其检测方法，属于食品领域。

背景技术

[0002] 近年来，随着人民生活水平的提高，食品安全问题日益凸显。“三聚氰胺事件”更使人们强化了非食品用添加剂的食品安全问题，但食用添加剂的不合法添加形势日趋恶劣，如各种各样蛋白饮品（粉、乳等）中鱼龙混杂的蛋白原料添加，各种各样的调制奶、酸奶、核桃乳、核桃粉、奶粉中添加大豆粉等，牛奶、黄牛奶、山羊奶、马奶等的相互掺假问题，极大的影响了食品消费市场的安全和消费者的消费信心。因此，加强其检验方法的研究迫在眉睫。

[0003] 目前蛋白质检测方法主要包括：蛋白质电泳技术、液相色谱技术、生物质谱技术、近红外光谱技术、免疫技术等。其中只有 ELISA 检测法具有操作简便、快速、灵敏度高、特异性强、经济等优点。国内已有利用大豆蛋白多克隆抗体 ELISA 方法测定火腿肠大豆蛋白含量，利用提纯牛乳酪蛋白免疫试验动物，获得针对酪蛋白的多克隆抗体，建立了牛奶中牛奶蛋白质含量的 ELISA 检测方法，具有良好的特异性、敏感性、重复性。我们在之前的工作中已成功建立了一种间接 ELISA 方法用来对核桃蛋白定量检测及掺假检验，但该方法及提供的试剂盒仍然具有稳定性差、重复性弱等缺点。在此工作基础上，将间接法进行改善，改进成一种双抗夹心 ELISA 方法，具有良好的重复性、稳定性和特异性。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒，通过制备两种抗核桃蛋白多克隆抗体，建立了一种夹心 ELISA 法，为我国食品行业中核桃蛋白定量和掺假问题提供了一种重要的监测手段；该试剂盒包括 ELISA 酶标板、阳性抗原、酶标二抗、稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液；其中 ELISA 酶标板为一抗包被的 ELISA 酶标板，一抗为豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体，酶标二抗为 HRP 标记的兔抗核桃蛋白多克隆抗体，其它试剂为 ELISA 试剂盒公知的、市场上有产品销售的组分。

[0005] 本发明试剂盒可包括如下组分：

(1)ELISA 96 孔酶标板：每个试剂盒装有一块真空包装的 ELISA 板，该 ELISA 板由豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体以体积比 1:5000 的比例稀释后按常规方法进行包被；ELISA 板含有可拆卸 ELISA 微孔板条，规格为：8 孔 ×12 条或 8 条 ×12 孔；

(2) 阳性抗原：核桃蛋白 10 μL；

(3) 酶标二抗：HRP 标记的兔抗核桃蛋白多克隆抗体使用液 10 μL；

(4) 底物显色液：0.1% TMB, 10mL；

(5) 终止液：2M 的硫酸溶液 10mL；

(6) 洗涤液：0.1M pH7.4 PBST 溶液 30mL；

(7) 稀释液：含 5% 脱脂牛奶的 PBST 30mL，作为样品、抗体稀释液；

本发明中利用常规等电点法、透析法、滤膜过滤法制备阳性抗原核桃蛋白，具体操作如下：

1)按每克磨好的核桃粉添加5~10ml的石油醚的比例，用石油醚对核桃粉进行脱脂2~3次后，自然风干，得脱脂核桃粉；

2)将石油醚脱脂核桃粉溶解于核桃粉质量5~10倍水中，调节溶液pH至10~12，然后在55~60℃水浴搅拌提取1~3h，再调节溶液pH值至6.5~7.5进行沉淀；

3)然后溶液3000r/min离心20min，取上清液放入5Kd透析袋透析24~72h，收集透析袋内溶液，经0.45μm和0.22μm滤膜依次过滤，滤液即为核桃蛋白抗原溶液，然后测定蛋白浓度，调整至6~10mg/mL，分装，-20℃保存备用。

[0006] 本发明中所述豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体的制备方法如下：

1)将纯化的核桃蛋白抗原与弗氏完全佐剂以质量(g):体积(ml)≥0.0001的比例混合乳化15~60分钟，乳化完全后免疫豚鼠，此为基础免疫；

2)之后分别间隔三周、两周、两周使抗原与弗氏不完全佐剂以质量(g):体积(ml)≥0.00005的比例混合乳化，进行三次加强免疫；第三次加强免疫前，采集血清2mL，ELISA法检测效价；两周后静脉注射纯抗原，冲刺免疫两次，两次冲刺免疫间间隔一周；

3)最后一次免疫7天后，按公知的血清制备方法采血，置于37℃恒温箱中2h，4℃过夜→4℃10000g离心→收集上清，即得抗核桃蛋白多克隆抗体，分装，于-20℃以下保存备用。

[0007] 本发明中所述兔抗核桃蛋白多克隆抗体的制备方法如下：

1)将纯化的核桃蛋白抗原与弗氏完全佐剂以质量(g):体积(ml)≥0.0001的比例混合乳化15~60分钟，乳化完全后免疫新西兰大白兔，此为基础免疫；

2)之后每隔两周抗原与弗氏不完全佐剂以质量(g):体积(ml)≥0.00005混合、乳化，进行两次加强免疫；第二次加强免疫前，采集血清2mL，ELISA法检测效价；两周后静脉注射纯抗原，冲刺免疫一次；

3)最后一次免疫7天后，按公知的血清制备方法采血，置于37℃恒温箱中2h，4℃过夜→4℃10000g离心→收集上清，即得抗核桃蛋白多克隆抗体，分装，于-20℃以下保存备用。

[0008] 本发明中所述用于核桃蛋白定性定量检测的ELISA试剂盒的检测方法，具体操作如下：

1)加样：将标准核桃蛋白和样品核桃制品用稀释液分别稀释成为不同的浓度，并加入酶标板，100 μL/孔，37℃孵育1h；

2)洗涤：弃样品液，在吸水纸上拍干，加洗涤液300 μL/孔，微震荡3min/次，洗涤3次；

3)加酶标二抗：加稀释过的酶标二抗溶液(体积比1:1000)，100 μL/孔，37℃孵育1h；

4)之后采用公知的洗涤→加底物显色液→加终止液→OD值检测等ELISA常规方法进

5)建立标准曲线：用不同稀释度的核桃蛋白标准溶液经上述步骤测定得到的OD₄₅₀，建立标准曲线及回归方程；

6)用不同稀释度(即不同浓度)的核桃制品溶液经上述步骤测定得到的OD₄₅₀中有线性关系的数据代入标准曲线回归方程计算出核桃制品中核桃蛋白的含量，从而可以分析出样品中核桃蛋白的浓度，再根据核桃制品凯氏定氮法测定得到总蛋白含量，即可计算出核桃制品中是否掺有非核桃蛋白以及掺入程度。

[0009] 本发明相对于现有技术的优点和技术效果如下：

1) 本发明首次公开一种核桃蛋白定量检测的夹心 ELISA 试剂盒及其检测方法,可以定量定性分析样品中核桃蛋白,适合工厂化生产,也适合公司厂家对核桃类产品的严格监控;

2) 本发明试剂盒所有试剂均为已配制好的工作液,可以简便、快速、灵敏的检测核桃类产品(粉、露、奶、乳等)中核桃蛋白含量;并且本试剂盒样本用量少,试剂保存时间长,对操作者无毒性,对环境无污染;因此,本发明建立制备的核桃蛋白定量检测的间接 ELISA 试剂盒具有广阔的市场前景和重大的社会意义;

3) 使用本发明试剂盒检测准确、过程简单快速、灵敏度高、成本低,可满足相关企业单位批量检测核桃及相关产品中核桃蛋白含量和掺假检验的需要;

4) 标准曲线的检测范围在 160ng/ml-20ng/ml,回收率范围均在 84.25%~99.84%之间;且特异性较好,与其他植物坚果如,花生、大豆、芝麻均无交叉反应;

5) 该夹心 ELISA 方法跟我们之前建立的间接法相比,重复性更好,稳定性更强。

附图说明

[0010] 图 1 为本发明对核桃蛋白定量检测的夹心 ELISA 试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0011] 下面通过附图和实施例对本发明作进一步详细说明,但本发明保护范围不局限于所述内容。

[0012] 实施例 1:用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒,包括如下组分:

(1)一抗包被过的 ELISA 96 孔酶标板:每个试剂盒装有一块真空包装的 ELISA 板,该板由豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体以体积比 1:5000 的比例稀释后按常规方法进行包被;ELISA 板含有可拆卸 ELISA 微孔板条,规格为:8 孔 ×12 条;

(2)阳性抗原:核桃蛋白 10 μL;

(3)酶标二抗:HRP 标记的兔抗核桃蛋白多克隆抗体使用液 10 μL;

其它为 ELISA 试剂盒公知的组分:

1)底物显色液:0.1% TMB, 10mL;

2)终止液:2M 的硫酸溶液 10mL;

3)10 倍浓缩洗涤剂(使用时 10 倍稀释):0.1M pH7.4 PBST 溶液 30mL;

4)5 倍稀释液(使用时 5 倍稀释):含 5% 脱脂牛奶的 PBST 30mL,作为样品、抗体稀释液。

[0013] 本实施例中阳性抗原核桃蛋白的制备方法如下:

1)按每克磨好的核桃粉添加 10ml 的石油醚的比例,用石油醚对核桃粉进行脱脂 2 次后,自然风干,得脱脂核桃粉;

2)石油醚脱脂核桃粉溶解于脱脂核桃粉质量 10 倍水中,调节溶液 pH 至 12,然后在 60°C 水浴搅拌提取 3h,再调节溶液 pH 值至 7.5 进行沉淀;

3)然后溶液 3000r/min 离心 20min,取上清液放入 5Kd 透析袋透析 24h,收集透析袋内溶液,经 0.45 μm 和 0.22 μm 滤膜依次过滤,滤液即为核桃蛋白抗原溶液,然后测定蛋白浓度,调整至 9mg/mL,分装,-20°C 保存备用。

[0014] 本实施例中豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体的制备方法如下：

1) 适应性饲养豚鼠一周：雌性八只，0.5kg/只，每天喂养豚鼠饲料一次，50g/次/只，喂水两次；每两天打扫鼠笼卫生，使豚鼠生活环境保持清洁；

2) 阴性血清制备：免疫前，将耳消毒后，用锐器(刀或刀片)割破耳缘，在切口边缘涂抹20%柠檬酸钠溶液，阻止血凝，则血可自切口自动流出，进入盛器；操作时，使耳充血效果较好。此法能采血0.5ml左右。取收集的血液在37℃恒温箱中放置2h以防止激活补体系统，再将试管在4℃放置过夜使血液凝固；次日，4℃，10000g离心20分钟，收集上清液，4℃保存；

3) 初次免疫：将纯化的核桃蛋白抗原4mg与8mL弗氏完全佐剂混合，漩涡震荡乳化半小时，乳化完全后颈背部皮下多点注射，1mL/只；

4) 加强免疫：三周后取核桃蛋白1mg与8mL弗氏不完全佐剂的混合液，乳化后颈背部皮下注射，1mL/只；

5) 二次加强免疫：两周后取核桃蛋白1mg与8mL弗氏不完全佐剂的混合液，乳化后颈背部皮下注射，1mL/只；检测效价：利用ELISA法检测阳性血清中多克隆抗体的效价，检测结果二次加强免疫后达到 10^5 ；

6) 三次加强免疫：同步骤5)；

7) 阳性血清制备：一周后采集豚鼠血0.5mL/只，方法同步骤2)；

8) 再过两周后核桃蛋白抗原不加佐剂进行静脉注射冲刺免疫两次，间隔一周；

9) 阳性血清制备：7天后股动脉分离采血10mL/只，置于37℃恒温箱中2h，4℃过夜；次日4℃，10000g离心10min后收集上清，分装，于-20℃保存备用。

[0015] 本实施例中兔抗核桃蛋白多克隆抗体的制备方法如下：

1) 适应性饲养新西兰大白兔一周：雌兔两只，2.5kg/只，每天喂养兔子饲料一次，200g/次/只，喂水两次；每两天打扫兔笼卫生，使兔子生活环境保持清洁；

2) 阴性血清制备：免疫前，轻轻的将兔子放在特制兔盒中，处于放松状态的兔子采血会较容易，按压兔子耳根部并用酒精棉球擦拭直至血管突出，然后将针头插入耳部血管的中上部，观察到进针后小心抽出活塞收集血液2mL；结束收集后，退出针头并按压伤处以制止血流，再用乙醇消毒；取收集的血液在37℃恒温箱中放置2h以防止激活补体系统，再将试管在4℃放置过夜使血液凝固；用药铲将血凝块从管壁上拨落，将血液转移至塑料离心管中，4℃，10000g离心20分钟，收集上清液，4℃保存；

3) 初次免疫：将纯化的核桃蛋白1mg与4mL弗氏完全佐剂混合，漩涡震荡乳化半小时，乳化完全后颈背部皮下多点注射新西兰大白兔，2mL/只；

4) 加强免疫：两周后取核桃蛋白250μg与4mL弗氏不完全佐剂的混合液，乳化后颈背部皮下注射新西兰大白兔，2mL/只；检测效价：利用ELISA法检测阳性血清中多克隆抗体的效价，检测结果二次加强免疫后达到 10^5 ；

5) 二次加强免疫：方法同步骤4)；

6) 阳性血清制备：两周后采集兔血2mL/只，方法同步骤2)；

7) 再过两周后核桃蛋白抗原不加佐剂进行静脉注射冲刺免疫一次；

8) 阳性血清制备：7天后颈动脉分离采血采血100mL/只，置于37℃恒温箱中2h，4℃过夜；次日4℃，10000g离心10min后收集上清，分装，于-20℃保存备用。

[0016] 本实施例制备的核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒的检测方法,具体操作如下:

以某品牌核桃乳为例:

1) 样品前处理:取核桃乳样品 1ml 于 EP 管中,15000rpm,常温条件下离心 10min,得到的上清备用;

2) 加样:将标准核桃蛋白溶液,按照 2 倍倍比稀释成 8 个不同的浓度,将不同稀释度的标准品和样品溶液分别加到酶标板中,100 μL/孔,37℃ 孵育 1h;

3) 洗涤:弃样品液,在吸水纸上拍干,加洗涤液 300 μL/孔,微震荡 3min/次,洗涤 3 次;

4) 加酶标二抗:稀释 1000 倍的二抗 ---HRP 标记的兔抗核桃蛋白多克隆抗体,100 μL/孔,37℃ 孵育 1h;

5) 洗涤:同步骤 3);

6) 加底物显色液:100 μL/孔,室温避光孵育 10min;

7) 加终止液:100 μL/孔;

8) 检测 OD 值:酶标仪测定 OD₄₅₀ 值;

9) 用不同稀释度(即不同浓度)的核桃蛋白标准溶液经上述步骤测定得到的 OD₄₅₀,建立标准曲线及回归方程 Y=0.0047x+0.1592, R²=0.9901;

10) 用不同稀释度(即不同浓度)的核桃乳溶液经上述步骤测定得到的 OD₄₅₀ 中有线性关系的数据代入标准曲线回归方程计算出核桃乳中核桃蛋白的含量,从而可以分析出核桃粉中核桃蛋白的浓度,再根据核桃乳凯氏定氮总蛋白含量计算出核桃粉中其它蛋白的掺入程度。

[0017] 实验结果:根据建立的标准曲线及稀释适当倍数的样品 OD 值,算出核桃乳中核桃蛋白含量为 1%,标签上注明的蛋白含量 0.7% 比较,可以认为该核桃乳为合格产品,即并未掺入其它大豆蛋白等非核桃蛋白。

[0018] 实施例 2:用于核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒,包括如下组分:

(1) 一抗包被过的 ELISA 96 孔酶标板:每个试剂盒装有一块真空包装的 ELISA 板,该板由豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体以 1:5000 的比例稀释后进行包被。ELISA 板含有可拆卸 ELISA 微孔板条,规格为:8 条 × 12 孔;

(2) 阳性抗原:核桃蛋白 10 μL;

(3) 酶标二抗:HRP 标记的兔抗核桃蛋白多克隆抗体使用液 10 μL;

其它为 ELISA 试剂盒公知的组分:

1) 底物显色液:0.1% TMB, 10mL;

2) 终止液:2M 的硫酸溶液 10mL;

3) 10 倍浓缩洗涤剂(使用时 10 倍稀释):0.1M pH7.4 PBST 溶液 30mL;

4) 5 倍稀释液(使用时 5 倍稀释):含 5% 脱脂牛奶的 PBST 30mL,作为样品、抗体稀释液。

[0019] 本实施例中阳性抗原核桃蛋白的制备方法如下:

1) 按每克磨好的核桃粉添加 5ml 的石油醚的比例,用石油醚对核桃粉进行脱脂 3 次后,自然风干,得脱脂核桃粉;

2) 石油醚脱脂核桃粉溶解于核桃粉质量 5 倍水中,调节溶液 pH 至 11,然后在 55℃ 水浴搅拌提取 2h,再调节溶液 pH 值至 7.0 进行沉淀;

3) 然后溶液 3000r/min 离心 20min, 取上清液放入 5Kd 透析袋透析 48h, 收集透析袋内溶液, 经 0.45μm 和 0.22μm 滤膜依次过滤, 滤液即为核桃蛋白抗原溶液, 然后测定蛋白浓度, 调整至 6mg/mL, 分装, -20℃保存备用。

[0020] 本实施例中豚鼠抗核桃蛋白多克隆抗体的制备方法如下：

1) 适应性饲养豚鼠一周 : 雌性八只, 0.5kg/只, 每天喂养豚鼠饲料一次, 50g/次/只, 喂水两次; 每两天打扫鼠笼卫生, 使豚鼠生活环境保持清洁;

2) 阴性血清制备 : 免疫前, 将耳消毒后, 用锐器(刀或刀片)割破耳缘, 在切口边缘涂抹 20% 柠檬酸钠溶液, 阻止血凝, 则血可自切口自动流出, 进入盛器; 操作时, 使耳充血效果较好。此法能采血 0.5ml 左右。取收集的血液在 37℃恒温箱中放置 2h 以防止激活补体系统, 再将试管在 4℃放置过夜使血液凝固; 次日, 4℃, 10000g 离心 20 分钟, 收集上清液, 4℃保存;

3) 初次免疫 : 将纯化的核桃蛋白 4mg 与 8mL 弗氏完全佐剂混合, 漩涡震荡乳化半小时, 乳化完全后颈背部皮下多点注射, 1mL/只;

4) 加强免疫 : 三周后取核桃蛋白 1mg 与 8mL 弗氏不完全佐剂的混合液, 乳化后颈背部皮下注射, 1mL/只;

5) 二次加强免疫 : 两周后取核桃蛋白 1mg 与 8mL 弗氏不完全佐剂的混合液, 乳化后颈背部皮下注射, 1mL/只; 检测效价 : 利用 ELISA 法检测阳性血清中多克隆抗体的效价, 检测结果二次加强免疫后达到 10⁵;

6) 三次加强免疫 : 同步骤 5);

7) 阳性血清制备 : 一周后采集豚鼠血 0.5mL/只, 方法同步骤 2);

8) 再过两周后核桃蛋白抗原不加佐剂进行静脉注射冲刺免疫两次, 间隔一周;

9) 阳性血清制备 : 7 天后股动脉分离采血 10mL/只, 置于 37℃恒温箱中 2h, 4℃过夜; 次日 4℃, 10000g 离心 10min 后收集上清, 分装, 于 -20℃保存备用。

[0021] 本实施例中兔抗核桃蛋白多克隆抗体的制备方法如下 :

1) 适应性饲养新西兰大白兔一周 : 雌兔两只, 2.5kg/只, 每天喂养兔子饲料一次, 200g/次/只, 喂水两次; 每两天打扫兔笼卫生, 使兔子生活环境保持清洁;

2) 阴性血清制备 : 免疫前, 轻轻的将兔子放在特制兔盒中, 处于放松状态的兔子采血会较容易, 按压兔子耳根部并用酒精棉球擦拭直至血管突出, 然后将针头插入耳部血管的中上部, 观察到进针后小心抽出活塞收集血液 2mL; 结束收集后, 退出针头并按压伤处以制止血流, 再用乙醇消毒; 取收集的血液在 37℃恒温箱中放置 2h 以防止激活补体系统, 再将试管在 4℃放置过夜使血液凝固; 用药铲将血凝块从管壁上拨落, 将血液转移至塑料离心管中, 4℃, 10000g 离心 20 分钟, 收集上清液, 4℃保存;

3) 初次免疫 : 将纯化的核桃蛋白 1mg 与 4mL 弗氏完全佐剂混合, 漩涡震荡乳化半小时, 乳化完全后颈背部皮下多点注射新西兰大白兔, 2mL/只;

4) 加强免疫 : 两周后取核桃蛋白 250 μg 与 4mL 弗氏不完全佐剂的混合液, 乳化后颈背部皮下注射新西兰大白兔, 2mL/只; 检测效价 : 利用 ELISA 法检测阳性血清中多克隆抗体的效价, 检测结果二次加强免疫后达到 10⁵;

5) 二次加强免疫 : 方法同步骤 4);

6) 阳性血清制备 : 两周后采集兔血 2mL/只, 方法同步骤 2);

7) 再过两周后核桃蛋白抗原不加佐剂进行静脉注射冲刺免疫一次；

8) 阳性血清制备：7天后颈动脉分离采血采血 100mL/ 只，置于 37℃恒温箱中 2h, 4℃过夜；次日 4℃, 10000g 离心 10min 后收集上清，分装，于 -20℃保存备用。

[0022] 本实施例制备的核桃蛋白定性定量检测的 ELISA 试剂盒的检测方法，具体操作如下：

以某品牌核桃粉为例：

1) 样品前处理：首先将提取缓冲液预热至 60℃，再以料液比为 1:10 (W/V) 将样品与提取缓冲液充分混合，室温震荡 15min，最后 10000g、常温条件下离心 10min；得到的上清进行适当稀释即可。

[0023] 2) 加样：将标准核桃蛋白溶液，按照 2 倍倍比稀释成 8 个不同的浓度，将不同稀释度的标准品和样品溶液分别加到酶标板中，100 μL / 孔，37℃孵育 1h；

3) 洗涤：弃样品液，在吸水纸上拍干，加洗涤液 300 μL / 孔，微震荡 3min/ 次，洗涤 3 次；

4) 加酶标二抗：稀释 1000 倍的二抗 ---HRP 标记的兔抗核桃蛋白多克隆抗体，100 μL / 孔，37℃孵育 1h；

5) 洗涤：同步骤 3)；

6) 加底物显色液：100 μL / 孔，室温避光孵育 10min；

7) 加终止液：100 μL / 孔；

8) 检测 OD 值：酶标仪测定 OD₄₅₀ 值；

9) 用不同稀释度（即不同浓度）的核桃蛋白标准溶液经上述步骤测定得到的 OD₄₅₀，建立标准曲线及回归方程 Y=0.0047x+0.1592, R²=0.9901；

10) 用不同稀释度（即不同浓度）的核桃粉溶液经上述步骤测定得到的 OD₄₅₀ 中有线性关系的数据代入标准曲线回归方程计算出核桃粉中核桃蛋白的含量，从而可以分析出样品中核桃蛋白的浓度，再根据核桃乳凯氏定氮总蛋白含量计算出核桃粉中其它蛋白的掺入程度。

[0024] 实验结果：根据建立的标准曲线及稀释适当倍数的样品 OD 值，算出核桃该品牌核桃粉中核桃蛋白含量为 3.1%，凯氏定氮法测得的蛋白含量 ≥ 6.3% 比较，表明该核桃粉有一半以上的蛋白来自其它原料或标签上注明的大豆蛋白。

[0025] 实施例 3：通过 ELISA 实验确定回收率范围均在 84.25% -99.84% 之间

本实施例的具体实施方法为：选择如下浓度的核桃蛋白溶液 160ng/ml、108ng/ml、80ng/ml、54ng/ml、40ng/ml、20ng/ml、13.5ng/ml（即为真实值），利用间接 ELISA 法结合标准曲线检测得出相应核桃蛋白浓度（即为测定值），通过多次重复实验、计算得到回收率见表 1。

[0026] 表 1：核桃蛋白回收率检测结果

期望值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	回收率 (%)	变异系数 CV (%)
160 ^a	147.68 ^a	92.3 ^a	3.53 ^a
108 ^a	107.83 ^a	99.84 ^a	4.17 ^a
80 ^a	86.19 ^a	92.26 ^a	1.48 ^a
54 ^a	55.98 ^a	96.33 ^a	4.09 ^a
40 ^a	45.28 ^a	86.8 ^a	4.71 ^a
20 ^a	23.15 ^a	84.25 ^a	3.12 ^a
13.5 ^a	14.9 ^a	89.63 ^a	2.89 ^a

实施例 4 :通过 ELISA 实验确定标准曲线的检测范围在 160ng/ml-20ng/ml

本实施例的具体实施方法为 :选择如下稀释度的核桃蛋白溶液 20ug/ml、10ug/ml、5120ng/ml、2560ng/ml、1280ng/ml、640ng/ml、320ng/ml、160ng/ml、80K、256K、512K、空 白, 利用夹心 ELISA 法检测得到 OD450 值, 分析数据发现 160ng/ml-20ng/ml 之间有良好的线性关系, 见图 1, 且最低检测限为 20ng/ml, 此处也可以说明本试剂盒的灵敏度较一般的多抗试剂盒高。

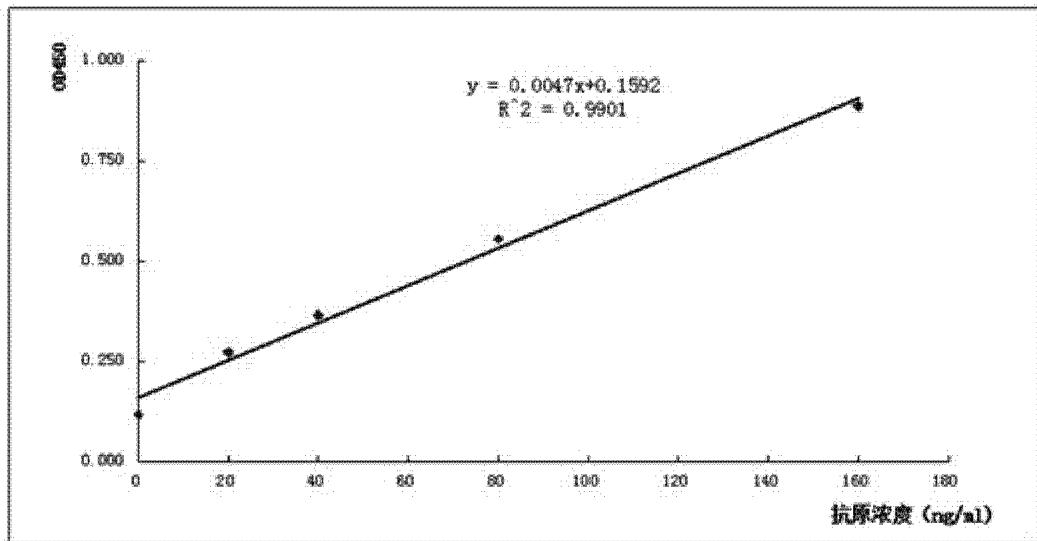


图 1

专利名称(译)	用于核桃蛋白定性定量检测的ELISA试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN103760362A	公开(公告)日	2014-04-30
申请号	CN201410006330.1	申请日	2014-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
[标]发明人	陈朝银 方娟 赵声兰 葛锋 刘迪秋 熊向峰 韩本勇		
发明人	陈朝银 方娟 赵声兰 葛锋 刘迪秋 熊向峰 韩本勇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/535		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种用于核桃蛋白定性定量检测的ELISA试剂盒及其检测方法，该试剂盒包括一抗包被的ELISA酶标板、阳性抗原核桃蛋白、酶标二抗、稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液。固定在酶标板微孔表面上的抗体捕获标准液或样品液中的核桃蛋白，酶标抗体识别核桃蛋白并与之结合，形成抗体-核桃蛋白-抗体-酶的复合物，酶与底物反应显色后测出吸光度，从标准曲线中定量计算出样本中的核桃蛋白浓度进而对核桃蛋白进行定量检测及掺假检验；本发明的优点在于使用本发明试剂盒检测准确、过程简单快速、灵敏度高，可满足相关企业单位批量检测核桃及相关产品中核桃蛋白含量和掺假检验的需要。