



(21)申请号 201711073646.2

(22)申请日 2017.11.05

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家
科技园B11栋3楼

(72)发明人 洪霞 杜霞 袁超

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种检测果蔬中保鲜剂邻苯基苯酚的试剂盒的制备

(57)摘要

一种检测邻苯基苯酚的试剂盒及其检测方法用于对苹果中邻苯基苯酚含量的检测。本试剂盒采用间接竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被邻苯基苯酚抗原,样本中邻苯基苯酚和此抗原竞争抗邻苯基苯酚抗体(抗试剂),同时抗邻苯基苯酚抗体与酶标二抗(酶标物)相结合,经TMB底物显色,样本吸光值与其含有的邻苯基苯酚成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中邻苯基苯酚的含量。

1. 一种检测苹果中邻苯基苯酚的试剂盒由盒体,酶标板一块,标准液6瓶(1 mL/瓶): 0ppb; 0.6ppb;1.8ppb;5.4ppb;16.2ppb;48.6ppb,酶标物1瓶(6 mL),显色液A(6 mL),显色液B(6 mL),终止液(6 mL)浓缩洗涤液 $10\times$ (40 mL),浓缩样品稀释液 $5\times$ (20 mL),海绵托架所组成;海绵托架内装有试剂瓶,海绵托架和酶标板均安装在盒体内。

2. 根据权利要求1所述一种检测邻苯基苯酚的试剂盒,其特征在于所述的海绵托架上制有孔和凹槽。

3. 根据权利要求1所述一种检测邻苯基苯酚的试剂盒,其特征在于所述的酶标板有塑料支架和各自分开的带孔穴的塑料条组成。

4. 一种检测邻苯基苯酚的试剂盒及用该试剂盒检测邻苯基苯酚的方法,其特征在于抗体的特异性,本方法抗体制备选择了与邻苯基苯酚和牛血清白蛋白进行交叉反应;本方法在对抗邻苯基苯酚杂交瘤细胞株大量筛选的基础上,得到了1株能分泌抗邻苯基苯酚的杂交瘤细胞株;本研究成功地筛选出能够分泌抗邻苯基苯酚的单克隆抗体杂交瘤细胞株,制备出对邻苯基苯酚具有高亲合力、高特异性的单克隆抗体,并建立了快速、灵敏的检测苹果中邻苯基苯酚污染水平的酶联免疫吸附试验检测方法,为苹果的快速筛检提供了技术支持。

5. 一种检测邻苯基苯酚的试剂盒及用该试剂盒检测邻苯基苯酚的方法,配液1:样品稀释液;用去离子水将邻苯基苯酚浓缩样品稀释液按1:4体积比进行稀释,即1份邻苯基苯酚浓缩样品稀释液加4份去离子水;用于提取样本的稀释,样品稀释液在4℃环境可保存一个月;配液2:洗涤工作液;用去离子水将浓缩洗涤液($10\times$)按1:9体积比进行稀释,即1份浓缩洗涤液($10\times$)加9份去离子水;用于酶标板的洗涤,洗涤工作液在4℃环境可保存一个月。

6. 一种检测邻苯基苯酚的试剂盒及用该试剂盒检测邻苯基苯酚的方法其特征在于进行样品前处理:苹果:1、取1g均质样本于50 mL离心管中,加入5 mL水,剧烈振荡1 min;2、加入5 mL乙腈,剧烈振荡3 min,4000g以上离心5 min;3、取1ml上清液于10ml玻璃试管中,50~60℃水浴氮气流下吹干;4、加入1ml正己烷用涡旋仪涡动30s,再加入1mL样品稀释液,涡动30s, 4000 r/min离心5 min;5、除去上层有机相,将下层液体转移到另一洁净离心管中,用于检测。

7. 一种检测邻苯基苯酚的试剂盒及用该试剂盒检测邻苯基苯酚的方法,其特征在于在酶标板微孔条上预包被邻苯基苯酚抗原,洗版,然后用封闭液进行封闭,拍干;加标准品/样本50 μ L到对应的微孔中,加入酶标物50 μ L/孔,再加入抗体工作液50 μ L/孔轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25℃避光反应30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 300 μ L /孔,每次浸泡15~30 s,充分洗涤4~5次,用吸水纸拍干;加入显色液A 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,再加入显色液B 50 μ L /孔,用盖板膜盖板后置室温避光反应15~20 min;每孔各加50 μ L终止液,轻轻振荡混匀,设定酶标仪在450 nm处,测定OD值(建议用450/630 nm双波长检测,在5 min内读完数据)。

一种检测果蔬中保鲜剂邻苯基苯酚的试剂盒的制备

技术领域

[0001] 一种快速高效检测食品中邻苯基苯酚的酶联免疫试剂盒及其检测方法,属于酶联免疫分析(ELISA)技术领域,主要用于食品中邻苯基苯酚残留的检测。

背景技术

[0002] 食品安全卫生关系到人类的生命和健康,引起了国际社会的广泛关注。随着食品生产自然方式的减少,工业化比重的增加,食品被人们故意或非故意污染的机会正逐渐增加,而且随着国际贸易的日益发达,食品污染扩散的速度之快、范围之广、危害之大,也是前所未有的。现在的果蔬保鲜贮藏技术,主要是依靠适宜的低温和空气调节,但在果蔬贮藏期间它们能够承受的温使用度和气体条件下,控制不住霉菌的生长;另外果蔬保鲜贮藏需要的较高湿度,正式霉菌生长的良好条件,因此在果蔬保鲜中使用防腐剂是必不可少的。防腐剂不但对果蔬保鲜有利,而且它也可控制产生霉菌,从而使人们免受霉菌毒素的侵害。

[0003] 防腐剂的使用对食品贮藏具有重要意义。但在食品中使用化学品难免让人们担心,防腐剂能杀菌,同时对人体也有害处。人们对于在食品中使用化学品,尤其是使用防腐剂很担心,但在实际上不使用又不行,防腐剂成了一把双刃剑。为此,有关专家提出几点建议,其中一点要严格执行GB2760中规定的最高使用限量和最高残留限量,选择合适的剂量,最大限度地提高药效,从而减少使用量,将污染降至最低水平。这就需要发展相应的检测方法,快速、准确的检测出果蔬中残留的防腐剂,给消费者提供最大限度的博阿胡。防腐剂在实际应用时,由于微生物种类的多样性和防腐剂作用的特点,人们致力加强复配技术的开发和应用,采用多种保鲜剂的混合应用。因此,需要发展同时测定果蔬中多种保鲜剂的分析方法,提高分析时间和材料方面效率。在世界各国广泛使用,防止水果在生长、储存、运输过程中腐烂变质。但水果中残留的防腐剂对人体具有一定的毒性,主要侵害人体的肝肾、神经系统和骨髓。有文献报道邻苯基苯酚对试验动物具有潜在的致膀胱癌作用。因此,需要发明一种工序少、操作简便检测的新方法。因此,需要发明一种工序少、操作简便检测的新方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种结构简单,使用方便,廉价,方便携带的检测邻苯基苯酚的试剂盒。

[0005] 本发明的另一个目的是克服其他方法的一些不足,从而提供一种样品前处理简单,提取后就可直接测定,不需要进化过程,一次可测定大量样本,而且简便,快速,灵敏,准确,廉价的检测邻苯基苯酚的方法。

[0006] 本发明试剂盒主要由盒体,酶标板一块,标准液6瓶(1 mL/瓶):0ppb; 0.6ppb; 1.8ppb;5.4ppb;16.2ppb;48.6ppb,酶标物1瓶(6 mL),显色液A(6 mL),显色液B(6 mL),终止液(6 mL)浓缩洗涤液10×(40mL),浓缩样品稀释液5×(20 mL),海绵托架所组成。海绵托架内装有试剂瓶,海绵托架和酶标板均安装在盒体内。

[0007] 本发明主要采用酶联免疫吸附(ELISA)竞争法来检测邻苯基苯酚。

[0008] 制备针对邻苯基苯酚的单克隆抗体:

1. 免疫动物: 采用小剂量长周期的免疫方案。对6~8周龄的雌性BALB/c小鼠, 体重18~20g, 首次免疫用100 μ g邻苯基苯酚-小牛血清白蛋白 (BSA) 与等量完全福氏佐剂混匀, 腹腔注射。2周后, 用50 μ g邻苯基苯酚-BSA与等量不完全福氏佐剂混匀后, 腹腔注射。此后每隔2周用50 μ g邻苯基苯酚-BSA与等量不完全福氏佐剂混匀, 腹腔注射。8周后脾内免疫50 μ g邻苯基苯酚-BSA作为加强免疫, 3d后取脾细胞进行融合。

[0009] 2. 细胞融合: 免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 (Sp2/0) 以10:1混合, 用50%聚乙二醇 (PEG) 作融合剂。融合细胞悬于含20%小牛血清的选择培养基内, 分种于加有BALB/c小鼠腹腔渗出细胞作滋养层的96孔细胞培养板中, 置5%CO₂, 37℃孵箱中培养, 当镜检杂交瘤克隆生长达1/3~1/2视野时, 取上清进行筛选。

[0010] 3. 杂交瘤筛选及抗体检测: 以邻苯基苯酚-BSA为包被抗原, 用间接非竞争ELISA法筛选分泌抗邻苯基苯酚抗体的细胞孔, 用邻苯基苯酚间接竞争抑制性ELISA法确证。以免疫小鼠的血清为阳性对照, 以Sp2/0细胞培养的上清液为空白对照, 以细胞培养板中未长出克隆的细胞培养上清为阴性对照, 阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \geq 21$ 。

[0011] 4. 杂交瘤细胞克隆化: 采用培养瓶内准确计数稀释法。当连续3次100%阳性, 即可将杂交瘤细胞冻存于液氮罐中。

[0012] 5. 单克隆抗体的生产: 采用动物体内诱生单克隆抗体的方法。

[0013] 6. 单克隆抗体的纯化: 采用饱和硫酸铵法对腹水进行纯化。

[0014] 7. 单克隆抗体的鉴定: 抗体的免疫球蛋白类别及亚类鉴定采用抗体亚类测定试剂盒进行测定。抗体IgG含量采用二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白测定试剂盒进行测定。抗体分子量采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法。抗体滴度测定以邻苯基苯酚-BSA为包被抗原, 从1:10000开始将抗体进行倍比稀释, 以Sp2/0细胞培养上清为阴性对照, 用间接非竞争ELISA方法测定抗体滴度, 以 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \geq 21$ 的最大稀释倍数为滴定终点。抗体亲和力的测定采用间接非竞争性ELISA法, 即测定抗体的亲和常数。抗体的特异性和抗体的灵敏度用间接竞争抑制性ELISA法进行测定。

[0015] 用邻苯基苯酚-BSA免疫BALB/c小鼠获得了较好的免疫应答。细胞融合后, 经间接非竞争ELISA方法筛选, 并用间接竞争ELISA方法确证, 从中选择出对邻苯基苯酚毒素有强抑制而阳性对照孔较强的细胞株, 经3~4次亚克隆, 达到3次100%阳性, 建立了1株稳定分泌抗邻苯基苯酚单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0016] 单克隆抗体特性的鉴定: 抗邻苯基苯酚抗体亚类是IgG1, 相对分子量是150KD, 抗体的亲和力常数是 2.8×10^{-11} mol/L。

[0017] 加标回收试验: 从市场上购买苹果, 分别进行5 μ g/kg和10 μ g/kg加标回收试验。对苹果样品的平均加标回收率分别为 $(112.5 \pm 9.6)\%$ 和 $(87.7 \pm 19.8)\%$ 。

[0018] 本发明成功地筛选出能够分泌抗邻苯基苯酚的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 制备出对邻苯基苯酚具有高亲合力、高特异性的单克隆抗体,

检测方法:

包被: 首先在酶标板微孔条上预包被邻苯基苯酚抗原, 用10 mmol/L pH 9-10碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液作为包被液, 每孔加100 μ L 37℃ 2小时, 弃去包被液, 洗涤2-5次。加入含1%-5%牛血清蛋白 (溶于pH 7-8的磷酸盐缓冲液) 37℃ 1.5小时。弃去封闭液, 拍干。4℃保

存,用时取出回温。

[0019] 使用须知:

- 1、使用之前将所有试剂和需用微孔板回升至室温;
- 2、使用之后立即将所有试剂放回2~8 °C;
- 3、在使用中不要让微孔干燥;
- 4、在ELISA分析中的重复性,很大程度上取决于洗板的一致性,正确的洗板操作是ELISA测定程序中的要点;
- 5、在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖板膜盖住微孔板。

[0020] 样品检测:取包被好的酶标板,加标准品/样本50μL到对应的微孔中,加入酶标物50μL/孔,再加入抗体工作液50μL轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25℃避光反应30min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 300μL /孔,每次浸泡15~30 s,充分洗涤4~5次,用吸水纸拍干。加入显色液A 50μL/孔,轻轻振荡混匀,再加入显色液B 50μL /孔,用盖板膜盖板后置室温避光反应15~20 min。每孔各加50μL终止液,轻轻振荡混匀,设定酶标仪在450 nm处,测定OD值(建议用450/630 nm双波长检测,在5 min内读完数据)。

结果分析:所测得的标准液或样品吸光度的平均值(B)除以第一个标准液(0标准液)的吸光度(B₀)值再乘以100%,得到百分吸光度值。

[0021] 百分吸光度值(%) = $B / B_0 \times 100\%$

以标准品浓度的10为底的对数为X轴,百分吸光值为Y轴,绘制标准曲线。将样本的百分吸光值代入标准曲线,从标准曲线上读出样本所对应的值,作为10的幂,乘以稀释倍数,即为样品中所含邻苯基苯酚的量。

[0022] 分别对0 ng/mL,0.6 ng/mL,1.8 ng/mL,5.4 ng/mL,16.2 ng/mL,48.6 ng/mL。的标准品进行检测,每个浓度做 3 个平行,取平均值,以标准品浓度自然对数为 X 轴,吸光值为 Y 轴,做标准曲线,计算其变异系数。

[0023] 利用试剂盒专业分析软件进行计算,更便于大量样品的准确、快速分析。

[0024] 包被板固相抗原制备:

将邻苯基苯酚-BSA用50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH9.6缓冲液稀释至10 mg/L的包被液,96(或48)孔微孔板各孔加100 μL,37℃下避光孵育2 h,弃去包被液,洗涤2次,加入150 μL含3%BSA的上述Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲液封闭,37 °C下避光孵育1.5 h,弃去封闭液,晾干,板条密封后置-4℃冷冻保存。

[0025] 试剂的配制:

(1)标准品邻苯基苯酚:(0 ng/mL,0.6 ng/mL,1.8 ng/mL,5.4 ng/mL,16.2 ng/mL,48.6 ng/mL),从邻苯基苯酚纯品中稀释得到,稀释液为甲醇:水体积比为4 :6;

(2)洗涤液:14.5 mmol/L NaCl、0.2 ml/L Tween-80和0.2 %NaN₃的50 mmol/L Tris-HCl pH7.8;

(3)显色液A:0.2 M Na₂HPO₄ 25.7 mL,0.1 M柠檬酸24.3 mL和30%的H₂O₂ 50 mL;

(4)显色液B:称取5 mg四甲基邻苯基苯酚二胺(TMB)加入2.5 mL无水乙醇中,可加热至37 °C~40 °C直到TMB完全溶解;

(5)终止液:2 mol/L硫酸,在一升的容量瓶里加入700-800ml水,然后再向其中加入200克98%的浓硫酸,边加边搅拌,待冷却后,在补加水到刻度线即可;

(6) 样品稀释液:用去离子水将邻苯基苯酚浓缩样品稀释液按1:4体积比进行稀释,即1份邻苯基苯酚浓缩样品稀释液加4份去离子水。用于提取样本的稀释,样品稀释液在4℃环境可保存一个月;

(7) 洗涤工作液:用去离子水将浓缩洗涤液(10×)按1:9体积比进行稀释,即1份浓缩洗涤液(10×)加9份去离子水,用于酶标板的洗涤,洗涤工作液在4℃环境可保存一个月。

[0026] 实验室应自备的试剂:

乙腈、正己烷、去离子水。

[0027] 测定之前注意事项

- 1、使用之前将所有试剂和需用微孔板回升至室温;
- 2、使用之后立即将所有试剂放回2~8℃;
- 3、在使用中不要让微孔干燥;
- 4、在ELISA分析中的重复性,很大程度上取决于洗板的一致性,正确的洗板操作是ELISA测定程序中的要点;
- 5、在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖板膜盖住微孔板;
- 6、取出需用数量的微孔板及框架,将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于2~8℃。

[0028] 实施例 检测苹果样品

- 1、取1g均质样本于50 mL离心管中,加入5 mL水,剧烈振荡1 min;
- 2、加入5 mL乙腈,剧烈振荡3 min,4000g以上离心5 min;
- 3、取1ml上清液于10ml玻璃试管中,50~60℃水浴氮气流下吹干;
- 4、加入1ml正己烷用涡旋仪涡动30s,再加入1mL样品稀释液,涡动30s, 4000 r/min离心5 min;
- 5、除去上层有机相,将下层液体转移到另一洁净离心管中,用于检测。

[0029] 测定:

- 1、将所需试剂和微孔板从冷藏环境中取出,在室温下平衡30 min,每种液体使用前均须摇匀。注意标准液均需做2个平行试验;
- 2、加标准品/样本:加标准品/样本50μL到对应的微孔中,再加入酶标记物50μL/孔,然后再加入50μL/孔抗体工作液,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光反应30 min;
- 3、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 250μL/孔,每次浸泡15~30 s,充分洗涤4~5次,用吸水纸拍干;
- 4、显色:加入底物液A液50μL/孔,再加底物液B液50μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境反应15 min;
- 5、测定:每孔各加50μL终止液,设定酶标仪在450 nm处,测定OD值(建议用450/630 nm双波长检测,在5 min内读完数据)。根据标准曲线计算苹果样本中邻苯基苯酚含量。

专利名称(译)	一种检测果蔬中保鲜剂邻苯基苯酚的试剂盒的制备		
公开(公告)号	CN109752521A	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN201711073646.2	申请日	2017-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 杜霞 袁超		
发明人	洪霞 杜霞 袁超		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测邻苯基苯酚的试剂盒及其检测方法用于对苹果中邻苯基苯酚含量的检测。本试剂盒采用间接竞争ELISA方法，在酶标板微孔条上预包被邻苯基苯酚抗原，样本中邻苯基苯酚和此抗原竞争抗邻苯基苯酚抗体（抗试剂），同时抗邻苯基苯酚抗体与酶标二抗（酶标物）相结合，经TMB底物显色，样本吸光值与其含有的邻苯基苯酚成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中邻苯基苯酚的含量。