



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110045108 B

(45) 授权公告日 2021.10.29

(21) 申请号 201910450666.X

(22) 申请日 2019.05.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110045108 A

(43) 申请公布日 2019.07.23

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号江南大学食品学院生物界面与生物检测研究所

(72) 发明人 胥传来 刘丽强 孙佳佳 仇雪林文祥 陶睿

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 张仕婷

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1844926 A, 2006.10.11

CN 105541655 A, 2016.05.04

CN 106084059 A, 2016.11.09

CN 105652005 A, 2016.06.08

US 2016031927 A1, 2016.02.04

US 2005095650 A1, 2005.05.05

审查员 石维平

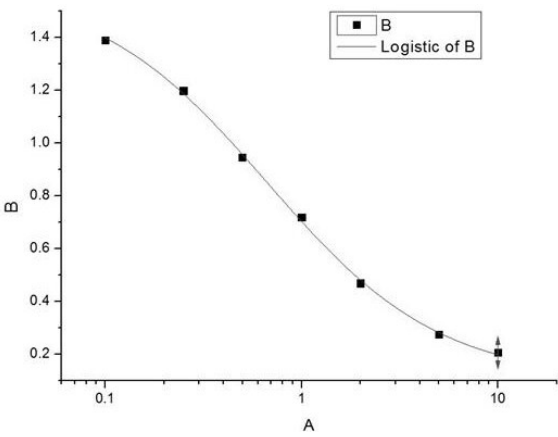
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

一种基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒及其检测方法,属于免疫检测技术领域。本发明试剂盒包含:酶标板、辣椒碱标准品、酶标物、显色液、终止液、10×浓缩洗涤液、抗体工作液、样品稀释液和样品复溶液。通过洗涤工作液的制备、标准溶液的配制、标准曲线的绘制、待测样品的准备、测定和计算得到检测结果。本发明的优点是能准确灵敏地检测食用油中辣椒碱含量,样品前处理过程简单,耗时少,能同时检测大量样品,检测成本远低于传统仪器检测方法。本发明能实现地沟油的现场高通量快速检测,为日常监管提供重要的技术手段,为我国食用油的质量安全提供有力的技术保障,具有重要的现实意义。



1. 一种基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒包含:酶标板、辣椒碱标准品、酶标物、显色液、终止液、10×浓缩洗涤液、抗体工作液、样品稀释液和样品复溶液;

所述酶标板为已经用辣椒碱包被抗原制作好的酶标板,包被浓度为0.1μg/mL;

所述辣椒碱包被抗原制备过程为:

a、以香兰素胺盐酸盐作为半抗原,称取20mg于反应瓶中,加入 400μL DMF 溶解,称取 11.4~11.6mg NHS 于反应瓶中,再加入 19.0~19.2 mg EDC盐酸盐,室温避光搅拌过夜;

b、取上清活泼酯液,分别逐滴滴加到224mg BSA 溶液中反应,反应缓冲液为 0.05mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液;反应在磁力搅拌下室内温度避光进行 4h,从加样结束开始计时;

c、将反应液置透析袋内,于 0.01M pH 7.4的PBS中4℃搅拌透析,每8h更换一次透析液,共更换4次,透析结束后,即得到辣椒素人工偶联抗原,即辣椒碱包被抗原;

所述抗体工作液为浓度0.6μg/mL的CGMCC No.14689的杂交瘤细胞株分泌所得抗体溶液。

2. 根据权利要求1所述基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述辣椒碱标准品的浓度依次为0、0.1ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL;

所述酶标物为HRP标记的羊抗鼠IgG,工作浓度为0.1μg/mL;

所述显色液为显色液A液和显色液B液;

所述终止液为2mol/L硫酸溶液;

所述10×浓缩洗涤液具体为添加了质量浓度为0.05%Tween-20的0.02mol/L PBS缓冲液,其pH为7.4。

3. 根据权利要求1所述基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液配方为:500mL浓度为96%以上的甲醇中加按质量浓度计1%乙腈、49%的浓度为97%以上的氯仿、0.025% Tween-20。

4. 根据权利要求1所述基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述样品复溶液配方为:950mL蒸馏水中加入按质量浓度计0.02%KCl、0.023%~0.024% KH₂PO₄、0.8%NaCl、0.362%~0.363%Na₂HPO₄、5%甲醇、0.025%Tween-20和0.02%PEG-20000。

5. 权利要求1所述基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒的检测方法,其特征是步骤如下:

(1) 洗涤工作液的制备:取10×浓缩洗涤液,按照1 份 10×浓缩洗涤液兑9份去离子水的比例配置1×洗涤工作液,用于对酶标板进行清洗;

(2) 标准溶液的配制:采用辣椒碱标准品配置标准溶液,具体浓度如下:0、0.1ng/mL、0.25ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL;在酶标板上按照上述浓度顺序加入标准溶液,50μL/孔,至少两个重复;

(3) 标准曲线的绘制:

每孔加入50μL 0.6μg/mL抗体工作液,37℃温育30min后,取出并将孔内液体甩干,每孔依次加入步骤(1)中已配置好的1×洗涤工作液200μL,倒出液体,此后再重复洗涤2次,最后

拍干；

每孔加入100 μ L的酶标物，酶标板装入袋中后再放入保温箱中保温30min，取出后将孔内液体甩干，每孔加入步骤(1)中已配置好的1 $\times$ 洗涤工作液200 μ L，倒出液体，此后再重复洗涤2次，最后拍干；

每孔加100 μ L显色液，暗处37 $^{\circ}$ C反应15min；取出酶标板，每孔加100 μ L终止液，用酶标仪测定光密度值A450；以辣椒碱标准品浓度为X轴，百分吸光值为Y轴，绘制标准曲线；

(4) 待测样品的准备：取待测样品进行前处理，配置得到待测样品；在酶标板上加入待测样品，50 μ L/孔，每个待测样品至少两个平行；

(5) 测定：按照步骤(3)所述步骤对酶标板中的待测样品进行测定；

(6) 计算：将样品吸光值代入标准曲线，得到相应的值A，即为待测样品中辣椒碱的浓度。

6. 根据权利要求5所述基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒的检测方法，其特征在于：步骤(2)中辣椒碱标准品采用标准品稀释液进行稀释配置；所述标准品稀释液配方按质量浓度计为：950mL蒸馏水中加入按质量浓度计为0.02%KCl、0.023%~0.024%KH₂PO₄、0.8%NaCl、0.362%~0.363%Na₂HPO₄、5%甲醇和0.025%Tween-20。

7. 根据权利要求5所述基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒的检测方法，其特征在于：步骤(4)中所述样品的检测前处理步骤如下：

a、取1g样品加入5mL样品稀释液，用旋涡混合器2500r/min充分混匀5min；混合均匀后放入离心机，在5000r/min、5 $^{\circ}$ C的条件下离心5min，离心结束后，取上层液相；

b、重复步骤a得到二次提取的上层液相，与第一次提取的上层液相合并；

c、取两根管，分别加入2mL上述合并液相，在50 $^{\circ}$ C下用氮气吹干；

d、吹干后，在两根管中分别加入2mL样品复溶液复溶，得到样品溶液，进行检测；其中一根管作为平行对照。

8. 根据权利要求5所述基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒的检测方法，其特征在于：所述显色液包括显色液A：配方为醋酸钠13.5g~13.8g，柠檬酸1.4g~1.6g，30%双氧水0.3mL，蒸馏水加至500mL；显色液B：配方为乙二胺四乙酸二钠0.2g，柠檬酸0.95g，甘油50mL，取0.15g TMB溶于3mL DMSO中，蒸馏水加至500mL；

使用时，按显色液A：显色液B质量比为5:1的比例配置显色液，注意现配现用。

一种基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒及其检测方法,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] “地沟油”问题是多年来我国食用植物油质量安全领域面临的重大难题。广义的地沟油,指各类废弃的劣质食用油(waste edible oils),主要的的第一大类是餐厨废油脂(restaurant waste lipids),来源于下水道中的油腻漂浮物或者是宾馆、酒楼的剩饭、剩菜(通称泔水);第二类来源是由劣质动物皮、肉、内脏加工提炼后产出的油;第三类来源是回收油脂,包括餐饮店使用的泛油、煎炸老油等。但流向地沟油加工窝点的主要是餐厨废弃油脂,早在1990年,就有报道称北京朝阳区在八个月之内取消了三个地沟油炼制点。这是在CNKI 数据库中能查到的关于地沟油的最早报道。1991 年下半年,一伙不法之徒在北京西南郊苗圃,用从各家饭馆收集的泔水炼制“地沟油”,之后再将其卖给个体饭馆。工商人员曾一次查获 21 桶“地沟油”,达 2000 多公斤。据报道,世界上每年产生的餐厨废弃油脂大概有 1000 万吨。从 CNKI 数据库中对于地沟油的研究报道来看,最初我国学者大多也以变废为宝的思想来研究地沟油,除转化物为柴油外,还可以用于生产肥皂等。然而由于成本较高,利润不够丰厚,这些工作因而依然没有阻止地沟油流向餐桌,危害人们的身体健康。地沟油经历了多次高温反复油炸与下水道的氧化腐化过程,成分发生变化,产生了如黄曲霉素、苯并芘、反式脂肪酸等各种有毒物质,并含有洗涤剂成分,如长期食用必然会引发身体的疾病。轻则引起消化不良、腹泻,严重的会引发贫血、中毒性肝病等症状,长期食用有诱发癌症的危险,危害极大。

[0003] 辣椒碱是辣椒果实中所含的辛辣成分,其主要用途是用于调味品生产,以及火锅底料,凉菜,休闲食品、方便食品、快餐、微波食品等。辣椒除了上面所述的几种深加工方法外,还可以加工成各种即食食品,如腌青辣椒、豆瓣辣酱、五香辣椒、辣椒芝麻酱、辣椒糊等。正常食用油里一般不含辣椒碱成分,但由于辣椒作为调味料,在全国各地的菜系中都有涉及,于是作为地沟油主要来源的泔水油,不可避免会含有辣椒碱。辣椒碱的理化性质非常稳定,能够耐受高温,脂溶性极强,在随食物烹饪过程中,其化学结构不易被破坏,而且在地沟油精炼过程中,辣椒碱依然难以被全部去除,不可避免的会有辣椒碱残留,即使只有痕量辣椒碱存在,只要有高灵敏的辣椒碱检测方法就能识别。

[0004] 地沟油目前的检测方法有基于其理化性质建立的感官鉴定法,也有凯氏定氮法、电导法、光谱法(如紫外—可见光谱法、荧光分析法、红外光谱法以及核磁共振法)、色谱法(如气相色谱法、高效液相色谱法)、离子色谱法等较为常见及普遍的方法。但是感官鉴定法只能用于食源性样品中辣椒素的检测;电导法不适合深度精炼的地沟油,因为深度精炼可除去油脂中大部分的水溶性离子和极性分子,使得地沟油电导率大大降低;凯氏定氮法、可见光谱法及荧光分析法易受样品中杂质的影响;而气相色谱法、高效的液相色谱法、红外光

谱法以及核磁共振法虽然具有较高的灵敏性及准确度,但是该方法需要专业操作人员及昂贵的精密仪器,分析成本高,虽然适用于专业检测实验室,但是无法满足现场快速检测的要求。基于现有这些方法的检测灵敏度和特异性,通过监测辣椒素类物质判别“地沟油”的准确率在 80%左右。

[0005] 根据目前国内外资料显示,基于抗原抗体检测辣椒碱的免疫分析方法研究很少,还没有商品化产品。而ELISA方法具有高特异性、高灵敏度、低成本、适合现场检测、操作简便、快速,可实现高通量定量检测的优势,如果有了这样一款产品,就能为地沟油的日常监管提供高效的快速检测手段,为我国食用油的质量安全提供有力的技术保障。

发明内容

[0006] 本发明的目的是克服上述不足之处,提供一种基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒及其检测方法,本着高效、节约、迅速的原则,利用辣椒碱抗体抗原,研制开发酶联免疫(ELISA)技术,使得地沟油的检测过程简便,准确性和特异性大幅提高。

[0007] 本发明的技术方案,一种基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒,该试剂盒包含:酶标板、辣椒碱标准品、酶标物、显色液、终止液、10×浓缩洗涤液、抗体工作液、样品稀释液和样品复溶液。

[0008] 进一步的,所述酶标板为已经用辣椒碱包被抗原制作好的酶标板,包被浓度为0.1 μg/mL。

[0009] 进一步的,辣椒碱包被抗原制备过程为:

[0010] a、以香兰素胺盐酸盐作为半抗原,称取20mg于反应瓶中,加入 400μL DMF 溶解,称取 11.4~11.6mg NHS 于反应瓶中,再加入 19.0~19.2 mg EDC盐酸盐,室温避光搅拌过夜;

[0011] b、取上清活泼酯液,分别逐滴滴加到224mg BSA 溶液中反应,反应缓冲液为0.05mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液;反应在磁力搅拌下室内温度避光进行 4h,从加样结束开始计时;

[0012] c、将反应液置透析袋内,于 0.01M pH 7.4的PBS中4℃搅拌透析,每8h更换一次透析液,共更换4次,透析结束后,即得到辣椒素人工偶联抗原,即辣椒碱包被抗原。

[0013] 进一步的,所述辣椒碱标准品的浓度依次为0,0.1ng/ mL,0.25 ng/ mL、0.5 ng/ mL、1ng/ mL、2ng/ mL、5ng/mL、10ng/mL;

[0014] 进一步的,所述酶标物为HRP标记的羊抗鼠IgG,工作浓度为0.1μg/mL;

[0015] 进一步的,所述显色液为显色液A液和显色液B液;

[0016] 进一步的,所述终止液为2mol/L硫酸溶液;

[0017] 进一步的,所述10×浓缩洗涤液具体为添加了质量浓度为0.05%Tween-20的0.02mol/L PBS缓冲液,其pH为7.4。

[0018] 进一步的,所述抗体工作液为浓度0.6μg/mL的CGMCC No .14689的杂交瘤细胞株分泌所得抗体溶液。

[0019] 所述抗体由专利号201811269168.7“一种分泌辣椒碱单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用”所公布的方式制得。

[0020] 进一步的,所述样品稀释液配方为:500mL浓度为96%以上的甲醇中加按质量浓度

计1%乙腈、49%的浓度为97%以上的氯仿、0.025%Tween-20。

[0021] 进一步的,样品复溶液配方为:950mL蒸馏水中加入按质量浓度计0.02%KCl、0.023%~0.024% KH_2PO_4 、0.8%NaCl、0.362%~0.363% Na_2HPO_4 、5%甲醇、0.025%Tween-20和0.02%PEG-20000。

[0022] 本发明还提供了一种基于辣椒碱指标的地沟油酶联免疫检测试剂盒的检测方法,步骤如下:

[0023] (1)洗涤工作液的制备:取10×浓缩洗涤液,按照1份10×浓缩洗涤液兑9份去离子水的比例配置1×洗涤工作液,用于对酶标板进行清洗;

[0024] (2)标准溶液的配制:采用辣椒碱标准品配置标准溶液,具体浓度如下:0,0.1ng/mL,0.25ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL;在酶标板上按照上述浓度顺序加入标准溶液,50μL/孔,至少两个重复;

[0025] (3)标准曲线的绘制:

[0026] 每孔加入50μL 0.6μg/mL抗体工作液,37℃温育30min后,取出并将孔内液体甩干,每孔依次加入步骤(1)中已配置好的1×洗涤工作液200μL,倒出液体,此后再重复洗涤2次,最后拍干;

[0027] 每孔加入100μL的酶标物,酶标板装入袋中后再放入保温箱中保温30min,取出后将孔内液体甩干,每孔加入步骤(1)中已配置好的1×洗涤工作液200μL,倒出液体,此后再重复洗涤2次,最后拍干;

[0028] 每孔加100μL显色液,暗处37℃反应15min;取出酶标板,每孔加100μL终止液,用酶标仪测定光密度值A450;以辣椒碱标准品浓度为X轴,百分吸光值为Y轴,绘制标准曲线;

[0029] (4)待测样品的准备:取待测样品进行前处理,配置得到待测样品;在酶标板上加入待测样品,50μL/孔,每个待测样品至少两个平行;

[0030] (5)测定:按照步骤(3)所述步骤对酶标板中的待测样品进行测定;

[0031] (6)计算:将样品吸光值代入标准曲线,得到相应的值A,即为待测样品中辣椒碱的浓度。

[0032] 进一步的,步骤(2)中辣椒碱标准品采用标准品稀释液进行稀释配置;所述标准品稀释液配方按质量浓度计为:950mL蒸馏水中加入按质量浓度计为0.02%KCl、0.023%~0.024% KH_2PO_4 、0.8%NaCl、0.362%~0.363% Na_2HPO_4 、5%甲醇和0.025%Tween-20。

[0033] 进一步的,步骤(4)中所述样品的检测前处理步骤如下:

[0034] a、取1g样品加入5mL样品稀释液,用旋涡混合器2500r/min充分混匀5min;混合均匀后放入离心机,在5000r/min,5℃的条件下离心5min,离心结束后,取上层液相;

[0035] b、重复步骤a得到二次提取的上层液相,与第一次提取的上层液相合并;

[0036] c、取两根管,分别加入2mL上述合并液相,在50℃下用氮气吹干;

[0037] d、吹干后,在两根管中分别加入2mL样品复溶液复溶,得到样品溶液,进行检测;其中一根管作为平行对照。

[0038] 进一步的,所述显色液包括显色液A:配方为醋酸钠13.5g~13.8g,柠檬酸1.4g~1.6g,30%双氧水0.3mL,蒸馏水加至500mL;显色液B:配方为乙二胺四乙酸二钠0.2g,柠檬酸0.95g,甘油50mL,取0.15g TMB溶于3mL DMSO中,蒸馏水加至500mL;

[0039] 进一步的,使用时,按显色液A:显色液B质量比为5:1的比例配置显色液,注意现配

现用。

[0040] 本发明试剂盒的分析原理：

[0041] 本试剂盒采用间接竞争ELISA方法，在酶标板微孔上预包被辣椒碱抗原，样本中辣椒碱和此抗原竞相结合辣椒碱抗体（抗体工作液），同时辣椒碱抗体与酶标二抗（酶标物）相结合，经TMB底物显色，样本吸光值与其含有的辣椒碱呈负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样本中辣椒碱的含量。

[0042] 本发明的有益效果：本发明的优点是能准确灵敏地检测食用油中辣椒碱含量，样品前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量样品，检测成本远低于传统仪器检测方法。本发明能实现地沟油的现场高通量快速检测，为日常监管提供重要的技术手段，为我国食用油的质量安全提供有力的技术保障，具有重要的现实意义。

附图说明

[0043] 图1是辣椒碱标准品的标准曲线图。A：以辣椒碱标准品浓度为X轴；B：百分吸光值为Y轴。

具体实施方式

[0044] 以下实施例用于对本发明的进一步说明，但不用来限制本发明所要保护的范围。

[0045] 以下实施例中的香兰素胺盐酸盐来源于sigma-aldrich西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司。

[0046] 实施例1

[0047] （1）洗涤工作液的制备：用去离子水将 10×浓缩洗涤液按 1:9 体积比进行稀释（1 份 10×浓缩洗涤液+9份去离子水）用于酶标板的洗涤。

[0048] （2）样品准备与提取：分别取1g食用油样品于15mL具塞离心管中，加入辣椒碱标准品（2.5ppb、4ppb、10ppb、40ppb），配制成不同浓度的辣椒碱和食用油的混合液。每管加入5mL样品稀释液，用漩涡混合器（2500r/min）充分混匀5min。放入离心机中，在5000r/min，5℃条件下离心5min。离心完成后，取上层液相。按上述步骤重新提取一次，合并两次液相。取2mL待测液相，在50℃下加热，用氮气吹干。吹干后，加2mL样品复溶液复溶。并做一组平行实验进行对比。

[0049] （3）绘制标准曲线与样品测定同时进行。在已包被好的酶标板上按照下列浓度顺序加入标准溶液，50μl/孔，至少两个重复：0，0.1ng/mL，0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL。取上述样品提取液加入余下孔中，50μL/孔，至少两个平行。每孔加入50μL 0.6μg/mL抗体工作液，37℃温育30min后，洗涤并拍干。加入酶标物，100μL/每孔。酶标板装入袋中后再放入保温箱中保温30min，取出后洗涤并拍干。每孔加100μL显色液（按显色液A：显色液B=5:1的比例配置显色液，注意现配现用），暗处37℃反应15min。取出酶标板，每孔加100μL终止液，用酶标仪测定光密度值A450。以辣椒碱标准品浓度为X轴，百分吸光值为Y轴，绘制标准曲线。

[0050] （4）将样品吸光值代入标准曲线，得到相应的值A，即为样品提取液中辣椒碱的浓度。计算回收率：回收率=A×10/加标浓度。

[0051] 加标值为2.5ppb的回收率为69%、87%，4ppb的回收率为80%、91%，10ppb的回收率为

82%、85%、40ppb的回收率为92%、100%。

[0052] 标准品检测结果如表1所示,样品检测结果如表2所示。

[0053] 表1

标准曲线测定			
标准品浓度 (ng/mL)	吸光值 1	吸光值 2	均值
0	2.136	2.215	2.1755
0.1	1.943	1.96	1.9515
0.25	1.9	1.971	1.9355
0.5	1.667	1.701	1.684
1	1.304	1.359	1.3315
2	0.989	0.996	0.9925
5	0.566	0.594	0.58
10	0.402	0.425	0.4135

[0055] 表2

样品测定						
样品加标值	吸光值 1	吸光值 2	均值	计算值		回收率
2.5ppb	1.973	1.954	1.9635	0.17177	1.7177	69%
	1.917	1.917	1.917	0.21822	2.1822	87%
4ppb	1.846	1.793	1.8195	0.32103	3.2103	80%
	1.821	1.738	1.7795	0.3658	3.658	91%
10ppb	1.38	1.524	1.452	0.81671	8.1671	82%
	1.452	1.418	1.435	0.84562	8.4562	85%
40ppb	0.683	0.722	0.7025	3.69366	36.9366	92%
	0.674	0.669	0.6715	3.99339	39.9339	100%

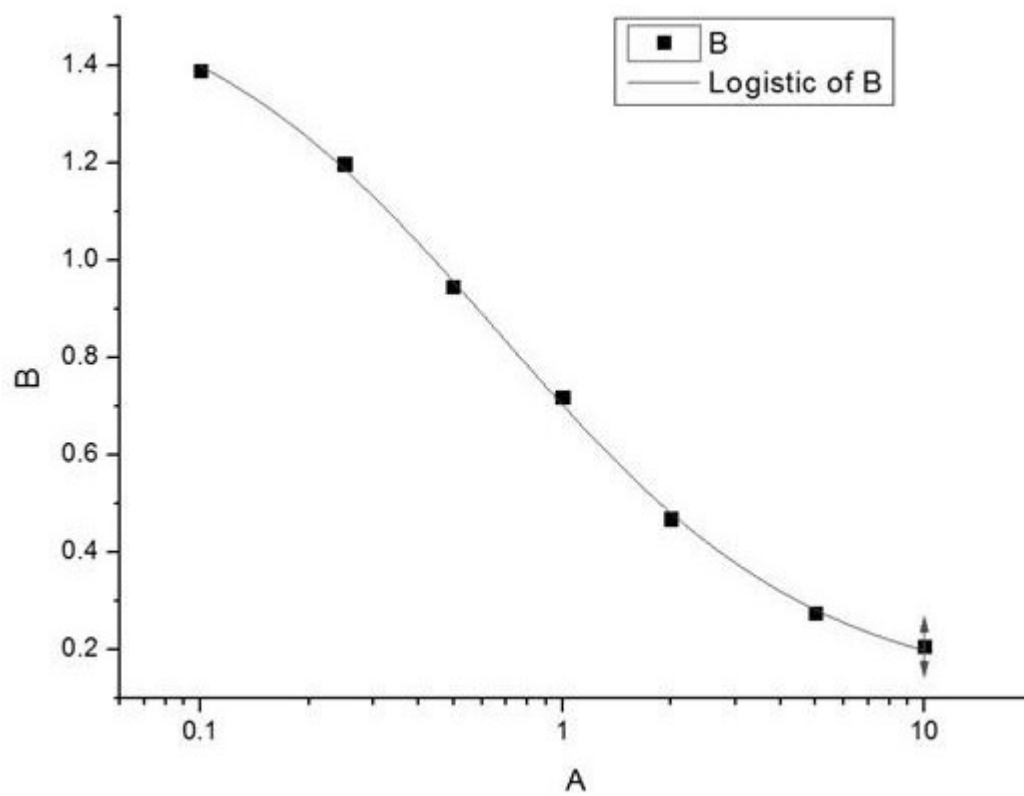


图1