

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910058317.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 30/74 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月15日

[11] 公开号 CN 101482559A

[22] 申请日 2009.2.12

[21] 申请号 200910058317.X

[71] 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市一环路南一段 24 号

[72] 发明人 邓安平 贺莉 邢玮玮 杨红  
王玉珍 李大伟

[74] 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任公司

代理人 邓继轩

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

## [54] 发明名称

测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法

## [57] 摘要

本发明公开了测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法 (ELISA), 其特点是合成氨基无色孔雀石绿的修饰物并将其与蛋白联接, 制得免疫原及包被抗原, 通过免疫动物获得兔抗无色孔雀石绿的多克隆抗体, ELISA 标准曲线的浓度范围为 0.1 ~ 100ng/mL, IC<sub>50</sub> 为 0.9 - 2.6ng/mL, 加标回收率为 76.2 - 95.0%, ELISA 与 HPLC 的相关系数为 0.975, n = 7; 由于所制抗体与孔雀石绿的交叉反应率分别为 95.25%, 故 ELISA 可以用于测定孔雀石绿和无色孔雀石绿的总量, 而无需将任何氧化步骤。

1. 测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

(1) 无色孔雀石绿衍生物的制备

取5.5~7.5g 对硝基苯甲醛溶于14~18g N,N-二甲基苯胺中，加入4.8~6.8g  $ZnCl_2$ ，于温度80~100℃搅拌反应直至绿色溶液形成固体，冷却至室温，固体溶于丙酮，同时过滤除去 $ZnCl_2$ 颗粒，粗产品过柱纯化、干燥，得硝基无色孔雀石绿黄色粉末，取0.17~0.27g 硝基无色孔雀石绿溶于6~10mL甲醇中，以5%钨碳为催化剂，加入反应釜中，通入氢气，于温度100~120℃反应1~5小时，过滤反应物，收集滤液，用旋转蒸发器旋干溶液，粗产品用体积比为95:5的甲醇:苯混合液重结晶，得到氨基无色孔雀石绿白色粉末；

(2) 免疫原及包被抗原的制备

取 30~40mg 纯化的氨基无色孔雀石绿溶于 0.6mL 水中，缓慢滴加浓度为 15mg/mL 的  $NaNO_2$  溶液 0.33mL，用盐酸调节混合液的 pH 值至 1.5，在暗处、温度 4℃ 反应过夜，取少量上述溶液，滴加到 N, N-二甲基苯胺中，溶液颜色由无色变为淡黄色，表明重氮化反应完成；将 10.5 mg 氨基磺酸胺溶于 0.21 mL 纯水中，缓慢滴加到重氮盐溶液中，终止反应；

称取牛血清白蛋白和卵清蛋白各 100 mg，分别溶于 1.5mL 浓度为 0.01mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲溶液中；将重氮化溶液缓慢滴加至上述蛋白质溶液中，用 NaOH 溶液调节 pH 值为 7.5，搅拌下于温度 4℃ 反应过夜；将混合物离心，取上清，装入透析袋中，透析数天，获得两种无色孔雀石绿-蛋白质溶液，冷冻干燥，在温度-20℃ 保存待用；无色孔雀石绿-牛血清白蛋白和无色孔雀石绿-卵清蛋白分别用作免疫原及包被抗原；

(3) 无色孔雀石绿多克隆抗体的制备

用免疫原免疫两只新西兰大白兔，将 1~4 mg 免疫原溶于 0.5~4mL 的生理盐水中，加入 0.5~3mL 完全福氏佐剂，混合成油包水的乳浊液，每只兔子每次吸取 0.5~2.0mL 乳浊液，多点皮下注射入兔子背部，1~5 周后，对兔进行第二次免疫，使用不完全福氏佐剂，其余与第一次免疫相同，第二次免疫后，2~5 周进行下一次免疫，并且第三

次、第四次免疫后，5~7天抽取0.1~0.5mL耳血，检测抗体产生的情况，第五次免疫后，5~15天处死兔子，取全血，将血液在冰箱中放置过夜，吸取上层清液，分装，于低温冰箱中储存，即得兔抗无色孔雀石绿多克隆抗体；

#### (4) 建立测定无色孔雀石绿含量的酶联免疫吸附分析方法

对所得抗体性能进行表征，在最优试验条件下，建立测定孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的 ELISA；

#### (5) ELISA 对加标样品中无色孔雀石绿含量的测定

选择了4种样品：自来水，食用鱼养殖水样，鱼样I，鱼样II进行加标实验，不同加标样品萃取方法不同，(1)水样：自来水不需任何预处理，食用鱼养殖水样用0.45 μm的滤膜过滤，取水样1mL，加入LMG储备液，使水样LMG加标浓度分别为1, 2, 5 ng/mL；(2)：鱼样：称取1.0g鱼样品于10mL离心管中，加入LMG储备液，使鱼样LMG中加标浓度为20, 50, 100 μg/g，样品室温下放置30min，加入3ml乙腈，涡旋混匀5min，超声波振荡提取15min，4000r/min离心10min，上清液转至25mL梨型瓶中，重复上述步骤，合并两次萃取液，将收集液在35℃下减压旋转蒸发至体积约2~3mL，移取样品溶液加至已活化的中性氧化铝柱上，4mL乙腈洗涤中性氧化铝柱，收集全部流出液，45℃旋转蒸发至干，用1.00mL 0.01%酪蛋白溶液溶解后待测；无色孔雀石绿加标回收率在76.2~95.0%之间，相对标准偏差为2.7~13.1%，说明方法准确性和精密度都比较好；

#### (6) ELISA 和 HPLC 的比较

无色孔雀石绿的 HPLC 条件为：Agilent 高效液相色谱仪，配备荧光检测器，柱温 35℃，流动相为体积比 80:20 的乙腈:0.125 mol/L HAc/NH<sub>4</sub>Ac, pH 4.5 的混合液，流速为 1.3 mL/min，进样 50 μL，荧光激发波长 265nm，荧光发射波长 360nm，无色孔雀石绿标准溶液进样量分别为 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 ng，样品萃取液用 0.45 μm 的滤膜过滤后直接测定；

所建立的 ELISA 的可靠性用 HPLC 进行进一步验证，7 种加标样品，即食用鱼养殖水样，加标浓度 5 μg/L；鱼样 I，加标浓度 20 μg/kg, 50 μg/kg, 100 μg/kg；鱼样 II，加标浓度 20 μg/kg, 50 μg/kg, 100 μg/kg；加标样品用上述方法处理并用 ELISA 和 HPLC 测定，测定结果以 HPLC 为横坐标，ELISA 为纵坐标作图得两者的相关曲线，回归方程为  $Y=1.0305X - 0.7307$ ，相关系数为 0.975, n=7，说明二者的相关性很好。

## 测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法

### 一. 技术领域

本发明涉及一种测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA),属于食品安全监督或食品分析的研究领域。

### 二. 背景技术

孔雀石绿(Malachite Green, MG)又名碱性绿、盐基块绿、孔雀绿和中国绿,为带有金属光泽的绿色结晶体,化学名称:四甲基代二氨基三苯甲烷,分子式为 $C_{23}H_{25}N_2Cl$ ,分子量为364.92,易溶于水、甲醇和乙醇,溶液呈蓝绿色。孔雀石绿是一种人工合成的三苯基甲烷类工业染料,主要用于制陶、纺织、皮革和食品等产业上的颜色剂和细胞化学上的染色剂等。孔雀石绿具有抗菌、杀虫等功效,是药用染料中抗菌效力较强的一类,被广泛用作驱虫剂和杀菌剂,以杀灭水产动物体外的寄生虫,原动物和鱼卵中的霉菌等。孔雀石绿对防治水霉病等有特效,在水产养殖中曾大量使用。孔雀石绿在生物体内会很快转化为无色孔雀石绿(Leucomalachite Green, LMG)。无色孔雀石绿是孔雀石绿在生物体内的主要代谢物和主要存在形式。孔雀石绿及无色孔雀石绿在环境水体和水生物体内均可存留较长时间。

近年来国内外研究表明孔雀石绿为潜在的致癌、致畸、致突变物质,而其代谢物无色孔雀石绿被确证具有高毒、高残留和三致作用,因此,孔雀石绿的使用污染水环境,其代谢物无色孔雀石绿对水生物及人体健康造成极大危害。美国、加拿大、日本、欧盟等许多国家都将孔雀石绿列为水产养殖禁用药物。欧盟规定水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量不得超过 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国于2002年5月也将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》中。

测定孔雀石绿和无色孔雀石绿的主要方法是色谱分析方法,包括气相色谱(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)等。HPLC-紫外可见检测器(UV)为最常用的检测方法。孔雀石绿的最大吸收波长为618nm,利用HPLC-UV检测,背景干扰小,测量结果准确。无色孔雀石绿在可见区无吸收,利用HPLC-UV检测,背景干扰严重,难以获取精确的结果,故常利用氧化剂如二氧化铅或2,3-二氯-5,6-氰基-1,4

-苯醌将无色孔雀石绿氧化为孔雀石绿后进行检测。无色孔雀石绿也可利用高效液相色谱-荧光检测法检测。色谱分析方法虽然灵敏度较高、准确性较好，但是色谱法仪器昂贵、样品预处理复杂、费时、检测成本高，不适用于大量样品的筛选。

酶联免疫吸附分析法（ELISA）具有灵敏度高、特异性强、分析快速的优点，已广泛用于临床、药物、食品和环境等分析领域。到目前为止，仅有一篇用ELISA测定孔雀石绿和无色孔雀石绿的文献报道（Yang, et al. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8851-8856），但抗体的交叉反应小，孔雀石绿或无色孔雀石绿只能由相应的抗体所建立的ELISA测定。最近，测定孔雀石绿或无色孔雀石绿总量的ELISA试剂盒也已上市（Bioscientific Com），但此试剂盒价格昂贵，且需要一个额外的样品处理步骤，即在测定前须将无色孔雀石绿氧化成孔雀石绿。

### 三. 发明内容

本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法（ELISA），其特点是利用抗无色孔雀石绿抗体与孔雀石绿的高交叉反应率，同时测定孔雀石绿和无色孔雀石绿残留总量，而无需氧化步骤。

本发明的目的由以下技术措施实现，其中所述原料份数除特殊说明外，均为重量份数。

#### 测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析法

##### （1）无色孔雀石绿衍生物的制备

取5.5~7.5g 对硝基苯甲醛溶于14~18g N,N-二甲基苯胺中，加入4.8~6.8g ZnCl<sub>2</sub>，于温度80~100℃搅拌反应直至绿色溶液形成固体，冷却至室温，固体溶于丙酮，同时过滤除去ZnCl<sub>2</sub>颗粒，粗产品过柱纯化、干燥，得硝基无色孔雀石绿黄色粉末，取0.17~0.27g 硝基无色孔雀石绿溶于6~10mL甲醇中，以5%钨碳为催化剂，加入反应釜中，通入氢气，于温度100~120℃反应1~5小时，过滤反应物，收集滤液，用旋转蒸发器旋干溶液，粗产品用体积比为95:5的甲醇:苯混合液重结晶，得到氨基无色孔雀石绿白色粉末；

##### （2）免疫原及包被抗原的制备

取30~40mg纯化的氨基无色孔雀石绿溶于0.6mL水中，缓慢滴加浓度为15mg/mL的NaNO<sub>2</sub>溶液0.33mL，用盐酸调节混合液的pH值至1.5，在暗处、温度4℃反应过夜，取少量上述溶液，滴加到N,N-二甲基苯胺中，溶液颜色由无色变为淡黄色，表明重氮化反应完成；将10.5mg氨基磺酸胺溶于0.21mL纯水中，缓慢滴加到重氮盐溶液中，

终止反应:

称取牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)各 100 mg, 分别溶于 1.5mL 浓度为 0.01mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲溶液中; 将重氮化溶液缓慢滴加至上述蛋白质溶液中, 用 NaOH 溶液调节 pH 值为 7.5, 搅拌下于温度 4℃ 反应过夜; 将混合物离心, 取上清, 装入透析袋中, 透析数天, 获得两种无色孔雀石绿-蛋白质溶液, 冷冻干燥, 在温度-20℃ 保存待用; 无色孔雀石绿-牛血清白蛋白(LMG-BSA)和无色孔雀石绿-卵清蛋白(LMG-OVA)分别用作免疫原及包被抗原;

### (3) 无色孔雀石绿多克隆抗体的制备

用免疫原免疫两只新西兰大白兔, 将 1~4 mg 免疫原溶于 0.5~4mL 的生理盐水中, 加入 0.5~3mL 完全福氏佐剂, 混合成油包水的乳浊液, 每只兔子每次吸取 0.5~2.0mL 乳浊液, 多点皮下注射入兔子背部, 1~5 周后, 对兔进行第二次免疫, 使用不完全福氏佐剂, 其余与第一次免疫相同, 第二次免疫后, 2~5 周进行下一次免疫, 并且第三次、第四次免疫后, 5~7 天抽取 0.1~0.5mL 耳血, 检测抗体产生的情况, 第五次免疫后, 5~15 天处死兔子, 取全血, 将血液在冰箱中放置过夜, 吸取上层清液, 分装, 于低温冰箱中储存, 即得兔抗无色孔雀石绿多克隆抗体;

### (4) 建立测定无色孔雀石绿含量的酶联免疫吸附分析方法

对所得抗体性能进行表征, 在最优试验条件下, 建立测定无色孔雀石绿的 ELISA;

本发明的优点:

1. 制备出抗无色孔雀石绿多克隆抗体, 且所制备出的抗体与孔雀石绿的交叉反应率为 95.25%, 以此抗体为基础建立了测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法。
2. 灵敏度高, 与已报道的最灵敏的 ELISA 结果相近。
3. 样品处理简单、测试量大、测试费用低。
4. 对样品的测定, ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

## 四、附图说明

图 1. 无色孔雀石绿(LMG)、牛血清白蛋白(BSA)和无色孔雀石绿-牛血清白蛋白(LMG-BSA)交联物的紫外-可见光谱图

LMG 和 BSA 分别在 260 nm 和 280 nm 处有特征吸收峰, LMG-BSA 在 367nm 出现一峰, 为 LMG 与 BSA 交联所形成的更大的共轭体系的特征峰, 表明无色孔雀石绿已成功与蛋白交联。

无色孔雀石绿(LMG)、卵清蛋白(OVA)和无色孔雀石绿-卵清蛋白(LMG-OVA) 交联物的紫外-可见光谱图与图 1 相似

图2. ELISA测定无色孔雀石绿的平均标准曲线 (n=9)。

无色孔雀石绿标准溶液浓度范围为0.1~100 ng/mL, 灵敏度 $IC_{50}$ 值在0.9-2.6ng/mL, 最低检出线(S/N=3)为0.02-0.10 ng/mL。包被抗原 LMG-OVA, 1:9,000 (即110 ng/well); 抗体, 1:3,000; 羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶(GaRIgG-HRP), 1:5,000;

图 3.ELISA 和 HPLC 对 7 个加标样品中无色孔雀石绿的检测结果的相关曲线

以 HPLC 为横坐标, ELISA 为纵坐标作图, 得相关曲线, 回归方程为  $Y=1.0305X-0.7307$ , 相关系数为 0.975,  $n=7$ , 说明二者的相关性很好

## 五、具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行具体的描述, 有必要在此指出的是本实施只用于对发明进行进一步说明, 但不能理解为对本发明保护范围的限制, 该领域的技术熟练人员可以根据上述发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

实施例:

### 1. 无色孔雀石绿衍生物的制备

取5.5~7.5g 对硝基苯甲醛溶于14~18g N,N-二甲基苯胺中, 加入4.8~6.8g  $ZnCl_2$ , 于温度80~100℃搅拌反应直至绿色溶液形成固体, 冷却至室温, 固体溶于丙酮, 同时过滤除去 $ZnCl_2$ 颗粒, 粗产品过柱纯化、干燥, 得硝基无色孔雀石绿黄色粉末, 取0.17~0.27g 硝基无色孔雀石绿溶于6~10mL甲醇中, 以5%钨碳为催化剂, 加入反应釜中, 通入氢气, 于温度100~120℃反应1~5小时, 过滤反应物, 收集滤液, 用旋转蒸发仪旋干溶液, 粗产品用体积比为95:5的甲醇:苯混合液重结晶, 得到氨基无色孔雀石绿白色粉末;

### 2. 免疫原和包被抗原的制备

取 30~40mg 纯化的氨基无色孔雀石绿溶于 0.6mL 水中, 缓慢滴加浓度为 15mg/mL 的  $NaNO_2$  溶液 0.33mL, 用盐酸调节混合液的 pH 值至 1.5, 在暗处、温度 4℃反应过夜, 取少量上述溶液, 滴加到 N, N-二甲基苯胺中, 溶液颜色由无色变为淡黄色, 表明重氮化反应完成; 将 10.5 mg 氨基磺酸胺溶于 0.21 mL 纯水中, 缓慢滴加到重氮盐溶液中, 终止反应;

称取牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)各 100 mg, 分别溶于 1.5mL 浓度为 0.01mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲溶液中; 将重氮化溶液缓慢滴加至上述蛋白质溶液中, 用 NaOH 溶液调节 pH 值为 7.5, 搅拌下于温度 4℃反应过夜; 将混合物离心, 取上清,

装入透析袋中,透析数天,获得两种无色孔雀石绿-蛋白质溶液,冷冻干燥,在温度-20℃保存待用;无色孔雀石绿-牛血清白蛋白(LMG-BSA)和无色孔雀石绿-卵清蛋白(LMG-OVA)分别用作免疫原及包被抗原;

LMG、BSA 和 LMG-BSA 交联物的紫外-可见光谱图如图 1 所示, LMG、OVA 和 LMG-OVA 交联物的紫外-可见光谱图与图 1 相似。

### 3. 无色孔雀石绿多克隆抗体的制备

用免疫原免疫两只新西兰大白兔,将 1~4 mg 免疫原溶于 0.5~4mL 的生理盐水中,加入 0.5~3mL 完全福氏佐剂,混合成油包水的乳浊液,每只兔子每次吸取 0.5~2.0mL 乳浊液,多点皮下注射入兔子背部,1~5 周后,对兔进行第二次免疫,使用不完全福氏佐剂,其余与第一次免疫相同,第二次免疫后,2~5 周进行下一次免疫,并且第三次、第四次免疫后,5~7 天抽取 0.1~0.5mL 耳血,检测抗体产生的情况,第五次免疫后,5~15 天处死兔子,取全血,将血液在冰箱中放置过夜,吸取上层清液,分装,于低温冰箱中储存,即得兔抗无色孔雀石绿多克隆抗体;

### 4. 优化实验条件,建立测定无色孔雀石绿的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)

对所得抗体性能进行表征,在最优试验条件下,建立测定无色孔雀石绿的 ELISA;

#### (1) 溶液配制

##### (a) 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液

称取 2.606g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 3.434g  $\text{NaHCO}_3$ , 用 800mL 超纯水混匀溶解后,调节 pH 值,加水至 1 L,配成 0.05 mol/L, pH=9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;

##### (b) 磷酸缓冲液(储备液, PBS×10)

称取 21.961g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 6.031g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 87.666g  $\text{NaCl}$ , 加 800 mL 超纯水混合,加热溶解;用 1 mol/L 的  $\text{NaOH}$  调节 pH=7.5, 加超纯水至 1 L, 配成含 0.15 mol/L  $\text{NaCl}$ , pH=7.5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(储备液);

##### (c) 酪蛋白溶液

称取酪蛋白加热溶解于 0.01 mol/L 的 PBS 中,配成 1.0%酪蛋白溶液;

##### (d) 磷酸缓冲液-吐温储备液(含 1%Tween20 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, PBST×10, pH=7.5);

##### (e) 无色孔雀石绿标准溶液的配制(1 mg/mL)

2mg LMG 溶解于 2 mL 甲醇;

##### (f) LMG-OVA 和 LMG-BSA 交联物的配制(1 mg/mL)

用微量天平称 LMG-OV 或 LMG-BSA 交联物 2 mg，加入 2 mL 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液溶解；

(g) 底物溶液 (20 mL 纯水；1 mL 醋酸钠缓冲液；200  $\mu$ L 四甲基联苯胺 (TMB) (1%)；20  $\mu$ L 过氧化氢 (5%) )；

(1) 醋酸钠缓冲液

称取 3.450g  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，用 100 mL 超纯水溶解，再用 1 mol/L 柠檬酸 (21.031g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot \text{H}_2\text{O}$  溶解于 100 mL 水中) 调节 pH=5.8 后，再用水定容到 250 mL，配成 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液；

(2) TMB: 称取 0.0717g TMB，用 7.17 mL 二甲基亚砷溶解，混匀，配成 1%，w/v；

(3) 过氧化氢: 取 20  $\mu$ L 30% 的过氧化氢加入 100  $\mu$ L 超纯水中，混匀，配成 5%；

(h)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液: 移取 25 mL 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ，溶解于 475 mL 的超纯水中，配成 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。

(2) 主要仪器

洗板机: A5082, Tecan, Austria; 酶标仪: A2082, Tecan, Austria; 高效液相色谱仪 Agilent, 带荧光检测器

(3) 间接竞争 ELISA 步骤

(a) 用包被抗原包板，每孔 200  $\mu$ L，4 $^\circ$ C 过夜；

(b) PBST 缓冲液 (PBST 储备液 1: 10 稀释)，每孔 280  $\mu$ L，洗涤三次；

(c) 加入酪蛋白溶液封阻，每孔 280  $\mu$ L，室温放置 1 小时；

(d) PBST 缓冲液洗板三次；

(e) 依次每孔加入 100  $\mu$ L 的标准溶液和 100  $\mu$ L 的一定稀释度的多克隆抗体，室温放置 1 小时；

(f) PBST 缓冲液洗板三次；

(g) 加入酶标二抗 (羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶, GaRIgG-HRP)，每孔 200  $\mu$ L，室温放置 1 小时；

(h) PBST 缓冲液洗板三次；

(i) 加入底物液显色，每孔 200  $\mu$ L，振摇 15~20 分钟；

(j) 加入 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液，每孔 80  $\mu$ L，终止反应；

(k) 用酶标仪测定吸光度值，做出标准曲线，进行结果分析与讨论。

(4) ELISA 实验条件的优化

本发明对包被抗原的浓度、抗体的稀释度、酶标二抗的稀释度，样品稀释液等作了优化，优化结果为：包被抗原 110ng/well，抗体的稀释度为 1: 3000，酶标二抗的稀释度为 1: 5000，实验温度在室温下进行。

#### (5) ELISA 的灵敏度及稳定性

无色孔雀石绿标准溶液的浓度为：0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 ng/mL，由无色孔雀石绿的储备液 1.0 mg/mL 经过 0.01% 酪蛋白溶液稀释而得。以无色孔雀石绿浓度的对数为横坐标，以相对信号  $B/B_0 \times 100\%$  为纵坐标做标准曲线 ( $B_0$ : 无色孔雀石绿浓度为 0 ng/mL 所对应的吸光度值; B: 其他各浓度对应的吸光度值)。图 2 为 ELISA 测定无色孔雀石绿的平均标准曲线( $n=9$ )， $IC_{50}$  值为 0.9~2.6 ng/mL;

#### (6) ELISA 的特异性

ELISA 特异性可用交叉反应率来表示。交叉反应率 (CR%) = (无色孔雀石绿  $IC_{50}$ /测试物质的  $IC_{50}$ )  $\times 100\%$ 。交叉反应率越小，ELISA 的特异性越高。

本发明选择 3 种结构相近的三苯基甲烷类工业染料孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫及其它 8 种常见抗生素进行交叉反应实验，交叉反应物及交叉反应实验如表 1 所示。所制得的抗无色孔雀石绿抗体与孔雀石绿，结晶紫，无色结晶紫的交叉反应率分别为 95.25%，29.07%和 212.38%，与其他 8 种常见抗生素药物几乎没有交叉反应。

无色结晶紫与无色孔雀石绿的结构极为相似，故抗体与无色结晶紫的交叉反应率最大(212.38%)，但与文献报道值相近(200%)。

所制备出的抗体与孔雀石绿的交叉反应率分别为 95.25%，因此以此抗体为基础建立的酶联免疫吸附分析方法可以测定孔雀石绿和无色孔雀石绿的总量。

### 5. ELISA 对加标样品中无色孔雀石绿含量的测定

选择了4种样品：自来水，食用鱼养殖水样，鱼样I，鱼样II进行加标实验。不同加标样品萃取方法不同，(1)水样：自来水不需任何预处理，食用鱼养殖水样用0.45  $\mu$ m的滤膜过滤。取水样1ml，加入LMG储备液，使水样LMG加标浓度分别为1, 2, 5 ng/ml; (2): 鱼样：称取1.0g鱼样品于10ml离心管中，加入LMG储备液，使鱼样LMG中加标浓度为20, 50, 100  $\mu$ g/g，样品室温下放置30min，加入3ml乙腈，涡旋混匀5min，超声波振荡提取15min，4000r/min 离心10min，上清液转至25ml梨型瓶中，重复上述步骤，合并两次萃取液，将收集液在35℃下减压旋转蒸发至体积约2~3mL，移取样品溶液加至已活化的中性氧化铝柱上，4mL乙腈洗涤中性氧化铝柱，收集全部流出液，45℃旋转蒸

发至干，用1.00mL 0.01%酪蛋白溶液溶解后待测。无色孔雀石绿加标回收率在76.2–95.0%之间，相对标准偏差为2.7–13.1%，说明方法准确性和精密度都比较好；

#### 6. ELISA 和 HPLC 的比较

无色孔雀石绿的 HPLC 条件为：Agilent 高效液相色谱仪，配备荧光检测器，柱温 35℃，流动相为体积比 80:20 的乙腈:0.125 mol/L HAc/NH<sub>4</sub>Ac, pH 4.5 的混合液，流速为 1.3 mL/min，进样 50 μL，荧光激发波长 265nm，荧光发射波长 360nm，无色孔雀石绿标准溶液进样量分别为 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 ng，样品萃取液用 0.45 μm 的滤膜过滤后直接测定；

所建立的 ELISA 的可靠性用 HPLC 进行进一步验证，7 种加标样品，即食用鱼养殖水样，加标浓度 5 μg/L；鱼样 I，加标浓度 20 μg/kg, 50 μg/kg, 100 μg/kg；鱼样 II，加标浓度 20 μg/kg, 50 μg/kg, 100 μg/kg；加标样品用上述方法处理并用 ELISA 和 HPLC 测定，测定结果以 HPLC 为横坐标，ELISA 为纵坐标作图得两者的相关曲线，回归方程为  $Y=1.0305X - 0.7307$ ，相关系数为 0.975, n=7，说明二者的相关性很好。

#### 7. ELISA 测定真实样品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总含量

以自来水，两个食用鱼养殖水样，1 个观赏鱼养殖水样及从农贸市场中购得两种鱼样，用所建立的 ELISA 对上述 6 个样品进行测定，测定结果如表 3 所示。结果表明，在观赏鱼水样及鱼样 I 中测得孔雀石绿及无色孔雀石绿残留总量分别为 1.84 ug/L, 1.38 ug/kg，其它样品中未测出。

表 1. 交叉反应实验结果

Compound	IC50(ng/mL)	Cross-reactivity (%)
Leucomalachite green	2.23 <sup>a</sup>	100
Malachite green	2.34	95.25
Leucocrystal violet	1.05	212.38
Crystal violet	7.67	29.07
Pararosaniline	1394	0.16
Methyl blue	>10000	<0.01
Stilboestrol	>10000	<0.01
Olaquinox	>10000	<0.01
Clenbuterol	>10000	<0.01
Chloramphenicol	>10000	<0.01
Bright blue	>10000	<0.01
Erythromycin	>10000	<0.01

<sup>a</sup> 在交叉反应实验中，测得的无色孔雀石绿的 IC<sub>50</sub> : 2.23 ng/ mL

表 2 ELISA 测定真实样品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量

样品种类	检出浓度 (ng/ml 或 ng/g)	相对标准偏差 (%)n=3
自来水	未检出	-
食用鱼养殖水样 I	未检出	-
食用鱼养殖水样 II	未检出	-
观赏鱼水样	1.84±0.26	14.1
鱼样 I	1.38±0.06	4.3
鱼样 II	未检出	-

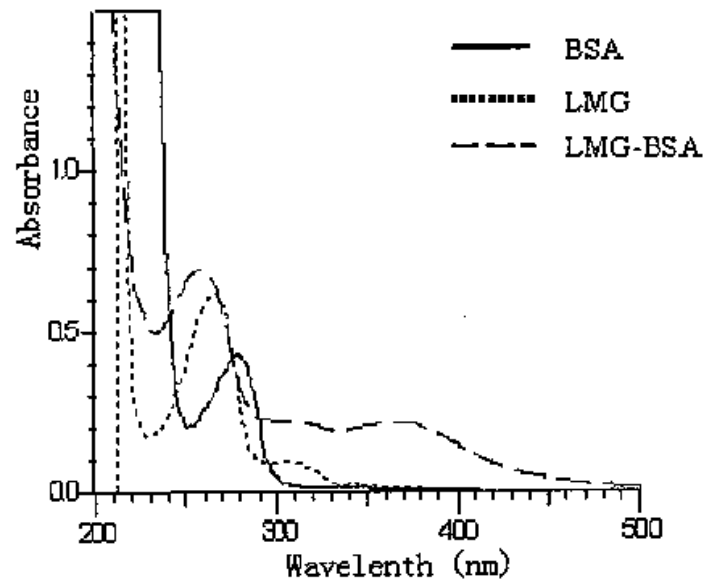


图 1

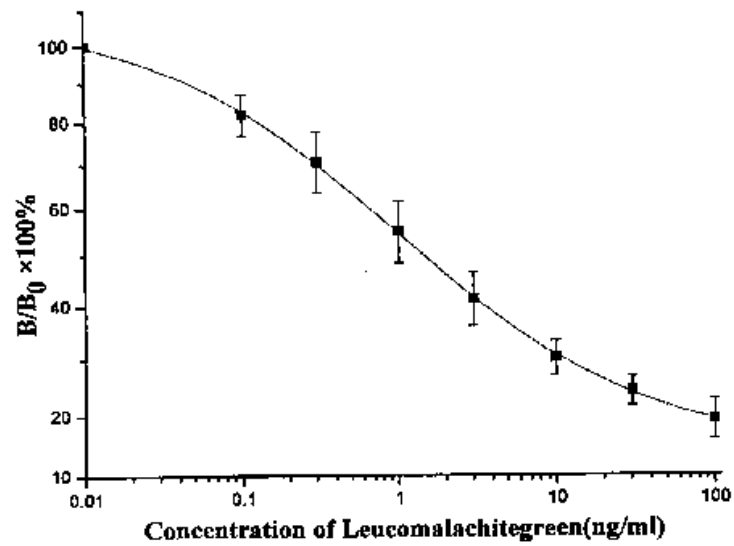


图 2

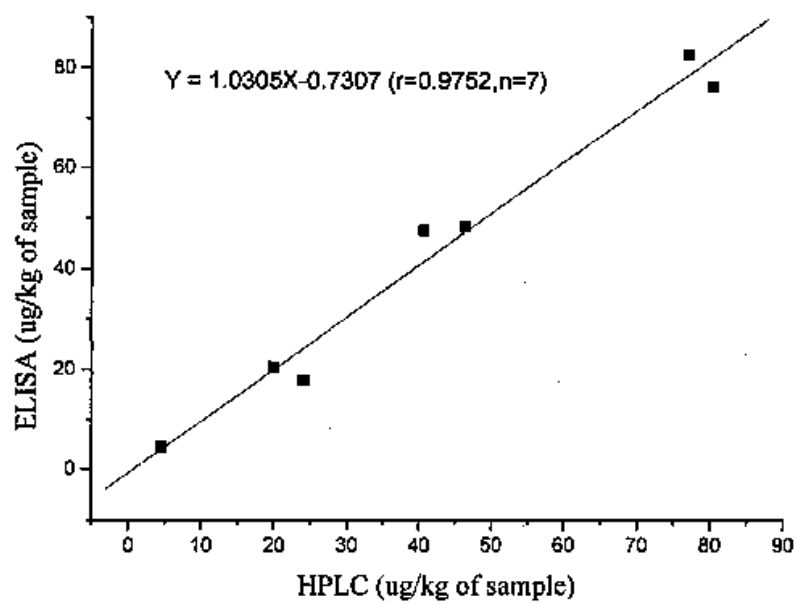


图 3

专利名称(译)	测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101482559A</a>	公开(公告)日	2009-07-15
申请号	CN200910058317.X	申请日	2009-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	四川大学		
申请(专利权)人(译)	四川大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川大学		
[标]发明人	邓安平 贺莉 邢玮玮 杨红 王玉珍 李大伟		
发明人	邓安平 贺莉 邢玮玮 杨红 王玉珍 李大伟		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/74 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**摘要(译)**  
 本发明公开了测定水样及水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)，其特点是合成氨基无色孔雀石绿的修饰物并将其与蛋白联接，制得免疫原及包被抗原，通过免疫动物获得免抗无色孔雀石绿的多克隆抗体，ELISA标准曲线的浓度范围为0.1~100ng/mL，IC50为0.9-2.6ng/mL，加标回收率为76.2-95.0%，ELISA与HPLC的相关系数为0.975，n=7；由于所制抗体与孔雀石绿的交叉反应率分别为95.25%，故ELISA可以用于测定孔雀石绿和无色孔雀石绿的总量，而无需将任何氧化步骤。

Compound	IC50(ng/mL)	Cross-reactivity (%)
Leucomalachite green	2.23 <sup>a</sup>	100
Malachite green	2.34	95.25
Leucocrystal violet	1.05	212.38
Crystal violet	7.67	29.07
Pararosanine	1394	0.16
Methyl blue	>10000	<0.01
Stilboestrol	>10000	<0.01
Olaquinox	>10000	<0.01
Clenbuterol	>10000	<0.01
Chloramphenicol	>10000	<0.01
Bright blue	>10000	<0.01
Erythromycin	>10000	<0.01