

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102879572 A

(43) 申请公布日 2013.01.16

(21) 申请号 201210363374.0

(22) 申请日 2012.09.26

(71) 申请人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市工业园区仁爱路
199 号

(72) 发明人 邓安平 曹碧云 杨红 宋娟

(74) 专利代理机构 北京瑞思知识产权代理事务
所(普通合伙) 11341

代理人 李涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测食品中三聚氰胺含量的 ELISA 方法

(57) 摘要

本发明公开了检测食品中三聚氰胺含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)。其特点是合成了三种不同的三聚氰胺半抗原衍生物,并将衍生物与载体蛋白质交联,合成三种免疫原和包被抗原,运用杂交瘤单抗制备技术制得单克隆抗体。四种样品即纯牛奶、奶粉、鸡饲料和猪饲料中加入不同量的三聚氰胺,并用 ELISA 直接测定,加标回收率为 72.6 - 133.3%,相对标准偏差为 0.8 - 18.9%;加标样品同时用 HPLC 和 ELISA 检测并比较测定结果,回归曲线为 $Y=1.5589x-1.4004$,线性相关系数为 0.9902,表明两种方法有较好的相关性。

1. 一种检测食品中三聚氰胺含量的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

步骤一:三聚氰胺修饰物的制备;

步骤二:免疫原和包被抗原的制备;

步骤三:三聚氰胺单克隆抗体的制备;

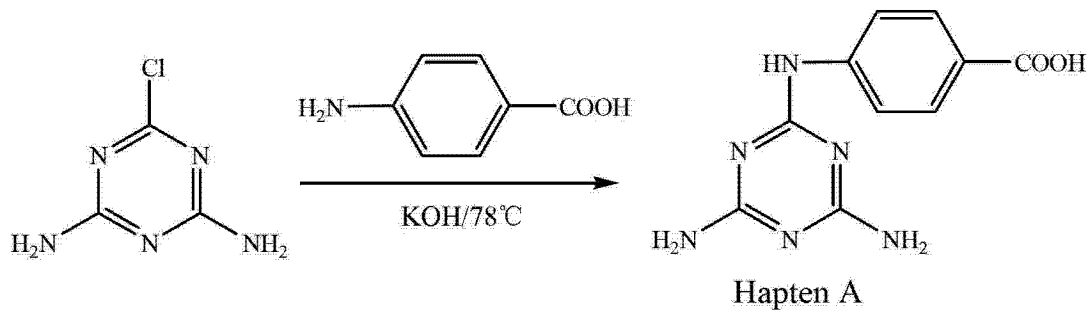
步骤四:建立测定三聚氰胺的酶联免疫吸附分析方法;

步骤五:ELISA 对加标样品中三聚氰胺含量的测定。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述步骤一包括:

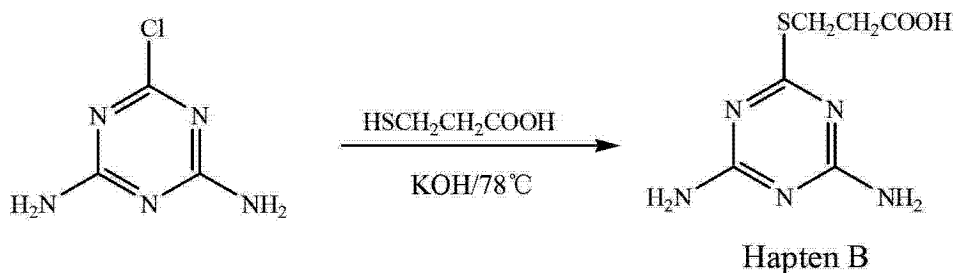
1) 三聚氰胺半抗原 A (Hapten A) 的合成

称取 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪(CAAT)加入反应瓶,用无水甲醇溶解,再加入对氨基苯甲酸溶于氢氧化钾的无水甲醇中;反应回流 5~12 小时,直到 CAAT 反应完全;反应混合物过滤,并用无水乙醇和蒸馏水各洗三次,得到白色粗产物;再用甲醇/二氯甲烷按一定的溶剂比过柱,得到纯品;其反应式如下:



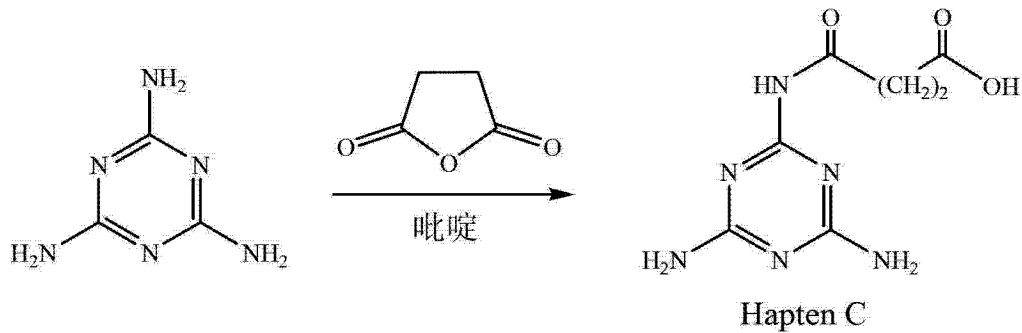
2) 三聚氰胺半抗原 B (Hapten B) 的合成

称取 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪(CAAT)加入反应瓶,用无水乙醇溶解,再加入 3-巯基丙酸溶于氢氧化钾的无水甲醇中;反应回流 5~12 小时,直到 CAAT 反应完全;反应混合物过滤,并用无水乙醇和蒸馏水各洗三次,得到白色粗产物。再用甲醇/二氯甲烷按一定的溶剂比过柱,得到纯品;其反应式如下:



3) 三聚氰胺半抗原 C (Hapten C) 的合成

称取三聚氰胺溶于吡啶溶液中,加入丁二酸酐,室温搅拌过夜,吹干吡啶,得到白色产物;再用甲醇/二氯甲烷按一定的溶剂比过柱,得到纯品;其反应式如下:



4) Hapten A、Hapten B 和 Hapten C 的表征：

¹H-NMR 谱：用 Bruker AMX-400 核磁共振仪测试 Hapten A、Hapten B 和 Hapten C 的核磁谱，以氘代二甲亚砜溶液为溶剂，内标为 TMS；

Hapten A：¹H NMR (DMSO-d₆, δ vs TMS) : 2.09 (s, 2H), 6.09 (s, 4H), 7.77-7.91 (t, 4H), 9.2 (s, 1H).

Hapten B：¹H NMR (DMSO-d₆, δ vs TMS) : 2.64 (t, 2H), 3.14 (t, 2H), 6.9 (br, 4H).

Hapten C：¹H NMR (DMSO-d₆, δ vs TMS) : 2.21, 3.20 (t, 2H), 6.49 (s, 4H); 9.67 (s, 1H)。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述步骤二包括：

分别称取 Hapten A 或 Hapten B，或 Hapten C 和二环己基碳二亚胺，N-羟基琥珀酰亚胺，一同溶解于二甲基甲酰胺中，室温下搅拌过夜，将混合液离心 5~20 分钟，取上层清液，缓慢加入到 0.01~0.02% 的牛血清白蛋白即 BSA 和 0.01~0.02% 卵清白蛋白即 OVA，搅拌 1~10 小时，离心分离，取上层清液，透析数天，溶液冷冻干燥，置冰箱中存放，其中，Hapten A-BSA、Hapten B-BSA 和 Hapten C-BSA 为免疫原；Hapten A-OVA、Hapten B-OVA 和 Hapten C-OVA 为包被抗原，即分别是包被抗原 A、包被抗原 B 和包被抗原 C。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述步骤四包括：

- (1) 溶液配制；
- (2) 间接竞争 ELISA 步骤；
- (3) ELISA 的优化条件和灵敏度；
- (4) ELISA 的标准曲线；
- (5) ELISA 的特异性。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中，所述(1)溶液配制包括：

- (a). 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液；
- (b). 磷酸缓冲液；
- (c). 酪蛋白溶液；
- (d). 磷酸缓冲液 - 吐温储备液；
- (e). 底物溶液；
- (f). H₂SO₄ 溶液；
- (g) RPMI-1640 培养液。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中，所述(2)间接竞争 ELISA 步骤包括：

- (a). 加入包被抗原于酶标板中，每孔 200 μL，冰箱 4℃ 过夜；
- (b). 用 PBST 缓冲液，PBST 储备液，1:10 稀释，350 μL/孔，洗板三次；
- (c). 加入酪蛋白进行封阻，每孔 300 μL，室温保温保湿放置 1 小时；

- (d). 用 PBST 缓冲液洗板三次；
- (e). 在酶标板的每孔中依次分别加入 100 μ L 标准溶液和 100 μ L 一定稀释度的单克隆抗体, 室温保温保湿放置 1 小时；
- (f). 用 PBST 缓冲液洗板三次；
- (g). 加入酶标二抗(羊抗鼠 IgG- 辣根过氧化物酶, GaMIgG-HRP), 每孔 200 μ L, 室温保温保湿放置 1 小时；
- (h). 用 PBST 缓冲液洗板三次；
- (i). 加入底物溶液, 每孔 200 μ L, 室温保温保湿避光反应, 在微量振荡器上振摇约 15~25 分钟；
- (j). 加入 5% H_2SO_4 溶液, 每孔 50~100 μ L, 终止酶反应；
- (k). 用酶标仪测定吸光度, 作出标准曲线, 进行结果分析与讨论。
7. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中, 所述 (3)ELISA 的优化条件和灵敏度：
包括：抗原浓度为 100~2000ng/mL；抗体稀释度为 1:20000~1:50000；羊抗兔辣根过氧化物酶稀释度为 1:5000~1:10000；封阻液为 1%casein；孵育时间为 1h；显色时间为 15min。
8. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中, 所述 (4)ELISA 的标准曲线包括：
分别选用包被抗原 A、包被抗原 B 和包被抗原 C 作为包被抗原, 考察了 ELISA 的灵敏度；
分别以目标物浓度的对数为横坐标, 以相对信号 $B/B_0 \times 100\%$ 为纵坐标作出标准曲线；
 B_0 : 标准浓度为 0ng/mL 所对应的吸光度； B : 其它标准浓度所对应的吸光度。
9. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中, 所述 (5)ELISA 的特异性包括：
ELISA 特异性可用交叉反应率的大小来表示；
交叉反应率 $CR\% = \text{三聚氰胺的 } IC_{50} / \text{测试物质的 } IC_{50} \times 100\%$ ；
交叉反应率越小, ELISA 的特异性越高。
10. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述步骤五包括：
选择四种样品：纯牛奶、奶粉、猪饲料和鸡饲料进行加标反应实验；同一样品取两份，一份加入适量的三聚氰胺溶液，一份作为空白样品；纯牛奶样品稀释后直接用 ELISA 测定，奶粉样品用 pH=7.4 磷酸缓冲液溶解后稀释直接用 ELISA 测定，动物饲料样品加入三氯乙酸溶液，超声提取 20min 后, 4 $^{\circ}C$ 下 10000g/10min 离心, 上清稀释后用 ELISA 直接测定。

一种检测食品中三聚氰胺含量的 ELISA 方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测食品中三聚氰胺含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。

背景技术

[0002] 三聚氰胺 (melamine), 化学名称为 2, 4, 6-三氨基-1, 3, 5-三嗪, 别名蜜胺、氰尿酸胺、三聚酰胺等, 是一种重要的氮杂环有机化工原料, 用途十分广泛。三聚氰胺最主要的用途是作为生产三聚氰胺甲醛树脂 (MF) 的原料, 被广泛运用于木材、塑料、造纸、纺织、皮革等行业; 三聚氰胺还可以作阻燃剂、减水剂、甲醛清洁剂等。由于三聚氰胺分子中含有大量氮元素, 而常规的“凯氏定氮法”测饲料或食品中蛋白质含量时不能排除这类“伪蛋白氮”的干扰, 因而一些不法分子为降低成本在小麦粉、大米粉、饲料、奶粉等植物性或动物性高蛋白类食品中添加这种非食品性化工原料, 以提高其产品中的蛋白质含量。

[0003] 2007 年, 美国爆发宠物食品受污染事件。事后调查表明: 掺杂了 $\leq 6.6\%$ 三聚氰胺的小麦蛋白粉是宠物食品导致中毒的原因。2008 年 9 月, 中国爆发三鹿婴幼儿奶粉受污染事件, 导致食用了受污染奶粉的婴幼儿产生肾结石病症, 其原因也是奶粉中含有三聚氰胺。根据美国食物及药物管理局 (FDA) 的标准, 三聚氰胺每日可容忍摄入量为每日 0.63 毫克/公斤体重。FDA 指出, 除婴儿食品外, 普通食物中含有三聚氰胺和其类似物质限量值为 2.5mg/kg, 婴儿食品中则不应该含有任何剂量的三聚氰胺。欧盟、澳大利亚和新西兰等许多国家和地区也普遍采用 2.5mg/kg 为最低检出值。2008 年 10 月 7 日, 我国卫生部、工业和信息化部、农业部、国家工商管理总局、国家质检总局五部门联合制定了乳品中三聚氰胺管理限量值, 婴幼儿配方乳粉中三聚氰胺的限量值为 1mg/kg; 含乳 15% 以上的其他食品中三聚氰胺的限量值为 2.5mg/kg。现有的文献报道的三聚氰胺的检测方法主要有重量法 (包括苦味酸法及升华法)、电位滴定法、液相色谱检测法、液相色谱-质谱联用检测法、气相色谱-质谱检测法以及试剂盒检测法 (ELISA) 等。前三种方法对仪器的要求较低, 但前处理方法和检测限不能达到目前对食品中三聚氰胺的检测要求。高效液相色谱法简便、快速, 适用于食品中含量较高的三聚氰胺的定量工作, 若同时利用二极管阵列检测器可作初步定性, 成本低于质谱法, 易于推广。而液质联用法不需要进行衍生化, 简化了样品处理的步骤, 与气相色谱质谱联用法和液相色谱法相比, 具有高灵敏度和高选择性的特点, 更适合于食品中三聚氰胺的快速筛查和定量分析。我国已有 GB/T22388-2008 和 GB/T22400-2008 两个标准, 包含了 HPLC 法和 HPLC-MS 法, 并把 HPLC 法作为快速筛分原料乳中三聚氰胺的手段。HPLC-MS 也是美国 FDA 用于检测和定量食品中三聚氰胺的基本分析方法, 其检测限可达 ppb 级。

[0004] 酶联免疫吸附法则比较简单快速, 可以节约较多的资源。现在市场上已有三聚氰胺的试剂盒出售和相关文献的报道。国内已有申请 ELISA 测定食品中三聚氰胺含量的专利, 如专利号为 CN101206223A (中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所), 专利号为 CN101407580A (吉林大学), 专利号为 CN101429243A (浙江大学)。但是所报道的方法的

检测灵敏度均不够高,不能很好的满足现实生活中对三聚氰胺检测的需要。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种检测食品中三聚氰胺含量的酶联免疫吸附分析方法,其特点是基于抗原与抗体之间特异性反应而建立的分析方法。

[0006] 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。检测食品中三聚氰胺含量的酶联免疫吸附分析方法:

[0007] 三聚氰胺完全抗原的制备及检测食品中三聚氰胺含量的 ELISA 方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤一:三聚氰胺修饰物的制备;

[0009] 步骤二:免疫原和包被抗原的制备;

[0010] 步骤三:三聚氰胺单克隆抗体的制备;

[0011] 步骤四:建立测定三聚氰胺的酶联免疫吸附分析方法;

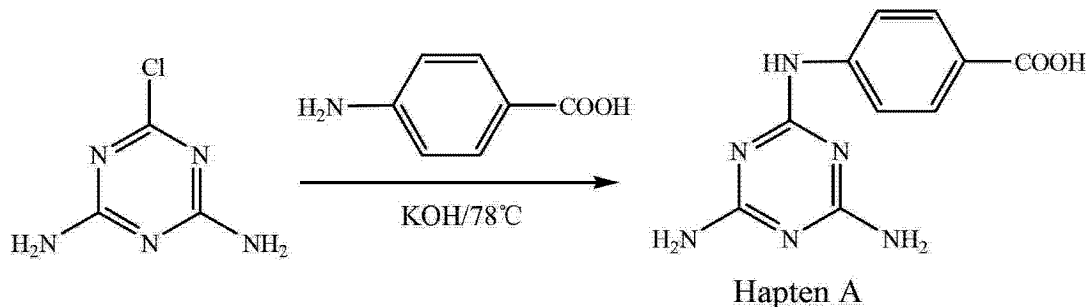
[0012] 步骤五:ELISA 对加标样品中三聚氰胺含量的测定。

[0013] 其中,所述步骤一包括:

[0014] 1) 三聚氰胺半抗原 A (Hapten A) 的合成

[0015] 称取 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪(CAAT)加入反应瓶,用无水甲醇溶解,再加入对氨基苯甲酸溶于氢氧化钾的无水甲醇中。反应回流 5~12 小时,直到 CAAT 反应完全。反应混合物过滤,并用无水乙醇和蒸馏水各洗三次,得到白色粗产物。再用甲醇/二氯甲烷按一定的溶剂比过柱,得到纯品。其反应式如下:

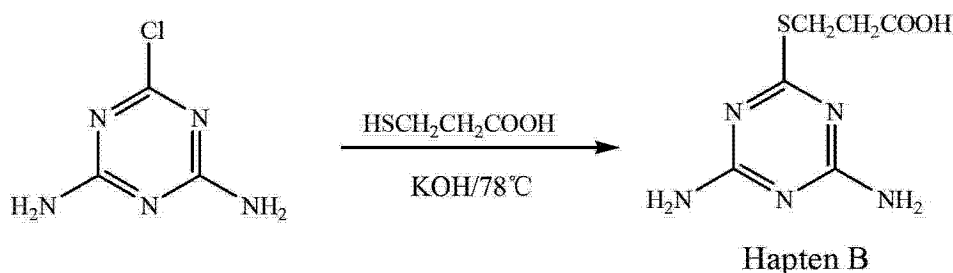
[0016]



[0017] 2) 三聚氰胺半抗原 B (Hapten B) 的合成

[0018] 称取 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪(CAAT)加入反应瓶,用无水乙醇溶解,再加入 3-巯基丙酸溶于氢氧化钾的无水甲醇中。反应回流 5~12 小时,直到 CAAT 反应完全。反应混合物过滤,并用无水乙醇和蒸馏水各洗三次,得到白色粗产物。再用甲醇/二氯甲烷按一定的溶剂比过柱,得到纯品。其反应式如下:

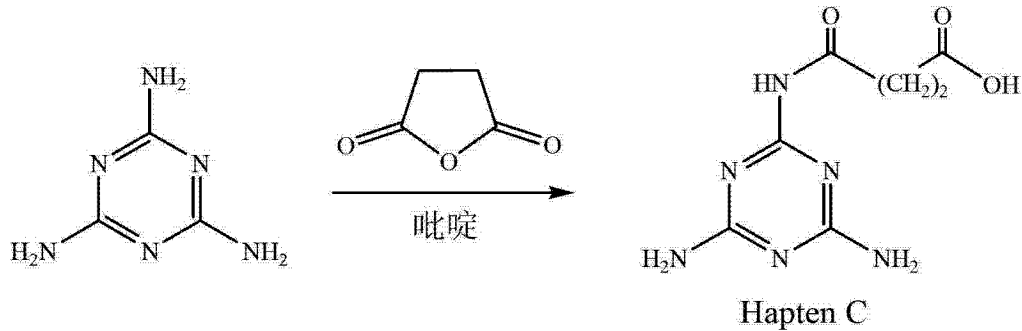
[0019]



[0020] 3) 三聚氰胺半抗原 C (Hapten C) 的合成

[0021] 称取三聚氰胺溶于吡啶溶液中, 加入丁二酸酐, 室温搅拌过夜, 吹干吡啶, 得到白色产物。再用甲醇 / 二氯甲烷按一定的溶剂比过柱, 得到纯品。其反应式如下:

[0022]



[0023] 4) Hapten A、Hapten B 和 Hapten C 的表征:

[0024] $^1\text{H-NMR}$ 谱: 用 Bruker AMX-400 核磁共振仪测试 Hapten A、Hapten B 和 Hapten C 的核磁谱, 以氘代二甲亚砜溶液为溶剂, 内标为 TMS;

[0025] Hapten A: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ vs TMS): 2.09 (s, 2H), 6.09 (s, 4H), 7.77-7.91 (t, 4H), 9.2 (s, 1H).

[0026] Hapten B: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ vs TMS): 2.64 (t, 2H), 3.14 (t, 2H), 6.9 (br, 4H).

[0027] Hapten C: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ vs TMS): 2.21, 3.20 (t, 2H), 6.49 (s, 4H); 9.67 (s, 1H).

[0028] 其中, 所述步骤二包括:

[0029] 分别称取 Hapten A 或 Hapten B, 或 Hapten C 和二环己基碳二亚胺, N-羟基琥珀酰亚胺, 一同溶解于二甲基甲酰胺中, 室温下搅拌过夜, 将混合液离心 5~20 分钟, 取上层清液, 缓慢加入到 0.01~0.02% 的牛血清白蛋白即 BSA 和 0.01~0.02% 卵清白蛋白即 OVA, 搅拌 1~10 小时, 离心分离, 取上层清液, 透析数天, 溶液冷冻干燥, 置冰箱中存放, 其中, Hapten A-BSA、Hapten B-BSA 和 Hapten C-BSA 为免疫原; Hapten A-OVA、Hapten B-OVA 和 Hapten C-OVA 为包被抗原, 即分别是包被抗原 A、包被抗原 B 和包被抗原 C。

[0030] 其中, 所述步骤四包括:

[0031] (1) 溶液配制;

[0032] (2) 间接竞争 ELISA 步骤;

[0033] (3) ELISA 的优化条件和灵敏度;

[0034] (4) ELISA 的标准曲线;

[0035] (5) ELISA 的特异性。

[0036] 其中, 所述(1) 溶液配制包括:

[0037] (a). 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液;

[0038] (b). 磷酸缓冲液;

[0039] (c). 酪蛋白溶液;

[0040] (d). 磷酸缓冲液 - 吐温储备液;

[0041] (e). 底物溶液;

[0042] (f). H_2SO_4 溶液;

- [0043] (g) RPMI-1640 培养液。
- [0044] 其中,所述(2)间接竞争 ELISA 步骤包括;
- [0045] (a). 加入包被抗原于酶标板中,每孔 200 μ L,冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜;
- [0046] (b). 用 PBST 缓冲液, PBST 储备液, 1:10 稀释, 350 μ L/孔,洗板三次;
- [0047] (c). 加入酪蛋白溶液进行封阻,每孔 300 μ L,室温保温保湿放置 1 小时;
- [0048] (d). 用 PBST 缓冲液洗板三次;
- [0049] (e). 在酶标板的每孔中依次分别加入 100 μ L 标准溶液和 100 μ L 一定稀释度的单克隆抗体,室温保温保湿放置 1 小时;
- [0050] (f). 用 PBST 缓冲液洗板三次;
- [0051] (g). 加入酶标二抗(羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶, GaMIgG-HRP),每孔 200 μ L,室温保温保湿放置 1 小时;
- [0052] (h). 用 PBST 缓冲液洗板三次;
- [0053] (i). 加入底物溶液,每孔 200 μ L,室温保温保湿避光反应,在微量振荡器上振摇约 15~25 分钟;
- [0054] (j). 加入 5% H_2SO_4 溶液,每孔 50~100 μ L,终止酶反应;
- [0055] (k). 用酶标仪测定吸光度,作出标准曲线,进行结果分析与讨论。
- [0056] 其中,所述(3)ELISA 的优化条件和灵敏度包括:抗原浓度为 100~2000ng/mL;抗体稀释度为 1:20000~1:50000;羊抗兔辣根过氧化物酶稀释度为 1:5000~1:10000;封阻液为 1%casein;孵育时间为 1h;显色时间为 15min。
- [0057] 其中,所述(4)ELISA 的标准曲线包括:
- [0058] 分别选用包被抗原 A、包被抗原 B 和包被抗原 C 作为包被抗原,考察了 ELISA 的灵敏度;
- [0059] 分别以目标物浓度的对数为横坐标,以相对信号 $B/B_0 \times 100\%$ 为纵坐标作出标准曲线;
- [0060] B_0 :标准浓度为 0ng/mL 所对应的吸光度; B :其它标准浓度所对应的吸光度。
- [0061] 其中,所述(5)ELISA 的特异性包括:
- [0062] ELISA 特异性可用交叉反应率的大小来表示;交叉反应率 $CR\% = \frac{\text{三聚氰胺的 } IC_{50}}{\text{测试物质的 } IC_{50}} \times 100\%$;交叉反应率越小,ELISA 的特异性越高。
- [0063] 其中,所述步骤五包括:
- [0064] 选择四种样品:纯牛奶、奶粉、猪饲料和鸡饲料进行加标反应实验;同一样品取两份,一份加入适量的三聚氰胺溶液,一份作为空白样品;纯牛奶样品稀释后直接用 ELISA 测定,奶粉样品用 pH=7.4 磷酸缓冲液溶解后稀释直接用 ELISA 测定,动物饲料样品加入三氯乙酸溶液,超声提取 20min 后,4 $^{\circ}$ C 下 10000g/10min 离心,上清稀释后用 ELISA 直接测定。
- [0065] 本发明的优点:
- [0066] 1、成功制备出三种三聚氰胺完全抗原。
- [0067] 2、成功制备出抗三聚氰胺的单克隆抗体,并建立出测定样品中三聚氰胺含量的 ELISA 方法。
- [0068] 3、灵敏度高、特异性强。
- [0069] 4、样品处理简单、测试量大、测试费用低。

[0070] 5、对样品的测定, ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

附图说明

[0071] 图 1. 基于单克隆抗体建立的 ELISA 标准曲线。

[0072] 图 2. ELISA 和 HPLC 对牛奶加标样品中三聚氰胺的检测结果的相关曲线。

具体实施方式

[0073] 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本发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

[0074] 实施例:

[0075] 1. 三聚氰胺修饰物的制备

[0076] 三聚氰胺是小分子化合物, 没有免疫原性, 不能直接免疫动物产生抗体, 必须对三聚氰胺的分子结构进行合理、有效的化学修饰, 使其带有活性基团, 才能与载体蛋白交联, 制得免疫原和包被抗原。本发明制备了三种三聚氰胺修饰物, 即 Hapten A、Hapten B 和 Hapten C:

[0077] 1) 三聚氰胺半抗原 A (Hapten A) 的合成

[0078] 称取 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪(CAAT)3~5mmol 加入反应瓶, 用无水甲醇溶解, 再加入对氨基苯甲酸 5~10mmol 溶于 10~15mmol 氢氧化钾的无水甲醇中。反应回流 5~12 小时, 直到 CAAT 反应完全。反应混合物过滤, 并用无水乙醇和蒸馏水各洗三次, 得到白色粗产物。再用甲醇/二氯甲烷=1:15~1:19 溶剂比过柱, 得到纯品。

[0079] 2) 三聚氰胺半抗原 B (Hapten B) 的合成

[0080] 称取 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪(CAAT)3~5mmol 加入反应瓶, 用无水乙醇溶解, 再加入 3-巯基丙酸 5~10mmol 溶于 10~15mmol 氢氧化钾的无水甲醇中。反应回流 5~12 小时, 直到 CAAT 反应完全。反应混合物过滤, 并用无水乙醇和蒸馏水各洗三次, 得到白色粗产物。再用甲醇/二氯甲烷=1:15~1:19 溶剂比过柱, 得到纯品。

[0081] 3) 三聚氰胺半抗原 C (Hapten C) 的合成

[0082] 称取三聚氰胺 0.3~0.5mmol 溶于吡啶溶液中, 加入 0.3~0.5mmol 丁二酸酐, 室温搅拌过夜, 吹干吡啶, 得到白色产物。再用甲醇/二氯甲烷=1:15~1:19 溶剂比过柱, 得到纯品。

[0083] 4) Hapten A、Hapten B 和 Hapten C 的表征:

[0084] $^1\text{H-NMR}$ 谱: 用 Bruker AMX-400 核磁共振仪测试 Hapten A、Hapten B 和 Hapten C 的核磁谱, 以氘代二甲亚砜溶液为溶剂, 内标为 TMS;

[0085] Hapten A: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ vs TMS): 2.09(s, 2H), 6.09(s, 4H), 7.77-7.91(t, 4H), 9.2(s, 1H).

[0086] Hapten B: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ vs TMS): 2.64(t, 2H), 3.14(t, 2H), 6.9(br, 4H).

[0087] Hapten C: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ vs TMS): 2.21, 3.20(t, 2H), 6.49(s, 4H); 9.67(s, 1H).

[0088] 2. 免疫原和包被抗原的制备

[0089] 分别称取 0.10~0.45mmol 的 Hapten A(或 Hapten B, 或 Hapten C), 二环己基碳二

亚胺 $0.10 \sim 0.80 \text{ mmol}$, N-羟基琥珀酰亚胺 $0.10 \sim 0.80 \text{ mmol}$, 一同溶解于 $100 \sim 600 \mu\text{L}$ 二甲基甲酰胺中, 室温下搅拌过夜, 将混合液离心 $5 \sim 20$ 分钟, 取上层清液, 缓慢加入到 $0.01 \sim 0.02\%$ 的牛血清白蛋白即 BSA 和 $0.01 \sim 0.02\%$ 卵清白蛋白即 OVA, 搅拌 $1 \sim 10$ 小时, 离心分离, 取上层清液, 透析数天, 溶液冷冻干燥, 置冰箱中存放, 其中, Hapten A-BSA、Hapten B-BSA 和 Hapten C-BSA 为免疫原; Hapten A-OVA、Hapten B-OVA 和 Hapten C-OVA 为包被抗原, 即分别是包被抗原 A、包被抗原 B 和包被抗原 C。

[0090] 3. 三聚氰胺单克隆抗体的制备

[0091] 免疫: 将免疫原溶于生理盐水中, 再与等体积的完全福氏佐剂混合, 皮下多点免疫 BALB/C 小鼠, 每只小鼠免疫原剂量在 $50 \sim 100 \mu\text{g}$, 第一次免疫后, 每隔两周再次免疫, 将完全福氏佐剂换成不完全福氏佐剂, 第三次免疫后一周, 尾部取血检测抗血清效价, 最后一次腹腔加强免疫, 不加佐剂。

[0092] 融合: 最后一次对小鼠加强免疫, 三天后取小鼠脾脏, 将脾细胞与骨髓瘤细胞 (SP2/0) 按 $5:1 \sim 10:1$ 的比例混合, 在 50% 聚乙二醇 4000 的作用下融合, 杂交瘤细胞用 HAT 培养液混悬, 加入预先含有饲养细胞的 96 孔培养板, 置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养。

[0093] 筛选: 融合后 2 周左右, 用间接 ELISA 法筛选, 将阴性孔无色或接近无色, 而阳性孔明确显色的细胞用有限稀释法进行亚克隆 2-3 次, 及时进行检测。

[0094] 单克隆抗体的大量生产: 先腹腔注射液体石蜡于 BALB/C 小鼠, 7-10 天后腹腔接种杂交瘤细胞, 观察小鼠腹水情况, 待腹水尽可能多, 濒于死亡之前, 收集腹水。用硫酸铵沉淀法纯化腹水中的单克隆抗体, 纯化抗体与等体积甘油 $1:1$ 混合并置于 -20°C 保存。

[0095] 4. 建立测定三聚氰胺的酶联免疫吸附分析方法 (ELISA)

[0096] 优化实验条件, 对所制得的抗体进行性能表征, 在实验条件优化的基础上, 建立以单克隆抗体为基础的测定食品中三聚氰胺含量的酶联免疫吸附分析方法。

[0097] (1) 溶液配制

[0098] (a). 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液

[0099] 称取 $2.606 \text{ g Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 3.434 g NaHCO_3 , 用 800 mL 超纯水混匀溶解后, 调节 pH 值, 加水至 1 L , 配成 0.05 mol/L , $\text{pH}=9.6$ 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液;

[0100] (b). 磷酸缓冲液 (储备液, $\text{PBS} \times 10$)

[0101] 称取 $21.961 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $6.031 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 87.666 g NaCl , 加 800 mL 超纯水混合, 加热溶解; 用 1 mol/L 的 NaOH 调节 $\text{pH}=7.4$; 加超纯水至 1 L , 配成含 0.15 mol/L NaCl , $\text{pH}=7.4$ 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (储备液);

[0102] (c). 酪蛋白溶液

[0103] 称取酪蛋白加热溶解于 0.01 mol/L 的 PBS 中, 配成 $0.5 \sim 2\%$ 酪蛋白溶液;

[0104] (d). 磷酸缓冲液 - 吐温储备液 (含 $1\% \text{ Tween} 20$ 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, $\text{PBST} \times 10$, $\text{pH}=7.4$)。

[0105] (e). 底物溶液 (20 mL 纯水; 1 mL 醋酸钠缓冲液; $200 \mu\text{L}$ 四甲基联苯胺 (TMB) (1%); $20 \mu\text{L}$ 过氧化氢 (5%))

[0106] ①. 醋酸钠缓冲液: 称取 $3.450 \text{ g CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 用 100 mL 超纯水溶解, 再用 1 mol/L 柠檬酸 (称取 $21.031 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶解于 100 mL 水中) 调节 $\text{pH}=5.8$ 后, 再加水到 250 mL 容量瓶中, 配成 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液;

- [0107] ②. TMB: 称取 0.0717g TMB, 用 7.17mL 二甲基亚砷溶解, 混匀, 配成 1%, v/v ;
- [0108] ③. 过氧化氢: 取 20 μ L 30% 的过氧化氢加入 100 μ L 超纯水中, 混匀, 配成 5% ;
- [0109] (f). H_2SO_4 溶液: 移取 25mL 浓 H_2SO_4 , 溶解于 475mL 的超纯水中, 配成 5% H_2SO_4 溶液 ;
- [0110] (g) RPMI-1640 培养液: RPMI-1640 固体粉末 10.4g 溶于 800ml 超纯水中, 加入 HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸) 4.67g, 并按终体积 1L 计算加入 200mmol/L L-谷氨酸、100mmol/L 2-巯基乙醇及 1mmol/L (即 0.1g/L) 丙酮酸钠, 再加入 10 万 IU 青霉素以及 10 万 IU 链霉素, 补加超纯水使终体积达 1000ml, 磁力搅拌 3~4 小时, 充分溶解后再加入 $NaHCO_3$ 约 2g 调节培养液 pH 至 7.2~7.4, 0.22 μ m 滤器过滤除菌, 无菌分装, -20 $^{\circ}$ C 密封保存。

[0111] (2) 主要仪器

[0112] 洗板机: A5082, Tecan, Austria ; 酶标仪: A2082, Tecan, Austria ; 高效液相色谱仪: Alltech-1001

[0113] (3) 间接竞争 ELISA 步骤

- [0114] (a). 加入一定浓度的包被抗原于酶标板中, 每孔 200 μ L, 冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜 ;
- [0115] (b). 用 PBST 缓冲液 (PBST 储备液, 1:10 稀释, 350 μ L/孔) 洗板三次 ;
- [0116] (c). 加入酪蛋白进行封阻, 每孔 300 μ L, 室温保温保湿放置 1 小时 ;
- [0117] (d). 用 PBST 缓冲液洗板三次 ;
- [0118] (e). 在酶标板的每孔中依次分别加入 100 μ L 标准溶液和 100 μ L 一定稀释度的单克隆抗体, 室温保温保湿放置 1 小时 ;
- [0119] (f). 用 PBST 缓冲液洗板三次 ;
- [0120] (g). 加入酶标二抗 (羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶, GaMIgG-HRP), 每孔 200 μ L, 室温保温保湿放置 1 小时 ;
- [0121] (h). 用 PBST 缓冲液洗板三次 ;
- [0122] (i). 加入底物溶液 (临用新配), 每孔 200 μ L, 室温保温保湿避光反应, 在微量振荡器上振摇约 15~25 分钟 ;
- [0123] (j). 加入 5% H_2SO_4 溶液, 每孔 50~100 μ L, 终止酶反应 ;
- [0124] (k). 用酶标仪测定吸光度, 作出标准曲线, 进行结果分析与讨论。

[0125] (4) ELISA 的优化条件和灵敏度

[0126] 表 1 ELISA 优化条件参数, 包括包被抗原, 抗体,

[0127] 羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (GaMIgG-HRP)

[0128]

包被抗原		抗体		GaMIgG-HRP
类	稀释度	浓	度	稀释度
别		(ng/mL)		
A	1:10000	100	1:50000	1:5000
B	1:1000	1000	1:50000	1:5000
C	1:500	2000	1:20000	1:10000

[0129] 包括抗原浓度为 100~2000ng/mL ; 抗体稀释度为 1:20000~1:50000 ; 羊抗兔辣根

过氧化物酶稀释度为 1:5000~1:10000;封阻液为 1%casein;孵育时间为 1h;显色时间为 15min。

[0130] (5)ELISA 的标准曲线

[0131] 图 1 是以包被抗原 A、包被抗原 B 和包被抗原 C 分别作为包被抗原的 ELISA 标准曲线,包被抗原 A(■),包被抗原 B(●),包被抗原 C(▲)。表 2 为 IC_{50} 和 LOD 值。

[0132] 表 2 包被抗原 A、包被抗原 B 和包被抗原 C 分别作为包被抗原 ELISA 检测三聚氰胺的 IC_{50} 和 LOD 值

	包被抗原类	A	B	C
[0133]	$IC_{50}(ng/mL)$	14.6-26.2	1.7-4.0	3.9-7.9
	$LOD(ng/mL)$	0.84-1.9	0.15-0.40	0.26-1.5

[0134] 由图 1 和表 2 可知,基于不同的包被抗原建立的检测三聚氰胺 ELISA 方法中,方法的灵敏度均较高,其 IC_{50} 值均远低于国家限定标准。其中,基于包被抗原 B 建立的检测三聚氰胺 ELISA 方法得到的灵敏度最高, IC_{50} 值为 1.7-4.0ng/mL。因此,所建立的 ELISA 可以灵敏的检测食品中三聚氰胺含量。

[0135] (6)ELISA 的特异性

[0136] ELISA 特异性可用交叉反应率的大小来表示。交叉反应率(CR%)=三聚氰胺的 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。

[0137] 本发明选择 5 种三聚氰胺的结构类似物和其它 7 种药物进行交叉反应实验,以灵敏度较高的的包被抗原 B、C 作为包被抗原,考察 ELISA 的特异性,结果如表 3 所示。

[0138] 表 3 单克隆抗体与三嗪类及其他七种药物的交叉反应率

化合物	包被抗原 B		包被抗原 C	
	IC ₅₀	CR	IC ₅₀	CR
	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)
三聚氰胺	1.7	100	3.9	100
CAAT	27.0	6.3	76.7	5.1
环丙氨嗪	16.1	10.5	47.9	8.2
三聚氰酸	>10000	<0.01	>10000	<0.01
三聚氰氯	>10000	<0.01	>10000	<0.01
[0139] 阿特拉津	>10000	<0.01	>10000	<0.01
克伦特罗	>10000	<0.01	>10000	<0.01
吡虫啉	>10000	<0.01	>10000	<0.01
氯霉素	>10000	<0.01	>10000	<0.01
林可霉素	>10000	<0.01	>10000	<0.01
喹乙醇	>10000	<0.01	>10000	<0.01
十八甲基炔	>10000	<0.01	>10000	<0.01
甲泼尼龙	>10000	<0.01	>10000	<0.01

[0140] 从表 3 中看出,包被抗原为 B 时,单克隆抗体与 CAAT、环丙氨嗪的交叉反应率分别为 6.3%, 10.5%;包被抗原为 C 时,单克隆抗体与 CAAT、环丙氨嗪的交叉反应率分别为 5.1% 和 8.2%,与其他三嗪类物质和药物都没有交叉反应。因此,所建立的 ELISA 可以特异性的检测食品中三聚氰胺含量。

[0141] 5、ELISA 对加标样品中三聚氰胺含量的测定

[0142] 选择四种样品:纯牛奶、奶粉、猪饲料和鸡饲料进行加标反应实验;同一样品取两份,一份加入适量的三聚氰胺溶液,一份作为空白样品;纯牛奶样品稀释后直接用 ELISA 测定,奶粉样品用 pH=7.4 磷酸缓冲液溶解后稀释直接用 ELISA 测定,动物饲料样品加入三氯乙酸溶液,超声提取 20min 后,4℃ 下 10000g/10min 离心,上清稀释后用 ELISA 直接测定。结果如表 4 所示,加标回收率为 72.8 - 133.0%,批内相对标准偏差(RSD)为 0.8 - 18.9%(n=3)。

[0143] 表 4ELISA 直接检测加标样品中三聚氰胺的回收率和相对标准偏差(RSD)

[0144]

样品	加标浓度 (mg/L or mg/kg)	测定浓度 (mg/kg or mg/L)	回收 率(%)	批内 RSD,% (n=3)	批间 RSD,% (n=3)
纯 牛奶 I	1.0	1.08±0.14	99.0	13.0	8.0
	2.5	2.20±0.24	84.4	10.9	4.9
	3.0	3.36±0.47	109.0	14.0	20.8
纯 牛奶 II	1.0	0.86±0.10	80.0	11.6	5.7
	2.5	1.88±0.20	72.8	10.6	11.8
	3.0	2.90±0.36	94.7	12.4	19.7
奶 粉	1.0	1.41±0.11	133.0	7.8	19.1
	2.5	2.42±0.46	93.6	18.9	16.4
	3.0	3.48±0.07	113.3	2.0	2.58
鸡 饲料	15	16.2±1.1	99.3	7.0	9.1
	20	21.3±3.1	100.0	14.4	17.8
	30	31.6±3.0	101.0	9.5	3.9
猪 饲料	15	16.6±0.1	106.7	0.8	3.9
	20	18.4±2.4	89.0	13.2	10.1
	30	30.2±3.2	98.7	10.7	10.3

[0145] 注：空白值：纯牛奶 I :0.09mg/L, 纯牛奶 II :0.06mg/L, 奶粉 :0.08mg/kg, 鸡饲料 :1.3mg/kg, 猪饲料 :0.6mg/kg。

[0146] 回收率 (%) = [(测定浓度 - 空白值) / 加标浓度] × 100%

[0147] 6. ELISA 与 HPLC 的比较

[0148] HPLC 测定条件为：色谱条件：C18 柱 (4.6mm×250mm, 5 μm), 流动相为乙腈：离子对试剂缓冲溶液 (10:90, v/v), 流速为 1mL/min; 进样量为 20 μL; 紫外检测波长为 240nm; 三聚氰胺标准溶液浓度为：0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20, 60 μg/mL, 样品萃取液用 0.45 μm 的滤膜过滤后直接测定。(离子对缓冲溶液的配置：准确称取 2.10g 柠檬酸和 2.16g 辛烷磺酸钠, 加入约 980mL 水溶解, 调节 pH 至 3.0 后, 定容至 1L 备用。)

[0149] 纯牛奶样品加标不同浓度三聚氰胺后, 加三氯乙酸、乙腈超声提取后, 离心取上清, 提取液经适当稀释后由 ELISA 法直接测定; 提取液经阳离子交换固相萃取柱净化后, 洗脱液于 50℃ 下用氮气吹干, 残留物用 1mL 流动相定容, 涡旋混合 1min, 过 0.45 μm 的滤膜后, 供 HPLC 测定。以 HPLC 的测定结果为横坐标, ELISA 测定结果为纵坐标作图, 得两者的

相关曲线,如图 2 所示,回归曲线为 $Y=1.5589x-1.4004$ ($R=0.9902$, $n=6$),表明 ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

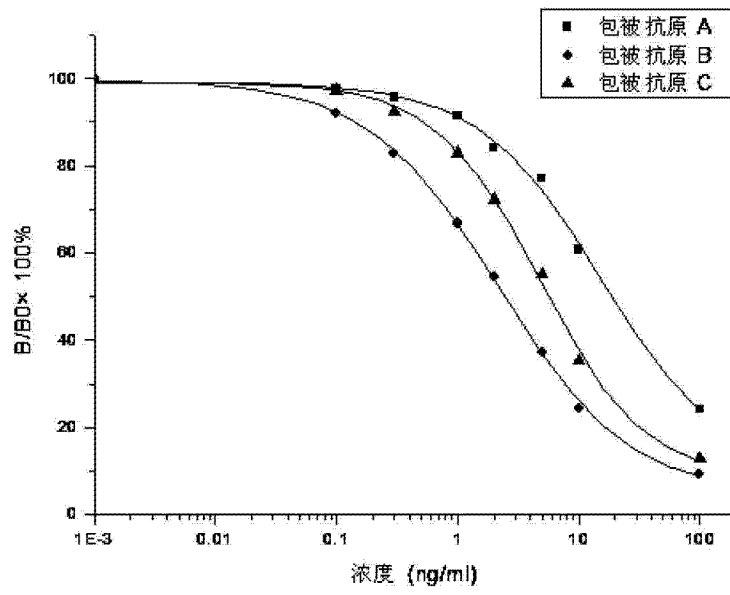


图 1

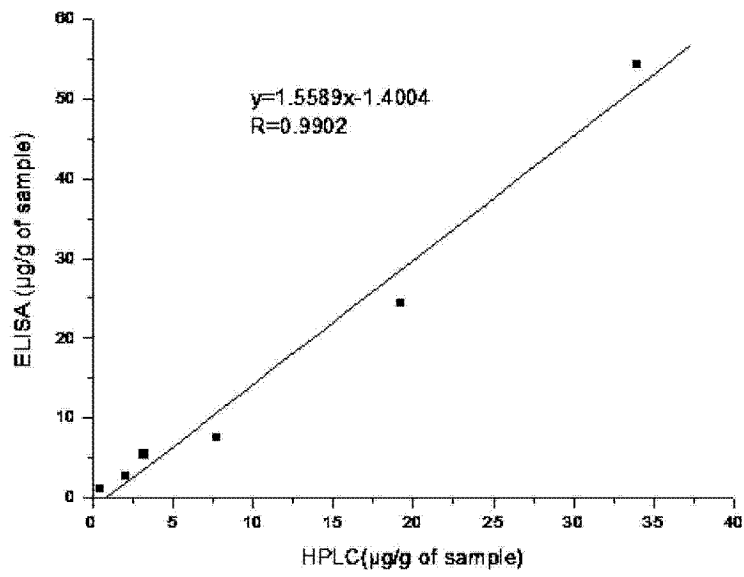


图 2

专利名称(译)	一种检测食品中三聚氰胺含量的ELISA方法		
公开(公告)号	CN102879572A	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN201210363374.0	申请日	2012-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	邓安平 曹碧云 杨红 宋娟		
发明人	邓安平 曹碧云 杨红 宋娟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	李涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了检测食品中三聚氰胺含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)。其特点是合成了三种不同的三聚氰胺半抗原衍生物,并将衍生物与载体蛋白质交联,合成三种免疫原和包被抗原,运用杂交瘤单抗制备技术制得单克隆抗体。四种样品即纯牛奶、奶粉、鸡饲料和猪饲料中加入不同量的三聚氰胺,并用ELISA直接测定,加标回收率为72.6-133.3%,相对标准偏差为0.8-18.9%;加标样品同时用HPLC和ELISA检测并比较测定结果,回归曲线为 $Y=1.5589x-1.4004$,线性相关系数为0.9902,表明两种方法有较好的相关性。