

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710090394.4

[43] 公开日 2008年10月15日

[11] 公开号 CN 101285836A

[22] 申请日 2007.4.10

[21] 申请号 200710090394.4

[71] 申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

[72] 发明人 赵美萍 周爽 宓捷波

[74] 专利代理机构 北京君尚知识产权代理事务所
代理人 周政

权利要求书2页 说明书11页

[54] 发明名称

丙烯酰胺全抗原的制备及其酶联免疫定量检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种丙烯酰胺全抗原的制备方法，将N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺在中性或弱碱性磷酸盐缓冲溶液中直接与载体蛋白分子表面的氨基进行胺解偶联反应，形成丙烯酰胺的全抗原。以该全抗原免疫动物获得特异性识别丙烯酰胺的多克隆抗体，由此而建立一种适于水溶液中及食品中丙烯酰胺含量测定的酶联免疫分析方法，并提供了相应的试剂盒。本发明制备丙烯酰胺全抗原的方法操作简便，无需加入其他反应试剂，在最大程度上保留了丙烯酰胺结构的完整性，并保证偶联位置与特征基团距离最远，使丙烯酰胺分子的特征结构得到充分暴露。所建立的丙烯酰胺的酶联免疫检测方法和试剂盒特异性强、灵敏度高、操作方便，适于实现成本低廉、快速简单的大量样品检测。

1. 一种丙烯酰胺全抗原的制备方法，N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺在 pH 7~8 磷酸盐缓冲溶液中直接与载体蛋白分子表面的氨基进行胺解偶联反应，形成丙烯酰胺的全抗原。
2. 如权利要求 1 所述的丙烯酰胺全抗原的制备方法，其特征在于，所述载体蛋白选自：牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白和钥孔贼血蓝蛋白。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的丙烯酰胺全抗原的制备方法，其特征在于，所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01~0.1 mol/L，反应温度为室温至 37℃，反应时间为 2~14 h。
4. 一种丙烯酰胺酶联免疫定量检测方法包括，如下步骤：
 - (1) 将 N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺在 pH 7~8 磷酸盐缓冲溶液中分别与不同的载体蛋白进行胺解偶联反应，制成丙烯酰胺免疫全抗原和包被全抗原；
 - (2) 用免疫全抗原免疫动物，获得多克隆抗体；
 - (3) 用包被全抗原包被酶标板；
 - (4) 封闭酶标板，然后加入所述多克隆抗体与待测样品的混合液进行竞争性结合反应，同时以多克隆抗体与标准丙烯酰胺溶液的混合液作为参比；
 - (5) 加入生物素标记的二抗；
 - (6) 加入酶标亲和素；
 - (7) 加底物显色，终止反应后检测丙烯酰胺的存在。
5. 如权利要求 4 所述的丙烯酰胺酶联免疫定量检测方法，其特征在于：步骤 (1) 所用的载体蛋白选自：牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白和钥孔贼血蓝蛋白。
6. 如权利要求 4 或 5 所述的丙烯酰胺酶联免疫定量检测方法，其特征在于：所述步骤 (6) 使用辣根过氧化物酶标记的亲和素；步骤 (7) 中所述的底物为四甲基联苯胺，加硫酸终止反应。
7. 如权利要求 6 所述的丙烯酰胺酶联免疫定量检测方法，其特征在于，该方法还包括步骤 (8) 测吸光度值 A_{450nm} 以确定待测样品中丙烯酰胺的含量。
8. 一种测定丙烯酰胺含量的试剂盒，包括：

包被有抗原的酶标板：抗原为 N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺在 pH 7~8 磷酸盐缓冲溶液中直接与载体蛋白胺解偶联得到的丙烯酰胺全抗原；

第一抗体溶液：含有针对丙烯酰胺的特异性抗体，该特异性抗体是用 N-丙烯酰

氧琥珀酰亚胺在 pH 7~8 磷酸盐缓冲溶液中与另一载体蛋白胺解偶联得到的丙烯酰胺全抗原免疫动物获得的多克隆抗体, 4°C 存储;

生物素标记的二抗溶液: 含有生物素标记的二抗, 4°C 存储;

酶标亲和素: 含有酶标记的亲和素, 4°C 存储;

丙烯酰胺标准溶液: 作参比, 用于绘制吸光度值—浓度对数的标准曲线;

洗涤缓冲液: 含有吐温 20 的生理缓冲溶液, 用于洗去酶标板上未结合的物质以及非特异性吸附的物质;

样品稀释液: 含 0.1 mol/L NaHCO₃, 0.5 mol/L NaCl 的水溶液, 或者是其他离子强度 $I=0.2-0.6$ mol/L 和 pH 7.2-8.5 的缓冲溶液, 用于稀释待测样品或丙烯酰胺标准溶液;

底物溶液: 所含底物可被标记亲和素的酶催化生成有色产物;

终止液: 用于终止酶催化反应。

9. 如权利要求 8 所述的测定丙烯酰胺含量的试剂盒, 其特征在于, 所述载体蛋白选自: 牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白和钥孔贼血蓝蛋白。
10. 如权利要求 8 或 9 所述的测定丙烯酰胺含量的试剂盒, 其特征在于, 标记亲和素的酶选自: 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 β -D-半乳糖苷酶。

丙烯酰胺全抗原的制备及其酶联免疫定量检测方法

技术领域

本发明涉及丙烯酰胺的检测方法，尤其是涉及一种丙烯酰胺全抗原的制备方法及相应的丙烯酰胺酶联免疫定量检测方法，属于化合物分析检测领域。

背景技术

丙烯酰胺（Acrylamide）是一种广泛使用的有机合成单体，大量用于生产聚丙烯酰胺和其它的共聚化合物，并广泛用于染料、塑胶的合成以及用作建材和日用品中的增稠剂。聚丙烯酰胺可作为助凝剂处理饮用水和污水。联合国粮农组织和世界卫生组织联合食品添加剂专家委员会对食品中的丙烯酰胺进行了系统的危险性评估，其神经毒性、生殖发育毒性和遗传毒性均得到证实，并被国际癌症研究机构列为 2 类致癌物（即人类可能致癌物）。许多国家规定在饮用水中丙烯酰胺单体的浓度不应超过 0.25 $\mu\text{g/L}$ 。

2002 年 4 月，瑞典国家食品管理局和斯德哥尔摩大学研究人员首次发现，一些淀粉类食品在油炸和烧烤等高温加工的过程中会产生丙烯酰胺。随后挪威、英国、瑞士和美国等国家也相继报道了类似结果，并证明是在加工过程中通过梅拉德（Maillard）反应生成的一种副产物。由此食品中丙烯酰胺的污染问题引起了国际社会的高度关注。基于该问题的普遍性和迫切性，世界卫生组织和联合国粮农组织在联合举办的食品中丙烯酰胺问题专家咨询会上建议将建立对食物中丙烯酰胺较为简便、成本低廉的检测方法作为各国今后的一个重要研究方向，为食品质量控制提供方便、可靠的检测手段。

目前检测丙烯酰胺的常用方法主要集中为色谱-质谱的分析方法，该类方法样品预处理要求高、步骤繁琐，依赖大型、昂贵的仪器设备，并且不能同时测定多个样品，不适合大规模的样品检测。而免疫分析方法通常对样品处理要求低、设备和操作相对简单、特异性高，并有潜力发展为现场检测方法。

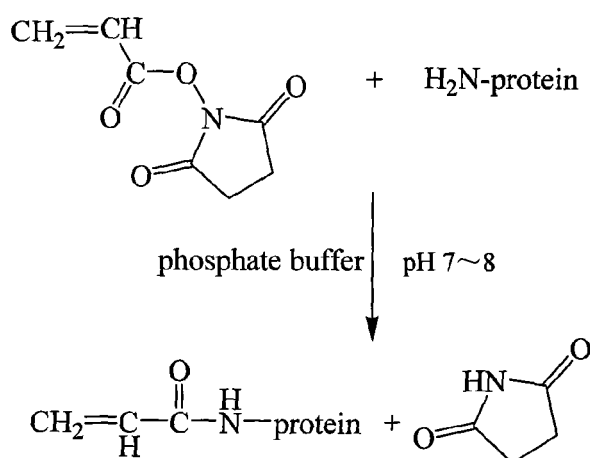
对于免疫分析方法而言，抗体是决定整个方法性能的重要基础，而抗体的效果在很大程度上取决于能引起相应动物发生免疫反应的抗原的结构。丙烯酰胺作为一类小分子化合物，虽然能与抗体发生免疫反应，即具有抗原性，但却不能直接引起动物机体的免疫应答反应，即不具有免疫原性。它只相当于抗原分子上的一个抗原决定簇，被称为半抗原。为此，必须将其与其他载体蛋白偶联，如：牛血清白蛋白（BSA）、鸡卵清白蛋白（OVA）和钥孔嘁血蓝蛋白（KLH）等，获得全抗原后，才能用于免疫动物。但是丙烯酰胺分子量

极低，只有 71.09，分子结构非常简单（分子式： $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ ）。一般地，分子越小，能够产生免疫原性的特征基团就越少，即使作为半抗原与蛋白偶联后，得到的全抗原用来免疫动物产生抗体的成功率也比大分子要小很多。因此，以丙烯酰胺这样的“超小分子”作为半抗原去制备特异性的抗体并建立相应的免疫检测方法，是抗体制备和免疫分析领域的难点之一。到目前为止，国内外还没有关于丙烯酰胺抗体制备及其免疫分析方法的报道。

发明内容

本发明的目的在于提供一种丙烯酰胺全抗原的制备方法，以该全抗原免疫动物获得特异性识别丙烯酰胺的多克隆抗体，由此而建立一种简单快速、操作方便、成本低廉，适于水溶液中及食品中丙烯酰胺含量测定的酶联免疫分析方法。

为了使最终获得的抗体与全抗原上的半抗原结构具有良好的结合性质，在丙烯酰胺全抗原合成的过程中，偶联方法的选择是至关重要的。本发明的技术方案是将 N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺（NAS）在中性或弱碱性（pH 7~8）磷酸盐缓冲溶液中直接与载体蛋白分子表面的氨基进行胺解偶联反应，形成丙烯酰胺的全抗原，如下所示：



上述磷酸盐缓冲液的浓度通常为 0.01 mol/L 至 0.1 mol/L，常用的磷酸盐如磷酸钠盐、磷酸钾盐及其与氯化钠、氯化钾的混合物。上述胺解偶联反应通常在室温至 37℃ 条件下进行，反应 2 h 至 14 h，可获得蛋白氨基偶联率为 25-45% 的丙烯酰胺全抗原。上述载体蛋白例如：牛血清白蛋白（BSA）、鸡卵清白蛋白（OVA）和钥孔贼血蓝蛋白（KLH），NAS 分别与它们偶联成全抗原 Acr-BSA、Acr-OVA 和 Acr-KLH。

上述方法在合成全抗原过程中尽量保持了丙烯酰胺分子特征基团（ α,β -不饱和羰基）的完整性，可以成功获得免疫反应性较好的针对丙烯酰胺超小分子的多克隆抗体，并能够

以该抗体与相应的丙烯酰胺包被抗原建立灵敏度较高的免疫分析方法。本发明的丙烯酰胺酶联免疫定量检测方法包括如下步骤：

- (1) 将 N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺 (NAS) 在中性或弱碱性磷酸盐缓冲溶液中分别与不同的载体蛋白进行胺解偶联反应，制成丙烯酰胺免疫全抗原和包被全抗原；
- (2) 用免疫全抗原免疫动物，获得多克隆抗体；
- (3) 用包被全抗原包被酶标板；
- (4) 封闭酶标板，然后加入上述多克隆抗体与待测样品的混合液进行竞争性结合反应，同时以多克隆抗体与标准丙烯酰胺溶液的混合液作为参比；
- (5) 加入生物素标记的二抗；
- (6) 加入酶标亲和素；
- (7) 加底物显色，终止反应后检测丙烯酰胺的存在。

此外，根据需要还可以进一步包括步骤 (8) 定量检测吸光度值，确定丙烯酰胺的含量。待测样品中丙烯酰胺的浓度与吸光度值成反比。

该方法基于竞争酶联免疫分析的原理，以固定于固相载体上的载体蛋白偶联的丙烯酰胺与溶液中游离的丙烯酰胺分子竞争性地结合反应体系中少量的丙烯酰胺抗体，通过测量最终与固相丙烯酰胺结合的抗体数目来指示溶液中参与竞争的游离丙烯酰胺的含量。这是一种竞争抑制的过程，最终的测量信号（吸光度值）与溶液中丙烯酰胺的含量成反比。

上述测定丙烯酰胺含量的酶联免疫分析方法中，步骤 (1) 的载体蛋白选自：牛血清白蛋白 (BSA)、鸡卵清白蛋白 (OVA) 和钥孔贼血蓝蛋白 (KLH)，但用于包被的全抗原和免疫的全抗原所选的载体蛋白不同。N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺 (NAS) 直接与载体蛋白偶联合成牛血清白蛋白偶联的丙烯酰胺全抗原 (Acr-BSA)、鸡卵清白蛋白偶联的丙烯酰胺全抗原 (Acr-OVA) 或钥孔贼血蓝蛋白偶联的丙烯酰胺全抗原 (Acr-KLH)。

步骤 (2) 用免疫全抗原免疫动物 (如家兔)，得到特异性识别丙烯酰胺的多克隆抗体，为整个检测方法的建立奠定了基础。

针对丙烯酰胺的抗体可以与包被全抗原上的丙烯酰胺决定簇发生特异性的结合，但任何一种物质过量都会造成步骤 (4) 的竞争反应无效，本发明抗原包被液的浓度应在 20-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时最佳；而多克隆抗体工作浓度在 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间，5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时最佳。在上述条件下，包被全抗原与多克隆抗体的反应曲线符合免疫反应的特征，而且包被全抗原的结合位点略微过量，保证在抗体的有限结合位点可以发生竞争反应。在优化的包被和抗体工作浓度下，若样品中含有丙烯酰胺，则会与包被全抗原竞争有限的抗体结合位

点,造成最终结合到包被全抗原上的抗体量减少,引起吸光度值的变化。本发明方法中,最合适的待测丙烯酰胺浓度范围是 50 ng/mL-500 μ g/mL。

上述步骤(6)通常使用辣根过氧化物酶标记的亲合素;步骤(7)经酶底物四甲基联苯胺(TMB)作用显蓝色,加终止液硫酸,变成黄色;步骤(8)在 450 nm 处测吸光度值 A_{450nm} 。试样中丙烯酰胺的浓度与 A_{450nm} 值成反比,通过绘制吸光度值—浓度对数的标准曲线求出样品中丙烯酰胺浓度。

本发明用 N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺(NAS)直接与载体蛋白偶联合成全抗原。该法与传统偶联方式不同,无须借助其他活化试剂,两种反应物可以直接进行偶联,N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺(NAS)的酯键断裂,与载体蛋白的氨基形成酰胺键,生成具有丙烯酰胺特征结构的全抗原。该法操作简便,无须加入其他反应试剂,在最大程度上保留了丙烯酰胺结构的完整性,并保证偶联位置与特征基团距离最远,使丙烯酰胺分子的特征结构得到充分暴露。

本发明的丙烯酰胺酶联免疫定量检测方法适合于水溶液中丙烯酰胺的测定,该溶液可以是水、含有其他基质的血样、注射液或与水混溶的有机溶剂的水溶液。本发明的方法同样适用于食品类样品中丙烯酰胺的测定,在检测该类样品时,需要先将样品中的丙烯酰胺提取到一种合适的溶剂中,如水溶液,一般要求过滤取清液。对于溶液的 pH 值,较佳的是 7~8,保证抗原抗体之间的结合反应。

选用合适的溶剂和方法能够从食品样中提取丙烯酰胺。根据丙烯酰胺在极性溶剂中溶解度高的特性,用水或含水的甲醇、甲酸等溶液,采用超声、煮沸等方法均可从这些固体样品中提出丙烯酰胺。本发明对油炸淀粉类食品的提取条件进行了优化,较佳的提取方法是选用 0.1-1%的甲酸水溶液,在室温下搅拌 1.5-2 小时即可完成提取,回收率接近 100%。

为扩大该免疫分析方法的检测范围,使之适用于丙烯酰胺含量极低的水溶液或食品样品的检测,本发明提供一种活性炭 SPE 柱,用于高效浓缩富集丙烯酰胺,其保留率可达 100%,回收率达 98%。制备活性炭 SPE 柱,通常将适量粒状或粉状的活性炭依次用甲醇和水超声清洗后填入已除去填料的商品化 SPE 柱管中,其使用方法同商品化 SPE 柱。

本发明建立的丙烯酰胺的酶联免疫吸附分析法所需全部试剂,组成了一种结构简单、操作便利、灵敏度高的测定丙烯酰胺含量的试剂盒,包括:

包被有抗原的酶标板:抗原为 N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺(NAS)与载体蛋白胺解偶联的

全抗原；

第一抗体溶液：含有针对丙烯酰胺的特异性抗体，为 N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺（NAS）与另一载体蛋白胺解偶联的全抗原免疫动物得到的多克隆抗体，4℃存储；

生物素标记的二抗溶液：含有生物素标记的二抗，4℃存储；

酶标亲和素：含有酶标记的亲和素，4℃存储，可选用的酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶（AP）和β-D-半乳糖苷酶；

丙烯酰胺标准溶液：作参比，用于绘制吸光度值—浓度对数的标准曲线；

洗涤缓冲液：含有吐温 20 的生理缓冲溶液，用于洗去酶标板上未结合的物质以及非特异性吸附的物质；

样品稀释液：含 0.1 mol/L NaHCO₃, 0.5 mol/L NaCl 的水溶液，或者是具有相近离子强度 ($I=0.2-0.6$ mol/L) 和 pH 值 (7.2-8.5) 的缓冲溶液，用于稀释待测样品或丙烯酰胺标准溶液；

底物溶液：所含底物可被标记亲和素的酶催化生成有色产物；

终止液：用于终止酶催化反应。

上述载体蛋白选自：牛血清白蛋白（BSA）、鸡卵清白蛋白（OVA）和钥孔贼血蓝蛋白（KLH），但用于包被的全抗原和免疫的全抗原所选的载体蛋白不同。

上述第一抗体溶液通常配制成 1 mg/mL，使用时用样品稀释液稀释 200 倍作为第一抗体工作液。

生物素标记的二抗溶液与酶标亲和素溶液使用时应稀释后作为工作液，使最终的吸光度值落入 0.5~1.5，稀释倍数通常分别为 2000 倍和 400 倍。

样品洗涤缓冲液通常配制成 10×溶液，使用时作 10 倍稀释。

试剂盒（包括第一抗体工作液、生物素标记二抗工作液和酶标亲和素工作液）在 4℃存储，1×样品稀释液、1×洗涤缓冲液配制后可于常温保存。

应用试剂盒检测水溶液及食品中丙烯酰胺含量的方法，首先要求对样品进行适当的处理：若样品为溶液，则可直接进行检测或简单过滤后进行检测；若样品为固体食品等，则以水或有机溶剂配合搅拌、加热、超声等方法提取后，过滤取清液进行检测；若样品中丙烯酰胺含量很少，未达到检测下限，则可配合使用活性炭 SPE 萃取装置（上述活性炭 SPE 柱配合 SPE 真空装置使用），先对样品或提取液进行浓缩后再检测。

本发明的有益效果，一是采用了一种全新的合成全抗原的方法，即将 N-丙烯酰氧琥珀

酰亚胺 (NAS) 直接与牛血清白蛋白 (BSA)、鸡卵清白蛋白 (OVA) 和钥孔贼血蓝蛋白 (KLH) 通过一步偶联, 合成具有丙烯酰胺特征结构的全抗原, 方法操作简便, 无须加入其他活化试剂, 在最大程度上保留了丙烯酰胺结构的完整性, 并保证特征基团得到充分暴露。二是用上述合成的全抗原免疫动物, 在国内外首次成功获得了针对丙烯酰胺的多克隆抗体, 并且以该抗体为基础, 首次建立了用于丙烯酰胺检测的酶联免疫分析方法。该方法特异性强、重现性好、灵敏度较高、成本低廉、能够简单快速地用于水样及食品样品的大量检测, 是对现有丙烯酰胺检测方法的一个重要补充。三是样品处理相对简单。与传统的色谱方法相比, 免疫分析方法特异性强, 基底影响小, 因此对样品处理要求相对简单。一般基体简单的液体样品可直接检测; 固体食品样品则用水或有机溶剂配合搅拌、加热、超声等方法提取后, 简单过滤就可用于检测。而目前作为丙烯酰胺主流检测方法的色谱法, 为防止共流出峰的出现、色谱柱的堵塞, 以及提高灵敏度, 需进行各种纯化, 甚至衍生化处理。四是提供了一种活性炭 SPE 装置, 可用于高效富集丙烯酰胺, 扩大了本发明建立的免疫分析方法的检测范围, 使之适用于丙烯酰胺含量低的水溶液或食品样品的检测。目前国内外报道的商品化 SPE 柱对丙烯酰胺均无明显保留, 只能起到纯化作用, 不能进行富集, 而本发明提供的 SPE 柱保留率可达 100%, 回收率达 98%。五是方法所涉及的仪器和试剂简单, 通用性好, 除全抗原和抗体之外, 其它所有试剂、96 孔酶标板、酶标仪及温箱等均极易获得, 这使得本方法可以被许多检测机构及相应部门直接使用, 作为检测丙烯酰胺的手段。

综上所述, 由于本发明采用了全新的全抗原合成方法, 在国内外首次成功获得特异性针对丙烯酰胺的抗体, 并首次建立丙烯酰胺的酶联免疫检测方法。本发明的方法和试剂盒特异性强、灵敏度较高, 能地检测水溶液及食品中丙烯酰胺含量。相对于主流的色谱法对于样品处理的较高要求以及检测成本与低通量的检测模式, 本方法更适于实现成本低廉、快速简单的大量样品检测。这一方法不仅适于广大生产及检测部门对丙烯酰胺的产生及含量进行监测、控制, 而且可以进一步制成试剂盒实现现场、及时的检测, 这对于及时监控生产过程, 以及现场食品监督都具有极其重要的意义。

具体实施方式

下面通过实施例进一步详细说明本发明, 但不以任何方式限制本发明的范围。

实施例 1: 丙烯酰胺全抗原的制备及相应多克隆抗体的获取

- 1) Acr-OVA 全抗原的合成: 将 2 mg NAS 超声溶解于 1 mL DMSO 溶剂中; 然后将 100 μ L 该溶液逐滴加至 1 mL 0.01 mol/L pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液 (含 1 mg OVA) 中, 36 $^{\circ}$ C 搅拌反应 2-3 hr; 最后将所得溶液除盐冻干, 得约 1 mg 产物, -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 2) 免疫动物: 用步骤 1 所获得的全抗原按表 1 过程对家兔进行免疫; 然后采血, 4000 rpm 离心 20 min, 取血清, -20 $^{\circ}$ C 冻存。
- 3) 多克隆抗体的纯化: 取 1 mL 血清, 用 0.06 mol/L, pH 4.8 的 HAc-NaAc 缓冲液稀释 4 倍, 逐滴加入 120 μ L 辛酸, 搅拌 30 min; 于室温 12,000 rpm 离心 20 min, 取上清; 然后加入体积为上清 1/10 的 0.1 mol/L, pH 7.4 的 PBS 溶液, 并用 1.0 mol/L NaOH 调 pH 为 7.4; 搅拌下, 滴加等体积 pH 7.4 的饱和硫酸铵溶液, 静置 2 hr; 于 4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心 30 min, 弃上清, 并将沉淀溶于 1 mL 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 中透析, 最后测定该抗体溶液的浓度, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冻存待用。

表 1. 丙烯酰胺全抗原免疫家兔的完整流程

天数	免疫用量	免疫部位
0	0.75 mL 4 mg/mL 全抗原与 0.75 mL 弗氏完全佐剂充分乳化, 乳化液取 1 mL	左右脚掌各 0.5 mL
10	0.75 mL 2 mg/mL 全抗原与 0.75 mL 弗氏不完全佐剂充分乳化, 乳化液取 1 mL	左右腘窝淋巴结各 0.5 mL
20	0.75 mL 2 mg/mL 全抗原与 0.75 mL 弗氏不完全佐剂充分乳化, 乳化液取 1 mL	背部脊椎两侧 6 点注射, 每点约 0.16 mL
30	0.75 mL 2 mg/mL 全抗原与 0.75 mL 弗氏不完全佐剂充分乳化, 乳化液取 1 mL	臀部及肩胛 4 点注射, 每点 0.25 mL
37	采静脉耳血 0.5 mL, 用 ELISA 测定血清效价	/
41	颈动脉采血, 获多抗血清	/

实施例 2: 本发明检测方法的最低检出限及线性范围

在 96 孔酶标板中, 每孔用 100 μ L 50 μ g/mL 的 Acr-BSA 包被, 于 4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时; 以 5% 脱脂奶粉溶液在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时后, 每孔中加入 50 μ L 10 μ g/mL 的纯化抗体溶液和 50 μ L 梯度稀释的丙烯酰胺标准品溶液 (浓度分别为 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时, 然后每孔先后加入 100 μ L 的合适浓度的生物标记的二抗溶液和酶标亲和素溶液, 使最终的吸光度值在 0.5~1.5 (通常商购的生物标记二抗需 1:2000 稀释, 酶标亲和素需 1:400 稀释), 经过同样的温育过程后加入底物显色, 10-15 分钟后以 2

mol/L 硫酸终止。每个试样同时做 6 份平行。

采用 logit-log 法对测定结果进行线性回归。本发明方法的工作曲线的线性范围为：0.05-500 $\mu\text{g/mL}$ ；回归方程为 $\ln[A/(A_0-A)]=4.4095-1.4777 \lg c_{\text{Acr}}$ ($R=0.993$, $n=6$)。以竞争丙烯酰胺含量为 0 的测定结果作为空白参比，计算其 6 份平行样品的吸光度值的标准偏差 σ ，得出该方法的最低检测限为 0.03 $\mu\text{g/mL}$ （定义为三倍信噪比）。

实施例 3：本发明与标准的高效液相色谱（HPLC）方法的比较

以市售油炸薯条加标提取液（加标量为 100 $\mu\text{g/mL}$ 提取液）为测量物，用本发明的方法和 HPLC 分别测量该提取液的浓度。

1) HPLC 测量

用色谱进行测量的操作条件如下：

色谱柱： C_{18} 反相柱(Dikma Technologies Diamonsil, 5μ , $150 \times 4.6 \text{ mm}$)；

流动相：甲醇- H_2O (5: 95 v/v) ， 流速：0.6 mL/min ；

柱温：25 $^\circ\text{C}$

检测器：紫外检测器 (UVD)，检测波长为 210 nm；

进样器：10 μL 样品环。

以 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、8.0、10、12、15、20、30 $\mu\text{g/mL}$ 丙烯酰胺标准溶液作为工作曲线，采用峰面积积分，线性回归，确定 HPLC 对于丙烯酰胺的工作曲线为 $A(\text{mAu}) = -1.7595 + 83.043 c_{\text{Acr}}$ ($R = 0.9999$, $n = 3$)，线性范围为：0.02-50 $\mu\text{g/mL}$ ，检测限为：0.008 $\mu\text{g/mL}$ （定义为三倍信噪比）。

在测量油炸薯条加标提取液的过程中，进行了 3 次平行测定，最终测得加标提取液中丙烯酰胺的浓度为 99 $\mu\text{g/mL}$ 。

2) 本发明方法（ELISA 法）的测量

ELISA 操作过程及试剂量同实施例 2 中工作曲线的测定部分，对提取液进行了 6 份平行测量，最终测得加标提取液中丙烯酰胺的浓度为 102 $\mu\text{g/mL}$ 。

两种方法的测量结果显示，HPLC 和本发明方法的测量结果基本一致，本发明是一种可靠的测定丙烯酰胺的方法。

实施例 4：本发明方法的回收率测定

以油炸薯条提取液样品为基体，加入标准丙烯酰胺，使样品中丙烯酰胺的最终浓度分别为 20 $\mu\text{g/mL}$ ，66 $\mu\text{g/mL}$ ，200 $\mu\text{g/mL}$ ，666 $\mu\text{g/mL}$ 然后按实施例 2 中的过程与抗体混合进

行测定。每个点作 6 份平行，结果见表 2。

表 2. 油炸薯条提取液样品的回收率测定 (n=6)

加入的标准丙烯酰胺含量 ($\mu\text{g/mL}$)	测得丙烯酰胺含量 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD, %)
10.0	10.7	107	10
33.0	35.5	107	7
100	98.9	99	8
333	315	95	6

相对标准偏差表示测量的精密度，用多次测量后的标准差与测量平均值的比值百分数表示。结果表明该方法的回收率很好，且样品溶液中基体的干扰对方法影响小。

实施例 5: 市售油炸薯条样品的试剂盒检测

一个检测实际样品的丙烯酰胺检测试剂盒，盒内包括一块 96 孔酶标板，第一抗体溶液（含 1 mg/mL 抗体），生物素标记二抗溶液（50 μL ，1:2000 稀释为工作液），酶标亲和素溶液（100 μL ，1:400 稀释为工作液），丙烯酰胺标准溶液（1 mL，20 mg/mL），10 \times 洗涤缓冲液（20 mL，0.1 mol/L PBST），样品稀释液（20 mL，0.1 mol/L NaHCO_3 ，0.5 mol/L NaCl ），显色液 A（15 mL），显色液 B（1 mL 30% H_2O_2 ），终止液（15 mL，2 mol/L H_2SO_4 ）以及操作流程一份。其中：

酶标板包被有抗原，抗原为 N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺 (NAS) 与载体蛋白偶联的全抗原；

第一抗体溶液：含有针对丙烯酰胺的特异性抗体（1 mg/mL），为通过上述全抗原免疫动物得到的多克隆抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 存储；

生物素标记二抗溶液：生物素标记的二抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 存储；

酶标亲和素溶液：辣根过氧化物酶标记的亲合素，4 $^{\circ}\text{C}$ 存储；

丙烯酰胺标准溶液：作参比，用于绘制吸光度值-浓度对数的标准曲线；

10 \times 洗涤缓冲液：0.1 mol/L 的含吐温 20 的磷酸缓冲液，具体每升含有 2.89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，80 g NaCl ，2 g KCl ，2 g KH_2PO_4 和 0.05 % (v/v) 吐温 20 (Tween 20)，用于洗去酶标板上未结合的物质以及非特异性吸附的物质；

样品稀释液：0.1 mol/L NaHCO_3 ，0.5 mol/L NaCl ，用于稀释待测样品或丙烯酰胺标准溶液；

显色液 A：含 0.6 mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)，44

mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 137 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 μL 二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) 和 10mL 的去离子水, 与显色液 B 配合使用, 并由辣根过氧化物酶作为催化剂, 加速反应显色;

显色液 B: 30%的 H_2O_2 水溶液, 与显色液 A 配合, 并由辣根过氧化物酶作为催化剂, 加速反应显色;

终止液: 2 mol/L 的 H_2SO_4 溶液, 用于终止酶催化反应。

试剂盒的检测过程通过以下步骤得以实现:

1. 加样: 将标准溶液、空白及待测样 50 μl 与 50 μl 第一抗体工作液混合, 加入酶标板的各孔内, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 温育 1 小时。
2. 洗板: 用 1 \times 洗涤液将酶标板洗涤 3 次, 每次 3 分钟, 在滤纸上拍干。
3. 每孔加入生物素标记二抗工作液 100 μl , 37 $^\circ\text{C}$ 温育 1 小时。
4. 洗板, 同前。
5. 每孔加入酶标亲和素工作液 100 μl , 37 $^\circ\text{C}$ 温育 30 min。
6. 洗板, 同前。
7. 显色: 底物 A 与底物 B 按 1000:1.5 比例混合, 每孔加入上述底物混合液 100 μL , 暗处反应 10-15 分钟。
8. 终止: 每孔加入终止液 60 μl , 在 450 nm 处测吸光值。通过与标准工作曲线的比较, 得出样品中丙烯酰胺的含量。

将市售油炸薯条搅碎混匀, 平行称取 3 份样品, 每份 10 g, 分别进行不加标, 加标 0.5 mg, 1 mg 的处理。再以 100 mL 1% 甲酸水溶液室温搅拌提取 1.5 小时, 离心过滤, 经活性炭 SPE 柱富集, 甲醇洗脱, 蒸发至近干, 用样品稀释液定容至适当体积。然后将上述提取液 50 μL 与 50 μL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的第一抗体溶液混合, 加入 96 孔酶标板内, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 温育 1 小时; 以 1 \times 洗涤缓冲液洗涤 3 次后, 于每个孔内加入 100 μL 生物素标记二抗溶液 (1:2000 稀释), 37 $^\circ\text{C}$ 温育 1 小时; 以 1 \times 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 再于每个孔内加入 100 μL 酶标亲和素溶液 (1:400 稀释), 37 $^\circ\text{C}$ 温育 30 min; 接着以 1 \times 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每孔加入 100 μL 显色液 A 与显色液 B 按 1000: 1.5 比例混合的显色液, 置于暗处反应 15 分钟; 最后于每孔内加入 60 μL 终止液结束反应, 测量 450 nm 处的吸光值。其中每个试样同时做 6 份平行, 并以 0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丙烯酰胺标准溶液为工作曲线, 样品的测量结果见表 3。

表 3. 油炸薯条测定结果

丙烯酰胺加标量 (mg/kg)	—	50	100
丙烯酰胺测得量 (mg/kg)	7.9	55	102
RSD (%) (n=6)	7	10	8
加标回收率 (100%)	—	110	102

表 3 中较好的加标回收率表明本试剂盒适合于检测实际油炸薯条样品中丙烯酰胺含量，并能给出较准确的测定结果。另外，配合活性炭 SPE 富集装置的使用，可根据实际样品中丙烯酰胺的大致含量确定浓缩倍数，使待测液的浓度落入试剂盒的线性范围内。因此该试剂盒的准确度和灵敏度能够满足食品中丙烯酰胺的实际检测的需求。

专利名称(译)	丙烯酰胺全抗原的制备及其酶联免疫定量检测方法		
公开(公告)号	CN101285836A	公开(公告)日	2008-10-15
申请号	CN200710090394.4	申请日	2007-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	赵美萍 周爽 宓捷波		
发明人	赵美萍 周爽 宓捷波		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
代理人(译)	周政		
其他公开文献	CN101285836B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种丙烯酰胺全抗原的制备方法，将N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺在中性或弱碱性磷酸盐缓冲溶液中直接与载体蛋白分子表面的氨基进行胺解偶联反应，形成丙烯酰胺的全抗原。以该全抗原免疫动物获得特异性识别丙烯酰胺的多克隆抗体，由此而建立一种适于水溶液中及食品中丙烯酰胺含量测定的酶联免疫分析方法，并提供了相应的试剂盒。本发明制备丙烯酰胺全抗原的方法操作简便，无需加入其他反应试剂，在最大程度上保留了丙烯酰胺结构的完整性，并保证偶联位置与特征基团距离最远，使丙烯酰胺分子的特征结构得到充分暴露。所建立的丙烯酰胺的酶联免疫检测方法和试剂盒特异性强、灵敏度高、操作方便，适于实现成本低廉、快速简单的大量样品检测。

