



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101839907 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 201010145257.8

(22) 申请日 2010.04.09

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路 17 号

(72) 发明人 许艇 李季 韦克毅 王佳

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种苏丹红 I 的酶联免疫吸附分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种苏丹红 I 的酶联免疫吸附分析方法,其是以人工合成的半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联作为免疫原制备苏丹红 I 多克隆抗体;以所述半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联的复合物作为包被抗原,进行竞争性酶联免疫吸附分析 (ELISA)。本发明的方法能准确灵敏地检测食品中的苏丹红 I 残留,样品的前处理过程简单,耗时少,能同时检测大量的样品,样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。本发明对解决大批量样品的苏丹红 I 残留现场监控技术具有重要的现实意义。

1. 一种苏丹红 I 的酶联免疫吸附分析方法,其特征在于,其是以人工合成的半抗原与 BSA 偶联作为免疫原制备苏丹红 I 多克隆抗体;以所述半抗原与 OVA 偶联的复合物作为包被抗原,进行竞争性酶联免疫吸附分析,其中所述半抗原为 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯甲酸、4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯丁酸、4'-(2-羟基-1-萘偶氮基)联苯-4-甲酸、6-羟基-5-(苯偶氮基)-2-萘甲酸、2-(1-苯偶氮基-2-萘氧基)乙酸和 5-(1-苯偶氮基-2-萘氧基)戊酸中的任意一种。

2. 如权利要求 1 所述的酶联免疫吸附分析方法,其特征在于,所述半抗原通过活性酯法与 BSA 和 OVA 偶联。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫吸附分析方法,其特征在于,所述苏丹红 I 多克隆抗体以 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯丁酸与 BSA 偶联的复合物为免疫原。

4. 如权利要求 3 所述的酶联免疫吸附分析方法,其特征在于,所述包被抗原为 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯甲酸与 OVA 偶联的复合物。

5. 权利要求 1-4 任一项所述的酶联免疫吸附分析方法用于检测番茄酱和辣椒粉样品中的苏丹红 I 残留量。

6. 一种检测苏丹红 I 残留量的酶联免疫吸附分析试剂盒,其特征在于,其含有的抗体为以人工合成的半抗原与 BSA 偶联作为免疫原制备的苏丹红 I 多克隆抗体;包被抗原为所述半抗原与 OVA 偶联的复合物;其中所述半抗原为 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯甲酸、4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯丁酸、4'-(2-羟基-1-萘偶氮基)联苯-4-甲酸、6-羟基-5-(苯偶氮基)-2-萘甲酸、2-(1-苯偶氮基-2-萘氧基)乙酸和 5-(1-苯偶氮基-2-萘氧基)戊酸中的任意一种。

7. 如权利要求 6 所述的酶联免疫吸附分析试剂盒,其特征在于,所述半抗原通过活性酯法与 BSA 和 OVA 偶联。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的酶联免疫吸附分析试剂盒,其特征在于,所述苏丹红 I 多克隆抗体以 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯丁酸与 BSA 偶联的复合物为免疫原。

9. 如权利要求 8 所述的酶联免疫吸附分析试剂盒,其特征在于,所述包被抗原为 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯甲酸与 OVA 偶联的复合物。

一种苏丹红 I 的酶联免疫吸附分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种苏丹红 I 的半抗原合成及其免疫分析方法。属于免疫分析化学技术领域。

背景技术

[0002] 苏丹红 (Sudan dyes) 是一类人工合成的亲脂性偶氮化合物, 主要分为四类 (I、II、III、IV), 其中苏丹红 II、III、IV 都是苏丹红 I 的衍生物。国际癌症研究机构将苏丹红归为三类致癌物, 即动物致癌物, 目前尚不确定对人类有致癌作用。2003 年英国、法国等许多欧盟国家相继发现了进口辣椒和食品中含有苏丹红, 引发了全球的“苏丹红”风暴。我国自 2005 年 3 月开始, 也相继在辣椒调味品、咸鸭蛋及唇膏等产品中发现苏丹红, 最常见的是苏丹红 I 和苏丹红 IV。

[0003] 苏丹红残留常规的分析主要是应用高效液相色谱 (HPLC) 或者高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 等仪器方法在实验室进行。应用这些理化分析技术对食品、生物和环境等样品中痕量苏丹红残留进行分析, 不仅仪器化程度要求较高, 并且需要经过繁复的分离、提取、净化等前处理过程, 分析速度慢、成本高, 前处理过程需要使用大量的有机溶剂, 容易造成环境污染。许多理化分析技术本身就具有局限性, 如苏丹红 I 的热稳定性差, 难于用气相色谱法分析, 而液相色谱尚缺乏选择性好的高灵敏度检测器等。随着待检样品、特别是要求现场快速检测样品量的迅速增加, 传统的仪器分析手段难以适应要求, 因此, 迫切需要开发和应用高效率的苏丹红快速分析技术。

发明内容

[0004] 本发明针对上述不足, 公开了一种具有高灵敏度、高特异性、高准确度、高精度、操作方法简单的 ELISA 方法, 用于食品中苏丹红 I 的批量、快速检测。

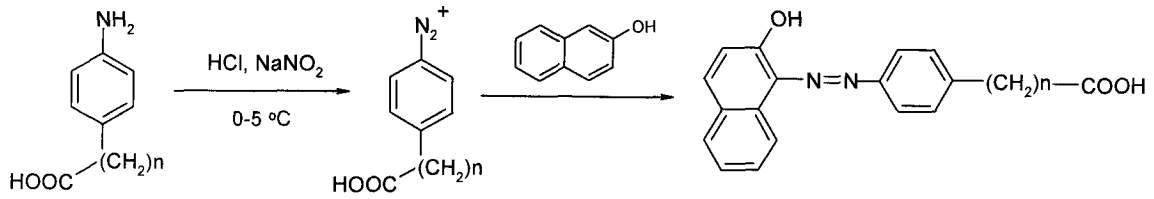
[0005] 为实现上述目的, 本发明所采用的技术方案是: 一种苏丹红 I 的酶联免疫吸附分析方法, 其是以人工合成的半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联作为免疫原制备苏丹红 I 多克隆抗体; 以所述半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联的复合物作为包被抗原, 进行竞争性 ELISA, 其中所述半抗原为 4-(2-羟基-1-萘偶氮基) 苯甲酸 (S1)、4-(2-羟基-1-萘偶氮基) 苯丁酸 (S2)、4'-(2-羟基-1-萘偶氮基) 联苯-4-甲酸 (S3)、6-羟基-5-(苯偶氮基)-2-萘甲酸 (S4)、2-(1-苯偶氮基-2-萘氧基) 乙酸 (S5) 和 5-(1-苯偶氮基-2-萘氧基) 戊酸 (S6) 中的任意一种。

[0006] 本发明主要根据苏丹红 I 的化学结构特点, 设计及合成苏丹红 I 的 6 种半抗原; 再将半抗原与 BSA 偶联后制备人工免疫原, 分别免疫新西兰大耳白兔制备出苏丹红 I 多克隆抗体。然后以 6 种半抗原与 OVA 偶联的复合物作为包被抗原, 分别吸附于酶标板孔壁上, 用定量苏丹红 I 做抑制试验, 对每种抗体进行筛选, 选出抑制效果最好的抗体和包被抗原组合, 建立苏丹红 I 的竞争性 ELISA 方法。在番茄酱和辣椒粉样品中添加定量的苏丹红 I, 样品经简单前处理后用建立的 ELISA 检测, 计算准确度和精确度, 对 ELISA 方法进行验证。

[0007] 本发明的方法,其中所述半抗原通过活性酯法与 BSA 和 OVA 偶联。

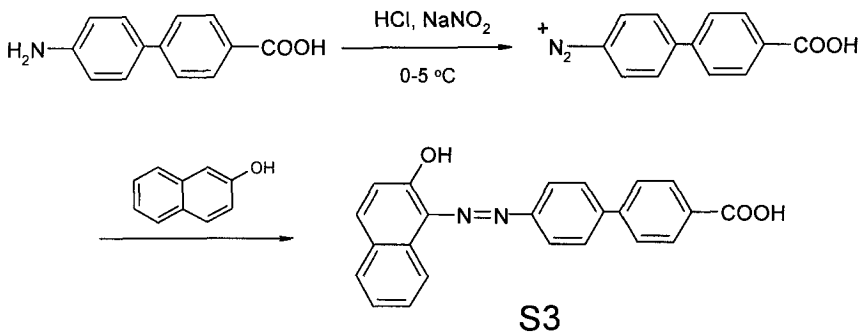
[0008] 其中,本发明的 6 种苏丹红 I 的半抗原 (S1-S6) 合成的技术路线如下:

[0009]

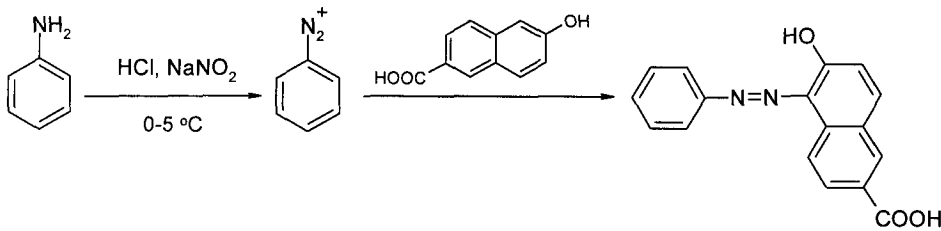


S1: n=0; S2: n=3

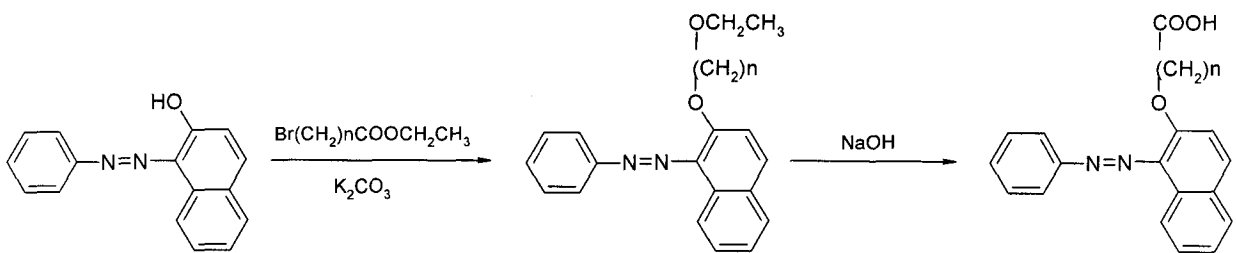
[0010]



S3



S4



S5: n=1; S6: n=4

[0011] 其中,苏丹红 I 抗体的制备过程中所用的免疫原优选是半抗原 S2、S4、S6 与 BSA 的偶联复合物 (BSA-S2、BSA-S4 和 BSA-S6)。包被抗原是所有 6 种半抗原分别与 OVA 的偶联复合物 (OVA-S1、OVA-S2、OVA-S3、OVA-S4、OVA-S5 和 OVA-S6)。

[0012] 最后筛选出抑制效果最好的抗体和包被抗原组合是抗 BSA-S2 抗体和包被抗原 OVA-S1。即苏丹红 I 多克隆抗体以 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯丁酸与 BSA 偶联的复合物为免疫原;以 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯甲酸与 OVA 偶联的复合物作为包被抗原。

[0013] 其中,苏丹红 I 的竞争性 ELISA 方法原理是:酶标板上的每个孔均包被有相同量的

包被抗原,依次加入待测苏丹红 I 标准品或样品、多克隆抗体,固相包被抗原和待测苏丹红 I 相互竞争与抗体反应,由于每个孔中的固相抗原和加入的抗体含量均一致,所以当待测的苏丹红 I 浓度高时,则被结合在固相抗原上的抗体少,加入的酶标二抗与被固定抗体结合量少,用洗涤液洗涤后加入底物液和显色液,显色反应浅,用酶标仪检测的 OD 值低,表明抑制率高;反之,当待测苏丹红 I 浓度低时,则所测的 OD 值高,抑制率低。根据用已知的苏丹红 I 浓度检测所作的标准曲线,可以推算出待测苏丹红 I 的浓度。根据本发明提供的 ELISA 方法和现有的技术,可以制备出直接使用的 ELISA 试剂盒,其可以含有上述抗苏丹红 I 多克隆抗体、吸附在酶标板上的上述包被抗原、苏丹红 I 的标准液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体(酶标二抗)、浓缩缓冲液(PBST,含 0.05% (v/v) Tween20 的磷酸盐缓冲液, pH7.4)、样品稀释液(含 10% 甲醇的 PBST)、显色液(A 液和 B 液)、终止液(2M 的硫酸液)等等,方便直接使用。

[0014] 本发明的优点是能准确灵敏地检测食品中的苏丹红 I 残留,样品的前处理过程简单,耗时少,能同时检测大量的样品,样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。本发明对解决大批量样品的苏丹红 I 残留现场监控技术具有重要的现实意义。

附图说明

[0015] 图 1 为苏丹红 I 的标准抑制曲线,抗体来源于免疫原 BSA-S2,包被抗原为 OVA-S1。

具体实施方式

[0016] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0017] 实施例 1 苏丹红 I 半抗原的合成及结构鉴定

[0018] (1) 半抗原 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯甲酸(S1)的合成及鉴定

[0019] 将 1.37g 4-氨基苯甲酸溶于 50ml 水中,冰浴冷却至 0-5℃,在搅拌状态下逐滴加入 12ml 浓盐酸,然后加入 5ml 亚硝酸钠溶液(0.7g),混合液继续搅拌 10min,温度控制为 0-5℃。将 1.44g 2-萘酚溶于 30ml 氢氧化钠溶液(10%, w/v)中,用冰浴预冷后再加入到上述混合液中,搅拌 30min 后,反应液用真空抽滤,产物用去离子水洗涤,最后用甲醇重结晶后得到纯化半抗原 S1,产率约为 60%。

[0020] 结构鉴定:¹H NMR(DMSO) δ (ppm): 15.89(1H, s, ArOH), 13.03(1H, s, COOH), 8.47(1H, d, J = 7.7Hz, Ar), 8.06(2H, d, J = 6.9Hz, Ar), 7.96(1H, d, J = 9.6Hz, Ar), 7.88(2H, d, J = 6.9Hz, Ar), 7.75(1H, d, J = 7.7Hz, Ar), 7.61(1H, t, J = 4.4Hz, Ar), 7.50(1H, t, J = 4.4Hz, Ar), 6.80(1H, d, J = 9.6Hz, Ar). ¹³C NMR(DMSO) δ (ppm): 175.99(COOH), 166.87, 146.81, 142.41, 132.87, 131.24, 131.24, 130.34, 129.72, 129.37, 128.31, 128.25, 127.00, 125.66, 121.92, 117.55, 117.55(Ar).

[0021] (2) 半抗原 4-(2-羟基-1-萘偶氮基)苯丁酸(S2)的合成及鉴定

[0022] 半抗原 S2 的合成方法与半抗原 S1 合成方法类似,用 4-氨基苯丁酸替代 4-氨基苯甲酸,半抗原 S2 的产率约为 55%。

[0023] 结构鉴定:¹H NMR(DMSO) δ (ppm): 15.65(1H, s, ArOH), 12.10(1H, s, COOH), 8.61(1H, d, J = 8.2Hz, Ar), 7.98(1H, d, J = 9.3Hz, Ar), 7.86-7.74(3H, m, Ar),

7.47(1H, t, J = 7.3Hz, Ar), 7.39(1H, d, J = 8.4Hz, Ar), 7.27(2H, d, J = 7.5Hz, Ar), 7.01(1H, d, J = 9.3Hz, Ar), 2.68(2H, t, J = 7.6Hz CH₂CH₂COOH), 2.26(2H, t, J = 7.3Hz CH₂CH₂CH₂), 1.85(2H, m, J = 7.4Hz CH₂CH₂CH₂). ¹³C NMR(DMSO) δ (ppm): 174.34(COOH), 165.43, 144.44, 142.94, 138.97, 132.81, 129.86, 129.86, 129.13, 129.02, 128.91, 127.96, 126.22, 122.75, 121.37, 119.80, 118.74, 108.78, 108.78(Ar), 34.26(CH₂CH₂CH₂COOH), 33.18(CH₂CH₂CH₂COOH), 26.28(CH₂CH₂CH₂COOH).

[0024] (3) 半抗原 4'-(2-羟基-1-萘偶氮基)联苯-4-甲酸(S3)的合成及鉴定

[0025] 半抗原 S3 的合成方法与半抗原 S1 合成方法类似,用 4'-氨基-4-羧基联苯替代 4-氨基苯甲酸,半抗原 S3 的产率约为 40%.

[0026] 结构鉴定:¹H NMR(DMSO) δ (ppm): 15.83(1H, s, ArOH), 13.05(1H, s, COOH), 8.57(1H, d, J = 8.1Hz, Ar), 8.05(1H, d, J = 8.4Hz, Ar), 8.00-7.87(9H, m, Ar), 7.80(1H, d, J = 8.0Hz, Ar), 7.46(1H, t, J = 8.0Hz, Ar), 6.93(1H, d, J = 9.4Hz, Ar). ¹³C NMR(DMSO) δ (ppm): 168.62(COOH), 144.89, 140.96, 140.04, 139.35, 132.84, 130.13, 130.13, 129.60, 129.26, 129.07, 128.81, 128.25, 128.25, 128.03, 126.08, 126.08, 126.03, 126.03, 123.96, 121.51, 119.77, 119.77(Ar).

[0027] (4) 半抗原 6-羟基-5-(苯偶氮基)-2-萘甲酸(S4)的合成及鉴定

[0028] 半抗原 S4 的合成方法与半抗原 S1 合成方法类似,用 6-羟基-2-萘甲酸和苯胺分别替代 2-萘酚和 4-氨基苯甲酸,半抗原 S4 的产率约为 58%.

[0029] 结构鉴定:¹H NMR(DMSO) δ (ppm): 15.84(1H, s, ArOH), 13.06(1H, s, COOH), 8.64(1H, d, J = 8.6Hz, Ar), 8.44(1H, s, Ar), 8.11(2H, t, J = 9.1Hz, Ar), 7.90(2H, d, J = 7.0Hz, Ar), 7.58(2H, t, J = 7.8Hz, Ar), 7.44(1H, t, J = 7.3Hz, Ar), 7.03(1H, d, J = 9.4Hz, Ar). ¹³C NMR(DMSO) δ (ppm): 168.60(COOH), 167.23, 145.33, 140.04, 135.81, 130.97, 129.97, 129.97, 129.02, 128.85, 128.85, 127.86, 127.38, 124.67, 121.63, 119.57, 119.57(Ar).

[0030] (5) 半抗原 2-(1-苯偶氮基-2-萘氧基)乙酸(S5)的合成及鉴定

[0031] 将 100ml 丙酮加入到 250ml 圆底烧瓶中,再加入 1.05g 苏丹红 I 和 10g 碳酸钾,搅拌使其成悬浊液,在氮气保护下,将 1.48g 溴乙酸乙酯逐滴加入到反应液中,加热回流反应大约 24h,冷却至室温。真空抽滤去除滤渣,蒸干滤液中的丙酮,残留物加入到 50ml 含 4% 氢氧化钠(w/v)的甲醇中,混合液加热回流反应 2h,冷却至室温,蒸干甲醇,将残留物溶于 50ml 水中,用 6M 的 HCl 调整溶液的 pH 值至 6.0,析出红色沉淀,该沉淀经晾干后再以重结晶方法纯化,最终产物半抗原 S5 的产率约为 42%.

[0032] 结构鉴定:¹H NMR(DMSO) δ (ppm): 13.11(1H, s, COOH), 8.25(1H, d, J = 8.4Hz, Ar), 8.03(1H, d, J = 9.3Hz, Ar), 7.96(3H, d, J = 9.6Hz, Ar), 7.68-7.48(6H, m, Ar), 4.93(2H, s, OCH₂). ¹³C NMR(DMSO) δ (ppm): 170.36(COOH), 153.07, 147.74, 135.82, 131.60, 131.17, 129.66, 129.66, 129.13, 128.24, 128.23, 127.22, 124.87, 122.76, 122.51, 122.51, 116.29, 66.53(OCH₂).

[0033] (6) 半抗原 5-(1-苯偶氮基-2-萘氧基)戊酸(S6)的合成及鉴定

[0034] 半抗原 S6 的合成方法与半抗原 S5 合成方法类似,用 5-溴戊酸乙酯替代溴乙酸乙酯,半抗原 S6 的产率约为 44%.

[0035] 结构鉴定： ^1H NMR(DMSO) δ (ppm) :12.03(1H, s, COOH), 8.30(1H, d, $J = 8.5\text{Hz}$, Ar), 8.04(1H, d, $J = 9.1\text{Hz}$, Ar), 7.97-7.92(3H, m, Ar), 7.66-7.46(5H, m, Ar), 7.45(1H, t, $J = 5.8\text{Hz}$, Ar), 4.21(2H, t, $J = 5.7\text{Hz}$, OCH_2CH_2), 2.27(2H, t, $J = 7.0\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1.70(4H, m, $J = 5.1\text{Hz}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ^{13}C NMR(DMSO) δ (ppm) :174.50(COOH), 153.18, 148.02, 135.58, 131.42, 131.32, 131.32, 129.59, 128.76, 128.20, 128.00, 127.94, 124.58, 122.62, 122.30, 122.30, 116.61(Ar), 69.59(OCH₂), 33.43(CH_2COOH), 28.50($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.33($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

[0036] 实施例 2 苏丹红 I 多克隆抗体制备

[0037] 利用半抗原中的羧基,以活性酯法分别将半抗原 S2, S4 和 S6 与 BSA 偶联制备免疫原,冻干保存。将 2mg 免疫原溶于 1ml 生理盐水中,再与 1ml 完全弗氏佐剂混合,充分乳化后注射新西兰大耳白兔大腿,每一种免疫原免疫 2 只兔子。以后每隔两周加强免疫一次,换用不完全弗氏佐剂与免疫原混合,免疫部位为颈背部皮下,从第三次免疫开始,每次免疫后一周从兔耳静脉采血检测血清效价。总共加强免疫 7 次,最后一次免疫后一周从兔颈动脉采全血,用 35% 的饱和硫酸铵盐析法纯化兔抗血清,获得较纯的苏丹红 I 多克隆抗体。

[0038] 实施例 3 苏丹红 I 的竞争性 ELISA 方法

[0039] 用活性酯法将所有半抗原(S1-S6)分别与 OVA 偶联制备包被抗原,以苏丹红 I 作抑制物,用竞争性 ELISA 法对每一种抗体进行筛选,其步骤如下:

[0040] (1) 包被:用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释,在 96 孔酶标板中每孔加入 $100\ \mu\text{l}$, 4°C 包被过夜。

[0041] (2) 洗板:每孔加入 $200\ \mu\text{l}$ 的 PBST(含 0.05% (v/v) Tween20 的磷酸盐缓冲液, pH 7.4), 放置 1min, 再甩掉洗涤液, 重复 3 次, 将板内残留 PBST 在吸水纸上拍干。

[0042] (3) 封闭:加入封闭液 $150\ \mu\text{l}$ /孔, 在室温条件下静置 1.5h, 弃封闭液, 洗板同上。封闭液配制:100ml 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 中加入 1g 明胶。

[0043] (4) 竞争反应:每孔加入 $50\ \mu\text{l}$ 的苏丹红 I 标准液或待测的样品, 标准液和样品稀释液均用含 10% 甲醇的 PBST; 再加入 $50\ \mu\text{l}$ 的抗体, 抗体稀释液为 PBST, 在室温下反应 1h, 洗板。

[0044] (5) 加酶标二抗:将羊抗兔酶标二抗用 PBST 按 1 : 10,000 稀释, 每孔加入 $100\ \mu\text{l}$, 在室温下反应 1h, 洗板。

[0045] (6) 显色:A 液配制:过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Tween-20 $100\ \mu\text{l}$, 蒸馏水 1000ml, pH5; B 液配制:四甲基联苯胺 (TMB) 700mg (40ml DMSO 溶解), 10.3g 柠檬酸, 蒸馏水 1000ml, pH2.4-2.6。将 A 液和 B 液按 1 : 1 混合, 然后每孔加入 $100\ \mu\text{l}$, 室温条件下避光显色 10-15min。

[0046] (7) 终止及测定:每孔加入 $50\ \mu\text{l}$ 浓度为 2M 的硫酸液终止反应, 立即用酶标仪于 450nm 波长测定各孔的 OD 值。

[0047] 根据表 1 的结果, 苏丹红 I 抑制效果最好的组合是抗 BSA-S2 的抗体和包被抗原 OVA-S1, 因此该组合被用于建立苏丹红 I 的标准曲线, 并用于样品分析。

[0048] 表 1 不同抗体与包被抗原组合苏丹红 I 的 IC_{50} 值

[0049]

免疫原	包被抗原					
	OVA-S1	OVA-S2	OVA-S3	OVA-S4	OVA-S5	OVA-S6
BSA-S2	1.8	16.7	2.8	2.5	27.5	30.6
BSA-S4	45.2	8.8	58.5	25.6	NA	NA
BSA-S6	NA	NA	NA	NA	155	276

[0050] NA 表示未检测

[0051] 实施例 4 苏丹红 I 的标准抑制曲线

[0052] 应用实施例 3 的 ELISA 方法, 建立苏丹红 I 的标准抑制曲线, 抗体 (来源于 BSA-S2) 和包被抗原 (OVA-S1) 的最佳工作浓度用方阵法筛选获得, 抗体和包被抗原的浓度均为 1 : 10,000。苏丹红 I 的系列标准浓度设置范围为 0 ~ 100ng/ml。以四参数方程拟合标准曲线 (见图 1), 灵敏度用抑制最高 OD 值一半时所需的苏丹红 I 的浓度表示, 即抑制中浓度 IC₅₀ 值, 该标准曲线的 IC₅₀ 值为 1.6ng/ml。最低检测限 (LOD) 以 IC₁₀ 表示, 该值为 0.02ng/ml。曲线的线性范围 IC₂₀-IC₈₀ 值为 0.1-15ng/ml。

[0053] 实施例 5 抗体的特异性实验

[0054] 选择结构类似物苏丹红 (I, II, III, IV)、苏丹红 G、对位红、1-氨基-2-萘酚、晚霞黄、2-萘酚和苯胺作为待测物, 测得各物质的 IC₅₀ 值, 再用下列方程式计算抗体对这些物质的交叉反应性; 交叉反应率愈小, 则抗体对苏丹红 I 的特异性愈强, 反之则抗体的特异性差。

[0055] 交叉反应 (CR%) = IC₅₀(苏丹红 I) / IC₅₀(供试物) × 100%

[0056] 实验测定结果见表 2, 采用间接 ELISA 法, 多克隆抗体与对位红存在一定的交叉反应 (12.8%), 原因是苏丹红 I 与对位红的结构非常接近, 唯一的不同是对位红结构中苯环对位有一个硝基。抗体对其它结构相近或相似物质均无明显的交叉反应 (< 0.3%)。说明该抗体的特异性好, 可确保对样品中苏丹红 I 残留测定结果的可靠性。

[0057] 表 2 抗体与苏丹红 I 结构类似物的交叉反应

	结构类似物	交叉反应 (%)
	苏丹红 I	100
	苏丹红 II	0.11
	苏丹红 III	0.23
	苏丹红 IV	0.22
[0058]	苏丹红 G	< 0.1
	对位红	12.8
	1-氨基-2-萘酚	0.14
	晚霞黄	< 0.01
	2-萘酚	< 0.01
	苯胺	< 0.01

[0059] 实施例 6 苏丹红 I 酶联免疫吸附分析试剂盒

[0060] 本例中, 试剂盒包含如下部分:

[0061] (1) 吸附了包被抗原 (OVA-S1) 的 96 孔酶标板。

[0062] (2) 以 BSA-S2 为免疫原制备的抗苏丹红 I 多克隆抗体。

[0063] (3) 苏丹红 I 的标准液。

[0064] (4) 辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体 (酶标二抗)。

[0065] (5) 浓缩缓冲液 (PBST) 的配方为:氯化钠 8g、磷酸二氢钾 0.2g、磷酸氢二钠 3g、氯化钾 5g、Tween-20 2ml、蒸馏水 20ml。

[0066] (6) 样品稀释液:含 10% 甲醇的 PBST。

[0067] (7) 显色 A 液:过氧化脲 1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Tween-20 $100 \mu\text{l}$, 蒸馏水 1000ml, pH5; 显色 B 液:四甲基联苯胺 (TMB) 700mg (40ml DMSO 溶解), 10.3g 柠檬酸, 蒸馏水 1000mL, pH2.4-2.6。

[0068] (8) 2M 的硫酸液。

[0069] 本试剂盒组装完成后,在 4°C 下至少可保存 6 个月。

[0070] 实施例 7 样品检测

[0071] 从超市中购买番茄酱和辣椒粉样品,经 HPLC-GC 鉴定样品中不含苏丹红等添加剂。分别称取 2.0g 番茄酱和辣椒粉在 50ml 烧杯中,往样品中添加苏丹红 I 标准品,使番茄酱中苏丹红 I 的终浓度为 $0.5 \mu\text{g/g}$, $1 \mu\text{g/g}$ 和 $5 \mu\text{g/g}$, 辣椒粉中苏丹红 I 的终浓度为 $1.0 \mu\text{g/g}$, $5 \mu\text{g/g}$ 和 $20 \mu\text{g/g}$ 。样品前处理:往烧杯中加入 20ml 的甲醇,超声萃取 10min, 过滤,滤液用旋转蒸发仪蒸干,残留物用 5ml 的甲醇/PBST 混合液 (v/v, 1/9) 溶解,溶液经 $0.45 \mu\text{m}$ 醋酸纤维素膜过滤后,用建立的苏丹红 I 的 ELISA 方法进行测定。因为提取液中的各种基质对 ELISA 有干扰,所以采用 PBST (含 10% 甲醇) 稀释样品的方法消除基质的影响,根据实验结果,番茄酱和辣椒粉的提取液所需的最小稀释倍数是 20 倍和 50 倍。添加回收的检测结果见表 3,批内分析的平均回收率是 60.8-96.8%, 变异系数 6.4-16.2%; 批间分析的平均回收率是 58.5-92.4%, 变异系数 1.8-17.5%。该方法的准确度和精确度均符合实际检测要求,可用于苏丹红 I 在食品中的快速筛查。

[0072] 表 3 样品中苏丹红 I 的 ELISA 检测结果

样品	添加浓度 ($\mu\text{g/g}$)	批内分析 (n=3)		批间分析 (n=3)	
		回收率 (%)	变异系数 (%)	回收率 (%)	变异系数 (%)
番茄酱	0	< LOD		< LOD	
	0.5	63.6	10.1	70.2	11.2
	2.0	96.8	8.3	92.4	10.0
	10	77.5	7.5	75.2	1.8
辣椒粉	0	< LOD		< LOD	
	1.0	60.8	16.2	58.5	14.3
	5.0	88.7	11.1	86.8	17.5
	20	89.0	6.4	91.2	4.4

[0074] 通过以上实施例可知,本发明提供了一种苏丹红 I 的酶联免疫吸附分析方法,涉及 6 种苏丹红 I 半抗原的合成及结构鉴定、苏丹红 I 多克隆抗体的制备、最佳的抗体和包被抗原组合筛选、苏丹红 I 免疫分析方法的建立。本发明的特点是合成多种不同的半抗原,从而增加了抗体和包被抗原的多样性,通过筛选不同的抗体和包被抗原组合,建立了一种异源性的苏丹红 I 的 ELISA 方法,该方法灵敏度达 0.02ng/ml ,能准确地检测食品中的苏丹红

I 残留,样品的前处理过程简单,耗时少,能作为一种仪器检测方法的补充,对样品进行筛查。

[0075] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

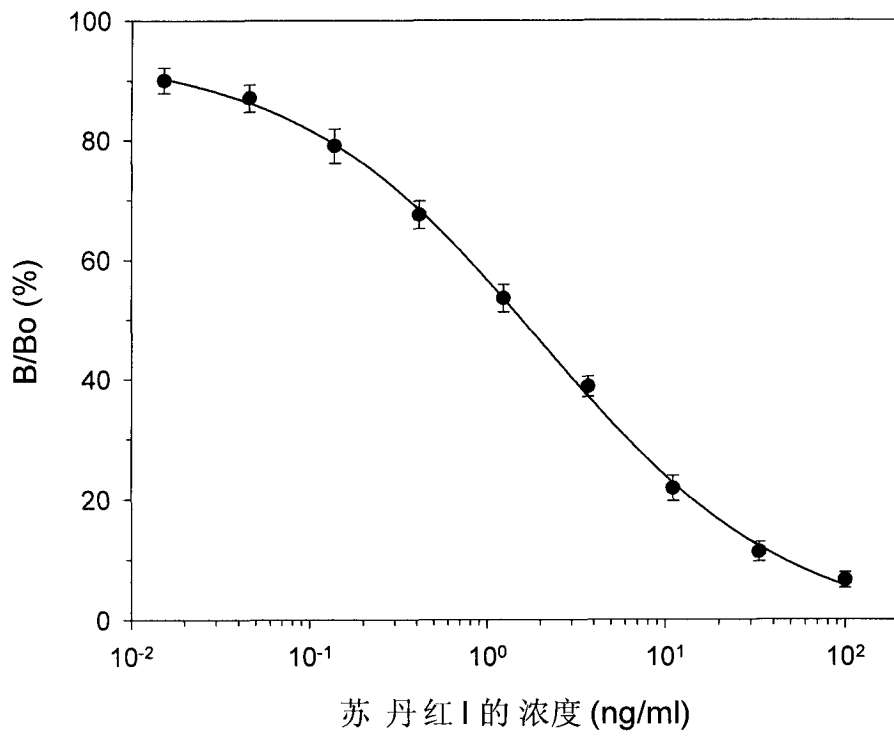
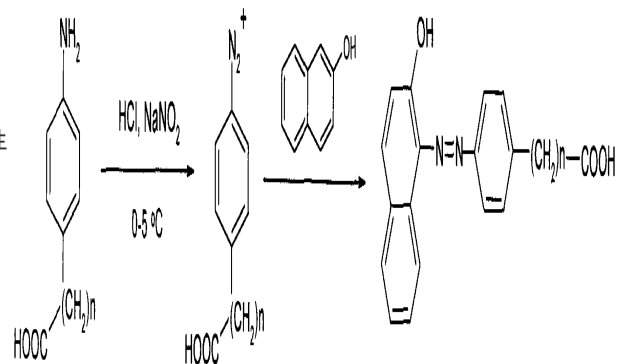


图 1

专利名称(译)	一种苏丹红I的酶联免疫吸附分析方法		
公开(公告)号	CN101839907A	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	CN201010145257.8	申请日	2010-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	许艇 李季 韦克毅 王佳		
发明人	许艇 李季 韦克毅 王佳		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	王朋飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种苏丹红I的酶联免疫吸附分析方法，其是以人工合成的半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联作为免疫原制备苏丹红I多克隆抗体；以所述半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联的复合物作为包被抗原，进行竞争性酶联免疫吸附分析(ELISA)。本发明的方法能准确灵敏地检测食品中的苏丹红I残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。本发明对解决大批量样品的苏丹红I残留现场监控技术具有重要的现实意义。



S1: n=0; S2: n=3