

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102331500 A

(43) 申请公布日 2012.01.25

(21) 申请号 201110035486.9

G01N 33/535(2006.01)

(22) 申请日 2011.02.01

(71) 申请人 天津百鸥瑞达生物科技有限公司

地址 300457 天津市经济技术开发区洞庭路
220 号天津国际生物医药联合研究院
N1003

(72) 发明人 张波 王飞 郗日沫 王鹏 易建
张霞 薛秋艳 徐德顺

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

代理人 杨宏军 尚继栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

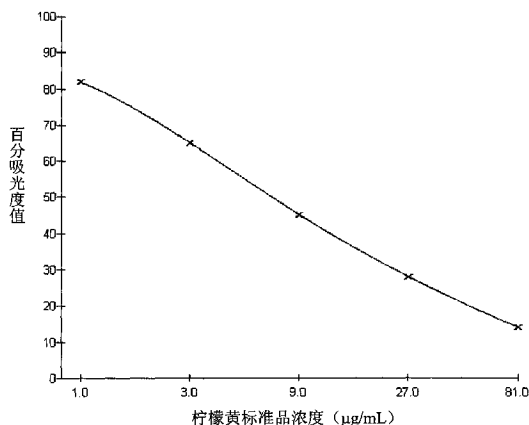
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于检测柠檬黄的方法及酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了用于检测柠檬黄的方法及酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测柠檬黄的酶联免疫试剂盒,包括柠檬黄半抗原和柠檬黄的特异性抗体;所述特异性抗体为所述柠檬黄的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的柠檬黄单克隆抗体,保证了检测结果的可靠性,实验结果表明,本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点;本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式,使用方便,成本低廉。用本发明试剂盒检测柠檬黄的方法,操作简便,对样品的前处理要求低,能同时快速检测大批量样品。因此,利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法,能够进行现场监控且适合大量样品的定性和定量筛查。



1. 一种检测柠檬黄的酶联免疫试剂盒,包括柠檬黄抗原和柠檬黄的特异性抗体;所述特异性抗体为柠檬黄的多克隆抗体或单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于包含下列成分:

- (1) 包被了柠檬黄抗原的酶标板,
- (2) 酶标记柠檬黄抗体工作液,
- (3) 柠檬黄标准品溶液,
- (4) 底物显色液,
- (5) 反应终止液,
- (6) 浓缩洗涤液,
- (7) 样品稀释液。

3. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述酶标板为96或40孔酶标板,包被有能与柠檬黄抗体特异结合的柠檬黄抗原,并封闭微孔表面未吸附柠檬黄抗原的位点。

4. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述酶标记柠檬黄抗体工作液是采用戊二醛法或过碘酸盐氧化法将标记酶与柠檬黄抗体进行偶联得到,所述标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取的碱性磷酸酯酶;所述柠檬黄抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或基因工程抗体的任意一种。

5. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:

当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液为过氧化氢或过氧化脲,四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液,所述终止液为1~2mol/L硫酸溶液或2mol/L的氢氧化钠溶液;

当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为底物液和底物缓冲液,底物液为对硝基磷酸盐缓冲液,底物缓冲液为含有过氧化氢或氧化脲的pH=5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为1~2mol/L硫酸溶液或2mol/L的氢氧化钠溶液。

6. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述浓缩洗涤液为含0.5~1.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液,pH7.4,浓度为0.1mol/L。

7. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述样品稀释液为pH7.4~8.0、0.01mol/L的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述柠檬黄标准品液的浓度分别为:0 μ g/mL、1 μ g/mL、3 μ g/mL、9 μ g/mL、27 μ g/mL、81 μ g/mL。

9. 一种检测样品中的柠檬黄含量的方法,包括以下步骤:

- 1) 用柠檬黄抗原包被酶标板;
- 2) 加入柠檬黄标准品或待测样品;
- 3) 加入酶标记的柠檬黄特异性抗体,孵育,洗涤;
- 4) 加入底物显色液显色;
- 5) 加入反应终止液终止反应;

6) 通过比较柠檬黄标准品与待测样品的颜色,推测出待测样品中的柠檬黄含量;或者,测定各孔的吸光度,建立柠檬黄浓度相对于吸光度的标准曲线,并根据该标准曲线由待测样品的吸光度推算出待测样品中的柠檬黄含量。

10. 一种检测样品中的柠檬黄含量的方法,其特征在于包括以下步骤:

- 1) 样品前处理；
- 2) 使用如权利要求 1-8 所述的酶联免疫试剂盒进行检测；
- 3) 结果处理与分析。

用于检测柠檬黄的方法及酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测柠檬黄的方法及酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 柠檬黄色素是目前我国批准使用的六种食用合成色素之一,被广泛应用于食品、药品、化妆品、医疗器具、烟草、饲料、食用包装、日化品、玩具等领域。其分子结构为偶氮化合物,在体内代谢的产物为对人体具有潜在危害的芳香类化合物。因此,我国对在食品中的柠檬黄色素有严格限制。如果人们长期或一次性大量食用柠檬黄含量超标的食品,可能会引起过敏、腹泻等症状,当摄入量过大,超过肝脏负荷时,会在体内蓄积,对肾脏、肝脏产生一定伤害。目前,柠檬黄国家标准所采取的检测方法是薄层分析及分光光度计法,近年来,我国科研工作者在柠檬黄检测方面做了大量的工作,但都主要集中在理化检测方面,文献检索尚未发现关于柠檬黄的 ELISA 检测方法的报道,鉴于此,本发明研究和建立了柠檬黄的直接竞争 ELISA 检测方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有柠檬黄检测产品中存在的不足,提供一种高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单,能大批量快速检测柠檬黄的酶联免疫试剂盒。

[0004] 本发明的另一目的是提供利用上述酶联免疫试剂盒检测柠檬黄残留的方法。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用如下测定原理:首先将柠檬黄抗原包被于固相载体,例如酶标板上,然后加入标准品或待测样品,再加入酶标记柠檬黄抗体,包被抗原与标准品/待测样品中的柠檬黄竞争酶标抗体,待测样品柠檬黄含量高时,则与固相抗原结合的酶标抗体就少,反之结合在固相抗原上的酶标抗体就多,与固相抗原结合酶标抗体就越少,发色反应减弱,百分吸光度值低,反之,则发色反应增强,百分吸光度增高,以百分吸光度值为纵坐标,柠檬黄标准品浓度的半对数为横坐标作图即得标准曲线,再根据柠檬黄的标准曲线和待检样品的百分吸光度值,即可推算出待测样品中柠檬黄的浓度。

[0006] 本发明的具体技术方案为:

[0007] 提供一种检测柠檬黄的酶联免疫试剂盒,包括柠檬黄抗原和柠檬黄的特异性抗体;所述特异性抗体为柠檬黄的多克隆抗体或单克隆抗体。

[0008] 提供一种柠檬黄残留的酶联免疫检测试剂盒,包含下列成分:

[0009] (1) 包被了柠檬黄抗原的酶标板

[0010] (2) 酶标记柠檬黄抗体工作液

[0011] (3) 柠檬黄标准溶液

[0012] (4) 底物显色液

[0013] (5) 反应终止液

[0014] (6) 浓缩洗涤液

[0015] (7) 样品稀释浓缩液

[0016] 所述酶标板采是 96 或 40 孔酶标板,酶标板孔内包被有能与抗柠檬黄抗体特异结合的柠檬黄抗原,所用的包被液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,碳酸盐缓冲溶液含 1 ~ 2g 碳酸钠、2 ~ 4g 碳酸氢钠和双蒸水 1L,封闭液为 pH7.4,含有 5% 山羊血清、10g/L 酪蛋白的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0017] 所述酶标记柠檬黄抗体工作液为采用过碘酸盐法将酶与柠檬黄抗体进行偶联得到的。所用标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,本发明优选为辣根过氧化物酶,且采用改良后的过碘酸盐氧化法进行标记,提高了标记效率,节省了酶与抗体的用量,保证标记后酶与抗体具有良好的活性。

[0018] 所述柠檬黄标准溶液的浓度为 :0 μ g/mL、1 μ g/mL、3 μ g/mL、9 μ g/mL、27 μ g/mL、81 μ g/mL。

[0019] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液为过氧化氢或过氧化脲、四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液,所述终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

[0020] 当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液由底物液和底物缓冲液组成,底物液为对硝基磷酸盐缓冲液,底物缓冲液为含有过氧化氢或氧化脲的 pH = 5.0 磷酸 - 柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

[0021] 所述浓缩洗涤液为含 5% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH = 7.4,浓度为 0.1mol/L,为正常使用浓度的 10 倍。

[0022] 所述样品稀释液为 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH = 7.4。

[0023] 其中,酶标记柠檬黄抗体是如下制备的 :

[0024] 将柠檬黄抗体与辣根过氧化物 (HRP) 采用过碘酸钠法进行偶联。

[0025] 具体方法为 :

[0026] a) 溶解 5mg HRP 于 1ml 超纯水中,加入新配制的 0.1mol/L 多碘酸钠 75 μ L,置室温或 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 20 分钟或 30 分钟。

[0027] b) 反应完后装入透析袋,0.001mol/L pH = 4.0 醋酸缓冲液 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,期间按需更换透析液。

[0028] c) 将抗体用 0.01mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/L,另外用 0.01mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5ml 抗体加入 HRP 溶液中,置室温或 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 2 小时。

[0029] d) 加入 100 μ L 4mg/mL 硼氢化钠,4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 2 小时。

[0030] e) 对 0.01mol/L PBS 透析过夜,加入保存液 -20 $^{\circ}$ C 保藏备用。

[0031] 其中,酶标板的制备方法为 :

[0032] 用包被缓冲液将柠檬黄抗原按需要稀释,向酶联板微孔中加入抗原稀释液,放入 37 $^{\circ}$ C 环境进行孵育,再放入 4 $^{\circ}$ C 环境中过夜孵育,得到的酶联板的稳定性好,倾去包被液,用洗涤液洗涤,然后在每孔中加入封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0033] 本发明同时提供了利用上述酶联免疫试剂盒进行食品中柠檬黄检测的使用方法 :

[0034] (1) 样品前处理 ;

[0035] (2) 使用试剂盒进行检测 ;

[0036] (3) 结果处理与分析。

[0037] 本发明提供待测样品前处理方法为：

[0038] 当所述样品为液体食品时，所述样品前处理方法为：将液体食品除去气体，与样本稀释液以体积比 1：5-10 混合，取混合后样品用于分析；

[0039] 当所述样品为面糊、调味果酱类食品时，所述样品前处理方法为：将待检物与样本稀释液以质量体积比为 1：10-15 混匀，离心，取上清与样本稀释以一定比例稀释后检测。

[0040] 当所述样品为果酱、半固体复合调味料时，样品置于水浴溶解 / 均质，加一定量的正己烷脱脂，与样本稀释液以质量体积比为 1：10-15 混匀，离心，取下层检测。

[0041] 使用试剂盒检测的方法为：

[0042] (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出，置于室温平衡；

[0043] (2) 将标准品或待测样品加入已经包被有柠檬黄抗原的酶标板孔内，然后每孔加入酶标记物，轻拍混匀，孵育；

[0044] (3) 洗涤；

[0045] (4) 每孔加入底物显色液，轻拍混匀，避光孵育；

[0046] (5) 每孔加入反应终止液，混合均匀，在波长 450nm 下，以空气为空白，酶标仪测定各孔吸光值；

[0047] 本发明提供的检测结果处理与分析方法为：

[0048] 以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值，以百分吸光度值为纵坐标，柠檬黄标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线，求出直线方程。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值，根据方程式求出对应对应样品的柠檬黄浓度。所述百分吸光度值的计算式为：

[0049] 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100$

[0050] 其中，B 为标准溶液或样品的平均吸光值， B_0 为 $0 \mu\text{g/mL}$ 标准溶液的平均吸光度值。

[0051] 柠檬黄线性检测范围为 $0-135 \mu\text{g/mL}$ ，检测限为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，整个检测过程只需 30 分钟就可以完成。

[0052] 本发明提供了一种检测样品中的柠檬黄含量的方法，包括以下步骤：

[0053] 1) 用柠檬黄抗原包被酶标板；

[0054] 2) 加入柠檬黄标准品或待测样品；

[0055] 3) 加入酶标记的柠檬黄特异性抗体，孵育，洗涤；

[0056] 4) 加入底物显色液显色；

[0057] 5) 加入反应终止液终止反应；

[0058] 6) 通过比较柠檬黄标准品与待测样品的颜色，推测出待测样品中的柠檬黄含量；或者，测定各孔的吸光度，建立柠檬黄浓度相对于吸光度的标准曲线，并根据该标准曲线由待测样品的吸光度推算出待测样品中的柠檬黄含量。

[0059] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0060] 本发明的试剂盒采用直接竞争 ELISA 检测模式，采用高特异性、高亲合力的抗体，减少了操作步骤，提高了检测的灵敏度、准确度；采用包被抗原进行酶标板的包被，相对于抗体包被，更有利于达到较好的包被效果与较长的保存时间，从而提高了试剂盒检测的精

密度与稳定性；另外本试剂盒利用酶标板标记抗体技术，且采用改良后的过碘酸盐氧化法进行标记，将酶直接标记于柠檬黄特异性抗体上，将柠檬黄特异性抗体与酶两种最重要的反应物合二为一，提高了标记效率，节省了酶与抗体的用量，保证标记后酶与抗体具有良好的活性，不仅大大简化了操作步骤和反应时间，减少了因操作复杂引起的误差，而且无需再试剂盒内再配置抗抗体，同时也节约了柠檬黄特异性抗体与酶的用量，从而大大降低了试剂盒的成本另外，本试剂盒选用单底物液，相对其他同类试剂盒的双底物液，操作更为方便。基于以上优点，本试剂盒非常适用于柠檬黄残留的痕量分析与批量检测，具有重要的现实意义。

附图说明

[0061] 图 1 为柠檬黄 ELISA 检测标准曲线。

具体实施方式

[0062] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0063] 实施例 1 抗原的制备

[0064] 柠檬黄抗原的制备：

[0065] a. 10mg 纯化的柠檬黄加入到 0.5mL 0.01mol/L 磷酸缓冲液 PBS，搅拌溶解；

[0066] b. 上述反应液中加入 50 μ mol EDC 和 50 μ mol NHS，室温下反应 2 小时；

[0067] c. 将上述活化的柠檬黄滴加到 BSA 溶液中（10mg BSA 溶于 1ml PBS 溶液），室温反应 2 小时，然后用 0.1mol/L pH7.2 的 PBS 透析 3 天，每天换透析液 3 次，分装冻干后，-20℃ 保存。

[0068] 实施例 2 抗体的制备

[0069] 柠檬黄鼠单克隆抗体制备：

[0070] 动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以柠檬黄半抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 60 μ g/ 只，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，腹腔注射，间隔 3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂湿合乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

[0071] 细胞融合与克隆化：取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 4 : 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用显微克隆法对阳性孔进行克隆化，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0072] 细胞冻存和复苏：取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 5×10^6 个 / mL 的细胞悬液，分装于冻存管，在 -70℃ 超低温冰箱中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

[0073] 单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 Balb/c 8 周龄的小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个 / 只，7-10 天后采集腹水。用免疫层析法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存。

[0074] 实施例 3 酶标记柠檬黄抗体的制备

[0075] 将柠檬黄抗体与辣根过氧化物（HRP）采用过碘酸钠法进行偶联。

[0076] 具体方法为：

[0077] a) 溶解 5mg HRP 于 1ml 超纯水中,加入新配制的 0.1mol/L 多碘酸钠 75 μ L,置室温或 4℃冰箱反应 20 分钟或 30 分钟。

[0078] b) 反应完后装入透析袋,0.001mol/L pH = 4.0 醋酸缓冲液 4℃透析过夜,期间需要更换透析液几次。

[0079] c) 将抗体用 0.01mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL,另外用 0.01mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5ml 抗体加入 HRP 溶液中,置室温或 4℃冰箱反应 2 小时。

[0080] d) 加入 100 μ L 4mg/mL 硼氢化钠,4℃冰箱反应 2 小时。

[0081] e) 对 0.01mol/L PBS 透析过夜,加入保存液 -20℃保藏备用。

[0082] 实施例 4 酶联免疫试剂盒组分的配制

[0083] (1) 浓缩洗涤缓冲液的配制:含 0.5%吐温-20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH7.4,浓度为 0.1mol/L,为正常使用浓度的 10 倍。

[0084] (2) 样品稀释液的配制:pH7.4、0.01mol/L、含有 0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲液。

[0085] (3) 封闭液的配制:含有 5%山羊血清、10g/L 酪蛋白的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0086] (4) 底物显色液的配制:过氧化氢或过氧化脲与邻苯二胺(OPD)或四甲基联苯胺(TMB)的混合液终止液的配制:

[0087] (5) 终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液,按照实验室常规方法配制。

[0088] (6) 酶标板微孔板的包被:包被抗原用 pH9.6,0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 0.1~0.5 μ g/mL,其中碳酸盐缓冲溶液含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠以及双蒸水 1L。在酶标板的每孔加 100 μ L,37℃包被 1 小时后,4℃下包被过夜,倾去包被液,用 PBST 洗涤 5 次,拍干,然后在每孔中加入 200 μ L 0~5.0%脱脂奶粉,放入 37℃温箱中 2 小时,甩干,干燥后封入铝箔袋中 4℃保存。

[0089] (7) 柠檬黄标准溶液的配制:准确称取柠檬黄标样 10mg,溶于 0.1mL 0.1mol/L 盐酸溶液,然后用样品稀释液分别配制 0 μ g/mL、1 μ g/mL、3 μ g/mL、9 μ g/mL、27 μ g/mL、81 μ g/mL 柠檬黄溶液,4℃保存。

[0090] (8) 试剂分装:各种试剂按要求配制,测定合格后无菌分装。酶标记柠檬黄抗体工作液 7ml/瓶,柠檬黄标准样品 1ml/瓶,底物显色液 7ml/瓶,终止液 7ml/瓶,浓缩洗液 50ml/瓶,样品稀释液 50ml/瓶。分装后贴标签,注明批号和有效期,4℃保存。

[0091] (9) 试剂盒的组装:分别将可拆卸包被好抗原的微孔板 1 块,酶标记柠檬黄抗体工作液、底物显色液、终止液、浓缩洗液、样品稀释液各 1 瓶,柠檬黄标准溶液 6 瓶,使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装,4℃保存。

[0092] 实施例 5 组建检测柠檬黄的酶联免疫试剂盒,包含下述组分:

[0093] (1) 包被柠檬黄抗原的 96 孔酶标板,或根据产品规格的需要选用 40 孔酶标板;

[0094] (2) 辣根过氧化物酶标记柠檬黄单克隆抗体,7mL/瓶;

[0095] (3) 柠檬黄标准溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μ g/mL、1 μ g/mL、3 μ g/mL、9 μ g/mL、27 μ g/mL、81 μ g/mL,1mL/瓶;

[0096] (4) 底物显色液,7mL/瓶;

[0097] (5) 终止液,7mL/瓶;

- [0098] (6) 浓缩洗涤液, 50mL/瓶;
- [0099] (7) 样品稀释液, 50mL/瓶;
- [0100] (8) 使用说明书, 1份;
- [0101] (9) 盖板膜, 2张;
- [0102] (10) 自封袋(含干燥剂), 1个。
- [0103] 实施例 6 样品处理方法
- [0104] 1、饮料类食品(稀释倍数:5):
- [0105] 如汽水、饮料等, 取适量液体食品样品 2ml, 加入 8ml 样本稀释液, 混匀, 取 50 μ l 进行检测
- [0106] 2、面糊、调味果酱类食品(稀释倍数:10)
- [0107] 取 1g 样品, 加入 9ml 样本稀释液, 混匀 10 分钟; 5000rpm, 离心 10 分钟, 取上清 50 μ l 检测。
- [0108] 3、果酱、半固体复合调味料(稀释倍数:20)
- [0109] 取 1g 样品, 加入 19ml 样本稀释液, 混匀, 加入 10ml 正己烷, 混匀 10 分钟; 5000rpm, 离心 10 分钟, 取上清 50 μ l 检测。
- [0110] 实施例 7 使用试剂盒的检测方法
- [0111] (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出, 置于室温, 即 20 ~ 24 $^{\circ}$ C, 平衡 30 分钟以上, 将足够标准和样品所用数量的条板固定于支架, 标准和样品做两个平行实验, 按顺序编号。
- [0112] (2) 在标准品孔加入 50 μ L 标准品, 样品孔加入 50 μ L 待测样品。然后每孔加入 50 μ L 酶标记物, 轻拍混匀。盖上盖板膜, 在室温孵育 20 分钟。
- [0113] (3) 倒出孔中的液体, 将微孔架倒置在吸水纸上拍打, 每轮洗板拍打 3 次, 以保证完全除去孔中的液体。用 250 μ L 蒸馏水充入孔中, 再次倒掉微孔中的液体, 再重复操作 5 遍。
- [0114] (4) 每孔加入 100 μ L 显色液, 轻拍混匀, 盖上盖板膜, 暗处室温孵育 15 分钟。
- [0115] (5) 加入 50 μ L 反应终止液到微孔中。混合好在波长 450nm 或 492nm, 测定各孔吸光值, 必须在加入终止液后立刻读取吸光度值。
- [0116] 检测结果计算与分析:
- [0117] 以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值, 以百分吸光度值为纵坐标, 柠檬黄标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线, 求出直线方程。见图 1。
- [0118] $Y = -17.657X + 96.476$; $R^2 = 0.9921$ 。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值, 根据方程式求出对应样品的柠檬黄浓度。所述百分吸光度值的计算式为:
- [0119] 其中, B 为标准溶液或样品的平均吸光值, B_0 为 0 μ g/mL 标准溶液的平均吸光度值。
- [0120] 实施例 8 试剂盒精密度与准确度试验
- [0121] 1、标准品溶液重复性试验
- [0122] 从 3 批按照实施例 1 中的方法制备的酶标板中, 各抽出 10 个微孔, 测定 9 μ g/m 标准品溶液的吸光度值(OD 值), 计算批内变异系数和批间变异系数 CV, 结果见表 1。
- [0123] 表 1 标准品溶液重复性试验
- [0124]

cv%		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CV %
实测值	01批	8.5	7.4	9.1	8.5	8.1	8.6	8.5	7.9	8.5	9.0	6.0
	04批	7.8	8.1	8.8	8.1	8.4	9.2	8.6	8.7	7.9	8.6	5.2
	05批	8.7	9.3	8.4	8.9	8.5	9	9.1	9.0	9.1	9.3	3.5

[0125] 2、样本的可重复性实验

[0126] 对阴性饮料、果冻进行添加,添加终浓度为 $20\mu\text{g/ml}$ 。分别取三个不同批次的试剂盒各三个,每个浓度重复五次,分别计算变异系数,结果见表2,表3。

[0127] 表2 饮料类食品的可重复性试验

[0128]

批号	实测值 ($\mu\text{g/ml}$)					变异系数(%)
01批	18.5	18.9	19.8	18.4	19.5	3.2
	18.8	17.5	18.2	18.7	19.4	3.8
	17.9	19.3	18.7	18.9	19.3	3.1
04批	18.9	18.5	19.4	18.1	19.0	2.6
	18.9	17.8	18.7	19.3	18.4	2.5
	18.2	19.1	19.3	18.8	19	2.2
05批	17.5	18.7	18	17.9	18.9	3.2
	18.3	19.2	17.9	18.5	18.6	2.6
	18.8	17.8	18.7	19.2	17.9	3.3

[0129] 表3 果酱类食品的可重复性试验

[0130]

批号	实测值 ($\mu\text{g/ml}$)					变异系数
01批	17.9	18.3	18.1	19.2	18.7	2.8
	18.8	17.6	17.8	19.1	18.9	3.7
	19.1	18.5	17.8	18.5	18.9	2.7
04批	18.9	18.5	19.3	18	18.4	2.7
	18.1	18.8	19.1	18.6	19.1	2.2
	18.5	18.6	18.5	17.9	18.9	1.9
05批	18.4	19.2	17.9	18.4	18.7	2.6
	18.1	18.3	19.1	18.5	17.8	2.66
	18.3	19.1	18.5	18.3	18.7	1.8

[0131] 结果表明饮料类、果冻类食品的变异系数均小于20%,符合农业部关于酶免试剂盒精密度的相关规定。

[0132] 3、试剂盒的准确度试验

[0133] 以阴性饮料、面糊、果酱进行添加,添加终浓度为 $10\mu\text{g/ml}$, $30\mu\text{g/ml}$,每个浓度做三孔平行,计算其添加回收率。

[0134] 表4

样本		饮料		面糊		果酱		
添加终浓度 ($\mu\text{g/ml}$)		10	30	10	30	10	30	
[0135]	回收率	1	85.2	84.2	80.3	82	83.7	85.6
		2	86.9	87.7	84.4	83.6	88.1	89.3
	%	3	86.1	82.3	86.7	81.8	85.6	82.6
平均值			86.1	84.7	83.8	82.5	85.8	85.8
CV%			0.99	3.2	3.9	1.2	2.56	3.9

[0136] 实施例 9 保存期试验

[0137] (1) 将试剂盒放置于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$, 分别取 0、2、4、6、8、10、11 和 12 个月的试剂盒, 对柠檬黄标准品 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0138] (2) 将试剂盒在 37°C 保存的条件下放置 12 天, 每天对标准样品 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0139] (3) 将试剂盒在 -20°C 冰箱保存 12 天, 每天对柠檬黄标准样品 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0140] 从结果可看出, 经过三种条件保存试验, 柠檬黄标准样品 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的吸光度值下降小于 5%, 且 OD 不低于 1.5; 50%抑制率在 $8 \sim 12 \mu\text{g/L}$ 之间; 添加回收率在 70~105% 之间; 批内变异系数小于 10%; 各项指标均符合质量要求, 因此, 试剂盒可以在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存 12 个月。

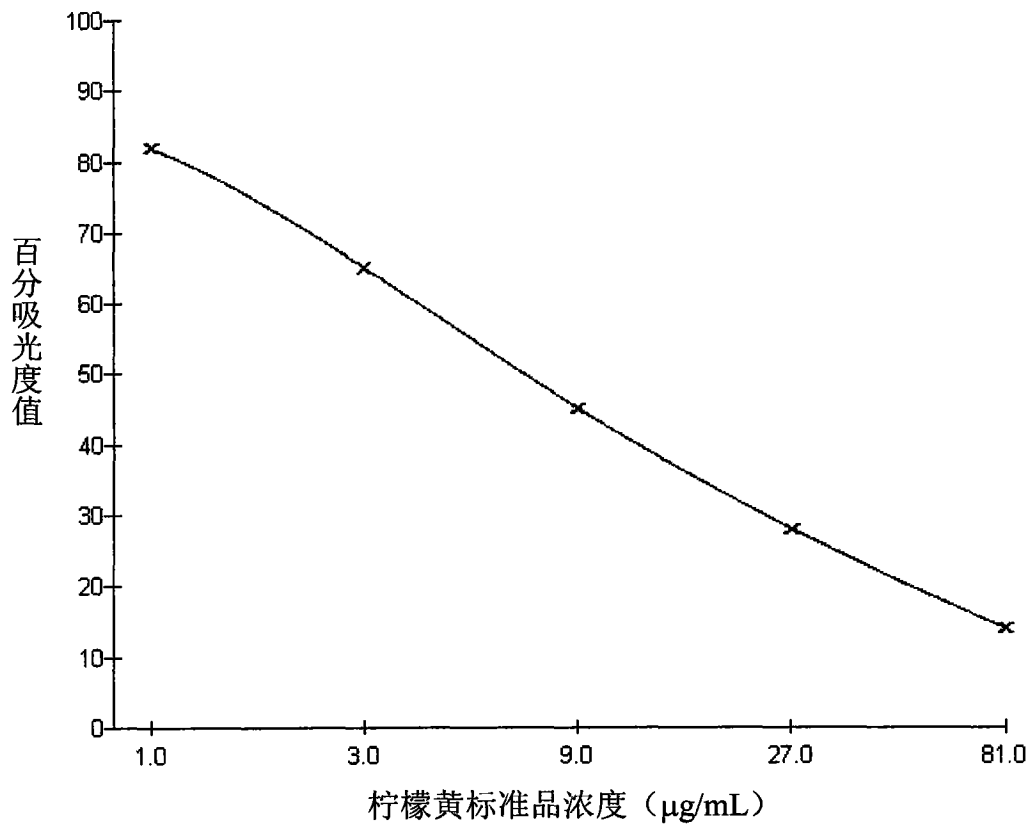


图 1

专利名称(译)	用于检测柠檬黄的方法及酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN102331500A	公开(公告)日	2012-01-25
申请号	CN201110035486.9	申请日	2011-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	天津百鸥瑞达生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津百鸥瑞达生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津百鸥瑞达生物科技有限公司		
[标]发明人	张波 王飞 郗日沫 王鹏 易建 张霞 薛秋艳 徐德顺		
发明人	张波 王飞 郗日沫 王鹏 易建 张霞 薛秋艳 徐德顺		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	杨宏军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于检测柠檬黄的方法及酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测柠檬黄的酶联免疫试剂盒，包括柠檬黄半抗原和柠檬黄的特异性抗体；所述特异性抗体为所述柠檬黄的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的柠檬黄单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性，实验结果表明，本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高特点；本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式，使用方便，成本低廉。用本发明试剂盒检测柠檬黄的方法，操作简便，对样品的前处理要求低，能同时快速检测大批量样品。因此，利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法，能够进行现场监控且适合大量样品的定性和定量筛查。

