



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102721803 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201210194135. 7

(22) 申请日 2012. 06. 13

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483 号

(72) 发明人 孙远明 雷红涛 王强 王弘
沈玉栋 杨金易 徐振林 吕书为
唐秋实

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102
代理人 林丽明 任重

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

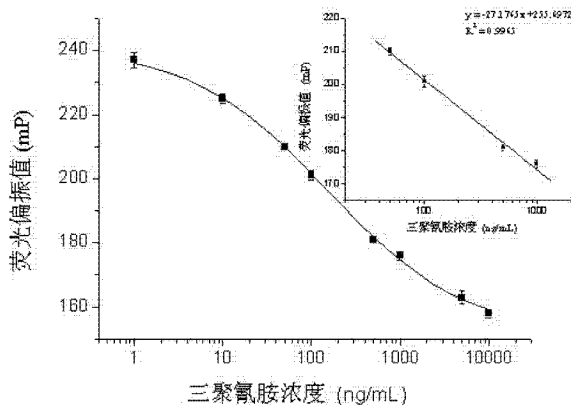
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法

(57) 摘要

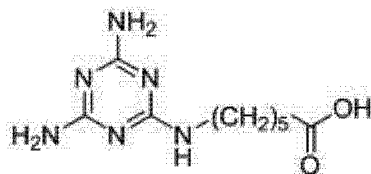
本发明公开了一种三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法。本发明制备得到一种稳定、灵敏的单试剂免疫复合物,在 4° C 下至少可稳定保存 1 个月以上。以此为基础上建立的三聚氰胺荧光偏振检测方法,反应过程中无需洗涤分离,只需将待检样品和单试剂免疫复合物经过短时间的一步反应,即可获得检测结果,检测限为 3. 2ng/mL,检测范围为 12. 2 ~ 1012. 4ng/mL,是一种快速、简便的高通量三聚氰胺检测方法,非常适合三聚氰胺的实际检测应用,并为今后发展现场检测试剂盒奠定了基础。



1. 一种三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,其特征在于是将待检样品和单试剂免疫复合物混合置换反应,测量荧光偏振值,根据标准曲线定量计算出待检样品中三聚氰胺的浓度;

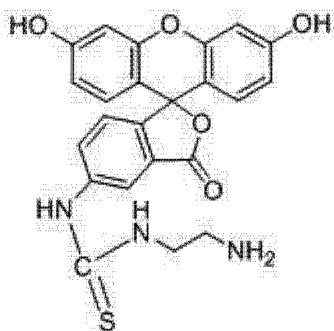
所述单试剂免疫复合物是将三聚氰胺半抗原与异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物偶联成三聚氰胺荧光示踪物活性产物;将三聚氰胺荧光示踪物活性产物和三聚氰胺抗体混合反应制备得到;

所述三聚氰胺半抗原,具有式(I)所示结构:



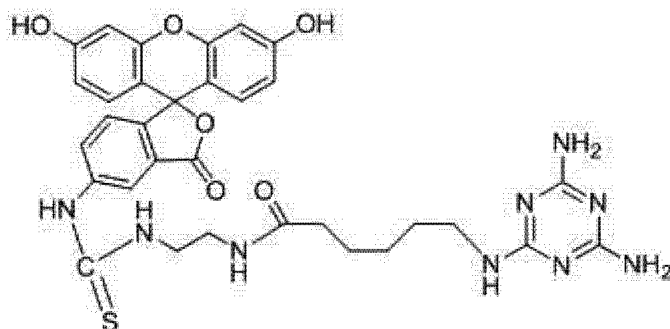
(I);

所述异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物具有式(II)所示结构:



(II);

所述三聚氰胺荧光示踪物活性产物具有式(III)所示结构:



(III)。

2. 根据权利要求1所述三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,其特征在于是所述三聚氰胺荧光示踪物活性产物与三聚氰胺抗体的体积比为1:1。

3. 根据权利要求1所述三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,其特征在于是所述三聚氰胺荧光示踪物活性产物与三聚氰胺抗体混合反应时间为12分钟。

4. 一种三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,其特征在于是包括以下步骤:

(1) 标绘制准曲线:分别向系列浓度的三聚氰胺标准物中加入权利要求1所述单试剂免疫复合物,置换反应,测量荧光偏振值的变化建立标准曲线;

(2) 检测样品,计算得到结果:将待检样品与权利要求1所述单试剂免疫复合物混合,

置换反应,测量荧光偏振值,根据标准曲线定量计算出待检样品中三聚氰胺的浓度。

5. 根据权利要求4所述三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,其特征在于步骤(1)所述置换反应是在室温下反应15min。

6. 根据权利要求4所述三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,其特征在于步骤(2)所述置换反应是在室温下反应15min。

7. 根据权利要求4所述三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,其特征在于步骤(1)所述三聚氰胺标准物和单试剂免疫复合物的体积比为1:9。

8. 根据权利要求4所述三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,其特征在于步骤(2)所述待检样品和单试剂免疫复合物的体积比为1:9。

9. 权利要求1~8任一项权利要求所述的检测方法在奶粉或牛奶中三聚氰胺检测方面的应用。

三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全技术领域,具体涉及一种三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法(Single-reagent Polarization Fluoroimmunoassay, SRPFIA)。

背景技术

[0002] 三聚氰胺(Melamine)(化学式: $C_3H_6N_6$),俗称密胺、蛋白精,国际理论与应用化学联合会(IUPAC)命名为“1,3,5-三嗪-2,4,6-三氨基”,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,通常被用作化工原料。近年来三聚氰胺被非法添加于食品、饲料当中,尤其用于乳制品中的蛋白造假。摄入三聚氰胺可能导致生殖损害和肾结石,甚至进一步导致膀胱癌。为保障食品安全和消费者身体健康,2011年农业部、卫生部等5部门联合发布《关于三聚氰胺在食品中的限量值的公告》,明确规定三聚氰胺不是食品原料,也不是食品添加剂,禁止人为添加到食品中,并制定我国三聚氰胺在食品中的限量值,其中婴儿配方食品中三聚氰胺的限量值限定为1 mg/kg,其他食品中三聚氰胺的限量值为2.5 mg/kg,高于上述限量的食品一律不得销售。

[0003] 目前针对三聚氰胺的检测主要采用仪器检测的方法。主要方法有:高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)和气相色谱法-质谱联用法(GC-MS)等。虽然这些仪器方法具有准确度高、重复性好、适用于定量检测等优点,但设备价格昂贵,且方法操作复杂,需受过专门训练的人员才能操作,难以进行样品的大规模筛选,生产实践中的推广受到一定的限制。

[0004] 免疫检测方法以其灵敏、特异、快速、简便的优点在药物残留检测领域已被广泛应用,相比仪器检测法具有很多优势。关于三聚氰胺免疫检测方法,目前已有公开专利,如吴小平等《一种三聚氰胺半抗原与抗原及其制备方法与应用》(专利申请号:200910085644.4),雷红涛等《氰脲三酰胺半抗原、抗原和抗体制备方法及应用》(专利申请号:200910038375.6)。其中,非均相的酶联免疫吸附测定法(ELISA)以其高效、低成本和高灵敏的优势在食品安全检测领域广泛应用,市面已可见各种商品化三聚氰胺ELISA快速检测的试剂盒。但是该检测方法为多步反应,每反应一步都需要分离反应结合物和未反应的试剂,反应步骤繁琐、需要反复洗涤,操作非常繁琐耗时。因此,有必要针对三聚氰胺研究提供一种快速、简便的高通量均相检测方法,能够一步完成三聚氰胺的检测分析,以满足和适应三聚氰胺的实际应用检测要求。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对现有三聚氰胺免疫检测技术中操作复杂、耗时等技术不足,建立一种三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,整个检测过程只需要一步,操作简单。

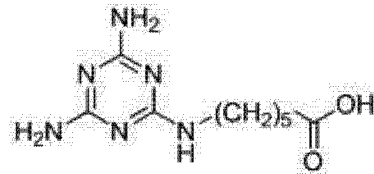
[0006] 本发明另一目的是提供所述检测方法的应用。

[0007] 本发明上述目的通过以下技术方案予以实现:

提供一种三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,是将待检样品和单试剂免疫复合物混合置换反应,测量荧光偏振值,根据标准曲线定量计算出待检样品中三聚氰胺的浓度。

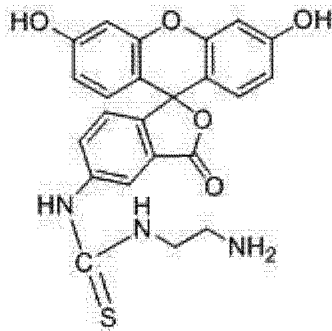
[0008] 本发明选择合适的三聚氰胺半抗原与异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物偶联,合成三聚氰胺荧光示踪物活性产物,将三聚氰胺荧光示踪物活性产物和三聚氰胺抗体混合反应,制备得到一种稳定的单试剂免疫复合物;检测的时候将待检样品和单试剂免疫复合物混合后经过短时间的置换反应,测量荧光偏振值,根据标准曲线定量计算出待检样品中三聚氰胺的浓度。

[0009] 所述三聚氰胺半抗原,优选具有式(I)所示结构:



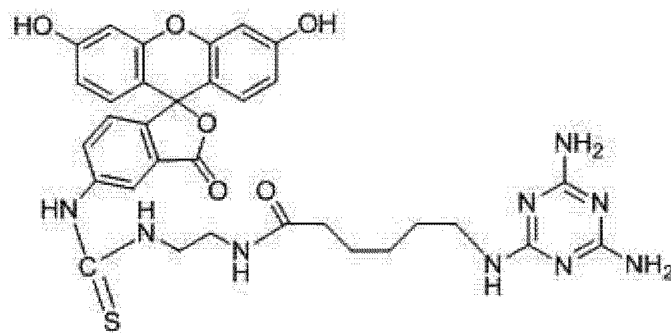
(I)

所述异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物优选具有式(II)所示结构:



(II)

所述三聚氰胺荧光示踪物活性产物优选具有式(III)所示结构:



(III)

所述单试剂免疫复合物的制备方法是:将三聚氰胺半抗原与异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物偶联,合成三聚氰胺荧光示踪物活性产物;将三聚氰胺荧光示踪物活性产物和三聚氰胺抗体混合反应,制备得到单试剂免疫复合物,贮存于 4℃,备用;

优选地,所述三聚氰胺荧光示踪物活性产物与三聚氰胺抗体混合反应是在室温下混合反应 1 ~ 15 分钟,更为优选反应 12 分钟,即得所得单试剂免疫复合物,贮存于 4℃,使用时取出即可用于检测;所述单试剂免疫复合物可以在 4℃ 下至少可稳定保存 1 个月以上。

[0010] 所述三聚氰胺荧光示踪物活性产物与三聚氰胺抗体的用量比例优选体积比为 1:1。

[0011] 基于所述单试剂免疫复合物,本发明提供一种三聚氰胺荧光偏振检测方法,包括以下步骤:

(1) 标绘制准曲线:分别向系列浓度的三聚氰胺标准物中加入本发明所述单试剂免疫复合物,置换反应,测量荧光偏振值的变化建立标准曲线;

(2) 检测样品,计算得到结果:将待检样品与所述单试剂免疫复合物混合,置换反应,测量荧光偏振值,根据标准曲线定量计算出待检样品中三聚氰胺的浓度。

[0012] 步骤(1)和步骤(2)所述置换反应是在室温下反应1~20min,优选15min。

[0013] 步骤(1)和步骤(2)所述单试剂免疫复合物的用量按照样品和单试剂免疫复合物的体积比为1:9确定。

[0014] 本发明可应用奶粉、牛奶等产品中三聚氰胺的检测。

[0015] 本发明的有益效果是:

现有三聚氰胺检测技术操作繁琐耗时,不能满足高通量快速检测的要求,譬如ELISA方法,属于一种非均相方法,需要多步反应、每步都要洗涤,反应时间长,操作不便。针对这一严重影响三聚氰胺检测技术应用的不足,本发明提供了一种稳定、适宜的单试剂免疫复合物,在此基础上建立了三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法,只需将分析物加入单试剂免疫复合物中,无需分离洗涤操作,经过短时间的一步反应,即可获得检测结果。本发明方法检测限为3.2 ng/mL,检测范围为12.2~1012.4 ng/mL,是一种快速、简便的高通量三聚氰胺检测方法,便于现场操作和运输,非常适合当今三聚氰胺检测需求。

[0016] 本发明在制备所述单试剂免疫复合物时,选择合适的半抗原和异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物进行偶联,将制备得到的偶联物作为荧光标记物,并进一步以所述荧光标记物与三聚氰胺抗体按照恰当的比例反应合理的时间得到稳定、灵敏的单试剂免疫复合物,所述单试剂免疫复合物在4℃下至少可稳定保存1个月以上,以满足一步法检测三聚氰胺,非常适合三聚氰胺的实际检测应用,并为今后发展现场检测试剂盒奠定了基础。

附图说明

[0017] 图1为单试剂免疫复合物制备过程的结合动力学曲线

图2为置换反应动力学曲线

图3为三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法的标准曲线

图4为单试剂免疫复合物稳定性的测试图。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0019] 实施例1:荧光示踪物的制备

步骤1:异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物的合成。

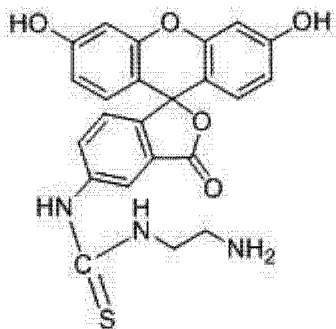
[0020] 用甲醇配制1% (体积百分比浓度)的三乙胺溶液,得甲醇三乙胺溶液;

将20mg (0.3 μmol)乙二胺加入5mL的甲醇三乙胺溶液中,得乙二胺溶液;

再将11.7mg (0.03 μmol)异硫氰酸荧光素溶于1mL的甲醇三乙胺溶液中,逐滴加到

乙二醇溶液中,室温避光搅拌反应 1 h,浓缩,硅胶柱层析,洗脱剂为乙酸乙酯+甲醇(3:1, v/v),收集流出的黄色物质即得异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物,质谱鉴定,MS (EI) m/z : 448. 1,对应异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物分子 $C_{23}H_{19}N_3O_5S$ 的分子量。

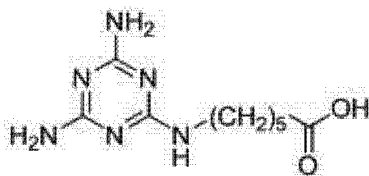
[0021] 异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物具有式(II)所示结构:



(II)

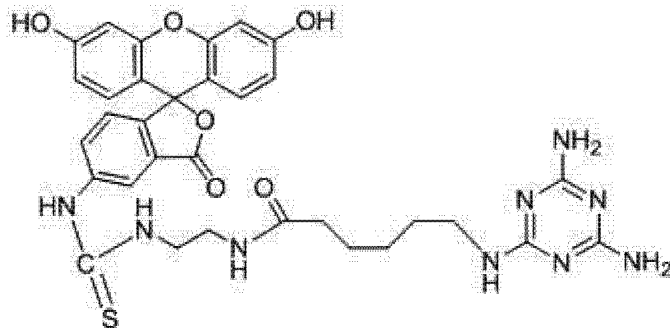
步骤 2 : 荧光素与半抗原的偶联

本实施例使用的三聚氰胺半抗原具有式(I)所示结构,制备方法可参照文献 Lei 等, Anal Chim Acta 2010, 665, (1), 84-90.) 等。



[0022] (I)

将 10mg (40 μ mol) 所述三聚氰胺半抗原, 16 mg (80 μ mol) N, N' - 二环己基碳二亚胺(DCC) 和 10 mg (80 μ mol) N- 羟基琥珀亚酰胺(NHS)溶于 0.5 mL N, N' 二甲基甲酰胺(DMF) 中,室温搅拌反应过夜。离心去除沉淀,上清中加入 4.5 mg (10 μ mol) 异硫氰酸荧光素乙二胺衍生物,室温下搅拌反应 3h,产物用制备型薄层层析板(购自中国青岛海洋化工集团公司)分离纯化,展开剂比例为氯仿:甲醇 = 4:1 (v/v)。其中 $R_f=0.8$ 处的荧光物质用甲醇提取后能够与三聚氰胺抗体特异性反应,并且给出强烈荧光偏振信号(约 245mP),证明所得产物为三聚氰胺荧光示踪物。经质谱鉴定,MS (EI) m/z : 671. 7,对应目标荧光示踪物分子 $C_{32}H_{33}N_9O_6S$ 的分子量,示踪物具有式(III)所示结构:



(III)

实施例 2 : 单试剂免疫复合物的制备

使用硼酸缓冲液(50mmol/L, pH 值为 8.0。可将 0.2mol/L 硼酸溶液 70mL 与 0.05mol/L 硼砂溶液 30 mL 混合,用蒸馏水稀释到 400 毫升,得到 pH 值 8.0 的硼酸缓冲液)作为三聚

氰胺多克隆抗体的稀释液。将 10mL 浓度为 1 nmol/L 的三聚氰胺荧光示踪物(制备方法见实施例 1) 与等体积 100 倍稀释的三聚氰胺多克隆抗体(制备方法可参照 Yin 等, J Agric Food Chem 2010, 58, (14), 8152-8157.)混合反应 1~15 分钟即可得到单试剂免疫复合物。通过连续测量荧光偏振值(mP) 来监控反应的状态, 得到结合动力学曲线, 见附图 1 所示。结果显示, 混合反应 12min 后荧光偏振值基本保持在同一水平, 即此时可获得处于稳定状态的单试剂免疫复合物, 保存在 4℃, 需要时取出使用即可。

[0023] 为了评价所制备的单试剂免疫复合物的稳定性, 将其置于在 4℃ 存放, 监测不同药物浓度下荧光偏振值的变化来观察其稳定性。结果见附图 4 所示, 所制备单试剂免疫复合物在一个月不同药物浓度下荧光偏振值基本没有变化, 表明本发明制备的单试剂免疫复合物在 4℃ 下可以稳定保存 1 个月以上。

[0024] 实施例 3: 标准曲线的绘制

取实施例 2 制备得到备用的单试剂免疫复合物各 180 μ L 若干份, 分别加入 20 μ L、浓度分别为 0 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、5000 ng/mL、10000 ng/mL 的三聚氰胺标准品(产品购自美国 Sigma 公司), 同时以硼酸缓冲溶液(50 mmol/L, pH 值为 8.0, 同实施例 2)作为空白对照(0ng/mL), 连续测量荧光偏振值来监控置换反应的状态, 获取竞争反应动力学曲线, 见附图 2 所示。结果显示, 置换反应 15min 后同一浓度下三聚氰胺标准品的荧光偏振值基本保持在同一水平, 即此时置换反应达到平衡状态, 可以保证竞争检测结果的稳定性和准确性, 以此时的 mP 值为纵坐标, 三聚氰胺标准品浓度对数值为横坐标, 应用 originPro7.5 软件四参数对数函数进行曲线拟合。

[0025] 三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法的标准曲线见附图 3 所示。所建立的标准曲线在缓冲溶液中的灵敏度为 3.2ng/mL, 检测范围为 12.2~1012.4 ng/mL。食品法典委员会(CAC)、欧盟、美国 FDA 和我国规定婴儿奶粉中三聚氰胺最大残留限量为 1mg/kg。本发明的方法能够很好地满足检测灵敏度的需要。

[0026] 实施例 4 样品检测应用例

(1) 样品前处理

称取 1g 奶粉样品于离心管中, 加入 5mL 甲醇水溶液(甲醇和水的体积比为 1:1), 漩涡震荡 10 min, 于 4℃、10000rpm/min 离心 5min, 吸取中层清液, 用硼酸缓冲液(50 mmol/L, pH 值为 8.0, 同实施例 2) 稀释后用于检测。

[0027] (2) 检测

将 20 μ L 经过步骤(1)所述样品前处理后的奶粉样品加入到 180 μ L 实施例 2 制备得到备用的单试剂免疫复合物中, 置换反应 15min 后测量荧光偏振值(mP), 根据附图 3 所示标准曲线, 计算得到样品中三聚氰胺的浓度, 并通过测定样品的检测回收率来评价本发明所建立的三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法的准确度; 同时按照国标《GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》第二法 HPLC-MS/MS 方法同时检测, 进行对比, 确证本发明单试剂荧光偏振免疫检测方法(SRPFA) 的准确性。实验结果见表 1 所示:

表 1 奶粉样品的检测结果(n=3)

表 1 奶粉样品的检测结果 (n=3)

样品添加浓度 (mg/kg)	SRPFIA			HPLC-MS/MS		
	检测值	回收率	变异系数	检测值	回收率	变异系数
	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)
0.2	0.16	85.4	10.2	0.18	91.0	7.4
0.5	0.42	84.2	8.7	0.43	86.4	4.3
1	0.98	98.1	9.1	0.94	94.2	6.7

由表 1 实验结果可见,奶粉样品的 SRPFIA 检测的回收率在 85.4% ~ 98.1% 之间,变异系数在 8.7% ~ 10.2%,且与 HPLC-MS 检测方法结果基本吻合,准确度较高。而且本发明为一步反应,反应灵敏,显著节约时间,可很好地应用于三聚氰胺快速、高通量检测。

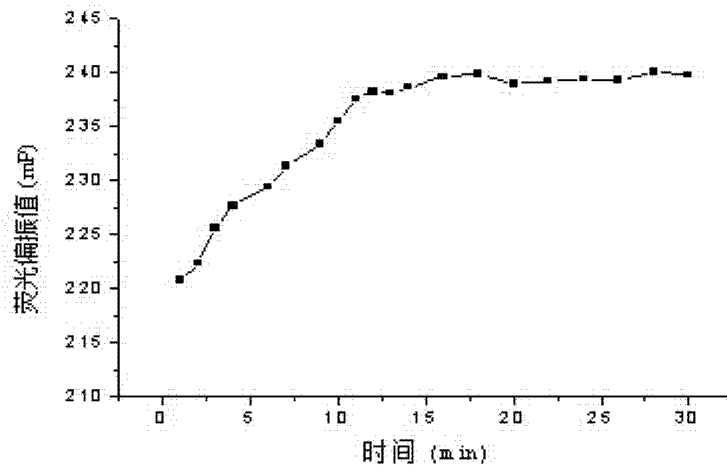


图 1

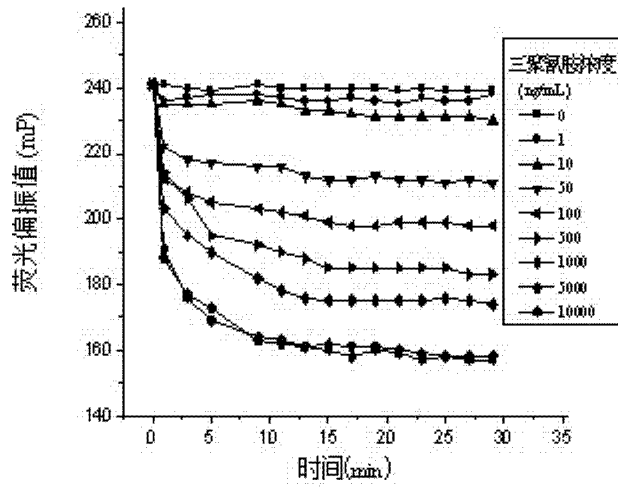


图 2

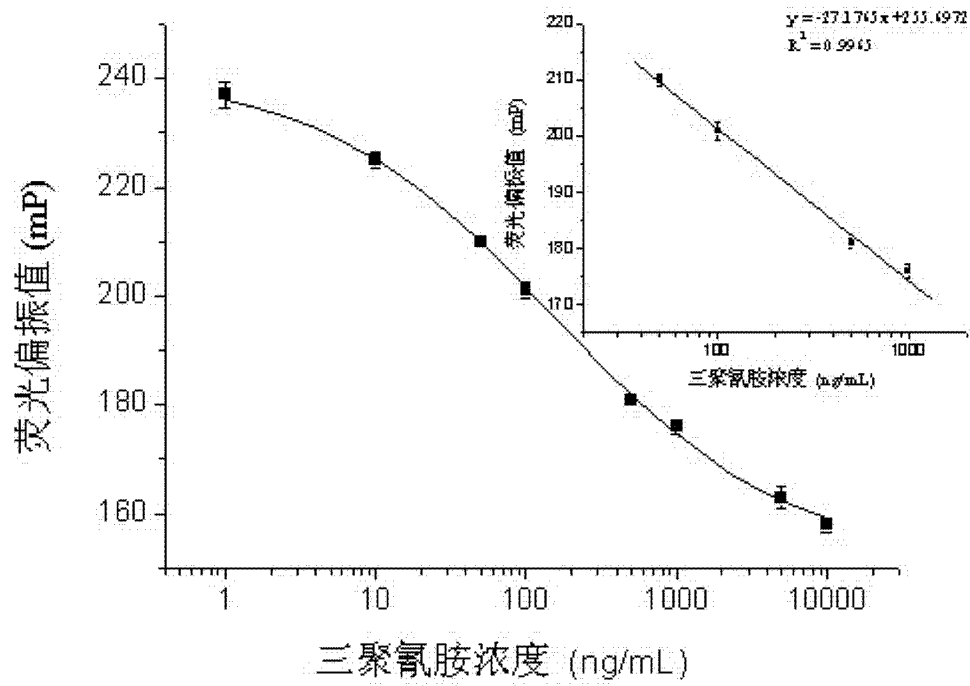


图 3

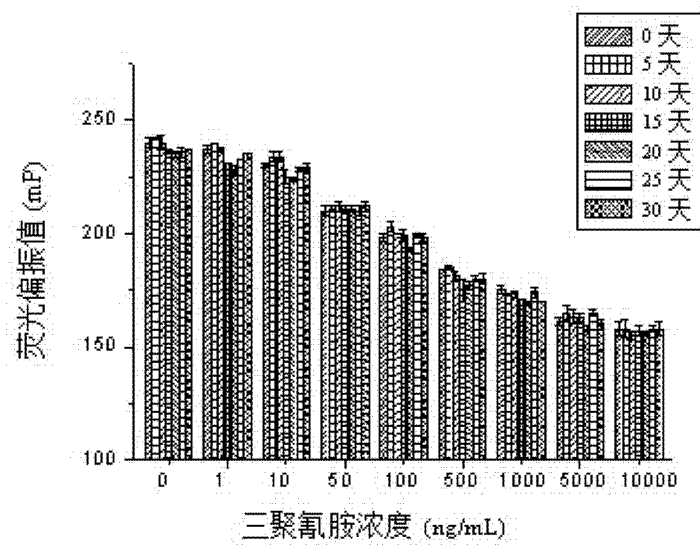


图 4

专利名称(译)	三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法		
公开(公告)号	CN102721803A	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN201210194135.7	申请日	2012-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 雷红涛 王强 王弘 沈玉栋 杨金易 徐振林 吕书为 唐秋实		
发明人	孙远明 雷红涛 王强 王弘 沈玉栋 杨金易 徐振林 吕书为 唐秋实		
IPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	林丽明 任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种三聚氰胺单试剂荧光偏振免疫检测方法。本发明制备得到一种稳定、灵敏的单试剂免疫复合物，在4°C下至少可稳定保存1个月以上。以此基础上建立的三聚氰胺荧光偏振检测方法，反应过程中无需洗涤分离，只需将待检样品和单试剂免疫复合物经过短时间的一步反应，即可获得检测结果，检测限为3.2ng/mL，检测范围为12.2~1012.4ng/mL，是一种快速、简便的高通量三聚氰胺检测方法，非常适合三聚氰胺的实际检测应用，并为今后发展现场检测试剂盒奠定了基础。

