



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102401830 B

(45) 授权公告日 2014.03.12

(21) 申请号 201110207845.4

(22) 申请日 2011.07.25

(73) 专利权人 伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心

地址 835000 新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州伊宁市伊犁河路 304 号

(72) 发明人 孟茹 王振宝

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐新科联专利代理事务所(有限公司) 65107

代理人 欧咏

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1621839 A, 2005.06.01,

CN 1967247 A, 2007.05.23,

CN 1766628 A, 2006.05.03,

CN 1766622 A, 2006.05.03,

M. Bouksaim et al..Production and utilization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for

immuno-location of nisin in producing and sensitive bacterial strains.《Journal of Applied Microbiology》.1999,(第 87 期),500-510.

ANA M. SU&Aacute;

REZ et al..Generation of Polyclonal Antibodies against Nisin: Immunization Strategies and Immunoassay Development.《APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY》.1996,第 62 卷(第 6 期),第 2117-2121 页.

M. B. FALAHEE et al..An enzyme immunoassay for nisin.《Inremuniat Journal of Food Science nrid Technology》.2007,(第 25 期),590-595.

M. Bouksaim et al..Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence.《Journal of Applied Microbiology》.1998,(第 84 期),176-184.

审查员 周洋

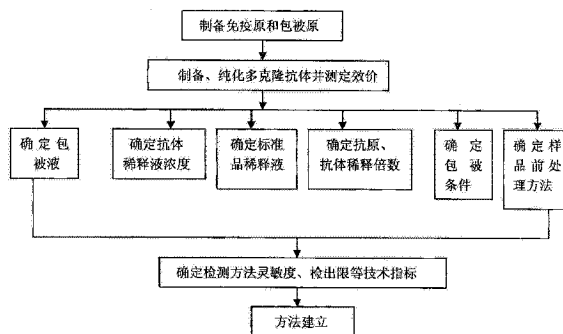
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种食品防腐剂-乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种食品防腐剂-乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法,用乳酸链球菌素作为抗原进行动物免疫得到多克隆抗体,以乳酸链球菌素半抗原与卵清蛋白OVA的偶联物作为包被抗原,以乳酸链球菌素为标准品,建立免疫检测及对食品样品的处理方法,提供其方法的载体试剂盒。该检测方法的构建包括:对检测样品的处置;包被抗原的制备;多克隆抗体的制备及竞争反应;加酶标二抗、显色等。获得的检测试剂盒包括:包被原的酶标板1块;酶标二抗工作液1瓶;抗体工作液1瓶;乳酸链球菌素标准品溶液6瓶;底物显色液2瓶;终止液1瓶;浓缩洗涤液1瓶;复溶工作液1瓶。



CN 102401830 B

1. 一种食品防腐剂-乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法,其特征在于:用乳酸链球菌素作为抗原进行动物免疫得到多克隆抗体,以乳酸链球菌素半抗原与卵清蛋白 O V A 的偶联物作为包被抗原,以乳酸链球菌素为标准品,构建免疫检测及对样品的处置方法,即获取该方法的载体试剂盒;

1) 检测方法的构建:

包被抗原的制备:用 pH 值为 9.6 的 0.01-0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液稀释包被抗原 1000 倍,加入酶标板,每孔 100  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 倾去包被液,用含有 0.05% 叠氮化钠、0.1% 明胶和 0.05% 吐温的磷酸盐缓冲液,即 0.02M、pH7.4, 洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后在每孔中加入 150  $\mu$  l 封闭液,即 0.1% 叠氮化钠和 10% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液,37 $^{\circ}$ C 温育 2h, 倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存;

多克隆抗体的制备:将 1.0mg/ml 的乳酸链球菌素溶液与等量的弗氏佐剂混合均匀,对首次免疫的兔子实施颈背部皮下多点注射,每点 0.2ml;第二次免疫,将 1.0mg/ml 乳酸链球菌素溶液与等量的弗氏不完全佐剂混合均匀,对兔子实施颈背部皮下多点注射,每点 0.2ml;每次注射间隔 2 周,采血检测抗血清效价,直到抗体效价大于 1:3000 为止;

竞争反应:用 0.1% 牛血清白蛋白的 0.03-0.06mol/L 的磷酸盐缓冲液,对乳酸链球菌素的标准品实施梯度稀释,其梯度为 0.1、0.5、2.5、12.5、62.5  $\mu$  g/ml, 每孔加 50  $\mu$  l;将制备的多克隆抗体以 2.5% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液按 1:1000 比例稀释后加入,每孔加入 50  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min, 然后用 PBST 洗涤 3-5 次;

加酶标二抗:将 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体以 1:5000 稀释后加入,每孔加入 100  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C, 30min 后,用 PBST 洗涤 3-5 次;

显色:每孔加入显色液 100  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 显色 15min;最后每孔加入终止液 2M 硫酸溶液 50  $\mu$  L;用酶标仪 450nm 测吸光值  $A_{450}$ , 与所作标准曲线对比算出待测样品的乳酸链球菌素的含量;

上述乳酸链球菌素标准品购置于 sigma 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体购置于 Jackson ImmnoResearch LABORATORIES, INC;

2) 对检测样品的处置:

乳饮料:将 0.1% 牛血清白蛋白的 0.03-0.06mol/L 磷酸盐缓冲液,即为复溶工作液,对样品处置,即稀释 10 倍;

肉制品:将样品制成粉末状,取 1g 样品置于 50ml 离心管里,加入 5ml 的复溶工作液,充分震荡混匀,后静置 10min, 提取上清 1-2ml, 用于分析。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫检测方法,其特征在于:该方法的检测试剂盒包括:

1) 包被原的酶标板 1 块,其包被原为乳酸链球菌素与载体蛋白偶联物;

2) 乳酸链球菌素抗体工作液 1 瓶:抗体稀释液为含有质量比为 2.5% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液,抗体工作液稀释浓度为 1:1000, 8ml/瓶;

3) 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体工作液 1 瓶:酶标二抗稀释液为含有质量比为 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液,羊抗兔抗抗体稀释浓度为 1:5000, 7ml/瓶;

4) 乳酸链球菌素标准品溶液,共 6 瓶,浓度分别为 0mg/L, 0.1mg/L, 0.5mg/L, 2.5mg/L, 12.5mg/L, 62.5mg/L;

- 5) 底物显色液 2 瓶, 由 A 液和 B 液组成, 底物显色液 A 液为过氧化脲, 7ml/ 瓶; 底物显色液 B 液为四甲基联苯胺, 7ml/ 瓶;
- 6) 终止液 1 瓶, 含 1-2mol/L 硫酸, 7ml/ 瓶;
- 7) 浓缩洗涤液 1 瓶, 含 0.05% 吐温、0.1% 明胶、0.05% 叠氮钠的磷酸盐缓冲液 0.02M、pH7.4, 40ml/ 瓶;
- 8) 复溶工作液 1 瓶, 50ml/ 瓶。

## 一种食品防腐剂—乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术,获取的食品天然防腐剂—乳酸链球菌素酶联免疫检测方法,尤其适用于乳制品及饮料与肉制品中的乳酸链球菌素含量的测定。

### 背景技术

[0002] 乳酸链球菌素(Nisin)是从乳酸乳球菌或乳酸链球菌发酵产物中提制的一种多肽抗菌素类物质,是一种世界公认的安全的天然生物性食品防腐剂和抗菌剂。我国于1990年开始批准使用Nisin,到目前为止,全世界约有50多个国家和地区广泛使用Nisin。

[0003] Nisin是由34个氨基酸组成的多肽,其分子量为3510,属于羊毛硫抗生素(Lantibiotics),活性部位含有大量的稀有氨基酸,包括羊毛硫氨酸、 $\beta$ -甲基羊毛硫氨酸、脱氢丙氨酸、 $\beta$ -甲基脱氢丙氨酸等一些非编码的氨基酸。Nisin的活性分子常以二聚体和四聚体的形式存在,其分子量为7000和14000。

[0004] 乳酸链球菌素能有效杀死或抑制引起食品腐败变质的革兰氏阳性菌,特别是细菌孢子:如葡萄球菌、链球菌、乳杆菌、小球菌、明串珠菌、芽孢杆菌等,对乳酸链球菌素很敏感。

[0005] 乳酸链球菌素定量分析的最初测定的方法为1934年Cox GA等人建议采用的甲基蓝还原法,后来相继开发了用于Nisin定量的生物分析方法,包括试管稀释法、浊度分析法、琼脂扩散法、ATP生物发光测定法、绿光荧光蛋白测定法和微量滴定法等。1990年Falahee发展了多克隆抗血清分析乳酸链球菌素的酶联免疫分析法。1996年Suarez, Rodriguez设计了多克隆抗体酶联免疫吸附法。Bouksaim报道多克隆抗体的酶联免疫分析法。

[0006] 目前,我国关于乳酸链球菌素的测定有两种方法,其一是琼脂扩散法,该方法是依据企业标准QB 2394-2007《食品添加剂 乳酸链球菌素》,采用琼脂扩散法的原理在琼脂表面利用检测菌的生长显示抑菌效果,由抑菌圈直径及标准效价换算出效价,确定其含量,由于该方法具有灵敏度低、无法精确定量、易受干扰因素的影响、易于污染环境等缺点,不易于各检测机构推广使用。其二是液相色谱法,经查2010年建立了液相色谱检测方法并申请了专利,该方法由于所需仪器及耗材均较昂贵,检出限低,且耗时长,不易大范围推广。本次文献检索披露的内容有《天然防腐剂—乳酸链球菌素》(中国食品与营养,2008年第4期)和《乳酸链球菌素检测技术的研究进展》(中国食品添加剂,2008年第5期)。

[0007] 本发明所建立的食品中乳酸链球菌素酶联免疫快速检测方法,既定性也能够定量,是目前国际公认的用于测定食品中添加剂含量的方法,具有灵敏度高、特异性强、自动化程度高、快速简便、无污染、重现性好等特点,适宜普遍推广和应用。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于:提供乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法及试剂盒为食品安全保驾护航,所建立的简单、敏感、直接的免疫学方法有重要的实践意义。

[0009] 本发明目的是这样实现的：一种食品防腐剂-乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法，用乳酸链球菌素作为抗原进行动物免疫得到多克隆抗体，以乳酸链球菌素半抗原与卵清蛋白 O V A 的偶联物作为包被抗原，以乳酸链球菌素为标准品，构建免疫检测及对样品的处置方法，即获取该方法的载体试剂盒；

[0010] 1) 检测方法的构建：

[0011] 包被抗原的制备：用 pH 值为 9.6 的 0.01-0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液稀释包被抗原 1000 倍，加入酶标板，每孔 100 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h，倾去包被液，用含有 0.05% 叠氮化钠、0.1% 明胶和 0.05% 吐温的磷酸盐缓冲液，即 0.02M、pH 7.4，洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150  $\mu$  l 封闭液，即 0.1% 叠氮化钠和 10% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存；

[0012] 多克隆抗体的制备：将 1.0mg/ml 的乳酸链球菌素溶液与等量的弗氏佐剂混合均匀，对首次免疫的兔子实施颈背部皮下多点注射，每点 0.2ml；第二次免疫，将 1.0mg/ml 乳酸链球菌素溶液与等量的弗氏不完全佐剂混合均匀，对兔子实施颈背部皮下多点注射，每点 0.2ml；每次注射间隔 2 周，采血检测抗血清效价，直到抗体效价大于 1:3000 为止；

[0013] 竞争反应：用 0.1% 牛血清白蛋白的 0.03-0.06mol/L 的磷酸盐缓冲液，对乳酸链球菌素的标准品实施梯度稀释，其梯度为 0.1、0.5、2.5、12.5、62.5 $\mu$ g/ml，每孔加 50 $\mu$ l；将制备的多克隆抗体以 2.5% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液按 1:1000 比例稀释后加入，每孔加入 50 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 温育 30min，然后用 PBST 洗涤 3-5 次；

[0014] 加酶标二抗：将 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体以 1:5000 稀释后加入，每孔加入 100 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C，30min 后，用 PBST 洗涤 3-5 次；

[0015] 显色：每孔加入显色液 100 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 显色 15min；最后每孔加入终止液 2 M 硫酸溶液 50  $\mu$  L；用酶标仪 450nm 测吸光值  $A_{450}$ ，与所作标准曲线对比算出待测样品的乳酸链球菌素的含量；

[0016] 上述乳酸链球菌素标准品购置于 sigma 公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购置于 Jackson ImmnoResearch LABORATORIES, INC；

[0017] 2) 对检测样品的处置：

[0018] 乳饮料：将 0.1% 牛血清白蛋白的 0.03-0.06mol/L 磷酸盐缓冲液，即为复溶工作液，对样品处置，即稀释 10 倍；

[0019] 肉制品：将样品制成粉末状，取 1g 样品置于 50ml 离心管里，加入 5ml 的复溶工作液，充分震荡混匀，后静置 10min，提取上清 1-2ml，用于分析。

[0020] 所述的酶联免疫检测方法，该方法的检测试剂盒包括：

[0021] 1) 包被原的酶标板 1 块，其包被原为乳酸链球菌素与载体蛋白偶联物；

[0022] 2) 酶标二抗工作液 1 瓶，其工作液用 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液稀释 5000 倍的酶标二抗获取，7ml/ 瓶；

[0023] 3) 抗体工作液 1 瓶，其工作液用 2.5% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液稀释 1000 倍的抗体获取，8ml/ 瓶；

[0024] 4) 乳酸链球菌素标准品溶液，共 6 瓶，浓度分别为 0mg /L, 0.1mg/L, 0.5mg/L, 2.5mg/L, 12.5mg/L, 62.5mg/L；

[0025] 5) 底物显色液 2 瓶，由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲，7ml/ 瓶；底

物显色液 B 液为四甲基联苯胺,7ml/瓶;

[0026] 6) 终止液 1 瓶,含 1-2mol/L 硫酸,7ml/瓶;

[0027] 7) 浓缩洗涤液 1 瓶,含 0.05% 吐温、0.1% 明胶、0.05% 叠氮钠的磷酸盐缓冲液 0.02M、pH 7.4,40ml/瓶;

[0028] 8) 复溶工作液 1 瓶,50ml/瓶。

[0029] 本发明方法的检测原理:在酶标板微孔条上预包被乳酸链菌素与载体蛋白的偶联物,加入样品溶液或标准品溶液后,再加入乳酸链球菌素抗体溶液,样品中的乳酸链球菌素或标准品与酶标板上包被的乳酸链球菌素偶联抗原竞争乳酸链球菌素抗体,加入酶标记抗体进行放大作用,用显色液显色,样品吸光值与样品中乳酸链球菌素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样品中乳酸链球菌素的含量,同时也可根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度乳酸链球菌素标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中乳酸链球菌素含量的浓度范围。

[0030] 本发明构建并实现的定量检测食品中乳酸链球菌素的快速检测方法—酶联免疫法及市场销售的试剂盒,填补了国内的空白,为行业的食品检测提供了快速精准的检测新产品,彰显技术进步。

#### 附图说明

[0031] 本发明对照说明书附图作进一步说明。

[0032] 附图 1 为乳酸链球菌素的标准曲线图;

[0033] 如图所示: X 轴为浓度的半对数值, Y 轴为百分吸光度值。

[0034] 附图 2 为技术路线实施示意图;

[0035] 如图所示:本技术路线以乳酸链球菌素为免疫原制得了高效价的抗乳酸链球菌素的多克隆抗体,以乳酸链球菌素与卵清蛋白的偶联物作为包被原建立了间接竞争酶联免疫方法,用此方法检测乳制品及肉制品中的乳酸链球菌素。

#### 具体实施方式

[0036] 本发明对照实施例作进一步说明。

[0037] 本发明方法的实施步骤:

[0038] 1) 检测方法的构建:

[0039] 包被抗原的制备:用 pH 值为 9.6 的 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液稀释包被抗原 1000 倍,加入酶标板,每孔 100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,倾去包被液,用含有 0.05% 叠氮化钠、0.1% 明胶和 0.05% 吐温的磷酸盐缓冲液,即 0.02M、pH 7.4,洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后在每孔中加入 150 $\mu$ l 封闭液,即 0.1% 叠氮化钠和 10% (质量百分含量)牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液,37 $^{\circ}$ C 温育 2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存;

[0040] 乳酸链球菌素多克隆抗体的制备:取 1.0mg/ml 的乳酸链球菌素溶液与等量的弗氏佐剂(自配,液体石蜡与羊毛脂混合液,组分为 2:1,加 10mg/ml 卡介苗)混匀,首次免疫时每只兔子 2.0ml,颈背部皮下多点注射,每点 0.2ml,第二次免疫时取乳酸链球菌素溶液与等量的弗氏不完全佐剂(自配,液体石蜡与羊毛脂混合液,组分为 2:10)混匀,每只兔子 2.0ml,颈背部皮下多点注射,每点 0.2ml。每次注射间隔 2 周,免疫期间采血,检测抗

血清效价,连续加强免,直到获得满意的抗体效价(大于 1:3000)为止。最后一次无佐剂用 1.0mg 抗原直接腹腔注射。

[0041] 竞争反应:用 0.1% 牛血清白蛋白的 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液,对乳酸链球菌素的标准品实施梯度稀释,其梯度为 0.1、0.5、2.5、12.5、62.5 $\mu$ g/ml,每孔加 50 $\mu$ l;将制备的多克隆抗体以 2.5% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液按 1:1000 比例稀释后加入,每孔加入 50 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 温育 30min,然后用 PBST 洗涤 4 次;

[0042] 加酶标二抗:将 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体以 1:5000 稀释后加入,每孔加入 100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C,30min 后,用 PBST 洗涤 5 次;

[0043] 显色:每孔加入显色液 100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 显色 15min;最后每孔加入终止液 2 M 硫酸溶液 50  $\mu$  L;用酶标仪 450nm 测吸光值  $A_{450}$ ,与所作标准曲线对比算出待测样品的乳酸链球菌素的含量;

[0044] 其中选用的乳酸链球菌素标准品购置于 sigma 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购置于 Jackson ImmnoResearch LABORATORIES, INC。

[0045] 2) 检测样品的处理:

[0046] 乳饮料:用复溶工作液将样品稀释 10 倍,其中含 0.1% 牛血清白蛋白的 0.06mol/L 的磷酸盐缓冲液即为复溶工作液;

[0047] 肉制品:将样品剁碎成粉末状,取 1g 样品至 50ml 离心管里,加入 5ml 的复溶工作液,充分震荡混匀后静置 10min,小心的提取上清 2ml 用于分析,注意不要吸到表层的油脂和底层的沉淀。

[0048] 3) 酶联免疫试剂盒的制备;以乳酸链球菌素与卵清蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒包括:

[0049] <1> 包被原的酶标板 1 块,其包被原为乳酸链球菌素与载体蛋白偶联物;

[0050] <2> 乳酸链球菌素标准品溶液共 6 瓶,浓度分别为 0 mg /L (mg/kg),0.1 mg /L (mg/kg),0.5 mg /L (mg/kg),2.5 mg /L (mg/kg),12.5 mg /L (mg/kg),62.5 mg /L (mg/kg);

[0051] <3> 底物显色液共 2 瓶:底物显色液由 A 液和 B 液组成,底物显色液 A 液为过氧化脲,1 瓶,7ml/瓶;底物显色液 B 液为四甲基联苯胺,1 瓶,7ml/瓶;

[0052] <4> 乳酸链球菌素抗体工作液 1 瓶:抗体稀释液为含有 2.5% (质量百分含量)酪蛋白的磷酸盐缓冲液,抗体工作液稀释浓度为 1:1000,8ml/瓶;

[0053] <5> 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体工作液 1 瓶:酶标二抗稀释液为含有 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液,羊抗兔抗体稀释浓度为 1:5000 (质量百分含量),7ml/瓶;

[0054] <6> 浓缩洗涤液 1 瓶:含 0.05% 吐温、0.1% 明胶、0.05% (质量百分含量)叠氮钠的磷酸盐缓冲液(0.02M、pH 7.4);40ml/瓶;

[0055] <7> 终止液 1 瓶:含有 2mol/L 硫酸,7ml/瓶;

[0056] <8> 复溶工作液 1 瓶:含 0.1% (质量百分含量)牛血清白蛋白的 0.06mol/L 磷酸盐缓冲液,50ml/瓶。

[0057] 4) 采用试剂盒对样品中乳酸链球菌素含量的检测:

[0058] 本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测乳酸链球菌素的含量;

[0059] 向包被有乳酸链球菌素与卵清蛋白偶联物的酶标板微孔中加入乳酸链球菌素标准品溶液或样品溶液 50 $\mu$ l, 再加入乳酸链球菌素抗体工作液 50 $\mu$ l, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min; 倒出孔中液体, 每孔加入 250 $\mu$ l 洗涤液, 30 秒后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干; 每孔加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体工作液 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 重复洗涤步骤; 每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲, 底物显色液 B 液四甲基联苯胺(TMB), 各 50 $\mu$ l, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min, 每孔加入 2mol/L 终止液硫酸 50 $\mu$ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪, 测定每孔吸光度值。

[0060] 所获得的每个浓度标准品溶液或样品吸光度值的平均值(B) 除以第一个标准(0 标准) 的吸光度值(B<sub>0</sub>) 再乘以 100%, 即为百分吸光度值。

[0061] 公式: 百分吸光度值(%) =  $B/B_0 \times 100\%$

[0062] 公式中 B 为标准品溶液或样品溶液的平均吸光度值, B<sub>0</sub> 为 0mg/L 标准品溶液的平均吸光度值。

[0063] 以乳酸链球菌素标准品浓度(mg/L) 的半对数值为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图, 如图 1 所示; 相对应每一个样品中乳酸链球菌素的浓度可以从标准曲线上读出, 用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值, 相对应每一个样品的浓度, 则可从标准曲线上读出样品中乳酸链球菌素的含量。

[0064] 将附图 1 中各个标准品浓度对应的吸光度的平均值列表, 见表 1。

[0065]

将附图 1 中各个标准品浓度对应的吸光度的平均值列表, 见表 1。

表 1

标准溶液浓度	0.1mg/L	0.5mg/L	2.5mg/L	12.5mg/L	62.5mg/L
百分吸光度值	1.842	1.354	0.773	0.456	0.226
变异系数	6.0%	2.4%	6.8%	5.6%	1.4%

由上表数据得知: 50%抑制率为 1.1; 拐点数为 2。

[0066] 本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法, 计算出样品溶液浓度; 还可以利用计算机专业软件实施快速分析, 整个检测过程只需 1.5 小时。

[0067] 例如: 检测火腿肠样品中乳酸链球菌素含量

[0068] 将火腿肠剁碎成粉末状, 取 1g 样品至 50ml 离心管里, 加入 5ml 的复溶工作液, 充分震荡混匀, 后静置 10min, 小心的提取上清 1ml 至 2ml 离心管里用于分析, 注意不要吸到表层的油脂和底层的沉淀;

[0069] 取两条酶标板, 做好标记后, 加标准品 / 样本各 50 $\mu$ l 到对应的板孔中, 然后每孔加 50 $\mu$ l 抗体工作液, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 洗板 4-5 次; 每孔加酶标二抗 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 洗板 4-5 次; 加底物显色液 A 液和 B 液各 50 $\mu$ l 到每个孔中, 37 $^{\circ}$ C 反应 15min, 终止, 读出每孔的吸光度值, 各孔标记及吸光度值如 表 2 所示。

[0070]

表 2

浓 度 mg/kg	0	0	0.1	0.1	0.5	0.5	2.5	2.5
吸光度值	2.142	2.162	1.841	1.881	1.374	1.372	0.803	0.713
浓 度 mg/kg	12.5	12.5	62.5	62.5			空白	空白
吸光度值	0.429	0.461	0.220	0.222	1.087	1.157	0.004	0.007

[0071] 带入计算软件,得到标准曲线 1 图:

[0072] 标准曲线回归方程为 : $y = -0.277x + 0.544$  ;

[0073] 样品的 OD 值的平均值为 1.122,除以 0 标准品的 OD 值 ;

[0074] 即样品百分吸光度值( $\%$ ) =  $1.122 / 2.152 \times 100\% = 52.14\%$ ,将 52.14% 带入回归方程,  $52.14\% = -0.277x + 0.544$  得  $x = 0.08$ ,即  $\log(\text{样品浓度}) = 0.08$ ,计算出样品浓度为 0.9mg/kg,乘以其稀释倍数  $= 0.9 \times 5 = 4.5 \text{ mg/kg}$ ,所得样品含量为 4.5 mg/kg。

[0075] 5) 检测方法的性能验证 :

[0076] 评价竞争酶联免疫吸附试验反应灵敏度的方法,常用的有  $IC_{50}$  抑制浓度(指 0 标准溶液吸光度值的 50% 处所对应的标品浓度)和最低检测限,两者值越低说明试剂盒的灵敏度越高。

[0077]  $IC_{50}$  值与抗体和酶结合物的质量及检测方法有关,分别测定 20 次标准曲线的  $IC_{50}$  抑制浓度,确定该值浮动范围,测定结果见表 3。

[0078]

表3	IC <sub>50</sub> 统计表										mg/L
次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
IC <sub>50</sub>	1.1	1.3	1.0	1.4	1.1	1.2	1.2	1.1	1.0	1.4	
次数	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	1.16
IC <sub>50</sub>	1.2	1.1	1.2	1.1	1.3	1.0	1.1	1.2	1.1	1.1	

[0079] 由上表数据得知 :统计  $IC_{50}$  二十次测定结果,  $IC_{50}$  平均值为 1.16 mg /L,浮动范围在 1.0 mg /L -1.4 mg /L 之间。经计算  $IC_{50}$  的平均值  $\pm 3$  倍标准差的范围为 0.8 mg /L -1.5 mg /L ;因此确定标准曲线  $IC_{50}$  应在 0.8 mg /L -1.5 mg /L 的范围之内。

[0080] 最低检测限为乳酸链球菌素试剂盒测定实际样本的最小可检出量,结果见表 4、表 5。

[0081]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.2	0.1	0.2	0.3	0.0	0.3	0.2	0.1
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.0	0.1	0.2
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.3	0.3	0.2	0.3	0.18	0.09	0.45	

由上表数据得知：空白肉制品样品最低检测限为 0.45 mg /kg。

[0082]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.5	0.4	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.4
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.6	0.1	0.5	0.3	0.0	0.4	0.2	0.1
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.1	0.3	0.5	0.6	0.30	0.18	0.85	

由上表数据得知：空白乳制品样品的最低检测限为 0.85 mg /L。

[0083] 6) 检测精密度和准确度的验证：

[0084] 取空白肉制品样品以 0.5 mg /kg、10 mg /kg 和 100 mg /kg 乳酸链球菌素进行添加，取空白乳制品样品以 1 mg /L、30 mg /L 和 300 mg /L 乳酸链球菌素进行添加，每种样品、每个浓度各 5 个平行，用试剂盒提供的操作方法提取测定；抽取三批试剂盒，每批试剂盒测定同一份样品 3 次，分别计算测定样品的回收率、板内、批内、批间变异系数，结果见表 6、表 7。

[0085]

表6 肉制品样品精密度及准确度的试验

批号	添加0.5mg/kg				添加10mg/kg				添加100mg/kg			
	回收率%	板内 CV%	批内 CV%	批间 CV%	回收率%	板内 CV%	批内 CV%	批间 CV%	回收率%	板内 CV%	批内 CV%	批间 CV%
第一批	105.9	8.9	8.6	11.0	75.8	8.6	9.7	12.4	112.4	6.7	8.5	10.7
第二批	106.3	6.9	9.1		116.3	7.2	10.3		88.2	7.1	9.3	
第三批	93.1	7.7	11.5		84.5	6.4	8.8		96.5	5.4	10.4	

表7 乳制品样品精密度及准确度的试验

批号	添加1 mg/L				添加30 mg/L				添加300 mg/L			
	回收率%	板内 CV%	批内 CV%	批间 CV%	回收率%	板内 CV%	批内 CV%	批间 CV%	回收率%	板内 CV%	批内 CV%	批间 CV%
第一批	78.6	6.1	9.4	10.9	106.8	8.1	8.2	11.5	99.4	5.9	10.2	12.6
第二批	88.1	7.2	8.7		117.9	5.4	9.7		116.5	8.3	7.4	
第三批	110.6	7.4	9.6		98.7	6.7	9.1		79.4	8.1	9.5	

由上表 6、7 数据得知：所测样品的板内变异系数在 5.4%-8.9%之间均小于 20%，所测批内、批间的变异系数小于 20%；样品回收率均在 75.8%-117.9%之间。

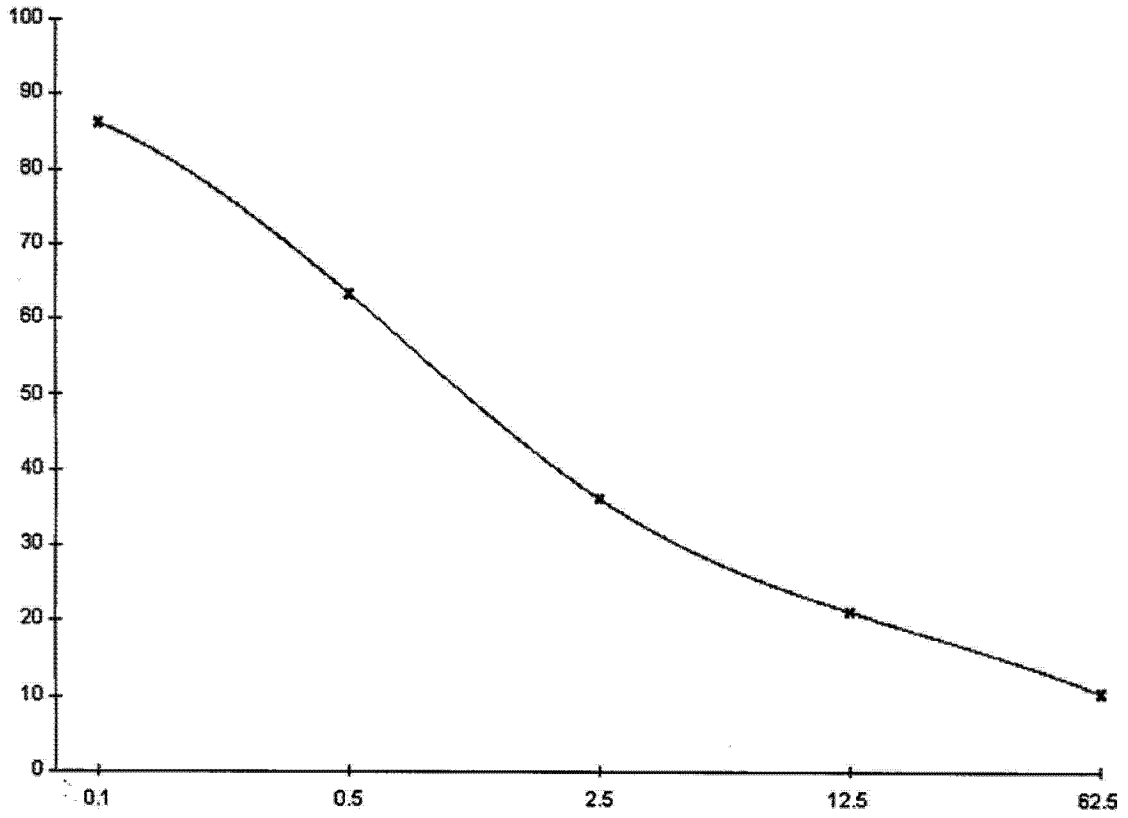


图 1

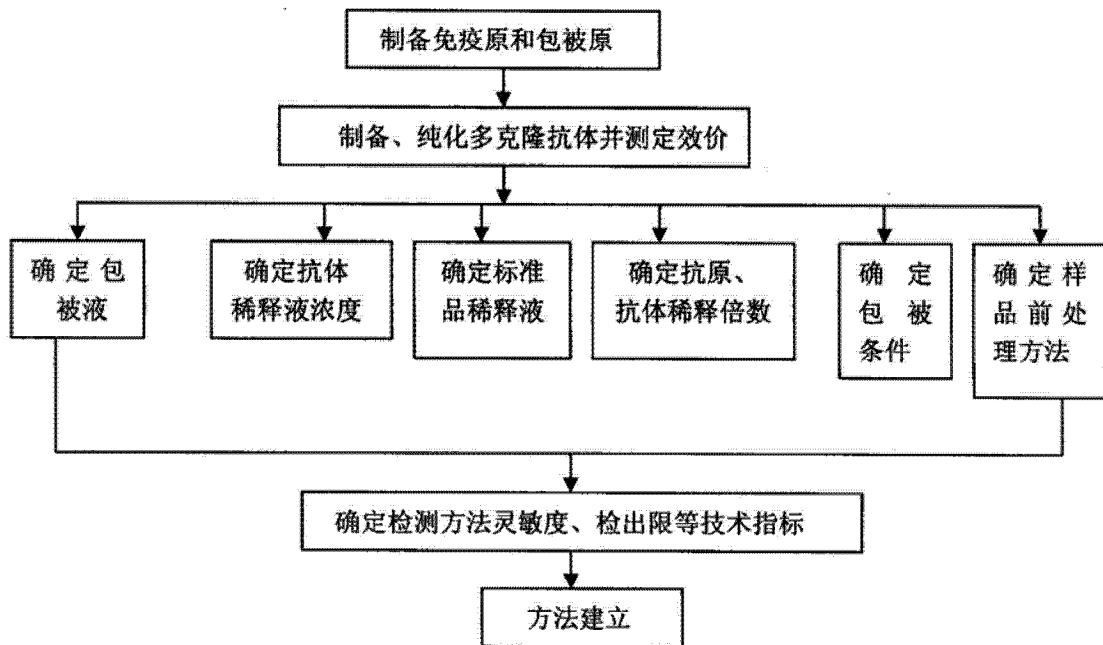


图 2

专利名称(译)	一种食品防腐剂-乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102401830B</a>	公开(公告)日	2014-03-12
申请号	CN201110207845.4	申请日	2011-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心		
申请(专利权)人(译)	伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心		
当前申请(专利权)人(译)	伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心		
[标]发明人	孟茹 王振宝		
发明人	孟茹 王振宝		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN102401830A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种食品防腐剂-乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法，用乳酸链球菌素作为抗原进行动物免疫得到多克隆抗体，以乳酸链球菌素半抗原与卵清蛋白OVA的偶联物作为包被抗原，以乳酸链球菌素为标准品，建立免疫检测及对食品样品的处理方法，提供其方法的载体试剂盒。该检测方法的构建包括：对检测样品的处置；包被抗原的制备；多克隆抗体的制备及竞争反应；加酶标二抗、显色等。获得的检测试剂盒包括：包被原的酶标板1块；酶标二抗工作液1瓶；抗体工作液1瓶；乳酸链球菌素标准品溶液6瓶；底物显色液2瓶；终止液1瓶；浓缩洗涤液1瓶；复溶工作液1瓶。

