

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810227894.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
C12N 5/12 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月22日

[11] 公开号 CN 101413943A

[22] 申请日 2008.12.2

[21] 申请号 200810227894.2

[71] 申请人 北京望尔康泰生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平回龙观镇国际信息  
产业基地高新四街8号

共同申请人 北京望尔生物技术有限公司

[72] 发明人 何方洋 万宇平 冯才伟 赵正苗  
冯才茂 汪善良

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
代理人 关 畅

权利要求书3页 说明书16页 附图2页

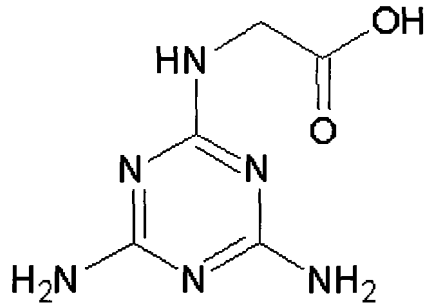
[54] 发明名称

一种检测三聚氰胺的方法及其专用酶联免疫  
试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测三聚氰胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒，包括半抗原和三聚氰胺的特异性抗体；所述特异性抗体为所述三聚氰胺的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的三聚氰胺单克隆抗体，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三聚氰胺的方法，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

1、一种检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒，包括半抗原和三聚氰胺的特异性抗体；所述特异性抗体为所述三聚氰胺的多克隆抗体或单克隆抗体；所述半抗原的结构式如下：



2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述半抗原和三聚氰胺的特异性抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联，得到半抗原与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述特异性抗体为包被原，所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

3、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括抗抗体；所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；

所述半抗原和抗抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联，得到半抗原与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述抗抗体为包被原，所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

4、根据权利要求 1、2 或 3 所述的试剂盒，其特征在于：所述单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2716 的对三聚氰胺药物单克隆杂交瘤细胞株 C-3-4 分泌产生的抗体。

5、根据权利要求 1-4 中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括三聚氰胺标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液；

所述浓缩洗涤液为 pH 值为 7.8-8.5、含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为

0.02-0.05 % (质量百分含量) 叠氮化钠、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 1.0-2.0 % (质量百分含量) 吐温-20、0.1-0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液为含有在所述浓缩复溶液中的终浓度为 5-10% (质量百分含量) 的 DMSO、pH 为 6.5-6.7、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

6、根据权利要求 1-5 中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶；当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成，显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，终止液为 1-2mol/L 硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液，终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

7、根据权利要求 5 或 6 所述的试剂盒，其特征在于：所述浓缩洗涤液为 pH 值为 8.2、含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.03 % (质量百分含量) 叠氮化钠、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 2.0 % (质量百分含量) 吐温-20、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液为含有在所述浓缩复溶液中的终浓度为 8% (质量百分含量) DMSO、pH 为 6.6、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液；所述底物显色液 A 液为过氧化脲，所述底物显色液 B 液为四甲基联苯胺；所述终止液为 2mol/L 的盐酸。

8、一种检测三聚氰胺的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

当所述样品为牛奶样品时，所述样品前处理方法为：将所述浓缩复溶液与牛奶混匀，其中所述牛奶与所述浓缩复溶液的体积比为 1: 8-10，取所述混匀后的样品用于分析；

当所述样品为奶粉样品时，所述样品前处理方法为：用醋酸缓冲液超声溶解奶粉，其中所述醋酸缓冲液与所述奶粉的配比为 4-6ml: 0.5-1.5g，离心取上清液，将所述上清液以 1: 8-10 的体积比与所述浓缩复溶液混匀，取样用于分析；

当所述样品为饲料时，所述样品前处理方法为：将乙腈与饲料混匀，其中所述乙腈与所述饲料的配比为 8-12ml: 0.5-1.5g，然后超声提取 8-15min，离心取上清液；再将所述上清液吹干，加入正己烷，混匀，再加入所述浓缩复溶液，其中所述上清液、所述正己烷与所述浓缩复溶液的体积比为 1: 1: 1，离心取下层水相；将所述下层水相与所述浓缩复溶液以 1: 8-10 的体积比混匀，取样用于分析；

2) 利用权利要求 1-7 中任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所得到的样品。

9、由保藏号为 CGMCC No. 2716 的对三聚氰胺药物单克隆杂交瘤细胞株 C-3-4 分泌产生的三聚氰胺的单克隆抗体。

10、保藏号为 CGMCC No. 2716 的对三聚氰胺药物单克隆杂交瘤细胞株 C-3-4。

## 一种检测三聚氰胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种检测三聚氰胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

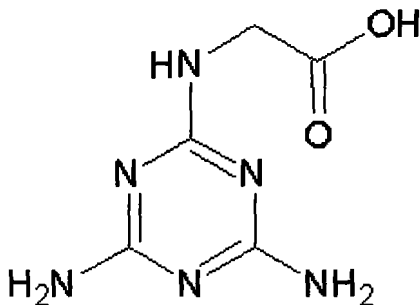
三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物，其结构式如图 1 所示。其含氮量高达 66%，白色单晶斜晶体，无味。因其易于购买和生产，成本低，固有不法厂商针对凯氏定氮法的不足，将其添加于食品和饲料中以提高蛋白含量，获取利益。虽然三聚氰胺属于低毒性化合物，但其在动物体内会代谢为三聚氰酸，三聚氰胺与三聚氰酸发生反应并累积，可引起膀胱结石和泌尿道病变。膀胱结石长期刺激，可出现膀胱肿瘤。因此，在实践中有必要建立一种精确度高、灵敏度高的检测三聚氰胺的方法。

目前，三聚氰胺残留量的常规检测方法主要有液相色谱/质谱法（LC/MS）、高效液相色谱（HPLC）、液相色谱串联质谱（LC/MSMS）等，但是这些方法存在着仪器设备复杂、检测过程繁琐和对检验人员的技能要求高的缺点，不适合现场监控和大量样品的筛查。

### 发明内容

本发明的一个目的是提供一种检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒，包括半抗原和三聚氰胺的特异性抗体；所述特异性抗体为所述三聚氰胺的多克隆抗体或单克隆抗体；所述半抗原的结构式如下：



其中，所述半抗原和三聚氰胺的特异性抗体可以以下述任一种形式存在：

1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联，得到半抗原与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述特异性抗体为包被原，所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

所述试剂盒还可以既包括半抗原和三聚氰胺的特异性抗体又包括抗抗体；所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；其中，所述半抗原和抗抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联，得到半抗原与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述抗抗体为包被原，所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

所述三聚氰胺多克隆抗体或三聚氰胺单克隆抗体，均是用所述三聚氰胺半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述载体蛋白可为甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、牛血清蛋白、兔血清蛋白、血蓝蛋白或卵清蛋白等。

所述单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2716 的对三聚氰胺药物单克隆杂交瘤细胞株 C-3-4 分泌产生的抗体。

所述三聚氰胺多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括三聚氰胺标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液；

其中，所述浓缩洗涤液可以为 pH 值为 7.8-8.5、含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.02-0.05 % 叠氮化钠、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 1.0-2.0 % 吐温-20、0.1-0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液可以为含有在所述浓缩复溶液中的终浓度为 5-10% 的 DMSO、pH 为 6.5-6.7、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。上述百分含量为质量百分含量。

所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶；当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成，显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，终止液为 1-2mol/L 硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液，终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

所述浓缩洗涤液具体可以为 pH 值为 8.2、含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.03 % 叠氮化钠、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 2.0 % 的吐温-20、0.2mol/L 磷酸

盐缓冲液；所述浓缩复溶液具体可以为含有在所述浓缩复溶液中的终浓度为 8% 的 DMSO、pH 为 6.6、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液；所述底物显色液 A 液为过氧化脲，所述底物显色液 B 液为四甲基联苯胺；所述终止液为 2mol/L 的盐酸。所述百分含量为质量百分含量。

三聚氰胺是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。将三聚氰胺半抗原与甲状腺蛋白采用碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原，三聚氰胺半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利，半抗原与甲状腺蛋白的结合摩尔比为 23-28: 1 比较合适。在制备包被原时，三聚氰胺半抗原与所述载体蛋白的摩尔配比为 26: 1 比较合适。三聚氰胺半抗原是通过将三聚氰胺与溴乙酸叔丁酯通过化学反应得到的。

制作包被有包被原的酶标板时，所述包被缓冲液可以为 pH 值为 9.0-9.6、0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液，所用封闭液可以为含有在所述封闭液中的终浓度为 10%（质量百分含量）的牛血清白蛋白、pH 值为 8.4-8.8、0.1mol/L 巴比妥钠-盐酸缓冲液。

本发明的另一个目的是提供一种检测三聚氰胺的方法。

本发明所提供的检测三聚氰胺的方法，包括以下步骤：

#### 1) 样品前处理

当所述样品为牛奶样品时，所述样品前处理方法为：将所述浓缩复溶液与牛奶混匀，其中所述牛奶与所述浓缩复溶液的体积比为 1: 8-10，取所述混匀后的样品用于分析；

当所述样品为奶粉样品时，所述样品前处理方法为：用醋酸缓冲液超声溶解奶粉，其中所述醋酸缓冲液与所述奶粉的配比为 4-6ml: 0.5-1.5g，离心取上清液，将所述上清液以 1: 8-10 的体积比与所述浓缩复溶液混匀，取样用于分析；

当所述样品为饲料时，所述样品前处理方法为：将乙腈与饲料混匀，其中所述乙腈与所述饲料的配比为 8-12ml: 0.5-1.5g，然后超声提取 8-15min，离心取上清液；再将所述上清液吹干，加入正己烷，混匀，再加入所述浓缩复溶液，其中所述上清液、所述正己烷与所述浓缩复溶液的体积比为 1: 1: 1，离心取下层水相；将所述下层水相与所述浓缩复溶液以 1: 8-10 的体积比混匀，取样用于分析；

#### 2) 利用上述任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所得到的样品。

由保藏号为 CGMCC No. 2716 的对三聚氰胺药物单克隆杂交瘤细胞株 C-3-4 分泌产生的三聚氰胺的单克隆抗体属于本发明的保护范围。

保藏号为 CGMCC No. 2716 的对三聚氰胺药物单克隆杂交瘤细胞株 C-3-4 也属于本发明的保护范围。

本发明的检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中三聚氰胺的残留量。本试剂盒中采用高特异性的三聚氰胺单克隆抗体，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三聚氰胺的方法，操作简便，简化了传统检测方法的步骤，缩短了检测的时间，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，将在三聚氰胺的检测中发挥重要作用。

### **附图说明**

图 1 为三聚氰胺的结构式。

图 2 为三聚氰胺与溴乙酸叔丁酯反应中产生的中间产品 I。

图 3 为中间产品 I 通过水解反应得半抗原。

图 4 为包被原为半抗原与载体蛋白偶联物、酶标记物为酶标抗抗体的试剂盒的标准曲线。

### **具体实施方式**

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。

实施例 1、以半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的制备及使用

一、以三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的检测原理如下：

当在酶标板微孔条上的包被原为三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联物时，向酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液后，加入三聚氰胺特异性抗体，样品中残留的三聚氰胺与酶标板上三聚氰胺偶联抗原竞争三聚氰胺特异性抗体，再加入酶标抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样品吸光值与三聚氰胺的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中三聚氰胺的残留含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅，通过与系列浓度三聚氰胺标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中三聚氰胺的浓度范围。

二、以三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试

剂盒一般可以包括如下：

1、包被有三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板，包被原的浓度可以为 0.15-0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

2、酶标抗抗体工作液：酶标二抗为用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；酶标二抗的稀释液为含有在稀释液中的终浓度为 6-8 %（质量百分含量）的山羊血清、pH 为 9.1-9.6、0.2-0.3mol/L 磷酸盐缓冲液，酶标抗抗体工作液稀释度为 1:500。

3、三聚氰胺特异性抗体工作液：可以为三聚氰胺多克隆抗体或三聚氰胺单克隆抗体工作液；用稀释液将三聚氰胺单克隆抗体稀释 3000 倍，得到特异性抗体工作液，所述稀释液为 pH 值为 9.3-9.7、0.2mol/L 的碳酸盐缓冲液。

4、三聚氰胺标准品溶液（北京艾杰尔科技有限公司，CAS：108-78-1）：6 瓶，浓度分别为 0  $\mu\text{g/L}$ ，10  $\mu\text{g/L}$ ，30  $\mu\text{g/L}$ ，90  $\mu\text{g/L}$ ，270  $\mu\text{g/L}$ ，810  $\mu\text{g/L}$ 。配制标准品的溶液为含有在配制标准品的溶液中终浓度为 5-10 %（质量百分含量）的 DMSO、pH 为 6.5-6.7、0.1-0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲或过氧化氢，7ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺，7ml/瓶，1 瓶。

6、终止液：1-2 mol/L 盐酸或硫酸。

7、浓缩洗涤液：pH 值为 7.8-8.5、含有在洗涤液中的终浓度为 0.02-0.05 %（质量百分含量）叠氮化钠和在洗涤液中的终浓度为 1.0-2.0 %（质量百分含量）的吐温-20、0.1-0.3 mol/L 的磷酸盐缓冲液；40ml/瓶，1 瓶。

8、浓缩复溶液：含有在复溶液中的终浓度为 5-10%（质量百分含量）的 DMSO、pH 为 6.5-6.7、0.1-0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液；200 ml/瓶，1 瓶。

三、以三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的具体组成及其制备：

#### （一）组成

1、包被有三聚氰胺半抗原与牛血清白蛋白偶联物的酶标板，包被原的浓度可以为 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 。

2、酶标抗抗体工作液：用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；酶标抗抗体工作液稀释度为 1:3000；酶标二抗的稀释液为在稀释液中的终浓度为 7 %（质量百分含量）的山羊血清、pH 为 9.4、0.3mol/L 磷酸盐缓冲液，酶标抗抗体工作液稀释

度为 1:500。

3、三聚氰胺单克隆抗体工作液：单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2716 的对三聚氰胺药物单克隆杂交瘤细胞株 C-3-4 分泌产生，三聚氰胺单克隆抗体工作液是按照以下方法制备的：用稀释液将三聚氰胺单克隆抗体稀释 3000 倍，得到单抗工作液，所述稀释液为 pH 值为 9.6、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

4、三聚氰胺标准品溶液（北京艾杰尔科技有限公司，CAS：108-78-1）：6 瓶，浓度分别为 0 $\mu$ g/L，10 $\mu$ g/L，30 $\mu$ g/L，90 $\mu$ g/L，270 $\mu$ g/L，810 $\mu$ g/L，配制标准品的溶液为在配制标准品的溶液中终浓度为 8%（质量百分含量）的 DMSO、pH 为 6.6、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

5、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，7ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺，7ml/瓶，1 瓶。

6、终止液：2mol/L 盐酸。

7、浓缩洗涤液：pH 值为 8.2，含有在洗涤液中的终浓度为 0.03%（质量百分含量）叠氮化钠、在洗涤液中的终浓度为 2.0%（质量百分含量）吐温-20、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液；40 ml/瓶，1 瓶。

8、浓缩复溶液：含有在复溶液中的终浓度为 8%（质量百分含量）DMSO、pH 为 6.6、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液；200 ml/瓶，1 瓶。

## （二）制备

### 1、包被有半抗原与牛血清白蛋白偶联物的酶标板的制备

#### （1）半抗原的制备

1) 取 0.5g (3.97mmol) 三聚氰胺于干燥的 50ml 圆底烧瓶中，加 35ml DMF 搅拌溶解，取 0.44g(7.93mmol) KOH、0.12g 无水 NaI 加至上述溶液中，滴加 0.646 ml 溴乙酸叔丁酯，充分混合后，加热升温 65 $^{\circ}$ C 反应 10h。反应结束后，冷却至室温，加水稀释，用乙酸乙酯萃取，干燥，旋蒸，得黄色油状物，乙酸乙酯：石油醚=2：1 过柱得产品 I（如图 2 所示）；

2) 取 0.32g 中间产品 I 用 5ml 甲醇溶解，再加入 5ml 三氟乙酸，室温搅拌 20h。反应完成后旋蒸除去溶剂，得油状物，用甲醇与乙酸乙酯 1：1 混合溶剂溶解，向溶液中滴加石油醚，直至有白色浑浊出现，加热使之变澄清，放置冷却，析出白色沉淀，真空抽滤，得半抗原产品（如图 3 所示）。

#### （2）包被原的制备

将半抗原与牛血清白蛋白通过碳化二亚胺法偶联得到包被原，具体步骤如下：

将步骤（1）制备的半抗原 10 mg、40 mg 碳化二亚胺（DEC）和 15 mg N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）充分溶解于 1 mL DMF 中，在加热条件下搅拌 24 h，得到反应液 I 液；称取 BSA 20 mg，使之充分溶解在 3.0 mL PBS（pH 8.2）中，得到反应液 II 液（半抗原与牛血清白蛋白的摩尔配比为 26:1）；将 I 液缓慢加入到 II 液中，并于室温下搅拌 5 h，用 0.01 mol/L PBS 缓冲液透析 3 d，每天换 2 次透析液，以除去未反应的小分子物质，以 12000 rpm 的速度离心 30 min，收集上清，得到半抗原与牛血清白蛋白的偶联物，分装，于 -20℃ 保存备用。

### （3）包被有包被原的酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成 0.15-0.25 μg/ml，每孔加入 100 μl，37℃ 温育 2 h，再 4℃ 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150-200 μl 封闭液，37℃ 温育 1-2 h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

其中，所用的包被缓冲液是 pH 值为 9.5、0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液；所用封闭液是含有在封闭液中终浓度为 8%（质量百分含量）的牛血清白蛋白、pH 值为 8.6、0.1 mol/L 的巴比妥钠-盐酸缓冲液。

## 2、三聚氰胺单克隆抗体的制备

### （1）免疫原的制备

三聚氰胺是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

将上述得到的半抗原与甲状腺蛋白采用碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原，具体步骤如下：

将上述制备的半抗原 10 mg、40 mg 碳化二亚胺（DEC）和 15 mg N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）充分溶解于 1 mL DMF 中，在加热条件下搅拌 24 h，得到反应液 I 液；称取甲状腺蛋白 25 mg，使之充分溶解在 3.0 mL PBS（pH 8.2）中，得到反应液 II 液；将 I 液缓慢加入到 II 液中，并于室温下搅拌 5 h，半抗原与甲状腺蛋白的摩尔比为 26:1，用 0.01 mol/L PBS 缓冲液透析 3 d，每天换 2 次透析液，以除去未反应的小分子物质，以 12000 rpm 的速度离心 30 min，收集上清，得到半抗原与甲状腺蛋白的偶联物，分装，于 -20℃ 保存备用。

### （2）制备单抗

#### a. 动物免疫

将步骤（1）得到的免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 150 $\mu$ g/只，使其产生抗血清。

#### b. 细胞融合和克隆化

取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 9: 1（数量配比）比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，筛选得到稳定分泌三聚氰胺单克隆抗体的对三聚氰胺药物单克隆杂交瘤细胞株，将此细胞株命名为 C-3-4，该细胞株已于 2008 年 10 月 20 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所，邮编 100101），保藏号为 CGMCC No.2716。

#### c. 细胞冻存和复苏

将杂交瘤细胞 C-3-4 用冻存液制成  $1 \times 10^9$  个/ml 的细胞悬液，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

#### d. 单克隆抗体的制备与纯化

增量培养法：将杂交瘤细胞 CGMCC No.2716 置于细胞培养基中，在 37 $^{\circ}$ C 条件下进行培养，用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化，得到单克隆抗体，-20 $^{\circ}$ C 保存。

所述细胞培养基为向 RPMI-1640 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠，使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20%（质量百分含量），使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为 0.2%（质量百分含量）；所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

### 3、三聚氰胺多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以半抗原与甲状腺蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1.5 mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3-4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

### 4、辣根过氧化物酶标记抗抗体：

所用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔抗抗体均购自美国 JACKSON 公司。

### 四、以半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒的应用

本发明试剂盒可以用于检测奶粉、牛奶、饲料等样品中的三聚氰胺。

## 1、组织样品前处理

### 牛奶样品：

吸取 100  $\mu\text{l}$  鲜牛奶，加入 900  $\mu\text{l}$  复溶工作液，混匀取 50  $\mu\text{l}$  用于分析。

### 奶粉样品：

称取 1 g 奶粉，加入 5 ml 0.02M 醋酸缓冲液超声溶解，4000g 以上离心 5 min，吸取上清 100  $\mu\text{l}$  加入 900  $\mu\text{l}$  复溶工作液混匀，取 50  $\mu\text{l}$  用于分析。

### 饲料样品：

称取 1g 饲料，加入 10 ml 乙腈，超声提取 10 min，4000g 以上离心 5 min，吸取 1 ml 上清液于 45 $^{\circ}\text{C}$  水浴吹干，加入 1 ml 正己烷，涡动 30 s，加入 1 ml 复溶工作液，涡动 30s，4000g 以上离心 5 min，去上层正己烷，取下层水相 100  $\mu\text{l}$  加入 900  $\mu\text{l}$  复溶工作液混匀，取 50  $\mu\text{l}$  用于分析。

## 2、检测

向包被有三聚氰胺偶联抗原的酶标板微孔中加入三聚氰胺标准品溶液或样品溶液 50  $\mu\text{l}$ ，再加入三聚氰胺单克隆抗体工作液 50  $\mu\text{l}$ ，用盖板模封板，37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中反应 30 min，倒出孔内液体，每孔加入 250  $\mu\text{l}$  洗涤液，30 s 后倒出孔内液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干；加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 100  $\mu\text{l}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中反应 30 min，倒出孔内液体，重复洗板步骤；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），轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱避光显色 15 min，每孔加入 2 mol/L 终止液硫酸 50  $\mu\text{l}$ ，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在 450 nm 处，测定每孔吸光度值（OD 值）。

## 3、检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值（B）除以第一个标准品溶液（0 标准）的吸光度值（ $B_0$ ）再乘以 100%，得到百分吸光度值。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

公式中 B 为标准品溶液或样品溶液的平均吸光度值， $B_0$  为 0  $\mu\text{g/L}$  标准品溶液的平均吸光度值。

以三聚氰胺标准品浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图（图 4）。用同样的办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三聚氰胺的残留量。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。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件, 此法更便于大量样品的快速分析, 整个检测过程只需 75 分钟可以完成。

## 五、试剂盒灵敏度、精密度、准确度和保存期检测

### (一) 标准品精密度试验:

从实施例 1 中步骤三中不同时间段制备的不同批次 (01 批、02 批、03 批) 的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒, 从每个试剂盒的酶标板中各抽出 20 个微孔, 测定 270 $\mu$ g/L 三聚氰胺标准溶液的吸光度值 (OD 值), 计算变异系数。

实验结果如表 1 所示, 标准品吸光度值的变异系数在 3.5%-9.4%之间, 符合精密度小于或等于 20%的规定。

表 1、标准品可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	01 批	5.4	3.5	6.7	9.4	5.8	6.7	8.0	8.4	8.7	9.1
	02 批	5.6	4.7	8.3	9.1	7.2	6.4	5.8	6.7	5.9	5.1
%	03 批	6.3	7.4	6.5	5.7	8.2	5.4	6.1	6.7	7.2	4.0

### (二) 样品精密度和准确度试验

#### 1、样品精密度试验:

向不含三聚氰胺的奶粉、牛奶、饲料样品中添加三聚氰胺标准品, 使三聚氰胺在样品中的终浓度为 2 mg/kg, 再分别按照上述方法进行样品前处理。从实施例 1 中步骤三中所述的不同时间段制备的三个批次的试剂盒 (01 批、03、06 批) 中各抽取 3 个试剂盒, 进行实验, 每个样品重复 5 次, 分别计算变异系数 (CV%)。结果如表 2、表 3 和表 4 所示 (各表中的数值为 5 次重复的平均值)。

结果表明奶粉、牛奶、饲料样品的变异系数均在 6.2%-15.2%之间, 符合了《农业部文件》农医发【2005】17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度标准。

表 2、牛奶样品 可重复性试验

批号	实测值 (mg/kg)					变异系数 CV%
01	1.95	2.05	1.7	2	2.05	7.5
	2.25	2.3	1.85	2	1.7	12.7

	2.4	2.45	2.15	2.25	2.05	7.4
	2.25	1.6	2.1	1.9	1.85	12.8
03	2.3	2.15	1.75	1.7	2.1	13.1
	2.05	2.2	2.15	1.8	1.6	12.9
	2.4	1.75	1.9	1.75	1.7	15.2
06	1.7	2.35	2.05	2.15	2.2	11.6
	2.05	2.2	2.25	1.95	2.25	6.3

表 3、奶粉样品可重复性试验

批号	实测值 (mg/kg)					变异系数 CV%
	2.1	1.85	1.6	2.15	1.85	11.6
01	1.6	1.85	2.05	2.1	1.55	13.7
	1.7	1.65	1.85	2.05	1.9	8.8
	1.9	2.1	1.9	2.1	2.35	9.0
03	2.1	2.2	1.85	1.8	2.35	11.3
	2.35	2.15	1.9	1.8	1.65	14.2
	2.15	1.9	1.95	2.05	2.2	6.2
06	2.1	2.25	2.1	1.7	2.25	10.8
	1.9	2.2	2.4	2.1	2.15	8.4

表 4、饲料样品可重复性试验

批号	实测值 (mg/kg)					变异系数 CV%
	2.1	1.85	1.75	2.15	1.7	10.7
01	2.05	1.85	1.7	2.1	1.9	8.4
	1.8	2	1.7	2.15	2.3	12.4
	1.6	1.95	2.15	1.8	1.5	14.6
03	1.7	1.9	2.05	2	1.55	11.4
	1.5	1.7	1.9	2	1.6	11.9
	2.05	2.15	1.8	1.9	2	6.8
06	1.95	1.8	2.1	1.6	1.55	12.9

1.55	2.2	1.8	1.9	1.6	14.4
------	-----	-----	-----	-----	------

## 2、样品准确度试验

向不含三聚氰胺的牛奶、奶粉、饲料样品中添加三聚氰胺标准品溶液，在牛奶、奶粉样品中使其终浓度分别为 1mg/kg (L) 和 2mg/kg (L)，饲料样品中使其终浓度分别为 2mg/kg (L) 和 4mg/kg (L)，然后按照实施例 1 中所述的样品前处理方法进行处理；再用实施例 1 中步骤三中所述的试剂盒进行检测，每个浓度做 4 个平行，分别计算准确度（准确度=实测值/添加值）。结果如表 5 所示。结果表明牛奶样品添加回收率在 68.7%-97.6%之间，奶粉样品添加回收率在 62.7%-96.8%之间，饲料样品添加回收率在 62.5%-89.6%之间。

表 5、试剂盒的准确度

样品		牛奶		奶粉		饲料	
		1	2	1	2	2	4
准确度%	1	68.7	97.6	84.3	87.5	75.2	65.7
	2	86.3	85.0	72.3	77.5	82.4	83.4
	3	82.5	78.6	82.2	96.8	78.5	89.6
	4	92.7	86.9	62.7	82.6	62.5	83.7
平均值%		82.6	87.0	75.4	86.1	74.7	80.6

### (三) 交叉反应率试验：

选择与三聚氰胺有类似结构和类似功能的 3 种药物测定交叉反应率。通过各种药物的标准曲线分别得到其 50%抑制浓度。用下式计算步骤三中试剂盒对其它药物的交叉反应率。试剂盒对于三聚氰胺的交叉反应率越大，则其对该药物检测的特异性就越好。重复测定 3 次，结果取平均值。

交叉反应率 (%) = (引起 50%抑制三聚氰胺的浓度/引起 50%抑制的三聚氰胺类似物浓度) × 100%

实验结果如表 6 所示，表明，本发明试剂盒对三聚氰胺的特异性好，即本发明试剂盒可以检测三聚氰胺。

表 6、试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
------	----------

三聚氰胺	100
三聚氰酸	<1
三嗪	<1
三嗪二胺	<1

#### (四) 试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为 2-8℃，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、三聚氰胺添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 6 天，进行加速老化实验，结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生，将试剂盒放入-20℃ 冰箱冷冻 5 天，测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8℃ 至少可以保存 6 个月以上。

#### (五) 试剂盒的最低检测限

取不含三聚氰胺的阴性牛奶样品，用步骤三中试剂盒分别进行 20 次检测，测定结果的平均值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

结果如表 7 所示，表明试剂盒的最低检测限为 99.7μg/kg。

表 7、阴性牛奶样品测定结果统计表 (μg/kg)

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	48.7	30.2	25.9	86.3	25.9	43.7	68.3	28.5
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	62.5	73.4	60.8	60.4	63.7	45.2	46.3	48.7
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	50.2	41.6	38.9	58.7	50.4	16.4	99.7	

实施例 2、用于检测三聚氰胺的试剂盒还可以有如下几种：

一、包被原为特异性抗体，酶标记物为酶标半抗原的试剂盒

(一) 本试剂盒的工作原理为：

当在微孔条上预包被实施例 1 中所述三聚氰胺特异性抗体时，加入样品溶液或

标准品溶液后，再加入酶标记半抗原溶液。样品中的三聚氰胺或三聚氰胺标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的三聚氰胺特异性抗体，用显色液显色，样品吸光值与样品中三聚氰胺的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样品中三聚氰胺的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅，通过与系列浓度的三聚氰胺标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中三聚氰胺的浓度范围。

(二) 本试剂盒的组成为：

(1) 包被有包被原的酶标板：包被原为三聚氰胺单克隆抗体，由保藏号为CGMCC No. 2716的对三聚氰胺药物的单克隆杂交瘤细胞株C-3-4分泌产生；包被原的浓度可以为0.15-0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

(2) 酶标记物：酶标三聚氰胺半抗原的工作液；标记酶为辣根过氧化物酶。

(3) 三聚氰胺标准品溶液（北京艾杰尔科技有限公司，CAS：108-78-1）：6瓶，浓度分别为0  $\mu\text{g/L}$ ，10  $\mu\text{g/L}$ ，30  $\mu\text{g/L}$ ，90  $\mu\text{g/L}$ ，270  $\mu\text{g/L}$ ，810  $\mu\text{g/L}$ 。配制标准品的溶液：在所述配制标准品的溶液中终浓度为10%（质量百分含量）的DMSO、pH为6.5-6.7、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液。

(4) 底物显色液：由显色液A液和显色液B液组成，显色液A液为过氧化氢，显色液B液为邻苯二胺。

(5) 终止液为1-2 mol/L硫酸溶液。

(6) 浓缩洗涤液：pH值为8.5、含有在浓缩洗涤液中的终浓度为0.05%（质量百分含量）叠氮化钠、在浓缩洗涤液中的终浓度为2.0%（质量百分含量）吐温-20、0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液；40 ml/瓶，1瓶。

(7) 浓缩复溶液：含有在浓缩复溶液中的终浓度为10%（质量百分含量）的DMSO、pH为6.7、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液；200 ml/瓶，1瓶。

二、包被原为三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联物、酶标记物为酶标三聚氰胺特异性抗体的试剂盒

(一) 工作原理

当在微孔条上预包被三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联物时，加入样品溶液或标准品溶液后，再加入酶标实施例1中所述三聚氰胺特异性抗体。样品中的三聚氰胺或三聚氰胺标准品与酶标板上包被的三聚氰胺半抗原竞争三聚氰胺特异性抗体，用显色液显色，样品吸光值与样品中三聚氰胺的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样品中三聚氰胺的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅，通过与系列浓度

三聚氰胺标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中三聚氰胺的浓度范围。

## (二) 本试剂盒的组成

(1) 包被有包被原的酶标板：包被原为三聚氰胺半抗原与牛血清白蛋白偶联物。

(2) 酶标记物：酶标特异性抗体工作液，标记酶为碱性磷酸酶；特异性抗体是单克隆抗体，由保藏号为CGMCC No. 2716的对三聚氰胺药物的单克隆杂交瘤细胞株C-3-4分泌产生。

(3) 三聚氰胺标准品溶液（北京艾杰尔科技有限公司，CAS：108-78-1）：6瓶，浓度分别为0  $\mu\text{g/L}$ ，10  $\mu\text{g/L}$ ，30  $\mu\text{g/L}$ ，90  $\mu\text{g/L}$ ，270  $\mu\text{g/L}$ ，810  $\mu\text{g/L}$ 。配制标准品的溶液：含有在所述配制标准品的溶液中的终浓度为5%（质量百分含量）的DMSO、pH为6.5、0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色剂为硝基磷酸盐缓冲液（4-硝基酚磷酸盐缓冲液）。

(5) 终止液为1 mol/L氢氧化钠溶液。

(6) 浓缩洗涤液：pH值为7.8、含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为0.02%（质量百分含量）叠氮化钠、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为1.0%（质量百分含量）吐温-20、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液；40 ml/瓶，1瓶。

(7) 浓缩复溶液：含有在所述浓缩复溶液中的终浓度为5%（质量百分含量）的DMSO、pH为6.5、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液；200 ml/瓶，1瓶。

三、包被原为抗抗体，酶标记物为酶标三聚氰胺半抗原

## (一) 工作原理

当在微孔条上预包被抗抗体时，加入三聚氰胺特异性抗体孵育后，加入样品溶液或标准品溶液，再加入酶标三聚氰胺半抗原。样品中的三聚氰胺或三聚氰胺标准品与酶标三聚氰胺半抗原竞争三聚氰胺特异性抗体，用显色液显色，样品吸光度值与样品中三聚氰胺的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样品中三聚氰胺的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅，通过与系列浓度三聚氰胺标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中三聚氰胺的浓度范围。

## (二) 试剂盒组成如下：

(1) 包被有包被原的酶标板：包被原为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；包被原的浓度可以为0.15-0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

(2) 酶标记物：辣根过氧化物酶标记的实施例1中所述三聚氰胺半抗原；

(3) 特异性抗体工作液：单克隆抗体：是由保藏号为 CGMCC No. 2716 的对三聚氰胺药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-3-4 分泌产生。

(4) 三聚氰胺标准品溶液（北京艾杰尔科技有限公司，CAS：108-78-1）：6 瓶，浓度分别为 0  $\mu\text{g/L}$ ，10  $\mu\text{g/L}$ ，30  $\mu\text{g/L}$ ，90  $\mu\text{g/L}$ ，270  $\mu\text{g/L}$ ，810  $\mu\text{g/L}$ 。配制标准品的溶液：含有在所述配制标准品的溶液中的终浓度为 7%（质量百分含量）的 DMSO、pH 为 6.6、0.15 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(5) 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，7 ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为邻苯二胺，7 ml/瓶，1 瓶。

(6) 浓缩洗涤液：pH 值为 8.0，含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.04 %（质量百分含量）叠氮化钠、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 1.5%（质量百分含量）吐温-20、0.15mol/L 的磷酸盐缓冲液；40 ml/瓶，1 瓶。

(7) 浓缩复溶液：含有在所述浓缩复溶液中的终浓度为 8%（质量百分含量）的 DMSO、pH 为 6.6、0.15mol/L 的磷酸盐缓冲液；200 ml/瓶，1 瓶。

(8) 终止液：终止液为 1-2 mol/L 硫酸或盐酸溶液。

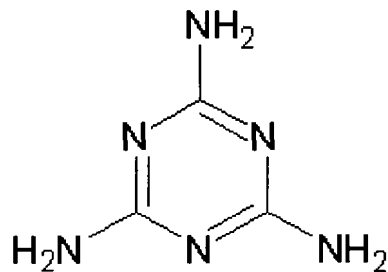


图 1

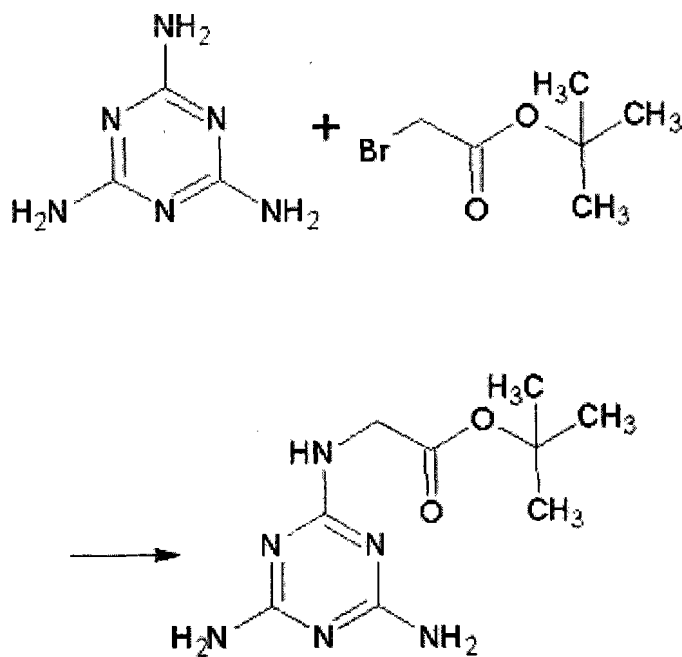


图 2

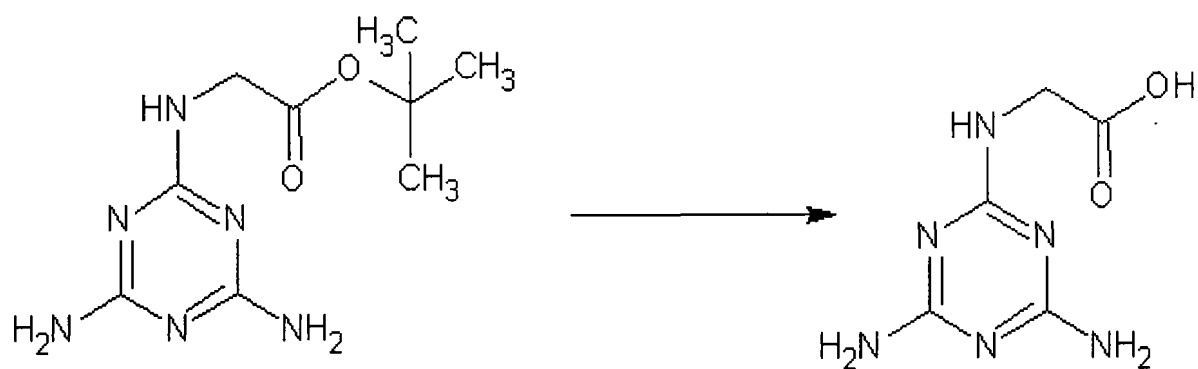


图 3

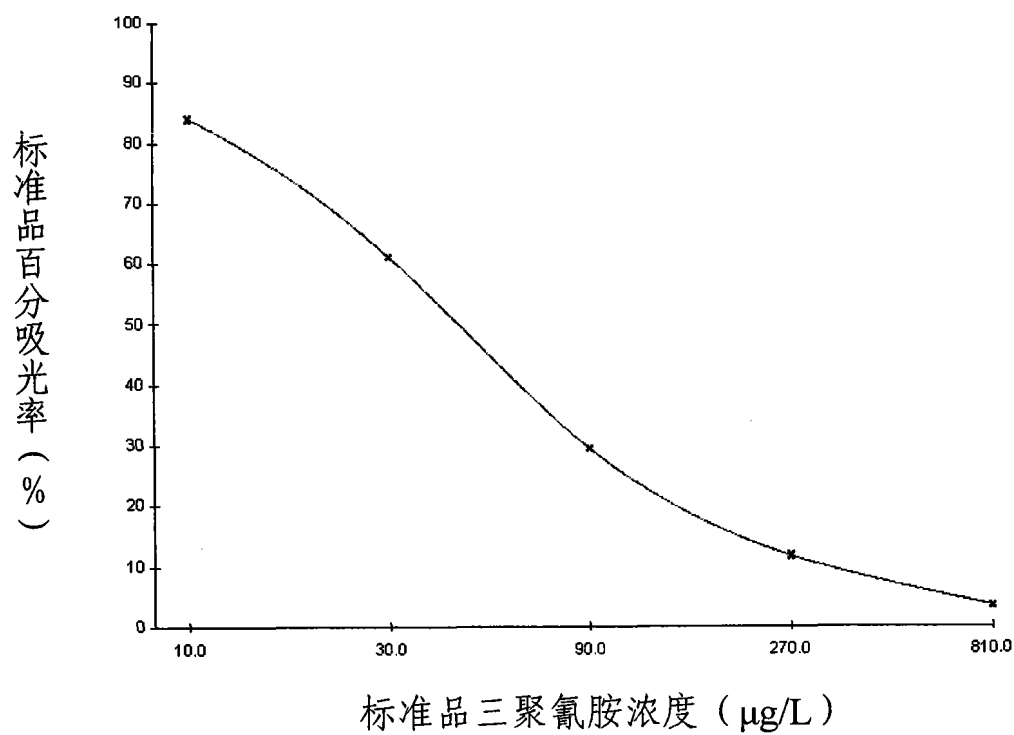


图 4

专利名称(译)	一种检测三聚氰胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101413943A</a>	公开(公告)日	2009-04-22
申请号	CN200810227894.2	申请日	2008-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 万宇平 冯才伟 赵正苗 冯才茂 汪善良		
发明人	何方洋 万宇平 冯才伟 赵正苗 冯才茂 汪善良		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 C12N5/12		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101413943B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测三聚氰胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒，包括半抗原和三聚氰胺的特异性抗体；所述特异性抗体为所述三聚氰胺的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的三聚氰胺单克隆抗体，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三聚氰胺的方法，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。

