

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102313808 A

(43) 申请公布日 2012.01.11

(21) 申请号 201110035545.2

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)

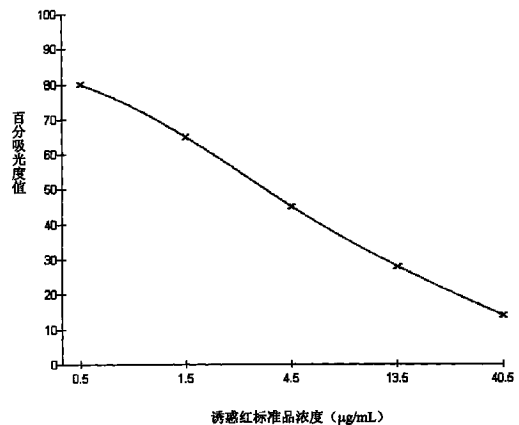
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于检测诱惑红的方法及酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了用于检测诱惑红的方法及酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测诱惑红的酶联免疫试剂盒,包括诱惑红半抗原和诱惑红的特异性抗体;所述特异性抗体为所述诱惑红的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的诱惑红单克隆抗体,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诱惑红的方法,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. 一种检测诱惑红的酶联免疫试剂盒,包括诱惑红半抗原和诱惑红的特异性抗体;所述特异性抗体为诱惑红的多克隆抗体或单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:

1) 所述半抗原与载体蛋白偶联,得到的半抗原-载体蛋白偶联物作为包被原,所述特异性抗体为酶标记的;或者

2) 所述特异性抗体为包被原,所述半抗原为酶标记的。

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,如羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;并且:

1) 所述半抗原与载体蛋白偶联,得到的半抗原-载体蛋白的偶联物作为包被原,所述抗抗体为酶标记的;

2) 所述抗抗体作为包被原,所述半抗原为酶标记的。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括诱惑红标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液中的至少一种。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的试剂盒,其特征在于:所述诱惑红半抗原或诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物、所述诱惑红特异性抗体、所述抗抗体中的任一种已包被在酶标板上。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的试剂盒,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酶;当标记酶为辣根过氧化物酶时,使用的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,终止液为1-2mol/L硫酸溶液或盐酸溶液;当标记酶为碱性磷酸酶时,使用的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4所述的试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为pH值为6-9、含有终浓度为0.02-0.05%(质量)的防腐剂、终浓度为1.0-2.0%(质量)的吐温-20、0.1-0.2mol/L的磷酸盐缓冲液,优选地,所述浓缩洗涤液为pH值为7.4、含有终浓度为0.03%(质量)的防腐剂、终浓度为1.5%(质量)的吐温-20的0.2mol/L磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有终浓度为5-10%(质量)的DMSO、pH为6-8的0.1-0.2mol/L磷酸盐缓冲液,优选地,所述浓缩复溶液为含有终浓度为8%(质量)的DMSO、pH为7.4的0.2mol/L磷酸盐缓冲液;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2mol/L硫酸溶液或盐酸溶液。

8. 一种检测样品中的诱惑红含量的方法,包括以下步骤:

1) 用诱惑红半抗原或诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物包被酶标板;

2) 将诱惑红标准品或待测样品加入所述包被的酶标板孔内,然后每孔加入酶标记的诱惑红特异性抗体,孵育,洗涤;

3) 加入底物显色液显色;

4) 加入反应终止液终止反应;

5) 通过比较诱惑红标准品与待测样品的颜色,推测出待测样品中的诱惑红含量;或者,测定各孔的吸光度,建立诱惑红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诱惑红含量。

9. 一种检测样品中的诱惑红含量的方法,包括以下步骤:

- 1) 用诱惑红半抗原或诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物包被酶标板；
- 2) 加入诱惑红标准品或待测样品；
- 3) 加入诱惑红特异性抗体, 孵育, 洗涤；
- 4) 加入酶标记的抗抗体, 孵育, 洗涤；
- 5) 加入底物显色液显色；
- 6) 加入反应终止液终止反应；

7) 通过比较诱惑红标准品与待测样品的颜色, 推测出待测样品中的诱惑红含量; 或者, 测定各孔的吸光度, 建立诱惑红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诱惑红含量。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的检测样品中诱惑红含量的方法, 还包括样品前处理步骤, 其中:

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 : 10-15 混合, 取混合后样品用于分析;

当所述样品为糖果、话梅类食品时, 所述样品前处理方法为: 将待检物粉碎, 与样本稀释液以质量体积比为 1 : 5-10 混匀, 离心, 取上清与样本稀释液以一定比例稀释后检测。

当所述样品为冰激凌、糕点时, 样品置于水浴溶解, 均质化, 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。

## 用于检测诱惑红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诱惑红的方法及酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] 诱惑红是食用色素的一种,呈鲜艳的深红色,单色品种。该色素稳定性优良,被广泛用于食品、饮料、药品、化妆品、饲料、烟草、玩具、食品包装材料等的着色。水溶性合成色素,鲜艳的深红色,应用于糖果包衣、冰淇淋、雪糕、糖果、糕点、饮料等的着色。

[0003] 但是长期食用诱惑红对身体会产生危害,为一般毒性、致泻性甚至致癌性,尤其是偶氮化合物类合成色素的致癌作用明显。偶氮化合物在体内分解,可形成两种芳香胺化合物,芳香胺在体内经过代谢活动后与靶细胞作用可能引起癌变。此外,食用合成色素在生产过程中还可能混入砷和铅,能导致皮下肉瘤、肝癌、肠癌及恶性淋巴瘤等。

[0004] 诱惑红属于食用红色色素。中国《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760-1996)中规定:诱惑红可用于糖果包衣,最大使用量 0.085g/kg;用于冰淇淋、雪糕、苹果干、燕麦片(调香、调色载体)、可可玉米片(即食早餐谷类食品)为 0.07g/kg;用于炸鸡调料为 0.04g/kg;用于冰棍、糖果、糕点彩装、红绿丝、染色樱桃罐头、红肠肠衣、果汁饮料、果汁酒(色淀除外),最大用量 0.05g/kg;用于果汁(味)型饮料,0.025g/kg(按稀释 6 倍计)。

[0005] 通常,检测诱惑红的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、纸上层析法、分光光度法等等。HPLC法与分光光度法是诱惑红残留检测的确证方法,其优点是检测精确度高,但因其仪器化程度高、检测时间长、过程繁琐、检测费用昂贵等而阻碍其推广应用。理化检测法多以有机溶剂萃取后过层析柱,然后观察颜色进行诱惑红残留的判断,此方法主观性强,对微量残留很难进行测定,而且无法定量,因此很难符合检测单位实际使用的要求。而酶联免疫分析(ELISA)快速检测技术因灵敏度高、特异性好、既可定性又可定量,且成本低、操作简单快速、一次检测样本量大、仪器化程度低,现已成为常用的筛选方法。并且经过检索相关的文献与专利并未发现国内外有关于诱惑红免疫检测的方法与试剂盒。

[0006] 总之,现有酶联免疫试剂盒采用的检测方法复杂、繁琐,很难应用于实践,且现有技术由于普遍存在稳定性差、样品前处理及检测步骤复杂、设备条件要求较高、价格昂贵等不足,严重影响了诱惑红残留检测与监控,因此研制稳定性高、操作简单、设备要求低、廉价的诱惑红 ELISA 检测试剂盒具有非常重要的经济和社会意义。

### 发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供一种检测诱惑红的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测诱惑红的酶联免疫试剂盒,包括诱惑红半抗原和诱惑红的特异性抗体;所述特异性抗体为诱惑红的多克隆抗体或单克隆抗体;其中,所述半抗原和诱惑红的特异性抗体可以以下述任一种形式存在:

[0008] 1) 将诱惑红半抗原与载体蛋白进行偶联,得到诱惑红半抗原与载体蛋白的偶联物(以下称为半抗原-载体蛋白偶联物),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；

[0009] 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。

[0010] 所述试剂盒还可以既包括半抗原和诱惑红的特异性抗体,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形式存在:

[0011] 1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联,得到半抗原-载体蛋白偶联物,将其作为包被原,所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物;

[0012] 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。

[0013] 所述诱惑红多克隆抗体或诱惑红单克隆抗体,均是用所述诱惑红半抗原-载体蛋白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。

[0014] 所述单克隆抗体是通过杂交瘤细胞技术得到的。所述诱惑红多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

[0015] 为了方便检测,所述试剂盒还可包括酶标板,当所述诱惑红特异性抗体或抗抗体用酶进行标记时,所述酶标板上包被有所述诱惑红半抗原或诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物;当所述半抗原用酶进行标记时,所述酶标板上包被有所述诱惑红特异性抗体或所述抗抗体。

[0016] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还可包括诱惑红标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液中的至少一种;

[0017] 其中,所述浓缩洗涤液为 pH 值为 6-9、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) 防腐剂、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、0.1-0.2mol/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 6-8、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0018] 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酶;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 硫酸溶液或盐酸溶液。当标记为碱性磷酸酶时,所述显色液为硝基磷酸盐缓冲液,终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0019] 所述浓缩洗涤液具体可以为 pH 值为 7.4、含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度 0.03% 的防腐剂、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 1.50% 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 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;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 2mol/L 硫酸溶液或盐酸溶液。

[0020] 诱惑红是小分子物质,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。将诱惑红半抗原与牛血清蛋白采用碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原,诱惑红半抗原与载体蛋白的比例过低或过高都对免疫不利,半抗原与牛血清蛋白的结合摩尔比为 23-28 : 1 较合适。在制备包被原时,诱惑红半抗原与所述载体蛋白的摩尔配比为 26 : 1 比较合适。诱惑红半抗原是通过将诱惑红与二乙酸叔丁酯通过化学反应得到的。

[0021] 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、

0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, 封闭液为 pH6-8, 含有 5% -8% 山羊血清、10g/L 酪蛋白的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0022] 本发明的另一个目的是提供一种检测诱惑红的方法。

[0023] 本发明所提供的一种检测样品中的诱惑红含量的方法, 包括以下步骤:

[0024] 1) 用诱惑红半抗原或诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物包被酶标板;

[0025] 2) 将诱惑红标准品或待测样品加入所述包被的酶标板孔内, 然后每孔加入酶标记的诱惑红特异性抗体, 孵育, 洗涤;

[0026] 3) 加入底物显色液显色;

[0027] 4) 加入反应终止液终止反应;

[0028] 5) 通过比较诱惑红标准品与待测样品的颜色, 推测出待测样品中的诱惑红含量; 或者, 测定各孔的吸光度, 建立诱惑红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诱惑红含量。

[0029] 本发明所提供的另一种检测样品中的诱惑红含量的方法, 包括以下步骤:

[0030] 1) 用诱惑红半抗原或诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物包被酶标板;

[0031] 2) 加入诱惑红标准品或待测样品;

[0032] 3) 加入诱惑红特异性抗体, 孵育, 洗涤;

[0033] 4) 加入酶标记的抗抗体, 孵育, 洗涤;

[0034] 5) 加入底物显色液显色;

[0035] 6) 加入反应终止液终止反应;

[0036] 7) 通过比较诱惑红标准品与待测样品的颜色, 推测出待测样品中的诱惑红含量; 或者, 测定各孔的吸光度, 建立诱惑红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诱惑红含量。

[0037] 在本发明所提供的检测样品中的诱惑红含量的方法, 还可以包括样品前处理步骤:

[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 : 10-15 混合, 取混合后样品用于分析;

[0039] 当所述样品为糖果、话梅类食品时, 所述样品前处理方法为: 将待检物粉碎, 与样本稀释液以质量体积比为 1 : 5-10 混匀, 再加入一定体积的正己烷脱脂, 离心, 取上清与样本稀释液以一定比例稀释后检测。

[0040] 当所述样品为冰淇淋、糕点时, 样品置于水浴溶解、均质化, 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] 本发明的检测诱惑红的酶联免疫试剂盒采用直接竞争及间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中诱惑红的含量。本试剂盒中采用高特异性的诱惑红单克隆抗体, 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诱惑红的方法, 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, 将在诱惑红的检测中发挥重要作用。

## 附图说明

[0042] 图 1 为诱惑红 ELISA 检测标准曲线。

## 具体实施方式

[0043] 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。

[0044] 实施例 1、以半抗原-载体蛋白偶联物为包被原、酶标抗体为酶标记物的试剂盒及 ELISA 检测方法

[0045] 一、以诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物为包被原、酶标抗体为酶标记物的 ELISA 检测原理:

[0046] 当在酶标板微孔条上的包被原为诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物时,向酶板微孔中加入标准品溶液或样品溶液后,样品中的诱惑红与酶标板上诱惑红偶联抗原竞争酶标诱惑红特异性抗体,洗板,显色,样品吸光值与诱惑红的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样品中诱惑红的含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅,通过与系列浓度诱惑红标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中诱惑红的含量。

[0047] 二、以诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物为包被原、酶标抗体为酶标记物的试剂盒一般可以包括:

[0048] 1、包被有诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物的酶标板,包被原的浓度可以为 0.1-0.5  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0049] 2、酶标抗体工作液:酶标抗体为用辣根过氧化物酶标记的诱惑红特异性抗体;酶标抗体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 6-8、0.2-0.3mol/L 磷酸盐缓冲液,酶标抗体工作稀释度为 1 : 2500。

[0050] 3、诱惑红标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ , 9  $\mu\text{g/ml}$ , 27  $\mu\text{g/ml}$ , 81  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 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 pH 为 7.0-7.5、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0051] 4、底物显色液: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,7ml/瓶,1 瓶。

[0052] 5、终止液:1-2mol/L 盐酸或硫酸。

[0053] 6、浓缩洗涤液:pH 值为 6-9、含有在洗涤液中的终浓度为 0.02-0.05% (质量百分含量) 的防腐剂和洗涤液中的终浓度为 1.0-2.0% (质量百分含量) 的吐温-20、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液;40ml/瓶,1 瓶。

[0054] 7、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 6-8、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液;200ml/瓶,1 瓶。

[0055] 三、以诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物为包被原、酶标抗体为酶标记物的试剂盒的具体组成及其制备:

[0056] (一) 组成

[0057] 1、包被有诱惑红半抗原-牛血清白蛋白偶联物的酶标板,包被原的浓度可以为 0.30  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0058] 2、酶标抗体工作液:酶标抗体为用辣根过氧化物酶标记的诱惑红特异性抗体;酶

标抗体的稀释液为含有在稀释液中的终浓度为 6%（质量百分含量）的山羊血清、pH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液，酶标抗抗体工作稀释度为 1 : 2500。

[0059] 3、诱惑红标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0  $\mu$ g/ml, 0.5  $\mu$ g/ml, 1.5  $\mu$ g/ml, 4.5  $\mu$ g/ml, 13.5  $\mu$ g/ml, 40.5  $\mu$ g/ml。配制标准品的溶液为在配制标准品溶液中终浓度为 pH 为 7.2、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0060] 4、底物显色液：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，7ml/瓶，1 瓶。

[0061] 5、终止液：2mol/L 盐酸。

[0062] 6、浓缩洗涤液：pH 值为 6-9、含有在洗涤液中的终浓度为 0.02-0.05%（质量百分含量）的防腐剂和洗涤液中的终浓度为 1.0-2.0%（质量百分含量）的吐温-20、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液；40ml/瓶，1 瓶

[0063] 7、浓缩复溶液：含有在复溶液中的终浓度为 8%（质量百分含量）的 DMSO、pH 为 7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液；200ml/瓶，1 瓶。

[0064] （二）制备

[0065] 1、包被有半抗原-牛血清白蛋白偶联物的酶标板的制备

[0066] 1) 诱惑红包被原的制备：

[0067] a. 以 200mg 纯化的氨基诱惑红加 0.3mol/L HCL 12mL 的比例，将纯化的氨基诱惑红搅拌溶解；

[0068] b. 在冰浴搅拌的条件下缓慢加入 10g/L  $\text{NaNO}_2$ ，使氨基诱惑红重氮化，同时监测  $\text{NaNO}_2$  是否过量，检测方法：取淀粉/碘化钾溶液滴于白色干燥玻璃片上，滴加 1 滴上述重氮化溶液，混合后 30 秒内呈现蓝黑色即完成氨基诱惑红的重氮化；

[0069] c. 上述重氮化的氨基诱惑红继续反应 20 分钟，称取 800mg 的 BSA，溶于碳酸盐缓冲液，制成 20g/L 蛋白溶液，在冰浴搅拌条件下缓慢加入重氮化氨基诱惑红溶液；边加边用 0.01mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5 ~ 8.0，获得诱惑红与牛血清白蛋白得偶联物 (LMG-BSA)，置于 4℃ 冰箱过夜；

[0070] d. 于 4℃ 条件下，先用 pH 值较低的稀 HCL (0.01mol/L) 溶液透析，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。

[0071] 2) 包被有包被原的酶标板的制备

[0072] 用包被缓冲液将包被原稀释成 0.3  $\mu$ g/ml，每孔加入 100  $\mu$ l，37℃ 温育 2 小时，再 4℃ 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 5 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中入 200-300  $\mu$ l 封闭液，37℃ 温育 1-2 小时，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密保存。

[0073] 其中，所用的包被缓冲液是 pH 值为 9.5、0.05mol/L 碳酸盐缓冲液；所用封闭液为 pH7.4，含有 5% 山羊血清、10g/L 酪蛋白的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0074] 2、诱惑红单克隆抗体的制备

[0075] 1) 免疫原的制备

[0076] 诱惑红是小分子物质，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。

[0077] 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：

[0078] 将上述制备的半抗原 10mg、40mg 碳化二亚胺 (DEC) 和 15mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 充分溶解于 1mL DMF 中,在加热条件下搅拌 24 小时,得到反应液 a 液;称取甲状腺蛋白 25mg,使之充分溶解在 3.0mLPBS(PH 8.2) 中,得到反液 b 液;将 a 液缓慢加入到 b 液中,并于室温下搅拌 5 小时,半抗原与甲状腺蛋白的摩尔比为 26 : 1,用 0.01mol/L PBS 缓冲液透析 3 天,每天换 2 次透析液,以除去未应的小分子物质,以 12000rpm 的速度离心 30 分钟,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。

[0079] 2) 诱惑红单克隆抗体的制备

[0080] 动物免疫:以半抗原-载体蛋白偶联物为免疫原对 Ba1b/c 小鼠进行间隔免疫,间接 ELISA 检测并得到血液里含有诱惑红特异性抗体的小鼠脾脏。

[0081] 细胞融合与克隆:取产生特异性抗体的 Ba1b/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 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。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0082] 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细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。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。

[0083] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 Ba1b/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,7 ~ 14 天后腹腔注射杂交瘤细胞,7 ~ 10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法或亲和层析法进行腹水纯化。纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定,小瓶分装,-20℃ 保存。

[0084] 3、诱惑红多克隆抗体的制备

[0085] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以半抗原-甲状腺蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 1.5mg/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,大腿内侧皮下多点注射,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。

[0086] 4、辣根过氧化物酶标记抗体

[0087] 使用辣根过氧化物酶标记上述制备的诱惑红单克隆抗体或多克隆抗体。

[0088] 将诱惑红抗体与辣根过氧化物 (HRP) 采用过碘酸钠法进行偶联。

[0089] 具体方法为:

[0090] a) 溶解 5mg 辣根过氧化物酶 HRP 于 1ml 超纯水中,加入新配制的 0.1mol/L 多碘酸钠 75  $\mu$  L,置室温或 4℃ 冰箱反应 20 分钟或 30 分钟。

[0091] b) 反应完后装入透析袋,对 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。

[0092] 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。

[0093] d) 加入 100  $\mu$  L 4mg/mL 硼氢化钠,4℃ 冰箱反应 2 小时。

[0094] e) 用 0.01mol/L PBS 透析 24 小时,加入保存液 -20℃ 保藏备用

[0095] 四、以半抗原-载体蛋白偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒的应用

[0096] 1、本发明试剂盒可以用于检测液体食品,糕点,冰淇淋等样品中的诱惑红。

[0097] (1) 饮料、果汁 (稀释倍数 10) :

[0098] 含汽饮料需经水浴振摇充分去汽后,取 1ml 加入 9ml 样品稀释液,取 50  $\mu$  l 作为待检液。

[0099] (2) 糖果、话梅、蜜饯类 (稀释倍数 20) :

[0100] 取 2g 粉碎的样品 (有核蜜饯或话梅需先除去核),加入 10ml 样品稀释液,5ml 正己烷,充分振匀 10 分钟;4000g 离心 10 分钟,取 1ml 水相,3ml 样品稀释液,充分混匀,取 50  $\mu$  l 作为待检液。

[0101] (3) 冰淇淋 (稀释倍数 10) :

[0102] 将冰淇淋置于烧杯中 60 $^{\circ}$ C 水浴融化;取 1g 融化的样品,加入 5ml 正己烷,振匀,加入 10ml 样品稀释液,充分振匀 3 分钟;4000g 离心 10 分钟,取 50  $\mu$  l 水相,作为待检液。

[0103] (4) 糕点 (稀释倍数 10) :

[0104] 取 1g 粉碎的样品,加入 5ml 正己烷,混匀,加入 10ml 样品稀释液,充分混匀 3 分钟;4000g 离心 5 分钟,取 50  $\mu$  l 水相,作为待检液。

[0105] 2、检测

[0106] 向包被有诱惑红偶联抗原的酶标板微孔中加入诱惑红标准品溶液或样品溶液 50  $\mu$  l,再加入酶标记诱惑红特异性抗体工作液 50  $\mu$  l,用盖板模封板,25 $^{\circ}$ C 恒温中反应 30 分钟,倒出孔内液体,每孔加入 300  $\mu$  l 洗涤液,30 秒后倒出孔内液体,重复操作 5 次,用吸水纸拍干;加入显色底物液 100  $\mu$  l,轻轻振荡混匀,25 $^{\circ}$ C 恒温中反应 30 分钟,每孔加入 50  $\mu$  l 2mol/L 终止液硫酸,混匀,用酶标仪波长设定在 450nm 处,测定每孔吸光度值 (OD 值)。

[0107] 3、检测结果分析

[0108] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品液 (0 标准) 的吸光度值 ( $B_0$ ),再乘以 100%,得到百分吸光度值。

[0109]

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

[0110] 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  $\mu$  g/L 标准品溶液的平均吸光度值。

[0111] 以诱惑红标准品浓度 ( $\mu$  g/mL) 值为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线图。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诱惑红的含量。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 60 分钟就可以完成。

[0112] 实施例 2、以半抗原 - 载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒及 ELISA 检测方法

[0113] 一、以诱惑红半抗原 - 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:

[0114] 当在酶标板微孔条上的包被原为诱惑红半抗原 - 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,加入诱惑红特异性抗体,样品中的诱惑红与酶标板上

诱惑红偶联抗原竞争诱惑红特异性抗体,洗板,再加入酶标抗抗体进行放大作用,用显色液显色,样品吸光度值与诱惑红的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样品中诱惑红的含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅,通过与系列浓度诱惑红标准品溶液颜色的比较粗略判断样品中诱惑红的浓度范围。

[0115] 二、以诱惑红半抗原-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:

[0116] 1、包被有诱惑红半抗原-载体蛋白偶联物的酶标板,包被原的浓度可以为  $0.2 \mu\text{g/ml}$ 。

[0117] 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 8% (质量百分含量) 的山羊血清、pH7.4、 $0.2\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液,酶标抗抗体工作液稀释度为 1 : 5000。

[0118] 3、诱惑红特异性抗体工作液:可以为诱惑红多克隆抗体或诱惑红单克隆抗体工作液;用稀释液将诱惑红单克隆抗体稀释 3000 倍,得到特异性抗体工作液,所述稀释液为 pH 值为 7.4、 $0.2\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液。

[0119] 4、诱惑红标准品溶液 6 瓶,浓度分别为  $0 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $1.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $4.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $13.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $40.5 \mu\text{g/ml}$ 。配制标准品的溶液为在配制标准品溶液中终浓度为 pH 为 7.4、 $0.1\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液。

[0120] 5、底物显色液: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,  $7\text{ml/瓶}$ , 1 瓶。

[0121] 6、终止液:  $2\text{mol/L}$  盐酸或硫酸。

[0122] 7、浓缩洗涤液: pH 值为 7.4, 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 0.05% (质量百分含量) 吐温 20、 $0.02\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液;  $40\text{ml/瓶}$ , 1 瓶。

[0123] 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 7.4、 $0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液;  $200\text{ml/瓶}$ , 1 瓶。

[0124] 实施例 3、试剂盒精密度、准确度、保存性试验

[0125] 1、试剂盒的精密度实验

[0126] (1) 标准品溶液重复性试验

[0127] 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  $4.5 \mu\text{g/ml}$  标准品溶液的吸光度值 (OD 值),重复 10 次,计算变异系数 CV%,结果见表 1。

[0128] 表 1 标准品溶液重复性试验

[0129]

cv%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01 批	8	6.5	7.3	6.6	6.4	7.1	6.2	6.8	7.4	8
02 批	6.6	6.8	6.7	6.9	7.2	7.4	8.1	6.3	6.6	8.3
03 批	7.2	6.5	6.3	6.1	7.3	6.5	6.3	7.6	8.1	7.7

[0130] 结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 6.2 ~ 8.3% 之间,批间变异系数为 9.2%。

[0131] (2) 样本的可重复性试验

[0132] 以  $5 \mu\text{g/ml}$  浓度向果汁、冰淇淋和糕点添加标准品,分别取三个不同批次的试剂

盒各五个,每个浓度重复五次,分别计算变异系数,结果见表 2-4。

[0133] 表 2 果汁可重复性试验

[0134]

批号	实测值 ( $\mu\text{g/ml}$ )					变异系数
01 批	4.6	4.3	3.9	4.0	4.7	8.2%
	4.1	4.6	4.2	4.5	4	6%
	4.2	4.8	4.3	4.1	4.9	8.2%
03 批	5.2	4.8	4.5	4.3	4.4	7.8%
	4.4	4.5	3.9	4	4.7	7.9%
	4.8	4.5	4.1	3.9	4.1	8.5%
05 批	4.2	3.8	3.9	4.6	4.5	8.4%
	4.7	4.3	4.2	4.1	4.5	5.5%
	3.7	3.9	3.9	4.4	4.2	6.9%

[0135] 表 3 冰淇淋可重复性试验

[0136]

批号	实测值 ( $\mu\text{g/ml}$ )					变异系数
01 批	5.3	4.8	4.7	5.6	5	7.2%
	4.8	4.9	5.6	5.2	5.1	6.1%
	4.9	5.2	5.9	5.4	5.3	6.8%
03 批	4.7	4.4	5.2	4.8	4.5	6.6%
	4.8	4.5	4.9	5.3	4.7	6.1%
	4.4	4.2	4.4	5.1	5.0	8.7%
05 批	4.7	5.1	4.8	5.2	5.1	4.4%
	5.2	4.8	4.3	4.3	4.9	8.4%
	4.7	4.9	4.7	5.1	4.4	5.5%

[0137] 表 4 糕点可重复性试验

[0138]

批号	实测值 ( $\mu\text{g/ml}$ )					变异系数
01 批	5.2	4.8	4.7	5.2	4.5	6.4%
	5.3	4.5	4.4	4.0	4.3	10.1%
	4.4	4.7	5.1	4.7	4.9	5.5%
03 批	5.3	4.6	4.4	5.0	4.8	7.2%
	5	5.3	4.5	4.8	4.3	8.3%
	5.1	4.8	4.6	4.9	5.2	4.8%
05 批	4.5	4.8	5.2	4.6	4.9	5.7%
	4.7	4.2	4.5	5.3	4.8	8.6%
	5	4.3	4.7	4.6	5.1	6.8%

[0139] 2、试剂盒的准确度试验

[0140] 准确度是指测得值与真值的符合程度,在 ELISA 测定中,准确度常以回收率表示,精密度常以变异系数来表示。在空白样本(如果汁、饮品或糕点)中,将诱惑红添加至终浓度为  $3\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ ,每个浓度各 10 个平行,测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表 2。

[0141] 表 2 试剂盒准确的试验

[0142]

样本		果汁		冰淇淋	
添加浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )		3	10	3	10
回收率%	1	86	87	74	69
	2	89	86	72	75
	3	88	84	69	73
	4	82	82	71	68
平均值		86.2	84.8	71.5	71.2
CV%		3.5%	2.6%	2.9%	4.6%

[0143]

样本		糕点		糖包果	
添加浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )		3	10	3	10
回收率%	1	85	80	78	81
	2	82	81	79	77
	3	84	78	73	75
	4	80	83	72	83
平均值		82.8	80.5	75.5	79
CV%		2.7%	2.6%	4.7%	4.6%

[0144] 结果表明,果汁的回收率在 75 ~ 78%之间,冰淇淋的回收率在 76%左右,糕点的回收率在 78 ~ 80%,糖包果的回收率在 70.5 ~ 72.8%。

[0145] 3、试剂盒保存期试验

[0146] (1) 将试剂盒放置于 2 ~ 8℃,分别取 0、2、4、6、8、10、11 和 12 个月的试剂盒,对诱惑红标准品 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 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。

[0147] (2) 将试剂盒在 37℃保存的条件下放置 12 天,每天对诱惑红标准样品 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 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。

[0148] (3) 将试剂盒在 -20℃冰箱保存 12 天,每天对诱惑红标准样品 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 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。

[0149] 从结果可看出,经过三种条件保存试验,诱惑红标准样品 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 的吸光度值下降小于 5%,且 OD 不低于 1.5;50%抑制率在 3.5-5.5  $\mu\text{g/ml}$  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 ~ 8℃保存 12 个月。

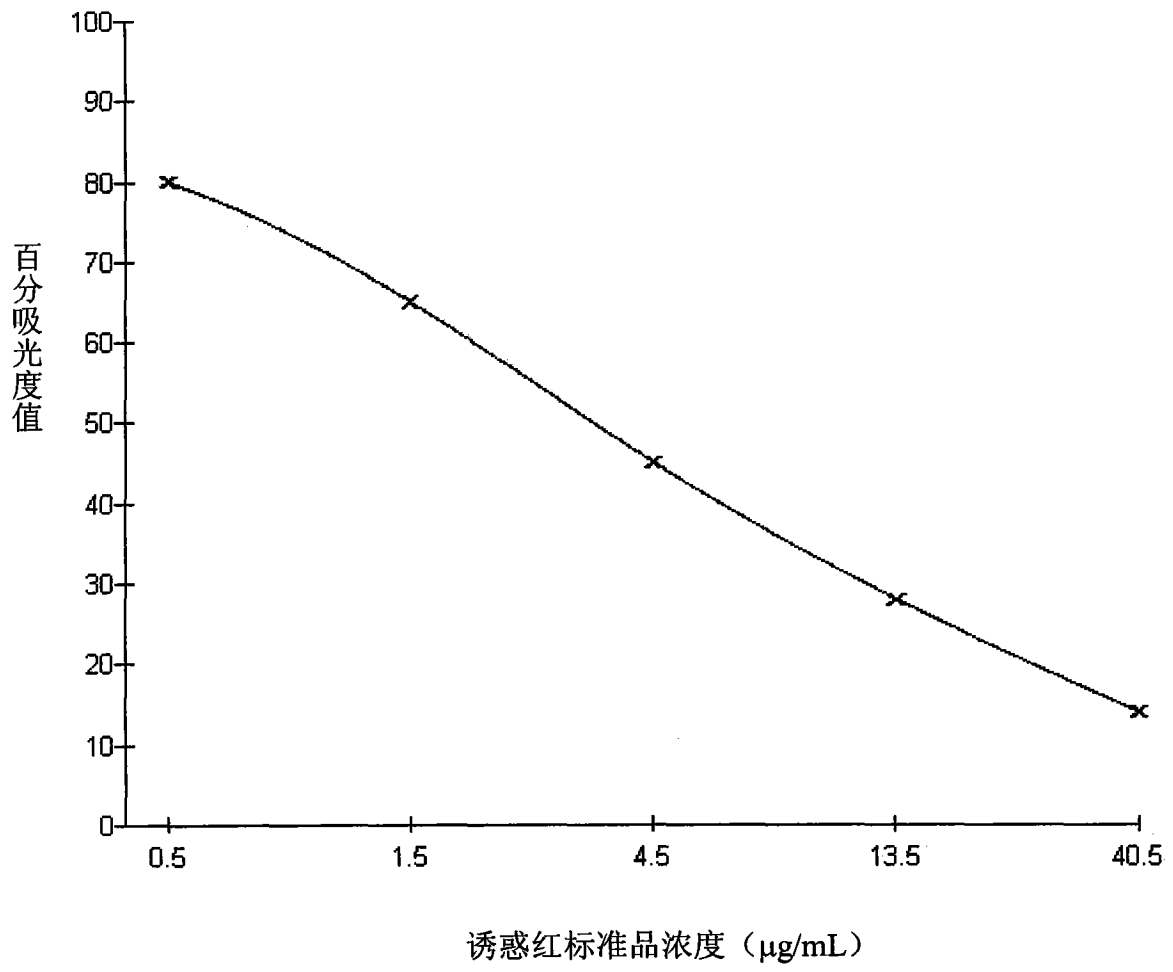


图 1

专利名称(译)	用于检测诱惑红的方法及酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102313808A</a>	公开(公告)日	2012-01-11
申请号	CN201110035545.2	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	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了用于检测诱惑红的方法及酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测诱惑红的酶联免疫试剂盒，包括诱惑红半抗原和诱惑红的特异性抗体；所述特异性抗体为所述诱惑红的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的诱惑红单克隆抗体，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诱惑红的方法，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。

