

[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 200810079607.8

[51] Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101381410A

[22] 申请日 2008.10.23

[21] 申请号 200810079607.8

[71] 申请人 河北大学

地址 071002 河北省保定市五四东路180号

[72] 发明人 王庭欣 李小亭 赵志磊 吴广臣

夏立娅 刘峥颢 庞艳苹

[74] 专利代理机构 石家庄汇科专利商标事务所

代理人 王琪

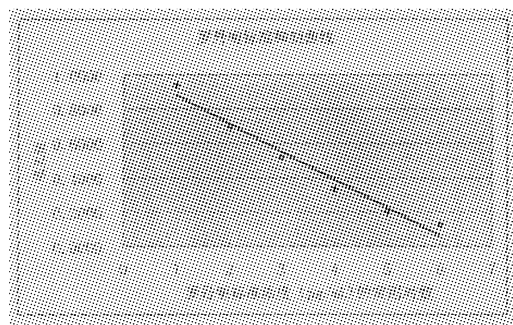
权利要求书3页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称

罗丹明123人工抗原合成、抗体制备方法及应用

[57] 摘要

本发明属于抗原、抗体的制备方法，专用于非食用色素罗丹明B特异性识别、及研制罗丹明B的速测免疫试剂盒。包括罗丹明B人工抗原合成及其抗体的制备方法，主要以罗丹明123代替罗丹明B合成免疫抗原和包被抗原，并将免疫抗原注射到新西兰大白兔体内，制备出高效价的罗丹明B抗体，该抗体稳定性好，效价高，为罗丹明B酶联免疫试剂盒的研制解决了技术难点，该方法实用性强，抗原抗体制备过程无需高价值设备，可操作性强，适于大规模生产。



1、罗丹明 123 人工抗原合成方法，其特征包括如下工艺步骤：

精确称取20-30mg罗丹明123溶于400 μ L甲醇；精确称取200-250mg牛血清白蛋白溶于5mL0.1mol/L，pH7.4磷酸盐缓冲液中；将罗丹明123甲醇溶液缓慢滴加到牛血清蛋白液中，同样加入3mL25%（V：V）戊二醛水溶液，混匀，室温静置1小时，4 $^{\circ}$ C冰箱过夜；装入透析袋，4 $^{\circ}$ C下、pH=7.4的0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析5天，然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积，测定浓度和结合比，加入1/1000叠氮钠，4 $^{\circ}$ C保存。

2、根据权利要求 1 所述的罗丹明 123 人工抗原合成方法，其特征在于还包括合成罗丹明 123 包被抗原，步骤如下：

取 5mg 罗丹明 123 溶于 300 μ L 甲醇；取分子量 4500 的卵清蛋白 12mg 溶于 2.5mL，pH7.4 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中；然后将罗丹明 123 溶液缓滴于卵清蛋白溶液中，再加入 1.5mL25%戊二醛混匀，室温静置 1 小时，4 $^{\circ}$ C冰箱过夜，在 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 5 天，得包被抗原。

3、根据权利要求 1 所述的罗丹明 123 人工抗原的抗体制备方法，其特征在于：免疫动物选择雄性新西兰大白兔，月龄 3 个月，体重 1.5 公斤，饲养于标准实验动物房中，连续观察 3 天，确定身体状况正常后进行免疫。

4、根据权利要求 3 所述的罗丹明 123 人工抗原的抗体制备方法，其特征在于免疫实验动物是精确称取 5mg/mL 的人工抗原 0.2mL，溶于 0.3mL pH=7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液；与 0.5mL 弗氏完全佐剂乳化后初次免疫，采用多点皮内和肌肉注射；

加强免疫用 0.1mL 人工抗原溶于 0.4mL pH=7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐

缓冲液和 0.5mL 弗氏不完全佐剂乳化后免疫；

分别于初次免疫后 2 周、4 周、8 周、12 周共加强免疫四次，于第五次免疫完后 10 天，由兔子的耳缘静脉取血，离心分离血清得到抗体， -80°C 保存。

5、根据权利要求 1、2、3 和 4 所述的罗丹明 123 人工抗原合成、抗体制备方法，其特征在于抗体效价的测定包括：

(a) 包被：采用 0.16%碳酸钠/0.29%碳酸氢钠缓冲液将包被抗原稀释到 5 微克/毫升，在酶标板上用移液枪每孔加入 100 微升，然后室温过夜；

(b) 洗涤：用含 0.05%吐温 20 的 0.01 摩尔/升、 $\text{pH}=7.4$ 磷酸缓冲液为洗涤液，洗酶标板 3 次；

(c) 封闭：加入 1%的卵清蛋白封闭液 200 微升 1/孔，室温封闭 1 小时后拍干；

(d) 加样：再用洗涤液洗酶标板 3 次，加入梯度稀释倍数分别为 1：1000、1：4000、1：8000、1：16000、1：32000、1：64000、1：128000 和 1：256000 的抗体 50 微升/孔，室温孵育 1 小时；

(e) 加入酶标二抗：再用洗涤液洗 4 次，加入 50 微升/孔酶标二抗，室温孵育半小时；

(f)：显色：再用洗涤液洗酶标板 5 次，加入 150 微升/孔邻苯二胺显色液，室温显色 10 分钟；

(g) 终止：加入 2 摩尔/升的硫酸 50 微升/孔，酶标仪 490nm 读取各孔吸光值；

判定标准：阳性血清与阴性血清的吸光比值 2：1 的血清稀释倍数为血清效价。

6、根据权利要求 1、2、3 和 4 所述的罗丹明 123 人工抗原、抗体的用途，其特征在於：专用于非食用色素罗丹明 B 的特异性识别、及研制罗丹明 B 的速测免疫试剂盒。

罗丹明 123 人工抗原合成、抗体制备方法及应用

技术领域

本发明属于抗原、抗体的制备方法及应用，专用于非食用色素罗丹明 B 的特异性识别、及研制罗丹明 B 的速测免疫试剂盒。

背景技术

罗丹明类化合物是以氧杂蒽为母体的碱性染料，有多种同系物。罗丹明 B (Rhodamine B) 是一种具有鲜桃红色的人工合成的化工染料，具有致癌致突变作用。罗丹明 B 俗称花粉红，是一种碱性荧光染料，罗丹明 B 具有脂溶性，常被不法分子用作调味品（主要是辣椒粉和辣椒油）及腊肠的染色剂。使用了被污染的调味品制作食品时会造成残留。给社会带来极大的危害。酶联免疫技术是二十世纪六十年代发展起来的新技术，现在已广泛应用于快速、微量检测农药残留。该方法可定性定量检测食品中微量残留有害物质，且对仪器要求不高，操作快速简单，无需对样品进行复杂的前处理，灵敏度高，特异性强，适用于大量样本快速检测，实现酶联免疫检测的关键是合成罗丹明 B 人工抗原和抗体，由于罗丹明 B 的化学结构不易合成人工抗原，尚未见应用于罗丹明 B 的检测报道。

发明内容

本发明的目的在于采用罗丹明 B 的同系物罗丹明 123 合成人工抗原，制备的罗丹明 123 抗体能与罗丹明 B 发生特异性结合，从而达到检测食品中违禁成分罗丹明 B 的目的。

本发明提供的整体技术方案是：

1、罗丹明 123 人工抗原合成方法，包括如下工艺步骤：

精确称取20-30mg罗丹明123溶于400 μ L甲醇；精确称取200-250mg牛血清白蛋白溶于5mL 0.1mol/L, pH7.4磷酸盐缓冲液中；将罗丹明123甲醇溶液缓慢滴加到牛血清蛋白液中，同样加入3mL 25% (V:V) 戊二醛水溶液，混匀，室温静置1小时，4 $^{\circ}$ C冰箱过夜；装入透析袋，4 $^{\circ}$ C下、pH=7.4的0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析5天，然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积，测定浓度和结合比，加入1/1000叠氮钠，4 $^{\circ}$ C保存。

所述的罗丹明 123 人工抗原合成方法，还包括合成罗丹明 123 包被抗原，步骤如下：

取 5mg 罗丹明 123 溶于 300 μ L 甲醇；取分子量 4500 的卵清蛋白 12mg 溶于 2.5mL, pH7.4 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中；然后将罗丹明 123 溶液缓滴于卵清蛋白溶液中，再加入 1.5mL 25%戊二醛混匀，室温静置 1 小时,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜，在 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 5 天，得包被抗原。

2、所述的罗丹明 123 人工抗原的抗体制备方法：

免疫动物选择雄性新西兰大白兔，月龄 3 个月，体重 1.5 公斤，饲养于标准实验动物房中，连续观察 3 天，确定身体状况正常后进行免疫。

所述的罗丹明 123 人工抗原的抗体制备方法，免疫实验动物是精确称取 5mg/mL 的人工抗原 0.2mL，溶于 0.3mL pH=7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液；与 0.5mL 弗氏完全佐剂乳化后初次免疫，采用多点皮内和肌肉注射；

加强免疫用 0.1mL 人工抗原溶于 0.4mL pH=7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液和 0.5mL 弗氏不完全佐剂乳化后免疫；

分别于初次免疫后 2 周、4 周、8 周、12 周共加强免疫四次，于第五次免疫完后 10 天，由兔子的耳缘静脉取血，离心分离血清得到抗体，-80 $^{\circ}$ C保存。

3、罗丹明 123 抗体效价的测定包括：

(a) 包被：采用 0.16%碳酸钠/0.29%碳酸氢钠缓冲液将包被抗原稀释到 5 微克/毫升，在酶标板上用移液枪每孔加入 100 微升，然后室温过夜；

(b) 洗涤：用含 0.05%吐温 20 的 0.01 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液为洗涤液，洗酶标板 3 次；

(c) 封闭：加入 1%的卵清蛋白封闭液 200 微升 1/孔，室温封闭 1 小时后拍干；

(d) 加样：再用洗涤液洗酶标板 3 次，加入梯度稀释倍数分别为 1：1000、1：4000、1：8000、1：16000、1：32000、1：64000、1：128000 和 1：256000 的抗体 50 微升/孔，室温孵育 1 小时；

(e) 加入酶标二抗：再用洗液洗 4 次，加入 50 微升/孔酶标二抗，室温孵育半小时；

(f)：显色：再用洗涤液洗酶标板 5 次，加入 150 微升/孔邻苯二胺显色液，室温显色 10 分钟；

(g) 终止：加入 2 摩尔/升的硫酸 50 微升/孔，酶标仪 490nm 读取各孔吸光值；

判定标准：阳性血清与阴性血清的吸光比值 2：1 的血清稀释倍数为血清效价。

所述的罗丹明 123 人工抗原、抗体的用途为：非食用色素罗丹明 B 的特异性识别、及研制罗丹明 B 的速测免疫试剂盒。

本发明所取得的实质性特点和显著的技术进步在于：

(1) 抗原实用性强：罗丹明 123 抗原合成与抗体制备技术对于检测食品中

罗丹明 B 具有重要的使用价值和实际意义。用上述方法能够制备具有活性基团的罗丹明 B 类似结构的抗原，并用此抗原生产出高特异性识别罗丹明 B 类结构的抗体。为罗丹明 B 的高效、快速、简便的分析开山辟路，必将会推动罗丹明 B 速测试剂盒的问世；

(2) 制备的抗体特异性强，灵敏度高，其灵敏度为 $0.01 \mu\text{g/L}$ ；

(3) 抗原抗体稳定性好：此方法合成的罗丹明 B 抗原及抗体具有较好的稳定性， -20°C 环境至少可以存放 3 年；

(4) 抗原制备技术简便可行：抗原的整个制备过程无需特别的仪器设备。成本低廉，容易工厂化规模生产。

附图说明

图 1 是罗丹明 123 的标准抑制曲线

具体实施方式

以下结合本发明的实施例作进一步描述，但不作为对本发明的限定。

本实施例的整体技术构思如下：

1-1、采用罗丹明 123 代替罗丹明 B 合成免疫抗原：

精确称取 20-30mg 罗丹明 123 溶于 400 μL 甲醇；精确称取 200-250mg 牛血清白蛋白溶于 5mL 0.1mol/L ， $\text{pH}7.4$ 磷酸盐缓冲液中；将罗丹明 123 甲醇溶液缓慢滴加到牛血清蛋白液中，同样加入 3mL 25% (V:V) 戊二醛水溶液，混匀，室温静置 1 小时， 4°C 冰箱过夜；装入透析袋，在 4°C 下、 $\text{pH}=7.4$ 的 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 5 天，然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积，测定浓度和结合比，加入 1/1000 叠氮钠， 4°C 保存。

1-2、采用罗丹明 123 代替罗丹明 B 合成包被抗原：

取 5mg 罗丹明 123 溶于 300 μ L 甲醇；取分子量 4500 的卵清蛋白 12mg 溶于 2.5mL, pH7.4 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中；然后将罗丹明 123 溶液缓滴于卵清蛋白溶液中，再加入 1.5mL 25% 戊二醛混匀，室温静置 1 小时，4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜，在 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 5 天，得包被抗原。

2、制备罗丹明 123 人工抗原的抗体：

免疫动物选择雄性新西兰大白兔，月龄 3 个月，体重 1.5 公斤，饲养于标准实验动物房中，连续观察 3 天，确定身体状况正常后进行免疫。

精确称取 5mg/mL 的人工抗原 0.2mL，溶于 0.3mL pH=7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液；与 0.5mL 弗氏完全佐剂乳化后初次免疫，采用多点皮内和肌肉注射；

加强免疫用 0.1mL 人工抗原溶于 0.4mL pH=7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液和 0.5mL 弗氏不完全佐剂乳化后免疫；

分别于初次免疫后 2 周、4 周、8 周、12 周共加强免疫四次，于第五次免疫完后 10 天，由兔子的耳缘静脉取血，离心分离血清得到抗体，-80 $^{\circ}$ C 保存。

3、罗丹明 123 抗体效价的测定：

包被缓冲液 (CB) : 1.6 克碳酸钠和 2.9 克碳酸氢钠加蒸馏水至 1000 毫升。

封闭液 (BB) : 用包被缓冲液配制的 1% 卵清蛋白

洗涤液 : 含 0.05% 吐温 20 的 0.01 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液

(a) 包被 : 采用包被缓冲液将包被抗原稀释到 5 微克/毫升，在酶标板上用移液枪每孔加入 100 微升，然后室温过夜；

(b) 洗涤 : 用洗涤液洗酶标板 3 次；

(c) 封闭 : 加入封闭液 200 微升 1/孔，室温封闭 1 小时后拍干；

(d) 加样 :再用洗涤液洗酶标板 3 次,加入梯度稀释倍数分别为 1 : 1000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000、1 : 32000、1 : 64000、1 : 128000 和 1 : 256000 的抗体 50 微升/孔, 室温孵育 1 小时;

(e) 加入酶标二抗 :再用洗液洗 4 次, 加入 50 微升/孔酶标二抗, 室温孵育半小时;

(f) : 显色 :再用洗涤液洗酶标板 5 次, 加入 150 微升/孔邻苯二胺显色液, 室温显色 10 分钟;

(g) 终止 :加入 2 摩尔/升的硫酸 50 微升/孔, 酶标仪 490nm 读取各孔吸光值;

判定标准 :阳性血清与阴性血清的吸光比值 2 : 1 的血清稀释倍数为血清效价。计算抗体效价为 1 : 64000。

4、罗丹明 123 人工抗原的鉴定 :

4-1、抗原抗体最佳工作浓度的筛选

固定酶标二抗工作浓度为 1:1000, 按方阵法筛选包被抗原(原浓度为 0.75mg/mL)和抗体浓度, 结果见表 1, 包被抗原和抗体浓度分别为 1:100 和 1:2000 ; 1:200 和 1:1000 ; 1:400 和 1:1000 三个组合均在 1~1.5 范围内。

表 1 包被抗原与抗体工作浓度的筛选结果

包被抗原浓度	抗体浓度			
	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
1:50	3.209	2.111	0.465	0.242
1:100	1.839	1.192	0.411	0.245
1:200	1.387	0.711	0.308	0.250
1:400	1.34	0.847	0.369	0.323

4-2、绘制罗丹明 123 标准抑制曲线

(a) 包被：采用包被缓冲液将包被抗原稀释到 1 : 100，在酶标板上用移液枪每孔加入 100 微升，然后室温过夜；

(b) 洗涤：用洗涤液洗酶标板 3 次；

(c) 封闭：加入封闭液 200 微升 1/孔，室温封闭 1 小时后拍干；

(d) 加样：再用洗涤液洗酶标板 3 次，加入梯度稀释倍数为 1 : 2000 的抗体 50 微升/孔，随后向其它孔分别加入浓度为 1000 微升/孔、100 微升/孔、10 微升/孔、1 微升/孔、0.1 微升/孔和 0.01 微升/孔的罗丹明 123 50 μ L，室温孵育 1 小时；

(e) 加入酶标二抗：再用洗涤液洗 4 次，加入 50 微升/孔酶标二抗，室温孵育半小时；

(f) 显色：再用洗涤液洗酶标板 5 次，加入 150 微升/孔邻苯二胺显色液，室温显色 10 分钟；

(g) 终止：加入 2 摩尔/升的硫酸 50 微升/孔，酶标仪 490nm 读取各孔吸光值，绘制紫外吸收光谱标准曲线。说明罗丹明 123 浓度的常用对数与吸光值呈线性关系。

4-3、间接竞争酶联免疫 (ELISA) 测定抗体的特异性

(a) 包被、(b) 洗涤、(c) 封闭：与上述罗丹明 B 抗体效价的测定操作步骤相同；

(d) 加样：再用洗涤液洗酶标板 3 次，设置空白对照及阳性对照：空白对照为 100 微升/孔 0.1mol/L, pH7.4 磷酸盐缓冲液；阳性对照为抗体；其余孔为 50 微升抗体加 50 μ L 罗丹明 B，其中罗丹明 B 浓度为 1.00、0.10、0.01、

0.001、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} $\mu\text{g/L}$ ，室温孵育 1 小时；

(e) 加入酶标二抗：再用洗涤液洗 4 次，加入 50 微升/孔酶标二抗，室温孵育半小时；

(f)：显色：再用洗涤液洗酶标板 5 次，加入 150 微升/孔邻苯二胺显色液，室温显色 10 分钟；

(g) 终止：加入 2 摩尔/升的硫酸 50 微升/孔，酶标仪 490nm 读取各孔吸光值，竞争抑制率。

竞争抑制率 (%) (IC) = (有竞争抗原孔的 OD_{490} 值/阳性对照孔 OD_{490} 值) $\times 100$ 。

结果为各浓度的竞争抑制率均大于 10%，表明该抗体有特异性反应；其 IC_{50} 为 $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，表明能与抗体反应的罗丹明 B 的灵敏度为 $0.01 \mu\text{g/L}$ ，用罗丹明 123 代替罗丹明 B 人工抗原合成及抗体完全可行。

本发明列举的实施例旨在更进一步地阐明罗丹明 123 人工抗原合成、抗体制备方法和应用方向，而不对本发明的范围构成任何限制。

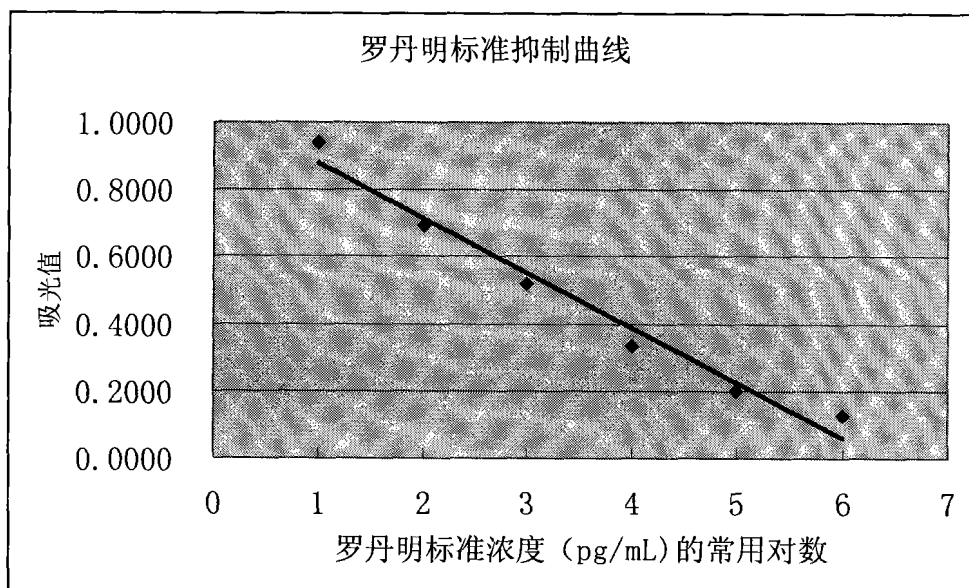


图 1

专利名称(译)	罗丹明123人工抗原合成、抗体制备方法及应用		
公开(公告)号	CN101381410A	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN200810079607.8	申请日	2008-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	河北大学		
申请(专利权)人(译)	河北大学		
当前申请(专利权)人(译)	河北大学		
[标]发明人	王庭欣 李小亭 赵志磊 吴广臣 夏立娅 刘峥颢 庞艳萃		
发明人	王庭欣 李小亭 赵志磊 吴广臣 夏立娅 刘峥颢 庞艳萃		
IPC分类号	C07K14/765 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	王琪		
其他公开文献	CN101381410B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于抗原、抗体的制备方法，专用于非食用色素罗丹明B特异性识别、及研制罗丹明B的速测免疫试剂盒。包括罗丹明B人工抗原合成及其抗体的制备方法，主要以罗丹明123代替罗丹明B合成免疫抗原和包被抗原，并将免疫抗原注射到新西兰大白兔体内，制备出高效价的罗丹明B抗体，该抗体稳定性好，效价高，为罗丹明B酶联免疫试剂盒的研制解决了技术难点，该方法实用性强，抗原抗体制备过程无需高价值设备，可操作性强，适于大规模生产。

