



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101381410 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

(21) 申请号 200810079607.8

期), 86-95.

(22) 申请日 2008.10.23

王传现等. 食品中罗丹明 B 的高效液相色谱  
荧光检测. 《分析仪器》. 2008, (第 1 期), 27-30.

(73) 专利权人 河北大学

审查员 岳礼溪

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

13115

代理人 王琪

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

JUNIUS M et al. Studies of the  
Metabolism of Rhodamine B. 《TOXICOLOGY AND  
APPLIED PHARMACOLOGY》. 1961, 第 3 卷 (第 1

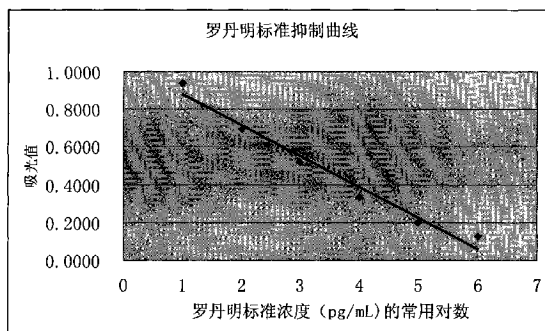
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(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  $\mu$ 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 0.01mol/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 $^{\circ}$ C 保存。

2. 罗丹明 123 包被抗原合成方法,其特征在于包括如下步骤:

取 5mg 罗丹明 123 溶于 300  $\mu$ 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 0.01mol/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;

所述的免疫实验动物方法是:精确称取 5mg/mL 的人工抗原 0.2mL,溶于 0.3mL pH = 7.4 的 0.01mol/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 0.01mol/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。

罗丹明 123 抗体效价的测定方法是:

(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 / 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。

## 罗丹明 123 人工抗原合成、抗体制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 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

[0002] 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

[0003] 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。

[0004] 本发明提供的整体技术方案是:

[0005] 1、罗丹明 123 人工抗原合成方法,包括如下工艺步骤:

[0006] 精确称取 20-30mg 罗丹明 123 溶于 400  $\mu$ 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白蛋白液中,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 0.01mol/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 $^{\circ}$ C 保存。

[0007] 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:

[0008] 取 5mg 罗丹明 123 溶于 300  $\mu$ 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 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 5 天,得包被抗原。

[0009] 2、所述的罗丹明 123 人工抗原的抗体制备方法:

[0010] 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。

[0011] 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 0.01mol/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;

[0012] 加强免疫用 0.1ml 人工抗原溶于 0.4mL pH = 7.4 的 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液和 0.5mL 弗氏不完全佐剂乳化后免疫;

[0013] 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℃ 保存。

[0014] 3、罗丹明 123 抗体效价的测定包括:

[0015] (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;

[0016] (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;

[0017] (c) 封闭:加入 1% 的卵清蛋白封闭液 200 微升 / 孔,室温封闭 1 小时后拍干;

[0018] (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;

[0019] (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;

[0020] (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;

[0021] (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;

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 本发明所取得的实质性特点和显著的技术进步在于:

[0025] (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;

[0026] (2) 制备的抗体特异性强,灵敏度高,其灵敏度为 0.01  $\mu$ g/L;

[0027] (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℃ 环境至少可以存放 3 年;

[0028] (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

[0029] 图 1 是罗丹明 123 的标准抑制曲线

## 具体实施方式

[0030] 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。

[0031] 本实施例的整体技术构思如下:

[0032] 1-1、采用罗丹明 123 代替罗丹明 B 合成免疫抗原：

[0033] 精确称取 20-30mg 罗丹明 123 溶于 400  $\mu$  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白蛋白液中，同样加入 3mL 25% (V:V) 戊二醛水溶液，混匀，室温静置 1 小时，4℃ 冰箱过夜；装入透析袋，在 4℃ 下、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℃ 保存。

[0034] 1-2、采用罗丹明 123 代替罗丹明 B 合成包被抗原：

[0035] 取 5mg 罗丹明 123 溶于 300  $\mu$  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℃ 冰箱过夜，在 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 5 天，得包被抗原。

[0036] 2、制备罗丹明 123 人工抗原的抗体：

[0037] 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。

[0038] 精确称取 5mg/mL 的人工抗原 0.2mL，溶于 0.3mL pH = 7.4 的 0.01mol/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；

[0039] 加强免疫用 0.1mL 人工抗原溶于 0.4mL pH = 7.4 的 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液和 0.5mL 弗氏不完全佐剂乳化后免疫；

[0040] 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℃ 保存。

[0041] 3、罗丹明 123 抗体效价的测定：

[0042] 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。

[0043] 封闭液 (BB)：用包被缓冲液配制的 1% 卵清蛋白

[0044] 洗涤液：含 0.05% 吐温 20 的 0.01 摩尔 / 升、pH = 7.4 磷酸缓冲液

[0045] (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；

[0046] (b) 洗涤：用洗涤液洗酶标板 3 次；

[0047] (c) 封闭：加入封闭液 200 微升 / 孔，室温封闭 1 小时后拍干；

[0048] (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；

[0049] (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；

[0050] (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；

[0051] (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；

[0052] 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。

[0053] 4、罗丹明 123 人工抗原的鉴定：

[0054] 4-1、抗原抗体最佳工作浓度的筛选

[0055] 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。

[0056] 表 1 包被抗原与抗体工作浓度的筛选结果

[0057]

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

[0058] 4-2、绘制罗丹明 123 标准抑制曲线

[0059] (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;

[0060] (b) 洗涤:用洗涤液洗酶标板 3 次;

[0061] (c) 封闭:加入封闭液 200 微升 / 孔,室温封闭 1 小时后拍干;

[0062] (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 12350uL,室温孵育 1 小时;

[0063] (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;

[0064] (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;

[0065] (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。

[0066] 4-3、间接竞争酶联免疫 (ELISA) 测定抗体的特异性

[0067] (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;

[0068] (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 50uL 罗丹明 B,其中罗丹明 B 浓度为 1.00、0.10、0.01、0.001、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$   $\mu$ g/L,室温孵育 1 小时;

[0069] (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;

[0070] (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;

[0071] (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。

[0072] 竞争抑制率 (%) (IC) = (有竞争抗原孔的 OD<sub>490</sub> 值 / 阳性对照孔 OD<sub>490</sub> 值) × 100。

[0073] 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<sub>50</sub> 为 0.01 μg·L<sup>-1</sup>，表明能与抗体反应的罗丹明 B 的灵敏度为 0.01 μg/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。

[0074] 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。

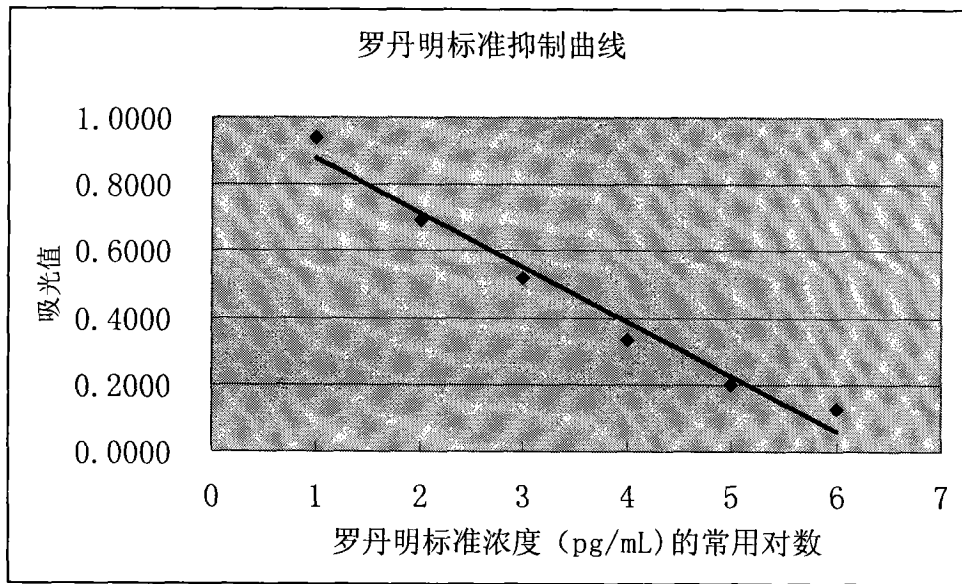


图 1

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	<a href="#">CN101381410B</a>	公开(公告)日	2011-06-08
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	CN101381410A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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。

