



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105399639 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201510937173. 0

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 14

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市河西区大沽南路 1038 号

(72) 发明人 生威 张燕 王硕 方国臻 刘冰 王俊平

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理有限公司 11401

代理人 李明卓

(51) Int. Cl.

G07C 215/52(2006. 01)

G07K 14/765(2006. 01)

G07K 14/77(2006. 01)

G07K 16/44(2006. 01)

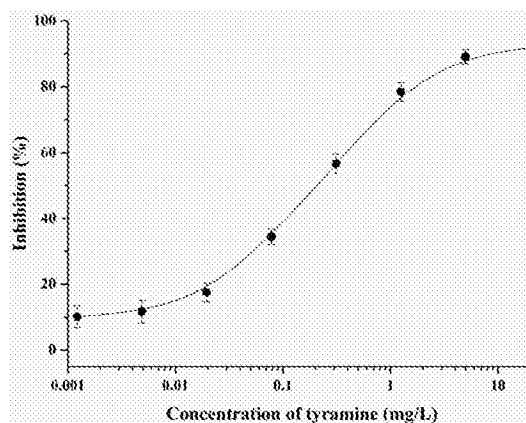
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

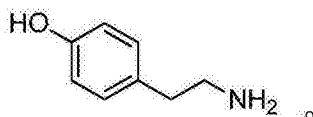
一种酪胺人工抗原和抗体及其制备方法与应用

(57) 摘要

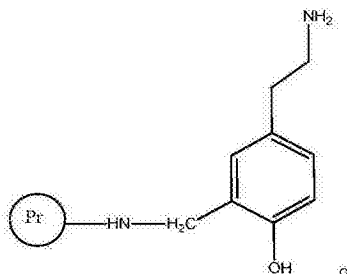
本发明提供了一种酪胺人工抗原和抗体及其制备方法与应用,涉及酪胺人工抗原和抗体的制备及其免疫分析方法的建立。本发明克服了传统的理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题,提供了简便、快速、灵敏、准确的免疫分析技术。采用甲醛法和戊二醛法,将酪胺分别与阳离子化的牛血清白蛋白、卵清蛋白偶联,成功制备了酪胺的人工抗原与包被原。人工抗原再经动物免疫、取血、分离纯化制得特异性抗体。使用该抗体建立的检测食品中酪胺的检测方法具有良好的特异性和灵敏度,检测限可以稳定到 0. 02mg/L,并且检测方法成本低廉,操作简便,适合于食品中酪胺的快速检测。



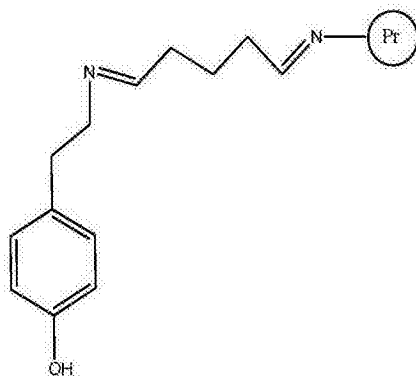
1. 一种酪胺半抗原, 其特征在于, 分子结构式为:



2. 一种酪胺人工抗原, 其特征在于, 由权利要求 1 所述的酪胺半抗原与阳离子化牛血清蛋白相连接合成, 所述酪胺人工抗原分子结构式为:



3. 一种酪胺包被原, 其特征在于, 由权利要求 1 所述的酪胺半抗原与卵清蛋白相连接合成, 得到的酪胺包被原分子结构式为:



4. 一种酪胺抗体, 其特征在于, 所述酪胺抗体能与权利要求 2 人工抗原或权利要求 3 包被原发生特异性免疫反应的 IgG 抗体。

5. 权利要求 2 所述的酪胺人工抗原的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 阳离子化 BSA 的制备:

准确量取 20mL PBS, 冰浴条件下边搅拌边缓慢加入 18.0mg 乙二胺, 用 1mol/L HCl 调 pH 至 7.4; 称取 1.00g BSA 和 56.0mg EDC 加入上述溶液中, 室温反应 2h; 用玻沙漏斗抽滤, 取上清液装入透析袋中; 用 0.01mol/L 的 PBS 于 4℃连续透析 3 天, 然后在 -20℃下, 用真空冷冻机进行干燥, 最后冻存于 -20℃冰箱;

(2) 酪胺与载体蛋白 cBSA 的连接:

准确称取 20.0mg cBSA 于 25mL 圆底烧瓶, 加入 4mL 0.01mol/L 的 PBS 将其溶解, 准确称取 4.2mg 酪胺于 5mL 小棕瓶中, 加入 200 μL DMSO 将其溶解; 将酪胺缓慢加入溶解的蛋白中; 加入 5 μL 37% 的甲醛水溶液, 30℃水浴磁力搅拌 8h, 反应液澄清, 装入透析袋中, 用 0.01mol/L 的 PBS 于 4℃连续透析 3 天, 然后分装, -20℃保存备用。

6. 权利要求 3 所述的酪胺包被原的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

准确称取 20.0mg OVA 于 25mL 圆底烧瓶, 加入 4mL 0.01M 的 PBS 将其溶解, 准确称取 4.2mg 酪胺于 5mL 小棕瓶中, 加入 200 μL DMSO 将其溶解; 将酪胺缓慢加入溶解的 OVA 中;

缓慢加入 15 μL 25% 的戊二醛水溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下磁力搅拌过夜; 将反应液装入透析袋中, 用 0.01mol/L 的 PBS 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 连续透析 3 天, 然后分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

7. 权利要求 4 所述酪胺抗体的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

免疫动物选用雌性大白兔, 首次免疫采用背部多点皮下注射和腿部肌肉注射免疫, 加强免疫采用背部多点皮下注射免疫; 初免后进行四次加强免疫, 具体做法分别是:

初次免疫: 取 1mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中, 进行动物免疫;

加强免疫: 用 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液, 进行动物免疫; 加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次, 此后间隔一个月; 第五次免疫后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血, 进行效价检测;

抗体纯化: 定时监测动物抗体效价, 当抗体对权利要求 3 所述的酪胺包被原效价达到较高水平时, 采集血液, 并离心获得抗血清, 使用 ProteinA-Sepharose 4B 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化, 制备得到权利要求 4 所述的 IgG 抗体。

8. 权利要求 4 所述酪胺抗体的应用, 其特征在于, 所述的酪胺抗体应用于酪胺含量的免疫检测。

9. 根据权利要求 8 所述的酪胺抗体的应用, 其特征在于包括如下步骤:

(1) 包被: 用包被液把包被抗原稀释, 然后以 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 包被于 96 孔酶标板上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3h;

(2) 洗板: 加入洗涤液 PBST, 250 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 于振荡器上振荡 2min, 弃去 PBST, 重复洗板 3 次;

(3) 封闭: 每孔加入 200 μL 封闭液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1h, 然后弃去封闭液, 用 PBST 重复洗板 3 次;

(4) 加样: 每孔先加入 50 μL 的酪胺标准溶液或样品溶液, 然后各加入 50 μL 的抗体, 加样完毕后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下竞争反应 1h, 然后用 PBST 重复洗板 4 次;

(5) 加羊抗兔 HRP 标记二抗: 把羊抗兔 HRP 标记二抗用 PBS 稀释适当浓度, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加样, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30min, 用 PBST 重复洗板 5 次;

(6) 显色: 每孔加入 100 μL 混匀后的底物液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 15-20min;

(7) 终止: 每孔加入 50 μL 的硫酸终止液, 终止显色反应;

(8) 读数: 在双波长方式, 450nm 为测定波长, 650nm 为参比波长, 下用酶标仪测定各孔的吸光度值。抑制率的计算公式如式所示:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}}{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中: OD 对照: 加 PBS 和抗体的微孔的吸光值;

OD 空白: 只加 PBS 的微孔的吸光值;

OD: 加了抗体和标准品或样品的微孔的吸光度值。

一种酪胺人工抗原和抗体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于小分子化合物免疫化学和痕量残留分析技术领域；涉及有机合成，免疫化学，生物化学及物化测试技术等；特别涉及生物胺类小分子化合物酪胺半抗原、人工抗原的设计合成，和免疫动物特异性抗体的制备及其免疫分析方法的建立。

背景技术

[0002] 酪胺是存在于生物机体内的有效生理活性物质，是一种血管活性胺，在生物机体的正常代谢中起着不可替代生理功能。微量的酪胺对大脑皮层及其精神活动具备重要的调节作用，而且对血管和肌肉的松弛、收缩效果明显。另外，酪胺、苯乙胺等具有清除自由基、抗氧化等作用，并可以抑制不饱和脂肪酸的氧化。通常情况下，人体摄入少量的酪胺不会对人体产生影响，而当摄入过量的酪胺、组胺（尤其是同时摄入多种生物胺）时，会产生头痛、恶心、心率加快、血压升高、呼吸急促等不良反应，严重的还会危害生命。酪胺还会引起外周血管收缩，增加血糖的浓度，诱导去甲肾上腺素的分泌，引起患者血压升高以及偏头疼等。EFSA 指出，摄入酪胺、苯乙胺、色胺等，在其代谢消耗 30min 至数小时之后会引起血管收缩、高血压，并伴有头痛、出汗、恶心、呕吐、瞳孔扩张等临床症状。正常情况下，可在 24h 逐渐恢复。研究表明富含酪胺的食物可诱发偏头痛，摄食酪胺的含量如果超过 100mg 会导致血压升高以及偏头痛，如果超过 1080mg/kg 会引发急性中毒性肿胀。

[0003] 酪胺广泛存在于肉类及其制品、水产品以及啤酒、酱油、奶酪等各类发酵食品中，其含量水平常常作为新鲜度以及卫生状况的评定指标，因此很多国内外学者对酪胺的分离检测方法进行了研究。常见的检测胺类物质的方法有色谱法、毛细管电泳法以及生物传感器法等。传统仪器方法存在前处理复杂，仪器和相应配套费用昂贵，分析速度慢等缺点，难以满足实际分析的需要，因此迫切要求发展简便、快速、灵敏的分析技术。

[0004] 但是与大分子不同，小分子化合物免疫分析有自身特点：

[0005] (1) 小分子化合物 ($MW \leq 1000 \text{ Da}$) 一般不具有人工抗原性，不能直接免疫动物产生特异性抗体、必须合成突出分子立体结构特异性部位的半抗原，并与大分子载体连接构成接合物，才能免疫动物产生针对这一目标小分子化合物的特异性抗体。这种半抗原与大分子载体的结合物称为人工抗原。人工抗原的制备不是任意的，包括结合位点、结合方式、载体种类、以及半抗原与目标分析物任何结构上的差异如大小、形状、成份、构型、构象、极性、电子云密度等等在内的诸因素，都可能极大地影响着相应抗体的性质，因此它们是决定产生其特异性抗体和建立免疫分析方法的关键。

[0006] (2) 虽然小分子化合物不具有人工抗原性，但具有反应原性，即具有与相应抗体发生免疫学反应的能力，并可进行体外定量，遵循质量作用定律。

[0007] 免疫分析技术被引入小分子残留分析领域，成为一种最有发展和应用潜力的定量分析技术之一，受到广泛的重视。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。因此，目标分析物分子免疫学特性，以及如何通过化学或生化技术突出和利用这些特性，是该领域重要的研究内容。这一技术目前已成为微量分析研究的一个崭新

领域,可与传统分析方法并列作为一项新的分析途径。酪胺人工抗原和特异性抗体以及以此为基础建立免疫分析方法尚未见报道。

发明内容

[0008] 本发明的目的是通过设计合成酪胺半抗原及相应的人工抗原和抗体。本发明的另一个目的是提供酪胺的半抗原及相应的人工抗原和抗体的制备方法。本发明再一个目的是提供酪胺的半抗原及相应的人工抗原和抗体的应用。其中酪胺的人工抗原包括人工抗原和包被原。

[0009] 本发明的独特之处在于突出了酪胺分子特异性抗原决定簇,又克服了化学合成的困难,免疫动物诱导产生亲合性很高的特异性抗体;并以此为基础建立了 ELISA 方法即快速免疫分析方法,准确检测食品中的酪胺含量。

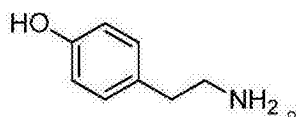
[0010] 本发明利用目标分析物半抗原与载体蛋白质偶联,制备有效人工抗原,免疫动物制备对小分子分析物特异性抗体,利用抗原抗体的特异性免疫学反应,从而定性定量地检测样本中超微量小分子目标分析物,即可用于样本测定。其选择性决定于免疫学反应的特异性,其灵敏度取决于抗体的亲合性和标记物的可检性。因此可以快速准确地分析检测酪胺在样本中的含量。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。

[0011] 人工抗原是合成半抗原与载体蛋白的偶联物,若用于免疫动物,即为人工抗原,若用于免疫分析中包被反应板,即为包被原。对于同一种目标分子,人工抗原和包被原通常不用同一种偶联物,目的是减少抗体对包被原的非特异性结合,提高分析的特异性和灵敏度。因为人工抗原免疫动物所产生的抗体,不仅能识别半抗原,也能识别载体蛋白。因此,人工抗原和包被原所用的载体蛋白一般是不相同的,载体蛋白的结构和分子质量差异越大,非特异性结合反应越弱,分析灵敏度越高。另外人工抗原和包被原中半抗原结构有差异也有利于提高方法灵敏度。本发明在人工抗原和包被原的制备中采用不同的方法为的是获得提高方法灵敏度。

[0012] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

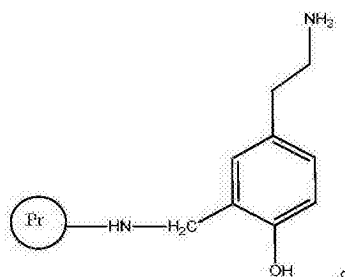
[0013] 一种酪胺半抗原的分子结构如下所示:

[0014]



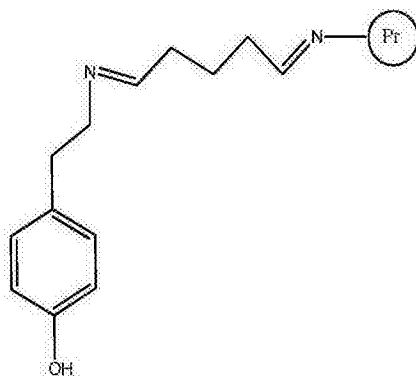
[0015] 一种酪胺人工抗原,是由酪胺半抗原与阳离子化的牛血清蛋白相连接合成,所述酪胺人工抗原分子结构式为:

[0016]



[0017] 一种酪胺包被原,是由酪胺半抗原与卵清蛋白相连接合成,所述酪胺包被原分子结构式为:

[0018]



[0019] 一种酪胺抗体,是能与人工抗原或包被原发生特异性免疫反应的 IgG 抗体。

[0020] 酪胺人工抗原的制备方法采用甲醛法充分暴露酪胺所有抗原决定簇,包括以下步骤:

[0021] (1) 阳离子化 BSA(cBSA) 的制备:

[0022] 准确量取 20mL PBS,冰浴下边搅拌边缓慢加入 18.0mg 乙二胺 (EDA),用 1mol/LHCl 调 pH 至 7.4;称取 1.00g BSA 和 56.0mg EDC 加入上述溶液中,室温反应 2h;用玻沙漏斗抽滤,取上清液装入透析袋中;用 0.01mol/L 的 PBS 于 4℃ 连续透析 3 天,然后在 -20℃ 下,用真空冷冻机进行干燥,最后冻存于 -20℃ 冰箱。

[0023] (2) 酪胺与载体蛋白 cBSA 的连接:

[0024] 准确称取 20.0mg cBSA 于 25mL 圆底烧瓶,加入 4mL 0.01mol/L 的 PBS 将其溶解,准确称取 4.2mg 酪胺于 5mL 小棕瓶中,加入 200 μL DMSO 将其溶解。将酪胺缓慢加入溶解的蛋白中。加入 5 μL 37% 的甲醛水溶液,30℃ 水浴磁力搅拌 8h。反应液澄清,装入透析袋中,用 0.01mol/L 的 PBS 于 4℃ 连续透析 3 天,然后分装, -20℃ 保存备用。

[0025] 酪胺包被原的制备方法采用戊二醛一步连接法,包括以下步骤:

[0026] 准确称取 20.0mg OVA 于 25mL 圆底烧瓶,加入 4mL 0.01M 的 PBS 将其溶解,准确称取 4.2mg 酪胺于 5mL 小棕瓶中,加入 200 μL DMSO 将其溶解。将酪胺缓慢加入溶解的 OVA 中。缓慢加入 15 μL 25% 的戊二醛水溶液,4℃ 下磁力搅拌过夜。将反应液装入透析袋中,用 0.01mol/L 的 PBS 于 4℃ 连续透析 3 天,然后分装, -20℃ 保存备用。

[0027] 酪胺抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0028] (1) 免疫:免疫动物选用雌性大白兔,首次免疫采用背部多点皮下注射和腿部肌肉注射免疫,加强免疫采用背部多点皮下注射免疫。初免后进行四次加强免疫,具体做法分别是:

[0029] 初次免疫 :取 1mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,进行动物免疫 ;

[0030] 加强免疫 :用 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液,进行动物免疫 ;加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次,此后间隔一个月。第五次免疫后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测 ;

[0031] (2) 抗体纯化 :定时监测动物抗体效价,当抗体对上述的酪胺包被原效价达到较高水平时,采集血液,并离心获得抗血清,使用 ProteinA-Sepharose4B 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化,制备得到上述的 IgG 抗体。

[0032] 所述的酪胺抗体应用于生物胺酪胺含量的免疫检测,所述的免疫检测为酶联免疫吸附剂测定,即 ELISA。

[0033] 酪胺抗体应用于生物胺酪胺含量的免疫检测,包括如下步骤 :

[0034] (1) 包被 :用包被液把包被抗原适当稀释,然后以 100 μ L/well 包被于 96 孔酶标板上,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜或 37 $^{\circ}$ C 孵育 3h。

[0035] (2) 洗板 :加入洗涤液 PBST,250 μ L/ 孔,于振荡器上振荡 2min,弃去 PBST,重复洗板 3 次 ;

[0036] (3) 封闭 :每孔加入 200 μ L 封闭液,于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h,然后弃去封闭液,用 PBST 重复洗板 3 次 ;

[0037] (4) 加样 :每孔先加入 50 μ L 的酪胺标准溶液或样品溶液,然后各加入 50 μ L 的抗体,加样完毕后,在 37 $^{\circ}$ C 下竞争反应 1h,然后用 PBST 重复洗板 4 次 ;

[0038] (5) 加羊抗兔 HRP 标记二抗 :把羊抗兔 HRP 标记二抗用 PBS 稀释适当浓度,100 μ L/well 加样,37 $^{\circ}$ C 下孵育 30min,用 PBST 重复洗板 5 次。

[0039] (6) 显色 :每孔加入 100 μ L 混匀后的底物液,37 $^{\circ}$ C 下反应 15-20min ;

[0040] (7) 终止 :每孔加入 50 μ L 的硫酸终止液,终止显色反应。

[0041] (8) 读数 :在双波长方式 (450nm 为测定波长,650nm 为参比波长) 下用酶标仪测定各孔的吸光度值。抑制率的计算公式如式所示 :

[0042]

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{OD_{\text{对照}} - OD}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

[0043] 式中 :OD 对照 :加 PBS 和抗体的微孔的吸光值 ;

[0044] OD 空白 :只加 PBS 的微孔的吸光值 ;

[0045] 本发明制备出酪胺的高灵敏度、特异性强的抗体,建立简单、快速的酪胺酶联免疫检测方法,为食品新鲜度的检测提供了一种可靠的技术支撑。

[0046] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果 :

[0047] (1) 该设计、合成的人工抗原与目标待测物相似程度高,对待测物的特征结构保留完整,充分暴露酪胺抗原决定簇,为制备特异性良好的抗体奠定了基础 ;采用不同合成方法制备有结构差异的包被原,与抗体组成抗原抗体竞争反应系统,利用抗体识别差异化提高方法灵敏度。

[0048] (2) 其抗体具有良好的特异性和灵敏度,检测极限达到 0.02mg/L。

[0049] (3) 因此,本发明合成人工抗原的方法与其他方法相比较,更加易于推广普及。并

且提供的快速检测方法操作简便、快速,而且检测的精确度可达 90% 以上,非常适合现场检测的需要。因此,本发明不仅在实验室检测中表现出色,并为开发出成本低廉、检测效率高、操作简便的酶联免疫快速检测工具,奠定了基础,具有良好的应用前景;既有经济效益又有社会效益。

附图说明

[0050] 图 1 为酪胺酶联免疫检测标准曲线

具体实施方式

[0051] 实施例一

[0052] (1) 酪胺人工抗原的制备

[0053] a. 阳离子化 BSA(cBSA) 的制备:

[0054] 准确量取 20mL PBS,冰浴下边搅拌边缓慢加入 18.0mg 乙二胺(EDA),用 1mol/LHCl 调 pH 至 7.4;称取 1.00g BSA 和 56.0mg EDC 加入上述溶液中,室温反应 2h;用玻沙漏斗抽滤,取上清液装入透析袋中;用 0.01mol/L 的 PBS 于 4℃ 连续透析 3 天,然后在 -20℃ 下,用真空冷冻机进行干燥,最后冻存于 -20℃ 冰箱。

[0055] b. 酪胺与载体蛋白 cBSA 的连接:

[0056] 准确称取 20.0mg cBSA 于 25mL 圆底烧瓶,加入 4mL 0.01mol/L 的 PBS 将其溶解,准确称取 4.2mg 酪胺于 5mL 小棕瓶中,加入 200 μ LDMSO 将其溶解。将酪胺缓慢加入溶解的蛋白中。加入 5 μ L 37% 的甲醛水溶液,30℃ 水浴磁力搅拌 8h。反应液澄清,装入透析袋中,用 0.01mol/L 的 PBS 于 4℃ 连续透析 3 天,然后分装, -20℃ 保存备用。

[0057] (2) 酪胺包被原的制备

[0058] 准确称取 20.0mg OVA 于 25mL 圆底烧瓶,加入 4mL 0.01M 的 PBS 将其溶解,准确称取 4.2mg 酪胺于 5mL 小棕瓶中,加入 200 μ L DMSO 将其溶解。将酪胺缓慢加入溶解的 OVA 中。缓慢加入 15 μ L 25% 的戊二醛水溶液,4℃ 下磁力搅拌过夜。将反应液装入透析袋中,用 0.01mol/L 的 PBS 于 4℃ 连续透析 3 天,然后分装, -20℃ 保存备用。

[0059] (3) 酪胺抗体的制备

[0060] a. 免疫:免疫动物选用雌性大白兔,首次免疫采用背部多点皮下注射和腿部肌肉注射免疫,加强免疫采用背部多点皮下注射免疫。初免后进行四次加强免疫,具体做法分别是:

[0061] 初次免疫:取 1mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,进行动物免疫;

[0062] 加强免疫:用 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液,进行动物免疫;加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次,此后间隔一个月。第五次免疫后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测;

[0063] b. 抗体纯化:定时监测动物抗体效价,当抗体对权利要求 3 所述的酪胺包被原效价达到较高水平时,采集血液,并离心获得抗血清,使用 ProteinA-Sepharose 4B 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化,制备得到权利要求 4 所述的 IgG 抗体。

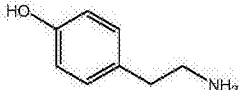
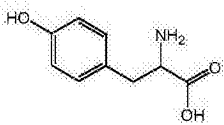
[0064] 利用方阵实验分别确定包被原的包被量为每孔 0.1 μ g,抗体稀释倍数为

1:1000, , 酶标二抗稀释倍数为 1:15000, 在此条件下测定抗体特异性。以抗体与结构类似化合物的交叉反应程度, 以抑制抗体最大结合率的 50% 所需目标分析物的浓度 IC_{50} 与所需各种结构类似化合物的浓度 IC_{50} 之比的百分数表示, 即交叉反应率 $CR(\%)$ 。

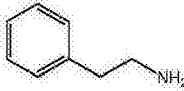
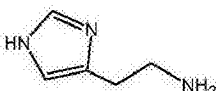
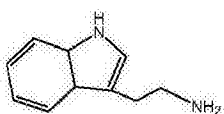
[0065] $CR(\%) = IC_{50}(\text{酪胺}) / IC_{50}(\text{结构类似物}) \times 100$ 交叉反应越小, 抗体特异性越高。见表 1。

[0066] 表 1 酪胺抗体对酪胺及其结构类似物交叉反应率

[0067]

化合物名称	结构	$IC_{50}(\text{mg/L})$	交叉反应率(%)
酪胺		0.20	100
酪氨酸		>2000	< 0.01

[0068]

苯乙胺		>2000	< 0.01
组胺		>2000	< 0.01
色胺		>2000	< 0.01

[0069] 实施例 2

[0070] 使用实施例 1 得到的酪胺抗体进行免疫检测

[0071] (1) 包被 : 用包被液把包被抗原适当稀释, 然后以 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 包被于 96 孔酶标板上, 4°C 孵育过夜或 37°C 孵育 3h。

[0072] (2) 洗板 : 加入洗涤液 PBST, $250 \mu\text{L}/\text{well}$, 于振荡器上振荡 2min, 弃去 PBST, 重复洗板 3 次 ;

[0073] (3) 封闭 : 每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 封闭液, 于 37°C 封闭 1h, 然后弃去封闭液, 用 PBST 重复洗板 3 次 ;

[0074] (4) 加样 : 每孔先加入 $50 \mu\text{L}$ 的酪胺标准溶液或样品溶液, 然后各加入 $50 \mu\text{L}$ 的抗体, 加样完毕后, 在 37°C 下竞争反应 1h, 然后用 PBST 重复洗板 4 次 ;

[0075] (5) 加羊抗兔 HRP 标记二抗 : 把羊抗兔 HRP 标记二抗用 PBS 稀释适当浓度, $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 加样, 37°C 下孵育 30min, 用 PBST 重复洗板 5 次。

[0076] (6) 显色 : 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 混匀后的底物液, 37°C 下反应 15-20min ;

[0077] (7) 终止 :每孔加入 50 μ L 的硫酸终止液,终止显色反应。

[0078] (8) 读数 :在双波长方式 (450nm 为测定波长,650nm 为参比波长) 下用酶标仪测定各孔的吸光度值。抑制率的计算公式如式所示 :

[0079]

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{OD_{\text{对照}} - OD}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

[0080] 式中 :OD 对照 :加 PBS 和抗体的微孔的吸光值 ;

[0081] OD 空白 :只加 PBS 的微孔的吸光值 ;

[0082] 标准曲线中, X 轴为酪胺浓度, Y 轴为酪胺标准品在各浓度下对抗体的抑制率,是典型的 S 型曲线。

[0083] 如图 1 所示,计算酪胺间接竞争 ELISA 方法的灵敏度 (IC_{50} 值) 与检出限 (IC_{15} 值) 分别为 : $0.20 \pm 0.015 \text{mg/L}$ 和 $0.02 \pm 0.004 \text{mg/L}$ 。

[0084] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

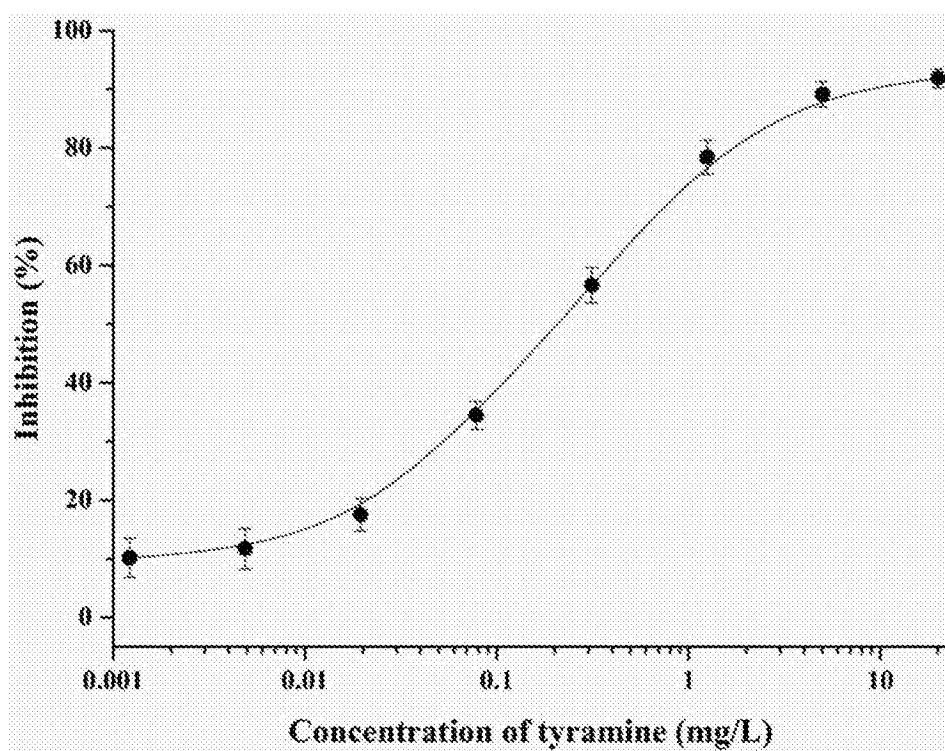


图 1

专利名称(译)	一种酪胺人工抗原和抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN105399639A	公开(公告)日	2016-03-16
申请号	CN201510937173.0	申请日	2015-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	生威 张燕 王硕 方国臻 刘冰 王俊平		
发明人	生威 张燕 王硕 方国臻 刘冰 王俊平		
IPC分类号	C07C215/52 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07C215/52 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种酪胺人工抗原和抗体及其制备方法与应用，涉及酪胺人工抗原和抗体的制备及其免疫分析方法的建立。本发明克服了传统的理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题，提供了简便、快速、灵敏、准确的免疫分析技术。采用甲醛法和戊二醛法，将酪胺分别与阳离子化的牛血清白蛋白、卵清蛋白偶联，成功制备了酪胺的人工抗原与包被原。人工抗原再经动物免疫、取血、分离纯化制得特异性抗体。使用该抗体建立的检测食品中酪胺的检测方法具有良好的特异性和灵敏度，检测限可以稳定到0.02mg/L，并且检测方法成本低廉，操作简便，适合于食品中酪胺的快速检测。

