



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104817639 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 05

(21) 申请号 201510231471. 8

(22) 申请日 2015. 05. 08

(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 贡东军 信海红 周丽岩

孟墨 冯智敏 吕宝新

(74) 专利代理机构 石家庄国域专利商标事务所

有限公司 13112

代理人 白海静

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

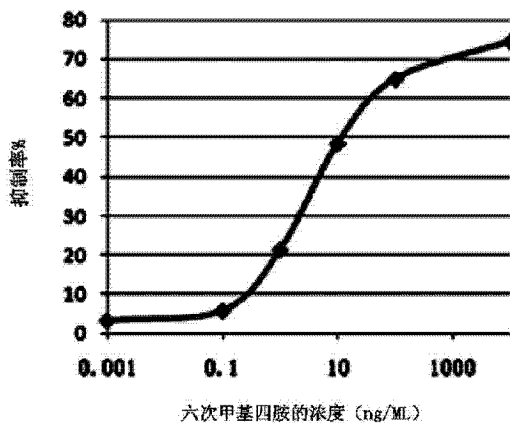
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法,包括:A、配制 0.16-0.3mg/ml 的六次甲基四胺溶液;B、配制含牛血清白蛋白的复合磷酸盐缓冲液;C、将所述六次甲基四胺溶液滴加到所述复合磷酸盐缓冲液中,再加入戊二醛水溶液,混匀,室温静置 1-2 小时,4℃静置过夜;D、将步骤 C 过夜后的混合液装入透析袋中,用磷酸盐缓冲液透析 3-5 天,每天换液 1-2 次,得六次甲基四胺完全抗原。同时,本发明还用该抗原及其制备的抗体建立了六次甲基四胺的定量检测方法。本发明提供的抗原及抗体特异性和灵敏性强,其检测方法的检出限低、精准度高、步骤简单、易于操作控制,可广泛应用于食品安全检验领域中六次甲基四胺的检测。



1. 一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(A) 配制浓度为 200-300mg/ml 的六次甲基四胺溶液;

(B) 配制 pH 值为 7-10、离子浓度为 10-1000 mmol、含载体蛋白 30-50 mg/ml 的复合磷酸盐缓冲液;所述载体蛋白为牛血清白蛋白;

(C) 将所述六次甲基四胺溶液滴加到所述复合磷酸盐缓冲液中,再加入体积比浓度为 20-25% 的戊二醛水溶液,混匀,室温静置 1-2 小时,4℃静置过夜;所述六次甲基四胺:复合磷酸盐缓冲液:戊二醛水溶液的添加比例为:80-120 mg : 1-5ml : 2-3ml;

(D) 将步骤(C)过夜后的混合液装入透析袋中,用磷酸盐缓冲液透析 3-5 天,每天换液 1-2 次,得六次甲基四胺完全抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的六次甲基四胺完全抗原的制备方法,其特征在于,所述六次甲基四胺溶液的溶剂为甲醇、乙醇或水中的一种。

3. 一种权利要求 1 制备的六次甲基四胺完全抗原在六次甲基四胺检测中的应用。

4. 一种六次甲基四胺的定量检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(a) 按照权利要求 1 所述的方法合成六次甲基四胺完全抗原;

(b) 利用步骤(a)合成的六次甲基四胺完全抗原进行动物免疫,获得六次甲基四胺多克隆抗血清;

(c) 对步骤(a)合成的六次甲基四胺完全抗原进行包被,获得六次甲基四胺包被抗原;

(d) 用六次甲基四胺包被抗原包被酶标板,封闭,加入不同浓度的六次甲基四胺标准品,再加入六次甲基四胺多克隆抗血清的稀释液,设置以不加入六次甲基四胺标准品为阴性对照,设置空白对照,洗板,拍干,加入酶标二抗,洗板,拍干,加入底物显色液,终止反应,测定酶标板上标准品、阴性对照和空白对照的 OD₄₉₀值;

(e) 根据步骤(d)测得各孔的 OD₄₉₀值,按照公式抑制率 = (阴性对照 OD 值 - 标准品 OD 值) / (阴性对照 OD 值 - 空白对照 OD 值) × 100%, 计算不同浓度六次甲基四胺标准品所对应的抑制率;

(f) 以六次甲基四胺浓度为横坐标,以所述六次甲基四胺浓度所对应的抑制率为纵坐标,绘制六次甲基四胺竞争抑制标准曲线;对所述标准曲线进行拟合,得线性拟合方程;

(g) 测定样品时,先对待测样品进行前处理,按照所述步骤(d)的操作过程,将待测样品代替六次甲基四胺标准品进行加样检测,测定待测样品的 OD₄₉₀值,按照公式抑制率 = (阴性对照 OD 值 - 待测样品 OD 值) / (阴性对照 OD 值 - 空白对照 OD 值) × 100%, 计算所述待测样品 OD₄₉₀值对应的抑制率,将所得的抑制率带入到所述标准曲线读出其所对应的六次甲基四胺的含量值或根据所述线性拟合方程计算出待测样品中六次甲基四胺的含量。

5. 根据权利要求 4 所述的六次甲基四胺的定量检测方法,其特征在于,步骤(b)所述六次甲基四胺多克隆抗血清制备的工艺为:采用初次免疫制剂对两只雄性大耳白家兔进行初次免疫,之后用加强免疫制剂分别于初次免疫后的第 2 周、4 周、8 周、12 周各加强免疫 1 次,采用背部皮下脊柱两侧多点进行免疫,于最后一次免疫完第 10 天,从兔子的耳缘静脉取血,将血清收集于离心管中,室温静置 30-35min,待血浆凝聚后,4℃静置过夜,将血清以 3000 r/min 离心 15-20 min,得到的上清液为六次甲基四胺多克隆抗血清。

6. 根据权利要求 5 所述的六次甲基四胺的定量检测方法,其特征在于,所述初次免疫制剂的制备工艺为将所述六次甲基四胺完全抗原按体积比为 1:4 溶于磷酸盐缓冲液中,得

抗原磷酸缓冲液,在抗原磷酸缓冲液中加入与其等体积的弗氏完全佐剂,乳化即得;所述加强免疫制剂的制备工艺为将所述六次甲基四胺完全抗原按体积比为 1:9 溶于磷酸盐缓冲液中,得加强抗原磷酸缓冲液,在加强抗原磷酸缓冲液中加入与其等体积的弗氏不完全佐剂,乳化即得;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01 mol/L, pH 值为 7.4。

7. 根据权利要求 4 所述的六次甲基四胺的定量检测方法,其特征在于,步骤(c)所述六次甲基四胺包被抗原的制备工艺为:配制浓度为 15-25mg/ml 的六次甲基四胺溶液;配置浓度为 0.1mol/L、pH 值为 7.4、含有卵清蛋白 4.5-5.0mg/ml 的磷酸盐缓冲液;将六次甲基四胺溶液缓慢滴加到含卵清蛋白磷酸缓冲溶液中,之后,再加入体积比浓度为 20-25% 戊二醛水溶液,混匀,室温静置 1 小时,4℃静置过夜,装入透析袋,4℃下在 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中连续透析 5 天,每天换液 1 次,得到的六次甲基四胺包被抗原;所述六次甲基四胺:含卵清蛋白的磷酸缓冲溶液:戊二醛水溶液的添加比例为 5-6 mg : 2-5ml : 1-2 ml。

8. 根据权利要求 4 所述的六次甲基四胺的定量检测方法,其特征在于,步骤(d)所述包被酶标板的六次甲基四胺包被抗原的浓度为 5.8-6.2 μg/ml,包被量为 95-105 μl/孔;所述不同浓度六次甲基四胺标准品是指将六次甲基四胺溶于甲醇中配制成浓度分别为 10000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml、0.1 ng/ml、0.001ng/ml 系列样品,其添加量为 50 μl/孔;所述六次甲基四胺多克隆抗血清的稀释液的稀释比例为 1:2000,其添加量为 50 μl/孔;所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标二抗,所述辣根过氧化物酶标二抗的稀释比例为 1:3000,加入量为 100 μl/孔。

9. 根据权利要求 4、5、6、7 或 8 所述的六次甲基四胺的定量检测方法,其特征在于,步骤(f)所述的线性拟合方程为 $y=8.89711\ln(x)+24.852$,所述 x 为六次甲基四胺的浓度,所述 y 为抑制率。

10. 一种权利要求 4 所述的六次甲基四胺定量检测方法在食品安全检测中的应用。

一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测领域,具体地说是一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法及其该完全抗原在六次甲基四胺检测中的应用。

背景技术

[0002] 六次甲基四胺(俗名乌洛托品),分子式 $C_6H_{12}N_4$,属化工原料,被卫生部列入第五批《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单》中,六次甲基四胺被禁止添加到食品当中或在加工食品过程中使用。部分违法者将其掺入腐竹、粉丝、水产品等食品中,会起到增白、保鲜、增加口感、防腐的效果。六次甲基四胺本身属低毒类,可作为药物服用。但其在酸性条件下,能分解出甲醛,甲醛易与体内多种化学结构的受体发生反应,如与氨基化合物可以发生缩合,与巯基化合物加成,使蛋白质变性。甲醛在体内还可还原为醇,故可表现出甲醇的毒理作用,对人体的肾、肝、中枢神经、免疫功能、消化系统等均有损害。

[0003] 目前,国家标准中还没有关于六次甲基四胺的指定检测方法,一般行业内对其进行检测,主要采用仪器法,比如高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MSMS)等。这些方法虽然可以精确地进行定量检测分析,但是存在检测仪器昂贵、成本高、需要专门的技术人员来检测、检测时间长、方法操作复杂等缺陷。因此,行业内非常迫切开发一种简单、快速、高效检测六次甲基四胺的方法。

[0004] 免疫学检测方法是应用免疫学理论设计的一系列测定抗原、抗体、免疫细胞及其分泌的细胞因子的实验方法。它可以克服仪器检测法的上述缺陷,能够以其简单、快速、灵敏度高、特异性强、结果直观、无需仪器等高效地应用于食品安全检测领域。目前,免疫学检测方法中应用较广泛的是酶联免疫吸附测定法,简称ELISA法;其基本原理是通过化学的方法将酶与抗体或抗原结合起来,形成酶标记物;或通过免疫学的方法将酶与酶抗体结合起来,形成免疫复合物,然后通过显色来检测。由此可见,为适应于食品安全检测高效、快速特性的迫切需求,行业内开发一种六次甲基四胺的免疫检测方法是一个非常不错的选择。但是,建立该方法首先需要制备出待测物的高特异性和高敏感性的完全抗原和抗体,而一般针对特定的半抗原需选择合适的人工抗原合成方法,才能获得高效价的抗体和理想的检测效果。到目前为止,国内外尚无合成六次甲基四胺完全抗原方法的报道,而采用目前现有技术中常规合成人工抗原的方法,如重氮化法、碳二亚胺法、活泼酯法、混合酸酐法等,根本无法合成理想的六次甲基四胺完全抗原。与此同时,目前国内外也没有关于采用酶联免疫法检测六次甲基四胺的相关报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一是提供一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法,以提供一种高特异性的完全抗原,为其能够投入到六次甲基四胺酶联免疫简单、快速、有效的检测应用中。

[0006] 本发明的目的之二是利用制备的六次甲基四胺完全抗原及抗体建立一种六次甲

基四胺的定量检测方法。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的：一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法，包括以下步骤：

(A) 配制浓度为 200-300mg/ml 的六次甲基四胺溶液；

(B) 配制 pH 值为 7-10、离子浓度为 10-1000 mmol、含载体蛋白 30-50 mg/ml 的复合磷酸盐缓冲液；所述载体蛋白为牛血清白蛋白；

(C) 将所述六次甲基四胺溶液滴加到所述复合磷酸盐缓冲液中，再加入体积比浓度为 20-25% 的戊二醛水溶液，混匀，室温静置 1-2 小时，4℃ 静置过夜；所述六次甲基四胺：复合磷酸盐缓冲液：戊二醛水溶液的添加比例为：80-120 mg：1-5ml：2-3ml；

(D) 将步骤(C) 过夜后的混合液装入透析袋中，用磷酸盐缓冲液透析 3-5 天，每天换液 1-2 次，得六次甲基四胺完全抗原。

[0008] 所述六次甲基四胺溶液的溶剂为甲醇、乙醇或水中的一种；优选甲醇。

[0009] 通过实验证明，采用上述方法制备的六次甲基四胺完全抗原可成功制备高特异性和灵敏性的六次甲基四胺多克隆抗体，完全能够应用于检测待测物中的六次甲基四胺的含量。

[0010] 一种六次甲基四胺的定量检测方法，包括以下步骤：

(b) 利用步骤(a) 合成的六次甲基四胺完全抗原进行动物免疫，获得六次甲基四胺多克隆抗血清；

(c) 对步骤(a) 合成的六次甲基四胺完全抗原进行包被，获得六次甲基四胺包被抗原；

(d) 用六次甲基四胺包被抗原包被酶标板，封闭，加入不同浓度的六次甲基四胺标准品，再加入六次甲基四胺多克隆抗血清的稀释液，设置以不加入六次甲基四胺为阴性对照，设置空白对照，洗板，拍干，加入酶标二抗，洗板，拍干，加入底物显色液，终止反应，测定酶标板上标准品、阴性对照和空白对照的 OD₄₉₀ 值；

(e) 根据步骤(d) 测得各孔的 OD₄₉₀ 值，按照公式抑制率 = (阴性对照 OD 值 - 样品 OD 值) / (阴性对照 OD 值 - 空白对照 OD 值) × 100%，计算不同浓度六次甲基四胺标准品所对应的抑制率；

(f) 以六次甲基四胺浓度为横坐标，以所述六次甲基四胺浓度所对应的抑制率为纵坐标，绘制六次甲基四胺竞争抑制标准曲线；对所述标准曲线进行拟合，得线性拟合方程；

(g) 测定样品时，先对待测样品进行前处理，按照所述步骤(d) 的操作过程，将待测样品代替六次甲基四胺标准品进行加样检测，测定待测样品的 OD₄₉₀ 值，按照所述抑制率的计算公式计算所述 OD 值对应的抑制率，将所得的抑制率带入到所述标准曲线读出其所对应的六次甲基四胺的含量值或根据所述线性拟合方程计算出待测样品中六次甲基四胺的含量。

[0011] 本发明步骤(b) 所述六次甲基四胺多克隆抗血清制备的工艺方法为：步骤(b) 所述六次甲基四胺多克隆抗血清制备的工艺为：采用初次免疫制剂对两只雄性大耳白家兔进行初次免疫，之后用加强免疫制剂分别于初次免疫后的第 2 周、4 周、8 周、12 周各加强免疫 1 次，采用背部皮下脊柱两侧多点进行免疫，于最后一次免疫完第 10 天，从兔子的耳缘静脉取血，将血清收集于离心管中，室温静置 30-35min，待血浆凝聚后，4℃ 静置过夜，将血清以 3000 r/min 离心 15-20 min，得到的上清液为六次甲基四胺多克隆抗血清。

[0012] 所述初次免疫制剂的制备工艺为将所述六次甲基四胺完全抗原按体积比为 1:4

溶于磷酸盐缓冲液中,得抗原磷酸缓冲液,在抗原磷酸缓冲液中加入与其等体积的弗氏完全佐剂,乳化即得;所述加强免疫制剂的制备工艺为将所述六次甲基四胺完全抗原按体积比为 1:9 溶于磷酸盐缓冲液中,得加强抗原磷酸缓冲液,在加强抗原磷酸缓冲液中加入与其等体积的弗氏不完全佐剂,乳化即得;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01 mol/L, pH 值为 7.4。

[0013] 本发明步骤(c)所述六次甲基四胺包被抗原的制备工艺为:步骤(c)所述六次甲基四胺包被抗原的制备工艺为:配制浓度为 15-25mg/ml 的六次甲基四胺溶液;配置浓度为 0.1mol/L、pH 值为 7.4、含有卵清蛋白 4.5-5.0mg/ml 的磷酸盐缓冲液;将六次甲基四胺溶液缓慢滴加到含卵清蛋白磷酸缓冲溶液中,之后,再加入体积比浓度为 20-25% 戊二醛水溶液,混匀,室温静置 1 小时,4℃静置过夜,装入透析袋,4℃下在 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中连续透析 5 天,每天换液 1 次,得到的六次甲基四胺包被抗原;所述六次甲基四胺:含卵清蛋白的磷酸缓冲溶液:戊二醛水溶液的添加比例为 5-6 mg : 2-5ml : 1-2 ml。

[0014] 本发明步骤(d)中所述包被酶标板的包被工艺为:包被酶标板的六次甲基四胺包被抗原的浓度为 5.8-6.2 μg/ml,优选 6 μg/ml,包被量为 95-105 μl/孔,优选 100 μl/孔,4℃包被过夜 12h, PBST 洗板 3 次,拍干即可。

[0015] 本发明步骤(d)中所述封闭的工艺为:用质量百分比浓度为 5% 的脱脂奶粉水溶液封闭,其添加量为 200 μl/孔,37℃温箱孵育封闭 1h, PBST 洗板 3 次,拍干即可。

[0016] 本发明步骤(d)中所述加入不同浓度的六次甲基四胺标准品是指每孔先加入 50 μl、浓度分别为 10000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml、0.1 ng/ml、0.001ng/ml 的六次甲基四胺甲醇溶液。

[0017] 本发明步骤(d)中所述加入六次甲基四胺多克隆抗血清的稀释液的稀释比例为 1:2000,其添加量为 50 μl/孔,37℃温箱孵育 1h, PBST 洗板 4 次,拍干。

[0018] 本发明步骤(d)中所述酶标二抗为辣根过氧化物羊抗兔酶标二抗(Solarbio,北京博奥康生物技术有限公司),加入辣根过氧化物酶标二抗的稀释梯度为 1:3000,加入量为 100 μl/孔,37℃温箱孵育 30min, PBST 洗板 5 次,拍干。

[0019] 本发明步骤(d)中底物显色为邻苯二胺底物体系,添加量为 150 μl/孔,37℃避光反应 20 min。

[0020] 本发明步骤(d)中所述终止的终止液为 2mol/L 的浓硫酸,添加量为 50 μl/孔,终止反应。

[0021] 本发明步骤(d)中所述测定 OD 值在波长 490nm 条件下用酶标仪读取即可。

[0022] 本发明提供的定量检测方法通过实验证明可以在食品安全检测中推广应用。

[0023] 本发明首创公开了六次甲基四胺完全抗原的制备方法,并通过制备的完全抗原免疫动物得到的六次甲基四胺多克隆抗体,该制备方法简单、易操作,制备的完全抗原特异性强、灵敏度高,可用于六次甲基四胺残留的免疫检测,实现食品中六次甲基四胺的安全监控。同时,本发明利用制备的完全抗原及抗体首次公开一种新的检测六次甲基四胺的 ELISA 法,即采用间接竞争 ELISA 法精准地定量分析样品中含有的六次甲基四胺,通过实验证明,其最低检测限(LOD 值)为 0.33 ng/ml。本发明的检测方法检测时间短,无需大型仪器,对样品的前处理要求低,处理过程简单,能够同时快速检测大批样品,而且检测结果准确度高,

应用性强,操作简单,可实现腐竹、粉丝、水产品中六次甲基四胺的快速、准确地检测,这对于维护广大消费者利益及保障政府部门的监管工作具有重大意义。

附图说明

[0024] 图 1 为牛血清白蛋白的光谱扫描图谱。

[0025] 图 2 为六次甲基四胺偶联牛血清白蛋白的光谱扫描图谱。

[0026] 图 3 为六次甲基四胺竞争抑制标准曲线图。

具体实施方式

[0027] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。

[0028] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。实施例中所用的试验材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0029] 实施例 1 六次甲基四胺完全抗原的制备

配制 pH 值为 7.4、离子浓度为 100 mmol、含有 200 mg 牛血清白蛋白(载体蛋白)的复合磷酸盐缓冲液 5ml;称取 100mg 六次甲基四胺溶于 400 μ l 甲醇中,溶解后将其滴入到配好的复合磷酸盐缓冲液中;再加入 3ml 体积比浓度为 25% 的戊二醛水溶液,混匀,室温静置 1 小时,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,用磷酸盐缓冲液连续透析 5 天,每天换液 1 次,得六次甲基四胺完全抗原(完全抗原 HMTA-BSA)。

[0030] 实施例 2 六次甲基四胺完全抗原的鉴定

用去离子水精确配制六次甲基四胺和牛血清白蛋白(BSA)标准溶液。用去离子水配制偶联物 HMTA-BSA 标准溶液,利用凯氏定氮法测其蛋白质的浓度,并使偶联物溶液蛋白质的浓度和 BSA 蛋白浓度一致,在波长 200nm ~ 700nm 的范围内分别对其进行光谱扫描,判断其是否偶联成功。其结果见图 1 和图 2。

[0031] 结果显示:六次甲基四胺抗原的最大吸收波长所对应的吸光值与六次甲基四胺和牛血清白蛋白的明显不同,由图 1 和图 2 对比可知,六次甲基四胺与载体蛋白发生偶联后,其偶联物紫外光谱扫描图谱与载体蛋白 BSA 的相比,光谱曲线发生了改变,最大吸收峰处的吸收波长由 285nm 移动至 507nm,吸光值也有所增加,这说明载体蛋白分子上已经成功的连接上了一定数量的六次甲基四胺半抗原小分子,说明六次甲基四胺和牛血清白蛋白已经偶联成功。经过计算,六次甲基四胺和牛血清白蛋白结合的摩尔比为 7:1。

[0032] 实施例 2 六次甲基四胺包被抗原的制备

准确称取六次甲基四胺 5mg 溶于 300 μ l 甲醇当中,然后准确称取 12mg 卵清蛋白(OVA)溶于 2.5ml 浓度为 0.1mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)中;将溶有六次甲基四胺的甲醇溶液缓慢滴加到卵清蛋白磷酸缓冲溶液中,之后,再加入 1.5ml 体积比浓度为 25% 戊二醛水溶液,混匀,室温静置 1 小时,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;将其装入透析袋,4 $^{\circ}$ C 下在 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中连续透析 5 天,每天换液 1 次;得到的六次甲基四胺包被抗原(包被抗原 HMTA-OVA),将该抗原用磷酸缓冲液(浓度为 0.1mol/L、pH 值为 7.4)以 0.75mg/ml 的浓度分装于 1.5ml 离心管中,于 -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存,备用。

[0033] 实施例 3 六次甲基四胺多克隆抗体的制备

实验动物免疫 :准确量取 0.1ml 完全抗原 HMTA-BSA,溶于 0.4ml 浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,将得到的溶液与 0.5ml 的弗氏完全佐剂充分乳化后进行初次免疫,加强免疫用 0.1ml 完全抗原 HMTA-BSA 溶于 0.9ml 浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 中,与 1ml 的弗氏不完全佐剂充分乳化后进行免疫,免疫两只雄性大耳白家兔,采用背部皮下脊柱两侧多点(6~9 点)注射,分别于初次免疫后 2 周、4 周、8 周、12 周共加强免疫四次,于第五次免疫完后第 10 天,由兔子的耳缘静脉取血,将血清收集于 10 毫升的离心管中,室温静置 30min,待血浆凝聚后,4℃冰箱过夜,将血清以 3000r/mim 离心 15min,得到的上清液为六次甲基四胺多克隆抗血清(抗血清),将抗血清分装,于 -80℃冷冻保存。

[0034] 实施例 4 六次甲基四胺多克隆抗血清效价的测定

(1) 包被酶标板 :用 0.05 mol/L、pH 值为 9.6 的碳酸盐包被缓冲液(1.6gNa₂CO₃+2.9gNaHCO₃+1000 ml 去离子水)将浓度为 0.75mg/ml 的包被抗原 HMTA-OVA 溶液稀释至 10 μg/ml,包被于 96 孔酶标板 100 μl/孔,4℃冰箱过夜 12h, PBST (PBS+Tween-20)洗板 3 次,300 μl/孔,每次 3min,将板拍干;

(2) 封闭 :用质量百分比浓度为 5% 的脱脂奶粉水溶液封闭酶标板,200 μl/孔,37℃温箱孵育 1h, PBST 洗板 3 次,拍干;

(3) 加样 :第一行为 PBS 空白对照,以下 7 行分别为梯度稀释的含六次甲基四胺多克隆抗血清(1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000),100 μl/孔,做三次平行实验,37℃温箱孵育 1h, PBST 洗板 4 次,拍干;

(4) 加辣根过氧化物酶标二抗 :将辣根过氧化物羊抗兔酶标二抗(Solarbio,北京博奥康生物技术有限公司)用 PBS 做 1:3000 稀释,100 μl/孔,37℃温箱孵育 30min, PBST 洗板 5 次,拍干;

(5) 底物显色 :加入邻苯二胺底物体系(现配现用,1.84gNa₂HPO₄·12H₂O+0.51g 柠檬酸+40mgOPD +150 μlH₂O₂+100ml 去离子水),150 μl/孔,37℃避光反应 20min;

(6) 终止 :加入 2mol/L 的浓硫酸,50 μl/孔,终止反应;

(7) 测定每个反应孔的 OD 值 :5min 内酶标仪测定,于 490nm 处选择 OD 值为 1.0 左右的血清稀释倍数,即为抗血清的效价。用此方法测得的抗血清效价能够满足应用所需的抗体效价要求。

[0035] 根据测定结果,采用常用的封闭时间、反应温度和时间,通过方阵法确定包被原浓度和抗体的最佳稀释比例,选择吸光值在 1.0 左右的抗原抗体结合浓度为最佳工作浓度,经测定其工作浓度为 :包被抗原 HMTA-OVA 的浓度为 5.8-6.2 μg/ml,其最优工作浓度为 :包被抗原 HMTA-OVA 的浓度为 6.0 μg/ml,抗体稀释度为 1:2000。

[0036] 根据上述所确定的抗原和抗体的最佳结合浓度进行实验,辣根过氧化物酶标二抗按照 1:1500、1:3000、1:6000、1:12000 梯度稀释。通过反应测得的 OD 值最接近 1.0 作为评价标准,此时为酶标二抗最佳工作浓度。经测得,辣根过氧化物酶标二抗的最佳稀释度为 1:3000。

[0037] 实施例 5 六次甲基四胺竞争抑制标准曲线的建立

(1) 包被 :用浓度为 6.0 μg/ml 包被抗原 HMTA-OVA 包被酶标板,100 μl/孔,4℃包被过夜 12h, PBST 洗板 3 次,拍干;

(2) 封闭 :加入质量百分比浓度为 5% 的脱脂奶粉水溶液封闭,200 μl/孔,37℃温箱孵

育封闭 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

(3) 加抗体和标准样品: 每孔先加入 50 μ l 的不同稀释浓度六次甲基四胺标准品 (10000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml、0.1 ng/ml、0.001ng/ml), 再加入 50 μ l 稀释比例为 1:2000 的所述抗血清, 以不加入六次甲基四胺标准品的孔为阴性对照孔, 同时以不加入任何物品的孔为空白对照孔, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1h, PBST 洗板 4 次, 拍干;

(4) 加辣根过氧化物酶标二抗: 加入 1:3000 稀释的辣根过氧化物酶标二抗 (Solarbio, 北京博奥康生物技术有限公司), 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 30min, PBST 洗板 5 次, 拍干;

(5) 底物显色: 加入邻苯二胺底物体系 (现配现用, 1.84gNa₂HP04 · 12H₂O+0.51g 柠檬酸 +40mgOPD +150 μ lH₂O₂+100ml 去离子水), 150 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 20 min;

(6) 终止: 加入 2mol/L 的浓硫酸, 50 μ l/孔, 终止反应; 在波长 490nm 条件下用酶标仪读取添加不同浓度的六次甲基四胺标准品反应孔的 OD₄₉₀值 (吸光值);

(7) 根据 OD 值计算抑制率, 抑制率的计算公式为: 抑制率 = (阴性对照 OD 值 - 样品 OD 值) / (阴性对照 OD 值 - 空白对照 OD 值) × 100%, 以六次甲基四胺浓度为横坐标, 所对应的抑制率为纵坐标, 绘制标准曲线; 其结果如图 3 所示, 进一步对工作曲线进行方程拟合, 得其线性拟合方程为 $y=8.89711n(x)+24.852$, $R^2=0.9882$ 。

[0038] 标准曲线的作用在于, 在测定样品时可以根据标准曲线, 相对应每一个样品中六次甲基四胺的含量可从标准曲线上读出, 也可以根据线性拟合方程计算出样本中六次甲基四胺的含量。测得的吸光度与样品中六次甲基四胺的含量成反比, 根据测得的吸光值计算抑制率, 再由标准曲线或线性拟合方程计算样品中六次甲基四胺的含量。

[0039] 实施例 6 六次甲基四胺的定量检测方法

样品前处理: 选取 3 种待测样品腐竹、粉丝、水产品, 分别放入研钵中研磨粉碎, 过筛去除大的颗粒, 分别称取 15g 样本置于蒸发皿中, 加入 10ml 正己烷, 摇匀后水浴蒸干, 取出再加入 10ml 正己烷, 摇匀继续蒸干; 分别向其中加入 10ml 的甲醇, 摇匀, 凝缩定容至 1ml, 用 PBS 做 1:10 的稀释, 制得 3 种待测样品溶液;

用移液器分别取待测样品溶液 100 μ l, 采用间接竞争 ELISA 法做检测:

(1) 包被: 用浓度为 6.0 μ g/ml 包被抗原 HMTA-OVA 包被酶标板, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜 12h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

(2) 封闭: 加入质量百分比浓度为 5% 的脱脂奶粉水溶液封闭, 200 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育封闭 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

(3) 加抗体和待测样品: 每孔先加入 50 μ l 的样本液, 再加入 50 μ l 稀释比例为 1:2000 的所述抗血清, 以不加入待测样本溶液的孔为对照孔, 同时设置空白对照, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1h, PBST 洗板 4 次, 拍干;

(4) 加辣根过氧化物酶标二抗: 加入 1:3000 稀释的辣根过氧化物酶标二抗, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 30min, PBST 洗板 5 次, 拍干。

[0040] (5) 底物显色: 加入邻苯二胺底物体系 (现配现用, 配置方法同上), 150 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 20 min。

[0041] (6) 终止: 加入 2mol/L 的浓硫酸, 50 μ l/孔, 终止反应, 在波长 490nm 条件下用酶标仪读取 OD 值。

[0042] (7) 分析检测结果: 测得的吸光度与样品中六次甲基四胺的含量成反比, 按照上述

抑制率的计算公式计算出所述 OD 值对应的抑制率,将所得的抑制率带入到实施例 5 得到的六次甲基四胺竞争抑制标准曲线中,读出其所对应的六次甲基四胺的含量值,也可以根据实施 5 得到的线性拟合方程计算出样本中六次甲基四胺的含量,即为待测样品中所含六次甲基四胺的含量。

[0043] 根据六次甲基四胺竞争抑制标准曲线,由拟合方程可知本发明提供的 ELISA 检测方法的 IC₅₀ 为 16.88 ng/ml,表明本发明制备的抗原及抗体具有较好的特异性,提供的检测方法灵敏度较高。

[0044] 根据六次甲基四胺竞争抑制曲线,本发明将抑制率为 15% 时的标准物六次甲基四胺浓度定为最低检测限。由拟合方程可知 ELISA 检测方法的 IC₁₅ 为 0.33ng/ml,所以,本法的最低检测限为 0.33 ng/ml。

[0045] 实施例 7 本发明提供的检测方法在食品中六次甲基四胺残留检测中的应用

对腐竹样品进行前处理,处理过程同实施例 6,向无六次甲基四胺的腐竹样品中添加 15 ng/ml 的六次甲基四胺作为实际待检样品,用间接竞争 ELISA 法进行检测。

[0046] 样品前处理:用 PBS 对样品做 1:10 稀释,制备样品溶液;

间接竞争 ELISA 法检测:

(1)包被:用浓度为 6.0 μg/ml 包被抗原 HMTA-OVA 包被酶标板,100 μl/孔,4℃包被过夜 12h, PBST 洗板 3 次,拍干;

(2)封闭:加入质量百分比浓度为 5% 的脱脂奶粉水溶液封闭,200 μl/孔,37℃温箱孵育封闭 1h, PBST 洗板 3 次,拍干;

(3)加抗体和待测样品:每孔先加入 50 μl 的样本液,再加入 50 μl 稀释比例为 1:2000 的所述抗血清,以不加入待测样本溶液的孔为对照孔,同时设置空白对照,37℃温箱孵育 1h, PBST 洗板 4 次,拍干;

(4)加辣根过氧化物酶标二抗:加入 1:3000 稀释的酶标二抗,100ul/孔,100 μl/孔,37℃温箱孵育 30min, PBST 洗板 5 次,拍干;

(5)底物显色:加入邻苯二胺底物体系(现配现用,配置方法同上),150 μl/孔,37℃避光反应 20 min;

(6)终止:加入 2mol/L 的浓硫酸,50 μl/孔,终止反应,在波长 490nm 条件下用酶标仪读取 OD 值。

[0047] 结果分析:

根据测得的 OD 值,通过抑制率计算公式,计算其抑制率为 27.78%,将抑制率带入到线性拟合方程,求得样品溶液中六次甲基四胺的含量为 1.39ng/ml,由于样品溶液经前处理已经稀释了 10 倍,所以测定样品腐竹中六次甲基四胺的含量为 13.9ng/ml,回收率 92.5%。

[0048] 对比例 1

六次甲基四胺完全抗原的制备:将六次甲基四胺 100mg 溶于 400 μl 甲醇当中,溶解后将其滴入 PH 值为 7.4、离子浓度为 100mmol、含有 200mg 载体蛋白的磷酸盐缓冲液 5ml 中,室温避光搅拌 30min,将 PH 值为 7.4、离子浓度为 100mmol、含有 100mg 碳二亚胺的磷酸盐缓冲液 3ml 逐滴加入上述混合液中,23℃恒温避光缓慢搅拌过夜。载体蛋白采用牛血清白蛋白,用磷酸盐缓冲液在 4℃下连续透析 5 天,每天换液 1 次,得六次甲基四胺免疫抗原。

[0049] 六次甲基四胺包被抗原的鉴定:取六次甲基四胺、牛血清白蛋白和六次甲基四胺

抗原分别进行紫外(200nm-700nm)光谱扫描,比较三者的最大吸收波长和所对应的吸光值,鉴定六次甲基四胺是否与载体蛋白发生偶联,结果显示六次甲基四胺抗原的最大吸收波长所对应的吸光值与六次甲基四胺和牛血清白蛋白的无明显变化。经过计算,六次甲基四胺和牛血清白蛋白结合的摩尔比仅为 2:1。

[0050] 对比例 2

六次甲基四胺完全抗原的制备:将六次甲基四胺 5mg 溶于 300 μ l 甲醇当中,溶解后将其滴入 PH 值为 7.4、离子浓度为 100mmol、含有 12mg 载体蛋白的磷酸盐缓冲液 2.5ml 中,室温避光搅拌 30min,将 PH 值为 7.4、离子浓度为 100mmol、含有 10mg 碳二亚胺的磷酸盐缓冲液 1.5ml 逐滴加入上述混合液中,23 $^{\circ}$ C 恒温避光缓慢搅拌过夜。载体蛋白采用卵清白蛋白,用磷酸盐缓冲液在 4 $^{\circ}$ C 下连续透析 5 天,每天换液 1 次,得六次甲基四胺包被抗原。

[0051] 六次甲基四胺包被抗原的鉴定:取六次甲基四胺、卵清白蛋白和六次甲基四胺抗原分别进行紫外(200nm-700nm)光谱扫描,比较三者的最大吸收波长和所对应的吸光值,鉴定六次甲基四胺是否与载体蛋白发生偶联,结果显示六次甲基四胺抗原的最大吸收波长所对应的吸光值与六次甲基四胺和卵清白蛋白的无明显变化。经过计算,六次甲基四胺和卵清白蛋白结合的摩尔比为 2:1。

[0052] 对比例 3

六次甲基四胺完全抗原的制备:将六次甲基四胺 100mg 溶于 400 μ l 甲醇当中,记为 A 液;将 200mg 载体蛋白溶解于 PH 值为 7.4、离子浓度为 100mmol 的磷酸盐缓冲液 5ml 中,记为 B 液;将 3ml 体积比为 25% 的戊二醛水溶液记为 C 液。载体蛋白采用牛血清白蛋白。将三种溶液充分混合,室温静置 1 小时,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。用磷酸盐缓冲液连续透析 5 天,每天换液 1 次,得六次甲基四胺免疫抗原。

[0053] 六次甲基四胺包被抗原的鉴定:取六次甲基四胺、牛血清白蛋白和六次甲基四胺抗原分别进行紫外(200nm-700nm)光谱扫描,比较三者的最大吸收波长和所对应的吸光值,鉴定六次甲基四胺是否与载体蛋白发生偶联,结果显示六次甲基四胺抗原的最大吸收波长所对应的吸光值与六次甲基四胺和牛血清白蛋白的无明显变化。经过计算,六次甲基四胺和牛血清白蛋白结合的摩尔比为 2.91:1。

[0054] 对比例 4

六次甲基四胺完全抗原的制备:将六次甲基四胺 5mg 溶于 300 μ l 甲醇当中,记为 A 液;将 12mg 载体蛋白溶解于 PH 值为 7.4、离子浓度为 100mmol 的磷酸盐缓冲液 2.5ml 中,记为 B 液;将 1.5ml 体积比为 25% 的戊二醛水溶液记为 C 液。载体蛋白采用卵清白蛋白。将三种溶液充分混合,室温静置 1 小时,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。用磷酸盐缓冲液连续透析 5 天,每天换液 1 次,得六次甲基四胺包被抗原。

[0055] 六次甲基四胺包被抗原的鉴定:取六次甲基四胺、卵清白蛋白和六次甲基四胺抗原分别进行紫外(200nm-700nm)光谱扫描,比较三者的最大吸收波长和所对应的吸光值,鉴定六次甲基四胺是否与载体蛋白发生偶联,结果显示六次甲基四胺抗原的最大吸收波长所对应的吸光值与六次甲基四胺和卵清白蛋白的无明显变化。经过计算,六次甲基四胺和卵清白蛋白结合的摩尔比为 2.91:1。

[0056] 上述描述仅作为本发明可实施的技术方案提出,不作为对其技术方案本身的单一限制条件。

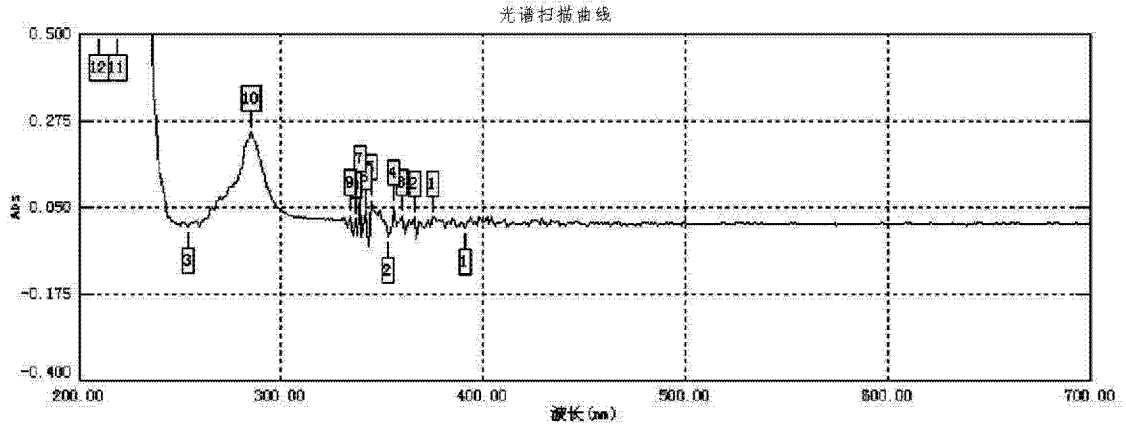


图 1

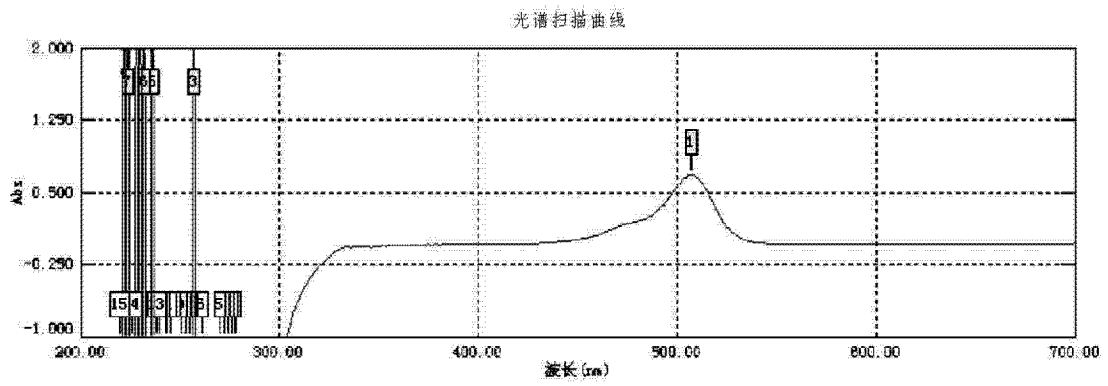


图 2

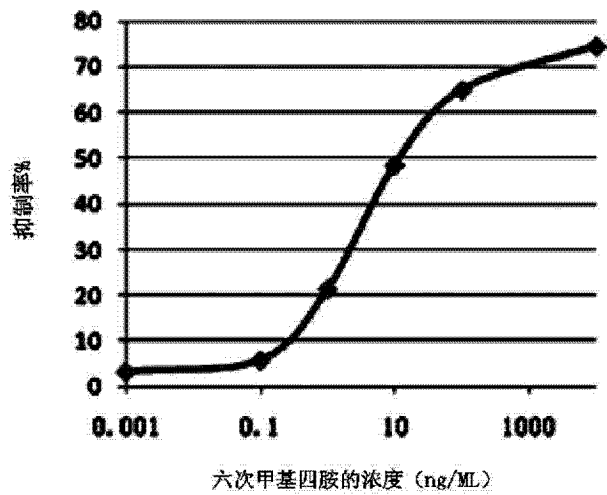


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法及其应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN104817639A | 公开(公告)日 | 2015-08-05 |
| 申请号 | CN201510231471.8 | 申请日 | 2015-05-08 |
| [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 贡东军 信海红 周丽岩 孟墨 冯智敏 吕宝新 | | |
| 发明人 | 王庭欣 贡东军 信海红 周丽岩 孟墨 冯智敏 吕宝新 | | |
| IPC分类号 | C07K14/765 C07K1/107 G01N33/543 G01N33/531 | | |
| CPC分类号 | C07K14/765 C07K19/00 G01N33/531 G01N33/543 G01N2430/00 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种六次甲基四胺完全抗原的制备方法，包括：A、配制0.16-0.3mg/ml的六次甲基四胺溶液；B、配制含牛血清白蛋白的复合磷酸盐缓冲液；C、将所述六次甲基四胺溶液滴加到所述复合磷酸盐缓冲液中，再加入戊二醛水溶液，混匀，室温静置1-2小时，4℃静置过夜；D、将步骤C过夜后的混合液装入透析袋中，用磷酸盐缓冲液透析3-5天，每天换液1-2次，得六次甲基四胺完全抗原。同时，本发明还用该抗原及其制备的抗体建立了六次甲基四胺的定量检测方法。本发明提供的抗原及抗体特异性和灵敏性强，其检测方法的检出限低、精准度高、步骤简单、易于操作控制，可广泛应用于食品安全检验领域中六次甲基四胺的检测。

