



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106018793 A

(43)申请公布日 2016. 10. 12

(21)申请号 201610330766.5

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2015.05.08

(62)分案原申请数据

201510234034.1 2015.05.08

(71)申请人 河北大学

地址 071002 河北省保定市北市区五四东
路180号河北大学

(72)发明人 王庭欣 周丽岩 孟墨 庞艳荣
王庭祥 谢飞 任勃儒

(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.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

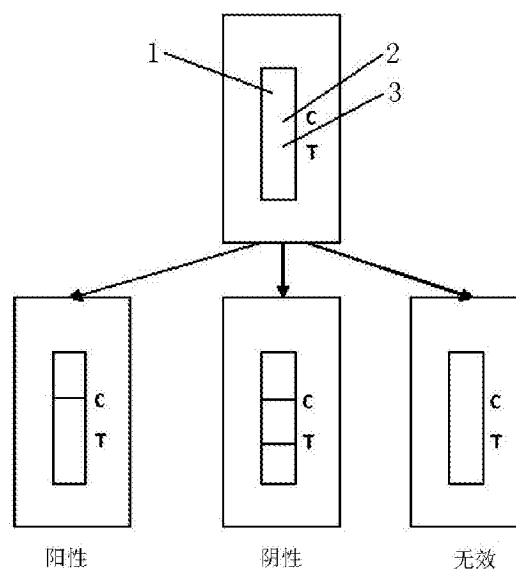
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种六次甲基四胺的检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种六次甲基四胺的检测试剂盒,包括检测卡、胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物以及磷酸盐缓冲稀释液。同时,本发明还提供了一种六次甲基四胺的检测方法和应用。该试剂盒及其检测方法可以定性及半定量检测样品中是否含有待测物以及待测物含量的大致范围。本发明提供的试剂盒中检测卡结构简单,成本低,检测所需时间短,能够同时快速检测大批样品,而且检测结果准确,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食品安全监管工作具有重大意义。



1. 一种六次甲基四胺的检测方法,其特征在于,采用试剂盒检测六次甲基四胺,包括以下步骤:

所述试剂盒,包括:

检测卡;所述检测卡包括硝酸纤维素膜,在所述硝酸纤维素膜上设有一条含六次甲基四胺包被抗原的检测带和一条含有羊抗兔二抗的质控带;

胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物;以及

磷酸盐缓冲稀释液;

(1)预处理待测样品;

(2)将所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物与磷酸盐缓冲液按1:2混合,将处理后的待测样品与所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物和磷酸盐缓冲液的混合物按体积比为1:5混合,得混合液;

(3)将所述混合液逐滴加到所述检测卡的检测带与质控带之间的区域上;静置10-15min,观察,若质控带和检测带都显红色,则待测样品为阴性,即表明待测样品中不含六次甲基四胺或其含量小于0.5ng/ml最低检出限;若仅质控带显红色,则待测样品为阳性,即表明待测样品中含有六次甲基四胺且含量大于所述最低检出限,若质控带均不显色,则该测试无效;

所述试剂盒中胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物的制备工艺包括以下步骤:

(A)合成六次甲基四胺完全抗原:配制浓度为200-300 mg/ml的六次甲基四胺溶液;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;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25%的戊二醛水溶液,混匀,室温静置1-2小时,4℃冰箱过夜,再装入透析袋中,透析3-5天,每天换液1-2次,得六次甲基四胺完全抗原;所述六次甲基四胺:复合磷酸盐缓冲液:戊二醛水溶液质量体积比为:80-120 mg : 1-5ml : 2-3ml;

(B)制备六次甲基四胺多克隆抗体:用所述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体;

(C)制备胶体金溶液:将100 ml质量比浓度为0.01%的HAuCl₄的水溶液边搅拌边加热至沸腾,保持煮沸2-3 min,搅拌,加入1.2 ml质量比浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,待溶液颜色变为透明的红色并不再变化时,保持煮沸15 min,停止加热,搅拌,冷却至室温,添加蒸馏水恢复溶液至100 ml;

(D)制备胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物:调节胶体金溶液的pH值为8-10,按体积比1:0.06取所述胶体金溶液和所述六次甲基四胺多克隆抗体,在磁力搅拌下,将所述六次甲基四胺多克隆抗体逐滴加入到所述胶体金溶液中,10-15 min后向溶液中逐滴加入牛血清白蛋白,使溶液中所述牛血清白蛋白的终浓度达到1-2%,搅拌30-40min,置于4℃下过夜;在4℃下1500r/min离心10min,取上清液于4℃下、10000r/min离心30min,弃去上清液,得胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物。

2. 根据权利要求1所述的六次甲基四胺的检测方法,其特征在于,步骤(B)所述的制备六次甲基四胺多克隆抗体的工艺为: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。

3.根据权利要求2所述的六次甲基四胺的检测方法,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。

4.根据权利要求1所述的六次甲基四胺的检测方法,其特征在于,所述试剂盒检测卡的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。

一种六次甲基四胺的检测方法

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的检测方法。

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,六次甲基四胺属于小分子物质,如想要对其进行检测,主要采用仪器检测的方法,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性及定量检测分析,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,尤其不适用于食品安全监管现场的快速检测。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。免疫学检测方法中应用较广泛的是酶联免疫法,简称ELISA法。但是ELISA法相对更适用于定量检测方法,检测时间相对较长,不适于快速定性检测。因此,为适应市场需求,行业内迫切需要开发一种简单、快速、灵敏度高、特异性强、结果直观、无需精密仪器的六次甲基四胺的定性检测装置及检测方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种六次甲基四胺的检测试方法,以解决在食品安全检验时,现有方法无法快速、准确地、大批量定性或半定量检测六次甲基四胺的问题。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种六次甲基四胺的检测试剂盒,其特征在于,包括:

检测卡;所述检测卡包括硝酸纤维素膜,在所述硝酸纤维素膜上设有一条含六次甲基四胺包被抗原的检测带和一条含有羊抗兔二抗的质控带;

胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物;以及

磷酸盐缓冲稀释液。

[0006] 所述六次甲基四胺包被抗原是通过以下方法制备的: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。

[0007] 所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物是通过以下步骤制备的:

(A)合成六次甲基四胺完全抗原:配制浓度为200-300mg/ml的六次甲基四胺溶液;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;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25%的戊二醛水溶液,混匀,室温静置1-2小时,4℃冰箱过夜,再装入透析袋中,透析3-5天,每天换液1-2次,得六次甲基四胺完全抗原;所述六次甲基四胺:复合磷酸盐缓冲液:戊二醛水溶液质量体积比为:80-120 mg : 1-5ml : 2-3ml;

(B)制备六次甲基四胺多克隆抗体:采用所述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体;

(C)制备胶体金溶液:将100 ml质量比浓度为0.01%的HAuCl₄水溶液用恒温磁力搅拌器加热至沸腾,保持煮沸2-3 min,搅拌,加入1.2 ml质量比浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,待溶液颜色变为透明的红色并不再变化时,保持煮沸15 min,停止加热,搅拌,冷却至室温,用蒸馏水恢复至100 ml;

(D)制备胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物:调节胶体金的pH值为8-10,按体积比为1:0.06取所述胶体金和所述六次甲基四胺多克隆抗体,在磁力搅拌下,将所述六次甲基四胺多克隆抗体逐滴加入到胶体金溶液中,10-15 min后向溶液中逐滴加入牛血清白蛋白,使溶液中所述牛血清白蛋白的终浓度达到1-2%,搅拌30-40 min,置于4℃下过夜;在4℃下1500r/min离心10min,取上清液于4℃下、10000r/min离心30min,弃去上清液,得胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物。

[0008] 所述制备六次甲基四胺多克隆抗体的方法为: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体。

[0009] 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。

[0010] 所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4,为市售商品。

[0011] 所述质控带与检测带相互平行且间隔0.3-0.7cm;所述检测带用8-12μl的六次甲基四胺包被抗原划线而成,所述质控带用8-12μl的羊抗兔二抗稀释液划线而成,所述羊抗兔二抗稀释液是指将0.5μl的羊抗兔二抗用磷酸盐缓冲液稀释100倍。

[0012] 本发明提供的六次甲基四胺的检测试剂盒在食品安全检测中的应用。

[0013] 一种六次甲基四胺的检测方法,包括以下步骤:

(a)合成六次甲基四胺完全抗原:配制浓度为0.16-0.3mg/ml的六次甲基四胺溶液;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;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25%的戊二醛水溶液,混匀,室温静置1-2小时,4℃冰箱过夜,再装入透析袋中,透析3-5天,每天换液1-2次,得六次甲基四胺完全抗原;所述六次甲基四胺:复合磷酸盐缓冲液:戊二醛水溶液质量体积比为:80-120 mg : 1-5ml : 2-3ml;

(b)制备六次甲基四胺多克隆抗体:采用所述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体;

(c)制备六次甲基四胺包被抗原:用卵清蛋白对所述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)制备胶体金溶液;

(f)胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物的制备和纯化:调节胶体金的pH值为8-10,按体积比为1:0.06取所述胶体金和所述六次甲基四胺多克隆抗体,在磁力搅拌下,将所述六次甲基四胺多克隆抗体逐滴加入到胶体金溶液中,10-15min后向溶液中逐滴加入牛血清白蛋白,使溶液中所述牛血清白蛋白的终浓度达到1-2%,搅拌30-40 min,置于4℃下过夜;在4℃下1500r/min离心10min,取上清液于4℃下、10000r/min离心30min,弃去上清液,得胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物;

(g)制备检测卡:准备硝酸纤维素膜,在所述硝酸纤维素膜上划线设有相互平行的检测带和质控带,所述检测带用六次甲基四胺包被抗原划线,所用体积10μl;所述质控带用羊抗兔二抗稀释液划线,所用体积为10μl,所述羊抗兔二抗稀释液是指将0.5μl的羊抗兔二抗用磷酸盐缓冲液稀释100倍;所述质控带与检测带间隔0.3-0.7cm,划线后在37℃恒温箱中固定20-25min,再浸泡在5%脱脂牛奶中封闭30 min;将封闭完的膜用PBST冲洗三次,用吸水纸吸去多余的水分,37℃干燥15min即可;

(h)检测待测样品:预处理待测样品;将所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物与磷酸盐缓冲液按1:2混合,将预处理后的待测样品与所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物和磷酸盐缓冲液的混合物按体积比为1:5混合,得混合液;将所述混合液逐滴加到检测卡上检测带与质控带之间的区域上;静置10-15min,观察,若质控带和检测带都显红色,则待测样品为阴性,即表明待测样品中不含六次甲基四胺或其含量小于0.5ng/ml最低检出限;若仅质控带显红色,则待测样品为阳性,即表明待测样品中含有六次甲基四胺,且含量大于所述最低检出限,若质控带不显色,则该测试无效。所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4。

[0014] 步骤(b)所述制备六次甲基四胺多克隆抗体的工艺为: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;

步骤(b)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。

[0015] 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。

[0016] 步骤(d)所述的制备胶体金溶液的方法为:将100 ml质量比浓度为0.01%的HAuCl₄水溶液用恒温磁力搅拌器加热至沸腾,保持煮沸2-3 min,搅拌,加入1.2 ml质量比浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,待溶液颜色变为透明的红色并不再变化时,保持煮沸15 min,停止加热,搅拌,冷却至室温,用蒸馏水恢复至100 ml。

[0017] 本发明中所述六次甲基四胺溶液的溶剂为甲醇、乙醇或水中的任意一种。

[0018] 本发明还可在所述的检测方法的步骤(h)之前制备标准比色卡,所述标准比色卡的制备方法为:将六次甲基四胺标准品用含体积比浓度为5%的甲醇的磷酸缓冲液稀释成系列浓度为0.01ng/ml、0.1 ng/ml、0.5 ng/ml、1 ng/ml、5 ng/ml和10 ng/ml的稀释液,以不添加六次甲基四胺标准品为空白对照,将所述六次甲基四胺标准品的稀释液与所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物稀释液按体积比为1:5混合,将所述混合液逐滴加到检测卡上检测带与质控带之间的区域上;制得不同浓度六次甲基四胺标准品的比色带,将不同东都比色带拼接制成标准比色卡;从实验结果,根据肉眼观察显色情况,确定该检测卡的最低检出限为0.5ng/ml;浓度为0.5ng/ml以上的所述标准比色卡用作与测定样品测试结果的比对参照卡,待测样品通过比对,即可半定量确定待测样品含有六次甲基四胺的含量范围。

[0019] 本发明提供的检测方法通过实验证明,可以在食品安全定性及半定量检测中推广应用。

[0020] 本发明首创制备了特异性和灵敏性高的六次甲基四胺的完全抗原,并以六次甲基四胺抗原为基础首次研发了一种六次甲基四胺的检测试剂盒,该试剂盒中的检测卡是以胶体金作为示踪标记物,以硝酸纤维素膜为固相载体,包被六次甲基四胺抗原作为检测带,包被羊抗兔二抗作为质控带,加入待检样本和胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物(金标记抗体)后,经微孔滤膜毛细管作用使待测样本中的抗原与膜上包被的抗原竞争金标记抗体,当样品中待检测物浓度低时,金标记抗体与包被抗原结合的就多,这时肉眼可见显色的红色条带,即以此可直接判断待测样品中是否含有六次甲基四胺,即样品的阴阳性,同时,本发明还可做标准比色卡,可以将待测物与标准比色卡相比对,从而半定量预测待测物中六次甲基四胺的含量范围。本发明提供的检测试剂盒中的检测卡只需固相载体硝酸纤维素膜和在其上划线即可制备,结构简单,成本低,检测速度快,灵敏性高,检出限低,整个检测过程只需10-15分钟,操作简便,结果直观,无需仪器,非常适合现场快速检测,可广泛应用于临床、食品检测、环境污染、生物污染和生物制剂的定性或半定量免疫检测。

[0021] 同时,本发明还提供了一种利用制备的检测试剂盒定性分析检测样品中是否含有

的六次甲基四胺的方法,同时可以通过标准比色卡的比对,可以半定量检测样品中的六次甲基四胺的大致含量范围,该方法通过实验证明,其最低检测限(LOD值)为0.5ng/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食品安全监管工作具有重大意义。

[0022] 附图说明;

图1为牛血清白蛋白的光谱扫描图谱。

[0023] 图2为六次甲基四胺偶联牛血清白蛋白的光谱扫描图谱。

[0024] 图3为六次甲基四胺胶体金检测卡检测示意图,其中:1为硝酸纤维素膜,2为质控线,3为检测线。

[0025] 图4为六次甲基四胺标准品浓度标准比色卡示意图,图中六次甲基四胺标准品浓度从下到上依次为:a:空白,b:0.01 ng/ml,c:0.1 ng/ml,d:0.5 ng/ml,e:1 ng/ml,f:5 ng/ml,g:10ng/ml。

[0026] 图5为本发明采用检测卡定性检测腐竹样品中六次甲基四胺含量的结果图。

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℃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3六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℃冰箱过夜;将其装入透析袋,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(包被抗原HMTA-OVA),将该抗原用碳酸盐缓冲液(浓度为0.05mol/L、pH值为9.6)以0.75mg/ml的浓度分装于1.5ml离心管中,于-80℃冷冻保存,备用。

[0033] 实施例4 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/min离心15min,得到的上清液为六次甲基四胺多克隆抗体(抗血清),将抗血清分装,于-80℃冷冻保存。

[0034] 实施例5 胶体金颗粒的制备

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液:将质量比浓度为0.01%的HAuCl₄水溶液100ml用恒温磁力搅拌器加热至沸腾,保持煮沸2min,不断搅拌的同时迅速加入质量比浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液1.2ml,期间溶液颜色变化为由灰色逐渐加深成黑色,再慢慢变紫,然后向红色转变,待溶液颜色变为透明的红色并不再变化时,继续煮沸15min,撤去热源,继续搅拌,冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积。

[0035] 实施例6 胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物的制备与纯化

制备:用0.1mol/L的K₂CO₃调节胶体金溶液的pH值至9,量取胶体金溶液10ml、六次甲基四胺多克隆抗体0.6ml,在磁力搅拌下,将六次甲基四胺多克隆抗体用微量加样器逐滴加入到10 ml的胶体金溶液中,10min后逐滴加入质量比浓度为10%的牛血清白蛋白(BSA)使溶液中BSA的质量比终浓度为1%,以稳定胶体金标记物,搅拌30min后置于4℃过夜;

纯化:将过夜后的胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体,于4℃下1500r/min离心10min,取上清液分装后,再于4℃下,10000r/min离心30min,弃去上清液,得胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物,可将其储存液重悬为原体积的1/10,4℃保存备用。

[0036] 实施例7 六次甲基四胺胶体金检测卡及其试剂盒的制备

将硝酸纤维素膜裁剪为长*宽为0.2cm*5cm,在其上用HMTA-OVA(六次甲基四胺包被抗原)用划线笔划线,划线带所用材料的体积为10 μ l,线宽约5mm,作为检测带(T带);再将0.5 μ l的羊抗兔二抗用PBS稀释100倍,以相同的方法划线,划线带所用羊抗兔二抗缓冲液的体积也为10 μ l,即为质控带(C带),其T带与C带间隔0.7cm;划线后首先在37℃恒温箱中固定20min,再浸泡在5%脱脂牛奶中封闭30min;将封闭完的膜用PBST冲洗三次,用吸水纸吸去多余的水分,37℃干燥15min后,即得检测卡。

[0037] 以上述制备的检测卡、实施例6制备的胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物以及50-100ml磷酸盐缓冲液(浓度为0.01 mol/L,pH值为7.4)组成六次甲基四胺的检测

试剂盒。

[0038] 本发明中的羊抗兔二抗为北京博奥康生物技术有限公司的市售商品,品名为Solarbio。

[0039] 实施例8 六次甲基四胺的检测

预处理待测样品:取样,置于研钵中研磨粉碎,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,制得待测样品溶液;

将所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物与磷酸盐缓冲液按1:2混合均匀,将处理后的待测样品溶液与所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物和磷酸缓冲液按体积比为1:5混合,得混合液;

将所述混合液逐滴加到检测卡的检测带与质控带之间的区域上;静置10-15min,观察,若质控带和检测带呈红色,则待测样品为阴性,即表明待测样品中不含六次甲基四胺或其含量小于0.5ng/ml最低检出限;若仅质控带呈红色,则待测样品为阳性,即表明待测样品中含有六次甲基四胺,若质控带呈无色,则该测试无效。

[0040] 实施例9 六次甲基四胺标准品浓度标准比色卡的制备

将六次甲基四胺标准品用含体积比浓度为5%的甲醇的磷酸缓冲液稀释成系列浓度为0.01ng/ml、0.1 ng/ml、0.5 ng/ml、1 ng/ml、5 ng/ml和10 ng/ml的稀释液,以不添加六次甲基四胺标准品为空白对照,将所述六次甲基四胺标准品的稀释液与所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物稀释液按体积比为1:5混合,将所述混合液逐滴加到检测卡上检测带与质控带之间的区域上;得到不同浓度检测条带,拼接制得不同浓度六次甲基四胺标准品的比色卡,见图4。从图4可知,根据裸眼观察情况,确定该检测卡的最低检出限为0.5ng/ml;浓度为0.5ng/ml以上的所述标准比色卡用作与测定样品测试结果的比对参照卡,待测样品通过比对,即可半定量确定待测样品含有六次甲基四胺的含量范围。

[0041] 本发明提供的检测方法通过实验证明,可以在食品安全现场检测中推广应用。

[0042] 实施例10 本发明制备的检测卡及其检测方法在食品检测中的应用

取适量腐竹样品(购于保定惠友超市,卫生检疫合格,高效液相色谱法检测不含有六次甲基四胺)放入研钵中研磨粉碎,过筛去除大的颗粒,将均质样本置于蒸发皿中,一式两份,分别添加0.1ng/g、10ng/g含量的六次甲基四胺,加入10ml正己烷,摇匀后水浴蒸干,再加入10ml正己烷摇匀继续蒸干;加入10ml甲醇,摇匀,凝缩定容至1ml。取样品提取液用PBS稀释10倍,用作待测样品溶液。其中添加浓度为0.1ng/g的腐竹为样品1、添加浓度为10ng/g的腐竹为样品2。

[0043] 将所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物与磷酸盐缓冲液按1:2混合,将处理后的待测样品溶液与所述胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物和磷酸盐缓冲液按体积比为1:5混合,反应5min后,将所述混合液逐滴加到检测卡上检测带与质控带之间的区域上,静置15min,观察显色情况。结果如图5所示,通过肉眼可观察出:样品1检测带出现明显显色红色条带现象,则说明该样品中不含六次甲基四胺或含量极少(小于检测极限值0.5ng/ml);样品2的检测带用裸眼无法辨认显色现象,则说明样品2中含有六次甲基四胺,其浓度大于0.5ng/ml。由以上实验可以证明,本发明提供的试剂盒及其检测方法检测快速、有效,检测结果准确,适合大批量样品现场快速检测。

[0044] 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。

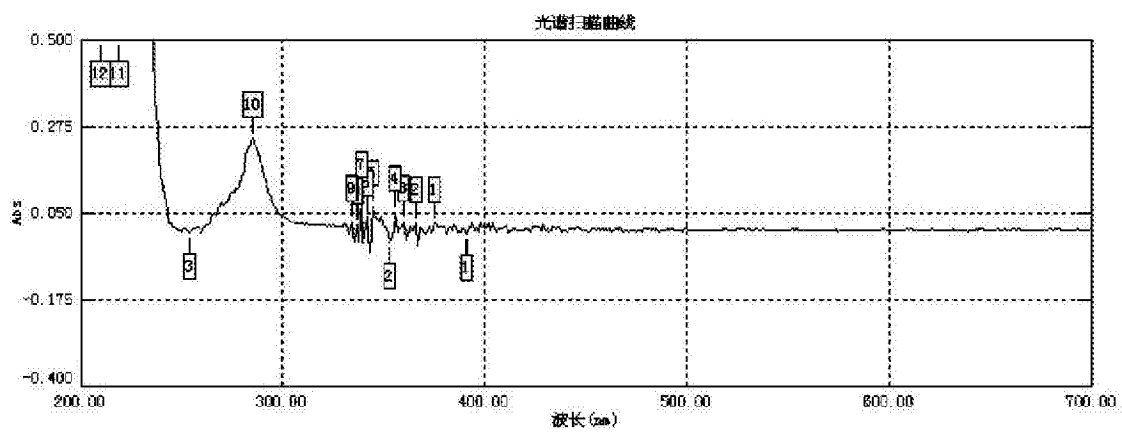


图1

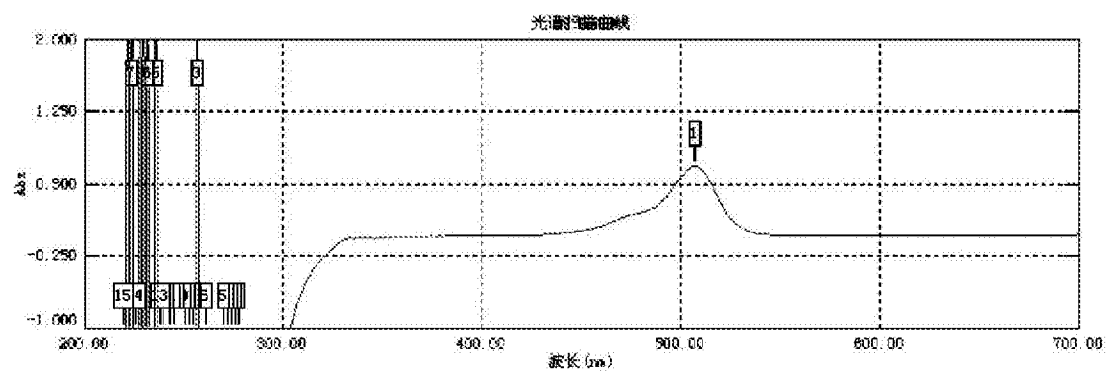


图2

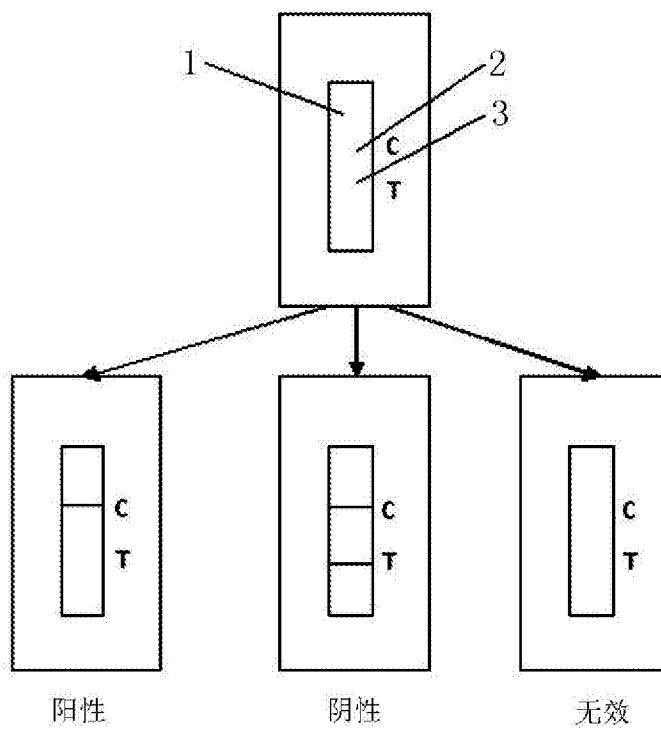


图3

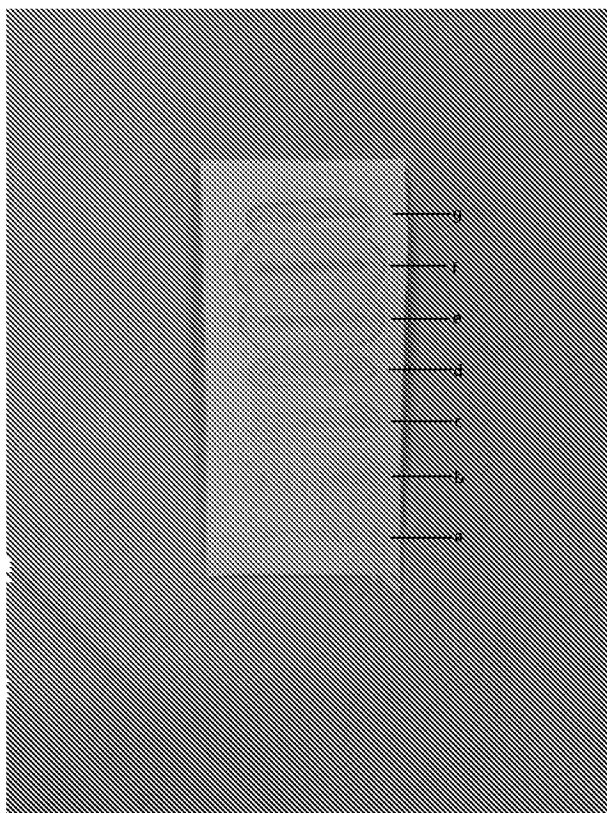


图4

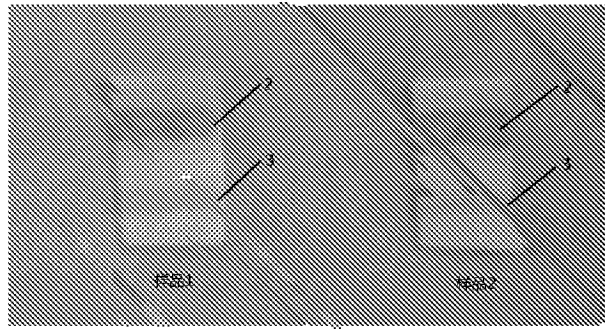


图5

专利名称(译)	一种六次甲基四胺的检测方法		
公开(公告)号	CN106018793A	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201610330766.5	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 周丽岩 孟墨 庞艳荣 王庭祥 谢飞 任勃儒		
发明人	王庭欣 周丽岩 孟墨 庞艳荣 王庭祥 谢飞 任勃儒		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/558		
其他公开文献	CN106018793B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种六次甲基四胺的检测试剂盒，包括检测卡、胶体金标记六次甲基四胺多克隆抗体复合物以及磷酸盐缓冲稀释液。同时，本发明还提供了一种六次甲基四胺的检测方法和应用。该试剂盒及其检测方法可以定性及半定量检测样品中是否含有待测物以及待测物含量的大致范围。本发明提供的试剂盒中检测卡结构简单，成本低，检测所需时间短，能够同时快速检测大批样品，而且检测结果准确，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食品安全监管工作具有重大意义。

