

分类号

密级

# 江南大学

## 博士学位论文

题目: 三聚氰胺单克隆抗体制备及其  
高灵敏快速检测技术研究

英文并列题目: Studies on Preparation of Melamine  
Monoclonal Antibody and High-sensitive  
and Rapid Detection Methods

研究生: 孙凤霞

专业: 食品营养与安全

研究方向: 食品安全

导师: 胥传来 教授

指导小组成员: 王利兵 研究员

学位授予日期: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席: 夏文水 教授

### 江南大学

地址: 无锡市蠡湖大道 1800 号

二〇一一年十二月

## 独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得江南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

签 名: 孙凤霞 日 期: 2011.12.18

### 关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解江南大学有关保留、使用学位论文的规定：江南大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签 名: 孙凤霞 导师签名: 朱传东  
日 期: 2011.12.19

## 摘 要

三聚氰胺奶粉污染事件使我国乳制品行业遭到重创，国内外纷纷设置了在各种食品中三聚氰胺的允许残留限量。在我国，三聚氰胺已被列入生乳收购及乳制品产品出厂必检项目。为满足庞大的检测业务要求，亟需开发高通量、快速、高灵敏的三聚氰胺筛查手段应用于三聚氰胺的日常监控。鉴于此，本论文开展了以下研究：

本文首先设计合成并鉴定了三种三聚氰胺半抗原：MEL-MCA，MEL-ACA 和 MEL-PABA；采用活性酯法制备并鉴定了三种免疫原 MEL-MCA-BSA，MEL-ACA-BSA 和 MEL-PABA-BSA；采用混合酸酐法制备并鉴定了三种包被原 MEL-MCA-OVA，MEL-ACA-OVA 和 MEL-PABA-OVA；通过动物免疫实验，研究不同半抗原结构对免疫效果的影响。结果表明三种免疫原均具有免疫原性，其中以免疫原 MEL-ACA-BSA 和包被原 MEL-PABA-OVA 的异源免疫分析组合效果最好。

将制备的三种免疫原免疫 BALB/C 小鼠以制备抗三聚氰胺单克隆抗体，共获得 4 株可稳定分泌抗三聚氰胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株，制备腹水并进行免疫特性分析，其抗体亚型为 IgG<sub>1</sub> 型，抗体亲和常数为  $2.67 \times 10^9$  L/mol，该抗体除与灭蝇胺交叉反应率为 132% 外，与其他三聚氰胺结构类似物无交叉反应，为目前报道的免疫特性最好的抗三聚氰胺单克隆抗体。

利用获得的单克隆抗体建立了三聚氰胺间接竞争 ELISA 检测方法并制备了试剂盒。通过对 ELISA 影响各因素的优化，最终确定其 IC<sub>50</sub> 为  $6 \pm 0.55$  ng/ml，奶粉最低检测限为 100 μg/kg，液态奶最低检测限为 20 ng/ml。添加回收实验结果表明，奶粉样品和液态奶样品的添加回收率分别为 93%-101.9% 和 83.6%-96.9%，变异系数均小于 10%；用国家标准方法 GB/T 22388-2008 LC-MS/MS 法进行确证，表明本研究所制备的 ELISA 试剂盒检测结果准确可靠，可用于乳及乳制品中三聚氰胺的检测，且试剂盒在 4°C 可保存 1 年，完全满足三聚氰胺残留检测的实际要求。

利用单克隆抗体制备了特异性识别、净化三聚氰胺的 IAC 柱，并建立了奶粉和液态奶中三聚氰胺的 IAC-LC-MS/MS 检测方法，IAC 柱动态柱容量为 24.14 n mol/ml gel，绝对柱容量为 3.36 n mol/mg 抗体，IAC 柱最佳重复使用次数为 8 次；建立的 IAC-LC-MS/MS 检测方法的检测限为 10 ng/ml，定量限为 20 ng/ml，实际样品添加回收率为 79.4-91.8%，变异系数小于 10%，符合国际规定的残留分析方法要求，可用于实际样品中三聚氰胺残留检测。

采用柠檬酸钠法制备金纳米粒子，利用抗三聚氰胺单克隆抗体制备胶体金标记物，建立了基于胶体金免疫层析技术的乳及乳制品中三聚氰胺残留的高灵敏快速检测方法。通过优化确定胶体金标记抗体的最佳 pH 值为 8.0，胶体金标记最佳抗体用量为 8 μg/ml，包被原最佳包被浓度和最佳二抗包被浓度为 0.5 mg/ml 制备出三聚氰胺胶体金免疫层析试纸条。结果表明试纸条对三聚氰胺标准品的检测限为 12.5 ng/ml，实际奶粉样品的检测限为 37.5 μg/kg，对三聚氰胺结构类似物无交叉反应性，可满足三聚氰胺实际检测需求。

利用冠醚对金纳米粒子进行修饰制备功能化金纳米粒子，建立基于分子识别的三聚氰胺高灵敏快速检测比色法。通过优化确定三聚氰胺的检测线性范围为 10-500ng/ml，检测限为 6ng/ml，奶粉样品添加回收率在 98.4%-105.6%之间，变异系数小于 10%，可实现三聚氰胺简单、快速、高灵敏检测。

关键词：三聚氰胺，单克隆抗体，酶联免疫分析，免疫亲和色谱柱，胶体金免疫层析试纸条，功能化金纳米粒子



## Abstract

The melamine contamination event of milk powder greatly impacted China's dairy industry. And the maximum residue limits of melamine in food have been set up both in domestic and abroad. In China, melamine has been one of the conventional detection items for milk and related products. Therefore, high-throughput, rapid, and highly sensitive screening methods are urgently needed to satisfy the needs for melamine detection. In view of this, this dissertation carried out the following studies:

In this dissertation, three haptens (MEL-MCA, MEL-ACA and MEL-PABA) were designed, synthesized and identified. Three immunogens (MEL-MCA-BSA, MEL-ACA-BSA and MEL-PABA-BSA) and three coating antigens (MEL-MCA-OVA, MEL-ACA-OVA and MEL-PABA-OVA) were conjugated by the active ester method and mixed anhydride method, respectively. The effects of hapten structure for immunity were investigated by animal immunization experiment. Results showed that the synthesis of these three immunogens was successful, and revealed that the MEL-ACA-BSA antibody/MEL-PABA-OVA coating conjugate combination was the best for heterologous ELISA system.

Three immunogens was applied to immunize BALB/c mice to produce anti-melamine monoclonal antibody. And four monoclonal cell lines which could steadily secrete anti-melamine monoclonal antibody were obtained successfully. The subtype of antibody was identified as IgG<sub>1</sub> by the commercial Kit. And the antibody affinity constant was calculated to be  $2.67 \times 10^9$  L/mol. The most important property of the prepared antibody was that there was no cross-reaction to other MEL analogues except with cyromazine. The antibody achieved in this study was the best high-quality antibody among the currently reported monoclonal antibody against MEL.

Based on the obtained monoclonal antibody, an indirect competitive ELISA detection method of MEL was established and a relative ELISA Kit was assembled. Factors that may affect the performances of ELISA were optimized systematically. The IC<sub>50</sub> value was  $6 \pm 0.55$  ng/ml and the limit of detection (LOD) was 100 μg/kg in powder and 20 ng/ml in liquid milk, respectively. Recovery results showed that the recoveries ranged from 93 to 101.9% in milk powder samples and from 83.6 to 96.9% for liquid milk, respectively and variation coefficients were less than 10%. Real samples were determined through the developed ELISA Kit of our laboratory. Detection results were also further compared with results of by LC-MS/MS method according to national standard GB/T22388-2008, which showed highly consistency of the two methods. The stability results of the ELISA Kit indicated that the Kit stored at 4°C for one year can still be useful, which satisfy the requirement of the determination of MEL residues.

Based on the obtained anti-melamine monoclonal antibody, we prepared the immunoaffinity chromatography column to specifically purify MEL and developed the IAC-LC-MS/MS method of measure MEL in powder and liquid milk. The results showed that the dynamic column capacities of IAC was 24.14 n mol/ml gel, and the specific column capacity of IAC was 3.36 n mol/mg antibody, respectively. The best regeneration cycle of

IAC was 8 cycles. The limit of detection of IAC-LC-MS/MS method was 10ng/ml, and the limit of quantification was 20ng/ml, respectively. The recoveries of melamine from spiked milk and milk products samples ranged from 79.4 to 91.8%, and the variation coefficients were less than 10%, and which satisfied the requirement of the determination of MEL residues.

In this dissertation, colloidal gold was also prepared via sodium citrate reduction method. Based on the anti-melamine antibody, we developed a high-sensitivity and fast detection method for the MEL by the colloidal gold immunochromatographic assay. Several factors that affected assay performance were optimized. Finally, the optimal pH of gold-labeled antibodies was 8.0, the optimal antibody amount was 8 $\mu$ g/ml, and the optimal concentrations of coating and second antibody were 0.5mg/ml. The test strip for MEL had a visual detection limit of 12.5ng/ml in stand solution and 37.5 $\mu$ g/kg in powder, and had no cross-reactivity to MEL analogues, which could meet the demand of practical MEL testing.

Beside, we further developed a sensitive and rapid visually and spectroscopic method for MEL detection by the molecular recognition between crown ether functionalized gold nanoparticles (GNPs) and amino group in MEL. Under the optimal conditions, MEL could be selectively detected in a concentration range from 10ng/ml to 500ng/ml with a limit of detection as 6ng/ml. Recovery results showed that the recoveries ranged from 98.4 to 105.6% in milk powder samples, and variation coefficients were less than 10%, which could be applicable for simple, rapid and sensitivity MEL detection.

**Keywords:** melamine (MEL), monoclonal antibody, ELISA, immunoaffinity chromatography column, colloidal gold immunochromatographic strip, functional gold nanoparticles

## 缩略语表

| 英文缩写             | 英文全称   | 中文全称                 |
|------------------|--|----------------------|
| MEL              | Melamine   | 三聚氰胺                 |
| BSA              | Bovine serum albumin                             | 牛血清白蛋白               |
| OVA              | Ovalbumin  | 卵清白蛋白                |
| DMF              | Dimethylformamide                                | 二甲基甲酰胺               |
| CDT              | 2-chloro-4,6-diamine-1,3,5-Triazine              | 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪 |
| NHS              | N-hydroxysuccinimide                             | N-羟基琥珀酰亚胺            |
| DCC              | Dicyclohexylcarboimide                           | N,N-二环己基碳二亚胺         |
| EDC              | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide   | 碳二亚胺                 |
| MCA              | 3-Mercaptopropionic acid                         | 3-巯基丙酸               |
| ACA              | Aminocaproic Acid                                | 6-氨基己酸               |
| PABA             | p-aminobenzoic acid                              | 对氨基苯甲酸               |
| HPLC             | High-performance liquid chromatography           | 高效液相色谱法              |
| IAC              | Immunoaffinity chromatography column             | 免疫层析色谱柱              |
| ELISA            | Enzyme-linked immunosorbent assay                | 酶联免疫吸附测定法            |
| GC-MS            | Gas chromatography with mass spectrometry        | 气相色谱-质谱联用法           |
| GICA             | Colloidal gold-based immunochromatographic assay | 胶体金免疫层析分析            |
| IC <sub>50</sub> | Half of maximal inhibition                       | 50%抑制率的待测物的浓度        |
| IgG              | Immunoglobulin G                                 | 免疫球蛋白 G              |
| LOD              | Limitation of detection                          | 检测限                  |
| LOQ              | Limit of quantification                          | 定量限                  |
| Mab              | Monoclonal antibody                              | 单克隆抗体                |
| MRLs             | Maximum residue limits                           | 最高残留限量               |
| OD               | Optical density                                  | 光密度                  |
| SPE              | Solid phase extraction                           | 固相萃取                 |
| TMB              | 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine                   | 四甲基联苯胺               |
| UV               | Ultraviolet detection                            | 紫外检测                 |

# 目 录

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| 摘 要.....                  | I   |
| Abstract.....             | III |
| 缩略语表.....                 | V   |
| 第一章 绪论.....               | 1   |
| 1.1 本课题的立题背景 .....        | 1   |
| 1.2 三聚氰胺概述 .....          | 2   |
| 1.2.1 理化性质.....           | 2   |
| 1.2.2 正常用途.....           | 2   |
| 1.2.3 违法添加.....           | 3   |
| 1.3 毒理学研究 .....           | 4   |
| 1.3.1 三聚氰胺的毒性研究.....      | 4   |
| 1.3.2 三聚氰胺的代谢.....        | 4   |
| 1.3.3 三聚氰胺中毒机制.....       | 5   |
| 1.4 三聚氰胺样品前处理技术 .....     | 6   |
| 1.4.1 溶剂萃取技术.....         | 6   |
| 1.4.2 固相萃取技术.....         | 6   |
| 1.4.3 分子印迹技术.....         | 7   |
| 1.4.4 免疫亲和层析柱法.....       | 7   |
| 1.5 三聚氰胺检测方法 .....        | 7   |
| 1.5.1 仪器分析法.....          | 8   |
| 1.5.2 免疫化学分析法.....        | 11  |
| 1.5.3 其他检测方法.....         | 13  |
| 1.6 本课题立题意义和研究的主要内容 ..... | 15  |
| 1.6.1 立题意义.....           | 15  |
| 1.6.2 研究的主要内容.....        | 15  |
| 参考文献.....                 | 15  |
| 第二章 三聚氰胺抗原设计、合成及鉴定.....   | 21  |
| 2.1 引言 .....              | 21  |
| 2.2 材料与方法 .....           | 21  |
| 2.2.1 药品与试剂.....          | 21  |
| 2.2.2 主要仪器及设备.....        | 21  |
| 2.2.3 主要溶液.....           | 22  |
| 2.2.4 实验动物.....           | 22  |
| 2.2.5 试验方法.....           | 22  |
| 2.3 结果与分析 .....           | 27  |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| 2.3.1 半抗原合成与结构鉴定.....               | 27        |
| 2.3.2 人工抗原的合成与鉴定.....               | 29        |
| 2.3.3 多克隆抗体的鉴定.....                 | 32        |
| 2.4 讨论.....                         | 34        |
| 2.4.1 半抗原结构设计.....                  | 34        |
| 2.4.2 偶联比.....                      | 34        |
| 2.4.3 抗体的制备与鉴定.....                 | 35        |
| 2.5 本章小结.....                       | 35        |
| 参考文献.....                           | 35        |
| <b>第三章 三聚氰胺单克隆抗体的制备与鉴定.....</b>     | <b>37</b> |
| 3.1 引言.....                         | 37        |
| 3.2 材料与方法.....                      | 37        |
| 3.2.1 药品与试剂.....                    | 37        |
| 3.2.2 主要仪器与设备.....                  | 37        |
| 3.2.3 主要溶液.....                     | 38        |
| 3.2.4 实验动物和细胞.....                  | 38        |
| 3.2.5 实验方法.....                     | 38        |
| 3.3 结果与讨论.....                      | 42        |
| 3.3.1 免疫小鼠血清筛选.....                 | 42        |
| 3.3.2 杂交瘤细胞株的建立.....                | 44        |
| 3.3.3 单克隆抗体的生产与纯化.....              | 44        |
| 3.3.4 三聚氰胺单克隆抗体特性鉴定.....            | 45        |
| 3.4 本章小结.....                       | 48        |
| 参考文献.....                           | 48        |
| <b>第四章 三聚氰胺竞争 ELISA 试剂盒的研制.....</b> | <b>51</b> |
| 4.1 前言.....                         | 51        |
| 4.2 材料和仪器.....                      | 51        |
| 4.2.1 药品与试剂.....                    | 51        |
| 4.2.2 主要仪器及设备.....                  | 51        |
| 4.3 实验方法.....                       | 52        |
| 4.3.1 间接竞争 ELISA 方法的优化.....         | 52        |
| 4.3.2 样品添加回收测定.....                 | 53        |
| 4.3.3 实际样品测定.....                   | 53        |
| 4.3.4 ELISA 试剂盒的组装.....             | 53        |
| 4.3.5 ELISA 试剂盒的评估.....             | 54        |
| 4.4 结果与讨论.....                      | 54        |
| 4.4.1 间接竞争 ELISA 优化.....            | 54        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.4.2 添加回收率测定 .....                                    | 57        |
| 4.4.3 实际样品检测 .....                                     | 58        |
| 4.4.4 试剂盒评估 .....                                      | 60        |
| 4.5 本章小结 .....   | 62        |
| 参考文献 .....   | 62        |
| <b>第五章 三聚氰胺净化免疫亲和色谱柱制备及 IAC-LC-MS/MS 检测方法的建立 .....</b> | <b>65</b> |
| 5.1 前言 .....   | 65        |
| 5.2 材料与方法 .....  | 65        |
| 5.2.1 主要试剂与材料 .....                                    | 65        |
| 5.2.2 主要仪器设备 .....                                     | 65        |
| 5.2.3 主要溶液 .....                                       | 65        |
| 5.2.4 实验方法 .....                                       | 66        |
| 5.3 结果与讨论 .....  | 69        |
| 5.3.1 IAC 柱的制备 .....                                   | 69        |
| 5.3.2 偶联率的测定 .....                                     | 69        |
| 5.3.3 柱容量的测定 .....                                     | 70        |
| 5.3.4 再生次数的测定 .....                                    | 70        |
| 5.3.5 标准曲线的建立 .....                                    | 70        |
| 5.3.6 检测限与定量限 .....                                    | 71        |
| 5.3.7 IAC-LC-MS/MS 法添加回收率测定 .....                      | 71        |
| 5.4 本章小结 .....   | 73        |
| 参考文献 .....   | 73        |
| <b>第六章 基于金纳米粒子三聚氰胺高灵敏、快速检测方法研究 .....</b>               | <b>75</b> |
| 6.1 前言 .....   | 75        |
| 6.2 材料与设备 .....  | 75        |
| 6.2.1 主要试剂与材料 .....                                    | 75        |
| 6.2.2 主要仪器设备 .....                                     | 75        |
| 6.2.3 主要溶液及配制 .....                                    | 76        |
| 6.3 胶体金免疫层析试纸条 .....                                   | 76        |
| 6.3.1 胶体金的制备 .....                                     | 76        |
| 6.3.2 胶体金标记抗体 .....                                    | 77        |
| 6.3.3 包被抗原的筛选 .....                                    | 78        |
| 6.3.4 各种溶液的筛选 .....                                    | 78        |
| 6.3.5 金标抗体浓度的确定 .....                                  | 78        |
| 6.3.6 包被原和二抗包被浓度的确定 .....                              | 79        |
| 6.3.7 试纸条的组装与测试方法 .....                                | 79        |
| 6.3.8 试纸条性能测定 .....                                    | 80        |



|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| 6.3.9 结果和讨论.....                  | 80         |
| 6.4 基于功能化金纳米粒子分子识别的三聚氰胺比色检测法..... | 87         |
| 6.4.1 18-冠醚-6 的巯基衍生化.....         | 87         |
| 6.4.2 胶体金溶液 pH 优化.....            | 87         |
| 6.4.3 功能化金纳米粒子制备.....             | 87         |
| 6.4.4 检测原理.....                   | 87         |
| 6.4.5 三聚氰胺标准溶液检测限的测定.....         | 88         |
| 6.4.6 特异性测定.....                  | 89         |
| 6.4.7 添加回收实验.....                 | 89         |
| 6.4.8 结果与讨论.....                  | 89         |
| 6.5 本章小结.....                     | 95         |
| 参考文献.....                         | 95         |
| <b>全文结论.....</b>                  | <b>99</b>  |
| <b>创 新 点.....</b>                 | <b>101</b> |
| <b>致 谢.....</b>                   | <b>102</b> |
| <b>附录： 攻读博士学位期间发表的论文与专利.....</b>  | <b>103</b> |

# 第一章 绪论

## 1.1 本课题的立题背景

“民以食为天”，自古以来就是人类意识中根深蒂固的观念，也是人类社会赖以生存发展的第一要素。在生产劳动力低下的封建社会，“食”是影响社会稳定的重要因素，主要指食物的数量，对其以求果腹而已。随着社会经济的不断发展，新的食物品种层出不穷，尤其是人类迈入 21 世纪以来，科学技术的发展日新月异，各种农药、兽药的广泛应用在造福大农业的同时也给食品行业带来很多隐患，各类食品添加剂的滥用，重金属污染，制伪、掺假食品的屡禁不绝以及各种有毒有害化学物质的违法添加等使得我国的食品安全问题越来越突出，日益成为政府、民众和舆论的焦点。例如，2004 年安徽阜阳的“大头娃娃”事件，致使 13 名婴儿死亡，数百名婴儿患上严重营养不良症；2006 年河北省发现含有致癌物质苏丹红的“红心咸鸭蛋”；2008 年 9 月爆发的含有三聚氰胺的“毒奶粉”事件举国震惊，引发巨大舆论关注和民众问责，致使整个乳制品行业面临危机；2011 年震惊全国的双汇“瘦肉精”事件，此恶性事件自 2001 年以来在全国各地多有发生，可谓屡禁不止，台湾“塑化剂”事件导致很多知名食品企业陷入质量安全信任危机<sup>[1,2]</sup>。这些重大食品安全事件教给大众很多化学知识的同时再次引起全社会舆论的高度关注和民众对食品安全的担忧，我国食品安全工作已面临严峻考验。

三聚氰胺事件发生后，世界上先后有 97 个国家和地区禁止进口或回收中国制造、含有三聚氰胺的食品，使得我国相关食品的出口几乎陷入停顿<sup>[3]</sup>。这一事件不仅对我国经济造成巨大损害，同时还引发国外消费者对我国乳制品质量的信任危机，进而对整个食品出口造成巨大的负面影响，而这种影响是更为长远的。

回望国内，政府积极应对食品安全危机，制定了《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》（GBT 22388-2008），《原料乳中三聚氰胺快速检测 液相色谱法》（GBT 22400-2008）和《植物源产品中三聚氰胺、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺和三聚氰酸的测定 气相色谱-质谱法》（GBT 22288-2008）等国家标准。自 2008 年 12 月份开始，卫生部会同农业部、公安部等 9 部委联合开展了“全国严厉打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治工作”，持续深入整治食品非法添加行为，并公布 151 种食品和饲料中非法添加物名单，包括 22 种“易滥用食品添加剂”、47 种在食品中可能“违法添加的非食用物质”和 82 种“禁止在饲料、动物饮用水和畜禽水产养殖过程中使用的药物和物质”。同时，专门成立国务院食品安全委员会，公布实施新的《食品安全法》、《乳品质量安全监督管理条例》和《食品添加剂使用标准》等法律法规，反映出政府打击食品安全问题的决心。但是事实证明，目前的食品安全问题是难以控制的。2009 年陕西金桥乳业和上海熊猫乳品有限公司生产的乳制品被查出三聚氰胺超标；2010 年陕西乐康乳业公司和宁夏天天乳业生产的奶粉均检出三聚氰胺含量超标。至此，食品安全的公民基本信任被三聚氰胺彻底击溃。

## 1.2 三聚氰胺概述

### 1.2.1 理化性质

三聚氰胺（2, 4, 6-三氨基-1, 3, 5-三嗪, Melamine, 简称为 MEL），简称三胺，学名三胺三嗪，别名蜜胺，是一种三嗪类含氮杂环有机化合物，分子式为  $C_3H_6N_6$ ，由化学家 Liebig 于 1834 年通过加热钾硫氰酸和氯化铵而首次合成出<sup>[4]</sup>。随后，化学家们又开发出很多不同的方法进行合成，包括加热碳酸胍法、硫尿素法、氨脲法、双氰胺法等<sup>[5]</sup>。其中主要采用尿素法，即在氨存在下加热尿素来获得，此种方法与其他方法相比成本较低被广泛采用。通常，在三聚氰胺合成的过程中，会产生很多的副产物，如三聚氰酸二酰胺（ammeline）、三聚氰酸一酰胺（ammelide）和三聚氰酸(cyanuric acid)。同时，三聚氰胺在强酸性或强碱性条件下也可以水解成这些物质，其结构式如图 1-1 所示。

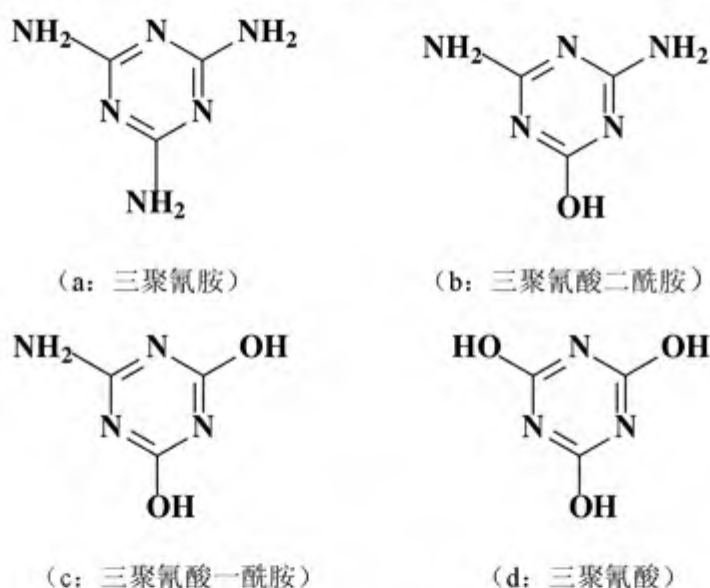


图 1-1 三聚氰胺及其水解产物的结构式

Fig.1-1 The chemical structures of melamine and hydrolysis products

三聚氰胺是一种低毒、无味的白色单斜棱晶体，分子量为 126.12，在常压下，354°C 分解，不溶于乙醚、四氯化碳、苯；微溶于冷水；能溶于热水、甲醇、甲醛、乙酸、吡啶、甘油等。同时，三聚氰胺的溶解度随着溶液 pH 和温度的变化而变化。在一定的溶液 pH 值条件下，其溶解度随着温度的升高而增大，如三聚氰胺在水温为 20°C 时，溶解度小于 1%；当水温在 90-100°C 时，溶解度增加至 5%左右<sup>[6]</sup>。三聚氰胺在中性条件溶解度最高，其次是碱性，弱酸性时溶解度最低；而在强碱性或强酸性条件下，其溶解度又随着碱性和酸性的增加而逐渐增大<sup>[7]</sup>。

### 1.2.2 正常用途

作为一种工业用有机化合物，三聚氰胺在中性或弱碱性条件下，与甲醛可发生缩合反应，生成产物羟甲基三聚氰胺；然后在微酸性 (pH5.5-6.5) 条件下，与羟甲基三聚氰胺进一步发生缩聚反应生成三聚氰胺-甲醛聚合树脂，具有硬度大，耐热，耐水，耐老化，耐腐蚀，不易燃等优点，可用来生产粘合剂，涂料，厨房用具，阻燃剂，装饰面板

等，广泛应用于诸多行业<sup>[8]</sup>。需要注意的是，三聚氰胺树脂虽是一种热固性塑料，但在足够热的条件下（约 120°C）也会发生融化，释放有毒物质。因此，出于安全考虑，由三聚氰胺甲醛树脂为原料制作的餐具不能放入烤箱或微波炉中使用，且制造商在物品上会标有“不可放进微波炉使用”等字样。

### 1.2.3 违法添加

国外在 1958 年开始将三聚氰胺作为非蛋白氮原料添加到牛饲料中，后来因为其在反刍动物体内不能被完全水解，这一做法在 1978 年已经被禁止<sup>[9]</sup>。然而近年来，三聚氰胺频频被不法商贩用作食品添加剂添加到食品或饲料中。蛋白质主要由氨基酸组成，其含氮量约为 16%，而三聚氰胺分子含氮量高达 66%，将其添加到食品或饲料中可显著提高表观蛋白量。这是因为蛋白质的测定方法通常采用“凯氏定氮法”，由丹麦化学家凯耶达尔在 1883 年提出<sup>[10]</sup>，该方法的基本原理是：样品中的蛋白质和其他有机成分在催化剂存在下，被硫酸消化，产生的氨与硫酸结合生成硫酸铵，然后中和消化液，将游离出的氨蒸馏到硼酸溶液中形成硼酸铵，再用盐酸或硫酸标准溶液滴定，最后将酸的消耗量乘以换算系数，即为样品的蛋白质含量。此方法精确度较高，费用较低，操作简单，可用于所有食品中的蛋白质分析，是一种测定蛋白质含量的经典方法。但是，从其原理不难看出，凯氏定氮法实际上测定的是样品中的氮原子含量，然后间接推导出样品中的蛋白质含量，但该方法却不能确定氮原子的来源，就是说无论样品中的氮来源如何，统统被计算成蛋白质。因此，很多不法商贩抓住这一测定方法的漏洞，将三聚氰胺这一富含氮的化工原料作为食品添加剂添加到各种食品或饲料中，用以增高其表观蛋白质含量，以达到国家规定的蛋白质含量标准，降低成本，牟取暴利。更为重要的是，三聚氰胺本身是一种无味的白色结晶状粉末，且具有一定的黏性，少量掺杂时不易被发现，还可改变产品的口感特性，所以三聚氰胺成为掺假、造假者提高蛋白质检测含量的“首选”目标，更被称为“蛋白精”而广为使用。

2004 年，在亚洲地区暴发猫、狗等宠物食用添加三聚氰胺的饲料而导致肾衰竭事件<sup>[11]</sup>。2007 年，美国也出现同样的宠物毒粮事件，并导致上百只宠物死亡<sup>[12]</sup>。随即，美国食品药品监督管理局（FDA, Food and Drug Administration）对此展开调查，结果在含有从中国进口的蛋白粉的宠物食品中检测出三聚氰胺。同时，中国国家质检总局的调查也表明：饲料中掺杂的三聚氰胺就是致使猫、狗中毒死亡的元凶。

真正令国人认识三聚氰胺的是 2008 年 9 月爆发的“三鹿毒奶粉”事件。从 2008 年 6 月 28 日兰州市解放军第一医院收治的首例患“肾结石”婴幼儿到 9 月 11 日《东方早报》发表《甘肃 14 名婴儿疑喝“三鹿”奶粉致肾病》的报导，立即引发全社会的广泛关注。后经证实三鹿牌婴幼儿奶粉被非法添加三聚氰胺，随即国家质检总局在全国紧急开展了婴幼儿奶粉三聚氰胺含量专项检查，结果发现全国多个著名品牌的婴幼儿奶粉均含有三聚氰胺，整个奶制品行业面临危机。根据有关部门报告，截止 2009 年 1 月，全国共有超过 54000 名婴幼儿因食用三聚氰胺污染奶粉而住院接受治疗，并导致至少 6 名婴幼儿死亡<sup>[13]</sup>。事件发生后，政府积极应对，2009 年 1 月不法商贩被依法处决，问题奶粉要求全部销毁。然而，2009 年 12 月上海熊猫乳品有限公司乳制品被查出三聚氰胺



超标；2010年宁夏天天乳业和陕西乐康乳业公司生产的奶粉均检出三聚氰胺含量超标。调查发现这些奶粉是以2008年未销毁的问题奶粉为原料所生产，并已涉及冰棒、牛奶、糕点、糖果、饮料等各种食品。至此，三聚氰胺卷土重来，食品安全的公民基本信任被三聚氰胺彻底击溃。

### 1.3 毒理学研究

#### 1.3.1 三聚氰胺的毒性研究

三聚氰胺是一种无毒或低毒的化工原料，不允许作为食品添加剂使用，但可以作为食品包装原料使用<sup>[14]</sup>。既然三聚氰胺是无毒或低毒的，那是什么原因导致婴幼儿肾结石呢？

2007年12月，美国食品药品监督管理局关于三聚氰胺对动物的毒性评估报告中显示，大鼠的口服半数致死量（LD<sub>50</sub>, Lethal dose 50）为3161毫克/公斤体重/天，小鼠的口服LD<sub>50</sub>为3296毫克/公斤体重/天，无不良反应剂量（NOAEL, No observed adverse effect level）为63毫克/公斤体重/天，人体无不良反应剂量可换算为0.63毫克/公斤体重/天<sup>[15]</sup>。

动物实验表明，口服三聚氰胺和三聚氰酸混合物的主要临床症状表现为体重降低、膀胱结石、肾结石、结晶尿症和泌尿系统膀胱上皮增生；长期或反复摄入可导致生殖和泌尿系统损害，导致膀胱及肾结石，并可诱发膀胱癌<sup>[16]</sup>。

Rice等1999年研究了经口服三聚氰胺对不同性别的老鼠和耗子的致癌性。实验结果发现，三聚氰胺可导致雄老鼠膀胱上皮增生，雄耗子则会产生膀胱癌及上皮癌，同时也发现膀胱结石的耗子会进一步导致膀胱肿瘤<sup>[17]</sup>。这与1984年Melnick等所观察到的对于啮齿类动物，三聚氰胺的毒性症状主要表现为泌尿系统结石，并且雄性小鼠发病率高于雌性小鼠的实验结果相吻合<sup>[18]</sup>。Erol Yildrin等的研究也指出三聚氰胺有潜在致癌作用<sup>[19]</sup>。

研究表明，三聚氰胺对不同动物的毒性不同，对猫的毒性作用较强。如2007年美国的宠物毒粮事件中，猫和狗的中毒报告数量之比为5:2；Cianciolo等的研究指出猫食用三聚氰胺后，会产生尿道管状坏疽和结晶尿等症状<sup>[20]</sup>。Puschner等报道了三聚氰胺，三聚氰酸，以及二者混合物对猫的毒性研究，结果发现：当三聚氰胺和三聚氰酸单独饲喂给猫时，未观察到肾功能障碍。但是在饲喂含1%三聚氰胺和三聚氰酸的混合饲料48h后，猫出现急性肾衰竭症状。结果表明单独口服三聚氰胺或三聚氰酸对动物的毒性作用较低，但是将二者的混合物饲喂给动物时，会使其发生急性肾衰竭甚至死亡<sup>[21]</sup>。

#### 1.3.2 三聚氰胺的代谢

毒理学研究表明，三聚氰胺对不同动物的毒性作用不同，显示出种属选择性，这种选择性可能是因为不同动物种属间毒物代谢的动力学差异造成的。三聚氰胺在动物体内存留的时间很短，美国FDA的报告指出三聚氰胺在动物摄食10-15天内不经代谢直接以原型形式从尿液排出，半衰期约为3-4h，属于在体内不变化、短停留物质。FDA的报告还认为动物食用添加三聚氰胺的饲料后，人类短期内食用这种动物来源食品，对人

体健康威胁很小<sup>[22]</sup>。

### 1.3.3 三聚氰胺中毒机制

Ronald 和 Jennifer 等分别做了三聚氰胺在猪体内的药代动力学研究，结果发现了同一现象：三聚氰胺并未在肝脏进行生物转化，而是蓄积在肾脏中并形成结晶<sup>[23,24]</sup>。2007年的宠物毒粮事件中，受害宠物均发现在肾远曲小管或集合管出现特异性的结晶。2008年“三鹿奶粉事件”中受害婴幼儿主要临床症状也表现为肾结石。由此可以看出，三聚氰胺作用的靶器官主要为泌尿系统和肾脏。

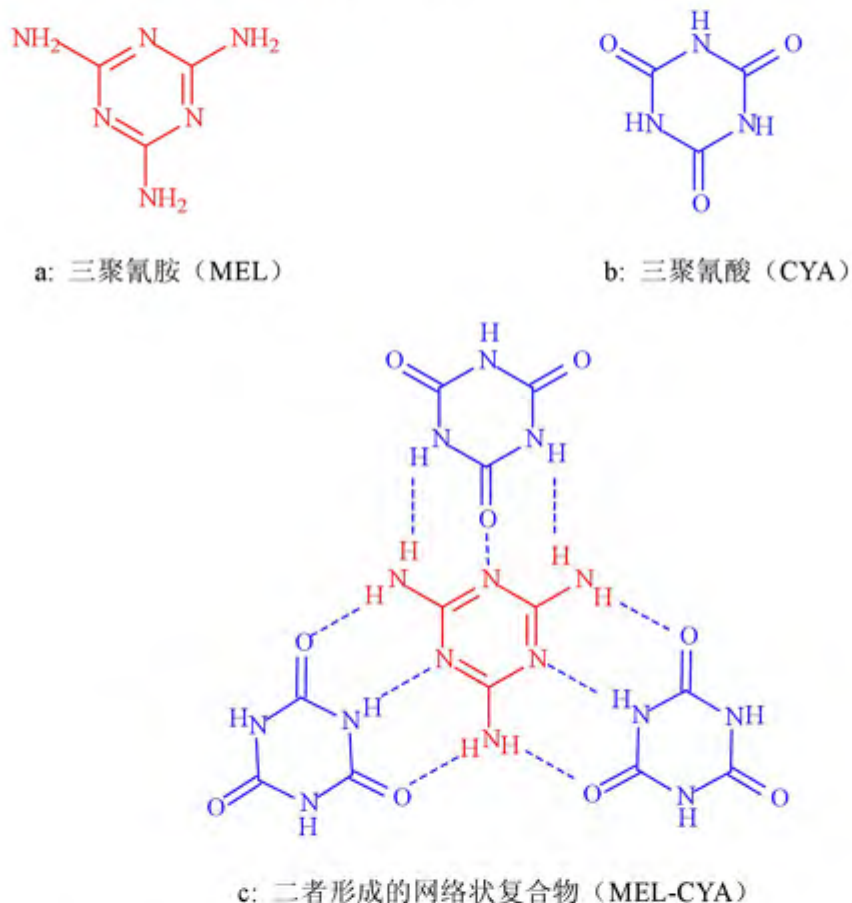


图 1-2 三聚氰胺，三聚氰酸及其复合物的结构

Fig.1-2 Chemical structures of melamine, cyanuric acid and MEL-CYA.

研究认为，三聚氰胺产生肾结石，可能是由于三聚氰胺和其水解产物三聚氰酸在体内形成一种不溶于水的大分子网络结构复合物，如图 1-2 所示。三聚氰胺摄入体内后，在胃酸的强烈作用下，逐步水解产生三聚氰酸，这两种物质不能被机体转化，随血液循环到达肾脏，通过分子间氢键作用形成复合物，然后复合物之间通过分子间自我交联最终形成大的网络状结构复合物，这种复合物的溶解度（2.2mg/L）远远低于三聚氰胺（3240mg/L）和三聚氰酸（2000mg/L）的溶解度。因此，这种复合物在肾脏中蓄积并形成结晶，阻塞肾小管，致使尿液排出困难，肾脏积水，最终导致肾衰竭甚至死亡。所以，当食品或饲料中含有三聚氰胺时，也相当于含有了三聚氰酸，二者共同作用导致肾结石的发生<sup>[25, 26]</sup>。



## 1.4 三聚氰胺样品前处理技术

牛奶、宠物饲料、奶酪、奶粉等样品富含蛋白质和脂肪会严重干扰三聚氰胺的检测，所以在仪器分析之前采用合适的、有效的样品纯化程序是必需的。样品前处理技术（包括提取，净化，富集，衍生等）的主要目的是通过除去样品中可能影响检测的杂质组分来提高检测方法的灵敏度。然而，因为基质的复杂性，大多数的样品前处理程序都需要在提取后进行一步或多步的净化过程，而这需要花费数十分钟至数小时。但有效的样品前处理及纯化在各种分析领域中都是至关重要的。

### 1.4.1 溶剂萃取技术

溶剂萃取（Solvent extraction, SE）是 20 世纪发展起来的分离技术，其原理是利用溶质在两种互不相溶或者部分互溶的液相之间分配不同的性质来实现目标物的分离或提纯，包括液液萃取（Liquid-liquid extraction, LLE）和加速溶剂萃取（Accelerated solvent extraction, ASE）等方法，具有选择性高，分离效果好和适应范围广等特点。

三聚氰胺是一种弱碱性的化合物，在强酸或强碱环境下可发生水解。三聚氰胺提取在中性、酸性和碱性条件下均可进行，对于食品基质，中性和酸性（ $\text{pH} \leq 3$ ）条件下提取更为常用。中性条件提取通常使用乙腈-水或者甲醇-水的混合溶液作为提取液<sup>[27,28]</sup>。酸性条件提取可选用不同的溶剂及其混合溶液，包括三氯乙酸，甲酸，醋酸，盐酸和三氟乙酸等，其中最常用的为三氯乙酸<sup>[29-32]</sup>。三聚氰胺污染的样品一般都富含脂肪和蛋白质，所以在提取前必需进行脱脂和沉淀蛋白，可先用正己烷和二氯甲烷溶液脱脂，再用三氯乙酸沉淀蛋白质，最后用乙腈来提取三聚氰胺。

### 1.4.2 固相萃取技术

固相萃取法（Solid phase extraction, SPE）是一种相对较老的基于液相色谱分离机制的样品制备技术。自 1978 年美国 Waters 公司首次将固相萃取柱 Sep-Pak 投放市场以来，固相萃取技术得到了快速发展，其原理是利用固体吸附剂进行萃取，将液体样品通过填充固体吸附剂的萃取柱，目标物和杂质被吸附而保留在柱上，用选择性溶剂去除杂质，然后再用洗脱液洗脱或加热解吸附，从而达到分离和富集目标化合物的目的。

三聚氰胺是一种弱碱性的化合物，在酸性溶液中可电解为正离子，所以，通常用阳离子交换固相萃取柱（如强阳离子交换，混合模式阳离子交换，聚苯乙烯阳离子交换）进行样品纯化以去除中性和酸性干扰物。目前，采用 SPE 柱在各种基质中选择性提取和浓缩三聚氰胺最为广泛，如 SCX-C18 混合填料反相色谱柱<sup>[33]</sup>、Waters Oasis MCX 柱<sup>[28,30,31]</sup>和 Strata-X-C 柱<sup>[31]</sup>等。洗涤液和洗脱液的种类及应用顺序也会影响三聚氰胺的检测。理论上，对于三聚氰胺的纯化，样品应先用酸性的水溶液洗涤，然后再用甲醇洗脱，这是因为酸性条件有利于三聚氰胺和阳离子基团结合。

固相萃取技术具有高效、快速、简便、溶剂耗费少、设备简单等特点，但在处理大量样品时，仍是一项耗时、耗力的工作，在实际应用时，通常将 SPE 与其他分析技术联机自动操作，如 SPE-HPLC、SPE-LC-MS<sup>2</sup>、SPE-UPLC-MS<sup>2</sup> 等<sup>[32-34]</sup>。

### 1.4.3 分子印迹技术

分子印迹技术 (Molecular imprinting technique, MIT) 是上世纪末发展起来的一种新方法, 可为人们提供具有期望空间结构和特定结合性质的具有分子识别功能的分子印迹聚合物新型高分子仿生材料。在制备时, 首先用功能单体将模板分子通过共价或非共价的方式进行聚合, 而后再将模板分子除去, 从而获得能特异性键合模板分子及其类似物的分子组装体, 具有类似于抗体的高选择性、高特异性和高柔韧性等优点, 适合作为固相萃取填料或分子印迹薄膜来分离富集目标化合物, 达到样品分离纯化的目的。

目前, 使用分子印迹聚合物作为固相吸附剂来特异性提取三聚氰胺的研究还比较少。Li 等利用环丙三氨三嗪为模板分子, 采用甲基丙烯酸、二甲基丙烯酸乙二醇酯和乙腈分别作为功能单体、交联剂和致孔剂来制备特异性识别三聚氰胺的分子印迹聚合物。该聚合物对三聚氰胺最大结合浓度为 53.2 n mol/mg, 将其作为固相萃取吸附剂提取样品中的三聚氰胺, 建立了牛奶和饲料中三聚氰胺的 MIT-GC-MS 分析方法, 其检测限为 0.01  $\mu\text{g/g}$ , 定量限 LOQ 为 0.05  $\mu\text{g/g}$ , 样品添加回收率为 93.1-101.3%<sup>[35]</sup>。

### 1.4.4 免疫亲和层析柱法

免疫亲和层析柱 (Immunoaffinity chromatography column, IAC) 的原理是将特异性的抗体固定于固相载体上, 如琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶等, 并装于柱中, 然后通过抗原抗体之间特异性结合来实现样品中目标物的分离净化, 同时可对样品中目标物进行浓缩, 从而提高检测灵敏度, 具有选择性好, 操作简单快捷、耗时少、节省试剂等优点, 是一种重要的前处理手段<sup>[36-39]</sup>。

Zhong 等制备了三聚氰胺免疫层析色谱柱进行受污染食品中三聚氰胺残留的提取和净化, 该柱子对三聚氰胺最高结合能力为 1250 ng, 添加回收率为 82.5-101.4%, 变异系数小于 10.6%, 重复使用次数高达 30 次, 不需要样品前处理即可直接用来提取鸡肉, 鸡蛋及奶制品中的三聚氰胺残留<sup>[40]</sup>。

## 1.5 三聚氰胺检测方法

2007 年美国发生三聚氰胺宠物毒粮事件, 致使很多宠物死亡。随后在我国爆发出奶制品受三聚氰胺污染导致婴幼儿结石事件。因为我国是乳产品和原料的出口大国, 该事件引发广泛的食品安全恐慌。在随后的几个月, 美国和其他国家相继发出三聚氰胺污染食品的报告。这些事件促动美国食品药品监督管理局 FDA、欧盟、中国以及其他国家和地区纷纷设立了在各种食品中三聚氰胺最大残留限量标准, 见表 1-1。总的来说, 多数国家将三聚氰胺的限量标准规定为在婴幼儿、孕产妇奶粉中为 1ppm, 其他奶制品中为 2.5ppm。

目前, 用于三聚氰胺检测的方法主要分为三大类: 一) 仪器分析方法: 包括毛细管电泳, 高效液相色谱法, 液相色谱-质谱法, 液相色谱-串联质谱法和核磁共振光谱法等; 二) 免疫分析法: 如酶联免疫吸附法, 胶体金免疫层析分析法等; 三) 其他检测方法: 如以分子印记聚合物和纳米粒子为基础的传感器检测方法。

表 1-1 各国制定三聚氰胺在各种食品中的最大限量标准

Table.1-1 Limits standard of melamine in different country

| 国家或地区 | 食品基质            | 限量标准 (ppm) |
|-------|-----------------|------------|
| 欧盟    | 含乳食品、高蛋白食品      | 2.5        |
| 美国    | 牛奶、乳制品、含乳食品     | 0.25       |
| 澳大利亚  | 婴幼儿配方奶粉         | 1.0        |
|       | 其他乳制品           | 2.5        |
| 加拿大   | 婴幼儿配方奶粉         | 1.0        |
|       | 其他乳制品           | 2.5        |
| 俄罗斯   | 食品              | 1.0        |
| 新西兰   | 食品原材料           | 5.0        |
|       | 婴幼儿配方奶粉         | 1.0        |
| 中国    | 婴幼儿配方奶粉         | 1.0        |
|       | 奶粉, 液态奶, 其他配方奶粉 | 2.5        |

### 1.5.1 仪器分析法

#### 1.5.1.1 毛细管电泳

毛细管电泳 (Capillary electrophoresis, CE) 是近年发展最快的以高压电场为驱动力, 依据样品中各组分之间电荷、大小和亲水性的差异而实现分离的一类液相分离技术, 具有高灵敏度、高分辨率、高速度等优点, 广泛应用于各个领域。

Cernova 等 2009 年采用紫外检测器, 对奶粉中的三聚氰胺进行快速检测, 其检测限可达到  $0.06 \mu\text{g/mL}$ <sup>[41]</sup>。同时, Yan 等提出用毛细管电泳联合二极管阵列检测器 (CE-DAD) 检测奶制品, 鱼饲料和鱼肉等多种样品中的三聚氰胺残留<sup>[42]</sup>。随后, Chen 等运用毛细管电泳技术也建立了一种可同时检测牛奶中三聚氰胺和 5-羟甲基呋喃甲醛的灵敏、简单和可靠的分析方法。该方法将毛细管电泳与二极管阵列检测器联用, 在检测系统中添加十二烷基磺酸钠作为筛选介质以增加分离效率。结果表明, 根据迁移时间和紫外吸收光谱的不同可实现三聚氰胺和 5-羟甲基呋喃甲醛的同时检测, 其检测限分别为  $0.047 \mu\text{g/mL}$  和  $0.067 \mu\text{g/mL}$ , 与高效液相法相比该方法具有分辨率高、分析时间短、所需样品量少、分离效率高等优点<sup>[43]</sup>。另外, Xia 等在 2010 年将毛细管区带电泳法联合二极管阵列检测器 (CZE-DAD) 建立了一种简单、快速、准确并可同时检测鸡蛋、宠物饲料和乳制品中的三聚氰胺及其类似物的方法<sup>[44]</sup>。但是, 毛细管电泳进样量小, 出峰时间短, 稳定性也有待提高, 所以此法检测痕量三聚氰胺还有一定的局限性, 目前只能用于含量较高的样品分析。

#### 1.5.1.2 高效液相色谱法

高效液相色谱法 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 是目前最常用的检测三聚氰胺的方法。Ehling 等运用高效液相色谱法同时检测大米、小麦和玉米面粉中三聚氰胺及其类似物三聚氰酸二氰胺、氰尿酸胺和三聚氰酸, 对于三聚氰胺, 其检测

限为 5ppm<sup>[45]</sup>。2008 年, Muniz-Valencia 等也报道了用 LC 法检测大米中的三聚氰胺及其类似物<sup>[46]</sup>。

然而, 高效液相色谱法一般不能用来确证三聚氰胺, 这是因为三聚氰胺的紫外吸收光谱区低于 250nm, 当样品制备和色谱条件未达到最优化时容易发生错误定量<sup>[47]</sup>。为了增加结果的灵敏度和可信度, 研究者将 DAD 系统和荧光反应引入到 HPLC 系统中。如 Ding 等采用 HPLC-DAD 方法检测植物源蛋白粉中三聚氰胺残留, 其检测限为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[48]</sup>。另外, Kim 等比较了 HPLC-DAD 法和酶联免疫法分析宠物饲料中三聚氰胺的残留, 两种方法检测限分别为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 20ppb<sup>[49]</sup>。

### 1.5.1.3 液相色谱-质谱联用法

质谱技术因其可显示分子特征, 检测灵敏度高而被广泛应用于各种目标物的检测。液相色谱-质谱联用法 (LC-MS) 和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 是当前定量检测三聚氰胺的最主要方法。Lv 等建立了一种可靠的 LC-MS/MS 法来检测羔羊肝脏、肾脏组织及血清中的三聚氰胺和三聚氰酸残留。结果表明, 在羔羊组织中三聚氰胺和三聚氰酸的检测限分别为 10 ng/g 和 20 ng/g; 在血清中分别为 30 ng/mL 和 40 ng/mL<sup>[50]</sup>。2008 年, Filigenzi 等提出一种高灵敏、高特异性定量检测肾组织中三聚氰胺及其类似物残留的 HPLC-MS/MS 方法, 该方法可用来诊断三聚氰胺导致的肾衰竭<sup>[51]</sup>。

此外, 也有很多研究报道运用 LC-MS/MS 法检测三聚氰胺及其类似物在猪肌肉组织, 鱼和虾等样品中的残留。在这些报道中, 样品提取液多为乙腈或乙腈和水的混合物。但是由于乙腈在全世界范围内供应不足, 所以急需发展一种新的有机溶剂作为可替代的提取液用于检测三聚氰胺。Tran 等做了这方面的尝试, 其结果表明: 甲醇可作为一种有效的提取溶剂用来提取食品中三聚氰胺及其类似物<sup>[52]</sup>。

考虑到三聚氰胺是一种强极性物质, 在传统的反相 LC 柱中难以保留, 有学者提出用亲水作用色谱柱 (Hydrophilic interaction chromatography, HILIC) 联合 MS 技术从基质中制备三聚氰胺。Andersen 等用 HILIC 柱进行 LC-MS/MS 分析鱼和虾组织中三聚氰胺的残留, 此方法可定性和定量分析三聚氰胺, 其检测限为 3.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[53]</sup>。

上面所报道的方法在一个单循环中只能检测三聚氰胺, 而不能同时检测三聚氰胺和三聚氰酸。而 Heller 等所建立的 HILIC/LC-MS<sup>2</sup> 方法可同时检测动物饲料中的三聚氰胺和三聚氰酸。将两性离子对添加到 HILIC 柱中, 在 pH 梯度变化时可很好的将三聚氰胺和三聚氰酸分离, 从而实现在单循环中两者的同时检测, 其最低检测浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{g}$ <sup>[54]</sup>。随后, Desmarchelier 等也报道了一种同时定量检测三聚氰胺和三聚氰酸的 LC-MS/MS 法, 实验中未使用 SPE 柱纯化样品, 可避免样品制备过程中分析物的污染以确保结果的可信度, 其检测限分别为 0.025 mg/kg 和 0.05 mg/kg<sup>[55]</sup>。

### 1.5.1.4 气相色谱-质谱联用法

气相色谱-质谱联用法 (Gas chromatography with mass spectrometry, GC-MS) 也常用来定量检测和确证三聚氰胺及其类似物。1987 年, Toth 等首先报道用气相色谱-质谱联用法来检测环丙氨嗪及其代谢物三聚氰胺<sup>[56]</sup>。2000 年, Yokley 等用 HPLC 和 GC-MS



法检测土壤样品中环丙氨嗪和三聚氰胺残留，实验首先用乙腈：碳酸铵混合液（70:30，v/v）提取，然后在仪器进样前用 SCX 树脂纯化样品<sup>[57]</sup>。随后，Zhu 等提出用 GC-MS 法同时定量和确证动物源食品中环丙氨嗪和三聚氰胺残留。此法重点研究进样前优化净化程序以降低基质干扰。样品制备时首先用酸性的乙腈或水溶液提取，然后鸡肉或鱼肉组织用二氯甲烷脱脂，鸡蛋或牛奶样本用 3%三氯乙酸萃取，而后提取物经 MCX 柱纯化，进样前用 N,O-双（三甲基硅烷基）三氟乙酰胺进行衍生。与 Toth 所建立的方法相比，该法检测水平更低，肌肉组织中检测限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，牛奶和鸡蛋中检测限为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[58]</sup>。

此外，还有很多文献报道 GC-MS 法检测牛奶等样品中三聚氰胺及其类似物的残留。但是，由于 GC-MS 法繁杂的样品前处理和净化过程使其检测效率低下，在大量检测样品时受到限制。因此，需要发展一种简单有效、快速可靠的方法来检测食品中的三聚氰胺及其类似物。

#### 1.5.1.5 其他质谱技术

20 世纪 80 年代以来，随着软电离技术的产生，如电喷雾（Electron Spray Ionization, ESI），基质辅助激光解吸电离（Matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI），低温等离子电离（low-temperature plasma, LTP）等，质谱技术也得到相应发展。Tang 等采用 MALDI-MS 技术建立了一种快速，灵敏可直接分析三聚氰胺的新方法，其原理是将基质分子和尿液中的三聚氰胺氰尿酸盐简单混合，而后采用  $\text{N}_2$  激光（337 nm）照射以使三聚氰胺分子发生解吸或电离，从而进入检测器执行分析。该方法只需要简单的水洗过程即可降低尿液底物的干扰并提高三聚氰胺的离子强度，从而实现尿液中低至 12.5  $\mu\text{g}$  三聚氰胺的检测，并成功用于快速检测实际样品。优点在于可用于高通量分析，样品制备简单，所需时间只需要 7min，且检测十分灵敏<sup>[59]</sup>。此外，Huang 等利用低温等离子体电离样品，在 30s 内即可对奶粉等样品中 ppb 级的三聚氰胺完成测定。该方法分析奶粉的检测限为 6 ppb，不需要样品前处理，可实现快速高通量检测，适应于大量样品的检测<sup>[60]</sup>。也有研究者采用解吸电喷雾离子化-质谱法（DESI-MS）和萃取电喷雾离子化-质谱法（EESI-MS）技术实现对三聚氰胺在各种复杂基质中的快速和原位检测。这些新型质谱技术的最主要优点在于可实现高通量检测，而这在需要筛查大量样本时显得格外重要。

#### 1.5.1.6 光谱法

目前报道的用于检测三聚氰胺的光谱学方法主要包括核磁共振光谱法（Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR），红外光谱法（Infrared spectrometry, IR）和拉曼光谱法（Raman spectrometry, RS）等。核磁共振光谱法可用于筛选食品中未知污染物，主要优点在于无需或只需简单的样品前处理，可避免前处理过程造成的目标物破坏，以保留其更多的结构信息。Lachenmeier 等使用 400-MHz 和 700-MHz 下高分辨核磁共振模式，实现对奶粉中三聚氰胺污染的检测，同时通过图谱叠加，可作为定量分析手段，并与 LC-MS/MS 法进行了比较研究，结果表明 LC-MS/MS 灵敏度优于 NMR，但 NMR

精确度更高且所需前处理时间最短<sup>[61]</sup>。

拉曼光谱是利用光散射来测定物质的特征分子振动，在某些区域形成特征吸收从而产生该物质的指纹谱带，优点在于样品前处理中不需要离心、过滤和净化等程序，分析时间短。但是商业化的底物价格昂贵，且重复使用时背景噪音较高，所以，很多研究者重去开发更适用，更经济的底物。最近研究表明在表面增强拉曼光谱试验中采用新型纳米底物可增强拉曼信号。如 Lin 等以金纳米颗粒为底物采用表面增强拉曼光谱分析三聚氰胺及其类似物的振动特征光谱。结果表明，以金纳米颗粒为底物时三聚氰胺的拉曼信号可放大约 30000 倍。采用最小二乘分析  $676\text{cm}^{-1}$  处的特征峰的拉曼强度和三聚氰胺浓度的对数值之间的相关性，该法可实现对三聚氰胺及其类似物的快速和定量分析，其检测限约为 33 ppb<sup>[62]</sup>。

红外光谱法是利用每种分子因其结构和组成不同而具备独特红外吸收光谱的原理来实现不同分子的结构分析和鉴定。Mauer 等采用红外光谱法来检测和定量分析婴幼儿奶粉中三聚氰胺残留。此法可分析添加有 1ppm 三聚氰胺的奶粉，且无需或只需少量的样品前处理，在 5min 内可完成检测<sup>[63]</sup>。但是，红外光谱法不适用于液体样品分析，且定量水平和灵敏度有待提高。

#### 1.5.1.7 化学发光分析法

化学发光分析法 (Chemiluminescence analysis, CL) 具有高灵敏度，线性范围广，所需仪器简单等优点吸引了越来越多的研究者。2009 年，Wang 等建立了基于鲁米诺-肌红蛋白系统的高灵敏化学发光法检测三聚氰胺残留。研究表明，三聚氰胺和鲁米诺可竞争性的与肌红蛋白反应，当样品中存在三聚氰胺并与肌红蛋白反应形成一种复合体后，会强烈地抑制鲁米诺与肌红蛋白反应所产生的化学光的强度，且化学发光强度的降低与三聚氰胺的浓度呈正比线性关系，检测线性范围为  $10\text{ pg/mL}-50\text{ ng/mL}$ ，检测限可达到  $3\text{ pg/mL}$ ，实际样品添加回收率为 93.4%-106.5%<sup>[64]</sup>。虽然化学发光法灵敏度高，仪器简单，易于操作，但在大量检测样品时其稳定性仍有待提高。

#### 1.5.2 免疫化学分析法

免疫化学分析法是基于抗原抗体之间特异性识别，实现对检测样品中抗原或抗体进行定性、定量分析，其特点是高灵敏、高特异性、方法简单。如酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，荧光偏振免疫测定法 (Fluorescence polarization immunoassay, FPIA)，胶体金免疫层析分析 (Colloidal gold-based immunochromatographic assay, GICA) 和化学发光酶免疫测定 (Chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA) 等已被广泛用于食品及环境中各种有毒有害物质的残留检测。各种免疫分析的核心试剂为高特异性抗体。1975 年，英国科学家 Kohler 和 Milstein 在细胞杂交技术的基础上，创建了杂交瘤技术，为利用 B 细胞杂交瘤分泌预定特异性单克隆抗体技术奠定了基础，并因此获得 1984 年诺贝尔医学奖<sup>[65]</sup>。自单克隆抗体技术诞生以来，因其特异性好、性质稳定、在体外可大批量生产等优点广泛应用于食品及农产品中各种非法添加物及有毒有害物质的检测。



### 1.5.2.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是上世纪 70 年代建立起来的免疫分析技术, 是目前最常用的检测样品中抗体或抗原的免疫学方法, 包括直接法、间接法、双抗体夹心法和间接竞争抑制法等。对小分子物质如三聚氰胺, 主要采用间接竞争法检测。在残留分析中, 酶联免疫试剂盒用于大量样品的筛选, 在得到阳性样品时通过 GC-MS, LC-MS 等方法进行进一步的确证分析。Garber 对三种商业化的三聚氰胺 ELISA 试剂盒进行了评估, 分别为: Abraxis Melamine Plate kit (5005B), Abraxis Atrazine ELISA (520005) and EnviroGard Triazine Plate kit (7211000) 三种试剂盒, 结果显示只有 Abraxis 公司生产的 Abraxis Melamine Plate kit (5005B) 可以准确、灵敏的检测食品中三聚氰胺残留, 检测限为 20 ng/mL<sup>[66]</sup>。

研究认为, 分子量小于 1000 的物质为半抗原, 本身没有免疫原性, 不能直接刺激机体免疫系统产生抗体, 必需与大分子载体(如牛血清白蛋白 BSA, 钥孔血蓝蛋白 KLH) 偶联制备出完全抗原才能用来诱导动物机体产生抗体。三聚氰胺分子量仅为 126, 是典型的小分子半抗原, 用制备的三聚氰胺人工抗原来刺激机体免疫系统产生特异性抗体也是比较困难的。三聚氰胺事件后, 国内外开始研究三聚氰胺完全抗原的合成、多克隆抗体及单克隆抗体的制备等工作。Wang 等建立了一种间接竞争 ELISA 法, 可用于检测猪和鸡的组织及体液中三聚氰胺残留, 检测限为 50 ng/mL, 同时用 GC-MS 法作为确证, 两种方法显示很好的相关性<sup>[67]</sup>。华南农业大学的 Lei 等合成三聚氰胺完全抗原免疫动物得到特异性多克隆抗体, 建立了特异性检测三聚氰胺的间接竞争 ELISA 法, 其半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 为 70.6 ng/mL<sup>[68]</sup>。河北农业大学的 Liu 等也做了此类研究, 首先对三聚氰胺进行衍生化合合成完全抗原免疫动物得到了三聚氰胺的多克隆抗体, 建立 ELISA 法并对动物肌肉组织中三聚氰胺残留进行检测, 检测限为 1.8 ng/g, 样品添加回收率为 84.6-94.3%; 同时, 所获得的三聚氰胺多克隆抗体对环丙三氨三嗪存在交叉反应, 交叉反应率为 59%<sup>[69]</sup>。

随后, Yin 等制备了抗三聚氰胺单克隆抗体并建立了检测牛奶、奶粉和动物饲料等样品中三聚氰胺残留的间接竞争 ELISA 法, 实际样品检测限牛奶中为 0.1 mg/L, 奶粉为 0.2 mg/kg, 饲料中为 0.5 mg/L, 添加回收率为 79-110%<sup>[70]</sup>。另外, 何方洋等利用三聚氰胺类似物与载体蛋白偶联合成免疫原及包被原, 免疫 BALB/c 小鼠, 制备了抗三聚氰胺的单克隆抗体<sup>[71]</sup>。蔡家利等也成功制备了抗三聚氰胺单克隆抗体, 其对三聚氰胺的 IC<sub>50</sub> 值为 4.15 μg/mL, 除与三聚氰酸交叉反应率为 72%外, 与三嗪及其他抗生素等交叉反应率均小于 5%<sup>[72]</sup>。

这些研究结果提示, 与其他分子量大的化合物相比, 三聚氰胺更难以制备出性质优良的完全人工抗原以及特异性好, 灵敏性高的抗体。首先需要选择合适的三聚氰胺结构类似物作为半抗原进行衍生化, 然后采用合适的偶联方法将其与载体蛋白连接得到完全抗原, 关键在于不能破坏其表面结构和保持最小的能量转移, 这对制备出高灵敏、高特异性和稳定的三聚氰胺抗体是至为重要的。

### 1.5.2.2 胶体金免疫层析分析

胶体金标记技术是上世纪 70 年代继三大标记技术（放射性同位素、荧光素和酶）之后发展起来的第四大固相标记技术。最早应用于免疫电泳技术，在进入 90 年代后成为目前最快速灵敏的免疫学检测技术之一，胶体金免疫层析分析（Colloidal gold-based immunochromatographic assay, GICA）的原理是：将特异性的抗原或抗体固定于硝酸纤维素膜等固相载体的一端，而后将此端浸入待检样品溶液中，通过毛细管作用，各种免疫反应试剂进行特异性结合，最后通过目测胶体金标记物的显色情况达到检测目的。与其他免疫分析方法相比，GICA 具有不需要专用仪器，检测速度快，操作简单方便，可长期保存实验结果，易于实现现场检测等优点，主要作为定性或半定量筛选检测手段<sup>[73,74]</sup>。

目前，采用胶体金免疫层析法对三聚氰胺进行检测的研究很少。中国农业大学的 Li 等应用胶体金免疫层析技术对食品中三聚氰胺进行了检测。结果表明：原料乳中检测限为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ，动物饲料和奶粉检测限为 1  $\mu\text{g/g}$ ，其他奶制品检测限为 2  $\mu\text{g/g}$ ，整个检测过程在 3-10min 完成，且与 GC-MS 方法具有非常好的相关性<sup>[75]</sup>。

### 1.5.2.3 化学发光酶免疫测定

与 ELISA 和 GICA 法相比，化学发光酶免疫测定（Chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA）方法需要专用仪器、价格昂贵、分析成本较高，限制其在食品检测及环境监测中的应用。Choi 等建立了一种新型的酶促化学发光体系来检测牛奶中的三聚氰胺，试验采用 1,1'-乙二酰二咪唑为 CLEIA 底物，检测线性范围为 3.8-125 ppb，检测限为 1.12ppb，而常规的鲁米诺-CLEIA 法和 ELISA 法检测限分别为 6.3 ppb 和 9.0 ppb，同时该方法检测时间相对较短，样品不需任何前处理即可进行检测<sup>[76]</sup>。

### 1.5.2.4 荧光偏振免疫测定

荧光偏振免疫测定（Fluorescence polarization immunoassay, FPIA）是一种定量免疫分析技术，采用竞争反应原理，其荧光信号强度与待测样品中分析物的浓度成反比，绘制出竞争结合抑制标准曲线，通过与标准曲线比较而得到待分析物的定量值。FPIA 法最适于小分子物质如药物，激素等的检测，具有灵敏度高、准确度高、速度快、操作简单等优点，但所需仪器设备昂贵，与 ELISA 法和 GICA 法相比分析成本高，限制了它在食品安全检测中的应用。Wang 等以三聚氰胺衍生物为半抗原制备了三聚氰胺多克隆抗体，在此基础上建立了检测奶制品中三聚氰胺残留的 FPIA 方法，其  $\text{IC}_{50}$  为 164.7  $\text{ng/mL}$ ，检测限为 9.3  $\text{ng/mL}$ ，样品添加回收率在 79.4-119%之间，检测结果与 HPLC-MS 方法具有良好的相关性<sup>[77]</sup>。

### 1.5.3 其他检测方法

随着多学科交叉的快速发展，新型检测技术层出不穷，其中传感器技术因能大幅度提高检测灵敏度和扩大检测范围而备受瞩目。目前应用于三聚氰胺检测的传感器技术依其核心单元主要有两种：以分子印记聚合物为基础的传感器和以各种纳米粒子为基础的传感器。

### 1.5.3.1 分子印迹聚合物传感器

分子印迹技术是近年发展起来的一种新方法，可为人们提供具有期望结构和性质的分子聚合物。在制备时，首先用功能单体将模板分子通过共价或非共价的方式聚合起来，而后再将模板分子除去，从而获得能专一性键合模板分子及其类似物的分子组装体。分子印记聚合物主要应用于传感器（如电极型传感器：以分子印记聚合物膜为敏感层），信号聚合物和分子印迹吸收（如可作为天然抗体的替代物）等分析方法。

Pietrzyk 等以三聚氰胺为模板分子，bis(2,2'-bithienyl)-benzo-[18-crown-6]methane 为功能单体，3,3'-bis[2,20-bis(2,20-bithiophene-5-yl)]thianaphthene 为交联单体，通过电聚合方式制备出三聚氰胺分子印迹聚合物膜，建立了基于分子印迹聚合物膜的三聚氰胺化学传感器分析法，其检测限为 5nM，检测线性范围为 5 nM-1 mM<sup>[78]</sup>。另外，Liang 等也建立了基于分子印迹聚合物的电位传感器方法用于牛奶中三聚氰胺残留检测。他们以甲基丙烯酸为功能单体，二甲基丙烯酸乙二醇酯为交联单体制备分子印记聚合物，然后联合离子选择电极检测牛奶中三聚氰胺，其检测限为 6.0 uM<sup>[79]</sup>。

### 1.5.3.2 光学传感器

目前应用于三聚氰胺检测的传感器主要为光学传感器，其原理是当存在待检目标物时，可使纳米材料传感系统发生颜色变化或者表面等离子体共振，从而实现对目标物的检测。

根据颜色变化原理制备的比色传感器可分为两种：一种是对纳米材料不进行任何修饰，直接用于比色分析。如 Li 等报道了一种检测牛奶中三聚氰胺的肉眼可视检测方法。实验所用金纳米粒子未经任何修饰，在中性条件下，三聚氰胺可使金纳米粒子快速聚集，溶液由之前的红色变成蓝色或紫色，从而实现检测目的，其检测限为 0.4 μg/mL，相较于其他方法其灵敏度还有待提高<sup>[80]</sup>。基于同样的原理，Chi 等和 Wei 等分别建立了检测三聚氰胺的比色方法，检测限分别为 25 ppb 和 40 ppb，且实验可在 5min 内完成<sup>[81,82]</sup>。另一种传感器采用功能化纳米粒子，其表面连接有特殊的功能基团，可与待检目标物实现特异性结合。如 Han 等建立了一种可特异性检测婴幼儿奶粉中三聚氰胺的比色方法。研究者首先合成银纳米粒子，然后用对-硝基苯胺进行表面修饰，通过电子供体-受体相互作用实现对三聚氰胺的特异性检测，当存在三聚氰胺时，银纳米粒子溶液发生颜色变化，从黄色变成蓝色，其检测水平在 0.1 μg/g<sup>[83]</sup>。另外，Lu 等使用金纳米粒子建立了一种对奶制品中三聚氰胺进行实时检测的可靠、灵敏分析法，实验首先合成 1-mercapto-ethyl-1,3,5-triazine-2,4,6-trione (MTT，其通过氢键可与三聚氰胺特异性识别)，而后再将 MTT 修饰于金纳米粒子表面并稳定金纳米粒子，其颜色为酒红色，当加入三聚氰胺时，颜色变为蓝色，该方法在 1min 内可实现对 2.5 ppb 三聚氰胺的肉眼识别<sup>[84]</sup>。

应用于三聚氰胺检测的基于表面等离子体共振技术 (Surface Plasma Resonance, SPR) 的光学免疫传感器研究较少。SPR 技术是一种基于物理光学现象的检测技术，通过测量分子结合导致的芯片表面折射率的变化来检测多种分子间的结合过程。其原理在于芯片表面折射率的变化与吸附在其上的物质有关，将配体分子固定于芯片的金属膜表



面, 监控溶液中被分析物与配体间复合物形成或解离过程, 此过程中芯片表面溶液的折射率发生变化, 从而产生相应的 SPR 信号。Fodey 等利用 SPR 免疫传感器对婴幼儿奶粉中的三聚氰胺进行了检测, 研究中将三聚氰胺类似物制备出的多克隆抗体固定于生物传感芯片上, 利用抗原抗体之间的特异性识别实现三聚氰胺的特异性检测, 其  $IC_{50}$  为  $67.9 \text{ ng/mL}$ , 检测限为  $0.5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ <sup>[85]</sup>。

## 1.6 本课题立题意义和研究的主要内容

### 1.6.1 立题意义

2008 年三聚氰胺事件在国内引发巨大社会舆论和民众问责, 我国食品安全工作面临严峻考验。政府积极应对, 制定并实施了一系列的法律法规, 反映出政府打击食品安全问题的决心。HPLC, LC-MS 和 GC-MS 等理化检测方法具有检测灵敏度高、结果准确可靠等优点, 在三聚氰胺检测中得到了很好的应用。但是, 三聚氰胺已被列入生乳收购及乳制品产品出厂必检项目, 面对如此庞大的检测数量, 传统的理化仪器检测方法分析成本巨大且工作量繁重, 不能满足实际检测业务需求。因此, 我国亟需开展三聚氰胺残留的高通量、快速检测方法和技术的研究, 同时开发高通量、快速、高灵敏的三聚氰胺筛查手段应用于三聚氰胺的日常监控, 对保障我国乳制品安全具有重要的意义。

### 1.6.2 研究的主要内容

本课题的研究内容主要有以下 6 个方面:

1. 设计合成及鉴定多种三聚氰胺的半抗原和人工完全抗原;
2. 制备特异性识别三聚氰胺的单克隆抗体;
3. 建立检测三聚氰胺残留的间接竞争 ELISA 方法, 并研制出相应的 ELISA 试剂盒;
4. 制备净化提纯三聚氰胺的免疫亲和色谱柱并建立 IAC-LC-MS/MS 检测方法;
5. 建立基于胶体金免疫层析技术的三聚氰胺高灵敏快速检测方法;
6. 建立基于功能性金纳米粒子分子识别的三聚氰胺高灵敏快速检测方法。

## 参考文献

1. 中华人民共和国卫生部. 三鹿奶粉事件专题 [EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohbgt/s3582/200809/37769.htm>, 2008-09-11.
2. 肖新李, 黄飞平. 盐酸克伦特罗引起食物中毒 225 例[J]. 广东医学, 2002, 23(10):1004.
3. 王徽. 食品安全问题对中国对外贸易的影响[J]. 时代经贸, 2009, 151: 75-77.
4. Zhang L, Zhang J, Li ZJ, et al. New coordination motifs of melamine directed by N-H...X (X = Cl or Br) hydrogen bonds [J]. Inorg. Chem., 2007, 46:5838-5840.
5. Bann B., Miller S.A. Melamine and derivatives of melamine [J]. Chem. Rev. 1958, 58:131-172.
6. Chapman R.P., Averell P.R., Harris R.R. Solubility of melamine in water [J]. Ind. Eng. Chem. 1943, 35: 137-138.
7. 徐佩, 黄龙峰, 李瑞忠. 不同 pH 的三聚氰胺水溶液溶解性能研究[J]. 安徽化工, 2008,

34(6):23-24.

8. World Health Organization, Executive Summary [EB/OL].  
[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/Exec\\_Summary\\_melamine.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Exec_Summary_melamine.pdf), 2008-11-1.
9. Newton G.L., Utley P.R. Melamine as a dietary nitrogen source for ruminants [J]. *Journal of Animal Science*, 1978, 47: 1338-1344.
10. 胡国良. 三聚氰胺引发食品安全风暴[J]. *决策探索*, 2008,11: 6-9.
11. Brown C.A., Jeong K.S., Poppenga R.H., et al. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007 [J]. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007, 19 (5): 525-531.
12. US Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/RecallsWithdrawals/ucm129575.htm>.2007.
13. Chan E.Y., Griffiths S.M., Chan C.W. Public-health risks of melamine in milk products [J]. *The Lancet*, 2008, 372(9648):1444-1445.
14. US Food and Drug Administration. Melamine contamination in China. (Accessed at: <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm179005.htm>).2009.
15. Melamine and Cyanuric Acid Interaction May Play Part in Illness and Death from Recalled Pet Food [J]. American Veterinary Medical Association. Press Release, 2007-05-01.
16. US Food and Drug Administration. FDA warns staff on major melamine health risks. <http://www.itchmo.com/fda-melamine-surveillance-order-warns-against-major-health-risks-686/all-comments>. 2007.
17. Rice J.M., Baan R.A., Blettner M. Rodent tumors of urinary bladder, renal cortex, and thyroid gland in IARC Monographs evaluations of carcinogenic risk to humans [J]. *Toxicol Science*, 1999, 49:166-171.
18. Melnick R.L., Boorman G.A., Haseman J.K. Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984, 72(2): 292-303.
19. Erol Yildrin, Casey W.H. Interaction between cyromazine and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar GPS11 for control of onion maggot, *Delia antiqua* [J]. *Crop protection*, 2003, 22: 923-927.
20. Cianciolo R.E., Bischoff K, Ebel J.G., et al. Clinicopathologic, histologic, and toxicologic findings in 70 cats inadvertently exposed to pet food contaminated with melamine and cyanuric acid [J]. *Am Vet Med Assoc*, 2008, 233(5):729-737.
21. Puschner B, Poppenga RH, Lowenstine LJ, et al. Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats [J]. *Vet Diagn Invest*, 2007,19(6):616~624.
22. FDA/USDA Joint News Release: Scientists Conclude Very Low Risk to Humans from Food Containing Melamine [EB/OL]. USDA and FDA. Retrieved on 2007205207. <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01629.html>. 2007-05-07.
23. Ronald E, Baynes, Geof Smith, et al. Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46:1196-1200.
24. Jennifer L, Buur, Ronald E, et al. Estimation meat withdrawal times in pigs exposed to melamine contaminated feed using a physiologically based pharmacokinetic model [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 51:324-331.
25. Dobson R.L.M.; Motlagh S.; Quijano M., et al. Identification and Characterization of Toxicity of

- Contaminants in Pet Food Leading to an Outbreak of Renal Toxicity in Cats and Dogs [J]. *Toxicol. Sci.* 2008, 106: 251-262.
26. Seto C.T., Whitesides G.M. Self assembly based on cyanuric acid melamine lattice [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112:6409-6411.
27. 王征. GC-MS 法测定动物食品中的三聚氰胺[J]. *福建分析测试*, 2008,17 (2):1-4.
28. 李爱军, 张代辉, 马书民. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中三聚氰胺残留[J]. *分析化学研究简报*, 2008,36(5):699-701.
29. 汪辉, 曹小彦, 彭新凯. 高效液相色谱-二极管阵列法测定高蛋白食品中的三聚氰胺[J]. *食品与机械*, 2007,23(5):114-115.
30. 曹莹, 张文刚, 黄士新. 高效液相色谱法分析饲料中的三聚氰胺[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2007,(6):47-48.
31. 王亚吨, 林海丹, 邓国东. 反相高效液相色谱法测定饲料中三聚氰胺的含量[J]. *广东饲料*, 2008, 17(3):41-43.
32. 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺[J]. *色谱*, 2008,26(3):339-342.
33. 冯薇, 王伯初, 米鹏程. 适用于 LC- MS 的三聚氰胺检测新方法[J]. *广东农业科学*, 2008,(4):62-64.
34. 中华人民共和国卫生部. 《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》[S]. 国家标准 GBT 22388-2008.
35. Mu Li, Liying Zhang, Zihui Meng, et al. Molecularly-imprinted microspheres for selective extraction and determination of melamine in milk and feed using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878: 2333-2338.
36. Rule G.S., Mordehai A.V., Henion J. Determination of carbofuran by online immunoaffinity chromatography with couple-column liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal. Chem.*, 1994, 66: 230-235.
37. Shen J.Z., Qian C.F., Jiang H.Y., et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination in broiler chicken tissues [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2001, 49:2697-2701.
38. Creaser C.S., Feely S.J., Houghton E., et al. Immunoaffinity chromatography combined on-line with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of corticosteroids [J]. *J. Chromatogr. A*, 1998, 794: 37-43.
39. Dubois M, Taillieu X, Colemonts Y, et al. GC-MS determination of anabolic steroids after multi-immunoaffinity purification [J]. *Analyst*, 1998, 123: 2611-2616.
40. Yongben Zhang, Lijing Zhang, Huicai Zhang, et al. Immunoaffinity-based solid phase extraction for the determination of melamine in animal-derived foods followed by LC [J]. *Chromatographia*, 2011, 73: 1211-1215.
41. Žana Černova, Ina Razmislevičienė, Audrius Padarauskas. Determination of melamine in milk powder by capillary electrophoresis [J]. *Chemija*, 2009, 20(4):231-235.
42. N. Yan, L. Zhou, Z. Zhu, et al, Determination of melamine in dairy products, fish feed, and fish by capillary zone electrophoresis with diode array detection [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57,807-811.



43. Chen Z.J., Yan X.M. Simultaneous Determination of Melamine and 5-Hydroxymethylfurfural in Milk by Capillary Electrophoresis with Diode Array Detection [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 8742–8747.
44. Jingen Xia, Naiyuan Zhou, Yujun Liu, et al. Simultaneous determination of melamine and related compounds by capillary zone electrophoresis [J]. *Food Control*, 2010, 21(6):912-918.
45. S. Ehling, S. Tefera, I.P. Ho. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid [J]. *Food Additives & Contaminants*, 2007, 24, 1319–1325.
46. Muniz-Valencia R., Ceballos-Magana S.G., Rosales-Martinez D., et al. Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392, 523–531.
47. Desmarchelier A., Cuadra M.G., Delatour T., and P. Mottier. Simultaneous Quantitative Determination of Melamine and Cyanuric Acid in Cow's Milk and Milk-Based Infant Formula by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 7186–7193.
48. T. Ding, J. Xu, J. Li, et al. Determination of melamine residue in plant origin protein powders using high performance liquid chromatography-diode array detection and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Sepu* 2008, 26, 6–9.
49. Kim B., Perkins L.B., Bushway R.J., et al. Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *The Journal of AOAC International*, 2008, 91,408–413.
50. X.W. Lv, J. Wang, L. Wu, et al. Tissue Deposition and Residue Depletion in Lambs Exposed to Melamine and Cyanuric Acid-Contaminated Diets [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 943–948.
51. Filigenzi M.S., Puschner B., Aston L.S., and Poppenga R.H. Diagnostic Determination of Melamine and Related Compounds in Kidney Tissue by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 7593–7599.
52. Tran B.N., Okoniewski R., Storm R., et al. Use of Methanol for the Efficient Extraction and Analysis of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Dairy Products and Pet Foods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (1):101–107.
53. Andersen W.C., Turnipseed S.B., Karbiwnyk C.M., et al. Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 4340–4347.
54. Heller D.N., and Nochetto C.B. Simultaneous determination and confirmation of melamine and cyanuric acid in animal feed by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22, 3624–3632.
55. Desmarchelier A., Cuadra M.G., Delatour T., and Mottier P. Simultaneous Quantitative Determination of Melamine and Cyanuric Acid in Cow's Milk and Milk-Based Infant Formula by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry, 2009, 57, 7186–7193.
56. Toth J.P., Bardalaye P.C. Capillary Gas Chromatographic Separation and Mass Spectrometric Detection of Cyromazine and Its Metabolite Melamine. *Journal of chromatography*, 1987, 408, 335-340.
  57. Yokley R.A., Mayer L.C., Rezaaiyan R., et al. Analytical Method for the Determination of Cyromazine and Melamine Residues in Soil Using LC-UV and GC-MSD [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 3352-3358.
  58. X.L. Zhu, S.H. Wang, Q. Liu, et al. Determination of Residues of Cyromazine and Its Metabolite, Melamine, in Animal-Derived Food by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Derivatization [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 11075-11080.
  59. Tang H.W., Ng K.M., Chui S.S.Y., et al. Analysis of Melamine Cyanurate in Urine Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 3676–3682.
  60. Huang G.M., Ouyang Z., Graham Cooks R. High-throughput trace melamine analysis in complex mixtures [J]. *Chemical Communications*, 2009, 559–561.
  61. Lachenmeier D.W., Frank W., Humpfer E., et al. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis [J]. *European Food Research and Technology*, 2005, 220 (2), 215–221.
  62. M. Lin, L. He, J. Awika, et al. Detection of melamine in gluten, chicken feed and processed foods using surface enhanced Raman spectroscopy and HPLC [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73(8):129-134.
  63. Mauer L.J., Chernyshova A.A., Hiatt A., et al. Melamine Detection in Infant Formula Powder Using Near- and Mid-Infrared Spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 3974–3980.
  64. Wang Z.M., Chen D.H., Gao X., and Z.H. Song, Subpicogram Determination of Melamine in Milk Products Using a Luminol-Myoglobin Chemiluminescence System [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 3464–3469.
  65. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256:495.
  66. Garber E.A.E. Detection of Melamine Using Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technology [J]. *Journal of Food Protection*, 2008, 71, 590–594.
  67. Zongyi Wang, Xi Ma, Liying Zhang, et al. Screening and determination of melamine residues in tissue and body fluid samples [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 662(1): 69-75.
  68. Hongtao Lei, Yudong Shen, Lijun Song, et al. Hapten synthesis and antibody production for the development of a melamine immunoassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 665: 84-90.
  69. Juxiang Liu, Yongben Zhong, Jing Liu, et al. An enzyme linked immunosorbent assay for the determination of cyromazine and melamine residues in animal muscle tissues. *Food Control*, 2010, 21:1482-1487.
  70. Weiwei Yin, Jinting Liu, Taichang Zhang, et al. Preparation of Monoclonal Antibody for Melamine and Development of an Indirect Competitive ELISA for Melamine Detection in Raw Milk, Milk Powder, and Animal Feeds [J]. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 8152–8157.

71. 何方洋, 万宇平, 罗晓琴等. 三聚氰胺单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 吉林畜牧兽医, 2010,31(3):7-9.
72. 蔡家利, 陈昕, 徐社会. 三聚氰胺单克隆抗体的制备及鉴定[J], 重庆理工大学学报, 2010,24(4):30-35.
73. Michael G.W. Immunochromatographic techniques: a critical review [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2000, 366:635-645.
74. Westgard J.O. Point of care in using statistics in methods comparison studies [J]. Clinical Chemistry, 1998, 210:2240-2245.
75. Xiangmei Li, Pengjie Luo, Shusheng Tang, et al. Development of an Immunochromatographic Strip Test for Rapid Detection of Melamine in Raw Milk, Milk Products and Animal Feed [J]. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 6064–6070.
76. JooHee Choi, Young-Teck Kim, Ji Hoon Lee. Rapid quantification of melamine in milk using competitive 1, 1'-oxalyldiimidazole chemiluminescent enzyme immunoassay [J]. Analyst, 2010, 135, 2445–2450.
77. Qiang Wang, Simon A. Houghy, et al. Development of a fluorescence polarization immunoassay for the detection of melamine in milk and milk powder [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 399:2275–2284.
78. Pietrzyk A, Kutner W, Chitta R, et al. Melamine acoustic chemosensor based on molecularly imprinted polymer film [J]. Anal. Chem. 2009, 81 (24): 10061–10070.
79. Rongning Liang, Ruiming Zhang, Wei Qin. Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 141(2): 544-550.
80. Li Li, Baoxin Li, Di Cheng, Lihui Mao. Visual detection of melamine in raw milk using gold nanoparticles as colorimetric probe [J]. Food Chemistry, 2010, 122(3): 895-900.
81. Hong Chi, Bianhua Liu, Guijian Guan, et al. A simple, reliable and sensitive colorimetric visualization of melamine in milk by unmodified gold nanoparticles [J]. Analyst, 2010, 135(5): 1070-1075.
82. Fang Wei, Robert Lam, Stacy Cheng, et al. Rapid detection of melamine in whole milk mediated by unmodified gold nanoparticles [J]. Applied Physics Letters, 2010, 96(13): 3702-3705.
83. Han Cuiping, Li Haibing. Visual detection of melamine in infant formula at 0.1ppm level based on silver nanoparticles [J]. Analyst, 2010, 135(3): 583-588.
84. Kelong Ai, Yanlan Liu, Lehui Lu. Hydrogen-Bonding Recognition-Induced Color Change of Gold Nanoparticles for Visual Detection of Melamine in Raw Milk and Infant Formula [J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(27): 9496-9497.
85. Fodey T.L., Thompson C.S., Traynor I.M., et al. Development of an Optical Biosensor Based Immunoassay to Screen Infant Formula Milk Samples for Adulteration with Melamine [J]. Anal. Chem. 2011, 83, 5012–5016.



## 第二章 三聚氰胺抗原设计、合成及鉴定

### 2.1 引言

三聚氰胺是一种小分子化合物，分子量只有 126，属于典型的半抗原。根据现有的免疫学理论，分子量小于 1000 的物质不能直接刺激机体免疫系统产生特异性抗体，只具有免疫反应性，而不具有免疫原性，必需与大分子载体偶联制备完全抗原，然后免疫动物才能获得特异性抗体<sup>[1]</sup>。免疫检测技术是以抗体对抗原的特异性识别作用为基础的分析方法，抗体是所有免疫检测技术的核心试剂。因此，抗体的制备是一个非常重要的环节，主要包括：目标物选择，半抗原结构设计、合成与鉴定，完全抗原的合成与鉴定，动物实验分析及结果鉴定。完全抗原决定了抗体的特异性、灵敏度和亲和性，最终影响免疫检测的结果，因此完全抗原的设计与合成是抗体制备的重要步骤，而半抗原结构设计是人工抗原设计中的关键环节<sup>[2,3]</sup>。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 药品与试剂

三聚氰胺 (Melamine, MEL), 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪 (2-chloro-4, 6-diamine-1, 3, 5-Triazine, CDT), 灭蝇胺, 阿特拉津, N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS), N,N-二环己基碳二亚胺 (dicyclohexylcarbodiimide, DCC), 碳二亚胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide Hydrochloride, EDC), 完全弗氏佐剂, 不完全弗氏佐剂, 四甲基联苯胺(TMB), 3-巯基丙酸 (MPA), 6-氨基己酸 (ACA), 对氨基苯甲酸 (PABA), 均为 Sigma 公司产品; 快速佐剂, [北京康碧泉生物科技有限公司](#); 牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA), 卵清白蛋白(Ovalbumine, OVA), 上海伯奥生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(HRP-IgG), 康成生物工程公司; 氯甲酸异丁酯, 三正丁胺, 二甲基甲酰胺 (dimethylformamide, DMF), 上海化学试剂公司; Tween-20, 浙江龙游县化工试剂厂; 甲醇, 氯化钠, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 中国医药集团上海化学试剂总公司; 试验用水为 Millipore 超纯水; 上述试剂若无特别注明均为分析纯。

#### 2.2.2 主要仪器及设备

AB104-N 型电子天平 (上海梅特勒-托利多公司); BP211D 型电子分析天平 (德国赛多利斯公司); 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); 可调式移液器 (Thermo Labsystems 公司); U-3000 型紫外扫描仪 (日本岛津); MuLiskan Mks 型酶标仪 (Thermo Labsystems 公司); Costar92592 可拆酶标板 (上海吉泰生物科技有限公司); KQ-250DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DHG-9070A 型电热干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); MALDI SYNAPT QTof MS 液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司); 90-2 型定时恒温磁力搅拌器 (上海沪西分析仪器厂); ZD-9556 型水平摇床 (江

苏太仓科教器材厂); XMIB 型电热恒温水浴锅 (上海沪西分析仪器厂); TGL-40B 台式低速离心机 (上海安亭科学仪器厂); WH-2 型微型漩涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂); DELTA320 型 pH 计 (上海梅特勒-托利多公司); 3K30 型高速冷冻离心机 (Sigma 公司); RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); FTS EI585-Q 型冷冻干燥仪 (美国 STONE RIDGG 公司)。

### 2.2.3 主要溶液

1. 磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L PBS, pH 7.4): 称取 NaCl 80 g, KCl 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  36.2 g, 溶于超纯水, 全部溶解后, 定容至 1000 mL, 用时稀释 10 倍。

2. 硼酸盐缓冲液 (0.2 mol/L BB, pH 9.0): 0.2 mol/L 硼酸: 称取硼酸 1.237 g 溶于纯水定容至 100 mL; 0.05 mol/L 硼酸钠溶液: 称取十水合硼酸钠 1.907 g 溶于纯水定容至 100 mL; 用时取 1.2 mL 硼酸溶液与 4.8 mL 硼酸钠溶液混合即为 pH 9.0 的硼酸盐缓冲液。

3. 包被液 (CBS, 0.05 mol/L, pH 9.6): 称取  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 g 和  $\text{NaHCO}_3$  2.93 g, 加纯水定容至 1000 mL。

4. 洗涤液 (PBST): 为含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 溶液。

5. 封闭液: 为含 0.1% BSA 的包被缓冲液。

6. 抗体稀释液: 为含 0.1% BSA 的洗涤缓冲液。

7. TMB 底物缓冲液 (pH 5.0): A 液: 称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.68 g, 柠檬酸 0.933 g, 加入 18  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 加纯水定容至 100 mL; B 液: 称取 60 mg TMB 溶于 100 mL 乙二醇; 使用时按 A 液: B 液 (5:1, v/v) 配比使用, 临用前配制。

8. 终止液 (2 mol/L,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ): 取 98% 浓硫酸 22.2 mL 加入纯水 177.8 mL。

### 2.2.4 实验动物

新西兰大白兔, 购自中国科学院上海实验动物中心。

### 2.2.5 试验方法

#### 2.2.5.1 三聚氰胺半抗原合成与鉴定

##### 1. 半抗原 MEL-MCA 的合成与鉴定

半抗原 MEL-MCA 的合成参考 Marvin 等人的方法并有所改进<sup>[4]</sup>, 合成反应如下图 2-1 所示。称取 CDT 0.75 g (5 mmol) 置于 100 mL 圆底三口烧瓶中, 加入 50 ml 无水乙醇, 超声使其完全溶解, 为 A 液; 再称取 3-巯基丙酸 0.58 g (5.5 mmol), KOH 1.01 g (15.3 mmol), 加入 10 ml 无水乙醇完全溶解, 为 B 液; 搅拌下缓慢将 B 液逐滴滴加到 A 液中, 70°C 加热回流反应 12 h 结束反应。待反应瓶冷却至室温后, 将反应液用滤纸过滤, 过滤液用无水乙醇和 4°C 去离子水洗涤, 用 6N 的 HCL 调节 pH 到 6 得到白色沉淀, 将其冷冻干燥即得到半抗原 MEL-MCA, 所得产物经 LC-MS 鉴定。



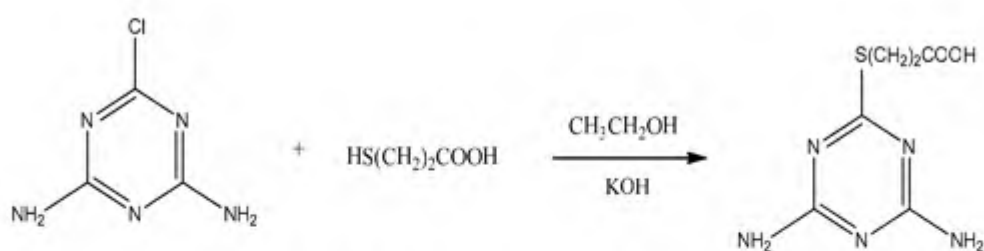


图 2-1 半抗原 MEL-MCA 合成路线

Fig.2-1 Synthetic scheme for hapten MEL-MCA

## 2. 半抗原 MEL-ACA 的合成与鉴定

半抗原 MEL-ACA 的合成参考 Mark 等人的方法并有所改进<sup>[5]</sup>，合成反应如下图所示。称取 CDT 1.21 g (8.1 mmol) 置于 100 mL 圆底三口烧瓶中，加入 15 ml 丙酮，超声使其完全溶解，为 A 液；再称取 6-氨基己酸 1.26 g (9.4 mmol)，二异丙基乙胺 (N,N-diisopylethylamine, DIEA) 2.5 g (10 mmol) 溶解于 10ml 丙酮，为 B 液；搅拌下缓慢将 B 液逐滴滴加到 A 液中，70°C 加热回流反应 24 h 结束反应；待反应瓶冷却至室温后，将反应液用滤纸过滤，过滤液减压蒸馏，将得到的棕褐色油状物溶解在 50 mL 5%的碳酸钠溶液中；用二氯甲烷 (3×20 ml) 进行萃取，收集水相用 6N 的 HCL 调节 pH 到 3，用乙酸乙酯 (3×20 ml) 进行萃取，收集有机相加入硫酸钠干燥后过滤，将滤液真空干燥即得到半抗原 MEL-ACA，所得产物经 LC-MS 鉴定。

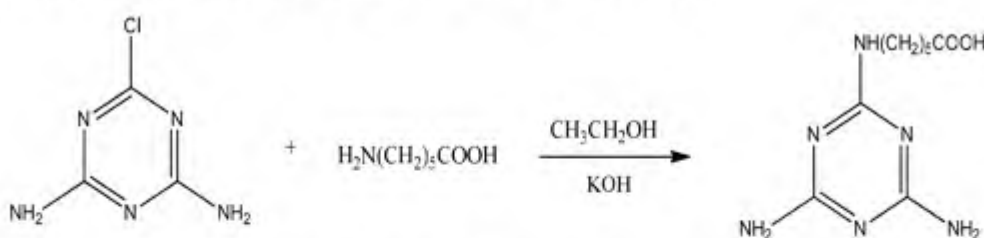


图 2-2 半抗原 MEL-ACA 合成路线

Fig.2-2 Synthetic scheme for hapten MEL-ACA

## 3. 半抗原 MEL-PABA 的合成与鉴定

半抗原 MEL-PABA 的合成参考 Mark 等人的方法稍作修改<sup>[5]</sup>，合成反应如下图所示。称取 CDT 0.75 g (5 mmol) 置于 100 mL 圆底三口烧瓶中，加入 50 ml 无水乙醇，超声使其完全溶解，为 A 液；再称取对氨基苯甲酸 0.75 g (5.5 mmol)，KOH 1.01 g (15.3 mmol)，加入 10 ml 无水乙醇完全溶解，为 B 液；搅拌下缓慢将 B 液逐滴滴加到 A 液中，70°C 加热回流反应 24 h 结束反应。待反应瓶冷却至室温后，将反应液用滤纸过滤，过滤液用无水乙醇和 4°C 去离子水洗涤，用 6N 的 HCL 调节 pH 到 6 得到白色沉淀，将其冷冻干燥即得到半抗原 MEL-PABA，所得产物经 LC-MS 鉴定。

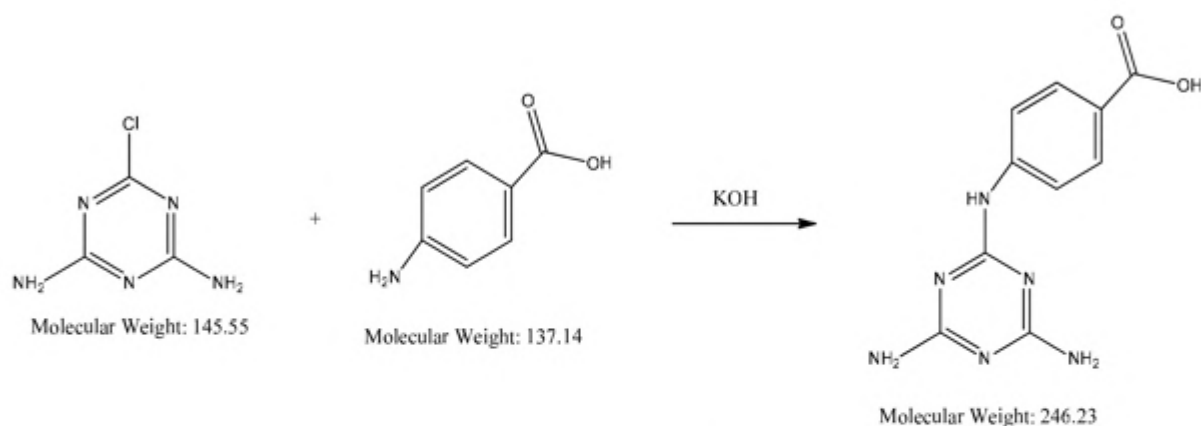


图 2-3 半抗原 MEL-PABA 合成路线

Fig.2-3 Synthetic scheme for Hapten MEL-PABA

### 2.2.5.2 完全抗原的合成与鉴定

#### 1. 免疫原的制备

采用活泼酯法 (NHS /DCC) 将上述合成好的半抗原偶联到载体蛋白 BSA 上制备免疫原<sup>[6,7]</sup>，具体步骤如下：

取上述合成好的半抗原 MEL-MCA、MEL-ACA 和 MEL-PABA 各 20mg，再称取 3 份 NHS 各 17 mg 加入到 3 种半抗原中，再分别溶解在 1ml 的 DMF 中，待其完全溶解后，各加入 DCC 31 mg，反应在 4°C 搅拌下过夜，离心去沉淀，收集上清（即活性酯中间体），为 A 液；称取 3 份 BSA 100 mg 溶解在 8 ml PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 溶液中，为 B 液；分别将 A 液逐滴滴加到 B 液中，磁力搅拌下 4°C 反应过夜；将反应终液转移到透析袋中，于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 缓冲液中 4°C 搅拌透析，每天换水 3 次，共透析 3 天；透析结束后离心取上清，分装于 0.5 mL 离心管中，-20°C 保藏待用，分别记为 MEL-MCA-BSA，MEL-ACA-BSA，MEL-PABA-BSA。

#### 2. 包被原的制备

采用混合酸酐法<sup>[8]</sup>将上述合成好的半抗原偶联到载体蛋白 OVA 上制备包被原，具体步骤如下：

取上述合成好的半抗原 MEL-MCA、MEL-ACA 和 MEL-PABA 各 20 mg，加入 1 mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解，4°C 下加入 20 ul 三正丁胺和 16 ul 氯甲酸异丁酯，在 4°C 搅拌下反应 2 h，得到 A 液；称取 3 份 OVA 100 mg 溶解在 8 ml 硼酸盐缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH 9.0) 中，为 B 液；冰浴条件下，分别将 A 液逐滴滴加到 B 液中，维持 4°C 搅拌反应过夜；将反应终液转移到透析袋中，于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 缓冲液中 4°C 搅拌透析，每天换水 3 次，共透析 3 天；透析结束后离心取上清，分装于 0.5 mL 离心管中，置于 -20°C 保藏待用，分别标记为 MEL-MCA-OVA，MEL-ACA-OVA，MEL-PABA-OVA。

#### 3. 人工抗原的鉴定

人工抗原的鉴定和半抗原与载体蛋白的偶联比率计算往往是同时进行的。比较常用的方法有非变性蛋白质电泳<sup>[9]</sup>、紫外分光光度法<sup>[10]</sup>、蛋白质末端自由氨基分析<sup>[11]</sup>等，其中，紫外分光光度法是小分子人工抗原鉴定中的经典手段，主要是依据光吸收图谱迭加的性质，分析载体蛋白在偶联前后紫外扫描光谱的变化情况来判定偶联是否成功及计算偶联比。偶联比测定参照文献方法<sup>[12]</sup>，半抗原/蛋白偶联物结合比按照摩尔吸光系数  $\epsilon$  计算，公式为：

$$\text{半抗原/蛋白结合比} = (\epsilon_{\text{偶联物}} - \epsilon_{\text{蛋白}}) / \epsilon_{\text{半抗原}}$$

其中， $\epsilon$  为在半抗原特征吸收波长处的摩尔吸光系数。

同时，采用 Bradford 法测定偶联物在 260nm 和 280nm 处的紫外吸光值，计算偶联物的蛋白质浓度，其计算公式为<sup>[13]</sup>：

$$\text{蛋白浓度 (mg/mL)} = (1.45 \times \text{OD}_{280\text{nm}} - 0.74 \times \text{OD}_{260\text{nm}}) \times \text{稀释倍数}$$

### 2.2.5.3 半抗原结构对免疫效果的影响

#### 1. 多克隆抗体的制备

选取 2 月龄，体重 1-2 kg 的健康雌性新西兰大白兔 6 只。免疫前观察一周，编号并采血作为阴性对照血清。免疫原与等体积的弗氏佐剂混合，用注射器进行乳化，直至乳液滴至冷水液面上时不扩散，并在 5min 内保持状态完整，则表示乳化成功可用于免疫，程序见表 2-1。在第 3 次免疫后的第 7 天耳缘静脉采血检测血清效价；最后一次免疫 5-6 天后心脏采血<sup>[14]</sup>，37°C 烘箱静置 2 h，然后 4°C 过夜，血清析出后，5000 rpm 离心 10min，取上清，加入 50%甘油和 0.01%硫柳汞钠，小管分装，保存于-20°C 冰箱待用。

表 2-1 新西兰大白兔免疫方案

Table2-1 Immunization protocol of New Zealand rabbits

| 免疫时间 | 抗原类型        | 免疫剂量      | 免疫途径      |
|------|-------------|-----------|-----------|
| 首免   | 免疫原+弗氏完全佐剂  | 1 mg/kg   | 颈背部皮内多点注射 |
| 二免   | 免疫原+弗氏不完全佐剂 | 1 mg/kg   | 颈背部皮下多点注射 |
| 三免   | 免疫原+弗氏不完全佐剂 | 1 mg/kg   | 颈背部皮下多点注射 |
| 四免   | 免疫原+弗氏不完全佐剂 | 1 mg/kg   | 颈背部皮下多点注射 |
| 冲击免疫 | 免疫原         | 0.5 mg/kg | 耳静脉注射     |

#### 2. 酶联免疫吸附分析 ELISA 操作程序

1) 采用间接 ELISA 方法检测血清效价，具体操作步骤如下：

- ①包被：将包被原用包被缓冲液从 10  $\mu\text{g/mL}$  开始倍比稀释，100  $\mu\text{l/孔}$ ，37°C 反应 2h。
- ②洗涤：将板内溶液倾去，甩干，并用洗涤液洗涤 3 次，每次 3min。
- ③封闭：拍干后，加入 200  $\mu\text{l/孔}$  封闭液，37°C 反应 2h。洗涤后烘干备用。
- ④加样：将抗血清从 1:1000 开始倍比稀释，并加入到各稀释度的包被孔中，100  $\mu\text{l/孔}$ ，37°C 反应 1h；充分洗涤后，加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG，100  $\mu\text{l/孔}$ ，37°C 反应 1h。

⑤显色反应：将酶标板取出，充分洗涤后，每孔加入 100 ul 的 TMB 显色液，37°C 避光反应 15min。

⑥终止和测定：每孔加入 100 ul 终止液以终止反应，然后用酶标仪测定各孔的 OD<sub>450</sub> 值。

⑦结果判读：以 OD<sub>450</sub> 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍（即 P/N≥2.1）所对应的血清最高稀释倍数即为血清的 ELISA 效价。

2) 采用间接竞争 ELISA 方法检测血清特异性，具体操作步骤如下：

①用上述的间接 ELISA 方阵滴定法确定包被原和抗体的工作浓度，以 OD<sub>450</sub> 值在 1.5 左右时所对应的抗原和抗体浓度为最适工作浓度。

②包被：将包被原用包被缓冲液稀释至最适工作浓度，100 ul/孔，37°C 反应 2h。

③洗涤和封闭：方法操作同上述间接 ELISA 法。

④配制三聚氰胺标准溶液：将三聚氰胺标准品用 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 溶液配制成 1 mg/mL 的母液，然后，在加样前，再用 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 溶液倍比稀释成需要浓度。

⑤加样：每孔加入 50 ul 倍比稀释的三聚氰胺各浓度标准品，然后再加入 50 ul/孔最适稀释倍数的抗血清，37°C 反应 1h。充分洗涤后，加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG，100 ul/孔，37°C 反应 1h。

⑥显色反应：将酶标板取出，充分洗涤后，每孔加入 100 ul 的 TMB 显色液，37°C 避光反应 15min。

⑦终止和测定：每孔加入 100 ul 终止液以终止反应，然后用酶标仪测定各孔的 OD<sub>450</sub> 值。

⑧数据处理：以三聚氰胺各浓度的对数为横坐标，以三聚氰胺各浓度对应的 OD 值为纵坐标，绘制标准曲线，计算半数抑制浓度（IC<sub>50</sub>，即 OD<sub>450</sub> 值从零标准溶液对应的 A0 下降到 50%时所对应的标准品浓度），从而判定抗血清对三聚氰胺是否具有特异性。

上述所用的包被原包括：MEL-MCA-OVA，MEL-ACA-OVA，MEL-PABA-OVA；所用的抗体为三种免疫原免疫兔子所获得的抗血清，包括：抗 MEL-MCA-BSA 的 MCA-1 和 MCA-2；抗 MEL-ACA-BSA 的 ACA-1 和 ACA-2；抗 MEL-PABA-BSA 的 PABA-1 和 PABA-2。

### 3. 抗体鉴定

利用建立的间接 ELISA 方法进行矩阵分析，测定 3 种免疫原所得抗血清对三种包被原的抗体亲和性，比较包被原浓度在 1 μg/mL 时不同抗原/抗体组合的抗血清效价，从而分析半抗原结构对抗体亲和性的影响。

采用建立的间接竞争 ELISA 方法测定三种免疫原所得抗血清与三种包被原形成的抗原/抗体组合在最佳工作浓度时对三聚氰胺的抑制曲线，参照文献方法计算各抑制曲线的 IC<sub>50</sub> 值<sup>[15]</sup>，据此分析半抗原结构对抗体灵敏度的影响。

另外，衡量抗体质量好坏的另一个重要指标是抗体的特异性，通常用抗体对目标物类似物的交叉反应率表示。但本实验半抗原设计的目的是筛选出能有效刺激动物免疫系统继而得到灵敏度高的抗体的免疫原，而抗体特异性的保证主要在后续单克隆抗体筛选

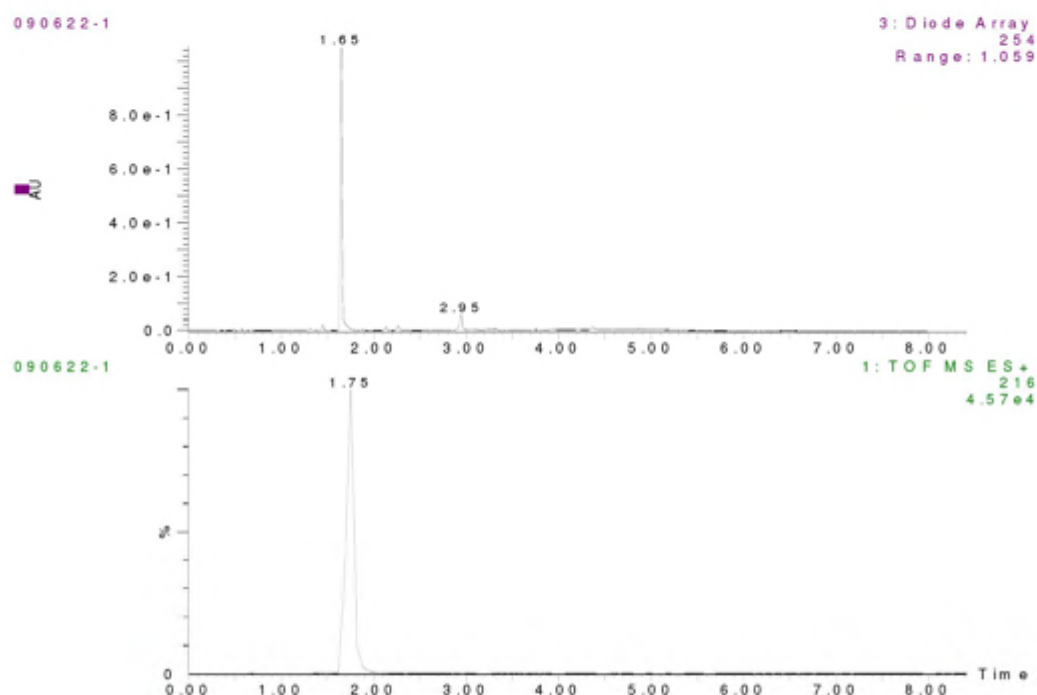


实验中实现，因此，在本章中未对抗体特异性进行分析。

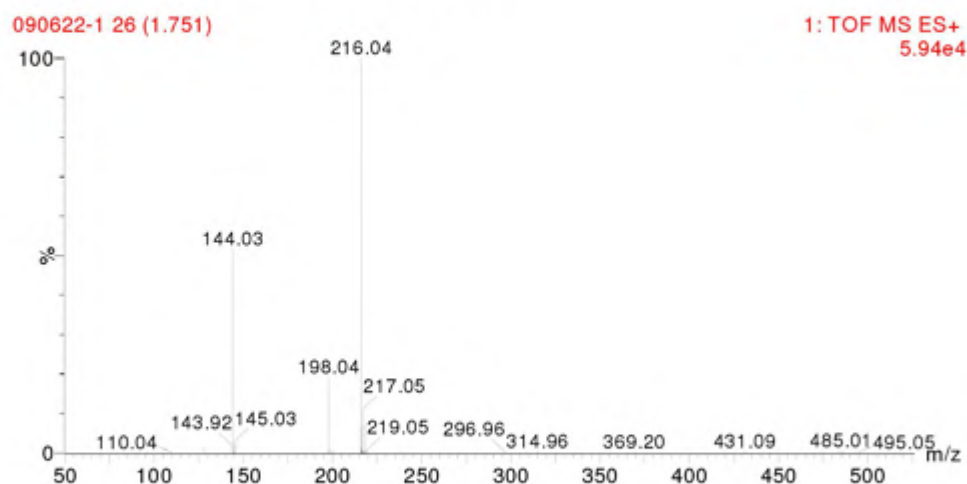
## 2.3 结果与分析

### 2.3.1 半抗原合成与结构鉴定

#### 2.3.1.1 半抗原 MEL-MCA 的合成与鉴定



(a) 液相色谱图



(b) 质谱图

图 2-4 (a) MEL-MCA 的液相图 (b) MEL-MCA 的质谱图

Fig.2-4 (a) the LC spectrum of MEL-MCA; (b) the MS spectrum of MEL-MCA

图 2-4 是反应得到的半抗原 MEL-MCA 的液质联用图谱。从液相图中可见在 1.65min 时有一个较强的出峰，且主要为一个峰，未见其他杂峰，说明得到的物质纯度比较高。CDT 分子量为 145，3-巯基丙酸分子量为 106，衍生产物 MEL-MCA 分子量为 215，在质谱图中可以看到，正离子液相 1.75min 出现的峰，其质谱图中含有 m/z 为 216 的碎片，推测其应为 M+1 峰，据此可推断半抗原 MEL-MCA 衍生化成功。

### 2.3.1.2 半抗原 MEL-ACA 的合成与鉴定

图 2-5 是半抗原 MEL-ACA 的液质联用图谱。从液相图中可见在 2.51min 时有一个较强的出峰，且主要为一个峰，未见其他杂峰，说明得到的物质纯度比较高。CDT 分子量为 145，6-氨基己酸分子量为 131，衍生产物 MEL-ACA 分子量为 240，在质谱图中可以看到，正离子液相 2.529min 出现的峰，其质谱图中含有  $m/z$  为 241 的碎片，推测其应为  $M+1$  峰，据此可推断半抗原 MEL-ACA 衍生化成功。

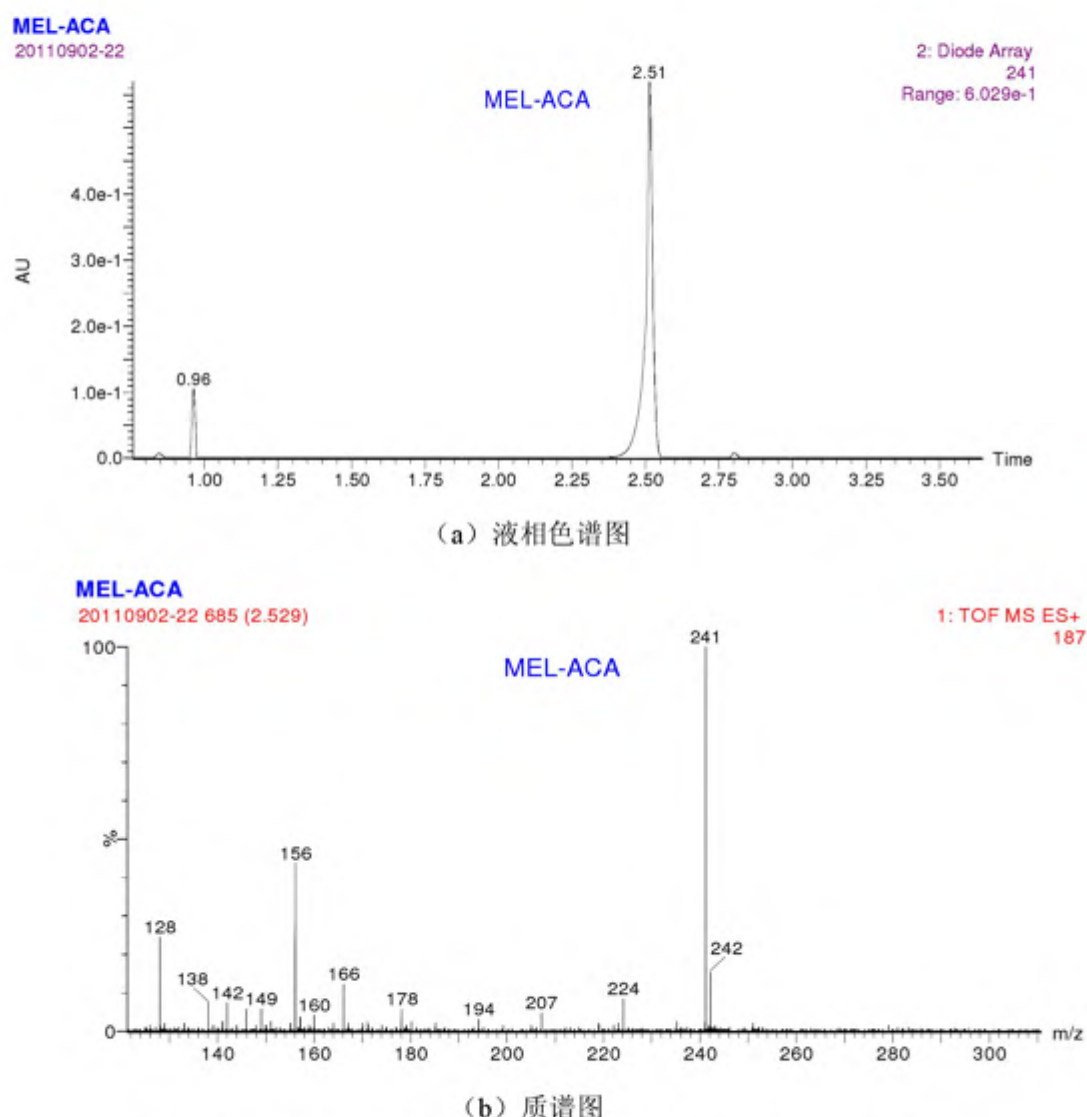


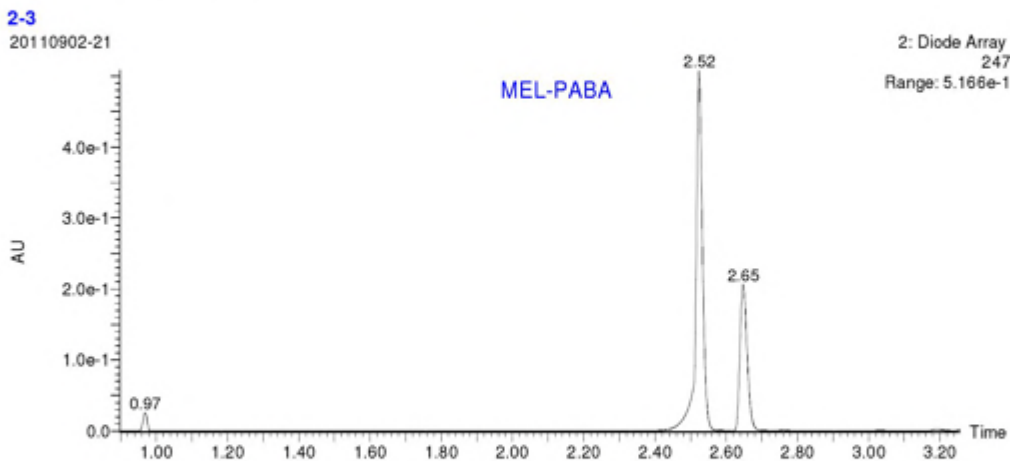
图 2-5 (a) MEL-ACA 的液相图 (b) MEL-ACA 的质谱图

Fig.2-5 (a) the LC spectrum of MEL-ACA; (b) the MS spectrum of MEL-ACA

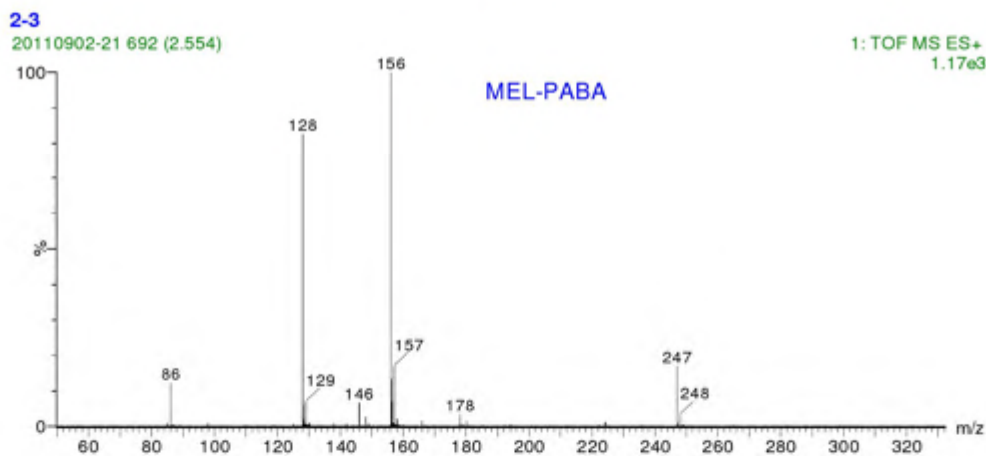
### 2.3.1.3 半抗原 MEL-PABA 的合成与鉴定

图 2-6 是半抗原 MEL-PABA 的液质联用图谱。从液相图中可见在 2.52min 时有一个较强的出峰，说明在此时间内有较强紫外吸收的物质产生，在 2.65min 时有一较弱峰出现，提示得到的产物中还有少量杂质。CDT 分子量为 145，对氨基苯甲酸分子量为 137，衍生产物 MEL-PABA 分子量为 246，在质谱图中可以看到，正离子液相 2.554min 出现

的峰，其质谱图中含有  $m/z$  为 247 的碎片，推测其应为  $M+1$  峰，据此可推断半抗原 MEL-PABA 衍生化成功。



(a) 液相色谱图



(b) 质谱图

图 2-6 (a) MEL-PABA 的液相图 (b) MEL-PABA 的质谱图

Fig.2-6 (a) the LC spectrum of MEL-PABA; (b) the MS spectrum of MEL-PABA

## 2.3.2 人工抗原的合成与鉴定

### 2.3.2.1 免疫原的鉴定

#### 1. 免疫原 MEL-MCA-BSA 的鉴定

从图 2-7 中可以看出，半抗原 MEL-MCA 特征吸收峰在 234nm，载体蛋白 BSA 特征吸收峰在 278nm，偶联物 MEL-MCA-BSA 兼具半抗原 MEL-MCA 和 BSA 的特征吸收峰，且呈现图谱叠加趋势，由此可认为人工抗原 MEL-MCA-BSA 合成成功，可用于下一步的免疫试验，并计算得到该人工抗原的偶联率为 24。

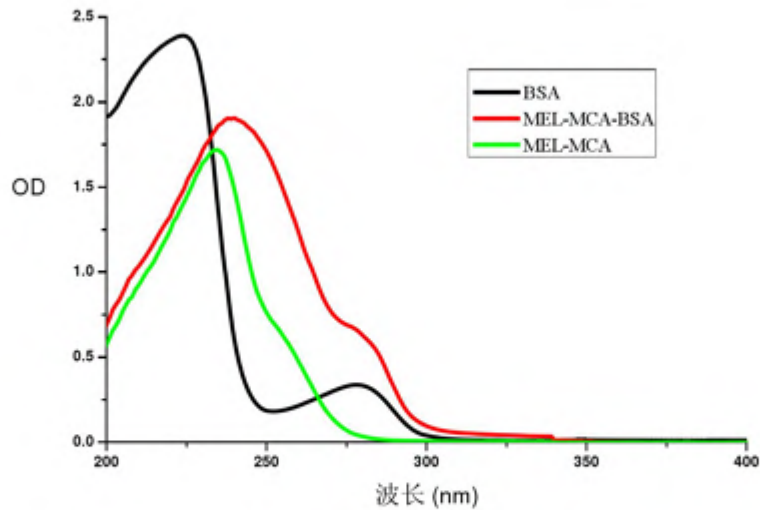


图 2-7 人工抗原 MEL-MCA-BSA 的紫外扫描图

Fig.2-7 Ultraviolet spectrum of the antigen MEL-MCA-BSA

### 2. 免疫原 MEL-ACA-BSA 的鉴定

从图 2-8 中可以看出，半抗原 MEL-ACA 特征吸收峰在 239nm，载体蛋白 BSA 特征吸收峰在 278nm，偶联物 MEL-ACA-BSA 兼具半抗原 MEL-ACA 和 BSA 的特征吸收峰，且呈现图谱叠加趋势，由此可认为人工抗原 MEL-ACA-BSA 合成成功，可用于下一步的免疫试验，并计算得到该人工抗原的偶联率为 29。

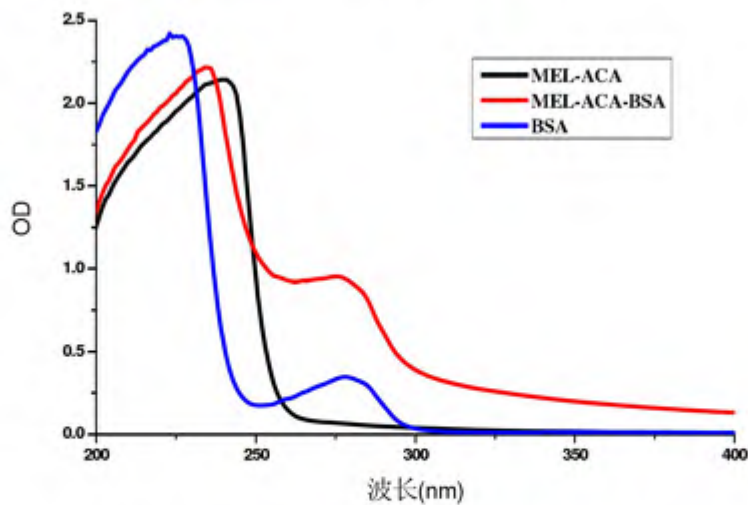


图 2-8 人工抗原 MEL-ACA-BSA 的紫外扫描图

Fig.2-8 Ultraviolet spectrum of the antigen MEL-ACA-BSA

### 3. 免疫原 MEL-PABA-BSA 的鉴定

从图 2-9 中可以看出，半抗原 MEL-PABA 在 217nm 和 254nm 波长处存在特征吸收峰，载体蛋白 BSA 特征吸收峰在 278nm，偶联物 MEL-PABA-BSA 在 220-300nm 波长范围内兼具半抗原 MEL-PABA 和 BSA 的特征吸收峰，且呈现图谱叠加趋势，与原蛋白 BSA 相比在 254nm 处有一明显的吸收峰，这是由于 BSA 偶联上较多半抗原分子后所表现出的半抗原特征吸收。由此可认为人工抗原 MEL-PABA-BSA 合成成功，可用于下一



步的免疫试验，并计算得到该人工抗原的偶联率为 31。

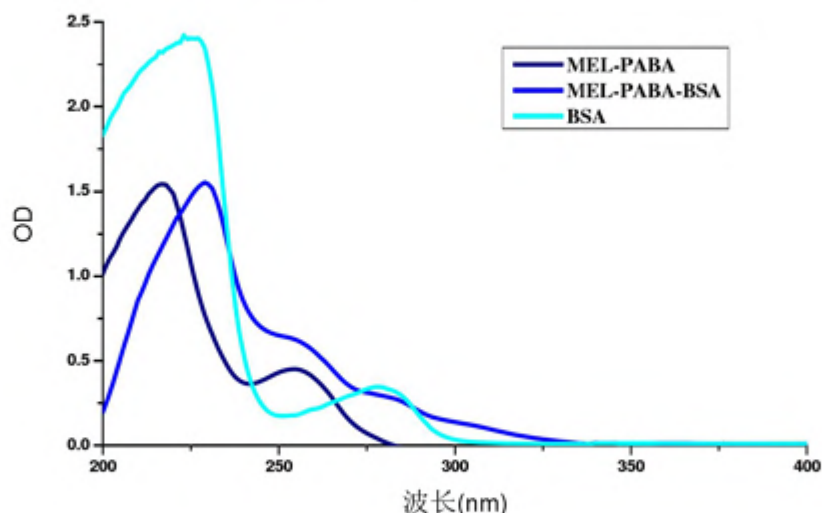


图 2-9 人工抗原 MEL-PABA-BSA 的紫外扫描图

Fig.2-9 Ultraviolet spectrum of the antigen MEL-PABA-BSA

### 2.3.2.2 包被原的鉴定

#### 1. 包被原 MEL-MCA-OVA 的鉴定

从图 2-10 中可以看出，半抗原 MEL-MCA 特征吸收峰在 234nm，载体蛋白 OVA 特征吸收峰在 278nm，偶联物 MEL-MCA-OVA 兼具半抗原 MEL-MCA 和 OVA 的特征吸收峰，且呈现图谱叠加趋势，由此可认为人工抗原 MEL-MCA-OVA 合成成功，可用于下一步的免疫试验，并计算得到该人工抗原的偶联率为 13.3。

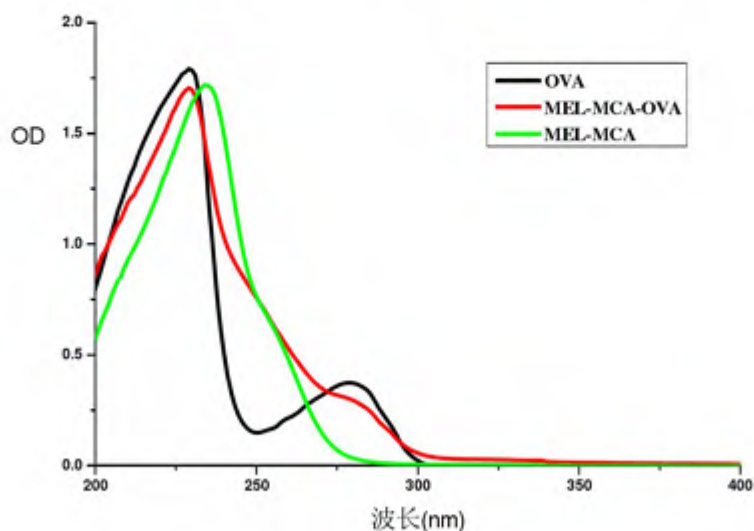


图 2-10 人工抗原 MEL-MCA-OVA 的紫外扫描图

Fig.2-10 Ultraviolet spectrum of the antigen MEL-MCA-OVA

#### 2. 包被原 MEL-ACA-OVA 的鉴定

从图 2-11 中可以看出，半抗原 MEL-ACA 特征吸收峰在 239nm，载体蛋白 OVA 特征吸收峰在 278nm，偶联物 MEL-ACA-OVA 兼具半抗原 MEL-ACA 和 OVA 的特征吸收

峰，且呈现图谱叠加趋势，由此可认为人工抗原 MEL-ACA-OVA 合成成功，可用于下一步的免疫试验，并计算得到该人工抗原的偶联率为 16。

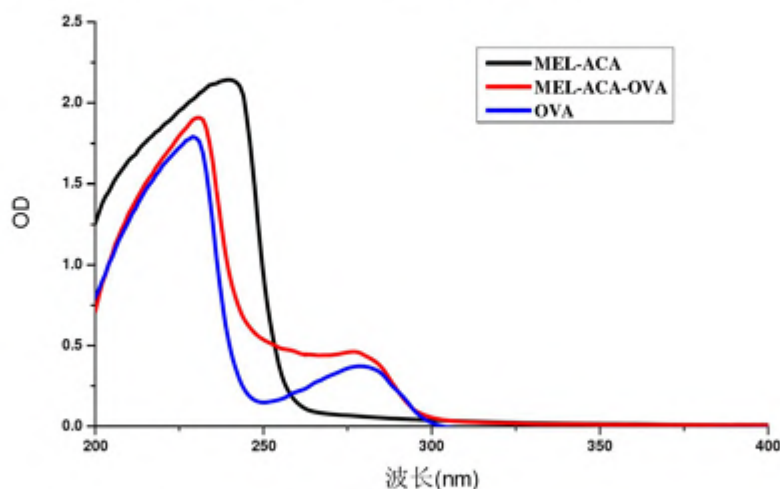


图 2-11 人工抗原 MEL-ACA-OVA 的紫外扫描图

Fig.2-11 Ultraviolet spectrum of the antigen MEL-ACA-OVA

### 3. 包被原 MEL-PABA-OVA 的鉴定

从图 2-12 中可以看出，半抗原 MEL-PABA 在 217nm 和 254nm 波长处存在特征吸收峰，载体蛋白 OVA 特征吸收峰在 278nm，偶联物 MEL-PABA-OVA 在 220-300nm 波长范围内兼具半抗原 MEL-PABA 和 OVA 的特征吸收峰，且呈现图谱叠加趋势，在 254nm 处的吸收值明显高于原蛋白，这是由于 OVA 偶联上较多半抗原分子后所表现出的半抗原特征吸收。由此可认为人工抗原 MEL-PABA-OVA 合成成功，可用于下一步的抗体检测，并计算得到该人工抗原的偶联率为 19。

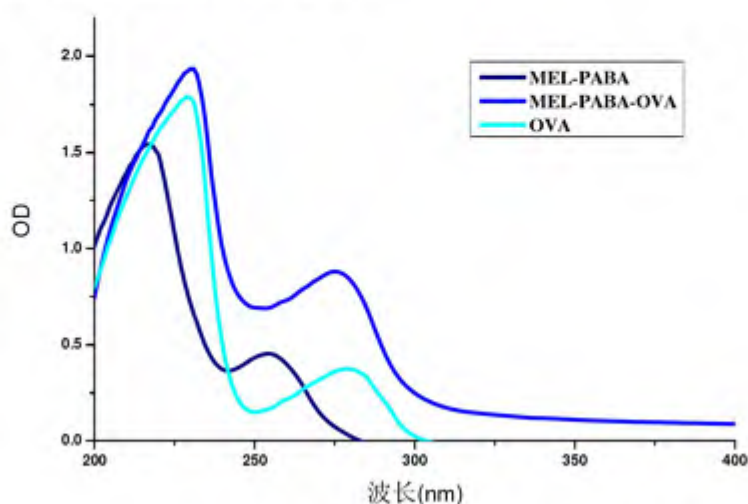


图 2-12 人工抗原 MEL-PABA-OVA 的紫外扫描图

Fig.2-12 Ultraviolet spectrum of the antigen MEL-PABA-OVA

### 2.3.3 多克隆抗体的鉴定

#### 2.3.3.1 抗血清效价

制备高亲和性的抗体是建立高效灵敏的免疫检测技术的前提。按照间接 ELISA 方

阵法测定所得抗血清的效价，选取 1 $\mu$ g/ml 包被原浓度进行包板，OD<sub>450nm</sub> 值大于等于阴性对照孔 OD<sub>450nm</sub> 值的 2.1 倍对应的抗血清稀释倍数即为抗血清的效价，OD<sub>450nm</sub> 值比较见表 2-2。数据表明，采用同源 ELISA 系统进行检测时，三种免疫原的免疫效果并无明显差异，这与 Kim<sup>[16]</sup>等关于半抗原连接臂长度在 3-6 个碳原子之间时免疫效果无明显差异的理论相一致。

表 2-2 抗血清免疫效果比较 (OD<sub>450nm</sub> 测定值)

Table2-2 Compare of antiserum titer values (OD<sub>450nm</sub> values)

| 三种免疫原        | 抗血清    | 三种包被原       |             |              |
|--------------|--------|-------------|-------------|--------------|
|              |        | MEL-MCA-OVA | MEL-ACA-OVA | MEL-PABA-OVA |
| MEL-MCA-BSA  | MCA-1  | 0.928±0.01  | 0.495±0.00  | 0.385±0.01   |
|              | MCA-2  | 0.867±0.01  | 0.456±0.02  | 0.398±0.02   |
| MEL-ACA-BSA  | ACA-1  | 0.797±0.00  | 1.176±0.01  | 0.875±0.00   |
|              | ACA-2  | 0.756±0.01  | 1.167±0.01  | 0.848±0.01   |
| MEL-PABA-BSA | PABA-1 | 1.032±0.01  | 0.521±0.01  | 1.489±0.01   |
|              | PABA-2 | 1.164±0.02  | 0.574±0.01  | 1.466±0.00   |

实验结果表明，MEL-PABA-BSA 免疫原所获得的血清效价最高，为 729000 倍；MEL-MCA-BSA 免疫原所获得的血清效价较低，为 81000 倍。三种免疫原均能产生效价高的抗血清，表明三种免疫原的免疫效果并无明显差异。对于同一种抗血清，分别采用同源性和异源性 ELISA 系统检测<sup>[17]</sup>，结果表明同源性的包被原所测得的效价明显高于异源性包被原所测得的效价，这可能是因为同源性的免疫原和包被原配对检测时具有较高的亲和性。

### 2.3.3.2 半抗原结构与抗体灵敏度

抗体质量好坏影响各种免疫检测技术的灵敏度，最直接的指标是其 IC<sub>50</sub> 值的高低。IC<sub>50</sub> 值越低，所获得的抗血清质量越好，所建立的免疫检测方法灵敏度就越高；反之，IC<sub>50</sub> 值越高，则得到的抗血清质量越差，以此建立的免疫检测方法灵敏度就越低。

表 2-3 抗体灵敏度的比较 (IC<sub>50</sub> 值: ng/mL)

Table2-3 Compare of IC<sub>50</sub> values of antibodies (ng/mL)

| 三种免疫原        | 抗血清    | 三种包被原       |             |              |
|--------------|--------|-------------|-------------|--------------|
|              |        | MEL-MCA-OVA | MEL-ACA-OVA | MEL-PABA-OVA |
| MEL-MCA-BSA  | MCA-1  | 5280        | 3568        | -            |
|              | MCA-2  | 6720        | 4834        | -            |
| MEL-ACA-BSA  | ACA-1  | 3758        | 1823        | 198          |
|              | ACA-2  | 4497        | 2230        | 220          |
| MEL-PABA-BSA | PABA-1 | 3542        | 6572        | -            |
|              | PABA-2 | 4259        | 7841        | -            |

三种免疫原得到的抗血清与包被原的各种组合对三聚氰胺进行检测的 IC<sub>50</sub> 值见表 2-3。一般而言，采用异源包被可以提高免疫检测方法的灵敏度。本实验结果表明，对于 MEL-ACA-BSA 免疫原而言，MEL-ACA-BSA 免疫原/ MEL-PABA-OVA 包被原异源组合的 IC<sub>50</sub> 值最低，约为 200 ng/mL，明显低于 MEL-ACA-BSA 免疫原/ MEL-ACA-OVA

包被原同源组合的  $IC_{50}$  值 (约为  $2 \mu\text{g/mL}$ )，而另一种异源组合 MEL-ACA-BSA 免疫原/MEL-MCA-OVA 包被原的  $IC_{50}$  值 (约  $4.5 \mu\text{g/mL}$ ) 却很高，这说明，异源包被原检测可能会提高检测的灵敏度，但包被半抗原结构的选择仍需要实验筛选。同时，MEL-PABA-BSA 免疫原获得的抗血清效价最高，MEL-ACA-BSA 免疫原的异源免疫分析法检测灵敏度最好，这表明抗血清效价的高低与抗体的灵敏度之间并无直接关系。

## 2.4 讨论

### 2.4.1 半抗原结构设计

三聚氰胺是一种小分子化合物，本身无免疫原性，必需将其与大分子载体偶联才有可能刺激动物免疫系统获得特异性识别三聚氰胺的抗体。根据其化学结构特点，虽然三聚氰胺本身含有三个氨基，可直接与载体蛋白的末端-COOH 进行偶联反应，但是，应该考虑到三聚氰胺分子中氮杂环结构比较稳定，其上三个伯氨基相连的都是双键，氨基去质子化的倾向很低，活化困难，即使将其活化成功并与载体蛋白偶联，其偶联效率极低且完全抗原结构中也缺乏必要的手臂结构，目标物特征结构被载体所包埋，免疫系统对目标物不能识别，从而导致免疫失败。

因此，对三聚氰胺半抗原的设计与合成应考虑选取合适的三聚氰胺类似物为半抗原，对其进行结构改造，引入合适长度的末端带有-COOH 或者-NH<sub>2</sub> 活性基团的手臂结构，然后再与载体蛋白的末端-NH<sub>2</sub> 或-COOH 发生共价偶联反应制备完全抗原。本实验选取三聚氰胺类似物 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪 (2-Chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine, CDT) 作为半抗原进行结构改造，因其分子中 Cl 取代基较为活泼，容易发生反应。

根据现有理论，半抗原手臂结构长度在 3-6 个碳原子为宜，且免疫效果并无明显差异<sup>[16]</sup>。在半抗原设计时，我们着重考虑半抗原连接手臂位点邻近基团的变化对免疫效果的差异。首先将所有半抗原手臂结构长度保持在 3-6 个碳原子之间，同时，为了摒除不同的偶联方法对免疫效果的影响，将半抗原连接手臂末端全部设计为-COOH 活性基团。这些设计都有利于研究半抗原连接手臂位点邻近基团的变化对免疫效果的差异。

### 2.4.2 偶联比

对于分子量小于 1000 的化合物，其本身不具有免疫原性，需要与载体大分子蛋白偶联制备完全抗原才能刺激动物机体免疫系统得到抗血清。常用的载体蛋白为牛血清白蛋白 BSA，卵清蛋白 OVA，钥孔血蓝蛋白 KLH 等，其中 BSA 免疫原性强，理化性质稳定，常作为免疫原载体蛋白；OVA 免疫原性稍弱，常作为包被原载体蛋白使用。

研究表明，载体蛋白与半抗原的最佳分子结合比即两者的偶联率对抗体的产生和质量有着重要影响。关于最佳偶联比，不同研究者的结果有所不同，吴松如等<sup>[18]</sup>提出最佳半抗原与载体偶联率以 3~45:1 为好，而 Eilange<sup>[19]</sup>则认为偶联率在 5~25:1 之间最佳。偶联比过高，并不能得到更好的抗体，可能是因为过多的半抗原分子不利于载体蛋白与淋巴细胞结合，影响载体刺激免疫系统，不能产生免疫应答；偶联比过低，不能有效刺激免疫反应，不利于抗体的产生。对于三聚氰胺，Yin 等<sup>[20]</sup>以三聚氰胺为原料通过衍生



化制备出半抗原,采用碳二亚胺法与甲状腺球蛋白偶联制备出完全抗原,其偶联比为 1:26,免疫动物得到单克隆抗体性状良好,其  $IC_{50}$  为 22.6 ng/ml;何方洋<sup>[21]</sup>等通过重氮化法制备三聚氰胺-BSA 完全抗原,其偶联比为 1:48;本研究制备的三种免疫原的偶联率分别为 1:24, 1:29, 1:31,均具有良好的免疫性能。

### 2.4.3 抗体的制备与鉴定

本实验将三种免疫原免疫兔子得到多克隆抗体,并采用异源和同源 ELISA 检测系统分别对获得的多克隆抗体进行了分析。

实验结果表明,三种半抗原所获得的抗血清就抗体亲和性而言其免疫效果并无明显差异,MEL-PABA-BSA 免疫原得到的抗体亲和性最高,其次是 MEL-ACA-BSA 免疫原,MEL-MCA-BSA 免疫原得到的抗体亲和性最低;在抗体灵敏度方面,MEL-ACA-BSA 抗体/MEL-PABA-OVA 包被原组合的灵敏度最高( $IC_{50}$  为 200 ng/mL),这可能是由于半抗原连接位点附近的取代基不同或者半抗原与连接手臂形成的空间结构对抗原抗体的结合有重要影响而产生的。MEL-PABA 半抗原结构与 MEL-ACA 半抗原结构相差较大,而三聚氰胺结构与 MEL-ACA 免疫半抗原结构差异较小,在竞争 ELISA 系统中,MEL-PABA-OVA 包被原容易被三聚氰胺替换而产生,但是好的异源组合需要必要的筛选工作,这与文献报道相一致<sup>[22]</sup>。

## 2.5 本章小结

1. 设计合成并鉴定了三种半抗原: MEL-MCA, MEL-ACA 和 MEL-PABA;采用活性酯法制备并鉴定了三种免疫原: MEL-MCA-BSA, MEL-ACA-BSA 和 MEL-PABA-BSA;采用混合酸酐法制备并鉴定了三种包被原: MEL-MCA-OVA, MEL-ACA-OVA 和 MEL-PABA-OVA。

2. 动物免疫试验表明,三种免疫原均具有良好的免疫性能,其中 MEL-PABA-BSA 免疫原得到的抗血清亲和性最好; MEL-ACA-BSA 免疫原得到的抗血清灵敏度最好,异源 ELISA 免疫分析检测的  $IC_{50}$  为 200 ng/mL;制备的三种免疫原可用于制备抗三聚氰胺单克隆抗体,为建立有效检测三聚氰胺的免疫分析方法提供有力支持。

## 参考文献

1. 胥传来. 食品免疫学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008. 45-78.
2. Morozova V.S., Levashova A.I., Ermin S.A. Determination of Pesticides by Enzyme Immunoassay [J]. *Journal of Analytical Chemistry*. 2005, 60(3):202-217.
3. 江汉湖. 食品免疫学导论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 132-133.
4. Goodrow M.H., Harrison R.O., Hammock B.D. Hapten Synthesis, Antibody Development, and Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay for s-Triazine Herbicides [J]. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38: 990-996.
5. Muldoon M.T., Huang R.Nan, Hapeman C.J., et al. Hapten Synthesis and Immunoassay Development for the Analysis of Chlorodiamino-s-triazine in Treated Pesticide Waste and Rinsate [J]. *J. Agric. Food*

- Chem. 1994, 42: 747-755.
6. Zhang Q., Li T.J., Zhu X.X., et al. The Determination of N-methylcarbamate Insecticide Metolcarb by Enzyme-linked Immunosorbent Assay [J]. Chinese J. of Anal. Chem. 2006, 34:178-182.
  7. Schneider C., Heinz F.S., Schneider R.J. A novel Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Ethynylestradiol using a long-chain Biotinylated EE2 Derivative [J]. Steroids, 2004, 69(4): 245-253.
  8. Yoshino Nishiguchi, Yoshiharu Kobayashi. Enzyme Immunoassay for Serum Dexamethasone using 4-(Carboxymethylthio) Dexamethasone as a New Hapten [J]. Steroids, 1992, 57:178-181.
  9. Kamps-Holtzapfle C., Carlin R.J., Sheffield C., et al. Analysis of hapten-carrier protein conjugates by nondenaturing gel electrophoresis [J]. Journal of Immunological Methods, 1993, 164:245-253.
  10. Erlanger B.F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: A Survey [J]. Methods in Enzymology, 1980, 70: 85-103.
  11. Kim Y.J., Cho Y.A., Lee H.S., Lee Y.T. Investigation of the effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion [J]. Anal. Chim. Acta, 2003, 494:29-40.
  12. 袁媛. 糖皮质激素多残留免疫研究与量子点在免疫分析中的应用[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2008.
  13. 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 北京科学出版社, 2002.
  14. 董志伟, 王琰. 抗体工程[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2002.
  15. 刘凤权, 许志刚, 王金生. 定量测定甲胺磷残留的间接竞争 ELISA 的建立和初步应用[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(2):140-146.
  16. Kim Y.J., Cho Y.A., Lee H.S., et al. Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity [J]. Anal Chim. Acta, 2003, 475(1-2): 85-96.
  17. Holthues H, Pfeifer-Fukumura U, Sound I, et al. Evaluation of the concept of heterology in a monoclonal antibody-based ELISA utilizing direct hapten linkage to polystyrene microtiter plates [J]. Journal of Immunological Methods, 2005, 304(1-2): 68-77.
  18. 吴松如, 万寅生. 植物小分子物质的免疫检测技术[J]. 植物生理通讯, 1999, 5:68-72.
  19. Eilange B F. The preparation of antigenic hapten carrier conjugates [J]. A Servey, Methods in Enzymology, 1980, 70:85-104.
  20. Weiwei Yin, Jinting Liu, Taichang Zhang, et al. Preparation of Monoclonal Antibody for Melamine and Development of an Indirect Competitive ELISA for Melamine Detection in Raw Milk, Milk Powder, and Animal Feeds [J]. J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 8152-8157.
  21. 何方洋, 万宇平, 罗晓琴等. 三聚氰胺单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 吉林畜牧兽医, 2010,31(3):7-9.
  22. 张奇. 倍硫磷和速灭威半抗原分子设计及其免疫效果研究[D]: [博士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2007.

## 第三章 三聚氰胺单克隆抗体的制备与鉴定

### 3.1 引言

抗体是所有免疫检测技术的核心试剂，制备高灵敏度和高特异性的抗体是小分子免疫分析技术的关键点和难点。自 1890 年 Behring<sup>[1]</sup>等发现免疫动物的血清中含有抗体起至今，抗体已经超越传统的定义出现了各种人工模拟抗体，但是，通过免疫动物获得抗体仍是经典的生产抗体途径。

Kohler 和 Milstein 于 1975 年建立了 B 淋巴细胞杂交瘤技术，将具有分泌抗体功能但不能自身繁殖的脾细胞与不具有分泌抗体能力但在体外可无限繁殖的骨髓瘤细胞融合，得到杂交瘤细胞，从而实现抗体在体外的无限生产，所得到的抗体是由识别单一抗原决定簇的杂交瘤细胞分泌的，故称为单克隆抗体<sup>[2]</sup>。该项技术具有巨大的生命力和发展前景，被誉为抗体生产技术的一次重大革命。与多克隆抗体相比，单克隆抗体具有更强的特异性识别能力，而这种特异性识别能力可通过人工筛选而获得，从而制备出特异识别某一特定化合物或者特异识别某一类化合物共有结构的单克隆抗体<sup>[3]</sup>。随着越来越多的食品污染事件和检测物质的增多，单克隆抗体在食品污染物免疫检测分析中发挥着越来越大的作用。

本实验将第二章制备的三种免疫原，通过免疫 BLBA/C 小鼠，用杂交瘤技术筛选出特异性分泌抗三聚氰胺的杂交瘤细胞株，并通过体内诱生腹水的方法制备抗三聚氰胺单克隆抗体，为建立三聚氰胺免疫检测方法奠定基础。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 药品与试剂

三聚氰胺 (Melamine, MEL)，灭蝇胺，CDT，阿特拉津，PEG1500，DMSO (生化纯)，完全弗氏佐剂，不完全弗氏佐剂均是购自 Sigma 产品；快速佐剂，北京康碧泉生物科技有限公司；RPMI 1640 细胞培养基，HAT 培养基 (50×)，HT 培养基 (100×)，胎牛血清，L-谷氨酰胺，双抗，均为 Gibco 产品；鼠 IgG 亚类检测试剂盒 (RS 200)，为美国 EnviroLogix 公司产品。

#### 3.2.2 主要仪器与设备

DMIRB 倒置生物显微镜 (德国 Leica 公司)；MuLtiskan Mks 型酶标仪 (Thermo LabSystems 公司)；96 孔，24 孔和 6 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司)；Costar92592 可拆酶标板 (上海吉泰生物科技有限公司)；超净工作台 (苏州净化设备有限公司)；CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo LabSystems 公司)；LDZX-50KB 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂)；TGL-40B 台式低速离心机 (上海安亭科学仪器厂)；XMIB 型电热恒温水浴锅 (上海沪西分析仪器厂)。



### 3.2.3 主要溶液

#### 3.2.3.1 细胞培养相关溶液

1. RPMI-1640 完全培养基: RPMI-1640 基础培养基+ 10% 胎牛血清 + 1% 双抗。
2. HT 培养液: RPMI-1640 基础培养液+ 1% HT 浓缩液(100×) + 20% 胎牛血清 + 1% 双抗。
3. HAT 培养液: RPMI-1640 基础培养液+ 2% HAT 浓缩液(50×) + 20% 胎牛血清 + 1% 双抗。
4. 细胞冻存液: 10% DMSO + 20% 胎牛血清 + 70% RPMI-1640 基础培养基。
5. 0.4%台盼蓝溶液: 0.4 g 台盼蓝溶于 100 mL 灭菌水。
6. L-谷氨酰胺溶液 (0.2 mol/L): 称取谷氨酰胺 2.9 g, 溶于 100 mL 超纯水中, 过滤除菌后分装于 1 mL 离心管, -20°C 保存。

#### 3.2.3.2 抗体纯化相关溶液配制

1. 饱和硫酸铵溶液: 称取 500g 硫酸铵加入 500ml 蒸馏水中, 加热至完全溶解, 室温过夜, 析出的结晶任其留在瓶中。临用前取所需的量, 用 2mol/L NaOH 调 pH 至 7.8。
2. 醋酸缓冲液 (0.06 mol/L, pH 5.0): 取无水乙酸钠 1.4765g, 加入 4.68ml 冰乙酸, 用纯水完全溶解并定容至 100ml。
3. 磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L PBS, pH 7.4): NaCl 80g, KCl 2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  36.2g, 溶于超纯水, 全部溶解后, 定容至 1000 mL, 用时稀释 10 倍即可。

#### 3.2.3.3 ELISA 检测相关溶液配制 (见第二章 2.2.3)

### 3.2.4 实验动物和细胞

BALB/C 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心; SP2/0 骨髓瘤细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

### 3.2.5 实验方法

#### 3.2.5.1 小鼠免疫

选择 6-8 周龄, 雌性 BALB/C 小鼠为免疫动物, 采用弗氏佐剂和快速佐剂两种佐剂进行免疫, 将第二章制备的三种免疫原各免疫小鼠 5 只 (编号从 1-15)。弗氏佐剂免疫方法为: 首免取适量免疫原与等体积弗氏完全佐剂混合, 乳化好后经颈背部皮下多点注射免疫, 每间隔 3 周加强免疫一次, 待血清效价达到要求后采用腹腔注射进行冲击免疫, 免疫方案见表 3-1。



表 3-1 BALB/C 小鼠弗氏佐剂免疫方案

Table 3-1 Immunization protocol of BALB/c mice by Freund's adjuvant

| 免疫时间 | 抗原类型        | 免疫剂量                 | 免疫途径      |
|------|-------------|----------------------|-----------|
| 首免   | 免疫原+弗氏完全佐剂  | 100 $\mu\text{g}$ /只 | 颈背部皮下多点注射 |
| 二免   | 免疫原+弗氏不完全佐剂 | 100 $\mu\text{g}$ /只 | 颈背部皮下多点注射 |
| 三免   | 免疫原+弗氏不完全佐剂 | 100 $\mu\text{g}$ /只 | 颈背部皮下多点注射 |
| 四免   | 免疫原+弗氏不完全佐剂 | 100 $\mu\text{g}$ /只 | 颈背部皮下多点注射 |
| 冲击免疫 | 免疫原         | 50 $\mu\text{g}$ /只  | 腹腔注射      |

快速佐剂免疫方法为：首免取适量免疫原与等体积快速佐剂混合，不需乳化小鼠腿部肌肉直接注射，间隔 21 天后同法加强免疫一次，10 天后取血检测，选择小鼠进行冲击免疫，免疫方案见表 3-2。

表 3-2 BALB/C 小鼠快速佐剂免疫方案

Table 3-2 Immunization protocol of BALB/C mice by quick adjuvant

| 免疫时间 | 抗原类型            | 免疫剂量                 | 免疫途径   |
|------|-----------------|----------------------|--------|
| 首免   | <u>免疫原+快速佐剂</u> | 100 $\mu\text{g}$ /只 | 腿部肌肉注射 |
| 二免   | <u>免疫原+快速佐剂</u> | 100 $\mu\text{g}$ /只 | 腿部肌肉注射 |
| 冲击免疫 | 免疫原             | 50 $\mu\text{g}$ /只  | 腹腔注射   |

### 3.2.5.2 效价和抑制水平测定

弗氏佐剂免疫小鼠三免后第 10 天，快速佐剂免疫小鼠二免后第 10 天，小鼠经断尾采血分离血清，采用间接 ELISA 法测定血清效价（方法同第二章 2.2.5.3），采用间接竞争 ELISA 法测定血清灵敏度（方法同第二章 2.2.5.3）。选择  $\text{IC}_{50}$  值最低且血清效价大于 10000 的小鼠用于细胞融合。

### 3.2.5.3 杂交瘤细胞株的建立

参照文献并进行改进<sup>[4-7]</sup>，具体步骤为：

#### 1. 骨髓瘤细胞培养

从  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中取出冻存的 SP2/0 骨髓瘤细胞，立即投入  $38^{\circ}\text{C}$  水浴，并轻轻摇动使其在 1min 内融化，1000 rpm，离心 10min，弃去上清，缓慢加入 1ml RPMI 1640 完全培养液并轻吸混匀，转入细胞培养瓶补加培养液至 4ml，置于  $37^{\circ}\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养。融合前 1 天，进行细胞换液并使细胞保持在对数生长阶段。融合当天，将骨髓瘤细胞收集于 50ml 离心管内，1200 rpm，5min，弃去上清；加入 20ml 基础培养液，轻击管底使细胞团分散，1200 rpm，5min，弃去上清；将细胞重悬浮于 10ml RPMI 1640 基础培养基中。取 100  $\mu\text{l}$  悬液，稀释 10 倍后加等体积 0.4% 台酚蓝染液进行活细胞计数，细胞活力应大于 95%。

#### 2. 饲养细胞的制备

本实验采用小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞，在融合前一天制备。将未免疫，健康

的 BALB/C 小鼠摘除眼球取血，制备阴性血清，随后拉颈脱臼致死，并浸泡于 75% 酒精中 5min；转移至无菌超净台内，将小鼠腹部向上无菌打开腹腔，用移液器吸取 5 mL 基础培养液注入腹腔，轻轻的反复抽吸腹腔内培养液并收集于 50ml 离心管内，1200 rpm，离心 5min，弃上清；轻击管底弹松离心管底部细胞，并用 HAT 培养液重悬细胞，每孔 100ul 加到 96 孔细胞培养板中，置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 3. 免疫脾细胞的制备

将挑选出用于细胞融合的小鼠于融合前三天进行冲刺免疫。融合当天，小鼠摘除眼球取血，颈椎脱臼法处死后浸泡于 75% 的酒精中 5min；转至超净工作台，无菌取出脾脏，置于 200 目铜网上研磨，制备脾细胞悬液并收集于 50ml 离心管内；1200rpm，离心 5min，弃上清，用 RPMI 1640 基础培养液同法离心洗涤 3 次；弃上清，用 10ml RPMI 1640 基础培养液重悬细胞；取出 100ul 悬液，稀释 10 倍后用 0.4% 台盼蓝染色计数活细胞，一般细胞数量应达到 10<sup>8</sup> 为宜。

### 4. 细胞融合

按照常规方法进行细胞融合，具体步骤为：将脾细胞与骨髓瘤细胞按 5-10: 1 的比例混合于 50ml 融合管中，补加 RPMI 1640 基础培养基至 30 ml，用移液器轻轻吹吸充分混匀；1200 rpm，离心 5min，将上清尽量吸净；轻击离心管底部将沉淀细胞松散成糊状，握于手心预热；在 1min 内滴加预热至 37°C 的 50% PEG (PH 8.0) 1ml，边加边轻轻摇动；手心紧握静置 1min；1min 内滴加 RPMI 1640 基础培养液 1ml，边加边轻轻摇动；随后 5min 内滴加 RPMI 1640 基础培养基至 20 ml；手心紧握静置 5min；800 rpm，离心 6min，弃去上清；加入 HAT 培养液，使沉淀细胞悬浮并轻轻混匀；将细胞悬浮液加于 96 孔细胞培养板，每孔 100ul，置 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

### 5. 杂交瘤细胞筛选

细胞融合当天为 0 天，每隔 3-4 天进行换液，第 4 天用 HAT 培养液半换液，第 7、10 天用 HT 培养液半换液。经常观察杂交瘤细胞生长情况，待其长至孔底面积 1/10 以上时吸出上清供抗体检测（约在培养第 10~11 天）。对于小分子物质，首先用间接 ELISA 法进行初筛（同时设置阳性对照孔和阴性对照孔），再用间接竞争 ELISA 法对初次筛选到的阳性孔进行检测，选择强阳性、强特异性、细胞生长良好的孔进行亚克隆。

### 6. 阳性杂交瘤细胞克隆

采用有限稀释法对筛选到的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆。亚克隆前一天制备饲养细胞并铺于 96 孔细胞培养板，所用培养液为 HT 培养液；将待亚克隆的阳性杂交瘤细胞制成细胞悬液，并计数；将细胞悬液倍比稀释成每毫升含 20 个，10 个，5 个细胞三组浓度，每孔 100ul 加入到事先铺有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中（即每孔 2 个，1 个，0.5 个细胞），每种浓度分别为 40 孔，40 孔和 16 孔；置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，并经常观察细胞有无污染；第 4 天时于倒置显微镜下观察，记录每个孔的细胞克隆团数；待克隆团长至视野的 1/4 时取上清作抗体检测；将检测为阳性的细胞扩大培养或进行下

一次亚克隆。一般需要连续进行三次亚克隆，且第三次亚克隆所有克隆孔均为阳性方可建立细胞株。

## 7. 杂交瘤细胞的冻存与复苏

### 1) 杂交瘤细胞的冻存

从第三次亚克隆孔中，挑选强阳性、细胞生长旺盛和抑制效果最好的克隆孔进行扩大培养，建立杂交瘤细胞株并进行冻存<sup>[8]</sup>。具体程序如下：冻存前使细胞处于对数生长期并于冻存前一天进行细胞换液，冻存当天收集细胞于 50ml 离心管中，1200 rpm，离心 5min，弃上清；用 10ml RPMI-1640 基础液进行细胞重悬，并计数；1200 rpm，离心 5min，弃上清；用冻存液配制成  $5 \times 10^6$ /ml 细胞悬液，每管 1ml 分装于冻存管中，并标明细胞名称、冻存日期、批号等；将冻存管置于 4°C，30min 后转至 -20°C，2h 再转入 -80°C 冰箱或液氮长期保存。

### 2) 杂交瘤细胞株的复苏

从 -80°C 冰箱或液氮中取出冷冻管，迅速放入 38°C 水浴内，1min 内不断轻轻摇动以加速融化，1200 rpm，离心 5min，弃上清，加适量培养液转至细胞培养瓶或 6 孔细胞培养板中培养。

## 3.2.5.4 单克隆抗体生产

### 1. 体内诱生法

将建立的杂交瘤细胞株进行扩大培养，待其长至一定数量后，收集细胞并采用间接 ELISA 法测定细胞上清效价。选用健康的 BALB/C 小鼠，腹腔注射石蜡油，每只小鼠 0.5ml。7-10 天后，腹腔接种用 RPMI-1640 基础液洗涤 3 次的杂交瘤细胞株，每只小鼠  $1 \times 10^6$  个/0.5ml。从第 6 天开始，每天观察小鼠腹水产生情况，如腹部明显膨大，以手触摸时，皮肤有紧绷感，食欲减退且不愿活动时即可采集腹水<sup>[9,10]</sup>。将腹水离心 (12000 rpm，20min)，收集上清，分装，-80°C 冻存备用。

### 2. 单克隆抗体的纯化

采用辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水的纯化，具体操作为：取 1 份腹水加 2 份 0.06 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液，用 1mol/L HCL 调 pH 至 4.8；按每 ml 稀释腹水加 11ul 辛酸的比例，室温搅拌下逐滴加入辛酸，于 30min 内加完，4°C 静置 2h，8000 rpm，30min，弃沉淀；上清加入 1/10 体积的 0.01 mol/L PBS，用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.2；然后缓慢加入等量的饱和硫酸铵溶液，混匀，4°C 静置 1h，5000 rpm，20min，弃上清；沉淀溶于 1ml 生理盐水中，用 0.01mol/L PBS 4°C 透析过夜，其间换水 3 次以上；将透析带内溶液取出，分装于小管内，-20°C 保存备用。

## 3.2.5.5 抗三聚氰胺单克隆抗体鉴定

### 1. 效价测定

采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体的效价（方法见第二章 2.2.5.3）

## 2. 抗体亲和力测定

采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体的亲和常数 ( $Ka$ )<sup>[10]</sup>，具体步骤为：将包被原从 1 $\mu$ g/ml 开始倍比稀释进行包板，共四个浓度：1 $\mu$ g/ml, 0.5 $\mu$ g/ml, 0.25 $\mu$ g/ml, 0.125 $\mu$ g/ml；单克隆抗体从 1000 倍开始倍比稀释，加入已包被的酶标板中，其余步骤同间接 ELISA 法；以单克隆抗体浓度的对数值为横坐标，以 OD<sub>450nm</sub> 值为纵坐标，可绘制出相对应的 4 条曲线，找出每条曲线上最大 OD<sub>450nm</sub> 值和 50%最大 OD<sub>450nm</sub> 值所对应的抗体浓度，4 个抗体浓度两两一组，按照下面的公式计算  $Ka$ 。

$$Ka = (n-1) / 2 (n [Ab']_t - [Ab]_t)$$

其中， $n$  是每组中两个包被原浓度的倍数， $[Ab']_t$  和  $[Ab]_t$  分别为每组中两个 50%最大 OD<sub>450nm</sub> 值所对应的抗体浓度。

## 3. 抗体免疫球蛋白类和亚类鉴定

取杂交瘤细胞株上清，采用美国 EnviroLogix 公司的小鼠单克隆抗体亚型鉴定试纸 (RS 200) 进行抗体免疫球蛋白类和亚类鉴定。抗体亚型鉴定试纸基于胶体金免疫分析技术，可直接用于细胞上清液，无需稀释，5min 内即可显示结果。

## 4. 灵敏度鉴定

采用间接竞争 ELISA 法测定单克隆抗体对不同浓度三聚氰胺的抑制情况，方法见第二章 2.2.3.5，唯一不同的是抗体采用纯化好的腹水型单克隆抗体。以不同三聚氰胺浓度的对数值为横坐标，以抑制率  $B/B_0$  为纵坐标，绘制标准抑制曲线，计算单克隆抗体对三聚氰胺的 IC<sub>50</sub>。

## 5. 特异性鉴定

采用间接竞争 ELISA 法进行单克隆抗体的特异性鉴定，将三种三聚氰胺类似物灭蝇胺，CDT，阿特拉津作为交叉反应分析物，测定各交叉反应分析物的 IC<sub>50</sub> 值，计算单克隆抗体对各类似物的交叉反应率 (CR%)。

# 3.3 结果与讨论

## 3.3.1 免疫小鼠血清筛选

首先用间接 ELISA 法对免疫小鼠的抗血清进行检测，包被浓度为 1 $\mu$ g/ml，确定各抗血清的效价，并选出抗体的最佳工作浓度，然后用间接竞争 ELISA 法测定抗血清对三聚氰胺的抑制水平，弗氏佐剂免疫小鼠检测结果见表 3-3。从表中数据可知，三种免疫原联合弗氏佐剂免疫小鼠均得到了抗血清，其中以 MEL-ACA-BSA 免疫原免疫的小鼠血清抑制水平最好，这和第二章的结果相一致。



表 3-3 弗氏佐剂免疫小鼠抗血清测定

Table 3-3 Results of assay antiserum for Freund's adjuvant mice

| 三种免疫原        | 小鼠编号 | 二免检测结果 |                          | 三免检测结果 |                          |
|--------------|------|--------|--------------------------|--------|--------------------------|
|              |      | 效价     | IC <sub>50</sub> (μg/ml) | 效价     | IC <sub>50</sub> (μg/ml) |
| MEL-MCA-BSA  | 1    | >3200  | 14.19                    | 12800  | 7.17                     |
|              | 2    | 3200   | 16.70                    | 6400   | 9.75                     |
|              | 3    | 6400   | 11.74                    | 12800  | 7.37                     |
|              | 4    | 3200   | -                        | >6400  | 12.51                    |
|              | 5    | 3200   | 21.59                    | 6400   | 11.95                    |
| MEL-ACA-BSA  | 6    | 8000   | 11.74                    | 16000  | 4.12                     |
|              | 7    | 4000   | 15.87                    | >8000  | 6.16                     |
|              | 8    | >8000  | 9.82                     | 16000  | 2.06                     |
|              | 9    | 8000   | 10.21                    | 16000  | 3.42                     |
|              | 10   | 8000   | 10.92                    | >16000 | 3.58                     |
| MEL-PABA-BSA | 11   | 8000   | 20.23                    | 16000  | 12.76                    |
|              | 12   | >4000  | 25.58                    | >8000  | 11.05                    |
|              | 13   | 8000   | 35.73                    | >16000 | 16.34                    |
|              | 14   | >8000  | 17.25                    | 16000  | 8.73                     |
|              | 15   | 4000   | -                        | >4000  | -                        |

快速佐剂免疫小鼠抗血清检测结果见表 3-4，从中可以看出，三种免疫原联合快速佐剂免疫小鼠均得到了抗血清，其中以 MEL-ACA-BSA 免疫原免疫的小鼠血清抑制水平最好，这与弗氏佐剂免疫小鼠血清检测的结果相一致。

表 3-4 快速佐剂免疫小鼠抗血清测定

Table 3-4 Results of assay antiserum for quick adjuvant mice

| 三种免疫原        | 小鼠编号 | 二免检测结果 |                          |
|--------------|------|--------|--------------------------|
|              |      | 效价     | IC <sub>50</sub> (μg/ml) |
| MEL-MCA-BSA  | 1    | 12800  | 4.19                     |
|              | 2    | 6400   | 6.70                     |
|              | 3    | >12800 | 4.74                     |
|              | 4    | >6400  | 12.18                    |
|              | 5    | >6400  | 8.59                     |
| MEL-ACA-BSA  | 6    | >32000 | 3.74                     |
|              | 7    | >16000 | 1.75                     |
|              | 8    | 64000  | 2.82                     |
|              | 9    | >16000 | 1.31                     |
|              | 10   | 32000  | 0.647                    |
| MEL-PABA-BSA | 11   | 16000  | 9.53                     |
|              | 12   | >8000  | 7.28                     |
|              | 13   | 32000  | 5.37                     |
|              | 14   | 16000  | 7.25                     |
|              | 15   | >16000 | 11.52                    |

比较两种免疫佐剂所得到的小鼠血清检测结果可以看出，快速佐剂免疫的小鼠在二免后即可得到效价很高的抗血清，且抑制水平也优于弗氏佐剂免疫小鼠。对于制备单克隆抗体来说，融合小鼠血清效价很重要，效价高表明脾脏中致敏的 B 淋巴细胞数量多，细胞融合时得到阳性杂交瘤细胞的概率就高；反之，得到阳性杂交瘤细胞的几率就小。一般而言，小鼠血清效价达到 10000 以上即可用于融合<sup>[11]</sup>。

常规的弗氏佐剂免疫从免疫小鼠至得到可融合的阳性脾细胞一般需要 80-100 天，而快速佐剂只需要 30 天即可，这对于缩短单克隆抗体制备周期具有重要的实际意义。这可能是由于快速佐剂含有的灭活卡介苗组分在小剂量重复免疫的情况下能强烈刺激动物免疫系统致使脾脏中致敏的 B 淋巴细胞数量短期内急速增多，从而减少抗体产生所需时间。而常规免疫只在首免时运用含灭活卡介苗的弗氏完全佐剂去刺激动物机体免疫系统，加强免疫时采用不含灭活卡介苗的弗氏不完全佐剂，对动物免疫系统的刺激比较温和，抗体产生比较缓慢。

根据检测结果，本实验选取 MEL-ACA-BSA 免疫原经快速佐剂免疫的效价在 32000，抑制效果最好（IC<sub>50</sub> 值为 0.647 μg/ml）的 10 号小鼠用于细胞融合制备单克隆抗体。

### 3.3.2 杂交瘤细胞株的建立

本实验细胞融合共铺 8 块 96 孔细胞培养板，每块板上留两个 96 孔作对照，经常观察细胞有无污染。第 7 天显微镜观察并记录有细胞团生长的孔数，共有 646 孔，融合率为 85%。第 10 天细胞团长至孔底 1/10 面积时取上清进行检测，共有 126 个阳性孔；其中 OD<sub>450nm</sub> 值大于 1.8 的设为强阳性，有 27 个孔；OD<sub>450nm</sub> 值在 1.0-1.8 之间的为中等强度阳性，有 53 个；OD<sub>450nm</sub> 值小于 1.0 的为弱阳性，有 46 个孔。第 12 天对阳性孔进行特异性检测，共筛选到 49 个孔有抑制，融合阳性率为 7.6%。经过三次亚克隆后，共挑出 4 株稳定分泌抗三聚氰胺单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞株（2C4，3E6，5D11，7F9），经间接竞争 ELISA 法检测抑制效果最好的细胞株为 2C4，经多次传代、冻存和复苏后其分泌抗体能力稳定，对其进行扩大培养以及腹水制备和抗体鉴定。

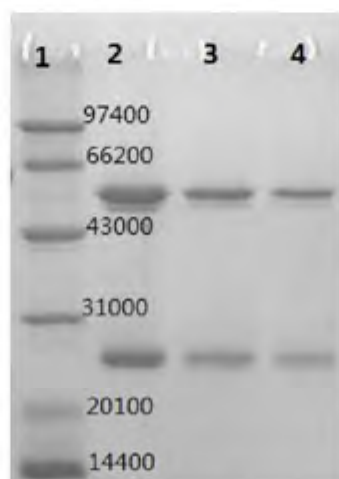
单克隆抗体的制备，关键在于融合后阳性杂交瘤细胞的获得和尽早进行细胞筛选以及亚克隆<sup>[12]</sup>。在细胞融合和亚克隆筛选过程中添加饲养层细胞是十分必要的，可以分泌多种生长因子支持杂交瘤细胞生长，还可吞噬细胞碎片<sup>[13]</sup>，一只小鼠的腹腔巨噬细胞一般铺 6-8 块板较适宜。细胞融合过程是一个随机事件，主要受融合剂、培养基的 pH 值和骨髓瘤细胞生长状态影响。本实验结果表明，融合用骨髓瘤细胞的生长状态对融合后杂交瘤细胞的生长和阳性杂交瘤细胞的获得最为重要。在融合前应使骨髓瘤细胞处于对数生长期，并于融合前一天进行换液传代培养，以保证融合形成的杂交瘤细胞在不利条件下继续生长。经过 ELISA 筛选所获得的阳性杂交瘤细胞孔，越早进行亚克隆，得到阳性杂交瘤细胞的几率就越大。如果得到的阳性孔比较多，应该挑选 OD 值高，细胞生长状况良好的单克隆团进行亚克隆。

### 3.3.3 单克隆抗体的生产与纯化

单克隆抗体的大量生产主要有体内诱生法和体外培养法，本实验采用体内诱生腹水



法进行单克隆抗体的生产，小鼠腹腔注入杂交瘤细胞后，于第 6 天可观察到小鼠腹部微微胀大，至第 10 天时腹部异常膨大，一只小鼠可产生 3-5 ml 腹水，浓度为 6-8 mg/ml，完全可以满足后续实验需求。腹水型单克隆抗体含有很多干扰物质，对免疫分析会造成一定影响，使用前需要进行纯化处理。在偏酸条件下，正辛酸可以沉淀腹水中除 IgG 免疫球蛋白外的其他蛋白质，使上清中只含有 IgG 型免疫球蛋白。本实验对所获得腹水进行抗体免疫球蛋白类鉴定后，采用正辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化，得到较纯的单克隆抗体，进行 SDS-PAGE 电泳，如图 3-1 所示。纯化后的腹水为两条带，其中一条为 IgG 的轻链，另一条为重链，抗体纯化程度高，可用于后续实验。



(1: Marker; 2: 抗体稀释 5 倍; 3: 抗体稀释 10 倍; 4: 抗体稀释 20 倍)

图 3-1 腹水抗体纯化的 SDS-PAGE 图

Fig.3-1 SDS-PAGE gels electrophoresis of the purified ascite

### 3.3.4 三聚氰胺单克隆抗体特性鉴定

#### 3.3.4.1 单克隆细胞株培养上清和腹水效价测定

本实验筛选出四株杂交瘤细胞 2C4, 3E6, 5D11, 7F9, 并将其中效价最高、抑制最好的 2C4 细胞株制备腹水，采用间接 ELISA 法测定效价，结果见表 3-5。

表 3-5 三聚氰胺单克隆抗体的效价

Table 3-5 Test results of anti- melamine McAb titer

| 杂交瘤细胞株 | 细胞培养上清效价 | 腹水效价      |
|--------|----------|-----------|
| 2C4    | 1: 12800 | > 2187000 |
| 3E6    | 1: 6400  | —         |
| 5D11   | 1: 6400  | —         |
| 7E9    | 1: 3200  | —         |

#### 3.3.4.2 单克隆抗体亲和力测定

将纯化好的腹水用间接 ELISA 法测定抗体的亲和力，结果见图 3-2。抗体的亲和常数是对抗原抗体相互作用的最直接表示，是指抗体特定结合位点与相应抗原表面单一抗原决定簇之间的结合强度。James 认为亲和常数在  $10^7$ - $10^{12}$  L/mol 之间的抗体为高亲和力

的抗体，亲和常数在  $10^5$ - $10^7$  L/mol 之间的抗体为低亲和力的抗体<sup>[14]</sup>。本研究所获得的单克隆抗体经间接 ELISA 法测定，其亲和力常数为  $2.67 \times 10^9$  L/mol，属于高亲和力抗体，满足后续实验中免疫亲和柱对单克隆抗体亲和力的要求。

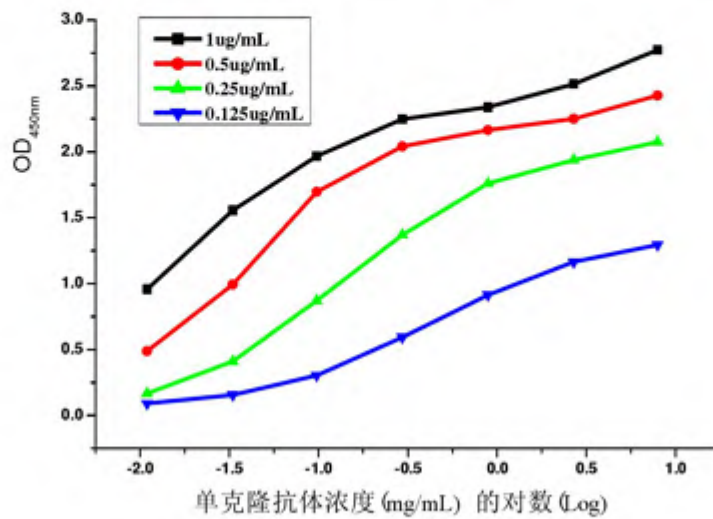
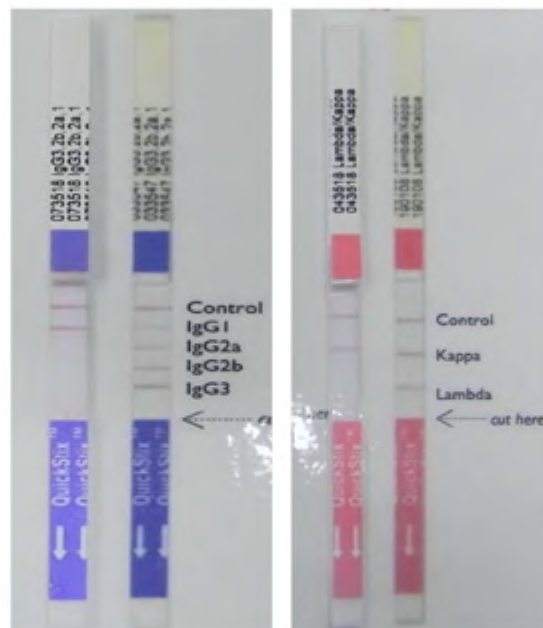


图 3-2 单克隆抗体亲和力测定结果

Fig.3-2 Results of affinity test of anti-melamine McAb

### 3.3.4.3 单克隆抗体亚类鉴定



(a: IgG 亚类鉴定; b: 轻链类型鉴定)

图 3-3 单克隆抗体亚类鉴定结果

Fig.3-3 Isotype identification results of anti-melamine McAb

取细胞培养上清或腹水直接用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试纸条进行抗体免疫球蛋白类和轻链类型鉴定，该鉴定试纸基于胶体金免疫分析技术，结果直观可肉眼判读，结果如图 3-3。通过检测用试纸条（图中左侧试纸条）与说明试纸条（图中右侧试纸条）相对照，表明本实验获得的细胞株分泌的抗体免疫球蛋白类为 IgG<sub>1</sub> 型，适合用于后续



的 ELISA 方法研究；轻链类型为 Kappa 链。

### 3.3.4.4 单克隆抗体灵敏度测定

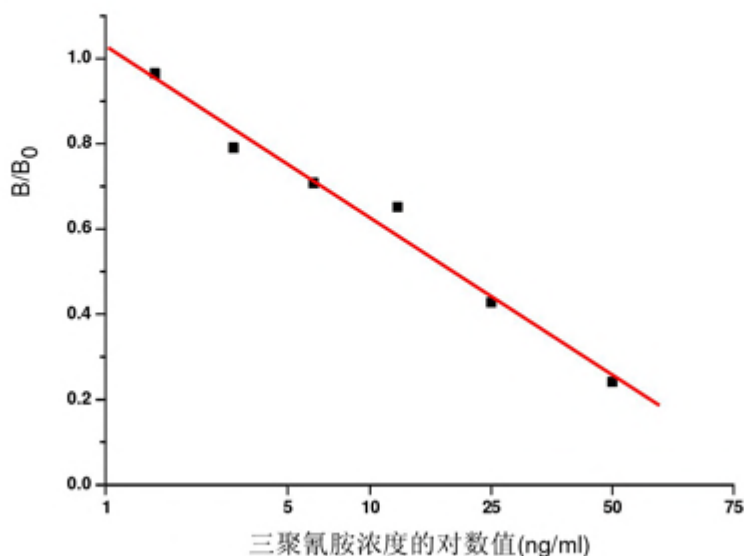


图 3-4 单克隆抗体的间接竞争抑制曲线

Fig.3-4 Inhibitive curve of Monoclonal antibody by indirect competitive ELISA

单克隆抗体的灵敏度测定是抗体免疫特性鉴定的重要内容，直接影响所建立的免疫分析方法的优劣。本研究采用间接竞争 ELISA 法对所获得的单克隆抗体进行不同浓度三聚氰胺的抑制实验， $IC_{50}$  值为 17 ng/ml，与融合之前的小鼠血清  $IC_{50}$  值 647 ng/ml 相比，表明获得的单克隆抗体对三聚氰胺具有更高的灵敏度。这是因为抗血清中含有多种抗体成分，抗体之间在选择性和亲和性方面可能存在较大差异；单克隆抗体将产生不同抗体的 B 淋巴细胞通过筛选分门别类，可得到由强阳性的 B 淋巴细胞融合形成的杂交瘤细胞，从而得到抑制效果突出的单克隆抗体。

### 3.3.4.5 单克隆抗体交叉反应性测定

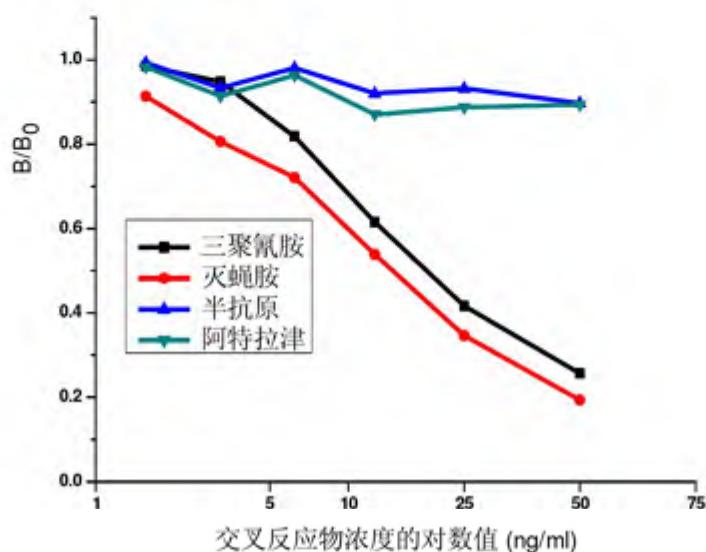


图 3-5 单克隆抗体交叉反应测定

Fig.3-5 Cross-reactivity of Monoclonal antibody

抗体的交叉反应率表示抗体与抗原表面不同结构的抗原决定簇发生结合的能力。交叉反应率越低,则表明抗体的特异性越强,据此建立的免疫检测分析方法越可靠。本研究对三种三聚氰胺结构类似物进行了交叉反应测定,结果如图 3-5。本实验所获得的抗三聚氰胺单克隆抗体与灭蝇胺交叉反应率为 131%,与其他结构类似物的交叉反应率均小于 0.01%,说明单克隆抗体的特异性较强。

### 3.4 本章小结

1. 将第二章制备的具有免疫性能的三种免疫原采用常规免疫和快速免疫两种方式免疫 BALB/C 小鼠。结果表明,快速佐剂免疫方式更适用于单克隆抗体制备。本实验选取 MEL-ACA-BSA 免疫原经快速佐剂免疫的效价最高、抑制效果最好的 10 号小鼠用于细胞融合。

2. 将脾细胞与骨髓瘤细胞融合后,通过 ELISA 筛选和三次亚克隆,获得 4 株可稳定分泌抗三聚氰胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株,选择其中效价最高、抑制最好的 2C4 细胞株制备腹水型单克隆抗体。

3. 采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水型单克隆抗体并进行免疫特性分析,其抗体亚型为 IgG<sub>1</sub> 型,适合用于 ELISA 方法研究;抗体亲和常数为  $2.67 \times 10^9$  L/mol,属于高亲和力抗体,可用于后续的免疫亲和柱研究;抗体检测三聚氰胺的 IC<sub>50</sub> 为 17 ng/ml,该抗体除与灭蝇胺交叉反应率为 132%外,与其他三聚氰胺结构类似物无交叉反应,具有较好的特异性。

### 参考文献

1. 杜念兴. 兽医免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
2. 董志伟, 王炎. 抗体工程[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997.
3. Jang M.S., Lee S.J., Xue X., et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a generic hapten for class-specific determination of organophosphorus pesticides [J]. Bull. Korean Chem. Soc. 2002, 23(8):1116-1120.
4. Heddy Zola 著. 单克隆抗体手册[M]. 周宗安等译. 南京: 南京大学出版社, 1991.
5. Hansbrough J.F., Gadd M.A. Temporal analysis of murine lymphocyte subpopulations by monoclonal antibodies and dual-color flow cytometry after burn and nonburn injury [J]. Surgery, 1989, 106(1):69-80.
6. Karsten U, Rudolph M. Monoclonal antibodies against tumour-associated antigens: mycoplasma as a major technical obstacle and its possible circumvention by azaserine selection medium [J]. Arch Geschwulstforsch, 1985, 55(5):305-310.
7. 张龙翔等. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 教育出版社, 1977.
8. Song YC, Pegg D.E., Hunt C.J. Cryopreservation of the common carotid artery of the rabbit: optimization of dimethyl sulfoxide concentration and cooling rate [J]. Cryobiology, 1995, 32(5): 405-421.
9. Xiao X W, Guo J Q, Cai S H, et al. Establishment of hybridoma cell lines secreting MCAs against

- potato virus X and determination of their physical and chemical characteristics [J]. Chin J Biotechnol, 1989, 5(2):89-95.
10. Fay H., Pfister H., Messerli J, et al. Methods of isolation: purification and quantitation of bovine immunoglobulins [J]. Zbl Vet Med B. 1976, 23:269-300.
  11. 李春媛. 三聚氰胺单克隆抗体制备及其在 ELISA 检测中的应用[M];[硕士学位论文]. 吉林: 吉林大学, 2009.
  12. 王鹤佳. 玉米赤霉醇单克隆抗体的制备及酶联免疫检测方法的建立[M];[硕士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2005.
  13. 杨利国. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
  14. James W. G. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice [M]. Academic Press, Inc Ltd, 1983.





## 第四章 三聚氰胺竞争ELISA试剂盒的研制

### 4.1 前言

2008年三聚氰胺毒奶粉事件发生后,三聚氰胺的残留检测引起了世界各国的广泛关注,成为各种研究的热点。各国纷纷制定了三聚氰胺在各种食品中的限量标准,我国对婴幼儿、孕产妇奶粉中三聚氰胺的限量设为1mg/kg,对其他奶制品中三聚氰胺的限量设为2.5mg/kg<sup>[1]</sup>,这一标准和世界上大多数国家的规定相符合。

对于三聚氰胺的检测,国标法为液相色谱-质谱法和气象色谱-质谱法进行测定,具有灵敏度高和准确性高的优点,但需要专业的技术人员和昂贵的仪器设备,不能在基层中广泛应用,有必要发展一种在日常监测中使用的三聚氰胺检测方法。免疫检测分析技术是一种以抗原抗体特异性结合为基础的分析方法,其中ELISA法具有操作简单、灵敏度高、重复性好等优点,是一种较为实用的免疫检测分析方法,已广泛应用于三聚氰胺残留的日常检测中<sup>[2-7]</sup>。

我们在第三章的研究中获得了特异性识别三聚氰胺的单克隆抗体,并进行了纯化和鉴定,在此基础上,本章对影响间接竞争ELISA系统的各因素进行优化,建立检测三聚氰胺的间接竞争ELISA方法,开发出三聚氰胺ELISA检测试剂盒,为三聚氰胺的日常监测提供有力的技术手段。

### 4.2 材料和仪器

#### 4.2.1 药品与试剂

三聚氰胺(Melamine, MEL), 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪(2-chloro-4, 6-diamine-1, 3, 5-Triazine, CDT), 灭蝇胺, 阿特拉津, 四甲基联苯胺(TMB), 均为Sigma公司产品; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(HRP-IgG), 康成生物工程公司; Tween-20, 浙江龙游县化工试剂厂; 甲醇, 氯化钠, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 中国医药集团上海化学试剂总公司; 试验用水为Millipore超纯水; 上述试剂若无特别注明均为分析纯。

#### 4.2.2 主要仪器及设备

AB104-N型电子天平(上海梅特勒-托利多公司); BP211D型电子分析天平(德国赛多利斯公司); 超纯水系统(Hi-tech Instruments Co.,Ltd.); 可调式移液器(Thermo Labsystems公司); U-3000型紫外扫描仪(日本岛津); MuLiskan Mks型酶标仪(Thermo Labsystems公司); Costar92592可拆酶标板(上海吉泰生物科技有限公司); DHG-9070A型电热干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); MALDI SYNAPT QToF MS液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪(美国Waters公司); ZD-9556型水平摇床(江苏太仓科教器材厂); WH-2型微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); DELTA320型pH计(上海梅特勒-托利多公司)。

## 4.3 实验方法

### 4.3.1 间接竞争 ELISA 方法的优化

间接竞争 ELISA 方法的操作步骤详见第二章 2.2.5.3。本研究所用抗体为免疫原 MEL-ACA-BSA 获得的抗三聚氰胺单克隆抗体，选择 MEL-PABA-OVA 作为包被原进行 ELISA 方法优化和建立。根据第三章研究结果，包被原 MEL-PABA-OVA 稀释为  $1\mu\text{g/ml}$  进行包被酶标板，抗体工作浓度为 1:8000，酶标记羊抗鼠 (HRP-IgG) 二抗稀释 3000 倍，三聚氰胺标准品浓度稀释为 0, 1.6 ng/ml, 3.2 ng/ml, 6.2 ng/ml, 12.5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml 进行竞争测定绘制标准抑制曲线。每个条件做 3 个平行测定，评判指标为曲线最大吸光值 ( $A_{\max}$ )、半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 和两者的比数 ( $A_{\max}/IC_{50}$ )，从而挑选出最优条件以进行下一步实验。

#### 4.3.1.1 包被缓冲液的优化

实验选取两种包被缓冲液进行参数优化，1 号为 0.05M pH 9.6 碳酸盐缓冲液 (CBS)；2 号为 0.01 M pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS)。分别用两种包被原缓冲液稀释包被原进行包被，其余操作如上所述，通过对曲线最大吸光值 ( $A_{\max}$ )、半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 和两者比数 ( $A_{\max}/IC_{50}$ ) 的比较，选择最佳包被缓冲液。

#### 4.3.1.2 封闭液的优化

在选择出最佳包被缓冲液后，进行封闭液的优化。本实验共对三种封闭液进行了优化选择，分别为 1 号封闭液：0.05M pH 9.6 CBS+0.1%明胶；2 号封闭液：0.05M pH 9.6 CBS+0.1% PVA；3 号封闭液：0.05M pH 9.6 CBS+0.1%BSA。用最佳包被缓冲液稀释包被原进行包板后，分别用三种封闭液进行封闭，其余操作如上所述，通过对曲线最大吸光值 ( $A_{\max}$ )、半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 和两者比数 ( $A_{\max}/IC_{50}$ ) 的比较，选择最佳封闭液。

#### 4.3.1.3 抗体稀释液的优化

本实验选用两种抗体稀释液进行优化实验，1 号抗体稀释液：0.01M pH7.4 PBS+0.05%Tween20+0.1%明胶；2 号抗体稀释液：0.01M pH7.4 PBS+0.05%Tween 20+0.1%明胶+5%海藻糖。用优化出的包被缓冲液稀释包被原包板和封闭液进行封闭后，分别用两种抗体稀释液稀释抗体和二抗，其余操作如上所述，通过对曲线最大吸光值 ( $A_{\max}$ )、半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 和两者比数 ( $A_{\max}/IC_{50}$ ) 的比较，选择最佳抗体稀释液。

#### 4.3.1.4 标准品稀释液的优化

标准品稀释液的优化对建立 ELISA 分析方法是十分重要的。本实验主要对标准品稀释液的 pH (3, 5, 7.4, 9)，甲醇含量 (0, 10, 20, 30%, v/v) 和 NaCl 含量 (0, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2, 14.4%, v/v) 进行了优化分析。在最佳包被缓冲液、封闭液和抗体稀释液的基础上进行优化，其余操作如上所述，通过对曲线最大吸光值 ( $A_{\max}$ )、半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 和两者比数 ( $A_{\max}/IC_{50}$ ) 的比较，选择最佳标准品稀释液。

### 4.3.2 样品添加回收测定

#### 4.3.2.1 样品前处理

1) 奶粉样品: 称取 1g 奶粉样品于 50mL 塑料离心管中, 加入 5mL 三氯乙酸和 5mL 纯水, 超声提取 10min, 再震荡提取 10min, 然后以不低于 4000r/min 离心 10min, 去除蛋白, 取上清液, 适当稀释后用于 ELISA 分析。

2) 液态奶样品: 取 1ml 液态奶样品于 50mL 塑料离心管中, 加入 500ul 三氯乙酸和 500ul 纯水, 超声提取 10min, 再震荡提取 10min, 然后以不低于 4000r/min 离心 10min, 去除蛋白, 取上清液, 适当稀释后用于 ELISA 分析。

#### 4.3.2.2 样品稀释倍数对 ELISA 检测的影响

取空白样品(奶粉、液态奶等)按照 4.3.3.1 所述的方法进行前处理去除蛋白后, 用优化好的标准品稀释液分别设定原液、2 倍稀释和 5 倍稀释三个梯度, 然后再分别添加倍比稀释的标准品溶液, 同时以 0.01M pH 7.4 PBS 溶液添加各浓度标准品溶液作为对照, 采用 ELISA 方法进行检测, 绘制标准抑制曲线, 考察样品稀释倍数对 ELISA 检测结果的影响。

#### 4.3.2.3 添加回收率测定

取空白奶粉样品, 分别添加 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  水平的三聚氰胺标准品; 另取空白液态奶样品, 分别添加 100  $\text{ng}/\text{ml}$ , 1000  $\text{ng}/\text{ml}$ , 5000  $\text{ng}/\text{ml}$  水平的三聚氰胺标准品; 每个浓度做三个平行, 每个样品做三个重复, 各样本按照 4.3.3.1 所述的方法进行前处理后, 用 ELISA 方法进行检测各 OD 值, 根据标准抑制曲线, 计算出实际测定浓度, 按下面公式计算添加回收率:

$$\text{添加回收率} = \frac{\text{实际测定值}}{\text{添加值}} \times 100\%$$

### 4.3.3 实际样品测定

从本地超市中选购奶粉、液态奶共 20 份样品, 按照 4.3.3.1 所述的方法进行前处理后, 用 ELISA 方法进行检测, 根据标准抑制曲线对检测结果进行定量分析。为确定建立的 ELISA 检测方法的准确性, 将各样品同时用国家标准方法 GB/T 22388-2008<sup>[8]</sup>中的 LC-MS/MS 法进行检测, 最后将两种方法的检测结果进行比较分析。在进行 ELISA 检测的同时, 配制系列标准品溶液(0, 10  $\text{ng}/\text{ml}$ , 25  $\text{ng}/\text{ml}$ , 50  $\text{ng}/\text{ml}$ , 100  $\text{ng}/\text{ml}$ , 250  $\text{ng}/\text{ml}$ , 500  $\text{ng}/\text{ml}$ ) 进行 LC-MS/MS 检测, 每个浓度均进样 2 次, 然后以标准品浓度为横坐标, 以各浓度对应的峰面积为纵坐标, 绘制 LC-MS/MS 检测三聚氰胺标准曲线。

#### 4.3.4 ELISA 试剂盒的组装

在上述参数优化的基础上, 进行三聚氰胺 ELISA 检测试剂盒的组装。主要组分包括: 包被并封闭好的可拆卸式 8×12 酶标板(真空包装); 1 号液(1:8000 稀释的抗三聚氰胺单克隆抗体); 2 号液(1:3000 稀释的酶标羊抗鼠二抗); 3 号液(底物缓冲液 A 液);

4 号液 (底物缓冲液 B 液); 5 号液 (终止液); 6 号液 (PBST 洗液, 5 倍浓缩液, 用时稀释 5 倍); 各浓度三聚氰胺标准品 (0, 1.6 ng/ml, 3.2 ng/ml, 6.2 ng/ml, 12.5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml); 海绵支架; 组装后的试剂盒置于 4°C 保存。

#### 4.3.5 ELISA 试剂盒的评估

##### 4.3.5.1 试剂盒的灵敏度和精确度

将三聚氰胺标准品稀释成不同浓度, 用组装的试剂盒进行测定, 共测定 20 次, 绘制每次测定的标准抑制曲线, 计算  $IC_{50}$ , 确定试剂盒的灵敏度和最低检测限。试剂盒的精确度通常以板间误差和板内误差表示。具体方法为: 取 3 个试剂盒, 每个试剂盒中取出 2 列微孔, 将 2 个浓度的三聚氰胺标准品 (0, 8ng/ml) 分别添加到 2 列微孔中, 每个浓度设 5 个重复, 按试剂盒的 ELISA 方法进行测定, 计算变异系数。

##### 4.3.5.2 保存期实验

将试剂盒置于 37°C 保存, 在 1 个月内每周取出部分进行测试, 每次做 3 个平行, 共测 5 次。检测其  $B_0$  值、 $IC_{50}$ , 按下列公式计算 D 值:

$$D = \frac{\sin(B_0) + Slope + R^2}{IC_{50}}$$

绘制 D 值随时间变化的曲线, 确定试剂盒的保存期。

##### 4.3.5.3 与市售试剂盒的比较

将本研究所制备的 ELISA 试剂盒与美国 Abraxis 公司生产的三聚氰胺 ELISA 试剂盒进行比较, 主要指标为  $IC_{50}$ 、最低检测限、回收率和变异系数等。

## 4.4 结果与讨论

### 4.4.1 间接竞争 ELISA 优化

诸多研究表明间接竞争 ELISA 方法受多种因素的影响, 对不同的分子目标物而言, 其适宜的 ELISA 检测条件有所不同, 因此有必要对其主要影响因素进行优化, 使得整个 ELISA 检测过程在最适宜的条件下进行<sup>[9-13]</sup>。本实验主要围绕其各种缓冲液体系如包被缓冲液、封闭液、抗体稀释液和标准品稀释液对 ELISA 检测方法的影响进行研究。

#### 4.4.1.1 包被缓冲液优化

首先考察包被缓冲液对间接竞争 ELISA 的影响, 结果见表 4-1。

从表中数据可知, 1 号碳酸盐包被缓冲液的  $IC_{50}$  值低于 2 号磷酸盐包被缓冲液, 且  $A_{max}$  值和  $A_{max}/IC_{50}$  值也较高, 保证了检测结果的稳定性, 因此, 1 号碳酸盐包被缓冲液对三聚氰胺 ELISA 检测方法是较为理想的包被缓冲液。这可能是因为包被过程中, 包被蛋白分子结构上的疏水基团与酶标板聚苯乙烯表面的疏水基团通过物理吸附而结



合，而这种结合是非特异性的，主要受包被缓冲液 pH 的影响，1 号包被缓冲液的离子强度或者 pH，可能使包被蛋白的空间构象发生变化更有利于其与酶标板的结合。

表 4-1 包被缓冲液的优化

Table 4-1 Optimization of coating buffer

| 指标                | 1 号包被缓冲液 | 2 号包被缓冲液 |
|-------------------|----------|----------|
| $A_{max}$         | 1.604    | 1.067    |
| $IC_{50}$ (ng/ml) | 24.6     | 31.5     |
| $A_{max}/IC_{50}$ | 0.065    | 0.033    |

注：1 号包被缓冲液：0.05M pH9.6 CBS； 2 号包被缓冲液：0.01 M pH7.4 PBS.

#### 4.4.1.2 封闭液优化

在包被缓冲液优化基础上，对三种封闭液进行了优化实验，结果如表 4-2 所示。

表 4-2 封闭液的优化

Table 4-2 Optimization of blocking buffer

| 指标                | 1 号封闭液 | 2 号封闭液 | 3 号封闭液 |
|-------------------|--------|--------|--------|
| $A_{max}$         | 1.105  | 1.413  | 0.899  |
| $IC_{50}$ (ng/ml) | 24.9   | 23.9   | 25.9   |
| $A_{max}/IC_{50}$ | 0.044  | 0.059  | 0.034  |

注：1 号封闭液：0.05M, pH9.6 CBS+0.1%明胶； 2 号封闭液：0.05M, pH9.6 CBS+0.1%PVA；  
3 号封闭液：0.05M, pH9.6 CBS+0.1%BSA

从表 4-2 可知，2 号封闭液的  $A_{max}$  值 1.413 与优化前的  $A_{max}$  值 1.604 差异最小， $IC_{50}$  值最低，且  $A_{max}/IC_{50}$  值最高，因此，可推断 2 号封闭液更有利于保持 ELISA 方法的重复性，是理想的封闭液选择。这可能是由于 2 号封闭液中的 PVP 组分比 1 号封闭液的明胶和 3 号封闭液的 BSA 更有利于封闭酶标板中未结合包被原的固相载体表面，从而减少 ELISA 过程中的非特异性吸附，保证检测结果的重复性和可靠性。

#### 4.4.1.3 抗体稀释液的优化

在包被缓冲液和封闭液优化的基础，分别用两种抗体稀释液来稀释抗体和酶标二抗，考察不同抗体稀释液对 ELISA 方法的影响，结果如表 4-3 所示。

表 4-3 抗体稀释液的优化

Table 4-3 Optimization of antibody dilution

| 抗体                | 1 号抗体稀释液 | 1 号抗体稀释液 | 2 号抗体稀释液 | 2 号抗体稀释液 |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| 酶标二抗              | 1 号抗体稀释液 | 2 号抗体稀释液 | 1 号抗体稀释液 | 2 号抗体稀释液 |
| $A_{max}$         | 1.591    | 1.645    | 1.371    | 1.027    |
| $IC_{50}$ (ng/ml) | 30.2     | 19.8     | 24.7     | 29.4     |
| $A_{max}/IC_{50}$ | 0.052    | 0.073    | 0.055    | 0.034    |

注：1 号抗体稀释液：0.01M, pH7.4 PBS +0.05%Tween 20(PBST)+0.1%明胶

2 号抗体稀释液：0.01M, pH7.4 PBS +0.05%Tween 20(PBST)+0.1%明胶+5%海藻糖

抗体用 1 号抗体稀释液稀释，二抗用 2 号抗体稀释液稀释的 ELISA 系统比较合适，其  $A_{max}$  值变化不大相对稳定， $IC_{50}$  值最低为 19.8ng/ml，因此，该组合是比较适宜的抗

体稀释液选择。究其原因，可能是因为抗体稀释液中的海藻糖在免疫分析中可促进抗原抗体之间的相互识别，从而提高检测分析的灵敏度。

#### 4.4.1.4 标准品稀释液的优化

在应用上述优化条件的基础上，着重对标准品稀释液进行了优化研究，分别考察甲醇含量，NaCl 含量和 pH 值对 ELISA 系统的影响，结果见表 4-4。

表 4-4 甲醇含量的优化

Table 4-4 Optimization of the methanol content

| 甲醇含量 (%)           | 0     | 10    | 20    | 30    |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| $A_{\max}$         | 1.331 | 1.509 | 1.328 | 1.292 |
| $IC_{50}$ (ng/ml)  | 18.7  | 16.2  | 20.1  | 24.8  |
| $A_{\max}/IC_{50}$ | 0.071 | 0.093 | 0.066 | 0.052 |

从表 4-4 可以看出，随着甲醇含量的变化， $A_{\max}$  值出现一定的波动。当甲醇含量在 10% 时， $A_{\max}$  值与之前测定的结果相差不大，可保持 ELISA 系统的稳定性，而且  $IC_{50}$  值最低；当甲醇含量增高时， $IC_{50}$  值增高而  $A_{\max}$  值降低，可能是高浓度甲醇使得抗体发生部分变性<sup>[14]</sup>，从而对抗原抗体的相互作用产生负面影响。因此，选择标准品稀释液中含 10% 甲醇为最佳条件进行下一步优化。

表 4-5 NaCl 含量的优化

Table 4-5 Optimization of the NaCl content

| NaCl 含量 (%)        | 0     | 0.9   | 1.8   | 3.6   | 7.2   | 14.4  |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $A_{\max}$         | 1.481 | 1.518 | 1.556 | 1.401 | 1.168 | 0.914 |
| $IC_{50}$ (ng/ml)  | 16.5  | 18.1  | 13.9  | 15.8  | 16.3  | 16.7  |
| $A_{\max}/IC_{50}$ | 0.089 | 0.083 | 0.112 | 0.088 | 0.071 | 0.054 |

标准品稀释液中 NaCl 含量对 ELISA 检测系统具有很大影响，很多研究者都进行了此方面的研究<sup>[15,16]</sup>。从表 4-5 中可以看出，NaCl 含量从 0-1.8% 时， $A_{\max}$  值逐渐升高；NaCl 含量从 1.8%-14.4% 时呈现逐渐降低的趋势。当 NaCl 含量为 1.8% 时，ELISA 检测具有最低的  $IC_{50}$  值，这可能是因为适量的 NaCl 可以降低 ELISA 过程中的非特异性吸附，从而提高检测的灵敏度。因此，选择 NaCl 含量为 1.8% 的标准品稀释液进行下一步优化。

表 4-6 pH 值的优化

Table 4-6 Optimization of the pH value

| pH 值               | 3     | 5     | 6     | 7.4   | 9     | 11    |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $A_{\max}$         | 0.317 | 1.269 | 1.135 | 1.557 | 0.683 | 0.236 |
| $IC_{50}$ (ng/ml)  | —     | 14.4  | 14.5  | 10.6  | 28.3  | —     |
| $A_{\max}/IC_{50}$ | —     | 0.088 | 0.078 | 0.147 | 0.024 | —     |

注：“—”代表未测到。

从表 4-6 中可看出， $A_{\max}$  值随着标准品稀释液 pH 值的变化呈现一定的波动，pH 从 3 到 7.4 时， $A_{\max}$  值逐渐增大；当 pH 为 9、11 时， $A_{\max}$  值又显著降低，尤其是 pH 为 3 和 11 时 ELISA 分析几乎不显色，这表明抗原抗体的相互识别作用在极端的 pH 条件下

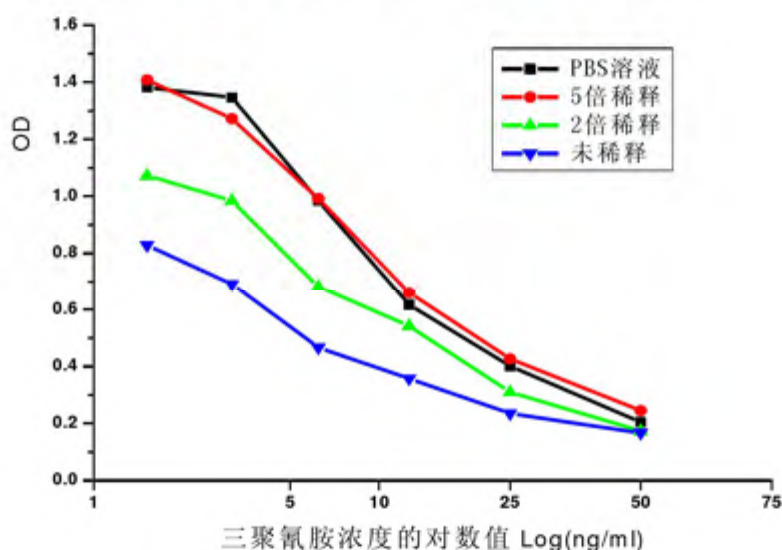
明显变弱，标准品缓冲液的 pH 值严重影响了 ELISA 方法的灵敏度，这与已有的研究结果相一致<sup>[17-19]</sup>。原因可能是 pH 值的变化能够使得抗原和抗体的离子化状态发生相应变化，从而对抗原抗体之间的非共价作用如静电作用和氢键作用产生影响，最终导致 ELISA 方法灵敏度的变化。

与碱性溶液系统相比较，建立的三聚氰胺 ELISA 方法在偏酸性条件下更稳定。因此，标准缓冲液选择为 0.01M pH 7.4 PBS+10%甲醇+1.8%NaCl 进行 ELISA 实验。

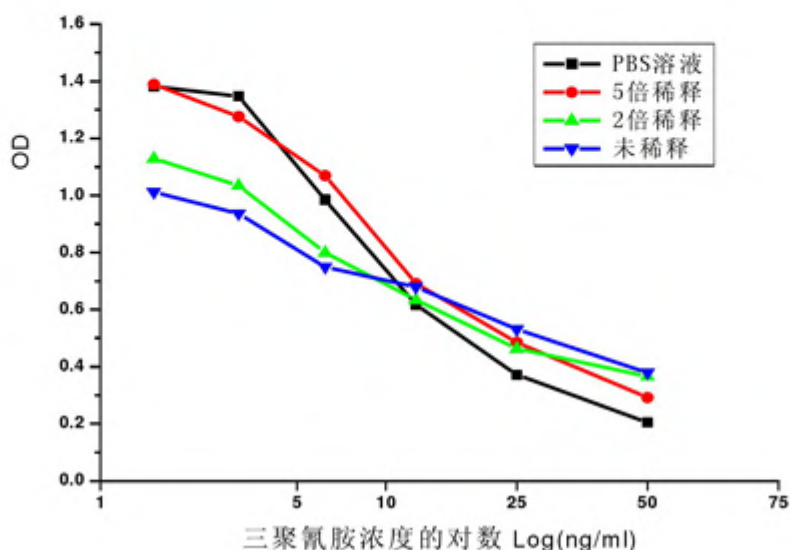
#### 4.4.2 添加回收率测定

##### 4.4.2.1 样品稀释倍数对 ELISA 的影响

奶粉样品和液态奶样品不同稀释倍数的标准曲线如图 4-1 所示。



(a) 奶粉不同稀释倍数对 ELISA 的影响



(b) 液态奶不同稀释倍数对 ELISA 的影响

图 4-1 样品基质效应对 ELISA 的影响

Fig.4-1 Effect of matrix in samples on ELISA

从图 4-1 中可以看出，奶粉和液态奶样品在未稀释和 2 倍稀释时，ELISA 检测的

OD 值明显低于 PBS 样品稀释液的测定值,而两者稀释 5 倍所检测到的 OD 值与 PBS 样品稀释液的测定值相差不大,两条标准曲线几乎重合。奶粉在样品前处理时已经稀释了 10 倍,液态奶在前处理过程中稀释了 2 倍,所以,实际检测奶粉样品稀释 50 倍,液态奶样品稀释 10 倍时可消除基质效应对 ELISA 检测的影响。

#### 4.4.2.2 添加回收率测定

在免疫分析方法中,常常做添加回收实验来检测所建立方法的准确性。本实验对奶粉和液态奶分别进行了样品添加回收测定,奶粉添加浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 实际检测时样品稀释了 50 倍,即实际检测样品溶液中相应添加浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 液态奶添加浓度为 100 $\text{ng}/\text{ml}$ , 1000 $\text{ng}/\text{ml}$ , 5000 $\text{ng}/\text{ml}$ , 实际检测时样品稀释了 10 倍,即实际检测样品溶液中相应添加三聚氰胺浓度为 10 $\text{ng}/\text{ml}$ , 100 $\text{ng}/\text{ml}$ , 500 $\text{ng}/\text{ml}$ , 检测结果见表 4-7。

表 4-7 ELISA 法测定样品中三聚氰胺添加回收率

Table 4-7 Recovery analysis of melamine from different samples by ELISA

| 基质                                | 添加浓度 | 检测浓度              | 回收率 (%)          | 变异系数 (%) |
|-----------------------------------|------|-------------------|------------------|----------|
| 奶粉<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 2    | 1.8 $\pm$ 0.89    | 93.0 $\pm$ 0.09  | 4.9      |
|                                   | 20   | 20.4 $\pm$ 1.30   | 101.9 $\pm$ 0.05 | 6.4      |
|                                   | 100  | 95.8 $\pm$ 3.34   | 95.8 $\pm$ 0.09  | 3.5      |
| 液态奶<br>( $\text{ng}/\text{ml}$ )  | 10   | 8.3 $\pm$ 0.53    | 83.6 $\pm$ 0.05  | 6.4      |
|                                   | 100  | 96.8 $\pm$ 5.59   | 96.9 $\pm$ 0.10  | 5.8      |
|                                   | 500  | 468.2 $\pm$ 36.67 | 93.7 $\pm$ 0.07  | 7.8      |

由表 4-7 可知,奶粉样品的添加回收率在 93%-101.9%之间,变异系数在 3.5%-6.4%之间;液态奶样品的添加回收率在 83.6%-96.9%之间,变异系数在 5.8%-7.8%之间,二者均在合适范围内,说明所建立的 ELISA 方法具有较高的准确性。

对于 ELISA 分析方法,不同基质均可对检测结果产生一定影响,因此,在实际样品检测之前需要确定不同样本的标准抑制曲线,有些研究在做标准曲线时采用基质添加标准曲线<sup>[20]</sup>,每次检测时均需要重新配制标准溶液以测定标准曲线,且不同的基质需要测定不同的标准曲线,这对于商品化的 ELISA 试剂盒是不适宜的。本实验采用 PBS 样品缓冲液稀释标准品进行测定而得到标准抑制曲线,同时考察了基质效应对 ELISA 检测的影响,结果表明奶粉稀释 50 倍,液态奶稀释 10 倍时,可基本消除基质对 ELISA 系统的影响;添加回收实验结果也表明奶粉和液态奶的样品添加回收率和变异系数均在免疫分析方法可接受范围内,说明所建立的三聚氰胺间接竞争 ELISA 方法具有较高的准确度。

#### 4.4.3 实际样品检测

采用 ELISA 进行实际样品检测时,结果需要用 LC-MS/MS 方法进行确证,因此,首先需要建立 LC-MS/MS 方法检测三聚氰胺的标准曲线。以三聚氰胺标准品浓度为横坐标,以各浓度对应的峰面积为纵坐标,绘制 LC-MS/MS 检测三聚氰胺标准曲线,如图 4-2 所示。



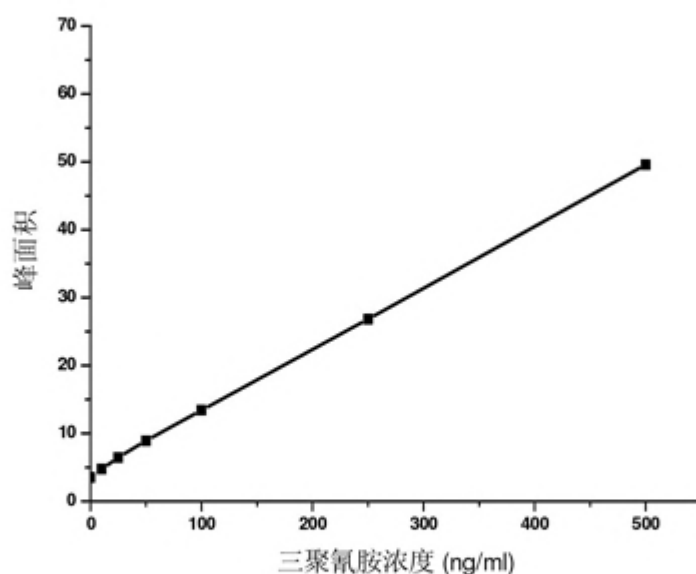


图 4-2 LC-MS/MS 法标准曲线

Fig. 4-2 Calibrate curve of the LC-MS/MS method

在实际样品检测中，同时采用本研究所建立的间接竞争 ELISA 法和国家标准方法 GB/T 22388-2008 中的 LC-MS/MS 法分别对 20 份本地超市购得的奶粉和液态奶样品进行了比对试验，结果见表 4-8。

表 4-8 ELISA 法和 LC-MS/MS 法结果比较

Table 4-8 Comparison of results obtained with ELISA and LC-MS/MS method

| 样品                                | 编号 | ELISA 法 | LC-MS/MS 法 |
|-----------------------------------|----|---------|------------|
| 奶粉<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 1  | ND      | ND         |
|                                   | 2  | ND      | ND         |
|                                   | 3  | ND      | ND         |
|                                   | 4  | ND      | ND         |
|                                   | 5  | ND      | ND         |
|                                   | 6  | ND      | ND         |
|                                   | 7  | ND      | ND         |
|                                   | 8  | ND      | ND         |
|                                   | 9  | ND      | ND         |
|                                   | 10 | ND      | ND         |
| 液态奶<br>(ng/ml)                    | 1  | ND      | ND         |
|                                   | 2  | 71.4    | 86.5       |
|                                   | 3  | ND      | ND         |
|                                   | 4  | ND      | ND         |
|                                   | 5  | ND      | ND         |
|                                   | 6  | 34.6    | 42.6       |
|                                   | 7  | ND      | ND         |
|                                   | 8  | ND      | ND         |
|                                   | 9  | 143.5   | 165.8      |
|                                   | 10 | ND      | ND         |

注：ND 表示未检出。

从表 4-8 中可以看出，共有 17 份样品未检出三聚氰胺，只有 3 份液态奶检出含有

不同浓度的三聚氰胺，但其含量均在我国对奶制品中三聚氰胺的限量标准范围内，产品合格率为 100%。同时可以看出两种方法的检测结果具有很好的一致性，表明本研究所建立的间接竞争 ELISA 方法结果准确可靠，可用于乳及乳制品中三聚氰胺的检测；同时与 LC-MS/MS 方法相比，ELISA 方法具有样品前处理简单，检测成本低，可实现高通量检测等优点，更适于三聚氰胺残留检测。

#### 4.4.4 试剂盒评估

##### 4.4.4.1 灵敏度和精确度确定

根据本章中 ELISA 系统的优化实验，建立了三聚氰胺的间接竞争 ELISA 方法，并进行了试剂盒的组装。评价试剂盒最主要指标是灵敏度和精确度，灵敏度越低，精确度越高说明该试剂盒越能应用于实际检测。

通常灵敏度用  $IC_{50}$  和最低检测限来表示，经过 20 次测定，本研究制备的试剂盒其  $IC_{50}$  为  $6 \pm 0.55ng/ml$ ，测定 10 份奶粉空白样品，得到对奶粉的最低检测限为  $100\mu g/kg$ ；测定 10 份液态奶空白样品，得到对液态奶的最低检测限为  $20ng/ml$ ，完全满足三聚氰胺残留检测的需要，最终本试剂盒推荐的标准曲线见图 4-3。

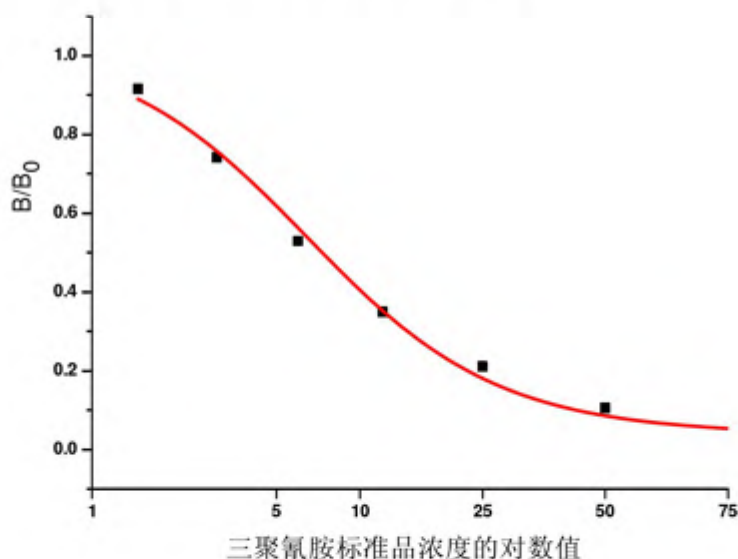


图 4-3 ELISA 试剂盒的标准曲线

Fig.4-3 Calibrate curve of the ELISA kit

同时，试剂盒精确度的考察也是一项重要的内容，精确度越高，实际检测中出现假阳性和假阴性的概率就会大大减少，从而确保检测结果的可靠性。本研究通过测定板内变异系数和板间变异系数对所制备的 ELISA 试剂盒进行了精确度评价，结果见表 4-9，板间和板内变异系数均小于 10%，表明试剂盒检测结果稳定可靠。

表 4-9 ELISA 试剂盒的精确度分析  
Table4-9 Precision assay of ELISA Kit

| 试剂盒 | 板号   | 标准品<br>(ng/ml) | OD <sub>450nm</sub> |      |      |      | 平均值       | 变异系数<br>(n=5, %) |
|-----|------|----------------|---------------------|------|------|------|-----------|------------------|
| 1号  | 1-1号 | 0              | 1.49                | 1.64 | 1.68 | 1.54 | 1.58±0.1  | 6.1              |
|     |      | 8              | 0.64                | 0.72 | 0.75 | 0.65 | 0.69±0.05 | 7.2              |
|     | 1-2号 | 0              | 1.55                | 1.58 | 1.60 | 1.49 | 1.56±0.07 | 4.2              |
|     |      | 8              | 0.62                | 0.71 | 0.72 | 0.57 | 0.66±0.06 | 9.4              |
| 2号  | 2-1号 | 0              | 1.65                | 1.58 | 1.39 | 1.46 | 1.52±0.13 | 8.6              |
|     |      | 8              | 0.73                | 0.64 | 0.61 | 0.67 | 0.66±0.05 | 7.9              |
|     | 2-2号 | 0              | 1.58                | 1.62 | 1.71 | 1.65 | 1.64±0.06 | 3.7              |
|     |      | 8              | 0.61                | 0.59 | 0.63 | 0.75 | 0.65±0.06 | 8.5              |
| 3号  | 3-1号 | 0              | 1.72                | 1.63 | 1.58 | 1.49 | 1.61±0.12 | 7.2              |
|     |      | 8              | 0.69                | 0.6  | 0.57 | 0.61 | 0.62±0.05 | 7.7              |
|     | 3-2号 | 0              | 1.65                | 1.55 | 1.52 | 1.68 | 1.60±0.08 | 5.0              |
|     |      | 8              | 0.7                 | 0.71 | 0.65 | 0.67 | 0.68±0.03 | 4.8              |

#### 4.4.4.2 试剂盒保存期

将制备好的试剂盒置于 37°C 进行加速稳定性实验, 通过测定 B<sub>0</sub> 值和 IC<sub>50</sub> 值计算出 D 值, 然后以保存时间 (以周为单位) 为横坐标, 以相应时间的 D 值为纵坐标, 绘制 D 值随储存时间变化的曲线, 从而分析试剂盒的有效保存期。从图 4-4 可以看出, 随着储存时间的延长 D 值有所降低, 但总体波动范围不大, 在试剂盒可接受范围内, 说明所制备试剂盒的 B<sub>0</sub> 值和 IC<sub>50</sub> 值变化很小, 检测结果稳定可靠。根据 Arrhenius 公式可推算出本试剂盒的保存期为 4°C 条件下保存期 1 年, 与常规 ELISA 试剂盒的保存期一致。

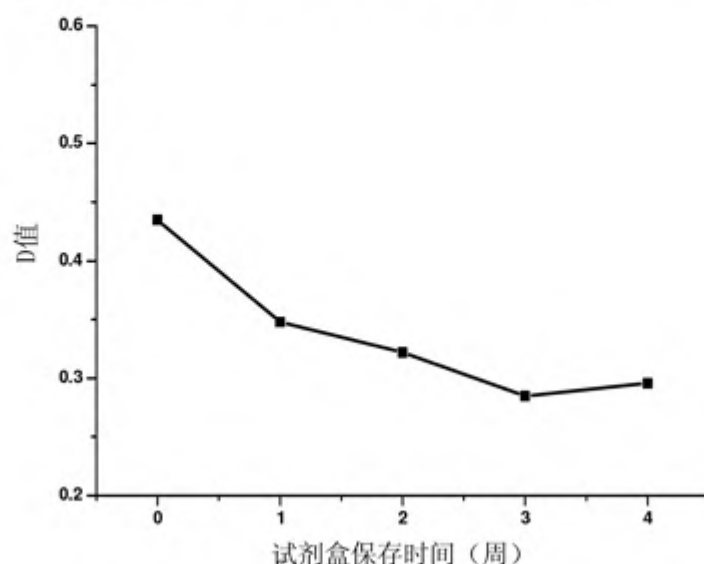


图 4-4 试剂盒保存时间与 D 值变化

Fig.4-4 Variation of D values of the ELISA kit stored time

#### 4.4.4.3 与其他试剂盒的比较

将本研究制备的间接竞争 ELISA 试剂盒与美国 Abraxis 公司生产的三聚氰胺 ELISA

试剂盒进行比较分析, 结果见表 4-10。

表 4-10 两种试剂盒的比较研究

Table 4-10 Comparison results of two kits

| 试剂盒技术指标                  | 自制试剂盒    | 市售试剂盒     |
|--------------------------|----------|-----------|
| IC <sub>50</sub> (ng/ml) | 6        | 10        |
| 最低检测限 (奶粉)               | 100      | 500       |
| 回收率 (牛奶)                 | 105 ± 5% | 110 ± 10% |
| 变异系数 (%)                 | 小于 10    | 小于 10     |

从表 4-10 中可见, 本研究制备的三聚氰胺 ELISA 试剂盒的样品回收率、变异系数等参数与市场上美国 Abraxis 公司生产的三聚氰胺 ELISA 试剂盒相近, 而灵敏度、最低检测限等关键技术指标要优于市售试剂盒。

#### 4.5 本章小结

1. 建立了三聚氰胺间接竞争 ELISA 方法, 通过优化, 最终确定 ELISA 最佳工作条件为: 包被原 MEL-PABA-OVA 最佳工作浓度为 1 $\mu$ g/ml; 抗体工作浓度为 1:8000 稀释; 酶标记羊抗鼠 (HRP-IgG) 二抗 1:3000 稀释; 包被液采用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液; 封闭液选用 0.05M pH9.6 CBS+0.1% PVA; 抗体稀释液为 0.01M pH7.4 PBS+0.05% Tween 20+0.1% 明胶+5% 海藻糖; 标准品稀释液为 0.01M pH7.4 PBS+5% 甲醇+1.8% NaCl。

2. 对建立的 ELISA 方法进行奶粉和液态奶添加回收率测定, 结果表明所建立的 ELISA 方法具有较高的准确性。

3. 用 ELISA 法检测实际样品, 并用 LC-MS/MS 法进行确证, 结果表明两种方法具有很好的一致性, 表明本研究建立的 ELISA 方法结果准确可靠, 可用于乳及乳制品中三聚氰胺的检测。

4. 制备三聚氰胺 ELISA 试剂盒, 其 IC<sub>50</sub> 为 6 ± 0.55 ng/ml, 奶粉最低检测限为 100  $\mu$ g/kg, 液态奶最低检测限为 20 ng/ml, 板间和板内变异系数均小于 10%。通过与其他市售同类试剂盒进行比较, 表明自制试剂盒的性能更优良; 且试剂盒在 4 $^{\circ}$ C 保存 1 年仍可使用, 完全满足三聚氰胺残留检测的要求。

#### 参考文献

1. 中华人民共和国卫生部. 卫生部等 5 部门关于三聚氰胺在食品中的限量值的公告 [EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s7891/201104/51355.htm>, 2011-04-20.
2. Zongyi Wang, Xi Ma, Liying Zhang, et al. Screening and determination of melamine residues in tissue and body fluid samples [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 662(1): 69-75.
3. Hongtao Lei, Yudong Shen, Lijun Song, et al. Hapten synthesis and antibody production for the development of a melamine immunoassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 665: 84-90.
4. Juxiang Liu, Yongben Zhong, Jing Liu, et al. An enzyme linked immunosorbent assay for the determination of cyromazine and melamine residues in animal muscle tissues [J]. *Food Control*, 2010,



- 21:1482-1487.
5. Weiwei Yin, Jinting Liu, Taichang Zhang, et al. Preparation of Monoclonal Antibody for Melamine and Development of an Indirect Competitive ELISA for Melamine Detection in Raw Milk, Milk Powder, and Animal Feeds [J]. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 8152–8157.
  6. 何方洋, 万宇平, 罗晓琴等. 三聚氰胺单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *吉林畜牧兽医*, 2010,31(3):7-9.
  7. 蔡家利, 陈昕, 徐社会. 三聚氰胺单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *重庆理工大学学报*, 2010, 24(4):30-35.
  8. 中华人民共和国卫生部. 《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》[S]. 国家标准 GBT 22388-2008.
  9. Hashida S., Nakagawa K., Imagawa M., et al. Use of inorganic salts to minimize serum interference in a sandwich enzyme assay for growth hormone using Fab' horse radish peroxidase conjugate [J]. *Clin. Chim. Acta.* 1983, 135: 263-273.
  10. Karpinski K.F. Optimality assessment in the Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Biometrics*, 1990, 46: 381-390.
  11. Jones G., Wortberg M., Kreissig S.B., et al. Sources of experimental variation in calibration curves for enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 313: 197-207.
  12. Rocke D.M., Jones G. Optimal design for ELISA and other forms of immunoassay [J]. *Technometrics*, 1997, 39: 162-170.
  13. Selby C. Interference in immunoassay [J]. *Ann Clin Biochem*, 1999, 36: 704-721.
  14. Lee H.J., Shan G.; Watanabe T.; et al. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Cypermethrin [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52:1039-1043.
  15. Song Shanshan, Lin Fei, Liu Liqiang, et al. Immunoaffinity removal and immunoassay for rhodamine B in chilli powder [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2010, 12(45): 2589-2595.
  16. Lin Fei, Song Shanshan, Liu Liqiang, et al. Development of the detection of benzophenone in recycled paper packaging materials by ELISA [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 1(22): 39-46.
  17. Juan J, Manclús A, Montoya A. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Insecticide Chlorpyrifos.2.Assay Optimization and Application to Environmental Waters [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44: 4063-70.
  18. Oubina A, Ballesteros B, Galvea R, et al. Development and optimization of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for 4-nitrophenol. Application to the analysis of certified water samples [J]. *Analytica Chimica Acta* 1999, 387: 255-66.
  19. Xu CL, Peng CF, Liu L, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of hexoestrol [J]. *J Anim Feed Sci* 2006, 15: 159-71.
  20. Jin Y., Jang J.k., Han C.H. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of gentamicin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53:7639-7643.



## 第五章 三聚氰胺净化免疫亲和色谱柱制备及IAC-LC-MS/MS

### 检测方法的建立

#### 5.1 前言

在实际检测中,由于样品成分十分复杂,各种干扰物质的含量常常高于样品中被检组分的含量,严重影响被检组分准确检测的同时还可能会损伤仪器导致仪器使用寿命减短。因此,在对可能含有待检组分样品检测前必须进行样品的前处理,使待检组分与各种干扰物相分离,并得到进一步净化浓缩。因而可以说,样品前处理效果的好坏直接影响着分析方法的灵敏度和准确性<sup>[1]</sup>。

免疫亲和层析柱(Immunoaffinity chromatography column, IAC)的原理是将特异性的抗体固定于固相载体上(如琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶)制成免疫吸附剂并装于柱中,然后通过抗原抗体之间特异性和可逆性结合来实现样品中目标物的分离净化,同时可对样品中目标物进行浓缩,从而提高检测灵敏度,具有选择性好、操作简单快捷、耗时少、节省试剂等优点,是一种重要的前处理手段<sup>[2,3]</sup>。

#### 5.2 材料与amp;方法

##### 5.2.1 主要试剂与材料

抗三聚氰胺单克隆抗体,实验室自制;三聚氰胺,2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪(2-chloro-4,6-diamine-1,3,5-Triazine, CDT),灭蝇胺,阿特拉津, CNBr 活化的 Sepharose 4B,均为 Sigma 公司产品;乙腈(色谱纯),甲醇(色谱纯),为美国 Fisher 公司产品;碳酸二氢钠(分析纯),碳酸氢二钠(分析纯),氯化钠(分析纯),均为中国医药集团上海化学试剂总公司;甲酸(分析纯)为北京化学试剂公司;超纯水为 Milli-Q 纯化水。

##### 5.2.2 主要仪器设备

AB104-N 型电子天平(上海梅特勒-托利多公司);U-3000 型紫外扫描仪(日本岛津);90-2 型定时恒温磁力搅拌器(上海沪西分析仪器厂);TSQ Vantage 三重四极杆液质联用仪(美国 ThermoFisher 公司);WH-2 型微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);可调试移液器和 HPD-25D 真空泵(Thermo Labsystems 公司);DELTA320 型 pH 计(上海梅特勒-托利多公司);722 型可见分光光度计(上海分析仪器厂);ZF-90 型暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂)。

##### 5.2.3 主要溶液

1. Tris-HCl 缓冲液(0.1 M, pH 8.0 0.5 M NaCl):称取 Tris 12.1 g, NaCl 29.3 g,加入浓盐酸 2.4 mL,超纯水定容至 1000 mL。
2. 偶联缓冲液(0.1 M, pH 9.0 NaHCO<sub>3</sub>):称取 NaHCO<sub>3</sub> 8.4 g, NaCl 29.2 g,加超纯水定容至 1000 mL 即可。

3. 1mM HCl: 166.6 ul 浓盐酸 (36%, 12M) 加超纯水至 2000 ml, 过滤除菌。
4. 封闭液: 称取 60.5g Tris-Base 溶于 500 ml 偶联缓冲液中, 过滤除菌即可。
5. 低 pH 洗液: 称取 29.2g NaCl, 5.72 mL 冰醋酸加超纯水至 1000 mL 即可。
6. 上样缓冲液 (0.02 M pH 7.4PBS+10%甲醇): 称取 NaCl 80 g, KCl 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, 和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 36.2 g 溶于 500 ml 纯水中, 加热至 40°C, 全部溶解后冷却至室温, 定容至 1000 mL, 用时稀释 5 倍即可。
7. 淋洗液 (0.01M pH7.4 PBST): 含 0.05% Tween-20 的 0.01M pH 7.4 PBS 溶液。
8. 洗脱液(0.01M pH 3.5 甘氨酸-盐酸溶液+50%甲醇): 称取甘氨酸 7.5 g, 加入 12 mol/L HCl 10mL, 甲醇 500 mL, 纯水定容至 1000 mL。
9. 再生液 (0.01M pH 7.4 PBST): 含 0.05% Tween-20 的 0.01M pH 7.4 PBS 溶液
10. 平衡保存液 (0.01M pH 7.4 PBS): 为 0.1M pH 7.4 PBS 用时稀释 10 倍即可。

## 5.2.4 实验方法

### 5.2.4.1 三聚氰胺净化免疫亲和柱的制备

#### 1. 抗体制备与鉴定

所用抗体为本实验室制备的抗三聚氰胺单克隆抗体, 其纯化、活性鉴定及脱盐处理见第三章。经 ELISA 测定, 纯化所得抗体为高特异性、高亲和力的抗三聚氰胺单克隆抗体。

#### 2. IAC 柱的制备

将纯化后的抗三聚氰胺单克隆抗体与溴化氰活化的 Sepharose 4B 进行偶联, 以制备免疫亲和吸附剂。具体操作步骤为:

1) 将 80 mg 以上的纯化后的抗体用偶联缓冲液透析 12h, 而后测定抗体蛋白浓度, 按下列公式计算: 抗体溶液的 OD<sub>280nm</sub>, 并计算浓度。

$$\text{蛋白浓度} = (1.45 \times \text{OD}_{280\text{nm}} - 0.74 \times \text{OD}_{260\text{nm}}) \times \text{稀释倍数}$$

2) 取 3g 溴化氰活化的 Sepharose 4B 固体胶用 15 ml 1mM HCl 溶液进行溶胀 15min。

3) 取透析后的抗体 80 mg 溶于 15 ml 偶联缓冲液。

4) 将 Sepharose 4B 转移至砂芯漏斗上, 用 1mM HCl 洗涤, 再用偶联缓冲液洗涤, 勿完全抽干。

5) 将 Sepharose 4B 转移至抗体溶液中进行混合, 4°C 搅拌过夜。

6) 取出一小部分胶溶液, 2000 rpm 离心 1min, 取上清测定 OD<sub>280nm</sub>, 如测定值低于原始 OD<sub>280nm</sub> 值的 1/10, 则偶联完成, 并依下列公式计算偶联率:

$$\text{偶联率} (\%) = \frac{\text{偶联前抗体总量} - \text{未偶联抗体量}}{\text{偶联前抗体总量}} \times 100\%$$

7) 偶联完成后, 用偶联缓冲液洗涤, 加入 20ml 封闭液, 室温封闭 2h。

8) 依次用低 pH 洗液和偶联缓冲液, 循环洗涤, 重复 3 次。测定最终洗出液 OD<sub>280nm</sub>,



当低于 0.01 时，表明洗涤合格，最终将胶混悬于 15mL 的偶联缓冲液中。

9) 将柱子 (3ml 免疫亲和柱) 垂直放置，取 1100 $\mu$ l 混悬胶溶液缓慢加入柱中，静置 1h，使填料充分沉到柱体底部。

10) 在柱子中，加入 0.7mL 的 0.02% NaN<sub>3</sub> 的 0.01M pH 7.4 PBS 溶液，密封待用。

### 3. 柱容量的测定

将制备好的 IAC 柱子与真空泵连接，调节流速，使液体以 2d/s 的速度流出 (不超过 1 mL/min)，用 10ml PBS 平衡，待液体排干后，将 10 mL 1 $\mu$ g/mL 处理后的样品溶液加到 IAC 柱中，流速同上，收集上样滤液，LC-MS/MS 检测 (检测方法见 5.2.4.2)。当 IAC 柱结合能力达到饱和后，分别用 10 mL 0.01M pH 7.4 PBST, 10mL 纯水淋洗，然后用 1mL 含 50% 甲醇的 0.01M pH3.5 甘氨酸-盐酸溶液进行样品的洗脱，收集洗脱液用于 LC-MS/MS 检测。按照下列公式计算动态柱容量和绝对柱容量：

$$\text{动态柱容量 (n mol/mg gel)} = \frac{\text{三聚氰胺浓度 (ng/ml)} \times \text{体积 (ml)}}{\text{柱床体积 (ml)} \times \text{分子量}} \times 100\%$$

$$\text{绝对柱容量 (n mol/mg 抗体)} = \frac{\text{动态柱容量 (n mol/mg gel)}}{\text{单位体积抗体偶联量 (mg/ml gel)}} \times 100\%$$

### 4. IAC 柱再生次数

用 500ng/ml 三聚氰胺标准品溶液进行上样测定，按照标准步骤操作，重复使用 15 次，测定每次的柱容量，当回收率仍大于 50% 时所使用的次数为最适再生次数。

#### 5.2.4.2 IAC-LC-MS 检测方法的建立

##### 1. 样品的前处理

1) 奶粉样本：称取 1g 奶粉 (精确至 0.01g)，置于 50ml 离心管中，加入甲醇：水 (1:1, v/v) 10ml，漩涡混匀，超声提取 15min，以 8000 rpm，离心 10min，取上清液 1ml，加到 9ml 的 0.01M pH 7.4 PBS 溶液中，混匀，取出 5ml 用制备好的 IAC 柱进行净化。

2) 液态奶样本：称取 1ml 液态奶中，置于 5ml 离心管中，加入甲醇：水 (1:1, v/v) 1ml，漩涡混匀，超声提取 15min，以 8000 rpm，离心 10min，撇去上层脂肪，取清液 0.1ml，加到 4.9ml 的 0.01M pH 7.4 PBS 溶液中，混匀，用制备好的 IAC 柱进行净化。

##### 2. 样品的 IAC 净化

将经过前处理的奶粉或液态奶样本用制备好的 IAC 柱子进行三聚氰胺的净化，具体步骤为：

1) 取下 IAC 柱子上下端的塞子，将 IAC 柱子与真空泵连接，调节流速为 2d/s (不超过 1 ml/min)。

2) 待液体排干后，取 5ml 处理后的样本溶液进行上样，流速同上。

3) 待液体排干后, 依次用 6 ml 0.01M pH 7.4 PBS 和 4 ml 纯水淋洗去除杂质, 流速同上。

4) 待液体排干后, 用 1ml 洗脱液进行样本的洗脱, 流速为 1 d/s (不超过 0.5ml/min), 收集洗脱液, 用于 LC-MS/MS 检测, 计算回收率。

5) 待液体排干后, 用 10ml 平衡保存液进行柱子平衡, 流速为 1 d/s。

6) 柱子下端用塞子密封, 加入 3ml 平衡保存液, 上端用塞子密封, 置于 4°C 保存。

### 3. 检测条件的设置

液质系统使用串联四级杆液质联用仪: Thermo Vantage (配备 ESI 源和 APCI 源); Surveyor 液相色谱系统: 液相系统包括自动进样器(Autosampler 1.3), 质谱泵(MS Pump 2.0); 软件使用 Xcalibur 2.5.6 版。检测条件为:

色谱条件: 色谱柱: CAPCELL PAK CR (SCX: C18=1: 4, 150 mm × 2.0mm, i.d.); 流动相: 等体积的醋酸铵溶液 (pH 4.9) 和乙腈充分混合, 用冰醋酸调节 pH 3.0 后备用; 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 室温。

质谱条件: 电离模式、极性: ESI, 正离子模式(positive ion); 毛细管温度: 350°C; 气体: 鞘气 (Sheath Gas) 55, 辅助气 (Auxiliary Gas) 6, Q2 (pressure) 1.5; 喷射电压: 2.5 kV; 数据采集参数: width: 0.002, scan time: 0.005s, MRM 模式。

表 5-1 三聚氰胺 LC-MS/MS 多反应监测条件

Table 5-1 Conditions multiple reaction monitoring of LC-MS/MS for melamine

| 化合物  | 保留时间<br>(min) | 母离子<br>(m/z) | 子离子<br>(m/z)    | 停留时间<br>(s) | 裂解电压<br>(V) | 碰撞能量<br>(V) |
|------|---------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| 三聚氰胺 | 2.84-2.93     | 127          | 85 <sup>a</sup> | 0.30        | 100         | 20          |
|      |               |              | 68              | 0.30        | 100         | 35          |

注: 加“<sup>a</sup>”的离子用于定量

#### 5.2.4.3 标准曲线的绘制

取空白样品 (奶粉和液态奶) 按上述的方法进行前处理, 经 IAC 柱净化, 在洗脱液中分别添加系列浓度三聚氰胺标准品 (0, 10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml, 500ng/ml), 混匀, LC-MS/MS 测定。每个浓度设 3 个重复, 以标准品浓度为横坐标, 以相应的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

#### 5.2.4.4 检测限及定量限的测定

根据空白样品的基线噪音值, 计算出基线噪音平均值, 按信噪比 S/N 为 3 时对应的标准品浓度定义为检测限, 以 S/N 为 6 时对应的标准品浓度定义为定量限。

#### 5.2.4.5 IAC-LC-MS/MS 法的添加回收率

称取 1g 奶粉和 1ml 液态奶, 以 25ng/ml, 125ng/ml, 500ng/ml 的水平添加三聚氰胺标准品, 按上述的样品前处理方法处理, IAC 柱净化, 1ml 洗脱液洗脱, LC-MS/MS 检测。根据各添加水平的峰面积, 结合标准曲线, 计算回收率和变异系数。

## 5.3 结果与讨论

### 5.3.1 IAC 柱的制备

IAC 柱的核心试剂是免疫吸附剂，由惰性基质和抗体组成。将本实验室自制的抗三聚氰胺单克隆抗体处理后用分光光度计进行测定，根据公式计算抗体浓度为 7mg/ml。

制备 IAC 柱的核心是选择高特异性的抗体，包括多克隆抗体和单克隆抗体两大类。其中单克隆抗体针对某一特定的抗原表位，由单一的 B 淋巴细胞所分泌，具有高度纯化和高度专一的特性，且在体外可无限量生产，有利于制备高容量的 IAC 柱及 IAC 柱的商品化和标准化。但是单克隆抗体抵抗力较差，易受操作中所用洗涤液和洗脱液的影响而导致抗体性能降低甚至变性，因此，需要严格控制 IAC 柱的使用条件以尽量减少对单克隆抗体免疫性能的影响。

选择合适的载体即惰性基质是成功制备高性能 IAC 柱的前提。合适的载体必需具有一定的刚性和疏松的多孔结构，颗粒大小均一，具有亲水性，理化性质稳定且易于活化等特性。通常可分为两类：一类是主要用于制备在线 IAC 柱的，如键合相硅胶、玻璃珠和亲水性的有机聚合体等<sup>[4-6]</sup>，这类载体能承受较高的压力，可以与 HPLC、CE 等仪器连用，提高分析的速度和精密度；另一类是主要用于制备离线 IAC 柱，如葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺、纤维素、三丙烯酰胺等<sup>[7,8]</sup>，这类载体不耐压力，需要在低流速下使用，其中琼脂糖具有疏松的网状立体结构可允许大分子物质自由扩散，其基质骨架上富含游离羟基可供活化和偶联，亲水性良好且几乎不带电荷可使抗原抗体反应自由进行，并使非特异性吸附降至最低等特性。目前使用最广泛的是 Sepharose 4B<sup>[9,10]</sup>，已有商品化的经溴化氰活化的 Sepharose 4B，本实验即采用溴化氰活化的 Sepharose 4B 作为载体与抗体偶联制备免疫吸附剂，结果表明选用 Sepharose 4B 作为载体是比较合适的。

### 5.3.2 偶联率的测定

待载体与抗体偶联完成后，取上清进行紫外测定，计算偶联率，其结果见表 5-2。

表 5-2 载体与抗体的偶联结果

Table 5-2 Results of conjugation between antibody and carrier

| IAC 柱评定指标             | 抗体量 (mg) | 偶联率 (%) |
|-----------------------|----------|---------|
| 偶联前                   | 80       | —       |
| 已偶联                   | 75.4     | 94.3    |
| 未偶联                   | 4.6      | 5.7     |
| 单位体积抗体偶联量( mg/ml gel) | 7.18     |         |

抗体与载体合适的偶联率是制备高性能 IAC 柱的基础之一。一般认为每 1ml 溶胀的载体偶联 4-10mg 的抗体比较合适<sup>[11,12]</sup>。当偶联的抗体小于 4mg/ml 时，载体上偶联抗体量过少，使得 IAC 柱的吸附能力较弱，不能有效保留待测物；当偶联的抗体大于 10mg/ml 时，载体上偶联抗体量过多，导致 IAC 柱吸附能力过强，不利于将吸附的待测物充分洗脱。从表 5-2 中可知，本研究制备的 IAC 柱抗体偶联率为 94.3%，单位体积抗体偶联量为 7.18 mg/ml gel，实验结果表明载体与抗体达到了较理想的偶联。

### 5.3.3 柱容量的测定

柱容量可分为绝对柱容量和动态柱容量,指的是 IAC 柱中所固定抗体能够吸附目标待测物的最大容量<sup>[13]</sup>。其中,动态柱容量是指每毫升免疫吸附剂对目标待测物的最大吸附量;绝对柱容量是指每毫克固定抗体对目标待测物的最大吸附量。通常所说的柱容量指的是动态柱容量。

表 5-3 IAC 柱的动态柱容量和绝对柱容量

| Table 5-3 Dynamic column capacity and specific column capacity of IAC |                      |                     |
|---|----------------------|---------------------|
| 三聚氰胺分子量   | 动态柱容量 (n mol/ml gel) | 绝对柱容量 (n mol/mg 抗体) |
| 126   | 24.14                | 3.36                |

从表 5-3 中可知,本研究所制备的 IAC 柱,其动态柱容量为 24.14 n mol/ml gel,绝对柱容量为 3.36 n mol/mg 抗体,完全满足三聚氰胺残留的检测分析。

### 5.3.4 再生次数的测定

IAC 柱的再生是衡量 IAC 柱性能的重要指标之一。本实验将制备好的 IAC 柱用 500ng/ml 三聚氰胺标准品溶液进行上样测定,按照标准步骤操作,重复使用 15 次,测定每次的回收率。结果表明,在连续使用 8 次以后,IAC 柱的回收率下降到 50%以下,说明有部分结合力较弱的抗体在洗脱液的反复作用下失去了结合三聚氰胺的能力,根据对再生次数的定义,本研究所制备的 IAC 柱最适再生次数为 8 次。

### 5.3.5 标准曲线的建立

取空白样品按上述的方法进行前处理,经 IAC 柱净化,在洗脱液中分别添加三聚氰胺系列浓度标准品分别进行 LC-MS/MS 检测,并绘制标准曲线,如图 5-1 所示,三聚氰胺在 10-500 ng/ml 范围内的峰面积与浓度呈良好的线性关系,线性方程为: $Y=967233+368926*X$ ,相关系数为 0.999。

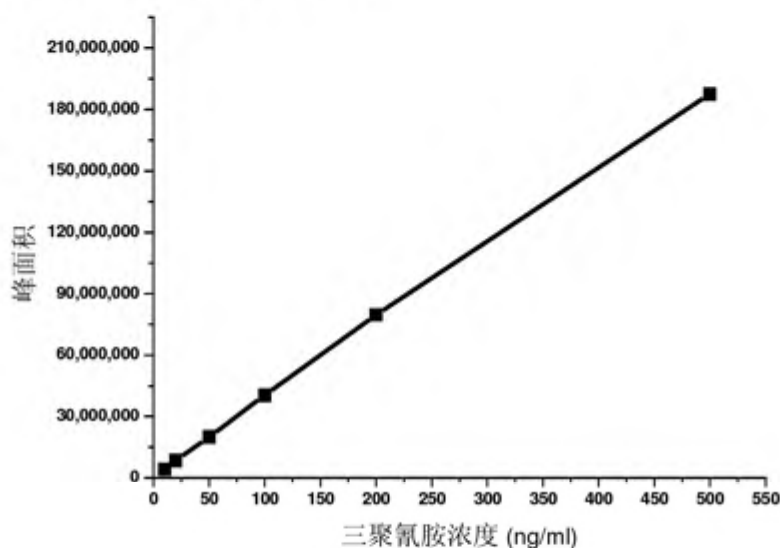


图 5-1 LC-MS/MS 法检测标准曲线

Fig.5-1 Calibrate curve of the LC-MS/MS method



### 5.3.6 检测限与定量限

根据空白样品的基线噪音值，计算出基线噪音平均值，按信噪比 S/N 为 3 时对应的标准品浓度定义为检测限，以 S/N 为 6 时对应的标准品浓度定义为定量限，奶粉和液态奶样品中三聚氰胺的检测限和定量限的结果见表 5-4。

表 5-4 奶粉及液态奶中三聚氰胺的检测限和定量限

| 基质  | 检测限 (ng/ml) | 定量限 (ng/ml) |
|-----|-------------|-------------|
| 奶粉  | 10          | 20          |
| 液态奶 | 10          | 20          |

### 5.3.7 IAC-LC-MS/MS 法添加回收率测定

对奶粉和液态奶分别以 25ng/ml, 125ng/ml, 500ng/ml 的水平进行添加回收实验，按上述的样品前处理方法处理，IAC 柱净化，1ml 洗脱液洗脱，LC-MS/MS 检测，奶粉空白样本和加标样品色谱图见图 5-2 和图 5-3。

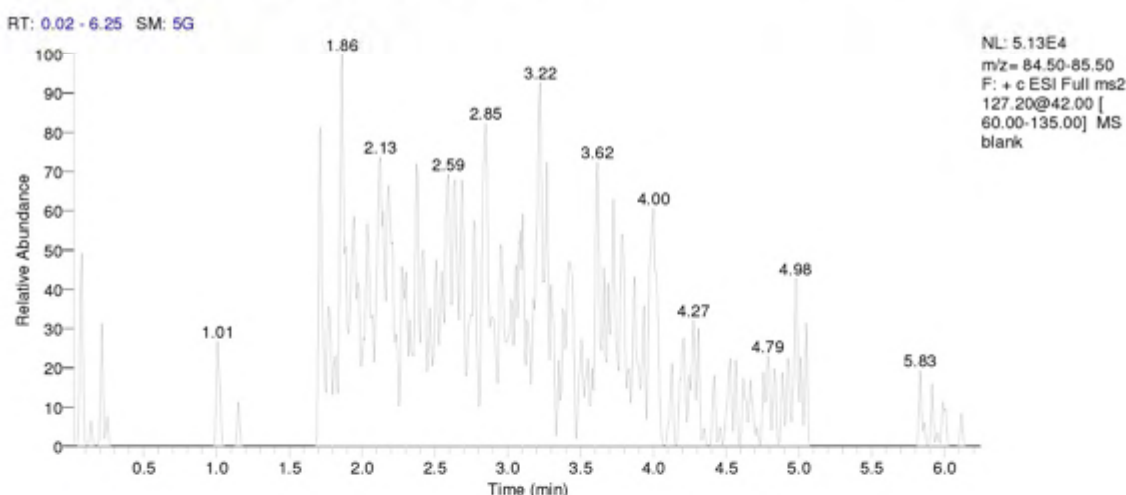


图 5-2 空白奶粉 IAC-LC-MS/MS 检测的总离子色谱图

Fig.5-2 TIC of the MEL in the blank powder samples by IAC-LC-MS/MS

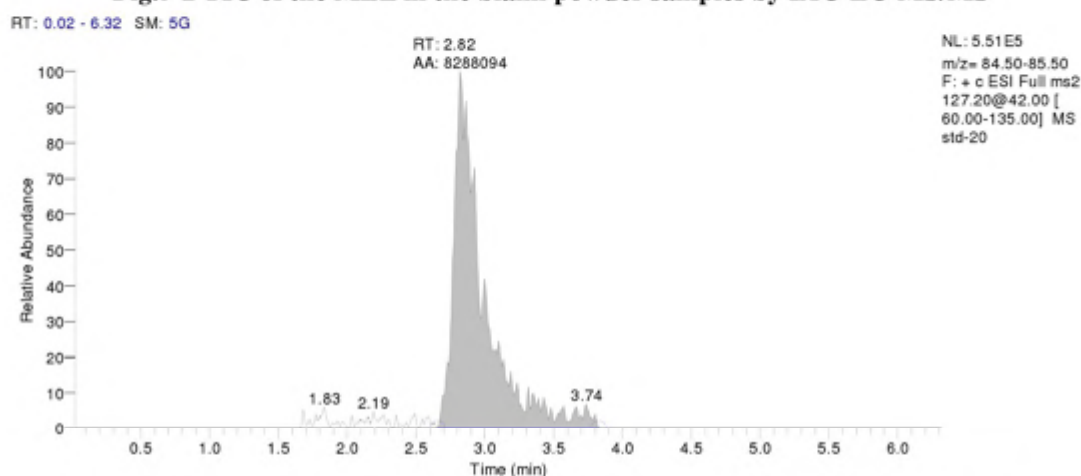


图 5-3 奶粉中添加 25ng/ml 三聚氰胺 IAC-LC-MS/MS 检测的总离子色谱图

Fig.5-3 TIC of the MEL in the powder samples (25ng/ml) by IAC-LC-MS/MS

液态奶空白样本和加标样品色谱图见图 5-4 和图 5-5

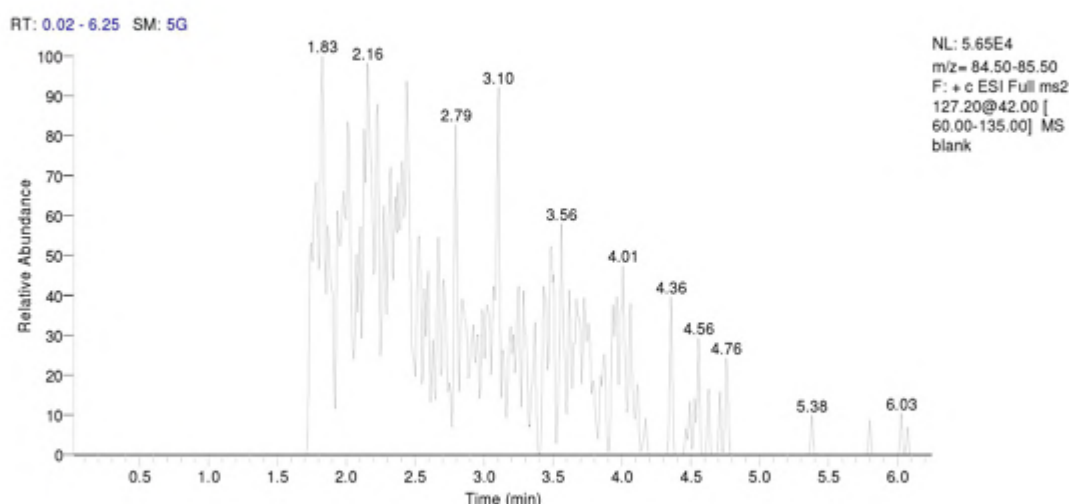


图 5-4 空白液态奶 IAC-LC-MS/MS 检测的总离子色谱图

Fig.5-4 TIC of the MEL in the blank liquid milk samples by IAC-LC-MS/MS

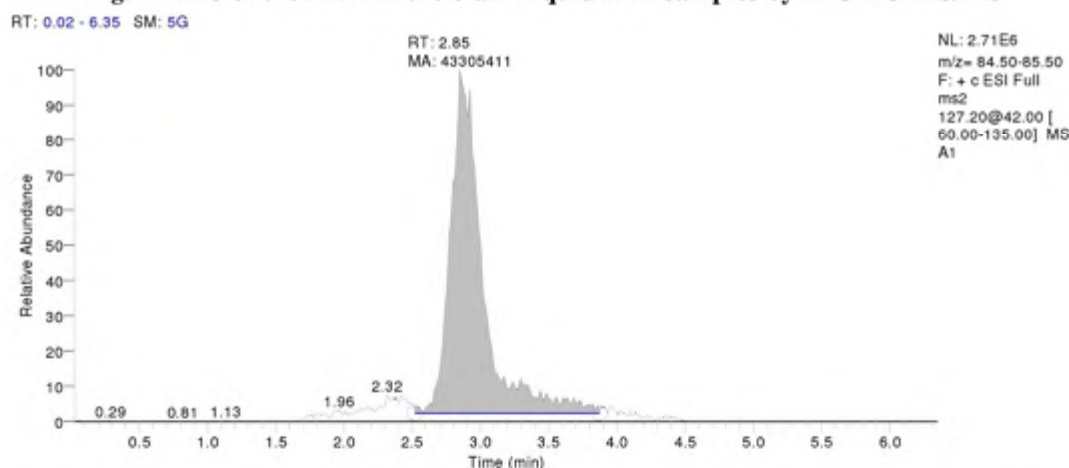


图 5-5 液态奶中添加 125 ng/ml 三聚氰胺 IAC-LC-MS/MS 检测的总离子色谱图

Fig.5-5 TIC of the MEL in the liquid milk samples (125ng/ml) by IAC-LC-MS/MS

奶粉和液态奶各水平的添加回收率结果见表 5-5。

表 5-5 奶粉和液态奶中三聚氰胺的添加回收率和变异系数

Table 5-5 Recoveries and coefficient variations of MEL in milk samples

| 基质  | 添加浓度 (ng/ml) | 回收率 (%)    | 变异系数 (%) |
|-----|--------------|------------|----------|
| 奶粉  | 25           | 84.4±0.08  | 9.6      |
|     | 125          | 104.2±0.07 | 6.9      |
|     | 500          | 95.4±0.09  | 9.8      |
| 液态奶 | 25           | 87.1±0.08  | 8.9      |
|     | 125          | 98.3±0.09  | 8.7      |
|     | 500          | 93.7±0.08  | 8.7      |

从上表可以得出，对空白奶粉和液态奶样品以 25ng/ml, 125ng/ml, 500ng/ml 的水平进行添加三聚氰胺时，用 IAC-LC-MS/MS 法进行检测，奶粉样品的添加回收率在 84.4%-104.2%之间，变异系数小于 10%；液态奶样品的添加回收率在 87.1%-98.3%之间，

变异系数小于 10%，这与文献中所报道的参数相近<sup>[14]</sup>。我国农业部、欧盟等对残留分析方法要求中规定<sup>[16,17]</sup>，限量浓度小于 0.01mg/kg 的残留物，残留分析方法回收率应大于 60%，变异系数应小于 20%；限量浓度大于 0.01mg/kg 的残留物，残留分析方法回收率应在 80%-110%之间，变异系数应小于 20%。本研究建立的三聚氰胺 IAC-LC-MS/MS 方法完全符合上述要求。

## 5.4 本章小结

本研究还利用单克隆抗体制备了特异性识别、净化三聚氰胺的 IAC 柱，并建立了奶粉和液态奶中三聚氰胺的 IAC-LC-MS/MS 检测方法，IAC 柱动态柱容量为 24.14 n mol/ml gel，绝对柱容量为 3.36 n mol/mg 抗体；IAC-LC-MS/MS 检测方法的检测限为 10ng/ml，定量限为 20ng/ml，实际样品添加回收率为 79.4-91.8%，变异系数小于 10%，符合国际规定的残留分析方法要求，且 IAC 柱可重复使用 8 次，可用于实际三聚氰胺残留检测。

## 参考文献

1. 赵思俊. 动物组织中喹诺酮类药物多残留检测方法的研究[D]:[博士学位论文]. 北京:中国农业大学, 2007.
2. Rule G.S., Mordehai A.V., Henion J. Determination of carbofuran by online immunoaffinity chromatography with couple-column liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal. Chem.*, 1994, 66: 230-235.
3. Shen J.Z., Qian C.F., Jiang H.Y., et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination in broiler chicken tissues [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2001, 49:2697-2701.
4. Holtzapple C.K., Buckley S.A., Stanker L.H. Immunosorbents coupled on-line with liquid chromatography for the determination of fluoroquinolones in chicken liver [J]. *J.Agric. Food Chem.*, 1999, 47: 2963-2968.
5. Holtzapple C.K., Buckley S.A., Stanker L.H. Separation and quantification of two fluoroquinolones in serum by on-line high-performance immunoaffinity chromatography [J]. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 4148-4153.
6. Prince A.E., Fan T.S., Skoczinski B.A., et al. Development of an immunoaffinity-based solid-phase extraction for diazinon [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 444: 37-49.
7. Creaser C.S., Feely S.J., Houghton E., et al. Immunoaffinity chromatography combined on-line with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of corticosteroids [J]. *J. Chromatogr. A*, 1998, 794: 37-43.
8. Dubois M, Taillieu X, Colemonts Y, et al. GC-MS determination of anabolic steroids after multi-immunoaffinity purification [J]. *Analyst*, 1998, 123: 2611-2616.
9. 李俊锁, 钱传范, 扈洪波等. 兽药残留的免疫亲和色谱分析(一)[J]. *中国兽药杂志*, 1997, 4(32):49-52.
10. Shelver W.L., Larsen G.L., Huwe J.K. Use of an immunoaffinity column for

- tetrachloro-dibenzo-pdioxin serum sample cleanup [J]. *J. Chromatogr. B*, 1998, 705: 261-268.
11. Delaunay-Bertoncini N, Pichon V. Immuno-based preparation for trace analysis [J]. *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000:29-52.
  12. Delaunay-Bertoncini N, Hennion M.C. Immunoaffinity solid-phase extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis coupling with HPLC and CE-perspectives [J]. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, 2004, 34: 717-736.
  13. 李俊锁, 邱明月, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
  14. Yong Ben Zhong, Li Jing Zhang, Hui Cai Zhang, et al. Immunoaffinity-Based Solid Phase Extraction for the Determination of Melamine in Animal-Derived Foods Followed by LC [J]. *Chromatographia*, 2011, 73: 1211-1215.
  15. Commission of the European Communities. Council Directive 96/23/EC, Off. J. Eur. Communities: Legis., L125, 1996, 10.
  16. 中华人民共和国农业部. “兽药残留分析技术标准的通知(2003)”. 2003.



## 第六章 基于金纳米粒子三聚氰胺高灵敏、快速检测方法研究

### 6.1 前言

纳米是一个长度单位，纳米粒子是指物质的三维空间尺寸中至少有一维尺寸处于 1-100 nm 范围的一种介于固体和分子间的亚稳态物质，具有区别于宏观物质，又不同于原子、分子的独特性能，主要包括小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应，使得纳米粒子的光学、电学、磁学等性质发生变化，成为近年来各领域研究的热点<sup>[1]</sup>。金纳米粒子也称为胶体金，是所有纳米粒子中最稳定的一种，在药物小分子检测、抗原抗体标记、分子生物学和化学反应催化等方面应用最多。

金纳米粒子常用于标记特定的抗原抗体制备出胶体金标记物从而开发被分析物的快速免疫检测方法，如胶体金免疫层析法（Gold Immunochromatography Assay, GICA），其原理是：将特异性的抗原或抗体固定于硝酸纤维素膜等固相载体的一端，而后将此端浸入待检样品溶液中，通过毛细管作用，各种免疫反应试剂进行特异性结合，最后通过目测胶体金标记物的显色情况达到检测目的。与其他免疫分析方法相比，GICA 具有不需要专用仪器，检测速度快，操作简单方便，可长期保存实验结果，易于实现现场检测等优点，主要作为定性或半定量筛选检测手段<sup>[2,3]</sup>。目前，GICA 法已经广泛应用于各种毒素，生物大分子和抗生素的检测<sup>[4-6]</sup>，但国内外对三聚氰胺胶体金免疫层析法的研究很少<sup>[7]</sup>。

表面等离子共振现象是金纳米粒子的重要性质，当金纳米粒子表面结合上其他分子或金纳米粒子发生团聚时，金纳米粒子的间距变小，表面等离子共振发生改变，颜色从酒红色变成蓝色，基于这个原理，金纳米粒子被广泛应用于开发多种被分析物的高灵敏、快速比色检测法<sup>[8,9]</sup>。

本研究采用柠檬酸钠法制备金纳米粒子，用抗三聚氰胺单克隆抗体和冠醚分别进行修饰，建立基于抗原抗体反应的胶体金免疫层析试纸条和基于功能性金纳米粒子分子识别的三聚氰胺实时快速比色检测法。

### 6.2 材料与设备

#### 6.2.1 主要试剂与材料

三聚氰胺抗原，抗体为实验室制备；柠檬酸三钠，购自中国医药集团上海化学试剂总公司；氯金酸  $\text{HAuCl}_4$ ，为上海晶纯试剂有限公司产品；18-冠醚-6，1,6-二溴己烷，氢氧化钠，硫脲，均购自 Sigma 公司；Purabind RP 硝酸纤维素膜，英国 Whatman 公司；玻璃纤维膜 Glass33（结合释放垫），德国 Schleicher&Schuell 公司；玻璃纤维膜 CB-SB08（样品垫），PVC 底板，吸水纸，上海金标有限公司。

#### 6.2.2 主要仪器设备

透射电镜 H7000（日本 HITACHI 公司）；金标点样仪 Bio-dot XYZ3000，金标切条

机 Bio-dot CM4000 (美国 Bio-dot 公司); 恒温磁力搅拌器 (德国 IKA 公司); 数码相机 Nikon Coolpix 5400 (日本 Nikon 公司); Nicolet Nexus 470 型傅立叶变换红外光谱仪 (美国 Thermo 公司); Zetasizer Nano ZS 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (英国 MALVERN 公司); U-3000 型紫外扫描仪 (日本岛津); pH 计 (上海 Mettler Toledo 公司); 纯水设备 (美国 Millipore 公司)。

### 6.2.3 主要溶液及配制

#### 6.2.3.1 主要溶液

##### 1. 包被原稀释液 (A)

- A1 0.05mol/L pH7.4 Tris-HCL 缓冲液
- A2 0.05mol/L pH9.6 CBS 碳酸盐缓冲液
- A3 0.01mol/L pH7.4 PBS 磷酸盐缓冲液

##### 2. 金标抗体稀释液 (B)

- B1 0.002mol/L pH7.4 硼酸盐缓冲液 (BBS) +1%蔗糖+0.5%Triton X-100
- B2 0.01mol/L pH7.4 PBS+0.1%BSA+0.5%Triton X-100
- B3 0.01mol/L pH7.4 PBS+0.1%BSA+0.1%PEG+0.5%Triton X-100

#### 6.2.3.2 溶液配制

1. 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 磷酸盐缓冲液: 称取 KCl 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g, NaCl 80 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  36.2 g, 溶于超纯水, 全部溶解后, 定容至 1000 mL, 用时稀释 10 倍。
2. 0.05 mol/L pH 9.6 CBS 碳酸盐缓冲液: 称取 1.59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 2.93 g  $\text{NaHCO}_3$ , 加纯水溶解并定容至 1000 mL。
3. 0.002 mol/L pH 7.4 硼酸盐缓冲液 (BBS): 称取 1.907 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶于纯水并定容于 100 ml, 即为 0.05 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  溶液; 称取 1.237g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  溶于纯水并定容至 100 ml, 为 0.2 mol/L 的  $\text{H}_3\text{BO}_3$  溶液; 取 9 ml 的  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  溶液和 1 ml 的  $\text{H}_3\text{BO}_3$  溶液混合, 得到 0.2 mol/L pH 7.4 的碳酸盐缓冲液, 临用时稀释 100 倍即为 0.002 mol/L pH 7.4 硼酸盐缓冲液。

## 6.3 胶体金免疫层析试纸条

### 6.3.1 胶体金的制备

#### 6.3.1.1 玻璃容器的准备

制备胶体金所用的玻璃器皿彻底清洗后在王水中浸泡 72h 后取出先用大量自来水反复冲洗, 再加洗洁精洗涤, 置于蒸馏水中浸泡 24h 后再用去离子水反复冲洗三次以上, 37°C 烘箱烘干备用<sup>[10]</sup>。

#### 6.3.1.2 柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液

所用试剂均用超纯水配制。将配制的 0.01% 氯金酸溶液 100 ml 加到锥形瓶瓶中, 置于恒温电磁搅拌器上加热至沸腾后持续 2min, 迅速加入 2 ml 1% 的柠檬酸三钠水溶液,

继续搅拌加热，直到溶液变成透亮的酒红色时继续加热 10min 后停止加热，继续搅拌使其冷却，4°C 保存备用<sup>[11]</sup>。

### 6.3.1.3 胶体金质量鉴定

1. 采用可见光扫描鉴定：将制备好的胶体金溶液在 400-800 nm 波长范围内进行紫外扫描，确定胶体金最大吸收峰波长<sup>[12]</sup>，并计算颗粒的平均粒径。

2. 采用透射电镜扫描鉴定：将制备好的胶体金溶液进行透射电镜扫描，观察胶体金颗粒大小是否均一，有无椭圆形或多边形颗粒存在，并计算胶体金颗粒的平均直径。

## 6.3.2 胶体金标记抗体

### 6.3.2.1 标记抗体前处理

所用抗体为本实验室制备并纯化的抗三聚氰胺单克隆抗体，在标记前必需进行除盐，抗体用 0.005 mol/L pH 7.0 的 NaCl 缓冲液透析，换水 2 次，4°C 过夜，取出经 8000rpm，4°C 离心 20min 以去除聚合物沉淀，上清于 4°C 保存备用。

### 6.3.2.2 胶体金标记抗体最佳 pH 值的确定

所用胶体金的制备见本章 6.3.1。取 7 管 1 ml 胶体金溶液，用 0.1 mol/L  $K_2CO_3$  或者 0.1 mol/L HCl 分别调节 pH 值为 5.5, 6.0, 7.4, 8.0, 8.6, 9.2, 9.8；每管胶体金溶液加入抗体蛋白各 30  $\mu$ g，漩涡混匀，静置 5min 后分别加入 100 ul 10% NaCl 溶液，静置 2h 后，颜色发生变化的胶体金溶液表明 pH 不合适，将仍保持为红色的各管胶体金溶液离心除去沉淀，测定上清在所制备的胶体金特征吸收峰处的 OD 值并作为纵坐标，以标记时的 pH 值为横坐标将结果绘制成图。

需要注意的是，将 pH 计直接插到胶体金溶液中容易堵塞 pH 计的电极，测定时应首先用终浓度为 0.1% 的聚乙二醇（PEG20000）稳定胶体金溶液后再进行 pH 的测定。

### 6.3.2.3 胶体金标记最佳抗体用量的确定

本研究采用目测法来确定胶体金标记最佳抗体用量，具体操作步骤如下：首先用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  或者 0.1 mol/L HCl 将胶体金溶液 pH 调节为最佳 pH，然后每管 1ml 分装为 10 小管；将抗体用 0.005 mol/L、pH 9.0 的硼酸盐缓冲液做系列稀释，使得抗体浓度为 2-20 $\mu$ g/ml，每种浓度取 1ml 加到分装的胶体金溶液中，另取 1ml 胶体金溶液加 1ml 硼酸盐稀释液（不含抗体）作为对照管；静置 10min 后，各管分别加入 100ul 10% 的 NaCl 溶液，漩涡混匀后静置 2h，观察颜色变化，选择胶体金颜色仍保持为红色的最少抗体用量即为胶体金标记最佳抗体用量。

### 6.3.2.4 胶体金标记抗体的制备

在胶体金标记的抗体实际用量的基础上，根据要标记的胶体金体积计算出抗体用量，然后根据下面步骤进行操作：用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  调节胶体金溶液的 pH 值为最佳 pH，从中取 10ml 胶体金溶液加到 50ml 锥形瓶中，置于电磁搅拌器上 250 rpm 持续搅拌；逐滴加入 3ml 总量为 10 倍最佳标记抗体蛋白量的溶液；持续搅拌 30min 后，再逐滴加入

BSA 溶液使其终浓度为 1%，维持搅拌 30min；将溶液以 3000 rpm 常温离心 15min，去沉淀；取上清溶液以 11000 rpm 4°C 离心 40min，溶液分为两层，保留下层可流动的暗红色沉淀，用 0.002 mol/L、pH7.4 含 1%蔗糖的硼酸盐缓冲液混悬，恢复至原有体积后再次离心，为彻底除去未结合蛋白质可重复离心 2-4 次；最后用 0.002 mol/L、pH7.4 含 0.02% NaN<sub>3</sub> 的硼酸盐缓冲液将沉淀重悬为原体积的 1/10，置于 4°C 保存备用。

#### 6.3.2.5 胶体金标记抗体的活性鉴定

取羊抗鼠二抗 3ul 点样在 NC 膜上并置于 37°C 烘箱干燥 10min 后取出，取 2ul 金标抗体点样在 NC 膜上羊抗鼠二抗处，静置 5min 后用超纯水冲洗 NC 膜，并用肉眼观察。若 NC 膜上点样位置出现明显的红色斑点，说明制备的金标抗体与羊抗鼠二抗发生了结合反应，表明所制备的胶体金标记抗体具有活性可用于胶体金免疫层析分析。

#### 6.3.3 包被抗原的筛选

将第二章制备的五种完全抗原 MEL-MCA-OVA, MEL-MCA-BSA, MEL-ACA-OVA, MEL-PABA-BSA, MEL-PABA-OVA 分别喷涂于 NC 膜上并制作试纸条，通过比较各自检测线有无及颜色深浅来确定最佳的包被用抗原。

#### 6.3.4 各种溶液的筛选

##### 6.3.4.1 包被原稀释液的选择

分别用三种包被原稀释液 A1 (0.05mol/L pH7.4 Tris-HCL 缓冲液)、A2 (0.01mol/L pH7.4 PBS 磷酸盐缓冲液) 和 A3 (0.05mol/L pH9.6 CBS 碳酸盐缓冲液) 将包被抗原稀释 1:10, 1:50, 1:100 后点样于 NC 膜上，置于 37°C 烘箱干燥 10min；取出，将金标抗体 2×稀释后点样于 NC 膜上相同位置处，静置 5min 后用洗涤液冲洗，观察对比检测线显色情况。

##### 6.3.4.2 金标抗体稀释液的选择

取 3 份浓缩纯化的金标抗体各 20ul，分别用三种金标抗体稀释液 B1 (0.002 mol/L pH7.4 硼酸盐缓冲液+1% 蔗糖+0.5% Triton X-100)、B2 (0.01 mol/L pH7.4 PBS+0.1% BSA+0.5% Triton X-100) 和 B3 (0.01 mol/L pH7.4 PBS+0.1% BSA+0.1% PEG+0.5% Triton X-100) 将金标抗体做 2×, 4×, 8×稀释，然后滴加于已点样的 NC 膜上，静置 5min 后用洗涤液冲洗，观察对比检测线显色情况。

#### 6.3.5 金标抗体浓度的确定

将浓缩纯化后的金标抗体用 0.002mol/L、pH7.4 的硼酸盐缓冲液做 2×, 4×, 8×三个不同浓度稀释，分别按 10ul/cm<sup>2</sup>喷涂在结合垫上，干燥后制作成试纸条。在其他条件不变的情况下，测试 0, 2ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml 的三聚氰胺标准溶液，根据 NC 膜上检测线的显色情况确定最佳的金标抗体稀释度。



### 6.3.6 包被原和二抗包被浓度的确定

用选出的包被原稀释液调节包被抗原 MEL-PABA-OVA 浓度为 0.2mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 分别喷于 NC 膜上, 干燥后制成试纸条, 分别用 0, 2ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml 的三聚氰胺标准溶液检测, 比较 NC 膜上检测线的显色情况, 选出最佳的包被原浓度, 然后将羊抗鼠二抗稀释为 0.2mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 分别喷于 NC 膜上作为质控线, 观察显色情况选出最佳二抗浓度。

### 6.3.7 试纸条的组装与测试方法

#### 6.3.7.1 试纸条的组装

根据 6.3.3-6.3.6 确定的最适条件, 采用 Biodot 喷膜机将包被抗原和羊抗鼠 IgG 喷于 NC 膜上, 分别作为 T 线 (检测线) 和 C 线 (控制线), 将金标抗体包被于金标结合垫上, 在 37°C 烘箱干燥 10min, 然后将 NC 膜、金标结合垫、样品垫和吸水垫按图 6-1 进行组装, 用切割机切成 3mm 宽的试纸条, 与干燥剂一起装于铝箔袋中密封保存备用。

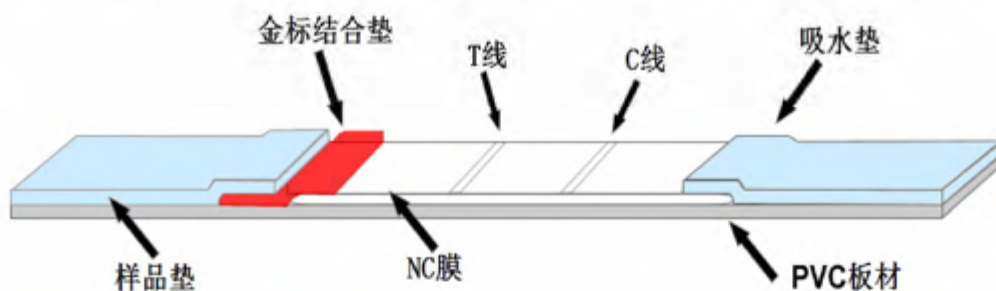


图 6-1 胶体金层析试纸条组装示意图

Fig. 6-1 Schematic description of gold lateral flow strip

#### 6.3.7.2 试纸条的测试

三聚氰胺属于小分子物质, 试纸条采用竞争法进行检测。将试纸条平放, 取适量标准品溶液或样品提取液滴到样品垫上, 静置 5-10min 后肉眼观察 NC 膜的显色情况。

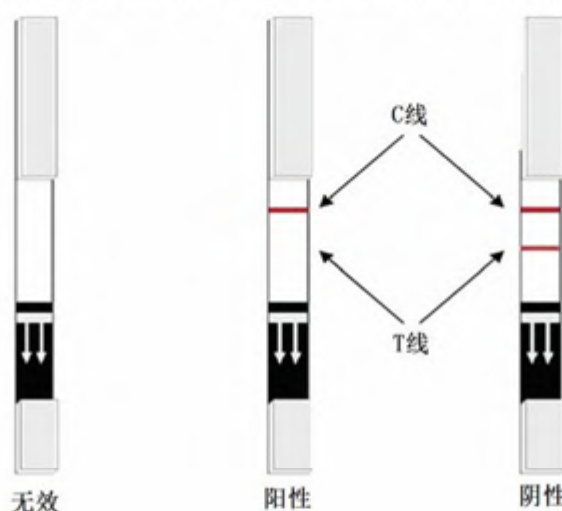


图 6-2 胶体金层析试纸条结果判定示意图

Fig. 6-2 Illustration of gold lateral flow strip results

如图 6-2 所示, 如果 T 线 (检测线) 和 C 线 (控制线) 均出现红色条带, 则说明样品为阴性; 如果 C 线 (控制线) 出现红色条带, T 线 (检测线) 没有出现红色条带, 则说明样品为阳性; 如果 T 线 (检测线) 显色很弱且明显比 C 线 (质控线) 显色浅, 则提示样品为可疑阳性样品; 不管样品中是否存在三聚氰胺, C 线 (控制线) 均应显色, 若 C 线不显色, 则说明试纸条失效。

### 6.3.8 试纸条性能测定

#### 6.3.8.1 三聚氰胺标准溶液检测限的测试

将三聚氰胺用标准品稀释液系列稀释为 0, 3 ng/ml, 6 ng/ml, 8 ng/ml, 10 ng/ml, 12.5 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 同时设阴性对照, 取各浓度标准溶液 200 ul 加到空白的 96 孔酶标板中, 将试纸条插到各浓度标准溶液中进行测试, 10min 后观察结果。共做 3 个重复测定, 将 T 线 (检测线) 刚好完全消失的标准品浓度定为检测限。

#### 6.3.8.2 特异性测试

将三聚氰胺的结构类似物: 阿拉特津, 灭蝇胺, CDT 分别稀释为 50ng/ml 和 500ng/ml, 再分别用试纸条进行检测, 分析试纸条的特异性。每个类似物做 3 个重复。

#### 6.3.8.3 重复性实验

分别从 3 个批次的试纸条中各随机抽取 6 根试纸条进行重复性试验。

#### 6.3.8.4 保存试验

将制备好的试纸条密封于铝箔袋中, 置于 60°C 烘箱, 每天从中取出 4 条, 用于检测阴性空白样品和 12.5ng/ml 三聚氰胺阳性样品, 观察 NC 膜上检测线的显色情况以及金标垫上金标抗体的释放情况。

#### 6.3.8.5 样品基质对检测的影响

取空白奶粉样品置于 50 ml 离心管中, 加入纯水进行融解, 分别做未稀释, 2×稀释, 3×稀释, 4×稀释, 再分别加入 12.5ng/ml 水平的三聚氰胺标准品, 混匀, 用制备的试纸条进行检测, 观察 C 线和 T 线颜色深浅、T 线的有无以及 NC 膜上金标抗体的稀释情况, 从而确定实际奶粉样品检测时的稀释倍数。

#### 6.3.8.6 实际样品检测及确证

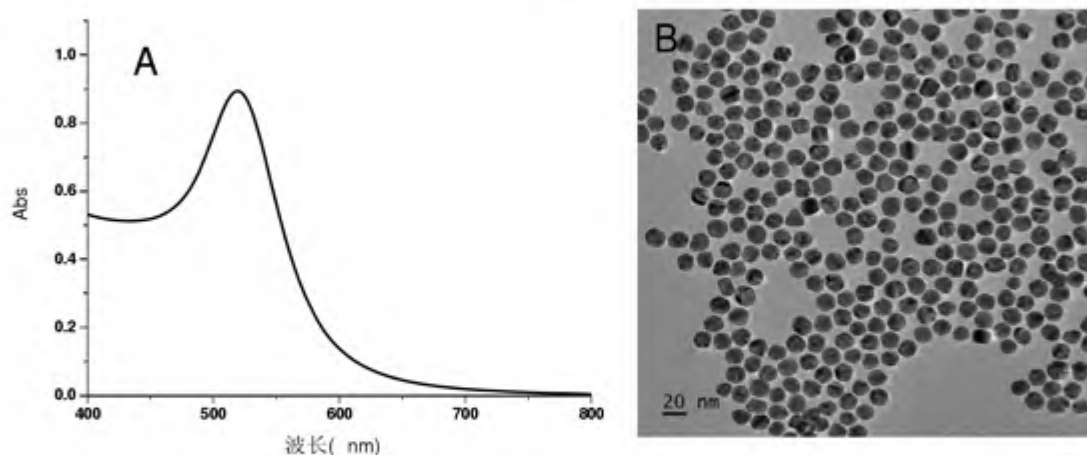
从江苏省出入境检验检疫局获得 50 份原料乳样品, 用纯水稀释 3 倍, 各取出 200ul 加到试纸条的样品结合垫上进行测试, 5min 后观察结果。同时, 每份样品的检测结果用 GC-MS/MS 法进行确证。每个样本做 3 个重复。

### 6.3.9 结果和讨论

#### 6.3.9.1 胶体金制备及鉴定

通过肉眼观察, 制备的胶体金溶液外观呈晶莹透亮的酒红色。在 400-800nm 波长范

围内进行紫外扫描，并将胶体金溶液进行透射电镜扫描，结果见图 6-3。



(A: 胶体金溶液的紫外扫描图谱; B: 胶体金溶液的透射电镜图)

图 6-3 胶体金溶液紫外扫描图和透射电镜图

Fig. 6-3 UV-Vis spectrum and transmission electron microscope maps of colloidal gold solution

由紫外扫描图谱可以看出，制备的胶体金溶液最大吸收峰波长为 520.3nm，将其代入线性回归方程  $Y(\text{颗粒粒径})=6.0308 X (\lambda_{\text{max}}) - 3118.6$  可计算胶体金颗粒直径为 19.5nm，且最大吸收峰的峰宽较小，说明胶体金颗粒的粒径分布比较均匀。电镜图也表明胶体金颗粒大小均一，没有多边形或椭圆形的颗粒，分散性较好。通过测量图中胶体金颗粒直径大小，可计算出胶体金颗粒平均粒径约为 18.9nm，这与紫外扫描鉴定法得到的结果基本一致。

在各种形貌的胶体金颗粒中，球形胶体金粒子对蛋白质的吸附能力最强，可与多种蛋白分子非共价结合，因此在免疫检测分析中最为常用<sup>[13]</sup>。在 GICA 检测系统中，其信号的获得是由胶体金颗粒聚集在一起而形成肉眼可见的颜色变化，若颗粒太小则不能产生足够的肉眼可见颜色变化，颗粒太大则会因位阻效应影响其在试纸条上的流动性，因此，合适大小的胶体金颗粒对 GICA 检测是比较重要的<sup>[14,15]</sup>。一般认为粒径为 15-30nm 的胶体金对 GICA 试纸条是比较合适的<sup>[16,17]</sup>，本实验所制备的胶体金粒径在 19nm 左右，大小适中，可用于三聚氰胺抗体的标记。

#### 6.3.9.2 标记抗体蛋白最佳 pH 值的确定

本实验对胶体金标记抗体最佳 pH 值的测定结果见图 6-4。从图中可以看出，当标记所用胶体金的 pH 在 8.0-9.2 之间时，所形成的胶体金标记抗体蛋白结合物的光密度值较高，说明在该 pH 范围内胶体金颗粒和抗体的吸附比较好，形成的金标抗体结合物最稳定。因此，本实验选择 pH8.0 为胶体金标记抗体蛋白的最佳 pH。

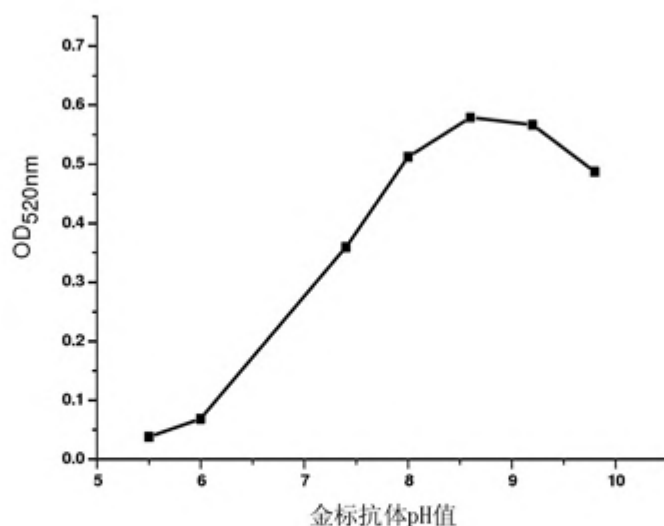


图 6-4 最适 pH 值的测定结果

Fig.6-4 Determination of the optimal pH value for gold-antibody

胶体金标记技术是指蛋白质如抗体等高分子物质被吸附到胶体金颗粒表面的过程。其机理在于蛋白质表面带有正电荷，与胶体金颗粒表面的负电荷通过静电吸附作用结合在一起，同时又可保持生物大分子的活性从而可形成金标记物，与相应配体结合后可大量聚集在一起，形成肉眼可见的红色斑点，从而可进行各种物质的定性或半定量快速免疫检测分析。在进行标记前，抗体必需经过脱盐处理，以避免高浓度的盐离子干扰抗体蛋白和胶体金颗粒的吸附。同时，这种吸附作用也取决于胶体金溶液的 pH 值，一般将抗体的等电点作为金标抗体的最适 pH，这是因为蛋白质处在等于或稍大于其等电点的 pH 时呈电中性，分子表面张力最大，较易吸附于胶体金颗粒表面而形成一个蛋白层，阻止胶体金颗粒之间的聚集使其处于稳定状态<sup>[18]</sup>。本实验确定的最适 pH 为 8.0，这也与单抗的等电点比较接近。

#### 6.3.9.3 胶体金标记抗体最佳浓度的确定

本实验采用目测法对胶体金标记抗体所需最小抗体蛋白量进行测定。目测法结果见表 6-1。由表中可见，当加入抗体蛋白量为 0-6 $\mu\text{g/ml}$  时，胶体金呈现由红变蓝的现象，说明此时的蛋白量不足以稳定胶体金；当加入抗体蛋白量达到或超过 8 $\mu\text{g/ml}$  时胶体金溶液保持为红色不变，说明此时胶体金颗粒和抗体蛋白的吸附效果较好，且基本达到饱和状态。因此，选择 8 $\mu\text{g/ml}$  为稳定胶体金溶液的最小抗体蛋白量。

表 6-1 目测法确定最适抗体用量

Table 6-1 Determination of the optimum antibody amount by visual inspection

| 管号                        | 对照 | 1 | 2 | 3  | 4 | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 |
|---------------------------|----|---|---|----|---|----|----|----|----|----|----|
| 抗体用量 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0  | 2 | 4 | 6  | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 |
| 最终颜色                      | 蓝  | 蓝 | 蓝 | 浅蓝 | 红 | 红  | 红  | 红  | 红  | 红  | 红  |

#### 6.3.9.4 金标抗体活性的鉴定

通过鉴定，金标抗体与羊抗鼠二抗在 NC 膜的点样处可见明显的粉红色斑点，二者发生结合反应，说明金标抗体具有免疫活性。



### 6.3.9.5 包被抗原的选择

本研究对五种完全抗原进行了筛选,结果表明三种 OVA 偶联物的检测线颜色很浅,几乎不可见,有时会出现反白现象;两种 BSA 偶联物的检测限颜色均较深,其中以 MEL-PABA-BSA 包被的检测线显色最深,考虑到 ELISA 系统中选用的包被原为 MEL-PABA-OVA,为保证检测灵敏度,本实验选用 MEL-PABA-BSA 作为包被原用于胶体金免疫层析分析。

### 6.3.9.6 包被原稀释液的选择

对三种包被原稀释液进行筛选,结果见表 6-2,采用 A3 作为包被原稀释液时,检测线显色较深,且在包被原 1:10, 1:50, 1:100 稀释时均有明显的显色,原因可能是 CBS 缓冲液更有利于包被原吸附到 NC 膜上。因此,选择 A3 即 0.05mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液作为包被原稀释液。

表 6-2 包被原稀释液的选择结果

Table6-2 Selection of coating diluents by naked eyes

| 稀释倍数  | 显色结果      |           |           |
|-------|-----------|-----------|-----------|
|       | A1 包被原稀释液 | A2 包被原稀释液 | A3 包被原稀释液 |
| 1:10  | +++       | +++       | +++       |
| 1:50  | +++       | ++        | ++        |
| 1:100 | +         | -         | ++        |

注:“-”没有显色或无法辨别;“+”可见显色但与背景反差不大;

“+++”显色明显;“++++”显色深且与背景反差大。

### 6.3.9.7 金标抗体稀释液的选择

对三种金标抗体稀释液进行筛选,结果见表 6-3。

表 6-3 金标抗体稀释液的筛选结果

Table6-3 Optimal of dilution buffer for gold-antibody

| 金标抗体稀释倍数 | 显色结果       |            |            |
|----------|------------|------------|------------|
|          | B1 金标抗体稀释液 | B2 金标抗体稀释液 | B3 金标抗体稀释液 |
| 2× 稀释    | +++        | +++        | +++        |
| 4× 稀释    | +++        | ++         | ++         |
| 8× 稀释    | ++         | +          | +          |

通过考察显色深浅和背景颜色,确定 B1 即含 1%蔗糖和 0.5%Triton X-100 的 0.002mol/L pH 7.4 硼酸盐缓冲液为实际应用的金标抗体稀释液。金标抗体稀释液直接影响着金标抗体的活性和其在金标结合垫上的释放,在试纸条优化中,金标抗体稀释液的选择是十分重要的。一般在金标抗体稀释液中需要有表面活性剂和蛋白保护剂组分。表面活性剂可以促进金标抗体在结合垫上的释放,并有效减少 NC 膜上的非特异性吸附<sup>[19]</sup>,是金标抗体稀释液中的重要组分。常用的表面活性剂有 Triton X-100 和 Tween-20。据文献报道, Triton X-100 作为表面活性剂比 Tween-20 效果好<sup>[20]</sup>,因此本实验选用 Triton X-100 作为表面活性剂并取得了良好效果。蛋白保护剂主要为糖类、异源蛋白质和多羟

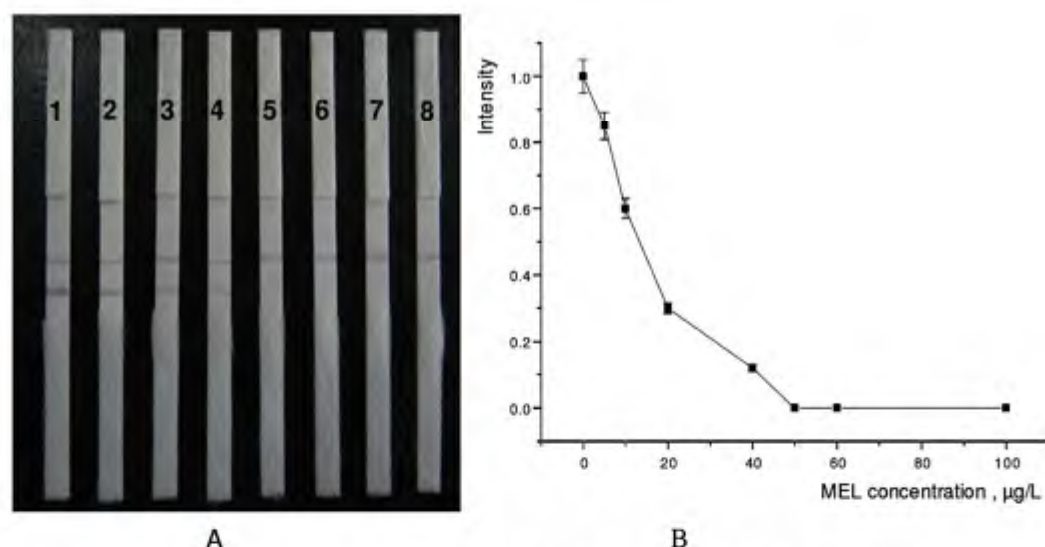
基化合物（如 PEG）等，其中糖类如蔗糖、海藻糖等可与抗体蛋白分子形成氢键，在干燥状态下仍可保持抗体的活性；异源蛋白质（如 BSA）和惰性高分子聚合物（如 PEG）分子量相对较大，可在抗体蛋白表面形成一层保护膜以保护抗体结构免遭外界物质的破坏，对试纸条的稳定性具有重要作用<sup>[16]</sup>。本实验确定的金标抗体稀释液中含 1%蔗糖和 0.5%Triton X-100，可保证试纸条的灵敏度和稳定性。

#### 6.3.9.8 金标抗体、包被原和二抗包被浓度的确定

通过设置不同的金标抗体、包被原和二抗包被浓度组合，综合考察检测线和控制线显色情况、背景深浅和灵敏度，经多次测定，最终确定金标抗体最适稀释倍数为 1:4；包被原最佳包被浓度为 0.5mg/ml；最佳二抗包被浓度为 0.5mg/ml。

#### 6.3.9.9 试纸条对三聚氰胺标准溶液检测限的确定

通过对系列浓度的三聚氰胺标准品的检测，确定试纸条检测三聚氰胺标准溶液的检测限，结果见图 6-5。



(A: 三聚氰胺浓度分别为 1: 0, 2: 3ng/ml, 3: 6ng/ml, 4: 8ng/ml, 5: 10ng/ml, 6: 12.5ng/ml, 7: 15ng/ml, 8: 20ng/ml; B: 标准曲线)

图 6-5 试纸条三聚氰胺半定量标准曲线

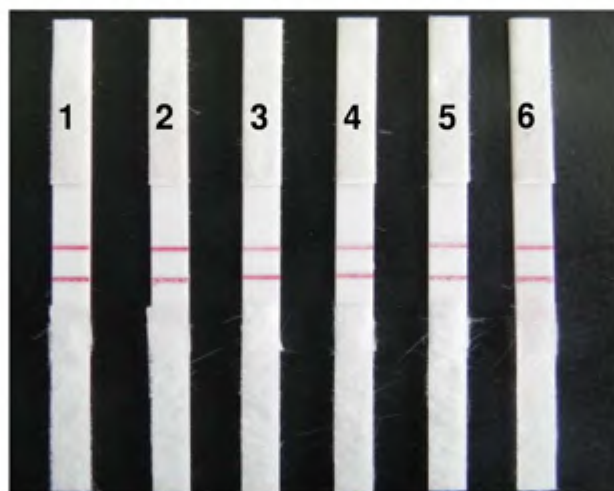
Fig.6-5 Standard curve for melamine quantization with test strip

从图 6-5 中图 A 可以看出，与阴性对照相比，当标准品浓度为 10ng/ml 时，检测线颜色明显变浅；当标准品浓度达到 12.5ng/ml 时，检测线肉眼完全不可见。用灰度扫描仪进行各试纸条扫描，以三聚氰胺浓度为横坐标，以灰度值为纵坐标，绘制标准曲线，如图 6-5 中图 B 所示，试纸条检测三聚氰胺在 3-15ng/ml 范围内线性关系良好，相关系数  $R^2=0.92$ ，变异系数小于 8%，表明所制备的试纸条可用于三聚氰胺的半定量检测。

#### 6.3.9.10 特异性测试

对试纸条进行交叉反应实验，以确定其对三聚氰胺的特异性，检测结果见图 6-6。结果表明，试纸条对灭蝇胺、阿特拉津、CDT 均无明显交叉反应，可以较好的区分三聚氰胺及其类似物，对三聚氰胺具有很好的特异性。这一结果与第四章 ELISA 结果存在

差异，原因可能是 ELISA 所用包被原为 MEL-PABA-OVA，而胶体金试纸条所用包被原为 MEL-PABA-BSA，两种包被原因载体蛋白和偶联方法不同其空间结构和偶联比存在差异，表现为对灭蝇胺的识别性能不同而造成的。



(图中交叉反应物浓度为 1: 灭蝇胺 50ng/ml; 2: 灭蝇胺 500ng/ml; 3: 阿特拉津 50ng/ml; 4: 阿特拉津 500ng/ml; 5: CDT 50ng/ml; 6: CDT 500ng/ml)

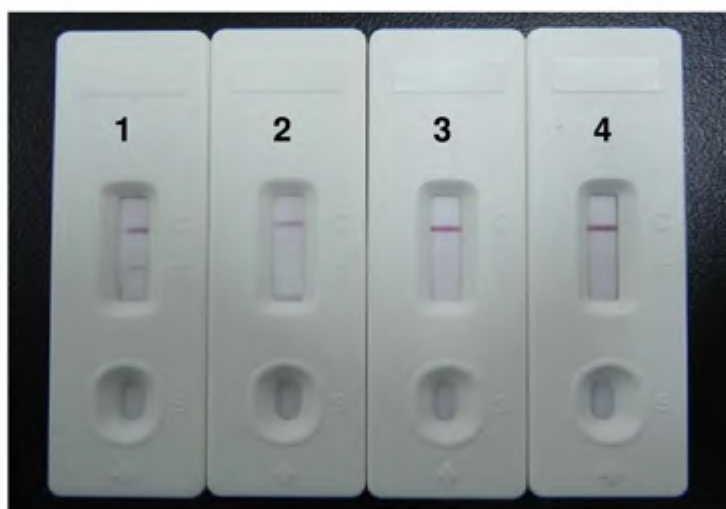
图 6-6 试纸条特异性测试结果

Fig.6-6 Determination of cross-reactivity by one step strip

#### 6.3.9.11 试纸条重复性及保存期

经测定试纸条检测结果稳定，重复性好。60℃ 烘箱中保存的试纸条直至第 7 天检测时才出现检测线颜色变浅，NC 膜上金标抗体释放不完全的现象，根据 Arrhenius 公式可估算出试纸条在 4℃ 条件下可保存半年以上，常温可保存一个月以上，达到试纸条保存期要求。

#### 6.3.9.12 样品基质对检测的影响



(图中奶粉稀释倍数分别为:1: 未稀释; 2: 2×稀释; 3: 3×稀释; 4: 4×稀释)

图 6-7 样品基质对试纸条检测的影响

Fig.6-7 Effect of sample matrix on the test strip

为考察样品基质对试纸条检测结果的影响，将奶粉稀释不同倍数后进行了测定，结果如图 6-7 所示，将未稀释的奶粉样品加到加样孔时，溶液迁移很慢，C 线和 T 线颜色较淡，说明金标垫上金标抗体释放不完全，且 T 线也很明显；奶粉样品 2×稀释进行检测时，T 线消失，但是也存在 C 线颜色较淡和金标抗体释放不完全现象；奶粉样品 3×稀释和 4×稀释检测时，C 线明显，T 线完全消失，背景清晰，考虑到试纸条实际检测的稳定性，我们认为奶粉样品进行 3×稀释进行检测对试纸条检测结果不会产生干扰。因此，本研究制备的试纸条检测奶粉实际样品的检测限可定为 37.5μg/kg，这一结果要优于文献报道中试纸条<sup>[21]</sup>和市场上同类产品的检测限，同时也低于国家规定的三聚氰胺在各种食品中的限量值，完全满足三聚氰胺实际检测的需要。

### 6.3.9.13 实际样品检测及确证

用试纸条检测 50 个实际样品，并采用 GC-MS/MS 进行确证，结果见表 6-4。

表 6-4 实际样品三聚氰胺试纸条和 GC-MS/MS 法检测结果

Table 6-4 Test results of MEL in real raw milk by strip and GC-MS/MS

| 样本编号 | 试纸条检测<br>(n=3)   | GC-MS-MS 检测<br>(μg/L)  | 样本编号 | 试纸条检测<br>(n=3) | GC-MS-MS 检测<br>(μg/L) |
|------|------------------|------------------------|------|----------------|-----------------------|
| H-1  | +++ <sup>a</sup> | 54.8                   | S-22 | +++            | 410                   |
| H-2  | --- <sup>b</sup> | ND <sup>c</sup>        | P-1  | +++            | 32.8                  |
| H-3  | ---              | ND                     | P-2  | +++            | 51.7                  |
| H-4  | ---              | ND                     | P-3  | ---            | ND                    |
| H-5  | +++              | 184                    | P-4  | ---            | ND                    |
| H-6  | +++              | 23.5                   | P-5  | ---            | ND                    |
| H-7  | +++              | 20.2                   | P-6  | +++            | 17.2                  |
| H-8  | +++              | 19.7                   | P-7  | ---            | ND                    |
| H-9  | +++              | 42                     | P-8  | ---            | ND                    |
| H-10 | +++              | 107                    | P-9  | ---            | ND                    |
| H-11 | ---              | ND                     | P-10 | ---            | ND                    |
| H-12 | ---              | ND                     | P-11 | ---            | ND                    |
| H-13 | ---              | ND                     | P-12 | ---            | ND                    |
| H-14 | ---              | ND                     | Z-15 | ---            | ND                    |
| H-15 | ---              | ND                     | Z-16 | +++            | 17.9                  |
| H-16 | +++              | 46.4                   | Z-17 | ---            | ND                    |
| H-17 | +++              | 97.9                   | Z-18 | ---            | ND                    |
| H-18 | ---              | ND                     | Z-19 | ---            | ND                    |
| H-19 | ±±± <sup>d</sup> | 8.4                    | Z-21 | ±±±            | 10.5                  |
| H-20 | ---              | 7                      | Z-22 | ---            | ND                    |
| H-21 | +++              | 44                     | Z-23 | ---            | ND                    |
| H-22 | ---              | ≈2.4(<QL) <sup>e</sup> | Z-24 | ---            | ND                    |
| S-19 | +++              | 110                    | Z-25 | ---            | ND                    |
| S-20 | +++              | 1100                   | Z-26 | +++            | 13.4                  |
| S-21 | +++              | 280                    | Z-27 | ---            | ND                    |

注：+++<sup>a</sup>：阳性；---<sup>b</sup>：阴性；±±±<sup>d</sup>：弱阳性；ND<sup>c</sup>：未检出；≈2.4(<QL)<sup>e</sup>：含量低于 LOQ。



结果表明两种方法具有很好的一致性，表明本研究制备的试纸条完全可以用于实际样品中三聚氰胺残留的快速检测，而且与 GC-MS/MS 法相比，试纸条检测成本低，操作简单，可以实现现场高灵敏检测。

## 6.4 基于功能化金纳米粒子分子识别的三聚氰胺比色检测法

### 6.4.1 18-冠醚-6 的巯基衍生化

金纳米粒子表面修饰小分子通常利用金和巯基形成金硫键，首先需要对 18-冠醚-6 进行巯基衍生化<sup>[22]</sup>，此步骤分为两步进行，具体为：

#### 1. 2-(羟甲基)-18-冠醚-6-C<sub>6</sub>-Br 的制备

称取 4.5 mmol, 0.11 g 氢化钠 (65%-55%矿物油) 溶于 5ml 二甲亚砜溶液，加入 1.94 mmol (0.57 g) 2-羟甲基-18 冠醚-6，室温下搅拌 30min，再加入 10.1 mmol 1,6-二溴己烷 (1.55 mL)，室温搅拌过夜。向反应溶液中加入甲醇猝灭，减压蒸发，残留液用 50mL 二氯甲烷萃取，用 50 mL 纯水洗三遍，无水硫酸镁干燥 10h，过滤，得到的溶液经硅胶柱纯化，苯：石油醚 (1:1, v/v) 进行洗脱得到目标物 A。

#### 2. 2-(羟甲基)-18 冠醚-6-C<sub>6</sub>-SH 的制备

称取 0.49 g, 1.08 mmol 物质 A 溶于 10mL 乙醇，加 0.4 g, 5.5 mmol 硫脲充分混合后，加热回流过夜。用 0.4g, 7 mmol 氢氧化钾加入到反应液中调节 pH，继续回流 2h，加 1M 盐酸酸化。向反应残留液中加入 50mL 二氯甲烷萃取，50 mL 纯水洗三遍，无水硫酸镁干燥 10h，过滤，得到的溶液经硅胶柱纯化，用苯进行洗脱，得到目标物 B，进行核磁鉴定，<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.231.31 (m, 4H), 1.521.63(m, 2H), 2.51(q, 2H), 3.28-3.49(m,5H),3.51-3.90(m,22H)，18-冠醚-6 衍生化成功。

### 6.4.2 胶体金溶液 pH 优化

取 6 管 1ml 胶体金溶液，用 0.5M 氢氧化钠调节 pH 值依次为 6, 7, 8, 9, 10, 11，漩涡混匀，静置 2h，测各 pH 条件下胶体金的 Zeta 电位值并作为纵坐标，以对应的 pH 值为横坐标将结果绘制成图，选择最稳定的 pH 值。

### 6.4.3 功能化金纳米粒子制备

取 6.3.1 制备的金纳米粒子溶液 20 mL，用 0.2 mL, 0.5 M 氢氧化钠调节至 pH 8。取衍生化的冠醚-B 2ml 溶解于 4.4ml 乙醇，加入到调节好的金纳米粒子溶液中，室温下搅拌 2 天，1000 rpm，离心 15min，去上清。为更好的除去多余的冠醚，可重复离心 2-3 次，最后将沉淀用超纯水稀释到原体积，4°C 保存备用<sup>[23]</sup>，并采用衰减全反射技术进行红外鉴定偶联效果。

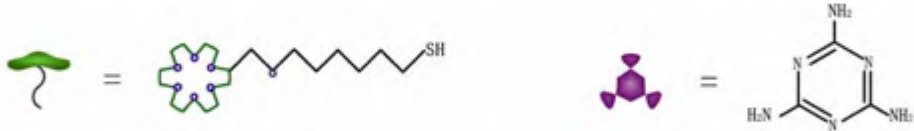
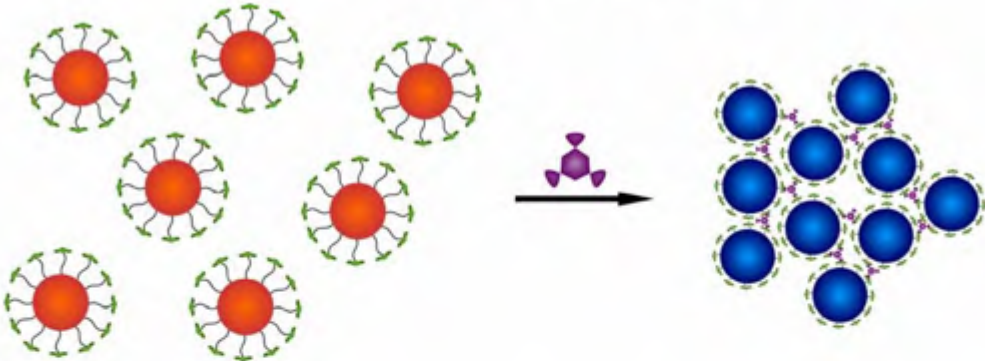
### 6.4.4 检测原理

利用冠醚家族检测各种目标物的研究已有报道，但均存在检测限偏高的问题<sup>[24-28]</sup>。在冠醚家族中，18-冠醚-6 能结合氨基尤其是三聚氰胺分子中存在的烷基氨离子<sup>[29,30]</sup>，

通过与三聚氰胺连接形成一种类似于准轮烷的结构。同时，18-冠醚-6 可通过-SH 与金纳米粒子偶联，从而可制备出识别三聚氰胺的功能性金纳米粒子。18-冠醚-6 通过冠醚上氧原子与三聚氰胺分子中酰亚胺基团形成氢键  $\text{NH}\cdots\text{O}$  从而实现了对三聚氰胺的识别<sup>[31]</sup>。更重要的是决定冠醚氧原子上空间反应的主要因素是铵根离子进入的深度<sup>[32]</sup>，这与其他基于环形配体引起金纳米粒子聚集的机理是截然不同的<sup>[33]</sup>，本研究基于功能化金纳米粒子分子识别检测三聚氰胺的原理如图 6-8 所示。



(A: 18-冠醚-6 与三聚氰胺结合示意图)



(B: 三聚氰胺促使功能化金纳米粒子发生聚集示意图)

图 6-8 基于功能性金纳米粒子检测三聚氰胺原理图

Fig.6-8 Schematics of determination MEL by functional GNPs

6.4.5 三聚氰胺标准溶液检测限的测定

配制不同浓度的三聚氰胺标准溶液 0, 0.5ng/ml, 1ng/ml, 100ng/ml, 250ng/ml, 2000ng/ml, 4000ng/ml, 5000ng/ml, 20000ng/ml, 以 1:2 的体积比添加到制备好的功能化金纳米粒子溶液中，观察各浓度条件下功能化金纳米粒子溶液颜色变化，并分别用分

光光度计法进行扫描，TEM 扫描，DLS 测定，根据功能化金纳米粒子的特征表面等离子共振峰的变化绘制标准曲线。

#### 6.4.6 特异性测定

选择胞嘧啶，胸腺嘧啶和 1,4-苯二胺三种化合物，分别配置 0, 50ng/ml, 100ng/ml, 500ng/ml, 1000ng/ml, 2500ng/ml, 5000ng/ml, 20000ng/ml 的标准溶液，添加到功能性金纳米粒子溶液中进行紫外测定，从而分析所制备的功能性金纳米粒子检测三聚氰胺的特异性。

#### 6.4.7 添加回收实验

取空白奶粉 100mg 用超纯水配成 2ml 溶液，分别以 10 $\mu$ g/kg, 50 $\mu$ g/kg, 100 $\mu$ g/kg, 200 $\mu$ g/kg, 500 $\mu$ g/kg 的水平进行三聚氰胺标准品的添加，再加入 61mM 的三氯乙酸和乙腈，超声充分震荡后，10000rpm，离心 10min，取出上清，过滤，滤液用去离子水恢复到原体积，用本文制备的 IAC 柱进行前处理和纯化。将得到的样品以 1:2 比例加入到金纳米粒子自组装体系中，每个浓度做 4 个重复。利用金纳米粒子的颜色变化检测奶粉中的三聚氰胺，测定样品回收率。

#### 6.4.8 结果与讨论

##### 6.4.8.1 胶体金溶液 pH 优化

本研究采用柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金溶液，其 pH 值为 6.2。通过 0.5M 氢氧化钠对胶体金溶液 pH 进行调节，测定不同 pH 条件下胶体金的 Zeta 电位并作为纵坐标，以相应的 pH 值为横坐标，绘制成图 6-9。

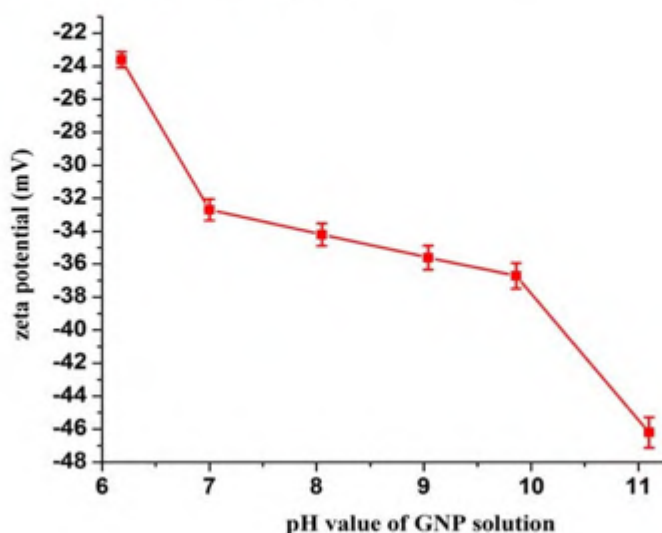


图 6-9 不同 pH 胶体金溶液的 Zeta 电位

Fig.6-9 Effect on zeta potential of GNPs pH

胶体金溶液的稳定性会影响纳米粒子自组装结构并使其特征表面等离子体共振频率发生变化，所以保持胶体金体系的稳定是成功构建目标功能性金纳米粒子并将其应用到检测分析中的前提。胶体金溶液的 pH 值会改变金纳米粒子表面的电荷分布，从而影



响体系的稳定性以及检测方法的灵敏性和可重复性。因此，对胶体金溶液的 pH 值进行优化以降低金纳米粒子之间的非特异性聚集是不可缺少的。从图 6-9 中可知，胶体金在 pH 为 6 时 Zeta 电位值为 -24 mV，随着 pH 的升高，Zeta 电位的负值增加，此时金纳米粒子表面负电荷增加，粒子之间的静电斥力相应增加，纳米金的稳定性提高。但当 pH 值增加到一定值时，Zeta 电位迅速增大，破坏了金表面的电荷分布，稳定性降低。在 pH 值 7-10 范围内，胶体金表面电位的变化相对平稳，即在此范围内胶体金相对稳定。考虑所建立方法的生物应用及稳定性和重复性，选择 pH8.0 为最佳 pH 用于下游实验。

#### 6.4.8.2 功能化金纳米粒子制备

对冠醚修饰的金纳米粒子采用衰减全反射傅里叶变化红外光谱技术进行鉴定。在测定前将金纳米粒子 13000g，10°C 离心，重复一次，除去上清，用稀释液复溶，吸取一滴加到金属铜网上，红外光烤干后检测，结果如图 6-10 所示。

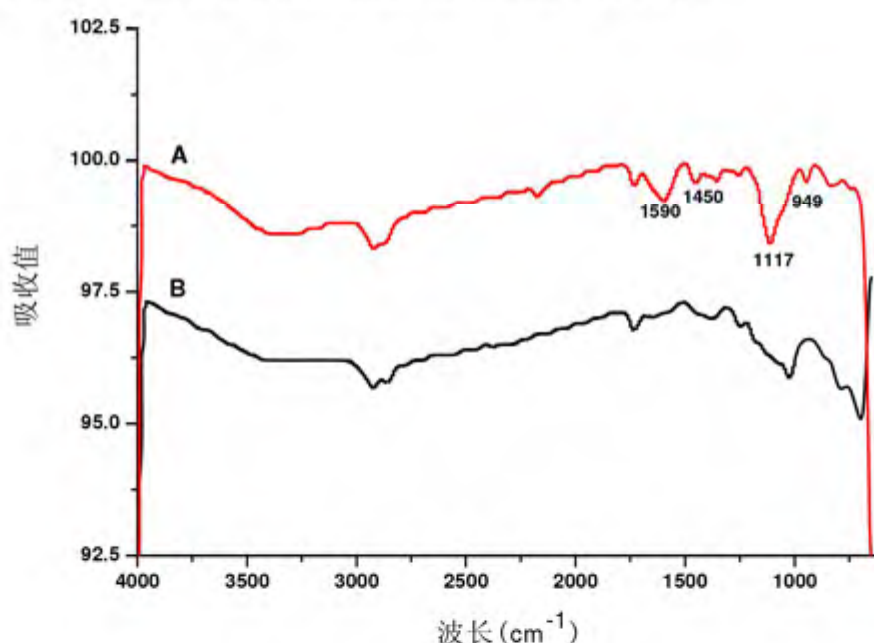


图 6-10 功能性金纳米粒子的红外光谱

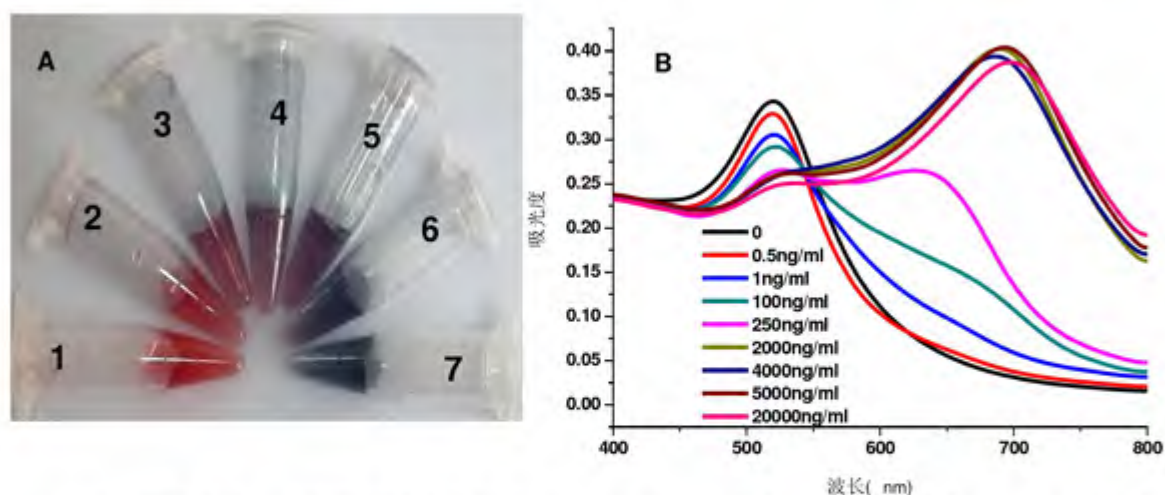
Fig.6-10 Transmission FT-IR spectra of functional GNPs

图 A 为偶联冠醚的功能性金纳米粒子的红外图谱，B 为原始金纳米粒子的红外图谱。对比 A 和 B 可知，A 在 949  $\text{cm}^{-1}$ 、1117  $\text{cm}^{-1}$ 、1450  $\text{cm}^{-1}$  和 1590  $\text{cm}^{-1}$  出现四个冠醚特有的红外吸收峰；同时冠醚衍生后带有的 -SH 在 2650  $\text{cm}^{-1}$  和 2450  $\text{cm}^{-1}$  处的红外特征吸收峰因与金纳米粒子形成金硫键而消失，这些特征峰表明巯基修饰的冠醚修饰金纳米粒子制备功能化金纳米粒子成功。

#### 6.4.8.3 三聚氰胺标准溶液检测限测定

向功能化金纳米粒子中加入不同浓度三聚氰胺标准溶液后，溶液颜色逐渐发生变化，如图 6-11 中图 A 所示，当加入 10ng/ml 三聚氰胺时，颜色从酒红色变成桃红色；随着三聚氰胺加入量的增多，溶液颜色逐渐由紫色最终成为蓝色，整个变色过程在 1min 内完成。





(A: 目测颜色变化, 三聚氰胺浓度分别为: 1: 0; 2: 10ng/ml; 3: 100ng/ml; 4: 1000ng/ml; 5: 2000ng/ml; 6: 5000ng/ml; 7: 10000ng/ml; B: 紫外光谱图)

图 6-11 功能化金纳米粒子添加各浓度三聚氰胺的颜色和紫外光谱

Fig.6-11 Change of visual color and UV-vis spectra of the functional GNPs with MEL

对各浓度溶液进行紫外扫描, 结果如图 6-11 中图 B 所示, 功能化金纳米粒子的特征吸收峰在 525nm, 当加入三聚氰胺后功能化金纳米粒子在 525nm 处的特征吸收峰的强度变弱; 在 698nm 处出现一个新的表面等离子体共振吸收峰, 且随着三聚氰胺浓度升高, 698nm 处峰的吸收值 ( $A_{698}$ ) 增加, 而 525nm 处峰的吸收值 ( $A_{525}$ ) 减小, 进而  $A_{698}/A_{525}$  的比值增大, 以三聚氰胺添加浓度为横坐标, 以相应的功能化金纳米粒子图谱中  $A_{698}/A_{525}$  的比值为纵坐标可建立标准曲线, 如图 6-12 所示, 本研究建立的三聚氰胺快速检测法的检测线性范围为 10-500ng/ml, 检测限为 6ng/ml, 可完全满足三聚氰胺常规检测要求, 且操作简单、快速、结果直观, 与其他基于金纳米粒子的三聚氰胺检测方法相比<sup>[34-36]</sup>更具优势。

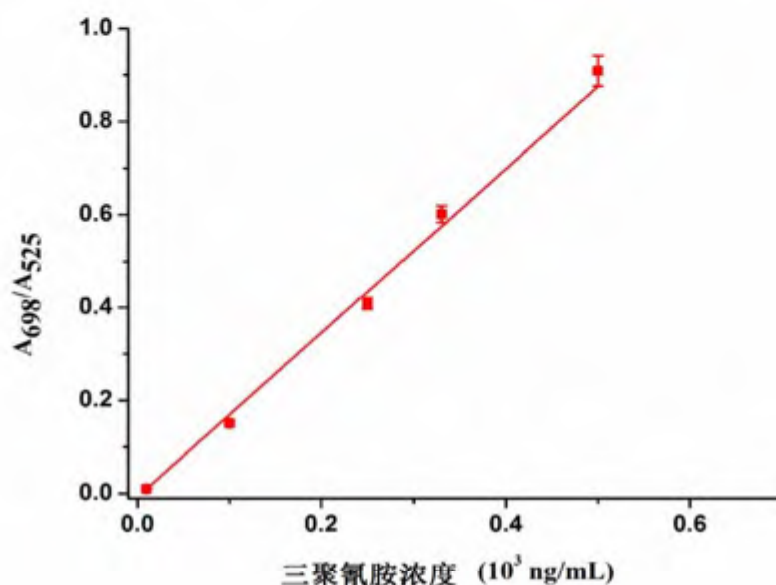
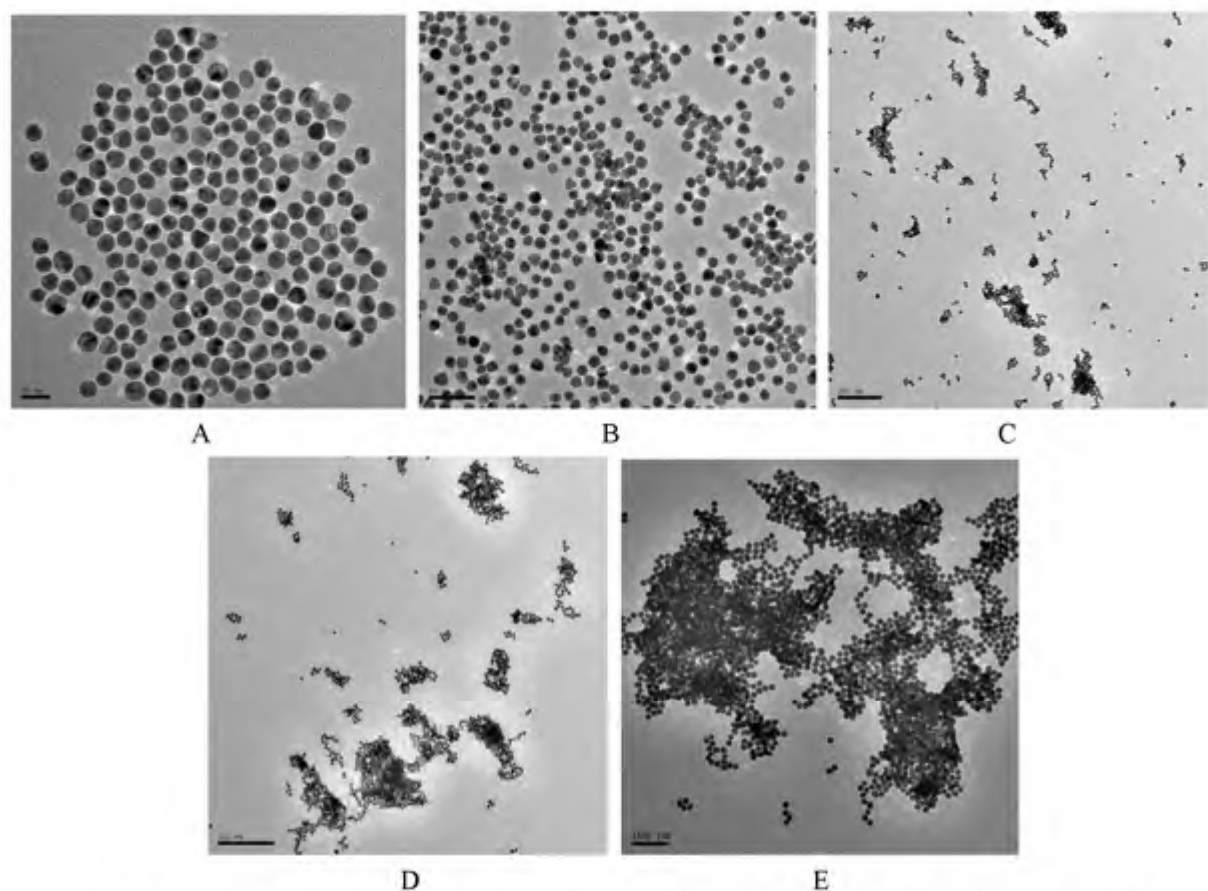


图 6-12 三聚氰胺检测标准曲线

Fig.6-12 Calibration curve of determination melamine by functional GNPs

为进一步验证添加三聚氰胺可促使功能化金纳米粒子发生聚集, 对各添加浓度产物进行 TEM 电镜扫描, 电压为 200 kV, 结果如图 6-13 所示。



(三聚氰胺添加浓度从 A 至 E 分别为: 0; 500ng/ml; 1000ng/ml; 5000ng/ml; 20000ng/ml)

图 6-13 添加各浓度三聚氰胺的功能化金纳米粒子电镜图

Fig.6-13 TEM micrographs of functional GNPs with MEL

图 6-13 图 A 为未添加三聚氰胺的功能化金纳米粒子 TEM 图, 可见粒子分散均匀, 状态稳定无聚集现象。当添加三聚氰胺后, 功能化金纳米粒子上偶联的冠醚环中的氧原子与三聚氰胺分子的  $-NH_2$  进行识别, 形成类似于准轮烷的复杂结构, 使得功能化金纳米粒子之间距离拉近, 形成聚集体。且随着三聚氰胺浓度的增加, 聚集体相应增大, 用 DLS 进行确证, 以三聚氰胺的添加浓度为横坐标, 以相应形成的聚集体的平均粒径为纵坐标, 绘制成图 6-14。

从图中可以看出, 在 0-20000ng/ml 范围内, 添加三聚氰胺浓度与所形成的功能性金纳米粒子聚集体大小之间关系比较复杂, 为非线性关系, 但同时可以观察到在 0-2000ng/ml 范围内, 聚集体大小与三聚氰胺浓度表现为良好的线性关系。

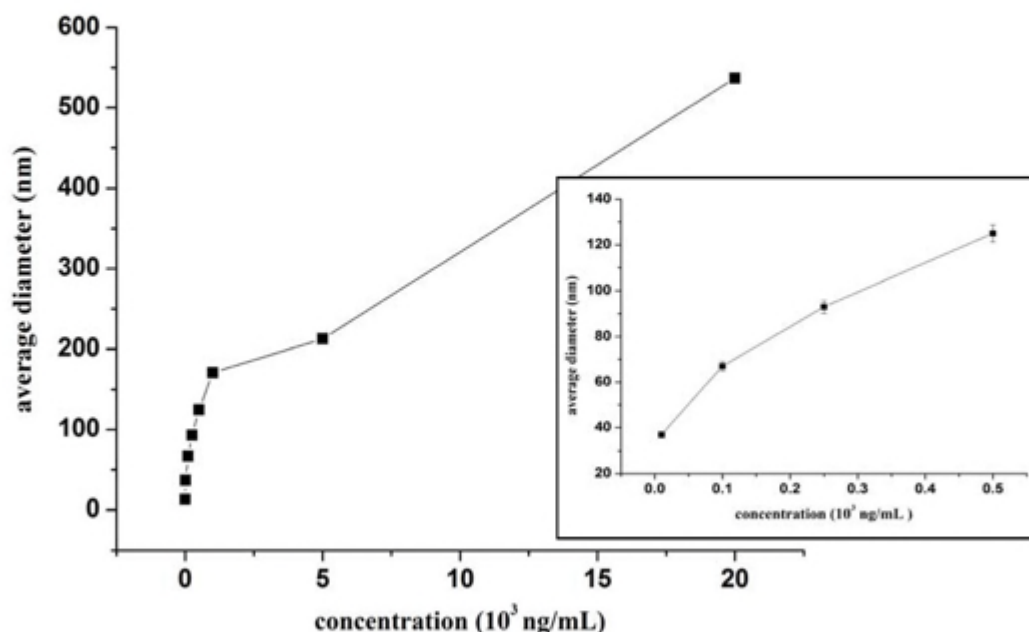


图 6-14 功能化金纳米粒子聚集体大小与三聚氰胺添加浓度的关系

Fig.6-14 The relationship between the size of aggregate and the concentration of melamine.

#### 6.4.8.4 特异性测定

为研究所制备的功能性金纳米材料检测三聚氰胺的特异性，选择胞嘧啶，胸腺嘧啶和 1,4-苯二胺三种化合物，分别配制 0, 50ng/ml, 100ng/ml, 500ng/ml, 1000ng/ml, 2500ng/ml, 5000ng/ml, 20000ng/ml 的标准溶液，添加到功能性金纳米粒子溶液中通过紫外测定进行特异性分析，结果如图 6-15 所示。

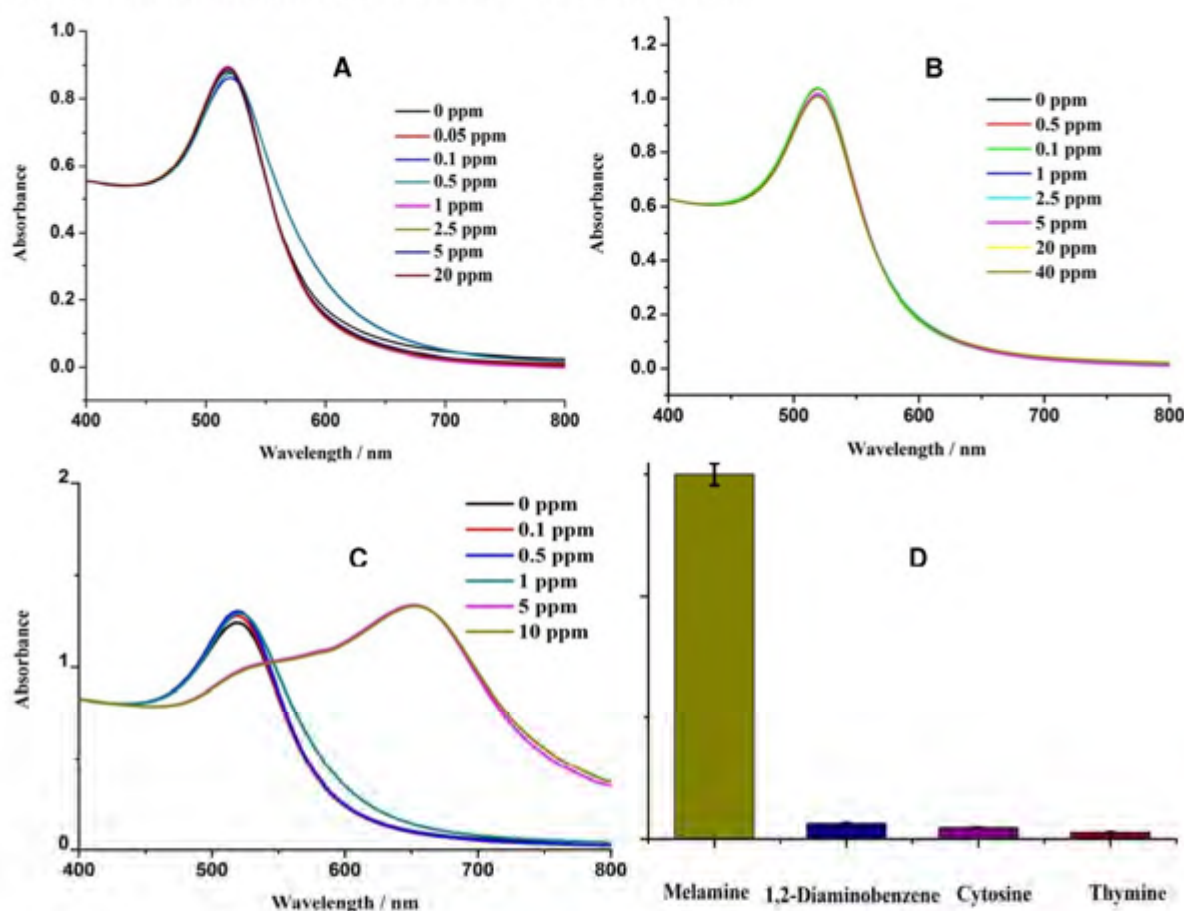
图 6-15 中，图 A 为胞嘧啶测定结果，图 B 为胸腺嘧啶检测结果，图 C 为 1,4-苯二胺检测结果。从图中可以看出，所制备的功能性金纳米粒子对胞嘧啶和胸腺嘧啶无识别作用，1,4-苯二胺在高浓度下会产生信号，但在三聚氰胺检测范围内浓度却无信号产生不会对检测形成干扰。考虑到三聚氰胺规定的最低限量标准为 1000ng/ml，故将胞嘧啶，胸腺嘧啶、1,4-苯二胺和三聚氰胺均稀释为 1000ng/ml 进行检测，如图 6-15-D 所示，结果表明在三聚氰胺限量范围内，三种物质对检测结果不会形成干扰。

胞嘧啶和胸腺嘧啶分子中含有一个氨基基团，在可能含三聚氰胺的生物样本中也可能含有，根据检测原理，这些物质可能会与功能性纳米粒子发生结合。实际检测结果表明，胞嘧啶和胸腺嘧啶对本研究检测结果不会形成干扰。原因可能是虽然功能性纳米粒子上的 18-冠醚-6 可以与胞嘧啶、胸腺嘧啶中的氨基相识别，但是，由于分子中只存在一个氨基，结合后没有多余的氨基与相邻的功能性纳米粒子上的 18-冠醚-6 再进行结合，这就意味着即使发生结合也不会改变功能性纳米粒子之间的距离，表观上不会发生颜色变化，保证了检测的准确性。

1,4-苯二胺分子中含有二个氨基且分子量小，可以同时与两个功能性金纳米粒子上的冠醚或者同一个功能性金纳米粒子上的两个冠醚结合，发生前一种结合时会拉近功能



性金纳米粒子间的距离，这也解释了为什么 1,4-苯二胺在浓度低时功能性金纳米粒子聚集现象不明显，在高浓度时才会产生一定信号的原因。



(A: 胞嘧啶; B: 胸腺嘧啶; C: 1,4-苯二胺; D: 四种物质检测结果比较图)

图 6-15 功能性金纳米粒子对三聚氰胺类似物特异性检测

Fig.6-15 Results of the specificity of MEL analogues by functional GNPs

另外，已有研究表明 18-冠醚-6 对  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  离子也有一定的识别结合功能<sup>[37,38]</sup>，三聚氰胺样品中可能会存在  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  离子，因此有必要考虑  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  离子对检测结果的影响。据报道，18 冠醚-6 与  $\text{Na}^+$  离子是以 1:1 进行结合，也就是说一个 18-冠醚-6 分子只能结合一个  $\text{Na}^+$  离子，这种情况类似于胞嘧啶和胸腺嘧啶等含有一个氨基基团的物质对检测结果的影响，根据上面的检测结果，可以认为溶液中的  $\text{Na}^+$  离子对检测结果不会造成干扰。对于  $\text{K}^+$  离子，18 冠醚-6 与其以 1:2 进行结合，也就是说一个 18-冠醚-6 分子能结合两个  $\text{K}^+$  离子，且研究表明，18-冠醚-6 对  $\text{K}^+$  离子的最低检测限为 700ng/ml，这种情况类似于 1,4-苯二胺等含有两个氨基基团的物质对检测结果的影响，考虑到实际检测三聚氰胺样品中  $\text{K}^+$  离子含量不可能高达 700ng/ml，因此，我们认为  $\text{K}^+$  离子和  $\text{Na}^+$  离子对检测结果不会造成干扰。

很多大分子物质含有两个或更多的氨基基团，根据检测原理，含有氨基的小分子物质对检测的影响更为重要，因为这类小分子物质可引起了最强的表面等离子吸收峰的移动。而金纳米粒子与其他含有更多氨基分子（如蛋白）间的反应不是主要的，因为即使大分子物质上氨基与金纳米粒子的 18-冠醚-6 发生结合，二者间的距离也要大得多，金



纳米粒子等离子峰杂交共振的机会要弱得多，因此，可以认为含有两个或更多氨基基团的大分子物质对检测结果不会造成干扰。

#### 6.4.8.5 添加回收率测定

对奶粉以 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，500 $\mu\text{g}/\text{kg}$  的水平进行添加回收实验，按上述的样品前处理方法处理，IAC 柱净化后用制备的功能性金纳米粒子进行检测并计算各浓度的添加回收率，结果见表 6-5。

表 6-5 功能性金纳米粒子检测三聚氰胺方法的添加回收率测定

Table 6-5 Recoveries and coefficient variations of MEL by functional GNPs

| 基质 | 添加浓度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 检测浓度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 回收率(%) | 变异系数(%) |
|----|---------------------------------|---------------------------------|--------|---------|
| 奶粉 | 10                              | 10.56 $\pm$ 0.51                | 105.6  | 4.8     |
|    | 50                              | 49.47 $\pm$ 0.83                | 98.9   | 1.7     |
|    | 100                             | 99.31 $\pm$ 5.72                | 99.3   | 5.8     |
|    | 200                             | 201.20 $\pm$ 9.09               | 100.6  | 4.5     |
|    | 500                             | 492.30 $\pm$ 23.64              | 98.4   | 4.8     |

从表中可以看出，奶粉样品各浓度添加回收率在 98.4%-105.6%之间，变异系数小于 10%，符合我国农业部、欧盟等对残留分析方法要求中的相关规定，表明本研究所建立的基于功能性金纳米粒子分子识别的比色法可应用于三聚氰胺实际样品的检测。

## 6.5 本章小结

本章采用柠檬酸钠法制备金纳米粒子，首先用抗三聚氰胺单克隆抗体制备胶体金标记物，建立了基于胶体金免疫层析技术的乳及乳制品中三聚氰胺残留的快速高灵敏检测法，其对三聚氰胺标准品的检测限为 12.5ng/ml，奶粉样品检测限为 37.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，可用于三聚氰胺实际检测。

同时，利用 18-冠醚-6 修饰金纳米粒子制备功能化金纳米粒子，建立基于分子识别的三聚氰胺高灵敏快速比色检测法，其检测限为 6ng/ml，奶粉样品添加回收率在 98.4%-105.6%之间，变异系数小于 10%，可实现奶粉中三聚氰胺的简单、快速、高灵敏检测。

## 参考文献

1. Alivisatos A.P. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystal [J]. J. Phys. Chem., 1996, 100: 13226-13239.
2. Michael G.W. Immunochromatographic techniques: a critical review [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2000, 366: 635-645.
3. Westgard J.O. Point of care in using statistics in methods comparison studies [J]. Clinical Chemistry, 1998, 210: 2240-2245.
4. Verheijen R., Osswald I.K., Dietrich R., et al. Development of a One Step Strip Test for the Detection of (Dihydro) streptomycin Residues in Raw Milk [J]. Food and Agricultural Immunology. 2000,

- 12(1):31-40.
5. Guo Yi-Rong, Liu Shao-Ying, Gui Wen-Jun, Zhu Guo-Nian. Gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of carbofuran and triazophos in water samples [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 389(1):32-39.
  6. Lai Weihua, Fung Daniel Y.C., Yang Xu, et al. Development of a colloidal gold strip for rapid detection of ochratoxin A with mimotope peptide [J]. *Food Control*, 2009, 20(9):791-795.
  7. Xiangmei Li, Pengjie Luo, Shusheng Tang, et al. Development of an Immunochromatographic Strip Test for Rapid Detection of Melamine in Raw Milk, Milk Products and Animal Feed [J]. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 6064–6070.
  8. Jhansi R.K., Tahir A., Sadia A.K. Use of gold nanoparticles in a simple colorimetric and ultrasensitive dynamic light scattering assay: selective detection of arsenic in ground water [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48(1): 1-5.
  9. Elghaian R., Storhoff J.J., Mucic R.C. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles [J]. *Science*. 1997, 277: 1078.
  10. 周友泉. 免疫胶体金的制备及其在医学检验中的应用 [EB/OL]. <http://wenku.baidu.com/view/f9f85122192e45361066f5e5.html>.
  11. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension [J]. *Nature Physical Science*, 1973, 241: 20-22.
  12. 孙秀兰. 食品中黄曲霉素 B1 金标层析检测方法研究[D]:[博士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2004.
  13. Lin, S. Y.; Liu, S. W.; Lin, C. M.; Chen, C. H. *Anal. Chem.* 2002, 74, 330-335.
  14. 刘丽强. 19-去甲睾酮胶体金免疫层析试纸条的研制[D]:[博士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2007.
  15. Verheijen R., Stouten P., Czaemier G., Haasnoot W. Development of a one step strip test for the detection of sulfadimidine residues [J]. *Analyst*, 1998, 123:2437-2441.
  16. Qian S., Bau H.H. Analysis of Lateral Flow Biodetectors: Competitive Format [J]. *Anal. Biochem*, 2004, 326:211-224.
  17. Paek S.H., Lee S.H., Gho J.H. Development of rapid one-step immunochromatographic assay [J]. *Methods*, 2000, 22:53-60.
  18. Horton J.K., Swinburne S., Sullivan M.J. A novel rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin [J]. *J. Immunol. Methods*, 1991, 140:131-134.
  19. 王伯云, 李玉松, 黄高晟, 张远强. 病理学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 438-458.
  20. 唐伟国. 医学检验诊断试剂的制备与应用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
  21. 陈义强. 动物园食品中氨基糖苷类抗生素残留检测方法研究[D]:[博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2008, 84-85.
  22. Xiangmei Li, Pengjie Luo, Shusheng Tang, et al. Development of an Immunochromatographic Strip Test for Rapid Detection of Melamine in Raw Milk, Milk Products and Animal Feed [J]. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 6064–6070.
  23. Simon, F., Bernard, A.B., Albert, V.D.B., et al. Electrochemical Detection of Electrochemically Inactive Cations by Self-Assembled Monolayers of Crown Ethers [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120(19): 4652-4657.

24. Storhoff, J.J.; Lazarides, A.A.; Mucic, R.C., et al. What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies? [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122(19): 4640-4650.
25. Lin, S. Y.; Tsai, Y. T.; Chen, C. C.; et al. Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles [J]. *J. Phys. Chem. B.* 2004, 108(7): 2134-2139.
26. Wu, S. H.; Wu, Y. S.; Chen, C. H. Colorimetric Sensitivity of Gold Nanoparticles: Minimizing Interparticular Repulsion as a General Approach [J]. *Anal. Chem.* 2008, 80(17): 6560-6566.
27. Mayes, A. G.; Blyth, J.; Millington, R. B.; Lowe, C. R. Metal Ion-Sensitive Holographic Sensors [J]. *Anal. Chem.* 2002, 74(15):3649-3657.
28. Bradshaw J.S.; Krakowiak K.E., Ozatt R.M. *Aza-Crown Macrocycles* [M]. John Wiley and Johns: New York, 1993.
29. Toupance, T.; Benoit, H.; Sarazin, D.; Simon, J. Ionoelectronics. Pillarlike Aggregates Formed via Highly Nonlinear Complexation Processes. A Light-Scattering Study [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119(39):9191-9197.
30. Nagano, Kobayashi, A.; Sasaki, Y. The Crystal Structure of the Ammonium Bromide Complex of 1, 4, 10, 16-Hexaoxacyclo-octadecane (18-Crown-6).C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>.O. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1978, 51, 790-793.
31. Fyfe M. C. T.; Stoddart J. F. *ChemInform Abstract: (Supra) Molecular Systems Based on Crown Ethers and Secondary Dialkylammonium Ions* [J]. *Advances in Supramolecular Chemistry.* 1999, (30) : 51-53.
32. Newcomb, M.; Moore, S. S.; Cram, D. J. Host-guest complexation. 5. Convergent functional groups in macrocyclic polyethers [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99(19): 6405-6410.
33. Trueblood, K. N.; Knohler, C. B.; Lawrence, D. S.; Stevens, R.V. Structures of the 1:1 complexes of 18-crown-6 with hydrazinium perchlorate, hydroxylammonium perchlorate, and methylammonium perchlorate [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104(5):1355-1362.
34. Klajn, Rafal; Fang, Lei; Coskun, Ali; *Metal Nanoparticles Functionalized with Molecular and Supramolecular Switches* [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131(12):4233-4235.
35. Kelong Ai, Yanlan Liu, Lehui Lu. Hydrogen-Bonding Recognition-Induced Color Change of Gold Nanoparticles for Visual Detection of Melamine in Raw Milk and Infant Formula [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131(27): 9496-9497.
36. Fang Wei, Robert Lam, Stacy Cheng, et al. Rapid detection of melamine in whole milk mediated by unmodified gold nanoparticles [J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 96(13): 133702-133704.
37. Han, C.P., Li, H.B. Visual detection of melamine in infant formula at 0.1 ppm level based on silver nanoparticles [J]. *Analyst*, 2010, 135:583-588.
38. Shuyi Lin, Chun-hsien Chen, Meng-chieh Lin, Hsiu-fu Hsu. A Cooperative Effect of Bifunctionalized Nanoparticles on Recognition: Sensing Alkali Ions by Crown and Carboxylate Moieties in Aqueous Media [J]. *Anal. Chem.* 2005, 77(15):4821-4828.





## 全文结论

### 1. 成功构建三聚氰胺半抗原及人工抗原

合成并鉴定了三种三聚氰胺半抗原：MEL-MC，MEL-ACA 和 MEL-PABA；制备并鉴定了三种免疫原 MEL-MC-BSA，MEL-ACA-BSA 和 MEL-PABA-BSA 以及三种包被原 MEL-MC-OVA，MEL-ACA-OVA 和 MEL-PABA-OVA。通过动物实验表明，所制备的三种免疫原均具有免疫原性，其中 MEL-ACA-BSA 免疫原/ MEL-PABA-OVA 包被原的异源免疫分析组合 ELISA 检测结果更好。

### 2. 获得高特异性的抗三聚氰胺单克隆抗体

将制备的三种免疫原用于制备三聚氰胺单克隆抗体，共获得 4 株可稳定分泌抗三聚氰胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株，制备腹水并进行免疫特性分析，其抗体亚型为 IgG<sub>1</sub> 型，适合用于 ELISA 方法研究；抗体亲和常数为  $2.67 \times 10^9 \text{L/mol}$ ，属于高亲和力抗体，可用于后续的免疫亲和柱研究；该抗体除与灭蝇胺交叉反应率为 132% 外，与其他三聚氰胺结构类似物无交叉反应，具有较好的特异性。

### 3. 建立三聚氰胺高灵敏 ELISA 检测方法

在抗三聚氰胺单克隆抗体的基础上，建立了三聚氰胺间接竞争 ELISA 方法，通过优化，最终确定 ELISA 最佳工作条件为：包被原 MEL-PABA-OVA 最佳工作浓度为  $1 \mu\text{g/ml}$ ；抗体工作浓度为 1:8000 稀释；酶标记羊抗鼠（HRP-IgG）二抗 1:3000 稀释；包被液采用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液；封闭液选用 0.05M pH9.6 CBS+0.1% PVA；抗体稀释液为 0.01M pH7.4 PBS+0.05% Tween 20+0.1% 明胶+5% 海藻糖；标准品稀释液为 0.01M pH7.4 PBS+5% 甲醇+1.8% NaCl。

### 4. 制备三聚氰胺间接竞争 ELISA 试剂盒

在 ELISA 最佳工作条件下制备了三聚氰胺间接竞争 ELISA 试剂盒，该试剂盒 IC<sub>50</sub> 值为  $6 \pm 0.55 \text{ng/ml}$ ，奶粉最低检测限为  $100 \mu\text{g/kg}$ ，液态奶最低检测限为  $20 \text{ng/ml}$ ；奶粉样品的添加回收率在 93%-101.9% 之间，液态奶样品的添加回收率在 83.6%-96.9% 之间，变异系数均小于 10%，与市售三聚氰胺 ELISA 试剂盒进行比较，表明自制试剂盒的性能更优良；用 LC-MS/MS 法确证表明试剂盒检测结果准确可靠；该试剂盒在 4°C 保存 1 年仍可使用，完全满足三聚氰胺残留检测的要求。

### 5. 开发净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱及建立 IAC-LC-MS/MS 检测方法

利用单克隆抗体制备了特异性识别、净化三聚氰胺的 IAC 柱，并建立了奶粉和液态奶中三聚氰胺的 IAC-LC-MS/MS 检测方法。IAC 柱动态柱容量为  $24.14 \text{ n mol/ml gel}$ ，绝对柱容量为  $3.36 \text{ n mol/mg 抗体}$ ；IAC-LC-MS/MS 检测方法的检测限为  $10 \text{ng/ml}$ ，定量限为  $20 \text{ng/ml}$ ，完全满足三聚氰胺残留检测的要求；通过添加回收实验测定，添加回收率和变异系数符合国际规定的残留分析方法要求，且 IAC 柱可重复使用 8 次，可用于实际三聚氰胺残留检测。

## 6. 开发快速检测三聚氰胺的胶体金免疫层析试纸条

本研究采用柠檬酸钠法制备金纳米粒子，用抗三聚氰胺单克隆抗体制备胶体金标记物，通过优化确定胶体金标记抗体的最佳 pH 值为 8.0，胶体金标记最佳抗体用量为 8 $\mu$ g/ml，包被原最佳包被浓度和最佳二抗包被浓度为 0.5mg/ml 制备出三聚氰胺胶体金免疫层析试纸条，经测定，试纸条对三聚氰胺的检测限为 12.5ng/ml，实际奶粉样品的检测限为 37.5 $\mu$ g/kg，对三聚氰胺结构类似物无交叉反应性，可满足三聚氰胺实际检测需求。

## 7. 建立基于功能性金纳米粒子分子识别的三聚氰胺高灵敏快速检测方法

利用冠醚修饰金纳米粒子制备功能性金纳米粒子，建立基于分子识别的三聚氰胺高灵敏快速检测比色法，其检测限为 6ng/ml，奶粉样品添加回收率在 98.4%-105.6%之间，变异系数小于 10%，可实现奶粉中三聚氰胺的简单、快速、高灵敏检测。

## 创 新 点

1. 选取三聚氰胺类似物，设计并合成出不同结构的三聚氰胺半抗原及人工抗原；筛选出免疫性能最好的人工抗原制备抗三聚氰胺单克隆抗体，采用异源免疫分析方法，开发出高灵敏、高通量的三聚氰胺 ELISA 试剂盒，该试剂盒的  $IC_{50}$ 、检测限等关键技术指标优于市售同类试剂盒。
2. 制备胶体金标记三聚氰胺抗体，采用异源免疫分析方法，开发出高灵敏快速检测三聚氰胺的胶体金免疫层析试纸条，其检测限达到 12.5 ng/ml。
3. 利用冠醚修饰金纳米粒子制备功能性金纳米粒子，建立了基于分子识别的三聚氰胺高灵敏快速检测比色法。

## 致 谢

本论文是在导师胥传来教授的悉心指导和大力支持下完成的。学术上导师渊博的知识、敏捷灵活的思维，独特的见解和严谨的科研态度使我感受到科研人的魅力；生活上导师无微不至的关心和事无巨细的帮助使我感受到良师益友的温暖；为人处世上导师本着“做人 做事 做学问”的准则言传身教使我感受到智者的睿智，所有这些都将使我终生受益。值此论文付梓之际，谨向我的导师胥传来教授表示最衷心的感谢和最诚挚的敬意。

实验的顺利完成融入了我的导师和实验室各位老师的悉心教诲以及各位同学对我的真诚帮助。

衷心感谢实验室的彭池方老师、匡华老师、胡拥明老师在实验过程中的悉心帮助和指导。

衷心感谢实验室的刘丽强、陈伟、朱颖越、马伟、徐丽广、严文静、许宙、宋姗姗、林菲、邢常瑞、马文蔚、邓晓芳、吴晓玲、李灼坤、屈昌龙、勇倩倩、徐乃丰、郝昌龙等同学的无私帮助和支持鼓励，与你们相处的点滴时光将永远烙印在我心底。

衷心感谢国家重点实验室的陶冠军老师、秦昉老师、顾晓红老师等在试验分析测试方面给予的指导和支持。

特别感谢我的父母多年来对我的默默支持和无私奉献，以及我的爱人彭夏雨先生对我的理解和支持，是他们的爱一路伴我，给予我不断前进的力量，在此衷心祝愿他们身体健康，平安吉祥。

江大三年，是我用激情和汗水谱写的一段青春历程，走过的路很是值得回味和反思，有成功也有失败，但总体来说，所获颇丰。相信这些经历和积累都将成为我人生道路上的宝贵财富，并激励我开始为新的征程而奋斗和拼搏。



## 附录： 攻读博士学位期间发表的论文与专利

### 发表论文：

1. Fengxia Sun, Wei Ma, Liguang Xu, Yinyue Zhu, Liqiang Liu, Chifang Peng, Libing Wang, Hua Kuang, Chuanlai Xu. Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010, 11(29): 1239-1249. (IF: 6.602)
2. Fengxia Sun, Liqiang Liu, Wenwei Ma, Chuanlai Xu, Hua Kuang. Rapid On-site Determination Melamine in Raw Milk by an Immunochromatographic Strip. *International Journal of Food Science & Technology*. (accepted, IF: 1.223)
3. Fengxia Sun, Liqiang Liu, Chuanlai Xu, Hua Kuang. ELISA Development of Melamine detection in milk powder. *Food and Agricultural Immunology*. (accepted, IF: 0.633)

### 专利：

1. 胥传来, 孙凤霞, 刘丽强, 彭池方, 徐丽广, 谢会玲, 袁媛, 尹丽梅。一种三聚氰胺人工抗原的合成方法。专利授权号: ZL 200810234130.6.
2. 王利兵, 胥传来, 孙凤霞, 刘丽强, 匡华, 宋姗姗。净化三聚氰胺的免疫亲和色谱柱及用其净化三聚氰胺的方法, 申请号: 2011101874752.