



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103792360 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201210435692. 3

(22) 申请日 2012. 11. 05

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 祝文珍

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 21/31(2006. 01)

C07K 16/14(2006. 01)

权利要求书3页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

杂色曲霉毒素的酶联免疫吸附试剂盒制备及检测方法

(57) 摘要

本发明为杂色曲霉毒素的酶联免疫吸附检测专用试剂盒。其检测快速、灵敏、准确、可定量,操作简便,且对样品纯度要求不高,特异性强,特别适用于大批量样品的检测,为此,本发明还提供了专用试剂盒的制备及检测方法。其中包括洗涤液,显色液,终止液。其特征在于:包有杂色曲霉毒素固相抗原的包被板、杂色曲霉毒素(ST)标准品,杂色曲霉毒素单克隆抗体、杂色曲霉毒素酶标抗体。

1. 杂色曲霉毒素试剂盒的制备,包括洗涤液,显色液,终止液;其特征在于:包有杂曲霉毒素固相抗原的包被板、杂色曲霉毒素(ST)标准品,杂色曲霉毒素单克隆抗体、杂色曲霉毒素酶标抗体。

2. 杂色曲霉毒素固相抗原的包被板制作,包括包被原的制作、封闭液的配置、以及孵育;包被原的偶联:根据杂色曲霉的结构特征偶联载体蛋白 BSA 方法如下:

碳二亚胺(EDC)法偶联杂色曲霉毒素半抗原与蛋白载体; 取 5 mg 杂色曲霉毒素半抗原和 2.5 mg cBSA 溶解在 250 μ L TE buffer (pH 8.0) 中,充分震荡使其溶解,再取 EDC·HCl 79 mg 充分溶解于 250 μ L TE buffer(pH 8.0)中;将杂色曲霉毒素半抗原和 cBSA 的混合溶液边震荡边逐滴加入 EDC 溶液,在 37 $^{\circ}$ C 摇床中反应 2 h 以上;先用 Sephadex 柱分离偶联产物和未结合的杂色曲霉毒素半抗原小分子;再透析纯化,将 0.5 mL 溶液在 PBS 中透析 3 d,每天换液两次,每次换液 200 mL;制得的杂色曲霉毒素偶联物透析产物小剂量分装,于 -20 $^{\circ}$ C 保存,备用;包被原加入包被液用作固相抗原的包板制作;包被液:1.6 g 碳酸钠加上 2.9 g 碳酸氢钠,加双蒸水至 1000 mL,调节 pH 至 9.6;封闭液:1 g BSA,100 mL PBS;包板时每孔 100 μ L 包板液,37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h,后取出洗板两次,加封闭液,每孔 180 μ L,37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5 h,取出甩干,加干燥剂 2~8 $^{\circ}$ C 保存。

3. 根据权利要求书第一条所述,杂色曲霉毒素单克隆抗体制备方法

I 材料和方法

(1) 试剂

人工抗原:杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白复合物,弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂,L-谷氨酰胺,牛血清白蛋白第五部分,聚乙二醇-1000, 2, 6, 10, 14-四甲基十五烷(Pristane),邻苯二胺,二甲基亚砜,Tris, Hepes pH 缓冲剂,免疫球蛋白,辣根过氧化氢酶,鼠抗 IgG 等,其它常规化学试剂均为优级纯、分析纯试剂;

(2) 免疫动物

8 周龄 BALB/c 雄性小鼠用人工抗原杂色曲霉毒素-BSA 进行二次免疫;每只小鼠基础免疫剂量为 100 μ g 腹腔注射;24 d 后加强免疫,剂量为每只小鼠 100 μ g,尾静脉注射,4 d 后取脾融合;

(3) 细胞融合

免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 Sp-2/0 以 10:1 混合;

用 50% 分子量为 1000 的聚乙二醇作融合剂,融合细胞用含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,接种于类似小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 50% CO₂,37 $^{\circ}$ C 条件下培养 7 d 后,每培养孔更换 2/3 HAT 培养液;9 d 后,开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆化;

(4) 腹水抗体纯化

用硫酸铵盐析法纯化腹水抗体;

(5) 杂交瘤筛选及抗体检测

杂交瘤筛选用固相抗原间接竞争性 ELISA 法进行;包被抗原杂色曲霉毒素-BSA 的浓度为 15 μ g/mL,每孔加量 120 μ L;每孔所含抗体抗原反应物由 80 μ L 培养上清液+2 μ L 经紫外分光光度计标定浓度的杂色曲霉毒素 (10 μ g/mL) 组成;检测对照中的抗原部分则用 20 μ L 毒素稀释液 (20%MeOH-PBS) 代替;酶底物用邻苯二胺(OPD);其它按标准方法进行;

(6) 抗体的特性

①抗体滴度：

用固相抗原间接非竞争性 ELISA 测定,测试条件为:包被抗原为杂色曲霉毒素-BSA,浓度 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔加量 150 μL ;抗体从 100 倍开始对倍稀释,每孔加量 130 μL ;抗体稀释液为 0.1% 的 BSA-PBS;阴性对照孔用 SP-2/0 骨髓瘤细胞培养上清液;封闭液为 1% BSA-PBS,每孔加量 250 μL ;酶底物用 OPD,其它按标准方法进行;

②检测标准毒素灵敏度：

先用棋盘滴定法筛选出包被抗原浓度和抗体工作稀释度的优化组合,以此为测试条件,用固相抗原间接竞争性 ELISA 法做出杂色曲霉毒素的标准抑制曲线,并对结果进行数理统计分析;其中 ELISA 测试条件为:包被抗原杂色曲霉毒素-BSA 的浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔加量 150 μL ;抗体工作稀释度 1:25600;抗体稀释液为 0.1% BSA-PBS;抗体抗原反应液为每孔 65 μL 抗体+65 μL 相应浓度杂色曲霉毒素;封闭液为 1% BSA-PBS,每孔加量 250 μL ;酶底物为 OPD;阴性对照用 Sp-2/0 骨髓瘤细胞培养上清液,其它按标准方法进行;

③抗体的特异性：

用固相抗原间接竞争性 ELISA 法测定,参试毒素为杂色曲霉毒素,构巢曲霉,黄曲霉,寄生曲霉,黄曲霉毒素马;其它测试条件同②;

④抗体亚类分析：

用免疫双扩散法进行;

⑤抗体的亲和力：

Friguet 法,对应小鼠 IgG 标准曲线滴定出抗体 IgG 含量,再对应抗体滴度曲线求出平衡态下,抗体使抗原达到半饱和时的游离抗体克分子浓度 [Ab],代入下式求出抗体的亲和常数 K (L/mol),

$$K_a = 1 / [Ab]$$

(7) 样品中杂色曲霉毒素提取与纯化

II 结果与讨论

(1) 细胞融合与杂交瘤细胞的筛选细胞融合后,约 57.6% 的孔中长出杂交瘤克隆,其中抗体检测阳性率约为 88%;从中选择对抗原有强抑制作用的孔,经多次亚克隆,建立了 5 个稳定分泌抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,各细胞株经两次亚克隆以后,阳性率已达到 100%;第 3 次克隆化时有反复(疑为假明性),所以进行了 4 次亚克隆;将上述抗体纯化,即可。

4. 根据权利要求书第一条所述,杂色曲霉毒素的标准品由高标稀释而成,稀释液为 PBS;0.1M PBS:1000 mL 蒸馏水中加 NaCl 9 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 6 g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.4 g, pH:7.2。

5. 根据权利要求书第一条所述,杂色曲霉毒素的酶标抗体的酶由辣根过氧化酶标记;该酶标抗体用交联法制作,交联剂是 25% 的戊二醛水溶液,原理是利用戊二醛分子上对称的两个醛基,分别与酶和蛋白质分子中游离的氨基、酚基等以共价键结合而进行标记;标记时应尽量采用新鲜纯品,当戊二醛的 OD_{235nm}/OD_{280nm} < 3 时,即为好的交联剂;该发明采用一步法制作,即把辣根过氧化酶、戊二醛和杂色曲霉抗体一起加入进行交联;然后透析出过量的戊二醛而制备出具有高分子量的酶结合物;由于抗体分子量大(16),酶分子量小(4

万), 抗体分子的氨基数比酶蛋白分子氨基数多得多, 结果生成的抗体-戊二醛或抗体-戊二醛-抗体多而造成酶标物的活性小; 一步法操作: ①抗 IgG-杂色曲霉毒素的制备: 将 10 mg 杂色曲霉毒素溶于含有 5 mg 抗 IgG 的 1 mL PBS (0.01 mol/L pH 7.0) 中, 在冰浴中缓缓搅拌, 尽量避免气泡产生, 完全溶解后, 缓缓滴加 1% 戊二醛溶液 4 mL, 使戊二醛的最终浓度为 0.2%, 移至室温中静置 2 h~3 h 后, 以 0.01 mol/L pH 7.0 PBS 液 4°C 充分透析或以 SephadexG25 柱除去过量的戊二醛, 4°C 保存备用 (也可保存于 50% 甘油中置低温冰箱); ②抗 IgG-HRP 的制备: 将 12 mg HRP 溶于含 5 mg 抗 IgG 的 1 mL PBS (0.1 mol/L pH 6.8) 中, 缓慢搅拌下加入 1% 戊二醛溶液 4 mL, 置室温 2h~3h, 充分透析或以 SephadexG₂₅ 除戊二醛, 小量分装后保存于低温冰箱, 避免反复冻融或冷冻干燥保存。

6. 根据权利要求书所述, 杂色曲霉毒素的检测步骤如下: 取包被板, 加入标准品/样本 50 μ L 到对应的微孔中, 再加入酶标记物 50 μ L/孔, 然后再加入 50 μ L/孔抗体工作液, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置室温避光反应 30 min; 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 加洗涤液 250 μ L/孔, 每次浸泡 15~30 s, 充分洗涤 4~5 次, 用吸水纸拍干; 加入显色液 100 μ L/孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境反应 15 min; 每孔各加 50 μ L 终止液, 设定酶标仪在 450 nm 处, 测定 OD 值 (建议用 450/630 nm 双波长检测, 在 5 min 内读完数据); 从标准曲线中计算样品中 ST 的含量

杂色曲霉毒素的酶联免疫吸附试剂盒制备及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体为对杂色曲霉毒素酶联免疫吸附检测专用试剂盒的制备及专业检测。

背景技术

[0002] 杂色曲霉毒素 (ST) 主要是杂色曲霉和构巢曲霉的最终代谢产物,同时又是黄曲霉和寄生曲霉生成黄血霉毒素过程后期的中间产物。据报道,感染了杂色曲霉的玉米在 27℃ 的环境下,21 天可产生杂色曲霉毒素 12 g/kg 以上。杂色曲霉毒素在 1954 年由杂色曲霉培养物中首先分离出的,但并未引起人们的足够重视,至发现黄曲霉毒素的强致癌性后,才开始注意。用 ^{14}C 标记方法已证实杂色曲霉毒素能转变成黄曲霉毒素,而且有人认为杂色曲霉毒素可能是非洲某些地区肝癌的病因。

[0003] 能产生 ST 的菌种主要是杂色曲霉、构巢曲霉和离蠕孢霉。此外,谢瓦曲霉、赤曲霉、焦曲霉、阿姆斯特丹曲霉、黄褐曲霉、四脊曲霉、变色曲霉、爪曲霉、毛壳霉及黄曲霉和寄生曲霉等也可产生 ST。上述这些霉菌广泛存在于自然界,可污染大麦、小麦、玉米、花生、大豆、咖啡豆、火腿、奶酪等粮食、食品和饲草,尤其对小麦、玉米、花生等饲料和饲草污染更为严重。产毒量最高的是杂色曲霉,其次是构巢曲霉和离蠕孢霉,前者产生 ST 的量约为后者的 2 倍。

[0004] 本发明为杂色曲霉毒素的酶联免疫吸附检测专用试剂盒。其检测快速、灵敏、准确、可定量,操作简便,且对样品纯度要求不高,特异性强,特别适用于大批量样品的检测。

发明内容

[0005] 本发明提供了专用试剂盒的制备及检测方法。其中包括洗涤液,显色液,终止液。其特征在于:包有杂色曲霉毒素固相抗原的包被板、杂色曲霉毒素 (ST) 标准品,杂色曲霉毒素单克隆抗体、杂色曲霉毒素酶标抗体。

[0006] 检测时,取包被板,加入标准品 / 样本 50 μL 到对应的微孔中,再加入酶标记物 50 μL / 孔,然后再加入 50 μL / 孔抗体工作液,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光反应 30 min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 250 μL / 孔,每次浸泡 15~30 s,充分洗涤 4~5 次,用吸水纸拍干。加入显色液 100 μL / 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃ 避光环境反应 15 min。每孔各加 50 μL 终止液,设定酶标仪在 450 nm 处,测定 OD 值(建议用 450/630 nm 双波长检测,在 5 min 内读完数据)。从标准曲线中计算样品中 ST 的含量。测得的标准液或样品吸光度的平均值 (B) 除以第一个标准液 (0 标准液) 的吸光度 (B_0) 值再乘以 100%,得到百分吸光度值,

$$\text{百分吸光度值}(\%) = B/B_0 \times 100\%$$

以标准品浓度的 10 为底的对数为 X 轴,百分吸光值为 Y 轴,绘制标准曲线。将样本的百分吸光值代入标准曲线,从标准曲线上读出样本所对应的值,作为 10 的幂,乘以稀释倍数,即为样品中所含杂色曲霉毒素的量。

附图说明

[0007] 图 1 为杂色曲霉毒素标准曲线图。

具体实施方式

[0008] 实施例 1 样本前处理方法

准确称取 5.00 g 样品,加 45 mL 乙腈,5 mL 含有 4%KCl 的 40%硫酸溶液后,在振荡机上振荡 30 min 倾出清液,再用 10 mL 乙腈分两次洗残渣,收集乙腈液并与上述提取液合并,合并的提取液用石油醚脱脂三(石油醚用量为 20,15,10 mL),脱脂后的提取液加水 25mL,用氯仿萃取三次(氯仿用量为 20,15,10mL),收集的氯仿层在低温(-6℃)下冷冻,然后过滤去冰,去脂,用旋转蒸发器蒸干(温度 40℃以下),残渣用样品稀释液溶解后供色谱测定用。

[0009] 实施例 2 杂色曲霉毒素的酶联免疫吸附试剂盒制备

1、杂色曲霉毒素固相抗原的包被板制作,包括包被原的制作封闭、液的配置、以及孵育。把包被原加入包被液用作固相抗原的包板制作。包被液:1.6 g 碳酸钠加上 2.9 g 碳酸氢钠,加双蒸水至 1000 mL,调节 pH 至 9.6。封闭液:1 gBSA,100mLPBS。包板时每孔 100 μ L 包板液,37℃下孵育 2 h,后取出洗板两次,加封闭液,每孔 180 μ L,37℃下孵育 1.5 h,取出甩干,加干燥剂 2~8℃保存;

2、包被原的偶联:

碳二亚胺(EDC)法偶联杂色曲霉毒素半抗原与蛋白载体:取 5 mg 杂色曲霉毒素半抗原和 2.5 mg cBSA 溶解在 250 μ L TE buffer(pH 8.0)中,充分震荡使其溶解,再取 EDC·HCl 79 mg 充分溶解于 250 μ L TE buffer (pH 8.0)中。将杂色曲霉毒素半抗原和 cBSA 的混合溶液边震荡边逐滴加入 EDC 溶液,在 37℃摇床中反应 2 h 以上。先用 Sephadex 柱分离偶联产物和未结合的杂色曲霉毒素半抗原小分子,再透析纯化,将 0.5 mL 溶液在 PBS 中透析 3 d,每天换液两次,每次换液 200 mL。透析产物杂色曲霉毒素半抗原偶联蛋白小剂量分装,于 -20℃保存,备用;

3、杂色曲霉毒素单克隆抗体制备方法:

I 材料和方法

(1) 试剂

人工抗原:杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白复合物,弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂,L-谷氨酰胺,牛血清白蛋白第五部分,聚乙二醇-1000,2,6,10,14-四甲基十五烷(Pristane),邻苯二胺,二甲基亚砷,Tris,Hepes pH 缓冲剂,免疫球蛋白,辣根过氧化氢酶标物,小鼠 IgG 和羊抗小鼠 IgG 等,其它常规化学试剂均为优级纯、分析纯试剂;

(2) 免疫动物

8 周龄 BALB/c 雄性小鼠用人工抗原杂色曲霉毒素-BSA 行二次免疫;每只小鼠基础免疫剂量为 100 μ g,腹腔注射:24d 后加强免疫,尾静脉注射,4 d 后取脾融合;

(3) 细胞融合

免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 Sp-2/0 以 10:1 混合。用 50% 分子量为 1000 聚乙二醇作融合剂,融合细胞用含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,接种于似小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 50% CO₂,37℃条件下培养,7 d 后,每培养孔更换 2/3HT

培养液。9 d后,开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆化;

(4) 腹水抗体纯化

用硫酸铵盐析法纯化腹水抗体;

(5) 杂交瘤筛选及抗体检测

杂交瘤筛选用固相抗原间接竞争性ELISA法进行:包被抗原杂色曲霉毒素-BSA的浓度为15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔加量120 μL ;每孔所含抗体抗原反应物由80 μL 培养上清液+2 μL 经紫外分光光度计标定浓度的杂色曲霉毒素(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组成;检测对照孔中的抗原部分则用20 μL 毒素稀释液(20%MeOH-PBS)代替;酶底物用邻苯二胺(OPD);其它按标准方法进行;

(6) 抗体的特性

① 抗体滴度:

用固相抗原间接非竞争性ELISA测定,测试条件为:包被抗原为杂色曲霉毒素-BSA,浓度15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔加量150 μL ;抗体从100倍开始对倍稀释,每孔加量130 μL ;抗体稀释液为0.1%的BSA-PBS;阴性对照孔用SP-2/0骨髓瘤细胞培养上清液;封闭液为1%BSA-PBS,每孔加量250 μL ;酶底物用OPD。其它按标准方法进行;

② 检测标准毒素灵敏度:

先用棋盘滴定法筛选出包被抗原浓度和抗体工作稀释度的优化组合,以此为测试条件,用固相抗原间接竞争性ELISA法做出杂色曲霉毒素的标准抑制曲线,并对结果进行数理统计分析。其中ELISA测试条件为:包被包被原杂色曲霉毒素-BSA偶联蛋白的浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔加量150 μL ;抗体工作液稀释比为1:25600;抗体稀释液为0.1% BSA-PBS;抗体抗原反应液为每孔65 μL 抗体+65 μL 相应浓度杂色曲霉毒素;封闭液为1%BSA-PBS,每孔加量250 μL ;酶底物为OPD;阴性对照用Sp-2/0骨髓瘤细胞培养上清液。其它按标准方法进行;

③ 抗体的特异性:

用固相抗原间接竞争性ELISA法测定,参试毒素为杂色曲霉毒素,构巢曲霉,黄曲霉,寄生曲霉,黄曲霉毒素马,其它测试条件同②;

④ 抗体亚类分析:

用免疫双扩散法进行;

⑤ 抗体的亲和力:

Friguet法。对应小鼠IgG标准曲线滴定出抗体IgG含量,再对应抗体滴度曲线求出平衡态下,抗体使抗原达到半饱和时的游离抗体克分子浓度 $[Ab]$,代入下式求出抗体的亲和常数 K (L/mol),

$$K_a = 1 / [Ab]$$

(7) 样品中杂色曲霉毒素提取与纯化;

II 结果与讨论

细胞融合一与杂交瘤细胞的筛选细胞融合后,约57.6%的孔中长出杂交瘤克隆,其中抗体检测阳性率约为88%。从中选择对抗原有强抑制作用的孔,经多次亚克隆、建立了5个稳定分泌抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株各细胞株经两次亚克隆以后,阳性率已达到100%。2H8第3次克隆化时有反复(疑为假阳性),所以进行了4次亚克隆。将上

述抗体纯化,即可。

[0010] 4、杂色曲霉毒素的标准品由高标稀释而成,稀释液为 PBS。0.1M PBS:1000 mL 蒸馏水中加 NaCl 9 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, pH:7.2。

[0011] 5、杂色曲霉毒素的酶标抗体的酶由辣根过氧化物酶标记。该酶标抗体用交联法制作,联剂是 25% 的戊二醛水溶液。原理是利用戊二醛分子上对称的两个醛基,分别与酶和蛋白质分子中游离的氨基、酚基等以共价键结合而进行标记。标记时应尽量采用新鲜纯品,当戊二醛的 $\text{OD}_{235\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} < 3$ 时,即为好的交联剂。该发明采用一步法制作,即把辣根过氧化物酶、戊二醛和杂色曲霉抗体一起加入进行交联。然后透析出过量的戊二醛而制备出具有高分子量的酶结合物。由于抗体分子量大(16 万),酶分子量小(4 万),抗体分子的氨基数比酶蛋白分子氨基数多得多,结果生成的抗体-戊二醛或抗体-戊二醛-抗体多而造成酶标物的活性小。一步法操作:

①抗 IgG-杂色曲霉毒素的制备:将 10 mg 杂色曲霉毒素溶于含有 5 mg 抗 IgG 的 1 mL PBS(0.01 mol/L pH7.0) 中,在冰浴中缓缓搅拌,尽量避免气泡产生,完全溶解后,缓缓滴加 1% 戊二醛溶液 4 mL,使戊二醛的最终浓度为 0.2%,移至室温中静置 2h~3h 后,以 0.01 mol/L pH7.0 PBS 液 4°C 充分透析或以 SephadexG25 柱除去过量的戊二醛,4°C 保存备用(也可保存于 50% 甘油中置低温冰箱);②抗 IgG-HRP 的制备:将 12 mg HRP 溶于含 5 mg 抗 IgG 的 1 mL PBS(0.1mol/L pH6.8) 中,缓慢搅拌下加入 1% 戊二醛溶液 4 mL,置室温 2h~3h,充分透析或以 SephadexG₂₅ 除戊二醛,小量分装后保存于低温冰箱,避免反复冻融,或冷冻干燥保存。

[0012] 6、洗涤液的制备:

十二水磷酸氢钠 68.8 g 加磷酸二氢钠 6.9 g,氯化钠 45 g, Tween-20 0.5 mL,加双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.4。

[0013] 7、显色液的制备:

显色液 A:无水乙酸钠 8.2 g, β -糊精 2.5 g,过氧化氢脲 428.6 g,加双蒸水至 1 L,调节 pH 至 5.0,4°C 保存,使用时达室温。显色液 B:100 mg TMB 溶于 10 mL DMSO 中,棕色瓶保存。使用时将 14.6 mL 显色液 A 与 0.45 mL 显色液 B 混合 15 分钟。

[0014] 8、终止液制备:

2M 硫酸:0.11 L 18M 的浓硫酸加水稀释到 1 L。

[0015] 实施例 3 测定步骤:

1、将所需试剂和微孔板从冷藏环境中取出,在室温下平衡 30 min,每种液体使用前均须摇匀。注意标准液均需做 2 个平行试验;

2、加标准品:加标准品/样本 50 μL 到对应的微孔中,再加入酶标记物 50 μL /孔,然后再加入 50 μL /孔抗体工作液,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光反应 30 min;

3、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 250 μL /孔,每次浸泡 15~30 s,充分洗涤 4~5 次,用吸水纸拍干;

4、显色:加入显色液 100 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境反应 15 min;

5、测定:每孔各加 50 μL 终止液,设定酶标仪在 450 nm 处,测定 OD 值(建议用 450/630 nm 双波长检测,在 5 min 内读完数据);

6、结果分析：

所测得的标准液或样品吸光度的平均值(B)除以第一个标准液(0 标准液)的吸光度(B_0)值再乘以 100%,得到百分吸光度值,

$$\text{百分吸光度值(\%)} = B/B_0 \times 100\%$$

以标准品浓度的 10 为底的对数为 X 轴,百分吸光值为 Y 轴,绘制标准曲线。将样本的百分吸光值代入标准曲线,从标准曲线上读出样本所对应的值,作为 10 的幂,乘以稀释倍数,即为样品中所含杂色曲霉毒素的量。

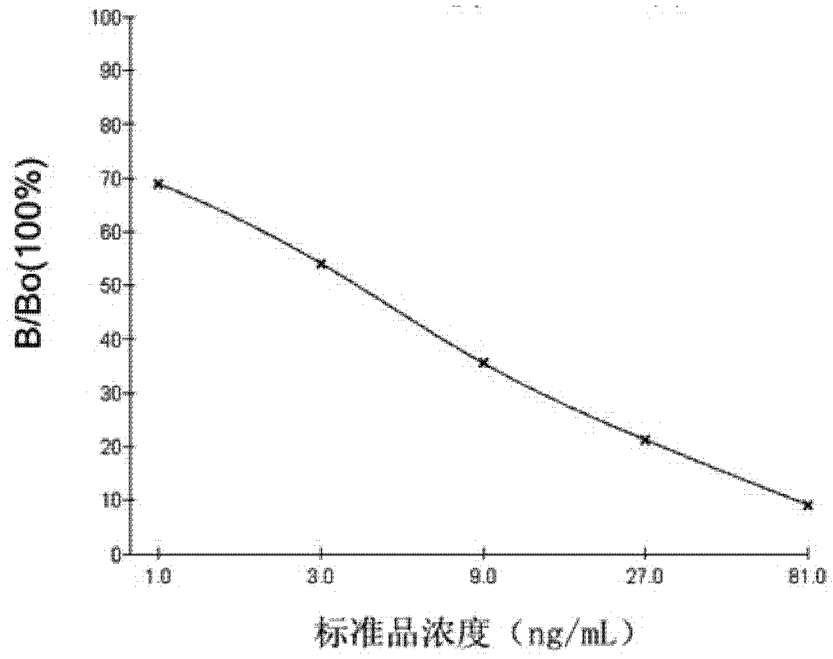


图 1

专利名称(译)	杂色曲霉毒素的酶联免疫吸附试剂盒制备及检测方法		
公开(公告)号	CN103792360A	公开(公告)日	2014-05-14
申请号	CN201210435692.3	申请日	2012-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 祝文珍		
发明人	杜道林 祝文珍		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/31 C07K16/14		
CPC分类号	G01N33/54373 C07K16/14		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为杂色曲霉毒素的酶联免疫吸附检测专用试剂盒。其检测快速、灵敏、准确、可定量，操作简便，且对样品纯度要求不高，特异性强，特别适用于大批量样品的检测，为此，本发明还提供了专用试剂盒的制备及检测方法。其中包括洗涤液，显色液，终止液。其特征在于：包有杂色曲霉毒素固相抗原的包被板、杂色曲霉毒素（ST）标准品，杂色曲霉毒素单克隆抗体、杂色曲霉毒素酶标抗体。

