



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103983771 A

(43) 申请公布日 2014.08.13

(21) 申请号 201410229447.6

(22) 申请日 2014.05.23

(71) 申请人 广东海洋大学

地址 524000 广东省湛江市麻章区湖光岩东  
广东海洋大学

(72) 发明人 王雅玲 吴朝金 孙力军 邱妹  
徐德峰 刘颖

(74) 专利代理机构 广州市南锋专利事务所有限  
公司 44228

代理人 刘广生

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备方法及应用,以该免疫磁珠为基础建立的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒,是利用免疫磁珠与样品中的隐蔽态 T-2 毒素竞争结合抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体,通过检测样品中隐蔽态 T-2 毒素对免疫磁珠结合抗体的抑制率,可以间接分析隐蔽态 T-2 毒素的含量。该方法不仅具有免疫磁珠富集纯化特性,而且可以去除非特异性物质的干扰,提高了 ELISA 中载体对抗原的吸附能力,提高了检测的灵敏度,降低了检测限。该试剂盒检测操作简单,高效快速,价格低廉,无需复杂的仪器及人员操作,可广泛应用于食品、饲料及动物机体内隐蔽态 T-2 毒素的检测。

1. 一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒,其特征在于:所述检测试剂盒包含有洗涤液、样品稀释液、显色液、终止液,还包括:

(1)包被抗原的免疫磁珠:以 3-Ac-NEOS-HS-OVA 为包被抗原,经 PB 缓冲液将包被抗原稀释到 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在含有 0.4 mg 经 EDC 和 NHS 活化的羧基磁珠的离心管中加入 1 mL 包被抗原,重悬后,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下,偶联反应 3 h 后,洗涤液洗涤 2-4 次,磁力架上进行磁分离去除洗涤液后,再向离心管中加入封闭液 0.5 mL,重悬 37  $^{\circ}\text{C}$  下反应 1-2 h,洗涤液洗涤 2-4 次制得;

(2)检测抗体:可识别隐蔽态 T-2 毒素的抗 T-2 毒素母核多克隆抗体;

(3)酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的羊抗兔酶标抗体;

(4)标准 T-2 毒素母核工作液:以 T-2 毒素作为标准母核供体,配制不同浓度的标准母核工作液。

2. 根据权利要求 1 所述的一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒,其特征在于:所述封闭液为含 5% 卵清蛋白或者 5% 脱脂奶粉的 PB 缓冲液。

3. 根据权利要求 1 所述的一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒,其特征在于:所述抗 T-2 毒素母核多克隆抗体的制备方法为:免疫原 3-Ac-NEOS-HS-BSA 与弗氏完全佐剂进行 1:1 混合乳化完全,选择 2.0-2.5 kg 之间的大白兔进行免疫;后每间隔两周进行一次加强免疫,免疫原 3-Ac-NEOS-HS-BSA 与弗氏不完全佐剂进行 1:1 混合乳化完全,并于每次加强免疫后的第 10 天进行一次耳缘静脉采血,检测抗血清效价,当效价达到要求后,进行心脏采血,并进行抗血清纯化制备,得抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体。

4. 根据权利要求 2 所述的一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒,其特征在于:所述 PB 缓冲液的制备方法为:先配制 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,取 19 mL 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 81 mL 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,充分混合即为 0.2 mol/L PB 缓冲液,pH 为 7.4-7.5。

5. 一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于:以包被 T-2 毒素母核抗原的免疫磁珠为载体,隐蔽态 T-2 毒素与免疫磁珠竞争抗 T-2 毒素母核多克隆抗体,通过酶联免疫反应,间接检测样品中隐蔽态 T-2 毒素的含量;

具体方法为:

(1)利用纯化的 T-2 毒素母核免疫原 3-Ac-NEOS-HS-BSA 免疫新西兰种兔子,制备得高效价可识别隐蔽态 T-2 毒素的抗血清,硫酸铵沉淀法纯化抗血清得抗 T-2 毒素母核多克隆抗体;

(2)T-2 毒素母核包被原免疫磁珠的制备:37  $^{\circ}\text{C}$  环境下,活化后磁珠与 T-2 毒素母核包被原 3-Ac-NEOS-HS-OVA 偶联旋转孵育 3 h;用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟,用封阻缓冲液于 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2 小时,置于保存缓冲液中 4  $^{\circ}\text{C}$  保存待用;

(3)按照有机溶剂提取法处理样品,处理后样品与免疫磁珠混合重悬于含 10% 甲醇的 PBS 缓冲液中;加入 T-2 毒素母核抗体 37  $^{\circ}\text{C}$  下旋转孵育 2.5 h,加入 250  $\mu\text{L}$  的稀释度为 1:3000 的酶标抗体,37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2 h,磁分离,PBST 洗涤三次;加入 250  $\mu\text{L}$  的 TMB,室温反应 15 min 后,加入 100  $\mu\text{L}$  2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,终止反应;磁分离,上清液至 96 孔酶标板中,450nm 下检测 OD 值,根据标准曲线计算隐蔽态 T-2 毒素浓度。

6. 一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的检测方法,其特

征在于:活化后的羧基磁珠与包被原偶联,制备得可吸附抗 T-2 毒素母核多克隆抗体的免疫磁珠,该免疫磁珠可与样品中的隐蔽态 T-2 毒素竞争偶联抗 T-2 毒素母核抗体,通过检测样品中隐蔽态 T-2 毒素产生的抑制效果,根据拟合曲线,间接检测计算样品中隐蔽态 T-2 毒素的含量,并以隐蔽态 T-2 毒素产生的抑制率为依据进行产品标注和宣传,具体步骤如下:

(1) 样品前处理:按照常规的有机溶剂提取法,有机溶剂多次提取样品中的隐蔽态 T-2 毒素,并进行氮吹浓缩后,用样品稀释液进行复溶,制备样品检测液;

(2) 添加免疫磁珠和检测抗体:取 250  $\mu\text{L}$  的样品检测液加入到含 0.4 mg 包被抗原免疫磁珠的离心管中,充分混合后,加入 250  $\mu\text{L}$  样品稀释液配制的抗体溶液,稀释度为 1:3000,旋转重悬,37  $^{\circ}\text{C}$  下反应 3 h,洗涤液洗涤 2-4 次,磁力架上磁分离弃上清;

(3) 添加酶标抗体:取试剂盒中的酶标抗体,用洗涤液按照 1:3000 的比例进行稀释,后取 250  $\mu\text{L}$  加入上述离心管中,37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2h,洗涤液洗涤 2-4 次,磁力架上磁分离弃上清;

(4) 显色:加入显色液,250  $\mu\text{L}$ /管,在室温下显色 15 min,用终止液终止显色;

(5) 测光密度值:磁分离后,吸取终止反应后的溶液,用酶标仪进行测量,测光密度值。

7. 根据权利要求 6 所述的一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的洗涤液 PBST:取 NaCl 8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42 g, KCl 0.2 g,用 800 mL 去离子水溶解后加入 0.5 mL Tween-20,充分混匀,调整 PH 至 7.4,定容至 1 L。

8. 根据权利要求 6 所述的一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的样品稀释液 PBS:取 NaCl 8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42 g, KCl 0.2 g,用 800 mL 去离子水溶解后,调整 PH 至 7.4,定容至 1 L。

9. 根据权利要求 6 所述的一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的显色液包括底物液 A 和底物液 B,其中底物液 A:取 3, 3', 5', 5'-四甲基联苯二胺 0.2 g,无水乙醇 100 mL,加去离子水定容至 1 L;底物液 B:取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  14.6 g,柠檬酸 9.3 g,0.75% 过氧化氢尿素溶液 6.4 mL,加去离子水 800 mL,调节 PH 至 5.2,补充去离子水定容至 1000 mL。

10. 根据权利要求 6 所述的一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的终止液:2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。

11. 一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的应用,其特征在于:所述的应用是用该试剂盒对食品、饲料及对动物本中的隐蔽态 T-2 毒素进行检测。

## 一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试剂盒,具体涉及一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备方法及应用,属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 隐蔽态真菌毒素是真菌毒素在一定的外界环境条件下,通过与糖苷、蛋白、脂肪、硫酸盐等物质相结合而形成,通常作用位点为真菌毒素的羟基部位。如 T-2 毒素的 C3 位和 HT-2 毒素的 C3 和 C4 位都能偶联糖苷或蛋白,形成隐蔽态。部分学者认为,食源性植物体内的隐蔽态真菌毒素,是在机体针对真菌毒素产生的一种解毒模式作用下形成的。极性较低的单端孢霉烯族毒素如玉米赤霉烯酮通过与部分糖类、氨基酸及硫酸盐等极性较高的物质相结合,性质发生改变,极性升高,并暂时性的降低了真菌毒素的毒性。然而,虽然真菌毒素在机体内转变为隐蔽态真菌毒素,可以暂时性的降低作用危害,但是隐蔽态真菌毒素的母核结构并未被破坏,仍然可能在机体内再次解离为前体毒素而造成危害。由于隐蔽态真菌毒素性质跟真菌毒素比较变化较大,如极性发生改变等,隐蔽态真菌毒素可逃避常规检测方法的检测,从而形成潜在的食品的安全问题。特别是在某些食品的加工过程中,真菌毒素容易在外部加工环境的作用下被转化为隐蔽态真菌毒素,从而逃离检测。这些便对隐蔽态真菌毒素的检测技术提出了更高的要求。

[0003] 目前,对于检测真菌毒素的抗体检测方法和相应的试剂盒,有一定的研究和报道。中国专利,公开号 CN1611944,公开了一种甘蔗花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒,包括盒体、设在盒体内的酶标板和设在盒体内的用液。盒体内的用液包括阳性对照、阴性对照、酶标抗体、缓冲液和底物,盒体内的用液还包括甘蔗花叶病毒云南分离物多克隆抗体、甘蔗花叶病毒云南分离物单克隆抗体。该方法仅用于检测甘蔗花叶病毒云南分离物,关于 T-2 毒素检测的试剂盒仍未见有报道。

[0004] 现有的文献主要集中于游离态真菌毒素上的应用,未见有在隐蔽态真菌毒素上应用的报道。现有的检测真菌毒素的抗体方法包括普通 ELISA 方法、荧光免疫法、放射免疫法及化学发光法等都存在相应的弱点。荧光免疫法、放射免疫法及化学发光法需要一定的实验仪器,且放射免疫法还存在放射性同位素污染的问题。胶体金免疫层析法虽然有操作简单的优点,但是灵敏度比较低。而普通 ELISA,其是以酶标板为载体制备试剂盒,由于酶标板固定的单面接触模式,限制了其检测的灵敏度,不能满足低剂量真菌毒素检测的要求。因此有必要建立一种灵敏可靠、简单快速、适于检测低剂量隐蔽态真菌毒素的方法,从而提高对真菌毒素的监控力度。而以免疫磁珠代替酶标板建立的 ELISA 便符合这一要求。免疫磁珠具有可分离和富集目标提取物的功能特性,磁珠上偶联的抗体或抗原可与待测物特异性结合,在经外界磁场的加持作用下,磁性小球可定向移动富集,从而达到分离富集的效果。免疫磁珠分离技术操作简便,耗时短,且分离富集效果好,将免疫磁珠技术与酶联免疫法相结合,建立的免疫磁珠酶联免疫检测技术与传统的酶联免疫检测相比较,灵敏度得到了很大

的提升。与传统的 ELISA 相比较,磁性微粒作为载体对抗体的吸附能力是酶标板的 1000 倍以上。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种可应用于检测隐蔽态 T-2 毒素的灵敏度高、操作简便、检测快速的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒,并公开了其应用方法。本发明区别于在磁珠上偶联抗体制备免疫磁珠的传统方式,采用包被法在羧基磁珠上包被 T-2 毒素母核抗原制备抗原-免疫磁珠,进而用其建立可检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠 ELISA 试剂盒,本试剂盒除了具有普通 ELISA 试剂盒的优点外,还具有免疫磁珠富集纯化目标物的优点,并且弥补了以酶标板作为载体导致灵敏度低的缺点,从而提高检测的灵敏度和特异性。

[0006] 为达到上述发明目的,本发明采用的技术方案是:

一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争检测试剂盒,其特征在于:所述检测试剂盒包含有洗涤液、样品稀释液、显色液、终止液,还包括:

(1) 包被抗原的免疫磁珠:以 3-Ac-NEOS-HS-OVA 为包被抗原,经 PB 缓冲液配制为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在含有 0.4 mg 经 EDC 和 NHS 活化的羧基磁珠的离心管中加入 1 mL 包被抗原,旋转重悬后,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下,偶联 3 h 后,洗涤液洗涤 2-4 次,磁力架上进行磁分离去除洗液后,再向离心管中加入封闭液 0.5 mL,37  $^{\circ}\text{C}$  下,重悬旋转反应 1-2 h,洗涤液洗涤 2-4 次制得;

(2) 检测抗体:可识别隐蔽态 T-2 毒素的抗 T-2 毒素母核多克隆抗体;

(3) 酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的羊抗兔酶标抗体;

(4) 标准 T-2 毒素母核工作液:以 T-2 毒素作为标准母核供体,配制不同浓度的标准母核工作液。

[0007] 所述封闭液为含 5% 卵清蛋白或者 5% 脱脂奶粉的 PB 缓冲液;所述辣根过氧化物酶标记的羊抗兔酶标抗体购自广州齐云生物技术公司。

[0008] 所述抗 T-2 毒素母核多克隆抗体的制备方法为:免疫原 3-Ac-NEOS-HS-BSA 与弗氏完全佐剂进行 1:1 混合乳化完全,选择 2.0-2.5 kg 之间的大白兔进行免疫;后每间隔两周进行一次加强免疫,免疫原 3-Ac-NEOS-HS-BSA 与弗氏不完全佐剂进行 1:1 混合乳化完全,并于末次加强免疫后的第 10 天进行一次耳缘静脉采血,检测抗血清效价,当效价达到要求后,进行心脏采血,并进行抗血清纯化制备得抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体。

[0009] 所述 PB 缓冲液的制备方法为:先配制 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,取 19 mL 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 81 mL 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,充分混合即为 0.2 mol/L PB 缓冲液, pH 为 7.4-7.5。

[0010] 一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备方法,以包被 T-2 毒素母核抗原的免疫磁珠为载体,隐蔽态 T-2 毒素与免疫磁珠竞争抗 T-2 毒素母核多克隆抗体,通过酶联免疫反应,间接检测样品中隐蔽态 T-2 毒素的含量;

具体方法为:

(1) 利用纯化的 T-2 毒素母核免疫原 3-Ac-NEOS-HS-BSA 免疫新西兰种兔子,制备得高效价可识别隐蔽态 T-2 毒素的抗血清,硫酸铵沉淀法纯化抗血清得抗 T-2 毒素母核多克隆抗体;

(2) T-2 毒素母核包被原免疫磁珠的制备:37  $^{\circ}\text{C}$  环境下,活化后磁珠与 T-2 毒素母核包

被原 3-Ac-NEOS-HS-OVA 偶联旋转孵育 3h ;用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟,用封阻缓冲液于 37 °C 旋转孵育 2 小时,置于保存缓冲液中,4°C 保存待用 ;

(3) 按照有机溶剂提取法处理样品,处理后样品与免疫磁珠混合重悬于含 10% 甲醇的 PBS 缓冲液中 ;加入 T-2 毒素母核抗体 37 °C 下旋转孵育 2.5 h,加入 250  $\mu$ L 的稀释度为 1 : 3000 的酶标抗体,37 °C 旋转孵育 2 h,磁分离, PBST 洗涤三次 ;加入 250  $\mu$ L 的 TMB 显色工作液,室温反应 15 min 后,加入 100  $\mu$ L 2 mol/L 的  $H_2SO_4$ ,终止反应 ;磁分离,上清液至 96 孔酶标板中,450nm 下检测 OD 值,根据标准曲线计算隐蔽态 T-2 毒素浓度。

[0011] 一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的检测方法,活化后的羧基磁珠与包被原偶联,制备得可吸附抗 T-2 毒素母核多克隆抗体的免疫磁珠,该免疫磁珠可与样品中的隐蔽态 T-2 毒素竞争偶联 T-2 毒素母核抗体,通过检测样品中隐蔽态 T-2 毒素产生的抑制效果,根据标准曲线间接检测样品中隐蔽态 T-2 毒素的含量,并以隐蔽态 T-2 毒素产生的抑制率为依据进行产品标注和宣传,具体步骤如下 :

(1) 样品前处理 :按照常规的有机溶剂提取法,有机溶剂多次提取样品中的隐蔽态 T-2 毒素,并进行氮吹浓缩后,用样品稀释液进行复溶,制备样品检测液 ;

(2) 添加免疫磁珠和检测抗体 :取 250  $\mu$ L 的样品检测液加入到含 0.4 mg 包被抗原免疫磁珠的离心管中,充分混合后,加入 250  $\mu$ L 样品稀释液配制的抗体溶液,稀释度为 1 :3000,旋转重悬,37 °C 下反应 3 h,洗涤液洗涤 2-4 次,磁力架上磁分离弃上清 ;

(3) 添加酶标抗体 :取试剂盒中的酶标抗体,用洗涤液按照 1 :3000 的比例进行稀释,后取 250  $\mu$ L 加入上述离心管中,37 °C 旋转孵育 2 h,洗涤液洗涤 2-4 次,磁力架上磁分离弃上清 ;

(4) 显色 :加入显色液,250  $\mu$ L/ 管,在室温下显色 15 min,用终止液终止反应 ;

(5) 测光密度值 :磁分离后,吸取终止反应后的溶液,用酶标仪进行测量,测光密度值。

[0012] 本发明中洗涤液、样品稀释液、显色液、终止液属于现有技术,本领域技术人员可以根据需要配置,优选洗涤液 PBST :取 NaCl 8 g,  $KH_2PO_4$  0.27 g,  $Na_2HPO_4$  1.42 g, KCl 0.2 g,用 800 mL 去离子水溶解后加入 0.5 mL Tween-20,充分混匀,调整 PH 至 7.4,定容至 1 L。

[0013] 样品稀释液 PBS :取 NaCl 8 g,  $KH_2PO_4$  0.27 g,  $Na_2HPO_4$  1.42 g, KCl 0.2 g,用 800 mL 去离子水溶解后,调整 PH 至 7.4,定容至 1 L。

[0014] 显色液包括底物液 A 和底物液 B,其中底物液 A :取 3, 3', 5', 5- 四甲基联苯二胺 0.2 g,无水乙醇 100 mL,加去离子水定容至 1 L ; 底物液 B :取  $Na_2HPO_4$  14.6 g,柠檬酸 9.3 g,0.75% 过氧化氢尿素溶液 6.4 mL,加去离子水 800 mL,调节 PH 至 5.2,补充去离子水定容至 1000mL。

[0015] 终止液 :2 mol/L 的  $H_2SO_4$  溶液 。

[0016] 一种用于检测隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的应用,所述的应用是将该试剂盒用于食品、饲料及对动物样本中的隐蔽态 T-2 毒素进行检测。

[0017] 本发明相对于现有技术的有益效果是 :

1. 本发明采用免疫磁珠作为 ELISA 检测的载体,相对于传统 ELISA 以酶标板作为载体,提高了载体对抗原的吸附能力,进而提高了检测的灵敏度,降低了检测限,并且根据免疫磁珠可在外界磁场作用达到富集分离的作用,以免疫磁珠建立的 ELISA,有力地排除了非特异

性物质的干扰,特异性强。

[0018] 2. 本发明的检测仪器简单,操作步骤简便、快速,检测成本低,适用于大量样品的检测,易于推广普及。

### 具体实施方式

[0019] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围,本发明具体实施方式是通过制备和应用两方面进行实施的。

#### [0020] 实施例 1

##### 一、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备:

1. 抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体的制备,利用纯化的 T-2 毒素母核完全抗原免疫新西兰种兔子,加强免疫后,制备得高效价的抗血清,硫酸铵沉淀法纯化抗血清得 T-2 毒素母核多克隆抗体;

2. T-2 毒素母核包被原免疫磁珠的制备:取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 250 $\mu$ L,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2 小时,进行磁珠活化;用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 3 分钟,加入 T-2 毒素母核包被原,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 旋转孵育 3 小时,制备成 T-2 毒素母核包被原免疫磁珠;用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟。用封阻缓冲液于 37 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2 小时,置于保存缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 保存待用;

3. 按照有机溶剂提取法处理样品,处理后样品与免疫磁珠混合重悬于含 10% 甲醇的 PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)中;加入两倍最佳抗体工作浓度的抗体 200  $\mu$ L,与上述重悬磁珠混合,37 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2.5h,磁分离, PBST 洗涤三次;加入 200  $\mu$ L 的酶标抗体(稀释度 1:3000),37 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2h,磁分离, PBST 洗涤三次;加入 200  $\mu$ L 的 TMB 显色工作液,室温反应 15min 后,加入 100  $\mu$ L 的 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,终止反应;磁分离,吸出 200  $\mu$ L 上清液,至 96 孔酶标板中,450nm 下检测 OD 值;

##### 二、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒检测样品中隐蔽态 T-2 毒素:

以无菌吸管吸取 2mL 液体类食品样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇),充分混匀,制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中,充分混匀后,加入适当浓度的 T-2 毒素母核抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。作用完毕后,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,洗涤后,加入酶标二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时,磁分离弃上清,加入一定比例的 TMB 显色工作液进行反应,后加入 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,磁分离保留上清,450nm 下检测 OD 值。根据标准曲线技术隐蔽态 T-2 毒素浓度。

#### [0021] 实施例 2

##### 一、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备:

1. 抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体的制备,利用纯化的 T-2 毒素母核完全抗原免疫新西兰种兔子,加强免疫后,制备得高效价的抗血清,硫酸铵沉淀法纯化抗血清得 T-2 毒素母核多克隆抗体;

2. T-2 毒素母核包被原免疫磁珠的制备:取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 250  $\mu$ L,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2 小时,进行磁珠活化;用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 3 分钟,加

入 T-2 毒素母核包被原,混匀,于 37 °C 旋转孵育 3 小时,制备成 T-2 毒素母核包被原免疫磁珠;用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 旋转孵育 2 小时,置于保存缓冲液中 4 °C 保存待用;

3. 按照有机溶剂提取法处理样品,处理后样品与免疫磁珠混合重悬于含 10% 甲醇的 PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)中;加入两倍最佳抗体工作浓度的抗体 200  $\mu$ L,与上述重悬磁珠混合,37 °C 旋转孵育 2.5 h,磁分离, PBST 洗涤三次;加入 200  $\mu$ L 的酶标抗体(稀释度 1:3000),37 °C 旋转孵育 2h,磁分离, PBST 洗涤三次;加入 200  $\mu$ L 的 TMB 显色工作液,室温反应 15min 后,加入  $H_2SO_4$ (100  $\mu$ L, 2 mol/L),终止反应;磁分离,吸出 200  $\mu$ L 上清液,至 96 孔酶标板中,450nm 下检测 OD 值;

#### 二、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒检测样品中隐蔽态 T-2 毒素:

称取 2g 半固体类食品待测样品至 20mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇),8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 分钟,充分混匀,制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中,充分混匀后,加入适当浓度的 T-2 毒素母核抗体,37 °C 孵育 2 小时。作用完毕后,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,洗涤后,加入酶标二抗,37 °C 孵育 2 小时,磁分离弃上清,加入一定比例的 TMB 显色工作液进行反应,后加入 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止反应,磁分离保留上清,450nm 下检测 OD 值。根据标准曲线计算隐蔽态 T-2 毒素浓度。

#### [0022] 实施例 3

##### 一、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备:

1. 抗 T-2 毒素母核多克隆抗体的制备,利用纯化的 T-2 毒素母核完全抗原免疫新西兰种兔子,加强免疫后,制备得高效价的抗血清,硫酸铵沉淀法纯化抗血清得 T-2 毒素母核多克隆抗体;

2. T-2 毒素母核包被原免疫磁珠的制备:取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 250  $\mu$ L,混匀,于 37 °C 旋转孵育 2 小时,进行磁珠活化;用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 3 分钟,加入 T-2 毒素母核包被原,混匀,于 37 °C 旋转孵育 3 小时,制备成 T-2 毒素母核包被原免疫磁珠;用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 旋转孵育 2 小时,置于保存缓冲液中 4 °C 保存待用;

3. 按照有机溶剂提取法处理样品,处理后样品与免疫磁珠混合重悬于含 10% 甲醇的 PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)中;加入两倍最佳抗体工作浓度的抗体 200  $\mu$ L,与上述重悬磁珠混合,37 °C 旋转孵育 2.5 h,磁分离, PBST 洗涤三次;加入 200  $\mu$ L 的酶标抗体(稀释度 1:3000),37 °C 旋转孵育 2 h,磁分离, PBST 洗涤三次;加入 200  $\mu$ L 的 TMB 显色工作液,室温反应 15 min 后,加入 100  $\mu$ L 的  $H_2SO_4$ (2 mol/L),终止反应;磁分离,吸出 200  $\mu$ L 上清液,至 96 孔酶标板中,450nm 下检测 OD 值;

##### 二、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒检测样品中隐蔽态 T-2 毒素:

称取 2 g 固体类食品待测样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇),8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 分钟,充分混匀,制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中,充分混匀后,加入适当浓度的 T-2 毒素母核抗体,37 °C 孵育 2 小时。作用完毕后,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,洗涤后,加入酶标二抗,37 °C 孵育 2 小时,磁分离弃上清,加入一定比例的 TMB 显色工作液进行反应,后加入 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止反应,磁分离保留

上清, 450nm 下检测 OD 值。根据标准曲线计算隐蔽态 T-2 毒素浓度。

#### [0023] 实施例 4

##### 一、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备：

1. 抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体的制备, 利用纯化的 T-2 毒素母核完全抗原免疫新西兰种兔子, 加强免疫后, 制备得高效价的抗血清, 硫酸铵沉淀法纯化抗血清得多克隆抗体；

2. T-2 毒素母核包被原免疫磁珠的制备: 取磁珠放入离心管中, 加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次, 每次间隔 3 分钟, 除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 250  $\mu\text{L}$ , 混匀, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2 小时, 进行磁珠活化; 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍, 每次间隔 3 分钟, 加入 T-2 毒素母核包被原, 混匀, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 3 小时, 制备成 T-2 毒素母核包被原免疫磁珠; 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次, 每次间隔 3 分钟。用封阻缓冲液于 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2 小时, 置于保存缓冲液中 4  $^{\circ}\text{C}$  保存待用；

3. 按照有机溶剂提取法处理样品, 处理后样品与免疫磁珠混合重悬于含 10% 甲醇的 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH7.4) 中; 加入两倍最佳抗体工作浓度的抗体 200  $\mu\text{L}$ , 与上述重悬磁珠混合, 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2.5 h, 磁分离, PBST 洗涤三次; 加入 200  $\mu\text{L}$  的酶标抗体 (稀释度 1:3000), 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2 h, 磁分离, PBST 洗涤三次; 加入 200  $\mu\text{L}$  的 TMB 显色工作液, 室温反应 15min 后, 加入 100  $\mu\text{L}$  的 2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 终止反应; 磁分离, 吸出 200  $\mu\text{L}$  上清液, 至 96 孔酶标板中, 450nm 下检测 OD 值；

##### 二、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒检测样品中隐蔽态 T-2 毒素：

以无菌吸管吸取 2 mL 液体类饲料待测样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液 (含 10% 甲醇), 充分混匀, 制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中, 充分混匀后, 加入适当浓度的 T-2 毒素母核抗体, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时。作用完毕后, 置于磁力架上捕获磁珠, 除去上清液, 洗涤后, 加入酶标二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时, 磁分离弃上清, 加入一定比例的 TMB 进行反应, 后加入 2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 磁分离保留上清, 450nm 下检测 OD 值。根据标准曲线计算隐蔽态 T-2 毒素浓度。

#### [0024] 实施例 5

##### 一、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒的制备：

1. 抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体的制备, 利用纯化的 T-2 毒素母核完全抗原免疫新西兰种兔子, 加强免疫后, 制备得高效价的抗血清, 硫酸铵沉淀法纯化抗血清得多克隆抗体；

2. T-2 毒素母核包被原免疫磁珠的制备: 取磁珠放入离心管中, 加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次, 每次间隔 3 分钟, 除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 250  $\mu\text{L}$ , 混匀, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2 小时, 进行磁珠活化; 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍, 每次间隔 3 分钟, 加入 T-2 毒素母核包被原, 混匀, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 3 小时, 制备成 T-2 毒素母核包被原免疫磁珠; 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次, 每次间隔 3 分钟。用封阻缓冲液于 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2 小时, 置于保存缓冲液中 4  $^{\circ}\text{C}$  保存待用；

3. 按照有机溶剂提取法处理样品, 处理后样品与免疫磁珠混合重悬于含 10% 甲醇的 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.4) 中; 加入两倍最佳抗体工作浓度的抗体 200  $\mu\text{L}$ , 与上述重悬磁珠混合, 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2.5 h, 磁分离, PBST 洗涤三次; 加入 200  $\mu\text{L}$  的酶标抗体 (稀释度 1:3000), 37  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 2h, 磁分离, PBST 洗涤三次; 加入 200  $\mu\text{L}$  的 TMB 显色工作液, 室温反应 15 min 后, 加入 100  $\mu\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2 mol/L), 终止反应; 磁分离, 吸出 200  $\mu\text{L}$  上清

液,至 96 孔酶标板中,450nm 下检测 OD 值;

## 二、免疫磁珠间接竞争 ELISA 试剂盒检测样品中隐蔽态 T-2 毒素:

称取 2g 半固体类饲料待测样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇),8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 分钟,充分混匀,制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中,充分混匀后,加入适当浓度的 T-2 毒素母核抗体,37 °C 孵育 2 小时。作用完毕后,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,洗涤后,加入酶标二抗,37 °C 孵育 2 小时,磁分离弃上清,加入一定比例的 TMB 显色工作液,后加入 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止反应,磁分离保留上清,450nm 下检测 OD 值。根据标准曲线计算隐蔽态 T-2 毒素浓度。

专利名称(译)	一种用于检测隐蔽态T-2毒素的免疫磁珠间接竞争ELISA试剂盒的制备及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103983771A</a>	公开(公告)日	2014-08-13
申请号	CN201410229447.6	申请日	2014-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
[标]发明人	王雅玲 吴朝金 孙力军 邱妹 徐德峰 刘颖		
发明人	王雅玲 吴朝金 孙力军 邱妹 徐德峰 刘颖		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/553 G01N33/56961		
代理人(译)	刘广生		
其他公开文献	CN103983771B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种用于检测隐蔽态T-2毒素的免疫磁珠间接竞争ELISA试剂盒的制备方法及应用，以该免疫磁珠为基础建立的免疫磁珠间接竞争ELISA试剂盒，是利用免疫磁珠与样品中的隐蔽态T-2毒素竞争结合抗T-2毒素母核的多克隆抗体，通过检测样品中隐蔽态T-2毒素对免疫磁珠结合抗体的抑制率，可以间接分析隐蔽态T-2毒素的含量。该方法不仅具有免疫磁珠富集纯化特性，而且可以去除非特异性物质的干扰，提高了ELISA中载体对抗原的吸附能力，提高了检测的灵敏度，降低了检测限。该试剂盒检测操作简单，高效快速，价格低廉，无需复杂的仪器及人员操作，可广泛应用于食品、饲料及动物机体体内隐蔽态T-2毒素的检测。