

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710056559.6

[43] 公开日 2008年7月30日

[11] 公开号 CN 101231291A

[22] 申请日 2007.1.25

[21] 申请号 200710056559.6

[71] 申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038 号

[72] 发明人 王 硕 王向红 郑文杰 张 燕  
权 英

[74] 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司  
代理人 王来佳

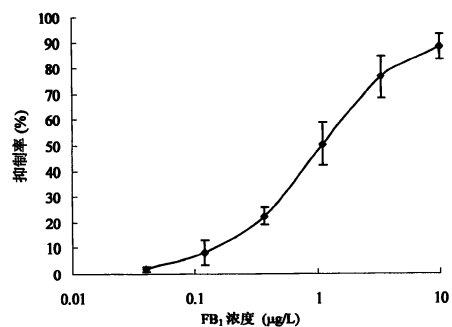
权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 1 页

## [54] 发明名称

采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B1 含量的试剂盒及其检测方法

## [57] 摘要

本发明属涉及一种采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B1 含量的试剂盒及其检测方法，其试剂盒包括制备伏马毒素 B<sub>1</sub>-KLH 抗原；制备多克隆伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体；制备酶标抗原；制备包被板；配制试剂。本发明主要采用酶联免疫分析检测技术来检测伏马毒素 B1，可实现对食品中及粮食作物中的伏马毒素 B1 定量检测的目的；并且本试剂盒结构简单、使用方便、价廉、灵敏度高；其检测方法特异性强，灵敏度高，准确性好，其灵敏度可以达到  $\mu\text{g}/\text{kg}$  级。



1. 一种采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量的试剂盒, 包括试剂和 96 孔酶标板, 其特征在于: 该试剂盒的制备包括以下步骤:

- (1) 制备伏马毒素 B<sub>1</sub>-KLH 抗原;
- (2) 制备多克隆伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体;
- (3) 制备酶标抗原;
- (4) 制备包被板;
- (5) 配制试剂。

2. 根据权利要求 1 所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量的试剂盒, 其特征在于: 制备伏马毒素 B<sub>1</sub>-KLH 抗原的方法是:

- (1) 将大分子蛋白匙孔血兰蛋白 KLH 用戊二醛溶液溶解, 3~5℃ 连续搅拌 15~18 h, 在缓冲液 PBS 中透析 45~50 h 以除去过多的戊二醛;
- (2) 将伏马毒素 B<sub>1</sub> 溶于甲醇中, 逐滴加入到已活化的大分子蛋白 KLH 中, 室温搅拌反应 1~2 h, 然后放于 3~5℃ 连续搅拌 15~20h 过夜, 形成混合液;
- (3) 向混合液中加入硼氢化钠, 连续搅拌 3~5 h 以封闭未反应的醛基, 形成反应液;
- (4) 将反应液装入透析袋, 在缓冲液 PBS 中透析 68~73 h;
- (5) 精确量取蛋白质偶联物溶液的体积并测定浓度, 加入叠氮钠后 4℃ 保存。

3. 根据权利要求 2 所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量的试剂盒, 其特征在于: 所述的戊二醛溶液为 50% 的戊二醛溶于 0.01 mol/L 缓冲液 PBS 中, 其 pH=7.4。

4. 根据权利要求 1 所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量的试剂盒, 其特征在于: 所述的制备多克隆伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体的方法是:

- (1) 伏马毒素免疫原 1mg 溶于 NaCl 中, 与弗氏完全佐剂乳化, 制得油包水抗原乳化剂;
- (2) 利用新西兰大白兔作为免疫动物进行皮下多点注射, 进行初次免疫, 在初次免疫 14 天后进行加强免疫, 免疫原剂量为 0.5mg, 用弗氏不完全佐剂进行乳化, 以后每隔三十天左右加强免疫一次, 共免疫 6 次左右, 每次免疫 10 天后对动物试采血进行血清效价测定和亲

和力测定；

(3)末次免疫后采用颈动脉采血法对动物采全血，经离心处理后收集全部血清，采取免疫亲和层析法进行抗体纯化，所得抗体添加0.1%W/V的叠氮钠后于3~5℃储存备用。

5.根据权利要求1所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素B<sub>1</sub>含量的试剂盒，其特征在于：所述的制备酶标抗原的方法是：

(1)将辣根过氧化酶 HRP 加入 1 mol/L 高碘酸钠溶液并于室温活化 15~25 min，然后对 1 mM 醋酸钠缓冲液透析过夜，形成活化的辣根过氧化酶 HRP；

(2)向活化后的 HRP 中加入伏马毒素 B<sub>1</sub>，室温搅拌反应 1~3 h 后，向反应液中加入 0.1 mL 的 1 mol/L 硼氢化钠溶液终止反应，该反应过程在 3~5 °C 下进行 0.5~1.5h；

(3)将所有反应液放入透析袋中对 0.01 mol/L 的缓冲液 PBS 透析 70~73 h。

6.根据权利要求1所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素B<sub>1</sub>含量的试剂盒，其特征在于：所述的制备包被板的方法是：

用 pH9.6 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>—NaHCO<sub>3</sub> 的缓冲液将伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体稀释为 1μg/100μL 作为包被液，微孔板每孔各加入 100μL，室温放置过夜或者 36~38℃恒温温育 2~3h，洗涤液洗涤三次除去包被液，加入冻干液封闭 0.5~1.5 小时，洗涤液洗涤四次后，冻干，3~5℃保存。

7.根据权利要求1所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素B<sub>1</sub>含量的试剂盒，其特征在于：所述的试剂盒体内的试剂构成及其制备方法为：

(1)缓冲液 PBS：其构成包括 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 及 NaCl，加双蒸水稀释，在使用时 1：5 倍稀释；

(2)伏马毒素 B<sub>1</sub> 标准液：以伏马毒素 B<sub>1</sub> 纯品配制的母液中稀释得到，母液所用溶剂为色谱纯甲醇，稀释液为 5%甲醇磷酸盐缓冲液，共六瓶，浓度分别为：10μg/L, 3.33μg/L, 1.11μg/L, 0.37μg/L, 0.123μg/L, 0.041μg/L；

(3)冻干液：Tris 溶于 100mL 双蒸水中，盐酸调节 pH7.4，加入蔗糖、乳糖、牛血清蛋白和抗坏血酸；

(4)底物 A：其构成为无水醋酸钠、β—糊精及过氧化氢脲，加双蒸水稀释后，调 pH 至 5.0 左右，3~5℃保存；

(5)底物 B：50 mg 溶于二甲基亚砷 5 mL；

- (6)洗涤液：含 0.05% Tween20 的 PBS 水溶液；
- (7)基质隐蔽剂：0.5%鱼皮胶 PBS 溶液；
- (8)酶标抗原。

8.一种如权利要求 1 所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量的试剂盒的检测方法，其特征在于：取包被有伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体的微孔包被板，加入伏马毒素 B<sub>1</sub> 标准或处理好的样品到各微孔中，再加入酶标抗原（即伏马毒素 B<sub>1</sub>-HRP），震荡反应 0.5~1.5h，洗涤液洗涤，提前混合底物 A 和底物 B 作为底物液并加入到微孔中，反应 0.4~0.6h 后每孔加入 1.25mol/L 硫酸中止反应，测定吸光度值，对照标准曲线计算样品中的伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量。

9. 根据权利要求 8 所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量的试剂盒的检测方法，其特征在于：所述的伏马毒素 B<sub>1</sub> 样品的处理方法为：取各种谷物样品各 8~12 g，分别向各种加标样品中加入 30~50 mL 萃取液，于混合振荡器上 200~300 rpm 振荡萃取 10~20 min，静置 10~20 min 后，取部分上清用基质掩蔽剂稀释后即可。

## 采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B1 含量的试剂盒及其检测方法

### 技术领域

本发明属于食品免疫分析技术领域，涉及对食品和粮食作物中的伏马毒素 B1 含量的检测，尤其是一种采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B1 含量的试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

伏马毒素 (Fumonisin, FBs) 是 1988 年由南非科学家 Gelderblom 等首次从 *F. verticillioides* (异名：串珠镰孢 *F. moniliforme* Sheldon) MRC 826 培养物中分离到的一组结构类似物，也称伏马菌素、腐马素等。该毒素主要由串珠镰孢及多育镰孢 (*F. proliferatum* Matsushinma) 产生，是以污染玉米为主的水溶性次级代谢产物。1989 年 Laurent 等从伏马毒素中分离出两种结构相似的有毒物质，分别被命名为伏马毒素 B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>)和伏马毒素 B<sub>2</sub>(FB<sub>2</sub>)。到目前为止，已发现有 FB<sub>1</sub>、FB<sub>2</sub>、FB<sub>3</sub>、FB<sub>4</sub>、FA<sub>1</sub>、FA<sub>2</sub>、FC<sub>1</sub>、FC<sub>2</sub>、FC<sub>3</sub>、FC<sub>4</sub>、FQ 和 FP<sub>1</sub> 等多种衍生物；其中，以 FB<sub>1</sub> 的毒性最强，污染水平最高。

伏马毒素与疯牛病病毒、二恶英、大肠杆菌 O-157 和氯丙醇五种污染物被认为是当今世界危及人类食品安全的五大毒素。国际上认为伏马毒素是一种具有重大卫生学意义的真菌毒素，已形成继黄曲霉毒素之后的又一个研究热点。世界卫生组织也将伏马毒素作为近几年需要优先进行研究的几种真菌毒素之一。许多证据表明，伏马毒素能引起动物各种疾病，可严重威胁人类和动物的健康及食品安全，也被认为与人类食管癌的高发有关。1993 年，国际癌症研究院 (The International Agency for Research on Cancer) 将伏马毒素定为 2B 组致癌物质 (可能是人类致癌物)。

国际癌症研究机构 (IARC) 于 1993 对伏马毒素的毒性进行了评价，JECFA(FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会)于 2001 年第 56 次会议确定伏马毒素的急、慢性无作用剂量值为 20mg/kg·bw，并将伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> (单一或混合) 的 PMTDI (暂定每日耐受摄入量) 定为 2 μg/kg。由于资料不足，CCFAC (食品添加剂与污染物法典委员) 尚未规定伏马毒素的最高限量，我国目前也没有制定关于粮

食与饲料中伏马毒素的限量标准。2001年美国食品与药物管理局(FDA)发布了供人类食用的玉米和玉米产品伏马毒素最高限量指导性公告,规定人类食用玉米中伏马毒素最高限量为2mg/kg;另外,FDA的畜牧医学中心(CVM)也同时发布了动物饲料中伏马毒素的最高限量指导性公告,规定其限量范围为5-100mg/kg;瑞士公共健康部(Swiss Federal Office of Public Health)对伏马毒素在玉米中的限量也作了规定,为每克干的玉米中含有的FB<sub>1</sub>和FB<sub>2</sub>总量小于1mg;而法国公共卫生委员会(French Council of Public Hygiene)则推荐谷物中的最大限量为3mg/kg。

目前伏马毒素B1的测定方法有多种,如:薄层层析法(TLC)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC/MS)、毛细管电泳法(CE)、液相色谱-质谱法(LC/MS)和酶联免疫测定法(ELISA)等方法。其中,国内外研究与应用较多的是HPLC法,这是国际分析化学家协会(AOAC)的指定分析方法,在伏马毒素的检测中最为常用。但是这种方法前处理过程繁琐,操作复杂,在实验时需要将伏马毒素进行柱前衍生化处理,而且通常需要专业人员进行操作,仪器设备昂贵,检测过程耗时且费用较高,不适于大量样品的现场快速检测;酶联免疫测定法ELISA由于其特异性强,灵敏度高,准确性好,操作简便,适于大批量样品的检测等优点越来越受到人们的青睐。虽然很多科研机构和大专院校的科研人员对伏马毒素B1酶联免疫分析检测方法进行了研究,但是检测的灵敏度和试剂盒的稳定性方面离实际应用还有一定的距离。

酶联免疫吸附剂测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)的基本原理是:将酶与抗原或抗体用交联剂结合起来,此种酶标记抗原或抗体与待测样品中相应抗体或抗原发生特异反应,并牢固结合;在加入相应的酶的底物时,底物被酶催化生成呈色物,可根据该呈色物的有无和呈色深浅作定性或定量观察。由于此技术是建立在抗原抗体反应和酶的高效催化作用的基础上,故而该技术具有检测灵敏度高、特异性强、准确性好等特点。

### 发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的不足而提供一个可定量检测食品中及粮食作物中的伏马毒素B1含量的试剂盒及其检测方法,该试剂盒结构简单、使用方便、价廉、灵敏度高,该检测方法检测的灵敏度可达 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 级。

本发明解决其技术问题是通过以下技术方案实现的：

一种采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量的试剂盒，包括试剂和 96 孔酶标板，该试剂盒的制备包括以下步骤：

- (1) 制备伏马毒素 B<sub>1</sub>-KLH 抗原；
- (2) 制备多克隆伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体；
- (3) 制备酶标抗原；
- (4) 制备包被板；
- (5) 配制试剂。

其中，制备伏马毒素 B<sub>1</sub>-KLH 抗原的方法是：

(1) 将大分子蛋白匙孔血兰蛋白 KLH 用戊二醛溶液溶解，3~5℃ 连续搅拌 15~18 h，在缓冲液 PBS 中透析 45~50 h 以除去过多的戊二醛；

(2) 将伏马毒素 B<sub>1</sub> 溶于甲醇中，逐滴加入到已活化的大分子蛋白 KLH 中，室温搅拌反应 1~2 h，然后放于 3~5℃ 连续搅拌 15~20h 过夜，形成混合液；

(3) 向混合液中加入硼氢化钠，连续搅拌 3~5 h 以封闭未反应的醛基，形成反应液；

(4) 将反应液装入透析袋，在缓冲液 PBS 中透析 68~73 h；

(5) 精确量取蛋白质偶联物溶液的体积并测定浓度，加入叠氮钠后 4℃ 保存。

而且，所述的戊二醛溶液为 50% 的戊二醛溶于 0.01 mol/L 缓冲液 PBS 中，其 pH=7.4。

而且，所述的制备多克隆伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体的方法是：

(1) 伏马毒素免疫原 1mg 溶于 NaCl 中，与弗氏完全佐剂乳化，制得油包水抗原乳化剂；

(2) 利用新西兰大白兔作为免疫动物进行皮下多点注射，进行初次免疫，在初次免疫 14 天后进行加强免疫，免疫原剂量为 0.5mg，用弗氏不完全佐剂进行乳化，以后每隔三十天左右加强免疫一次，共免疫 6 次左右，每次免疫 10 天后对动物试采血进行血清效价测定和亲和力测定；

(3) 末次免疫后采用颈动脉采血法对动物采全血，经离心处理后收集全部血清，采取免疫亲和层析法进行抗体纯化，所得抗体添加 0.1%W/V 的叠氮钠后于 3~5℃ 储存备用。

5. 根据权利要求 1 所述的采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量的试剂盒，其特征在于：所述的制备酶标抗原的方法是：

(1)将辣根过氧化酶 HRP 加入 1 mol/L 高碘酸钠溶液并于室温活化 15~25 min, 然后对 1 mM 醋酸钠缓冲液透析过夜, 形成活化的辣根过氧化酶 HRP;

(2)向活化后的 HRP 中加入伏马毒素 B<sub>1</sub>, 室温搅拌反应 1~3 h 后, 向反应液中加入 0.1 mL 的 1 mol/L 硼氢化钠溶液终止反应, 该反应过程在 3~5 °C 下进行 0.5~1.5h;

(3)将所有反应液放入透析袋中对 0.01 mol/L 的缓冲液 PBS 透析 70~73 h。

而且, 所述的制备包被板的方法是:

用 pH9.6 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>—NaHCO<sub>3</sub> 的缓冲液将伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体稀释为 1μg/100μL 作为包被液, 微孔板每孔各加入 100μL, 室温放置过夜或者 36~38 °C 恒温温育 2~3h, 洗涤液洗涤三次除去包被液, 加入冻干液封闭 0.5~1.5 小时, 洗涤液洗涤四次后, 冻干, 3~5 °C 保存。

而且, 所述的试剂盒体内的试剂构成及其制备方法为:

(1)缓冲液 PBS: 其构成包括 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 及 NaCl, 加双蒸水稀释, 在使用时 1: 5 倍稀释;

(2)伏马毒素 B<sub>1</sub> 标准液: 以伏马毒素 B<sub>1</sub> 纯品配制的母液中稀释得到, 母液所用溶剂为色谱纯甲醇, 稀释液为 5% 甲醇磷酸盐缓冲液, 共六瓶, 浓度分别为: 10μg/L, 3.33μg/L, 1.11μg/L, 0.37μg/L, 0.123μg/L, 0.041μg/L;

(3)冻干液: Tris 溶于 100mL 双蒸水中, 盐酸调节 pH7.4, 加入蔗糖、乳糖、牛血清蛋白和抗坏血酸;

(4)底物 A: 其构成为无水醋酸钠、β—糊精及过氧化氢脲, 加双蒸水稀释后, 调 pH 至 5.0 左右, 3~5 °C 保存;

(5)底物 B: 50 mg 溶于二甲基亚砷 5 mL;

(6)洗涤液: 含 0.05% Tween20 的 PBS 水溶液;

(7)基质隐蔽剂: 0.5% 鱼皮胶 PBS 溶液;

(8)酶标抗原。

而且, 取包被有伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体的微孔包被板, 加入伏马毒素 B<sub>1</sub> 标准或处理好的样品到各微孔中, 再加入酶标抗原 (即伏马毒素 B<sub>1</sub>-HRP), 震荡反应 0.5~1.5h, 洗涤液洗涤, 提前混合底物 A 和底物 B 作为底物液并加入到微孔中, 反应 0.4~0.6h 后每孔加入 1.25mol/L 硫酸中止反应, 测定吸光度值, 对照标准曲线计算样品中的伏马毒素 B<sub>1</sub> 含量。

而且, 所述的伏马毒素 B<sub>1</sub> 样品的处理方法为: 取各种谷物样品

各 8~12 g, 分别向各种加标样品中加入 30~50 mL 萃取液, 于混合振荡器上 200~300 rpm 振荡萃取 10~20 min, 静置 10~20 min 后, 取部分上清用基质掩蔽剂稀释后即可。

### 附图说明

图 1 为本发明伏马毒素 B<sub>1</sub>-ELISA 标准曲线图;

### 具体实施方式

下面结合实施例说明本发明, 这里所述实施例的方案不限制本发明; 本领域的专业人员按照本发明的方案可以对其进行改进和变化, 这些改进和变化都应视为在本发明的范围内, 本发明的范围和实质由权利要求来限定。

#### 一、制备试剂盒

##### 1. 伏马毒素 B<sub>1</sub>-KLH 抗原的制备

称取 10 mg 大分子蛋白匙孔血兰蛋白 (KLH) (以下简称 KLH), 用 10 mL 0.2% 戊二醛 (50% 戊二醛溶于 0.01 mol/L PBS (缓冲液, 以下简称 PBS) 中, pH 7.4) 溶解, 4°C 连续搅拌 16 h, 在 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 中透析 48 h 除去过多的戊二醛。取 1 mg FB<sub>1</sub> 溶于 0.4 mL 甲醇中, 逐滴加入到已活化的 KLH 中, 室温搅拌反应 2 h, 然后放于 4°C 连续搅拌过夜 (16 h), 最后向混合液中加入 12 mg 硼氢化钠, 连续搅拌 4 h 以封闭未反应的醛基。最后将反应液装入透析袋, 在 PBS 中透析 72 h, 然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积并测定浓度, 加入叠氮钠后 4°C 保存。

该伏马毒素 B<sub>1</sub> 是一种小分子半抗原, 分子量为 721, 只有反应原性而无免疫原性, 需要与载体蛋白偶联后才能使动物产生免疫应答。伏马毒素 B<sub>1</sub> 第 2 位碳原子上的氨基是偶联的最佳部位, 因此可以用戊二醛法将伏马毒素 B<sub>1</sub> 分子中的氨基和大分子蛋白 KLH 相结合, 以合成的伏马毒素 B<sub>1</sub>-KLH 作为免疫原进行动物免疫。

##### 2. 多克隆伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体的制备

免疫动物选择日本大耳白兔 3 只, 月龄 3 个月, 体重 1.5 公斤左右, 分别编号为 1 号、2 号和 3 号。免疫采取皮下和肌肉注射法共同进行。

免疫程序: 初次免疫: 为提高抗原的免疫性, 采用由弗氏完全佐剂乳化的免疫原, 剂量为 1 mg (溶于 1 mL 0.9% 的 NaCl 和 1 mL 的弗氏完全佐剂)。加强免疫: 初次免疫后第 14 天进行加强免疫, 剂量为 0.5 mg (溶于 1 mL 0.9% 的 NaCl 及 1 mL 的弗氏不完全佐剂)。以后

每隔 30 天加强免疫一次，共免疫 6 次。从第 2 次加强免疫开始，每次免疫 10 天后对动物试采血进行血清效价测定和亲和力测定。末次免疫后采用颈动脉采血法对动物采全血，经离心处理后收集全部血清，采取免疫亲和层析法进行抗体纯化，所得抗体添加 0.1% (W/V) 的叠氮钠后于 4℃ 储存备用。

### 3. 酶标抗原的制备:

准确称取 2.0 mg HRP，加入 1 mol/L 高碘酸钠溶液于室温活化 20 min，然后对 1 mM 醋酸钠缓冲液(pH 4.4)透析过夜。向活化后的 HRP 中加入 1.0 mL 伏马毒素 B<sub>1</sub>(1 mg 伏马毒素 B<sub>1</sub> 溶于 1 mL pH 9.5 的碳酸盐缓冲液中)，室温搅拌反应 2 h 后，向反应液中加入 0.1 mL 1 mol/L 的硼氢化钠溶液终止反应，该过程在 4℃ 下进行 1 h。最后将所有反应液放入透析袋中对 0.01 mol/L 的 PBS 透析 72 h。

### 4. 包被板的制备

伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体包被于微孔板中，用 pH9.6 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>—NaHCO<sub>3</sub> 的缓冲液将伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体稀释为 1μg/100μL 作为包被液，96 孔(或 48 孔) 微孔板每孔各加入 100μL，室温放置过夜或者 37℃ 恒温温育 2-3 小时，洗涤液洗涤三次除去包被液，加入 200μL 冻干液封闭 1 小时，洗涤液洗涤四次后，冻干，4℃ 保存。

### 5. 试剂的配制

缓冲液 (PBS): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O: 68.8g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O: 8.97g, NaCl: 45g 加双蒸水至 1L，使用时 1: 5 倍稀释；

冻干液: 0.121g Tris 溶于 100mL 双蒸水中，盐酸调节 pH7.4，加入 1g 蔗糖、1g 乳糖、2g 牛血清蛋白和 0.8g 抗坏血酸。

底物 A: 无水醋酸钠: 8.2g，β—糊精: 2.5g，过氧化氢脲: 429 mg 加双蒸水至 1000 mL，调 pH 至 5.0，4℃ 保存；

底物 B: 50mg 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 5 mL；

洗涤液: 含 0.05% Tween20 的 PBS 水溶液；

终止液: 1.25mol/L 硫酸；

伏马毒素 B<sub>1</sub> 标准液，以伏马毒素 B<sub>1</sub> 纯品配制的母液中稀释得到，母液所用溶剂为色谱纯甲醇，稀释液为 5% 甲醇磷酸盐缓冲液，共六瓶，浓度分别为: 10μg/L, 3.33μg/L, 1.11μg/L, 0.37μg/L, 0.123μg/L, 0.041μg/L。

基质隐蔽剂: 0.5% 鱼皮胶 PBS 溶液

试剂盒提供的试剂:

1×96 孔板, (8 条×12 孔, 可以进行拆分) 包被有伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体;

6×伏马毒素 B<sub>1</sub> 标准液, 1.0mL/瓶, 标准液浓度为: 10μg/L, 3.33μg/L, 1.11μg/L, 0.37μg/L, 0.123μg/L, 0.041μg/L;

1×伏马毒素 B<sub>1</sub>-HRP, 用时 PBS 1: 1000 稀释;

1×底物 A, 15mL;

1×底物 B, 1mL;

1×洗涤液, 30mL, 用时以蒸馏水 1: 5 稀释;

1×缓冲液, 30mL;

1×终止液, 5mL;

1×基质隐蔽剂, 10mL。

测定之前注意事项:

(1)使用之前将所有试剂恢复室温 (15-30℃);

(2)使用之后立即将所有试剂放回 4℃;

(3)如果样品量大建议使用多通道移液器。

## 二、检测谷物样品 (以玉米为例)

玉米经粉碎机分别充分粉碎成粉末状, 于干燥箱中 50℃ 烘干, -20℃ 储存备用。分别取玉米样品各 10 g, 加入 40 mL 萃取液(75% 甲醇/水, V:V), 于混合振荡器上 250 rpm 振荡萃取 15 min, 静置 10-20 min 后, 取部分上清用基质掩蔽剂 15 倍稀释后用于 ELISA 测定。

加标试验中, 分别向样品其中添加不同浓度的 FB<sub>1</sub>, 将加标样品充分混匀, 室温静置过夜。其余处理过程同上。

## 三、检测方法

取包被有伏马毒素 B<sub>1</sub> 抗体的冻干板条, 加酶标抗原和标样 (或样品提取液): 每孔先加入 100 μL 伏马毒素 B<sub>1</sub> 标样溶液或样品提取液, 然后加入 100 μL 酶标抗原溶液, 以不加 FB<sub>1</sub> 标样的孔为对照孔。室温反应 1 h, 然后用 PBST 洗液洗板 3 次; 在每孔中加入 150 μL 底物液, 室温下反应 30 min; 每孔加入 50 μL 终止液, 终止反应; 在双波长方式(450-650 nm)下用酶标仪读取吸光度值。在对玉米样品的检测中, 分别在 250μg/kg 和 500μg/kg 水平进行加回收试验, 其回收率为 103%和 86%。

本发明的工作原理是:

采用酶联免疫检测技术定量检测伏马毒素 B<sub>1</sub>, 其测定的基础是

酶标记免疫反应，微孔板包被伏马毒素 B1 抗体，加入伏马毒素 B1 标准或样品，再加入伏马毒素 B1 和辣根过氧化物酶（HRP）连接物，游离的伏马毒素 B1 和伏马毒素 B1—HRP 连接物共同竞争伏马毒素 B1 抗体，没有连接的伏马毒素 B1 被洗涤除去，加入反应底物，在 HRP 酶催化下反应体系显色，加入中止液后用酶标仪测定其吸光度，吸光度值与样品中的伏马毒素 B1 浓度成反比，对照标准曲线（图 1）即可以确定被测样品中的伏马毒素 B1 的含量。

本发明主要采用酶联免疫分析检测技术来检测伏马毒素 B1，可实现对食品中及粮食作物中的伏马毒素 B1 的定量检测的目的；并且本试剂盒结构简单、使用方便、价廉、灵敏度高；其检测方法特异性强，灵敏度高，准确性好，其灵敏度可以达到  $\mu\text{g}/\text{kg}$  级。

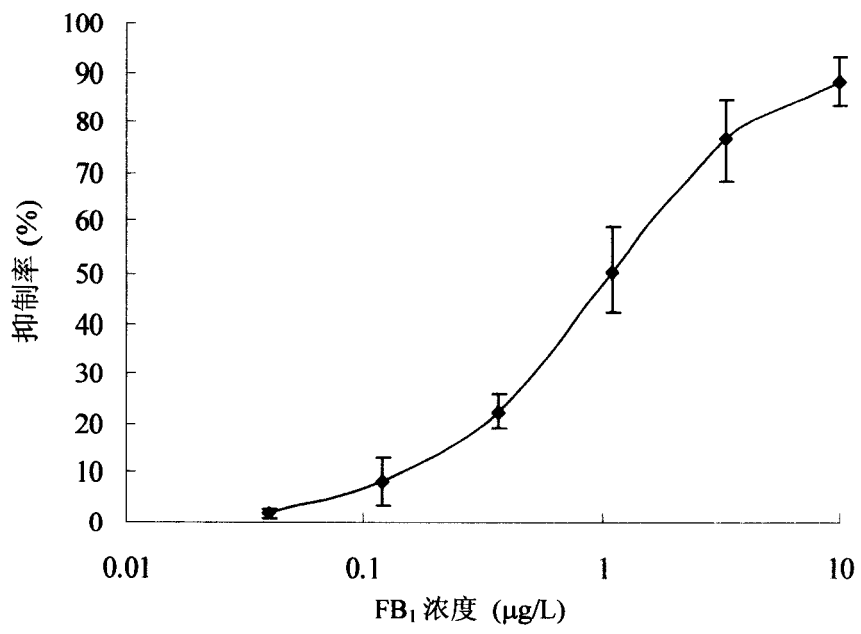


图 1

专利名称(译)	采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素B1含量的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101231291A</a>	公开(公告)日	2008-07-30
申请号	CN200710056559.6	申请日	2007-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	王硕 王向红 郑文杰 张燕 权英		
发明人	王硕 王向红 郑文杰 张燕 权英		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属涉及一种采用酶联免疫检测技术定量检测食品中伏马毒素B1含量的试剂盒及其检测方法，其试剂盒包括制备伏马毒素B1 - KLH抗原；制备多克隆伏马毒素B1抗体；制备酶标抗原；制备包被板；配制试剂。本发明主要采用酶联免疫分析检测技术来检测伏马毒素B1，可实现对食品中及粮食作物中的伏马毒素B1定量检测的目的；并且本试剂盒结构简单、使用方便、价廉、灵敏度高；其检测方法特异性强，灵敏度高，准确性好，其灵敏度可以达到 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 级。

