



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108226512 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201611159443.0

(22)申请日 2016.12.15

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家
科技园B11栋3楼

(72)发明人 杜道林 薛永来 洪霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联
免疫试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒,包括包被的黄曲霉毒素B1抗体和酶标记抗原。本发明的检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒,对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批样品;最低检测限达 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,可直接判断样品是否超标,具有高特异性、高灵敏度、高精确度、高准确度等特点,可在食品瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1残留检测中发挥重要作用。

1. 一种检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒,其特征在于:由多孔包被板,缓冲液,瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1标准品,酶标记抗原,洗涤液所组成。

2. 一种根据权利要求1所述检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒的检测方法,包括样本前处理,其特征在于:

(1) 以苏薇微生物研究有限公司生产的AFB1 酶联免疫定量测试盒中的样品处理方法为基础,并对该方法进行改进;准确称取 5.0 g 黄酒于 50mL 刻度离心管中,加入甲醇:水 (体积比 1:1) 定容至 25 mL,涡旋 3 min,然后50 °C 超声 10 min,最后取1.0 mL过 0.22 μm 的膜,样液待测;(2) 将步骤(1)的待测物进行酶联免疫,对照标准曲线计算样品中的AFB1的含量。

3. 根据权利要求1所述检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的固相载体是多孔包被板,采用48或者96孔的多微孔包被板作为固相载体;

根据权利要求1所述检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素 B1的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于:根据待测样品量,截取相应酶标板孔数,依次加入配置好的标准溶液或黄酒样品提取液 50 μL ,再加入酶标抗原50 μL ,将反应板放入37 °C恒温培养箱中孵育30 min,取出反应板,用力甩掉反应液,拍干后,每孔加入250 μL 洗涤液洗涤,重复洗板 4 次,每孔加入显色底物液 A 和 B,摇匀,将反应板放入 37°C 恒温培养箱中显色15min,显色结束后,每孔加入50 μL 终止液,摇匀后用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度值。

一种检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 黄曲霉毒素主要由黄曲霉、寄生曲霉、烟曲霉和少数温特曲霉菌株产生,是一组化学结构类似的二呋喃香豆素衍生物。目前,分离鉴定出的天然黄曲霉毒素主要类型为B和G毒素,包括黄曲霉毒素B1(AFB1)、黄曲霉毒素B2(AFB2)、黄曲霉毒素G1(AFG1)、黄曲霉毒素G2(AFG2),其中,以黄曲霉毒素 B1毒性最强。1993 年,国际癌症研究机构定义黄曲霉毒素 B1为一类致癌物,其毒性相当于氰化钾的10倍,砒霜的68倍,尤其对人和动物肝脏具有极强致癌性。毒理学研究表明,黄曲霉毒素的危害还包括导致机体免疫力低下,致畸和致突变性。根据GB2761—2011食品国家标准《食品中真菌毒素限量》规定,稻谷、糙米、大米及其制品中黄曲霉毒素B1限量为 $10\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,小麦、大麦、其他谷物及其制品的限量为 $5\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,婴幼儿配方食品和辅助食品限量为 $0.5\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。欧盟国家规定更加严格,要求加工谷类食品和婴儿食品中黄曲霉毒素B1的含量不能超过 $0.1\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,但目前,GB 2761—2011对于黄酒中黄曲霉毒素B1的限量还没有规定。黄酒是我国特有的一种酿造酒,也是世界三大古酒(啤酒、黄酒和葡萄酒)之一。

[0002] 黄酒主要以稻米、黍米、黑米、小麦、玉米、糯米等为原料酿造而成,因其具有抗氧化、抗衰老、降血压、降胆固醇、代谢和免疫调节等功效,深受国人喜爱。黄酒原料(如陈粮)、酿造过程、储存环节中都有可能发生黄曲霉毒素污染,因此检测黄酒中黄曲霉毒素含量有其必要性。

[0003] 目前,食品中应用比较广泛的黄曲霉毒素检测方法有高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、酶联免疫测定法(ELISA)、液相色谱质谱串联分析技术(LC-MS/MS)等。HPLC和LC-MS/MS方法虽然定量准确,但是样品前处理一般需特定的净化柱,净化柱价格相对较高,同时需要配置价格昂贵的检测仪器,操作人员需专门经过仪器培训,而酶联免疫法只需要全扫描酶标仪,操作简单、快速,灵敏度高,检测人员容易上手,在许多企业和小型检测机构得到了广泛应用。本研究利用酶联免疫检测技术(ELISA),以黄酒为样本,检测了本地市场中随机抽取的瓶装黄酒中 AFB1 的含量,并对检测方法进行有效评估。

发明创造内容

[0004] 本发明的目的是提供一种检测本发明的目的是提供一种检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素 B1的酶联免疫试剂盒,包括包被抗体、酶标记物。

[0006] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括A,B,C,D,E,F试剂液、G试剂液、H试剂液、I试剂液、J试剂液。

[0007] 所述A,B,C,D,E,F试剂液为瓶装黄酒中黄曲霉毒素 B1系列浓度标准溶液。

[0008] 所述G试剂液为酶标记抗原。

[0009] 所述H试剂液为洗涤液。

[0010] 所述I试剂液为底物溶液。

[0011] 所述J试剂液为终止液。

[0012] 本发明的检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒,包括包被瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1抗体和酶标记抗原。

[0013] 本发明的检测原理为根据待测样品量,截取相应酶标板孔数,依次加入配置好的标准溶液或黄酒样品提取液50 μ L,再加入酶标抗原50 μ L,将反应板放入37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 30 min,取出反应板,用力甩掉反应液,拍干后,每孔加入250 μ L 洗涤液洗涤,重复洗板 4 次,每孔加入显色底物液 A 和 B,摇匀,将反应板放入37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中显色15 min,显色结束后,每孔加入50 μ L 终止液,摇匀后用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度值。

[0014] 本发明主要采用间接竞争ELISA方法定性或定量检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素 B1的残留量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批样品;最低检测限达0.05 μ g $\cdot$ kg $^{-1}$,可直接判断样品是否超标,具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,可在可在食品瓶装黄酒中黄曲霉毒素 B1残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0015] 图1 酶联免疫法测定AFB1的线性关系。

具体实施方式

[0016] 实施例1、检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒

(1)检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒的结构

材料与试剂:

不同品牌和产地的黄酒样品 26个,黄曲霉毒素AFB1 酶联免疫定量测试盒(江苏省苏微微生物研究有限公司)。黄曲霉毒素B1标准品(纯度>98%) 购于北京泰乐祺科技有限公司(新加坡 Pribolab)。色谱级甲醇购于Te-dia(美国,俄亥俄州,费尔菲尔德)。

[0017] 仪器与设备:

1500 型全波长酶标仪(美国热电公司),电子天平 BSA 822-cw(赛多利斯科学仪器),GNP-9160 型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),DS-7510DTH 型超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司)。

[0018] (2)所用试剂的配制

所述A,B,C,D,E,F 试剂液为瓶装黄酒中黄曲霉毒素 B1系列浓度标准溶液为0.0,0.10,0.25,0.50,1.0,2.0 μ g $\cdot$ L $^{-1}$ 。

[0019] 所述G试剂液为酶标记抗原。

[0020] 所述H试剂液为洗涤液。

[0021] 所述I试剂液为底物溶液。

[0022] 所述J试剂液为终止液。

[0023] 实施例2、样品的前处理及检测

(1)样品的前处理

以苏薇微生物研究有限公司生产的 AFB1酶联免疫定量测试盒中的样品处理方法为基

础,并对该方法进行改进。准确称取 5.0 g 黄酒于 50mL 刻度离心管中,加入甲醇:水(体积比 1:1)定容至 25 mL,涡旋 3 min,然后 50 °C 超声 10 min,最后取 1.0 mL 过 0.22 μm 的膜,样液待测。

[0024] (2) 检测

根据待测样品量,截取相应酶标板孔数,依次加入配置好的标准溶液或黄酒样品提取液 50μL,再加入酶标抗原50μL,将反应板放入 37 °C 恒温培养箱中孵育 30 min,取出反应板,用力甩掉反应液,拍干后,每孔加入250 μL 洗涤液洗涤,重复洗板 4 次,每孔加入显色底物液 A 和 B,摇匀,将反应板放入 37 °C 恒温培养箱中显色 15 min,显色结束后,每孔加入 50 μL 终止液,摇匀后用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值。

[0025] (3) 标准曲线

将系列 AFB1 标准溶液 (0.0,0.10,0.25,0.50,1.0,2.0 μg · L⁻¹) 测得的吸光度值,绘制标准曲线(图 1)。横坐标为标准曲线浓度的常用对数值(lgc),纵坐标为各标准液吸光度值与 0 ng · mL⁻¹标准溶液孔的吸光度值的比值得线性方程 $y = -0.4679x + 0.3132$, $R^2 = 0.9982$,黄曲霉毒素 B1在0.1~2.0 μg · L⁻¹范围内呈线性相关。

[0026] 实施例3、试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度

1. 试剂盒灵敏度试验

按照试验步骤,通过依次添加黄曲霉毒素B1 到样品中,降低AFB1在450 nm 时的光密度来确定最低检测浓度,即检测的灵敏度。结果如表1所示。从表1可以看出,AFB1 浓度为0.05 μg · kg⁻¹时,酶标仪450 nm下的吸光值为1.264,与AFB1为0时的吸光值 1.424 之差大于0.1,此浓度可确定为本方法的灵敏度,因此本法对AFB1的最低检出浓度为0.05 μg · kg⁻¹,即该方法对黄酒中 AFB1 的检测灵敏度为0.05 μg · kg⁻¹。

[0027] 2. 准确度测定

选 1#黄酒样品作为添加回收试验样品,分别添加 0,2.0,3.5,5.0 μg · kg⁻¹四个浓度,按照试验步骤测定添加样品中 AFB1 含量,每个浓度做3 个重复结果如表 2。当加样浓度在2.0~3.5μg · kg⁻¹时,样品的加标回收率在 105% 左右;当加样浓度进一步增大到 5.0 μg · kg⁻¹时,样品的加标回收率降至 90%。

[0028] 3. 重复性测定

按照试验检测步骤重复测定黄酒中 AFB1 的含量 6 次,计算其标准偏差和相对标准偏差,检测结果如表3所示。可以看出,多次样品测定的平均值为1.319,标准差为0.050,相对标准偏差为 3.5%,重现性能够满足分析方法的要求。

[0029] 4. 不同瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的含量

选取目前市场上消费较多的干型黄酒、半干型黄酒、特性半干型黄酒、半甜型黄酒和特型半甜型黄酒 5类黄酒样品,样品编号1到26。测定的黄曲霉毒素B1含量从结果 可看出,26 个随机购买的瓶装黄酒样品中均有检出黄曲霉毒素 B1,其中 10 个样品黄曲霉毒素B1含量小于 0.5 μg · kg⁻¹,14个样品中黄曲霉毒素B1含量在 0.5~1.0 μg · kg⁻¹之间,2个样品黄曲霉毒素B1含量大于1.0 μg · kg⁻¹,但小于 2.0 μg · kg⁻¹。总体来看,随机购买的瓶装黄酒样品中黄曲霉毒素含量低。由于黄酒中AFB1的限量现在还没有正式的国标规定,参考食品中真菌毒素限量标准(GB 2761—2011 对大米中 AFB1限量为10 μg · kg⁻¹,小麦中AFB1 限量要求为 5 μg · kg⁻¹),抽取的26个黄酒样品中黄曲霉毒素B1的含量均未超标。

[0030] 表1 黄酒样品依次添加不同浓度的黄曲霉毒素B1所测的吸光度值

样品中AFBI浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	D_{450}			均值
0.0	1.562	1.446	1.264	1.424
0.05	1.298	1.224	1.271	1.264
0.10	1.266	1.142	1.234	1.215
1.0	0.595	0.637	0.624	0.618

表2 黄酒样品不同添加浓度回收率试验结果

添加浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	本底值/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均测定值/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均回收率/%
2.0	0.29	2.4	105.5 ± 0.55
3.5	0.29	4.0	106.0 ± 0.57
5.0	0.29	4.8	90.2 ± 0.54

表3 黄酒样品重复性试验结果

样品	D_{450}
平行1	1.255
平行2	1.384
平行3	1.353
平行4	1.316
平行5	1.284
平行6	1.324
平均值	1.319
标准偏差	0.050
相对标准偏差/%	3.5

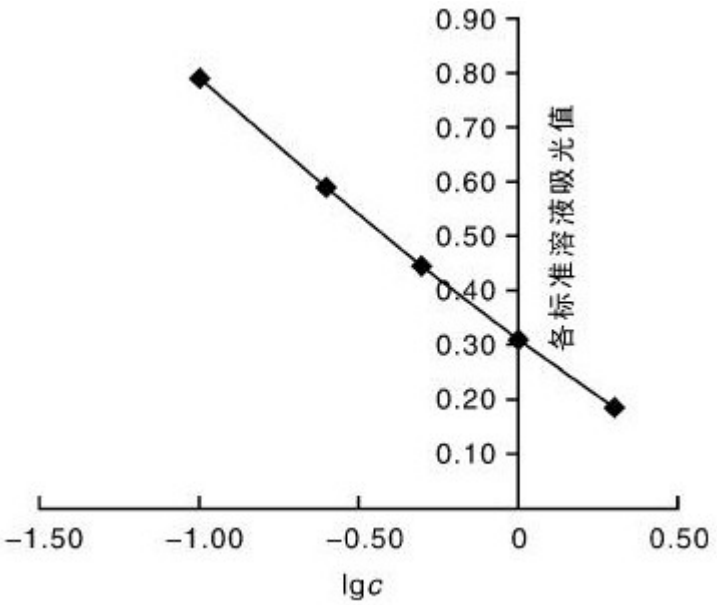


图1

专利名称(译)	一种检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN108226512A	公开(公告)日	2018-06-29
申请号	CN201611159443.0	申请日	2016-12-15
[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		
当前申请(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 薛永来 洪霞		
发明人	杜道林 薛永来 洪霞		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/535 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒，包括包被的黄曲霉毒素B1抗体和酶标记抗原。本发明的检测瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒，对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批样品；最低检测限达 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，可直接判断样品是否超标，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，可在食品瓶装黄酒中黄曲霉毒素B1残留检测中发挥重要作用。

