



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725143 A

(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201811607127.4

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2018.12.27

G01N 33/577(2006.01)

(71)申请人 国家食品安全风险评估中心

地址 100022 北京市朝阳区广渠路37号院2
号楼

申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

(72)发明人 骆鹏杰 赵云峰 陈霞 王紫菲
陈银辉 李敬光 周爽

(74)专利代理机构 北京华进京联知识产权代理
有限公司 11606

代理人 黎艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

(54)发明名称

黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒及检测方法

(57)摘要

一种黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒及检测方法,黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,包括:酶标板、黄曲霉毒素B₁标准品溶液、黄曲霉毒素B₁抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液;所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为2mol/L的硫酸水溶液;所述酶标板包被有黄曲霉毒素B₁包被抗原;所述黄曲霉毒素B₁包被抗原通过黄曲霉毒素B₁抗原与牛血清白蛋白偶联得到。相对于传统的检测方法,上述试剂盒的检测方法,检测过程及样品处理过程都相对较为简单,检测过程和操作都较为便捷。

1. 一种黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,包括:酶标板、黄曲霉毒素B₁标准品溶液、黄曲霉毒素B₁抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液;

其中,所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;

所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;

所述终止液为2mol/L的硫酸水溶液;

所述浓缩稀释液为磷酸盐缓冲液;

所述浓缩洗涤液包括磷酸盐吐温缓冲液;

所述酶标板包被有黄曲霉毒素B₁包被抗原;所述黄曲霉毒素B₁包被抗原通过黄曲霉毒素B₁抗原与牛血清白蛋白偶联得到。

2. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述浓缩稀释液为10倍浓缩稀释液,用于稀释十倍时使用。

3. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述浓缩洗涤液为10倍浓缩洗涤液,用于稀释十倍时使用。

4. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述黄曲霉毒素B₁抗体工作液通过采用黄曲霉毒素B₁包被抗原作为免疫原制备得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:10000比例制备得到。

5. 根据权利要求4所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗工作液通过羊抗鼠抗体加抗体稀释液按1:2000稀释制备得到。

6. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述黄曲霉毒素B₁抗原的制备方法包括如下步骤:

将黄曲霉毒素B₁与羧甲基羟氨半盐酸盐置于吡啶中,室温避光搅拌反应24小时,得到第一反应液;

将所述第一反应液冷冻干燥,得到固体干燥物;

将固体干燥物用纯水溶解后,并用盐酸调节pH为3.0,用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥后得到黄曲霉毒素B₁脒;

将黄曲霉毒素B₁脒溶解于KOH的吡啶溶液中,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,在70~80℃的温度下反应12小时,得到第二反应液;

向第二反应液中加入N-羟基琥珀酰亚胺,室温搅拌反应2小时,得到第三反应液。

7. 根据权利要求6所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,将所述第三反应液冷冻干燥即得到黄曲霉毒素B₁抗原。

8. 根据权利要求6所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述黄曲霉毒素B₁包被抗原的制备方法包括如下步骤:

将阳离子牛血清白蛋白用蒸馏水溶解后,加入至第三反应液中,避光室温搅拌下反应24小时,得到第四反应液;

将第四反应液在0.01摩尔/升的磷酸盐缓冲液中透析3天,将透析液冷冻干燥得到黄曲霉毒素B₁包被抗原。

9. 根据权利要求8所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述阳离子牛血清白蛋白为牛血清白蛋白与乙二胺联结得到。

10. 一种黄曲霉毒素的检测方法,其特征在于,采用如权利要求1至9任一项中所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒进行检测。

黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本申请涉及真菌毒素检查技术领域,特别是涉及一种黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素是黄曲霉和寄生曲霉的有毒的代谢产物,黄曲霉毒素是目前已知的最强致癌物之一,其毒性大于氰化物、砷化物等的毒性。目前已经发现的黄曲霉毒素有二十多种,黄曲霉毒素对人类造成健康威胁的主要是黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂、M₁和M₂。黄曲霉毒素主要存在于谷物、坚果和饲料中。1993年黄曲霉毒素B₁被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为I类致癌物,是一类毒性极强的剧毒物质。它被证明对人和动物的肝脏、肾脏等组织和器官具有很大的危害。我国规定:黄曲霉毒素B₁在玉米、大米和小麦中限量分别不得超过20μg/kg、10μg/kg和5μg/kg,各种饲料中黄曲霉毒素B₁的限量标准为10μg/kg-50μg/kg。

[0003] 目前,市场上的黄曲霉毒素的检测方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附法等,上述检测方法检测过程和操作过程都较为麻烦,无法适应大样本检测。

发明内容

[0004] 基于此,有必要提供一种检测过程和操作较为便捷的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒及检测方法。

[0005] 一种黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,包括:酶标板、黄曲霉毒素B₁标准品溶液、黄曲霉毒素B₁抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液;

[0006] 其中,所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;

[0007] 所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;

[0008] 所述终止液为2mol/L的硫酸水溶液;

[0009] 所述浓缩稀释液为磷酸盐缓冲液;

[0010] 所述浓缩洗涤液包括磷酸盐吐温缓冲液;

[0011] 所述酶标板包被有黄曲霉毒素B₁包被抗原;所述黄曲霉毒素B₁包被抗原通过黄曲霉毒素B₁抗原与牛血清白蛋白偶联得到。

[0012] 在其中一个实施例中,所述浓缩稀释液为10倍浓缩稀释液,用于稀释十倍时使用。

[0013] 在其中一个实施例中,所述浓缩洗涤液为10倍浓缩洗涤液,用于稀释十倍时使用。

[0014] 在其中一个实施例中,所述黄曲霉毒素B₁抗体工作液通过采用黄曲霉毒素B₁包被抗原作为免疫原制备得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:10000比例制备得到。

[0015] 在其中一个实施例中,所述酶标二抗工作液通过羊抗鼠抗体加抗体稀释液按1:2000稀释制备得到。

- [0016] 在其中一个实施例中,所述黄曲霉毒素B₁抗原的制备方法包括如下步骤:
- [0017] 将黄曲霉毒素B₁与羧甲基羟氨半盐酸盐置于吡啶中,室温避光搅拌反应24小时,得到第一反应液;
- [0018] 将所述第一反应液冷冻干燥,得到固体干燥物;
- [0019] 将固体干燥物用纯水溶解后,并用盐酸调节pH为3.0,用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥后得到黄曲霉毒素B₁肟;
- [0020] 将黄曲霉毒素B₁肟溶解于KOH的吡啶溶液中,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,在70~80℃的温度下反应12小时,得到第二反应液;
- [0021] 向第二反应液中加入N-羟基琥珀酰亚胺,室温搅拌反应2小时,得到第三反应液。
- [0022] 在其中一个实施例中,将所述第三反应液冷冻干燥即得到黄曲霉毒素B₁抗原。
- [0023] 在其中一个实施例中,所述黄曲霉毒素B₁包被抗原的制备方法包括如下步骤:
- [0024] 将阳离子牛血清白蛋白用蒸馏水溶解后,加入第三反应液中,避光室温搅拌下反应24小时,得到第四反应液;
- [0025] 将第四反应液在0.01摩尔/升的磷酸盐缓冲液中透析3天,将透析液冷冻干燥得到黄曲霉毒素B₁包被抗原。
- [0026] 在其中一个实施例中,所述阳离子牛血清白蛋白为牛血清白蛋白与乙二胺联结得到。
- [0027] 一种黄曲霉毒素的检测方法,采用如上任一实施例中所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒进行检测。
- [0028] 上述黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,对黄曲霉毒素的检测采用固相间接竞争酶联免疫反应的远离,把提取的待检测样品、酶标二抗工作液和黄曲霉毒素B₁抗体工作液加入对应的酶标板微孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液A、底物液B,在酶的作用下显色剂呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品溶液或样品中通用黄曲霉毒素的含量成反比例关系,据此可用于检测样品中的黄曲霉毒素的含量。相对于传统的薄层色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附法等,上述黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒的检测,采用酶标仪就可以完成大批量样品的检测,检测过程及样品处理过程都相对较为简单,检测过程和操作都较为便捷。

具体实施方式

[0029] 为了便于理解本申请,为使本申请的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面对本申请的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本申请,给出了本申请的较佳实施方式。但是,本申请可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施方式。相反地,提供这些实施方式的目的是使对本申请的公开内容理解的更加透彻全面。本申请能够以很多不同于在此描述的其它方式来实现,本领域技术人员可以在不违背本申请内涵的情况下做类似改进,因此本申请不受下面公开的具体实施例的限制。此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本申请的描述中,“多个”的含义是至少两个,例如两个,三个等,除非另有明确具体的限定。在本申请的描述中,“若干”的含义是至少一个,例

如一个,两个等,除非另有明确具体的限定。除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中所使用的术语只是为了描述具体的实施方式的目的,不是旨在于限制本申请。本文所使用的术语“及/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0030] 一实施例中,一种黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,包括:酶标板、黄曲霉毒素B₁标准品溶液、黄曲霉毒素B₁抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液;

[0031] 其中,所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为2mol/L的硫酸水溶液,即硫酸溶解于水形成的溶液,其中,硫酸的浓度为2mol/L;所述浓缩稀释液为磷酸盐缓冲液;例如,所述浓缩稀释液为10倍浓缩稀释液,用于稀释十倍时使用。例如,所述浓缩稀释液为0.1mol/L的PBS,pH值范围7.0-7.5,所述浓缩稀释液用于稀释十倍使用。所述浓缩洗涤液包括磷酸盐吐温缓冲液;例如,所述浓缩洗涤液为10倍浓缩洗涤液,用于稀释十倍时使用。例如,所述浓缩洗涤液包括0.5%吐温-20和0.01mol/L的PBS,所述浓缩洗涤液的pH值范围7.0-7.5,所述浓缩洗涤液用于稀释十倍使用,稀释后的浓缩洗涤液即为PBST。

[0032] 所述酶标板包被有黄曲霉毒素B₁包被抗原;所述黄曲霉毒素B₁包被抗原通过黄曲霉毒素B₁抗原与牛血清白蛋白偶联得到。一实施例中,将黄曲霉毒素B₁包被抗原包被在酶标板上的方法如下:用0.05mol/L的pH为9.6的碳酸盐缓冲液(CBS)作为包被液,将黄曲霉毒素B₁包被抗原稀释成黄曲霉毒素B₁包被抗原的浓度为25微克/毫升。取96孔酶标板,每孔中加入包被液100微升/孔,37℃孵育2h,避光,取出酶标板倒掉板酶标内液体,加入稀释10倍后的浓缩洗涤液300微升/孔,洗板2次,30秒/次,然后加入0.5%牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum,BSA)封闭,150微升/孔,37℃放置1.5h,弃去封闭液直接拍干,拍干后的酶标板在25℃下晾干,然后将酶标板放置于4℃条件下保存。在其中一实施例中,将包被液孵育过程中,也可以采用4℃避光孵育过夜。如此,能够较好地将黄曲霉毒素B₁包被抗原包被在酶标板上。需要说明的是,黄曲霉毒素B₁包被抗原或者黄曲霉毒素B₁抗原可以通过市售购买得到,也可以通过本申请后续的实施例的制备方法制备得到。

[0033] 上述黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,对黄曲霉毒素的检测采用固相间接竞争酶联免疫反应的远离,把提取的待检测样品、酶标二抗工作液和黄曲霉毒素B₁抗体工作液加入对应的酶标板微孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液A、底物液B,在酶的作用下显色剂呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品溶液或样品中通用黄曲霉毒素的含量成反比例关系,据此可用于检测样品中的黄曲霉毒素的含量。相对于传统的薄层色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附法等,上述黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒的检测,采用酶标仪就可以完成大批量样品的检测,检测过程及样品处理过程都相对较为简单,检测过程和操作都较为便捷。

[0034] 一实施例中,黄曲霉毒素B₁标准品溶液的标准品浓度分别为0μg/升、0.05μg/升、0.15μg/升、0.45μg/升、1.35μg/升和4.05μg/升。

[0035] 一实施例中,所述黄曲霉毒素B₁抗体工作液通过采用黄曲霉毒素B₁包被抗原作为免疫原制备得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:10000比例制备得到。本申请中,通过选用黄曲霉毒素B₁包被抗原,由于其偶联了牛血清白蛋白,因此能够较好地作为免疫原来

制备得到单克隆抗体。需要说明的是,单克隆抗体的制备,可以将黄曲霉毒素B₁包被抗原提供给外包公司制备得到。让外包公司制备时要求单克隆抗体的验收标准为间接ELISA效价为1:32万。

[0036] 一实施例中,所述酶标二抗工作液通过羊抗鼠抗体加抗体稀释液按1:2000稀释制备得到。需要说明的是,羊抗鼠抗体可以通过市售购买得到。

[0037] 为了较好地制备黄曲霉毒素B₁抗原,一实施例中,所述黄曲霉毒素B₁抗原的制备方法包括如下步骤:

[0038] 将黄曲霉毒素B₁与羧甲基羟氨半盐酸盐置于吡啶中,室温避光搅拌反应24小时,得到第一反应液;

[0039] 将所述第一反应液冷冻干燥,得到固体干燥物;

[0040] 将固体干燥物用纯水溶解后,并用盐酸调节pH为3.0,用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥后得到黄曲霉毒素B₁肼;

[0041] 将黄曲霉毒素B₁肼溶解于KOH的吡啶溶液中,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,在70~80℃的温度下反应12小时,得到第二反应液;

[0042] 向第二反应液中加入N-羟基琥珀酰亚胺,室温搅拌反应2小时,得到第三反应液。可以根据需要将第三反应液冷冻干燥以得到黄曲霉毒素B₁抗原。例如,将所述第三反应液冷冻干燥即得到黄曲霉毒素B₁抗原。

[0043] 如此,能够较好地制备黄曲霉毒素B₁抗原。

[0044] 一个具体实施例是,所述黄曲霉毒素B₁抗原的制备方法包括如下步骤:

[0045] 将20mg的黄曲霉毒素B₁与30mg的羧甲基羟氨半盐酸盐置于2.0ml的吡啶中,室温避光搅拌反应24小时,得到第一反应液;

[0046] 将所述第一反应液冷冻干燥,得到固体干燥物;

[0047] 将固体干燥物用10ml纯水溶解后,并用0.2摩尔/升的盐酸调节pH为3.0,用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥后得到黄曲霉毒素B₁肼;

[0048] 将10mg的黄曲霉毒素B₁肼溶解于1ml的0.1摩尔/升的KOH的吡啶溶液中,加入6.5mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),在70~80℃的温度下反应12小时,得到第二反应液;

[0049] 向第二反应液中加入40mg的N-羟基琥珀酰亚胺和1ml的pH为5.0的MES(吗啉乙磺酸)缓冲液(MES hydrate),10分钟后向第二反应液中再加入40mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌反应2小时,得到第三反应液。

[0050] 如此,能够较好地制备黄曲霉毒素B₁抗原,其纯度较高。当然,同样地,可以根据需要将第三反应液冷冻干燥以得到黄曲霉毒素B₁抗原。例如,将所述第三反应液冷冻干燥即得到黄曲霉毒素B₁抗原。需要说明的是,黄曲霉毒素B₁肼即为AFB₁肼化物AFB₁-O。经过申请人研究发现,通过选择20mg的黄曲霉毒素B₁与30mg的羧甲基羟氨半盐酸盐置于2.0ml的吡啶中,室温避光搅拌反应24小时,得到第一反应液;将所述第一反应液冷冻干燥,得到固体干燥物;将固体干燥物用10ml纯水溶解后,并用0.2摩尔/升的盐酸调节pH为3.0,用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥后得到黄曲霉毒素B₁肼;如此,制备得到的黄曲霉毒素B₁肼的肼化率较高,肼化率能够达到96.21%。

[0051] 一实施例中,所述黄曲霉毒素B₁包被抗原的制备方法包括如下步骤:

[0052] 将阳离子牛血清白蛋白(cBSA)用蒸馏水溶解后,加入第三反应液中,避光室温搅拌下反应24小时,得到第四反应液;例如,所述阳离子牛血清白蛋白为牛血清白蛋白与乙二胺联结得到。

[0053] 将第四反应液在0.01摩尔/升的磷酸盐缓冲液中透析3天,将透析液冷冻干燥得到黄曲霉毒素B₁包被抗原。

[0054] 如此,能够较好地将牛血清白蛋白与黄曲霉毒素B₁抗原进行偶联以得到黄曲霉毒素B₁包被抗原。

[0055] 一个具体实施中,所述黄曲霉毒素B₁包被抗原的制备方法包括如下步骤:

[0056] 将40mg的阳离子牛血清白蛋白(cBSA)用2ml的蒸馏水溶解后,加入至第三反应液中,避光室温搅拌下反应24小时,得到第四反应液;

[0057] 将第四反应液在0.01摩尔/升的磷酸盐缓冲液中透析3天,期间每隔4小时至5小时换一次磷酸盐缓冲液,将透析液冷冻干燥得到黄曲霉毒素B₁包被抗原。

[0058] 如此,能够较好地将牛血清白蛋白与黄曲霉毒素B₁抗原进行偶联以得到黄曲霉毒素B₁包被抗原。

[0059] 一实施例中,所述黄曲霉毒素B₁包被抗原的制备方法包括如下步骤:

[0060] 将20mg的黄曲霉毒素B₁与30mg的羧甲基羟氨半盐酸盐置于2.0ml的吡啶中,室温避光搅拌反应24小时,得到第一反应液;

[0061] 将所述第一反应液冷冻干燥,得到固体干燥物;

[0062] 将固体干燥物用10ml纯水溶解后,并用0.2摩尔/升的盐酸调节pH为3.0,用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥后得到黄曲霉毒素B₁脞;

[0063] 将10mg的黄曲霉毒素B₁脞溶解于1ml的0.1摩尔/升的KOH的吡啶溶液中,加入6.5mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),在70~80℃的温度下反应12小时,得到第二反应液;

[0064] 向第二反应液中加入40mg的N-羟基琥珀酰亚胺和1ml的pH为5.0的MES缓冲液,10分钟后向第二反应液中再加入40mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌反应2小时,得到第三反应液;

[0065] 将40mg的阳离子牛血清白蛋白(cBSA)用2ml的蒸馏水溶解后,加入至第三反应液中,避光室温搅拌下反应24小时,得到第四反应液;其中,cBSA通过牛血清白蛋白(BSA)与乙二胺联结得到;

[0066] 将第四反应液在0.01摩尔/升的磷酸盐缓冲液中透析3天,期间每隔4小时至5小时换一次磷酸盐缓冲液,将透析液冷冻干燥得到黄曲霉毒素B₁包被抗原。

[0067] 尤其需要说明的是,经申请人研究发现,通过选用如上各质量及浓度参数制备得到的第三反应液中,黄曲霉毒素B₁抗原的纯度较高,其反应转化率较高,直接将第三反应液冻干即可制备得到纯度较高的黄曲霉毒素B₁抗原。此外,通过将40mg的阳离子牛血清白蛋白加入至第三反应液后,能够使得牛血清白蛋白能够较好地与黄曲霉毒素B₁抗原进行偶联,制备得到的黄曲霉毒素B₁包被抗原转化率较高,且黄曲霉毒素B₁包被抗原纯度较高,纯度达到75%以上。

[0068] 在其中一个实施例中,所述黄曲霉毒素B₁包被抗原通过黄曲霉毒素B₁抗原与牛血清白蛋白偶联得到中,所述黄曲霉毒素B₁与所述牛血清白蛋白的摩尔比为15:1至16:1。如

此,制备得到的黄曲霉毒素B₁包被抗原适合制备单克隆抗体用。

[0069] 上述黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒,对黄曲霉毒素的检测采用固相间接竞争酶联免疫反应的远离,把提取的待检测样品、酶标二抗工作液和黄曲霉毒素B₁抗体工作液加入对应的酶标板微孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液A、底物液B,在酶的作用下显色剂呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品溶液或样品中通用黄曲霉毒素的含量成反比例关系,据此可用于检测样品中的黄曲霉毒素的含量。相对于传统的薄层色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附法等,上述黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒的检测,采用酶标仪就可以完成大批量样品的检测,检测过程及样品处理过程都相对较为简单,检测过程和操作都较为便捷。

[0070] 其它实施例中,所述酶标二抗工作液通过酶标二抗加抗体稀释液按1:2000稀释制备得到,其中酶标二抗通过将羊抗鼠抗体与辣根过氧化物酶采用过碘酸钠改良法进行偶联得到。

[0071] 本发明还提供一种黄曲霉毒素的检测方法,采用如上任一实施例中所述的黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒进行检测。

[0072] 一实施例中,黄曲霉毒素的检测方法包括如下步骤:预处理待测样品得到待测样品液,取包被有黄曲霉毒素B₁包被抗原的酶标板,黄曲霉毒素B₁标准品溶液/待测样品液、酶标二抗工作液和黄曲霉毒素B₁抗体工作液各50微升/孔到对应的微孔中,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃的室温避光环境中反应30min,将微孔内液体甩干,用洗涤工作液洗涤4~5次,每次间隔10s,拍干后加入底物液A50微升/孔,底物液B 50微升/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃的避光环境中反应15~20min,加入终止液50微升/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处或双波长450/630nm检测,测定每孔吸光度值(需要在5min内读完数据),以黄曲霉毒素B₁标准品溶液的浓度(ppb)的对数为横坐标,黄曲霉毒素B₁标准品溶液的百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中通用黄曲霉毒素的含量。如此,即可计算出待测样品中的黄曲霉毒素的含量。

[0073] 一实施例中,待测样品包括谷物、大豆、饲料、植物油、酱油、醋、酒类和糕点。当然,待测样品也不限于谷物、饲料、植物油、酱油、醋、酒类和糕点。例如,谷物包括但不限于玉米、小麦、大麦和大米。例如,酒类包括但不限于白酒、啤酒、威士忌、樱桃酒、葡萄酒。

[0074] 一实施例中,当待测样品为玉米、小麦、大麦、大米或大豆时,样品待处理过程如下:

[0075] 称取5.0g粉碎后的待测样品于50ml离心管中,加入25.0ml的70%甲醇,置于多功能旋转混合器上振荡10分钟(或使用高速均质器均质3分钟,或摇床上振荡40分钟),得到提取液。

[0076] 将提取液用普通滤纸过滤,吸取200微升的滤液置于1.5ml离心管中,加入300微升的稀释10倍后的浓缩稀释液,用涡旋混合器混匀,得到样品液,样品液再用稀释10倍后的浓缩稀释液稀释12.5倍之后即得到待测样品液。

[0077] 一实施例中,当待测样品为饲料时,样品待处理过程如下:

[0078] 称取5.0g粉碎后的待测样品于50ml离心管中,加入25.0ml的70%甲醇,置于多功能旋转混合器上振荡10分钟(或使用高速均质器均质3分钟,或摇床上振荡40分钟),得到提取液。

[0079] 将提取液用普通滤纸过滤,然后用0.22微米的有机系滤膜过滤后,取100微升滤液置于1.5ml离心管中,加入500微升的稀释10倍后的浓缩稀释液,用涡旋混合器混匀,得到样品液,样品液再用稀释10倍后的浓缩稀释液稀释30倍之后即得到待测样品液。

[0080] 一实施例中,当待测样品为植物油时,样品待处理过程如下:

[0081] 称取2.5g植物油样品,分别加入10ml正己烷和10mL的70%甲醇的水溶液,剧烈振荡3min(用手或振荡器),或摇床震荡10min;

[0082] 静置分层,3000rpm离心2分钟;吸取200微升下层置于1.5ml离心管中,加入300微升的稀释10倍后的浓缩稀释液,用涡旋混合器混匀,得到样品液,样品液再用稀释10倍后的浓缩稀释液稀释10倍之后即得到待测样品液。

[0083] 一实施例中,当待测样品为酱油或醋时,样品待处理过程如下:

[0084] 取5.0ml待测样品于50ml离心管中,加入25.0ml三氯甲烷置于多功能旋转混合器上振荡10分钟(或使用高速均质器均质3分钟,或摇床上振荡40分钟);

[0085] 4000rpm离心5分钟,取上层澄清溶液5ml与氮气吹干仪在60℃下吹干;加入4ml的70%甲醇水溶液涡旋混匀1分钟,使其充分复溶,得到复溶液;

[0086] 吸取200微升的复溶液置于1.5ml离心管中,加入300微升的稀释10倍后的浓缩稀释液,用涡旋混合器混匀,得到样品液,样品液再用稀释10倍后的浓缩稀释液稀释10倍之后即得到待测样品液。

[0087] 一实施例中,当待测样品为糕点时,样品待处理过程如下:

[0088] 取5.0g待测样品于50ml的离心管中,加入25.0ml的70%甲醇水溶液,将离心管置于多功能旋转混合器上振荡10分钟(或使用高速均质器均质3分钟,或摇床上振荡40分钟);

[0089] 定性滤纸过滤,取滤液5ml加入10ml的三氯甲烷涡旋1min,4000rpm离心5分钟,取下层澄清的三氯甲烷溶液5ml与氮气吹干仪在60℃下吹干;加入2ml的70%甲醇水涡旋混匀1分钟,使其充分复溶,得到复溶液;

[0090] 吸取200μl复溶液置于1.5ml离心管中,加入300微升的稀释10倍后的浓缩稀释液,用涡旋混合器混匀,得到样品液,样品液再用稀释10倍后的浓缩稀释液稀释10倍之后即得到待测样品液。

[0091] 一实施例中,当待测样品为酒类,如白酒、啤酒、威士忌、樱桃酒、葡萄酒等时,样品待处理过程如下:

[0092] 取5.0ml待测样品于50ml的离心管中,加入25.0ml的三氯甲烷置于多功能旋转混合器上振荡10分钟(或使用高速均质器均质3分钟,或摇床上振荡40分钟);

[0093] 3000rpm离心5分钟,取上层澄清溶液5ml于氮气吹干仪在60℃下吹干;加入5ml的70%甲醇水溶液后涡旋混匀1分钟,使其充分复溶,得到复溶液;

[0094] 吸取200微升的复溶液置于1.5ml离心管中,加入300微升的稀释10倍后的浓缩稀释液,用涡旋混合器混匀,得到样品液,样品液再用稀释10倍后的浓缩稀释液稀释12.5倍之后即得到待测样品液。

[0095] 将样品采用如上的待处理过程,能够便于后续较好地进行黄曲霉毒素的检测。

[0096] 下面结合具体实施例继续对本发明的黄曲霉毒素的检测方法予以说明。

[0097] 具体实施例

[0098] 1、试剂盒的组成

[0099]

- 1)、包被有黄曲霉毒素 B₁ 包被抗原的 96 微孔板: 1 块 (96 孔, 12 条×8 孔);
- 2)、黄曲霉毒素 B₁ 标准品溶液: 0ng/ml、0.25ng/ml、0.5ng/ml、1.0ng/ml、2.0ng/ml 各 1 瓶×1.0ml;
- 3)、黄曲霉毒素 B₁ 抗体工作液: 1 瓶×10ml;
- 4)、酶标二抗工作液: 1 瓶 × 10ml;
- 5)、10×浓缩洗涤液: 1 瓶 × 50ml;
- 6)、10×浓缩稀释液: 1 瓶 × 50ml;
- 7)、显色底物 TMB: 1 瓶 × 17ml;
- 8)、终止液: 1 瓶 × 7ml。

[0100] 其中,本实施例中的黄曲霉毒素B₁包被抗原采用如下制备方法制备得到:

[0101] 将20mg的黄曲霉毒素B₁与30mg的羧甲基羟氨半盐酸盐置于2.0ml的吡啶中,室温避光搅拌反应24小时,得到第一反应液;

[0102] 将所述第一反应液冷冻干燥,得到固体干燥物;

[0103] 将固体干燥物用10ml纯水溶解后,并用0.2摩尔/升的盐酸调节pH为3.0,用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥后得到黄曲霉毒素B₁脘;

[0104] 将10mg的黄曲霉毒素B₁脘溶解于1ml的0.1摩尔/升的KOH的吡啶溶液中,加入6.5mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),在70~80℃的温度下反应12小时,得到第二反应液;

[0105] 向第二反应液中加入40mg的N-羟基琥珀酰亚胺和1ml的pH为5.0的MES缓冲液,10分钟后向第二反应液中再加入40mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌反应2小时,得到第三反应液;

[0106] 将40mg的阳离子牛血清白蛋白(cBSA)用2ml的蒸馏水溶解后,加入至第三反应液中,避光室温搅拌下反应24小时,得到第四反应液;其中,cBSA通过牛血清白蛋白(BSA)与乙二胺联结得到;

[0107] 将第四反应液在0.01摩尔/升的磷酸盐缓冲液中透析3天,期间每隔4小时至5小时换一次磷酸盐缓冲液,将透析液冷冻干燥得到黄曲霉毒素B₁包被抗原。

[0108] 2、需要的仪器和试剂

[0109] 1) 仪器

[0110] 一酶标仪450nm(iElisa全自动酶标仪或相当者);

[0111] 一微量移液器:20μl-200μl单道,100μl-1000μl单道,50μl-300μl八道;

[0112] 一多功能旋转混合器(或者摇床、高速均质器);

[0113] 一酶标板振荡器;

[0114] 一涡旋混合器;

[0115] 一氮气吹干仪;

- [0116] —50ml离心管；
- [0117] —1.5ml离心管；
- [0118] —离心机；
- [0119] —定性滤纸；
- [0120] —过滤漏斗；
- [0121] —天平：感量0.01g。
- [0122] 2)、试剂
- [0123] —样品提取液为70%的甲醇水溶液：取700ml甲醇，加300ml纯水，混匀。
- [0124] —纯水（蒸馏水、去离子水）、正己烷、三氯甲烷。
- [0125] 3、样品处理
- [0126] 3.1谷物（玉米、小麦、大麦、大米、大豆）：
- [0127] 1)、称取3.0g粉碎样品于50ml离心管中，加入23.0ml样品提取液70%甲醇，置于多功能旋转混合器上振荡10分钟（或使用高速均质器均质3分钟，或摇床上振荡40分钟）。
- [0128] 2)、将提取液用普通滤纸过滤，吸取200 μ l滤液置于1.5ml离心管中，加入300 μ l稀释十倍后的浓缩稀释液，用涡旋混合器混匀。
- [0129] 稀释倍数：12.5。
- [0130] 3.2饲料：
- [0131] 1)、称取3.0g粉碎样品于50ml离心管中，加入23.0ml样品提取液70%甲醇，置于多功能旋转混合器上振荡10分钟（或使用高速均质器均质3分钟，或摇床上振荡40分钟）。
- [0132] 2)、将提取液用普通滤纸过滤，用0.22 μ m有机系滤膜过滤后，取100 μ l滤液置于1.5ml离心管中，加入500 μ l稀释十倍后的浓缩稀释液，用涡旋混合器混匀。
- [0133] 稀释倍数：30
- [0134] 3.3植物油
- [0135] 1) 称取2.5g油样品，分别加入10ml正己烷和10ml样品提取液（70%甲醇水），剧烈振荡3min（用手或振荡器），或摇床震荡10min。
- [0136] 2) 静置分层，3000RPM离心2分钟。吸取200 μ l下层置于1.5ml离心管中，加入300 μ l稀释十倍后的浓缩稀释液，用涡旋混合器混匀。
- [0137] 样本稀释倍数为10倍。
- [0138] 3.4酱油、醋：
- [0139] 1)、取3.0ml样品于50ml离心管中，加入23.0ml三氯甲烷置于多功能旋转混合器上振荡10分钟（或使用高速均质器均质3分钟，或摇床上振荡40分钟）。
- [0140] 2)、4000转离心5分钟，取上层澄清溶液5ml与氮气吹干仪（60℃）吹干。加入4ml 70%甲醇水涡旋混匀1分钟，使其充分复溶。
- [0141] 3)、吸取200 μ l复溶液置于1.5ml离心管中，加入300 μ l稀释十倍后的浓缩稀释液，用涡旋混合器混匀。
- [0142] 稀释倍数：10。
- [0143] 3.5糕点：
- [0144] 1)、取3.0g样品于50ml离心管中，加入23.0ml 70%甲醇水置于多功能旋转混合器上振荡10分钟（或使用高速均质器均质3分钟，或摇床上振荡40分钟）。

[0145] 2)、定性滤纸过滤,取滤液5ml加入10ml三氯甲烷涡旋1min,4000转离心5分钟,取下层澄清三氯甲烷溶液5ml与氮气吹干仪(60℃)吹干。加入2ml 70%甲醇水涡旋混匀1分钟,使其充分复溶。

[0146] 3)、吸取200μl复溶液置于1.5ml离心管中,加入300μl稀释十倍后的浓缩稀释液,用涡旋混合器混匀。

[0147] 稀释倍数:10。

[0148] 3.6酒类(白酒、啤酒、威士忌、樱桃酒、葡萄酒等)

[0149] 1)、取3.0ml样品于50ml离心管中,加入23.0ml三氯甲烷置于多功能旋转混合器上振荡10分钟(或使用高速均质器均质3分钟,或摇床上振荡40分钟)。

[0150] 2)、3000转离心5分钟,取上层澄清溶液5ml于氮气吹干仪(60℃)吹干。加入5ml 70%甲醇水涡旋混匀1分钟,使其充分复溶。

[0151] 3)、吸取200μl复溶液置于1.5ml离心管中,加入300μl稀释十倍后的浓缩稀释液,用涡旋混合器混匀。

[0152] 稀释倍数:12.5。

[0153] 4.酶联免疫分析程序

[0154] 4.1测定之前注意事项

[0155] 1)使用前将所有试剂平衡至室温(20-25℃)。

[0156] 2)使用后迅速将试剂放入2-8℃冷藏。

[0157] 3)在ELISA分析中的再现性,很大程度上取决于洗板的一致性,正确的洗板操作是ELISA测定程序中的要点。

[0158] 4)所有温育过程应避免阳光直射,并按要求用盖板覆盖住酶标板。

[0159] 4.2溶液的配制

[0160] 1)提取液的配制:根据实验所需的量配制70%的甲醇水溶液(水要用纯水、或蒸馏水、去离子水)

[0161] 2)洗涤液的配制:将浓缩洗涤液用纯水稀释10倍后使用。(例如:取10ml浓缩液+90ml纯水,可以用于32孔的检测)。

[0162] 4.3测定程序

[0163] 1)、将足够标准品和样品所用数量的孔条插入酶标板架,标准品和样品做两个平行实验,记录下标准和样品的位置。未使用的酶标板用铝箔袋封好置2-8℃冷藏保存。

[0164] 2)、吸取50μl标准品或样品分别加至相应的微孔(双孔)中,然后各加入50μl稀释后的黄曲霉毒素酶标抗原,即黄曲霉毒素B₁标准品溶液或待测样品液;再加入50μl的黄曲霉毒素B₁抗体工作液,加盖,在室温孵育20分钟。需要说明的是每个标准品和样品必须使用新的吸头。

[0165] 3)、倒出孔中的液体,每孔加入250μl的稀释10后的浓缩洗涤液,置于酶标板振荡器上振荡30秒钟(或者手工振荡),重复操作四次。洗完后用力在吸水纸上拍干。

[0166] 4)、每孔加入150μl显色底物TMB,室温避光温育10分钟。

[0167] 5)、每孔加入50μl终止液。

[0168] 6)、置于酶标仪中,振荡混匀,在450nm处测定吸光度值(OD值)。(iEliSa全自动酶标仪可以直接读出、打印浓度值)

[0169] 5、结果判定

[0170] 1) 所获得的每个浓度标准溶液和样本吸光度值的平均值 (B) 除以第一个标准 (浓度为0纳克/毫升的黄曲霉毒素B₁标准品溶液) 的吸光度值 (B₀) 再乘以100%, 即百分吸光度值。

$$[0171] \quad \text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0172] 以黄曲霉毒素B₁标准品浓度值 (ppb) 为X轴, 百分吸光度值为Y轴, 绘制标准曲线图。相对应每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法, 计算出样本溶液浓度。利用计算机专业软件, 更便于大量样品的快速分析。

[0173] 2)、样品的实际浓度为读数结果乘以稀释倍数, 谷物样品的稀释倍数为12.5, 饲料样品稀释倍数为30。

[0174] 3)、如果测定值超出检测范围, 样品提取溶液按一定的比例用70%甲醇的水溶液稀释。

[0175] 6. 性能指标

[0176] 经检测, 得到如下性能指标:

[0177] 1) 检测限LOD: 谷物1.5ppb (μg/kg), 饲料4.0ppb, 植物油1.5ppb (μg/kg), 酱油、醋1.5ppb (μg/kg)。

[0178] 2) 定量限LOQ: 谷物3.0ppb, 饲料7.5ppb, 植物油2.5ppb (μg/kg), 酱油、醋2.5ppb (μg/kg)。

[0179] 上述黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒, 对黄曲霉毒素的检测采用固相间接竞争酶联免疫反应的远离, 把提取的待检测样品、酶标二抗工作液和黄曲霉毒素B₁抗体工作液加入对应的酶标板微孔中, 孵育一段时间后, 洗板加入底物液A、底物液B, 在酶的作用下显色剂呈现蓝色, 加入终止液, 颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品溶液或样品中通用黄曲霉毒素的含量成反比例关系, 据此可用于检测样品中的黄曲霉毒素的含量。相对于传统的薄层色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附法等, 上述黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒的检测, 采用酶标仪就可以完成大批量样品的检测, 检测过程及样品处理过程都相对较为简单, 检测过程和操作都较为便捷。

[0180] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合, 为使描述简洁, 未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述, 然而, 只要这些技术特征的组合不存在矛盾, 都应当认为是本说明书记载的范围。需要说明的是, 本申请的“一实施例中”、“例如”、“又如”等, 旨在对本申请进行举例说明, 而不是用于限制本申请。以上所述实施例仅表达了本申请的几种实施方式, 其描述较为具体和详细, 但并不能因此而理解为对本申请专利范围的限制。应当指出的是, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本申请构思的前提下, 还可以做出若干变形和改进, 这些都属于本申请的保护范围。因此, 本申请的保护范围应以所附权利要求为准。

一种黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒及检测方法，黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒，包括：酶标板、黄曲霉毒素B1标准品溶液、黄曲霉毒素B1抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液；所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液；所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液；所述终止液为2mol/L的硫酸水溶液；所述酶标板包被有黄曲霉毒素B1包被抗原；所述黄曲霉毒素B1包被抗原通过黄曲霉毒素B1抗原与牛血清白蛋白偶联得到。相对于传统的检测方法，上述试剂盒的检测方法，检测过程及样品处理过程都相对较为简单，检测过程和操作都较为便捷。

- [illegible]