



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103575886 B

(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201210252457.2

(22)申请日 2012.07.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103575886 A

(43)申请公布日 2014.02.12

(73)专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇国际
信息产业基地高新四街8号

(72)发明人 何方洋 万宇平 冯静 吴继华

李勇 韩雪倩 何丽霞 朱亮亮

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

(56)对比文件

CN 1877332 A,2006.12.13,

K.Thirumala-Davi et al.Development
and Application of an Indirect
Competitive Enzyme-Linked Immunoassay for
Aflatoxin M1 in Milk and Milk-Based
Confectionery.《Agricultural and Food
Chemistry》.2002,第50卷(第4期),933-937.

审查员 李进进

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

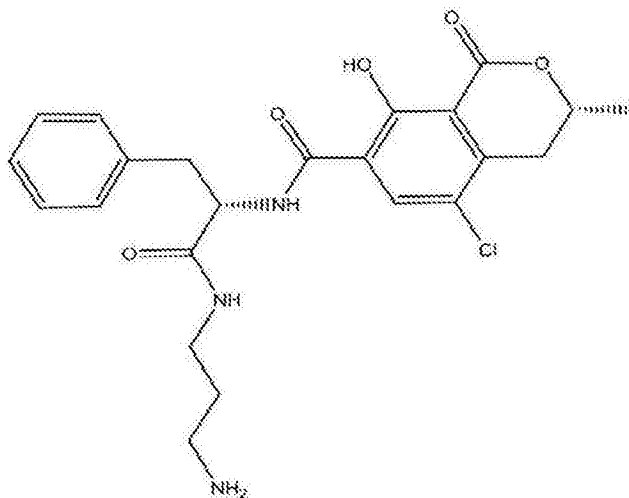
(54)发明名称

检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒及其应
用

(57)摘要

本发明提供了一种检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒,它含有:包被有赭曲霉毒素A偶联抗原的酶标板,赭曲霉毒素A标准品溶液,浓缩酶结合物,酶结合物工作液,底物显色液,终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测样本中赭曲霉毒素A的方法,它包括:首先进行样本前处理,然后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测饲料(原料、配合料和浓缩料)样本中赭曲霉毒素A的残留量,其操作简便、成本低、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测赭曲霉毒素A的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于包括有:包被有赭曲霉毒素A偶联抗原的酶标板,赭曲霉毒素A标准品溶液,浓缩酶结合物,酶结合物稀释液,底物显色液,终止液,所述赭曲霉毒素A偶联抗原是由赭曲霉毒素A半抗原与载体蛋白偶联得到,所述赭曲霉毒素A半抗原结构如下:



所述赭曲霉毒素A半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

- 1) 取20mg赭曲霉毒素A, 10 μ l 1,3-丙二胺, 催化量的4-二甲氨基吡啶溶解于2ml N,N'-二甲基甲酰胺中, 得到I液;
- 2) 取20mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶解于0.5ml DMF中, 得到II液;
- 3) 在0℃条件下, 将II液缓慢滴加至I液中, 恢复室温后, 继续反应20h;
- 4) 蒸除溶剂, 用体积比为20:1的二氯甲烷和甲醇的洗脱液进行柱层析, 得到赭曲霉毒素A半抗原。

2. 一种检测样品中赭曲霉毒素A含量的方法, 主要步骤包括:

- 1) 将待测样品进行前处理;
- 2) 用权利要求1所述的酶联免疫试剂盒进行检测;
- 3) 分析检测结果。

检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒,其适用于饲料(原料、配合料、浓缩料)中赭曲霉毒素A测定。

技术背景

[0002] 赭曲霉毒素A(Ochratoxin A)由曲霉和青霉两类霉菌产生,常污染食品和饲料。赭曲霉毒素A能引起动物急性和慢性毒性,是强致癌物质,可对肾脏造成不可逆的致死毒害,引起肾脏萎缩,还可使胎儿畸形、流产甚至死亡,严重影响动物的机能和生长状况,其对人类的潜在危害备受关注。为此,国际癌症研究机构JARC将其定位ⅡB类致癌物,加强对赭曲霉毒素A检测是防止被赭曲霉毒素A污染食物和饲料直接或间接进入人类食物链重要方法。

[0003] 目前,赭曲霉毒素A的残留分析方法主要有化学分析法和免疫化学分析法,化学分析法最早应用于毒素的残留检测,在1973年薄层层析法即成为国际化学分析协会(ACAC)检测赭曲霉毒素A的官方方法,薄层层析法的优点是方法简单,使用的试剂价格便宜,但是存在灵敏度较差,所需试剂繁多,检测周期长,仪器检测,如液相-质谱联用法具有灵敏度高等特点,但是设别昂贵,需要复杂的样品前处理,不适合现场监控和大量样本的筛查。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于赭曲霉毒素A含量测定的酶联免疫试剂盒,其操作简单,适合现场大批量样品的筛选。

[0005] 本发明试剂盒,它包括:

[0006] (1)包被有赭曲霉毒素A偶联抗原的酶标板;

[0007] (2)赭曲霉毒素A标准品溶液;

[0008] (3)浓缩酶结合物;

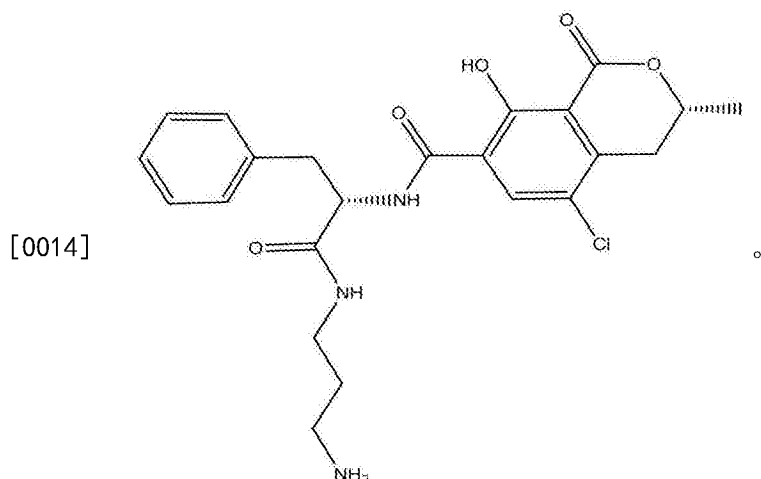
[0009] (4)酶结合物稀释液;

[0010] (5)底物显色液;

[0011] (6)终止液。

[0012] 所述赭曲霉毒素A偶联抗原为赭曲霉毒素A半抗原与载体蛋白的偶联物,所述载体蛋白可为卵清蛋白、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白。

[0013] 所述赭曲霉毒素A半抗原的结构如下:



[0015] 所述赭曲霉毒素A半抗原制备过程:

[0016] 1)取20mg赭曲霉毒素A,10 μ l 1,3-丙二胺,催化量的4-二甲氨基吡啶溶解于2ml N,N'-二甲基甲酰胺中,得到I液;

[0017] 2)取20mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶解于0.5ml DMF中,得到II液;

[0018] 3)在0℃条件下,将II液缓慢滴加至I液中,恢复室温后,继续反应20 h;

[0019] 4)蒸除溶剂,柱层析(洗脱液:二氯甲烷/甲醇,体积比20:1),得到赭曲霉毒素A半抗原。

[0020] 所述浓缩酶结合物为酶标记的赭曲霉毒素A单克隆抗体,所述标记酶为辣根过氧化物酶;酶结合物是采用过碘酸钠法将标记酶与抗体进行偶联得到的。

[0021] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括赭曲霉毒素A标准品溶液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液。

[0022] 所述的终止液为1~2mol/L的硫酸或盐酸溶液,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,底物液A液为过氧化脲溶液,底物液B液为四甲基联苯胺溶液。

[0023] 所述的酶结合物稀释液为pH7.2~7.4,含0.05%~0.1%牛血清白蛋白,0.1mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0024] 其中酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液为pH9.6,0.1mol/L碳酸盐缓冲液,所用封闭液为pH7.2~7.4,0.5%~1%牛血清白蛋白,0.1mol/L磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0025] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2 μ g/ml,每孔加入100 μ l,37℃温育2h或4℃过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入150~200 μ l封闭液,37℃温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0026] 本发明的检测原理为:

[0027] 当在微孔条上预包被赭曲霉毒素A偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,样本中残留的赭曲霉毒素A与酶标板上预包被的赭曲霉毒素A偶联抗原竞争赭曲霉毒素A的酶结合物,用底物显色液显色,样本吸光值与所含赭曲霉毒素A的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中赭曲霉毒素A的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的赭曲霉毒素A标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中赭曲霉毒素A的浓度范围。

[0028] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测赭曲霉毒素A的方法,它包括步骤:

[0029] (1)样品前处理;

[0030] (2)用试剂盒进行检测;

[0031] (3)分析检测结果。

[0032] 本发明检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒主要采用竞争ELISA方法检测样品中赭曲霉毒素A的含量;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量样品,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、准确度高、精确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,携带便利、使用方便、结构简单、检测方法快速、简便、适于大批量样品筛选。

附图说明

[0033] 图1:赭曲霉毒素A半抗原合成图

[0034] 图2:赭曲霉毒素A半抗原核磁共振氢谱图

[0035] 图3:试剂盒的标准曲线图

具体实施方式

[0036] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0037] 实施例1 试剂盒组分的制备

[0038] 1、赭曲霉毒素A半抗原制备

[0039] 1)取20mg赭曲霉毒素A,10 μ l 1,3-丙二胺,催化量的4-二甲氨基吡啶(DMAP)溶解于2 ml N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)中,得到I液;

[0040] 2)取20mg N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)溶解于0.5ml DMF中,得到II液;

[0041] 3)在0℃条件下,将II液缓慢滴加至I液中,恢复室温后,继续反应20 h;

[0042] 4)蒸除溶剂,柱层析(洗脱液:二氯甲烷/甲醇,体积比20:1),得到赭曲霉毒素A半抗原,合成路线图如图1。

[0043] 取上述产物经核磁共振氢谱测定,如图2所示,核磁图谱说明:8.0ppm处新增酰胺特征峰、羧基信号峰的消失以及2.0-3.5ppm之间出现的3组烷烃信号峰说明半抗原合成成功。

[0044] 2、抗原的制备

[0045] 免疫原制备——赭曲霉毒素A半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0046] 1)取赭曲霉毒素A半抗原5.3mg用0.5mlDMF溶解,得到I液;

[0047] 2)取BSA 30mg用2.0ml ,pH7.0,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液溶解,得到II液;

[0048] 3)取碳化二亚胺(EDC)10mg用0.5ml,pH7.0,0.1mol/L磷酸盐缓冲液溶解,得到液;

[0049] 4)将I液与II液混合,在搅拌下缓慢滴加入III液,室温反应2小时,4℃透析三天,每天换液三次,得到免疫原。

[0050] 包被原制备——赭曲霉毒素A半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0051] 1)取赭曲霉毒素A半抗原5.3mg用0.5mlDMF溶解,得到I液;

[0052] 2)取OVA 18mg用2.0ml, pH7.0, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液溶解,得到Ⅱ液;

[0053] 3)取EDC10mg用0.5ml, pH7.0, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液溶解,得到Ⅲ液;

[0054] 4)将Ⅰ液与Ⅱ液混合,在搅拌下缓慢滴加入Ⅲ液,室温反应2小时,4℃透析三天,每天换液三次,得到包被原。

[0055] 3、赭曲霉毒素A单克隆抗体的制备

[0056] a. 动物免疫

[0057] 将上述步骤得到的免疫抗原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0058] b. 细胞融合和克隆化

[0059] 取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按9:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,筛选得到稳定分泌赭曲霉毒素A单克隆抗体的赭曲霉毒素A单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0060] c. 细胞冻存和复苏

[0061] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^9 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0062] d. 单克隆抗体的制备与纯化

[0063] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0064] 4、酶标板的制备

[0065] 用包被缓冲液将包被原稀释成0.1~0.2μg/ml,每孔加入100μl,37℃温育2h或4℃过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入150~200μl封闭液,37℃温育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0066] 5、酶标记抗体的制备

[0067] 将抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用过碘酸钠法进行偶联制备酶标记抗体,酶与抗体的摩尔浓度比为2:1。

[0068] 实施例2 检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒的组建

[0069] 组建检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0070] (1)包被赭曲霉毒素A偶联抗原的酶标板;

[0071] (2)赭曲霉毒素A标准品溶液6瓶,浓度分别为0μg/L、1μg/L、3μg/L、9μg/L、27μg/L、81μg/L;

[0072] (3)浓缩酶结合物;

[0073] (4)酶结合物稀释液;

[0074] (5)底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,底物液A液为过氧化脲,底物液B液为四甲基联苯胺;

[0075] (6)终止液为2mol/L硫酸。

[0076] 实施例3 样品中赭曲霉毒素A的检测

[0077] 1. 样品前处理

[0078] 用均质器均质饲料样本;称取 $5.0g \pm 0.05g$ 均质后的饲料样本至50ml聚苯乙烯离心管中,加入25ml 50%甲醇,用振荡器剧烈振荡5min,3000g以上,室温(20~25℃/68~77°F)离心5min;取500μl上清液至2ml聚苯乙烯离心管中,加入500μl 10%氯化钠水溶液用振荡器

振荡1min,混匀;取20 μ l用于分析。

[0079] 2. 用试剂盒检测

[0080] 向包被有赭曲霉毒素A偶联抗原的酶标板微孔中加入赭曲霉毒素A标准品溶液/样品20 μ l,再加入酶结合物工作液100 μ l(将浓缩酶结合物用酶结合物稀释液按照1:20的体积进行稀释),用盖板模封板,25℃避光反应10min,倒出孔内液体,每孔加入250 μ l去离子水充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干,每孔加入底物液A液过氧化脲50 μ l,底物液B液四甲基联苯胺(TMB)50 μ l,轻轻振荡混匀,25℃恒温箱避光显色5min,每孔加入2mol/L终止液硫酸50 μ l,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在450nm处,测定每孔吸光度值(OD值)。

[0081] 3. 检测结果分析

[0082] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,得到百分吸光度值。以赭曲霉毒素A标准品浓度(μ g/L)的对数值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出赭曲霉毒素A的含量。

[0083] 实施例4 赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒灵敏度、精密度和准确度、保存期实验

[0084] 1. 试剂盒灵敏度和检测限

[0085] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度试验,试剂盒灵敏度为1 μ g/L,分别对20份空白饲料(原料、配合料、浓缩料)样本进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光率的浓度,以20份样本赭曲霉毒素A浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果得该方法对饲料(原料、配合料、浓缩料)样本检测限为10 μ g/kg。

[0086] 2. 试剂盒准确度和精密度

[0087] 以重复测定某一浓度样品的检测结果变异系数(CV%)作为精密度评价指标。以回收率作为准确度评价指标。变异系数CV%计算公式为: $CV\% = SD / \bar{X} \times 100\%$;其中SD为标准偏差, $\bar{X}$ 为测定数据的平均值。回收率计算公式为:回收率(%)= 实际测定值/理论值 $\times 100\%$ 。其中理论值为模拟样品的添加浓度。

[0088] 按10 μ g/kg、20 μ g/kg、40 μ g/kg三个浓度赭曲霉毒素A对原料、配合料、浓缩料样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0089] 表1 精密度及准确度试验

[0090]

样品名称	添加浓度($\mu\text{g/kg}$)	回收率(n=4)%	批内变异系数(n=4)%	批间变异系数(n=3)%
原料	10	88.5	10.5	10.6
	20	98.7	7.8	8.8
	40	95.6	6.4	7.5
配合料	10	91.4	9.8	10.3
	20	96.0	11.3	11.6
	40	102.8	10.5	11.5
浓缩料	10	87.8	7.5	8.0
	20	95.6	11.3	11.6
	40	94.2	8.2	8.7

[0091] 以10、20、40 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度的赭曲霉毒素A对饲料(原料、配合料、浓缩料)样品进行添加,平均回收率在87.8%~102.8%之间;变异系数均小于20%。检测结果的精密度和准确度均符合相关标准要求。

[0092] 3. 试剂盒保存期试验

[0093] 试剂盒保存条件为2~8 $^{\circ}\text{C}$,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、赭曲霉毒素A添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 可以保存12个月。

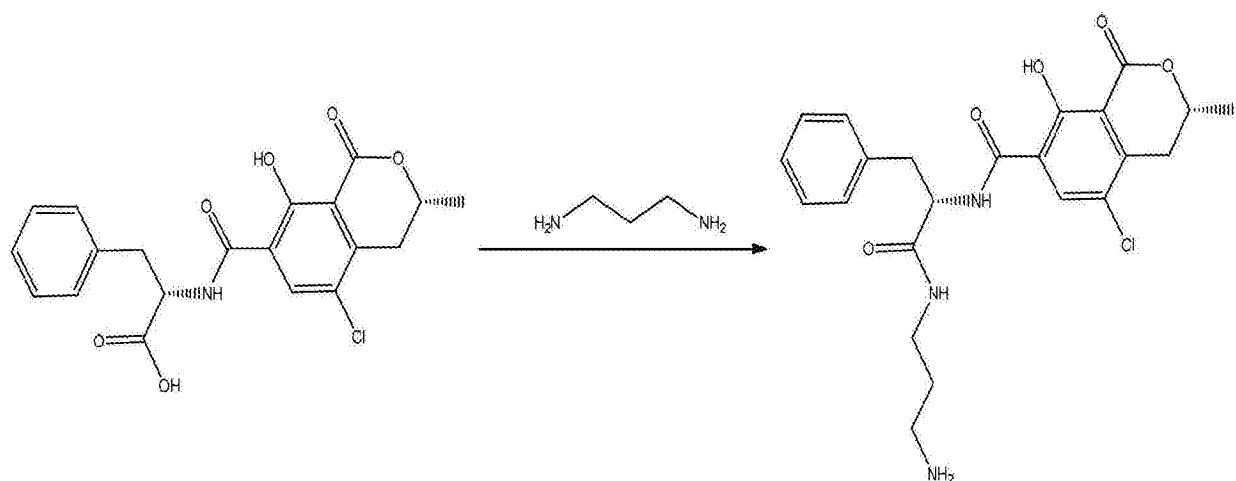


图1

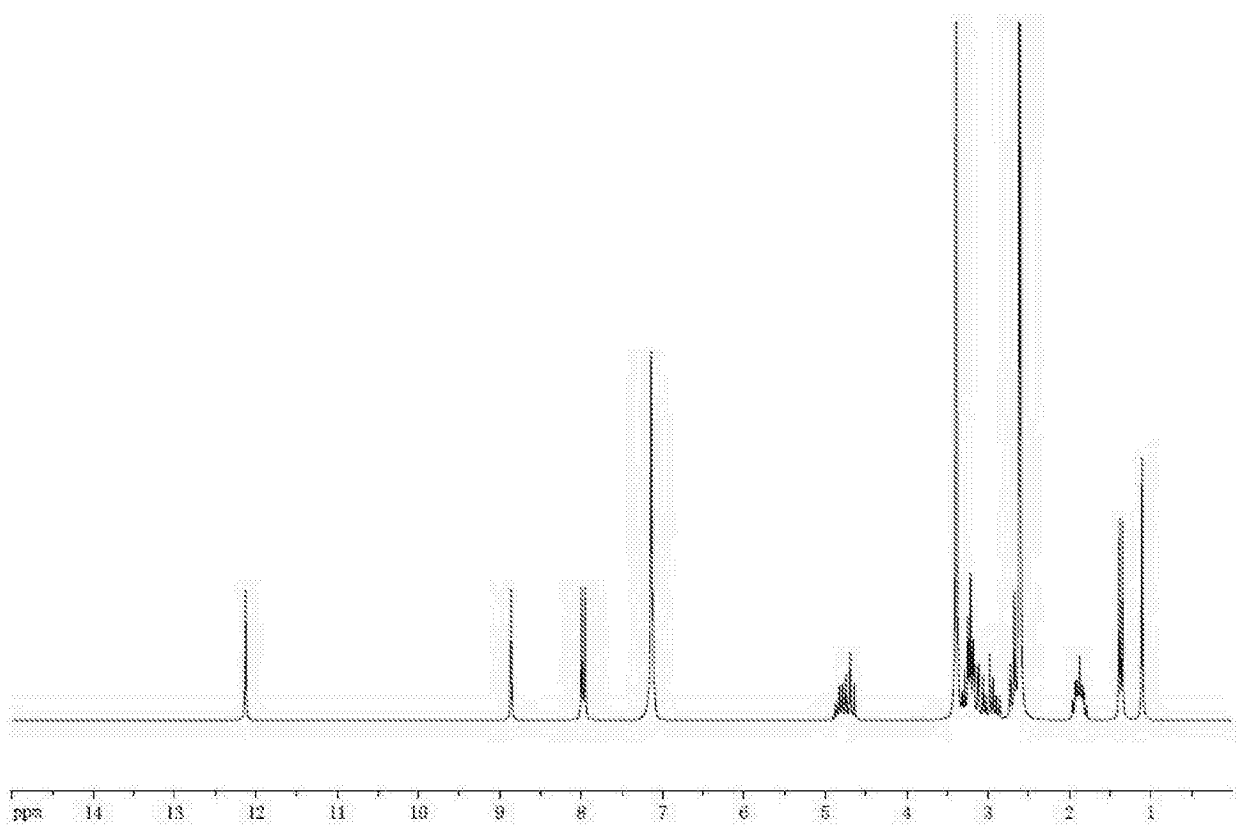


图2

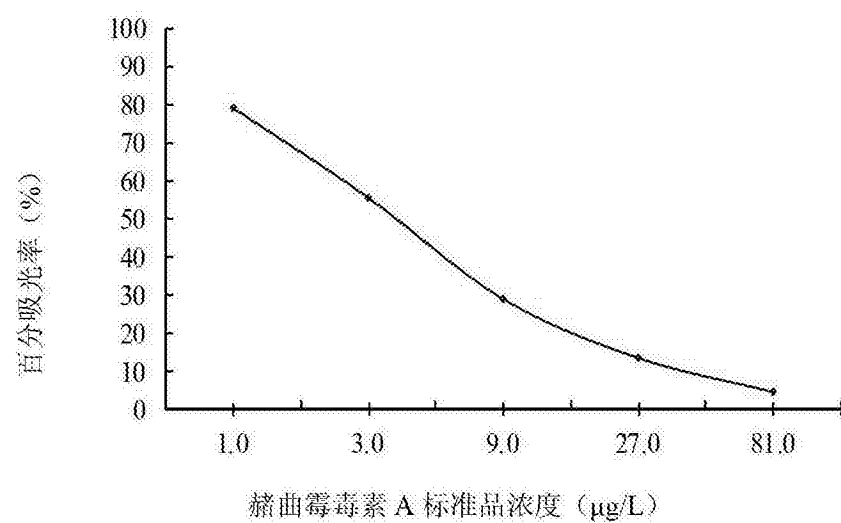


图3

专利名称(译)	检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN103575886B	公开(公告)日	2016-09-21
申请号	CN201210252457.2	申请日	2012-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 万宇平 冯静 吴继华 李勇 韩雪倩 何丽霞 朱亮亮		
发明人	何方洋 万宇平 冯静 吴继华 李勇 韩雪倩 何丽霞 朱亮亮		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577 G01N33/68		
审查员(译)	李进进		
其他公开文献	CN103575886A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测赭曲霉毒素A的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有赭曲霉毒素A偶联抗原的酶标板，赭曲霉毒素A标准品溶液，浓缩酶结合物，酶结合物工作液，底物显色液，终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测样本中赭曲霉毒素A的方法，它包括：首先进行样本前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测饲料（原料、配合料和浓缩料）样本中赭曲霉毒素A的残留量，其操作简便、成本低、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

样品名称	添加浓度(μg/kg)	回收率(n=4)%	批内变异系数(n=4)%	批间变异系数(n=3)%
原料	10	88.5	10.5	10.6
	20	98.7	7.8	8.8
	40	95.6	6.4	7.5
配合料	10	91.4	9.8	10.3
	20	96.0	11.3	11.6
	40	102.8	10.5	11.5
浓缩料	10	87.8	7.5	8.0
	20	95.6	11.3	11.6
	40	94.2	8.2	8.7