



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103792347 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201210435376. 6

(22) 申请日 2012. 11. 05

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国
家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 吴湾湾

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测
专用测试盒

(57) 摘要

本发明为 B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫
吸附检测专用测试盒。其检测快速、灵敏、准确、可
定量、操作简单、且对样品纯度要求不高,特异性
强,特别适用于大批量样品的检测,为此本发明还
提供了专用测试盒的制备及检测方法。其特征在
于:其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液 A、显
色液 B 和终止液,其还包括包被有 B 类单端孢霉烯
族毒素固相抗原的包被板、B 类单端孢霉烯族毒
素标准品、B 类单端孢霉烯族毒素抗体冻干品。检
测后在 450nm 处测吸光度值,从标准曲线计算样
品中的 B 类单端孢霉烯族毒素含量。

1. B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒,其特征在于:其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液 A、显色液 B 和终止液,其还包括包被有 B 类单端孢霉烯族毒素固相抗原的包被板、B 类单端孢霉烯族毒素标准品、B 类单端孢霉烯族毒素抗体冻干品以及酶标记的羊抗鼠抗体冻干品。

2. B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:其包括以下步骤:包被板的制备、B 类单端孢霉烯族毒素标准品的制备、B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)偶联物的制备,抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体及其溶液的制备,完全福氏佐剂的制备,不完全福氏佐剂的制备、酶标记的羊抗鼠抗体冻干品的制备;显色液 A 的制备;显色液 B 的制备;终止液的制备。

3. 根据权利要求 2 所述 B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:所述包被板包被 B 类单端孢霉烯族毒素固相抗原,其采用 96 或 48 或 24 孔微孔板,用 10 mmol/L~100 mmol/L pH9~10 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的缓冲液作为包被液,将 B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)稀释至 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~1.0 $\mu\text{g/mL}$,96 或 48 或 24 孔微孔板各加 100 μL ,2~8℃放置过夜或放 37℃烘箱中孵育 2 h,弃去包被液,洗涤 2~3 次,加入含 1%~5% 牛血清蛋白(溶于 pH 7~8 的磷酸盐缓冲液),2~8℃封闭过夜或 37℃烘箱中放置 1.5 h,弃去封闭液,吹干,板条密封后置 -4℃~4℃保存。

4. 根据权利要求 2 所述 B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:所述 B 类单端孢霉烯族毒素标准品用呕吐毒素(DON)标准品表示,呕吐毒素(DON)标准品用呕吐毒素(DON)纯品中稀释得到,稀释液为去离子水,DON 浓度为:0.001 ng/mL~1000 ng/mL。

5. 根据权利要求 2 所述 B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:B 类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白(BSA)偶联物的制备:将 B 类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 90 min~120 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5 mL 乙酸乙酯中,超声波处理 10 min~30 min 后,6000 rpm—15000 rpm 下离心 5 min—30 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡 10 min~60 min,离心;将上清液缓慢滴加到牛血清白蛋白(溶于 0.01 M—0.2 M NaHCO_3 溶液中),在 2~8℃震荡 2 h~3 h,然后,在 0.01 M—0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)(pH7~8)中透析,换透析液 3~8 次;冷冻干燥,偶联物于 -4℃—4℃保存。

6. 根据权利要求 2 所述 B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)偶联物的制备:将 B 类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 90 min~120 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5 mL 乙酸乙酯中,超声波处理 10 min~30 min 后,6000 rpm—15000 rpm 下离心 5 min—30 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡 10

min~60 min,离心;将上清液缓慢滴加到卵清蛋白(溶于0.01 M—0.2 M NaHCO₃溶液中),在2~8℃震荡2 h~3 h,然后,在0.01 M—0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS溶液)(pH7~8)中透析,换透析液3~8次;冷冻干燥,偶联物于-4℃—4℃保存。

7. 根据权利要求2所述的B类单端孢霉烯族毒素酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:B类单端孢霉烯族毒素抗体及其溶液的制备:取B类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白偶联物用生理盐水配成0.1 μg/μL~10 μg/μL抗原溶液与等体积完全福氏佐剂混匀,充分乳化,供首次免疫用,加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂,首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射,免疫剂量为10 μg/只~100 μg/只小鼠,以后每隔2周到4周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量为10 μg/只~100 μg/只,最后一次免疫采用脾内注射,4天后取脾融合,将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞SP-2/o以10:1比列混合,离心,去除上清,在50 s~90 s内将0.1 mL~10 mL 50% 聚乙二醇(分子量为1500)加至细胞中,充分混匀,使其溶解,1~3 min后加入10 mL~50 mL DMEM 培养液,终止融合,水浴静置10 min~30 min后离心,去除上清;将融合细胞用含5%~30% 小牛血清的HAT选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 饲养细胞/0.1 mL接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的96孔培养板中,于5%~10%CO₂,35℃—45℃条件下培养,5天—10天后,每培养孔更换2/3 HT 培养液,10天~20天后,开始对对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆,杂交瘤筛选采用固相抗原间接竞争ELISA法进行,以B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白为包被抗原,以免疫小鼠的血清为阳性对照;以SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照;阳性细胞孔的判断标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$;对分泌阳性抗体的细胞进行克隆;采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一微滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为70个/mL,再取1 mL 稀释至20倍,接种于96孔培养板中进行亚克隆,直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止;对10周龄~13周龄Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.3 mL/只~0.5 mL/只;8天~10天后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞/只,5天后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,加甘油于-4℃~4℃保存;上述反应成分的比列为:B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白:生理盐水=(10—1000) μg:(0.1~10) mL。

8. 根据权利要求2所述的B类单端孢霉烯族毒素酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:所述完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=(6~24)g:(10~40) mL:(0.05~0.5) g;所述不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂=(6~24)g:(10~40) mL。

9. 根据权利要求2所述的B类单端孢霉烯族毒素酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:所述的酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为辣根或氧化物酶—羊抗鼠抗体冻干品;所述浓缩洗涤液为含有吐温和Na₂N₃ 磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为0.8 mol/L pH7.2~7.5的磷酸盐缓冲液;所述显色液A为含有过氧化氢的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲溶液;所述显色液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为硫酸溶液。

10. B类单端孢霉烯族毒素酶联免疫吸附检测专用测试盒的检测方法,其特征在于:

1) 将待测样本进行前处理,得到待测样本溶液:a) 所述待测样品为谷物或饲料;取待测样品溶于10%(体积百分含量)甲醇水溶液中,超声波振荡,过滤并收集滤液,即为待测样

本溶液；b) 所述待测样品为啤酒；将待测样本搅拌，除去过量气体，静置得到上清液，即为待测样本溶液；c) 所述待测样品为麦芽汁；直接作为待测样本溶液；

2) 用所述试剂盒对所述样本进行检测：取包被有 B 类单端孢霉烯族毒素 - 卵清蛋白的微孔包被板，加入 50 μL ~100 μL 的 DON 标准品或处理好的样品到各自的微孔中，加入 50 μL ~100 μL 抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体，25℃左右孵育 0.5 h~1 h，洗涤液洗 3~5 次，加 50 μL ~100 μL 辣根过氧化物酶 (HRP) - 羊抗鼠抗体，25℃左右孵育 0.5~1 h，用洗涤液洗 3~5 次，加 50 μL ~100 μL 显色液 A 和 50 μL ~100 μL 显色液 B，避光静置 10~20 min 后加终止液，在 450 nm 处测其吸光度值，从标准曲线计算样品中 B 类单端孢霉烯族毒素含量。

11. B 类单端孢霉烯族毒素各主要毒素交叉反应率的检测方法，其特征在于用生物化学技术和 B 类单端孢霉烯族毒素适应方法，将 DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV、FUS-X 设为被测物，通过生物化学反应测定 DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV、FUS-X 的交叉反应系数，经测定，部分谷物 DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV、FUS-X 的交叉反应系数是：

类型	交叉反应率
DON	100%
3-Ac-DON	120%
15-Ac-DON	85%
NIV	89%
FUS-X	150%

B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒

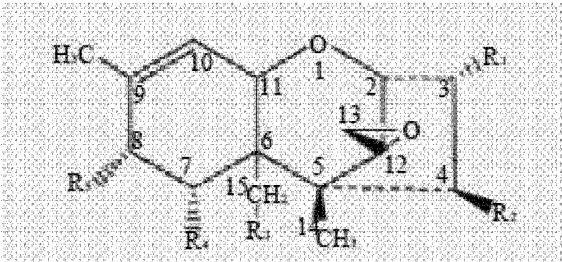
[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及生物及食品安全检测技术领域，具体为 B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒及制备及检测方法。

背景技术

[0003] B 类单端孢霉烯族毒素是一类由镰刀菌属类真菌产生的代谢物，在自然界分布极为广泛，多分布于小麦、大麦、玉米等谷物籽实中，是自然发生的最危险的食品污染物，对人畜危害十分严重。它不但引起人畜急慢性中毒，还具有致癌、致畸、致突变的潜在危险。B 类单端孢霉烯族毒素主要包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、3- 乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl-DON, 3-Ac-DON)、15- 乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyl-DON, 15-Ac-DON)、雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)和镰刀菌酮(fusarenon X, FUS-X) 等。其化学结构如下图所示(I) 及表 1 所示。



[0004] (I)

表 1

类型	单端孢霉烯族毒素	缩写	R1	R2	R3	R4	R5
B 型	脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol)	DON	OH	H	OH	OH	=O
	3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-acetyl-DON)	3-Ac-DON	OA c	H	OH	OH	=O
	15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-acetyl-DON)	15-Ac-DON	OH	H	OA c	OH	=O
	雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol)	NIV	OH	OH	OH	OH	=O
	镰刀菌酮(fusarenon X)	FUS-X	OH	OA c	OH	OH	=O

目前 B 类单端孢霉烯族毒素的检测方法有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、薄层层析发(TLC) 等，由于以上诸分析法样品前处理比较复杂，操作时需专门的技术人员、检测费用昂贵，不利于推广应用。

发明内容

[0005] 针对上述问题,本发明提供了 B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒,其检测快速、灵敏、准确、可定量、操作简便、无需贵重仪器设备,且对样品纯度要求不高,特异性强,简化了样品预处理和纯化过程,特别适用于大批量样品的检测,为此本发明还提供了专用测试盒的制备及检测方法。

[0006] B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒,其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液 A、显色液 B 和终止液,其特征在于:还包括包被有 B 类单端孢霉烯族毒素固相抗原的包被板、B 类单端孢霉烯族毒素标准品、B 类单端孢霉烯族毒素抗体冻干品。

[0007] B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:其包括以下步骤,包被板的制备、B 类单端孢霉烯族毒素标准品的制备、B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA) 偶联物的制备,抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体及其溶液的制备,完全福氏佐剂的制备,不完全福氏佐剂的制备、酶标记的羊抗鼠抗体冻干品的制备;显色液 A 的制备;显色液 B 的制备;终止液的制备。

[0008] 其进一步特征在于:所述包被板包被 B 类单端孢霉烯族毒素固相抗原,其采用 96 或 48 或 24 孔微孔板,用 10 mmol/L~100 mmol/L pH9~10 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的缓冲液作为包被液,将 B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)稀释至 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~1.0 $\mu\text{g/mL}$,96 或 48 或 24 孔微孔板各加 100 μL ,2~8℃放置过夜或放 37℃烘箱中孵育 2 h,弃去包被液,洗涤 2~3 次,加入含 1%~5% 牛血清蛋白(溶于 pH 7~8 的磷酸盐缓冲液),2~8℃封闭过夜或 37℃烘箱中放置 1.5 h,弃去封闭液,吹干,板条密封后置 -4℃~4℃保存。

[0009] 所述 B 类单端孢霉烯族毒素标准品用呕吐毒素(DON)标准品表示,呕吐毒素(DON)标准品用呕吐毒素(DON)纯品中稀释得到,稀释液为去离子水,DON 浓度为:0.001 ng/mL~1000 ng/mL。

[0010] B 类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白(BSA) 偶联物的制备:将 B 类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 90 min~120 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5 mL 乙酸乙酯中,超声波处理 10 min~30 min 后,6000 rpm—15000 rpm 下离心 5 min—30 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于 N, N- 二甲基甲酰胺(DMF) 中,室温震荡 10min~60min,离心;将上清液缓慢滴加到牛血清白蛋白(溶于 0.01 M—0.2 M NaHCO_3 溶液中),在 2~8℃震荡 2 h~3 h,然后,在 0.01—0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)(pH 7~8) 中透析,换透析液 3~8 次;冷冻干燥,偶联物 -4℃—4℃保存。

[0011] B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)偶联物的制备:将 B 类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 90 min~120 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5 mL 乙酸乙酯中,超声波处理 10 min~30 min 后,6000 rpm—15000 rpm 下离心 5 min—30 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、

二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡10 min~60 min,离心;将上清液缓慢滴加到卵清蛋白(溶于0.01 M-0.2 M NaHCO₃溶液中),在2~8℃震荡2 h~3 h,然后,在0.01—0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS溶液)(pH 7~8)中透析,换透析液3~8次;冷冻干燥,偶联物-4℃—4℃保存。

[0012] 抗B类单端孢霉烯族毒素抗体及其溶液的制备:取B类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白偶联物用生理盐水配成0.1 μg/μL~10 μg/μL抗原溶液与等体积完全福氏佐剂混匀,充分乳化,供首次免疫用,加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂,首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射,免疫剂量为10 μg/只~100 μg/只小鼠,以后每隔2周到4周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量为10 μg/只~100 μg/只,最后一次免疫采用脾内注射,4天后取脾融合,将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞SP-2/o以10:1比列混合,离心,去除上清,在50 s~90 s内将0.1 mL~10 mL 50%聚乙二醇(分子量为1500)加至细胞中,充分混匀,使其溶解,1~3 min后加入10 mL~50 mL DMEM 培养液,终止融合,水浴静置10 min~30 min后离心,去除上清;将融合细胞用含5%~30%小牛血清的HAT选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 饲养细胞/0.1 mL接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的96孔培养板中,于5%~10% CO₂, 35℃—45℃条件下培养,5天—10天后,每培养孔更换2/3 HT 培养液,10天~20天后,开始对对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆,杂交瘤筛选采用固相抗原间接竞争ELISA法进行,以B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白为包被抗原,以免疫小鼠的血清为阳性对照。以SP-2/o骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照;阳性细胞孔的判断标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$;对分泌阳性抗体的细胞进行克隆;采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一微滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为70个/mL,再取1 mL稀释至20倍,接种于96孔培养板中进行亚克隆,直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止;对10周龄~13周龄Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.3 mL/只~0.5 mL/只。8天~10天后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞/只,5天后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,加甘油于-4℃~4℃保存;上述反应成分的比列为:B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白:生理盐水=(10—1000) μg:(0.1~10) mL。

[0013] 所述完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=(6~24)g:(10~40) mL:(0.05~0.5) g;所述不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂=(6~24)g:(10~40) mL。

[0014] 所述的酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为辣根过氧化物酶—羊抗鼠抗体冻干品;所述浓缩洗涤液为含有吐温和Na₂PO₄磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为0.8 mol/L pH7.2~7.5的磷酸盐缓冲液;所述显色液A为含有过氧化氢的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲溶液;所述显色液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为硫酸溶液。

[0015] B类单端孢霉烯族毒素酶联免疫吸附检测专用测试盒的检测方法,其特征在于:

1、将待测样本进行前处理,得到待测样本溶液;

1) 所述待测样品为谷物或饲料

取待测样品溶于10%(体积百分含量)甲醇水溶液中,超声波振荡,过滤并收集滤液,即为待测样本溶液。

[0016] 2) 所述待测样品为啤酒

将待测样本搅拌,除去过量气体,静置得到上清液,即为待测样本溶液;c) 所述待测样品为麦芽汁;直接作为待测样本溶液。

[0017] 2、用所述试剂盒对所述样本进行检测:取包被有 B 类单端孢霉烯族毒素-卵清蛋白的微孔包被板,加入 50 μL ~100 μL 的 DON 标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加入 50 μL ~100 μL 抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体,25℃左右孵育 0.5 h~1 h,洗涤液洗 3~5 次,加 50 μL ~100 μL 辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗鼠抗体,25℃左右孵育 0.5~1 h,用洗涤液洗 3~5 次,加 50 μL ~100 μL 显色液 A 和 50 μL ~100 μL 显色液 B,避光静置 10~20 min 后加终止液,在 450 nm 处测其吸光度值,从标准曲线计算样品中 B 类单端孢霉烯族毒素含量。

[0018] B 类单端孢霉烯族毒素各主要毒素交叉反应率的检测方法,其特征在于用生物化学技术和 B 类单端孢霉烯族毒素适应方法,将 DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV、FUS-X 设为被测物,通过生物化学反应测定 DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV、FUS-X 的交叉反应系数,经测定,部分谷物 DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV、FUS-X 的交叉反应系数是

类型	交叉反应率
DON	100%
3-Ac-DON	120%
15-Ac-DON	85%
NIV	89%
FUS-X	150%

本发明的 B 类单端孢霉烯族毒素酶联免疫吸附检测方法操作简便,检测快速、灵敏、准确,专用测试盒使用方便、价格低,适用于大批量样品的检测。

附图说明

[0019] 图 1 为 B 类单端孢霉烯族毒素标准曲线图,横坐标为 DON 标准溶液浓度的对数,纵坐标为百分比,即各标准品孔和样品孔光密度值除以零标准品孔光密度值(A_0)再乘以 100% 所得:光密度值(标准孔或样品孔)/光密度值(A_0) $\times 100\%$ =(纵坐标)。

具体实施方式

[0020] B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒,其特征不在于:其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液 A、显色液 B 和终止液,其还包括包被有 B 类单端孢霉烯族毒素固相抗原的包被板、B 类单端孢霉烯族毒素标准品、B 类单端孢霉烯族毒素抗体冻干品。

[0021] 下面结合实例描述本发明中 B 类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备。

[0022] 实施例 1

包被板包被 B 类单端孢霉烯族毒素固相抗原,其采用 96 或 48 或 24 孔微孔板,用 10 mmol/L pH9 Na_2CO_3 - NaHCO_3 的缓冲液作为包被液,将 B 类单端孢霉烯族毒素-卵清蛋白(OVA)稀释至 1.0 $\mu\text{g/mL}$,96 或 48 或 24 孔微孔板各加 100 μL ,8℃放置过夜或放 37℃烘箱中孵育 2 h,弃去包被液,洗涤 3 次,加入含 5%牛血清蛋白(溶于 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液),2℃封闭过夜或 37℃烘箱中放置 1.5 h,弃去封闭液,吹干,板条密封后置 -2℃冷冻保存。

[0023] 所述 B 类单端孢霉烯族毒素标准品用呕吐毒素(DON)标准品表示,呕吐毒素(DON)

标准品用呕吐毒素(DON)纯品中稀释得到,稀释液为去离子水,DON浓度为:0.001 ng/mL。

[0024] B类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白(BSA)偶联物的制备:将B类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌120 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于5 mL乙酸乙酯中,超声波处理20 min后,12000 rpm下离心5 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡30 min,离心;将上清液缓慢滴加到牛血清白蛋白(溶于0.2 M NaHCO₃溶液中),在5℃震荡3 h,然后,在0.01 M磷酸盐缓冲液(PBS溶液)(pH7.5)中透析,换透析液3次;冷冻干燥,偶联物-3℃保存。

[0025] B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)偶联物的制备:将B类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌105 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于5 mL乙酸乙酯中,超声波处理30 min后,15000 rpm下离心5 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡30 min,离心;将上清液缓慢滴加到卵清蛋白(溶于0.2 M NaHCO₃溶液中),在8℃震荡2 h,然后,在0.2 M磷酸盐缓冲液(PBS溶液)(pH7.5)中透析,换透析液6次;冷冻干燥,偶联物-2℃保存。

[0026] 所述抗B类单端孢霉烯族毒素抗体及其溶液的制备:取B类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白偶联物用生理盐水配成10 μg/μL抗原溶液与等体积完全福氏佐剂混匀,充分乳化,供首次免疫用,加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂,首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射,免疫剂量为10 μg/只小鼠,以后每4周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量为60 μg/只,最后一次免疫采用脾内注射,4天后取脾融合,将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞SP-2/o以10:1比列混合,离心,去除上清,在50 s内将0.1 mL50%聚乙二醇(分子量为1500)加至细胞中,充分混匀,使其溶解,3 min后加入50 mLDMEM培养液,终止融合,水浴静置20 min后离心,去除上清;将融合细胞用含30%小牛血清的HAT选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 1×10^6 饲养细胞/0.1 mL接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的96孔培养板中,于7.5%CO₂,40℃条件下培养,10天后,每培养孔更换2/3HT培养液,20天后,开始对对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆,杂交瘤筛选采用固相抗原间接竞争ELISA法进行,以B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白为包被抗原,以免疫小鼠的血清为阳性对照。以SP-2/o骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照;阳性细胞孔的判断标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$;对分泌阳性抗体的细胞进行克隆;采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一微滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为70个/mL,再取1 mL稀释至20倍,接种于96孔培养板中进行亚克隆,直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止;对10周龄Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.5 mL/只。8天后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞/只,5天后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,加甘油于-4℃保存;上述反应成分的比列为:B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白:生

理盐水 = 10 μ g : 4.95 mL。

[0027] 所述完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂:卡介苗 = 6 g : 25 mL : 0.5 g ;所述不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂 = 24 g : 40 mL。

[0028] 实施例 2

包被板包被 B 类单端孢霉烯族毒素固相抗原,其采用 96 或 48 或 24 孔微孔板,用 100 mmol/L pH10 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的缓冲液作为包被液,将 B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA) 稀释至 0.1 μ g/mL,96 或 48 或 24 孔微孔板各加 100 μ L,5℃放置过夜或放 37℃烘箱中孵育 2 h,弃去包被液,洗涤 2 次,加入含 1% 牛血清蛋白(溶于 pH7 的磷酸盐缓冲液),8℃封闭过夜或 37℃烘箱中放置 1.5 h,弃去封闭液,吹干,板条密封后置 -4℃冰箱保存。

[0029] 所述 B 类单端孢霉烯族毒素标准品用呕吐毒素(DON)标准品表示,呕吐毒素(DON)标准品用呕吐毒素(DON)纯品中稀释得到,稀释液为去离子水,DON 浓度为 :1000 ng/mL。

[0030] B 类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白(BSA)偶联物的制备:将 B 类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 90min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5 mL 乙酸乙酯中,超声波处理 10min 后,6000 rpm 下离心 30min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于 N, N- 二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡 10 min,离心;将上清液缓慢滴加到牛血清白蛋白(溶于 0.01 M NaHCO_3 溶液中),在 2℃震荡 2 h,然后,在 0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)(pH7)中透析,换透析液 8 次;冷冻干燥,偶联物 -2℃保存。

[0031] B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)偶联物的制备:将 B 类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 120 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5 mL 乙酸乙酯中,超声波处理 20 min 后,6000 rpm 下离心 30 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于 N, N- 二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡 60 min,离心;将上清液缓慢滴加到卵清蛋白(溶于 0.01 M NaHCO_3 溶液中),在 2℃震荡 2 h,然后,在 0.01 M 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)(pH7)中透析,换透析液 3 次;冷冻干燥,偶联物 -4℃保存。

[0032] 所述抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体及其溶液的制备:取 B 类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白偶联物用生理盐水配成 0.1 μ g/ μ L 抗原溶液与等体积完全福氏佐剂混匀,充分乳化,供首次免疫用,加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂,首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射,免疫剂量为 100 μ g/ 只小鼠,以后每 2 周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量为 10 μ g/ 只,最后一次免疫采用脾内注射,4 天后取脾融合,将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10 : 1 比列混合,离心,去除上清,在 90 s 内将 4.95 mL 50% 聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中,充分混匀,使其溶解,1 min 后加入 10 mL DMEM 培养液,终止融合,水浴静置 10 min 后离心,去除上清;将融合细胞用含 17.5% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 1×10^4 饲养细胞 / 0.1 mL 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 5% CO_2 , 45℃条件下

培养,5天后,每培养孔更换2/3HT培养液,10天后,开始对对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆,杂交瘤筛选采用固相抗原间接竞争ELISA法进行,以B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白为包被抗原,以免小鼠的血清为阳性对照。以SP-2/o骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照;阳性细胞孔的判断标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$;对分泌阳性抗体的细胞进行克隆;采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一微滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为70个/mL,再取1 mL稀释至20倍,接种于96孔培养板中进行亚克隆,直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止;对13周龄Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.3 mL/只。10天后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞/只,5天后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,加甘油于-2℃保存;上述反应成分的比列为:B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白:生理盐水=1000 μg:10 mL。

[0033] 所述完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=24 g:40 mL:0.05 g;所述不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂=6 g:25 mL。

[0034] 实施例3

包被板包被B类单端孢霉烯族毒素固相抗原,其采用96或48或24孔微孔板,用55 mmol/L pH9.5 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的缓冲液作为包被液,将B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)稀释至4.95 μg/mL,96或48或24孔微孔板各加100 μL,2℃放置过夜或放37℃烘箱中孵育2h,弃去包被液,洗涤5次,加入含3%牛血清蛋白(溶于pH8的磷酸盐缓冲液),5℃封闭过夜或37℃烘箱中放置1.5 h,弃去封闭液,吹干,板条密封后置4℃冰箱保存。

[0035] 所述B类单端孢霉烯族毒素标准品用呕吐毒素(DON)标准品表示,呕吐毒素(DON)标准品用呕吐毒素(DON)纯品中稀释得到,稀释液为去离子水,DON浓度为:500 ng/mL。

[0036] B类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白(BSA)偶联物的制备:将B类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌105 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于5 mL乙酸乙酯中,超声波处理30 min后,15000 rpm下离心17.5 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡60 min,离心;将上清液缓慢滴加到牛血清白蛋白(溶于0.095 M NaHCO_3 溶液中),在8℃震荡2.5 h,然后,在0.095 M磷酸盐缓冲液(PBS溶液)(pH 8)中透析,换透析液6次;冷冻干燥,偶联物-4℃保存。

[0037] B类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白(OVA)偶联物的制备:将B类单端孢霉烯族毒素溶解在吡啶中,在反应瓶中加入1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌90 min;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于5 mL乙酸乙酯中,超声波处理10 min后,10000 rpm下离心17.5 min,取上清液;将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡10 min,离心;将上清液缓慢滴加到卵清蛋白(溶于0.095 M NaHCO_3 溶液中),在5℃震荡3h,然后,在0.095 M磷酸盐缓冲液(PBS溶液)(pH 8)中透析,换透析液8次;冷冻干燥,偶联物-3℃保存。

[0038] 所述抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体及其溶液的制备 : 取 B 类单端孢霉烯族毒素—牛血清白蛋白偶联物用生理盐水配成 $4.95 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 抗原溶液与等体积完全福氏佐剂混匀, 充分乳化, 供首次免疫用, 加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂, 首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射, 免疫剂量为 $55 \mu\text{g}/\text{只}$ 小鼠, 以后每 3 周加强免疫一次, 加强免疫采用尾静脉注射, 免疫剂量为 $100 \mu\text{g}/\text{只}$, 最后一次免疫采用脾内注射, 4 天后取脾融合, 将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10 : 1 比列混合, 离心, 去除上清, 在 70 s 内将 10 mL 50% 聚乙二醇(分子量为 1500) 加至细胞中, 充分混匀, 使其溶解, 2 min 后加入 30 mL DMEM 培养液, 终止融合, 水浴静置 30 min 后离心, 去除上清; 将融合细胞用含 5% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后, 以最后浓度为 1×10^5 饲养细胞 / 0.1 mL 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中, 于 10%CO₂, 35°C 条件下培养, 8 天后, 每培养孔更换 2/3 HT 培养液, 15 天后, 开始对对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔, 取上清液进行筛选, 对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆, 杂交瘤筛选采用固相抗原间接竞争 ELISA 法进行, 以 B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白为包被抗原, 以免疫小鼠的血清为阳性对照。以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照; 阳性细胞孔的判断标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$; 对分泌阳性抗体的细胞进行克隆; 采用有限稀释法, 将阳性克隆细胞吹匀, 取一微滴至培养瓶内, 倒置显微镜下准确计数细胞个数, 稀释为 70 个 / mL, 再取 1 mL 稀释至 20 倍, 接种于 96 孔培养板中进行亚克隆, 直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止; 对 11.5 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.4 mL / 只。9 天后, 腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞 / 只, 5 天后注意观察, 收集腹水, 离心去除沉淀, 加甘油于 -3°C 保存; 上述反应成分的比列为 : B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白 : 生理盐水 = 495 μg : 0.1 mL。

[0039] 所述完全福氏佐剂是由下列材料配比而成, 液体石蜡 : 羊毛脂 : 卡介苗 = 15 g : 10 mL : 0.25 g; 所述不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成, 液体石蜡 : 羊毛脂 = 15 g : 10 mL。

[0040] 所述的酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为辣根或氧化物酶—羊抗鼠抗体冻干品; 所述洗涤液为含有吐温和 NaN₃ 磷酸盐缓冲液; 所述复溶液为 0.8 mol/L pH 7.2-7.5 的磷酸盐缓冲液; 所述显色液 A 为含有过氧化氢的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲溶液; 所述显色液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液; 所述终止液为硫酸溶液。

[0041] 上述实施例中, 所述 PBS 溶液为磷酸盐缓冲液。

[0042] 下面结合实例描述 B 类单端孢霉烯族毒素酶联免疫吸附检测专用测试盒的检测方法:

1、样品前处理。

[0043] (1) 谷物和饲料

准确称取 5 g 粉碎均匀的样品于三角瓶中, 加入 25 mL 10% (体积百分含量) 甲醇溶液, 超声波振荡 5 min。以定性滤纸快速过滤, 取 1 毫升滤液加入 3 毫升的样品复溶液 (将浓缩复溶液 20 倍稀释), 充分混匀, 用于检测。

[0044] (2) 啤酒、麦芽汁

取一定量的啤酒样品, 搅拌, 除去过量的气体, 静置后进行检测;

麦芽汁样品直接进行检测。

[0045] 2、实施例 1, 取包被有 B 类单端孢霉烯族毒素—卵清蛋白的微孔包被板, 加入 50

μL 的 DON 标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加入 100 μL 抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体,35℃ 孵育 0.5 h,洗涤液洗 3 次,加 100 μL 辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗鼠抗体,45℃ 孵育 0.75 h,用洗涤液洗 3 次,加 100 μL 显色液 A 和 100 μL 显色液 B,避光静置 20 min 后加终止液,在 450 nm 处测其吸光度值,从标准曲线计算样品中 B 类单端孢霉烯族毒素含量。

[0046] 实施例 2,取包被有 B 类单端孢霉烯族毒素-卵清蛋白的微孔包被板,加入 100 μL 的 DON 标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加入 50 μL 抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体,45℃ 孵育 1 h,洗涤液洗 5 次,加 50 μL 辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗鼠抗体,35℃ 孵育 0.5 h,用洗涤液洗 5 次,加 50 μL 显色液 A 和 75 μL 显色液 B,避光静置 10min 后加终止液,在 450 nm 处测其吸光度值,从标准曲线计算样品中 B 类单端孢霉烯族毒素含量。

[0047] 实施例 3,取包被有 B 类单端孢霉烯族毒素-卵清蛋白的微孔包被板,加入 75 μL 的 DON 标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加入 75 μL 抗 B 类单端孢霉烯族毒素抗体,40℃ 孵育 0.75 h,洗涤液洗 4 次,加 75 μL 辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗鼠抗体,45℃ 孵育 1 h,用洗涤液洗 4 次,加 75 μL 显色液 A 和 50 μL 显色液 B,避光静置 15 min 后加终止液,在 450 nm 处测其吸光度值,从标准曲线计算样品中 B 类单端孢霉烯族毒素含量。

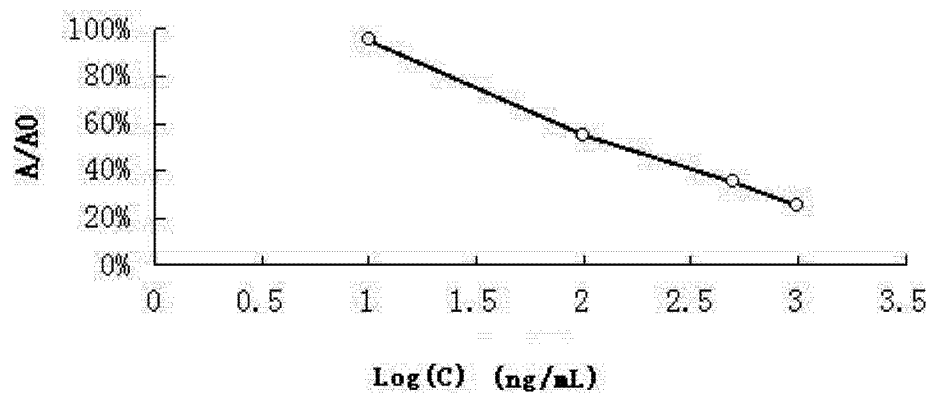


图 1

专利名称(译)	B类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒		
公开(公告)号	CN103792347A	公开(公告)日	2014-05-14
申请号	CN201210435376.6	申请日	2012-11-05
[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		
[标]发明人	杜道林 吴湾湾		
发明人	杜道林 吴湾湾		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N2333/37		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为B类单端孢霉烯族毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒。其检测快速、灵敏、准确、可定量、操作简单、且对样品纯度要求不高，特异性强，特别适用于大批量样品的检测，为此本发明还提供了专用测试盒的制备及检测方法。其特征在于：其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液A、显色液B和终止液，其还包括包被有B类单端孢霉烯族毒素固相抗原的包被板、B类单端孢霉烯族毒素标准品、B类单端孢霉烯族毒素抗体冻干品。检测后在450nm处测吸光度值，从标准曲线计算样品中的B类单端孢霉烯族毒素含量。

