



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104749356 B

(45)授权公告日 2017.08.08

(21)申请号 201510008258.0

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.01.07

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104749356 A

审查员 贾静

(43)申请公布日 2015.07.01

(73)专利权人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲3号

(72)发明人 张峰 凌云 雍炜 邢仕歌 陈达金涌

(74)专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 11465

代理人 杨兵

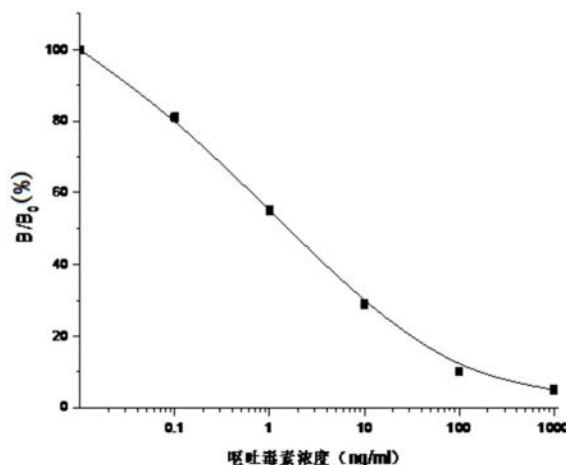
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒,其包括:受体微球、供体微球、生物素化呕吐毒素、呕吐毒素标准品;其中,所述受体微球包被有呕吐毒素抗体,所述供体微球包被有链霉亲和素。本发明还公开了呕吐毒素的均相免疫检测方法。本发明制备的检测试剂盒中的检测试剂稳定,灵敏、准确,具备适用面广、检测范围宽、灵敏度高、特异性强、检测通量大、线性范围较宽等优点。提供的检测呕吐毒素的方法,一方面,有效降低了非特异性反应的可能性以及背景噪音的影响,显著提高了分析效率和检测灵敏度;另一方面大大缩短检测时间,并可在现场快速检测粮食谷物中的呕吐毒素残留,检测全过程控制在20分钟之内,检测限符合中国及欧盟的限量标准。



1. 一种呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒,其特征在于,其包括:受体微球、供体微球、生物素化呕吐毒素和呕吐毒素标准品;

其中,所述受体微球包被有呕吐毒素抗体,所述供体微球包被有链霉亲和素;

该检测试剂盒还包括样品稀释液,所述样品稀释液为甲醇-PBS溶液;

所述受体微球包被有呕吐毒素抗体的具体步骤如下:

(1) 抗体的预处理

将一定量呕吐毒素抗体加入美国Millipore公司的带有滤膜的离心管中,9000rpm离心8min;将浓缩后的抗体加入0.2mL缓冲液(1),9000rpm离心8min后弃掉滤液,此步骤重复5-6次;将几次离心后的离心管取出,弃掉滤液,把离心管的滤膜反转,8000rpm离心6min,收集所得滤液,即所需要的抗体;完成后再次将滤膜反转,加入50 μ L缓冲液(1),静置片刻,使滤膜将待连接抗体的缓冲液(1)吸收,留在滤膜上的残余抗体溶解下来,将滤膜重新反转过来,8000rpm离心6min,收集滤膜上的液体,以上步骤重复1-3次,以使滤膜上的抗体尽可能多的被回收;

(2) 抗体浓度的检测

采用BCA蛋白定量分析试剂确定步骤(1)中抗体的浓度,按照BCA蛋白定量分析试剂的说明书进行操作,具体步骤如下:

1) 配置标准品系列浓度:用去离子水将BCA标准品稀释成以下系列浓度:2mg/mL、1.5mg/mL、1mg/mL、0.75mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.125mg/mL、0.025mg/mL、0mg/mL;

2) 配置BCA工作液:根据标准品和样品数量配置BCA工作液,将A液、B液按体积比为50:1的比例进行配置,充分混匀;

3) 待检测样品用去离子水作适当稀释,将25 μ L上述标准品及样品分别加入到96孔透明板的样品孔中;各孔加入200 μ LBCA工作液,37 $^{\circ}$ C孵育30min;

4) 将板条放置室温数分钟,将其冷却至室温,用酶标仪570nm波长测定,根据标准曲线计算抗体浓度,并将抗体浓度调整成2mg/mL;

(3) 抗体和微球的偶联

将呕吐毒素抗体和偶联有二抗的受体微球按照1:10的浓度比进行混匀,用缓冲液(1)将体积补充到200 μ L,室温下振荡1小时;

(4) 纯化

16000rpm离心15min后去上清,再加入一定量的保存缓冲液将受体微球重悬,再次16000rpm离心15min后去上清,重复此步骤二次,最后用保存缓冲液将其沉淀超声重悬,得到已连接抗体的受体微球,调整受体微球浓度为10 μ g/mL~30 μ g/mL待用;

(5) 保存

分装为50 μ L的小管,4 $^{\circ}$ C保存;

所述缓冲液(1):用0.13mol/L,pH 8.0的PBS配制25mg/mL氰基硼氧化钠,现配现用,所述保存缓冲液:为含有质量百分比为0.2%BSA,体积百分比为0.02%Proclin-300的PBS溶液,具体配置如下:

1L的双蒸水加入KCl 0.2g,KH₂PO₄ 0.2g,NaCl 8g,Na₂HPO₄·12H₂O 3.4g,2gBSA,0.2mL Proclin-300,混匀,室温保存;

其中,上述步骤(3)中抗体和微球的偶联采用水溶性碳二亚胺法,将表面修饰有活性羧

基的受体微球与呕吐毒素抗体共价偶联；

所述生物素化呕吐毒素的制备方法：

(1) 呕吐毒素-牛血清白蛋白偶联物的制备：取20mg呕吐毒素、1mol马来酸酐以及0.05mol的DMAP，溶于2ml甲苯，80℃搅拌12小时，蒸干溶剂，酸化，萃取，重结晶后得到呕吐毒素半抗原；将60mg呕吐毒素半抗原溶于9.5ml 0.01mol/L，pH5.0的PBS溶液中，加入12.5mg EDC，再加入1mlDMF溶解的10mg呕吐毒素半抗原，25℃搅拌反应2小时，再加入6mgEDC，置于阴暗处搅拌反应12小时，用0.01mol/L PBS透析72小时，每8小时更换1次透析液，即得到呕吐毒素-BSA偶联物；

(2) 将NHS-生物素和呕吐毒素-BSA偶联抗原按照1:5的摩尔比进行混匀，室温下振荡4小时，4℃保存透析2天，每12小时换一次透析缓冲液，分装使生物素化呕吐毒素浓度为3μg/mL~10μg/mL待用；

所述透析缓冲溶液中加入Proclin-300，其浓度为0.05%；

其中，所述透析缓冲液采用PBS溶液，配置方法为：1L的双蒸水加入KCl 0.2g，KH₂PO₄ 0.2g，NaCl 8g，Na₂HPO₄·12H₂O 3.4g，混匀，室温保存；

所述供体微球包被有链霉亲和素，其缓冲液为含25mM HEPES，100mM NaCl和0.05% Proclin-300，pH7.4的溶液，其中，该供体微球的浓度为10μg/mL~30μg/mL。

2. 如权利要求1所述的呕吐毒素均相免疫检测试剂盒，其特征在于，所述受体微球的浓度为20μg/mL，所述供体微球的浓度为20μg/mL，所述生物素化呕吐毒素浓度为5μg/mL。

3. 利用如权利要求1-2中任一项所述的呕吐毒素均相免疫检测试剂盒检测呕吐毒素的检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

1) 将所述呕吐毒素标准品配置成具有浓度梯度的标准品；

2) 反应板每孔加入所述受体微球，所述生物素化呕吐毒素抗原；之后，分别在各孔加入待测样品、步骤1) 制备的标准品；

3) 振荡，室温或37℃避光孵育5min~10min；

4) 每孔加入所述供体微球，振荡条件下，室温或37℃避光孵育5min~10min；

5) 结果读取：将反应板置于均相免疫检测仪上读数；

6) 检测结果分析：根据标准品检测的结果绘制标准曲线，将样品的检测结果对应标准曲线，即获得检测样品中呕吐毒素的含量；

所述步骤6) 检测结果分析包括：

a. 用所获得的每个浓度的标准品溶液的荧光计数值除以呕吐毒素浓度为0的荧光计数值再乘以100%，得到百分荧光计数值；以呕吐毒素标准品浓度的半对数值为X轴，百分荧光计数值为Y轴，绘制标准曲线图；

b. 按步骤a所述的百分荧光计数值计算方法，计算样品溶液的百分荧光计数值，相对应该待测样品的百分荧光计数值则可从标准曲线上读出所述待测样品中呕吐毒素的含量。

4. 如权利要求3所述的检测方法，其特征在于，所述受体微球的加入量为25μL，所述生物素化呕吐毒素的加入量为10μL，所述样品或标准品的加入量为35μL，所述供体微球的加入量为10μL。

5. 如权利要求3所述的检测方法，其特征在于，所述步骤3) 中37℃避光孵育的时间为5min，所述步骤4) 中37℃避光孵育的时间为10min。

呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种霉菌毒素残留的免疫化学快速检测技术,具体涉及呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 呕吐毒素最早于1970年在日本的一次赤霉病大麦中毒的病毒中发现,可引起动物拒食和呕吐现象。呕吐毒素作为一种常见的真菌毒素,在自然界中广泛存在,主要污染小麦、玉米等粮食作物及其制品。由于呕吐毒素较强的毒性,世界各国都高度重视对其的监控,并制定出严格的限量标准:美国食品药品监督管理局(FDA)规定在小麦成品中的限量为1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,欧盟规定谷粉和玉米粉中限量为750 $\mu\text{g}/\text{kg}$,我国在国家标准中规定谷物中呕吐毒素的限量为1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0003] 现有的呕吐毒素检测方法主要有理化方法、ELISA方法、胶体金层析法等。这些方法各有优缺点,无法满足现场快速检测的需求。理化方法前处理过程复杂、仪器化程度高、操作繁琐、效率低。ELISA方法经过多次洗脱过程,标记物酶易失活,底物见光易分解,环境干扰因素复杂等缺点,且已不能满足越来越低的限量标准。胶体金层析法可以满足现场快速的要求,但是只能定性检测无法得到定量结果。

[0004] 现有一些呕吐毒素定量检测试剂盒,如已公开专利CN 101413954A呕吐毒素的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备方法、CN103823064A一种呕吐毒素定量检测试剂盒及其使用方法,公开的试剂盒均采用是酶联免疫分析方法。酶联免疫分析方法是采用固相吸附分离的方法,需要固相材料吸附捕获抗体-待检抗原-标记抗体,由于标记抗体为过量,所以检测前均需要洗涤去除未参加反应的标记抗体。此时,通过检测与待测抗原结合的标记抗体,才能与待测抗原呈正比例关系。

[0005] 固相吸附分离方法有两个重要环节:包被和洗涤。固相吸附分离方法设计巧妙,操作简单,故应用非常广泛。但是,此种非均相反应模式因包被和洗涤环节的存在,给标记免疫分析造成很大缺陷,主要表现在以下两个方面:

[0006] 1. 在包被过程,无论物理吸附还是化学连接,包被于固相材料表面的抗体分子其构象不同于处于液相中的抗体分子,与抗原分子结合能力因空间位阻效应将受到一定限制;无论采用微球还是微孔板作为固相材料,由于包被面积有限,捕获抗体分子不能最大限度满足大量待测抗原的需要,由此将影响检测范围。

[0007] 2. “洗板”或“洗球”是非均相免疫分析中的重要环节且多次出现。洗涤过程增加检测程序的复杂性,增加检测时间并给实现自动化带来障碍。此外,由于洗涤过程特别是酶免疫分析,难于实现标准化,每个测试孔之间洗涤效果不同,在一定程度上影响检测的精密程度,出现批间、批内差异。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒及检测方法,以解决

现有检测盒中试剂种类多,其检测方法操作繁琐,检测灵敏度低的问题。

[0009] 本发明的另一个目的是提供一种呕吐毒素的均相免疫检测方法。

[0010] 为实现本发明的目的,采用以下技术方案。

[0011] 一种呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒,其包括如下试剂:受体微球、供体微球、生物素化呕吐毒素、呕吐毒素标准品;

[0012] 其中,所述受体微球包被有呕吐毒素抗体,所述供体微球包被有链霉亲和素。

[0013] 如上所述的呕吐毒素均相免疫检测试剂盒,优选地,该检测试剂盒还包括样品稀释液,所述样品稀释液为甲醇-PBS溶液。

[0014] 如上所述的呕吐毒素均相免疫检测试剂盒,优选地,所述受体微球的浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 30\mu\text{g}/\text{mL}$,所述供体微球的浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 30\mu\text{g}/\text{mL}$,所述生物素化呕吐毒素浓度为 $3\mu\text{g}/\text{mL}\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0015] 如上所述的呕吐毒素均相免疫检测试剂盒,优选地,所述受体微球的缓冲溶液为含有质量百分比为0.2%BSA,体积百分比为0.02%Proclin-300的PBS溶液,所述生物素化呕吐毒素的缓冲液为PBS溶液,所述供体微球的缓冲溶液为终浓度为25mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES),100mM NaCl0.05%Proclin-300,pH7.4的溶液。

[0016] 利用如上所述的呕吐毒素均相免疫检测试剂盒检测呕吐毒素的检测方法,包括以下步骤:

[0017] 1) 将所述呕吐毒素标准品配置成具有浓度梯度的标准品;

[0018] 2) 反应板每孔加入所述受体微球,生物素化呕吐毒素抗原;之后,分别在各孔加入待测样品、步骤1)制备的标准品;

[0019] 3) 振荡,室温或 37°C 避光孵育5min~10min;

[0020] 4) 每孔加入所述供体微球,振荡条件下,室温或 37°C 避光孵育5min~10min;

[0021] 5) 结果读取:将反应板置于均相免疫检测仪上读数;

[0022] 6) 检测结果分析:根据标准品检测的结果绘制标准曲线,将样品的检测结果对应标准曲线,即可获得检测样品中呕吐毒素的含量。

[0023] 如果待检样品为固体时,要对样品进行前处理,提取上清液进行检测。

[0024] 如上所述的检测方法,优选地,采用 $80\mu\text{L}$ 反应体系,所述受体微球的加入量为 $25\mu\text{L}$,所述生物素化呕吐毒素的加入量为 $10\mu\text{L}$,所述样品或标准品的加入量为 $35\mu\text{L}$,所述供体微球的加入量为 $10\mu\text{L}$ 。

[0025] 如上所述的检测方法,优选地,所述步骤(3)中 37°C 避光孵育的时间为5min,所述步骤(4)中 37°C 避光孵育的时间为10min。

[0026] 如上所述的检测方法,优选地,所述步骤(6)检测结果分析包括:

[0027] a. 用所获得的每个浓度的标准品溶液的荧光计数值除以呕吐毒素浓度为0的荧光计数值再乘以100%,得到百分荧光计数值;以呕吐毒素标准品浓度的半对数值为X轴,百分荧光计数值为Y轴,绘制标准曲线图;

[0028] b. 按步骤a所述的百分荧光计数值计算方法,计算所述待测样品的百分荧光计数值,相对应该待测样品的百分荧光计数值,则可从标准曲线上读出所述待测样品中呕吐毒素的含量。

[0029] 一种检测呕吐毒素的均相免疫检测方法,包括如下步骤:

- [0030] 1) 配置具有浓度梯度的呕吐毒素作为标准品；
- [0031] 2) 反应板每孔加入包被有呕吐毒素抗体的受体微球,生物素化呕吐毒素抗原;之后,分别在各孔加入待测样品、标准品或磷酸盐缓冲液；
- [0032] 3) 振荡,室温或37℃避光孵育；
- [0033] 4) 每孔加入包被链霉亲和素的供体微球,振荡条件下室温或37℃避光孵育；
- [0034] 5) 结果读取:将反应板置于均相免疫检测仪上读数；
- [0035] 6) 检测结果分析:根据标准品检测的结果绘制标准曲线,将样品的检测结果对应标准曲线,即可获得检测样品中呕吐毒素的含量。

[0036] 本发明提供的呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒,通过特异性的抗原抗体反应将纳米微珠对极大的拉近,级联化学发光反应将信号放大,有效的提高呕吐毒素检测的精度。该检测试剂盒中的检测试剂稳定,灵敏、准确,具备适用面广、检测范围宽、灵敏度高、特异性强、检测通量大、线性范围较宽等优点。

[0037] 采用本发明提供的呕吐毒素均相免疫检测方法,进行呕吐毒素的检测时,操作简单、混合后即可测定,避免了传统免疫分析中洗脱、分离等繁琐过程,一方面,有效降低了非特异性反应的可能性以及背景噪音的影响,显著提高了分析效率和检测灵敏度;另一方面大大缩短检测时间,并可在现场快速检测粮食谷物中的呕吐毒素残留,检测全过程控制在20min之内,检测限符合中国及欧盟的限量标准。

[0038] 利用本发明提供的呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒,进行呕吐毒素检测的灵敏度为0.006 $\mu\text{g}/\text{L}$,检测范围为0.006-1000 $\mu\text{g}/\text{L}$,大大高出现有技术ELISA的检测灵敏度。

附图说明

[0039] 图1是本发明一优选实施例检测呕吐毒素的标准曲线。

具体实施方式

[0040] 本发明的呕吐毒素免疫均相检测的原理,采用抑制法检测待测样品中的呕吐毒素。当样品中没有呕吐毒素时,反应液中的生物素化呕吐毒素抗原,与偶联有呕吐毒素抗体的受体微球结合,再加入偶联有链霉亲和素的供体微球,由于生物素与链霉亲和素结合,就会形成受体微球-呕吐毒素抗体-呕吐毒素-生物素-链霉亲和素-供体微球的聚合物。在激光(波长680nm)的照射下,供体微球上的光敏剂将周围环境中的氧气转化为更为活跃的单体氧。单体氧扩散至受体微球,与其上的化学发光剂反应,进一步激活了同样在受体微球上的荧光基因,使之发出荧光,波长为520~620nm,此时荧光值最高。单体氧的半衰期为4微秒,在溶液中的扩散距离为200nm左右,如果生物分子不存在特异的相互作用,也就是说如果未形成受体微球-呕吐毒素抗体-呕吐毒素-生物素-链霉亲和素-供体微球的聚合物,单体氧将无法扩散至距离较远的受体微球,则不会有荧光信号产生。

[0041] 如样品中有呕吐毒素,样品中的呕吐毒素将与生物素化呕吐毒素抗原竞争偶联有呕吐毒素抗体的受体微球,如果样品中存在呕吐毒素,该呕吐毒素将和偶联有呕吐毒素抗体的受体微球偶联,减少生物素化呕吐毒素抗原与偶联有呕吐毒素抗体的受体微球的结合数量,进而结合供体微球的数量减少,亮度降低,仪器所读取的荧光值减小。

[0042] 本发明建立的呕吐毒素免疫均相检测方法,所用试剂少,操作简单,采用了抑制法

检测呕吐毒素、级联放大体系,并且其反应环境是一个液相环境,抗原抗体的结合可在液相环境中自由结合,提高了结合的几率,且不会受空间位阻效应的影响,大大提高了检测灵敏度;反应过程不需要洗涤,每个孔中加入的试剂除待检样本不同外,其余都相同,标准化程度高,批间、批内差异小。

[0043] 下面将结合具体的实施例对本发明方法作进一步的描述,以便本领域技术人员进一步理解本发明,但以下实施例并不以任何形式限制本发明的保护范围。若如特别说明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用的试剂均为常规试剂。

[0044] 实施例1呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒的制备

[0045] 本发明的呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒包括:包被有呕吐毒素抗体的受体微球、生物素标记的呕吐毒素、呕吐毒素标准品、偶联有链霉亲和素的供体微球。

[0046] 其中,受体微球包被呕吐毒素抗体,生物素标记呕吐毒素具体步骤如下:

[0047] 1. 受体微球包被呕吐毒素抗体

[0048] (1) 抗体的预处理

[0049] 将一定量呕吐毒素抗体加入美国Millipore公司的带有滤膜的离心管中,9000rpm离心8min。将浓缩后的抗体加入0.2mL缓冲液(1),9000rpm离心8min后弃掉滤液,此步骤重复5-6次。将几次离心后的离心管取出,弃掉滤液,把离心管的滤膜反转,8000rpm离心6min,收集所得滤液,即所需要的抗体。完成后再次将滤膜反转,加入50 μ L缓冲液(1),静置片刻,使滤膜将待连接抗体的缓冲液(1)吸收,留在滤膜上的残余抗体溶解下来,将滤膜重新反转过来,8000rpm离心6min,收集滤膜上的液体,以上步骤重复1-3次,以使滤膜上的抗体尽可能多的被回收。

[0050] (2) 抗体浓度的检测

[0051] 采用BCA蛋白定量分析试剂确定步骤(1)中抗体的浓度,按照BCA蛋白定量分析试剂的说明书进行操作,具体步骤如下:

[0052] 1) 配置标准品系列浓度:用去离子水将BCA标准品稀释成以下系列浓度:2mg/mL、1.5mg/mL、1mg/mL、0.75mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.125mg/mL、0.025mg/mL、0mg/mL;

[0053] 2) 配置BCA工作液:根据标准品和样品数量配置BCA工作液,将A液、B液按体积比为50:1的比例进行配置,充分混匀;

[0054] 3) 待检测样品用去离子水作适当稀释,将25 μ L上述标准品及样品分别加入到96孔透明板的样品孔中;各孔加入200 μ LBCA工作液,37 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0055] 4) 将板条放置室温数分钟,将其冷却至室温,用酶标仪570nm波长测定,根据标准曲线计算抗体浓度,并将抗体浓度调整成2mg/mL。

[0056] (3) 抗体和微球的偶联

[0057] 将呕吐毒素抗体和偶联有二抗的受体微球按照1:10的浓度比进行混匀,用缓冲液(1)将体积补充到200 μ L,室温下振荡1小时。

[0058] (4) 纯化

[0059] 16000rpm离心15min后去上清,再加入一定量的保存缓冲液将受体微球重悬,再次16000rpm离心15min后去上清,重复此步骤二次,最后用保存缓冲液将其沉淀超声重悬,得到已连接抗体的受体微球,调整受体微球浓度为10 μ g/mL~30 μ g/mL待用。

[0060] (5) 保存

[0061] 分装为50 μ L的小管,4 $^{\circ}$ C保存。

[0062] 如上所用缓冲液的配置方法如下:

[0063] 缓冲液(1):用PBS(0.13mol/L,pH 8.0)配制25mg/mL NaBH₃CN(氰基硼氧化钠),现配现用。保存缓冲液:为含有质量百分比为0.2%BSA,体积百分比为0.02%Proclin-300的PBS溶液,具体配置如下:

[0064] 1L的双蒸水加入KCl 0.2g,KH₂PO₄0.2g,NaCl 8g,Na₂HPO₄·12H₂O 3.4g,2gBSA,0.2mL Proclin-300,混匀,室温保存。

[0065] 其中,步骤(3)中抗体和微球的偶联也可采用水溶性碳二亚胺(EDC)法,将表面修饰有活性羧基的受体微球与呕吐毒素抗体共价偶联。

[0066] 2.生物素化呕吐毒素

[0067] (1)呕吐毒素-牛血清白蛋白(呕吐毒素-BSA)偶联物的制备:取20mg呕吐毒素、1mol马来酸酐以及0.05mol的DMAP,溶于2ml甲苯,80 $^{\circ}$ C搅拌12小时,蒸干溶剂,酸化,萃取,重结晶后得到呕吐毒素半抗原。将60mg呕吐毒素半抗原溶于9.5ml 0.01mol/L,pH5.0的PBS溶液中,加入12.5mg EDC,再加入1mLDMF溶解的10mg呕吐毒素半抗原,25 $^{\circ}$ C搅拌反应2小时,再加入6mgEDC,置于阴暗处搅拌反应12小时,用0.01mol/L PBS透析72小时,每8小时更换1次透析液,即得到呕吐毒素-BSA偶联物。

[0068] (2)将NHS-生物素和呕吐毒素-BSA偶联抗原按照1:5的摩尔比进行混匀,室温下振荡4小时,4 $^{\circ}$ C保存透析2天,每12小时换一次透析缓冲液,分装使生物素化呕吐毒素浓度为3 μ g/mL~10 μ g/mL待用。

[0069] 为了延长生物素化呕吐毒素的使用有效期,可在缓冲溶液中加入Proclin-300,其浓度优选为0.05%。

[0070] 其中,透析缓冲液采用PBS溶液,配置方法为:1L的双蒸水加入KCl0.2g,KH₂PO₄0.2g,NaCl 8g,Na₂HPO₄·12H₂O 3.4g,混匀,室温保存。

[0071] 3.供体微球

[0072] 供体微球包被有链霉亲和素,其缓冲液为含25mM HEPES,100mM NaCl和0.05%Proclin-300,pH7.4的溶液,其中,供体微球的浓度优选为10 μ g/mL~30 μ g/mL。

[0073] 呕吐毒素抗体可采用羊抗、兔抗、鼠抗;偶联有二抗的受体微球中的二抗可采用与呕吐毒素抗体相对应应的兔抗羊IgG、鼠抗羊IgG;羊抗兔IgG、鼠抗兔IgG;兔抗鼠IgG、羊抗鼠IgG或SPA。

[0074] 呕吐毒素抗体、偶联有二抗的受体微球、供体微球可采用商品化试剂,可市售得到。举例如,偶联有二抗的受体微球购自PE公司(货号AL105C),包被有链霉亲和素的供体微球及其缓冲溶液购自PE公司(货号6760002)。

[0075] 实施例2一种呕吐毒素的均相免疫检测方法

[0076] 一种检测呕吐毒素的均相免疫检测方法,包括如下步骤:

[0077] 1)配置具有一定浓度梯度的呕吐毒素作为标准品;

[0078] 2)反应板每孔加入包被有呕吐毒素抗体的受体微球,生物素化呕吐毒素抗原;之后,分别在各孔加入待测样品、标准品或磷酸盐缓冲液;

[0079] 3)振荡,室温或37 $^{\circ}$ C避光孵育;

[0080] 4)每孔加入包被链霉亲和素的供体微球,振荡条件下,室温或37 $^{\circ}$ C避光孵育;

[0081] 5) 结果读取:将反应板置于均相免疫检测仪上读数;

[0082] 6) 检测结果分析:根据标准品检测的结果绘制标准曲线,将样品的检测结果对应标准曲线,即可获得检测样品中呕吐毒素的含量。

[0083] 具体地,利用如实施例1制备的试剂盒,进行呕吐毒素的均相免疫检测,检测方法具体如下:

[0084] 1) 配置不同浓度的呕吐毒素标准品:采用6个浓度,使呕吐毒素终浓度分别为0 μ g/L、0.1 μ g/L、1 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L、1000 μ g/L;

[0085] 2) 取96孔板,优选地,反应板每孔加入25 μ L受体微球,受体微球的浓度为20 μ g/mL,10 μ L生物素化呕吐毒素抗原,生物素化呕吐毒素抗原浓度优选为5 μ g/mL;

[0086] 3) 在标记为待检样品的孔中加入35 μ L待测样品;标记为标准曲线的孔中分别加入不同浓度的标准品;标记为本底的孔中加入磷酸盐缓冲液作为空白对照;

[0087] 4) 振荡条件为振荡速度为40-100转/分,37 $^{\circ}$ C避光孵育5分钟;

[0088] 5) 每孔加入供体微球10 μ L,供体微球的浓度可优选20 μ g/mL,振荡条件为振荡速度为40-100转/分,37 $^{\circ}$ C避光孵育10分钟;

[0089] 6) 结果读取:将反应板置于均相免疫检测仪上读数;

[0090] 7) 检测结果分析

[0091] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的荧光计数值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的荧光计数值(B_0)再乘以100%,得到百分荧光计数值。计算公式为:百分荧光计数值(%) = $(B/B_0) \times 100\%$ 。

[0092] 公式中B为标准品溶液的荧光计数值, B_0 为0 μ g/L标准溶液的荧光计数值。以呕吐毒素标准品浓度的半对数值为X轴,百分荧光计数值为Y轴,绘制标准曲线图(见图1)。用同样的办法计算样品溶液的百分荧光计数值,相对应该样品的百分荧光计数值,则可从标准曲线上读出该样品中呕吐毒素的含量。

[0093] 为了获得比较准确的检测结果,各浓度梯度的标准品或样品,可多做几个平行样,计算时,采用平行样的平均值绘制标准曲线或测得样品中呕吐毒素的含量。

[0094] 具体到检测样品中呕吐毒素的残留,要先对样品进行前处理,如对玉米或小麦等谷物样品的检测时,前处理可采用:称取玉米、小麦等谷物的样品2g。每份样品加入5mL甲醇-PBS溶液,在涡旋振荡器上振荡3~5min,然后静置3~5min,取上清液待测。

[0095] 样品稀释液采用甲醇-PBS溶液,其配置方法为无水甲醇与PBS溶液体积比为1:4。采用甲醇-PBS溶液可使呕吐毒素完全溶于溶液中,且对检测检测不会有任何影响。

[0096] 本实施例中采用的标准品为10倍比梯度稀释的标准品,也可采用二倍比、三倍比、四倍比等梯度稀释的标准品,进行标准曲线的绘制。

[0097] 实施例3本发明试剂盒 IC_{50} 测定

[0098] 采用实施例2中的检测方法仅对呕吐毒素标准品,即呕吐毒素溶液浓度范围为0 μ g/L、0.1 μ g/L、1 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L、1000 μ g/L,利用实施1制备的试剂盒对标准曲线进行检测,每个标准样品做平行孔5个。 IC_{50} 测定结果如表1。

[0099] 表1 IC_{50} 的测定结果

[0100]

编号	1	2	3	4	5	平均值
测定值 ($\mu\text{g/L}$)	0.95	1.03	1.15	0.99	1.2	1.07

[0101] 实施例4本发明检测试剂盒特异性检测

[0102] 同实施例3的操作,分别配制呕吐毒素、黄曲霉毒素B1、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮的标准品,按照实施例2的检测步骤进行。按照公式计算:交叉反应率(CR) = 50%抑制率时呕吐毒素浓度/50%抑制率时类似物浓度 \times 100%。

[0103] 表2 试剂盒特异性(交叉反应率)

[0104]

竞争物	CR(%)
呕吐毒素	100
黄曲霉毒素B1	<0.1
赭曲霉毒素	<0.1
玉米赤霉烯酮	<0.1

[0105] 由表2的结果说明,本发明制备的试剂盒检测呕吐毒素的特异性较高。

[0106] 实施例5本发明试剂盒灵敏度的测定

[0107] 采用实施例2中具体的检测方法,通过对20组呕吐毒素为零浓度的平行样进行检测,经测定,获得20组标准曲线零浓度点计数的平均值和标准差,以平均值的计数减2倍标准偏差所得的计数,从标准曲线中找到对应浓度即为本发明方法及检测试剂盒的检测灵敏度。经测定,计算获得谷物中呕吐毒素的灵敏度为0.006 $\mu\text{g/L}$,检测范围为0.006-1000 $\mu\text{g/L}$ 。

[0108] 实施例6本发明试剂盒的保存期试验

[0109] 实施例1制备的试剂盒,在保存条件为2-8 $^{\circ}\text{C}$,经过6个月的存放后,进行测定,测定结果表明,试剂盒的最大荧光计数值(零标准)、50%抑制浓度、呕吐毒素添加实际测定值均在正常范围之内。

[0110] 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存的条件下,放置4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。从以上结果可得出试剂盒可以在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 至少可以保存6个月以上。

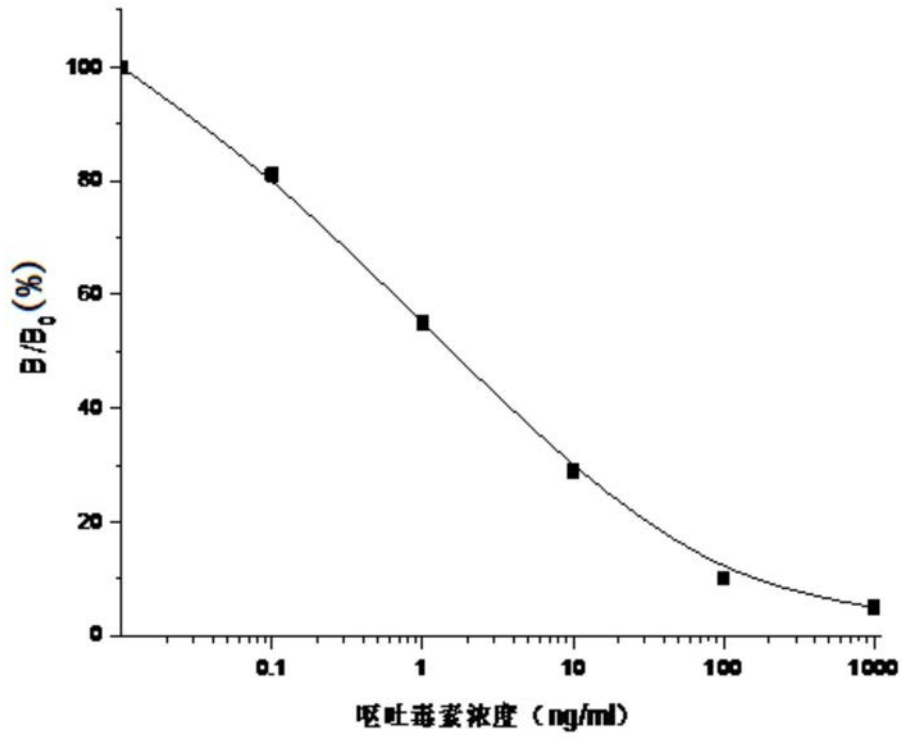


图1

专利名称(译)	呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN104749356B	公开(公告)日	2017-08-08
申请号	CN201510008258.0	申请日	2015-01-07
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	张峰 凌云 雍炜 邢仕歌 陈达 金涌		
发明人	张峰 凌云 雍炜 邢仕歌 陈达 金涌		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/5304 G01N33/531		
代理人(译)	杨兵		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN104749356A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种呕吐毒素的均相免疫检测试剂盒，其包括：受体微球、供体微球、生物素化呕吐毒素、呕吐毒素标准品；其中，所述受体微球包被有呕吐毒素抗体，所述供体微球包被有链霉亲和素。本发明还公开了呕吐毒素的均相免疫检测方法。本发明制备的检测试剂盒中的检测试剂稳定，灵敏、准确，具备适用面广、检测范围宽、灵敏度高、特异性强、检测通量大、线性范围较宽等优点。提供的检测呕吐毒素的方法，一方面，有效降低了非特异性反应的可能性以及背景噪音的影响，显著提高了分析效率和检测灵敏度；另一方面大大缩短检测时间，并可在现场快速检测粮食谷物中的呕吐毒素残留，检测全过程控制在20分钟之内，检测限符合中国及欧盟的限量标准。

