



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110031628 A

(43)申请公布日 2019.07.19

(21)申请号 201910343370.8

(22)申请日 2019.04.26

(71)申请人 烟台大学

地址 264005 山东省烟台市莱山区清泉路
30号

(72)发明人 李彦伸 袁智鹏 毛馨 尤艳莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种T-2毒素直接竞争化学发光定性定量免疫分析方法

(57)摘要

本发明涉及一种直接竞争化学发光免疫定性定量检测谷物中T-2毒素的方法。本发明的检测方法包括制备酶标T-2毒素抗体、直接竞争化学发光免疫检测、建立工作曲线方程和待测谷物样品的T-2毒素定量检测。本发明中改良的高碘酸钠法采用饱和NaBH₄甲醇溶液进行还原反应,克服了NaBH₄水溶液极易被氧化、不能长期保存的缺点,从而避免了该溶液现用现配的限制;直接竞争化学发光免疫检测技术提高了检测效率和检测的灵敏度;采用高灵敏的鲁米诺化学发光底物替代传统的TMB底物,极大程度的提高了反应的灵敏度;通过建立工作曲线可以快速、准确的得到样品中T-2毒素的浓度,降低了检测和计算的复杂程度,适用于广泛的基层检测工作的应用。

1. 一种直接竞争化学发光免疫检测T-2毒素的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 制备抗体标记物

辣根过氧化物酶HRP经高碘酸钠活化与T-2毒素抗体进行偶联反应进一步加入NaBH₄饱和甲醇溶液,充分进行还原反应后得到辣根过氧化物酶-T-2毒素抗体标记物。

(2) 直接竞争化学发光免疫检测

将预处理后的样品放置于T-2毒素包被完成的酶标板各孔中,加入步骤(1)制备的抗体标记物,进行直接竞争反应;洗板后各孔加入化学发光底物,测定发光强度。

2. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的方法,其特征在于,步骤(1)使用高碘酸钠NaIO₄对辣根过氧化物酶HRP进行活化。

3. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的方法,其特征在于,步骤(1)活化后的辣根过氧化物酶HRP与T-2毒素抗体IgG进行偶联。

4. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的方法,其特征在于,步骤(1)使用NaBH₄饱和甲醇溶液对偶联后的酶标T-2毒素抗体进行还原反应。

5. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的方法,其特征在于,步骤(2)加样前预处理包括包被、洗涤、密封等步骤;加样后处理包括洗涤步骤,无需间接竞争反应步骤,即可进行发光强度测定。

6. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的方法,其特征在于,步骤(2)所述化学发光底物为高灵敏鲁米诺化学发光底物。

7. 一种基于权利要求1所述的T-2毒素定量分析方法,其特征在于,所述方法还包括以下步骤:

a、建立工作曲线方程

对无污染的空白样品进行处理,制备空白基质溶液,以此对标准品进行稀释,得到系列梯度浓度T-2毒素溶液,处理后得到供试溶液;依照权利要求1步骤(2)的方法,测定加标样品的发光强度值。用所获得的每个浓度的标准品溶液的发光强度平均值(B)除以稀释溶液(0标准)的发光强度值(B₀)再乘以100%,即百分发光值。

$$\text{百分发光值}(\%) = (B/B_0) \times 100\%$$

以标准品溶液的浓度(ng/mL)的半对数值为X轴,百分发光值为Y轴,绘制标准曲线图;

b、测样品的T-2毒素定量检测

称取若干份待测样品,经处理后得到待测溶液,采用权利要求1步骤(2)的方法测定发光强度值,将数值代入步骤a建立的工作曲线方程计算出待测样品中T-2毒素的含量。

8. 一种基于权利要求1所述方法的T-2毒素定量分析方法,其特征在于所述方法包括以下样品前处理步骤:

然后准确称取2.0g谷物样品,分别置于50mL聚四氟乙烯管中。然后将向每份样品中加入10mL甲醇/PBS(60/40, v/v)溶液,震荡、涡旋提取10min, 4℃、9000g离心5min,取5mL上清液加入25mL PBS稀释,过0.45μm水相滤膜,得到待测溶液。

一种T-2毒素直接竞争化学发光定性定量免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全快速检测技术领域,具体涉及一种直接竞争化学发光免疫定性定量检测T-2毒素的方法。

背景技术

[0002] 随着生活水平的日益提高,人们对食品安全的要求越来越高,其中谷物中真菌毒素的污染导致的食品安全问题已成为全世界关注的焦点。谷物食品成分复杂,待测物浓度较低,通常采样量较大,这就对分析方法的灵敏度及快速性提出了更高的要求。直接竞争化学发光酶联免疫分析(Direct chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay, D-CLIA)技术将高灵敏的化学发光技术与免疫反应结合起来,该方法克服了传统的酶标记技术稳定性以及间接竞争反应操作复杂等缺点,具有灵敏度高、线性范围宽、操作简便、不需要十分昂贵的仪器设备等特点。

[0003] T-2毒素主要由镰刀菌属(三线镰刀菌和梨孢镰刀菌为主)产生的一种有毒代谢物,是单端孢霉烯族毒素中毒性最强的代表物。T-2毒素主要污染谷物类作物,尤其是在天气寒冷和潮湿的区域污染尤为严重。T-2毒素造成的污染已经遍及全球,对动物甚至人类的健康带来巨大的危害。近年来T-2毒素在全球范围频发,从世界各地的谷物样品中都曾检测到。欧盟食品科学委员会与2001年颁布一项临时标准,限定T-2毒素与其主要代谢物HT-2毒素总量的每日允许限量值为 $0.06\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d}$ 。联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)在日内瓦召开的联席会议上,将T-2毒素同黄曲霉毒素一样列为自然界存在的最危险的食品污染物之一。

[0004] 目前针对T-2毒素的检测主要有仪器分析方法、间接竞争酶联免疫法和生物学检测法等。仪器分析技术主要是基于高效液相色谱技术及液相色谱质谱联用技术,该方法灵敏度高,稳定性好。但是仪器分析技术需要复杂且价格昂贵的设备及训练有素的实验人员,该方法需要复杂的前处理技术,因此该方法在现场快速检测技术的应用方面有着很大的局限性。此外仪器分析在前处理过程中及色谱分离过程中需要用到大量的具有挥发性的有毒有害试剂,如甲醇、乙腈、乙酸乙酯、氯仿等,容易给实验人员造成危害。

[0005] 间接竞争酶联免疫法是一种基于抗原抗体特异性结合的免疫技术,相比仪器分析技术,该方法可以用于T-2毒素的现场快速检测,但是该方法主要是基于辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗技术进行间接竞争反应,利用标记酶催化四甲基联苯胺(TMB)底物显色对T-2毒素进行检测。间接竞争反应相比直接竞争反应多一步酶标二抗的结合过程,反应时间较长,导致检测效率受限;另一方面受底物TMB自身灵敏度的限制,该方法的灵敏度在一定的程度上有很大的局限性。

[0006] 生物学检测方法主要皮肤毒性试验、致呕吐试验、组织细胞培养试验等,这是检测毒素的存在与否及毒力强弱的最基本的方法,其能直观地反应毒素对细胞、组织和机体的作用。然后这种检测是极为不准确的,极易受到各种因素的干扰影响实验结果,产生假阳性

或者假阴性结果,因此目前很少使用。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种改良的高碘酸钠法制备酶标T-2毒素抗体及检测T-2毒素的直接竞争化学发光免疫快速检测方法。

[0008] 所述T-2毒素抗体为鼠抗T-2毒素IgG。

[0009] 所述酶为辣根过氧化物酶。

[0010] 所述包被原为T-2毒素与载体蛋白OVA的偶联物。

[0011] 所述化学发光底物由A液和B液组成,发光液A液为过硫酸钠溶液;发光液B液为鲁米诺溶液。

[0012] 本发明针对传统高碘酸钠法中还原剂 NaBH_4 不易保存的不足进行了改良,采用甲醇代替水来溶解 NaBH_4 ,因甲醇中氧气的溶解度非常低, NaBH_4 溶解在其中可以有效的隔绝氧气,延缓氧化过程。配制 NaBH_4 过饱和甲醇溶液,可进一步保证 NaBH_4 的还原性,因此可长期保存,避免在空气中被氧化,从而可以有效地克服 NaBH_4 溶液需要现用现配的缺陷。

[0013] 基于所制备的酶标T-2毒素抗体开发了直接竞争化学发光免疫检测法,该方法不需要复杂的前处理程序及昂贵的仪器设备,避免了由于设备所带来的不便于现场检测的缺陷,另外免疫反应仅需要微量的有机试剂,从而避免这些化学试剂给实验人员及环境所造成危害。直接竞争反应可以减少一步抗原-抗体反应,减少了实验所需的试剂,提高了检测效率,同时采用高灵敏度的化学发光底物试剂,可以极大程度的提高了反应的灵敏度,提高了检测能力。相比传统的检测技术,该方法可以用于T-2毒素现场的快速灵敏检测。

[0014] 本发明提供一种直接竞争化学发光免疫检测T-2毒素的方法,所述方法包括以下步骤:

[0015] (1) 制备抗体标记物

[0016] 使用高碘酸钠 NaIO_4 对辣根过氧化物酶HRP进行活化。

[0017] 进一步地,活化后的辣根过氧化物酶与T-2毒素抗体IgG进行偶联反应。

[0018] 进一步地,加入 NaBH_4 饱和甲醇溶液中进行还原反应,获得辣根过氧化物酶-T-2毒素抗体标记物。

[0019] (2) 包被T-2毒素酶标板

[0020] 使用碳酸盐缓冲液对包被原进行稀释,将稀释后的包被原进行酶标板包被。

[0021] 进一步地,采用洗涤液进行酶标板洗涤。

[0022] 进一步地,采用封闭液进行酶标板封闭,获得包被好的T-2毒素检测酶标板。置于20摄氏度保存备用。

[0023] (3) 直接竞争化学发光免疫检测

[0024] 将样品放置于T-2毒素包被酶标板各孔中,加入步骤(1)制备的抗体标记物,进行直接竞争反应;各孔加入化学发光底物,测定发光强度。

[0025] (4) 建立工作曲线方程

[0026] 选取无污染的空白谷物样品,然后准确称取若干份2.0g样品,分别置于50mL聚四氟乙烯管中,然后将向每份样品中加入10mL甲醇/PBS (60/40, v/v) 溶液,震荡、涡旋提取10min,4℃、9000g离心5min,取5mL上清液加入25mL PBS稀释,过0.45μm水相滤膜,得到空白

基质溶液。

[0027] 进一步地,以空白基质溶液稀释T-2毒素标准品,得到系列梯度浓度供试溶液。

[0028] 进一步地,依照步骤(3)的方法,以浓度取对数为横坐标,以样品百分发光值为纵坐标,绘制标准曲线。

[0029] (5)待测样品的T-2毒素定量检测

[0030] 称取若干份待测样品,待测样品加入甲醇/PBS (60/40, v/v) 溶液,震荡、涡旋提取、离心后,取上清溶液,稀释后经水相滤膜过滤,得到待测溶液。

[0031] 进一步地,采用步骤(3)的方法测定发光强度,将数值代入步骤(4)建立的工作曲线方程计算出待测样品中T-2毒素的含量。

[0032] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0033] 本发明的标记技术和检测方法具有突出的实质性特点和显著的进步,本发明中改良的高碘酸钠法克服了 NaBH_4 水溶液极易被氧化,不能长期保存的缺点,从而避免了该溶液现用现配的限制。

[0034] 本发明中的直接竞争化学发光免疫检测技术提高了检测效率和检测的灵敏度,在前期准备工作(酶标抗体制备及抗原包被封闭)完成以后,现场的检测时间减少了30min以上,整个检测过程的检测时间大大缩短,约40min即可完成。

[0035] 本发明采用高灵敏的鲁米诺化学发光底物替代传统的TMB底物,极大程度的提高了反应的灵敏度,本发明的检测限为 $5.80\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0036] 本发明通过建立工作曲线可以快速、准确的得到T-2毒素残留的浓度,降低了检测和计算的复杂程度,适用于广泛的基层检测工作的应用。

[0037] 本发明的其它特征和优点将在随后的说明书中阐述,并且,部分地从说明书中变得显而易见,或者通过实施本发明而了解。本发明的目的和其他优点可通过在说明书、权利要求书以及附图中所特别指出的结构来实现和获得。

附图说明

[0038] 附图用来提供对本发明技术方案的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本申请的具体实施方式一起用于解释本发明的技术方案,并不构成对本发明技术方案的限制。

[0039] 图1是本发明实施例1T-2毒素直接竞争化学发光免疫检测标准曲线。

[0040] 图2是本发明实施例2中T-2毒素的结构式。

具体实施方式

[0041] 下面将参照附图对本发明进行更详细的描述,其中表示了本发明的优选实施例,应该理解本领域技术人员可以修改在此描述的本发明而仍然实现本发明的有益效果。因此,下列描述应当被理解为对于本领域技术人员的广泛知道,而并不作为对本发明的限制。

[0042] 为了清楚,不描述实际实施例的全部特征。在下列描述中,不详细描述公知的功能和结构,因为它们会使本发明由于不必要的细节而混乱。应当认为在任何实际实施例的开发中,必须作出大量实施细节以实现开发者的特定目标。

[0043] 为使本发明的目的、特征更明显易懂,下面结合附图对本发明的具体实施方式作

进一步的说明。需要说明的是,附图均采用非常简化的形式且均使用非精准的比率,仅用于方便、清晰地辅助说明本发明实施例的目的。

[0044] 本实施例提供一种直接竞争化学发光免疫检测T-2毒素的方法,所述方法包括以下步骤:

[0045] 步骤A:制备辣根过氧化物酶-T-2毒素抗体标记物

[0046] (1) 称取5mg辣根过氧化物酶HRP溶解于1mL蒸馏水中;

[0047] (2) 向(1)中加入0.1M的NaIO₄溶液0.2mL,室温下避光搅拌20分钟,活化HRP;

[0048] (3) 将(2)转移至预处理过的透析袋中,置于1mM醋酸钠缓冲液(pH4.4)透析,4℃过夜;

[0049] (4) 称取10mgT-2毒素抗体IgG,溶于0.01M碳酸盐缓冲液中(pH8.0) 1mL;

[0050] (5) 取出溶液(3),加入0.2M碳酸盐缓冲液(PH9.5) 20μL,使以上醛基化的HRP的PH升高到9.0~9.5,迅速加入溶液(4),室温避光轻轻搅拌2小时进行偶联反应;

[0051] (6) 加0.1mL饱和NaBH₄溶液(甲醇溶解),混匀,4℃搅拌2小时,还原过量的醛基;

[0052] (7) 将上述液装入透析袋中,在PBS(0.15M,pH 7.4)透析,4℃过夜,即获得辣根过氧化物酶-T-2毒素抗体标记物。所获得的酶标抗体置于-20℃保存可用于后续的直接竞争免疫反应。

[0053] 步骤B:基于步骤A中制备的酶标T-2毒素抗体,建立检测T-2毒素的快速、灵敏的直接竞争化学发光免疫检测方法。

[0054] 步骤B1:直接竞争化学发光免疫检测方法

[0055] (1) 包被:用包被液将包被原稀释成一系列浓度加至酶标板,100μL/孔,37℃孵育2h;

[0056] (2) 洗涤:倾去孔内余液,用洗涤液洗3遍,300μL/孔,在吸水纸上拍干;

[0057] (3) 封闭:加入封闭液150μL/孔,37℃孵育1h,取出后直接拍干;

[0058] (4) 加样:各孔加入样品(标准品) 50μL/孔,加入步骤A制备的酶标抗体,50μL/孔,37℃孵育30min,进行直接竞争反应;

[0059] (5) 洗涤:同步骤(2);

[0060] (6) 测定:各孔加入鲁米诺化学发光底物50μL/孔,立即测定发光强度。

[0061] 步骤B2:建立工作曲线方程

[0062] (1) 选取无污染的空白谷物样品,然后准确称取若干份2.0g样品,分别置于50mL聚四氟乙烯管中,加入10mL甲醇/PBS(60/40,v/v)溶液,震荡、涡旋提取10min,4℃、9000g离心5min,取5mL上清液加入25mL PBS稀释,过0.45μm水相滤膜,得到空白基质溶液。

[0063] (2) 选取T-2毒素标准品储备液(甲醇溶解),然后用空白基质溶液稀释至梯度浓度的T-2毒素标准工作溶液以及不含T-2毒素的0标基质溶液,得到供试溶液。

[0064] (3) 各取50μL供试溶液,采用步骤B1方法进行测定,以浓度取对数为横坐标,以发光强度为纵坐标,使用Origin8.0软件进行四参数拟合,绘制标准曲线。

[0065] 步骤B3:待测样品的T-2毒素定性定量检测

[0066] (1) 取待测样品,然后准确称取若干份2.0g样品,分别置于50mL聚四氟乙烯管中。然后将向每份样品中加入10mLPBS溶液,震荡、涡旋提取10min,4℃、9000g离心5min,取上清液过0.45μm水相滤膜,得到待测溶液。

[0067] (2) 各取50 μ L待测溶液,采用步骤B1方法进行测定,测定发光强度。然后将测定样品的发光强度代入步骤B2建立的工作曲线方程计算出待测品中的T-2毒素的含量。

[0068] 上述检测方法中使用的各溶液均属于本领域的常规溶液,为进一步明确,现对溶液配方予以详细说明:

[0069] (1) PBS溶液:0.01mol/L,pH7.4磷酸盐缓冲液

NaCl 8.5 g

[0070]

KCl 0.02 g

Na₂HPO₄•12H₂O 2.9 g

[0071]

NaH₂PO₄•2H₂O 0.593 g

[0072] 加蒸馏水至1000mL

[0073] (2) 包被液:0.05mol/L,pH9.6的碳酸盐缓冲液(CB)

[0074] Na₂CO₃ 1.59g

[0075] NaHCO₃ 2.93g

[0076] 加蒸馏水至1000mL

[0077] (3) 封闭液

Na₂HPO₄•12H₂O 5.80 g

NaH₂PO₄•2H₂O 0.593 g

NaCl 8.0 g

[0078] Casin 2.50 g

蔗糖 50.0 g

小牛血清 50 mL

加蒸馏水至 1000 mL

[0079] (4) 洗涤液

NaCl 8.5 g

KCl 0.02 g

Na₂HPO₄•12H₂O 2.9 g

[0080]

NaH₂PO₄•2H₂O 0.593 g

Tween-20 0.5 mL

加蒸馏水至 1000 mL

[0081] (5) 鲁米诺化学发光底物

[0082] A液体:过硫酸钠贮备液0.1mol/L

[0083] B液体:Luminol储备液0.01mol/L:1.772g鲁米诺用0.1mol/L氢氧化钠溶液溶解,

定容至1L;

[0084] 使用前取等量的AB液混合。

[0085] 实施例1

[0086] 该实施例测定T-2毒素工作曲线与检出限,同时通过该实施例计算出工作曲线方程。

[0087] 工作曲线方程按如下所述建立:

[0088] 将空白谷物作为空白样品13份,样品匀质化处理,然后分别加10mL甲醇/PBS (60/40, v/v) 溶液,震荡、涡旋提取10min, 4℃、9000g离心5min,取5mL上清液加入25mL PBS稀释,过0.45μm水相滤膜,得到空白基质溶液。

[0089] 采用空白基质溶液配置系列浓度的空白样品T-2毒素基质加标标准品,初始浓度为10000ng/mL,依次三倍稀释,共11个浓度,最低浓度为0.169ng/mL,剩余1份作为不含T-2毒素的0标溶液,每个浓度做3个平行,得到供试品基质加标标准溶液。

[0090] 测定方法:用微量移液器分别抽取各浓度的供试品溶液50μL加入准备好的酶标板中(酶标抗体、包被、封闭完成),加入制备的酶标抗体,50μL/孔,37℃孵育30min,进行直接竞争反应,各孔加入鲁米诺化学发光底物50μL/孔,立即测定发光强度。

[0091] 使用origin8.0软件进行四参数拟合,绘制标准工作曲线(图1),IC₁₀为检测限,检测范围为IC₂₀-IC₈₀,结果见表1。

[0092] 表1谷物食品中T-2毒素的标准曲线、检测限及检测范围

[0093]

毒素	标准曲线	检测限 (μg/kg)	检测范围 (μg/kg)
T-2毒素	$Y = \{(0.8322 - 0.0623) / [1 + (X/0.3646)^{0.924}]\} + 0.0623$	5.80	10.13- 610.86

[0094] 实施例2

[0095] 准确度试验

[0096] 试验前,首先选取T-2毒素标准品,然后用乙腈溶解摇匀并定容制取T-2毒素标准溶液。

[0097] 供试品溶液的制备:选择无污染的谷物食品为空白样品,然后将样品匀质化处理,空白谷物食品(玉米、小麦)中添加一定量的T-2毒素标准溶液,使其在谷物中的浓度分别为40、200、1000μg/kg,每个浓度设置五个平行,混匀静置30min,然后将向每份样品中加入10mL甲醇/PBS (60/40, v/v) 溶液,震荡、涡旋提取10min, 4℃、9000g离心5min,取5mL上清液加入25mL PBS稀释,过0.45μm水相滤膜,得到待测溶液。

[0098] 测定方法:用微量移液器分别抽取各浓度的供试品溶液50μL加入T-2毒素包被的酶标板中,加入预先制备好的酶标抗体,50μL/孔,37℃孵育30min,进行直接竞争反应,各孔加入鲁米诺化学发光底物50μL/孔,立即测定发光强度。

[0099] 然后通过实施例1建立的工作曲线方程计算T-2毒素浓度,并计算回收率。谷物食品中T-2毒素添加回收率及变异系数见表2所示。

[0100] 表2谷物食品中T-2毒素添加回收率及变异系数

[0101]

谷物	毒素	添加浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)	日内变异系数 (n=5) (%)	日间变异系数 (n=3) (%)
大米	T-2 毒素	40	84.1~91.9	6.47	6.19
		200	89.6~108.5	10.8	13.7
		1000	72.0~91.7	4.68	5.67

[0102] 根据计算结果表明本方法应用于谷物食品中T-2毒素的平均回收率在72.0-108.5%之间,日内变异系数低于10.8%,日间变异系数低于13.7%。

[0103] 以上描述了本发明优选实施方式,然其并非用以限定本发明。本领域技术人员对在此公开的实施方案可进行并不偏离本发明范畴和精神的改进和变化。

[0104] 实施例3

[0105] 交叉反应率试验

[0106] 选择与T-2毒素有类似结构和类似功能的9种毒素测定交叉反应率。通过各种毒素的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。用下式计算该方法对其它类似的交叉反应率。

[0107] $\text{交叉反应率}(\%) = (\text{抑制}50\% \text{ T-2毒素的浓度} / \text{抑制}50\% \text{ 的T-2毒素类似物浓度}) \times 100\%$

[0108] 实验设3次重复,结果取平均数。

[0109] 表3T-2毒素检测的特异性

[0110]

No.	类似物	CR (%)
1	T-2	100
2	HT-2	113
3	T-2 triol	<0.01
4	T-2 tetraol	<0.01
5	NEO	< 0.01
6	NIV	26
7	DON	< 0.01
8	DOM-1	< 0.01
9	3-AcDON	< 0.01
10	15-AcDON	< 0.01

[0111] 实验结果表明,本发明所研制化学发光检测方法仅能识别T-2毒素及其代谢产物HT-2,而对其他毒素类似物的交叉反应可以忽略不计。本发明所用的抗体具有较好的广泛特异性,可用于谷物食品中T-2毒素、HT-2毒素的快速检测。

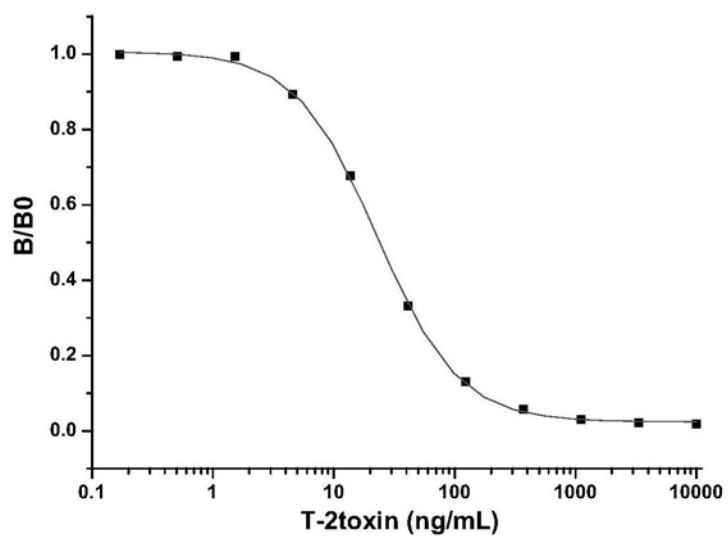


图1

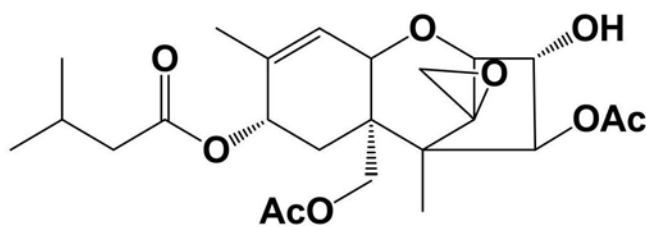
**T-2 toxin**

图2

专利名称(译)	一种T-2毒素直接竞争化学发光定性定量免疫分析方法		
公开(公告)号	CN110031628A	公开(公告)日	2019-07-19
申请号	CN201910343370.8	申请日	2019-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	烟台大学		
申请(专利权)人(译)	烟台大学		
当前申请(专利权)人(译)	烟台大学		
[标]发明人	李彦伸 袁智鹏 毛馨 尤艳莉		
发明人	李彦伸 袁智鹏 毛馨 尤艳莉		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/581		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种直接竞争化学发光免疫定性定量检测谷物中T-2毒素的方法。本发明的检测方法包括制备酶标T-2毒素抗体、直接竞争化学发光免疫检测、建立工作曲线方程和待测谷物样品的T-2毒素定量检测。本发明中改良的高碘酸钠法采用饱和NaBH₄甲醇溶液进行还原反应，克服了NaBH₄水溶液极易被氧化、不能长期保存的缺点，从而避免了该溶液现用现配的限制；直接竞争化学发光免疫检测技术提高了检测效率和检测的灵敏度；采用高灵敏的鲁米诺化学发光底物替代传统的TMB底物，极大程度的提高了反应的灵敏度；通过建立工作曲线可以快速、准确的得到样品中T-2毒素的浓度，降低了检测和计算的复杂程度，适用于广泛的基层检测工作的应用。

NaCl 8.5 g

KCl 0.02 g