



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106526167 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201610928188.5

C07K 14/47(2006.01)

(22)申请日 2016.10.31

C07K 16/14(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 王战辉 张素霞 史为民 曹明慧  
杨慧娟

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种青霉震颤素结合抗原及其抗体的制备与应用

(57)摘要

本发明公开了一种青霉震颤素结合抗原及其抗体的制备与应用。采用本发明的青霉震颤素酶联免疫试剂盒检测青霉震颤素对于青霉震颤素的特异性抗体与青霉震颤素包被原反应的半数抑制量( $IC_{50}$ )为100ng/mL,青霉震颤素的最低检测限为30ng/mL,青霉震颤素与黄曲霉素B1、环匹阿尼酸、呕吐毒素和黄绿青霉素样品的交叉反应率均小于0.1%。本发明提供的青霉震颤素酶联免疫试剂盒中青霉震颤素的特异性抗体具有高效价、高灵敏性和特异性强的特点,可用于快速、灵敏、简便地检测动物源性食品中青霉震颤素的残留量。

1. 一种检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒,包括青霉震颤素包被原和青霉震颤素的特异性抗体;所述青霉震颤素包被原是青霉震颤素与载体蛋白1的偶联物;所述青霉震颤素的特异性抗体为以青霉震颤素与载体蛋白2的偶联物为免疫原得到的多克隆抗体或单克隆抗体;所述载体蛋白1和所述载体蛋白2是相同或不同的载体蛋白。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述青霉震颤素包被原按照包括如下步骤的方法制备:将青霉震颤素与所述载体蛋白1进行偶联得到所述青霉震颤素包被原;

所述免疫原按照包括如下步骤的方法制备:将青霉震颤素与所述载体蛋白2进行所述偶联得到所述免疫原。

3. 根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述偶联通过Mannich反应实现。

4. 根据权利要求1-3中任一所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、猪源、兔源或豚鼠源抗体。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述载体蛋白1和所述载体蛋白2为牛血清白蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白、鼠血清白蛋白、甲状腺球蛋白或兔血清白蛋白。

6. 根据权利要求1-5中任一所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述载体蛋白1为血蓝蛋白;所述载体蛋白2为牛血清白蛋白。

7. 青霉震颤素结合抗原的制备方法,包括将青霉震颤素与权利要求1-6中任一所述载体蛋白1或权利要求1-6中任一所述载体蛋白2进行偶联得到青霉震颤素结合抗原,所述青霉震颤素结合抗原为权利要求1-6中任一所述青霉震颤素包被原或权利要求1-6中任一所述免疫原。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述偶联通过Mannich反应实现。

9. 下述1)-3)中任一所述产品:

1) 权利要求1-8中任一所述青霉震颤素包被原;

2) 权利要求1-8中任一所述免疫原;

3) 权利要求1-6中任一所述青霉震颤素的特异性抗体。

10. 下述1)-8)中任一所述应用:

1) 权利要求1-9中任一所述青霉震颤素包被原在制备青霉震颤素的特异性抗体中的应用;

2) 权利要求1-9中任一所述免疫原在制备青霉震颤素的特异性抗体中的应用;

3) 权利要求7或8所述方法在制备青霉震颤素的特异性抗体中的应用;

4) 权利要求1-6中任一所述的酶联免疫试剂盒在检测青霉震颤素中的应用;

5) 权利要求1-9中任一所述青霉震颤素包被原在检测青霉震颤素中的应用;

6) 权利要求1-9中任一所述免疫原在检测青霉震颤素中的应用;

7) 权利要求1-6中任一所述青霉震颤素的特异性抗体,或,权利要求9所述青霉震颤素的特异性抗体在检测青霉震颤素中的应用;

8) 权利要求7或8所述方法在检测青霉震颤素中的应用。

## 一种青霉震颤素结合抗原及其抗体的制备与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域中一种青霉震颤素结合抗原及其抗体的制备与应用。

### 背景技术

[0002] 青霉震颤素 (Penitrem A), 是一种由特定的曲霉属真菌 (Aspergillus)、麦角属真菌 (Claviceps) 和青霉属真菌 (Penicillium) 产生的真菌类神经毒素, 能够抑制平滑肌钾离子通道, 首次从引起羊神经症状的霉败饲料中分离得到, 主要侵害中枢神经, 使动物出现震颤、惊厥, 甚至死亡。

[0003] 目前检测青霉震颤素主要是采用仪器分析方法进行, 包括LC-UV、LC-MS和LC-MS-MS等分析方法, 但是这些仪器分析方法存在所需设备昂贵, 对工作人员技术要求高及检测前期处理步骤繁琐等不足之处, 不适用于大量样本的快速分析测定。基于抗原-抗体特异性反应的免疫分析检测技术是近年来在环境、食品安全检测领域被广泛应用的一种快速方便、高通量、低成本的检测技术, 已逐渐成为世界各国有毒有害残留物快速筛选检测的主要方法之一, 建立一种快速、灵敏、准确、简便地检测青霉震颤素残留量的免疫分析检测方法是当前亟待解决的问题。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是如何快速、准确、灵敏地检测青霉震颤素的残留量。

[0005] 为解决上述技术问题, 本发明首先提供了一种检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒。

[0006] 本发明所提供的检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒, 包括青霉震颤素包被原和青霉震颤素的特异性抗体; 所述青霉震颤素包被原是青霉震颤素与载体蛋白1的偶联物; 所述青霉震颤素的特异性抗体为以青霉震颤素与载体蛋白2的偶联物为免疫原得到的多克隆抗体或单克隆抗体; 所述载体蛋白1和所述载体蛋白2是相同或不同的载体蛋白。

[0007] 上述检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒中, 所述检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒还可包括酶标二抗, 所述酶标二抗中的标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶, 优选为辣根过氧化物酶, 辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或高碘酸钠法交联在二抗上; 所述二抗可为抗鼠或抗兔的抗体。

[0008] 上述检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒中, 所述青霉震颤素包被原可按照包括如下步骤的方法制备: 将青霉震颤素与所述载体蛋白1进行偶联得到所述青霉震颤素包被原; 所述免疫原可按照包括如下步骤的方法制备: 将青霉震颤素与所述载体蛋白2进行所述偶联得到所述免疫原。

[0009] 上述检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒中, 所述偶联通过Mannich反应实现。

[0010] 上述检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒中, 所述多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、猪源、兔源或豚鼠源抗体; 所述多克隆抗体具体可为鼠多克隆抗体。

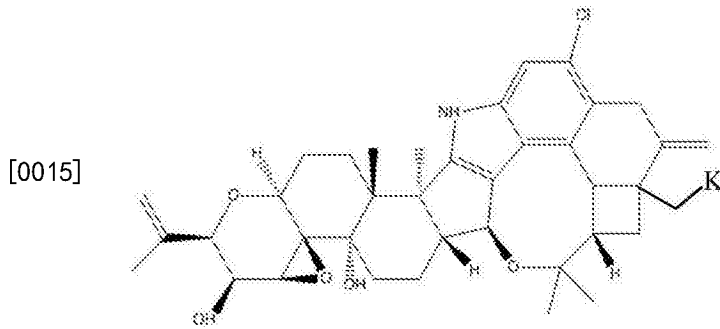
[0011] 上述检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒中, 所述单克隆抗体可为单克隆杂交瘤细

胞株分泌的单克隆抗体。

[0012] 上述检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒中,所述载体蛋白1和所述载体蛋白2可为牛血清白蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白、鼠血清白蛋白、甲状腺球蛋白或兔血清白蛋白;具体的,所述载体蛋白1可为血蓝蛋白,所述载体蛋白2可为牛血清白蛋白。

[0013] 为解决上述技术问题,本发明还提供了青霉震颤素结合抗原的制备方法。

[0014] 本发明所提供的青霉震颤素结合抗原的制备方法,包括将青霉震颤素与所述载体蛋白1或所述载体蛋白2进行偶联得到青霉震颤素结合抗原,所述青霉震颤素结合抗原为所述青霉震颤素包被原或所述免疫原。青霉震颤素结合抗原的结构如式I所示:



[0016] 式I中,K表示载体蛋白。

[0017] 上述青霉震颤素结合抗原的制备方法中,所述偶联通过Mannich反应实现。

[0018] 上文中,所述偶联具体可为在甲醛存在的条件下进行的Mannich反应。

[0019] 所述青霉震颤素结合抗原的制备方法还包括对所述青霉震颤素结合抗原进行纯化的步骤。

[0020] 所述青霉震颤素结合抗原的制备方法中,所述纯化可为将所述青霉震颤素结合抗原进行透析。

[0021] 所述青霉震颤素结合抗原的制备方法中,所述透析在pH为7.4、浓度为0.01M的PBS缓冲溶液中进行;所述透析在4℃进行。

[0022] 可作为固定青霉震颤素与载体蛋白的偶联物的载体的物质很多,如聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

[0023] 为解决上述技术问题,本发明还提供了下述1)-3)中任一所述产品:

[0024] 1) 任一所述青霉震颤素包被原;

[0025] 2) 任一所述免疫原;

[0026] 3) 任一所述青霉震颤素的特异性抗体。

[0027] 为解决上述技术问题,本发明还提供了下述1)-8)中任一所述应用:

[0028] 1) 任一所述青霉震颤素包被原在制备青霉震颤素的特异性抗体中的应用;

[0029] 2) 任一所述免疫原在制备青霉震颤素的特异性抗体中的应用;

[0030] 3) 所述青霉震颤素结合抗原的制备方法在制备青霉震颤素的特异性抗体中的应用;

[0031] 4) 任一所述的酶联免疫试剂盒在检测青霉震颤素中的应用;

[0032] 5) 任一所述青霉震颤素包被原在检测青霉震颤素中的应用;

[0033] 6) 任一所述免疫原在检测青霉震颤素中的应用;

[0034] 7) 任一所述青霉震颤素的特异性抗体在检测青霉震颤素中的应用;

[0035] 8) 所述青霉震颤素结合抗原的制备方法在检测青霉震颤素中的应用。

[0036] 本发明的检测原理为将青霉震颤素包被原吸附于固相载体上,加入样品和青霉震颤素的特异性抗体,再加入酶标二抗,待测样品中残留的青霉震颤素和固相载体上的青霉震颤素包被原竞争结合青霉震颤素的特异性抗体,显色后终止,测定样品吸光值,该值与样品中青霉震颤素残留物含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出青霉震颤素的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅,与系列浓度的青霉震颤素标准溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

[0037] 实验证明,采用本发明的青霉震颤素酶联免疫试剂盒检测青霉震颤素对于青霉震颤素的特异性抗体与青霉震颤素包被原反应的半数抑制量( $IC_{50}$ )为100ng/mL,青霉震颤素的最低检测限为30ng/mL,青霉震颤素与黄曲霉素B1、环匹阿尼酸、呕吐毒素和黄绿青霉素样品的交叉反应率均小于0.1%。本发明提供的青霉震颤素酶联免疫试剂盒中青霉震颤素的特异性抗体具有高效价、高灵敏性和特异性强的特点,可用于快速、灵敏、简便地检测动物源性食品中青霉震颤素的残留量。

#### 附图说明

[0038] 图1为青霉震颤素的化学结构式。

[0039] 图2为青霉震颤素结合抗原的质谱图。

#### 具体实施方式

[0040] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0041] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0042] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0043] 下述实施例中:青霉震颤素标准品为Sigma-Aldrich公司的产品,产品目录号为P265;黄曲霉素B1标准品为Sigma-Aldrich公司的产品,产品目录号为A6636;环匹阿尼酸标准品为Sigma-Aldrich公司的产品,产品目录号为C1530;呕吐毒素(脱氧雪腐镰刀菌烯醇)标准品为Sigma-Aldrich公司的产品,产品目录号为D0156;黄绿青霉素标准品为Sigma-Aldrich公司的产品,产品目录号为C2784;牛血清白蛋白为Sigma-Aldrich公司的产品,产品目录号为A1933;血蓝蛋白为Sigma-Aldrich公司的产品,产品目录号为H7017;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均为Sigma-Aldrich公司的产品,产品目录号分别为F-5881和F-5506。

[0044] 下述实施例中的BALB/c小鼠为北京维通利华实验动物技术有限公司产品,6-8周龄。

[0045] 下述实施例中的HRP-羊抗鼠IgG为美国Jackson immunoresearch公司的产品,产品目录号为115-035-003。

[0046] 下述实施例中的相关溶液如下:

[0047] 浓度为0.01M,pH值为7.4的PBS缓冲液的配制:8.5g NaCl、0.2g KCl、2.9g  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、0.59g  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ,1L去离子水。

[0048] 浓度为0.02M, pH值为7.4的PBS缓冲液的配制: 17g NaCl、0.4g KCl、5.8g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.18g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1L去离子水。

[0049] 包被缓冲液: 0.05mol/L的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH9.6), 溶剂为水, 溶质及其浓度如下:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g/L和 $\text{NaHCO}_3$  2.93g/L。

[0050] 洗涤液: 每1升洗涤液按照如下方法配制: 将0.5mL吐温20、5g叠氮化钠和990mL浓度为0.01M, pH值为7.4的磷酸盐缓冲液混合, 得到所述洗涤液。

[0051] 封闭液: 含有0.5% (体积百分含量) 小牛血清、5% (5g/100mL) 的蔗糖、1% (1g/100mL) 酪蛋白的0.02M的磷酸盐缓冲液, pH7.4。

[0052] 实施例1、检测青霉震颤素的酶联免疫试剂盒的制备

[0053] 1、青霉震颤素结合抗原的制备

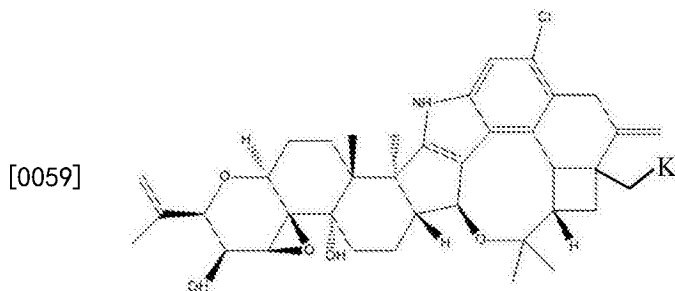
[0054] 青霉震颤素结合抗原按照包括如下步骤的方法制备: 将青霉震颤素与载体蛋白进行偶联得到青霉震颤素结合抗原, 载体蛋白为血蓝蛋白 (KLH) 或牛血清白蛋白 (BSA), 偶联通过Mannich反应实现。具体方法如下:

[0055] 将10mg的血蓝蛋白或15mg的牛血清白蛋白 (BSA) 溶解于2.0mL浓度为0.1mM, pH值为4.2的醋酸钠溶液中, 制备成浓度为5mg/mL的血蓝蛋白的醋酸钠溶液或浓度为7.5mg/mL的牛血清白蛋白的醋酸钠溶液。将2.0mg的青霉震颤素 (图1) 溶解于0.6mL溶剂中, 制备成浓度为3.33mg/mL的青霉震颤素溶液, 该溶剂是二甲基亚砜和37%的甲醛水溶液按照1:5的体积比混合得到的混合液。将0.6mL浓度为3.33mg/mL的青霉震颤素溶液加入到2.0mL浓度为5mg/mL的血蓝蛋白的醋酸钠溶液或浓度为7.5mg/mL的牛血清白蛋白的醋酸钠溶液中, 获得反应溶液; 将反应溶液于20-30°C条件下反应3h, 得到反应后的溶液。将反应后的溶液进行透析, 所用透析膜的截留分子量为10000-14000, 4°C在pH 7.4、浓度为0.01M的磷酸盐缓冲液中透析72h, 每12h换一次透析液, 收集透析袋中的溶液得到载体蛋白为血蓝蛋白的青霉震颤素结合抗原溶液和载体蛋白为牛血清白蛋白的青霉震颤素结合抗原溶液, 分装于安培瓶中, -20°C保存。

[0056] 2、青霉震颤素结合抗原的鉴定

[0057] 步骤1的载体蛋白为牛血清白蛋白的青霉震颤素结合抗原的质谱鉴定结果如图2: MALDI-TOF-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  实测值: 71985.432, 牛血清白蛋白的分子量为65718.633, 证明结合抗原合成的成功, 青霉震颤素的分子量为634.2, 其偶联率计算公式为: 偶联率 = (青霉震颤素结合抗原的分子量 - 牛血清白蛋白分子量) / 青霉震颤素的分子量。计算得到青霉震颤素结合抗原的偶联率为9.8, 即1个牛血清白蛋白与9.8个青霉震颤素偶联。

[0058] 上述鉴定结果表明青霉震颤素结合抗原的结构式如式I所示, K为牛血清白蛋白或血蓝蛋白:



式 I。

### [0060] 3、青霉震颤素多克隆抗体的制备

[0061] BALB/c小鼠10只,随机分成实验组和对照组(每组5只)。实验组:将步骤1的载体蛋白为牛血清白蛋白的青霉震颤素结合抗原作为青霉震颤素免疫原,第一次免疫时将青霉震颤素免疫原溶液采用包被缓冲液稀释,获得青霉震颤素免疫原稀释液。将0.6mL青霉震颤素免疫原稀释液与等体积的费式完全佐剂在室温下采用一次性注射器充分乳化,获得免疫用乳液。使用免疫用乳液通过颈背部皮下多点注射免疫BALB/c小鼠,每只BALB/c小鼠每次免疫剂量为100 $\mu$ g/只/次,其中,青霉震颤素免疫原的浓度以牛血清白蛋白计。随后每2周进行一次加强免疫,加强免疫用乳液为将0.6mL青霉震颤素免疫原稀释液与等体积的费式不完全佐剂进行充分乳化得到的,其余操作步骤均与第一次免疫时相同,共进行上述加强免疫操作4次。最后一次免疫的免疫液不加佐剂,其余操作步骤均与第一次免疫时相同。

[0062] 对照组以牛血清白蛋白(BSA)溶液(溶质为BSA,溶剂为包被缓冲液)进行免疫,免疫操作步骤与实验组完全相同。

[0063] 实验组与对照组分别进行免疫操作6次,在第6次免疫操作结束后7天,每组BALB/c小鼠进行眼眶静脉采血,每只小鼠采血量为150 $\mu$ L,采集的血液20-25 $^{\circ}$ C静置2h,然后置于4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜,4 $^{\circ}$ C放置结束后在4 $^{\circ}$ C、3500rpm离心10min,收集上清液,即获得青霉震颤素抗血清(来自实验组)和BSA抗血清(来自对照组),以免疫等体积的包被缓冲液的BALB/c小鼠血清作为阴性对照血清。

[0064] 分别将制备的青霉震颤素抗血清和BSA抗血清进行间接竞争ELISA分析(每孔均设三个重复孔)测定青霉震颤素抗血清的效价,具体步骤如下:

[0065] 1)包被:

[0066] 将步骤1的载体蛋白为血蓝蛋白的青霉震颤素结合抗原作为青霉震颤素包被原,用包被缓冲液溶解青霉震颤素包被原,得到如下浓度的青霉震颤素包被原溶液:1000ng/mL、500ng/mL、100ng/mL,每一浓度包被一行,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0067] 2)洗涤与封闭:倾去孔内包被原溶液,用洗涤液洗涤3次,每次3min;每孔加入150 $\mu$ L封闭液,37 $^{\circ}$ C恒温封闭1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min,得到酶标板。

[0068] 3)加样:将50 $\mu$ L采用包被缓冲液进行3倍倍比稀释的BALB/c小鼠抗血清(青霉震颤素抗血清或BSA抗血清)加到酶标板上反应,每孔100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min;然后向每孔中加入100 $\mu$ L HRP-羊抗鼠IgG,37 $^{\circ}$ C反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min。

[0069] 4)显色测定:每孔加入TMB溶液100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C显色20min,然后每孔加入50 $\mu$ L浓度为2M的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>以终止反应,最后用酶标仪测定各孔的OD<sub>450nm</sub>值。

[0070] ELISA分析中:空白对照孔中用高纯水代替BALB/c小鼠血清,作为空白对照;阴性对照以制备的阴性对照血清代替BALB/c小鼠血清。

[0071] 实验组:青霉震颤素抗血清对步骤1制备的浓度为500ng/mL的青霉震颤素包被抗原溶液的效价为1:5000。

[0072] 对照组:BSA抗血清,测定中均无显色反应,说明对照组未产生特异性针对步骤1制备的青霉震颤素包被抗原的抗血清。

[0073] 结果表明,用青霉震颤素免疫原免疫BALB/c小鼠,可以获得高效价的青霉震颤素抗血清。

[0074] 对青霉震颤素免疫原免疫BALB/c小鼠采用眼眶静脉取血,制备青霉震颤素抗血清,经硫酸铵分级沉淀得到纯化的青霉震颤素多克隆抗体。

[0075] 实施例2、青霉震颤素的酶联免疫试剂盒的灵敏度和特异性试验

[0076] 一、青霉震颤素的酶联免疫试剂盒的灵敏度试验

[0077] 用包被缓冲液稀释青霉震颤素标准品,制备成浓度分别为0、3、9、27、81、243和729ng/mL的青霉震颤素标准品溶液,作为实验溶液。采用6组平行试验(n=6)。

[0078] 用方阵滴定法确定实施例1制备的青霉震颤素包被原和实施例1制备的青霉震颤素多克隆抗体的工作浓度,青霉震颤素包被原的最佳稀释倍数为1:1000,青霉震颤素多克隆抗体的最佳稀释倍数为1:1000。

[0079] 进行如下实验:

[0080] 1、包被:用包被缓冲液稀释实施例1制备的青霉震颤素包被原,得到青霉震颤素包被原浓度为500ng/mL的青霉震颤素包被原溶液,用该青霉震颤素包被原溶液包被实验孔,100μL/孔,4℃过夜。

[0081] 2、洗涤与封闭:倾去孔内包被原溶液,用洗涤液洗涤3次,每次3min;每孔加入150μL封闭液,37℃恒温封闭1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min,得到酶标板。

[0082] 3、加样:

[0083] 3.1、标准品孔

[0084] 用包被缓冲液将实施例1的青霉震颤素多克隆抗体稀释1000倍得到青霉震颤素多克隆抗体稀释液,将50μL青霉震颤素多克隆抗体稀释液与50μL上述一种浓度的青霉震颤素标准品溶液加到酶标板上,37℃反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min;然后向每孔中加入100μL HRP-羊抗鼠1gG,37℃反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min。

[0085] 3.2、阴性对照孔

[0086] 与3.1的区别仅在于将青霉震颤素标准品溶液替换为等体积的高纯水,其它步骤不变。

[0087] 3.3、空白对照孔

[0088] 与3.1的区别仅在于将空白孔为将添加的青霉震颤素多克隆抗体稀释液替换为高纯水,其它步骤不变。

[0089] 4、显色测定:每孔加入TMB溶液100μL,20-30℃(如25℃)反应15min,然后每孔加入50μL浓度为2M的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>以终止反应,最后用酶标仪测定各孔的OD<sub>450nm</sub>值。

[0090] 以OD<sub>450nm</sub>值为纵坐标,以青霉震颤素标准品溶液浓度的log<sub>10</sub>值为横坐标,绘制半对数标准曲线图。标准曲线具有完整的反S形状,并具有上平台和下平台,标准曲线的平行测定次数6次,实验重复性良好,相对标准偏差(变异系数)均在20%以内。

[0091] 根据标准曲线得出10%抑制量和半数抑制量(IC<sub>50</sub>),比较检测灵敏度。

[0092] 抑制率用下式计算:

$$[0093] \quad \text{抑制率(\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\text{min}})}{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}})} \times 100\%$$

[0094] 式中:OD<sub>max</sub>为不加标准品时的吸光值(即阴性对照),OD<sub>x</sub>为标准品浓度为x时的吸光值,OD<sub>min</sub>为空白对照孔的吸光值。

[0095] 由ELISA方法的标准曲线可见,青霉震颤素对青霉震颤素多克隆抗体与青霉震颤素包被原反应的半数抑制量( $IC_{50}$ )为100ng/mL,最低检测限(LOD)为30ng/mL,在30-150ng/mL范围内,抑制率与青霉震颤素标准品溶液浓度的对数值呈显著的线性关系,相关系数为 $r=0.9982$ 。与未加青霉震颤素标准品溶液的阴性对照(未加青霉震颤素标准品溶液)相比,加入青霉震颤素标准品溶液后,吸光值呈明显的递减梯度,说明获得的青霉震颤素多克隆抗体能够特异性地识别青霉震颤素标准品,对青霉震颤素标准品具有较高的亲和力。

[0096] 二、青霉震颤素的酶联免疫试剂盒的特异性试验

[0097] 采用包被缓冲液分别溶解黄曲霉素B1标准品、环匹阿尼酸标准品、呕吐毒素标准品和黄绿青霉素标准品,分别制备成如下浓度梯度的溶液:0、3、9、27、81、243和729ng/mL,按照步骤一中的操作方法分别计算黄曲霉素B1、环匹阿尼酸、呕吐毒素和黄绿青霉素样品对青霉震颤素多克隆抗体与青霉震颤素包被原反应的半数抑制量( $IC_{50}$ )及青霉震颤素与黄曲霉素B1、环匹阿尼酸、呕吐毒素和黄绿青霉素样品的交叉反应率,交叉反应率的公式为:交叉反应率(%)=(引起青霉震颤素多克隆抗体与青霉震颤素包被原反应50%抑制的青霉震颤素的浓度/引起青霉震颤素多克隆抗体与青霉震颤素包被原反应50%抑制的其它物质的浓度) $\times 100\%$ 。实验设3次重复。

[0098] 结果表明,黄曲霉素B1、环匹阿尼酸、呕吐毒素和黄绿青霉素样品对青霉震颤素多克隆抗体与青霉震颤素包被原反应的半数抑制量( $IC_{50}$ )均大于100 $\mu$ g/mL,青霉震颤素与黄曲霉素B1、环匹阿尼酸、呕吐毒素和黄绿青霉素样品的交叉反应率均小于0.1%,无交叉反应,说明青霉震颤素多克隆抗体的特异性非常好。

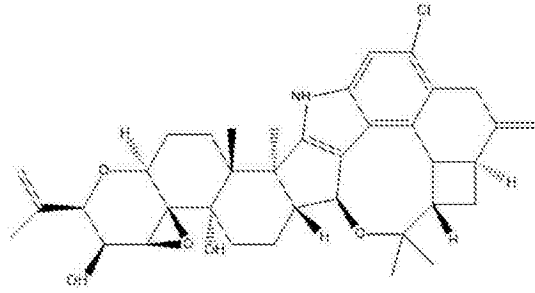


图1

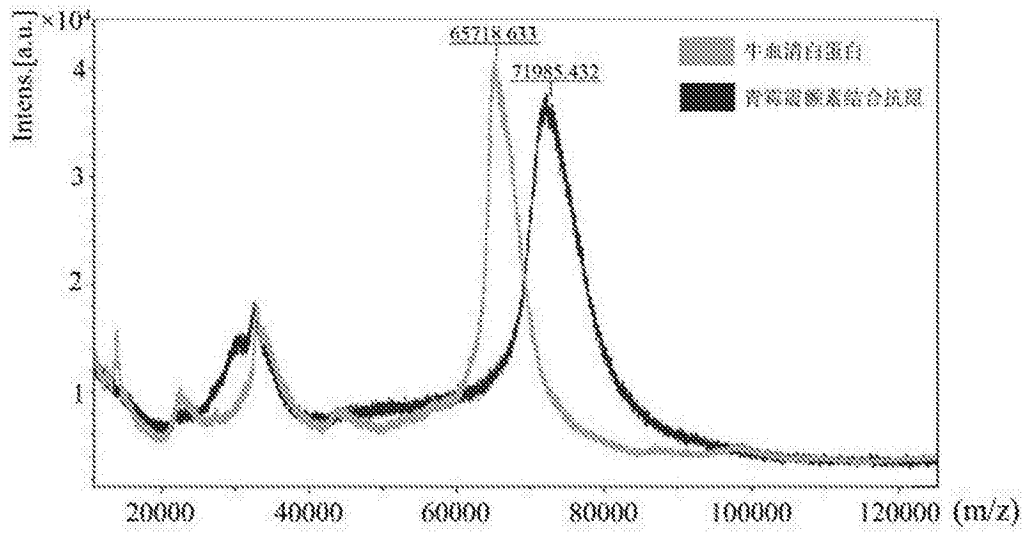
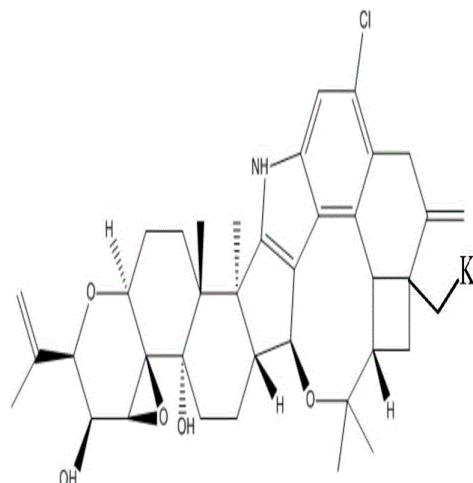


图2

专利名称(译)	一种青霉震颤素结合抗原及其抗体的制备与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106526167A</a>	公开(公告)日	2017-03-22
申请号	CN201610928188.5	申请日	2016-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 张素霞 史为民 曹明慧 杨慧娟		
发明人	王战辉 张素霞 史为民 曹明慧 杨慧娟		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 C07K14/795 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/47 C07K16/14		
CPC分类号	C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/14 C07K19/00 G01N33/531 G01N33/54353		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN106526167B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种青霉震颤素结合抗原及其抗体的制备与应用。采用本发明的青霉震颤素酶联免疫试剂盒检测青霉震颤素对于青霉震颤素的特异性抗体与青霉震颤素包被原反应的半数抑制量(IC50)为100ng/mL，青霉震颤素的最低检测限为30ng/mL，青霉震颤素与黄曲霉素B1、环匹阿尼酸、呕吐毒素和黄绿青霉素样品的交叉反应率均小于0.1%。本发明提供的青霉震颤素酶联免疫试剂盒中青霉震颤素的特异性抗体具有高效价、高灵敏性和特异性强的特点，可用于快速、灵敏、简便地检测动物源性食品中青霉震颤素的残留量。



式I;