



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110252429 A

(43)申请公布日 2019. 09. 20

(21)申请号 201910563255.1

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2019.06.26

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(71)申请人 国家粮食和物资储备局科学研究院

地址 100037 北京市西城区百万庄大街11号

(72)发明人 王松雪 叶金 轩志宏 张冰
李丽 吴宇

(74)专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有限公司 11577

代理人 杜立军 孙志一

(51)Int.Cl.

B01L 1/00(2006.01)

B01J 20/26(2006.01)

B01J 20/28(2006.01)

B01J 20/30(2006.01)

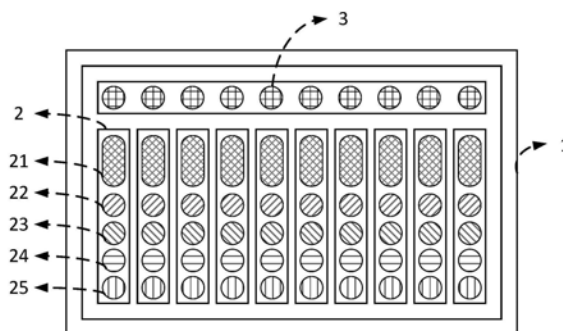
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒

(57)摘要

本发明实施例公开了一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒,所述试剂盒包括深孔板试剂条和磁棒套,所述深孔板试剂条包括多个黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条,用于实现多个通道的免疫磁珠的同时富集和转移。该试剂盒是一种高通量,操作简单,成本低,可自动化处理的黄曲霉毒素净化样品前处理试剂盒。



1. 一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括深孔板试剂条和磁棒套。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述深孔板试剂条包括多个黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条,用于实现多个通道的免疫磁珠的同时富集和转移。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条由依次排列的样品孔、磁珠孔、第一清洗孔、第二清洗孔和洗脱孔组成。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述样品孔中含有样品稀释液,用于放置样品提取液;所述样品稀释液包括水、PBS溶液或PBST溶液。

5. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述磁珠孔中含有黄曲霉毒素免疫磁珠溶液,其中含有黄曲霉毒素免疫磁珠,所述黄曲霉毒素免疫磁珠上包裹有用于特异性结合黄曲霉毒素的抗体。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述黄曲霉毒素免疫磁珠的制备方法如下:

(1) 取NHS磁珠放入离心管中,加入HCl溶液活化,利用磁吸附除去活化液后,加入含有黄曲霉毒素抗体的偶联缓冲液混匀,孵育2小时,进行抗体的偶联;

(2) 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔3分钟;用封闭液孵育2小时;

(3) 置于PBS缓冲液中4℃保存待用。

7. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述第一清洗孔中含有PBST溶液,其中PBST溶液中磷酸根的浓度为0.005-0.015M,且pH7.2-7.4;PBST溶液中吐温-20的体积含量为0.1%-0.3%。

8. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述第二清洗孔中含有PBS溶液,其中PBS溶液中磷酸根的浓度为0.005-0.015M,且pH7.2-7.4。

9. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述洗脱孔中含有毒素洗脱液,所述毒素洗脱液包括甲醇或乙腈,或含乙酸的甲醇或乙腈,或含甲酸的甲醇或乙腈,或甲醇或乙腈的水溶液。

10. 根据权利要求3-9中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述多个黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条上还分别覆盖有可移除的密封保护膜,用于将所述样品孔、磁珠孔、第一清洗孔、第二清洗孔和洗脱孔密封。

一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及试剂检测技术领域,具体涉及一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(AFT)是一类化学结构类似的化合物,均为二氢呋喃香豆素的衍生物。黄曲霉毒素是主要由黄曲霉(*aspergillus flavus*)寄生曲霉(*a.parasiticus*)等产生的次生代谢产物,广泛存在于各种食品和饲料中,对人体和动物的健康具有极大的危害。在湿热地区食品和饲料中出现黄曲霉毒素的机率最高。它们存在于土壤、动植物、各种坚果中,特别是容易污染花生、玉米、稻米、大豆、小麦等粮油产品,是霉菌毒素中毒性最大、对人类健康危害极为突出的一类。2017年10月27日,世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单初步整理参考,黄曲霉毒素在一类致癌物清单中。

[0003] 目前,黄曲霉毒素的检测方法主要包括酶联免疫试剂盒法、胶体金试纸条法、高效液相色谱法和高效液相色谱-质谱联用法。检测过程中样品的净化前处理过程尤为重要。免疫亲和柱是目前最为常用的前处理净化方法,其具有净化效果好,回收率高,稳定性好等优势,但其存在处理步骤复杂,柱筛板易堵,处理耗时,成本高,自动化难度大等问题。

[0004] 因此如何将上述问题加以解决,提供一种高效的黄曲霉毒素净化方法,尤其是使用方便、高效的净化用装置,即为本领域技术人员的研究方向所在。

发明内容

[0005] 本发明实施例的目的在于提供一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒,其是一种高通量,操作简单,成本低,可自动化处理的黄曲霉毒素净化样品前处理试剂盒。

[0006] 为实现上述目的,本发明实施例提供一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒,所述试剂盒包括深孔板试剂条和磁棒套。

[0007] 进一步的,所述深孔板试剂条包括多个黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条,用于实现多个通道的免疫磁珠的同时富集和转移。

[0008] 进一步的,所述黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条由依次排列的样品孔、磁珠孔、第一清洗孔、第二清洗孔和洗脱孔组成。

[0009] 进一步的,所述样品孔中含有样品稀释液,用于放置样品提取液。所述样品稀释液包括但不限于水、PBS溶液或PBST溶液。

[0010] 进一步的,所述磁珠孔中含有黄曲霉毒素免疫磁珠溶液,其中含有黄曲霉毒素免疫磁珠。

[0011] 进一步的,所述黄曲霉毒素免疫磁珠上包裹有用于特异性结合黄曲霉毒素的抗体。

[0012] 在一个实施方案中,所述黄曲霉毒素免疫磁珠的制备方法如下:

[0013] (1) 取NHS磁珠放入离心管中,加入HCl溶液活化,利用磁吸附除去活化液后,加入

含有黄曲霉毒素抗体的偶联缓冲液混匀, 孵育2小时, 进行抗体的偶联;

[0014] (2) 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次, 每次间隔3分钟; 用封闭液孵育2小时;

[0015] (3) 置于PBS缓冲液中4℃保存待用。

[0016] 进一步的, 步骤(1)中, 所述HCl溶液的浓度为1mM。

[0017] 进一步的, 步骤(2)中, 所述封闭液可以为乙酸铵、牛血清白蛋白(BSA)等。

[0018] 进一步的, 步骤(3)中, 所述PBS缓冲液含质量分数为0.02%的叠氮化钠。

[0019] 具体来说, 黄曲霉毒素包括AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、AFM1、AFM2等不同类型的, 本方法可以用于净化其中的一种或者多种, 根据毒素种类不同选择不同或全部的抗体。

[0020] 当样品提取液放入样品孔后, 利用含有磁棒的磁棒套将免疫磁珠转移至样品孔中, 利用不含有磁棒的磁棒套上下左右移动进行振荡, 利用免疫磁珠上包裹偶联的抗体结合目标物黄曲霉毒素。

[0021] 进一步的, 所述第一清洗孔中含有PBST溶液(磷酸盐吐温缓冲液)。其中PBST溶液中磷酸根的浓度为0.005-0.015M, 且pH 7.2-7.4; PBST溶液中吐温-20的体积含量为0.1%-0.3%。

[0022] 当样品孔中反应结束, 利用含有磁棒的磁棒套将免疫磁珠转移至第一清洗孔, 利用不含有磁棒的磁棒套上下移动进行振荡, 将免疫磁珠表面非特异性的吸附的杂质清洗。

[0023] 进一步的, 所述第二清洗孔中含有PBS溶液(磷酸盐缓冲液)。其中PBS溶液中磷酸根的浓度为0.005-0.015M, 且pH 7.2-7.4。

[0024] 当第一清洗孔中的清洗结束, 利用含有磁棒的磁棒套将免疫磁珠转移至第二清洗孔, 利用不含有磁棒的磁棒套上下移动进行振荡, 将免疫磁珠表面非特异性的吸附的杂质清洗。

[0025] 进一步的, 所述洗脱孔中含有毒素洗脱液。

[0026] 进一步的, 所述毒素洗脱液包括甲醇或乙腈, 或含乙酸的甲醇或乙腈, 或含甲酸的甲醇或乙腈, 或甲醇或乙腈的水溶液。

[0027] 当第二清洗孔中的清洗结束, 利用含有磁棒的磁棒套将免疫磁珠转移至洗脱孔, 利用不含有磁棒的磁棒套上下移动进行振荡, 将免疫磁珠吸附黄曲霉毒素洗脱, 利用含有磁棒的磁棒套将免疫磁珠转移至磁珠孔回收, 洗脱孔中剩余的含有黄曲霉毒素的毒素洗脱液用于后续黄曲霉毒素检测分析。

[0028] 在一个实施方案中, 所述多个黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条上还分别覆盖有可移除的密封保护膜, 用于将所述样品孔、磁珠孔、第一清洗孔、第二清洗孔和洗脱孔密封。

[0029] 在使用时, 可以手动或使用工具将所述密封保护膜移除, 从而保证了所述多个孔中的液体在使用前不受污染。

[0030] 由此, 所述的用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒包括多个深孔板试剂条和磁棒套, 通过试剂条提供样品稀释液、黄曲霉毒素免疫磁珠溶液, 磁珠清洗液和毒素洗脱液, 且使上述各液体在试剂条的各个对应的孔中, 从而提供用于毒素样品的稀释、净化、清洗和洗脱所需的全部试剂。

[0031] 本发明实施例具有如下优点:

[0032] 1、操作简单, 处理时间短;

[0033] 2、结合相关设备, 可以完全在无人值守的条件下完成批量黄曲霉毒素样品的自动

化净化前处理过程;

[0034] 3、减少了人为误差,提高结果准确性,降低前处理成本。

附图说明

[0035] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图仅仅是示例性的,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。

[0036] 本说明书所绘示的结构、比例、大小等,均仅用以配合说明书所揭示的内容,以供熟悉此技术的人士了解与阅读,并非用以限定本发明可实施的限定条件,故不具技术上的实质意义,任何结构的修饰、比例关系的改变或大小的调整,在不影响本发明所能产生的功效及所能达成的目的下,均应仍落在本发明所揭示的技术内容得能涵盖的范围内。

[0037] 图1为本发明一个实施例提供的用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒的结构示意图。

[0038] 图2为本发明一个实施例提供的黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条的结构示意图。

[0039] 其中附图标记为:

[0040] 1、试剂盒;2、黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条;21、样品孔;22、磁珠孔;23、第一清洗孔;24、第二清洗孔;25、洗脱孔;3、磁棒套。

具体实施方式

[0041] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0042] 实施例1

[0043] 本实施例中提供的用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒1包括深孔板试剂条(多个相同的黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条2)和磁棒套3。其中,每个黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条由依次排列的样品孔21、磁珠孔22、第一清洗孔23、第二清洗孔24和洗脱孔25组成。

[0044] 所述样品孔21中含有样品稀释液,用于放置样品提取液。所述磁珠孔22中含有黄曲霉毒素免疫磁珠溶液,其中含有黄曲霉毒素免疫磁珠,所述黄曲霉毒素免疫磁珠上包裹有用于特异性结合黄曲霉毒素的抗体。所述第一清洗孔23中含有PBST溶液(磷酸盐吐温缓冲液)。所述第二清洗孔24中含有PBS溶液(磷酸盐缓冲液)。所述洗脱孔25中含有毒素洗脱液,所述毒素洗脱液包括甲醇或乙腈,或含乙酸的甲醇或乙腈,或甲醇或乙腈的水溶液。

[0045] 所述多个黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条2上还分别覆盖有可移除的密封保护膜(未示出),用于将所述样品孔21、磁珠孔22、第一清洗孔23、第二清洗孔24和洗脱孔25密封。

[0046] 实验例1

[0047] 黄曲霉毒素免疫磁珠的制备

[0048] 1.取NHS磁珠放入离心管中,加入浓度为1mM的HCl溶液活化,反复三次,每次间隔5分钟,利用磁吸附除去活化缓冲液后,加入含有黄曲霉毒素抗体的偶联缓冲液混匀,孵育2

小时,进行抗体的偶联;

[0049] 2.用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔3分钟。用封闭液(乙酸铵或BSA)于37℃孵育2小时,

[0050] 3.置于含质量分数为0.02%叠氮化钠的PBS缓冲液中4℃保存待用。

[0051] 实验例2

[0052] 玉米样品中黄曲霉毒素的净化

[0053] (1)称取5g粉碎的玉米样品,装入20mL的离心管中,加入提取用溶液,放置在振荡器中振荡20分钟,静止2分钟,取上清液,即为样品提取液;

[0054] (2)撕去试剂条2上的保护膜,在样品孔21中加入0.5mL样品提取液;

[0055] (3)用不含有磁棒的磁棒套3插入试剂条2的磁珠孔22中,通过全自动免疫磁珠法纯化仪或手动上下移动进行振荡,将磁棒插入磁棒套3,吸附磁珠,将含有磁棒的吸附了磁珠的磁棒套3转移至样本孔21,磁棒移开;

[0056] (4)利用不含有磁棒的磁棒套3上下左右移动进行振荡,利用磁珠上偶联的抗体结合目标物黄曲霉毒素,振荡5分钟后,磁棒插入磁棒套3。

[0057] (5)利用含有磁棒的磁棒套3将磁珠转移至第一清洗孔23,利用不含有磁棒的磁棒套3上下移动进行振荡,将磁珠表面非特异性的吸附的杂质清洗。然后,利用含有磁棒的磁棒套3将磁珠转移至第二清洗孔24,利用不含有磁棒的磁棒套3上下移动进行振荡,将磁珠表面非特异性的吸附的杂质清洗。

[0058] (6)利用含有磁棒的磁棒套3将磁珠转移至洗脱孔25,利用不含有磁棒的磁棒套3上下移动进行振荡,将磁珠吸附的黄曲霉毒素洗脱,利用含有磁棒的磁棒套3将磁珠转移至磁珠孔22回收,洗脱孔25中剩余的毒素洗脱液用于后续黄曲霉毒素检测分析。

[0059] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

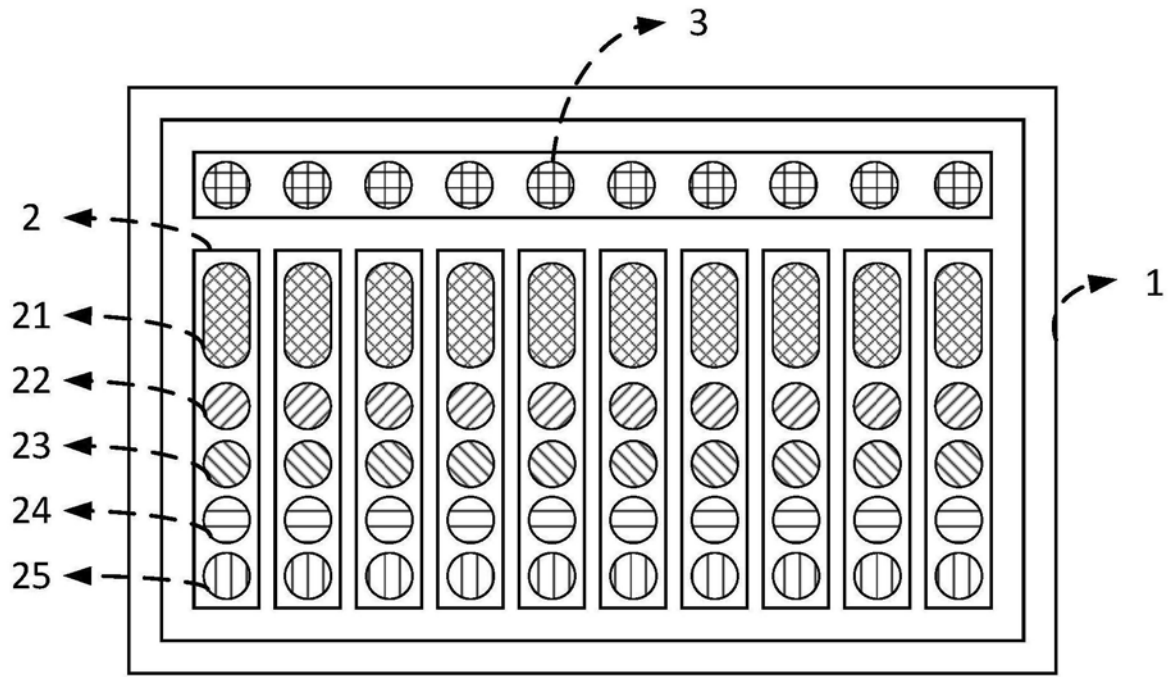


图1

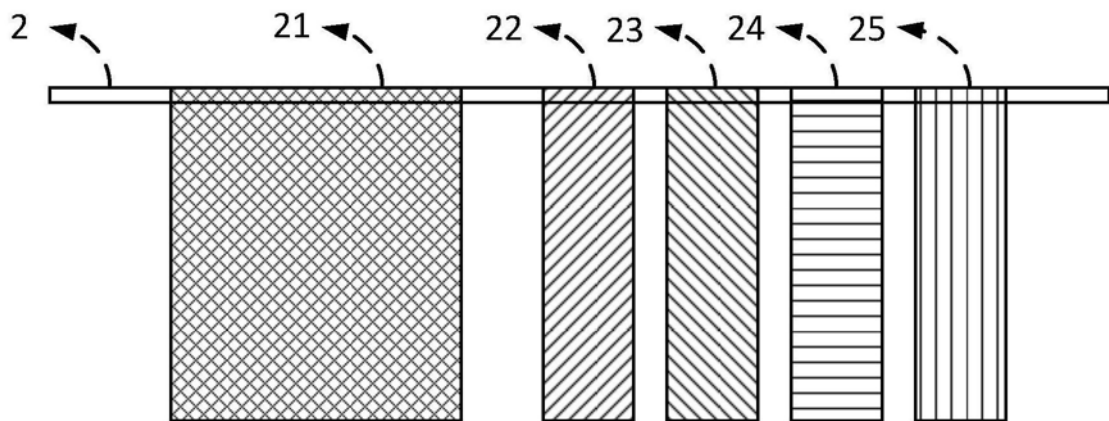


图2

专利名称(译)	一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒		
公开(公告)号	CN110252429A	公开(公告)日	2019-09-20
申请号	CN201910563255.1	申请日	2019-06-26
[标]发明人	王松雪 叶金 轩志宏 张冰 李丽 吴宇		
发明人	王松雪 叶金 轩志宏 张冰 李丽 吴宇		
IPC分类号	B01L1/00 B01J20/26 B01J20/28 B01J20/30 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	B01J20/26 B01J20/28009 B01J20/28019 B01L1/00 G01N33/5306 G01N33/532 G01N33/54326		
代理人(译)	杜立军 孙志一		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明实施例公开了一种用于黄曲霉毒素净化样品前处理的试剂盒，所述试剂盒包括深孔板试剂条和磁棒套，所述深孔板试剂条包括多个黄曲霉毒素免疫磁珠试剂条，用于实现多个通道的免疫磁珠的同时富集和转移。该试剂盒是一种高通量，操作简单，成本低，可自动化处理的黄曲霉毒素净化样品前处理试剂盒。

