



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101706496 A

(43) 申请公布日 2010. 05. 12

(21) 申请号 200910212585. 2

(22) 申请日 2009. 11. 13

(71) 申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路 20 号

(72) 发明人 黄飏 张珏 张艺 陈蕴 金坚

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/52(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

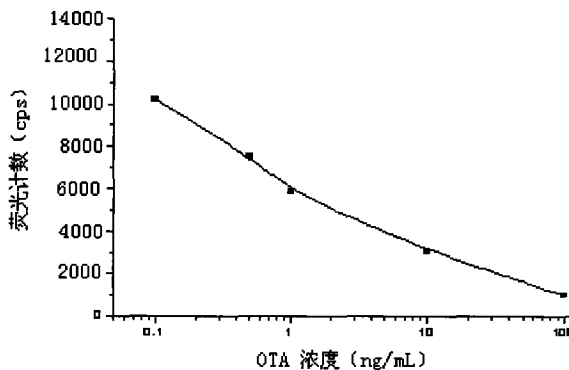
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种检测赭曲霉毒素 A 的试剂盒及其检测方法

## (57) 摘要

一种检测赭曲霉毒素 A 的试剂盒及其检测方法,属于光激化学发光免疫分析技术领域,用于对谷物,饲料及其制品中赭曲霉毒素 A(OTA) 含量的检测。本发明试剂盒的基础是均相标记免疫反应。取包被有 OTA-BSA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中,然后各孔顺序加入兔抗 OTA 抗体、生物素化羊抗兔抗体进行标记免疫反应;接着暗处加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应后检测光信号,在光激发下,通过单线态离子氧的产生和传递,给发光微粒产生荧光,用光激化学发光检测仪检测,光信号强度与样品中的 OTA 浓度成反比,对照标准曲线计算样品中的 OTA 含量。本发明试剂盒结构简单,操作简便、检测时间短、灵敏度高。



1. 一种检测赭曲霉毒素 A, 简称 OTA, 的光激化学发光免疫分析试剂盒, 其特征是由白色不透明微孔板 (1), 赭曲霉毒素 A 标准 (2), 连接赭曲霉毒素 A 人工抗原的发光微粒 (3), 兔抗赭曲霉毒素 A 的抗体冻干品 (4), 生物素化羊抗兔抗体冻干品 (5), 包被有链霉亲和素的感光微粒 (6) 组成。

2. 一种用权利要求 1 所述的试剂盒检测 OTA 的方法, 其特征是取包被有 OTA-BSA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板; 加入 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中, 然后各孔顺序加入兔抗 OTA 抗体、生物素化羊抗兔抗体进行标记免疫反应; 接着暗处加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应后检测光信号, 对照标准曲线计算样品中的 OTA 含量。

3. 根据权利要求 2 所述的检测 OTA 的方法, 其特征是操作为: 取 20  $\mu$  L 包被有 OTA-BSA 发光微粒加入到白色不透明微孔板; 加入 20  $\mu$  L 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中; 加 20  $\mu$  L 兔抗 OTA 抗体; 继续加入 20  $\mu$  L 生物素化羊抗兔抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟; 暗处加 175  $\mu$  L 包被有链霉亲和素的感光微粒, 37 $^{\circ}$ C 暗处孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号, 从标准曲线计算样品中的 OTA 含量。

## 一种检测赭曲霉毒素 A 的试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 一种检测赭曲霉毒素 A(OTA) 的试剂盒及其检测方法,属于光激化学发光免疫分析(LICLIA)技术领域,用于对谷物,饲料及其制品中 OTA 含量的检测。

### 背景技术

[0002] 赭曲霉毒素 A(OTA) 是真菌曲霉 ochraceous 和几种 Penicillium 真菌产生的一种毒素。OTA 已经被证明对动物及人的肾产生损害,也是一种致癌物质,霉菌毒素引起的中毒大多通过被霉菌污染的粮食,油料作物以及发酵食品等引起,而且霉菌毒素中毒往往表现为明显的地方性和季节性,临床表现较为复杂,有急性中毒、慢性中毒以及致癌、致畸和致突变等。OTA 在大多数谷物中均可分离到,包括大麦、小麦、燕麦、玉米、咖啡豆等,以这些谷物作为饲料的家禽也会受到污染,因此为了保障人们的健康,开展食品中 OTA 的卫生检测研究是很有必要的。

[0003] 目前 OTA 的测定方法有多种,如:薄层色谱法,高效液相色谱法,免疫测定法等。色谱法可以定性、定量,但其仪器设备昂贵,操作复杂且不适用于大批量样品的检测。免疫测定法由于其特异性强,灵敏度高,操作简便,不需直接接触毒素,且特别适于大批量样品的检测等优点而越来越被人们所重视和采用。

[0004] 光激化学发光免疫分析(LICLIA)是以纳米级高分子微粒为基础的新一代化学发光技术,该项技术将被广泛地应用于研究生物分子的相互作用。其主要原理是由光激发产生的均相化学发光技术。它具有快速、均相(免冲洗)、高灵敏和操作简单的特点。LICLIA 试剂由含有感光化合物的感光微粒和含有发光化合物的发光微粒组成,微粒直径约 188nm,表面覆盖多糖水凝胶。水凝胶能减少非特异性结合,同时,增加微粒的悬浮性。微粒通过水凝胶表面的功能团与生物分子共价连接。纳米级微粒大大增加了反应的表面积,每个微粒的表面包被着成百上千个生物分子,可捕获目标分子。

[0005] LICLIA 技术的核心原理是单线态氧的产生和传递。在受到红色激光(680nm)照射后,感光微粒能使周围环境中的氧转化为单线态氧,单线态氧的生存时间仅为 4 微秒。短暂的生存时间决定了单线态氧的传播直径很小(约为 200nm)。如果发光微粒在 200nm 范围之内就能接受单线态氧,并发出高能级的光(520nm-620nm)。相反,如果在 200nm 直径范围内没有发光微粒,单线态氧就会回落到基态氧而没有信号产生。这种依赖于两种微粒相互接近的化学能量传递是 LICLIA 均相反应的基础。通常在该反应体系中,微粒的浓度是很低的。两种微粒相互随机碰撞的几率很低,因此,反应体系的本底非常微弱。如果包被在微粒表面的生物分子相互作用,拉近了两个微粒的距离,例如形成免疫夹心复合物,这样就能产生能量的有效传递并发出光信号。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测 OTA 的试剂盒及其检测方法,用于对饲料,谷物及其制品中 OTA 含量的检测。

[0007] 本发明的技术方案：一种检测赭曲霉毒素 A，简称 OTA，的光激化学发光免疫分析试剂盒，由白色不透明微孔板 (1)，赭曲霉毒素 A 标准 (2)，连接赭曲霉毒素 A 人工抗原的发光微粒 (3)，兔抗赭曲霉毒素 A 的抗体冻干品 (4)，生物素化羊抗兔抗体冻干品 (5)，包被有链霉亲和素的感光微粒 (6) 组成。

[0008] 用所述的试剂盒检测 OTA 的方法，取包被有 OTA-BSA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板；加入 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，然后各孔顺序加入兔抗 OTA 抗体、生物素化羊抗兔抗体进行标记免疫反应；接着暗处加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应后检测光信号，对照标准曲线计算样品中的 OTA 含量。

[0009] 所述的检测 OTA 的方法，其操作为：取 20  $\mu$  L 包被有 OTA-BSA 发光微粒加入到白色不透明微孔板；加入 20  $\mu$  L 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中；加 20  $\mu$  L 兔抗 OTA 抗体；继续加入 20  $\mu$  L 生物素化羊抗兔抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟；暗处加 175  $\mu$  L 包被有链霉亲和素的感光微粒，37 $^{\circ}$ C 暗处孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号，从标准曲线计算样品中的 OTA 含量。

[0010] 本发明的有益效果：该检测试剂盒结构简单，操作简便、检测时间短、灵敏度高。

#### 附图说明

[0011] 图 1：检测赭曲霉毒素 A 的试剂盒示意图。1、白色不透明微孔板，2、OTA 标准，3、连接 OTA 人工抗原的发光微粒，4、兔抗 OTA 的抗体冻干品，5、生物素化羊抗兔抗体冻干品，6、包被有链霉亲和素的感光微粒。

[0012] 图 2：OTA-LICLIA 反应示意图。

[0013] 图 3：OTA-LICLIA 标准曲线图。

#### 具体实施方式

[0014] 实施例 1 制备试剂盒和检测玉米样品

[0015] 包被有 OTA 人工抗原的发光微粒制备：

[0016] 在离心管中加入 1mg 发光微粒，加入 12.5  $\mu$  L、质量浓度 1% Tween-20，0.05mg OTA-BSA 人工抗原，10  $\mu$  L 硼氢化氰钠，用 pH 6.0、0.1M 的 2-(N-吗啉) 乙磺酸 (MES) 缓冲液将体积补充到 200  $\mu$  L，37 $^{\circ}$ C 避光振荡反应 48 小时。加入 10  $\mu$  L pH 5.0、0.3M 的羧甲氧基胺半盐酸盐 (CMO) 溶液封闭未结合位点，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 小时后离心，分离得到已连接 OTA-BSA 的发光微粒，稀释后备用。

[0017] 试剂的配制：

[0018] 标准 OTA 试剂的配制：标准 OTA：0ng/mL，0.1ng/mL，0.5ng/mL，1ng/mL，10ng/mL，100ng/mL，从 OTA 纯品中稀释得到，稀释液为甲醇：水体积比 3：7。

[0019] 试剂盒的组成：

[0020] (1). 白色不透明微孔板 (12 条  $\times$  8 孔，可以拆分为单孔)。

[0021] (2). 1 $\times$  包被有 OTA 人工抗原的发光微粒：2mL。

[0022] (3). 6 $\times$  OTA 标准液，1.0ml/瓶，标准液浓度为：0，0.1，0.5，1，10，100ng/mL。

[0023] (4). 1 $\times$  兔抗 OTA 抗体冻干品，用时 2mL 蒸馏水溶解。

[0024] (5). 1 $\times$  生物素化羊抗兔抗体冻干品，用时 2mL 蒸馏水溶解。

[0025] (6). 1× 包被有链霉亲和素的感光微粒 :20mL。

[0026] 测定时注意事项

[0027] 1. 使用之前将所有试剂回升至室温 (18-30℃)。

[0028] 2. 使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃。

[0029] 3. 在所有恒温孵育过程中避免光线照射,用盖子盖住微孔。

[0030] 具体检测步骤如下:

[0031] 先将样品进行处理:将玉米样品粉碎至 20 目,取 5 克样品放在试管中,加入提取液 12.5mL(甲醇:水=7:3)。加塞振荡 3 分钟,过滤,滤纸采用新华 1 号纸。取 1mL 滤液用 1mL 蒸馏水或去离子水进行稀释,备用。

[0032] 取 20 μL 包被有 OTA-BSA 发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 20 μL 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中;加 20 μL 兔抗 OTA 抗体;继续加入 20 μL 生物素化羊抗兔抗体,37℃ 孵育 15 分钟;暗处加 175 μL 包被有链霉亲和素的感光微粒,37℃ 暗处孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号,从标准曲线计算样品中的 OTA 含量。结果见表 1,由标准曲线求得该例样品所含 OTA 浓度为 0.13ng/mL。

[0033] 表 1

OTA 标准点							样品玉米
OTA 浓度 (ng/mL)	0	0.1	0.5	1	10	100	0.13
荧光值 (cps)	12523	10201	7521	5852	3059	998	9675

[0035] 实施例 2 大麦样品测定

[0036] 试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同,用于检测大麦样品。

[0037] 具体检测步骤如下:

[0038] 先将大麦样品进行处理:将大麦样品粉碎至 20 目,取 5 克样品放在试管中,加入提取液 12.5mL(甲醇:水=7:3)。加塞振荡 3 分钟,过滤,滤纸采用新华 1 号纸。取 1mL 滤液用 1mL 蒸馏水或去离子水进行稀释,备用。

[0039] 取 20 μL 包被有 OTA-BSA 发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 20 μL 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中;加 20 μL 兔抗 OTA 抗体;继续加入 20 μL 生物素化羊抗兔抗体,37℃ 孵育 15 分钟;暗处加 175 μL 包被有链霉亲和素的感光微粒,37℃ 暗处孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号,从标准曲线计算样品中的 OTA 含量。结果见表 2,由标准曲线求得该例样品所含 OTA 浓度为 0.35ng/mL。

[0040] 表 2

[0041]

OTA 标准点							样品大麦
OTA 浓度 (ng/ml)	0	0.1	0.5	1	10	100	0.35
荧光值 (cps)	15323	12108	8798	6751	3852	1127	9489



图 1

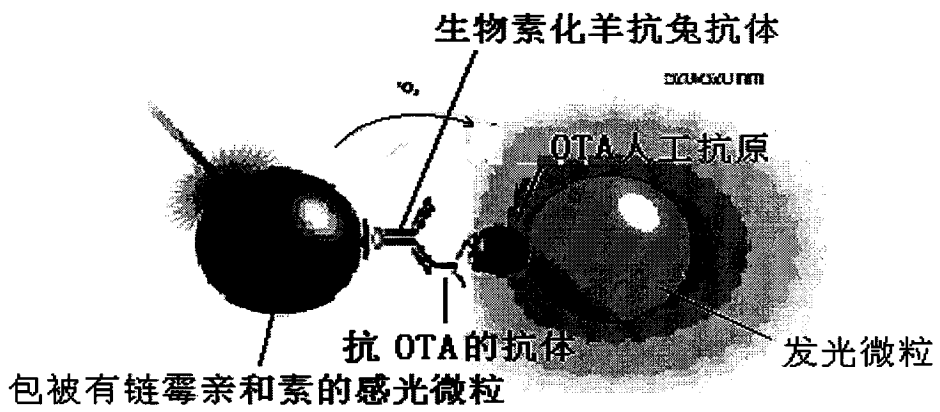


图 2

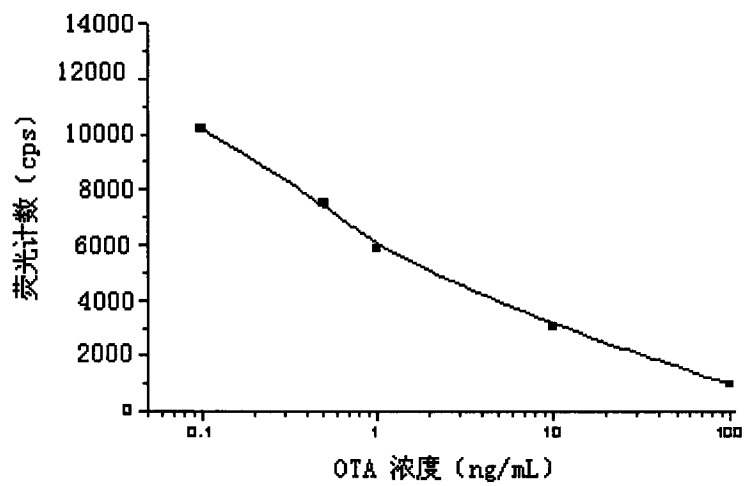


图 3

专利名称(译)	一种检测赭曲霉毒素A的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101706496A</a>	公开(公告)日	2010-05-12
申请号	CN200910212585.2	申请日	2009-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	黄飏 张珏 张艺 陈蕴 金坚		
发明人	黄飏 张珏 张艺 陈蕴 金坚		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/52 G01N21/64		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测赭曲霉毒素A的试剂盒及其检测方法，属于光激化学发光免疫分析技术领域，用于对谷物，饲料及其制品中赭曲霉毒素A(OTA)含量的检测。本发明试剂盒的基础是均相标记免疫反应。取包被有OTA-BSA的发光微粒加入到白色不透明微孔板；加入OTA标准或处理好的样品到各自的微孔中，然后各孔顺序加入免抗OTA抗体、生物素化羊抗兔抗体进行标记免疫反应；接着暗处加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应后检测光信号，在光激发下，通过单线态离子氧的产生和传递，给发光微粒产生荧光，用光激化学发光检测仪检测，光信号强度与样品中的OTA浓度成反比，对照标准曲线计算样品中的OTA含量。本发明试剂盒结构简单，操作简便、检测时间短、灵敏度高。

