



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106290889 A

(43)申请公布日 2017.01.04

(21)申请号 201610679285.5

(22)申请日 2016.08.16

(71)申请人 广东产品质量监督检验研究院  
地址 510110 广东省广州市开发区科学城  
揽月路80号

(72)发明人 李江 綦艳 李晓明 陈满英  
黎丁滔 黄志刚 田秀梅

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理  
有限公司 44224  
代理人 李海恬 万志香

(51)Int.Cl.  
G01N 33/577(2006.01)  
G01N 33/535(2006.01)

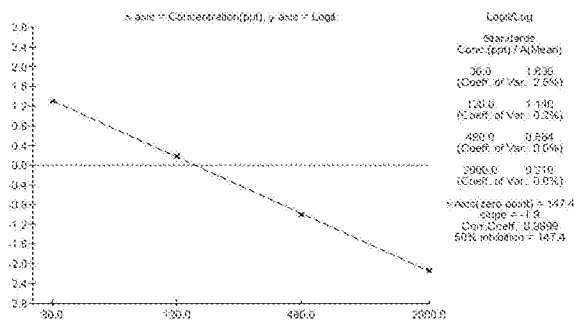
权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

黄曲霉毒素B1的检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种黄曲霉毒素B1的检测方法，属于酶联免疫吸附测定技术领域。该检测方法包括以下步骤：前处理：以提取溶液对待测样品进行提取，随后加入稀释液，得到待检溶液；所述提取溶液为体积百分浓度为40%–100%的甲醇水溶液和/或乙腈，所述稀释液为水或缓冲盐水溶液；检测：取所述待检溶液，加入到包被了黄曲霉毒素B1抗原的酶标板上，再加入黄曲霉毒素B1抗体溶液，温育，加入辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗进行酶活性的放大，洗板，加入底物显色剂、终止液，然后以酶标仪测定吸光度值，计算得到待测样品中黄曲霉毒素B1的含量。该检测方法避免了氮吹等前处理步骤，具有步骤简单，稳定性好的优点。能够快速检出黄曲霉毒素B1的残留量。



1. 一种黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

前处理:以提取溶液对待测样品进行提取,随后加入稀释液,得到待检溶液;所述提取溶液为体积百分浓度为40%-100%的甲醇水溶液和/或乙腈,所述稀释液为水或缓冲盐水溶液;

检测:取所述待检溶液,加入到包被了黄曲霉毒素B1抗原的酶标板上,再加入黄曲霉毒素B1抗体溶液,温育,加入酶标二抗进行酶活性的放大,洗板,加入底物显色剂、终止液,然后以酶标仪测定吸光度值,计算得到待测样品中黄曲霉毒素B1的含量。

2. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,所述黄曲霉毒素B1抗体溶液中黄曲霉毒素B1抗体的浓度为10-30ng/mL,且该黄曲霉毒素B1抗体溶液中还包括浓度为0.2-0.4g/100ml的氯化钙。

3. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,所述酶标二抗是浓度按1:1000的比例稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗。

4. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,当所述待测样品为富含色素的食品,所述提取溶剂为乙腈,所述稀释液为pH6-7的磷酸盐缓冲液;

当所述待测样品为低色素食品,所述提取溶剂为体积百分浓度为40-100%的甲醇水溶液,所述稀释液为水。

5. 根据权利要求4所述的黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,所述富含色素的食品为酱油、紫米或红米,所述低色素食品为花生、谷物、植物油、醋、酒、花生酱、饼干、蛋糕、豆粉、核桃粉、辣椒粉、饲料、辣椒酱或豆瓣酱;

当所述待测样品为酱油、紫米或红米,按照每克待测样品加入1.5-2.5ml提取溶剂的量进行提取,提取后,过滤,取滤液,按照滤液:稀释液体积比为1:8-10的量加入稀释液,即得待检溶液;

当所述待测样品为花生、谷物、植物油、醋、酒、花生酱、饼干、蛋糕、豆粉、核桃粉、辣椒粉或饲料,按照每克待测样品加入4-6ml提取溶剂的量进行提取,提取后,过滤,取滤液,按照滤液:稀释液体积比为1:3-5的量加入稀释液,即得待检溶液。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,所述酶标板上包被的黄曲霉毒素B1抗原的浓度为30-90ng/mL,所述黄曲霉毒素B1抗体与黄曲霉毒素B1抗原的用量比为1:3-9。

7. 根据权利要求6所述的黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,所述黄曲霉毒素B1抗原为黄曲霉毒素B1与载体蛋白的偶联物,所述黄曲霉毒素B1抗体为鼠源单克隆抗体。

8. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,所述黄曲霉毒素B1抗体溶液中还包括浓度为8-12g/100ml的牛血清白蛋白,浓度为0.05-0.09g/100ml的硫柳汞钠,且该黄曲霉毒素B1抗体溶液的pH值为5.5-6.5。

9. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素B1的检测方法,其特征在于,所述黄曲霉毒素B1抗原通过以下方法制备得到:

(1)黄曲霉毒素B1的活化:将黄曲霉毒素B1与羧甲基羟胺半盐酸盐溶解于吡啶中,使其反应,得到黄曲霉毒素B1的活化物;

(2)黄曲霉毒素B1完全抗原合成:采用N,N-二环己基碳酰亚胺法合成黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原;

所述黄曲霉毒素B1抗体通过以下方法制备得到：

(1)动物免疫：

以上述得到的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原作为免疫原对小鼠进行免疫；

(2)细胞融合：

免疫后，取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合；

(3)单克隆抗体的制备：

采用体内诱生法制备黄曲霉毒素B1单克隆抗体，并以辛酸-硫酸铵法提纯腹水，提纯后即得黄曲霉毒素B1单克隆抗体。

10. 根据权利要求9所述的黄曲霉毒素B1的检测方法，其特征在于，所述步骤(1)黄曲霉毒素B1的活化中，称取2.5mg黄曲霉毒素B1与25mg羧甲基羟胺半盐酸盐溶解于2ml吡啶中，25℃避光振荡反应24h，得到黄曲霉毒素B1的活化物；

所述步骤(2)黄曲霉毒素B1完全抗原合成中，称取500mg牛血清白蛋白溶于2ml 0.23mol/L的碳酸氢钠溶液，制成5%的牛血清白蛋白活化液，取2mg黄曲霉毒素B1的活化物、2.146mgN,N-二环己基碳酰亚胺和1.186mg N-羟琥珀酰亚胺酯，溶解于无水四氢呋喃，30℃振荡24h，然后4000r/min，离心15min，并用无水四氢呋喃洗涤沉淀，然后将上清液合并，待上清液中的四氢呋喃挥发完全后，将残留物溶于0.2mL二甲基甲酰胺中，并将此溶液缓慢滴加到活化的牛血清白蛋白中，置于磁力搅拌器上，避光室温反应过夜，反应产物在4℃搅拌下用磷酸盐缓冲液透析3天d，每天换液3-6次，透析后得到纯化的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原；

所述步骤(1)动物免疫中，以上述得到的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原作为免疫原对6-8周龄的雌性BALB/c小鼠进行免疫；首次免疫用100μg黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量完全福氏佐剂混匀，腹腔注射；2周后用60μg黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量不完全福氏佐剂混匀后，腹腔注射；此后每隔2周用50μg免疫原黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量不完全福氏佐剂混匀，腹腔注射，四次后加强免疫一次，待进行细胞融合；

所述步骤(2)细胞融合中，取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0以8:1体积比混合，用50%聚乙二醇作融合剂，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，选择强阳性、抑制率高的克隆化，之后扩大培养、建株，得到分泌抗体的单克隆细胞株；

所述步骤(3)单克隆抗体的制备中，将分泌抗体的单克隆细胞株混悬液注射到小鼠腹腔中，收集腹水，经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化，即得黄曲霉毒素B1单克隆抗体。

## 黄曲霉毒素B1的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫吸附测定技术领域,特别是涉及一种黄曲霉毒素B1的检测方法。

### 背景技术

[0002] 目前酱油、醋等食品中黄曲霉毒素B1的检测方法主要有化学分析法、仪器分析法、免疫分析法和生物传感器法等。

[0003] 其中,化学分析法中最常用的是薄层层析法,薄层层析法(TCL)利用的是某些真菌毒素(如黄曲霉毒素)在特定波长下能够显示荧光的特点。此法较经济,对设备和检验人员要求不高,但不能准确定量。

[0004] 仪器分析法主要有高压液相色谱法(HPLC)和液相色谱-质谱法(LC-MS)等。仪器分析法所用所需仪器价格和检测费用昂贵,需专人操作,准确度高、应用广泛。

[0005] 免疫分析法主要有胶体金免疫层析法(GICA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)。酶联免疫吸附法目前发展较为成熟,利用免疫试纸条可以进行定性测定,而酶联免疫吸附测定方法能够定量测定。酶联免疫吸附测定方法操作简便,成本较低,简单培训后即可检测,且高敏的检测产品检出限高于仪器方法,有机溶剂使用量少,污染小,对实验人员的危害也相对较小,检测结果相对稳定,在食品安全检测领域如乳品、粮食等有较为广泛的应用。

[0006] 目前,酶联免疫吸附法测定酱油、醋中的黄曲霉毒素已有报道,也有部分相关的产品,但其样品的前处理过程较为复杂,均采用三氯甲烷等高毒性有机溶剂,同时需氮吹处理,原因在于酱油中的色素及高含盐量对检测体系会产生干扰而导致检测结果不准确,因此需用三氯甲烷等有机溶剂进行萃取后氮吹复溶进行测定。但是,这样的前处理方法操作时间较长,氮吹处理过程需严格监控,很容易导致回收率出现波动。

### 发明内容

[0007] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种黄曲霉毒素B1的检测方法,采用该方法,能够避免氮吹等前处理步骤,既简化了操作步骤,又提高了检测方法的稳定性。

[0008] 一种黄曲霉毒素B1的检测方法,包括以下步骤:

[0009] 前处理:以提取溶液对待测样品进行提取,随后加入稀释液,得到待检溶液;所述提取溶液为体积百分浓度为40%-100%的甲醇水溶液和/或乙腈,所述稀释液为水或缓冲盐水溶液;

[0010] 检测:取所述待检溶液,加入到包被了黄曲霉毒素B1抗原的酶标板上,再加入黄曲霉毒素B1抗体溶液,温育,加入酶标二抗进行酶活性的放大,洗板,加入底物显色剂、终止液,然后以酶标仪测定吸光度值,计算得到待测样品中黄曲霉毒素B1的含量。

[0011] 本发明人经过长期的研究后发现,ELISA反应体系对低浓度的甲醇和乙腈耐受性较好,在此基础上,本发明人进行了大量的实验尝试,最终发现在前处理时,以体积百分浓度为40%-100%的甲醇水溶液和/或乙腈作为提取溶液,再加入水或缓冲盐水溶液作为稀

释液,从而获得待检溶液的方法,具有步骤简单,稳定性好的优点。

[0012] 在其中一个实施例中,所述黄曲霉毒素B1抗体溶液中黄曲霉毒素B1抗体的浓度为10-30ng/mL,且该黄曲霉毒素B1抗体溶液中还包括浓度为0.2-0.4g/100ml的氯化钙。本发明人在研究中发现,在抗体溶液中存在低浓度的氯化钙,能够提高检测体系的灵敏度。

[0013] 在其中一个实施例中,所述酶标二抗是浓度按1:1000的比例稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗。上述酶标二抗具有最佳的酶活性放大效果。

[0014] 在其中一个实施例中,当所述待测样品为富含色素的食品,所述提取溶剂为乙腈,所述稀释液为pH6-7的磷酸盐缓冲液;

[0015] 当所述待测样品为低色素食品,所述提取溶剂为体积百分浓度为40-100%的甲醇水溶液,所述稀释液为水。

[0016] 当待测样品为酱油等富含色素的食品时,采用pH6-7的磷酸盐缓冲液作为稀释液时样品的回收率最好,且不同样品间的差异较小。

[0017] 在其中一个实施例中,所述富含色素的食品为酱油、紫米或红米,所述低色素食品为花生、谷物、植物油、醋、酒、花生酱、饼干、蛋糕、豆粉、核桃粉、辣椒粉、饲料、辣椒酱或豆瓣酱;

[0018] 当所述待测样品为酱油、紫米或红米,按照每克待测样品加入1.5-2.5ml提取溶剂的量进行提取,提取后,过滤,取滤液,按照滤液:稀释液体积比为1:8-10的量加入稀释液,即得待检溶液;

[0019] 当所述待测样品为花生、谷物、植物油、醋、酒、花生酱、饼干、蛋糕、豆粉、核桃粉、辣椒粉或饲料,按照每克待测样品加入4-6ml提取溶剂的量进行提取,提取后,过滤,取滤液,按照滤液:稀释液体积比为1:3-5的量加入稀释液,即得待检溶液。

[0020] 在其中一个实施例中,所述酶标板上包被的黄曲霉毒素B1抗原的浓度为30-90ng/mL,所述黄曲霉毒素B1抗体与黄曲霉毒素B1抗原的用量比为1:3-9。

[0021] 在其中一个实施例中,所述黄曲霉毒素B1抗原为黄曲霉毒素B1与载体蛋白的偶联物,所述黄曲霉毒素B1抗体为鼠源单克隆抗体。

[0022] 在其中一个实施例中,所述黄曲霉毒素B1抗体溶液中还包括浓度为8-12g/100ml的牛血清白蛋白,浓度为0.05-0.09g/100ml的硫柳汞钠,且该黄曲霉毒素B1抗体溶液的pH值为5.5-6.5。

[0023] 在其中一个实施例中,所述黄曲霉毒素B1抗原通过以下方法制备得到:

[0024] (1)黄曲霉毒素B1的活化:将黄曲霉毒素B1与羧甲基羟胺半盐酸盐溶解于吡啶中,使其反应,得到黄曲霉毒素B1的活化物;

[0025] (2)黄曲霉毒素B1完全抗原合成:采用N,N-二环己基碳酰亚胺法合成黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原;

[0026] 所述黄曲霉毒素B1抗体通过以下方法制备得到:

[0027] (1)动物免疫:

[0028] 以上述得到的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原作为免疫原对小鼠进行免疫;

[0029] (2)细胞融合:

[0030] 免疫后,取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合;

[0031] (3)单克隆抗体的制备:

[0032] 采用体内诱生法制备黄曲霉毒素B1单克隆抗体,并以辛酸-硫酸铵法提纯腹水,提纯后即得黄曲霉毒素B1单克隆抗体。

[0033] 在其中一个实施例中,所述步骤(1)黄曲霉毒素B1的活化中,称取2.5mg黄曲霉毒素B1与25mg羧甲基羟胺半盐酸盐溶解于2ml吡啶中,25℃避光振摇反应24h,得到黄曲霉毒素B1的活化物;

[0034] 所述步骤(2)黄曲霉毒素B1完全抗原合成中,称取500mg牛血清白蛋白溶于2ml 0.23mol/L的碳酸氢钠溶液,制成5%的牛血清白蛋白活化液,取2mg黄曲霉毒素B1的活化物、2.146mgN,N-二环己基碳酰亚胺和1.186mg N-羟琥珀酰亚胺酯,溶解于无水四氢呋喃,30℃震荡24h,然后4000r/min,离心15min,并用无水四氢呋喃洗涤沉淀,然后将上清液合并,待上清液中的四氢呋喃挥发完全后,将残留物溶于0.2mL二甲基甲酰胺中,并将此溶液缓慢滴加到活化的牛血清白蛋白中,置于磁力搅拌器上,避光室温反应过夜,反应产物在4℃搅拌下用磷酸盐缓冲液透析3天d,每天换液3-6次,透析后得到纯化的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原;

[0035] 所述步骤(1)动物免疫中,以上述得到的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原作为免疫原对6-8周龄的雌性BALB/c小鼠进行免疫;首次免疫用100μg黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量完全福氏佐剂混匀,腹腔注射;2周后用60μg黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量不完全福氏佐剂混匀后,腹腔注射;此后每隔2周用50μg免疫原黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量不完全福氏佐剂混匀,腹腔注射,四次后加强免疫一次,待进行细胞融合;

[0036] 所述步骤(2)细胞融合中,取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0以8:1体积比混合,用50%聚乙二醇作融合剂,采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液,选择强阳性、抑制率高的克隆化,之后扩大培养、建株,得到分泌抗体的单克隆细胞株;

[0037] 所述步骤(3)单克隆抗体的制备中,将分泌抗体的单克隆细胞株混悬液注射到小鼠腹腔中,收集腹水,经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化,即得黄曲霉毒素B1单克隆抗体。

[0038] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0039] 本发明的一种黄曲霉毒素B1的检测方法,在前处理时,以体积百分浓度为40%-100%的甲醇和/或乙腈水溶液作为提取溶液,再加入水或缓冲盐水溶液作为稀释液,从而获得待检溶液的方法,避免了氮吹等前处理步骤,具有步骤简单,稳定性好的优点。能够快速检出黄曲霉毒素B1的残留量。

[0040] 并且,该检测方法还对所用的各抗原、抗体和各试剂成分进行了优化筛选,进一步提高了该检测方法的灵敏度、准确性和稳定性。

## 附图说明

[0041] 图1为实施例2中检测辣椒酱分析结果中标准品的CS曲线图;

[0042] 图2为实施例2中检测辣椒酱分析结果中标准品的LL曲线图;

[0043] 图3为实施例3中检测酒类样本分析结果中标准品的CS曲线图;

[0044] 图4为实施例3中检测酒类样本分析结果中标准品的LL曲线图。

## 具体实施方式

[0045] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0046] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0047] 实施例1

[0048] 一种黄曲霉毒素B1的检测方法,包括以下步骤:

[0049] 一、前处理。

[0050] 以提取溶液对待测样品进行提取,在本实施例中,所述待测样品为酱油。

[0051] 具体前处理方法为:称取5.0g有代表性的样品置入50mL聚苯乙烯离心管中,分别加入不同比例的不同提取溶液与其混合;于振荡器上剧烈振荡10分钟,转速为150r/min(或涡旋5min以上);取液体于4000r/min离心5min(或静置3min,再用定量滤纸过滤);取上清或滤液0.5mL,再按不同比例加入稀释液,得到待检溶液。待检溶液振荡5s或手摇匀,取50 $\mu$ L进行分析。

[0052] 二、检测。

[0053] 取所述待检溶液,加入到包被了黄曲霉毒素B1抗原的酶标板上,再加入黄曲霉毒素B1抗体溶液,温育后洗板,加入酶标二抗进行酶活性的放大,再次洗板,加入底物显色剂、终止液,然后以酶标仪测定吸光度值,计算得到待测样品中黄曲霉毒素B1的含量。

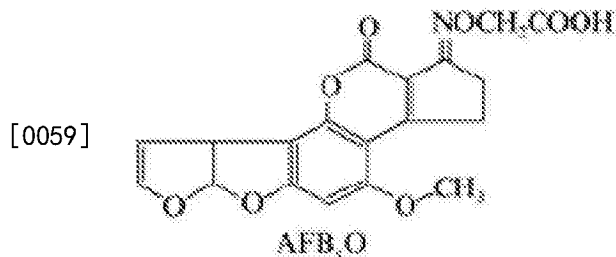
[0054] 1、试剂组成。

[0055] 在本实施例中,检测所用试剂盒包括以下成分:

[0056] 1)包被有黄曲霉毒素B1抗原的酶标板,包被抗原的稀释度为1:10000(即包被的黄曲霉毒素B1抗原的浓度为47ng/mL)。

[0057] 上述黄曲霉毒素B1抗原通过以下方法制备得到:

[0058] A、AFB<sub>1</sub>(黄曲霉毒素B1)的活化:称取2.5mg AFB<sub>1</sub>与25mg羧甲基羟胺半盐酸盐CMO溶解于2ml吡啶中,25 $^{\circ}$ C避光振摇反应24h,得到黄曲霉毒素B1的活化物,此活化物直接用于UV和质谱进行鉴定,确认为如下结构式的产物:



[0060] 注:AFB<sub>1</sub>O指黄曲霉毒素B1的活化物。

[0061] B、AFB<sub>1</sub>完全抗原合成:采用N,N-二环己基碳酰亚胺法合成黄曲霉毒素B1-牛血清

白蛋白人工抗原。具体为：称取500mg牛血清白蛋白溶于2ml 0.23mol/L的碳酸氢钠溶液，制成5%的牛血清白蛋白活化液，取2mg黄曲霉毒素B1的活化物、2.146mgN,N-二环己基碳酰亚胺和1.186mg N-羟琥珀酰亚胺酯，溶解于无水四氢呋喃，30℃震荡24h，然后4000r/min，离心15min，并用无水四氢呋喃洗涤沉淀，然后将上清液合并，待上清液中的四氢呋喃挥发完全后，将残留物溶于0.2mL二甲基甲酰胺中，并将此溶液缓慢滴加到活化的牛血清白蛋白中，置于磁力搅拌器上，避光室温反应过夜，反应产物在4℃搅拌下用磷酸盐缓冲液透析3天d，每天换液3-6次，透析后得到纯化的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原(AFB1-BSA)。

[0062] 上述包被有黄曲霉毒素B1抗原的酶标板的制备：

[0063] 用包被稀释液将黄曲霉毒素抗原(AFB1-BSA)稀释1/10000倍，每孔加入100 $\mu$ l，4℃温育16-18h，倾去包被液，用洗涤液洗涤2次，间隔10秒，排干。然后每孔加入200 $\mu$ L的封闭液，37℃温育2h，倾去孔内液体排干，干燥后用铝箔袋真空密封保存。

[0064] 2)、黄曲霉毒素B1抗体：6mL/瓶，抗体稀释液为PH6.0的水溶液，其中牛血清含量为10%，硫柳汞钠含量为0.07%，氯化钙含量为0.4%；工作浓度为1:100000(即黄曲霉毒素B1抗体的浓度为20ng/mL)。

[0065] 上述黄曲霉毒素B1抗体通过以下方法制备得到：

[0066] A、动物免疫：

[0067] 以上述得到的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原作为免疫原对6-8周龄的雌性BALB/c小鼠进行免疫；首次免疫用100 $\mu$ g黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量完全福氏佐剂混匀，腹腔注射；2周后用60 $\mu$ g黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量不完全福氏佐剂混匀后，腹腔注射；此后每隔2周用50 $\mu$ g免疫原黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白人工抗原与等量不完全福氏佐剂混匀，腹腔注射，四次后加强免疫一次，3d后取脾细胞进行融合。

[0068] B、细胞融合：

[0069] 免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)以8:1体积比混合，用50%聚乙二醇(PEG)作融合剂，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，选择强阳性、抑制率高的克隆化，之后扩大培养、建株、反复冻存与复苏，从而保证单克隆细胞分泌抗体的稳定性。

[0070] C、单克隆抗体的制备：

[0071] 采用体内诱生法制备黄曲霉毒素B1单克隆抗体，具体为，将分泌抗体的单克隆细胞株混悬液注射到小鼠腹腔中，收集腹水，并以辛酸-硫酸铵法提纯腹水，提纯后即得黄曲霉毒素B1单克隆抗体。提纯后采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，评价得到纯化效果较好。

[0072] 3)、酶标二抗：6mL/瓶，酶标二抗为辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗，稀释液为PH6.0的水溶液，其中牛血清含量20%，硫柳汞钠含量0.1%，氯化钙含量0.4%；工作浓度为1:1000。

[0073] 4)、黄曲霉毒素B1的标准品：5瓶，浓度分别为0 $\mu$ g/kg、0.03 $\mu$ g/kg、0.12 $\mu$ g/kg、0.48 $\mu$ g/kg、2 $\mu$ g/kg；标品稀释液为含10%甲醇0.01mol/LPH值6.5的磷酸盐缓冲液。

[0074] 5)、底物液：底物A，取无水乙酸钠8.2g，过氧化氢脲428.6mg，加超纯水定容至1000ml；调PH值至5.0，底物液B，取TMB溶于10mDMSO中，棕色瓶保存，使用时底物液A与底物液B1:1混合使用。

[0075] 6)、终止液:2mol/mL硫酸。

[0076] 7)浓缩洗涤液:40mL/瓶,浓度为0.1-0.2mol/LPH值为7.2-7.4的磷酸盐缓冲液,其中吐温-20含量1%-2%。

[0077] 8)、样品稀释液:0.02mol/LPH6.5磷酸盐缓冲液。

[0078] 2、操作步骤。

[0079] 1)加标准品/样品:加入标准品或样品50 $\mu$ L到对应的微孔中,加入辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗50 $\mu$ L/孔,再加入黄曲霉毒素B1抗体溶液50 $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境中反应30min。

[0080] 2)洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤液300 $\mu$ L/孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。

[0081] 3)显色:加入底物液A液50 $\mu$ L/孔,再加底物液B液50 $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境反应15min。

[0082] 4)测定:加入终止液50 $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处(建议用双波长450/630nm检测,请在5min内读完数据),测定每孔OD值。

[0083] 5)以样品OD值计算得到黄曲霉毒素B1的含量。

[0084] 具体方法如下:

[0085] A、百分吸光率的计算,标准品或样品的百分吸光率等于标准品或样品的吸光度值的平均值(双孔以上)除以第一个标准(0标准)的吸光度值,再乘以100%,即:百分吸光度值(%)=B/B<sub>0</sub>×100%

[0086] B—标准溶液或样品溶液的平均吸光度值

[0087] B<sub>0</sub>—0( $\mu$ g/kg)标准溶液的平均吸光度值

[0088] B、标准曲线的绘制与计算:以标准品百分吸光率为纵坐标,以黄曲霉毒素B<sub>1</sub>标准品浓度( $\mu$ g/kg)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样品的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>实际量。

[0089] 三、检测结果。

[0090] 1、发明人经过研究发现,ELISA反应体系能够对乙腈的耐受最大浓度为10%,为进一步减少样品基质的干扰及有机溶剂对ELISA反应体系的影响,同时考虑检测方法的灵敏度,将样品提取方法定为1:2提取,1:9水稀释进行实验,考察提取比例为1:2,稀释1:9水稀释条件下不同提取溶剂加标回收率,结果如下表所示。

[0091] 表1.不同提取溶剂,提取比例为1:2,稀释1:9水稀释条件下不同提取溶剂加标回收率

[0092] 

提取溶剂	加标浓度(ppb)	检测值(ppt)	回收率
------	-----------	----------	-----

[0093]

60%甲醇	0	1710.1	/
	2	4327.7	130.9%
	5	8924.5	144.3%
80%甲醇	0	1542.8	/
	2	3744.9	110.1%
	5	7696	123.1%
纯甲醇	0	1021.2	/
	2	3847.4	141.3%
	5	7953.1	138.6%
60%乙腈	0	232.5	/
	2	6314.5	304.1%
	5	17286.8	341.1%
80%乙腈	0	229.7	/
	2	3564.6	166.7%
	5	8950.5	174.4%
纯乙腈	0	179.1	/
	2	2426.6	112.4%
	5	6326.5	122.9%

[0094] 从上述结果中可以看出,当采用80%甲醇和纯乙腈提取时,回收率在可以接受的范围内,但80%甲醇提取的条件下样品(阴性)本底偏高在1.542ppb,检测结果假阳性,因此确采用纯乙腈为提取溶剂。

[0095] 2、为使检测结果更加准确,对提取比例和稀释比例进行优化,考虑方法检出限不能过高的原因,因此提取比例选取1:1;1:2;1:3进行实验,结果如下表所示。

[0096] 表2.不同提取比例,稀释比例固定为1:9条件下的检测结果

[0097]

提取溶剂	提取及稀释比例	加标浓度 (ppb)	检测值 (ppt)	回收率	稀释倍数
纯乙腈	1:1 提取 1:9 稀释	0	0.1	/	10 倍
		2	2402.3	120.1%	
		5	7759.6	155.2%	
	1:2 提取 1:9 稀释	0	0	/	20 倍
		2	2102.3	105.1%	

[0098]

		5	5107.1	102.1%	
		0	0	/	
	1:3 提取 1:9 稀释	2	3137.7	156.9%	30 倍
		5	6972.8	139.5%	

[0099] 从上述结果可以看出,提取比例为1:2,稀释比例为1:9的条件下结果最好,且整个方法的稀释倍数也不大为20倍,检出限满足使用要求。

[0100] 3、由于试剂盒反应体系能够耐受不超过10%有机溶剂体系,需对稀释比例进行确认,分别采用了四种稀释方式进行测定,结果如下表所示。

[0101] 表3.不同稀释比例条件下样品的检测结果

[0102]

提取方法	稀释比例	加标浓度(ppb)	检测值(ppt)	回收率	样品稀释倍数
纯乙腈 1:2 提取	1:5 稀释	0	315.4	/	12 倍
		2	3765.9	172.50%	
		5	8689.8	167.50%	
	1:9 稀释	0	0.3	/	20 倍
		2	2479.2	123.90%	
		5	5416.9	108.30%	
	1:15 稀释	0	144.8	/	32 倍
		2	2625.9	124.10%	
		5	5700.1	111.10%	
	1:19 稀释	0	0.5	/	40 倍
		2	2252.9	112.60%	
		5	7023.7	140.50%	

[0103] 从上述结果可以看出,当稀释比例为1:5时(样品有机溶剂含量超过10%)回收率偏高,方法不适用;而当稀释比例增大回收率影响不大,考虑方法检出限因此确定稀释比例为1:9。

[0104] 4、本发明人还对比了抗体溶液中存在低浓度的氯化钙和不存在氯化钙时对检测体系的影响,结果如下表所示。

[0105] 表4.考察抗体溶液中是否存在氯化钙对检测的影响

[0106]	抗体溶液	灵敏度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
--------	------	--------------------------------

[0107]	含有 0.4%的氯化钙	0.025-0.03
	无氯化钙	0.05-0.1

[0108] 从上述结果中可以看出,抗体溶液中需存在低浓度的氯化钙溶液,检测体系的灵敏度能够提高。

[0109] 5、本发明人还对比了稀释液为去离子水和pH6.5的磷酸盐缓冲液时对检测体系的影响,结果如下表所示。

[0110] 表5.考察不同稀释液对检测的影响

[0111]

提取方法	稀释液	加标浓度 (ppb)	检测值 (ppt)	回收率
纯乙腈 1:2 提取; 1:9 稀释	去离子水	0	235	/
		2	2751.9	125.8%
		5	6587.7	127.1%
	0.02mol/L 的 PH6.5 磷酸 盐缓冲液	0	0.3	/
		2	1987.7	99.4%
		5	5215.8	104.3%

[0112] 从上述结果可以看出,对于酱油样品来说,将稀释液改为PH6.5左右磷酸盐缓冲液时样品的回收率最好,不易出现偏高,假阳性情况,且不同样品间的差异较小。

[0113] 6、通过上述筛选,最终确定酱油样品的前处理方法为:1:2的纯乙腈提取,再以pH6.5的磷酸盐缓冲液为稀释液,按照1:9稀释,最终样品稀释倍数为20倍。以本实施例的试剂盒和方法进行检测,试剂盒灵敏度为0.03 $\mu$ g/kg,酱油样品的最低检测限为1.0 $\mu$ g/kg。

[0114] 以上述方案与液相检测方法进行对比,结果如下表所示。

[0115] 表6.本实施例检测方法与液相检测方法的符合情况

[0116]

样品名称	液相(ppt)	本实施例方法检测结果 (ppt)	符合情况(与液相)
酱油 1	未检出	0.5	符合
酱油 2	未检出	127	符合
酱油 3	未检出	35.2	符合
酱油 4	未检出	227.3	符合

[0117]

酱油 5	未检出	2.5	符合
酱油 6+1ppb	1050	956	91%
酱油 7+2ppb	1820	2245	123%
酱油 8+5ppb	4780	5890	123%
酱油 9+10ppb	11030	12400	112%
酱油 10+5ppb	5020	6010	120%

[0118] 从上述结果可以看出,本实施例的检测方法适用于酱油中黄曲酶毒素B1的检出,且具有操作方法简便,灵敏度高、准确性好和稳定性高的优点。

[0119] 实施例2

[0120] 一种黄曲霉毒素B1的检测方法,包括以下步骤:

[0121] 一、前处理。

[0122] 以提取溶液对待测样品进行提取,在本实施例中,所述待测样品为豆瓣酱。

[0123] 具体前处理方法为:称取4.0g有代表性的样品置入50mL聚苯乙烯离心管中,加入10mL的甲醇作为提取溶液与其混合;于振荡器上剧烈振荡10分钟,转速为150r/min(或涡旋5min以上);取液体于4000r/min离心5min(或静置3min,再用定量滤纸过滤);取上清或滤液0.1mL,再加入1.9mL去离子水为稀释液,得到待检溶液,稀释倍数为50。待检溶液振荡5s或手摇匀,取50 $\mu$ L进行分析。

[0124] 二、检测。

[0125] 按照权利要求1的方法进行检测。

[0126] 三、检测结果。

[0127] 考察不同样品的加标回收率,结果如下表所示。

[0128] 表7.不同豆瓣酱中的加标回收率

[0129]

样品名称	加标浓度 (ppb)	检测值 (ppt)	回收率 (%)
豆瓣酱 1 号	0	5456.2	/
	2.5	8071.2	104.6%
	5	10178.8	94.5%
	10	16643.1	111.9%
豆瓣酱 2 号	0	1144.3	/
	2.5	4883.6	149.6%

[0130]		5	7037.7	117.9%
		10	13963.8	128.2%
	豆瓣酱 3 号	0	0.5	/
		2.5	2371.7	94.8%
		5	5211.4	104.2%
		10	10441.9	104.4%
	豆瓣酱 4 号	0	418.5	/
		2.5	2128.3	68.4%
		5	4752.1	86.7%
		10	10661.8	102.4%
	豆瓣酱 5 号	0	0	/
		2.5	2377.5	95.1%
		5	6617.4	132.3%
		10	11744.9	117.4%
	豆瓣酱 6 号	0	500.3	/
		2.5	2558.1	82.3%
		5	6470.5	119.4%
		10	11769.8	112.7%

[0131] 从上述结果和图1-图2中可以看出,标准曲线的线性相关系数达到0.9999,大于0.990,LC50值为0.150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,实验参数满足要求,结果具有参考价值。且经过实验考察,以本实施例的方法进行检测,豆瓣酱等辣椒酱样品的最低检测限为1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0132] 即本实施例的方法适用于豆瓣酱中黄曲酶毒素B1的检出,且具有操作方法简便,灵敏度高、准确性好和稳定性高的优点。

[0133] 实施例3

[0134] 一种黄曲霉毒素B1的检测方法,包括以下步骤:

[0135] 一、前处理。

[0136] 以提取溶液对待测样品进行提取,在本实施例中,所述待测样品为料酒、黄酒、琵琶酒、白醋。

[0137] 具体前处理方法为:称取5.0g有代表性的样品置入100mL具塞三角瓶中,加入25mL 60%的甲醇作为提取溶液与其混合;于振荡器上剧烈振荡10分钟,转速为150r/min(或涡旋5min以上);取液体于4000r/min离心5min(或静置3min,再用定量滤纸过滤);取上清或滤液1mL,再加入5mL去离子水为稀释液,得到待检溶液,待检溶液的pH值应保证在6~8之间,可

用“NaOH”、“HCL”进行调节。待检溶液振荡5s或手摇匀,取50 $\mu$ L进行分析。

[0138] 二、检测。

[0139] 按照权利要求1的方法进行检测。

[0140] 三、检测结果。

[0141] 考察不同样品的加标回收率,结果如下表所示。

[0142] 表8.不同样品中的加标回收率

样品名称	加标浓度 (ppb)	检测值 (ppt)	回收率 (%)
白醋 1	0	415.96	
	2	2095.88	84.0%
	5	6388.58	119.5%
白醋 2	0	312.37	
	2	2063.29	87.5%
	5	4853.2	90.8%
黄酒	0	309.94	
	2	2954.12	132.2%
	5	6216.08	118.1%
枇杷酒	0	354.05	
	2	2701.8	117.4%
	5	6597.17	124.9%
料酒	0	0	
	2	1569.13	78.5%
	5	4831.96	96.6%

[0144] 从上述结果和图3-图4中可以看出,标准曲线的线性相关系数达到0.9980,大于0.9900,1C50值为0.184 $\mu$ g/kg,实验参数满足要求,结果具有参考价值。且经过实验考察,以本实施例的方法进行检测,料酒、黄酒、琵琶酒、白醋等样品的最低检测限为1.0 $\mu$ g/kg。

[0145] 即本实施例的方法适用于料酒、黄酒、琵琶酒、白醋中黄曲酶毒素B1的检出,且具有操作方法简便,灵敏度高、准确性好和稳定性高的优点。

[0146] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0147] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

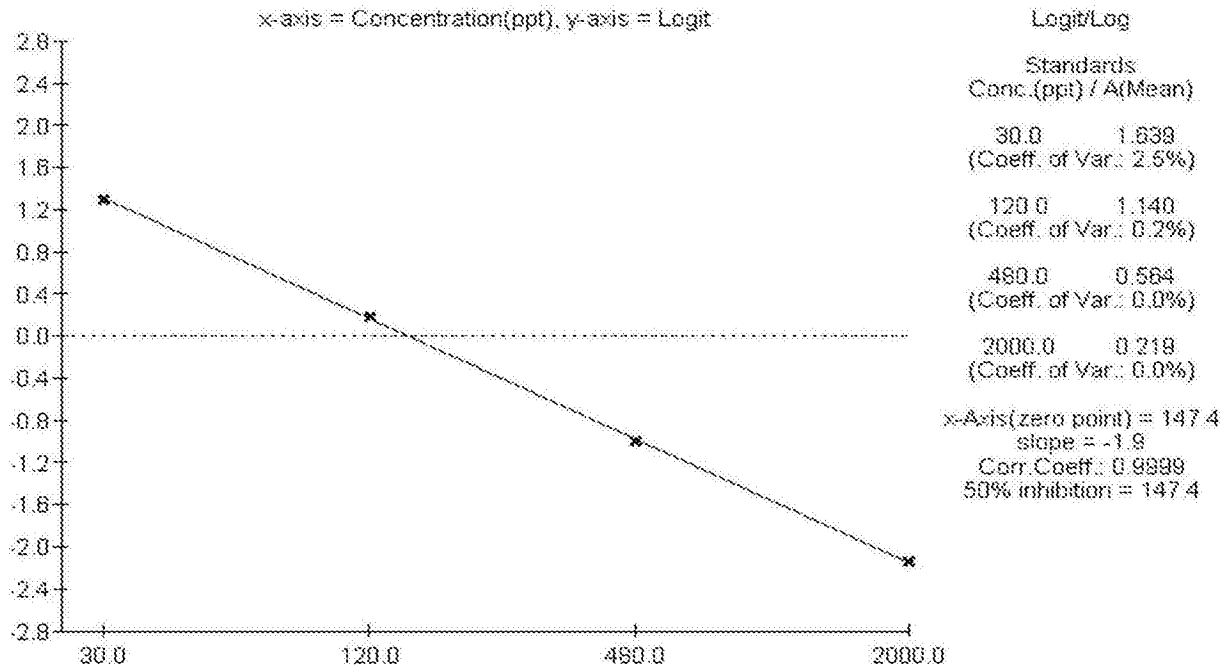


图1

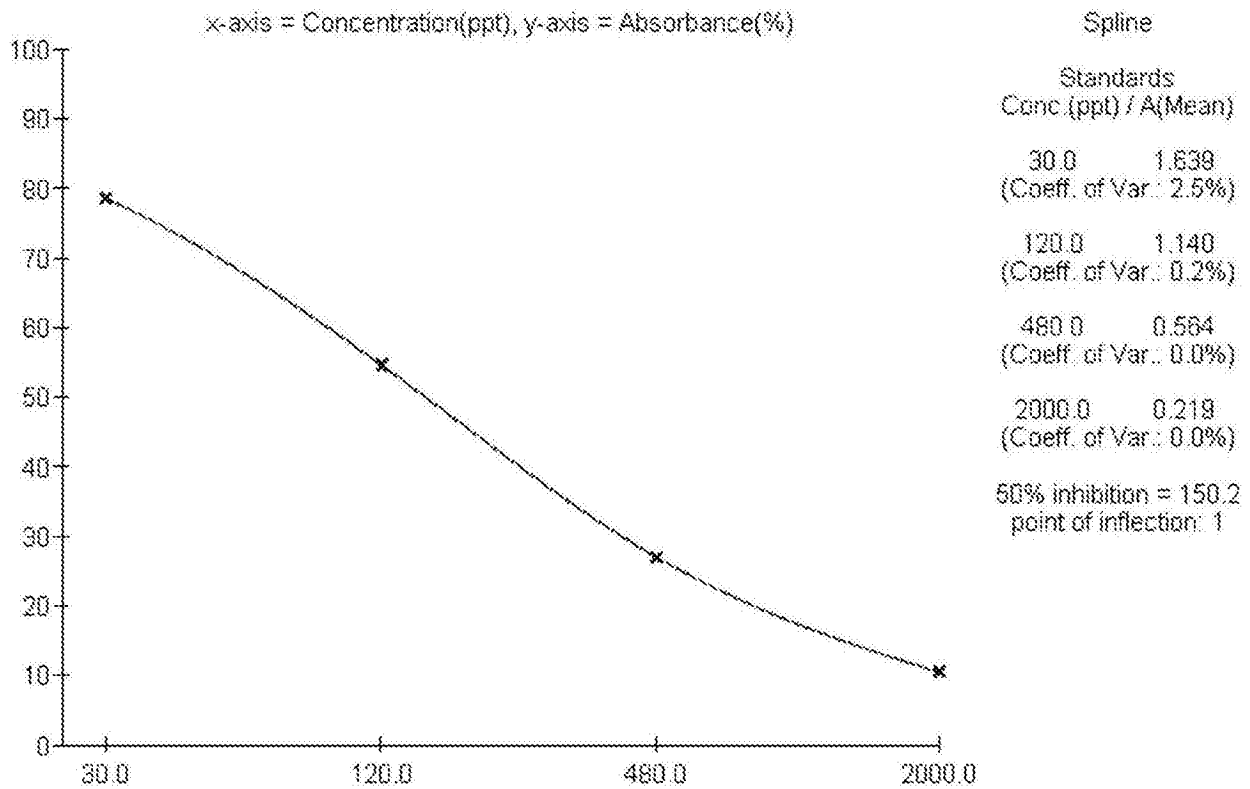


图2

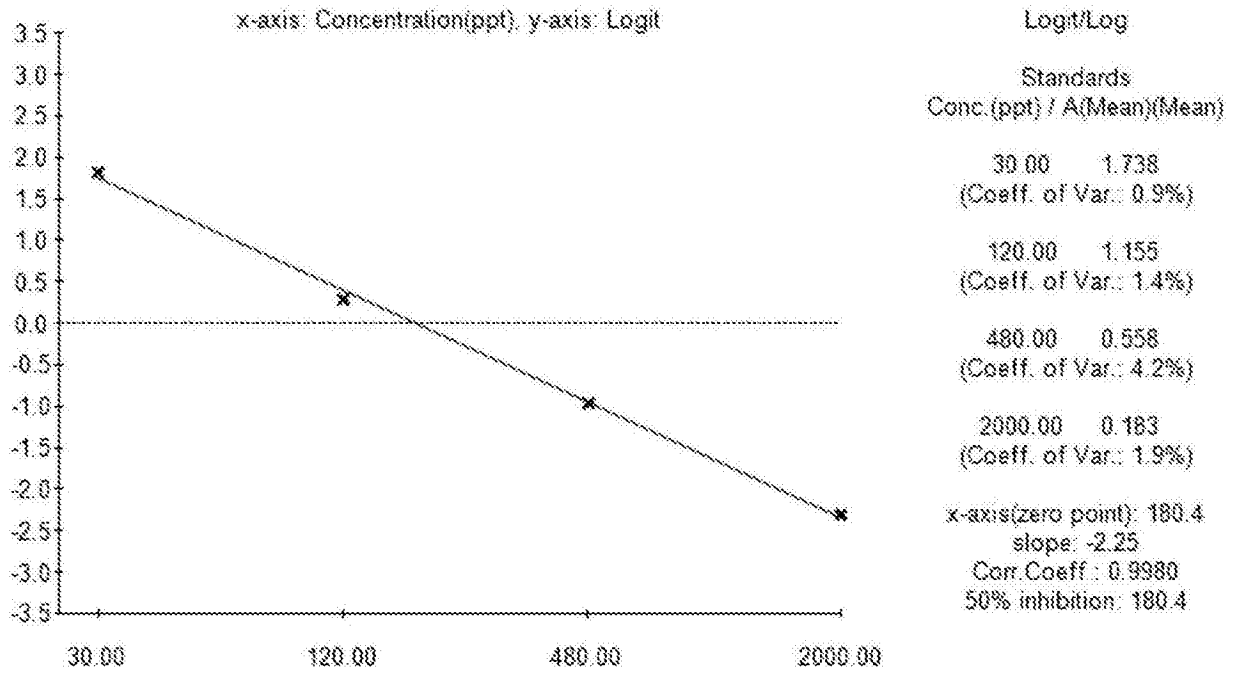


图3

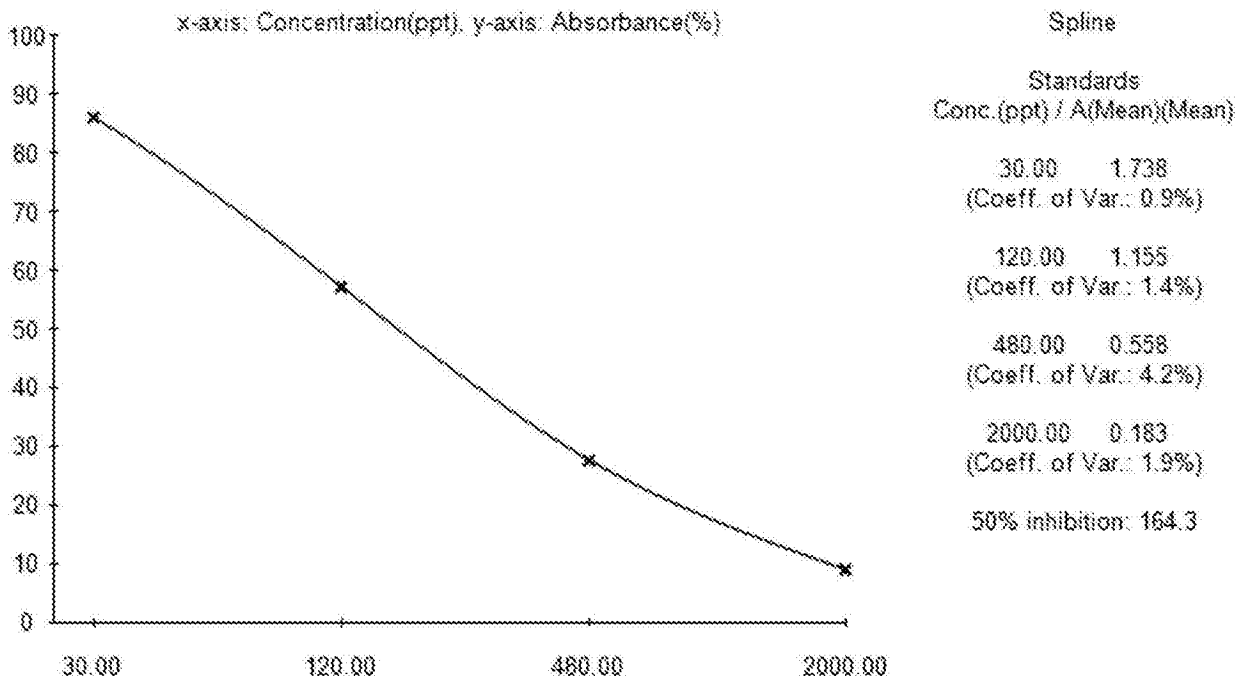


图4

专利名称(译)	黄曲霉毒素B1的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106290889A</a>	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201610679285.5	申请日	2016-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	广东产品质量监督检验研究院		
申请(专利权)人(译)	广东产品质量监督检验研究院		
当前申请(专利权)人(译)	广东产品质量监督检验研究院		
[标]发明人	李江 慕艳 李晓明 陈满英 黎丁滔 黄志刚 田秀梅		
发明人	李江 慕艳 李晓明 陈满英 黎丁滔 黄志刚 田秀梅		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
其他公开文献	CN106290889B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种黄曲霉毒素B1的检测方法，属于酶联免疫吸附测定技术领域。该检测方法包括以下步骤：前处理：以提取溶液对待测样品进行提取，随后加入稀释液，得到待检溶液；所述提取溶液为体积百分浓度为40%-100%的甲醇水溶液和/或乙腈，所述稀释液为水或缓冲盐水溶液；检测：取所述待检溶液，加入到包被了黄曲霉毒素B1抗原的酶标板上，再加入黄曲霉毒素B1抗体溶液，温育，加入辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗进行酶活性的放大，洗板，加入底物显色剂、终止液，然后以酶标仪测定吸光度值，计算得到待测样品中黄曲霉毒素B1的含量。该检测方法避免了氮吹等前处理步骤，具有步骤简单，稳定性好的优点。能够快速检出黄曲霉毒素B1的残留量。

