



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110058008 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201910300576.2

(22)申请日 2019.04.15

(71)申请人 广东省疾病预防控制中心

地址 511430 广东省广州市番禺区大石群
贤路160号

申请人 广东达元绿洲食品安全科技股份有
限公司

(72)发明人 龙朝阳 黄伟雄 李斌 方磊
许秀敏 黄智永 石松 任季玉

(74)专利代理机构 广州专理知识产权代理事务
所(普通合伙) 44493

代理人 谭昉

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种食品中米酵菌酸的检测方法及其应用

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种食品中米酵菌酸的检测方法及其应用,其检测方法包括如下步骤:1)制备米酵菌酸人工抗原:将米酵菌酸与载体蛋白偶联,制备米酵菌酸包被原和米酵菌酸免疫原;2)制备抗米酵菌酸的多克隆抗体:制备米酵菌酸免疫原对应的多克隆抗体;3)多克隆抗体特异性及灵敏度检测:包括酶标板的制备、抗体的制备、标准溶液的配制以及结果评价;本发明通过米酵菌酸与载体蛋白偶联制备了全抗原,并通过动物免疫成功制备了抗BA多克隆抗体。通过评价,本发明制备的抗原/抗体的性能完全能满足现场对米酵菌酸进行快速筛查的需求。

1. 一种食品中米酵菌酸的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 制备米酵菌酸人工抗原:将米酵菌酸与载体蛋白偶联,制备米酵菌酸包被原和米酵菌酸免疫原;

2) 制备抗米酵菌酸的多克隆抗体:通过动物免疫制备多克隆抗体;

3) 多克隆抗体特异性及灵敏度检测:包括酶标板的制备、抗体的制备、标准溶液的配制以及检测结果评价。

2. 由权利要求1所述的食品中米酵菌酸的检测方法,其特征在于,步骤1)中将米酵菌酸与载体蛋白偶联,保留米酵菌酸结构上的三个羧酸基团,制备得到具有母环结构的米酵菌酸人工抗原。

3. 由权利要求1或2所述的食品中米酵菌酸的检测方法,其特征在于,步骤1)制备米酵菌酸人工抗原包括如下步骤:1a) 将米酵菌酸溶解于氢溴酸中,振荡混匀之后用氢氧化钠调节酸碱度,即得到A液;1b) 将载体蛋白、NHS溶于超纯水中,充分溶解后,冰浴条件下加入EDC,之后移除冰浴升温至室温、并振荡,最后加入CB缓冲液搅拌均匀,即得到B液;1c) 将A液加入B液中,搅拌24h以上,用PBS溶液进行透析,收集透析液。

4. 由权利要求3所述的食品中米酵菌酸的检测方法,其特征在于,所述载体蛋白包括牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白以及血蓝蛋白的任意一种。

5. 由权利要求1所述的食品中米酵菌酸的检测方法,其特征在于,免疫原的载体蛋白为血蓝蛋白,包被原的载体蛋白为牛血清白蛋白。

6. 由权利要求3所述的食品中米酵菌酸的检测方法,其特征在于,步骤1a中酸碱度pH为7~8。

7. 由权利要求3所述的食品中米酵菌酸的检测方法,其特征在于,CB缓冲液的pH为9.6, PBS溶液pH为7.2。

8. 一种权利要求1至7任一项所述的食品中米酵菌酸的检测方法的应用,其特征在于,该检测方法应用于对食品中米酵菌酸的快速筛查。

一种食品中米酵菌酸的检测方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品中毒素检测的领域,具体涉及食品中米酵菌酸的检测方法及其应用。

背景技术

[0002] 米酵菌酸(Bongrekic acid,BA)是椰毒假单胞菌产生的一种毒素,食入该毒素污染的食物可引起人或动物中毒,重者可致死。现阶段研究,在食品中米酵菌酸的检测方法常用的液相色谱-串联质谱法、固相萃取-高效液相色谱法、高效液相色谱-二极管阵列检测器结合固相萃取法、超高效液相色谱串联质谱法等。本研究建立的免疫学检测方法暂未有报道。

[0003] 专利CN105403651A公开了一种米酵菌酸的液相色谱-串联质谱检测方法,检测灵敏度为50 μ g/kg;专利CN 108195954 A了一种全自动固相萃取-超高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸含量的方法,包括食品样品预处理、提取溶液的净化、HPLC分析,得到食品样品中的米酵菌酸含量,检测灵敏度为2.5 μ g/kg;苏永恒等建立固相萃取-高效液相色谱方法测定食品中米酵菌酸含量,样品通过外标法进行定量检测,灵敏度为5 μ g/kg(苏永恒,张伟,张榕杰,et al.固相萃取-高效液相色谱法测定食品中米酵菌酸含量[J].中国卫生工程学,2017 (04) :34-35+40.) ;苏肯明等建立了液相色谱-串联质谱法测定银耳中的米酵菌酸的新方法,检测灵敏度为5 μ g/kg(苏肯明,梁达清.液相色谱-串联质谱法测定银耳中的米酵菌酸[J].广东化工,2014,41 (16) :168-169.) ;周鹏建立了快速测定银耳中米酵菌酸的超高效液相色谱串联质谱分析方法,样本检出限0.5 μ g/kg(周鹏.超高效液相色谱串联质谱法测定银耳中米酵菌酸[J].食品研究与开发,2015,36 (22) :123-126)。

[0004] 以上方法虽然可以精确定量,但由于设备仪器昂贵,检测时间长,且需专业人员操作,因此无法实现真正意义上的现场快速检测。

发明内容

[0005] 针对以上问题,本发明的目的在于提供一种食品中米酵菌酸的检测方法及其应用,由于免疫学检测技术具有高特异性和高选择性的特点,非常适用于复杂基质痕量组分的分离或检测,但由于市场上一直未有针对米酵菌酸检测的生物原材料(抗原/抗体),使其免疫类的快速筛查产品无法成功开发。本发明通过米酵菌酸与载体蛋白偶联制备了全抗原,并通过动物免疫成功制备了抗BA多克隆抗体。通过评价,本发明制备的抗原/抗体的性能完全能满足现场对米酵菌酸进行快速筛查的需求。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 一种食品中米酵菌酸的检测方法,包括如下步骤:

[0008] 1) 制备米酵菌酸人工抗原:将米酵菌酸与载体蛋白偶联,制备米酵菌酸包被原和米酵菌酸免疫原;

[0009] 2) 制备抗米酵菌酸的多克隆抗体:通过动物免疫制备多克隆抗体;

[0010] 3) 多克隆抗体特异性及灵敏度检测:包括酶标板的制备、抗体的制备、标准溶液的配制以及结果评价;

[0011] 步骤1) 中将米酵菌酸与载体蛋白偶联,保留米酵菌酸结构上的三个羧酸基团,制备得到具有母环结构的米酵菌酸人工抗原;

[0012] 步骤1) 制备米酵菌酸人工抗原包括如下步骤:1a) 将米酵菌酸溶解于氢溴酸中,振荡混匀之后用氢氧化钠调节酸碱度,即得到A液;1b) 将载体蛋白、NHS溶于超纯水中,充分溶解后,冰浴条件下加入EDC,之后移除冰浴升温至室温、并振荡,最后加入CB缓冲液搅拌均匀,即得到B液;1c) 将A液加入B液中,搅拌24h以上,用PBS溶液进行透析,收集透析液;

[0013] 所述载体蛋白包括牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白以及血蓝蛋白的任意一种;

[0014] 其中,免疫原的载体蛋白为血蓝蛋白,包被原的载体蛋白为牛血清白蛋白;

[0015] 其中,步骤1a中酸碱度为7~8;

[0016] 所述CB缓冲液的pH为9.6,PBS溶液pH为7.2。

[0017] 一种食品中米酵菌酸的检测方法的应用,该检测方法应用于对食品中米酵菌酸的快速筛查。

[0018] 本发明的有益效果如下:

[0019] 本发明首次把米酵菌酸的检测采用免疫学的方法,通过将米酵菌酸与载体蛋白偶联,建立针对米酵菌酸检测的抗原和抗体,对食品中米酵菌酸的检测具有高特异性、高选择性以及高灵敏度等的特点,且相较现有的对米酵菌酸的检测、本发明的检测方法设备成本、时间成本以及人力成本更低、简单易行,满足市场上对米酵菌酸的快速筛查检测。

具体实施方式

[0020] 以下通过具体的实施案例对本发明作进一步详细的描述,应理解这些实施例仅用于说明本发明而不用限制本发明的保护范围,在阅读了本发明之后,本领域技术人员对本发明的各种等价形式的修改均落于本申请所附权利要求所限定。

[0021] 实施例1

[0022] 一种食品中米酵菌酸的检测方法:

[0023] (1) 制备米酵菌酸人工抗原:

[0024] A. 包被原BA-BSA的制备

[0025] 1) 将2mg米酵菌酸溶解于100~200 μ L 2M的氢溴酸中,室温振荡16h以上,再用2M氢氧化钠溶液调至pH=7~8之间,得到A液;

[0026] 2) 将10mg牛血清白蛋白(BSA)、4mg NHS溶于0.5ml超纯水中,充分溶解后,在冰浴条件下加入4mg EDC,移除冰浴后自然升至室温,并在室温下振荡30min以上,加入1.5ml pH9.6的CB缓冲液,室温搅拌1h以上,得到B液;

[0027] 3) 将A液加入B液中,室温避光磁力搅拌24h以上,用pH7.2PBS溶液透析3天,每天换液3次;

[0028] 4) 收集透析液,-20℃保存备用。

[0029] B. 免疫原BA-KLH的制备

[0030] 1) 将2mg米酵菌酸溶解于100~200 μ L 2M的氢溴酸中,室温振荡16h以上,再用2M氢

氧化钠溶液调至pH=7~8之间,得到A液;

[0031] 2) 将10mg牛血蓝蛋白(KLH)、4mg NHS溶于0.5ml超纯水中,充分溶解后,在冰浴条件下加入4mg EDC,移除冰浴后自然升至室温,并在室温下振荡30min以上,加入1.5ml pH9.6的CB缓冲液,室温搅拌1h以上,得到C液;

[0032] 3) 将A液加入C液中,室温避光磁力搅拌24h以上,用pH7.2PBS溶液透析3天,每天换液3次;

[0033] 4) 收集透析液,-20℃保存备用。

[0034] (2) 制备抗BA多克隆抗体:

[0035] 将免疫原BA-LKH,与等体积弗氏佐剂乳化后,免疫Balb/c小鼠。每只小鼠免疫剂量为50~100ug,免疫间隔2周,免疫3次后,采小鼠尾部静脉血检测血清效价;

[0036] 如抗体效价不达要求,需加强免疫,待抗体效价不再升高后,以100ug全抗原进行皮下加强免疫,5天后将血清效价为 3.0×10^4 以上的实验Balb/c小鼠处死,分离血清,用饱和硫酸铵法纯化,即为免疫原对应的多克隆抗体(简称抗BA多克隆抗体),制备好后分装冻存。

[0037] ELISA间接竞争法测定抗体阳性滴度以3倍于阴性血清的测定值为准,结果表明经纯化后的抗BA多克隆抗体的效价为1:64000。

[0038] (3) 多克隆的特异性及灵敏度检测

[0039] a. 酶标板的制备方法

[0040] 用pH9.6的碳酸盐缓冲液作包被稀释液,将BA-BSA稀释至0.5 μ g/ml,按100 μ L/孔加入聚苯乙烯微孔板中,4℃包被过夜,甩干,按250 μ L/孔加入含1%BSA,磷酸盐缓冲液中37℃封闭1h,甩干,干燥后真空包装保存;

[0041] b. 抗体的配制

[0042] 用含0.05%叠氮钠,pH7.4的磷酸盐缓冲液,将抗BA多克隆抗体稀释至0.1 μ g/ml,4℃保存;

[0043] c. 标准溶液的配制

[0044] 精确称量米酵菌酸标准品2mg,先用甲醇1ml溶解,再用pH7.4的磷酸盐缓冲液配制系列浓度为0、50、150、450、1350、4050 μ g/L的米酵菌酸标准溶液;

[0045] d. 评价检测结果

[0046] 向包被有BA-BSA的微孔酶标板中加入米酵菌酸标准溶液50 μ L/孔,再加入配制好的抗BA多克隆抗体溶液50 μ L/孔,37℃反应0.5h;甩干后,加入洗液300 μ L/孔,洗涤3次后拍干;再加入酶标二抗100 μ L/孔,37℃反应0.5h;再次洗涤3次后拍干,分别加入50 μ L/孔的显色液A和显色液B,37℃反应15min;加入1M硫酸50 μ L/孔终止,设定酶标仪于450nm波长测定每孔的OD值。

[0047] 结果如表1:

[0048] 表1 ELISA测试不同浓度米酵菌酸标准品OD值

米酵菌酸浓度 (ug/L)	0	50	150	450	1350	4050
---------------	---	----	-----	-----	------	------

[0050]	OD 值	2.635	2.036	1.427	0.869	0.401	0.194
	B/B0	100%	77.27%	54.16%	32.98%	15.22%	7.36%

[0051] 其中,B/B0是指不同浓度的标准品测试孔OD值与含量为0的标准品测试孔OD值的比值。

[0052] 表1中可看出,当米酵菌酸含量为0.05ug/L时,其B/B0值为77.27%,说明其检测OD与含0ug/L浓度的米酵菌酸测试孔OD值有明显差异,故ELISA对米酵菌酸检测灵敏度均可达50ug/L,因此,本发明的对食品中米酵菌酸的检测方法完全能满足现场对米酵菌酸进行快速筛查的需求。

专利名称(译)	一种食品中米酵菌酸的检测方法及其应用		
公开(公告)号	CN110058008A	公开(公告)日	2019-07-26
申请号	CN201910300576.2	申请日	2019-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	广东省疾病预防控制中心 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东省疾病预防控制中心 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东省疾病预防控制中心 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司		
[标]发明人	龙朝阳 黄伟雄 李斌 方磊 许秀敏 黄智永 石松 任季玉		
发明人	龙朝阳 黄伟雄 李斌 方磊 许秀敏 黄智永 石松 任季玉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	谭昉		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种食品中米酵菌酸的检测方法及其应用，其检测方法包括如下步骤：1) 制备米酵菌酸人工抗原：将米酵菌酸与载体蛋白偶联，制备米酵菌酸包被原和米酵菌酸免疫原；2) 制备抗米酵菌酸的多克隆抗体：制备米酵菌酸免疫原对应的多克隆抗体；3) 多克隆抗体特异性及灵敏度检测：包括酶标板的制备、抗体的制备、标准溶液的配制以及结果评价；本发明通过米酵菌酸与载体蛋白偶联制备了全抗原，并通过动物免疫成功制备了抗BA多克隆抗体。通过评价，本发明制备的抗原/抗体的性能完全能满足现场对米酵菌酸进行快速筛查的需求。

