

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410065382.2

[51] Int. Cl.
G01N 33/547 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1268931C

[22] 申请日 2004.11.27

[21] 申请号 200410065382.2

[71] 专利权人 江南大学

地址 214036 江苏省无锡市惠河路 170 号

[72] 发明人 陶文沂 金 坚 黄 飏 张莲芬

时 瑾

审查员 胡玉连

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

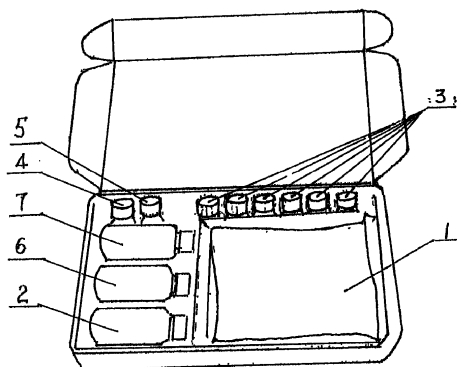
[54] 发明名称

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，属于时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术领域，用于对粮食，饲料及其食品中赭曲霉毒素 A (OTA) 含量的检测。本发明配制的试剂盒，采用 TRFIA 检测 OTA，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有 OTA-BSA，加入 OTA 标准或样品，再加入 OTA 抗体。游离的 OTA 与微孔板上的 OTA-BSA 竞争 OTA 抗体，没有连接的 OTA 抗体被洗涤除去，加入 Eu^{3+} -羊抗兔抗体，标记免疫反应后没有连接的 Eu^{3+} -羊抗兔抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps，荧光强度与样品中的 OTA 浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中 OTA 的含量。本发明提供的检测 OTA 试剂盒结构简单，使用方便、廉

价、灵敏度高，可以达到 1ng/ml 以上。



1、一种检测赭曲霉毒素 A 的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征是由 96 或 48 孔包被板 (1), 缓冲液 (2), 赭曲霉毒素 A 标准 (3), 赭曲霉毒素 A 的抗体冻干品 (4), 铕标记的羊抗兔抗体 (5), 洗涤液 (6) 和增强液 (7) 所组成。

2、权利要求 1 所述的试剂盒, 其中的包被板 (1) 包被固相抗原, 用 50mmol/L pH9.6 Na_2CO_3 - NaHCO_3 的缓冲液将 OTA-BSA 稀释至 10mg/L 做为包被液, 96 或 48 孔微孔板各孔加 100 μl , 4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜, 弃去包被液, 冲洗三次, 加 150 μl 含 3g/L BSA 的上述 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液封闭, 4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜, 弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

3、根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其中的赭曲霉毒素 A 标准 (3), 从 OTA 纯品中稀释得到, 稀释液为甲醇: 水=7: 3, 共 6 瓶, OTA 浓度分别为: 0ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml。

4、根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其中的赭曲霉毒素 A 的抗体冻干品 (4) 由下述方法制备, 用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2ml 混合 2mg OTA-KLH, 用匀浆器混合 2 小时, 制得油包水抗原乳化剂, 取 600 μl 制备好的油包水抗原乳化剂, 在新西兰大白兔身上多位点地进行皮下注射, 在免疫 3~4 次后, 可进行鉴定, 血清合格后稀释、分装、冻干备用。

5、根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其中的铕标记的羊抗兔抗体 (5) 由下述方法制备, 将购得的羊抗兔抗体, 经 PD-10 柱转换缓冲条件至 pH9.0, 收集蛋白峰, 取已转换的羊抗兔抗体加入 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸, 反应过夜, 反应液经柱层析, 收集蛋白峰, 稀释、分装备用。

6、根据权利要求 5 所述的试剂盒, 其中的铕标记的羊抗兔抗体 (5) 的制备方法为, 取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1-2ml, 经 PD-10 柱转换缓冲条件, 洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH8.5-9.0 缓冲液, 收集蛋白峰, 经紫外吸收分析定量, 用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L, 取 500-1000 μl 稀释后的羊抗兔抗体加入含 0.2-0.4mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸的小瓶中, 28-30 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌反应 16 小时, 反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sephadex-G50 柱层析, 柱的尺寸为 1 \times 40cm, 收集蛋白峰, 稀释、分装备用。

7、根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其中的缓冲液 (2) 为: 8mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛 IgG、50 $\mu\text{mol/L}$ 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80 和 0.1% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8; 洗涤液 (6) 为: 14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8; 增强液 (7) 为: 1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μmol β -萘甲酰三氟丙酮, 50 μmol 三正辛基氧化磷和 1ml 曲拉

通 X-100。

8、一种用权利要求 1 所述的试剂盒检测赭曲霉毒素 A 的方法，其特征是取包被有 OTA-BSA 的微孔包被板，加入 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，再加入 OTA 抗体，振荡反应，洗涤液洗涤，加铈标记的羊抗兔抗体，进行标记免疫反应，洗涤液洗涤，加增强液振荡后测量荧光强度 cps，对照标准曲线计算样品中的 OTA 含量。

9、根据权利要求 8 所述的检测赭曲霉毒素 A 的方法，其操作为：取包被有 OTA-BSA 的微孔包被板，加入 50 μ l 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，加 50 μ l 以缓冲液（2）作稀释剂 1：20 稀释的 OTA 抗体，25-37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5-1 小时，洗涤液洗三次，加以缓冲液（2）1：20 稀释的 100 μ l EU³⁺-羊抗兔抗体，25-37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5-1 小时，用洗涤液洗六次，加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps，从标准曲线计算样品中的 OTA 含量。

10、根据权利要求 8 所述的检测赭曲霉毒素 A 的方法，其中的样品处理方法为，谷物样品处理：将谷物样品粉碎至 20 目，取 5 克样品放在试管中，加入提取液 12.5ml，提取液为甲醇：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；血液样品处理：取 0.5ml 血液加 0.5ml 甲醇的水溶液，其中的甲醇：水=7：3，备用。

一种检测赭曲霉毒素 A 的试剂盒及其检测方法

技术领域

一种检测赭曲霉毒素 A 的试剂盒及其检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术领域,用于对粮食,饲料及其食品中赭曲霉毒素 A (简称 OTA) 含量的检测。

背景技术

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。

第 56 次 FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 会议对 OTA 进行了危险性评价,得出的结论是体内和体外试验显示 OTA 都具有遗传毒性,考虑到小麦、大麦和黑麦等谷物是摄入 OTA 主要的食物品种,决定制定这些食物中 OTA 的限量标准,会议认为这些食物及其制品中 OTA 限量为 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。到目前为止,已有 11 个国家制定了食品 ($1-50\mu\text{g}/\text{kg}$) 和饲料 ($100-1000\mu\text{g}/\text{kg}$) 中的 OTA 的限量标准,主要是欧洲国家,我国尚无粮食中的 OTA 限量标准。

因而作为国际食品安全评价机构的 JECFA 很少能得到我国的污染监测和暴露量评估数据,使我们始终处于被动地位。另外对于食品、农副土特产品、保健品等出口到欧盟市场,其检验检疫必须符合有关 OTA、黄曲霉、污染农药等食品安全规定的要求,在这方面我国产品的出口已遭受了很多的损失,而且进口方面,也迫切要求建立一个完善、方便的检测手段。因此,尽快建立高灵敏的 OTA 的检测,积极开展 OTA 的研究是当务之急。

目前赭曲霉毒素 A 的测定方法有多种,如:薄层色谱法 TLC (灵敏度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$), 高效液相色谱法 HPLC (灵敏度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$), 免疫荧光染色法 (灵敏度 $0.025\mu\text{g}/\text{ml}$), 但由于费时,灵敏度低,仪器设备昂贵,操作复杂且不适用于大批量样品的检测等缺点,已被逐步淘汰。酶联免疫测定法 ELISA (灵敏度为 $2.5\text{ng}/\text{ml}$), 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。尽管如此,检测的灵敏度和试剂的稳定性还无法达到要求,致使无法实际应用,所以到目前为止没有一个国产

的试剂盒面市。

时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 是上世纪八十年代初发展起来的新的免疫测定技术。时间分辨荧光免疫分析法其原理是利用具有双功能基团结构的螯合剂, 其一端和镧系元素结合, 另一端和抗体分子上的自由氨基联接, 制成 Eu^{3+} 标记抗体, 它与待测样品中的抗原结合成免疫复合物。理想情况下, 测定复合物中镧系元素的荧光强度就能确定样品中抗原的量, 但实际上这种复合物的荧光强度相当弱, 只有再加入一种增强溶液 (Enhancement solution), 使镧系元素从复合物中解离下来, 并与增强液中所含的 β -萘甲酰三氟丙酮 (β -NTA) 重新形成微胶囊, 在紫外等光的激发下发射很强的荧光, 增强效果上百万倍。用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps, 即可确定样品中抗原的量。

发明内容

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, 用于对粮食, 饲料及其食品中 OTA 含量的检测。

本发明的技术方案: 该检测 OTA 的试剂盒是由 1、96 或 48 孔包被板, 2、缓冲液, 3、赭曲霉毒素 A 标准, 4、赭曲霉毒素 A 的抗体冻干品, 5、镧标记的羊抗兔抗体, 6、洗涤液, 7、增强液所组成。

本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 来检测 OTA。采用 TRFIA 的技术主要有两个方面: 特异性多克隆抗体的制备, 利用抗原免疫家兔, 获得含有抗体的血清, 经过生化提纯分离免疫球蛋白; 第二, Eu^{3+} 标记抗体的制备。

测定方法为: 测定的基础是标记免疫反应。包被有 OTA-BSA 的微孔板, 加入 OTA 标准或已处理好的样品到各自的微孔中, 再加入 OTA 抗体, 振荡反应, 游离的 OTA 与微孔板上的 OTA-BSA 竞争 OTA 抗体, 洗涤液洗涤, 没有连接的 OTA 抗体在洗涤步骤中被除去。加入 Eu^{3+} -羊抗兔抗体, 进行标记免疫反应, 再用洗涤液洗涤, 反应后没有连接的 Eu^{3+} -羊抗兔抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后, 在紫外光的激发下发射很强的荧光, 用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps, 荧光强度与样品中的浓度成反比, 对照标准曲线即可确定样品中抗原的量。

所述的试剂盒, 其中的包被板 (1) 包被固相抗原, 用 50mmol/L pH9.6 Na_2CO_3 - NaHCO_3 的缓冲液将 OTA-BSA 稀释至 10mg/L 做为包被液, 96 或 48 孔微孔板各孔加 100 μ l, 4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜, 弃去包被液, 冲洗三次, 加 150 μ l 含 3g/L BSA 的上述 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液封闭, 4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜, 弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

所述的试剂盒, 其中的赭曲霉毒素 A 标准 (3), 从 OTA 纯品中稀释得到, 稀释液为甲醇: 水=7: 3, 共 6 瓶, OTA 浓度分别为: 0ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml。

所述的试剂盒, 其中的赭曲霉毒素 A 的抗体冻干品 (4) 由下述方法制备, 用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2ml 混合 2mg OTA-KLH, 用匀浆器混合 2 小时,

制得油包水抗原乳化剂，取 600 μ l 制备好的油包水抗原乳化剂，在新西兰大白兔身上多位点地进行皮下注射，在免疫 3~4 次后，可进行鉴定，血清合格后稀释、分装、冻干备用。

所述的试剂盒，其中的铕标记的羊抗兔抗体（5）由下述方法制备，将购得的羊抗兔抗体，经 PD-10 柱转换缓冲条件至 pH9.0，收集蛋白峰，取已转换的羊抗兔抗体加入 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸，反应过夜，反应液经柱层析，收集蛋白峰，稀释、分装备用。

所述的试剂盒，其中的铕标记的羊抗兔抗体（5）的制备方法为，取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1-2ml，经 PD-10 柱转换缓冲条件，洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH8.5-9.0 缓冲液，收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量，用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L，取 500-1000 μ l 稀释后的羊抗兔抗体加入含 0.2-0.4mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸的小瓶中，28-30 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌反应 16 小时，反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sephadex-G50 柱层析，柱的尺寸为 1 \times 40cm，收集蛋白峰，稀释、分装备用。

所述的试剂盒，其中的缓冲液（2）为：8mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛 IgG、50 μ mol/L 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80 和 0.1% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8；洗涤液（6）为：14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8；增强液（7）为：1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮，50 μ mol 三正辛基氧化膦和 1ml 曲拉通 X-100。

所述的试剂盒检测赭曲霉毒素 A 的方法，其特征是取包被有 OTA-BSA 的微孔包被板，加入 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，再加入 OTA 抗体，振荡反应，洗涤液洗涤，加铕标记的羊抗兔抗体，进行标记免疫反应，洗涤液洗涤，加增强液振荡后测量荧光强度 cps，对照标准曲线计算样品中的 OTA 含量。

所述的检测赭曲霉毒素 A 的方法，其操作为：取包被有 OTA-BSA 的微孔包被板，加入 50 μ l 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，加 50 μ l 以缓冲液（2）作稀释剂 1:20 稀释的 OTA 抗体，25-37 $^\circ\text{C}$ 振荡 0.5-1 小时，洗涤液洗三次，加以缓冲液（2）1:20 稀释的 100 μ l Eu^{3+} -羊抗兔抗体，25-37 $^\circ\text{C}$ 振荡 0.5-1 小时，用洗涤液洗六次，加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps，从标准曲线计算样品中的 OTA 含量。

所述的检测赭曲霉毒素 A 的方法，其中的样品处理方法为，谷物样品处理：将谷物样品粉碎至 20 目，取 5 克样品放在试管中，加入提取液 12.5ml，提取液为甲醇：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；血液样品处理：取 0.5ml 血液加 0.5ml 甲醇的水溶液，其中的甲醇：水=7:3，备用。

本发明的有益效果：该试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，可以达到1ng/ml以上。

附图说明

图 1：检测赭曲霉毒素 A 的试剂盒示意图。1、96 或 48 孔包被板，2、缓冲液，3、赭曲霉毒素 A 标准，4、赭曲霉毒素 A 的抗体冻干品，5、铕标记的羊抗兔抗体，6、洗涤液，7、增强液。

图 2：OTA-TRFIA 标准曲线图。

具体实施方式

实施例 1 制备试剂盒和检测玉米样品

OTA 是典型的半抗原，故在免疫反应中具有反应原性，但需与大分子物质结合后才有免疫原性，OTA 中的羧基为活性基团，可与蛋白质的氨基结合。因此可用碳二亚胺法，使 OTA 与大分子蛋白 KLH 结合，以合成的 OTA-KLH 作为人工合成的免疫抗原进行动物免疫。

OTA-KLH 抗原的制备：

- 1、用 1ml 二甲基甲酰胺（DMF）溶解 1-2mg OTA；
- 2、用 1ml 的 0.13mol/L NaHCO_3 偶联缓冲液溶解 1-2mg KLH 载体蛋白；
- 3、取 0.4-0.8mg OTA 的溶液加到 KLH 的溶液中；
- 4、溶解 2-4mg 碳二亚胺（EDC）于 1mL 双蒸水，并取 50-100 μL 加入到上述混合液中，室温作用 2 小时（避光）；
- 5、离心后取上清液上柱（Sephadex G-25）分离，进行紫外扫描检测。

多克隆赭曲霉毒素 A 抗体的制备：

1. 选取 4 周大的、体重约 1.5Kg 的健康新西兰大白兔。OTA 是一种半抗原，将 OTA 和 KLH 相连接作为抗原。

2. 油包水抗原乳化剂的制备：用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2ml 混合 2mg OTA-KLH，用匀浆器混合 2 小时。将制好的乳化剂滴入盛有冷水的烧杯中，一油滴状态能完整地停留在水面上，而不扩散，表明是稳定的。

3. 免疫兔子及抽血：先将兔子背部的毛小心剪去，然后取 600 μl 制备好的油包水抗原乳化剂，多位点地进行皮下注射，使抗原能缓慢扩散，每隔 1~2 周免疫一次，共需六次，在免疫 3~4 次后，从兔子的耳缘静脉抽血约 1 ml，离心 10min 后，得血清可进行鉴定。合格后稀释、分装、冻干备用。

Eu^{3+} -羊抗兔抗体的制备：

取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1-2ml，经 PD-10 柱转换缓冲条件，洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量（ $1.46A_{280}$ - $0.74A_{260}$ ），用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 500-1000 μl 稀释后的羊抗兔抗体加入含 0.2-0.4mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸（ Eu^{3+} -DTTA）的小瓶中，30℃磁力搅拌反应 20

小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1 × 40cm) 层析, A_{280} 监测收集蛋白峰, 稀释分装备用。

包被板固相抗原制备:

将 OTA-BSA 用 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH9.6 缓冲液稀释至 10mg/L 的包被液, 96 (或 48) 孔微孔板各孔加 100 μ l, 4°C 放置过夜。弃去包被液, 冲洗三次, 加 150 μ l 含 3g/L BSA 的上述缓冲液封闭, 4°C 放置过夜。弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20°C 冷冻保存。

试剂的配制:

(1) 标准赭曲霉毒素 A(OTA): (0ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml), 从 OTA 纯品中稀释得到, 稀释液为甲醇: 水=7: 3。

(2) 缓冲液: 8mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛 IgG、50 μ mol/L 二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)、0.1ml/L Tween-80 和 0.1% NaN_3 的 Tris-HCl pH7.8。

(3) 洗涤液: 14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

(4) 增强液的配制: 1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮 (β -NTA), 50 μ mol 三正辛基氧化膦 (TOPO), 1ml 曲拉通 X-100 (Triton X-100)。

试剂盒提供的试剂

每一个盒中的试剂足够进行 96 个测量, 盒中的材料如下:

(1).1 × 96 孔板 (8 条 × 12 孔, 可以拆分为单孔) 包被有 OTA-BSA。

(2).6 × OTA 标准液, 1.0ml/瓶, 标准液浓度为: 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000ng/ml。

(3).1 × OTA 抗体冻干品, 用时 0.5ml 蒸馏水溶解。

(4).1 × EU³⁺-羊抗兔抗体冻干品, 用时 0.5ml 蒸馏水溶解。

(5).1 × 增强液: 15ml。

(6).1 × 洗涤液: 30 ml, 用时以蒸馏水 1: 25 稀释。

(7).1 × 缓冲液: 30 ml,

实验室应自备的试剂

甲醇。

70%甲醇溶液: 30ml 蒸馏水或去离子水和 70ml 纯甲醇混合制备 70%甲醇溶液。

蒸馏水或去离子水。

测定之前注意事项

1. 使用之前将所有试剂回升至室温(18-30°C)。
2. 使用之后立即将所有试剂放回 2-8 °C。
3. 如果样品量大建议使用多通道移液器。
4. 在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖子盖住微孔。

5. 取出需用数量的微孔板及框架,将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于 2-8℃。

具体检测步骤如下:

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。

取 OTA-BSA 板条,加入 50 μ l 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1:20 稀释的 OTA 抗体 50 μ l,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,25℃振荡 1 小时,洗涤液洗三次,加缓冲液 1:20 稀释的 EU³⁺-羊抗兔抗体 100 μ l,25℃振荡 1 小时,用洗涤液洗六次,加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 OTA 含量,见表 1 和图 2,该例的样品浓度为 0.23 ng/ml。

表 1

OTA 标准点							
OTA 浓度 (ng/ml)	0	0.1	1	10	100	1000	玉米 样品
荧光值 (cps)	904592	763472	662223	562183	425973	179612	721235

实施例 2 制备试剂盒

OTA-KLH 抗原的制备:同实施例 1。

多克隆赭曲霉毒素 A 抗体的制备:同实施例 1。

Eu³⁺-羊抗兔抗体的制备:

取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1ml,经 PD-10 柱转换缓冲条件,洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH9.0 缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量 (1.46A₂₈₀-0.74A₂₆₀),用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 500 μ l 加入含 0.2mg 的 Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 (Eu³⁺-DTTA) 的小瓶中,28℃磁力搅拌反应 16 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sephadex-G50 柱 (1 \times 40cm) 层析,收集蛋白峰,稀释分装备用。

包被板固相抗原制备:同实例 1。

试剂的配制:

1. 标准赭曲霉毒素 A (OTA): (0ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml), 从 OTA 纯品中稀释得到,稀释液为甲醇:水=7:3。

2. 缓冲液: 8mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛 IgG、50 μ mol/L DTPA、0.1ml/L

Tween-20 和 0.1%NaN₃ 的 Tris-HCl pH7.8。

3、洗涤液：14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-20 和 0.2%NaN₃ 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

4、增强液的配制：1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μ mol β -NTA, 50 μ mol TOPO, 1ml Triton X-100。

试剂盒提供的试剂

每一个盒中的试剂足够进行 48 个测量，盒中的材料如下：

- (1).1 \times 48 孔板（4 条 X 12 孔，可以拆分为单孔）包被有 OTA-BSA。
- (2).6 \times OTA 标准液, 1.0ml/瓶, 标准液浓度为：0, 0.1, 1, 10, 100, 1000ng/ml。
- (3).1 \times OTA 抗体冻干品，用时 0.5ml 蒸馏水溶解。
- (4).1 \times EU³⁺-羊抗兔抗体冻干品，用时 0.5ml 蒸馏水溶解。
- (5).1 \times 增强液：15ml。
- (6).1 \times 洗涤液：30 ml，用时以蒸馏水 1：25 稀释。
- (7).1 \times 缓冲液：30 ml，

实施例 3 制备试剂盒

OTA-KLH 抗原的制备

1. 用二甲基甲酰胺（DMF）溶解 2mg OTA；
2. 用 0.13mol/L NaHCO₃ 偶联缓冲液溶解 2mg KLH 载体蛋白；
3. 取 0.8mg OTA 的溶液加到 KLH 的溶液中；
4. 溶解 4mg 碳化二亚胺（EDC）于双蒸水，并取 100 μ L 加入到上述混合液中，室温作用 2 小时（避光）；
5. 离心后取上清液上柱（Sephadex G-25）分离，进行紫外扫描检测。

多克隆赭曲霉毒素 A 抗体的制备与实施例 1 相同，略。

Eu³⁺-羊抗兔抗体的制备：

取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 2ml，经 PD-10 柱转换缓冲条件，洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量（1.46A₂₈₀-0.74A₂₆₀），用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 1000 μ l 加入含 0.4mg 的 Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸（Eu³⁺-DTTA）的小瓶中，30 $^{\circ}$ C 磁力搅拌反应 20 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱（1 \times 40cm）层析，A₂₈₀ 监测收集蛋白峰，稀释分装备用。

固相抗原制备与实施例 1 相同。

试剂的配制与实施例 1 相同。

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同。

实验室应自备的试剂与实施例 1 相同。

测定之前注意事项同实施例 1。

具体检测步骤同实施例 1。

实施例 4

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同，用于检测大麦样品。

具体检测步骤如下：

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。

取 OTA-BSA 板条，加入 50 μ l 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，每个标准和样品必须使用新的吸头，加缓冲液 1：20 稀释的 OTA 抗体 50 μ l，移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体，25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时，洗涤液洗三次，加缓冲液 1：20 稀释的 EU³⁺-羊抗兔抗体 100 μ l，25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时，用洗涤液洗六次，加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 OTA 含量，见表 2 和图 2，该例的样品浓度为 0.17 ng/ml。

表 2

OTA 标准点							
OTA 浓度 (ng/ml)	0	0.1	1	10	100	1000	大麦 样品
荧光值 (cps)	904592	763472	662223	562183	425973	179612	733093

实施例 5

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同，用于检测血液样品。

具体检测步骤如下：

先将血液样品进行处理：取 0.5ml 血液加 0.5ml 甲醇的水溶液（甲醇：水=7：3）进行稀释，备用。

取 OTA-BSA 板条，加入 50 μ l 的 OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，每个标准和样品必须使用新的吸头，加缓冲液 1：20 稀释的 OTA 抗体 50 μ l，移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体，25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时，洗涤液洗三次，加缓冲液 1：20 稀释的 EU³⁺-羊抗兔抗体 100 μ l，25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时，用洗涤液洗六次，加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 OTA 含量，见表 3 和图 2，该例的样品浓度为 0.14 ng/ml。

表 3

OTA 标准点							
OTA 浓度 (ng/ml)	0	0.1	1	10	100	1000	血液 样品
荧光值 (cps)	904592	763472	662223	562183	425973	179612	738848

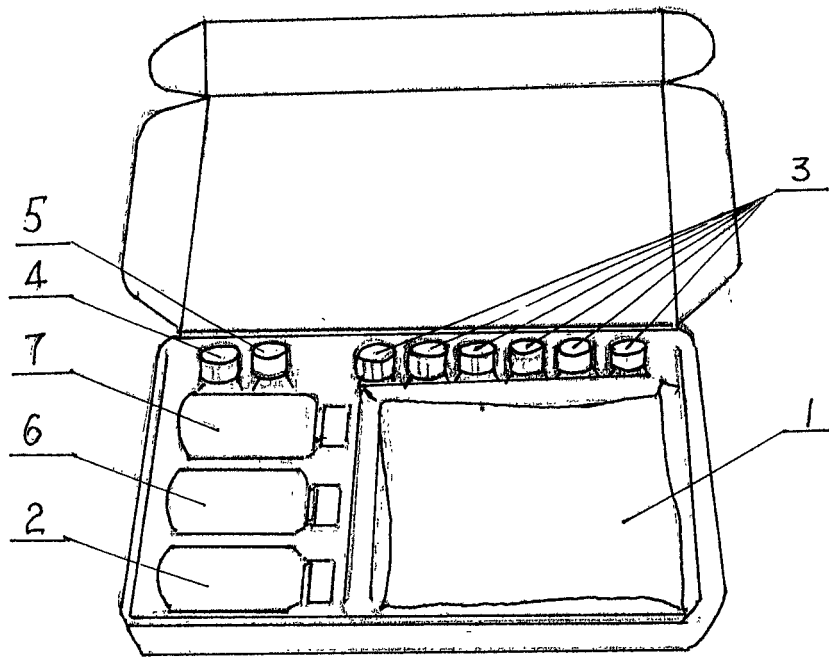


图 1

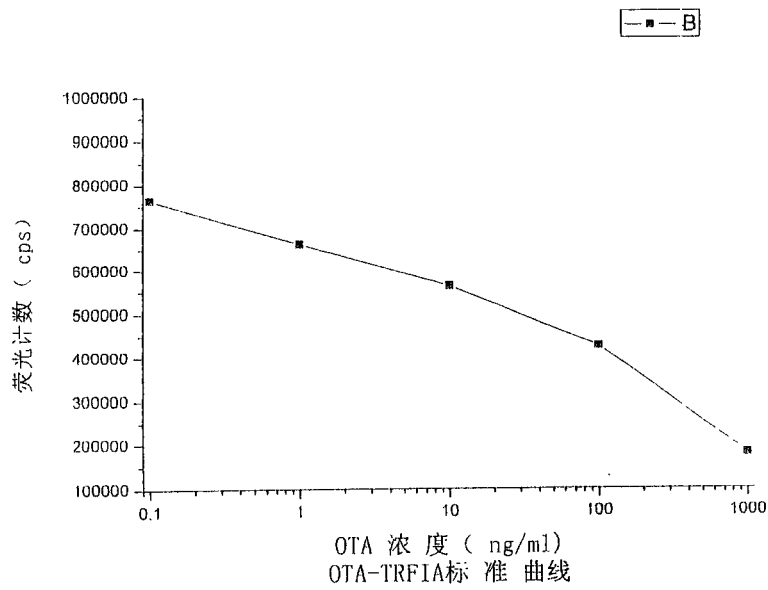


图 2

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	CN1268931C	公开(公告)日	2006-08-09
申请号	CN200410065382.2	申请日	2004-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	陶文沂 金坚 黄飏 张莲芬 时瑾		
发明人	陶文沂 金坚 黄飏 张莲芬 时瑾		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/569 G01N33/533 G01N21/64		
其他公开文献	CN1614422A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测赭曲霉毒素A的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术领域，用于对粮食，饲料及其食品中赭曲霉毒素A(OTA)含量的检测。本发明配制的试剂盒，采用TRFIA检测OTA，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有OTA-BSA，加入OTA标准或样品，再加入OTA抗体。游离的OTA与微孔板上的OTA-BSA竞争OTA抗体，没有连接的OTA抗体被洗涤除去，加入Eu³⁺-羊抗兔抗体，标记免疫反应后没有连接的Eu³⁺-羊抗兔抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的OTA浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中OTA的含量。本发明提供的检测OTA试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，可以达到1ng/ml以上。

