



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510038865.8

[43] 公开日 2005年9月28日

[11] 公开号 CN 1673747A

[22] 申请日 2005.4.12

[21] 申请号 200510038865.8

[71] 申请人 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 赵晓联  
张莲芬 时瑾

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利事务所

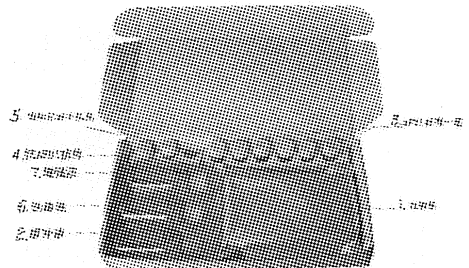
代理人 时旭丹

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称 一种检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的试剂盒及其检测方法

### [57] 摘要

一种检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 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,饲料及其食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 含量的检测。本发明配制的试剂盒,采用 TRFIA 检测 AFB<sub>1</sub>,测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有 AFB<sub>1</sub>-HRP,加入 AFB<sub>1</sub> 标准或样品,再加入 AFB<sub>1</sub> 抗体。游离的 AFB<sub>1</sub> 与微孔板上的 AFB<sub>1</sub>-HRP 竞争 AFB<sub>1</sub> 抗体,没有连接的 AFB<sub>1</sub> 抗体被洗涤除去,加入 EU<sup>3+</sup>-羊抗兔抗体,标记免疫反应后没有连接的 EU<sup>3+</sup>-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 AFB<sub>1</sub> 浓度成反比,对照标准曲线即可确定被测样品中 AFB<sub>1</sub> 的含量。本发明提供的检测 AFB<sub>1</sub> 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。



1.一种检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>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),黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>标准(3),黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>的抗体冻干品(4),铈标记的羊抗兔抗体(5),洗涤液(6)和增强液(7)所组成。

2.根据权利要求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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>的缓冲液将黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>-辣根过氧化物酶稀释至 0.25mg/L 做为包被液,96 或 48 孔微孔板各孔加 100 μl,4℃放置过夜,弃去包被液,冲洗三次,加 150 μl 含 0.2%明胶和 2%蔗糖的 50mmol/L pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液封闭,4℃放置过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置-20℃冷冻保存。

3.根据权利要求1所述的试剂盒,其中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>标准(3),共 6 瓶,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>浓度分别为:0ng/ml,0.05ng/ml,0.1ng/ml,1ng/ml,10ng/ml,100ng/ml。

4.根据权利要求1所述的试剂盒,其中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>的抗体冻干品(4),用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2ml 混合 2mg 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>-牛血清白蛋白,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,其中的铈标记的羊抗兔抗体(5),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<sup>3+</sup>-N<sub>2</sub>-[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,其中的铈标记的羊抗兔抗体(5),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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 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<sup>3+</sup>-N<sub>2</sub>-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸的小瓶中,28-30℃磁力搅拌反应 16-20 小时,反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sephadex-G50 柱(1×40cm)层析,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):8mmol/L NaCl、0.1%明胶、0.2%牛 IgG、50 μmol/L 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80 和 0.1%NaN<sub>3</sub>的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8;洗涤液(6):14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2%NaN<sub>3</sub>的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8;增强液(7):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 所述的试剂盒检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的方法，其特征是取包被有黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>-辣根过氧化物酶的微孔包被板，加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准或处理好的样品到各自的微孔中，再加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 抗体，振荡反应，洗涤液洗涤，加标记的羊抗兔抗体，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黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量。

9.根据权利要求 8 所述的检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的方法，其操作为：取包被有黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>-辣根过氧化物酶的微孔包被板，加入 50 $\mu$ l 的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准或处理好的样品到各自的微孔中，加 50 $\mu$ l 以缓冲液 (2) 作稀释剂，1: 1000 稀释黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 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: 100 稀释的 100 $\mu$ l EU<sup>3+</sup>-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 $\mu$ 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黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量。

10.根据权利要求 8 所述的检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的方法，其中的样品处理，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，甲醇：水=7：3，进行稀释，备用。

## 一种检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的试剂盒及其检测方法

### 技术领域

一种检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 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,饲料及其食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (简称 AFB<sub>1</sub>) 含量的检测。

### 背景技术

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 是真菌黄曲霉 *Aspergillus flavus* 和寄生曲霉 *A. parasiticus* 菌株产生的一组强毒性的次生代谢产物,尤其是 AFB<sub>1</sub> 为强污染物质,分布范围广,能引起人类,各种饲料动物的急性中毒死亡,还能引起致癌,致畸,致突变,即使几十  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的含量仍有很大的毒性。食品和饲料中黄曲霉毒素 1mg/kg 以上有剧毒。其毒性为氰化钾的 10 倍,为砒霜的 68 倍。食用被黄曲霉毒素污染严重的食品后可出现发热,腹痛,呕吐,食欲减退,严重者在 2~3 周内出现肝脾肿大,肝区疼痛,皮肤黏膜黄染,腹水,下肢浮肿及肝功能异常等中毒性肝病症状,也可能出现心脏扩大,肺水肿,甚至痉挛,昏迷等症。由于不易防止食物被真菌污染,因此人们对长期食用低剂量黄曲霉毒素污染的可能性非常关注。由于黄曲霉毒素特别是 B<sub>1</sub> 是潜在的致癌物质,人长期接触低剂量的黄曲霉毒素可能会有影响,1988 年国际癌症研究机构将黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 列为 1A 类致癌物质。

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 是最强的致癌物质,它在食物中的法定限量非常低,其限量标准为 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。欧盟委员会对婴幼儿食品中的毒素限量标准进行了补充。草案规定,在包括谷类食品在内的婴幼儿食品中,毒性最大的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的最大限量为 0.05 微克/千克;在婴儿配方食品及改进配方中,黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 的最大限量为 0.025 微克/千克。

目前黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定方法有多种,如:薄层色谱法 TLC (灵敏度为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ),高效液相色谱法 HPLC (灵敏度为 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ),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 1ng/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。

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<sup>3+</sup> 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 $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮( $\beta$ -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 AFB<sub>1</sub> 的试剂盒及其检测方法, 用于对粮食, 饲料及其食品中 AFB<sub>1</sub> 含量的检测。

本发明的技术方案: 该检测 AFB<sub>1</sub> 的试剂盒是由 1、96 或 48 孔包被板, 2、缓冲液, 3、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准, 4、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的抗体冻干品, 5、铕标记的羊抗兔抗体, 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 AFB<sub>1</sub>。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<sup>3+</sup>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 AFB<sub>1</sub>-HRP 的微孔板, 加入 AFB<sub>1</sub> 标准或已处理好的样品到各自的微孔中、再加入 AFB<sub>1</sub> 抗体, 振荡反应, 游离的 AFB<sub>1</sub> 与微孔板上的 AFB<sub>1</sub>-HRP 竞争 AFB<sub>1</sub> 抗体, 洗涤液洗涤, 没有连接的 AFB<sub>1</sub> 抗体在洗涤步骤中被除去。加入 EU<sup>3+</sup>-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<sup>3+</sup>-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 AFB<sub>1</sub> 浓度成反比, 对照标准曲线即可确定样品中抗原的量。

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: 检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的试剂盒示意图。1、96 或 48 孔包被板, 2、缓冲液, 3、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准, 4、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 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: AFB<sub>1</sub>-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

##### AFB<sub>1</sub>-KLH 抗原的制备

1. 用二甲基甲酰胺(DMF)溶解 2mg AFB<sub>1</sub>;
2. 用 0.13mol/L NaHCO<sub>3</sub> 偶联缓冲液溶解 2mg KLH 载体蛋白;
3. 取 0.8mg AFB<sub>1</sub> 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 $\mu$ 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。

### 多克隆黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 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。AFB<sub>1</sub> 是一种半抗原,将 AFB<sub>1</sub> 和 BSA 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 AFB<sub>1</sub>-BSA,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<sup>3+</sup>-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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量(1.46A<sub>280</sub>-0.74A<sub>260</sub>),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<sup>3+</sup>-N<sub>2</sub>-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸(Eu<sup>3+</sup>-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<sub>280</sub> 监测收集蛋白峰,稀释分装备用。

### 包被板固相抗原制备:

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>-辣根过氧化物酶(AFB<sub>1</sub>-HRP)抗原由江苏省微生物研究所提供,将 AFB<sub>1</sub>-HRP 用 50mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH9.6 缓冲液稀释至 0.25mg/L 的包被液,96(或 48)孔微孔板各孔加 100 μl,4℃放置过夜。弃去包被液,冲洗三次,加 150 μl 含 0.2%明胶和 2%蔗糖的 50mmol/L pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液封闭,4℃放置过夜。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置-20℃冷冻保存。

### 试剂的配制:

(1) 标准黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 由江苏省微生物研究所提供,共 6 瓶,浓度分别为:0ng/ml, 0.05ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml。

(2) 缓冲液:8mmol/L NaCl、0.1%明胶、0.2%牛 IgG、50 μmol/L 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80 和 0.1%NaN<sub>3</sub> 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

(3) 洗涤液:14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2%NaN<sub>3</sub> 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 μmol β-萘甲酰三氟丙酮(β-NTA), 50 μmol 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 AFB<sub>1</sub>-HRP。
- (2).6 × AFB<sub>1</sub> 标准液, 1.0ml/瓶,标准液浓度为：0, 0.05, 0.1, 1, 10, 100ng/ml。
- (3).1 × AFB<sub>1</sub> 抗体冻干品，用时 0.5ml 蒸馏水溶解。
- (4).1 × EU<sup>3+</sup>-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℃)。
2. 使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃。
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 AFB<sub>1</sub>-HRP 板条，加入 50μl 的 AFB<sub>1</sub> 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 1：1000 稀释的 AFB<sub>1</sub> 抗体 50μl，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 1：100 稀释的 EU<sup>3+</sup>-羊抗兔抗体 100μl，25℃振荡 1 小时，用洗涤液洗六次，加 200μl 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 AFB<sub>1</sub> 含量，见表 1 和图 2，该例的样品中 AFB<sub>1</sub> 浓度为 0.19 ng/ml。

表 1

AFB <sub>1</sub> 标准点							
AFB <sub>1</sub> 浓度 (ng/ml)	0	0.05	0.1	1	10	100	玉米 样品
荧光值 (cps)	462891	419758	358320	140082	62342	39118	299562

## 实施例 2 制备试剂盒

多克隆黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 抗体的制备：同实施例 1。

Eu<sup>3+</sup>-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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH9.0 缓冲液。收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量（1.46A<sub>280</sub>-0.74A<sub>260</sub>），用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 500 μl 加入含 0.2mg 的 Eu<sup>3+</sup>-N<sub>2</sub>-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸（Eu<sup>3+</sup>-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（1×40cm）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. 标准黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>): (0ng/ml, 0.05ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml)。

2. 缓冲液：8mmol/L NaCl、0.1%明胶、0.2%牛 IgG、50 μmol/L 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80 和 0.1%NaN<sub>3</sub> 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8

3. 洗涤液：14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-20 和 0.2%NaN<sub>3</sub> 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 μmol β-NTA, 50 μmol 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 × 48 孔板（4 条 X 12 孔，可以拆分为单孔）包被有 AFB<sub>1</sub>-HRP。
- (2). 6 × AFB<sub>1</sub> 标准液，1.0ml/瓶，标准液浓度为：0, 0.05, 0.1, 1, 10, 100ng/ml。
- (3). 1 × AFB<sub>1</sub> 抗体冻干品，用时 0.5ml 蒸馏水溶解。
- (4). 1 × EU<sup>3+</sup>-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，

实施例 3 制备试剂盒

AFB<sub>1</sub>-KLH 抗原的制备，同实施例 1。

多克隆黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 抗体的制备与实施例 1 相同，略。

Eu<sup>3+</sup>-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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量（1.46A<sub>280</sub>-0.74A<sub>260</sub>），用上述洗脱液稀释羊抗兔

抗体至 2g/L。取 1000  $\mu$ l 加入含 0.4mg 的  $\text{Eu}^{3+}$ - $\text{N}_2$ -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 ( $\text{Eu}^{3+}$ -DTTA) 的小瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$  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,  $A_{280}$  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, 用于检测棉籽粕样品。

具体检测步骤如下:

先将棉籽粕样品进行处理: 将棉籽粕样品粉碎至 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  $\text{AFB}_1$ -HRP 板条, 加入 50 $\mu$ l 的  $\text{AFB}_1$  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: 1000 稀释的  $\text{AFB}_1$  抗体 50 $\mu$ l, 移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体, 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡 0.5 小时, 洗涤液洗三次, 加缓冲液 1: 100 稀释的  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡 0.5 小时, 用洗涤液洗六次, 加 200 $\mu$ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的  $\text{AFB}_1$  含量, 见表 2 和图 2, 该例的样品中  $\text{AFB}_1$  浓度为 4.17 ng/ml。

表 2

AFB <sub>1</sub> 标准点							
AFB <sub>1</sub> 浓度 (ng/ml)	0	0.05	0.1	1	10	100	棉籽粕 样品
荧光值 (cps)	632195	573827	421368	241579	89485	49953	144364

#### 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  $\text{AFB}_1$ -HRP 板条, 加入 50 $\mu$ l 的  $\text{AFB}_1$  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: 1000 稀释的 AFB<sub>1</sub> 抗体 50 $\mu$ 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 3 次，加缓冲液 1: 100 稀释的 EU<sup>3+</sup>-羊抗兔抗体 100 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5 小时，用洗涤液洗 6 次，加 200 $\mu$ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 AFB<sub>1</sub> 含量，见表 3 和图 2，该例的样品中 AFB<sub>1</sub> 浓度为 0.07 ng/ml。

表 3

AFB <sub>1</sub> 标准点							
AFB <sub>1</sub> 浓度 (ng/ml)	0	0.05	0.1	1	10	100	血液 样品
荧光值 (cps)	875714	797246	622599	322290	135619	95452	738848

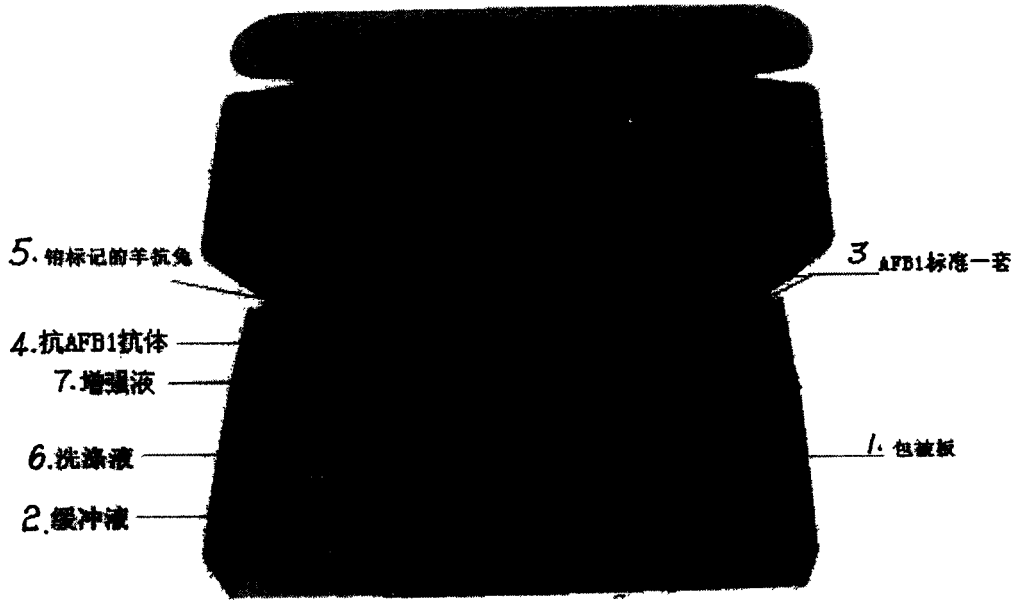
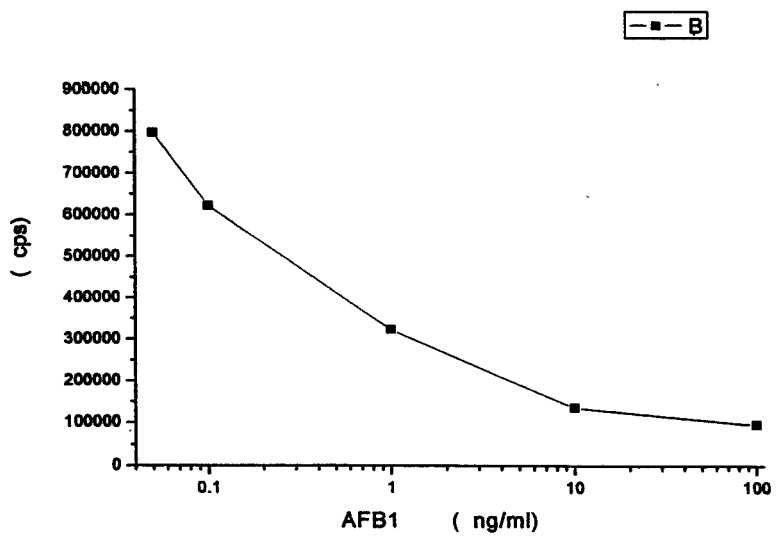


图 1



AFB1-TRFIA

图 2

专利名称(译)	一种检测黄曲霉毒素B1的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1673747A</a>	公开(公告)日	2005-09-28
申请号	CN200510038865.8	申请日	2005-04-12
[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 赵晓联 张莲芬 时瑾		
发明人	陶文沂 金坚 黄飏 赵晓联 张莲芬 时瑾		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测黄曲霉毒素B1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，饲料及其食品中黄曲霉毒素B1 (AFB1)含量的检测。本发明配制的试剂盒，采用TRFIA检测AFB1，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有AFB1 - HRP，加入AFB1标准或样品，再加入AFB1抗体。游离的AFB1与微孔板上的AFB1 - HRP竞争AFB1抗体，没有连接的AFB1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AFB1浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中AFB1的含量。本发明提供的检测AFB1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。

