



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103792356 A

(43) 申请公布日 2014.05.14

(21) 申请号 201210433003.5

(22) 申请日 2012.11.04

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 洪霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法

(57) 摘要

本发明为检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及其检测方法,其检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括:包被了伏马毒素抗原的酶标板、伏马毒素标准品、伏马毒素抗体工作液、伏马毒素酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。伏马毒素检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应,把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液 A、底物液 B,在酶的作用下孔里将会出现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中伏马毒素的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测玉米中的伏马毒素。

1. 检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括酶标板、伏马毒素标准品、伏马毒素抗体工作液、伏马毒素酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

2. 检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括以下步骤:酶标板的制备、伏马毒素标准品的制作、伏马毒素单克隆抗体及其工作液的制备、伏马毒素酶标二抗工作液的制备、洗涤液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备。

3. 根据权利要求 2 所述伏马毒素的检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的伏马毒素包被抗原是将伏马毒素半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将伏马毒素抗原稀释成 1:10000 比例,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300 μ L/孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,180 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存。

4. 根据权利要求 2 所述伏马毒素的检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的伏马毒素标准品浓度分别为 0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、150 ng/mL。

5. 根据权利要求 2 所述伏马毒素的检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的伏马毒素蛋白质偶联物单克隆抗体是采用伏马毒素人工抗原免疫兔所得,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:40000。

6. 根据权利要求 2 所述伏马毒素的检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的伏马毒素酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成 1:2000 比例;所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为 2 mol/L 的硫酸;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其包含 0.5% 吐温-20,0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

7. 权利要求 2 所述的检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,基于抗原抗体进行间接竞争酶联免疫反应,该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25 $^{\circ}$ C)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有伏马毒素抗原的酶标板,加标准品/样本 50 μ L/孔到对应的微孔中;

(4) 加入伏马毒素酶标二抗工作液,50 μ L/孔,然后加入伏马毒素抗体工作液,50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 260 μ L/孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,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);

(6) 加入底物液 A 50 μ L/孔,底物液 B 50 μ 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 15~20 min;

(7) 加入终止液 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据);

(8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计

算样品中伏马毒素的含量。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

- (1) 配制 90% 的甲醇溶液(每个样品需要:4 mL 蒸馏水 +36 mL 甲醇);
- (2) 研磨代表性样品(使 50% 的样品可以通过一个 20 目的滤网);
- (3) 称量 20 g 研磨过滤后的样品加入 40 mL 90% 的甲醇溶液,样品稀释比为 1:2(w/v);
- (4) 在密封的容器里混合,震荡涡旋 1 min;
- (5) 静置、用滤纸(Whatman #1)过滤 5-10 mL 以上处理的液体,收集滤液;
- (6) 以 1:20 的比例稀释滤液(取 0.1 mL 滤液然后加入 1.9 mL 的蒸馏水或去离子水),混匀待测。

检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,具体地涉及一种用于定量检测坚果、谷物和谷物产品中的伏马毒素残留量的 ELISA 试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 伏马毒素 (Fumonisin) 是一组主要由串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 在一定温度和湿度条件下繁殖所产生的真菌毒素。1988 年, Gelderblom 等首次从玉米中分离出伏马毒素 B1。伏马毒素在自然界中分布广泛,且危害性大,逐渐引起了国内外学者的高度重视。目前,已发现的伏马毒素结构类似物主要分为 A、B、C、P 四类,包括 FA1、FA2、FB1、FB2、FB3、FB4、FC1、FC2、FC3、FC4、FP1 等。

[0003] 伏马毒素 (B1, B2, 和 B3) 是由镰孢菌 (霉) 属念珠菌产生的真菌毒素。在世界范围内都发现了伏马毒素污染玉米的现象。研究表明伏马毒素可以诱发老鼠患肝癌,猪的肺水肿和人的脑脊髓蛋白质病。在一些地区中玉米中伏马毒素含量很高,在这些地区 (比如中国和非洲) 人的食道癌具有高发性。

[0004] 研究证实伏马毒素可致马大脑白质软化症 (EL-EM), 神经性中毒而表现意识障碍、失明和运动失调等症状, 严重者甚至造成死亡。对猪造成肺水肿综合征 (PPE), 并能造成肝脏和食道损伤。伏马毒素还可引起灵长类动物的动脉粥样硬化样改变, 诱发大鼠肝癌, 与人类食道癌的发生也密切相关。国际癌症研究机构与加利福尼亚环境保护机构已宣布伏马毒素为人类潜在的致癌物质 (2B 级致癌物)。

[0005] 基于伏马毒素的污染范围较广, 毒性作用也较大, 许多国家和地区对伏马毒素进行了系统研究。但目前国际上对于食品与饲料中伏马毒素的限量及检测方法尚无统一标准。瑞典规定人类食物中伏马毒素的限量为 1 mg/kg, 美国食品与药品管理局 (FDA) 发布了供人类食用的玉米和玉米产品伏马毒素的最高限量指导性公告, 规定人类食用玉米中伏马毒素最高限量为 2 mg/kg。同时, FDA 的畜牧医学中心 (CVM) 也发布了动物饲料中伏马毒素的最高限量指导性公告, 规定其限量范围为 1~50 mg/kg。在 FAO/WHO 联合会上关于食品添加剂的会议 (2001 年 2 月) 中规定, 伏马毒素对人体的安全限量为每天摄入量按人体体重算 FB1、FB2、FB3 量不超过 2 g/kg。FB1 以低于最大限量为最好, 对 FB2、FB3 的限制相对较宽。我国对此的相关法规也正在制定中。在出入境检验检疫行业推荐标准中, 液相色谱法对伏马毒素 B1、B2 的测定低限均为 0.05 mg/kg, 而酶联免疫吸附法则推荐检测低限为 12 g/kg。这些行业标准和检测方法均可为我国制定国家标准提供一定的依据。

[0006] 免疫学技术具有敏感、特异、简便的特点, 近年来已被应用于伏马毒素残留检测。目前伏马毒素的免疫学检测试剂盒大多来自进口, 而国内有关伏马毒素的试剂盒的开发还相对落后。本发明旨在建立一种检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法。

发明内容

[0007] 针对现有技术中存在的问题, 本发明提供了检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒, 其检

测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。本发明提供了检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法。

[0008] 检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括酶标板、伏马毒素标准品、伏马毒素抗体工作液、伏马毒素酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

[0009] 检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括以下步骤:酶标板的制备、伏马毒素标准品的制作、伏马毒素单克隆抗体及其工作液的制备、伏马毒素酶标二抗工作液的制备、洗涤液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备。

[0010] 其进一步特征在于:所述的伏马毒素包被抗原是将伏马毒素半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将伏马毒素抗原稀释成 1:10000 比例,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300 μ L/孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,180 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存。

[0011] 所述的伏马毒素标准品浓度分别为 0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、150 ng/mL。

[0012] 伏马毒素蛋白质偶联物单克隆抗体工作液的制备:采用伏马毒素人工抗原免疫兔所得到,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:40000。

[0013] 所述伏马毒素酶标二抗工作液的制备:用酶标二抗稀释液稀释成 1:2000 比例;所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为 2 mol/L 的硫酸;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其包含 0.5% 吐温-20,0.01mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0014] 伏马毒素的 ELISA 试剂盒的检测方法,基于抗原抗体进行间接竞争酶联免疫反应,该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25 $^{\circ}$ C)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有伏马毒素抗原的酶标板,加标准品/样本 50 μ L/孔到对应的微孔中;

(4) 加入伏马毒素酶标二抗工作液,50 μ L/孔,然后加入伏马毒素抗体工作液,50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 260 μ L/孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,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);

(6) 加入底物液 A 50 μ L/孔,底物液 B 50 μ 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 15~20min;

(7) 加入终止液 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据);

(8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中伏马毒素的含量。

[0015] 其中,所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

- (1) 配制 90% 的甲醇溶液(每个样品需要:4 mL 蒸馏水+36 mL 甲醇);
- (2) 研磨代表性样品(使 50% 的样品可以通过一个 20 目的滤网);
- (3) 称量 20 g 研磨过滤后的样品加入 40 mL 90% 的甲醇溶液,样品稀释比为 1:2(w/v);
- (4) 在密封的容器里混合,震荡涡旋 1 min;
- (5) 静置、用滤纸(Whatman #1) 过滤 5-10 mL 以上处理的液体,收集滤液;
- (6) 以 1:20 的比例稀释滤液(取 0.1 mL 滤液然后加入 1.9 mL 的蒸馏水或去离子水),混匀待测。

[0016] 本发明采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法来检测。用于检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的测定原理:样品中的伏马毒素与酶标板上固定的抗原特异性竞争体,加入酶标二抗,与抗体反应,通过酶催化显色剂显色,根据显色的深浅来判断样品中伏马毒素的含量。如果样品中的伏马毒素含量少,显色深;反之,则显色浅。本发明的试剂盒检测方法操作简便,检测灵敏、准确、快速,适用于大批量样品的检测。

附图说明

[0017] 图 1 为伏马毒素标准曲线图。

具体实施方式

[0018] 检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒,其包括酶标板、伏马毒素标准品、伏马毒素抗体工作液、伏马毒素酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

[0019] 下面具体描述本发明中检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒的制备。

[0020] 伏马毒素蛋白质偶联物的制备:

将伏马毒素半抗原与载体蛋白 BSA 按 12:1 的结合比混合在 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)中,然后加入入碳二亚胺,搅拌 1~2h,置室温反应 24 h,最后用 0.2 mol/L pH 7.6 的 PBS 透析两天,除去未反应的半抗原,即可得到伏马毒素蛋白质偶联物。

[0021] 伏马毒素抗体的制备:

选用 3 月龄健康大白兔,通过三次免疫,每次伏马毒素蛋白质偶联物免疫原用量为 50 μ g/0.05 mL,每次免疫间隔时间为 2 周。初次免疫分别将免疫抗原与费氏佐剂及不安全佐剂等量混合,劲部皮下多点注射,二次、三次免疫直接注入腹腔。融合前 3 天每只腹腔注入 25 μ g 伏马毒素蛋白质偶联物进行加强免疫,免疫后第 6 d 耳静脉取血,采用间接竞争 ELISA 法测定效价。取得较高效价后用半抗原直接在大腿肌肉注射,8 d 后颈动脉采全血,分离抗血清,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,制成冻干粉后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0022] 酶标伏马毒素的制备:

将 25% 戊二醛用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)稀释至 5%,称取 5 mg HRP 溶于 0.5 mL 5% 的戊二醛,37 $^{\circ}$ C 水浴结合 2 h;加入 0.15 mol/L NaCl 1.0 mL,充分混匀后,置 4 $^{\circ}$ C 预冷 10 min;加入无水乙醇 2.4 mL,颠倒混合,立即 1000 r/min 离心 10 min;弃掉上清,沉淀用冷的 75% 乙醇洗一次,将离心管倒置,风干;加入 0.05 mol/L pH 9.6 的 CBS 0.5 mL 溶解沉淀物;将 5 mg PEA 抗体溶于 0.5 mL 0.15 mol/L NaCl,再与醛化 HRP 溶液混合;加

入 1.0 mol/L pH 9.6 的 CBS 溶液,调节 pH 至 9.0~9.5,于 4℃下,电磁搅拌结合 24 h;加入 0.1 mL 0.15 mol/L 赖氨酸,以封闭残留的醛基,终止反应,放置于 4℃下 2 h;将反应物通过 Sephadex G-200 凝胶柱,用 PBS 洗脱,收集第一洗脱峰;或将反应物装入透析袋,用 0.01 mol/L pH7.2 PBS,4℃透析过夜并收集;即为酶标记抗体(HRP-伏马毒素)。

[0023] 制备包被有伏马毒素包被抗原的酶标板:

酶标板包被伏马毒素抗原,包被抗原是将伏马毒素半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将伏马毒素抗原稀释成 1:10000 比例,100 μL/孔,37℃放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300 μL/孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,180 μL/孔,37℃放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25℃)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4℃下保存。

[0024] 所述的伏马毒素标准品配制浓度分别为 0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、150 ng/mL。

[0025] 所述的伏马毒素蛋白质偶联物单克隆抗体工作液的制备:采用伏马毒素人工抗原免疫兔所得,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:40000。

[0026] 所述伏马毒素酶标二抗工作液的制备:用酶标二抗稀释液稀释成 1:2000 比例;所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为 2 mol/L 的硫酸;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其包含 0.5% 吐温-20,0.01mol/L 的 PBST,pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0027] 基于上述制备的试剂,本发明用于检测伏马毒素的 ELISA 试剂盒包括如下材料:

- (1) 96 孔酶标板 ×1 块(包被有偶联抗原);
- (2) 标准液 ×6 瓶:(1mL/瓶) 0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、150 ng/mL;
- (3) 酶标二抗工作液 7 mL;
- (4) 抗体工作液 7 mL;
- (5) 底物液 A 7 mL;
- (6) 底物液 B 7 mL;
- (7) 终止液 7 mL;
- (8) 10× 浓缩洗涤液 20 mL;

使用本试剂盒时的注意事项:

(1) 室温低于 20℃或试剂及样本没有回到室温(20~25℃)会导致所有标准的 OD 值偏低;

(2) 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况,则会出现标准曲线不成线性,重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作;

(3) 每加一种试剂前需将其摇匀;

(4) 反应终止液为 2M 盐酸,避免接触皮肤;

(5) 不要使用过了有效日期的试剂盒;也不要使用过了有效期的试剂盒中的任何试剂,掺杂使用过了有效期的试剂盒会引起灵敏度的降低;不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂;

(6) 储存条件:保存试剂盒于2~8℃,不要冷冻,将不用的酶标板微孔板放进自封袋重新密封。标准物质和无色的发色剂对光敏感,因此要避免直接暴露在光线下;

(7) 试剂变质的迹象:发色试剂有任何颜色表明发色剂变质,应当弃之。0标准的吸光度(450/630 nm)值小于0.5($A_{450\text{ nm}} < 0.5$)时,表示试剂可能变质,请勿使用;

(8) 该试剂盒最佳反应温度为25℃,温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化。

[0028] 本发明伏马毒素的ELISA试剂盒在检测坚果、谷物和谷物产品中的伏马毒素残留量中的应用:

本发明的试剂盒用于检测坚果、谷物和谷物产品中的伏马毒素残留量时,通过以下步骤实施:样品预处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0029] (1) 样品预处理

配制90%的甲醇溶液(每个样品需要:4 mL蒸馏水+36 mL甲醇);研磨代表性样品(使50%的样品可以通过一个20目的滤网);称量20 g研磨过滤后的样品加入40 mL 90%的甲醇溶液,样品稀释比为1:2(w/v);在密封的容器里混合,震荡涡旋1 min;静置、用滤纸(Whatman #1)过滤5-10 mL以上处理的液体,收集滤液;以1:20的比例稀释滤液(取0.1 mL滤液然后加入1.9 mL的蒸馏水或去离子水),混匀待测。

[0030] (2) 用本发明试剂盒进行检测上述样品中伏马毒素残留量

取包被有伏马毒素抗原的酶标板,加标准品/样本50 μL/孔到对应的微孔中;加入伏马毒素酶标二抗工作液,50 μL/孔,然后加入伏马毒素抗体工作液,50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25℃避光环境中反应30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液260 μL/孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干;加入底物液A 50 μL/孔,底物液B 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15~20 min;加入终止液50 μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处或双波长450/630 nm检测,测定每孔吸光度值(请在5 min内读完数据);对比待测样品与标准品的吸光度值大小,定量分析待测样品中的伏马毒素的残留量。

[0031] (3) 分析结果

用上述制备的试剂盒中的6个伏马毒素标准品浓度0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、150 ng/mL,在450/630 nm处测量吸光度值。

[0032] 百分吸光率的计算,标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0标准)的吸光度值,再乘以100%,即

$$\text{百分吸光度值}(\%) = B/B_0 \times 100\%$$

其中B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 —0 ppb标准溶液的平均吸光度值。

[0033] 以标准品百分吸光率为纵坐标,以伏马毒素标准品浓度(ppb)的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。标准曲线见附图1。 $Y = -19.495X + 101.84$, $R^2 = 0.9989$ 。将样本的 B/B_0 值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应样本的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中伏马毒素的实际浓度。

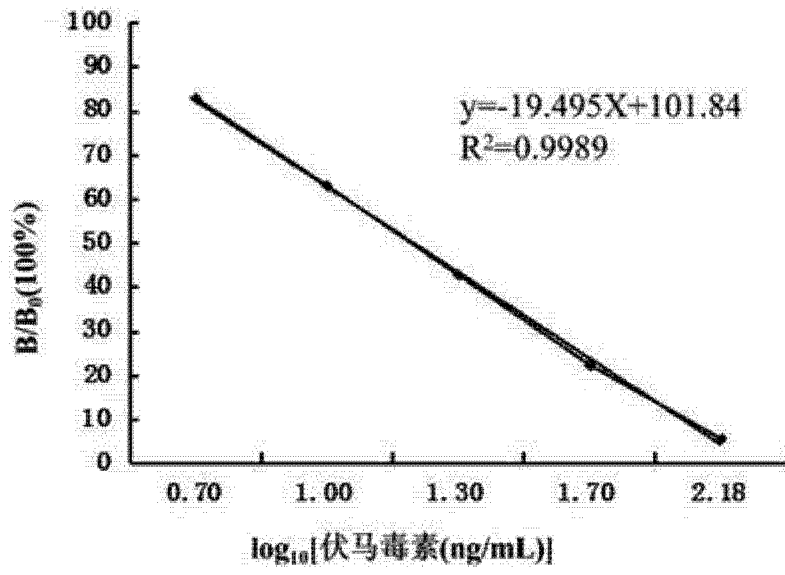


图 1

专利名称(译)	检测伏马毒素的ELISA试剂盒的制备及检测方法		
公开(公告)号	CN103792356A	公开(公告)日	2014-05-14
申请号	CN201210433003.5	申请日	2012-11-04
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 洪霞		
发明人	杜道林 洪霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N2333/40		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为检测伏马毒素的ELISA试剂盒的制备及其检测方法，其检测灵敏、准确、快速，操作简便、特异性强，适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括：包被了伏马毒素抗原的酶标板、伏马毒素标准品、伏马毒素抗体工作液、伏马毒素酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。伏马毒素检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应，把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中，孵育一段时间后，洗板加入底物液A、底物液B，在酶的作用下孔里将会出现蓝色，加入终止液，颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中伏马毒素的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测玉米中的伏马毒素。

