



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808934 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201210439123. 6

(22) 申请日 2012. 11. 07

(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 曾昆

(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

用于检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备

(57) 摘要

本发明为一种用于检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备,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:包被了呕吐毒素抗原的酶标板、呕吐毒素标准品、呕吐毒素抗体工作液、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。呕吐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呕吐毒素的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测谷类及谷物制品中的呕吐毒素。

1. 检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括酶标板、呕吐毒素标准品、呕吐毒素抗体工作液、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. 检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、呕吐毒素标准品的制作、呕吐毒素单克隆抗体及其工作液的制备、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 所述呕吐毒素的检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的呕吐毒素包被抗原是将呕吐毒素半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为卵清白蛋白(OVA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将呕吐毒素抗原稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{L}/\text{孔}$,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,180 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}\text{C}$)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

4. 根据权利要求 2 所述呕吐毒素的检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的呕吐毒素标准品浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

5. 根据权利要求 2 所述呕吐毒素的检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的呕吐毒素单克隆抗体是采用呕吐毒素人工抗原免疫小鼠所得,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:10000。

6. 根据权利要求 2 所述呕吐毒素的检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的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-20,0.01mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

7. 权利要求 2 所述的检测呕吐毒素的 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,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 $^{\circ}\text{C}$)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有呕吐毒素抗原的酶标板,加标准品/样本 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 到对应的微孔中;

(4) 加入呕吐毒素酶标二抗工作液,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,然后加入呕吐毒素抗体工作液,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{L}/\text{孔}$,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 $\mu\text{L}/\text{孔}$,底物液 B 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 15~20min;

(7) 加入终止液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,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呕吐毒素的含量。

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) 取粉碎好的样品过 20 目筛并彻底混合;
 - (2) 称取 20g 样品,加入 100ml 蒸馏水,剧烈震荡 3 分钟;
 - (3) 静置 3 分钟,使样品沉淀;
 - (4) 用 Whatman GF/A 玻璃纤维纸过滤萃取液,备用。

用于检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备

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谷物和谷物产品中的呕吐毒素残留量的 ELISA 试剂盒。

背景技术

[0002] 真菌毒素是真菌产生的次级代谢产物,目前已知的有 300 多种化学结构不同的真菌毒素,其中有 30 多种真菌菌株产生的代谢产物对动物和人类都具有致病性。根据 FAO 估计,每年全世界约有 25% 的粮食作物受到真菌毒素的污染,造成的经济损失每年达数十亿美元。在人类日益关注食品卫生质量和安全的今天,真菌毒素的污染已成为不容忽视的问题。我国农产品和饲料中常见的、危害性比较大的真菌毒素主要有黄曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、呕吐菌素、玉米赤霉烯酮及赭曲霉毒素 A 等。

[0003] 呕吐毒素,又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON),是于 1970 年从被禾谷镰刀菌污染的玉米中分离出来的一种能引起呕吐的毒素,主要由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)和燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum*)产生,常见于赤霉病麦。我国是小麦赤霉病高发区,赤霉病流行时,长江中下游地区、东北春麦区和黄淮小麦的病穗率高达 50% 以上。呕吐毒素的化学名称为 3a, 7a, 15-三羟基草镰孢菌-9-烯-8-酮,分子量 296.3,属单端孢霉烯族化合物 B 型。对热比较稳定,一般的烹调和加热都不能破坏其毒性,对碱性环境比较敏感,用碳酸钠溶液洗涤粮食,可以除掉 70% 左右的 DON。

[0004] DON 对小麦黄化芽鞘和培根的生长有强生物活性,特别是对感病小麦有显著的生长抑制作用,并损伤寄主组织细胞,导致芽鞘、胚根变色溃烂。DON 可直接污染谷类等农作物,从而进入人或动物体内,还可通过被污染的肉、奶等动物源性食品进入人体。动物 DON 中毒后表现为呕吐,食欲减退,体重下降,流产,弱仔和死胎,死亡率增高。人类 DON 中毒后会出现恶心、呕吐、胃部不适、腹痛、腹泻、头痛、头晕,还可能有口干、全身无力的症状,少数患者会出现颜面潮红、发烧。DON 还具有很强的致癌、致畸、致突变的毒性、免疫毒性等危害,已被联合国粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 确定为最危险的自然发生食品污染物之一。1998 年,在国际癌症研究机构公布的评价报告中,呕吐毒素被列为三类致癌物。

[0005] 呕吐毒素的危害已引起很多国家的重视,一些国家已制定了谷物中呕吐毒素的限量标准,美国制定供人类食用的小麦呕吐毒素允许限量 ≤ 2 mg/kg,而欧盟制定的限量标准相对较严,谷粉及玉米粉中允许限量 ≤ 0.75 mg/kg。我国 GB 2715-2005《粮食卫生标准》中规定小麦、大麦、玉米及其成品粮中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇的限量为 1000 μ g/kg, GB 2761-2005《食品中真菌毒素限量》规定小麦和玉米的脱氧雪腐镰刀菌烯醇的限量为 1000 μ g/kg。

[0006] 自 60 年代以来,所建立的呕吐毒素的检测方法多达 30 余种,主要分为三类:生物学方法、理化方法以及免疫分析方法。生物学方法的检测方法极易受到干扰,现已较少使用。基于大型精密仪器的理化方法具有灵敏度高、特异性强的优点,但其需要昂贵的检测设

备、专业的操作人员,以及复杂的样本前处理方法,限制了该方法的广泛应用。免疫分析方法兴起于上世纪 80 年代,基于抗原抗体的特异性结合,具有灵敏、快速、特异、简便等优点,近年来已广泛应用到毒素残留的检测中。目前呕吐毒素的免疫学检测试剂盒大多来自进口,而国内有关呕吐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呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备。

发明内容

[0007] 针对现有技术中存在的问题,本发明提供了一种用于检测呕吐毒素的 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。本发明提供了一种用于检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备。

[0008] 检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括酶标板、呕吐毒素标准品、呕吐毒素抗体工作液、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] 一种用于检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、呕吐毒素标准品的制作、呕吐毒素单克隆抗体及其工作液的制备、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:所述呕吐毒素包被抗原是将呕吐毒素半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为卵清白蛋白(OVA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液作为包被液,将呕吐毒素包被抗原稀释成 1 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 放置过夜,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] 所述呕吐毒素标准品浓度分别为 0 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.5 μ g/mL;

所述呕吐毒素单克隆抗体工作液的制备:采用呕吐毒素人工抗原免疫小鼠,并通过细胞融合、筛选所得到,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:10000;

所述酶标二抗工作液的制备:用羊抗小鼠的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。

[0012] 呕吐毒素的 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) 样本前处理,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) 取包被有呕吐毒素抗原的酶标板,加标准品/样本 50 μ L/孔到对应的微孔中;

(4) 加入酶标二抗工作液,50 μ L/孔,然后加入呕吐毒素抗体工作液,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 μL /孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干;

(6) 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 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 15 ~ 20min;

(7) 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);

(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呕吐毒素的含量。

[0013] 其中,所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

- (1) 取粉碎好的样品过 20 目筛并彻底混合;
- (2) 称取 20g 样品,加入 100ml 蒸馏水,剧烈震荡 3 分钟;
- (3) 静置 3 分钟,使样品沉淀;
- (4) 用 Whatman GF/A 玻璃纤维纸过滤萃取液,备用。

[0014] 本发明采用酶联免疫吸附试验方法来检测。用于检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的测定原理:样品中的呕吐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呕吐毒素的含量。如果样品中的呕吐毒素含量少,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

[0015] 图 1 为呕吐毒素标准曲线图。

具体实施方式

[0016] 检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒,其包括酶标板、呕吐毒素标准品、呕吐毒素抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

[0017] 下面具体描述本发明中检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒的制备,

呕吐毒素蛋白质偶联物的制备:

将 20mgDON 溶解在 200 μL 吡啶中,加入到 2ml 的反应瓶中,在反应瓶中加入 68mg 的 1-丁基硼酸。混合物在室温下搅拌过夜,产生 7,15-氧-(丁基硼)-脱氧雪腐镰刀菌烯醇。再在其中加入 32mg 琥珀酸酐,并通入无氧氮气。密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 90min,产生 3-氧-半琥珀酰-7,15-氧-(丁基硼)-脱氧雪腐镰刀菌烯醇。将吡啶在室温吹干后,加入少量的水。然后将残余物(3-HS-DON)溶解于 5mL 乙酸乙酯中。超声波处理 15 分钟后,10000rpm 离心 10 分钟,取上清液。将沉淀物用乙酸乙酯溶解,重复上述操作,合并上清液。将上清液减压浓缩,进行薄层层析。

[0018] 3-HS-DON 与等摩尔的 NHS、DCC 溶于尽可能少的 DMF 中,室温振荡 30min,离心除去二环己基脒。将上清液缓慢滴加到溶于 0.1 N NaHCO_3 的 5%BSA 或 OVA,反应混合物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 2h。在 0.01M PBS (PH7.5) 中透析过夜,测定浓度后,分装冻存。其中 DON-BSA 偶联物用作免疫原,DON-OVA 偶联物用作包被原。

[0019] 呕吐毒素抗体的制备:

选用 16 ~ 18g BABL/c 小鼠,免疫剂量为每只小鼠每次 100 μ g,共免疫五次。首次采用免疫原与弗氏完全佐剂等量混匀,于颈部皮下多点注射;第二、三、四次免疫采用免疫原与弗氏不完全佐剂等量混匀,于背部皮下多点注射;第五次免疫,在融合前三天,采用免疫原直接注射腹腔。取小鼠脾脏细胞与 SP2/0 细胞融合,有限稀释法克隆细胞株,ELISA 检测细胞株特性,包括效价、特异性、灵敏度等。将灵敏度高、特异性好的细胞株扩大培养,并冻存;同时腹腔注射小鼠,获得腹水,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,透析后,测定浓度,分装冻存。

[0020] 制备包被有呕吐毒素包被抗原的酶标板:

用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐 (CBS) 缓冲液作为包被液,将呕吐毒素抗原 DON-OVA 稀释成 1 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 放置过夜,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;

所述的呕吐毒素标准品配制浓度分别为 0 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.5 μ g/mL;

所述的呕吐毒素单克隆抗体工作液的制备:采用呕吐毒素人工抗原免疫小鼠,并通过细胞融合、筛选所得,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:10000;

所述酶标二抗工作液的制备:用羊抗小鼠的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。

[0021] 基于上述制备的试剂,本发明用于检测呕吐毒素的 ELISA 试剂盒包括如下材料:

- (1) 96 孔酶标板 \times 1 块 (包被有偶联抗原);
- (2) 标准液 \times 5 瓶:(1mL/瓶) 0 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.5 μ g/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 \times 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 $^{\circ}$ C 或试剂及样本没有回到室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) 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 硫酸,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。

[0022] 本发明呕吐毒素的ELISA试剂盒在检测谷物和谷物产品中的呕吐毒素残留量中的应用:

本发明的试剂盒用于检测谷物和谷物产品中的呕吐毒素残留量时,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。

[0023] (1) 样品预处理

取粉碎好的样品过20目筛,并彻底混合;称取20g样品,加入100ml蒸馏水,剧烈震荡3分钟;静置3分钟,使样品沉淀;用Whatman GF/A玻璃纤维纸过滤萃取液,备用。

[0024] (2) 用本发明试剂盒进行检测上述样品中呕吐毒素残留量

取包被有呕吐毒素抗原的酶标板,加标准品/样本50 μL/孔到对应的微孔中;加入酶标二抗工作液,50 μL/孔,然后加入呕吐毒素抗体工作液,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15~20min;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呕吐毒素的残留量。

[0025] (3) 分析结果

用上述制备的试剂盒中的5个呕吐毒素标准品浓度0 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.5 μg/mL,在450/630 nm处测量吸光度值;

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为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 为0 ppb标准溶液的平均吸光度值。

[0026] 以标准品百分吸光率为纵坐标,以呕吐毒素标准品浓度(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。 $Y=A+B \times X$,其中 $A=41.33733$, $B=-62.5364$, $R^2=-0.9909$ 。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呕吐毒素的实际浓度。

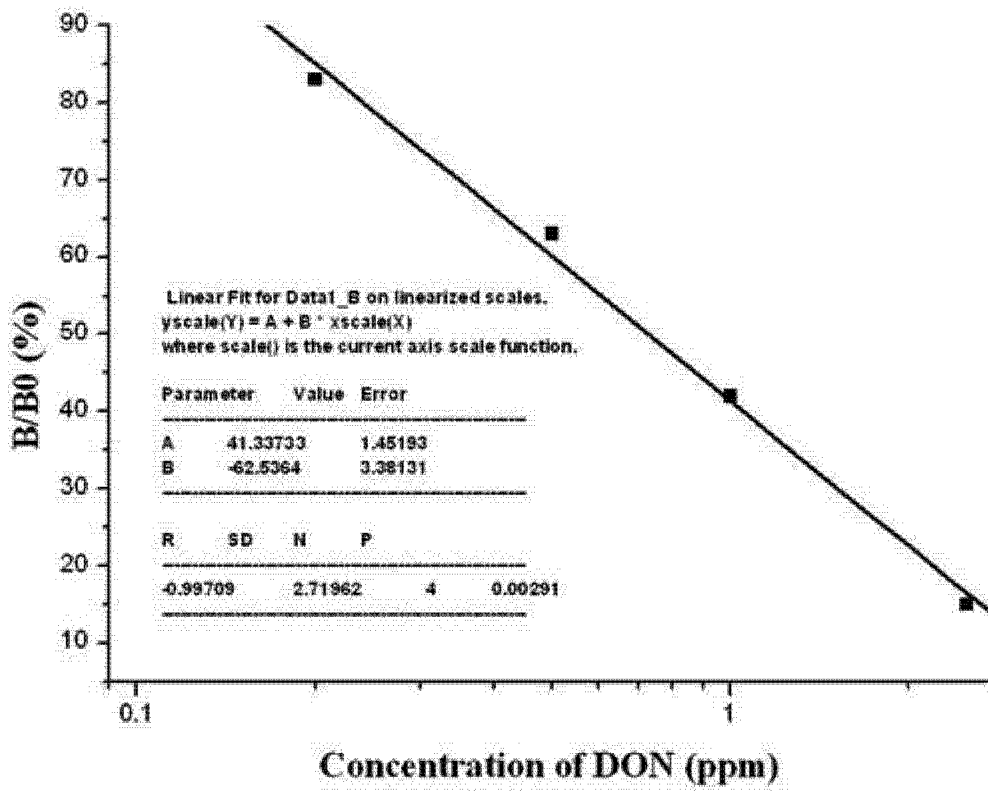


图 1

专利名称(译)	用于检测呕吐毒素的ELISA试剂盒的制备		
公开(公告)号	CN103808934A	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	CN201210439123.6	申请日	2012-11-07
[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 曾昆		
发明人	杜道林 曾昆		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56911		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为一种用于检测呕吐毒素的ELISA试剂盒的制备，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：包被了呕吐毒素抗原的酶标板、呕吐毒素标准品、呕吐毒素抗体工作液、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。呕吐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呕吐毒素的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测谷类及谷物制品中的呕吐毒素。

