



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 10808838 A

(43)申请公布日 2018.05.29

(21)申请号 201711331141.1

(22)申请日 2017.12.13

(71)申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72)发明人 马良 潘姝历 张宇昊

(74)专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 赵荣之

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

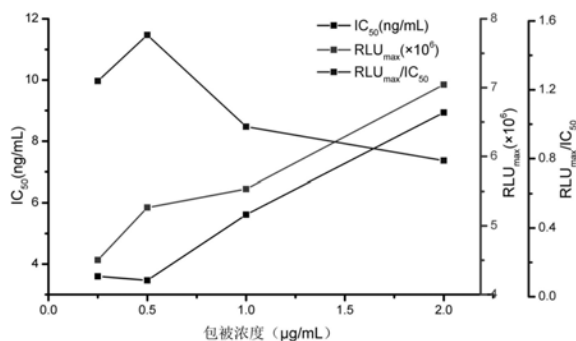
权利要求书1页 说明书7页 附图6页

## (54)发明名称

双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用及方法

## (57)摘要

本发明涉及一种双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用及方法,本发明采用酶联免疫分析法,利用辣根过氧化物酶催化过氧化脲氧化3-(4-羟苯基)丙酸,生成能发荧光的3-(4-羟苯基)丙酸二聚体,进而在乙腈介质中,在增强剂咪唑的参与下,同双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯和过氧化脲反应产生强化学发光,建立了一种简单、快速、高灵敏度的测定细交链格孢菌毒素的化学发光间接竞争免疫分析方法;该方法的半抑制浓度 $IC_{50}$ 为95.2ng/L,在12.21~1562.50ng/L范围内成良好的线性关系,最低检出限LOD为2.53ng/L,能够用于链格孢霉毒素检测。



1. 双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於:所述测定使用化学发光酶联免疫分析法。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於:所述化学发光是基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯— $H_2O_2$ —3-(4-羟苯基)丙酸二聚体化学发光体系。
4. 基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法,其特征在於,包括如下步骤:在酶标板中包被链格孢霉毒素抗原,封闭后用抗链格孢菌酮酸单克隆抗体竞争,然后加入酶标二抗孵育,加入过氧化脲与3-(4-羟苯基)丙酸混合液酶催化反应后,转移至另一白色酶标板中,加入含咪唑的过氧化脲,混匀后加入双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯乙腈溶液显色,酶标仪检测。
5. 根据权利要求4所述基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法,其特征在於:所述包被为将浓度为 $0.25\sim 1.0\mu\text{g/mL}$ 的BSA修饰链格孢霉毒素加入酶标板中, $4^\circ\text{C}$ 过夜。
6. 根据权利要求4所述基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法,其特征在於:所述封闭为将脱脂奶粉溶液于 $37^\circ\text{C}$ 温育1h;甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板2次,每次3min,所述脱脂奶粉溶液为每1.0g脱脂奶粉溶于20mL PBST的溶液。
7. 根据权利要求4所述基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法,其特征在於:加入浓度为 $0.05\sim 0.25\mu\text{g/mL}$ 的抗链格孢菌酮酸单克隆抗体,温育;甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板2次,每次至少3min。
8. 根据权利要求4所述基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法,其特征在於:所述酶标二抗孵育为将HRP标记的羊抗鼠抗体稀释2000~8000倍,温育,甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板5次,每次至少3min。
9. 根据权利要求4所述基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法,其特征在於:所述酶催化反应为将过氧化脲与3-(4-羟苯基)丙酸混合,控制pH值为6.0,温育5~30min;混合后所述过氧化脲浓度为 $4.0\times 10^{-3}\sim 12\times 10^{-3}\text{mol/L}$ ;所述3-(4-羟苯基)丙酸浓度为 $5\times 10^{-3}\sim 11\times 10^{-3}\text{mol/L}$ 。
10. 根据权利要求4所述基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法,其特征在於:加入含咪唑的过氧化脲溶液,溶液中过氧化脲浓度为 $1\sim 4\text{mol/L}$ ,所述咪唑浓度为 $2\times 10^{-3}\text{mol/L}$ ,混匀后加入浓度为 $1\sim 4\times 10^{-3}\text{mol/L}$ 的双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯乙腈溶液。

## 双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用及方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,涉及双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用,还涉及双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯测定链格孢霉毒素的方法。

### 背景技术

[0002] 链格孢霉(*Alternaria*)是半知菌暗色丝孢菌中重要的一类真菌,能产生70余种真菌毒素和植物毒素,称为链格孢毒素,其中细交链孢菌酮酸(TA)是唯一被美国列入有毒化学物质登记册中的链格孢毒素,TA是链格孢霉中最为重要的毒素之一,可广泛污染蔬菜、水果及谷物。虽然能产生该毒素的链格孢菌株检出率低,但产毒能力很强,其毒素水平居各种链格孢毒素之首。TA能与其它真菌毒素协同作用,产生急性毒性。由于TA在大量商业产品都被发现,例如谷物、果汁、西红柿产品、啤酒和胡萝卜,欧洲食品安全机构(EFSA)已经公布了这些毒素的最高限量标准,而我国目前由于对此类毒素研究较少,目前没有相关的限量法规。因此,发展一种高灵敏、快速和特异的方法来实现对TA的定量检测是十分必要的。

[0003] 目前针对TA的精测方法主要有气-液色谱法(GLC)、气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)等,此类方法测量结果准确度高、稳定性好,但通常需要大型的实验仪器和复杂的前处理过程,不适用于现场检测。酶联免疫分析法在检测TA中有很多优点,包括高选择性和特异性和使用不含放射性试剂。钟红等建立的TA残留检测间接竞争ELISA方法,最低检出限为0.02ng/mL,检测范围0.06-35.95ng/mL。马良等建立的基于鲁米诺体系的TA残留检测化学发光酶联免疫方法,最低检出限为0.01ng/mL,检测范围0.032-30.244ng/mL。此类方法不需要大型设备和严格的实验室条件,研制出的试剂盒使用方便快捷,可实现高通量的现场速测。

[0004] 过氧草酸酯类化学发光体系是一类高效的新型化学发光体系,这种体系除了具有发光效率高,强度大,寿命长的特点外,同时还可以通过成分选择和调节,使发光强度、持续时间和颜色满足特殊需要。在各种草酸酯类试剂中,双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯(TCPO)相比之下最为稳定,所以应用更为广泛一些。目前,以TCPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-荧光物质化学发光体系为手段的检测方法有少量报道,主要集中在兽药残留、抗生素、葡萄球菌肠毒素C1、胆固醇、生物胺以及其他化学成分的检测,而在真菌毒素检测方面尚无相关研究。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用;本发明的目的之二在于提供基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法。

[0006] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 1、双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用。

[0008] 优选的,所述测定使用化学发光酶联免疫分析法。

[0009] 优选的,所述化学发光是基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯—H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—3-(4-羟苯基)丙酸二聚体化学发光体系。

[0010] 2. 基于双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯检测链格孢霉毒素的方法,包括如下步骤:在酶标板中包被链格孢霉毒素抗原,封闭后用抗链格孢菌酮酸单克隆抗体竞争,然后加入酶标二抗孵育,加入过氧化脲与3-(4-羟苯基)丙酸混合液酶催化反应后,转移至另一白色酶标板中,加入含咪唑的过氧化脲,混匀后加入双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯乙腈溶液显色,酶标仪检测。

[0011] 优选的,所述包被为将浓度为0.25~1.0μg/mL的BSA修饰链格孢霉毒素加入酶标板中,4℃过夜。更优选的,所述BSA修饰链格孢霉毒素的浓度为0.5μg/mL。

[0012] 优选的,所述封闭为将脱脂奶粉溶液于37℃温育1h;甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板2次,每次3min,所述脱脂奶粉溶液为每1.0g脱脂奶粉溶于20mL PBST的溶液。

[0013] 优选的,加入浓度为0.05~0.25μg/mL的抗链格孢菌酮酸单克隆抗体,温育;甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板2次,每次至少3min。更优选的,所述抗链格孢菌酮酸单克隆抗体的浓度为0.2μg/mL,所述温育为37℃温育0.5h。

[0014] 本发明中,所述单抗由生物保藏编号为CCTCC NO:C201702的杂交瘤细胞制备,保藏于中国典型培养物保藏中心学,保藏日期为2016年12月27日。

[0015] 优选的,所述酶标二抗孵育为将HRP标记的羊抗鼠抗体稀释2000~8000倍,温育,甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板5次,每次至少3min。更优选的,所述HRP标记的羊抗鼠抗体稀释6000倍,温育为37℃温育1h。

[0016] 优选的,所述酶催化反应为将过氧化脲与3-(4-羟苯基)丙酸混合,控制pH值为6.0,温育5~30min;混合后所述过氧化脲浓度为 $4.0 \times 10^{-3} \sim 12 \times 10^{-3}$ mol/L;所述3-(4-羟苯基)丙酸浓度为 $5 \times 10^{-3} \sim 11 \times 10^{-3}$ mol/L。更优选的,过氧化脲浓度以 $8.0 \times 10^{-3}$ mol/L,3-(4-羟苯基)丙酸浓度为 $7.0 \times 10^{-3}$ mol/L。

[0017] 优选的,加入含咪唑的过氧化脲溶液,溶液中过氧化脲浓度为1~4mol/L,所述咪唑浓度为 $2 \times 10^{-3}$ mol/L,混匀后加入浓度为 $1 \sim 4 \times 10^{-3}$ mol/L的双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯乙腈溶液。更优选的,溶液中过氧化脲浓度为1~2mol/L,双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯乙腈溶液浓度为 $5 \times 10^{-3}$ mol/L。

[0018] 本发明的有益效果在于:本发明基于TCPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PHPPA Dimer体系的化学发光酶联免疫检测方法,将其首次应用于真菌毒素的检测;本发明通过酶联免疫分析法,辣根过氧化物酶催化过氧化脲氧化3-(4-羟苯基)丙酸(PHPPA),生成能发荧光的3-(4-羟苯基)丙酸二聚体(PHPPA Dimer)。进而在乙腈介质中,在增强剂咪唑的参与下,同双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯和过氧化脲反应产生强化学发光;并且通过合理选择有机溶剂、避免水相体系的引入,解决过氧化草酸酯发光试剂难溶于水的问题,该方法的半抑制浓度IC<sub>50</sub>为95.2ng/L,链格孢菌酮酸在12.21~1562.50ng/L范围内成良好的线性关系,最低检出限LOD为2.53ng/L,对样品进行加标检测,面粉样品的平均回收率为76.24%~88.95%,燕麦样品的平均回收率为85.34%~93.28%。用该方法获得的结果与传统的酶联免疫分析法和鲁米诺化学发光分析方法进行了比较,得到了更为理想的结果。

## 附图说明

- [0019] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图进行说明:
- [0020] 图1为不同包被浓度对icCLEIA的影响。
- [0021] 图2为单抗浓度对icCLEIA的影响。
- [0022] 图3为酶标二抗稀释度对icCLEIA的影响。
- [0023] 图4为缓冲液pH对icCLEIA的影响。
- [0024] 图5为酶反应中过氧化脲浓度对icCLEIA的影响。
- [0025] 图6为PHPPA浓度对icCLEIA的影响。
- [0026] 图7为酶反应时间对icCLEIA的影响。
- [0027] 图8为TCPO浓度对icCLEIA的影响。
- [0028] 图9为显色中过氧化脲浓度对icCLEIA的影响。
- [0029] 图10为增强剂咪唑浓度对icCLEIA的影响。
- [0030] 图11 icCLEIA标准工作曲线 (n=3)。

### 具体实施方式

- [0031] 下面将结合附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。
- [0032] 本发明实施例使用的仪器和试剂如下:
- [0033] 恒温培养箱(长城科工贸有限公司)、Syneng H1MG多功能酶标仪(Gene Company Limited公司)、pHS-4C酸度计(上海科学仪器公司)、JS系列电子天平(精度0.0001g)(上海精天电子仪器有限公司)、HJ-3恒温数显磁力搅拌器(江苏科析有限公司)、单通道、多通道移液器(德国Eppendorf公司)、96孔可拆化学发光酶标板(上海生工生物有限公司)。
- [0034] 双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯(TCPO)、3-(4-羟苯基)丙酸(PHPPA)、过氧化脲( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ )均购于美国sigma公司,细交链格孢菌酮酸标准品(新加坡Pribolab公司)、抗细交链格孢菌酮酸单克隆抗体(该抗体由生物保藏编号为CCTCC NO:C201702的杂交瘤细胞株制备)、羊抗小鼠IgG-HRP(武汉博士德公司)、咪唑(天津市远航化学品有限公司)、乙腈、HCl、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、NaCl、KCl、Tween-20(成都科龙化工试剂公司)、脱脂奶粉、面粉、燕麦(购于本地超市),所有试剂均为分析纯,水为超纯水。
- [0035] 包被缓冲液(CBS)是pH 9.6 0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液;pH7.4 0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)通过溶解0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,2.9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,8.0g NaCl,0.2g KCl在1升水中制得;洗涤液(PBST)为含有0.05% Tween-20的0.01mol/L PBS缓冲液溶液。过氧化脲和PHPPA工作液用pH 6.0PBS按照一定比例稀释而成。TCPO, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ (含咪唑)工作液是用无水乙腈稀释至所需浓度。
- [0036] 实施例1
- [0037] 构建检测TA的化学发光酶联免疫分析法(icCLIA),具体步骤如下:
- [0038] (1)包被:包被缓冲液CBS稀释包被原TAO-BSA,加入96孔白色酶标板中,每孔100 $\mu\text{L}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板2次,每次3min。
- [0039] (2)封闭:称取1.0g脱脂奶粉溶于20mL PBST溶液中,每孔200 $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1h;甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板2次,每次3min。
- [0040] (3)竞争:用PBS将TA标准品从25ng/mL开始倍比稀释,共稀释14个梯度(25ng/mL、

12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、1.5625ng/mL、0.78125ng/mL、0.390625ng/mL、0.195313ng/mL、0.097656ng/mL、0.048828ng/mL、0.024414ng/mL、0.012207ng/mL、0.006104ng/mL、0.003052ng/mL),每个浓度梯度做3个重复孔,每孔50 $\mu$ L,零标准品孔和空白孔用PBS代替。PBST将抗血清稀释,每孔50 $\mu$ L,空白孔用PBST代替,37 $^{\circ}$ C温育0.5h;甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板2次,每次3min。

[0041] (4) 二抗:PBST稀释酶标二抗(IgG-HRP)4000倍,每孔100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C温育1h。甩板后在滤纸上拍干,PBST洗板5次,每次3min。

[0042] (5) 酶催化反应:过氧化脲与PHPPA等体积混合,每孔100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C温育10min。

[0043] (6) 转移:用多通道移液器从各反应孔中移取50 $\mu$ L反应后的酶催化产物至另一白色酶标板,注意一一对应。

[0044] (7) 显色:加入含咪唑的1mol/L过氧化脲,每孔25 $\mu$ L,混匀后加入0.01mol/L TCPO乙腈溶液,每孔25 $\mu$ L。

[0045] (8) 读数:立即放入酶标仪,记录化学发光信号。

[0046] (9) 数据处理以TA浓度的对数为横坐标,各TA浓度对应的RLU平均值(RLU)与零标准品孔的RLU(RLU<sub>max</sub>)的比值为纵坐标,绘制竞争曲线。

[0047] icCLEIA工作参数优化:

[0048] (1) 包被原浓度

[0049] 包被缓冲液将TAO-BSA分别稀释至2.0 $\mu$ g/mL、1.0 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、0.25 $\mu$ g/mL包被酶标板,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜,其余步骤上述操作。不同包被浓度结果如图1所示,TAO-BSA包被浓度越小,TA标准品竞争结合特异性抗血清越多,洗板后残留的抗体越少,发光强度越低,IC<sub>50</sub>随TAO-BSA包被浓度增加先下降后上升,RLU<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub>在包被浓度为0.5 $\mu$ g/mL时最大。RLU<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub>越大,IC<sub>50</sub>越低,说明方法的检测效果越好,故选择TAO-BSA包被浓度为0.5 $\mu$ g/mL。其主要原因是包被原浓度过高,不仅浪费抗原而且容易产生多层抗原吸附,在操作过程中脱落从而降低敏感性和重复性;包被原浓度过低,固相载体上结合的抗原量小,后续反应结合的抗体量减少。

[0050] (2) 单抗浓度

[0051] 用PBST将单抗稀释至0.4 $\mu$ g/mL、0.3 $\mu$ g/mL、0.2 $\mu$ g/mL、0.1 $\mu$ g/mL、0.05 $\mu$ g/mL,50 $\mu$ L/孔,其余步骤按照上述操作。由于单抗浓度与酶标二抗结合量有关,从图2可以看出,单抗浓度越低,其与HRP标记的二抗特异性结合量减少,TCPO体系发光信号降低,故RLU<sub>max</sub>随单抗浓度的增加而不断上升;而单抗浓度过大,竞争反应效果不明显,IC<sub>50</sub>值在单抗浓度大于0.2 $\mu$ g/mL时迅速上升,RLU<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub>在0.2 $\mu$ g/mL时最高,故选择单抗浓度为0.2 $\mu$ g/mL。

[0052] (3) 酶标二抗稀释度

[0053] 将HRP标记的羊抗鼠抗体分别用PBST缓冲液稀释2000、4000、6000、8000和10000倍,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育1h,其余步骤按照上述操作。从图3可以看出,酶标二抗稀释倍数越高,HRP的浓度越低,RLU<sub>max</sub>逐渐减小;HRP浓度过低,整体发光信号减弱,竞争反应效果不明显,IC<sub>50</sub>先降低后上升;酶标二抗稀释6000倍时RLU<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub>值高于其他稀释度且敏感性高,故选择二抗稀释度为6000。产生上述结果的原因是酶标二抗浓度过高,易发生非特异性结合且洗板时不易完全洗脱过量未结合二抗,导致本底增加;二抗浓度过低,发光信号不强,信号放大倍数降低,方法敏感性差。

[0054] (4) HRP酶反应条件优化

[0055] A. 缓冲液pH

[0056] 调节0.01M PBS pH至4、5、6、7、8、9、10,其余步骤按照上述操作。结果见图4,在pH4.0~10.0范围内的考察表明,pH值为6.0时,此方法具有最大的发光强度和发光信噪比。结果表明,在HRP酶催化反应中,缓冲溶液的pH值对生成的荧光物质3-(4-羟苯基)丙酸二聚体的浓度具有较大的影响。

[0057] B. 过氧化脲与PHPPA的浓度

[0058] pH6PBS稀释过氧化脲为5、10、20、40、60、80、100、120( $\times 10^{-4}$ mol/L),稀释PHPPA为30、50、70、90、110( $\times 10^{-4}$ mol/L),其余步骤按照上述操作。结果如图5、图6所示, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 浓度过低,发光强度过低且不稳定,而浓度过高会导致 $\text{IC}_{50}$ 的增大;随着PHPPA浓度的增加, $\text{IC}_{50}$ 呈现先降低后增加的趋势。当 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 浓度以 $8.0 \times 10^{-3}$ mol/L,PHPPA浓度为 $7.0 \times 10^{-3}$ mol/L时,能获得最大的发光信噪比。

[0059] C. 反应时间

[0060] 过氧化脲与PHPPA等体积混合,每孔100 $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育3min、5min、10min、15min、30min,其余步骤按照上述操作。结果见图7,结果显示酶反应时间则以10min为宜,低于10min化学发光强度较低,孵育时间长于10min,化学发光强度增加缓慢而 $\text{IC}_{50}$ 逐渐上升。

[0061] (5) 化学发光条件优化

[0062] A. TCPO乙腈溶液浓度

[0063] 配制不同浓度的TCPO乙腈溶液,2.5、5、10、15( $\times 10^{-3}$ mol/L)进行试验,其余步骤按照上述操作。结果如图8所示。由图8可知,TCPO浓度越大,体系发光强度越大,但背景值也不断增加,掩盖目标物发光信号; $\text{IC}_{50}$ 在TCPO浓度为 $5 \times 10^{-3}$ mol/L降到最低值后开始上升, $\text{RLU}_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 值在 $5 \times 10^{-3}$ mol/L时最大,故选择TCPO乙腈溶液浓度为 $5 \times 10^{-3}$ M。表明TCPO添加量过多或过少,均会导致不同标准品浓度孔间酶催化产生的发光信号变化减小,竞争抑制曲线下下降趋势减缓, $\text{IC}_{50}$ 增大。

[0064] B. 含咪唑的过氧化脲溶液浓度

[0065] 配制含咪唑的不同浓度过氧化脲溶液,0.25mol/L、0.5mol/L、1mol/L、2mol/L、4mol/L进行试验,其余步骤按照上述操作。结果如图9,当确定过氧化脲溶液浓度低于1mol/L时, $\text{IC}_{50}$ 的变化明显,当过氧化脲溶液高于1mol/L, $\text{IC}_{50}$ 值缓慢上升; $\text{RLU}_{\text{max}}$ 随着过氧化脲乙腈溶液浓度增加而上升。最终确定过氧化脲溶液浓度为2mol/L。

[0066] C. 咪唑浓度

[0067] 配制不同咪唑浓度的过氧化脲溶液,1、2、4、8( $\times 10^{-3}$ mol/L)进行试验,其余步骤按照上述操作。结果如图10所示。由图10可知,随着咪唑浓度的增加, $\text{RLU}_{\text{max}}$ 不断上升,但 $\text{IC}_{50}$ 也呈现先降低后升高的趋势,导致方法的灵敏度下降,最终,确定咪唑的浓度为 $2 \times 10^{-3}$ mol/L。表明咪唑的添加对有助于发光强度的增强结果。

[0068] (6) icCLEIA的标准工作曲线

[0069] 根据选择的条件参数,按照操作步骤进行检测,以TA浓度的对数值lgC为横坐标,各标准品孔发光强度RLU与最大发光值 $\text{RLU}_{\text{max}}$ 的比值为纵坐标,每个梯度做3个重复,绘制icCLEIA方法的标准曲线,根据线性回归方程计算出该方法的 $\text{IC}_{50}$ 值和线性范围( $\text{IC}_{20} \sim \text{IC}_{80}$ )。标准曲线如图11所示,其线性回归方程为 $y = 23.67 - 26.06x$ , $R^2 = 0.9861$ ,经计算得该

方法检测的线性范围12.21~1562.50ng/L, IC<sub>50</sub>为95.2ng/L, 最低检出限为2.53ng/L。

[0070] (7) icCLEIA方法评价

[0071] A. 最低检出限

[0072] 用icCLEIA测定10个不同批次零标准品孔的RLU值, 计算平均值(X)和标准差(SD), 按照公式 $LOD\% = (X - 2SD) / X \times 100\%$ 进行计算, 根据标准曲线方程计算对应的TA质量浓度为该方法理论检出下限。

[0073] B. icCLEIA方法准确度

[0074] 称取2.0g面粉于50mL离心管中, 除空白组外分别将5 $\mu$ g、50 $\mu$ g、100 $\mu$ g TA标准品, 加入30mL 70%甲醇提取液(70:30, v/v), 涡旋震荡5min, 4000r/min离心10min, 取上清液1mL, 与10%NaCl溶液等体积混合。PBS缓冲液稀释N(25)倍后用icCLEIA检测。称取2.0g粉碎燕麦片于50mL离心管中, 除空白组外分别5 $\mu$ g、50 $\mu$ g、100 $\mu$ g TA标准品, 加入30mL100%甲醇溶液, 静置10min, 涡旋震荡15min, 4000r/min离心10min, 取上清液1mL, 与10%NaCl溶液等体积混合。PBS缓冲液分别稀释N倍后用icCLEIA检测。

$$[0075] \quad \text{回收率}(\%) = \frac{\text{检出量} - \text{空白值}}{\text{实际添加量} / (60 \times N)} \times 100\%$$

[0076] 其中60为样品前处理和检测方法的既定稀释倍数

[0077] N为根据样品浓度预计稀释倍数

[0078] 每个添加水平做3次重复, 每次做7个重复孔, 结果如表1所示, 面粉样品的平均回收率为76.24%~88.95%, 燕麦样品的平均回收率为85.34%~93.28%。

[0079] 表1. 面粉、燕麦样品添加回收试验 (n=3)

样品	加样 (ng·g <sup>-1</sup> )	回收率 (%)	CV (%)	
			批内	批间
面粉	33.33	76.24	6.14	12.95
	16.67	82.97	5.75	9.23
	1.66	88.95	5.14	8.74
燕麦	33.33	86.49	3.72	6.92
	16.67	85.34	4.28	7.23
	1.66	93.28	2.94	6.11

[0081] C. icCLEIA方法与已有酶联免疫方法的比较

[0082] 根据已有的酶联免疫分析法、鲁米诺化学发光免疫法, 采用本实验所使用的单克隆抗体进行实验。三种方法的比较结果见表2。

[0083] 表2. 三种酶联免疫检测方法的比较

[0084]

参数	酶联免疫分析法	鲁米诺化学发光免疫法	TCPO 化学发光免疫法
线性范围/(ng/L)	16.4-2436.9	15.0-1184.6	12.21~1562.50
检出限/(ng/L)	4.68	2.84	2.53

[0085] 综上所述,与传统的酶联免疫分析和鲁米诺化学发光体系相比较,草酸酯化学发光体系更加灵敏且有更高的发光量子产率,有利于提高免疫分析方法的灵敏度。在本实验中,使用高特异性的单克隆抗体和超灵敏的化学发光体系TCPO-CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PHPPA Dimer,TCPO化学发光体系基于酶联免疫分析和辣根过氧化物酶催化荧光反应,已经成功用于细交链格孢菌酮酸含量的测定。结果表明其可以显著增强测定灵敏度,该方法的IC<sub>50</sub>为95.2ng/L,线性回归方程为 $y=23.67-26.06x$ ,检测范围12.21~1562.50ng/L,最低检测限2.53ng/L,面粉样品的平均回收率为76.24%-88.95%,燕麦样品的平均回收率为85.34%-93.28%。此方法兼具有酶联免疫分析法的高特异性以及化学发光分析的高灵敏度,以及TCPO体系更高的发光量子产率和化学发光高通量性等优点。

[0086] 然而,基于TCPO发光试剂作为发光体系在免疫分析当中的应用也存在一些问题,因其很难溶于水只能溶于有毒的有机溶剂如乙腈、丙酮等,同时有不同程度的水解,导致对水溶液样品检测受到一定的限制,在没有催化剂存在下发光会受到一定程度的限制,而且发光体系还受到溶剂和试剂纯度以及极性的影响。若能解决这些问题,将有望进一步提高此方法的灵敏度并用于其他生物样品和酶联免疫试剂盒的分析。

[0087] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

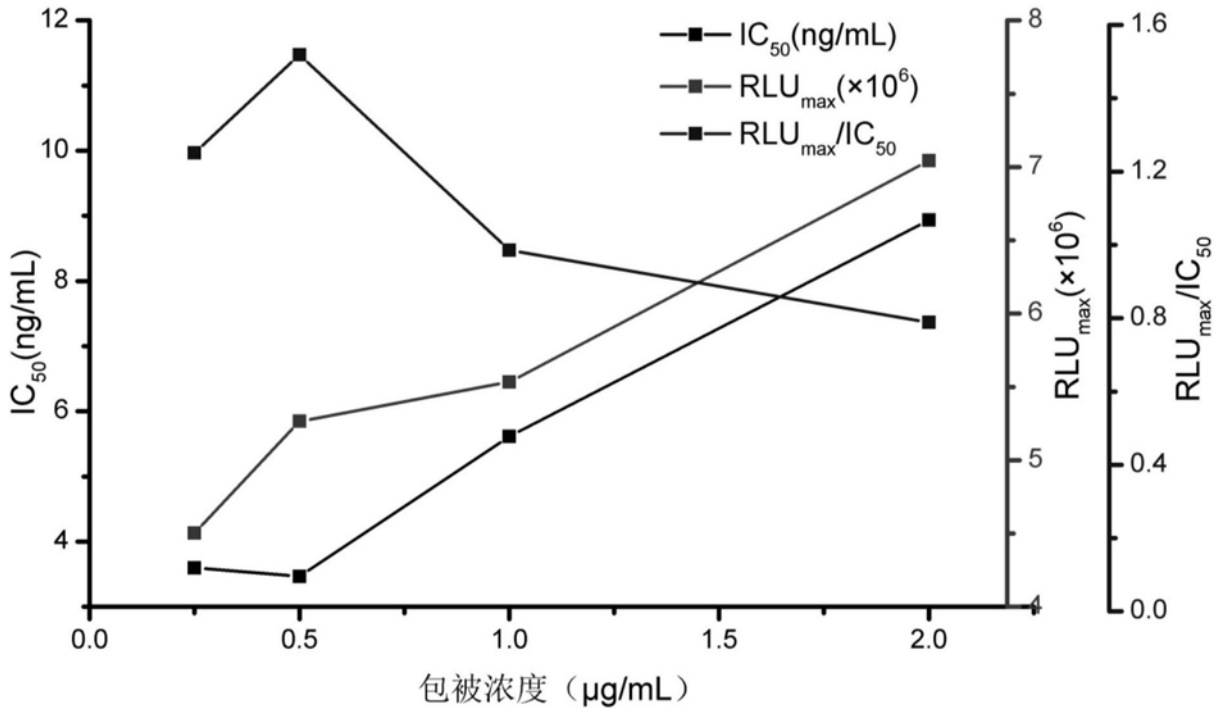


图1

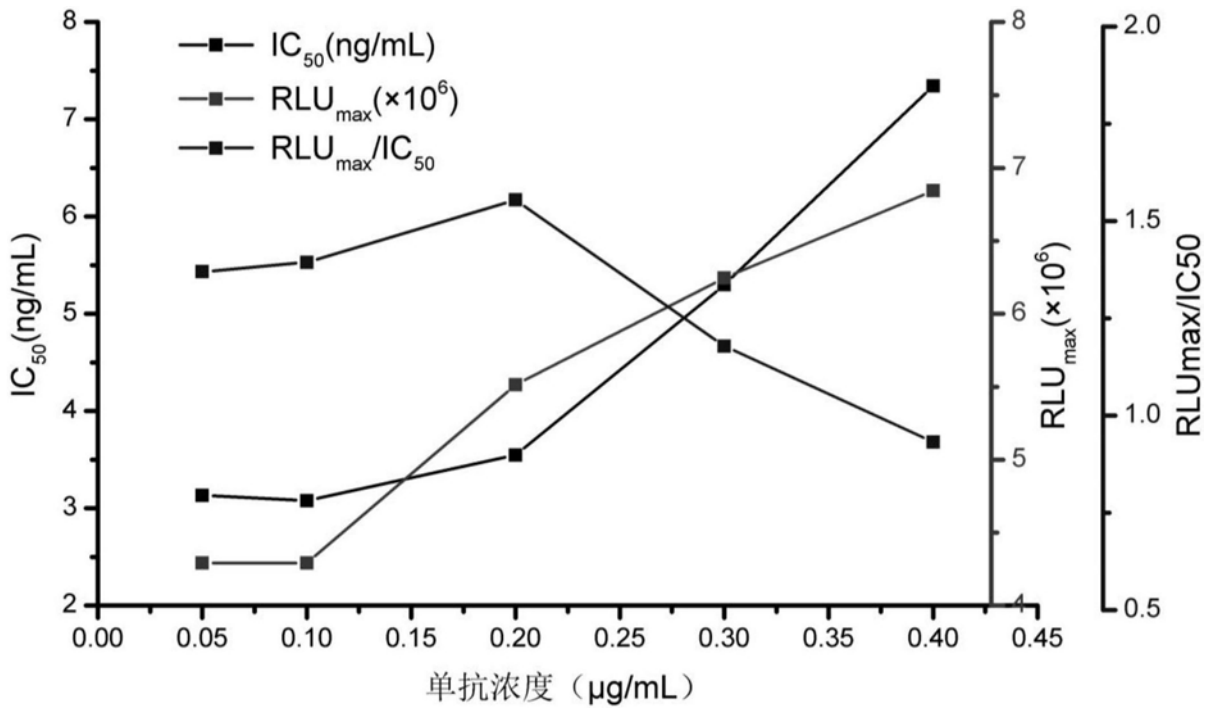


图2

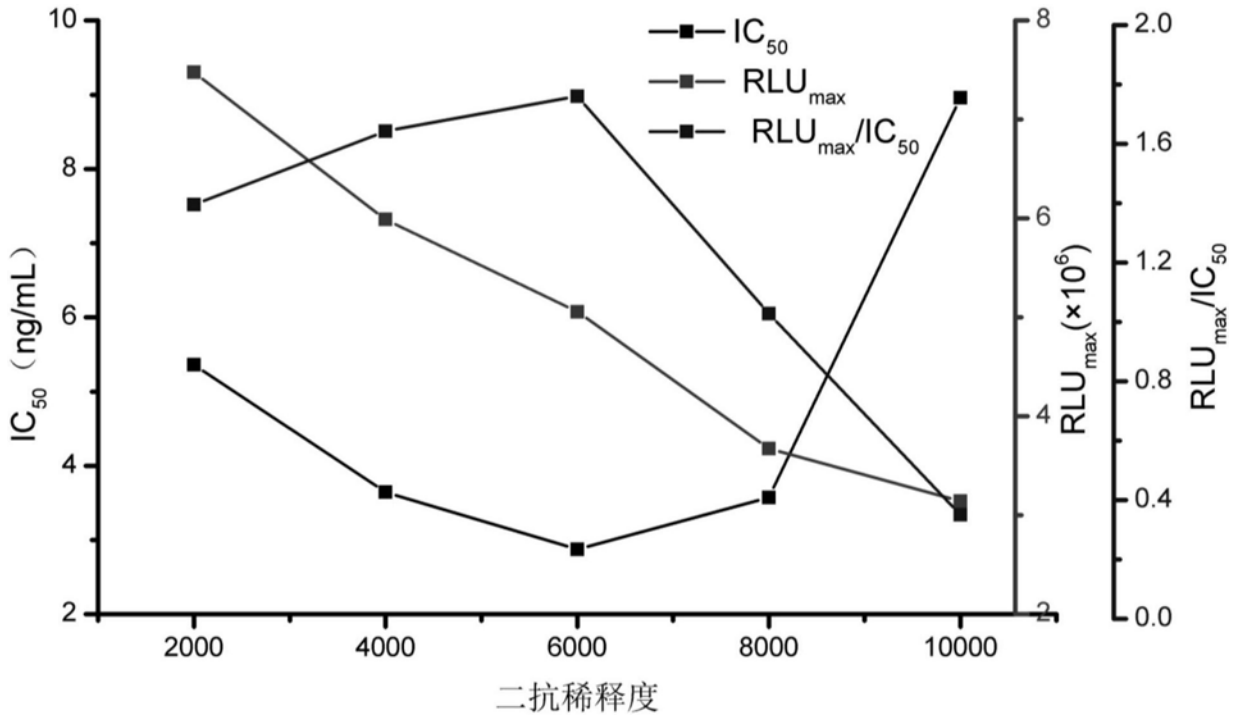


图3

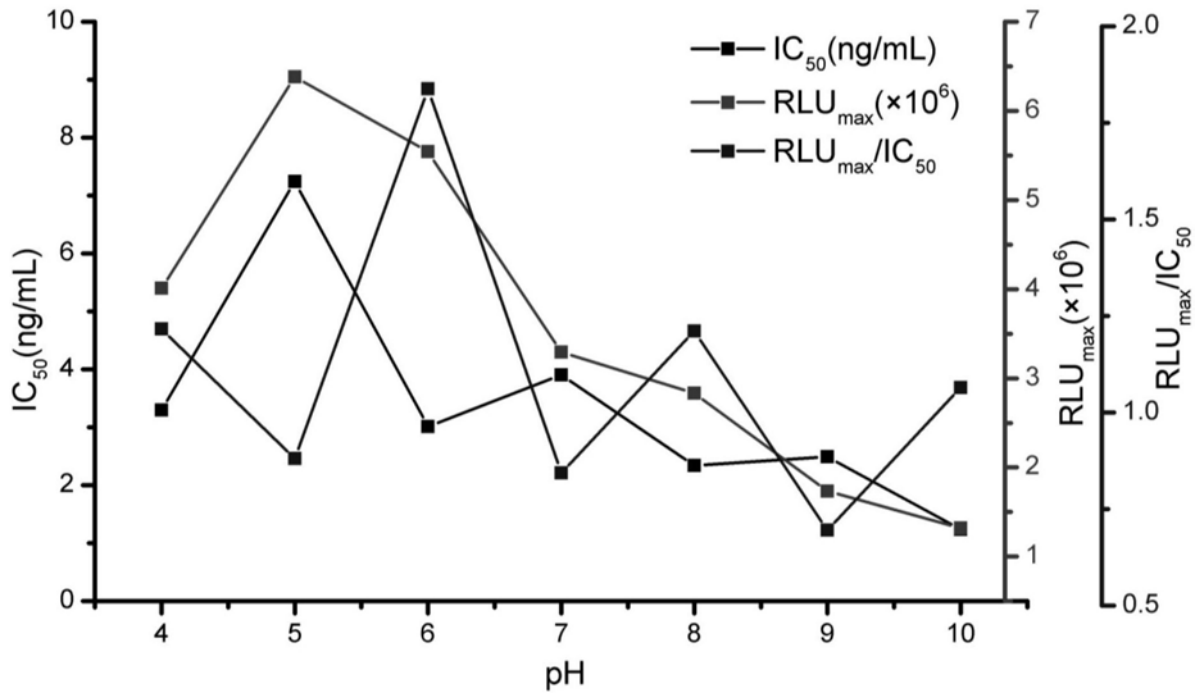


图4

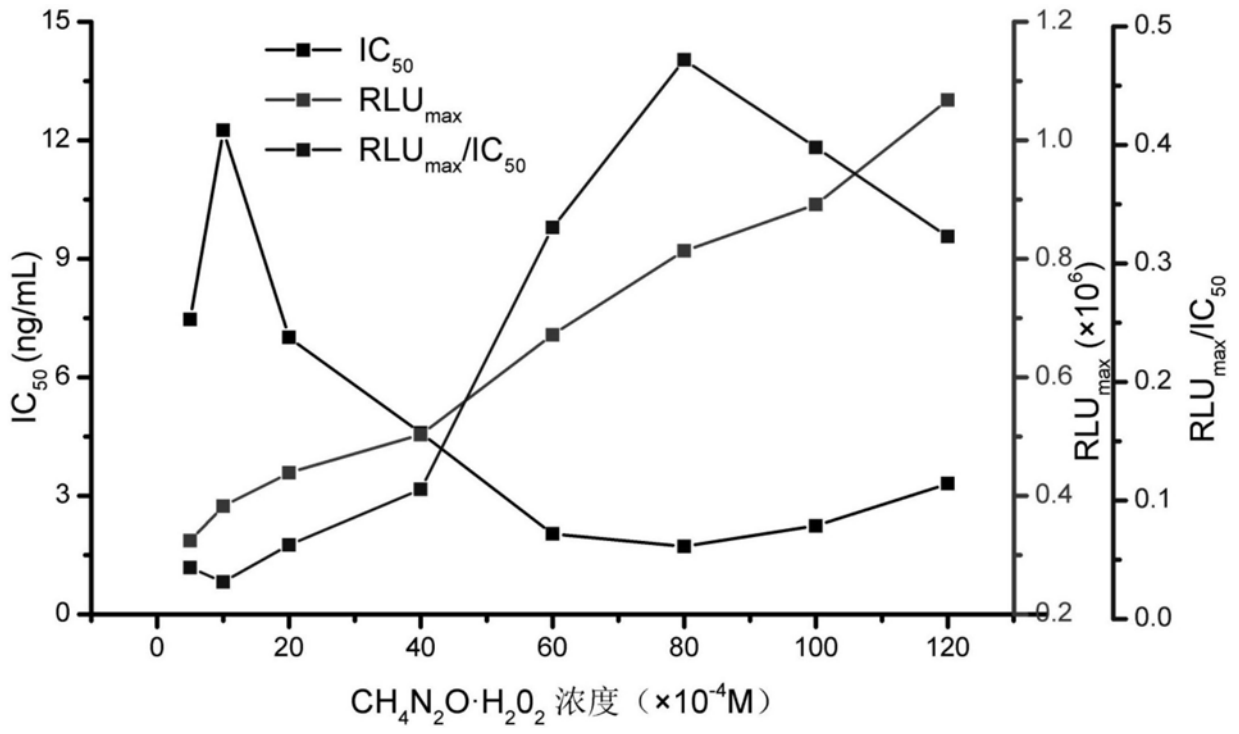


图5

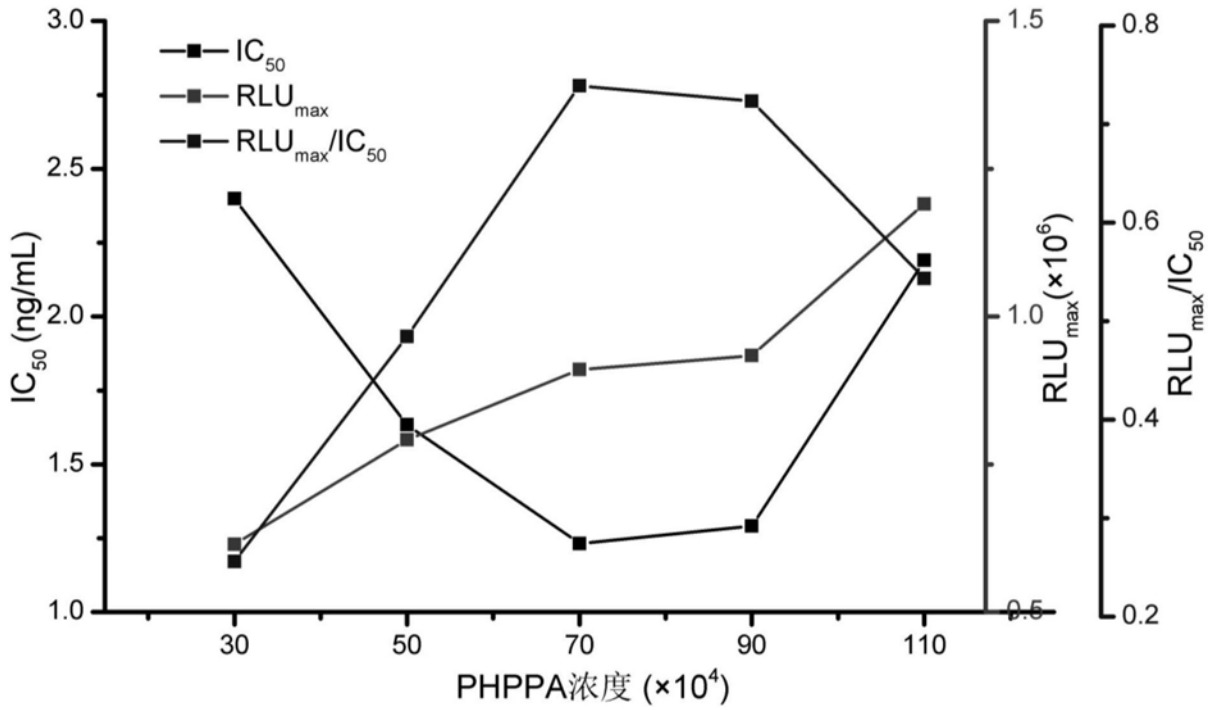


图6

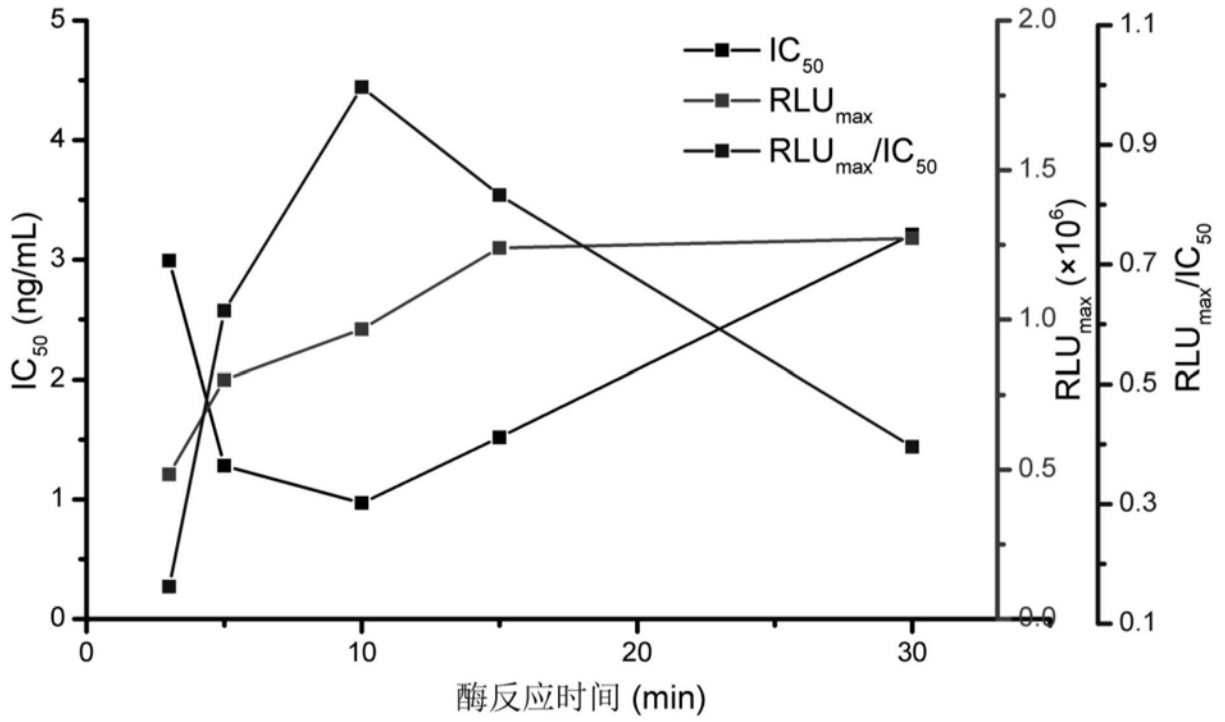


图7

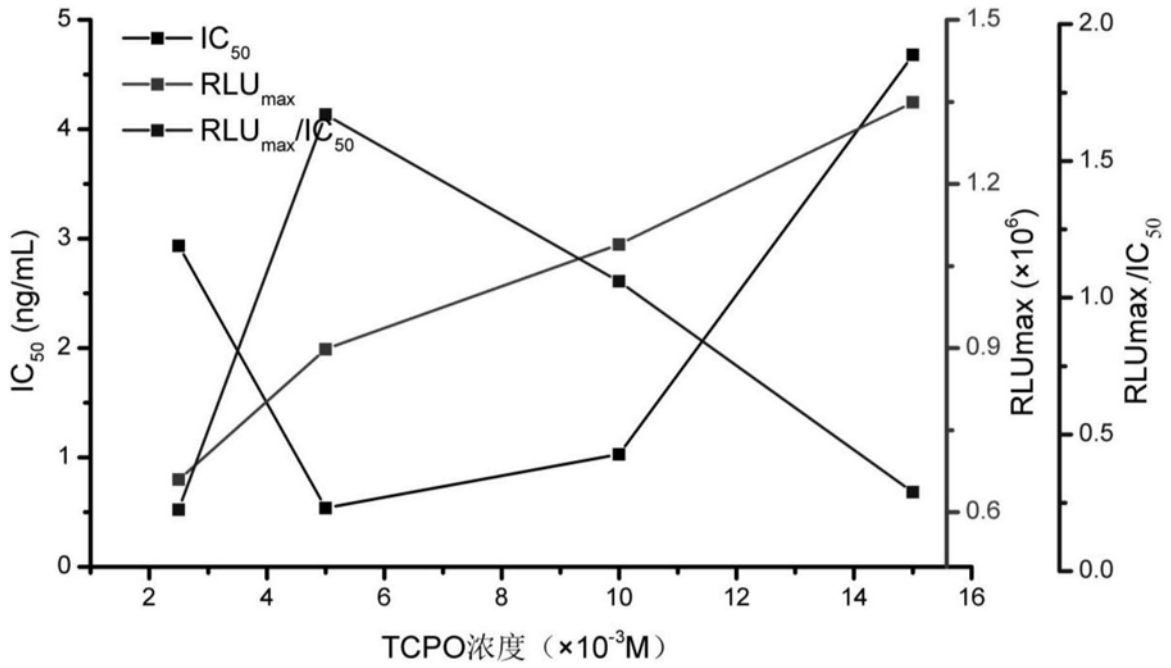


图8

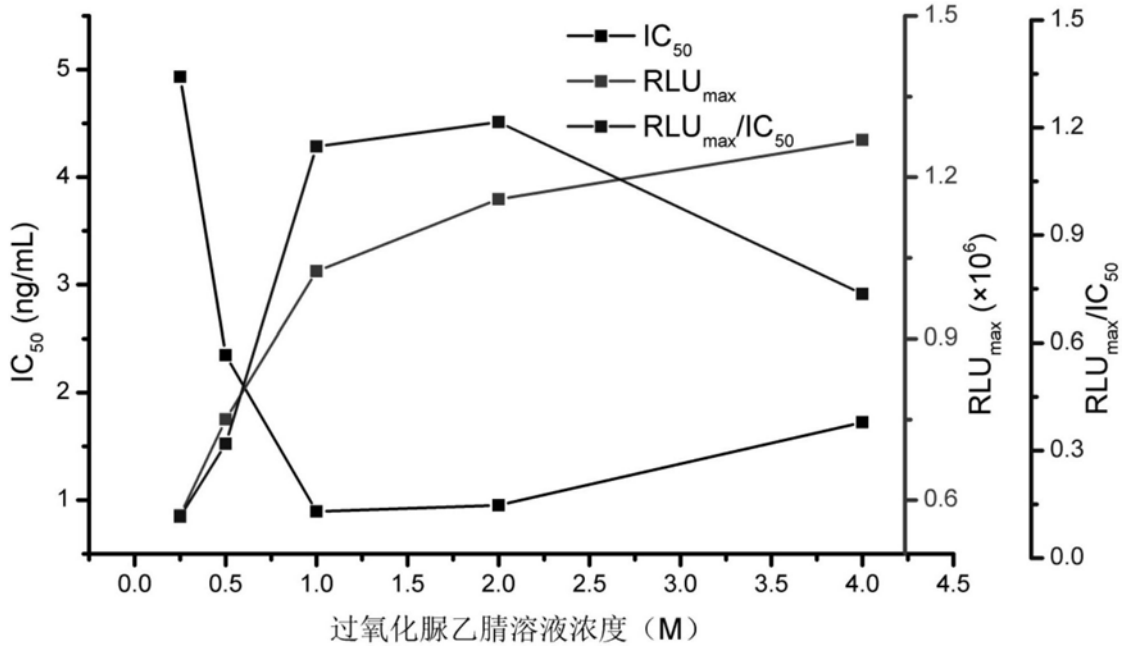


图9

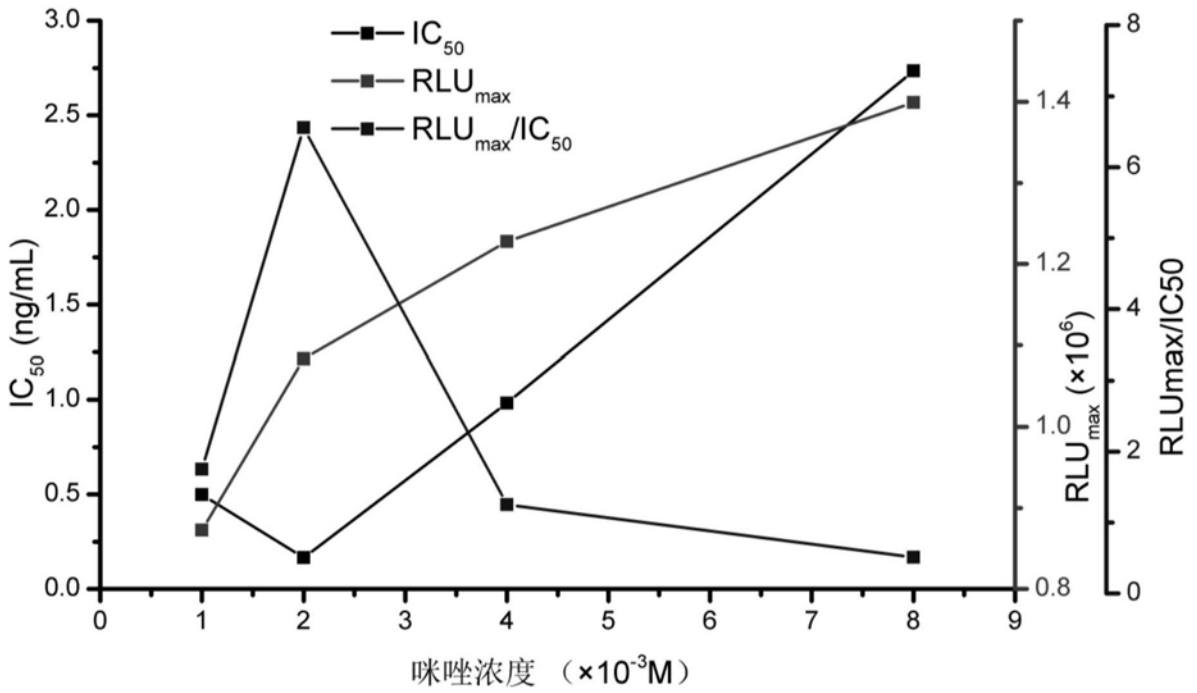


图10

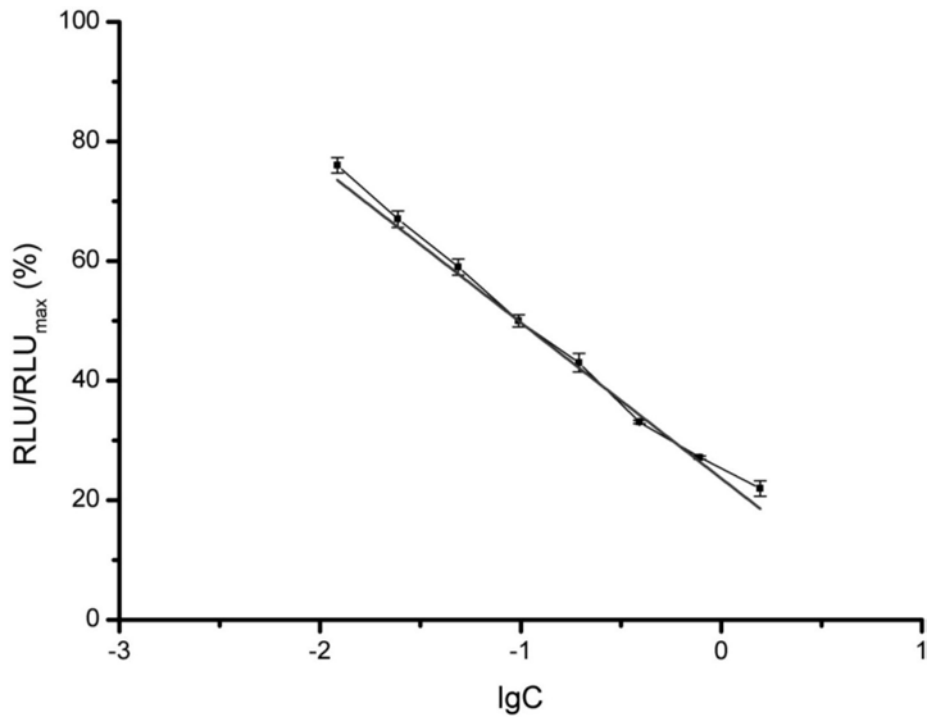


图11

专利名称(译)	双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用及方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108088838A</a>	公开(公告)日	2018-05-29
申请号	CN2017111331141.1	申请日	2017-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	西南大学		
申请(专利权)人(译)	西南大学		
当前申请(专利权)人(译)	西南大学		
[标]发明人	马良 潘姝历 张宇昊		
发明人	马良 潘姝历 张宇昊		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯在测定链格孢霉毒素中的应用及方法，本发明采用酶联免疫分析法，利用辣根过氧化物酶催化过氧化脲氧化3-(4-羟苯基)丙酸，生成能发荧光的3-(4-羟苯基)丙酸二聚体，进而在乙腈介质中，在增强剂咪唑的参与下，同双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯和过氧化脲反应产生强化学发光，建立了一种简单、快速、高灵敏度的测定细交链格孢菌毒素的化学发光间接竞争免疫分析方法；该方法的半抑制浓度IC<sub>50</sub>为95.2ng/L，在12.21 ~ 1562.50ng/L范围内成良好的线性关系，最低检出限LOD为2.53ng/L，能够用于链格孢霉毒素检测。

