



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109270260 A

(43)申请公布日 2019.01.25

(21)申请号 201811346302.9

(22)申请日 2018.11.13

(71)申请人 无锡中德伯尔生物技术有限公司
地址 214174 江苏省无锡市惠山经济开发区堰新路311号创业中心三期5号楼

(72)发明人 湛胜楠 熊勇华 李林 袁杰

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 15/00(2006.01)

G01N 15/02(2006.01)

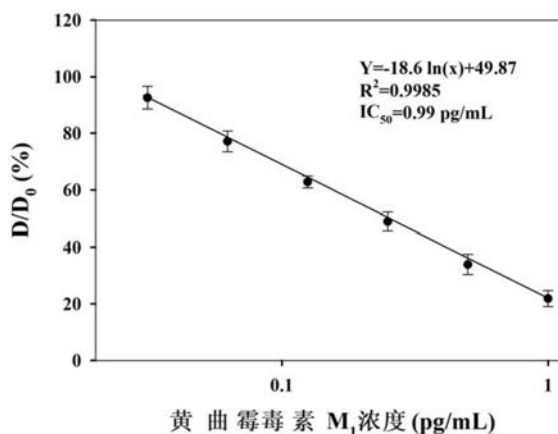
权利要求书3页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

一种检测黄曲霉毒素M₁的方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测黄曲霉毒素M₁的方法,所述方法为以酶标记的黄曲霉毒素B₁作为竞争抗原,并基于动态光散射技术,用直接竞争酶联免疫分析法检测黄曲霉毒素M₁的方法。此方法降低了竞争抗原与黄曲霉毒素M₁单克隆抗体的亲和力,克服了竞争抗原不易被目标抗原竞争而导致的灵敏度低的问题;同时借助于动态光散射法进行输出信号的检测,相较于传统的直接竞争酶联免疫分析法可以提高检测灵敏度,实现黄曲霉毒素M₁的痕量检测。



1. 一种检测黄曲霉毒素M₁的方法,其特征在于,所述方法为以酶标记的黄曲霉毒素B₁作为竞争抗原,并基于动态光散射技术,用直接竞争酶联免疫分析法检测黄曲霉毒素M₁的方法。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 将黄曲霉毒素M₁单克隆抗体包被于固体载体上,形成固相抗体;

(2) 向步骤(1)得到的固相抗体中加入含有黄曲霉毒素M₁的待测样品和葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁,混合均匀,反应;

(3) 向步骤(2)得到的混合液中加入葡萄糖溶液,混合均匀,反应;

(4) 向步骤(3)得到的混合液中加入辣根过氧化物酶、酪胺、胶体金溶液,反应;

(5) 检测胶体金的平均水化粒径,根据黄曲霉毒素M₁标准品建立的标准曲线计算得到待测样品中黄曲霉毒素M₁的含量。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(1)所述将黄曲霉毒素M₁单克隆抗体包被于固体载体上的具体方法为:

(I) 用缓冲液稀释蛋白G,并将稀释液加入到酶标板中,静置;

(II) 去除酶标板中的液体,洗涤,并加入用缓冲液稀释的抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体,静置;

(III) 去除酶标板中的液体,洗涤,再加入牛血清白蛋白封闭液封闭,去除封闭液。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(I)所述缓冲液为0.04-0.06mol/L pH=9.4-9.8的碳酸盐缓冲液;

优选地,步骤(I)所述蛋白G稀释后的浓度为18-22μg/mL;

优选地,步骤(I)所述酶标板为96孔酶标板;

优选地,步骤(I)所述稀释液加入到酶标板中的量为100μL/孔;

优选地,步骤(I)所述静置的时间为8-12h;

优选地,步骤(I)所述静置的温度为0-8℃。

5. 如权利要求3或4所述的方法,其特征在于,步骤(II)所述洗涤为用含有0.01-0.06%吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤;

优选地,所述磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L;

优选地,所述磷酸缓冲液的pH值为7.0-7.5;

优选地,步骤(II)所述缓冲液为0.01mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液;

优选地,步骤(II)所述抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体稀释后的浓度为0.1-1μg/mL;

优选地,步骤(II)所述静置的时间为1-3h;

优选地,步骤(II)所述静置的温度为35-39℃。

6. 如权利要求3-5任一项所述的方法,其特征在于,步骤(III)所述洗涤为用含有0.01-0.06%吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤;

优选地,所述磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L;

优选地,所述磷酸缓冲液的pH值为7.0-7.5;

优选地,步骤(III)所述封闭的时间为1-3h;

优选地,步骤(III)所述封闭的温度为35-39℃;

优选地,步骤(1)所述形成固相抗体后进行洗涤;

优选地,步骤(1)所述洗涤为用含有0.01-0.06%吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤;

优选地,所述磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L;

优选地,所述磷酸缓冲液的pH值为7.0-7.5。

7.如权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(2)所述葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁的制备方法为:

(A)将黄曲霉毒素B₁和羧基甲氧基胺盐酸盐溶于吡啶中,避光反应至黄曲霉毒素B₁被完全肟化,得到黄曲霉毒素B₁肟;

(B)将步骤(A)得到的黄曲霉毒素B₁肟溶于四氢呋喃,加入N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,避光反应;

(C)将步骤(B)得到的产物进行离心,收集固体,去除四氢呋喃并将其溶解于N,N-二甲基甲酰胺,之后将其加入至含有葡萄糖氧化酶的碳酸氢钠溶液中,避光反应,得到所述葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁。

8.如权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤(A)所述避光反应的时间为2-10h;

优选地,步骤(A)所述避光反应用薄层色谱法进行反应的监控;

优选地,步骤(A)完成后将黄曲霉毒素B₁肟用乙酸乙酯抽提并纯化;

优选地,步骤(B)所述避光反应用薄层色谱法进行反应的监控;

优选地,步骤(C)所述离心的速度为3000-8000rpm;

优选地,步骤(C)所述离心过滤的时间为10-20min;

优选地,步骤(C)所述葡萄糖氧化酶与黄曲霉毒素B₁的摩尔比为1:(5-50),优选1:10;

优选地,步骤(C)所述避光反应的时间为1-5h;

优选地,步骤(C)完成后将得到的葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁进行透析纯化,得到纯化的葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁。

9.如权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(2)所述待测样品的加入量为40-60μL/孔,优选50μL/孔;

优选地,步骤(2)所述葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁的加入量为40-60μL/孔,优选50μL/孔;

优选地,步骤(2)所述反应的时间为20-80min;

优选地,步骤(2)所述反应的温度为35-39℃;

优选地,步骤(2)所述反应后进行洗涤;

优选地,步骤(2)所述洗涤为用含有0.01-0.06%吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤;

优选地,所述磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L;

优选地,所述磷酸缓冲液的pH值为7.0-7.5;

优选地,步骤(3)所述反应的时间为40-90min;

优选地,步骤(3)所述反应的温度为35-39℃;

优选地,步骤(4)所述胶体金是通过以下方法制备的:

将氯金酸加热至沸腾,再向其中加入柠檬酸三钠溶液,继续加热,待溶液颜色变为深红色,用冰水冷却,抽滤纯化,得到所述胶体金;

优选地,所述氯金酸与柠檬酸三钠的浓度比为1:(30-50);

优选地,所述胶体金制备完成后置于4℃下保存;

优选地,所述胶体金的粒径为13nm;

优选地,步骤(4)所述胶体金的加入量为90-110 μ L/孔,优选100 μ L/孔;

优选地,步骤(4)所述辣根过氧化物酶的加入量为40-60 μ L/孔,优选50 μ L/孔;

优选地,步骤(4)所述酪胺的加入量为40-60 μ L/孔,优选50 μ L/孔;

优选地,步骤(4)所述反应的温度为20-30 $^{\circ}$ C;

优选地,步骤(4)所述反应的时间为1-10min;

优选地,步骤(5)所述检测胶体金的平均水化粒径是利用激光粒度仪检测的;

优选地,所述检测的激发光波长为633nm,检测角度为173 $^{\circ}$;

优选地,所述由黄曲霉毒素M₁标准品建立的标准曲线是通过如下方法得到的:选取5-10个不同浓度的黄曲霉毒素M₁标准品溶液,按照权利要求2所述步骤对各标准品下胶体金的平均水化粒径进行测定,以平均水化粒径的值为纵坐标,黄曲霉毒素M₁的浓度为横坐标,建立标准曲线,求出标准曲线的方程。

10.如权利要求1-9中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法具体包括以下步骤:

(1)将黄曲霉毒素M₁单克隆抗体包被于96孔酶标板上,形成固相抗体,用0.01mol/L pH=7.0-7.5的含有0.01-0.06%吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤;

(2)向步骤(1)得到的固相抗体中加入含有黄曲霉毒素M₁的待测样品和葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁,混合均匀,在35-39 $^{\circ}$ C下反应20-80min,用0.01mol/L pH=7.0-7.5的含有0.01-0.06%吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤;

(3)向步骤(2)得到的混合液中加入葡萄糖溶液,混合均匀,在35-39 $^{\circ}$ C下反应40-90min;

(4)向步骤(3)得到的混合液中加入辣根过氧化物酶、酪胺、粒径为13nm的胶体金溶液,在20-30 $^{\circ}$ C下反应1-10min;

(5)用激光粒度仪检测胶体金的平均水化粒径,根据黄曲霉毒素M₁标准品建立的标准曲线计算得到待测样品中黄曲霉毒素M₁的含量。

一种检测黄曲霉毒素M₁的方法

技术领域

[0001] 本发明属于抗原检测技术领域,具体涉及一种检测黄曲霉毒素M₁的方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素M₁主要由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生,是黄曲霉毒素的结构类似物之一,其毒性高于氰化钾和砒霜,属于高剧毒物质,并且有强致癌性和致突变性,研究表明肝癌高发区的发病率与患者尿液中的黄曲霉毒素M₁密切相关。哺乳动物摄入被黄曲霉毒素B₁污染的饲料或食品后,B₁在动物肝脏可转换为M₁,从而污染牛乳。因此,监测食品特别是乳制品中黄曲霉毒素M₁具有重大意义。

[0003] 由于黄曲霉毒素M₁的污染多发生在乳及乳制品中,且黄曲霉毒素M₁相对稳定,因此制定严格的黄曲霉毒素M₁限量标准,不仅有助于乳制品行业品质的管理,而且能最大限度地保证消费者购买到营养安全的食品。目前针对黄曲霉毒素M₁的定量检测方法有物理化学法(如薄层色谱法、液相色谱法等)、免疫化学法(如发射免疫法、酶联免疫法等)。但相比于其他方法,酶联免疫法操作简便,成本低,灵敏度相对较高,适合高通量样本的筛选和普查,适用于快速检测。随着科技的发展,国际上对乳制品中黄曲霉毒素M₁的限量标准日趋严格,对于检测灵敏度的要求也越来越高,常规的酶联免疫法已经不能满足痕量黄曲霉毒素M₁的检测。因此需要更加灵敏、快速和便捷的方法和技术对黄曲霉毒素M₁进行监控。

[0004] CN107688087A公开了一种黄曲霉毒素M₁的检测凝胶柱及黄曲霉毒素M₁的检测方法,黄曲霉毒素M₁的检测凝胶柱包括空心柱以及填充在空心柱内的检测层和质控层。检测时,将待测样品和化学发光标记物标记的黄曲霉毒素M₁酶标抗原加入到该黄曲霉毒素M₁的检测凝胶柱中并流经检测层和质控层,待测样品和化学发光标记物标记的黄曲霉毒素M₁酶标抗原两者共同竞争检测层中的黄曲霉毒素M₁单克隆抗体,根据检测层的颜色和质控层的颜色判断待测样品中是否含有黄曲霉毒素M₁。上述黄曲霉毒素M₁的检测凝胶柱携带方便,适合现场大量样本的快速检测,但灵敏度不高,不能满足痕量黄曲霉毒素M₁的检测要求。

[0005] CN103091494B公开了一种黄曲霉毒素M₁的化学发光酶联免疫检测试剂盒及使用方法,该试剂盒的使用方法包括如下步骤:(1)待测样品的前处理;(2)依次加入黄曲霉毒素M₁标准品溶液或样品、黄曲霉毒素M₁抗体,竞争反应后加入酶标抗体,最后加入化学发光液通过化学发光免疫分析仪进行黄曲霉毒素M₁的定量检测;(3)结果处理与分析。该发明提供的检测试剂盒依然不能满足痕量黄曲霉毒素M₁的检测要求。

[0006] CN104569381A公开了一种检测样品中黄曲霉毒素M₁含量的方法及酶联免疫试剂盒,该发明采用直接竞争ELISA检测模式,并采用包被抗原进行酶标板的包被,采用改良后的过碘酸盐氧化法进行酶标板标记,将酶直接标记于黄曲霉毒素M₁特异性抗体上,将黄曲霉毒素M₁特异性抗体与酶两种最重要的反应物合二为一,提高了标记效率,节省了酶与抗体的用量,保证标记后酶与抗体具有良好的活性,无需在试剂盒内再配置抗体,大大降低了试剂盒的成本,但检测灵敏度不高,不能满足痕量黄曲霉毒素M₁的检测要求。

[0007] 综上,开发出一种更加灵敏、快速和便捷的检测黄曲霉毒素M₁的方法是很有必要

的。

发明内容

[0008] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种检测黄曲霉毒素M₁的新方法。

[0009] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0010] 本发明提供一种检测黄曲霉毒素M₁的方法,所述方法为以酶标记的黄曲霉毒素B₁作为竞争抗原,并基于动态光散射技术,用直接竞争酶联免疫分析法检测黄曲霉毒素M₁的方法。

[0011] 在本发明中,所述方法包括以下步骤:

[0012] (1) 将黄曲霉毒素M₁单克隆抗体包被于固体载体上,形成固相抗体;

[0013] (2) 向步骤(1)得到的固相抗体中加入含有黄曲霉毒素M₁的待测样品和葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁,混合均匀,反应;

[0014] (3) 向步骤(2)得到的混合液中加入葡萄糖溶液,混合均匀,反应;

[0015] (4) 向步骤(3)得到的混合液中加入辣根过氧化物酶、酪胺、胶体金溶液,反应;

[0016] (5) 检测胶体金的平均水化粒径,根据黄曲霉毒素M₁标准品建立的标准曲线计算得到待测样品中黄曲霉毒素M₁的含量。

[0017] 所述检测胶体金的平均水化粒径是基于动态光散射技术,即使用动态光散射粒度仪来测定的。

[0018] 黄曲霉毒素M₁单克隆抗体对黄曲霉毒素B₁的交叉反应率为54.17%,本发明采用酶标记的黄曲霉毒素B₁作为竞争抗原,一方面降低了竞争抗原与黄曲霉毒素M₁单克隆抗体的亲和力,解决了竞争抗原不易被目标抗原竞争,而导致的灵敏度低的问题;由于黄曲霉毒素M₁标准品的价格较贵,因此也降低了黄曲霉毒素M₁检测的成本;另一方面,由于羟基的存在,合成酶标记黄曲霉毒素M₁的难度增加,因此,本发明选用黄曲霉毒素B₁与酶的偶联物作为竞争抗原。

[0019] 金纳米粒子具有较高的摩尔消光系数以及明显的表面等离子特性,可通过改变其大小、形状、组分及分散状态,改变溶液颜色,但需要大量金纳米粒子才能用肉眼对实验结果进行判读,误差较大,而动态光散射分析技术能够区分单个纳米粒子、纳米粒子的二聚体、寡聚物或聚合物,相较于传统的底物显色法可以实现黄曲霉毒素M₁的痕量检测。

[0020] 本发明使用葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁作为竞争抗原,其与待测物竞争结合于酶标板上,通过加入葡萄糖,使其在葡萄糖氧化酶的作用下产生葡萄糖酸和双氧水,双氧水在辣根过氧化物酶的作用下产生羟自由基,酪胺在羟自由基的作用下,形成带有氨基的网状结构,通过静电作用,诱导带有羧基的柠檬酸表面的金纳米粒子聚集,测定金纳米粒子的平均水化粒径,通过绘制黄曲霉毒素M₁标准品与平均水化粒径的标准曲线得到待测物浓度与金纳米粒子平均水化粒径之间的线性关系,从而计算黄曲霉毒素M₁的含量。

[0021] 当待测物中游离的黄曲霉毒素M₁越多,由于缺少相应的酶及后续的催化反应,只有极少量的双氧水,金纳米粒子的聚集程度就越低,导致金纳米粒子平均水化粒径就越小;反之,则金纳米粒子的平均水化粒径就越大。

[0022] 在本发明中,步骤(1)所述将黄曲霉毒素M₁单克隆抗体包被于固体载体上的具体

方法为：

[0023] (I) 用缓冲液稀释蛋白G,并将稀释液加入到酶标板中,静置；

[0024] (II) 去除酶标板中的液体,洗涤,并加入用缓冲液稀释的抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体,静置；

[0025] (III) 去除酶标板中的液体,洗涤,再加入牛血清白蛋白封闭液封闭,去除封闭液。

[0026] 在本发明中,步骤(I)所述缓冲液为0.04-0.06mol/L(例如0.04mol/L、0.045mol/L、0.05mol/L、0.055mol/L或0.06mol/L等)pH=9.4-9.8(例如9.4、9.5、9.6、9.7或9.8等)的碳酸盐缓冲液。

[0027] 优选地,步骤(I)所述蛋白G稀释后的浓度为18-22 μ g/mL,例如18 μ g/mL、19 μ g/mL、20 μ g/mL、21 μ g/mL、22 μ g/mL或23 μ g/mL等。

[0028] 优选地,步骤(I)所述酶标板为96孔酶标板。

[0029] 优选地,步骤(I)所述稀释液加入到酶标板中的量为100 μ L/孔。

[0030] 优选地,步骤(I)所述静置的时间为8-12h,例如8h、9h、9.5h、10h、10.5h、11h、11.5h或12h等。

[0031] 优选地,步骤(I)所述静置的温度为0-8 $^{\circ}$ C,例如0 $^{\circ}$ C、1 $^{\circ}$ C、2 $^{\circ}$ C、3 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、5 $^{\circ}$ C、6 $^{\circ}$ C、7 $^{\circ}$ C或8 $^{\circ}$ C等。

[0032] 在本发明中,步骤(II)所述洗涤为用含有0.01-0.06%(例如0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%或0.06%等)吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤。

[0033] 优选地,所述磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L。

[0034] 优选地,所述磷酸缓冲液的pH值为7.0-7.5,例如7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5等。

[0035] 优选地,步骤(II)所述缓冲液为0.01mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

[0036] 优选地,步骤(II)所述抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体稀释后的浓度为0.1-1 μ g/mL,例如0.1 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.3 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.6 μ g/mL、0.7 μ g/mL、0.8 μ g/mL、0.9 μ g/mL或1 μ g/mL等。

[0037] 优选地,步骤(II)所述静置的时间为1-3h,例如1h、1.5h、2h、2.2h、2.5h、2.8h或3h等。

[0038] 优选地,步骤(II)所述静置的温度为35-39 $^{\circ}$ C,例如35 $^{\circ}$ C、36 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、38 $^{\circ}$ C或39 $^{\circ}$ C等。

[0039] 在本发明中,步骤(III)所述洗涤为用含有0.01-0.06%(例如0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%或0.06%等)吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤。

[0040] 优选地,所述磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L。

[0041] 优选地,所述磷酸缓冲液的pH值为7.0-7.5,例如7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5等。

[0042] 优选地,步骤(III)所述封闭的时间为1-3h,例如1h、1.5h、2h、2.5h或3h等。

[0043] 优选地,步骤(III)所述封闭的温度为35-39 $^{\circ}$ C,例如35 $^{\circ}$ C、36 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、38 $^{\circ}$ C或39 $^{\circ}$ C等。

[0044] 优选地,步骤(1)所述形成固相抗体后进行洗涤。

[0045] 优选地,步骤(1)所述洗涤为用含有0.01-0.06%(例如0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%或0.06%等)吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤。

[0046] 优选地,所述磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L。

- [0047] 优选地,所述磷酸缓冲液的pH值为7.0-7.5,例如7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5等。
- [0048] 在本发明中,步骤(2)所述葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁的制备方法为:
- [0049] (A)将黄曲霉毒素B₁和羧基甲氧基胺盐酸盐溶于吡啶中,避光反应至黄曲霉毒素B₁被完全胍化,得到黄曲霉毒素B₁胍;
- [0050] (B)将步骤(A)得到的黄曲霉毒素B₁胍溶于溶于四氢呋喃,加入N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,避光反应;
- [0051] (C)将步骤(B)得到的产物进行离心,收集固体,去除四氢呋喃并将其溶解于N,N-二甲基甲酰胺,之后将其加入至含有葡萄糖氧化酶的碳酸氢钠溶液中,避光反应,得到所述葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁。
- [0052] 在本发明中,步骤(A)所述避光反应的时间为2-10h,例如2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h、9h或10h等。
- [0053] 优选地,步骤(A)所述避光反应用薄层色谱法进行反应的监控。
- [0054] 优选地,步骤(A)完成后将黄曲霉毒素B₁胍用乙酸乙酯抽提并纯化。
- [0055] 优选地,步骤(B)所述避光反应用薄层色谱法进行反应的监控。
- [0056] 优选地,步骤(C)所述离心的速度为3000-8000rpm,例如3000rpm、4000rpm、5000rpm、5500rpm、6000rpm、6500rpm、7000rpm或8000rpm等。
- [0057] 优选地,步骤(C)所述离心过滤的时间为10-20min,例如10min、11min、12min、13min、14min、15min、16min、17min、18min、19min或20min等。
- [0058] 优选地,步骤(C)所述葡萄糖氧化酶与黄曲霉毒素B₁的摩尔比为1:(5-50),例如1:5、1:6、1:8、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:30、1:40、1:45或1:50等,优选1:10。
- [0059] 优选地,步骤(C)所述避光反应的时间为1-5h,例如1h、2h、3h、4h或5h等。
- [0060] 优选地,步骤(C)完成后将得到的葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁进行透析纯化,得到纯化的葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁。
- [0061] 在本发明中,步骤(2)所述待测样品的加入量为40~60μL/孔,例如40μL/孔、45μL/孔、50μL/孔、55μL/孔或60μL/孔等,优选50μL/孔。
- [0062] 优选地,步骤(2)所述葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁的加入量为40~60μL/孔,例如40μL/孔、45μL/孔、50μL/孔、55μL/孔或60μL/孔等,优选50μL/孔。
- [0063] 优选地,步骤(2)所述反应的时间为20-80min,例如20min、30min、40min、50min、60min、70min或80min等。
- [0064] 优选地,步骤(2)所述反应的温度为35-39℃,例如35℃、36℃、37℃、38℃或39℃等。
- [0065] 优选地,步骤(2)所述反应后进行洗涤。
- [0066] 优选地,步骤(2)所述洗涤为用含有0.01-0.06%(例如0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%或0.06%等)吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤。
- [0067] 优选地,所述磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L。
- [0068] 优选地,所述磷酸缓冲液的pH值为7.0-7.5,例如7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5等。
- [0069] 优选地,步骤(3)所述反应的时间为40-90min,例如40min、50min、60min、70min、80min或90min等。
- [0070] 优选地,步骤(3)所述反应的温度为35-39℃,例如35℃、36℃、37℃、38℃或39℃

等。

[0071] 优选地,步骤(4)所述胶体金是通过以下方法制备的:

[0072] 将氯金酸加热至沸腾,再向其中加入柠檬酸三钠溶液,继续加热,待溶液颜色变为深红色,用冰水冷却,抽滤纯化,得到所述胶体金。

[0073] 优选地,所述氯金酸与柠檬酸三钠的浓度比为1:(30-50),例如1:30、1:32、1:35、1:37、1:40、1:42、1:45、1:48或1:50等。

[0074] 优选地,所述胶体金制备完成后置于4℃下保存。

[0075] 优选地,所述胶体金的粒径为13nm。

[0076] 优选地,步骤(4)所述胶体金的加入量为90-110μL/孔,例如90μL/孔、95μL/孔、100μL/孔、105μL/孔或110μL/孔等,优选100μL/孔。

[0077] 优选地,步骤(4)所述辣根过氧化物酶的加入量为40-60μL/孔,例如40μL/孔、45μL/孔、50μL/孔、55μL/孔或60μL/孔等,优选50μL/孔。

[0078] 优选地,步骤(4)所述酪胺的加入量为40-60μL/孔,例如40μL/孔、45μL/孔、50μL/孔、55μL/孔或60μL/孔等,优选50μL/孔。

[0079] 优选地,步骤(4)所述反应的温度为20-30℃,例如20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃或30℃等。

[0080] 优选地,步骤(4)所述反应的时间为1-10min,例如1min、2min、3min、4min、5min、6min、7min、8min、9min或10min等。

[0081] 优选地,步骤(5)所述检测胶体金的平均水化粒径是利用激光粒度仪检测的。

[0082] 优选地,所述检测的激发光波长为633nm,检测角度为173°。

[0083] 优选地,所述由黄曲霉毒素M₁标准品建立的标准曲线是通过如下方法得到的:选取5-10个不同浓度的黄曲霉毒素M₁标准品溶液,按照权利要求2所述步骤对各标准品下胶体金的平均水化粒径进行测定,以平均水化粒径的值为纵坐标,黄曲霉毒素M₁的浓度为横坐标,建立标准曲线,求出标准曲线的方程。

[0084] 作为本发明的优选技术方案,所述方法具体包括以下步骤:

[0085] (1) 将黄曲霉毒素M₁单克隆抗体包被于96孔酶标板上,形成固相抗体,用0.01mol/L pH=7.0-7.5的含有0.01-0.06%吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤;

[0086] (2) 向步骤(1)得到的固相抗体中加入含有黄曲霉毒素M₁的待测样品和葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁,混合均匀,在35-39℃下反应20-80min,用0.01mol/L pH=7.0-7.5的含有0.01-0.06%吐温-20的磷酸缓冲液进行洗涤;

[0087] (3) 向步骤(2)得到的混合液中加入葡萄糖溶液,混合均匀,在35-39℃下反应40-90min;

[0088] (4) 向步骤(3)得到的混合液中加入辣根过氧化物酶、酪胺、粒径为13nm的胶体金溶液,在20-30℃下反应1-10min;

[0089] (5) 用激光粒度仪检测胶体金的平均水化粒径,根据黄曲霉毒素M₁标准品建立的标准曲线计算得到待测样品中黄曲霉毒素M₁的含量。

[0090] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0091] 本发明采用葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁作为竞争抗原,降低了竞争抗原与黄曲霉毒素M₁单克隆抗体的亲和力,解决了竞争抗原不易被目标抗原竞争而导致的灵敏度

低的问题；

[0092] 本发明使用黄曲霉毒素B₁代替黄曲霉毒素M₁与酶偶联作为竞争抗原,解决了黄曲霉毒素M₁标准品价格贵,成本高,黄曲霉毒素M₁与酶偶联困难的问题；

[0093] 本发明借助于动态光散射法进行输出信号的检测,相较于传统的底物显色法可以提高检测灵敏度,实现黄曲霉毒素M₁的痕量检测。

附图说明

[0094] 图1是本发明所述检测方法的原理示意图；

[0095] 图2是实施例1所述检测方法在0-32pg/mL浓度范围的平均水化粒径百分率-浓度关系图；

[0096] 图3是实施例1所述检测方法的标准曲线图；

[0097] 图4是实施例2所述检测方法的标准曲线图；

[0098] 图5是实施例3所述检测方法的标准曲线图；

[0099] 图6是实施例4所述检测方法的标准曲线图；

[0100] 图7是对比例1所述检测方法的标准曲线图；

[0101] 图8是对比例2所述检测方法的标准曲线图。

具体实施方式

[0102] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0103] 以下实施例中所涉及的黄曲霉毒素M₁单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的黄曲霉毒素B₁工作液来自无锡中德伯尔生物技术有限公司,黄曲霉毒素M₁、B₁购自Sigma公司。

[0104] 以下实施例中所涉及的磷酸盐缓冲液(PBS,0.01M,pH7.4)的配制方法为:将40g NaCl、13.5g Na₂HPO₄、1.0g KH₂PO₄、1.0g KCl溶于1L超纯水,用0.1M NaOH调pH值至8.0-9.0。

[0105] 实施例1

[0106] 本实施例提供一种以葡萄糖氧化酶与黄曲霉毒素B₁半抗原偶联作为竞争抗原,以葡萄糖作为底物,基于动态光散射的直接竞争酶联免疫吸附法来检测牛乳中黄曲霉毒素M₁残留量的方法。具体操作方法如下:

[0107] (1) 正式试验:

[0108] 用0.05mol/L pH=9.6的碳酸盐缓冲液稀释蛋白G至20μg/mL,并将稀释液以100μL/孔加入到96孔酶标板中,在4℃下静置12h;去除酶标板中的液体,用含有0.05%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次;以100μL/孔加入用0.01mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液稀释的浓度为0.1μg/mL的抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体,在37℃下静置1h;去除酶标板中的液体,用含有0.05%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次;以340μL/孔再加入10mg/mL的牛血清白蛋白封闭液在37℃下孵育120min,去除封闭液,用含有0.05%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次。

[0109] 分别向包被有黄曲霉毒素M₁单克隆抗体的酶标板中以50μL/孔加入14种不同浓度

(浓度分别为0pg/mL、0.008pg/mL、0.016pg/mL、0.032pg/mL、0.063pg/mL、0.13pg/mL、0.25pg/mL、0.5pg/mL、1.00pg/mL、2.00pg/mL、4.00pg/mL、8.00pg/mL、16.00pg/mL、32.00pg/mL)的黄曲霉毒素M₁标准品,再以50μL/孔加入葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁工作液,混合均匀,在37℃下反应30min,用含有0.05%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次。

[0110] 以100μL/孔加入0.5mol/L的葡萄糖溶液,混合均匀,在37℃下反应60min。分别以50μL/孔、50μL/孔、100μL/孔加入辣根过氧化物酶、酪胺和13nm胶体金溶液,在25℃下反应5min;测定胶体金的平均水化粒径。

[0111] (2) 建立标准曲线:

[0112] 先根据下式计算平均水化粒径百分率:

[0113] 平均水化粒径百分率(%) = $D/D_0 \times 100\%$

[0114] 其中, D₀为0pg/mL的黄曲霉毒素M₁标准品下测定的平均水化粒径值, D为其余13种浓度黄曲霉毒素M₁标准品下测定的平均水化粒径值。

[0115] 以胶体金的平均水化粒径百分率为纵坐标, 黄曲霉毒素M₁标准品的浓度的对数值为横坐标, 建立标准曲线, 标准曲线为 $y = -18.6 \ln(x) + 49.87$, $R^2 = 0.9985$, 如附图2和3所示。根据附图2和3可知, 该检测方法的IC₅₀值为0.99pg/mL, 其中IC₅₀被定义为平均水化粒径百分率为50%时所对应的黄曲霉毒素M₁的浓度。

[0116] (3) 含有黄曲霉毒素M₁的样品的检测:

[0117] 样品前处理: 将牛乳用75%的甲醇水溶液溶解萃取, 在室温下震荡反应30min, 混合均匀, 然后在5000rpm, 10min条件下离心进行固液分离, 弃去沉淀物, 取上清保留备用。

[0118] 重复上述(2)正式试验的步骤, 仅把黄曲霉毒素M₁标准品替换为含有黄曲霉毒素M₁的上述样品溶液, 测定胶体金的平均水化粒径后, 将平均水化粒径百分率值代入标准曲线中, 计算得到样品溶液中黄曲霉毒素M₁的浓度值, 将其乘以溶液稀释的倍数即得到样品中黄曲霉毒素M₁的实际浓度。

[0119] 实施例2

[0120] 本实施例提供一种以葡萄糖氧化酶与黄曲霉毒素B₁半抗原偶联作为竞争抗原, 以葡萄糖作为底物, 基于动态光散射的直接竞争酶联免疫吸附法来检测牛乳中黄曲霉毒素M₁残留量的方法。具体操作方法如下:

[0121] (1) 正式试验:

[0122] 用0.04mol/L pH=9.4的碳酸盐缓冲液稀释蛋白G至18μg/mL, 并将稀释液以100μL/孔加入到96孔酶标板中, 在0℃下静置8h; 去除酶标板中的液体, 用含有0.01%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次; 以100μL/孔加入用0.01mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液稀释的浓度为0.5μg/mL的抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体, 在35℃下静置2h; 去除酶标板中的液体, 用含有0.01%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次; 以340μL/孔再加入10mg/mL的牛血清白蛋白封闭液在35℃下孵育60min, 去除封闭液, 用含有0.01%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次。

[0123] 分别向包被有黄曲霉毒素M₁单克隆抗体的酶标板中以40μL/孔加入14种不同浓度(浓度分别为0pg/mL、0.008pg/mL、0.016pg/mL、0.032pg/mL、0.063pg/mL、0.13pg/mL、

0.25pg/mL、0.5pg/mL、1.00pg/mL、2.00pg/mL、4.00pg/mL、8.00pg/mL、16.00pg/mL、32.00pg/mL)的黄曲霉毒素M₁标准品,再以40μL/孔加入葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁工作液,混合均匀,在35℃下反应20min,用含有0.01%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次。

[0124] 以100μL/孔加入0.5mol/L的葡萄糖溶液,混合均匀,在35℃下反应40min。分别以40μL/孔、40μL/孔、90μL/孔加入辣根过氧化物酶、酪胺和13nm胶体金溶液,在20℃下反应10min;测定胶体金的平均水化粒径。

[0125] (2) 建立标准曲线:

[0126] 先根据下式计算平均水化粒径百分率:

[0127] 平均水化粒径百分率(%) = $D/D_0 \times 100\%$

[0128] 其中, D_0 为0pg/mL的黄曲霉毒素M₁标准品下测定的平均水化粒径值, D 为其余13种浓度黄曲霉毒素M₁标准品下测定的平均水化粒径值。

[0129] 以胶体金的平均水化粒径百分率为纵坐标,黄曲霉毒素M₁标准品的浓度的对数值为横坐标,建立标准曲线,标准曲线为 $y = -19.011 \ln(x) + 52.178$, $R^2 = 0.991$,如附图4所示。根据附图4可知,该检测方法的IC₅₀值为1.121pg/mL,其中IC₅₀被定义为平均水化粒径百分率为50%时所对应的黄曲霉毒素M₁的浓度。

[0130] (3) 含有黄曲霉毒素M₁的样品的检测:

[0131] 样品前处理:将牛乳用75%的甲醇水溶液溶解萃取,在室温下震荡反应30min,混合均匀,而后在5000rpm,10min条件下离心进行固液分离,弃去沉淀物,取上清保留备用。

[0132] 重复上述(2)正式试验的步骤,仅把黄曲霉毒素M₁标准品替换为含有黄曲霉毒素M₁的上述样品溶液,测定胶体金的平均水化粒径后,将平均水化粒径百分率值代入标准曲线中,计算得到样品溶液中黄曲霉毒素M₁的浓度值,将其乘以溶液稀释的倍数即得到样品中黄曲霉毒素M₁的实际浓度。

[0133] 实施例3

[0134] 本实施例提供一种以葡萄糖氧化酶与黄曲霉毒素B₁半抗原偶联作为竞争抗原,以葡萄糖作为底物,基于动态光散射的直接竞争酶联免疫吸附法来检测牛乳中黄曲霉毒素M₁残留量的方法。具体操作方法如下:

[0135] (1) 正式试验:

[0136] 用0.06mol/L pH=9.8的碳酸盐缓冲液稀释蛋白G至22μg/mL,并将稀释液以100μL/孔加入到96孔酶标板中,在8℃下静置12h;去除酶标板中的液体,用含有0.06%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次;以100μL/孔加入用0.01mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液稀释的浓度为1μg/mL的抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体,在39℃下静置3h;去除酶标板中的液体,用含有0.06%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次;以340μL/孔再加入10mg/mL的牛血清白蛋白封闭液在39℃下孵育180min,去除封闭液,用含有0.06%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次。

[0137] 分别向包被有黄曲霉毒素M₁单克隆抗体的酶标板中以60μL/孔加入14种不同浓度(浓度分别为0pg/mL、0.008pg/mL、0.016pg/mL、0.032pg/mL、0.063pg/mL、0.13pg/mL、0.25pg/mL、0.5pg/mL、1.00pg/mL、2.00pg/mL、4.00pg/mL、8.00pg/mL、16.00pg/mL、

32.00pg/mL)的黄曲霉毒素M₁标准品,再以60μL/孔加入葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁工作液,混合均匀,在39℃下反应80min,用含有0.06%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次。

[0138] 以100μL/孔加入0.5mol/L的葡萄糖溶液,混合均匀,在39℃下反应90min。分别以60μL/孔、60μL/孔、110μL/孔加入辣根过氧化物酶、酪胺和13nm胶体金溶液,在30℃下反应1min;测定胶体金的平均水化粒径。

[0139] (2) 建立标准曲线:

[0140] 先根据下式计算平均水化粒径百分率:

[0141] 平均水化粒径百分率(%) = $D/D_0 \times 100\%$

[0142] 其中, D₀为0pg/mL的黄曲霉毒素M₁标准品下测定的平均水化粒径值, D为其余13种浓度黄曲霉毒素M₁标准品下测定的平均水化粒径值。

[0143] 以胶体金的平均水化粒径百分率为纵坐标,黄曲霉毒素M₁标准品的浓度的对数值为横坐标,建立标准曲线,标准曲线为 $y = -18.21 \ln(x) + 49.93$, $R^2 = 0.9971$,如附图5所示。根据附图5可知,该检测方法的IC₅₀值为0.9961pg/mL,其中IC₅₀被定义为平均水化粒径百分率为50%时所对应的黄曲霉毒素M₁的浓度。

[0144] (3) 含有黄曲霉毒素M₁的样品的检测:

[0145] 样品前处理:将牛乳用75%的甲醇水溶液溶解萃取,在室温下震荡反应30min,混合均匀,然后在5000rpm,10min条件下离心进行固液分离,弃去沉淀物,取上清保留备用。

[0146] 重复上述(2)正式试验的步骤,仅把黄曲霉毒素M₁标准品替换为含有黄曲霉毒素M₁的上述样品溶液,测定胶体金的平均水化粒径后,将平均水化粒径百分率值代入标准曲线中,计算得到样品溶液中黄曲霉毒素M₁的浓度值,将其乘以溶液稀释的倍数即得到样品中黄曲霉毒素M₁的实际浓度。

[0147] 实施例4

[0148] 本实施例提供一种以葡萄糖氧化酶与黄曲霉毒素B₁半抗原偶联作为竞争抗原,以葡萄糖作为底物,基于动态光散射的直接竞争酶联免疫吸附法来检测牛乳中黄曲霉毒素M₁残留量的方法。具体操作方法如下:

[0149] (1) 正式试验:

[0150] 用0.05mol/L pH=9.4的碳酸盐缓冲液稀释蛋白G至20μg/mL,并将稀释液以100μL/孔加入到96孔酶标板中,在4℃下静置8h;去除酶标板中的液体,用含有0.05%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次;以100μL/孔加入用0.01mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液稀释的浓度为0.3μg/mL的抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体,在35℃下静置2h;去除酶标板中的液体,用含有0.05%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次;以340μL/孔再加入10mg/mL的牛血清白蛋白封闭液在37℃下孵育60min,去除封闭液,用含有0.05%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次。

[0151] 分别向包被有黄曲霉毒素M₁单克隆抗体的酶标板中以50μL/孔加入14种不同浓度(浓度分别为0pg/mL、0.008pg/mL、0.016pg/mL、0.032pg/mL、0.063pg/mL、0.13pg/mL、0.25pg/mL、0.5pg/mL、1.00pg/mL、2.00pg/mL、4.00pg/mL、8.00pg/mL、16.00pg/mL、32.00pg/mL)的黄曲霉毒素M₁标准品,再以50μL/孔加入葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素B₁

工作液,混合均匀,在37℃下反应20min,用含有0.05%的吐温20的0.01mol/L PBS洗涤酶标板三次后用0.01mol/L的PBS再洗涤一次。

[0152] 以100μL/孔加入0.5mol/L的葡萄糖溶液,混合均匀,在35℃下反应40min。分别以50μL/孔、50μL/孔、100μL/孔加入辣根过氧化物酶、酪胺和13nm胶体金溶液,在25℃下反应10min;测定胶体金的平均水化粒径。

[0153] (2) 建立标准曲线:

[0154] 先根据下式计算平均水化粒径百分率:

[0155] 平均水化粒径百分率(%) = $D/D_0 \times 100\%$

[0156] 其中, D_0 为0pg/mL的黄曲霉毒素 M_1 标准品下测定的平均水化粒径值, D 为其余13种浓度黄曲霉毒素 M_1 标准品下测定的平均水化粒径值。

[0157] 以胶体金的平均水化粒径百分率为纵坐标,黄曲霉毒素 M_1 标准品的浓度对数值为横坐标,建立标准曲线,标准曲线为 $y = -20.311 \ln(x) + 51.2$, $R^2 = 0.993$,如附图6所示。根据附图6可知,该检测方法的 IC_{50} 值为1.06pg/mL,其中 IC_{50} 被定义为平均水化粒径百分率为50%时所对应的黄曲霉毒素 M_1 的浓度。

[0158] (3) 含有黄曲霉毒素 M_1 的样品的检测:

[0159] 样品前处理:将牛乳用75%的甲醇水溶液溶解萃取,在室温下震荡反应30min,混合均匀,而后在5000rpm,10min条件下离心进行固液分离,弃去沉淀物,取上清保留备用。

[0160] 重复上述(2)正式试验的步骤,仅把黄曲霉毒素 M_1 标准品替换为含有黄曲霉毒素 M_1 的上述样品溶液,测定胶体金的平均水化粒径后,将平均水化粒径百分率值代入标准曲线中,计算得到样品溶液中黄曲霉毒素 M_1 的浓度值,将其乘以溶液稀释的倍数即得到样品中黄曲霉毒素 M_1 的实际浓度。

[0161] 对比例1

[0162] 本实施例提供一种以辣根过氧化物酶与黄曲霉毒素 B_1 半抗原偶联作为竞争抗原,以TMB作为底物的直接竞争酶联免疫吸附法来检测牛乳中黄曲霉毒素 M_1 残留量的方法。具体操作方法如下:

[0163] (1) 正式试验:

[0164] 按照实施例1中的方法制备包被有黄曲霉毒素 M_1 单克隆抗体的酶标板。

[0165] 分别向固相抗体中以50μL/孔加入8种不同浓度(浓度分别为0ng/mL、0.05ng/mL、0.25ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL)的黄曲霉毒素 M_1 标准品,再以50μL/孔加入辣根过氧化物酶标记的黄曲霉毒素 B_1 工作液,混合均匀,在37℃下反应45min,去除孔内液体,用洗涤工作液340μL/孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干。

[0166] 以100μL/孔加入TMB显色液,混合均匀,在37℃下反应15min,以50μL/孔加入终止液,在25℃下反应5min;用酶标仪在450nm下检测吸光度值。

[0167] (2) 建立标准曲线:

[0168] 先根据下式计算平均百分吸光率:

[0169] 平均百分吸光率(%) = $B/B_0 \times 100\%$

[0170] 其中, B_0 为0ng/mL的黄曲霉毒素 M_1 标准品下测定的平均吸光度值, B 为其余7种浓度黄曲霉毒素 M_1 标准品下测定的平均吸光度值。

[0171] 以平均百分吸光率值为纵坐标,黄曲霉毒素 M_1 标准品的浓度的对数值为横坐标,

建立标准曲线,标准曲线为 $y = -13.391 \ln(x) + 41.64$, $R^2 = 0.9954$,如附图7所示。根据附图7可知,该检测方法的 IC_{50} 值为 0.54 ng/mL ,其中 IC_{50} 被定义为平均百分吸光率为50%时所对应的黄曲霉毒素 M_1 的浓度。

[0172] (3) 含有黄曲霉毒素 M_1 的样品的检测:

[0173] 样品前处理:将牛乳用75%的甲醇水溶液溶解萃取,在室温下震荡反应30min,混合均匀,然后在5000rpm,10min条件下离心进行固液分离,弃去沉淀物,取上清保留备用。

[0174] 重复上述(2)正式试验的步骤,仅把黄曲霉毒素 M_1 标准品替换为含有黄曲霉毒素 M_1 的上述样品溶液,测定吸光度值后,将平均百分吸光率值代入标准曲线中,计算得到样品溶液中黄曲霉毒素 M_1 的浓度值,将其乘以溶液稀释的倍数即得到样品中黄曲霉毒素 M_1 的实际浓度。

[0175] 对比例2

[0176] 本实施例提供一种以葡萄糖氧化酶与黄曲霉毒素 B_1 半抗原偶联作为竞争抗原,以葡萄糖作为底物,基于胶体金比色的酶联免疫吸附法来检测牛乳中黄曲霉毒素 M_1 残留量的方法。具体操作方法如下:

[0177] (1) 正式试验:

[0178] 用 0.05 mol/L $\text{pH} = 9.4$ 的碳酸盐缓冲液稀释蛋白G至 $20 \mu\text{g/mL}$,并将稀释液以 $100 \mu\text{L/孔}$ 加入到96孔酶标板中,在 4°C 下静置8h;去除酶标板中的液体,用含有0.05%的吐温20的 0.01 mol/L PBS洗涤酶标板三次后用 0.01 mol/L 的PBS再洗涤一次;以 $100 \mu\text{L/孔}$ 加入用 0.01 mol/L $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸盐缓冲液稀释的浓度为 $0.3 \mu\text{g/mL}$ 的抗黄曲霉毒素 M_1 单克隆抗体,在 35°C 下静置2h;去除酶标板中的液体,用含有0.05%的吐温20的 0.01 mol/L PBS洗涤酶标板三次后用 0.01 mol/L 的PBS再洗涤一次;以 $340 \mu\text{L/孔}$ 再加入 10 mg/mL 的牛血清白蛋白封闭液在 37°C 下孵育60min,去除封闭液,用含有0.05%的吐温20的 0.01 mol/L PBS洗涤酶标板三次后用 0.01 mol/L 的PBS再洗涤一次。

[0179] 分别向包被有黄曲霉毒素 M_1 单克隆抗体的酶标板中以 $50 \mu\text{L/孔}$ 加入14种不同浓度(浓度分别为 0 pg/mL 、 0.008 pg/mL 、 0.016 pg/mL 、 0.032 pg/mL 、 0.063 pg/mL 、 0.13 pg/mL 、 0.25 pg/mL 、 0.5 pg/mL 、 1.00 pg/mL 、 2.00 pg/mL 、 4.00 pg/mL 、 8.00 pg/mL 、 16.00 pg/mL 、 32.00 pg/mL)的黄曲霉毒素 M_1 标准品,再以 $50 \mu\text{L/孔}$ 加入葡萄糖氧化酶标记的黄曲霉毒素 B_1 工作液,混合均匀,在 37°C 下反应20min,用含有0.05%的吐温20的 0.01 mol/L PBS洗涤酶标板三次后用 0.01 mol/L 的PBS再洗涤一次。

[0180] 以 $100 \mu\text{L/孔}$ 加入 0.5 mol/L 的葡萄糖溶液,混合均匀,在 35°C 下反应40min。分别以 $50 \mu\text{L/孔}$ 、 $50 \mu\text{L/孔}$ 、 $100 \mu\text{L/孔}$ 加入辣根过氧化物酶、酪胺和 13 nm 胶体金溶液,在 25°C 下反应10min;记录400-700nm的紫外可见吸收图谱。

[0181] (2) 建立标准曲线:

[0182] 先根据下式计算抑制率:

[0183] 百分抑制率(%) = $B/B_0 \times 100\%$

[0184] 其中, B_0 为 0 ng/mL 的黄曲霉毒素 M_1 标准品下测定的胶体金溶液在 520 nm 与 630 nm 处紫外吸光度值的比值, B 为其余7种浓度黄曲霉毒素 M_1 标准品下测定的胶体金溶液在 520 nm 与 630 nm 处紫外吸光度值的比值。

[0185] 以百分抑制率(B/B_0)为纵坐标,黄曲霉毒素 M_1 标准品的浓度的对数值为横坐标,建

立标准曲线,标准曲线为 $y = -21.29 \ln(x) + 117.83$, $R^2 = 0.9903$,如附图8所示。根据附图8可知,该检测方法的 IC_{50} 值为 24.19 pg/mL ,其中 IC_{50} 被定义为百分抑制率为50%时所对应的黄曲霉毒素 M_1 的浓度。

[0186] (3) 含有黄曲霉毒素 M_1 的样品的检测:

[0187] 样品前处理:将牛乳用75%的甲醇水溶液溶解萃取,在室温下震荡反应30min,混合均匀,然后在5000rpm,10min条件下离心进行固液分离,弃去沉淀物,取上清保留备用。

[0188] 重复上述(2)正式试验的步骤,仅把黄曲霉毒素 M_1 标准品替换为含有黄曲霉毒素 M_1 的上述样品溶液,测定胶体金400-700nm吸光度值后,将百分抑制率值代入标准曲线中,计算得到样品溶液中黄曲霉毒素 M_1 的浓度值,将其乘以溶液稀释的倍数即得到样品中黄曲霉毒素 M_1 的实际浓度。

[0189] 综上,由实施例1-4和对比例1-2所述检测方法得到的标准曲线可知,与对比例相比,使用实施例所述检测方法即以葡萄糖氧化酶与黄曲霉毒素 B_1 半抗原偶联作为竞争抗原,以葡萄糖作为底物,基于动态光散射的直接竞争酶联免疫吸附法得到的标准曲线 IC_{50} 值显著降低,检测灵敏度显著提高,实现了黄曲霉毒素 M_1 的痕量检测。

[0190] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的检测黄曲霉毒素 M_1 的方法,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

[0191] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0192] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

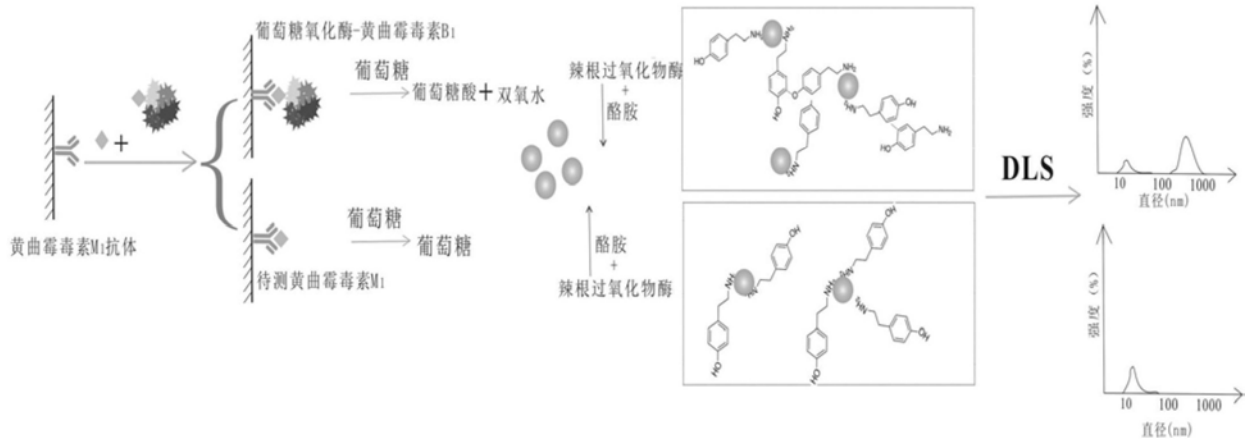


图1

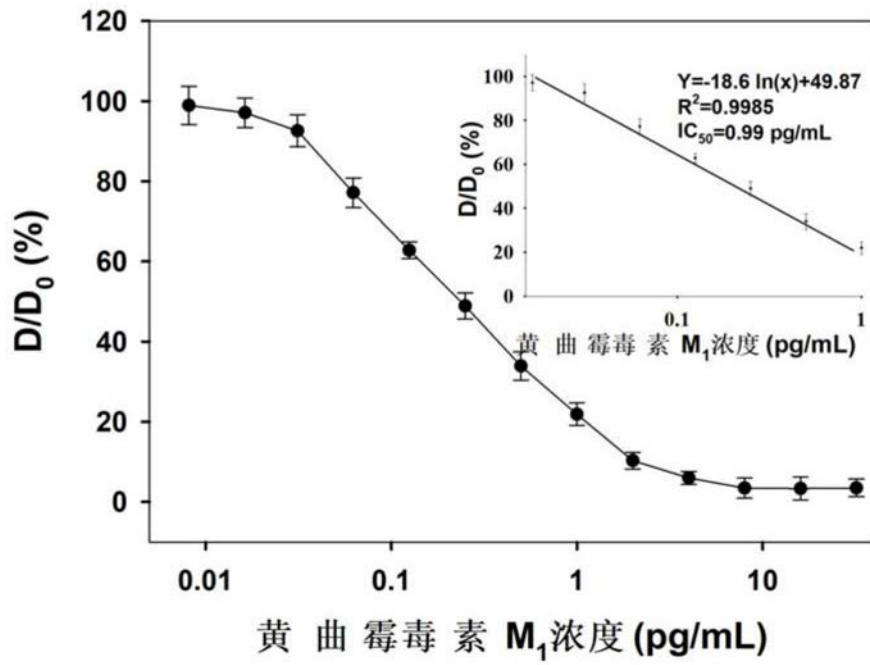


图2

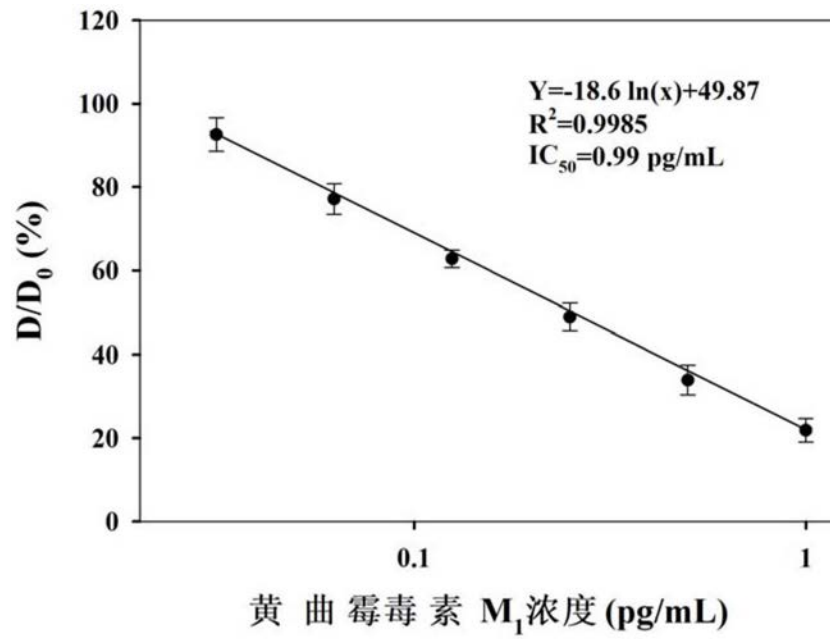


图3

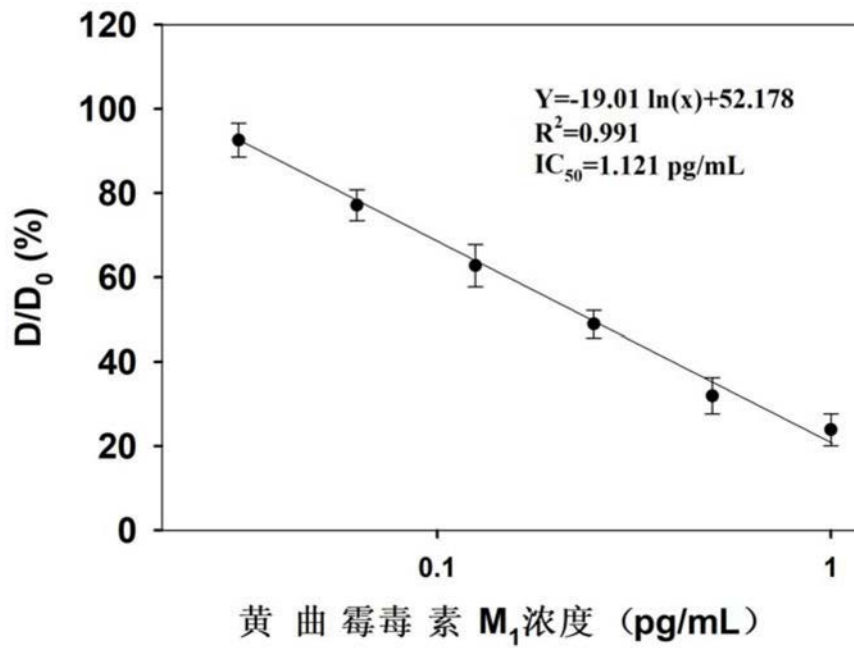


图4

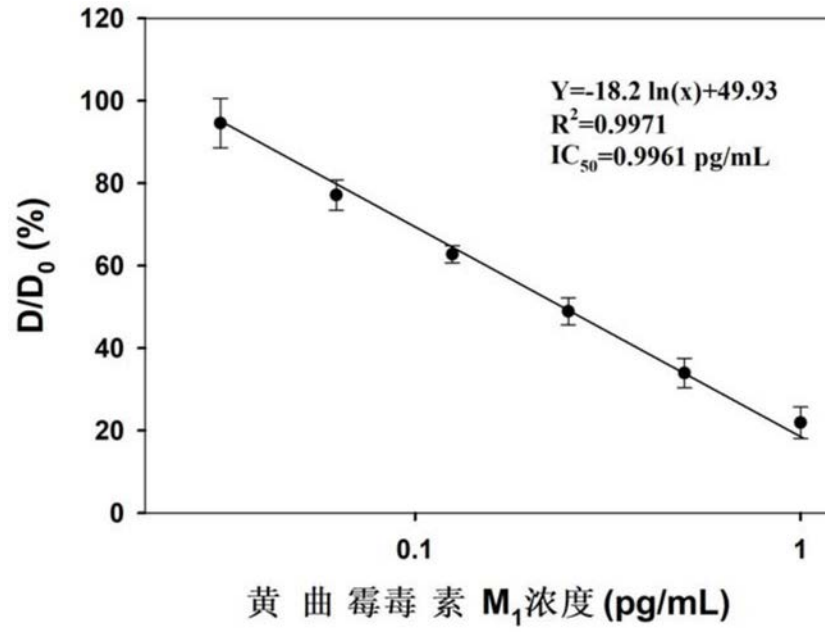


图5

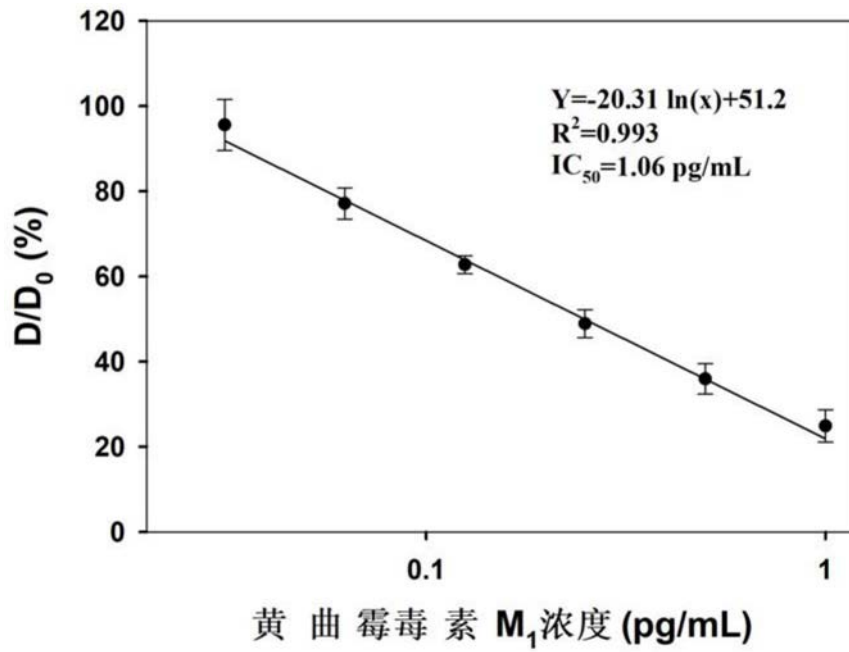


图6

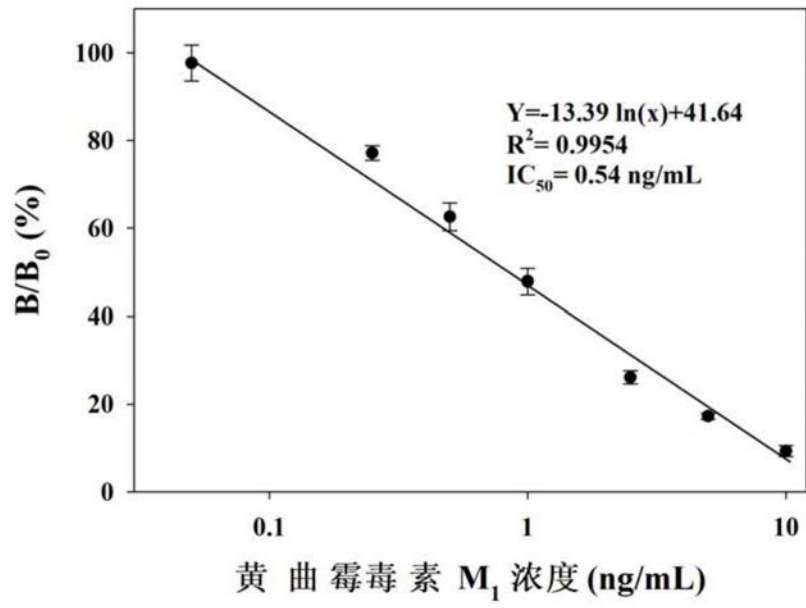


图7

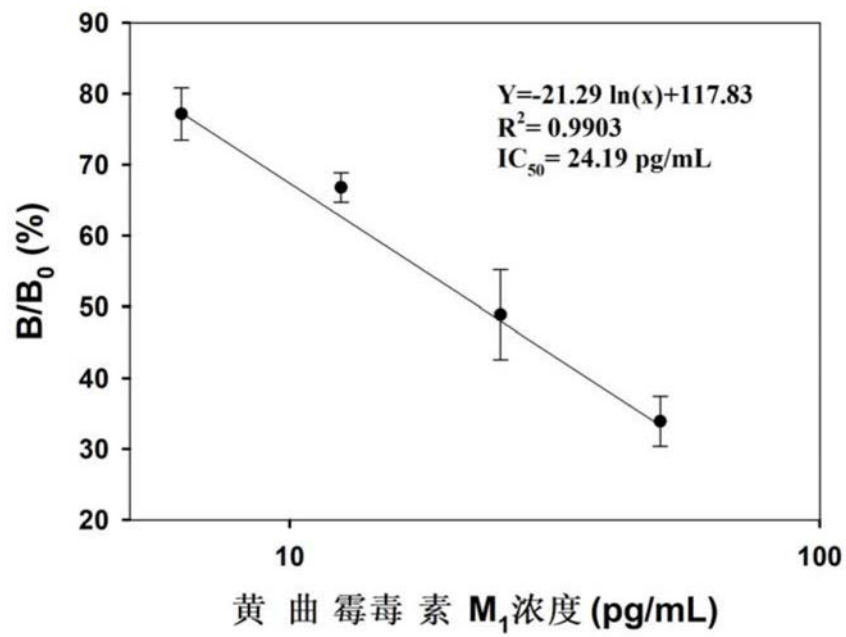


图8

专利名称(译)	一种检测黄曲霉毒素M1的方法		
公开(公告)号	CN109270260A	公开(公告)日	2019-01-25
申请号	CN201811346302.9	申请日	2018-11-13
[标]发明人	湛胜楠 熊勇华 李林 袁杰		
发明人	湛胜楠 熊勇华 李林 袁杰		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N15/00 G01N15/02		
CPC分类号	G01N33/535 G01N15/00 G01N15/02 G01N15/0211 G01N33/54346 G01N33/577 G01N2015/0038 G01N2015/0065 G01N2015/0222 G01N2015/0277		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测黄曲霉毒素M1的方法，所述方法为以酶标记的黄曲霉毒素B1作为竞争抗原，并基于动态光散射技术，用直接竞争酶联免疫分析法检测黄曲霉毒素M1的方法。此方法降低了竞争抗原与黄曲霉毒素M1单克隆抗体的亲和力，克服了竞争抗原不易被目标抗原竞争而导致的灵敏度低的问题；同时借助于动态光散射法进行输出信号的检测，相较于传统的直接竞争酶联免疫分析法可以提高检测灵敏度，实现黄曲霉毒素M1的痕量检测。

