



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101750484 A

(43) 申请公布日 2010.06.23

(21) 申请号 200910035334.1

(22) 申请日 2009.09.25

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号

(72) 发明人 王周平 李井泉 段诺 吴世嘉

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种纳米金标记 - 黄曲霉毒素 B₁ 新型检测方法

(57) 摘要

本发明涉及利用纳米金标记黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁), 结合纳米金银增强、吸光度检测 / 溶出化学发光检测技术, 建立了两种 AFB₁ 新型超灵敏检测体系。第一种方法用 AFB₁ 抗体与金标抗原、待测抗原进行竞争免疫反应, 然后加入银增强溶液, 以金为核沉积生长银, 通过检测吸光度来确定待测物中 AFB₁ 的含量, 该方法的检出限可达到 0.01ng/mL。第二种方法在前一种方法的基础上, 将银化学溶出, 通过化学发光法检测沉积的银的量来确定待测物中 AFB₁ 的含量, 该方法的检出限可达到 0.002ng/mL。本发明建立的 AFB₁ 检测技术准确、灵敏、快速, 对于食品安全具有重要意义。

1. 一种纳米金标记黄曲霉毒素 B₁ 的新型检测方法,其特征在于:

(1) 采用纳米金标记 AFB₁ 人工抗原,使其与 AFB₁ 标准抗原直接竞争同固定化抗体发生免疫反应;

(2) 加入银增强溶液,以金为核沉积生长银,通过检测吸光度来确定纳米金表面沉积的银的量,从而对 AFB₁ 进行间接定量检测。

(3) 进一步将银化学溶出,采用溶出化学发光检测技术,通过二次信号放大,实现了 AFB₁ 的超灵敏化学发光检测。

2. 如权利要求 1 所述一种纳米金标记黄曲霉毒素 B₁ 的新型检测方法,其特征在于纳米金标记 AFB₁ 人工抗原的制备:

取 1mL 纳米金于离心管中,加 1.5mL 溶于 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 中的人工抗原于其中,充分混合。室温下放置 1h,12000g 离心 45min,除去上清液后,加入 1.5mL 1% BSA,重悬沉淀物,置冰箱 4℃ 保存备用。

3. 如权利要求 1 所述一种纳米金标记黄曲霉毒素 B₁ 的新型检测方法,其特征在于银增强液的制备:

0.85g 氢醌溶于 15mL 超纯水中;1.175g 柠檬酸三钠 /1.275g 柠檬酸溶于 5mL 超纯水中;0.5g 硝酸银溶于 2mL 超纯水中,溶液均需新鲜配制,确保无结晶体析出且无色,氢醌和柠檬酸混合液应在银增强前 30 分钟左右保持 37℃ 温育。

4. 如权利要求 1 所述一种纳米金标记黄曲霉毒素 B₁ 的新型检测方法,其特征在于进一步将银化学溶出,采用溶出化学发光检测技术实现对黄曲霉毒素的超灵敏检测。

此过程分两步:

第一步:用 HNO₃ (v/v) 来溶解银,溶解时间采用 15 分钟。

第二步:溶解所得的银离子溶液中均加入 60 μL 5mol/L 的 NaOH 来调节其酸度。然后该溶液转移至含有 200 μL 2% (m/V) K₂S₂O₈, 40 μL 6×10⁻³mol/L MnSO₄ 和 36 μL 1:1 (v/v) H₃PO₄ 的离心管中,混合均匀后马上放入 90℃ 水浴中加热 7 分钟。流水冷却中止该催化反应并用 5mol/L NaOH 调节溶液的 pH 值至 10。取该溶液 50 μL 转移至石英发光管中,然后注射入 200 μL luminol (1 μmol/L, pH13.5) 同时在发光分析仪上记录发光信号。该实验中银离子的化学发光强度和金标抗原的浓度成正比 (与样品中 AFB₁ 的含量成反比),可以得出化学发光信号和待测 AFB₁ 的关系。

一种纳米金标记 - 黄曲霉毒素 B₁ 新型检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用纳米金标记黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 人工抗原,利用纳米金银增强原理,结合吸光度检测 / 溶出化学发光检测技术,建立了 AFB₁ 新型超灵敏检测体系。属于生物细胞学和微生物菌类毒性代谢产物检测方法技术领域。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 是黄曲霉菌和寄生曲霉菌的二次代谢产物,有极强的毒性和致癌性,可引发动物的肝癌、胃癌、肾癌等,是目前发现的最强的化学致癌物质,还可以通过食物链在生物体之间转移,因而不仅给农民和家禽、家畜生产者造成经济上的损失,而且污染食品继而对人类健康构成一定的威胁。因此,建立准确、灵敏、快速的 AFB₁ 检测技术对于食品安全具有重要意义。

[0003] 迄今为止,已建立的 AFB₁ 检测方法主要包括薄层色谱法、酶联免疫吸附法和 HPLC 法等。这些方法各有其优点,能不同程度的满足实践当中对 AFB₁ 检测的需求。但随着人们生活水平的提高,对涉及食品安全的危害因子(如 AFB₁)的限量标准将会越来越低,同时国际食品贸易壁垒的加剧都要求能尽快发展出更灵敏、快速的检测方法。本发明的特点就在于它能实现对黄曲霉毒素的高灵敏检测。

发明内容

[0004] 本发明涉及采用纳米金标记 AFB₁ 人工抗原,使其与 AFB₁ 标准抗原直接竞争同固定化抗体发生免疫反应,再加入银增强液,银在纳米金上沉积。待测抗原的浓度越大,通过免疫反应结合的金标记抗原就越少,纳米金上沉积的银就越少,颜色(灰度)也越浅,用分光光度法测定该银增强产物的吸光度,即可得出待测 AFB₁ 的量,建立了吸光度检测体系。其次,进一步将银化学溶出,采用溶出化学发光检测技术,通过二次信号放大,建立了金标银增强 - 溶出化学发光检测体系,实现了 AFB₁ 的超灵敏化学发光检测。

[0005] 具体实验原理如图 1 所示。

[0006] 具体来说,本发明的主要分析步骤如下:

[0007] 1 标准试样制备

[0008] 1.1 本发明所用试液与材料:① AFB₁ 单克隆抗体溶液;② 封闭液(含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 10mmol/L PBS(pH 7.4));③ 人工 AFB₁ 抗原溶液;④ AFB₁ 标准溶液;⑤ 包被缓冲液(pH 9.6 的 10mmol/L PBS);⑥ 洗涤液(含 0.05% Tween20 的 10mmol/L PBS(pH 7.4));⑦ 银增强液(组成见 2.2);⑧ 银溶出液(1 : 3HNO₃(v : v) 溶液);⑨ 化学发光反应液(组成见 2.4)。ELISA 96 孔板及反应板框架。

[0009] 1.2 制备黄曲霉毒素 AFB₁ 标准溶液

[0010] 用甲醇配成 1mg/mL 的 AFB₁ 储备液, -20℃ 冰箱贮存,于检测当天,准确吸取储备液,用含 20% 甲醇的 10mmol/L PBS(pH 7.0) 稀释成制备标准曲线的所需浓度。

[0011] 1.3 制备 AFB₁ 单克隆抗体溶液

[0012] 用 10mmol/L PBS 溶解 AFB₁ 单克隆抗体制备 AFB₁ 单克隆抗体储备液,用时进一步稀释。

[0013] 1.4 纳米金的制备

[0014] (1) 在圆底烧瓶中加入 95.8mL 超纯水,再加入 4.2mL 1%的氯金酸溶液,磁力加热搅拌,持续煮沸 10min。

[0015] (2) 加入 10mL 1%的柠檬酸三钠溶液(迅速),溶液开始有些蓝色,然后变浅蓝色,再加热出现红色。

[0016] (3) 等到出现透明的橙红色,停止加热,将热源除去,继续搅拌 15min。

[0017] 图 2 为所制备纳米金颗粒的紫外-可见吸收光谱,其最大吸收波长为 520nm。

[0018] 图 3 为所制备纳米金颗粒的透射电镜(TEM)图,可以看出纳米金形貌为较均一的球状,粒径在 12nm 左右,适合做蛋白标记物。

[0019] 1.5 纳米金标记 AFB₁ 人工抗原复合物制备

[0020] 取 1mL 纳米金于离心管中,加 1.5mL 溶于 0.01mol/L 磷酸缓冲液(PBS)中的人工抗原于其中,充分混合。室温下放置 1h,12000g 离心 45min,除去上清液后,加入 1.5mL 1% BSA,重悬沉淀物,置冰箱 4℃保存备用。

[0021] 1.6 制备抗体包被酶标板

[0022] 于洁净酶标板每孔加入 100 μL 用包被缓冲液稀释 AFB₁ 单克隆抗体溶液。4℃过夜。拍干,用洗涤液洗 3 次。再用每孔加封闭液 100 μL 37℃温育 1h。随后在吸水纸上拍干,用洗涤液洗 3 次。冰箱低温保存备用。

[0023] 2 检测

[0024] 2.1 金标抗原直接竞争免疫反应

[0025] 1) 截取 13 孔已包被好 AFB₁ 抗体的酶标板孔放置在反应板框架上,设定 1 号孔为仪器调零孔,2 ~ 13 号孔为免疫反应测定孔。

[0026] 2) 每孔用 250 μL 洗涤液洗涤,放置 1min 后,甩掉洗涤液,在吸水板上拍干,重复洗板一次。

[0027] 3) 1 号孔加入 100 μL 金标 AFB₁ 人工抗原稀释液,2 ~ 13 号孔分别加入系列的 AFB₁ 标准溶液和金标 AFB₁ 抗原溶液各 50 μL。轻轻振摇,使各孔中的反应物混匀。

[0028] 4) 将反应板放入 37℃恒温培养箱中孵育 30min。

[0029] 5) 取出反应板,用力甩掉反应液,拍干。

[0030] 6) 每孔加入 250 μL 洗涤液,放置 2min,甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干,重复洗涤 4 次,备用。

[0031] 2.2 银增强及吸光度值的检测

[0032] 取银增强液迅速混匀立即加入各酶标板孔内,每孔 100 μL,置于恒温箱里反应,反应一定时间后,每孔加超纯水洗涤终止反应。然后将银增强后的微孔板放入酶标仪中,在 630nm 处检测其吸光度值。银增强反应在暗处避光进行,以减少银自身成核反应,增强特异性。

[0033] 在银增强过程中,随着时间的推移,增强液的灰度会不断增加,尤其是通过免疫吸附锚定于酶标板上的纳米金颗粒可显著加速银颗粒的聚集,即纳米金银增强信号的吸光度值变化是剂量时间依赖性的(图 4)。在一定的时间控制下,银增强的灰度值变化与免疫反

应体系中固定于酶标孔内的纳米金颗粒的量呈正相关。通过一系列实验优化,选择出最合适的时间点 120s 终止银增强反应,得出银增强吸光度值与 0.01 ~ 0.25ng/mL 浓度范围内的 AFB₁ 呈良好的线性关系(图 5),检测下限为 0.01ng/mL。所得分析参数如表 1 所示。

[0034] 表 1 光密度法测定所得分析参数

[0035]

线性范围 (ng/mL)	浓度与吸光度值的 关系曲线	相关 系数	检测限 (ng/mL)
0.01 ~ 0.25	$y = -8.4678x + 2.2174$	0.9934	0.01

[0036] 所述银增强液的制备:0.85g 氢醌溶于 15mL 超纯水中;1.175g 柠檬酸三钠/1.275g 柠檬酸溶于 5mL 超纯水中;0.5g 硝酸银溶于 2mL 超纯水中,溶液均需新鲜配制,确保无晶体析出且无色,氢醌和柠檬酸混合液应在银增强前 30min 左右保持 37℃ 温育。

[0037] 2.3 银的化学溶解

[0038] 采用 1 : 3HNO₃(v/v) 来溶解纳米金表面沉积的银。以超纯水取代化学溶出的银离子溶液做空白对照,结果用溶银测出的化学发光值与空白对照化学发光值差值即相对化学发光值表示。从图 6 可以看出,银在 1 : 3HNO₃(v/v) 中易于溶解,10min 即可溶解完全,为保证其完全溶解,本实验中溶解时间都采用 15 分钟。

[0039] 2.4 化学发光检测条件

[0040] 溶出的银离子催化 MnSO₄-K₂S₂O₈-H₃PO₄ 体系生成 KMnO₄,进而氧化 luminol 化学发光,通过 Ag⁺ 浓度与化学发光信号之间良好的线性关系完成对目标物质的检测。

[0041] 本发明选定上述试剂浓度和用量为 K₂S₂O₈ 浓度为 0.02g/mL(200 μL), MnSO₄ 浓度 6×10⁻³mol/L(40 μL), 1 : 1(v/v)H₃PO₄(36 μL), 1 μmol/L luminol 溶液(200 μL)。

[0042] 2.5 化学发光检测方法

[0043] 用 1 : 3(V/V)HNO₃ 来溶解银增强后各酶标板孔内的银(100 μL/孔),溶解所得的银离子溶液中均加入 60 μL 5mol/L 的 NaOH 来调节其酸度。然后该溶液转移至含有 200 μL 2% (m/V)K₂S₂O₈, 40 μL 6×10⁻³mol/L MnSO₄ 和 36 μL 1 : 1(v/v)H₃PO₄ 的离心管中,混合均匀后马上放入 90℃ 水浴中加热 7 分钟。流水冷却中止该催化反应并用 5mol/L NaOH 调节溶液的 pH 值至 10。取该溶液 50 μL 转移至石英发光管中,然后注射入 200 μL luminol(1 μmol/L, pH 13.5) 同时在发光分析仪上记录发光信号。本发明中银离子的化学发光强度和金标抗原的浓度成正比(与样品中 AFB₁ 的含量成反比),可以得出化学发光信号和待测 AFB₁ 的关系。

[0044] 2.6 分析性能

[0045] 在选定的最佳条件下,考察了不同浓度 AFB₁ 的化学发光响应曲线。研究发现(如图 7 所示),相对化学发光强度与 AFB₁ 浓度在 0.002-0.300ng/ml 浓度范围内呈良好的线性关系,检出下限为 0.002ng/ml。分析参数如表 2 所示。7 次重复测量 0.01ng/ml AFB₁ 来评价该方法的精密度,相对标准偏差为 3.8%。可见所建立方法具有很高的灵敏度且精密度良好,是一种较为理想的 AFB₁ 超灵敏分析方法。

[0046] 表 2 化学发光法测定所得分析参数

[0047]

线性范围 (ng/mL)	浓度与化学发光强度 的关系曲线	相关系数	检测限 (ng/mL)
0.002 ~ 0.300	$y = -14190x + 7840.1$	0.9909	0.002

[0048] 本发明创新性的利用了金标银增强技术来检测黄曲霉毒素 AFB₁, 不仅发挥了纳米金标记的优势, 更利用了银增强技术将信号有效放大, 建立了比传统方法更灵敏高效的检测手段。有可能为其他真菌毒素或微生物的超灵敏分析开辟一条新的途径。

附图说明

[0049] 图 1 AFB₁ 化学发光免疫检测示意图

[0050] 图 2 纳米金的紫外 - 可见吸收图谱

[0051] 图 3 所制备纳米金的 TEM 形貌

[0052] 图 4 不同浓度 AFB₁ 的银增强时间与吸光度值的关系曲线

[0053] 图 5 AFB₁ 浓度与吸光度值之间的关系曲线

[0054] 图 6 银溶解时间的影响

[0055] 图 7 AFB₁ 浓度与相对化学发光强度的关系曲线

具体实施方式

[0056] 下面的实例将具体说明本发明的操作方法, 但不能作为对本发明的限定。

[0057] 实例 1 食用花生油中 AFB₁ 的检测

[0058] 1 材料

[0059] 1.1 仪器

[0060] 采用 Multiskan MK3 酶标仪 (美国 Thermo 公司) 测定银增强后吸光度; 采用 MPI-B 型多参数化学发光分析系统 (西安瑞迈分析仪器有限公司) 进行溶出化学发光测定; DF-101S 型集热式磁力加热搅拌器 (河南巩义市予华仪器厂) 用于金纳米粒子合成; TU-1900 紫外可见光分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司) 用于测定纳米吸收光谱; TecnaiG220 透射电镜 (TEM) (美国 FEI 公司) 用于合成的金纳米粒子的形貌表征。LH586-2 型恒温水槽 (上海精科实业有限公司) 用于反应温度控制。5804R 高速离心机 (上海泰亚赛福科技发展有限公司) 用于纳米粒子及生物功能化纳米粒子离心分离。96 微孔板为 BBI 公司 (加拿大) 产品。

[0061] 1.2 试剂和样品

[0062] AFB₁ 标准品、AFB₁ 人工抗原、AFB₁ 单克隆抗体均购自 Sigma 公司; 柠檬酸, 柠檬酸钠, 氢醌, 硝酸银 (AgNO₃), 浓硝酸, 磷酸, 硫酸锰, 过硫酸钾, 二水乙二胺四乙酸二钠等均购于中国医药上海化学试剂公司, 氯金酸 (HAuCl₄) 购于上海久岳化工有限责任公司, 鲁米诺购于 Merck 公司 (德国), 牛血清蛋白 (BSA) 购于北京鼎国生物工程有限公司, 超纯水购于无锡华润华晶微电子有限公司。试验所用试剂均为分析纯。

[0063] 加标回收样品制备:用小烧杯称取 4.0g 食用花生油样品 6 份,分别添加不同浓度的 AFB₁ 标准物质,用 20.0mL 石油醚将样品移于 125mL 分液漏斗中,用 20.0mL 甲醇-水(55+45)溶液分次洗烧杯,溶液一并移入分液漏斗中,振摇 2min。静置分层后,放出下层甲醇-水溶液于 75mL 蒸发皿中,再用 5.0mL 甲醇-水溶液重复振摇提取一次,提取液一并加入蒸发皿中,65℃水浴通风挥干。用 2.0mL 20%甲醇-磷酸缓冲液分三次(0.8、0.7、0.5mL)溶解并彻底冲洗蒸发皿中凝结物,移至小试管,加盖振荡后静置待测。

[0064] 实际油样品制备:不同品牌食用花生油样品 10 个(其中过期花生油样品 3 个),按照加标回收样品制备方法(省略“添加不同浓度的 AFB₁ 标准物质”步骤)执行。

[0065] 1.3 标准品储备液

[0066] 用 0.01mol/L PBS 将 AFB₁ 标准溶液稀释出系列浓度待用。

[0067] 2 方法

[0068] 2.1 金标人工抗原直接竞争免疫反应

[0069] 1) 截取 13 孔已包被好 AFB₁ 抗体的酶标板孔放置反应板框架上,设定 1 号孔为仪器调零孔,2~13 号孔为免疫反应测定孔。

[0070] 2) 每孔用 250 μL 洗涤液洗涤,放置 1min 后,甩掉洗涤液,在吸水板上拍干,重复洗板一次。

[0071] 3) 1 号孔加入 100 μL 金标 AFB₁ 人工抗原稀释液,2~13 号孔分别加入系列的 AFB₁ 标准溶液和金标 AFB₁ 抗原溶液各 50 μL。轻轻振摇,使各孔中的反应物混匀。

[0072] 4) 将反应板放入 37℃恒温培养箱中孵育 30min。

[0073] 5) 取出反应板,用力甩掉反应液,拍干。

[0074] 6) 每孔加入 250 μL 洗涤液,放置 2min,甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干,重复洗涤 4 次。

[0075] 2.2 取银增强液迅速混匀立即加入各酶标板孔内,每孔 100 μL,置于温箱里反应,反应 120s 后,置入超纯水中,终止反应。

[0076] 2.3 光密度检测

[0077] 将银增强后的微孔板放入酶标仪中,在 630nm 处检测其吸光度值。

[0078] 2.4 银的化学溶出

[0079] 采用 1 : 3HNO₃(v/v) 来溶解银增强后各酶标板孔内的银(100 μL/孔),溶解时间为 13 分钟。

[0080] 2.5 化学发光检测

[0081] 溶解所得的银离子溶液中均加入 60 μL 5mol/L 的 NaOH 来调节其酸度。然后该溶液转移至含有 200 μL 2% (m/V)K₂S₂O₈, 40 μL 6×10⁻³mol/L MnSO₄ 和 36 μL 1 : 1(v/v) H₃PO₄ 的离心管中,混合均匀后马上放入 90℃水浴中加热 7 分钟。流水冷却中止该催化反应并用 5mol/L NaOH 调节溶液的 pH 值至 10。取该溶液 50 μL 转移至石英发光管中,然后射入 200 μL luminol(1 μmol/L, pH 13.5) 同时在发光分析仪上记录发光信号。

[0082] 3 结果分析

[0083] 表 3、4 分别为采用所建立纳米金标记-银增强-光密度检测法、纳米金标记-银增强-溶出化学发光法测定食用花生油中 AFB₁ 加标回收实验结果和 10 个不同来源食用花生油中 AFB₁ 含量的测定结果。

[0084] 实例 1 说明本发明具有灵敏度高、准确度高的特点,可实际应用于食品中 AFB₁ 的检测。

[0085] 表 3 食用花生油中 AFB₁ 加标回收实验结果

[0086]

添加浓度 (ng/mL)	测得浓度 (ng/mL) ^a		回收率 (%)	
添加浓度 (ng/mL)	测得浓度 (ng/mL) ^a		回收率 (%)	
	光密度检测	溶出化学 发光检测	光密度检测	溶出化学发光检测
0.05	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	80.00	80.00
0.10	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	90.00	90.00
0.40	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.03	95.00	97.50
0.70	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.06	95.71	94.28
1.00	0.96 ± 0.04	0.95 ± 0.02	96.00	95.00
1.50	1.42 ± 0.11	1.45 ± 0.10	94.67	96.67

[0087] ^a 适当稀释后测得值 ;Mean ± S. D. n = 3

[0088] 表 4 本发明所述两种方法检测实际花生油样品结果

[0089]

样品号	测得含量 (ng/mL) ^a	
	光密度检测	溶出化学发光检测
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
6	-	-
7	-	-
8 (过期)	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.04
9 (过期)	1.20 ± 0.08	1.23 ± 0.10
10 (过期)	1.66 ± 0.14	1.63 ± 0.11

[0090] a 适当稀释后测得值 ;Mean \pm S. D. n = 3

[0091] 实例 2 化学发光法与酶联免疫法 (ELISA) 在 AFB₁ 检测中的结果相关性

[0092] 1 参照实例 1 中的化学发光法检测食用花生油中添加的不同浓度标准 AFB₁, 同时进行 ELISA 法测定, 二者结果进行相关性分析。

[0093] 用于对照实验的 AFB₁ 酶联免疫定量试剂盒购于无锡市微生物研究所有限责任公司, 试剂盒由包被抗体反应板 (48 孔); A 试剂: 样品稀释液 (1 瓶); B 试剂: AFB₁ 标准溶液 [1 套 (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2ng/mL)]; C 试剂: 酶标抗原 (2/1/1 瓶); D 试剂: 酶标抗原稀释液 (1 瓶); E 试剂: 浓缩洗涤液 (1 瓶); F 试剂: 显色底物液 a (1 瓶); G 试剂: 显色底物液 b (1 瓶); H 试剂: 终止液 (1 瓶); 反应板框架 (1 块) 组成。ELISA 试剂盒操作步骤如下:

[0094] 1) 截取 13 孔已包被好 AFB₁ 抗体的酶标板孔放置反应板框架上, 设定 1 号孔为仪器调零孔, 2-13 号孔为免疫反应测定孔。

[0095] 2) 每孔用 250 μ L 洗涤液洗涤, 放置 1min 后, 甩掉洗涤液, 在吸水板上拍干, 重复洗板一次。

[0096] 3) 1 号孔加入 50 μ L A 试剂和 50 μ L D 试剂, 2-13 号孔分别加入系列的 B 试剂和 50 μ L D 试剂。轻轻振摇, 使各孔中的反应物混匀。

[0097] 4) 将反应板放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 30min。

[0098] 5) 取出反应板, 用力甩掉反应液, 拍干。

[0099] 6) 每孔加入 250 μ L 洗涤液, 放置 2min, 甩掉洗涤液, 在吸水纸上拍干, 重复洗涤 4 次。

[0100] 7) 每孔加 50 μ L F 试剂和 50 μ L G 试剂, 37 $^{\circ}$ C 培养 30min 后, 加 100 μ L G 试剂终止反应。

[0101] 8) 于酶标仪上测定 630nm 处吸光度值, 代入根据制作的标准曲线方程计算样品中 AFB₁ 浓度。

[0102] 2 结果分析

[0103] 为了评价本发明所建立方法的可靠性, 我们将 AFB₁ 实际样品用本发明建立的化学发光法与酶联免疫法同时测定, 并绘制 AFB₁ 的标准曲线。根据 AFB₁ 标准曲线, 得出样品中 AFB₁ 的浓度, 与用酶联免疫法得出的结果进行比较, 其结果如表 5 所示, 二者的检测结果具有良好的相关性 ($p < 0.001$), 表明本发明建立的方法可靠, 可用于实际样品的测定。

[0104] 表 5 本发明化学发光法与 ELISA 法测得结果

[0105]

添加 AFB ₁ 浓度 (ng/mL)	化学发光法检测到浓度 (ng/mL)	ELISA 法检测到浓度 (ng/mL)
0.1	0.091	0.099
0.15	0.148	0.151
0.2	0.205	0.190
0.25	0.256	0.251

添加 AFB ₁ 浓度 (ng/mL)	化学发光法检测到浓度 (ng/mL)	ELISA 法检测到浓度 (ng/mL)
0.30	0.295	0.309
0.35	0.348	0.347

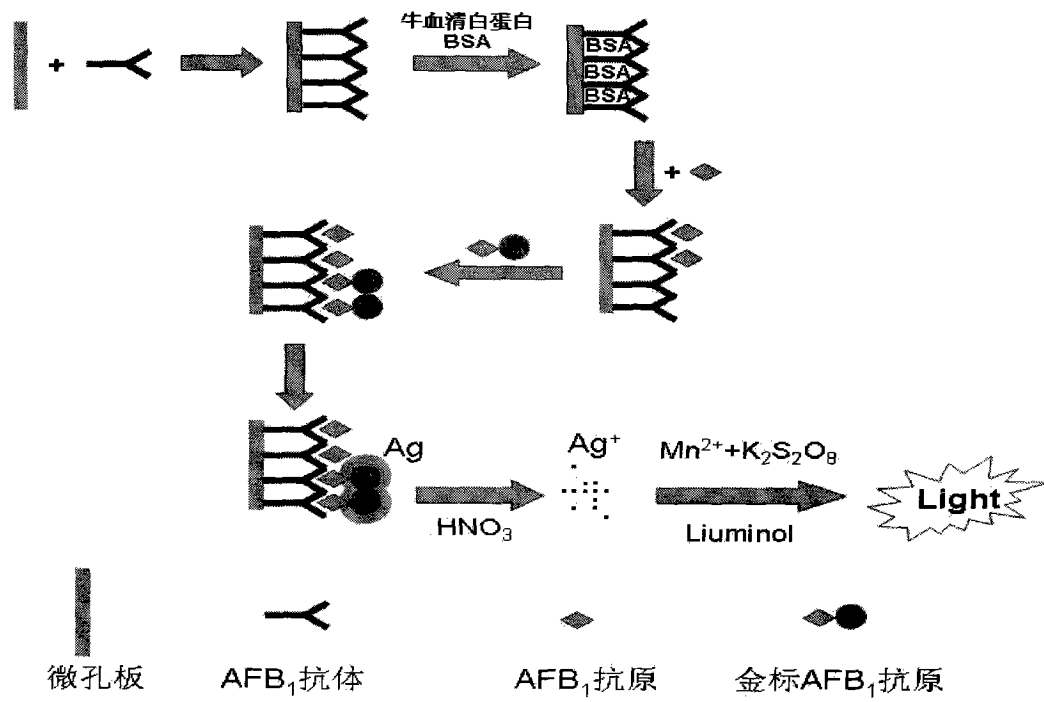


图 1

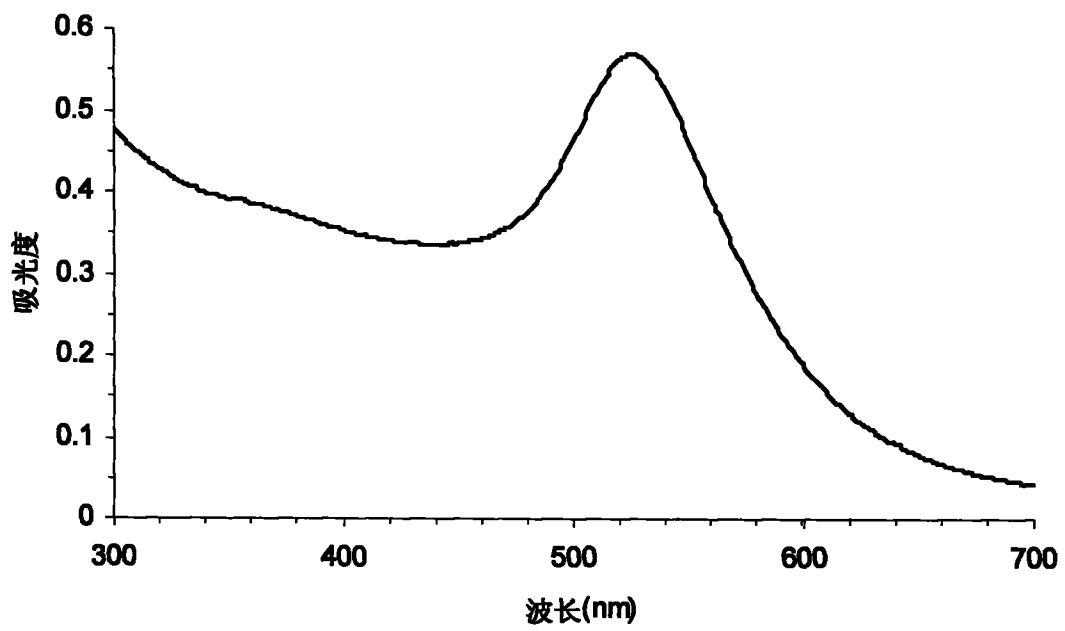


图 2

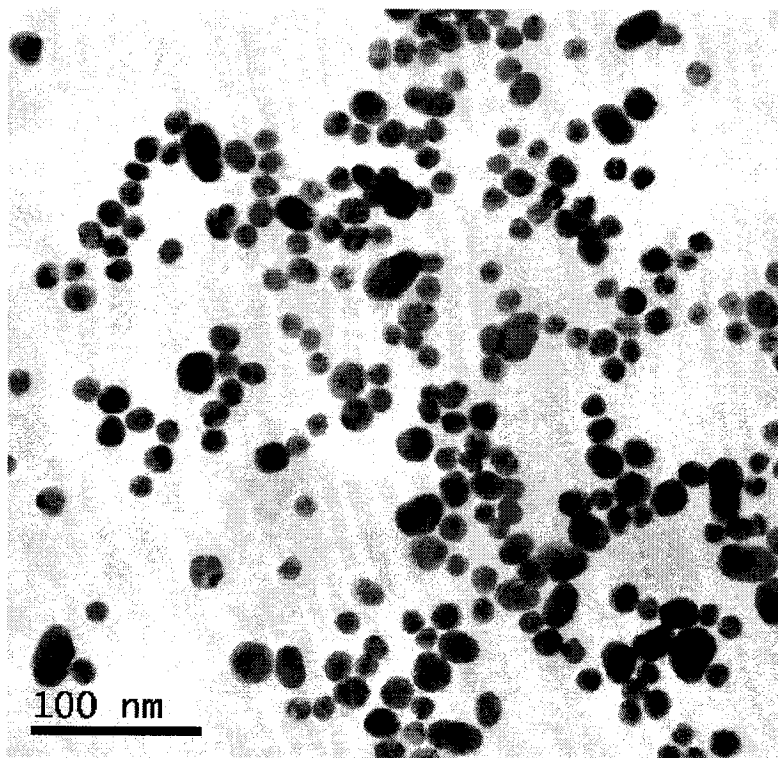


图 3

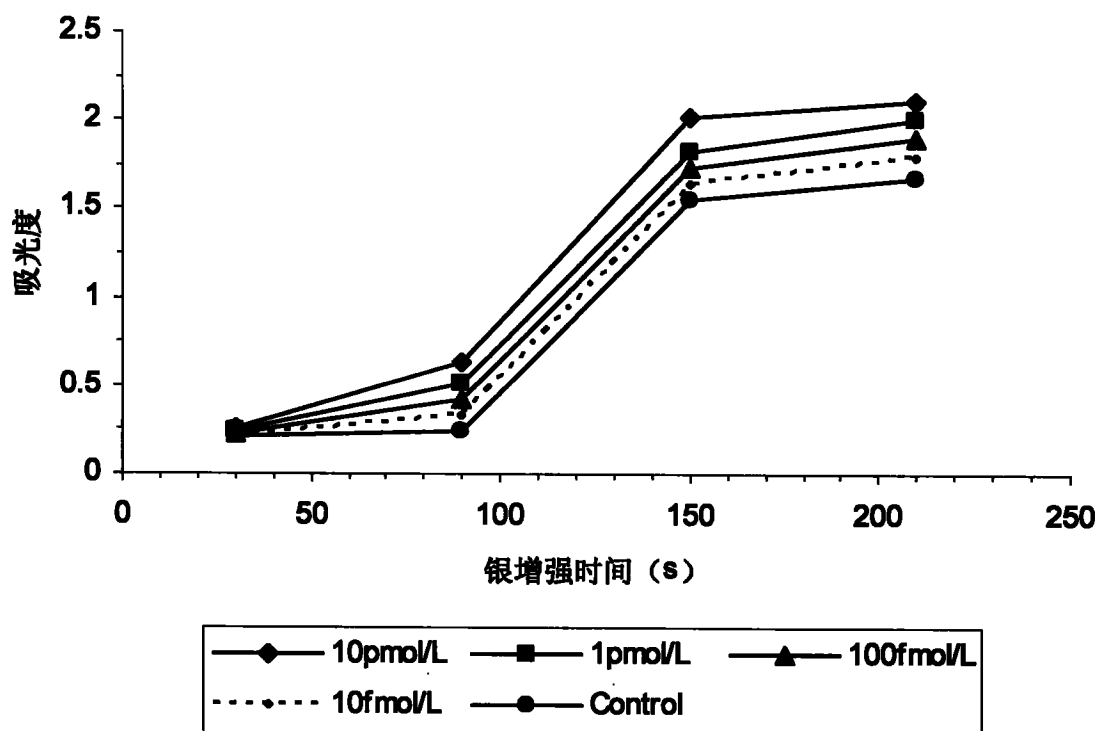


图 4

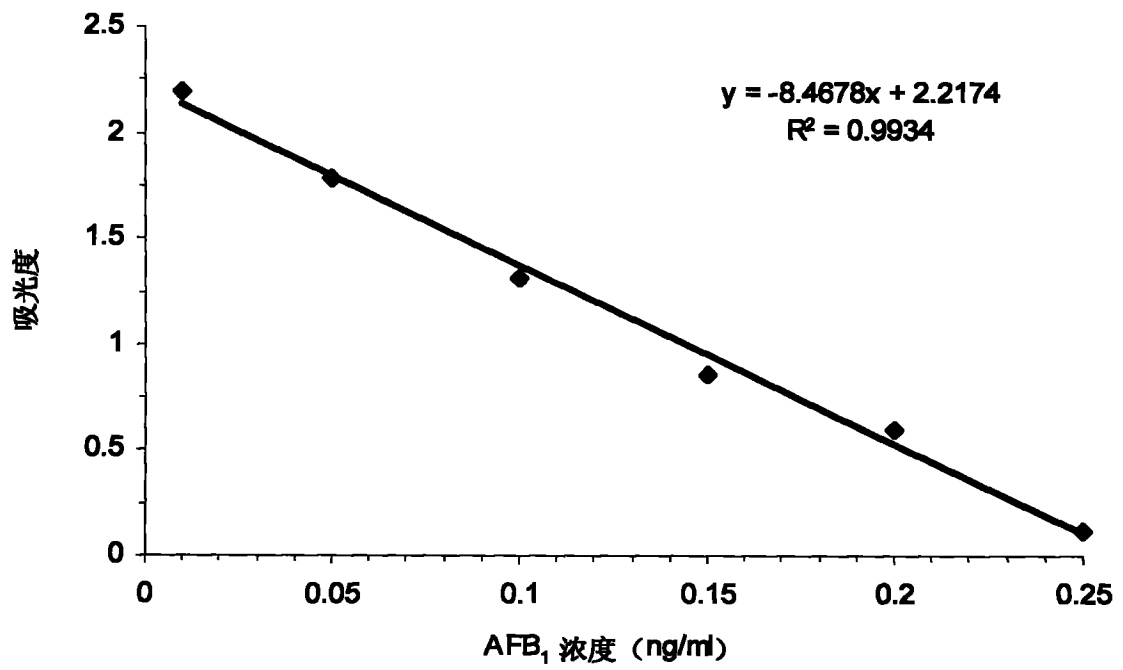


图 5

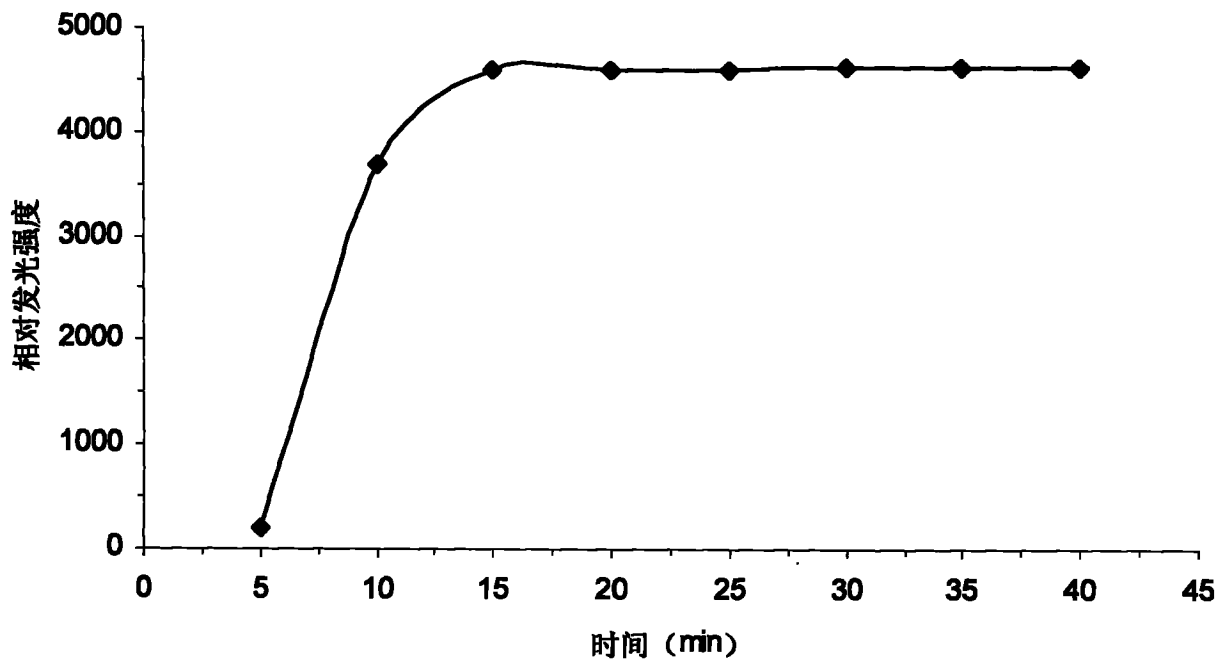


图 6

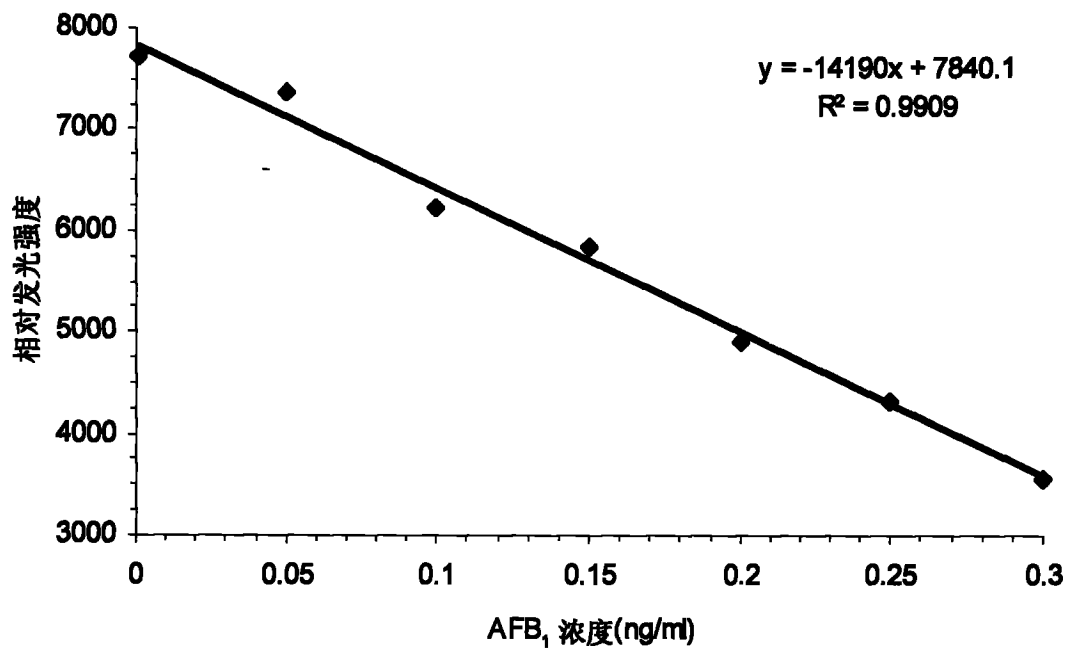


图 7

专利名称(译)	一种纳米金标记-黄曲霉毒素B1新型检测方法		
公开(公告)号	CN101750484A	公开(公告)日	2010-06-23
申请号	CN200910035334.1	申请日	2009-09-25
[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	王周平 李井泉 段诺 吴世嘉		
发明人	王周平 李井泉 段诺 吴世嘉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/31 G01N21/76 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及利用纳米金标记黄曲霉毒素B1(AFB1)，结合纳米金银增强、吸光度检测/溶出化学发光检测技术，建立了两种AFB1新型超灵敏检测体系。第一种方法用AFB1抗体与金标抗原、待测抗原进行竞争免疫反应，然后加入银增强溶液，以金为核沉积生长银，通过检测吸光度来确定待测物中AFB1的含量，该方法的检出限可达到0.01ng/mL。第二种方法在前一种方法的基础上，将银化学溶出，通过化学发光法检测沉积的银的量来确定待测物中AFB1的含量，该方法的检出限可达到0.002ng/mL。本发明建立的AFB1检测技术准确、灵敏、快速，对于食品安全具有重要意义。

添加浓度 (ng/mL)	测得浓度 (ng/mL) ^a		回收率 (%)	
添加浓度 (ng/mL)	测得浓度 (ng/mL) ^a		回收率 (%)	
	光密度检测	溶出化学 发光检测	光密度检测	溶出化学发光检测
0.05	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	80.00	80.00
0.10	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	90.00	90.00
0.40	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.03	95.00	97.50
0.70	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.06	95.71	94.28
1.00	0.96 ± 0.04	0.95 ± 0.02	96.00	95.00
1.50	1.42 ± 0.11	1.45 ± 0.10	94.67	96.67