



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108828205 A

(43)申请公布日 2018.11.16

(21)申请号 201810310843.X

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2018.04.09

(71)申请人 国家食品安全风险评估中心

地址 100022 北京市朝阳区广渠路37号院2
号楼

申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

(72)发明人 骆鹏杰 陈霞 周爽 赵云峰

李敬光 张霁月

(74)专利代理机构 北京华进京联知识产权代理

有限公司 11606

代理人 王赛

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

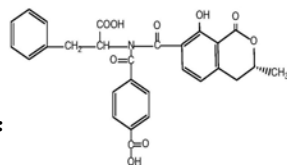
权利要求书1页 说明书9页

(54)发明名称

赭曲霉毒素A半抗原、人工抗原及其制备方法、试剂盒及赭曲霉毒素A的检测方法

(57)摘要

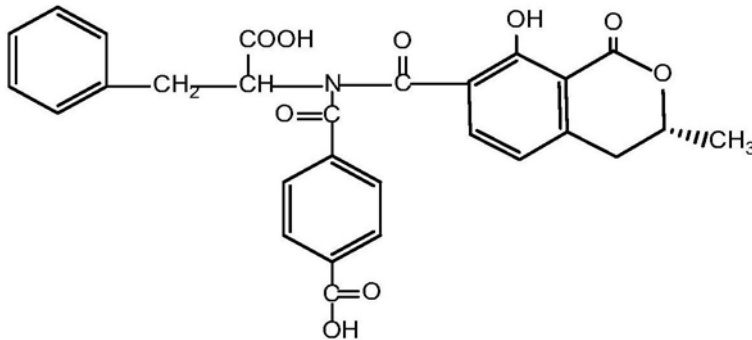
本发明提供一种赭曲霉毒素A半抗原、人工抗原及其制备方法、试剂盒及赭曲霉毒素A的检测方法,所述赭曲霉毒素A半抗原的化学结构式



(I)如下:

式(I)。

1. 一种赭曲霉毒素A半抗原,其特征在于,所述赭曲霉毒素A半抗原的化学结构式(I)如下:



式 (I)。

2. 一种根据权利要求1所述的赭曲霉毒素A半抗原的制备方法,包括将所述赭曲霉毒素A和对甲酸苯甲酰氯溶解在有机溶剂中反应。

3. 根据权利要求2所述的赭曲霉毒素A半抗原的制备方法,其特征在于,所述赭曲霉毒素A的量为20~40mg,所述对甲酸苯甲酰氯的量为10~20mL。

4. 一种赭曲霉毒素A人工抗原,其特征在于,为根据权利要求1所述的赭曲霉毒素A半抗原与第一载体蛋白的偶联物。

5. 一种赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒,其特征在于,包括以权利要求2所述的赭曲霉毒素A人工抗原为免疫原得到的抗体。

6. 根据权利要求5所述的赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒,其特征在于,还包括底物显色液,所述底物显色液包括对硝基酚磷酸盐显色液。

7. 根据权利要求5所述的赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒,其特征在于,还包括包被有包被原的酶标板。

8. 根据权利要求5所述的赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述包被原包括氯甲酸异丁酯和所述赭曲霉毒素A反应得到的化合物与第二载体蛋白的偶联物。

9. 根据权利要求8所述的赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白独立的为BSA、OVA或牛甲状腺球蛋白。

10. 一种赭曲霉毒素A的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将待测样品进行前处理;

S2、使用权利要求5至9中任意一项所述的赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒对经过所述前处理的所述待测样本进行酶联免疫法检测;以及

S3、分析检测结果。

赭曲霉毒素A半抗原、人工抗原及其制备方法、试剂盒及赭曲霉毒素A的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,特别是涉及赭曲霉毒素A半抗原、人工抗原及其制备方法、试剂盒及赭曲霉毒素A的检测方法。

背景技术

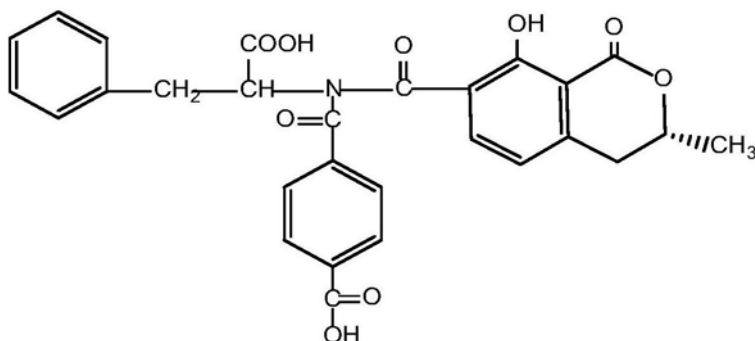
[0002] 赭曲霉毒素A(Ochratoxin A, OTA)由曲霉和青霉两类霉菌产生,常污染食品和饲料。赭曲霉毒素A能引起动物急性和慢性中毒,是强致癌物质,可对肾脏造成不可逆的致死毒害,引起肾脏萎缩,还可使胎儿畸形、流产甚至死亡,严重影响动物的机能和生长状况,其对人类的潜在危害备受关注。为此,国际癌症研究机构将其定位为IIB类致癌物,加强对赭曲霉毒素A检测是防止被赭曲霉毒素A污染的食物和饲料直接或间接进入人类食物链的重要方法。1996年, Zimmerli首次检测到赭曲霉毒素A在葡萄酒和葡萄汁中,随后大量的研究证明了葡萄酒中赭曲霉毒素A的存在,其已经成为人类摄取赭曲霉毒素A的第二大来源。

[0003] 目前,检测葡萄酒中赭曲霉毒素A的主要方法有薄层色谱法、高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FD),以及高效液相色谱-质谱检测法(HPL-CMS)。薄层色谱检测限太低,高效液相色谱-质谱检测法(HPL-CMS)设备较为昂贵,不是所有的检测机构均拥有。因此建立一种快速、准确、方便、实用的检测方法,有利于监控葡萄酒生产过程中赭曲霉毒素A的含量,从而才能保障我国葡萄酒的食品安全与葡萄酒产业的健康发展。

发明内容

[0004] 基于此,有必要针对赭曲霉毒素A,提供一种赭曲霉毒素A半抗原、人工抗原及其制备方法、试剂盒及赭曲霉毒素A的检测方法。

[0005] 一种赭曲霉毒素A半抗原,所述赭曲霉毒素A半抗原的化学结构式(I)如下:



[0006]

[0007] 一种所述的赭曲霉毒素A半抗原的制备方法,包括将所述赭曲霉毒素A和对甲酸苯甲酰氯溶解在有机溶剂中反应。

[0008] 在其中一个实施例中,所述赭曲霉毒素A的量为20~40mg,所述对甲酸苯甲酰氯的量为10~20mL。

[0009] 一种赭曲霉毒素A人工抗原为所述的赭曲霉毒素A半抗原与第一载体蛋白的偶联物。

[0010] 一种赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒,包括所述的赭曲霉毒素A人工抗原为免疫原得到的抗体。

[0011] 在其中一个实施例中,还包括底物显色液,所述底物显色液包括对硝基酚磷酸盐显色液。

[0012] 在其中一个实施例中,还包括包被有包被原的酶标板。

[0013] 在其中一个实施例中,所述包被原包括氯甲酸异丁酯和所述赭曲霉毒素A反应得到的化合物与第二载体蛋白的偶联物。

[0014] 在其中一个实施例中,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白独立的为 BSA、OVA 或牛甲状腺球蛋白。

[0015] 一种赭曲霉毒素A的检测方法,包括以下步骤:

[0016] S1、将待测样品进行前处理;

[0017] S2、使用所述的赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒对经过所述前处理的所述待测样本进行酶联免疫法检测;以及

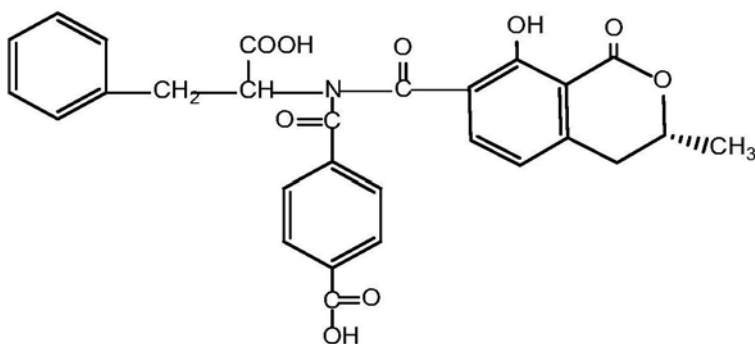
[0018] S3、分析检测结果。

[0019] 上述本发明提供的赭曲霉毒素A半抗原,可以通过将所述赭曲霉毒素A和对甲酸苯甲酰氯溶解在有机溶剂中得到。将得到的化合物与载体蛋白连接得到赭曲霉毒素A人工抗原,这种抗原最大程度的保留了赭曲霉毒素A全部官能团结构的特征。所述赭曲霉毒素A人工抗原能够发挥最佳的构效关系优势,从而得到特异性很强的抗体。

具体实施方式

[0020] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下通过实施例,对本发明的赭曲霉毒素A半抗原及抗原以及赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒及其检测方法进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0021] 本发明实施例提供一种赭曲霉毒素A半抗原,所述赭曲霉毒素A半抗原的化学结构式(I)如下:



[0022]

[0023] 式(I)。

[0024] 本发明实施例还提供一种赭曲霉毒素A半抗原的制备方法,包括将所述赭曲霉毒素A和对甲酸苯甲酰氯溶解在有机溶剂中反应。

[0025] 本发明实施例所述的赭曲霉毒素A半抗原为所述赭曲霉毒素A和所述对甲酸苯甲酰氯溶解在有机溶剂,例如二甲基甲酰胺(DMF)中反应得到。优选的,在反应中添加三乙胺作为催化剂,加速反应进度。所述赭曲霉毒素A是小分子物质,其分子量是403.82,属于典型的半抗原。小分子物质在免疫反应中,只具有反应原性而不具有免疫原性,需要与大分子

载体蛋白偶联才具有免疫原性,才能刺激机体发生免疫应答,从而产生抗体。因此,增加所述赭曲霉毒素A分子结构与大分子载体蛋白偶联的能力,且不影响其本身的抗原决定簇的结构尤为关键。发明人通过大量实验发现,所述对甲酸苯甲酰氯在起到交联剂作用的同时,可防止大分子载体蛋白对半抗原的屏蔽效应,即防止半抗原与载体结合时,抗原决定簇被包埋在卷曲凹陷的大分子结构中,抗原决定簇的完全外露使得所产生的对应抗体的专一性相应增加,进而交叉反应减少。半抗原或其衍生物结构中末端的活性基团如 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 为间隔臂,与载体蛋白偶联合成完全抗原。因此,所述对甲酸苯甲酰氯为所述赭曲霉毒素A分子引入羧基官能团的同时,对所述赭曲霉毒素A分子抗原决定簇的结构没有影响。

[0026] 优选的,取20~40mg的所述赭曲霉毒素A和10~20mL所述对甲酸苯甲酰氯,溶解在所述二甲基甲酰胺(DMF)中。进一步优选的,取30mg的所述赭曲霉毒素A和15mL所述对甲酸苯甲酰氯溶解在所述二甲基甲酰胺(DMF)中反应,同时添加三乙醇胺作为催化剂,得到所述赭曲霉毒素A半抗原。

[0027] 本发明实施例还提供一种赭曲霉毒素A人工抗原,为所述的赭曲霉毒素A半抗原与第一载体蛋白的偶联物。

[0028] 优选的,本发明实施例所述的赭曲霉毒素A人工抗原的制备方法包括:

[0029] 采用活化酯法预处理所述赭曲霉毒素A半抗原;以及

[0030] 将预处理后的所述赭曲霉毒素A半抗原与第一载体蛋白偶联。

[0031] 采用活化酯法预处理所述赭曲霉毒素A半抗原即对所述赭曲霉毒素A半抗原的羧基进行酯化,进一步优选的,所述赭曲霉毒素A半抗原与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和N,N-二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于二甲基甲酰胺(DMF)中反应,更进一步优选的,取20~40mg所述赭曲霉毒素A半抗原与10~20ml N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和N,N-二环己基碳化二亚胺(DCC)反应。上述反应过程在室温避光并持续搅拌10~12h条件下进行。优选的,上述反应过程在室温黑暗环境下持续搅拌11h,黑暗环境下,反应更加完全。酯化后的反应液加入到含有第一载体蛋白的溶液中,所述第一载体蛋白中的氨基与被酯化后的所述赭曲霉毒素A半抗原通过化学键偶联形成偶联物,即得到赭曲霉毒素A人工抗原。

[0032] 所述第一载体蛋白,可以是天然蛋白质、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、兔血清白蛋白(RSA)、卵清白蛋白(OVA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、谷胱甘肽S转移酶(GST)、纯化的重组蛋白、人工合成多肽、人血清白蛋白(HSA)、卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(Knoweyhole Limpet Hemocyanin, KLH)、多价抗原肽(MAP,主要指多聚Lys)中的一种,也可以是人工蛋白、酶、多肽或聚合物。优选的为牛甲状腺球蛋白。

[0033] 本发明实施例还提供一种赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒,包括以所述赭曲霉毒素A人工抗原为免疫原得到的抗体。

[0034] 所述抗体优选以一抗工作液的形式提供。具体的,所述一抗工作液的制备方法包括:以所述赭曲霉毒素A人工抗原为免疫原免疫非哺乳动物得到抗血清,从所述抗血清中纯化得到所述赭曲霉毒素A多克隆抗体,将所述赭曲霉毒素A多克隆抗体按照一定比例稀释形成稀释液,即得到所述一抗工作液。所述非哺乳动物可以为兔、羊、鼠、豚鼠或马等。

[0035] 优选的,所述赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒还包括酶标二抗工作液,优选的,所述酶标二抗工作液为碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗工作液。

[0036] 所述赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒还包括包被有包被原的酶标板,所述包被原包

括氯甲酸异丁酯和所述赭曲霉毒素A反应得到的化合物与第二载体蛋白的偶联物。所述包被原的制备方法与所述赭曲霉毒素人工抗原的制备方法不同,有助于提高所述赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒反应的特异性。所述第二载体蛋白,可以是天然蛋白质、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、卵清白蛋白(OVA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、谷胱甘肽S转移酶(GST)、纯化的重组蛋白、人工合成多肽、兔血清白蛋白(RSA)、人血清白蛋白(HSA)、卵清蛋白(OVA)、多价抗原肽(MAP,主要指多聚Lys)中的一种,也可以是人工蛋白、酶、多肽或聚合物。优选的为钥孔血蓝蛋白(Knoweyhole Limpet Hemocyanin, KLH)。所述第二载体蛋白区别于所述第一载体蛋白的种类,所述第一载体蛋白与所述第二载体蛋白的种类不同,有助于进一步提高所述赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒反应的特异性。

[0037] 优选的,所述赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒还包括底物显色液,优选的,所述底物显色液包括对硝基酚磷酸盐显色液。所述硝基酚磷酸盐显色液在碱性磷酸酶的作用下,释放出的对硝基苯酚(4-NPP)在碱性溶液中分子重排,可形成黄色的水溶性醌类产物(最大光吸收值405-415nm)。

[0038] 优选的,所述赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒还包括20×浓缩洗涤液和赭曲霉毒素A标准品液,更优选的,标准品的浓度分别为0μg/kg、0.05μg/kg、

[0039] 0.15μg/kg、0.45μg/kg、1.35μg/kg、4.05μg/kg。

[0040] 本发明实施例还提供一种赭曲霉毒素A的检测方法,包括以下步骤:

[0041] S1、将待测样品进行前处理;

[0042] S2、使用所述的赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒对经过所述前处理的所述待测样本进行酶联免疫法检测;以及

[0043] S3、分析检测结果。

[0044] 所述步骤S1将待测样品进行前处理,优选的,所述待测样品为玉米、小麦、面粉、饲料、玉米副产物、葡萄酒或烘焙咖啡豆。

[0045] 优选的,所述将待测样品进行前处理,是对所述待测样品中的所述赭曲霉毒素A进行有机溶剂提取,再将其稀释到适合检测的浓度作为待测样品备用。

[0046] 在一个具体实施例中,所述葡萄酒的样品前处理方法为:向葡萄酒中加入甲醇混匀,用聚乙二醇对混合液进行稀释,稀释混匀后备用。进一步优选的,向1mL葡萄酒中加入3mL 60%的甲醇水溶液混匀。取100μL混合液,向其内加入400μL的含有1%聚乙二醇8000的稀释液,混匀后点板分析。

[0047] 在一个具体的实施例中,所述步骤S2用所述赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒进行检测,是向包被了包被原的酶标板中加入标准品溶液或待测样本溶液(50μL/孔),再加入所述一抗工作液(50μL/孔)和所述酶标二抗工作液(50μL/孔),室温反应20min后,弃上清,对酶标板洗涤四次。每次洗涤过程如下,每孔中加入250μL洗涤液,30s后弃上清,将20×浓缩洗涤液用水稀释至20倍体积,即为洗涤液,用吸水纸拍干,每孔加入100μL底物显色液,用酶标仪检测。设置五个复孔,每个浓度的标准品溶液发光强度的平均值(B)除以0溶液的发光强度的平均值(B₀),再乘以100%即结合率。计算公式:结合率(%) =

[0048] $B/B_0 \times 100\%$ 。

[0049] 所述步骤S3分析检测结果,以标准品溶液中的赭曲霉毒素的浓度(ng/mL)为X轴, B/B₀为Y轴,绘制标准曲线图。根据标准曲线的回归方程可以求出待测样本溶液中赭曲霉毒

素A的浓度。本发明中检测结果的分析可以利用专业软件,可以实现大量样本的快速分析,整个检测过程只需30min就可以完成。结合率 (B/B₀) 为50%时对应的标准品溶液中的赭曲霉毒素A的浓度即为IC₅₀值。

[0050] 所述赭曲霉毒素A试剂盒的检测原理:当在酶标板上预包被包被原后,加入待测样本溶液,随后加入所述一抗工作液和所述酶标二抗工作液,待测样本溶液中残留的所述赭曲霉毒素A与所述酶标板上包被的包被原竞争一抗,与一抗结合的包被原所形成的抗原-抗体结合物进一步的与所述酶标二抗工作液进一步结合反应后,加入底物显色液后,所述酶标二抗上的碱性磷酸酶与底物显色液发生化学反应发出黄色光,其发光强度与待测样本溶液中的所述赭曲霉毒素A含量成负相关,再与标准曲线比较即可得出待测样本溶液中所述赭曲霉毒素A的含量。

[0051] 实施例1

[0052] 赭曲霉毒素A半抗原的制备

[0053] 称取30mg的赭曲霉毒素A和15ml对甲酸苯甲酰氯溶解在3ml二甲基甲酰胺 (DMF) 中,0℃环境下加入三乙醇胺,反应1h后,用碳酸氢钠溶液发生淬灭反应后对其进行萃取处理,干燥浓缩得到赭曲霉毒素A半抗原。

[0054] 实施例2

[0055] 赭曲霉毒素A人工抗原的制备

[0056] 称取100μL的上述赭曲霉毒素A半抗原与10mgNHS和20mgDCC溶于 500μL的二甲基甲酰胺 (DMF) 中,室温避光搅拌12h;在约1h内将上述反应液逐滴加至含100mg牛甲状腺球蛋白的加入到10%N,N-二甲基甲酰胺溶液中,同时搅拌。1h后转至4℃环境的0.01M PBS中磁力搅拌透析2d,期间每6h换一次透析液。紫外扫描透析液无小分子吸收峰时,可以将其离心取上清液即为所述赭曲霉毒素A人工免疫原,将其产物分装于离心管中,-20℃保存。

[0057] 实施例3

[0058] 多克隆抗体的制备

[0059] 将制备的所述赭曲霉毒素A半抗原与载体蛋白的偶联物,用pH7.4、0.01M的 PBS缓冲液稀释,得到免疫原稀释液。

[0060] 对实验用Ba1b/c小白鼠作为免疫动物,免疫过程如下(免疫剂量为蛋白量):

[0061] 对实验用Ba1b/c小白鼠进行首次免疫:将免疫原稀释液与等体积的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,通过颈背部皮下多点注射,免疫剂量为1mg/kg · b.w.。对实验用Ba1b/c小白鼠进行首次免疫后,每隔2周进行一次加强免疫,将免疫原稀释液与弗氏不完全佐剂按照1:1的比例混合乳化,颈背部皮下多点注射,单次免疫剂量为1mg/kg · b.w.。

[0062] 对实验用Ba1b/c小白鼠进行末次免疫:再首次免疫10周后进行末次免疫,直接通过颈背部皮下多点注射免疫原稀释液,免疫剂量为1mg/kg · b.w.。

[0063] 末次免疫1周后,将血清效价为 3.0×10^4 以上的实验Ba1b/c小鼠处死,分离血清,用饱和硫酸铵法纯化,即为免疫原对应的多克隆抗体(简称多克隆抗体B),制备好后可分装冻存。

[0064] 实施例4

[0065] 包被抗原酶标板的制备

[0066] 取20mg赭曲霉毒素A,溶于1mL无水DMF中,冷却到10℃。加入15mL 氯甲酸异丁酯,0

℃环境下搅拌反应30min,得到溶液为半抗原反应液。将反应液加入含有载体蛋白的PBS中,连续搅拌得到包被有赭曲霉毒素A的偶联抗原。取500μL上述溶液加入到含有20mg的牛甲状腺球蛋白的PBS(pH7.2,0.01M)中,4℃环境中连续磁力搅拌12h。

[0067] 将上述制备的包被原溶液用包被缓冲液稀释得到包被原稀释液。所述包被缓冲液即pH9.5、0.02M的碳酸盐溶液。将包被原稀释液加入酶标板,37℃孵育,优选的,每孔加入100μL,孵育16h。倾去孔内的液体,洗涤,拍干。每孔加入200μL 封闭液,所述封闭液为牛血清白蛋白和1000mLpH7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液的混合液。37℃温育2h,倾去孔内的液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0068] 实施例5

[0069] 所述酶标二抗工作液的制备

[0070] 将10mg的碱性磷酸酶溶解在2mL的pH为5.0的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,向该溶液中加入1.0%的戊二醛水溶液0.1mL。按照碱性磷酸酶(ALP)酶:抗体的质量比为1:2的比例加入二抗羊抗鼠抗体,室温搅拌反应4h。按照NaBH₄与碱性磷酸酶(ALP)质量比为1:10的比例加入NaBH₄,在室温环境下搅拌反应4h,得到碱性磷酸酶(ALP)标记的二抗溶液,用0.9%的生理盐水溶液透析纯化后4℃保存。

[0071] 实施例6

[0072] 标准品溶液的制备

[0073] 将赭曲霉毒素A溶于pH7.4、0.05M的磷酸盐缓冲液中,分别得到浓度为0.02ng/mL、0.06ng/mL、0.18ng/mL、0.54ng/mL和1.62ng/mL的标准品溶液。将pH7.4、0.05M的磷酸盐缓冲液作为标准品溶液的阴性对照溶液,称为0溶液。

[0074] 实施例7

[0075] 葡萄酒样品处理

[0076] 取葡萄酒1mL加入60%的甲醇水溶液3mL,充分混匀后得到混合液。取混合液100μL加入400μL的含有1%的聚乙二醇8000的样品稀释液,混匀后点板分析。稀释倍数为20倍。

[0077] 实施例8

[0078] 玉米样品的处理(小麦、面粉与玉米的处理相同)

[0079] 将玉米粉碎后称取4.0g有代表性的样本置入50mL离心管中,加入60%的甲醇水溶液10mL与其混合。将离心管放置在振荡器上剧烈振荡10min,其转速为150r/min(采用手摇或者涡旋均需5min以上),转速在4000r/min以上离心5min即可。震荡后静置3min,再用定量滤纸过滤。取滤液100μL加入900μL去离子水,振荡5s或手摇混匀,取50μL样本稀释液分装备用。

[0080] 实施例9

[0081] 试剂盒的具体使用方法

[0082] S101、将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25℃)平衡30min以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0083] S102、取出需要数量的酶标板,将不用的酶标板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于2~8℃。切勿冷冻。

[0084] S103、洗涤液在使用前也需回温。

[0085] S104、编号:将样本和标准品对应微孔按序编号,每个样本和标准品做2孔平行,并

记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0086] S105、加标准品/样本稀释液：加标准品/样本稀释液50 μ L到对应的微孔中，然后加入所述一抗工作液和所述酶标二抗工作液各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15min。

[0087] S106、洗板：小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液250 μ L/孔，充分洗涤4~5次，每次间隔10s，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）。

[0088] S107、显色：加入底物液显色液50 μ L/孔轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置室温避光环境反应15min。

[0089] S108、测定：设定酶标仪于450nm处（建议用双波长450/630nm检测，请在5min内读完数据），测定每孔OD值。

[0090] S109、定量分析

[0091] 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%。

[0092] 标准曲线的绘制与计算

[0093] 以标准品百分吸光率为纵坐标，以赭曲霉毒素标准品浓度（ μ g/kg）的对数为横坐标，绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中赭曲霉毒素A实际量。

[0094] 实施例10

[0095] 试剂盒灵敏度包括方法灵敏度及方法的检测限。取空白样本20批次检测，按公式计算方法对样本的最低检测限值。公式中SD为标准偏差、MN为平均 $L_{OD}=MN+3SD$ 配置不同浓度的标准品，去 $R^2>0.99$ 曲线段安排合理的浓度作标准曲线。确定绘制标准曲线，确定该试剂盒的线性范围为，方法灵敏度为 0.02ng/mL^{-1} ，线性相关系数为0.9996。经空白样本检测，检测限为0.05ng/kg。

[0096] 灵敏度：0.05 μ g/kg

[0097] 检出限分别如下：

[0098] 玉米、小麦、面粉：1.25 μ g/kg

[0099] 饲料、玉米副产物：2.5 μ g/kg

[0100] 葡萄酒：1.0 μ g/kg

[0101] 烘焙咖啡豆：2.5 μ g/kg

[0102] 回收率：100 \pm 20%

[0103] 精密度：试剂盒的变异系数均小于10%。

[0104] 实施例11

[0105] 试剂盒稳定性试验考虑到运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将上述试剂盒在37 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C分别保存14天、7天、280天，测定的结果表明试剂盒各项指标完全正常。从结果可以看出试剂盒在2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C至少可以保存12个月以上。

[0106] 实施例12

[0107] 赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒的特异性是通过相应的物质进行交叉反应试验来确定的结果如下：

[0108] 同实施例6的操作，分别配制赭曲霉毒素A、赭曲霉毒素B、赭曲霉毒素C、黄曲霉毒

素B1、呕吐毒素、玉米赤霉烯的标准品,按照实施例9的检测步骤进行。按照公式计算:交叉反应率(CR) = 50%抑制率时黄曲霉毒素B1浓度/50%抑制率时类似物浓度 × 100%。

[0109] 表1试剂盒特异性(交叉反应率)

[0110]

竞争物	CR%
赭曲霉毒素A	100.0
赭曲霉毒素B	0.08
赭曲霉毒素C	0.003
黄曲霉毒素B1	0.00001
呕吐毒素	0.00001
玉米赤霉烯酮	0.00001

[0111] 表1的结果说明,本发明制备的试剂盒检测赭曲霉毒素A的特异性较高。

[0112] 对比例1

[0113] 赭曲霉毒素A对照物试剂盒组成中赭曲霉毒素A半抗原对照物、人工抗原对照物的制备如下,其他组分的组成制备与实施例3-11都相同。

[0114] 赭曲霉毒素A半抗原对照物的制备

[0115] 取20mg赭曲霉毒素A,10 μ l1,3丙二胺,10 μ l4-二甲氨基吡啶(DMAP)溶解于2mlN,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,得到A液;取20mgN,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)溶解于0.5mlDMF中得到B液。在0 $^{\circ}$ C条件下,将B液缓慢滴加至A液中,恢复室温后继续反应20h,蒸除溶剂,柱层析(洗脱液:二氯甲烷/甲醇,体积比20:1),得到赭曲霉毒素A半抗原对照物。所述赭曲霉毒素A半抗原对照物利用与实施例2相同的方法制备赭曲霉毒素人工抗原。

[0116] 试剂盒的灵敏度:0.5 μ g/kg

[0117] 检出限分别为:

[0118] 玉米、小麦、面粉:2.5 μ g/kg

[0119] 饲料、玉米副产物:5 μ g/kg

[0120] 葡萄酒:5.0 μ g/kg

[0121] 烘焙咖啡豆:5 μ g/kg

[0122] 回收率:100 \pm 20%

[0123] 精密度:试剂盒的变异系数大于10%。

[0124] 赭曲霉毒素A酶联免疫试剂盒的特异性是通过相应的物质进行交叉反应试验来确定的结果如下:

[0125] 同实施例6的操作,分别配制赭曲霉毒素A、黄曲霉毒素B1、呕吐毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯的标准品,利用对比例1制备的人工抗原所制备的赭曲霉毒素A酶联免疫检测试剂盒的检测步骤按照实施例9进行。按照公式计算:交叉反应率(CR) = 50%抑制率时黄曲霉毒素B1浓度/50%抑制率时类似物浓度 × 100%。

[0126] 表2试剂盒特异性(交叉反应率)

[0127]

竞争物	CR%
赭曲霉毒素A	100.0

赭曲霉毒素B	5.3
赭曲霉毒素C	0.04
黄曲霉毒素B1	0.001
呕吐毒素	0.001
玉米赤霉烯酮	0.001

[0128] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0129] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

专利名称(译)	赭曲霉毒素A半抗原、人工抗原及其制备方法、试剂盒及赭曲霉毒素A的检测方法		
公开(公告)号	CN108828205A	公开(公告)日	2018-11-16
申请号	CN201810310843.X	申请日	2018-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
[标]发明人	骆鹏杰 陈霞 周爽 赵云峰 李敬光 张霁月		
发明人	骆鹏杰 陈霞 周爽 赵云峰 李敬光 张霁月		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/54306		
代理人(译)	王赛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种赭曲霉毒素A半抗原、人工抗原及其制备方法、试剂盒及赭曲霉毒素A的检测方法，所述赭曲霉毒素A半抗原的化学结构式(I)如下：

