



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102520177 A

(43) 申请公布日 2012.06.27

(21) 申请号 201110402715.6

(22) 申请日 2011.12.07

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 严亚贤 王元凯 孙建和

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司

公司 31236

代理人 郭国中

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

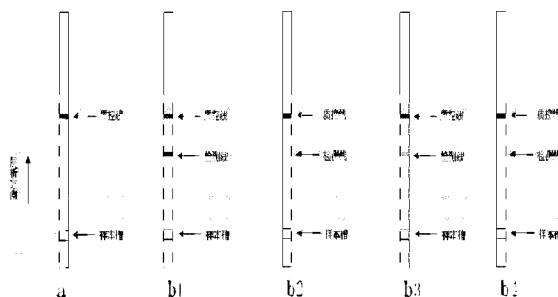
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

定量检测玉米赤霉烯酮的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种定量检测玉米赤霉烯酮的方法,包括如下步骤:1、制备偶联物 ZEN-BSA 和 ZEN-OVA;2、制备抗 ZEN 的单克隆抗体;3、制备胶体金,标记抗 ZEN 的单克隆抗体;将标记后的单克隆抗体喷涂到金标垫上;4、在硝酸纤维素膜上进行点样;5、组装成试纸条;6、绘制 ZEN 浓度与显色值的标准曲线,将待测样品的显色值带入标准曲线中,得到待测样品中 ZEN 的含量。本发明检测对象单一且针对性强,准确率高,检测速度快,所需时间短,不需经培训的专业人员就可使用本发明方法来检测,满足粮食储存销售机构、出入境、海关等检验部门快速、正确地判断玉米赤霉烯酮含量的要求,并且便于基层推广和运用。



1. 一种检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一,将 ZEN 半抗原分别与 BSA 和 OVA 偶联,得到偶联物 ZEN-BSA 和 ZEN-OVA;

步骤二,用 ZEN-OVA 作为免疫原,采用常规方法制备抗 ZEN 的单克隆抗体;

步骤三,制备胶体金,用该胶体金标记抗 ZEN 的单克隆抗体,将标记后的单克隆抗体喷涂到金标垫上;

步骤四,在硝酸纤维素膜上进行 ZEN-BSA、兔抗鼠抗体的喷涂,之后将所述喷涂后的硝酸纤维素膜放入牛血清白蛋白溶液中封闭;

步骤五,将所述金标垫、所述喷涂后的硝酸纤维素膜、样品垫和吸水垫组装成试纸条,干燥;

步骤六,根据已知不同浓度 ZEN 标准品的显色值,绘制 ZEN 浓度与显色值的标准曲线;

步骤七,取待测样品用甲醇提取,离心,取上清,并用稀释液稀释,根据该待测样品的甲醇提取液的显色值,通过标准曲线得到该待测样品提取液中的 ZEN 浓度。

2. 如权利要求 1 所述的检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述步骤三中,所述胶体金的颗粒直径为 25nm。

3. 如权利要求 1 所述的检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述步骤三中,所述胶体金的制备包括如下步骤:将 100ml 的 0.01% HAuCl_4 溶液加热至沸腾,之后加入 1ml 的 1% 柠檬酸三钠溶液,煮沸 7~10min,最后加三蒸水至 100ml,制备得到 25nm 的胶体金溶液,所述百分数为质量体积百分数。

4. 如权利要求 1 所述的检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述步骤三中,所述抗玉米赤霉烯酮的单克隆抗体在被标记之前经过透析除盐处理。

5. 如权利要求 1 所述的检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述步骤三中,所述标记包括如下步骤:在搅拌的条件下,向胶体金溶液中加入抗玉米赤霉烯酮的单克隆抗体,使其终浓度达到 $3.6 \mu\text{g/mL}$,室温下孵育 15min,用 0.1mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液的 pH 为 6.5,然后加入 10% BSA 至 BSA 的终浓度为 0.1%,10000rpm 离心 20min,弃上清,再用含 1% BSA 的 2mM pH 为 8.0 的硼酸盐缓冲液洗涤,共洗涤 3 次,最后加入含 4% 蔗糖、6% 海藻糖、BSA 和叠氮钠分别为 1% 和 0.05% 的 2mM pH 为 7.4 的硼酸盐缓冲液中,即完成标记,所述百分数为质量体积百分数。

6. 如权利要求 1 所述的检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述步骤五中,所述干燥为 37°C 烘箱干燥。

7. 如权利要求 1 所述的检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述步骤七中,所述甲醇为 80% 的甲醇,所述百分数为体积百分数。

8. 如权利要求 1 所述的检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述步骤七中,所述离心为 2500g 离心 15 分钟。

9. 如权利要求 1 所述的检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述步骤七中,所述稀释液为含 10% 甲醇的 0.05M pH 为 7.4 的 PBST,所述百分数为体积百分数。

定量检测玉米赤霉烯酮的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物检测技术领域的方法,具体是涉及一种定量检测玉米赤霉烯酮的方法。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮毒素 (Zearalenone, ZEN) 是镰刀菌在一定湿度和温度条件下繁殖所产生的次级代谢产物。玉米赤霉烯酮毒素可存在于玉米、小麦、大麦、高粱、黑麦等谷物,也可存在于食用含 ZEN 饲料的动物组织中,包括牛奶、鸡蛋等。玉米赤霉烯酮毒素与自发性乳腺癌,输卵管和子宫水肿、增生,精细胞畸变、凋亡等疾病有关。玉米赤霉烯酮毒素具有分布广泛、残留时间长、难处理、和其他毒素一起有增强毒性的现象。加入 WTO 之后,农产品及相关食品的国际贸易量日益增加,随之对进出口产品的生物安全性的要求也越来越高,为了保证这类产品的顺利上市和食用者的健康,出入境检疫、海关、生产企业、监督部门等部门迫切需要一种快速简便的玉米赤霉烯酮毒素检测方法。

[0003] 胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标志物,应用抗原抗体反应的一种免疫标记技术。胶体金是由氯金酸 (HAuCl_4) 在还原剂如白磷、单宁酸 / 柠檬酸钠和柠檬酸三钠等作用下,聚合成特定大小的金颗粒,由于静电作用成为一种稳定的胶体状态,故称为胶体金。胶体金标记,实质上是蛋白质高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。吸附机理是胶体金颗粒表面的负电荷,与蛋白质分子的正电荷基团因静电作用而形成牢固结合。这种球型的胶体金颗粒具有高电子密度,能够对多种生物高分子物质如葡萄球菌、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酶、抗生素、激素、BSA (牛血清白蛋白) 等非共价结合,形成可见的紫红色,使其成为免疫反应的优良标记物,因此广泛应用于各种物质的检测。

[0004] 酶联免疫吸附实验由于液相中的抗原 (或抗体) 需经扩散才能与固相上的抗原或抗体反应,需较长时间,各个步骤需彻底地洗涤,并且需要特定的酶和底物显色,因此耗时长,程序繁琐;高效液相色谱法因其对检测样品、仪器及操作人员的要求,不利于基层常规检测使用。胶体金免疫层析法能克服上述方法的不足,胶体金免疫层析定量试验法利用抗原抗体反应原理,胶体金标记示踪物与固定在膜上的抗原或抗体形成复合物被截留而显色,不需要特定的酶和底物显色,也不需要抗原抗体之间的较长时间的物理吸附,而根据显色深浅判定阴阳性结果并根据标准曲线计算出具体浓度,安全有效,简单方便。

[0005] 胶体金免疫层析试验的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的胶体金标记。固定在 NC 膜上的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,胶体金标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又有示踪的功能。在测定时,受检样品 (测定其中的抗体或抗原) 通过毛细作用向前移行与金标垫上的抗原或抗体起反应。继续向前移行,与固定在 T 线 (检测线) 抗原或抗体结合形成免疫复合物被截留而显色,约为一条宽为 1mm 的棕红色条带,多余的金标抗体继续向前移动,与固定在 C 线 (质控线) 的二抗结合被截留而显色,约为一条宽为 1mm 的棕红色条带。此时 T 线形成金标复合物与标本中受检物质的量呈一定的比例,故可根据 T 线呈现的颜色深浅进行定量分析。

[0006] 关于玉米赤霉烯酮毒素的检测国内外已建立了多种方法。目前检测 ZEN 的方法主要为高效液相色谱法 (HPLC), 气相色谱-质谱联用法 (GC-MS), 液谱和质谱联用法 (LC-MS)。然而, 这些方法需要对检测样品进行严格的预处理, 还需要高效液相色谱仪等贵重仪器, 同时要求有专业的操作人员, 不利于现场常规检测使用。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服现有技术的不足, 提供一种快速定量检测玉米赤霉烯酮毒素的方法。本发明检测对象单一且针对性强, 准确率高, 检测速度快, 所需时间短, 只需 20 分钟, 不需经培训的专业人员就可使用本发明方法来检测, 满足粮食储存销售机构、出入境、海关等检验部门快速、正确地判断 ZEN 含量的要求, 并且便于基层推广和运用。

[0008] 本发明是通过以下技术方案实现:

[0009] 一种检测玉米赤霉烯酮的方法, 该方法包括如下步骤:

[0010] 步骤一, 将 ZEN 半抗原分别与 BSA 和 OVA 偶联, 得到偶联物 ZEN-BSA 和 ZEN-OVA;

[0011] 步骤二, 用 ZEN-OVA 作为免疫原, 采用常规方法制备抗 ZEN 的单克隆抗体;

[0012] 步骤三, 制备胶体金, 用该胶体金标记抗 ZEN 的单克隆抗体, 将标记后的单克隆抗体喷涂到金标垫上;

[0013] 步骤四, 在硝酸纤维素膜上进行 ZEN-BSA、兔抗鼠抗体的喷涂, 之后将所述喷涂后的硝酸纤维素膜放入牛血清白蛋白溶液中封闭;

[0014] 步骤五, 将所述金标垫、所述喷涂后的硝酸纤维素膜、样品垫和吸水垫组装成试纸条, 干燥;

[0015] 步骤六, 根据已知不同浓度 ZEN 标准品的显色值, 绘制 ZEN 浓度与显色值的标准曲线;

[0016] 步骤七, 取待测样品用甲醇提取, 离心, 取上清, 并用稀释液稀释, 根据该待测样品的甲醇提取液的显色值, 通过标准曲线得到该待测样品提取液中的 ZEN 浓度。

[0017] 优选地, 所述步骤三中, 所述胶体金的颗粒直径为 25nm。

[0018] 优选地, 所述步骤三中, 所述胶体金的制备包括如下步骤: 将 100ml 的 0.01% HAuCl_4 溶液加热至沸腾, 之后加入 1ml 的 1% 柠檬酸三钠溶液, 煮沸 7~10min, 最后加三蒸水至 100ml, 制备得到 25nm 的胶体金溶液, 所述百分数为质量体积百分数。

[0019] 优选地, 所述步骤三中, 所述抗玉米赤霉烯酮的单克隆抗体在被标记之前经过透析除盐处理。

[0020] 优选地, 所述步骤三中, 所述标记包括如下步骤: 在搅拌的条件下, 向胶体金溶液中加入抗玉米赤霉烯酮的单克隆抗体, 使其终浓度达到 $3.6 \mu\text{g/mL}$, 室温下孵育 15min, 用 0.1mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液的 pH 为 6.5, 然后加入 10% BSA 至 BSA 的终浓度为 0.1%, 10000rpm 离心 20min, 弃上清, 再用含 1% BSA 的 2mM pH 为 8.0 的硼酸盐缓冲液洗涤, 共洗涤 3 次, 最后加入含 4% 蔗糖、6% 海藻糖、BSA 和叠氮钠分别为 1% 和 0.05% 的 2mM pH 为 7.4 的硼酸盐缓冲液中, 即完成标记, 所述百分数为质量体积百分数。

[0021] 优选地, 所述步骤五中, 所述干燥为 37°C 烘箱干燥。

[0022] 优选地, 所述步骤七中, 所述甲醇为 80% 的甲醇, 所述百分数为体积百分数。

[0023] 优选地, 所述步骤七中, 所述离心为 2500g 离心 15 分钟。

[0024] 优选地,所述步骤七中,所述稀释液为含 10% 甲醇的 0.05M pH 为 7.4 的 PBST,所述百分数为体积百分数。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:待测样品若有 ZEN 毒素,由于毛细效应向前层析移动,样品液中的 ZEN 与金标单克隆抗体形成的复合物,竞争了检测线上抗原与金标单克隆抗体结合的机会,所以胶体金不能或仅少量能被检测线上的抗原截流而沉积故而以检测线显色强度来判定 ZEN 含量,并可精确定量,由此判定谷物、食品、动物产品等检测样品中 ZEN 的含量。本发明检测对象单一且针对性强,准确率高。检测速度快,所需时间短,只需 20 分钟、不需经培训的专业人员就可使用本发明方法来检测,满足粮食储存销售机构、出入境、海关等检验部门快速、正确地判断 ZEN 毒素含量的要求,并且便于基层推广和运用。

附图说明

[0026] 图 1 为本发明实施例试纸条的结构示意图;

[0027] 图 2 为本发明实施例试纸条的结果示意图。

具体实施方式

[0028] 下面结合附图对本发明的实施例作详细说明:本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0029] 下面实施例中,未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。本发明中,BSA 为牛血清白蛋白;OVA 为卵清白蛋白;ZEN 为玉米赤霉烯酮;ZEN-BSA 和 ZEN-OVA 分别表示 ZEN 与 BSA、OVA 的偶联物,PBST 代表在 PBS 中加入 Twen-20 配置而成的缓冲液,这些技术术语都是本领域技术人员所熟知的。

[0030] 实施例

[0031] 1、抗原的制备

[0032] (1) 玉米赤霉烯酮包被抗原的制备

[0033] 取 0.33ml (3mg/ml) ZEN,混合于 1.2ml 吡啶中,加入 2mg O-羧甲基羟胺,室温搅拌反应 24h;将溶液真空干燥后,加入 4ml 蒸馏水,并使其溶解,调整 pH 至 8.0;未反应的 ZEN 用苯抽提除去(3ml 苯,共抽提 3 次),除去苯相,保留水相。水相调 pH 至 3.0,用乙酸乙酯抽提(10ml 乙酸乙酯,共抽提 4 次),抽出酯相,弃水相。酯相用无水硫酸钠滤过后吹干。吹干后的结晶物溶于 0.5ml 碱性氧化铝处理过的二氧六环中;称取 20mgBSA 溶于 0.7ml 0.05mol/L (pH7.2) 的 PBS 中;之后,将两溶液于 4℃ 下缓慢混合,得溶液 a;取 1mg NHS 和 2mg DCC 溶于 0.2ml 二氧六环中得溶液 b,并缓慢将溶液 b 滴加到溶液 a 中,进而得到溶液 c。将溶液 c 室温下搅拌反应 16h,调 pH 至 6.0,通风橱中吹干,缓慢滴加 DCC 溶液(2mgDCC 溶于 0.2ml 二氧六环中而得),室温下搅拌反应 48h,最后用 PBS 透析 2~3d,-20℃ 保存,得 ZEN-BSA 完全抗原。

[0034] (2) 玉米赤霉烯酮免疫抗原的制备

[0035] 玉米赤霉烯酮免疫抗原的制备方法基本同玉米赤霉烯酮包被抗原的制备方法,不同的地方在于将 BSA 替换为 OVA,制备得到 ZEN-OVA 完全抗原。

[0036] 2、抗玉米赤霉烯酮的单克隆抗体的制备

[0037] 将ZEN-OVA完全抗原溶解于PBS中,测定完全抗原中载体蛋白的浓度。将抗原与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,皮下注射免疫6周龄Ba1b/C小鼠,每只0.1ml;二免:两周后,改用弗氏不完全佐剂,用同样的方法和剂量,进行免疫;三免,操作同二免。免疫5天后眼底静脉采血测效价,效价达到1:10000以上时加强免疫:腹腔注射不加佐剂的抗原0.1ml,三天后处死小鼠,取其脾脏,与骨髓瘤细胞融合。用间接ELISA方法筛选阳性杂交瘤细胞。通过小鼠腹腔注射杂交瘤细胞来大量制备小鼠腹水,腹水经过过滤、离心初步纯化后,采用辛酸法和亲和层析法纯化腹水,得玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备。

[0038] 3、胶体金的制备

[0039] 先将100ml的0.001% (W/V) HAuCl_4 溶液加热至沸腾,迅速加入1ml的1% (W/V) 柠檬酸三钠水溶液,开始有些蓝色,然后浅蓝、蓝色,再加热出现红色,煮沸7~10min出现透明的酒红色,最后加三蒸水至100ml,就这样制备了25nm的胶体金溶液。然后用电镜镜检,确保制备的金颗粒尽量使其大小一致,均匀,颗粒直径在25nm左右。

[0040] 4、单克隆抗体的标记

[0041] 待标记的抗体蛋白用0.005mol/L的氯化钠溶液透析48小时除盐,然后用制备好的25nm的胶体金来标记多克隆抗体蛋白。具体步骤为:①向搅拌中的胶体金溶液里迅速加入抗体蛋白使其终浓度达到 $3.6\mu\text{g/mL}$,室温下孵育15min;②用0.1mol/L K_2CO_3 调节金溶液的pH为6.5,然后加入10% (W/V) BSA至终浓度0.1%来稳定胶体金溶液,反应5min;③10000rpm离心20min,弃上清,再用含1% (W/V) BSA的2mM pH为8.0的硼酸盐缓冲液洗涤,共洗涤3次;④最后加入含4% (W/V) 蔗糖、6% (W/V) 海藻糖、BSA和叠氮钠分别为1% (W/V) 和0.05% (W/V) 的2mM硼酸盐缓冲液(pH 7.4)中,4℃储存备用。以上操作中应注意,一切溶液中不应含杂质微粒,可用高速离心或微孔滤膜预处理。

[0042] 5、胶体金试纸条的组装

[0043] 将标记好的单克隆抗体蛋白喷涂到金标垫上,喷涂ZEN-BSA偶联抗原到硝酸纤维素膜上的T线,喷涂兔抗鼠的单克隆抗体到硝酸纤维素膜上的C线,之后将硝酸纤维素膜放入牛血清白蛋白溶液中封闭。将金标垫、喷涂后的硝酸纤维素膜、样品垫和吸水垫组装成试纸条,37℃烘箱干燥。试纸条的组装顺序如图1所示,试纸条的组成由下到上依次包括塑料底衬1、硝酸纤维素膜2、金标垫3、样品垫4、吸水垫5,其中塑料底衬1的作用是提供组装平台,硝酸纤维素膜2上具有兔抗鼠单克隆抗体喷涂的C线,以ZEN-BSA喷涂的T线,金标垫3上加有金标抗体,样品垫4提供了待测样品加入的位置。

[0044] 6、胶体金试纸条的使用及结果判定

[0045] 取ZEN标准品,分别稀释为1、2、4、8、16、32ng/ml溶液,并同时配制空白溶液,取250 μl 滴入试纸条样品槽中;取0.75g待检样品用3ml 80%甲醇(甲醇:水=80:20)提取,2500g离心15min,取上清,并用稀释液稀释2.4倍,取250 μl 滴入试纸条样品槽中,20min后将显色完成的标准品与待测样品的试纸条放入读条仪中,读取C、T线的显色值,并记录;利用Excel软件绘制ZEN标准品浓度与显色值的标准曲线,将待测样品显色值带入标准曲线中,得到ZEN浓度结果;将此结果 \times 稀释因子(4 \times 2.4),即为样品中所含ZEN浓度($\mu\text{g/kg}$)。

[0046] 把待检样品滴入试纸条的样本槽中,由于毛细效应,液体的层析方向向上,对于层

析的结果见图 2,其中 a 为样品中 ZEN 含量超过 32ng/ml 时的结果示意图 ;b1-b4 分别为 ZEN 浓度分别为 1、4、8、32ng/ml 时的结果示意图。

[0047] 鉴定方法具体为 :

[0048] 若在 C 线上出现红色条带,则判定试纸条测试结果有效 ;

[0049] 若在 T 线和 C 线上均出现棕红色条带,将 T 线显色值代入标准曲线中 ;

[0050] 若 T 线显色值等于或大于空白溶液的值,则样品中不含或含有少于 1ng/ml 的 ZEN ;

[0051] 若 T 线显色值在标准曲线范围内,则样品中含有的 ZEN 浓度可根据标准曲线算出 ;

[0052] 若 T 线显色值为 0,则待测样品中 ZEN 含量超出 32ng/ml。

[0053] 可以看出,本实施例的方法可直接定量检测样品中的 ZEN,不需要专业培训,操作方便、快速,20 分钟即可获得结果,本发明满足粮食储存销售机构、出入境、海关等检验部门快速、正确地判断 ZEN 含量的要求,并且便于基层推广和运用。

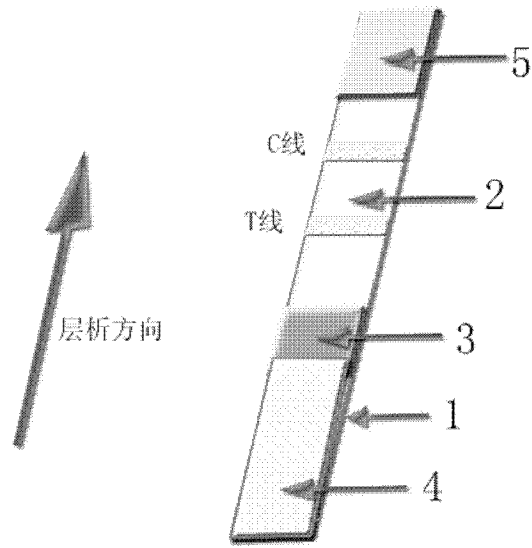


图 1

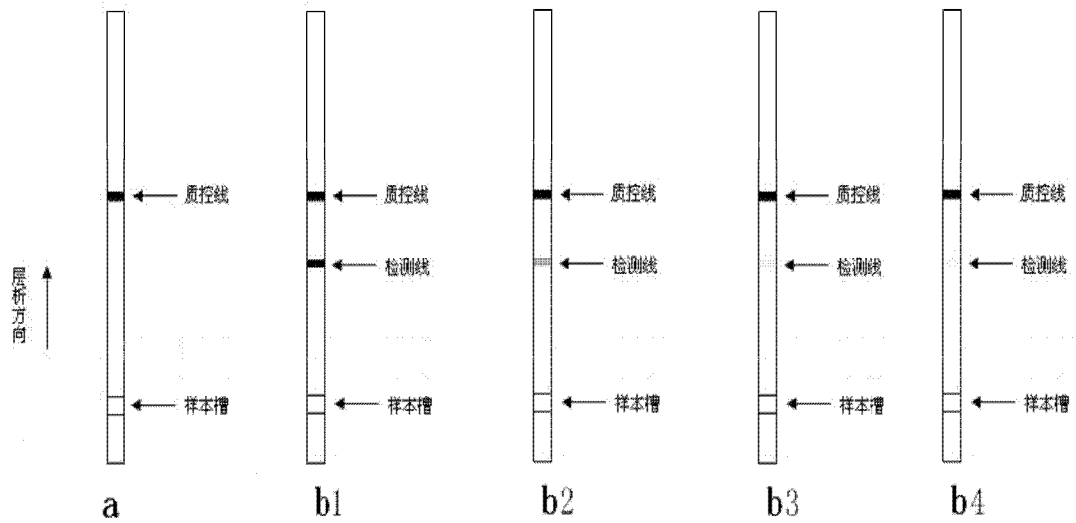


图 2

专利名称(译)	定量检测玉米赤霉烯酮的方法		
公开(公告)号	CN102520177A	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN201110402715.6	申请日	2011-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	严亚贤 王元凯 孙建和		
发明人	严亚贤 王元凯 孙建和		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种定量检测玉米赤霉烯酮的方法，包括如下步骤：1、制备偶联物ZEN-BSA和ZEN-OVA；2、制备抗ZEN的单克隆抗体；3、制备胶体金，标记抗ZEN的单克隆抗体；将标记后的单克隆抗体喷涂到金标垫上；4、在硝酸纤维素膜上进行点样；5、组装成试纸条；6、绘制ZEN浓度与显色值的标准曲线，将待测样品的显色值带入标准曲线中，得到待测样品中ZEN的含量。本发明检测对象单一且针对性强，准确率高，检测速度快，所需时间短，不需经培训的专业人员就可使用本发明方法来检测，满足粮食储存销售机构、出入境、海关等检验部门快速、正确地判断玉米赤霉烯酮含量的要求，并且便于基层推广和运用。

