



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105759044 B

(45)授权公告日 2017.12.15

(21)申请号 201610156864.1

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2016.03.18

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105759044 A

CN 104569381 A, 2015.04.29,  
CN 87105153 A, 1988.02.03,  
CN 102169090 A, 2011.08.31, 全文.  
US 4181853 A, 1980.01.01,

(43)申请公布日 2016.07.13

(73)专利权人 南昌大学  
地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学  
府大道999号

审查员 赵晓明

(72)发明人 熊勇华 江湖 黄小林 裴可  
熊颖 许恒毅

(74)专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有  
限公司 36115  
代理人 施秀瑾

(51)Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

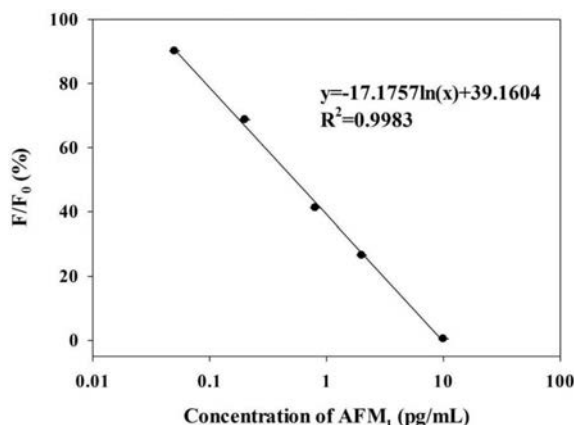
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

## (54)发明名称

一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法

## (57)摘要

本发明提供了一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,该方法基于直接竞争ELISA技术,先将单抗包被后,加入待测样品和触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>,样品中的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>与触酶标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>竞争性的与酶标板上固定的单克隆抗体结合,通过触酶催化双氧水分解,降低对巯基丙酸修饰的碲化镉量子点的荧光淬灭,根据荧光强度来判断样品中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的含量。本发明创新性的引入了新的过氧化氢酶,在降低成本的同时提升了反应精度;与此同时,本发明使用了更为灵敏的新型荧光底物巯基丙酸修饰的碲化镉量子点,较传统的TMB底物发光灵敏性显著提升。



1. 一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,该方法属于直接竞争酶联免疫法,该方法是针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>抗原的检测,该方法中用于标记抗原的酶是触酶C100,该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

2. 根据权利要求1所述的针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,而后加入待测样品;

2) 而后加入触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>,混合后于35~39℃避光环境中反应40~80min,洗涤;

3) 而后加入浓度为8~12μmol/L的双氧水溶液混合,于35~39℃避光环境中反应20~40min;

4) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于室温避光环境中反应10~20min;

5) 检测步骤4)产物的荧光强度。

3. 根据权利要求2所述的针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,其特征在于步骤1)中所述包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体具体包括以下操作:

A) 取蛋白G,在酶标板上以0.04~0.06mol/L、pH9.4~9.8的碳酸盐缓冲液作为包被液,稀释蛋白G至18~22μg/mL;

B) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,而后取抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,利用所述包被液在酶标孔内稀释抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体至0.6~1μg/mL;

C) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,再加入牛血清白蛋白封闭液,于35~39℃封闭1~3h,而后弃去封闭液。

4. 根据权利要求3所述的针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,其特征在于步骤A)中稀释后,于0~8℃条件下静置8~12h,再执行步骤B);步骤B)中稀释后,于35~39℃条件下静置1~3h,再执行步骤C)。

5. 根据权利要求2所述的针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,其特征在于步骤2)所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>是通过以下方法制备的:

M) 配制黄曲霉毒素M<sub>1</sub>胍化物浓度为0.8~1.2mg/mL的四氢呋喃溶液,加入N-羟基丁二酰亚胺至浓度为1.8~2.2mg/mL,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐至浓度为3.6~4.4mg/mL,而后于避光条件下反应40~80min;

N) 而后固液分离,取上清挥发溶剂,取残留物溶解于二甲基甲酰胺中,即得到活化产物;

P) 将步骤N)所述活化产物与含触酶C100浓度为3.5~4.5mg/mL的碳酸氢钠溶液混合,于避光条件下反应8~12h;

Q) 而后透析去除游离的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>胍化物,即得到所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>。

6. 根据权利要求5所述的针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,其特征在于步骤N)中所述固液分离是10000r/min离心15min。

7. 根据权利要求2所述的针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,其特征在于步骤4)所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点是通过以下方法制备的:配制含有8~12mmol/L硝酸镉、20~28mmol/L巯基丙酸、3~7mmol/L碲氢化钠的溶液即为前体溶液,所述前体溶液的pH为11~11.5,将所述前体溶液水浴加热至93~97℃,即得到所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

8. 根据权利要求2所述的针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,其特征在于步骤5)中荧光强度的检测是利用酶标仪实现的,激发波长为310nm,发射波长为590nm。

9. 根据权利要求2~8任一项所述的针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,其特征在于所述洗涤是利用洗涤液冲洗或浸泡,所述洗涤液是含有0.3~0.7% (v/v)吐温-20的PBST溶液,所述PBST溶液的浓度为0.005~0.02mol/L,所述PBST溶液的pH为7.0~7.5。

## 一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗原检测技术领域,进一步涉及基于ELISA的抗原检测技术,具体涉及一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法。

### 背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(Aflatoxin)是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等真菌产生的次级代谢产物,主要有黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>等。研究表明哺乳类动物在摄入被黄曲霉毒素B<sub>1</sub>污染的饲料或食物后,黄曲霉毒素B<sub>1</sub>在体内代谢会生成黄曲霉毒素M<sub>1</sub>。黄曲霉毒素M<sub>1</sub>对人和动物具有极强的肝脏毒性、致癌性和致突变性。2002年,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将黄曲霉毒素M<sub>1</sub>定位为1类致癌物。由于其主要存在于人们,尤其是更容易受到毒素损害的婴幼儿的日常消费的乳制品中,黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的污染问题更加引起社会的广泛关注。因此,建立灵敏、快速的检测方法是有效防治黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的重要技术前提。

[0003] 现有技术中,检测黄曲霉毒素M<sub>1</sub>常用方法包括确证法以及快速筛查法两大类。常用确证法有高效液相色谱法及液相色谱-质谱联用法等。尽管该类方法具有灵敏度高等特点,但需依赖于昂贵的仪器设备和熟练的操作人员,且需复杂的样品前处理,因此无法满足基层及现场实地监控的需要。基于免疫学的快速筛查方法因具有通量高、检测快速、价格便宜等优势,近年来得到了大量的推广和应用。特别是,酶联免疫吸附法(ELISA)方法因具有快速、灵敏、特异、准确、可定量、操作简便、无需贵重仪器设备,且对样品纯度要求不高,特别适用于大批量样品的检测等优点,已成为黄曲霉毒素M<sub>1</sub>快速筛查检测的主要方法。然而,现有技术中针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的ELISA检测方法普遍基于辣根过氧化物酶标记的抗体或抗原催化双氧水生成羟自由基,进而氧化无色的化学显色底物四甲基联苯二胺(TMB)形成蓝色产物,然后使用终止液(2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止反应形成黄色溶液于450nm处记录吸光度值。该方法因其显色强度较低,因此检测灵敏度相对较低,当待测样品中目标物含量较低时易出现假阴性结果,从而无法满足实际应用的要求。

[0004] 近年来,一些新型的信号传导机制被报道用于替代传统ELISA的信号传导机制用于提高ELISA的灵敏度,如放射免疫分析底物、化学发光底物、荧光底物以及共振胶体金溶液等。然而,发光体系的构建需要充分考虑被检测对象的分子生物学性质,例如在方法层面,抗体的包被及其与抗原的结合性能,选用何种标记物酶及其与抗体的偶联方法,显色底物的选择以及具体发光方法;在效果层面,既要保证显色反应的灵敏性,又应满足显色强度与目标物含量的线性关系。因此,针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的ELISA检测方法,尤其以提升其检测灵敏性为目的的方法改进,具有突出的技术难度。

### 发明内容

[0005] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,以解决现有技术的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>ELISA检测方法精度较低。

[0006] 本发明要解决的另一技术问题是现有技术用于黄曲霉毒素M<sub>1</sub>检测的ELISA方法中,标记抗原的酶灵敏性较低。

[0007] 本发明要解决的再一技术问题是现有技术用于黄曲霉毒素M<sub>1</sub>检测的ELISA方法中,显色系统灵敏性较低。

[0008] 本发明要解决的又一技术问题是当采用ELISA法检测黄曲霉毒素M<sub>1</sub>时,过程中抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单抗的包被效果较差。

[0009] 本发明要解决的又一技术问题是当采用触酶C100作为抗原标记酶对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>执行ELISA检测时,具体工艺方法并不明确。

[0010] 本发明要解决的又一技术问题是当采用触酶C100作为抗原标记酶、采用双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点作为底物对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>执行ELISA检测时,检测结果与抗原浓度的线性关系不佳。

[0011] 本发明要解决的又一技术问题是当采用触酶C100作为抗原标记酶、采用双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点作为底物对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>执行ELISA检测时,过程中洗涤效果不佳。

[0012] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0013] 一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,该方法属于直接竞争酶联免疫法,该方法是针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>抗原的检测,该方法中用于标记抗原的酶是触酶C100。

[0014] 作为优选,该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0015] 作为优选,该方法包括以下步骤:

[0016] 1) 包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,而后加入待测样品;

[0017] 2) 而后加入触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>,混合后于35~39℃避光环境中反应40~80min,洗涤;

[0018] 3) 而后加入浓度为8~12μmol/L的双氧水溶液混合,于35~39℃避光环境中反应20~40min;

[0019] 4) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于室温避光环境中反应10~20min;

[0020] 5) 检测步骤4) 产物的荧光强度。

[0021] 该荧光强度即用于反应待测样品中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>含量,实际操作中可利用已知浓度且呈梯度分布的多组黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标准液通过以上方法绘制荧光强度-黄曲霉毒素M<sub>1</sub>浓度标准曲线,再利用待测样品的荧光强度从标准曲线中计算待测样品的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>含量。具体操作方法可以依据本技术领域的一般技术常识任一选择。上述梯度分布的多组黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标准液,可以分别选择0pg/mL、0.05pg/mL、0.2pg/mL、0.8pg/mL、2pg/mL、10pg/mL。

[0022] 该优选技术方案中,步骤1) 中先加入待测样品,使待测样品中所含有的抗原物质与酶标板上的抗体结合,待步骤2) 加入触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>后,触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>与待测样品中的抗原竞争性的与固相抗体结合;步骤3) 加入双氧水溶液后,可被触酶C100催化分解;而后步骤4) 加入量子点后实现发光作用;由于酶标板上所含有的触酶C100的量与发光强度呈正相关、与待测样品中抗原含量呈负相关,因此待测样品中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的含量与发光强度呈负相关性。在该优选技术方案中:各试剂在使用前可以先

于室温平衡30min以上再使用;步骤1)中待测样品的加入量优选为30~70 $\mu$ L/孔,更优的是50 $\mu$ L/孔;步骤2)中触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的加入量优选为30~70 $\mu$ L/孔,更优的是50 $\mu$ L/孔;步骤3)中双氧水溶液的加入量优选为80~120 $\mu$ L/孔,更优的是100 $\mu$ L/孔;步骤4)中巯基丙酸修饰的碲化镉量子点的加入量优选为30~70 $\mu$ L/孔,更优的是50 $\mu$ L/孔。

[0023] 作为优选,步骤1)中所述包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体具体包括以下操作:

[0024] A) 取蛋白G,在酶标板上以0.04~0.06mol/L、pH9.4~9.8的碳酸盐缓冲液作为包被液,稀释蛋白G至18~22 $\mu$ g/mL;

[0025] B) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,而后取抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,利用所述包被液在酶标孔内稀释抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体至0.6~1 $\mu$ g/mL;

[0026] C) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,再加入牛血清白蛋白封闭液,于35~39 $^{\circ}$ C封闭1~3h,而后弃去封闭液。

[0027] 进一步可以执行以下优选:步骤A)中稀释后,于0~8 $^{\circ}$ C条件下静置8~12h,再执行步骤B);步骤B)中稀释后,于35~39 $^{\circ}$ C条件下静置1~3h,再执行步骤C);步骤A)所述包被液的加入量为80~120 $\mu$ L/孔,更优的是100 $\mu$ L/孔;步骤B)中包被液的加入量为80~120 $\mu$ L/孔,更优的是100 $\mu$ L/孔;步骤C)所述牛血清白蛋白的浓度为0.3~0.7%,更优的是0.5%;弃去封闭液后的酶标板于室温下干燥,而后于2~6 $^{\circ}$ C保存。

[0028] 作为优选,步骤2)所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>是通过以下方法制备的:

[0029] M) 配制黄曲霉毒素M<sub>1</sub>胍化物浓度为0.8~1.2mg/mL的四氢呋喃溶液,加入N-羟基丁二酰亚胺至浓度为1.8~2.2mg/mL,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐至浓度为3.6~4.4mg/mL,而后于避光条件下反应40~80min;

[0030] N) 而后固液分离,取上清挥发溶剂,取残留物溶解于二甲基甲酰胺中,即得到活化产物;

[0031] P) 将步骤N)所述活化产物与含触酶C100浓度为3.5~4.5mg/mL的碳酸氢钠溶液混合,于避光条件下反应8~12h;

[0032] Q) 而后透析去除游离的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>胍化物,即得到所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>。

[0033] 进一步可以执行以下优选:步骤M)中所述四氢呋喃溶液的溶剂仅为四氢呋喃;步骤M)中反应温度为室温;步骤N)中二甲基甲酰胺的用量是步骤M)中四氢呋喃用量的1/5~3/5;步骤P)中所述碳酸氢钠溶液中碳酸氢钠含量为0.1~0.15mol/L,更优的是0.1~0.15mol/L;步骤P)中的反应是在震荡条件下进行的;步骤Q)所述透析的时间为66~78h,更优的是72h;步骤Q)所述透析是在0.01mol/L的PBS溶液中进行的;步骤N)中所述固液分离是10000r/min离心15min。

[0034] 作为优选,步骤4)所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点是通过以下方法制备的:配制含有8~12mmol/L硝酸镉、20~28mmol/L巯基丙酸、3~7mmol/L碲氢化钠的溶液即为前体溶液,所述前体溶液的pH为11~11.5,将所述前体溶液水浴加热至93~97 $^{\circ}$ C,即得到所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。在此基础上进一步优选的,还可以包括pH调整环节,所述pH调整是利用NaOH实现的。

[0035] 作为优选,步骤5)中荧光强度的检测是利用酶标仪实现的,激发波长为310nm,发射波长为590nm。

[0036] 在以上任一项技术方案基础上优选的,所述洗涤是利用洗涤液冲洗或浸泡,所述洗涤液是含有0.3~0.7% (v/v) 吐温-20的PBST溶液,所述PBST溶液的浓度为0.005~0.02mol/L,所述PBST溶液的pH为7.0~7.5。

[0037] 在以上技术方案中,触酶(Catalase)又称为过氧化氢酶,本发明中所使用的触酶C100专指由美国Sigma-Aldrich公司出品的、型号为cat.No.C100的触酶。所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>是指在黄曲霉毒素M<sub>1</sub>分子上连接触酶C100后的物质。

[0038] 以上技术方案中,酶标板可以选用96孔黑色荧光酶标板。96孔黑色荧光酶标板,抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,触酶C100,双氧水,硝酸镉,巯基丙酸,碲氢化钠等试剂均自市面购得。

[0039] 作为优选,所述洗涤是向酶标孔中加入320~360 $\mu$ L/孔的洗涤液,洗涤3~4次,每次间隔10~30s。

[0040] 作为优选,待测样品在执行检测前先进行以下预处理:(1)先将奶粉溶解,再用75%甲醇水溶液进行萃取;(2)剧烈震荡30min,使其充分混匀;(3)5000rpm离心10min,弃去沉淀;(4)取1mL上清液用1mL PBS稀释,备用。

[0041] 本发明采用酶联免疫吸附试验方法来检测。用于检测黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的ELISA试剂盒的测定原理:样品中的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>与触酶标记黄曲霉毒素M<sub>1</sub>竞争性的与酶标板上固定的抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体结合,通过触酶催化双氧水分解,降低对巯基丙酸修饰的碲化镉量子点的荧光淬灭,根据荧光强度的大小来判断样品中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的含量。如果样品中的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>含量少,荧光强度高;反之,则荧光强度低。即荧光强度的高低与标准品或样品中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测奶粉及乳制品中的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>。本发明的试剂盒检测方法操作简便,检测灵敏、准确、快速,适用于大批量样品的检测。

[0042] 采用本发明技术方案具有如下有益效果:

[0043] 1、本发明方法使用更为灵敏的新型的触酶取代传统ELISA方法中的辣根过氧化物酶,可以大大节约了成本。

[0044] 2、本发明方法使用更为灵敏的新型的荧光底物(巯基丙酸修饰的碲化镉量子点)取代传统ELISA方法中的化学显色底物,可以大大提高其检测灵敏度,相对于传统ELISA至少提高了2-3数量级。

## 附图说明

[0045] 图1是本发明检测方法和以辣根过氧化物酶作为抗体标记物酶、以TMB作为底物的常规检测方法原理对比图。

[0046] 图2是本发明实施例1中百分荧光率-黄曲霉毒素M<sub>1</sub>浓度标准曲线图。

[0047] 图3是本发明实施例2中百分吸光率-黄曲霉毒素M<sub>1</sub>浓度标准曲线图。

## 具体实施方式

[0048] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中对于属于公知的结构或功能将不进行详细描述。

[0049] 以下实施例中所使用的近似性语言可用于定量表述,表明在不改变基本功能的情

况下可允许数量有一定的变动。因此,用“大约”、“左右”等语言所修正的数值不限于该准确数值本身。在一些实施例中,“大约”表示允许其修正的数值在正负百分之十(10%)的范围内变化,比如,“大约100”表示的可以是90到110之间的任何数值。此外,在“大约第一数值到第二数值”的表述中,大约同时修正第一和第二数值两个数值。在某些情况下,近似性语言可能与测量仪器的精度有关。

[0050] 除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解相同含义。

[0051] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0052] 以下实施例中,所述96孔黑色荧光酶标板购买于美国Corning公司;所述的抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体、黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标品及黄曲霉毒素M<sub>1</sub>脲化物是购买于无锡中德伯尔生物技术有限公司;所述触酶(cat.No.C100)和底物液A双氧水购买于美国Sigma-Aldrich公司(35%,cat.No.349887)。所述的触酶C100即指触酶(cat.No.C100)。

[0053] 实施例1(基于本发明黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的新型荧光ELISA检测方法制备一试剂盒,并将其用于在检测奶粉和乳制品中的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>残留量)

[0054] 检测黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的新型荧光ELISA试剂盒的制备及检测方法,包括抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体包被的96孔黑色荧光酶标板、黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标准品、触酶标记黄曲霉毒素M<sub>1</sub>工作液、底物液A双氧水,荧光底物液B巯基丙酸修饰的碲化镉量子点和浓缩洗涤液。

[0055] 下面具体描述本发明中检测黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的ELISA试剂盒的制备,

[0056] 所述96孔黑色荧光酶标板购买于美国Corning公司;抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体是购买于无锡中德伯尔生物技术有限公司;触酶(cat.No.C100)和底物液A所述双氧水购买于美国Sigma-Aldrich公司(35%,cat.No.349887)。

[0057] 所述触酶标记黄曲霉毒素M<sub>1</sub>通过以下方式获得:取0.5mg黄曲霉毒素M<sub>1</sub>脲化物溶解于500μL无水四氢呋喃中,加入1mg N-羟基丁二酰亚胺和2.0mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,室温避光反应60min;10000r/min离心15min,弃沉淀,干燥上清,挥发四氢呋喃,残留物溶于200μL二甲基甲酰胺中,得到活化产物;将活化产物缓慢滴加于触酶溶液(4mg,溶解于1mL 0.13mol/L NaHCO<sub>3</sub>溶液中)中,室温避光剧烈振荡过夜,反应产物在0.01mol/L的PBS溶液中透析72h,去除游离的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>脲化物;透析结束后,将样品冷冻干燥得到触酶标记黄曲霉毒素M<sub>1</sub>,分装,-20℃保存。

[0058] 所述荧光底物液B巯基丙酸修饰的碲化镉量子点通过以下方式获得:取新鲜配置的碲氢化钠溶液加入到硝酸镉溶液中,加入1mol/L的氢氧化钠溶液调pH值至11.2,向混合溶液中加入巯基丙酸溶液做稳定剂,形成的碲化镉前体溶液水浴加热到95℃。前体溶液中加入各溶液的浓度为硝酸镉溶液的终浓度为10mmol/L,巯基丙酸的终浓度为24mmol/L,碲氢化钠的终浓度为5mmol/L。所述抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体包被的96孔黑色荧光酶标板的制备:

[0059] 用0.05mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将蛋白G(购买于上海研卉生物科技有限公司,cat.No.PRO-402)稀释成20μg/mL,100μL/孔,4℃放置过夜,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液340μL/孔,洗板3次,30s/次;然后将抗黄曲霉毒素

M<sub>1</sub>单克隆抗体稀释成0.8μg/mL,100μL/孔,37℃放置2h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液340μL/孔,洗板3次,30s/次;最后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA,购买于美国Sigma-Aldrich公司,cat.No.A4737)封闭,340μL/孔,37℃放置2h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25℃)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置4℃下保存。所述的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标准品配制浓度分别为0pg/mL、0.05pg/mL、0.2pg/mL、0.8pg/mL、2pg/mL、10pg/mL。

[0060] 所述触酶标记黄曲霉毒素M<sub>1</sub>工作液的制备:采用黄曲霉毒素M<sub>1</sub>与触酶偶联得到的,用PBS(0.01M,pH7.4)稀释成1:1280。

[0061] 所述底物液A双氧水的制备:用PBS(0.01mol/L,pH7.4)稀释至10μmol/L。所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点荧光底物液的制备:方法,用PBS(0.01mol/L,pH7.4)稀释成1:400。

[0062] 所述浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液,其包含0.5%吐温-20,0.01mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间。

[0063] 基于上述制备的试剂,本发明用于检测黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的ELISA试剂盒包括如下材料:

[0064] (1) 96孔酶标板×1块(包被有抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的单克隆抗体);

[0065] (2) 标准液×6瓶:(1mL/瓶)0pg/mL、0.05pg/mL、0.2pg/mL、0.8pg/mL、2pg/mL、10pg/mL;

[0066] (3) 触酶标黄曲霉毒素M<sub>1</sub>工作液8mL;

[0067] (4) 底物液A 7mL;

[0068] (5) 荧光底物液B 7mL;

[0069] (6) 终止液 7mL;

[0070] (7) 10×浓缩洗涤液20mL。

[0071] 使用本试剂盒时的注意事项:

[0072] (1) 从冰箱中取出的试剂及样本应回温至20~25℃;

[0073] (2) 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况,则会出现标准曲线不成线性,重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作;

[0074] (3) 每加一种试剂前需将其摇匀;

[0075] (4) 底物液A为浓度35%的双氧水,避免直接接触皮肤;

[0076] (5) 不要使用过了有效日期的试剂盒;也不要使用过了有效期的试剂盒中的任何试剂,掺杂使用过了有效期的试剂盒会引起灵敏度的降低;不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂;

[0077] (6) 储存条件:保存试剂盒于2~8℃,不要冷冻,将不用的酶标板微孔板放进自封袋重新密封。底物液A和荧光底物液B对光敏感,因此要避免直接暴露在光线下;

[0078] (7) 该试剂盒最佳反应温度为25℃,温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化。

[0079] 本发明的试剂盒用于检测奶粉和乳制品产品中的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>残留量时,通过以下步骤实施:样品前处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0080] (1) 样品前处理

[0081] (1) 先将奶粉溶解,再用75%甲醇水溶液进行萃取;(2) 剧烈震荡30min,使其充分混匀;(3) 5000rpm离心10min,弃去沉淀;(4) 取1mL上清液用1mL PBS稀释,备用。

[0082] (2) 用本发明试剂盒进行检测上述样品中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>残留量

[0083] 取包被有抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体的酶标板,加标准品/样本50μL/孔到对应的微孔中;加入触酶标记黄曲霉毒素M<sub>1</sub>工作液,50μL/孔,用盖板膜盖板后置室温37℃避光环境中反应45min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,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;加入底物液A双氧水(10μmol/L)稀释液,100μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置37℃避光环境中反应30min;加入荧光底物液B巯基丙酸修饰的碲化镉量子点稀释液50μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15min,设定荧光酶标仪(美国Thermo Varioskan Flash全波长多功能酶标仪)于激发波长为310nm,发射波长为590nm处检测,测定每孔荧光值(请在5min内读完数据);以标准品测试的荧光值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的含量。

[0084] (3) 分析结果

[0085] 用上述制备的试剂盒中的6个黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标准品浓度0pg/mL、0.05pg/mL、0.2pg/mL、0.8pg/mL、2pg/mL、10pg/mL。在激发波长为310nm,发射波长为590nm处检测荧光强度。

[0086] 百分荧光率的计算,标准品或样本的百分荧光率等于标准品或样本的百分荧光强度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0标准)的荧光强度值,再乘以100%,即百分荧光率(%) =  $F/F_0 \times 100\%$ ,其中F为标准溶液或样本溶液的平均荧光强度值,F<sub>0</sub>为0pg/mL标准溶液的平均荧光强度值。

[0087] 以标准品百分荧光率为纵坐标,以黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标准品浓度(pg/mL)的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。标准曲线为 $y = -17.17571 \ln(x) + 39.1604$ , $R^2 = 0.9983$ ,见附图2。该方法的IC<sub>50</sub>被定义为百分分光率为50%时所对应的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的浓度。通过该标准曲线计算得IC<sub>50</sub>为0.532pg/mL。当进行实际样本检测时,将样本的百分荧光率( $F/F_0 \times 100\%$ )值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应样本的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的实际浓度。

[0088] 实施例2(以辣根过氧化物酶为抗体标记酶、以TMB作为显色底物的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>直接竞争ELISA检测方法)

[0089] 传统ELISA试剂盒用于检测奶粉和乳制品产品中的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>残留量时,通过以下步骤实施:样品前处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0090] (1) 样品前处理

[0091] (1) 先将奶粉溶解,再用75%甲醇水溶液进行萃取;(2) 剧烈震荡30min,使其充分混匀;(3) 5000rpm离心10min,弃去沉淀;(4) 取1mL上清液用1mL PBS稀释,备用。

[0092] (2) 用传统ELISA试剂盒进行检测上述样品中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>残留量

[0093] 取包被有抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体的酶标板,加标准品/样本50μL/孔到对应的微孔中;加入辣根过氧化物酶标记黄曲霉毒素M<sub>1</sub>工作液,50μL/孔,用盖板膜盖板后置室温37℃避光环境中反应45min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,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;加入TMB显色液,100μL/孔,轻轻振荡混匀,用

盖板膜盖板后置37℃避光环境中反应15min;加入终止液50μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处检测,测定每孔吸光度值(请在5min内读完数据);对比待测样品与标准品的吸光度值大小,定量分析待测样品中的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的残留量。

[0094] (3) 分析结果

[0095] 用传统ELISA试剂盒中的6个黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标准品浓度0ng/mL、0.0195ng/mL、0.0391ng/mL、0.1563ng/mL、0.3125ng/mL、0.625ng/mL。在450nm处测量吸光度值。

[0096] 百分吸光率的计算,标准品或样品的百分吸光率等于标准品或样品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%,即百分吸光度值(%) =  $B/B_0 \times 100\%$  其中B为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值,B<sub>0</sub>为0ng/mL标准溶液的平均吸光度值。

[0097] 以标准品百分吸光率为纵坐标,以黄曲霉毒素M<sub>1</sub>标准品浓度(ng/mL)的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。标准曲线为 $y = -18.0564 \ln(x) + 14.819$ ,  $R^2 = 0.9955$ , 见附图3。该方法的IC<sub>50</sub>被定义为百分吸光率为50%时所对应的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的浓度。通过该标准曲线计算得IC<sub>50</sub>为0.142ng/mL。当进行实际样本检测时,将样本的百分荧光率( $B/B_0 \times 100\%$ )值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应样本的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的实际浓度。

[0098] 由以上实施例1与实施例2对比可以发现,本发明的新型ELISA方法灵敏度可达经典ELISA方法的267倍[ $(142\text{pg/mL}) / (0.532\text{pg/mL})$ ],同时也证明本发明的新型ELISA方法适用于以高灵敏度检测任何传统ELISA方法可以检测的物质。

[0099] 实施例3

[0100] 一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,该方法属于直接竞争酶联免疫法,该方法是针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>抗原的检测,该方法中用于标记抗原的酶是触酶C100。

[0101] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0102] 该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0103] 具体检测方法包括以下步骤:

[0104] 1) 包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,而后加入待测样品;

[0105] 2) 而后加入触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>,混合后于35℃避光环境中反应40min,洗涤;

[0106] 3) 而后加入浓度为8μmol/L的双氧水溶液混合,于35℃避光环境中反应20min;

[0107] 4) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于35℃避光环境中反应10min;

[0108] 5) 检测步骤4) 产物的荧光强度。

[0109] 步骤1) 中所述包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体具体包括以下操作:

[0110] A) 取蛋白G,在酶标板上以0.04mol/L、pH9.4的碳酸盐缓冲液作为包被液,稀释蛋白G至18μg/mL,于0℃条件下静置8h;

[0111] B) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,而后取抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,利用所述包被液在酶标孔内稀释抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体至0.6μg/mL,于35℃条件下静置1h;

[0112] C) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,再加入牛血清白蛋白封闭液,于35℃封闭1h,而后弃去封闭液。

[0113] 步骤2) 所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>是通过以下方法制备的:

[0114] M) 配制黄曲霉毒素M<sub>1</sub>脲化物浓度为0.8mg/mL的四氢呋喃溶液,加入N-羟基丁二酰亚胺至浓度为1.8mg/mL,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐至浓度为3.6mg/mL,而后于避光条件下反应40min;

[0115] N) 而后以10000r/min离心15min进行固液分离,取上清挥发溶剂,取残留物溶解于二甲基甲酰胺中,即得到活化产物;

[0116] P) 将步骤N) 所述活化产物与含触酶C100浓度为3.5mg/mL的碳酸氢钠溶液混合,于避光条件下反应8h;

[0117] Q) 而后透析去除游离的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>脲化物,即得到所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>。

[0118] 步骤4) 所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点是通过以下方法制备的:配制含有8mmol/L硝酸镉、20mmol/L巯基丙酸、3mmol/L碲氢化钠的溶液即为前体溶液,所述前体溶液的pH为11,将所述前体溶液水浴加热至93℃,即得到所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0119] 步骤5) 中荧光强度的检测是利用酶标仪实现的,激发波长为310nm,发射波长为590nm。

[0120] 所述洗涤是利用洗涤液冲洗或浸泡,所述洗涤液是含有0.3% (v/v) 吐温-20的PBST溶液,所述PBST溶液的浓度为0.005mol/L,所述PBST溶液的pH为7.0。

[0121] 实施例4

[0122] 一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,该方法属于直接竞争酶联免疫法,该方法是针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>抗原的检测,该方法中用于标记抗原的酶是触酶C100。

[0123] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0124] 该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0125] 具体检测方法包括以下步骤:

[0126] 1) 包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,而后加入待测样品;

[0127] 2) 而后加入触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>,混合后于39℃避光环境中反应80min,洗涤;

[0128] 3) 而后加入浓度为12μmol/L的双氧水溶液混合,于39℃避光环境中反应40min;

[0129] 4) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于39℃避光环境中反应20min;

[0130] 5) 检测步骤4) 产物的荧光强度。

[0131] 步骤1) 中所述包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体具体包括以下操作:

[0132] A) 取蛋白G,在酶标板上以0.06mol/L、pH9.8的碳酸盐缓冲液作为包被液,稀释蛋白G至22μg/mL,于8℃条件下静置12h;

[0133] B) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,而后取抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,利用所述包被液在酶标孔内稀释抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体至1μg/mL,于39℃条件下静置3h;

[0134] C) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,再加入牛血清白蛋白封闭液,于39℃封闭3h,而后弃去封闭液。

[0135] 步骤2) 所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>是通过以下方法制备的:

[0136] M) 配制黄曲霉毒素M<sub>1</sub>脲化物浓度为1.2mg/mL的四氢呋喃溶液,加入N-羟基丁二酰

亚胺至浓度为2.2mg/mL,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐至浓度为4.4mg/mL,而后于避光条件下反应80min;

[0137] N) 而后以10000r/min离心15min进行固液分离,取上清挥发溶剂,取残留物溶解于二甲基甲酰胺中,即得到活化产物;

[0138] P) 将步骤N) 所述活化产物与含触酶C100浓度为4.5mg/mL的碳酸氢钠溶液混合,于避光条件下反应12h;

[0139] Q) 而后透析去除游离的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>衍化物,即得到所述触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>。

[0140] 步骤4) 所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点是通过以下方法制备的:配制含有12mmol/L硝酸镉、28mmol/L巯基丙酸、7mmol/L碲氢化钠的溶液即为前体溶液,所述前体溶液的pH为11.5,将所述前体溶液水浴加热至97℃,即得到所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0141] 步骤5) 中荧光强度的检测是利用酶标仪实现的,激发波长为310nm,发射波长为590nm。

[0142] 所述洗涤是利用洗涤液冲洗或浸泡,所述洗涤液是含有0.7% (v/v) 吐温-20的PBST溶液,所述PBST溶液的浓度为0.02mol/L,所述PBST溶液的pH为7.5。

[0143] 实施例5

[0144] 一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,该方法属于直接竞争酶联免疫法,该方法是针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>抗原的检测,该方法中用于标记抗原的酶是触酶C100。

[0145] 在以上技术方案的基础上满足以下条件:

[0146] 该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0147] 具体检测方法包括以下步骤:

[0148] 1) 包被抗黄曲霉毒素M<sub>1</sub>单克隆抗体,而后加入待测样品;

[0149] 2) 而后加入触酶C100标记的黄曲霉毒素M<sub>1</sub>,混合后于37℃避光环境中反应60min,洗涤;

[0150] 3) 而后加入浓度为10μmol/L的双氧水溶液混合,于37℃避光环境中反应60min;

[0151] 4) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于37℃避光环境中反应15min;

[0152] 5) 检测步骤4) 产物的荧光强度。

[0153] 实施例6

[0154] 一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,该方法属于直接竞争酶联免疫法,该方法是针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>抗原的检测,该方法中用于标记抗原的酶是触酶C100,该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0155] 实施例7

[0156] 一种针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>的检测方法,该方法属于直接竞争酶联免疫法,该方法是针对黄曲霉毒素M<sub>1</sub>抗原的检测,该方法中用于标记抗原的酶是触酶C100。

[0157] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

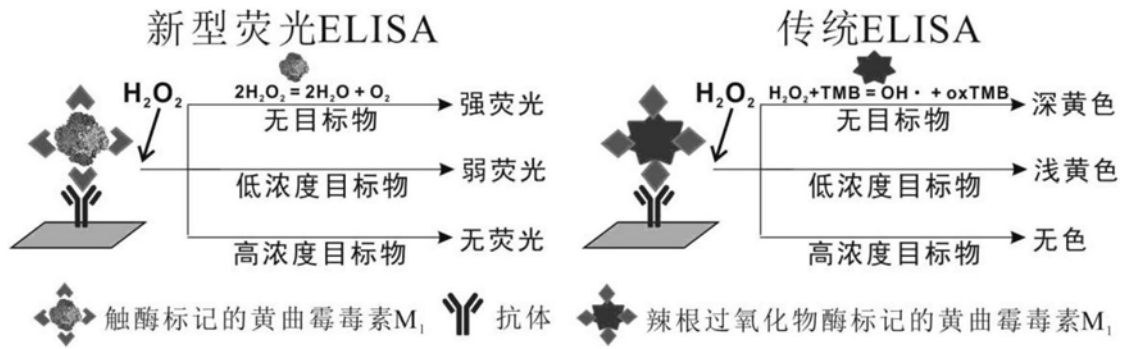


图1

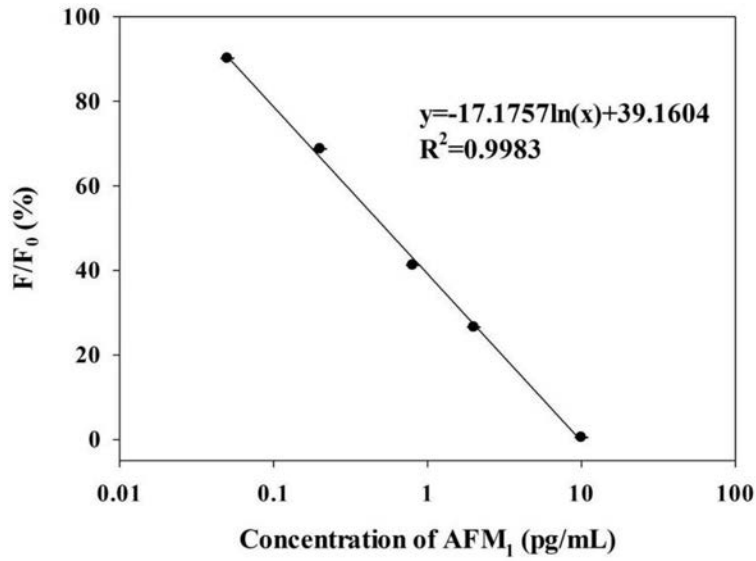


图2

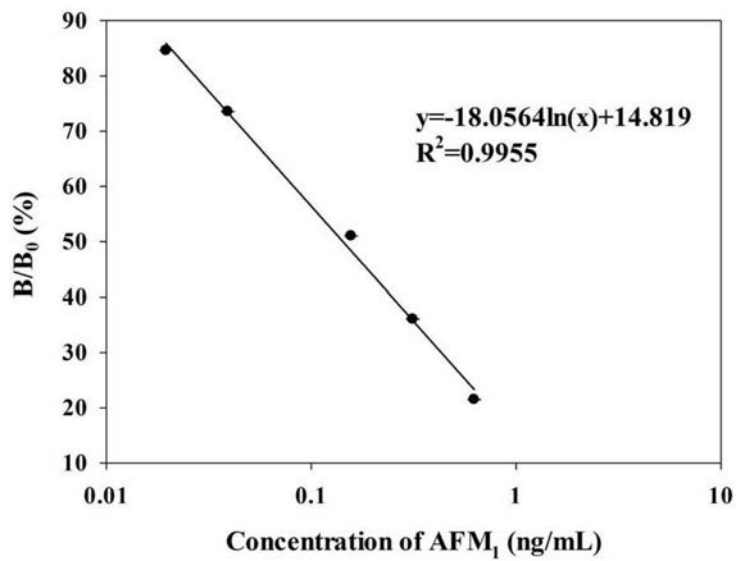


图3

专利名称(译)	一种针对黄曲霉毒素M1的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105759044B</a>	公开(公告)日	2017-12-15
申请号	CN201610156864.1	申请日	2016-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	熊勇华 江湖 黄小林 裴可 熊颖 许恒毅		
发明人	熊勇华 江湖 黄小林 裴可 熊颖 许恒毅		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN105759044A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种针对黄曲霉毒素M1的检测方法，该方法基于直接竞争ELISA技术，先将单抗包被后，加入待测样品和触酶C100标记的黄曲霉毒素M1，样品中的黄曲霉毒素M1与触酶标记的黄曲霉毒素M1竞争性的与酶标板上固定的单克隆抗体结合，通过触酶催化双氧水分解，降低对巯基丙酸修饰的碲化镉量子点的荧光淬灭，根据荧光强度来判断样品中黄曲霉毒素M1的含量。本发明创新性的引入了新的过氧化氢酶，在降低成本的同时提升了反应精度；与此同时，本发明使用了更为灵敏的新型荧光底物巯基丙酸修饰的碲化镉量子点，较传统的TMB底物发光灵敏性显著提升。

