



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113125728 A

(43)申请公布日 2021.07.16

(21)申请号 201911402008.X

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 镇江华维检测技术有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯经十  
五路99号11幢

(72)发明人 洪霞 杜霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒  
制备

(57)摘要

本发明为检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括:包被杂色曲霉毒素抗原的酶标板、杂色曲霉毒素标准品、杂色曲霉毒素抗体工作液、杂色曲霉毒素酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应,把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标板微孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液A、底物液B,在酶的作用下显色剂呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中杂色曲霉毒素的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测乳制品中杂色曲霉毒素的残留量。

1. 检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,包括酶标板、杂色曲霉毒素标准品、杂色曲霉毒素抗体工作液、杂色曲霉毒素酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。

2. 检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,包括以下步骤:酶标板的制备、杂色曲霉毒素标准品的制备、杂色曲霉毒素抗体工作液的制备、杂色曲霉毒素酶标二抗工作液的制备、底物液A的制备、底物液B的制备、终止液的制备、浓缩稀释液的制备和浓缩洗涤液的制备。

3. 根据权利要求2所述的检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其特征在于:所述的酶标板制备方法为将杂色曲霉毒素半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)偶联得到杂色曲霉毒素包被抗原,用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将包被抗原稀释成1:40000比例,100  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2 h,取出酶标板甩掉板内液体,加入稀释后的浓缩洗涤液300  $\mu$ L/孔,洗板2次,30 s/次,然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,150  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置1.5 h,弃去封闭液直接拍干,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干,抽检合格后将酶标板真空密封于4 $^{\circ}$ C条件下保存。

4. 根据权利要求2所述的检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其特征在于:杂色曲霉毒素标准品的浓度分别为0 mg/kg、0.1mg/kg、0.3 mg/kg、0.9 mg/kg、2.7 mg/kg、8.1 mg/kg。

5. 根据权利要求2所述的检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其特征在于:所述的杂色曲霉毒素抗体工作液是采用杂色曲霉毒素人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:60000比例制备。

6. 根据权利要求2所述的一种检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其特征在于:所述的杂色曲霉毒素酶标二抗工作液由酶标二抗加稀释液稀释成1:2000比例,所述底物液A为含有0.5 mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液,所述终止液为2 mol/L的硫酸,所述浓缩稀释液是10倍浓缩稀释液,其为0.1 mol/L的PBS,pH值范围7.0-7.5之间,所述浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液,其为含0.5%吐温-20,0.01 mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间。

7. 权利要求2所述的检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,基于抗原抗体的间接竞争酶联免疫反应原理,该方法的特征在于:预处理待测样品,取包被有杂色曲霉毒素抗原的酶标板,按序分别加入标准品/样本、杂色曲霉毒素酶标二抗工作液、杂色曲霉毒素抗体工作液各50  $\mu$ L/孔到对应的微孔中,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25 $^{\circ}$ C避光环境中反应30 min,将孔内液体甩干,用洗涤工作液充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,拍干后加入底物液A 50  $\mu$ L/孔,底物液B 50  $\mu$ 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15~20 min,加入终止液50  $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处或双波长450/630 nm检测,测定每孔吸光度值(请在5 min内读完数据),以的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中杂色曲霉毒素的含量。

## 一种检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒制备

### 技术领域

[0001] 本发明涉及兽药残留检测技术领域,特别是检测乳制品中杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] 杂色曲霉毒素(ST)是致癌性真菌毒素之一。其毒性虽弱于黄曲霉毒素,但由于主要的产毒菌杂色曲霉、构巢曲霉等在食品饲料中分布广,产毒比例高,故对人、畜、家禽的危害不容忽视。杂色曲霉毒素(Sterigmatocystin)主要是杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的最终代谢产物,同时又是黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus* Speare)合成黄血霉毒素过程后期的中间产物。据报道,感染了杂色曲霉的玉米在27℃的环境下,21天可产生杂色曲霉毒素12g/kg以上。杂色曲霉毒素的大鼠经口LD<sub>50</sub>以mg/kg体重计,雄性为166、雌性为120,小鼠为800以上。猴经腹腔注射LD<sub>50</sub>为32。由LD<sub>50</sub>值可看出,灵长类(猴)对杂色曲霉毒素的敏感性比啮齿类高。杂色曲霉毒素引起的致死性病变主要为肝、肾实质器官坏死。杂色曲霉毒素具有致癌性,还可使枯草杆菌及小鼠细胞发生突变反应。ST在自然界中广泛存在,因结构与黄曲霉毒素相似,因此其毒性和致癌性受到世界各国的高度重视。杂色曲霉毒素杂色曲霉毒素杂色曲霉毒素

酶联免疫吸附法是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选,近年来已广泛应用于食品安全检测行业。本发明旨在建立一种检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

### 发明内容

[0003] 为了克服色谱法的不足,本发明提供一种检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法。该方法灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的快速检测。

[0004] 本发明检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒,包括酶标板、杂色曲霉毒素标准品、杂色曲霉毒素抗体工作液、杂色曲霉毒素酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。

[0005] 本发明检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、杂色曲霉毒素标准品的制备、杂色曲霉毒素抗体工作液的制备、杂色曲霉毒素酶标二抗工作液的制备、底物液A的制备、底物液B的制备、终止液的制备、浓缩稀释液的制备和浓缩洗涤液的制备。

[0006] 其进一步特征在于:所述的酶标板经由杂色曲霉毒素抗原包被制备,具体步骤是将杂色曲霉毒素半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)偶联得到包被抗原,用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将杂色曲霉毒素包被抗原稀释成1:40000比例,100 μL/孔,37℃避光孵育2 h,取出酶标板甩掉板内液体,加入经稀释的浓缩洗涤液300 μL/孔,洗板2次,30 s/次,然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭液,150 μL/孔,37℃放置

1.5 h,甩掉封闭液直接拍干,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于4℃条件下保存。

[0007] 杂色曲霉毒素标准品浓度分别为0 mg/kg、0.1mg/kg、0.3 mg/kg、0.9 mg/kg、2.7 mg/kg、8.1 mg/kg。

[0008] 所述杂色曲霉毒素抗体工作液是采用杂色曲霉毒素人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:60000比例制备。

[0009] 所述杂色曲霉毒素酶标二抗工作液由酶标二抗加稀释液稀释成1:2000比例,所述底物液A为含有0.5 mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液,所述终止液为2 mol/L的硫酸,所述浓缩稀释液是10倍浓缩稀释液,为0.1 mol/L的PBS,pH值范围7.0-7.5之间,所述浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液,为含0.5% 吐温-20,0.1 mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间。

[0010] 检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法,基于抗原抗体的间接竞争酶联免疫反应原理,该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,并将其复溶于样品稀释液中;

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

(3) 取包被有杂色曲霉毒素抗原的酶标板,加标准品/样本50 μL/孔到对应的微孔中,加入杂色曲霉毒素酶标二抗工作液,50 μL/孔,然后加入杂色曲霉毒素抗体工作液,50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25℃避光环境中反应30 min;

(4) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液260 μL/孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,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);

(5) 加入底物液A 50 μL/孔,底物液B 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15~20 min;

(6) 加入终止液50 μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处或双波长450/630 nm检测,测定每孔吸光度值(请在5 min内读完数据);

(7) 以的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中杂色曲霉毒素的含量。

[0011] 本发明检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒及其检测方法的测定原理:样品中的杂色曲霉毒素与酶标板上固定的抗原特异性竞争抗体,加入酶标二抗,与抗体反应,通过酶催化显色剂显色,根据显色的深浅来判断样品中杂色曲霉毒素的含量。如果样品中的杂色曲霉毒素含量少,显色深;反之,则显色浅。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快速检测。

## 具体实施方式

[0012] 杂色曲霉毒素蛋白质偶联物的制备:

采用琥珀酸酐法得到带羧基的杂色曲霉毒素半抗原衍生物,之后取0.05 mmol与载体蛋白BSA按10:1的结合比混合在0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液(CBS)中,然后加入0.15 mmol碳二亚胺,搅拌置室温反应24 h,最后于0.2 mol/L pH 7.6的PBS缓冲液中透析

两天,除去未反应的半抗原,将得到的蛋白质偶联物溶液于-20℃保存备用。

[0013] 杂色曲霉毒素抗体的制备:

选用健康成年纯种BALA/C小鼠,取与蛋白质偶联制备的免疫抗原50μg与等量完全弗氏佐剂混合采用腹腔注射进行初次免疫,之后每隔3周用相同剂量免疫抗原加等量不完全弗氏佐剂采用腹腔注射进行二次、三次免疫,每次免疫6天后尾静脉采血测定抗血清效价至一定滴度后,用相同剂量不加佐剂进行末次免疫,3天后取脾制备脾细胞悬浮液与骨髓瘤细胞进行细胞融合,筛选出所需要的杂交瘤细胞系进行克隆化,选择处于对数生长期的杂交瘤细胞进行冻存,用于腹水制备,先腹腔注射0.5 ml液体石蜡于BALB/C鼠致敏,2周后腹腔注射 $1 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞,接种细胞7-10天后可产生腹水,待腹水尽可能多时用注射器抽取腹水,反复收集数次,4000 rpm离心15 min,收集上清,采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水对单克隆抗体进行纯化,冷冻干燥得冻干粉后于-20℃保存备用。

[0014] 制备包被有杂色曲霉毒素包被抗原的酶标板:

包被抗原是将杂色曲霉毒素半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)偶联得到的,用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将杂色曲霉毒素抗原稀释成1:40000比例,100 μL/孔,37℃放置2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液300 μL/孔,洗板2次,30 s/次,然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,150 μL/孔,37℃放置1.5 h,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。

[0015] 杂色曲霉毒素标准品配制浓度分别为0 mg/kg、0.1mg/kg、0.3 mg/kg、0.9 mg/kg、2.7 mg/kg、8.1 mg/kg。

[0016] 杂色曲霉毒素抗体工作液的制备:采用杂色曲霉毒素人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:60000比例制备。

[0017] 杂色曲霉毒素酶标二抗工作液由酶标二抗加稀释液稀释成1:2000比例,底物液A为含有0.5 mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液,终止液为2 mol/L的硫酸,浓缩稀释液是10倍浓缩稀释液,为0.1 mol/L的PBS,pH值范围7.0-7.5之间,浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液,为含0.5%吐温-20,0.01mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间。

[0018] 基于上述制备的试剂,本发明用于检测杂色曲霉毒素的酶联免疫试剂盒包括如下材料:

- (1) 96孔酶标板×1块;
- (2) 标准液×6瓶:(1mL/瓶) 0 mg/kg、0.1mg/kg、0.3 mg/kg、0.9 mg/kg、2.7 mg/kg、8.1 mg/kg;
- (3) 抗体工作液 7 mL;
- (4) 酶标二抗工作液 7 mL;
- (5) 底物液A 7 mL;
- (6) 底物液B 7 mL;
- (7) 终止液 7 mL;
- (8) 10×浓缩稀释液 40 mL;
- (9) 10×浓缩洗涤液 40 mL;

本发明的试剂盒用于检测乳制品样本中杂色曲霉毒素残留量时,通过以下步骤实施:样品预处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0019] (1) 用本发明试剂盒检测待测样品中杂色曲霉毒素残留量

取包被有杂色曲霉毒素抗原的酶标板,加标准品/样本50  $\mu\text{L}$ /孔到对应的微孔中;加入酶标二抗工作液,50  $\mu\text{L}$ /孔,然后加入杂色曲霉毒素抗体工作液,50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液300  $\mu\text{L}$ /孔,充分洗涤4次,浸泡15-30 s,用吸水纸拍干;加入底物液A 50  $\mu\text{L}$ /孔,底物液B 50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应15 min;加入终止液50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处或双波长450/630 nm检测,测定每孔吸光度值(请在5 min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杂色曲霉毒素残留量。

[0020] (2) 分析结果

百分吸光度值的计算,标准品或样本的百分吸光度值等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0标准)的吸光度值,再乘以100%,即

$$\text{百分吸光度值}(\%) = B/B_0 \times 100\%$$

其中B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, $B_0$ —0 ppb标准溶液的平均吸光度值。

[0021] 以杂色曲霉毒素的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,求出直线方程。将样本的百分吸光度值代入标准曲线中,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杂色曲霉毒素的实际浓度。