



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102746403 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 24

(21) 申请号 201210117617. 2

*C07K 16/06* (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 04. 20

*G01N 33/53* (2006. 01)

### (83) 生物保藏信息

CCTCC NO. C201014 2010. 07. 13

CCTCC NO. 201017 2010. 07. 13

(71) 申请人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二路  
2号

(72) 发明人 李培武 管笛 张奇 张文

丁小霞

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限

公司 42102

代理人 乔宇

(51) Int. Cl.

*C07K 16/42* (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 14 页

序列表 4 页 附图 5 页

### (54) 发明名称

用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物、其制备方法及其黄曲霉毒素 ELISA 检测方法

### (57) 摘要

本发明涉及用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物、其制备方法及其黄曲霉毒素 ELISA 检测方法。用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物,其特征在于:它为可识别各鼠源抗黄曲霉毒素单克隆抗体的兔抗鼠抗体。它是以鼠源抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体、抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体作为混合抗原,经免疫新西兰长耳大白兔,颈动脉取血,血清亲和纯化后获得。该标准品通用替代物无毒无害,可分别通过替代黄曲霉毒素 ELISA 检测方法中各相应黄曲霉毒素标准品来定量检测样品中的各相应黄曲霉毒素浓度。

1. 用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物,其特征在于:它为可识别各鼠源抗黄曲霉毒素单克隆抗体的兔抗鼠抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物,其特征在于:所述抗黄曲霉毒素单克隆抗体为抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体、抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物的制备方法,其特征在于:它是以鼠源抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体、抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体作为混合抗原,经免疫新西兰长耳大白兔,颈动脉取血,血清亲和纯化后获得的。

4. 根据权利要求 3 所述的用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物的制备方法,其特征在于:所述的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体为由保藏编号为 CCTCC NO. C201014 的杂交瘤细胞株 3G1 分泌产生的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体 3G1;所述的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体为由保藏编号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 分泌产生的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体 2C9,所述的抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体 1C8 为由保藏编号为 CCTCC NO. C201017 的杂交瘤细胞株 1C8 分泌产生的抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体 1C8;所述抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体 3G1,抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体 2C9 和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体 1C8 为等摩尔量配比作混合抗原。

5. 用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物在黄曲霉毒素 ELISA 检测中的应用。

6. 黄曲霉毒素 ELISA 检测方法,其特征在于:它包括以下步骤:

(1) 采用常规间接竞争 ELISA 方法,将标准品通用替代物取代各黄曲霉毒素标准品,分别建立各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $a(x_1, y_1)$ ,

—— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度, $y_1$  为抑制率;

(2) 采用常规间接竞争 ELISA 方法,测定待测样品的抑制率;

(3) 将步骤(2)得到的待测样品抑制率相应代入步骤(1)的曲线方程中,然后将计算得到的各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度结果代入各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , —— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度, $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度——,计算得到待测样品中各相应黄曲霉毒素的浓度。

7. 根据权利要求 6 所述的黄曲霉毒素 ELISA 检测方法,其特征在于:所述步骤(3)为:相应结合各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 分析曲线方程  $a(x_1, y_1)$ , —— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度, $y_1$  为抑制率——,和各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , —— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度, $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度——,得到:在标准品通用替代物做 ELISA 标准分析曲线下抑制率与各相应黄曲霉毒素浓度的曲线方程  $e(y_1, x_2)$ , —— $y_1$  为抑制率, $x_2$  为各相应黄曲霉毒素浓度;

将步骤(2)得到的待测样品抑制率代入上述曲线方程  $e(y_1, x_2)$ ,计算得到待测样品中各相应黄曲霉毒素的浓度。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的黄曲霉毒素 ELISA 检测方法,其特征在于:所述步骤(3)

中的各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ ，—— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度， $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度——，是采用以下方法得到的：

①采用常规间接竞争 ELISA 方法分别建立各相应黄曲霉毒素标准品的 ELISA 标准分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$ ，—— $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度， $y_2$  为抑制率；

②采用常规间接竞争 ELISA 方法，将标准品通用替代物替代各相应黄曲霉毒素标准品，分别建立各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ ，—— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度， $y_1$  为抑制率；

③相应结合各相应黄曲霉毒素标准品分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$  和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ ，得到各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ ，—— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度， $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度。

9. 根据权利要求 8 所述的黄曲霉毒素 ELISA 检测方法，其特征在于：所述步骤③为：相应结合各相应黄曲霉毒素标准品分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$ ，—— $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度， $y_2$  为抑制率——，和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ ，—— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度， $y_1$  为抑制率——，计算 20% ~ 80% 的抑制率范围内同一抑制率所对应的各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度，然后以各相应黄曲霉毒素标准品浓度  $x_2$  为横坐标，各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度  $x_1$  为纵坐标，分别作图拟合而得到各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ ，—— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度， $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度。

10. 根据权利要求 6 或 7 所述的黄曲霉毒素 ELISA 检测方法，其特征在于：所述的常规间接竞争 ELISA 法中抑制率的测定方法如下：取包被各黄曲霉毒素相应的黄曲霉毒素完全抗原的微孔包被板，加入各黄曲霉毒素相应的抗黄曲霉毒素单克隆抗体，然后加入待测样品或各相应黄曲霉毒素标准品或标准品通用替代物，反应后，洗涤液洗涤，加酶标记羊抗鼠二抗，进行标记免疫反应，洗涤液洗涤后，加显色液，暗处静置后加终止液，在 450 nm 下测定光吸收值，根据待测孔光吸收值为 B，对照孔的光吸收值为  $B_0$ ，计算抑制率为  $B/B_0$ 。

11. 根据权利要求 6 或 7 所述的黄曲霉毒素 ELISA 检测方法，其特征在于：所述各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ ，—— $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度， $y_1$  为抑制率——的建立中，各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度布设范围为 0.4-100  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物、其制备方法 及黄曲霉毒素 ELISA 检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属黄曲霉毒素检测领域,具体涉及用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物、其制备方法及黄曲霉毒素 ELISA 检测方法。

### 背景技术

[0002] 黄曲霉毒素主要是由黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉菌(*Aspergillus parasiticus*)和集蜂曲霉菌(*Aspergillus nonius*)产生的一组高毒和强致癌的次生代谢产物,主要有黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>),黄曲霉毒素 M1 (Aflatoxin M<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub>),黄曲霉毒素 G1 (Aflatoxin G<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>)。其广泛存在于各种农产品、食品和饲料中,严重污染花生、稻米、玉米、小麦等粮油产品,极大威胁人民的身体健康和生命安全。由于黄曲霉毒素对人类的潜在威胁日趋严重,世界上已有 100 多个国家对农产品食品中黄曲霉毒素的含量进行了严格的限量要求。因此迫切需要操作简单、快速、高通量的检测技术对污染物进行监控、检测。免疫学检测技术具有灵敏度高、样品前处理简单、操作方便的特点。其中酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)具有检测通量高、样品需要量少的优点,已广泛应用于食品及农产品中黄曲霉毒素的检测。由于 ELISA 法定量时需要竞争反应和标准曲线,检测过程中需应用大量黄曲霉毒素标准品进行质控,且检测不同的黄曲霉毒素需要不同的黄曲霉毒素标准品。并且,这些高毒强致癌物质的使用会对操作人员和环境带来极大的危害,且因价格昂贵、供应紧张,经常影响检测过程的进行。因此急需一种安全、低成本的 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物会大大降低检测过程的风险,简化检测步骤。

### 发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是提供用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物、其制备方法及黄曲霉毒素 ELISA 检测方法。该标准品通用替代物无毒无害,可分别通过替代黄曲霉毒素 ELISA 检测方法中的各相应黄曲霉毒素标准品来定量检测样品中各相应黄曲霉毒素浓度。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:

用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物,其特征在于:它为可识别各鼠源抗黄曲霉毒素单克隆抗体的兔抗鼠抗体。

[0005] 按上述方案,所述抗黄曲霉毒素单克隆抗体优选为抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体、抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体。

[0006] 用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物的制备方法,其特征在于:它是以鼠源抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体、抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体作为混合抗原,经免疫新西兰长耳大白兔,颈动脉取血,血清亲和纯化后获得的。

[0007] 按上述方案,所述的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体为由保藏编号为 CCTCC NO.

C201014 的杂交瘤细胞株 3G1 分泌产生的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体 3G1 ;所述的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体为由保藏编号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 分泌产生的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体 2C9,所述的抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体 1C8 为由保藏编号为 CCTCC NO. C201017 的杂交瘤细胞株 1C8 分泌产生的抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体 1C8 ;所述抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体 3G1,抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体 2C9 和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体 1C8 为等摩尔量配比作混合抗原。

[0008] 用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物在黄曲霉毒素 ELISA 检测中的应用。

[0009] 黄曲霉毒素 ELISA 检测方法,其特征在于 :它包括以下步骤 :

(1) 采用常规间接竞争 ELISA 方法,将标准品通用替代物取代各黄曲霉毒素标准品,分别建立各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $a(x_1, y_1)$ ,

——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $y_1$  为抑制率 ;

(2) 采用常规间接竞争 ELISA 方法,测定待测样品的抑制率 ;

(3) 将步骤(2)得到的待测样品抑制率相应代入步骤(1)的曲线方程中,然后将计算得到的各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度结果代入各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , ——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度——,计算得到待测样品中各相应黄曲霉毒素的浓度。

[0010] 按上述方案,所述步骤(3)为 :相应结合各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 分析曲线方程  $a(x_1, y_1)$ , ——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $y_1$  为抑制率——,和各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , ——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度——,得到 :在标准品通用替代物做 ELISA 标准分析曲线下抑制率与各相应黄曲霉毒素浓度的曲线方程  $e(y_1, x_2)$ , ——  $y_1$  为抑制率,  $x_2$  为各相应黄曲霉毒素浓度 ;

将步骤(2)得到的待测样品抑制率代入上述曲线方程  $e(y_1, x_2)$ ,计算得到待测样品中各相应黄曲霉毒素的浓度。

[0011] 按上述方案,所述步骤(3)中的各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , ——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度——,是采用以下方法得到的 :

①采用常规间接竞争 ELISA 方法分别建立各相应黄曲霉毒素标准品的 ELISA 标准分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$ , ——  $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度,  $y_2$  为抑制率 ;

②采用常规间接竞争 ELISA 方法,将标准品通用替代物替代各相应黄曲霉毒素标准品,分别建立各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ , ——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $y_1$  为抑制率 ;

③相应结合各相应黄曲霉毒素标准品分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$  和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ ,得到各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , ——  $x_1$  为各相应黄

曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度。

[0012] 所述各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$  是恒定不变的, 在后续检测实验中无需重新建立。

[0013] 按上述方案, 所述步骤③为: 相应结合各相应黄曲霉毒素标准品分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$ , ——  $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度,  $y_2$  为抑制率——, 和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ , ——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $y_1$  为抑制率——, 计算 20% ~ 80% 的抑制率范围内同一抑制率所对应的各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度, 然后以各相应黄曲霉毒素标准品浓度  $x_2$  为横坐标, 各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度  $x_1$  为纵坐标, 分别作图拟合而得到各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , ——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $x_2$  为各相应黄曲霉毒素标准品的浓度。

[0014] 按上述方案, 所述的常规间接竞争 ELISA 法中抑制率的测定方法如下: 取包被各黄曲霉毒素相应的黄曲霉毒素完全抗原的微孔包被板, 加入各黄曲霉毒素相应的抗黄曲霉毒素单克隆抗体, 然后加入待测样品或各相应黄曲霉毒素标准品或标准品通用替代物, 反应后, 洗涤液洗涤, 加酶标记羊抗鼠二抗, 进行标记免疫反应, 洗涤液洗涤后, 加显色液, 暗处静置后加终止液, 在 450 nm 下测定光吸收值, 根据待测孔光吸收值为 B, 对照孔的光吸收值为  $B_0$ , 计算抑制率为  $B/B_0$ 。

[0015] 按上述方案, 所述各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ , ——  $x_1$  为各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度,  $y_1$  为抑制率——的建立中, 各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物的浓度布设范围为 0.4-100  $\mu\text{g/mL}$ 。

[0016] 以待测样品中黄曲霉毒素 B1 测量为例, 黄曲霉毒素 B1 的 ELISA 典型检测方法为:

(1) 黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$  的建立,  $x_1$  为标准品通用替代物的浓度,  $x_2$  为黄曲霉毒素 B1 标准品的浓度;

(1.1) 采用常规间接竞争 ELISA 方法建立黄曲霉毒素 B1 标准品的 ELISA 标准分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$ , ——  $x_2$  为黄曲霉毒素 B1 标准品的浓度,  $y_2$  为抑制率;

(1.2) 采用常规间接竞争 ELISA 方法, 将标准品通用替代物取代黄曲霉毒素 B1 标准品, 建立黄曲霉毒素 B1 相应的标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ , ——  $x_1$  为标准品通用替代物的浓度,  $y_1$  为抑制率;

(1.3) 结合黄曲霉毒素 B1 标准品分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$  和其相应的标准品通用替代物 ELISA 分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ , 计算 20% ~ 80% 的抑制率范围内同一抑制率所对应的黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度, 然后以黄曲霉毒素 B1 标准品浓度  $x_2$  为横坐标, 标准品通用替代物浓度  $x_1$  为纵坐标, 作图拟合而得相应的黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , ——  $x_1$  为标准品通用替代物的浓度,  $x_2$  为黄曲霉毒素 B1 标准品;

(2) 采用常规间接竞争 ELISA 方法, 将标准品通用替代物取代黄曲霉毒素 B1 标准品, 建立黄曲霉毒素 B1 相应的标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $a(x_1, y_1)$ , ——  $x_1$  为标准品通用替代物的浓度,  $y_1$  为抑制率;

(3) 结合标准品通用替代物 ELISA 分析曲线方程  $a(x_1, y_1)$ , ——  $x_1$  为标准品通用替

代物的浓度,  $y_1$  为抑制率——, 和黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度的换算方程  $b(x_1, x_2)$ , ——  $x_1$  为标准品通用替代物的浓度,  $x_2$  为黄曲霉毒素 B1 标准品的浓度——, 得到在标准品通用替代物做 ELISA 标准分析曲线下抑制率与黄曲霉毒素 B1 浓度的曲线方程  $e(y_1, x_2)$ , ——  $y_1$  为抑制率,  $x_2$  为黄曲霉毒素 B1 浓度;

(4) 采用常规间接竞争 ELISA 法, 测定待测样品的抑制率;

(5) 将步骤(4)得到的待测样品抑制率代入上述曲线方程  $e(y_1, x_2)$ , 计算得到待测样品中黄曲霉毒素 B1 的浓度。

[0017] 在待测样品中黄曲霉毒素 B1 的首次检测中, 步骤(2)中的标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $a(x_1, y_1)$  可直接采取步骤(1.2)得到的标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程  $d(x_1, y_1)$ , 无需重复。在后续检测分析中, 因黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程是恒定不变的, 可直接采用预先建立的黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程  $b(x_1, x_2)$ , 而无需为获得黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程重新建立黄曲霉毒素 B1 标准品的 ELISA 标准分析曲线方程  $c(x_2, y_2)$ , 减少了黄曲霉毒素 B1 标准品使用环节, 降低黄曲霉毒素 B1 标准品的使用对环境造成的危害, 降低检测成本, 简化操作步骤。其它黄曲霉毒素的分析检测亦如此。

[0018] 传统的竞争性 ELISA 定量模式是基于样品中游离黄曲霉毒素与包被于酶标板上的固定黄曲霉毒素抗原竞争结合抗黄曲霉毒素单克隆抗体, 样品中的游离黄曲霉毒素越多, 与黄曲霉毒素单克隆抗体竞争结合越多, 留在酶标板上与固定抗原结合的抗黄曲霉毒素单克隆抗体越少, 则可结合在抗黄曲霉毒素单克隆抗体上的酶标二抗也越少, 最终显色程度越弱。

[0019] 本发明基于的工作模式为标准品通用替代物与酶标二抗竞争结合抗黄曲霉毒素单克隆抗体, 标准品通用替代物越多, 最终结合到抗黄曲霉毒素单克隆抗体上的酶标二抗就越少, 显色反应时酶越少, 显色程度越弱。由此可知, 标准品通用替代物与黄曲霉毒素标准品之间存在着正相关的关系, 只要探明二者之间量的对应关系, 即可将标准品通用替代物替代黄曲霉毒素标准品进行 ELISA 分析曲线的校准, 检测黄曲霉毒素含量。由于标准品通用替代物为黄曲霉毒素单克隆抗体的非标记二抗, 其可识别各抗黄曲霉毒素单克隆抗体包括抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体、抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体, 因此该标准品通用替代物能够应用于基于各黄曲霉毒素的 ELISA 检测方法中包括黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 M1 和抗黄曲霉毒素 G1, 具有通用性。

[0020] 本发明的有益效果在于:

(1) 该黄曲霉毒素的标准品通用替代物的本质是一种抗体, 无毒, 对人体无害, 成本低;

(2) 在黄曲霉毒素检测中, 应用该标准品通用替代物进行 ELISA 分析曲线校准, 减少了剧毒强致癌的各相应黄曲霉毒素标准品使用环节, 有利于保护操作人员身体不受黄曲霉毒素标准品的侵害; 降低各相应黄曲霉毒素标准品的使用对环境造成的危害; 降低检测成本;

(3) 基于该标准品通用替代物的 ELISA 检测方法具有通用性, 可用于检测各种黄曲霉毒素, 如黄曲霉毒素 B1、G1 和 M1。

## 附图说明

[0021] 图 1 各相应黄曲霉毒素标准品 ELISA 标准分析曲线, 图中: - ■ - AFB1; - ▼ - AFG1; - ● - AFM1;

图 2 各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线, 图中: - ■ - mab: 3G1; - ▼ - mab: 2C9; - ● - mab: 1C8;

图 3 黄曲霉毒素 B1 标准品浓度与标准品通用替代物浓度间的对应关系曲线;

图 4 黄曲霉毒素 G1 标准品浓度与标准品通用替代物浓度间的对应关系曲线;

图 5 黄曲霉毒素 M1 标准品浓度与标准品通用替代物浓度间的对应关系曲线。

## 具体实施方式

### [0022] 实施例 1 标准品通用替代物的制备

1. 杂交瘤细胞株 3G1, 该细胞株已于 2010 年 7 月 13 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 保藏地址是, 中国, 武汉, 武汉大学, 保藏编号为 CCTCC NO. C201014。其筛选方法, 抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及其亚型特性如下:

#### (1) 杂交瘤细胞株 3G1 的筛选

##### ① 抗原合成及动物免疫

购买市售黄曲霉毒素 B1 标准品进行完全抗原合成, 具体合成步骤如下: 将 4 mg AFB1 溶于 2 mL 丙酮, 加入 40  $\mu$ L 10%  $H_2SO_4$ , 混合物在 56  $^{\circ}C$  搅拌反应 4 h; 产物蒸干后, 加入 5 mL 的  $H_2O$ , 用 25 mL 氯仿提取两次, 然后用 20 mL  $H_2O$  洗涤有机层, 保留有机层; 蒸去有机溶剂, 得黄色固体产物。取 1.0 mg 产物, 向其中加入 2 mL 0.5% BSA 溶液(4 mL PBS(磷酸盐缓冲液, pH7.4) 溶解 20 mg BSA) 37  $^{\circ}C$  反应 30 min; 加入 100  $\mu$ L 6.5 mM  $NaBH_4$ , 4 $^{\circ}C$  反应 30 min; 加入 50  $\mu$ L 0.1M HCl, 除去过量的  $NaBH_4$ 。在 4 $^{\circ}C$  条件下, PBS 溶液(磷酸盐缓冲液, pH7.4) 透析 3d, 除去 AFB1 及 AFB<sub>2a</sub>, 最后进行常规紫外扫描法鉴定, 鉴定结果表明制备得到了黄曲霉毒素 B1 完全抗原 AFB<sub>2a</sub>-BSA。

[0023] 购买 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 6 只, 免疫自行合成的黄曲霉毒素 B1 完全抗原 AFB<sub>2a</sub>-BSA。第一次免疫将完全抗原 AFB<sub>2a</sub>-BSA 与等量福氏完全佐剂混合乳化, 然后小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于首免 4 周后进行, 采用福氏不完全佐剂与等体积完全抗原 AFB<sub>2a</sub>-BSA 乳化, 小鼠腹腔注射。第三次免疫与第二次免疫间隔时间 4 周, 免疫方式及剂量与第二次相同, 第四次免疫于第三次免疫 3 周后进行, 免疫方式及免疫剂量与第二次免疫相同, 每次免疫剂量为每鼠 50  $\mu$ g。前 3 次每次免疫后一周, 尾静脉采血, 分离血清, 采用间接 ELISA 法监测小鼠血清抗体效价。第 4 次免疫后一周, 尾静脉采血, 分离血清, 采用间接 ELISA 法监测小鼠血清抗体效价, 并用间接竞争 ELISA 法测定小鼠血清灵敏度, 选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行最后一次加强免疫, 免疫剂量为之前的 2 倍。AFB1 购于 Sigma-Aldrich 公司。

##### [0024] ② 细胞融合

最后一次加强免疫 3 天后, 采用 50% (重量百分数) 的聚乙二醇即 PEG (分子量为 1450) 作融合剂, 按常规方法进行细胞融合, 具体步骤如下:

颈椎脱臼法处死免疫小鼠, 在无菌条件下取脾脏, 分离脾细胞, 与鼠源骨髓瘤细胞

SP2/0 以 5 : 1 的个数比混合,用 RPMI-1640 基础培养液洗混合细胞,然后用 50%PEG 融合,融合时间 1 分钟,然后加满 RPMI-1640 基础培养液,离心,移去上清,小鼠脾细胞和鼠源骨髓瘤细胞 SP2/0 形成的融合细胞用 72mL RPMI-1640 基础培养液重悬,将重悬起来的细胞滴加到 96 孔细胞培养板内,2 滴 / 孔,置 37℃ 二氧化碳培养箱培养,所述的 RPMI-1640 基础培养液为含有 20% (体积百分数) 胎牛血清,2% (重量百分数) 生长因子和 1% (重量百分数) 次黄嘌呤 - 氨基蝶呤 - 胸腺嘧啶核苷。上述 SP2/0 购于上海泛柯生物科技有限公司; RPMI-1640 基础培养液购于 Hyclone 公司;1% 次黄嘌呤 - 氨基蝶呤 - 胸腺嘧啶核苷(HAT) 购于 Sigma-Aldrich 公司。

### [0025] ③细胞株的筛选及克隆

待细胞融合后第 12 天左右,细胞集落长到占孔底 1/2 面积大小,培养液变黄,即可进行抗体检测。采用 ELISA 方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选,筛选分两步进行,第一步采用间接 ELISA 法筛选出抗黄曲霉毒素 B1 而不抗载体蛋白 BSA 的阳性孔;第二步采用间接竞争 ELISA 法对第一步筛选出的阳性孔进行检测,用黄曲霉毒素 B1 作为竞争原,选择吸光值和灵敏度均较高的孔(吸光值较高指竞争原为 0 的孔即阴性对照孔的最终测定值较高,灵敏度较高指抑制率为 50% 时的竞争原浓度亦即  $IC_{50}$  值较小),采用有限稀释法进行克隆,克隆后 10 天左右采用同样的两步法进行检测,如此重复克隆 2-3 次后,获得杂交瘤细胞株 3G1。

### [0026] (2) 抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体杂交瘤细胞株系 3G1 抗体可变区序列测定

①提取总 RNA:采用天根公司的总 RNA 提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株系 3G1 的总 RNA;

②合成 cDNA:以步骤 1 获得的总 RNA 为模板,oligo (dT)<sub>15</sub> 为引物,按照 SuperScript™-2 II 反转录酶说明书进行反转录,合成 cDNA 第一链;引物 oligo (dT)<sub>15</sub> 由 Invitrogen 购得;

③PCR 法克隆可变区基因:根据 GENE BANK 中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以 cDNA 为模版扩增抗体轻、重链可变区基因。PCR 程序为:94℃ 30s、55℃ 1min、72℃ 1min,扩增 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经过 1% (重量百分数) 的琼脂糖凝胶电泳分离后,用试剂盒纯化回收 DNA 片段,连接到载体 pMD18-T 中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取阳性克隆,送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序。其中引物的序列分别为:重链可变区引物为 5'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3'(22mer) 和 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3'(32mer) 其中 S、M、R 和 W 为兼并碱基,M=A/C,R=A/G,S=C/G,W=A/T,轻链可变区引物为 5'-GAC ATT GAG CTC ACC CAG CTT GGT GCC -3'(24mer) 和 5'-CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC-3'(24mer)。

[0027] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长 347bp,序列如 SEQ ID NO:1 所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由 115 个氨基酸组成,序列如 SEQ ID NO:3 所示。轻链可变区编码基因序列长 338bp,序列如 SEQ ID NO:2 所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由 110 个氨基酸组成,序列如 SEQ ID NO:4 所示。

### [0028] (3) 抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备、亚型及特性鉴定:

将抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体杂交瘤细胞株系 3G1 注射预先用福氏不完全佐剂处理

过的 BALB/c 小鼠,收集该小鼠的腹水,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,具体操作为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,4℃,12000r/min 离心 15min,吸取上清,将所得腹水上清与 4 倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为 33 μL,室温混合 30min,4℃静置 2h,然后 4℃,12000r/min 离心 30min,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入 1/10 滤液体积的摩尔浓度为 0.1mol/L 和 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,用 2 mol/L 的氢氧化钠溶液调节该混合液的 pH 值至 7.4,4℃预冷,缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为 0.277g/mL,4℃静置 2h,然后 4℃,12000r/min 离心 30min,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积 1/10 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,对纯水透析,将充分透析好的蛋白溶液置 -70℃冰箱冷冻,之后用冷冻干燥机冻干,收集冻干粉,即得纯化好的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体,将抗体置 -20℃冰箱中备用;

所述的醋酸盐缓冲液为 0.29g 醋酸钠,0.141mL 醋酸加水定容至 100mL 所得;所述的 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液为 0.8g 氯化钠,0.29g 十二水磷酸氢二钠,0.02g 氯化钾,磷酸二氢钾 0.02g,加水定容至 100mL 所得。

[0029] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株 3G1 分泌的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的亚型为 IgG<sub>2a</sub>。

[0030] 用常规非竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)法测得 3G1 的鼠腹水抗体的效价可达  $6.4 \times 10^6$ ,即鼠腹水抗体稀释  $6.4 \times 10^6$  倍时的溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争 ELISA 法鉴定其对黄曲霉毒素 B1 的灵敏度为 1.6ng/mL,与黄曲霉毒素 B2 交叉反应率为 6.4%,黄曲霉毒素 G1 与 G2 的交叉反应率均小于 1%。

[0031] 2. 杂交瘤细胞株 1C8,该细胞株已于 2010 年 7 月 13 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址是,中国,武汉,武汉大学,保藏编号为 CCTCC NO. C201017。其筛选方法,抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及其亚型特性如下:

#### (1) 杂交瘤细胞株 1C8 的制备

##### ① 抗原合成及动物免疫

购买市售黄曲霉毒素 G1 标准品,根据 CN101270146.X 中的具体实施方式的实施例 1 中公开的 AFG1-BSA 的合成方法进行 AFG1-BSA 完全抗原的合成;

购买 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 6 只,免疫自行合成的黄曲霉毒素 G1 完全抗原 AFG1-BSA。第一次免疫将完全抗原 AFG1-BSA 与等量福氏完全佐剂混合乳化,然后小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于首免 4 周后进行,采用福氏不完全佐剂与等体积完全抗原 AFG1-BSA 乳化,小鼠腹腔注射。第三次免疫与第二次免疫间隔时间 4 周,免疫方式及剂量与第二次相同,第四次免疫于第三次免疫 3 周后进行,免疫方式及免疫剂量与第二次免疫相同,每次免疫剂量为每鼠 50 μg。前 3 次每次免疫后一周,尾静脉采血,分离血清,采用间接 ELISA 法监测小鼠血清抗体效价。第 4 次免疫后一周,尾静脉采血,分离血清,采用间接 ELISA 法监测小鼠血清抗体效价,并用间接竞争 ELISA 法测定小鼠血清灵敏度,选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行最后一次加强免疫,免疫剂量为之前的 2 倍。

##### [0032] ② 细胞融合

于最后一次加强免疫 3 天后,采用 50%(重量百分数)的聚乙二醇即 PEG(分子量为 1450)作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤:无菌条件下杀死免疫小鼠,分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞 SP2/0 以 5 : 1 的个数比混合,用 RPMI-1640 基础培养液洗混合细胞,用

50%PEG 融合,融合 1 分钟,然后加满 RPMI-1640 基础培养液,离心,移去上清,小鼠脾细胞和鼠源骨髓瘤细胞 SP2/0 形成的融合细胞用 72mLRPMI-1640 基础培养液重悬,将重悬起来的细胞滴加到 96 孔细胞培养板内,2 滴 / 孔,置 37℃二氧化碳培养箱培养,所述的 RPMI-1640 基础培养液为含有 20% (体积百分数) 胎牛血清,2% (重量百分数) 生长因子和 1% (重量百分数) 次黄嘌呤 - 氨基蝶呤 - 胸腺嘧啶核苷即 HAT。上述 SP2/0 购于上海泛柯生物科技有限公司 ;RPMI-1640 基础培养液购于 Hyclone 公司 ;1% 次黄嘌呤 - 氨基蝶呤 - 胸腺嘧啶核苷即 HAT 购于 Sigma-Aldrich 公司。

[0033] ③细胞株的筛选及克隆待细胞融合后第 12 天左右,细胞集落长到占孔底 1/2 大小,培养液变黄,即可进行抗体检测。采用 ELISA 方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选,筛选分两步进行,第一步采用间接 ELISA 法筛选出抗黄曲霉毒素 G1 而不抗载体蛋白 BSA 的阳性孔 ;第二步采用间接竞争 ELISA 法对第一步筛选出的阳性孔进行检测,用黄曲霉毒素 G1 作为竞争原,选择吸光值和灵敏度均较高的孔(吸光值较高指竞争原为 0 的孔即阳性对照孔的最终测定值较高,灵敏度较高指抑制率为 50% 时的竞争原浓度亦即  $IC_{50}$  值较小),采用有限稀释法进行克隆,克隆后 10 天左右采用同样的两步法进行检测,如此重复克隆 2-3 次后,获得杂交瘤细胞株 1C8。

[0034] (2) 抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体杂交瘤细胞株系 1C8 抗体可变区序列测定

①提取总 RNA :采用天根公司的总 RNA 提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株系 1C8 的总 RNA ;

②合成 cDNA :以步骤 1 获得的总 RNA 为模板,oligo (dT) <sub>15</sub> 为引物,按照 SuperScript™-2 II 反转录酶说明书进行反转录,合成 cDNA 第一链 ;引物 oligo (dT) <sub>15</sub> 由 Invitrogen 购得 ;

③PCR 法克隆可变区基因 :根据 GENE BANK 中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以 cDNA 为模版扩增抗体轻、重链可变区基因。PCR 程序为 :94℃ 30s、55℃ 1min、72℃ 1min,扩增 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经过 1% (重量百分数) 的琼脂糖凝胶电泳分离后,用试剂盒纯化回收 DNA 片段,连接到载体 pMD18-T 中,转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$  感受态细胞,挑取阳性克隆,送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序。其中引物的序列分别为 :重链可变区引物为 5'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3' (22mer) 和 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3' (32mer) 其中 S、M、R 和 W 为兼并碱基,M=A/C,R=A/G,S=C/G,W=A/T,轻链可变区引物为 5'-GAC ATT GAG CTC ACC CAG CTT GGT GCC -3' (24mer) 和 5'-CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC-3' (24mer)。

[0035] 得到的基因序列结果 :轻链可变区编码基因序列长 332bp,序列如 SEQ ID NO:1 所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由 110 个氨基酸组成,序列如 SEQ ID NO:3 所示。重链可变区编码基因序列长 362bp,序列如 SEQ ID NO:2 所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由 120 个氨基酸组成,序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0036] (3) 抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体的制备纯化、亚型和特性鉴定

将实施例 2 获得的抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体杂交瘤细胞株系 1C8 注射预先用福氏不完全佐剂处理过的 BALB/c 小鼠,收集该小鼠的腹水,采用辛酸 - 硫酸铵法纯化抗体,具体操作为 :用双层滤纸过滤小鼠腹水,4℃,12000r/min 离心 15min,吸取上清,将所得腹水上

清与 4 倍体积的醋酸盐缓冲液混合, 搅拌下缓慢加入正辛酸, 每毫升腹水所需的正辛酸体积为  $33 \mu\text{L}$ , 室温混合 30min,  $4^{\circ}\text{C}$  静置 2h, 然后  $4^{\circ}\text{C}$ , 12000r/min 离心 30min, 弃沉淀, 将得到的上清液用双层滤纸过滤后, 加入 1/10 滤液体积的摩尔浓度为 0.1mol/L 和 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液, 用 2mol/L 的氢氧化钠溶液调节该混合液的 pH 值至 7.4,  $4^{\circ}\text{C}$  预冷, 缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为 0.277g/mL,  $4^{\circ}\text{C}$  静置 2h, 然后  $4^{\circ}\text{C}$ , 12000r/min 离心 30min, 弃上清, 将所得沉淀用原腹水体积 1/10 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液重悬, 装入透析袋, 对纯水透析, 将充分透析好的蛋白溶液置  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻, 之后用冷冻干燥机冻干, 收集冻干粉, 即得纯化好的抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体, 将抗体置  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用;

所述的醋酸盐缓冲液为 0.29g 醋酸钠, 0.141mL 醋酸加水定容至 100mL 所得; 所述的 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液为 0.8g 氯化钠, 0.29g 十二水磷酸氢二钠, 0.02g 氯化钾, 磷酸二氢钾 0.02g, 加水定容至 100mL 所得。

[0037] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株 1C8 分泌的抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体的亚型为  $\text{IgG}_{2a}$ 。

[0038] 用常规非竞争酶联免疫吸附分析 (ELISA) 法测得 1C8 的鼠腹水抗体的效价可达  $8.19 \times 10^5$ , 即鼠腹水抗体稀释  $8.19 \times 10^5$  倍时的溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争 ELISA 法鉴定其对黄曲霉毒素 G1 的灵敏度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为 13.92ng/mL, 与黄曲霉毒素 B1, B2 及 M1 没有交叉反应。

[0039] 3. 标准品通用替代物的制备:

将鼠源抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体 3G1、抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体 2C9 和抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体 1C8 等摩尔量混合, 并用作混合抗原, 采用常规方法免疫新西兰长耳大白兔, 颈动脉取血, 血清亲和纯化, 所纯化的血清即为标准品通用替代物;

所述的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体 3G1 由保藏编号为 CCTCC NO. C201014 的杂交瘤细胞株 3G1 分泌产生, 所述的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体 2C9 由保藏编号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 分泌产生, 所述的抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体是由保藏编号为 CCTCC NO. C201017 的杂交瘤细胞株 1C8 分泌产生。

[0040] 下述实施例 2-4 中:

所述包被缓冲液为:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93 g, 加纯水定容至 1 L。

[0041] 所述 OVA 为卵清白蛋白。

[0042] 所述 PBST 溶液为:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $\text{KCl}$  0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 g,  $\text{NaCl}$  8.0 g, 0.5mL Tween-20, 加纯水定容至 1 L。

[0043] 所述显色液为 9.5 mL 底物缓冲液 + 0.5 mL 底物使用液 +  $32 \mu\text{L}$  浓度为 3% 的双氧水

组成。

[0044] 底物缓冲液为:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.841 g,  $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.933 g 溶于 100 mL 超纯水中。

[0045] 底物使用液为: 2 mg TMB 溶解在 100 mL 无水乙醇中。

[0046] 实施例 2 花生样品中黄曲霉毒素 B1 的测定

(1) 标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 B1 标准品浓度的对应关系换算方程的建立

①黄曲霉毒素 B1 标准品 ELISA 标准分析曲线方程

首先用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 B1 完全抗原 (AFB<sub>1</sub>-OVA, 2 μg/mL), 加入酶标板中, 每孔 100 μL, 4 °C 过夜。PBST 溶液洗板三次后, 每孔加 200 μL 1.5% OVA 水溶液作为封闭液, 37 °C 反应 1 h。PBST 洗板三次, 每孔加入 50 μL 抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液, 再加入黄曲霉毒素 B1 标准品 (2.4 到 600 pg/mL)。37 °C 反应 1 h 后, PBST 洗板三次, 每孔加入 100 μL 商品化羊抗鼠酶标二抗, 37 °C 反应 1 h。PBST 洗板六次, 加入显色液反应 15 min。加入 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值, 待测孔光吸收值为 B, 无黄曲霉毒素 B1 标准品孔的光吸收值为 B<sub>0</sub>, 抑制率为 B/B<sub>0</sub>。黄曲霉毒素 B1 标准品 ELISA 分析曲线见图 1 “- ■ -” 部分, 经非线性逻辑斯蒂回归拟合得黄曲霉毒素 B1 标准品 ELISA 标准分析曲线方程为:

$$y_2 = 75.78 / [1 + (x_2/25.25)^{2.37}] + 15.89 \quad \text{方程(1)}$$

其中  $y_2$  表示抑制率,  $x_2$  表示黄曲霉毒素 B1 浓度。

#### [0047] ②标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程

用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 B1 完全抗原 (AFB<sub>1</sub>-OVA, 2 μg/mL), 加入酶标板中, 每孔 100 μL, 4 °C 过夜。PBST 溶液洗板三次后, 每孔加 200 μL 1.5% OVA 水溶液作为封闭液, 37 °C 反应 1h。PBST 洗板三次, 每孔加入 50 μL 抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液, 再加入 50 μL 标准品通用替代物 (0.4 到 100 μg/mL)。37 °C 反应 1 h 后, PBST 洗板三次, 每孔加入 100 μL 商品化羊抗鼠酶标二抗, 37 °C 反应 1 h。PBST 洗板六次, 加入显色液反应 15 min。加入 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值, 待测孔光吸收值为 B, 无标准品通用替代物孔的光吸收值为 B<sub>0</sub>, 抑制率为 B/B<sub>0</sub>。用标准品通用替代物替代黄曲霉毒素 B1 标准品, 得到的标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线见图 2 中 “- ■ -” 部分, 经非线性逻辑斯蒂回归拟合得标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程为:

$$y_1 = 86.22 / [1 + (x_1/5.26)^{1.23}] + 12.92 \quad \text{方程(2)}$$

其中  $y_1$  表示抑制率,  $x_1$  表示标准品通用替代物浓度。

#### [0048] ③标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 B1 标准品浓度的对应关系换算方程

根据方程(1)和方程(2), 计算出 20% ~ 80% 抑制率范围内同一抑制率所对应的黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度, 间隔为 5% 抑制率。然后以黄曲霉毒素 B1 浓度为横坐标, 标准品通用替代物浓度为纵坐标作图, 得到同一抑制率下黄曲霉毒素 B1 浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系曲线, 见图 3, 并经非线性逻辑斯蒂回归分析拟合得到标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 B1 标准品浓度的对应关系方程:

$$x_1 = 98.26 / [1 + (x_2/115.97)^{1.89}] + 0.54 \quad \text{方程(3)}$$

其中  $x_1$  表示标准品通用替代物浓度,  $x_2$  表示黄曲霉毒素 B1 浓度。

#### [0049] (2) 花生样品中 AFB<sub>1</sub> 浓度的测定

##### ①在标准品通用替代物做标准曲线下, 抑制率与黄曲霉毒素 B1 浓度曲线方程

根据方程(2)和(3)求出在标准品通用替代物做标准曲线下, 抑制率与黄曲霉毒素 B1 浓度的关系曲线方程为:

$$y_1 = 86.22 / (1 + ((98.26 / (1 + (x_2/115.97)^{1.89}) + 0.54) / 5.26)^{1.23}) + 12.92 \quad \text{方程(4)}$$

其中  $y_1$  表示抑制率,  $x_2$  表示黄曲霉毒素 B1 浓度。

##### [0050] ②花生样品中 AFB<sub>1</sub> 浓度的测定

称取 5 g 花生样品(记为 1#)溶于 15 mL 80% 甲醇水溶液(含 4% NaCl),漩涡 30 s 混匀,放于超声波振荡器中,50 ° C 水浴振荡 15 min。取上清过 0.45 μm 有机滤膜。滤液用 PBS 稀释 10 倍,取 50 μL 上样作检测样品液。

[0051] 用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 B1 完全抗原(AFB<sub>1</sub>-OVA, 2 μg/mL),加入酶标板中,每孔 100 μL,4 ° C 过夜。PBST 溶液洗板三次后,每孔加 200 μL 1.5% OVA 水溶液作为封闭液,37 ° C 反应 1h。PBST 洗板三次,每孔加入 50 μL 抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体溶液,再加入 50 μL 花生样品液。37 ° C 反应 1 h 后,PBST 洗板三次,每孔加入 100 μL 商品化羊抗鼠酶标二抗,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板六次,加入显色液反应 15 min。加入 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值,待测孔光吸收值为 B,无待测样品孔的光吸收值为 B<sub>0</sub>,计算出样品的抑制率。

[0052] 将花生样品 1# 的抑制率值代入方程(4)中,求得花生样品 1# 中黄曲霉毒素 B1 浓度为 15.6 μg/kg;采用农业部公布的标准方法 NY/T 1286-2007 检测所得花生样品 1# 中黄曲霉毒素 B1 浓度为 14.3 μg/kg,两个结果的相对偏差符合标准规定的误差范围。

[0053] 称取 5 g 花生样品 2 (记为 2#)溶于 15 mL 80% 甲醇水溶液(含 4% NaCl),漩涡 30 s 混匀,放于超声波振荡器中,50 ° C 水浴振荡 15 min。取上清过 0.45 μm 有机滤膜。滤液用 PBS 稀释 10 倍,取 50 μL 上样作检测样品液。

[0054] 根据如上花生样品 1# 的检测方法测得花生样品 2# 的抑制率并代入方程(4)中求得该花生样品 2# 中黄曲霉毒素 B1 的浓度为 9.6 μg/kg;采用农业部公布的标准方法 NY/T 1286-2007 检测所得花生样品 2# 中黄曲霉毒素 B1 浓度为 8.7 μg/kg,两个结果的相对偏差符合标准规定的误差范围。

[0055] 实施例 3 花生样品中黄曲霉毒素 G1 浓度的测定

(1) 标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 G1 标准品浓度的对应关系换算方程的建立

①黄曲霉毒素 G1 标准品 ELISA 分析曲线方程

首先用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 G1 完全抗原(AFG<sub>1</sub>-OVA, 2 μg/mL),加入酶标板中,每孔 100 μL,4 ° C 过夜。PBST 溶液洗板三次后,每孔加 200 μL 1.5% OVA 水溶液作为封闭液,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板三次,每孔加入 50 μL 抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体溶液,再加入黄曲霉毒素 G1 标准品(82.3 到 20000pg/mL)。37 ° C 反应 1 h 后,PBST 洗板三次,每孔加入 100 μL 商品化羊抗鼠酶标二抗,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板六次,加入显色液反应 15 min。加入 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值,待测孔光吸收值为 B,无黄曲霉毒素 G1 标准品孔的光吸收值为 B<sub>0</sub>,抑制率为 B/B<sub>0</sub>。黄曲霉毒素 G1 标准品 ELISA 标准分析曲线见图 1 “- ▼ -” 部分,经非线性逻辑斯蒂回归拟合得黄曲霉毒素 G1 标准品 ELISA 标准分析曲线方程为:

$$y_2 = 79.52/[1 + (x_2/3150.46)^{1.03}] + 18.59 \quad \text{方程(5)}$$

其中 y<sub>2</sub> 表示抑制率, x<sub>2</sub> 表示黄曲霉毒素 G1。

[0056] ②标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程

用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 G1 完全抗原(AFG<sub>1</sub>-OVA, 2 μg/mL),加入酶标板中,每孔 100 μL,4 ° C 过夜。PBST 溶液洗板三次后,每孔加 200 μL 1.5% OVA 水溶液作为封闭液,37 ° C 反应 1h。PBST 洗板三次,每孔加入 50 μL 抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体溶液,再加入 50 μL 标准品通用替代物((0.4 到 100 μg/mL)。37 ° C 反应 1 h 后, PBST 洗板三

次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  商品化羊抗鼠酶标二抗,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h。PBST 洗板六次,加入显色液反应 15 min。加入 50  $\mu\text{L}$  2 M 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值,待测孔光吸收值为 B,无标准品通用替代物孔的光吸收值为  $B_0$ ,抑制率为  $B/B_0$ 。用标准品通用替代物替代黄曲霉毒素 G1 标准品得到的标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线见图 2 “- $\blacktriangledown$ -”部分,经非线性逻辑斯蒂回归拟合得标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程为:

$$y_1 = 261.72 / [1 + (x_1/471.09)^{0.37}] - 149.45 \quad \text{方程(6)}$$

其中  $y_1$  表示抑制率,  $x_1$  表示标准品通用替代物浓度。

[0057] ③标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 G1 标准品浓度的对应关系换算方程

再根据方程(5)和方程(6),将 20%~80% 抑制率范围内同一抑制率所对应的黄曲霉毒素 G1 浓度和标准品通用替代物浓度算出,间隔为 5% 抑制率。然后以黄曲霉毒素 G1 浓度为横坐标,标准品通用替代物浓度为纵坐标作图,得到同一抑制率下所对应的黄曲霉毒素 G1 浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系曲线,见图 4,并经非线性逻辑斯蒂回归分析拟合得到标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 G1 标准品浓度的对应关系换算方程:

$$x_1 = 86.11 / [1 + (x_2/11200.22)^{1.39}] - 0.43 \quad \text{方程(7)}$$

其中  $x_1$  表示标准品通用替代物浓度,  $x_2$  表示黄曲霉毒素 G1 浓度。

[0058] (2) 花生样品中 AFG1 浓度的测定

①在标准品通用替代物做标准曲线下,抑制率与黄曲霉毒素 G1 浓度曲线方程

根据方程(6)和(7)求出在标准品通用替代物做标准曲线下,抑制率与黄曲霉毒素 G1 浓度的关系曲线方程为:

$$y_1 = 261.72 / (1 + ((86.11 / (1 + (x_2/11200.22)^{1.39}) - 0.43) / 471.09)^{0.37}) - 149.45 \quad \text{方程(8)}$$

其中  $y_1$  表示抑制率,  $x_2$  表示黄曲霉毒素 G1 浓度。

[0059] ②花生样品中 AFG<sub>1</sub> 浓度的测定

称取 5 g 花生样品(记作 1#)溶于 15 mL 80% 甲醇水溶液(含 4% NaCl),漩涡 30 s 混匀,放于超声波振荡器中,50 $^{\circ}\text{C}$  水浴振荡 15 min。取上清过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜。滤液用 PBS 稀释 10 倍,取 50  $\mu\text{L}$  上样作检测液。

[0060] 用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 G1 完全抗原(AFG<sub>1</sub>-OVA, 2  $\mu\text{g/mL}$ ),加入酶标板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。PBST 溶液洗板三次后,每孔加 200  $\mu\text{L}$  1.5% OVA 水溶液作为封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h。PBST 洗板三次,每孔加入 50  $\mu\text{L}$  抗黄曲霉毒素 G1 单克隆抗体溶液,再加入 50  $\mu\text{L}$  花生样品液。37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h 后, PBST 洗板三次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  商品化羊抗鼠酶标二抗,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h。PBST 洗板六次,加入显色液反应 15 min。加入 50  $\mu\text{L}$  2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值,待测孔光吸收值为 B,无待测样品孔的光吸收值为  $B_0$ ,抑制率为  $B/B_0$ ,计算出样品的抑制率。

[0061] 将花生样品 1# 的抑制率值代入方程(8)中,求出花生样品 1# 中黄曲霉毒素 G1 的浓度为 4.2  $\mu\text{g/kg}$ ;采用国家质检总局公布的标准方法 SN 0637-1997 测定花生样品 1# 中黄曲霉毒素 G1 的浓度为 3.9  $\mu\text{g/kg}$ ,两个结果的相对偏差符合标准规定的误差范围。

[0062] 称取 5 g 花生样品(记作 2#)溶于 15 mL 80% 甲醇水溶液(含 4% NaCl),漩涡 30 s 混匀,放于超声波振荡器中,50 $^{\circ}\text{C}$  水浴振荡 15 min。取上清过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜。滤液

用 PBS 稀释 10 倍,取 50  $\mu\text{L}$  上样作检测液。

[0063] 根据如上花生样品 1# 的检测方法测得花生样品 2# 的抑制率并代入方程(8)中计算,最终求得该花生样品 2# 中的黄曲霉毒素 G1 浓度为 1.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,采用国家质检总局公布的标准方法 SN 0637-1997 测定花生样品 2# 中黄曲霉毒素 G1 的浓度为 1.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,两个结果的相对偏差符合标准规定的误差范围。

[0064] 实施例 4 牛奶样品中黄曲霉毒素 M1 浓度的测定

(1) 标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 M1 标准品浓度的对应关系换算方程的建立

①黄曲霉毒素 M1 标准品 ELISA 标准分析曲线方程

首先用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 M1 完全抗原(AFM<sub>1</sub>-OVA, 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),加入酶标板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,4 ° C 过夜。PBST 溶液洗板三次后,每孔加 200  $\mu\text{L}$  1.5% OVA 水溶液作为封闭液,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板三次,每孔加入 50  $\mu\text{L}$  抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液,再加入黄曲霉毒素 M1 标准品(4.1 到 1000  $\text{pg}/\text{mL}$ )。37 ° C 反应 1 h 后,PBST 洗板三次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  商品化羊抗鼠酶标二抗,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板六次,加入显色液反应 15 min。加入 50  $\mu\text{L}$  2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值,待测孔光吸收值为 B,无黄曲霉毒素 M1 标准品孔的光吸收值为 B<sub>0</sub>,抑制率为 B/B<sub>0</sub>。黄曲霉毒素 M1 标准品 ELISA 标准分析曲线见图 1 “-●-”部分,经非线性逻辑斯蒂回归拟合得黄曲霉毒素 M1 标准品 ELISA 标准分析曲线方程为:

$$y_2 = 78.84 / [1 + (x_2/121.97)^{1.19}] + 12.27 \quad \text{方程(9)}$$

其中  $y_2$  表示抑制率,  $x_2$  表示黄曲霉毒素 M1 浓度。

[0065] ②标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程

用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 M1 完全抗原(AFM<sub>1</sub>-OVA, 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),加入酶标板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,4 ° C 过夜。PBST 溶液洗板三次后,每孔加 200  $\mu\text{L}$  1.5% OVA 水溶液作为封闭液,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板三次,每孔加入 50  $\mu\text{L}$  抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液,再加入 50  $\mu\text{L}$  标准品通用替代物((0.4 到 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。37 ° C 反应 1 h 后,PBST 洗板三次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  商品化羊抗鼠酶标二抗,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板六次,加入显色液反应 15 min。加入 50  $\mu\text{L}$  2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值,待测孔光吸收值为 B,无标准品通用替代物孔的光吸收值为 B<sub>0</sub>,抑制率为 B/B<sub>0</sub>。用标准品通用替代物替代黄曲霉毒素 M1 标准品的 ELISA 分析曲线见图 2 “-●-”部分,经非线性逻辑斯蒂回归拟合得标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程为:

$$y_1 = 133.42 / [1 + (x_1/61.81)^{0.80}] - 30.98 \quad \text{方程(10)}$$

其中  $y_1$  表示抑制率,  $x_1$  表示标准品通用替代物浓度。

[0066] ③标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 M1 标准品浓度的对应关系换算方程的建立

根据方程(9)和方程(10),将 20% ~ 80% 抑制率范围内同一抑制率所对应的黄曲霉毒素 M1 浓度和标准品通用替代物浓度计算出,间隔为 5% 抑制率。以黄曲霉毒素 M1 浓度为横坐标,标准品通用替代物浓度为纵坐标作图,得到同一抑制率下所对应的黄曲霉毒素 M1 浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系曲线,见图 4,并经非线性逻辑斯蒂回归拟合得到标准品通用替代物浓度和黄曲霉毒素 M1 标准品浓度的对应关系换算方程:

$$x_1 = 146.41 / [1 + (x_2/340.89)^{1.30}] + 3.22 \quad \text{方程(11)}$$

其中  $x_1$  表示标准品通用替代物浓度,  $x_2$  表示 AFM<sub>1</sub> 浓度。

[0067] (2) 牛奶样品中 AFM<sub>1</sub> 浓度的测定

①在标准品通用替代物做标准曲线下,抑制率与黄曲霉毒素 M1 浓度曲线方程

根据方程(10)和(11)求出在标准品通用替代物做标准曲线下,抑制率与黄曲霉毒素 M1 浓度的关系曲线方程为:

$$y_1 = 133.42 / (1 + ((146.41 / (1 + (x_2 / 340.89)^{1.30}) + 3.22) / 61.81)^{0.80}) \quad 30.98$$

方程(12)

其中  $y_1$  表示抑制率,  $x_2$  表示 AFM<sub>1</sub> 浓度。

[0068] ②牛奶样品中 AFM<sub>1</sub> 浓度的测定

取 20 mL 牛奶样品(记作 1#)加入 50 mL 离心管中,在 3500 g 下离心 15 min,去掉上层油脂层,舍去下层沉淀物,取中间层,取 50  $\mu$ L 上样检测。

[0069] 用包被缓冲液稀释黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 完全抗原(AFM<sub>1</sub>-OVA, 2  $\mu$ g/mL),加入酶标板中,每孔 100  $\mu$ L, 4 ° C 过夜。PBST 溶液洗板三次后,每孔加 200  $\mu$ L 1.5% OVA 水溶液作为封闭液,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板三次,每孔加入 50  $\mu$ L 抗黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 单克隆抗体溶液,再加入 50  $\mu$ L 牛奶样品液。37 ° C 反应 1 h 后, PBST 洗板三次,每孔加入 100  $\mu$ L 商品化羊抗鼠酶标二抗,37 ° C 反应 1 h。PBST 洗板六次,加入显色液反应 15 min。加入 50  $\mu$ L 2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 下测定光吸收值,待测孔光吸收值为 B,无待测样品孔的光吸收值为 B<sub>0</sub>,抑制率为 B/B<sub>0</sub>,算出样品的抑制率。

[0070] 将牛奶样品 1# 的抑制率值代入方程(12)中,求出牛奶样品 1# 中黄曲霉毒素 M1 的浓度为 0.92  $\mu$ g/kg;采用国家标准 GB/T 23212-2008 测得牛奶样品 1# 中黄曲霉毒素 M1 的浓度为 0.95 $\mu$ g/kg,两个结果的相对偏差符合标准规定的误差范围。

[0071] 取 20 mL 牛奶样品(记作 2#)加入 50 mL 离心管中,在 3500 g 下离心 15 min,去掉上层油脂层,舍去下层沉淀物,取中间层,取 50  $\mu$ L 上样检测。

[0072] 根据如上牛奶样品 1# 的检测方法测得牛奶样品 2# 的抑制率并代入方程(12)中计算,最终求得该牛奶样品中的黄曲霉毒素 M1 浓度为 0.37  $\mu$ g/kg;采用国家标准 GB/T 23212-2008 测得牛奶样品 2# 中黄曲霉毒素 M1 的浓度为 0.34 $\mu$ g/kg,两个结果的相对偏差符合标准规定的误差范围。

[0073] 上述实施例 2-4 皆是相应测定待测样品中黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 M1 的首次实验。在后续检测中包括放置长时间后,因各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程恒定不变,无需重新建立。故具体步骤可直接简化为:建立各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物 ELISA 标准分析曲线方程,然后相应结合各相应黄曲霉毒素标准品浓度和各相应黄曲霉毒素标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程(如以样品中黄曲霉毒素 B1 测量为例,则该黄曲霉毒素 B1 标准品浓度和标准品通用替代物浓度的对应关系换算方程见方程(3)),得到:在标准品通用替代物做 ELISA 标准分析曲线下,抑制率与各相应黄曲霉毒素浓度的曲线方程  $e(y_1, x_2)$ ,然后测定待测样品的抑制率值,相应代入上述方程计算即可得。

## 序列表

< 110 > 中国农业科学院油料作物研究所

< 120 > 用于 ELISA 检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物、其制备方法及其黄曲霉毒素 ELISA 检测方法

< 160 > 8

< 210 > 1

< 211 > 347bp

< 212 > DNA

< 213 > 小鼠

< 400 > 1

```

tgaggagacg gtgaccgtgg tcccttggcc ccagtagtcc atagcccagt 50
aggccgatct tgcacagtaa tatgtggctg tgcctcagt agtcacagaa 100
tttaactgca ggtagtactg gttcttggat gtgtctcgag tgatggagat 150
tcgactcttg agagatggat tgtagtaagg gttaccactg tagctcatga 200
accccatgta ctcaagttaa ttcccaggga atttccggat ccagtgccag 250
taatcactgg tgatggagtc gccagtgaca gaacaggtga gggacagagt 300
ctgagaaggt ttcacgaggc taggtcctga ctctgcagc tgcacct 347

```

< 210 > 2

< 211 > 338bp

< 212 > DNA

< 213 > 小鼠

< 400 > 2

```

gacattgagc tcaccagtc tccaaaattc atgtccacat cagtaggaga 50
cagggtcagc atctcttgca aggccagtca ggatgtgggt actgatgtag 100
cctggtacgg agtcctgat cgcctcacag gcagtggatc tgggacagat 150
ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct gaagacttgg cagattattt 200
ctgtcaaaa tatagcagct atattcacgt tcggctcggg gacaaagttg 250
gaaataaaac gtttttgtgg agaggggcat gtcatagtcc tcaactgtgtc 300
tcacgttcgg tgctgggacc aagctggagc tgaaacgg 338

```

< 210 > 3

< 211 > 115

< 212 > PRT

< 213 > 小鼠

< 400 > 3

Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr
1				5					10					15					20
Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Asp	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	Tyr	Trp	His	Trp	Ile	Arg	Lys	Phe	Pro
				25					30					35					40
Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Tyr	Met	Gly	Phe	Met	Ser	Tyr	Ser	Gly	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Pro
				45					50					55					60
Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Gln
				65					70					75					80
Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Tyr	Trp
				85					90					95					100
Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
				105					110					115					

< 210 > 4

< 211 > 110

< 212 > PRT

< 213 > 小鼠

< 400 > 4

Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser
1				5					10					15					20
Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Thr	Asp	Val	Ala	Trp	Tyr	Gly	Val	Pro	Asp
				25					30					35					40
Arg	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser
				45					50					55					60
Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ile	His	Val	Arg	Leu	Gly
				65					70					75					80
Asp	Lys	Val	Gly	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Trp	Arg	Gly	Ala	Cys	His	Ser	Pro	His	Cys	Val
				85					90					95					100
Ser	Arg	Ser	Val	Leu	Gly	Pro	Ser	Trp	Ser										
				105					110										

< 210 > 5

< 211 > 332bp

< 212 > DNA

< 213 > 小鼠

< 400 > 5

```

ccgttttatt tccagcttgg tccccctcc gaacgtgtaa gctccctaata 50
gtgctgacag taataggttg cagcctcctc ctccctccaca ggatggatgt 100
tgagggtgaa gtctgtccca gaccactgc cactgaacct ggcagggacc 150
ccagattcta ggttggatac aagatagatg aggagtctgg gtggctgtcc 200
tggtttctgt tggttccagt gcatataact atagccagat gtactgacac 250
ttttgctggc cctgtatgag atggcggccc tctgccccag agatacagct 300
aaggaagctg gagactgggt gagctcaatg tc 332

```

< 210 > 6

< 211 > 362bp

< 212 > DNA

< 213 > 小鼠

< 400 > 6

```

aggtgcagct gcagcagtea ggacctgagc tggtagggcc tgggacttca 50
gtgaagatat cctacaagge ttctggctgt accttccctca cctactggat 100
gagctgggtg aagttgagge ctgcacaggg ccttgagtgg attggacaga 150
tttttctgc aggtggtagt gctaacttca atgagatddd cagggdcaag 200
gccacattga ctgtaggcac atcctccagt tcagcctaca tgcagctaat 250
cagcctgaca tctgaggact ctgcggdcaa tttctgtgca agagaggagg 300
gcctattact atcttatggt agggacttct ggggccaagg gaccacggd 350
accgtctect ca 362

```

< 210 > 7

< 211 > 110

< 212 > PRT

< 213 > 小鼠

< 400 > 7

```

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Ala
1           5           10           15           20
Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Thr Ser Tyr Met His Trp Asn
           25           30           35           40
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
           45           50           55           60

```

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
65 70 75 80  
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg  
85 90 95 100  
Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys Leu Asn  
105 110

< 210 > 8

< 211 > 120

< 212 > PRT

< 213 > 小鼠

< 400 > 8

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser  
1 5 10 15 20  
Tyr Lys Ala Ser Gly Cys Thr Phe Leu Thr Tyr Trp Met Ser Trp Val Lys Leu Arg Pro  
25 30 35 40  
Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ala Asn Phe Asn  
45 50 55 60  
Glu Ile Phe Arg Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Thr Ser Ser Ser Ser Ala Tyr Met  
65 70 75 80  
Gln Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Asn Phe Cys Ala Arg Glu Glu Gly  
85 90 95 100  
Leu Leu Leu Ser Tyr Gly Arg Asp Phe Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
105 110 115 120

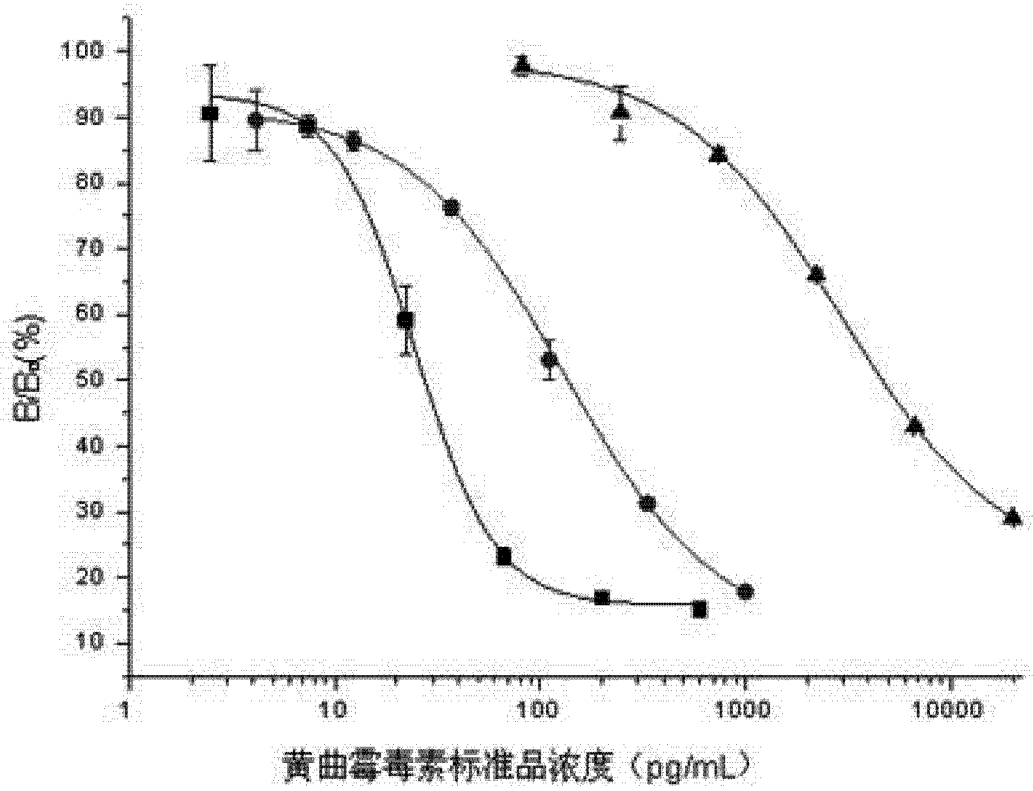


图 1

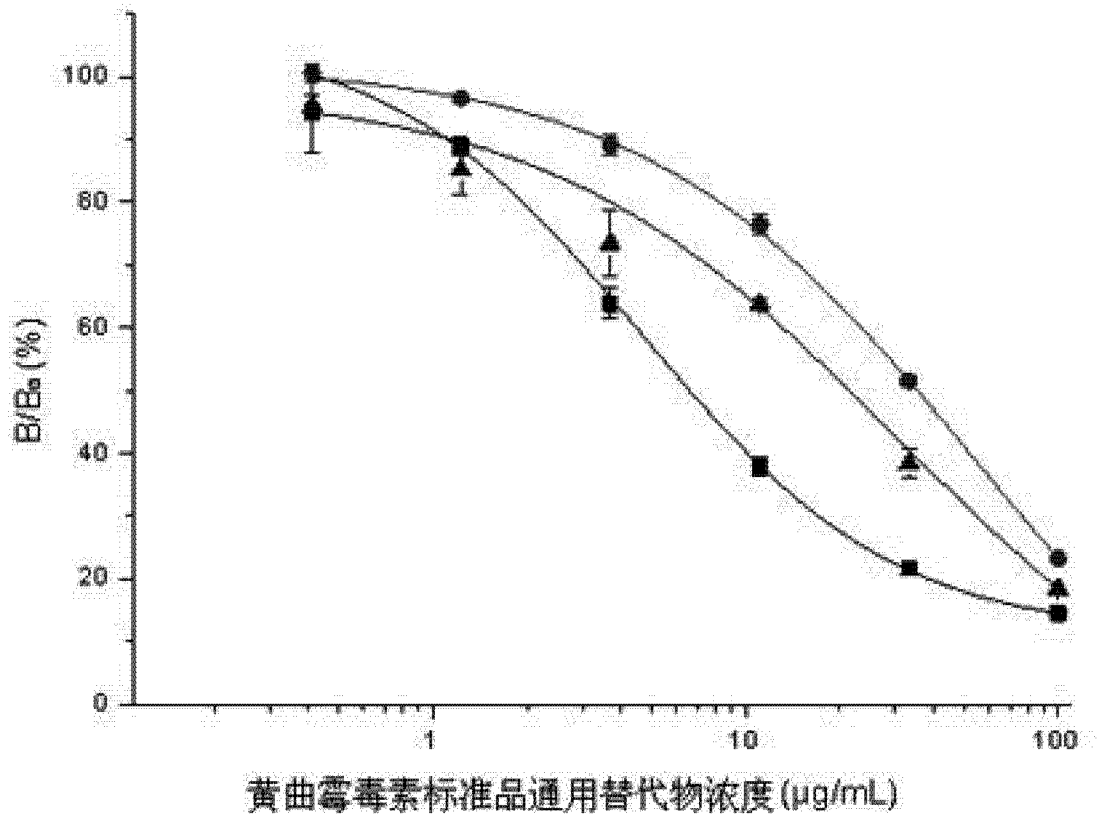


图 2

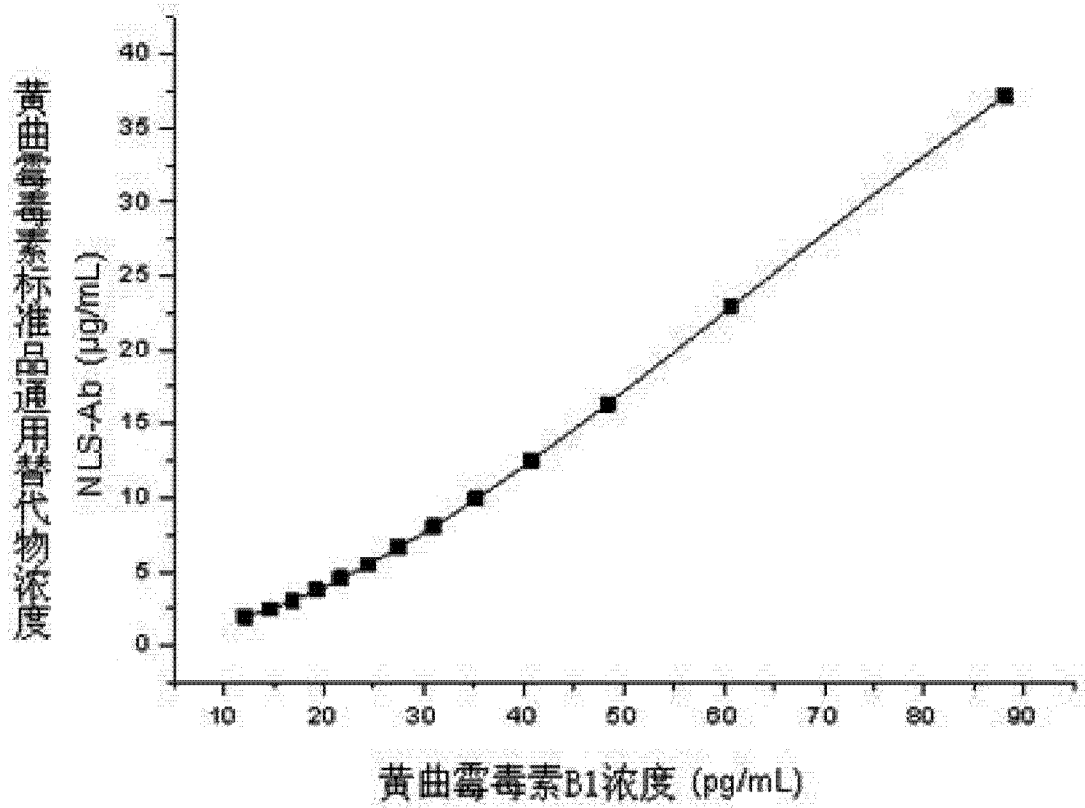


图 3

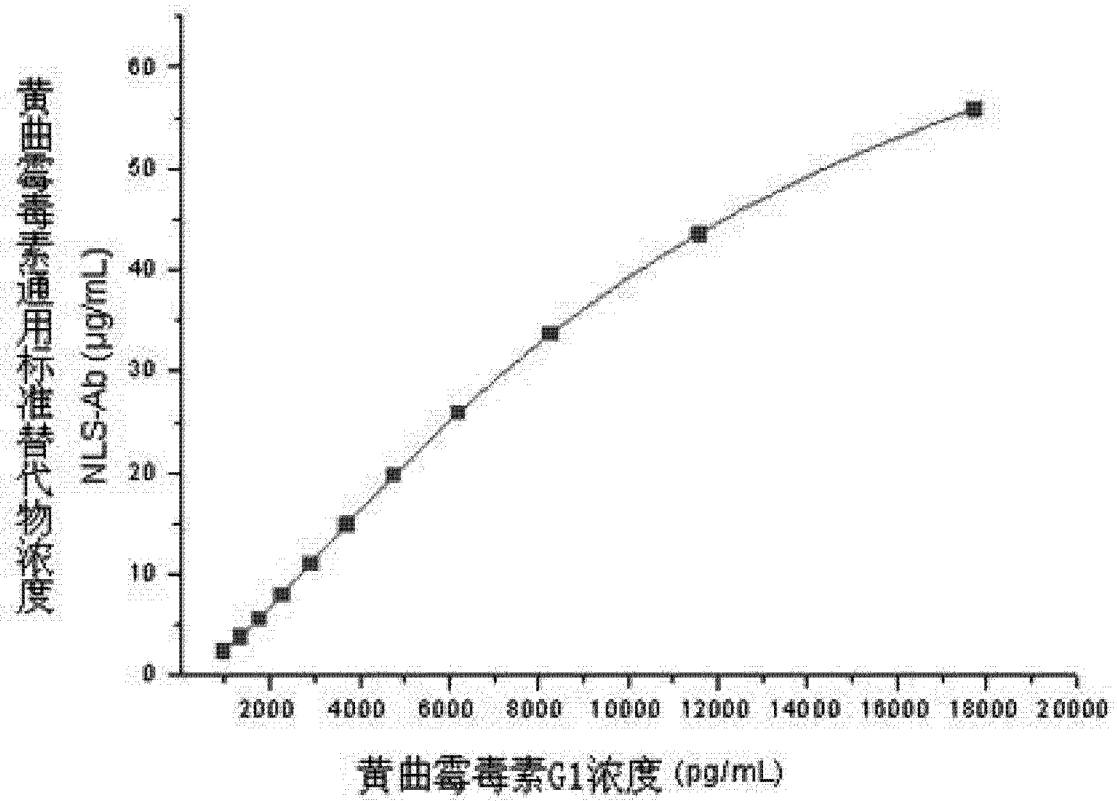


图 4

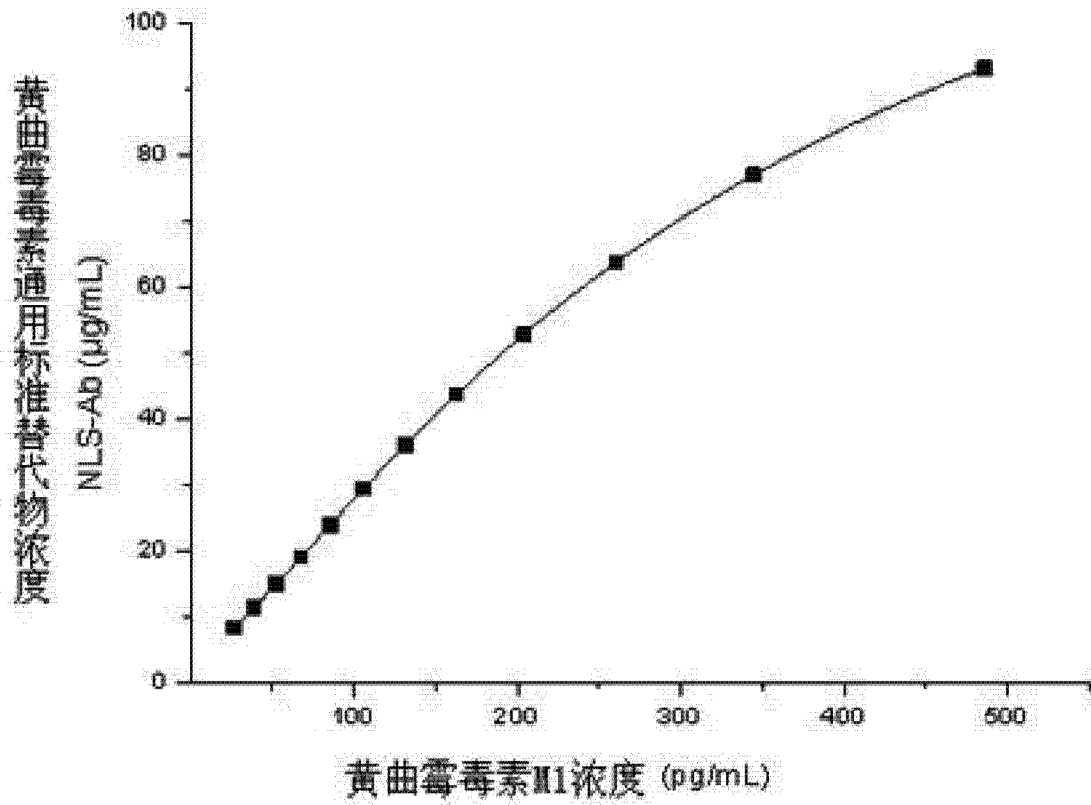


图 5

专利名称(译)	用于ELISA检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物、其制备方法及黄曲霉毒素ELISA检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102746403A</a>	公开(公告)日	2012-10-24
申请号	CN201210117617.2	申请日	2012-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	李培武 管笛 张奇 张文 丁小霞		
发明人	李培武 管笛 张奇 张文 丁小霞		
IPC分类号	C07K16/42 C07K16/06 G01N33/53		
代理人(译)	乔宇		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于ELISA检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物、其制备方法及黄曲霉毒素ELISA检测方法。用于ELISA检测黄曲霉毒素的标准品通用替代物，其特征在于：它为可识别各鼠源抗黄曲霉毒素单克隆抗体的兔抗鼠抗体。它是以鼠源抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体、抗黄曲霉毒素M1单克隆抗体和抗黄曲霉毒素G1单克隆抗体作为混合抗原，经免疫新西兰长耳大白兔，颈动脉取血，血清亲和纯化后获得。该标准品通用替代物无毒无害，可分别通过替代黄曲霉毒素ELISA检测方法中各相应黄曲霉毒素标准品来定量检测样品中的各相应黄曲霉毒素浓度。

