



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101865924 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

(21) 申请号 201010210195. 4

(22) 申请日 2010. 06. 26

(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 王雨晨 孙建和

(74) 专利代理机构 上海交达专利事务所 31201

代理人 王锡麟 王桂忠

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

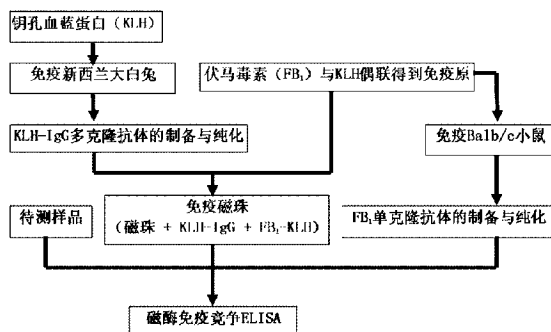
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法

(57) 摘要

一种化学检测技术领域的基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,通过制备伏马毒素-KLH 偶联物和伏马毒素-OVA 偶联物并将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠结合,制备成伏马毒素检测磁珠;再利用伏马毒素-KLH 偶联物制备伏马毒素单克隆抗体,并与伏马毒素检测磁珠一并运用竞争 ELISA 方法进行伏马毒素分子检测,并通过磁性分离法获取伏马毒素检测磁珠,进行显色后通过酶标仪获得检测结果。本发明对低于检测极限的伏马毒素样品,通过免疫磁珠的富集作用以及磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大,从而能够间接改变检测极限,提高检测的灵敏度,避免漏检。



1. 一种基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,其特征在于,首先制备兔抗钥孔血蓝蛋白多克隆抗体并将其与磁珠偶联,然后将伏马毒素半抗原分别偶联至 KLH 和卵白蛋白,并用伏马毒素分别连接到 KLH 和 OVA,形成伏马毒素-KLH 偶联物和伏马毒素-OVA 偶联物;同时将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠结合,制备成伏马毒素检测磁珠;再利用伏马毒素-KLH 偶联物制备伏马毒素单克隆抗体,并与伏马毒素检测磁珠一并运用竞争 ELISA 方法进行伏马毒素分子检测,并通过磁性分离法获取伏马毒素检测磁珠,进行显色后通过酶标仪获得检测结果。

2. 根据权利要求 1 所述的基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,其特征是,所述的制备兔抗钥孔血蓝蛋白多克隆抗体是指:以 KLH 作为免疫原对新西兰大白兔进行免疫处理并制备得到多克隆抗体,然后以亲和层析柱纯化得到兔抗钥孔血蓝蛋白多克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,其特征是,所述的将伏马毒素半抗原分别偶联至 KLH 和卵白蛋白是指:伏马毒素半抗原通过戊二醛法分别与 KLH 和卵白蛋白偶联,将伏马毒素分别连接到 KLH 和 OVA,从而合成伏马毒素-KLH 和伏马毒素-OVA 偶联物。

4. 根据权利要求 3 所述的基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,其特征是,所述的戊二醛法是指:将 KLH 放入透析袋,置于含 0.2% 戊二醛的 PBS 溶液中 4℃ 透析 16h,然后转入 PBS 中透析 8h 除去未反应的戊二醛,得到透析产物;向透析产物中加入伏马毒素,4℃ 反应 16h;加入三羟甲基氨基甲烷并反应 2h 以封闭未反应的蛋白位点,最后用 PBS 透析 2~3d, -20℃ 保存。

5. 根据权利要求 1 所述的基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,其特征是,所述的将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠结合,制备成伏马毒素检测磁珠是指:将兔抗钥孔血蓝蛋白多克隆抗体与表面修饰活性基团为 protein A 的纳米磁珠偶联,再将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠进一步结合,形成伏马毒素检测磁珠。

6. 根据权利要求 1 或 5 所述的基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,其特征是,所述的将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠结合,制备成伏马毒素检测磁珠的具体步骤包括:

i) 吸取适量磁珠于 1.5ml 离心试管中,置于磁场中使磁珠与贮存液分离,用 pH7.4 的 PBS 清洗缓冲液清洗,并用含有质量百分比为 0.01% 的 Tween20 的 pH 为 8.2 的磷酸钠盐偶联缓冲液重新悬浮磁珠;

ii) 将适量兔抗 KLH-IgG 加入磁珠悬液中,室温下震荡孵育后,用清洗缓冲液清洗磁珠,加入过量的 5% 脱脂奶粉溶液以封闭未结合抗体的游离配点;

iii) 将适量伏马毒素-KLH 偶联物加入磁珠悬液中,使蛋白质在磁珠悬液中达到一定浓度,室温下震荡孵育后,用清洗缓冲液清洗磁珠,将磁珠悬液转移至新管,放置次场中分离,弃掉清洗缓冲液并提取得到伏马毒素检测磁珠进行后续试验。

7. 根据权利要求 1 所述的基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,其特征是,所述的运用竞争 ELISA 方法进行伏马毒素分子检测是指:从以玉米等谷物为原材料的食品、饲料等采集来的被检样品经 80% 甲醇提取,2500g 离心 15min,其上清液转移到 5ml 的离心管中作为待检测液体样品备用;将伏马毒素检测磁珠用偶联缓冲液稀释 20

倍,同时将伏马毒素单克隆抗体稀释 6000 倍和待检液体样品充分混合后加入试管中,悬浮磁珠,37℃震荡孵育 1 小时后,用清洗缓冲液清洗磁珠,将磁珠转移至新管,弃掉清洗缓冲液,加入酶标二抗,用偶联缓冲液悬浮磁珠,37℃震荡孵育 1 小时后,用清洗缓冲液清洗磁珠。

基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种化学检测技术领域的方法,具体是一种基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法。

背景技术

[0002] 伏马毒素 (Fumonisin) 是由串珠镰刀菌产生的真菌毒素,目前已知有 11 种衍生物。自 1989 年发现伏马毒素以来,受到世界各国的普遍重视,许多国家对其进行了系统的研究。伏马毒素能够对玉米及其制品造成污染,而且在以谷物为原料的一些产品中如面条、啤酒、调味品,甚至在芦笋中也检测到了伏马毒素。研究证实伏马毒素可引发马的白脑软化症,神经性中毒而呈现意识障碍、失明和运动失调,甚至导致死亡。引发猪的肺水肿综合症,并可诱发人类的食道癌和肝癌、胃癌等疾病,从而对畜牧业和人类的健康构成危害。1992 年美国 FDA 和农业部伏马毒素研究工作小组建议马饲料中伏马毒素应低于 5mg/kg,猪饲料伏马毒素应低于 10mg/kg,肉牛和家禽饲料伏马毒素应低于 50mg/kg。瑞典规定人类食物中伏马毒素限量为 1mg/kg。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贸易和食用者的健康,出入境检疫、海关、生产企业、监督部门等部门迫切需要一种特异、快速、简便的伏马毒素检测方法。

[0003] 关于伏马毒素的检测国内外已建立了多种方法。其中高效液相色谱法 (HPLC),灵敏度高,在全球范围内的玉米及其制品的调查中,90% 以上的实验室用的都是 HPLC 法,其检测限可以达到 0.1 ~ 0.05mg/kg。然而,由于伏马毒素本身既没有特异的紫外吸收基团,同时也没有荧光特性,但在一定条件下伏马毒素可同某些物质反应形成具有荧光的衍生物,因此荧光衍生剂和衍生方法的选择与 HPLC 检测伏马毒素的准确度和灵敏性有密切关系。此外,该法需要对检测样品进行严格的预处理,仪器化程度高且价格昂贵,分析速度慢,同时要求有专业的操作人员,不利于在基层推广使用及大量样本筛选。放射免疫分析法,检测限约为 200ng/kg,但具有同位素半衰期短,存在放射性污染等缺点。而免疫学方法具有灵敏度高,特异性强,仪器设备要求低和样本前处理相对简单等优点,适于现场监控和大量样本筛选,特别是酶联免疫吸附试验 (ELISA)。据目前文献报道,常规的 ELISA 检测限是 10-50ng/mL。但是,随着人们对健康要求的不断提高,以及对真菌毒素的毒性的进一步认识,伏马毒素的最高残留限量 (RML) 同样也将会有更严格的要求。那么目前的各种检测体系都将受到灵敏度的限制,因此需要一种检测灵敏度更高的测定方法。

[0004] 磁珠是由 γ -Fe₂O₃ 和 Fe₃O₄ 磁性材料合成的均一、超顺磁性微球。每个微球体均包被一层多聚材料,作为吸附和结合各种分子的载体。免疫磁珠 (Immunomagnetic beads, IMB) 是免疫学和磁载体技术相结合而发展起来的一类新型材料,是一种表面包被有特异性配基 (抗体及有活性的化学基团) 的磁性微球,可与含有相应抗原的靶物质特异性地结合形成新的复合物,通过外加磁场的作用,使磁珠和溶液快速分离,可以在短时间内得到浓缩、纯净的待测样品,缩短检测时间,提高检测效益和灵敏度。目前,磁酶免疫 (MB-ELISA)

检测方法是免疫磁珠在免疫检测领域最主要的应用,其采用免疫磁珠配合常规 ELISA 方法主要用于免疫检测、细胞和微生物的分离和蛋白质、DNA, RNA 以及 mRNA 等生物大分子纯化检测,其基本步骤为:将针对抗原的抗体与磁珠进行偶联,制备免疫磁珠;加入适量体积的免疫磁珠到检测样品中,使免疫磁珠上的抗体和样品中的抗原结合,然后通过磁性分离,除去上清;加入一定体积的过氧化物酶标记过的二抗,然后放在 37℃ 条件下温育,再通过磁性分离,除去上清;加底物显色,把显色液移入 96 孔 ELISA 反应板中,酶标仪中读数。

[0005] 磁酶免疫的方法对大分子抗原具有良好的检测效果,但是对有关伏马毒素等小分子的检测实例尚未见报道。经过本课题组实验表明,用 MB-ELISA 检测方法检测灵敏度要比一般的竞争 ELISA 方法高。

[0006] 经过对现有技术的检索发现,针对伏马毒素的免疫学检测方法主要是运用酶联免疫吸附法 (ELISA)。ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。根据酶反应底物显色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,因而使测定具有较高的灵敏度。宫慧芝等人发表的《伏马菌素 B₁ 免疫学检测方法的建立》一文中,FB₁ 间接竞争酶联免疫吸附方法的最低检出浓度为 5 μg/L,校正曲线的线性范围 50-500 μg/L。

[0007] 但是该现有技术的最低检出浓度为 5 μg/L,随着人们对健康要求的不断提高,以及对真菌毒素的毒性的进一步认识,伏马毒素的最高残留限量 (RML) 同样也将会有更严格的要求。那么目前这种检测体系就会受到灵敏度的限制,因此本发明利用 ELISA 方法优势的同时,结合了免疫磁珠的富集作用以及磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大,从而能够间接改变检测极限,提高检测的灵敏度,避免漏检。

发明内容

[0008] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提供一种基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法,与现有技术相比灵敏度更高且重复性好,稳定性高。

[0009] 本发明是通过以下技术方案实现的,本发明首先制备兔抗钥孔血蓝蛋白 (KLH) 多克隆抗体并将其与磁珠偶联,然后将伏马毒素半抗原分别偶联至 KLH 和卵白蛋白 (OVA),并用伏马毒素分别连接到 KLH 和 OVA,形成伏马毒素-KLH 偶联物和伏马毒素-OVA 偶联物;同时将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠结合,制备成伏马毒素检测磁珠;再利用伏马毒素-KLH 偶联物制备伏马毒素单克隆抗体,并与伏马毒素检测磁珠一并运用竞争 ELISA 方法进行伏马毒素分子检测,并通过磁性分离法获取伏马毒素检测磁珠,进行显色后通过酶标仪获得检测结果。

[0010] 所述的制备兔抗钥孔血蓝蛋白 (KLH) 多克隆抗体是指:以 KLH 作为免疫原对新西兰大白兔进行免疫处理并制备得到多克隆抗体,然后以亲和层析柱纯化得到兔抗钥孔血蓝蛋白多克隆抗体。

[0011] 所述的将伏马毒素半抗原分别偶联至 KLH 和卵白蛋白是指:伏马毒素半抗原通过戊二醛法分别与 KLH 和卵白蛋白偶联,将伏马毒素分别连接到 KLH 和 OVA,从而合成伏马毒素-KLH 和伏马毒素-OVA 偶联物。

[0012] 所述的戊二醛法是指:将 KLH 放入透析袋,置于含 0.2% 戊二醛的 PBS 溶液中 4℃ 透析 16h,然后转入 PBS 中透析 8h 除去未反应的戊二醛,得到透析产物;向透析产物中加入

伏马毒素,4℃反应 16h;加入三羟甲基氨基甲烷并反应 2h 以封闭未反应的蛋白位点,最后用 PBS 透析 2 ~ 3d, -20℃保存。

[0013] 所述的将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠结合,制备成伏马毒素检测磁珠是指:将兔抗钥孔血蓝蛋白多克隆抗体与表面修饰活性基团为 protein A 的纳米磁珠偶联,再将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠进一步结合,形成伏马毒素检测磁珠。

[0014] 所述的将伏马毒素-KLH 偶联物与免疫磁珠结合,制备成伏马毒素检测磁珠的具体步骤包括:

[0015] i) 吸取适量磁珠于 1.5ml 离心试管中,置于磁场中使磁珠与贮存液分离,用 pH7.4 的 PBS 清洗缓冲液清洗,并用含有质量百分比为 0.01% 的 Tween20 的 pH 为 8.2 的磷酸钠盐偶联缓冲液重新悬浮磁珠;

[0016] ii) 将适量兔抗 KLH-IgG 加入磁珠悬液中,室温下震荡孵育后,用清洗缓冲液清洗磁珠,加入过量的 5% 脱脂奶粉溶液以封闭未结合抗体的游离配点;

[0017] iii) 将适量伏马毒素-KLH 偶联物加入磁珠悬液中,使蛋白质在磁珠悬液中达到一定浓度,室温下震荡孵育后,用清洗缓冲液清洗磁珠,将磁珠悬液转移至新管,放置次场中分离,弃掉清洗缓冲液并提取得到伏马毒素检测磁珠进行后续试验。

[0018] 所述的利用伏马毒素-KLH 偶联物制备伏马毒素单克隆抗体是指:用伏马毒素-KLH 偶联物作为免疫原,采用杂交瘤技术制备抗伏马毒素的单克隆抗体。其基本步骤包括:抗原制备、动物免疫、免疫脾细胞和骨髓瘤细胞制备、细胞融合、杂交瘤细胞选择培养、杂交瘤细胞筛选、杂交瘤细胞克隆化、单克隆抗体的检定、分泌单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立和单克隆抗体的制备。

[0019] 所述的运用竞争 ELISA 方法进行伏马毒素分子检测是指:从以玉米等谷物为原材料的食品、饲料等采集来的被检样品经 80% 甲醇提取,2500g 离心 15min,其上清液转移到 5ml 的离心管中作为待检测液体样品备用;将伏马毒素检测磁珠用偶联缓冲液稀释 20 倍,同时将伏马毒素单克隆抗体稀释 6000 倍和待检测液体样品充分混合后加入试管中,悬浮磁珠,37℃震荡孵育 1 小时后,用清洗缓冲液清洗磁珠,将磁珠转移至新管,弃掉清洗缓冲液,加入酶标二抗,用偶联缓冲液悬浮磁珠,37℃震荡孵育 1 小时后,用清洗缓冲液清洗磁珠。

[0020] 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,由于酶标板面积的限制,所能捕获的目标抗原抗体数量有限,检测线和灵敏度都受到一定限制。

[0021] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:磁性免疫载体特异性好,固液经磁力作用能较容易分离,对低于检测极限的伏马毒素样品,通过免疫磁珠的富集作用以及磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大,从而能够间接改变检测极限,提高检测的灵敏度,避免漏检。

附图说明

[0022] 图 1 为本发明流程图。

[0023] 图 2 为实施例检测标准曲线图。

具体实施方式

[0024] 下面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。

[0025] 首先要制备兔抗钥孔血蓝蛋白 (KLH) 多克隆抗体并纯化,将其与磁珠偶联;将 FB_1 连接到 KLH 上获得具有免疫原性的 FB_1 -KLH 偶联物,并通过透析及超滤离心纯化该偶联物;再进一步将 FB_1 -KLH 偶联物与偶联有 KLH 多克隆抗体的免疫磁珠结合,制备成包被有 FB_1 -KLH 偶联物的免疫磁珠;将 FB_1 -KLH 偶联物作为免疫原免疫 Balb/C 小鼠制备单克隆抗体,并用卵白蛋白 (OVA) 与 FB_1 偶联的 FB_1 -OVA 偶联物作为包被抗原采用间接酶联免疫吸附实验测定抗 FB_1 抗体效价;纯化单克隆抗体;利用制备出的免疫磁珠与 FB_1 单克隆抗体,运用间接竞争 ELISA 方法检测待检样品中的 FB_1 分子,最后,通过磁性分离技术将上清移入 96 孔 ELISA 反应板中,在酶标仪中进行检测得出结果。

[0026] 实施例 1

[0027] 钥孔血蓝蛋白 (KLH) 多克隆抗体的制备与纯化

[0028] 将抗原 KLH 与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,背部皮内注射免疫新西兰大白兔,每只 1ml;二次免疫: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;三次免疫,操作同二次免疫。第三次免疫 5 天后耳静脉采血测效价,效价达到 1 : 10000 以上时加强免疫:耳静脉注射不加佐剂的抗原 1ml;1 周后,进行心脏采血,将所采集血清置于 37℃ 温箱 1 小时,移至 4℃ 冰箱过夜后,3500 转离心 10 分钟,取上清,用亲和层析柱纯化,得到兔抗 KLH 的 IgG。

[0029] 实施例 2

[0030] 伏马毒素 FB_1 完全抗原偶联物的制备

[0031] ①伏马毒素-钥孔血蓝蛋白偶联物的制备:将 1mlKLH(10mg/ml) 放入透析袋,置于 200mlPBS(含 0.2%戊二醛)溶液中 4℃透析 16h,然后转入 PBS 中透析 8h 除去未反应的戊二醛。向 KLH 透析物中加入 2mg FB_1 ,4℃反应 16h。加入 10mgTris,反应 2h,封闭未反应的蛋白位点。最后用 PBS 透析 2 ~ 3d, -20℃保存。

[0032] ②卵白蛋白-伏马毒素偶联物的制备:将 2.5mg 卵白蛋白 (OVA) 溶于 0.1ml0.01MPB 缓冲液中,加入 10u150%戊二醛,室温搅拌过夜。4℃条件下用 PBS 透析过夜,除去多余 GA。0.5mg 伏马毒素 (FB_1) 溶于 0.2ml25%乙醇,将其加入到激活的 OVA 透析物(约 0.15ml)中,加入 0.1ml1M 碳酸缓冲液 (pH9.5),4℃搅拌过夜。加入 0.05ml1M 赖氨酸 (pH7),4℃反应 3h。最后用 PBS 透析 72h,2 次换液。-20℃保存。

[0033] 实施例 3

[0034] 免疫磁珠的制备

[0035] 吸取 50 μ l 磁珠于 1.5ml 离心试管中,置于磁场中使磁珠与贮存液分离,用清洗缓冲液 (PBS, pH7.4) 清洗 2 遍,取 5 μ l 抗 KLH-IgG 用 200 μ l 偶联缓冲液 (磷酸钠盐溶液, 0.01% Tween20, pH8.2) 稀释后加入,并重悬浮磁珠,室温下震荡孵育 10-30 分钟后,用清洗缓冲液清洗磁珠两遍,加入 400 μ l 5%脱脂奶粉溶液以封闭未结合抗体的游离配点,再次用清洗缓冲液清洗磁珠 2 遍;随后将 FB_1 -KLH 用偶联缓冲液稀释至 10 μ g/ml 后加入 200 μ l, 室温下震荡孵育 10-30 分钟,用清洗缓冲液清洗磁珠 2 遍;将磁珠悬浮液转移至新管,置于磁场磁性分离,弃掉清洗缓冲液,用制备好的的免疫磁珠进行后续试验,或者加入偶联缓冲

液放入 4℃ 冰箱保存,以备使用,制备好的免疫磁珠保存时间最好不超过 1 个月。

[0036] 实施例 4

[0037] 伏马毒素单克隆抗体的制备

[0038] 将 FB_1 -KLH 完全抗原冻干粉溶解于 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;二次免疫: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;三次免疫,操作同二次免疫。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。

[0039] 实施例 5

[0040] 利用磁酶免疫法检测伏马毒素方法的建立

[0041] 将实施例 3 中制备的免疫磁珠用偶联缓冲液稀释 20 倍,实施例 4 中制备的抗伏马毒素单克隆抗体稀释 6000 倍和预处理的待检液体样品充分混合后加入试管中,悬浮磁珠,37℃ 震荡孵育 1 小时后,用清洗缓冲液清洗磁珠 3 遍,将磁珠转移至新管,弃掉清洗缓冲液;用偶联缓冲液将酶标二抗稀释 10000 倍后,取 200 μ l 加入试管中,悬浮磁珠,37℃ 震荡孵育 1 小时后,用清洗缓冲液清洗磁珠 3 遍,将磁珠悬液转移至新管,弃掉清洗缓冲液;加 100 μ l 底物液 (100 \times TMB) 显色 6 分钟后,加入 50 μ l 终止液 (2mol/L 浓 H_2SO_4) 终止;通过磁性分离技术移取上清,在酶标仪中进行检测得出结果。

[0042] 实施例 6

[0043] 磁酶免疫检测法检测伏马毒素的标准曲线的建立

[0044] 以效价测定结果中吸光值为 1.0 左右的抗体稀释倍数的两倍作为间接竞争 ELISA 中的抗体浓度,其中竞争 FB_1 浓度从 100ng/mL 开始倍比稀释 15 次,做标准曲线选取浓度分别为 50,25,12.5,3.125,0.781,0.391,0.098ng/mL。设置 PBS 空白对照,并以竞争抗原 FB_1 抑制浓度对数为横坐标,以竞争率为纵坐标,绘制竞争标准曲线,见图二。分析该曲线,建立的 MB-ELISA 法的检测灵敏度为 0.098ng/mL,为当 FB_1 浓度在 0.098-50ng/mL 时有较好线性关系 (图二),检测范围 0.098-50ng/mL,得到的标准方程为: $Y = -0.3016X + 0.6763$,其中: $R^2 = 0.9818$ 。

[0045] 由上述实施例可以看出,本发明可直接检测样品中的 FB_1 ,与常规酶联免疫检测方法相比,检测含有伏马毒素样品灵敏度更高,通过免疫磁珠的富集作用以及磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大,从而能够间接改变检测极限,提高检测的灵敏度,避免漏检。

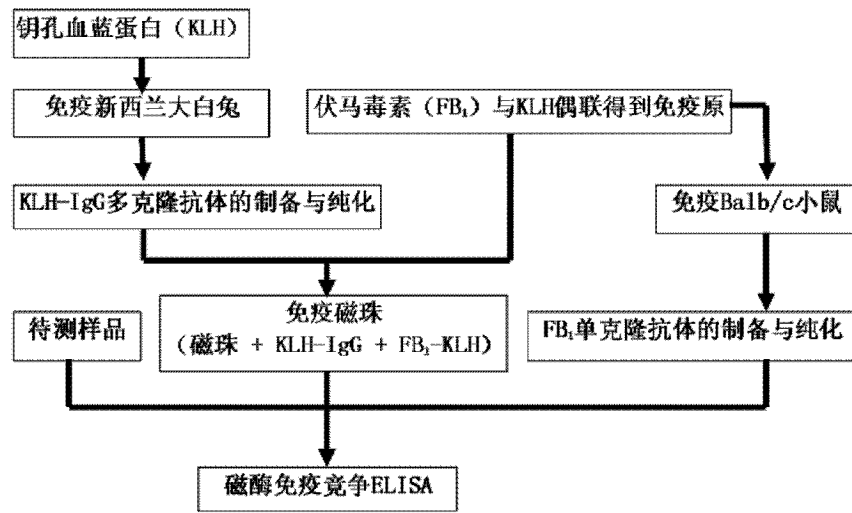


图 1

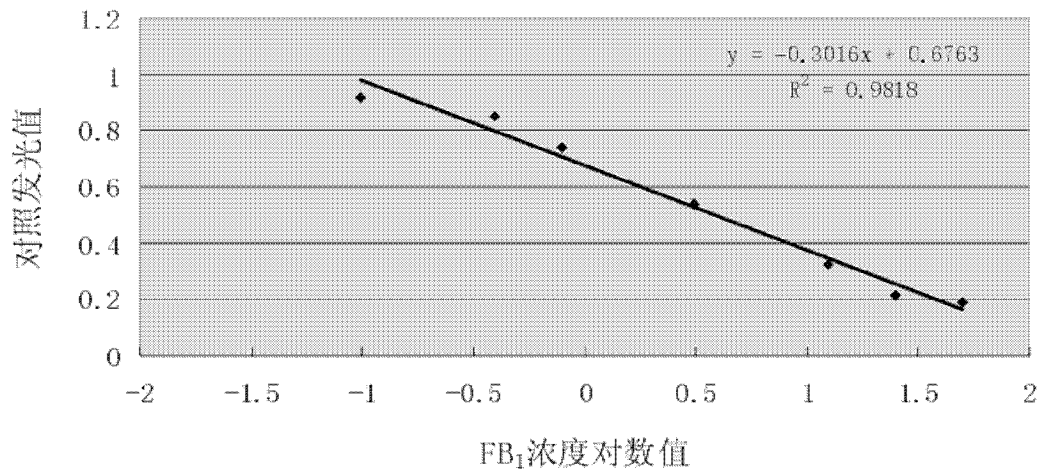


图 2

专利名称(译)	基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法		
公开(公告)号	CN101865924A	公开(公告)日	2010-10-20
申请号	CN201010210195.4	申请日	2010-06-26
[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 王雨晨 孙建和		
发明人	严亚贤 王雨晨 孙建和		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
其他公开文献	CN101865924B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种化学检测技术领域的基于免疫磁珠联合酶联免疫吸附试验检测伏马毒素的方法，通过制备伏马毒素-KLH偶联物和伏马毒素-OVA偶联物并将伏马毒素-KLH偶联物与免疫磁珠结合，制备成伏马毒素检测磁珠；再利用伏马毒素-KLH偶联物制备伏马毒素单克隆抗体，并与伏马毒素检测磁珠一并运用竞争ELISA方法进行伏马毒素分子检测，并通过磁性分离法获取伏马毒素检测磁珠，进行显色后通过酶标仪获得检测结果。本发明对低于检测极限的伏马毒素样品，通过免疫磁珠的富集作用以及磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大，从而能够间接改变检测极限，提高检测的灵敏度，避免漏检。

