



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110672852 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201810707250.7

(22)申请日 2018.07.02

(71)申请人 中国医学科学院药用植物研究所
地址 100193 北京市海淀区马连洼北路151号

(72)发明人 孔维军 肖昌彬 杨美华 刘晓菲
廖晓芳

(74)专利代理机构 北京方安思达知识产权代理有限公司 11472
代理人 陈琳琳 张红生

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

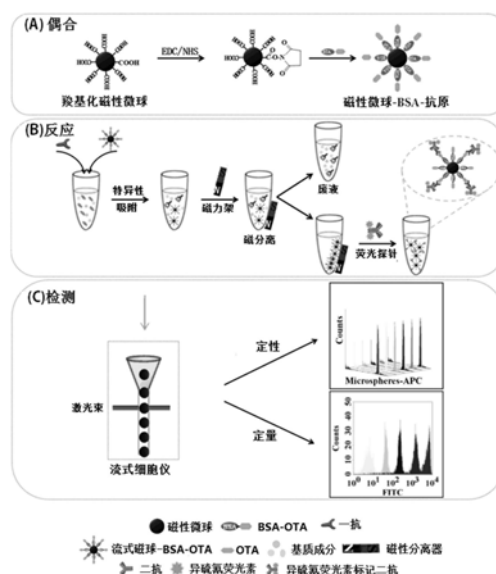
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法,所述检测方法包括以下步骤:1)磁性荧光微球偶联牛血清白蛋白-赭曲霉毒素A复合物的制备;2)标准曲线的制定:利用不同浓度的OTA标准品建立标准曲线;3)中药中赭曲霉毒素A的检测。本发明的流式磁球检测方法具有灵敏度高、检测速度快、特异性强、重复性好、绿色节能、环境友好、高通量检测等优势,能准确分析复杂基质中痕量真菌毒素的残留水平。



1. 一种中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法,所述检测方法包括以下步骤:

1) 磁性荧光微球偶联牛血清白蛋白-赭曲霉毒素A复合物的制备:

以磁性荧光微球为载体,在其表面偶联牛血清白蛋白-赭曲霉毒素A,得到磁性荧光微球-牛血清白蛋白-赭曲霉毒素A复合物;

2) 标准曲线的制定:利用不同浓度的OTA标准品建立标准曲线;

3) 中药中赭曲霉毒素A的检测:

中药样品提取液加入赭曲霉毒素A单克隆抗体,孵育,再加入磁性荧光微球-牛血清白蛋白-赭曲霉毒素A复合物作为捕获探针,孵育,磁吸附分离富集、洗涤后再加入异硫氰酸荧光素标记羊抗小鼠二抗作为荧光信号探针,经免疫反应,再次磁吸附分离富集、洗涤后采用流式细胞仪检测磁性荧光微球表面的荧光强度,计算磁性荧光微球表面的荧光强度抑制率,依据绘制的标准曲线和磁性荧光微球表面抑制率计算出中药样品中赭曲霉毒素A的含量。

2. 根据权利要求1所述的中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法,其特征在于,步骤1)中,所述磁性荧光微球直径为 $6.20\mu\text{m}$,其表面带有羧基活性功能基团。

3. 根据权利要求1所述的中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法,其特征在于,步骤1)中,在碳化二亚胺和N-羧基琥珀酰亚胺盐酸盐存在条件下,在载体表面共价偶联牛血清白蛋白-赭曲霉毒素A。

4. 根据权利要求1所述的中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法,其特征在于,所述中药为麦芽。

一种中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物免疫分析和分析化学领域,涉及一种中药中赭曲霉毒素A超灵敏检测的流式磁球检测方法,特别是涉及磁性微球技术、悬浮式液相芯片技术、免疫分析快速检测方法。

背景技术

[0002] 赭曲霉毒素(ochratoxins, OTs)是自然界中的赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)、纯绿青霉(*Penicillium viridicatum*)和碳黑曲霉(*Aspergillus Carbonarius*)产生的有毒次级代谢产物,是以异香豆素与苯丙氨酸为结合体的衍生物。其中赭曲霉毒素A(OTA)的毒性最强,具有严重的肾毒性及致癌、致畸、致突变、免疫抑制等毒性作用,已被世界卫生组织(WHO)划定为IIB类(可能的人类)致癌物。已有报道表明,食品、农产品、中药材、“药食同源”食品等基质中OTA的发生率和残留水平均较高,不仅会影响其质量和安全性,达不到治疗疾病的目的,也会对人类健康和生命安全造成潜在威胁。《中国药典》(2015年版)仅规定了麦芽、陈皮、僵蚕等19味中药材中黄曲霉毒素的限量标准,尚未涉及OTA。鉴于中药材中OTA的高检出率及高残留水平而相关限量标准缺失的现状,建立简单、灵敏、高效的分析手段快速监测大批量中药材中OTA的残留水平,并总结其残留规律,进而制定相应的限量标准已成为中药材安全监督部门及相关研究领域迫切需要解决的关键问题。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种中药中赭曲霉毒素A超灵敏检测的流式磁球检测方法。本发明的流式磁球检测方法具有灵敏度高、检测速度快、特异性强、重复性好、绿色节能、环境友好、高通量检测等优势,能准确分析复杂基质中痕量真菌毒素的残留水平。

[0004] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0005] 一种中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法,所述检测方法包括以下步骤:

[0006] 1) 磁性荧光微球包被牛血清白蛋白-OTA复合物的制备:

[0007] 以磁性荧光微球为载体,在其表面偶联牛血清白蛋白-OTA,得到磁性荧光微球-牛血清白蛋白-OTA复合物;

[0008] 2) 标准曲线的制定:利用不同浓度的OTA标准品建立标准曲线;

[0009] 3) 中药中赭曲霉毒素A的检测:

[0010] 中药样品提取液加入OTA单克隆抗体,孵育,再加入磁性荧光微球-牛血清白蛋白-OTA复合物,孵育,磁吸附分离富集、洗涤后再加入异硫氰酸荧光素标记羊抗小鼠二抗,经免疫反应,磁吸附分离富集、洗涤后采用流式细胞仪检测磁性荧光微球表面的荧光强度,计算磁性荧光微球表面的荧光强度抑制率,依据绘制的标准曲线和磁性荧光微球表面抑制率计算出中药样品中OTA的含量。

[0011] 流式磁球技术(Cytometric magnetic-bead array, CMBA)以一系列荧光强度不同的磁性微球为载体、仅需少量样品即可实现样品中多种目标成分快速检测的新型高通量分

析技术。作为一种新型固体载体,流式磁球易使基质液与磁球偶联物更快分离,外界磁场的存在使偶联、清洗、离心等过程更简单、快捷,大大降低了磁球的损失率,洗涤更充分,不仅非特异性吸附少,而且节约时间,增强了磁球表面的荧光强度,高效提高了方法的检测灵敏度,实现中药材等复杂基质中OTA的更快、更灵敏、更高效分析,提高了检测速度、特异性和检测效率,在食品、农产品、中药材等基质中痕量成分分析中显示出速度快、灵敏度高、特异性强、操作简便、重复性好等优势,为相关领域基质的质量和安全监管及控制提供了可靠的技术保障。

附图说明

[0012] 图1为中药中赭曲霉毒素A超灵敏检测的流式磁球技术原理图;

[0013] 图2为中药中赭曲霉毒素A超灵敏检测的技术条件及参数考察结果图;

[0014] 其中,(a)磁球偶联BSA-OTA免疫分析物的用量;(b)FITC-IgG稀释倍数;(c)甲醇浓度;(d)基质溶液稀释倍数;(e)pH值;(f)孵育温度;(g)孵育时间;(h)检测灵敏度;

[0015] 图3麦芽样品提取液的竞争抑制校正曲线图;

[0016] 图4不同浓度的赭曲霉毒素A存在下流式磁球技术系统的散点图。

具体实施方式

[0017] 本说明书中公开的任一特征,除非特别叙述,均可被其他等效或具有类似目的的替代特征加以替换。除非特别叙述,每个特征只是一系列等效或者类似特征中的一个例子而已。所述仅仅是为了帮助理解本发明,不应该视为对本发明的具体限制。

[0018] 下面以附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[0019] 如图1所示,本发明以麦芽为模式中药材(还可以用于其他中药材中OTA的检测),通过图2所述一系列影响探针稳定性和专一性的条件优化,建立流式磁球技术检测其中OTA的污染水平。首先以带有活性功能基团修饰的荧光编码磁性微球为载体,采用共价偶联方式法将OTA抗原免疫蛋白偶联在磁性微球上。将抗原包被的磁性微球加入到中药样品提取液中,随后加入抗OTA特异性单克隆抗体,基于间接免疫竞争原理,磁性微球上共价偶联的BSA-OTA与样品中OTA共同竞争OTA单克隆抗体,经磁性分离器快速吸附、洗涤、富集后,再与异硫氰酸荧光素标记的荧光二抗探针特异识别和结合,经免疫反应和磁性分离器吸附、洗涤、富集后形成“磁性微球包被抗原蛋白-免疫单克隆抗体-荧光探针”偶合物,利用准确高效的流式细胞仪捕获磁性微球表面荧光强度,实现麦芽等复杂基质中OTA的快速定性定量测定。如图3所示,利用不同浓度的OTA标准品建立标准曲线及麦芽样品基质匹配曲线,建立样品中OTA含量与磁性微球表面的荧光强度成负相关检测模式,最终定性定量得到样品中的OTA准确含量从而确定其OTA的污染水平。

[0020] 所采用的磁性微球直径为 $6.20\mu\text{m}$,其表面带有羧基活性功能基团,经化学合成试剂碳化二亚胺(EDC)和N-羧基琥珀酰亚胺盐酸盐(NHS)将牛血清蛋白-赭曲霉毒素A抗原(BSA-OTA)共价偶联至磁性微球表面形成竞争抗原。

[0021] 分离和清洗过程均在外界磁力的作用下实现,磁性颗粒在磁场中定位移动,短时间即可完成聚集,可大大节约时间,提高分离速度,且省去了离心等步骤,操作也更为简单。

[0022] 如图2所示,实验过程中,考察以下8项条件(磁球偶联BSA-OTA免疫分析物的用量、

FITC-IgG稀释倍数、甲醇浓度、基质溶液稀释倍数、pH值、孵育温度、孵育时间、检测灵敏度),确定最稳定、专一的探针操作条件。具体制备方法和检测方法包括以下步骤:

[0023] 1、磁性荧光微球与BSA-OTA免疫分析物的制备:磁性荧光微球UMC3F(直径6.20 μ m,630nm激发,690nm发射)表面修饰的羧基与BSA-OTA蛋白偶联抗原BSA表面的氨基,通过活性酯法在交联剂碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)催化下形成牢固结合的酰胺键从而形成“磁性微球-BSA-OTA蛋白免疫分析物”,与样品中待测目标物共同竞争抗毒素的单克隆抗体。

[0024] 2、中药材中OTA的检测:建立一种基于间接竞争模式的流式微球检测方法,利用磁性荧光编码微球偶联BSA-OTA复合物与样品或标准品中的OTA共同竞争其定量的特异性识别抗体,然后加入“异硫氰酸荧光素标记羊抗小鼠二抗”作为荧光探针,通过流式细胞仪检测磁性微球本体和表面荧光,磁性微球本地荧光定位检测探针(如图4所示),表面的平均荧光强度间接地定量表达样品中OTA的含量。

[0025] 3、检测方法:偶联有检测抗原的磁性荧光微球与待测样品提取液、抗OTA单克隆抗体共同进行免疫竞争反应,反应后经磁性分离器磁吸附分离与富集,洗涤微球表面吸附和样品溶液中的杂质,清除体系中剩余的及已与样品中OTA免疫结合而未结合到微球表面的抗体,再加入荧光标记的二抗进行免疫反应后,再次磁吸附富集、洗涤、缓冲液重悬,采用流式细胞仪进行分析检测,根据图3所建立的标准曲线计算样品中的OTA毒素含量。

[0026] 实施例1:流式磁球技术快速检测中药麦芽中赭曲霉毒素A含量

[0027] 1、仪器及材料:

[0028] a.仪器:

BD FACSCalibur 流式细胞仪	美国 BD 公司;
LC-20AD XR 液相色谱仪	日本岛津公司;
AB 5500 QTRAP [®] 质谱仪	美国 AB SCIEX 公司;
TUS-200P 恒温振荡金属浴	上海一恒公司;
KQ-500 超声仪	昆山市超声仪器有限公司;
ANKE TGL-16C 高速离心机	上海安亭公司;

[0029] AB-135-S 电子分析天平 瑞士 Mettler-Toledo 公司;

pH 计 德国 Sartorius 公司;

WH-861 型旋涡混合器 金坛市盛蓝仪器制造有限公司;

Eppendorf 可调移液器 德国 Eppendorf 公司;

ZD-9556 水平摇床 太仓市科教器材厂;

XMTD-6000 型恒温水浴锅 北京市长风仪器仪表公司;

八孔磁吸附磁力架 西安金磁纳米生物技术有限公司。

[0030] b.材料:

[0031] OTA对照品:浓度为1mg/mL,购于新加坡Pribolab公司,纯度 $\geq 99\%$;色谱分析用甲

醇为色谱纯,美国Fisher Scientific公司;水为娃哈哈纯净水;其余试剂均为分析纯。

[0032] 羧基化红色荧光磁性微球UMC3F:直径 $6.20\mu\text{m}$,630nm激发,690nm发射,购自美国Bangs laboratories (Fishers,IN,USA) 公司;

[0033] 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA):纯度为 $>99.8\%$,购自美国Sigma-Aldrich公司;

[0034] 赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白(BSA-OTA,7.8mg/mL)与赭曲霉毒素A单克隆抗体(Monoclonal antibodies,mAb,7.2mg/mL)购自山东绿都生物工程有限公司;

[0035] 异硫氰酸荧光素标记羊抗小鼠二抗(Fluorescein Isothiocyanate (FITC) labeled Goat anti-Mouse IgG (H+L),1.5mg/mL)购自美国Fitzgerald公司;

[0036] 吗啉乙磺酸(MES)、N-羧基琥珀酰亚胺盐酸盐(NHS)、碳化二亚胺(EDC)购自美国Sigma公司;

[0037] 所测麦芽样品分别购自河北(8批次)、安徽(2批次)、广东(2批次)、黑龙江(1批次)、内蒙古(1批次),所有样品均为市场上随机购买而来,低温干燥后备用。

[0038] 10mM的PBS (pH7.4):NaCl 8.0g、 Na_2HPO_4 1.2g、 KH_2PO_4 0.2g、KCl 0.2g加蒸馏水溶解定容至1000mL;

[0039] 封闭液:PBSBT (pH7.4,含1%BSA和0.1%Tween-20);

[0040] 洗涤缓冲液:PBST (pH7.4,含0.1%Tween-20);

[0041] 保存缓冲液:PBSBTN (pH7.4,含0.1%BSA、0.01%Tween-20和0.05% NaN_3);

[0042] 活化缓冲液:50mM MES (pH5.0);

[0043] 偶联缓冲液:50mM MES (pH6.0);

[0044] 偶联剂:0.32M EDC、0.33M NHS;

[0045] 样品提取液:甲醇-PBS (60:40,v/v);

[0046] 样品稀释液:甲醇-PBS (20:80,v/v);

[0047] pH调节均用2M HCl和2M NaOH,溶液在使用前均过 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜,其他试剂均为分析纯。

[0048] 2、具体制备方法和检测方法如下:

[0049] a、磁性荧光微球偶联抗原的制备:取 $20\mu\text{L}$ (1.458×10^6 个)磁性荧光微球于2mL EP管中,加入200 μL 活化缓冲液振荡30s,充分混匀后静置5min,磁力架磁吸附2min弃去上清液,用活化缓冲液清洗2次后加入160 μL 偶联缓冲液(20 μL EDC和20 μL NHS),于恒温振荡金属浴中孵育(25°C ,600rpm)30min,磁吸附后去上清,加入200 μL 偶联缓冲液及BSA-OTA蛋白偶联物,充分混匀后恒温振荡金属浴上孵育2h,每隔30min振摇均匀,磁吸附后去上清。清洗2次后加入500 μL 封闭液,再于恒温振荡金属浴中孵育2h,每隔30min振摇均匀,磁吸附后去上清,清洗2次后加入1mL保存缓冲液于 4°C 储藏备用。分别取1、2、4、8、10、20和30 μL 磁球偶联BSA-OTA免疫分析物,加入200 μL PBS混匀,BD FACSCalibur流式细胞仪检测并计数,磁性荧光微球偶联抗原的制备过程均避光操作。

[0050] b、标准曲线的制定:取适量1.0mg/mL OTA甲醇储备液,加入麦芽阴性样品提取液,制备100、25、6.25、1.56、0.391、0.098、0.01、0.001、0ng/mL的基质匹配标准溶液。取100 μL 不同浓度的基质匹配标准品加入到2mL EP管中,加入100 μL 50ng/mL抗体孵育20min,加入8 μL 磁性微球偶联BSA-OTA免疫分析物孵育40min,磁吸附后去上清,清洗2次,加入1:4000倍稀

释的FITC-IgG荧光二抗孵育1h后清洗2次,加入200μL PBS振荡混匀后BD FACSCalibur流式细胞仪检测。检测时,635nm激光激发磁性微球本体荧光在流式细胞仪的APC荧光值通道检测,488nm激光激发磁球表面结合的FITC-IgG荧光,在流式细胞仪的FITC荧光值通道检测。收集2000个门内磁球,约90s后结束检测,每个样品平行制备3份检测样品进行平行检测,分析磁球表面的平均荧光强度 (Mean Fluorescence Intensity,MFI) 即可对样品中OTA进行定量分析,其表面的荧光强度与OTA标准品的浓度呈负相关,通过抑制率与OTA标准品浓度即可制作标准曲线。本发明建立的流式磁球技术检测OTA的标准曲线,如下表1。方法的检测限 (IC₁₀)、线性范围 (IC₁₀~IC₉₀) 及IC₅₀值分别为0.025ng/mL、0.025ng/mL-13.94ng/mL和0.463ng/mL。

[0051] 表1麦芽提取液竞争抑制校正曲线的参数

[0052]

样品	标准曲线	R^2	IC ₁₀ (ng/mL)	IC ₅₀ (ng/mL)	IC ₉₀ (ng/mL)
麦芽提取液	$Y=0.029+(1-0.029)/(1+(0.463/X)^{0.742})$	0.978	0.025	0.463	13.94
Malt extract					

[0053] 其中,Y为结合率,X为分析物浓度。

[0054] c、麦芽待测样品中OTA含量分析:称取麦芽粗粉(过2号筛)1g于10mL EP管中,加入2mL样品提取液,涡旋混匀1min,超声提取15min,12000rpm高速离心10min,吸取上清液过0.22μm聚四氟乙烯滤膜。稀释5倍后14000rpm离心10min,取上清备用。取100μL麦芽样品提取液加入到2mL EP管中,加入100μL 50ng/mL抗体孵育20min,再加入8μL磁性微球偶联BSA-OTA免疫分析物孵育40min,磁吸附后去上清,清洗2次,加入1:4000倍稀释的FITC-IgG荧光二抗孵育1h后清洗2次,加入200μL PBS振荡混匀后BD FACSCalibur流式细胞仪检测。检测时,635nm激光激发磁球本体荧光,在流式细胞仪的APC荧光值通道检测,488nm激光激发微球表面结合的FITC-IgG荧光,在流式细胞仪的FITC荧光值通道检测。收集2000个门内磁球,约90s后结束检测,每个样品平行制备3份进行检测,计算磁球表面的荧光强度抑制率,依据绘制的标准曲线和磁球表面抑制率可计算出麦芽样品中OTA的含量。表2为市场上随机购买麦芽样品中测得的OTA毒素含量,其中“-”表示未检测到。

[0055] 表2 16批麦芽中OTA的污染水平

[0056]

编号	来源	OTA 含量 (g/kg)			编号	来源	OTA 含量 (g/kg)		
1	河北	-	-	-	9	安徽	-	-	-
2	河北	-	-	-	10	安徽	-	-	-
3	河北	-	-	-	11	安徽	1.98	2.69	3.45
4	河北	-	-	-	12	安徽	-	-	-
5	河北	-	-	-	13	广东	-	-	-
6	河北	-	-	-	14	黑龙江	1.63	2.50	1.77
7	河北	-	-	-	15	广东	-	-	-
8	河北	-	-	-	16	内蒙古	-	-	-

[0057] d、加样回收率：制备阴性（不含OTA）麦芽样品溶液，按照1、5和25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个水平添加OTA标准品溶液，上样检测并计算方法的加样回收率及相对标准偏差。结果表明，回收率为86.48%~99.29%，相对标准偏差2.05%~3.73%，如表3所示。

[0058] 表3样品中OTA的添加回收率实验 (n=3)

[0059]

添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)			平均回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD, %)
1	86.48	94.84	87.49	89.60	3.73
5	94.12	90.92	98.56	94.53	3.13
25	95.60	94.50	99.29	96.46	2.05

[0060] e、交叉反应：样品提取液中OTA结构类似物及其它真菌毒素的存在可能会导致交叉反应，进而影响结果的准确性。本研究考察了黄曲霉毒素B₁ (AFB₁)、呕吐毒素、伏马毒素、玉米赤霉烯酮对抗体交叉污染的影响。

[0061] 交叉反应率 (%) = $\text{IC}_{50}(\text{OTA}) / \text{IC}_{50}(\text{其他毒素}) \times 100\%$ ；

[0062] 结果发现，黄曲霉毒素B₁、呕吐毒素、伏马毒素、玉米赤霉烯酮与抗体的交叉反应率均小于1.2，表明其他毒素与OTA的抗体几乎不产生交叉反应。

[0063] 本发明的工艺参数（如温度、时间等）区间上下限取值以及区间值都能实现本法，在此不一一列举实施例。

[0064] 本发明未详细说明的内容均可采用本领域的常规技术知识。

[0065] 最后所应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制。尽管参照实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应该理解,对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,都不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

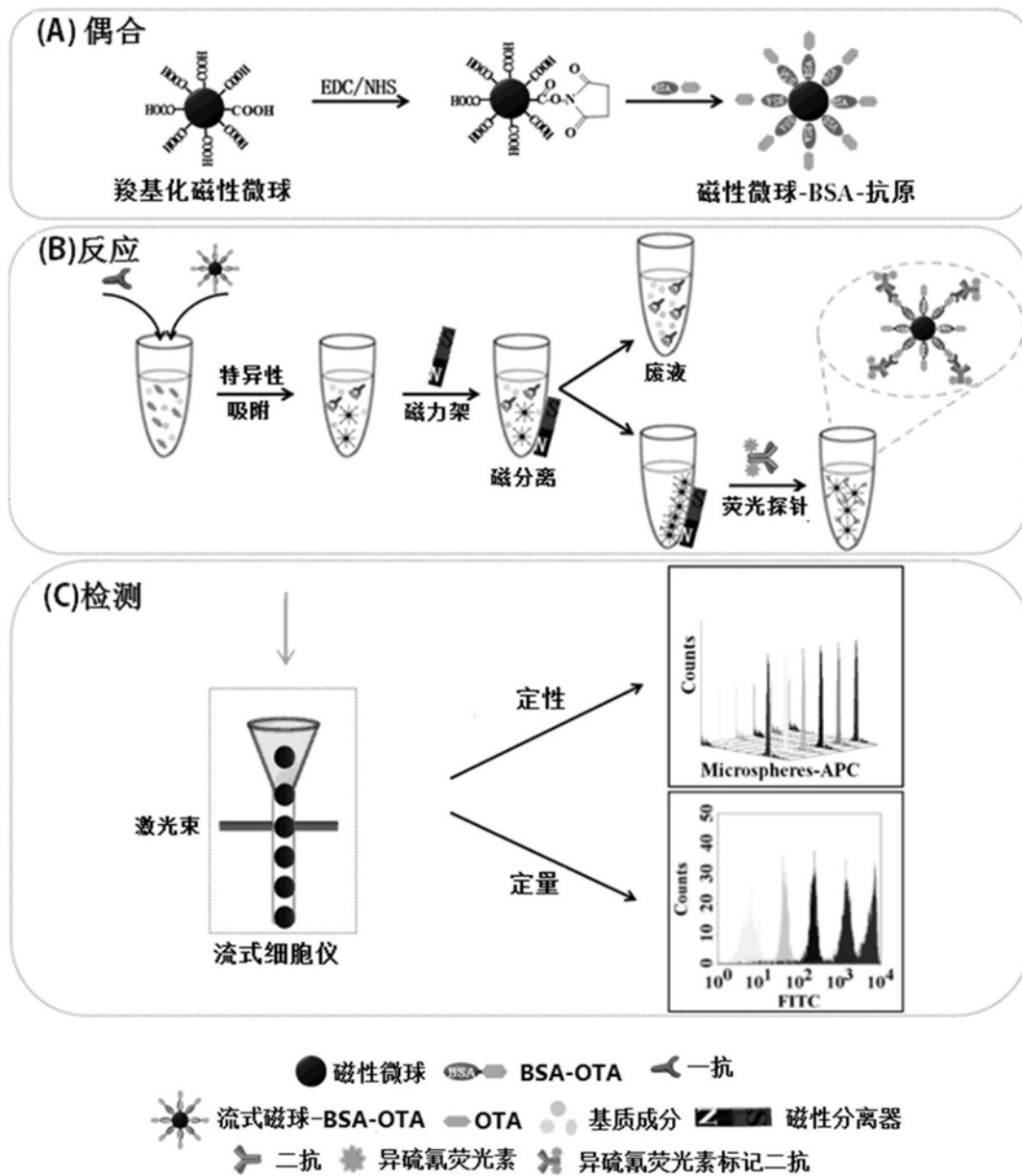


图1

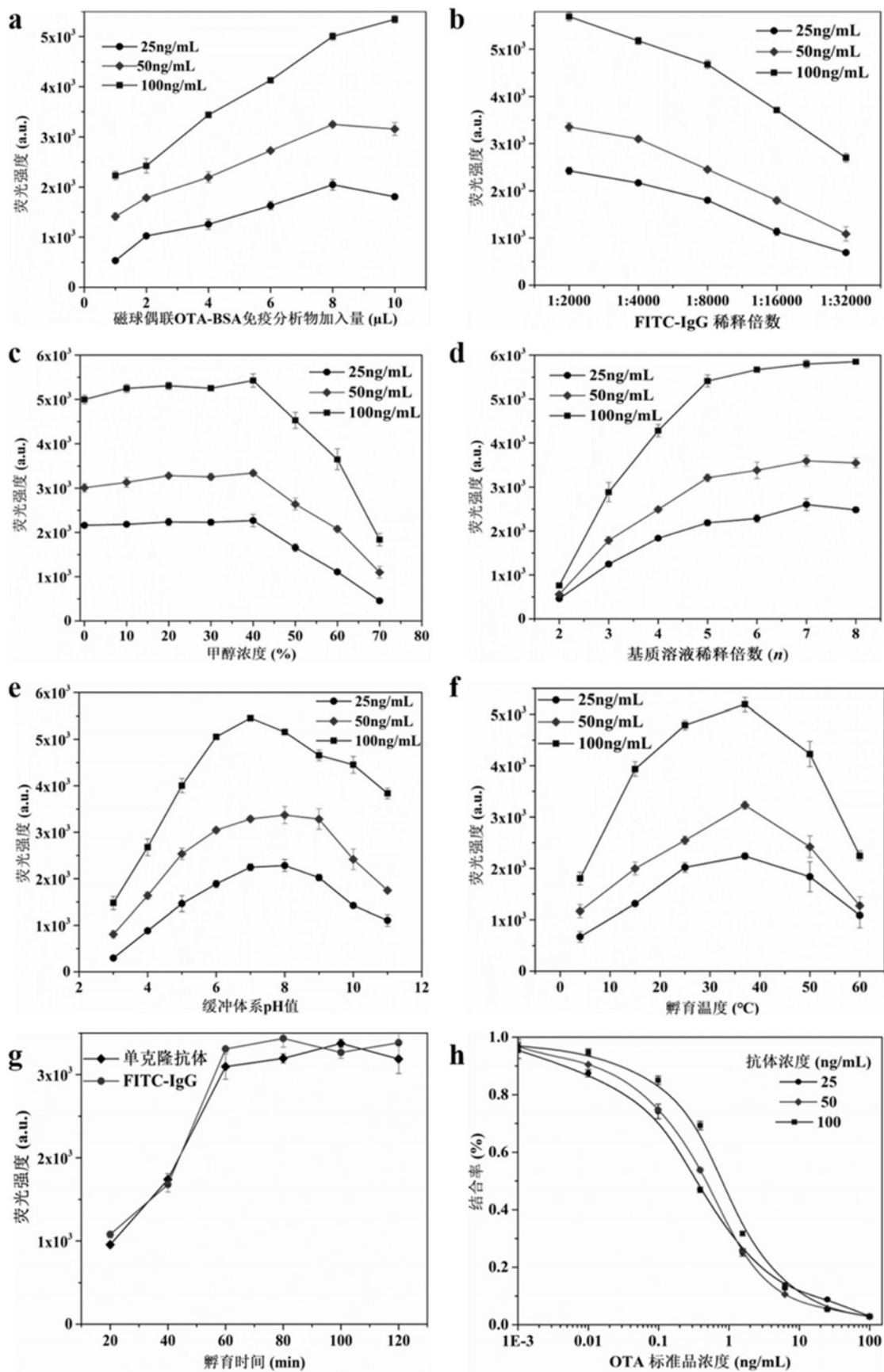


图2

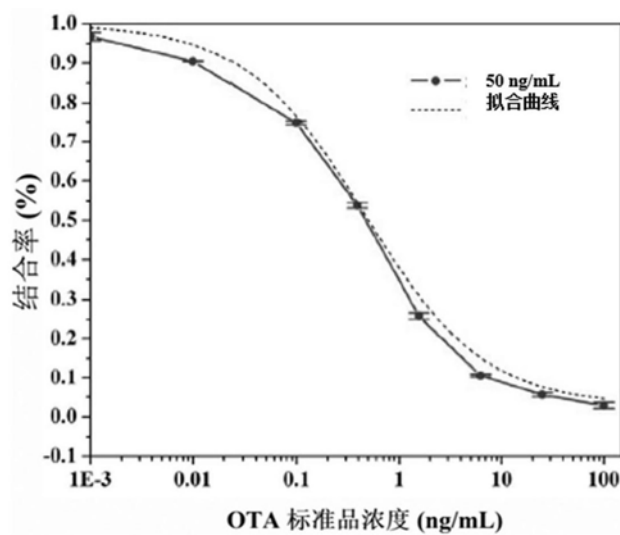


图3

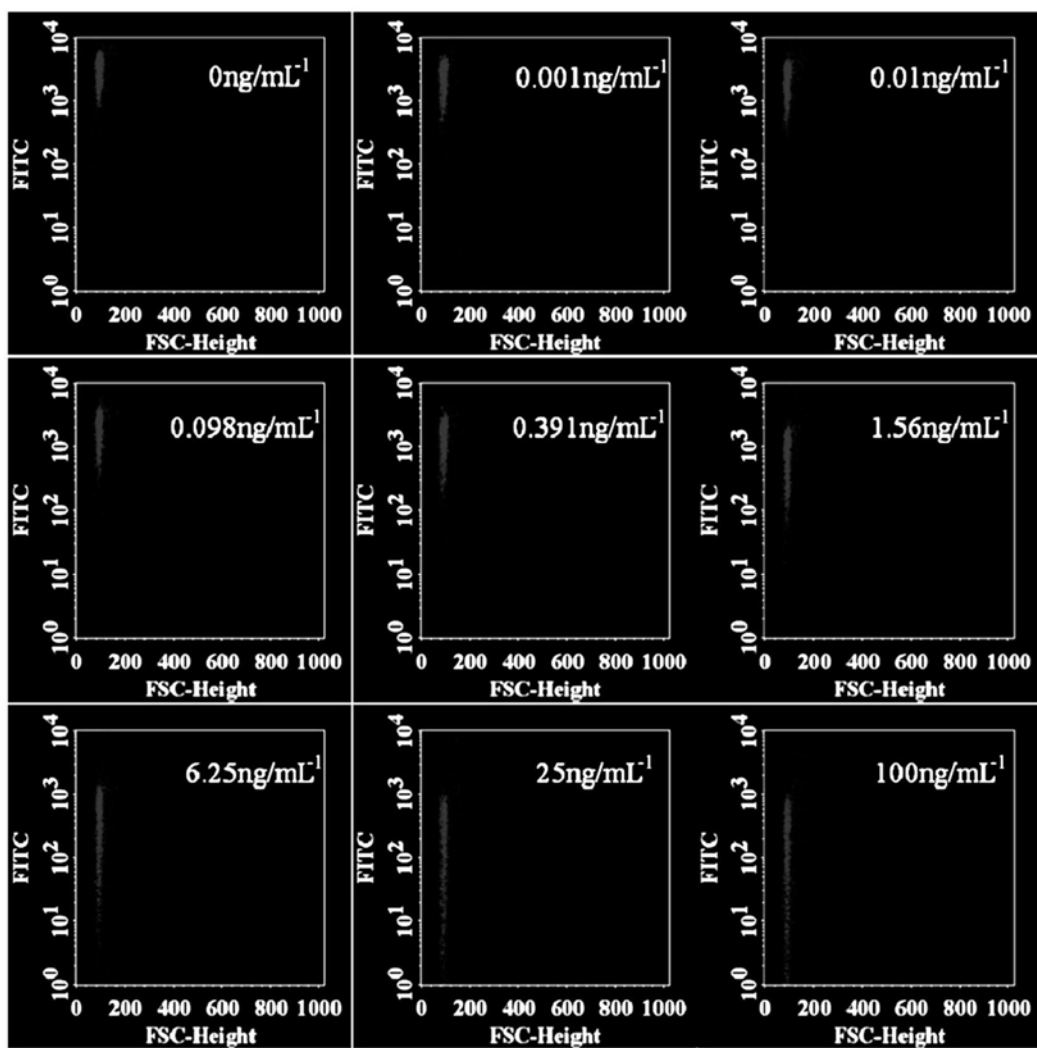


图4

专利名称(译)	一种中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法		
公开(公告)号	CN110672852A	公开(公告)日	2020-01-10
申请号	CN201810707250.7	申请日	2018-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院药用植物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院药用植物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院药用植物研究所		
[标]发明人	孔维军 杨美华 刘晓菲 廖晓芳		
发明人	孔维军 肖昌彬 杨美华 刘晓菲 廖晓芳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	陈琳琳 张红生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种中药中赭曲霉毒素A的流式磁球检测方法，所述检测方法包括以下步骤：1)磁性荧光微球偶联牛血清白蛋白-赭曲霉毒素A复合物的制备；2)标准曲线的制定：利用不同浓度的OTA标准品建立标准曲线；3)中药中赭曲霉毒素A的检测。本发明的流式磁球检测方法具有灵敏度高、检测速度快、特异性强、重复性好、绿色节能、环境友好、高通量检测等优势，能准确分析复杂基质中痕量真菌毒素的残留水平。

