



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108517013 A

(43)申请公布日 2018.09.11

(21)申请号 201810311537.8

C07K 14/77(2006.01)

(22)申请日 2018.04.09

C07K 14/795(2006.01)

C12N 9/10(2006.01)

(71)申请人 国家食品安全风险评估中心

G01N 33/64(2006.01)

地址 100022 北京市朝阳区广渠路37号院2  
号楼

G01N 33/535(2006.01)

申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防  
控制所

(72)发明人 骆鹏杰 陈霞 周爽 李敬光

赵云峰 蒋双勤

(74)专利代理机构 北京华进京联知识产权代理  
有限公司 11606

代理人 王赛

(51)Int.Cl.

C07K 16/44(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

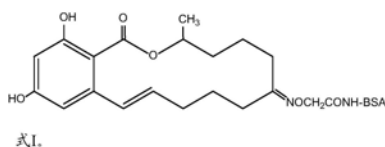
权利要求书1页 说明书8页

### (54)发明名称

玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯  
酮酶联免疫试剂盒及其检测方法

### (57)摘要

本发明提供一种玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒及其检测方法,该制备方法包括以下步骤:S1、提供玉米赤霉烯酮半抗原,所述玉米赤霉烯酮半抗原的化学结构式如式I表示;S2、将所述玉米赤霉烯酮半抗原与第一载体蛋白偶联,得到偶联物;S3、将步骤S2得到的偶联物作为免疫原对产蛋禽类进行免疫,收集免疫后的所述产蛋禽类所产的禽蛋;S4、从所述禽蛋的蛋液中提取玉米赤霉烯酮卵黄抗体。



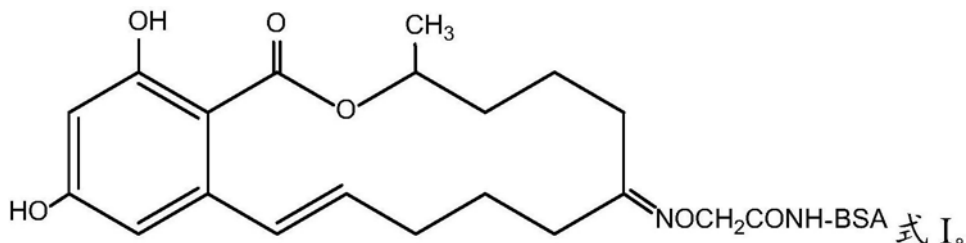
1. 一种玉米赤霉烯酮抗体的制备方法,该方法包括以下步骤:

S1、提供玉米赤霉烯酮半抗原,所述玉米赤霉烯酮半抗原的化学结构式如式I表示;

S2、将所述玉米赤霉烯酮半抗原与第一载体蛋白偶联,得到偶联物;

S3、将所述偶联物作为免疫原对产蛋禽类进行免疫,收集免疫后的所述产蛋禽类所产的禽蛋;

S4、从所述禽蛋的蛋液中提取玉米赤霉烯酮卵黄抗体,



2. 根据权利要求1所述玉米赤霉烯酮抗体的制备方法,其特征在于,所述产蛋禽类选择23周到28周的白来航鸡。

3. 根据权利要求1所述玉米赤霉烯酮抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤S4中所述提取方法采用聚乙二醇沉淀法,包括三个梯度洗脱阶段,第一个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为3%~4%;第二个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为5~10%;第三个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为10~15%。

4. 根据权利要求3所述玉米赤霉烯酮抗体的制备方法,其特征在于,所述第一个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为3.5%;所述第二个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为8%;所述第三个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为12%。

5. 根据权利要求3所述玉米赤霉烯酮抗体的制备方法,其特征在于,所述聚乙二醇沉淀法中,所述聚乙二醇为聚乙二醇6000。

6. 根据权利要求1所述玉米赤霉烯酮抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤S1包括将玉米赤霉烯酮毒素与O-羧甲基羟胺反应得到所述玉米赤霉烯酮半抗原。

7. 一种玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括根据权利要求1至6中任一项所述的玉米赤霉烯酮抗体的制备方法制备得到的玉米赤霉烯酮卵黄抗体。

8. 根据权利要求7所述的玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒,其特征在于,还包括包被有包被原的酶标板,所述包被原包括所述玉米赤霉烯酮与第二载体蛋白的偶联物。

9. 根据权利要求8所述的玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白独立的为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清白蛋白、匙孔血蓝蛋白、谷胱甘肽S转移酶、纯化的重组蛋白、人工合成多肽、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白、多价抗原肽、酶或多肽。

10. 一种玉米赤霉烯酮的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

S10、将待测样品进行前处理;

S20、使用权利要求7至9中任意一项所述的玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒对经过所述前处理的所述待测样本进行酶联免疫法检测;以及

S30、分析检测结果。

## 玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,特别是涉及一种玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN) 又称F-2毒素,主要成分为禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌等产生的2,4-二羟基苯甲酸内酯类化合物。玉米赤霉烯酮主要污染玉米、麦类、谷物等作物,具有很强的雌性激素作用,可引起猪、大鼠、小鼠、家禽等动物的雌激素过多症和严重的生殖道症状及不孕症,还具有免疫毒性、基因毒性等,对人也有雌激素作用。玉米赤霉烯酮一般用薄层色谱、高效液相色谱法检测,但因其操作繁杂、费用昂贵而影响实际应用,不是所有的检测机构均拥有。应用酶联免疫检测技术研发的新一代真菌毒素检测产品,与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等优点,操作时间非常短,符合大批量饲料样品检测的要求,但酶联免疫检测技术需要使用大量的抗体,目前市面上已有的玉米赤霉烯酮抗体制备方法产量小、价格昂贵,因此急需提供一种成本低廉可大规模生产的玉米赤霉烯酮抗体制备方法。

### 发明内容

[0003] 基于此,有必要针对玉米赤霉烯酮抗体产量小、成本高的问题,提供一种玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒及其检测方法。

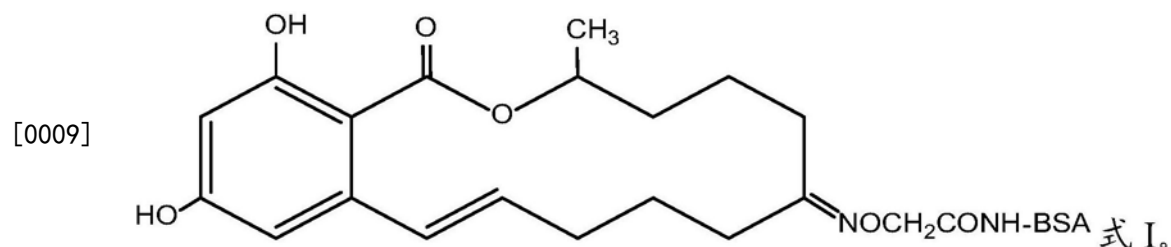
[0004] 一种玉米赤霉烯酮抗体的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0005] S1、提供玉米赤霉烯酮半抗原,所述玉米赤霉烯酮半抗原的化学结构式如式I表示;

[0006] S2、将所述玉米赤霉烯酮半抗原与第一载体蛋白偶联,得到偶联物;

[0007] S3、将所述偶联物作为免疫原对产蛋禽类进行免疫,收集免疫后的所述产蛋禽类所产的禽蛋;

[0008] S4、从所述禽蛋的蛋液中提取玉米赤霉烯酮卵黄抗体,



[0010] 在其中一个实施例中,所述产蛋禽类选择23周到28周的白来航鸡。

[0011] 在其中一个实施例中,所述步骤S4中所述提取方法采用聚乙二醇沉淀法,包括三个梯度洗脱阶段,第一个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为3%~4%;第二个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为5~10%;第三个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体

积比为10~15%。

[0012] 在其中一个实施例中,所述第一个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为3.5%;所述第二个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为8%;所述第三个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为12%。

[0013] 在其中一个实施例中,所述聚乙二醇沉淀法中,所述聚乙二醇为聚乙二醇 6000。

[0014] 所述步骤S1包括将玉米赤霉烯酮毒素与O-羧甲基羟胺反应得到所述玉米赤霉烯酮半抗原。

[0015] 一种玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括所述的玉米赤霉烯酮抗体的制备方法制备得到的玉米赤霉烯酮卵黄抗体。

[0016] 在其中一个实施例中,还包括包被有包被原的酶标板,所述包被原包括所述玉米赤霉烯酮与第二载体蛋白的偶联物。

[0017] 在其中一个实施例中,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白独立的为天然蛋白质、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、卵清白蛋白(OVA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、谷胱甘肽S转移酶(GST)、纯化的重组蛋白、人工合成多肽、兔血清白蛋白(RSA)、人血清白蛋白(HSA)、卵清蛋白(OVA)、多价抗原肽(MAP,主要指多聚Lys)中的一种,或者是人工蛋白、酶、多肽。

[0018] 一种玉米赤霉烯酮的检测方法,包括以下步骤:

[0019] S10、将待测样品进行前处理;

[0020] S20、使用所述的玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒对经过所述前处理的所述待测样本进行酶联免疫法检测;以及

[0021] S30、分析检测结果。

[0022] 本发明对玉米赤霉烯酮半抗原偶联得到人工抗原,免疫产蛋禽类,提取禽蛋中的卵黄抗体,纯化得到玉米赤霉烯酮-1gY抗体,所述玉米赤霉烯酮-1gY抗体具有典型的免疫球蛋白的空间构象且性质稳定,为生产特异性强、灵敏度高的玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒提供了核心原材料,并且含有所述玉米赤霉烯酮卵黄抗体的试剂盒在生产、运输和贮存过程中具有产量高、成本低廉、稳定性好、精确性高的优点,本发明所提供的玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒及其检测方法具有广阔的发展前景。

## 具体实施方式

[0023] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下通过实施例,对本发明的玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒及其检测方法进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

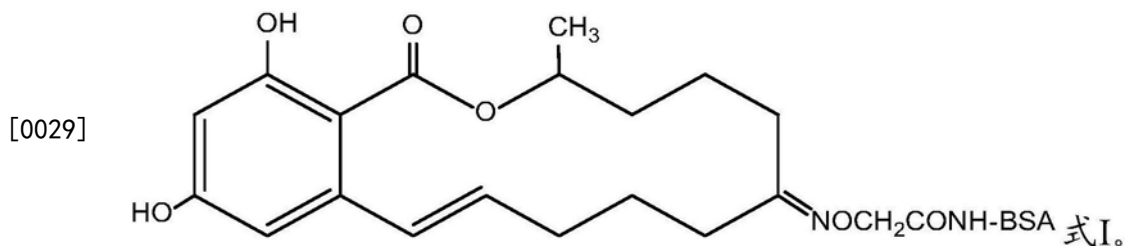
[0024] 本发明实施例提供一种玉米赤霉烯酮抗体的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0025] S1、提供玉米赤霉烯酮半抗原,所述玉米赤霉烯酮半抗原的化学结构式如式I表示;

[0026] S2、将所述玉米赤霉烯酮半抗原与第一载体蛋白偶联,得到偶联物;

[0027] S3、将步骤S2得到的偶联物作为免疫原对产蛋禽类进行免疫,收集免疫后的所述产蛋禽类所产的禽蛋;

[0028] S4、从所述禽蛋的蛋液中提取玉米赤霉烯酮卵黄抗体,



[0030] 步骤S1可包括：将玉米赤霉烯酮毒素与O-羧甲基羟胺 ( $\text{H}_2\text{NOCH}_2\text{COOH}$ ) 反应得到所述玉米赤霉烯酮半抗原。优选地，将所述的玉米赤霉烯酮毒素与吡啶类有机溶剂混合后加入所述O-羧甲基羟胺，用甲醇-磷酸缓冲盐溶液处理得到结晶体，该结晶体即所述玉米赤霉烯酮半抗原。所述玉米赤霉烯酮分子结构与大分子载体蛋白偶联，不影响其本身的抗原决定簇的结构尤为关键。发明人通过大量实验发现，所述O-羧甲基羟胺起到交联剂作用的同时，可防止大分子载体蛋白对半抗原的屏蔽效应，即防止半抗原与载体结合时，抗原决定簇被包埋在卷曲凹陷的大分子结构中，抗原决定簇的完全外露使得所产生的对应抗体的专一性相应增加，进而交叉反应减少。半抗原或其衍生物结构中末端的活性基团如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 为间隔臂，与载体蛋白偶联合成完全抗原。因此，所述O-羧甲基羟胺为所述玉米赤霉烯酮分子引入羧基官能团的同时，对所述玉米赤霉烯酮分子抗原决定簇的结构没有影响。

[0031] 进一步优选地，取5~10mg的所述玉米赤霉烯酮溶解在5~10mL的吡啶中，加入3~5mg所述O-羧甲基羟胺。在一实施例中，取5mg的所述玉米赤霉烯酮溶解在10mL的吡啶中，加入3.3mg所述O-羧甲基羟胺，同时用甲醇-磷酸盐缓冲溶液处理得到结晶体。优选地，选用30%的所述甲醇-磷酸盐缓冲溶液得到结晶体，得到所述玉米赤霉烯酮半抗原。

[0032] 在步骤S2中，优选地，将所述步骤S1得到的结晶物溶于有机溶剂中得到溶液A，进一步优选地，所述有机溶剂为二氧六环；称取所述第一载体蛋白溶于磷酸缓冲盐溶液中得到溶液B，将溶液A和溶液B混合，再缓慢滴加N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和N,N-二环己基碳化二亚胺 (DCC) 溶液，反应得到的偶联物为免疫原。更进一步优选地，将所述步骤S1得到的结晶物溶于所述二氧六环中，称50~100mg的第一载体蛋白溶于3~5mL的磷酸缓冲盐溶液中，将以上两种溶液在4℃缓慢混合，再缓慢滴加N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和N,N-二环己基碳化二亚胺 (DCC) 溶液，混合物于室温下搅拌10~16h，用HCl调整pH至6.0，通风橱中吹干，将6mg的DCC溶于0.5mL二氧六环中缓慢滴加DCC溶液，混合物于室温下搅拌反应48h，产物为免疫原，分装-20℃保存备用。

[0033] 所述第一载体蛋白，可以是天然蛋白质、牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、兔血清白蛋白 (RSA)、卵清白蛋白 (OVA)、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、谷胱甘肽S转移酶 (GST)、纯化的重组蛋白、人工合成多肽、人血清白蛋白 (HSA)、卵清蛋白 (OVA)、多价抗原肽 (MAP，主要指多聚Lys) 中的一种，也可以是人工蛋白、酶、多肽。

[0034] 在步骤S3中，优选地，选取健康状况良好的产蛋禽类鸡，进一步优选地，所述产蛋禽类选择23周到28周的白来航鸡，在本实施例中所述产蛋禽类为25周的白来航鸡。此阶段的白来航鸡的产蛋率恒定，鸡蛋中卵黄抗体的特异性强，产量高于其他阶段的白来航鸡。分别取步骤S2制备的所述免疫原与弗氏完全佐剂乳化，优选地，免疫原与弗氏完全佐剂按照体积比1:1的比例乳化。首次免疫后开始收集鸡蛋，4℃保存备用。

[0035] 在步骤S4中，所述卵黄抗体即卵黄中的免疫球蛋白 (immunoglobulin of yolk, IgY)，作为禽类的一种免疫球蛋白IgY在功能上相当于哺乳动物免疫球蛋白IgG，但结构上

不同于哺乳动物免疫球蛋白IgG,针对特定的玉米赤霉烯酮人工抗原得到的所述玉米赤霉烯酮,卵黄抗体具有典型的免疫球蛋白的空间构象且性质稳定,持续高亲和力的效价,是一种易于生产、廉价的抗体,免疫一只鸡所收集到的仅一个鸡蛋中含有的特异性卵黄抗体的量远远高于免疫一只兔所收集到的全部血清中的抗体量,因此可以实现玉米赤霉烯酮卵黄抗体批量生产。

[0036] 优选地,采用聚乙二醇沉淀法提取卵黄抗体。具体的,将卵黄液与无菌的0.01mol/L磷酸缓冲盐溶液(PBS)按照1:2的比例稀释,第一阶段将稀释液混匀后加3%~4%的聚乙二醇,充分混匀后于摇床室温作用30~40min,低浓度的聚乙二醇将卵黄液中的脂质物质聚集沉淀,对混合液10000×g、4℃离心20~30min,用滤纸过滤回收上清液,卵黄抗体为水溶性蛋白质溶解在上清液中。第二阶段再加滤液体积7~9%的聚乙二醇,摇床室温作用30min后,4℃环境下10000×g离心15~25min,卵黄抗体与聚乙二醇结合形成沉淀,弃上清液收集沉淀用PBS重悬。第三阶段加11%~12%的聚乙二醇,摇床室温作用30min,4℃、10000×g离心10~20min,弃上清液收集沉淀用PBS重悬。再按比例加入甲醛对第三阶段用PBS重悬得到的卵黄抗体液进行再次脱脂,同时对卵黄抗体内微生物进行灭活,灭菌后的卵黄抗体保存期更长,在PBS中透析24~48h,并用SDS-PAGE鉴定提取结果,抗体分装后于-20℃冰箱保存备用。聚乙二醇(PEG)是非离子型水溶性聚合物,易溶于水,且不会导致卵黄抗体提取液的温度变化,高浓度不会引起蛋白质变性,沉淀蛋白质的时间比盐析蛋白常用的硫酸铵还短,缩短了纯化操作的时间。进一步优选地,所述聚乙二醇采用聚乙二醇6000可以提高卵黄抗体的回收率。

[0037] 进一步优选的,第一个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比为3.5%;第二个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比8%;第三个阶段所述洗脱液聚乙二醇的质量体积比12%,经SDS-PAGE鉴定提取结果可知,此梯度产生的杂蛋白最少,抗体分装后于-20℃冰箱保存备用。

[0038] 本发明实施例还提供一种玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒,包括所述的玉米赤霉烯酮抗体的制备方法制备得到的玉米赤霉烯酮卵黄抗体。

[0039] 所述抗体优选以一抗工作液的形式提供。具体的,将所述玉米赤霉烯酮卵黄抗体稀释形成稀释液,即得到所述一抗工作液。

[0040] 优选的,所述玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒还包括酶标二抗工作液,优选的,所述酶标二抗工作液为碱性磷酸酶标记的羊抗鸡二抗工作液。

[0041] 所述玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒还包括包被有包被原的酶标板,所述包被原包括所述玉米赤霉烯酮与第二载体蛋白的偶联物。所述包被原的制备方法与所述玉米赤霉烯酮人工抗原的制备方法不同,使得通过所述玉米赤霉烯酮人工抗原偶联物得到的所述玉米赤霉烯酮卵黄抗体识别包被原的特异性强,有助于提高所述玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒的特异性。优选地,所述第二载体蛋白溶于碳酸氢钠溶液中得到A溶液,将所述玉米赤霉烯酮溶解在有机溶液中,优选地,所述有机溶液为甲醇溶液;再将所述玉米赤霉烯酮溶液缓慢加入A溶液中,分装-20℃冻存。包被抗原的制备方法与人工抗原的制备方法不同,有助于提高所述玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒反应的特异性。

[0042] 所述第二载体蛋白可以是天然蛋白质、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、卵清白蛋白(OVA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、谷胱甘肽S转移酶(GST)、纯化的重组蛋白、人工合

成多肽、兔血清白蛋白 (RSA)、人血清白蛋白 (HSA)、卵清蛋白 (OVA)、多价抗原肽 (MAP, 主要指多聚Lys) 中的一种, 也可以是人工蛋白、酶、多肽或聚合物。所述第二载体蛋白区别于所述第一载体蛋白的种类, 所述第一载体蛋白与所述第二载体蛋白的种类不同, 有助于进一步提高所述玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒反应的特异性。

[0043] 优选的, 所述玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒还包括底物显色液, 优选的, 所述底物显色液包括对硝基酚磷酸盐显色液。所述硝基酚磷酸盐显色液在碱性磷酸酶的作用下, 释放出的对硝基苯酚 (4-NPP) 在碱性溶液中分子重排, 可形成黄色的水溶性醌类产物 (最大光吸收值405-415nm)。

[0044] 优选的, 所述玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒还包括20×浓缩洗涤液和玉米赤霉烯酮标准品液, 更优选的, 标准品的浓度分别为0μg/kg、0.05μg/kg、0.15μg/kg、0.45μg/kg、1.35μg/kg、4.05μg/kg。

[0045] 本发明实施例还提供一种玉米赤霉烯酮的检测方法, 包括以下步骤:

[0046] S10、将待测样品进行前处理;

[0047] S20、使用所述的玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒对经过所述前处理的所述待测样本进行酶联免疫法检测; 以及

[0048] S30、分析检测结果。

[0049] 所述步骤S10将待测样品进行前处理, 优选的, 所述待测样品为玉米、小麦、面粉、饲料、玉米副产物。

[0050] 优选的, 所述将待测样品进行前处理, 是对所述待测样品中的所述玉米赤霉烯酮进行有机溶剂提取, 再将其稀释到适合检测的浓度作为待测样品备用。

[0051] 在一个具体的实施例中, 所述步骤S20用所述玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒进行检测, 是向包被了包被原的酶标板中加入标准品溶液或待测样本溶液 (50μL/孔), 再加入所述一抗工作液 (50μL/孔) 和所述酶标二抗工作液 (50μL/孔), 室温反应20min后, 弃上清, 对酶标板洗涤四次。每次洗涤过程如下, 每孔中加入250μL洗涤液, 30s后弃上清, 将20×浓缩洗涤液用水稀释至20倍体积, 即为洗涤液, 用吸水纸拍干, 每孔加入100μL底物显色液, 用酶标仪检测。设置五个复孔, 每个浓度的标准品溶液发光强度的平均值 (B) 除以0溶液的发光强度的平均值 (B<sub>0</sub>), 再乘以100%即结合率。计算公式: 结合率 (%) =  $B/B_0 \times 100\%$ 。

[0052] 在所述步骤S30中以标准品溶液中的玉米赤霉烯酮的浓度 (ng/mL) 为X轴, B/B<sub>0</sub>为Y轴, 绘制标准曲线图。根据标准曲线的回归方程可以求出待测样本溶液中玉米赤霉烯酮的浓度。本发明中检测结果的分析可以利用专业软件, 可以实现大量样本的快速分析, 整个检测过程只需30min就可以完成。结合率 (B/B<sub>0</sub>) 为50%时对应的标准品溶液中的玉米赤霉烯酮的浓度即为IC<sub>50</sub>值。

[0053] 所述玉米赤霉烯酮试剂盒的检测原理: 当在酶标板上预包被包被原后, 加入待测样本溶液, 随后加入所述一抗工作液和所述酶标二抗工作液, 待测样本溶液中残留的所述玉米赤霉烯酮与所述酶标板上包被的包被原竞争一抗, 与一抗结合的包被原所形成的抗原-抗体结合物进一步的与所述酶标二抗工作液进一步结合反应后, 加入底物显色液后, 所述酶标二抗上的碱性磷酸酶与底物显色液发生化学反应发出黄色光, 其发光强度与待测样本溶液中的所述玉米赤霉烯酮含量成负相关, 再与标准曲线比较即可得出待测样本溶液中所述玉米赤霉烯酮的含量。

**[0054] 实施例1****[0055] 玉米赤霉烯酮半抗原的制备**

[0056] 将5mg玉米赤霉烯酮加入到3ml吡啶溶剂中,再向其中加入3.3mg的O-羧甲基羟胺,在室温下搅拌反应24h,然后真空干燥,得到的固体残留物溶于5ml蒸馏水中,用1mol/L的NaOH调节pH至8.0,未参与反应的玉米赤霉烯酮通过乙酸乙酯从水相中抽提除去。水相中的反应产物用HCl调节pH至3.0,得到的沉淀为反应产物,并用10ml乙酸乙酯抽提四次,抽提物用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>过滤后再抽干,残余物用30%甲醇-磷酸盐缓冲溶液处理使其结晶。

**[0057] 玉米赤霉烯酮人工抗原的制备**

[0058] 将制备得到的结晶物溶于二氧六环中配成10mmol/L溶液,称取67mg的牛血清白蛋白溶于3.5ml的0.05mol/L、pH7.2的磷酸盐缓冲溶液中,将以上两种溶液在4℃环境下,缓慢进行混合,再将3mgN-羟基琥珀酰亚胺和6mg N,N-二环己基碳化二亚胺溶液溶于0.5ml二氧六环溶液中,室温环境下缓慢搅拌16h,用HCl 调整pH至6.0,通风橱中吹干,再将6mg的DCC溶于0.5ml二氧六环后将其缓慢滴加其中,混合物于室温下再搅拌反应48h,产物用0.01mmol/L的磷酸盐缓冲溶液透析3天,产物为免疫原,分装-20℃保存备用。

**[0059] 卵黄抗体的制备**

[0060] 选取2只健康状况良好的25周龄白来航鸡,在动物房适应性饲养1周。分别取250微升抗原与等体积的弗氏完全佐剂乳化后,采用六点法每点0.1mL对鸡胸部肌肉注射。然后于第21、35、49天和63天用弗氏不完全佐剂乳化,对鸡进行加强免疫。首免后开始收集鸡蛋,4℃保存备用。

[0061] 卵黄抗体的分离与纯化采用聚乙二醇6000法提取卵黄抗体。卵黄液与无菌的0.01mol/L的磷酸盐缓冲溶液稀释1:2的体积比,混匀后加入与混合液体积相等的浓度为3.5%的聚乙二醇6000,充分混匀后于置于摇床上,设置摇床温度为室温作用40min。混合液通过10000×g转速、4℃环境下离心30min后,用滤纸过滤回收上清液,再加滤液体积相等的浓度为8.5%的聚乙二醇6000,摇床室温作用30min后,4℃环境下,转速10000×g离心25min,弃上清液,收集沉淀,将收集的沉淀用10mL磷酸盐缓冲溶液重悬,加入与重悬液体积相等的12%的聚乙二醇6000,摇床室温作用30min,4℃环境下、转速10 000×g离心20min,弃上清液收集沉淀用1.2mL磷酸盐缓冲溶液重悬,在磷酸盐缓冲溶液中透析24h,并用SDS-PAGE鉴定提取结果,抗体分装后于-20℃冰箱保存备用。

**[0062] 包被抗原酶标板的制备**

[0063] 将50mg的卵清蛋白溶于0.9ml的0.3mol/L的碳酸氢钠溶液中制备得到A液,将12mg的玉米赤霉烯酮溶解在100μl的甲醇得到B液;再将B溶液缓慢加入溶液中,搅拌过程中调节pH至6.0,在4℃中缓慢滴加7.5%甲醛溶液,密闭后在4℃中连续搅拌20h,产物用0.01mol/L的磷酸盐缓冲溶液透析3天,产物为包被原,分装-20℃冻存。

[0064] 将上述制备的包被原溶液用包被缓冲液稀释得到包被原稀释液。所述包被缓冲液即pH9.5、0.02M的碳酸盐溶液。将包被原稀释液加入酶标板,37℃孵育,优选的,每孔加入100μL,孵育16h。倾去孔内的液体,洗涤,拍干。每孔加入 200μL封闭液,所述封闭液为牛血清白蛋白和1000mLpH7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液的混合液。37℃温育2h,倾去孔内的液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

**[0065] 酶标二抗工作液的制备**

[0066] 将10mg的碱性磷酸酶溶解在2mL的pH为5.0的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,向该溶液中加入1.0%的戊二醛水溶液0.1mL。按照碱性磷酸酶(ALP)酶:抗体的质量比为1:2的比例加入二抗羊抗鸡抗体,室温搅拌反应4h。按照NaBH<sub>4</sub>与碱性磷酸酶(ALP)质量比为1:10的比例加入NaBH<sub>4</sub>,在室温环境下搅拌反应4h,得到碱性磷酸酶(ALP)标记的二抗溶液,用0.9%的生理盐水溶液透析纯化后4℃保存。

[0067] 标准品溶液的制备

[0068] 将玉米赤霉烯酮溶于pH7.4、0.05M的磷酸盐缓冲液中,分别得到浓度为0.02ng/mL、0.06ng/mL、0.18ng/mL、0.54ng/mL和1.62ng/mL的标准品溶液。将pH7.4、0.05M的磷酸盐缓冲液作为标准品溶液的阴性对照溶液,称为0溶液。

[0069] 玉米样品的处理(小麦、面粉与玉米的处理相同)

[0070] 将玉米粉碎后称取4.0g有代表性的样本置入50mL离心管中,加入60%的甲醇水溶液10mL与其混合。将离心管放置在振荡器上剧烈振荡10min,其转速为150r/min(采用手摇或者涡旋均需5min以上),转速在4000r/min以上离心5min即可。震荡后静置3min,再用定量滤纸过滤。取滤液100μL加入900μL去离子水,振荡5s或手摇混匀,取50μL样本稀释液分装备用。

[0071] 试剂盒的具体使用方法

[0072] S101、将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25℃)平衡30min以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0073] S102、取出需要数量的酶标板,将不用的酶标板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于2~8℃。切勿冷冻。

[0074] S103、洗涤液在使用前也需回温。

[0075] S104、编号:将样本和标准品对应微孔按序编号,每个样本和标准品做2孔平行,并记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0076] S105、加标准品/样本稀释液:加标准品/样本稀释液50μL到对应的微孔中,然后加入所述一抗工作液和所述酶标二抗工作液各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。

[0077] S106、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250μL/孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10s,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)。

[0078] S107、显色:加入底物液显色液50μL/孔轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光环境反应15min。

[0079] S108、测定:设定酶标仪于450nm处(建议用双波长450/630nm检测,请在5min内读完数据),测定每孔OD值。

[0080] S109、定量分析。

[0081] 百分吸光率的计算,标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本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%。

[0082] 标准曲线的绘制与计算

[0083] 以标准品百分吸光率为纵坐标,以玉米赤霉烯酮标准品浓度(μg/kg)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,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玉米赤霉烯酮实际量,并记录50%吸光率时

玉米赤霉烯酮的浓度，。

[0084] 试剂盒灵敏度包括方法灵敏度及方法的检测限。取空白样本20批次检测，按公式计算方法对样本的最低检测限值。公式中SD为标准偏差、MN为平均  $L_{OD}=MN+3SD$ 配置不同浓度的标准品，去 $R^2>0.99$ 曲线段，安排合理的浓度作标准曲线。确定绘制标准曲线，确定该试剂盒的线性范围为，方法灵敏度为  $0.02ng/mL^{-1}$ ，线性相关系数为0.9996。经空白样本检测，检测限为0.05ng/kg。

[0085] 检出限分别如下：

[0086] 玉米、小麦、面粉：1.25ng/kg

[0087] 饲料、玉米副产物：1.5ng/kg

[0088] 回收率：100±20%

[0089] 精密度：试剂盒的变异系数均小于10%。

[0090] 试剂盒稳定性试验考虑到运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将上述试剂盒在37℃、4℃、-20℃分别保存7天、14天、280天，测定的结果表明试剂盒各项指标完全正常。从结果可以看出试剂盒在2℃~8℃至少可以保存12 个月以上。

[0091] 配制黄曲霉毒素B1的标准品，用上述方法制备的试剂盒检测黄曲霉毒素B1 标准品得到的吸光率，制作黄曲霉毒素B1的标准曲线，呕吐毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮的标准曲线制作方式与黄曲霉毒素B1相同，得到50%抑制率时黄曲霉毒素B1、呕吐毒素、赭曲霉毒素的浓度。按照公式计算：交叉反应率(CR) = 50%抑制率时玉米赤霉烯酮浓度/50%抑制率时类似物浓度×100%。分别将黄曲霉毒素B1、呕吐毒素、赭曲霉毒素以及上文已经得到的玉米赤霉烯酮50%抑制率时溶液浓度作为50%抑制率时类似物浓度代入公式，所得交叉反应率结果如下：

[0092] 表1试剂盒特异性(交叉反应率)

[0093]

| 竞争物     | CR%   |
|---------|-------|
| 玉米赤霉烯酮  | 100.0 |
| 黄曲霉毒素B1 | <0.1  |
| 呕吐毒素    | <0.1  |
| 赭曲霉毒素   | <0.1  |

[0094] 表1的结果说明，本发明制备的试剂盒对于黄曲霉毒素B1、呕吐毒素、赭曲霉毒素的交叉反应率小于0.1，说明本发明制备的试剂盒检测玉米赤霉烯酮的特异性高。

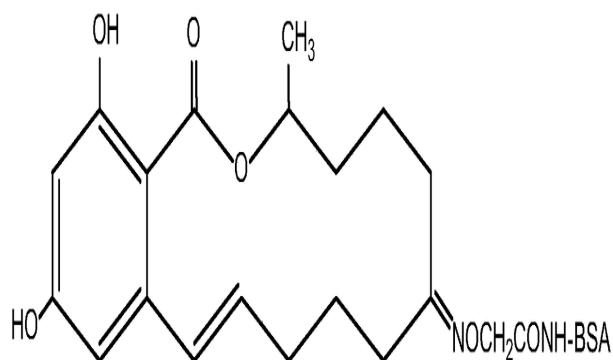
[0095] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载的范围。

[0096] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

|                |                                                                                                     |         |            |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒及其检测方法                                                                   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108517013A</a>                                                                        | 公开(公告)日 | 2018-09-11 |
| 申请号            | CN201810311537.8                                                                                    | 申请日     | 2018-04-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国家食品安全风险评估中心<br>中国疾病预防控制中心传染病预防控制所                                                                  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 国家食品安全风险评估中心<br>中国疾病预防控制中心传染病预防控制所                                                                  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 国家食品安全风险评估中心<br>中国疾病预防控制中心传染病预防控制所                                                                  |         |            |
| [标]发明人         | 骆鹏杰<br>陈霞<br>周爽<br>李敬光<br>赵云峰<br>蒋双勤                                                                |         |            |
| 发明人            | 骆鹏杰<br>陈霞<br>周爽<br>李敬光<br>赵云峰<br>蒋双勤                                                                |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/44 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C12N9/10 G01N33/64 G01N33/535                             |         |            |
| CPC分类号         | C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K2317/11 C12N9/1088 C12Y205/01018 G01N33/535 G01N33/64 |         |            |
| 代理人(译)         | 王赛                                                                                                  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                                      |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供一种玉米赤霉烯酮抗体的制备方法、玉米赤霉烯酮酶联免疫试剂盒及其检测方法，该制备方法包括以下步骤：S1、提供玉米赤霉烯酮半抗原，所述玉米赤霉烯酮半抗原的化学结构式如式I表示；S2、将所述玉米赤霉烯酮半抗原与第一载体蛋白偶联，得到偶联物；S3、将步骤S2得到的偶联物作为免疫原对产蛋禽类进行免疫，收集免疫后的所述产蛋禽类所产的禽蛋；S4、从所述禽蛋的蛋液中提取玉米赤霉烯酮卵黄抗体。



式I。