



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107356759 A

(43)申请公布日 2017. 11. 17

(21)申请号 201710645436.X

(22)申请日 2017.08.01

(83)生物保藏信息

CGMCC No.14309 2017.06.28

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 周立刚 王保民 傅小香 赖道万
王晓晗

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 何叶喧

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的方法及其专用酶联免疫试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的方法及其专用酶联免疫试剂盒。方法及试剂盒所使用的单克隆抗体是由小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌产生的,小鼠杂交瘤细胞系4C4F11在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.14309。本发明所提供的单克隆抗体能同时识别稻曲菌素A和稻曲菌素B,利用该单克隆抗体制备得到的酶联免疫试剂盒可用于定性或定量同时检测出样品中稻曲菌素A和稻曲菌素B,线性检测范围在2~76ng/mL,具有快速、灵敏的优点。本发明在农业、畜牧业和食品工业均有广阔的应用前景,预期能创造较大的经济效益。

1. 小鼠杂交瘤细胞系4C4F11,在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.14309。
2. 由权利要求1所述的小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌产生的单克隆抗体。
3. 权利要求2所述的单克隆抗体在检测或辅助检测稻曲菌素中的应用。
4. 权利要求1所述的小鼠杂交瘤细胞系4C4F11或权利要求2所述的单克隆抗体在制备检测或辅助检测稻曲菌素的试剂或试剂盒中的应用。
5. 一种检测或辅助检测稻曲菌素的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中含有独立包装的权利要求2所述的单克隆抗体。
6. 一种检测或辅助检测稻曲菌素的方法,包括使用权利要求5中所述的试剂盒对待测样品进行检测的步骤。
7. 权利要求5中所述试剂盒在定量检测稻曲菌素含量中的应用。
8. 将权利要求2所述的单克隆抗体和固相载体相偶联得到的免疫亲和吸附剂或以所述免疫亲和吸附剂为填料的免疫亲和色谱柱。
9. 含有权利要求8中所述的免疫亲和吸附剂的试剂盒或含有权利要求8中所述的免疫亲和色谱柱的试剂盒。
10. 权利要求8中所述的免疫亲和吸附剂或免疫亲和色谱柱或权利要求9中所述的试剂盒在分离纯化稻曲菌素中的应用。

一种同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 稻曲病(Rice false smut)是目前世界范围内严重危害水稻的一种真菌病害,也叫丰收病、伪黑穗病、绿黑穗病等,主要症状是在水稻穗部形成稻曲球。稻曲病病原为稻绿核菌,有性态学名为*Villosiclava virens* (Nakata) Tanaka&Tanaka,无性态学名为*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi。该病不仅造成水稻空秕率明显上升,使得水稻减产,还会形成稻曲球污染水稻,从而降低稻谷的产量和品质,更为严重的是产生对人畜有害的毒素,严重影响粮食与食品安全。已报道稻曲球和稻曲病菌中存在两类主要的真菌毒素,即稻曲菌素(Ustiloxins)和稻绿核菌素(Ustilaginoidins)。稻曲菌素为水溶性环肽,具有广泛的毒性,对水稻种子萌发、幼苗和愈伤组织生长有毒害作用;可造成畜禽生长和生殖能力的下降和内脏器官病变;对真核细胞微管蛋白组装和细胞骨架形成有抑制作用。

[0003] 基于稻曲菌素广泛的毒性,快速、准确了解稻曲球、稻曲病菌、以及稻草和稻谷及其制品中稻曲菌素的种类和含量就显得尤为重要。在已经阐明结构的5种稻曲菌素中,稻曲菌素A(Ustiloxin A,简称UA)和B(Ustiloxin B,简称UB)是存在于样品中的主要毒素,它们的毒性也最高。目前已有的关于稻曲菌素的检测分析方法主要针对稻曲菌素A或B,可采用高效液相色谱(HPLC)法、液质联用(LC-MS)法和间接竞争酶联免疫检测(icELISA)法进行分析。由于免疫测定技术具有高通量、快速及灵敏度高等特点,在真菌毒素的检测方面已经获得了广泛的应用。虽然已有关于稻曲菌素A的抗血清和单克隆抗体,以及稻曲菌素B的单克隆抗体及其专用酶联免疫试剂盒的文献报道,但都只能单一检测稻曲菌素A或稻曲菌素B。基于稻曲菌素A和稻曲菌素B通常同时存在于实际样品中,且占稻曲菌素总量的95%以上,所以开发一种能同时识别稻曲菌素A和稻曲菌素B的单克隆抗体的酶联免疫检测方法及其专用酶联免疫试剂盒将使得样品中主要稻曲菌素的快速检测十分便利和高效,因而具有非常重要的意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明提供的小鼠杂交瘤细胞系4C4F11,已于2017年6月28日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),登记入册编号为CGMCC No.14309。

[0006] 由小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌产生的单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

[0007] 所述单克隆抗体可用于检测或辅助检测稻曲菌素,尤其适合于检测或辅助检测植

物样品中的稻曲菌素。

[0008] 本发明所提供的小鼠杂交瘤细胞系4C4F11或由小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌产生的单克隆抗体可用于制备检测或辅助检测稻曲菌素的试剂或试剂盒,特别是用于制备检测或辅助检测植物样品中的稻曲菌素的试剂或试剂盒。

[0009] 本发明还保护一种检测或辅助检测稻曲菌素的酶联免疫试剂盒,所述试剂盒中含有独立包装的由小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌产生的单克隆抗体。

[0010] 所述试剂盒中还含有稻曲菌素A标准品和/或稻曲菌素B标准品。

[0011] 所述稻曲菌素A标准品可为稻曲菌素A或由所述稻曲菌素A配制成的一系列不同浓度的稻曲菌素A溶液;所述一系列不同浓度的稻曲菌素A溶液的浓度具体可为:200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL和3.125ng/mL。所述稻曲菌素A溶液的溶剂具体可为水,稀释可用样品稀释液。

[0012] 所述稻曲菌素B标准品可为稻曲菌素B或由所述稻曲菌素B配制成的一系列不同浓度的稻曲菌素B溶液;所述一系列不同浓度的稻曲菌素B溶液的浓度具体可为:200 ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL和3.125ng/mL。所述稻曲菌素B溶液的溶剂具体可为水,稀释可用样品稀释液。

[0013] 所述试剂盒中还含有稻曲菌素A酶标记物UA-HRP。所述稻曲菌素A酶标记物 UA-HRP是将稻曲菌素A采用辣根过氧化物酶HRP标记得到的。

[0014] 所述稻曲菌素A酶标记物UA-HRP的制备方法包括如下步骤:(1)将辣根过氧化物酶HRP溶液与稻曲菌素A溶液混合,搅拌,得到混合溶液;(2)向步骤(1)得到的混合溶液中加入 NaBH_4 水溶液,搅拌;(3)将步骤(2)的溶液用PBS透析(4次),得到的溶液与等体积甘油混匀,得到稻曲菌素A酶标记物UA-HRP。所述辣根过氧化物酶HRP溶液的制备方法包括如下步骤:将辣根过氧化物酶HRP溶解在包被缓冲液中,加入0.1M的 NaIO_4 水溶液,室温下搅拌20min,然后用0.2M的醋酸-醋酸钠缓冲液透析(两次,每次6h);透析得到的溶液用0.2M的醋酸-醋酸钠缓冲液稀释200倍,得到辣根过氧化物酶HRP溶液。所述辣根过氧化物酶HRP、包被缓冲液和 NaIO_4 水溶液的配比关系为4mg:1mL:200 μL 。所述稻曲菌素A溶液的制备方法包括如下步骤:将稻曲菌素A溶解于水中,得到稻曲菌素A溶液。所述稻曲菌素A和水的配比关系为3mg:350 μL 。所述辣根过氧化物酶HRP溶液与稻曲菌素A溶液的配比关系为1mL:350 μL 。所述步骤(1)得到的混合溶液pH=9.5。所述步骤(1)中,搅拌具体可为室温搅拌2h。所述步骤(2)中,所述 NaBH_4 水溶液中 NaBH_4 的浓度为4mg/mL。

[0015] 所述试剂盒中还含有独立包装的羊抗鼠IgG(购自Jackson公司,商品目录号为115-005-003)。

[0016] 所述试剂盒中还含有独立包装的包被缓冲液。

[0017] 所述试剂盒中还含有独立包装的洗涤液。

[0018] 所述试剂盒中还含有独立包装的样品稀释液。

[0019] 所述试剂盒中还含有独立包装的底物缓冲液。

[0020] 所述试剂盒中还含有独立包装的终止缓冲液。

[0021] 以上任一所述样品稀释液的溶剂为水,溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和NaCl、吐温-20和明胶;溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和NaCl在所述样品稀释液中的浓度分别为0.02M、0.0015M和0.14M;所述吐温-20和明胶在所述样品稀释液中的百分含量为0.1%(体积百分数)和0.5%

(0.5g/100mL)。所述样品稀释液的pH为7.5。

[0022] 以上任一所述包被缓冲液的溶剂为水,溶质为 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 ;溶质 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 在包被缓冲液中的浓度分别为0.01M和0.04M。所述包被缓冲液pH为9.6。

[0023] 以上任一所述洗涤液的溶剂为水,溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和吐温-20;溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 在洗涤液中的浓度分别为0.02M、0.0015M和0.14M;吐温-20在洗涤液中的体积百分含量为0.1%。所述洗涤液的pH值为7.5。

[0024] 以上任一所述底物缓冲液由A液和B液等体积混合得到;A液溶剂为水,溶质为四甲基联苯胺(TMB)和一水合柠檬酸,溶质TMB和一水合柠檬酸在A液中的浓度分别为0.003M和0.05M;B液的溶剂为水,溶质为柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 ,溶质柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 在B液中的浓度分别为0.01M和0.03M。所述底物缓冲液的pH 值为3.5。

[0025] 以上任一所述终止缓冲液为浓度为1M的盐酸水溶液。

[0026] 以上任一所述试剂盒可用于定量检测稻曲菌素,尤其适合于定量检测植物样品中的稻曲菌素。

[0027] 本发明还保护一种检测或辅助检测稻曲菌素的方法,包括使用以上任一所述的试剂盒对待测样品进行检测的步骤。

[0028] 所述方法包括如下步骤(1)~(7):

[0029] (1)待测样品经水提取,提取液直接检测或加适量样品稀释液稀释成样品液;

[0030] (2)包被:取96孔酶标板,采用羊抗鼠IgG溶液进行包被,200 μL /孔;羊抗鼠 IgG的浓度为1000ng/mL,溶剂为包被缓冲液;37 $^{\circ}\text{C}$ 包被3h,用洗涤液洗涤4次;

[0031] (3)加样品:每孔加入100 μL 样品液;

[0032] (4)加稻曲菌素A酶标记物和单克隆抗体:每孔依次加入50 μL 稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液的稀释液(用样品稀释液将稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液稀释5000倍)和50 μL 小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌的单克隆抗体溶液(浓度为250 ng/mL);每种稀释液设置三个复孔;置湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下30min,洗板4次;

[0033] (5)显色:取10mL底物缓冲液,向其中加入10 μL 的30% (质量分数) H_2O_2 ,得到底物溶液,将底物溶液加入酶标板中,每孔200 μL 。避光显色15min;

[0034] (6)终止:每孔加入50 μL 终止缓冲液,用酶标仪450nm处测定各孔的OD值。

[0035] (7)在同一块板上同时做标准曲线,根据标准曲线计算得到样品中稻曲菌素的含量。

[0036] 以上任一所述稻曲菌素包括稻曲菌素A和稻曲菌素B。

[0037] 本发明提供的单克隆抗体对稻曲菌素A和稻曲菌素B均有良好的结合特性,即对稻曲菌素A和稻曲菌素B具有普适性。

[0038] 因此利用本发明提供的单克隆抗体定性检测稻曲菌素时,由于待测样本的未知性以及不确定性,如果结果为阴性、待测样本既不含有稻曲菌素A也不含有稻曲菌素B,如果结果为阳性、待测样本可能含有稻曲菌素A也可能含有稻曲菌素B也可能既含有稻曲菌素A也含有稻曲菌素B。

[0039] 因此利用本发明提供的单克隆抗体定量检测稻曲菌素时,由于待测样本的未知性以及不确定性,检测到的稻曲菌素含量可能为稻曲菌素A的含量(待测样本中只含有稻曲菌素A不含有稻曲菌素B),也可能为稻曲菌素B的含量(待测样本中只含有稻曲菌素B不含有稻

曲菌素A),也可能为稻曲菌素A和B的总含量(待测样本中既含有稻曲菌素A又含有稻曲菌素B)。

[0040] 本发明还保护将所述由小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌产生的单克隆抗体和固相载体相偶联得到的免疫亲和吸附剂。

[0041] 本发明还保护以所述免疫亲和吸附剂为填料的免疫亲和色谱柱。

[0042] 本发明还保护含有所述免疫亲和吸附剂的试剂盒。

[0043] 本发明还保护含有所述免疫亲和色谱柱的试剂盒。

[0044] 本发明还保护所述免疫亲和吸附剂在分离纯化稻曲菌素中的应用。

[0045] 本发明还保护所述免疫亲和色谱柱在分离纯化稻曲菌素中的应用。

[0046] 本发明还保护含有所述免疫亲和吸附剂的试剂盒或含有所述免疫亲和色谱柱的试剂盒在分离纯化稻曲菌素中的应用。

[0047] 所述稻曲菌素包括稻曲菌素A和稻曲菌素B。

[0048] 本发明所提供的同时识别稻曲菌素A和稻曲菌素B的单克隆抗体是以稻曲菌素 B-OVA(稻曲菌素B和卵清白蛋白的偶联物)为免疫原,通过免疫小鼠、细胞融合和对杂交瘤细胞进行筛选得到的;利用该单克隆抗体制备得到的直接竞争酶联免疫试剂盒,用于定性或定量检测植物样品中的稻曲菌素A和稻曲菌素B,线性检测范围在2~72 ng/mL,具有快速、灵敏和高效的优点。本发明在农业、畜牧业和食品工业均有广阔的应用前景,预期能创造较大的经济效益。

附图说明

[0049] 图1为酶联免疫试剂盒检测稻曲菌素A和稻曲菌素B浓度的标准曲线。

具体实施方式

[0050] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0051] 弗氏完全佐剂:Sigma公司,产品目录编号为F5881。

[0052] 弗氏不完全佐剂:Sigma公司,产品目录编号为F5506。

[0053] 稻曲菌素A(标准品)和稻曲菌素B(标准品)的制备方法可具体参考发明人所发表的如下论文:

[0054] Shan T, Sun W, Liu H, Gao S, Lu S, Wang M, Chen Z, Wang S, Zhou L. Determination and analysis of ustiloxins A and B by LC-ESI-MS and HPLC in false smut balls of rice. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13 (9): 11275-11287.

[0055] Shan T, Sun W, Wang X, Fu X, Sun W, Zhou L. Purification of ustiloxins A and B from rice false smut balls by macroporous resins. Molecules, 2013, 18 (7): 8181-8199.

[0056] 稻曲菌素A(标准品)和稻曲菌素B(标准品)的制备方法也可具体参考专利:检测稻

曲菌素B的方法及其专用酶联免疫试剂盒(授权公告号:CN 104569416B)。

[0057] 包被缓冲液:溶剂为水,溶质为 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 ,pH值为9.6;溶质 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 在包被缓冲液中的浓度分别为0.01M和0.04M。

[0058] 洗涤液:溶剂为水,溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和吐温-20,pH值为7.5;溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 在洗涤液中的浓度分别为0.02M、0.0015M和0.14M;吐温-20在洗涤液中的体积百分含量为0.1%。

[0059] 样品稀释液:溶剂为水,溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 、吐温-20和明胶,pH值为7.5;溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 在所述样品稀释液中的浓度分别为0.02M、0.0015M和0.14M;所述吐温-20和明胶在所述样品稀释液中的百分含量为0.1%(体积百分数)和0.5%(0.5g/100mL)。

[0060] 底物缓冲液由A液和B液等体积混合得到,pH值为3.5;A液溶剂为水,溶质为四甲基联苯胺(TMB)和一水合柠檬酸,溶质TMB和一水合柠檬酸在A液中的浓度分别为0.003M和0.05M;B液的溶剂为水,溶质为柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 ,溶质柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 在B液中的浓度分别为0.01M和0.03M。

[0061] 终止缓冲液:浓度为1M的盐酸水溶液。

[0062] 实施例1、稻曲菌素B-OVA免疫原的合成

[0063] 1、称取1.1mg稻曲菌素B溶解在0.5mL(二甲基甲酰胺)DMF中,得到溶液A。

[0064] 2、称取8mg(卵白蛋白)OVA用1mL PBS溶解,得到溶液B。

[0065] 3、将步骤1得到的溶液A加入到步骤2得到的溶液B中,搅拌均匀,加入6.8 μL 5%(体积百分数)戊二醛,4℃过夜偶联,PBS中透析3天,得到稻曲菌素B-OVA 免疫原溶液。

[0066] 实施例2、稻曲菌素A酶标记物UA-HRP的合成

[0067] 1、称取4mg辣根过氧化物酶HRP溶解在1mL包被缓冲液中,加入200 μL 的 0.1M的 NaIO_4 溶液,在室温下搅拌20min。

[0068] 2、将步骤1得到的溶液用0.2M的醋酸-醋酸钠缓冲液透析两次,每次6h;透析得到的溶液用0.2M的醋酸-醋酸钠缓冲液稀释200倍,得到HRP溶液。

[0069] 3、称取3mg的稻曲菌素A粉末溶解在350 μL 的蒸馏水中,得到将稻曲菌素A 水溶液;将稻曲菌素A水溶液加至1mL步骤2得到的HRP溶液中,用0.1M的 NaOH 调节pH=9.5,室温下搅拌2h。

[0070] 4、往3所得的溶液中加入0.1mL的4mg/mL的 NaBH_4 水溶液,4℃下搅拌2h。

[0071] 5、将4所得溶液用PBS透析4次,得到溶液加入等体积甘油混匀,得到稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液,分装,-20℃保存。

[0072] 实施例3、杂交瘤细胞株的获得及同时识别稻曲菌素A和稻曲菌素B的单克隆抗体的制备

[0073] Bal b/C小白鼠:8-10周龄雌性小鼠,购自军事医学科学院实验动物中心。

[0074] SP2/0骨髓瘤细胞:购自中国兽医药品监察所。

[0075] 一、动物免疫

[0076] 1、以8-10周龄的雌性Bal b/C小白鼠作为实验动物。

[0077] 2、基础免疫:取1mL实施例1制备的稻曲菌素B-OVA免疫原溶液(浓度为1mg/mL,溶剂为PBS),加入等体积弗氏完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。

用乳化好的免疫原采用腹腔及背部皮下多点注射Ba1 b/C小白鼠,注射剂量为每只小鼠注射0.1mg稻曲菌素B-OVA免疫原,其中腹腔注射0.05mg,背部皮下注射两点,0.025mg/点。

[0078] 3、加强免疫:基础免疫2周后,取1mL实施例1制备的稻曲菌素B-OVA免疫原溶液(浓度为1mg/mL,溶剂为PBS),加入1mL弗氏不完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。将乳化好的免疫原采用腹腔及背部皮下多点注射Ba1 b/C小鼠,注射剂量为每只小鼠注射0.1mg稻曲菌素B-OVA免疫原,其中腹腔注射0.05mg,背部皮下注射两点,0.025mg/点。

[0079] 二、细胞融合和克隆化

[0080] 加强免疫每隔2周一次,从第三次加强免疫开始,每次免疫后第3天,从小鼠眼眶采血,测定抗体效价,效价的定义为OD值为1时的血清稀释倍数。待效价大于1:8000(即OD值为1,稀释倍数为8000)后,选择血清效价最佳的小鼠,取脾细胞,按9:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合;采用直接竞争ELISA的方法筛选分泌抗体效价和特异性好的单克隆细胞株。

[0081] 上述直接竞争ELISA方法的步骤具体如下:

[0082] (1)包被:取96孔酶标板,每孔中加入200 μ L的羊抗鼠IgG(购自Jackson公司,商品目录号为115-005-003;浓度为1000ng/mL,溶剂为包被缓冲液),37 $^{\circ}$ C包被3小时,用洗涤液洗涤4次。

[0083] (2)加样品:抑制孔每孔加入100 μ L预先配置好的稻曲菌素B标准品溶液(浓度为200ng/mL,溶剂为样品稀释液),空白孔每孔加入100 μ L的样品稀释液。

[0084] (3)加稻曲菌素A酶标记物和抗体:每孔依次加入50 μ L稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液的稀释液(用样品稀释液将实施例2得到的稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液稀释5000倍)和50 μ L的杂交瘤细胞培养液,置湿盒中37 $^{\circ}$ C条件下30min,洗板4次。

[0085] (4)显色:取10mL底物缓冲液,向其中加入10 μ L的30%(质量分数)H₂O₂,得到底物溶液,将底物溶液加入酶标板中,每孔200 μ L。避光显色15min。

[0086] (5)终止:每孔加入50 μ L终止缓冲液,用酶标仪450nm处测定各孔的OD值,部分结果见表1。表1中,2B2、2E2、3H1、4C4和5C7分别代表筛选过程中加入的细胞培养板不同孔中的杂交瘤细胞,抑制率(%)=[(空白孔OD值-抑制孔OD值)/空白孔OD值]。

[0087] 表1直接竞争ELISA法筛选杂交瘤细胞的结果

[0088]

项目位置编号	空白孔的 OD 值	抑制孔 (200 ng/mL) 的 OD 值	识别率 (%)
2B2	0.314	0.059	81.2

[0089]

2E2	3.075	2.843	7.5
3H1	0.763	0.413	45.9
4C4	1.884	0.587	68.8
5C7	0.661	0.195	70.5

[0090] 吸光值越大,说明抗体对抗原的亲合力越高;抑制率越高,说明抗体的特异性越好。从表1的数据可以看出,2E2的吸光值最大,说明2E2对包被抗原的亲合力最高,但其抑制率只有7.5%,表明2E2的特异性差;2B2和5C7的抑制率分别达81.2%和 70.5%,但与包被抗原的亲合力很弱;在融合得到的5株阳性细胞株中,只有4C4与包被抗原的亲合力较高,抑制率也较好(68.8%)。因此选取4C4杂交瘤细胞继续进行筛选,最后得到分泌抗体特异性好、亲合力高的小鼠杂交瘤细胞系4C4F11。小鼠杂交瘤细胞系4C4F11已于2017年6月28日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),登记入册编号为CGMCC No.14309。

[0091] 三、细胞冻存和复苏

[0092] 用冻存液将小鼠杂交瘤细胞系4C4F11制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时,取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后移入培养瓶内培养。

[0093] 四、单克隆抗体的制备与纯化

[0094] 1、增量培养

[0095] 细胞培养基的制备方法:向DMEM培养基中添加小牛血清(购自GIBCOBRL,产品目录号为26170-043)和碳酸氢钠,小牛血清的终浓度为20%(体积百分含量),碳酸氢钠的终浓度为0.2%(质量百分含量),pH为7.4。

[0096] 将小鼠杂交瘤细胞系4C4F11置于上述细胞培养基中,37℃培养,期间每天观察,并及时扩增培养。

[0097] 2、腹水制备

[0098] Ba1b/C小鼠腹腔注射灭菌石蜡油(0.3mL/只)。7天后腹腔注射小鼠杂交瘤细胞系4C4F11(约 10^6 个/只)。7天后采集腹水,用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,纯化后的腹水(即小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌的单克隆抗体溶液)-20℃保存。

[0099] 五、单克隆抗体的鉴定

[0100] 1、将步骤四的2得到的小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌的单克隆抗体溶液采用单克隆抗体类型检测试剂盒(购自Sigma,产品编号为1S02-1KT)检测单克隆抗体的亚型,具体操作参见试剂盒说明书。

[0101] 结果显示,小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌的单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为IgG1型。

[0102] 2、利用直接竞争ELISA法测定单克隆抗体的灵敏度和交叉反应

[0103] (1) 包被:取96孔酶标板,每孔中加入200 μ L羊抗鼠IgG(购自Jackson公司,商品目录号为115-005-003;浓度为1000ng/mL,溶剂为包被缓冲液),37℃包被3小时,用洗涤液洗涤4次。

[0104] (2) 加样品:每孔加入100 μ L预先配置好的稻曲菌素A或B标准品溶液(溶剂为样品稀释液),稻曲菌素A溶液浓度为:200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL和3.125ng/mL;稻曲菌素B溶液浓度为:200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL和3.125ng/mL;对照孔每孔加入100 μ L 的样品稀释液。

[0105] (3) 加稻曲菌素A酶标记物和抗体:每孔依次加入50 μ L稻曲菌素A酶标记物 UA-HRP溶液的稀释液(用样品稀释液将实施例2得到的稻曲菌素A酶标记物UA-HRP 溶液稀释5000倍)和50 μ L的步骤四中的2得到的单克隆抗体溶液(浓度为250ng/mL);每种稀释液设置三个复孔;置湿盒中37℃条件下30min,洗板4次。

[0106] (4) 显色:取10mL底物缓冲液,向其中加入10 μ L的30%(质量分数)H₂O₂,得到底物溶液,将底物溶液加入酶标板中,每孔200 μ L。避光显色15min。

[0107] (5) 终止:每孔加入50 μ L终止缓冲液,用酶标仪450nm处测定各孔的OD值。

[0108] 以待测化合物溶液浓度为横坐标,B/B₀(B表示含有待测化合物时的吸光值;B₀表示不含有待测化合物时的吸光值,即对照孔吸光度值)为纵坐标,运用OriginPro 8 软件分别计算稻曲菌素A和稻曲菌素B的1C₅₀值,按下列公式计算交叉反应率:

[0109] 交叉反应率(%)=[1C₅₀(稻曲菌素A)/1C₅₀(待测稻曲菌素)] \times 100%

[0110] 结果见表2。结果显示,得到的单克隆抗体对稻曲菌素A和稻曲菌素B的交叉反应率分别为100%和105%,说明所得单克隆抗体对稻曲菌素A和稻曲菌素B的识别能力基本相当。

[0111] 表2单克隆抗体与稻曲菌素A和稻曲菌素B的交叉反应

[0112]

稻曲菌素	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 (%)
稻曲菌素 A	13.2 \pm 0.8	100
稻曲菌素 B	12.5 \pm 1.0	105 \pm 6.8

[0113] 实施例4、能同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的酶联免疫试剂盒

[0114] 一、试剂盒的制备

[0115] 本申请的能同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的酶联免疫试剂盒由羊抗鼠(包被原)、小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌的单克隆抗体、稻曲菌素A酶标记物UA-HRP、包被缓冲液、样品稀释液、洗涤液、稻曲菌素A标准品溶液或稻曲菌素B标准品溶液、底物缓冲液和终止缓冲液组成。

[0116] 羊抗鼠IgG:购自Jackson公司,商品目录号为115-005-003。

[0117] 小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌的单克隆抗体:由实施例3步骤四的2制备得到。

[0118] 稻曲菌素A酶标记物UA-HRP:由实施例2制备得到。

[0119] 包被缓冲液:溶剂为水,溶质为Na₂CO₃和NaHCO₃,pH值为9.6;溶质Na₂CO₃和NaHCO₃在包被缓冲液中的浓度分别为0.01M和0.04M。

[0120] 洗涤液:溶剂为水,溶质为Na₂HPO₄、KH₂PO₄、NaCl和吐温-20,pH值为7.5;溶质

Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 在洗涤液中的浓度分别为0.02M、0.0015M和0.14M；吐温-20在洗涤液中的体积百分含量为0.1%。

[0121] 样品稀释液：溶剂为水，溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 、吐温-20和明胶，pH值为7.5；溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 在所述样品稀释液中的浓度分别为0.02M、0.0015M和0.14M；所述吐温-20和明胶在所述样品稀释液中的百分含量为0.1%（体积百分数）和0.5%（0.5g/100mL）。

[0122] 稻曲菌素A标准品溶液：为系列不同浓度的稻曲菌素A溶液，浓度具体为：200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL和3.125ng/mL，溶于样品稀释液中。

[0123] 稻曲菌素B标准品溶液：为系列不同浓度的稻曲菌素B溶液，浓度具体为 200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL和3.125ng/mL，溶于样品稀释液中。

[0124] 底物缓冲液由A液和B液等体积混合得到，pH值为3.5；A液溶剂为水，溶质为四甲基联苯胺（TMB）和一水合柠檬酸，溶质TMB和一水合柠檬酸在A液中的浓度分别为0.003M和0.05M；B液的溶剂为水，溶质为柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 ，溶质柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 在B液中的浓度分别为0.01M和0.03M。

[0125] 终止缓冲液：浓度为1M的盐酸水溶液。

[0126] 二、试剂盒的应用

[0127] 1、制作标准曲线

[0128] (1) 包被：取96孔酶标板，采用羊抗鼠IgG溶液进行包被，200 μL /孔；羊抗鼠 IgG的浓度为1000ng/mL，溶剂为包被缓冲液；37℃包被3h，用洗涤液洗涤4次。

[0129] (2) 加标准品溶液：将作为标准品的系列不同浓度的稻曲菌素A或稻曲菌素B 溶液分别加入至不同的试验孔，每孔100 μL ；对照孔为样品稀释液，每孔100 μL 。

[0130] (3) 加稻曲菌素A酶标记物和单克隆抗体：每孔依次加入50 μL 稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液的稀释液（用样品稀释液将稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液稀释5000倍）和50 μL 小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌的单克隆抗体溶液（浓度为250 ng/mL）；每种稀释液设置三个复孔；置湿盒中37℃条件下30min，洗板4次。

[0131] (4) 显色：取10mL底物缓冲液，向其中加入10 μL 的30%（质量分数） H_2O_2 ，得到底物溶液，将底物溶液加入酶标板中，每孔200 μL 。避光显色15min。

[0132] (5) 终止：每孔加入50 μL 终止缓冲液，用酶标仪450nm处测定各孔的OD值。

[0133] (6) 绘制标准曲线：以不同浓度的稻曲菌素A或稻曲菌素B溶液为横坐标， B/B_0 （ B 表示含有待测化合物时的吸光值； B_0 表示不含有待测化合物时的吸光值，即对照孔吸光度值）为纵坐标，运用OriginPro 8软件绘制标准曲线。

[0134] 实验设3次重复，取三次实验结果的平均值，得到的标准曲线如图1所示。

[0135] 用稻曲菌素A做标准曲线方程为 $Y = 1.10058 / [1 + (X/18.10851)^{0.70629}] - 0.10058$ ($R^2 = 0.99941$)；用稻曲菌素B做标准曲线方程为 $Y = 1.06993 / [1 + (X/15.753)^{0.68999}] - 0.07035$ ($R^2 = 0.99681$)， Y 表示 B/B_0 ， X 表示稻曲菌素A在溶液中的浓度（ng/mL）。($B_0 - B$)/ B_0 为20%–80%时稻曲菌素A的浓度范围即为检测范围；($B_0 - B$)/ B_0 为10%时稻曲菌素A的浓度即为检测限。用稻曲菌素A做标准曲线时线性检测范围在2~72ng/mL；检测限为0.7ng/mL； $1C_{50}$ 值为14ng/mL。

[0136] 用稻曲菌素B做标准曲线方程为 $Y = 1.06993 / [1 + (X/15.753)^{0.68999}] - 0.07035$

($R^2 = 0.99681$), Y 表示 B/B_0 , X 表示稻曲菌素B在溶液中的浓度(ng/mL)。($B_0 - B$)/ B_0 为20%~80%时稻曲菌素B的浓度范围即为检测范围; ($B_0 - B$)/ B_0 为10%时稻曲菌素B的浓度即为检测限。用稻曲菌素B做标准曲线时线性检测范围在2~76 ng/mL ; 检测限为0.6 ng/mL ; $1C_{50}$ 值为13 ng/mL 。

[0137] 以上结果显示以稻曲菌素A或稻曲菌B做标准曲线, 其线性检测范围、检测限和 $1C_{50}$ 值均无明显差异, 说明该单克隆抗体对稻曲菌素A或B的识别能力一致, 建立的直接竞争ELISA方法可用于同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的含量, 在实际使用中稻曲菌素A或B均可用作标准曲线用于计算样品中稻曲菌素A和稻曲菌素B的含量。

[0138] 2、步骤一中试剂盒的使用方法

[0139] (1) 待测样品经水提取, 提取液直接检测或加适量样品稀释液稀释成样品液。

[0140] (2) 包被: 取96孔酶标板, 采用羊抗鼠IgG溶液进行包被, 200 μL /孔; 羊抗鼠IgG的浓度为1000 ng/mL , 溶剂为包被缓冲液; 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被3h, 用洗涤液洗涤4次。

[0141] (3) 加样品: 每孔加入100 μL 样品液。

[0142] (4) 加稻曲菌素A酶标记物和单克隆抗体: 每孔依次加入50 μL 稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液的稀释液(用样品稀释液将稻曲菌素A酶标记物UA-HRP溶液稀释5000倍)和50 μL 小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌的单克隆抗体溶液(浓度为250 ng/mL); 每种稀释液设置三个复孔; 置湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下30min, 洗板4次。

[0143] (5) 显色: 取10mL底物缓冲液, 向其中加入10 μL 的30% (质量分数) H_2O_2 , 得到底物溶液, 将底物溶液加入酶标板中, 每孔200 μL 。避光显色15min。

[0144] (6) 终止: 每孔加入50 μL 终止缓冲液, 用酶标仪450nm处测定各孔的OD值。

[0145] 在同一块板上同时做标准曲线(参见步骤1), 根据标准曲线计算得到样品中稻曲菌素A和稻曲菌素B的含量。

[0146] 3、稻曲球样品和稻谷样品添加回收实验

[0147] (1) 称取50mg湖南汉寿地区稻曲球(2015年9月采集)粉末12份编号分别为1~12, 每份设置3个重复, 1-6分别添加0 mg/g 、0.2 mg/g 、0.5 mg/g 、1.0 mg/g 、2.0 mg/g 和4.0 mg/g 稻曲菌素A标准品, 7-12分别添加0 mg/g 、0.2 mg/g 、0.5 mg/g 、1.0 mg/g 、2.0 mg/g 和4.0 mg/g 稻曲菌素B标准品。分别向样品中加1.5mL蒸馏水超声提取30 min, 离心收集提取液, 重复提取三次, 合并三次提取液, 定容至5mL。提取液用样品稀释液稀释800倍得到稻曲球样品提取稀释液。

[0148] (2) 称取1g北京地区(未发病地区)稻谷中花17(2013年10月采集)粉末12份编号分别为1'~12', 每份设置3个重复, 1'-6'分别添加0 mg/g 、0.2 mg/g 、0.5 mg/g 、1.0 mg/g 、2.0 mg/g 和4.0 mg/g 稻曲菌素A标准品, 7'-12'分别添加0 mg/g 、0.2 mg/g 、0.5 mg/g 、1.0 mg/g 、2.0 mg/g 和4.0 mg/g 稻曲菌素B标准品。分别向样品中加6.0mL蒸馏水超声提取30min, 离心收集提取液, 重复提取3次, 合并3次提取液, 冷冻干燥后用1.0mL蒸馏水定容。浓缩液用样品稀释液稀释50倍得到稻谷样品提取稀释液。

[0149] (3) 各稻谷样品提取稀释液分别取100 μL 进行直接竞争ELISA分析, 按照上述步骤2中的步骤(2)~(6)进行。

[0150] (4) 用样品稀释液分别配制稻曲菌素A或B标准品溶液做标准曲线(参见步骤1)。根据标准曲线计算得到各稻曲球样品和稻谷样品提取稀释液中稻曲菌素A和稻曲菌素B的

含量。

[0151] (5) 计算回收率。

[0152] 回收率计算公式为：回收率(%) = [(稻曲菌素A和稻曲菌素B的检测含量 - 不添加稻曲菌素A或稻曲菌素B标准品时稻曲菌素A和稻曲菌素B的检测含量) / 稻曲菌素A或稻曲菌素B的添加含量] × 100%。

[0153] 其中，当计算步骤(1) 湖南汉寿地区回收率时，“稻曲菌素A和稻曲菌素B的检测含量”为编号为2-6和8-12的10份待测样品中测得的稻曲菌素A和稻曲菌素B的含量，“不添加稻曲菌素A或稻曲菌素B标准品时稻曲菌素A和稻曲菌素B的检测含量”为编号为1和7(稻曲菌素A或稻曲菌素B标准品添加含量为0)的待测样品中测得的稻曲菌素A和稻曲菌素B的含量。

[0154] 其中，当计算步骤(2) 北京地区回收率时，“稻曲菌素A和稻曲菌素B的检测含量”为编号为2'-6' 和8'-12' 的10份待测样品中测得的稻曲菌素A和稻曲菌素B的含量，“不添加稻曲菌素A或稻曲菌素B标准品时稻曲菌素A和稻曲菌素B的检测含量”为编号为1' 和7' (稻曲菌素A或稻曲菌素B标准品添加含量为0)的待测样品中测得的稻曲菌素A和稻曲菌素B的含量。

[0155] 湖南汉寿地区回收率统计结果见表3。用稻曲菌素A或稻曲菌素B作标准曲线计算得到的稻曲菌素A和B的含量基本一致，回收率范围在86%~102%。检测到的2015 年9月采集自湖南汉寿地区的稻曲球样品中稻曲菌素A和稻曲菌素B的含量为0.54 mg/g。

[0156] 北京地区回收率统计结果见表4。用稻曲菌素A或稻曲菌素B作标准曲线计算得到的稻曲菌素A和B的含量基本一致，回收率范围在84%-104%。采集自北京地区(未发病地区)的稻谷中花17样品中(2013年10月)未检测到稻曲菌素A和稻曲菌素B 的存在。

[0157] 表3湖南汉寿地区稻曲球样品的稻曲菌素A或B添加回收实验结果

[0158]

添加的 稻曲菌 素	添加含量 (mg/g)	检测含量 (mg/g)		平均回收率 (%)	
		稻曲菌素 A+B ^b	稻曲菌素 A+B ^c	稻曲菌素 A+B ^b	稻曲菌素 A+B ^c
稻曲菌 素 A	0 ^a	0.55 ± 0.005 ^d	0.52 ± 0.02	-	-
	0.2	0.73 ± 0.02	0.71 ± 0.02	92.2 ± 8	96.1 ± 2
	0.5	1.02 ± 0.05	1.02 ± 0.05	94.0 ± 9	100.4 ± 7
	1	1.54 ± 0.1	1.45 ± 0.09	99.1 ± 9	92.8 ± 7
	2	2.52 ± 0.2	2.36 ± 0.2	98.4 ± 8	91.9 ± 8
	4	4.46 ± 0.3	4.48 ± 0.1	97.7 ± 6	98.9 ± 3
稻曲菌 素 B	0	0.53 ± 0.01	0.54 ± 0.02	-	-
	0.2	0.71 ± 0.02	0.73 ± 0.03	92.1 ± 9	93.1 ± 10
	0.5	0.96 ± 0.02	1.03 ± 0.06	86.1 ± 3	97.2 ± 8
	1	1.49 ± 0.06	1.52 ± 0.07	96.0 ± 4	97.4 ± 6
	2	2.42 ± 0.09	2.43 ± 0.06	94.4 ± 4	94.4 ± 4
	4	4.01 ± 0.2	4.64 ± 0.02	87.0 ± 5	102.5 ± 4

[0159] ^a每个样品三次重复；^b以稻曲菌素A作标准曲线计算的结果；^c以稻曲菌素B作标准曲线计算的结果；^d三次检测平均值 ± SD

[0160] 表4北京地区稻谷样品的稻曲菌素A或B添加回收实验结果

[0161]

添加的 稻曲菌	添加含 量($\mu\text{g/g}$)	检测含量($\mu\text{g/g}$)		平均回收率(%)	
		稻曲菌素 A+B ^b	稻曲菌素 A+B ^c	稻曲菌素 A+B ^b	稻曲菌素 A+B ^c

[0162]

素					
稻曲菌 素 A	0 ^a	ND ^d	ND	-	-
	0.1	0.09 ± 0.007^e	0.09 ± 0.01	87.9 ± 7	91.0 ± 10
	0.25	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.008	92.2 ± 8	90.7 ± 3
	0.5	0.48 ± 0.04	0.42 ± 0.03	96.6 ± 8	84.1 ± 5
	1	0.96 ± 0.1	0.92 ± 0.07	95.9 ± 11	92.4 ± 7
	2	1.92 ± 0.1	2.08 ± 0.1	95.8 ± 6	103.8 ± 6
稻曲菌 素 B	0	ND	ND	-	-
	0.1	0.09 ± 0.009	0.09 ± 0.006	85.7 ± 9	90.1 ± 6
	0.25	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01	90.5 ± 7	92.0 ± 5
	0.5	0.45 ± 0.02	0.46 ± 0.03	90.0 ± 5	91.5 ± 6
	1	0.92 ± 0.07	0.92 ± 0.1	91.6 ± 7	92.3 ± 12
	2	1.79 ± 0.1	2.00 ± 0.2	89.4 ± 6	100.0 ± 9

[0163] ^a每个样品三次重复;^b以稻曲菌素A作标准曲线计算的结果;^c以稻曲菌素B作标准曲线计算的结果;^d ND代表没有检测到;^e三次检测平均值 \pm SD

[0164] 4、仪器验证实验

[0165] 采集自全国各个地区的稻曲球样品,向样品中加6.0mL蒸馏水超声提取30min,离心收集提取液,重复提取3次,合并3次提取液,冷冻干燥后用1.0mL蒸馏水定容,得到浓缩液,浓缩液用样品稀释液稀释50倍得到稻谷样品提取稀释液。将稻曲球样品提取稀释液分成两份,一份用直接竞争ELISA(dcELISA)检测(步骤2中的步骤(2)~(6)),另一份过滤(0.22 μm 滤膜),用HPLC进行检测。HPLC分析系统(Shimadzu, Japan)由LC-20AT二元高压输送泵,S1L-20AC自动进样器,SPD-M20A光电二极管阵列检测器,DGU-20A3自动脱气机,CTO-10AS柱温箱,CBM-20A lite系统控制器和菲罗门Hydro-C18(250mm \times 4.6mm,5 μm)反相色谱柱构成。色谱条件为:流动相:甲醇-水=15:85+0.02%TFA(v/v);流速:1mL/min;紫外检测波长:220 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;样品进样量:50 μL ;总分析时间:25min。

[0166] 用稻曲菌素A标准品配制稻曲菌素A标准溶液(溶剂为超纯水):500 $\mu\text{g/mL}$;250 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、31.25 $\mu\text{g/mL}$ 、15.625 $\mu\text{g/mL}$ 、7.8125 $\mu\text{g/mL}$ 、3.90625 $\mu\text{g/mL}$ 和1.953125 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0167] 待测样品同时用HPLC进行检测建立标准曲线:UA, $Y=1508667.5516X+81977.1372$ ($R^2=0.9999$);UB, $Y=1344310.7866X+38521.9310$ ($R^2=0.9997$),Y表示峰面积,X分别表示检测到的稻曲菌素A(UA)和稻曲菌素B(UB)的含量(μg)。

[0168] 结果如表5和表6所示。结果表明,用建立的直接竞争ELISA(dcELISA)和HPLC法同时检测稻曲球提取液结果相关性较好, $Y=0.969X-0.0049$ ($R^2=0.9932$),Y表示HPLC检测浓度(mg/g),X表示dcELISA检测浓度(mg/g),本发明所建立的dcELISA方法准确可靠。

[0169] 表5全国不同地区的稻曲球样品仪器验证实验结果

[0170]

稻曲球样品编号	dcELISA 检测到的稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B 的含量 (mg/g)	HPLC 检测得到的稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B 的含量 (mg/g)
1	1.23 ± 0.04^a	1.16 ± 0.04^a
2	0.98 ± 0.10	0.91 ± 0.02
3	1.30 ± 0.08	1.25 ± 0.07
4	1.17 ± 0.12	1.13 ± 0.02
5	1.13 ± 0.08	1.19 ± 0.01
6	1.07 ± 0.10	0.99 ± 0.04
7	1.01 ± 0.02	0.92 ± 0.01
8	0.82 ± 0.07	0.90 ± 0.03
9	1.56 ± 0.15	1.50 ± 0.04
10	1.17 ± 0.05	1.13 ± 0.06
11	0.61 ± 0.04	0.58 ± 0.03
12	1.97 ± 0.22	1.93 ± 0.06
13	1.30 ± 0.09	1.21 ± 0.05
14	1.55 ± 0.09	1.55 ± 0.01
15	0.64 ± 0.06	0.59 ± 0.01
16	0.66 ± 0.05	0.59 ± 0.01
17	0.76 ± 0.03	0.71 ± 0.04
18	0.84 ± 0.03	0.79 ± 0.06
19	1.05 ± 0.04	0.99 ± 0.002

[0171] ^a三次检测平均值 \pm SD

[0172] 表6采自全国不同地区的稻谷样品仪器验证实验结果

[0173]

稻谷样品编号	dcELISA 检测到的稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B 的含量 (μ g/g)	HPLC 检测得到的稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B 的含量 (μ g/g)
1	ND ^a	ND ^a
2	ND	ND
3	61.00 ± 3.3^b	64.27 ± 5.67^b
4	84.75 ± 5.2	88.47 ± 4.02
5	188.73 ± 4.9	190.47 ± 7.70
6	29.42 ± 0.2	ND
7	5.62 ± 0.3	ND
8	2.94 ± 0.2	ND
9	3.38 ± 0.2	ND
10	3.46 ± 0.2	ND
11	4.61 ± 0.3	ND
12	6.13 ± 0.3	ND

[0174]

13	9.35 ± 0.3	ND
14	6.51 ± 0.5	ND
15	130.99 ± 3.0	136.27 ± 1.50
16	57.59 ± 2.5	63.38 ± 5.23
17	4.98 ± 0.2	ND

[0175] ^a ND代表没有检测到；^b三次检测平均值±SD。

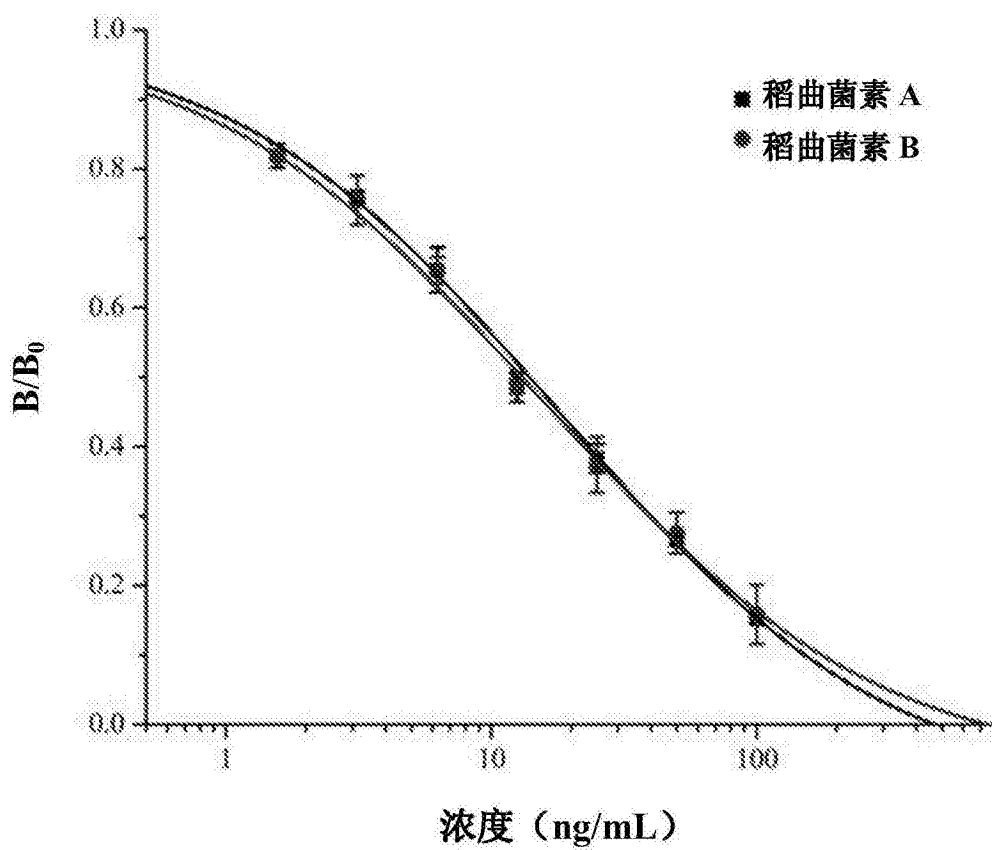


图1

专利名称(译)	一种同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN107356759A	公开(公告)日	2017-11-17
申请号	CN201710645436.X	申请日	2017-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	周立刚 王保民 傅小香 赖道万 王晓晗		
发明人	周立刚 王保民 傅小香 赖道万 王晓晗		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN107356759B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种同时检测稻曲菌素A和稻曲菌素B的方法及其专用酶联免疫试剂盒。方法及试剂盒所使用的单克隆抗体是由小鼠杂交瘤细胞系4C4F11分泌产生的，小鼠杂交瘤细胞系4C4F11在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.14309。本发明所提供的单克隆抗体能同时识别稻曲菌素A和稻曲菌素B，利用该单克隆抗体制备得到的酶联免疫试剂盒可用于定性或定量同时检测出样品中稻曲菌素A和稻曲菌素B，线性检测范围在2~76ng/mL，具有快速、灵敏的优点。本发明在农业、畜牧业和食品工业均有广阔的应用前景，预期能创造较大的经济效益。

项目位置编号	空白孔的OD值	抑制孔(200 ng/mL)的OD值	识别率(%)
2B2	0.314	0.059	81.2