

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910091750.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月3日

[11] 公开号 CN 101661036A

[22] 申请日 2009.8.27

[21] 申请号 200910091750.3

[71] 申请人 北京倍爱康生物技术有限公司

地址 100070 北京市丰台区海鹰路1号院6号楼

[72] 发明人 全文斌 陈立杰 韩子华 张婉英

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

一种黄曲霉毒素 B1 磁微粒分离酶联免疫检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 磁分离酶联免疫定量检测方法, 属于食品安全免疫检测技术领域。本发明采用竞争法的免疫检测原理, 将 AFB1 与生物酶连接制成酶标抗原试剂, 将抗异硫氰酸荧光素 (FITC) 抗体吸附在磁微粒表面制成磁分离试剂, 将 FITC 与抗 AFB1 抗体连接制成抗试剂。样本中 AFB1 与酶标 AFB1 竞争结合少量的 FITC 标抗 AFB1 抗体, 形成抗原抗体复合物。加入磁分离试剂后, 磁微粒表面连接的抗 FITC 抗体将复合物捕获到磁微粒表面。洗涤, 最后加入底物并检测。本发明的优点在于: ①以磁微粒代替传统酶标板作为固相载体, 使免疫反应接近液相条件下进行, 反应更充分和迅速, 与传统 ELISA 方法比较, 具有特异性高、重复性好的特点; ②采用一步竞争法原理, 检测用时短。

1、一种黄曲霉毒素 B1 (AFB1)磁微粒分离酶联免疫方法，其特征在于检测步骤为：

(1) 加样与免疫反应：在试管中加入 20-200 μ l 样本溶液、AFB1 校准品或 AFB1 质控品，然后加入 20-200 μ l 酶标抗原试剂和 20-200 μ l 抗试剂。混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 5-30 分钟；

(2) 加磁分离试剂：在试管中加入 20-100 μ l 磁分离试剂，混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 5-30 分钟；

(3) 洗涤：使磁微粒在磁场中沉降，去上清，加入 100-500 μ l 清洗液，去除磁场，震荡使磁微粒充分混悬 30 秒，然后再次使磁微粒在磁场中沉降，去除上清液。如此重复 2-4 次；

(4) 加底物溶液：每管加入 50-300 μ l 生物酶催化的显色或发光底物，混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 5-30 分钟；

(5) 终止显色（仅适用于显色法）：每管加入 100-300 μ l 终止液，并放在磁分离器上分离 10 分钟；

(6) 读值：在分光光度计或发光强度检测仪上读取吸光度或发光强度值；

2、根据权利要求 1 所述的抗试剂其特征在于：是抗 AFB1 抗体与异硫氰酸荧光素 (FITC) 的共价连接物溶液。所述抗 AFB1 抗体可以是单克隆抗体，也可以是多克隆抗体。其工作浓度为 0.2-10 μ g/ml。

3、根据权利要求 1 所述的酶标抗原试剂，其特征在于：是黄曲霉毒素 B1 衍生物与牛血清白蛋白 (BSA) 的共价连接物 (AFB1-BSA) 进一步共价连接生物酶形成的连接物溶液。所述的生物酶可以是辣根过氧化物酶 (HRP)，也可以是碱性磷酸酶 (ALP)。生物酶与 AFB1-BSA 的连接方法可以通过过碘酸钠氧化法，戊二醛法或 Succinimidyl

4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)、2-Iminothiolane \cdot HCl (2IT) 交联法等多种方法。其工作浓度为 0.5-5 μ g/ml。

4、根据权利要求 1 所述的 AFB1 校准品和 AFB1 质控品的稀释液是 AFB1 的甲醇水溶液，甲醇浓度为 50-80%。

一种黄曲霉毒素 B1 磁微粒分离酶联免疫检测方法

技术领域

本发明属于免疫检测分析技术领域，涉及食品安全相关的免疫检测分析技术，特别提供了一种快速检测黄曲霉毒素 B1(Aflatoxin B1, AFB1) 的磁微粒分离酶联免疫检测方法，适用于花生、玉米等各种食物和饲料中黄曲霉毒素 B1 的定性检测。

背景技术

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AF) 是黄曲霉和寄生曲霉中产毒菌株的代谢产物，普遍存在于霉变的食物及饲料中，是目前为止所发现的毒性最大的真菌毒素。它可通过多种途径污染食品和饲料，直接或间接进入人类食物链，威胁人类健康和生命安全。黄曲霉毒素进入机体后除抑制 DNA、RNA 的合成外，也抑制肝脏蛋白质的合成，对人体及动物内脏器官尤其是肝脏损害严重。黄曲霉毒素十分耐热，加热至 230℃才能被完全破坏，因此一般烹饪加工也不易消除。黄曲霉毒素引起人类的急性中毒事件，国内外均有许多报导，最典型的是印度的霉变玉米事件。该事件直接导致了数十人丧生，数百人患上不同程度的肝脏疾病。世界卫生组织报导，黄曲霉毒素含量在 30—50 ng/ml 时为低毒，50—100 ng/ml 时为中毒，100—1000 ng/ml 时为高毒，1000 ng/ml 以上为极毒。

鉴于黄曲霉毒素对人类的巨大危害性，各国对其在食品中的含量作了严格规定。我国对玉米、小麦等粮食中 AF 的限量标准是小于 10ng/ml。花生中限量标准是小于 20ng/ml。

目前，黄曲霉毒素根据分子结构的差别主要分为 4 类：即 B1、B2、G1、G2，其中 AFB1 是最常见也是毒性最强的黄曲霉毒素。黄曲霉毒素有 2 种代谢产物 M1 和 M2。

磁微粒分离酶联免疫检测技术是一种以磁性微粒为固相分离载体，将免疫磁微粒分离技术与酶联免疫检测技术相结合而建立的一种新型免疫检测方法。传统 ELISA 方法，抗原、抗体的结合反应是在固相（ELISA 板反应孔）表面进行的，而磁微粒分离酶联免疫检测方法，抗原、抗体的结合反应也在近似液相的条件下进行，因而反应快速、彻底。与传统 ELISA 相比具有灵敏度高，检测用时少的优点。

“竞争免疫检测法”是一种多用于检测小分子半抗原的方法，其检测原理是：待测抗原与酶标记的抗原竞争结合少量的固相抗体，通过洗涤去除未结合的抗原，最后加入生物酶催化的显色或发光底物显色。在一定浓度范围内，显色或发光强度与待测抗原含量呈反比。

发明内容

本发明的目的在于提供一种具有灵敏度高、特异性好、适用性广、操作简便和节省检测时间的检测AFB1的磁微粒分离酶联免疫检测方法。

所述的AFB1磁微粒分离酶联免疫检测方法的试剂组成包括：①磁分离试剂[结合有抗异硫氰酸荧光素（FITC）抗体的磁微粒混悬液]；②抗试剂（FITC标记的抗AFB1抗体溶液）；③酶标抗原试剂（偶联有生物酶的AFB1溶液）；④清洗液；⑤ AFB1校准品（含有一定量AFB1抗原的溶液）；⑥质控品（含有一定量AFB1抗原的溶液）；⑦底物溶液（显色或发光底物溶液）。

所述的 AFB1 磁微粒分离酶联免疫检测方法的检测方法如下：

（1）样本（食品、饲料等）处理：采用行业通用的方式进行处理，将固体样品粉碎成粉末，之后一定比例的甲醇水溶液进行萃取，之后滤纸过滤去除沉渣，滤液可直接用于测试使用，有需要时也可用纯化水进行适当稀释，具体做法举例如下：取约 50~100g 样品碾碎或粉碎成均一的粉末或糊状物；取 5g 均质样品加 15ml 70%甲醇水溶液；室温下搅拌混合 10 分钟；用滤纸过滤去除沉渣；取 100 μ l 滤液，加入 600 μ l 的水，即得到样品溶液（该过程将样本稀释 21 倍）。

（2）加样和免疫反应：在试管中加入 20-200 μ l 样本，然后依次加入 20-200 μ l 酶标抗原试剂和 20-200 μ l 抗试剂。混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 5-30 分钟；

（3）加磁分离试剂：在试管中加入 20-100 μ l，0.1-10mg/ml 的磁分离试剂，混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 5-30 分钟；

（4）洗涤：使磁微粒在磁场中沉降，去上清，加入 100-500 μ l 清洗液，去除磁场，震荡 30 秒使磁微粒充分混悬，再次使磁微粒在磁场中沉降，去除上清液。如此重复洗涤 2-4 次；

（5）加底物溶液：每管加入 50-300 μ l 生物酶催化的显色或发光底物。混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 5-30 分钟；

（6）终止显色：每管加入 100-300 μ l 终止液，并放在磁分离器上分离 10 分钟（适用于显色法）；

（7）读值：在分光光度计或发光强度检测仪上读取吸光度或发光强度值；

所述的AFB1磁微粒分离酶联免疫检测方法的工作原理是：首先，通过样本处理过程，使样本中的AFB1溶解在甲醇水溶液中用于后续分析。样本提取液与酶标AFB1抗原试剂、FITC

标抗试剂混合温育后，样品中的AFB1与酶标AFB1竞争结合少量的FITC标抗体，形成抗原抗体复合物。加入偶联有羊抗FITC抗体的磁分离试剂后，磁分离试剂可将免疫复合物捕获到磁微粒表面。经过洗涤，去除未结合的AFB1、酶标AFB1和其他杂质。最后加入酶催化的显色或发光底物。在一定浓度范围内，待测样本中的AFB1含量与显色或发光程度呈反比，据此可以定量测定样本中AFB1的含量。

本发明的技术解决方案如下：

(1) 磁分离试剂的制备：将抗 FITC 抗体连接在磁微粒表面。所述的磁微粒直径在 0.1-5.0 μm 之间，具有超顺磁性，表面可含有氨基 (NH₂-) 或羧基 (COOH-) 活性基团。所述的羊抗 FITC 抗体与磁微粒的连接可以通过化学交联剂，如戊二醛、1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) 等以共价键的形式，也可以通过物理吸附（静电作用、离子键或疏水作用等）的形式。

(2) 酶标抗原试剂的制备：将 AFB1 衍生物与牛血清白蛋白 (BSA) 共价连接，之后再与生物酶共价连接。所述的生物酶可以是辣根过氧化物酶 (HRP)，也可以是碱性磷酸酶 (ALP)。共价连接方法可以通过过碘酸钠氧化法、戊二醛法或 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)、2-Iminothiolane·HCl (2IT) 交联等多种方法。

(3) 底物溶液：所述的底物溶液可以是 HRP 催化的显色底物甲基联苯胺 (Tetrabenzidine, TMB) 或发光底物鲁米诺 (Luminol) 等，也可以是 ALP 催化的显色底物单磷酸酚酞 (PMP) 或发光底物 AMPPD, CSPD 和 CSPD-Star 等。

(4) AFB1校准品和质控品：将高纯度AFB1抗原称重后用甲醇水溶液溶解分装制成。

本发明具有以下优点：

(1) 样本处理方法简单。样本经粉碎、提取、过滤和稀释等简单处理后即可用于检测，无需离心、纯化、浓缩等复杂处理过程。

(2) 该方法检测灵敏度高、重复性好、操作简便和节省检测时间的优点。

附图说明

图 1 磁微粒分离酶联免疫法检测 AFB1 示意图

具体实施方式

实施例 1: 抗 FITC 抗原与表面氨基 (COOH-) 磁微粒偶联, 制备磁分离试剂

取 100mg 表面含羧基 (COOH-) 活性基团的磁微粒用 0.1 M MES (2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid), pH 4.5-5 溶液 10ml 洗涤 3 次。磁微粒用该溶液 1ml 重悬, 加入 2mg 抗 FITC 抗体, 混合均匀。加入 100 μ l 10mg/ml EDC 溶液, 混合均匀后室温反应 2 小时。用 10ml 含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 0.01M 磷酸盐缓冲液 (PBS) pH7.4 洗涤磁珠 3 次后, 用该溶液配制成 2.5mg/ml 的磁分离试剂工作液。

实施例 2: AFB1-BSA 连接碱性磷酸酶 (ALP), 制备酶标抗原试剂

取 5mg AFB1-BSA 抗原, 浓缩至 5mg/ml, 加入 13.76mg/ml 的活化剂 2-Iminothiolane•HCl (2IT) 溶液 10 μ l, 室温放置 20 分钟后加甘氨酸终止活化反应, 室温下放置 5 分钟。使用 Sephadex G25 柱子除盐, 收集蛋白洗脱峰。

取 5mg ALP 溶液, 加入 6.69mg/ml 的 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 溶液 50 μ l, 室温放置 30 分钟, 加入甘氨酸终止活化反应, 室温放置 5 分钟。使用 Sephadex G25 柱子除盐, 收集蛋白洗脱峰。

将活化的 AFB1-BSA 与活化的 ALP 混合, 室温放置 10 个小时, 然后使用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化, 除去未连接的游离 AFB1-BSA 和 ALP, 将连接物保存于 4 $^{\circ}$ C。

酶标抗原试剂稀释液配制方法为: Tris 12.11g, 氯化钠 8.77g, 叠氮钠 1g, 加纯化水至 600ml, 校正 pH 值至 7.5。加 Tween-20 2mL, BSA 10g, 加纯化水定容至 1000 ml。用 0.22 μ m 过滤器过滤, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

将上述 AFB1-BSA-ALP 连接物用上述稀释液稀释到 1-5 μ g/ml 配制成酶标抗原试剂工作液。

实施例 3: 抗 AFB1 抗体连接 FITC, 制备抗试剂

取 5mg 抗 AFB1 抗体溶液对 20mM pH9.0 碳酸缓冲液透析超过 12h, 透析后浓度要求大于 1mg/ml。加入 500 μ l 0.5mg/ml 的 FITC 溶液 (以 20mM pH9.0 碳酸缓冲液配制), 混匀后室温反应超过 12h。使用 Sephadex G25 柱子除去未结合 FITC, 收集蛋白洗脱峰。

抗试剂稀释液配制方法与酶标抗原试剂稀释液配制方法相同, 将上述 AFB1 抗体 FITC 连接物用稀释液稀释到 1-5 μ g/ml, 配制成抗试剂工作液。

实施例 4: AFB1 磁微粒分离酶免疫检测法检测花生和玉米样本中 AFB1

材料与仪器

- (1) 磁分离试剂：见上述磁分离试剂的制备；
- (2) 酶标抗原试剂：见上述酶标抗原试剂的制备；
- (3) 抗试剂：见上述抗试剂的制备；
- (4) 洗涤液：500mL（北京倍爱康生物技术有限公司生产）；
- (5) 底物溶物（PMP 溶液）：300mL（北京倍爱康生物技术有限公司生产）；
- (6) 终止溶液：600 mL（北京倍爱康生物技术有限公司生产）；
- (7) 磁分离酶联免疫测定仪：北京倍爱康生物技术有限公司生产；
- (8) 磁分离器：北京倍爱康生物技术有限公司生产；
- (9) 水浴箱（用于 37℃温浴）。

检测步骤如下：

- (1) 样本处理：取 5g 粉碎均质的花生或玉米样品分别加 15ml 70%甲醇水溶液；室温下混合 10 分钟；用 Whatman No.1 滤纸过滤；取 100 μ l 滤液，加入 600 μ l 的水，即得到样品溶液（该过程将样本稀释 21 倍）。
- (2) 加样与免疫反应：在平底试管中加入 60 μ L 样本溶液，然后分别依次加入 60 μ l 酶标抗原试剂和 60 μ l 抗试剂，混匀后 37℃温育 15 分钟；
- (3) 加磁分离试剂：在试管中加入 60 μ l 混匀后的磁分离试剂，混匀后 37℃温育 5 分钟；
- (4) 洗涤：将平底试管放在磁分离器上分离 2 分钟，倒去上清液，每管加入清洗液 300 μ L，充分混匀后，再将平底试管放在磁分离器上分离 2 分钟，弃去上清液。重复洗涤过程 2 次；
- (5) 加入底物溶液：每管加入 100 μ l 单磷酸酚酞（PMP）底物溶液，混匀后，37℃温育 15 分钟；
- (6) 终止显色：每管加入 300 μ L 终止液，并放在磁分离器上分离 10 分钟；
- (7) 读取吸光度值：用分光光度计或磁酶免测定仪读取吸光度值，波长为 492nm/550nm。

检测结果：

- (1) 测量范围：0~50ppb
- (2) 准确度：回收率为 80-110%。
- (3) 重复性：批内变异系数： $CV \leq 10\%$ ；批间变异系数： $CV \leq 15\%$
- (4) 灵敏度：灵敏度不高于 0.1 ppb。
- (5) 特异性：与其他类似毒素的交叉反应率见下表。

交叉反应物	交叉反应率 (%)
黄曲霉毒素 B1	100
黄曲霉毒素 B2	50
黄曲霉毒素 G1	7
黄曲霉毒素 G2	5
赭曲霉毒素	0.1
玉米赤霉烯酮	0.1

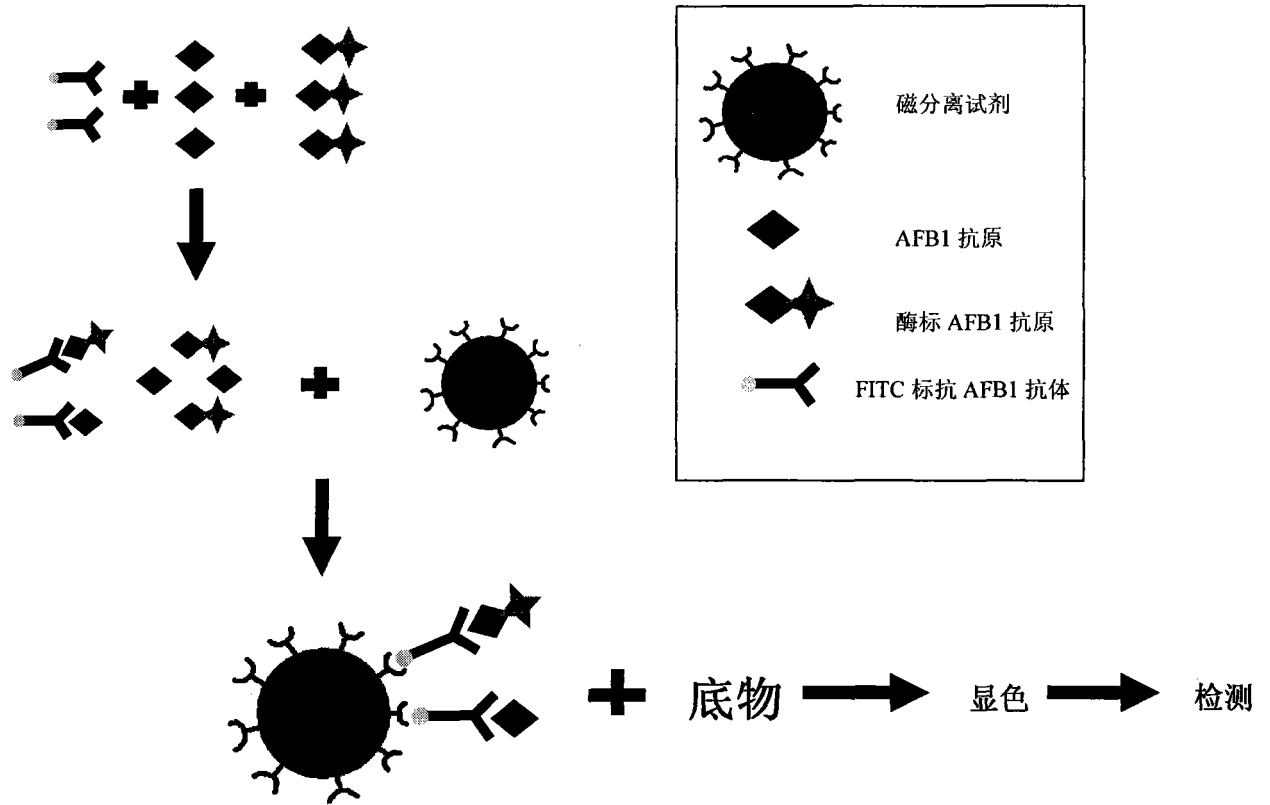


图 1.

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素B1磁微粒分离酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN101661036A	公开(公告)日	2010-03-03
申请号	CN200910091750.3	申请日	2009-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
[标]发明人	全文斌 陈立杰 韩子华 张婉英		
发明人	全文斌 陈立杰 韩子华 张婉英		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535 G01N21/31 G01N21/64		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种黄曲霉毒素B1(AFB1)磁分离酶联免疫定量检测方法，属于食品安全免疫检测技术领域。本发明采用竞争法的免疫检测原理，将AFB1与生物酶连接制成酶标抗原试剂，将抗异硫氰酸荧光素(FITC)抗体吸附在磁微粒表面制成磁分离试剂，将FITC与抗AFB1抗体连接制成抗试剂。样本中AFB1与酶标AFB1竞争结合少量的FITC标抗AFB1抗体，形成抗原抗体复合物。加入磁分离试剂后，磁微粒表面连接的抗FITC抗体将复合物捕获到磁微粒表面。洗涤，最后加入底物并检测。本发明的优点在于：①以磁微粒代替传统酶标板作为固相载体，使免疫反应接近液相条件下进行，反应更充分和迅速，与传统ELISA方法比较，具有特异性高、重复性好的特点；②采用一步竞争法原理，检测用时短。

