

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/558 G01N 33/532

G01N 33/577 G01N 33/52

G01N 30/88



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410054318.4

[43] 公开日 2005 年 3 月 2 日

[11] 公开号 CN 1588068A

[22] 申请日 2004.9.7

[21] 申请号 200410054318.4

[71] 申请人 上海大学

地址 200072 上海市闸北区延长路 149 号

[72] 发明人 黎双华 陈宇光

[74] 专利代理机构 上海上大专利事务所

代理人 顾勇华

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 黄曲霉毒素的检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种黄曲霉毒素的检测方法，更确切的说它是利用黄曲霉毒素单克隆抗体制备的免疫亲和柱及荧光光度计来检测食品中黄曲霉毒素的方法，属生物细胞学及微生物菌类毒性代谢产物检测方法技术领域。本发明方法的是：首先制备制备单克隆抗体，单克隆抗体的制备要通过小鼠免疫、细胞融合、杂交瘤筛选及获取杂交瘤细胞株、采集单克隆抗体等步骤来获得，然后利用上述的单克隆抗体来制备免疫亲和柱，最后将食品或饲料磨细后用甲醇/水溶液提取其中的黄曲霉毒素，经过过滤，将液体样品流经亲和柱达到净化后，再用甲醇将亲和柱上的 AFT 洗脱下来，然后用荧光分光光度计测定样液中黄曲霉毒素的含量。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种黄曲霉毒素的检测方法，它是以单克隆抗体免疫亲和柱为分离装置，用荧光光度计为检测工具的检测方法，该方法的特征是具有以下检测过程和步骤：

A. 亲和柱的准备和制备：

- a. 制备单克隆抗体，单克隆抗体的制备通过小鼠免疫、细胞融合、杂交瘤筛选及获取杂交瘤细胞株、采集单克隆抗体步骤来获得，其主要步骤为：

(a). 小鼠免疫：以黄曲霉毒素 B1 (简称 AFB<sub>1</sub>)和牛血清蛋白 BSA 的偶联复合物为免疫原（抗原）免疫小鼠；用 50ug/50ul 抗原（AFB<sub>1</sub>-BSA）与 50ul 弗氏完全佐剂乳化后腹腔注射每只 10 周龄 BALB/C 雄性小鼠，一个月后进行加强免疫，腹腔注射 50ug/50ul 抗原与弗氏不完全佐剂乳化后的抗原，再经过 2 个月后作最后一次免疫，采用尾静脉注射剂量为 50ug/50ul 抗原，4 天后取出小鼠的脾脏细胞，进行下一步的细胞融合；

(b) 细胞融合：免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 X63-Ag8.653 以 10:1 混匀，借助 50%聚乙二醇（PEG1500）进行融合，融合细胞用 HAT 选择培养基于 5%CO<sub>2</sub>，37℃培养箱中培养；7 天后更换 HT 培养液，第 10 天进行阳性筛选；

(c) 杂交瘤筛选及获取杂交瘤细胞株：进行阳性孔筛选采用间接非竞争酶联免疫吸附法与排除法结合的方法；将筛选得到的强阳性细胞进行有限稀释克隆化，反复克隆多次，获得多株能稳定分泌抗黄曲霉毒素 AFT 抗体的杂交瘤细胞株，对其中的 2A12 进行系统鉴定后待用；

(d) 采集单克隆抗体：将上述 2A12 杂交瘤细胞株扩大培养后，注入预先注射有降植烷的小鼠腹腔内，使其生长腹水瘤；10 天后采集腹水，该腹水中含有大量单克隆抗体；保存好该单克隆抗体备用；

- b. 利用上述的单克隆抗体来制备免疫亲和柱，其步骤如下：

(a) 称取适量溴化氰活化的的琼脂糖干粉：用 1 毫升 1M 的稀盐酸使其溶胀，然后在烧结玻璃滤器上冲洗以除去杂质；

(b). 将溶胀后的琼脂糖凝胶在偶联缓冲液中与上述制备得到得单克隆抗体均匀混合，并在室温下震荡充分反应 1 小时，偶联缓冲液由 0.1M NaHCO<sub>3</sub>

和 0.5M NaCl 配成, PH 值为 8.3;

(c) .除去未与琼脂糖凝胶结合的游离抗体;

(d) .封闭琼脂糖凝胶珠上残余的活性基团, 用 0.1M PH 值为 8.0 的 Tris-HCl 处理偶联复合物, 并静置 2 小时;

(e) .用含有 0.5M NaCl, PH 值为 4.0 的 0.1M 乙酸缓冲液淋洗偶联复合物一次, 再用含有 0.5M NaCl, PH 值为 8.0 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液淋洗一次, 如此循环反复清洗 3 次;

(f) .最后将琼脂糖—抗体复合物填充入 55×6mm 层析柱中, 即制成免疫亲和柱。平衡备用;

B.食品中黄曲霉毒素的分离与检测方法: 称取适量样品, 用一定比例的甲醇/水提取其中的 AFT, 经过过滤步骤并进行适当稀释之后, 将液体样品流经亲和柱达到净化的目的, 再用甲醇将亲和柱上的 AFT 洗脱下来, 在洗脱液中加入溴溶液衍生, 提高检测灵敏度, 然后用荧光分光光度计测定样液中黄曲霉毒素的含量。

## 黄曲霉毒素的检测方法

### 技术领域

本发明涉及一种黄曲霉毒素的检测方法，更确切的说它是利用黄曲霉毒素单克隆抗体制备的免疫亲和柱及荧光光度计来检测食品和饲料中黄曲霉毒素的方法，属生物细胞学及微生物菌类毒性代谢产物检测方法技术领域。

### 背景技术

黄曲霉毒素（Aflatoxin）是常见霉菌黄曲霉（*Aspergillus flavus*）和寄生曲霉（*A. parasiticus*）的一组化学结构类似的次级代谢毒性产物。已分离鉴定出 AFB<sub>1</sub>，AFB<sub>2</sub>，AFG<sub>1</sub>，AFG<sub>2</sub>，AFM<sub>1</sub> 等 12 种。黄曲霉毒素常存在于各种坚果如花生、核桃中，在大豆、玉米、稻谷、牛奶、奶制品、食用油及粮油制品中也经常被发现，尤其在空气湿润的热带和亚热带地区，AFT 污染比较严重。

黄曲霉毒素（AFT）对人及动物肝脏组织有很强的破坏作用，可导致肝癌，甚至死亡，此外还具有致畸、致基因突变等作用，对人类健康构成极大危害。因此，我国正在加大对粮油食品的监督检查力度，同时食品中玉米、花生及其制品中 AFT 含量成为欧盟各国对我国检验检疫的重点之一。为适应国内和国际形势要求，选择适当可行的方法检验 AFT 成为当务之急。

我国目前检测 AFT 的方法主要有薄层色谱（TLC）法，高效液相色谱（HPLC）法，酶联免疫吸附（ELISA）法。TLC 虽然具有简便经济的特点，但操作步骤多，灵敏度低。HPLC 灵敏度高，但样品处理烦琐，操作复杂，仪器昂贵。ELISA 重复性差，试剂寿命短。另外，这些测定方法在操作过程中需要使用剧毒 AFT 作标准物，预处理时需要用到有毒、异味有机溶剂，这些物质不仅毒害操作人员，而且污染环境。我国目前对 AFT 进行检测所用到的 ELISA 试剂盒依赖进口，价格昂贵，检测成本相当高，所以绝大部分企业在经济上负担较重因素影响下，不重视 AFT 的监督和检测工作。因此寻找一种经济、快捷、准确并且易于普及推广的 AFT 检测方法是当务之急。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种经济、快捷、精确、安全的食品中黄曲霉毒素的检测方法。本发明的另一个目的是提供一种利用黄曲霉毒素单克隆抗体得免疫亲和柱荧光光度计来检测食品中黄曲霉毒素的方法。

为达到上述目的，本发明采用如下技术方案：

1. 一种黄曲霉毒素的检测方法，它是以单克隆抗体免疫亲和柱为分离装置，用荧光光度计为检测工具的检测方法，该方法的特征是具有以下检测过程和步骤：

A. 亲和柱的准备和制备：

a. 制备单克隆抗体，单克隆抗体的制备要通过小鼠免疫、细胞融合、杂交瘤筛选及获取杂交瘤细胞株、采集单克隆抗体等步骤来获得，其步骤为：

(a). 小鼠免疫：以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>，(简称 AFB<sub>1</sub>)和牛血清蛋白 BSA 的偶联复合物为免疫原(抗原)免疫小鼠；用 50ug/50ul 抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 与 50ul 弗氏完全佐剂乳化后腹腔注射每只 10 周龄 BALB/C 雄性小鼠，一个月后作最后一次免疫，腹腔注射 50ug/50ul 抗原与弗氏不完全佐剂乳化后的抗原，再经过 2 个月后加强免疫，采用尾静脉注射剂量为 50ug/50ul 抗原，4 天后取出小鼠的脾脏细胞，进行下一步的细胞融合；

(b). 细胞融合：免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 X63-Ag8.653 以 10:1 混匀，借助 50%聚乙二醇(PEG1500)进行融合，融合细胞用 HAT 选择培养基于 5%CO<sub>2</sub>，37℃培养箱中培养；7 天后更换 HT 培养液，第 10 天进行阳性孔筛选；

(c). 杂交瘤筛选及获取杂交瘤细胞株：进行阳性孔筛选采用间接非竞争酶联免疫吸附法与排除法结合的方法；将筛选得到的强阳性细胞进行有限稀释克隆化，反复克隆多次，获得多株能稳定分泌抗黄曲霉毒素 AFT 抗体的杂交瘤细胞株，对其中的 2A12 进行系统鉴定后待用；

(d). 采集单克隆抗体：将上述 2A12 杂交瘤细胞株扩大培养后，注入预先注射有降植烷的小鼠腹腔内，使其生长腹水瘤；10 天后采集腹水，该腹水中含有大量单克隆抗体；保存好该单克隆抗体备用；

b. 利用上述的单克隆抗体来制备免疫亲和柱，其步骤如下：

(a). 称取适量溴化氰活化的琼脂糖干粉：用 1 毫升 1M 的稀盐酸使其溶胀，然后在烧结玻璃过滤器上冲洗以除去杂质；

(b). 将溶胀后的琼脂糖凝胶在偶联缓冲液中与上述制备得到得单克隆抗体均匀混合，并在室温下震荡充分反应 1 小时，偶联缓冲液由 0.1M NaHCO<sub>3</sub>

和 0.5M NaCl 配成, PH 值为 8.3;

(c) .除去未与琼脂糖凝胶结合的游离抗体;

(d) .封闭琼脂糖凝胶珠上残余的活性基团, 用 0.1M PH 值为 8.0 的 Tris-HCl 处理偶联复合物, 并静置 2 小时;

(e) .用含有 0.5M NaCl, PH 值为 4.0 的 0.1M 的乙酸缓冲液淋洗偶联复合物一次, 再用含有 0.5M NaCl, PH 值为 8.0 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液淋洗一次, 如此循环反复清洗 3 次;

(f) .最后将琼脂糖—抗体复合物填充入 55×6mm 层析柱中, 即制成免疫亲和柱。平衡备用;

B.食品中黄曲霉毒素的分离与检测方法: 称取适量样品, 用一定比例的甲醇/水提取其中的 AFT, 经过过滤步骤并进行适当稀释之后, 将液体样品流经亲和柱达到净化的目的, 再用甲醇将亲和柱上的 AFT 洗脱下来, 在洗脱液中加入溴溶液衍生, 提高检测灵敏度, 然后用荧光分光光度计测定样液中黄曲霉毒素的含量。

同现有技术相比, 本发明方法具有如下显而易见的特点和突出的优点: 本发明方法具有快捷、经济、精确度高等并且易于推广普及。本发明方法操作简单, 能直接读取测试结果, 能实现现场检测。因此, 能有效地对食品的生产、运输、储存和销售实现对黄曲霉毒素的监控和检测。

本发明方法可以进行黄曲霉毒素总量的测定, 其检测限度可达 1ug/kg, 测量范围为 1—300 ug/kg.

具体实施方式:

实施例一::

一、免疫亲和柱的准备和制备:

1. 制备单克隆抗体, 单克隆抗体的制备要通过小鼠免疫、细胞融合、杂交瘤筛选及获取杂交瘤细胞株、采集单克隆抗体等步骤来获得, 其步骤为:

(1). 小鼠免疫: 以黄曲霉毒素 B1 (简称 AFB<sub>1</sub>)和牛血清蛋白 BSA 的偶联复合物为免疫原免疫小鼠; 用 50ug/50ul 抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 与 50ul 弗氏完全佐剂乳化后腹腔注射每只 10 周龄 BALB/C 雄性小鼠, 一个月后进行加强免疫, 腹腔注射 50ug/50ul 抗原与弗氏不完全佐剂乳化后的抗原, 再经过 2 个月后加强免疫, 采用尾静脉注射剂量为 50ug/50ul 抗原, 4 天后取出小鼠的脾脏细胞, 进行下一步的细胞融合;

- (b). 细胞融合：免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 X63-Ag8.653 以 10:1 混匀，借助 50%聚乙二醇 (PEG1500) 进行融合，融合细胞用 HAT 选择培养基于 5%CO<sub>2</sub>, 37°C 培养箱中培养；7 天后更换 HT 培养液，第 10 天进行阳性孔筛选；
- (c). 杂交瘤筛选及获取杂交瘤细胞株：进行阳性孔筛选采用间接非竞争酶联免疫吸附法与排除法结合的方法；将筛选得到的强阳性细胞进行有限稀释克隆化，反复克隆多次，获得多株能稳定分泌抗黄曲霉毒素 AFT 抗体的杂交瘤细胞株，对其中的 2A12 进行系统鉴定后待用；
- (d). 采集单克隆抗体：将上述 2A12 杂交瘤细胞株扩大培养后，注入预先注射有降植烷的小鼠腹腔内，使其生长腹水瘤；10 天后采集腹水，该腹水中含有大量单克隆抗体；保存好该单克隆抗体备用；
- b. 利用上述的单克隆抗体来制备免疫亲和柱，其步骤如下：
- (a). 称取适量溴化氰活化的琼脂糖干粉：用 1 毫升 1M 的稀盐酸使其溶胀，然后在烧结玻璃过滤器上冲洗以除去杂质；
- (b). 将溶胀后的琼脂糖凝胶在偶联缓冲液中与上述制备得到得单克隆抗体均匀混合，并在室温下震荡充分反应 1 小时，偶联缓冲液由 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 和 0.5M NaCl 配成，PH 值为 8.3；
- (c). 除去未与琼脂糖凝胶结合的游离抗体；
- (d). 封闭琼脂糖凝胶珠上残余的活性基团，用 0.1M PH 值为 8.0 的 Tris-HCl 处理偶联复合物，并静置 2 小时；
- (e). 用含有 0.5M NaCl、PH 值为 4.0 的 0.1M 的乙酸缓冲液淋洗偶联复合物一次，再用含有 0.5M NaCl、PH 值为 8.0 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液淋洗一次，如此循环反复清洗 3 次；
- (f). 最后将琼脂糖—抗体复合物填充入 55×6mm 层析柱中，即制成免疫亲和柱。作平衡备用；

#### B. 饲料中黄曲霉毒素的分离与检测方法：

1. 样品提取：固体饲料经磨细，粒度小于 2mm，准确称取样品 50.0 克，加入氯化钠 5.0 克和甲醇 100ml，用高速均质器高速搅拌 1 分钟，然后定量滤纸过滤，准确移取 10ml 滤液，并用 40ml 蒸馏水共混均匀，再用玻璃纤维滤纸过滤，滤

液备用。

2. 试样滤液净化：将 AFT 免疫亲和柱连接于 10ml 玻璃注射器下，准确移取上述滤液（相当于 1 克样品），注入玻璃注射器中，控制压力使溶液以 6ml/min 的流速缓慢通过 AFT 免疫亲和柱，直至 2—3ml 空气通过柱体。以 10ml 蒸馏水淋洗柱子两次，弃去全部流出液，再使 2—3ml 空气通过柱体。然后准确加入 10ml 甲醇进行洗脱，流速为 1—2ml/min，收集全部洗脱液于玻璃试管中备用。
3. 荧光光度计测定

(1) 荧光光度计校准：在激发波长 360nm，发射波长 450nm 条件下，以 0.05mol/l 硫酸溶液为空白，调节荧光光度计的读数为 0.0ug/L，即相当于 0.0 ug/L 黄曲霉毒素；取荧光光度计校准溶液，以此来调节荧光光度计的读数值为 20 ug/L，即相当于 20 ug/L 黄曲霉毒素。荧光光度计校准溶液的配制为：称取 3.4 克硫酸奎宁，用 0.05mol/L 硫酸溶液溶解并定容至 100ml，即得荧光光度计校准溶液。此校准溶液在荧光光度计上的读数相当于 20 ug/L 黄曲霉毒素标准溶液。

(2) 测定：取上述试样洗脱液加入 1.0ml 0.002% 溴衍生溶液，混合均匀后静置 1 分钟，立刻于荧光光度计上测定样液中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>，AFB<sub>2</sub>，AFG<sub>1</sub>，AFG<sub>2</sub>，AFM<sub>1</sub> 的总含量。饲料中黄曲霉毒素的检测结果如表 1 所示：

表 1 饲料中 AFT 的检测结果

	荧光光度计测得的 AFT 浓度 (ug/kg)
1	3.4
2	3.5
3	3.4
平均值	3.43
变异系数(%)	1.7

从测定结果可以得出，所检测饲料中的黄曲霉毒素的含量其平均值为 3.43。且三个平行检测的结果批间变异系数为 1.7%，说明免疫亲和柱性能稳定，完全可以实际检测。

本发明中采用的免疫亲和柱的回收效果良好，它具有较高的回收率，可以通过荧光光度计检测免疫亲和柱的回收效果，检测方法如下：

将 AFT 混合标准品（AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>）以不同浓度添加到不含 AFT 的样品中。根据国家标准 GB/T18980—2003 提取方法提取 AFT，用本发明的免

疫亲和柱净化后，在真菌毒素荧光分析仪上直接读取 AFT 浓度结果，计算回收率，其结果如下表 2 所示：

表 2 荧光光度计检测回收率结果

次数	添加 AFT 浓度 (ng/g)		
	4	16	64
荧光计实际测得值 (ng/g)			
1	3.5	12.	47
2	3.8	11.	47
3	3.6	12	48
平均值	3.63	11.67	47.33
平均回收率 (%)	90.75	72.9	73.9
变异系数 (%)	4.2	5.0	1.2

从上表检测结果可知，其回收率均在 70%以上，处于《中华人民共和国进出口商品检验行业标准》的范围之内。由此表明本发明所采用的免疫亲和柱完全可以满足 AFT 快速检测的需要。

专利名称(译)	黄曲霉毒素的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1588068A</a>	公开(公告)日	2005-03-02
申请号	CN200410054318.4	申请日	2004-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	上海大学		
申请(专利权)人(译)	上海大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海大学		
[标]发明人	黎双华 陈宇光		
发明人	黎双华 陈宇光		
IPC分类号	G01N30/88 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种黄曲霉毒素的检测方法，更确切的说它是利用黄曲霉毒素单克隆抗体制备的免疫亲和柱及荧光光度计来检测食品中黄曲霉毒素的方法，属生物细胞学及微生物菌类毒性代谢产物检测方法技术领域。本发明方法的是：首先制备制备单克隆抗体，单克隆抗体的制备要通过小鼠免疫、细胞融合、杂交瘤筛选及获取杂交瘤细胞株、采集单克隆抗体等步骤来获得，然后利用上述的单克隆抗体来制备免疫亲和柱，最后将食品或饲料磨细后用甲醇/水溶液提取其中的黄曲霉毒素，经过过滤，将液体样品流经亲和柱达到净化后，再用甲醇将亲和柱上的AFT洗脱下来，然后用荧光分光光度计测定样液中黄曲霉毒素的含量。

	荧光光度计测得的 AFT 浓度 (ug/kg)
1	3.4
2	3.5
3	3.4
平均值	3.43
变异系数(%)	1.7