



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808920 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201210436706. 3

(22) 申请日 2012. 11. 06

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国
家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 尚苏林

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

串珠镰刀菌素酶联免疫检测试剂盒

(57) 摘要

本发明为串珠镰刀菌素酶联免疫检测试剂盒,其检测快速、灵敏、准确、操作简便,适用于大批量样品的检测,为此本发明还提供了试剂盒的制备及检测方法。其特征在于:包括包被板、串珠镰刀菌素标准品、串珠镰刀菌素单抗冻干品和酶标记的羊抗鼠抗体冻干品;检测时取包被板,加入 50 μ L 的串珠镰刀菌素标准品或处理好的样品到微孔中,加 50 μ L 辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗鼠抗体,加 50 μ L 抗串珠镰刀菌素抗体,室温下反应 30min,用洗涤液洗 3 次~5 次,用吸水纸拍干,加 50 μ L 显色液 A 和 50 μ L 显色液 B,暗处静置 15 分钟后加终止液,在 450nm 处测其吸光度值,从标准曲线计算样品中的串珠镰刀菌素含量。

1. 串珠镰刀菌素酶联免疫检测试剂盒的制备,包括洗涤液,显色液,终止液;其特征在于:包有串珠镰刀菌素固相抗原的包被板、串珠镰刀菌素标准品,串珠镰刀菌素单克隆抗体、串珠镰刀菌素酶标二抗。

2. 串珠镰刀菌素固相抗原的包被板制作,包括包被原的制作、封闭液的配置、以及孵育;把包被原加入包被液用作固相抗原的包板制作;包被液:称取 1.6 g 碳酸钠加上 2.9 g 碳酸氢钠,加双蒸水至 1000 mL,调节 pH 至 9.6;封闭液:称取 1 g BSA,加到 100 mL PBS 缓冲液中;包板时每孔 100 μ L 包板液,37°C 下孵育 2 h,后取出洗板两次,加封闭液,每孔 180 μ L,37°C 下孵育 1.5 h,取出甩干,加干燥剂 2 - 8°C 保存。

3. 根据权利要求书第一条所述,串珠镰刀菌素的标准品由高标稀释而成,稀释液为 PBS 缓冲液;0.1M PBS:1000 mL 蒸馏水中加 NaCl 9g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, PH:7.2。

4. 根据权利要求书第一条所述,串珠镰刀菌素的酶标二抗的酶由辣根过氧化酶标记。

5. 根据权利要求书所述,串珠镰刀菌素的检测步骤如下:取包被板,加入标准品/样本 50 μ L 到对应的微孔中,再加入酶标记物 50 μ L/孔,然后再加入 50 μ L/孔抗体工作液,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光反应 30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 250 μ L/孔,每次浸泡 15 ~ 30 s,充分洗涤 4 ~ 5 次,用吸水纸拍干;加入显色 A,B 液 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境反应 15 min;每孔各加 50 μ L 终止液,设定酶标仪在 450 nm 处,测定 OD 值(建议用 450/630 nm 双波长检测,在 5 min 内读完数据);从标准曲线中计算样品中串珠镰刀菌素的含量。

串珠镰刀菌素酶联免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域,具体涉及食品中有害残留物质的检测方法,特别是一种串珠镰刀菌素酶联免疫检测试剂盒的发明。

背景技术

[0002] 串珠镰刀菌素是某些镰刀菌的代谢产物,因最初是由 Cole 等人于 1973 年自串珠镰刀菌的培养物中提取出来的,而被命名为串珠镰刀菌素串珠镰刀菌素。该菌素为水溶性,对动物各器官,特别是对心血管有极强的毒性作用。串珠镰刀菌的化学名为 3,4-二酮-1-羟基环丁烯,自然界中以钠盐或钾盐的方式存在。它是淡黄色针状结晶,具有水溶性。串珠镰刀菌素的毒性很强,小鸡经口 LD_{50} 为 4.0 mg/kg。急性中毒的大鼠可导致进行性肌肉衰弱。呼吸困难,发绀,昏迷和死亡。有人认为某些疾病与摄食玉米有关。该毒素的毒理作用是选择性抑制 α -氧化戊二酸盐脱氢酶和丙酮酸盐脱氢酶系统。Wilson 等发现了串珠镰刀菌素的肝毒性和致肝癌性。在食品和饲料中,串珠镰刀菌素的检测方法有薄层色谱法,气象色谱法,气-质联机和高效液相色谱法。由于以上诸分析法样品前处理比较复杂,操作时需专门的技术人员、检测费用昂贵,不利于推广应用。

发明内容

[0003] 本发明为串珠镰刀菌素酶联免疫检测试剂盒。其检测快速、灵敏、准确、可定量,操作简便,且对样品纯度要求不高,特异性强,特别适用于大批量样品的检测,为此,本发明还提供了专用试剂盒的制备及检测方法。其特征在于:包有串珠镰刀菌素固相抗原的包被板制备(包括串珠镰刀菌素酶标二抗,洗涤液,显色液,终止液等的制备),串珠镰刀菌素单克隆抗体的制备。

[0004] 串珠镰刀菌素-牛血清白蛋白偶联物的制备:将串珠镰刀菌素溶解在 3 mL-100 mL 吡啶中,加入羧甲基羟胺盐酸盐,室温下搅拌过夜,氮气吹干,加入 10 mL-100 mL 蒸馏水,用氢氧化钠溶液调 pH 为 8.5-9.5 左右,再用二氯甲烷提取 3 次-5 次,每次 10 mL-20 mL,弃去二氯甲烷,水层用盐酸溶液调 pH 为 2.5-3.5 左右,再用二氯甲烷提取 3 次-6 次,每次 10 mL-20 mL,收集二氯甲烷,过无水硫酸钠脱水,过滤,低温用氮气吹干,得到串珠镰刀菌素中间产物。取串珠镰刀菌素中间产物,加入 3 mL-50 mL 二氧六环,加入氯甲酸乙丁酯,5℃-12℃下搅拌反应 30 分钟-45 分钟,将反应液滴加到牛血清白蛋白中,然后牛血清白蛋白溶于 5 mL-50 mL 蒸馏水和 5 mL-50 mL 二氧六环中,用氢氧化钠溶液调 pH 为 8-9,5℃-12℃下搅拌反应 5 小时-6 小时,然后,以蒸馏水进行透析,换液 3 次-5 次,冷冻干燥,偶联物-20℃-40℃保存;上述反应成分的比例为:串珠镰刀菌素:羧甲基羟胺盐酸盐=(10-1000)mg:(10-2000)mg,串珠镰刀菌素中间产物:氯甲酸乙丁酯:BSA=(10-1000)mg:(10-1000)μL:(10-3000)mg。

[0005] 串珠镰刀菌素-卵清蛋白偶联物的制备:将串珠镰刀菌素溶解在 3 mL-100 mL 吡啶中,加入羧甲基羟胺盐酸盐,室温下搅拌过夜,氮气吹干,加入 10 mL-100 mL 蒸馏水,

用氢氧化钠溶液调 pH 为 8.5-9.5 左右,再用二氯甲烷提取 3 次-5 次,每次 10 mL-20 mL,弃去二氯甲烷,水层用盐酸溶液调 pH 为 2.5-3.5 左右,再用二氯甲烷提取 3 次-6 次,每次 10 mL-20 mL,收集二氯甲烷,过无水硫酸钠脱水,过滤,低温用氮气吹干,得到串珠镰刀菌素中间产物;取串珠镰刀菌素中间产物,加入 3 mL-50 mL 二氧六环,加入氯甲酸乙丁酯,5℃-12℃下搅拌反应 30 分钟-45 分钟,将反应液滴加到牛血清白蛋白中,然后牛血清白蛋白溶于 5 mL-50 mL 蒸馏水和 5 mL-50 mL 二氧六环中,用氢氧化钠溶液调 pH 为 8-9,5℃-12℃下搅拌反应 5 小时-6 小时,然后,以蒸馏水进行透析,换液 3 次-5 次,冷冻干燥,偶联物 -20℃-40℃保存;上述反应成分的比例为:串珠镰刀菌素:羧甲基羟胺盐酸盐=(10-1000)mg:(10-2000)mg,串珠镰刀菌素中间产物:氯甲酸乙丁酯:OVA=(10-1000)mg:(10-1000)μL:(10-3000)mg。

[0006] 所述抗串珠镰刀菌素单克隆抗体及其溶液的制备:取串珠镰刀菌素-牛血清白蛋白偶联物用生理盐水配成 0.1 μg/μL 抗原溶液,与等体积完全福氏佐剂混匀,充分乳化,供首次免疫用,加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂,首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射,免疫剂量为 10 μg/只-100 μg/只小鼠,以后每隔 2 周-4 周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量 10 μg/只-100 μg/只,最后一次免疫采用脾内注射,4 天后取脾融合,将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0 以 10:1 比例混合,离心,去除上清,在 50 s-90 s 内将 0.1 mL-10 mL 50% 聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中,充分混匀,使其融合,1 分钟-3 分钟后加入 10 mL-50 mL DMEM 培养液,终止融合,水浴静止 10 分钟-30 分钟后离心,去除上清;将融合细胞用含 5-30% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 1×10^4 - 1×10^6 饲养细胞接种于小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 5%-10% CO₂, 35℃-45℃ 条件下培养,5 天-10 天后,每培养孔更换 HT 培养液。10 天-20 天后,开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果。阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆,杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞争 ELISA 法进行,以串珠镰刀菌素-卵清蛋白偶联物为包被抗原,以免疫小鼠的血清为阳性对照,以 SP2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照;阳性细胞孔的判定标准为(A 试验-A 空白)代 A 对照-A 空白>2.1;对分泌阳性抗体的细胞进行克隆;采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为 70 个/mL,再取 1 mL 稀释 20 倍,接种入 96 孔培养板中进行亚克隆,直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止;对 10 周龄-13 周龄 BALB/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.3 mL/只-0.5 mL/只,8 天-10 天后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^6 细胞/只,5 天后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,加甘油于 -20℃~-40℃ 保存;上述反应成分的比例为:串珠镰刀菌素-牛血清白蛋白偶联物:生理盐水=(10-1000)μg:(0.1-10)mL。

[0007] 酶标板制备:

1、串珠镰刀菌素固相抗原的包被板制作,包括包被原的制作、封闭液的配置、以及孵育。把包被原加入包被液用作固相抗原的包板制作。包被液:称取 1.6 g 碳酸钠加上 2.9 g 碳酸氢钠,加双蒸水至 1000 mL,调节 pH 至 9.6。封闭液:称取 1 g BSA,加到 100 mL PBS 缓冲液中。包板时每孔 100 μL 包板液,37℃下孵育 2 h,后取出洗板两次,加封闭液,每孔 180 μL,37℃下孵育 1.5 h,取出甩干,加干燥剂 2-8℃ 保存;

2、串珠镰刀菌素的标准品由高标稀释而成,稀释液为 PBS 缓冲液。0.1M PBS:1000

mL 蒸馏水中 NaCl 9 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, pH:7.2;

3、串珠镰刀菌素的酶标二抗的酶由辣根过氧化酶标记;

4、洗涤液的制备:十二水磷酸氢钠 68.8 g 加磷酸二氢钠 6.9 g, 氯化钠 45 g, Tween-20 0.5 mL, 加双蒸水至 1 L, 调节 pH 至 7.4;

5、显色液的制备:显色液 A:无水乙酸钠 8.2 g, β -糊精 2.5 g, 过氧化氢脲 428.6 mg, 加双蒸水至 1 L, 调节 PH 至 5.0, 4℃ 保存, 使用时达室温。显色液 B:100 mg TMB 溶于 10 mL DMSO 中, 棕色瓶保存。使用时将 14.6 mL 显色液 A 与 0.45 mL 显色液 B 混合 15 分钟;

6、终止液制备:2M 硫酸, 取 1 份浓硫酸加到 8 份去离子水中, 即为 2M 硫酸。

附图说明

[0008] 附图 1 为本发明串珠镰刀菌素标准品的吸光度曲线示意图。

具体实施方案

[0009] 样本前处理

处理前须知:

(a) 实验中必须使用一次性吸头, 在吸取不同的试剂时要更换吸头;

(b) 实验之前须检查各种实验器具是否洁净, 必须使用洁净实验器具, 以避免污染干扰实验结果;

(c) 未处理的样本冷冻保存;

(d) 处理后的样本可在 2-8℃ 避光保存 24 h; 所有样品应于 2-8℃ 避光保存。

[0010] 前处理步骤:

1、玉米等粮食作物处理方法

(1) 取 3 g 粉碎样品, 加入 30 mL 样品提取液(用去离子水将甲醇按 7:3 体积比进行稀释, 即 7 份甲醇加 3 份去离子水, 用于提取样本中的串珠镰刀菌素);

(2) 剧烈振荡 5 min;

(3) 4000 r/min 离心 5 min, 或用普通滤纸过滤;

(4) 上清液或滤液用去离子水按 1:19 比例稀释; 取稀释后液体待测。

[0011] 2、饲料处理方法

(1) 取 3 g 粉碎样品, 加入 30 mL 样品提取液(用去离子水将甲醇按 7:3 体积比进行稀释, 即 7 份甲醇加 3 份去离子水, 用于提取样本中的串珠镰刀菌素);

(2) 剧烈振荡 5 min;

(3) 4000 r/min 离心 5 min, 或用普通滤纸过滤;

(4) 上清液或滤液用去离子水按 1:49 比例稀释; 取稀释后液体待测。

[0012] 测定步骤:

1、将所需试剂和微孔板从冷藏环境中取出, 在室温下平衡 30 min, 每种液体使用前均须摇匀。注意标准液均需做 2 个平行试验;

2、加标准品:加标准品/样本 50 μL 到对应的微孔中, 再加入酶标记物 50 μL /孔, 然后再加入 50 μL /孔抗体工作液, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置室温避光反应 30 min;

3、洗板:小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 加洗涤液 250 μL /孔, 每次浸泡 15~30

s,充分洗涤 4 ~ 5 次,用吸水纸拍干;

4、显色:加入显色 A,B 液各 50 μ L/ 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃避光环境反应 15 min;

5、测定:每孔各加 50 μ L 终止液,设定酶标仪在 450 nm 处,测定 OD 值(建议用 450/630 nm 双波长检测,在 5 min 内读完数据);

6、结果分析

所测得的标准液或样品吸光度的平均值(B)除以第一个标准液(0 标准液)的吸光度(B_0)值再乘以 100%,得到百分吸光度值,

$$\text{百分吸光度值}(\%) = B/B_0 \times 100\%$$

以标准品浓度的 10 为底的对数为 X 轴,百分吸光值为 Y 轴,绘制标准曲线。然后将样本的百分吸光值代入标准曲线,从标准曲线上读出样本所对应的值,为 10 的幂,乘以稀释倍数,即为样品中所含串珠镰刀菌素的量。

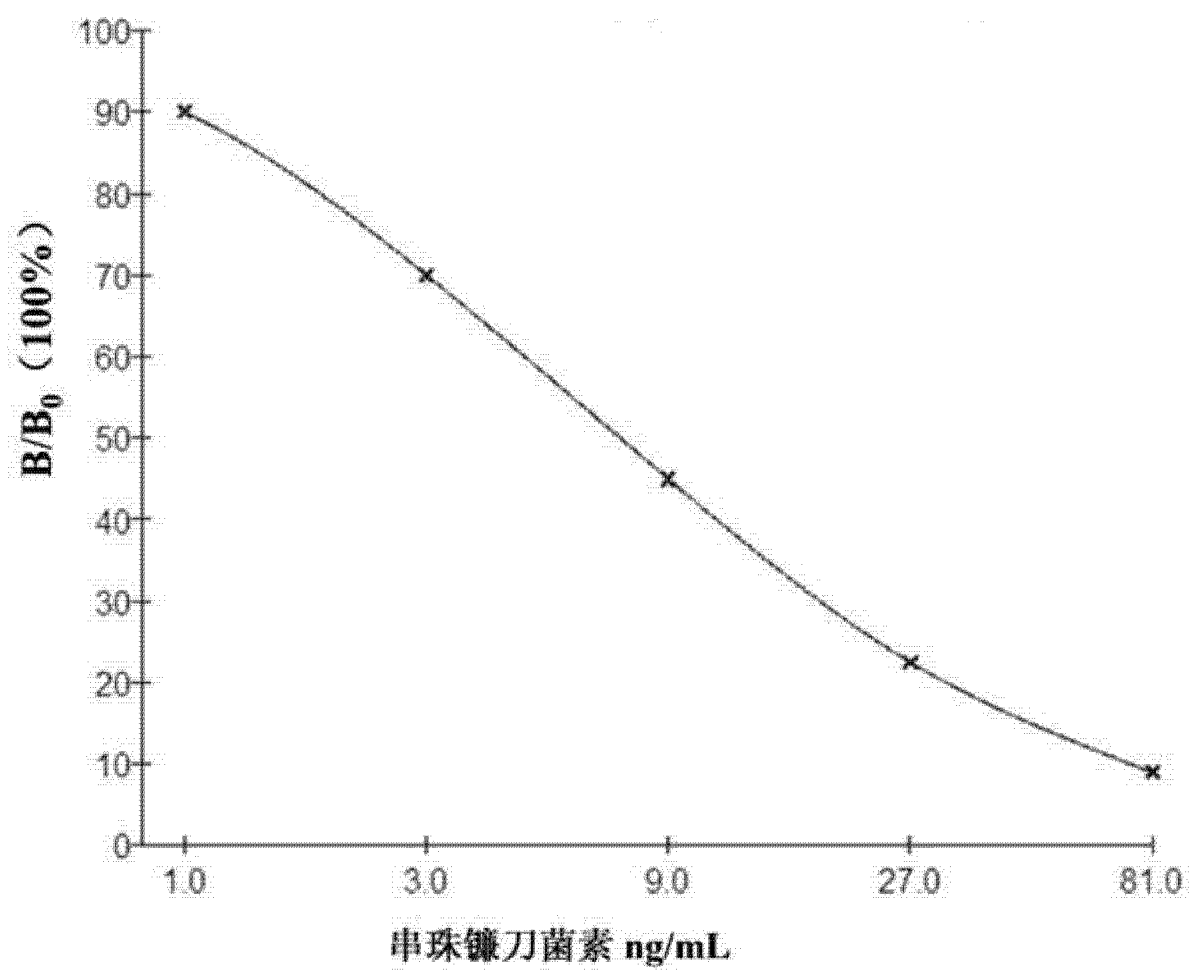


图 1

专利名称(译)	串珠镰刀菌素酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103808920A	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	CN201210436706.3	申请日	2012-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 尚苏林		
发明人	杜道林 尚苏林		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为串珠镰刀菌素酶联免疫检测试剂盒，其检测快速、灵敏、准确、操作简便，适用于大批量样品的检测，为此本发明还提供了试剂盒的制备及检测方法。其特征在于：包括包被板、串珠镰刀菌素标准品、串珠镰刀菌素单抗冻干品和酶标记的羊抗鼠抗体冻干品；检测时取包被板，加入50 μ L的串珠镰刀菌素标准品或处理好的样品到微孔中，加50 μ L辣根过氧化物酶（HRP）-羊抗鼠抗体，加50 μ L抗串珠镰刀菌素抗体，室温下反应30min，用洗涤液洗3次~5次，用吸水纸拍干，加50 μ L显色液A和50 μ L显色液B，暗处静置15分钟后加终止液，在450nm处测其吸光度值，从标准曲线计算样品中的串珠镰刀菌素含量。

