



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104897651 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201410832184. 8

(22) 申请日 2014. 12. 27

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 万宇平 冯月君 崔海峰 冯静
宋灏 贾芳芳 吴小胜

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种黄曲霉毒素 M1 的化学发光试剂盒及其
应用

(57) 摘要

本发明公开了一种黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫 (CLEIA) 检测试剂盒, 包括盒体, 设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂; 其特征在于, 所述化学发光板的各孔包被有抗黄曲霉毒素 M1 抗体; 所述试剂包括: 酶标黄曲霉毒素 M1 抗原浓缩液, 酶标黄曲霉毒素 M1 抗原稀释液, 黄曲霉毒素 M1 系列标准品溶液, 化学发光底物 A、B 液, 浓缩洗涤液, 浓缩复溶液; 本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点, 与传统的 ELISA 法比较, 操作时间大幅度减少。可用作检测牛奶、奶粉中黄曲霉毒素 M1 残留检测。

1. 一种黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂;其特征在于,所述化学发光板的各孔包被有抗黄曲霉毒素 M1 抗体;所述试剂包括:酶标黄曲霉毒素 M1 抗原浓缩液,酶标黄曲霉毒素 M1 抗原稀释液,黄曲霉毒素 M1 系列标准品溶液,化学发光底物 A、B 液,浓缩洗涤液,浓缩复溶液。

2. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯 96 孔化学发光板。

3. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述酶标抗原是由黄曲霉毒素 M1 半抗原与载体蛋白偶联得到,黄曲霉毒素 M1 半抗原由黄曲霉毒素 M1 和溴丁酸经过一系列反应得到。

4. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述抗体包被浓度为 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 。

5. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述酶标黄曲霉毒素 M1 抗原的工作浓度为 1:4000。

6. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述黄曲霉毒素 M1 抗体是由黄曲霉毒素 M1 与牛血清蛋白偶合制成的偶联物作为免疫原免疫 Balb/c 小鼠制备获得。

7. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述黄曲霉毒素 M1 系列标准品溶液浓度分别为:0、0.05、0.15、0.45、1.35、4.05ng/mL。

8. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述浓缩复溶液具体为浓缩磷酸盐缓冲液,是每升含 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.74g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 32.6g 的水溶液。

9. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数 0.05%吐温-20 的 $\text{pH} = 7.4$, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液。

10. 根据权利要求 1 所述黄曲霉毒素 M1 的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光液 A 液为鲁米诺含量为 0.01M、对甲苯酚含量为 0.001M $\text{pH} = 8.8$ 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;B 液为每 100mL 溶液含柠檬酸 2.1g,无水 Na_2HPO_4 2.82g,0.75%的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液,所述百分比为质量百分比。

一种黄曲霉毒素 M1 的化学发光试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测黄曲霉毒素 M1 的化学发光免疫检测试剂盒,用于检测牛奶、奶粉中的黄曲霉毒素 M1 含量或残留量。属于免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素 M1 属于黄曲霉毒素一类结构相似的化合物中的一种,在湿热地区食品和饲料中出现黄曲霉毒素的机率最高。物理化学性质相当稳定,不被巴氏消毒法破坏。哺乳类动物摄入被黄曲霉毒素 B1 污染的饲料或食品后,通过羟基化作用转化成黄曲霉毒素 M1。黄曲霉毒素 M1 危害主要表现在致癌性和致突变性,对人及动物肝脏组织有破坏作用,可导致肝癌甚至死亡。因此,大多数政府机构都对人体和动物可摄入的黄曲霉毒素量有严格的法规限制,很多国家已经对牛奶和乳制品中的黄曲霉毒素 M1 含量有了明确的限量标准,黄曲霉毒素 1993 年被世界卫生组织 (WHO) 的癌症研究机构划定为 1 类致癌物。

[0003] 目前,测定黄曲霉毒素 M1 的主要方法是荧光光度法、高效液相色谱、双流向酶联免疫法等。仪器方法是非常有效、准确、敏感的方法,但是待检样品需经一系列的预处理,繁琐费时,从样品预处理到得出检验结果需要较长时间,检测费用很高;另一方面这种检测方法还必须有昂贵的仪器设备,只有特定的专业人员才能应用,而且每次检测的样品有限,不适应大批样品的筛查,严重阻碍了该检测方法的推广应用,更不适合于现场检验。与之相比,化学发光免疫法具有快速、灵敏、方便、检测成本较低等特点,能最大限度地减少操作误差和工作强度,是一种非常适合基层检测牛奶、奶粉中黄曲霉毒素 M1 的筛选方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种黄曲霉毒素 M1 的化学发光检测试剂盒。该试剂盒具有检测灵敏度高、应用灵活、方便的特点,可用于牛奶、奶粉等样品中黄曲霉毒素 M1 的残留量检测。

[0005] 为实现上述目的,本发明主要是利用抗原与抗体的特异性免疫反应的基本原理来实现的。化学发光免疫分析法是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光法的高灵敏性和免疫分析法的高特异性。在整个反应过程中,样品中黄曲霉毒素 M1 含量越高,反应体系中发光强度越弱;反之,样品中黄曲霉毒素 M1 含量越少,发光强度越高。

[0006] 本发明的检测黄曲霉毒素 M1 的化学发光免疫检测试剂盒含有盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂。具体含有以下成分:

[0007] 包被有抗黄曲霉毒素 M1 抗体的白色不透明 96 孔可拆卸或不可拆卸的聚苯乙烯化学发光板。

[0008] 应用 $\text{pH} = 7.40$ 、 0.05mol/L 的 PBS 溶液稀释黄曲霉毒素 M1 纯品得到的黄曲霉毒素 M1 系列标准品溶液,浓度范围至少包含了 $0.05 \sim 4.05\text{ng/mL}$ 的浓度区间。

[0009] 酶标抗原浓缩液:由黄曲霉毒素 M1 与卵清蛋白偶合制成的人工抗原与辣根过氧化物酶偶联制备得到。

[0010] 酶标抗原稀释液 :pH7.6 的 0.01M 的磷酸钠、0.25M 的 NaCl 溶液。

[0011] 发光底物液 :发光底物液分为 A、B 液。A 液为化学发光底物 - 鲁米诺和发光增强剂 - 对甲苯酚溶液, B 液为过氧化氢脲溶液。

[0012] 浓缩复溶液 :浓缩复溶液具体为 2 倍浓缩磷酸盐缓冲液, 使用前用双蒸水稀释至工作浓度后使用, 用于样品前处理。

[0013] 浓缩洗涤液 :浓缩洗涤溶液具体为含有吐温 -20 (Tween-20) 缓冲液的 20 倍浓缩磷酸盐缓冲液, 使用前用双蒸水稀释至工作浓度后使用, 用于实验过程中洗涤化学发光板。

[0014] 本发明溶液的配制 :

[0015] 本发明试剂盒中涉及的黄曲霉毒素 M1 标准品溶液、酶标黄曲霉毒素 M1 抗原溶液、化学发光溶液及洗涤溶液及其配方对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大 ; 其中各溶液的主要成分及其配制方法是 :

[0016] 1、黄曲霉毒素 M1 标准溶液 :以常规方法将黄曲霉毒素 M1 纯品用 0.05mol/L, pH = 7.4 的 PBS 配制成浓度分别为 0、0.05、0.15、0.45、1.35、4.05ng/mL 的黄曲霉毒素 M1 标准溶液。

[0017] 2、酶标黄曲霉毒素 M1 抗原溶液 :用黄曲霉毒素 M1 与偶联蛋白偶联制备的人工抗原与辣根过氧化物酶偶联制备得到, 将所得酶标黄曲霉毒素 M1 抗原用酶标黄曲霉毒素 M1 稀释液稀释成 1:4000 的工作浓度。

[0018] 3、酶标抗原稀释液 :为 pH7.6 的磷酸钠为 0.01M、NaCl 为 0.25M 的缓冲溶液。

[0019] 4、化学发光溶液 :A 液为鲁米诺含量为 0.01M、对甲苯酚含量为 0.001M pH = 8.8 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液, B 液为每 100mL 溶液含柠檬酸 2.1g, 无水 Na_2HPO_4 2.82g, 0.75% 的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液。

[0020] 5、浓缩复溶工作液 : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.74g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 32.6g 溶于 1L 的去离子水中。

[0021] 6、浓缩洗涤溶液 :按体积分数 0.05% 将吐温 -20 添加至 pH = 7.4, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中。

[0022] 7、包被溶液 :1.59g 碳酸钠和 2.53g 碳酸氢钠溶于 1L 水中, 调节 pH = 9.5。

[0023] 8、封闭溶液配制 :10g BSA 溶于 1L 洗涤溶液中, 再加入重量比为 5% 的 NaN_3 。

[0024] 本发明化学发光板的包被 :

[0025] 本发明中包被化学发光板采用将抗黄曲霉毒素 M1 抗体置于设定的包被溶液中, 以设定的浓度, 在 37℃ 恒温箱中反应包被。

[0026] 本发明采用的是 pH = 9.5 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液。本发明中微孔板中所包被的抗黄曲霉毒素 M1 抗体在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上, 可以经受多次洗板, 采用的抗体包被浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0027] 包被好的微孔板可以用封闭溶液封闭, 封闭液中惰性蛋白优选 BSA, 需加入 NaN_3 防止变质。

[0028] 酶标黄曲霉毒素 M1 抗原溶液的制备 :

[0029] 本发明中酶标黄曲霉毒素 M1 抗原溶液浓度是决定本发明中黄曲霉毒素 M1 化学发光检测试剂盒测定范围及灵敏度的重要因素。

[0030] 本发明中涉及的酶标黄曲霉毒素 M1 抗原溶液可以用酶标黄曲霉毒素 M1 稀释液稀

释成 1:4000 的工作浓度。

[0031] 按照上述酶标黄曲霉毒素 M1 抗原溶液浓度制备的试剂盒可以达到很好的线性范围（标准线范围可以达到 0.05 ~ 4.05ng/mL）和很好的灵敏度（ IC_{50} 为 0.065ng/mL）。

[0032] 化学发光溶液的配制：

[0033] 所述化学发光液 A 液为鲁米诺含量为 0.01M、对甲苯酚含量为 0.001M $pH = 8.8$ 的三（羟甲基）氨基甲烷溶液，B 液为 100mL 溶液含柠檬酸 2.1g，无水 Na_2HPO_4 2.82g，0.75% 的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液。所述鲁米诺为化学发光底物，对甲苯酚为发光增强剂。

[0034] 本发明的原理是将抗体-抗原反应的高度特异性与酶催化的高度灵敏性结合起来，利用酶催化底物的化学发光反应检测产物浓度。

[0035] 本发明的化学发光检测试剂盒具有灵敏度高、简便快速、准确的特点，与传统的比色 ELISA 法比较，灵敏度可以提高一个数量级。有望在牛奶、奶粉中的黄曲霉毒素 M1 残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0036] 图 1 为黄曲霉毒素 M1 半抗原合成反应式。

[0037] 图 2 为黄曲霉毒素 M1 半抗原核磁共振氢谱图。

[0038] 图 3 为本发明化学发光试剂盒工作曲线。

具体实施方式

[0039] 实施例 1：半抗原、抗原及单克隆抗体的制备

[0040] (1) 黄曲霉毒素 M1 半抗原合成

[0041] 反应 a：取黄曲霉毒素 M1 5mg，加干燥的乙腈 10mL 溶解，滴加含 3mg 三溴化硼溶液 1mL，室温搅拌 4h，停止反应，检测，原料全部反应完成。停止反应，蒸干，加水与适量乙酸乙酯，萃取，静置，分层，分去水相，无水硫酸钠干燥，蒸干，得到产物 1。

[0042] 反应 b：产物 1 加 DMF 溶解，加碳酸钠 20mg，搅拌，加溴丁酸 10mg，60℃ 反应 8h，检测，原料全部反应完成，加水、乙酸乙酯萃取，水洗，干燥蒸干，过硅胶短柱，得到半抗原产物。

[0043] 取上述产物经核磁共振氢谱测定，如图 2 所示，化学位移 $\delta = 11\text{ppm}$ 的为羧基氢共振吸收峰，化学位移 $\delta = 4.0\text{ppm}$ 、 2.0ppm 、 2.3ppm 为间隔臂上亚甲基的氢共振吸收峰，证明间隔臂连接成功，半抗原结构正确，说明半抗原合成成功。

[0044] (2) 免疫原（黄曲霉毒素 M1-BSA）的合成

[0045] 取 18mg 半抗原，溶解于 1mL DMF 中，取 30mg EDC 和 NHS 用 0.2mL 水充分溶解后于加入 (1) 中，室温下搅拌 24h，即可得到反应液 (1)。称取 BSA 50mg，使之充分溶解在 3.8mL PB 中，将反应液 (1) 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中，并于室温下搅拌 24h。用 0.01mol/L PBS，4℃ 透析 3d 每天换 3 次透析液，以除去未反应的小分子物质。分装，于 -20℃ 保存备用。

[0046] 称取半抗原 18mg 和 OVA 50mg，按上述步骤反应制备包被抗原，供酶标用。

[0047] (3) 黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体的制备

[0048] A，动物免疫：用上述制备出的免疫原（黄曲霉毒素 M1-BSA）按 100 μg /只，以生理盐水溶解免疫原与弗氏完全佐剂等体积混匀，颈背部皮下注射免疫 6 ~ 8 周龄 Balb/c 雌

鼠,初次免疫后第 7、14、28 天以免疫原与弗氏不完全佐剂等体积混匀,各追加免疫一次,融合前 3 天以免疫复合物 $100\ \mu\text{g}/\text{只}$,不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0049] B,细胞融合:按常规方法进行,取免疫小鼠的脾细胞与处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 混合,然后在 45 秒内缓慢加入预热的融合剂 (PEG4000) 进行融合,用 HAT 培养基悬浮均匀,再加入适量的饲养细胞,培养于 96 孔培养板,于 37°C , $5\%\ \text{CO}_2$ 培养箱中培养,5 天后用 HT 培养基半换液,9 天时候进行全换液。

[0050] C,杂交瘤细胞的筛选:细胞融合后,待细胞长到培养孔面积的 $1/4$ 时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初选采用间接 ELISA 方法,以包被抗原(预先用方阵法常规滴定其最佳包被浓度和阳性血清稀释度)包被化学发光板,加入被测孔培养上清,孵育,清洗后加入羊抗鼠 IgG-HRP 和 IgM-HRP,OPD 进行显色反应。筛选出的阳性孔再用间接竞争 ELISA 方法筛选,先将细胞上清与 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄曲霉毒素 M1 等体积混合, 37°C 水浴作用 30min,再加入到包被好的化学发光板中。同时用 PBS 取代黄曲霉毒素 M1 作对照,其余步骤同上。若经黄曲霉毒素 M1 阻断后的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值下降到对照孔的 50% 以下,则判为阳性,经 2~3 次检测都为阳性的孔,立即用有限稀释法进行亚克隆化。

[0051] D,单克隆抗体制备:将 2~3 次亚克隆建株后的杂交瘤细胞扩大培养,收集上清液用间接 ELISA 测定效价,冻存;并取 8~10 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 $0.5\text{mL}/\text{只}$,7~10 日后腹腔注射杂交瘤细胞 $1\sim 2\times 10^6/\text{只}$,7~10 日后抽取小鼠腹水,离心取上清,测定效价,并冻储备用。

[0052] 实施例 2:酶标抗原的制备

[0053] A,称取 2mg HRP 溶解于 0.5mL 双蒸水中;加入 0.5mL 新配制的 $0.06\text{mol}/\text{L}$ NaIO_4 溶液, 4°C 避光作用 30min;

[0054] B,加入 $160\text{mmol}/\text{L}$ 的乙二醇 0.5mL ,室温作用 30min;

[0055] C,加入黄曲霉毒素 M1- 0.05mg ,混匀后装入处理过的透析袋中,置 1000mL 的 $0.05\text{mol}/\text{L}$ 碳酸钠缓冲液中透析, 4°C 过夜;

[0056] D,透析液吸至 10mL 的离心管中,加 0.25mL 新配的 $5\text{g}/\text{L}$ NaBH_4 液,混匀后置 4°C 2h;加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 4°C 作用 30min,在 4°C 下 3000rpm 离心 25min,弃上清;

[0057] E,将沉淀溶于 1.5mL $0.02\text{mol}/\text{L}$ pH7.4PBS 中,吸入透析袋内,在 $0.02\text{mol}/\text{L}$ pH 7.4PBS 透析, 4°C 过夜(中途更换 PBS3 次);

[0058] F,将透析液中液体吸至微量离心管中, 4°C 下 10000rpm 离心 30min,将上清液吸出,加等量甘油,混匀, -20°C 保存备用。

[0059] 实施例 3:CLEIA 检测方法的建立

[0060] (1) 包被抗体与酶标抗原浓度的优选(方阵法)

[0061] 纵向用每种包被抗体按 80.0 、 40.0 、 20.0 、 10.0 、 5.0 、 2.5 、 1.25 、 $0.625\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列稀释度包被化学发光板, $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$,置于 37°C 恒温箱 2h 后,拍干;以 $150\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 封闭溶液封闭, 37°C 恒温箱放置 2 小时,洗板一次,拍干;加入 $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 一系列稀释的酶标黄曲霉毒素 M1 抗原($1:1000$ 至 $1:512000$),室温($20\sim 25^{\circ}\text{C}$)孵育 15min,洗板五次,最后一次拍干;分别加入 $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 的化学发光 A、B 液,测定发光强度值。以发光强度值随酶标抗原的浓度有明显梯度变化的包被抗体浓度和酶标抗原稀释度为最佳浓度进行特异性测定。

[0062] (2) 抗体灵敏度的测定

[0063] 根据上述对包被抗体及酶标抗原浓度的优选实验,申请人选择并确定酶标抗原浓度为 1:4000,包被抗体浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 进行抗体的灵敏度的测定:

[0064] A,包被:用 0.05M pH = 9.6 的碳酸盐包被溶液将抗黄曲霉毒素 M1 抗体配成 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,每个聚苯乙烯板化学发光板反应孔中加 100 μL ,37℃恒温箱 2h。弃去孔内溶液,拍干。

[0065] B,封闭:用封闭溶液封闭上述已包被的化学发光板,150 μL /孔,37℃恒温箱 2h 然后洗板一次,拍干。

[0066] C,加样:加不同浓度的黄曲霉毒素 M1 标准品溶液 50 μL /孔,再加入 50 μL /孔稀释的酶标黄曲霉毒素 M1 抗原 (1:4000) 于上述已封闭的反应孔中,室温 (20 ~ 25℃) 避光孵育 15min,然后洗板五次,最后一次拍干。

[0067] D,发光:于各反应孔中加入临时配制的化学发光溶液 100 μL /孔,反应 3min 后用化学发光免疫分析仪检测。

[0068] E,检测结果以抑制率计算:

[0069] 相对发光强度 (%) = RLU/RLU_0 ,RLU 是标准品或者样品溶液测定的发光强度值,RLU₀是空白 (浓度为 0 的标准溶液) 的发光强度值。

[0070] 计算 50%抑制率时药物的浓度即为该抗体的灵敏度。

[0071] 实施例 4:检测黄曲霉毒素 M1 的化学发光试剂盒

[0072] (1) 检测黄曲霉毒素 M1 的化学发光试剂盒的组成

[0073] A,包被有黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体的固相载体 (化学发光板);

[0074] B,黄曲霉毒素 M1 标准品溶液:0、0.05、0.15、0.45、1.35、4.05ng/mL。

[0075] C,浓缩酶标黄曲霉毒素 M1-OVA 溶液:用人工抗原 (黄曲霉毒素 M1-OVA) 与辣根过氧化物酶偶联制备得到,使用时用稀释液稀释至工作浓度。

[0076] D,酶标黄曲霉毒素 M1-OVA 稀释液:磷酸钠、NaCl 缓冲溶液。

[0077] E,发光溶液:A 液为鲁米诺、对甲苯酚溶液,B 液过氧化氢脲溶液,使用时 A 液、B 液等体积混匀,现配现用。

[0078] F,2 倍浓缩复溶液,使用时用双蒸水稀释至工作浓度。

[0079] G,20 倍浓缩洗涤溶液:使用时用双蒸水稀释至工作浓度。

[0080] (2) 化学发光板的制备

[0081] 用包被液将抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体稀释成 5.0 $\mu\text{g/mL}$,每孔加入 100 μL ,37℃恒温箱放置 2h,倾去包被液,拍干,然后每孔加入封闭液 150 μL ,37℃恒温箱放置 2h,倾去孔内液体,洗涤液洗涤一次,拍干,用锡箔纸真空密封保存。

[0082] 实施例 5:检测黄曲霉毒素 M1 的化学发光试剂盒的应用

[0083] (1) 试剂的配制

[0084] A,洗涤溶液:将试剂盒中提供的浓缩洗涤液用去离子水按 1:19 倍稀释后使用。

[0085] B,复溶工作液:将试剂盒中提供的浓缩磷酸盐缓冲液用去离子水按 1:1 倍稀释后使用。

[0086] C,化学发光溶液:使用前将 A 液与 B 液按体积比 1:1 混匀。

[0087] D,酶标抗原工作液:将酶标抗原稀释液和酶标抗原浓缩液按 10:1 体积比混合并混匀。

[0088] (2) 样品前处理

[0089] A, 牛奶

[0090] 新鲜牛奶样本可直接进行检测, 经过冷冻保存的牛奶样本解冻后静置一段时间, 除去上层脂肪后再进行检测。

[0091] B, 奶粉

[0092] 称取 $1\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 奶粉样本, 加入 8ml 复溶工作液, 涡动均匀。

[0093] (3) 检测步骤

[0094] A, 加样: 加标准品 / 样本 $50\ \mu\text{L}$ 到对应的微孔中, 再加入酶标抗原工作液 $50\ \mu\text{L}$ / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境中反应 15min。

[0095] B, 洗涤: 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 用洗涤工作液 $250\ \mu\text{L}$ / 孔, 充分洗涤 5 次, 每次间隔 10s, 用吸水纸拍干;

[0096] C, 加发光溶液: 每孔加入新配制的发光底物 A、B 液各 $100\ \mu\text{L}$, 震荡约 30 秒左右, 用盖板膜盖板后室温放置 3min。

[0097] D, 检测: 直接放入微孔板发光分析仪内测量读数。

[0098] (4) 结果判断

[0099] 所获得的标准品和样品发光强度值的平均值除以第一个标准 (0 标准) 的发光强度值再乘以 100, 以抑制率为纵坐标, 黄曲霉毒素 M1 浓度的对数为横坐标作标准曲线, 每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。

[0100] 相对发光强度 (%) = $\text{RLU} / \text{RLU}_0$, RLU 是标准品或者样品溶液测定的发光强度值, RLU_0 是空白 (浓度为 0 的标准溶液) 的发光强度值。

[0101] 实施例 6: 试剂盒特异性试验

[0102] 以黄曲霉毒素 M1 作为标准, 设黄曲霉毒素 M1 的交叉反应率为 100%, 用于抗体交叉反应性研究的药物均为与黄曲霉毒素 M1 结构或者功能相似的药物: 黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2。按试剂盒步骤操作, 但加入的竞争物分别为不同的黄曲霉毒素 M1 类似物, 制作抑制曲线, 根据线性方程计算各竞争物 50% 抑制浓度 (IC_{50})。交叉反应率 (% CR) 即为抗体对黄曲霉毒素 M1 的 IC_{50} 与抗体对黄曲霉毒素 M1 竞争物的 IC_{50} 之比的百分数, 按下式进行计算:

[0103]

$$\text{交叉反应率 \% (CR\%)} = \frac{\text{抗体对黄曲霉毒素 M1 药物的 } \text{IC}_{50}}{\text{抗体对黄曲霉毒素 M1 竞争物得 } \text{IC}_{50}} \times 100\%$$

[0104] 结果列于表 1:

[0105] 表 1 黄曲霉毒素 M1 试剂盒特异性试验

[0106]

竞争物	交叉反应率 (%)
黄曲霉毒素 M1	100

黄曲霉毒素 B1	163
黄曲霉毒素 B2	20.7
黄曲霉毒素 G1	99.7
黄曲霉毒素 G2	3

[0107] 实施例 7 : 试剂盒精密度和准确度试验

[0108] 分别以不同浓度的黄曲霉毒素 M1 添加牛奶、奶粉样本进行添加回收试验, 计算不同药物在不同样本中得回收率, 从而确定试剂盒的准确度, 每个样本添加 3 个浓度, 每个浓度添加 5 个样本, 抽取 3 个批次试剂盒进行试验。

[0109] 根据制定的标准曲线的线性方程进行回收率的定量计算, 结果见下表 2。

[0110] 表 2 黄曲霉毒素 M1 试剂盒准确度试验

[0111]

牛奶				
批号	添加浓度 ng/g	0.05	1.0	2.0
第一批次	实测平均浓度	0.046	1.02	2.14
	批内变异系数%	6.5	7.1	7.8
第二批次	实测平均浓度	0.047	1.06	2.04
	批内变异系数%	8.3	8.9	7.5
第三批次	实测平均浓度	0.052	1.07	2.01
	批内变异系数%	9.1	9.3	8.5
	批间变异系数%	9.4	9.7	9.0
奶粉				
批号	添加浓度 ng/g	0.4	0.8	1.6
第一批次	实测平均浓度	0.42	0.83	1.68
	批内变异系数%	8.4	6.8	8.2
第二批次	实测平均浓度	0.43	0.85	1.70
	批内变异系数%	7.9	9.1	7.4
第三批次	实测平均浓度	0.41	0.85	1.69
	批内变异系数%	7.7	8.6	8.1
	批间变异系数%	9.1	9.3	9.4

[0112] 从上述测定结果看, 牛奶样本的回收率在 92.0%~107.0% 之间; 奶粉样本的回收率在 102.5%~107.5% 之间。总体批内变异系数在 6.5%~9.3% 之间, 批间变异系数在 9.0%~9.7% 之间。表明本试剂盒有很好的精密度和准确度。

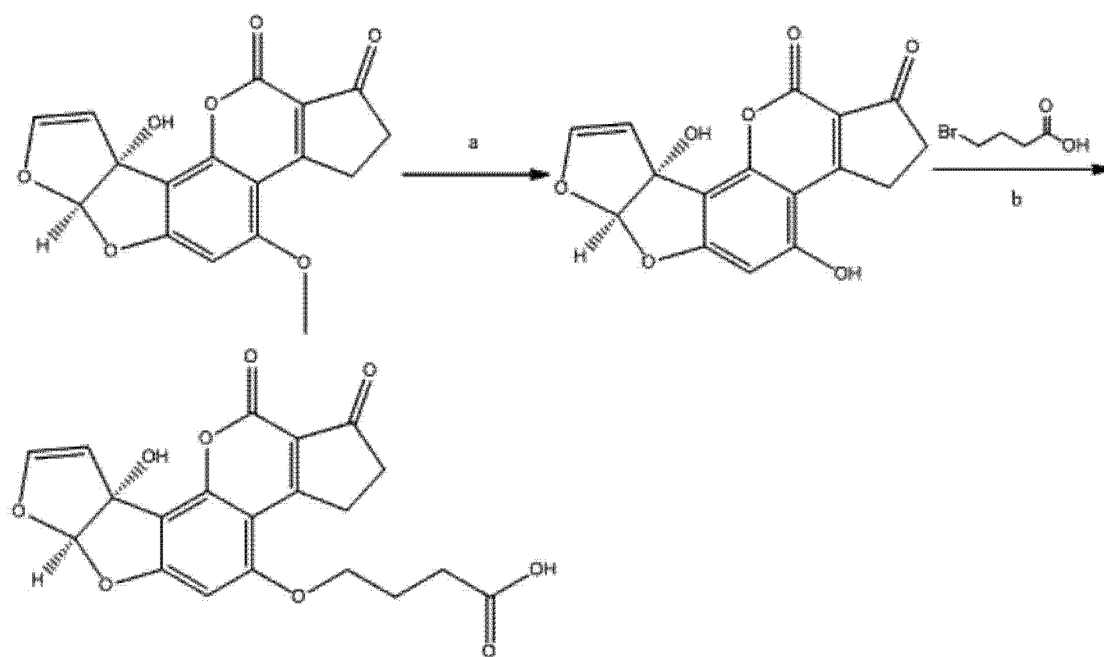


图 1

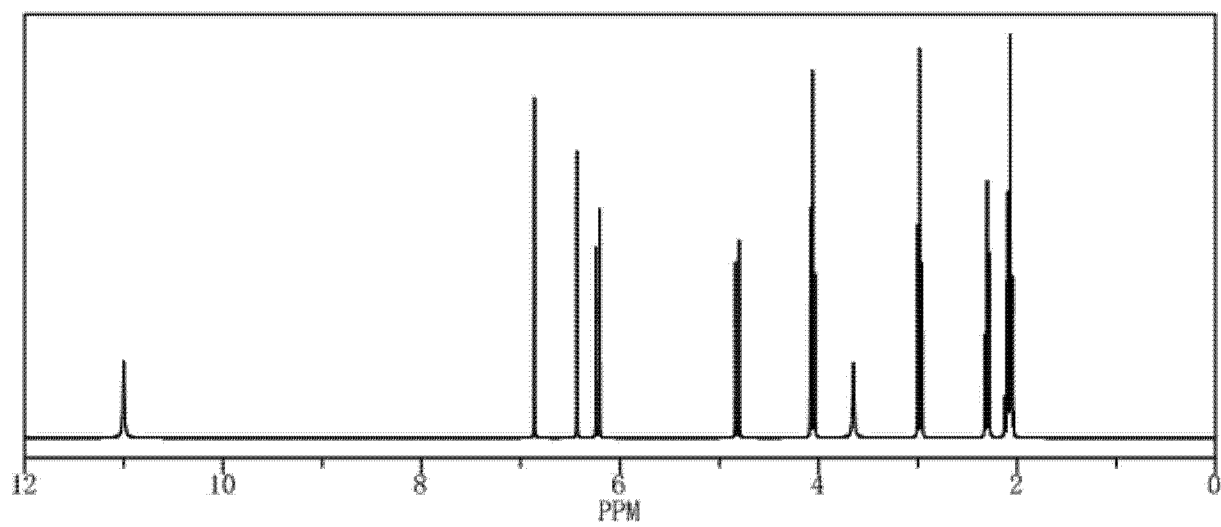


图 2

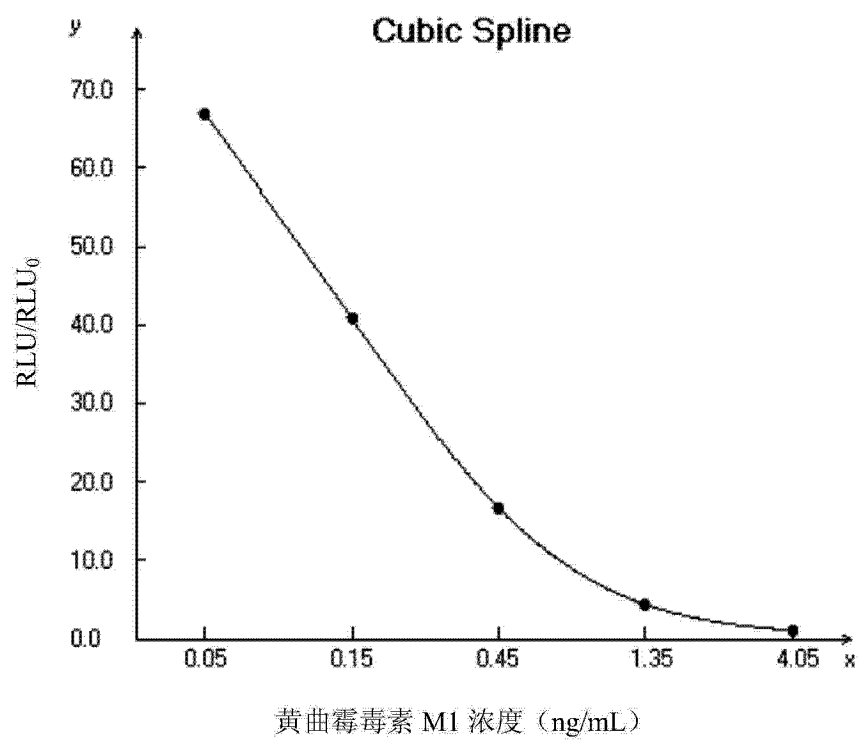


图 3

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素M1的化学发光试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN104897651A	公开(公告)日	2015-09-09
申请号	CN201410832184.8	申请日	2014-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	万宇平 冯月君 崔海峰 冯静 宋灏 贾芳芳 吴小胜		
发明人	万宇平 冯月君 崔海峰 冯静 宋灏 贾芳芳 吴小胜		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN104897651B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种黄曲霉毒素M1的化学发光酶联免疫(CLEIA)检测试剂盒，包括盒体，设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂；其特征在于，所述化学发光板的各孔包被有抗黄曲霉毒素M1抗体；所述试剂包括：酶标黄曲霉毒素M1抗原浓缩液，酶标黄曲霉毒素M1抗原稀释液，黄曲霉毒素M1系列标准品溶液，化学发光底物A、B液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液；本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点，与传统的ELISA法比较，操作时间大幅度减少。可用作检测牛奶、奶粉中黄曲霉毒素M1残留检测。

抗体对黄曲霉毒素 M1 药物的 IC₅₀

$$\text{交叉反应率\% (CR\%)} = \frac{\text{抗体对黄曲霉毒素 M1 药物的 IC}_{50}}{\text{抗体对黄曲霉毒素 M1 竞争物得 IC}_{50}} \times 100\%$$

抗体对黄曲霉毒素 M1 竞争物得 IC₅₀