



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645691 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201611226282.2

(22)申请日 2016.12.27

(71)申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72)发明人 马良 钟红 张宇昊

(74)专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 王贵君

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

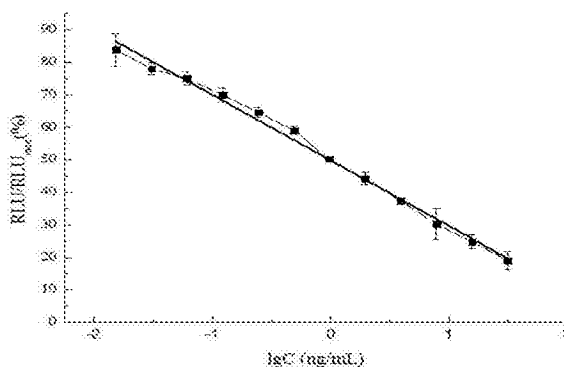
权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(54)发明名称

一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法

(57)摘要

本发明涉及一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,该方法基于辣根过氧化物酶催化鲁米诺-过氧化氢发光体系,建立细交链格孢菌酮酸间接竞争化学发光酶联免疫检测方法,兼具化学发光法高灵敏度与免疫分析法特异性强的特点,该方法的检测范围为0.032ng/mL~30.244ng/mL,IC₅₀为0.973ng/mL,最低检出限为0.010ng/mL,线性回归方程为 $y = 49.82 - 20.14x$, $R^2 = 0.9966$ 。与传统ELISA方法相比IC₅₀和最低检测限更低、特异性强,发光信号持续时间长,可达数小时,检测线性范围更宽,为研究细交链格孢菌酮酸限量标准、细交链格孢菌酮酸污染水平检测及风险分析提供依据。



1. 一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 取酶标板,每孔加入细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物,孵育后洗板,拍干,然后向每孔加入封闭液进行封闭,再洗板,拍干,得到细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物包被的酶标板;

(2) 将固体粮食粉碎后过40~60目筛,获得固体粮食颗粒,将所述固体粮食颗粒加入甲醇溶液中,涡旋震荡后离心,取上清液与NaCl溶液混合后加入PBS进行稀释,制得待测样品溶液;

(3) 将细交链格孢菌酮酸标准品溶液稀释成一系列的浓度梯度,然后将不同浓度的细交链格孢菌酮酸标准品溶液分别加入步骤(1)中的酶标板的标准孔中,将步骤(2)中制得的待测样品溶液加入所述酶标板的样品孔中,然后向所述酶标板的每孔加入细交链格孢菌酮酸抗体,孵育后洗板,拍干;再向所述酶标板的每孔加入酶标二抗,孵育后洗板,拍干;最后向所述酶标板的每孔加入化学发光液,轻拍混匀,利用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU;

(4) 检测结果计算与分析,即得样品中细交链孢菌酮酸的含量。

2. 如权利要求1所述的一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,其特征在于,包括如下步骤:(1) 取酶标板,每孔加入经碳酸盐缓冲液稀释后的细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物,4℃孵育12h后以PBST缓冲液洗板,拍干,然后按200μL/孔向每孔加入封闭液在37℃下封闭60min,PBST缓冲液洗板,拍干,得到细交链格孢菌酮酸与BSA偶联物包被的酶标板,包被浓度为0.5~4.0μg/mL,包被量为100μL/孔;所述碳酸盐缓冲液浓度为0.05mol/L,pH为9.6;所述PBST缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为7.4;

(2) 将固体粮食粉碎后过40目筛,获得固体粮食颗粒,按料液比(g/mL)1:15将所述固体粮食颗粒加入质量分数为50~100%甲醇溶液中,涡旋震荡5min后以4000r/min离心10min,取上清液与质量分数为10%的NaCl溶液等体积混合后加入PBS缓冲液稀释25倍,制得待测样品溶液;所述PBS缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为5.8~8.0;

(3) 以步骤(2)中PBS缓冲液将浓度为1.0mg/mL细交链格孢菌酮酸标准品溶液稀释成0.018、0.054、0.164、0.494、1.481、4.444、13.333、40ng/mL 7个浓度,然后将不同浓度的细交链格孢菌酮酸标准品溶液各取50μL分别加入步骤(1)中的酶标板的标准孔中,取50μL步骤(2)中制得的待测样品溶液加入所述酶标板的样品孔中,然后向所述酶标板的每孔加入50μL细交链格孢菌酮酸抗体,37℃下孵育15~60min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板,拍干;再向所述酶标板的每孔加入100μL酶标二抗,37℃下孵育60min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板,拍干;最后向所述酶标板的每孔加入50~150μL化学发光液,轻拍混匀,利用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU;所述细交链格孢菌酮酸抗体经步骤(2)中PBS缓冲液稀释40000~100000倍;所述酶标二抗经步骤(2)中PBS缓冲液稀释4000~10000倍;

(4) 检测结果计算与分析,即得样品中细交链孢菌酮酸的含量。

3. 如权利要求1所述的一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 取酶标板,每孔加入经碳酸盐缓冲液稀释后的细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物,4℃孵育12h后以PBST缓冲液洗板,拍干,然后按200μL/孔向每孔加入封闭液在37℃下封闭60min,PBST缓冲液洗板,拍干,得到细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物包被的酶标板,包被

浓度为2 μ g/mL,包被量为100 μ L/孔;所述经碳酸盐缓冲液浓度为0.05mol/L,pH为9.6;所述PBST缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为7.4;

(2)将固体粮食粉碎后过40目筛,获得固体粮食颗粒,按料液比(g/mL)1:15将所述固体粮食颗粒加入质量分数为50~100%甲醇溶液中,涡旋震荡5min后以4000r/min离心10min,取上清液与质量分数为10%的NaCl溶液等体积混合后加入PBS缓冲液稀释25倍,制得待测样品溶液;所述PBS缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为7.4;

(3)以步骤(2)中PBS缓冲液将浓度为1.0mg/mL细交链格孢菌酮酸标准品溶液稀释成0.018、0.054、0.164、0.494、1.481、4.444、13.333、40ng/mL 7个浓度,然后将不同浓度的细交链格孢菌酮酸标准品溶液各取50 μ L分别加入步骤(1)中的酶标板的标准孔中,取50 μ L步骤(2)中制得的待测样品溶液加入所述酶标板的样品孔中,然后向所述酶标板的每孔加入50 μ L细交链格孢菌酮酸抗体,37 $^{\circ}$ C下孵育30min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板,拍干;再向所述酶标板的每孔加入100 μ L酶标二抗,37 $^{\circ}$ C下孵育60min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板,拍干;最后向所述酶标板的每孔加入125 μ L化学发光液,轻拍混匀,利用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU;所述细交链格孢菌酮酸抗体经步骤(2)中PBS缓冲液稀释80000倍;所述酶标二抗经步骤(2)中PBS缓冲液稀释8000倍;

(4)检测结果计算与分析,即得样品中细交链格孢菌酮酸的含量。

4.如权利要求1~3任一项所述的一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述酶标板为96孔可拆化学发光酶标板。

5.如权利要求1~3任一项所述的一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述封闭液为质量分数为5.0%的脱脂奶粉、质量分数为10.0%的脱脂奶粉、质量分数为0.5%的BSA、质量分数为1.0%的BSA、质量分数为0.5%的OVA或质量分数为1.0%的OVA中的一种。

6.如权利要求1~3任一项所述的一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述细交链格孢菌酮酸抗体为细交链格孢菌酮酸多克隆抗体。

7.如权利要求1~3任一项所述的一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述酶标二抗为辣根过氧化酶标记的羊抗小鼠IgG。

8.如权利要求1~3任一项所述的一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述化学发光物质为ECL发光试剂。

一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品检测领域,涉及一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法。

背景技术

[0002] 细交链格孢菌酮酸(tenipazonic acid,TA)是链格孢霉、稻瘟病霉、高粱点霉等在特定条件下产生的有毒代谢产物之一,是继交链孢酚(Alternariol,AOH)、交链孢酚单甲醚(Alternariol monomethyl ether,AME)后发现的一种链格孢霉毒素。TA是一种广泛存在于谷物、蔬菜、水果中的天然毒物,它能在生长、加工、贮藏等环节产生,在小麦、番茄酱、食用油、葡萄酒等农产品中均曾发现过TA污染。各种链格孢霉毒素中,TA毒性最强,长期食用被TA污染的食品,可能会严重危害人体健康。雄性小鼠经口半致死量为182mg/kg,雌性小鼠经口半致死量为81mg/kg。有研究报道指出,TA与某些其他真菌毒素复合污染时,会产生协同效应使毒性作用增强,加大对人体和动物的健康威胁。由于TA具有多种生物学特性,在各种链格孢霉毒素中对哺乳类动物的毒性最大,是目前链格孢霉毒素中被研究最多的一种毒素。随着人们安全意识的提高,对真菌毒素的检测要求也越来越高。TA常用检测方法有气相色谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱法等,但这些方法对设备和人员的素质要求较高、耗时长、设备昂贵,不适合大批量和快速的现场检测,所以急需一种简单快速高灵敏的检测方法。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法。

[0004] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0005] 1、一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,包括如下步骤:

[0006] (1)取酶标板,每孔加入细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物,孵育后洗板,拍干,然后向每孔加入封闭液进行封闭,再洗板,拍干,得到细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物包被的酶标板;

[0007] (2)将固体粮食粉碎后过40~60目筛,获得固体粮食颗粒,将所述固体粮食颗粒加入甲醇溶液中,涡旋震荡后离心,取上清液与NaCl溶液混合后加入PBS进行稀释,制得待测样品溶液;

[0008] (3)将细交链格孢菌酮酸标准品溶液稀释成一系列的浓度梯度,然后将不同浓度的细交链格孢菌酮酸标准品溶液分别加入步骤(1)中的酶标板的标准孔中,将步骤(2)中制得的待测样品溶液加入所述酶标板的样品孔中,然后向所述酶标板的每孔加入细交链格孢菌酮酸抗体,孵育后洗板,拍干;再向所述酶标板的每孔加入酶标二抗,孵育后洗板,拍干;最后向所述酶标板的每孔加入化学发光液,轻拍混匀,利用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU;

[0009] (4)检测结果计算与分析,即得样品中细交链格孢菌酮酸的含量。

[0010] 进一步优化,包括如下步骤:

[0011] (1) 取酶标板,每孔加入经碳酸盐缓冲液稀释后的细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物,4℃孵育12h后以PBST缓冲液洗板,拍干,然后按200 μ L/孔向每孔加入封闭液在37℃下封闭60min,PBST缓冲液洗板,拍干,得到细交链格孢菌酮酸与BSA偶联物包被的酶标板,包被浓度为0.5~4.0 μ g/mL,包被量为100 μ L/孔;所述碳酸盐缓冲液浓度为0.05mol/L,pH为9.6;所述PBST缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为7.4;

[0012] (2) 将固体粮食粉碎后过40目筛,获得固体粮食颗粒,按料液比(g/mL)1:15将所述固体粮食颗粒加入质量分数为50~100%甲醇溶液中,涡旋震荡5min后以4000r/min离心10min,取上清液与质量分数为10%的NaCl溶液等体积混合后加入PBS缓冲液稀释25倍,制得待测样品溶液;所述PBS缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为5.8~8.0;

[0013] (3) 以步骤(2)中PBS缓冲液将浓度为1.0mg/mL细交链格孢菌酮酸标准品溶液稀释成0.018、0.054、0.164、0.494、1.481、4.444、13.333、40ng/mL 7个浓度,然后将不同浓度的细交链格孢菌酮酸标准品溶液各取50 μ L分别加入步骤(1)中的酶标板的标准孔中,取50 μ L步骤(2)中制得的待测样品溶液加入所述酶标板的样品孔中,然后向所述酶标板的每孔加入50 μ L细交链格孢菌酮酸抗体,37℃下孵育15~60min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板,拍干;再向所述酶标板的每孔加入100 μ L酶标二抗,37℃下孵育60min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板,拍干;最后向所述酶标板的每孔加入50~150 μ L化学发光液,轻拍混匀,利用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU;所述细交链格孢菌酮酸抗体经步骤(2)中PBS缓冲液稀释40000~100000倍;所述酶标二抗经步骤(2)中PBS缓冲液稀释4000~10000倍;

[0014] (4) 检测结果计算与分析,即得样品中细交链孢菌酮酸的含量。

[0015] 进一步优化,包括如下步骤:

[0016] (1) 取酶标板,每孔加入经碳酸盐缓冲液稀释后的细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物,4℃孵育12h后以PBST缓冲液洗板,拍干,然后按200 μ L/孔向每孔加入封闭液在37℃下封闭60min,PBST缓冲液洗板,拍干,得到细交链格孢菌酮酸与BSA的偶联物包被的酶标板,包被浓度为2 μ g/mL,包被量为100 μ L/孔;所述经碳酸盐缓冲液浓度为0.05mol/L,pH为9.6;所述PBST缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为7.4;

[0017] (2) 将固体粮食粉碎后过40目筛,获得固体粮食颗粒,按料液比(g/mL)1:15将所述固体粮食颗粒加入质量分数为50~100%甲醇溶液中,涡旋震荡5min后以4000r/min离心10min,取上清液与质量分数为10%的NaCl溶液等体积混合后加入PBS缓冲液稀释25倍,制得待测样品溶液;所述PBS缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为7.4;

[0018] (3) 以步骤(2)中PBS缓冲液将浓度为1.0mg/mL细交链格孢菌酮酸标准品溶液稀释成0.018、0.054、0.164、0.494、1.481、4.444、13.333、40ng/mL 7个浓度,然后将不同浓度的细交链格孢菌酮酸标准品溶液各取50 μ L分别加入步骤(1)中的酶标板的标准孔中,取50 μ L步骤(2)中制得的待测样品溶液加入所述酶标板的样品孔中,然后向所述酶标板的每孔加入50 μ L细交链格孢菌酮酸抗体,37℃下孵育30min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板,拍干;再向所述酶标板的每孔加入100 μ L酶标二抗,37℃下孵育60min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板,拍干;最后向所述酶标板的每孔加入125 μ L化学发光液,轻拍混匀,利用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU;所述细交链格孢菌酮酸抗体经步骤(2)中PBS缓冲液稀释80000倍;所述酶标二抗经步骤(2)中PBS缓冲液稀释8000倍;

[0019] (4) 检测结果计算与分析,即得样品中细交链孢菌酮酸的含量。

- [0020] 进一步优化,步骤(1)中,所述酶标板为96孔可拆化学发光酶标板。
- [0021] 进一步优化,步骤(1)中,所述封闭液为质量分数为5.0%的脱脂奶粉、质量分数为10.0%的脱脂奶粉、质量分数为0.5%的BSA、质量分数为1.0%的BSA、质量分数为0.5%的OVA或质量分数为1.0%的OVA中的一种。
- [0022] 进一步优化,步骤(3)中,所述细交链格孢菌酮酸抗体为细交链格孢菌酮酸多克隆抗体。
- [0023] 进一步优化,步骤(3)中,所述酶标二抗为辣根过氧化酶标记的羊抗小鼠IgG。
- [0024] 进一步优化,步骤(3)中,所述化学发光物质为ECL发光试剂。
- [0025] 本发明的有益效果在于:本发明提供一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法,该方法为以辣根过氧化酶催化鲁米诺-过氧化氢发光体系的icCLEIA分析方法检测谷物中细交链格孢菌酮酸含量,该方法的检测范围为0.032ng/mL~30.244ng/mL,1C₅₀为0.973ng/mL,最低检出限为0.010ng/mL,线性回归方程为 $y = 49.82 - 20.14x$, $R^2 = 0.9966$ 。通过对面粉和燕麦进行测试,发现面粉样品的平均加标回收率为82.43%~96.09%,燕麦样品的平均加标回收率为81.53%~93.41%,批间变异系释与批内变异系数均小于12%;与农产品中常见的重点真菌毒素交叉反应率均小于1%,表明方法特异性良好。该方法与UPLC-MS/MS准确度一致,可满足谷物中细交链格孢菌酮酸的快速检测。传统酶联免疫方法的OD值在2.0左右,本方法鲁米诺发光强度为5个量级,发光信号强度大,发光持续时间长,对细交链格孢菌酮酸检测更加灵敏,为制备检测细交链格孢菌酮酸残留化学发光酶联免疫试剂盒提供基础。

附图说明

- [0026] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图进行说明:
- [0027] 图1为实施例1中多克隆抗体效价变化图;
- [0028] 图2为实施例3中PBS缓冲液的pH值对检测结果的影响图;
- [0029] 图3为实施例4中TAO-BSA的包被浓度对检测结果的影响图;
- [0030] 图4为实施例5中不同封闭液对检测结果的影响图;
- [0031] 图5为实施例6中细交链格孢菌酮酸多克隆抗体稀释倍数对检测结果的影响图;
- [0032] 图6为实施例7中竞争反应时间对检测结果的影响图;
- [0033] 图7为实施例8中羊抗小鼠IgG-HRP稀释倍数对检测结果的影响图;
- [0034] 图8为实施例9中ECL发光试剂添加量对检测结果的影响图;
- [0035] 图9为实施例10中标准曲线图;
- [0036] 图10为实施例11中其他毒素的化学发光酶联免疫反应结果图;
- [0037] 图11为实施例13中化学发光酶联免疫方法与UPLC-MS/MS两者检测结果的线性回归分析图。

具体实施方式

- [0038] 下面将结合附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。
- [0039] 材料与试剂:脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Desoxynivalenol, DON)、T-2毒素(T-2toxin, T-2)、展青霉素(Patulin, PAT)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、赭曲霉毒素A

(Ochratoxin A, OTA)、链格孢霉毒素链格孢酚(Alternariol, AOH) (新加坡Pribolab公司); 黄曲霉毒素B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、鸡卵白蛋白(Ovalbumin from egg, OVA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国sigma公司); 脱脂奶粉(伊利有限公司); 高灵敏ECL发光试剂(A液: 稳定剂, B液: 增强型化学发光剂) (上海生工生物有限公司); 羊抗小鼠IgG-HRP(武汉博士德公司); TA与血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)的偶联物; 免疫原TAO-KLH、TA与BSA的偶联物; 包被原TAO-BSA(实验室自制); 其他试剂均为国产或进口分析纯; 面粉, 燕麦(均购买于当地超市)。

[0040] 移液器(德国Eppendorf公司); DHP-600型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器厂); Syneng HIMG酶标仪(Gene Company Limited公司); 96孔可拆化学发光酶标板(上海生工生物有限公司); JS系列电子天平(精度0.0001g, 上海精天电子仪器有限公司)。Waters Quattro-Premier XE超高效液相色谱-串联质谱仪(配有Acquity UPLC BEH C₁₈色谱柱(50mm×2.1mm, 1.7μm)) (美国Waters公司)。

[0041] SPF级6-8周龄雌性Balb/c小鼠(重庆腾鑫生物技术公司)

[0042] 实施例1

[0043] 细交链格孢菌酮酸多克隆抗体

[0044] 取6-8周龄Balb/c雌性小鼠, 采用颈背部皮下注射免疫。首次免疫采用TAO-KLH与等体积弗氏完全佐剂混合并完全乳化后免疫; 21d后加强免疫, 用上述TAO-KLH与弗氏不完全佐剂混合乳化免疫; 每间隔2周加强免疫一次, 第5次免疫后7d眼眶取血。离心取上清液与甘油等体积混合后-20℃冰箱保存。

[0045] 细交链格孢菌酮酸多克隆抗体效价测定

[0046] 免疫注射后间隔7天, 断尾取血, 用间接ELISA法检测血清效价。以OD_{450nm}值接近1.0时的稀释倍数作为血清效价。效价变化如图1所示, 由图1可知, 免疫次数增加, 血清效价不断提高, 五免后效价均大于10000, 说明免疫效果好, 后续实验均使用2号鼠五免后的抗血清。

[0047] 实施例2

[0048] (1) 取酶标板, 每孔加入经碳酸盐缓冲液稀释后的细交链格孢菌酮酸与BSA偶联物(TAO-BSA), 4℃孵育12h后以PBST缓冲液洗板2次, 拍干, 然后按200μL/孔向每孔加入5.0%脱脂奶粉在37℃下封闭60min, PBST洗板2次, 拍干; 得到TAO-BSA包被的酶标板, 包被浓度为1.0μg/mL, 包被量为100μL/孔; 所述碳酸盐缓冲液浓度为0.05mol/L, pH为9.6; 所述PBST缓冲液浓度为0.01mol/L, pH为7.4;

[0049] (2) 以PBS缓冲液将浓度为1.0mg/mL细交链格孢菌酮酸标准品溶液稀释成0.018、0.054、0.164、0.494、1.481、4.444、13.333、40ng/mL 7个浓度, 然后将不同浓度的细交链格孢菌酮酸标准品溶液各取50μL分别加入步骤(1)中的酶标板的标准孔中, 然后向所述酶标板的每孔加入50μL实施例1中制备的细交链格孢菌酮酸多克隆抗体, 37℃下孵育后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板2次, 拍干; 再向所述酶标板的每孔加入100μL辣根过氧化酶标记的羊抗小鼠IgG(羊抗小鼠IgG-HRP), 37℃下孵育60min后以步骤(1)中PBST缓冲液洗板6次, 拍干; 最后向所述酶标板的每孔加入100μL ECL发光试剂, 轻拍混匀, 利用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU; 所述细交链格孢菌酮酸多克隆抗体经PBS缓冲液稀释40000倍; 所述辣根过氧化酶标记的羊抗小鼠IgG经步骤(2)中PBS缓冲液稀释4000倍; 所述PBS缓冲液的

浓度为0.01mol/L, pH为5.8。

[0050] 实施例3

[0051] PBS缓冲液的pH值对检测结果的影响

[0052] 由于反应体系的pH能直接影响抗原抗体间的结合,进而影响方法的检测限及灵敏度,将PBS缓冲液稀的pH分别调至5.8、6.4、7.4、8.0,其余步骤按照实施例2操作。实验结果如图2所示,由图2可知,1C₅₀随pH增大先缓慢下降后上升,RLU_{max}先上升后下降,RLU_{max}/1C₅₀在pH为7.4时最高,故选择PBS缓冲液pH为7.4。

[0053] 实施例4

[0054] TAO-BSA的包被浓度对检测结果的影响

[0055] 包被抗原的使用浓度过高,既浪费抗原,又可使本底增高;包被原浓度过低,固相载体上有大量微孔不能与抗原结合,增加了非特异性反应,影响检测的敏感性。将TAO-BSA的浓度分别调至4.0、2.0、1.0、0.5μg/mL, PBS缓冲液pH为7.4,其余步骤按照实施例2操作。实验结果如图3所示,由图3可知,TAO-BSA包被浓度越小,TA标准品竞争结合特异性抗血清越多,洗板后残留的抗体越少,抗体结合的羊抗小鼠1gG-HRP量少,HRP催化鲁米诺产生的发光强度越低,1C₅₀随TAO-BSA包被浓度减少先下降后上升,RLU_{max}/1C₅₀在包被浓度为2.0μg/mL时最大,1C₅₀越低,RLU_{max}/1C₅₀越大,说明方法的检测效果越好,故选择TAO-BSA包被浓度为2.0μg/mL。

[0056] 实施例5

[0057] 不同封闭液对检测结果的影响

[0058] 抗原在包被的时候浓度较低,固相载体表面尚有未被结合的位点,封闭就是让大量的不相关蛋白质占据固相载体上暴露的结合位点,同时稳定结合的抗原分子,从而阻止一抗和二抗与固相载体非特异性结合,产生高背景值,降低特异性与敏感性。在高灵敏的化学发光反应中背景值尤为重要。

[0059] 分别以5.0%脱脂奶粉、10.0%脱脂奶粉、0.5%BSA、1.0%BSA、0.5%OVA、1.0%OVA为封闭液, PBS缓冲液pH为7.4, TAO-BSA包被浓度为2.0μg/mL,其余步骤按照实施例2操作。实验结果如图4所示,由图4可知,未封闭时高背景会掩盖检测物的发光信号,故RLU_{max}较封闭组低。蛋白的种类不同可能与酶标板及后续抗体的作用效果有差异,5%脱脂奶粉、10%脱脂奶粉和1%BSA为封闭液时,发光值较其他组更高,但1C₅₀值也较高,敏感性较差,1.0%OVA的RLU_{max}/1C₅₀明显高于其他组,且1C₅₀值最低,灵敏度高,故选择1.0%OVA为封闭液。

[0060] 实施例6

[0061] 细交链格孢菌酮酸多克隆抗体稀释倍数对检测结果的影响

[0062] 细交链格孢菌酮酸多克隆抗体与羊抗小鼠1gG-HRP结合率有关,将细交链格孢菌酮酸多克隆抗体分别稀释40000、60000、80000、100000倍, PBS缓冲液pH为7.4, TAO-BSA包被浓度为2.0μg/mL, 1.0%OVA为封闭液,其余步骤按照实施例2操作。实验结果如图5所示,由图5可知,多克隆抗体稀释倍数越大浓度越低,与羊抗小鼠1gG-HRP特异性结合减少,鲁米诺发光信号降低,故RLU_{max}随多克隆抗体的稀释倍数增加而不断降低;1C₅₀值先降低,在80000倍时达到最小值后缓慢上升,且RLU_{max}/1C₅₀在稀释80000倍时最高,故选择多克隆抗体稀释80000倍。

[0063] 实施例7

[0064] 竞争反应时间对检测结果的影响

[0065] 竞争反应是包被原与毒素标准品同时与细交链格孢菌酮酸多克隆抗体特异性结合,将竞争反应时间分别设定为15、30、45、60min,PBS缓冲液pH为7.4,TAO-BSA包被浓度为2.0 μ g/mL,1.0%OVA为封闭液,多克隆抗体稀释80000倍,其余步骤按照实施例2操作。实验结果如图6所示,由图6可知,反应时间越长,与包被原结合的多克隆抗体越多,与羊抗小鼠IgG-HRP特异性结合增加,RLU_{max}有逐渐上升趋势,在30min与45min上升较为缓慢,可能反应已达到平衡,整体1C₅₀值差异较小,但在30min时RLU_{max}/1C₅₀值最大,故选择竞争反应时间为30min。

[0066] 实施例8

[0067] 羊抗小鼠IgG-HRP稀释倍数对检测结果的影响

[0068] 羊抗小鼠IgG-HRP浓度过高,本底增加;浓度过低,鲁米诺发光信号不强,敏感性差。将羊抗小鼠IgG-HRP分别稀释4000、6000、8000、10000倍,PBS缓冲液pH为7.4,TAO-BSA包被浓度为2.0 μ g/mL,1.0%OVA为封闭液,多克隆抗体稀释80000倍,竞争反应时间为30min,其余步骤按照实施例2操作。实验结果如图7所示,由图7可知,羊抗小鼠IgG-HRP稀释倍数越高,HRP的浓度越低,催化鲁米诺-过氧化氢发光体系由化学能转化为光能的效率降低,RLU_{max}逐渐降低,1C₅₀先降低后上升,在稀释度为8000倍时RLU_{max}/1C₅₀值远高于其他稀释度且敏感性高,故选择羊抗小鼠IgG-HRP稀释度为8000。

[0069] 实施例9

[0070] ECL发光试剂添加量对检测结果的影响

[0071] 将ECL发光试剂的添加量分别调至50、75、100、125、150 μ L/孔,PBS缓冲液pH为7.4,TAO-BSA包被浓度为2.0 μ g/mL,1.0%OVA为封闭液,多克隆抗体稀释80000倍,竞争反应时间为30min,羊抗小鼠IgG-HRP稀释度为8000,其余步骤按照实施例2操作。实验结果如图8所示,由图8可知,ECL发光试剂添加量越大,HRP催化鲁米诺产生的发光强度越高,RLU_{max}不断增大,背景值也不断加大;1C₅₀先下降后上升,每孔添加125 μ L时1C₅₀最小,且RLU_{max}/1C₅₀值最大,故选择添加量125 μ L/孔。

[0072] 实施例10

[0073] PBS缓冲液pH为7.4,TAO-BSA包被浓度为2.0 μ g/mL,1.0%OVA为封闭液,多克隆抗体稀释80000倍,竞争反应时间为30min,羊抗小鼠IgG-HRP稀释度为8000,ECL发光试剂添加量125 μ L/孔,其余步骤按照实施例2操作,以细交链格孢菌酮酸标准品溶液浓度的对数值lgC为横坐标,各标准品孔发光强度RLU与最大发光值RLU_{max}的比值为纵坐标,每个梯度做4个重复,绘制细交链格孢菌酮酸标准品溶液化学发光酶联免疫吸附分析的标准曲线,如图9所示,由图9可知,其线性回归方程为 $y = 49.82 - 20.14x$, $R^2 = 0.9966$,根据检测线计算得到检测的线性范围0.032ng/mL~30.244ng/mL,1C₅₀为0.973ng/mL。

[0074] PBS缓冲液pH为7.4,TAO-BSA包被浓度为2.0 μ g/mL,1.0%OVA为封闭液,多克隆抗体稀释80000倍,竞争反应时间为30min,羊抗小鼠IgG-HRP稀释度为8000,ECL发光试剂添加量125 μ L/孔,其余步骤按照实施例2操作,测定10个不同批次的空白标准品的RLU值,计算平均值(X)和标准差(SD),按照公式 $LOD\% = (X - 3SD) / X \times 100\%$ 进行计算,得出最低检出限为0.010ng/mL。

[0075] 实施例11

[0076] 细交链格孢菌酮酸多克隆抗体与细交链格孢菌酮酸特异性结合测试

[0077] 以交叉反应率来评价细交链格孢菌酮酸多克隆抗体的特异性,交叉反应率越低特异性越好。将AFB₁、DON、T-2、PAT、ZEN、OTA和AOH真菌毒素标准品倍比稀释为0.061、0.122、0.244、0.488、0.977、1.953、3.906、7.813、15.625、31.250、62.5、125、250、500ng/mL14个浓度,设置PBS缓冲液pH为7.4,TAO-BSA包被浓度为2.0μg/mL,1.0%OVA为封闭液,多克隆抗体稀释80000倍,竞争反应时间为30min,羊抗小鼠IgG-HRP稀释度为8000,ECL发光试剂添加量125μL/孔,其余步骤按照实施例2,分别作分析物及其类似物的竞争抑制曲线,如图10所示,得出各毒素的IC₅₀值,并计算交叉反应率,计算公式如下:

$$[0078] \quad \text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{TA毒素}IC_{50}}{\text{竞争原}IC_{50}} \times 100$$

[0079] 通过计算可知,AFB₁、DON、T-2、PAT、ZEN、OTA和AOH真菌毒素的IC₅₀值都大于500ng/mL,交叉反应率计算结果均小于1%,无明显交叉反应,说明制备的多克隆抗体与TA毒素可特异性结合,其他6种农产品中重点毒素对细交链格孢菌酮酸检测的干扰程度很小,该方法具有较好的特异性。

[0080] 实施例12

[0081] (1) 称取2.0g面粉于50mL离心管中,加入30mL质量分数为70%甲醇溶液中,涡旋震荡5min后以4000r/min离心10min,取1mL上清液与质量分数为10%的NaCl溶液等体积混合后加入PBS缓冲液稀释25倍,制得待测样品溶液;所述PBS缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为7.4;设置测试条件:PBS缓冲液pH为7.4,TAO-BSA包被浓度为2.0μg/mL,1.0%OVA为封闭液,多克隆抗体稀释80000倍,竞争反应时间为30min,羊抗小鼠IgG-HRP稀释度为8000,ECL发光试剂添加量125μL/孔,取50μL该待测样品溶液加入酶标板的样品孔中,其余步骤按照实施例2操作。

[0082] (2) 称取2.0g粉碎后的燕麦片于50mL离心管中,加入30mL质量分数为100%甲醇溶液中,涡旋震荡15min后以4000r/min离心10min,取上清液与质量分数为10%的NaCl溶液等体积混合后加入PBS缓冲液稀释25倍,制得待测样品溶液;所述PBS缓冲液浓度为0.01mol/L,pH为7.4;设置测试条件:PBS缓冲液pH为7.4,TAO-BSA包被浓度为2.0μg/mL,1.0%OVA为封闭液,多克隆抗体稀释80000倍,竞争反应时间为30min,羊抗小鼠IgG-HRP稀释度为8000,ECL发光试剂添加量125μL/孔,取50μL该待测样品溶液加入酶标板的样品孔中,其余步骤按照实施例2操作。

[0083] (3) 检测结果计算与分析,即得样品中细交链格孢菌酮酸的含量,计算公式如下:

$$[0084] \quad C(\text{样品}) = N \times 10^{(49.82-r)/20.14}$$

[0085] N: 样品稀释总倍数

[0086] r: 样品孔发光强度RLU与0标准品孔的发光值RLU_{max}的比值,RLU/RLU_{max}

[0087] (4) 取不同批次化学发光酶标板,分别向面粉样品和燕麦样品中添加细交链格孢菌酮酸,添加量分别为5.0、10.0、20.0ug,按照(1)、(2)中的方法,每个添加量做3次重复,每次做7个重复孔,计算批内变异系数和批间变异系数。变异系数(Coefficient of variation,CV)计算公式为:

[0088]
$$SD = \sqrt{\frac{(Xi - X)^2}{N - 1}}$$

[0089]
$$CV (\%) = (SD/X) \times 100$$

[0090] 结果见表1。

[0091] 表1 面粉、小麦样品添加回收试验结果表

Sample	Spiked (ng.g ⁻¹)	Recovery (%)	Intra-assay CV (%)	Inter-assay CV (%)
[0092] Wheat	6.24	82.43	5.02	10.39
	3.12	84.37	4.81	11.37
	1.56	96.09	4.08	8.33
Oat	6.24	81.53	4.83	10.32
	3.12	85.77	4.60	11.79
	1.56	93.41	2.61	9.56

[0093] 由表1可知,面粉样品的平均回收率为82.43%-96.09%,燕麦样品的平均回收率为81.53%-93.41%。面粉样品的批内变异系数为4.08%-5.02%,批间变异系数为8.33%-11.37%;燕麦样品的批内变异系数为2.61%-4.83%,批间变异系数为9.56%-10.32%,均小于15%,说明以本发明中的方法检测细交链格孢菌酮酸的精密度高。

[0094] 实施例13

[0095] 分别向面粉和燕麦样品中添加细交链格孢菌酮酸,添加量分别为5.0、10.0、20.0ug,分别采用UPLC-MS/MS和实施例12中(1)方法进行检测,以UPLC-MS/MS检测结果为横坐标,以化学发光酶联免疫方法检测结果为纵坐标做线性回归分析,结果如图11所示,由图11可知,线性回归方程为: $y=0.825x-0.073$, $R^2=0.9984$,说明icCLE1A与UPLC-MS/MS方法具有良好的的一致性和准确度。

[0096] 本发明中的方法不仅可以用于面粉和燕麦中细交链格孢菌酮酸的检测,还可以用于大米、小麦、玉米、各种米粉等粮食中细交链格孢菌酮酸的检测。

[0097] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

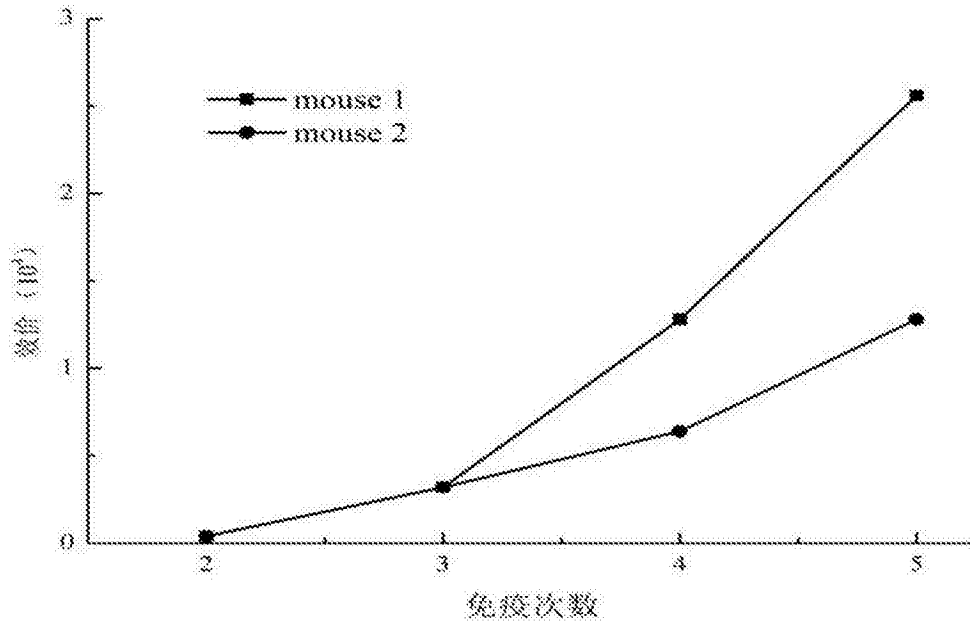


图1

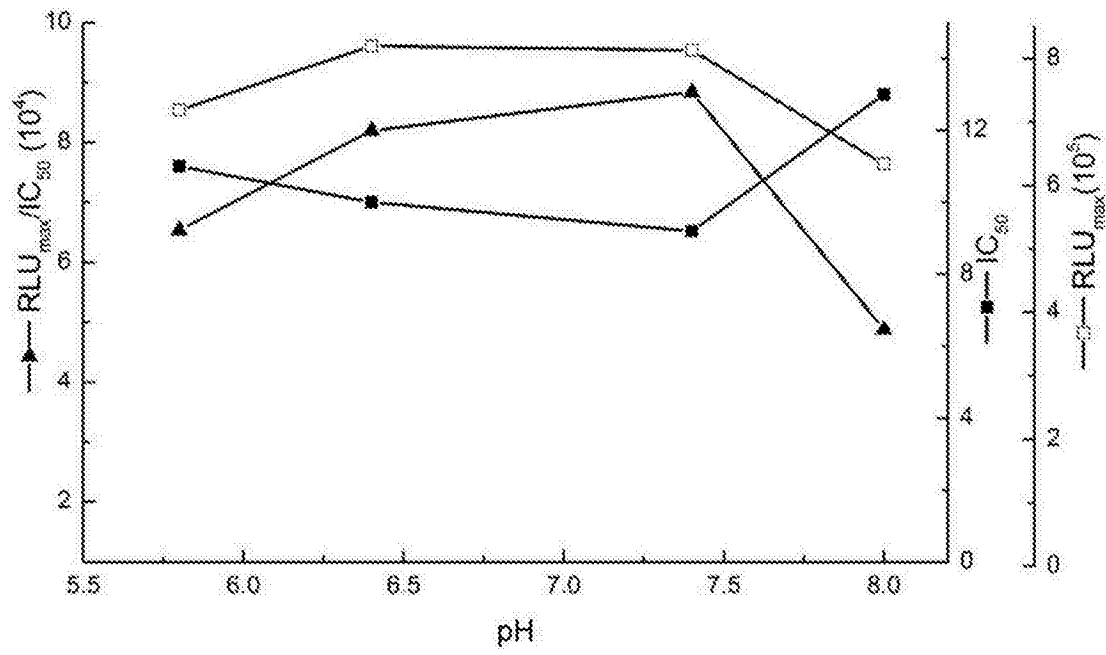


图2

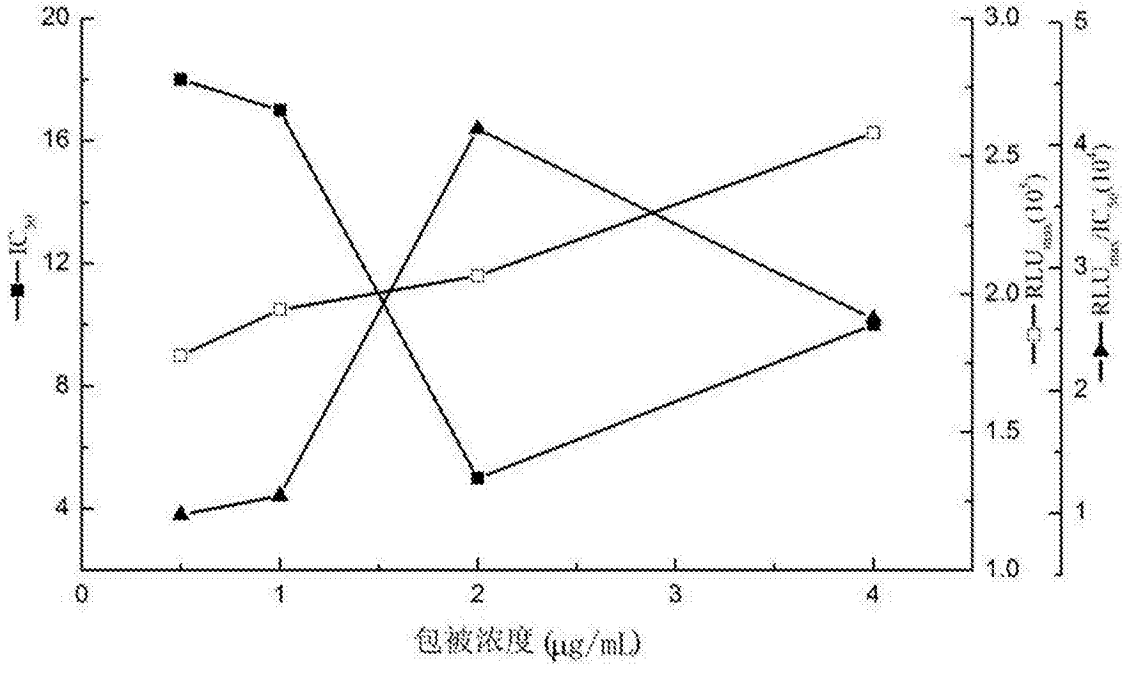


图3

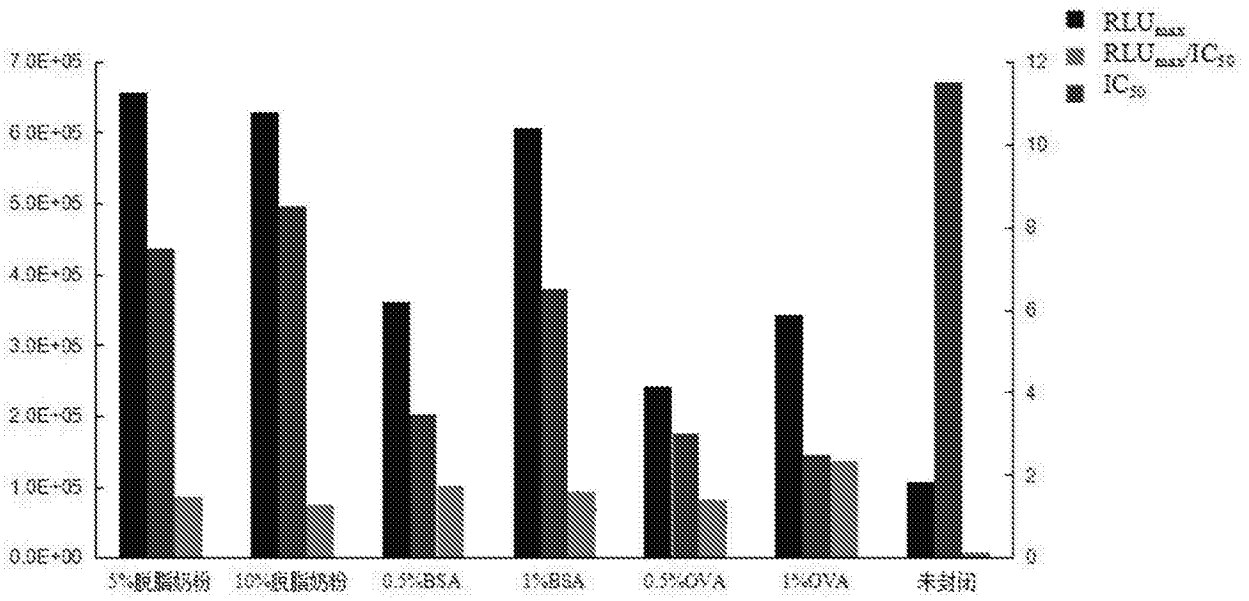


图4

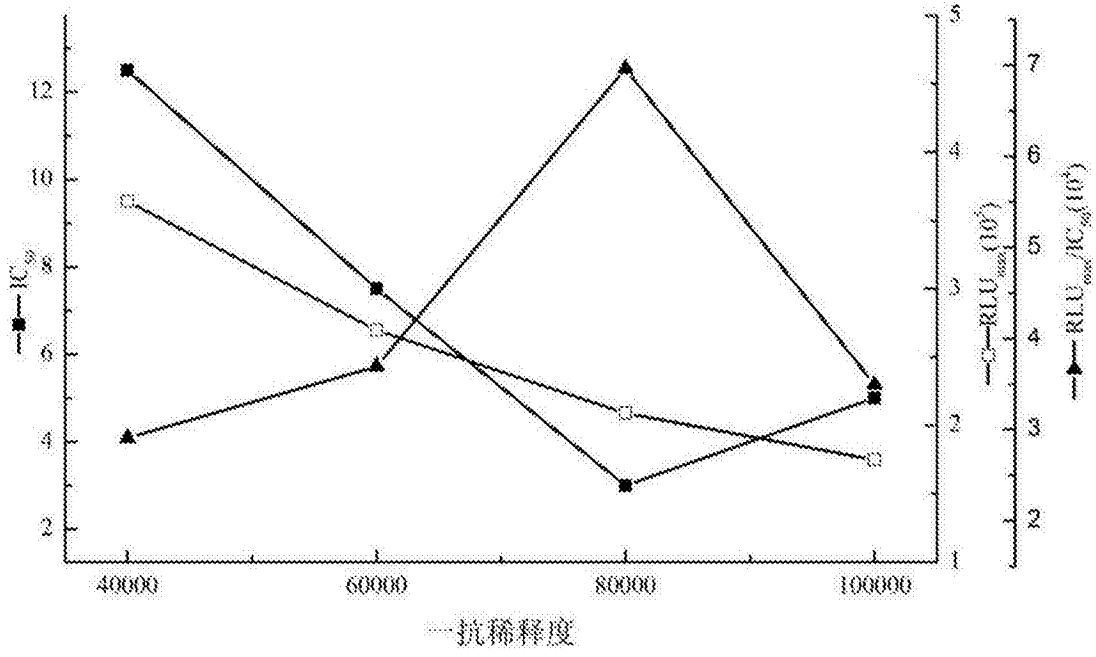


图5

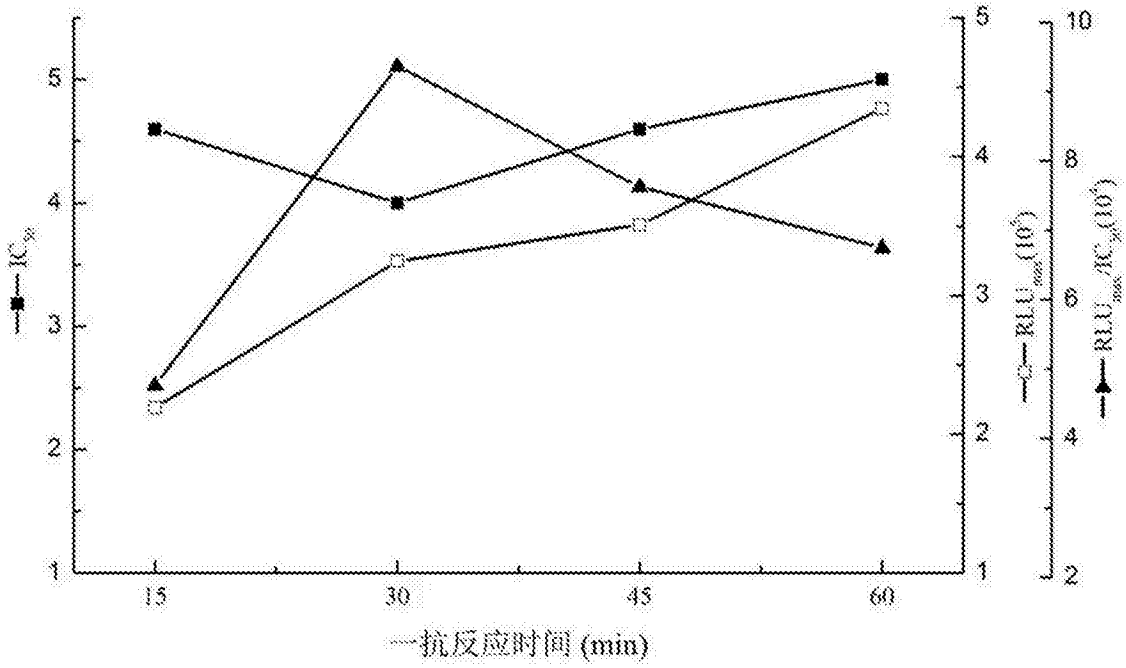


图6

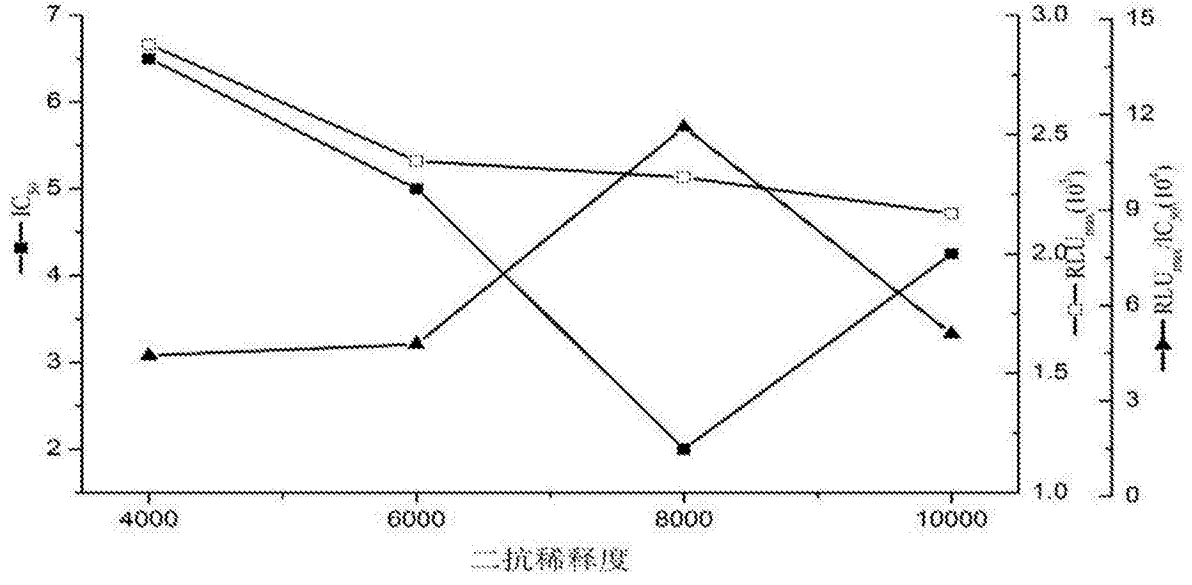


图7

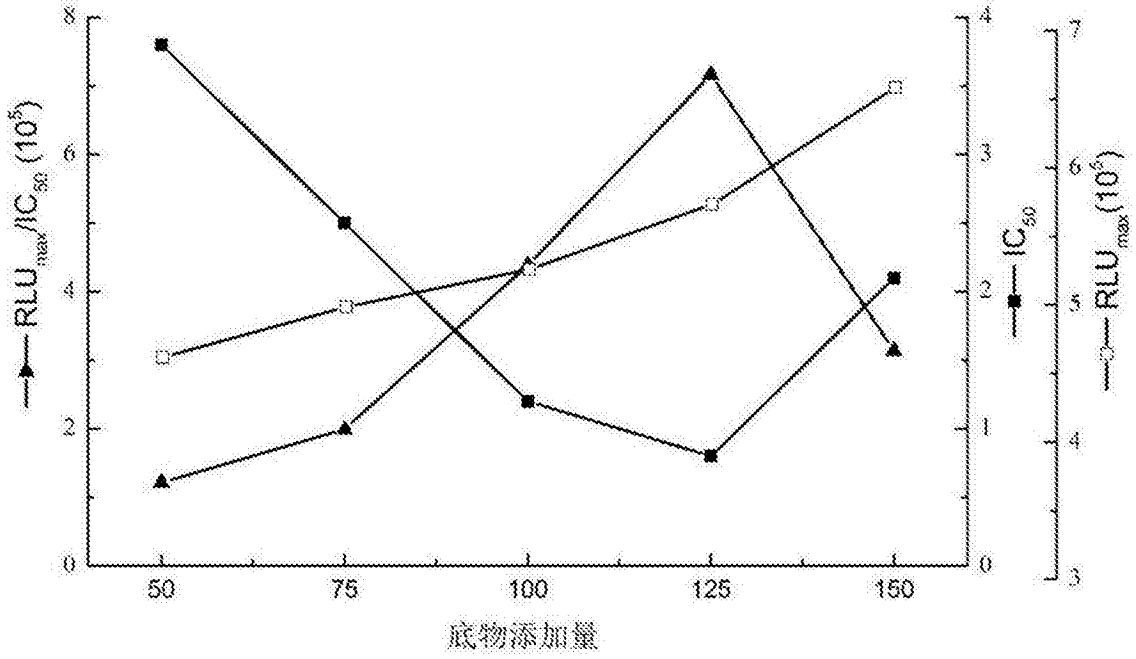


图8

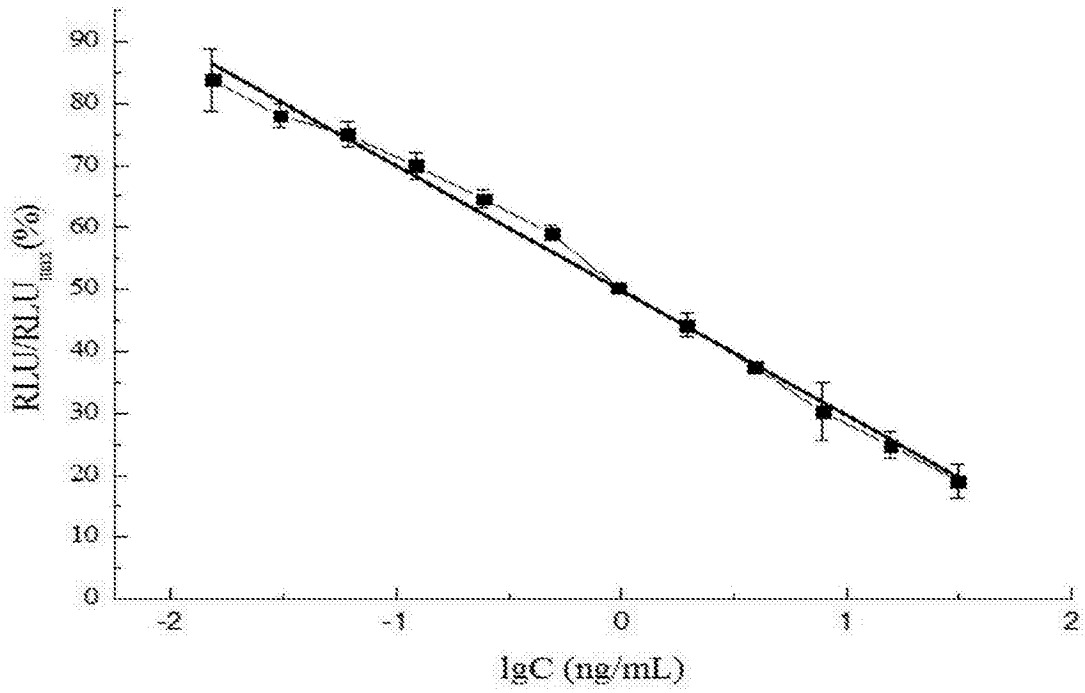


图9

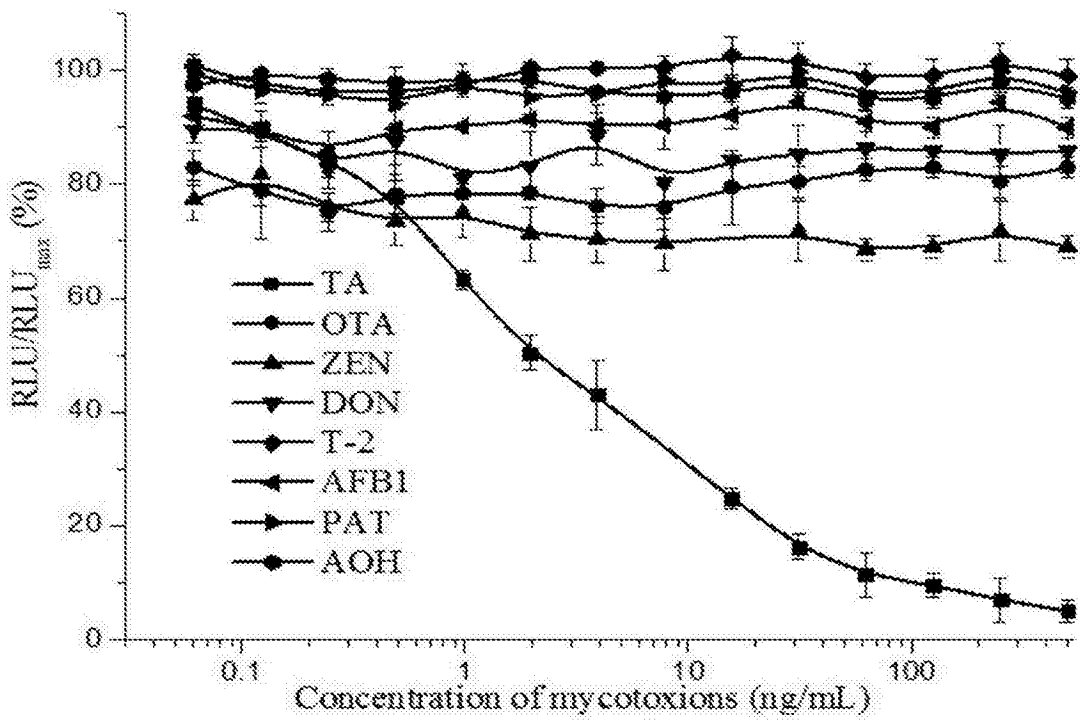


图10

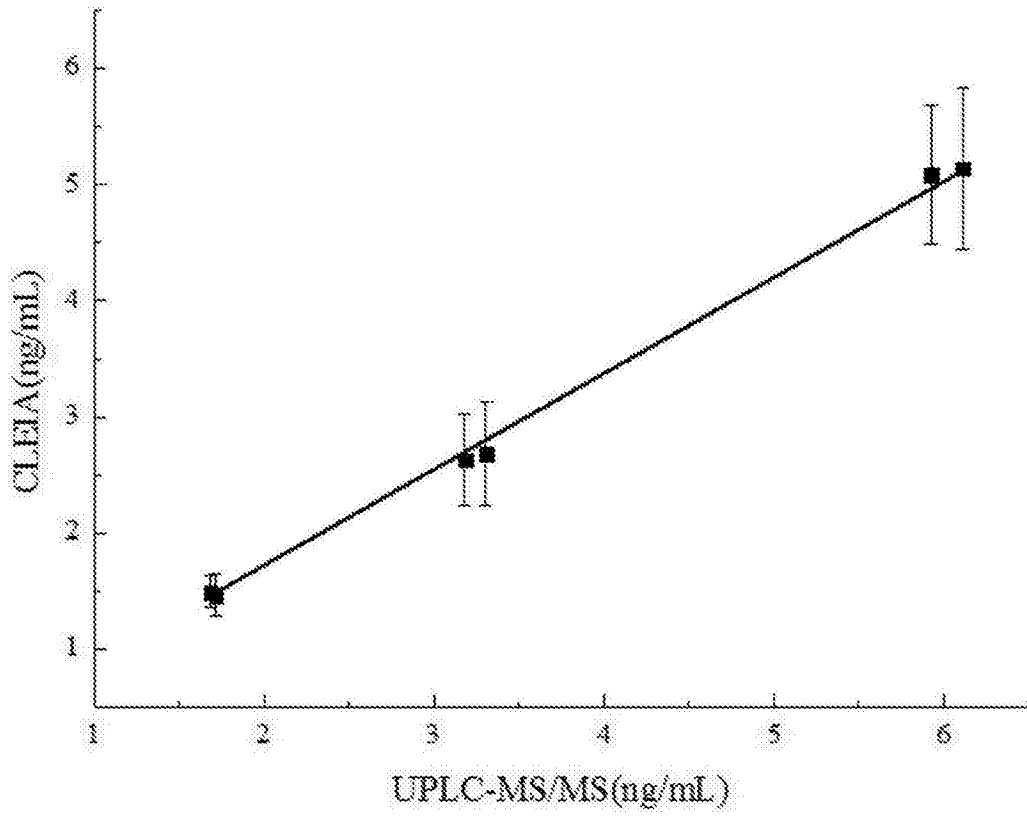


图11

专利名称(译)	一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法		
公开(公告)号	CN106645691A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201611226282.2	申请日	2016-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	西南大学		
申请(专利权)人(译)	西南大学		
当前申请(专利权)人(译)	西南大学		
[标]发明人	马良 钟红 张宇昊		
发明人	马良 钟红 张宇昊		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/76 G01N33/543 G01N2333/37		
代理人(译)	王贵君		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测细交链格孢菌酮酸的方法，该方法基于辣根过氧化物酶催化鲁米诺-过氧化氢发光体系，建立细交链格孢菌酮酸间接竞争化学发光酶联免疫检测方法，兼具化学发光法高灵敏度与免疫分析法特异性强的特点，该方法的检测范围为0.032ng/mL ~ 30.244ng/mL，IC50为0.973ng/mL，最低检出限为0.010ng/mL，线性回归方程为 $y = 49.82 - 20.14x$ ， $R^2 = 0.9966$ 。与传统ELISA方法相比IC50和最低检测限更低、特异性强，发光信号持续时间长，可达数小时，检测线性范围更宽，为研究细交链格孢菌酮酸限量标准、细交链格孢菌酮酸污染水平检测及风险分析提供依据。

