



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107884581 A

(43)申请公布日 2018.04.06

(21)申请号 201711090268.9

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2017.11.08

(71)申请人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市高新技术开发
区科学大道100号

(72)发明人 王爱萍 周景明 张改平 赵军
刘红亮 祁艳华 胡小宏 刘燕凯
李春革 牛艳 孙国苹

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通
合伙) 41114

代理人 韩华

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

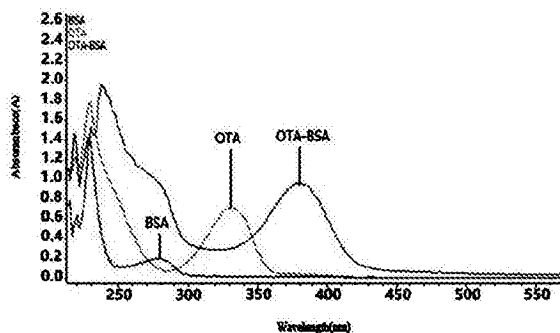
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,是由空白发光板、包被抗体、酶标抗体、赭曲霉毒素A标准、发光底物、洗涤液组成;所述酶标抗体采用只与OTA特异性结合的单克隆抗体,其亚型为重链IgG1,轻链Kappa型,亲和力达 2.11×10^{11} L/mol;所述酶标抗体采用的单克隆抗体是将筛选出的阳性单抗用辛酸-硫酸铵法纯化后,通过简易过碘酸钠法偶联得到。本发明采用化学发光免疫分析法来检测OTA含量,测定的基础是双抗体夹心免疫反应,灵敏度高,特异性强,检测时无需昂贵的仪器设备和专业的操作人员,可以实现现场实时检测;而且试剂盒结构简单,使用试剂少,检测成本低。



1. 一种采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,其特征在于:是由空白发光板、包被抗体、酶标抗体、赭曲霉毒素A标准、发光底物、缓冲液、洗涤液组成;所述酶标抗体采用只与OTA特异性结合的单克隆抗体,其亚型为重链IgG1,轻链Kappa型,亲和力达 2.11×10^{11} L/mol。

2. 根据权利要求1所述的采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,其特征在于:所述酶标抗体采用的单克隆抗体是将筛选出的阳性单抗用辛酸-硫酸铵法纯化后,通过简易过碘酸钠法偶联得到。

3. 根据权利要求1所述的采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,其特征在于:所述包被抗体的制备方法为:将合成的OTA-BSA分别加入弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂用乳化剂乳化,通过背部皮下多点注射的方法,免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠,50 μ g/只;间隔2周免疫一次,共免疫四次,取效价高的小鼠的脾脏与瘤细胞进行细胞融合,筛选阳性克隆,再通过体内诱生腹水的方法大量制备抗OTA单克隆抗体,最后纯化得到。

4. 根据权利要求1所述的采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,其特征在于:所述赭曲霉毒素A标准从OTA的纯品中稀释得到,稀释液为甲醇:水=7:3,共7瓶,其OTA的浓度分别为0ng/mL、2ng/mL、4ng/mL、8ng/mL、16ng/mL、32ng/mL、64ng/mL。

5. 根据权利要求1所述的采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,其特征在于:所述发光底物的制备方法为:以0.1mol/L过氧化脲为氧化剂,和缓冲液磷酸氢二钠-柠檬酸配制发光底物A;以0.05mol/L鲁米诺为发光剂,和缓冲液Tris-HCL配制成发光底物B。

6. 根据权利要求1所述的采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,其特征在于:所述缓冲液包括:采用0.05M pH9.6的CBS缓冲液作为包被缓冲液,采用5%脱脂奶+0.05M pH7.4的PBST作为封闭液,采用0.05M pH7.5 Tris-HCL缓冲液作为酶稀缓冲液。

7. 根据权利要求1所述的采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,其特征在于:所述洗涤液为PBS+0.1-0.5%Tween-20。

采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术,尤其是涉及一种采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒。

背景技术

[0002] 赭曲霉毒素是由真菌如曲霉菌和青霉菌分泌的有毒代谢物,是400多种具有不同化学结构和毒性作用的真菌毒素的主要组成部分。赭曲霉毒素广泛存在于各种食物中,如谷物及其副产品、可可、咖啡、肉类、乳汁、干果、调味品、酒类等,对人类及动物健康造成了很大的威胁。OTA具有肾毒性,免疫毒性和致畸作用,并被国际癌症研究机构(IARC)归类为目前致癌力最强的天然物质之一,并且分布范围很广。最有害的赭曲霉毒素A(OTA)可以在死亡的宿主真菌内存活,并在人体中有长达35天的半衰期。OTA的有害影响与其结构有关,带有7-羧基基团的苯丙氨酸的酰胺键;OTA似乎与天然苯丙氨酸在蛋白质合成中有竞争关系,影响在蛋白质合成和细胞凋亡中酶的抑制和激活,影响免疫抑制、免疫器官的减少和抗体反应抑制,改变免疫细胞活性和调节细胞因子的生成。

[0003] OTA作为一种小分子半抗原,不具有免疫原性,因此OTA只能与大分子载体蛋白偶联后才能诱导动物产生免疫应答,再利用单克隆抗体技术获得既能无限增殖又能分泌抗OTA单抗的杂交瘤细胞株,最后通过体内诱生腹水的方法获得大量的抗OTA单克隆抗体。通过筛选反应性最强,灵敏度高和特异性好的抗体配对,建立反应体系,确定适合用于包被的单克隆抗体以及适合用于标记的单克隆抗体。针对包被抗体,建立反应性最高、37℃存放14天后仍能够保持反应性保持稳定的微孔板包被方法及保护蛋白种类,确定OTA单克隆抗体与固相载体能够紧密的连接在一起,使两者经过长时间的高温破坏也能保持稳定。

[0004] 目前,检测OTA的方法需要有仪器分析和免疫分析。仪器分析包括高效液相色谱(HPLC),液相色谱串联质谱(LC-MS / MS),尽管许多实际样品中具有极高的敏感性和多功能性,但这些检测方法需要样品前期处理的时间长,同时设备昂贵,操作复杂。免疫测定,如酶联免疫吸附测定(ELISA)虽可在较短的时间内完成样品分析,但该方法灵敏度差,检测限偏高,检测结果不精确。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,以解决现有检测需要的试剂种类多,检测操作繁琐且检测灵敏度低的问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒,是由空白发光板、包被抗体、酶标抗体、赭曲霉毒素A标准、发光底物、洗涤液组成;所述酶标抗体采用只与OTA特异性结合的单克隆抗体,其亚型为重链IgG1,轻链Kappa型,亲和力达 2.11×10^{11} L/mol。

[0007] 所述酶标抗体采用的单克隆抗体是将筛选出的阳性单抗用辛酸-硫酸铵法纯化后,通过简易过碘酸钠法偶联得到。

[0008] 所述包被抗体的制备方法为:将合成的OTA-BSA分别加入弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂用乳化剂乳化,通过背部皮下多点注射的方法,免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠,50 μ g/只;间隔2周免疫一次,共免疫四次,取效价高的小鼠的脾脏与瘤细胞进行细胞融合,筛选阳性克隆,再通过体内诱生腹水的方法大量制备抗OTA单克隆抗体,最后纯化得到。

[0009] 所述赭曲霉毒素A标准从OTA的纯品中稀释得到,稀释液为甲醇:水=7:3,共7瓶,其OTA的浓度分别为0ng/mL、2ng/mL、4ng/mL、8ng/mL、16ng/mL、32ng/mL、64ng/mL。

[0010] 所述发光底物的制备方法为:以0.1mol/L过氧化脲为氧化剂,和缓冲液磷酸氢二钠-柠檬酸配制发光底物A;以0.05mol/L鲁米诺为发光剂,和缓冲液Tris-HCL配制发光底物B。

[0011] 本发明采用0.05M pH9.6的CBS缓冲液作为包被缓冲液,5%脱脂奶+0.05M pH7.4的PBST作为封闭液,0.05M pH7.5 Tris-HCL缓冲液作为酶稀缓冲液。

[0012] 所述洗涤液采用PBS+0.1-0.5%Tween-20。

[0013] 采用本发明试剂盒检测赭曲霉毒素A时,首先处理标本:

谷物样品处理方法为:将谷物样品粉碎至20目,称取粉末5g至试管中,加入提取液10mL,提取液为甲醇:水体积比=4:1,加塞后再旋涡混匀器上剧烈震荡混匀10min,以5000r/min的速度离心5min,弃去沉淀,保留上清并用PBS将其稀释成适宜的倍数以便进行检测。

[0014] 血液样品的处理方法:取0.5mL血液加0.5mL的甲醇水溶液,甲醇:水=4:1,备用。

[0015] 然后制备化学发光板:用0.05M pH9.6的CBS作为包被缓冲液,将纯化得到的包被抗体稀释成8mg/L的浓度作为包被液;100 μ L/孔加注于空白发光板,放置 4 $^{\circ}$ C过夜;再用PBST洗液洗板3次,使用5%脱脂奶+0.05M pH7.4的PBST封闭液进行封闭保护,室温封闭2小时;甩干封闭液,制成化学发光板。

[0016] 本发明测定的基础是双抗体夹心免疫反应,测试时,在包被有抗OTA抗体的化学发光板上加入OTA标准或已经处理好的样品到微孔板中,加入OTA酶标抗体,震荡反应后,游离的OTA把包被抗体和酶标抗体连接在一起,洗涤液洗涤,没有连接的酶标抗体在洗涤的过程中除去,加发光底物震荡5min后,用化学发光仪测其光强度,光强度与样品中的浓度成正比,对照标准曲线可以确定样品中抗原的量。

[0017] 本发明采用化学发光免疫分析法来检测OTA含量,灵敏度高,特异性强,检测时无需昂贵的仪器设备和专业的操作人员,可以实现现场实时检测;而且试剂盒结构简单,使用试剂少,检测成本低。

附图说明

[0018] 图1 人工完全抗原OTA-BSA的紫外扫描鉴定结果。

[0019] 图2 人工完全抗原OTA-OVA的紫外扫描鉴定结果。

[0020] 图3 人工完全抗原SDS-PAGE的鉴定结果。

[0021] 图4 六株单克隆抗体SDS-PAGE的鉴定结果。

[0022] 图5 2G3单克隆抗体亲和力鉴定结果。

[0023] 图6 2G3单克隆抗体特异性鉴定结果。

[0024] 图7 试剂盒与HPLC比对实验结果(玉米)。

[0025] 图8 试剂盒与HPLC比对实验结果(血液)。

具体实施方式

[0026] 下面通过具体实施例对本发明做更加详细的说明。以下实施例中所用原料及试剂,如无特别说明,则均为市售;所涉及的检测方法或试验方法,如无特别说明,则均为常规方法。

[0027] 实施例1 包被抗体的制备

1、人工完全抗原的制备与鉴定

由于OTA属于小分子物质,只有免疫原性,没有免疫反应性,必须与大分子物质偶联后,借助大分子的T表位才能刺激机体产生针对OTA的特异性应答。本申请采用活化酯法(NHS)将OTA分别与大分子BSA和OVA进行偶联,制备免疫抗原OTA-BSA和包被抗原OTA-OVA。

[0028] 1)用2mL的THF溶解1mg OTA,加入1mg NHS和2mg EDC后剧烈反应4h,使用N₂挥发THF,残留物溶于0.4mL二甲基甲酰胺中,此得到活化产物;

2)用2mL 0.13mol/L NaHCO₃溶解10mg BSA,4℃预冷;

3)将第1步制得的活化产物缓慢滴加到第2步的溶液中,室温避光反应4h,反应产物于0.05mol/L NaHCO₃中透析72h,之后3000rpm离心10min,得到的OTA-BSA抗原收集并分装,-20℃保存备用;

4)同样采用上述第1)~3)的方法,将其中的BSA替换成OVA,制备OTA-OVA抗原。

[0029] 5)通过紫外吸收光谱法、SDS-PAGE法对制备的人工完全抗原OTA-BSA和OTA-OVA进行鉴定:

鉴定结果如图1和图2所示,OTA在333nm处有特征吸收峰,BSA、OVA在280nm处有特征吸收峰,人工抗原OTA-BSA和OTA-OVA的最大紫外吸收峰在379nm处,相对于空白载体蛋白(BSA/OVA)和OTA的峰值,产生了一定的位置偏移与叠加现象,初步证明偶联物制备成功。

[0030] 人工抗原的SDS-PAGE鉴定结果如图3所示,OTA-BSA条带相对于BSA条带(66KD)有拖尾现象产生,同样的,OTA-OVA条带相对于OVA条带(43KD)出现明显的拖尾现象,由此可以证明上述制备的人工抗原OTA-BSA和OTA-OVA偶联成功。

[0031] 2、动物免疫

1)将合成的OTA-BSA分别加入弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂,乳化制成免疫抗原;

2)通过背部皮下多点注射的方法,用OTA-BSA免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠3只,50μg/只;

3)在首次免疫14天和28天后分别用OTA-BSA弗氏不完全佐剂免疫抗原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫;

4)最后一次加强免疫后3~30周,细胞融合前3~4天,通过尾静脉注射的方法,用不含佐剂的OTA-BSA对BALB/c小鼠进行超强免疫,免疫剂量是100μg/只。

[0032] 5)多抗血清效价和敏感性测定结果

最后一次加强免疫后一周,分别对3只小鼠进行剪尾采血,然后通过间接ELISA法和间接竞争ELISA法分别对3只小鼠多抗血清的效价和敏感性进行测定。其中3号鼠的免疫效果最好,效价是1:51200,半数抑制IC₅₀为2.8 ng/mL,因此,选择3号鼠进行细胞融合。

[0033] 3、细胞融合及单克隆抗体制备

1)采用聚乙二醇的方法,将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量10:

1的比例进行细胞融合,融合后的细胞用HAT选择培养基进行筛选;

2)分装在铺有饲养细胞的96孔细胞培养板,置37℃、5% CO₂培养箱内培养,10天后,以人工合成抗原OTA-OVA作为包被抗原,通过间接ELISA法对长有杂交瘤细胞的孔进行阳性筛选;

3)细胞融合后,通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行多次亚克隆筛选,最终获得了6株能稳定分泌抗OTA单克隆抗体的杂交瘤细胞株(1A3,2B7,2B10,2G3,3F5,3H1)。

[0034] 4)选择经产的雌性BALB/c小鼠,腹腔内注射500μl灭菌石蜡,一周后,再次腹腔内注射获得的单克隆杂交瘤细胞,注射量为 2×10^5 个细胞,再过一周后,待小鼠腹部膨大后抽取腹水,离心后取上清,用辛酸硫酸铵法对腹水进行纯化。

[0035] 4、单抗腹水的鉴定

1)效价和敏感性测定:将得到的6株杂交瘤细胞株通过体内诱生腹水的方法大量制备单克隆抗体,腹水纯化后结果如图4所示,从图中可以看出纯化后的腹水分别在约50KD和25KD处有两条明显的条带,分别代表单克隆抗体的重链和轻链,证明纯化效果很好。

[0036] 间接ELISA测定结果显示,6株单抗的效价均达到 10^6 ,其中2G3单克隆抗体的效价高达 8.192×10^6 ;根据间接竞争ELISA测定结果,计算出2G3单克隆抗体的IC₅₀是1.19ng/ml;

2)亚型鉴定:用亚型鉴定试剂盒对单抗的亚型进行鉴定,鉴定结果显示2G3单克隆抗体属于亚型为重链IgG1,轻链Kappa型。

[0037] 3)亲和力测定:用CBS液将包被原OTA-OVA稀释成浓度2μg/ml和1μg/ml的包被液分别包板,通过间接ELISA法测定单抗腹水效价,以单抗浓度为横坐标,OD₄₅₀值为纵坐标,绘出相应的2条间接ELISA反应曲线,以每条曲线上部平坦段的OD₄₅₀值作为100%,在曲线上算出50% OD₄₅₀值时对应的抗体浓度,按照公式 $K_{aff} = (n-1) / 2 (n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算单抗的亲常数,其中 $n = [Ag]_t / [Ag']_t$, $[Ag]_t$ 、 $[Ag']_t$ 为2个不同的包被原浓度, $[Ab]_t$ 、 $[Ab']_t$ 为各包被抗原浓度下50%OD₄₅₀值对应的抗体浓度。根据亲和力测定结果(图5)计算出2G3单克隆抗体的亲和力是 2.11×10^{11} L/mol(一般认为亲和力在 10^7 — 10^{12} 为效果好);

4)特异性测定:分别选择与OTA结构相似的毒素或分子(OTB、OTC、AFB1、T-2、BSA和OVA)作为竞争标品,通过间接竞争ELISA法测定所获得的单抗对各竞争标品的敏感性。特异性鉴定结果(图6)也表明了单克隆抗体只与OTA特异性结合。

[0038] 5、稳定性鉴定:将所建立的单克隆杂交瘤细胞株连续培养3个月并反复液氮冻存复苏,从而鉴定杂交瘤细胞的稳定性。

[0039] 实施例2 酶标抗体的制备

(1)称取5mgHRP溶解于1ml蒸馏水中,再加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,在2~8℃环境下避光搅拌20分钟。

[0040] (2)将上述溶液装入透析袋中,在1M pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,置于2~8℃环境下过夜(12~16h)。加入20μl 0.2M pH 9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化HRP的pH升高到9.0~9.5,然后立即加入10mg实验得到的6株OTA单克隆抗体,在1ml 0.01M碳酸盐缓冲液中,放置2~8℃环境下避光轻轻搅拌2小时。

[0041] (3)然后再加0.1ml新配的4mg/ml NaBH₄液,混匀,再放置2~8℃冰箱2小时。将上述液装入透析袋中,对0.05M pH7.4 PBS透析,再放置2~8℃环境过夜(12~16h)。

[0042] (4)在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,放置2~8℃冰箱1小时后,3000rpm离心30min,弃去上清液。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量0.05M pH7.4的PBS中。

[0043] (5)将上述溶液装入透析袋中,对0.05M pH7.4的PBS缓冲盐水透析,去除铵离子后,10,000rpm离心30min去除沉淀,上清液即为OTA酶标抗体。加入等体积甘油混匀,分装保藏于-20℃冰箱备用。

[0044] (6)通过上述方法可得到6个酶标抗体,分别为1A3-HRP,2B7-HRP,2B10-HRP,2G3-HRP,3F5-HRP和3H1-HRP。

[0045] 实施例3 抗体配对的筛选

(1)按照实验所需取出适量的包被孔,编上序号。每孔分别加入100μI标准品或血清样本。

[0046] (2)然后每孔再分别加入酶结合物100μI。在微型振荡器上振荡30秒,使孔内液体混合均匀。

[0047] (3)放置37℃温箱,温育60分钟。利用洗板机,用洗液洗板5次,最后在吸水纸上拍干以除去残余液体。

[0048] (4)每孔加入混合后的底物A+B液100μI,室温(18-25℃)反应5分钟。使用化学发光检测仪检测。

[0049] (5)配对初步筛选的实验方法:将6种包被板和6种酶结合物两两配对进行试验,加入浓度呈梯度的样品,测其发光值与高效液相色谱检测数值相比较。判断标准 $R^2 > 95\%$ 。

[0050] (6)3F5包被抗体和2G3-HRP的配对组合与HPLC的相关性 $R^2 = 0.96$,故优选3F5包被抗体和2G3-HRP的配对作为即将建立的化学发光试剂盒的包被抗体和酶标抗体。

[0051] 实施例4 试剂盒反应体系的建立

1、包被抗体的固相化(化学发光板的制作)

将实施例3筛选出的3F5作为包被抗体按包被量100μI/孔加注于空白发光板;置于2~8℃过夜(16~24h);再用PBST洗液洗板2次;封闭液进行封闭保护,封闭液量为200μI/孔,室温(18-25℃)封保3小时;甩干封保液,然后放置37℃温箱过夜(16-24h)烘干,制成化学发光板;其中包被缓冲液采用0.05M pH9.6的CBS缓冲液,包被浓度为8μg/mL,封闭液为5%脱脂奶;这样的配方组合包被的信号值最高,稳定性性能好;

2、酶结合物配方的确定

酶结合物稀释液的选择标准首先应是不会影响反应的正常进行,即不会对试验的示踪信号-发光值造成影响。并且,酶结合物的稀释液还应对酶结合物有一定的保护作用,即最大程度上保护酶结合物,使其保持一定的活性。本发明的酶结合物浓度选择1:1000,确定50%小牛血清作为酶稀蛋白保护剂,选择0.05M pH7.5 Tris-HCL缓冲液作为酶稀缓冲液,稳定性性能好;

3、发光底物的确定

本发明的发光底物由发光底物A和发光底物B两个组分组成:以0.1mol/L的过氧化脲溶解于pH值为5.9的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制发光底物A;以0.05mol/L的鲁米诺溶解于pH值为9.1的Tris-HCL缓冲液配制发光底物B。试剂盒检测时将发光底物A和发光底物B按照1:1之体积比混合,由反应孔辣根过氧化物酶催化过氧化脲和鲁米诺进行反应并释放出光

子。由发光仪检测并计数统计。

[0052] 实施例5 本发明试剂盒的性能测定

本发明试剂盒主要检测以下性能：灵敏度、准确度、精密度、线性和稳定性。

[0053] 对于灵敏度：随机抽取阴性样品，用化学发光试剂盒进行分析，测低限（LOD）以阴性样品的平均测定值（ $n = 20$ ）加上其3 倍的标准差进行计算，可得玉米、小麦和血液中OTA 的检测低限分别为0.152、0.215和0.274 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，小于0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，符合要求。

[0054] 对于准确度：在同一发光板上做6 组浓度梯度稀释样品的标准曲线，分别在6 个包被批次的发光板上各做1组浓度梯度稀释样品标准曲线，进行板内与板间变异系数分析，研究不同标准品浓度测定结果的准确性。各浓度板内变异系数在1.52%~ 4.84%之间，平均变异系数为2.47%，板间变异系数在1.74%~ 4.24% 之间，平均变异系数为2.89%。板内与板间的变异系数均小于10%，说明该方法的准确性较高，可以满足样品中OTA 含量分析的基本要求。

[0055] 对于样品添加回收率实验（精密度）：在玉米、小麦和血液阴性样品中分别添加OTA 标准品至5、10 和25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，每浓度重复做3 次，每个重复设2孔平行。用试剂盒进行测定，并根据标准曲线计算样品添加回收率。回收率=样品实测浓度/样品理论添加浓度 $\times 100\%$ 。试验证明，小麦、玉米阴性样品中，OTA 在添加5~25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的平均回收率在83.3%~91.4%范围内，平均变异系数7.63%，说明该方法的精密度较高。

[0056] 对于线性：将接近128 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 样本，分别稀释至64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按照试剂盒说明书进行操作，将每一浓度样本重复检测2次，计算平均值，将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合，并计算线性相关系数 R^2 ，实验检测的结果，线性相关系数 $R^2=0.9936$ ，大于0.99。符合要求。

[0057] 对于稳定性：取到效期后的一个批号试剂盒，对样品进行检测，试剂盒的灵敏度、准确度、精密度、线性等性能指标均符合相应的要求，说明该试剂盒稳定性较好。

[0058] 实施例6 本发明试剂盒与HPLC 比对试验

玉米粉粉碎至20目，加入提取液10mI，提取液为甲醇：水体积比=4:1，加塞后再旋涡混匀器上剧烈震荡混匀10min，以5000r/min的速度离心5min，弃去沉淀，保留上清并用PBS将其稀释成适宜的倍数以便进行检测；血液样品的处理方法：取0.5mI血液加0.5mI的甲醇水溶液，甲醇：水=4:1，备用。

[0059] 测试时，阴性样品中分别添加OTA 标准品至15、35、55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，分别用HPLC与化学发光试剂盒测定，每个样品添加浓度重复6次，以HPLC 测定值为横坐标、试剂盒测定值为纵坐标绘制散点图进行回归分析，以相关系数（ R^2 ）衡量2 种方法的相符性。

[0060] 结果如图7所述，表明玉米样品中2种检测方法的相关系数（ $R^2=0.96$ ），表明本发明的试剂盒与HPLC具有较高的相符性，可用于谷物样品中OTA批量快速筛查。

[0061] 结果如图8所述，表明血液样品中2种检测方法的相关系数（ $R^2=0.94$ ），表明本发明的试剂盒与HPLC具有较高的相符性，可用于血液样品中OTA批量快速筛查。

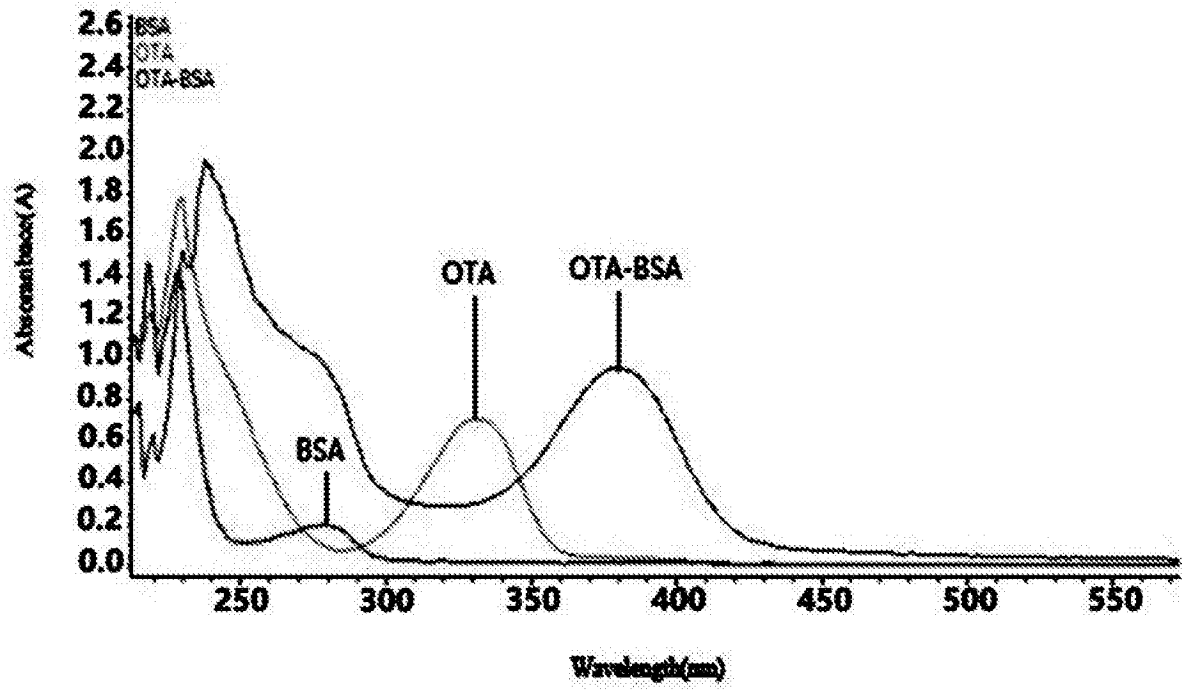


图1

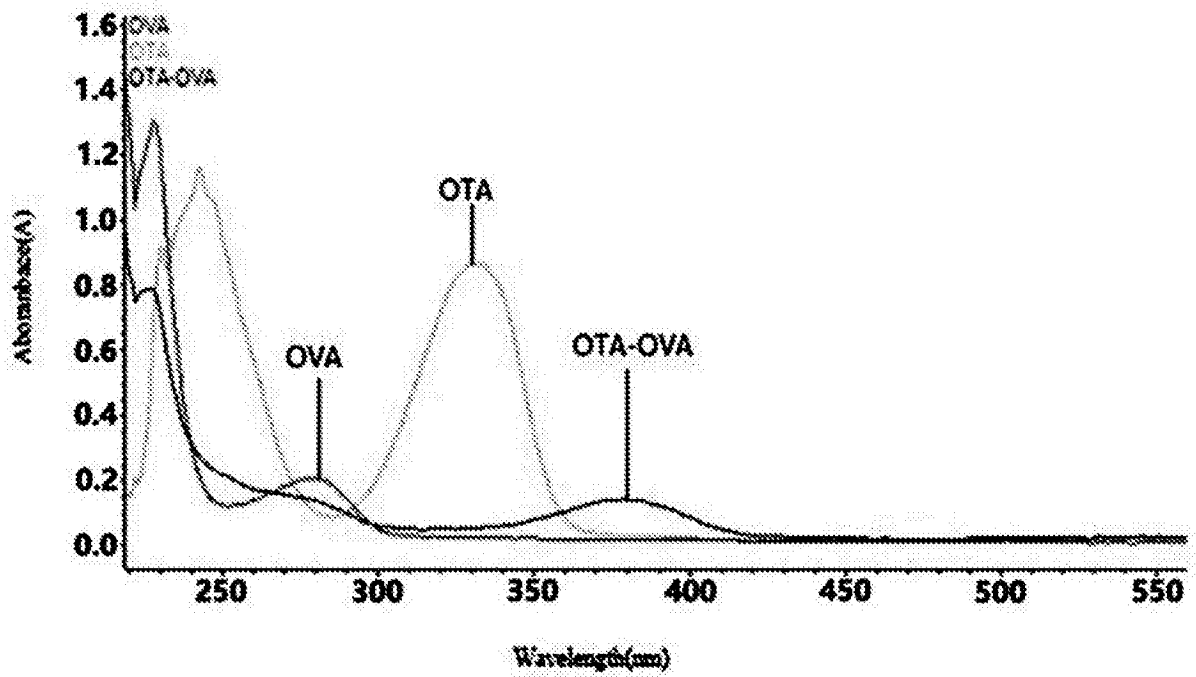


图2

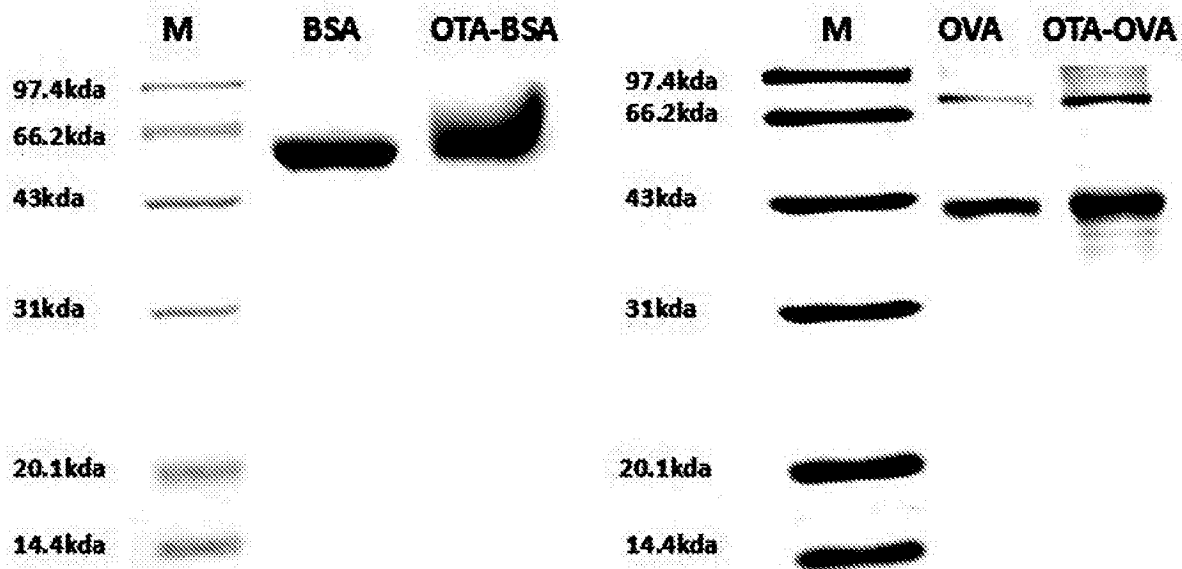


图3

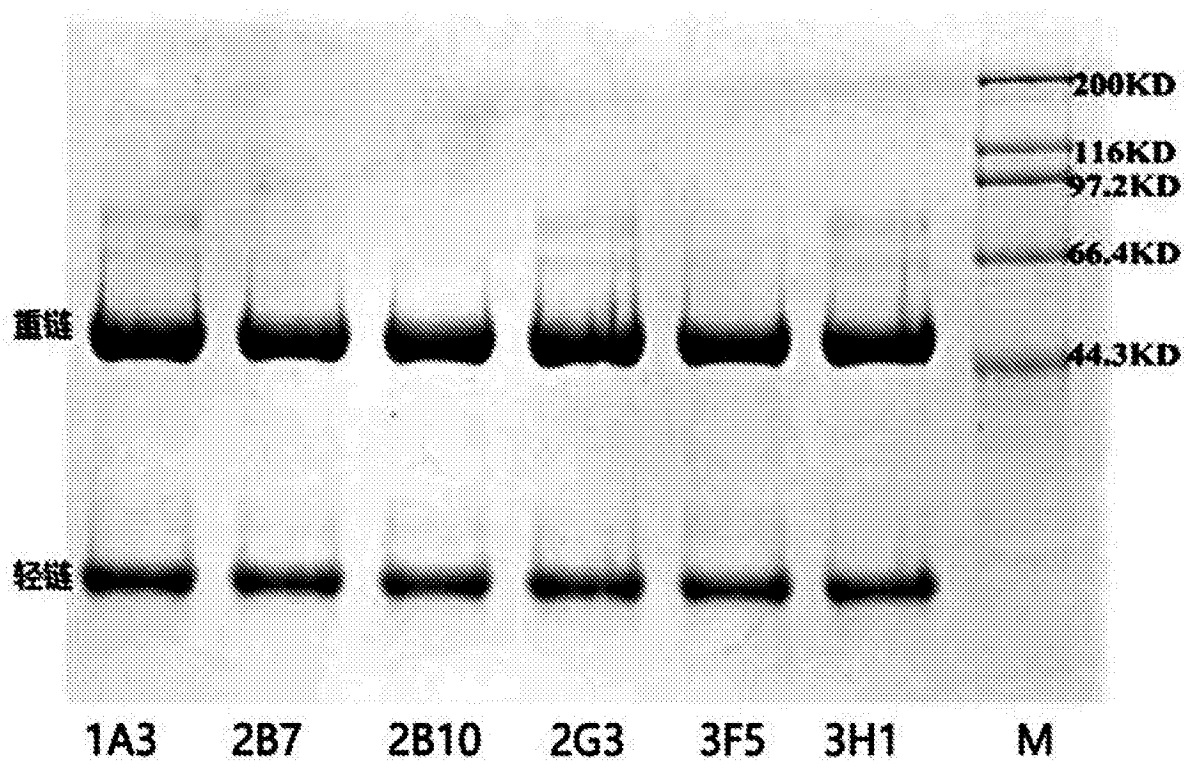


图4

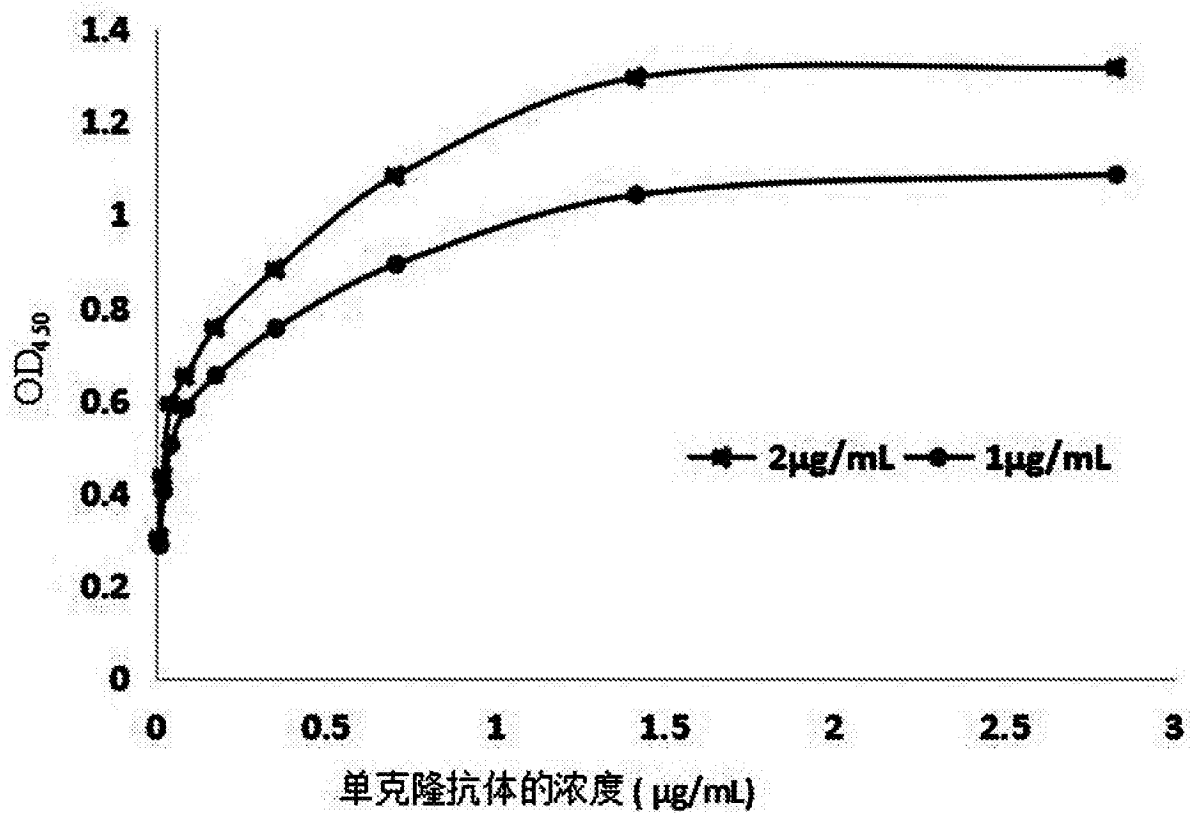


图5

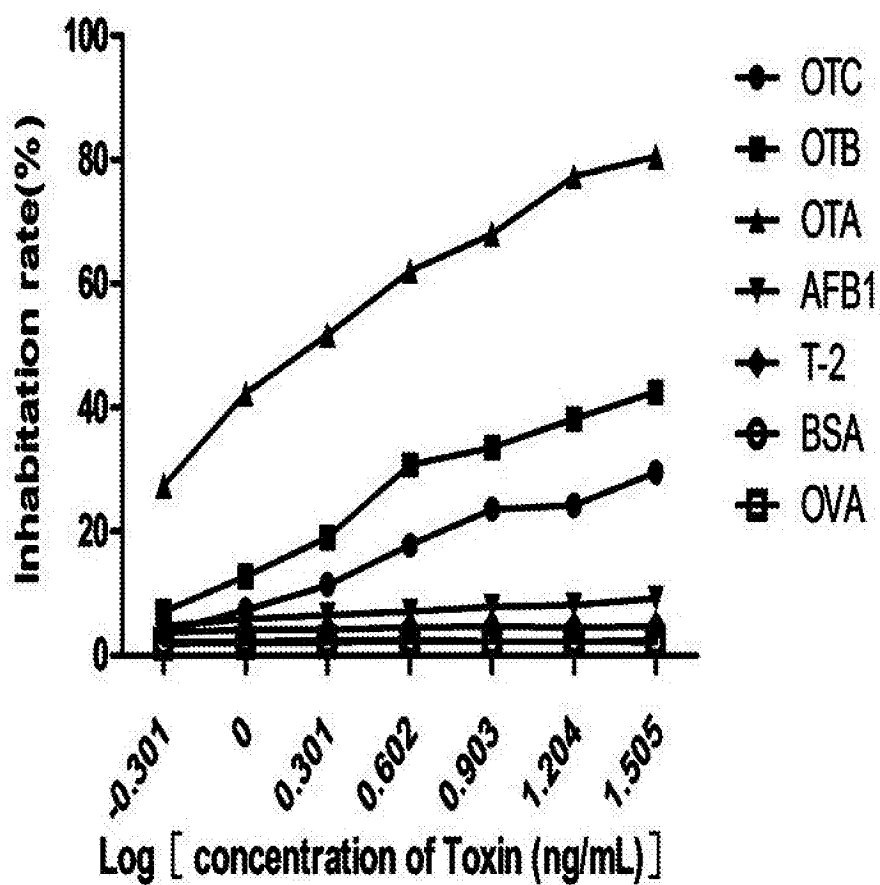


图6

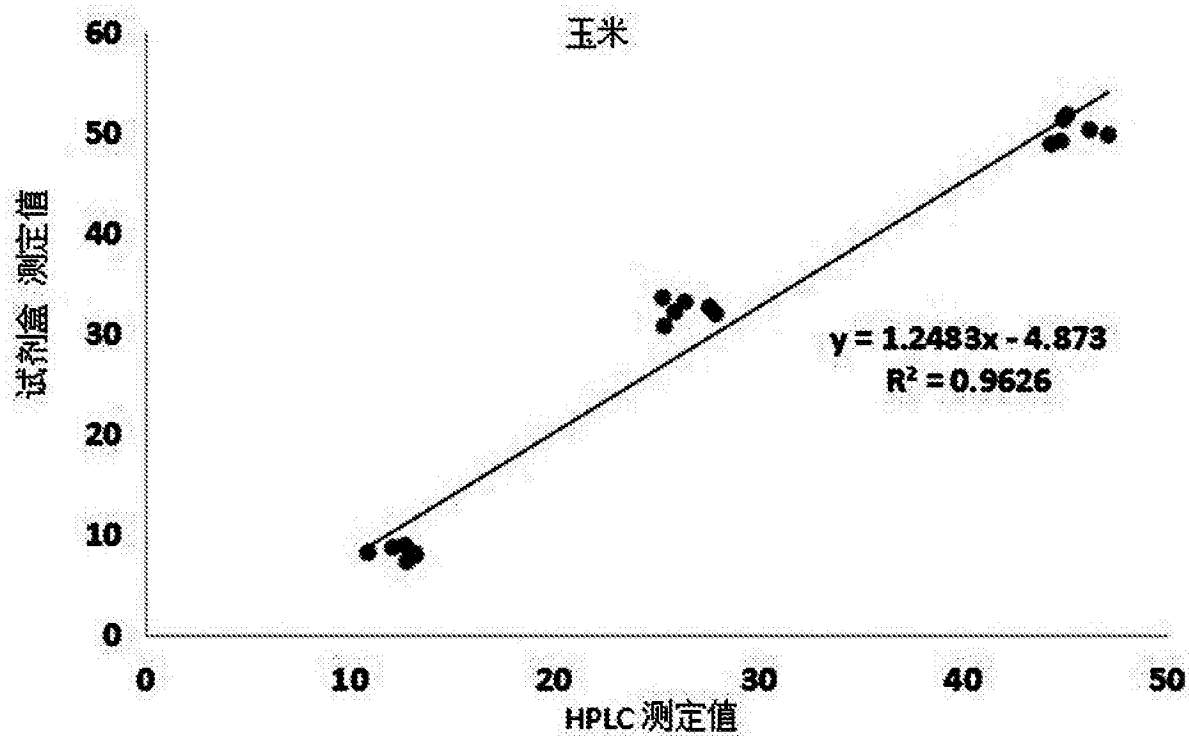


图7

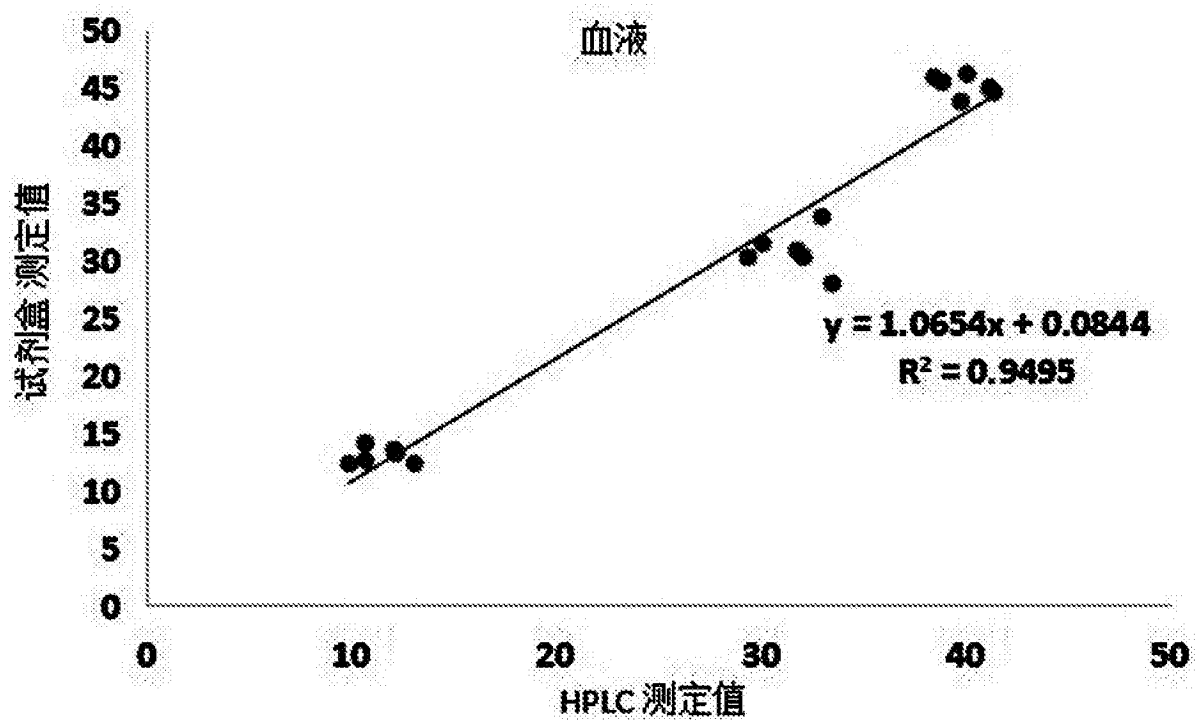


图8

专利名称(译)	采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒		
公开(公告)号	CN107884581A	公开(公告)日	2018-04-06
申请号	CN2017111090268.9	申请日	2017-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学		
申请(专利权)人(译)	郑州大学		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学		
[标]发明人	王爱萍 周景明 张改平 赵军 刘红亮 祁艳华 胡小宏 刘燕凯 李春革 牛艳 孙国苹		
发明人	王爱萍 周景明 张改平 赵军 刘红亮 祁艳华 胡小宏 刘燕凯 李春革 牛艳 孙国苹		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 G01N33/577 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/56961 G01N21/76 G01N21/763 G01N33/535 G01N33/577 G01N2333/38 G01N2333/385		
代理人(译)	韩华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种采用化学发光法定量检测赭曲霉毒素的试剂盒，是由空白发光板、包被抗体、酶标抗体、赭曲霉毒素A标准、发光底物、洗涤液组成；所述酶标抗体采用只与OTA特异性结合的单克隆抗体，其亚型为重链IgG1，轻链Kappa型，亲和力达 2.11×10^{11} L/mol；所述酶标抗体采用的单克隆抗体是将筛选出的阳性单抗用辛酸-硫酸铵法纯化后，通过简易过碘酸钠法偶联得到。本发明采用化学发光免疫分析法来检测OTA含量，测定的基础是双抗体夹心免疫反应，灵敏度高，特异性强，检测时无需昂贵的仪器设备和专业的操作人员，可以实现现场实时检测；而且试剂盒结构简单，使用试剂少，检测成本低。

