



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103823064 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410074626. 7

(22) 申请日 2014. 03. 03

(71) 申请人 中华人民共和国张家港出入境检验检疫局

地址 215600 江苏省苏州市张家港市人民中路 59 号

(72) 发明人 王毅谦 邵景东 吴福平 郭旸 申进玲

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

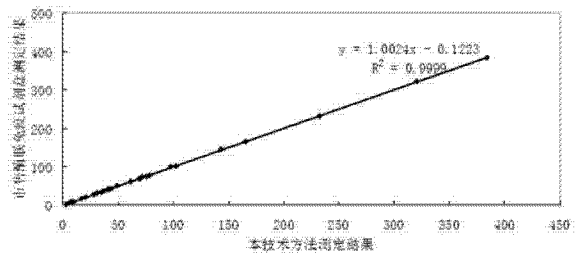
权利要求书3页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

一种呕吐毒素定量检测试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种呕吐毒素定量检测试剂盒机器使用方法,所述试剂盒包括:①磁分离试剂;②抗试剂;③酶标抗原试剂;④清洗液;⑤校准品、质控品;⑥底物溶液;⑦终止液;其中磁分离试剂为结合有抗异硫氰酸荧光素 FITC-DON 抗体的磁微粒混悬液;抗试剂为 FITC 标记的抗 DON 抗体溶液;酶标抗原试剂为偶联有生物酶的 DON 溶液;本发明的具有显著优点:本发明的呕吐毒素定量检测试剂盒操作简单、快速、灵敏准确;能够适用于日常大规模的食品或饲料中呕吐毒素的样品检测。



1. 一种呕吐毒素定量检测试剂盒,其特征在于,包括:

- ①磁分离试剂;
- ②抗试剂;
- ③酶标抗原试剂;
- ④清洗液;
- ⑤校准品、质控品;
- ⑥底物溶液;
- ⑦终止液;

其中磁分离试剂为结合有抗异硫氰酸荧光素-呕吐毒素 FITC-DON 抗体的磁微粒混悬液;抗试剂为 FITC 标记的抗 DON 抗体溶液;酶标抗原试剂为偶联有生物酶的 DON 溶液。

2. 一种呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

磁分离试剂的制备:

选用 100mg 具有顺磁性、表面带有羧基活性基团的磁分离微粒用 0.1mol/L、pH 4.5 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸 MES 溶液 10mL 洗涤 3 次后,磁分离微粒用该溶液 1mL 重悬;之后加入 50-250 μ l 浓度为 10mg/ml 碳二亚胺 EDC 活化,25 $^{\circ}$ C 混匀 2 小时,加入 2mg 抗 FITC 抗体,37 $^{\circ}$ C 混合均匀 2 小时;之后加入 1mL 浓度为 0.01 mol/L PBS 缓冲液于 37 $^{\circ}$ 密闭静置 1 小时,所述 PBS 缓冲液为 pH7.4 的 5% 牛血清白蛋白 BSA;最后用 10mL0.5% BSA 溶液的 0.01mol/L 磷酸缓冲溶液 PBS 缓冲液洗涤磁珠 3 次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液;

②抗试剂的制备:

将 DON 单克隆抗体溶液与 FITC 共价连接;

③酶标抗原试剂的制备:

所述酶标抗原试剂的制备包括以下成分: DON-BSA 偶联物以及酶标抗原试剂;

DON-BSA 偶联物的制备:

取 20mgDON、1mol 马来酸酐以及 0.05--0.1mol 的 4-二甲氨基吡啶 DMAP,溶于 2ml 甲苯,80 $^{\circ}$ C 搅拌 12 小时,蒸干溶剂,酸化,萃取,重结晶后得到 DON 半抗原;

将 60mg DON 半抗原溶于 9.5mL 0.01mol/L、pH 5.0 的 PBS 溶液中,加入 12.5mg EDC,再加入 1ml 溶解了 10mgDON 半抗原的二甲基甲酰胺 DMF 溶液,25 $^{\circ}$ C 搅拌反应 2 小时,再加入 6mgEDC,置于阴暗处搅拌反应 12 小时,用 0.01mol/L PBS 透析 72 小时,每 8 小时更换 1 次透析液,即得到 DON-BSA 偶联物;

(2)酶标抗原试剂制备:

a. 将 5mg DON-BSA 抗原溶于 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 溶液中,加入 0.1mol/mL 活化剂 2-Iminothiolane·HCl 溶液 20 μ L,20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟后加入甘氨酸终止反应;20 $^{\circ}$ C 静置 3-5 分钟;过柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

b. 将碱性磷酸酶 ALP 溶于 pH8.0 的 2mmol/L EDTA、20 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 Tris-HCL 溶液中,溶度 5mg/mL,加入 0.10mg/mL 巯基活化试剂,室温放置 40 分钟,过柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

将 a 和 b 溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比 1:1 混合,室温放置 3 小时,然后用凝胶层析柱分离纯化,收集第一峰和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物保存在 4 $^{\circ}$ C,将上述连接物用酶反应物稀释液稀释到 5ug/mL,使用 0.2 μ m 过滤器过滤后 4 $^{\circ}$ C

保存；

其中，酶反应物稀释液配置方法：Tris 12.5g，氯化钠 8.5g，叠氮钠 1g，加纯化水至 600mL，调整 pH 值至 7.5；加吐温-20 1mL，BSA 10g，加纯化水定容至 1L；用 0.2 μm 过滤器过滤，于 4℃ 保存；

④清洗液的制备：

取 Tris 12.54g、NaCl 325.6g 与吐温-20 5g 先溶于 900ml 水中，再取 0.2ml 液体生物防腐剂 Proclin-300 溶于溶液中，最后将 pH 调整至 7.4 并定容至 1000ml，完全溶解后用 0.2 μm 过滤器过滤既得清洗液浓缩液，使用时稀释 20 倍既得清洗液；

⑤校准品与质控品的制备：

将 DON 抗原称重后用标准品缓冲液溶解分装，校准品浓度分别为 1 ng/mL、10ng/mL、40 ng/mL、200 ng/mL 与 1000 ng/mL，质控品浓度为 1 ng/mL 与 100 ng/mL，4℃ 保存；

其中，标准品缓冲液的配制：取 Tris 2.42g、NaCl 2g，BSA 2.5g，Proclin-300 1ml 溶于 1000ml 纯化水，pH 调整至 7.4，用 0.2 μm 过滤器过滤，4℃ 保存；

⑥底物溶液的制备：

取乙醇胺 100g，NaCl 2g，单磷酸酚酞 4g，用纯化水配成 1000ml，用 37% 盐酸调 pH 至 8.4，用 0.2 μm 过滤器过滤，于 4℃ 保存；

⑦终止液的制备

取 NaCl 1-2g，Na₂CO₃ 10-15g，EDTA 10-15g，用纯化水配制成 1000ml，用 0.2 μm 过滤器过滤，常温保存。

3. 根据权利要求 2 所述的呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述选取的 100mg 具有顺磁性、表面带有羧基活性基团的磁分离微粒的直径为 0.1-0.2 μm。

4. 根据权利要求 2 所述的呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述 FITC 抗体为羊抗、鼠抗或兔抗。

5. 根据权利要求 2 所述的呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法，其特征在于，DON 单克隆抗体为羊抗、鼠抗或兔抗。

6. 根据权利要求 2 所述的呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述 MES 溶液的制备方法为：称取 MES 19.52g，Tris 1.56g，NaCl 4.24g 于 1L 烧杯中，量取 950ml 纯化水溶解，调节 pH 至 4.5；加纯化水定容到 1L，采用孔径 0.2 μm 滤膜过滤除菌，4℃ 保存。

7. 根据权利要求 2 所述的呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述 DON 单克隆抗体溶液与 FITC 共价连接的连接方法为 Marshell 法。

8. 根据权利要求 2 所述的呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述柱子为 Sephadex G25 柱子；所述凝胶层析柱为 Superdex 200 凝胶层析柱。

9. 一种呕吐毒素磁微粒分离酶联免疫检测方法，其特征在于，包括如下步骤：

a. 备 DON 样本溶液：将食品或饲料样品粉碎成粉末，之后称取 5g 粉碎均匀的样品，加入 25ml 10% 甲醇水溶液萃取，振荡 10 分钟后用定性滤纸过滤去沉渣，收集滤液，滤液即可直接用于检测；

b. 样和免疫反应：在试管中加入 50 μL 样品溶液，然后分别依次加入 50 μL 酶标抗原试剂和 50 μL 抗试剂，混匀后 37℃ 温育 20 分钟；

c. 加磁分离试剂：在试管中加入 50 μL 混匀后的磁分离试剂，混匀后继续 37℃ 温育

10 分钟；

d. 清洗：试管放置在磁分离器上分离 3 分钟，倒去上清液，每管加入清洗液 250 μ L，充分混匀后，将试管放置在磁分离器上分离 3 分钟，倒去上清液，重复洗涤过程 2 次；

e. 加入底物溶液：每管加入 200 μ L 底物溶液至试管中，37° C 混匀 5 分钟；

f. 终止显色：每管加入 200 μ L 终止液，磁分离 10 分钟；

g. 读值：在分光光度计上读取吸光度。

一种呕吐毒素定量检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物监测领域,属于生物技术领域,特别是一种呕吐毒素定量检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 呕吐毒素(Vomitoxin),又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON),化学名称为 $3\alpha,7\alpha,1,5$ -三羟基草镰孢菌-9-烯-8-酮,属单端孢霉烯族化合物。DON具有很高的细胞毒性及免疫抑制性,因此,对人类及动物的健康构成了威胁。

[0003] 在20世纪90年代开始推广的磁微粒分离酶联免疫检测技术是一种结合免疫磁微粒分离技术与酶联免疫检测技术建立的新型酶联免疫检测方法。磁微粒酶联免疫反应在近似液相下进行反应,免疫反应的表面积较ELISA法有更大的提高;另外磁微粒具有超顺磁性,在磁场下具有磁场响应性,更易于固液分离。该方法克服了普通酶联免疫分析(ELISA)分析精密度差、灵敏度差的缺点,反应快速、彻底,具有灵敏度高,特异性高,操作简便,检测用时少和不易受外界因素干扰的优点。

[0004] 现在,还缺少能够快速、高效、高灵敏度检测呕吐毒素的试剂盒,因此想要迅速、高效的检测呕吐毒素依然很困难。

发明内容

[0005] 为解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种呕吐毒素定量检测试剂盒及其制备、操作方法,采用该试剂盒进行呕吐毒素检测具有较高的灵敏度、特异性、操作简便和更短检测时间的优点。

[0006] 为了实现上述目标,本发明采用如下的技术方案:

[0007] 一种呕吐毒素定量检测试剂盒,其特征在于,包括:

[0008] ①磁分离试剂;

[0009] ②抗试剂;

[0010] ③酶标抗原试剂;

[0011] ④清洗液;

[0012] ⑤校准品、质控品;

[0013] ⑥底物溶液;

[0014] ⑦终止液;

[0015] 其中磁分离试剂为结合有抗异硫氰酸荧光素FITC-DON抗体的磁微粒混悬液;抗试剂为FITC标记的抗DON抗体溶液;酶标抗原试剂为偶联有生物酶的DON溶液。

[0016] 一种呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0017] ①磁分离试剂的制备:

[0018] 选用100mg具有顺磁性、表面带有羧基活性基团的磁分离微粒用0.1mol/L、pH 4.5的2-(N-吗啉代)乙磺酸MES溶液10mL洗涤3次后,磁分离微粒用该溶液1mL重悬;之

后加入 50-250 μ l 浓度为 10mg/ml 碳二亚胺 EDC 活化, 25°C 混匀 2 小时, 加入 2mg 抗 FITC 抗体, 37°C 混合均匀 2 小时; 之后加入 1ml 浓度为 0.01mol/L PBS 缓冲液于 37°C 密闭静置 1 小时, 所述 PBS 缓冲液为 pH7.4 的 5% 牛血清白蛋白 BSA; 最后用 10ml 0.5% BSA 溶液的 0.01mol/L 磷酸缓冲溶液 PBS 缓冲液洗涤磁珠 3 次, 并用该溶液制成磁分离试剂溶液;

[0019] ②抗试剂的制备:

[0020] 将 DON 单克隆抗体溶液与 FITC 共价连接;

[0021] ③酶标抗原试剂的制备:

[0022] 所述酶标抗原试剂的制备包括以下成分: DON-BSA 偶联物以及酶标抗原试剂;

[0023] (1) DON-BSA 偶联物的制备:

[0024] 取 20mg DON、1mol 马来酸酐以及 0.05--0.1mol 的 4-二甲氨基吡啶 DMAP, 溶于 2ml 甲苯, 80°C 搅拌 12 小时, 蒸干溶剂, 酸化, 萃取, 重结晶后得到 DON 半抗原;

[0025] 将 60mg DON 半抗原溶于 9.5ml 0.01mol/L, pH5.0 的 PBS 溶液中, 加入 12.5mg EDC, 再加入 1ml 溶解了 10mg DON 半抗原的二甲基甲酰胺 DMF 溶液, 25°C 搅拌反应 2 小时, 再加入 6mg EDC, 置于阴暗处搅拌反应 12 小时, 用 0.01mol/L PBS 透析 72 小时, 每 8 小时更换 1 次透析液, 即得到 DON-BSA 偶联物;

[0026] (2) 酶标抗原试剂制备:

[0027] a. 将 5mg DON-BSA 抗原溶于 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 溶液中, 加入 0.1mol/mL 活化剂 2-Iminothiolane · HCl 溶液 20 μ l, 20°C 放置 30 分钟后加入甘氨酸终止反应; 20°C 静置 3-5 分钟; 过柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0028] b. 将碱性磷酸酶 ALP 溶于 pH8.0 的 2mmol/L EDTA、20mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 Tris-HCl 溶液中, 浓度 5mg/mL, 加入 0.10mg/mL 巯基活化试剂, 室温放置 40 分钟, 过柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0029] 将 a 和 b 溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比 1:1 混合, 室温放置 3 小时, 然后用凝胶层析柱分离纯化, 收集第一峰和第二峰, 除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶, 将产物保存在 4°C, 将上述连接物用酶反应物稀释液稀释到 5ug/mL, 使用 0.2 μ m 过滤器过滤后 4°C 保存;

[0030] 其中, 酶反应物稀释液配置方法: Tris 12.5g, 氯化钠 8.5g, 叠氮钠 1g, 加纯化水至 600ml, 调整 pH 值至 7.5; 加吐温 -20 1ml, BSA 10g, 加纯化水定容至 1L; 用 0.2 μ m 过滤器过滤, 于 4°C 保存;

[0031] ④清洗液的制备:

[0032] 取 Tris 12.54g、NaCl 325.6g 与吐温 -20 5g 先溶于 900ml 水中, 再取 0.2ml 液体生物防腐剂 Proclin-300 溶于溶液中, 最后将 pH 调整至 7.4 并定容至 1000ml, 完全溶解后用 0.2 μ m 过滤器过滤既得清洗液浓缩液, 使用时稀释 20 倍既得清洗液;

[0033] ⑤校准品与质控品的制备:

[0034] 将 DON 抗原称重后用标准品缓冲液溶解分装, 校准品浓度分别为 1ng/mL、10ng/mL、40ng/mL、200ng/mL 与 1000ng/mL, 质控品浓度为 1ng/mL 与 100ng/mL, 4°C 保存;

[0035] 其中, 标准品缓冲液的配制: 取 Tris 2.42g、NaCl 2g, BSA 2.5g, Proclin-300 1ml 溶解于 1000ml 纯化水, pH 调整至 7.4, 用 0.2 μ m 过滤器过滤, 4°C 保存;

[0036] ⑥底物溶液的制备:

[0037] 取乙醇胺 100g, NaCl2g, 单磷酸酚酞 4g, 用纯化水配成 1000ml, 用 37% 盐酸调 pH 至 8.4, 用 0.2 μm 过滤器过滤, 于 4℃ 保存;

[0038] ⑦终止液的制备

[0039] 取 NaCl11-2g, Na₂CO₃10-15g, EDTA10-15g, 用纯化水配制成 1000ml, 用 0.2 μm 过滤器过滤, 常温保存。

[0040] 一种呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述选取的 100mg 具有顺磁性、表面带有羧基活性基团的磁分离微粒的直径为 0.1-0.2 μm。

[0041] 一种呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述 FITC 抗体为羊抗、鼠抗或兔抗。

[0042] 一种呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述 DON 单克隆抗体为羊抗、鼠抗或兔抗。

[0043] 一种呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述 MES 溶液的制备方法为: 称取 MES19.52g, Tris1.56g, NaCl4.24g 于 1L 烧杯中, 量取 950mL 纯化水溶解, 调节 pH 至 4.5; 加纯化水定容到 1L, 采用孔径 0.2 μm 滤膜过滤除菌, 4℃ 保存。

[0044] 一种呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述 DON 单克隆抗体溶液与 FITC 共价连接的连接方法为 Marsshall 法。

[0045] 一种呕吐毒素定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述柱子为 SephadexG25 柱子; 所述凝胶层析柱为 Superdex200 凝胶层析柱。

[0046] 一种呕吐毒素磁微粒分离酶联免疫检测方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

[0047] a. 备 DON 样本溶液: 将食品或饲料样品粉碎成粉末, 之后称取 5g 粉碎均匀的样品, 加入 25mL10% 甲醇水溶液萃取, 振荡 10 分钟后用定性滤纸过滤去沉渣, 收集滤液, 滤液即可直接用于检测;

[0048] b. 样和免疫反应: 在试管中加入 50 μL 样品溶液, 然后分别依次加入 50 μL 酶标抗原试剂和 50 μL 抗试剂, 混匀后 37℃ 温育 20 分钟;

[0049] c. 加磁分离试剂: 在试管中加入 50 μL 混匀后的磁分离试剂, 混匀后继续 37℃ 温育 10 分钟;

[0050] d. 清洗: 试管放置在磁分离器上分离 3 分钟, 倒去上清液, 每管加入清洗液 250 μL, 充分混匀后, 将试管放置在磁分离器上分离 3 分钟, 倒去上清液, 重复洗涤过程 2 次;

[0051] e. 加入底物溶液: 每管加入 200 μL 底物溶液至试管中, 37℃ 混匀 5 分钟;

[0052] f. 终止显色: 每管加入 200 μL 终止液, 磁分离 10 分钟;

[0053] g. 读值: 在分光光度计上读取吸光度。

[0054] 本发明的呕吐毒素定量检测试剂盒检测方法原理: 本方法采用竞争性免疫检测原理, 分别将异硫氰酸荧光素 (FITC) 抗体吸附在磁微粒表面形成磁分离试剂; 将 FITC 与呕吐毒素 DON 抗体偶联形成抗试剂; 将呕吐毒素 DON 与碱性磷酸酶 ALP 连接形成酶标抗原试剂。检测时样品中的 DON 抗原与酶标 DON 抗原竞争性结合 FITC 标记的 DON 抗试剂形成抗原抗体复合物, 再加入磁分离试剂后, 通过 FITC 的抗原抗体反应, 将抗原抗体复合物结合到磁微粒表面。最后经洗涤, 加入显色底物并检测。

[0055] 本发明的有益之处在于: 1. 本发明的呕吐毒素定量检测试剂盒操作简单、快速、

灵敏准确 ;2. 能够适用于日常大规模的食品或饲料中呕吐毒素的样品检测。

附图说明

[0056] 图 1 是本发明的两种检测方法测定小麦呕吐毒素含量结果线性关系图。

具体实施方式

[0057] 实施例一：

[0058] 本发明的呕吐毒素定量检测试剂盒制备方法，具体步骤如下：

[0059] 一．磁分离试剂制备：

[0060] 选用 100mg 具有超顺磁性，表面带有羧基(COOH-) 活性基团的磁分离微粒(直径 0.1 μ m)用 0.1mol/L2- (N- 吗啉代) 乙磺酸 MES,pH4.5 溶液 10mL 洗涤 3 次,磁微粒用该溶液 1mL 重悬。之后加入 50 μ L10mg/ml EDC 活化,25 $^{\circ}$ C 混匀 2 小时,加入 2mg 抗 FITC 抗体(羊抗),37 $^{\circ}$ C 混合均匀 2 小时。之后加入等体积 0.01mol/L PBS5%BSA(pH7.4) 缓冲液于 37 $^{\circ}$ 封闭 1 小时 ;最后用 10mL 含 0.5%BSA 溶液的 0.01mol/L PBS(pH7.4) 缓冲液洗涤磁珠 3 次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0061] 所述 MES 溶液的制备方法为：

[0062] 称取 MES19.52g,Tris1.56g,NaCl4.24g 于 1L 烧杯中 , 量取 950mL 纯化水溶解,调节 pH 至 4.5 ;加纯化水定容到 1L,采用孔径 0.2 μ m 滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0063] 二．抗试剂的制备

[0064] 将 DON 单克隆抗体溶液与异硫氰酸荧光素 (FITC) 按 Marsshall 法共价连接,所述 DON 抗体是单克隆抗体(羊抗)。

[0065] 三．酶标抗原试剂制备：

[0066] (1)呕吐毒素 - 牛血清白蛋白 (DON-BSA) 偶联物的制备：

[0067] 取 20mgDON、1mol 马来酸酐以及 0.05mol 的 DMAP,溶于 2ml 甲苯,80 $^{\circ}$ C 搅拌 12 小时,蒸干溶剂,酸化,萃取,重结晶后得到 DON 半抗原。

[0068] 将 60mg DON 半抗原溶于 9.5ml0.01mol/L, pH5.0 的 PBS 溶液中,加入 12.5mg EDC,再加入 1mLDMF 溶解的 10mgDON 半抗原,25 $^{\circ}$ C 搅拌反应 2 小时,再加入 6mgEDC,置于阴暗处搅拌反应 12 小时,用 0.01mol/LPBS 透析 72 小时,每 8 小时更换 1 次透析液,既得到 DON-BSA 偶联物。

[0069] (2)酶标抗原试剂制备：

[0070] a. 将 5mg DON-BSA 抗原溶于 0.01mol/L PBS PH7.4 溶液中 ;加入 0.1mol/mL 活化剂 2-Iminothiolane •HCl (2IT) 溶液 20 μ L,20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟后加入甘氨酸终止反应 ;20 $^{\circ}$ C 静置 3-5 分钟 ;通过 SephadexG25 柱子除去活化剂,收集蛋白峰；

[0071] b. 将碱性磷酸酶 ALP 溶于 2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCLPH8.0 溶液中,溶度 5mg/mL,加入 0.10mg/mL Traunt 试剂室温放置 40 分钟,通过 SephadexG25 柱子除去活化剂,收集蛋白峰；

[0072] 将 a 和 b 溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比 1:1 混合,室温放置 3 小时,然后用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化,收集第一和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物保存在 4 $^{\circ}$ C。将上述连接物用酶反应物稀释液稀释到 5 μ g/mL,使用 0.2 μ m

过滤器过滤后 4℃ 保存。

[0073] 其中,酶反应物稀释液配置方法:Tris12.5g,氯化钠 8.5g,叠氮钠 1g,加纯化水至 600mL,调整 pH 值至 7.5。加吐温 201mL,BSA10g,加纯化水定容至 1L。用 0.2 μ m 过滤器过滤,于 4℃ 保存。

[0074] 四.清洗液的制备:

[0075] 取 Tris12.54g、NaCl325.6g 与吐温-205g 先溶于 900ml 水中,再取 0.2ml 液体生物防腐剂 Proclin-300 溶于溶液中,最后将 pH 调整至 7.4 并定容至 1000ml,完全溶解后用 0.2um 滤器过滤既得清洗液浓缩液,使用时稀释 20 倍既得清洗液。

[0076] 五.校准品与质控品的制备:

[0077] 将 DON 抗原称重后用标准品缓冲液溶解分装,校准品浓度分别为 1ng/mL、10ng/mL、40ng/mL、200ng/mL 与 1000ng/mL,质控品浓度为 1ng/mL 与 100ng/mL,4℃ 保存。

[0078] 其中,标准品缓冲液的配制:取 Tris2.42g、NaCl2g,BSA2.5g,Proclin-3001ml 溶解于 1000ml 纯化水,pH 调整至 7.4,用 0.2 μ m 过滤器过滤,4℃ 保存。

[0079] 六.底物溶液的制备:

[0080] 取乙醇胺 100g,NaCl2g,单磷酸酚酞 4g,用纯化水配成 1000mL,用 37% 盐酸调 pH 至 8.4,用 0.2 μ m 过滤器过滤,于 4℃ 保存。

[0081] 七.终止液的制备

[0082] 取 NaCl11.0g,Na₂CO₃10g,EDTA10g,用纯化水配制成 1000mL,用 0.2 μ m 过滤器过滤,常温保存。

[0083] 实施例二:

[0084] 一.磁分离试剂制备:

[0085] 选用 100mg 具有超顺磁性,表面带有羧基(COOH-)活性基团的磁分离微粒(直径 0.2 μ m)用 0.1mol/L MES,pH4.5 溶液 10mL 洗涤 3 次,磁微粒用该溶液 1mL 重悬。之后加入 75ul10mg/ml EDC 活化,25℃ 混匀 2 小时,加入 2mg 抗 FITC 抗体(鼠抗),37℃ 混合均匀 2 小时。之后加入等体积 0.01mol/L PBS5%BSA(pH7.4)缓冲液于 37° 封闭 1 小时;最后用 10mL 含 0.5%BSA 溶液的 0.01mol/LPBS(pH7.4)缓冲液洗涤磁珠 3 次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0086] 所述 MES 溶液的制备方法为:

[0087] 称取 MES19.52g,Tris1.56g,NaCl4.24g 于 1L 烧杯中,量取 950mL 纯化水溶解,调节 pH 至 4.5;加纯化水定容到 1L,采用孔径 0.2 μ m 滤膜过滤除菌,4℃ 保存。

[0088] 二.抗试剂的制备

[0089] 将 DON 单克隆抗体溶液与异硫氰酸荧光素(FITC)按 Marsshall 法共价连接,所述 DON 抗体是单克隆抗体(鼠抗)。

[0090] 三.酶标抗原试剂制备:

[0091] (1)呕吐毒素-牛血清白蛋白(DON-BSA)偶联物的制备:

[0092] 取 20mgDON、1mol 马来酸酐以及 0.07mol 的 DMAP,溶于 2ml 甲苯,80℃ 搅拌 12 小时,蒸干溶剂,酸化,萃取,重结晶后得到 DON 半抗原。

[0093] 将 60mg DON 半抗原溶于 9.5ml0.01mol/L,pH5.0 的 PBS 溶液中,加入 12.5mg EDC,再加入 1mLDMF 溶解的 10mgDON 半抗原,25℃ 搅拌反应 2 小时,再加入 6mgEDC,置于阴暗处搅

拌反应 12 小时,用 0.01mol/LPBS 透析 72 小时,每 8 小时更换 1 次透析液,既得到 DON-BSA 偶联物。

[0094] (2)酶标抗原试剂制备:

[0095] a. 将 5mg DON-BSA 抗原溶于 0.01mol/L PBS PH7.4 溶液中;加入 0.1mol/mL 活化剂 2-Iminothiolane·HCl (2IT) 溶液 20 μ L, 20°C 放置 30 分钟后加入甘氨酸终止反应;20°C 静置 3-5 分钟;通过 SephadexG25 柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

[0096] b. 将碱性磷酸酶 ALP 溶于 2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCL PH8.0 溶液中,溶度 5mg/mL,加入 0.10mg/mL Traunt 试剂室温放置 40 分钟,通过 SephadexG25 柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

[0097] 将 a 和 b 溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比 1:1 混合,室温放置 3 小时,然后用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化,收集第一和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物保存在 4°C。将上述连接物用酶反应物稀释液稀释到 5 μ g/mL,使用 0.2 μ m 过滤器过滤后 4°C 保存。

[0098] 其中,酶反应物稀释液配置方法:Tris12.5g,氯化钠 8.5g,叠氮钠 1g,加纯化水至 600mL,调整 pH 值至 7.5。加吐温 201mL,BSA10g,加纯化水定容至 1L。用 0.2 μ m 过滤器过滤,于 4°C 保存。

[0099] 四. 清洗液的制备:

[0100] 取 Tris12.54g、NaCl325.6g 与吐温 -205g 先溶于 900ml 水中,再取 0.2ml 液体生物防腐剂 Proclin-300 溶于溶液中,最后将 pH 调整至 7.4 并定容至 1000ml,完全溶解后用 0.2 μ m 滤器过滤既得清洗液浓缩液,使用时稀释 20 倍既得清洗液。

[0101] 五. 校准品与质控品的制备:

[0102] 将 DON 抗原称重后用标准品缓冲液溶解分装,校准品浓度分别为 1ng/mL、10ng/mL、40ng/mL、200ng/mL 与 1000ng/mL,质控品溶度为 1ng/mL 与 100ng/mL,4°C 保存。

[0103] 其中,标准品缓冲液的配制:取 Tris2.42g、NaCl2g,BSA2.5g,Proclin-3001ml 溶解于 1000ml 纯化水,pH 调整至 7.4,用 0.2 μ m 过滤器过滤,4°C 保存。

[0104] 六. 底物溶液的制备:

[0105] 取乙醇胺 100g,NaCl2g,单磷酸酚酞 4g,用纯化水配成 1000mL,用 37% 盐酸调 pH 至 8.4,用 0.2 μ m 过滤器过滤,于 4°C 保存。

[0106] 七. 终止液的制备

[0107] 取 NaCl2.0g,Na₂CO₃15g,EDTA15g,用纯化水配制成 1000ml,用 0.2 μ m 过滤器过滤,常温保存。

[0108] 实施例三:

[0109] 一. 磁分离试剂制备:

[0110] 选用 100mg 具有超顺磁性,表面带有羧基(COOH-)活性基团的磁分离微粒(直径 0.1 μ m)用 0.1mol/L MES,pH4.5 溶液 10mL 洗涤 3 次,磁微粒用该溶液 1mL 重悬。之后加入 100 μ l10mg/ml EDC 活化,25°C 混匀 2 小时,加入 2mg 抗 FITC 抗体(兔抗),37°C 混合均匀 2 小时。之后加入等体积 0.01mol/L PBS5%BSA (pH7.4) 缓冲液于 37° 封闭 1 小时;最后用 10mL 含 0.5%BSA 溶液的 0.01mol/L PBS (pH7.4) 缓冲液洗涤磁珠 3 次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0111] 所述 MES 溶液的制备方法为：

[0112] 称取 MES19.52g, Tris1.56g, NaCl4.24g 于 1L 烧杯中, 量取 950mL 纯化水溶解, 调节 pH 至 4.5; 加纯化水定容到 1L, 采用孔径 0.2 μ m 滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0113] 二. 抗试剂的制备

[0114] 将 DON 单克隆抗体溶液与异硫氰酸荧光素 (FITC) 按 Marshall 法共价连接, 所述 DON 抗体是单克隆抗体(兔抗)。

[0115] 三. 酶标抗原试剂制备：

[0116] (1) 呕吐毒素 - 牛血清白蛋白 (DON-BSA) 偶联物的制备：

[0117] 取 20mgDON、1mol 马来酸酐以及 0.1mol 的 DMAP, 溶于 2ml 甲苯, 80 $^{\circ}$ C 搅拌 12 小时, 蒸干溶剂, 酸化, 萃取, 重结晶后得到 DON 半抗原。

[0118] 将 60mg DON 半抗原溶于 9.5ml 0.01mol/L, pH5.0 的 PBS 溶液中, 加入 12.5mg EDC, 再加入 1ml DMF 溶解的 10mgDON 半抗原, 25 $^{\circ}$ C 搅拌反应 2 小时, 再加入 6mgEDC, 置于阴暗处搅拌反应 12 小时, 用 0.01mol/L PBS 透析 72 小时, 每 8 小时更换 1 次透析液, 既得到 DON-BSA 偶联物。

[0119] (2) 酶标抗原试剂制备：

[0120] a. 将 5mg DON-BSA 抗原溶于 0.01mol/L PBS PH7.4 溶液中; 加入 0.1mol/mL 活化剂 2-Iminothiolane \cdot HCl (2IT) 溶液 20 μ L, 20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟后加入甘氨酸终止反应; 20 $^{\circ}$ C 静置 3-5 分钟; 通过 SephadexG25 柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0121] b. 将碱性磷酸酶 ALP 溶于 2mmol/L EDTA 20mmol/L Tris-HCL PH8.0 溶液中, 溶度 5mg/mL, 加入 0.10mg/mL Traut 试剂室温放置 40 分钟, 通过 SephadexG25 柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0122] 将 a 和 b 溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比 1:1 混合, 室温放置 3 小时, 然后用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化, 收集第一和第二峰, 除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶, 将产物保存在 4 $^{\circ}$ C。将上述连接物用酶反应物稀释液稀释到 5 μ g/mL, 使用 0.2 μ m 过滤器过滤后 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0123] 其中, 酶反应物稀释液配置方法: Tris12.5g, 氯化钠 8.5g, 叠氮钠 1g, 加纯化水至 600mL, 调整 pH 值至 7.5。加吐温 201mL, BSA10g, 加纯化水定容至 1L。用 0.2 μ m 过滤器过滤, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0124] 四. 清洗液的制备：

[0125] 取 Tris12.54g、NaCl325.6g 与吐温 -205g 先溶于 900ml 水中, 再取 0.2ml 液体生物防腐剂 Proclin-300 溶于溶液中, 最后将 pH 调整至 7.4 并定容至 1000ml, 完全溶解后用 0.2 μ m 滤器过滤既得清洗液浓缩液, 使用时稀释 20 倍既得清洗液。

[0126] 五. 校准品与质控品的制备：

[0127] 将 DON 抗原称重后用标准品缓冲液溶解分装, 校准品浓度分别为 1ng/mL、10ng/mL、40ng/mL、200ng/mL 与 1000ng/mL, 质控品溶度为 1ng/mL 与 100ng/mL, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0128] 其中, 标准品缓冲液的配制: 取 Tris2.42g、NaCl2g, BSA2.5g, Proclin-3001ml 溶解于 1000ml 纯化水, pH 调整至 7.4, 用 0.2 μ m 过滤器过滤, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0129] 六. 底物溶液的制备：

[0130] 取乙醇胺 100g, NaCl2g, 单磷酸酚酞 4g, 用纯化水配成 1000mL, 用 37% 盐酸调 pH

至 8.4, 用 0.2 μ m 过滤器过滤, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0131] 七. 终止液的制备

[0132] 取 NaCl 11.8g, Na₂CO₃ 12g, EDTA 12g, 用纯化水配制成 1000mL, 用 0.2 μ m 过滤器过滤, 常温保存。

[0133] 实施例四:

[0134] 一. 磁分离试剂制备:

[0135] 选用 100mg 具有超顺磁性, 表面带有羧基(COOH-) 活性基团的磁分离微粒(直径 0.18 μ m) 用 0.1mol/L MES, pH4.5 溶液 10mL 洗涤 3 次, 磁微粒用该溶液 1mL 重悬。之后加入 150 μ l 10mg/ml EDC 活化, 25 $^{\circ}$ C 混匀 2 小时, 加入 2mg 抗 FITC 抗体(羊抗), 37 $^{\circ}$ C 混合均匀 2 小时。之后加入等体积 0.01mol/L PBS5%BSA (pH7.4) 缓冲液于 37 $^{\circ}$ 封闭 1 小时; 最后用 10mL 含 0.5%BSA 溶液的 0.01mol/L PBS (pH7.4) 缓冲液洗涤磁珠 3 次, 并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0136] 所述 MES 溶液的制备方法为:

[0137] 称取 MES 19.52g, Tris 1.56g, NaCl 4.24g 于 1L 烧杯中, 量取 950mL 纯化水溶解, 调节 pH 至 4.5; 加纯化水定容到 1L, 采用孔径 0.2 μ m 滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0138] 二. 抗试剂的制备

[0139] 将 DON 单克隆抗体溶液与异硫氰酸荧光素 (FITC) 按 Marsshall 法共价连接, 所述 DON 抗体是单克隆抗体(羊抗)。

[0140] 三. 酶标抗原试剂制备:

[0141] (1) 呕吐毒素 - 牛血清白蛋白 (DON-BSA) 偶联物的制备:

[0142] 取 20mg DON、1mol 马来酸酐以及 0.05mol 的 DMAP, 溶于 2ml 甲苯, 80 $^{\circ}$ C 搅拌 12 小时, 蒸干溶剂, 酸化, 萃取, 重结晶后得到 DON 半抗原。

[0143] 将 60mg DON 半抗原溶于 9.5ml 0.01mol/L, pH5.0 的 PBS 溶液中, 加入 12.5mg EDC, 再加入 1mL DMF 溶解的 10mg DON 半抗原, 25 $^{\circ}$ C 搅拌反应 2 小时, 再加入 6mg EDC, 置于阴暗处搅拌反应 12 小时, 用 0.01mol/L PBS 透析 72 小时, 每 8 小时更换 1 次透析液, 既得到 DON-BSA 偶联物。

[0144] (2) 酶标抗原试剂制备:

[0145] a. 将 5mg DON-BSA 抗原溶于 0.01mol/L PBS PH7.4 溶液中; 加入 0.1mol/mL 活化剂 2-Iminothiolane •HCl (2IT) 溶液 20 μ L, 20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟后加入甘氨酸终止反应; 20 $^{\circ}$ C 静置 3-5 分钟; 通过 SephadexG25 柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0146] b. 将碱性磷酸酶 ALP 溶于 2mmol/L EDTA 20mmol/L Tris-HCL PH8.0 溶液中, 溶度 5mg/mL, 加入 0.10mg/mL Traunt 试剂室温放置 40 分钟, 通过 SephadexG25 柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0147] 将 a 和 b 溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比 1:1 混合, 室温放置 3 小时, 然后用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化, 收集第一和第二峰, 除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶, 将产物保存在 4 $^{\circ}$ C。将上述连接物用酶反应物稀释液稀释到 5 μ g/mL, 使用 0.2 μ m 过滤器过滤后 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0148] 其中, 酶反应物稀释液配置方法: Tris 12.5g, 氯化钠 8.5g, 叠氮钠 1g, 加纯化水至 600mL, 调整 pH 值至 7.5。加吐温 20 1mL, BSA 10g, 加纯化水定容至 1L。用 0.2 μ m 过滤器过

滤,于 4℃保存。

[0149] 四. 清洗液的制备:

[0150] 取 Tris12.54g、NaCl325.6g 与吐温-205g 先溶于 900ml 水中,再取 0.2ml 液体生物防腐剂 Proclin-300 溶于溶液中,最后将 pH 调整至 7.4 并定容至 1000ml,完全溶解后用 0.2um 滤器过滤既得清洗液浓缩液,使用时稀释 20 倍既得清洗液。

[0151] 五. 校准品与质控品的制备:

[0152] 将 DON 抗原称重后用标准品缓冲液溶解分装,校准品浓度分别为 1ng/mL、10ng/mL、40ng/mL、200ng/mL 与 1000ng/mL,质控品浓度为 1ng/mL 与 100ng/mL,4℃保存。

[0153] 其中,标准品缓冲液的配制:取 Tris2.42g、NaCl2g,BSA2.5g,Proclin-3001ml 溶解于 1000ml 纯化水,pH 调整至 7.4,用 0.2 μ m 过滤器过滤,4℃保存。

[0154] 六. 底物溶液的制备:

[0155] 取乙醇胺 100g,NaCl2g,单磷酸酚酞 4g,用纯化水配成 1000mL,用 37% 盐酸调 pH 至 8.4,用 0.2 μ m 过滤器过滤,于 4℃保存。

[0156] 七. 终止液的制备

[0157] 取 NaCl2.0g,Na₂CO₃10g,EDTA10g,用纯化水配制成 1000mL,用 0.2 μ m 过滤器过滤,常温保存。

[0158] 实施例五:

[0159] 一. 磁分离试剂制备:

[0160] 选用 100mg 具有超顺磁性,表面带有羧基(COOH-)活性基团的磁分离微粒(直径 0.18um)用 0.1mol/L MES, pH4.5 溶液 10mL 洗涤 3 次,磁微粒用该溶液 1mL 重悬。之后加入 200u110mg/ml EDC 活化,25℃混匀 2 小时,加入 2mg 抗 FITC 抗体(鼠抗),37℃混合均匀 2 小时。之后加入等体积 0.01mol/L PBS5%BSA (pH7.4) 缓冲液于 37° 封闭 1 小时;最后用 10mL 含 0.5%BSA 溶液的 0.01mol/LPBS (pH7.4) 缓冲液洗涤磁珠 3 次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0161] 所述 MES 溶液的制备方法为:

[0162] 称取 MES19.52g,Tris1.56g,NaCl4.24g 于 1L 烧杯中,量取 950mL 纯化水溶解,调节 pH 至 4.5;加纯化水定容到 1L,采用孔径 0.2 μ m 滤膜过滤除菌,4℃保存。

[0163] 二. 抗试剂的制备

[0164] 将 DON 单克隆抗体溶液与异硫氰酸荧光素 (FITC) 按 Marsshall 法共价连接,所述 DON 抗体是单克隆抗体(鼠抗)。

[0165] 三. 酶标抗原试剂制备:

[0166] (1)呕吐毒素-牛血清白蛋白(DON-BSA) 偶联物的制备:

[0167] 取 20mgDON、1mol 马来酸酐以及 0.08mol 的 DMAP,溶于 2ml 甲苯,80℃搅拌 12 小时,蒸干溶剂,酸化,萃取,重结晶后得到 DON 半抗原。

[0168] 将 60mg DON 半抗原溶于 9.5ml0.01mol/L, pH5.0 的 PBS 溶液中,加入 12.5mg EDC,再加入 1mLDMF 溶解的 10mgDON 半抗原,25℃搅拌反应 2 小时,再加入 6mgEDC,置于阴暗处搅拌反应 12 小时,用 0.01mol/LPBS 透析 72 小时,每 8 小时更换 1 次透析液,既得到 DON-BSA 偶联物。

[0169] (2)酶标抗原试剂制备:

[0170] a. 将 5mg DON-BSA 抗原溶于 0.01mol/L PBS PH7.4 溶液中;加入 0.1mol/mL 活化剂 2-Iminothiolane·HCl (2IT) 溶液 20 μ L, 20°C 放置 30 分钟后加入甘氨酸终止反应;20°C 静置 3-5 分钟;通过 SephadexG25 柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

[0171] b. 将碱性磷酸酶 ALP 溶于 2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCLPH8.0 溶液中,溶度 5mg/mL,加入 0.10mg/mL Traunt 试剂室温放置 40 分钟,通过 SephadexG25 柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

[0172] 将 a 和 b 溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比 1:1 混合,室温放置 3 小时,然后用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化,收集第一和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物保存在 4°C。将上述连接物用酶反应物稀释液稀释到 5 μ g/mL,使用 0.2 μ m 过滤器过滤后 4°C 保存。

[0173] 其中,酶反应物稀释液配置方法:Tris12.5g,氯化钠 8.5g,叠氮钠 1g,加纯化水至 600mL,调整 pH 值至 7.5。加吐温 201mL,BSA10g,加纯化水定容至 1L。用 0.2 μ m 过滤器过滤,于 4°C 保存。

[0174] 四. 清洗液的制备:

[0175] 取 Tris12.54g、NaCl325.6g 与吐温 -205g 先溶于 900ml 水中,再取 0.2ml 液体生物防腐剂 Proclin-300 溶于溶液中,最后将 pH 调整至 7.4 并定容至 1000ml,完全溶解后用 0.2um 滤器过滤既得清洗液浓缩液,使用时稀释 20 倍既得清洗液。

[0176] 五. 校准品与质控品的制备:

[0177] 将 DON 抗原称重后用标准品缓冲液溶解分装,校准品浓度分别为 1ng/mL、10ng/mL、40ng/mL、200ng/mL 与 1000ng/mL,质控品溶度为 1ng/mL 与 100ng/mL,4°C 保存。

[0178] 其中,标准品缓冲液的配制:取 Tris2.42g、NaCl2g,BSA2.5g,Proclin-3001ml 溶解于 1000ml 纯化水,pH 调整至 7.4,用 0.2 μ m 过滤器过滤,4°C 保存。

[0179] 六. 底物溶液的制备:

[0180] 取乙醇胺 100g,NaCl2g,单磷酸酚酞 4g,用纯化水配成 1000mL,用 37% 盐酸调 pH 至 8.4,用 0.2 μ m 过滤器过滤,于 4°C 保存。

[0181] 七. 终止液的制备

[0182] 取 NaCl1.5g,Na₂CO₃10g,EDTA15g,用纯化水配制成 1000mL,用 0.2 μ m 过滤器过滤,常温保存。

[0183] 实施例六:

[0184] 一. 磁分离试剂制备:

[0185] 选用 100mg 具有超顺磁性,表面带有羧基(COOH-)活性基团的磁分离微粒(直径介于 0.18um)用 0.1mol/L MES, pH4.5 溶液 10mL 洗涤 3 次,磁微粒用该溶液 1mL 重悬。之后加入 250u110mg/ml EDC 活化,25°C 混匀 2 小时,加入 2mg 抗 FITC 抗体(兔抗),37°C 混合均匀 2 小时。之后加入等体积 0.01mol/L PBS5%BSA(pH7.4) 缓冲液于 37° 封闭 1 小时;最后用 10mL 含 0.5%BSA 溶液的 0.01mol/LPBS (pH7.4) 缓冲液洗涤磁珠 3 次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0186] 所述 MES 溶液的制备方法为:

[0187] 称取 MES19.52g,Tris1.56g,NaCl4.24g 于 1L 烧杯中,量取 950mL 纯化水溶解,调节 pH 至 4.5;加纯化水定容到 1L,采用孔径 0.2 μ m 滤膜过滤除菌,4°C 保存。

[0188] 二. 抗试剂的制备

[0189] 将 DON 单克隆抗体溶液与异硫氰酸荧光素 (FITC) 按 Marsshall 法共价连接, 所述 DON 抗体是单克隆抗体 (兔抗)。

[0190] 三. 酶标抗原试剂制备:

[0191] (1) 呕吐毒素 - 牛血清白蛋白 (DON-BSA) 偶联物的制备:

[0192] 取 20mgDON、1mol 马来酸酐以及 0.07mol 的 DMAP, 溶于 2ml 甲苯, 80℃ 搅拌 12 小时, 蒸干溶剂, 酸化, 萃取, 重结晶后得到 DON 半抗原。

[0193] 将 60mg DON 半抗原溶于 9.5ml 0.01mol/L, pH5.0 的 PBS 溶液中, 加入 12.5mg EDC, 再加入 1ml DMF 溶解的 10mgDON 半抗原, 25℃ 搅拌反应 2 小时, 再加入 6mgEDC, 置于阴暗处搅拌反应 12 小时, 用 0.01mol/LPBS 透析 72 小时, 每 8 小时更换 1 次透析液, 既得到 DON-BSA 偶联物。

[0194] (2) 酶标抗原试剂制备:

[0195] a. 将 5mg DON-BSA 抗原溶于 0.01mol/L PBS PH7.4 溶液中; 加入 0.1mol/mL 活化剂 2-Iminothiolane •HCl (2IT) 溶液 20 μ L, 20℃ 放置 30 分钟后加入甘氨酸终止反应; 20℃ 静置 3-5 分钟; 通过 SephadexG25 柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0196] b. 将碱性磷酸酶 ALP 溶于 2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCL PH8.0 溶液中, 溶度 5mg/mL, 加入 0.10mg/mL Traunt 试剂室温放置 40 分钟, 通过 SephadexG25 柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0197] 将 a 和 b 溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比 1:1 混合, 室温放置 3 小时, 然后用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化, 收集第一和第二峰, 除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶, 将产物保存在 4℃。将上述连接物用酶反应物稀释液稀释到 5 μ g/mL, 使用 0.2 μ m 过滤器过滤后 4℃ 保存。

[0198] 其中, 酶反应物稀释液配置方法: Tris12.5g, 氯化钠 8.5g, 叠氮钠 1g, 加纯化水至 600mL, 调整 pH 值至 7.5。加吐温 201mL, BSA10g, 加纯化水定容至 1L。用 0.2 μ m 过滤器过滤, 于 4℃ 保存。

[0199] 四. 清洗液的制备:

[0200] 取 Tris12.54g、NaCl325.6g 与吐温 -205g 先溶于 900ml 水中, 再取 0.2ml 液体生物防腐剂 Proclin-300 溶于溶液中, 最后将 pH 调整至 7.4 并定容至 1000ml, 完全溶解后用 0.2 μ m 过滤器过滤既得清洗液浓缩液, 使用时稀释 20 倍既得清洗液。

[0201] 五. 校准品与质控品的制备:

[0202] 将 DON 抗原称重后用标准品缓冲液溶解分装, 校准品浓度分别为 1ng/mL、10ng/mL、40ng/mL、200ng/mL 与 1000ng/mL, 质控品溶度为 1ng/mL 与 100ng/mL, 4℃ 保存。

[0203] 其中, 标准品缓冲液的配制: 取 Tris2.42g、NaCl2g, BSA2.5g, Proclin-3001ml 溶解于 1000ml 纯化水, pH 调整至 7.4, 用 0.2 μ m 过滤器过滤, 4℃ 保存。

[0204] 六. 底物溶液的制备:

[0205] 取乙醇胺 100g, NaCl2g, 单磷酸酚酞 4g, 用纯化水配成 1000mL, 用 37% 盐酸调 pH 至 8.4, 用 0.2 μ m 过滤器过滤, 于 4℃ 保存。

[0206] 七. 终止液的制备

[0207] 取 NaCl1.5g, Na₂CO₃15g, EDTA10g, 用纯化水配制成 1000mL, 用 0.2 μ m 过滤器过滤,

常温保存。

[0208] 以本试剂实施例 1 为例制备出呕吐毒素定量检测试剂盒,并以此检测 30 例盲样食品标本,具体检测方法如下:

[0209] a. 备 DON 样本溶液:将 30 例盲样食品标本粉碎成粉末,之后每个标本称取 5g 粉碎均匀的样品,加入 25mL10% 甲醇水溶液萃取,振荡 10 分钟后用定性滤纸过滤去沉渣,收集滤液,滤液即可直接用于检测;

[0210] b. 样和免疫反应:在每个试管中加入 50 μ L 样品溶液,然后分别依次加入 50 μ L 酶标抗原试剂和 50 μ L 抗试剂,混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟;

[0211] c. 加磁分离试剂:在每个试管中加入 50 μ L 混匀后的磁分离试剂,混匀后继续 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟;

[0212] d. 清洗:试管放置在磁分离器上分离 3 分钟,倒去上清液,每管加入清洗液 250 μ L,充分混匀后,将试管放置在磁分离器上分离 3 分钟,倒去上清液,重复洗涤过程 2 次;

[0213] e. 加入底物溶液:每管加入 200 μ L 底物溶液至试管中,37 $^{\circ}$ C 混匀 5 分钟;

[0214] f. 终止显色:每管加入 200 μ l 终止液,磁分离 10 分钟;

[0215] g. 读值:在分光光度计上读取吸光度。

[0216] 得到以下检测结果:

[0217] 分析灵敏度:对 20 次零校准品的测定,取其 2 倍的平均偏差,其在标准曲线上对应的浓度即为分析灵敏度;本发明试剂盒分析灵敏度为 0.1ng/mL。

[0218] 精密性:批内精密度 CV% \leq 10.0%;批间精密度 CV% \leq 15.0%;

[0219] 准确度:回收率为 100-110%

[0220] 测量范围:1-1000ng/mL。

[0221] 线性范围:取本试剂实施例 1,每点重复检测 3 次,得出本试剂盒标准曲线为: $y=1.0024x-0.1223$, 线性相关 $R^2=0.9999$, 本发明试剂盒线性范围为 0.1-1000ng/mL (见图 1)。又以本试剂盒与市售酶联免疫法试剂盒分别检测同一批 30 例标本,具体见表 1,检测结果显示出了两者良好的相关性:

样本序号	本发明实施例 1 测定值 (ng/ml)	市售酶联免疫法测定值 (ng/ml)	样本序号	本发明实施例 1 测定值 (ng/ml)	市售酶联免疫法测定值 (ng/ml)
1	35.3	34.1	16	143.2	144.5
2	69.7	69.3	17	102.8	102.1
3	165.2	166.3	18	6.4	6.4
4	41.9	41.6	19	75.5	74.8
5	71.6	72.5	20	320.1	322.6
6	2.8	2.7	21	43.4	44.1
7	16.3	16.2	22	28.1	27.7
8	20.4	20.4	23	9.3	9.5
9	97.9	99.1	24	2.9	2.9
10	232.1	230.9	25	40.9	41.1
11	68.8	69.3	26	36.7	36.2
12	70.4	69.9	27	78.7	77.9
13	40.8	41.2	28	61.2	61
14	384.1	383.8	29	48.9	49.3
15	7.9	8.1	30	31.3	31

[0223] 表 1

[0224] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和优点。本行业的技术人员应该了解,上述实施例不以任何形式限制本发明,凡采用等同替换或等效变换的方式所获得的技术方案,均落在本发明的保护范围内。

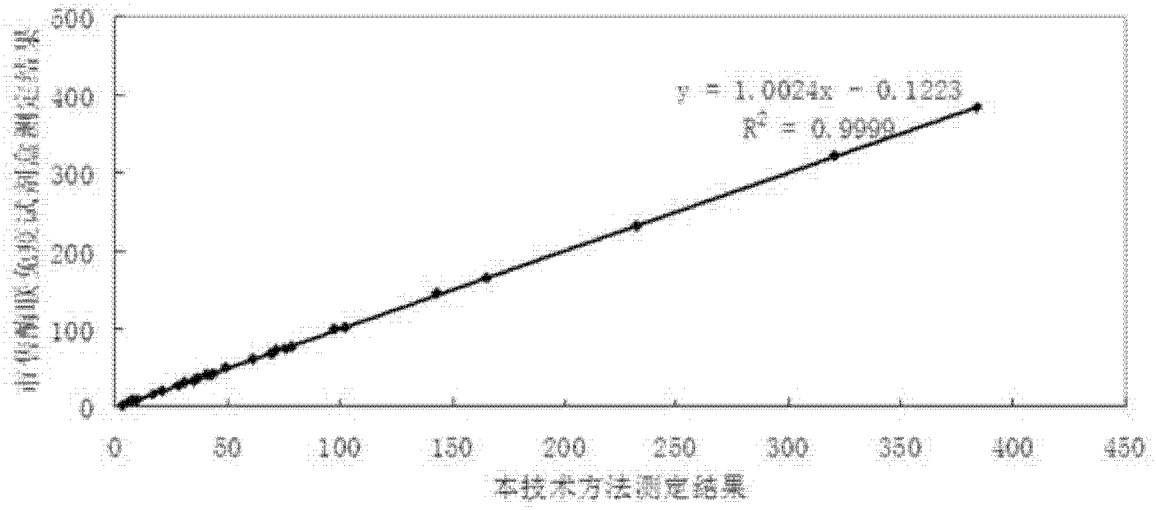


图 1

专利名称(译)	一种呕吐毒素定量检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN103823064A	公开(公告)日	2014-05-28
申请号	CN201410074626.7	申请日	2014-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	中华人民共和国张家港出入境检验检疫局		
申请(专利权)人(译)	中华人民共和国张家港出入境检验检疫局		
当前申请(专利权)人(译)	中华人民共和国张家港出入境检验检疫局		
[标]发明人	王毅谦 邵景东 吴福平 郭扬 申进玲		
发明人	王毅谦 邵景东 吴福平 郭扬 申进玲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54333		
代理人(译)	董建林		
其他公开文献	CN103823064B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种呕吐毒素定量检测试剂盒机器使用方法，所述试剂盒包括：①磁分离试剂；②抗试剂；③酶标抗原试剂；④清洗液；⑤校准品、质控品；⑥底物溶液；⑦终止液；其中磁分离试剂为结合有抗异硫氰酸荧光素FITC-DON抗体的磁微粒混悬液；抗试剂为FITC标记的抗DON抗体溶液；酶标抗原试剂为偶联有生物酶的DON溶液；本发明的具有显著优点：本发明的呕吐毒素定量检测试剂盒操作简单、快速、灵敏准确；能够适用于日常大规模的食品或饲料中呕吐毒素的样品检测。

