



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771210 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611037179.3

(22)申请日 2016.11.23

(71)申请人 百奥森(江苏)食品安全科技有限公司

地址 214070 江苏省无锡市滴翠路100号创意园三期A幢303

(72)发明人 周朱晨 张根义 胡彬 张进
吴念绮 周合

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种食品中呕吐毒素的检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种食品中呕吐毒素的检测试剂盒,包括:酶标抗原、酶标抗原稀释液、呕吐毒素单克隆抗体、呕吐毒素系列标准品溶液、化学发光底物A液、化学发光底物B液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。本发明试剂盒具有较高的灵敏度和特异性,对呕吐毒素的检测灵敏度可达到0.25mg/L。

1. 一种食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,包括:酶标抗原、酶标抗原稀释液、呕吐毒素单克隆抗体、呕吐毒素系列标准品溶液、化学发光底物A液、化学发光底物B液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求1所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,所述的酶标抗原是辣根过氧化物酶标记的呕吐毒素半抗原的标记物,所述的呕吐毒素半抗原是由呕吐毒素与乙二胺在甲醇溶液中反应而得。

3. 根据权利要求1所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,所述的酶标抗原稀释液是pH值7.2~7.4、 Na_2HPO_4 浓度为0.012mol/L、NaCl浓度为0.23mol/L的缓冲溶液。

4. 根据权利要求1所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,所述的呕吐毒素单克隆抗体是由呕吐毒素半抗原与牛血清白蛋白得到的偶联物作为免疫原免疫Ba1b/c小鼠制备获得。

5. 根据权利要求1所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,所述的化学发光底物A液为含有鲁米诺、对甲苯酚的三羟甲基氨基甲烷溶液,所述的化学发光底物B液为含有柠檬酸三钠和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 的水溶液。

6. 根据权利要求5所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,所述的化学发光底物A液为鲁米诺含量为0.04~0.045 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、对甲苯酚含量为0.02~0.0025 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、pH值8.4~8.5的三羟甲基氨基甲烷溶液,所述的化学发光底物B液为每100ml水溶液含柠檬酸三钠3.1~3.5g和体积百分含量为0.65%的 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 1.0~1.2ml。

7. 根据权利要求1所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,所述的呕吐毒素标准品溶液浓度分别为:0mg/L、0.25mg/L、0.50mg/L、0.75mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、4.0mg/L、8.0mg/L。

8. 根据权利要求1所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,所述的浓缩复溶液为10倍浓缩复溶液,具体是每升含100~120g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的水溶液。

9. 根据权利要求1所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒,其特征在于,所述的浓缩洗涤液为10倍浓缩洗涤液,具体是含有体积分数0.5~0.6wt.%吐温-20、pH值7.4~7.5、1.2~1.6mol/L磷酸盐缓冲液。

一种食品中呕吐毒素的检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及食品检测技术领域,具体是一种食品中呕吐毒素的检测试剂盒。

背景技术

[0002] 呕吐毒素最早于1970年在日本的一次赤霉病大麦中毒的病毒中发现,可引起动物拒食和呕吐现象。呕吐毒素作为一种常见的真菌毒素,在自然界中广泛存在,主要污染小麦、玉米等粮食作物及其制品。由于呕吐毒素较强的毒性,世界各国都高度重视对其的监控,并制定出严格的限量标准:美国食品药品监督管理局(FDA)规定在小麦成品中的限量为1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,欧盟规定谷粉和玉米粉中限量为750 $\mu\text{g}/\text{kg}$,我国在国家标准中规定谷物中呕吐毒素的限量为1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0003] 现有的呕吐毒素检测方法主要有理化方法、ELISA方法、胶体金层析法等。这些方法各有优缺点,无法满足现场快速检测的需求。理化方法前处理过程复杂、仪器化程度高、操作繁琐、效率低。ELISA方法经过多次洗脱过程,标记物酶易失活,底物见光易分解,环境干扰因素复杂等缺点,且已不能满足越来越低的限量标准。胶体金层析法可以满足现场快速的要求,但是只能定性检测无法得到定量结果。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种具有较高的灵敏度和特异性的食品中呕吐毒素的检测试剂盒。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种食品中呕吐毒素的检测试剂盒,包括:酶标抗原、酶标抗原稀释液、呕吐毒素单克隆抗体、呕吐毒素系列标准品溶液、化学发光底物A液、化学发光底物B液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

[0006] 作为本发明进一步的方案:所述的酶标抗原是辣根过氧化物酶标记的呕吐毒素半抗原的标记物,所述的呕吐毒素半抗原是由呕吐毒素与乙二胺在甲醇溶液中反应而得。

[0007] 作为本发明进一步的方案:所述的酶标抗原是辣根过氧化物酶标记的呕吐毒素半抗原的标记物,其保存于含0.048~0.052wt.%的吐温-20、0.034~0.038mol/L的pH值7.2~7.4的磷酸盐缓冲液中。

[0008] 作为本发明进一步的方案:所述的酶标抗原稀释液是pH值7.2~7.4、 Na_2HPO_4 浓度为0.012mol/L、 NaCl 浓度为0.23mol/L的缓冲溶液。

[0009] 作为本发明进一步的方案:所述的呕吐毒素单克隆抗体是由呕吐毒素半抗原与牛血清白蛋白得到的偶联物作为免疫原免疫Ba1b/c小鼠制备获得。

[0010] 作为本发明进一步的方案:所述的呕吐毒素单克隆抗体通过呕吐毒素半抗原与牛血清白蛋白得到的偶联物作为免疫原免疫Ba1b/小鼠、细胞融合、杂交瘤细胞的筛选、亚克隆和小鼠腹水的效价测定得到。

[0011] 作为本发明进一步的方案:所述的化学发光底物A液为含有鲁米诺、对甲苯酚的三

羟甲基氨基甲烷溶液,所述的化学发光底物B液为含有柠檬酸三钠和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 的水溶液。

[0012] 作为本发明进一步的方案:所述的化学发光底物A液为鲁米诺含量为0.04~0.045 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、对甲苯酚含量为0.02~0.0025 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、pH值8.4~8.5的三羟甲基氨基甲烷溶液,所述的化学发光底物B液为每100ml水溶液含柠檬酸三钠3.1~3.5g和体积百分含量为0.65%的 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 1.0~1.2ml。

[0013] 作为本发明进一步的方案:所述的呕吐毒素标准品溶液浓度分别为:0mg/L、0.25mg/L、0.50mg/L、0.75mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、4.0mg/L、8.0mg/L,标准品稀释液为含0.03wt.%吐温-20、pH值7.2、0.05mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0014] 作为本发明进一步的方案:所述的浓缩复溶液为10倍浓缩复溶液,具体是每升含100~120g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的水溶液。

[0015] 作为本发明进一步的方案:所述的浓缩洗涤液为10倍浓缩洗涤液,具体是含有体积分数0.5~0.6wt.%吐温-20、pH值7.4~7.5、1.2~1.6mol/L磷酸盐缓冲液。

[0016] 利用所述的食品中呕吐毒素的检测试剂盒进行检测的方法,包括下列步骤:

(1)将酶标抗原与酶标抗原稀释液按照1:20的体积比进行稀释,得到酶标抗原工作液;

(2)分别取50~55 μL 酶标抗原、50~55 μL 样品提取液和50~55 μL 呕吐毒素单克隆抗体,依次加入到容器中,在室温下反应22min,弃上清液后,用洗涤液300~500 μL 对复合物沉淀清洗3~5次;

(3)往分离好的复合物中加入化学发光底物A液和化学发光底物B液各35 μL ,检测发出的相对光强度(RLU),样品中呕吐毒素的含量与RLU成负相关关系,可以通过RLU标准曲线计算呕吐毒素的残留浓度。

[0017] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明试剂盒具有较高的灵敏度和特异性,对呕吐毒素的检测灵敏度可达到0.25mg/L。

具体实施方式

[0018] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0019] 实施例1:试剂盒具体组分的制备

1、呕吐毒素半抗原合成

1.0g呕吐毒素与0.08g乙二胺在100ml甲醇中的混合液,在室温下反应5~6h,蒸除溶剂,定量得到呕吐毒素半抗原。

[0020] 2、酶标抗原的制备

取10~15mg呕吐毒素半抗原,溶解于1~1.5ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中;取27~32mg二氯乙烷(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.1~0.3ml水充分溶解后于加入半抗原溶解液中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A;称取辣根过氧化物酶(HRP)30~50mg,使之充分溶解在pH值7.2、3.8ml的磷酸盐缓冲液中,将反应液A逐滴缓慢滴加到HRP溶液中,并于室温下搅拌24h;用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液于4℃透析3天,每天换3次透析液,以除去未反

应的小分子物质,得到呕吐毒素酶标抗原;分装,于-20℃保存备用。

[0021] 3、免疫原的制备

将HRP 30~50mg替换为牛血清白蛋白(BSA)40~60mg,制备方法同上,得到免疫原。

[0022] 4、呕吐毒素单克隆抗体的制备

A)动物免疫:用上述制备出的免疫原(RAC-BSA)按100μg/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100μg/只,不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0023] 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(聚乙二醇2000)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℃,5%CO₂培养箱中培养,5天后用HT培养基半换液,9天时进行全换液。

[0024] 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)包被酶标板,加入被测孔培养上清,孵育,清洗后加入呕吐毒素标准品溶液35μL,再加入细胞上清液35μL和羊抗鼠IgG-HRP 35μL,于37℃反应30min,洗板,再加入底物液显色液100μL,于25℃下避光反应15min,再加入终止液35μL,测定OD_{450nm}值下降到对照孔的50%以下,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。

[0025] 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0.5ml/只,7~10日后腹腔注射杂交瘤细胞1~2×10⁶/只,7~10日后抽取小鼠腹水,离心取上清,测定效价,并冻存备用。

[0026] 实施例2:试剂盒的组建

组建检测食品中呕吐毒素的检测试剂盒,使其含有下列组分:

辣根过氧化物酶标记的呕吐毒素半抗原的标记物

酶标抗原稀释液

呕吐毒素单克隆抗体

呕吐毒素标准品溶液,浓度分别为:0mg/L、0.25mg/L、0.50mg/L、0.75mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、4.0mg/L、8.0mg/L,标准品稀释液为含0.03wt.%吐温-20、pH值7.2、0.05mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0027] 浓缩复溶液为10倍浓缩复溶液,具体是每升含100~120g的NaH₂PO₄·2H₂O的水溶液。

[0028] 浓缩洗涤液为10倍浓缩洗涤液,具体是含有体积分数0.5~0.6wt.%吐温-20、pH值7.4~7.5、1.2~1.6mol/L磷酸盐缓冲液。

[0029] 实施例3:样品中呕吐毒素残留量的检测

1、样品前处理方法

(1)牛奶

取35μL鲜牛奶样品加入950μL样品稀释液(用去离子水将浓缩复溶液稀释成10倍体

积), 涡动混匀, 取该溶液用于样品分析。

[0030] (2) 奶粉

称取 $0.5\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 奶粉样品, 加入 5ml 样品稀释液, 涡动混匀, 从中取出 $200\mu\text{L}$ 加入至 $600\mu\text{L}$ 样品稀释液中, 涡动混匀, 取该溶液用于样品分析。

[0031] 2、用试剂盒检测与结果分析

将酶标抗原与酶标抗原稀释液按照1:20的体积比进行稀释, 得到酶标抗原工作液; 分别取 $50 \sim 55\mu\text{L}$ 酶标抗原、 $50 \sim 55\mu\text{L}$ 样品提取液和 $50 \sim 55\mu\text{L}$ 呕吐毒素单克隆抗体, 依次加入到容器中, 在室温下反应 22min , 弃上清液后, 用洗涤液 $300 \sim 500\mu\text{L}$ 对复合物沉淀清洗 $3 \sim 5$ 次; 往分离好的复合物中加入化学发光底物A液和化学发光底物B液各 $35\mu\text{L}$, 检测发出的相对光强度(RLU), 样品中呕吐毒素的含量与RLU成负相关关系, 可以通过RLU标准曲线计算呕吐毒素的残留浓度。

[0032] 本发明采用8个呕吐毒素标准品(0mg/L 、 0.25mg/L 、 0.50mg/L 、 0.75mg/L 、 1.0mg/L 、 2.0mg/L 、 4.0mg/L 、 8.0mg/L)进行曲线测绘。将所获得的标准品和样品RLU值的平均值除以第一个标准品的RLU值(RLU_0 值)再乘以100, 以相对发光强度($\% = RLU/RLU_0$)为纵坐标, 呕吐毒素浓度的对数为横坐标做标准曲线, 每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。

[0033] 实施例4: 试剂盒质量的测定

1、试剂盒的检测限

试剂盒检测限的定义为: 测定20次阴性样品, 测定的平均值加上3倍标准差。该试剂盒的检测限为: 牛奶 0.75mg/L , 奶粉 1.0mg/kg 。

[0034] 2、试剂盒的准确度和精密度

准确度是指测定值与真值间的符合程度, 试剂盒准确度常用回收率表示。精密度又称可重复性, 常用变异系数表示。

[0035] 按照实施例3的样品前处理方法, 以 0.5mg/L 、 0.75mg/L 和 1.0mg/L 浓度的呕吐毒素对牛奶样品进行添加, 以 0.75mg/kg 、 1.0mg/kg 和 2.0mg/kg 浓度的呕吐毒素对奶粉样品进行添加, 每种样品每个浓度测定5个平行, 用三批试剂盒进行测定, 计算样品的回收率及精密度。实验结果显示, 牛奶样品中呕吐毒素的添加回收率范围在 $84.8 \sim 115.6\%$, 奶粉样品中呕吐毒素的添加回收率范围在 $81.7 \sim 113.5\%$ 。批内和批间变异系数均小于 15% 。

[0036] 3、特异性

以呕吐毒素作为标准, 设呕吐毒素的交叉反应率为 100% , 用于抗体交叉反应性研究的药物均为与呕吐毒素结构或者功能相似的竞争药物: 黄曲霉毒素B1、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮。按试剂盒步骤操作, 制作抑制曲线, 根据线性方程计算各药物的 50% 抑制浓度($1C_{50}$)。交叉反应率($\%CR$)即为抗体对呕吐毒素的 $1C_{50}$ 与抗体对呕吐毒素竞争物的 $1C_{50}$ 之比的百分数, 结果显示: 试剂盒对呕吐毒素具有较高的特异性, 对与呕吐毒素结构或者功能相似的竞争药物均无交叉反应。

[0037] 对于本领域技术人员而言, 显然本发明不限于上述示范性实施例的细节, 而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下, 能够以其他的具体形式实现本发明。因此, 无论从哪一点来看, 均应将实施例看作是示范性的, 而且是非限制性的, 本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定, 因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0038] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种食品中呕吐毒素的检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106771210A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611037179.3	申请日	2016-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	百奥森江苏食品安全科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	百奥森(江苏)食品安全科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	百奥森(江苏)食品安全科技有限公司		
[标]发明人	周朱晨 张根义 胡彬 张进 吴念绮 周合		
发明人	周朱晨 张根义 胡彬 张进 吴念绮 周合		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种食品中呕吐毒素的检测试剂盒，包括：酶标抗原、酶标抗原稀释液、呕吐毒素单克隆抗体、呕吐毒素系列标准品溶液、化学发光底物A液、化学发光底物B液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。本发明试剂盒具有较高的灵敏度和特异性，对呕吐毒素的检测灵敏度可达到0.25 mg/L。