



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110407732 B

(45) 授权公告日 2021.05.25

(21) 申请号 201910616806.6

(22) 申请日 2019.07.09

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110407732 A

(43) 申请公布日 2019.11.05

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72) 发明人 王弘 王锋 沈玉栋 肖治理

杨金易 徐振林 雷红涛 孙远明

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 段卉

(51) Int. Cl.

C07D 207/38 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/64 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

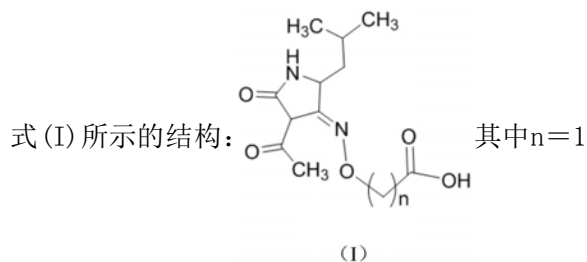
审查员 姜雪

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

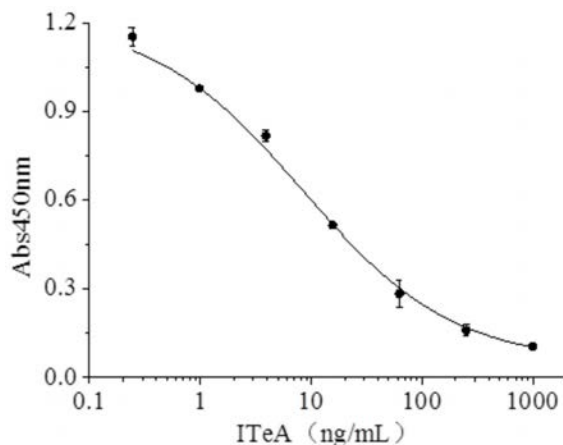
一种直接针对异细交链孢菌酮酸的半抗原、
人工抗原、抗体及其制备方法与应用

(57) 摘要

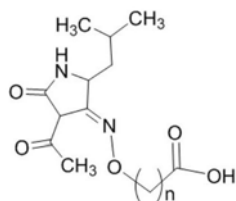
本发明公开了一种直接针对异细交链孢菌
酮酸的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与
应用,一种异细交链孢菌酮酸的半抗原,具有如

~6。本发明进一步通过将半抗原偶联到载体蛋白上,成功制备得到2种人工抗原,将其中一种异细交链孢菌酮酸人工抗原作为免疫原,免疫动物获得直接针对异细交链孢菌酮酸的高特异性抗体,效价为1:128000;建立了一种能够直接检测异细交链孢菌酮酸的酶联免疫分析方法;该方法具有简便快速、特异性强、灵敏度较高的特点,对异细交链孢菌酮酸的检测限为0.3ng/mL,半数抑

制浓度为8.3ng/mL,线性范围为0.9~73.1ng/mL。



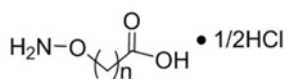
1. 一种异细交链孢菌酮酸的半抗原,其特征在于,具有如式(I)所示的结构:



(I)

其中 $n=1\sim6$ 。

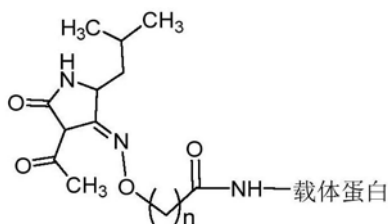
2. 权利要求1所述的半抗原的制备方法,其特征在于,异细交链孢菌酮酸和具有式(II)所示结构的带羧基的羟胺半盐酸盐通过脗化衍生反应得到具有式(I)所示结构的异细交链孢菌酮酸半抗原,



(II)

其中 $n=1\sim6$ 。

3. 一种异细交链孢菌酮酸的人工抗原,其特征在于,具有如式(III)所示的结构:



(III)

其中 $n=1\sim6$ 。

4. 权利要求3所述的人工抗原的制备方法,其特征在于,采用活泼酯法将具有式(I)所示结构的异细交链孢菌酮酸半抗原与载体蛋白偶联制备得到。

5. 一种利用权利要求1所述半抗原或权利要求3所述人工抗原制备的抗体。

6. 权利要求1所述半抗原、权利要求3所述人工抗原、或权利要求5所述抗体在检测异细交链孢菌酮酸或制备异细交链孢菌酮酸检测试剂盒中的应用。

7. 一种异细交链孢菌酮酸的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 将权利要求3所述人工抗原包被于酶标板的微孔内,孵育、洗板、封闭、干燥;

S2. 将梯度稀释的异细交链孢菌酮酸标准品或待测样品液加入酶标板微孔内,随后将权利要求5所述抗体加入微孔内,孵育、洗板;

S3. 将酶标二抗加入酶标板微孔内,孵育、洗板;

S4. 将显色液加入酶标板微孔内,孵育;

S5. 将终止液加入酶标板微孔内,并用酶标仪读数;

S6. 以各标准品浓度孔吸光值与零标准孔吸光值比值为纵坐标,以药物标准液浓度的 $\log_{10}$ 值为横坐标,绘制酶联免疫检测方法的标准曲线,定量分析样品中异细交链孢菌酮酸含量。

一种直接针对异细交链孢菌酮酸的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,更具体地,涉及一种直接针对异细交链孢菌酮酸的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 异细交链孢菌酮酸(Iso-Tenuazonic Acid, ITeA),是链格孢菌、稻瘟病菌、曲霉菌、高粱点霉等多种真菌产生的一种天然毒素,分子式为 $C_{10}H_{15}NO_3$,化学名称为3-乙酰基-4-羟基-5-异丁基吡咯啉-2-酮。它是细交链孢菌酮酸(Tenuazonic Acid, TeA)的同分异构体,都属于四氨基酸衍生物,两者具有相似的化学性质。而TeA毒素是链格孢霉毒素中毒性最强的,也被美国食品与药品管理局列入有毒化学物质登记册中。目前,国内外有关ITeA的毒理学数据尚无系统研究的,但近些年来在婴儿食品、啤酒、土豆、水果、胡椒等多种食品中均有检出TeA。由于ITeA和TeA两者结构相似,且有研究显示ITeA与TeA具有相同的抗菌活性及对植物的毒害作用,有学者猜想它们在毒理学上具有一定的相似性和相关性。目前研究显示食品中ITeA可能对食品安全和人类健康造成一定风险,这使得食品中ITeA的检测也越来越值得关注。

[0003] 目前对于ITeA的检测,目前多为仪器分析方法,但仪器方法设备昂贵,条件苛刻,并不适用于ITeA的快速检测。少数几篇文献采用的是免疫快速检测方法,但仅是通过ITeA衍生物的分析来实现ITeA的间接检测,且衍生方法操作复杂,效率不高,产物纯化难度很大。目前并未见直接针对ITeA分析的免疫检测方法,而抗体作为免疫分析的核心试剂,因此非常有必要提供一种直接针对异细交链孢菌酮酸的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服现有技术的不足,提供一种直接针对异细交链孢菌酮酸的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用。

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种异细交链孢菌酮酸的半抗原。

[0006] 本发明的第二个目的是提供所述的半抗原的制备方法。

[0007] 本发明的第三个目的是提供一种异细交链孢菌酮酸的人工抗原。

[0008] 本发明的第四个目的是提供所述的人工抗原的制备方法。

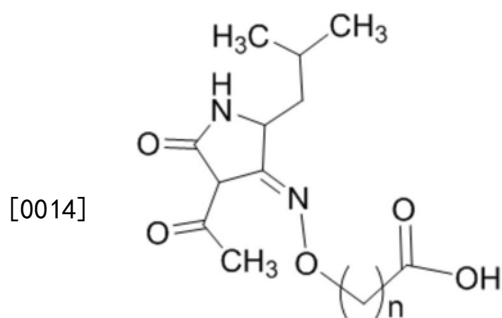
[0009] 本发明的第五个目的是提供一种利用所述半抗原或所述人工抗原制备的抗体。

[0010] 本发明的第六个目的是提供所述半抗原、所述人工抗原、或所述抗体在检测异细交链孢菌酮酸或制备异细交链孢菌酮酸检测试剂盒中的应用。

[0011] 本发明的第七个目的是提供一种异细交链孢菌酮酸的检测方法。

[0012] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案予以实现的:

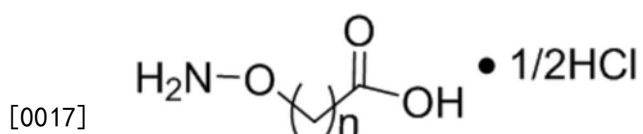
[0013] 1.一种异细交链孢菌酮酸的半抗原,具有如式(I)所示的结构:



(I)

[0015] 其中 $n=1\sim6$ 。

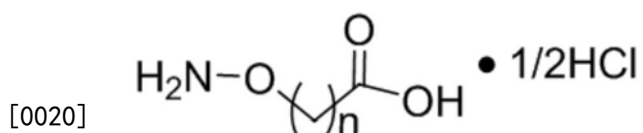
[0016] 所述的半抗原的制备方法,异细交链孢菌酮酸和具有式(II)所示结构的带羧基的羟胺半盐酸盐通过脗化衍生反应得到具有式(I)所示结构的异细交链孢菌酮酸半抗原,



(II)

[0018] 其中 $n=1\sim6$ 。

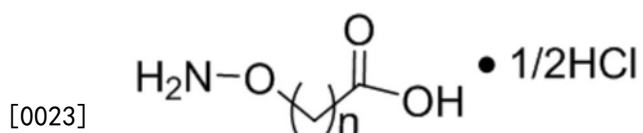
[0019] 优选地,将异细交链孢菌酮酸与具有式(II)所示结构的带羧基的羟胺半盐酸盐以1:1~2的摩尔比加入到甲醇:水为的2~6:1(体积比)混合溶液中,混合均匀后,置于油浴锅中回流加热反应,反应结束后将混合物过硅胶柱纯化,所得产物干燥后置于-20℃避光密封储存,



(II)

[0021] 其中 $n=1\sim6$ 。

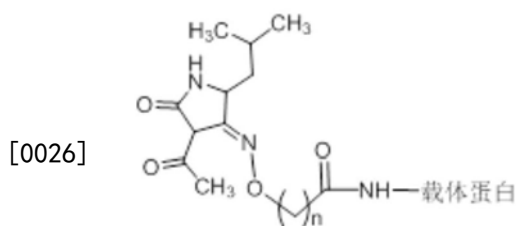
[0022] 最优选地,将异细交链孢菌酮酸与具有式(II)所示结构的带羧基的羟胺半盐酸盐以1:2的摩尔比加入到甲醇:水为的3:1(体积比)混合溶液中,混合均匀后,置于油浴锅中回流加热反应,反应结束后将混合物过硅胶柱纯化,所得产物干燥后置于-20℃避光密封储存,



(II)

[0024] 其中 $n=1\sim6$ 。

[0025] 一种异细交链孢菌酮酸的人工抗原,具有如式(III)所示的结构:



(III)

[0027] 其中 $n=1\sim6$ 。

[0028] 优选地,所述载体蛋白为钥孔血蓝蛋白、牛血清蛋白或卵白蛋白。

[0029] 所述的人工抗原的制备方法,其特征在于,采用活泼酯法将具有式(I)所示结构的异细交链孢菌酮酸半抗原与载体蛋白偶联制备得到。

[0030] 优选地,将具有式(I)所示结构的异细交链孢菌酮酸半抗原溶于适量N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌加入适量N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),4℃下磁力搅拌反应过夜,离心后,取上清液为A液;称取10mg载体蛋白溶于0.01mol/L的PBS中,搅拌溶解制备B液,4℃磁力搅拌下,A液逐滴加入B液中,4℃下反应12h。离心取上清液,4℃下用0.01mol/L的PBS透析3d,每天更换3次透析液,得到目的产物,分装后冻存于-20℃冰箱中。

[0031] 一种利用所述半抗原或所述人工抗原制备的抗体,也属于本发明的保护范围。

[0032] 优选地,所述抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或基因工程抗体中的一种或几种。

[0033] 所述半抗原、所述人工抗原、或所述抗体在检测异细交链孢菌酮酸或制备异细交链孢菌酮酸检测试剂盒中的应用。

[0034] 本发明还要求保护一种异细交链孢菌酮酸的检测方法,包括以下步骤:

[0035] S1.将所述人工抗原包被于酶标板的微孔内,孵育、洗板、封闭、干燥;

[0036] S2.将梯度稀释的异细交链孢菌酮酸标准品或待测样品液加入酶标板微孔内,随后将所述抗体加入微孔内,孵育、洗板;

[0037] S3.将酶标二抗加入酶标板微孔内,孵育、洗板;

[0038] S4.将显色液加入酶标板微孔内,孵育;

[0039] S5.将终止液加入酶标板微孔内,并用酶标仪读数;

[0040] S6.以各标准品浓度孔吸光值与零标准孔吸光值比值为纵坐标,以药物标准液浓度的 $\log_{10}$ 值为横坐标,绘制酶联免疫检测方法的标准曲线,根据建立的标准曲线计算出检测限LOD(10%抑制率的药物浓度, IC_{10})和半数抑制量(50%抑制率的药物浓度, IC_{50}),定量分析样品中异细交链孢菌酮酸含量。

[0041] 抑制率按下式计算:

[0042] 抑制率 (%) = $\left(1 - \frac{B}{B_0}\right) \times 100\%$,

[0043] 其中各标准液浓度孔的吸光值为B,零标准孔的吸光值为 B_0 。

[0044] 优选的,步骤S1中,所述人工抗原偶联的载体蛋白为BSA。

[0045] 优选地,步骤S2中,所述抗体的免疫原偶联的载体蛋白为KLH。

[0046] 优选的,步骤S1中,所述人工抗原的浓度为125ng/mL,步骤S2中,所述抗体的使用

浓度为稀释16000倍。

[0047] 优选的,步骤S4中,所述显色液为S3所述酶标二抗中酶所对应的的底物溶液。

[0048] 优选的,步骤S5中,所述终止液是一定浓度的浓硫酸或氢氧化钠溶液。

[0049] 更优选地,步骤S5中,所述浓硫酸或氢氧化钠溶液为1~4mol/L。

[0050] 进一步更优选地,步骤S5中,所述浓硫酸或氢氧化钠溶液为2mol/L。

[0051] 优选地,所述抗体的制备方法为:0.1mg异细交链孢菌酮酸免疫原(ITeA-CM0-KLH)与100μL的sigma公司商品化免疫佐剂(第1次免疫用弗氏完全佐剂,以后加强免疫均用弗氏不完全佐剂)完全佐剂乳化,采用皮下多点免疫雌性Balb/c小鼠;首次免疫后,进行多次的加强免疫,步骤如下:取0.1mg异细交链孢菌酮酸免疫原(ITeA-CM0-KLH)与100μL的弗氏不完全佐剂乳化,间隔周期为2周,每次加强免疫1周后,尾部取血测定抗血清效价;待效价稳定不变时,再加强一次免疫,1周后采全血,室温静置0.5h,离心后吸取上层析出的血清,于-20℃下保存备用。

[0052] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0053] 本发明的最大创新点是提供了一种直接针对异细交链孢菌酮酸的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法,提供了上述半抗原、人工抗原及抗体在异细交链孢菌酮酸免疫检测技术中的应用,提供一种直接针对异细交链孢菌酮酸的酶联免疫检测方法。该发明克服传统异细交链孢菌酮酸免疫检测技术中抗体仅针对异细交链孢菌酮酸衍生物,不能针对异细交链孢菌酮酸实现直接检测,检测时需要先针对其进行衍生化处理等不足。

[0054] (1)本发明合成一种直接针对异细交链孢菌酮酸的半抗原,通过将半抗原偶联到载体蛋白上,成功制备得到2种人工抗原;(2)将其中一种异细交链孢菌酮酸人工抗原作为免疫原,免疫动物获得直接针对异细交链孢菌酮酸的高特异性抗体,效价为1:128000;(3)建立了一种能够直接检测异细交链孢菌酮酸的酶联免疫分析方法;(4)该方法具有简便快速、特异性强、灵敏度较高的特点,对异细交链孢菌酮酸的检测限为0.3ng/mL,半数抑制浓度为8.3ng/mL,线性范围为0.9~73.1ng/mL。

附图说明

[0055] 图1为异细交链孢菌酮酸半抗原ITeA-CM0 (n=1) 质谱鉴定图。

[0056] 图2为异细交链孢菌酮酸半抗原ITeA-CM0 (n=1) 及人工抗原紫外鉴定图。

[0057] 图3为不同包被原的抑制曲线。

[0058] 图4为包被原浓度和抗体稀释倍数的抑制曲线。

[0059] 图5为以ITeA-CM0 (n=1) 为半抗原制备的抗体对异细交链孢菌酮酸的抑制曲线。

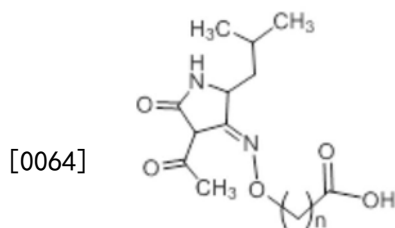
具体实施方式

[0060] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0061] 实施例1异细交链孢菌酮酸半抗原ITeA-CM0 (n=1) 的制备

[0062] 一、实验方法

[0063] 利用ITeA脲化衍生的方法制备如式(I)所示的结构异细交链孢菌酮酸半抗原,



(I)

[0065] 其中 $n=1$ 。

[0066] 将100mg ITeA和120mg羧甲基羟胺半盐酸盐溶于16.0mL溶剂(甲醇:水=3:1)中,混合均匀后,置于油浴锅中65℃回流加热2h。反应结束后将混合物过硅胶柱纯化(氯仿:甲醇=15:1),所得产物干燥后置于-20℃避光密封储存。

[0067] 二、实验结果

[0068] 异细交链孢菌酮酸半抗原ITeA-CM0 ($n=1$) 质谱鉴定图如图1所示,ESI-MS结果 $[M-H]^-$ 269。

[0069] 实施例2异细交链孢菌酮酸人工抗原ITeA-CM0-KLH/BSA ($n=1$) 制备及鉴定

[0070] 免疫原与包被原的制备方法中,不同之处在于所使用的载体蛋白,所述免疫原载体蛋白为钥孔血蓝蛋白(KLH),所述包被原载体蛋白为牛血清蛋白(BSA),所用的偶联方法为有一定修改的活泼酯法。

[0071] 一、实验方法

[0072] 免疫原(ITeA-CM0-KLH)的制备方法:将实施例1中制备合成的2.4mg ITeA-CM0 ($n=1$) 溶于200 μ L的N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌加入3.69mg的N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和2.05mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),4℃下磁力搅拌反应过夜,离心后,取上清液为A液;称取10mg KLH溶于3mL的0.01mol/L的PBS中,搅拌溶解制备B液。4℃磁力搅拌下,A液逐滴加入B液中,4℃下反应12h。离心取上清液,4℃下用0.01mol/L的PBS透析3d,每天更换3次透析液,得到免疫原,分装后冻存于-20℃冰箱中。

[0073] 包被原(ITeA-CM0-BSA, ITeA-CM0-OVA)的制备方法:将实施例1中制备的4.09mg ITeA-CM0 ($n=1$) 溶于200 μ L的N,N-二甲基甲酰胺,搅拌加入6.25mg的N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和3.49mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),4℃下磁力搅拌反应过夜,离心后,取上清液为A液;称取10mg BSA(OVA)溶于3mL的0.01mol/L的PBS中,搅拌溶解制备B液。4℃磁力搅拌下,A液逐滴加入B液中,4℃下反应12h。离心取上清液,4℃下用0.01mol/L的PBS透析3d,每天更换3次透析液,得到包被原,分装后冻存于-20℃冰箱中。

[0074] 二、实验结果

[0075] 对载体蛋白、半抗原ITeA-CM0 ($n=1$) 及其相应的免疫原和包被原进行紫外扫描测定(200~450nm)(图2),发现免疫原和包被原同时具备半抗原和载体蛋白的特征吸收峰,说明免疫抗原和包被抗原偶联成功。

[0076] 实施例3抗体的制备及鉴定

[0077] 一、实验方法

[0078] 将实施例2中制备的0.1mg异细交链孢菌酮酸免疫原(ITeA-CM0-KLH)与100 μ L的免

疫佐剂(第1次免疫用弗氏完全佐剂,以后加强免疫均用弗氏不完全佐剂)完全佐剂乳化,采用皮下多点免疫雌性Ba1b/c小鼠。首次免疫后,进行多次的加强免疫,步骤如下:取0.1mg异细交链孢菌酮酸免疫原与100 μ L的弗氏不完全佐剂乳化,间隔周期为2周。每次加强免疫1周后,尾部取血测定抗血清效价。待效价稳定不变时,选取免疫效果最好的小鼠加强一次免疫,1周后采全血,室温静置0.5h,离心后吸取上层析出的血清,于-20 $^{\circ}$ C下保存备用。采用间接竞争ELISA法测定抗血清效价和抑制率。

[0079] 二、实验结果

[0080] 间接竞争ELISA法测定免疫小鼠抗血清效价为1:128000,抑制率为87.1%。

[0081] 实施例4检测异细交链孢菌酮酸的ELISA方法的建立及反应条件的优化

[0082] 一、ELISA法的建立

[0083] (1) 将一定浓度包被原包被在ELISA酶标板的不同微孔内,经37 $^{\circ}$ C包被过夜后,每孔加入120 μ L 5%脱脂奶粉溶液于37 $^{\circ}$ C封闭3h。甩干孔内液体后,37 $^{\circ}$ C烘1h,备用;

[0084] (2) 将50 μ L梯度浓度的异细交链孢菌酮酸标准液或经前处理的待测样品液加入酶标板的微孔内,向ELISA酶标板的不同微孔内加入50 μ L一定浓度的实施例3制备的抗体血清,37 $^{\circ}$ C孵育一定时间,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤5次,在吸水纸上拍干;

[0085] (3) 向ELISA酶标板的不同微孔内加入100 μ L一定浓度的HRP标记羊抗鼠二抗溶液,37 $^{\circ}$ C温育一定时间,用洗涤液洗涤5次,拍干;

[0086] (4) 向ELISA酶标板的不同微孔内加入100 μ L TMB底物显色溶液,37 $^{\circ}$ C温育10min,加入50 μ L的2mol/L硫酸溶液终止,用酶标仪在波长450nm处测定吸光值,以各标准品浓度孔吸光值与零标准孔吸光值比值为纵坐标,以药物标准液浓度的 $\log_{10}$ 值为横坐标,绘制标准曲线图。

[0087] 酶联免疫分析方法中包被原种类、包被原浓度和抗体稀释倍数对方法的灵敏度有着很大影响,选择以下条件进行参数优化。

[0088] 二、包被原种类

[0089] 1、实验方法

[0090] 分别以ITeA-CMO-BSA和ITeA-CMO-OVA作为包被原,按照上文的方法检测吸光值(Abs_{450nm}),作竞争抑制曲线,比较 Abs_{450nm}/IC_{50} 、 IC_{50} 及 Abs_{450nm} 的大小。

[0091] 2、实验结果

[0092] 结果如图3所示,确定最优包被原为ITeA-CMO-BSA。

[0093] 三、包被原浓度和抗体稀释倍数

[0094] 1、实验方法

[0095] 通过棋盘滴定法优化包被原浓度和多克隆抗体稀释倍数,设定包被原浓度(1000、500、250、125、62.5ng/mL)及驼源抗体稀释倍数(8000、16000、32000、64000、128000倍),按照上文的方法检测吸光值(Abs_{450nm}),作竞争抑制曲线,比较 Abs_{450nm}/IC_{50} 、 IC_{50} 及 Abs_{450nm} 大小。

[0096] 2、实验结果

[0097] 结果如图4所示,最优包被原浓度和抗体稀释倍数为125ng/mL-16000倍。

[0098] 四、一种检测异细交链孢菌酮酸的ELISA方法

[0099] (1) 将125ng/mL的包被原ITeA-CMO-BSA包被在ELISA酶标板的不同微孔内,经37 $^{\circ}$ C

包被过夜后,每孔加入120 μ L 5%脱脂奶粉溶液于37 $^{\circ}$ C封闭3h。甩干孔内液体后,37 $^{\circ}$ C烘1h,备用;

[0100] (2) 将50 μ L梯度浓度的异细交链孢菌酮酸标准液或经前处理的待测样品液加入酶标板的微孔内,向ELISA酶标板的不同微孔内加入50 μ L的稀释16000倍的实施例3制备的抗体血清,37 $^{\circ}$ C孵育一定时间,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤5次,在吸水纸上拍干;

[0101] (3) 向ELISA酶标板的不同微孔内加入100 μ L一定浓度的HRP标记羊抗鼠二抗溶液,37 $^{\circ}$ C温育一定时间,用洗涤液洗涤5次,拍干;

[0102] (4) 向ELISA酶标板的不同微孔内加入100 μ L TMB底物显色溶液,37 $^{\circ}$ C温育10min,加入50 μ L的2mol/L硫酸溶液终止,用酶标仪在波长450nm处测定吸光值,以各标准品浓度孔吸光值与零标准孔吸光值比值为纵坐标,以药物标准液浓度的 $\log_{10}$ 值为横坐标,绘制标准曲线图。

[0103] 以ITeA-CM0 (n=1) 为半抗原制备的抗体对异细交链孢菌酮酸的抑制曲线如图5所示。

[0104] 实施例5抗体的特异性及ELISA方法灵敏度分析

[0105] 一、实验方法

[0106] 按照实施例4的方法绘制酶联免疫分析 (ELISA) 标准曲线;将ITeA-CM0-BSA作为包被原,将125ng/mL的包被原包被在ELISA酶标板的不同微孔内,孵育、洗板、封闭、干燥;将50 μ L梯度浓度的异细交链孢菌酮酸标准品和50 μ L的稀释16000倍的实施例3制备的抗体血清加入到包被好的ELISA酶标板中,37 $^{\circ}$ C下温育40min,洗板5次,加100 μ L HRP酶标记的羊抗鼠,37 $^{\circ}$ C下温育40min,洗板5次,加100 μ L TMB溶液37 $^{\circ}$ C显色10min,10%硫酸终止显色反应,酶标仪测定450nm处吸光值。以各吸光值为纵坐标,相应标准品浓度对数值为横坐标,应用Origin 8.5软件四参数对数函数进行曲线拟合。将异细交链孢菌酮酸的几种类似物进行梯度稀释,然后与抗血清进行反应,制作标准曲线。通过曲线分别计算出各类似物的 IC_{50} ,计算建立的免疫检测方法对异细交链孢菌酮酸类似物的交叉反应率:

[0107] 交叉反应率= $IC_{50}(\text{ITeA}) / IC_{50}(\text{类似物}) \times 100\%$ 。

[0108] 曲线拟合为 $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$,

[0109] 其中,A和D分别代表异细交链孢菌酮酸标准品浓度最小和最大时的吸光值,C为中点浓度;当标准品浓度等于C时的吸光值值为 $(A+D) / 2$,正处于曲线的拐点处,半数抑制量浓度为 IC_{50} ,B表示曲线的陡峭程度,称斜率因子;以 IC_{10} 为检测限,以 $IC_{20} \sim IC_{80}$ 为检测范围。以梯度异细交链孢菌酮酸溶液为标准品,建立ELISA的标准曲线。

[0110] 二、实验结果

[0111] 结果分析可知,本发明建立的残留检测方法对异细交链孢菌酮酸的 IC_{50} 为8.3ng/mL,检测限为0.3ng/mL,在0.9~73.1ng/mL的范围内,抑制率与异细交链孢菌酮酸浓度的对数值成显著的S型曲线关系,相关系数 R^2 为0.9986。因此,该方法可以直接检测食品中异细交链孢菌酮酸的含量,且具有高灵敏度和高特异性的优点。本发明建立的检测方法对异细交链孢菌酮酸类似物的交叉反应率见表1。

[0112] 表1 本发明建立的检测方法对异细交链孢菌酮酸类似物的交叉反应率:

	竞争药物	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率
[0113]	异细交链孢菌酮酸	8.3	100%
	细交链孢菌酮酸	>1000	< 1%
	链格孢酚	>1000	< 1%
	链格孢酚甲醚	>1000	< 1%

[0114] 实施例6一种ELISA法直接检测待测样品中异细交链孢菌酮酸的方法

[0115] (1) 将125ng/mL ITeA-CMO-BSA包被在ELISA酶标板的不同微孔内,经37℃包被过夜后,每孔加入120μL 5%脱脂奶粉溶液于37℃封闭3h。甩干孔内液体后,37℃烘1h,备用;

[0116] (2) 将50μL梯度浓度(0、0.244141、0.976563、0.976563、15.625、62.5、250、1000ng/mL)异细交链孢菌酮酸标准液或经前处理的待测样品液加入酶标板的微孔内,向ELISA酶标板的不同微孔内加入50μL 1:16000稀释的抗血清,37℃孵育40min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤5次,在吸水纸上拍干;

[0117] (3) 向ELISA酶标板的不同微孔内加入100μL 1:5000稀释的HRP标记羊抗鼠二抗溶液,37℃温育30min,用洗涤液洗涤5次,拍干;

[0118] (4) 向ELISA酶标板的不同微孔内加入100μL TMB底物显色溶液,37℃温育10min,加入50μL的2mol/L硫酸溶液终止,用酶标仪在波长450nm处测定吸光值,以各标准品浓度孔吸光值与零标准孔吸光值比值为纵坐标,以药物标准液浓度的log10值为横坐标,绘制标准曲线图。

[0119] (5) 根据标准曲线和待测样品的吸光值,可计算出待测样品中异细交链孢菌酮酸的含量。

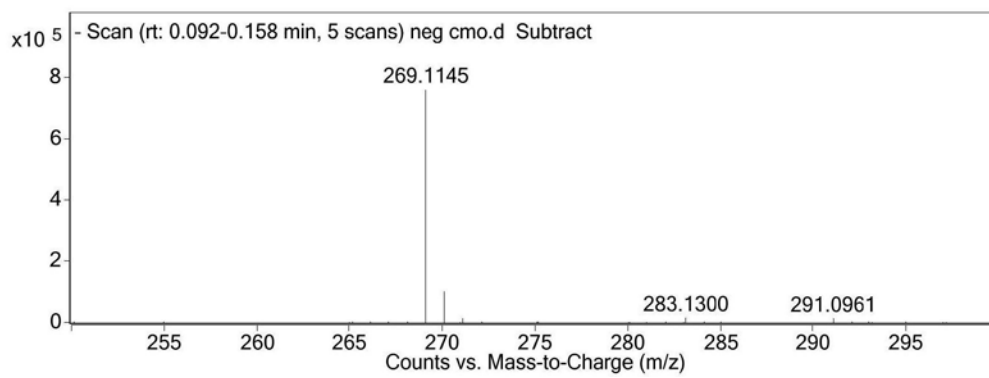


图1

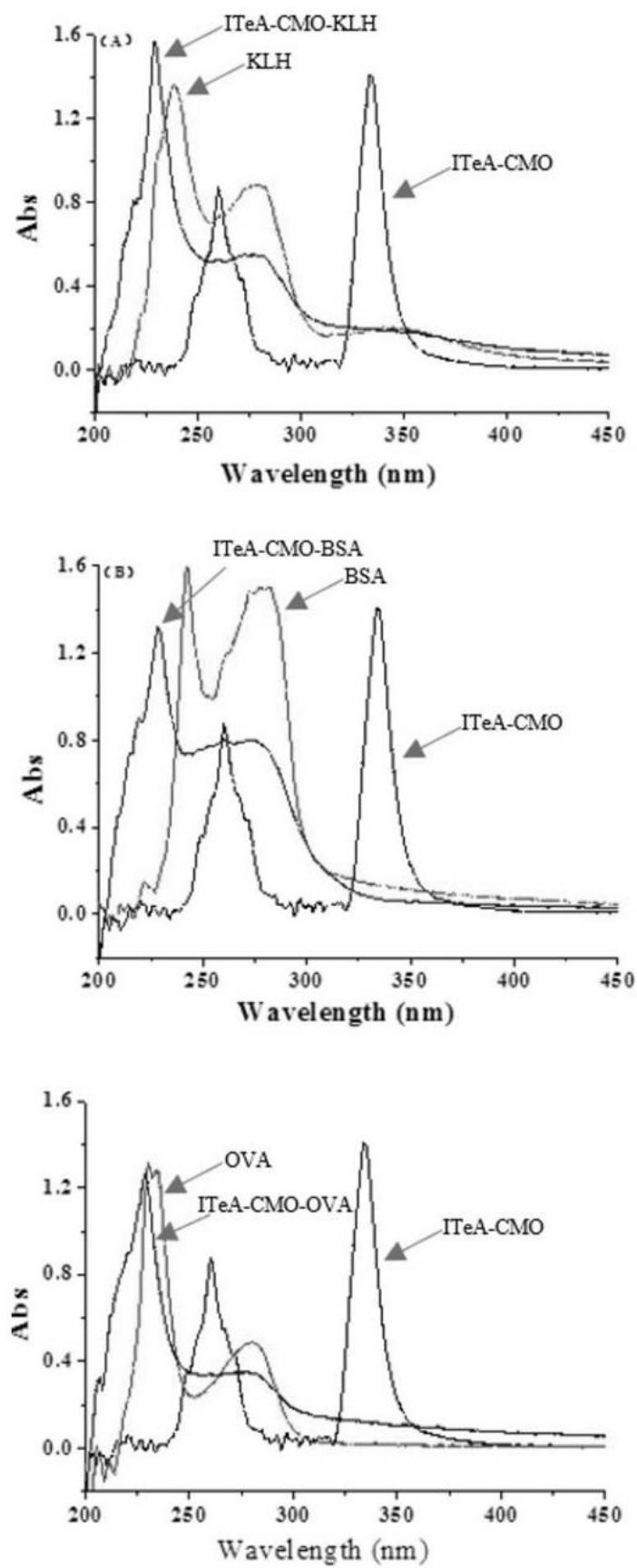


图2

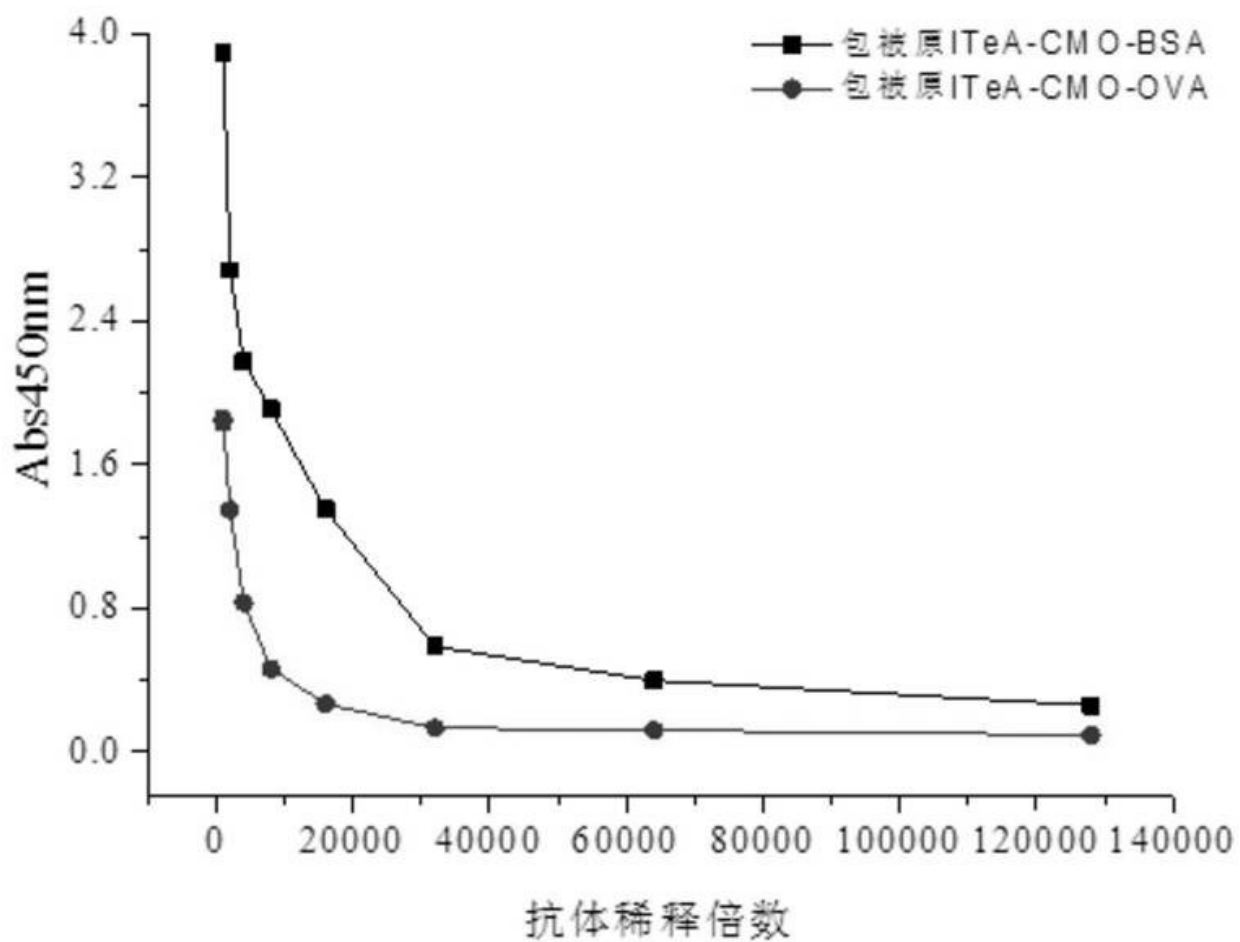


图3

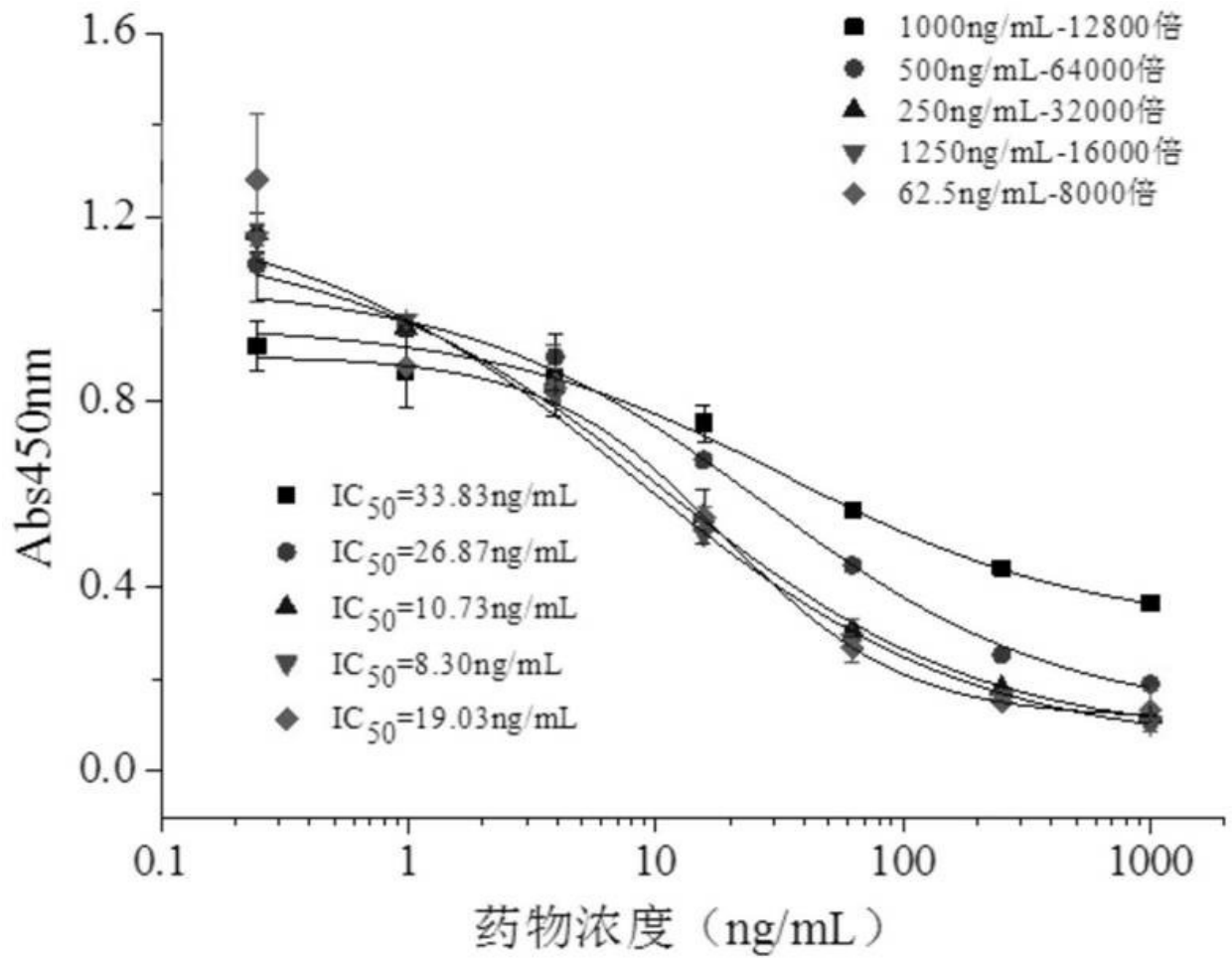


图4

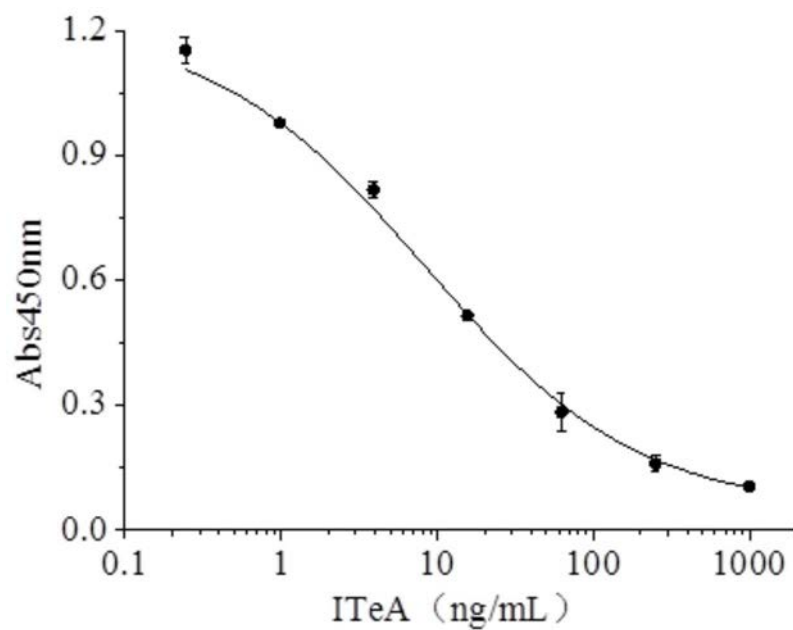


图5