



(21)申请号 201911103229.7

(22)申请日 2019.11.12

(71)申请人 沭阳康源泰博生物科技有限公司

地址 223600 江苏省宿迁市沭阳县南湖街道学院路高创园3楼沭阳康源泰博生物科技有限公司

(72)发明人 张波 刘向阳 雷达 孙晓帅
卢洪洋

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,该试剂盒以免疫磁珠为固相载体,经过化学反应,使免疫磁珠上偶联有黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮单克隆抗体和赭曲霉毒素单克隆载体。本发明对样品中的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素具有较高的特异性,避免了漏检的现象;同时简化了样品的前处理步骤,减少有机溶剂的使用,因而能够提高检测的回收率、准确性和灵敏度。

1. 一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,其以免疫磁珠为固相载体,经过化学反应活化,活化后磁珠与黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮抗体、赭曲霉毒素抗体偶联,制得能够对黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素实现快速富集和纯化的样本前处理试剂盒。

2. 根据权利要求1所述的一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,其特征在于每个免疫磁珠净化试剂盒中所含抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体、抗赭曲霉毒素单克隆抗体分别为:0.4mg-1mg、0.5mg-1.5mg和0.5-2.0mg。

3. 根据权利要求1所述的一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,其特征在于所述的免疫磁珠浓度为4-60mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,其特征在于使用具体步骤以下:

将偶联有黄曲霉毒素抗体、玉米赤霉烯酮抗体、赭曲霉毒素抗体的免疫磁珠恢复至室温,缓慢旋转混匀,将预先处理的样本溶液放入试管中,后将免疫磁珠转移至该试管中,充分旋转重悬,室温下旋转捕获15min,以实现最大程度地捕获样本中的玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素,利用磁架进行磁分离,缓慢弃去上清液;将已捕获过样本的免疫磁珠利用清洗液清洗数次,轻摇重悬磁分离;已实现黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素的样本富集净化;

将上述得到的免疫磁珠洗脱液进行洗脱,室温震荡几秒钟,磁分离,上清液即为待测的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素样本,可用于后续测定。

一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于一种食品安全检测分析领域,具体涉及一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒。

背景技术

[0002] 免疫磁珠是免疫学和磁性载体技术结合而成的纳米级材料,其表面为带有氨基、羧基、羟基或巯基等化学官能团的磁珠。包被抗体的免疫磁珠作为固相载体,其表面的抗体与相应抗原发生特异性结合形成抗原-抗体-磁珠复合物,这种复合物在磁场作用下,迅速向磁场移动,使复合物与其他物质分离,达到分离目的。

[0003] 在粮食、饲料等农产品的生产、加工、运输等过程中,受到温度、湿度等影响,为毒素的生产繁殖提供了有力的契机,我国每年有大量农作物因真菌毒素污染严重而失去使用价值,黄曲霉毒素是一类结构类似的化合物,主要是由黄曲霉菌和寄生曲霉产生的次级代谢产物。黄曲霉毒素被世界卫生组织划定为I类致癌物,以黄曲霉毒素B1毒性最强,其毒性是砒霜的68倍。黄曲霉毒素能对人及动物的肝脏组织产生破坏作用,严重时可导致肝癌甚至死亡。赭曲霉毒素是曲霉毒素和青霉素的真菌形成的次级代谢产物。研究表明摄入了被这种毒素污染的农产品后,会发生急性或慢性中毒症,能对人及动物的肝脏组织产生破坏作用,严重时可导致肝癌甚至死亡。因而防止污染黄曲霉毒素玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素的食品和饲料直接或间接地进入人类食物链,加强对黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素的检测十分重要。

发明内容

[0004] 本发明目的是为了提供一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,用于样本中黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素的复合富集和净化,以解决当前样品净化分离操作复杂、分离效率低的等技术问题。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,其以免疫磁珠为载体,经过化学反应活化,使得磁珠表面带有亲和配基,活化后磁珠与黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮抗体和赭曲霉毒素抗体偶联,制得能够对黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素实现快速富集和纯化的样本前处理试剂盒,以便后续HPLC或酶联免疫吸附法的测量。

[0006] 优选地,所述试剂盒的具体步骤如下:将偶联有黄曲霉毒素B1抗体、玉米赤霉烯酮抗体、赭曲霉毒素抗体的免疫磁珠从冰箱中取出恢复至室温,旋转混匀,将预先处理的样本溶液放入试管中,后将免疫磁珠转移至试管中,充分旋转重悬,室温下旋转捕获20min,以实现最大程度地捕获样本中的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素,利用磁架进行磁分离,缓慢弃去上清液;将已捕获过样本的免疫磁珠利用清洗液清洗数次,轻摇重悬磁分离;已实现黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的样本富集净化;将上述得到的免疫

磁珠洗脱液进行洗脱,室温震荡几秒钟,磁分离,上清液即为待测的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素样本,可用于后续的HPLC测定。

[0007] 优选地,每个免疫磁珠净化试剂盒中所含抗黄曲霉毒素B1抗体、抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体、抗赭曲霉毒素单克隆抗体分别为:0.4mg-1mg、0.5mg-1.5mg和0.5-2.0mg。

[0008] 优选地,免疫磁珠浓度为4-60mg/mL。

[0009] 一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,具体制备方法为:

(1) 抗体预处理:将已纯化好的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体及抗赭曲霉毒素抗体置于pH6.5 50mmol/L缓冲液透析过夜12h;

(2) 活化:取一定量的磁珠于离心管中,超声分散重悬混匀,分别加入配制的EDC和NHS,在室温下放置于血液混匀仪进行活化反应2h,使溶液一直保持着悬浮混匀状态;

(3) 偶联:用磁架进行磁分离,缓慢倒出上清液,同上PBS缓冲液洗涤三次,混匀仪上重悬。将已预处理好的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、抗玉米赤霉烯酮抗体及抗赭曲霉毒素抗体加入到已活化好的的免疫磁珠中,室温下反应过夜,放置于混匀仪上旋转保持悬浮状态;

(4) 封闭:用磁架进行磁分离,倒出上清液,加入40μL的乙醇胺溶液和BSA封闭液,37℃封闭2h,保持悬浮状态;

(5) 保存:用PBS清洗免疫磁珠3次,磁分离,弃上清液,于4℃保存于免疫磁珠保存液中。

[0010] 与现有技术相比,其有益效果为:

本发明利用免疫磁珠分离技术,可避免免疫亲和柱法、有机溶剂萃取法等提取时需要使用大量有机溶剂的缺点,且不需要多加纯化步骤去除杂质,可直接对毒素分离纯化,操作简便,便于实现自动化。

[0011] 本发明可在短时间迅速、有选择地分离内将样品中的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的富集与纯化,磁珠上偶联的抗体可准确识别黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的特征基团,从而减少漏检,具有高分离性、高特异性、高稳定性的特点,有效地减少了背景物质的干扰,提高了检测的准确性和精准性。

具体实施方式

[0012] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围,本发明具体实施方式如下。

[0013] 实施例1一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒,其以免疫磁珠为载体,经过化学反应活化,使得磁珠表面带有亲和配基,活化后磁珠与黄曲霉毒素B1抗体、玉米赤霉烯酮抗体和赭曲霉毒素抗体偶联,制得能够对黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素实现快速富集和纯化的样本前处理试剂盒,以便后续HPLC或酶联免疫吸附法的测量。

[0014] 试剂盒的使用具体步骤为将偶联有黄曲霉毒素B1抗体、玉米赤霉烯酮抗体、赭曲霉毒素抗体的免疫磁珠从冰箱中取出恢复至室温,旋转混匀,将预先处理的样本溶液放入试管中,后将免疫磁珠转移至试管中,充分旋转重悬,室温下旋转捕获20min,以实现最大程度地捕获样本中的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素,利用磁架进行磁分离,缓慢弃去上清液;将已捕获过样本的免疫磁珠利用清洗液清洗数次,轻摇重悬磁分离;已实现黄

曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的样本富集净化；将上述得到的免疫磁珠洗脱液进行洗脱，室温震荡几秒钟，磁分离，上清液即为待测的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素样本，可用于后续的HPLC测定。

[0015] 实施例2本发明提供一种黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的复合前处理试剂盒的具体制备方法为：(1)抗体预处理：将已纯化好的抗黄曲霉毒素B1抗体、抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体及抗赭曲霉毒素抗体置于pH6.5 50mmol/L缓冲液透析过夜12h；(2)活化：取一定量的磁珠于离心管中，超声分散重悬混匀，分别加入配制的EDC和NHS，在室温下放置于血液混匀仪进行活化反应2h，使溶液一直保持着悬浮混匀状态；(3)偶联：用磁架进行磁分离，缓慢倒出上清液，同上PBS缓冲液洗涤三次，混匀仪上重悬。将已预处理好的抗黄曲霉毒素B1抗体、抗玉米赤霉烯酮抗体及抗赭曲霉毒素抗体加入到已活化好的的免疫磁珠中，室温下反应过夜，放置于混匀仪上旋转保持悬浮状态；(4)封闭：用磁架进行磁分离，倒出上清液，加入40μL的乙醇胺溶液和BSA封闭液，37℃封闭2h，保持悬浮状态；(5)保存：用PBS清洗免疫磁珠3次，磁分离，弃上清液，于4℃保存于免疫磁珠保存液中；

实施例3 实际样品的检测

1、称取10.0 g的玉米样品与100mL甲醇-水溶液(7:3)混合，加入一定的样品稀释液，放于震荡器震荡10分钟，离心取上清液，上清液放入样本仓中；

2、将免疫磁珠试剂盒加入样品稀释液中，充分混匀后于37℃孵育30分钟，作用完毕后，置于磁力架上捕获磁珠，除去上清液，用缓冲液清洗3次，清洗结束后以无水甲醇洗脱出免疫磁珠上的玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素，所得样品即为富集纯化后的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素，留待用ELISA、HPLC对黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素进行含量检测，本发明可在短时间迅速、有选择地分离内将样品中的黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素的富集与纯化，避免了大量使用有机溶剂，有效地减少了背景物质的干扰，提高了检测的准确性和精准性，利用免疫磁珠分离技术，操作简便，便于实现自动化，不需要大型仪器和特殊培训的专业人员。

[0016] 以上的实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解对专利范围的限制，应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都是属于本发明的保护范围。