



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104181294 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 03

(21) 申请号 201310626655. 5

(22) 申请日 2013. 12. 02

(71) 申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路 1 号

(72) 发明人 李朝睿 张弦 邱景富

(51) Int. Cl.

G01N 33/551 (2006. 01)

G01N 27/327 (2006. 01)

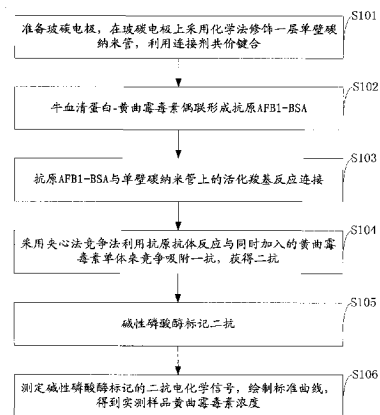
权利要求书1页 说明书3页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测超低含量黄曲霉毒素的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测超低含量黄曲霉毒素的方法,该方法包括以下步骤:准备玻碳电极,在玻碳电极上采用化学法修饰一层单壁碳纳米管,利用连接剂共价键合;牛血清蛋白-黄曲霉毒素偶联形成抗原AFB1-BSA;抗原AFB1-BSA与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接;采用夹心法竞争法利用抗原抗体反应与同时加入的黄曲霉毒素单体来竞争吸附一抗,获得二抗;碱性磷酸酶标记二抗;测定碱性磷酸酶标记的二抗电化学信号,绘制标准曲线,得到实测样品黄曲霉毒素浓度。本发明提供的检测超低含量黄曲霉毒素的方法操作简单、选择性高、特异性高,能简单快速的检测含量黄曲霉毒素,所需设备简易,成本低,具有极大的实际使用价值和良好的发展空间。



1. 一种检测超低含量黄曲霉毒素的方法,其特征在于,该检测超低含量黄曲霉毒素的方法包括以下步骤:

准备玻碳电极,在玻碳电极上采用化学法修饰一层单壁碳纳米管,利用连接剂共价键合;

牛血清蛋白-黄曲霉毒素偶联形成抗原 AFB1-BSA;

抗原 AFB1-BSA 与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接;

采用夹心法竞争法利用抗原抗体反应与同时加入的黄曲霉毒素单体来竞争吸附一抗,获得二抗;

碱性磷酸酶标记二抗;

测定碱性磷酸酶标记的二抗电化学信号,绘制标准曲线,得到实测样品黄曲霉毒素浓度。

2. 如权利要求 1 所述的检测超低含量黄曲霉毒素的方法,其特征在于,利用连接剂共价键合的方法为:利用 3- 二甲基氨基丙基亚胺 /N- 羟基琥珀酰亚胺连接剂共价键合法。

3. 如权利要求 1 所述的检测超低含量黄曲霉毒素的方法,其特征在于,抗原 AFB1-BSA 与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接的方法为:

抗原 AFB1-BSA 通过蛋白质氨基端与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接。

4. 如权利要求 1 所述的检测超低含量黄曲霉毒素的方法,其特征在于,标记二抗的碱性磷酸酶 (EC3. 1. 3. 1) 可采用:戊二醛交联标记法。

一种检测超低含量黄曲霉毒素的方法

技术领域

[0001] 本发明属于黄曲霉毒素检测领域,尤其涉及一种检测超低含量黄曲霉毒素的方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素 (aflatoxin, AFT) 主要是由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 等真菌产生的次生代谢产物。黄曲霉毒素分为 B1, B2, G1, G2 以及 M1, M2 几个亚型,其中 AFB1 被国际癌症研究机构列为 I 级致癌剂,毒性最大,是氰化钾的 10 倍,砒霜的 68 倍,低剂量长期摄入或大剂量一次暴露均可引发多种动物肝脏发生癌变或急性中毒。低剂量长期摄入或大剂量一次暴露均可引发多种动物肝脏发生癌变或急性中毒。

[0003] AFB1 的理化性质非常稳定,在高温 268 ~ 269 °C 时才分解,高压 0.103MPa(120°C)4h 处理毒性才降低一半,分子质量为 312.06u。AFB1 可以通过食物链富集到人体,危害人体健康,因而世界各国都将 AFB1 作为强制性监控指标。

[0004] 目前黄曲霉毒素的检测方法主要有:

[0005] I、生物鉴定法(利用黄曲霉毒素能影响微生物、水生动物、家禽等生物体的细胞代谢来鉴定黄曲霉毒素的存在。该方法专一性差、灵敏度低,一般只作为化学分析法的佐证,其特点是待检样品不需很纯,主要用于定性);

[0006] II、化学分析法(最常用的为薄层层析法(TLC),主要是半定量);

[0007] III、仪器分析法(高效液相色谱法(HPLC)和毛细管电泳技术,具有自动化、高分离效能、高检测效能,缺点是需要昂贵的仪器设备,操作复杂);

[0008] IV、免疫分析法(放射免疫法、亲和层析法、酶联免疫法和免疫胶体金技术,具有操作简单、高选择、高特异性等特点,是较成熟的快速诊断方法,但是有时检测灵敏度不十分理想。

发明内容

[0009] 本发明实施例的目的在于提供一种检测超低含量黄曲霉毒素的方法,旨在解决目前检测黄曲霉毒素的方法灵敏度不高、检测范围比较窄的问题。

[0010] 本发明实施例是这样实现的,一种检测超低含量黄曲霉毒素的方法,该方法包括以下步骤:

[0011] 准备玻碳电极,在玻碳电极上采用化学法修饰一层单壁碳纳米管,利用连接剂共价键合;

[0012] 牛血清蛋白-黄曲霉毒素偶联形成抗原 AFB1-BSA;

[0013] 抗原 AFB1-BSA 与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接;

[0014] 采用夹心法竞争法利用抗原抗体反应与同时加入的黄曲霉毒素单体来竞争吸附一抗,获得二抗;

[0015] 碱性磷酸酶标记二抗；

[0016] 测定碱性磷酸酶标记的二抗电化学信号，绘制标准曲线，得到实测样品黄曲霉毒素浓度。

[0017] 进一步，利用连接剂共价键合的方法为：利用 3- 二甲基氨基丙基亚胺 (EDC)/N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 连接剂共价键合法。

[0018] 进一步，抗原 AFB1-BSA 与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接的方法为：

[0019] 抗原 AFB1-BSA 通过蛋白质氨基端与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接。

[0020] 进一步，标记二抗的碱性磷酸酶可采用 (EC3. 1. 3. 1)：戊二醛交联标记法

[0021] 本发明提供的检测超低含量黄曲霉毒素的方法操作简单、选择性高、特异性高，能简单快速的检测含量黄曲霉毒素，所需设备简易，成本低，具有极大的实际使用价值和良好的发展空间。

附图说明

[0022] 图 1 是本发明实施例提供的检测超低含量黄曲霉毒素的方法流程图。

[0023] 图 2 是本发明实施例提供的检测超低含量黄曲霉毒素的化学反应过程示意图；

[0024] 图 3 是本发明实施例提供的黄曲霉毒素 B1 含量测定标准曲线示意图。

具体实施方式

[0025] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0026] 图 1 示出了本发明提供的检测超低含量黄曲霉毒素的方法的流程。为了便于说明，仅仅示出了与本发明相关的部分。

[0027] 如图 1 所示，本发明的实施例提供的检测超低含量黄曲霉毒素的方法包括以下步骤：

[0028] 准备玻碳电极，在玻碳电极上采用化学法修饰一层单壁碳纳米管，利用连接剂共价键合；

[0029] 牛血清蛋白 - 黄曲霉毒素偶联形成抗原 AFB1-BSA；

[0030] 抗原 AFB1-BSA 与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接；

[0031] 采用夹心法竞争法利用抗原抗体反应与同时加入的黄曲霉毒素单体来竞争吸附一抗，获得二抗；

[0032] 碱性磷酸酶标记二抗；

[0033] 测定碱性磷酸酶标记的二抗电化学信号，绘制标准曲线，得到实测样品黄曲霉毒素浓度。

[0034] 作为本发明实施例的一优化方案，利用连接剂共价键合的方法为：利用 3- 二甲基氨基丙基亚胺 (EDC)/N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 连接剂共价键合法。

[0035] 作为本发明实施例的一优化方案，抗原 AFB1-BSA 与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接的方法为：

[0036] 抗原 AFB1-BSA 通过蛋白质氨基端与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接。

[0037] 作为本发明实施例的一优化方案,标记二抗的碱性磷酸酶可采用:戊二醛交联标记法。

[0038] 表 1 花生加标回收率测定

[0039]

样品编号	加入量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定量* ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)
1	0.5	0.54 \pm 0.16	108.0
2	5	4.53 \pm 0.72	90.6
3	25	23.44 \pm 4.53	93.8
4	80	76.25 \pm 3.64	95.3
5	320	350.45 \pm 15.98	109.4

[0040] * 数据为 3 次实测平均

[0041] 下面结合附图及具体实施例对本发明的应用原理作进一步描述。

[0042] 使用玻碳电极,并在电极上通过化学法修饰一层单壁碳纳米管,及利用 3- 二甲基氨基丙基亚胺 (EDC)/N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 连接剂共价键合。利用单壁碳纳米管的导电特性,使得修饰后的玻碳电极能够检测超低含量黄曲霉毒素。牛血清蛋白 - 黄曲霉毒素偶联形成的抗原 (AFB1-BSA) 通过蛋白质氨基端与单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接,并通过抗原抗体反应与同时加入的黄曲霉毒素单体来竞争吸附一抗 (夹心法竞争法),再加入并测定碱性磷酸酶标记的二抗电化学信号绘制标准曲线和得到实测样品黄曲霉毒素浓度。此法同时优化 AFB1-BSA、一抗、二抗等浓度本发明检测限可以达到 5pg/ml,同时标准曲线可以从 10pg/ml 到 100ng/ml,与以前的方法相比具有检出限低,检测浓度范围广的特点。

[0043] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

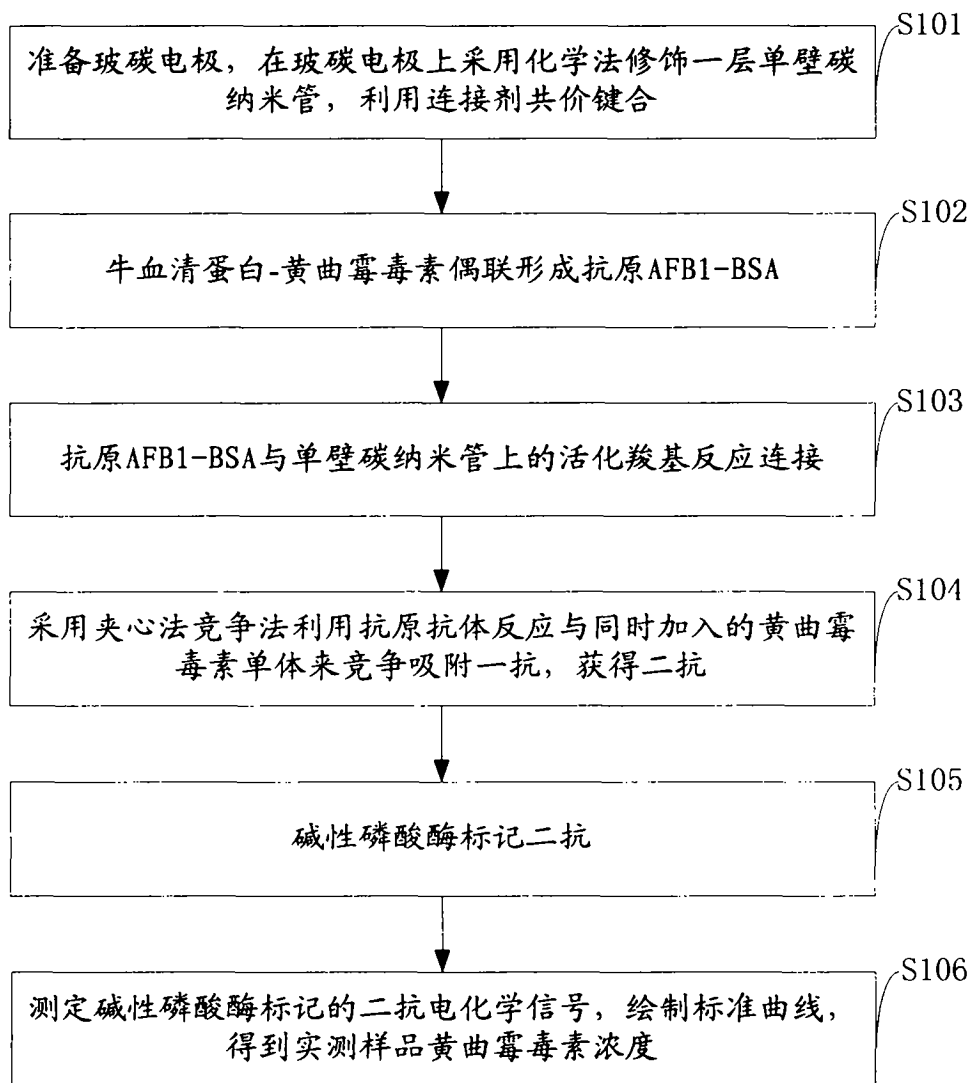


图 1

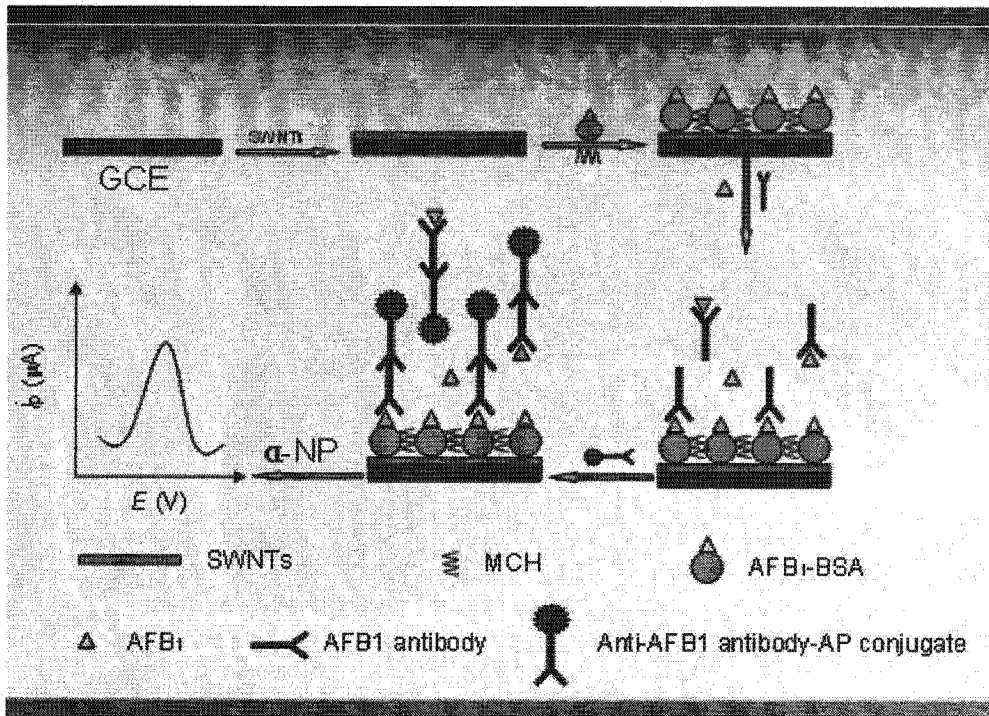


图 2

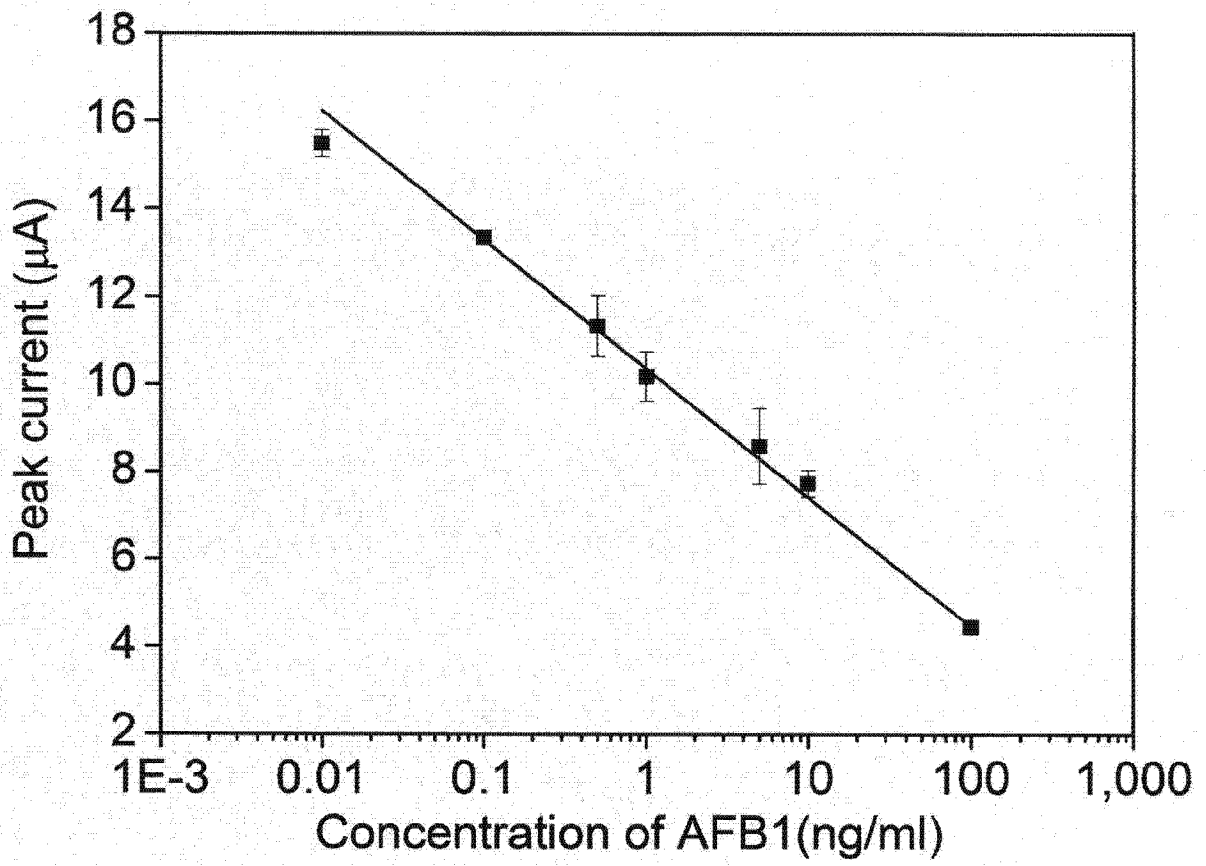


图 3