

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680053201.1

[51] Int. Cl.

G01N 21/77 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 3 月 11 日

[11] 公开号 CN 101384896A

[22] 申请日 2006.12.13

[21] 申请号 200680053201.1

[30] 优先权

[32] 2005.12.23 [33] DE [31] 102005062377.8

[86] 国际申请 PCT/EP2006/012000 2006.12.13

[87] 国际公布 WO2007/079893 德 2007.7.19

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.21

[71] 申请人 拜尔技术服务有限责任公司

地址 德国莱沃库森

共同申请人 拜尔农作物科学股份公司

[72] 发明人 J·伯梅斯特 I·多恩 U·拉比

I·豪瑟-哈恩

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 林 森

权利要求书 3 页 说明书 15 页

[54] 发明名称

用于检测真菌毒素的设备和方法

[57] 摘要

本发明涉及用于检测真菌毒素的设备和方法并涉及适于实施所述方法的试剂盒。

1. 用于快速检测真菌毒素的方法，其包括以下步骤：

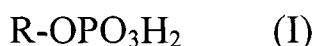
a) 提供薄膜波导，其包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a)，其中(b)具有比(a)低的折射率，特异性和/或亲和性结合配偶体作为真菌毒素和/或结合配偶体的化学或生化识别元件以空间分离的方式固定在该薄膜波导上，

b) 将含一种或多种真菌毒素的样品和结合配偶体施加于所述薄膜波导上固定的结合配偶体上，

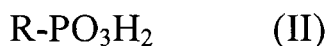
c) 检测由于固定在薄膜波导上的结合配偶体与来自样品的真菌毒素和/或与结合配偶体的相互作用产生的消逝场中的信号，

d) 确定样品中存在的一种或多种真菌毒素的量。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于将单或多层下式 (I) 的有机磷酸



和/或下式 (II)的有机磷酸



和/或它们的盐施加到所述薄膜波导，其中

R 是 C_{10} 至 C_{24} 烷基。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于使用有机磷酸、有机磷酸、有机磷酸盐和/或有机磷酸盐，其中 R 选自包括无支链的 C_{10} 至 C_{20} 烷基的组，优选选自包括无支链的 C_{12} 至 C_{18} 烷基的组，有机磷酸、有机磷酸、有机磷酸盐和/或有机磷酸盐优选选自包括十二烷基磷酸、十二烷基磷酸盐、十八烷基磷酸盐和/或十八烷基磷酸的组。

4. 如前述权利要求之一所述的方法，其特征在于使用包括光透明波导层(a)的薄膜波导，该薄膜波导包括氧化物，所述氧化物选自包括 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 和/或 ZrO_2 的组，优选选自包括 TiO_2 、 Ta_2O_5 和/或 Nb_2O_5 的组。

5. 如前述权利要求之一所述的方法，其特征在于所述所述结合配偶体选自包括抗真菌毒素抗体、抗真菌毒素抗体缀合物、真菌毒素、真菌毒素缀合物、抗真菌毒素抗体片段、真菌毒素结合肽、真菌毒素结合性抗运载蛋白、真菌毒素结合性适体、真菌毒素结合性适配子和/或真菌毒素结合性印迹聚合物的组，优选选自包括抗真菌毒素抗体、抗真菌毒

素抗体缀合物、真菌毒素和/或真菌毒素缀合物的组。

6. 如前述权利要求之一所述的方法, 其特征在于所述标记元件, 优选是荧光团, 通过蛋白质, 优选通过牛血清白蛋白, 与真菌毒素结合。

7. 如前述权利要求之一所述的方法, 其特征在于所述样品是人或动物的食品, 其优选选自包括谷类、酒、果汁、水果和/或含谷类、酒、果汁和/或水果的产品、或用溶剂或溶剂混合物提取的所述食品或产品的提取物的组。

8. 如前述权利要求之一所述的方法, 其特征在于, 在检测信号前, 样品与作为化学或生化识别元件的固定结合配偶体和/或结合配偶体一起温育小于 15 分钟, 优选小于 10 分钟。

9. 如前述权利要求之一所述的方法, 其特征在于, 所述真菌毒素选自包括黄曲霉毒素、赭曲毒素、麦角生物碱、棒曲霉素和/或镰刀霉毒素的组, 例如选自包括脱氧瓜萎镰菌醇、瓜萎镰菌醇、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素、HT-2 毒素和/或伏马菌素的组, 优选选自包括赭曲毒素 A、脱氧瓜萎镰菌醇、瓜萎镰菌醇、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素、HT-2 毒素、伏马菌素 B1、伏马菌素 B2 和/或伏马菌素 B3 的组。

10. 如前述权利要求之一所述的方法, 其特征在于在谷类提取物中检测甚至为 0.1 pM 至 100 nM 真菌毒素、优选 1 pM 至 1 nM 真菌毒素的真菌毒素。

11. 如前述权利要求之一所述的方法, 其特征在于通过免疫测试、优选竞争性免疫测试、尤其优选间接竞争性免疫测试, 实施检测。

12. 用于实施快速检测真菌毒素的方法的设备, 其特征在于, 该设备含有薄膜波导, 该薄膜波导包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a), 其中(b)具有比(a)低的折射率。

13. 如权利要求 12 所述的设备, 其特征在于, 所述薄膜波导的光透明层(b)由诸如玻璃或石英的硅酸盐或由透明塑料制成, 所述透明塑料优选选自包括聚碳酸酯、聚酰亚胺、聚甲基丙烯酸酯、聚苯乙烯、环状聚烯烃和/或环状聚烯烃共聚物的组, 更优选由环状聚烯烃制成, 该薄膜波导包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a), 其中(b)具有比(a)低的折射率。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的设备, 其特征在于, 所述光透明波导层(a) 具有 40 nm 至 1000 nm 的厚度, 优选 40 nm 至 300 nm, 更优

选 80 nm 至 200 nm。

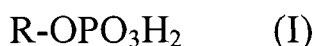
15. 如前述权利要求之一所述的设备,其特征在于,通过使用一种或多种格栅结构将激发光耦合进光透明波导层(a)。

16. 如前述权利要求之一所述的设备,其特征在于,用于耦合激发光的格栅结构具有 200 nm 至 1000 nm 的周期,优选 200 nm 至 400 nm。

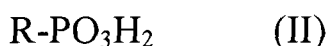
17. 如前述权利要求之一所述的设备,其特征在于,所述格栅具有 3 nm 至 60 nm 的调制深度,优选 10 nm 至 40 nm。

18. 如前述权利要求之一所述的设备,其特征在于,所述激发光具有 300 nm 至 1100 nm 的波长,优选 300 nm 至 800 nm,更优选 500 nm 至 700 nm。

19. 如前述权利要求之一所述的设备,其特征在于,将单或多层下式 (I) 的有机磷酸



和/或下式 (II)的有机膦酸



和/或它们的盐施加于薄膜波导,其中

R 是 C_{10} 至 C_{24} 烷基。

20. 如前述权利要求之一所述的设备,其特征在于所述识别元件以多至 100 000 个测量场形式以二维排列施加,其中一个测量场具有优选 0.001 mm^2 至 6 mm^2 的面积,更优选 0.1 mm^2 至 1 mm^2 。

21. 如前述权利要求之一所述的设备,其特征在于每平方厘米有大于 10 个、优选大于 50 个测量场被施加于薄膜波导。

22. 用于快速检测真菌毒素的试剂盒,其特征在于该试剂盒包括至少一个薄膜波导,该薄膜波导包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a),其中(b)具有比(a)低的折射率,特异性和/或亲和性结合配偶体作为真菌毒素和/或结合配偶体的化学或生化识别元件以空间分离的方式固定在该薄膜波导上。

23. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其特征在于它包含试剂,其优选包含荧光标记的结合配偶体。

24. 如前述权利要求之一所述的试剂盒用于快速检测真菌毒素的用途。

用于检测真菌毒素的设备和方法

本发明涉及用于检测真菌毒素的设备和方法并涉及适于实施所述方法的试剂盒。

真菌毒素的检测包括很多领域的应用，例如用于食品和饲料方面，用于环境分析，用于农作物保护和用于生化研究。

真菌毒素是真菌产生的有毒物质，它们具有非常不同的化学结构。真菌毒素在诸如谷物、含油种子和水果的收获产物中被找到，而且可导致人和动物中毒。到现在已有超过 300 种不同的真菌毒素被鉴定出来，其被分成约 25 种结构类型并表现出不同的毒性作用。根据毒素类型，真菌毒素可导致急性或慢性中毒。真菌毒素的常规种类有黄曲霉毒素、赭曲毒素、麦角生物碱、棒曲霉素和镰刀霉毒素。镰刀霉毒素中特别重要的有脱氧瓜萎镰菌醇、玉米赤霉烯酮、瓜萎镰菌醇、T-2-/HT2-毒素和伏马菌素，因为它们经常在谷物产品中被发现。因此，在谷仓、谷物贸易和谷物加工部分（例如磨坊、麦芽坊、饲料生产商、农场、咨询中心、大学或政府部门，例如为了保证食品质量的消费者保护部门）中应当实现针对真菌毒素的测试，例如针对田间真菌毒素（例如镰刀霉毒素）或针对贮藏真菌毒素的测试。

现有技术中已经公开了用于检测真菌毒素的许多方法。例如通过色谱方法（如 HPLC），其可与基于荧光的吸收或质谱检测联用，来检测真菌毒素。例如，HPLC 分析谷物样品前，通常通过免疫亲和柱浓缩并纯化分析物。所有基于 HPLC 的方法都投资额高、样品处理相对复杂和时间分析长的缺点。由于所述缺点，基于 HPLC 的检测方法不适于快速、廉价并简单地分析诸如生产、存放、贸易或加工的谷物中的谷物样品。代之以在专门的分析实验室中进行基于 HPLC 的分析。结果，在实践中，只能延迟几天得到结果。

检测真菌毒素的备选方法是 ELISA（酶联免疫吸附测试）技术。在微滴定板上进行 ELISA，微滴定板的孔用诸如特异性结合真菌毒素的捕获抗体涂覆。ELISA 测试的缺点是有许多移液、洗涤和温育步骤，这会使分析时间相对较长，超过 30 分钟。这限制了该测试在分析实验室之外的地点快速进行。而且，该测试不能同时检测多种分析物，因为每个

微滴定板上通常只涂覆以一种抗体。

检测真菌毒素的另一种方法是侧向流动测试 (LFA)。通过 LFA 可检测真菌毒素，例如在硝化纤维条上进行直接竞争性免疫测试，其中通过毛细管力使要分析的样品经过整个硝化纤维条。不利的是，该方法仅能进行定性真菌毒素检测。该测试的另一个缺点是每种真菌毒素需要单独的条。

现有技术还包括开发用于检测真菌毒素的方法的研究，例如 M. M. Ngundi 等，Anal. Chem. 2005, 77, 148-154 所述的。该方法包括通过将赭曲毒素 A 固定在玻璃载片上来实现检测赭曲毒素 A 的间接竞争性免疫测试。荧光标记的赭曲毒素 A 抗体和要确定的样品的混合物上样于玻璃载片上，在通过洗涤去除未结合的抗体后对其读数。不利的是，该方法需要洗涤步骤和 10 至 20 分钟的温育时间，还需要复杂的荧光成像系统来读出结果。结果，在此基础上不可能开发出能在分析实验室外的地点上进行的快速测试。

因此，由于要复杂的读数设备，现有技术已知的检测真菌毒素的方法需要巨大投资额，包括许多手工步骤或不能在分析实验室以外使用。

因此，本发明的目的是提供克服至少一个上述现有技术缺点的方法，尤其是能以快速、廉价和容易实现的方式在样品中检测真菌毒素的方法。

该目的通过用于快速检测真菌毒素的方法实现，其包括以下步骤：

a) 提供薄膜波导，其包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a)，其中(b)具有比(a)低的折射率，特异性和/或亲和性结合配偶体作为真菌毒素和/或结合配偶体的化学或生化识别元件以空间分离的方式固定在该薄膜波导上，

b) 将含一种或多种真菌毒素的样品和结合配偶体施加于所述薄膜波导上固定的结合配偶体上，

c) 检测由薄膜波导上固定的结合配偶体与样品中的真菌毒素和/或与结合配偶体的相互作用产生的消逝场中的信号，

d) 确定样品中存在的一种或多种真菌毒素的量。

本发明的另一主题在于用于实施检测真菌毒素的方法的设备。

进一步的主题是适于实施用于检测真菌毒素的方法的试剂盒。

本发明其他有益的实施方案来源于从属权利要求。

令人惊讶的是，发现本发明用于检测真菌毒素的方法可容易地并在专门的分析实验室以外进行。这使本发明的方法能通过快速测试来进行，而无需将样品转送分析实验室。而且有利的是，根据本发明方法所述的真菌毒素检测仅需很少或者无需洗涤步骤。这是特别有利的，因为进行洗涤步骤是耗时的，推迟了分析结果的获得，并可能歪曲分析结果，或者尤其在较不小心或不适当地进行后者的时候，甚至使检测完全不可能进行。

综合本发明方法的有利性质，使得能在诸如谷仓、谷物贸易和谷物加工场所中的食品中检测真菌毒素。该方法尤其能方便而快速地进行，这甚至能使不是专家实验室的专门分析员的个人都能实现所述方法。

在该方法的优选实施方案中，作为薄膜波导使用基于薄膜波导的消逝场生物芯片（优选是基于薄膜波导的平面光波导生物芯片）。

光波导是一类信号换能器，其能用于检测与波导层（通常是电介质）接触的介质的光学性质的改变。当光以引导模式传入波导层时，光场在介质/波导分界面上并不陡然下降，而是在邻接于波导的所谓检测介质中指数衰减。该指数衰减的光场被称为消逝场。用合适的测量装置能检测消逝场内与波导层接触的介质的光学性质的改变。

波导用作信号换能器是有利的，因为对于在波导分界面上固定的识别元件的情况，在波导内的分界面上检测介质光学性质改变的时候，能检测所述识别元件的结合或反应。

因此，在实施所述检测时可能节约时间并简化过程。

因此，通过改变直接在信号换能器或薄膜波导表面上的例如要分析的样品的介质光学性质，例如通过吸收、荧光、磷光、发光等的变化，能检测到信号或标记的元件。

优选检测消逝场中的荧光信号。根据本发明用于标记结合配偶体（例如真菌毒素、真菌毒素缀合物、抗体缀合物或抗体）的标记元件优选是有机荧光团、纳米颗粒、荧光纳米颗粒、珠、荧光珠、荧光蛋白质或其他发出信号分子或单位或者各种标记元件的任意组合。优选使用以能发光的方式标记的结合配偶体。优选的标记元件是有机荧光团和/或荧光蛋白质。

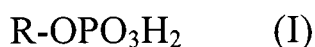
根据本发明的方法，优选荧光标记的结合配偶体可受消逝场激发。在优选的实施方案中，消逝场由 Duveneck 等的 US 5, 959, 292 所述的

平面光波导产生。用合适的装置能检测各向同性发出的荧光。在其他实施方案中，耦合进波导的荧光可通过合适的光学元件再次耦合出波导并可通过合适的光学装置来检测。

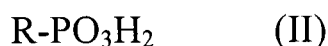
尤其有利的是，优选在检测信号前可限制或甚至完全省去洗掉荧光标记的结合配偶体或者含标记的结合配偶体的样品或溶液。因为也可省去提供的洗涤规程中通常使用的各种缓冲溶液，所以这能节约时间并以简化的方式检测真菌毒素。

可用的薄膜波导优选包括光透明波导层(a)，其包括氧化物，选自包括 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 和/或 ZrO_2 的组，优选选自包括 TiO_2 、 Ta_2O_5 和/或 Nb_2O_5 的组。光透明波导层(a) 优选由 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 或 ZrO_2 制成，优选由 TiO_2 ， Ta_2O_5 或 Nb_2O_5 制成。五氧化钽经证实是特别有利的，尤其是用于检测荧光信号。

在一个优选实施方案中，向薄膜波导上，尤其向包括氧化物的光透明波导层(a)上，所述氧化物选自包括 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 和/或 ZrO_2 的组，施加单或多层下式 (I) 的有机磷酸



和/或下式 (II)的有机磷酸



和/或它们的盐，其中

R 是 C_{10} 至 C_{24} 烷基。

优选可用的有有机磷酸和/或有机磷酸，更优选有机磷酸盐和/或有机磷酸盐，其中 R 选自包括无支链的 C_{10} 至 C_{20} 烷基的组，优选选自包括无支链的 C_{12} 至 C_{18} 烷基的组，优选选自包括十二烷基磷酸、十二烷基磷酸盐、十八烷基磷酸盐和/或十八烷基磷酸的组。

优选可用的是有机磷酸或有机磷酸盐，其通过水溶液中的水溶性盐的形式来施加于薄膜波导上。

在优选的实施方案中，有机磷酸和/或有机磷酸（优选有机磷酸盐）以单层的方式施加于薄膜波导，特别是消逝场生物芯片，优选是平面光波导生物芯片。它们可通过浸涂方法来施加。

该单层可作为粘着促进层施加于由氧化物构成的光透明层。有利的是，有机磷酸和/或有机磷酸能与识别元件（尤其与蛋白质或与蛋白质偶联的识别元件）相互作用，并增强所述识别元件与生物芯片的结合。

可用的结合配偶体优选选自包括抗真菌毒素抗体、抗真菌毒素抗体缀合物、真菌毒素、真菌毒素缀合物、抗真菌毒素抗体片段、真菌毒素结合肽、真菌毒素结合性抗运载蛋白（Anticaline）、真菌毒素结合性适体、真菌毒素结合性适配子和/或真菌毒素结合性印迹聚合物的组，优选选自包括抗真菌毒素抗体、抗真菌毒素抗体缀合物、真菌毒素和/或真菌毒素缀合物的组。

结合配偶体在各种情况下特异地与和/或亲和性地与各其他结合配偶体相互作用。例如，施加于薄层波导上的抗真菌毒素抗体亲和性地与固定在所述薄膜波导上的真菌毒素结合。同样，固定在薄膜波导上的抗真菌毒素抗体亲和性地与用于所述薄层波导上的真菌毒素或真菌毒素缀合物结合。结合特异性在此取决于所用的亲和性配偶体。因此，可用的交叉反应性抗真菌毒素抗体亲和性地与诸如伏马菌素类的相应真菌毒素结合，但特异性不如诸如抗伏马菌素 B1 的特定抗体。固定的结合配偶体也被称为识别元件或“捕获分子”。

可从诸如蛋白质和抗真菌毒素抗体或真菌毒素中形成抗真菌毒素抗体缀合物和真菌毒素缀合物。

在优选的实施方案中，例如在间接竞争性测试中，固定的结合配偶体是真菌毒素缀合物。真菌毒素缀合物优选由结合至蛋白质（例如牛血清白蛋白（BSA））的真菌毒素形成。使用该真菌毒素-BSA 缀合物的特定益处是以下事实，即真菌毒素与薄膜波导的结合能通过蛋白质和有机磷酸和/或有机膦酸间的相互作用增强。这可改善识别元件与所述薄膜波导的粘着。

标记元件（例如荧光染料或荧光团）可直接与结合配偶体结合，例如与抗真菌毒素抗体或真菌毒素结合，或通过间隔元件（例如蛋白质或烷基链或聚乙二醇链）连接。标记元件（例如荧光染料或荧光团）优选通过蛋白质与真菌毒素结合。合适蛋白质的例子是 BSA。荧光团通过 BSA 与真菌毒素的结合可显著改善标记元件与结合配偶体（例如抗体）的结合。另一个益处在于，可以由此避免用于将例如荧光团直接结合到真菌毒素的复杂方法。例如，用于直接竞争性测试中的针对固定的抗真菌毒素抗体的优选结合配偶体是荧光标记的真菌毒素-BSA 缀合物。

真菌毒素原则上可在样品、溶液或其他介质中检测，其都可施加于薄膜波导上。在优选的实施方案中，样品是人或动物的食物。优选根据

本发明的方法，在谷类、谷类产品、酒、果汁或水果和/或含谷类、酒、果汁和/或水果的产品中检测真菌毒素。要分析的样品（例如食品或产品）在本文中可施加于薄膜波导上，或用溶剂或溶剂混合物提取出来并使用提取出的提取物。所述提取物可以稀释或浓缩的方式使用。

真菌毒素可通过与溶剂或溶剂混合物处理而从要研究的样品（例如谷物或其他食品）中取出。例如，真菌毒素可通过研磨并接着用水或有机溶剂或溶剂混合物提取而从谷物样品中取出，例如使用水（视需要可以与缓冲物质、盐、酸或碱和其他添加剂混合）和有机溶剂的混合物，例如使用水和甲醇或乙醇或水和乙腈的混合物。其他提取真菌毒素的方法对普通技术人员来说是已知的。然后所得的溶解的真菌毒素直接或在稀释或浓缩后在薄膜波导或芯片上分析。

可用的识别元件被称为“捕获分子”，其优选选自包括抗真菌毒素抗体、抗真菌毒素抗体缀合物、真菌毒素和/或真菌毒素缀合物的组，优选是两种或更多的不同物质，其可以共价或通过诸如疏水吸附非共价固定于薄膜波导表面或芯片表面上。例如，将识别元件通过被称为点的测量场方式施加于薄膜波导表面或芯片表面，来固定它们，该方法也被称为点样。优选进行溶液（优选含有作为识别元件的一种或多种结合配偶体的缓冲溶液）点样，其通过被称为点样仪的自动应用设备实施。优选在点样后温育薄膜波导或芯片至少1小时（优选数小时），从而能使识别元件粘附在所述薄膜波导或芯片上。

优选在点样后用蛋白质溶液（优选可用的封闭蛋白质（Blocking-Proteins）溶液，例如BSA）处理生物芯片至少1小时，优选2小时至6小时，特别优选3小时至4小时。去除溶液后，干燥并存储薄膜波导或生物芯片。

样品和优选的荧光标记的结合配偶体可同时或先后地施加于薄膜波导（优选消逝场生物芯片，优选平面光波导生物芯片）上固定的识别元件。因此在温育样品（例如芯片上的提取物）之前或期间，可能要加入优选的荧光标记的结合配偶体，例如针对一种或多种真菌毒素的一种或多种优选荧光标记的真菌毒素、真菌毒素缀合物或抗体。例如，也可能将要分析的样品提取物以与针对一种或多种真菌毒素的优选标记的、更优选荧光标记的真菌毒素、真菌毒素缀合物或抗体的混合物形式施加于芯片上。

特别有利的是,根据本发明的方法,样品可与用作薄膜波导上化学或生化识别元件的固定的结合配偶体和/或结合配偶体温育小于 15 分钟,优选小于 10 分钟,尤其优选小于 5 分钟,然后检测信号。

这些使得大大优于已知的方法,所述方法需要温育时间,其中所施加的真菌毒素缀合物与标记的真菌毒素抗体溶液有时要花多至 2 小时,或者大大优于需要让样品与标记的抗真菌毒素抗体预先温育的方法。相对于已知的方法,这能通过本发明的方法快得多地确定真菌毒素,更具体的,温育时间被显著缩短。在尤其优选的实施方案中,温育时间可小于 10 分钟或甚至仅有 5 分钟。尤其在综合了能省去洗涤步骤的其他益处的情况下,这能使本发明的方法在小于 20 分钟(优选小于 15、特别优选小于 10 分钟)内产生结果。

利用本发明的方法,可定量并优选只有很小差异地测定真菌毒素。例如,所谓“实验室间差异系数”——重复性的量度,可小于 50%,优选小于 40%。而且,所谓“实验室间差异系数”——重复性的量度,可小于 20%。这能使本发明的方法在标准化和简单的方法框架内使用,来用于确定食品(例如谷物、谷物产品或酒)中的真菌毒素。

可检测的真菌毒素优选选自包括黄曲霉毒素、赭曲毒素、麦角生物碱、棒曲霉素和/或镰刀霉毒素的组,例如选自包括脱氧瓜萎镰菌醇、瓜萎镰菌醇、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素、HT-2 毒素、赭曲毒素 A 和/或伏马菌素的组。伏马菌素优选选自包括伏马菌素 B1、伏马菌素 B2 和/或伏马菌素 B3 的组。

因此,可用的结合配偶体优选选自包括黄曲霉毒素、赭曲毒素、麦角生物碱、棒曲霉素和/或镰刀霉毒素的真菌毒素组,例如选自包括脱氧瓜萎镰菌醇、瓜萎镰菌醇、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素、HT-2 毒素、赭曲毒素 A 和/或伏马菌素的组,而真菌毒素抗体选自包括黄曲霉毒素、赭曲毒素、麦角生物碱、棒曲霉素和/或镰刀霉毒素的组,例如选自包括脱氧瓜萎镰菌醇、瓜萎镰菌醇、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素、HT-2 毒素和/或伏马菌素的组。

根据所用的免疫测试类型,将结合配偶体(例如间接竞争性免疫测试情况下一种或多种真菌毒素)作为识别元件固定在薄膜波导上,而另外的结合配偶体(例如间接竞争性免疫测试情况下一种或多种抗真菌毒素抗体)在使用样品前或与样品同时上样于薄膜波导。加入的结合配偶

体在此优选经可发光标记, 优选经荧光团标记。

可用的结合配偶体优选选自包括脱氧瓜萎镰菌醇、瓜萎镰菌醇、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素、HT-2 毒素、赭曲毒素 A 和/或伏马菌素 B1、伏马菌素 B2 和/或伏马菌素 B3 的组, 而真菌毒素抗体选自包括脱氧瓜萎镰菌醇、瓜萎镰菌醇、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素、HT-2 毒素、赭曲毒素 A 和/或伏马菌素 B1、伏马菌素 B2 和/或伏马菌素 B3 的组。

本文可优选使用针对真菌毒素的单克隆抗体, 例如抗伏马菌素 B1、抗伏马菌素 B2 或抗伏马菌素 B3。也可用于抗伏马菌素类的抗体。可用的结合配偶体(优选针对真菌毒素的抗体)可单独或混合使用, 而且还可能使用交叉反应性抗体。

本发明方法的特定益处源于以下事实, 即本发明的方法能以提高的灵敏度检测真菌毒素。例如, 尤其在人或动物食品中, 例如在谷物、酒、果汁、水果和/或其产品中, 或在所述食品或产品的提取物中, 甚至可以检测纳摩尔或皮摩尔真菌毒素浓度范围的真菌毒素。例如, 在谷类提取物中, 甚至可以检测 0.1 pM 至 100 nM 真菌毒素范围内(优选 1 pM 至 1 nM 真菌毒素范围内)的真菌毒素。更具体的, 可以检测的浓度小于 1 nM, 优选小于 100 pM 的真菌毒素, 优选小于 10 pM 真菌毒素, 尤其优选小于 1 pM 真菌毒素。

而且, 在谷类提取物中可检测 10^{-4} ppb 至 10 000 ppb 真菌毒素范围内的真菌毒素, 在谷物中是 10^{-2} ppb 至 10 000 ppb 真菌毒素范围内的真菌毒素。在谷类提取物中优选可检测 ≤ 0.1 ppb 真菌毒素范围内的真菌毒素, 优选 ≤ 0.01 ppb 真菌毒素范围内的, 特别优选 $\leq 10^{-4}$ ppb 真菌毒素范围内的真菌毒素, 在谷物中是 ≤ 0.1 ppb 真菌毒素范围内的, 优选 ≤ 0.01 ppb 真菌毒素范围内的, 特别优选 $\leq 10^{-4}$ ppb 真菌毒素范围内的真菌毒素。

这使得能在分析实验室外比迄今可能的方法更准确地确定食品中所含的真菌毒素。

本发明的方法使得能检测至少 2 种真菌毒素, 优选 2 至 1000 种真菌毒素, 优选 5 至 100 种真菌毒素。特别是可同时确定多种真菌毒素。这大大优于已知的方法, 所述方法大部分仅能在同时检测单一真菌毒素。

用于检测真菌毒素的方法的优选实施方案提供了以空间分离的方

式在薄膜波导表面上固定特异性和/或亲和性结合配偶体作为真菌毒素和/或结合配偶体的化学或生化识别元件,所述薄膜波导包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a),其中(b)具有比(a)低的折射率。然后,同时或先后加入要分析的样品和优选的荧光团标记的结合配偶体。固定在薄膜波导上的结合配偶体、样品中的真菌毒素和/或优选的荧光团标记的结合配偶体之间的特异性和/或亲和性相互作用,可以作为消逝场中的信号编号而检测。样品中存在真菌毒素导致在消逝场产生信号的变化。

根据本发明,可通过测试来检测真菌毒素,例如在芯片上的免疫测试。优选通过免疫测试(优选竞争性免疫测试)来实施真菌毒素的检测,例如有直接或间接竞争性免疫测试,尤其优选通过间接竞争性免疫测试来实施。

用于通过直接竞争性免疫测试检测真菌毒素的方法的优选实施方案可以构思为:以空间分离的方式在薄膜波导表面上固定抗真菌毒素抗体作为真菌毒素的化学或生化识别元件,所述薄膜波导包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a),其中(b)具有比(a)低的折射率。然后,与要分析的样品同时或在其之前加入优选的荧光团标记的真菌毒素或优选的荧光团标记的真菌毒素-BSA 缀合物。固定在薄膜波导上的抗真菌毒素抗体、样品中的一种或多种真菌毒素和/或优选用荧光团标记的真菌毒素或真菌毒素-BSA 缀合物之间的相互作用,可以作为消逝场中的信号改变进行检测。

在直接竞争性免疫测试的情况下,优选在芯片表面上通过诸如点样来共价或非共价固定两种或多种不同抗真菌毒素抗体。例如,如果将要研究的样品的提取物与优选荧光标记的真菌毒素或真菌毒素缀合物的混合物上样于芯片,就能使所述标记的或未标记的真菌毒素或真菌毒素缀合物竞争所述芯片上可供使用的抗体结合位点。在芯片上温育提取物之前或期间,可加入荧光标记的真菌毒素。结合至固定的抗体的标记的真菌毒素的量与提取物中存在的真菌毒素的量成反比。

也可通过夹心测试(Sandwich-Assay)进行检测。在这种情况下,使用标记的检测抗体,而不是使用标记的真菌毒素或真菌毒素缀合物,所述经标记的检测抗体结合到由固定在芯片上的抗体和真菌毒素组成的固定复合物上。在夹心测试中,结合至抗体的荧光团的量与提取物中的真菌毒素浓度成正比。

用于通过间接竞争性免疫测试检测真菌毒素的方法的另一种优选的实施方案可构思为：以空间分离的方式在薄膜波导表面上固定真菌毒素或优选用荧光团标记的真菌毒素-BSA 缀合物作为化学或生化识别元件，所述薄膜波导包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a)，其中(b)具有比(a)低的折射率。然后，与要分析的样品同时或在其之前加入优选用荧光团标记的抗真菌毒素抗体。固定在薄膜波导上的真菌毒素或优选用荧光团标记的真菌毒素-BSA 缀合物、样品中的一种或多种真菌毒素和/或优选用荧光团标记的抗真菌毒素抗体之间的相互作用，可以作为消逝场中的信号改变进行检测。

根据本发明，也可通过间接竞争性免疫测试检测真菌毒素。在这种情况下，可在芯片上固定真菌毒素或真菌毒素缀合物，例如真菌毒素-蛋白质缀合物，优选真菌毒素-BSA 缀合物。如果将要研究的样品提取物与优选用荧光标记的抗真菌毒素-抗体的混合物上样于芯片，就能使固定的真菌毒素和存在于溶液中的真菌毒素竞争荧光标记的抗体可供使用的结合位点。在芯片上温育提取物之前或期间，可加入荧光标记的抗真菌毒素抗体。在这种情况下，被结合的标记抗体的量与提取物中存在的真菌毒素的量成反比。

另外有利的是，可通过读数设备检测消逝场中的信号。例如，所述读数设备可以是耐用而廉价的读数设备。

可用合适的软件评估信号强度（例如荧光强度）并计算样品中存在的真菌毒素的量。

尤其在综合了方法易于实现、可能同时并定量地在耐用而廉价的读数设备上检测数种真菌毒素的情况下，本发明的方法提供的益处使得能在分析实验室以外简单而快速地检测真菌毒素。

本发明的另一主题在于用于实施用于检测真菌毒素的方法的设备。

实施用于检测真菌毒素的方法的设备有薄膜波导，优选有基于薄膜波导的平面光波导生物芯片，所述薄膜波导包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a)，其中(b)具有比(a)低的折射率。识别元件优选固定于层(a)上。

合适的平面光波导的例子在 WO 01/92870 或 US 5, 959, 292 中有描述。

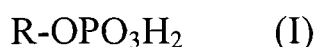
在设备的优选实施方案中，薄膜波导（优选平面光波导生物芯片）

的光透明层(b),可由诸如玻璃或石英的硅酸盐或由透明塑料(优选选自包括聚碳酸酯、聚酰亚胺、聚甲基丙烯酸酯、聚苯乙烯、环状聚烯烃和/或环状聚烯烃共聚物的组)制成,优选由环状聚烯烃或环状聚烯烃共聚物制成。适于制备光透明层(b)的塑料的例子在 WO 03/020488 中有描述。

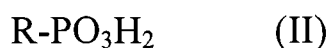
优选的是透明热塑性塑料或可注射塑料,例如选自包括聚碳酸酯、聚酰亚胺,丙烯酸酯(尤其是聚甲基丙烯酸甲酯)、或聚苯乙烯的组。

在设备的优选实施方案中,光透明波导层(a)可包括氧化物,所述氧化物选自包括 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 和/或 ZrO_2 的组,优选选自包括 TiO_2 、 Ta_2O_5 和/或 Nb_2O_5 的组。也可用几种这类氧化物的组合。优选光透明波导层(a)由 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 或 ZrO_2 (优选 TiO_2 、 Ta_2O_5 或 Nb_2O_5) 制成。使用五氧化钽经证实是尤其有益的。

在优选的实施方案中,薄膜波导,尤其在含选自包括 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 和/或 ZrO_2 的组的氧化物的光透明层上,包括单或多层下式 (I) 的有机磷酸,



和/或下式 (II) 的有机膦酸



和/或它们的盐,其中

R 是 C_{10} 至 C_{24} 烷基。

优选可用的是有机磷酸和/或有机膦酸,优选是有机磷酸盐和/或有机膦酸盐,其中 R 选自包括无支链的 C_{10} 至 C_{20} 烷基的组,优选选自包括无支链的 C_{12} 至 C_{18} 烷基的组,优选选自包括十二烷基磷酸、十二烷基磷酸盐、十八烷基膦酸盐和/或十八烷基膦酸的基团。

优选的是有机磷酸或有机磷酸盐,其通过水溶液中水溶性盐的方式施加于薄膜波导。

在优选的具体实施方案中,有机磷酸和/或有机膦酸(优选有机磷酸盐)以单层方式施加于薄膜波导,尤其是消逝场生物芯片,优选平面光波导生物芯片。

该单层可以作为粘着促进层施加于由氧化物制备的光透明层。有利的是,有机磷酸和/或有机膦酸能与识别元件(尤其与结合在载体蛋白质上的识别元件)相互作用,并增强所述识别元件与生物芯片的结合。

在设备的优选形式中，有机磷酸和/或有机膦酸（优选有机磷酸盐）以粘着促进层形式施加于薄膜波导，优选施加于由氧化物制备的光透明层。所述粘着促进层可增强识别元件对薄膜波导或生物芯片的结合。

优选粘着促进层具有小于 200 nm、优选小于 20 nm 的厚度。

激发光优选通过使用一种或多种格栅结构而耦合进光透明波导层(a)。

所述格栅结构优选是具有任何剖面的凹凸格栅（Reliefgitter）（例如具有矩形、三角或半圆剖面），或是在基本平的光透明层(a)中周期调节折射率的相格栅或体积格栅。格栅结构也可以是带有一致周期的衍射格栅，或可以是多衍射格栅。格栅结构可具有周期性，其在垂直或平行于耦合入光透明波导层(a)的激发光传播方向的空间中变化。

优选可用于耦合入激发光的格栅结构具有 200 nm 至 1000 nm，优选 200 nm 至 400 nm 的周期。而且，优选格栅的调制深度（Modulationstief）为 3 nm 至 60 nm，优选为 10 nm 至 40 nm。优选调制深度与第一光透明波导层(a)厚度的比率等于或小于 0.4。同样，优选折射率的调节发生在层 a 和层 b 之间的分界面上以及在层 a 与分析介质的分界面上。

优选光透明波导层(a) 具有 40 nm 至 1000 nm 的厚度，优选 40 nm 至 300 nm，更优选 80 nm 至 200 nm。

层(a)和(b)间折射指数的差异优选 ≥ 0.2 ，优选 ≥ 0.5 ，并更优选是 0.56。

激发光优选具有 300 nm 至 1100 nm 的波长，优选 300 nm 至 800 nm，更优选 500 nm 至 700 nm。

合适的激发光可通过格栅结构耦合进入，在耦合入和在层(a)中传导的光的传播方向上，下游连接有层(a)的非调节区，其设置有多个测量区的阵列，在这些阵列上检测各种真菌毒素。在传导光传播的方向上，可有利地下游连接有一个或多个其他格栅结构，其中其下游带有另一个测量区阵列。或者，一个阵列或多个阵列的测量区可在层(a)的调节区域中。

优选对于在耦合入的激发光传播方向的下游连接的每个测量区阵列，分配有对于该阵列呈特异性的格栅结构，来耦合出所述激发光，其中对特定用于各阵列的格栅结构垂直于耦合入的激发光的传播方向构造，或者也可以该方向穿过整个薄膜波导而延伸。

设备可具有非常大量的单独的测量场。在设备的优选实施方案中，

作为化学或生化识别元件的特异性和/或亲和性结合配偶体以多至 100 000 个测量场或点的形式以二维排列施加，其中单个测量场或点优选具有 0.001 mm^2 至 6 mm^2 的面积，优选 0.1 mm^2 至 1 mm^2 范围。优选每平方厘米大于 10、优选大于 50 个测量场施加于薄膜波导或生物芯片上。

本发明的另一主题是用于检测真菌毒素的试剂盒。试剂盒包括至少一个薄膜波导，所述薄膜波导包括在第二光透明层(b)上的第一光透明波导层(a)，其中(b)具有比(a)低的折射率，特异性和/或亲和性结合配偶体作为生物毒素和/或结合配偶体的化学或生化识别元件以空间分离的方式固定在该薄膜波导上。

试剂盒可另外包括至少一种包含优选标记的结合配偶体的试剂。试剂盒还可包括数种包含优选标记的结合配偶体的试剂或包含不同标记的结合配偶体混合物的试剂。试剂盒可另外包括用以实施如前述任意权利要求所述检测的缓冲液和/或溶剂。还设想了包括检测单元的试剂盒。

试剂盒可用于快速检测真菌毒素。

以下给出了用于举例说明本发明的实施例。

实施例 1

建立标准曲线用以在间接竞争性免疫测试中在消逝场生物芯片上测量玉米赤霉烯酮

7 个生物芯片(Unaxis 公司, Liechtenstein), 其外尺寸为 $1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$, 由玻璃制成, 玻璃中刻有 18 nm 格栅深度的光格栅, 并提供有 155 nm 厚的五氧化钽层, 通过将生物芯片浸入含 $500\text{ }\mu\text{M}$ 十八烷基磷酸的正庚烷/异丙醇 (9:1) 溶液中来涂覆十八烷基磷酸。在“生物芯片阵列器”(Perkin Elmer, 德国)型的点样仪的帮助下, 将玉米赤霉烯酮和牛血清白蛋白的缀合物(ZEA-BSA, ZEA:BSA 比率 = 50:1, 由 Biopure 公司, Tulln, 奥地利制备)和标记有染料 DyLight 647 (Pierce, 德国)的 BSA 分子(DyLight 647-BSA) 上样于生物芯片上。点样溶液含浓度为 $5 \times 10^{-4}\text{ mg/ml}$ DyLight 647-BSA, 在含有 0.1% BSA 和 0.1% Tween 20 的 PBS (137 mM NaCl , 2.8 mM KCl , $10\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1.8\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4)中, 以及 0.5 mg/ml BSA-ZEA 缀合物, 在含有 0.1% BSA 和 0.1% Tween 20 的 PBS 中。将点以两个场(阵列)形式点样到芯片上新的交替的行中, 每

行有 10 个 DyLight 647-BSA 点和 BSA-ZEA 缀合物点。

高空气湿度(40%)情况下温育点过夜, 然后用在 PBS 中的 3% BSA 溶液处理生物芯片 4 小时。将测量室施加到芯片上, 使得在每个芯片上形成带有分离的反应室的两个阵列。制备 0 $\mu\text{g/l}$ 至 31 $\mu\text{g/l}$ 的不同浓度的玉米赤霉烯酮水溶液, 并与用 DyLight 647 标记的单克隆抗玉米赤霉烯酮抗体 (Biotez, Berlin)混合, 由此在每种情况下制备出 1 nM 抗体溶液。

在每种情况下, 将不同浓度的混合物导入测量室中, 在“Minifluo IV”荧光读数仪(Bayer Technology Services, 德国)上测量生物芯片最多 10 分钟, 而不进行其他处理步骤。每个玉米赤霉烯酮点上得到的荧光强度除以特定点上下的 DyLight 647-BSA 点荧光强度的平均值。确定阵列中所有 40 个点的荧光强度的平均值。得到的浓度依赖性荧光强度在 Origin 7G (Origin Lab Corporation, 美国)计算机程序的辅助下通过 S 形拟合来拟合。

可以发现, 通过评估样品的荧光强度, 能在 0.4 ppb 至 4 ppb 玉米赤霉烯酮范围内定量 ZEA 浓度, 所述测量范围分别对应于拟合的 S 形曲线中最大荧光强度的 80%和 20%, 对应于溶液中所用的 ZEA 浓度范围的 1 nM 至 10 nM 。

实施例 2

建立标准曲线用以测量脱氧瓜萎镰菌醇 (DON)并测量污染的谷物饲料样品

15 个生物芯片(Unaxis 公司, Liechtenstein), 其外形尺寸为 1 cm x 2 cm, 由玻璃制成, 玻璃中刻有 (18 nm 格栅深度的) 光格栅, 提供有五氧化钽层 (155 nm), (通过将生物芯片浸入十八烷基膦酸的正庚烷/异丙醇 9:1 溶液中来) 涂覆十八烷基膦酸。在 Nanoplotter (GeSiM, 德国)型的点样仪的帮助下, 将脱氧瓜萎镰菌醇和牛血清白蛋白的缀合物 (DON-BSA, DON:BSA 比率 = 100:1, 由 Biopure 公司, Tulln, 奥地利制备)和狗 IgG (Rockland, 美国) 上样于生物芯片上。点样溶液由含浓度为 0.2 mg/ml 的狗 IgG 的含海藻糖的 PBS (137 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4)和含浓度为 1 mg/ml 的 BSA-DON 缀合物的含海藻糖的 PBS 组成。以两排每排有 12 个狗 IgG 点

的和它们之间一排 12 个 BSA-DON 缀合物点的方式将点通过两个场(阵列)上样到芯片上。

将点于 37℃温育 1 h,然后用 PBS 中的 BSA 溶液处理生物芯片多至 4 小时。将测量室加到芯片上,使得在每个芯片上形成带有分离的反应室的两个阵列。通过与 70%甲醇的水溶液(v/v)一起摇动 5 分钟来提取 5g 无污染的小麦粉。离心提取物,然后用含 BSA、酪蛋白、干燥低脂奶粉、Tween 20,聚乙二醇和蔗糖的 Tris 柠檬酸缓冲液 (pH 7.4) 以 1:4 (v/v, 提取物:缓冲液)的比率稀释。制备不同浓度(15 至 150 µg/l)的脱氧瓜萎镰菌醇,并与用 DyLight 647 标记的单克隆抗脱氧瓜萎镰菌醇抗体以及与同样标记有 DyLight 647 的单克隆山羊抗狗 IgG 抗体混合,由此在每种情况下制备出 1 nM 抗体溶液。

在每种情况下,将不同浓度的溶液导入测量室中,在“Minifluo IV”荧光读数仪(Bayer Technology Services, 德国)上测量生物芯片最多 10 分钟,而不进行其他处理步骤。每个脱氧瓜萎镰菌醇点上得到的荧光强度除以各点上下的狗 IgG 点荧光强度的平均值。确定阵列中所有 12 个 DON 点的荧光强度的归一化的平均值。得到的浓度依赖性的正态化的荧光强度在计算机程序的辅助下通过指数拟合来拟合。

与以上所示提取方法相似,提取 5g DON-污染的谷物粗粉饲料样品(Coring 公司,德国,被鉴定有 526 ppb DON)并稀释提取物。对于 300 µl 稀释的提取物,将用 DyLight 647 标记的单克隆抗脱氧瓜萎镰菌醇抗体和同样标记有 DyLight647 的单克隆山羊抗狗 IgG 抗体加入,使得在每种情况下得到 1 nM 抗体溶液。在每种情况下,将 100 µl 溶液导入测量室中,在“Minifluo IV”荧光读数仪(Bayer Technology Services, 德国)上测量生物芯片最多 10 分钟,而不进行其他处理步骤。每个脱氧瓜萎镰菌醇点上得到的荧光强度除以特定点上下的狗 IgG 点荧光强度的平均值。确定阵列中所有 12 个 DON 点的荧光强度的归一化的平均值。得到的荧光强度在上述标准曲线的帮助下转化成谷物粗粉饲料中的 DON 浓度,通过 3 次测量由此得到 590 ppb 的平均值。