



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110108871 A

(43)申请公布日 2019.08.09

(21)申请号 201910363226.0

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2019.04.30

G01N 33/532(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO. C201871 2018.03.23

(71)申请人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二
路2号

(72)发明人 张奇 李培武 王督 张兆威
张文

(74)专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102

代理人 乔宇

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书4页 说明书12页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫
分析试纸条、制备及其应用

(57)摘要

本发明公开了同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用。其包括底板,底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为三条,呈间隔分布,所述三条检测线上分别包被各毒素蛋白偶联物,所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述的抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生。其可用于黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的同步检测,操作简单快速、灵敏度高。

1. 同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条, 其特征在于: 包括底板, 底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫, 相邻各垫在连接处交叠连接, 所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫, 硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线, 所述检测线位于质控线的下方, 个数为三条, 呈间隔分布, 所述三条检测线上分别包被有杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物、环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物, 所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体; 所述金标垫上横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体和纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体; 所述的抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生。

2. 根据权利要求1所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条, 其特征在于: 所述抗黄曲霉毒素单克隆抗体为由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体, 抗杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生。

3. 根据权利要求1所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条, 其特征在于: 所述的吸水垫长16~18mm, 宽2~4mm; 检测垫长25~30mm, 宽2~4mm; 金标垫长6~9mm, 宽2~4mm; 样品垫长12~18mm, 宽2~4mm, 相邻各垫的交叠长度为1~3mm; 所述的吸水垫为吸水纸; 所述的底板为纸板。

4. 根据权利要求1所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条, 其特征在于: 所述检测垫上每相邻两条检测线之间的间距为2~3mm, 靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm, 所述靠近质控线的检测线与质控线的间距为5~7mm。

5. 根据权利要求1所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条, 其特征在于: 所述检测垫上每厘米检测线所需的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng; 每厘米检测线所需的杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng; 每厘米检测线所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng; 每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng。

6. 根据权利要求1所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条, 其特征在于: 所述金标垫中所用的纳米金的粒径为15~20nm; 所述金标垫上每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体的用量为100~200ng, 所需的纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的用量为100~200ng, 所需的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100~200ng。

7. 权利要求1所述的检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条的制备方法, 其特征在于: 包括以下步骤:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁成16~18mm即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物、杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物和环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物用包被缓冲液分别配制成0.25~0.5mg/mL的包被液, 用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线, 得到三条检测线, 所述检测垫上每厘米检

测线所需的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;每厘米检测线所需的杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;每厘米检测线所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng;所述每相邻两条检测线之间的间距为2~3mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm;然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成0.5mg/mL的包被液;于距检测线5~10mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng,然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟;

(3) 样品垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥10~16小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

(4) 金标垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥10~16小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体溶液、纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液的混合溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为200~400ng,然后真空冷冻干燥2~4小时,置干燥器中室温保存;所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生;

(5) 试纸条的组装

在底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条。

8. 根据权利要求7所述的检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条的制备方法,其特征在于:所述检测线包被中所使用的包被缓冲液为:1g牛血清白蛋白,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;所述质控线的包被中所使用的包被缓冲液为:1g卵清蛋白,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;所述的封闭液是按照下述方法配置得到的:将1~2g卵清蛋白,2~5g蔗糖,0.02~0.05g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.4mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,;在搅拌的状态下缓慢加入1.5mL 0.1mg/mL的抗黄曲霉毒素单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用;

所述纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.45mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,;在搅拌的状态下缓慢加入1.5mL 0.1mg/mL的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用;

所述纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.1mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH;在搅拌的状态下缓慢加入2mL 0.1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用。所述的标记洗涤保存液为:2.0g聚乙二醇-20000,0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得。

9. 权利要求1所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条的应用,其特征在于:应用方法如下:将样品经甲醇提取,获得待测提取液,将待测提取液用水稀释,使稀释液中甲醇的终体积浓度为20~30%,得到待测样品溶液;再取该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条的样品垫上进行检测,其作为检测试纸条,另取等体积的甲醇浓度一致的甲醇水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条的样品垫上,其作为对照试纸条,一段时间后将检测试纸条和对照试纸条进行显色对照:

当检测试纸条上包被黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量低于0.25ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量等于或高于0.25ng/mL并低于1ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素的含量等于或高于1ng/mL;

当检测试纸条上包被杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素含量低于0.5ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素含量等于或高于0.5ng/mL并低于2ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素的含量等于或高于2ng/mL;

当检测试纸条上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸含量低于1ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸含量等于或高于1ng/mL并低于5ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸的含量等于或高于5ng/mL;

当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线是否显色,该试纸条判为无效;

最后经换算即得待测样品中黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的含量。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于:所述的甲醇提取为:将待测样品磨细,加入体积浓度为70%的甲醇水溶液,混匀,涡旋震荡提取,离心取上清即待测提取液;所述的

待测样品溶液的用量为80-150 μ L,检测时间为15-20分钟。

同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用

技术领域

[0001] 本发明属生物检测领域,具体涉及一种同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用。

背景技术

[0002] 黄曲霉菌一种常见的腐生型好氧真菌,在土壤中以分生孢子或菌核的形式存在,在植物组织中则以菌丝体的形式存在,菌核能在极端环境条件下(高温、干旱等)存活。黄曲霉菌具有多个次级代谢基因簇,可产生黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸等有毒次级代谢产物,能于作物收获前、收获后诱发多种重要农产品,如大米、玉米、花生、饲料等病害的发生并造成黄曲霉菌真菌毒素的污染。黄曲霉毒素是I类致癌物质,具有诱导突变、抑制免疫和致癌的作用,能强烈破坏人和动物的肝脏组织,严重时会导致肝癌甚至死亡;杂色曲霉毒素是黄曲霉毒素生物合成的前体物,其毒性仅次于黄曲霉毒素,具有肝毒性,肾毒性,细胞遗传毒性和强致癌性;环匹阿尼酸可单独产生或与黄曲霉毒素同时产生,可导致心细胞变性,胞膜通透性增加,神经元坏死等症状。鉴于黄曲霉菌真菌毒素的危害,世界各国对其含量制定了各种法律法规。为了加强对农产品中黄曲霉菌真菌毒素的检测,保障人们的消费安全,开发针对这些真菌毒素的检测技术,尤其是快速检测,是了解和掌握农产品安全卫生信息,增强食品安全消费的重要环节。

[0003] 现有技术中常用的黄曲霉菌真菌毒素检测技术主要有薄层层析法、精密仪器分析法、免疫学分析法。薄层层析法不需要特殊的仪器设备,但检测试剂用量大、操作繁琐、准确性差,不能准确定量。精密仪器分析法包括高效液相色谱法、液相色谱与质谱及串联质谱联用等方法,需要严格的实验室环境以及昂贵的仪器设备,具有前处理复杂,样品检测成本高、不适于现场检测。免疫学分析法克服了前两者的缺点,具有特异性强、灵敏度高、样品前处理简单、成本低、对实验人员和环境的污染危害小、适于现场批量检测等优点。其中基于纳米金的免疫层析快速检测技术具有简便、快速、灵敏、适于现场检测的优点。但目前还没有针对黄曲霉菌杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸等多种黄曲霉菌真菌毒素的免疫层析试纸条问世。因此,迫切需要能同步检测多种真菌毒素的检测技术,以实现农产品中黄曲霉菌真菌毒素混合污染的同步、快速监测。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题是提供一种同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用。其可用于样品中黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸三种真菌毒素含量的同步检测,具有操作简单、快速、灵敏度高的特点。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案为:

[0006] 同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条,包括底板,底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫

以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为三条,呈间隔分布,所述三条检测线上分别包被有杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物(ST-BSA)、环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物(CPA-OVA)和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA),所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫上横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体和纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体;所述的抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为 CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生。

[0007] 按上述方案,所述抗黄曲霉毒素单克隆抗体为由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体,抗杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生。

[0008] 按上述方案,所述的吸水垫长16~18mm,宽2~4mm;检测垫长25~30mm,宽2~4mm;金标垫长6~9mm,宽2~4mm;样品垫长12~18mm,宽2~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm。

[0009] 按上述方案,所述的吸水垫为吸水纸;所述的底板为纸板。

[0010] 按上述方案,所述检测垫上每相邻两条检测线之间的间距为2~3mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,所述靠近质控线的检测线与质控线的间距为5~7mm。

[0011] 按上述方案,所述检测垫上每厘米检测线所需的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;每厘米检测线所需的杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;每厘米检测线所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng。

[0012] 按上述方案,所述金标垫中所用的纳米金的粒径为15~20nm;所述金标垫上每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100~200ng。

[0013] 如上所述检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0014] (1)吸水垫的制备

[0015] 将吸水纸剪裁成16~18mm即得吸水垫;

[0016] (2)检测垫的制备

[0017] 检测线的包被:

[0018] 将黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物、杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物和环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物用包被缓冲液分别配制成0.25~0.5mg/mL的包被液,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线,得到三条检测线,所述检测垫上每厘米检测线所需的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;每厘米检测线所需的杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;每厘米检测线所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng;所述每相邻两条检测线之间的间距为2~3mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm;然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;

[0019] 质控线的包被:

[0020] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成0.5mg/mL的包被液;于距检测线5~10mm 的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng,然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟;

[0021] (3) 样品垫的制备

[0022] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥10~16小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存。

[0023] (4) 金标垫的制备

[0024] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥10~16小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体溶液、纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液的混合溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为200~400ng,然后真空冷冻干燥2~4小时,置干燥器中室温保存;所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生;

[0025] (5) 试纸条的组装

[0026] 在底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条。

[0027] 按上述方案,所述检测线包被中所使用的包被缓冲液为:1g牛血清白蛋白,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0028] 按上述方案,所述质控线的包被中所使用的包被缓冲液为:1g卵清蛋白,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至 100mL所得;

[0029] 按上述方案,所述的封闭液是按照下述方法配置得到的:将1~2g卵清蛋白,2~5g蔗糖,0.02~0.05g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0030] 按上述方案,所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.4mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值;;在搅拌的状态下缓慢加入1.5mL 0.1mg/mL的抗黄曲霉毒素单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10% 卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以 12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用;

[0031] 所述纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.45mL 0.1mol/L碳酸钾水溶

液调节pH值,;在搅拌的状态下缓慢加入1.5mL 0.1mg/mL的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以 12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用。

[0032] 所述纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.1mL 0.1mol/L K_2CO_3 水溶液调节pH;在搅拌的状态下缓慢加入2mL0.1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用。所述的标记洗涤保存液为:2.0g聚乙二醇-20000,0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,纯水定容至1000mL, 0.22 μ m滤膜过滤所得。

[0033] 如上所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条的应用,方法如下:将样品经甲醇提取,获得待测提取液,将待测提取液用水稀释,使稀释液中甲醇的终体积浓度为 20~30%,得到待测样品溶液;再取该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到所述的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条的样品垫上进行检测,其作为检测试纸条,另取等体积的甲醇浓度一致的甲醇水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条的样品垫上,其作为对照试纸条,一段时间后将检测试纸条和对照试纸条进行显色对照:

[0034] 当检测试纸条上包被黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量低于0.25ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量等于或高于0.25ng/mL并低于 1ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素的含量等于或高于1ng/mL;

[0035] 当检测试纸条上包被杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素含量低于0.5ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素含量等于或高于0.5ng/mL并低于 2ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素的含量等于或高于2ng/mL;

[0036] 当检测试纸条上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸含量低于1ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸含量等于或高于1ng/mL并低于5ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸的含量等于或高于5ng/mL;

[0037] 当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线是否显色,该试纸条判为无效;

[0038] 最后经换算即得待测样品中黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的含量。

[0039] 按上述方案,所述的甲醇提取为:将待测样品磨细,加入体积浓度为70%的甲醇水溶液,混匀,涡旋震荡提取,离心取上清即待测提取液;所述的待测样品溶液的用量为80-150 μ L,检测时间为15-20分钟。

[0040] 该免疫层析试纸条在黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸混合污染同步检测

中的工作原理：当待测样品溶液加入到试纸条下端的样品垫上时，待测样品溶液通过毛细作用沿试纸条向吸水垫方向移动，当其移动至金标垫时，纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体被溶解。当样品中含有黄曲霉毒素时，黄曲霉毒素将和金标垫上的纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合并一同向上泳动，其到达固定着黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物抗原的检测线时，抗原将和黄曲霉毒素竞争结合纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体上有限的抗原结合位点，样品中黄曲霉毒素含量越高，检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体将越少，在检测线上形成的显色带颜色越浅；当样品中含有杂色曲霉毒素时，杂色曲霉毒素将和金标垫上的纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体结合并一同向上泳动，其到达固定着杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物 (ST-BSA) 抗原的检测线时，抗原将和杂色曲霉毒素竞争结合纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体上有限的抗原结合位点，样品中杂色曲霉毒素含量越高，检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体将越少，在检测线上形成的显色带颜色越浅；当样品中含有环匹阿尼酸时，环匹阿尼酸将和金标垫上的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体结合并一同向上泳动，其到达固定着环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物 (CPA-OVA) 抗原的检测线时，抗原将和环匹阿尼酸竞争结合纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体上有限的抗原结合位点，样品中环匹阿尼酸含量越高，检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体将越少，在检测线上形成的显色带颜色越浅。

[0041] 当三条检测线上的抗原所结合的纳米金标记的对应的抗体少于一定的数量时，三条检测线处将不会有红色线条出现。无论样品中是否含有这三种真菌毒素，未被检测线上的抗原截获的纳米金标记的抗真菌毒素的抗体或纳米金标记的抗真菌毒素的抗体与真菌毒素的结合物将继续移动到质控线并与质控线上的兔抗鼠多克隆抗体结合并被富集显色。据此，分别将检测试纸条上包被黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的检测线、包被杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物 (ST-BSA) 的检测线和包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物 (CPA-OVA) 的检测线与对照试纸条上相应检测线颜色进行显色对照，即可获得样品中黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸这三种真菌毒素的混合污染情况。

[0042] 本发明的有益效果：

[0043] (1) 快速、同步检测黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸。本发明提供的免疫层析试纸条能在一条试纸条上实现对黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸三种真菌毒素的同步、快速检测，使用的抗体均为单克隆抗体，特异性好、灵敏度高，各真菌毒素的检测之间无干扰，简单、快速。

[0044] (2) 灵敏度高。本发明提供的免疫层析试纸条对检测溶液中黄曲霉毒素的最低检测限为0.25ng/mL，对杂色曲霉毒素的最低检测限为0.5ng/mL，对环匹阿尼酸的最低检测限为1ng/mL，该检测限能满足欧盟对食品中这三种真菌毒素的限量要求。

附图说明

[0045] 图1为本发明提供的同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条的结构示意图。图中：1吸水垫、2检测垫、3金标垫、4样品垫、5质控线、6黄曲霉毒素检测线、7杂色曲霉毒素检测线、8环匹阿尼酸检测线。

具体实施方式

[0046] 实施例1:抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体、抗杂色曲霉毒素单克隆抗体和抗环匹阿尼酸单克隆抗体的获得

[0047] a.抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11 分泌产生,具体根据申请号为2010102445095的专利中报道的方法预先制得,其制备方法为:将杂交瘤细胞株1C11注射预先用福氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠,收集该小鼠的腹水,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,具体操作为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,4℃,12000r/min 离心15min,吸取上清,将所得腹水上清与3倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为33μL,室温混合30min,4℃静置2h,然后4℃,12000r/min离心30min,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH值至7.4,4℃预冷,缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h,然后4℃,12000r/min离心30min,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,对纯水透析,将充分透析好的蛋白溶液置-70℃冰箱冷冻,之后用冷冻干燥机冻干,收集冻干粉,即得纯化好的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体,将抗体置-20℃冰箱中备用;

[0048] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容至100mL所得;所述的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,磷酸二氢钾0.02g加水定容至100mL所得。

[0049] b.杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生,具体根据申请号为201410115952.8的专利中报道的方法预先制得,制备方法为:将获得的杂交瘤细胞株ST03注射到预先用福氏不完全佐剂处理过的Balb/c小鼠的腹部,收集小鼠的腹水,纯化后得到杂色曲霉毒素单克隆抗体。所述的纯化为辛酸-硫酸铵纯化法,具体操作为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,4℃,12000r/min离心15min以上,吸取上清,将所得腹水上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为33μL,室温混合30-60min,4℃静置2h以上,然后4℃,12000r/min离心30min以上,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和 pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH值至7.4,4℃预冷,缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h以上,然后4℃,12000r/min 离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用纯水透析,将充分透析好的蛋白溶液置-70℃冰箱冷冻,之后用冷冻干燥机冻干,收集冻干粉,即得纯化好的杂色曲霉毒素单克隆抗体,将抗体置-20℃冰箱中备用;

[0050] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容到100mL所得;所述的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,磷酸二氢钾0.02g,加水定容到100mL所得。

[0051] c.抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生

[0052] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO.C C201871的杂交瘤细胞株YTT-2

产生。具体如下：

[0053] 将环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株YTT-2腹腔注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠体内,收集小鼠的腹水,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,具体操作为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,过滤后的腹水于4℃,12000r/min离心15min以上,吸取上清,将上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,边搅拌边缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为30~35μL,室温混合30~60min,4℃静置2h以上,然后4℃,12000r/min离心30min以上,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和pH7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4,4℃预冷,缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h以上,然后4℃,12000r/min离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用纯水透析,将充分透析好的蛋白溶液置-70℃冰箱冷冻,然后用冷冻真空干燥机冻干,收集冻干粉,即得纯化好的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,将抗体置-20℃冰箱中备用;

[0054] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容至100mL所得;所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.9g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,磷酸二氢钾0.02g,加水定容至100mL所得。

[0055] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株YTT-2分泌的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的亚型为IgG2a型。

[0056] 用常规间接非竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)法测得YTT-2的鼠腹水抗体的效价可达 1.2×10^5 ,即鼠腹水抗体稀释 1.2×10^5 倍时的溶液测定结果为阳性。常规间接竞争ELISA法鉴定其对环匹阿尼酸的灵敏度(IC₅₀)为0.84ng/mL,对黄曲霉毒素B1,B2,G1,G2,M1和杂色曲霉毒素的交叉反应率均小于0.1%。

[0057] 杂交瘤细胞株YTT-2的筛选:

[0058] 1. 抗原合成及动物免疫

[0059] 购买市售环匹阿尼酸标准品进行完全抗原合成,具体的合成步骤如下:将1mg CPA溶于1mL 0.05M NaHCO₃的50%甲醇水溶液中;取2mg血蓝蛋白(KLH)加入0.4mL 3M醋酸钠,在室温搅拌条件下,1min内逐滴加入0.2mL甲醛,持续搅拌10min;将CPA逐滴缓慢加入到KLH中,室温条件下持续搅拌16h以上。将最终反应产物CPA-KLH置于合适大小透析袋内,于PBS中4℃搅拌透析三天。同样方法合成检测原CPA-OVA。

[0060] 购买6周龄雌性BaLb/c小鼠6只,免疫自行合成的环匹阿尼酸完全抗原CPA-KLH,免疫剂量为100μg/只。第一次免疫将完全抗原CPA-KLH与弗氏完全佐剂混合乳化,进行背部皮下多点注射免疫。初免间隔3周,之后每次间隔2周进行免疫,使用弗氏不完全佐剂乳化进行免疫。从第三次免疫一周后,进行尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA法监测小鼠血清抗体效价,用间接竞争ELISA法测定小鼠血清灵敏度,选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行最后一次冲刺免疫,融合前3天取100μg免疫原溶于200μL PBS直接注射腹腔。弗氏佐剂购于Sigma-Aldrich公司。

[0061] 2. 细胞融合

[0062] 最后一次冲刺免疫3天后,采用50%(重量百分数)的聚乙二醇即PEG(分子量为1450)作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤如下:

[0063] 颈椎脱臼法处死免疫小鼠,在无菌条件下摘取脾脏,研磨分离脾细胞,与鼠源骨髓

瘤细胞SP2/0按5:1个数比混合,用RPMI-1640基础培养液洗混合细胞,用50%PEG融合,融合1分钟,然后加满RPMI-1640基础培养液,离心,移去上清,小鼠脾细胞和鼠源骨髓瘤细胞SP2/0形成的融合细胞用72mLRPMI-1640基础培养液重悬,将重悬起来的细胞滴加到96孔细胞培养板内,2滴/孔,置37℃二氧化碳培养箱养,所述的RPMI-1640基础培养液为含有20%(体积百分数)胎牛血清,2%(重量百分数)生长因子和1%(重量百分数)次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT。上述SP2/0购于上海泛柯生物科技有限公司;RPMI-1640基础培养液购于Hyclone公司;1%次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT购于Sigma-Aldrich公司。

[0064] 3. 细胞株的筛选及克隆

[0065] 待细胞融合后第12天左右,细胞集落长到占孔底1/2面积大小,培养液变黄,即可进行抗体检测。采用ELISA方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选,筛选分两步进行,第一步采用间接非竞争ELISA法筛选出抗环匹阿尼酸而不抗载体蛋白KLH的阳性孔;第二步采用间接竞争ELISA法对第一步筛选出的阳性孔进行检测,以环匹阿尼酸作为竞争原,选择吸光值和灵敏度均较高的孔(吸光值较高指竞争原为0的孔即阳性对照孔的最终测定值较高,灵敏度较高指抑制率为50%时的竞争原浓度亦即IC₅₀值较小),采用有限稀释法进行克隆,克隆后10天左右采用同样的两步法进行检测,如此重复克隆2-3次后,获得杂交瘤细胞株YTT-2,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址是,中国,武汉,武汉大学,保藏编号为CCTCC NO.C201871,保藏日期为2018年3月23日。

[0066] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株系YTT-2抗体可变区序列测定

[0067] (1) 提取总RNA:采用天根公司的总RNA提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株YTT-2的总RNA。

[0068] (2) 合成cDNA:以步骤1获得的总RNA为模板,oligo(dT)₁₅为引物,按照SuperScript™-2II反转录酶说明书进行反转录,合成cDNA第一链;引物oligo(dT)₁₅由Invitrogen购得;

[0069] (3) PCR法克隆可变区基因:根据GENBANK中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以CDNA为模版扩增抗体重链、轻链可变区基因。PCR程序为:94℃30s、55℃50s、72℃1min,扩增30个循环,最后72℃延伸10min。PCR产物经过1%(重量百分数)的琼脂糖凝胶电泳分离后,用试剂盒纯化回收DNA片段,连接在载体pMD18-T中,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,挑取阳性克隆,送至苏州泓迅生物科技有限公司进行测序。其中引物的序列分别为:重链可变区引物为5'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3' (22mer)和5'-TGA GGA GACGGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3' (32mer)其中S、M、R和W为兼并碱基,M=A/C,R=A/G,S=C/G,W=A/T,轻链可变区引物为5'-GAC ATT GAG CTC ACC CAG CTT GGT GCC-3' (24mer)和5'-CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC-3' (24mer)。

[0070] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长360bp,序列如SEQ ID NO:1所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由120个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:3所示。轻链可变区编码基因序列长322bp,序列如SEQ ID NO:2所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由107个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:4所示。

[0071] 实施例2

[0072] 同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条,如图1所示,包括底板,底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫1、检测垫2、金标垫3和样品垫4,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线5和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为三条,呈间隔分布,所述三条检测线上分别包被有杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物(ST-BSA)、环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物(CPA-OVA)和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA),分别为杂色曲霉毒素检测线7、环匹阿尼酸检测线8,黄曲霉毒素检测线6、所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫上横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体和纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体;所述的抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为 CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生。

[0073] 制备方法步骤如下:

[0074] (1)吸水垫的制备

[0075] 将吸水纸剪裁成16mm即得吸水垫

[0076] (2)检测垫的制备

[0077] 检测线的包被:

[0078] 将黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液配制成0.25mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿15mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线I,每厘米检测线I所需的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)的包被量为100ng;将杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液分别配制成0.25mg/mL的包被液,于距检测线I 2mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线II,每厘米检测线II所需的杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物(ST-BSA)的包被量为100ng;将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物用包被缓冲液分别配制成0.25mg/mL的包被液,于距检测线II 2mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线III,每厘米检测线III所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物(CPA-OVA)的包被量为80ng;然后于37℃条件下干燥60分钟;

[0079] 质控线的包被:

[0080] 将兔抗鼠多克隆抗体配制成0.5mg/mL的包被液;于距检测线5mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100ng,然后于37℃条件下干燥60分钟;

[0081] (3)样品垫的制备

[0082] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0083] (4)金标垫的制备

[0084] 玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥10小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液、纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液的混合溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的用量为100ng,所需的纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的用量为100ng,所需的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100ng,然后真空冷冻干燥2小时,置

干燥器中室温保存;所述的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生,抗杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生,抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生;

[0085] (5) 试纸条的组装

[0086] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条。

[0087] 所述检测线包被中所使用的包被缓冲液为:1g牛血清白蛋白,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0088] 所述的质控线包被中所使用的包被缓冲液为:1g卵清蛋白,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0089] 所述的封闭液是按照下述方法配置得到的:将1g卵清蛋白,2g蔗糖,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0090] 所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的纳米金溶液,0.4mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,;在搅拌的状态下缓慢加入1.5mL 0.1mg/mL的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以 12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用。

[0091] 所述纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.45mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,;在搅拌的状态下缓慢加入1.5mL 0.1mg/mL的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以 12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用。

[0092] 所述纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.1mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH;在搅拌的状态下缓慢加入2mL0.1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液 12000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用。

[0093] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为15nm;

[0094] 所述的标记洗涤保存液为:2.0g聚乙二醇-20000,0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,纯水

定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得。

[0095] 上述同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条在玉米样品检测中的应用:

[0096] 取5g已磨细的1#、2#和3#花生待测样品,加入20mL体积浓度为70%的甲醇水溶液,涡旋震荡提取30分钟,离心取上清,将上层清液即提取液用水稀释3倍,使稀释液中甲醇的终体积浓度为23.3%,得到待测样品溶液。再取100μL稀释好的待测样品溶液作为检测液逐滴加入到同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条的样品垫上进行检测,其作为检测试纸条。另取等体积的甲醇浓度为23.3%的甲醇水溶液作为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条的样品垫上,其作为对照试纸条,15分钟后读取结果。

[0097] 检测结果:1#待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,包被AFB1-BSA的检测线颜色比对照试纸条检测线浅,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量等于或高于0.25ng/mL并低于1ng/mL;包被ST-BSA的检测线颜色比对照试纸条检测线浅,表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素含量等于或高于0.5ng/mL并低于2ng/mL;包被CPA-OVA的检测线颜色比对照试纸条检测线未显色,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸的含量等于或高于5ng/mL;

[0098] 2#待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,包被AFB1-BSA、ST-BSA、CPA-OVA的检测线均未显色,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量等于或高于1ng/mL;杂色曲霉毒素含量等于或高于2ng/mL;环匹阿尼酸的含量等于或高于5ng/mL;

[0099] 3#待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,包被AFB1-BSA的检测线颜色比对照试纸条检测线浅,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量等于或高于0.25ng/mL并低于1ng/mL;包被ST-BSA的检测线未显色,表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素含量等于或高于2ng/mL;包被CPA-OVA的检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸的含量低于1ng/mL。

[0100] 实施例3

[0101] 同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条的制备方法,步骤如下:

[0102] (1)吸水垫的制备

[0103] 将吸水纸剪裁成18mm即得吸水垫;

[0104] (2)检测垫的制备

[0105] 检测线的包被:

[0106] 将黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液配制成0.5mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿20mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线I,每厘米检测线I所需的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 的包被量为300ng;将杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液分别配制成0.5mg/mL的包被液,于距检测线I3mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线II,每厘米检测线II所需的杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物 (ST-BSA) 的包被量为300ng;将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物用包被缓冲液分别配制成0.5mg/mL的包被液,于距检测线II3mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线III,每厘米检测线III所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物用 (CPA-OVA) 的包被量为400ng;然后于 37

℃条件下干燥120分钟；

[0107] 质控线的包被：

[0108] 将兔抗鼠多克隆抗体配制成0.5mg/mL的包被液；于距检测线10mm的位置，用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上，得到质控线，每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为300ng，然后于37℃条件下干燥120分钟；

[0109] (3) 样品垫的制备

[0110] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿，取出，于37℃条件下干燥16小时，得样品垫，然后置干燥器中室温保存。

[0111] (4) 金标垫的制备

[0112] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿，取出，于37℃条件下干燥16小时，于已干燥的玻璃纤维膜上，用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液、纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液的混合溶液，其中：每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的用量为200ng，所需的纳米金标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的用量200ng，所需的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为200ng，然后真空冷冻干燥4小时，置干燥器中室温保存；所述的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生，抗杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生，抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生；

[0113] (5) 试纸条的组装

[0114] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，交叠长度为1~3mm，即得同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条。

[0115] 取5g已磨细的1#、2#和3#花生待测样品，加入20mL体积浓度为70%的甲醇水溶液，涡旋震荡提取30分钟，离心取上清，将上层清液即提取液用水稀释，使稀释液中甲醇的终体积浓度为20~30%，得到待测样品溶液。再取100μL该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条的样品垫上进行检测，其作为检测试纸条。另取等体积的甲醇浓度一致的甲醇水溶液做为阴性对照液，逐滴加入另一同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析纸条的样品垫上，其作为对照试纸条，20分钟后将检测试纸条和对照试纸条进行显色对照。

[0116] 检测结果：待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带，包被AFB1-BSA的检测线未显色，表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量等于或高于1ng/mL；包被ST-BSA的检测线未显色，表明待测样品溶液中杂色曲霉毒素含量等于或高于2ng/mL；包被CPA-OVA的检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近，表明待测样品溶液中环匹阿尼酸的含量低于1ng/mL。

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用

<160> 4

<210> 1

<211> 360bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

```
gagatccagc tgcagcagtc tggacctgac ctgatgaagc ctggggcttc 50
agtgaagata tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact acctactaca 100
tgcactgggt gaagcagagc catggaaaga gccttgagtg gattggatat 150
attgatcctt tcaatggtga tactaggtac aaccgaaat tcaaggccaa 200
ggccacattg actgtagaca aatcttccag cacagcctac atgcagctca 250
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagtttat 300
tactacggta gtagctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac 350
tgtctctgca 360
```

<210> 2

<211> 322bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 2

```
gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga 50
cacagtcacc atcacttgcc atgcaagtca gggcattagc agtaatatag 100
ggtgggttgca gcagaaacca gggaaatcat ttaagggcct gatctatcaa 150
ggaagcaact tggaagatgg agttccatca aggttcagtg gcagtggatc 200
tggagcagat tattctctca ccatcagcag cctggaatat gaagattttg 250
cagactatta ctgtgtacag tttgctcagt ttctctccac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa ac 322
```

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

```
Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Met Lys Pro Gly
1           5           10           15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
           20           25           30
Thr Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
```

	35	40	45
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Asp Thr Arg Tyr			
	50	55	60
Asn Pro Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	65	70	75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp			
	80	85	90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser			
	95	100	105
Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
	110	115	120
<210> 4			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 4			
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu			
1	5	10	15
Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser			
	20	25	30
Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys			
	35	40	45
Gly Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile			
	65	70	75
Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln			
	80	85	90
Phe Ala Gln Phe Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu			
	95	100	105
Leu Lys			
107			

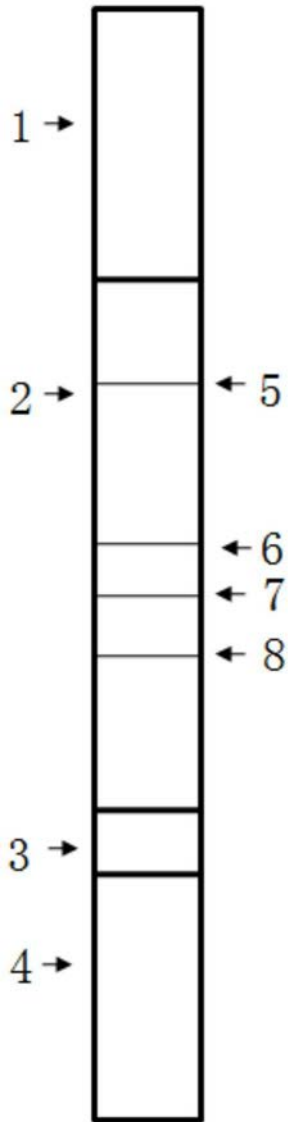


图1

专利名称(译)	同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用		
公开(公告)号	CN110108871A	公开(公告)日	2019-08-09
申请号	CN201910363226.0	申请日	2019-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	张奇 李培武 王督 张兆威 张文		
发明人	张奇 李培武 王督 张兆威 张文		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58		
代理人(译)	乔宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了同步检测黄曲霉菌真菌毒素的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用。其包括底板，底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫，硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线，所述检测线位于质控线的下方，个数为三条，呈间隔分布，所述三条检测线上分别包被各毒素蛋白偶联物，所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体；所述的抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO. C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生。其可用于黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素和环匹阿尼酸的同步检测，操作简单快速、灵敏度高。

