



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110108875 A

(43)申请公布日 2019.08.09

(21)申请号 201910364887.5

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 李培武 唐晓倩 姜俊 张奇  
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15页  
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉  
毒素A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明涉及同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条。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,硝酸纤维素膜上横向设有质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为四条,呈间隔分布,分别包被有各毒素蛋白偶联物,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;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。其可用于样品中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸,赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮四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。

1. 同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,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,硝酸纤维素膜上横向设有质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为四条,呈间隔分布,所述四条检测线上分别包被有黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物、环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物、赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物和玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体;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。

2. 根据权利要求1所述的同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,其特征在于:所述抗黄曲霉毒素用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,抗赭曲霉毒素A单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201329的杂交瘤细胞株1H2分泌产生,抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201328的杂交瘤细胞株2D3分泌产生。

3. 根据权利要求1所述的同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,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环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng;每厘米检测线所需的赭曲霉毒素A-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玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,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,所述的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100~200ng,所述的纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的用量为100~200ng,所述纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为200~400ng。

7. 权利要求1所述的同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层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、环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物、赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物和玉米赤霉烯酮-牛血清白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，得到四条检测线，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环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng；每厘米检测线所需的赭曲霉毒素A-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玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng；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60~120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、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液、纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮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环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100~200ng，所需的纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的用量为100~200ng，所需的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条。

8. 根据权利要求7所述的同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于：所述检测线的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市售质量浓度为0.01%的纳米金溶液，用0.4mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值；在搅拌的状态下缓慢加入1.5mL0.1mg/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0.1mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值；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；

所述纳米金标记的抗赭曲霉毒素A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0.4mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值；在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL 0.1mg/mL的抗赭曲霉毒素A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玉米赤霉烯酮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0.425mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值；在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL 0.1mg/mL的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体水溶液，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0.1mol/L碳酸钾水溶液为：13.8g碳酸钾溶于纯水定容至1000mL，0.22μm滤膜过滤所得；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8所述的同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的应用，其特征在于：方法如下：

将样品经甲醇提取，获得甲醇提取液，将甲醇提取液用水稀释，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多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多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;

当检测试纸条上包被赭曲霉毒素A-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赭曲霉毒素A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赭曲霉毒素A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赭曲霉毒素A的含量等于或高于2ng/mL;

当检测试纸条上包被玉米赤霉烯酮-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玉米赤霉烯酮含量低于1ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮含量等于或高于1ng/mL并低于4ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于4ng/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、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的含量。

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 $\mu$ L,检测时间为15-20分钟。

## 同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条

### 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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素 A和玉米赤霉烯酮多毒素混合污染的免疫层析试纸条及制备方法。

### 背景技术

[0002] 真菌毒素是真菌在生长过程中产生的有毒次级代谢产物,农产品在收获后处理不当,导致温度或湿度过高,可能引起真菌的生长繁殖,以及真菌毒素的污染。黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮是农产品中常见的真菌毒素。黄曲霉毒素与环匹阿尼酸是黄曲霉和寄生曲霉等产生,赭曲霉毒素是由曲霉和青霉产生,玉米赤霉烯酮是由镰刀菌产生,四种真菌毒素在农产品包括大米、玉米、花生、小麦、高粱、饲料等粮食与饲料中广泛发生。真菌毒素对人和动物具有极大的危害,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,主要作用于肝脏;环匹阿尼酸可导致心细胞变性,胞膜通透性增加,神经元坏死;赭曲霉毒素对肝脏与肾脏的毒害,大量毒素也可能引起动物的肠粘膜炎症和坏死;玉米赤霉烯酮具有雌激素毒性作用,能造成动物急慢性中毒,引起动物繁殖技能异常甚至死亡。鉴于真菌毒素的危害作用及其在农产品与饲料的广发发生,世界各国对其含量进行了严格的限定。随着人们对食品安全要求的提高,需要加强农产品中真菌毒素的检测,开发安全、可靠的检测技术,提高我国食品安全水平。

[0003] 现有的对黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮四种真菌毒素的检测方法主要包括薄层层析法、精密仪器分析法和免疫学分析法。薄层层析法检测真菌毒素时,不需要特殊的仪器设备,在一般实验室条件下都可进行,但检测试剂用量大、操作繁琐、其它组分干扰严重、准确性差,不能准确定量,且对实验人员和周围环境污染危害较大,不适于现场快速检测,其应用范围越来越窄。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的方法,其灵敏度高,准确性好,但仪器昂贵,要求所检测的样品的纯化程度高,样品前处理过程繁琐,耗时长,对实验环境和检测人员要求高,难以实现快速检测,检测成本高,不适用于现场快速检测。免疫分析方法克服了薄层层析法和仪器分析法的缺点,由于其特异性强、灵敏度高、样品前处理简单、成本低、对实验人员和周围环境的污染危害小、适于现场批量检测等优点在近年来获得了快速发展。基于胶体金标记抗体与抗原特异性结合反应的免疫层析技术由于其检测结果肉眼可见,不需要大型仪器设备,检测成本低,分析时间短,近年来在真菌毒素等微量残留物的定性、在线、快速检测上得到了广泛应用。

[0004] 我国小农户分散型的种植方式,农产品中真菌毒素发生率高,且同一农产品受多种真菌毒素污染的可能性大,因此迫切需要能同步检测多种真菌毒素的检测技术,以实现粮食及饲料等中真菌毒素混合污染的同步、快速监测。

## 发明内容

[0005] 本发明所要解决的问题是提供一种同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条及制备方法。其可用于样品中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮四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。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案为:

[0007] 同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,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,硝酸纤维素膜上横向设有质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为四条,呈间隔分布,所述四条检测线上分别包被有黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA)、环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物 (CPA-OVA)、赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物 (OTA-BSA) 和玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物 (ZEN-BSA),所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体;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。

[0008] 按上述方案,所述抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体为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,抗赭曲霉毒素A单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201329的杂交瘤细胞株1H2分泌产生,抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201328的杂交瘤细胞株2D3分泌产生。

[0009] 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。

[0010] 按上述方案,所述的吸水垫为吸水纸;所述的底板为纸板。

[0011] 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。

[0012] 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环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng;每厘米检测线所需的赭曲霉毒素A-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玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng。

[0013] 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,所述的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100~200ng,所述的纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的用量为100~200ng,所述纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为200~400ng。

[0014] 如上所述同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1)吸水垫的制备

[0016] 将吸水纸剪裁得吸水垫；

[0017] (2)检测垫的制备

[0018] 检测线的包被：

[0019] 将黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物、环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物、赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物和玉米赤霉烯酮-牛血清白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，得到四条检测线，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环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物物的包被量为 80~400ng；每厘米检测线所需的赭曲霉毒素A-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玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng；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60~120分钟；

[0020] 质控线的包被：

[0021] 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；

[0022] (3)样品垫的制备

[0023] 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；

[0024] (4)金标垫的制备

[0025] 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、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液、纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮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环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100~200ng，所需的纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的用量为100~200ng，所需的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮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；

[0026] (5)试纸条的组装

[0027] 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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条。

[0028] 按上述方案，所述检测线的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；



[0029] 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;

[0030] 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;

[0031] 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市售质量浓度为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。

[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值,;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。

[0033] 所述纳米金标记的抗赭曲霉毒素A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0.4mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,;在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL 0.1mg/mL的抗赭曲霉毒素A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。

[0034] 所述纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮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0.425mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,;在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL 0.1mg/mL的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体水溶液,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。

[0035] 所述的0.1mol/L碳酸钾水溶液为:13.8g碳酸钾溶于纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得;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。

[0036] 如上所述的同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的应用,方法如下:

[0037] 将样品经甲醇提取,获得甲醇提取液,将甲醇提取液用水稀释,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多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多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:

[0038] 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;

[0039] 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;

[0040] 当检测试纸条上包被赭曲霉毒素A-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赭曲霉毒素A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赭曲霉毒素A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赭曲霉毒素A的含量等于或高于2ng/mL;

[0041] 当检测试纸条上包被玉米赤霉烯酮-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玉米赤霉烯酮含量低于1ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮含量等于或高于1ng/mL并低于4ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于4ng/mL;

[0042] 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;

[0043] 最后经换算即得待测样品中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的含量。

[0044] 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  $\mu$ L,检测时间为15-20分钟。

[0045] 该免疫层析试纸条在黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮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、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体被溶解。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;

[0046] 当样品中含有赭曲霉毒素A时,赭曲霉毒素A将和金标垫上的纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-BSA)抗原的检测线时,抗原将和赭曲霉毒素A竞争结合纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中赭曲霉毒素A含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体将越少,在检测线上形成的显色带颜色越浅;当样品中含有玉米赤霉烯酮时,玉米赤霉烯酮将和金标垫上的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEN-BSA)抗原的检测线时,抗原将和玉米赤霉烯酮竞争结合纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中玉米赤霉烯酮含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体将越少,在检测线上形成的显色带颜色越浅。

[0047] 当四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,四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四种真菌毒素,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(AFB1-BSA)、包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的检测线(CPA-OVA)、包被赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-BSA)的检测线和包被玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEN-BSA)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、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮这四种真菌毒素的混合污染情况。

[0048] 本发明的有益效果:

[0049] (1) 在一条试纸条上实现对黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮四种真菌毒素的同步、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。

[0050] (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,环匹阿尼酸的最低检测限为1ng/mL,对赭曲霉毒素A的最低检测限为0.5ng/mL,对玉米赤霉烯酮的最低检测限为1ng/mL,该检测限能满足欧盟对食品中这四种真菌毒素的限量要求。

[0051] (3) 样品前处理方法简单。样品前处理只需要将甲醇水提取液加入样品中震荡提取,离心取上清,取上清液稀释即可进行检测,整个样品前处理过程简单、快速。

## 附图说明

[0052] 图1为本发明的同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的结构示意图。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I、7环匹阿尼酸检测线II、8赭曲霉毒素A检测线III、9玉米赤霉烯

酮检测线IV。

### 具体实施方式

[0053] 实施例1:抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体、抗赭曲霉毒素A单克隆抗体,抗环匹阿尼酸单克隆抗体,抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的获得。

[0054] a.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

[0055] 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:

[0056] 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;

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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 $1.2 \times 10^5$ ,即鼠腹水抗体稀释 $1.2 \times 10^5$ 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(IC<sub>50</sub>)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%。

[0060] 杂交瘤细胞株YTT-2的筛选:

[0061] 1.抗原合成及动物免疫

[0062] 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 NaHCO<sub>3</sub>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。

[0063] 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100 $\mu$ g免疫原溶于200 $\mu$ L PBS直接注射腹腔。弗氏佐剂购于Sigma-Aldrich公司。

#### [0064] 2.细胞融合

[0065] 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:

[0066] 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 $^{\circ}$ C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。

#### [0067] 3.细胞株的筛选及克隆

[0068] 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IC<sub>50</sub>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。

[0069] 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

[0070] (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。

[0071] (2) 合成cDNA:以步骤1获得的总RNA为模板,oligo(dT)<sub>15</sub>为引物,按照SuperScript<sup>TM</sup>-2II反转录酶说明书进行反转录,合成cDNA第一链;引物oligo(dT)<sub>15</sub>由Invitrogen购得;

[0072] (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 $^{\circ}$ C 30s、55 $^{\circ}$ C 50s、72 $^{\circ}$ C 1min,扩增30个循环,最后72 $^{\circ}$ C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DH5 $\alpha$ 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)。

[0073] 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。

[0074] b.抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的获得

[0075] 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;

[0076] 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。

[0077] c.抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的获得

[0078] 赭曲霉毒素A单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201329的杂交瘤细胞株1H2分泌产生,具体根据申请号为201310115921.8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1H2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,即得纯化好的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体,将抗体置-20℃冰箱中备用;

[0079] 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。

[0080] d. 抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的获得

[0081] 玉米赤霉烯酮单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201328的杂交瘤细胞株2D3分泌产生,具体根据申请号为201310115825.3的专利中报道的方法预先制得,制备方法为:将杂交瘤细胞株2D3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,即得纯化好的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体,将抗体置-20℃冰箱中备用;

[0082] 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。

[0083] 实施例2:

[0084] 同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,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,硝酸纤维素膜上横向设有质控线5和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为四条,呈间隔分布,所述四条检测线上分别包被有黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)、环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物(CPA-OVA)、赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-BSA)和玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEN-BSA),分别为6黄曲霉毒素检测线I、7环匹阿尼酸检测线II、8赭曲霉毒素A检测线III、9玉米赤霉烯酮检测线IV,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体;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。

[0085] 其制备方法,步骤如下:

[0086] (1) 吸水垫的制备

[0087] 将吸水纸剪裁成16mm即得吸水垫;

[0088] (2) 检测垫的制备

[0089] 检测线的包被:

[0090] 将黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)用包被缓冲液分别配制成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的包被量为100ng;将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物(CPA-OVA)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所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80ng;将赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-BSA)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所需的赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100ng;将玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEN-BSA)用包被缓冲液分别配制成0.25mg/mL的包被液,于距检测线III 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IV,每厘米检测线IV所需的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100ng,然后于37℃条件下干燥60分钟;

[0091] 质控线的包被:

[0092] 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;

[0093] (3) 样品垫的制备

[0094] 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;

[0095] (4) 金标垫的制备

[0096] 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,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、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液、纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮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环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100ng,所需的纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的用量为100ng,所需的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为200ng,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;抗赭曲霉毒素A单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201329的杂交瘤细胞株1H2分泌产生;抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201328的杂交瘤细胞株2D3分泌产生;

[0097] (5) 试纸条的组装

[0098] 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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条。

[0099] 所述包被抗原的包被液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;

[0100] 所述的兔抗鼠多克隆抗体的包被液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;

[0101] 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;

[0102] 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,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。

[0103] 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值,;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。

[0104] 所述纳米金标记的抗赭曲霉毒素A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0.4mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,;在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL 0.1mg/mL的抗赭曲霉毒素A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。

[0105] 所述纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮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0.425mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值;在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL 0.1mg/mL的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体水溶液,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。

[0106] 所述的0.1mol/L碳酸钾水溶液为:13.8g碳酸钾溶于纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得;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。

[0107] 上述同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条在玉米样品检测中的应用:

[0108] 称取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100 $\mu$ L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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上,其作为对照试纸条,15分钟后读取结果。

[0109] 检测结果:1#检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线I和检测线II颜色与对照试纸条中的检测线I和检测线II颜色接近,检测线III和检测线V未显色,由此判定:黄曲霉毒素含量低于0.25ng/mL;环匹阿尼酸含量低于1ng/mL;赭曲霉毒素A的含量等于或高于2ng/mL;玉米赤霉烯酮的含量等于或高于4ng/mL;

[0110] 2#检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线I颜色与对照试纸条中的检测线I颜色接近,检测线II未显色,检测线III颜色比对照试纸条检测线III浅,检测线V未显色,由此判定:1#待测样品溶液中黄曲霉毒素含量低于0.25ng/mL;环匹阿尼酸的含量等于或高于5ng/mL;赭曲霉毒素A含量等于或高于0.5ng/mL并低于2ng/mL;玉米赤霉烯酮的含量等于或高于4ng/mL;

[0111] 3#检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线I、II、III、V时均不显色,表明:待测样品溶液中黄曲霉毒素的含量等于或高于1ng/mL;环匹阿尼酸的含量等于或高于5ng/mL;赭曲霉毒素A的含量等于或高于2ng/mL;玉米赤霉烯酮的含量等于或高于4ng/mL;

[0112] 实施例3同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,步骤如下:

[0113] (1)吸水垫的制备

[0114] 将吸水纸剪裁成18mm即得吸水垫;

[0115] (2)检测垫的制备

[0116] 检测线的包被:将黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)用包被缓冲液分别配制成0.5mg/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的包被量为300ng;将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物(CPA-OVA)用包被缓冲液分别配制成0.5mg/mL的包被液,于距检测线I2mm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所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为400ng;将赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-BSA)用包被缓冲液分别配制成0.5mg/mL的包被液,于距检测线II2mm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所需的赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物的包被量为300ng;将玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEN-BSA)用包被缓冲液分别配制成0.5mg/mL的包被液,于距检测线III2mm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IV,每厘米检测线IV所需的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的包被量为300ng,然后于40℃条件下干燥120分钟;

[0117] 质控线的包被:

[0118] 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40℃条件下干燥120分钟;

[0119] (3) 样品垫的制备

[0120] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于40℃条件下干燥16小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0121] (4) 金标垫的制备

[0122] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于40℃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、纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液、纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮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环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为200ng,所需的纳米金标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的用量为200ng,所需的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为400ng,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;抗赭曲霉毒素A单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201329的杂交瘤细胞株1H2分泌产生;抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201328的杂交瘤细胞株2D3分泌产生;

[0123] (5) 试纸条的组装

[0124] 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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条。

[0125] 所述包被抗原的包被液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;

[0126] 所述的兔抗鼠多克隆抗体的包被液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;

[0127] 所述的封闭液是按照下述方法配置得到的:将2g卵清蛋白,5g蔗糖,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;

[0128] 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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上,其作为对照试纸条,20分钟后读取结果。

[0129] 检测结果:检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线I的颜色比对照试纸条中检测线I的颜色浅,检测线II、检测线III和检测线IV的颜色分别与对照试纸条中检测线II、检测线III和检测线IV的颜色接近,由此判定: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;环匹阿尼酸含量低于1ng/mL;赭曲霉毒素A含量低于0.5ng/mL;玉米赤霉烯酮含量低于1ng/mL。

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条

<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 aacccgaaat tcaaggccaa 200
ggccacattg actgtagaca aatcttccag cacagcctac atgcagctca 250
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagtttat 300
tactacggta gtagctggtt 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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;400&gt; 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

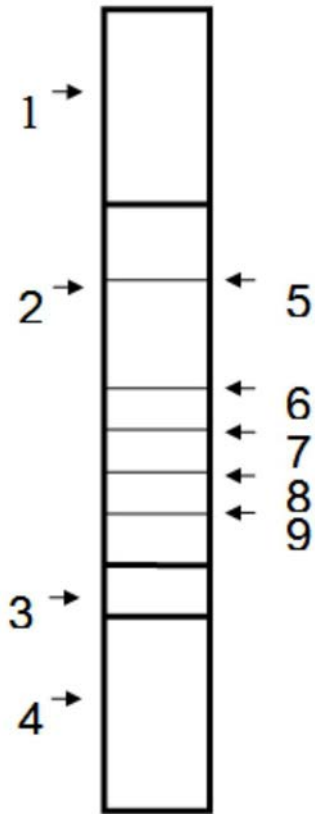


图1

专利名称(译)	同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN110108875A</a>	公开(公告)日	2019-08-09
申请号	CN201910364887.5	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	李培武 唐晓倩 姜俊 张奇 张文		
发明人	李培武 唐晓倩 姜俊 张奇 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	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条。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，硝酸纤维素膜上横向设有质控线和检测线，所述检测线位于质控线的下方，个数为四条，呈间隔分布，分别包被有各毒素蛋白偶联物，所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体；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。其可用于样品中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸，赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮四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。

