



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108912090 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810402557.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2018.04.28

C07D 311/80(2006.01)

(66)本国优先权数据

C07K 14/77(2006.01)

201810146471.1 2018.02.12 CN

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/14(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/532(2006.01)

CGMCC NO.15581 2018.04.03

G01N 33/558(2006.01)

(71)申请人 北京农业质量标准与检测技术研究中心

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号北京市农林科学院

(72)发明人 王蒙 姜冬梅 冯晓元 许文涛
韦迪哲 田晓琴

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 黄爽

权利要求书2页 说明书9页 附图3页

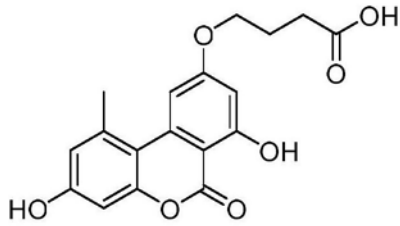
(54)发明名称

一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条,其是利用结构如式(I)所示的半抗原制备的快速检测交链孢毒素(AOH和AME)的免疫层析试纸条,本发明采用一步间接竞争免疫层析技术开发出可快速定性或半定量检测样品中AOH和AME两种交链孢毒素总含量的免疫层析试纸条,操作简单,经济实用,适合于现场检测,可广泛应用于农产品和食品等样品中AOH和AME两种交链孢毒素污染的检测及快速筛查。

1. 交链孢毒素半抗原,其特征在於,其结构如式(I)所示:



式(I)。

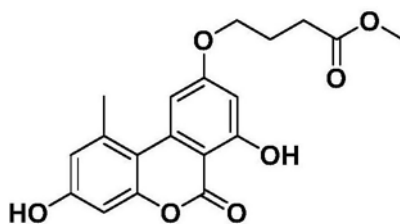
2. 交链孢毒素全抗原,其特征在於,由权利要求1所述交链孢毒素半抗原与载体蛋白偶联后得到的;

其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优选牛血清白蛋白、卵清蛋白。

3. 由权利要求2所述交链孢毒素全抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体。

4. 权利要求1所述交链孢毒素半抗原的制备方法,其特征在於,将交链孢酚70mg溶解到DMF 5mL中,加入碳酸钾47mg和溴丁酸甲酯30mg,加热到40℃反应5h;冷却,加入10mL水稀释,用乙酸乙酯萃取3次,合并有机相,干燥,减压蒸去溶剂;然后过100-200目硅胶柱进行分离,以CH₂Cl₂:CH₃OH体积比20:1为洗脱剂,得到中间体I,其结构如式(II)所示;将中间体I 45mg溶解到四氢呋喃-甲醇-水7mL中,加入氢氧化钠15mg搅拌过夜;减压蒸去溶剂,加入5mL水稀释,盐酸调pH为5,过滤,干燥即得;

其中,四氢呋喃-甲醇-水的体积比为3:3:1;



式(II)。

5. 由权利要求1所述交链孢毒素半抗原,或权利要求2所述交链孢毒素全抗原,或权利要求3所述特异性抗体制备的交链孢毒素检测试剂或试剂盒,其中所述交链孢毒素选自交链孢酚、交链孢酚单甲醚。

6. 权利要求1所述交链孢毒素半抗原,或权利要求2所述交链孢毒素全抗原,或权利要求3所述特异性抗体,或权利要求5所述检测试剂或试剂盒在交链孢毒素的免疫分析检测中的应用,其中所述交链孢毒素选自交链孢酚、交链孢酚单甲醚。

7. 权利要求1所述交链孢毒素半抗原,或权利要求2所述交链孢毒素全抗原,或权利要求3所述特异性抗体,或权利要求5所述检测试剂在制备交链孢毒素的胶体金检测试纸条中的应用,其中所述交链孢毒素选自交链孢酚、交链孢酚单甲醚。

8. 一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条,其特征在於,包括样品垫、胶体金结合垫、反应膜、吸水垫和底板,所述反应膜上设有检测线和质控线,所述样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫依次粘贴在底板上;

其中,所述胶体金结合垫上包被有交链孢毒素特异性抗体-胶体金标记物;所述检测线包被有权利要求2所述交链孢毒素全抗原,所述质控线包被有羊抗鼠二抗。

9. 根据权利要求8所述的试纸条,其特征在於,所述交链孢毒素特异性抗体-胶体金标

记物的制备方法如下:用还原剂将氯金酸还原成胶体金纳米颗粒;将胶体金与交链袍毒素特异性抗体混合孵育30min,加入牛血清白蛋白使其终浓度为1%,反应30min后;离心纯化、浓缩即得交链袍毒素特异性抗体-胶体金标记物。

10. 利用权利要求8或9所述试纸条检测交链袍毒素的方法,其特征在于,将待测样品粉碎,向2~10g样品中加入体积浓度为80%的甲醇水溶液8~50mL,混匀,振荡提取30min,静置5~10min,将上清液用水稀释,使稀释液中甲醇的终体积浓度为20%~35%,得到待测样品溶液;将待测样品溶液滴加到所述试纸条的样品垫上进行检测,根据检测线和质控线的显色结果判定。

一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全监测和免疫分析检测技术领域,具体地说,涉及一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条。

背景技术

[0002] 交链孢毒素(Alternaria toxins)主要是由交链孢属产生的一系列有毒的次生代谢产物。由于交链孢菌能在低温下生长繁殖,是造成贮运过程中农产品腐败变质的重要原因。目前已发现的有70多种,其中10种对动物和植物具有毒性作用。交链孢酚(Alternariol,AOH)和交链孢酚单甲醚(Alternariol monomethyl ether,AME)属于二苯并吡喃酮类毒素,是一类具有致突变性、基因毒性和致癌性等多种毒性的小分子化合物。据报道,河南省林县小麦受交链孢污染严重,且小麦原粮中AOH和AME毒素含量较高,已证明与该地区食管癌高发密切相关。EFSA在2011年和2016年进行两次风险评估结果表明,随膳食摄入的AOH和AME毒素对公众健康存在潜在风险。我国已于2017年将小麦及面粉中交链孢毒素污染列入国家食品污染物及有害因素的监控计划。因此,建立准确、高效的快速检测交链孢毒素的方法进而提高政府监管的时效性是目前亟待解决的关键问题。

[0003] 目前,国内外尚未制定AOH和AME毒素在农产品及食品中的限量标准,其主要采用传统的大型仪器检测方法,如气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联和毛细管电泳等,不仅费时费力,且操作要求高,不适宜大批量的快速筛选,已不能满足社会对食品安全监管的需要。免疫分析法主要有酶联免疫分析法和胶体金免疫层析法,具有快速、灵敏、操作简单等优点,近年来获得了快速发展。酶联免疫吸附法是目前常使用的一种检测方法,它具有快速、灵敏、可定量、对样品纯度要求不高,特别适用于大批量样品的检测,但由于需要酶标仪和操作熟练的人员以及检测时间相对较长,所以不适合现场快速检测。基于胶体金标记抗体与抗原特异性结合反应的免疫层析试纸条的检测结果肉眼可见,不需要大型仪器设备,检测成本低,分析时间短,从而可实现对各种真菌毒素等微量残留物的定性、在线、快速检测。

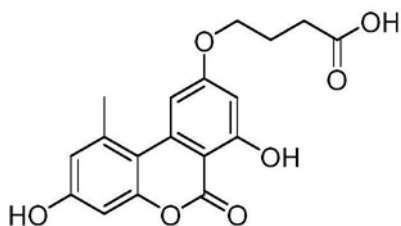
发明内容

[0004] 本发明的目的是提供交链孢毒素半抗原及其制备方法与应用。

[0005] 本发明的另一目的是提供一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条(即一种快速检测交链孢毒素的免疫层析试纸条)及其应用。

[0006] 为了实现本发明目的,本发明的交链孢毒素半抗原,其结构如式(I)所示:

[0007]



式(I)

[0008] 本发明还提供交链孢毒素全抗原,由所述交链孢毒素半抗原与载体蛋白偶联后得到的,即半抗原的羧基与载体蛋白的游离氨基发生缩合反应。

[0009] 其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白等;优选牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)。

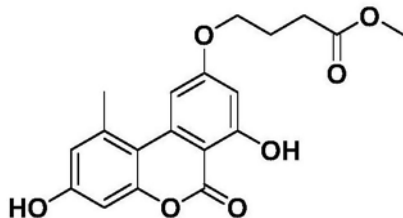
[0010] 所述交链孢毒素全抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体。其中,所述交链孢毒素单克隆抗体是以交链孢毒素半抗原-载体蛋白偶联物(如交链孢毒素-BSA)作为免疫原,通过免疫试验动物,结合杂交瘤细胞制备技术获得的单抗。优选地,所述单抗的效价为1:810000。

[0011] 采用ELISA法测定所述单抗的效价。ELISA检测效价所用的包被原,其制备方法如下:

[0012] 取交链孢毒素半抗原8mg,加0.2mL DMF溶解,澄清,加入DCC 4.13mg,加入NHS 2.3mg,室温搅拌2h,过滤,除去沉淀物,得到半抗原活化液A液;取卵清蛋白(OVA) 50mg,加8mL 0.05mol/L pH 7.2PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5h。停止反应,0.02M PBS缓冲液透析3d,每天换液三次,得到交链孢毒素-OVA包被抗原,分装,-20℃保存,备用。

[0013] 本发明的交链孢毒素半抗原可通过如下方法制备:将交链孢酚70mg溶解到DMF 5mL中,加入碳酸钾47mg和溴丁酸甲酯30mg,加热到40℃反应5h;冷却,加入10mL水稀释,用乙酸乙酯萃取3次,合并有机相,干燥,减压蒸去溶剂;然后过100-200目硅胶柱进行分离,以CH₂Cl₂:CH₃OH体积比20:1为洗脱剂,得到中间体I,其结构如式(II)所示;将中间体I45mg溶解到四氢呋喃-甲醇-水7mL中,加入氢氧化钠15mg搅拌过夜;减压蒸去溶剂,加入5mL水稀释,盐酸调pH为5,过滤,干燥即得。其中,四氢呋喃-甲醇-水的体积比为3:3:1。

[0014]



式(II)

[0015] 交链孢毒素半抗原合成路线见图1。

[0016] 本发明还提供由所述交链孢毒素半抗原,或所述交链孢毒素全抗原,或所述特异性抗体制备的交链孢毒素(交链孢酚、交链孢酚单甲醚)检测试剂或试剂盒。

[0017] 本发明还提供所述交链孢毒素半抗原,或所述交链孢毒素全抗原,或所述特异性抗体,或所述检测试剂或试剂盒在交链孢毒素(交链孢酚、交链孢酚单甲醚)的免疫分析检测中的应用。

[0018] 本发明还提供所述交链孢毒素半抗原,或所述交链孢毒素全抗原,或所述特异性抗体,或所述检测试剂在制备交链孢毒素(交链孢酚、交链孢酚单甲醚)的胶体金检测试纸条中的应用。

[0019] 本发明还提供一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条(图4),包括样品垫、胶体金结合垫、反应膜、吸水垫和底板,所述反应膜上设有检测线和质控线,所述样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫依次粘贴在底板上。优选地,所述胶体金结合垫1/3~1/2被覆盖于样品垫下。

[0020] 其中,所述胶体金结合垫上包被有交链孢毒素特异性抗体-胶体金标记物,所述交链孢毒素特异性抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体;所述检测线包被有所述交链孢毒素全抗原(例如交链孢毒素半抗原-OVA偶联物),所述质控线包被有羊抗鼠二抗。

[0021] 所述交链孢毒素特异性抗体-胶体金标记物的制备方法如下:用还原剂将氯金酸还原成胶体金纳米颗粒;将胶体金与交链孢毒素特异性抗体混合孵育30min,加入牛血清白蛋白使其终浓度为1%,反应30min后;离心纯化、浓缩即得交链孢毒素特异性抗体-胶体金标记物。

[0022] 优选地,所述还原剂为1%柠檬酸三纳水溶液。所述胶体金的纳米颗粒大小为13~40nm,更优选为18nm。

[0023] 在本发明的一个具体实施方式中,交链孢毒素特异性抗体-胶体金标记物的制备如下:

[0024] 取制备好的粒径大小为18nm的胶体金溶液2mL,用0.2mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至7.0;随后逐滴加入200 μ L浓度为20-100 μ g/mL(优选100 μ g/mL)的A0H单克隆抗体,室温条件下磁力搅拌反应2h;逐滴加入10%的BSA,使其在胶体金溶液中的终浓度为1%(体积分数),室温条件下磁力搅拌反应30min;加入10%的PEG20000溶液,并使其终浓度为0.2%,室温条件下磁力搅拌30min;12000rpm离心30min,弃上清,收集胶体金沉淀;沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4 $^{\circ}$ C备用。

[0025] 其中,所述复溶缓冲液为:0.02%~0.1%酪蛋白(质量分数)、0.05%~0.2%(质量分数)吐温-80、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。优选地,复溶缓冲液为:0.02%酪蛋白(质量分数)、0.05%(质量分数)吐温-80、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0026] 所述底板可为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品垫可为吸滤纸或滤油纸;所述胶体金结合垫可为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜可为硝酸纤维素膜(NC膜)或醋酸纤维素膜。

[0027] 优选地,本发明所述单克隆抗体是由杂交瘤细胞株A0H分泌产生的单抗。杂交瘤细胞株A0H现已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101,保藏编号CGMCC NO.15581,保藏日期2018年4月3日。

[0028] 本发明还提供所述免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0029] (1) 制备喷涂有交链孢毒素单克隆抗体-胶体金标记物的胶体金结合垫;

[0030] (2) 制备具有包被有交链孢毒素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠二抗的质控线的反应膜;

[0031] (3) 将步骤(1)和(2)制备好的胶体金结合垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0032] 具体地,所述免疫层析试纸条的制备方法如下:

[0033] 1) 半抗原制备:将A0H与溴丁酸甲酯经过一系列反应得到交链孢毒素半抗原产物;

[0034] 2) 将交链孢毒素半抗原与载体蛋白偶联,得到交链孢毒素半抗原-载体蛋白偶联物;

[0035] 3) 用交链孢毒素半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞

通过融合、筛选,得到交链孢毒素单克隆杂交瘤细胞株;

[0036] 4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金,所述胶体金的纳米颗粒大小为13~40nm,更优选为18nm;

[0037] 5) 将步骤3) 制备的交链孢毒素单克隆抗体加入步骤5) 制备的胶体金中,得到交链孢毒素单克隆抗体-胶体金标记物;

[0038] 6) 将交链孢毒素单克隆抗体-胶体金标记物喷涂在胶体金结合垫上,37℃烘1h后取出,置于干燥环境中保存备用,优选的所述金标垫上每cm喷涂长度所需的纳米金标记的抗交链孢毒素单克隆抗体的用量为200~400ng;

[0039] 7) 将交链孢毒素半抗原-载体蛋白偶联物包被在反应膜上构成检测线,所述的检测线上每cm所需要的交链孢毒素-载体蛋白偶联物的包被量为800~1000ng;

[0040] 8) 将羊抗鼠抗体包被在反应膜上构成质控线,所述的检测线上每cm所需要的羊抗鼠多克隆抗体的包被量为100~200ng;

[0041] 9) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH为7.2、0.1mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2h,37℃下烘干2h;

[0042] 10) 在底板上按顺序粘贴上样品吸收垫、胶体金结合垫、反应膜、吸水垫,样品吸收垫盖住胶体金结合垫,最后切成3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装,4~30℃条件下可保存12个月。

[0043] 本发明进一步提供利用所述免疫层析试纸条检测(农产品和食品中)交链孢毒素(AOH和AME总量)的方法,将待测样品粉碎,向2~10g样品中加入体积浓度为80%的甲醇水溶液8~50mL,混匀,振荡提取30min,静置5~10min,将上清液用水稀释,使稀释液中甲醇的终体积浓度为20%~35%,得到待测样品溶液;将待测样品溶液(60~100μL)滴加到所述试纸条的样品垫上进行检测(反应10min),根据检测线和质控线的显色结果判定。

[0044] 由于AOH和AME具有相似的结构(AME为AOH的甲基化产物),本发明的检测AOH和AME总量的快速检测试纸条,从设计交链孢毒素的半抗原结构出发,制备通用型交链孢毒素单克隆抗体。将交链孢单克隆抗体-胶体金标记物固定于胶体金结合垫上,当样品中含有AOH或AME中的一种或两种时,在流动过程中与胶体金结合垫上的交链孢毒素单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成毒素-抗体-胶体金标记物。样本中的毒素与反应膜检测线上的交链孢毒素半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合交链孢毒素单克隆抗体-胶体金标记物,根据检测线红色条带有无或颜色深浅来判断待测样品液中是否含有交链孢毒素。

[0045] 检测结果的判断图5所示。

[0046] 阴性:检测线(T)显色比质控线(C)显色深或显色一致,表示样本中AOH和AME的总量低于检测限,判为阴性。

[0047] 阳性:检测线(T)显色比质控线(C)显色浅或检测线(T)不显色,表示样本中AOH和AME的总量等于或高于检测限,判为阳性。

[0048] 无效:当质控线(C)不显示出红色条带,则无论检测线(T)显示出红色条带与否,该试纸条均判为无效。

[0049] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0050] (一) 本发明的检测AOH和AME总量的快速检测试纸条,从设计交链孢毒素的半抗原结构出发,制备通用型交链孢毒素单克隆抗体。当样品中含有AOH或AME中的一种或两种时,

应用本发明的胶体金免疫层析试纸条,可快速检测样品中AOH和AME总量的污染情况,具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低,易推广等优点。

[0051] (二)本发明采用一步间接竞争免疫层析技术开发出可快速定性或半定量检测样品中AOH和AME两种交链孢毒素总含量的免疫层析试纸条,操作简单,经济实用,适合于现场检测,可广泛应用于农产品和食品等样品中AOH和AME两种交链孢毒素污染的检测及快速筛查。

[0052] (三)本发明的试纸条可检测两种交链孢毒素的总量。由于AME为AOH的甲基化产物,具有相类似的结构,以此为基础,本发明从设计AOH的半抗原结构出发,制备免疫原和包被原,进而筛选高专一性、高亲和性并能同时识别AOH和AME的单克隆抗体,所筛选的AOH单克隆抗体与AME 100%交叉,并进一步将其应用于胶体金免疫层析试纸条的制备中,因此用于检测AOH和AME毒素总量,实际应用价值大。

[0053] (四)本发明提供的快速检测AOH和AME毒素总量的免疫层析试纸条对样品中交链孢毒素总量的最低检测限为10ng/g,检测灵敏度高。

[0054] (五)本发明的试纸条具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合基层单位使用、储存简单、保质期长的优点。用本发明试纸条检测AOH和AME毒素总量的方法简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0055] 图1为本发明式(I)所示的交链孢毒素半抗原合成路线图。

[0056] 图2为本发明所述交链孢毒素半抗原核磁共振氢谱图。

[0057] 图3为本发明所述交链孢毒素半抗原LC-MS谱图。

[0058] 图4为本发明所述快速检测交链孢毒素的免疫层析试纸条的结构示意图;其中,1-样品垫,2-胶体金结合垫,3-反应膜,4-吸水垫,5-底板,6-检测线,7-质控线。

[0059] 图5为本发明所述快速检测交链孢毒素的免疫层析试纸条的检测结果判定图;其中,A-C分别表示检测结果阴性、阳性和无效。

具体实施方式

[0060] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0061] 实施例1 快速检测交链孢毒素(AOH和AME)的免疫层析试纸条的制备

[0062] 将AOH(70mg,0.17mmol)溶解到DMF(5mL)中,加入碳酸钾(47mg,0.34mmol)和溴丁酸甲酯(30mg,0.17mmol),加热到40℃反应5h。冷却并加入10mL水稀释,用乙酸乙酯萃取三次,合并有机相,干燥,减压蒸去溶剂。然后通过100-200目硅胶柱(CH₂Cl₂:CH₃OH体积比20:1为洗脱剂)进行分离,得到相对较纯的中间体I。但是中间体I中仍然含有部分上两个溴丁酸甲酯的副产物,且副产物与中间体I在硅胶板上极性相差很小。由于下一步甲酯水解后所得产物的溶解性很差,所以选择在这一步借助制备液相色谱仪进行分离。得到45mg纯的中间体I(收率74%)。

[0063] 将中间体I(45mg,0.13mmol)溶解到四氢呋喃/甲醇/水(3mL/3mL/1mL)中,加入氢氧化钠(15mg,0.39mmol)搅拌过夜。减压蒸去溶剂,加入5mL水稀释,用1N盐酸调节pH=5,析

出白色固体。过滤,干燥得到交链孢毒素半抗原产物(35mg,78%)。表征:高效液相(214nm纯度95.8%,254nm纯度96.4%),串联质谱(产物分子量为344,谱图出M+1=345),核磁氢谱(氘代DMSO,12.20和10.38各出一个酚羟基氢;11.82出一个羧基氢;7.21,6.73,10.38一共出四个芳环上的氢;4.18-4.15出两个靠近羧基的亚甲基氢;2.74出三个甲基氢;2.44-2.41出脂肪链上最中间亚甲基氢;2.01-1.98出第三个亚甲基氢)。这些峰的存在,证明间隔臂偶联成功。交链孢毒素半抗原结构如式(I)所示。交链孢毒素半抗原核磁共振氢谱图见图2。交链孢毒素半抗原LC-MS谱图见图3。

[0064] 2、免疫原的制备

[0065] 取交链孢毒素半抗原18mg,加0.3mL DMF溶解,澄清,加碳二亚胺(EDC)8.6mg,搅拌,澄清,加N-琥珀酰亚胺(NHS)5.2mg,室温搅拌活化3h,得到A液;取牛血清白蛋白(BSA)50mg,加8mL 0.05mol/L pH7.2PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5h。停止反应,0.02M PBS缓冲液透析3d,每天换液三次,得到交链孢毒素-BSA免疫原,分装,-20℃保存,备用。

[0066] 3、包被原的制备

[0067] 取交链孢毒素半抗原8mg,加0.2mL DMF溶解,澄清,加二环己基碳二亚胺(DCC)4.13mg,加N-琥珀酰亚胺(NHS)2.3mg,室温搅拌2h,过滤,除去沉淀物,得到半抗原活化液A液;取卵清蛋白(OVA)50mg,加8mL 0.05mol/L pH7.2PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5h。停止反应,0.02M PBS缓冲液透析3d,每天换液三次,得到交链孢毒素-OVA包被抗原,分装,-20℃保存,备用。

[0068] 4、交链孢毒素单克隆抗体的制备

[0069] (1) 动物免疫

[0070] 将步骤2得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。第一次免疫将交链孢毒素完全抗原与等量弗氏完全佐剂乳化后,于小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于4周后进行,采用弗氏不完全佐剂与等量交链孢毒素完全抗原乳化,于小鼠腹腔注射。第三次免疫与第二次免疫间隔4周,免疫方式与其相同,第四次免疫于第三次免疫3周后进行,免疫方式与第二次免疫相同,同样为腹腔注射。4次免疫剂量相同。第四次免疫后1周,尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA法监测小鼠血清效价,并用间接竞争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加强免疫,免疫剂量为之前的2倍。

[0071] (2) 细胞融合和克隆

[0072] 取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按8:1(数量比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,待细胞融合后第12d左右,细胞集落长到占孔底1/2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ELISA法筛选出抗交链孢毒素而不抗载体蛋白BSA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,用AOH和AME共2种作为竞争原,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),利用有限稀释法,将阳性细胞在检测后的2d内进行克隆,直到得到能够稳定分泌交链孢毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株AOH(CGMCC NO.15581);将此杂交瘤细胞株进行扩大培养和传代,无限量地产生特异性单克隆抗体。

[0073] (3) 细胞冻存和复苏

[0074] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^6 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0075] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0076] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0077] 所述细胞培养基为向RPMI1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20% (质量分数),碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2% (质量分数);所述细胞培养基的pH为7.4。

[0078] 5、抗体效价的测定

[0079] 在酶标板的每个孔中分别包被100μL稀释到一定浓度的包被原,4℃包被过夜;清洗液洗板1次后,每孔加入封闭液150μL,37℃孵育2h后甩干;每孔分别加入用抗体稀释液稀释的抗体100μL,37℃孵育0.5h;清洗液洗板3次后,每孔分别加入用酶标二抗稀释液稀释2500倍的酶标二抗,37℃孵育0.5h;清洗液洗板3次后,再加入显色液(50μL底物液A液,50μL底物液B液。TMB双组分显色液,购自北京索莱宝科技有限公司),室温避光反应10-15min;加入50μL终止液终止反应;用酶标仪测定吸光度,吸收波长为450/630nm。本发明制备的交链孢毒素单克隆抗体的效价可达到1:810000。

[0080] 6、抗体特异性试验

[0081] 用间接竞争ELISA法鉴定交链孢毒素单克隆抗体对AOH、AME及其他三种交链孢毒素的灵敏度,其中对AOH和AME分别为1.79和1.86pg/mL,交叉反应率分别为100.0%和103.9%,而对细交链孢酮酸、交链孢烯和腾毒素的交叉反应率小于0.01%。

[0082] 7、交链孢毒素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0083] (1) 胶体金的制备

[0084] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01% (质量分数),取100mL置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入2.5mL 1%柠檬酸三钠,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。

[0085] (2) 交链孢毒素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0086] 取制备好的粒径大小为18nm的胶体金溶液2mL,用0.2mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至7.0;随后逐滴加入200μL浓度为100μg/mL的单克隆抗体,室温条件下磁力搅拌反应2h;逐滴加入10%的BSA,使其在胶体金溶液中的终浓度为1% (体积分数),室温条件下磁力搅拌反应30min;加入10%的PEG 20000溶液,并使其终浓度为0.2%,室温条件下磁力搅拌30min;12000rpm离心30min,弃上清,收集胶体金沉淀;沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用。

[0087] 复溶缓冲液为:0.02%酪蛋白(质量分数)、0.05% (质量分数)吐温-80、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0088] 8、胶体金结合垫的制备

[0089] 将胶体金结合垫浸泡在预处理缓冲液(0.5%BSA,1.5g蔗糖和0.01g叠氮钠溶于50mL10mM pH 7.2的磷酸盐缓冲液)中,均匀浸湿1h,随后用大量的磷酸盐缓冲液进行彻底

清洗,37℃烘3h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的交链袍毒素单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在胶体金结合垫上,每1cm胶体金结合垫喷涂0.01mL交链袍毒素单克隆抗体-胶体金标记物后,置于37℃环境中(湿度<20%)60min后取出,置于4℃干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

[0090] 9、反应膜的制备

[0091] 将交链袍毒素半抗原-OVA偶联物包被到反应膜上构成检测线,将羊抗鼠抗体包被在反应膜上构成质控线。

[0092] 包被过程:用磷酸缓冲液将交链袍毒素半抗原-OVA偶联物稀释到1.0mg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T线),包被量为0.8μL/cm;用0.01mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗体稀释到200μg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C线),包被量为1.0μL/cm。C线与T线之间的距离约为5mm,将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2h。

[0093] 为了防止NC膜的非特异性吸附,对干燥后的固定有包被原和二抗的NC膜进行封闭:将固定有包被原和羊抗鼠二抗的NC膜浸入到NC膜封闭液(0.5g BSA,0.25g脱脂奶粉和150μL Tween-20溶于50mLTris-HCl缓冲液)中,并放于37℃恒温箱中维持30min。随后用大量的PB缓冲液对其进行彻底清洗后,室温条件下干燥,最后4℃干燥条件下存放备用。

[0094] 10、样品吸收垫的制备

[0095] 将样品吸收垫置于含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH7.2、0.1mol/L磷酸盐缓冲液中浸泡2h,37℃烘2h备用。

[0096] 11、试纸条的组装

[0097] 将样品吸收垫、胶体金结合垫、反应膜、吸水垫依次按顺序粘贴在PVC底板上;胶体金结合垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,胶体金结合垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐;所述反应膜上有检测线和质控线,检测线(T线)和质控线(C线)均为与所述试纸条的长相垂直的条状带;检测线位于靠近胶体金结合垫的末端的一侧;质控线位于远离胶体金结合垫的末端的一侧;将试纸条用机器切成3mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,4~30℃条件下可保存12个月。

[0098] 实施例2 免疫层析试纸条的灵敏度分析

[0099] 取已磨细的1#空白小麦样品,添加AOH标准品,使其浓度分别为50、25、10、5、1ng/g;另取已磨细的2#空白小麦样品,添加AME标准品,使其浓度分别为50、25、10、5、1ng/g。分别取70μL上述含有AOH或AME标品的小麦提取液,分别滴加到制备的胶体金免疫层析试纸条上进行检测,10min后观察显色结果,每个样本重复测定三次。

[0100] 从结果中可以看出,当1#样品中AOH或2#样品中AME浓度小于10ng/g时,随着AOH或AME标准品浓度的降低,检测线上红色强度增加;当AOH或AME浓度大于10ng/g时,检测线不显色。上述结果表明,该试纸条的检测限为10ng/g。

[0101] 实施例3 免疫层析试纸条的应用

[0102] 1、样品的前处理

[0103] 称取已磨细的待测样品5g,加入体积浓度为80%的甲醇水溶液25mL,混匀,在常温下振荡提取30min,静置10分钟,将上层清液即提取液用水稀释2.5倍,使稀释液中甲醇的终

浓度为32%。

[0104] 2、用试纸条进行检测

[0105] 用移液器取稀释后的样本液70 μ L(滴管2-3滴)垂直滴于加样孔中,同时取70 μ L 32%甲醇水做为阴性对照液;液体流动时开始计时,反应10min,判读结果。

[0106] 3、分析检测结果

[0107] 阴性(-):T线显色比C线显色深或显色一致,表示样本中AOH和AME毒素总量低于检测限,如图5-A。

[0108] 阳性(+):T线显色比C线显色浅或T线不显色,表示样本中AOH和AME毒素总量等于或高于检测限,如图5-B。

[0109] 无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效,如图5-C。在此情况下,应再次仔细阅读说明书,并用新的试纸条重新测试。

[0110] 实施例4 样品检测实例

[0111] 取已磨细的3#空白小麦样品,添加AOH和AME标准品,其中AOH和AME浓度都为5ng/g;取已磨细的4#空白小麦样品,添加AOH和AME标准品,其中AOH和AME浓度分别为5ng/g和3ng/g;取已磨细的5#空白小麦样品,添加AOH和AME标准品,其中AOH和AME浓度分别为5ng/g和7ng/g。分别取70 μ L上述提取液,分别滴加到制备的胶体金免疫层析试纸条上进行检测,10min后观察显色结果,每个样本重复测定三次。

[0112] 从结果中可以看出,检测试纸条的质控线显示出红色线条,而3#检测线不显色,则判为阳性结果,表明待测样品中的交链孢毒素总量即AOH和AME总含量高于10ng/g;4#检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线颜色比对照试纸条检测线颜色浅,则判为阳性结果,表明待测样品中的交链孢毒素总量即AOH和AME总含量高于或等于10ng/g;5#检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近,判为阴性结果,表明待测样品中的交链孢毒素总量即AOH和AME的总含量低于10ng/g。

[0113] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

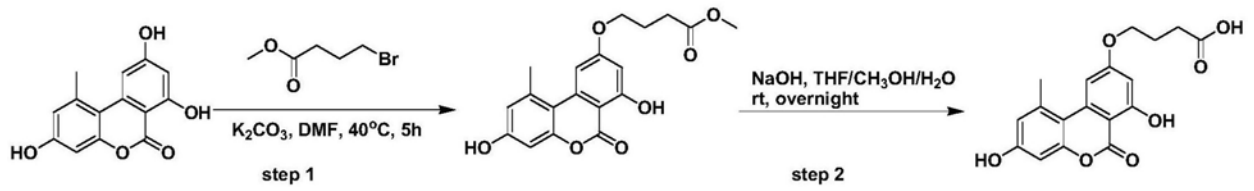


图1

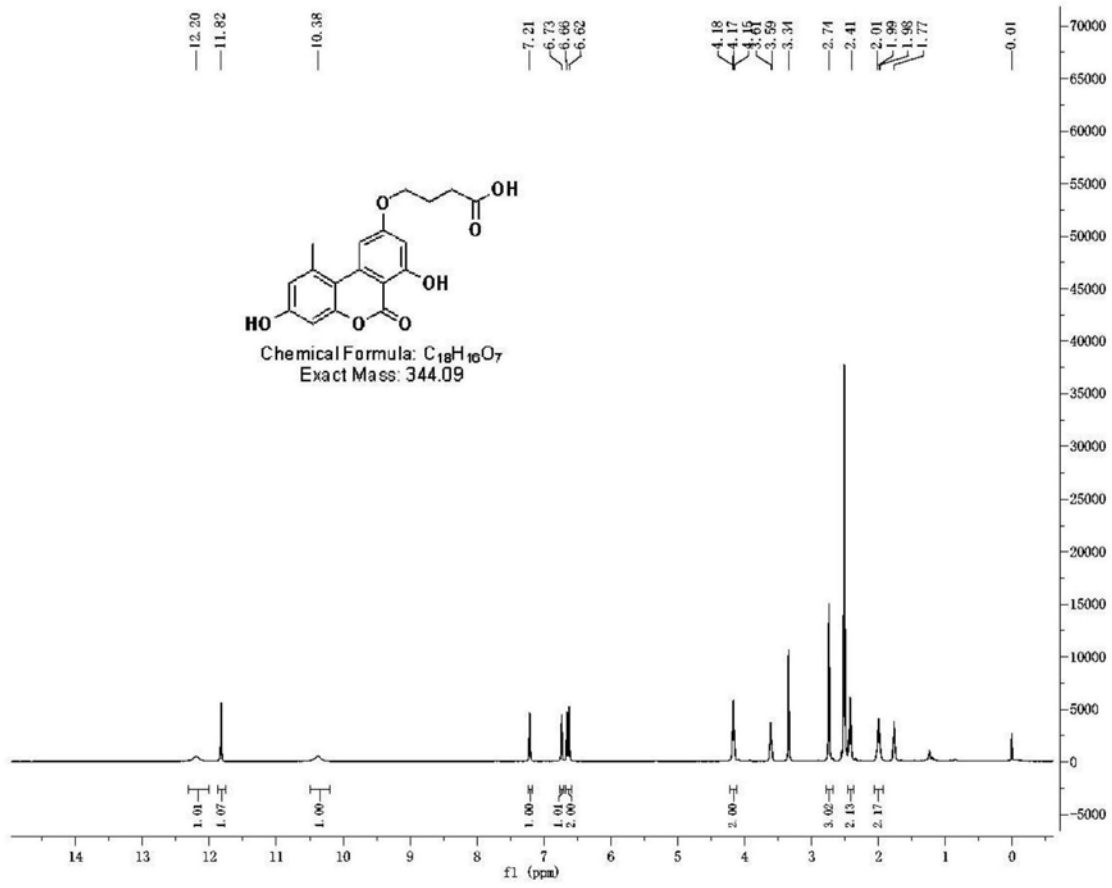


图2

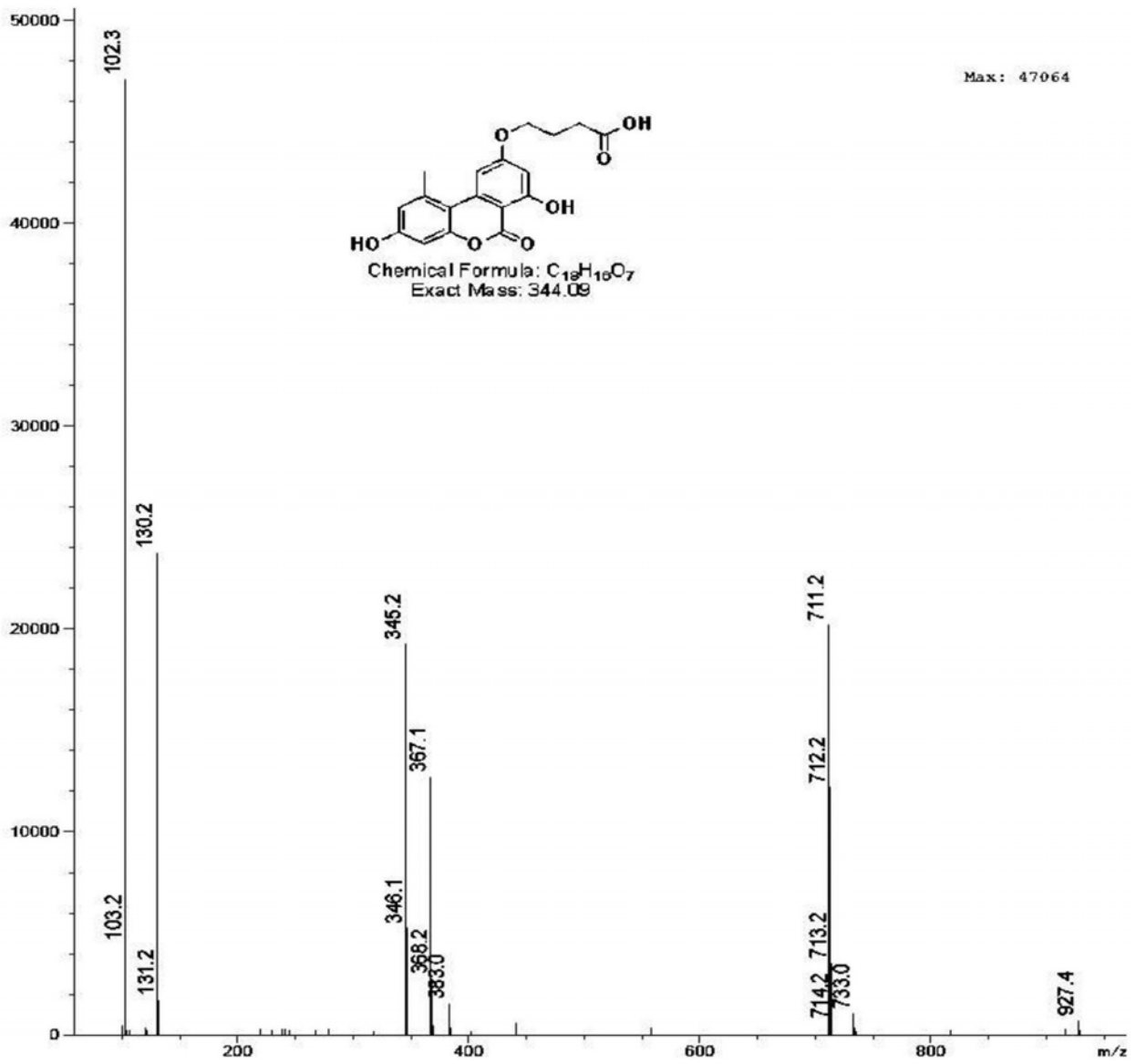


图3

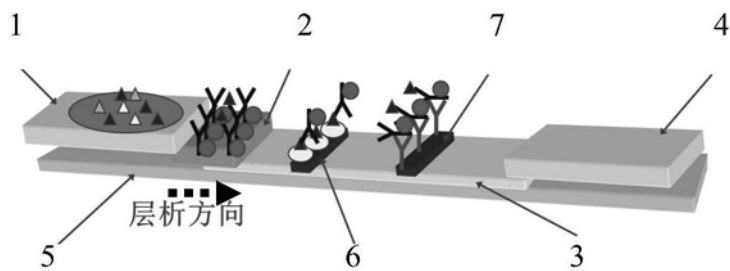
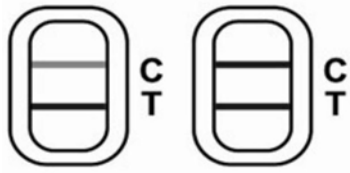


图4



A



B



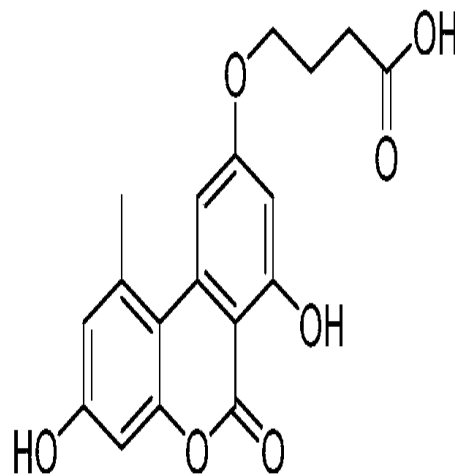
C

图5

专利名称(译)	一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条		
公开(公告)号	CN108912090A	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810402557.6	申请日	2018-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
[标]发明人	王蒙 姜冬梅 冯晓元 许文涛 韦迪哲 田晓琴		
发明人	王蒙 姜冬梅 冯晓元 许文涛 韦迪哲 田晓琴		
IPC分类号	C07D311/80 C07K14/77 C07K11/107 C07K16/14 G01N33/532 G01N33/558		
CPC分类号	C07D311/80 C07K14/77 C07K16/14 C07K19/00 G01N33/532 G01N33/558		
代理人(译)	王文君 黄爽		
优先权	201810146471.1 2018-02-12 CN		
其他公开文献	CN108912090B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测交链孢酚和交链孢酚单甲醚总量的试纸条，其是利用结构如式(I)所示的半抗原制备的快速检测交链孢毒素(AOH和AME)的免疫层析试纸条，本发明采用一步间接竞争免疫层析技术开发出可快速定性或半定量检测样品中AOH和AME两种交链孢毒素总含量的免疫层析试纸条，操作简单，经济实用，适合于现场检测，可广泛应用于农产品和食品等样品中AOH和AME两种交链孢毒素污染的检测及快速筛查。



式 (I)