



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110108873 A

(43)申请公布日 2019.08.09

(21)申请号 201910363513.1

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2019.04.30

G01N 33/533(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 21/64(2006.01)

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 李慧 白艺珍
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3页 说明书13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 和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒

(57)摘要

本发明公开了同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒。其包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和销标记的各单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,所述荧光试纸条包括底板,底板的粘性面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述的检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线和检测线,所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体,个数为4条,分别包被各毒素蛋白偶联物,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。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和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:它包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和铕标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、铕标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体和铕标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中:所述荧光试纸条包括底板,底板的粘性面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述的检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线和检测线,所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线个数为4条,检测线上分别上包被黄曲霉毒素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和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述抗黄曲霉毒素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,所述抗赭曲霉毒素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和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒,所述铕标记的单克隆抗体是按照以下方法制备得到:

所述铕标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体将抗黄曲霉毒素单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂可偶联抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体:30 μ g-80 μ g;

所述铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体将抗环匹阿尼酸单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂可偶联抗环匹阿尼酸单克隆抗体:40 μ g-90 μ g;

所述铕标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体将抗赭曲霉毒素A单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂可偶联抗赭曲霉毒素A单克隆抗体:40 μ g-90 μ g;

所述铕标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体将抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂可偶联抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体:30 μ g-90 μ g。

4. 根据权利要求3所述的同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒,所述的活化方法为取铕标记试剂,用pH 8.2 0.2mol/L的硼酸缓冲液中超声分散,然后缓慢加入碳二亚胺溶液,室温振荡活化,离心去上清液,用pH 8.2 0.2mol/L的硼酸缓冲液复溶,备用,所述的活化时间为15-30min。

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和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中的吸水垫

长16~18mm,宽3~4mm;检测垫长18~30mm,宽3~4mm;样品垫长10~12mm,宽3~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm;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,质控线和检测线的间距为5~10mm;所述的样品反应瓶为1~5mL的卡口瓶;所述的黄曲霉毒素、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时间分辨荧光试剂盒还包括样品稀释液和样品稀释液吸管,所述的样品稀释液为体积分数为0.01%~0.30%的吐温-20水溶液。

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和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述荧光试纸条中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AFB1-BSA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CPA-OVA的包被量为100~400ng;每厘米检测线所需的赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物OTA-BSA的包被量为100~400ng;每厘米检测线所需的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物ZEN-BSA的包被量为100~400ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng。

7. 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和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述样品反应瓶中铈标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体冻干品的含量为100~300ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为100~200ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体冻干品的含量为100~300ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体冻干品的含量为100~300ng。

8. 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和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述的时间分辨荧光试纸条的制备方法如下:

(1) 将吸水纸剪裁得吸水垫;

(2) 检测垫的制备:

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配制成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿15~20mm的位置,用线喷方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别间隔包被,得到4条检测线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;

将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液,于距检测线5~10mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,每厘米质控线所需的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4~10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

(4) 免疫层析时间分辨荧光试纸条的组装:

在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得免疫层析时间分辨荧光试纸条。

9. 权利要求1所述的免疫层析时间分辨荧光速测试剂盒在黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮含量检测中的应用,其特征在于:应用方法为:将待测样品经前处理获得待测样品溶液后,加入样品反应瓶中,混匀,插入时间分辨荧光试纸条,37℃反应

10分钟后,用时间分辨荧光测试仪进行检测,获得免疫层析时间分辨荧光试纸条上检测线(T)荧光强度与质控线(C)荧光强度的比值;基于免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C)分别与黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮浓度的关系曲线,获得待测样品溶液中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的含量,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所述的的应用,其特征在于:应用方法为:所述的免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)分别与黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮浓度的关系曲线是采用以下方法得到的:

(1) 配制得到一系列浓度的黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮标准品溶液;

(2) 将适量上述各浓度的黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮标准品溶液分别加入到样品反应瓶中,混匀,插入免疫层析时间分辨荧光试纸条,37℃反应10分钟,用时间分辨荧光免疫分析仪检测得到各免疫层析时间分辨荧光试纸条上检测线(T)和质控线(C)的荧光强度值,由此获得各免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C);

(3) 经拟合得到免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮浓度的关系曲线。

同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A 和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属生物检测领域,涉及真菌毒素免疫层析时间分辨荧光试剂盒,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和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒。

背景技术

[0002] 真菌毒素是真菌在适宜条件下产生的一类毒性很强的化学物质,能广泛污染大米、玉米、花生、饲料等农产品。真菌毒素可通过直接摄取、吸入以及皮肤接触等方式进入人体及牲畜体内,对人类及动物的健康造成威胁。为了保障粮食卫生安全,我国对粮食中的真菌毒素制定了相关的限量标准(GB 2761-2011)。黄曲霉毒素是黄曲霉和寄生曲霉等产生的一组结构类似的次生代谢产物,因其致癌、致畸、致突变以及免疫抑制作用,已被列为I类致癌物质;环匹阿尼酸主要是由黄曲霉和寄生曲霉分泌产生的次生代谢产物,可导致心细胞变性,胞膜通透性增加,神经元坏死等症状;赭曲霉毒素是由曲霉和青霉产生的一类真菌毒素,其中赭曲霉毒素A的毒性最强且产毒量最高,能导致肝脏与肾脏的毒害,引起肾小管上皮损伤和肠道淋巴腺体坏死;玉米赤霉烯酮是由镰刀菌产生的真菌毒素,具有免疫毒性、肝毒性、遗传毒性、潜在致癌性、类似雌激素的毒作用,对肿瘤发生也有一定影响,对人和动物的健康有潜在危害。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] 现有真菌毒素的检测方法包括薄层层析法、精密仪器分析法和免疫学分析法。其中薄层层析法是较早用于检测真菌毒素最常用的检测方法,该法不需要特殊的仪器设备,一般实验室都可进行,但试剂用量大、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。精密仪器分析法主要包括液相色谱-质谱联用法和高效液相色谱法,这些方法灵敏度高,准确性好,但又有仪器昂贵,要求真菌毒素样品纯化程度高,样品前处理过程繁琐,耗时长,对实验环境要求高等不足,难以实现快速检测。免疫分析技术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、对实验人员和周围环境的污染危害小、适于现场批量检测等优点,已应用于食品、医疗等多个领域。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题是提供一种能同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A 和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒。该免疫层析时间分辨荧光试剂盒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] 同步检测黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光

试剂盒,它包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和铕标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、铕标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体和铕标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中:所述荧光试纸条包括底板,底板的粘性面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述的检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线和检测线,所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线个数为4条,检测线上分别上包被黄曲霉毒素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,所述抗赭曲霉毒素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。

[0008] 按上述方案,所述铕标记的单克隆抗体是按照以下方法制备得到:

[0009] 所述铕标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体将抗黄曲霉毒素单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂可偶联抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体:30 μ g-80 μ g;

[0010] 所述铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体将抗环匹阿尼酸单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂可偶联抗环匹阿尼酸单克隆抗体:40 μ g-90 μ g;

[0011] 所述铕标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体将抗赭曲霉毒素A单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂可偶联抗赭曲霉毒素A单克隆抗体:40 μ g-90 μ g;

[0012] 所述铕标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体将抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂可偶联抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体:30 μ g-90 μ g。

[0013] 按上述方案,所述的活化方法为取铕标记试剂,用pH 8.2 0.2mol/L的硼酸缓冲液中超声分散,然后缓慢加入碳二亚胺溶液,室温振荡活化,离心去上清液,用pH 8.2 0.2mol/L 的硼酸缓冲液复溶,备用,所述的活化时间为15-30min。

[0014] 按上述方案,上述配制好的铕标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体、铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、铕标记的赭曲霉毒素A单克隆抗体、铕标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中备用,使用时,将其放入样品反应瓶中,置于冷冻干燥机中冻干,得到各铕标记的单克隆抗体冻干品,备用。

[0015] 按上述方案,所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中的吸水垫长16~18mm,宽3~

4mm;检测垫长18~30mm,宽3~4mm;样品垫长10~12mm,宽3~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm;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,质控线和检测线的间距为5~10mm;所述的样品反应瓶为1~5mL的卡口瓶。

[0016] 按上述方案,所述荧光试纸条中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AFB1-BSA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CPA-OVA的包被量为100~400ng;每厘米检测线所需的赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物OTA-BSA的包被量为100~400ng;每厘米检测线所需的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物ZEN-BSA的包被量为100~400ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng。

[0017] 所述样品反应瓶中铈标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体冻干品的含量为100~300ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为100~200ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体冻干品的含量为100~300ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体冻干品的含量为100~300ng。

[0018] 按上述方案,所述的黄曲霉毒素、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时间分辨荧光试剂盒还包括样品稀释液和样品稀释液吸管,所述的样品稀释液为体积分数为0.01%-0.30%的吐温-20水溶液。

[0019] 按上述方案,所述的时间分辨荧光试纸条的制备方法如下:

[0020] (1) 将吸水纸剪裁得吸水垫;

[0021] (2) 检测垫的制备:

[0022] 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配制成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿15~20mm的位置,用线喷方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别间隔包被,得到4条检测线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;

[0023] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液,于距检测线5~10mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,每厘米质控线所需的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;

[0024] (3) 样品垫的制备:

[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4~10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0026] (4) 免疫层析时间分辨荧光试纸条的组装:

[0027] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得免疫层析时间分辨荧光试纸条;

[0028] 按上述方案,所述免疫层析时间分辨荧光试纸条的制备中配制黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物包被液、环匹阿尼酸-卵清蛋白的偶联物包被液、赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物包被液和玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物包被液,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；

[0029] 配制兔抗鼠多克隆抗体包被液中所使用的包被缓冲液为：每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] 所述免疫层析时间分辨荧光试纸条的制备中使用的封闭液为：将2g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，0.5g吐温-20，加水定容至100mL所得。

[0031] 上述免疫层析时间分辨荧光速测试剂盒在黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮含量检测中的应用：将待测样品经前处理获得待测样品溶液后，加入样品反应瓶中，混匀，插入时间分辨荧光试纸条，37℃反应10分钟后，用时间分辨荧光测试仪进行检测，获得免疫层析时间分辨荧光试纸条上检测线(T)荧光强度与质控线(C)荧光强度的比值；基于免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C)分别与黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮浓度的关系曲线，获得待测样品溶液中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的含量，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。

[0032] 按上述方案，所述的免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)分别与黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮浓度的关系曲线是采用以下方法得到的：

[0033] (1) 配制得到一系列浓度的黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮标准品溶液；

[0034] (2) 将适量上述各浓度的黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮标准品溶液分别加入到样品反应瓶中，混匀，插入免疫层析时间分辨荧光试纸条，37℃反应10分钟，用时间分辨荧光免疫分析仪检测得到各免疫层析时间分辨荧光试纸条上检测线(T)和质控线(C)的荧光强度值，由此获得各免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)；

[0035] (3) 经拟合得到免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮浓度的关系曲线。

[0036] 本发明的有益效果：

[0037] (1) 快速、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。本发明提供的免疫层析时间分辨荧光试剂盒能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。

[0038] (2) 灵敏度高。本发明提供的免疫层析时间分辨荧光试剂盒对检测溶液中黄曲霉毒素的最低检测限为0.07ng/mL，对环匹阿尼酸的最低检测限为0.5ng/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的限量要求。

附图说明

[0039] 图1为本发明提供的黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮免疫层析时间分辨荧光速测试剂盒中免疫层析时间分辨荧光试纸条的结构示意图。图中：1吸水垫、2检测垫、3样品垫、4质控线、5黄曲霉毒素检测线、6环匹阿尼酸检测线、7赭曲霉毒素A检测线、8玉米赤霉烯酮检测线。

具体实施方式

[0040] 实施例1：抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的获得

[0041] 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201010245095.5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1C11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，纯化处理后获得抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体。其中，纯化方法为辛酸-硫酸铵法，具体操作为：将腹水从-20℃冰箱拿出室温解冻。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，即得纯化好的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体，将抗体置-20℃冰箱中备用；

[0042] 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。

[0043] 实施例2：抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的获得

[0044] 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，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、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液重悬，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，将抗体置于-20℃冰箱中备用；

[0045] 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8g氯化钠,2.9g十二水磷酸氢二钠,0.2g氯化钾,磷酸二氢钾0.2g,加水定容到100mL所得;所述的0.01mol/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。

[0046] 实施例3:抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的获得

[0047] 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,其具体制备方法为: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,具体操作步骤为: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、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液重悬,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,将抗体置于-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8g氯化钠,2.9g十二水磷酸氢二钠,0.2g氯化钾,磷酸二氢钾0.2g,加水定容到100mL所得;所述的0.01mol/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] 实施例4:抗环匹阿尼酸单克隆抗体的获得

[0050] 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:

[0051] 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;

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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%。

[0055] 杂交瘤细胞株YTT-2的筛选:

[0056] 1. 抗原合成及动物免疫

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 2. 细胞融合

[0060] 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:

[0061] 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。

[0062] 3. 细胞株的筛选及克隆

[0063] 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。

[0064] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株YTT-2抗体可变区序列测定

[0065] (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。

[0066] (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;

[0067] (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)。

[0068] 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。

[0069] 实施例5: 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时间分辨荧光试剂盒及其应用

[0070] 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免疫层析时间分辨荧光试剂盒, 包括荧光试纸条、含有铈标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体冻干品、含有铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品、含有铈标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体冻干品、含有铈标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体冻干品的样品反应瓶, 样品稀释液及样品稀释液吸管。所述的免疫层析时间分辨荧光试纸条如图1所示, 包括纸板, 纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫, 相邻各垫在连接处交叠连接, 交叠长度为1mm, 所述的检测垫以硝酸纤维素膜为基垫, 硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线和检测线, 所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体, 所述检测线个数为4条, 检测线上分别上包被黄曲霉毒素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, 为黄曲霉毒素检测线5、环匹阿尼酸检测线6、赭曲霉毒素A检测线7、玉米赤霉烯酮检测线8, 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。

[0071] 制备方法:

[0072] 荧光试纸条的制备:

[0073] (1) 吸水垫的制备

[0074] 将吸水纸剪裁成长16mm, 宽4mm的规格, 得吸水垫;

[0075] (2) 检测垫的制备

[0076] 检测线的包被

[0077] 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浓度为0.2mg/mL的包被液,于硝酸纤维素膜上沿15mm的位置,用线喷方式将其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所需包被抗原的包被量为100ng;将环匹阿尼酸-卵清蛋白的偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.2mg/mL的包被液,于距检测线I 2mm的位置,用线喷方式将其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所需包被抗原的包被量为100ng;将赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.2mg/mL的包被液,于距检测线II 2mm的位置,用线喷方式将其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所需包被抗原的包被量为100ng;将玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.2mg/mL的包被液,于距检测线III 2mm的位置,用线喷方式将其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所需包被抗原的包被量为100ng;然后于37℃条件下干燥60min;

[0078] 质控线的包被;

[0079] 将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度为0.2mg/mL的包被液,于距检测线I 5mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线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60min;

[0080] 所述的包被液为: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;

[0081] (3) 样品垫的制备:

[0082] 将玻璃纤维膜剪裁成长10mm,宽4mm的规格,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] 所述的封闭缓冲液为:2g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,0.5g吐温-20,加水定容至100mL 所得;

[0084] (4) 荧光试纸条的组装:

[0085] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1mm,即得荧光试纸条;

[0086] 所述铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的获得:

[0087] 取800μL 0.2mol/L pH 8.2的硼酸缓冲液,加入200μL氧化铈乳胶,上海优你生物科技股份有限公司,用800W中超声清洗仪超声10min;加入40μL的15mg/mL碳二亚胺溶液,涡旋混匀15min;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;将沉淀用1mL含0.5%的BSA的硼酸缓冲液重悬,振荡混匀,再用800W超声清洗仪超声10min;加入1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液40μL,4℃下摇床过夜后;13,300r/min离心10分钟,弃上清,加入1mL 0.5%BSA 溶液复溶,4℃下摇床2小时;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;用含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液复溶,即得铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,置于4℃保存备用。

[0088] 所述铈标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的获得:

[0089] 取800μL 0.2mol/L pH 8.2的硼酸缓冲液,加入200μL氧化铈乳胶,上海优你生物

科技股份有限公司,用800W中超声清洗仪超声10min;加入40 μ L的15mg/mL碳二亚胺溶液,涡旋混匀15min;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;将沉淀用1mL含0.5%的BSA的硼酸缓冲液重悬,振荡混匀,再用800W超声清洗仪超声10min;加入1mg/mL的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液40 μ L,4℃下摇床过夜后;13,300r/min离心10分钟,弃上清,加入1mL 0.5%BSA溶液复溶,4℃下摇床2小时;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;用含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液复溶,即得铈标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体,置于4℃保存备用。

[0090] 所述铈标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的获得:

[0091] 取800 μ L 0.2mol/L pH 8.2的硼酸缓冲液,加入200 μ L氧化铈乳胶,上海优你生物科技股份有限公司,用800W中超声清洗仪超声10min;加入40 μ L的15mg/mL碳二亚胺溶液,涡旋混匀15min;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;将沉淀用1mL含0.5%的BSA的硼酸缓冲液重悬,振荡混匀,再用800W超声清洗仪超声10min;加入1mg/mL的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体溶液40 μ L,4℃下摇床过夜后;13,300r/min离心10分钟,弃上清,加入1mL 0.5%BSA溶液复溶,4℃下摇床2小时;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;用含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液复溶,即得铈标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体,置于4℃保存备用。

[0092] 所述铈标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的获得:

[0093] 取800 μ L 0.2mol/L pH 8.2的硼酸缓冲液,加入200 μ L氧化铈乳胶,上海优你生物科技股份有限公司,用800W中超声清洗仪超声10min;加入40 μ L的15mg/mL碳二亚胺溶液,涡旋混匀15min;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;将沉淀用1mL含0.5%的BSA的硼酸缓冲液重悬,振荡混匀,再用800W超声清洗仪超声10min;加入1mg/mL的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液40 μ L,4℃下摇床过夜后;13,300r/min离心10分钟,弃上清,加入1mL 0.5%BSA溶液复溶,4℃下摇床2小时;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;用含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液复溶,即得铈标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体,置于4℃保存备用。

[0094] 所述的样品反应瓶的获得:配制好的铈标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体、铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、铈标记的赭曲霉毒素A单克隆抗体、铈标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中。各取300 μ L放入样品反应瓶中,置于冷冻干燥机中冻干,备用。所述样品反应瓶中铈标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体冻干品的含量为100ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为100ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体冻干品的含量为100ng,所述样品反应瓶中铈标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体冻干品的含量为100ng。

[0095] 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时间分辨荧光试剂盒在玉米样品中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮含量检测中的应用:

[0096] 称取已磨细的阴性玉米样品5g,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%。

[0097] 用上述得到的阴性样品提取液配置黄曲霉毒素B1、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮分别对应为以下浓度梯度的黄曲霉毒素B1、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮混合标准品溶液6个。黄曲霉毒素B1浓度分别为0ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.25ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL；环匹阿尼酸浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL；赭曲霉毒素A浓度分别为0ng/mL、0.25ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2ng/mL、4ng/mL；玉米赤霉烯酮浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.5ng/mL、5.0ng/mL、10ng/mL。标准溶液每个浓度重复5次，用上述免疫层析时间分辨荧光试剂盒进行检测：将上述标准品溶液150μL加入样品反应瓶中，混匀，插入免疫层析时间分辨荧光试纸条，37℃反应6分钟后，用吸水纸吸干样品垫残留液体，立即用时间分辨荧光分析仪检测（检测波长：365nm，测定波长：615nm），读取检测区域的荧光信号强度值，质控线荧光强度的比值（T/C），计算5次重复平均值；分别以黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮标准品浓度为横坐标，各浓度标准品溶液相应的检测线与质控线荧光强度的比值即T/C为纵坐标，拟合得到关系曲线。标准曲线公式如 $Y=a*\ln c+b$ ，3种检测对象的标准曲线参数如下表所示：

[0098]

	a	b	R ²	检测限/ng/mL
黄曲霉毒素B1	-1.536	4.761	0.992	0.07
环匹阿尼酸	-1.689	3.579	0.977	0.5
赭曲霉毒素A	-1.735	5.816	0.988	0.5
玉米赤霉烯酮	-1.451	4.356	0.981	1.0

[0099] 取待检玉米样品检测液150μL加入样品反应瓶中，混匀，插入免疫层析时间分辨荧光试纸条，37℃反应6min后，用吸水纸吸干样品垫残留液体，立即用时间分辨荧光免疫分析仪检测（激发波长：365nm，测定波长：615nm），获得各免疫层析时间分辨荧光试纸条3条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值（T/C），然后将其分别代入上述得到的免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值（T/C）与黄曲霉毒素B1浓度、杂色曲霉毒素浓度、环匹阿尼酸浓度的关系曲线，得该玉米样品中的黄曲霉毒素B1含量为4.6μg/kg、环匹阿尼酸含量为2.6μg/kg、赭曲霉毒素A含量为0μg/kg、玉米赤霉烯酮含量为6.1μg/kg。

[0100] 实施例6：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时间分辨荧光试剂盒及其应用

[0101] 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免疫层析时间分辨荧光试剂盒，包括荧光试纸条、含有钡标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体冻干品、含有钡标记的抗环匹阿尼酸素单克隆抗体冻干品、含有钡标记的抗赭曲霉毒素A单克隆抗体冻干品、含有钡标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体冻干品的样品反应瓶，样品稀释液及样品稀释液吸管。所述的免疫层析时间分辨荧光试纸条包括纸板，纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，交叠长度为3mm。

[0102] (1) 吸水垫的制备

[0103] 将吸水纸剪裁成长18mm，宽4mm的规格，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浓度为0.5mg/mL的包被液,于硝酸纤维素膜上沿20mm的位置,用线喷方式将其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所需包被抗原的包被量为300ng;将环匹阿尼酸-卵清蛋白的偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.5mg/mL的包被液,于距检测线I 3mm的位置,用线喷方式将其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所需包被抗原的包被量为400ng;将赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.5mg/mL的包被液,于距检测线II 3mm的位置,用线喷方式将其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所需包被抗原的包被量为400ng;将玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.5mg/mL的包被液,于距检测线III 3mm的位置,用线喷方式将其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所需包被抗原的包被量为400ng;然后于37℃条件下干燥120min;

[0107] 质控线的包被;

[0108] 将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度为0.5mg/mL的包被液,于距检测线I 10mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线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120min;

[0109] 所述的包被液为: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;

[0110] (3) 样品垫的制备:

[0111] 将玻璃纤维膜剪裁成长12mm,宽4mm的规格,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;

[0112] 所述的封闭缓冲液为:2g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,0.5g吐温-20,加水定容至100mL 所得;

[0113] (4) 荧光试纸条的组装:

[0114] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为3mm,即得荧光试纸条;

[0115] 所述的样品反应瓶的获得:配制好的铕标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体、铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、铕标记的赭曲霉毒素A单克隆抗体、铕标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中。各取300μL放入样品反应瓶中,置于冷冻干燥机中冻干,备用。所述样品反应瓶中铕标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体冻干品的含量为300ng,所述样品反应瓶中铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为200ng,所述样品反应瓶中铕标记的抗赭曲霉毒素A 单克隆抗体冻干品的含量为300ng,所述样品反应瓶中铕标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体冻干品的含量为300ng。

[0116] 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时间分辨荧光试剂盒在玉米样品中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮含量检测中的应用:

[0117] 取经高效液相色谱确认的含多种毒素的玉米样品,黄曲霉毒素B1含量为7.1μg/

kg、环匹阿尼酸含量为5.6μg/kg、赭曲霉毒素含量为6.7μg/kg、玉米赤霉烯酮含量为38.2μg/kg。

[0118] 称取已磨细的上述玉米样品5g,加入体积浓度为70%的甲醇水溶液20ml,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%,得到待测玉米样品检测液。

[0119] 取待检玉米样品检测液150μL加入样品反应瓶中,混匀,插入免疫层析时间分辨荧光试纸条,37℃反应6min后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用时间分辨荧光免疫分析仪检测(激发波长:365nm,测定波长:615nm),获得各免疫层析时间分辨荧光试纸条3条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C),然后将其分别代入上述得到的免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与黄曲霉毒素B1浓度、杂色曲霉毒素浓度、环匹阿尼酸浓度的关系曲线,得该玉米样品中的黄曲霉毒素B1含量为6.9μg/kg、环匹阿尼酸含量为5.8μg/kg、赭曲霉毒素A含量为6.5μg/kg、玉米赤霉烯酮含量为39.0μg/kg。

35	40	45
Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn	Gly Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Lys Phe	
50	55	60
Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val	Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65	70	75
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser	Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85	90	95
Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser	Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln	
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
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 Gly	
1	5	10
Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys His	Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn	
20	25	30
Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile	
35	40	45
Tyr Gln Gly Ser Asn Leu Glu Asp	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr	
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys	Val Gln Phe Ala Gln Phe Pro Pro	
85	90	95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu	Glu Leu Lys	
100	105	

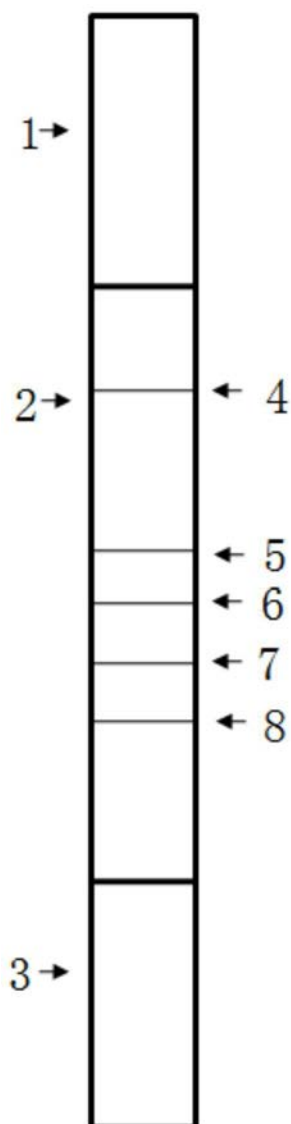


图1

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 和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒		
公开(公告)号	CN110108873A	公开(公告)日	2019-08-09
申请号	CN201910363513.1	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 李慧 白艺珍 张文		
发明人	张奇 李培武 李慧 白艺珍 张文		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/582		
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毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光试剂盒。其包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和销标记的各单克隆抗体冻干品的样品反应瓶，所述荧光试纸条包括底板，底板的粘性面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，所述的检测垫以硝酸纤维素膜为基垫，硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线和检测线，所述质控线上包被有兔抗鼠多克隆抗体，个数为4条，分别包被各毒素蛋白偶联物，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。可用于样品中黄曲霉毒素、环匹阿尼酸、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮含量的同步检测，具有操作简单、快速、灵敏度高的特点。