



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 206710440 U

(45)授权公告日 2017.12.05

(21)申请号 201720357308.0

(22)申请日 2017.04.07

(73)专利权人 南京微测生物科技有限公司

地址 210061 江苏省南京市高新区新锦湖
路3-1号中丹园B栋1307室

(72)发明人 肖理文 徐秀 赵皖 刘伟

(74)专利代理机构 常州佰业腾飞专利代理事务
所(普通合伙) 32231

代理人 高姗

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

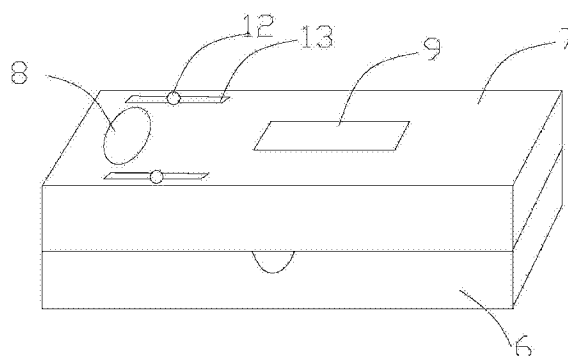
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)实用新型名称

快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒

(57)摘要

本实用新型属于生物检测技术领域,具体涉及一种快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,所述包括盒体和盖体,盖体从盒体开口的一侧密封盒体,盖体上设有加样孔和观察窗,盖体的内壁滑动的设有密封件,密封件滑动过程中打开或封闭加样孔,盒体内设有免疫层析试纸条,所述免疫层析试纸条包括底板,底板上按照由一端至另一端的方向上顺序搭接有样品垫、结合垫、反应垫和吸水垫,结合垫上吸附有荧光微球标记呕吐毒素抗体和荧光微球标记鸡IgY,反应垫上设有检测区和质控区,检测区上包被有呕吐毒素抗原蛋白,质控区上包被有羊抗鸡IgY。本实用新型的试剂盒可快速、高效的检测呕吐毒素。



1. 一种快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,其特征在于:包括箱体(6)和盖体(7),盖体(7)从箱体(6)开口的一侧密封箱体(6),盖体(7)上设有加样孔(8)和观察窗(9),盖体(7)的内壁滑动的设有密封件(11),密封件(11)滑动过程中打开或封闭加样孔(8),箱体(6)内设有免疫层析试纸条,所述免疫层析试纸条包括底板(1),底板(1)上按照由一端至另一端的方向上顺序搭接有样品垫(2)、结合垫(3)、反应垫(4)和吸水垫(5),结合垫(3)上吸附有荧光微球标记呕吐毒素抗体和荧光微球标记鸡IgY,反应垫(4)上设有检测区(401)和质控区(402),检测区(401)上包被有呕吐毒素抗原蛋白,质控区(402)上包被有羊抗鸡IgY。

2. 根据权利要求1所述的快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,其特征在于:所述荧光微球为Eu³⁺标记的乳胶微球。

3. 根据权利要求1所述的快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,其特征在于:反应垫(4)为聚酯纤维素膜。

4. 根据权利要求1所述的快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,其特征在于:盖体(7)的内壁上设有滑槽(10),密封件(11)的两侧嵌置于滑槽(10)内。

5. 根据权利要求4所述的快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,其特征在于:密封件(11)与一滑钮(12)连接,盖体(7)上设有长条孔(13),长条孔(13)与滑槽(10)平行,滑钮(12)穿过长条孔(13)并从盖体(7)的顶面伸出。

6. 根据权利要求1所述的快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,其特征在于:箱体(6)的底部设有定位件(14),所述免疫层析试纸条被定位件(14)固定限位。

7. 根据权利要求6所述的快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,其特征在于:所述定位件(14)为一卡环。

8. 根据权利要求1所述的快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,其特征在于:箱体(6)和盖体(7)的一端铰接,另一端通过扣接的方式使箱体(6)与盖体(7)闭合。

快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型属于生物检测技术领域,具体涉及一种快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒。

背景技术

[0002] 呕吐毒素主体成分为DON (deoxynivalenol, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇),属于单端孢霉烯族化合物,主要由禾谷镰刀菌、尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、拟枝孢镰刀菌、粉红镰刀菌、雪腐镰刀菌等镰刀菌产生。另外,头孢菌属、漆斑菌属、木霉属等的菌株都可产生该毒素。单端孢霉烯族毒素共有150多种,是一类强有力免疫抑制剂,所引起典型症状是采食量降低,所以这类毒素又叫饲料拒食毒素。呕吐毒素(DON)是其中最重要一种毒素,主要来自镰刀菌属(*Fusarium*),尤其是禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)。由于它可以引起猪的呕吐,故又名呕吐毒素(vomitoxin,VT)。

[0003] 呕吐毒素是食品中常见的真菌毒素,在自然界中广泛存在,通常在欧洲及北美发现的3种毒素是脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇和15-脱氧雪腐镰刀菌烯醇。由于它们具有很高的细胞毒素及免疫抑制性质,因此,对人类及动物的健康构成了威胁,特别是对免疫功能具有明显的影响。根据DON的剂量和暴露时间不同可引起免疫抑制或免疫刺激。当人摄入了被DON污染的食物后,会导致厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝等急性中毒症状,严重时损害造血系统造成死亡。由于中国传统饮食习惯中粮谷比例大大高于西方,使得呕吐毒素的危害更为突出。1998年,在国际癌症研究机构公布的评价报告中,呕吐毒素被列为3类致癌物。我国谷物、猪配合饲料、犊牛配合饲料、泌乳期动物配合饲料中DON的限量标准为1.0mg/kg,牛配合饲料、家禽配合饲料中DON的限量标准为5.0mg/kg。

[0004] 目前检测呕吐毒素的方法有多种,如薄层色谱法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、气相色谱、高效液相色谱、红外光谱分析等。高效液相色谱相属于国标法,灵敏度高、准确度高,但需要昂贵的仪器、样品的前处理复杂、花费时间长,检测成本高,不能现场操作,而且需专业人员操作,所以限制了其应用。酶联免疫吸附实验,对检测环境要求高,需要专业人员操作,适合大量样品的检测,并且有相应的数据处理。呕吐毒素的荧光定量检测试纸条配合相应的荧光读数仪,具有准确度高,重复性好,检测成本低,环境要求低,操作简单,便于数据的管理,保存和上传的特点。本产品适用于快速定量检测粮食谷物(大米、玉米、小麦、大麦、高粱等)及其制品、饲料及其原料中呕吐毒素的残留浓度,样品前处理简单,整个检测过程仅需18min左右(前处理8min+检测8min),呕吐毒素荧光定量检测试纸条的CUT OFF值为1000ppb,灵敏度100ppb,添加回收率80%~125%,线性范围为100ppb~5000ppb,在10000ppb的浓度下与其他毒素无交叉反应。适用于各类粮食谷物加工企业、第三方检测机构及各级政府监管部门。

实用新型内容

[0005] 本实用新型的目的是提供一种快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,可快速、高效的检测呕吐毒素。

[0006] 为实现上述目的,本实用新型所采用的技术方案是:包括盒体和盖体,盖体从盒体开口的一侧密封盒体,盖体上设有加样孔和观察窗,盖体的内壁滑动的设有密封件,密封件滑动过程中打开或封闭加样孔,盒体内设有免疫层析试纸条,所述免疫层析试纸条包括底板,底板上按照由一端至另一端的方向上顺序搭接有样品垫、结合垫、反应垫和吸水垫,结合垫上吸附有荧光微球标记呕吐毒素抗体和荧光微球标记鸡IgY,反应垫上设有检测区和质控区,检测区上包被有呕吐毒素抗原蛋白,质控区上包被有羊抗鸡IgY。

[0007] 优选的,所述荧光微球为Eu³⁺标记的乳胶微球。

[0008] 优选的,所述反应垫为聚酯纤维素膜。

[0009] 优选的,所述盖体的内壁上设有滑槽,密封件的两侧嵌置于滑槽内。

[0010] 优选的,所述密封件与一滑钮连接,盖体上设有长条孔,长条孔与滑槽平行,滑钮穿过长条孔并从盖体的顶面伸出。

[0011] 优选的,所述盒体的底部设有定位件,所述免疫层析试纸条被定位件固定限位。

[0012] 优选的,所述定位件为一卡环。

[0013] 优选的,所述盒体和盖体的一端铰接,另一端通过扣接的方式使盒体与盖体闭合。

[0014] 采用上述技术方案后,本实用新型具有以下积极效果:

[0015] (1) 本实用新型中的免疫层析试纸条,通过肉眼观察即可判断呕吐毒素阴阳性,采用荧光读数仪读取T线和C线的荧光强度并计算T/C值,通过仪器内置的标准曲线即可定量的计算出样品中呕吐毒素的含量,同时,定量检测结果可呈现于荧光读数仪液晶显示屏上,同时可打印获得纸质的检测报告;

[0016] (2) 将免疫层析试纸条放置于试剂盒中,且加样孔是被密封件遮住的,可长期储存试纸条,防止试纸条受到污染。需要检测时,直接从加样孔加样,从观察窗定性的判断阴阳性,若需对呕吐毒素进行定量时,可将试纸条从试剂盒中取出,放入与荧光检测仪配套的模具中,或可直接将试剂盒放入荧光检测仪中检测,均可。

附图说明

[0017] 图1为本实用新型中免疫层析试纸条的结构图;

[0018] 图2为图1所示免疫层析试纸条的俯视图;

[0019] 图3为本实用新型的快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒的结构图;

[0020] 图4为移除盒体后盖体的结构图;

[0021] 图5为移除盖体后盒体的结构图。

[0022] 其中:1、底板,2、样品垫,3、结合垫,4、反应垫,401、检测区,402、质控区,5、吸水垫,6、盒体,7、盖体,8、加样孔,9、观察窗,10、滑槽,11、密封件,12、滑钮,13、长条孔,14、定位件。

具体实施方式

[0023] 下面结合附图和具体实施方式对本实用新型作进一步详细说明。

[0024] 在本实用新型中,除非另有明确的规定和限定,术语“安装”、“相连”、“连接”、“固

定”等术语应作广义理解,例如,可以是固定连接,也可以是可拆卸连接,或成一体;可以是机械连接,也可以是电连接;可以是直接相连,也可以通过中间媒介间接相连,可以是两个元件内部的连通或两个元件的相互作用关系。对于本领域的普通技术人员而言,可以根据具体情况理解上述术语在本实用新型中的具体含义。

[0025] 1.如图1所示,为本实用新型中的免疫层析试纸条,包括底板1,底板1上按照由一端至另一端的方向上顺序搭接有样品垫2、结合垫3、反应垫4和吸水垫5,结合垫3上吸附有荧光微球标记呕吐毒素抗体和荧光微球标记鸡IgY,反应垫4上设有检测区401和质控区402,检测区401上包被有呕吐毒素抗原蛋白,质控区402上包被有羊抗鸡IgY。

[0026] 其中荧光微球标记呕吐毒素抗体是由呕吐毒素抗体和乳胶微球偶联得到,荧光微球标记鸡IgY是由鸡IgY和乳胶微球偶联得到。

[0027] 2.一种快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒,包括盒体6和盖体7,盖体7从盒体6开口的一侧密封盒体6,盒体6和盖体7的一端铰接,另一端通过扣接的方式使盒体6与盖体7闭合。

[0028] 盖体7上设有加样孔8和观察窗9,盖体7的内壁通过一滑槽10滑动的设有密封件11,密封件11与一滑钮12连接,盖体7上设有长条孔13,长条孔13与滑槽10平行,滑钮12穿过长条孔13并从盖体7的顶面伸出,密封件11滑动过程中可以打开或封闭加样孔8。

[0029] 盒体6的底部设有定位件14,盒体6内设有本案中的免疫层析试纸条,所述免疫层析试纸条被定位件14固定限位。其中,该定位件14为一卡环,将试纸条卡住。

[0030] 3.本案免疫层析试纸条的制备方法为:

[0031] (1)将没有任何载体基苯乙烯微球包裹 Eu^{3+} 得到合成好的、带有标记物的乳胶微球;

[0032] (2)将呕吐毒素抗体和鸡IgY分别与带有标记物的乳胶微球偶联;

[0033] (3)将呕吐毒素抗体标记物和鸡IgY标记物均匀的喷在结合垫3上,37摄氏度烘干24h,得到乳胶垫,在干燥的环境中保存备用;

[0034] (4)将呕吐毒素抗原蛋白划在聚酯纤维素膜上检测区401处,羊抗鸡IgY划在聚酯纤维素膜上质控区402处,37摄氏度烘干24h,得到反应垫4,在干燥的环境中保存备用;

[0035] (5)在底板1上按顺序粘贴上样品垫2、结合垫3、反应垫4、吸水垫5,最后切成4mm宽的小条,装入试剂盒中,4~30℃条件下可保存12个月。

[0036] 4.应用本案中试剂盒,定量检测粮食谷物饲料中呕吐毒素残留的方法,它包括以下步骤:

[0037] 1)样品的处理

[0038] 2)样本的稀释

[0039] 3)加样

[0040] 4)读数

[0041] 上述免疫层析试纸条采用荧光侧向免疫层析(Fluorescent Lateral Flow,FLF)方法学原理。当将待测样品滴加在加样孔8时,样品中的呕吐毒素与结合垫3中的荧光微球标记呕吐毒素抗体结合并通过毛细作用向前层析,达到检测区401后,检测T线上固定的呕吐毒素抗原与剩余未结合的荧光微球标记呕吐毒素抗体结合。检测线T线上结合的荧光微球标记呕吐毒素抗体的量与样品中呕吐毒素的浓度成反比,质控区402上质控线C线结合的

荧光标记物与样品中呕吐毒素的浓度无关。层析结束后,采用荧光读数仪读取T线和C线的荧光强度并计算T/C值,通过仪器内置的标准曲线即可计算出样品中呕吐毒素的含量并判断阴阳性。定量检测结果将呈现于荧光读数仪液晶显示屏上,同时可按打印键打印获得纸质的检测报告,另外,开通仪器的WIFI数据上传功能后,检测相关数据信息将自动上传至“食品安全溯源管理云平台”,便于溯源及质量管理。

[0042] 阴性(-):检测结果<cutoff值(可根据客户的内控质量标准进行调整),结果为阴性;

[0043] 阳性(+):检测结果 \geq cutoff值(可根据客户的内控质量标准准进行调整),结果为阳性;

[0044] 无效:读数仪报错,则本次检测无效,需重新测试;

[0045] 如果检测结果超出线性范围的上限,可取样品提取离心后的上清液,用样品提取液稀释5倍后再次检测(取100 μ l上清液,加400 μ l提取液),检测结果乘以5,即为样品的最终浓度。

[0046] 5. 样本检测

[0047] 1) 取空白谷物饲料样本,玉米,大米,小麦,面粉各一份,分别称取7份,添加呕吐毒素标准品终浓度到0ppb,100ppb,250ppb,500ppb,1000ppb,2500ppb,5000ppb。提取后采用试剂盒检测。每个样本检测十个平行样,读取数据如表1所示。

[0048] 表1样本添加检测结果

[0049]

样本	玉米			小麦		
添加浓度	浓度平均值	CV	准确度	浓度平均值	CV	准确度
0ppb	3.56	23.45%	——	0.05	34.56%	——
100ppb	104.45	6.67%	92.63~110.56%	98.31	9.45%	89.45~104.55%
250ppb	264.44	7.87%	94.67~105.45%	246.76	8.67%	88.43~107.56%
500ppb	562.56	9.45%	94.79~117.69%	498.45	7.83%	91.25~112.33%
1000ppb	1089.45	7.89%	89.34~115.33%	1005.54	7.92%	98.32~107.34%
2500ppb	2572.56	6.52%	90.33~103.78%	2467.45	9.35%	85.61~104.36%
5000ppb	4903.53	4.78%	90.34~105.32%	4902.56	5.82%	95.67~104.29%
样本	大米			面粉		
添加浓度	浓度平均值	CV	回收范围	浓度平均值	CV	回收范围
0ppb	3.65	26.71%	——	0.32	23.44%	——
100ppb	104.56	5.56%	92.45~113.44%	90.43	6.67%	83.33~100.44%
250ppb	263.63	7.34%	99.44~104.56%	235.42	6.72%	96.33~106.45%
500ppb	520.42	5.25%	88.34~104.24%	498.42	8.56%	89.45~113.44%
1000ppb	1004.41	8.35%	89.42~110.45%	973.44	7.64%	90.42~107.33%
2500ppb	2590.42	8.12%	92.44~106.32%	2459.45	5.23%	92.34~111.34%
5000ppb	5002.56	9.44%	84.41~106.33%	4903.44	8.34%	83.55~103.53%

[0050] 表2市场样本色谱检测结果与呕吐毒素荧光定量检测试纸条检测结果对比

[0051]

样本名称	高效液相色谱检测值	检测值 1	检测值 2	CV	准确度 1	准确度 2
小麦①	187	185.38	199.95	5.35%	99.13%	106.93%
麸皮	615	607.74	622.38	1.68%	98.82%	101.20%
玉米	1097	1219.53	1005.169	13.63%	111.17%	91.63%
面粉①	989	1071.04	925.28	10.33%	108.30%	93.56%
面粉②	2145	1959.64	2234.05	9.25%	91.36%	104.15%
DDGS	2345	2567.56	2845.56	7.26%	109.49%	121.35%
细麸	1702	1673.55	1565.45	4.72%	98.33%	91.98%
喷浆玉米皮①	3212	3216.56	2908.44	7.11%	100.14%	90.55%
豆粕	88	89.44	98.33	6.70%	101.64%	111.74%
小麦②	3856	3665.23	3894.23	4.28%	95.05%	100.99%
喷浆玉米皮②	356	342.54	378.42	7.04%	96.22%	106.30%

[0052] 市场样本色谱检测值和呕吐毒素荧光定量检测试纸条检测值符合率,线性曲线为: $y=0.986x+24.1$, $R^2=0.989$ 。

[0053] 结果表明:用呕吐毒素荧光定量检测试纸条检测粮食谷物饲料样本,和高效液相色谱值比对,符合率达到98.9%,准确度范围80%~125%, $CV\leq 15\%$ 。符合快速定量检测的要求。

[0054] 2) 特异性检测

[0055] 用呕吐毒素荧光定量检测试纸条,检测10ug/ml的玉米赤霉烯酮,黄曲霉毒素B1,赭曲霉毒素A,伏马菌素,T-2毒素,结果显示均小于100ng/ml。说明呕吐毒素荧光定量检测试纸条,与玉米赤霉烯酮,黄曲霉毒素B1,赭曲霉毒素A,伏马菌素,T-2毒素均无交叉反应。

[0056] 对本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本实用新型要求的保护范围之内。

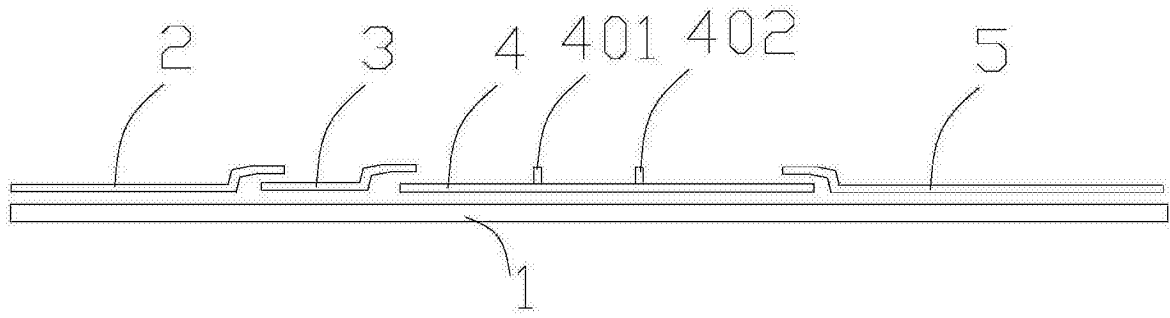


图1

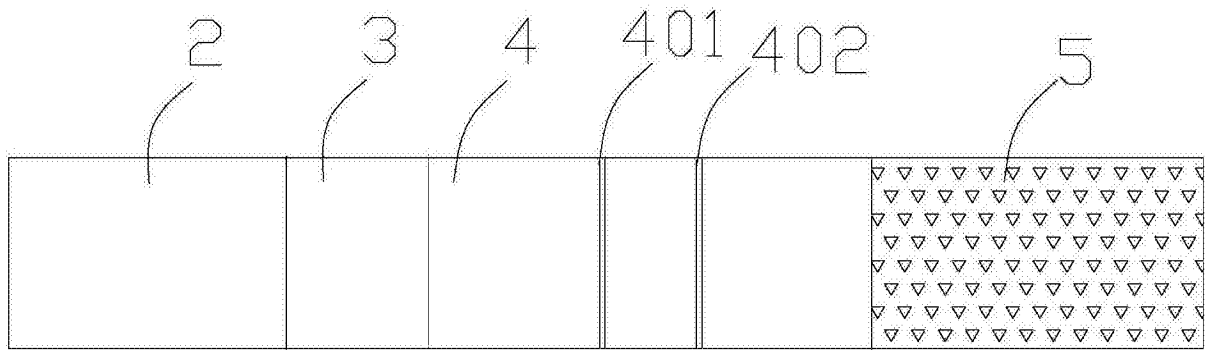


图2

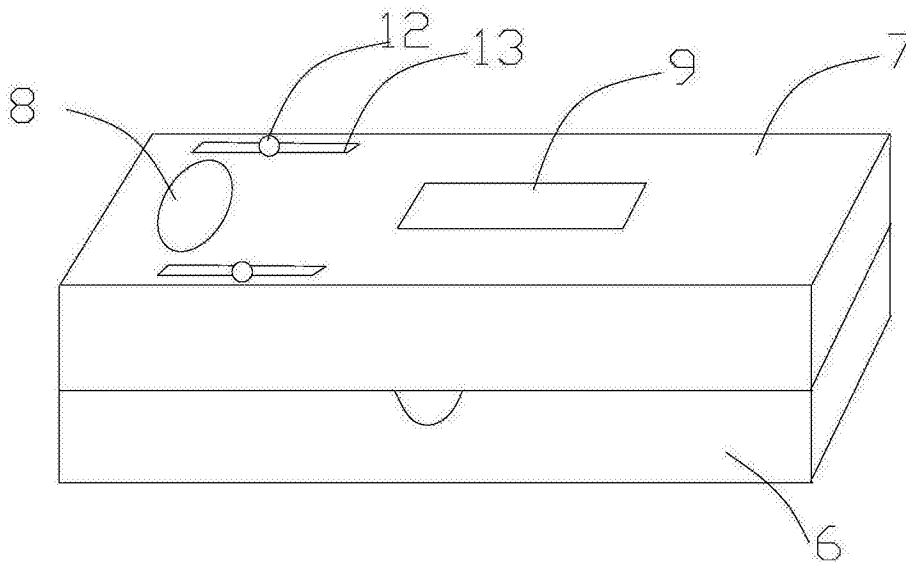


图3

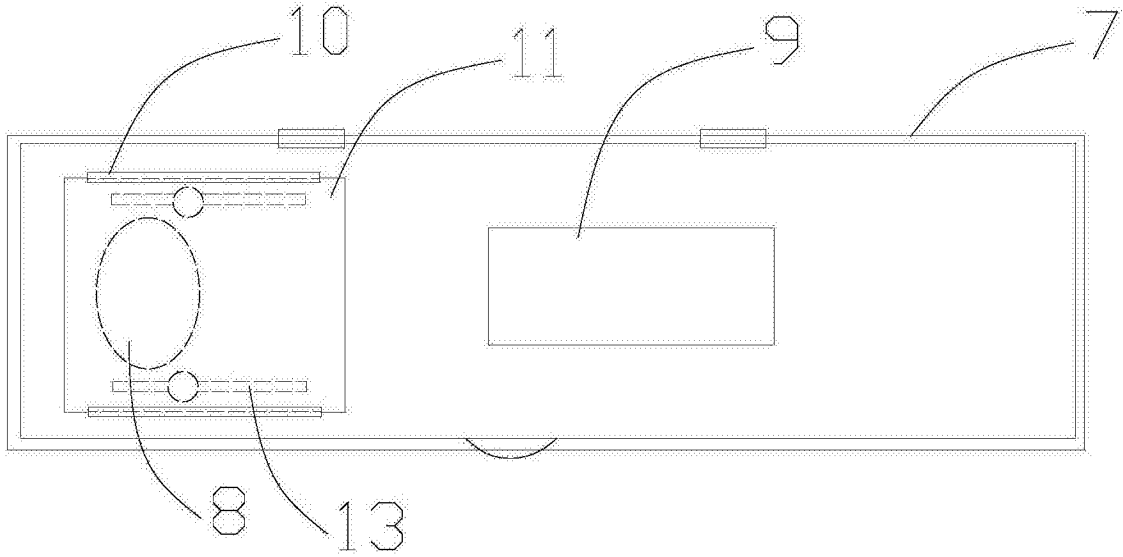


图4

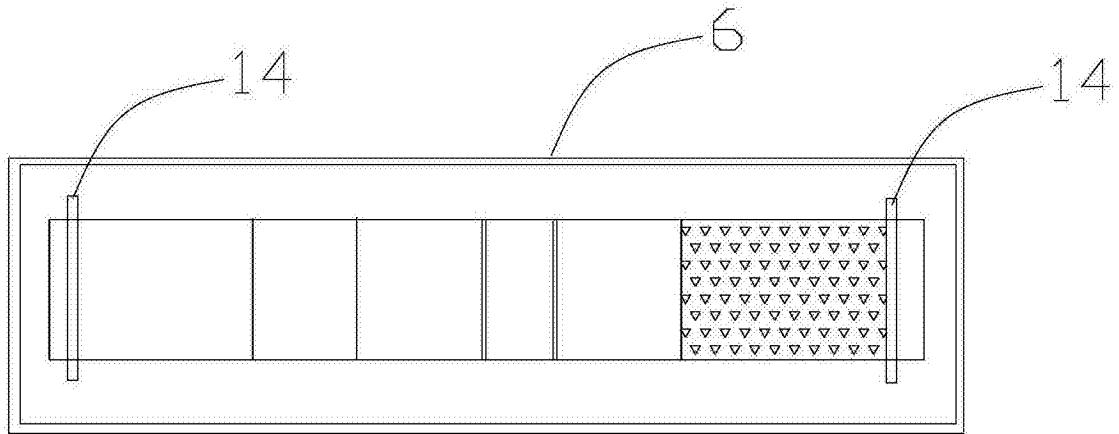


图5

专利名称(译)	快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒		
公开(公告)号	CN206710440U	公开(公告)日	2017-12-05
申请号	CN201720357308.0	申请日	2017-04-07
[标]发明人	肖理文 徐秀 赵皖 刘伟		
发明人	肖理文 徐秀 赵皖 刘伟		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N21/64		
代理人(译)	高姗		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型属于生物检测技术领域，具体涉及一种快速定量检测呕吐毒素的荧光免疫层析试剂盒，所述包括盒体和盖体，盖体从盒体开口的一侧密封盒体，盖体上设有加样孔和观察窗，盖体的内壁滑动的设有密封件，密封件滑动过程中打开或封闭加样孔，盒体内设有免疫层析试纸条，所述免疫层析试纸条包括底板，底板上按照由一端至另一端的方向上顺序搭接有样品垫、结合垫、反应垫和吸水垫，结合垫上吸附有荧光微球标记呕吐毒素抗体和荧光微球标记鸡IgY，反应垫上设有检测区和质控区，检测区上包被有呕吐毒素抗原蛋白，质控区上包被有羊抗鸡IgY。本实用新型的试剂盒可快速、高效的检测呕吐毒素。

