



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061144 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201811095047.5

(22)申请日 2018.09.19

(71)申请人 无限极(中国)有限公司

地址 529156 广东省江门市新会区会城镇
七堡工贸城北区三号

申请人 弘正道(中国)中药研究有限公司

(72)发明人 程敏 谭丽容 陈媛 张勇

邢克宇 徐绍兰

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

代理人 潘颖 赵青朵

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及食品安全检测技术领域,特别涉及一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该定性定量免疫层析试纸条,在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体;硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,检测线上包被有荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原,质控线上包被有第二抗体。本发明双显色体系对检测样本中的玉米赤霉烯酮同时实现定性和定量检测,样本结果在检测中得到双体系验证,结果更加可靠,节约检测时间。

1. 一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;

所述玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体;

所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,所述检测线上包被有荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原,所述质控线上包被有第二抗体。

2. 根据权利要求1所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原为偶联有大分子蛋白和荧光微球的玉米赤霉烯酮。

3. 根据权利要求2所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述大分子蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

4. 根据权利要求2所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球为直径0.01~10 μ m的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的微球。

5. 根据权利要求4所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光物质为有机或无机的荧光物质,或者为多种荧光物质的掺杂物,或者为量子点。

6. 根据权利要求1所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述胶体金颗粒为直径10~100nm的金颗粒。

7. 如权利要求1至6中任一项所述定性定量免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

将玉米赤霉烯酮与大分子偶联,得到玉米赤霉烯酮人工抗原,然后采用荧光微球对玉米赤霉烯酮人工抗原进行标记,得到荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原;

在硝酸纤维素膜的检测线位置包被荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原,在硝酸纤维素膜的质控线位置包被第二抗体;

采用胶体金颗粒对玉米赤霉烯酮单克隆抗体进行标记,得到胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体,将胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体附着于玻璃纤维膜上;

在底板上依次搭接粘贴滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸水纸,得到用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体的喷涂量为7~9 μ L/cm。

9. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原的包被浓度为1.0~5.0mg/mL,喷涂量为0.7~0.8 μ L/cm;所述第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL,喷涂量为0.7~0.8 μ L/cm。

10. 一种定性定量检测玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 定性检测

在权利要求1至6中任一项所述定性定量免疫层析试纸条的样品垫上加入检测样本,反应10~12min后,观察试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况:

检测线和质控线都显示红色条带,则检测样本中玉米赤霉烯酮的含量小于60 μ g/kg,定性判断为阴性;

检测线不显示红色条带,质控线显示红色条带,则检测样本中玉米赤霉烯酮含量大于等于60 μ g/kg,定性判断为阳性;

(2) 定量检测

检测定性判断为阳性的试纸条的荧光强度,根据标准曲线得到检测样本中玉米赤霉烯酮的含量。

一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,特别涉及一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮(Zearalenone,简称ZEN)由镰刀菌属产生的一种激素类真菌毒素。玉米赤霉烯酮有多种结构类似的衍生物,主要包括 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮等,这些物质可由玉米赤霉烯酮在动植物体内代谢转化而成,也可由镰刀菌产生,它们同样具有雌激素效应且常见于粮食及动植物组织中,可引起各种谷物病变,主要发生在玉米、高粱、燕麦、小麦、大麦及谷子等农作物中。研究表明,玉米赤霉烯酮及其代谢物具有类雌激素作用,能导致动物雌激素水平过高及严重的生殖和不育问题。玉米赤霉烯酮污染饲料和食品后,不仅使农业经济受到严重影响,而且还会带来严重的食品安全问题,威胁到人类的健康。

[0003] 鉴于玉米赤霉烯酮的危害严重,我国规定对于谷物及其制品,小麦、小麦粉中玉米赤霉烯酮的限量标准为 $60\mu\text{g}/\text{kg}$,玉米、玉米面(渣、片)为 $60\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 现行的食品安全国家标准食品中玉米赤霉烯酮测定的第一法为液相色谱法,适用于粮食和粮食制品,酒类,酱油、醋、酱及酱制品,大豆、油菜籽、食用植物油中玉米赤霉烯酮的测定。第二法为荧光光度法,适用于大豆、油菜籽、食用植物油中玉米赤霉烯酮的测定。第三法为固相萃取柱净化液相色谱-质谱法,适用于牛肉、猪肉、牛肝、牛奶、鸡蛋中玉米赤霉烯酮的测定。除此之外,还有一些常用的检测方法,例如免疫法、薄层色谱法、气相色谱-质谱法等。

[0005] 免疫层析技术是出现于80年代初期的一种独特的免疫分析方式,它通常以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,通过抗原抗体结合的免疫反应原理,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测线),通过酶反应或直接运用可目测的标记物(如胶体金)而得到直观的实验结果(如检测线出现不同颜色的条带);而游离标记物则越过检测线,达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的目测标记载体有胶体金、乳胶、胶体硒等,其中运用最成功的标记物为胶体金。但是,胶体金免疫层析试纸条存在以下缺陷:

[0006] (1)一般试纸条均为通过肉眼观察结果进行定性分析,无法实现精准的定量检测。

[0007] (2)不同的材料基质效应明显,样本背景干扰较大,易产生假阳性结果。

[0008] (3)检测的阳性结果无法保存,通常超过判断时间后,结果不再准确可靠。

[0009] 市场为了满足对样本进行定量检测的需求,各种基于不同标记物的定量检测试纸条也层出不穷,一般的定量检测试纸条,都是单一的标记物标记抗体后,通过小型仪器读取显色信号值,再通过绘制标准曲线进行定量检测。目前基于不同元素标记物的荧光免疫层析方法也已经出现,并获得高灵敏度,但是该定量检测方法也存在以下缺陷:

[0010] (1)实际检测中,阴性结果所占比率很高,但该方法所有试纸条均需要用仪器读取,否则不能得到结果,在做大批量样本检测时,耗时较长。

[0011] (2)定量检测中,检测部门仍然需要一个阈值来区分阴性和阳性,所以数据处理量较大。

发明内容

[0012] 有鉴于此,本发明提供了一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该定性定量免疫层析试纸条灵敏度高、检测时间短、操作简便,并能同时实现定性和定量检测检测样本中玉米赤霉烯酮。

[0013] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0014] 本发明提供了一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条,在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;

[0015] 玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体;

[0016] 硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,检测线上包被有荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原,质控线上包被有第二抗体。

[0017] 在本发明中,荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原为偶联有大分子蛋白和荧光微球的玉米赤霉烯酮。

[0018] 作为优选,大分子蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0019] 作为优选,荧光微球为直径0.01~10 μ m的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的微球。

[0020] 作为优选,荧光物质为有机或无机的荧光物质,或者为多种荧光物质的掺杂物,或者为量子点。

[0021] 作为优选,胶体金颗粒为直径10~100nm的金颗粒。

[0022] 作为优选,胶体金颗粒是直径为10~100nm的采用柠檬酸三钠还原氯金酸来制备的金颗粒,其表面带有负电荷,可以与蛋白质进行偶联。

[0023] 本发明还提供了该定性定量免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0024] 将玉米赤霉烯酮与大分子偶联,得到玉米赤霉烯酮人工抗原,然后采用荧光微球对玉米赤霉烯酮人工抗原进行标记,得到荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原;

[0025] 在硝酸纤维素膜的检测线位置包被荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原,在硝酸纤维素膜的质控线位置包被第二抗体;

[0026] 采用胶体金颗粒对玉米赤霉烯酮单克隆抗体进行标记,得到胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体,将胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体附着于玻璃纤维膜上;

[0027] 在底板上依次搭接粘贴滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸水纸,得到用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条。

[0028] 作为优选,胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体的喷涂量为7~9 μ L/cm。

[0029] 优选地,胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体的喷涂量为8 μ L/cm。

[0030] 作为优选,荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原的包被浓度为1.0~5.0mg/mL,喷涂量为0.7~0.8 μ L/cm;第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL,喷涂量为0.7~0.8 μ L/cm。

[0031] 优选地, 荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原的包被浓度为1.0~5.0mg/mL, 喷涂量为0.74 μ L/cm; 第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL, 喷涂量为0.74 μ L/cm。

[0032] 作为优选, 胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备方法如下:

[0033] 取胶体金溶液40mL, 用0.02M的碳酸钾调节pH为7.0, 加入玉米赤霉烯酮单克隆抗体, 使其终浓度达到10~60 μ g/mL, 充分混合后, 室温搅拌反应1~4h, 然后加入10%牛血清白蛋白, 室温反应0.5~1h, 在(2000~5000) \times g离心5~20min, 沉淀用0.02M pH 7.0的磷酸盐缓冲液复溶, 复溶体积为起始体积的十分之一, 于4 $^{\circ}$ C保存。

[0034] 在本发明提供的具体实施例中, 胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备方法如下:

[0035] 取胶体金溶液40mL, 用0.02M的碳酸钾调节pH为7.0, 加入400 μ g的玉米赤霉烯酮单克隆抗体, 充分混合后, 室温搅拌反应1h, 然后加入10%牛血清白蛋白, 室温反应0.5h, 在5000 \times g离心20min, 沉淀用0.02M pH 7.0的磷酸盐缓冲液复溶, 复溶体积为起始体积的十分之一, 于4 $^{\circ}$ C保存。

[0036] 在本发明中, 将胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体附着于玻璃纤维膜上具体为: 将上述复溶液喷涂至玻璃纤维膜上, 25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h, 喷涂量为2~4 μ L/cm。

[0037] 作为优选, 荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原的包被浓度为1.0~5.0mg/mL, 喷涂量为0.7~0.8 μ L/cm; 所述第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL, 喷涂量为0.7~0.8 μ L/cm。

[0038] 优选地, 荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原的包被浓度为1.0~5.0mg/mL, 喷涂量为0.74 μ L/cm; 所述第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL, 喷涂量为0.74 μ L/cm。

[0039] 在本发明提供的实施例中, 荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原的包被浓度为2mg/mL, 喷涂量为0.74 μ L/cm; 第二抗体的包被浓度为1mg/mL, 喷涂量为0.74 μ L/cm。

[0040] 作为优选, 将荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原和第二抗体包被到硝酸纤维素膜上采用喷涂的方式, 硝酸纤维素膜上检测线和质控线的喷涂步骤为:

[0041] 用0.01~0.5M pH7.0的磷酸盐缓冲液调节荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原浓度为1~5mg/mL, 将其喷涂于检测线位置, 喷涂量为0.74 μ L/cm;

[0042] 用0.01~0.5M pH7.0的磷酸盐缓冲液调节第二抗体浓度为1~5mg/mL, 将其喷涂于质控线位置, 喷涂量为0.74 μ L/cm;

[0043] 将硝酸纤维素膜在37 $^{\circ}$ C条件下烘干处理8~12h。

[0044] 优选地, 用0.02M pH7.0的磷酸盐缓冲液调节荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原浓度为2mg/mL。

[0045] 优选地, 用0.02M pH7.0的磷酸盐缓冲液调节第二抗体浓度为1.0mg/mL。

[0046] 作为优选, 检测线和质控线相隔5~7mm。

[0047] 在本发明提供的一具体实施例中, 检测线和质控线相隔5mm。

[0048] 在本发明中, 与玻璃纤维膜搭接的硝酸纤维素膜一端的膜顶边与检测线相隔10~12mm。

[0049] 优选地, 与玻璃纤维膜搭接的硝酸纤维素膜一端的膜顶边与检测线相隔10mm。

[0050] 在本发明中, 与玻璃纤维膜搭接的硝酸纤维素膜一端的膜顶边与质控线相隔15~19mm。

[0051] 优选地,与玻璃纤维膜搭接的硝酸纤维素膜一端的膜顶边与质控线相隔15mm。

[0052] 在本发明提供的具体实施例中,第二抗体为羊抗鼠抗体。

[0053] 本发明还提供了一种定性定量检测玉米赤霉烯酮的方法,包括如下步骤:

[0054] (1) 定性检测

[0055] 在本发明提供的定性定量免疫层析试纸条的样品垫上加入检测样本,反应10~12min后,观察试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况:

[0056] 检测线和质控线都显示红色条带,则检测样本中玉米赤霉烯酮的含量小于60 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定性判断为阴性;

[0057] 检测线不显示红色条带,质控线显示红色条带,则检测样本中玉米赤霉烯酮含量大于等于60 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定性判断为阳性;

[0058] 如果定性检测结果在判断时检测线出现微弱的淡红色条带,提示样本中可能含有玉米赤霉烯酮,但浓度低于60 $\mu\text{g}/\text{kg}$,则可采用定量方法进行检测。

[0059] (2) 定量检测

[0060] 定量检测是根据标准曲线得到检测样本中玉米赤霉烯酮的含量。

[0061] 在本发明中,检测样本为薏苡仁。

[0062] 本发明提供了一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该定性定量免疫层析试纸条,在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体;硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,检测线上包被有荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原,质控线上包被有第二抗体。本发明的有益效果是:

[0063] 1. 双显色体系对检测样本中的玉米赤霉烯酮同时实现定性和定量检测:本方法在一张试纸条上,先通过胶体金显色系统,目测检测线和质控线红色条带的有无来进行定性检测。如果胶体金显示为阳性样本时,再通过荧光微球读取仪对荧光显色系统进行读取,得到阳性样本的准确浓度,实现定量检测。一张试纸条同时实现两种检测功能,样本结果在检测中得到双体系验证,结果更加可靠。

[0064] 2. 在实际应用中,阴性样本的占有比率是最大的,检测大批量样本时,先通过目测排除阴性结果,可以大大节约检测时间,阳性结果又可以再进行再次精确定量,实现结果数据化和方便保存。

附图说明

[0065] 图1是玉米赤霉烯酮定性定量免疫层析试纸条结构示意图;其中,滤纸1,样品垫2,玻璃纤维膜(胶体金抗体复合物垫)3,硝酸纤维素膜(NC膜)4,检测线5,质控线6,吸水纸7,PVC底板8;

[0066] 图2是玉米赤霉烯酮定性定量免疫层析试纸条检测原理图;其中,▲示玉米赤霉烯酮(ZEN),●示胶体金-ZEN抗体复合物,○示荧光微球-ZEN偶联抗原,Y示抗鼠二抗。

具体实施方式

[0067] 本发明公开了一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备

方法和应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0068] 本发明提供一种检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条。它包括底板,以及在底板上依次搭接地粘贴的滤纸,样本垫,玻璃纤维垫,硝酸纤维素膜和吸水纸,其中所述的玻璃纤维垫上喷涂有胶体金标记的玉米赤霉烯酮单抗复合物,所述的硝酸纤维素膜上包被有荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原作为检测线和包被有抗鼠抗体作为质控线。

[0069] 所述荧光微球是直径为 $0.01\sim 10\mu\text{m}$ 的采用较长荧光半衰期的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的特殊微球,其表面连接有活性基团;所述荧光物质包括有机或无机的荧光物质或多种荧光物质的掺杂物以及量子点。

[0070] 所述的胶体金颗粒是直径为 $10\sim 100\text{nm}$ 的采用柠檬酸三钠还原氯金酸来制备的金颗粒,其表面带有负电荷,可以与蛋白质进行偶联。

[0071] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种制备上述试纸条的方法,它包括如下的步骤:

[0072] (1)硝酸纤维素膜的制备

[0073] ①制备玉米赤霉烯酮人工抗原;

[0074] 为了制备硝酸纤维素膜,首先将玉米赤霉烯酮标准品与蛋白大分子通过共价偶联法制备质控区所需的人工抗原,偶联方法为:混合酸酐法。偶联蛋白可选:牛血清白蛋白和卵清蛋白,偶联好大分子蛋白质后,再通过EDC-NHS活化法把荧光微球和全抗原进行标记。

[0075] ②检测线和质控线的制备。

[0076] 分别将荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上,制成检测线和质控线。用 $0.1\sim 0.5\text{M}$ pH 7.5的PBS(磷酸盐缓冲溶液)分别调节包被物浓度为 $1\sim 5\text{mg/mL}$,喷膜量为 $0.74\mu\text{L/cm}$,检测线喷涂玉米赤霉烯酮人工抗原,质控线喷涂抗鼠抗体,两区相隔 5mm ; 37°C 烘干过夜处理后,室温干燥的环境下保存备用。

[0077] (2)胶体金抗体复合物垫的制备

[0078] ①胶体金颗粒通过电荷作用和范德华力标记玉米赤霉烯酮单抗:取胶体金溶液用 0.02M 的碳酸钾调节pH为7.0,加入 $10\sim 60\mu\text{g}$ 的玉米赤霉烯酮单抗,充分混合后,室温搅拌反应 $1\sim 4\text{hr}$,然后加入 1% 牛血清白蛋白,室温反应 1hr ,在 $2000\times g$ 离心 $5\sim 15\text{min}$,沉淀用 0.02M pH 7.0的磷酸盐缓冲液复溶,复溶体积为起始体积的十分之一,于 4°C 保存待用。

[0079] ③金标抗体复合物用BIODOT Dispensing System喷涂至玻璃纤维膜上, 25°C 真空干燥 $1\sim 2\text{hr}$,置于室温干燥的环境下备用。

[0080] (3)试纸条的组装;

[0081] 在底板上依次搭接地粘贴下述材料:

[0082] ①滤纸;

[0083] ②样本垫;

[0084] ③喷涂有胶体金-玉米赤霉烯酮单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫;

[0085] ④荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原作为检测线和抗鼠抗体作为质控线的

硝酸纤维素膜；

[0086] ⑤吸水纸。

[0087] 即组装成本发明的免疫层析试纸条。

[0088] (4)检测方法；

[0089] 用上述的免疫层析试纸条检测薏苡仁样本中玉米赤霉烯酮的方法，包括如下的步骤：

[0090] ①称取薏苡仁2g，加入10mL提取液后震荡1分钟，取上清液检测；

[0091] ②在试纸加样孔中加入110 μ L薏苡仁提取液样本，反应10min，目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况；

[0092] ③如果检测线和质控线显示红色条带，则样本中玉米赤霉烯酮的含量小于60 μ g/kg，定性判断为阴性，反之，如果检测线不显色，只有质控线显色，则样本中玉米赤霉烯酮含量大于60 μ g/kg，定性判断为阳性。

[0093] ④根据胶体金红色条带显示的结果，如果样本为阳性时，将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口，检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示，根据仪器中已经录入的标准曲线，即可计算出样本中玉米赤霉烯酮的含量，实现阳性样本的定量检测（胶体金显色后，在20分钟内读取的荧光数据均有效）。

[0094] 本发明提供的一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用中所用试剂或仪器均可由市场购得。

[0095] 下面结合实施例，进一步阐述本发明：

[0096] 实施例1：薏苡仁中检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条的制备

[0097] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0098] 1. 硝酸纤维素膜的制备；

[0099] (1) 制备荧光微球标记的玉米赤霉烯酮 (ZEN-BSA) 人工抗原：

[0100] 与蛋白质的偶联方法为混合酸酐法，偶联比为1:10-1:100，偶联后透析纯化，得到ZEN-BSA。与荧光微球的标记方法为EDC-NHS法，以人工抗原蛋白质子浓度计算，与荧光微球的偶联比为1:1。标记后超滤离心洗涤3次，得到荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原。

[0101] (2) 检测线和质控线的制备：

[0102] 荧光微球标记的ZEN-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上：用0.02M pH 7.5的PBS（磷酸盐缓冲液）稀释抗原偶联物的浓度至2mg/mL，所得的溶液喷涂在膜上作为检测线；稀释抗鼠抗体的浓度至1mg/mL，所得的溶液喷涂在膜上作为质控线，两线的喷膜体积均为0.74 μ L/cm，检测线与膜顶边间隔10mm，两线中间间隔5mm，37 $^{\circ}$ C烘干12小时，放置于干燥柜中保存备用。

[0103] 2. 胶体金复合物垫的制备：

[0104] 胶体金标记玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备：取40mL胶体金（25nm左右大小），用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为7.0，加入400 μ g玉米赤霉烯酮单克隆抗体，充分混合后，室温搅拌反应1hr，加入10%的牛血清白蛋白4mL，封闭反应30min，5000 \times g离心力离心20min，超纯水离心洗涤3次，沉淀用0.02M pH 7.0的PBS（其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20）复溶沉淀至起始体积的1/10后进行结合垫的喷涂，喷涂至30 \times 0.8cm的玻璃纤维膜上，25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2hr，放于干燥柜中备用。该半成品与NC膜组装。检测样本结果为：该条件下标准曲

线浓度为:0、10、20、40、80、160ppb, R^2 为0.9943, IC_{50} 为56ng/mL, 线性回归方程式为: $y = -1024.1987x + 1198.6738$ 。

[0105] 3. 组装试纸条:

[0106] (1)滤纸和样本垫规格为 1×30 cm;

[0107] (2)喷涂有胶体金抗体复合物的玻璃纤维, 规格为 0.8×30 cm;

[0108] (3)已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜, 规格为 2.5×30 cm;

[0109] (4)吸水纸, 规格为 1.2×30 cm;

[0110] (5)PVC底板, 规格为 5.5×30 cm。

[0111] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴, 组装好后用切刀裁切成 4×55 mm的试纸条, 装入塑料卡壳中, 压紧并装入铝箔袋, 加入干燥剂后, 封口保存, 室温环境保质期为6个月。

[0112] 如图1所示, 该免疫层析试纸条的构成为: 在PVC底板8上, 依次搭接地粘贴喷涂有检测线5和质控线6的NC膜4、喷涂有胶体金抗体复合物的金垫3、样本垫1、滤纸2和吸水纸7, 粘贴好后通过切条机切成 4×55 mm的试纸条, 装入塑料卡壳中, 即为一个完整的检测试纸条。

[0113] 如图2所示, 检测原理如下:

[0114] 样本加入试纸条后, 样本如果是阴性(玉米赤霉烯酮含量小于 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$), 样本随层析方向层析, 结合垫上的胶体金抗体复合物涌动到检测线位置, 与检测线上的荧光微球标记的玉米赤霉烯酮偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物, 胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带; 部分未与偶联抗原结合的胶体金抗体复合物涌动到质控线位置, 抗鼠二抗可以和鼠源性单抗发生结合从而质控线也显示红色条带, 通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性, 则样本中的玉米赤霉烯酮先与胶体金抗体复合物结合, 结合了玉米赤霉烯酮的胶体金抗体复合物不能再和检测线上的荧光微球标记的玉米赤霉烯酮偶联抗原结合, 则检测线胶体金显色消失, 则肉眼判断为阳性。因为胶体金的显色, 会对检测线上的荧光微球进行淬灭, 所以显色的阴性结果, 荧光值较低, 而显色为阳性的结果, 因无胶体金的淬灭, 荧光值较强, 利用这个荧光微球荧光值与样本中玉米赤霉烯酮呈现的正相关性, 用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线上的荧光强度, 通过数据分析, 得出薏苡仁样本中玉米赤霉烯酮的具体浓度。本检测体系中, 胶体金显色体系用来进行定性检测, 荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0115] 二、定性并定量检测样本中的玉米赤霉烯酮

[0116] 1. 将薏苡仁样本粉碎, 过18目筛, 准确称取1g, 用80%浓度的甲醇溶液进行提取, 振荡3min, 4°C 、4000r/min离心10min, 取上清, 用0.01MPBS (pH7.4) 溶液稀释到甲醇终浓度为20%, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 有机滤头, 取110 μL 试样滴加于试纸条样本垫上, 反应10min; 按照说明书对薏苡仁进行样本前处理。

[0117] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0118] 3. 如果检测线和质控线都显示红色条带, 则薏苡仁中玉米赤霉烯酮的含量小于 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定性判断为阴性, 反之, 如果检测线不显色, 只有质控线显示红色条带, 则样本中玉米赤霉烯酮含量大于 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定性判断为阳性。

[0119] 4. 根据胶体金红色条带显示的结果, 如果样本为阳性时, 将试纸条插入荧光读取

仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中玉米赤霉烯酮的含量,实现阳性样本的定量检测(胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效)。

[0120] 5. 样本验证:实验过程中,以玉米赤霉烯酮标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度薏苡仁样本进行检测(该已知样本经GC-MS法定量为0、28、49、81、200ppb),用本方法检测,完全符合确证样本结果,具体数据见表1。

[0121] 表1:本检测方法与仪器确证方法结果对比n=3

[0122]

样本编号	GC-MS 结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	本方法定量检测结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	本方法定性检测结果
1	0	0	阴性
2	28	21	阴性
3	49	43	弱阳性
4	81	76	阳性
5	200	193	阳性

[0123] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

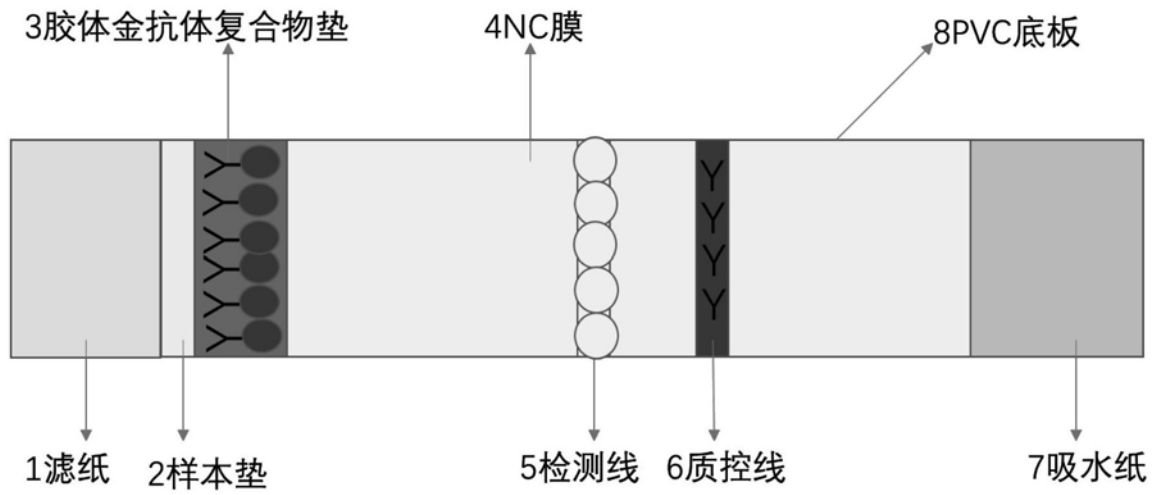


图1

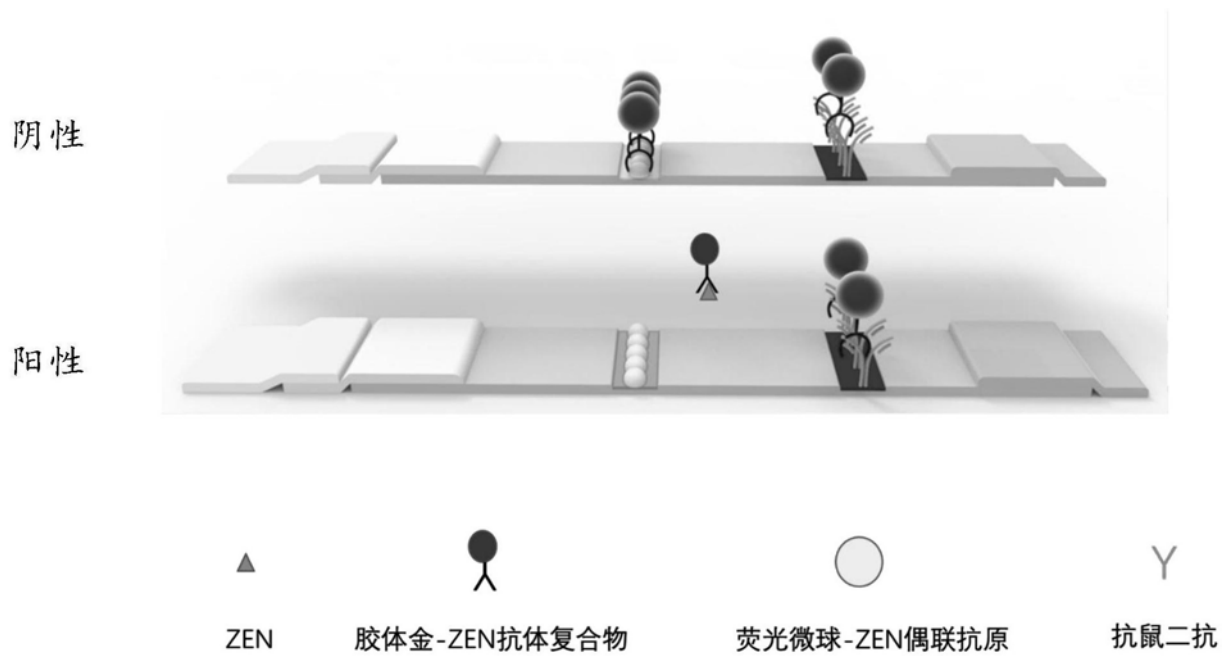


图2

专利名称(译)	一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109061144A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201811095047.5	申请日	2018-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	无限极(中国)有限公司		
申请(专利权)人(译)	无限极(中国)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	无限极(中国)有限公司		
[标]发明人	程敏 谭丽容 陈媛 张勇 邢克宇 徐绍兰		
发明人	程敏 谭丽容 陈媛 张勇 邢克宇 徐绍兰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/582 G01N33/585		
代理人(译)	潘颖		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及食品安全检测技术领域，特别涉及一种用于检测玉米赤霉烯酮的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该定性定量免疫层析试纸条，在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸；玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体；硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线，检测线上包被有荧光微球标记的玉米赤霉烯酮人工抗原，质控线上包被有第二抗体。本发明双显色体系对检测样本中的玉米赤霉烯酮同时实现定性和定量检测，样本结果在检测中得到双体系验证，结果更加可靠，节约检测时间。

样本编号	GC-MS 结果 ($\mu\text{g/kg}$)	本方法定量检测结果 ($\mu\text{g/kg}$)	本方法定性检测结果
1	0	0	阴性
2	28	21	阴性
3	49	43	弱阳性
4	81	76	阳性
5	200	193	阳性