



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102109518 A

(43) 申请公布日 2011.06.29

(21) 申请号 201110062947.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.03.16

G01N 33/558 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

G01N 33/532 (2006.01)

201010598213.0 2010.12.21 CN

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO: C201018 2010.07.13

(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 张道宏 张奇 张文

管笛 丁小霞 姜俊

(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 胡建平

权利要求书 3页 说明书 11页

序列表 2页 附图 2页

(54) 发明名称

黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明属生物检测领域。黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条,其特征在于:包括纸板,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,所述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,所述检测线包被有黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物 (AFM1-BSA),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 M1 单克隆抗体,所述抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体由保藏号为 CCTCCNO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 产生。该试纸条用于检测黄曲霉毒素 M1,具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

1. 黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条,其特征在于:包括纸板,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,所述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,所述检测线包被有黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物,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 M1 单克隆抗体,所述抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 产生。

2. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素 M1 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。

3. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫上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。

4. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素 M1 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 M1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为 75 ~ 375ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 50 ~ 500ng。

5. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素 M1 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 M1 单克隆抗体的用量为 200 ~ 600ng。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的黄曲霉毒素 M1 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

将吸水纸剪裁即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物配制成 0.1 ~ 0.5mg/mL 的包被液 A;于距离硝酸纤维素膜上沿为 15 ~ 20mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线,每厘米检测线上所需黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物 (AFM1-BSA) 的包被量为 75 ~ 375ng,然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 5 ~ 20 分钟;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体配制成 0.1 ~ 0.5mg/mL 的包被液 B;于距检测线 5 ~ 10mm 的位置,用点喷方式将包被液 B 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 50 ~ 500ng,然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 5 ~ 20 分钟;

(3) 样品垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 37 ~ 40°C 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) 金标垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 37 ~ 40°C 条件下干燥 4 ~ 10 小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液横向进行喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体为 200 ~ 600ng,然后真空冷冻干燥 2 ~ 6h,置干燥器中室温保存;

所述的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 产生；

(5) 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、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，即得黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条。

7. 根据权利要求 6 所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于：所述的包被液 A 是按照下述方法配制得到的：将 10 ~ 50mg 市售黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物 (AFM1-BSA)，1 ~ 2g 牛血清白蛋白，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；

所述的包被液 B 是按照下述方法配制得到的：将 10 ~ 50mg 兔抗鼠多克隆抗体，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。

8. 根据权利要求 6 所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于：所述的封闭液 A 是按照下述方法配置得到的：将 1 ~ 2g 牛血清白蛋白，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；

所述的封闭液 B 是按照下述方法配制得到的：将 1 ~ 2g 牛血清白蛋白，0.1 ~ 0.2mL 曲拉通 X-100，0.3 ~ 0.5g 聚乙烯吡咯烷酮，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。

9. 根据权利要求 6 所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于：所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的标记方法为：取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液，调节溶液 pH 值为 5.5；在搅拌的状态下缓慢加入 2.5mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体水溶液，继续搅拌 30min；加入质量浓度为 10% 牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为 1%，继续搅拌 30min；于 4℃ 放置 2h 后，1500r/min 离心 15min，取上清液，弃沉淀；将上清液 12000r/min 离心 30 min，弃去上清液，加入 50.0mL 标记洗涤保存液；再以 12000r/min 离心 30 min，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，其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.05mg/mL；

所述的标记洗涤保存液是按照下述方法配制得到的：2.0g 聚乙二醇 20000，0.2g 叠氮化钠，0.1235 克硼酸，纯水定容至 1000mL，0.22μm 滤膜过滤所得。

10. 一种权利要求 1 或 2 所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的应用，其特征在于：取 1mL 待测液态牛乳及其制品，加入 0.25 ~ 0.5mL 水，混匀，得到样品溶液，取 100 μ L 已稀释好的样品溶液做为检测液逐滴滴加到一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫，将其作为检测试纸条，同时取 1mL 不含黄曲霉毒素 M1 的空白牛奶样品，加 0.25 ~ 0.5mL 水，混匀，得到阴性对照溶液，取 100 μ L 阴性对照溶液，逐滴滴加到另一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫，将其作为对照试纸条，15 分钟后读取结果；

检测结果：(1) 阳性：当检测试纸条的质控线显示出红色线条，而检测线不显色时，或者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时，判为阳性，表明待测样品中黄曲霉毒素 M1 的含量高于或等于 0.5ng/mL；(2) 阴性：当检测试纸条的质控线和

检测线均显示出红色线条,并且检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近时,判为阴性结果,表明待测样品中黄曲霉毒素 M1 的含量低于 0.5ng/mL;(3) 无效:当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线显示或不显示红色线条,该试纸条判为无效。

黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属生物检测领域,具体涉及一种黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素主要是由黄曲霉和寄生曲霉分泌产生的次生代谢产物,是一种能引起人畜各种损害的天然有毒化合物。黄曲霉毒素 (AFT) 目前已发现 20 余种,其中黄曲霉毒素 B1 为毒性及致癌性最强的物质。黄曲霉毒素 M1 是黄曲霉毒素 B1 的羟基化代谢产物,也是一种强致癌物质。当哺乳动物摄入 AFB1 污染的饲料后,在体内经羟基化会将 AFM1 分泌于乳汁当中。奶牛经摄入黄曲霉毒素 B1 污染的饲料后产出的牛奶中便含有黄曲霉毒素 M1。由于黄曲霉毒素 M1 相当稳定,巴氏灭菌法也无法将其杀灭,所以检测黄曲霉毒素 M1 不仅要检测动物饲料原料,而且要检测最终产品。为此世界各国都规定了牛乳及其制品中黄曲霉毒素 M1 的最大允许含量并将其作为强制性标准,如中国政府规定牛乳及其制品(消毒牛奶、新鲜生牛乳、全脂牛奶粉、淡炼乳、甜炼乳、奶油)中黄曲霉毒素 M1 的最高允许含量为 0.5 ng/mL。

[0003] 现有技术中常用的黄曲霉毒素检测技术主要有薄层层析法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、免疫学分析法。前两者具有样品前处理步骤繁琐,耗时费力,仪器价格昂贵,需要专业人员操作等的缺点,而免疫学分析法具有特异性强、样品前处理简单、成本低、对实验人员和环境的污染危害小等优点。最常用的免疫学分析法有酶联免疫吸附法、纳米金免疫层析法等。目前已有黄曲霉毒素 M1 的 ELISA 试剂盒问世,如德国拜发 R-Biopharm 公司以及美国 Abraxis 公司等研发的黄曲霉毒素 M1 ELISA 检测试剂盒。而基于纳米金的免疫层析快速检测技术因其更短的检测时间和更简单的样品前处理而显示出更大的应用价值和前景。但目前世界上还没有针对黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条问世。因此,研究建立一种针对黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条对于监控黄曲霉毒素 M1 的含量具有很重要的意义和应用价值。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条及其制备方法。该试纸条用于检测黄曲霉毒素 M1,具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

[0005] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案为:

黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条(见图 1 和图 2),包括纸板,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,所述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,所述检测线包被有黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物 (AFM1-BSA),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 M1 单克隆抗体,所述抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 产生。

[0006] 所述的杂交瘤细胞株 2C9 已于 2010 年 7 月 13 日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. C201018。其具有序列表中 SEQ Gene No. 1 所示的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体重链可变区编码基因序列和序列表中 SEQ Gene No. 2 所示的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体轻链可变区编码基因序列。

[0007] 抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体, 它由保藏编号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 分泌产生。其重链可变区具有序列表中 SEQ Protein No. 1 所示的氨基酸序列; 轻链可变区具有序列表中 SEQ Protein No. 2 所示的氨基酸序列。该抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体可以识别黄曲霉毒素 M1, 对黄曲霉毒素 M1 的 50% 抑制浓度 IC_{50} 为 67 pg/mL。

[0008] 本发明采用的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体的制备方法, 步骤如下:

(1) 采用两步筛选法获得杂交瘤细胞株 2C9: 将 BALB/c 小鼠经黄曲霉毒素完全抗原 AFM1-BSA 免疫 4-6 次后, 用 2 倍于前一次免疫剂量的黄曲霉毒素完全抗原 AFM1-BSA 作最后一次加强免疫, 3 天后进行细胞融合, 采用 ELISA 方法分两步进行筛选融合细胞: 第一步采用间接 ELISA 法筛选出抗黄曲霉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培养液进行检测, 用黄曲霉毒素 M1 作为竞争原, 选择吸光值和灵敏度均较高的孔, 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筛选法进行检测, 如此重复克隆 2-3 次后, 最终筛选获得杂交瘤细胞株 2C9;

(2) 将获得的杂交瘤细胞株 2C9 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, 纯化即得抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体。

[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。

[0011] 按上述方案, 所述检测垫上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。

[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 M1-牛血清白蛋白偶联物 (AFM1-BSA) 的包被量为 75 ~ 375ng; 每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 50 ~ 500ng。

[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 M1 单克隆抗体的用量为 200 ~ 600ng。

[0014] 如上所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物 (AFM1-BSA) 配制成 0.1 ~ 0.5mg/mL 的包被液 A; 于距离硝酸纤维素膜上沿为 15 ~ 20mm 的位置, 用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线, 每厘米检测线上所需黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物 (AFM1-BSA) 的包被量为 75 ~ 375ng, 然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 5 ~ 20 分钟;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体配制成 0.1 ~ 0.5mg/mL 的包被液 B ;于距检测线 5 ~ 10mm 的位置,用点喷方式将包被液 B 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 50 ~ 500ng,然后于 37 ~ 40℃ 条件下干燥 5 ~ 20 分钟 ;

(3) 样品垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液 A 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) 金标垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 37 ~ 40℃ 条件下干燥 4 ~ 10 小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液横向进行喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体为 200 ~ 600ng,然后真空冷冻干燥 2 ~ 6h,置干燥器中室温保存 ;

所述的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 产生 ;

(5) 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、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,即得黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条。

[0015] 按上述方案,所述的包被液 A 是按照下述方法配制得到的 :将 10 ~ 50mg 市售黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物 (AFM1-BSA),1 ~ 2g 牛血清白蛋白,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 ;

所述的包被液 B 是按照下述方法配制得到的 :将 10 ~ 50mg 兔抗鼠多克隆抗体,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。

[0016] 按上述方案,所述的封闭液 A 是按照下述方法配置得到的 :将 1 ~ 2g 牛血清白蛋白,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 ;

所述的封闭液 B 是按照下述方法配制得到的 :将 1 ~ 2g 牛血清白蛋白,0.1 ~ 0.2mL 曲拉通 X-100,0.3 ~ 0.5g 聚乙烯吡咯烷酮,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。

[0017] 按上述方案,所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的标记方法为 :取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,调节溶液 pH 值为 5.5 ;在搅拌的状态下缓慢加入 2.5mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min ;加入质量浓度为 10% 牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为 1%,继续搅拌 30min ;于 4℃ 放置 2h 后,1500r/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,其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.05mg/mL ;

所述的标记洗涤保存液是按照下述方法配制得到的 :2.0g 聚乙二醇 20000,0.2g 叠氮化钠,0.1235 克硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22μm 滤膜过滤所得。

[0018] 如上所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的应用,方法如下:取 1mL 待测液态牛乳及其制品,加入 0.25 ~ 0.5mL 水,混匀,得到样品溶液,取 100 μ L 已稀释好的样品溶液做为检测液逐滴滴加到一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫,将其作为检测试纸条,同时取 1mL 不含黄曲霉毒素 M1 的空白牛奶样品,加 0.25 ~ 0.5mL 水,混匀,得到阴性对照溶液,取 100 μ L 阴性对照溶液,逐滴滴加到另一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫,将其作为对照试纸条,15 分钟后读取结果;

检测结果:(1) 阳性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线不显色时,或者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时,判为阳性,表明待测样品中黄曲霉毒素 M1 的含量高于或等于 0.5ng/mL;(2) 阴性:当检测试纸条的质控线和检测线均显示出红色线条,并且检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近时,判为阴性结果,表明待测样品中黄曲霉毒素 M1 的含量低于 0.5ng/mL;(3) 无效:当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线显示或不显示红色线条,该试纸条判为无效。

[0019] 该黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的工作原理: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 M1 单克隆抗体被溶解。当样品中含有黄曲霉毒素 M1 时,游离的黄曲霉毒素 M1 将和金标垫上的纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着抗原的检测线时,抗原将和黄曲霉毒素 M1 竞争结合纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中黄曲霉毒素 M1 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 M1 单克隆抗体将越少,形成的显色带颜色越浅。当抗原所结合的纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体少于一定的数量时,检测线处将不会有红色线条出现。无论样品中是否含有黄曲霉毒素,未被检测线上的抗原截获的纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体或纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体与黄曲霉毒素 M1 的结合物将继续移动到质控线并与质控线上的第二抗体结合并被富集显色,所以样品中不含黄曲霉毒素 M1,即为阴性时为两条红色条带,质控线和检测线均为红色;含有一定量黄曲霉毒素 M1,即为阳性时有两种情况:1、只出现一条红色质控线,检测线不显色;2、一条红色质控线和一条浅红色检测线;而质控线没有色带出现则表明试纸条失效。

[0020] 本发明的有益效果在于:

(1) 检测黄曲霉毒素 M1。本发明提供的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条使用的抗体为抗黄曲霉毒素 M1 特异性单克隆抗体,用于特异性快速检测黄曲霉毒素 M1;

(2) 操作简单。用该黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条进行检测时只需将样品溶液逐滴滴加到试纸条的样品垫上即可,为一步式操作,操作简单、方便;

(3) 检测过程不需要黄曲霉毒素 M1 标准溶液作为阳性对照。本发明提供的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条检测样品时不需要使用黄曲霉毒素 M1 标准溶液作为阳性对照,而只需用空白样品作为阴性对照即可;

(4) 检测灵敏度高。本发明提供的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条对样品中黄曲霉毒素 M1 的最低检测限为 0.5ng/mL。

附图说明

[0021] 图 1 为本发明的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的正视图。图中 :1 纸板、2 吸水垫 ;3 检测垫 ;4 金标垫 ;5 样品垫 ;6 质控线 ;7 检测线。

[0022] 图 2 为本发明的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的侧视结构示意图。图中 :1 纸板 ;2 吸水垫 ;3 检测垫 ;4 金标垫 ;5 样品垫。

[0023] 图 3 为实施例 2 的的结果判定图。图中 :1 对照试纸条 ;2 检测试纸条 ;3 质控线 ;4 检测线。

[0024] 图 4 为实施例 3 的的结果判定图。图中 :1 对照试纸条 ;2 检测试纸条 ;3 质控线 ;4 检测线。

[0025] 图 5 为实施例 4 的的结果判定图。图中 :1 对照试纸条 ;2 检测试纸条 ;3 质控线 ;4 检测线。

具体实施方式

[0026] 实施例 1 :抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体的制备方法

抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 2C9 产生,其制备方法,包括以下步骤:

1. 采用两步筛选法获得杂交瘤细胞株 2C9

(1) 动物免疫

购买 6 周龄 BALB/c 小鼠 6 只,免疫市售的黄曲霉毒素完全抗原 AFM1-BSA。第一次免疫将黄曲霉毒素完全抗原与等量福氏完全佐剂乳化后,于小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于 4 周后进行,采用福氏不完全佐剂与等量黄曲霉毒素完全抗原乳化,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,均为每鼠 40 μ g/mL。前 3 次每次免疫后 8 天,尾静脉采血,分离血清,采用间接 ELISA 法监测小鼠血清效价。第 4 次免疫后 8 天,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。黄曲霉毒素完全抗原 AFM1-BSA 购于 Sigma-Aldrich 公司;

2) 细胞融合

于最后一次加强免疫 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:无菌条件下杀死免疫小鼠,分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞 SP2/0 以 5 : 1 的个数比混合,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 二氧化碳培养箱培养,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 ;

3) 细胞株的筛选及克隆

待细胞融合后第 12 天左右,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 法筛选出抗黄曲霉毒素 M1 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,用黄曲霉毒素 M1 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_{50} 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 2C9。

[0027] 采用如下方法测定杂交瘤细胞株 2C9 抗体可变区序列:

(1)测定提取总 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 2C9 的总 RNA;

(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™-2 II 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;

(3)PCR 法克隆可变区基因:根据 GENE BANK 中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以 cDNA 为模版扩增抗体轻、重链可变区基因。PCR 程序为:94℃ 30s、55℃ 1min、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,连接到载体 pMD18-T 中,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆,送至上海桑尼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 GAC GGT 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);

得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长 354bp,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 117 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 332bp,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 110 个氨基酸组成,序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0028] 2. 抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体的纯化

将步骤 1 获得的杂交瘤细胞株 2C9 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 33 μ L,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 2 mol/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 M1

单克隆抗体,将抗体置 -20°C 冰箱中备用;

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。

[0029] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株 2C9 分泌的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体的亚型为 IgG2a。用常规非竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)法测得 2C9 的鼠腹水抗体的效价可达 4.26×10^6 ,即鼠腹水抗体稀释 4.26×10^6 倍时的溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争 ELISA 法鉴定其对黄曲霉毒素 M1 的灵敏度为 67 pg/mL,与黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2 交叉反应率均小于 0.1%。

[0030] 实施例 2-4:黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的制备及应用

下述实施例 2-4 使用的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体为实施例 1 制备得到的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体。

[0031] 实施例 2

黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁成长 16mm 宽 3mm 的规格,即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物 AFM1-BSA 配制成 0.1mg/mL 的包被液 A;于距硝酸纤维素膜上沿 15mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物的包被量为 75ng,然后于 37°C 条件下干燥 15 分钟;

所述的包被液 A 为:10mg 市售黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物 AFM1-BSA,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;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体配成 0.2mg/mL 的包被液 B;于距检测线 5mm 的位置,用点喷方式将包被液 B 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 100ng,然后于 37°C 条件下干燥 15 分钟;

所述的包被液 B 为将 20mg 兔抗鼠多克隆抗体,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;

所述的硝酸纤维素膜长 25mm,宽 3mm;

(3) 样品垫的制备:

将玻璃纤维膜剪裁成长 13mm 宽 3mm 的规格,放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 37°C 条件下干燥 6 小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

所述的封闭液 A 为 1g 牛血清白蛋白,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;

(4) 金标垫的制备:

将玻璃纤维膜剪裁成长 9mm 宽 3mm 的规格,放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 37°C 条件下

干燥 16 小时,于干燥好的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液横向喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体为 600ng,然后真空冷冻干燥 6h,置干燥器中室温保存;

所述的封闭液 B 为 1g 牛血清白蛋白,0.1mL 曲拉通 X-100,0.3g 聚乙烯吡咯烷酮,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;

所述的纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的具体标记方法为:量取 50.0mL 质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,用 0.1 mol/L 碳酸钾水溶液调节溶液 pH 值为 5.5;在搅拌的状态下缓慢加入 2.5mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入质量浓度为 10% 牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为 1%,继续搅拌 30min;于 4℃ 放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,取上清液,弃沉淀;将上清液 12000r/min 离心 30 min,弃去上清液,加入 50.0mL 标记洗涤保存液;再以 12000r/min 离心 30 min,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,其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.05mg/mL;

所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 15nm;

所述的 0.1 mol/L 碳酸钾水溶液为:13.8g 碳酸钾溶于纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得;所述的 0.1mg/mL 抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体水溶液为 1mg 抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶解在 10 mL 纯水中制成;所述的 10% 牛血清白蛋白水溶液为 10g 牛血清白蛋白溶解在 100mL 纯水中,0.22 μ m 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 叠氮化钠,0.1235 克硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得;

(5) 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、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为 1mm,即得黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条,见图 1 和图 2。

[0032] 上述黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的应用:

吸取 1# 和 2# 待测牛奶样品各 1mL,加入 0.25mL 水,混匀,得到样品溶液,取 100 μ L 已稀释好的样品溶液分别做为检测液逐滴加入一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫,将其作为检测试纸条;同时取 1mL 不含黄曲霉毒素 M1 的空白牛奶样品,加入 0.25mL 水,混匀,得到阴性对照溶液,取 100 μ L 阴性对照溶液,逐滴加到另一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫,将其作为对照试纸条,15 分钟后读取结果;

检测结果:1# 检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线不显色,则判为阳性结果,表明待测样品中的黄曲霉毒素 M1 的含量高于 0.5ng/mL,见图 3-1;2# 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,表明待测样品中的黄曲霉毒素 M1 的含量高于或等于 0.5ng/mL,见图 3-2。

[0033] 实施例 3

黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁成长 18mm 宽 4mm 的规格,即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物 AFM1-BSA 配制成 0.2mg/mL 的包被液 A ;于距硝酸纤维素膜上沿 18mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需的黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物的包被量为 150ng,然后于 38℃ 条件下干燥 10 分钟 ;

所述的包被液 A 为 :20mg 市售黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物 AFM1-BSA,1.5g 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 ;

质控线的包被 :

将兔抗鼠多克隆抗体配成 0.2mg/mL 的包被液 B ;于距检测线 8mm 的位置,用点喷方式将包被液 B 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 200ng,然后于 38℃ 条件下干燥 10 分钟 ;

所述的包被液 B 为将 20mg 兔抗鼠多克隆抗体,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 ;

所述的硝酸纤维素膜长 28mm,宽 4mm ;

(3) 样品垫的制备 :

将玻璃纤维膜剪裁成长 15mm 宽 4mm 的规格,放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 38℃ 条件下干燥 5 小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存 ;

所述的封闭液 A 为 1.5g 牛血清白蛋白,2.5g 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 ;

(4) 金标垫的制备 :将玻璃纤维膜剪裁成长 8mm 宽 4mm 的规格,放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 38℃ 条件下干燥 5 小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液横向喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体为 450ng,然后真空冷冻干燥 4h,置干燥器中室温保存 ;

所述的封闭液 B 为 1.5g 牛血清白蛋白,0.1mL 曲拉通 X-100,0.4g 聚乙烯吡咯烷酮,2.5g 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 ;

所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的具体标记方法为 :量取 50.0mL 质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,用 0.1 mol/L 碳酸钾水溶液调节溶液 pH 值为 5.5 ;在搅拌的状态下缓慢加入 2.5mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min ;加入质量浓度为 10% 牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为 1%,继续搅拌 30min ;于 4℃ 放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,取上清液,弃沉淀 ;将上清液 12000r/min 离心 30 min,弃去上清液,加入 50.0mL 标记洗涤保存液 ;再以 12000r/min 离心 30 min,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,其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.05mg/mL ;

所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 17nm ;

所述的 0.1 mol/L 碳酸钾溶液为 :13.8g 碳酸钾溶于纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得 ;所述的 0.1mg/mL 抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液为 1mg 抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶解在 10 mL 纯水中制成 ;所述的 10% 牛血清白蛋白溶液为 10g 牛血清白蛋白溶解在 100mL 纯水中,0.22 μ m 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,0.1235 克硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得;

(5) 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、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为 2mm,即得黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条,见图 1 和图 2。

[0034] 如上所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的应用:

吸取待测牛奶样品 1mL,加入 0.3mL 水,混匀,得到样品溶液,取 100 μ L 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫,将其作为检测试纸条,同时取 1mL 空白牛奶样品,加入 0.3mL 水,混匀,得到阴性对照溶液,取 100 μ L 阴性对照溶液,逐滴加入另一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫,将其作为对照试纸条,15 分钟后读取结果;

检测结果:检测试纸条的质控线和检测线均显示出红色线条,并且检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近,判为阴性结果,表明待测样品中的黄曲霉毒素 M1 的含量低于 0.5ng/mL,见图 4。

[0035] 实施例 4

黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁成长 17mm 宽 2mm 的规格,即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白的偶联物 AFM1-BSA 配制成 0.5mg/mL 的包被液 A;于距硝酸纤维素膜上沿 20mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需的黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为 375ng,然后于 39 $^{\circ}$ C 条件下干燥 8 分钟;

所述的包被液 A 为:50mg 市售黄曲霉毒素 M1-牛血清白蛋白偶联物 AFM1-BSA,2g 牛血清白蛋白,0.04g 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;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体配成 0.5mg/mL 的包被液 B;于距检测线 10mm 的位置,用点喷方式将包被液 B 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 500ng,然后于 39 $^{\circ}$ C 条件下干燥 8 分钟;

所述的包被液 B 为将 50mg 兔抗鼠多克隆抗体,0.04g 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;

所述的硝酸纤维素膜长 30mm,宽 2mm;

(3) 样品垫的制备

将玻璃纤维膜剪裁成长 17mm 宽 2mm 的规格,放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 39 $^{\circ}$ C 条件下干燥 10 小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

所述的封闭液 A 为 2g 牛血清白蛋白,5g 蔗糖,0.04g 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;

(4) 金标垫的制备

将玻璃纤维膜剪裁成长 6mm 宽 2mm 的规格,放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 39℃ 条件下干燥 10 小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液横向喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体为 200ng,然后真空冷冻干燥 3h,置干燥器中室温保存;

所述的封闭液 B 为 2g 牛血清白蛋白,0.15mL 曲拉通 X-100,0.05g 聚乙烯吡咯烷酮,5g 蔗糖,0.04g 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 M1 单克隆抗体溶液的具体标记方法为:量取 50.0mL 质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,用 0.1 mol/L 碳酸钾水溶液调节溶液 pH 值为 5.5;在搅拌的状态下缓慢加入 2.5mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入质量浓度为 10% 牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为 1%,继续搅拌 30min;于 4℃ 放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,取上清液,弃沉淀;将上清液 12000r/min 离心 30 min,弃去上清液,加入 50.0mL 标记洗涤保存液;再以 12000r/min 离心 30 min,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,其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.05mg/mL;

所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 20nm;

所述的 0.1 mol/L 碳酸钾水溶液为:13.8g 碳酸钾溶于纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得;所述的 0.1mg/mL 抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体水溶液为 1mg 抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体溶解在 10 mL 纯水中制成;所述的 10% 牛血清白蛋白水溶液为 10g 牛血清白蛋白溶解在 100mL 纯水中,0.22 μ m 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,0.1235 克硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得;

(5) 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、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为 3mm,即得黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条,见图 1 和图 2。

[0036] 如上所述的黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的应用:

吸取 1# 和 2# 待测牛奶样品各 1mL,加入 0.4mL 水,混匀,得到样品溶液,取 100 μ L 已稀释好的样品溶液分别做为检测液逐滴滴加到一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫,将其作为检测试纸条,同时取 1mL 空白牛奶样品,加入 0.4mL 水,混匀,得到阴性对照溶液,取 100 μ L 阴性对照溶液,逐滴加入另一黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条的样品垫,将其作为对照试纸条,15 分钟后读取结果;

检测结果:1# 检测试纸条的质控线不显色,检测试纸条的检测线显示红色线条,则判为无效,见图 5-1;2# 检测试纸条的质控线不显色,检测试纸条的检测线亦不显示红色线条,则判为无效,见图 5-2。

[0001]

序列表

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 黄曲霉毒素 M1 免疫层析试纸条及其制备方法

<160> 4

<210> 1

<211> 354bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

```

agg t g c a a c t   g c a g c a g t c a   g g g g c g g t g a   a g c c t g g g g c   c t c a g t g a a g   5 0
a t g t c c t g c a   a g g c t t t t g g   c a a c a c c t t c   a c t a c c t a t c   c a a t a a a c t g   1 0 0
g a t g a a c t a t   a a t c a t g g g a   a g a g c c t a g a   g t g g a t c g g g   a a t t t t c a t c   1 5 0
c t t t c a a t a a   t a a t a c t a a c   t a c a a t g a a a   a a t t c a a g g t   c a a g g c c a a a   2 0 0
t t g a c t g c a g   a a a a a t c c t c   t a g c g c a g t c   t a c t t g g a g c   t c a g g c g a t t   2 5 0
a a c a t c t g a t   g a c t c t g c t g   t t t a t t a c t g   t g c g a g g a c a   t t a c t a c g g t   3 0 0
a c t g g a g a a t   a c t t c g a t g t   c t g g g g c c a a   g g g a c c a c g g   t c a c c g t c t c   3 5 0
c t c a                                     3 5 4

```

<210> 2

<211> 332bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 2

```

c c g t t t g a t t   t c c a g e t t g g   t g c c c c c t c c   g a a c g t g t a a   g e t c c c t a a t   5 0
g t g c t g a c a g   t a a t a g g t t g   c a g c a t c c t c   c t c c t c c a c a   g g a t g g a t g t   1 0 0
t g a g g g t g a a   g t c t g t c c c a   g a c c c a c t g c   c a c t g a a c c t   g g c a g g g a c c   1 5 0
c c a g a t t c t a   g g t t g g a t a c   a a g a t a g a t g   a g g a g t c t g g   g t g g c t g t c c   2 0 0
t g g t t t c t g t   t g g t t c c a g t   g c a t a t a a c t   a t a g c c a g a t   g t a c t g a c a c   2 5 0
t t t t g c t g g c   c c t g t a t g a g   a t g g t g g c c c   t c t g c c c c a g   a g a t a c a g c t   3 0 0
a a g g a a g c t g   g a g a c t g g g t   g a g c t c a a t g   t c                                     3 3 2

```

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

```

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
1           5           10          15           20
Ala Phe Gly Asn Thr Phe Thr Thr Tyr Pro Ile Asn Trp Met Asn Tyr Asn His Gly Lys
          25           30           35           40

```

[0002]

Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Phe Asn Asn Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys
 45 50 55 60
 Phe Lys Val Lys Ala Lys Leu Thr Ala Glu Lys Ser Ser Ser Ala Val Tyr Leu Glu Leu
 65 70 75 80
 Arg Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Leu Leu Arg Tyr
 85 90 95 100
 Trp Arg Ile Leu Arg Cys Leu Gly Pro Arg Asp His Gly His Arg Leu Leu
 105 110 115

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 1 5 10 15 20
 Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn
 25 30 35 40
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
 45 50 55 60
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg
 85 90 95 100
 Ser Glu Gly Ala Pro Ser Trp Lys Ser Asn
 105 110

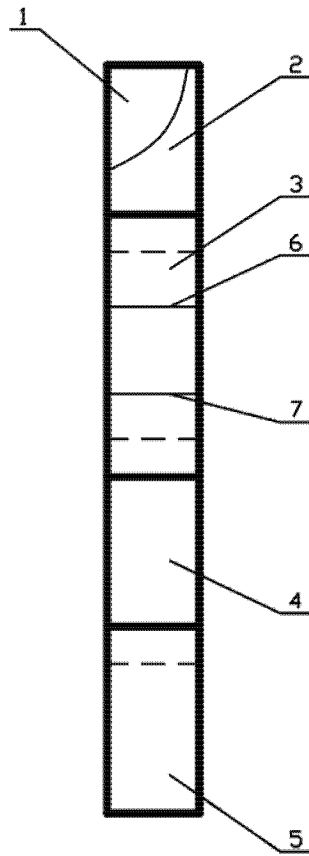


图 1

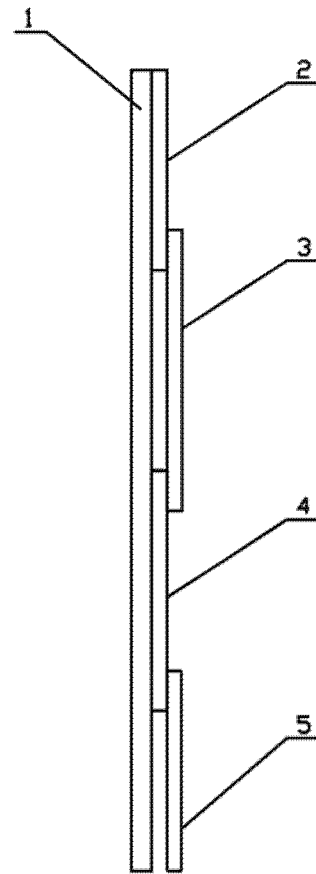


图 2

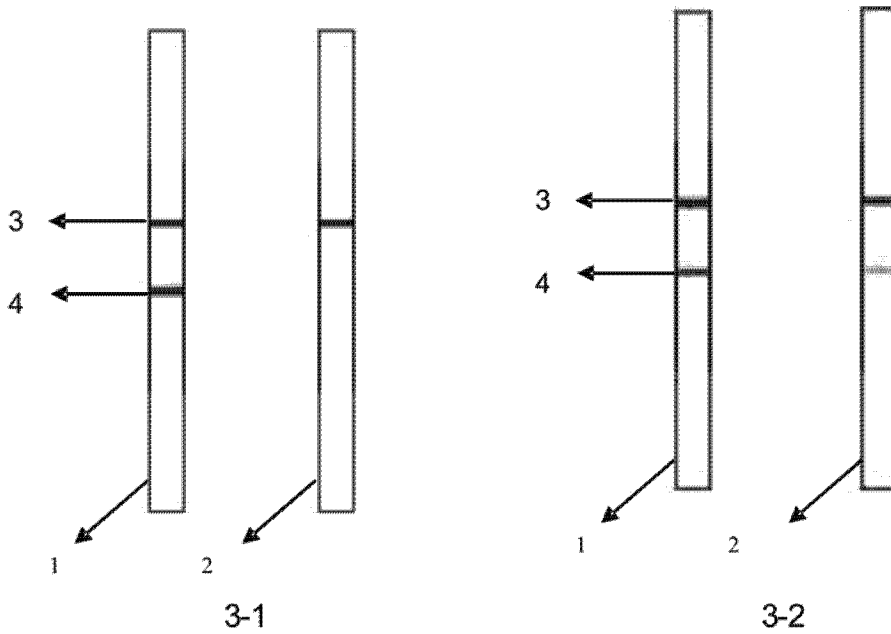


图 3

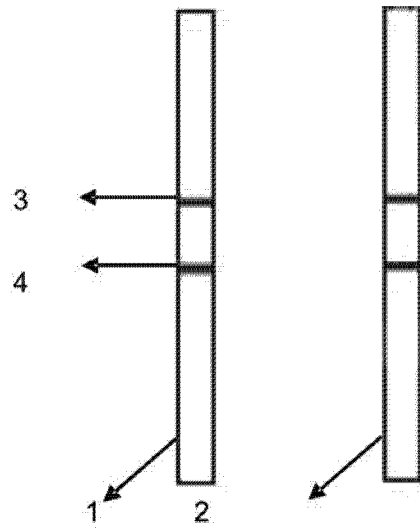


图 4

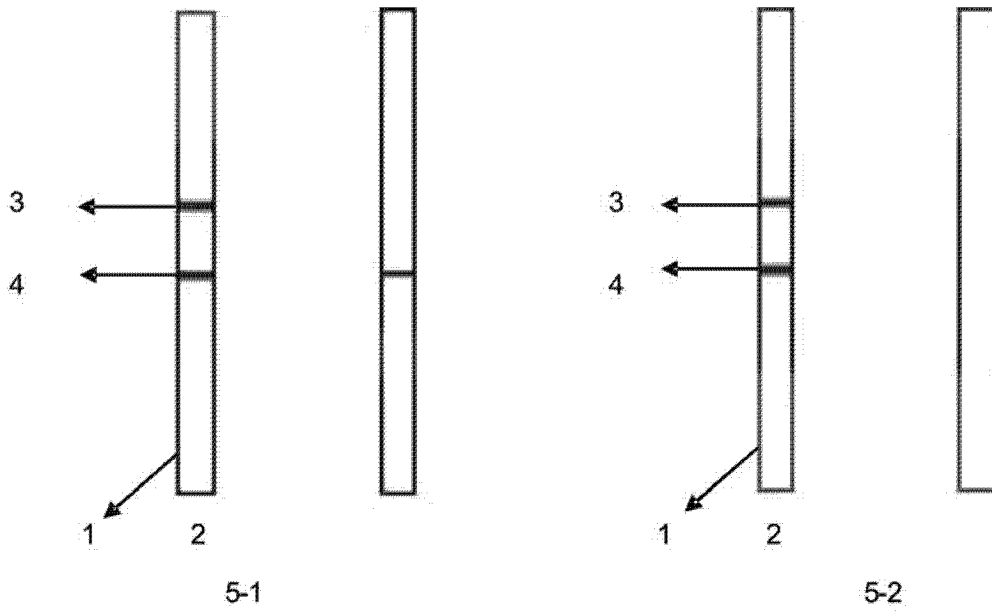


图 5

专利名称(译)	黄曲霉毒素M1免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN102109518A	公开(公告)日	2011-06-29
申请号	CN201110062947.1	申请日	2011-03-16
[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 张道宏 张奇 张文 管笛 丁小霞 姜俊		
发明人	李培武 张道宏 张奇 张文 管笛 丁小霞 姜俊		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	胡建平		
优先权	201010598213.0 2010-12-21 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物检测领域。黄曲霉毒素M1免疫层析试纸条，其特征在于：包括纸板，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，所述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，所述检测线包被有黄曲霉毒素M1-牛血清白蛋白偶联物(AFM1-BSA)，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M1单克隆抗体，所述抗黄曲霉毒素M1单克隆抗体由保藏号为CCTCCNO. C201018的杂交瘤细胞株2C9产生。该试纸条用于检测黄曲霉毒素M1，具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

