



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103257230 B

(45) 授权公告日 2014.01.08

(21) 申请号 201310115725.0

(22) 申请日 2013.04.03

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :C201328 2013.03.07

(73) 专利权人 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 李鑫 张奇 丁小霞

张文 张兆威

(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 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 201489002 U, 2010.05.26,

CN 102087284 A, 2011.06.08,

CN 101281195 A, 2008.10.08,

Rudolf Krska, Alexandra Molinelli. Rapid
test strips for analysis of mycotoxins in
food and feed. 《Anal Bioanal Chem》. 2009,
第 393 卷

张甄 等人. 同时检测 AFB1 和 ZEA 免疫
层析试纸条的研制. 《黑龙江八一农垦大学学
报》. 2010, 第 22 卷 (第 2 期),

张甄. 同时检测黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉
烯酮免疫层析试纸条的研制. 《中国优秀硕士论
文全文数据库》. 2010, (第 2010 年第 9 期),

审查员 毕秀华

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

同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污
染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉
烯酮混合污染的免疫层析试纸条、制备方法及其
应用。它包括纸板, 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, 检测垫以硝酸纤维素膜为基
垫, 硝酸纤维素膜上设有横向质控线和检测线, 检
测线位于质控线的下方, 个数为两条, 呈间隔分
布, 其上分别包被有玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白
偶联物和黄曲霉毒素 B₁-牛血清白蛋白偶联物, 质
控线包被有兔抗鼠多克隆抗体; 金标垫横向喷涂
有纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体和
纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体。其可
用于样品中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮两种真菌
毒素含量的同步检测, 具有操作简单、快速、灵
敏度高的特点。

CN 103257230 B

1. 同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,其特征在于:它包括纸板,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,硝酸纤维素膜上设有横向质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为两条,呈间隔分布,所述两条检测线上分别包被有玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物和黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物,所述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通用单克隆抗体和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体;所述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,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。

2. 根据权利要求 1 所述的同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,其特征在于:所述的吸水垫长 16 ~ 18mm,宽 3 ~ 4mm,检测垫长 18 ~ 30mm,宽 3 ~ 4mm;金标垫长 10 ~ 12mm,宽 3 ~ 4mm;样品垫长 12 ~ 15mm,宽 3 ~ 4mm,相邻各垫的交叠长度为 1 ~ 3mm。

3. 根据权利要求 1 所述的同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫上两条检测线之间的间距为 2-4mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为 15 ~ 20mm,所述靠近质控线的检测线与质控线的间距为 5 ~ 7mm。

4. 根据权利要求 1 所述的同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫包被玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的包被量为 100 ~ 300ng;包被黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为 100 ~ 300ng;质控线上每厘米所需要的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 50 ~ 200ng。

5. 根据权利要求 1 所述的同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条,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通用单克隆抗体的用量为 100 ~ 200ng,所需的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为 200 ~ 400ng。

6. 同步快速检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:它包括以下步骤:

吸水垫的制备

将吸水纸剪裁即得吸水垫;

检测垫的制备

检测线的包被:

将玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物和黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物用包被缓冲液分别配制成 0.25 ~ 0.5mg/mL 的包被液,用点喷方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别包被,得到两条检测线,然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 30 ~ 60 分钟;所述包被玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的包被量为 100 ~ 300ng;包被黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的检测线上所需要的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为 100 ~ 300ng,所述两条检测线之间的

间距为 2-4mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为 15 ~ 20mm;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成 0.2 ~ 0.4mg/mL 的溶液,于距靠近质控线的检测线 5 ~ 7mm 的位置,用点喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 50 ~ 200ng,然后于 37 ~ 40℃ 条件下干燥 1 ~ 2 小时;

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 6 ~ 10 小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

金标垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于 37 ~ 40℃ 条件下干燥 6 ~ 10 小时,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液的混合溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的用量为 100 ~ 200ng,所需纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为 200 ~ 400ng,然后真空冷冻干燥 2 ~ 4 小时,置干燥器中室温保存;所述的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;

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,即得同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条。

7. 根据权利要求 6 所述的同步快速检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述的包被缓冲液每 10mL 中含有:牛血清白蛋白 0.1 ~ 0.2g,氯化钠 0.08g,十二水磷酸氢二钠 0.029g,氯化钾 0.002g,磷酸二氢钾 0.002g。

8. 根据权利要求 6 所述的同步快速检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述样品垫的制备步骤中使用的封闭液每 100mL 中含有:牛血清白蛋白 1 ~ 2g,蔗糖 2 ~ 3g,叠氮化钠 0.02 ~ 0.05g,氯化钠 0.8g,十二水磷酸氢二钠 0.29g,氯化钾 0.02g,磷酸二氢钾 0.02g;

所述金标垫的制备步骤中使用的封闭液每 100mL 中含有:牛血清白蛋白 1 ~ 2g,蔗糖 2 ~ 3g,氯化钠 1 ~ 2g,吐温-20 0.05 ~ 0.1g,聚乙烯吡咯烷酮 0.2 ~ 0.5g,叠氮化钠 0.02 ~ 0.05g,十二水磷酸氢二钠 0.29g,氯化钾 0.02g,磷酸二氢钾 0.02g。

9. 根据权利要求 6 所述的同步快速检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的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通用单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,用 0.4mL 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液,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

40.0mL 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；

所述纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的，其具体方法为：取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液，用 0.425mL 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值，在搅拌的状态下缓慢加入 2.5mL 0.1mg/mL 的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体水溶液，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 40.0mL 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；

所述 0.1mol/L 碳酸钾水溶液为：13.8g 碳酸钾溶于纯水定容至 1000mL，0.22 μm 滤膜过滤所得；所述标记洗涤保存液为：2.0g 聚乙二醇-20000，0.2g 叠氮钠，0.1235g 硼酸，纯水定容至 1000mL，0.22 μm 滤膜过滤所得。

10. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的应用，其特征在于：它的应用方法为：称取已磨细待测样品，加入体积浓度为 60 ~ 80% 的甲醇水溶液，混匀，在 50 ~ 60℃ 水浴下超声提取 5 ~ 10 分钟，静置 5 ~ 10 分钟，将上层清液即提取液用水稀释，使稀释液中甲醇的终体积浓度为 20 ~ 30%，得到待测样品溶液，再取 80-150 μL 该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上进行检测，其作为检测试纸条，另取等体积的甲醇浓度一致的甲醇水溶液做为阴性对照液，逐滴加入另一同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上，其作为对照试纸条，15-20 分钟后将检测试纸条和对照试纸条进行显色对照：当检测试纸条上包被玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时，表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮含量低于 1ng/mL；比对应检测线的颜色浅时，表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮含量等于或高于 1ng/mL 并低于 4ng/mL；不显色时，表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于 4ng/mL；

当检测试纸条上包被黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时，表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量低于 0.25ng/mL；比对应检测线的颜色浅时，表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量等于或高于 0.25ng/mL 并低于 1ng/mL；不显色时，表明待测样品溶液中黄曲霉毒素的含量等于或高于 1ng/mL；

当质控线不显色时，无论检测试纸条的检测线是否显色，该试纸条判为无效；

最后经换算即得待测样品中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的含量。

同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及真菌毒素免疫层析试纸条,具体涉及同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮是存在于谷物中的有害物质,是由污染谷物的真菌所产生的次级代谢产物。粮食和饲料在收获过程中未被充分干燥或贮运过程中温度或湿度过高,都可能为真菌的生长繁殖提供适宜条件,从而引起真菌毒素的污染。黄曲霉毒素能强烈破坏人和动物的肝脏组织,严重时会导致肝癌甚至死亡;玉米赤霉烯酮具有类雌激素作用,能造成动物急慢性中毒,引起动物繁殖机能异常甚至死亡,这两种毒素普遍存在于粮食和饲料中,对人类的健康和安全造成严重威胁。鉴于这两种真菌毒素的危害作用及其在粮食和饲料中的广泛发生,世界各国粮食和饲料中这两种真菌毒素的含量进行了严格限定。为了加强对粮食和饲料中这些真菌毒素的检测,保障人们的消费安全,开发针对这些真菌毒素的检测技术,尤其是快速检测,是了解和掌握食品及饲料安全卫生信息,增强食品安全消费的重要环节。

[0003] 现有的对黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的检测方法主要包括薄层层析法、精密仪器分析法和免疫学分析法。薄层层析法检测真菌毒素时,不需要特殊的仪器设备,在一般实验室都可进行,但检测试剂用量大、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,其应用范围越来越窄。精密仪器分析法包括高效液相色谱法、液相色谱与质谱及串联质谱联用的方法,其灵敏度高,准确性好,但仪器昂贵,要求所检测的样品的纯化程度高,样品前处理过程繁琐,耗时长,对实验环境和检测人员要求高,难以实现快速检测,检测成本高,不适用于现场快速检测。免疫分析方法克服了薄层层析法和仪器分析法的缺点,由于其特异性强、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在近年来获得了快速发展。基于胶体金标记抗体与抗原特异性结合反应的免疫层析技术由于其检测结果肉眼可见,不需要大型仪器设备,检测成本低,分析时间短,近年来在真菌毒素等微量残留物的定性、在线、快速检测上得到了广泛应用。然而现有的用于真菌毒素检测的胶体金免疫层析试纸条大都只能检测一种真菌毒素。而我国小农户分散型的种植方式,农产品中真菌毒素发生率高,且同一农产品受多种真菌毒素污染的可能性大,因此迫切需要能同步检测多种真菌毒素的检测技术,以实现粮食及饲料等中真菌毒素混合污染的同步、快速监测。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题是提供一种同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用。该免疫层析试纸条可用于样品中黄曲霉毒素和

玉米赤霉烯酮两种真菌毒素含量的同步检测,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和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条(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,硝酸纤维素膜上设有横向质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为两条,呈间隔分布,所述两条检测线上分别包被有玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA),所述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通用单克隆抗体和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体;所述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,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;该杂交瘤细胞株2D3已于2013年3月7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. C201328。

[0007] 按上述方案,所述的吸水垫长16~18mm,宽3~4mm,检测垫长18~30mm,宽3~4mm;金标垫长10~12mm,宽3~4mm;样品垫长12~15mm,宽3~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm。

[0008] 按上述方案,所述的吸水垫为吸水纸。

[0009] 按上述方案,所述检测垫上两条检测线之间的间距为2~4mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,所述靠近质控线的检测线与质控线的间距为5~7mm。

[0010] 按上述方案,所述检测垫包被玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的包被量为100~300ng;包被黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)的检测线上每厘米所需要的黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)的包被量为100~300ng;质控线上每厘米所需要的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为50~200ng。

[0011] 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通用单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为200~400ng。

[0012] 如上所述同步快速检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 吸水垫的制备

[0014] 将吸水纸剪裁即得吸水垫;

[0015] (2) 检测垫的制备

[0016] 检测线的包被:

[0017] 将玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白的偶联物(AFB1-BSA)用包被缓冲液分别配制成0.25~0.5mg/mL的包被液,用点喷方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别包被,得到两条检测线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;所述包被玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的包被量为100~300ng;包被黄曲霉毒素B1-牛

血清白蛋白偶联物的检测线上所需要的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 的包被量为 100 ~ 300ng, 所述两条检测线之间的间距为 2-4mm, 靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为 15 ~ 20mm ;

[0018] 质控线的包被 :

[0019] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成 0.2 ~ 0.4mg/mL 的溶液, 于距靠近质控线的检测线 5 ~ 7mm 的位置, 用点喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上, 得到质控线, 每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 50 ~ 200ng, 然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 1 ~ 2 小时 ;

[0020] (3) 样品垫的制备

[0021] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿, 取出, 于 37 ~ 40°C 条件下干燥 6 ~ 10 小时, 得样品垫, 然后置干燥器中室温保存 ;

[0022] (4) 金标垫的制备

[0023] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿, 取出, 于 37 ~ 40°C 条件下干燥 6 ~ 10 小时, 用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液的混合溶液, 其中 : 每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的用量为 100 ~ 200ng, 所需纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为 200 ~ 400ng, 然后真空冷冻干燥 2 ~ 4 小时, 置干燥器中室温保存 ; 所述的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 ;

[0024] (5) 试纸条的组装

[0025] 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, 即得同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条。

[0026] 按上述方案, 所述的包被缓冲液每 10mL 中含有 : 牛血清白蛋白 0.1 ~ 0.2g, 氯化钠 0.08g, 十二水磷酸氢二钠 0.029g, 氯化钾 0.002g, 磷酸二氢钾 0.002g。

[0027] 按上述方案, 所述步骤 (3) 使用的封闭液每 100mL 中含有 : 牛血清白蛋白 1 ~ 2g, 蔗糖 2 ~ 3g, 叠氮化钠 0.02 ~ 0.05g, 氯化钠 0.8g, 十二水磷酸氢二钠 0.29g, 氯化钾 0.02g, 磷酸二氢钾 0.02g。

[0028] 按上述方案, 所述步骤 (4) 使用的封闭液每 100mL 中含有 : 牛血清白蛋白 1 ~ 2g, 蔗糖 2 ~ 3g, 氯化钠 1 ~ 2g, 吐温 -200.05 ~ 0.1g, 聚乙烯吡咯烷酮 0.2 ~ 0.5g, 叠氮化钠 0.02 ~ 0.05g, 十二水磷酸氢二钠 0.29g, 氯化钾 0.02g, 磷酸二氢钾 0.02g。

[0029] 按上述方案, 所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液是采用不饱和和标记法制备的, 其具体方法为 : 取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液, 用 0.4mL 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值, 在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液, 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°C 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 40.0mL 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;

[0030] 所述纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01%的纳米金溶液,用 0.425mL 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入 2.5mL 0.1mg/mL 的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体水溶液,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 40.0mL 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;

[0031] 所述 0.1mol/L 碳酸钾水溶液为:13.8g 碳酸钾溶于纯水定容至 1000mL,0.22 μm 滤膜过滤所得;所述标记洗涤保存液为:2.0g 聚乙二醇-20000,0.2g 叠氮钠,0.1235g 硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22 μm 滤膜过滤所得。

[0032] 如上所述的同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的应用,方法如下:称取已磨细待测样品,加入体积浓度为 60~80%的甲醇水溶液,混匀,在 50~60℃水浴下超声提取 5~10 分钟,静置 5~10 分钟,将上层清液即提取液用水稀释,使稀释液中甲醇的终体积浓度为 20~30%,得到待测样品溶液,再取 80~150 μL 该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上进行检测,其作为检测试纸条,另取等体积的甲醇浓度一致的甲醇水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上,其作为对照试纸条,15~20 分钟后将检测试纸条和对照试纸条进行显色对照:当检测试纸条上包被玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮含量低于 1ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮含量等于或高于 1ng/mL 并低于 4ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于 4ng/mL;

[0033] 当检测试纸条上包被黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物(AFB1-BSA)的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量低于 0.25ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素含量等于或高于 0.25ng/mL 并低于 1ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中黄曲霉毒素的含量等于或高于 1ng/mL;

[0034] 当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线是否显色,该试纸条判为无效,

[0035] 最后经换算即得待测样品中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的含量。

[0036] 该免疫层析试纸条在黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染同步检测中的工作原理: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通用单克隆抗体和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体被溶解。当样品中含有黄曲霉毒素时,黄曲霉毒素将和金标垫上的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物抗原的检测线时,抗原将和黄曲霉毒素竞争结合纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中黄曲

霉毒素含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体将越少,在检测线上形成的显色带颜色越浅;当样品中含有玉米赤霉烯酮时,玉米赤霉烯酮将和金标垫上的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)抗原的检测线 I 时,抗原将和玉米赤霉烯酮竞争结合纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中玉米赤霉烯酮含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体将越少,在检测线上形成的显色带颜色越浅。当两条检测线上的抗原所结合的纳米金标记的对应的抗体少于一定的数量时,两条检测线处将不会有红色线条出现。无论样品中是否含有这两种真菌毒素,未被检测线上的抗原截获的纳米金标记的抗真菌毒素的抗体或纳米金标记的抗真菌毒素的抗体与真菌毒素的结合物将继续移动到质控线并与质控线上的兔抗鼠多克隆抗体结合并被富集显色。据此,分别将检测试纸条上包被黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物的检测线和包被玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的检测线与对照试纸条上相应检测线颜色进行显色对照,即可获得样品中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮这两种真菌毒素的混合污染情况。

[0037] 本发明的有益效果:

[0038] (1) 一步、同时检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮。本发明提供的免疫层析试纸条能在一条试纸条上实现对黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮两种真菌毒素的同步、快速检测,使用的抗体均为单克隆抗体,特异性好、灵敏度高,各真菌毒素检测之间无干扰,简单、快速。

[0039] (2) 灵敏度高。本发明提供的免疫层析试纸条对检测溶液中黄曲霉毒素的最低检测限为 0.25ng/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这两种真菌毒素的限量要求。

[0040] (3) 操作简单。样品前处理只需要将甲醇水提取液加入样品中超声提取 5~10 分钟,然后静置 5~10 分钟,取上清液稀释即可进行检测,整个样品前处理过程简单、快速。附图说明

[0041] 图 1 为本发明的同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的正视图;

[0042] 图 2 为本发明的同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的侧视图;

[0043] 图 3 为实施例 2 的结果判定图;

[0044] 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 I;8 检测线 II;9 对照试纸条;10 检测试纸条。

具体实施方式

[0045] 实施例 1:抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体和抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的获得

[0046] a. 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏编号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 1C11 分泌产生,具体根据专利申请号为 CN201010245095.5 的专利中报道的方法预先制备,制备方法为:将杂交瘤细胞株 1C11 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 $33\ \mu\text{L}$,室温混合 30min, 4°C 静置 2h,然后 4°C , $12000\text{r}/\text{min}$ 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 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 和 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,用 $2\text{mol}/\text{L}$ 的氢氧化钠溶液调节该混合液的 pH 值至 7.4, 4°C 预冷,缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为 $0.277\text{g}/\text{mL}$, 4°C 静置 2h,然后 4°C , $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积 1/10 的 $0.01\text{mol}/\text{L}$ 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°C 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通用单克隆抗体,将抗体置于 -20°C 冰箱中备用;

[0047] 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 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 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。

[0048] b. 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 产生,其具体制备方法为:

[0049] 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°C , $12000\text{r}/\text{min}$ 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 $33\ \mu\text{L}$,室温混合 30min, 4°C 静置 2h,然后 4°C , $12000\text{r}/\text{min}$ 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 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 和 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,用 $2\text{mol}/\text{L}$ 的氢氧化钠溶液调节该混合液的 pH 值至 7.4, 4°C 预冷,缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为 $0.277\text{g}/\text{mL}$, 4°C 静置 2h,然后 4°C , $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积 1/10 的 $0.01\text{mol}/\text{L}$, 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°C 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°C 冰箱中备用;

[0050] 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 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 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 $0.01\text{mol}/\text{L}$ 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。

[0051] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株 2D3 分泌的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的亚型为 IgG2b。

[0052] 用常规非竞争酶联免疫吸附分析 (ELISA) 法测得注射杂交瘤细胞株 2D3 的 BALB/c 小鼠腹水纯化获得的抗体的效价可达 1.5×10^5 ,即抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体稀释 1.5×10^5 倍时的溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争 ELISA 法鉴定其对玉米赤霉烯酮的灵敏度为 $20\text{pg}/\text{mL}$,与 β -玉米赤霉烯醇, α -玉米赤霉烯醇, β -玉米赤霉醇的交叉反应分别为 84.9%, 3.3%, 3.2%。

[0053] 其中:上述杂交瘤细胞株 2D3 是根据以下方法筛选得到的:

[0054] (1) 动物免疫

[0055] 购买 6 周龄 BALB/c 小鼠 6 只,免疫市售的玉米赤霉烯酮完全抗原 ZEA-BSA。第一次免疫将玉米赤霉烯酮完全抗原与等体积的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体积的玉米赤霉烯酮完全抗原乳化,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 100 μ g。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,免疫剂量为前面的 2 倍。玉米赤霉烯酮完全抗原 ZEA-BSA 购于德国 aokin 公司。

[0056] (2) 细胞融合

[0057] 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 5~8:1 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,然后缓慢加入 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 20mL 含 1% HAT 的细胞完全培养基重悬,将悬起的细胞加入到 80mL 半固体培养基中,混匀后加到 6 孔细胞培养板上,1.5mL/孔,置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱培养。所述的含 1% HAT 的细胞完全培养基含有 20% (体积百分数) 胎牛血清,75% (体积百分数) RPMI-1640 基础培养液,1% (重量百分数) L-谷氨酰胺,1% (体积百分数) HEPES,1% (体积百分数) 双抗 (10000 单位每毫升青霉素和 10000 微克每毫升链霉素),2% (重量百分数) 生长因子 (HFCS) 和 1% (重量百分数) 次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即 HAT;半固体培养基为含 1% (质量百分数) 甲基纤维素的细胞完全培养基;RPMI-1640 基础培养液、HEPES、双抗和 L-谷氨酰胺购于 Hyclone 公司;1% 次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即 HAT 及甲基纤维素购于 Sigma-Aldrich 公司。

[0058] (3) 细胞株的筛选及克隆

[0059] 待细胞融合后 2-3 周,细胞集落长到人肉眼可见时,用微量移液器将克隆从该培养基中吸取,移至 96 孔细胞培养板采用液体放大培养,每孔移入 1 个克隆,待细胞长至满孔底 1/2~2/3 时,吸取培养上清进行阳性检测,即进行抗体检测。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 法筛选出抗玉米赤霉烯酮而不抗载体蛋白 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,用玉米赤霉烯酮作为竞争原,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亚克隆,亚克隆后采用同样的两步法进行检测,如此重复亚克隆 2-3 次后,获得杂交瘤细胞株 2D3。

[0060] 杂交瘤细胞株 2D3 抗体可变区序列测定

[0061] (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 2D3 的总 RNA;

[0062] (2) 合成 cDNA:以步骤 1 获得的总 RNA 为模板,oligo(dT)₁₅ 为引物,按照 SuperScriptTM-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;

[0063] (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、58℃ 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 CAGCTT GGT CCC-3' (24mer)。

[0064] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长 315bp, 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 105 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 329bp, 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 109 个氨基酸组成, 序列如 SEQ IDNO:4 所示。

[0065] 实施例 2

[0066] 同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮两种真菌毒素的免疫层析试纸条的制备方法, 步骤如下:

[0067] (1) 吸水垫的制备

[0068] 将吸水纸剪裁成长 16mm, 宽 4mm 的规格, 即得吸水垫;

[0069] (2) 检测垫的制备

[0070] 检测线的包被:

[0071] 将玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物 (ZEA-BSA) 用包被缓冲液配制成 0.4mg/mL 的包被液, 于距硝酸纤维素膜上沿 15mm 的位置, 用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线 I, 每厘米检测线 I 上所需玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物 (ZEA-BSA) 的包被量为 200ng; 将黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 用包被缓冲液配制成 0.25mg/mL 的溶液, 于距检测线 I 3mm 的位置用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线 II, 每厘米检测线 II 上所需黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 的包被量为 100ng, 然后于 37℃ 条件下干燥 30 分钟;

[0072] 质控线的包被:

[0073] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成 0.25mg/mL 的包被液, 于距检测线 I 6mm 的位置, 用点喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上, 得到质控线, 每厘米质控线上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 1 小时;

[0074] 所述的包被缓冲液为:0.1g 牛血清白蛋白, 0.08g 氯化钠, 0.029g 十二水磷酸氢二钠, 0.002g 氯化钾, 0.002g 磷酸二氢钾, 加水定容到 10mL 所得。

[0075] 所述的硝酸纤维素膜长 22mm, 宽 4mm。

[0076] (3) 样品垫的制备

[0077] 将玻璃纤维膜剪裁成长 12mm, 宽 4mm 的规格, 放入封闭液 A 中浸湿, 取出, 于 37℃ 条件下干燥 8 小时, 得样品垫, 然后置干燥器中室温保存。

[0078] 所述的封闭液 A 为:2g 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;

[0079] (4) 金标垫的制备

[0080] 将玻璃纤维膜剪裁成长 10mm 宽 4mm 的规格,放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 37℃ 条件下干燥 8 小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液的混合溶液,每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的用量为 135ng,所需纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为 300ng,然后真空冷冻干燥 2 小时,置干燥器中室温保存;

[0081] 所述的封闭液 B 为:2g 牛血清白蛋白,2.5g 蔗糖,1.6775g 氯化钠,0.05g 吐温-20,0.3g 聚乙烯吡咯烷酮,0.02g 叠氮化钠,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;

[0082] 所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,用 0.4mL 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液,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 40.0mL 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通用单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.04mg/mL;

[0083] 所述纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,用 0.425mL 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入 2.5mL 0.1mg/mL 的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体水溶液,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 40.0mL 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玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.05mg/mL;

[0084] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 15nm;

[0085] 所述 0.1mol/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;所述标记洗涤保存液为:2.0g 聚乙二醇-20000,0.2g 叠氮钠,0.1235g 硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得。

[0086] (5) 试纸条的组装

[0087] 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,即得同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条,见图 1 和图 2。

[0088] 上述同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条在玉米样品检测中的应用

[0089] 称取已磨细 1#、2# 和 3# 待测玉米样品,加入体积浓度为 70%的甲醇水溶液,待测样品和甲醇水溶液的质量体积比为 4g/mL,混匀,在 50℃水浴下超声提取 10 分钟,静置 10 分钟,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%,得到样品溶液,再取 100 μL 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,其作为检测试纸条,同时取 100 μL 甲醇浓度为 23.3%的甲醇水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,其作为对照试纸条,15 分钟后读取结果。

[0090] 检测结果:1# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线 I 和检测线 II 均不显色,见图 3-1,由此判定:1# 待测样品溶液中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于 4ng/mL;黄曲霉毒素的含量等于或高于 1ng/mL;经换算可得 1# 待测样品中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于 48ng/g;黄曲霉毒素的含量等于或高于 12ng/g。

[0091] 2# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线 I 颜色比对照试纸条检测线 I 浅,检测线 II 未显色,见图 3-2,由此判定:2# 待测样品溶液中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于 1ng/mL 并低于 4ng/mL,黄曲霉毒素的含量等于或高于 1ng/mL;经换算可得 2# 待测样品中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于 12ng/g 并低于 48ng/g;黄曲霉毒素的含量等于或高于 12ng/g。

[0092] 3# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线 I 颜色与对照试纸条中的检测线 I 颜色接近,检测线 II 比对照试纸条检测线 II 浅,见图 3-3,由此判定:3# 待测样品溶液中玉米赤霉烯酮的含量低于 1ng/mL,黄曲霉毒素的含量等于或高于 0.25ng/mL 并低于 1ng/mL;经换算可得 3# 待测样品中玉米赤霉烯酮的含量低于 12ng/g;黄曲霉毒素的含量等于或高于 3ng/g,并低于 12ng/g。

[0093] 实施例 3

[0094] 同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮两种真菌毒素的免疫层析试纸条的制备方法,步骤如下:

[0095] (1) 吸水垫的制备

[0096] 将吸水纸剪裁成长 18mm,宽 3mm 的规格,即得吸水垫;

[0097] (2) 检测垫的制备

[0098] 检测线的包被:

[0099] 将玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)用包被缓冲液配制成 0.3mg/mL 的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿 20mm 的位置,用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线 I,每厘米检测线 I 上所需玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的包被量为 300ng;将黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)用包被液配制成 0.5mg/mL 的溶液,于距检测线 I 2mm 的位置用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线 II,每厘米检测线 II 上所需黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)的包被量为 300ng,然后于 40℃条件下干燥 30 分钟;

[0100] 质控线的包被:

[0101] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成 0.4mg/mL 的包被液,于距检测线 I 7mm 的位置,用点喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 50ng,然后于 40℃条件下干燥 1.5 小时;

[0102] 所述的包被缓冲液为:0.2g 牛血清白蛋白,0.08g 氯化钠,0.029g 十二水磷酸氢二钠,0.002g 氯化钾,0.002g 磷酸二氢钾,加水定容到 10mL 所得。

[0103] 所述的硝酸纤维素膜长 28mm,宽 3mm。

[0104] (3) 样品垫的制备

[0105] 将玻璃纤维膜剪裁成长 15mm,宽 3mm 的规格,放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 40℃ 条件下干燥 6 小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存。

[0106] 所述的封闭液 A 为:2g 牛血清白蛋白,3g 蔗糖,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;

[0107] (4) 金标垫的制备

[0108] 将玻璃纤维膜剪裁成长 12mm,宽 3mm 的规格,放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 40℃ 条件下干燥 6 小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液的混合溶液,每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的用量为 200ng,所需纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的用量为 400ng,然后真空冷冻干燥 3 小时,置干燥器中室温保存;

[0109] 所述的封闭液 B 为:1g 牛血清白蛋白,3g 蔗糖,1g 氯化钠,0.1g 吐温-20,0.5g 聚乙烯吡咯烷酮,0.05g 叠氮化钠,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] 所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液是的制备方法如实施例 2,不同之处在于;其所使用的纳米金溶液中纳米金的粒径为 20nm;

[0111] (5) 试纸条的组装

[0112] 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,即得同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条。

[0113] 上述同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条在玉米样品检测中的应用

[0114] 称取已磨细待测玉米样品,加入体积浓度为 60% 的甲醇水溶液,待测样品和甲醇水溶液的质量体积比为 4g/mL,混匀,在 50℃ 水浴下超声提取 10 分钟,静置 10 分钟,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 20%,得到样品溶液,再取 100 μ L 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,其作为检测试纸条,同时取 100 μ L 甲醇浓度为 20% 的甲醇水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,其作为对照试纸条,20 分钟后读取结果。

[0115] 检测结果:待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线 I 和检测线 II 均不显色,由此判定:待测样品溶液中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于 4ng/mL;待测样品溶液中黄曲霉毒素的含量等于或高于 1ng/mL;经换算可得待测样品中玉米赤霉烯酮的含量等于或高于 48ng/g;黄曲霉毒素的含量等于或高于 12ng/g。

[0001]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

序列表

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用

<160> 4

<210> 1

<211> 315

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

```

gaggtgcaac tgggggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc    60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct    120
ccagagaagg ggcctggagt ggtcgcatac attagtagtg gcagtagtac cctccactat    180
gcagacacag tgaagggccg atlcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgtc    240
ctgcaaatga aactaccctc actatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac    300
cgtctctca atctc                                     315
    
```

<210> 2

<211> 329

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 2

```

atgtgctga cacagtctcc tgettctta gctgtatc tggggcagag ggccaccatc    60
tcatacagg ccagcaaaag tctcagtaca tctggctata gttalatga ctggaaccaa    120
cagaaaccag gacagccacc cagactctc atctatctg tatccaacct agaatctggg    180
gtccctgcca ggttcagtgg cagfgggtct gggacagact tcaccctcaa catcaatcct    240
gtggaggagg aggatgctgc aacctattac tctcagcaca ttaggaggct tacacgttcg    300
gaggggggac caagctggaa atcaaacgt                                     329
    
```

<210> 3

<211> 105

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1           5           10           15
Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
                20           25           30
    
```

[0002]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

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

<210> 4

<211> 109

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

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

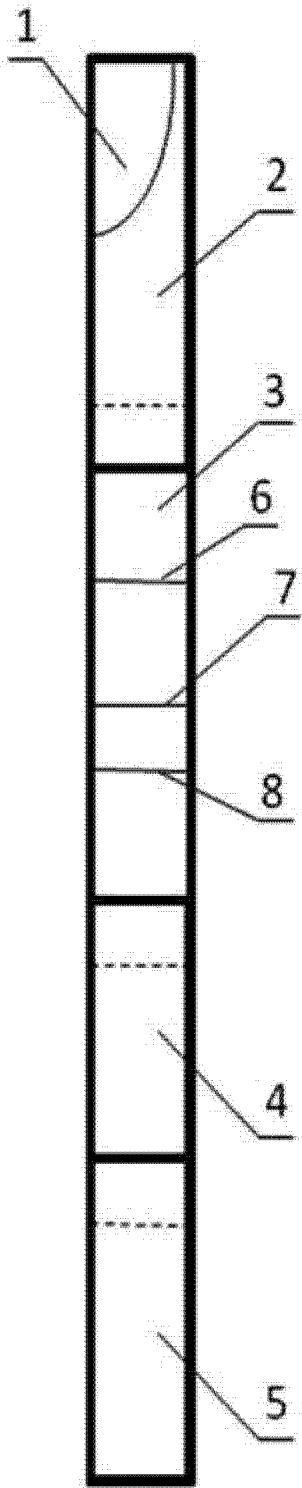


图 1

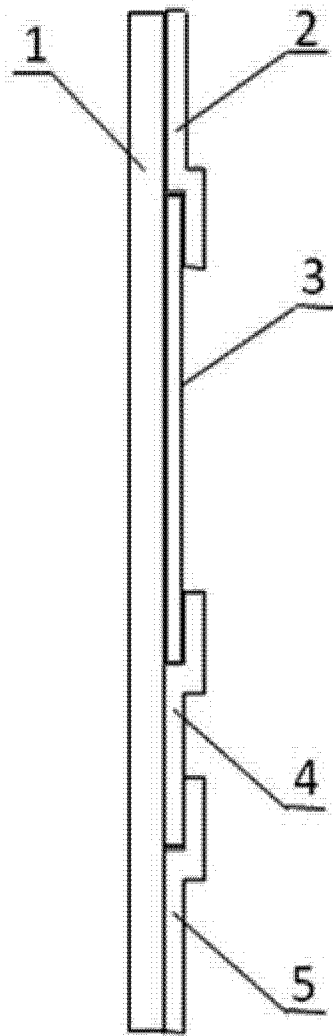


图 2

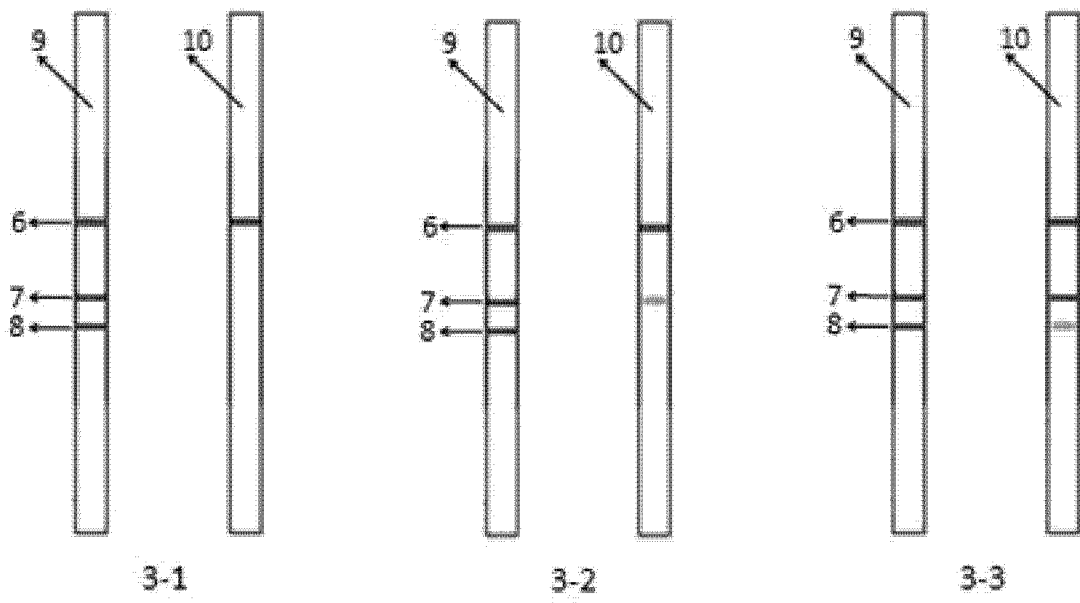


图 3

专利名称(译)	同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN103257230B	公开(公告)日	2014-01-08
申请号	CN201310115725.0	申请日	2013-04-03
[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 李鑫 张奇 丁小霞 张文 张兆威		
发明人	李培武 李鑫 张奇 丁小霞 张文 张兆威		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	乔宇		
其他公开文献	CN103257230A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及同步检测黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮混合污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用。它包括纸板，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，检测垫以硝酸纤维素膜为基垫，硝酸纤维素膜上设有横向质控线和检测线，检测线位于质控线的下方，个数为两条，呈间隔分布，其上分别包被有玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物，质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体；金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体和纳米金标记的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体。其可用于样品中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮两种真菌毒素含量的同步检测，具有操作简单、快速、灵敏度高的特点。

