



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103278630 A

(43) 申请公布日 2013.09.04

(21) 申请号 201310115186.0

G01N 33/531 (2006.01)

(22) 申请日 2013.04.03

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :C201329 2013.03.07

(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 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)

权利要求书3页 说明书11页

序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 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,其上分别包被有赭曲霉毒素 A-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赭曲霉毒素 A 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和赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A-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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体;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,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。

2. 根据权利要求 1 所述的同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫包被赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的赭曲霉毒素 A-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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的用量为 100 ~ 200ng。

6. 同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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:

(1) 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:

将赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白的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;所述包被赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白的偶联物的检测线上每厘米所需要的赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白的偶联物的包被量为 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 的包被液,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;

(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°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;

(4) 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°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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的用量为 100 ~ 200ng,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,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;

(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,即得同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条。

7. 根据权利要求 6 所述的同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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 所述的同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 (3) 和步骤 (4) 中使用的封闭液每 100mL 中含有:卵清白蛋白 1 ~ 2g,蔗糖 2 ~ 5g,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。

9. 根据权利要求 6 所述的同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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% 的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°C 冰箱备用;

所述纳米金标记的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体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 1.5mL 0.1mg/mL 的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体水溶液，继续搅拌 30min；加入质量浓度为 10% 的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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A-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赭曲霉毒素 A 含量低于 0.5mg/mL；比对应检测线的颜色浅时，表明待测样品溶液中赭曲霉毒素 A 含量等于或高于 0.5mg/mL 并低于 2mg/mL；不显色时，表明待测样品溶液中赭曲霉毒素 A 的含量等于或高于 2mg/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赭曲霉毒素 A 的含量。

同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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,具体涉及一种同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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] 真菌毒素 (mycotoxins) 是真菌在生长过程中产生的有毒次生代谢产物,真菌毒素通常是低分子物质,而且绝大多数真菌毒素都属热稳定物质。从霉菌毒素被发现以来,已经确认的真菌毒素大约有 300 多种之多,其中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素是毒性最大的两类毒素。黄曲霉毒素被国际癌症研究机构列为一类致癌物,赭曲霉毒素中的赭曲霉毒素 A 被列为二类致癌物。二者不仅毒性强,而且污染范围极广,黄曲霉毒素对粮食和饲料的危害有不少报道,赭曲霉毒素 A 也已被许多国家检出大量污染粮食作物,另外有资料表明二者也易同时污染同一粮食作物而对粮食和饲料产生混合污染。黄曲霉毒素能强烈破坏人和动物的肝脏组织,赭曲霉毒素主要引起肾脏损伤,且存在毒性的加性效应。鉴于真菌毒素的危害作用及其在粮食和饲料中的广泛发生,世界各国对其含量进行了严格限定。随着生活水平的不断提高,人们对食品质量安全的要求越来越高。为了提高我国食品质量安全水平,更大程度的满足人们的安全消费需求,应加强对粮食中真菌毒素的监测,开发准确、高效的检测技术,尤其是快速检测技术,缩短分析时间,提高我国食品安全性。

[0003] 现有的对黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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(以酶联免疫分析法和免疫层析试纸条为主)。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。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。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试纸条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,且同一农产品真菌毒素混合污染的可能性大,因此迫切需要能快速、同步检测真菌毒素混合污染的检测技术,以实现粮食及饲料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能同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 含量的同步检测,具有操作简单、快速、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:

同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体;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,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;该杂交瘤细胞株 1H2 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. C201329。

[0006] 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。

[0007] 按上述方案,所述的吸水垫为吸水纸。

[0008] 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。

[0009] 按上述方案,所述检测垫包被赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-BSA)的检测线上每厘米所需要的赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-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。

[0010] 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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的用量为 100~200ng。

[0011] 如上所述的同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的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:

将赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白的偶联物(OTA-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°C 条件下干燥 30~60 分钟;所述包被赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白的偶联物(OTA-BSA)的检测线上每厘米所

需要的赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白的偶联物 (OTA-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 ;

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 的包被液,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 ;

(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°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 ;

(4) 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°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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的用量为 100 ~ 200ng,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,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 ;

(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,即得同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条。

[0012] 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。

[0013] 按上述方案,所述步骤 (3) 和步骤 (4) 中使用的封闭液每 100mL 中含有 :卵清白蛋白 1 ~ 2g,蔗糖 2 ~ 5g,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。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 0.4mL0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入 2mL0.1mg/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% 的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°C 冰箱备用 ;

所述纳米金标记的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体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 0.4mL0.1mol/L 碳酸钾水溶液调

节 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入 1.5mL 0.1mg/mL 的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入质量浓度为 10% 的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。

[0014] 如上所述的同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白的偶联物(OTA-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赭曲霉毒素 A 含量低于 0.5mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中赭曲霉毒素 A 含量等于或高于 0.5mL 并低于 2g/mL;不显色时,表明待测样品溶液中赭曲霉毒素 A 的含量等于或高于 2/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(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;

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赭曲霉毒素 A 的含量。

[0015] 本发明提供的免疫层析试纸条在同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染应用中的工作原理: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赭曲霉毒素 A 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;当样品中含有赭曲霉毒素 A 时,赭曲霉毒素 A 将和金标垫上的纳米金标记的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体结合并一同向

上泳动,其到达固定着赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物 (OTA-BSA) 抗原的检测线 I 时,抗原将和赭曲霉毒素 A 竞争结合纳米金标记的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中赭曲霉毒素 A 含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物 (OTA-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赭曲霉毒素 A 这两种真菌毒素的混合污染情况。

[0016] 本发明的有益效果:

(1) 一步、同时检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染。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赭曲霉毒素 A 这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,各真菌毒素的检测之间无干扰,简单、快速。

[0017] (3) 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,对赭曲霉毒素 A 的最低检测限为 0.5ng/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。

[0018] (2) 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

[0019] 图 1 为本发明的同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条的正视图;

图 2 为本发明的同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条的侧视图;

图 3 为实施例 2 的结果判定图;

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 I;8 检测线 II;9 对照试纸条;10 检测试纸条。

具体实施方式

[0020] 实施例 1:抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体和抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的获得

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得,制备方法为:将保藏编号为 CCTCC NO. C201018 的杂交瘤细胞株 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 μ L, 室温混合 30min, 4 $^{\circ}$ C 静置 2h, 然后 4 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C 预冷, 缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为 0.277g/mL, 4 $^{\circ}$ C 静置 2h, 然后 4 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ 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单克隆抗体, 将抗体置于 -20 $^{\circ}$ 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。

[0021] b. 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 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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C 静置 2h, 然后 4 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C 预冷, 缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为 0.277g/mL, 4 $^{\circ}$ C 静置 2h, 然后 4 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻, 之后用冷冻干燥机冻干, 收集冻干粉, 即得纯化好的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体, 将抗体置于 -20 $^{\circ}$ 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 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。

[0022] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株 1H2 分泌的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的亚型为 IgG1。

[0023] 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 1H2 的 BALB/c 小鼠腹水抗体效价可达 7.2×10^5 , 即小鼠腹水抗体稀释 7.2×10^5 倍时的溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争 ELISA 法鉴定其对赭曲霉毒素 A 的灵敏度为 52pg/mL, 与赭曲霉毒素 B, 黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2, 呕吐毒素, 玉米赤霉烯酮, 伏马毒素的交叉反应率均小于 0.1%。

[0024] 杂交瘤细胞株 1H2 的筛选:

(1) 动物免疫

购买 6 周龄 BALB/c 小鼠 6 只, 免疫市售的赭曲霉毒素 A 完全抗原 OTA-BSA。第一次免疫将赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 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 70 μ g。前 3 次每次免疫后 8 ~ 10 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。

[0025] 赭曲霉毒素 A 完全抗原 OTA-BSA 购于 Sigma-Aldrich 公司。

[0026] (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。

[0027] 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 和甲基纤维素购于 Sigma-Aldrich 公司。

[0028] (3) 细胞株的筛选及克隆

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 法筛选出抗赭曲霉毒素 A 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,用赭曲霉毒素 A 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 1H2。

[0029] 杂交瘤细胞株 1H2 抗体可变区序列测定

(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 1H2 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[™]-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 ;

(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 $^{\circ}$ C 30s、58 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min,扩增 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 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 GGTGCC-3' (24mer) 和 5' -CCG TTT CAG CTC CAGCTT GGT CCC-3' (24mer)。

[0030] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长 353bp,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 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。

[0031] 实施例 2

同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,步骤如下:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁成长 16mm,宽 4mm 的规格,即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

将赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物 (OTA-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 上所需赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物 (OTA-BSA) 的包被量为 150ng;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 I2mm 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°C 条件下干燥 30 分钟;

所述的硝酸纤维素膜长 22mm,宽 4mm;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成 0.25mg/mL 的包被液,于距检测线 I6mm 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 80ng,然后于 37°C 条件下干燥 1 小时;

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;

(3) 样品垫的制备

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°C 条件下干燥 8 小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

所述的封闭液为:将 1g 卵清白蛋白,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 10mm 宽 4mm 的规格,放入步骤 (3) 所述的封闭液中浸湿,取出,于 37°C 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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的混合溶液,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 125ng,所需纳米金标记的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的用量为 150ng,然后真空冷冻干燥 2 小时,置干燥器中室温保存;

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 0.4mL0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入 2mL0.1mg/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;

所述纳米金标记的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体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 0.4mL0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入 1.5mL0.1mg/mL 的抗赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.03mg/mL;

所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 15nm;

所述的 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;所述的标记洗涤保存液为: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;

(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,即得同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条,见图 1 和图 2。

[0032] 上述同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条在花生样品检测中的应用:

称取已磨细的 1#、2# 和 3# 待测花生样品,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%,得到待测样品溶液,再取 100 μ L 待测样品溶液做为检测液逐滴加入一同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 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 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赭曲霉毒素 A 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。

[0033] 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 颜色比对照试纸条检测线

I 浅,检测线 II 未显色,见图 3-1,由此判定:1# 待测样品溶液中赭曲霉毒素 A 的含量等于或高于 0.5ng/mL 并低于 2ng/mL,黄曲霉毒素的含量等于或高于 1ng/mL;经换算可得 2# 待测样品中赭曲霉毒素 A 的含量等于或高于 6ng/g 并低于 24ng/g;黄曲霉毒素的含量等于或高于 12ng/g。

[0034] 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 3-2,由此判定:2# 待测样品溶液中赭曲霉毒素 A 的含量低于 0.5ng/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 2# 待测样品中赭曲霉毒素 A 的含量低于 6ng/g;黄曲霉毒素的含量等于或高于 3ng/g,并低于 12ng/g。

[0035] 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 和检测线 II 均不显色,见图 3-3,由此判定:3# 待测样品溶液中赭曲霉毒素 A 的含量等于或高于 2ng/mL;黄曲霉毒素的含量等于或高于 1ng/mL;经换算可得 3# 待测样品中赭曲霉毒素 A 的含量等于或高于 24ng/g;黄曲霉毒素的含量等于或高于 12ng/g。

[0036] 实施例 3:

同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,步骤如下:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁成长 18mm,宽 3mm 的规格,即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

将赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物 (OTA-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 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 上所需赭曲霉毒素 A-牛血清白蛋白偶联物 (OTA-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 4mm 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;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成 0.5mg/mL 的包被液,于距检测线 15mm 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 200ng,然后于 40℃ 条件下干燥 1 小时;

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;

所述的硝酸纤维素膜长 28mm,宽 3mm;

(3) 样品垫的制备

将玻璃纤维膜剪裁成长 15mm,宽 3mm 的规格,放入封闭液中浸湿,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。

[0037] 所述的封闭液为:将 2g 卵清白蛋白,4g 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;

(4) 金标垫的制备

将玻璃纤维膜剪裁成长 12mm, 宽 3mm 的规格, 放入步骤 (3) 中的封闭液中浸湿, 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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的混合溶液, 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赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的用量为 100ng, 然后真空冷冻干燥 2 小时, 置干燥器中室温保存;

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赭曲霉毒素 A 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;

(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, 即得同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条。

[0038] 上述同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条在花生样品检测中的应用

称取已磨细的待测花生样品, 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%, 得到待测样品溶液, 再取 100 μ L 待测样品溶液做为检测液逐滴加入一同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条的的样品垫, 其作为检测试纸条, 同时取 100 μ L 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赭曲霉毒素 A 混合污染的免疫层析试纸条的的样品垫, 其作为对照试纸条, 20 分钟后读取结果。

[0039] 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: 待测样品溶液中赭曲霉毒素 A 的含量等于或高于 2ng/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赭曲霉毒素 A 的含量等于或高于 24ng/g; 黄曲霉毒素的含量等于或高于 12ng/g。

[0001]

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赭曲霉毒素 A 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> 353
- <212> DNA
- <213> 小鼠
- <400> 1
- caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
- acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120
- cagccttcag gaaagggctc ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180
- tatgacccat cctgaagaa ccggetcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggta 240
- ttcctcagc tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcgcgtt 300
- tctaaccggt tcttctctgt ctggggcgct gggacctcag tcaccgtctc ctc 353
- <210> 2
- <211> 329
- <212> DNA
- <213> 小鼠
- <400> 2
- attgtgctga cacagtctcc tgettctta gctgtatctc tggggcagag ggccaccatc 60
- tcatacaggg ccagcaaaag tgtcagtaca tctggctata gttatatgca ctggaaccaa 120
- cagaaccag gacagccacc cagactctc atctatcttg tatccaacct agaactctggg 180
- gtcctgcca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcacctcaa catccatct 240
- gtggaggagg aggatgctgc aacctattac tgtcagcaca ttagggagct tacacgttcg 300

[0002]

gaggggggac caagctggaa atcaaactg

329

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser

1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys

35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg

50 55 60

Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr

65 70 75

Ser Arg Asn Gln Val Phe Leu Thr Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala

80 85 90

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ser Asn Arg Phe Phe

95 100 105

Ala Val Trp Gly Ala Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

110 115

<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

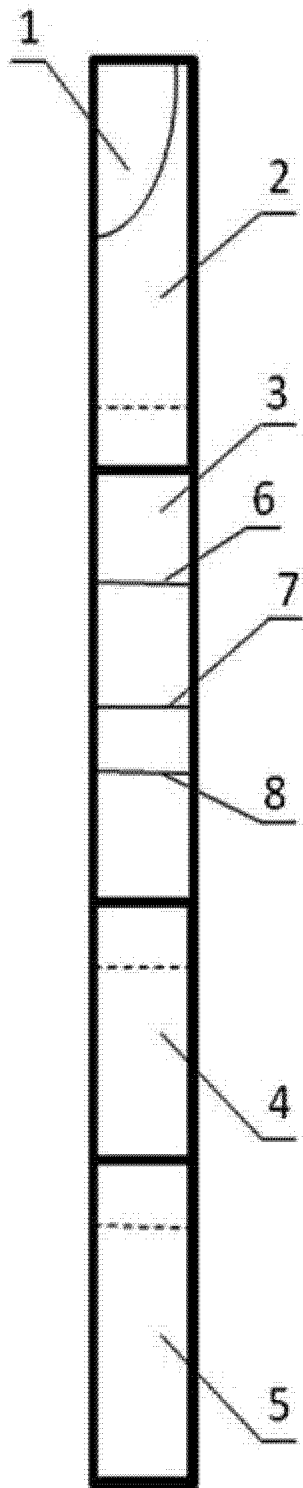
Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

65 70 75

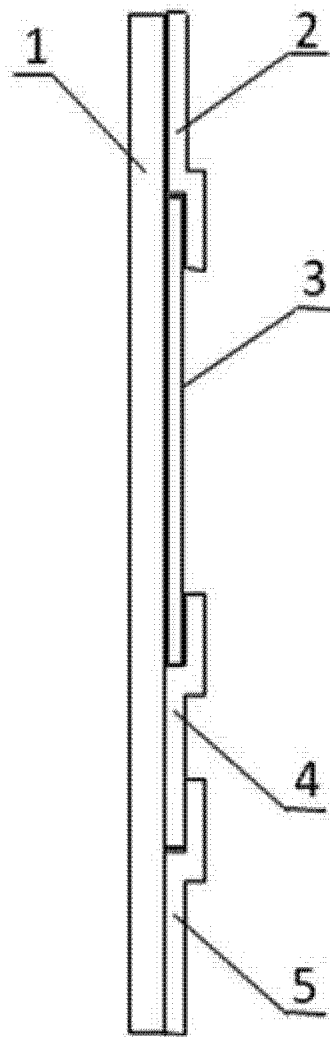
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

[0003]

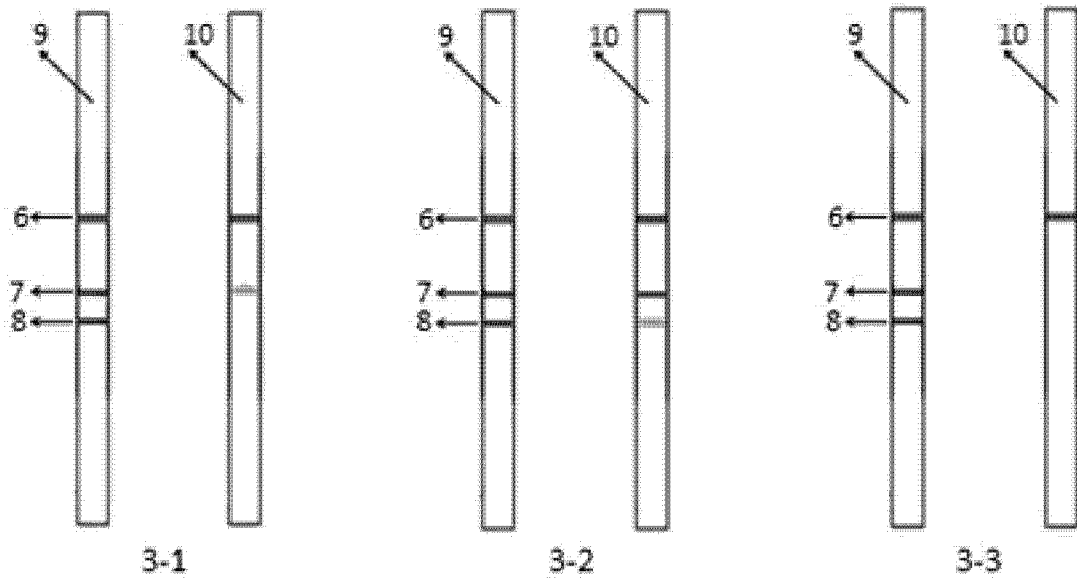
	80		85		90									
Cys	Gln	His	Ile	Arg	Glu	Leu	Thr	Arg	Ser	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
			95						100					105
Trp	Lys	Ser	Asn											



【图号】图 1



【图号】图 2



【图号】图 3

专利名称(译)	同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A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	CN103278630A	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	CN201310115186.0	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 G01N33/531		
代理人(译)	乔宇		
其他公开文献	CN103278630B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及同步检测黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A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，其上分别包被有赭曲霉毒素A-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赭曲霉毒素A含量的同步检测，具有操作简单、快速、灵敏度高的特点。

