



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105467115 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201510789180. 0

(22) 申请日 2015. 11. 17

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府
大道 999 号

(72) 发明人 赖卫华 吴成辉 刘道峰

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

牛奶中检测黄曲霉毒素 M1 的免疫层析胶体
金试纸条

(57) 摘要

本发明属于食品安全监测领域,公开了一种
检测黄曲霉毒素 M1 免疫层析胶体金试纸条,包括
样品垫、硝酸纤维素膜 (NC)、吸水垫和 PVC 背衬;
硝酸纤维素膜黏附在 PVC 背衬上,样品垫和吸水
垫分别黏附在硝酸纤维素膜上的两端。本发明为
采用一步法间接竞争免疫层析技术快速检测牛奶
中黄曲霉毒素 M1 残留是否符合欧盟限量标准 (小
于 0. 05ng/mL) 和中国 (美国等其他国家) 限量标
准 (小于 0. 5n/mL) 的胶体金试纸条,灵敏度可达
0. 05ng/mL。

1. 检测黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条,包括样品垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水垫和PVC背衬;硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,样品垫和吸水垫分别黏附在硝酸纤维素膜上的两端;

硝酸纤维素膜上依次分布样品垫、检测线T1、检测线T2、质控线、吸水垫;

检测线T1上固定的是1号抗原,浓度为0.15mg/mL;所述1号抗原为:黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比25:1偶联物;

检测线T2上固定的是2号抗原,浓度为0.8mg/mL;所述2号抗原为:黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比40:1偶联物;

质控线上喷涂的是羊(兔)抗鼠IgG,浓度为2.5mg/mL。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:检测线T1和检测线T2的间距是6.5mm,检测线T2和质控线之间的间距分别是3.5mm。

3. 权利要求1所述的试纸条制成的试纸盒,其特征在于包括检测黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条、及ELISA孔;所述ELISA孔内包被有黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物;检测时将牛奶样本加入ELISA孔内孵育2分钟后加至试纸条的样本垫上,15分钟后读取实验结果。

4. 根据权利要求3所述的试纸盒,其特征在于所述黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物的制备方法如下:用还原剂将氯金酸还原成20~40nm的胶体金颗粒;然后把胶体金与抗黄曲霉毒素M1单克隆抗体按体积质量比1:0.005~0.015混匀,使其结合形成稳定的胶体金颗粒,经纯化和浓缩产生黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物;所述还原剂优选为柠檬酸三钠。

5. 权利要求3所述的试纸盒,其制备方法包括如下步骤:

(1)检测黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条:

包括样品垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水垫和PVC背衬;硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,样品垫和吸水垫分别黏附在硝酸纤维素膜上的两端;

硝酸纤维素膜上依次分布样品垫、检测线T1、检测线T2、质控线、吸水垫;

检测线T1上固定的是1号抗原,浓度为0.15mg/mL;所述1号抗原为:黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比25:1偶联物;

检测线T2上固定的是2号抗原,浓度为0.8mg/mL;所述2号抗原为:黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比40:1偶联物;

质控线上喷涂的是羊(兔)抗鼠IgG,浓度为2.5mg/mL;

检测线T1和检测线T2的间距是6.5mm,检测线T2和质控线之间的间距分别是3.5mm;

将粘好的PVC材料切成一定宽度的试剂条;

(2)ELISA孔内包被有黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物;所述黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物的制备方法如下:用还原剂将氯金酸还原成20~40nm的胶体金颗粒;然后把胶体金与抗黄曲霉毒素M1单克隆抗体按体积质量比1:0.005~0.015混匀,使其结合形成稳定的胶体金颗粒,经纯化和浓缩产生黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物;所述还原剂优选为柠檬酸三钠;

(3)将试纸条、ELISA孔最后组装到一定大小的塑料盒中即可。

牛奶中检测黄曲霉毒素M1的免疫层析胶体金试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域中涉及免疫胶体金和真菌毒素残留检测领域。具体而言,本发明涉及一种适用于检测牛奶中黄曲霉毒素M1残留的免疫胶体金试纸条。

技术背景

[0002] 黄曲霉毒素M1(Aflatoxin M1)分子式为 $C_{17}H_{12}O_7$,属于黄曲霉毒素一类结构相似的化合物中的一种,该类毒素是由常见的黄曲霉菌(*Asperillus Flavus*)和寄生曲霉菌(*Asperillus Parasiticus*)产生的代谢产物,在湿热地区食品和饲料中出现黄曲霉毒素的机率最高。物理化学性质相当稳定,不被巴氏消毒法破坏。哺乳类动物摄入被黄曲霉毒素B1污染的饲料或食品后,通过羟基化作用转化成黄曲霉毒素M1。黄曲霉毒素M1危害主要表现在致癌性和致突变性,对人及动物肝脏组织有破坏作用,可导致肝癌甚至死亡。鉴于此,很多国家已经对牛奶和乳制品中的黄曲霉毒素M1含量有了明确的限量标准。

[0003] 牛奶是最古老的天然饮料之一,被誉为“白色血液”,对人体的重要性可想而知。根据《2013-2017年中国原奶行业投资策略分析》统计当前,我国虽已成为全球第三大原奶生产国。随着人民生活水平的提高,乳制品消费市场会不断扩大并趋于成熟,对牛奶的质量与安全有了更新的要求。然而,我国奶业发展面临着一系列新的挑战,其中食品安全问题在一定程度上严重制约了我国奶业的现代化发展,而黄曲霉毒素M1残留是目前最突出的问题之一。我国将牛奶中黄曲霉毒素M1的最低检测标准设定在 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$,欧盟将牛奶中黄曲霉毒素M1的最低检测标准设定在 $0.05\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 目前国际上对黄曲霉毒素的检测技术路线主要有两条:一条是以色(质)谱技术为核心的化学检测技术,另一条是快速生物检测技术。高效液相色谱法成本高,操作时间长,步骤多且复杂,因此无法实现真正意义上的现场检测。而胶体金试纸条检测法灵敏度高、特异性强、稳定性好、操作简便、现场快检测等优点,容易被基层掌握并大面积推广,适合于大批量样品的现场快速检测,不需要特定的仪器设备,也不需要特定的其他检测试剂,减少了检测单位的负担,能快速检测获得初步的检测结果,适合我国当前社会经济技术水平,因此是未来黄曲霉毒素检测的主要发展方向。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种采用一步法间接竞争免疫层析技术快速检测牛奶中黄曲霉毒素M1残留是否符合欧盟限量标准(小于 $0.05\text{ng}/\text{mL}$)和中国(美国等其他国家)限量标准(小于 $0.5\text{ng}/\text{mL}$)的胶体金试纸条。同时,本发明所得到的灵敏度 $0.05\text{ng}/\text{mL}$ 是胶体金试纸条能达到的最下限。

[0006] 本发明技术方案如下:

[0007] 检测黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条,包括样品垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水垫和PVC背衬;硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,样品垫和吸水垫分别黏附在硝酸纤维素膜上的两端;

- [0008] 硝酸纤维素膜上依次分布样品垫、检测线T1、检测线T2、质控线、吸水垫；
- [0009] 检测线T1上固定的是1号抗原，浓度为0.15mg/mL；所述1号抗原为：黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比25:1偶联物；
- [0010] 检测线T2上固定的是2号抗原，浓度为0.8mg/mL；所述2号抗原为：黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比40:1偶联物；
- [0011] 质控线上喷涂的是羊(兔)抗鼠IgG，浓度为2.5mg/mL；
- [0012] 检测线T1和检测线T2的间距是6.5mm，检测线T2和质控线之间的间距分别是3.5mm；
- [0013] 前述的试纸条制成的试纸盒，包括检测黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条、及ELISA孔；所述ELISA孔内包被有黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物；检测时将牛奶样本加入ELISA孔内孵育2分钟后加至试纸条的样本垫上，15分钟后读取实验结果。
- [0014] 所述黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物的制备方法如下：用还原剂将氯金酸还原成20~40nm的胶体金颗粒；然后把胶体金与抗黄曲霉毒素M1单克隆抗体按体积质量比1:0.005~0.015混匀，使其结合形成稳定的胶体金颗粒，经纯化和浓缩产生黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物；所述还原剂优选为柠檬酸三钠。
- [0015] 所述的试纸盒，其制备方法包括如下步骤：
- [0016] (1)检测黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条：
- [0017] 包括样品垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水垫和PVC背衬；硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上，样品垫和吸水垫分别黏附在硝酸纤维素膜上的两端；
- [0018] 硝酸纤维素膜上依次分布样品垫、检测线T1、检测线T2、质控线、吸水垫；
- [0019] 检测线T1上固定的是1号抗原，浓度为0.15mg/mL；所述1号抗原为：黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比25:1偶联物；
- [0020] 检测线T2上固定的是2号抗原，浓度为0.8mg/mL；所述2号抗原为：黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比40:1偶联物；
- [0021] 质控线上喷涂的是羊(兔)抗鼠IgG，浓度为2.5mg/mL；
- [0022] 检测线T1和检测线T2的间距是6.5mm，检测线T2和质控线之间的间距分别是3.5mm；
- [0023] 将粘好的PVC材料切成一定宽度的试剂条；
- [0024] (2)ELISA孔内包被有黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物；所述黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物的制备方法如下：用还原剂将氯金酸还原成20~40nm的胶体金颗粒；然后把胶体金与抗黄曲霉毒素M1单克隆抗体按体积质量比1:0.005~0.015混匀，使其结合形成稳定的胶体金颗粒，经纯化和浓缩产生黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物；所述还原剂优选为柠檬酸三钠
- [0025] (3)将试纸条、ELISA孔最后组装到一定大小的塑料盒中即可。
- [0026] 为了达到更好的技术效果：
- [0027] 1号抗原制备：采用EDC活性酯法制备AFB₁O-BSA免疫抗原。方法如下：称取1 mg EDC溶于0.5mL DMF水中(体积比6:9)标记为1号液，0.8mg NHS溶于0.2mL DMF中，标记为2号液。先把1号液加到有0.6mg AFB₁O的EP管中，溶解混匀，再加入2号液23℃避光摇晃(100r/min)，4h后补加1mg EDC继续摇晃至24h，使大部分AFB₁O生成N-羟琥珀酰亚胺酯，标记为3号

液。取 2.56×10^{-7} mol BSA用0.13 mol/L NaHCO_3 ，溶解制成0.5%的BSA溶液，标记为4号液。把3号液滴加到4号液中，继续23℃反应24小时。然后收集反应液到处理好的透析袋内，0.1 mol/L的PBS中置于4℃透析4天，第1天换透析液3次，以后每天2次。得到AFB₁-BSA完全抗原(1号抗原)。

[0028] 2号抗原的制备：方法与AFB₁的1号抗原的制备方法一致，区别不同之处在于黄曲霉毒素B₁与BSA的摩尔投料比改为40:1。得2号抗原。

[0029] 由于黄曲霉毒素B₁与黄曲霉毒素M₁单抗的结合能力相对较弱，增强了抗原抗体之间的竞争能力，从而达到T₁、T₂检测线有规律的阻断。

[0030] 有益效果：

[0031] 本发明的检测牛奶中黄曲霉毒素M₁免疫胶体金试纸条，采用竞争免疫法，以胶体金标记黄曲霉毒素M₁特异单克隆抗体，能够一步检测，同时符合牛奶中黄曲霉毒素M₁的两套标准(欧盟和中国)，结果准确，无需试剂洗涤和标准对照，能分批或单个样品及时检测。同时，本专利检测线低，可以达到最低检测限0.05 ng/mL。

[0032] 本发明的检测牛奶中黄曲霉毒素M₁免疫层析胶体金试纸条，使用原材料进行生产，产品生产流程简单，成本低，检测费用仅为气相/液相色谱的1/5左右，为酶标试剂盒的1/3。为使用者节省时间，降低因操作步骤冗繁造成的误差，试剂保存时间长、现场操作方便等优点，可在牛奶中黄曲霉毒素M₁快速检测及筛查中发挥重要作用。

附图说明

[0033] 图1黄曲霉毒素M₁免疫层析胶体金试纸条检测原理图

[0034] 注：A、B、C牛奶中黄曲霉毒素M₁的浓度分别为： $0 \leq C_1 < 0.05$ ng/mL(欧盟标准)、 $0.05 \leq C_2 < 0.5$ ng/mL(中国标准)、 $C_3 \geq 0.5$ ng/mL(黄曲霉毒素M₁残留不符合中国及欧盟的限量标准)；A、B、C对应的实验结果分别是：T₁、T₂、C显色；T₁、C显色，T₂阻断；T₁、T₂阻断，C显色。

[0035] 图2黄曲霉毒素M₁免疫层析胶体金试纸条结构图

[0036] 图3本发明试纸条对实际加标牛奶样本进行检测

具体实施方式

[0037] 提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明，而决不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

[0038] 实施例1全抗原、单克隆抗体的制备及效价检测

[0039] 1.1 AFB₁的1号全抗原的制备

[0040] 1.1.1黄曲霉毒素B₁肟化物的制备 2mg AFB₁(6.4×10^{-6} mol)和4mg羧甲基羟胺半盐酸盐(AOA HCl)溶于4mL吡啶甲醇双蒸水混合液中(体积比4:1:1)。86℃回流反应5-6h。每隔1h用薄层层析法((TLC)监测反应进程。室温放置过夜。真空干燥或者将所得残渣加入0.5mL三蒸水溶解，用0.1 mol/L的HCl调pH 3.0沉淀AFB₁O，然后把沉淀物和溶液部分分别用乙酸乙酯抽提2-3次后，收集上层的乙酸乙酯部分，温和的氮气流吹干。既得到黄色奶油状的肟。

[0041] 1.1.2竞争免疫抗原的制备 采用EDC活性酯法制备AFB₁O-BSA免疫抗原。方法如下：称取I mg EDC溶于0.5mL DMF水中(体积比6:9)标记为1号液，0.8mg NHS溶于0.2mL DMF

中,标记为2号液。先把1号液加到有0.6mg AFB₁O的EP管中,溶解混匀,再加入2号液23℃避光摇晃(100r/min),4h后补加1mg EDC继续摇晃至24h,使大部分AFB₁O生成N-羧琥珀酰亚胺酯,标记为3号液。取 2.56×10^{-7} mol BSA用0.13mol/L NaHCO₃,溶解制成0.5%的BSA溶液,标记为4号液。把3号液滴加到4号液中,继续23℃反应24小时。然后收集反应液到处理好的透析袋内,0.1mol/L的PBS中置于4℃透析4天,第1天换透析液3次,以后每天2次。得到AFB₁-BSA完全抗原(1号抗原)。

[0042] 1.2 AFB₁的2号全抗原的制备 方法与AFB₁的1号全抗原的制备方法一致,区别不同之处在于黄曲霉毒素B₁与BSA的摩尔投料比改为40:1。得2号抗原。

[0043] 1.3 AFM₁的全抗原的制备 方法与AFB₁的1号抗原的制备方法一致,只是将黄曲霉毒素B₁换成黄曲霉毒素M₁进行偶联。

[0044] 1.4抗黄曲霉毒素M₁的单克隆抗体的制备

[0045] 以半抗原-BSA为免疫原,免疫4只BALB/C小鼠,每只小鼠取100μg免疫原,与等体积弗氏完全佐剂混合乳化均匀,沿腹股沟注入腹腔膜内。4个周后,加强免疫,剂量不变,佐剂改为弗氏不完全佐剂。加强免疫三次后,采血测效价,待血清效价不再上升,用两倍剂量的抗原不加佐剂免疫小鼠,三天后在无菌条件下取脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞按5-10:1的比例混合于50mL离心管,加入30mL无血清IPMI1640培养基,1200r/min离心10min弃上清,将细胞团轻轻振松,置于37℃水浴中。把1mL 50%PEG-4000缓缓加入细胞中,在1min内滴完,同时轻轻搅动底部沉淀,静置1min。沿管壁缓慢加入无血清培养基终止融合过程。前30秒缓慢匀速加入1mL后30秒加入2mL,然后快速加入27mL无血清培养基,1200r/min离心10min,弃上清。融合后的细胞先在HAT选择性培养液中筛选,5天后换成HT培养液,待孔内的杂交细胞数量达到300个以上时,用ELISA对细胞培养上清液进行复孔检测,次日重复检测已确定结果。将强阳性孔内的细胞用有限稀释法进行克隆培养,并跟踪记录,经3次以上的克隆培养和检测,均呈阳性的孔内细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞经过扩大培养,选4只经产BALB/C小鼠,腹腔注射液体石蜡油0.5mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 - 10^6 /只,10天后,待小鼠腹部明显膨大时收集腹水。用正辛酸-硫酸铵沉淀法来纯化腹水,经核酸蛋白紫外扫描仪蛋白分析初步判断得到的蛋白为IgG蛋白。

[0046] 1.5检测抗体效价

[0047] 以1μg/mL浓度按每孔100μL包被酶标板,4℃包被过夜,洗涤5次,拍干,按每孔200μL封闭液4℃下封闭12h,洗涤3次,拍干。按每孔100μL加入抗血清稀释倍数为2000、10000、250000、50000、250000、1250000,阴性血清及空白(不加抗血清,只加其稀释液)室温作用30min,洗涤五次,拍干。加入每孔100μL酶标羊抗兔(鼠)抗体,室温作用30min,洗涤五次,拍干。加入每孔100μL显色液,37℃避光作用15min。加入每孔50μL终止液终止反应,酶标仪检测A值(450nm)。以两倍于阴性血清OD值的血清OD值对应的抗血清稀释度为抗血清效价。检测结果见表1:

[0048] 单克隆抗体效价检测结果

[0049]

稀释倍数	2000	10000	15000	30000	50000	250000	阴性血清	空白
OD ₁ 值	0.988	0.692	0.415	0.324	0.317	0.362	0.172	0.024
OD ₂ 值	0.975	0.673	0.442	0.398	0.365	0.354	0.207	0.020

OD ₃ 值	1.136	0.943	0.754	0.503	0.387	0.351	0.193	0.032
OD ₄ 值	0.982	0.669	0.411	0.376	0.344	0.351	0.223	0.030

[0050] 从表1的数据可以推断本发明制备的单克隆抗体的效价达15000。

[0051] 实施例2本发明中羊(兔)抗鼠IgG的制备

[0052] 选取健康雄性新西兰大白兔或山羊,以OVA-半抗原为免疫原与等量弗氏完全佐剂通过注射器对抽法混合成油包水的乳浊液,按1mg/kg体重的量进行首次免疫,采取背部皮下多点注射。每隔两周加强免疫一次,用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,剂量及方法同首次免疫。从第三次免疫开始,每次免疫后10天,耳缘静脉取血1mL,进行抗体效价检测,当抗体效价不再升高时,不加佐剂进行最后一次(第7次)免疫,大腿肌肉注射,7天后颈动脉放血,室温凝固2h后4℃过夜,8000r/min离心10分钟,除去血块,血清部分用50%饱和硫酸铵溶液沉淀,离心去上清液,沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,再用33%饱和硫酸铵溶液沉淀两次,沉淀物用尽可能少的磷酸缓冲液溶解,经透析得羊(兔)抗鼠IgG。

[0053] 实施例3本发明中胶体金试纸条的制备

[0054] 3.1胶体金的制备

[0055] 免疫胶体金技术的基本原理是,氯金酸在还原剂的作用下,可聚合为一定大小的金颗粒,形成带负电荷的、由于静电作用而稳定的疏水胶溶液。本发明采用柠檬酸三钠这种还原剂还原法制备胶体金,具体过程如下:取0.01%氯金酸100mL水溶液加热至沸,搅动下准确加入1%柠檬酸三钠水溶液0.7mL,金黄色的氯金酸在2分钟内变为紫红色,继续煮沸15min,冷却后用蒸馏水恢复原来的体积,即为制备的胶体金溶液。此胶体金溶液是否符合生产需求,除肉眼观察颜色需要为紫红色外,还需要采用紫外可见分光光度计分析,胶体金溶液需在可见区535nm有最高吸收峰,同时,电镜图显示制备的胶体金颗粒均一性较好、颗粒大小约在40nm。

[0056] 3.2胶体金标记抗体的制备

[0057] 调节胶体金溶液pH值至6.2,用恒速搅拌器均匀搅拌,同时逐滴加入实施例1制备的抗黄曲霉毒素M1的单克隆抗体或者加入市售的抗黄曲霉毒素M1的单克隆抗体(购自山东绿都生物科技有限公司,货号LD001,效价16500),60分钟后加入封闭剂(1%PEG20000溶液),30分钟后进行第二次封闭(10%BSA溶液),全部加完后,继续搅拌30分钟。通过离心(8kr/min,4℃,30min)获得均一性金标抗体沉淀。再加入重悬液(0.01M PBS缓冲液,含0.05%吐温-20和1%酪蛋白,pH值7.4),混匀后移至干净离心管,贮藏4℃冰箱中备用。

[0058] 3.3黄曲霉毒素M1胶体金免疫层析快速检测试纸条的制备

[0059] 检测黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条,包括样品垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水垫和PVC背衬;硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,样品垫和吸水垫分别黏附在硝酸纤维素膜上的两端;

[0060] 硝酸纤维素膜上依次分布样品垫、检测线T1、检测线T2、质控线、吸水垫;

[0061] 检测线T1上固定的是1号抗原(黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比25:1),浓度为0.15mg/mL;

[0062] 检测线T2上固定的是2号抗原(黄曲霉毒素B1与BSA摩尔偶联比40:1),浓度为0.8mg/mL;

[0063] 质控线上喷涂的是羊(兔)抗鼠IgG,浓度为2.5mg/mL;

[0064] 检测线T1和检测线T2的间距是6.5mm,检测线T2和质控线之间的间距分别是3.5mm;

[0065] 将1号全抗原(黄曲霉毒素B1与BSA的摩尔偶联比25:1)、2号全抗原(黄曲霉毒素B1与BSA的摩尔偶联比40:1)分别通过仪器(BioDot XYZ,Irvine,CA,USA,本专利的固定都是通过此仪器)固定在T1、T2检测线和羊(兔)抗鼠IgG固定在NC膜的检测区(T1,T2)和控制区,在37°C充分干燥;最终制成试纸条。

[0066] 黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条结构图见图2。

[0067] 进一步可以加上ELISA孔;所述ELISA孔内包被有黄曲霉毒素M1单克隆抗体-胶体金标记物;检测时将牛奶样本加入ELISA孔内孵育2分钟后加至试纸条的样本垫上,15分钟后读取实验结果。

[0068] 实施例4牛奶中黄曲霉毒素M1残留的胶体金免疫层析方法检测原理

[0069] 4.1本发明试纸条检测原理

[0070] 抗体标记在胶体金颗粒上,胶体金和样本同时在NC膜上移动,在移动的过程中,样本中的黄曲霉毒素M1和标记在胶体金颗粒上的抗体特异性的反应,当样本中的黄曲霉毒素M1含量低于0.05ng/mL时,足量胶体金标记抗体和固定在NC膜上的第一、二条检测线反应形成两条红色的检测线带;当样本中的黄曲霉毒素M1含量低于0.5ng/mL时,适量的胶体金标记抗体会和固定在NC膜上的第一条检测线反应形成一条红色的检测线带,T2完全阻断;当样本中黄曲霉毒素M1含量高于0.5ng/mL时,胶体金标记抗体被样本中的黄曲霉毒素M1完全结合,T1、T2完全阻断。实验过程中C线一直有显色。具体见图1。

[0071] 实施例5正交实验 $L_9(3)^4$ 确定本专利所用的试纸条最优条件

编号	抗体标记到胶体金的含量 μ g/mL	ELISA孔中的胶体金标记物体积 μ L	检测线固定的黄曲霉毒素 B1-BSA 的浓度		显色强度					
			T1	T2	0		0.05		0.5	
					T1	T2	T1	T2	T1	T2
			mg/mL	mg/mL						
1	1	2	0.15	0.2	+++	-	+++	-	+	-
2	1	8	0.3	0.4	++++	-	+++	-	+	-
3	1	16	0.6	0.8	+++++	-	+++	+	+	-
[0072]	4	2	0.6	0.4	+++++	-	+++	+	+++	-
5	2	8	0.15	0.8	+++	++	+++	-	-	-
6	2	16	0.3	0.2	+++++	-	+++	+	+++	-
7	10	2	0.3	0.8	+++	+	+++	+	+++	-
8	10	8	0.6	0.2	+++	-	+++	+	+++	-
9	10	16	0.15	0.4	+++	+	+++	-	+	-

[0073] 通过实验 $L_9(3)^4$ 对实验条件的优化得出最优条件为：抗体标记到胶体金的含量为2 μ g/mL；ELISA孔中的胶体金标记物体积8 μ L；T1、T2全抗原（黄曲霉毒素B1-BSA）的浓度分别为0.15、0.8mg/mL。

[0074] 实施例6在最优条件下本发明试纸条对实际加标牛奶样本进行检测

[0075] 6.1牛奶加标

[0076] 在阴性牛奶样本（拜发ELISA试剂盒测定，RIDASCREEN，货号R1121）中分别加入黄曲霉毒素M1样品，黄曲霉毒素M1的浓度分别为：0,0.025,0.05,0.1,0.25,0.5,1ng/mL。

[0077] 6.2实际样品测定

[0078] 将8 μ L金标记抗体移入ELISA空中，孵育2分钟，加入100 μ L牛奶样本，反应2分钟，将混合液转移至试纸条的反应孔中，15分钟后读取实验结果：检测线T2在0.05ng/mL处阻断、检测线T1在0.5ng/mL处阻断。具体结果见图3。

[0079] 注：1、2号样本加标浓度：0,0.025ng/mL；3、4、5号样本加标浓度为：0.05,0.1,0.25ng/mL；6,7号加标浓度：0.5,1ng/mL；检测线T2在0.05ng/mL处阻断、检测线T1在0.5ng/

mL处阻断。

[0080] 实施例7胶体金试纸条灵敏度试验

[0081] 取实施例3制成的试纸条,牛奶加标25个样本,ELISA检测真实样本浓度,每种样品重复3次,判断试纸条的检测灵敏度,结果见下表:

[0082] 本发明胶体金试纸条灵敏度试验

标号	样本加标浓度 (ng/ml)	ELISA 检测结果 (ng/ml)	试纸条检测结果		
			T1	T2	C
1	0.00	0.000	+	+	+
2	0.02	0.018	+	+	+
3	0.04	0.040	+	+	+
4	0.05	0.055	+	+	+
5	0.08	0.069	+	-	+
6	0.12	0.105	+	-	+
7	0.16	0.142	+	-	+
[0083] 8	0.20	0.221	+	-	+
9	0.24	0.225	+	-	+
10	0.28	0.247	+	-	+
11	0.32	0.301	+	-	+
12	0.36	0.323	+	-	+
13	0.40	0.418	+	-	+
14	0.44	0.426	+	-	+
15	0.50	0.488	-	-	+
16	0.56	0.551	-	-	+

	17	0.60	0.591	-	-	+
	18	0.68	0.668	-	-	+
	19	0.76	0.755	-	-	+
	20	0.84	0.822	-	-	+
[0084]	21	0.92	0.900	-	-	+
	22	1.00	0.928	-	-	+
	23	2.00	2.212	-	-	+
	24	3.00	2.910	-	-	+
	25	4.00	4.205	-	-	+

[0085] 从以上结果可以看出,本发明黄曲霉毒素M1胶体金免疫快速检测牛奶中黄曲霉毒素M1试纸条的检测限分别为0.05ng/mL、0.5ng/mL。

[0086] 实施例8本发明胶体金试纸条的特异性试验

[0087] 取实施例3制成的试纸条,在阴性的牛奶产品中(ELISA测定为阴性)分别加入黄曲霉毒素M1、黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2、赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮,使其终浓度为1,5,10,50,100,500ng/mL牛奶处理溶液。用试纸条检测的标准方法检测,判断试纸条检测的特异性,每种浓度的牛奶处理样品做3次重复。

[0088] 牛奶中黄曲霉毒素M1免疫胶体金试纸条特异性实验结果

[0089]

黄曲霉毒素 M1 结构类似物	牛奶中黄曲霉毒素 M1 胶体金免疫快速检测试纸条检测结果					
	1ng/mL	5ng/mL	10ng/mL	50ng/mL	100ng/mL	500ng/mL
黄曲霉毒素 M1	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
黄曲霉毒素 B1	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
黄曲霉毒素 B2	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
黄曲霉毒素 G1	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
黄曲霉毒素 G2	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
赭曲霉毒素 A	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
玉米赤霉烯酮	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

[0090] 实验结果如上表所示,黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2、赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮这些结构类似物在本发明黄曲霉毒素M1胶体金免疫快速检测试纸条中未产生交叉反应。

[0091] 实施例9胶体金试纸条的准确度试验

[0092] 本发明黄曲霉毒素M1胶体金免疫层析试纸条是半定量卡。取实施例3制成的试纸条,当牛奶中黄曲霉毒素M1的含量小于0.05ng/mL,样品检测结果视为阴性,符合欧盟的牛奶最低检测限标准;当牛奶中奶中黄曲霉毒素M1的含量大于0.05ng/mL小于0.5ng/mL,视为样品中黄曲霉毒素含量较低,符合中国牛奶最低检测限标准;当牛奶中奶中黄曲霉毒素M1的含量大于0.5ng/mL,视为样品中黄曲霉毒素含量较高,不符合欧盟及中国标准。

[0093] 添加黄曲霉毒素M1到阴性牛奶处理样品中时,是没有任何提取过程的,只需直接将牛奶处理样品用塑料吸管垂直滴加3滴无气泡的待检样品(约70 μ L)于加样孔内即可。

[0094] 实施例10胶体金试纸条保存期试验

[0095] 取实施例3制成的试纸条,保存条件为2-8 $^{\circ}$ C,经过6个月的测定,黄曲霉毒素M1添加实际样品测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}$ C保存条件下放置6天,进行加速稳定性实验,结果表明该胶体金试纸条各项指标完全符合要求。

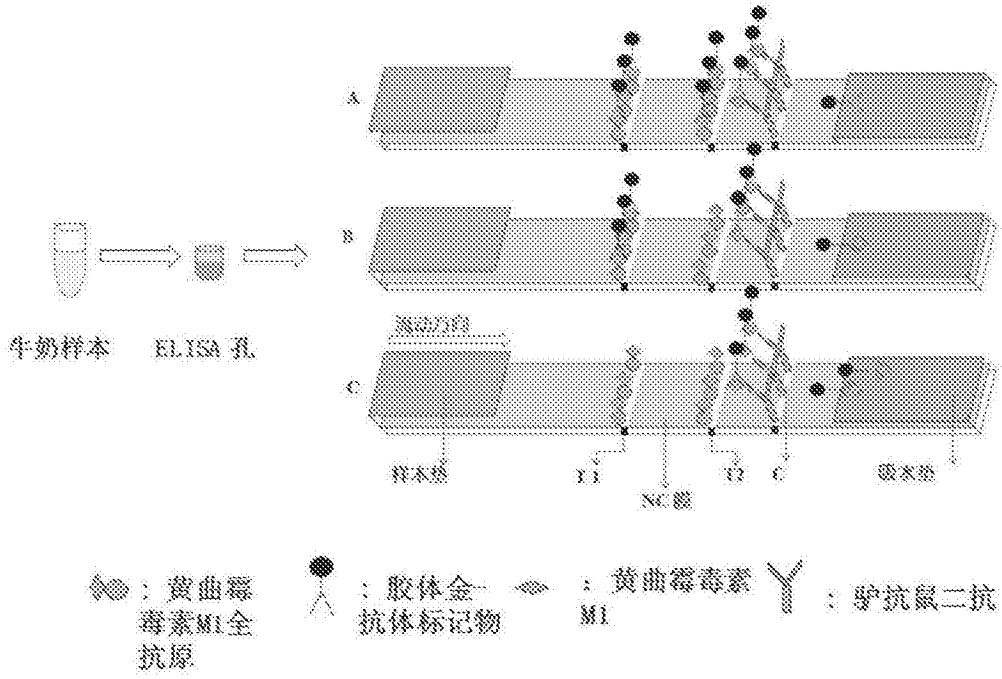


图1

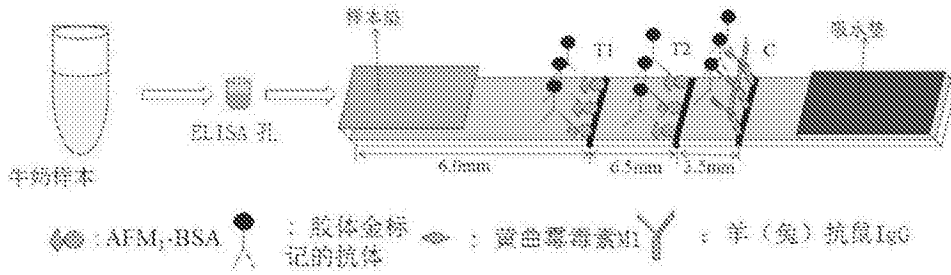


图2

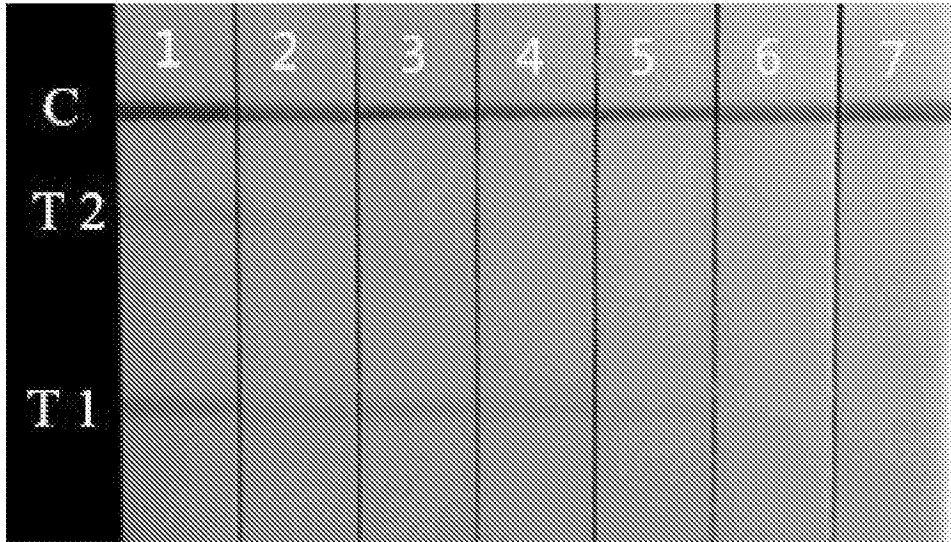


图3

专利名称(译)	牛奶中检测黄曲霉毒素M1的免疫层析胶体金试纸条		
公开(公告)号	CN105467115A	公开(公告)日	2016-04-06
申请号	CN201510789180.0	申请日	2015-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	赖卫华 吴成辉 刘道峰		
发明人	赖卫华 吴成辉 刘道峰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于食品安全监测领域，公开了一种检测黄曲霉毒素M1免疫层析胶体金试纸条，包括样品垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水垫和PVC背衬；硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上，样品垫和吸水垫分别黏附在硝酸纤维素膜上的两端。本发明为采用一步法间接竞争免疫层析技术快速检测牛奶中黄曲霉毒素M1残留是否符合欧盟限量标准(小于0.05ng/mL)和中国(美国等其他国家)限量标准(小于0.5n/mL)的胶体金试纸条，灵敏度可达0.05ng/mL。

编号	抗体标记到胶体金的含量 μg/mL	ELISA 孔中的胶体金标记物体积 μL	检测线固定的黄曲霉毒素 B1-BSA 的浓度		显色强度					
			T1 mg/mL	T2 mg/mL	0		0.05		0.5	
					T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	1	2	0.15	0.2	++	-	++	-	+	-
2	1	8	0.3	0.4	+++	-	++	-	+	-
3	1	16	0.6	0.8	++++	-	+	-	++	-
4	2	2	0.6	0.4	++++	-	+	-	++	-
5	2	8	0.15	0.8	+++	++	++	-	-	-
6	2	16	0.3	0.2	++++	-	+	-	++	-
7	10	2	0.3	0.8	+++	+	+	-	++	-
8	10	8	0.6	0.2	+++	-	+	-	++	-
9	10	16	0.15	0.4	++	+	++	-	+	-