



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110806476 A

(43)申请公布日 2020.02.18

(21)申请号 201911121620.X

(22)申请日 2019.11.15

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C201881 2018.04.03

(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 唐晓倩 王督 姜俊 张奇

李培武

(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 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页

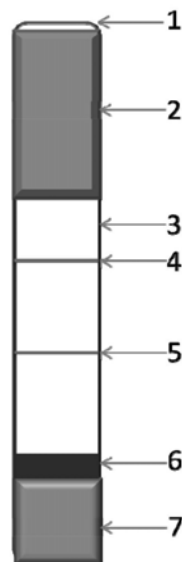
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用。它包括底板,底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,硝酸纤维素膜上横向设置质控线和检测线,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线的下方,所述检测线上包被有二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体;所述的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生。可实现对二乙酰镰草镰刀菌烯醇的快速检测,灵敏度高。



1. 检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条,其特征在于:它包括底板,底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,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线的下方,所述检测线上包被有二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA);所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体;所述的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生。

2. 根据权利要求1所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇免疫层析试纸条,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所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,所述检测线与质控线的间距为5~7mm。

4. 根据权利要求1所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测线上每厘米所需要的二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)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所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为100~200ng。

6. 权利要求1所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)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,得到检测线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;所述包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)的检测线上每厘米所需要的二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)的包被量为100~300ng;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℃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℃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℃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二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇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;所述的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生;

(5) 试纸条的组装

在底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,即得检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条。

7. 根据权利要求6所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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:氯化钠0.08g,氯化钾0.002g,磷酸二氢钾0.002g,卵清白蛋白0.1~0.2g,十二水合磷酸氢二钠0.029g。

8. 根据权利要求6所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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:蔗糖2~5g,氯化钠0.8g,氯化钾0.02g,叠氮化钠0.02~0.05g,磷酸二氢钾0.02g,牛血清白蛋白1~2g,十二水合磷酸氢二钠0.29g。

9. 根据权利要求6所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体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0.6mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加入2.0mL 0.1mg/mL的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体水溶液,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,0.22μm滤膜过滤所得;所述标记洗涤保存液为:0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,2.0g聚乙二醇-20000,纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得。

10. 根据权利要求1-5中任一项所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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80~150μL该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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,逐滴加入另一检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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:检测试纸条上包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白的偶联物(DAS-OVA)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二乙酰镰草镰刀菌烯醇

含量低于5ng/mL;比对照试纸条上对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量等于或高于5ng/mL并低于100ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于100ng/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二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量。

检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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,具体涉及一种检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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,目前发现的大约有400多种,其中单端孢霉烯族化合物是镰刀菌毒素中污染水平较高,危害较大的一类毒素,具有毒性强、污染范围广、频率高的特点。单端孢霉毒素分为A-D共四类,其中危害较大的为A和B两类。A类中的二乙酰镰草镰刀菌烯醇急性毒性较强,对大鼠的LD₅₀为0.75mg/kg。另外,其热稳定性较强,采用一般烹调手段不能破坏毒素,易进入食物链危害人体健康。中毒后临床表现为严重的皮炎、恶心、呕吐、血性腹泻、骨髓造血系统损害、神经系统紊乱、厌食和死亡。随着人们对食品质量安全的要求越来越高,更大程度的满足人们的安全消费需求,应加强对粮食中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的监测,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] 现有的对二乙酰镰草镰刀菌烯醇的检测方法主要采用仪器分析法。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,检测灵敏度高,准确性好,但是样品前处理过程繁琐,耗时较长,需要特定的实验环境 and 专业检测人员,适用于实验室内的检测。免疫分析方法具有特异性强、灵敏度高、成本低、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,检测成本低,分析时间短,近年来在真菌毒素等痕量化合物定性、在线、快速检测上得到了广泛应用。然而目前市场上未见用于二乙酰镰草镰刀菌烯醇检测的胶体金免疫层析试纸条。由于近年来多篇文献中报道谷物中二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染呈加重趋势,因此迫切需要可快速现场检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的检测技术,以保障我国食品安全。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题是提供一种检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量的检测,具有灵敏度高,操作简单、快速的特点。

[0005] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案为:

[0006] 同步检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条,包括底板,底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,硝酸纤维素膜上横向设置质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线的下方,所述检测线上包被有二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA);所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体;所述的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为

CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生;该杂交瘤细胞株DAS5G11E7已于2018年4月3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.C201881。

[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,所述检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,所述检测线与质控线的间距为5~7mm。

[0010] 按上述方案,所述检测线上每厘米所需要的二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)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二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为100~200ng。

[0012] 如上所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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] 将二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)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,得到检测线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;所述包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)的检测线上每厘米所需要的二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)的包被量为100~300ng;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℃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℃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℃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二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇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;所述的抗二乙

酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生。

[0024] (5) 试纸条的组装

[0025] 在底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,即得检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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:氯化钠0.08g,氯化钾0.002g,磷酸二氢钾0.002g,卵清白蛋白0.1-0.2g,十二水合磷酸氢二钠0.029g。

[0027] 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:蔗糖2~5g,氯化钠0.8g,氯化钾0.02g,叠氮化钠0.02~0.05g,磷酸二氢钾0.02g,牛血清白蛋白1~2g,十二水合磷酸氢二钠0.29g。

[0028] 按上述方案,所述纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇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0.6mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加入2.0mL 0.1mg/mL的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体水溶液,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;

[0029] 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,0.22μm

[0030] 滤膜过滤所得;所述标记洗涤保存液为:0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,2.0g聚乙二醇-20000,纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得。

[0031] 如上所述的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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80-150μL该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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,逐滴加入另一检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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:检测试纸条上包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白的偶联物(DAS-OVA)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二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量低于5ng/mL;比对照试纸条上对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量等于或高于5ng/mL并低于100ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于100ng/mL;

[0032] 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。

[0033] 最后经换算即得待测样品中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量。

[0034] 本发明提供的免疫层析试纸条在检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇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,纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体被溶解。当样品中含有二乙酰镰草镰刀菌烯醇时,二乙酰镰草镰刀菌烯醇将和金标垫上的纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物抗原的检测线时,检测线上包被的抗原将和二乙酰镰草镰刀菌烯醇竞争结合纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体将越少,在检测线上形成的显色带颜色越浅;当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,检测线处将不会有红色线条出现。无论样品中是否含有这种真菌毒素,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,将检测试纸条上包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白的偶联物的检测线与对照试纸条上相应检测线颜色进行显色对照,即可获得样品中二乙酰镰草镰刀菌烯醇这种真菌毒素的污染情况。

[0035] 本发明的有益效果:

[0036] (1) 一步检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染。本发明提供的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染免疫层析试纸条能实现对二乙酰镰草镰刀菌烯醇这种真菌毒素的快速检测。

[0037] (2) 灵敏度高。本发明提供的免疫层析试纸条对检测溶液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的最低检测限为5ng/mL。

[0038] (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

[0039] 图1为本发明的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条的正视图;

[0040] 图2为实施例2的结果判定图;

[0041] 图中:1纸板;2吸水垫;3检测垫;4质控线;5检测线;6金标垫;7样品垫;

[0042] 图3为本发明提供的二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体亲和力测定数据;

[0043] 图4(a)为本发明提供的二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体与其他真菌毒素交叉反应结果;(b)本发明提供的二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体建立的二乙酸镰草镰刀菌烯醇酶联免疫方法标准曲线。

具体实施方式

[0044] 实施例1:抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的获得

[0045] 抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生,制备方法为:

[0046] 将杂交瘤细胞株DAS5G11E7注射预先用弗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以上,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30-35μL,室温混合30-60min,

4℃静置2h以上。12000r/min,4℃离心30min以上,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至7.4,冰浴中缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h以上,然后12000r/min,4℃离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10体积的摩尔浓度为0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用0.01mol/LPBS透析两天,再改用PB透析两天,将透析袋中蛋白溶液取出,离心,收集上清,弃沉淀,放入-70℃预冻后放入冻干机中冻干。收集冻干粉,即为纯化好的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体;

[0047] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容到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,0.02g磷酸二氢钾,加水定容到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,0.2g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得。

[0048] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的亚型为IgG2b。

[0049] 用常规非竞争酶联免疫吸附法(ELISA)测得小鼠腹水纯化得到的抗体效价可达到 3.2×10^5 ,即抗体稀释 3.2×10^5 倍时溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争ELISA测定其对二乙酸镰草镰刀菌烯醇灵敏度为3.08ng/mL。与其他真菌毒素,T2毒素、HT2毒素、呕吐毒素、3-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇、赭曲霉毒素、伏马毒素的交叉反应均小于0.01%(表1;图4)。抗体的特异性高低可用交叉反应率来评价。采用间接竞争ELISA方法测定DAS5G11E7单克隆抗体,将DAS、T2毒素、HT2毒素、DON、3-ACDON、OTA、FB₁配制系列浓度的标准溶液,分别与等体积抗体共同加入酶标板中,孵育1h,其他步骤同间接竞争ELISA方法。以上述毒素标准品浓度为横坐标,以酶标仪测定的450nm下OD值B/B₀为纵坐标,绘制竞争抑制曲线,通过计算DAS与其他毒素的IC₅₀值比值来判定交叉反应率。计算公式如下:

[0050] $CR\% = (IC_{50}DAS / IC_{50}其他毒素) \times 100$ 。

[0051] 表1.DAS5G11E7与其他毒素的交叉反应。

毒素名称	结构	IC50	交叉反应率
DAS		3.08	100%
T-2 毒素		>100,000	<0.01%
HT-2 毒素		>100,000	<0.01%
[0052] DON		>100,000	<0.01%
3-acetyl-DON		>100,000	<0.01%
FB ₁		>100,000	<0.01%
OTA		>100,000	<0.01%

[0053] 利用间接非竞争ELISA测定DAS5G11E7的亲和力。用DAS-OVA按1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$,2h;封闭液封闭1h后,将用PBS稀释好的抗体(稀释因子1:2)加入酶标板,其余步骤同间接非竞争ELISA方法。以测定的OD₄₅₀值为纵坐标,抗体浓度(mol/L)的对数值为横坐标,做出4个浓度的4条S形曲线。找出每条S曲线顶部的最大OD值即OD_{max},找出每条曲线50%OD_{max}值对应的抗体浓度。将4个浓度任意两两一组,根据公式 $K_a = (n-1) / 2 (n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算抗体的亲和力常数,其中 $[Ab']_t$ 、 $[Ab]_t$ 为每组中两个50%最大OD值对应的抗体浓度,n为每组中包被抗原浓度的倍数(包括1:2,1:4,1:8三个比值),共得到6个K_a值。将得到的六个K_a值取平均,得抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇小鼠腹水抗体酶联免疫吸附分析(ELISA)法亲和力可达 $5.4 \times 10^8 \text{L}/\text{mol}$ (图3)。

[0054] 杂交瘤细胞株DAS5G11E7的筛选

[0055] 1. 动物免疫

[0056] 采用实验室制备的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原DAS-BSA对6-7周龄BALB/c小鼠进行免疫。第一次免疫将二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原与等体积的弗氏完全佐剂乳化后,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

的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原乳化,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对小鼠的血清效价进行检测。第3次免疫后8天,断尾采血,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。

[0057] 2. 细胞融合

[0058] 加强免疫3天后,采用重量百分数为50%的聚乙二醇分子量为1450的PEG作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤:无菌条件下脱颈处死小鼠,取出脾脏,用均质器碾碎脾脏,采用过滤网分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞SP2/0以5:1的个数比混合,离心,用RPMI-1640基础培养液重悬混合细胞,离心,弃上清。加入50%PEG 1-2mL,共用时1分钟,贴壁加入RPMI-1640基础培养液10-20mL,离心,弃上清,管底的融合细胞用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% (体积百分数)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和甲基纤维素购于sigma-Aldrich公司。

[0059] 细胞株的筛选及克隆

[0060] 待细胞融合后2-3周,细胞集落长至肉眼可见时,用微量移液器将克隆从培养基中挑出,转移至96孔细胞培养板采用HAT液体培养,待细胞长至2/3孔底时,吸取培养上清进行检测。采用两步筛选法,第一步采用间接ELISA方法,筛选出抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇而不抗载体蛋白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,用二乙酸镰草镰刀菌烯醇作为竞争原,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IC₅₀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4-5次后,获得杂交瘤细胞株DAS5G11E7。该杂交瘤细胞株已于2018年4月3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:C201881。

[0061] 抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体杂交瘤细胞株DAS5G11E7抗体可变区序列测定

[0062] (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DAS5G11E7的总RNA;

[0063] (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;

[0064] (3) PCR法克隆可变区基因:根据GENBANK中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以CDNA为模版扩增抗体重链、轻链可变区基因。PCR程序为:94 $^{\circ}$ C 30s、58 $^{\circ}$ C 45s、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,连接在载体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' -CAG GTS MAR CTG MAG GAG TCW G-3' (22mer)和5' -CAG GGG CCA GTG GAT AGA CAG ATG GGG G-3' (28mer),其中S、M、R和W为兼并碱基,M=A/C,R=A/G,S=G/C,W=A/T,轻链可变区引物为5' -GAC ATC AAG ATG ACC CAG TCT CCA-3' (24mer)和5' -CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC-3' (24mer)。

[0065] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长351bp,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324bp,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108个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:4所示。

[0066] 实施例2

[0067] 检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条的制备方法,步骤如下:

[0068] (1)吸水垫的制备

[0069] 将吸水纸剪裁成长16mm,宽4mm的规格,即得吸水垫;

[0070] (2)检测垫的制备

[0071] 将二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)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,每厘米检测线上所需二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物(DAS-OVA)的包被量为150ng,然后于37 $^{\circ}$ C条件下干燥30分钟;

[0072] 所述的硝酸纤维素膜长22mm,宽4mm;

[0073] 质控线的包被:

[0074] 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80ng,然后于37 $^{\circ}$ C条件下干燥1小时;

[0075] 所述的包被缓冲液为:0.1g卵清白蛋白,0.08g氯化钠,0.002g氯化钾,0.002g磷酸二氢钾,0.029g十二水磷酸氢二钠,加水定容到10mL所得;

[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,放入封闭液中浸湿,取出,于37 $^{\circ}$ C条件下干燥8小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0078] 所述的封闭液为:将1g牛血清白蛋白,2g蔗糖,0.8g氯化钠,0.02g氯化钾,0.02g叠氮化钠,0.02g磷酸二氢钾,0.29g十二水磷酸氢二钠,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,放入步骤(3)所述的封闭液中浸湿,取出,于37 $^{\circ}$ 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二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的溶液,每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为125ng,然后真空冷冻干燥2小时,置干燥器中室温保存;

[0081] 所述纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇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,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2mL 0.1mg/mL的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体水溶液,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二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液的质量浓度为0.06mg/mL;

[0082] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为15nm;

[0083] 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

[0084] 滤膜过滤所得;所述的标记洗涤保存液为:0.1235g硼酸,0.2g叠氮钠,2.0g聚乙二醇-20000,纯水定容至1000mL,0.22 μ m滤膜过滤所得;

[0085] (5) 试纸条的组装

[0086] 吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫在相互连接处交叠1-3mm,依次粘贴在纸板的一面,检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,其上包被有横向检测线与质控线,见图1。

[0087] 上述检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条在小麦面粉样品检测中的应用:

[0088] 称取小麦面粉样品20g,加入体积浓度为70%的甲醇水溶液100mL,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过0.45 μ m有机滤膜,再取100 μ L待测样品溶液作为检测液逐滴加入二乙酰镰草镰刀菌烯醇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14%的甲醇水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一免疫层析试纸条的样品垫,作为对照试纸条,15分钟后读取结果。

[0089] 检测结果:

[0090] 1#待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线颜色比对照试纸条检

[0091] 测线浅,见图2-1,由此判定:1#待测样品溶液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于5ng/mL并低于100ng/mL;经换算可得1#待测样品中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于25ng/g并低于500ng/g;

[0092] 2#待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线颜色与对照试纸条中的检测线颜色接近,见图2-2,由此判定:2#待测样品溶液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量低于5ng/mL;经换算可得2#待测样品中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量低于25ng/g。

[0093] 3#待测样品检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线不显色,见图2-3,由此判定:3#待测样品溶液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于100ng/mL;经换算可得3#待测样品中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于500ng/g。

序列表

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用

<160> 4

<210> 1

<211> 351bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

```
gaagtgaac tggaggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgttcag cctccggatt cactttcaat tactatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaacc tcctggagtg ggtcgcaggc attagtagtg gtggttctta cacctattat 180
tctgacagtg tgaagggacg attcaccatc tccagagaca gtgccacgaa caccctgtac 240
ctgcaaatga ccagtctgaa gtctcaagac acagccatgt attattgtat tagactcccc 300
tttgggtcta tggactattg gggtaagga accgcagtca ccgtctctc a 351
```

<210> 1

<211> 324bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 2

```
caggctgttg tgactcagga acctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc 60
acttgtcgct caagtactgg ggctgtaaca actggtaatt atgtcaactg ggtccaagag 120
aaaccagatc atttattcag tggcttaata ggtaatacca ataaccgagc tccaggtgtt 180
cctgccagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg ccctcacat cacagggaca 240
cagactgagg atgaggcaat atatttctgt gctctatggt acaccgacca tttggtgttc 300
ggtggaggaa ccaaattgac tgtc 324
```

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Tyr Tyr
           20           25           30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Asn Leu Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
```

50	55	60																	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Ala	Thr	Asn	Thr	Leu	Tyr				
65					70					75				80					
Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Gln	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ile	Arg	Leu	Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ala				
			100					105						110					
Val	Thr	Val	Ser	Ser															
				115															
<210>	1																		
<211>	108																		
<212>	PRT																		
<213>	小鼠																		
<400>	4																		
Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	Ser	Pro	Gly	Glu				
1				5					10					15					
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Gly				
			20					25					30						
Asn	Tyr	Val	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Asp	His	Leu	Phe	Ser	Gly				
			35				40					45							
Leu	Ile	Gly	Asn	Thr	Asn	Asn	Arg	Ala	Pro	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe				
	50					55					60								
Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Thr				
65					70					75				80					
Gln	Thr	Glu	Asp	Glu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Thr	Asp				
				85					90					95					
His	Leu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val								
			100					105											

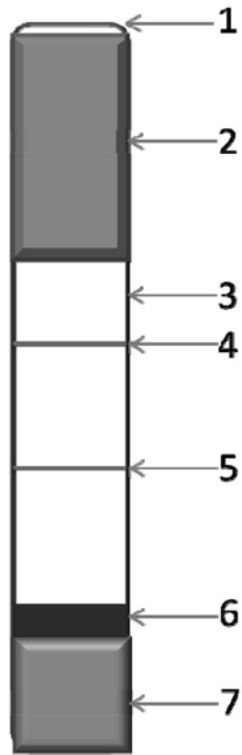


图1

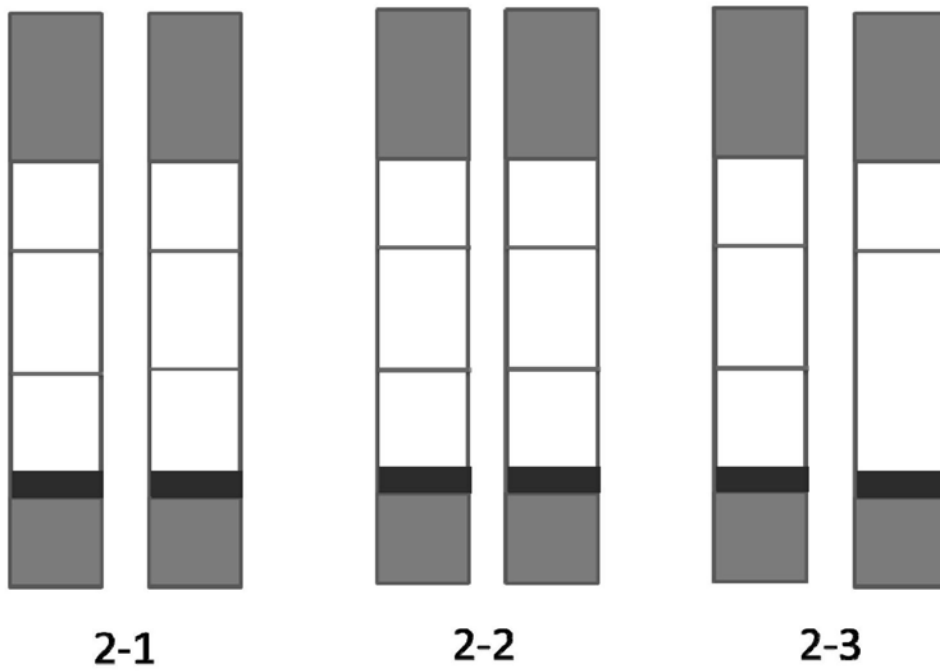


图2

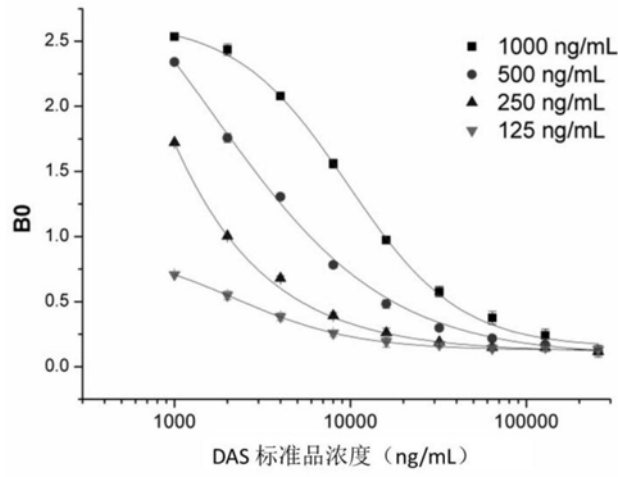


图3

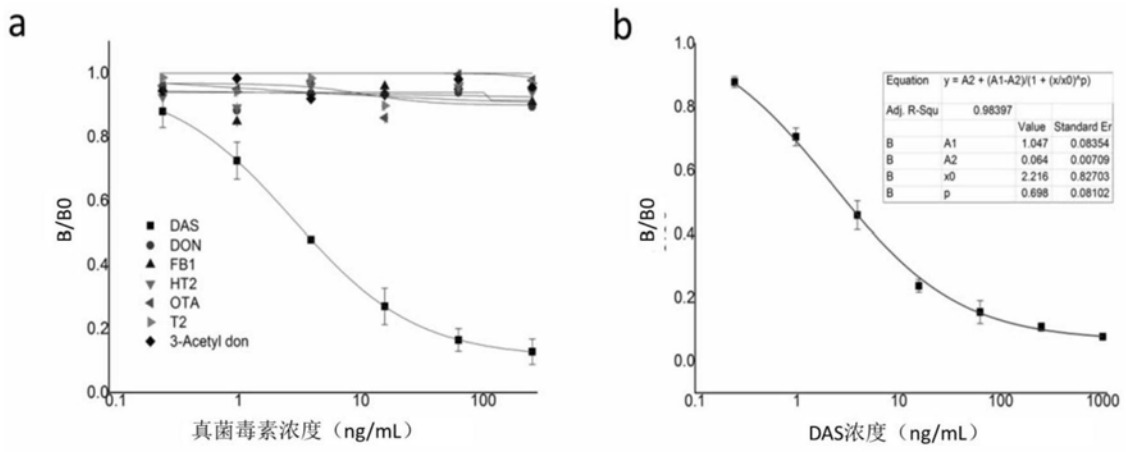


图4

专利名称(译)	检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN110806476A	公开(公告)日	2020-02-18
申请号	CN201911121620.X	申请日	2019-11-15
[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	唐晓倩 王督 姜俊 张奇 李培武		
发明人	唐晓倩 王督 姜俊 张奇 李培武		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	乔宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇污染的免疫层析试纸条、制备方法及其应用。它包括底板，底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，硝酸纤维素膜上横向设置质控线和检测线，质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体，所述检测线位于质控线的下方，所述检测线上包被有二乙酰镰草镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物；所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体；所述的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生。可实现对二乙酰镰草镰刀菌烯醇的快速检测，灵敏度高。

