

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

G01N 33/544

G01N 33/531

G01N 21/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510018602.0

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1687784A

[22] 申请日 2005. 4. 23

[21] 申请号 200510018602.0

[71] 申请人 江西中德大地生物工程有限公司

地址 330029 江西省南昌市高新一路建昌工业园海外大厦南 306 号

[72] 发明人 赖卫华 熊勇华 陈高明 李 林
曾祥敏

[74] 专利代理机构 江西省专利事务所

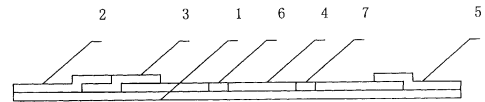
代理人 杨志宇

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 发明名称 无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸及其制备方法，它包括底板，样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫，检测线，质控线，其中：在底板上按顺序有样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫；示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成，质控线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。本发明生产过程中不需要黄曲霉毒素，避免了二次污染；检测过程无需黄曲霉毒素标品作为指示，而直接通过颜色判断结果；所耗费用低；灵敏度高；操作简便、快捷。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸，包括底板(1)，样品垫(2)，示踪粒子结合物垫(3)，硝酸纤维素膜(4)，吸水垫(5)，检测线(6)，质控线(7)，其特征在于：在底板(1)上按顺序有样品垫(2)，示踪粒子结合物垫(3)，硝酸纤维素膜(4)，吸水垫(5)；示踪粒子结合物垫(3)上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体，硝酸纤维素膜(4)上还设有检测线(6)和质控线(7)，检测线(6)由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成，质控线(7)由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。
- 2、根据权利要求1所述的一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法，包括如下步骤：待检样品的处理；硝酸纤维素膜(4)检测线(6)和质控线(7)的制备；示踪粒子结合物垫(3)的制备；组装试纸条；其特征是：硝酸纤维素膜(4)检测线(6)和质控线(7)的制备，包括如下步骤：用能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样作为检测线(6)；用能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样作为质控线(7)。
- 3、根据权利要求书2所述的一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法，其特征是制备检测线(6)的无毒体系是这样选择的：抗黄曲霉毒素单克隆抗体 $100\mu\text{l}$ ($100\mu\text{g/ml}$) 4°C 包被过夜，3%脱脂牛奶 4°C 封闭2h，用 Tris- 盐酸洗涤液 (TBST, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1%Tween20) 洗涤6次，每孔加入噬菌体肽库 $100\mu\text{l}$ ，室温下结合1h，再用TBST洗涤10次，每孔加入洗脱液(Gly-HCL pH2.2) $100\mu\text{l}$ 洗脱；中和洗脱液后留一部分作滴度测定，其余加到20ml接种有处于对数生长前期的 *E. coli* ER2738 的 LB 培养液中进行扩增培养， 37°C 震荡培养4.5h后， 4°C 10000r/min 离心10min，上清液加入1/6体积的聚乙二醇沉淀剂 (PEG/ NaCl)， 4°C 沉淀过夜； 4°C 10000r/min 离心15min，去上清，再用1ml TBST 悬浮噬菌体，加入1/6体积的PEG /NaCl 冰上孵育60 min； 4°C 离心15min，去上清，沉淀用 $200\mu\text{l}$ TBST 悬浮；测滴度后，进行第二次、第三次和第四次亲和筛选；每次加入的噬菌体量都为 2×10^{11} pfu，包被的抗体量分别为75、50和 $25\mu\text{g/ml}$ ，TBST 中 Tween20 的浓度增至0.5%，其余步骤与第一轮筛选相同；第4轮筛选后的洗脱产物经滴度测定后，用灭菌牙签从噬菌斑的平板上挑选蓝色噬菌斑，分别置1ml接种有处于对数生长前期的 *E. coli* ER2738 的 LB 培养液中进行扩增培养、纯化；用ELISA法鉴定得到的特异性结合的阳性噬菌体克隆，并用竞

争 ELISA 法筛选黄曲霉毒素的模拟表位,挑选亲和性强,灵敏度高的噬菌体进行扩增培养、纯化用于制备检测线(6)。

4、根据权利要求书 2 所述的一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是制备质控线(7)的抗体是这样选择的:通过在驴体内注射小白鼠免疫球蛋白,取其含抗体的血清并经纯化后制得的,其分子量为 80.000 道尔顿,在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现两条带,一条是分子量为 55000 道尔顿,另一条是分子量为 25.000 道尔顿;将纯化后的抗体线状点样制备质控线(7)。

5、根据权利要求书 2 所述的一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是检测线(6)和质控线(7)是这样制备的:将硝酸纤维素膜(4)按 20-30mm 宽的尺寸剪裁;将经纯化浓度调整为 0.1-1.0mg/ml 的无毒体系(噬菌体),在膜上线状点样作为检测线(6),检测线(6)点样位置离膜底边 15-18mm;将经纯化浓度调整为 0.2-1.5mg/ml 的相应驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体,在膜上线状点样作为质控线(7),质控线(7)点样位置离膜底边 11-13mm;硝酸纤维素膜(4)室温干燥 30min,置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min,取出吸干水分,于 37 孵育 30min,置室温下干燥处密封储藏。

6、根据权利要求书 2 所述的一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是示踪粒子结合物垫(3)的制备包括如下步骤:选用能与黄曲霉毒素无毒体系(噬菌体)结合的抗黄曲霉毒素单克隆抗体标记示踪粒子;把标记好的示踪粒子,分散在玻璃纤维纸上;

7、根据权利要求书 6 所述的一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是制备示踪粒子结合物垫(3)的抗体是这样选择的:按 Davis 的方法将黄曲霉毒素—蛋白复合体(AFB₁—BSA)溶于同体积的磷酸生理盐水(PBS)和完全佐剂中,免疫 BALB/C 小鼠,取小鼠脾脏与 SP2/O 小鼠骨髓细胞融合,融合细胞在选择性培养液中培养 7~14d,采用间接竞争 ELISA 方法筛选分泌抗体的杂交细胞株,杂交细胞株进行三次克隆化,产生的克隆细胞株一部分液氮冻存,一部分注入小鼠腹腔产生腹水,经纯化后得到的单克隆抗体用于标记示踪粒子。

8、根据权利要求书 6 所述的一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是制备示踪粒子结合物垫(3)的示踪粒子为如下一种

- ① 胶体金颗粒
- ② 乳胶颗粒
- ③ 胶体硒颗粒
- ④ 明胶颗粒

⑤ 磁性颗粒

9、根据权利要求书 2 所述的一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法，其特征是组装试纸条，步骤如下：在底板（1）上加上有检测线（6）和质控线（7）的硝酸纤维素膜（4）；在底板（1）上加上示踪粒子结合物垫（3）；在底板（1）上加上样品垫（2）；在底板（1）上加上吸水垫（5）；将粘贴了硝酸纤维素膜（4）、结合物垫、样品垫（2）和吸水垫（5）的底板（1）用切刀剪成 3-5mm 宽，组装为试纸条。

无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测黄曲霉毒素的试纸及其制备方法，尤其是一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸及其制备方法。

背景技术

黄曲霉毒素是由黄曲霉、寄生曲霉或模式曲霉产生的一种毒素，可引起动物和人的急性中毒、慢性中毒、致癌、致畸和致突变等。由于能产毒的黄曲霉菌株广泛地存在于自然界中，因此它极可能通过食物链进入人体，从而对人体健康构成巨大的威胁。要完全避免黄曲霉毒素对粮食，饲料，副食品，油料作物以及发酵食品等的污染非常困难。唯一有效的办法是加强对该类样品的监控检测，及时发现污染的食品、饲料及其原材料，并立即剔除，防止毒素超标污染的食品进入人类的食物链。

对黄曲霉毒素检测的公知方法，目前主要有薄层层析法、酶联免疫法、液相色谱法、胶体金免疫层析法和乳胶沉淀法。薄层层析法是采用硅胶 G 薄板进行毒素层析分离，在 365 纳米紫外光下观察黄曲霉毒素产生的荧光并与标准毒素的迁移率比较以确定毒素的存在（见 GB/T5009，22-1996），酶联免疫法（CN 1153908）是采用黄曲霉毒素—蛋白复合体包被酶联板，然后将样品与识别黄曲霉毒素的抗体混合，在酶联板的小孔中进行免疫反应，通过比色确定样品中黄曲霉毒素的浓度，液相色谱法测定的黄曲霉毒素的精度与酶联免疫法相似。上述各方法都存在如下缺点：操作程序复杂，只能在实验室进行；需要专业人员操作，用专门的仪器和设备，检测时间长，所需费用高，其费用在 200-1000 元人民币/每个样品。乳胶沉淀法（CN1254843）是快速测定法，具有简单、快速、常温保存、单份测定、除商品试剂外不需任何仪器设备的优点，适合现场黄曲霉毒素的现场快速检测。

免疫层析是出现于 80 年代初期的一种独特的免疫分析方式，它往往以条状纤维层析材料为固相，通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动，并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体（如抗体或抗原）发生高特异高亲和性的免疫反应，层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域（检测带），通过酶反应或直接运用可目测的标记物（如胶体金）而得到直观的实验现象（如显色）。而游离标记物则越过检测带，达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术目前已广泛应用于临床医疗检测中。国内外现有的商品供应及文献报道的检测项目主要包括以下方面：违禁药物检测（苯丙胺、

可卡因、大麻、吗啡、海洛因等)、传染病病原检测(梅毒螺旋体、淋球菌、沙眼衣原体、幽门螺杆菌等)、激素检测、寄生虫、肿瘤标记物、心血管病检测标志物等。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金,乳胶,胶体硒、明胶等,其中运用最成功的标记物为胶体金。黄曲霉毒素胶体金免疫层析法(CN1410771)是将胶体金免疫层析技术运用于黄曲霉毒素检测中的一个成功方法。

上述的这些方法在制备或检测过程中都涉及到要使用黄曲霉毒素标品的问题,如胶体金免疫层析法中检测线上喷的就是黄曲霉毒素-蛋白复合体。

众所周知,黄曲霉毒素毒性很强,其中黄曲霉毒素 B₁ 是已知毒性最强的天然物质,比氰化钾的毒性高 10 倍,以黄曲霉毒素作为材料进行生产或以黄曲霉毒素作为对照品进行检测,极有可能存在二次污染的隐患,对生产和操作人员的健康有极大的危害。再者,我国所需的高浓度的毒素标品目前全部依赖进口,价格昂贵,使检测试剂的成本居高不下。更为麻烦的是,在“9.11”恐怖袭击以后,西方国家加大了对剧毒化学药品的出口管制力度,在我国几乎无法从国外购买到所需的黄曲霉毒素,从而造成了我国该类试剂的生产举步为艰的局面。

应用无毒体系来检测黄曲霉毒素是检测技术发展的一个方向,目前尚未见到应用无毒体系检测黄曲霉毒素的免疫层析法的报道。

发明内容

本发明的目的在于提供一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸及其制备方法。

本发明的技术方案为:

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸,包括底板,样品垫,示踪粒子结合物垫,硝酸纤维素膜,吸水垫,检测线,质控线,其中:在底板上按顺序有样品垫,示踪粒子结合物垫,硝酸纤维素膜,吸水垫;示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体,硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线,检测线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成,质控线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备,包括如下步骤:

1. 待检样品的处理;
2. 硝酸纤维素膜检测线和质控线的制备

用能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样作为检测线;

用能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样作为质控线。

3. 示踪粒子结合物垫的制备:

选用能与黄曲霉毒素无毒体系(噬菌体)结合的抗黄曲霉毒素单克隆抗体标记示踪粒子。把标记好的示踪粒子,分散在玻璃纤维纸上。

4. 试纸条的组装:

①在底板上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜;②在底板上加上示踪粒子结合物垫;③在底板上加上样品垫;④在底板上加上吸水垫;组装为试纸条。

方案可细分为四部分:

1. 待检样品的处理; 2. 硝酸纤维素膜检测线和质控线的制备; 3. 示踪粒子结合物垫的制备; 4. 试纸条的组装。

1. 待检样品的处理

将被检测的样品粉碎为20目并取20克粉末放入25-60毫升的抽提液(每100毫升含60毫升甲醇,40毫升蒸馏水,4克氯化钠)经充分混合5分钟,再静置10-20分钟后轻轻吸取上清液,按1:3的比例与样品缓冲液(PBS+0.5%BSA)混合,混合液用于测定。必要时可用滤纸过滤上清液,取滤过的样品进行测定。

2. 硝酸纤维素膜检测线和质控线的制备

将硝酸纤维素膜按20-30mm宽的尺寸剪裁。将经纯化浓度调整为0.1-1.0mg/ml的无毒体系(噬菌体),在膜上线状点样作为检测线,检测线点样位置离膜底边15-18mm。将经纯化浓度调整为0.2-1.5mg/ml的相应驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体,在膜上线状点样作为质控线,质控线点样位置离膜底边11-13mm。硝酸纤维素膜室温干燥30min,置于1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡30min,取出吸干水分,于37℃孵育30min,置室温下干燥处密封储藏。

3. 示踪粒子结合物垫的制备

(1) 示踪粒子的制备和标记

①胶体金溶胶制备标记:

胶体金溶胶制备:取0.01%四氯化金水溶液200ml,加热至沸腾,加入1-20ml 1%柠檬酸钠水溶液,煮沸5min,出现橙红色,胶体金颗粒直径由电镜测定为10-80nm;

胶体金标记抗体:取50ml胶体金,用0.1mol/L碳酸钾调pH至8.2,搅拌下将胶体金溶胶和抗黄曲霉毒素的单克隆抗体混合,再加入聚乙二醇水溶液,使最终浓度为0.05%。将粗制品6000g离心45min,沉淀用生理盐水混悬

至 1.5ml, 4℃保存。

② 胶体硒溶胶制备和抗体标记:

胶体硒溶胶制备: 在 1 升容量的四颈圆底烧瓶内加入去离子水 550ml 和聚丙烯酸 10g, 通氮室温搅拌并加入水合肼 69.5ml, 继续搅拌 20 分钟。亚硒酸 9.63g 溶解于 280ml 水, 室温搅拌下滴入反应混合液内, 得到 120nm 红色硒溶胶。

胶体硒抗体标记: 抗体用 20mmol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液配成 4.6mg/ml 浓度溶液, 加 25ul 于 pH7.3 的 25ml 硒溶胶中, 室温搅拌 10 分钟后加 1% PEG8000 1ml, 混匀, 于 4℃以 5000rpm 离心 5 分钟, 得到松软的红色沉淀, 用含 0.05% NaN₃ 的磷酸盐缓冲液配成 1ml 悬液。

③ 乳胶的制备和抗体标记:

彩色乳胶颗粒购自 Bangs LA、B、Oratories 公司。抗体标记程序为: 用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将乳胶稀释到 1%浓度, 搅拌下加入一定量的抗黄曲霉毒素的单克隆抗体溶液, 室温搅拌 30 分钟后于 37℃水浴孵化 60 分钟, 4℃放置 4-5 小时。15000rpm 离心 30 分钟, 用适量磷酸盐缓冲液重悬。

(2) 示踪粒子结合物垫的制备

将标记了示踪粒子的抗黄曲霉毒素的单克隆抗体按比例混合分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上, 烘干或冻干后密封干燥保存。

4. 试纸条的组装:

在底板上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜; ②在底板上加上示踪粒子结合物垫; ③在底板上加上样品垫; ④在底板上加上吸水垫; ⑤将粘贴了硝酸纤维素膜、结合物垫、样品垫和吸水垫的底板用切刀剪成 3-5mm 宽, 组装为试纸条。

本发明的优点及应用范围:

本发明同以往检测粮食、发酵制品和饲料中黄曲霉毒素的技术相比具有如下优点: (1)生产过程中不需要黄曲霉毒素, 避免了黄曲霉毒素的二次污染; (2)检测过程无需黄曲霉毒素标品作为指示, 而直接通过颜色判断结果; (3)除商品试剂外不需任何仪器设备, 所耗费用低; (4)灵敏度较高, 可达 10ppb; (5)室温保存、单份测定, 可现场进行检测; (6)操作简便、快捷, 仅需 10-15 分钟。

本发明属于食品安全领域, 主要用于粮食、发酵制品和饲料中黄曲霉毒素的检测。本发明的试纸条的使用单位主要是国家相关执法部门, 如农业部门的畜牧局、质量技术监督局、动植物检疫局、商检局、防疫站等, 食品加工企业为了保证其产品的质量可靠性, 保证品牌及市场占有率, 也有大量需求, 同时随着人民群众对食品安全的重视, 黄曲霉毒素试纸条还将走进许多家庭。

实验例一：

胶体金免疫层析检测黄曲霉毒素的方法及试纸的制备并用于检测玉米样品

本实验例分为 5 部分：(1)待检样品的处理；(2) 硝酸纤维素膜的制备；(3) 胶体金结合物垫的制备；(4)试纸条的组装；(5) 检测和结果判断

(1) 待检样品的处理：

将被检测的玉米样品粉碎为 20 目并取 20 克粉末放入 25-60 毫升的抽提液（每 100 毫升含 60 毫升甲醇，40 毫升蒸馏水，4 克氯化钠）经充分混合 5 分钟，再静置 10-20 分钟后轻轻吸取上清液，按 1: 3 的比例与样品缓冲液（PBS+0.5%BSA）混合，混合液用于测定。必要时可用滤纸过滤上清液，取滤过的样品进行测定。

(2) 硝酸纤维素膜的制备：

将硝酸纤维素膜按 20-30mm 宽的尺寸剪裁。将经纯化浓度调整为 0.1-1.0mg/ml 的无毒体系（噬菌体），在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 15-18mm。将经纯化浓度调整为 0.2-1.5mg/ml 的相应驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体，在膜上线状点样作为质控线，质控线点样位置离膜底边 11-13mm。硝酸纤维素膜室温干燥 30min，置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min，取出吸干水分，于 37 孵育 30min，置室温下干燥处密封储藏。

(3) 胶体金结合物垫的制备：

分别取 50ml 颗粒直径为 30-50nm 胶体金，用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH 至 8.2，搅拌下将胶体金溶胶和抗黄曲霉毒素的单克隆抗体混合，再加入聚乙二醇水溶液，使最终浓度为 0.05%。将粗制品 6000g 离心 45min，沉淀用生理盐水混悬至 1.5ml，4℃保存。将标记胶体金颗粒的抗体混合并分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干或烘干后密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装：

① 在底板上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜；② 在底板上加上胶体金结合物垫；③ 在底板上加上样品垫；④ 在底板上加上吸水垫；组装为检测试纸条。

(5) 检测和结果判断

检测：取处理好的样本 0.5ml，离心片刻，垂直插入试纸条，插入深度不超过样品垫，在样本中停留约 15 分钟后观察结果。

结果判断如下：检测线有红线出现为阴性，无红线出现为阳性，若质控线有红线出现说明试纸条有效，若质控线无红线出现说明试纸条无效。

实验例二：

乳胶颗粒或明胶颗粒免疫层析检测黄曲霉毒素试纸的制备并用于检测玉米样品

本实验例分为 5 部分：(1) 待检样品的处理；(2) 硝酸纤维素膜的制备；(3) 胶体金结合物垫的制备；(4) 试纸条的组装；(5) 检测和结果判断

(1) 待检样品的处理：

将被检测的玉米样品粉碎为 20 目并取 20 克粉末放入 25-60 毫升的抽提液（每 100 毫升含 60 毫升甲醇，40 毫升蒸馏水，4 克氯化钠）经充分混合 5 分钟，再静置 10-20 分钟后轻轻吸取上清液，按 1:3 的比例与样品缓冲液（PBS+0.5%BSA）混合，混合液用于测定。必要时可用滤纸过滤上清液，取滤过的样品进行测定。

(2) 硝酸纤维素膜的制备：

将硝酸纤维素膜按 20-30mm 宽的尺寸剪裁。将经纯化浓度调整为 0.1-1.0mg/ml 的无毒体系（噬菌体），在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 15-18mm。将经纯化浓度调整为 0.2-1.5mg/ml 的相应驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体，在膜上线状点样作为质控线，质控线点样位置离膜底边 11-13mm。硝酸纤维素膜室温干燥 30min，置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min，取出吸干水分，于 37 孵育 30min，置室温下干燥处密封储藏。

(3) 乳胶结合物垫的制备：

彩色乳胶颗粒购自 Bangs Laboratories 公司，明胶颗粒购自 Zodolabs 公司，颜色为兰色。用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将乳胶颗粒或明胶颗粒稀释到 1% 浓度，分别取 50ml，搅拌下将乳胶溶液和不同株的抗 A，抗 B 和抗 H 单克隆抗体混合，室温搅拌 30 分钟后于 37℃水浴孵化 60 分钟，4℃放置 4-5 小时。15000rpm 离心 30 分钟，用 2ml 磷酸盐缓冲液重悬。将标记乳胶颗粒或明胶颗粒的抗体混合并分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装：

① 在底板上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜；② 在底板上加上胶体金结合物垫；③ 在底板上加上样品垫；④ 在底板上加上吸水垫；组装为检测试纸条。

(5) 检测和结果判断

检测：取处理好的样本 0.5ml，离心片刻，垂直插入试纸条，插入深度不超过样品垫，在样本中停留约 15 分钟后观察结果。

结果判断如下：检测线有兰色线出现为阴性，无兰色线出现为阳性，若质控线有兰色线出现说明试纸条有效，若质控线无兰色线出现说明试纸条无效。

实验例三：

胶体硒免疫层析检测黄曲霉毒素试纸的制备并用于检测玉米样品

本实验例分为 5 部分：(1) 待检样品的处理；(2) 硝酸纤维素膜的制备；(3) 胶体金结合物垫的制备；(4) 试纸条的组装；(5) 检测和结果判断

(1) 待检样品的处理：

将被检测的玉米样品粉碎为 20 目并取 20 克粉末放入 25-60 毫升的抽提液（每 100 毫升含 60 毫升甲醇，40 毫升蒸馏水，4 克氯化钠）经充分混合 5 分钟，再静置 10-20 分钟后轻轻吸取上清液，按 1:3 的比例与样品缓冲液（PBS+0.5%BSA）混合，混合液用于测定。必要时可用滤纸过滤上清液，取滤过的样品进行测定。

(2) 硝酸纤维素膜的制备：

将硝酸纤维素膜按 20-30mm 宽的尺寸剪裁。将经纯化浓度调整为 0.1-1.0mg/ml 的无毒体系（噬菌体），在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 15-18mm。将经纯化浓度调整为 0.2-1.5mg/ml 的相应驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体，在膜上线状点样作为质控线，质控线点样位置离膜底边 11-13mm。硝酸纤维素膜室温干燥 30min，置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min，取出吸干水分，于 37 孵育 30min，置室温下干燥处密封储藏。

(3) 胶体硒结合物垫的制备：

胶体硒抗体标记：抗黄曲霉毒素的单克隆抗体 20mmol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液配成 4.6mg/ml 浓度溶液，分别取 25ul 加入 25ml 硒溶胶中，室温搅拌 10 分钟后加 1%PEG8000 1ml，混匀，于 4℃以 5000rpm 离心 5 分钟，得到松软的红色沉淀，用含 0.05%NaN₃ 的磷酸盐缓冲液配成 1ml 悬液。将标记胶体硒颗粒的抗体混合并分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装：

① 在底板上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜；② 在底板上加上胶体金结合物垫；③ 在底板上加上样品垫；④ 在底板上加上吸水垫；组装为检测试纸条。

(5) 检测和结果判断

检测：取处理好的样本 0.5ml，离心片刻，垂直插入试纸条，插入深度不超过样品垫，在样本中停留约 15 分钟后观察结果。

结果判断如下：检测线有红色线出现为阴性，无红色线出现为阳性，若质控线有红色线出现说明试纸条有效，若质控线无红色线出现说明试纸条无效。

实验例四：

磁性颗粒免疫层析检测黄曲霉毒素试纸的制备并用于检测玉米样品。

本实验例分为 5 部分：(1) 待检样品的处理；(2) 硝酸纤维素膜的制备；(3) 磁性颗粒结合物垫的制备；(4) 试纸条的组装；(5) 检测和结果判断

(1) 待检样品的处理：

将被检测的玉米样品粉碎为 20 目并取 20 克粉末放入 25-60 毫升的抽提液（每 100 毫升含 60 毫升甲醇，40 毫升蒸馏水，4 克氯化钠）经充分混合 5 分钟，再静置 10-20 分钟后轻轻吸取上清液，按 1: 3 的比例与样品缓冲液（PBS+0.5%BSA）混合，混合液用于测定。必要时可用滤纸过滤上清液，取滤过的样品进行测定。

(2) 硝酸纤维素膜的制备：

将硝酸纤维素膜按 20-30mm 宽的尺寸剪裁。将经纯化浓度调整为 0.1-1.0mg/ml 的无毒体系（噬菌体），在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 15-18mm。将经纯化浓度调整为 0.2-1.5mg/ml 的相应驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体，在膜上线状点样作为质控线，质控线点样位置离膜底边 11-13mm。硝酸纤维素膜室温干燥 30min，置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min，取出吸干水分，于 37 孵育 30min，置室温下干燥处密封储藏。

(3) 磁性颗粒结合物垫的制备：

磁性颗粒购自 Bangs Laboratories 公司。用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将磁性颗粒稀释到 1%浓度，分别取 50ml，搅拌下将其和抗黄曲霉毒素的单克隆抗体混合，室温搅拌 30 分钟后于 37℃水浴孵化 60 分钟，4℃放置 4-5 小时。15000rpm 离心 30 分钟，用 2ml 磷酸盐缓冲液重悬。将标记磁性颗粒的抗体混合并分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干或烘干后密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装：

① 在底板上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜；② 在底板上加上胶体金结合物垫；③ 在底板上加上样品垫；④ 在底板上加上吸水垫；组装为检测试纸条。

(5) 检测和结果判断

检测：取处理好的样本 0.5ml，离心片刻，垂直插入试纸条，插入深度不超过样品垫，在样本中停留约 15 分钟后用磁读取仪判断结果。

结果判断如下：相应位置出现磁性增强为阴性，无磁性增强为阳性。

附图说明

图 1 为本发明一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸结构示意图。

附图标记：底板 1、样品垫 2、结合物垫 3、硝酸纤维素膜 4、吸水垫 5、

检测线 6、质控线 7。

具体实施方式

实施例 1

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸，包括底板 1，样品垫 2，示踪粒子结合物垫 3，硝酸纤维素膜 4，吸水垫 5，检测线 6，质控线 7，其中：在底板 1 上按顺序有样品垫 2，示踪粒子结合物垫 3，硝酸纤维素膜 4，吸水垫 5；示踪粒子结合物垫 3 上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体，硝酸纤维素膜 4 上还设有检测线 6 和质控线 7，检测线 6 由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成，质控线 7 由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。

检测原理：在样品垫 2 上滴加样品，如果样品中有足量的黄曲霉毒素，经层析作用移动到结合物垫 3，和示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合，当移动到检测线 6 时抗黄曲霉毒素单克隆抗体不能再与检测线 6 上的黄曲霉毒素的无毒体系抗原结合，因此检测线 6 上无颜色。多余的示踪粒子标记抗体继续向前移动到质控线 7 和质控线 7 上的驴抗小白鼠抗体结合并显色，表示检测试纸条有效。若样品中无黄曲霉毒素，则结合物垫 3 上的示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体和检测线 6 上的检测抗原结合，因此检测线 6 上显色。多余的示踪粒子标记抗体和质控线 7 上驴抗小白鼠抗体结合并显色，表示检测试纸条有效。

实施例 2

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法，包括如下步骤：待检样品的处理；硝酸纤维素膜 4 检测线 6 和质控线 7 的制备；示踪粒子结合物垫 3 的制备；组装试纸条；其特征是：硝酸纤维素膜 4 检测线 6 和质控线 7 的制备，包括如下步骤：用能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样作为检测线 6；用能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样作为质控线 7。其余同实施例 1。

实施例 3

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法，其特征是制备检测线 6 的无毒体系是这样选择的：抗黄曲霉毒素单克隆抗体 100 μ l (100 μ g/ml) 4 $^{\circ}$ C 包被过夜，3%脱脂牛奶 4 $^{\circ}$ C 封闭 2h，用 Tris-盐酸洗涤液 (TBST, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1%Tween20) 洗涤 6 次，每孔加入噬菌体肽库 100 μ l，室温下结合 1h，再用 TBST 洗涤 10 次，每孔加入洗脱液 (Gly-HCL pH2.2) 100 μ l 洗脱；中和洗脱液后留一部分作滴度测定，其余加到 20ml 接种有处于对数生长前期的 *E. coli* ER2738 的 LB 培养液中进行扩增培养，

37°C 震荡培养 4.5h 后, 4°C 10000r/min 离心 10min, 上清液加入 1/6 体积的聚乙二醇沉淀剂 (PEG/ NaCl), 4°C 沉淀过夜; 4°C 10000r/min 离心 15min, 去上清, 再用 1 ml TBST 悬浮噬菌体, 加入 1/6 体积的 PEG /NaCl 冰上孵育 60 min; 4°C 离心 15min, 去上清, 沉淀用 200 μ l TBST 悬浮; 测滴度后, 进行第二次、第三次和第四次亲和筛选; 每次加入的噬菌体量都为 2×10^{11} pfu, 包被的抗体量分别为 75、50 和 25 μ g/ml, TBST 中 Tween20 的浓度增至 0.5%, 其余步骤与第一轮筛选相同; 第 4 轮筛选后的洗脱产物经滴度测定后, 用灭菌牙签从噬菌斑的平板上挑选蓝色噬菌斑, 分别置 1 ml 接种有处于对数生长前期的 *E. coli* ER2738 的 LB 培养液中进行扩增培养、纯化; 用 ELISA 法鉴定得到的特异性结合的阳性噬菌体克隆, 并用竞争 ELISA 法筛选黄曲霉毒素的模拟表位, 挑选亲和性强, 灵敏度高的噬菌体进行扩增培养、纯化用于制备检测线 6。其余同实施例 2。

Gly-HCL pH2.2 溶液可以参考《从噬菌体展示随机肽库中淘选多肽药物》, (北京大学/政学者论文集/2002 年版/454-466 页) 提供的方法制备得到。其中 Gly 是甘氨酸的简称。

TBST 为 Tris-盐酸洗涤液的简称, Tris 为三羟甲基氨基甲烷的简称, 纽英伦生物技术(北京)有限公司可以提供 Tris-盐酸洗涤液。

E. coli ER2738 的 LB 培养液可以由友谊中联生物科技有限公司提供。

实施例 4

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法, 其特征是制备质控线 7 的抗体是这样选择的: 通过在驴体内注射小白鼠免疫球蛋白, 取其含抗体的血清并经纯化后制得的, 其分子量为 80.000 道尔顿, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现两条带, 一条是分子量为 55000 道尔顿, 另一条是分子量为 25.000 道尔顿; 将纯化后的抗体线状点样制备质控线 7。其余同实施例 2。

实施例 5

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法, 其特征是检测线 6 和质控线 7 是这样制备的: 将硝酸纤维素膜 4 按 20-30mm 宽的尺寸剪裁; 将经纯化浓度调整为 0.1-1.0mg/ml 的无毒体系(噬菌体), 在膜上线状点样作为检测线 6, 检测线 6 点样位置离膜底边 15-18mm; 将经纯化浓度调整为 0.2-1.5mg/ml 的相应驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体, 在膜上线状点样作为质控线 7, 质控线 7 点样位置离膜底边 11-13mm; 硝酸纤维素膜 4 室温干燥 30min, 置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min, 取出吸干水分, 于 37 孵育 30min, 置室温下干燥处密封储藏。其余同实施例 2。

实施例 6

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是示踪粒子结合物垫3的制备包括如下步骤:选用能与黄曲霉毒素无毒体系(噬菌体)结合的抗黄曲霉毒素单克隆抗体标记示踪粒子;把标记好的示踪粒子,分散在玻璃纤维纸上。其余同实施例2。

实施例7

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是制备示踪粒子结合物垫3的抗体是这样选择的:按Davis的方法将黄曲霉毒素—蛋白复合体(AFB₁-BSA)溶于同体积的磷酸生理盐水(PBS)和完全佐剂中,免疫BALB/C小鼠,取小鼠脾脏与SP2/0小鼠骨髓细胞融合,融合细胞在选择性培养液中培养7~14d,采用间接竞争ELISA方法筛选分泌抗体的杂交细胞株,杂交细胞株进行三次克隆化,产生的克隆细胞株一部分液氮冻存,一部分注入小鼠腹腔产生腹水,经纯化后得到的单克隆抗体用于标记示踪粒子。其余同实施例6。

实施例8

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是制备示踪粒子结合物垫3的示踪粒子为如下一种:① 胶体金颗粒;② 乳胶颗粒;③ 胶体硒颗粒;④ 明胶颗粒;⑤ 磁性颗粒。其余同实施例6。

实施例9

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备方法,其特征是组装试纸条,步骤如下:在底板1上加上有检测线6和质控线7的硝酸纤维素膜4;在底板1上加上示踪粒子结合物垫3;在底板1上加上样品垫2;在底板1上加上吸水垫5;将粘贴了硝酸纤维素膜4、结合物垫、样品垫2和吸水垫5的底板1用切刀剪成3-5mm宽,组装为试纸条。

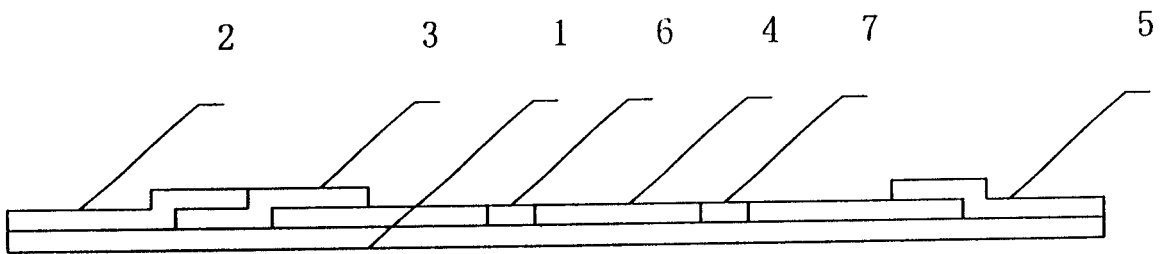


图 1

专利名称(译)	无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN1687784A	公开(公告)日	2005-10-26
申请号	CN200510018602.0	申请日	2005-04-23
[标]发明人	赖卫华 熊勇华 陈高明 李林 曾祥敏		
发明人	赖卫华 熊勇华 陈高明 李林 曾祥敏		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/544 G01N33/531 G01N21/00		
代理人(译)	杨志宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸及其制备方法，它包括底板，样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫，检测线，质控线，其中：在底板上按顺序有样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫；示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成，质控线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。本发明生产过程中不需要黄曲霉毒素，避免了二次污染；检测过程无需黄曲霉毒素标品作为指示，而直接通过颜色判断结果；所耗费用低；灵敏度高；操作简便、快捷。

