



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111272996 A

(43)申请公布日 2020.06.12

(21)申请号 201811481805.7

(22)申请日 2018.12.05

(71)申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市河西区大沽南路1038号

(72)发明人 张燕 沙志聪 生威 刘冰

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事务所(普通合伙) 12219

代理人 张勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种同时检测黄曲霉毒素B1和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明提供了一种同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条,包括作为支撑体的PVC背板1以及固定在支撑体上的固定层,固定层从检测端开始依次为样品垫5、结合垫4、层析垫2、吸水垫3;所述层析垫2上设有质控线6、检测线一7以及检测线二8,质控线6位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物,检测线一7位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物和黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗原的混合物,检测线二8位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物和赭曲霉毒素A抗原的混合物。本发明还公开了这种试纸条的制备方法。本发明具有简便、快速、灵敏度高、特异性好等特点,同时具有检测结果信号与待测物浓度呈正相关现象和能同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A两种物质的优点,创新性的针对了食品安全多残留污染问题,为食品安全提供了一种多残留检测方法。

1. 一种同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条，包括作为支撑体的PVC背板以及固定在支撑体上的的固定层，固定层从检测端开始依次为样品垫、结合垫、层析垫、吸水垫，其特征在于，先将层析垫固定在PVC背板上，再将吸水垫与层析垫有5mm的重合后固定在PVC背板上，然后结合垫一半长度与层析垫重合，另一半固定在PVC背板上，最后将样品垫与固定在PVC背板上的结合垫完全重合后固定在PVC背板上。

2. 根据权利要求1所述的一种同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条，其特征在于，所述的层析垫上设有质控线、检测线一以及检测线二，质控线位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物，检测线一位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物和黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗原的混合物，检测线二位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物和赭曲霉毒素A抗原的混合物，在层析垫上，以距离样品垫由近到远依次为检测线二、检测线一和质控线，分别作为试纸条的T2线、T1线和C线。

3. 根据权利要求1所述的一种同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条，其特征在于，所述的样品垫和结合垫均为玻璃纤维素膜，层析垫为硝酸纤维素膜，PVC背板为聚氯乙烯材料。

4. 根据权利要求1所述的一种同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条，其特征在于，用于同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A。

5. 根据权利要求1所述的一种同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

- (1) 纯化分别含有黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A抗体的血清，得到两种多克隆抗体；
- (2) 采用活化酯法制备两种物质的抗原；
- (3) 采用活化酯法制备量子点-鸡卵白蛋白结合物；
- (4) 用(1)的两种抗体分别与胶体金连接，制备得到两种物质的胶体金-抗体结合物；
- (5) 将适量步骤(3)制得的量子点-鸡卵白蛋白结合物，适量步骤(3)制得的量子点-鸡卵白蛋白结合物与适量步骤(2)制得的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗原混合物，适量步骤(3)制得的量子点-鸡卵白蛋白结合物与适量步骤(2)制得的赭曲霉毒素A抗原混合物，分别包被在试纸条C、T1、T2位置处；
- (6) 各取适量步骤(4)制得的胶体金-抗体结合物，与样品稀释液混合后上样；
- (7) 将PVC背板、层析垫、吸水垫、结合垫、样品垫按顺序组装，制备得到所述试纸条。

## 一种同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种同时快速检测谷物中的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的方法,特别是一种检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 黄曲霉毒素是在20世纪60年代初近10万只火鸡突然发生中毒死亡事件中被发现和确定,它是由黄曲霉和寄生曲霉所产生的次生代谢物。黄曲霉毒素是迄今发现毒性最强的一类生物毒素,其毒性是氰化钾的10倍,是砒霜的68倍,是三聚氰胺的416倍。黄曲霉毒素具有致畸、致癌致突变,其中最大的毒性就是致癌性,可引起机体发生原发性肝癌,肝脏是主要的靶器官,1993年被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为一类致癌物。在全球范围内,尤其是热带和亚热带地区,由于高温高湿环境,有利于黄曲霉菌的生长,占3/4的人口与黄曲霉毒素污染有直接或间接关系。就我国而言,黄曲霉毒素污染与总体分布情况是,南方严重,中部次之,北方较轻,东北、西北寒冷地区污染很少。黄曲霉菌在适宜的温湿条件下生长较快,生命力旺盛,易存活,污染也较为普遍,主要污染农作物如小麦、玉米、水稻、谷物等,油料作物如花生、大豆等,其中污染最为严重的是花生与玉米,给我国农业、畜牧业、食用油加工业带来极大危害。黄曲霉毒素B<sub>1</sub>是黄曲霉毒素中最为常见的一种,在天然污染的食品中存在范围大污染最为严重,对人类和动物危害最大,而且其毒性也最强,故在食品卫生监督中常以黄曲霉毒素B<sub>1</sub>作为黄曲霉毒素的污染指标。

[0003] 赭曲霉毒素是黄曲霉毒素后又一个引起全世界广泛关注的霉菌毒素。赭曲霉毒素是由曲霉属和青霉属的某些真菌产生的次级代谢产物。在赭曲霉毒素中赭曲霉毒素A的毒性和危害性最强,对人类和动物威胁最大,成为研究的主要目标。赭曲霉毒素A对人类和动物具有损伤肝肾器官功能,致畸致癌致突变和抑制免疫系统的影响。赭曲霉毒素A的污染不仅出现在谷物及其制品、豆类及其制品、酒类、坚果及籽类和饮料类等物质中,研究表明,赭曲霉毒素A的污染还出现在动物饲料里面,当动物摄食赭曲霉毒素A污染的饲料后,因代谢困难导致赭曲霉毒素A在体内蓄积,对动物的肝肾、肌肉和血液产生毒害作用。赭曲霉毒素A对食品污染而造成对人类健康的威胁,许多国家和地区制定了严格的赭曲霉毒素A限量标准。世界卫生组织规定:人类每天赭曲霉毒素A的最大摄入量不得超过16ng/kg。欧盟对于赭曲霉毒素A在谷物、谷物产品、可溶咖啡(速溶咖啡)、烤制咖啡、葡萄酒和葡萄汁、小麦蛋白中的最大残留限量分别是5μg/kg、3μg/kg、10μg/kg、5μg/kg、2μg/kg、8μg/kg,我国对于赭曲霉毒素A在谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、葡萄酒、烘焙咖啡豆、研磨咖啡(烘焙咖啡)、速溶咖啡中的最大残留限量分别是5μg/kg、5μg/kg、5μg/kg、2μg/kg、5μg/kg、5μg/kg、10μg/kg。

[0004] 量子点又名无机半导体纳米晶体是近年来发展起来的一种新型荧光纳米材料,它是由II-IV族(如CdSe、CdTe、CdS、ZnSe等)或III-V族(InP、InAs)元素组成的纳米颗粒。相较

于传统的荧光染料,量子点具有优良的荧光性能,激发光谱宽而发射光谱窄、斯托克位移较大且量子点合成时尺寸可调节等各种优点。量子点的荧光强度比传统染料高100倍左右,且光化学稳定性好用于标记探针时可提高方法的灵敏度。此外量子点具有优良的生物兼容性,其表面经过化学修饰后可与抗体、核酸等大分子连接且连接后不改变其生物性质。

[0005] 免疫层析技术是结合了抗原抗体特异性反应的免疫技术和因流动相中各组分与固定相的结合能力不同而分离的色谱层析技术发展形成的一种快速检测技术。层析过程中,添加结合了标记物的抗体或者抗原的待测液为流动相,在毛细管的作用下,与固定相上的抗原或者抗体特异性结合而聚集,最终根据呈现出的可以观察到的信号进行结果分析。免疫层析技术在胶体金标记免疫层析试纸条中应用最为广泛,依据检测物质的不同可以分为两种方式:双抗夹心法和间接竞争法。胶体金标记免疫层析试纸条在检测小分子物质的时候采用间接竞争法,其原理是以硝酸纤维素膜为固相层析载体,分别包被上二抗和抗原作为试纸条的质控线和检测线,通过毛细作用使待测液在硝酸纤维素膜上向上进行层析,同时使得金标垫上的金标抗体随待测液一同向上层析,待测液中的待测物与硝酸纤维素膜上的抗原竞争结合金标抗体,多余的金标抗体及其复合物继续向上进行层析,然后与硝酸纤维素膜上的二抗结合,最后根据试纸条的质控线和检测线进行结果判断。

[0006] 荧光共振能量转移是指处于激发态的供体通过分子之间电偶极的相互作用,以无辐射的能量跃迁形式,将能量转移给受体的过程。此过程的发生同供体与受体之间的距离,供体发射光谱与受体吸收光谱的重叠程度,以及供体与受体之间跃迁偶极矩的相对取向等因素相关。依据竞争抑制免疫层析原理和荧光共振能量转移原理,建立量子点荧光猝灭免疫层析试纸条方法。将硝酸纤维素膜、吸水垫、结合垫和样品垫依次粘贴在PVC背板上,将量子点标记的蛋白和量子点标记的蛋白同包被抗原的混合物分别包被在硝酸纤维素膜上依次作为试纸条的质控线和检测线,将胶体金标记的抗体与待测液混合后上样,根据试纸条质控线和检测线的荧光强度进行结果判断。当待测液中不含有有害物时,胶体金标记的抗体与试纸条检测线处包被抗原结合,当胶体金与量子点间的距离足够小时,量子点荧光发生猝灭现象,试纸条质控线和检测线分别呈现出荧光条带和猝灭条带;当待测液中有害物浓度较大时,有害物与试纸条检测线处包被抗原竞争结合胶体金标记的抗体,试纸条检测线结合胶体金标记的抗体减少,试纸条质控线不变,试纸条呈现出质控线荧光条带不变,检测线荧光条带逐渐出现,当有害物浓度继续增大时,此时试纸条检测线荧光条带完全出现,有害物质浓度再增加时,试纸条质控线和检测线保持荧光强度不变。

[0007] 目前大多数检测方法是针对食品中单一真菌毒素,但是,食品通常会受到多种真菌毒素的污染,因此,需要设计一些多残留检测的方法。

## 发明内容

[0008] 有鉴于此,本发明创造旨在提出一种同时检测谷物中黃曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的多残留量子点荧光猝灭免疫层析试纸条。

[0009] 为达到上述目的,本发明创造的技术方案是这样实现的:

[0010] 一种同时检测黃曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条,包括作为支撑体的PVC背板以及固定在支撑体上的的固定层,固定层从检测端开始依次为样品垫、结合垫、层析垫、吸水垫;所述层析垫上设有质控线、检测线一、检测线二,质控线位

置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物,检测线一位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物和黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗原的混合物,检测线二位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物和赭曲霉毒素A抗原的混合物。

[0011] 本发明还公开了上述量子点荧光猝灭免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0012] 1. 赭曲霉毒素A(黄曲霉毒素B<sub>1</sub>)血清的纯化

[0013] 本实验使用Protein A-Sepharose 4B纯化柱对兔血清进行纯化,具体步骤如下:

[0014] (1) 冲洗管路:用PB以5mL/min的速度冲洗管路,冲洗20min直至基线平衡;

[0015] (2) 平衡纯柱子:安装纯化柱后,将流速降为1mL/min,继续使用PB冲洗管路直至基线平衡,然后再冲洗30min。

[0016] (3) 上样:用PB稀释抗血清后上样,冲至基线平衡且30min内不发生变化。

[0017] (4) 洗脱:用甘氨酸-盐酸缓冲液冲洗柱子,保持流速不变,当峰值出现时,开始接收被洗脱下来的IgG抗体,并监测其在280nm处的吸光度值。

[0018] (5) 收集:收集A:280>0.2时的抗体溶液,用Tris缓冲液调节pH至中性。

[0019] (6) 封闭纯化柱:用醋酸溶液,流速5mL/min,冲洗柱子5min后,继续使用PB来平衡纯化柱,直至管路末端流出液体pH呈中性,再用乙醇溶液冲洗,直至充满整个管路,取下纯化柱,4℃冰箱保存。

[0020] (7) 抗体透析:将收集的抗体放于透析袋后,在4℃下用PB透析抗体三天。

[0021] (8) 抗体保存:纯化后所得黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A多克隆抗体于-20℃冰箱保存。

[0022] 2. 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗原的制备

[0023] 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>包被抗原采用活化酯法合成,具体步骤如下:

[0024] (1) 称取5mg黄曲霉毒素B<sub>1</sub>固体于棕色玻璃瓶中,加入5mL甲醇吡啶水溶液使其充分溶解,然后再加入5mg羧甲基羟胺半盐酸盐,在60℃条件下回流反应3h,常温放置过夜。将过夜反应后的溶液进行真空干燥,得到黄色产物,为黄曲霉毒素B<sub>1</sub>肟化物。将上述黄色产物溶于3mL二氯甲烷,在0℃条件下加入NHS、DCC、DMAP,搅拌反应过夜。然后过滤除掉副产物环己基脲,将过滤后的溶液进行真空干燥,得到固体产物。

[0025] (2) 将上述固体产物溶于0.3mL DMF,称取15mg OVA溶于预冷的磷酸氢二钾溶液,将半抗原溶液逐滴加入到OVA溶液中,4℃搅拌过夜,磷酸盐缓冲液PBS透析三天,透析结束分装后,置于-20℃保存。

[0026] 3. 赭曲霉毒素A抗原的制备

[0027] 赭曲霉毒素A包被抗原采用活化酯法合成,具体步骤如下:

[0028] (1) 称取1.0mg OTA于棕色玻璃中,用200μL无水四氢呋喃溶解。

[0029] (2) 按照OTA:NHS:EDC=1:2:4的比例,称取NHS、EDC加入到上述OTA溶液中,待完全溶解后,室温搅拌反应24h。

[0030] (3) 离心后取上清液并用氮气吹干,将得到的活化物复溶于DMF。

[0031] (4) 称取5mg鸡蛋卵清白蛋白溶于2mL磷酸盐缓冲液PBS,待完全溶解后置于磁力搅拌器上,在冰浴条件下将活化酯溶液缓慢滴加到蛋白溶液中,加入时应少量多次均匀滴加。

[0032] (5) 活化酯溶液全部加入到蛋白溶液后,将混合液转移至4℃冰箱,搅拌反应过夜。

[0033] (6) 用磷酸缓冲液PB透析72h除去多余未连接上的OTA半抗原,透析结束后置于-20℃保存。

[0034] 4. 量子点-鸡卵白蛋白偶联物的制备

[0035] 采用活化酯法将羧基水溶性量子点与OVA进行偶联,具体方法如下:

[0036] (1) 将25μL量子点加入到1.5mL进口安道管中。

[0037] (2) 加入6μL活化剂(EDC),搅拌均匀。

[0038] (3) 加入30μL OVA溶液,搅拌均匀,然后用硼酸盐缓冲液将混合液总体积补充至200μL。

[0039] (4) 将安道管避光固定在摇床上,260rpm室温反应3h。

[0040] (5) 将产物溶液在4℃,10000rpm条件下离心3min,除去量子点的团聚物,得到量子点和OVA反应的初步产物。

[0041] (6) 将初步产物用超滤离心管浓缩至100μL。

[0042] (7) 用尺寸排阻柱将产物纯化,除去未与量子点偶联的过量的OVA,收集产物约300μL即为量子点OVA偶联物。

[0043] (8) 将产物4℃避光保存。

[0044] 5. 胶体金-赭曲霉毒素A抗体标记物的制备

[0045] 胶体金-抗体(AuNPs-Ab)的制备方法:

[0046] (1) 用移液器吸取1mL胶体金溶液、适量K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,适量抗体到进口1.5mL离心管中,再混合均匀后,避光置于4℃冰箱,反应1h。

[0047] (2) 加入BSA溶液和PEG 20000溶液分别用来封闭胶体金和稳定金标抗体,反应30min。

[0048] (3) 在4℃2000rpm条件下离心15min,除去未与抗体连接的胶体金,离心后取上清液。

[0049] (4) 在4℃10000rpm条件下离心30min,得到固体物(金标抗体)。

[0050] (5) 用金标工作液复溶(4)得到的固体物,避光置于4℃冰箱保存。

[0051] 6. 胶体金-黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗体标记物的制备

[0052] 胶体金-抗体(AuNPs-Ab)的制备方法:

[0053] (1) 用移液器吸取1mL胶体金溶液、适量K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,适量抗体到进口1.5mL离心管中,再混合均匀后,避光置于4℃冰箱,反应1h。

[0054] (2) 加入BSA溶液和PEG 20000溶液分别用来封闭胶体金和稳定金标抗体,反应30min。

[0055] (3) 在4℃2000rpm条件下离心15min,除去未与抗体连接的胶体金,离心后取上清液。

[0056] (4) 在4℃10000rpm条件下离心30min,得到固体物(金标抗体)。

[0057] (5) 用金标工作液复溶(4)得到的固体物,避光置于4℃冰箱保存。

[0058] 7. 试纸条的组装

[0059] (1) 把硝酸纤维素膜粘贴在PVC背板对应位置处。

[0060] (2) 使用双维往复划膜仪分别将稀释16倍的量子点-鸡卵白蛋白偶联物、稀释8倍的量子点-鸡卵白蛋白与黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗原等体积混合物、稀释8倍的量子点-鸡卵白蛋白

与赭曲霉毒素A抗原等体积混合物包被在硝酸纤维素膜上,分别作为试纸条的C线、T1线、T2线。

[0061] (3) 放于37℃恒温培养箱中孵育6-8小时。

[0062] (4) 将吸水垫、结合垫、样品垫依次粘贴在PVC背板上,得到半成品试纸条。

[0063] (5) 用微电脑自动斩切机将半成品试纸条切成宽度为3.7mm的试纸条。

[0064] (6) 然后将其放入试纸条塑料壳中,组装成正品试纸条。

#### [0065] 8. 试纸条的使用

[0066] (1) 将待测样品进行前处理后,得到样品上清液,作为备用液。

[0067] (2) 将适量胶体金-黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗体偶联物和适量胶体金-赭曲霉毒素A抗体偶联物添加到待测样品前处理所得液体中,混合液总体积大约100μL。

[0068] (3) 将混合液滴加到试纸条样品垫处,10min后,观察检测信号进行结果判定。

[0069] (4) 当试纸条C线荧光信号适中T线荧光猝灭信号不变时,说明待测样品为阴性样品。当试纸条C线荧光信号适中T线荧光猝灭信号减弱时,说明待测样品为阴性样品。当试纸条C线荧光信号适中T线荧光猝灭信号减弱到刚刚出现荧光信号时,说明待测样品为阳性样品。当试纸条C线荧光信号适中T线荧光猝灭信号变成荧光信号且逐渐增强时,说明待测样品为阳性样品。当试纸条C线荧光信号弱或者消失时,说明此试纸条为无效试纸条,需重新检测再进行判断。

[0070] 9. 上述量子点购于武汉珈源量子点技术开发有限公司;硝酸纤维素膜购于美国Millipore公司;PVC背板、吸水垫、结合垫、样品垫均购于上海金标生物科技公司。

[0071] 本发明纯化了黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A抗体血清,制备了黄曲霉毒素B<sub>1</sub>包被原和赭曲霉毒素A抗原,制备了量子点-鸡卵白蛋白偶联物、胶体金-黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗体偶联物以及胶体金-赭曲霉毒素A抗体偶联物,得到了样品前处理方法、试纸条组装方法以及结果判定方式。

[0072] 本发明建立的用于同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条检测方法,该方法不需要大型仪器、不需要专业人员就能进行检测操作,检测成本低。基于免疫反应的特异性,检测结果准确、灵敏度高。将荧光猝灭现象与免疫层析试纸条结合,使得污染物的浓度与可视化信号呈现正向相关的结果判定,提高了检测方法的灵敏度。用于同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A提高了检测效率,创新性的针对了食品安全多残留污染问题。

#### 附图说明

[0073] 构成本发明创造的一部分的附图用来提供对本发明创造的进一步理解,本发明创造的示意性实施例及其说明用于解释本发明创造,并不构成对本发明创造的不当限定。

[0074] 图1为本发明检测试纸条的组装示意图。

[0075] 图2为黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A检测限的确定(黄曲霉毒素B<sub>1</sub>浓度从左到右依次为0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0μg/L,赭曲霉毒素A浓度从左到右依次为0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0μg/L)

[0076] 图3为玉米样品(阴性)中添加了黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A标品的样品检测结果(黄曲霉毒素B<sub>1</sub>浓度从左到右依次为0、2、3、6μg/kg,赭曲霉毒素A浓度从左到右依次为0、

1、1.5、3 $\mu$ g/kg)

[0077] 附图1标记说明：

[0078] 1.PVC背板

[0079] 2.层析垫

[0080] 3.吸水垫

[0081] 4.结合垫

[0082] 5.样品垫

[0083] 6.质控线

[0084] 7.检测线T1

[0085] 8.检测线T2

[0086] 9.样品液添加方向

[0087] 10.样品液层析方向

## 具体实施方式

[0088] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明创造中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0089] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明创造。

[0090] 实施例1(制备实施例)

[0091] (一) 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(赭曲霉毒素A) 血清的纯化

[0092] 本实验使用Protein A-Sepharose 4B纯化柱对兔血清进行纯化,具体步骤如下:

[0093] (1) 冲洗管路:用PB(Binding buffer,0.02mol/L,pH 7.0)以5mL/min的速度冲洗管路,冲洗20min直至基线平衡;

[0094] (2) 平衡纯柱子:安装纯化柱后,将流速降为1mL/min,继续使用PB冲洗管路直至基线平衡,然后再冲洗30min。

[0095] (3) 上样:用PB 1倍稀释抗血清后上样,冲至基线平衡且30min内不发生变化。

[0096] (4) 洗脱:用甘氨酸-盐酸缓冲液(Elution buffer,0.1mol/L,pH 2.7)冲洗柱子,保持流速不变,当峰值出现时,开始接收被洗脱下来的IgG抗体,并监测其在280nm处的吸光度值。

[0097] 收集:收集A:280>0.2时的抗体溶液,用Tris缓冲液(1mol/L)调节pH至中性。

[0098] (5) 封闭纯化柱:用醋酸溶液(1mol/L),流速5mL/min,冲洗柱子5min后,继续使用PB(Binding buffer,0.02mol/L,pH 7.0)来平衡纯化柱,直至管路末端流出液体pH呈中性,再用乙醇溶液(20%)冲洗,直至充满整个管路,取下纯化柱,4℃冰箱保存。

[0099] (6) 抗体透析:将收集的抗体放于透析袋后,在4℃下用PB透析抗体三天。

[0100] (7) 抗体浓度计算:透析结束后,测定抗体在280nm处的吸光度值,通过公式(一)

$$[0101] \text{抗体浓度 (mg/mL)} = \frac{A - A_0}{1.35} \times 20$$

[0102] 可计算抗体浓度:

[0103] 公式(一)

[0104] 其中:A<sub>0</sub>:空白对照的吸光度值;

[0105] A:抗体蛋白在280nm的吸光度值;

[0106] 1.35:蛋白系数。

[0107] (8) 抗体保存:纯化后所得AFB<sub>1</sub>和OTA多克隆抗体,分装标明名称、浓度、日期后,-20℃冰箱保存。

[0108] (二) 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗原的制备

[0109] 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>包被抗原采用活化酯法合成,具体步骤如下:

[0110] (1) 称取5mg黄曲霉毒素B<sub>1</sub>固体于棕色玻璃瓶中,加入5mL甲醇吡啶水溶液(甲醇:吡啶:水=4:1:1)使其充分溶解,然后再加入5mg羧甲基羟胺半盐酸盐,在60℃条件下回流反应3h,常温放置过夜。将过夜反应后的溶液进行真空干燥,得到黄色产物,即为黄曲霉毒素B<sub>1</sub>肟化物(AFB<sub>1</sub>oxime)。将上述黄色产物溶于3mL预冷的除水二氯甲烷,在0℃条件下加入2.7mg NHS,4.8mg DCC,2.5mg DMAP,搅拌反应过夜。然后过滤除掉副产物环己基脲,将过滤后的溶液进行真空干燥,得到固体产物。

[0111] (2) 将上述固体产物溶于0.3mL DMF,称取15mg OVA溶于预冷的磷酸氢二钾溶液(0.05mol/L, pH 9.1),将半抗原溶液5μL/min加入到OVA溶液中(有机溶剂最终含量不超过10%),4℃搅拌过夜,PBS透析三天,透析结束分装后,置于-20℃保存。

[0112] (三) 赭曲霉毒素A抗原的制备

[0113] 赭曲霉毒素A包被抗原采用活化酯法合成,具体步骤如下:

[0114] (1) 称取1.0mg OTA于棕色玻璃中,用200μL无水四氢呋喃溶解。

[0115] (2) 按照OTA:NHS:EDC=1:2:4的比例,称取0.57mg NHS、1.89mg EDC加入到上述OTA溶液中,待完全溶解后,室温搅拌反应24h。

[0116] (3) 10000r/min离心后取上清液并用氮气吹干,将得到的活化物复溶于300μL DMF。

[0117] (4) 称取5mg鸡蛋卵清白蛋白溶于2mL磷酸盐缓冲液PBS(0.1mol/L, pH 7.4),待完全溶解后置于磁力搅拌器上,在冰浴条件下将活化酯溶液缓慢滴加到蛋白溶液中,加入时应5μL/min滴加。

[0118] (5) 活化酯溶液全部加入到蛋白溶液后,将混合液转移至4℃冰箱,搅拌反应过夜。

[0119] (6) 用磷酸缓冲液PB(0.1mol/L, pH 7.4)透析72h除去多余未连接上的OTA半抗原,透析结束后置于-20℃保存。

[0120] 实施例2(制备实施例)

[0121] 多残留量子点荧光淬灭免疫层析试纸条的组装及制备方法

[0122] (一) 量子点-鸡卵白蛋白偶联物的制备

[0123] 采用活化酯法将羧基水溶性量子点与OVA进行偶联,具体方法如下:

[0124] (1) 将25μL量子点加入到1.5mL进口安道管中。

[0125] (2) 加入6μL活化剂EDC(用硼酸盐缓冲液(0.2mol/L, pH 7.4)配制浓度为10mg/mL,现用现配),搅拌均匀。

[0126] (3) 加入30μL 10mg/mL的OVA溶液,搅拌均匀,然后用硼酸盐缓冲液(0.2mol/L, pH 8.3)将混合液总体积补充至200μL。

[0127] (4) 将安道管避光固定在摇床上,260rpm室温反应3h。

[0128] (5) 将产物溶液在4℃,10000rpm条件下离心3min,除去量子点的团聚物,得到量子

点和OVA反应的初步产物。

[0129] (6) 将初步产物用超滤离心管浓缩至100 $\mu$ L (4℃ 8000rpm离心5min)。

[0130] (7) 用尺寸排阻柱将产物纯化,除去未与量子点偶联的过量的OVA,收集产物约300 $\mu$ L即为量子点OVA偶联物。

[0131] (8) 将产物4℃避光保存。

[0132] (二) 胶体金-黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗体标记物的制备

[0133] 胶体金-抗体(AuNPs-Ab)的制备方法:

[0134] (1) 用移液器吸取1mL胶体金溶液、5 $\mu$ L 0.2mol/L的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,20 $\mu$ L 1.33mg/mL的抗体到进口1.5mL离心管中,再混合均匀后,避光置于4℃冰箱,反应1h。

[0135] (2) 加入20%BSA溶液和10%PEG 20000溶液分别用来封闭胶体金和稳定金标抗体,反应30min。

[0136] (3) 在4℃2000rpm条件下离心15min,除去未与抗体连接的胶体金,离心后取上清液。

[0137] (4) 在4℃10000rpm条件下离心30min,得到固体物(金标抗体)。

[0138] (5) 用50 $\mu$ L金标工作液复溶(4)得到的固体物,避光置于4℃冰箱保存。

[0139] (三) 胶体金-赭曲霉毒素A抗体标记物的制备

[0140] 胶体金-抗体(AuNPs-Ab)的制备方法:

[0141] (1) 用移液器吸取1mL胶体金溶液、5 $\mu$ L 0.2mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,10 $\mu$ L 2.0mg/mL的抗体到进口1.5mL离心管中,再混合均匀后,避光置于4℃冰箱,反应1h。

[0142] (2) 加入20%BSA溶液和10%PEG 20000溶液分别用来封闭胶体金和稳定金标抗体,反应30min。

[0143] (3) 在4℃2000rpm条件下离心15min,除去未与抗体连接的胶体金,离心后取上清液。

[0144] (4) 在4℃10000rpm条件下离心30min,得到固体物(金标抗体)。

[0145] (5) 用50 $\mu$ L金标工作液复溶(4)得到的固体物,避光置于4℃冰箱保存。

[0146] (四) 试纸条的组装

[0147] (1) 把硝酸纤维素膜粘贴在PVC背板对应位置处。

[0148] (2) 使用双维往复划膜仪以1 $\mu$ L/cm分别将稀释16倍的量子点-鸡卵白蛋白偶联物、稀释8倍的量子点-鸡卵白蛋白与稀释8倍的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗原等体积混合物、稀释8倍的量子点-鸡卵白蛋白与稀释4倍的赭曲霉毒素A抗原等体积混合物包被在硝酸纤维素膜上,分别作为试纸条的C线、T1线、T2线。

[0149] (3) 放于37℃恒温培养箱中孵育8小时。

[0150] (4) 将吸水垫、结合垫、样品垫依次粘贴在PVC背板上,得到半成品试纸条。

[0151] (5) 用微电脑自动斩切机将半成品试纸条切成宽度为3.7mm的试纸条。

[0152] (6) 然后将其放入试纸条塑料壳中,组装成正品试纸条。

[0153] 实施例3(应用实施例)

[0154] 量子点标记免疫层析试纸条使用方法

[0155] (1) 将待测玉米样品用粉碎机粉碎后,准确称取5.0g玉米于15mL离心管中,加入5mL 70%甲醇样品提取液,涡旋震荡提取10min,然后10000rpm 10min离心取上清液,上清

液稀释15倍后作备用样品液。

[0156] (2) 将3 $\mu$ L胶体金-黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗体偶联物和2 $\mu$ L胶体金-赭曲霉毒素A抗体偶联物添加到95 $\mu$ L 1所得的备用样品液中,混合液总体积为100 $\mu$ L。将混合液滴加到试纸条样品垫处,10min后,观察检测信号进行结果判定。

[0157] (3) 当试纸条C线荧光信号适中T线荧光猝灭信号不变时,说明待测样品为阴性样品。当试纸条C线荧光信号适中T线荧光猝灭信号减弱时,说明待测样品为阴性样品。当试纸条C线荧光信号适中T线荧光猝灭信号减弱到刚刚出现荧光信号时,说明待测样品为阳性样品。当试纸条C线荧光信号适中T线荧光猝灭信号变成荧光信号且逐渐增强时,说明待测样品为阳性样品。当试纸条C线荧光信号弱或者消失时,说明此试纸条为无效试纸条,需重新检测再进行判断。

[0158] 实施例4(应用实施例)

[0159] 本发明的应用效果举例

[0160] 本实施例中所指的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条检测方法参照实施例3所述的操作步骤,其检测结果如下。

[0161] 1. 灵敏度试验

[0162] 将上样缓冲液配制成一系列浓度的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、赭曲霉毒素A混合标准品溶液,上样后,根据试纸条结果进行判断。

[0163] 由图2可知,当用上样缓冲液上样后,试纸条C线荧光强度适中,试纸条T1、T2线荧光条带完全猝灭,试纸条无背景干扰;当用黄曲霉毒素B<sub>1</sub>浓度为0.2 $\mu$ g/L赭曲霉毒素A浓度为0.1 $\mu$ g/L的混合标准品上样缓冲液上样后,试纸条C线荧光强度适中,试纸条T1、T2线荧光条带刚刚出现;随着混合标准品上样缓冲液中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、赭曲霉毒素A浓度的增大,试纸条C线荧光强度适中且稳定一致,试纸条T1、T2线荧光强度先增大后保持不变。确定多残留量子点荧光猝灭免疫层析试纸条同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A时的检测限分别为0.2 $\mu$ g/L和0.1 $\mu$ g/L。

[0164] 2. 加标样品的检测

[0165] 将玉米阴性样品,和用玉米阴性样品添加黄曲霉毒素B<sub>1</sub>标准品和赭曲霉毒素A标准品制备成含有黄曲霉毒素B<sub>1</sub>标准品和赭曲霉毒素A标准品分别为2、1 $\mu$ g/kg,3、1.5 $\mu$ g/kg,6、3 $\mu$ g/kg的玉米样品,前处理上样后,根据试纸条T线荧光条带刚刚出现时对应的样品中最小黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、赭曲霉毒素A浓度即为多残留量子点荧光猝灭免疫层析试纸条检测限。

[0166] 由图3可知,多残留量子点荧光猝灭免疫层析试纸条检测玉米样品时,随着样品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、赭曲霉毒素A浓度的增加,试纸条C线荧光条带稳定一致,试纸条T1、T2线荧光条带逐渐出现,当样品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>浓度为3 $\mu$ g/kg赭曲霉毒素A浓度为1.5 $\mu$ g/kg时,试纸条T1、T2线荧光条带刚刚出现,确定多残留量子点荧光猝灭免疫层析试纸条在玉米样品中的检测限为黄曲霉毒素B<sub>1</sub> 3 $\mu$ g/kg赭曲霉毒素A 1.5 $\mu$ g/kg。

[0167] 实验表明本发明的试纸条准确性好、灵敏度高,而且样品前处理方法简单,整个检测过程不超过10min,适用于大量样品的快速筛选,可作为黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A的同时快速多残留检测的有效筛选手段。

[0168] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造

的保护范围之内。

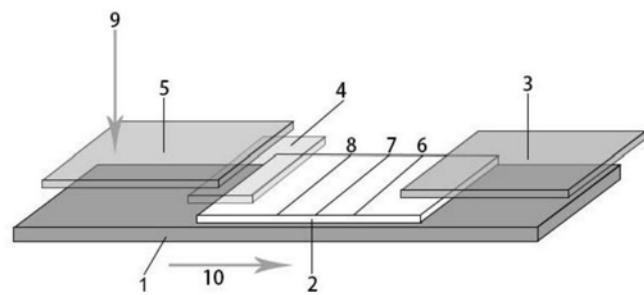


图1



图2



图3

专利名称(译)	一种同时检测黄曲霉毒素B1和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN111272996A</a>	公开(公告)日	2020-06-12
申请号	CN201811481805.7	申请日	2018-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	张燕 生威 刘冰		
发明人	张燕 沙志聪 生威 刘冰		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/58		
代理人(译)	张勇		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

本发明提供了一种同时检测黄曲霉毒素B1和赭曲霉毒素A的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条，包括作为支撑体的PVC背板1以及固定在支撑体上的固定层，固定层从检测端开始依次为样品垫5、结合垫4、层析垫2、吸水垫3；所述层析垫2上设有质控线6、检测线一7以及检测线二8，质控线6位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物，检测线一7位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物和黄曲霉毒素B1抗原的混合物，检测线二8位置处为量子点-鸡卵白蛋白结合物和赭曲霉毒素A抗原的混合物。本发明还公开了这种试纸条的制备方法。本发明具有简便、快速、灵敏度高、特异性好等特点，同时具有检测结果信号与待测物浓度呈正相关现象和能同时检测黄曲霉毒素B1和赭曲霉毒素A两种物质的优点，创新性的针对了食品安全多残留污染问题，为食品安全提供了一种多残留检测方法。

$$\text{抗体浓度 (mg/mL)} = \frac{A - A_0}{1.35} \times 20$$