



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105067811 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510434577. 8

(22) 申请日 2015. 07. 22

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 王战辉 沈建忠 张素霞 吴超

温凯 江海洋 李成龙

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 张立娜

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品。该产品由试纸条和经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体组成；所述试纸条由依次连接并固定于底板上的样品垫、设有检测线和质控线的层析膜，以及吸水垫组成；所述检测线和所述质控线相互分离；所述检测线处包被有 T-2 毒素与载体蛋白的偶联物；所述质控线处包被有二抗，所述二抗为抗所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的抗体；所述检测线位于所述层析膜靠近所述样品垫的一端；所述质控线位于所述层析膜靠近所述吸水垫的一端。本发明具有操作简便，设备简易便宜，不需专业人员操作等优势；与胶体金免疫层析试纸条相比，本发明能够通过荧光读数仪进行定量检测，能够有效提高免疫层析检测方法的灵敏度。

1. 基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品, 为 A 或 B:

A、由试纸条和经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体组成;

所述试纸条由依次连接并固定于底板上的样品垫、设有检测线和质控线的层析膜, 以及吸水垫组成;

所述检测线和所述质控线相互分离;

所述检测线处包被有 T-2 毒素半抗原与载体蛋白的偶联物;

所述质控线处包被有二抗, 所述二抗为抗所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的抗体;

所述检测线位于所述层析膜靠近所述样品垫的一端;

所述质控线位于所述层析膜靠近所述吸水垫的一端;

B、由含有所述试纸条的试剂盒和所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体组成;

所述试剂盒由所述试纸条和与所述试纸条扣合且符合如下条件的盖板组成: 所述盖板上具有与所述样品垫对应的加样窗口, 以及与所述检测线和所述质控线对应的显示窗口。

2. 根据权利要求 1 所述的产品, 其特征在于: 所述荧光微球标记的 T-2 毒素抗体为将待标记的 T-2 毒素抗体和所述荧光微球以酰胺键共价结合形成的聚合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的产品, 其特征在于: 所述荧光微球为表面修饰有羧基官能团, 内部包埋有荧光物质的纳米粒子, 直径为 200nm; 或

所述 T-2 毒素抗体为 T-2 毒素单克隆抗体。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的产品, 其特征在于: 所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体按照包括如下步骤的方法制备: 将所述 T-2 毒素抗体和所述荧光微球以 $6\mu\text{g}:0.4\text{mg}$ 的比例进行反应得到以酰胺键共价结合形成的荧光微球与 T-2 毒素抗体的偶联物。

5. 根据权利要求 4 所述的产品, 其特征在于: 所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的制备方法中, 所述反应为: 将所述 T-2 毒素抗体和所述荧光微球以 $6\mu\text{g}:0.4\text{mg}$ 的比例加入到标记缓冲液中, $20-25^{\circ}\text{C}$ 避光振荡 15min; 加入偶联活化剂 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺, $20-25^{\circ}\text{C}$ 避光振荡反应 2h; 接着加入牛血清白蛋白溶液 $20-25^{\circ}\text{C}$ 避光振荡 15min; 离心, 所得沉淀用复溶液复溶; 再离心, 所得沉淀中即含有所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体;

所述标记缓冲液的 pH 值为 6.5, 溶质为吗啉乙磺酸, 溶剂为水; 所述吗啉乙磺酸在所述标记缓冲液中的浓度为 0.05M;

所述牛血清白蛋白溶液的溶剂为水, 溶质为牛血清白蛋白; 所述牛血清白蛋白在所述牛血清白蛋白溶液中的浓度为 200g/L;

所述复溶液的溶剂为 0.02M 磷酸缓冲液, 溶质为牛血清白蛋白、葡聚糖和聚乙二醇 20000; 所述牛血清白蛋白在所述复溶液中的浓度为 10g/L, 所述葡聚糖在所述复溶液中的浓度为 20g/L, 所述聚乙二醇 20000 在所述复溶液中的浓度为 1g/L; 所述 0.02M 磷酸缓冲液的组成如下: 每 1L 所述 0.02M 磷酸缓冲液中含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.37g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.78g, 余量为水。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的产品, 其特征在于: 所述产品按照权利要求 7 所述方法制备。

7. 制备权利要求 1-5 中任一所述产品的方法, 包括分别制备权利要求 1-5 中任一所述

产品中的所述试纸条和所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的步骤；

制备所述试纸条的方法包括：

(a) 制备所述样品垫：将聚酯纤维膜浸泡在样品垫处理溶液中，1h 后取出晾干，即得所述样品垫；

所述样品垫处理溶液为含有 200g/L 聚乙烯吡咯烷酮的 0.5M 磷酸盐缓冲溶液；所述聚乙烯吡咯烷酮的分子量为 30000；所述 0.5M 磷酸缓冲液的组成如下：每 1L 所述 0.5M 磷酸缓冲液中含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 145.0g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14.8g, 余量为水；

(b) 制备所述层析膜：将所述 T-2 毒素半抗原与载体蛋白的偶联物以 0.8mg/mL 的浓度包被于硝酸纤维素膜得到所述检测线，将所述二抗以 1.0mg/mL 的浓度包被于所述硝酸纤维素膜上与所述检测线相互分离的区域，得到所述质控线，具有所述检测线和所述质控线的所述硝酸纤维素膜即为所述层析膜；

(c) 试纸条的制备：以 PVC 胶粘板作底板，将所述样品垫、所述层析膜和所述吸水垫依次连接并固定于所述底板上，使所述层析膜上的所述检测线靠近所述样品垫一端、所述质控线靠近所述吸水垫一端，即得到所述试纸条；

制备所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的方法为权利要求 4 或 5 中所述的制备所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的方法。

8. 权利要求 1-5 中任一所述的产品在检测 T-2 毒素中的应用。

9. 一种检测或辅助检测待测样品中是否含有 T-2 毒素的方法，包括：

(a1) 将待测样品与权利要求 1-5 任一所述产品中的所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体混合后加入到所述试纸条的所述样品垫，反应 10-15min；

(a2) 根据所述试纸条的反应结果，按照如下确定所述待测样品中是否含有 T-2 毒素：若所述检测线与所述质控线均显示荧光，且所述检测线的荧光强度不低于所述质控线的荧光强度，则所述待测样品中不含有 T-2 毒素或候选不含有 T-2 毒素；若所述检测线不显示荧光且所述质控线显示荧光，或所述检测线与所述质控线均显示荧光但所述检测线的荧光强度低于所述质控线的荧光强度，则所述待测样品中含有 T-2 毒素或候选含有 T-2 毒素。

10. 一种检测待测样品中 T-2 毒素含量的方法，包括：

(b1) 绘制标准曲线：配制系列浓度的 T-2 毒素的标准品溶液，将所得的若干份含有不同浓度的 T-2 毒素的标准品溶液分别与权利要求 1-5 任一所述产品中的所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体混合，得到若干份混合液；取若干个所述产品中的所述试纸条检测所述若干份混合液，每一个所述试纸条检测一份所述混合液，所述检测为：将所述混合液加入到所述试纸条的所述样品垫，反应 10-15min；用荧光读数仪读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度；以所述 T-2 毒素的标准品的浓度或其对数为横坐标，以所述检测线的荧光强度值为纵坐标，绘制标准曲线图，得到标准曲线方程；

(b2) 待测样品检测：将所述待测样品与所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体混合后加入到未使用过的所述试纸条的所述样品垫，反应 10-15min；用荧光读数仪读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度，将所述检测线的荧光强度值代入步骤 (b1) 所得标准曲线方程，计算得到所述待测样品中的 T-2 毒素的浓度值。

基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域,涉及一种基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品及其制备方法。

背景技术

[0002] T-2 毒素是由多种镰刀菌(三线镰刀菌为主)产生的一种 A 类单端孢霉烯族倍半萜烯类霉菌毒素。该毒素广泛污染小麦、大麦、玉米等谷物及其制品,可通过食物链的富集作用和体内蓄积作用,最终对动物和人类健康造成潜在威胁。文献显示,T-2 毒素已在全球范围内广泛出现,在我国谷物中的检出率达 80%。T-2 毒素具有较强的毒性,研究表明,其毒素能够引起人和动物多个系统的毒性效应。包括抑制蛋白质、DNA、和 RNA 的合成,诱导细胞凋亡,引起白细胞减少,造成血液毒性和免疫损伤等。人畜误食被大量毒素污染的谷物或饲料后,会引发多种急慢性中毒。表现为,呕吐、腹泻食道病变、造血组织严重损伤、神经机能障碍和免疫抑制等。目前,已有多个国家制定了 T-2 毒素的残留限量标准。在我国,由于监测标准的缺乏,国内未能形成健全的 T-2 毒素安全性评价方案,仅有 GB21693-2008《配合饲料中 T-2 毒素的允许量》中规定猪配合饲料和禽配合饲料中 T-2 毒素的允许量 $\leq 1\text{mg/kg}$ 。

[0003] 国内外有关 T-2 的检测方法有液相色谱法、气相色谱法和色谱联用法等仪器分析方法。这类仪器分析方法准确、稳定、灵敏,但耗时、设备昂贵,前处理方法繁琐,需要专业人员操作,不适用实际生产生活中。此外,快捷简便且灵敏的免疫检测技术是目前市场上应用最广泛的,主要有酶联免疫吸附法、免疫层析法等。相比较而言,免疫层析方法简单快速,结果直观,且不需要专业分析人员,特别适合现场监测。

[0004] 荧光微球是指将荧光团通过包埋、共价键连接等方式引入有机或无机纳米粒子中,并让纳米粒子承担有机小分子荧光染料的检测、标记等功能,具有相对稳定的形态结构以及发光行为。在荧光染料标记技术的基础上,建立起荧光微球标记层析检测技术,兼具 ELISA 和胶体金试纸条的快速、稳定、操作简便等优点。同时与胶体金免疫层析技术相比,又具有其自身优点:(1) 而荧光微球层析技术由于使用的示踪物为荧光微球,在激发光的照射下存在一个信号放大的过程,所以其灵敏度较胶体金试纸条要高;(3) 荧光微球检测试纸条能够通过荧光读数仪进行定量检测,能够有效提高免疫层析检测的灵敏度。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品。

[0006] 本发明所提供的基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品,可为如下 A 或 B:

[0007] A、由试纸条和经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体组成;

[0008] 所述试纸条由依次连接并固定于底板上的样品垫、设有检测线和质控线的层析膜,以及吸水垫组成;

- [0009] 所述检测线和所述质控线相互分离；
- [0010] 所述检测线处包被有 T-2 毒素半抗原与载体蛋白的偶联物；
- [0011] 所述质控线处包被有二抗,所述二抗为抗所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的抗体；
- [0012] 所述检测线位于所述层析膜靠近所述样品垫的一端；
- [0013] 所述质控线位于所述层析膜靠近所述吸水垫的一端；
- [0014] B、由含有 A 中所述试纸条的试剂盒和所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体组成；
- [0015] 所述试剂盒由所述试纸条和与所述试纸条扣合且符合如下条件的盖板组成:所述盖板上具有与所述样品垫对应的加样窗口,以及与所述检测线和所述质控线对应的显示窗口。
- [0016] 在所述产品中,“所述 T-2 毒素与载体蛋白的偶联物”中的“所述 T-2 毒素半抗原”具体可为 3- 琥珀酰 -T-2 ;“所述载体蛋白”具体可为卵清蛋白 (ovalbumin, OVA)。
- [0017] 在本发明中,由 3- 琥珀酰 -T-2 和卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 形成偶联物的偶联比为 10.8 :1 (卵清蛋白 :3- 琥珀酰 -T-2 的物质的量比)。
- [0018] 该偶联物具体是按照包括如下步骤的方法制备获得的：
- [0019] a) 按照如下制备半抗原 3- 琥珀酰 -T-2 (3-HS-T-2) :a1) 将 T-2 毒素溶于吡啶,加入琥珀酸酐并置于沸水浴中搅拌反应 4h,后蒸干吡啶;其中,所述 T-2 毒素、所述吡啶和所述琥珀酸酐的配比为 10mg :0.4mL :210mg ;a2) 向步骤 a1) 的残渣中加入氯仿复溶,再用去离子水洗涤,去除杂质,保留氯仿层,洗涤过程重复 4 次;其中,所述氯仿的用量与步骤 a1) 中所述 T-2 毒素的用量配比为 5mL :10mg ;a3) 将步骤 a2) 中的溶液蒸干,即得所述半抗原 3- 琥珀酰 -T-2。
- [0020] b) 按照如下制备包被原 (3-HS-T-2-OVA) :b1) 向步骤 a) 制备的所述半抗原 3- 琥珀酰 -T-2 中加入 DMF,震荡溶解,得到 A 液;其中,所述 DMF 的用量与步骤 a1) 中所述 T-2 毒素的用量配比为 1mL :10mg ;将卵清蛋白 (OVA) 和 1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) - 碳二亚胺 (EDC) 溶于磷酸盐缓冲液中,得到 B 液;其中,所述卵清蛋白 (OVA)、所述 1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) - 碳二亚胺 (EDC) 和所述磷酸盐缓冲液的配比为 25mg :15mg :5mL ;所述磷酸盐缓冲液的溶剂为水,溶质及浓度如下: KH_2PO_4 0.27g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.86g/L, KCl 0.2g/L, NaCl 8.8g/L ;b2) 将所述 A 液和所述 B 液混匀,室温 (20-25℃) 搅拌过夜 (12-16h) ;b3) 将步骤 2) 的反应液装入半透膜中,在所述磷酸盐缓冲液中透析 3 天,每天更换 3 次透析液,获得所述包被原。
- [0021] 当然所述卵清蛋白可以替换为其他载体蛋白,只要确保所述偶联物具有对 T-2 毒素的抗原性即可。
- [0022] 在所述产品中,所述荧光微球标记的 T-2 毒素抗体为将待标记的 T-2 毒素抗体和所述荧光微球以酰胺键共价结合形成的聚合物。
- [0023] 其中,所述荧光微球为表面修饰有羧基官能团,内部包埋有荧光物质的纳米粒子,直径为 200nm,其变异系数为 5% ;所述荧光微球的最大激发和发射波长分别为 580nm 和 605nm。
- [0024] 在本发明的一个实施例中,所述荧光微球具体是以含有所述荧光微球的悬浊液的形式呈现的,其固体含量为 2%,即每 1mL 所述悬浊液中含有所述荧光微球 0.02g,余量为超

纯水。更加具体的,所述荧光微球为 Thermo Fisher Scientific Inc. 产品,其产品目录号为 F-8887。

[0025] 所述 T-2 毒素抗体既可为 T-2 毒素单克隆抗体也可为 T-2 毒素多克隆抗体。在本发明的一个实施例中,所述 T-2 毒素抗体为 T-2 毒素单克隆抗体,具体为鼠源 T-2 毒素单克隆抗体,具体为北京维德维康生物技术有限公司产品,其产品目录号为 T-2-3D1-F1。相应的,所述二抗为抗鼠 IgG 的抗体,具体为羊抗鼠 IgG 的多克隆抗体,具体为北京维德维康生物技术有限公司产品。

[0026] 所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体按照包括如下步骤的方法制备:将所述 T-2 毒素抗体和所述荧光微球以 $6\mu\text{g}:20\mu\text{L}$ (相当于 0.4mg 荧光微球) 的比例进行反应得到以酰胺键共价结合形成的荧光微球与 T-2 毒素抗体的偶联物。

[0027] 在所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的制备方法中,所述反应具体为:将所述 T-2 毒素抗体和所述荧光微球以 $6\mu\text{g}:20\mu\text{L}$ (相当于 0.4mg 荧光微球) 的比例加入到标记缓冲液中,室温 (20-25℃) 避光振荡 15min;加入偶联活化剂 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC),室温 (20-25℃) 避光振荡反应 2h;接着加入牛血清白蛋白溶液室温 (20-25℃) 避光振荡 15min;离心,所得沉淀用复溶液复溶;再离心,所得沉淀中即含有所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体。

[0028] 所述标记缓冲液的 pH 值为 6.5,溶质为吗啉乙磺酸,溶剂为水;所述吗啉乙磺酸在所述标记缓冲液中的浓度为 0.05M。

[0029] 所述牛血清白蛋白溶液的溶剂为水,溶质为牛血清白蛋白;所述牛血清白蛋白在所述牛血清白蛋白溶液 100mL 中的含量为 20g。

[0030] 所述复溶液的溶剂为 0.02M 磷酸缓冲液,溶质为牛血清白蛋白、葡聚糖 (Dextran40000) 和聚乙二醇 (PEG 20000);所述牛血清白蛋白在所述复溶液中的浓度为 10g/L,所述 Dextran 40000 在所述复溶液中的浓度为 20g/L,所述 PEG 20000 在所述复溶液中的浓度为 1g/L。所述 0.02M 磷酸缓冲液的组成如下:每 1L 所述 0.02M 磷酸缓冲液中含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.37g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.78g,余量为水。

[0031] 其中,所述 T-2 毒素抗体与所述标记缓冲液的使用配比为 $6\mu\text{g}:1\text{mL}$ 。所述偶联活化剂 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) 用量为 0.4mg/20 μL 所述荧光微球 (相当于 0.4mg 荧光微球)。所述牛血清白蛋白溶液的用量为 20 μL /20 μL 所述荧光微球 (相当于 0.4mg 荧光微球)。所述离心的转速为 12857g,时间为 10min。所述离心的次数为 2 次。

[0032] 在本发明的一个实施例中,具体是按照包括如下步骤的方法制备获得所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的:将 $6\mu\text{g}$ 所述 T-2 毒素抗体和 20 μL 所述荧光微球 (固体含量为 2%,相当于 0.4mg 荧光微球) 加入到所述标记缓冲液中,室温 (20-25℃) 避光振荡 15min;加入 0.4mg 偶联活化剂 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC),室温 (20-25℃) 避光振荡反应 2h;接着加入 20 μL 所述牛血清白蛋白溶液,室温 (20-25℃) 避光振荡 15min;12857g 离心 10min,所得沉淀用所述复溶液复溶;再 12857g 离心 10min,所得沉淀中即含有所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体。

[0033] 在本发明中,所述样品垫的材质为聚酯纤维膜;所述层析膜的材质为硝酸纤维素膜;所述吸水垫的材质为植物纤维吸滤纸;所述底板的材质为 PVC 胶粘板。

[0034] 上述基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品可按照如下所述方法制备。

[0035] 本发明所提供的基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品的制备方法,包括分别制备所述产品中的所述试纸条和所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的步骤。

[0036] 制备所述试纸条的方法包括:

[0037] (a) 制备所述样品垫:将聚酯纤维膜浸泡在样品垫处理溶液中,1h 后取出晾干,即得所述样品垫;所述样品垫处理溶液为含有 20% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 的 0.5M 磷酸缓冲溶液。其中,所用聚乙烯吡咯烷酮,其分子量约为 30000;所述 20% 聚乙烯吡咯烷酮是指 100mL 缓冲溶液中含有 20g 的聚乙烯吡咯烷酮。所述 0.5M 磷酸缓冲溶液的组成如下:每 1L 所述 0.5M 磷酸缓冲溶液中含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 145.0g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14.8g,余量为水。

[0038] (b) 制备所述层析膜:将所述 T-2 毒素半抗原与载体蛋白的偶联物以 0.8mg/mL 的浓度包被于硝酸纤维素膜得到所述检测线,将所述二抗以 1.0mg/mL 的浓度包被于所述硝酸纤维素膜上与所述检测线相互分离的区域,得到所述质控线,具有所述检测线和所述质控线的所述硝酸纤维素膜即为所述层析膜;所述质控线与所述检测线两者平行且间距 4mm。

[0039] 其中,进行所述包被时采用的包被液为 0.02M 磷酸盐缓冲液,所述 0.02M 磷酸缓冲液的组成如下:每 1L 所述 0.02M 磷酸缓冲液中含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.37g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.78g,余量为水。所述检测线和所述质控线可通过采用划膜仪喷涂获得;获得所述检测线时,浓度为 0.8mg/mL 的所述 T-2 毒素与载体蛋白的偶联物的喷涂量为 $0.8 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 硝酸纤维素膜;获得所述质控线时,浓度为 1.0mg/mL 的所述二抗的喷涂量为 $0.9 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 硝酸纤维素膜。

[0040] (c) 试纸条的制备:以 PVC 胶粘板作底板,将所述样品垫、所述层析膜和所述吸水垫依次连接并固定于所述底板上,使所述层析膜上的所述检测线靠近所述样品垫一端、所述质控线靠近所述吸水垫一端(所述样品垫、所述吸水垫分别与所述层析膜交联一段,如交联约 1mm),即得到所述试纸条;

[0041] 制备所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的方法为上文所述的制备所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的方法。

[0042] 所述基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品在检测 T-2 毒素中的应用也属于本发明的保护范围。

[0043] 其中,所述检测 T-2 毒素既可为定性检测也可为定量检测。

[0044] 本发明的另一个目的是提供一种检测或辅助检测待测样品中是否含有 T-2 毒素的方法。

[0045] 本发明所提供的检测或辅助检测待测样品中是否含有 T-2 毒素的方法,具体可包括:

[0046] (a1) 将待测样品与所述产品中的所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体混合后加入到所述试纸条的所述样品垫,反应 10-15min;其后还可包括烘干的步骤。

[0047] (a2) 根据所述试纸条的反应结果,按照如下确定所述待测样品中是否含有 T-2 毒素:若所述检测线与所述质控线均显示荧光,且所述检测线的荧光强度不低于所述质控线的荧光强度,则所述待测样品中不含有 T-2 毒素或候选不含有 T-2 毒素;若所述检测线不显示荧光且所述质控线显示荧光,或所述检测线与所述质控线均显示荧光但所述检测线的荧

- 光强度低于所述质控线的荧光强度,则所述待测样品中含有 T-2 毒素或候选含有 T-2 毒素。
- [0048] 在所述方法中,所述待测样品为液体食品或固体食品的提取液,可含 T-2 毒素,也可不含 T-2 毒素。
- [0049] 本发明的再一个目的是提供一种检测待测样品中 T-2 毒素含量的方法。
- [0050] 本发明所提供的检测待测样品中 T-2 毒素含量的方法,具体可包括:
- [0051] (b1) 绘制标准曲线:配制系列浓度的 T-2 毒素的标准品溶液,将所得的若干份含有不同浓度的 T-2 毒素的标准品溶液分别与所述产品中的所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体混合,得到若干份混合液;取同一批次的若干个所述产品中的所述试纸条检测所述若干份混合液,每一个所述试纸条检测一份所述混合液,所述检测为:将所述混合液加入到所述试纸条的所述样品垫,反应 10-15min;烘干后用荧光读数仪读取(根据所采用的荧光微球的激发和发射波长选择读取荧光强度时使用的激发和发射波长,如采用最大激发和发射波长分别为 580nm 和 605nm 的荧光微球时,选取在激发和发射波长分别为 580nm 和 605nm 下读取数据)所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度;以所述 T-2 毒素的标准品的浓度或其对数为横坐标,以所述检测线的荧光强度值为纵坐标(横坐标和纵坐标可以互换,互换后仍属于本发明的保护范围),绘制标准曲线图,得到标准曲线方程;所述质控线的荧光强度值用来判定试纸条是否有效。
- [0052] 在本发明中,所述系列浓度的 T-2 毒素的标准品溶液的浓度由小到大依次具体为 0.3ng/mL、0.625ng/mL、1.25ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL 和 40ng/mL。
- [0053] (b2) 待测样品检测:将所述待测样品与所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体混合后加入到未使用过的所述试纸条(与步骤(b1)中的所述试纸条同一批次)的所述样品垫,反应 10-15min;烘干后用荧光读数仪读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度,将所述检测线的荧光强度值代入步骤(b1)所得标准曲线方程,计算得到所述待测样品中的 T-2 毒素的浓度值。
- [0054] 在所述方法中,所述待测样品为含有 T-2 毒素的液体食品或固体食品的提取液。
- [0055] 在上述两个检测方法中,将所述待测样品(或所述 T-2 毒素的标准品溶液)与所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体混合时,所述待测样品(或所述 T-2 毒素的标准品溶液)与所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的溶液的配比为 120 μ L:2 μ L;其中所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的溶液中,所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的浓度为 6 μ g/mL(以单克隆抗体的量计)。
- [0056] 在上述两个检测方法中,若所述待测样品为固体食品,如谷物(具体如大米、小麦、玉米)时,是按照包括如下步骤的方法获得所述提取液的:称取 1g 所述谷物,粉碎后加入离心管中,加入 2mL 20%(体积分数)甲醇溶液(溶剂为水),涡旋 3min,4000rpm 离心 10min,取上清,用样品稀释液稀释 2 倍。其中,所述样品稀释液的组成如下:每 1L 所述样品稀释液中含有 KH_2PO_4 0.27g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.86g, KCl 0.2g, NaCl 8.8g, 余量为水。
- [0057] 与现有技术相比,本发明具有明显价值。本发明所述的荧光微球检测试纸条与传统检测 T-2 毒素的液相色谱法、气相色谱法、色谱联用法和酶联免疫吸附法相比,具有操作简便,设备简易便宜,不需要专业人员操作等优势;与胶体金免疫层析试纸条相比,本发明能够通过荧光读数仪进行定量检测,能够有效提高免疫层析检测方法的灵敏度。

附图说明

[0058] 图 1 为 T-2 毒素荧光微球检测试纸条的结构示意图。其中,1 为样品垫,2 为层析膜,3 为底板,4 为吸水垫,5 为检测线,6 为质控线。

[0059] 图 2 为 T-2 毒素荧光微球检测试纸条的检测结果,肉眼判定示意图。

[0060] 图 3 为 T-2 毒素荧光微球检测试纸条的检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0061] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0062] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0063] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0064] 荧光微球:Thermo Fisher Scientific Inc. 产品,其产品目录号为 F-8887。该荧光微球表面修饰有大量羧基官能团,内部包埋有荧光物质的纳米粒子,直径为 200nm,其变异系数为 5%;所用荧光微球为悬浊液,其固体含量为 2%,即,即每 1mL 所述悬浊液中含有所述荧光微球 0.02g,余量为超纯水;所述荧光微球,其最大激发和发射波长分别为 580nm 和 605nm。

[0065] 鼠源 T-2 毒素单克隆抗体:北京维德维康生物技术有限公司产品,其产品目录号为 T-2-3D1-F1。

[0066] 羊抗鼠 IgG 抗体:羊抗鼠 IgG 的多克隆抗体,北京维德维康生物技术有限公司产品。

[0067] T-2 毒素的标准品:Pribolab(Singapore)Pte.Ltd 产品,其产品目录号为 MSS1023。

[0068] 实施例 1、基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品的制备

[0069] 所述基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品由试纸条和经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体组成。也可以为所述试纸条配制一个与所述试纸条扣合且符合如下条件的盖板:所述盖板上具有与样品垫对应的加样窗口,以及与检测线和质控线对应的显示窗口。

[0070] 一、试纸条的制备

[0071] 1、样品垫的制备

[0072] 将整张聚酯纤维膜浸泡在样品垫处理溶液中,1h 后取出晾干,干燥保存,即得所述样品垫。

[0073] 其中,所述样品垫处理溶液为含有 200g/L 聚乙烯吡咯烷酮的 0.5M 磷酸盐缓冲溶液;所述聚乙烯吡咯烷酮的分子量为 30000;所述 0.5M 磷酸缓冲液的组成如下:每 1L 所述 0.5M 磷酸缓冲液中含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 145.0g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14.8g,余量为水。

[0074] 2、层析膜的制备

[0075] (1) 制备 T-2 毒素与卵清蛋白的偶联物

[0076] T-2 毒素与卵清蛋白(ovalbumin, OVA)的偶联物具体是按照包括如下步骤的方法制备获得的:

[0077] A. 半抗原 3-琥珀酰-T-2(3-HS-T-2)的制备

[0078] ① 10mg T-2 毒素溶于 0.4mL 吡啶,加入 210mg 琥珀酸酐并置于沸水浴中搅拌反应

4h,后蒸干吡啶;

[0079] ②向残渣中加入 5mL 氯仿复溶,再用去离子水洗涤,去除杂质,保留氯仿层,洗涤过程重复 4 次;

[0080] ③将上述溶液蒸干,即得 3-HS-T-2。

[0081] B. 包被原 3-HS-T-2-OVA 的合成

[0082] ①A 液:向上述制备的 3-HS-T-2 中加入 1mL DMF,震荡溶解,得到 A 液;

[0083] B 液:25mg OVA 和 15mg EDC 溶于 5mL 磷酸盐缓冲液(所述磷酸盐缓冲液的溶剂为水,溶质及浓度如下: KH_2PO_4 0.27g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.86g/L, KCl 0.2g/L, NaCl 8.8g/L),得到 B 液;

[0084] ②将 A 液、B 液混匀,室温 (20-25℃) 搅拌过夜;

[0085] ③将反应液装入半透膜中,在所述磷酸盐缓冲液中透析 3 天,每天更换 3 次透析液,获得包被原 3-HS-T-2-OVA,即为 T-2 毒素与卵清蛋白的偶联物。

[0086] ④对部分包被原进行 MALDI-TOF 检测,经过计算得到其偶联结合比为 10.8:1(卵清蛋白:3-HS-T-2 的物质的量比)。

[0087] (2) 制备层析膜

[0088] 将步骤 (1) 制备的 T-2 毒素与卵清蛋白蛋白的偶联物 (3-HS-T-2-OVA) 和羊抗鼠 IgG 抗体分别用包被溶液稀释成 1:5 和 1:60,得到 T-2 毒素与卵清蛋白的偶联物溶液(浓度为 0.8mg/mL) 和羊抗鼠 IgG 抗体溶液(浓度为 1.0mg/mL)。将所述 T-2 毒素与卵清蛋白的偶联物溶液按照 $0.8 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 的用量喷涂在硝酸纤维素膜上,得到检测线;将所述羊抗鼠 IgG 抗体溶液按照 $0.9 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 的用量喷涂在所述硝酸纤维素膜上,得到质控线;使得检测线和质控线两者平行且间距 4mm;烘干 (37℃, 24h),密封干燥保存。

[0089] 所述包被溶液的组成如下:每 1L 所述包被溶液中含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.37g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.78g, NaCl 29.25g,余量为水。

[0090] 3、试纸条的制备

[0091] 以 PVC 胶粘板作底板,将步骤 1 制备的样品垫、步骤 2 制备的层析膜(具有质控线和检测线)和所述吸水垫(植物纤维吸滤纸)依次连接并固定于所述底板上,使所述层析膜上的所述检测线靠近所述样品垫一端、所述质控线靠近所述吸水垫一端,所述样品垫、所述吸水垫分别与所述层析膜交联一段(约 1mm),用切条机将贴好的 PVC 板切成等宽的试纸条即可,密封干燥保存。

[0092] 图 1 为试纸条的结构示意图。

[0093] 二、荧光微球标记 T-2 毒素单克隆抗体的制备

[0094] 将 $6 \mu\text{g}$ 所述 T-2 毒素单克隆抗体和 $20 \mu\text{L}$ 所述荧光微球(直径为 200nm,变异系数为 5%;固体含量为 2%,相当于 0.4mg 荧光微球)加入到所述标记缓冲液中,室温 (20-25℃) 避光振荡 15min;加入 0.4mg 偶联活化剂 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC),室温 (20-25℃) 避光振荡反应 2h;接着加入 $20 \mu\text{L}$ 牛血清白蛋白溶液,室温 (20-25℃) 避光振荡 15min;10000rpm(12857g) 离心 10min,以 1mL 复溶液;再 10000rpm(12857g) 离心 10min,最后以 $1000 \mu\text{L}$ 所述复溶液重悬沉淀,4℃ 保存。即获得荧光微球标记 T-2 毒素单克隆抗体悬液。悬液中,荧光微球标记的 T-2 毒素单克隆抗体的浓度为 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ (以单克隆抗体的量计)。

[0095] 其中,所述标记缓冲液的溶质为吗啉乙磺酸,溶剂为水;所述吗啉乙磺酸在所述标记缓冲液中的浓度为 0.05M, pH 值为 6.5。

[0096] 所述牛血清白蛋白溶液的溶剂为水,溶质为牛血清白蛋白;所述牛血清白蛋白在所述牛血清白蛋白溶液中的浓度为 200g/L。

[0097] 所述复溶液的溶剂为 0.02M 磷酸缓冲液,溶质为牛血清白蛋白、葡聚糖和聚乙二醇 20000 (PEG 20000);所述牛血清白蛋白在所述复溶液中的浓度为 10g/L,所述葡聚糖在所述复溶液中的浓度为 20g/L,所述聚乙二醇 20000 (PEG 20000) 在所述复溶液中的浓度为 1g/L;所述 0.02M 磷酸缓冲液的组成如下:每 1L 所述 0.02M 磷酸缓冲液中含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.37g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.78g,余量为水。

[0098] 实施例 2、实施例 1 中基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品的使用方法

[0099] 一、定性检测

[0100] 1、将 120 μL 待测样品与 2 μL 实施例 1 步骤二制备获得的荧光微球标记 T-2 毒素单克隆抗体悬液(悬液中所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$),以单克隆抗体的量计)混合,得到混合液;将所述混合液加入到实施例 1 步骤一制备的所述试纸条的所述样品垫,反应 10-15min,烘干。

[0101] 2、根据所述试纸条的反应结果,按照如下确定所述待测样品中是否含有 T-2 毒素:将反应后的试纸条置于紫外灯下照射,若所述检测线与所述质控线均显示亮红色荧光(所述检测线的荧光强度不显著低于所述质控线的荧光强度),则检测结果为阴性,即认为所述待测样品中不含有 T-2 毒素或候选不含有 T-2 毒素;若所述检测线不显示红色荧光或显色微弱(所述检测线的荧光强度低于所述质控线的荧光强度),且所述质控线显示亮红色荧光,则检测结果为阳性,即认为所述待测样品中含有 T-2 毒素或候选含有 T-2 毒素。

[0102] 应用实施例 1 中基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品检测待测样品中是否含有 T-2 毒素,肉眼判定结果如图 2 所示:当待测样品中 T-2 毒素不存在时,C 线、T 线均显示亮红色,实验结果为阴性(图 2 中 a);当待测样品中 T-2 毒素含量较高时,因无足够游离的所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体与层析膜上检测线处包被的抗原(即 T-2 毒素与卵清蛋白的偶联物 3-HS-T-2-OVA)结合,检测线显色微弱或不显色,质控线显示亮红色,实验结果为阳性(图 2 中 b)。不论样品中是否含有 T-2 毒素,质控线上的二抗都与所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体结合,显示亮红色,若质控线不显色,则实验结果无效(图 2 中 c 和 d)。

[0103] 二、定量检测

[0104] 1、绘制标准曲线

[0105] 用磷酸盐缓冲液(配方如下: KH_2PO_4 0.27g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.86g, KCl 0.2g, NaCl 8.8g, 纯水定容至 1L)将浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 T-2 毒素的标准品作系列稀释:0.3ng/mL、0.625ng/mL、1.25ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL 和 40ng/mL(同时设立空白对照组)。针对每个稀释度的 T-2 毒素标准品溶液,均将 120 μL T-2 毒素标准品溶液与 2 μL 实施例 1 步骤二制备获得的荧光微球标记 T-2 毒素单克隆抗体悬液(悬液中所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$,以单克隆抗体的量计)混合,得到若干份混合液;取同一批次的若干个实施例 1 步骤一制备的试纸条用于检测所述若干份混合液,每一个所述试纸条检测一份所述混合液,所述检测为:将所述混合液加入到所述试纸条的所述样品

垫,反应 10-15min;烘干后用荧光读数仪在激发和发射波长分别为 580nm 和 605nm 下读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度;以所述 T-2 毒素的标准品的浓度为横坐标 (X),以所述检测线的荧光强度值为纵坐标 (Y),绘制标准曲线图,得到标准曲线方程。质控线的荧光强度值用来判定试纸条是否有效。

[0106] 所得的标准曲线图如图 3 所示,标准曲线方程为:

[0107] $Y = 56.02 + (434.08 - 56.02) / [1 + (x/1.58)^{1.23}]$, $R^2 = 0.97$ 。

[0108] 2、待测样品检测

[0109] 将 120 μ L T-2 毒素标准品溶液与 2 μ L 实施例 1 步骤二制备获得的荧光微球标记 T-2 毒素单克隆抗体悬液(悬液中所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的浓度为 6 μ g/mL,以单克隆抗体的量计)混合后加入到未使用过的所述试纸条(与步骤 1 中绘制标准曲线图时采用的所述试纸条同一批次)的所述样品垫,反应 10-15min;烘干后用荧光读数仪在激发和发射波长分别为 580nm 和 605nm 下读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度,将所述检测线的荧光强度值代入步骤 1 的标准曲线方程中,计算得到所述待测样品中的 T-2 毒素的浓度值。

[0110] 实施例 3、应用实施例 1 中基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品进行检测时的特异性分析

[0111] 一、定性检测

[0112] 对照样品:浓度为 20ng/mL 的 T-2 毒素标准品溶液;供试样品浓度为 20ng/mL 的其它毒素(具体是指 HT-2 毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、伏马毒素、黄曲霉毒素和赭曲霉毒素)标准品溶液。

[0113] 参照实施例 2 步骤一测定各供试样品中是否含有 T-2 毒素。实验重复测定三次。

[0114] 结果显示,只有 T-2 毒素标准品溶液的检测结果呈阳性,即“所述检测线不显示红色荧光或显色微弱(所述检测线的荧光强度低于所述质控线的荧光强度),且所述质控线显示亮红色荧光”,而其它毒素标准品的结果均呈阴性,即“所述检测线与所述质控线均显示亮红色荧光(所述检测线的荧光强度不显著低于所述质控线的荧光强度)”。所述基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品可特异性定性检测 T-2 毒素。

[0115] 二、定量检测

[0116] 1、绘制标准曲线

[0117] 用磷酸盐缓冲液(配方为 KH_2PO_4 0.27g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.86g, KCl 0.2g, NaCl 8.8g, 纯水定容至 1L)将浓度为 10 μ g/mL 的 T-2 毒素或其它毒素(具体是指 HT-2 毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、伏马毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₁和赭曲霉毒素)的标准品作系列稀释:0.3ng/mL、0.625ng/mL、1.25ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL 和 40ng/mL(同时设立空白对照组)。针对每个稀释度的标准品溶液,均将 120 μ L 的标准品溶液与 2 μ L 实施例 1 步骤二制备获得的荧光微球标记 T-2 毒素单克隆抗体悬液(其中所述经荧光微球标记的 T-2 毒素抗体的含量为 6 μ g/mL,以单克隆抗体的量计)混合,得到若干份混合液;取同一批次的若干个实施例 1 步骤一制备的试纸条用于检测所述若干份混合液,每一个所述试纸条检测一份所述混合液,所述检测为:将所述混合液加入到所述试纸条的所述样品垫,反应 10-15min;烘干后用荧光读数仪在激发和发射波长分别为 580nm 和 605nm 下读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度;以所述 T-2 毒素或其它毒素标准品的浓度为

横坐标 (X), 以所述检测线的荧光强度值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线图。

[0118] 所得的标准曲线方程为:

$$[0119] \quad Y = A + (A - D) / [1 + (X/X_0)^B]$$

[0120] 2、以 T-2 毒素所得标准曲线方程的 X_0 与其它毒素所得标准曲线方程的 X_0 的比值进行产品定量检测时的特异性分析。

[0121] 所测 T-2 毒素的 X_0 为 1.58ng/mL, 所测 HT-2 毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、伏马毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₁ 和赭曲霉毒素的 X_0 均大于 40ng/mL。由此计算可知: T-2 毒素所得标准曲线方程的 X_0 与其它毒素所得标准曲线方程的 X_0 的比值均小于 4.0%, 即交叉反应率低于 4.0%, 所述基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品可特异性定量检测 T-2 毒素。

[0122] 实施例 4、应用实施例 1 中基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品进行定量检测的应用实例

[0123] 供试样品: 取三份不含有 T-2 毒素的空白大米样品, 依次添加 T-2 毒素的标准品溶液, 使得得到三份供试样品中 T-2 毒素的浓度分别为 5 μ g/kg、10 μ g/kg 和 20 μ g/kg。

[0124] 一、从供试样品中提取待测液体

[0125] 称取 1g 供试样品, 粉碎后加入离心管中, 加入 2mL 20% (体积分数) 甲醇溶液 (溶剂为水), 涡旋 3min, 4000rpm 离心 10min, 取上清, 用样品稀释液稀释 2 倍, 即获得待测液体。

[0126] 其中, 所述样品稀释液配方如下: KH_2PO_4 0.27g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.86g, KCl 0.2g, NaCl 8.8g, 纯水定容至 1L。

[0127] 二、测定供试样品中 T-2 毒素的含量

[0128] 参照实施例 2 步骤二测定三份供试样品对应的三份待测液体中 T-2 毒素的含量, 进一步计算得到三份供试样品中 T-2 毒素的含量。实验重复测定三次, 结果取均值。

[0129] 对于 5 μ g/kg、10 μ g/kg 和 20 μ g/kg 的添加量, 实测量分别为 4.7 μ g/kg、10.1 μ g/kg 和 19.2 μ g/kg, 其变异系数分别为 5.4%、7.5% 和 9.8%, 回收率分别为 94.9%、100.8% 和 96.1%, 符合残留检测的回收率 (80-120%) 和变异系数 (<15%) 的要求。

[0130] 实施例 5、应用实施例 1 中基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品进行定量检测时的检测限测定

[0131] 取 20 份不含有 T-2 毒素的空白大米样品, 参照实施例 4 步骤一将样本进行处理, 参照实施例 2 步骤二测定 20 份供试样品对应的 20 份待测液体中 T-2 毒素的含量, 进一步计算得到 20 份供试样品中 T-2 毒素的含量。以 20 份供试样品中 T-2 毒素含量的平均值加上 3 倍的标准差为检测限。

[0132] 结果显示: 实施例 1 中基于荧光微球免疫层析法检测 T-2 毒素的产品对待测样品中 T-2 毒素的检测限为 0.23 μ g/kg。

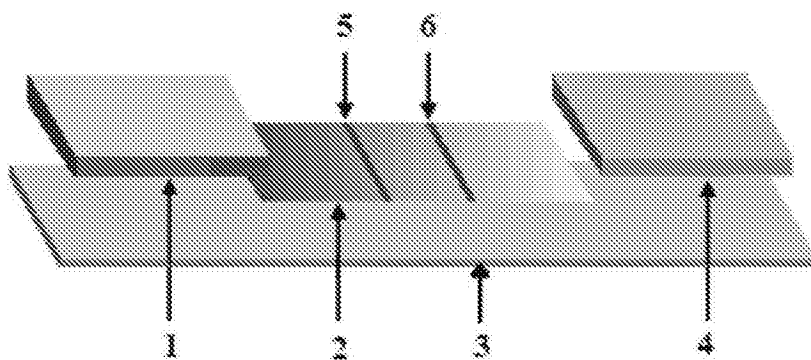


图 1

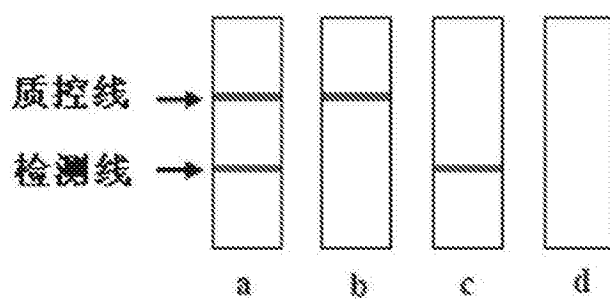


图 2

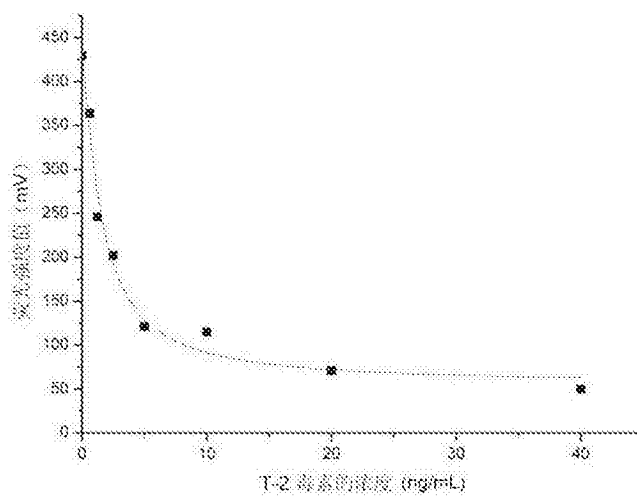


图 3

专利名称(译)	基于荧光微球免疫层析法检测T-2毒素的产品及其制备方法		
公开(公告)号	CN105067811A	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201510434577.8	申请日	2015-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 沈建忠 张素霞 吴超 温凯 江海洋 李成龙		
发明人	王战辉 沈建忠 张素霞 吴超 温凯 江海洋 李成龙		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/533		
代理人(译)	关畅 张立娜		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于荧光微球免疫层析法检测T-2毒素的产品。该产品由试纸条和经荧光微球标记的T-2毒素抗体组成；所述试纸条由依次连接并固定于底板上的样品垫、设有检测线和质控线的层析膜，以及吸水垫组成；所述检测线和所述质控线相互分离；所述检测线处包被有T-2毒素与载体蛋白的偶联物；所述质控线处包被有二抗，所述二抗为抗所述经荧光微球标记的T-2毒素抗体的抗体；所述检测线位于所述层析膜靠近所述样品垫的一端；所述质控线位于所述层析膜靠近所述吸水垫的一端。本发明具有操作简便，设备简易便宜，不需专业人员操作等优势；与胶体金免疫层析试纸条相比，本发明能够通过荧光读数仪进行定量检测，能够有效提高免疫层析检测方法的灵敏度。

