



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 204314300 U

(45) 授权公告日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201420842568. 3

(22) 申请日 2014. 12. 26

(73) 专利权人 北京康源泰博生物科技有限公司
地址 102600 北京市大兴区工业开发区科苑路 18 号

专利权人 国家粮食局科学研究院
南昌大学第二附属医院

(72) 发明人 张波 谢刚 王松雪 付晓玲
雷达 刘向阳

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

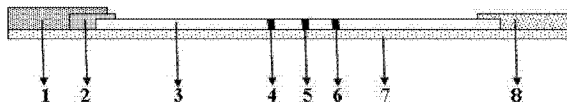
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 实用新型名称

一种同步检测赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条

(57) 摘要

本实用新型涉及一种同步检测赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条。由依次黏贴在背衬上的样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫组成。反应膜上喷有赭曲霉毒素 A—牛血清白蛋白偶联物、玉米赤霉烯酮—牛血清白蛋白偶联物和羊抗鼠抗体,作为检测线和质控线,可将反应结果以肉眼可见的颜色形式表现出来。具有操作简单、快速、灵敏度高的特点,且不需要借助其它仪器设备,适用于野外现场检测。可用于饲料、食品等样品中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮两种真菌毒素含量的同步检测。



1. 一种同步检测赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条,其特征在于:试纸条由依次黏贴在背衬上的样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫组成,且在相邻的地方有 2mm 的重叠,胶体金结合垫上喷有赭曲霉毒素 A 单克隆抗体及玉米赤霉烯酮单克隆抗体和胶体金颗粒的结合物;反应膜上从样品垫到吸水垫方向依次喷有赭曲霉毒素 A—牛血清白蛋白偶联物、玉米赤霉烯酮—牛血清白蛋白偶联物和羊抗鼠抗体,分别作为检测线和质控线。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于试纸条上的背衬为一面涂有不干胶的不吸水材料;样品垫用玻璃纤维制成;胶体金结合垫用聚酯膜或玻璃纤维素膜制成;反应膜用硝酸纤维素膜制成;吸水垫用吸水纸制成。

3. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于两条检测线和质控线呈间隔分布,相邻两条线之间的间距为 3—5mm。

4. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于所用胶体金颗粒的直径为 20—40nm。

一种同步检测赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本实用新型属于免疫层析分析检测技术领域,涉及食品安全检测相关的免疫层析检测技术,具体涉及一种同步检测赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条。

背景技术

[0002] 霉菌毒素是粮食或饲料中霉菌生长产生的次级代谢物,在粮食或饲料生产过程中,由于温度、湿度等环境因素的影响,可能为霉菌的生长繁殖提供适宜条件,从而引起霉菌毒素的污染。赭曲霉毒素和玉米赤霉烯酮是粮食饲料中常见的霉菌毒素。赭曲霉毒素(Ochratoxins)是一组结构类似的霉菌毒素,有 A、B、C、D 4 种化合物,主要危及人和动物肾脏,其中毒性最大、与人类健康关系最密切、产毒量最高、对农作物的污染最重、分布最广的是赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)。赭曲霉毒素 A 已被国际癌症研究机构(IARC)确定为 II B 类致癌物(可能引起人类癌症的物质)的一种霉菌毒素,它能致癌、致畸、致突变、破坏免疫系统,对肝、肾脏造成损害,还可导致神经中毒。玉米赤霉烯酮(Zearaleaone)是玉米赤霉菌的代谢产物,具有雌激素样作用,具有较强的生殖毒性和致畸作用,可引起动物发生雌激素亢进症,导致动物不孕或流产,对家禽、猪、牛和羊的影响较大,给畜牧业带来很大的经济损失。鉴于这两种霉菌毒素的危害作用,世界各国对粮食、饲料中这两种霉菌毒素的含量进行了严格限定。

[0003] 目前粮食、饲料中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量的检测方法主要采用薄层色谱法,免疫分析法及精密仪器分析法。薄层色谱法作为标准方法虽然被广泛使用沿用至今,虽不需要特殊的仪器设备,在一般实验室即可进行,但检测试剂用量大、操作繁琐、干扰严重、准确性差、灵敏度较低、不能准确定量,对实验人员和周围环境污染危害较大;精密仪器分析法主要有高效液相色谱法、超高效液相色谱法和液质联用法,虽然可以精确地进行定性、定量分析,但是由于其设备昂贵、操作复杂和对样品的纯度有较高的要求,需要专业的操作人员,导致检测成本高、周期长,无法满足大批量样本快速筛查的需要,难以实现快速检测。免疫分析法主要有酶联免疫分析法和胶体金免疫层析法,具有快速、灵敏、操作简单等优点,近年来获得了快速发展。然而现有用于霉菌毒素检测的免疫层析试纸条大都主要只能检测一种霉菌毒素。而受生产条件影响,我国的同一农产品受多种霉菌毒素污染的可能性大,因此迫切需要能快速、同步检测多种霉菌毒素的产品。

实用新型内容

[0004] 本实用新型针对粮食、饲料等样品中的赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量检测展开研究,提供一种具有快速、操作简单、特异性强、灵敏度高、不需要额外设备等特点,可用于现场快速同步检测赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量的胶体金免疫检测试纸条。

[0005] 试纸条应用竞争抑制免疫层析原理,通过检测区的抗原和金标垫上的金标抗体反应,以检测区是否显色来反应样品中的赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量是否超标。

[0006] 本试纸条由依次黏贴在背衬上的样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫组成。其中样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫在相邻的地方有不同程度的重叠,以保证层析作用从样品垫到吸水垫的顺利进行,使样品溶液中的有效成分、反应膜上的检测区及质控区与胶体金结合垫上的胶体金单抗偶联物顺利发生反应。

[0007] 本实用新型试纸条的各组成成分与功能如下:

[0008] 背衬:为一面涂有不干胶的不吸水材料,常用 PVC 板,用于固定试纸条其他组分;

[0009] 样品垫:用玻璃纤维制成,起吸收样品溶液,缓冲样品溶液 pH 值的作用

[0010] 胶体金结合垫:使用聚酯膜或玻璃纤维素膜制成,上有抗赭曲霉毒素 A 单抗及抗玉米赤霉烯酮单抗与胶体金的偶联物,作用为样品液中的抗原与金标抗体反应的起始场所;

[0011] 反应膜:使用硝酸纤维素膜,从样品垫到吸水垫方向依次喷有赭曲霉毒素 A—牛血清白蛋白偶联物、玉米赤霉烯酮—牛血清白蛋白偶联物和羊抗鼠抗体,分别作为检测线和质控线用于标记检测线和质控线,将反应结果以肉眼可见的颜色表现出来;

[0012] 吸水垫:由吸水纸制成,用于吸收多余的溶液使其不影响最终结果。

[0013] 本实用新型试纸条具有如下有益效果:

[0014] (1) 特异性好。本实用新型试纸条使用的是分别针对赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的单克隆抗体。

[0015] (2) 灵敏度高。本实用新型试纸条的最低检测限赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮分别为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, 满足国家标准中对粮食、饲料等样品中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的限量要求。

[0016] (3) 操作简单快速。本实用新型试剂板将实验所需的大部分原料都已整合到试纸条上,不存在试剂配制、洗涤分离等操作,滴加样品提取液后 3-5 分钟即可肉眼读取结果,且样品前处理方法简单。

附图说明

[0017] 图 1 为试纸条结构示意图。其中 1 为样品垫,2 为胶体金结合垫,3 为反应膜,4 为赭曲霉毒素 A 检测线,5 为玉米赤霉烯酮检测线,6 为质控线,7 为背衬,8 为吸水垫。

[0018] 图 2 为试纸条结果判定示意图。2-1 表示赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮都为阴性;2-2 表示赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮都为阳性;2-3 表示赭曲霉毒素 A 为阳性、玉米赤霉烯酮为阴性;2-4 表示赭曲霉毒素 A 为阴性、玉米赤霉烯酮为阳性;2-5、2-6、2-7、2-8 表示试纸条无效。

具体实施方式

[0019] 本实用新型试剂板的制备包括赭曲霉毒素 A 免疫原的制备、抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体制备、玉米赤霉烯酮免疫原的制备、抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体制备、胶体金溶液制备、胶体金标记抗赭曲霉毒素 A 单抗的制备,胶体金标记抗玉米赤霉烯酮单抗的制备,试纸条的组装。

[0020] 1、赭曲霉毒素 A 免疫原 (OTA-BSA) 制备

[0021] 1.1 称取 10mg BSA 溶解在 2ml 的 20mM pH7.4 的 PBS 溶液中,完全溶解。

[0022] 1.2 称取 1mg 赭曲霉毒素 A 溶于 0.2ml 四氢呋喃中,加入 5 mg DCC 和 4 mg NHS, 室温下反应 2 小时。

[0023] 1.3 将上述反应溶液滴加入 BSA 溶液中,室温下反应 4 小时。

[0024] 1.4 将上述反应溶液装入透析袋中,用 20mM pH7.4 PBS 溶液透析,4℃透析三天,期间每 8 小时换一次透析液。

[0025] 1.5 取出透析后的溶液,离心,取上清,-20℃保存。

[0026] 2、抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体制备

[0027] 2.1 小鼠免疫

[0028] 将制备好的赭曲霉毒素 A 免疫原,按体积比 1:1 加入佐剂混匀乳化,按蛋白浓度 100 μg/只腹部皮下多点免疫 BALB/c 小鼠,首免免疫原与弗氏完全佐剂等体积混匀,二免及以后以免疫元和弗氏不完全佐剂等体积混匀,首免 3 周后,以同样方法进行二次免疫,二免后每两 2 周免疫一次,三免后检测小鼠血清效价,血清效价合格后进行融合,融合前 3 天再追加免疫一次。

[0029] 2.2 细胞融合

[0030] 按照常规方法,准备好处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 和提取免疫小鼠的脾细胞,将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞混合,然后在 1 分钟左右时间内(最佳时间为 45 秒)缓慢加入预热的融合剂 (PEG4000) 进行融合,用 HAT 培养基悬浮均匀,再加入适量的饲养细胞,培养于 96 孔培养板,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,5 天后用 HT 培养基半换液,9 天的时候进行全换液。

[0031] 2.3 杂交瘤细胞的筛选

[0032] 细胞融合后,待细胞长到培养孔面积的 1/4 时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。采用间接非竞争 ELISA 方法初选,检测细胞培养上清液,检测为阳性的孔,立即用有限稀释法进行亚克隆化。

[0033] 2.4 杂交瘤细胞的冻存

[0034] 将进行了 2-3 次亚克隆后的杂交瘤细胞扩大培养后用含 25% 血清、10% DMSO 的基础细胞培养液冻存,浓度为 10⁶-10⁷左右 /ml。

[0035] 2.5 单克隆抗体腹水制备

[0036] 复苏冻存的杂交瘤细胞,扩大培养。取 8-10 周龄 BALB/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.5ml/只,7-10 日后腹腔注射杂交瘤细胞 1-2 × 10⁶ /只,7-10 日后抽取小鼠腹水,离心取上清,测定效价,冻存储备用。

[0037] 3、玉米赤霉烯酮免疫原 (ZEN-BSA) 制备

[0038] 3.1 称取 2 mg 玉米赤霉烯酮标品溶于 0.8ml 吡啶中,向其中加入 4 mg 的 O-羧甲基羟胺,溶解后,70℃搅拌反应 5 小时。

[0039] 3.2 将反应产物旋转蒸干,加 3ml 蒸馏水溶解,磁力搅拌下用 1mol/L NaOH 调 pH 至 8.0,用 10ml 二氯甲烷分三次抽提。用 0.2mol/L HCl 调水相 pH 至 3.0,用 6ml 乙酸乙酯分三次抽提沉淀物,置通风橱中氮吹干,所得干燥物即为玉米赤霉烯酮活化物。

[0040] 3.3 用 2ml DMF 溶解玉米赤霉烯酮活化物,加入 8 mg DCC 和 6mg NHS,室温磁力搅拌下反应 4h。称取 15mg BSA 溶解于 1.5ml 碳酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH 9.5)中,磁力搅拌下将玉米赤霉烯酮活化物溶液逐滴加入蛋白溶液中,室温下反应 5 小时。

[0041] 3.4 将上述反应溶液装入透析袋中,用 20mM pH7.4 PBS 溶液透析,4℃ 透析三天,期间每 8 小时换一次透析液。

[0042] 3.5 取出透析后的溶液,离心,取上清,-20℃ 保存。

[0043] 4、抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体制备

[0044] 4.1 小鼠免疫

[0045] 将制备好的玉米赤霉烯酮免疫原,按体积比 1:1 加入佐剂混匀乳化,按蛋白浓度 100 μg/只腹部皮下多点免疫 BALB/c 小鼠,首免免疫原与弗氏完全佐剂等体积混匀,二免及以后以免疫元和弗氏不完全佐剂等体积混匀,首免 3 周后,以同样方法进行二次免疫,二免后每两 2 周免疫一次,三免后检测小鼠血清效价,血清效价合格后进行融合,融合前 3 天再追加免疫一次。

[0046] 4.2 细胞融合

[0047] 按照常规方法,准备好处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 和提取免疫小鼠的脾细胞,将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞混合,然后在 1 分钟左右时间内(最佳时间为 45 秒)缓慢加入预热的融合剂 (PEG4000) 进行融合,用 HAT 培养基悬浮均匀,再加入适量的饲养细胞,培养于 96 孔培养板,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,5 天后用 HT 培养基半换液,9 天的时候进行全换液。

[0048] 4.3 杂交瘤细胞的筛选

[0049] 细胞融合后,待细胞长到培养孔面积的 1/4 时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。采用间接亚克隆化。

[0050] 4.4 杂交瘤细胞的冻存

[0051] 将进行了 2-3 次亚克隆后的杂交瘤细胞扩大培养后用含 25% 血清、10% DMSO 的基础细胞培养液冻存,浓度为 10⁶-10⁷ 左右 /ml。

[0052] 4.5 单克隆抗体腹水制备

[0053] 复苏冻存的杂交瘤细胞,扩大培养。取 8-10 周龄 BALB/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.5ml/只,7-10 日后腹腔注射杂交瘤细胞 1-2 × 10⁶ /只,7-10 日后抽取小鼠腹水,离心取上清,测定效价,冻存备用。

[0054] 5、胶体金溶液制备

[0055] 取 100ml 去离子水加入 2.5ml 1% 氯金酸溶液,煮沸后,迅速加入 1.5ml 2% 柠檬酸三钠溶液,继续煮沸 5 分钟,冷却后,4℃ 避光保存。经测定,该胶体金颗粒直径为 35nm 左右。

[0056] 6、胶体金标记赭曲霉毒素 A 单抗的制备

[0057] 移取制备的胶体金溶液 100ml,用 0.1M 碳酸氢钠溶液调整 pH 值到 8.0,加入 1ml 抗赭曲霉毒素 A 单抗,搅拌 15 分钟,缓慢加入 1ml 25M 的聚乙二醇 20000 溶液,搅拌 15 分钟后,10000r/min 离心 15 分钟。弃去上清液,加入 2ml 含 2%BSA 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液复溶后,4℃ 避光保存。

[0058] 7、胶体金标记玉米赤霉烯酮单抗的制备

[0059] 移取制备的胶体金溶液 100ml,用 0.1M 碳酸氢钠溶液调整 pH 值到 8.0,加入 1ml 抗玉米赤霉烯酮单抗,搅拌 15 分钟,缓慢加入 1ml 25M 的聚乙二醇 20000 溶液,搅拌 15 分钟后,10000r/min 离心 15 分钟。弃去上清液,加入 2ml 含 2%BSA 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液复溶后,4℃ 避光保存。

[0060] 8、试纸条的组装

[0061] 用点膜机把适当浓度的 OTA-BSA 偶联物、ZEN-BSA 偶联物以及羊抗鼠 IgG 分别喷涂在反应膜上,作为检测线和质控线,37℃干燥箱内干燥 5 小时。将适当浓度的两种金标抗体分别喷涂在经过处理的胶体金结合垫上,37℃干燥箱内干燥 5 小时。在 PVC 背衬板上依次粘贴样品垫,胶体金结合垫,反应膜和吸水垫。组装完毕后,用切割机切割为 3.5mm 宽的试纸条,同干燥剂一起密封入铝箔袋中保存。

[0062] 9、试纸条的检测操作办法

[0063] 9.1 样品前处理

[0064] 取 1g 粉碎的样品置于 10ml 离心管中,加入 5ml 样品提取液,剧烈震荡 3 分钟,静置 2 分钟后,吸取 0.5ml 的上清液,再加入 0.5ml 的样品稀释液,混合均匀后待用。

[0065] 9.2 检测步骤

[0066] 水平放置试纸条,吸取混合好的待测样品液 100 μ l 滴加到加样孔中,3-5 分钟内读取实验结果。

[0067] 9.3 结果判断

[0068] 在光线充足处,水平放置检测板,读取结果。

[0069] 质控线未显色,表示操作不当或试纸条已失效,应更换试纸条重新检测。

[0070] 质控线显色,两条检测线都显色,表示样品中所含赭曲霉毒素 A 及玉米赤霉烯酮的量低于检测限或者不含赭曲霉毒素 A 及玉米赤霉烯酮。

[0071] 质控线显色,两条检测线都不显色,表示样品中所含赭曲霉毒素 A 及玉米赤霉烯酮的量等于或高于检测限。

[0072] 质控线显色,赭曲霉毒素 A 的检测线显色而玉米赤霉烯酮的检测线不显色,表示样品中所含赭曲霉毒素 A 的量低于检测限或者不含赭曲霉毒素 A,而样品中所含玉米赤霉烯酮的量等于或高于检测限。

[0073] 质控线显色,赭曲霉毒素 A 的检测线不显色而玉米赤霉烯酮的检测线显色,表示样品中所含赭曲霉毒素 A 的量等于或高于检测限,而样品中所含玉米赤霉烯酮的量低于检测限或者不含与玉米赤霉烯酮。

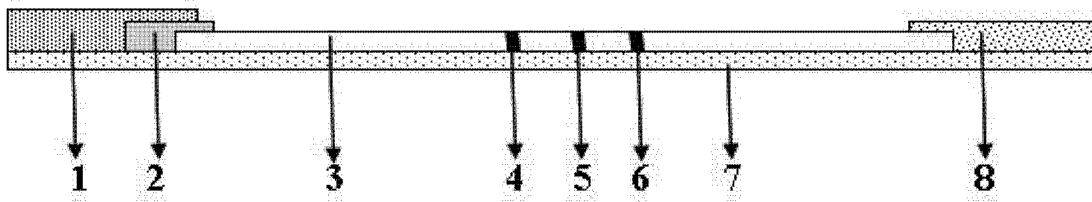


图 1

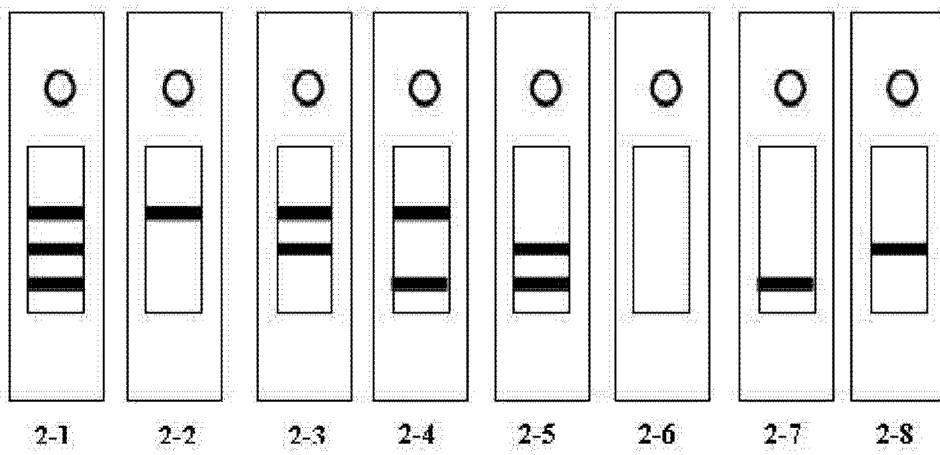


图 2

专利名称(译)	一种同步检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN204314300U	公开(公告)日	2015-05-06
申请号	CN201420842568.3	申请日	2014-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京康源泰博生物科技有限公司 国家粮食局科学研究院 南昌大学第二附属医院		
申请(专利权)人(译)	北京康源泰博生物科技有限公司 国家粮食局科学研究院 南昌大学第二附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京康源泰博生物科技有限公司 国家粮食局科学研究院 南昌大学第二附属医院		
[标]发明人	张波 谢刚 王松雪 付晓玲 雷达 刘向阳		
发明人	张波 谢刚 王松雪 付晓玲 雷达 刘向阳		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种同步检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的免疫层析试纸条。由依次黏贴在背衬上的样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫组成。反应膜上喷有赭曲霉毒素A—牛血清白蛋白偶联物、玉米赤霉烯酮—牛血清白蛋白偶联物和羊抗鼠抗体，作为检测线和质控线，可将反应结果以肉眼可见的颜色形式表现出来。具有操作简单、快速、灵敏度高的特点，且不需要借助其它仪器设备，适用于野外现场检测。可用于饲料、食品等样品中赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮两种真菌毒素含量的同步检测。

