



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111366716 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 201811596341.4

(22)申请日 2018.12.26

(71)申请人 丹阳亿太生物科技发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丹阳市开发区
八纬路留学生创业园

(72)发明人 洪霞 袁超 秦悦

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种检测霉菌毒素的免疫层析试纸条的制备

(57)摘要

检测技术领域的一种检测玉米赤霉烯酮的胶体金试纸条的制备及使用方法,包括如下步骤:将玉米赤霉烯酮半抗原通过戊二醛法分别与BSA和OVA偶联;利用所得的ZEN-BSA偶联物,采用常规方法制备抗玉米赤霉烯酮的单克隆抗体;用柠檬酸三钠还原法制备35 nm的胶体金,用该胶体金标记经过透析除盐处理的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体;将得到的单克隆抗体蛋白喷涂到金标垫上,将ZEN-OVA偶联物喷涂到T线,兔抗鼠的单克隆抗体喷涂到C线,组装成试纸条,干燥;将待测样品用甲醇提取,离心,取上清,将上清滴入试纸条的样本槽中,观察T线和C线的显色,鉴定,得到检测结果。本发明的方法检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。

1. 一种检测玉米赤霉烯酮(ZEN)的胶体金免疫层析试纸条的制备及使用方法,其特征在于,将玉米赤霉烯酮半抗原通过戊二醛法分别与BSA和OVA偶联,得到玉米赤霉烯酮的偶联物ZEN-BSA和ZEN-OVA;将ZEN-BSA作为免疫原,采用常规方法制备高灵敏度的抗玉米赤霉烯酮的单克隆抗体;用柠檬酸三钠还原法制备35 nm的胶体金溶液,用该胶体金标记玉米赤霉烯酮的单克隆抗体,制备成玉米赤霉烯酮单克隆抗体胶体金标记物;将玉米赤霉烯酮单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪喷在玻璃纤维素膜金标垫上,将ZEN-OVA偶联物、兔抗鼠的单克隆抗体分别喷涂在包被膜,即硝酸纤维素膜上,自然晾干或37℃烘干,组装成试纸条;将待测样品用甲醇提取,离心,取上清,将上清滴入试纸条的样本槽中,观察T线和C线的显色,得到检测结果。

2. 根据权利要求1所述的一种检测玉米赤霉烯酮(ZEN)的胶体金免疫层析试纸条的制备及使用方法,其特征是,所述胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液5-7 mL,继续加热搅拌,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃保存备用。

3. 根据权利要求1所述的一种检测玉米赤霉烯酮(ZEN)的胶体金免疫层析试纸条的制备及使用方法,其特征是,所述玉米赤霉烯酮单克隆抗体胶体金标记物的制备具体为:将要标记的玉米赤霉烯酮抗体在1000 r/min, 4℃条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL,过0.22 μm滤膜;取权利要求2中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温低速(1500 r/min)离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4℃,12000 r/min 离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成玉米赤霉烯酮单克隆抗体胶体金标记物。

4. 根据权利要求1所述的一种检测玉米赤霉烯酮(ZEN)的胶体金免疫层析试纸条的制备及使用方法,其特征是,所述胶体金膜的制备:将权利要求3中的玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 μL/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37℃烘干3 h,制成含玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜。

5. 根据权利要求1所述的一种检测玉米赤霉烯酮(ZEN)的胶体金免疫层析试纸条的制备及使用方法,其特征是,所述包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 μL/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃包被2 h后,室温自然晾干或者37℃烘干。

6. 根据权利要求1所述的一种检测玉米赤霉烯酮(ZEN)的胶体金免疫层析试纸条的制备及使用方法,其特征是,所述甲醇为体积分数为70%的甲醇。

7. 根据权利要求1所述的一种检测玉米赤霉烯酮(ZEN)的胶体金免疫层析试纸条的制备及使用方法,其特征是,所述试纸条的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度的长条。

8. 根据权利要求1所述的一种检测玉米赤霉烯酮(ZEN)的胶体金免疫层析试纸条的制

备及使用方法,其特征是,所述检测结果判断具体为:C线显色,T 线(检测线,靠近加样孔一端)显色,表明样品中不含玉米赤霉烯酮;C线显色,T线不显色,表明样品中含有玉米赤霉烯酮;未出现 C 线(对照线),可能是操作不当或检测卡已失效。

一种检测霉菌毒素的免疫层析试纸条的制备

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测技术领域的方法,特别是一种检测玉米赤霉烯酮的胶体金试纸条的制备及使用方法。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮又称F-2毒素,是一种具有雌激素作用的真菌毒素,其产毒菌主要是镰刀菌属(*Fusarium*)的菌株,如禾谷镰刀菌(*F.graminearum*)和三线镰刀菌(*F.tricinctum*),主要污染玉米、小麦、大米、大麦、小米和燕麦等谷物,在世界各地各种粮谷与饲料中均有存在。玉米赤霉烯酮耐热性较强,110℃下处理1 h才被完全破坏,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,引起妊娠期动物(包括人)流产、死胎和畸胎,对家禽、猪、牛和羊的影响较大,给畜牧业带来很大经济损失。

[0003] 目前,检测玉米赤霉烯酮的方法很多,根据真菌毒素含量常用的检测方法,可分为3类:①生物学检测法;②理化检测方法(薄层层析法TLC、高效液相色谱法HPLC、气相色谱法GC);③免疫化学检测法(ELISA、CLEIA等方法)(吴文达,2009)。其中,高效液相色谱法HPLC、气象色谱法GC是定量的检测方法,结果准确可靠,缺点是检出限较高、仪器设备较为昂贵;薄层层析法TLC灵敏度不高且不适用于检测大量样品的实际需要,近年来应用较少;酶联免疫吸附ELISA法是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选,但实验过程需较长时间,各个步骤需彻底洗涤,并且需要特定的酶和底物显色,因此耗时长,程序繁琐。

[0004] 本发明的目的是研制一种更适合企业进行现场检测且快捷简便、成本低廉的定性检测方法。胶体金免疫层析法(Gold immunochromatography assay,GICA)是一种灵敏度较高的检测方法,将金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术,能克服上述方法中的不足,检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种快速检测玉米赤霉烯酮的胶体金试纸条的方法。本发明的方法检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的,本发明包括如下步骤:

1、胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃保存备用。

[0007] 2、单克隆抗体的预处理:将要标记的玉米赤霉烯酮抗体在1000 r/min,4℃条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成

1 mg/mL,过0.22 μm 滤膜。

[0008] 3、玉米赤霉烯酮单克隆抗体胶体金标记物的制备:取上述1中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温低速(1500 r/min)离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4℃,12000 r/min 离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成玉米赤霉烯酮单克隆抗体胶体金标记物。

[0009] 4、胶体金膜的制备:将权利要求3中的玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37℃烘干3 h,制成含玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜。

[0010] 5、包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃包被2 h后,室温自然晾干或者37℃烘干。

[0011] 6、试纸条的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度的长条。

[0012] 7、检测结果判断具体为:C线显色,T 线(检测线,靠近加样孔一端)显色,表明样品中不含玉米赤霉烯酮;C线显色,T线不显色,表明样品中含有玉米赤霉烯酮;未出现 C 线(对照线),可能是操作不当或检测卡已失效。

[0013] 与现有技术相比,本发明具有如下的优势:本发明的方法检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测,便于推广和使用。

附图说明

[0014] 图1为本发明检测玉米赤霉烯酮的胶体金免疫层析试纸条的剖视结构图:图中1.样品垫 2.胶体金结合垫 3.PVC胶板 4.包被膜 5.吸水垫。

[0015] 图2为本发明检测玉米赤霉烯酮的胶体金试纸条的结果图。

具体实施方式

[0016] 以下对本发明的实施例作详细说明:本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0017] 本发明首先将玉米赤霉烯酮连接到OVA或BSA上获得具有免疫原性的完全抗原,并通过透析及超滤离心纯化该抗原;将该BSA与T-2偶联的抗原ZEN-BSA作为免疫原免疫Ba1b/C小鼠制备单克隆抗体,并用OVA与T-2偶联的抗原ZEN-OVA作为包被抗原采用间接酶联免疫实验测定T-2抗体效价;纯化单克隆抗体:用1% (w/v) 的柠檬酸三钠还原法制备35 nm的胶体金,并标记纯化的单克隆抗体蛋白;按金标单克隆抗体、ZEN-OVA偶联抗原、兔抗鼠单克隆抗体喷涂金标垫、检测线(T线)、质控线(C线),然后组装成试纸条,置37℃烘箱烘干。检测时,待试纸条于密封包装袋中恢复至室温后,将测试端插入样品液中,5~10分钟观察结果。

实施例

[0018] 1、免疫抗原的制备:将2 mg 玉米赤霉烯酮标准品加入如0.2 mL二甲基酰胺(DMF)

中溶解配制成A液,将5 mg BSA、3 mg EDPC溶解于25 mL去离子水中配制成B液,然后将A液逐滴加入B液中,边加边搅拌,10 min后,加1 mg EDPC,放置室温,保持pH 5.5,继续搅拌18 h,结束后用PBS (0.01 mol/L, pH7.2) 透析三天,每天换液一次。透析后,分装-20℃保存。

[0019] 2、包被抗原的制备:将2 mg 玉米赤霉烯酮标准品加入如0.2 mL二甲基酰胺(DMF)中溶解配制成A液,将5 mg OVA、3 mg EDPC溶解于25 mL去离子水中配制成B液,然后将A液逐滴加入B液中,边加边搅拌,10 min后,加1 mg EDPC,放置室温,保持pH 5.5,继续搅拌18 h,结束后用PBS (0.01 mol/L, pH7.2) 透析三天,每天换液一次。透析后,分装-20℃保存。

[0020] 3、单克隆抗体的制备:采用小剂量长周期的两种免疫方案。对6~8周龄的雌性Balb/C小鼠(体重18~20 g),大剂量免疫方案为,首次免疫用160 μg ZEN-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。3周后,再用80 μg ZEN-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。此后每隔3周用80 μg ZEN-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,腹腔注射。最后一次脾内免疫80 μg ZEN-BSA作为加强免疫。小剂量免疫方案为,首次免疫用100 μg ZEN-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。3周后,再用50 μg ZEN-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。此后每隔3周用50 μg ZEN-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,腹腔注射。最后一次脾内免疫50 μg ZEN-BSA作为加强免疫。三天后处死小鼠,取其脾脏,与骨髓瘤细胞融合。用间接ELISA方法筛选阳性杂交瘤细胞。通过小鼠腹腔注射杂交瘤细胞来大量制备小鼠腹水,腹水经过过滤、离心初步纯化后,采用辛酸法和亲和层析法纯化腹水。

[0021] 4、胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液5~7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2~8℃保存备用。

[0022] 5、单克隆抗体的预处理:将要标记的玉米赤霉烯酮抗体在1000 r/min, 4℃条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL,过0.22 μm滤膜。

[0023] 6、玉米赤霉烯酮单克隆抗体胶体金标记物的制备:取上述1中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温低速(1500 r/min)离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4℃,12000 r/min 离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成玉米赤霉烯酮单克隆抗体胶体金标记物。

[0024] 7、胶体金膜的制备:将权利要求3中的玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 μL/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37℃烘干3 h,制成含玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜。

[0025] 8、包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、玉米赤霉烯酮蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 μL/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃包被2 h后,室温自然晾干或者37℃烘干。

[0026] 9、试纸条的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度的长条。

[0027] 10、检测结果判断具体为:C线显色,T 线(检测线,靠近加样孔一端)显色,表明样

品中不含玉米赤霉烯酮;C线显色,T线不显色,表明样品中含有玉米赤霉烯酮;未出现 C 线(对照线),可能是操作不当或检测卡已失效。

[0028] 本发明的方法可以直接检测样品中的玉米赤霉烯酮,检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。

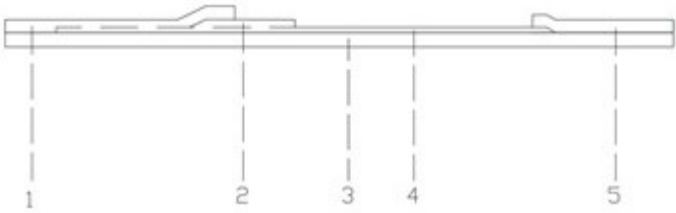


图1



图2

专利名称(译)	一种检测霉菌毒素的免疫层析试纸条的制备		
公开(公告)号	CN111366716A	公开(公告)日	2020-07-03
申请号	CN201811596341.4	申请日	2018-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 袁超 秦悦		
发明人	洪霞 袁超 秦悦		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/569		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

检测技术领域的一种检测玉米赤霉烯酮的胶体金试纸条的制备及使用方法，包括如下步骤：将玉米赤霉烯酮半抗原通过戊二醛法分别与BSA和OVA偶联；利用所得的ZEN-BSA偶联物，采用常规方法制备抗玉米赤霉烯酮的单克隆抗体；用柠檬酸三钠还原法制备35 nm的胶体金，用该胶体金标记经过透析除盐处理的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体；将得到的单克隆抗体蛋白喷涂到金标垫上，将ZEN-OVA偶联物喷涂到T线，兔抗鼠的单克隆抗体喷涂到C线，组装成试纸条，干燥；将待测样品用甲醇提取，离心，取上清，将上清滴入试纸条的样本槽中，观察T线和C线的显色，鉴定，得到检测结果。本发明的方法检测灵敏、准确、快速，操作简便、特异性强，适用于大批样品的检测。

