



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102680695 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201210171347. 3

(22) 申请日 2012. 05. 29

(71) 申请人 西安金磁纳米生物技术有限公司

地址 710077 陕西省西安市高新区丈八五路
2号现代企业中心东区3栋4层10402A

(72) 发明人 张秦鲁 王艳霞 崔亚丽

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限
公司 61211

代理人 陈广民

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

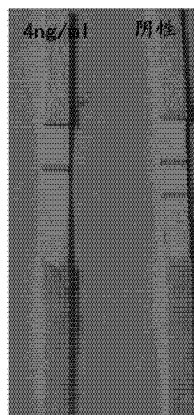
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于黄曲霉毒素检测的金磁微粒标记层析试
纸条

(57) 摘要

本发明提供一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒和基于该免疫磁性微粒制作的层析试纸条以及检测方法,以解决黄曲霉毒素样品净化分离过程中分离操作复杂、分离效率低、存在较大的安全隐患的技术问题,实现既能定性又能定量检测黄曲霉毒素的方法。其中,用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒,以粒径在 20nm-200nm 的金磁微粒为载体,黄曲霉毒素单克隆抗体为配基,金磁微粒经共价反应或亲和作用与黄曲霉毒素抗体连接;金磁微粒的饱和磁化强度大于 30emu/g。用金磁微粒标记的黄曲霉毒素抗体用于层析试纸条检测,既可以进行可目视化定性检测,又可以通过检测磁信号进行定量检测,大幅度提高了检测的灵敏度。



1. 一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒,其特征在于:所述免疫磁性微粒以粒径在 20nm-200nm 的金磁微粒为载体,黄曲霉毒素单克隆抗体为配基,金磁微粒经共价反应或亲和作用与黄曲霉毒素抗体连接;金磁微粒的饱和磁化强度大于 30emu/g。

2. 采用如权利要求 1 所述的免疫磁性微粒作为金磁微粒标记黄曲霉毒素抗体,制作得到的用于黄曲霉毒素检测的金磁微粒标记层析试纸条,其特征在于:包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;其中样品垫和结合垫的材料为玻璃纤维滤膜;

样品垫经过了样品垫处理液浸泡处理,晾干备用;样品垫处理液中含 0.1 ~ 2g pvp, 0.05 ~ 2ml TritonX-100 和 0.01 ~ 0.2mol/l PB;

结合垫经过了结合垫处理液浸泡处理,晾干备用;结合垫处理液中含 0.1% ~ 1% 吐温 -20 和 0.1% ~ 1% 曲拉通;

样品垫作为样品点样池,结合垫上喷有金磁微粒标记黄曲霉毒素抗体,在硝酸纤维素膜的检测线处包被 1 ~ 4mg/ml 黄曲霉毒素偶联抗原,在指控线处包被 1 ~ 4mg/ml 二抗。

3. 一种应用如权利要求 2 所述层析试纸条检测黄曲霉毒素的方法,包括以下步骤:

1] 金磁微粒标记抗体的制备

a. 黄曲霉毒素单克隆抗体在金磁微粒表面的固定

取金磁微粒加入到离心管中,轻摇重悬,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;再加入超纯水,轻摇重悬,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;将黄曲霉毒素抗体配制成浓度为 0.1 ~ 10mg/ml 的抗体溶液,抗体稀释液为超纯水或浓度小于 0.01M 的 PB,取适量加入金磁微粒中,反应浓度为 0.5-5mg/mL,在摇床中 25°C, 180r/min 反应 1h;反应完毕,磁性分离,弃上清;加入清洗缓冲液,轻摇重悬;磁性分离,弃上清,除去非特异性吸附在金磁微粒表面的黄曲霉毒素抗体;

本步骤采用的清洗缓冲液中含 0.05% 吐温的 0.0005M ~ 0.1M 的 PB;

b. 金磁微粒的封闭

在步骤 a 得到的金磁微粒中加入封闭剂,所述封闭剂中含 0.1% ~ 5% BSA, 0.05% ~ 1.5% 小牛血清, 0.1 ~ 2% PEG20000;在摇床中反应,封闭磁性微粒上未与黄曲霉毒素抗体结合的位点;用清洗缓冲液进行多次清洗,最后悬于重悬缓冲液中,最终标记抗体的浓度在 0.5 ~ 2mg/ml; 2 ~ 8°C 保存备用;

本步骤中采用的清洗缓冲液中含 0.05% 吐温的 0.0005M ~ 0.1M 的 PB;

本步骤中采用的重悬缓冲液中含 0.1% ~ 5% BSA, 1% ~ 10% 蔗糖, 0.01 ~ 1% PEG20000, 0.005% ~ 0.5% pvp, 0.1% ~ 1% 曲拉通;

2] 试纸条的制备

用样品垫处理液和结合垫处理液分别处理样品垫和结合垫处理 5 ~ 10min,然后铺平晾干,以增加样品垫的亲水性和金磁标记抗体在结合垫上的释放;用步骤 1] 的标记抗体以 4 μ l/cm ~ 12 μ l/cm 喷涂到处理好的结合垫上;取 PVC 板,上面组装吸水纸、NC 膜,以 1 μ l/cm 的速度分别在指控线和检测线的位置划 1 ~ 4mg/ml 二抗和 1 ~ 4mg/ml 偶联黄曲霉毒素抗原,然后将喷涂好的结合垫和处理好的上样垫组装到试纸条上,最后将试纸条切成 3 ~ 5mm 宽备用;

样品垫处理液中含 0.1 ~ 2g pvp, 0.05 ~ 2ml TritonX-100, 0.01 ~ 0.2mol/l PB;

结合垫处理液中含 0.1% ~ 1% 吐温 -20 和 0.1% ~ 1% 曲拉通;

3] 黄曲霉毒素的检测

a. 样品的制备

取样本溶于甲醇 - 水, 或者乙腈 - 水中, 提取, 提取液经过滤后以超纯水稀释;

b. 取制备好的待检测样本 $50 \sim 150 \mu\text{l}$ 上样到步骤 2] 制备好的试纸条上, 样品液在向上层析过程中, 首先在检测线处样品中的黄曲霉毒素小分子与标记在检测线上的偶联抗原竞争结合标记黄曲霉毒素, 而将标记抗体滞留在检测限处, 剩余的标记抗体就于指控线上的二抗结合;

若质控线和检测线都出现淡粉色条带, 表示待检测样本中含的黄曲霉毒素的量小于检测限; 若需要进一步确定黄曲霉毒素的量, 则在磁信号检测仪上进一步检测;

若指控线出线, 检测线不出淡粉色条带, 表示待检测样本中含的黄曲霉毒素的量等于或大于检测限。

用于黄曲霉毒素检测的金磁微粒标记层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及黄曲霉毒素的检测工具和检测方法,具体涉及一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒和基于该免疫磁性微粒制作的层析试纸条以及检测方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(AFT)是真菌的次级代谢产物,主要由黄曲霉、寄生曲霉和特曲霉产生,广泛存在土壤,动植物,各种坚果,特别是花生和核桃中。黄曲霉毒素主要有4种:即B1、B2、G1、G2,其中B1被认为是目前化学致癌物中最强的一种致癌剂和诱变剂。为了防止被AFT污染的食品进入人类消费链中,及时检测将是一种有效的手段。

[0003] 目前测定黄曲霉毒素(AFT)的方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附测定法、质谱法、放射免疫测定法、荧光光度法、层析试纸条法、化学发光和电化学发光法等。现在应用很普遍的高效液相色谱法和酶联免疫吸附法都存在样品前处理的问题,尤其是一些样本很难处理,如坚果类、花生、谷物、中药等。现在市场上卖的免疫亲和柱价格昂贵,而且单位体积柱容量相对较低,样品处理能力有限,样品处理量也相对固定,同时柱子容易堵塞。

[0004] 现有的检测黄曲霉毒素的方法存在以下不足:

[0005] 1、存在安全很大的安全问题,提取黄曲霉毒素需要使用多种有毒、异味的有机溶剂,用高效液相色谱和ELISA检测时,均需标定标准物或做标准曲线,这不仅毒害操作人员,而且污染环境。另外,放射性免疫检测,可能也引起放射性污染。

[0006] 2、检测步骤繁琐,检测时间长,如,高效液相色谱法和ELISA法。

[0007] 3、检测试剂需要冷藏,如ELISA法、化学发光、电化学发光。

[0008] 4、检测需要特殊的仪器设备,如HPLC法、ELISA法、电化学发光、化学发光、放射免疫测定法、荧光光度法等。

[0009] 5、只能进行定性而不能进行定量检测,如胶体金层析试纸条法。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒和基于该免疫磁性微粒制作的层析试纸条以及检测方法,以解决黄曲霉毒素样品净化分离过程中分离操作复杂、分离效率低、存在较大的安全隐患的技术问题,实现既能定性又能定量检测黄曲霉毒素的方法。

[0011] 本发明的技术解决方案是:

[0012] 一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒,其特殊之处在于:所述免疫磁性微粒以粒径在20nm-200nm的金磁微粒为载体,黄曲霉毒素单克隆抗体为配基,金磁微粒经共价反应或亲和作用与黄曲霉毒素抗体连接;金磁微粒的饱和磁化强度大于30emu/g。

[0013] 采用上述免疫磁性微粒作为金磁微粒标记黄曲霉毒素抗体,制作得到的用于黄曲霉毒素检测的金磁微粒标记层析试纸条,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;其中

样品垫和结合垫的材料为玻璃纤维滤膜；

[0014] 样品垫经过了样品垫处理液浸泡处理,晾干备用;样品垫处理液中含 0.1 ~ 2g pvp, 0.05 ~ 2ml TritonX-100 和 0.01 ~ 0.2mol/l PB;

[0015] 结合垫经过了结合垫处理液浸泡处理,晾干备用;结合垫处理液中含 0.1% ~ 1% 吐温-20 和 0.1% ~ 1% 曲拉通;

[0016] 样品垫作为样品点样池,结合垫上喷有金磁微粒标记黄曲霉毒素抗体,在硝酸纤维膜的检测线处包被 1 ~ 4mg/ml 黄曲霉毒素偶联抗原,在指控线处包被 1 ~ 4mg/ml 二抗(抗金磁微粒标记黄曲霉毒素抗体的抗体)。

[0017] 一种应用上述层析试纸条检测黄曲霉毒素的方法,包括以下步骤:

[0018] 1] 金磁微粒标记抗体的制备

[0019] a. 黄曲霉毒素单克隆抗体在金磁微粒表面的固定

[0020] 取金磁微粒加入到离心管中,轻摇重悬,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;再加入超纯水,轻摇重悬,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;将黄曲霉毒素抗体配制成浓度为 0.1 ~ 10mg/ml 的抗体溶液,抗体稀释液为超纯水或浓度小于 0.01M 的 PB,取适量加入金磁微粒中,反应浓度为 0.5-5mg/mL,在摇床中 25℃,180r/min 反应 1h;反应完毕,磁性分离,弃上清;加入清洗缓冲液,轻摇重悬;磁性分离,弃上清,除去非特异性吸附在金磁微粒表面的黄曲霉毒素抗体;

[0021] 本步骤采用的清洗缓冲液中含 0.05% 吐温的 0.0005M ~ 0.1M 的 PB;

[0022] b. 金磁微粒的封闭

[0023] 在步骤 a 得到的金磁微粒中加入封闭剂,所述封闭剂中含 0.1% ~ 5% BSA, 0.05% ~ 1.5% 小牛血清,0.1 ~ 2% PEG20000;在摇床中反应,封闭磁性微粒上未与黄曲霉毒素抗体结合的位点;用清洗缓冲液进行多次清洗,最后悬于重悬缓冲液中,最终标记抗体的浓度在 0.5 ~ 2mg/ml;2 ~ 8℃ 保存备用;

[0024] 本步骤中采用的清洗缓冲液中含 0.05% 吐温的 0.0005M ~ 0.1M 的 PB;

[0025] 本步骤中采用的重悬缓冲液中含 0.1% ~ 5% BSA, 1% ~ 10% 蔗糖,0.01 ~ 1% PEG20000, 0.005% ~ 0.5% pvp, 0.1% ~ 1% 曲拉通;

[0026] 2] 试纸条的制备

[0027] 用样品垫处理液和结合垫处理液分别处理样品垫和结合垫处理 5 ~ 10min,然后铺平晾干,以增加样品垫的亲水性和金磁标记抗体在结合垫上的释放;用步骤 1] 的标记抗体以 4 μ l/cm ~ 12 μ l/cm 喷涂到处理好的结合垫上;取 PVC 板,上面组装吸水纸、NC 膜,以 1 μ l/cm 的速度分别在指控线和检测线的位置划 1 ~ 4mg/ml 二抗和 1 ~ 4mg/ml 偶联黄曲霉毒素抗原,然后将喷涂好的结合垫和处理好的上样垫组装到试纸条上,最后将试纸条切成 3 ~ 5mm 宽备用;

[0028] 样品垫处理液中含 0.1 ~ 2g pvp, 0.05 ~ 2ml Triton X-100, 0.01 ~ 0.2mol/l PB;

[0029] 结合垫处理液中含 0.1% ~ 1% 吐温-20 和 0.1% ~ 1% 曲拉通;

[0030] 3] 黄曲霉毒素的检测

[0031] a. 样品的制备

[0032] 取样本溶于甲醇-水,或者乙腈-水中,提取,提取液经过滤后以超纯水稀释;

[0033] b. 取制备好的待检测样本 50 ~ 150 μ l 上样到步骤 2] 制备好的试纸条上, 样品液在向上层析过程中, 首先在检测线处样品中的黄曲霉毒素小分子与标记在检测线上的偶联抗原竞争结合标记黄曲霉毒素, 而将标记抗体滞留在检测限处, 剩余的标记抗体就于指控线上的二抗结合;

[0034] 若指控线和检测线都出现淡粉色条带, 表示待检测样本中含的黄曲霉毒素的量小于检测限; 若需要进一步确定黄曲霉毒素的量, 则在磁信号检测仪上进一步检测;

[0035] 若指控线出线, 检测线不出淡粉色条带, 表示待检测样本中含的黄曲霉毒素的量等于或大于检测限。

[0036] 本发明的优点是:

[0037] 1、金磁标记层析试纸条即可定性又可定量检测黄曲霉毒素, 用金磁微粒标记的黄曲霉毒素抗体用于层析试纸条检测, 既具有胶体金的光学性质, 可以进行可目视化定性检测 (可检测到 4ng/ml 的黄曲霉毒素), 又具有磁性微粒的磁性, 可以通过检测磁信号进行定量检测 (可检测到 0.01ng/ml 的黄曲霉毒素), 大幅度提高了检测的灵敏度。

[0038] 2、金磁标记层析纸条性质稳定、存放时间长, 金磁标记的层析试纸条在室温存放一个月, 检测活性不受影响。

[0039] 3、金磁标记层析纸条检测黄曲霉毒素方便快捷, 整个检测过程不超过 10min, 既可以目视也可以仪器读数。仪器设备轻便容易携带, 自动化程度高, 操作简单, 可直接读出测试结果, 可以在小型实验室或现场使用。

[0040] 4、检测成本低可广泛使用, 不需要大型的仪器设备, 使用者不需要专业培训, 一次检测只需几元钱, 可广泛应用于日常生活。

附图说明

[0041] 图 1: 金磁标免疫层析试纸条的结构图。

[0042] 图 2: 金磁微粒标记层析试纸条检测玉米中 4ng/g 黄曲霉毒素的检测, 其中, 左图为检测黄曲霉毒素玉米阴性样本的实验照片, 右图为检测玉米中 4ng/g 黄曲霉毒素时的实验照片。

[0043] 图 3: 金磁标记黄曲霉毒素层析试纸条 (检测线为 4ng/ml) 对 2ng/ml 的黄曲霉毒素样本的检测与磁信号检测图; 其中, 左图为 2ng/ml 的黄曲霉毒素样本的实验照片, 右图为 2ng/ml 的黄曲霉毒素样本的磁信号检测图。

[0044] 图 4: 金磁标记黄曲霉毒素层析试纸条 (检测线为 4ng/ml) 对 6ng/ml 的黄曲霉毒素样本的检测与磁信号检测图; 其中, 左图为 6ng/ml 的黄曲霉毒素样本的实验照片, 右图为 6ng/ml 的黄曲霉毒素样本的磁信号检测图。

具体实施方式

[0045] 本发明以金磁微粒为标记材料, 制备出了黄曲霉毒素层析试纸条。这种层析试纸条可定性定量检测黄曲霉毒素。金磁微粒是指粒径在 20nm-200 μ m, 具有超顺磁性和高比较面积的复合微粒。样本指所有含有黄曲霉毒素的食品、中药等样本。

[0046] 本发明用黄曲霉毒素单克隆抗体与金磁微粒共同反应一段时间后, 制备出金磁微粒标记抗体。将粗提取的黄曲霉毒素样本加到上样垫上, 在吸水纸的作用下, 黄曲霉毒素层

样本液层析到结合垫与金磁标记黄曲霉毒素抗体混合,并且黄曲霉毒素与金磁标记黄曲霉毒素抗体结合,它们形成的复合物顺着 NC 膜继续向上层析,在 T 线处未与样本中黄曲霉毒素结合的金磁微粒标记抗体在 T 线处与偶联黄曲霉毒素结合并沉积在 T 线处,最后剩余的金磁标记抗体层析到 C 线与二抗(抗金磁标记黄曲霉毒素抗体的抗体)结合,沉积在 C 线,因为金磁微粒有胶体金的光学性质,可以看到有金磁滞留的 T 线和 C 线均呈粉色条带。若 C 线和 T 线都出线表示待检测样本中含的黄曲霉毒素的量小于检测限,若想进一步确定黄曲霉毒素的量可以在磁信号检测仪上进一步检测。若 C 线出线, T 线不出线表示待检测样本中含的黄曲霉毒素的量等于或大于检测限。

[0047] 以下实施例对本发明的方案以具体实验操作的形式示例,其中的实验条件和设定参数不应视为对本发明基本技术方案的局限。

[0048] 实施例 1 金磁微粒标记层析试纸条的制备以及检测食品中黄曲霉毒素的具体过程:

[0049] 1] 金磁微粒标记抗体的制备

[0050] a. 黄曲霉毒素单克隆抗体在金磁微粒表面的固定:取 1mg 金磁微粒到一个 2ml 容量的离心管中,轻摇重悬。置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清。加入 1ml 超纯水,轻摇重悬。置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清。重复操作一次。将黄曲霉毒素单克隆抗体 100ug 配置成浓度为 0.1 ~ 10mg/ml 的溶液,取适量加入金磁微粒中,在摇床中 25℃, 180r/min 反应 1h。反应完毕,磁性分离,弃上清。加入 1ml 清洗缓冲液(含 0.05%吐温 20 的 0.0025M 的 PB),轻摇重悬磁粒。磁性分离,弃上清。

[0051] b. 金磁微粒的封闭:在上一步的磁粒中加入 1ml 的封闭剂,在摇床中 25℃, 180r/min 反应 2h。用 2ml 的清洗缓冲液(含 0.05%的吐温 20 0.0025M 的 PB)清洗 3 次,最后悬于 1ml 重悬缓冲液中,2 ~ 8℃保存备用。

[0052] 2] 试纸条的制备:用上样垫处理液和结合垫处理液分别处理上样垫和结合垫处理 10min,然后铺平晾干。用 1] 步的金磁标记抗体以 1ul/cm 喷涂到处理好的结合垫上。取 30cm 的 PVC 板,上面组装吸水纸、NC 膜,以 1ul/cm 的速度分别在指控线和检测线的位置划 2mg/ml 质控品和 2mg/ml 偶联黄曲霉毒素抗原,然后将喷涂好的结合垫和处理好的上样垫组装到试纸条上,最后将试纸条切成 0.38cm 宽备用。

[0053] 3] 黄曲霉毒素的检测

[0054] a. 样品的制备:取样本 5g,溶于 25ml 甲醇-水,或者乙腈-水提取,提取液经过滤后以超纯水稀释。

[0055] b. 取制备好的待检测样本 100 μ l 上样到 2] 步制备好的试纸条上,若指控线和检测线都出线表示待检测样本中含的黄曲霉毒素的量小于检测限,若想进一步确定黄曲霉毒素的量可以在磁信号检测仪上进一步检测。若指控线出线,检测线不出线表示待检测样本中含的黄曲霉毒素的量等于或大于检测限。

[0056] 从附图可以看出,本金磁标记层析试纸条具有很好的检测灵敏度,可以可目视化检测到 4ng/g 的黄曲霉毒素,在样品中黄曲霉毒素的量小于 4ng/ml 可以明显的看到有粉色条带,通过对样本中 2ng/ml 黄曲霉毒素的磁信号检测可以证明(如图 3)。样本中黄曲霉毒素的量大于 4ng/ml 时检测线没有粉色条带,对样本中 6ng/ml 黄曲霉毒素的磁信号检测可以证明(如图 4)。

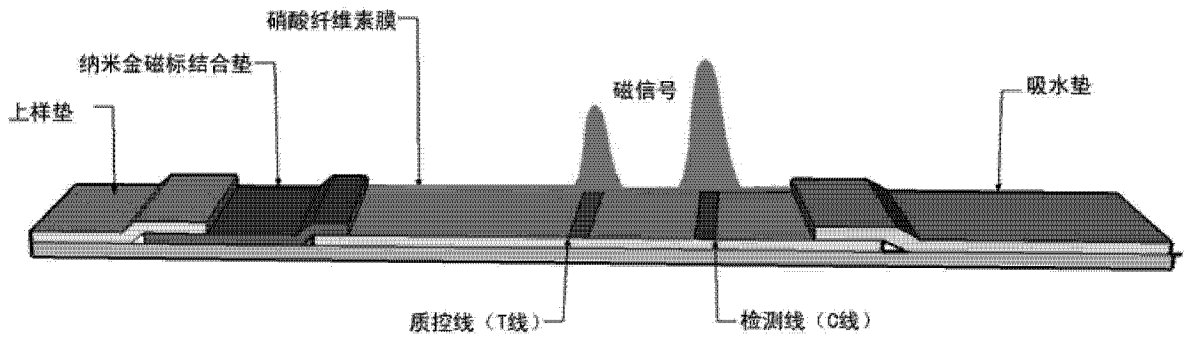


图 1

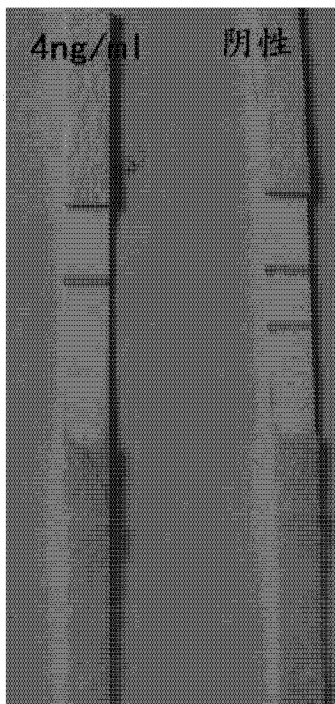


图 2

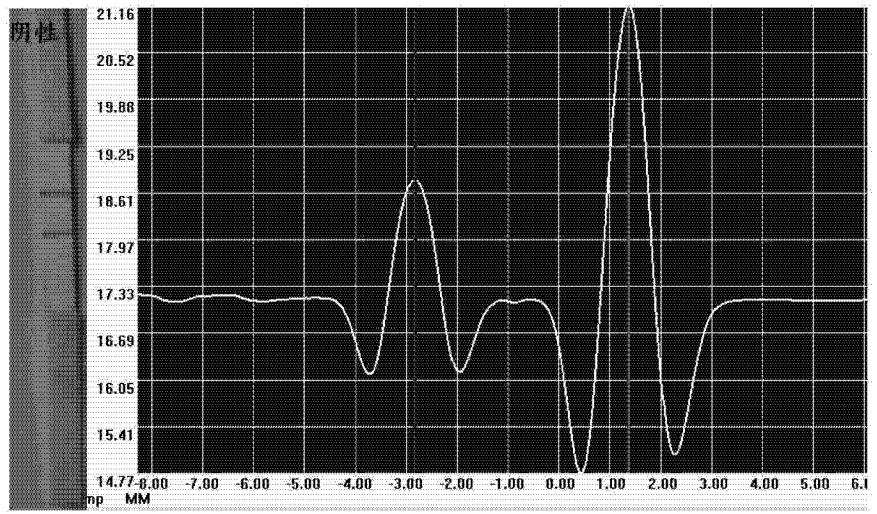


图 3

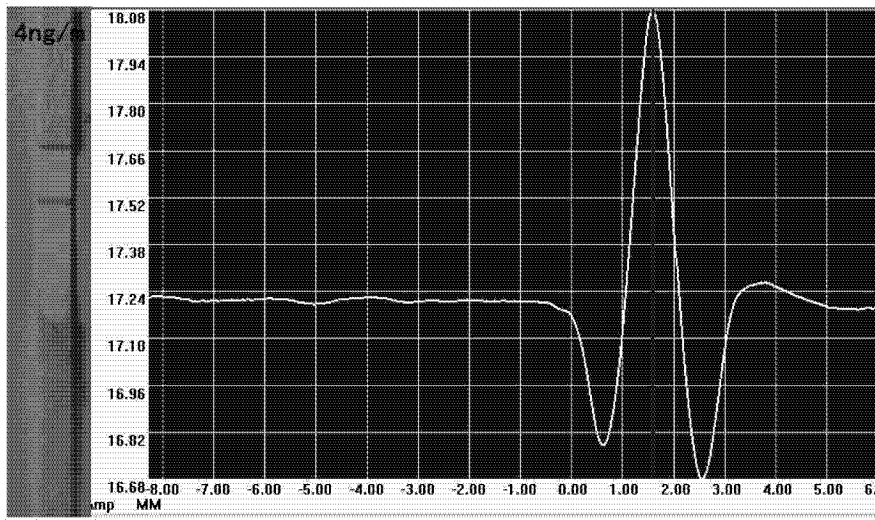


图 4

专利名称(译)	用于黄曲霉毒素检测的金磁微粒标记层析试纸条		
公开(公告)号	CN102680695A	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	CN201210171347.3	申请日	2012-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
[标]发明人	张秦鲁 王艳霞 崔亚丽		
发明人	张秦鲁 王艳霞 崔亚丽		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/532		
代理人(译)	陈广民		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒和基于该免疫磁性微粒制作的层析试纸条以及检测方法，以解决黄曲霉毒素样品净化分离过程中分离操作复杂、分离效率低、存在较大的安全隐患的技术问题，实现既能定性又能定量检测黄曲霉毒素的方法。其中，用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒，以粒径在20nm-200nm的金磁微粒为载体，黄曲霉毒素单克隆抗体为配基，金磁微粒经共价反应或亲和作用与黄曲霉毒素抗体连接；金磁微粒的饱和磁化强度大于30emu/g。用金磁微粒标记的黄曲霉毒素抗体用于层析试纸条检测，既可以进行可视化定性检测，又可以通过检测磁信号进行定量检测，大幅度提高了检测的灵敏度。

