



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108732346 A

(43)申请公布日 2018.11.02

(21)申请号 201810543859.5

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2018.05.31

(71)申请人 福州大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县福州地
区大学新区学园路2号

(72)发明人 郑允权 莫柳达 张文怡 黄剑东
郭养浩 石贤爱

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限
公司 35100

代理人 蔡学俊 李翠娥

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

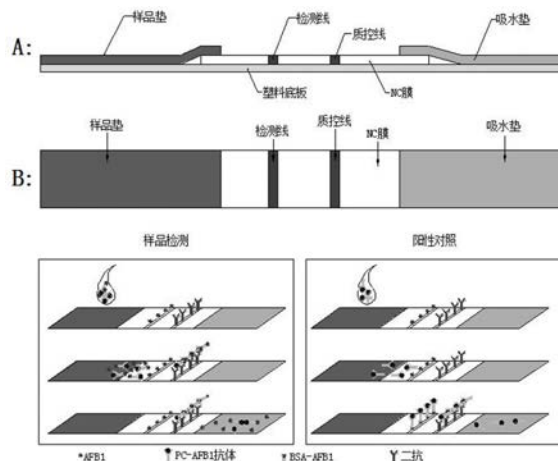
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

一种藻蓝蛋白荧光探针及其用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法

(57)摘要

本发明提供了一种藻蓝蛋白荧光探针及其用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法。将荧光藻蓝蛋白与黄曲霉毒素B1单克隆抗体进行偶联制成荧光探针,并将其应用于试纸条快速检测中,基于竞争免疫层析法原理,建立一种黄曲霉毒素B1快速测定的方法。本发明的快速检测试纸条操作简单快捷,适用于现场大批量样品的快速检测。



1. 一种藻蓝蛋白荧光探针的制备方法,其特征在于:按摩尔比为10~1:1往pH 为5.0~8.5、浓度为0.01~0.2 M的PBS缓冲液中加入藻蓝蛋白和黄曲霉毒素B1单克隆抗体,振荡混匀,向反应体系中加入体积分数为0.01%~0.5%的交联剂戊二醛,振荡混匀,于10~45℃摇床中匀速振荡,避光反应2~20 h。

2. 一种如权利要求1所述的制备方法制得的藻蓝蛋白荧光探针,其特征在于:所述的藻蓝蛋白荧光探针含1~10 $\mu\text{g/mL}$ 黄曲霉毒素B1单克隆抗体。

3. 一种将权利要求2所述的藻蓝蛋白荧光探针用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 用移液枪吸取20~100 μL 、0.1~30 ng/mL 的黄曲霉毒素B1待测样品,再加入10~70 μL 藻蓝蛋白荧光探针,混匀,竞争反应2~12 min;

2) 将步骤1)的反应液滴加至检测卡孔中,层析时间为5~12 min,将检测卡放入荧光免疫层析快速检测设备中进行检测。

4. 根据权利要求3所述的藻蓝蛋白荧光探针用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法,其特征在于:步骤2)所述检测卡的制备方法为:取0.01 mol/L、pH=7.0 PBS缓冲液分别稀释牛血清蛋白偶联黄曲霉毒素B1抗原和羊抗鼠二抗分别至0.01~5 mg/L和0.05~10 mg/L,用划膜器具均匀地画在NC膜上,分别为检测线和质控线,于室温下干燥2~12 h;将NC膜、样品垫、吸水垫依次组装在塑料底板上,装入检测卡,并放入密封袋中于4℃下保存以备用。

5. 根据权利要求3所述的藻蓝蛋白荧光探针用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法,其特征在于:步骤2)所述的荧光免疫层析快速检测设备,设置参数如下:LED灯滤光片波长为500~600 nm;相机滤光片的中心波长为600~750 nm。

6. 根据权利要求3所述的藻蓝蛋白荧光探针用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法,其特征在于:步骤2)所述的荧光免疫层析快速检测设备设定以下检测条件:LED灯的电压和电流分别为0.1~10 V和0.1~100 mA;相机的曝光时间为0.1~10 s。

一种藻蓝蛋白荧光探针及其用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种藻蓝蛋白荧光探针及其用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法。

背景技术

[0002] 藻蓝蛋白是从藻类分离出来的一种天然色素蛋白,不仅可作为天然蓝色色素用于食品、保健品、化妆品等领域,而且,藻蓝蛋白还具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和提高免疫等生理功能而广泛应用于医药保健领域。同时,藻蓝蛋白因其强烈的荧光性能可制成荧光试剂探针和荧光示踪剂,用于医疗诊断、免疫学、生物工程和其他研究领域。相对于其他荧光素,藻蓝蛋白具有摩尔消光系数大、荧光量子产率高以及斯托克斯位移大的特点,其脱辅基蛋白链含有氨基和羧基可以与其他分子成键,并同时保持两种分子的生物学活性。

[0003] 免疫层析技术(immunochromatography)是近20世纪末发展起来的一种分析方法,具有特异性、操作简单、快速等优点,因而成为环境保护、食品安全快速检测分析研究的热点。

[0004] 根据待检物质和抗体不同的结合模式,可将免疫层析技术分为直接法和竞争法。直接法用于检测多抗原位点的生物大分子,如人类、动物疫病的早期诊断、生化分析、抗体水平监测。竞争法用于抗原结合位点少或仅具有单个抗原结合位点的小分子化合物,多采用标记抗体模式。

[0005] 竞争法的工作原理为:在毛细管作用力下,待检物质先与结合垫处的标记抗体进行识别而结合,形成抗原-标记抗体复合物继续向前层析,到达T线时,未结合的标记抗体继续与T线的偶联抗原结合形成偶联抗原-标记抗体复合物而显色,当待检样品中的抗原越多,结合的标记抗体越多,则T线上结合到的标记抗体就越少,显色越弱;反之,当待检样品中的抗原越少,结合的标记抗体越少,则T线上结合到的标记抗体就越多,显色越强;抗原-标记抗体复合物或未结合的标记抗体与C线上的二抗结合,C线显色。竞争法常用于检测农药残留、重金属离子、真菌毒素等。

[0006] 目前,用于免疫层析技术的标记物主要为胶体金,其存在无法定量的缺点。因此,需要一种能够新的定量跟踪的标记物,同时,能保持快速测定、操作简便的优点。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对上述技术现状,提供一种藻蓝蛋白荧光探针及其用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法。本发明的检测方法操作简单快捷,适用于现场大批量样品的快速检测。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种藻蓝蛋白荧光探针的制备方法:按摩尔比为10~1:1往pH 为5.0~8.5、浓度为0.01~0.2 M的PBS缓冲液中加入藻蓝蛋白和黄曲霉毒素B1单克隆抗体,振荡混匀,向反应体系中

加入体积分数为0.01%~0.5%的交联剂戊二醛,振荡混匀,于10~45℃摇床中匀速振荡,避免反应2~20 h。

[0009] 一种如上所述的制备方法制得的藻蓝蛋白荧光探针,含1~10 $\mu\text{g/mL}$ 黄曲霉毒素B1单克隆抗体。

[0010] 一种将上述的藻蓝蛋白荧光探针用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法,包括以下步骤:

1) 用移液枪吸取20~100 μL 、0.1~30ng/mL的黄曲霉毒素B1待测样品,再加入10~70 μL 含1~10 $\mu\text{g/mL}$ 黄曲霉毒素B1单克隆抗体的藻蓝蛋白荧光探针,混匀,竞争反应2~12 min;

2) 将步骤1)的反应液滴加至检测卡孔中,层析时间为5~12 min,将检测卡放入荧光免疫层析快速检测设备中进行检测。

[0011] 步骤2)所述检测卡的制备方法为:取0.01 mol/L、pH=7.0 PBS缓冲液分别稀释牛血清蛋白偶联黄曲霉毒素B1抗原和羊抗鼠二抗分别至0.01~5 mg/L和0.05~10 mg/L,用划膜器具均匀地画在NC膜上,分别为检测线(T线)和质控线(C线),于室温下干燥2~12 h;将NC膜、样品垫、吸水垫依次组装在塑料底板上,装入检测卡,并放入密封袋中于4℃下保存以备。

[0012] 步骤2)所述的荧光免疫层析快速检测设备,设置参数如下:LED灯滤光片波长为500~600 nm;相机滤光片的中心波长为600~750 nm。

[0013] 步骤2)所述的荧光免疫层析快速检测设备设定以下检测条件:LED灯的电压和电流分别为0.1~10 V和0.1~100 mA;相机的曝光时间为0.1~10 s。

[0014] 本发明的优点在于:

本发明应用了天然藻蓝蛋白作为标记物,克服了传统人工合成标记物价格昂贵的缺陷;合成时产生有毒物质、污染环境的优点,并融合了自身摩尔消光系数大、荧光量子产率高以及斯托克斯位移大的优点;该检测方法具有操作简单快捷,适用于现场大批量样品的快速检测。

附图说明

[0015] 图1是免疫试纸条的检测原理图;

图2是荧光免疫层析快速检测设备;左为实物图,右为结构图;

图3是免疫试纸条检测AFB1的标准曲线。

具体实施方式

[0016] 以下通过试验例来进一步阐述具体实施方式,但不用来限制本发明的范围。

[0017] 实施例1

一种藻蓝蛋白荧光探针用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法,具体步骤为:

1) 快速检测卡的制备:取0.01 mol/L PBS (pH=7.0) 缓冲液分别稀释牛血清蛋白偶联黄曲霉毒素B1抗原和羊抗鼠二抗至2 mg/L和5 mg/L,用划膜器具均匀地画在NC膜上,分别为检测线(T线)和质控线(C线),于室温下干燥4 h。将NC膜、样品垫、吸水垫依次组装在塑料底板上,装入检测卡,并放入密封袋中于4℃下保存以备;

2) 藻蓝蛋白偶联黄曲霉毒素荧光探针的制备:按摩尔比为5:1往pH 为6.5、浓度为0.1

M的PBS缓冲液中加入藻蓝蛋白和黄曲霉毒素B1单克隆抗体,振荡混匀;向反应体系中加入体积分数为0.3%的交联剂戊二醛,振荡混匀,于25℃摇床中匀速振荡,避光反应2 h,制得含4 μg/mL黄曲霉毒素B1单克隆抗体的藻蓝蛋白荧光探针;

3)用移液枪吸取50 μL一定浓度的黄曲霉毒素B1待测样品,再加入50 μL含4 μg/mL黄曲霉毒素B1单克隆抗体的藻蓝蛋白荧光探针,混匀,竞争反应10 min;将混合后待检样品滴加至检测卡孔中,层析时间为7 min,将检测卡放入荧光免疫层析快速检测设备中进行检测;检测时荧光免疫层析快速检测设备设置的参数如下:LED灯滤光片波长为500 nm;相机滤光片的中心波长为750 nm;同时,设定检测条件如下:LED灯的电压和电流分别为5 V和20 mA;相机的曝光时间为1 s。

[0018] 实施例2

一种藻蓝蛋白荧光探针用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法,具体步骤为:

1)快速检测卡的制备方法为:取0.01 mol/L PBS (pH=7.0)缓冲液分别稀释牛血清蛋白偶联黄曲霉毒素B1抗原和羊抗鼠二抗至5 mg/L和2 mg/L,用划膜器具均匀地画在NC膜上,分别为检测线(T线)和质控线(C线),于室温下干燥12 h。将NC膜、样品垫、吸水垫依次组装在塑料底板上,装入检测卡,并放入密封袋中于4℃下保存以备;

2)藻蓝蛋白偶联黄曲霉毒素荧光探针的制备:按摩尔比为15:1往pH 为7.0、浓度为0.1 M的PBS缓冲液中加入藻蓝蛋白和黄曲霉毒素B1单克隆抗体,振荡混匀;向反应体系中加入体积分数为0.25%的交联剂戊二醛,振荡混匀,于25℃摇床中匀速振荡,避光反应5 h,制得含5 μg/mL黄曲霉毒素B1单克隆抗体的藻蓝蛋白荧光探针;

3)用移液枪吸取50 μL一定浓度的黄曲霉毒素B1待测样品,再加入50 μL含5 μg/mL黄曲霉毒素B1单克隆抗体的藻蓝蛋白荧光探针,混匀,竞争反应10 min;将混合后待检样品滴加至检测卡孔中,层析时间为10 min。将检测卡放入荧光免疫层析快速检测设备中进行检测;检测时,荧光免疫层析快速检测设备设置的参数如下:LED灯滤光片波长为550 nm;相机滤光片的中心波长为650 nm;同时,设定检测条件如下:LED灯的电压和电流分别为3 V和20 mA;相机的曝光时间为2 s。

[0019] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

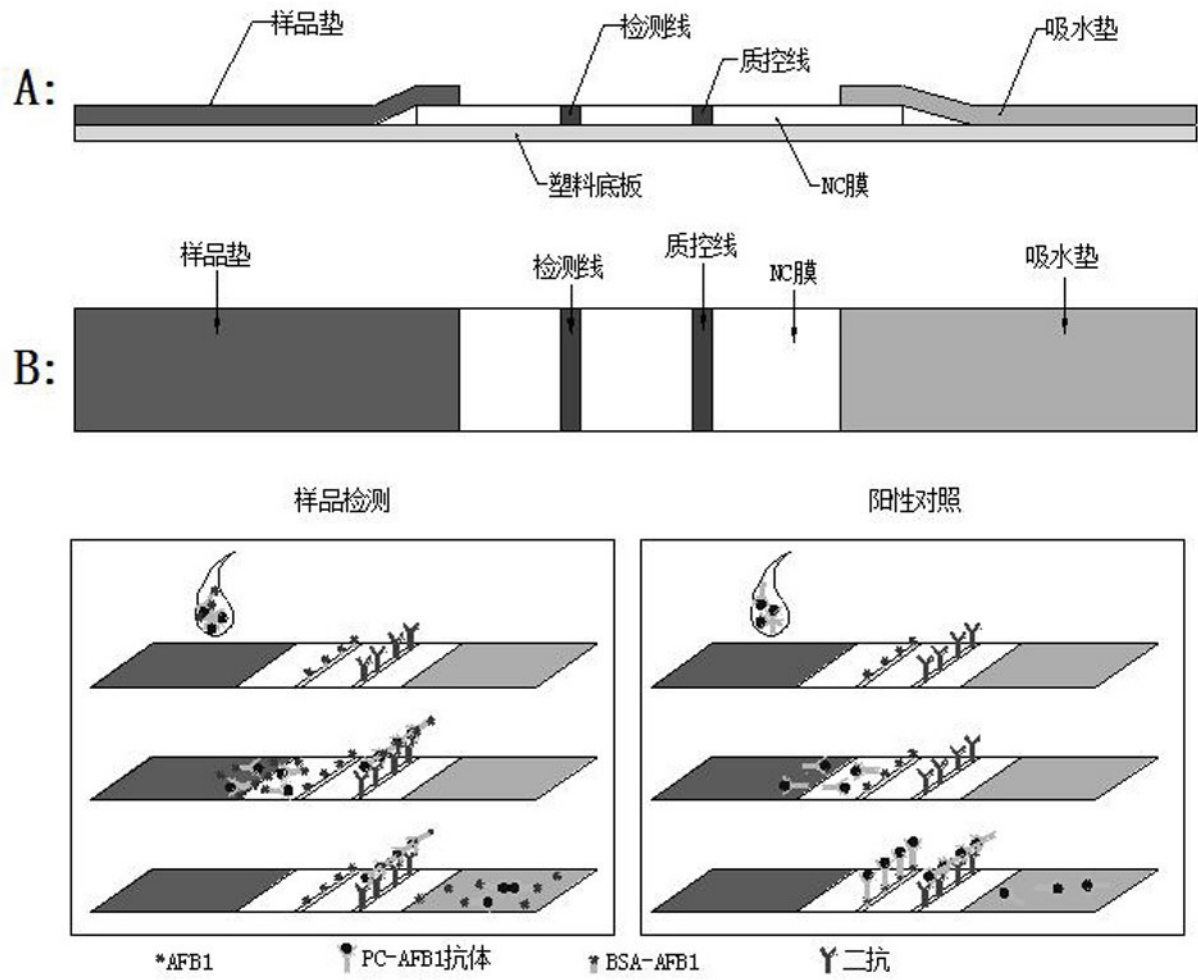


图1

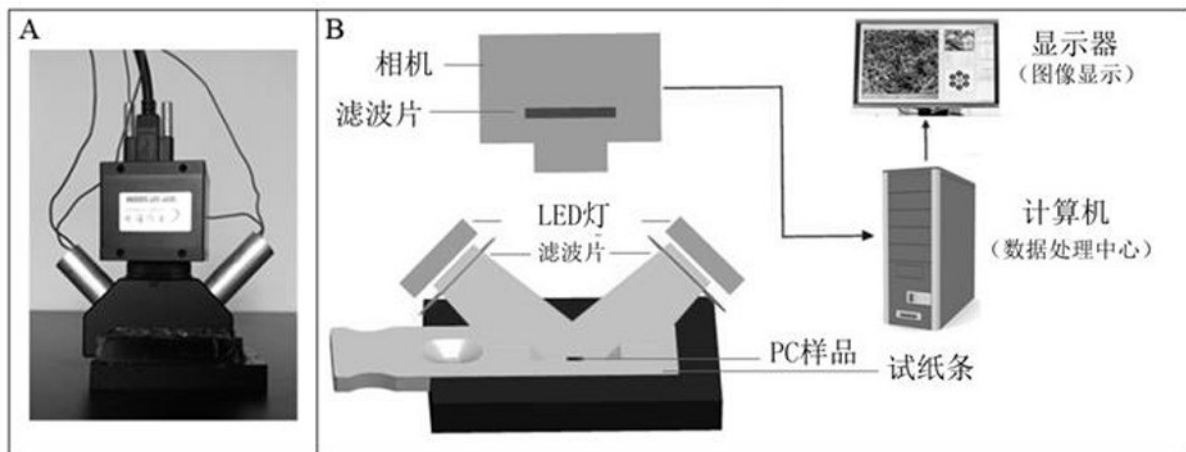


图2

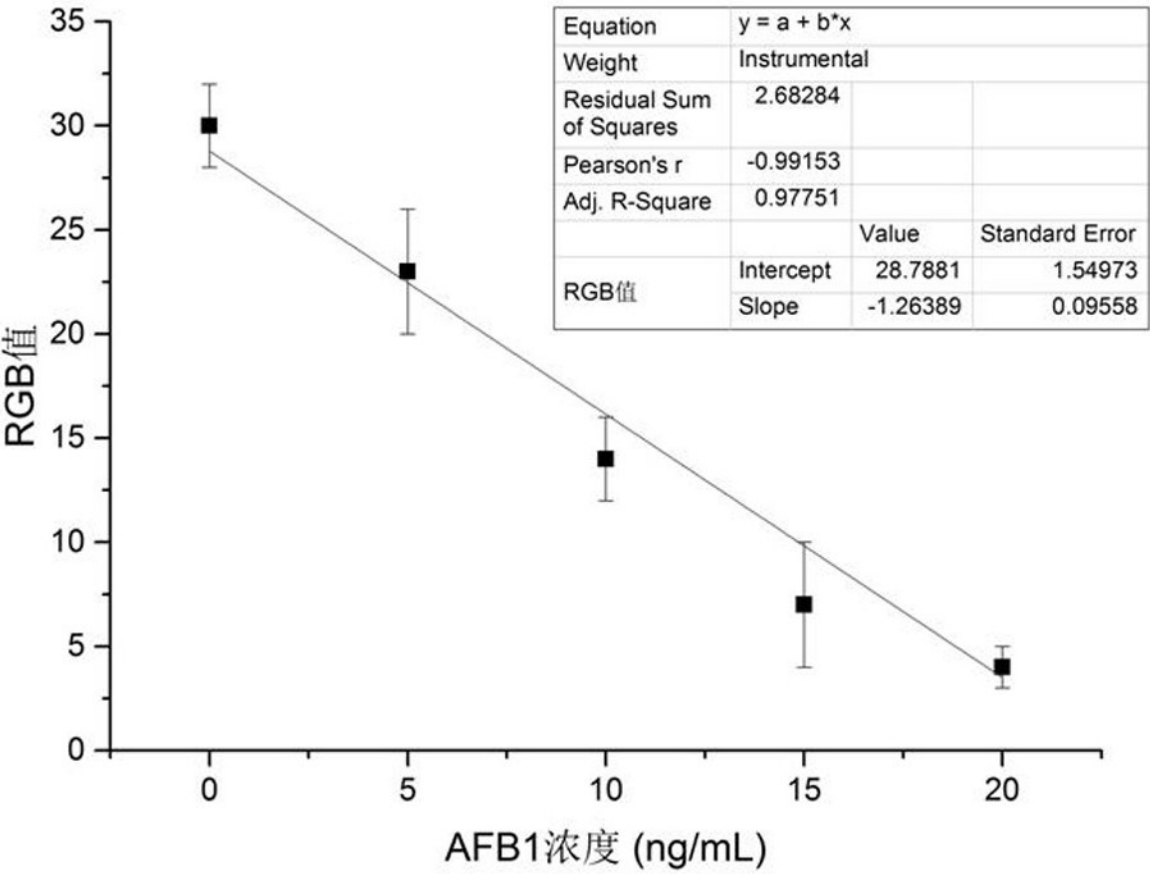


图3

专利名称(译)	一种藻蓝蛋白荧光探针及其用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法		
公开(公告)号	CN108732346A	公开(公告)日	2018-11-02
申请号	CN201810543859.5	申请日	2018-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	福州大学		
申请(专利权)人(译)	福州大学		
当前申请(专利权)人(译)	福州大学		
[标]发明人	郑允权 莫柳达 张文怡 黄剑东 郭养浩 石贤爱		
发明人	郑允权 莫柳达 张文怡 黄剑东 郭养浩 石贤爱		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/544 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/544 G01N33/56961 G01N33/577 G01N2333/38		
代理人(译)	蔡学俊 李翠娥		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种藻蓝蛋白荧光探针及其用于黄曲霉毒素B1快速检测的方法。将荧光藻蓝蛋白与黄曲霉毒素B1单克隆抗体进行偶联制成荧光探针，并将其应用于试纸条快速检测中，基于竞争免疫层析法原理，建立一种黄曲霉毒素B1快速测定的方法。本发明的快速检测试纸条操作简单快捷，适用于现场大批量样品的快速检测。

