



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101694496 A

(43) 申请公布日 2010.04.14

(21) 申请号 200910305934.5

(22) 申请日 2009.08.21

(71) 申请人 天津生机集团股份有限公司  
地址 301609 天津市静海县天宇科技园 2 号

(72) 发明人 伦艳霞

(74) 专利代理机构 天津市三利专利商标代理有限公司 12107

代理人 刘英兰

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/552(2006.01)

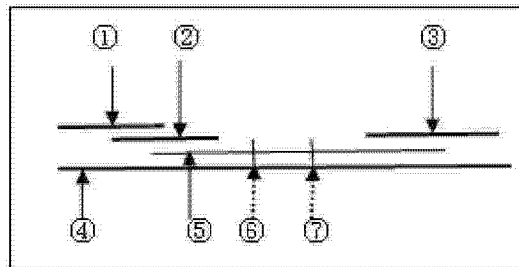
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

黄曲霉毒素快速检测试纸盒及其制备方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种黄曲霉毒素快速检测试纸盒及其制备方法,该试纸盒包括壳体和试纸条;试纸条用聚氯乙烯作背衬,设有的胶体金试纸条由四部分组成;所述试纸条在制备完全抗原时,利用不同的载体蛋白合成两种抗原,一种是用牛血清白蛋白(BSA)作载体合成 AFB<sub>1</sub>-BSA 作为免疫抗原;一种是用卵清白蛋白(OVA)作载体合成 AFB<sub>1</sub>-OVA 作为包被抗原;将胶体金-抗黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>结合物原液 1mL,用 80 μL 0.01M PBS 溶液稀释混匀即配成浓度为 15 μg/mL 的工作液;玻璃纤维膜吸附胶体金-抗黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>单克隆抗体结合物的制备以及硝酸纤维素膜(T)线包被 100 μg/mL 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>-OVA 复合物,(C)线包被 50 μg/mL 羊抗鼠 IgG 抗体。该试纸盒使用简单、快速、准确、灵敏;检测食品、饲料等,应用前景广阔。



1. 一种黄曲霉毒素快速检测试纸盒,包括塑料壳体和置于其中的试纸条;所述塑料壳体设有加样孔和观测孔;其特征在于:所述试纸条用聚氯乙烯作背衬,设有的胶体金试纸条主要由四部分组成:

(1) 在试纸条加样区粘贴样品垫;

(2) 在样品垫之下,硝酸纤维素膜之上粘贴吸附胶体金-抗黄曲霉毒素 AFB1 单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜,样品垫与玻璃纤维膜连接处有 3mm 重叠区;

(3) 在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜检测线包被黄曲霉毒素 AFB1-OVA 复合物,质控线包被羊抗鼠 IgG 抗体,然后再用 1% 牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜位于玻璃纤维膜之下,硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜连接处 2mm 重叠区;

(4) 在试纸条另一端粘贴吸水纸,吸水纸位于硝酸纤维素膜上端,吸水纸与硝酸纤维素膜的连接处有 2mm 重叠区。

2. 一种根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素快速检测试纸盒的制备方法,其特征在于:所述试纸条在制备完全抗原时,利用不同的载体蛋白合成两种抗原,一种是用牛血清白蛋白 (BSA) 作载体合成 AFB1-BSA 作为免疫抗原;一种是用卵清白蛋白 (OVA) 作载体合成 AFB1-OVA 作为包被抗原;将胶体金-抗黄曲霉毒素 AFB1 结合物原液 1mL,用 80  $\mu$  L 0.01M PBS 溶液稀释混匀即配成浓度为 15  $\mu$  g/mL 的工作液;玻璃纤维膜吸附胶体金-抗黄曲霉毒素 AFB1 单克隆抗体结合物的制备以及硝酸纤维素膜检测线包被 100  $\mu$  g/mL 黄曲霉毒素 AFB1-OVA 复合物,质控线包被 50  $\mu$  g/mL 羊抗鼠 IgG 抗体。

## 黄曲霉毒素快速检测试纸盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种对腐生真菌所产生代谢物的检测技术,特别涉及一种黄曲霉毒素快速检测试纸盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 真菌毒素对粮食、饲料的污染是一个全球性的问题,我国是农业大国,人民以谷物为主食的饮食习惯,使真菌毒素的污染问题显得更为突出。黄曲霉毒素是真菌毒素的重要代表之一,对世界上 30 多个国家和地区进行的调查表明,危害程度排在第一位。黄曲霉毒素是黄曲霉、寄生曲霉等的代谢产物,对人、畜肝脏的损害程度为所有生物毒素之首。黄曲霉毒素容易污染花生、玉米、大米、小麦、豆类、坚果类、肉类、乳及乳制品、水产品等食品,其中花生和玉米最容易受到污染。现已知饲料、食品或培养基中的黄曲霉毒素有 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 以及由 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub> 在体内经过羟化而衍生成的代谢产物 AFM<sub>1</sub>、AFM<sub>2</sub> 等,在天然污染的食物中以 AFB<sub>1</sub> 的毒性最强,是已知最强的经口致癌物。

[0003] 黄曲霉毒素超标是我国食品出口频繁遇到的问题,我国每年食品出口因黄曲霉毒素超标而遭受通报扣留屡屡发生,尤其体现在花生、谷物、果仁中。为了降低 AFB<sub>1</sub> 对人类的危害,世界各国不断制定尽可能低的食物中 AFB<sub>1</sub> 的限量标准,通过检验机构进行检测。高灵敏的仪器分析方法和快速有效的免疫分析方法正逐渐被应用于 AFB<sub>1</sub> 的检测。目前测定 AFB<sub>1</sub> 的主要方法有薄层层析法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、酶联免疫吸附法 (ELISA)、免疫亲和层析净化高效液相色谱等。随着经济的发展,尤其是中国加入 WTO 后,农副产品进出口贸易的扩大,人们对食品质量和健康水平要求的提高,研发并推广简便、快速、灵敏、特异性并适用于样品实地检测的方法势在必行。

[0004] 免疫胶体金技术是 80 年代继三大标记技术 (荧光素、放射性同位素和酶) 后发展起来并固相标记 (以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体反应) 的一种新型的免疫标记技术。目前已广泛应用于临床诊断,尤其是在医学临床检验中的应用。当前应用较多的免疫胶体金快速诊断技术主要有两种:斑点免疫金渗滤试验和免疫胶体金层析法。该诊断技术最大特点是单份测定、简单快速、特异敏感,像层析试纸条技术,不需任何仪器设备和试剂,几分钟就可用肉眼观察到颜色鲜明的实验结果,并可保存实验结果。免疫胶体金层析技术现已成为当今快速敏感的免疫学检测技术之一,特别适合于广大基层单位、医院、野外作业人员以及大批量时间紧的检测和大规模普查。目前胶体金主要应用于禽流感、家畜疫病、农药残留、食品安全等多个方向,因此该技术具有巨大的发展潜力和应用前景。

[0005] 因此,基于当前形势的迫切需要,亟需提供一种方便、快捷且敏感度高的检测方法,即研制开发一种快速检测粮食、饲料中的黄曲霉毒素快速检测试纸盒及其制备方法,造福于人类,将是该技术领域科研人员急需深入研究开发的新课题之一。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服上述不足之处,提供一种应用效果显著的黄曲霉毒素快速

检测试纸盒及其制备方法。

[0007] 为实现上述目的本发明所采用的实施方式如下：一种黄曲霉毒素快速检测试纸盒，包括塑料壳体 and 置于其中的试纸条；所述塑料壳体设有加样孔和观测孔；其特征在于：所述试纸条用聚氯乙烯 (PVC) 作背衬，设有的胶体金试纸条主要由四部分组成：

[0008] (1) 在试纸条加样区粘贴样品垫；

[0009] (2) 在样品垫之下，硝酸纤维素膜之上粘贴吸附胶体金抗黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜（结合垫），样品垫与玻璃纤维膜连接处有 3mm 重叠区；

[0010] (3) 在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜，在硝酸纤维素膜检测线 (T 线) 区包被黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>-OVA 复合物，质控线 (C 线) 区包被羊抗鼠 IgG 抗体，然后再用 1% 牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜位于玻璃纤维膜之下，硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜连接处 2mm 重叠区；

[0011] (4) 在试纸条另一端粘贴吸水纸，吸水纸位于硝酸纤维素膜上端，吸水纸与硝酸纤维素膜的连接处有 2mm 重叠区。

[0012] 一种根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素快速检测试纸盒的制备方法，其特征在于：所述试纸条在制备完全抗原时，利用不同的载体蛋白合成两种抗原，一种是用牛血清白蛋白 (BSA) 作载体合成 AFB<sub>1</sub>-BSA 作为免疫抗原；一种是用卵清白蛋白 (OVA) 作载体合成 AFB<sub>1</sub>-OVA 作为包被抗原；将胶体金 - 抗黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 结合物原液 1mL，用 80 μL 0.01M PBS 溶液稀释混匀即配成浓度为 15 μg/mL 的工作液；玻璃纤维膜吸附胶体金 - 抗黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体结合物的制备以及硝酸纤维素膜 (T) 线包被 100 μg/mL 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>-OVA 复合物，(C) 线包被 50 μg/mL 羊抗鼠 IgG 抗体。

[0013] 所述塑料壳体由加样孔和观测孔组成；在观测孔进行结果判定：阴性，检测线 (T 线) 和质控线 (C 线) 同时出现，表明样品中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 的浓度小于 5ng/mL；阳性，质控线 (C 线) 出现，检测线 (T 线) 不出现，表明样品中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 的浓度大于 5ng/mL。

[0014] 本发明的有益效果是：提供了一种简单、快速检测黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 胶体金检测试纸盒及其制备方法，即采用胶体金免疫层析试纸条检测法；该检测技术不需要任何仪器设备、费用较低，在 5 ~ 10min 之内就能检测出样品中是否含有黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 及进行半定量检测。黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 金标检测试纸条属于生物工程产品，主要用于检测花生、玉米、大米、植物油、豆类、发酵食品、乳制品、饲料原料、配合饲料、中药原料和中成药等样品中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 的含量。检测时只需将检测样品滴入样品孔中，2 ~ 3min 后即可在观测区中观察到检测线 (T 线) 和质控线 (C 线) 的显色情况，从而确定样品中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 含量是否达标。如果 T 线和 C 线均呈红色，则待检样品中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 达标；如果 T 线不变色，仅 C 线变色，则样品中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 含量超标。与现有测试方法（薄层色谱法、高限液相色谱法、酶联免疫吸附法）相比，本试纸盒不需要大型检测仪器，具有简单、快速、准确、灵敏等优点，而且具有广阔的应用前景，同时具有巨大的经济效益和社会效益。

#### 附图说明

[0015] 图 1 是黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 快速检测试纸结构示意图。

[0016] 图中：1 样品垫，2 玻璃纤维膜，3 吸水垫，4PVC 板，5 硝酸纤维素膜，6 检测线，7 质控线。

## 具体实施方式

[0017] 以下结合较佳实施例,对依据本发明提供的具体实施方式详述如下:

[0018] 实施例

[0019] 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 快速检测试纸盒是由塑料壳体和 0.4cm×6.5cm 试纸条所构成,试纸盒外壳表面有加样孔和观测孔,而试纸条被固定在壳体的中间位置,试纸条用聚氯乙烯(PVC)做背衬,形成 PVC 板 4;设有的胶体金试纸条主要由四部分组成:

[0020] (1) 在试纸条加样区粘贴样品垫 1;

[0021] (2) 在样品垫 1 之下,硝酸纤维素膜 5 之上粘贴吸附胶体金-抗黄曲霉

[0022] 毒素 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜 2(结合垫),样品垫 1 与玻璃纤维膜 2 连接处有 3mm 重叠区;

[0023] (3) 在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜 5,在硝酸纤维素膜检测线 6(T 线)包被黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>-OVA 复合物,质控线 7(C 线)包被羊抗鼠 IgG 抗体, T 线和 C 线相距 0.5cm;然后再用 1%牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜 5,硝酸纤维素膜位于玻璃纤维膜 2 之下,硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜连接处有 2mm 重叠区;

[0024] (4) 在试纸条另一端粘贴吸水纸,形成吸水垫 3,吸水纸位于硝酸纤维素膜上端,吸水纸与硝酸纤维素膜的连接处有 2mm 重叠区。

[0025] 所述的黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 快速检测试纸盒的制备方法,其特征在于:所述试纸条在制备完全抗原时,利用不同的载体蛋白合成两种抗原,一种是用牛血清白蛋白(BSA)作载体合成 AFB<sub>1</sub>-BSA 作为免疫抗原;一种是用卵清白蛋白(OVA)作载体合成 AFB<sub>1</sub>-OVA 作为包被抗原;将胶体金-抗黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 结合物原液 1mL,用 80 μL 0.01M PBS 溶液稀释混均即配成浓度为 15 μg/mL 的工作液;玻璃纤维膜吸附胶体金-抗黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体结合物的制备以及硝酸纤维素膜(T)线包被 100 μg/mL 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>-OVA 复合物,(C)线包被 50 μg/mL 羊抗鼠 IgG 抗体。

[0026] 所述塑料壳体由加样孔和观测孔组成;在观测孔进行结果判定:阴性,检测线(T线)和质控线(C线)同时出现,表明样品中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 的浓度小于 5ng/mL;阳性,质控线(C线)出现,检测线(T线)不出现,表明样品中黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 的浓度大于 5ng/mL。

[0027] 应用试验分析实例:

[0028] 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 快速检测试纸盒的主要反应是免疫学的抗原抗体反应,具体制备步骤涉及如下:

[0029] 1. AFB<sub>1</sub> 完全抗原的制备:

[0030] 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 是小分子有机化合物,相对分子量为 312.04,是一种典型的半抗原,以牛血清白蛋白(BSA)为载体蛋白,用 EDC 法合成 AFB<sub>1</sub> 完全抗原,合成步骤如下:

[0031] (1) AFB<sub>1</sub> 的活化根据 Morgan 报道的方法并加以改进,精密称取 10mg AFB<sub>1</sub> 溶于 6mL(甲醇:水:吡啶=4:1:1;体积比)混合液中,加入 20mg 缩甲基羟胺半盐酸盐,85°C 回流 3h,室温放置过夜(大约 10h),旋转蒸发仪减压蒸出溶剂;所得沉淀物用少量氯仿溶解,以氯仿:甲醇=9:1(体积比)为展开剂,与标准 AFB<sub>1</sub> 的展开值 R<sub>f</sub> 进行对照,R<sub>f</sub> 值为 0.25 左右的是 AFB<sub>1</sub> 的活化物;收集 AFB<sub>1</sub> 活化物,用少量的甲醇溶解,待用。

[0032] (2) AFB<sub>1</sub> 完全抗原的合成精密称取 AFB<sub>1</sub> 活化物 5mg 于 5mL 的磨口烧瓶中,加 5mL

无水二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液使其溶解, 放置在 4℃ 冰箱中冷却; 另取 50mg 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 溶于 1.0mL 蒸馏水中, 取 44mg 牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 4.0mL 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中, 冰箱中冷却待用; 在磁力搅拌的同时, 将 0.5mL EDC 溶液逐滴的加入 AFB<sub>1</sub> 溶液中, 4℃ 搅拌, 避光反应 1h。在反应液中缓慢滴加 BSA 溶液, 继续搅拌反应 1h 后, 再加入 0.5mL EDC 溶液, 4℃ 下反应 16h; 将产物溶液用 0.01mol/L PBS 溶液在 4℃ 下透析 72h, 每 12h 换透析液 1 次, 用小瓶分装, 真空冷冻干燥后, 置 -20℃ 保存。

### [0033] 2. 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的制备

[0034] (1) BALB/c 小鼠的免疫程序和方法, 用完全抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 免疫 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 第一次经腹腔及皮下多点注射, 抗原与弗氏完全佐剂等体积混匀乳化, 每只注射 0.1mL; 第 14 天、28 天分别用费氏不完全佐剂充分乳化的抗原进行第 2 次、第 3 次免疫, 剂量与第一次剂量相同; 第三次免疫一周后尾静脉采血, 测血清效价, 当效价达到 1:5000 以上时即可进行融合; 在融合前 3 天对小鼠不加佐剂加强免疫一次, 即经腹腔注射生理盐水稀释的抗原 100 μg/mL, 0.1mL/只, 加强免疫 3 天后, 取其脾细胞进行融合。

[0035] (2) 免疫脾细胞与骨髓瘤细胞的融合, 取免疫后小鼠脾细胞 10<sup>8</sup> 个/mL 与对数生长期小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0, 10<sup>7</sup> 个/mL) 以体积比为 10:1 混合, 用 50% 聚乙二醇 (PEG1500) 作为融合剂; 融合细胞悬于含 20% 胎牛血清的黄嘌呤氨基喋呤胸腺嘧啶核苷 (HAT) 选择培养基内, 使脾细胞含量达 2×10<sup>6</sup>/mL; 加入预先加有 BALB/c 小鼠腹腔渗出细胞做饲养细胞 (1~5×10<sup>4</sup> 个/孔) 的 96 孔细胞培养板, 置 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 孵箱中培养。当镜检杂交瘤克隆细胞生长达 1/3~1/2 视野时, 取上清液进行阳性细胞筛选。

[0036] (3) 克隆化, 采用有限稀释法进行阳性杂交瘤细胞株的克隆化, 及时检测抗体效价; 将阳性孔的细胞移至 24 孔板中扩大培养; 每个克隆应尽快冻存。

[0037] (4) 单克隆抗体的制备及纯化将培养的杂交瘤细胞离心, 弃去上清液, 用生理盐水将杂交瘤细胞悬浮, 并将细胞数调至 1~5×10<sup>6</sup> 个/mL; 选取 10 周龄的 BALB/c, 先腹腔注射液体石蜡 0.5mL/只, 1 周后腹腔注射杂交瘤细胞 1~5×10<sup>6</sup> 个/只, 10 天后抽取小鼠腹水; 将腹水离心 5000rpm, 10min, 收集上清液分装并测定效价, 置液氮中冻存备用; 采用辛酸-硫酸铵法对腹水进行纯化。

### [0038] 3. 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 免疫胶体金的制备

[0039] (1) 胶体金的制备准确称取 1g 氯金酸溶于 100mL 双蒸水中, 配成 1% 氯金酸盐溶液, 然后将 5mL 1% 氯金酸溶液加入 495mL 超纯水, 然后加入圆底烧瓶中加热, 煮沸后立即加入用 0.22 μm 滤器过滤的 10mL 1% 柠檬酸三钠溶液, 溶液的颜色依次由黑色、紫色、深蓝、变为酒红色, 当溶液的颜色完全变为透明的酒红色时, 继续回流 5min 后停止加热, 从磁力搅拌器上取下, 冷却至室温, 用超纯水补足至 500mL, 转入洁净的锥形玻璃瓶中, 4℃ 保存备用。

[0040] (2) 金标抗体的制备取制备好的胶体金溶液 20mL, 用 0.1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调 pH 至 8.6; 在磁力搅拌器上边搅拌边缓慢加入纯化好抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体 1mL (抗体标记前须用双蒸水充分透析除盐, 避免造成凝集), 终浓度为 50 μg/mL, 室温搅拌 20min; 加入质量分数为 10% PEG20000 溶液, 终浓度为 0.05%; 加入质量分数为 10% 的 BSA 溶液, 终浓度为 1%, 磁力搅拌使其充分混匀; 加入与胶体金抗体结合物同体积的 10% NaCl, 静置 1h; 用高速冷冻离心机 15000rpm, 4℃、离心 40min, 弃上清, 沉淀溶解于适量的 0.01M PBS 溶液中, 用 0.22 μm 的

滤膜过滤,终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0041] 4. 硝酸纤维素膜检测线(T线)和质控线(C线)的制备

[0042] (1) 黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>-卵清白蛋白(OVA)的合成精密称取 AFB<sub>1</sub> 活化物 5mg 于 5mL 的磨口烧瓶中,加 5mL 无水二甲基甲酰胺(DMF)溶液使其溶解,放置在 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷却;另取 20mg 碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶于 1.0mL 蒸馏水中,取 20mg 卵清白蛋白(OVA)溶于 2.0mL 0.01M 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中,冰箱中冷却待用;在磁力搅拌的同时,将 0.5mL EDC 溶液逐滴的加入 AFB<sub>1</sub> 溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$  搅拌,避光反应 1h。在反应液中缓慢滴加 OVA 溶液,继续搅拌反应 1h 后,再加入 0.5mL EDC 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$  下反应 16h;将产物溶液用 0.01M PBS 溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$  下透析 72h,每 12h 换透析液 1 次,用小瓶分装,真空冷冻干燥后,置 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用,用 0.01M PBS 溶液稀释至所需浓度 100  $\mu\text{g/mL}$ ,0.8  $\mu\text{L/cm}$ ,用于喷涂检测线。

[0043] (2) 羊抗鼠 IgG(质控线)购买于美国 Sigma 试剂公司。羊抗鼠 IgG 用 0.01M PBS 溶液稀释至所需浓度 50  $\mu\text{g/mL}$ ,4  $\mu\text{L/cm}$  用于喷涂质控线。

[0044] 本发明测定原理:本品采用高度特异性的抗原抗体反应及免疫层析分析技术,将试剂事先固定于硝酸纤维素膜上检测区(T)的 AFB<sub>1</sub>-OVA 偶联物、质控区(C)的羊抗鼠 IgG 和涂有胶体金-抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的玻璃纤维膜,通过单克隆抗体竞争结合 AFB<sub>1</sub>-OVA 偶联物来观测在质控线处形成抗金标抗体-金标抗体复合物,检测线处是否形成抗体-待测抗原-金标抗体复合物,从而确定样品中是否含有的 AFB<sub>1</sub>。

[0045] 测试时,在胶体金试纸盒的样品孔定量滴加 100  $\mu\text{L}$  样品处理液,如 AFB<sub>1</sub> 在样品中浓度低于 5ng/mL 时,特异性抗原不能与胶体金-AFB<sub>1</sub> 全部结合;胶体金抗体在层析过程中会被固定在硝酸纤维素膜上的 AFB<sub>1</sub>-OVA 偶联物结合,在测试区(T)内会出现一条紫红色条带,结果判定为阴性。阴性样品在检测过程中由于缺少抗体抗原竞争反应,将会在测试区(T)内出现紫红色条带。如果 AFB<sub>1</sub> 在样品中浓度高于 5ng/mL 时,特异性抗原与胶体金-AFB<sub>1</sub> 全部结合,从而在测试区(T)内因为竞争反应不会与 AFB<sub>1</sub>-OVA 偶联物结合而不出现紫红色条带,结果判定为阳性。无论 AFB<sub>1</sub> 是否存在于样品中,一条紫红色条带都会出现在质控区(C)内,当质控线(C)不显示出红色条带,则无论位置 T 显示出红色线条与否,该试纸卡判为无效,应取新的胶体金试纸盒重新测试。

[0046] 采用上述黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 快速检测试纸盒可以检测花生、玉米、大米、植物油、豆类、发酵食品、乳制品、饲料原料、配合饲料、中药原料和中成药等样品。

[0047] 将不同的待检样品分为三类,样品前处理方法分别为:

[0048] (1) 谷物、饲料等淀粉质原料:取 5g 样品并粉碎,再从中取 2.0g 均匀粉碎试样于配套离心管中;加入 4mL 纯净水和 4.0mL 的乙酸乙酯,将瓶塞盖紧密封,充分振荡 5min,静置 10min;将上清液用吸管出 2.0mL 到蒸发皿或小玻璃杯中,用电风吹干上清液;用铝箔袋内配套吸管,吸规定的稀释液量反复冲洗,彻底溶解杯底所有的固体,此溶解液为样品提取液即检测液。

[0049] (2) 食用油(花生油、香油、菜油等):称 2.0g 油样于小烧杯中,用 8mL 正己烷分 3 次将试样转移至分液漏斗中,准确加入 4mL 纯净水充分振荡 3min,吸去上层正己烷层,再加入 4mL 的乙酸乙酯,将瓶塞盖紧密封,充分振荡 5min,静置 10min,将上清液用吸管出 2.0mL 到小玻璃杯中,用电风吹干,再用稀释液溶解后为样品提取液。

[0050] (3) 牛奶:将检测牛奶样品置于室温,取样前将原奶摇匀,吸取 1mL 原奶,加入离心

管内,3000rpm/min,离心 5min,至管内上层液面出现明显的脂肪层,用吸管吸取脂肪层下脱脂牛奶样品至吸管刻度线位置,进行检测。

[0051] 具体检测步骤:

[0052] (1) 按样品制备处理方法处理样品后,得到检测样品提取液;

[0053] (2) 由铝箔袋内取出试纸卡,用滴管吸取待检样品溶液,滴加 2 滴于加样孔中,加样后开始计时,结果在 5min 时观测结果,超过 10min 的时间判读无效。

[0054] 上述参照实施例对该黄曲霉毒素快速检测试纸盒及其制备方法进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改,应属本发明的保护范围之内。

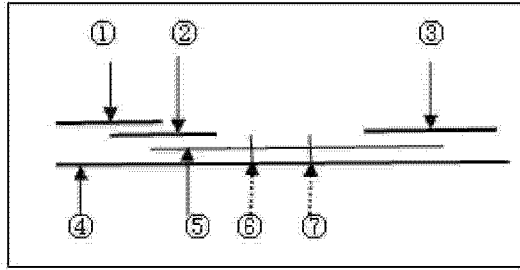


图 1

专利名称(译)	黄曲霉毒素快速检测试纸盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101694496A</a>	公开(公告)日	2010-04-14
申请号	CN200910305934.5	申请日	2009-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	天津生机集团		
申请(专利权)人(译)	天津生机集团股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津生机集团股份有限公司		
[标]发明人	伦艳霞		
发明人	伦艳霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/552		
代理人(译)	刘英兰		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种黄曲霉毒素快速检测试纸盒及其制备方法，该试纸盒包括壳体和试纸条；试纸条用聚氯乙烯作背衬，设有的胶体金试纸条由四部分组成；所述试纸条在制备完全抗原时，利用不同的载体蛋白合成两种抗原，一种是用牛血清白蛋白(BSA)作载体合成AFB1-BSA作为免疫抗原；一种是用卵清白蛋白(OVA)作载体合成AFB1-OVA作为包被抗原；将胶体金-抗黄曲霉毒素AFB1结合物原液1mL，用80μL0.01M PBS溶液稀释混均即配成浓度为15μg/mL的工作液；玻璃纤维膜吸附胶体金-抗黄曲霉毒素AFB1单克隆抗体结合物的制备以及硝酸纤维素膜(T)线包被100μg/mL黄曲霉毒素AFB1-OVA复合物，(C)线包被50μg/mL羊抗鼠IgG抗体。该试纸盒使用简单、快速、准确、灵敏；检测食品、饲料等，应用前景广阔。

