



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102841202 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 26

(21) 申请号 201110172360. 6

(22) 申请日 2011. 06. 24

(71) 申请人 安宝生

地址 519087 广东省珠海市唐家湾金凤路
18 号北师大珠海分校工程技术学院

申请人 袁剑锋
陈超

(72) 发明人 陈超 王英典 万一非 万沅松
龙云映 颜亭梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

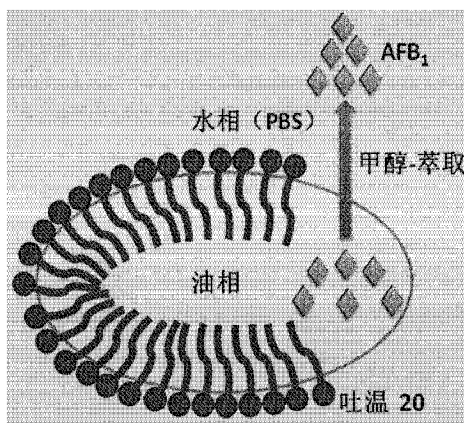
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种油脂中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种油脂中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒及其制备方法,属于免疫学和微生物菌类毒性代谢产物检测方法技术领域。结合吐温 20 乳化油脂样品技术,建立了可直接用于检测油脂中黄曲霉毒素 B₁ 的金标快速检测试纸,该试剂盒最低检出限度为 10ng/ml。本项发明的油脂中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒工作时无需复杂的油脂样品处理工艺,不仅缩短了预处理时间,而且突破了常规胶体金标免疫层析检测试纸只能检测水溶液样品的限制,可对含油脂样品直接检测。



1. 一种油脂中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒及其制备方法,其特征是由油脂样品处理液和金标试纸条组成,油脂经油脂样品处理液处理后,直接滴入金标试纸条进行黄曲霉毒素 B₁ 快速检测。

2. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒制备方法,其特征是油脂样品处理液由 2ml 规格的 Appendorf 管以及其中所装试剂组成,每管依照 4.9 : 2.1 : 3 的比例配制 PBS、甲醇和吐温 20 的混合溶液 1ml ;

3. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒制备方法,其特征是金标试纸条中吸水滤纸与吸水玻璃纤维,吸水玻璃纤维与硝酸纤维素膜的互相重叠区为 2mm。

4. 如权利要求 3 所述的检测试剂盒制备方法,其特征是金标试纸条中玻璃纤维与吸水滤纸及硝酸纤维素膜重叠形成 30° 斜面角。

一种油脂中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种油脂中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒及其制备方法,利用吐温 20 对油脂样品进行乳化处理,再将处理后样品用于黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析检测试纸条检测,属于免疫学和微生物菌类毒性代谢产物检测方法技术领域。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素 (AFT) 是一类结构和理化性质相似的二呋喃香豆素衍生物,基本结构含有一个二呋喃环和一个氧杂萘邻酮 (香豆素),前者是产毒和致癌的主要结构,后者对毒性和致癌性起加强作用。目前已发现的黄曲霉毒素有 20 种左右,AFT 在紫外线下能产生特定的荧光,根据荧光颜色不同,将其分为蓝紫色荧光的 B 族和黄绿色荧光的 G 族两大类及其衍生物,其中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 的急性毒性最强,是目前已经发现的 AFT 中的最强致癌物。AFB₁ 中毒症状表现为呕吐、厌食、发热、黄疸、腹水等肝炎症状,能诱导畸形、癌症的发生,对鱼类、禽类、家畜和灵长类动物的试验证明其肿瘤诱导作用极大,并能诱导多种癌症的发生。大量的流行病学调查证实,AFB₁ 的高摄入量和人类肝癌的发病率呈正相关关系,例如在非洲和东南亚等一些地区,AFB₁ 污染饮食被确定是肝细胞癌最主要的诱发因素之一,因此对食品中 AFB₁ 进行快速、有效的检测在食品安全上具有重要意义。

[0003] AFT 的分子量在 312-346 之间,熔点为 268-269℃。AFB₁ 分子量为 312.27,在中性水溶液中较稳定,在强酸性溶液中稍有分解,易被碱或强氧化剂破坏,加热至 268-269℃ 的熔解温度才开始裂解,故一般烹调温度不破坏其毒性。AFB₁ 和其它 AFT 一样,难溶于水、己烷、石油醚,易溶于甲醇、乙醇、氯仿、二甲基甲酰胺等有机溶剂,而花生等含油脂较高的粮食作物相对于其它食物而言更容易受到产 AFB₁ 的霉菌污染,因此被 AFB₁ 污染的食用油对人类健康危害极大。

[0004] 目前,金标-AFB₁ 快速免疫层析检测试纸是一种被大量应用的 AFB₁ 检测手段。此种试纸利用胶体金颗粒对黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物 (AFB₁-BSA) 进行标记,使其与样品中的 AFB₁ 竞争结合固定在试纸条检测线上的抗体,检测线如果显现胶体金的红色,则说明样品中不含有 AFB₁,反之则有。此试纸操作简单,灵敏度高,但是由于抗原抗体反应无法在油脂中发生,故此试纸目前无法检测含油脂的液体样品,在检测前必须对油脂样品进行复杂萃取处理和除油步骤,本项发明提供了一种简单处理油脂的液体,该液体与油脂混合后,可将混合液直接作为免疫层析检测试纸 (稍加改造) 的点样样品并进行快速鉴定。

发明内容

[0005] 本发明的目的:本发明提供一种简单、有效的油脂样品处理液,并对胶体金标免疫层析检测试纸结构稍加改造后,使其适用于这种油脂混合样品的检测。

[0006] 本发明技术方案:油脂样品处理原理是采用吐温 20 作为乳化剂对油脂样品进行乳化处理,使油脂在油脂处理液 (甲醇-PBS-吐温溶液) 中均匀分散为微小油滴,形成稳定的水包油 (O/W) 型乳化体系。在层析过程由于吐温 20 发挥着表面活性剂的作用,微小的油

滴完全被水分子稳固包裹着,使作为亲水胶体的抗体始终处于稳定的水相环境中,抗体的活性与功能不会受到影响,并且油样中的 AFB₁ 溶解于甲醇水溶液中可与 AFB₁-BSA 在水相中竞争结合固定的抗 AFB₁ 抗体,纤维素膜上的免疫反应正常发生而不受微小油滴干扰。

[0007] 检测原理:分别将 AFB₁-BSA 与羊抗鼠抗体固定在硝酸纤维素膜上作为检测线与质控线,在层析过程中,处理后的油脂样品中的 AFB₁ 首先与胶体金标记的小鼠抗 AFB₁ 抗体反应,在样品中 AFB₁ 浓度越大,结合在固定抗体上的金标 -AFB₁-BSA 就越少,检测线所显现的胶体金的红色就越浅。如果油样中 AFB₁ 浓度超过检测限度则所有的胶体金标记的小鼠抗 AFB₁ 毒素抗体都将被结合,则在检测线上就不会出现显色。正常情况下,无论是否含有 AFB₁,质控线都显示红色。通过观察检测线的颜色可直接定性判断油脂样品中 AFB₁ 的有无。

[0008] 本发明的有益结果:本发明采用改进的胶体金标免疫层析检测试纸,可直接对食用油中的 AFB₁ 进行检测。检测时将油脂处理液与油脂简单混合后,油脂即成为可有效进行免疫层析检测的乳浊液样品,根据观测区检测线和质控线的颜色变化,确定食用油样品中 AFB₁ 是否超标。与现有胶体金标免疫层析检测试纸相比,本项发明的 AFB₁ 快速检测试剂盒工作时无需复杂的油脂样品处理工艺,不仅缩短了预处理时间,而且突破了常规胶体金标免疫层析检测试纸只能检测水溶液样品的限制,可对含油脂样品直接检测

附图说明

[0009] 图 1 油脂样品处理液工作原理示意图

[0010] 图 2 金标免疫层析检测试纸结构示意图

[0011] 图 3 试剂盒检测食用油中 AFB₁ 结果图

具体实施方式

[0012] 1. 试剂材料:玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水纸、塑胶板、羊抗小鼠 IgG 购自 Solarbio 公司;AFB₁-BSA(溶于甲醇-PBS)、牛血清蛋白 V 购自 Sigma 公司;AFB₁ 单克隆抗体购自蓝图生物科技有限公司;氯金酸、柠檬酸三钠购自国药;吐温 20 购自 amresco 公司;本实验用水均为超纯水。

[0013] 2. 油脂样品处理液的制备:向 2.0ml 离心管中准确加入 490 μl PBS 缓冲液、210 μl 甲醇、300 μl 吐温 20。漩涡震荡混匀制成油脂样品处理液,常温密闭保存。

[0014] 3. 金标 -AFB₁ 免疫层析试纸制备:

[0015] 1) 配制 1% 氯金酸溶液:将 1g 氯金酸溶解于 100ml 超纯水中,4℃ 保存。

[0016] 2) 配制 1% 柠檬酸三钠溶液:称取 1g 柠檬酸三钠溶于 100ml 超纯水中,4℃ 保存。

[0017] 3) 硝酸纤维素膜封闭液:称取 1g BSA 溶解于 100ml 0.01mol/L PBS 缓冲液中,再加入 100 μl 吐温 20,充分混合,4℃ 保存。

[0018] 4) 胶体金制备:

[0019] 准确量取 100ml 0.01% 氯金酸溶液于硅化三角瓶中,摇匀后置于微波炉煮沸,搅动后立即加入 2ml 1% 柠檬酸三钠溶液,金黄色的氯金酸水溶液在 2 分钟内变为紫红色,继续煮沸 10 分钟。待溶液冷却至室温后用超纯水定容至 100ml,采用紫外分光光度计检测颗粒均匀度及粒度。

[0020] 5) 胶体金标记 AFB₁ 单克隆抗体:

[0021] 使用 PBS 缓冲液稀释 AFB₁ 单克隆抗体为 1.0mg/ml。取胶体金溶液 100ml,用 0.1mol/LK₂CO₃ 调节 pH 至 9.0。将 2ml 稀释后抗 AFB₁ 单抗溶液加入胶体金溶液中,滴加时应在磁力快速搅拌下逐滴缓慢加入,继续搅拌 15min。电磁搅拌下加入 200mg 牛血清蛋白以稳定金颗粒的残留表位。再搅拌 10min 后,以 1500rpm/min 4℃离心 10min,弃沉淀,上清液再以 12000rpm/min 4℃离心 30min,小心吸去上清,所得沉淀即为胶体金-抗 AFB₁ 单抗结合物。使用 1mmol/L Tris-HCl (pH 9.0) 缓冲液稀释至 5ml,以 0.5mg/ml 叠氮钠防腐,4℃保存备用。

[0022] 6) 处理玻璃纤维膜:

[0023] 将吸水玻璃纤维剪裁为长 1.5cm,宽 0.5cm 矩形小片后浸泡于胶体金-抗 AFB₁ 单抗混合液中,37℃干燥 2h,使玻璃纤维素膜吸附胶体金-抗 AFB₁ 单抗结合物,4℃密闭保存备用。

[0024] 7) 处理硝酸纤维素膜:

[0025] 在硝酸纤维素膜上用 AFB₁-BSA (2.0mg/ml) 及羊抗鼠 IgG 多克隆抗体 (2.0mg/ml) 划约 1mm 宽的线,分别作为检测线 (T 线) 和对照线 (C 线)。37℃干燥 20 分钟后,用 NC 膜封闭液封闭 2h,以 0.01mol/L PBS 洗涤 3 次。37℃干燥 30min。干燥后切成 0.5cm×1.5cm 的小条装入塑料盒中,加入干燥剂,密封避光,4℃保存备用。

[0026] 8) 试纸条的组装:

[0027] 试纸条由样品垫(吸水纸)、吸水玻璃纤维、硝酸纤维素膜、余液吸收垫(吸水纸)、底板(塑胶板)纸四部分组成。作为样品垫的吸水纸剪切为长宽均为 0.7×0.5cm 的长方形小片。余液吸收垫(吸水纸)剪切为长 1.5cm,宽 0.5cm 的矩形小条。将样品垫、吸水玻璃纤维、硝酸纤维素膜和余液吸收垫依次粘贴于 5.0cm×0.5cm 塑胶板表面制成金标- AFB_1 免疫层析试纸,除硝酸纤维素膜和余液吸收垫重叠区为 3mm 外,吸水玻璃纤维和样品垫及硝酸纤维素膜的重叠区为 2mm,且硝酸纤维素膜含 30° 斜面。

[0028] 试剂盒的实际使用

[0029] 下面实际介绍本发明的使用方法,但不能作为对本发明的限制。

[0030] 1. 试剂与样品:AFB₁ 标准液购自 Sigma 公司;食用花生油购自超市。

[0031] 2. 阳性样品的准备:使用 0.01mol/L PBS 将 AFB₁ 稀释至 2mg/ml 标准液。分别向 8 管 500 μ l 花生油中添加不同体积 AFB₁ 标准液,制成终浓度为 0ng/ml、0.5ng/ml、1.0ng/ml、2.0ng/ml、5.0ng/ml、10.0ng/ml、20.0ng/ml、30.0ng/ml 的阳性样品。

[0032] 3. 阴性样品准备:取 8 管 500 μ l 食用花生油,不添加 AFB₁ 标准液,但添加与各管阳性样品所加标准液体积相同的 0.01mol/L PBS 缓冲液。

[0033] 4. 样品检测前的处理:将阳性、阴性样品各分别吸取 300 μ l 加入 16 管油脂样品处理液中,颠倒混匀,制为 16 管待检液。

[0034] 5. 分别从 16 管待检液中吸取 300 μ l 下层液体(不吸取泡沫),缓慢滴加在金标- AFB_1 免疫层析试纸样品垫上,5 分钟后观察检测结果。

[0035] 6. 检测结果:重复以上实验 3 次。阴性样品全部正确检出阴性,假阳性率为 0%。阳性样品检测结果如表 1:

[0036] 表 1 黄曲霉毒素 B1 快速检测试剂盒检测灵敏度

	含 AFB ₁ 油样 (ng/ml)	AFB ₁ 检测试纸条
	0	—
	1	—
[0037]	2	—
	5	—
	10	+
	20	+
	30	+

[0038] 由此梯度实验结果可以得出 AFB₁ 快速检测试剂盒检测最低检出限度为 10ng/ml, 按照国家食用油的含 AFB₁ 不得超过 20 μg/kg 的标准, 即约 19ng/ml, 本试剂盒可作为商场、家庭甚至食品质量监控部门快速鉴定食用油是否含有 AFB₁ 的快速定性检测试纸。

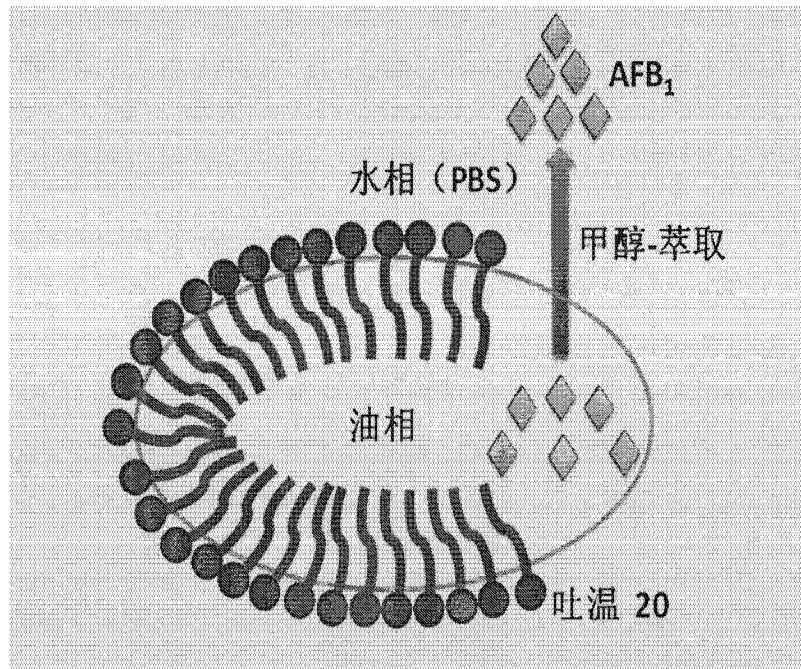


图 1

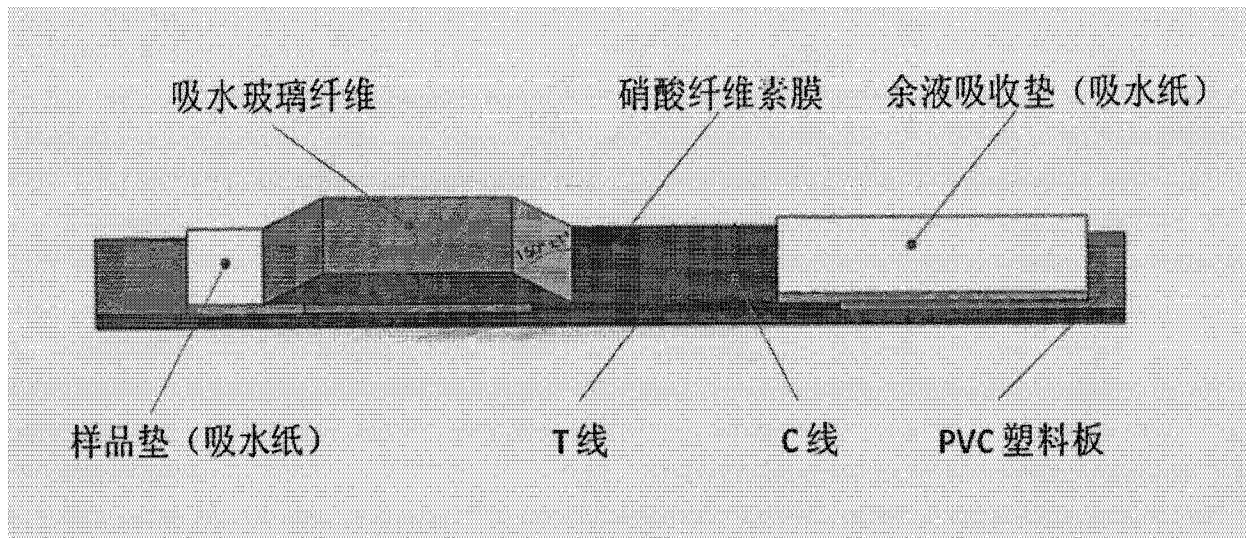


图 2

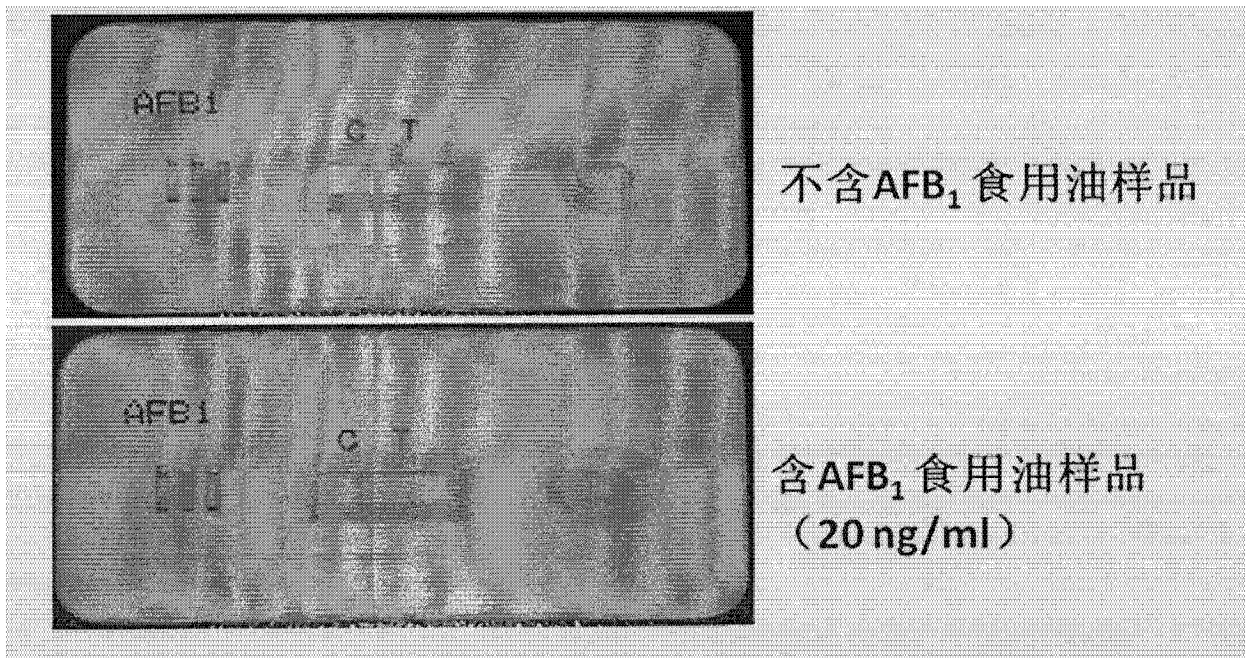


图 3

专利名称(译)	一种油脂中黄曲霉毒素B1快速检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102841202A	公开(公告)日	2012-12-26
申请号	CN201110172360.6	申请日	2011-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	袁剑锋 陈超		
申请(专利权)人(译)	袁剑锋 陈超		
当前申请(专利权)人(译)	袁剑锋 陈超		
[标]发明人	陈超 王英典 万一非 万沅松 龙云映 颜亨梅		
发明人	陈超 王英典 万一非 万沅松 龙云映 颜亨梅		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种油脂中黄曲霉毒素B1快速检测试剂盒及其制备方法，属于免疫学和微生物菌类毒性代谢产物检测方法技术领域。结合吐温20乳化油脂样品技术，建立了可直接用于检测油脂中黄曲霉毒素B1的金标快速检测试纸，该试剂盒最低检出限度为10ng/ml。本发明发明的油脂中黄曲霉毒素B1快速检测试剂盒工作时无需复杂的油脂样品处理工艺，不仅缩短了预处理时间，而且突破了常规胶体金标免疫层析检测试纸只能检测水溶液样品的限制，可对含油脂样品直接检测。

