



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 203535047 U

(45) 授权公告日 2014. 04. 09

(21) 申请号 201320335935. 6

(22) 申请日 2013. 06. 13

(73) 专利权人 安佑生物科技集团有限公司

地址 215437 江苏省苏州市太仓市沙溪镇岳
王新港中路 239 号

(72) 发明人 洪平 邬本成 孙满义

(74) 专利代理机构 苏州华博知识产权代理有限
公司 32232

代理人 黄珩

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

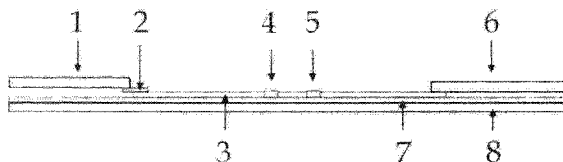
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 实用新型名称

一种检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板

(57) 摘要

本实用新型涉及一种检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板,由底板、背衬和盖板依次由下而上叠加组成,背衬上依次紧密粘接着样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和控制线,可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。盖板上设置加样孔和观察窗,观察窗分为检测区和控制区。试剂板利用免疫胶体金法可进行饲料中玉米赤霉烯酮含量的半定量直观检测,适合饲料生产加工企业,检验检疫机构等对饲料样品的大规模筛检。



1. 一种检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板,其特征在于,包括底板、背衬和盖板,所述背衬上依次紧密粘贴的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,相邻各部分间有 1-2 mm 的重叠,其中,所述胶体金结合垫包被胶体金标记的抗体;所述硝酸纤维素膜包被特异性结合抗原和多克隆抗体。

2. 如权利要求 1 所说的检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板,其特征在于,所述底板、背衬和盖板由上而下依次压制为一体。

3. 如权利要求 1 所说的检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板,其特征在于,所述硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和控制线,所述检测线包被玉米赤霉烯酮-BSA 特异性结合抗原,所述控制线包被羊抗鼠多克隆抗体。

4. 如权利要求 1 所说的检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板,其特征在于,所述胶体金标记的抗体为玉米赤霉烯酮单克隆抗体。

5. 如权利要求 1 所说的检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板,其特征在于,所述样品垫由玻璃纤维制成,所述胶体金结合垫由聚酯膜制成,所述吸水垫为滤纸。

6. 如权利要求 1 所说的检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板,其特征在于,所述底板和盖板为两块塑料模板,所述盖板上设置加样孔和观察窗,所述加样孔和观察窗不均匀的分布在盖板上,所述加样孔和观察窗之间有间隔,所述观察窗分为检测区和控制区。

一种检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板

技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种胶体金检测试剂板,更具体地,本实用新型涉及一种检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮 (zeara lenone, ZEN) 又称 F-2 毒素,首先从有赤霉病的玉米中分离得到,其产毒菌是镰刀菌属的菌株,主要由禾谷镰刀菌产生,粉红镰刀菌、三线镰刀菌等多种镰刀菌也能产生这种毒素。玉米赤霉烯酮有多种衍生物,如 7-脱氢玉米赤霉烯酮、玉米赤霉烯酸等。玉米赤霉烯酮的耐热性较强,在食品或饲料加工过程中均不易破坏,主要污染玉米、小麦、大麦等粮谷类作物。

[0003] 研究表明,玉米赤霉烯酮及其代谢物具有类雌激素作用,引起动物发生雌激素亢进症,导致不孕或流产;能造成动物急慢性中毒,引起中枢神经系统的中毒症状,如恶心、发冷、头痛、神智抑郁和共济失调等,甚至死亡。给畜牧场造成巨大经济损失。此外,很多资料显示 ZEA 具有生殖发育、免疫毒性,肝毒性,潜在致癌性等,最新研究显示其对女性乳腺肿瘤发生也有一定影响。玉米赤霉烯酮污染饲料和食品后,不仅使农业经济受到严重影响,而且还会带来严重的食品安全问题,威胁到人类的健康。

[0004] 目前,对动物玉米赤霉烯酮中毒尚无特效药治疗,为了控制 ZEN 对人和动物产生的危害,必须对饲料、谷物等中玉米赤霉烯酮含量进行检测,确定是否含有玉米赤霉烯酮。欧盟规定仔猪日粮中 ZEN 的最高限量为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$;意大利规定在谷物和谷类产品中 ZEN 的含量不能超过 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$;中国 GB13078.2-2006 饲料卫生标准中规定饲料中玉米赤霉烯酮的限量为 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$, GB2761-2011 食品安全国家标准规定食品中玉米赤霉烯酮限量为 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0005] 目前,比较常用的 ZEN 检测方法有薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法-质谱法 (GC-MS)、生物检测法和免疫学检测法等。薄层色谱分析法是较早用于毒素检测的一种方法,操作人员无需经过专门培训,且成本低,无需价格昂贵的仪器。但此方法所需试剂繁多,检测周期长,灵敏度不高,已远不能满足现代检测要求。高效液相色谱法、气相色谱法-质谱法等仪器分析方法具有准确度高、灵敏性强、可微量测定等优点,且气相色谱法-质谱法可同时检测不同的镰刀菌毒素,适合于饲料中 ZEN 的定量分析。但设备昂贵、对样品中毒素纯度的要求较高,导致检测成本高、周期长,无法满足大批量样品快速筛选的需要,所以使用受到限制。微生物检测法虽然待检样品不需很纯,但方法专一性差,灵敏度低,主要用于定性,一般只作为化学分析法的佐证。

[0006] ELISA 法是免疫学检测方法之一,具有特异、快速、灵敏度高和成本低的特点,适用于基层机构大量样品的筛选和普查。但此方法需接触 ZEN 标准品,不利于保护操作者的健康,且酶的活性易受温度影响,因此试剂需要低温保藏、寿命短,并易造成测定结果重复性较差。

实用新型内容

[0007] 为克服现有技术存在的上述缺陷,本实用新型针对检测需求,研制开发了一种检测玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板和检测试剂盒,通过胶体金免疫法检测饲料中的玉米赤霉烯酮。试剂板检测限符合要求,重现性好,检测时间短,适合现场快速检测,且检测过程中无需昂贵的仪器设备,也无需使用玉米赤霉烯酮标准品,有利于保护操作者。

[0008] 为了实现上述目的,本实用新型采用的技术方案是:一种检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板,包括底板、背衬和盖板,所述背衬上依次紧密粘贴的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,相邻各部分间有 1-2mm 的重叠,其中,所述胶体金结合垫包被胶体金标记的抗体;所述硝酸纤维素膜包被特异性结合抗原和多克隆抗体。

[0009] 优选的,所述底板、背衬和盖板由上而下依次压制为一体。

[0010] 优选的,所述硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和控制线,所述检测线包被玉米赤霉烯酮-BSA 特异性结合抗原,所述控制线包被羊抗鼠多克隆抗体。

[0011] 优选的,所述胶体金颗粒的粒径大小约为 30nm,所述胶体金标记的抗体为玉米赤霉烯酮单克隆抗体。

[0012] 优选的,所述样品垫由玻璃纤维制成,所述胶体金结合垫由聚酯膜制成,所述吸水垫为滤纸。

[0013] 优选的,所述底板和盖板为两块塑料模板,所述盖板上设置加样孔和观察窗,所述加样孔和观察窗不均匀的分布在盖板上,所述加样孔和观察窗之间有间隔,所述观察窗分为检测区和控制区。

[0014] 本实用新型试剂板应用层析式抗体免疫竞争原理,通过抗原和金标抗体反应显色,特异性检测饲料样品中的玉米赤霉烯酮含量,如果样品溶液中含有玉米赤霉烯酮,玉米赤霉烯酮就先和胶体金颗粒上的玉米赤霉烯酮单克隆抗体结合,而无法与检测线上的玉米赤霉烯酮特异性抗原结合。当样品中的玉米赤霉烯酮含量等于或超过试剂板检出限时,试剂板上的检测线显色较控制线浅甚至无显色,判定为阳性。反之,当样品中玉米赤霉烯酮含量在试剂板检出限以下或无残留时,试剂板上的检测线显色与控制线相近或偏深,判定为阴性。

[0015] 本实用新型试剂板由底板、背衬和盖板组成,背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。底板、背衬和盖板由上而下依次压制为一体。

[0016] 胶体金结合垫上包被有胶体金标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体;硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有玉米赤霉烯酮-BSA 特异性结合抗原和羊抗鼠多克隆抗体 IgG,分别作为检测线和控制线。偶联玉米赤霉烯酮的载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白等。盖板上设置加样孔和观察窗,加样孔和观察窗不均匀的分布在盖板上,加样孔和观察窗之间有间隔,观察窗分为检测区和控制区。

[0017] 本实用新型试剂板的各部分组成成分和功能如下:

[0018] 底板、盖板,为两块塑料模板,起固定背衬和标示各功能区(加样孔、检测区、控制区)的作用。

[0019] 背衬,由一面涂有不干胶的不吸水韧性材料制成,起固定支撑试剂板其他组成部分的作用。

[0020] 样品垫,由玻璃纤维制成,起吸收样品溶液和缓冲样品溶液 pH 值的作用。

[0021] 胶体金结合垫,由聚酯膜制成,其上有抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体与胶体金颗粒的结合物,为样品溶液中有效成分和金标抗体反应提供场所。

[0022] 硝酸纤维素膜,从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和控制线,将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0023] 吸水垫,由滤纸制成,将反应过程中多余的溶液吸收。

[0024] 本实用新型试剂板具有如下有益效果:

[0025] (1) 特异性好。本实用新型试剂板对玉米赤霉烯酮的交叉反应率为 100%,对呕吐毒素、伏马菌素、赭曲霉毒素 A 等真菌毒素的交叉反应率均低于 1%。可见,本实用新型试剂板对玉米赤霉烯酮反应具有高度专一性。

[0026] (2) 灵敏度高。本实用新型试剂板对饲料中玉米赤霉烯酮的最低检出限为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,符合国家限量要求,在对饲料中玉米赤霉烯酮的快速检测领域中达到了较优水平。根据实际检测需求,通过对样品前处理过程中上层溶液、专用稀释液用量的不同可调整试剂板的检测限,具体见表 1,适用于各类企业及检测机构。

[0027] 表 1 玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板检出限参照表

[0028]

上层溶液取液量 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.05	0.02	0.02
专用稀释溶液用量 (mL)	0.1	0.3	0.4	1.0	0.6	0.8
检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	100	200	250	500	750	1000

[0029] (3) 操作简单、快速、安全。本实用新型试剂板将反应所需的大部分原料整合到 PVC 背衬中,滴样后,抗原抗体反应在固相膜上快速进行,大大缩短检样时间,且样品无需特殊处理,滴样后 3-5 分钟即可用肉眼通过判断硝酸纤维素膜上的检测线和控制线的颜色深浅读取结果。检测实施过程不依赖任何实验设备,无需毒素标准样品,普通人员均可操作。

[0030] (4) 成本低,易推广。本实用新型试剂板生产工艺简单,流程成熟。生产成本低廉,投资少,收效快。

附图说明

[0031] 图 1 为玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板背衬结构示意图,其中 1 为样品垫,2 为胶体金结合垫,3 为硝酸纤维素膜,4 为检测线,5 为控制线,6 为吸水垫,7 为不干胶,8 为 PVC 底板。

[0032] 图 2 为玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板操作示意图,其中 S 为加样孔, C 为控制区, T 为检测区。

[0033] 图 3 是玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板结果判定阴性示意图;图 4 是玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板结果判定阳性示意图;图 5 是玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板结果判定无效示意图,其中 C 为控制区, T 为检测区。

具体实施方式

[0034] 本实用新型试剂板的制备包括载体蛋白偶联物的制备,抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备,胶体金溶液的制备,胶体金标记抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备和玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板的组装。

[0035] 1. 半抗原与载体蛋白的偶联

[0036] 玉米赤霉烯酮-6-羧甲氧肟的合成方法:5mg 的 ZEN 溶于 4mL 吡啶中,加入 3mg 的 O-羧甲基羟胺,在室温下搅拌 24h,之后真空干燥,水溶解,调 pH 到 8,乙酸乙酯提取 3 次,去水,结晶。

[0037] 利用碳二亚胺法合成玉米赤霉烯酮-牛血清蛋白偶联物(ZEN-BSA):将结晶物(玉米赤霉烯酮-6-羧甲氧肟)溶于二氧六环中配成 5mmol/L 溶液,称取 30mg BSA 溶于 2mL,0.05mol/L(pH7.4)的 PBS 中。4℃下,将二者混合,再缓慢滴加 3mg 的 N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)和 6mg 的 N,N'-二环己碳二亚胺(DCC)溶于 0.5mL 二氧六环的溶液,混合物于室温下搅拌反应 24h,透析,离心,冷冻备用。

[0038] 用卵清蛋白(OVA)替代 BSA,采用同样方法合成玉米赤霉烯酮-卵清蛋白偶联物(ZEN-OVA)。

[0039] 2. 抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备

[0040] 动物免疫:选 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,取 50 μg 完全抗原,与弗氏佐剂乳化,按 200 μL/只进行初免,颈部及皮下多点注射。之后免疫改为弗氏不完全佐剂,每隔 2 周免疫一次,剂量相同,腹腔注射。4 免后 10d 采血测定,选择血清效价高与 ZEN 抑制强的小鼠。融合前 3d 完全抗原腹腔加强免疫。

[0041] 细胞融合:融合前 1d,无菌条件下取 BALB/c 小鼠腹腔内细胞作饲养细胞,铺 96 孔细胞培养板备用;脱颈致死小鼠,无菌取脾制备脾细胞,按照免疫脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞 10:1 混合细胞,用 50%聚乙二醇(PEG)-1500 促融;将融合后的细胞悬液接种到已铺有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,先后用 HAT 和 HT 培养液培养,分别于第 4 天和第 7 天换液,第 12 天起用 DMEM 完全培养液培养。

[0042] 体内诱生腹水:约 8 周的 BALB/c 小鼠腹腔注射灭菌的液体石蜡 0.5mL/只,10d 后同法注射单克隆阳性细胞 0.2mL/只,8-10d 后抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水,用饱和硫酸铵盐析法纯化腹水。

[0043] 3. 胶体金溶液的制备

[0044] 胶体金颗粒的平均大小为 30nm,其制备方法为在 100mL 去离子水中加入 1mL1%柠檬酸三钠,煮沸后迅速加入 1mL1%氯金酸,继续煮沸 10min,冷却后,4℃下保存备用。

[0045] 4. 胶体金标记玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备

[0046] 取已制备好的 100mL 胶体金溶液,用 0.1mol/L 碳酸钾溶液调 pH 到 8.0。边搅拌边加入 1.5mg 抗玉米赤霉烯酮单抗,搅拌 20min,再逐滴加入 2mL25mol/L 聚乙二醇 20000(PEG20000),搅拌 15min。20,000rpm 离心 15min,弃上清液,加入 10mL pH7.4PBS 缓冲液(含 0.4mol/L PEG)清洗 2 次。将沉淀用 5mL 含 2% BSA 的 PBS 缓冲液(pH7.4)溶解,用 0.22 μm 无菌过滤器过滤后,4℃保存备用。

[0047] 5. 玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板的组装

[0048] 参照图 1,用点膜机把适当浓度的载体蛋白偶联物及羊抗鼠 IgG 喷在硝酸纤维素

膜上,分别作为检测线和控制线,37℃烘箱干燥 8h。以同样方法,将制备好的胶体金标记玉米赤霉烯酮单克隆抗体包被在胶体金结合垫上。

[0049] 检测试剂组成为 PVC 背衬,在其上按顺序粘上样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。用切割机将贴好的大卡切割成 4mm 宽的条,装入塑料模板中制成检测试剂板,再放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存。

[0050] 6. 玉米赤霉烯酮免疫胶体金快速检测试剂板检测实施操作方法

[0051] 6.1 样品制备

[0052] 称取 1g 研碎样品于 5mL 离心管中;加入 4mL 提取剂,剧烈震荡 3 分钟后,4,000rpm 离心 5 分钟,分为两层,上层为较澄清的溶液;根据所需检出限,取对应的上层溶液和专用稀释液用量;吹打混匀后,待检。

[0053] 6.2 使用方法

[0054] 从包装袋中取出试剂板,吸取待检样品溶液 100 μ L 滴加到加样孔中,加样后开始计时;结果应在 3-5min 读取,其他时间判读无效。观察时,试剂板水平放置于观察者正面。

[0055] 6.3 结果判断

[0056] 观察窗中 T 线显色比 C 线深或一样深为阴性,表示样品中玉米赤霉烯酮含量低于检出限或不含玉米赤霉烯酮。如图 3 所示。

[0057] 观察窗中 T 线显色比 C 线浅或 T 线无显色为阳性,表示样品中玉米赤霉烯酮含量等于或高于检出限。如图 4 所示。

[0058] 观察窗中未出现 C 线,可能是操作不当或试剂板已失效。应再次阅读说明书,并用新的试剂板重新测试。如图 5 所示。

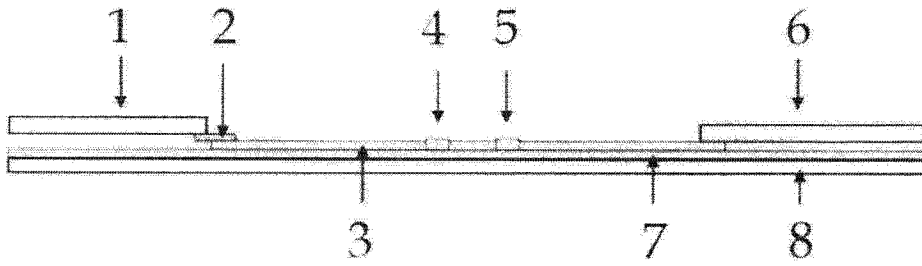


图 1

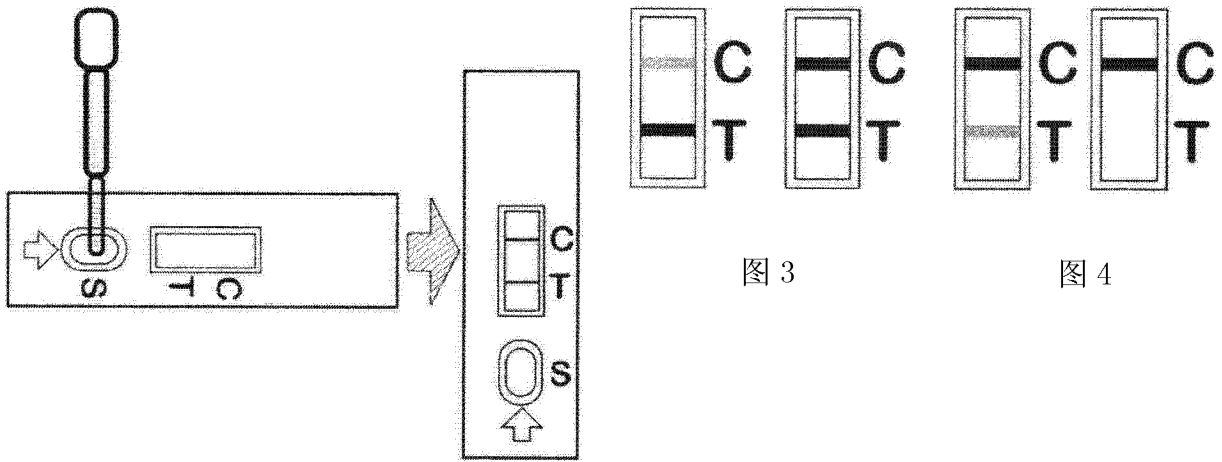


图 2

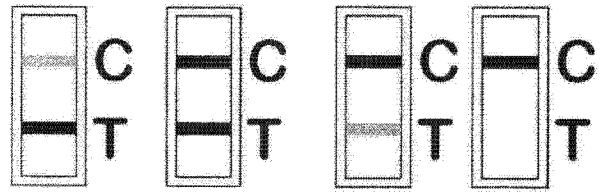


图 3

图 4

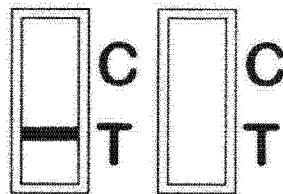


图 5

专利名称(译)	一种检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板		
公开(公告)号	CN203535047U	公开(公告)日	2014-04-09
申请号	CN201320335935.6	申请日	2013-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	安佑生物科技集团股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	安佑生物科技集团有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安佑生物科技集团有限公司		
[标]发明人	洪平 邬本成 孙满义		
发明人	洪平 邬本成 孙满义		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种检测饲料中玉米赤霉烯酮的胶体金试剂板，由底板、背衬和盖板依次由下而上叠加组成，背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和控制线，可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。盖板上设置加样孔和观察窗，观察窗分为检测区和控制区。试剂板利用免疫胶体金法可进行饲料中玉米赤霉烯酮含量的半定量直观检测，适合饲料生产加工企业，检验检疫机构等对饲料样品的大规模筛检。

