



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109142704 A

(43)申请公布日 2019.01.04

(21)申请号 201810737964.2

(22)申请日 2018.07.06

(71)申请人 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道1号

(72)发明人 王江 高志贤 宁保安 白家磊
李双 彭媛 张曼

(74)专利代理机构 北京思创大成知识产权代理有限公司 11614

代理人 高爽

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

C12Q 1/682(2018.01)

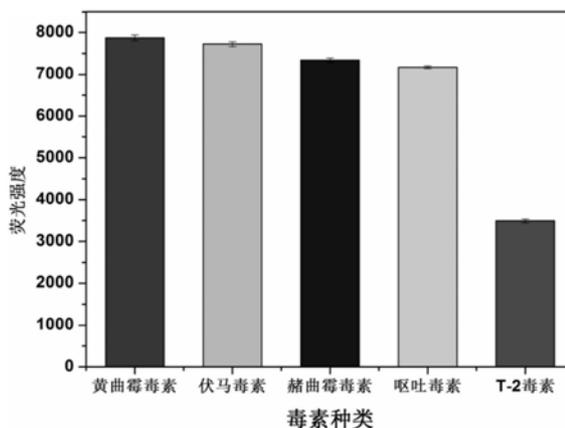
权利要求书2页 说明书6页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的试剂盒及方法

(57)摘要

本发明属于食品安全检测及免疫竞争技术领域,涉及一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的试剂盒及方法。该试剂盒包括以下组分:(1)磁珠;(2)抗T-2单克隆抗体;(3)抗T-2抗原;(4)金纳米粒子;(5)捕获DNA,能够与金纳米粒子形成共价连接;(6)条形码DNA;(7)环状DNA;(8)引物DNA,与环状DNA两端互补配对;其中,所述捕获DNA中的至少一部分与条形码DNA中的至少一部分互补配对;所述条形码DNA与环状DNA中的至少一部分相同。利用该试剂盒和方法能够高灵敏的检测T-2毒素。



1. 一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括以下组分:

- (1) 磁珠;
- (2) 抗T-2单克隆抗体;
- (3) 抗T-2抗原;
- (4) 金纳米粒子;
- (5) 捕获DNA,能够与金纳米粒子形成共价连接;
- (6) 条形码DNA;
- (7) 环状DNA;
- (8) 引物DNA,与环状DNA两端互补配对;

其中,所述捕获DNA中的至少一部分与条形码DNA中的至少一部分互补配对;所述条形码DNA与环状DNA中的至少一部分相同。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中,所述捕获DNA具有SEQ ID NO:1所示的碱基序列,并且,5'端修饰有-SH基团;所述条形码DNA具有SEQ ID NO:2所示的碱基序列。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中,所述环状DNA的长度为75-85bp,优选具有SEQ ID NO:3所示的碱基序列,且5'端修饰有磷酸基团;所述引物DNA具有SEQ ID NO:4所示的碱基序列。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中,所述磁珠的直径为2.5-3.0 μm ,所述金纳米粒子的直径为13-15nm。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中,所述磁珠和所述抗T-2抗原以磁珠偶联抗T-2抗原的形式提供。

6. 一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1) 获取磁珠偶联抗T-2抗原;

(2) 获取金纳米粒子检测探针:所述金纳米粒子检测探针包括金纳米粒子、与所述金纳米粒子连接的抗T-2单克隆抗体以及与所述金纳米粒子连接的双链DNA;

所述双链DNA包括捕获DNA和条形码DNA,所述捕获DNA与金纳米粒子共价连接;所述捕获DNA中的至少一部分与条形码DNA中的至少一部分互补配对;所述条形码DNA与环状DNA中的至少一部分相同;

(3) 向T-2毒素样品中加入所述磁珠偶联抗T-2抗原和所述金纳米粒子检测探针,振荡反应、磁力分离后弃上清,用DTT洗涤沉淀使条形码DNA解链游离,再次磁力分离,收集条形码DNA;

(4) 获取滚环扩增产物:所述环状DNA两端与引物DNA互补配对,经连接酶反应后成环,然后加入聚合酶进行滚环扩增反应,获取含有单链DNA的扩增产物,向扩增反应溶液中加入步骤(3)中收集的条形码DNA,杂交后进行核酸染色,测定荧光值;

(5) 测定不同浓度的T-2毒素标准品溶液的荧光值,建立荧光值与T-2毒素浓度的标准曲线;

(6) 测定含有T-2毒素的待测样品的荧光值,代入步骤(5)建立的标准曲线,计算出待测样品中T-2毒素的浓度。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述捕获DNA具有SEQ ID NO:1所示的碱基序列,并且,5'端通过-SH基团与所述金纳米粒子连接;

所述条形码DNA具有SEQ ID NO:2所示的碱基序列;

所述环状DNA的长度为75-85bp,优选具有SEQ ID NO:3所示的碱基序列,且5'端修饰有磷酸基团;

所述引物DNA具有SEQ ID NO:4所示的碱基序列;

所述磁珠的直径为2.5-3.0 μm ,所述金纳米粒子的直径为13-15nm。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述不同浓度的T-2毒素标准品溶液的浓度范围为0.002-200ng/mL。

9. 根据权利要求6所述的方法,其中,步骤(3)中,以1ng加入的所述金纳米粒子检测探针中的金纳米粒子计,所述磁珠偶联抗T-2抗原中抗T-2抗原的量为30-50 μg 。

10. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述核酸染色采用SYBRGreen I。

一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测及免疫竞争技术领域,更具体地,涉及一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素试剂盒及基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的方法。

背景技术

[0002] T-2毒素是由镰刀菌病原体产生的霉菌毒素,霉菌样小分子毒素也是自然界中污染最严重的天然毒素之一,主要存在于发霉的玉米,大麦,小麦,大豆和其他谷类作物和食品中。这些产品对人类健康和畜牧业发展构成极大的威胁。1973年,在日内瓦的联合国粮食及农业组织(粮农组织)和世界卫生组织(卫生组织)的联合会议上,这些毒素如黄曲霉毒素被列为食品污染最天然的来源。T-2毒素对人和动物消化系统,神经系统,生殖器真皮有毒,并且是致畸和致癌的。此外,T-2毒素还增加食物中毒,大骨病,DNA损伤和诱导细胞凋亡的风险。近年来,研究人员发现食管癌,地方性肾病,食物中毒性白血球减少症(ATA),克山病和大骨节病可能与单端孢菌毒素污染密切相关。

[0003] 目前我国国家标准中T-2毒素的检测方法主要采用免疫亲和层析纯化高效液相色谱法和酶联免疫吸附法。同时,国外已有竞争性免疫测定法,包括荧光偏振,基于免疫磁珠的测定和表面等离子体共振(SPR)。荧光偏振和SPR灵敏度高,但设备昂贵,给测试带来一定的困难。基于免疫磁珠的分析方法很简单,应用广泛,但比较费时。

[0004] 因此,建立一个快速、灵敏和准确的T-2毒素测定方法非常重要和必要。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素试剂盒及基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的方法。利用该试剂盒和方法能够高灵敏的检测T-2毒素。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的试剂盒,该试剂盒包括以下组分:

[0007] (1) 磁珠;

[0008] (2) 抗T-2单克隆抗体;

[0009] (3) 抗T-2抗原;

[0010] (4) 金纳米粒子;

[0011] (5) 捕获DNA,能够与金纳米粒子形成共价连接;

[0012] (6) 条形码DNA;

[0013] (7) 环状DNA;

[0014] (8) 引物DNA,与环状DNA两端互补配对;

[0015] 其中,所述捕获DNA中的至少一部分与条形码DNA中的至少一部分互补配对;所述

条形码DNA与环状DNA中的至少一部分相同。

[0016] 本发明的原理如图1所示,采用生物条形码免疫竞争模式,形成“MMP-抗原/单抗-AuNPs-条形码DNA”结构复合体或者“目标物/单抗-AuNPs-条形码DNA”结构复合体,每一个金纳米颗粒表面修饰有上百条DNA条形码,通过DTT洗涤使条形码DNA从复合体中释放出来,利用滚环扩增放大信号检测DNA实现对T-2毒素的间接定量。

[0017] 基于上述原理,所述捕获DNA与条形码DNA既要有一定互补配对能力,又要能够解链后用于后续扩增产物的互补配对。

[0018] 本发明可以采用任何能够实现上述目的的捕获DNA与条形码DNA。优选地,所述捕获DNA具有SEQ ID NO:1所示的碱基序列(5'-AAAAATACAATCTTCATCTACAT-3'),并且,5'端连接有-SH基团(5'-SH-AAAAATACAATCTTCATCTACAT-3'),可通过-SH基团实现与金纳米粒子的共价连接。所述条形码DNA优选具有SEQ ID NO:2(5'-ATGTAGATGAAGATTGTA-3')所示的碱基序列。

[0019] 根据本发明,检测条形码DNA通过滚环扩增完成。所述环状DNA和引物DNA均可通过常规方法设计。优选地,所述环状DNA具有SEQ ID NO:3所示序列(5'-CGTTGTTGTCTATGTAGATGAAGATTGTAGGTCAGAAGCAAGAACTGTGAAGATCGGTAATTATAAGCTGGT-3'),且5'端具有磷酸基团修饰(5'-p-CGTTGTTGTCTATGTAGATGAAGATTGTAGGTCAGAAGCAAGAACTGTGAAGATCGGTAATTATAAGCTGGT-3'),所述引物DNA具有SEQ ID NO:4所示碱基序列(5'-GACAACAACGACCAGCTTAT-3')。

[0020] 根据本发明,优选地,所述磁珠的直径为2.5-3.0 μ m,所述金纳米粒子的直径为13-15nm。特定尺寸的磁珠能够进一步提高检测的灵敏度。特定尺寸的金纳米粒子能够满足修饰的要求。

[0021] 根据本发明,所述磁珠和所述抗T-2抗原可以单独提供,也可以以磁珠偶联抗T-2抗原的形式提供。所述磁珠偶联抗T-2抗原可采用本领域常规的方法制得,例如,利用2.8 μ m磁珠和抗T-2抗原制备。

[0022] 本发明的第二方面提供一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的方法,该方法包括以下步骤:

[0023] (1) 获取磁珠偶联抗T-2抗原;

[0024] (2) 获取金纳米粒子检测探针:所述金纳米粒子检测探针包括金纳米粒子、与所述金纳米粒子连接的抗T-2单克隆抗体以及与所述金纳米粒子连接的双链DNA;

[0025] 所述双链DNA包括捕获DNA和条形码DNA,所述捕获DNA与金纳米粒子共价连接;所述捕获DNA中的至少一部分与条形码DNA中的至少一部分互补配对;所述条形码DNA与环状DNA中的至少一部分相同;

[0026] (3) 向T-2毒素样品中加入所述磁珠偶联抗T-2抗原和所述金纳米粒子检测探针,振荡反应、磁力分离后弃上清,用DTT洗涤沉淀使条形码DNA解链游离,再次磁力分离,收集条形码DNA;

[0027] (4) 获取滚环扩增产物:所述环状DNA两端与引物DNA互补配对,经连接酶反应后成环,然后加入聚合酶进行滚环扩增反应,获取含有单链DNA的扩增产物,向扩增反应溶液中加入步骤(3)中收集的条形码DNA,杂交后进行核酸染色,测定荧光值;

[0028] (5) 测定不同浓度的T-2毒素标准品溶液的荧光值,建立荧光值与T-2毒素浓度对

数的标准曲线；

[0029] (6) 测定含有T-2毒素的待测样品的荧光值，代入步骤(5)建立的标准曲线，计算出待测样品中T-2毒素的浓度。

[0030] 优选地，所述捕获DNA具有SEQ ID NO:1所示的碱基序列，并且，5'端通过-SH基团与所述金纳米粒子连接。

[0031] 所述条形码DNA具有SEQ ID NO:2所示的碱基序列。

[0032] 所述环状DNA的长度为75-85bp，优选具有SEQ ID NO:3所示的碱基序列，且5'端修饰有磷酸基团。

[0033] 所述引物DNA具有SEQ ID NO:4所示的碱基序列；所述磁珠的直径为2.5-3.0 μ m，所述金纳米粒子的直径为13-15nm。

[0034] 优选地，所述不同浓度的T-2毒素标准品溶液的浓度范围为0.002-200ng/mL。

[0035] 本发明的方法中，金纳米粒子检测探针和磁珠偶联抗T-2抗原的相对用量可根据需要确定，优选地，步骤(3)中，以1ng加入的所述金纳米粒子检测探针中的金纳米粒子计，所述磁珠偶联抗T-2抗原中抗T-2抗原的量为30-50 μ g。

[0036] 根据本发明，优选地，所述核酸染色采用SYBR Green I。

[0037] 本发明中，所述抗T-2单克隆抗体可以在实验室采用常规的免疫方法制备，也可以从公司购买。

[0038] 根据本发明，获取金纳米粒子检测探针的方法优选如下：

[0039] 采用柠檬酸钠还原法制备金纳米粒子，捕获探针5'端修饰有巯基(-SH)，能够在金纳米粒子表面形成Au-S键，条形码DNA与捕获探针通过碱基互补配对杂交结合。取制备好的金纳米粒子，加入抗T-2单克隆抗体，常温于涡旋振荡器下反应。加入捕获探针进行反应，为了降低金纳米粒子与DNA分子间斥力作用，加入PEG20000与盐溶液进行盐化。离心弃上清，用PBS洗涤，重复离心两次。将条形码DNA复溶后加入金纳米粒子中进行杂交。

[0040] 根据本发明提供的一种具体实施方式，采用柠檬酸钠还原法制备13nm左右金纳米粒子，捕获探针5'端修饰有巯基(-SH)，能够在金纳米粒子表面形成Au-S键，条形码DNA通过与捕获探针碱基互补配对结合。取900 μ L制备好的金纳米粒子，加入一定量的碳酸钠溶液调节pH至8.5-9.0，再加入21 μ L，1mg/mL的抗T-2单克隆抗体常温下震荡混匀反应1h。然后加入10D捕获DNA溶液，4 $^{\circ}$ C振荡3h。接下来加入110 μ L 10%PEG20000和130 μ L盐析缓冲液，振摇混合，使整个系统的终浓度为1%PEG20000和0.137M NaCl，并在室温下孵育2h。然后，将350 μ L的5%BSA溶液加入到上述系统中，使得BSA浓度为1%。将其轻轻搅拌混合，然后在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时。然后将溶液在4 $^{\circ}$ C以15000rpm离心20分钟。将其重复两次，弃去上清液并用封闭储存缓冲液洗涤。将离心的AuNPs-抗体-捕获DNA重新悬浮于250 μ L洗涤溶液中。最后，将生物条形码DNA和Tris杂交缓冲液加入到AuNPs-抗体-捕获DNA溶液中，37 $^{\circ}$ C混合2小时，4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0041] 本发明的试剂盒和方法具有灵敏度高、检测范围宽、操作简单、特异性好等优点，对T-2毒素最低检出限可达0.26pg/mL。对于T-2毒素的超灵敏检测具有重要的实际意义，对于实现现场快速检测具有很好的指导作用，为T-2毒素等小分子毒素的检测提供了新的思路和平台。

[0042] 本发明的其它特征和优点将在随后具体实施方式部分予以详细说明。

附图说明

[0043] 通过结合附图对本发明示例性实施方式进行更详细的描述,本发明的上述以及其它目的、特征和优势将变得更加明显。

[0044] 图1为本发明基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的方法的原理图。

[0045] 图2为根据本发明一种实施方式中金纳米粒子表面修饰DNA以及抗T-2抗体和金探针的紫外图谱。图中曲线由下至上依次为基线、金纳米探针、金纳米粒子、金纳米粒子-T-2抗体。

[0046] 图3-1和图3-2为滚环扩增检测的优化参数图。

[0047] 图4为以T-2毒素浓度对数为横坐标,检测的荧光强度为纵坐标绘制的标准曲线图。

[0048] 图5为验证本发明的基于生物条形码与滚环扩增检测T-2毒素的方法的特异性图。

具体实施方式

[0049] 下面将更详细地描述本发明的优选实施方式。虽然以下描述了本发明的优选实施方式,然而应该理解,可以以各种形式实现本发明而不应被这里阐述的实施方式所限制。

[0050] 实施例中未注明具体条件者,皆按照常规条件或制造商建议的条件进行,实验中的核苷酸序列均由上海生工生物(北京合成部)合成,氯金酸购自克百威公司,磁性微球购自Invitrogen公司,实验中所用到的T-2毒素标准品购自百灵威公司,抗T-2单克隆抗体、抗T-2毒素抗原均购自山东绿都生物科技有限公司。荧光分光光度计购自上海棱光。

[0051] 以下实施例中,

[0052] 捕获DNA:5'-SH-AAAAATACAATCTTCATCTACAT-3'

[0053] 条形码DNA:5'-ATGTAGATGAAGATTGTA-3'

[0054] 环状DNA:5'-p-CGTTGTTGTCTATGTAGATGAAGATTGTAGGTCAGAACTCAGGTGCAAGAACTGTGAAGATCGGTAATTATAAGCTGGT-3'

[0055] 引物DNA:5'-GACAAC AACGACCAGCTTAT-3'

[0056] 制备例1

[0057] 1、金纳米粒子检测探针的制备

[0058] (1) 取制备好的金纳米粒子900 μ L,采用2%的Na₂CO₃调节pH至8.5-9.0。

[0059] (2) 从-20 $^{\circ}$ C冰箱中取出稀释好的1mg/mL抗T-2单克隆抗体,加入21 μ L,室温下孵育1h。

[0060] (3) 加入10D捕获DNA,4 $^{\circ}$ C振荡反应3h。

[0061] (4) 加入110 μ L 10%PEG20000和130 μ L盐析缓冲液,振摇混合,使整个系统的终浓度为1%PEG20000和0.137M NaCl,并在室温下孵育2h。

[0062] (5) 将350 μ L的5%BSA溶液加入到上述系统中,使得BSA浓度为1%。将其轻轻搅拌混合,然后在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时。

[0063] (6) 将溶液在4 $^{\circ}$ C以15000rpm离心20分钟。重复两次,弃去上清液并用封闭储存缓冲液洗涤。将离心的AuNPs-抗体-CDNA重新悬浮于250 μ L洗涤溶液中。

[0064] (7) 将生物条形码DNA和Tris杂交缓冲液加入到AuNPs-抗体-捕获DNA溶液中,37 $^{\circ}$ C混合2小时,得到金纳米粒子检测探针,4 $^{\circ}$ C保存备用。紫外光谱图如图2所示。从图2可以看

出,当金纳米粒子上连接T-2抗体后在280nm处有明显吸收峰,由于在制备过程中金纳米粒子有一定的损耗,因此制备好的金纳米探针在525nm以及280nm处吸收峰会减弱。

[0065] 2、磁珠偶联抗T-2抗原的制备

[0066] (1) 向离心管中加入5mg M270磁珠粉末(磁珠试剂盒购于Invitrogen公司)。将磁珠用1mL C1溶液振荡3分钟,然后磁分离1分钟。

[0067] (2) 涡旋时,向其中加入30 μ L抗T-2抗原,加入220 μ L C1溶液和250 μ L C2溶液,在37 $^{\circ}$ C下垂直悬浮培养20h。

[0068] (3) 磁力分离1min后,弃上清,加入800 μ L HB涡旋混合液,磁力分离1min,弃上清。

[0069] (4) 随后洗脱,加入800 μ L SB溶液洗脱,涡旋混合3分钟,磁力分离1分钟,再次弃去上清液。

[0070] (5) 加入800 μ L SB溶液进行涡旋混合15min,磁力分离1min,弃上清,加入500 μ L SB溶液,4 $^{\circ}$ C保存待用。磁珠偶联抗T-2抗原制备完成。

[0071] 实施例1

[0072] 基于生物条形码与滚环扩增检测T-2毒素

[0073] (1) 将T-2毒素在10% (v/v) 甲醇-PBS中按梯度连续稀释至200ng/mL、20ng/mL、2ng/mL、0.2ng/mL、0.02ng/mL、0.002ng/mL、0.0002ng/mL,加入20 μ L金纳米粒子检测探针溶液并震荡1h。

[0074] (2) 然后加入15 μ L磁珠偶联抗T-2抗原溶液,37 $^{\circ}$ C振荡1h。在此反应过程中,T-2毒素与附着于金纳米粒子的抗T-2单克隆抗体结合,剩余的未结合抗体与磁珠偶联抗T-2抗原表面上的抗T-2抗原结合。

[0075] (3) 将所得溶液在磁力架上分离1分钟。丢弃上清液(与目标金纳米粒子溶液反应),用200 μ L PBST洗涤并重复该过程3次。

[0076] (4) 然后加入100 μ L的5mM DTT。在25 $^{\circ}$ C摇动90min后,生物条形码DNA从AuNPs上分离并再次进行磁性分离。

[0077] (5) 收集上清液(生物条形码DNA)用于RCA(滚环扩增,rolling circle amplification)。

[0078] (6) 滚环扩增包括三个步骤:成环、酶切、扩增。各反应优化条件如图3-1和图3-2所示。由图3-1可以看出:随着环状DNA浓度的增加,其对应的荧光强度增大,当环状DNA浓度从1 μ M上升到1.8 μ M时,其荧光强度没有发生显著变化,故选择1 μ M作为最适浓度。由图3-2可以看出:随着引物浓度的增加,其扩增产物也逐渐增多,荧光值也增大,当引物浓度从0.2 μ M到1 μ M时增加趋势明显,但是继续增大浓度其荧光强度变化不显著,故选择1 μ M作为最适浓度。

[0079] a成环:在200 μ L离心管中加入4 μ L 1 μ M环状DNA,2 μ L 1 μ M引物DNA,1 μ L 10 \times T-4 DNA连接酶缓冲液和2 μ L DEPC水,振荡混合物3分钟并离心1分钟,95 $^{\circ}$ C反应5min,冷却至室温后60 $^{\circ}$ C孵育45min。然后加入1 μ L T-4 DNA连接酶,摇匀,混匀,离心,16 $^{\circ}$ C孵育2h,65 $^{\circ}$ C孵育10min,使T-4DNA连接酶失活停止反应。

[0080] b酶切:将2 μ L 10 \times 核酸外切酶I缓冲液,2 μ L 10 \times 核酸外切酶III缓冲液,2 μ L核酸外切酶I,2 μ L核酸外切酶III和2 μ L DEPC水加入充分反应的溶液中,摇动并混匀,37 $^{\circ}$ C消化40min。将未环化的探针取出,95 $^{\circ}$ C反应5min后酶失活。

[0081] c扩增检测:向上述反应溶液中加入1 μ L条形码DNA(保存后的上清液),3 μ L 10 \times

Phi29聚合酶缓冲液。振荡3分钟,离心1分钟。95℃孵育5min,冰浴3min,加入1.5μL Phi29 DNA连接酶,1.5μL dNTP,2.5μL DEPC水,加0.5μL BSA混匀。将其在30℃下孵育2h,在65℃下反应10min停止反应。反应产物加入170μL ddH₂O,15μL SYBR Green I (1:1000稀释)并振摇15分钟。荧光分光光度计参数设置为488nm激发波长,发射起始波长510nm,发射终止波长600nm,激发带宽10nm,发射带宽10nm,高增益900v。通过测量的荧光值建立标准曲线。

[0082] 以T-2毒素的浓度为横坐标,荧光值为纵坐标,得到的标准曲线方程为: $y = -121.131gx + 3181.03$ ($R^2 = 0.9979$),如图4所示。检出限为0.26pg/mL。

[0083] 实施例2

[0084] 基于生物条形码与滚环扩增检测T-2毒素的特异性实验

[0085] 使用基于金纳米探针和滚环扩增的生物条形码,在相同条件下检测T-2毒素,以及与T-2毒素结构相似的四种其他小分子毒素(黄曲霉毒素,伏马菌素,赭曲霉毒素A,呕吐毒素)。

[0086] (1) 将5种毒素分别分成两组(10μg/mL、0.1μg/mL),每一组做3次,分别取100μL。

[0087] (2) 在每个毒素样品中加入50μL金纳米粒子检测探针,37℃下震荡1h。

[0088] (3) 然后加入20μL磁珠偶联抗T-2抗原,37℃震荡1h。

[0089] (4) 磁分离,弃掉上清液,用PBST溶液洗涤3次,每次轻轻震荡1min。

[0090] (5) 然后加入100μL的5mM DTT。在25℃摇动90min后,生物条形码DNA从AuNPs上分离并再次磁性分离。

[0091] (6) 收集上清液(生物条形码DNA)用于RCA。

[0092] (7) 滚环扩增具体步骤如实施例1。

[0093] 10μg/mL毒素的检测结果如图5所示。

[0094] 荧光强度越高表明DNA链越多,扩增越明显。在测定结果中,黄曲霉毒素,伏马菌素,赭曲霉毒素A、呕吐毒素与T-2抗体无特异性结合,甚至在高浓度(10μg/mL)时也未检测到反应,表明该方法用于T-2毒素检测具有良好的特异性和高灵敏度。

[0095] 以上已经描述了本发明的各实施例,上述说明是示例性的,并非穷尽性的,并且也不限于所披露的各实施例。在不偏离所说明的各实施例的范围和精神的情况下,对于本技术领域的普通技术人员来说许多修改和变更都是显而易见的。

序列表

<110> 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所
<120> 一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的试剂盒及方法
<130> BJI1800646PY
<160> 4
<170> SIPOSequenceListing 1.0
<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 1
aaaaatacaa tcttcatcta cat 23
<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 2
atgtagatga agattgta 18
<210> 3
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 3
cgttgttgtc tatgtagatg aagattgtag gtcagaactc aggtgcaaga aactgtgaag 60
atcggtaatt ataagctggt 80
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 4
gacaacaacg accagcttat 20

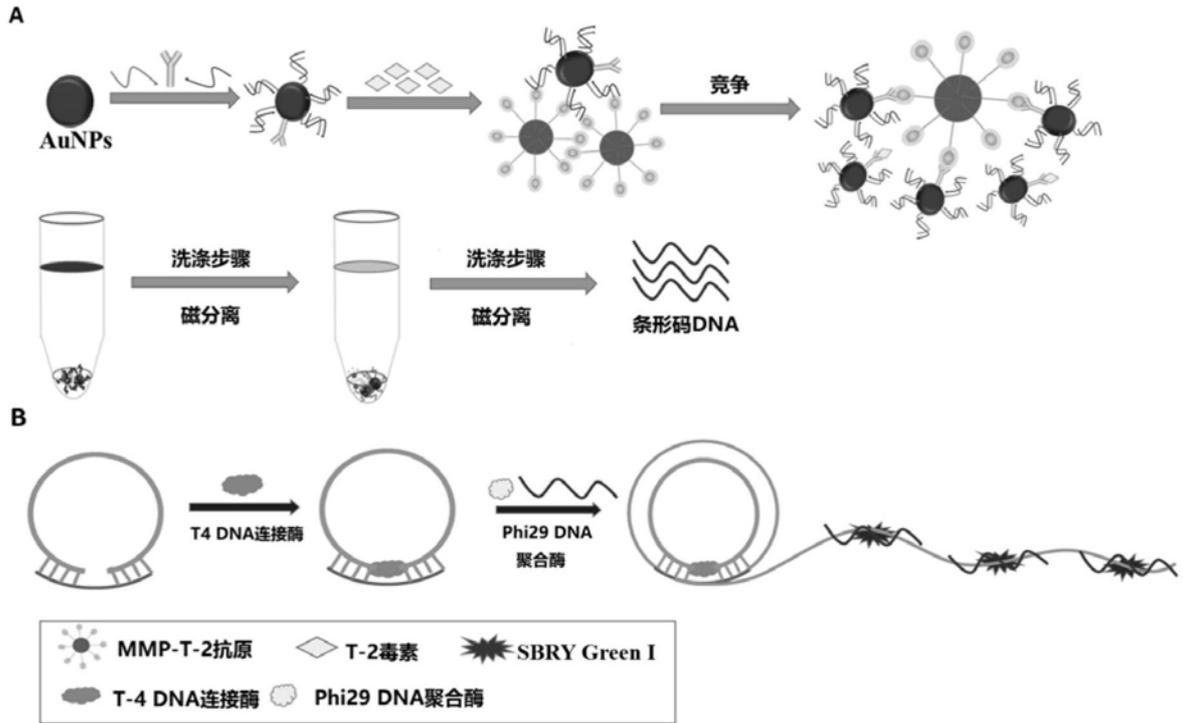


图1

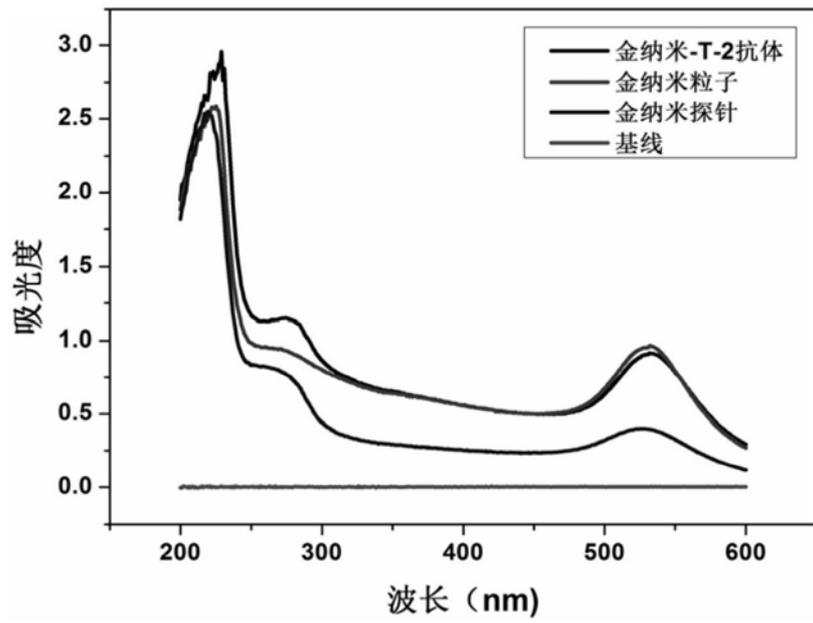


图2

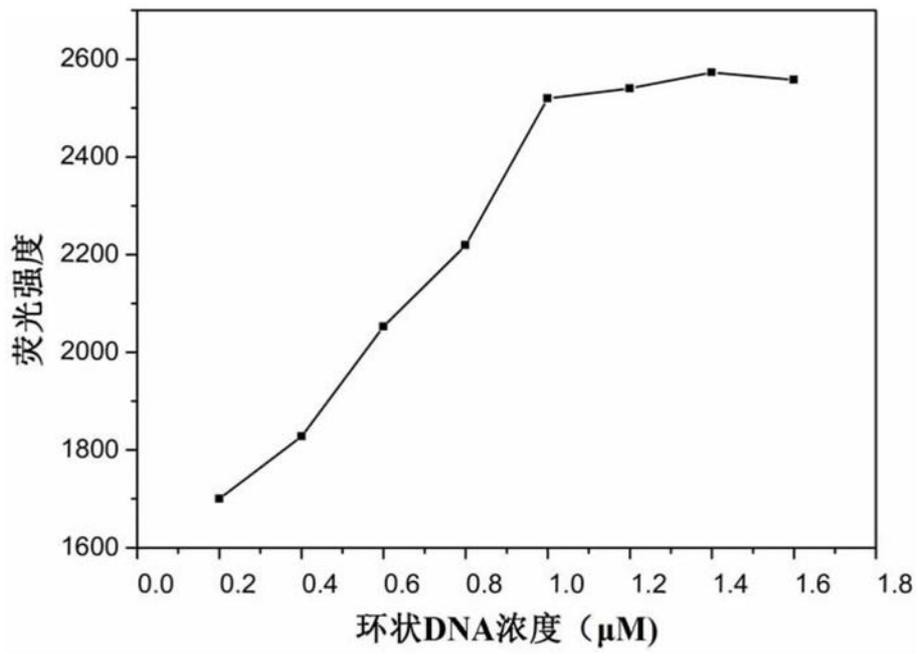


图3-1

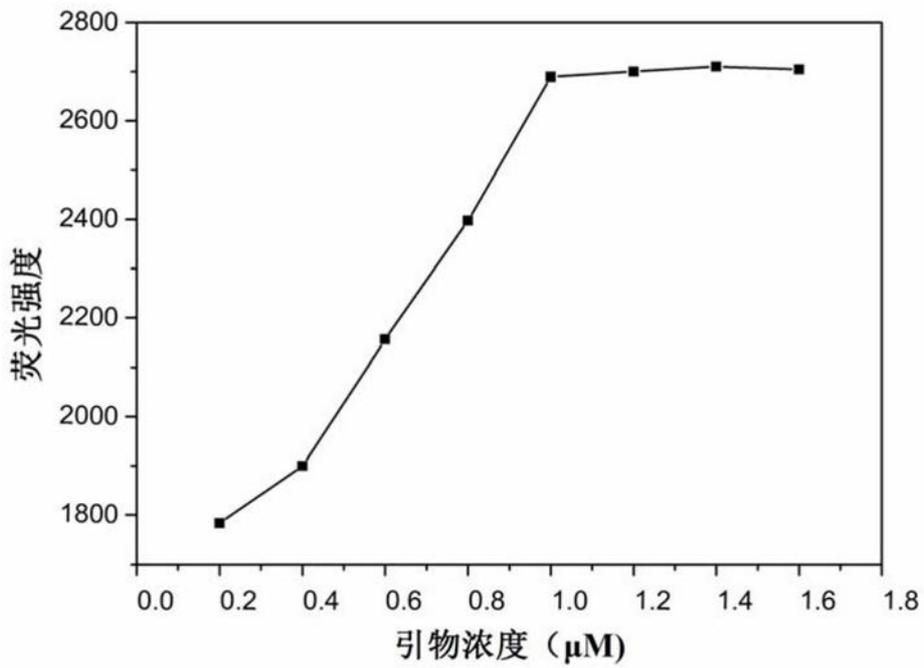


图3-2

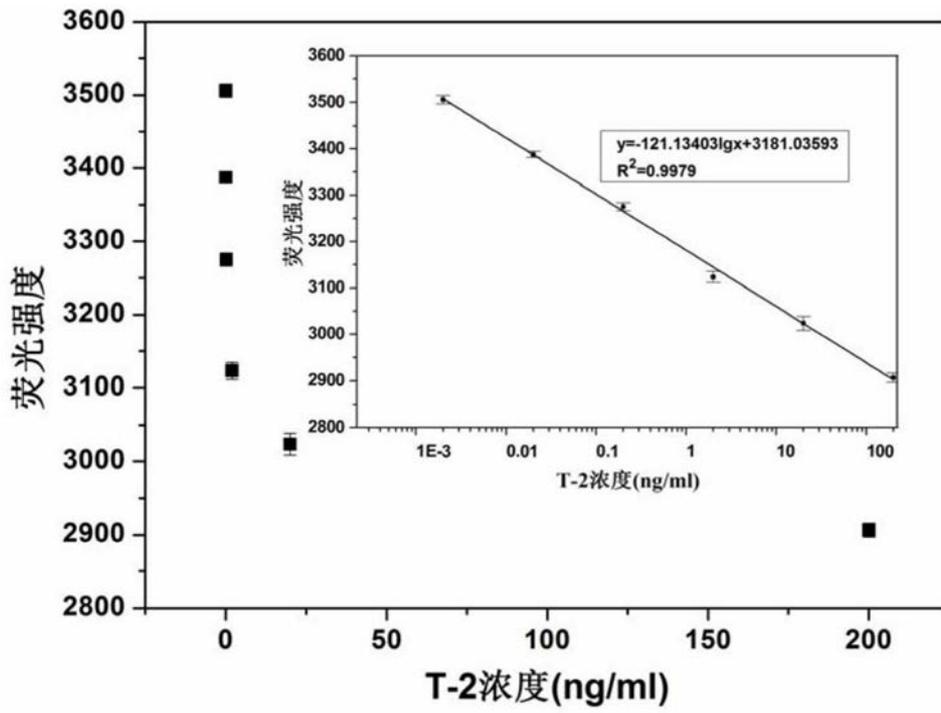


图4

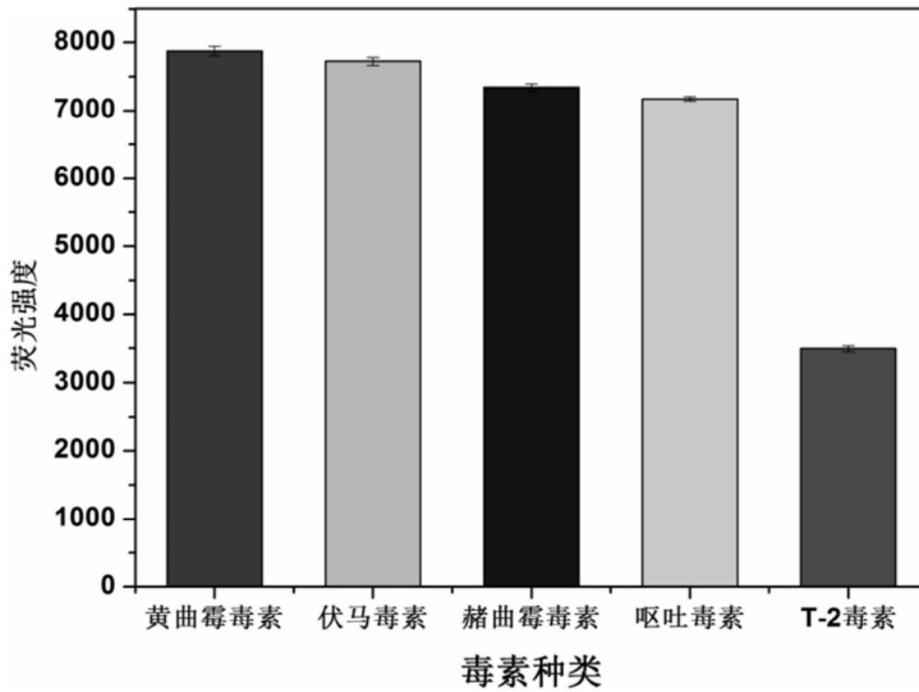


图5

专利名称(译)	一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN109142704A	公开(公告)日	2019-01-04
申请号	CN201810737964.2	申请日	2018-07-06
[标]发明人	王江 高志贤 宁保安 白家磊 李双 彭媛 张曼		
发明人	王江 高志贤 宁保安 白家磊 李双 彭媛 张曼		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/682		
CPC分类号	G01N33/53 C12Q1/682 G01N33/54346 C12Q2531/125		
代理人(译)	高爽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于食品安全检测及免疫竞争技术领域，涉及一种基于生物条形码与滚环扩增技术检测T-2毒素的试剂盒及方法。该试剂盒包括以下组分：(1)磁珠；(2)抗T-2单克隆抗体；(3)抗T-2抗原；(4)金纳米粒子；(5)捕获DNA，能够与金纳米粒子形成共价连接；(6)条形码DNA；(7)环状DNA；(8)引物DNA，与环状DNA两端互补配对；其中，所述捕获DNA中的至少一部分与条形码DNA中的至少一部分互补配对；所述条形码DNA与环状DNA中的至少一部分相同。利用该试剂盒和方法能够高灵敏的检测T-2毒素。

