



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102087284 A

(43) 申请公布日 2011.06.08

(21) 申请号 201010619519.X

(22) 申请日 2010.12.29

(71) 申请人 杭州南开日新生物技术有限公司
地址 310051 浙江省杭州市滨江区滨文路
95号活水工业园6幢4楼杭州南开日
新生物技术有限公司

(72) 发明人 张少恩 桑丽雅 周崇盈

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

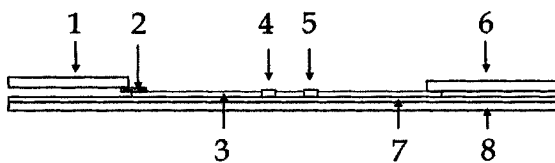
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测黄曲霉毒素 B1 的快速检测试剂板的制备方法

(57) 摘要

本发明一种检测黄曲霉毒素 B1 的快速检测试剂板的制备方法,属于真菌毒素检测领域,具体涉及一种检测谷物和食用油中黄曲霉毒素 B1 的快速检测试剂板的制备方法。本发明试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成,背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶金结合垫、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质控线,可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。该试剂板可进行半定量直观检测,整个操作过程仅需 40min,且无需任何昂贵实验设备辅助,利于大规模样本筛选,适合工商部门、检验检疫机构、粮油产品生产加工企业对于谷物和食用油中的黄曲霉毒素进行大规模快速检测。



1. 一种检测谷物和食用油中黄曲霉毒素 B1 的快速检测试剂板的制备方法,其特征在于醋酸纤维膜上的胶体金结合垫上包被有抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体-胶体金标记物,从样品垫到吸水垫方向依次是检测线和质控线,包被有黄曲霉毒素 B1- 载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG。

2. 如权利要求 1 所说的试剂板的制备方法,其特征在于将胶体金与抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体按一定比例混匀,使胶体金与抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体形成稳定的胶体金颗粒,通过浓缩形成抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体-胶体金标记物。

3. 如权利要求书 1 所说的试剂板的制备方法,其特征在于检测线上偶联黄曲霉毒素 B1 的载体蛋白可为牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、血蓝蛋白 (KLH)。

4. 如权利要求 1 所说的试剂板的制备方法,其特征在于样品中的黄曲霉毒素 B1 含量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,当样品中黄曲霉毒素 B1 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。

5. 如权利要求 1 所说的试剂板的制备方法,其特征在于工艺流程包括制备黄曲霉毒素 B1-BSA 偶联物、制备抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体、制备胶体金溶液、制备胶体金标记抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体和组装黄曲霉毒素 B1 免疫胶体金快速检测试剂板。

一种检测黄曲霉毒素 B1 的快速检测试剂板的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测黄曲霉毒素 B1 的快速检测试剂板的制备方法,特别是一种检测谷物和食用油中黄曲霉毒素 B1 的免疫胶体金快速检测试剂板的制备方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AFT) 属真菌毒素 (Mycotoxin),它主要是由黄曲霉和寄生曲霉所产生的,其他曲霉如片霉、青霉、镰孢霉、根霉等也可产生 AFT, AFT 常见于花生及其制品、玉米、棉籽,以及一些坚果类食品和饲料中。AFT 包括 B1、B2、G1 及 G2 等 10 多种,其中以黄曲霉毒素 B1 最为常见,毒性最强。B1 分布范围广,能引起人类(尤其是儿童)、各种饲养动物的急性中毒死亡,还能致畸、致癌、致突变,即使每千克物质含几十微克的黄曲霉毒素 B1 也有很大的毒性。因此对人、家禽、家畜的健康威胁极大。

[0003] 黄曲霉毒素危害性大,存在范围广,近几年闹得沸沸扬扬的“地沟油”事件,引起广大民众恐慌的就是其含有黄曲霉毒素,其毒性为砒霜的 100 倍;另外,人们熟称的“毒大米”,其中含有的致癌物质也是黄曲霉毒素,医学专家指出黄曲霉毒素的最短致癌时间仅为 24 周。为了预防黄曲霉毒素中毒事件的发生,维护人类健康,世界上已有 70 多个国家和地区对食品中黄曲霉毒素的含量作了严格限量要求。美国联邦政府有关法律规定,人类消费食品和奶牛饲料中的黄曲霉毒素含量(指 B1+B2+G1+G2 的总量)不能超过 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$,人类消费的牛奶中 M1 的含量不能超过 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,其他动物饲料中的含量不能超过 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。欧盟于 1999 年 1 月 1 日开始执行的 ECNo. 1525/98 法规规定,直接提供给人类食用的食物及组成食品的组分中黄曲霉毒素 B1 的含量不能超过 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$,黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的总量不得超过 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。日本规定,食品中黄曲霉毒素 B1 的含量不能超过 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。根据我国国家标准 GB2761-2005《食品中真菌毒素限量》的规定,我国食品中黄曲霉毒素 B1 允许量标准为:玉米、花生仁、花生油中不得超过 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$;玉米及花生仁制品(按原料折算)中不得超过 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$;大米、其他食用油中不得超过 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$,其他粮食、豆类、发酵食品中不得超过 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 目前检测谷物和食用油中黄曲霉毒素 B1 的方法主要有薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC) 和酶联免疫吸附法 (ELISA)。

[0005] 薄层色谱法是检测黄曲霉毒素 B1 的传统常用方法,是应用最早、最广的分析技术,曾是我国测定食品及饲料中 AFB1 的国家标准方法之一。该方法的优点在于所用的试剂、设备简单,费用低廉,容易掌握,适用大量样品的分离、筛选,一般的实验室均可开展。但是薄层色谱法检测黄曲霉毒素灵敏度低、重现差、操作烦琐、时间长且安全性差等缺点,已越来越不适用现代分析的要求。

[0006] 高效液相色谱法是目前国内测定黄曲霉毒素使用最多、也是比较权威的方法,灵敏度高、精度高、能同时分析多种黄曲霉毒素类型。但该法的样品前处理相对复杂,检测周期长、程序复杂、所需试剂繁多、操作时需要专门的技术人员,难以满足现代检测快速、简捷、现场化的要求。

[0007] 酶联免疫吸附法是应用抗原抗体特异性反应和酶的高效催化作用来测定黄曲霉毒素含量的免疫分析方法,具有特异性高、灵敏度高、快速、简便等优点。但是 ELISA 法中酶的活性易受反应条件影响,由此易造成测定结果重复性较差。此外 ELISA 试剂寿命短,因此需要低温保藏,而且该法在配制标准曲线时需要接触到黄曲霉毒素标准品,操作不安全。

发明内容

[0008] 本发明针对谷物和食用油中的黄曲霉毒素 B1 残留开展研究,提供一种用于现场快速筛选黄曲霉毒素阳性样本的检测技术,制备出现场检测谷物和食用油中黄曲霉毒素 B1 的免疫胶体金快速检测试剂板。本发明具有简单、快速、灵敏度高等特点,无须仪器设备配合测定,检测既可在实验室中进行,也可在农场、谷物混合车间、餐饮店等进行实地测定,5~10min 完成对样品中黄曲霉毒素 B1 的定性和半定量测定。

[0009] 本发明制备一种免疫胶体金快速检测试剂板,试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成,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。其中样品垫、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,其目的一方面是保证层析作用从样品垫到吸水垫部位顺利进行,另一方面是为了使样品溶液与样品垫有充分反应时间,样品垫上的缓冲体系可以中和样品溶液的酸碱度,保证样品溶液中的有效成分与胶体金结合垫上的金标抗体顺利发生反应。

[0010] 胶体金结合垫上包被有抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体与胶体金的结合物;硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有黄曲霉毒素 B1-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和质控线。偶联黄曲霉毒素 B1 的载体蛋白可为牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、血蓝蛋白 (KLH)。

[0011] 本发明制备一种免疫胶体金快速检测试剂板,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,特异性检测谷物和食用油中的黄曲霉毒素 B1 残留。如果样品溶液含有黄曲霉毒素 B1 残留,黄曲霉毒素 B1 先和胶体金颗粒上的抗体反应,因此当胶体金颗粒随样品溶液扩散至检测线时,胶体金颗粒上抗体的活性位点因被样品溶液中的黄曲霉毒素 B1 占据而无法与检测线上黄曲霉毒素 B1 特异性抗原结合;当样品中的黄曲霉毒素 B1 含量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,当样品中黄曲霉毒素 B1 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。

[0012] 本发明制备一种免疫胶体金快速检测试剂板,试剂板的各部分组成成分与功能如下:

[0013] 塑料模板,起固定试纸条及标示功能区(加样孔、检测区、控制区)的作用。

[0014] 背衬为一面涂有不干胶的不吸水的韧性材料,如 PVC 板,起固定支持试纸其他组成部分的作用。

[0015] 样品垫由玻璃纤维制成,起吸收样品溶液与缓冲样品溶液 pH 值的作用。

[0016] 胶体金结合垫由聚酯膜制成,其上标记有抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体与胶体金的结合物,是样品溶液中的有效成分与金标抗体发生反应的场所。

[0017] 硝酸纤维素膜部分主要作用是将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0018] 吸水垫为滤纸,作为吸水部分其作用是将移动上来的多余的溶液吸收。

[0019] 本发明试剂板具有如下有益效果：

[0020] (1) 特异性好。本发明试剂板的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体对黄曲霉毒素 B1 的交叉反应率均为 100%，与其他种类的抗生素包括玉米赤霉烯酮、伏马霉素、赭曲霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇等药物没有交叉反应。

[0021] (2) 灵敏度高。根据我国国家标准 GB 2761-2005《食品中真菌毒素限量》的规定，我国食品中黄曲霉毒素 B1 允许量标准为：玉米、花生仁、花生油中不得超过 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；玉米及花生仁制品（按原料折算）中不得超过 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；大米、其他食用油中不得超过 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，其他粮食、豆类、发酵食品中不得超过 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。本发明试剂板的灵敏度可达到 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，完全可以满足市场的检测需求。

[0022] (3) 操作简便快速。本发明试剂板将免疫层析反应所需的大部分原料已整合到试剂条中，滴样后抗原抗体反应在固相膜上快速进行，大大缩短了检样时间，滴样后 5～8 分钟内即可读取结果。本发明试剂板的操作不需任何专业培训，普通人员均可操作，只需按说明滴样后用肉眼判读即可。

[0023] (4) 不依赖于实验设备。本发明试剂板在直接滴样跑板后，通过肉眼判断硝酸纤维素膜上检测线和控制线的颜色深浅对比来判读结果，整个检测过程无需用到任何实验设备，真正做到对实验设备零要求，尤其适合于野外及现场操作，易于推广。

[0024] (5) 成本低，效益好。本发明试剂板生产工艺简单，可实现单个样本检测，生产成本低，大大降低了检测费用。

附图说明

[0025] 图 1 为黄曲霉毒素 B1 免疫胶体金快速检测试剂板结构示意图，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 板。

[0026] 图 2 为黄曲霉毒素 B1 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。

[0027] 图 3 为黄曲霉毒素 B1 免疫胶体金快速检测试剂板结果判定示意图，其中 C 为控制区，T 为检测区。

[0028] 具体实施方式

[0029] 本发明试剂板的制备包括黄曲霉毒素 B1 载体蛋白偶联物的制备、抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备、胶体金溶液、胶体金标记抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备和黄曲霉毒素免疫胶体金快速检测试剂板的组装。

[0030] 1. 黄曲霉毒素 B1 与载体蛋白的偶联

[0031] 采用碳二亚胺法 (EDC 法) 将黄曲霉毒素 B1 与载体蛋白 (牛血清蛋白 BSA 和卵清蛋白 OVA) 偶联制备免疫抗原和包被抗原。

[0032] 称取 2mg 黄曲霉毒素 B1 和 4mg CMO，溶解于 $400 \mu\text{L}$ 吡啶中， 25°C 避光振摇反应。直至反应完全。将反应产物冷冻干燥，所得残渣用 3mL 超纯水溶解，用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 8.0。分 3 次加入 10mL 苯 (4mL、3mL、3mL)，振荡萃取有机相中未反应的黄曲霉毒素 B1。在水相中滴加 0.1mol/L 稀盐酸调 pH 值至 3.0，得沉淀，用乙酸乙酯抽提沉淀物，真空干燥得中间产物黄曲霉毒素 B1 肟。

[0033] 称取 0.2mg 黄曲霉毒素 B1 胍,溶于 100 μ LDMF-水 (6 : 9,V/V) 中,加入 2mg EDC,避光混匀。再加入 0.5% C-BSA 溶液,25 $^{\circ}$ C 避光、100r/min 反应 4h,补加 EDC 2mg,继续反应。将偶联产物装入透析袋,在 0.01mol/L PBS(pH 7.4) 中置 4 $^{\circ}$ C 透析 3d,期间换透析液 3 次(每 24h 更换一次)。

[0034] 用 OVA 替代 BSA,采用同样方法制备黄曲霉毒素 B1-卵清蛋白偶联物。

[0035] 2. 抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备

[0036] 取 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,将作为免疫原的黄曲霉毒素 B1-BSA 偶联物与等体积的弗氏完全佐剂乳化,按 100 μ g/只剂量皮下注射,之后每隔 3 周加强免疫 1 次,用不完全佐剂腹腔注射。融合前 3d 强化免疫 1 次,不用佐剂,剂量加倍。细胞融合按常规方法进行:将 Sp2/0 多发性骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1 : 10 的比例混合,在 50% 聚乙二醇作用下融合,HAT 培养基悬浮,分种于 96 孔培养板中,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养。

[0037] 融合后,待细胞生长到培养孔面积的 1/4 时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初筛选择 10mg/L 黄曲霉毒素 B1-BSA 包被酶联板,被筛孔加培养上清,孵育、清洗后,加入羊抗鼠 IgG-HRP(1 : 1000),OPD 显色。筛选出的阳性孔再用黄曲霉毒素 B1-卵清蛋白偶联物包被的酶联板进行阻断间接 ELISA。将细胞培养上清与 2 \times 10⁻³mol/L 黄曲霉毒素 B1 溶液等量混合,37 $^{\circ}$ C 感作 1h,加入已包被的酶标板中。另外用 PBS(0.01mol/L,pH7.4) 替代黄曲霉毒素 B1 溶液作对照,其余步骤同上。若黄曲霉毒素 B1 阻断后的 OD 值降至对照孔的 50% 以下,则判为阳性孔。经 2~3 次检测都呈阳性的孔,立即用有限稀释法进行克隆化。

[0038] 体外培养:将克隆化的细胞株扩大培养,细胞浓度达 5 \times 10⁵/mL 时停止换液,细胞全部死亡后收集培养液。体内诱生腹水:给腹腔注射液体石蜡 10 天后的小鼠腹腔注射克隆化细胞株 10⁷ 个细胞,7 天后抽取腹水。

[0039] 3. 胶体金溶液的制备

[0040] 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 1mL 1% 柠檬酸三钠,煮沸后迅速加入 1mL 1% 氯金酸,继续煮沸 10min,冷却后,4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

[0041] 4. 胶体金标记抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备

[0042] 取已制备好的胶体金溶液 100mL,用 0.1mol/L 碳酸钾溶液调 pH 到 8.0。边搅拌边加入 2mg 抗黄曲霉毒素 B1 单抗,搅拌 20min,逐滴加入 2mL 25mol/L 聚乙二醇 20000(PEG20000),搅拌 15min。20,000rpm 离心 15min,弃上清液,加入 10mL pH 7.4 的 PBS 缓冲液(含 0.4mol/L PEG)清洗 2 次。将沉淀用 10mL 含 2% BSA 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)溶解,用 0.22 μ m 无菌过滤器过滤后,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0043] 5. 黄曲霉毒素 B1 免疫胶体金快速检测试剂板的组装

[0044] 用点膜机把适当浓度的黄曲霉毒素 B1-载体蛋白偶联物及羊抗鼠 IgG 喷在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线和质控线,37 $^{\circ}$ C 烘箱干燥 8h。以同样方法,将制备好的金标记黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体包被在胶体金结合垫上。

[0045] 检测试剂组成为一个 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。

[0046] 6. 黄曲霉毒素 B1 免疫胶体金快速检测试剂板检测实施操作方法

[0047] 6.1 样品制备

[0048] 大米:取 20g 大米于 50mL 离心管内,加入 20mL 缓冲液,剧烈震荡 1-2min,静置 1min,吸取至少 100 μ L 下层溶液,待检。

[0049] 食用油:取 1g 食用油于 50mL 离心管内,加入 1mL 正己烷,剧烈震荡 1min,静置片刻,往管内加入 0.5mL 缓冲液,剧烈震荡 1-2min,静置分层,吸取至少 100 μ L 下层溶液,待检。

[0050] 6.2 检测步骤

[0051] 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 5 ~ 8min 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。

[0052] 6.3 结果判断

[0053] 读取结果时,将试剂板水平置于观察者正面。

[0054] 阴性 (-):T 线显色(检测线,靠近加样孔一端)比 C 线(对照线)深或一样深,表示样品中黄曲霉毒素 B1 残留含量低于检测限或不含黄曲霉毒素 B1 残留。

[0055] 阳性 (+):T 线显色比 C 线浅,或 T 线无显色,表示样品中黄曲霉毒素 B1 残留含量高于检测限,T 线显色比 C 线越浅,表示样品中黄曲霉毒素 B1 含量越高。

[0056] 无效: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。

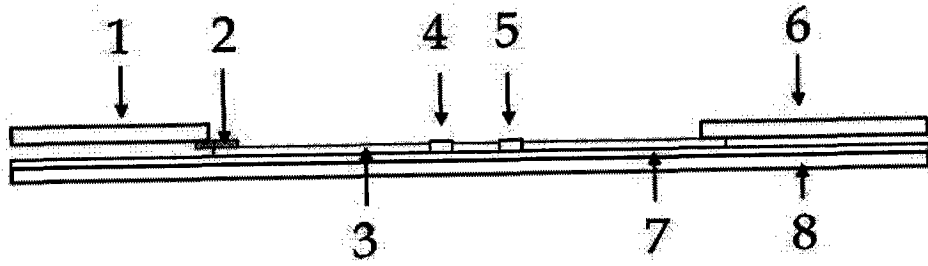


图 1

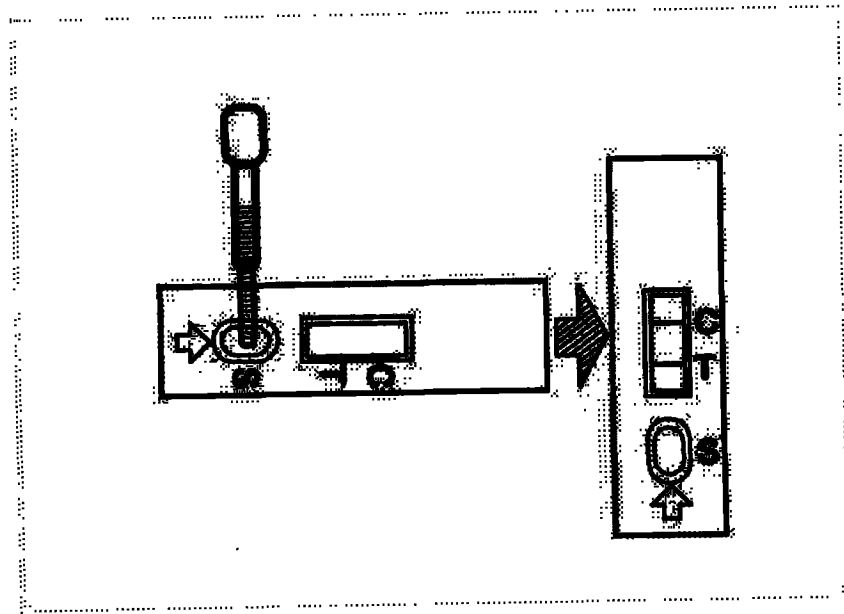


图 2

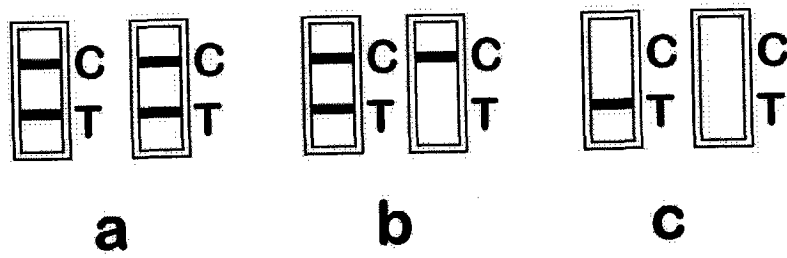


图 3

专利名称(译)	一种检测黄曲霉毒素B1的快速检测试剂板的制备方法		
公开(公告)号	CN102087284A	公开(公告)日	2011-06-08
申请号	CN201010619519.X	申请日	2010-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
[标]发明人	张少恩 桑丽雅 周崇盈		
发明人	张少恩 桑丽雅 周崇盈		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一种检测黄曲霉毒素B1的快速检测试剂板的制备方法，属于真菌毒素检测领域，具体涉及一种检测谷物和食用油中黄曲霉毒素B1的快速检测试剂板的制备方法。本发明试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成，背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶金结合垫、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质控线，可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。该试剂板可进行半定量直观检测，整个操作过程仅需40min，且无需任何昂贵实验设备辅助，利于大规模样本筛选，适合工商部门、检验检疫机构、粮油产品生产加工企业

对谷物和食用油中的黄曲霉毒素进行大规模快速检测。

