



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108776219 B

(45) 授权公告日 2021. 09. 03

(21) 申请号 201810402378.2

(22) 申请日 2018.04.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108776219 A

(43) 申请公布日 2018.11.09

(66) 本国优先权数据
201810145981.7 2018.02.12 CN

(83) 生物保藏信息
CGMCC NO.15582 2018.04.03

(73) 专利权人 北京农业质量标准与检测技术研
究中心

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9
号北京市农林科学院

(72) 发明人 王蒙 韦迪哲 冯晓元 姜冬梅
付海龙

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 王文君 黄爽

(51) Int.Cl.
C07D 207/38 (2006.01)
C07K 14/77 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
C07K 16/14 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105503689 A, 2016.04.20
CN 105503689 A, 2016.04.20
CN 106093381 A, 2016.11.09
CN 102516148 A, 2012.06.27

审查员 唐建刚

权利要求书2页 说明书8页 附图3页

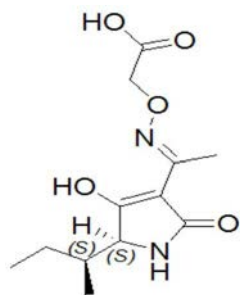
(54) 发明名称

一种快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析
试纸条

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条,其是利用结构如式(I)所示的半抗原制备的免疫层析试纸条,本发明采用一步间接竞争免疫层析技术开发出可快速定性或半定量检测样品中TeA含量的免疫层析试纸条,操作简单,经济实用,适合于现场检测,可广泛应用于农产品和食品等样品中TeA污染的检测及快速筛查。

1. 细交链格孢酮酸半抗原, 其特征在于, 其结构如式 (I) 所示:



式 (I) 。

2. 细交链格孢酮酸全抗原, 其特征在于, 由权利要求1所述细交链格孢酮酸半抗原与载体蛋白偶联后得到的;

其中, 所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

3. 根据权利要求2所述的细交链格孢酮酸全抗原, 所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

4. 由权利要求2或3所述细交链格孢酮酸全抗原制备的特异性抗体, 包括多克隆抗体和单克隆抗体。

5. 权利要求1所述细交链格孢酮酸半抗原的制备方法, 其特征在于, 将细交链格孢酮酸200mg和羧甲基羟胺半盐酸盐130mg溶解于10mL无水甲醇中, 加入2mL 98%冰醋酸, 室温搅拌3h; 减压蒸去有机溶剂, 剩余水相通过制备液相色谱仪纯化, 然后冻干即得。

6. 细交链格孢酮酸检测试剂, 其特征在于, 由权利要求1所述细交链格孢酮酸半抗原, 或权利要求2或3所述细交链格孢酮酸全抗原, 或权利要求4所述特异性抗体制备得到。

7. 细交链格孢酮酸检测试剂盒, 其特征在于, 由权利要求1所述细交链格孢酮酸半抗原, 或权利要求2或3所述细交链格孢酮酸全抗原, 或权利要求4所述特异性抗体制备得到。

8. 权利要求1所述细交链格孢酮酸半抗原在细交链格孢酮酸的免疫分析检测中的应用。

9. 权利要求2或3所述细交链格孢酮酸全抗原在细交链格孢酮酸的免疫分析检测中的应用。

10. 权利要求4所述特异性抗体在细交链格孢酮酸的免疫分析检测中的应用。

11. 权利要求6所述检测试剂在细交链格孢酮酸的免疫分析检测中的应用。

12. 权利要求7所述检测试剂盒在细交链格孢酮酸的免疫分析检测中的应用。

13. 权利要求1所述细交链格孢酮酸半抗原在制备细交链格孢酮酸的胶体金检测试纸条中的应用。

14. 权利要求2或3所述细交链格孢酮酸全抗原在制备细交链格孢酮酸的胶体金检测试纸条中的应用。

15. 权利要求4所述特异性抗体在制备细交链格孢酮酸的胶体金检测试纸条中的应用。

16. 权利要求6所述检测试剂在制备细交链格孢酮酸的胶体金检测试纸条中的应用。

17. 一种快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条, 其特征在于, 包括样品垫、胶体金结合垫、反应膜、吸水垫和底板, 所述反应膜上设有检测线和质控线, 所述样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫依次粘贴在底板上;

其中,所述胶体金结合垫上包被有细交链格孢酮酸特异性抗体-胶体金标记物;所述检测线包被有权利要求2或3所述细交链格孢酮酸全抗原,所述质控线包被有羊抗鼠二抗。

18.根据权利要求17所述的试纸条,其特征在于,所述细交链格孢酮酸特异性抗体-胶体金标记物的制备方法如下:用还原剂将氯金酸还原成胶体金纳米颗粒;将胶体金与细交链格孢酮酸特异性抗体混合孵育30min,加入牛血清白蛋白使其终浓度为1%,反应30min后;离心纯化、浓缩即得细交链格孢酮酸特异性抗体-胶体金标记物。

19.利用权利要求17或18所述试纸条检测细交链格孢酮酸的方法,其特征在于,将待测样品粉碎,向2~10g样品中加入体积浓度为80%的甲醇水溶液8~50mL,混匀,振荡提取30min,静置5~10min,将上清液用水稀释,使稀释液中甲醇的终体积浓度为20%~30%,得到待测样品溶液;将待测样品溶液滴加到所述试纸条的样品垫上进行检测,根据检测线和质控线的显色结果判定。

一种快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全监测和免疫分析检测技术领域,具体地说,一种快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条。

背景技术

[0002] 细交链格孢酮酸(Tenuazonic acid,TeA)是目前检出率最高的一种交链孢毒素,也是交链孢菌培养物导致动物急性中毒死亡的主要毒素,有催吐及心血管毒两种基本毒性,可使动物表现多涎、呕吐、厌食、血液浓缩,造成循环系统损伤和出血性胃肠病,从而致动物死亡。TeA的毒性作用主要是抑制蛋白质的生物合成。小鼠TeA持续暴露,发现小鼠出现了比较典型的癌变前的现象:食管黏膜上皮细胞部分细胞的细胞核固缩,染色质增大并呈颗粒化,说明其有诱发食管癌的可能性。且TeA与其他交链孢毒素同时存在时,会产生协同效应使毒性作用增强,进而增强对人和动物的健康风险。

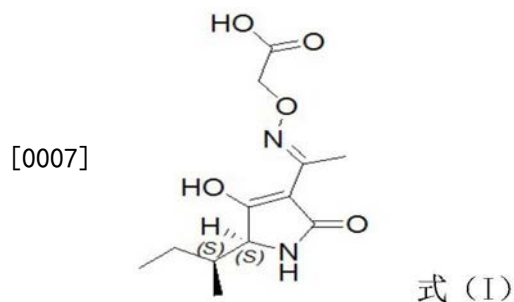
[0003] TeA在小麦、番茄、葡萄及其制品中检出率较高,特别是小麦及其制品中,在某些地区TeA的污染水平高达1000 μ g/kg以上。据报道,随膳食摄入TeA毒素对公众健康存在潜在风险,特别是对我国2~6岁儿童风险较大。我国已于2017年将小麦及面粉中交链孢毒素污染列入国家食品污染物及有害因素的监控计划。目前,TeA的检测主要采用传统的大型仪器检测方法,如液相色谱法、液相色谱-质谱联用等,不仅费时费力,且操作要求高,不适宜大批量的快速筛选,已不能满足社会对食品安全监管的需要。酶联免疫吸附法(ELISA)是目前常使用的一种检测方法,已有报道利用ELISA测定TeA的浓度,但由于需要酶标仪和操作熟练的人员以及检测时间相对较长,所以不适合现场快速检测。基于胶体金标记抗体与抗原特异性结合反应的免疫层析试纸条的检测结果肉眼可见,不需要大型仪器设备,检测成本低,分析时间短,从而可实现对各种真菌毒素的定性、在线、快速检测,但目前尚未见利用免疫层析试纸条检测TeA毒素的相关报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供细交链格孢酮酸半抗原及其制备方法与应用。

[0005] 本发明的另一目的是提供一种快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条及其应用。

[0006] 为了实现本发明目的,本发明的细交链格孢酮酸半抗原,其结构如式(I)所示:



[0008] 本发明还提供细交链格孢酮酸全抗原,由所述细交链格孢酮酸半抗原与载体蛋白

偶联后得到的,即半抗原的羧基与载体蛋白的游离氨基发生缩合反应。

[0009] 其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白等;优选牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)。

[0010] 所述细交链格孢酮酸全抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体。其中,所述TeA单克隆抗体是以TeA半抗原-载体蛋白偶联物(如TeA-BSA)作为免疫原,通过免疫试验动物,结合杂交瘤细胞制备技术获得的单抗。优选地,所述单抗的效价为1:270000。

[0011] 采用ELISA法测定所述单抗的效价。ELISA检测效价所用的包被原,其制备方法如下:

[0012] 取TeA半抗原8mg,加0.2mL DMF溶解,澄清,加入DCC 4.13mg,加入NHS 2.3mg,室温搅拌2h,过滤,除去沉淀物,得到半抗原活化液A液;取卵清蛋白(OVA) 50mg,加8mL 0.05mol/L pH 7.2PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5h。停止反应,0.02M PBS缓冲液透析3d,每天换液三次,得到TeA-OVA包被抗原,分装,-20℃保存,备用。

[0013] 本发明的细交链格孢酮酸半抗原可通过如下方法制备:将细交链格孢酮酸200mg和羧甲基羟胺半盐酸盐130mg溶解于10mL无水甲醇中,加入2mL 98%冰醋酸,室温搅拌3h;减压蒸去有机溶剂,剩余水相通过制备液相色谱仪纯化,然后冻干即得。TeA半抗原合成路线见图1。

[0014] 本发明还提供由所述细交链格孢酮酸半抗原,或所述细交链格孢酮酸全抗原,或所述特异性抗体制备的细交链格孢酮酸检测试剂或试剂盒。

[0015] 本发明还提供所述细交链格孢酮酸半抗原,或所述细交链格孢酮酸全抗原,或所述特异性抗体,或所述检测试剂或试剂盒在细交链格孢酮酸的免疫分析检测中的应用。

[0016] 本发明还提供所述细交链格孢酮酸半抗原,或所述细交链格孢酮酸全抗原,或所述特异性抗体,或所述检测试剂在制备细交链格孢酮酸的胶体金检测试纸条中的应用。

[0017] 本发明还提供一种快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条(图4),包括样品垫、胶体金结合垫、反应膜、吸水垫和底板,所述反应膜上设有检测线和质控线,所述样品垫、胶体金结合垫、反应膜和吸水垫依次粘贴在底板上。优选地,所述胶体金结合垫1/3~1/2被覆盖于样品垫下。

[0018] 其中,所述胶体金结合垫上包被有细交链格孢酮酸特异性抗体-胶体金标记物,所述细交链格孢酮酸特异性抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体;所述检测线包被有所述细交链格孢酮酸全抗原(例如TeA半抗原-OVA偶联物),所述质控线包被有羊抗鼠二抗。

[0019] 所述细交链格孢酮酸特异性抗体-胶体金标记物的制备方法如下:用还原剂将氯金酸还原成胶体金纳米颗粒;将胶体金与细交链格孢酮酸特异性抗体混合孵育30min,加入牛血清白蛋白使其终浓度为1%,反应30min后;离心纯化、浓缩即得细交链格孢酮酸特异性抗体-胶体金标记物。

[0020] 优选地,所述还原剂为1%柠檬酸三钠水溶液。所述胶体金的纳米颗粒大小为13~40nm,更优选为18nm。

[0021] 在本发明的一个具体实施方式中,TeA单克隆抗体-胶体金标记物的制备如下:

[0022] 取制备好的粒径大小为18nm的胶体金溶液2mL,用0.2mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至8.0;随后逐滴加入200μL浓度为20-100μg/mL(优选100μg/mL)的TeA单克隆抗体,

室温条件下磁力搅拌反应2h;逐滴加入10%的BSA,使其在胶体金溶液中的终浓度为1% (体积分数),室温条件下磁力搅拌反应30min;加入10%的PEG 20000溶液,并使其终浓度为0.2%,室温条件下磁力搅拌30min;12000rpm离心30min,弃上清,收集胶体金沉淀;沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液重悬沉淀重悬,置4℃备用。

[0023] 其中,所述复溶缓冲液为:0.02%~0.1%酪蛋白(质量分数)、0.05%~0.2% (质量分数)吐温-80、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。优选地,复溶缓冲液为:0.02%酪蛋白(质量分数)、0.05% (质量分数)吐温-80、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0024] 所述底板可为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品垫可为吸滤纸或滤油纸;所述胶体金结合垫可为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜可为硝酸纤维素膜(NC膜)或醋酸纤维素膜。

[0025] 优选地,本发明所述单克隆抗体是由杂交瘤细胞株TeA分泌产生的单抗。杂交瘤细胞株TeA现已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101,保藏编号CGMCC NO.15582,保藏日期2018年4月3日。

[0026] 本发明还提供所述免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0027] (1) 制备喷涂有TeA单克隆抗体-胶体金标记物的胶体金结合垫;

[0028] (2) 制备具有包被有TeA半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠二抗的质控线的反应膜;

[0029] (3) 将步骤(1)和(2)制备好的胶体金结合垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0030] 具体地,所述免疫层析试纸条的制备方法如下:

[0031] 1) 半抗原制备:将TeA与羧甲基羟胺半盐酸盐经过一系列反应得到式(I)的TeA半抗原产物;

[0032] 2) 将TeA半抗原与载体蛋白偶联,得到TeA半抗原-载体蛋白偶联物;

[0033] 3) 用TeA半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到TeA单克隆杂交瘤细胞株;

[0034] 4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金,所述胶体金的纳米颗粒大小为13~40nm,更优选为18nm;

[0035] 5) 将步骤3)制备的TeA单克隆抗体加入步骤4)制备的胶体金中,得到TeA单克隆抗体-胶体金标记物;

[0036] 6) 将TeA单克隆抗体-胶体金标记物喷涂在胶体金结合垫上,37℃烘1h后取出,置于干燥环境中保存备用;优选所述金标垫上每cm喷涂长度所需的纳米金标记的抗交链毒素单克隆抗体的用量为300~500ng;

[0037] 7) 将TeA半抗原-载体蛋白偶联物包被在反应膜上构成检测线,所述的检测线上每cm所需要的TeA-载体蛋白偶联物的包被量为600~800ng;

[0038] 8) 将羊抗鼠二抗包被在反应膜上构成质控线,所述的检测线上每cm所需要的羊抗鼠多克隆抗体的包被量为100~200ng;

[0039] 9) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH为7.2、0.1mol/L磷酸盐

缓冲液浸泡2h, 37℃下烘干2h;

[0040] 10) 在底板上按顺序粘贴上样品垫、胶体金结合垫、反应膜、吸水垫, 样品垫压住胶体金结合垫, 最后切成3mm宽的小条, 加塑料盒, 真空包装, 4~30℃条件下可保存12个月。

[0041] 本发明进一步提供利用所述免疫层析试纸条检测(农产品和食品中)细交链格孢酮酸的方法, 将待测样品粉碎, 向2~10g样品中加入体积浓度为80%的甲醇水溶液8~50mL, 混匀, 振荡提取30min, 静置5~10min, 将上清液用水稀释, 使稀释液中甲醇的终体积浓度为20%~30%, 得到待测样品溶液; 将待测样品溶液(60~100μL)滴加到所述试纸条的样品垫上进行检测(反应10min), 根据检测线和质控线的显色结果判定。

[0042] 本发明检测TeA毒素的快速检测试纸条采用高度特异识别的抗体抗原反应及免疫层析分析技术, 将TeA特异性抗体-胶体金标记物固定于胶体金结合垫上, 样品中的TeA在流动过程中与胶体金结合垫上的TeA单克隆抗体-胶体金标记物结合, 形成毒素-抗体-胶体金标记物。样本中的毒素与反应膜检测线上的TeA半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合TeA单克隆抗体-胶体金标记物, 根据检测线红色条带有无或颜色深浅来判断待测样品液中是否含有TeA毒素。

[0043] 检测结果的判断图5所示。

[0044] 阴性: 检测线(T)显色比质控线(C)显色深或显色一致, 表示样本中TeA浓度低于检测限, 判为阴性。

[0045] 阳性: 检测线(T)显色比质控线(C)显色浅或检测线(T)不显色, 表示样本中TeA浓度等于或高于检测限, 判为阳性。

[0046] 无效: 当质控线(C)不显示出红色条带, 则无论检测线(T)显示出红色条带与否, 该试纸条均判为无效。

[0047] 借由上述技术方案, 本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0048] (一) 本发明应用胶体金免疫层析法, 快速检测样品中TeA毒素的污染情况, 具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低, 非常容易推广等优点。

[0049] (二) 本发明采用一步间接竞争免疫层析技术开发出可快速定性或半定量检测样品中TeA含量的免疫层析试纸条, 操作简单, 经济实用, 适合于现场检测, 可广泛应用于农产品和食品等样品中TeA污染的检测及快速筛查。

[0050] (三) 本发明从设计TeA半抗原结构出发, 制备免疫原和包被原, 进而筛选高专一性、高亲和性的TeA单克隆抗体, 特异性好, 开发的胶体金免疫层析试纸条可直接用于TeA的检测, 实际应用价值大。

[0051] (四) 本发明的检测果蔬中链格孢毒素AME的胶体金免疫层析试纸条, 能够一步实现检测, 结果准确, 无需洗涤和标准参照, 能够对单个或批量样本实时快速定性或半定量检测, 检测灵敏度高, 检测限达到10ng/g。所述试纸条对其他交链孢毒素无交叉响应。

[0052] (五) 本发明的检测农产品及食品中TeA毒素的胶体金免疫层析试纸条, 具有制备简单, 成本低, 检测时间短、适合基层单位使用、储存简单、保质期长的优点, 可在现场大批量样本中TeA毒素的快速检测及筛查中发挥重要作用。能够更好地辅助我国食品企业及政府职能监管部门等开展相关检测工作。

附图说明

[0053] 图1为本发明式(I)所示的TeA半抗原合成路线图。

[0054] 图2为本发明所述TeA半抗原核磁共振氢谱图。

[0055] 图3为本发明所述TeA半抗原LC-MS谱图。

[0056] 图4为本发明所述快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条的结构示意图;其中,1-样品垫,2-胶体金结合垫,3-反应膜,4-吸水垫,5-底板,6-检测线,7-质控线。

[0057] 图5为本发明所述快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条的检测结果判定图;其中,A-C分别表示检测结果阴性、阳性和无效。

具体实施方式

[0058] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0059] 实施例1快速检测细交链格孢酮酸的免疫层析试纸条的制备

[0060] 1、TeA半抗原的制备

[0061] 将TeA (200mg, 1mmol) 和羧甲基羟胺半盐酸盐 (130mg, 1mmol) 溶到10mL无水甲醇中,加入2mL冰醋酸,室温搅拌3h。减压蒸去有机溶剂,剩余水相通过制备液相色谱仪纯化,然后冻干得到白色固体 (35mg, 13%)。产物表征:高效液相 (214nm, 254nm均大于98%);液质 (分子量270, 出M+1=271);核磁氢谱 (氘代DMSO, 7.77-7.70出一个氢, 4.68-4.661出两个氢, 3.94-3.87出一个氢, 2.33出三个氢, 1.76出一个氢, 1.28-1.05出两个氢, 0.93-0.89出三个氢, 0.86-0.80出三个氢)。这些峰的存在,证明间隔臂偶联成功。TeA半抗原结构如式(I)所示。TeA半抗原核磁共振氢谱图见图2。TeA半抗原LC-MS谱图见图3。

[0062] 2、免疫原的制备

[0063] 将18mg TeA半抗原溶于0.5mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中;加入13.7mg二环己基碳二亚胺(DCC),搅拌30min;加入7.6mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温避光磁力搅拌3h,得到A液;取牛血清白蛋白(BSA) 50mg,加8mL 0.05mol/L pH 7.2PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5h。停止反应,0.02M PBS缓冲液透析3d,每天换液三次,得到TeA-BSA免疫原,分装,-20℃保存,备用。

[0064] 3、包被原的制备

[0065] 取TeA半抗原8mg,加0.2mL DMF溶解,澄清,加入DCC 4.13mg,加入NHS 2.3mg,室温搅拌2h,过滤,除去沉淀物,得到半抗原活化液A液;取卵清蛋白(OVA) 50mg,加8mL 0.05mol/L pH 7.2PB缓冲液溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌反应5h。停止反应,0.02M PBS缓冲液透析3d,每天换液三次,得到TeA-OVA包被抗原,分装,-20℃保存,备用。

[0066] 4、TeA单克隆抗体的制备

[0067] (1) 动物免疫

[0068] 将步骤2得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。第一次免疫将交链孢毒素完全抗原与等量弗氏完全佐剂乳化后,于小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于4周后进行,采用弗氏不完全佐剂与等量交链孢毒素完全抗原乳化,于小鼠腹腔注射。第三次免疫与第二次免疫间隔4周,免疫方式与其相同,第四次免疫于第三次免疫3周后进行,免疫方式与第二次免疫相同,同样为腹腔注射。4次免疫剂量相同。第4

次免疫后1周,尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA法监测小鼠血清效价,并用间接竞争ELISA法测定小鼠血清灵敏度,选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行最后一次加强免疫,免疫剂量为之前的2倍。

[0069] (2) 细胞融合和克隆

[0070] 取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按8:1(数量比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,待细胞融合后第12d左右,细胞集落长到占孔底1/2大小,培养液变黄,即可进行抗体检测。采用间接竞争ELISA法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法,将阳性细胞在检测后的2d内进行克隆,直到得到能够稳定分泌交链毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株TeA(CGMCC NO.15582);将此杂交瘤细胞株进行扩大培养和传代,无限量地产生特异性单克隆抗体。

[0071] (3) 细胞冻存和复苏

[0072] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^6 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0073] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0074] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0075] 所述细胞培养基为向RPMI 1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20%(质量分数),碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2%(质量分数);所述细胞培养基的pH为7.4。

[0076] 5、抗体效价的测定

[0077] 在酶标板的每个孔中分别包被100μL稀释到一定浓度的包被原,4℃包被过夜;清洗液洗板1次后,每孔加入封闭液150μL,37℃孵育2h后甩干;每孔分别加入用抗体稀释液稀释的抗体100μL,37℃孵育0.5h;清洗液洗板3次后,每孔分别加入用酶标二抗稀释液稀释2500倍的酶标二抗,37℃孵育0.5h;清洗液洗板3次后,再加入显色液(50μL底物液A液,50μL底物液B液,TMB双组分显色液,购自北京索莱宝科技有限公司),室温避光反应10-15min;加入50μL终止液终止反应;用酶标仪测定吸光度,吸收波长为450/630nm。本发明制备的TeA单克隆抗体的效价可达到1:270000。

[0078] 6、TeA单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0079] (1) 胶体金的制备

[0080] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01%(质量分数),取100mL置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入2.5mL 1%柠檬酸三钠,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。

[0081] (2) TeA单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0082] 取制备好的粒径大小为18nm的胶体金溶液2mL,用0.2mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至8.0;随后逐滴加入200μL浓度为100μg/mL的TeA单克隆抗体,室温条件下磁力搅拌反应2h;逐滴加入10%的BSA,使其在胶体金溶液中的终浓度为1%(体积分数),室温条件下磁力搅拌反应30min;加入10%的PEG 20000溶液,并使其终浓度为0.2%,室温条件下磁力搅拌30min;12000rpm离心30min,弃上清,收集胶体金沉淀;沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液重悬沉淀重悬,置4℃备用。

[0083] 复溶缓冲液为:0.02%酪蛋白(质量分数)、0.05% (质量分数)吐温-80、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0084] 7、胶体金结合垫的制备

[0085] 将胶体金结合垫浸泡在预处理缓冲液(0.5%BSA,1.5g蔗糖和0.01g叠氮钠溶于50mL 10mM pH 7.2的磷酸盐缓冲液)中,均匀浸湿1h,随后用大量磷酸盐缓冲液进行彻底清洗,37℃烘3h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的TeA单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在胶体金结合垫上,每1cm胶体金结合垫喷涂0.01mL TeA单克隆抗体-胶体金标记物后,置于37℃环境中(湿度<20%)60min后取出,置于4℃干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

[0086] 8、反应膜的制备

[0087] 将TeA半抗原-OVA偶联物包被到反应膜上构成检测线,将羊抗鼠二抗包被在反应膜上构成质控线。

[0088] 包被过程:用磷酸缓冲液将交链毒素半抗原-OVA偶联物稀释到1.0mg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T线),包被量为0.6μL/cm;用0.01mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠二抗稀释到200μg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C线),包被量为1.0μL/cm。C线与T线之间的距离约为5mm,将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2h。

[0089] 为了防止NC膜的非特异性吸附,对干燥后的固定有包被原和二抗的NC膜进行封闭:将固定有包被原和羊抗鼠二抗的NC膜浸入到NC膜封闭液(0.5g BSA,0.25g脱脂奶粉和150μL Tween-20溶于50mL Tris-HCl缓冲液)中,并放于37℃恒温箱中维持30min。随后用大量的PB缓冲液对其进行彻底清洗后,室温条件下干燥,最后4℃干燥条件下存放备用。

[0090] 9、样品吸收垫的制备

[0091] 将样品吸收垫置于含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH7.2、0.1mol/L磷酸盐缓冲液中浸泡2h,37℃烘2h备用。

[0092] 10、试纸条的组装

[0093] 将样品吸收垫、胶体金结合垫、反应膜、吸水垫依次按顺序粘贴在PVC底板上;胶体金结合垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,胶体金结合垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐;所述反应膜上有检测线和质控线,检测线(T线)和质控线(C线)均为与所述试纸条的长相垂直的条状带;检测线位于靠近胶体金结合垫的末端的一侧;质控线位于远离胶体金结合垫的末端的一侧;将试纸条用机器切成3mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,4~30℃条件下可保存12个月。

[0094] 实施例2免疫层析试纸条的特异性、灵敏度分析

[0095] 1、检测限试验

[0096] 取已磨细的空白小麦样品,添加TeA标准品,使其浓度分别为50、25、10、5、1ng/mL。分别取70μL上述含有TeA标品的小麦提取液,分别滴加到制备的胶体金免疫层析试纸条上进行检测,10min后观察显色结果,每个样本重复测定三次。

[0097] 从结果中可以看出,当样品中TeA浓度小于10ng/mL时,随着TeA标准品浓度的降低,检测线上红色强度增加;当TeA浓度大于10ng/mL时,检测线不显色。上述结果表明,该试纸条的检测限为10ng/mL。

[0098] 2、特异性试验

[0099] 用TeA免疫层析试纸条检测500ng/mL的AOH(交链孢酚)、TEN(滕毒素)等交链孢毒素。结果显示,试纸条质控线和检测线均显色,呈阴性。说明本试纸条对其他交链孢毒素无交叉反应,特异性良好。

[0100] 实施例3免疫层析试纸条的应用

[0101] 1、样品的前处理

[0102] 称取已磨细的待测样品5g,加入体积浓度为80%的甲醇水溶液25mL,混匀,在常温下振荡提取30min,静置10min,将上层清液即提取液用水稀释,使稀释液中甲醇的终浓度为26.7%。

[0103] 2、用试纸条进行检测

[0104] 用移液器取稀释后的样本液70 μ L(滴管2-3滴)垂直滴于加样孔中,同时取70 μ L 26.7%甲醇水做为阴性对照液;液体流动时开始计时,反应10min,判读结果。

[0105] 3、分析检测结果

[0106] 阴性(-):T线显色比C线显色深或显色一致,表示样本中TeA毒素低于检测限,如图5-A。

[0107] 阳性(+):T线显色比C线显色浅或T线不显色,表示样本中TeA毒素等于或高于检测限,如图5-B。

[0108] 无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效,如图5-C。在此情况下,应再次仔细阅读说明书,并用新的试纸条重新测试。

[0109] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

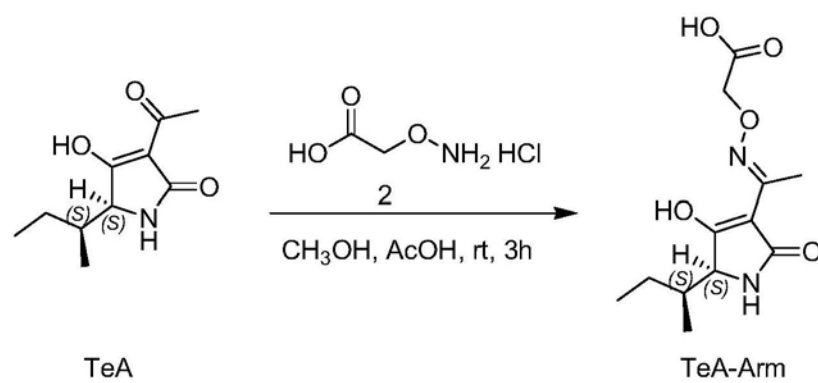


图1

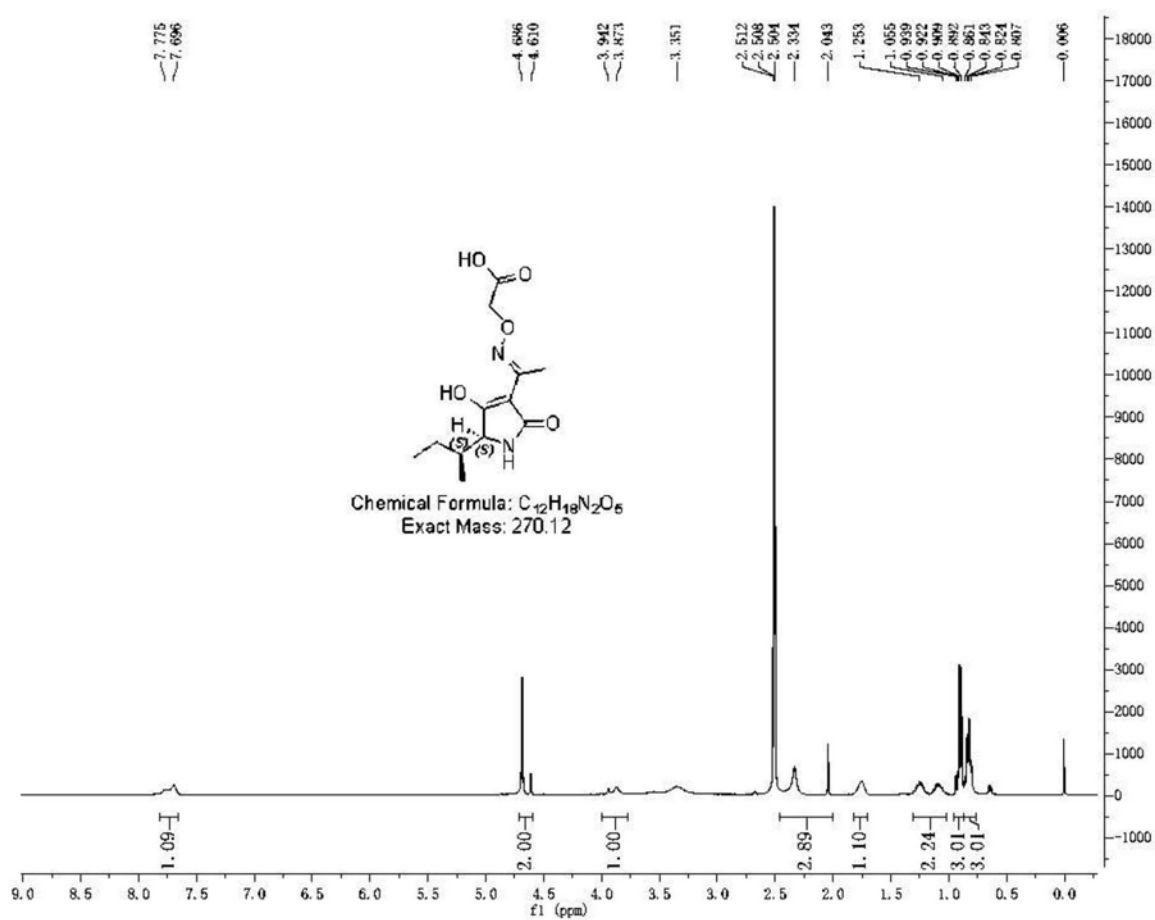


图2

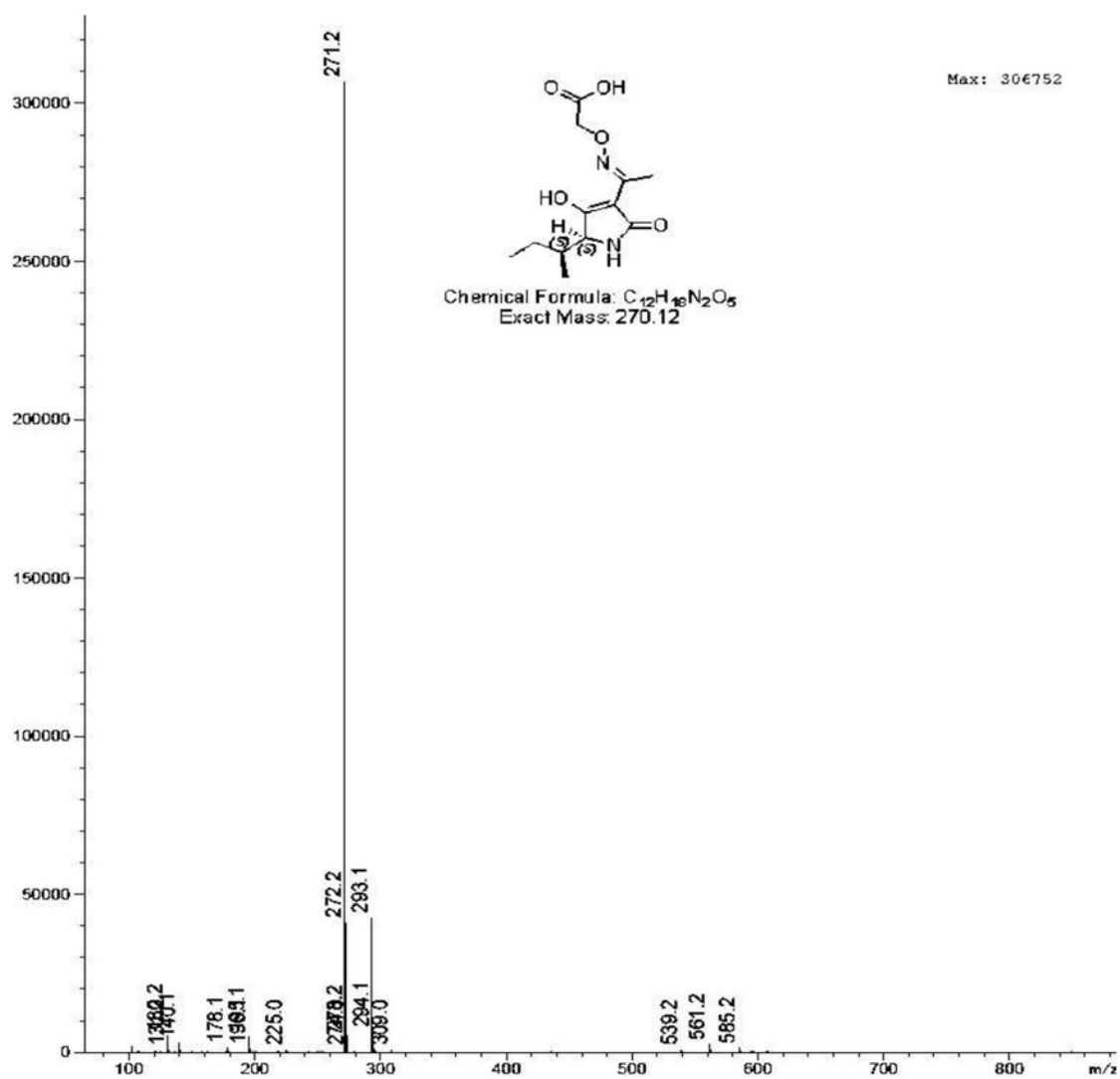


图3

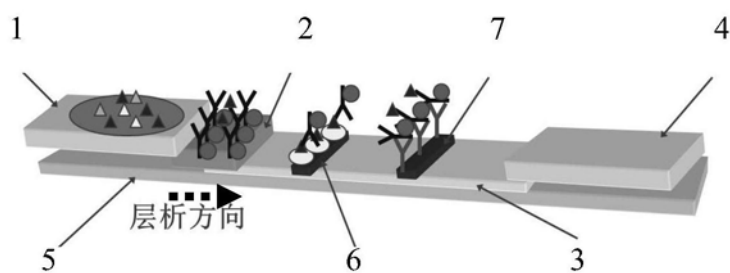


图4

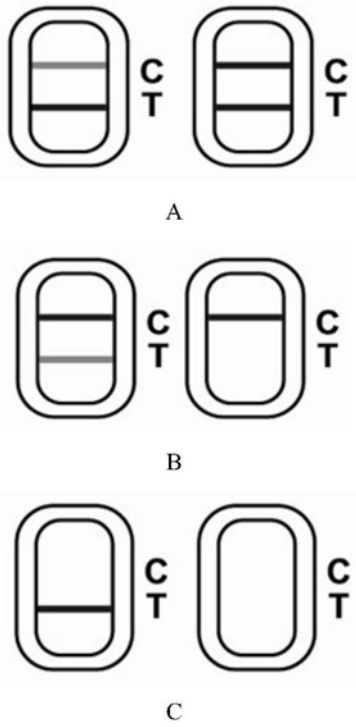


图5