



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110806481 B

(45) 授权公告日 2021.09.21

(21) 申请号 201911121513.7

(22) 申请日 2019.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110806481 A

(43) 申请公布日 2020.02.18

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO:C201881 2018.04.03

(73) 专利权人 中国农业科学院油料作物研究所
地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二
路2号

(72) 发明人 李培武 李慧 姜俊 张文 张奇

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102
代理人 乔宇

(51) Int. Cl.
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 110108872 A, 2019.08.09

CN 110300807 A, 2019.10.01

US 2011229914 A1, 2011.09.22

Richard Dietrich 等. Use of Monoclonal Antibodies for the Analysis of Mycotoxins.《Natural Toxins》.1995,第3卷(第4期),第288-293页.

R. Hack 等. A monoclonal antibody to the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol.《Letters in Applied Microbiology》.1989,第8卷(第2期),第71-75页.

Mayer B 等. Entwicklung eines immunchemischen Schnelltestverfahrens zum Multimykotoxinnachweis.《Springer-Verlag》.2000,第16卷(第2期),第227-230页.

Schubring SL 等. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of diacetoxyscirpenol in wheat and corn.《Mycotoxin research》.1987,第3卷(第2期),第97-106页.

审查员 林晓烨

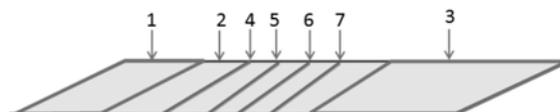
权利要求书3页 说明书11页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称
同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素的时间分辨荧光试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素的时间分辨荧光试剂盒。包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和含有标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素单克隆抗体的样品反应瓶，所述的免疫层析时间分辨荧光试纸条的一面从上至下依次设置吸水垫、检测垫和样品垫，相邻各垫于连接处交叠相接，检测垫以硝酸纤维素膜为基垫，硝酸纤维素膜上自上而下横向设有质控线和检测线，质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体，检测线个数为三条，分别包被各毒素-蛋白偶联

物。能实现对二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素三种真菌毒素的快速、同步检测。



1. 同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和含有铈标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体、铈标记的抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体、铈标记的抗杂色曲霉素单克隆抗体的样品反应瓶,所述的免疫层析时间分辨荧光试纸条包括衬板,衬板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫于连接处交相接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设有质控线和检测线,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,检测线位于质控线下方,个数为三条,检测线上分别包被有二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物和杂色曲霉素-牛血清白蛋白偶联物;所述的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体为由保藏编号为CCTCC NO:C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生。

2. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述的抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201013 的杂交瘤细胞株1C11分泌产生;抗杂色曲霉素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187 的杂交瘤细胞株ST03分泌产生。

3. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述铈标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备方法如下:按照铈标记试剂与抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的质量比为1:0.04~0.3的比例加入抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体,置于摇床中震荡2~4 h,离心后弃尽上清,封闭掉铈标记试剂表面多余结合位点,得到铈标记抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的目标产物;

所述铈标记的抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体的制备方法如下:按照铈标记试剂与抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体质量比为1:0.04~0.3的比例加入适量抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体,置于摇床中震荡2~4h,经离心后弃尽上清,封闭掉铈标记试剂表面多余结合位点,得到铈标记抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体的目标产物;

所述铈标记的抗杂色曲霉素单克隆抗体的制备方法如下:按照铈标记试剂与抗杂色曲霉素单克隆抗体质量比为1:0.04~0.3的比例加入适量抗杂色曲霉素单克隆抗体,置于摇床中震荡2~4 h,经离心后弃尽上清,封闭掉铈标记试剂表面多余结合位点,得到铈标记抗杂色曲霉素单克隆抗体的目标产物。

4. 根据权利要求3所述的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述封闭用封闭液为含有0.5~1%BSA 的硼酸缓冲液;

铈标记试剂使用前进行活化,所述的活化为:用硼酸缓冲液与铈标记试剂以体积比计为4:1-10:1的比例混匀,加入碳二亚胺EDC溶液振荡活化15~30 min,经10000~15000 rpm离心后,以硼酸缓冲液复溶,混匀,超声处理。

5. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述时间分辨荧光免疫层析试纸条规格如下:吸水垫的长为15~35 mm,宽为3~5 mm;样品垫的长为12~18 mm,宽为2~5 mm,相邻各垫交叠的长度为1~3 mm;检测垫上靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的距离为15~20 mm,相邻检测线之间的距离为1.5~4.5 mm,靠近质控线的检测线与质控线的间距为5~10 mm;

所述样品反应瓶为1~5 mL卡口瓶。

6. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述时间分辨荧光免疫层析试纸条的检测线上二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物包被量为0.02-0.8 μ

g/cm, 黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.01-0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}$, 杂色曲霉素-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.01-0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}$; 所述样品反应瓶中钼标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的含量为5-20 μg , 抗黄曲霉毒素单克隆抗体冻干品的含量为5-20 μg , 抗杂色曲霉素单克隆抗体冻干品的含量为5-20 μg 。

7. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒, 其特征在于: 还包括样品稀释液, 即体积分数为0.01%~0.30%吐温-20、0.5~1.5%蔗糖和0.1~1%牛血清蛋白水溶液。

8. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒, 其特征在于: 所述时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法如下:

(1) 吸水垫, 用吸水纸剪裁制备;

(2) 检测垫制备:

将二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物和杂色曲霉素-牛血清白蛋白偶联物分别配制成浓度为0.25~2 mg/mL的包被液, 分别于硝酸纤维素膜上划膜间隔包被, 得3条检测线, 置于37~40°C条件下干燥30~60 min;

所述试纸条中靠近质控线的检测线距硝酸纤维素膜上沿15~20 mm, 相邻两条检测线的间距为1.0~5.5 mm, 靠近质控线的检测线距质控线5~10 mm;

配制0.1~0.85 mg/mL的兔抗鼠多克隆抗体包被液, 于硝酸纤维素膜上距检测线5~10 mm的位置划膜横向包被, 每厘米质控线所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为0.4~0.8 μg , 得质控线, 置于37~40°C条件下干燥30~60 min;

(3) 样品垫制备:

将玻璃纤维膜置于封闭液中浸湿, 取出后置于37~40°C环境下干燥4~10 h, 得样品垫, 最后于室温干燥器中保存;

(4) 时间分辨荧光免疫层析试纸条组装:

在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫, 相邻各垫在连接处按1~3 mm长度交叠连接, 得时间分辨荧光免疫层析试纸条。

9. 根据权利要求8所述的时间分辨荧光试剂盒, 其特征在于: 所述时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备中, 配制二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物和杂色曲霉素-牛血清白蛋白偶联物包被液所使用的包被缓冲液配方为: BSA 0.1 g, NaN_3 0.002 g, NaCl 0.08 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.029 g, KCl 0.002 g, KH_2PO_4 0.002 g, 加去离子水定容至10 mL;

配制兔抗鼠多克隆抗体包被液所使用的包被缓冲液配方为: NaN_3 0.002 g, NaCl 0.08 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.029 g, KCl 0.002 g, KH_2PO_4 0.002 g, 加去离子水定容至10 mL;

使用的封闭液配方为:

所述封闭液配方为: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, Tween-20 1.0 g, PVPK-30 1.0 g, EDTA 0.25 g, BSA 0.5 g, NaN_3 0.02 g, 加去离子水定容至100 mL。

10. 权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒的应用, 其特征在于: 应用方法为: 将前处理好的待测样品液, 加至样品反应瓶中, 充分混匀后插入时间分辨荧光试纸条, 置于37°C反应6 min, 经时间分辨荧光测试仪检测, 获试纸条上检测线与质控线的时间分辨荧光强度比值; 根据检测线与质控线时间分辨荧光强度的比值和二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素浓度的关系曲线, 得待测样品液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、

杂色曲霉素的含量,经换算得出其在待测样品中的含量。

同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素的时间分辨荧光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明提供了真菌毒素时间分辨荧光免疫层析试剂盒,具体为一种同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇(蛇形毒素)、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素混合污染的时间分辨荧光试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] 二乙酸镰草镰刀菌烯醇(4,15-diacetoxyscirpenol,DAS)是一种由镰草镰刀菌、木贼镰刀菌产生的单端孢霉烯族毒素。DAS主要污染谷物和饲料,它对动物骨髓、大脑、心脏、淋巴、睾丸、胸腺、神经细胞等有毒害作用,还可引发胃肠炎,抗体减少,眼和体腔水肿等损伤。黄曲霉毒素是一类由黄曲霉(*Asperillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)侵染粮油等作物产生的有毒次生代谢产物,主要包括B1、B2、G1、G2、M1、M2六种。黄曲霉毒素B1的毒性为氰化钾的10倍,砒霜的68倍,被世界卫生组织列为一类致癌物。人畜大剂量接触黄曲霉毒素可引起急性中毒死亡,长期小剂量接触可引起免疫抑制,诱发肝、胃、支气管、肾、腺体等多器官癌症。杂色曲霉毒素(ST)是一种由杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)和构巢曲霉(*A.nidulans*)产生的致癌致畸真菌毒素,是真菌中黄曲霉毒素合成途径的前体。杂色曲霉毒素因污染含量高而大于黄曲霉毒素的危害性,与地区性肝、胃、食道的致癌致畸有很大的正相关性。二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1和杂色曲霉毒素在油料作物中常造成叠加污染,因此研制一种能同时检测这三类污染物的方便快捷的检测技术非常必要。

[0003] 目前,上述生物毒素的检测方法主要有液相色谱、气相色谱-质谱联用、液相色谱-质谱联用等仪器分析法。这些仪器分析法稳定性好、灵敏度高、准确性好,但是前处理步骤复杂,样品检测成本高。免疫层析法灵敏度高、操作简单、成本低廉,在抗原抗体特异性反应的基础上,利用硝酸纤维素固定抗原,使层析中游离靶标物与检测线上抗原竞争结合已标记抗体,通过检测线上标记物的量计算样品中靶标物含量。时间分辨荧光免疫分析(TRFICA)利用镧作为高亲和力探针,具有灵敏度高、性质稳定、避免荧光背景的干扰,检测时间短等优点,非常适合开发农药残留快速检测方法。

[0004] 因此开发一种同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇(蛇形毒素)、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素混合污染的时间分辨荧光试剂盒,具有很大的必要性和十分重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明涉及一种能同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素混合污染的时间分辨荧光试剂盒及制备方法。可同步检测样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1和杂色曲霉毒素的含量。具有操作简单、检测快速、灵敏度高的特点。

[0006] 本发明为解决上述技术问题,采用了如下技术方案:

[0007] 同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素混合污染的时间分

辨荧光试剂盒,包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和含有铕标记的抗二乙酸镧草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素单克隆抗体的样品反应瓶,所述的免疫层析时间分辨荧光试纸条包括衬板,衬板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫于连接处交叠相接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设有质控线和检测线,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,检测线位于质控线下方,个数为三条,检测线上分别包被有二乙酸镧草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物和杂色曲霉素-牛血清白蛋白偶联物;所述的抗二乙酸镧草镰刀菌烯醇单克隆抗体为由保藏编号为CCTCC NO:C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生。

[0008] 按上述方案,所述的抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生;抗杂色曲霉素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生。

[0009] 按上述方案,所述铕标记的抗二乙酸镧草镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备方法如下:按照铕标记试剂与二乙酸镧草镰刀菌烯醇单克隆抗体的质量比为1:(0.04~0.3)的比例加入抗二乙酸镧草镰刀菌烯醇单克隆抗体,置于摇床中震荡2~4h,离心后弃尽上清,封闭掉铕标记试剂表面多余结合位点,得到铕标记抗二乙酸镧草镰刀菌烯醇单克隆抗体的目标产物;

[0010] 所述铕标记的抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体的制备方法如下:按照铕标记试剂与抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体质量比为1:(0.04~0.3)的比例加入适量抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体,置于摇床中震荡2~4h,经离心后弃尽上清,封闭掉铕标记试剂表面多余结合位点,得到铕标记抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体的目标产物;

[0011] 所述铕标记的抗杂色曲霉素单克隆抗体的制备方法如下:按照铕标记试剂与抗杂色曲霉素单克隆抗体质量比为1:(0.04~0.3)的比例加入适量抗杂色曲霉素单克隆抗体,置于摇床中震荡2~4h,经离心后弃尽上清,封闭掉铕标记试剂表面多余结合位点,得到铕标记抗杂色曲霉素单克隆抗体的目标产物。

[0012] 按上述方案,所述封闭用封闭液为含有0.5~1%BSA的硼酸缓冲液。

[0013] 按上述方案,铕标记试剂使用前进行活化,所述的活化为:用硼酸缓冲液与铕标记试剂以4:1-10:1(V/V)的比例混匀,加入EDC溶液(15mg/mL,37.5ng-750ng)振荡活化15~30min,经10000~15000rpm离心后,以硼酸缓冲液复溶,混匀,超声处理。

[0014] 按上述方案,所述时间分辨荧光免疫层析试纸条规格如下:吸水垫的长为15~35mm,宽为3~5mm;样品垫的长为12~18mm,宽为2~5mm,相邻各垫交叠的长度为1~3mm;检测垫上靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的距离为15~20mm,相邻检测线之间的距离为1.5~4.5mm,靠近质控线的检测线与质控线的间距为5~10mm;

[0015] 所述样品反应瓶为1~5mL卡口瓶。

[0016] 按上述方案,所述时间分辨荧光免疫层析试纸条的检测线上二乙酸镧草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物包被量为0.02-0.8 μ g/cm,黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.01-0.8 μ g/cm,杂色曲霉素-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.01-0.8 μ g/cm。

[0017] 按上述方案,所述样品反应瓶中铕标记的抗二乙酸镧草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的含量为5-20 μ g,抗黄曲霉毒素单克隆抗体冻干品的含量为5-20 μ g,抗杂色曲霉素单克隆抗体冻干品的含量为5-20 μ g。

[0018] 按上述方案,所述的同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素混合污染的时间分辨荧光免疫层析试纸条还包括样品稀释液,即体积分数为0.01%~0.30%吐温-20、0.5~1.5%蔗糖和0.1~1%牛血清蛋白水溶液。

[0019] 按上述方案,所述时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法如下:

[0020] (1)吸水垫,用吸水纸剪裁制备;

[0021] (2)检测垫制备:

[0022] 将二乙酸镻草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物和杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物分别配制成浓度为0.25~2mg/mL的包被液,分别于硝酸纤维素膜上划膜间隔包被,得3条检测线,置于37~40℃条件下干燥30~60min;

[0023] 所述试纸条中靠近质控线的检测线距硝酸纤维素膜上沿15~20mm,相邻两条检测线的间距为1.0~5.5mm,靠近质控线的检测线距硝酸纤维素膜上沿15~20mm,靠近质控线的检测线距质控线5~10mm;

[0024] 配制0.1~0.85mg/mL的兔抗鼠多克隆抗体包被液,于硝酸纤维素膜上距检测线5~10mm的位置划膜横向包被,每厘米质控线所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为0.1~0.8 μ g,得质控线,置于37~40℃条件下干燥30~60min;

[0025] (3)样品垫制备:

[0026] 将玻璃纤维膜置于封闭液中浸湿,取出后置于37~40℃环境下干燥4~10h,得样品垫,最后于室温干燥器中保存;

[0027] (4)时间分辨荧光免疫层析试纸条组装:

[0028] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处按1~3mm长度交叠连接,得时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0029] 按上述方案,所述时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备中,配制二乙酸镻草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物和杂色曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物包被液所使用的包被缓冲液配方为:BSA 0.1g,NaN₃ 0.002g,NaCl 0.08g,Na₂HPO₄·12H₂O 0.029g,KCl 0.002g,KH₂PO₄ 0.002g,加去离子水定容至10mL。

[0030] 配制兔抗鼠多克隆抗体包被液所使用的包被缓冲液配方为:NaN₃ 0.002g,NaCl 0.08g,Na₂HPO₄·12H₂O 0.029g,KCl 0.002g,KH₂PO₄ 0.002g,加去离子水定容至10mL。

[0031] 所述时间分辨荧光免疫层析试纸条制备中使用的封闭液配方为:OVA 0.5~2g,C₁₂H₂₂O₁₁ 2g,NaN₃ 0.02g,NaCl 0.8g,Na₂HPO₄·12H₂O 0.29g,KCl 0.02g,KH₂PO₄ 0.02g,加去离子水定容至100mL。

[0032] 上述二乙酸镻草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素时间分辨荧光免疫层析速测试剂盒的应用:将前处理好的待测样品液,加至样品反应瓶中,充分混匀后插入时间分辨荧光试纸条,置于37℃反应6min,经时间分辨荧光测试仪检测,获试纸条上检测线(T)与质控线(C)的时间分辨荧光强度比值;根据检测线与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C)和二乙酸镻草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素浓度的关系曲线,得待测样品液中二乙酸镻草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素的含量,经换算得出其在待测样品中的含量。

[0033] 按上述方案,所述时间分辨荧光免疫层析试纸条检测线与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C)和二乙酸镻草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素浓度的关系曲线制作

方法如下：

[0034] (1) 配制得到一系列浓度的二乙酸镰草镰刀菌烯醇标准品溶液，配制得到一系列浓度的黄曲霉毒素B1标准品溶液，配制得到一系列浓度的杂色曲霉毒素标准品溶液。

[0035] (2) 将适量二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素标准品溶液分别加到样品反应瓶中，充分混匀后插入时间分辨荧光免疫层析试纸条，于37℃条件下反应10min，经时间分辨荧光免疫分析仪检测得各试纸条上检测线(T)和质控线(C)的时间分辨荧光强度值，由此获得检测线与质控线的时间分辨荧光强度比值(T/C)。

[0036] (3) 经拟合得时间分辨荧光试免疫层析纸条检测线与质控线的时间分辨荧光强度比值(T/C)与二乙酸镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线；经拟合得时间分辨荧光免疫层析纸条检测线与质控线的时间分辨荧光强度比值(T/C)与黄曲霉毒素B1浓度的关系曲线；经拟合得时间分辨荧光免疫层析试纸条检测线与质控线的时间分辨荧光强度比值(T/C)与杂色曲霉毒素浓度的关系曲线。

[0037] 本发明优势：

[0038] (1) 前处理简单。将甲醇水提取液加至样品中，超声提取5~10min，再静置5~10min，上清液稀释后即可进行检测，样品前处理操作简单、快速。

[0039] (2) 灵敏度高。本发明的时间分辨荧光免疫层析试剂盒对检测溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇最低检测限为0.50ng/mL，黄曲霉毒素B1的最低检测限为0.01ng/mL，对杂色曲霉毒素的最低检测限为0.05ng/mL，该检测限满足欧盟对食品中的限量要求。

[0040] (3) 快速同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素。本发明的时间分辨荧光免疫层析试剂盒能实现在同一试纸条上对二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素三种真菌毒素的快速、同步检测，所用抗体均为特异性好、灵敏度高的单克隆抗体，且三者之间无干扰。

附图说明

[0041] 图1为本发明的二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素时间分辨荧光免疫层析试纸条结构示意图：1吸水垫、2检测垫、3样品垫、4质控线、5二乙酸镰草镰刀菌烯醇检测线、6黄曲霉毒素B1检测线、7杂色曲霉毒素检测线。

[0042] 图2为本发明提供的二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体亲和力测定数据；

[0043] 图3(a)为本发明提供的二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体与其他真菌毒素交叉反应结果；(b)本发明提供的二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体建立的二乙酸镰草镰刀菌烯醇酶联免疫方法标准曲线。

具体实施方式

[0044] 实施例1抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的获得

[0045] 抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生，制备方法为：

[0046] 将杂交瘤细胞株DAS5G11E7注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠，收集该小鼠的腹水，采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体，具体操作为：用双层滤纸过滤小鼠腹水，4℃，12000r/min离心15min以上，吸取上清，将所得腹水上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混

合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为30-35 μ L,室温混合30-60min,4 $^{\circ}$ C静置2h以上。12000r/min,4 $^{\circ}$ C离心30min以上,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和pH为7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4,冰浴中缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4 $^{\circ}$ C静置2h以上,然后12000r/min,4 $^{\circ}$ C离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10体积的摩尔浓度为0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用0.01mol/LPBS透析两天,再改用PB透析两天,将透析袋中蛋白溶液取出,离心,收集上清,弃沉淀,放入-70 $^{\circ}$ C预冻后放入冻干机中冻干。收集冻干粉,即为纯化好的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体;

[0047] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容到100mL所得;所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得;所述的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液为8g氯化钠,2.9g十二水磷酸氢二钠,0.2g氯化钾,0.2g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得。

[0048] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的亚型为IgG2b。

[0049] 用常规非竞争酶联免疫吸附法(ELISA)测得小鼠腹水纯化得到的抗体效价可达到 3.2×10^5 ,即抗体稀释 3.2×10^5 倍时溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争ELISA测定其对二乙酸镰草镰刀菌烯醇灵敏度为3.08ng/mL。与其他真菌毒素,T2毒素、HT2毒素、呕吐毒素、3-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇、赭曲霉毒素、伏马毒素的交叉反应均小于0.01% (表1;图3)。抗体的特异性高低可用交叉反应率来评价。采用间接竞争ELISA方法测定DAS5G11E7单克隆抗体,将DAS、T2毒素、HT2毒素、DON、3-ACDON、OTA、FB₁配制系列浓度的标准溶液,分别与等体积抗体共同加入酶标板中,孵育1h,其他步骤同间接竞争ELISA方法。以上述毒素标准品浓度为横坐标,以酶标仪测定的450nm下OD值B/B₀为纵坐标,绘制竞争抑制曲线,通过计算DAS与其他毒素的IC₅₀值比值来判定交叉反应率。计算公式如下:

[0050] $CR\% = (IC_{50}DAS / IC_{50}其他毒素) \times 100$ 。

[0051] 表1.DAS5G11E7与其他毒素的交叉反应。

[0052]

毒素名称	结构	IC ₅₀	交叉反应率
------	----	------------------	-------

	DAS		3.08	100%
	T-2 毒素		>10 0,000	<0.01%
	HT-2 毒素		>10 0,000	<0.01%
[0053]	DON		>10 0,000	<0.01%
	3-acetyl-DON		>10 0,000	<0.01%
	FB ₁		>10 0,000	<0.01%
	OTA		>10 0,000	<0.01%

[0054] 利用间接非竞争ELISA测定DAS5G11E7的亲和力。用DAS-OVA按1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$,2h;封闭液封闭1h后,将用PBS稀释好的抗体(稀释因子1:2)加入酶标板,其余步骤同间接非竞争ELISA方法。以测定的OD₄₅₀值为纵坐标,抗体浓度(mol/L)的对数值为横坐标,做出4个浓度的4条S形曲线。找出每条S曲线最顶部的最大OD值即OD_{max},找出每条曲线50%OD_{max}值对应的抗体浓度。将4个浓度任意两两一组,根据公式 $K_a = (n-1)/2(n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算抗体的亲和力常数,其中 $[Ab']_t$ 、 $[Ab]_t$ 为每组中两个50%最大OD值对应的抗体浓度,n为每组中包被抗原浓度的倍数(包括1:2,1:4,1:8三个比值),共得到6个K_a值。将得到的六个K_a值取平均,得抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇小鼠腹水抗体酶联免疫吸附分析(ELISA)法亲和力可达 $5.4 \times 10^8 \text{L}/\text{mol}$ (图2)。

[0055] 杂交瘤细胞株DAS5G11E7的筛选

[0056] 1. 动物免疫

[0057] 采用实验室制备的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原DAS-BSA对6-7周龄BALB/c小鼠进行免疫。第一次免疫将二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原与等体积的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,采用福氏不完全佐剂与等体积的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原乳化,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,均为每鼠70 μ g。前3次每次免疫后8~10天,尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA对小鼠的血清效价进行检测。第3次免疫后8天,断尾采血,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,免疫剂量为前面的2倍。

[0058] 2. 细胞融合

[0059] 加强免疫3天后,采用重量百分数为50%的聚乙二醇分子量为1450的PEG作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤:无菌条件下脱颈处死小鼠,取出脾脏,用均质器碾碎脾脏,采用过滤网分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞SP2/0以5:1的个数比混合,离心,用RPMI-1640基础培养液重悬混合细胞,离心,弃上清。加入50%PEG 1-2mL,共用时1分钟,贴壁加入RPMI-1640基础培养液10-20mL,离心,弃上清,管底的融合细胞用20mL含1%HAT的细胞完全培养基重悬,将悬起的细胞加入到80mL半固体培养基中,混匀后加到6孔细胞培养板上,1.5mL/孔,置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱培养。所述的含1%HAT的细胞完全培养基含有20% (体积百分数)胎牛血清,75% (体积百分数)RPMI-1640基础培养液,1% (重量百分数)L-谷氨酰胺,1% (体积百分数)HEPES,1% (体积百分数)双抗(10000单位每毫升青霉素和10000微克每毫升链霉素),2% (体积百分数)生长因子(HFCS)和1% (重量百分数)次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT和甲基纤维素购于sigma-Aldrich公司。

[0060] 细胞株的筛选及克隆

[0061] 待细胞融合后2-3周,细胞集落长至肉眼可见时,用微量移液器将克隆从培养基中挑出,转移至96孔细胞培养板采用HAT液体培养,待细胞长至2/3孔底时,吸取培养上清进行检测。采用两步筛选法,第一步采用间接ELISA方法,筛选出抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇而不抗载体蛋白BSA的阳性孔;第二步采用间接竞争ELISA法对第一步筛选出的阳性孔进行检测,用二乙酸镰草镰刀菌烯醇作为竞争原,选择吸光值和灵敏度均较高的孔(吸光值较高指竞争原为0的孔即阳性对照孔的最终测定值较高,灵敏度较高指抑制率为50%时的竞争原浓度亦IC₅₀值较小),采用有限稀释法进行亚克隆,亚克隆后采用同样的两步法进行检测,如此重复亚克隆4-5次后,获得杂交瘤细胞株DAS5G11E7。该杂交瘤细胞株已于2018年4月3日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址是,中国,武汉,武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:C201881。

[0062] 抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体杂交瘤细胞株DAS5G11E7抗体可变区序列测定

[0063] (1) 提取总RNA:采用天根公司的总RNA提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株DAS5G11E7的总RNA;

[0064] (2) 合成cDNA:以步骤1获得的总RNA为模板,oligo(dT)15为引物,按照SuperScriptTM-2II反转录酶说明书进行反转录,合成cDNA第一链;引物oligo(dT)15由Invitrogen购得;

[0065] (3) PCR法克隆可变区基因:根据GENBANK中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以cDNA为模版扩增抗体重链、轻链可变区基因。PCR程序为:94 $^{\circ}$ C 30s、58 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 1min,扩增30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR产物经过1% (重量百分数)的琼脂糖凝胶电泳分离后,用试剂盒纯化回收DNA片段,连接在载体pMD18-T中,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细

胞,挑取阳性克隆,送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序。其中引物的序列分别为:重链可变区引物为5'-CAG GTS MAR CTG MAG GAG TCW G-3' (22mer)和5'-CAG GGG CCA GTG GAT AGA CAG ATG GGG G-3' (28mer),其中S、M、R和W为兼并碱基,M=A/C,R=A/G,S=G/C,W=A/T,轻链可变区引物为5'-GAC ATC AAG ATG ACC CAG TCT CCA-3' (24mer)和5'-CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC-3' (24mer)。

[0066] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长351bp,序列如SEQ ID NO:1所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由117个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:3所示。轻链可变区编码基因序列长324bp,序列如SEQ ID NO:2所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由108个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:4所示。

[0067] 实施例2抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体的制备

[0068] 抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生,具体根据申请号201010245095.5的专利中报道的方法预先制得。其具体的制备方法如下:预先用弗氏不完全佐剂处理BALB/c小鼠,将杂交瘤细胞株1C11注射到小鼠的腹部,约一周后收集腹水,用辛酸-硫酸铵法纯化得到抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体。具体纯化步骤:将小鼠腹水滤过双层滤纸,12000r/min,4℃,15min离心收集上清,吸出上清至四倍体积的醋酸盐缓冲液中,边搅拌边缓慢加入正辛酸,至正辛酸终体积为30~35μL/mL,置于室温下搅拌混合30~60min,再于4℃中静置2h以上。12000r/min,4℃,30min离心弃沉淀,上清液经双层滤纸过滤,加入1/10滤液体积的0.1mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲液,加入适量2mol/L氢氧化钠调节pH至7.4,将溶液冰浴,边搅拌边缓慢加入硫酸铵,至终浓度为0.277g/mL,于4℃中静置2h以上,12000r/min,4℃,30min离心收集沉淀,用1/10原腹水体积的0.01mol/L、pH 7.4磷酸盐缓冲液重悬沉淀,将悬浊液移至透析袋中,先用0.01mol/L PBS透析两天,再用PB透析两天,取出透析袋中蛋白溶液,离心收集上清,-70℃预冻后冻干机中冻干,收集冻干粉,即为抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体。

[0069] 所述醋酸盐缓冲液配方:0.29g CH₃COONa,0.141mL CH₃COOH,加水定容到100mL;所述0.01mol/L磷酸盐缓冲液配方:0.8g NaCl,0.29g Na₂HPO₄·12H₂O,0.02g KCl,0.02g KH₂PO₄,加水定容到100mL;所述0.1mol/L磷酸盐缓冲液配方:8g NaCl,2.9g Na₂HPO₄·12H₂O,0.2g KCl,0.2g KH₂PO₄,加水定容到100mL。

[0070] 实施例3抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的制备

[0071] 抗杂色曲霉毒素单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C2013187的杂交瘤细胞株ST03分泌产生,具体根据申请号201410115952.8的专利中报道的方法预先制得。其具体的制备方法如下:预先用弗氏不完全佐剂处理BALB/c小鼠,将杂交瘤细胞株ST03注射到小鼠的腹部,约一周后收集腹水,用辛酸-硫酸铵法纯化得到抗杂色曲霉毒素单克隆抗体。具体纯化步骤:将小鼠腹水滤过双层滤纸,12000r/min,4℃,15min离心收集上清,吸出上清至四倍体积的醋酸盐缓冲液中,边搅拌边缓慢加入正辛酸,至正辛酸终体积为30~35μL/mL,置于室温下搅拌混合30~60min,再于4℃中静置2h以上。12000r/min,4℃,30min离心弃沉淀,上清液经双层滤纸过滤,加入1/10滤液体积的0.1mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲液,加入适量2mol/L氢氧化钠调节pH至7.4,将溶液冰浴,边搅拌边缓慢加入硫酸铵,至终浓度为0.277g/mL,于4℃中静置2h以上,12000r/min,4℃,30min离心收集沉淀,用1/10原腹水体积的0.01mol/L、

pH 7.4磷酸盐缓冲液重悬沉淀,将悬浊液移至透析袋中,先用0.01mol/L PBS透析两天,再用PB透析两天,取出透析袋中蛋白溶液,离心收集上清,-70℃预冻后冻干机中冻干,收集冻干粉,即为抗杂色曲霉素单克隆抗体。

[0072] 所述醋酸盐缓冲液配方:0.29g CH_3COONa ,0.141mL CH_3COOH ,加水定容到100mL;所述0.01mol/L磷酸盐缓冲液配方:0.8g NaCl ,0.29g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.02g KCl ,0.02g KH_2PO_4 ,加水定容到100mL;所述0.1mol/L磷酸盐缓冲液配方:8g NaCl ,2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.2g KCl ,0.2g KH_2PO_4 ,加水定容到100mL。

[0073] 实施例4同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇(蛇形毒素)、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素混合污染的时间分辨荧光试剂盒及制备方法

[0074] 定量检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇(蛇形毒素)、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素混合污染的时间分辨荧光试剂盒由荧光试纸条、含有钡标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体、黄曲霉毒素B1单克隆抗体、杂色曲霉素单克隆抗体反应瓶、样品稀释液等组成。所述试纸条规格如下:吸水垫的长为38mm,宽为4mm;样品垫的长为15mm,宽为4mm,相邻各垫交叠的长度为1mm,检测垫长25mm,宽4mm;所述检测垫的基垫是硝酸纤维素膜,自上而下设有横向质控线和检测线;所述质控线包被有0.25 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 质控线的兔抗鼠多克隆抗体;所述检测线上分别包被有0.6 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 检测线的包被抗原,检测线距硝酸纤维素膜上沿9mm,质控线距第一条检测线4mm,距第二条检测线8mm,距第三条检测线11mm。

[0075] 所述时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法如下:

[0076] (1)吸水垫的制备:将吸水纸剪裁成长18mm,宽4mm的吸水垫。

[0077] (2)检测垫制备:

[0078] 检测线的包被:

[0079] 用包被缓冲液将二乙酸镰草镰刀菌烯醇-BSA配制成0.5mg/mL的包被液,按照0.6 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 检测线的包被量,于距硝酸纤维素膜上沿9mm处划膜横向包被,置于37℃中干燥60min;

[0080] 用包被缓冲液将黄曲霉毒素B1-BSA配制成0.25mg/mL的包被液,按照0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 检测线的包被量,于距硝酸纤维素膜上沿17mm处划膜横向包被,置于37℃中干燥60min;

[0081] 用包被缓冲液将杂色曲霉素-BSA配制成0.25mg/mL的包被液,按照0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 检测线的包被量,于距硝酸纤维素膜上沿22mm处划膜横向包被,置于37℃中干燥60min;

[0082] 所述包被缓冲液配方为:BSA0.1g, NaN_3 0.002g, NaCl 0.08g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.029g, KCl 0.002g, KH_2PO_4 0.002g,加去离子水定容至10mL。

[0083] 质控线的包被:

[0084] 包被缓冲液配制0.25mg/mL的兔抗鼠多克隆抗体包被液,于长25mm、宽4mm的硝酸纤维素膜上距检测线4mm的位置划膜横向包被,每厘米质控线所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为0.4 μg ,得质控线,置于37℃条件下干燥60min。

[0085] 所述包被缓冲液配方为: NaN_3 0.002g, NaCl 0.08g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.029g, KCl 0.002g, KH_2PO_4 0.002g,加去离子水定容至10mL。

[0086] (3)样品垫制备:

[0087] 将玻璃纤维膜剪裁成长15mm、宽4mm,置于封闭液中浸湿,取出后置于37℃环境下干燥6h,得样品垫,最后于室温干燥器中保存。

[0088] 所述封闭液配方为: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3g,Tween-20 1.0g,

PVPK-30 1.0g, EDTA0.25g, BSA0.5g, NaN_3 0.02g, 加去离子水定容至100mL。

[0089] (4) 时间分辨荧光免疫层析试纸条组装:

[0090] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫, 相邻各垫在连接处按1mm长度交叠连接, 得时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0091] 所述铕标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备方法如下: 用800 μL 0.2mol/L pH 8.18的硼酸缓冲液溶解200 μL 粒径100nm、固形物含量1%的铕标记试剂, 充分振荡混匀, 超声处理3s后, 再加入40 μL 15mg/mL EDC溶液振荡活化15min, 经13000rpm, 10 $^{\circ}\text{C}$, 10min离心弃上清后, 加入1mL硼酸缓冲液, 振荡混匀后超声处理3S, 然后加入20 μg 抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体, 置于摇床中250r/min、25 $^{\circ}\text{C}$ 震荡过夜, 经离心后弃尽上清, 加入1mL含有0.5%BSA的硼酸缓冲液复溶, 混匀后超声10min, 置于摇床中250r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 震荡2h, 得铕标记抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的目标产物。

[0092] 所述铕标记的抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体的制备方法如下: 用800 μL 0.2mol/L pH 8.18的硼酸缓冲液溶解200 μL 粒径100nm、固形物含量1%的铕标记试剂, 充分振荡混匀, 超声处理3s后, 再加入40 μL 15mg/mL EDC溶液振荡活化15min, 经13000rpm, 10 $^{\circ}\text{C}$, 10min离心弃上清后, 加入1mL硼酸缓冲液, 振荡混匀后超声处理3S, 然后加入15 μg 抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体, 置于摇床中250r/min、25 $^{\circ}\text{C}$ 震荡过夜, 经离心后弃尽上清, 加入1mL含有0.5%BSA的硼酸缓冲液复溶, 混匀后超声10min, 置于摇床中250r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 震荡2h, 得铕标记抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体的目标产物。

[0093] 所述铕标记的抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的制备方法如下: 用800 μL 0.2mol/L pH 8.18的硼酸缓冲液溶解200 μL 粒径100nm、固形物含量1%的铕标记试剂, 充分振荡混匀, 超声处理3s后, 再加入40 μL 15mg/mL EDC溶液振荡活化15min, 经13000rpm, 10 $^{\circ}\text{C}$, 10min离心弃上清后, 加入1mL硼酸缓冲液, 振荡混匀后超声处理3S, 然后加入15 μg 抗杂色曲霉毒素单克隆抗体, 置于摇床中250r/min、25 $^{\circ}\text{C}$ 震荡过夜, 经离心后弃尽上清, 加入1mL含有0.5%BSA的硼酸缓冲液复溶, 混匀后超声10min, 置于摇床中250r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 震荡2h, 得铕标记抗杂色曲霉毒素单克隆抗体的目标产物。本发明所用铕标记试剂可购于上海优你生物科技有限公司, 但不限于此。

[0094] 同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇(蛇形毒素)、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素混合污染的时间分辨荧光免疫层析试剂盒在实际样品中的应用。

[0095] 1. 荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C)与二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素浓度的关系曲线的建立:

[0096] (1) 对经高效液相色谱法(HPLC)鉴定未受二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素污染的小麦粉样品进行前处理。取待测样品25g, 添加70%甲醇水溶液100mL, 均质提取5分钟, 静置, 过双层滤纸, 搜集滤液。

[0097] (2) 对上述谷物样品稀释液进行标准品物质加标, 制备混合标准品溶液。将二乙酸镰草镰刀菌烯醇/黄曲霉毒素B1/杂色曲霉毒素以1:1:1的比例添加配得混合标准品溶液。浓度分别为15ng/mL、5ng/mL、1.5ng/mL、0.5ng/mL、0.15ng/mL、0.05ng/mL、0.005ng/mL;

[0098] (3) 取二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉毒素混合标准品溶液200 μL 加入样品瓶, 加入到含有铕标记的单克隆抗体的样品反应瓶中, 混匀, 将荧光试纸条样品垫一端插入反应瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应10分钟, 上机检测。检测仪器为时间分辨荧光免疫分析仪, 激

发波长365nm,发射波长615nm。检测得到各荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C)；

[0099] (4)分别以二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素标准品浓度为横坐标,各浓度标准品溶液相应的检测线与质控线时间分辨荧光强度的比值即T/C值为纵坐标,拟合得到关系曲线。该方法的有效检测范围为二乙酸镰草镰刀菌烯醇0.5ng/mL;黄曲霉毒素B1 0.01ng/mL;杂色曲霉素0.05ng/mL。

[0100] 2.样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素含量的加标回收实验:

[0101] 取待测样品20g,添加70%甲醇水溶液100mL,均质提取5分钟,静置,过双层滤纸,搜集滤液,以1:1的比例进行稀释。向其中分别准确添加二乙酸镰草镰刀菌烯醇(黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素)标准品0.5ng/mL、1.0ng/mL和2.0ng/mL,取上述待测样品检测液200 μ L加入到含有钡标记的单克隆抗体的样品反应瓶中,混匀,将荧光试纸条样品垫一端插入反应瓶中,37 $^{\circ}$ C反应10min,上机检测。检测仪器为时间分辨荧光免疫分析仪,激发波长365nm,发射波长615nm。检测得到各荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C);然后将其代入上述得到的荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C)与标准品物质浓度的关系曲线,得到样品溶液中的二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素物质浓度,然后根据稀释倍数即可求得样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素B1、杂色曲霉素物质含量。测得样品中的二乙酸镰草镰刀菌烯醇加标回收率依次为:102.5%,91.3%,89.0%;黄曲霉毒素B1加标回收率依次为:94.5%,86.1%,80.2%;杂色曲霉素加标回收率依次为:94.4%,80.6%,82.3%。

[0038]	50	55	60
[0039]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Thr Asn Thr Leu Tyr		
[0040]	65	70	75 80
[0041]	Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Gln Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
[0042]	85	90	95
[0043]	Ile Arg Leu Pro Phe Gly Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ala		
[0044]	100	105	110
[0045]	Val Thr Val Ser Ser		
[0046]	115		
[0047]	<210> 1		
[0048]	<211> 108		
[0049]	<212> PRT		
[0050]	<213> 小鼠		
[0051]	<400> 4		
[0052]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ala Thr Thr Thr Ser Pro Gly Glu		
[0053]	1	5	10 15
[0054]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Gly		
[0055]	20	25	30
[0056]	Asn Tyr Val Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Ser Gly		
[0057]	35	40	45
[0058]	Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe		
[0059]	50	55	60
[0060]	Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Thr		
[0061]	65	70	75 80
[0062]	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Thr Asp		
[0063]	85	90	95
[0064]	His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val		
[0065]	100	105	

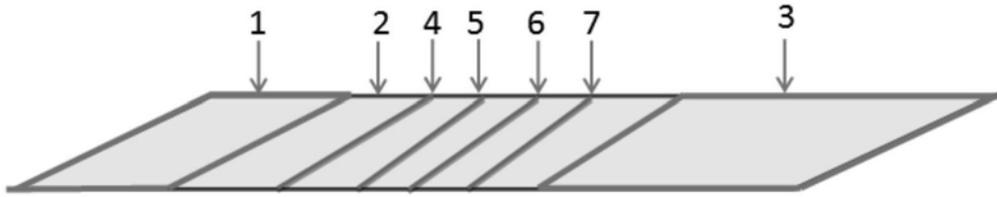


图1

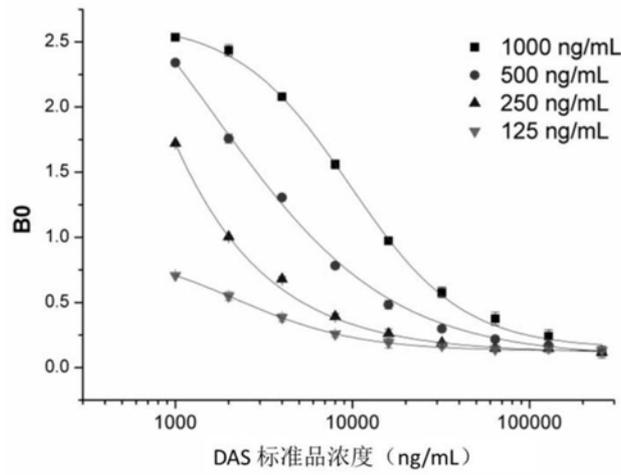


图2

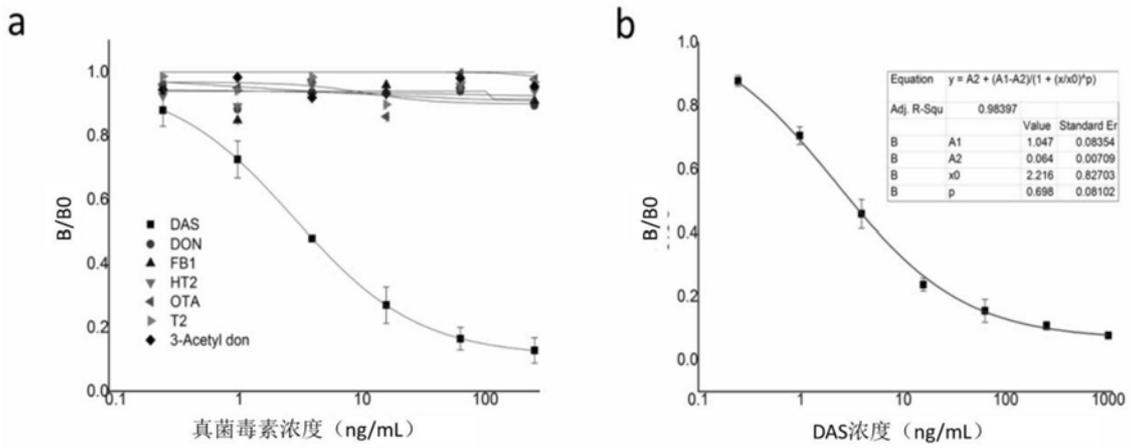


图3