



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111007246 B

(45) 授权公告日 2021.09.21

(21) 申请号 201911122507.3

(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 111007246 A

(43) 申请公布日 2020.04.14

(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 张奇 唐晓倩 白艺珍 张文
李培武

(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 107942062 A, 2018.04.20

CN 106153929 A, 2016.11.23

CN 103215230 A, 2013.07.24

CN 106932586 A, 2017.07.07

CN 103278631 A, 2013.09.04

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

E.N.Clare Mills, et al..An Enzyme-
linked Immunosorbent Assay for
Diacetoxyscirpenol Applied to the
Analysis of Wheat..《J.SCI.FOOD.AGRIC.》
.1988,225-233.

李业鹏,等.二乙酰蔗糖镰刀菌烯醇单克隆抗
体的制备..《卫生研究》.1992,第21卷(第5期),
254-257.

审查员 张绚

权利要求书3页 说明书11页
序列表2页 附图1页

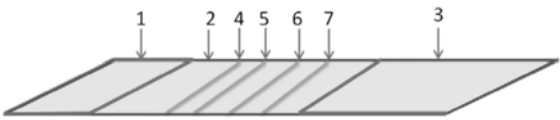
(54) 发明名称

同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐
镰刀菌烯醇、T-2毒素的时间分辨荧光试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的时间分辨荧光试剂盒。它包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和含有标记的各毒素的单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中: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,相邻各垫在连接处交叠连接,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设置横向质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线下方,个数为3条,检测线上分别上包被各毒素蛋白偶联物。其能在一条试纸条上实现对二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰

刀菌烯醇、T-2毒素三种真菌毒素的同步、快速检测。



1. 同步检测二乙酸铈草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:它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铈草镰刀菌烯醇单克隆抗体、含有铈标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体、含有铈标记的T-2毒素单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中: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,相邻各垫在连接处交叠连接,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设置横向质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线下方,个数为3条,检测线上分别上包被二乙酸铈草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物和T-2毒素-卵清白蛋白偶联物;所述的抗二乙酸铈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分泌产生的。

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:所述铈标记的抗二乙酸铈草镰刀菌烯醇单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:将铈标记试剂与二乙酸铈草镰刀菌烯醇单克隆抗体按质量比为1: 0.04-0.3,混匀后,摇床震荡2-4小时,离心移除上清,封闭铈标记试剂表面多余的结合位点,得到目标产物铈标记的抗二乙酸铈草镰刀菌烯醇单克隆抗体;

所述铈标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:铈标记试剂与脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体按质量比为1: 0.04-0.3,混匀后,摇床震荡2-4小时,离心移除上清,封闭铈标记试剂表面多余的结合位点,得到目标产物铈标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体;

所述铈标记的抗T-2毒素单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:将铈标记试剂与T-2毒素单克隆抗体按质量比为1: 0.04-0.3,混匀后,摇床震荡2-4小时,离心移除上清,封闭铈标记试剂表面多余的结合位点,得到目标产物铈标记的抗T-2毒素单克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:铈标记试剂使用前进行活化,所述的活化为:将铈标记试剂溶解在硼酸缓冲液中,振荡混匀,加入EDC溶液振荡活化15-30 min,10000-15000rpm离心,加入硼酸缓冲液振荡混匀,超声;所述封闭用封闭液为含有0.5~1%BSA 的硼酸缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中的吸水垫长15-35 mm,宽3-5mm;样品垫长12-18mm,宽2-5mm,相邻各垫的交叠长度为1-3mm;所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中检测垫上靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15-20mm,每相邻两条检测线之间的间距为1.5-4.5mm,靠近质控线的检测线与质控线的间距为4-10mm;所述的样品反应瓶为1-5mL的卡口瓶。

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:所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中检测垫上每厘米检测线所需的二乙酸铈草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.4-0.8 μ g,每厘米检测线所需的脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.8-1.0 μ g;每厘米检测线所需的T-2毒素-卵清白蛋白偶联物的包被量为0.8-1.0 μ g;

所述样品反应瓶中铈标记的抗二乙酸铈草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的含量为0.1-0.3 μ g,所述样品反应瓶中铈标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的含量为0.2-0.4 μ g;所述样品反应瓶中铈标记的抗T-2毒素单克隆抗体冻干品的含量为0.2-0.4 μ g;

g。

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:抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的IC₅₀小于或等于15ppb;

抗T-2毒素单克隆抗体的IC₅₀小于或等于2ppb。

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:所述的时间分辨荧光试剂盒还包括样品稀释液,所述的样品稀释液为0.01%-0.30%体积分数的吐温-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:所述的时间分辨荧光试纸条的制备方法如下:

(1) 将吸水纸剪裁为吸水垫;

(2) 检测垫的制备:

将二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、T-2毒素-卵清白蛋白偶联物配制成浓度为0.25-2mg/mL的包被液,用划膜方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别间隔包被,得到3条检测线,然后于37-40°C条件下干燥30-60分钟;所述包被二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.2-0.8μg;包被脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的包被量为0.2-1.0μg;包被T-2毒素-卵清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的包被量为0.2-1.0μg;

所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中检测垫上靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15-20mm,所述每相邻两条检测线之间的间距为1.5-4.5mm,靠近质控线的检测线与质控线的间距为4-10mm;

将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度为0.1-0.45mg/mL的包被液,于距检测线4-10mm的位置,用划膜方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为0.4~0.8μg,然后于37-40°C条件下干燥30-60分钟;

(3) 样品垫的制备:

将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37-40°C条件下干燥4-10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

(4) 免疫层析时间分辨荧光试纸条的组装:

在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1-3mm,即得免疫层析时间分辨荧光试纸条。

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:所述免疫层析时间分辨荧光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包被液、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物包被液、T-2毒素-卵清白蛋白偶联物包被液中所使用的包被缓冲液为:每10mL中含有牛血清白蛋白0.1g,叠氮化钠0.002g,氯化钠0.08g,十二水磷酸氢二钠0.029g,氯化钾0.002g,磷酸二氢钾0.002g;

配制兔抗鼠多克隆抗体包被液中所使用的包被缓冲液为:每10mL中含有叠氮化钠0.002g,氯化钠0.08g,十二水磷酸氢二钠0.029g,氯化钾0.002g,磷酸二氢钾0.002g;

所述免疫层析时间分辨荧光试纸条的制备中使用的封闭液为:每100mL中含有卵清白蛋白0.5-2g,蔗糖2g,叠氮化钠0.02g,氯化钠0.8g,十二水磷酸氢二钠0.29g,氯化钾0.02g,

磷酸二氢钾0.02g。

10. 权利要求1所述的时间分辨荧光试剂盒在二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素含量检测中的应用,其特征在于:将待测样品经前处理获得待测样品溶液后,加入样品反应瓶中,混匀,插入时间分辨荧光试纸条,37℃反应6分钟后,用时间分辨荧光测试仪进行检测,获得免疫层析时间分辨荧光试纸条上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;基于预先获得的免疫层析时间分辨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分别与二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素浓度的关系曲线,获得待测样品溶液中二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的含量,最后经换算即得待测样品中二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的含量。

同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的时间分辨荧光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及真菌毒素和农药时间分辨荧光免疫层析试纸条,具体涉及一种同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2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,属单端孢多霉烯毒素,主要由镰草镰刀菌和木贼镰刀菌产生。二乙酸镰草镰刀菌烯醇主要污染谷物和饲料,在饲料中检出率虽没有呕吐毒素高,但它对动物的毒性要高于呕吐毒素。与T-2毒素有相似之处,可损害动物骨髓等造血器官,白细胞持续减少,心肌病变出血等。脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON),也被称为呕吐毒素,可在体内蓄积,具有很强的细胞毒性、免疫毒性、胚胎毒性和致畸作用。导致人畜厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳和反应迟钝等急性中毒症状,严重时损害造血系统造成死亡。联合国粮农组织和世界卫生组织已将其确定为最危险的、自然发生的食品污染物之一,被列入国际研究的优先地位。T-2是单端孢霉烯族毒素中毒性最强的一种毒素。以上三种毒素均主要污染小麦、大麦、玉米等粮食作物及其制品,对人类健康及畜牧业构成了较大危害。由于二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素在谷物中混合污染常有发生,需要方便快捷的检测技术对三类污染物进行快速同步筛查,满足对农产品中毒素污染控制的监管需求。

[0003] 目前,这些毒素的检测方法主要有液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法等。这些方法稳定性好、灵敏度高、准确性好,但是前处理步骤复杂,样品检测成本高。免疫层析法克服了上述不足,以抗原抗体特异性反应为基础,用硝酸纤维素将抗原固定,使层析过程中游离靶标物与检测线上抗原竞争结合已标记抗体,通过结合在检测线上标记物的量计算样品中靶标物的含量。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)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2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] 本发明所要解决的问题是提供一种能同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的时间分辨荧光试剂盒及制备方法。该时间分辨荧光试剂盒可用于样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素含量的同步检测,具有操作简单、快速、灵敏度高的特点。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案为:

[0007] 同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的时间分辨荧光试剂盒,它包括免疫层析时间分辨荧光试纸条和含有镧标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单

克隆抗体、含有铈标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体、含有铈标记的T-2 毒素单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中: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,相邻各垫在连接处交叠连接,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设置横向质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线下方,个数为3条,检测线上分别上包被二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物和T-2毒素-卵清白蛋白偶联物;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分泌产生的。

[0008] 按上述方案,所述铈标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:将铈标记试剂与二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体按质量比为1: (0.04-0.3),混匀后,摇床震荡2-4小时,离心移除上清,封闭铈标记试剂表面多余的结合位点,得到目标产物铈标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体。

[0009] 所述铈标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:铈标记试剂与脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体按质量比为1: (0.04-0.3),混匀后,摇床震荡2-4小时,离心移除上清,封闭铈标记试剂表面多余的结合位点,得到目标产物铈标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体。

[0010] 所述铈标记的抗T-2毒素单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:将铈标记试剂与T-2毒素单克隆抗体按质量比为1: (0.04-0.3),混匀后,摇床震荡2-4小时,离心移除上清,封闭铈标记试剂表面多余的结合位点,得到目标产物铈标记的抗T-2毒素单克隆抗体。

[0011] 按上述方案,铈标记试剂使用前进行活化,所述的活化为:将铈标记试剂溶解在硼酸缓冲液中,振荡混匀,加入EDC溶液振荡活化15-30min,10000-15000rpm离心,加入硼酸缓冲液振荡混匀,超声。

[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,所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中的吸水垫长15-35mm,宽3-5mm;样品垫长12-18mm,宽2-5mm,相邻各垫的交叠长度为1-3mm;所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中检测垫上靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15- 20mm,每相邻两条检测线之间的间距为1.5-4.5mm,靠近质控线的检测线与质控线和检测线的间距为4-10mm;所述的样品反应瓶为1-5mL的卡口瓶。

[0014] 按上述方案,所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中检测垫上每厘米检测线所需的二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.4-0.8ug,每厘米检测线所需的脱氧雪腐镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物的包被量为0.8-1.0ug;每厘米检测线所需的T-2毒素-卵清白蛋白偶联物的包被量为0.8-1.0ug;

[0015] 所述样品反应瓶中铈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 0.1-0.3ug,所述样品反应瓶中铈标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的含量为0.2-0.4ug;所述样品反应瓶中铈标记的抗T-2毒素单克隆抗体冻干品的含量为 0.2-0.4ug。

[0016] 按上述方案,优选地,抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的IC₅₀小于等于15ppb。

[0017] 按上述方案,抗T-2毒素单克隆抗体的IC₅₀小于等于2ppb。

[0018] 按上述方案,所述的同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2

毒素混合污染的时间分辨荧光试剂盒还包括样品稀释液,所述的样品稀释液为体积分数为0.01%-0.30%的吐温-20、0.5-1.5%蔗糖和0.1-1%牛血清蛋白(BSA)水溶液;

[0019] 按上述方案,所述的时间分辨荧光试纸条的制备方法如下:

[0020] (1) 将吸水纸剪裁为吸水垫;

[0021] (2) 检测垫的制备:

[0022] 将二乙酸铈草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物、T-2毒素-卵清白蛋白偶联物配制成浓度为0.25-2mg/mL的包被液,用划膜方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别间隔包被,得到2条检测线,然后于37-40℃条件下干燥30-60分钟;所述包被二乙酸铈草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的二乙酸铈草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的包被量为0.2-0.8ug;包被脱氧雪腐镰刀菌烯醇-卵清白蛋白偶联物的检测线上所需要的包被量为0.2-1.0ug;包被T-2毒素-卵清白蛋白偶联物的检测线上所需要的包被量为0.2-1.0ug。

[0023] 所述免疫层析时间分辨荧光试纸条中检测垫上靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15-20mm,所述每相邻两条检测线之间的间距为1.0-5.5mm,靠近质控线的检测线与质控线的间距为5-10mm;靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15-20mm;

[0024] 将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度为0.1-0.45mg/mL的包被液,于距检测线5-10mm的位置,用划膜方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为0.4~0.8ug,然后于37-40℃条件下干燥30-60分钟;

[0025] (3) 样品垫的制备:

[0026] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37-40℃条件下干燥4-10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0027] (4) 免疫层析时间分辨荧光试纸条的组装:

[0028] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1-3mm,即得免疫层析时间分辨荧光试纸条;

[0029] 按上述方案,所述免疫层析时间分辨荧光试纸条的制备中配制二乙酸铈草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物包被液、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物包被液、T-2毒素-卵清白蛋白偶联物包被液中所使用的包被缓冲液为:每10mL中含有牛血清白蛋白0.1g,叠氮化钠0.002g,氯化钠0.08g,十二水磷酸氢二钠0.029g,氯化钾 0.002g,磷酸二氢钾0.002g;

[0030] 配制兔抗鼠多克隆抗体包被液中所使用的包被缓冲液为:每10mL中含有叠氮化钠0.002g,氯化钠0.08g,十二水磷酸氢二钠0.029g,氯化钾0.002g,磷酸二氢钾 0.002g;

[0031] 所述免疫层析时间分辨荧光试纸条的制备中使用的封闭液为:每100mL中含有卵清白蛋白0.5-2g,蔗糖2g,叠氮化钠0.02g,氯化钠0.8g,十二水磷酸氢二钠0.29g,氯化钾0.02g,磷酸二氢钾0.02g;

[0032] 上述免疫层析时间分辨荧光速测试剂盒在二乙酸铈草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素含量检测中的应用:将待测样品经前处理获得待测样品溶液后,加入样品反应瓶中,混匀,插入时间分辨荧光试纸条,37℃反应6分钟后,用时间分辨荧光测试仪进行检测,获得免疫层析时间分辨荧光试纸条上检测线(T)时间分辨荧光强度与质控线(C)时间

分辨荧光强度的比值；基于预先获得的免疫层析时间分辨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) 分别与二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素浓度的关系曲线，获得待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的含量，最后经换算即得待测样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的含量；

[0033] 按上述方案，所述的免疫层析时间分辨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) 分别与二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素浓度的关系曲线是采用以下方法得到的：

[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脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品溶液；配制得到一系列浓度的T-2毒素标准品溶液。

[0035] (2) 将适量上述各浓度的二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素标准品溶液分别加入到样品反应瓶中，混匀，插入免疫层析时间分辨荧光试纸条，37℃反应10分钟，用时间分辨荧光免疫分析仪检测得到各免疫层析时间分辨荧光试纸条上检测线 (T) 和质控线 (C) 的时间分辨荧光强度值，由此获得各免疫层析时间分辨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)；

[0036] (3) 经拟合得到免疫层析时间分辨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浓度的关系曲线；经拟合得到免疫层析时间分辨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) 与脱氧雪腐镰刀菌烯醇浓度的关系曲线；经拟合得到免疫层析时间分辨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T-2 毒素浓度的关系曲线。

[0037] 本发明的有益效果：

[0038] (1) 快速、同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素。本发明提供的免疫层析时间分辨荧光试剂盒能在一条试纸条上实现对二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素三种真菌毒素的同步、快速检测，特别地，使用的二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体特异性好 (对T2毒素、呕吐毒素 (DON) 等交叉反应均小于0.01%)、且灵敏度高，可保证各真菌毒素的检测之间无干扰，简单、快速。

[0039] (2) 灵敏度高。本发明提供的免疫层析时间分辨荧光试剂盒对检测溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的最低检测限为0.5ng/mL，对脱氧雪腐镰刀菌烯醇的最低检测限为1.0ng/mL，对T-2毒素的最低检测限为0.1ng/mL，该检测限能满足欧盟对食品中的限量要求。

[0040] (3) 样品前处理方法简单。样品前处理只需要将甲醇水提取液加入样品中超声提取5-10分钟，静置5-10分钟，取上清液过滤膜稀释即可进行检测。

附图说明

[0041] 图1为本发明提供的二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素时间分辨荧光免疫层析试纸条的结构示意图。图中：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脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测线、7T-2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] 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30-35μL,室温混合30-60min,4℃静置2h以上。12000r/min,4℃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℃静置2h以上,然后12000r/min,4℃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℃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。

毒素名称	结构	IC ₅₀	交叉反应率
DAS		3.08	100%
T-2 毒素		>100,000	<0.01%
HT-2 毒素		>100,000	<0.01%
DON		>100,000	<0.01%
3-acetyl-DON		>100,000	<0.01%
FB ₁		>100,000	<0.01%
OTA		>100,000	<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 μ g/mL浓度包被酶标板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ 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 5.4×10^8 L/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铤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℃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,筛选出抗二乙酰铤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,用二乙酰铤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] 抗二乙酰铤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SuperScript™-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℃30s、58℃45s、72℃

1min,扩增30个循环,最后72℃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DH5α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] 抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体优选IC50小于等于15ppb的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体。如山东绿都生物科技有限公司等生产的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体,本实施例具体使用的为山东绿都生物科技有限公司的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体,灵敏度IC50为12ppb。

[0068] 抗T-2毒素单克隆抗体优选IC50小于等于2ppb (2ng/ml) 的抗T-2毒素单克隆抗体,如山东绿都生物科技有限公司等生产的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体,本实施例具体使用的为山东绿都生物科技有限公司的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体,灵敏度IC50为经检测为0.8ng/mL。

[0069] 实施例4同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素时间分辨荧光试剂盒

[0070] 定量检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的时间分辨荧光试剂盒,包括荧光试纸条、含有钡标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体、脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体、T-2毒素单克隆抗体、反应瓶、样品稀释液,所述的荧光试纸条包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1mm,免疫层析时间分辨荧光试纸条中的吸水垫长38mm,宽4mm;检测垫长25mm,宽4mm;样品垫长15mm,宽4mm,相邻各垫的交叠长度为1mm;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设置横向质控线和检测线1,检测线2和检测线3,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体。

[0071] 所述荧光试纸条的获得:

[0072] (1) 吸水垫的制备

[0073] 将吸水纸剪裁成长18mm,宽4mm的规格,即得吸水垫;

[0074] (2) 检测垫的制备

[0075] 检测线的包被:

[0076] 将二乙酸镰草镰刀菌烯醇包被抗原用包被缓冲液配制成浓度为1mg/mL的包被液;于距硝酸纤维素膜上沿12mm的位置,用划膜的方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需包被抗原的包被量为0.6μg,然后于37℃条件下干燥 60分钟;

[0077] 将脱氧雪腐镰刀菌烯醇包被抗原用包被缓冲液配制成浓度为0.25mg/mL的包被

液;于距硝酸纤维素膜上沿8mm的位置,用划膜的方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需包被抗原的包被量为0.4 μ g,然后于37℃条件下干燥60 分钟;

[0078] 将T-2毒素包被抗原用包被缓冲液配制成浓度为0.25mg/mL的包被液;于距硝酸纤维素膜上沿8mm的位置,用划膜的方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需包被抗原的包被量为0.4 μ g,然后于37℃条件下干燥60分钟;

[0079] 所述的包被缓冲液为:每10mL中含有牛血清白蛋白BSA 0.1g,叠氮化钠0.002g,氯化钠0.08g,十二水磷酸氢二钠0.029g,氯化钾0.002g,磷酸二氢钾0.002g;

[0080] 质控线的包被:

[0081] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配成浓度为0.25mg/mL的包被液;于距检测线4mm的位置,用划膜方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为0.4 μ g,然后于37℃条件下干燥2小时;

[0082] 所述的包被缓冲液为:

[0083] 每10mL中含有牛血清白蛋白0.1g,叠氮化钠0.002g,氯化钠0.08g,十二水磷酸氢二钠0.029g,氯化钾0.002g,磷酸二氢钾0.002g;

[0084] 所述的硝酸纤维素膜长25mm,宽4mm。

[0085] (3) 样品垫的制备:

[0086] 将玻璃纤维膜剪裁成长15mm,宽4mm的规格,放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥6小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0087] 所述的封闭液为2.9g十二水磷酸氢二钠,0.3g二水合磷酸二氢钠,1.0g Tween-20, 1.0g聚乙烯吡咯烷酮(PVPK-30),0.25g EDTA,0.5g牛血清白蛋白BSA,0.02g叠氮钠,加水定容至100mL所得;

[0088] (4) 荧光试纸条的组装:

[0089] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1mm,即得荧光试纸条。

[0090] 所述铕标记的抗二乙酸镆草镰刀菌烯醇单克隆抗体的获得:

[0091] 取0.2mol/L pH 8.18的硼酸缓冲液800 μ L,加入200 μ L铕标记试剂(粒径100nm,固形物含量1%),振荡混匀。超声3S。加入40 μ L 15mg/mL EDC溶液,振荡混匀15min。13000r/min,10℃,离心10min,去上清液,加入1mL硼酸缓冲液复溶,振荡混匀,超声3S。加入20 μ g二乙酸镆草镰刀菌烯醇单克隆抗体,混匀,250r/min、25℃下摇床过夜。再次离心去上清,加入1mL含0.5%BSA的硼酸缓冲液进行复溶,振荡混匀,超声 10min,25℃下摇床2h,得到目标产物铕标记的抗二乙酸镆草镰刀菌烯醇单克隆抗体。上述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。

[0092] 所述铕标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的获得:

[0093] 取0.2mol/L pH 8.18的硼酸缓冲液800 μ L,加入200 μ L铕标记试剂(粒径100nm,固形物含量1%),振荡混匀。超声3S。加入40 μ L 15mg/mL EDC溶液,振荡混匀15min。13000r/min,10℃,离心10min,去上清液,加入1mL硼酸缓冲液复溶,振荡混匀,超声3S。加入20 μ g脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体,混匀,250r/min、25℃下摇床过夜。再次离心去上清,加入1mL含0.5%BSA的硼酸缓冲液进行复溶,振荡混匀,超声10min, 25℃下摇床2h,得到目标产物铕标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体。上述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] 所述铈标记的抗T-2毒素单克隆抗体的获得:

[0095] 取0.2mol/L pH 8.18的硼酸缓冲液800 μ L,加入200 μ L铈标记试剂(粒径100nm,固形物含量1%),振荡混匀。超声3S。加入40 μ L 15mg/mL EDC溶液,振荡混匀15min。13000r/min,10 $^{\circ}$ C,离心10min,去上清液,加入1mL硼酸缓冲液进行复溶,振荡混匀,超声3S。加入20 μ gT-2毒素单克隆抗体,混匀,250r/min、25 $^{\circ}$ C下摇床过夜。再次离心去上清,加入1mL含0.5%BSA的硼酸缓冲液进行复溶,振荡混匀,超声10min,25 $^{\circ}$ C下摇床2h,得到目标产物铈标记的抗T-2毒素单克隆抗体。上述铈标记试剂可购于上海优你生物科技有限公司,但不限于此。

[0096] 上述的时间分辨荧光免疫层析试纸条二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素定量检测中的应用:

[0097] 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、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素浓度的关系曲线的建立:

[0098] (1) 对经高效液相色谱法(HPLC)检测为二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素为阴性的谷物进行样品前处理。取谷物样品25g,添加80%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1:4的比例进行稀释。

[0099] (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/脱氧雪腐镰刀菌烯醇/T-2毒素以1:1:1的比例添加配得混合标准品溶液。标准品浓度依次为1.5ng/mL、0.5ng/mL、0.15ng/mL、0.05ng/mL、0.015ng/mL、0.005ng/mL及二乙酸镰草镰刀菌烯醇标准品溶液分别为15ng/mL、5ng/mL、1.5ng/mL、0.5ng/mL、0.15ng/mL、0.05ng/mL;

[0100] (3) 取二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合标准品溶液200 μ L加入样品瓶,加入到含有铈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);

[0101] (4) 分别以二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒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 0.5-20ng/mL;脱氧雪腐镰刀菌烯醇1.0-25ng/mL;T-2毒素0.1-10.5ng/mL。

[0102] 2. 小麦样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素含量的加标回收实验:

[0103] 取小麦样品20g,添加80%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(脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素)标准品1ng/mL、5ng/mL和10ng/mL,取上述待测样品检测液200 μ L加入到含有铈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、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素物质浓度,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、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素物质含量。测得小麦样品中的二乙酸镰草镰刀菌烯醇加标回收率依次为:101.0%,94.5%,90.1%;脱氧雪腐镰刀菌烯醇加标回收率依次为:98.9%,95.5%,89.2%;T-2毒素加标回收率依次为:108.4%,97.5%,93.0%。

[0001]	<110>	中国农业科学院油料作物研究所	
[0002]	<120>	同步检测二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的时间分辨荧光试剂盒	
[0003]	<160>	4	
[0004]	<210>	1	
[0005]	<211>	351bp	
[0006]	<212>	DNA	
[0007]	<213>	小鼠	
[0008]	<400>	1	
[0009]		gaagtgaac tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
[0010]		tcctgttcag cctccggatt cactttcaat tactatggca tgtcttgggt tcgccagact	120
[0011]		ccagacaacc tcctggagtg ggtcgcaggc attagtagtg gtggttctta cacctattat	180
[0012]		tctgacagtg tgaagggaac attcaccatc tccagagaca gtgccacgaa caccctgtac	240
[0013]		ctgcaaatga ccagtctgaa gtctcaagac acagccatgt attattgtat tagactcccg	300
[0014]		tttgggtcta tggactattg gggtaagga accgcagtca ccgtctcctc a	351
[0015]	<210>	1	
[0016]	<211>	324bp	
[0017]	<212>	DNA	
[0018]	<213>	小鼠	
[0019]	<400>	2	
[0020]		caggctgttg tgactcagga acctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc	60
[0021]		acttgctcgt caagtactgg ggctgtaaca actggtaatt atgtcaactg ggtccaagag	120
[0022]		aaaccagatc atttattcag tgggtctaata ggtaatacca ataaccgagc tccagggtgtt	180
[0023]		cctgccagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg ccctcaccat cacagggaca	240
[0024]		cagactgagg atgaggcaat atattttctgt gctctatggg acaccgacca tttgggtgttc	300
[0025]		ggtggaggaa ccaaattgac tgtc	324
[0026]	<210>	1	
[0027]	<211>	117	
[0028]	<212>	PRT	
[0029]	<213>	小鼠	
[0030]	<400>	3	
[0031]		Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[0032]		1 5 10 15	
[0033]		Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Tyr Tyr	
[0034]		20 25 30	
[0035]		Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Asn Leu Leu Glu Trp Val	
[0036]		35 40 45	
[0037]		Ala Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val	

[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
[0041]	Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Gln Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		80
[0042]		85	90
[0043]	Ile Arg Leu Pro Phe Gly Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ala		95
[0044]		100	105
[0045]	Val Thr Val Ser Ser		110
[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
[0054]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Gly		15
[0055]		20	25
[0056]	Asn Tyr Val Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Ser Gly		30
[0057]		35	40
[0058]	Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe		45
[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
[0062]	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Thr Asp		80
[0063]		85	90
[0064]	His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val		95
[0065]		100	105

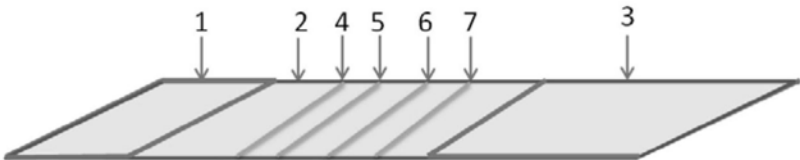


图1

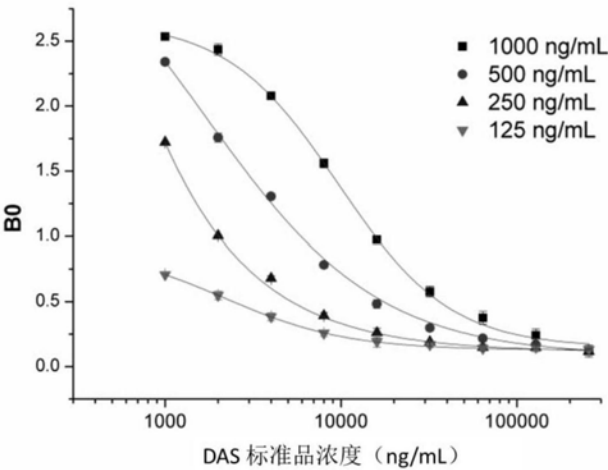


图2

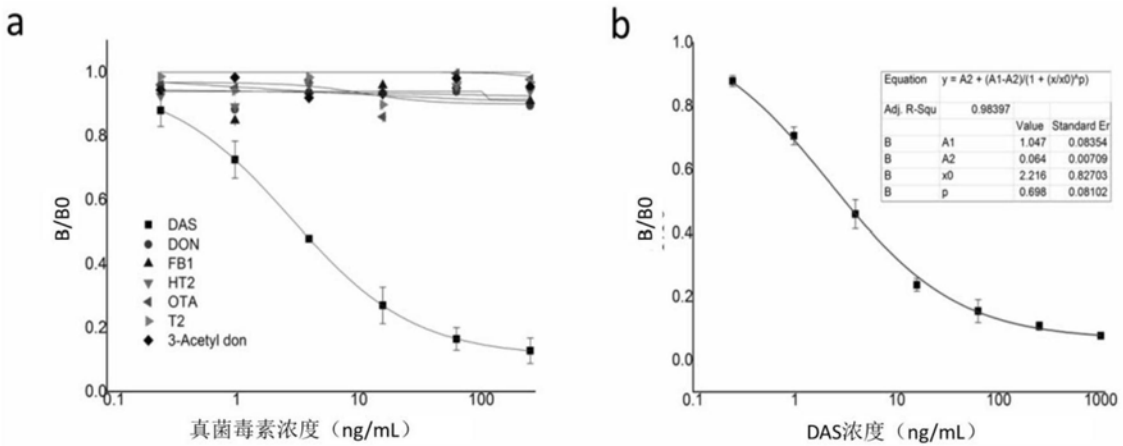


图3