



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111007247 B
(45) 授权公告日 2021.09.21

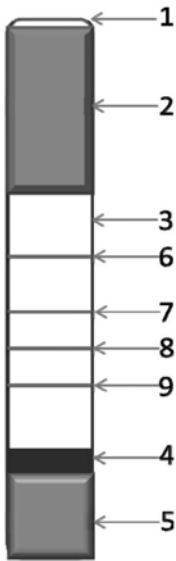
(21) 申请号 201911122589.1
(22) 申请日 2019.11.15
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111007247 A
(43) 申请公布日 2020.04.14
(83) 生物保藏信息
 CCTCC NO:C201881 2018.04.03
(73) 专利权人 中国农业科学院油料作物研究所
 地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二
 路2号
(72) 发明人 张兆威 唐晓倩 王督 张奇
 李培武
(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
 公司 42102
 代理人 乔宇
(51) Int. Cl.
 G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 206832820 U, 2018.01.02
 CN 103257230 A, 2013.08.21
 Richard Dietrich, et al..Use of
 Monoclonal Antibodies for the Analysis of
 Mycotoxins..《Natural Toxins》.1995,第3卷
 (第4期),
 E.N.Clare Mills, et al..An Enzyme-
 linked Immunosorbent Assay for
 Diacetoxyscirpenol Applied to the
 Analysis of Wheat..《J.SCI.FOOD.AGRIC.》
 .1988,
 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),
 审查员 张绚

权利要求书4页 说明书14页
序列表2页 附图2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毒素胶体金免疫层析试纸条

(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毒素胶体金免疫层
 析试纸条。它包括底板,底板的一面从上到下依
 次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各
 垫在连接处交叠连接,检测垫以硝酸纤维素膜为
 基垫,硝酸纤维素膜上横向设置有质控线和检测
 线,检测线位于质控线的下方,个数为三条,呈间
 隔分布,三条检测线上分别包被有各毒素蛋白偶
 联物,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;金
 标垫横向喷涂有胶体金标记的各抗体;所述抗二
 乙酸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。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。



111007247 B

1. 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毒素的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:包括底板,底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,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,硝酸纤维素膜上横向设置有质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为三条,呈间隔分布,所述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、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物和T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体、胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体和胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体;所述抗二乙酸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。

2. 根据权利要求1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毒素的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:所述的吸水垫长16~18mm,宽3~4mm,检测垫长18~30mm,宽3~4mm;金标垫长10~12mm,宽3~4mm;样品垫长12~15mm,宽3~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm。

3. 根据权利要求1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毒素的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:所述的吸水垫为吸水纸。

4. 根据权利要求1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毒素的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫上每相邻两条检测线之间的间距为2-3mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,所述靠近质控线的检测线与质控线的间距为5~7mm。

5. 根据权利要求1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毒素的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫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100~300ng;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脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;包被T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物的检测线上每厘米所需要的T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;质控线上每厘米所需要的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为50~200ng。

6. 根据权利要求1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毒素的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:所述金标垫中所用的胶体金的粒径为15~20nm;所述金标垫上每厘米喷涂长度所需的胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇克隆抗体的用量为100~200ng,所需胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体的用量为200~400ng。

7. 根据权利要求1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毒素的胶体金免疫层析试纸条,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。

8. 权利要求1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毒素的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

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和T-2毒素-牛血清白蛋白的偶联物用包被缓冲液分别配制成0.25~0.5mg/mL的包被液,用点喷方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别包被,得到三条检测线,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100~300ng;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脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng;包被T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物的检测线上所需要的T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物的包被量为100~300ng,所述每相邻两条检测线之间的间距为2-3mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液液配制成0.2~0.4mg/mL的包被液,于距靠近质控线的检测线5~7mm的位置,用点喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为50~200ng,然后于37~40℃条件下干燥1~2小时;

(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℃条件下干燥6~10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

(4) 金标垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥6~10小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂胶体金标记的抗二乙酸铈草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液、胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液和胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体溶液的混合溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的胶体金标记的抗二乙酸铈草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的抗T-2毒素单克隆抗体的用量为200~400ng,然后真空冷冻干燥2~4小时,置干燥器中室温保存;所述抗二乙酸铈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;

(5) 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、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得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毒素混合污染的胶体金免疫层析试纸条。

9. 根据权利要求8所述的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毒素的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述的包被缓冲液每10mL中含有:牛血清白蛋白0.1~0.2g,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;

所述步骤(3)和步骤(4)中的封闭液每100mL中含有:卵清白蛋白1~2g,蔗糖2~5g,叠氮化钠0.02~0.05g,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;

所述胶体金标记的抗二乙酸镻草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液,用0.4mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加入2mL 0.1mg/mL的抗二乙酸镻草镰刀菌烯醇单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,1500r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入40.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用;

所述胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液,用0.4mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加1.5mL 0.1mg/mL的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,1500r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入40.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用;

所述胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液,用0.425mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL 0.1mg/mL的抗T-2毒素单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,1500r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入40.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用;

所述的0.1mol/L碳酸钾水溶液为:13.8g碳酸钾溶于纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得;所述的标记洗涤保存液为:2.0g聚乙二醇-20000,0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得。

10. 权利要求1所述的同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的免疫层析试纸条的应用,其特征在于:应用方法如下:称取已磨细待测样品,加入体积浓度为60~80%的甲醇水溶液,混匀,在50~60℃水浴下超声提取5~10分钟,静置5~10分钟,将上层清液即提取液用水稀释,使稀释液中甲醇的终体积浓度为20~30%,得到待测样品溶液,再取80-150μL该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上进行检测,其作为检测试纸条,另取等体积的甲醇浓度一致的甲醇水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上,其作为对照试纸条,15-20分钟后将检测试纸条和对照试纸条进行显色对照:

当检测试纸条上包被二乙酸镻草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白的偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中二乙酸镻草镰刀菌烯醇含量

低于5ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇含量等于或高于5ng/mL并低于100ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于100ng/mL;

当检测试纸条上包被脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白的偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量低于10ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量等于或高于10ng/mL并低于200ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量等于或高于200ng/mL;

当检测试纸条上包被T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中T-2毒素含量低于5ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中T-2毒素含量等于或高于5ng/mL并低于80 ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中T-2毒素的含量等于或高于80ng/mL;

当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线是否显色,该试纸条判为无效;

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。

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毒素胶体金免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明提供了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(呕吐毒素)、T-2毒素的胶体金免疫层析试纸条及制备方法。

背景技术

[0002] 真菌毒素是真菌在食品或饲料里生长所产生的代谢产物,粮食和饲料在种收储运过程中均可产生真菌毒素的污染。二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素是粮食饲料中常见的真菌毒素。乙酸镰草镰刀菌烯醇,也被称为蛇形毒素,属于单端孢多霉烯毒素,主要由镰草镰刀菌和木贼镰刀菌产生,脱氧雪腐镰刀菌烯醇和T-2毒素是由某些镰刀菌产生的一种单端孢霉烯族毒素,三种真菌毒素在粮食包括小麦、玉米、大麦、燕麦、黑麦、大米和黍类等及花生、豆类等粮食和饲料中广泛发生。该三种毒素对人和动物均有极大危害,人畜摄入了被二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素污染的食物后,会导致厌食、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。鉴于真菌毒素的危害作用及其在粮食和饲料中的广泛发生,世界各国对其含量进行了严格限定。因此为了加强对粮食和饲料中这些真菌毒素的检测,尤其是快速检测,是了解和掌握食品及饲料安全卫生信息,增强食品安全消费的重要环节。

[0003] 现有对真菌毒素的检测方法主要包括薄层层析法、精密仪器分析法和免疫学分析法。薄层层析法检测真菌毒素时,不需要特殊的仪器设备,在一般实验室都可进行,但检测试剂用量大、操作繁琐、其它组分干扰严重、准确性差,不能准确定量,且对实验人员和周围环境污染危害较大,不适于现场快速检测。精密仪器分析法包括高效液相色谱法、液相色谱与质谱及串联质谱联用的方法,其灵敏度高,准确性好,但仪器昂贵,要求所检测的样品的纯化程度高,样品前处理过程繁琐,耗时长,对实验环境和检测人员要求高,难以实现快速检测,检测成本高。免疫分析方法克服了薄层层析法和仪器分析法的缺点,由于其特异性强、灵敏度高、样品前处理简单、成本低、对实验人员和周围环境的污染危害小、适于现场批量检测等优点在近年来获得了快速发展。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等微量残留物的定性、在线、快速检测。而我国小农户分散型的种植方式,农产品中真菌毒素发生率高,且同一农产品受多种真菌毒素污染的可能性大,因此迫切需要能快速、同步检测多种真菌毒素的检测技术,以实现粮食及饲料中多种真菌毒素的同步、快速、准确监测。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题是提供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毒素混合污染的胶体金免疫层析试纸条及制备方法。其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和T-2毒素三种真菌毒素含量的同步检测,具有操作

简单、快速、灵敏度高的特点。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案为:

[0006] 同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的胶体金免疫层析试纸条,包括底板,底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,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,硝酸纤维素膜上横向设置有质控线和检测线,所述检测线位于质控线的下方,个数为三条,呈间隔分布,所述三条检测线上分别包被有二乙酸镻草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DAS-BSA)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DON-BSA)和T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA),所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有胶体金标记的抗二乙酸镻草镰刀菌烯醇单克隆抗体、胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体和胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体;所述抗二乙酸镻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。

[0007] 按上述方案,所述的吸水垫长16~18mm,宽3~4mm,检测垫长18~30mm,宽3~4mm;金标垫长10~12mm,宽3~4mm;样品垫长12~15mm,宽3~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm。

[0008] 按上述方案,所述的吸水垫为吸水纸。

[0009] 按上述方案,所述检测垫上每相邻两条检测线之间的间距为2-3mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,所述靠近质控线的检测线与质控线的间距为5~7mm。

[0010] 按上述方案,所述检测垫包被二乙酸镻草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DAS-BSA)的检测线上每厘米所需要的二乙酸镻草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DAS-BSA)的包被量为100~300ng;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脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DON-BSA)的包被量为100~300ng;包被T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA)的检测线上每厘米所需要的T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA)的包被量为100~300ng;质控线上每厘米所需要的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为50~200ng。

[0011] 按上述方案,所述金标垫中所用的胶体金的粒径为15~20nm;所述金标垫上每厘米喷涂长度所需的胶体金标记的抗二乙酸镻草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇克隆抗体的用量为100~200ng,所需胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体的用量为200~400ng。

[0012] 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。

[0013] 按上述方案,抗T-2毒素单克隆抗体的IC₅₀小于等于2ppb。

[0014] 如上所述同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素的免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1)吸水垫的制备

[0016] 将吸水纸剪裁即得吸水垫;

[0017] (2)检测垫的制备

[0018] 检测线的包被:

[0019] 将二乙酸镻草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DAS-BSA)、脱氧雪腐镰刀菌烯

醇-牛血清白蛋白偶联物 (DON-BSA) 和T-2毒素-牛血清白蛋白的偶联物 (T-2-BSA) 用包被缓冲液分别配制成0.25~0.5mg/mL的包被液,用点喷方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别包被,得到三条检测线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;所述包被二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物 (DAS-BSA) 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 (DAS-BSA) 的包被量为100~300ng;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脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物 (DON-BSA) 的包被量为100~300ng;包被T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物的检测线上所需要的T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物 (T-2-BSA) 的包被量为100~300ng,所述每相邻两条检测线之间的间距为2-3mm,靠近质控线的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm;

[0020] 质控线的包被:

[0021] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液液配制成0.2~0.4mg/mL的包被液,于距靠近质控线的检测线5~7mm的位置,用点喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为50~200ng,然后于37~40℃条件下干燥1~2小时;

[0022] (3) 样品垫的制备

[0023] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥6~10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0024] (4) 金标垫的制备

[0025] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥6~10小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液、胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液和胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体溶液的混合溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为100~200ng,所需的抗T-2毒素单克隆抗体的用量为200~400ng,然后真空冷冻干燥2~4小时,置干燥器中室温保存;所述抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体保藏编号为CCTCCN0:C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生;

[0026] (5) 试纸条的组装

[0027] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得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毒素混合污染的胶体金免疫层析试纸条。

[0028] 按上述方案,所述的包被缓冲液每10mL中含有:牛血清白蛋白0.1~0.2g,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;

[0029] 按上述方案,所述步骤(3)和步骤(4)中的封闭液每100mL中含有:卵清白蛋白1~2g,蔗糖2~5g,叠氮化钠0.02~0.05g,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。

[0030] 按上述方案,所述胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液,用0.4mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加入2mL 0.1mg/mL的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%牛血清白蛋白

水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%，继续搅拌30min；于4℃放置2h后，1500r/min离心15min，取上清液，弃沉淀；将上清液12000r/min离心30min，弃去上清液，加入40.0mL标记洗涤保存液；再以12000r/min离心30min，弃去上清液，将沉淀用标记洗涤保存液重悬，得到5.0mL浓缩物，置4℃冰箱备用；

[0031] 所述胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体是采用不饱和标记法制备的，其具体方法为：取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液，用0.4mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值，在搅拌的状态下缓慢加1.5mL 0.1mg/mL的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体水溶液，继续搅拌30min；加入质量浓度为10%牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%，继续搅拌30min；于4℃放置2h后，1500r/min离心15min，取上清液，弃沉淀；将上清液12000r/min离心30min，弃去上清液，加入40.0mL标记洗涤保存液；再以12000r/min离心30min，弃去上清液，将沉淀用标记洗涤保存液重悬，得到5.0mL浓缩物，置4℃冰箱备用；

[0032] 所述胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的，其具体方法为：取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液，用0.425mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值，在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL 0.1mg/mL的抗T-2毒素单克隆抗体水溶液，继续搅拌30min；加入质量浓度为10%牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%，继续搅拌30min；于4℃放置2h后，1500r/min离心15min，取上清液，弃沉淀；将上清液12000r/min离心30min，弃去上清液，加入40.0mL标记洗涤保存液；再以12000r/min离心30min，弃去上清液，将沉淀用标记洗涤保存液重悬，得到5.0mL浓缩物，置4℃冰箱备用；

[0033] 所述的0.1mol/L碳酸钾水溶液为：13.8g碳酸钾溶于纯水定容至1000mL，0.22μm滤膜过滤所得；所述的标记洗涤保存液为：2.0g聚乙二醇-20000，0.2g叠氮钠，0.1235g硼酸，纯水定容至1000mL，0.22μm滤膜过滤所得。

[0034] 如上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毒素混合污染的免疫层析试纸条的应用，方法如下：称取已磨细待测样品，加入体积浓度为60~80%的甲醇水溶液，混匀，在50~60℃水浴下超声提取5~10分钟，静置5~10分钟，将上层清液即提取液用水稀释，使稀释液中甲醇的终体积浓度为20~30%，得到待测样品溶液，再取80-150μL该待测样品溶液作为检测液逐滴加入到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毒素混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上进行检测，其作为检测试纸条，另取等体积的甲醇浓度一致的甲醇水溶液做为阴性对照液，逐滴加入另一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毒素混合污染的免疫层析试纸条的样品垫上，其作为对照试纸条，15-20分钟后将检测试纸条和对照试纸条进行显色对照：

[0035] 当检测试纸条上包被二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白的偶联物(DAS-BSA)的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时，表明待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇含量低于5ng/mL；比对应检测线的颜色浅时，表明待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇含量等于或高于5ng/mL并低于100ng/mL；不显色时，表明待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于100ng/mL；

[0036] 当检测试纸条上包被脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白的偶联物(DON-BSA)的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时，表明待测样品溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量低于10ng/mL；比对应检测线的颜色浅时，表明待测样品溶液中脱氧雪腐镰刀菌

烯醇含量等于或高于10ng/mL并低于200ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量等于或高于200ng/mL;

[0037] 当检测试纸条上包被T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA)的检测线颜色与对照试纸条上对应检测线的颜色接近时,表明待测样品溶液中T-2毒素含量低于5ng/mL;比对应检测线的颜色浅时,表明待测样品溶液中T-2毒素含量等于或高于5ng/mL并低于80ng/mL;不显色时,表明待测样品溶液中T-2毒素的含量等于或高于80ng/mL;

[0038] 当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线是否显色,该试纸条判为无效;

[0039] 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。

[0040] 该免疫层析试纸条在二乙酸镰草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染同步检测中的工作原理:当待测样品溶液加入到试纸条下端的样品垫上时,待测样品溶液通过毛细作用沿试纸条向吸水垫方向移动,当其移动至金标垫时,胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体、胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体、胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体被溶解。当样品中含有二乙酸镰草镰刀菌烯醇时,二乙酸镰草镰刀菌烯醇将和金标垫上的胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物抗原的检测线I时,抗原将和二乙酸镰草镰刀菌烯醇竞争结合胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇含量越高,检测线上的抗原能够结合的胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体将越少,在检测线上形成的显色带颜色越浅;当样品中含有脱氧雪腐镰刀菌烯醇时,脱氧雪腐镰刀菌烯醇将和金标垫上的胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DON-BSA)抗原的检测线II时,抗原将和脱氧雪腐镰刀菌烯醇竞争结合胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量越高,检测线上的抗原能够结合的胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体将越少,在检测线上形成的显色带颜色越浅;当样品中含有T-2毒素时,T-2毒素将和金标垫上的胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA)抗原的检测线III时,抗原将和T-2毒素竞争结合胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中T-2毒素含量越高,检测线上的抗原能够结合的胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体将越少,在检测线上形成的显色带颜色越浅。

[0041] 当三条检测线上的抗原所结合的胶体金标记的对应的抗体少于一定的数量时,三条检测线处将不会有红色线条出现。无论样品中是否含有这三种真菌毒素,未被检测线上的抗原截获的胶体金标记的抗真菌毒素的抗体或胶体金标记的抗真菌毒素的抗体与真菌毒素的结合物将继续移动到质控线并与质控线上的兔抗鼠多克隆抗体结合并被富集显色。据此,分别将检测试纸条上包被二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白的偶联物的检测线、包被脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DON-BSA)的检测线和包被T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA)的检测线与对照试纸条上相应检测线颜色进行显色对照,即可获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毒素这三种真菌毒素的混合污染情况。

[0042] 本发明的有益效果:

[0043] (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。本发明提供的胶体金免疫层析试纸条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,使用的抗体均为单克隆抗体,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)等毒素交叉反应均小于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。

[0044] (2) 灵敏度高。本发明提供的胶体金免疫层析试纸条对检测溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的最低检测限达到5ng/mL,对脱氧雪腐镰刀菌烯醇的最低检测限可达到10ng/mL,对T-2毒的最低检测限可达到5ng/mL,该检测限能满足欧盟对食品中这三种真菌毒素的限量要求。

[0045] (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,然后静置5~10分钟,取上清液稀释即可进行检测,整个样品前处理过程简单、快速。

附图说明

[0046] 图1为本发明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毒素混合污染的胶体金免疫层析试纸条的正视图;

[0047] 图2为实施例2中小麦样品(编号分别为001,002,003)的结果判定图;

[0048] 图中:1纸板、2吸水垫、3检测垫、4金标垫、5样品垫、6质控线、7检测线Ⅲ、8检测线Ⅱ、9检测线Ⅰ、10对照试纸条、11检测试纸条;

[0049] 图3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;

[0050] 图4(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

[0051] 实施例1:抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的获得

[0052] 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:

[0053] 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/L PBBS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;

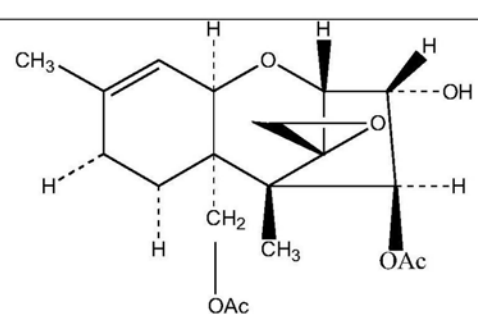
[0054] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容到100mL所得;所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得;所述的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液为8g氯化钠,2.9g十二水磷酸氢二钠,0.2g氯化钾,0.2g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得。

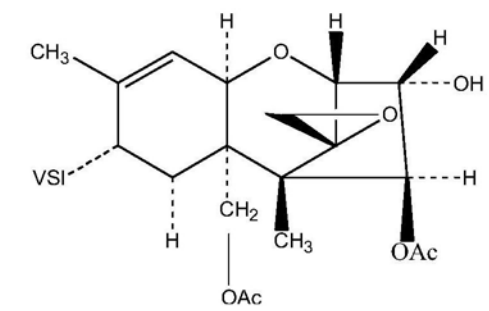
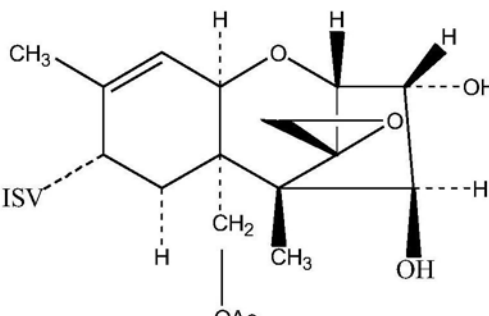
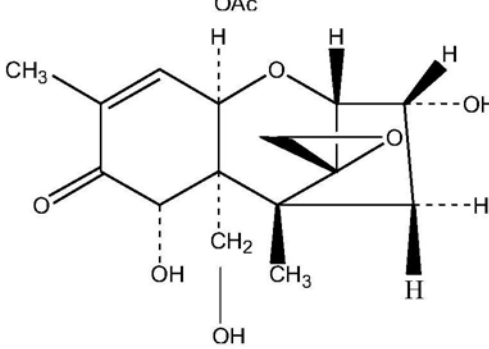
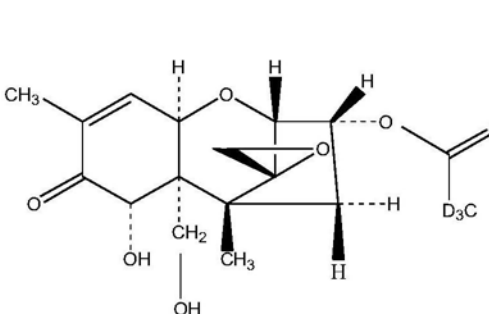
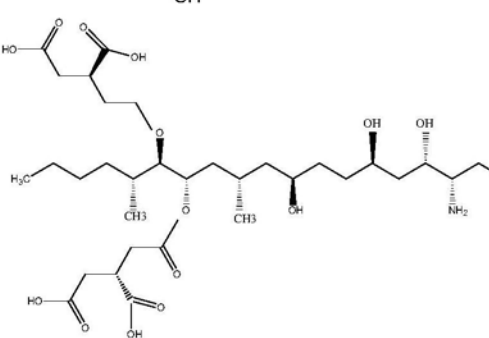
[0055] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的亚型为IgG2b。

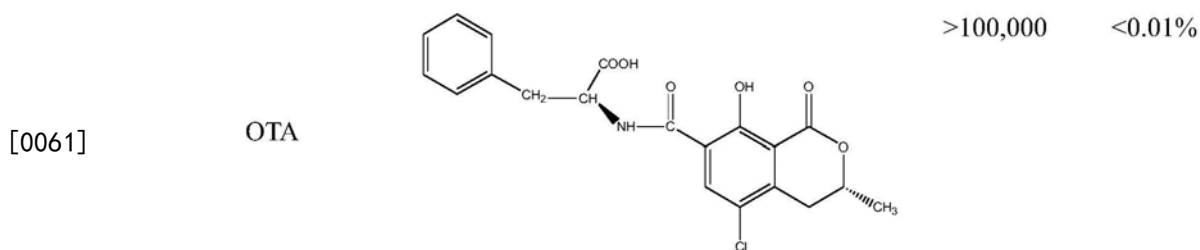
[0056] 用常规非竞争酶联免疫吸附法(ELISA)测得小鼠腹水纯化得到的抗体效价可达到 3.2×10^5 ,即抗体稀释 3.2×10^5 倍时溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争ELISA测定其对二乙酸镰草镰刀菌烯醇灵敏度为3.08ng/mL。与其他真菌毒素,T2毒素、HT2毒素、呕吐毒素、3-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇、赭曲霉毒素、伏马毒素的交叉反应均小于0.01%(表1;图4)。抗体的特异性高低可用交叉反应率来评价。采用间接竞争ELISA方法测定DAS5G11E7单克隆抗体,将DAS、T2毒素、HT2毒素、DON、3-ACDON、OTA、FB₁配制系列浓度的标准溶液,分别与等体积抗体共同加入酶标板中,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:

[0057] $CR\% = (IC_{50}DAS / IC_{50}其他毒素) \times 100$ 。

[0058] 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%
[0060] DON		>100,000	<0.01%
3-acetyl-DON		>100,000	<0.01%
FB ₁		>100,000	<0.01%



[0062] 利用间接非竞争ELISA测定DAS5G11E7的亲合力。用DAS-OVA按1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g/mL}$ 浓度包被酶标板,100 μL /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 $K_a = (n-1) / 2 (n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算抗体的亲合力常数,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)法亲合力可达 $5.4 \times 10^8 \text{L/mol}$ (图3)。

[0063] 杂交瘤细胞株DAS5G11E7的筛选

[0064] 1. 动物免疫

[0065] 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 μg 。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。

[0066] 2. 细胞融合

[0067] 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

[0068] 细胞株的筛选及克隆

[0069] 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 IC_{50} 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。

[0070] 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

[0071] (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;

[0072] (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;

[0073] (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)。

[0074] 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。

[0075] 抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体优选 IC_{50} 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 IC_{50} 为12ppb。

[0076] 抗T-2毒素单克隆抗体优选 IC_{50} 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生产的T-2毒素单克隆抗体,本实施例具体使用的为山东绿都生物科技有限公司的T-2毒素单克隆抗体,经检测灵敏度 IC_{50} 为0.8ng/mL。

[0077] 实施例2

[0078] 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毒素混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,步骤如下:

[0079] (1)吸水垫的制备

[0080] 将吸水纸剪裁成长16mm,宽4mm的规格,即得吸水垫;

[0081] (2)检测垫的制备

[0082] 检测线的包被:

[0083] 将T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(OTA-BSA)用包被缓冲液配制成0.4mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿15mm的位置,用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线Ⅲ,每厘米检测线Ⅲ上所需T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA)的包被量为160ng;将脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DON-BSA)用包被缓冲液配制成0.4mg/mL的包被液,于距检测线Ⅲ有2mm的位置,用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线Ⅱ,每厘米检测线Ⅱ上所需脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DON-BSA)的包被量为200ng;将二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DAS-BSA)用包被缓冲液配制成0.5mg/mL的溶液,于距检测线Ⅱ有2mm的位置用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线Ⅰ,每厘米检测线Ⅰ上所需二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DAS-BSA)的包被量为200ng,然后于37℃条件下干燥30分钟;

[0084] 质控线的包被:

[0085] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成0.25mg/mL的包被液,于距检测线Ⅲ有3mm的位置,用点喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为80ng,然后于37℃条件下干燥1小时;

[0086] 所述的包被缓冲液为:0.1g牛血清白蛋白,0.08g氯化钠,0.029g十二水磷酸氢二钠,0.002g氯化钾,0.002g磷酸二氢钾,加水定容到10mL所得。

[0087] 所述的硝酸纤维素膜长24mm,宽4mm。

[0088] (3)样品垫的制备

[0089] 将玻璃纤维膜剪裁成长12mm,宽4mm的规格,放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥8小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存。

[0090] 所述的封闭液为:将1g卵清白蛋白,2g蔗糖,0.02g叠氮化钠,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,加水定容至100mL所得。

[0091] (4)金标垫的制备

[0092] 将玻璃纤维膜剪裁成长10mm宽4mm的规格,放入步骤(3)所述的封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥8小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液、胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液和胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体溶液的混合溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为150ng,所需的胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为120ng,所需的抗T-2毒素单克隆抗体的用量为150ng,然后真空冷冻干燥2小时,置干燥器中室温保存;

[0093] 所述胶体金标记的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液,用0.4mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加入2mL 0.1mg/mL的抗二乙酸镰草镰刀菌

烯醇单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,1500r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入40.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用,其中胶体金标记的抗二乙酸镧草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液的质量浓度为0.04mg/mL;

[0094] 所述胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液,用0.4mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加入1.5mL0.1mg/mL的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,1500r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入40.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用,其中胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液的质量浓度为0.03mg/mL;

[0095] 所述胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取50.0mL市售质量浓度为0.01%的胶体金溶液,用0.425mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH值,在搅拌的状态下缓慢加入2.5mL0.1mg/mL的抗T-2毒素单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,1500r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12000r/min离心30min,弃去上清液,加入40.0mL标记洗涤保存液;再以12000r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用,其中胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体溶液的质量浓度为0.05mg/mL;

[0096] 所述胶体金溶液中胶体金的粒径为15nm;

[0097] 所述的0.1mol/L碳酸钾水溶液为:13.8g碳酸钾溶于纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得;所述的标记洗涤保存液为:2.0g聚乙二醇-20000,0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得。

[0098] (5) 试纸条的组装

[0099] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得同步检测二乙酸镧草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条,见图1和图2。

[0100] 上述同步检测二乙酸镧草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条在玉米样品检测中的应用:

[0101] 称取待测小麦样品(编号分别为001,002,003),加入体积浓度为70%的甲醇水溶液,混匀,在50℃水浴下超声提取10分钟,静置10分钟,将上层清液即提取液过0.45μm有机滤膜,使稀释液中甲醇的终体积浓度为14%,得到样品溶液,再取100μL稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一同步检测二乙酸镧草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,其作为检测试纸条,同时取100μL甲醇浓度为14%的水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测二乙酸镧草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯

醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,其作为对照试纸条,15分钟后读取结果。

[0102] 检测结果:001检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线I和检测线II颜色与对照试纸条中的检测线I和检测线III颜色接近,检测线II未显色,见图2中的2-1,由此判定:001待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的含量低于5ng/mL;T-2毒素的含量低于5ng/mL;脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量等于或高于200ng/mL;经换算可得001待测样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇与T-2毒素的含量均低于25ng/g,脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量等于或高于1000ng/g。

[0103] 002检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线I颜色与对照试纸条中的检测线I颜色接近,检测线II,III颜色比对照试纸条检测线II,III浅,见图2中的2-2,由此判定:002待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的含量低于5ng/mL,脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量高于10ng/mL并低于200ng/mL,T-2毒素的含量高于5ng/mL并低于80ng/mL,经换算可得002待测样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的含量低于25ng/g,脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量高于50ng/g,低于1000ng/g;T-2毒素的含量等于或高于25ng/g,并低于400ng/g。

[0104] 003检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线I,检测线II和检测线III颜色与对照试纸条中的检测线颜色接近,见图2中的2-3,表明:待测样品溶液中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的含量低于5ng/mL;脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量低于10ng/mL;T-2毒素的含量低于5ng/mL;经换算可得待测样品中二乙酸镰草镰刀菌烯醇的含量等于或高于25ng/g;脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量低于50ng/g;T-2毒素的含量低于25ng/g。

[0105] 实施例3

[0106] 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毒素混合污染的免疫层析试纸条的制备方法,步骤如下:

[0107] (1)吸水垫的制备

[0108] 将吸水纸剪裁成长18mm,宽3mm的规格,即得吸水垫;

[0109] (2)检测垫的制备

[0110] 检测线的包被:

[0111] 将二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DAS-BSA)用包被缓冲液配制成0.5mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿18mm的位置,用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线I,每厘米检测线I上所需二乙酸镰草镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DAS-BSA)的包被量为200ng;将脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DON-BSA)用包被缓冲液配制成0.4mg/mL的包被液,于距检测线I3mm的位置,用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线II,每厘米检测线II上所需脱氧雪腐镰刀菌烯醇-牛血清白蛋白偶联物(DON-BSA)的包被量为200ng;将T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA)用包被液配制成0.25mg/mL的溶液,于距检测线II3mm的位置用点喷方式将其包被于硝酸纤维素膜上得到检测线II,每厘米检测线II上所需T-2毒素-牛血清白蛋白偶联物(T-2-BSA)的包被量为300ng,然后于40℃条件下干燥30分钟;

[0112] 质控线的包被:

[0113] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成0.25mg/mL的包被液,于距检测线I6mm的位置,用点喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为80ng,然后于37℃条件下干燥1小时;

[0114] 所述的包被缓冲液为:0.2g牛血清白蛋白,0.08g氯化钠,0.029g十二水磷酸氢二钠,0.002g氯化钾,0.002g磷酸二氢钾,加水定容到10mL所得。

[0115] 所述的硝酸纤维素膜长30mm,宽3mm。

[0116] (3) 样品垫的制备

[0117] 将玻璃纤维膜剪裁成长15mm,宽3mm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。

[0118] 所述的封闭液为:将2g卵清白蛋白,4g蔗糖,0.05g叠氮化钠,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,加水定容至100mL所得。

[0119] (4) 金标垫的制备

[0120] 将玻璃纤维膜剪裁成长12mm,宽3mm的规格,放入步骤(3)所述的封闭液中浸湿,取出,于40℃条件下干燥6小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式向已干燥的玻璃纤维膜上横向喷涂胶体金标记的抗二乙酸镻草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液、胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液和胶体金标记的抗T-2毒素克隆抗体溶液的混合溶液,其中:每厘米喷涂长度所需的胶体金标记的抗二乙酸镻草镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为200ng,所需的胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体的用量为200ng,所需的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的用量为400ng,然后真空冷冻干燥2小时,置干燥器中室温保存;

[0121] 所述胶体金标记的抗二乙酸镻草镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液、胶体金标记的抗T-2毒素单克隆抗体溶液和胶体金标记的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体溶液是的制备方法如实施例2,不同之处在于;其所使用的胶体金溶液中胶体金的粒径为20nm;

[0122] (5) 试纸条的组装

[0123] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1mm,即得同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条。

[0124] 称取已磨细的待测小麦样品,加入体积浓度为70%的甲醇水溶液,混匀,在50℃水浴下超声提取10分钟,静置10分钟,使稀释液中甲醇的终体积浓度为14%,得到样品溶液,再取100μL稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,其作为检测试纸条,同时取100μL甲醇浓度为14%的水溶液做为阴性对照液,逐滴加入另一同步检测二乙酸镻草镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素混合污染的免疫层析试纸条的样品垫,其作为对照试纸条,20分钟后读取结果。

[0125] 检测结果:检测试纸条的质控线显示出红色条带,检测线I、检测线II和检测线III的颜色分别与对照试纸条中的检测线颜色接近,由此判定:待测样品溶液中T-2毒素的含量低于5ng/mL;脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量低于10ng/mL,二乙酸镻草镰刀菌烯醇的含量低于5ng/mL;经换算可得待测样品中T-2毒素的含量低于25ng/g;脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量低于50ng/g,二乙酸镻草镰刀菌烯醇的含量低于25ng/g。

- [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毒素胶体金免疫层析试纸条
- [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 tagactcccc 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 atatttctgt gctctatggt 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 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	

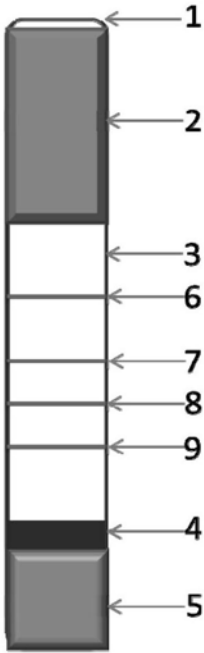


图1

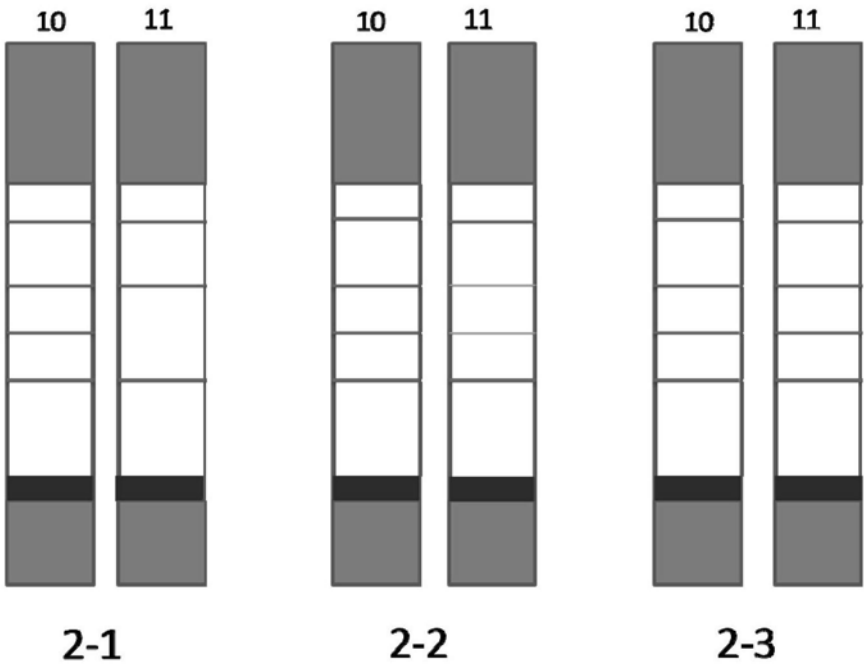


图2

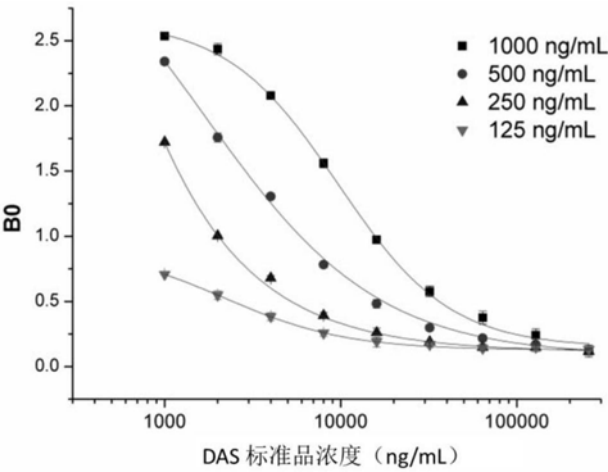


图3

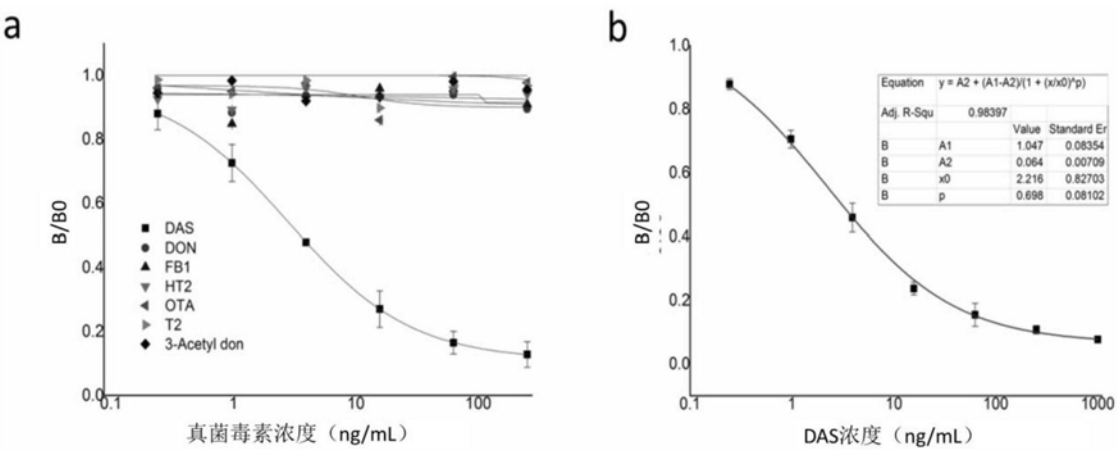


图4