



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112824877 A

(43)申请公布日 2021.05.21

(21)申请号 201911146742.4

(22)申请日 2019.11.21

(71)申请人 扬州千代科技有限公司

地址 225000 江苏省扬州市广陵区广陵产
业园科技创业园C3幢

(72)发明人 詹爱军 单君忆 招沐 闫文龙

(74)专利代理机构 扬州市苏为知识产权代理事
务所(普通合伙) 32283

代理人 周全

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

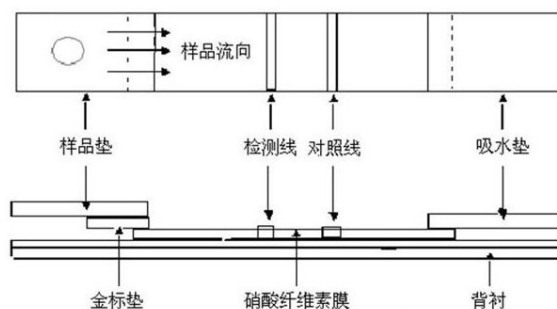
权利要求书3页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法

(57)摘要

一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法。涉及黄曲霉素,尤其涉及一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法。提供了方便加工,提高检测速度的利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法。本发明中的AFB1免疫荧光量子点检测卡特异性强,检测同族黄曲霉毒素以及其他真菌毒素结果均为阴性。反应时间一般在3-5 min,与传统的色谱,ELISA等检测方法相比大大缩短了检测时间,提高了检测速度,且彻底摆脱了大型设备的限制。本发明中的检测卡其检测灵敏度达到1 ppb,高于同类型胶体金产品。



1. 一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1) 材料选择;
- 2) 荧光量子点试剂配方;
- 3) 黄曲霉毒素免疫抗原的合成;
- 4) 黄曲霉毒素特异性抗体的制备;
- 5) 单克隆抗体亲和常数及效价检测;
- 6) 黄曲霉毒素检测抗原合成;
- 7) 荧光微球标记黄曲霉毒素b1抗体的制备;
- 8) AFB1抗体结合垫制备;
- 9) 黄曲霉毒素b1荧光量子点检测试剂条的制备;
- 10) 完成。

2. 根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤1)中的材料包括MES、NHS、碳二亚胺、2-(N-吗啉代)乙磺酸、牛血清白蛋白、Tween-20, Tritonx-100、PVP-40;

HAT培养基、荧光微球、羊抗鼠二抗、硝酸纤维膜、玻璃纤维膜和吸水纸。

3. 根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤2)包括:

硼砂缓冲液配置:硼酸6.183g,硼酸钠6.864g;超纯水定容至860mL;0.22 μ m膜滤过,置4 $^{\circ}$ C备用;

0.1M、pH4.7MES缓冲液:19.52gMES,58.44g氯化钠加超纯水至1L,用氢氧化钠调节PH值至4.7,置4 $^{\circ}$ C储存不超过一周;

10% BSA的配制:100.0g BSA;超纯水定容至1000.0mL;0.22 μ m膜滤过,置4 $^{\circ}$ C备用;

10% PVP-40的配制:100.0g PVP-40;超纯水定容至1000.0mL;0.22 μ m膜滤过,置4 $^{\circ}$ C备用;

10% Tween-20的配制:100.0mL Tween-20;超纯水稀释定容至1000.0mL;0.22 μ m膜滤过,置4 $^{\circ}$ C备用;

10% 叠氮钠的配制:100.0g 叠氮钠;超纯水定容至1000.0mL;0.22 μ m膜滤过,置4 $^{\circ}$ C备用;

玻璃器皿清洁液:重铬酸钾1000g,浓硫酸2500mL,加蒸馏水至10000mL;

抗体标记物稀释缓冲液的配制:取50g 蔗糖于250mL试剂瓶中,加入5mL10%BSA,3mL10% Tween-20,2mL10%PVP-40,0.2M PH7.4 PB定容至100mL,加入200 μ L10%叠氮钠;

玻纤垫片处理液的配置:称取海藻糖30.0g、BSA 5g、蔗糖15g于1000mL试剂瓶中,加入0.02mol/L PBS (pH7.4) 100mL,5mL山羊血清,3.1mL Triton-100,加超纯水定容至1L;

样品垫处理液的配置:称取海藻糖1.8g、BSA 6g、酪蛋白2.5g、BRIJ-35 5g、PVP-k40 5.4g、Na₂HPO₄ 13.578g、NaH₂PO₄ 2.8g、NaCl 4.015g于1000mL试剂瓶中,加入5mL Tween-20,加超纯水定容至1L;

抗原、二抗稀释液的配置:称取2g海藻糖于250mL试剂瓶中,加入1mL甲醇、5mL10%丙三醇,加0.02mol/L PBS定容至100mL;

0.2 mol/LPB:称取 2.3gNa₂HPO₄和0.456g NaH₂PO₄,加超纯水溶解后定容至1000mL,高压灭菌20min后常温保存,工作液pH值7.4;

0.02mol/L PBS称取 17.4g NaCl,2.3gNa₂HPO₄和0.456g NaH₂PO₄,加超纯水溶解后定容至1000mL,高压灭菌20min后常温保存,工作液pH值7.4;

5%二氯二钾硅烷的氯仿溶液:将25mL 二氯二钾硅烷溶解在 475mL 的氯仿溶液中,密封保存。

4.根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤3)中将黄曲霉毒素b1溶于无水甲醇中,加入吡啶,然后加入羧甲基羟胺半盐酸盐,旋转蒸发掉溶剂并过柱纯化得到半抗原;

取半抗原溶于DMF中,加入活化剂反应过夜,将反应液加入溶有OVA的PBS中,反应后用0.01MPBS透析获得黄曲霉毒素B1免疫抗原。

5.根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤4)包括如下步骤:

- 4.1)小鼠免疫;
- 4.2)细胞融合;
- 4.3)杂交瘤细胞筛选;
- 4.4)腹水的制备及纯化。

6.根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤5)采用间接ELISA方法,将两株单克隆抗体用样品稀释液从200倍开始进行2倍梯度稀释,进行检测。

7.根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤6)将黄曲霉毒素b1溶于无水乙醇中,加入吡啶,然后加入羧甲基羟胺半盐酸盐反应后,旋转蒸发掉溶剂并过柱纯化得到半抗原;取半抗原溶于DMF中,加入活化剂反应过夜,然后将反应液加入溶有BSA的PBS中,反应后用0.01 M PBS透析获得黄曲霉毒素b1检测抗原。

8.根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤7)中以平均直径为110nm、羧基修饰的荧光微球,抗AFB1单克隆抗体,按照下述方法制备荧光微球标记A型流感病毒标记抗体:

取5mg的上述羧基修饰的荧光微球用MES缓冲液洗涤并离心后,用1ml MES缓冲液重悬,加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺至终浓度为5mM、加入NHS至终浓度为10mM,室温避光,反应半小时得到活化后羧基修饰的荧光微球;

用50mM、pH8.5的硼砂缓冲液洗涤该活化后羧基修饰的荧光微球,取0.37mg上述待标记AFB1抗体分别和5mg上述活化后羧基修饰的荧光微球混合到50mM pH8.5的硼砂缓冲液中充分混匀;

室温避光反应2小时,让抗体和荧光微球形成稳定的肽键共价结合得到荧光微球与AFB1抗体的偶联物;

反应结束后,加入终浓度为1%的BSA溶液对荧光微球与AFB1抗体的偶联物上剩余活性羧基位点进行封闭,室温避光反应0.5小时;

完成后,用pH 7.4的0.02M PBS缓冲液洗涤、重悬得到5mg/ml荧光微球标记AFB1抗体液

体,4℃保存待用。

9.根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤8)中将上述步骤所得荧光微球标记荧光量子点标记AFB1抗体混合液,采用BioDot的XYZ3050喷膜系统将其按照2.5uL/cm喷量喷涂至处理过的玻璃纤维素膜上制备形成抗体结合垫,然后用网格托盘将其移入一个真空干燥箱内,真空干燥2h,加入干燥剂或变色硅胶,密封保存于4℃冰箱中。

10.根据权利要求1所述一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法,其特征在于,步骤9)中将标记好的荧光量子点抗体复合物喷涂于结合垫上;采用黄曲霉毒素B1 检测抗原并将其包被在 NC 膜表面作为检测线;羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜表面作为质控线;将结合垫、吸水纸和处理过的样品垫最后组装成黄曲霉毒素B1检测试纸条。

一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及黄曲霉素,尤其涉及一种利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法。

背景技术

[0002] 量子点标记的免疫层析技术由于具有胶体金免疫层析检测技术的全部优点而且具有更高的灵敏度而受到广泛的关注。量子点主要是由主族元素 II ~ VI, III ~ V 如 CdSe、CdTe、InP 组成的纳米颗粒,粒径一般介于 1~100 nm 之间。由于电子和空穴被量子限域,连续的能带结构变成具有分子特性的分立能级结构,受激后可以发射荧光。量子点由于存在显著的量子尺寸效应和表面效应,从而使它具有常规材料所不具备的光吸收特性,使其应用领域越来越广,特别是其在临床检验学和免疫学检测研究中的应用价值,引起了科学工作者的极大关注,发光量子点作为荧光探针标记生物大分子,是近年来纳米材料在生物分析领域的重要应用之一。

[0003] 综合现在的免疫学检测方法,量子点在标记免疫分析方面展现了诱人的前景。将荧光分析与免疫层析相结合应用于现在的免疫层析快速检测,其灵敏性相较于胶体金有较大的提高。另外利用不同粒径量子点具有不同颜色的特点将不同的量子点标记不同的抗体,并且制备成免疫层析试纸条,将有望实现利用一条试纸条同时检测不同的物质,极大的提高了食品安全检测的效率。

[0004] 基于量子点用于免疫层析快速检测的诸多优势,本发明拟将该技术应用于黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFB)在粮食和饲料安全方面的快速检测中,并研发相关的检测试纸条,有较好的市场前景和广泛的社会效益。

[0005] 黄曲霉毒素中毒(Aflatoxicosis)主要对动物肝脏的伤害,受伤害的个体因动物种类年龄,性别和营养状态而异。研究结果表明黄曲霉毒素可导致肝功能下降,降低牛奶产量和产蛋率并使动物的免疫力降低易受有害微生物的感染。此外,长期食用含低浓度黄曲霉毒素的饲料也可导致胚胎内中毒。通常年幼的动物对黄曲霉毒素更敏感,黄曲霉毒素的临床表现为消化系统功能紊乱降低生育能力,降低饲料利用率,贫血等。

[0006] 黄曲霉毒素B1的半数致死量为0.36毫克/公斤体重,属特剧毒的毒物范围(动物半数致死量<10毫克/公斤=它的毒性比氰化钾大10倍比砒霜大68倍)。它引起人的中毒主要是损害肝脏,发生肝炎肝硬化,肝坏死等。综上所述,黄曲霉毒素快速检测试纸条的研制,对保障粮食、饲料安全显得尤为关键。

发明内容

[0007] 本发明针对以上问题,提供了方便加工,提高检测速度的利用黄曲霉素制备荧光量子点免疫层析检测卡的方法。

[0008] 本发明包括以下步骤:包括以下步骤:

1) 材料选择;

- 2) 荧光量子点试剂配方;
- 3) 黄曲霉毒素免疫抗原的合成;
- 4) 黄曲霉毒素特异性抗体的制备;
- 5) 单克隆抗体亲和常数及效价检测;
- 6) 黄曲霉毒素检测抗原合成;
- 7) 荧光微球标记黄曲霉毒素b1抗体的制备;
- 8) AFB1抗体结合垫制备;
- 9) 黄曲霉毒素b1荧光量子点检测试剂条的制备;
- 10) 完成。

[0009] 步骤1)中的材料包括MES、NHS、碳二亚胺、2-(N-吗啉代)乙磺酸、牛血清白蛋白、Tween-20、Tritonx-100、PVP-40;

HAT培养基、荧光微球、羊抗鼠二抗、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜和吸水纸。

[0010] 步骤2)包括:

硼砂缓冲液配置:硼酸6.183g,硼酸钠6.864g;超纯水定容至860mL;0.22 μ m膜滤过,置4℃备用;

0.1M、pH4.7MES缓冲液:19.52gMES,58.44g氯化钠加超纯水至1L,用氢氧化钠调节PH值至4.7,置4℃储存不超过一周;

10% BSA的配制:100.0g BSA;超纯水定容至1000.0mL;0.22 μ m膜滤过,置4℃备用;

10% PVP-40的配制:100.0g PVP-40;超纯水定容至1000.0mL;0.22 μ m膜滤过,置4℃备用;

10% Tween-20的配制:100.0mL Tween-20;超纯水稀释定容至1000.0mL;0.22 μ m膜滤过,置4℃备用;

10% 叠氮钠的配制:100.0g 叠氮钠;超纯水定容至1000.0mL;0.22 μ m膜滤过,置4℃备用;

玻璃器皿清洁液:重铬酸钾1000g,浓硫酸2500mL,加蒸馏水至10000mL;

抗体标记物稀释缓冲液的配制:取50g 蔗糖于250mL试剂瓶中,加入5mL10%BSA,3mL10%Tween-20,2mL10%PVP-40,0.2M PH7.4 PB定容至100mL,加入200 μ L10%叠氮钠;

玻纤垫片处理液的配置:称取海藻糖30.0g、BSA 5g、蔗糖15g于1000mL试剂瓶中,加入0.02mol/L PBS (pH7.4) 100mL,5mL山羊血清,3.1mL Triton-100,加超纯水定容至1L;

样品垫处理液的配置:称取海藻糖1.8g、BSA 6g、酪蛋白2.5g、BRIJ-35 5g、PVP-k40 5.4g、Na₂HPO₄ 13.578g、NaH₂PO₄ 2.8g、NaCl 4.015g于1000mL试剂瓶中,加入5mL Tween-20,加超纯水定容至1L;

抗原、二抗稀释液的配置:称取2g海藻糖于250mL试剂瓶中,加入1mL甲醇、5mL10%丙三醇,加0.02mol/L PBS定容至100mL;

0.2 mol/LPB:称取 2.3gNa₂HPO₄和0.456g NaH₂PO₄,加超纯水溶解后定容至1000mL,高压灭菌20min后常温保存,工作液pH值7.4;

0.02mol/L PBS称取 17.4g NaCl,2.3gNa₂HPO₄和0.456g NaH₂PO₄,加超纯水溶解后定容至1000mL,高压灭菌20min后常温保存,工作液pH值7.4;

5%二氯二钾硅烷的氯仿溶液:将25mL 二氯二钾硅烷溶解在 475mL 的氯仿溶液中,密

封保存。

[0011] 步骤3) 中将黄曲霉毒素b1溶于无水甲醇中,加入吡啶,然后加入羧甲基羟胺半盐酸盐,旋转蒸发掉溶剂并过柱纯化得到半抗原;

取半抗原溶于DMF中,加入活化剂反应过夜,将反应液加入溶有OVA的PBS中,反应后用0.01MPBS透析获得黄曲霉毒素B1免疫抗原。

[0012] 步骤4) 包括如下步骤:

- 4.1) 小鼠免疫;
- 4.2) 细胞融合;
- 4.3) 杂交瘤细胞筛选;
- 4.4) 腹水的制备及纯化。

[0013] 步骤5) 采用间接ELISA方法,将两株单克隆抗体用样品稀释液从200倍开始进行2倍梯度稀释,进行检测。

[0014] 步骤6) 将黄曲霉毒素b1溶于无水乙醇中,加入吡啶,然后加入羧甲基羟胺半盐酸盐反应后,旋转蒸发掉溶剂并过柱纯化得到半抗原;取半抗原溶于DMF中,加入活化剂反应过夜,然后将反应液加入溶有BSA的PBS中,反应后用0.01 M PBS透析获得黄曲霉毒素b1检测抗原。

[0015] 步骤7) 中以平均直径为110nm、羧基修饰的荧光微球,抗AFB1单克隆抗体,按照下述方法制备荧光微球标记A型流感病毒标记抗体:

取5mg的上述羧基修饰的荧光微球用MES缓冲液洗涤并离心后,用1ml MES缓冲液重悬,加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺至终浓度为5mM、加入NHS至终浓度为10mM,室温避光,反应半小时得到活化后羧基修饰的荧光微球;

用50mM、pH8.5的硼砂缓冲液洗涤该活化后羧基修饰的荧光微球,取0.37mg上述待标记AFB1抗体分别和5mg上述活化后羧基修饰的荧光微球混合到50mM pH8.5的硼砂缓冲液中充分混匀;

室温避光反应2小时,让抗体和荧光微球形成稳定的肽键共价结合得到荧光微球与AFB1抗体的偶联物;

反应结束后,加入终浓度为1%的BSA溶液对荧光微球与AFB1抗体的偶联物上剩余活性羧基位点进行封闭,室温避光反应0.5小时;

完成后,用pH 7.4的0.02M PBS缓冲液洗涤、重悬得到5mg/ml荧光微球标记AFB1抗体液体,4℃保存待用。

[0016] 步骤8) 中将上述步骤所得荧光微球标记荧光量子点标记AFB1抗体混合液,采用BioDot的XYZ3050喷膜系统将其按照2.5uL/cm喷量喷涂至处理过的玻璃纤维素膜上制备形成抗体结合垫,然后用网格托盘将其移入一个真空干燥箱内,真空干燥2h,加入干燥剂或变色硅胶,密封保存于4℃冰箱中。

[0017] 步骤9) 中将标记好的荧光量子点抗体复合物喷涂于结合垫上;采用黄曲霉毒素B1检测抗原并将其包被在 NC 膜表面作为检测线;羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜表面作为质控线;将结合垫、吸水纸和处理过的样品垫最后组装成黄曲霉毒素B1检测试纸条。

[0018] 本发明中的AFB1免疫荧光量子点检测卡特异性强,检测同族黄曲霉毒素以及其他真菌毒素结果均为阴性。反应时间一般在3-5 min,与传统的色谱,ELISA等检测方法相比大

大缩短了检测时间,提高了检测速度,且彻底摆脱了大型设备的限制。本发明中的检测卡其检测灵敏度达到1 ppb,高于同类型胶体金产品。

附图说明

[0019] 图1是本发明的结构示意图。

具体实施方式

[0020] 本发明如图1所示,包括以下步骤:

- 1) 材料选择;
- 2) 荧光量子点试剂配方;
- 3) 黄曲霉毒素免疫抗原的合成;
- 4) 黄曲霉毒素特异性抗体的制备;
- 5) 单克隆抗体亲和常数及效价检测;
- 6) 黄曲霉毒素检测抗原合成;
- 7) 荧光微球标记黄曲霉毒素b1抗体的制备;
- 8) AFB1抗体结合垫制备;
- 9) 黄曲霉毒素b1荧光量子点检测试剂条的制备;
- 10) 完成。

[0021] 步骤1)中的材料包括MES (2- (N-吗啡啉) 乙磺酸)、NHS (N-羟基丁二酰亚胺)、碳二亚胺 (EDC)、2- (N-吗啡啉代) 乙磺酸、牛血清白蛋白 (BSA)、Tween-20, Tritonx-100、Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) 为sigma公司产品;

HAT培养基,阳性血清 (抗黄曲霉毒素b1小鼠血清) 购自哈兽研,阴性血清由实验室制备。

[0022] 荧光微球购自Bangs Laboratories, Inc. 公司,产品目录号为FC02F/10930;

羊抗鼠二抗,购于长沙博优生物科技有限公司,ABGAM-0500;

硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose membrane) 购于waterman 和Schleicher&Schuell公司;

玻璃纤维膜 (glass fibre)、吸水纸 (absorbent paper),支持板均购于上海金标生物科技有限公司。

[0023] 步骤2) 包括:

硼砂缓冲液配置:硼酸6.183g,硼酸钠6.864g;超纯水定容至860mL;0.22μm膜滤过,置4℃备用;

0.1M、pH4.7MES缓冲液:19.52gMES,58.44g氯化钠加超纯水至1L,用氢氧化钠调节PH值至4.7,置4℃储存不超过一周;

10% BSA的配制:100.0g BSA;超纯水定容至1000.0mL;0.22μm膜滤过,置4℃备用;

10% PVP-40的配制:100.0g PVP-40;超纯水定容至1000.0mL;0.22μm膜滤过,置4℃备用;

10% Tween-20的配制:100.0mL Tween-20;超纯水稀释定容至1000.0mL;0.22μm膜滤过,置4℃备用;

10% 叠氮钠的配制:100.0g 叠氮钠;超纯水定容至1000.0mL;0.22μm膜滤过,置4℃备

用;

玻璃器皿清洁液:重铬酸钾1000g,浓硫酸2500mL,加蒸馏水至10000mL;

抗体标记物稀释缓冲液的配制:取50g 蔗糖于250mL试剂瓶中,加入5mL10%BSA,3mL10% Tween-20,2mL10%PVP-40,0.2M PH7.4 PB定容至100mL,加入200uL10%叠氮钠;

玻纤垫片处理液的配置:称取海藻糖30.0g、BSA 5g、蔗糖15g于1000mL试剂瓶中,加入0.02mol/L PBS (pH7.4) 100mL,5mL山羊血清,3.1mL Triton-100,加超纯水定容至1L;

样品垫处理液的配置:称取海藻糖1.8g、BSA 6g、酪蛋白2.5g、BRIJ-35 5g、PVP-k40 5.4g、 Na_2HPO_4 13.578g、 NaH_2PO_4 2.8g、NaCl 4.015g于1000mL试剂瓶中,加入5mL Tween-20,加超纯水定容至1L;

抗原、二抗稀释液的配置:称取2g海藻糖于250mL试剂瓶中,加入1mL甲醇、5mL10%丙三醇,加0.02mol/L PBS (pH7.4) 定容至100mL;

0.2 mol/LPB (pH7.4):称取 2.3g Na_2HPO_4 和0.456g NaH_2PO_4 ,加超纯水溶解后定容至1000mL,高压灭菌20min后常温保存,工作液pH值7.4;

0.02mol/L PBS (pH7.4) 称取 17.4g NaCl,2.3g Na_2HPO_4 和0.456g NaH_2PO_4 ,加超纯水溶解后定容至1000mL,高压灭菌20min后常温保存,工作液pH值7.4;

5%二氯二钾硅烷的氯仿溶液:将25mL 二氯二钾硅烷溶解在 475mL 的氯仿溶液中,密封保存。

[0024] 步骤3)中将黄曲霉毒素b1溶于无水甲醇中,加入吡啶,然后加入羧甲基羟胺半盐酸盐,旋转蒸发掉溶剂并过柱纯化得到半抗原;

取半抗原溶于DMF中,加入活化剂反应过夜,将反应液加入溶有OVA的PBS中,反应后用0.01MPBS透析获得黄曲霉毒素B1免疫抗原。

[0025] 步骤4)包括如下步骤:

- 4.1)小鼠免疫;
- 4.2)细胞融合;
- 4.3)杂交瘤细胞筛选;
- 4.4)腹水的制备及纯化。

[0026] 具体如下:4.1)小鼠免疫

取黄曲霉毒素b1免疫抗原60 μg 与等量弗氏不完全佐剂完全混合成乳液,对4只编号为1,2,3,4的雌性Balb/c小鼠皮下多次进行初次免疫,两周后取黄曲霉毒素b1 30 μg 与等量的弗氏不完全佐剂混合进行加强免疫,共3次免疫雌性BALB/c小鼠。对免疫好的小鼠进行尾静脉采血,于37 $^{\circ}\text{C}$ 静置1h后4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,收集血清。进行间接ELISA方法检测免疫血清效价,并设置空白对照和阴性对照。最终确定可以和与小鼠骨髓瘤细胞SP/20进行融合的Balb/c小鼠,取黄曲霉毒素b1 50 μg 进行腹腔注射免疫。

[0027] 4.2)细胞融合

取正常小鼠的腹腔巨噬细胞作为饲养层细胞,取免疫小鼠的脾细胞与SP/20细胞,加入语文的选择培养基HAT.37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,在PEG1500的作用下进行细胞融合。加入无血清的IMDM终止融合,离心,加入新生牛血清及准备好的胸腺细胞,加入半固体培养基中混匀,倒入培养皿中,加入培养箱培养。

[0028] 4.3)杂交瘤细胞筛选

将融合后的细胞培养与96孔板中,用2 μ g/mL的“黄曲霉毒素b1”包板,吸取有杂交瘤细胞生长的细胞孔的培养上清,采用上述间接ELISA进行筛选。阴性对照为SP/20细胞培养上清、空白对照为PBS、阳性对照为阳性血清用PBS稀释100倍。筛选共进行两次。加入终止液,将96孔板于双波长(450nm,630nm)处测定吸光值。

[0029] 4.4)腹水的制备及纯化

取石蜡油500 μ L腹腔注射10周龄Balb/c小鼠。给Balb/c小鼠注射阳性杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$ 个。待小鼠腹腔明显膨大后,采集腹水。将采集的腹水与5000r/min离心10 min,取上清,将上清用Protein A柱进行纯化。将上清稀释并离心,使用0.22 μ m滤膜过滤除菌。用10倍柱体积的偶联缓冲液平衡柱子,保持流速为1 mL/min。上样,保持相同流速,收集液体。再使用5倍柱体积偶联缓冲液过柱,等量洗脱缓冲液洗脱抗体。调整pH,使用PBS过夜透析抗体。将抗体分装冻存。

[0030] 步骤5)采用间接ELISA方法,将两株单克隆抗体用样品稀释液从200倍开始进行2倍梯度稀释,进行检测。

[0031] 步骤6)将黄曲霉毒素b1溶于无水乙醇中,加入吡啶,然后加入羧甲基羟胺半盐酸盐反应后,旋转蒸发掉溶剂并过柱纯化得到半抗原;取半抗原溶于DMF中,加入活化剂反应过夜,然后将反应液加入溶有BSA的PBS中,反应后用0.01 M PBS透析获得黄曲霉毒素b1检测抗原。

[0032] 步骤7)中以平均直径为110nm、羧基修饰的荧光微球,抗AFB1单克隆抗体,按照下述方法制备荧光微球标记A型流感病毒标记抗体:

取5mg的上述羧基修饰的荧光微球用MES缓冲液(0.1M、pH4.7)洗涤并离心后,用1ml MES缓冲液重悬,加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)至终浓度为5mM、加入NHS(N-羟基丁二酰亚胺)至终浓度为10mM,室温避光,反应半小时得到活化后羧基修饰的荧光微球;

用50mM、pH8.5的硼砂缓冲液洗涤该活化后羧基修饰的荧光微球,取0.37mg上述待标记AFB1抗体分别和5mg上述活化后羧基修饰的荧光微球混合到50mM pH8.5的硼砂缓冲液中充分混匀;

室温避光反应2小时,让抗体和荧光微球形成稳定的肽键共价结合得到荧光微球与AFB1抗体的偶联物;

反应结束后,加入终浓度为1% (m/v) 的BSA溶液对荧光微球与AFB1抗体的偶联物上剩余活性羧基位点进行封闭,室温避光反应0.5小时;

完成后,用pH 7.4的0.02M PBS缓冲液洗涤、重悬得到5mg/ml荧光微球标记AFB1抗体液体,4 $^{\circ}$ C保存待用。

[0033] 步骤8)中将上述步骤所得荧光微球标记荧光量子点标记AFB1抗体混合液,采用BioDot的XYZ3050喷膜系统将其按照2.5 μ L/cm喷量喷涂至处理过的玻璃纤维素膜上制备形成抗体结合垫,然后用网格托盘将其移入一个真空干燥箱内,真空干燥2h,加入干燥剂或变色硅胶,密封保存于4 $^{\circ}$ C冰箱中。

[0034] 步骤9)中将标记好的荧光量子点抗体复合物喷涂于结合垫上;采用黄曲霉毒素B1检测抗原并将其包被在 NC 膜表面作为检测线(T线);羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜(NC)表面作为质控线(C线);将结合垫、吸水纸和处理过的样品垫最后组装成黄曲霉毒素B1

检测试纸条。

[0035] 在10万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的具有检测线和质控线的包被膜、上述样品垫、吸水垫、背板按图1所示进行搭配组装后,采用BioDot的CM4000裁切系统将贴好的纸板裁切,装入检测用夹片待用。

[0036] AFB1荧光量子点检测试纸条灵敏性结果:

将AFB1检测抗原进行不同浓度抗原检测,采用所建立的黄曲霉毒素b1荧光量子点检测试纸条进行检测,其检测结果如下所示。

[0037] 表1 AFB1荧光量子点检测卡不同样品浓度检测结果

浓度(ppb)	50	100	50	20	10	5	3	1	0.5
结果	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注: +表示加样反应后检测线明显, -表示加样反应后无检测线。

[0038] 从检测结果中可以得出AFB1荧光量子点检测试纸条检测AFB1抗原的灵敏度为1 ppb。

[0039] AFB1 荧光量子点检测试纸条特异性结果:

采用所建立的AFB1免疫荧光量子点检测卡对AFB2,AFM1,AFG等多种同类毒素进行检测,检测结果均为阴性。对其他种类真菌毒素进行检测,如呕吐毒素、赭曲霉毒素A、伏马毒素、玉米赤霉烯酮、展青霉素和T-2毒素,其检测结果也均为阴性。

[0040] 取样检测试验结果:

对采集的试验样品共200份,全部进行AFB1免疫荧光量子点检测卡和ELISA检测,两者检测结果如表2,表明所建立的方法使用性较强。

[0041] 表2 AFB1免疫荧光量子点检测卡样品检测结果

临床样品	阴性	阳性	总计/份
AFB1 荧光量子点检测	183	17	200
ELISA 检测	185	15	200
符合率	99%		

注: ELISA法检测计算浓度 ≥ 1 ppb判定为阳性,浓度小于1ppb判定为阴性。

[0042] 本发明的最终取样试验出现假阳性的原因可能与试验判定方式有关,AFB1免疫荧光量子点检测卡的最低检测浓度在1ppb左右,为了保证两种检测方式的可比性,我们将ELISA法的结果换算成黄曲霉毒素B1浓度,浓度 ≥ 1 ppb时判定为阳性,而根据表1实验结果表明本实验制备的AFB1检测卡检测浓度在0.5-1ppb之间,其中可能存在少量误差。

[0043] 对于本案所公开的内容,还有以下几点需要说明:

(1)、本案所公开的实施例附图只涉及到与本案所公开实施例所涉及到的结构,其他结构可参考通常设计;

(2)、在不冲突的情况下,本案所公开的实施例及实施例中的特征可以相互组合以得到新的实施例;

以上,仅为本案所公开的具体实施方式,但本公开的保护范围并不局限于此,本案所公开的保护范围应以权利要求的保护范围为准。

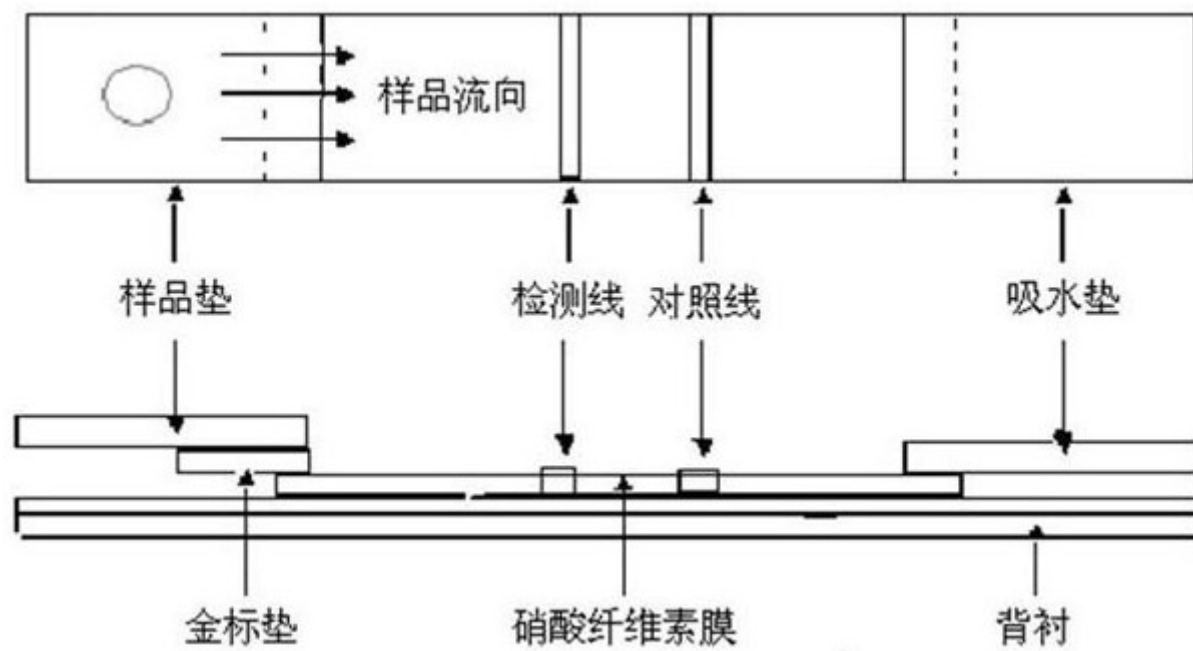


图1