



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108614106 A

(43)申请公布日 2018.10.02

(21)申请号 201810318997.3

(22)申请日 2018.04.11

(71)申请人 江苏省苏微微生物研究有限公司

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路7号

(72)发明人 张海涛 张一平 龚燕 董曼佳
杨婷婷 王红连 陆丽婷 华洵璐
秦海萍 叶进 匡群

(74)专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 张仕婷

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

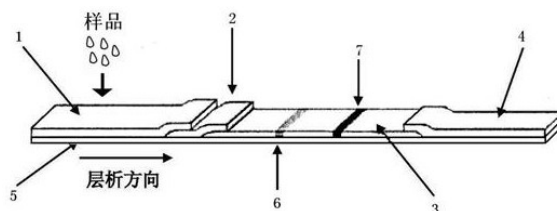
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡

(57)摘要

一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡,属于免疫层析和食品安全检测领域。本层析卡由样品垫、标记垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸和PVC底板组成。标记垫固定有纳米钨荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2。抗体1对呕吐毒素和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇有高度特异性;抗体2对呕吐毒素和3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇有高度特异性。本发明基于抗原抗体免疫学原理进行检测。本层析卡与便携式时间分辨荧光免疫分析仪联用,用于谷物及其制品中呕吐毒素及其乙酰化衍生物总量的快速定量检测,灵敏度高、稳定性好;检出限0.168 mg/kg,检测范围0.17~5 mg/kg,时间10~15min,操作简便,不需专业培训,广泛适用于各种场合和不同层次人员的需要。



1. 一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡,其特征就在于所述层析卡包括由样品垫(1)、标记垫(2)、硝酸纤维素NC膜(3)、吸水滤纸(4)和PVC底板(5)组成;所述标记垫(2)上固定有纳米钬荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2;所述抗体1对呕吐毒素DON和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇15-Ac-DON表现出高度的特异性;所述抗体2对呕吐毒素DON和3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇3-Ac-DON表现出高度的特异性;所述NC膜上喷涂有测试线T线(6)和控制线C线(7),T线固定有呕吐毒素-牛血清白蛋白DON-BSA包被抗原,C线固定有羊抗鼠抗体IgG。

2. 权利要求1所述检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡的制备方法,其特征就在于步骤为:

(1) 样品垫的制备:用含牛血清白蛋白BSA、吐温-20的磷酸缓冲液,浸泡玻璃纤维或聚酯纤维材料垫,然后置于温箱中烘干,获得样品垫;

(2) 标记垫的制备:用含牛血清白蛋白BSA、吐温-20的磷酸缓冲液,浸泡玻璃纤维或聚酯纤维材料垫,然后置于温箱中烘干;将纳米钬荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2,分别用含有海藻糖、蔗糖、BSA、吐温-20的磷酸缓冲液稀释,然后用喷金仪喷涂于该烘干后的材料垫上,置于温箱中烘干,获得标记垫;

(3) NC膜的制备:用含蔗糖的磷酸缓冲液,溶解包被抗原DON-BSA,使得浓度为0.4~0.8 mg/mL;然后采用自动喷膜仪喷涂在NC膜上,喷量为0.5~3 $\mu\text{L}/\text{cm}$,得到T线;用相同的磷酸缓冲液,溶解羊抗鼠IgG,使得浓度为0.8~1.2 mg/mL;然后采用自动喷膜仪喷涂在距离T线右侧3~5 mm位置处,喷量为0.5~3 $\mu\text{L}/\text{cm}$,得到C线;在温箱内烘干,获得NC膜;

(4) 层析卡的组装:以PVC 底板为衬板,将制备好的样品垫、标记垫、NC膜与吸水滤纸,由左端依次粘贴在底板上,并且相互之间有1~3 mm的交联,然后用切割机切割成一定尺寸的长条,装于塑料卡壳中,用压壳机压紧。

3. 根据权利要求2所述检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡的制备方法,其特征就在于步骤(2)中使用的纳米钬荧光微球为表面带有羧基的聚苯乙烯荧光微球,是通过以下步骤获得的:首先采用 β -二酮类螯合剂BHHCT 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-酰基)-氯磺化邻三联苯与烯丙基胺 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 反应,引入C=C双键,制备成可聚合的螯合物单体;再与 EuCl_3 反应,转化为基于钬离子发光原理的可聚合荧光螯合物单体;然后采用分散聚合法结合超声波辐照技术,在聚乙烯吡咯烷酮PVP、偶氮二异丁腈AIBN的参与下,与苯乙烯单体共价结合,制备出小粒径聚苯乙烯荧光微球;最后采用十一烯酸包覆法,利用微球表面的双键与十一烯酸的双键共聚,实现十一烯酸在微球表面的包覆,从而制备出羧基聚苯乙烯荧光微球;该微球直径为70~100 nm,变异系数CV值<5%,激发和发射波长分别为365 nm和615 nm。

4. 根据权利要求2所述检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡的制备方法,其特征就在于步骤(2)中使用的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2,是分别采用抗呕吐毒素杂交瘤细胞株SW-3 F4及SW-3 G12,经过体外培养、小鼠腹腔注射、采集腹水、提取纯化、抗体特异性鉴定而获得的;其中,抗体1与呕吐毒素DON交叉反应率100%,与15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇15-Ac-DON的交叉反应率 $\geq 100\%$,对DON和15-Ac-DON表现出高度的特异性;抗体2与呕吐毒素DON交叉反应率100%、与3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇3-Ac-DON的交叉反应率 $\geq 100\%$,对DON和3-Ac-DON表现出高度的特异性。

5. 根据权利要求2所述检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡的制备方法,其特征在于步骤(2)中纳米铕荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2,是通过以下步骤获得的:首先采用2-(N-吗啡啉)乙磺酸MES缓冲液清洗空白微球,然后用N-羟基琥珀酰亚胺NHS和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺EDC活化微球表面的羧基;接着加入抗体1或抗体2,通过EDC的中间介导作用,使微球表面的羧基与抗体的氨基发生酰胺化反应,形成偶联物,再采用BSA与乙醇胺 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 封闭微球表面未反应的羧基,最后得到的标记物抗体偶联率 $\geq 80\%$ 。

6. 权利要求1所述检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡的应用,其特征在于用于检测谷物及其制品中呕吐毒素及其乙酰化衍生物的总量,包括如下检测步骤:

(1) 以呕吐毒素系列标准品作为被检测样品,采用所述的时间分辨荧光免疫层析卡进行检测,用时间分辨荧光免疫分析仪进行结果显示,绘制标准曲线;

(2) 以经过样本前处理获得的提取液作为被检测样品,采用所述的时间分辨荧光免疫层析卡进行检测,用时间分辨荧光免疫分析仪进行结果显示,并结合标准曲线进行定量分析。

一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物总量的时间分辨荧光免疫层析卡,具体涉及其制备方法和应用于快速检测的方法,属于免疫层析技术领域和食品安全检测领域。

背景技术

[0002] 呕吐毒素又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol,DON,以下用英文简写),属单端孢霉烯族化合物,化学名称为3 α ,7 α ,15-三羟基草镰孢菌-9-烯-8-酮,其结构为四环的倍半萜,分子式为C₁₅H₂₀O₆,分子量296.3。呕吐毒素主要有两种乙酰化的衍生物,分别为3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-Ac-DON,以下用英文简写)和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-Ac-DON,以下用英文简写);现有测定数据表明,这两种乙酰化衍生物大约占谷物中总DON量的10%左右。

[0003] 呕吐毒素及其乙酰化衍生物,主要由镰刀菌属*Fusarium*的几个种产生,尤其是禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)。小麦、大麦、玉米等谷类作物,当生长或贮藏于潮湿高温环境条件时,极易受此类菌的侵染,导致毒素剧增。

[0004] DON及其乙酰化衍生物的性质稳定,耐热、耐压、耐弱酸、耐储藏,一般的食品加工不能破坏其结构。人和动物在误食被此类毒素污染的食物后,会产生呕吐、厌食、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝、免疫抑制和血液病等毒性反应。近年来发现DON及其衍生物可能与人类食管癌、IgA肾病有关,有明显细胞毒性、胚胎毒性和一定致畸作用,并可能有遗传毒性。最新的动物研究表明,DON及其衍生物可以和其他真菌毒素产生联合作用,加剧动物肝、肾脏细胞膜损伤和氧化损伤,导致动物过早死亡。

[0005] DON已被联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)确定为最危险的自然发生食品污染物之一;在1998年国际癌症研究机构公布的评价报告中,被列为三类致癌物。国际食品添加剂联合专家委员会(JECFA)认为,两种乙酰衍生物3-Ac-DON和15-Ac-DON的毒性与DON相当,在生物体消化系统内可通过乙酰化基团的水解,转化为DON而诱导毒性,因此于2010年对DON及其乙酰衍生物总和的每日容许最大摄入量确定为1.0 μ g/kg/d。欧盟正在考虑将目前执行的单一DON限量标准修订为DON及其衍生物(包括隐蔽型)之和。因此跟踪国际新标准,将我国现行食品中针对DON单一限量修订为DON及其衍生物之和为大势所趋。需特别指出的是,我国于2014年国家食品安全风险监测计划中,已明确要求检测小麦粉、燕麦(含燕麦片)、婴幼儿谷物类辅助食品中的DON、3-Ac-DON和15-Ac-DON三种化合物。

[0006] 国家标准GB5009.111-2016中规定了采用同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定谷物及食品中DON、3-Ac-DON和15-Ac-DON的含量。国家出入境检验检疫行业标准SN/T3137-2012中规定了采用液相色谱-质谱/质谱法检测出口食品中DON、3-Ac-DON和15-Ac-DON的含量。色谱法具有准确度、精密度和灵敏度高的优点,但仪器昂贵、样品前处理复杂、成本高、不能现场操作,对操作人员要求高。

[0007] 基于抗原抗体特异性反应的免疫学检测技术是目前应用最广泛的技术,主要有酶联免疫吸附法、免疫层析法等。前者需要培训专业操作人员、测定耗时0.5~1小时,并且经常出现假阳性结果,无法达到实时监控的目的。后者以胶体金免疫层析法为代表,操作简单、方便、快速且便宜,但灵敏度较低,不能定量检测。

[0008] 时间分辨荧光免疫分析法是近年来新兴起的一种快速免疫层析检测技术,其原理是利用具有特殊荧光的镧系离子与螯合剂结合作为示踪物,被标记的抗体在一定的抗原抗体免疫反应体系中发生反应,用时间分辨荧光免疫分析仪测定产物中的特异荧光强度,推测反应体系中分析物的浓度,从而达到对待测物定量分析的目的。基于该技术的时间分辨荧光免疫层析卡,除了兼具胶体金免疫层析卡的优点外,还具有更灵敏、更稳定、更准确等优点,因而适合于现场快速定量检测,成为了真菌毒素快检产品的开发重点。

[0009] 目前已有CN105067811A公布了一种检测T-2毒素的时间分辨荧光微球免疫层析卡的制备方法,CN102841204B授权了一种玉米赤霉烯酮时间分辨荧光免疫快检试纸条的制备方法。专利CN106153929A则是通过将荧光微球标记的呕吐毒素抗原固定于标记垫、将呕吐毒素抗体固定于捕获膜,来制备荧光免疫层析试纸条,其在权利要求书中并没有明确指明采用何种荧光微球,仅在说明书中提及采用基于钬复合物的荧光微球作为标记物之一。因此,国内涉及呕吐毒素时间分辨荧光免疫层析卡的专利很少;尤其在呕吐毒素及其乙酰化衍生物总量的快速定量测定方面,至今没有专利公开。

发明内容

[0010] 本发明的目的是针对当前本领域面临的问题和发展趋势,以及现有技术的不足,提供一种操作简单、携带方便、检测成本低、快速准确、稳定性好、灵敏度高、适用于快速定量检测的荧光免疫层析卡。

[0011] 本发明的更进一步目的是提供一种能测定谷物及其制品中DON、3-Ac-DON和15-Ac-DON总量的时间分辨荧光免疫层析卡。

[0012] 本发明的另一个目的是提供上述时间分辨荧光免疫层析卡的制备方法。

[0013] 本发明的再一个目的是提供上述时间分辨荧光免疫层析卡在快速检测中的应用方法。

[0014] 本发明的上述目的是通过如下技术方案予以实现的。

[0015] 一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡,所述层析卡包括由样品垫、标记垫、硝酸纤维素膜NC、吸水滤纸和PVC底板组成;所述标记垫上固定有纳米钬荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2;所述抗体1对呕吐毒素DON和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇15-Ac-DON表现出高度的特异性;所述抗体2对呕吐毒素DON和3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇3-Ac-DON表现出高度的特异性;所述NC膜上喷涂有测试线T线和控制线C线,T线固定有呕吐毒素-牛血清白蛋白DON-BSA包被抗原,C线固定有羊抗鼠抗体IgG。

[0016] 其制备方法包括如下步骤:

(1) 样品垫的制备

用含0.5%~1%(m/v)牛血清白蛋白(BSA)、0.5%~2%(v/v)吐温-20的0.1 M pH7.4磷酸缓冲液,浸泡玻璃纤维或聚酯纤维等材料垫,然后置于37℃温箱中烘干0.5~3小时,获得样品垫。

[0017] (2) 标记垫的制备

用含0.5%~1% (m/v) 牛血清白蛋白 (BSA)、0.5%~2% (v/v) 吐温-20的0.1 M pH7.4磷酸缓冲液,浸泡玻璃纤维或聚酯纤维等材料垫,然后置于37 °C温箱中烘干0.5~3小时。将纳米钨荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2,分别用含有2%~8% (m/v) 海藻糖、1%~3% (m/v) 蔗糖、0.2%~0.8% (m/v) BSA、0.2%~0.8% (v/v) 吐温-20的0.1 M pH7.4磷酸缓冲液稀释30~120倍;然后用喷金仪喷涂于上述烘干后的材料垫上,置于37 °C温箱中烘干1~3小时,获得标记垫。

[0018] (3) NC膜的制备

用含0.5%~2% (m/v) 蔗糖的0.01 M pH7.4磷酸缓冲液,溶解包被抗原DON-BSA,使得浓度为0.4~0.8 mg/mL,优选0.5 mg/mL;然后采用自动喷膜仪喷涂在NC膜上,喷量为0.5~3 μ L/cm,优选1 μ L/cm,得到T线。用相同的磷酸缓冲液,溶解羊抗鼠IgG,使得浓度为0.8~1.2 mg/mL,优选1 mg/mL,然后采用自动喷膜仪喷涂在距离T线右侧3~5 mm位置处,喷量为0.5~3 μ L/cm,优选1 μ L/cm,得到C线。将喷好T线、C线的NC膜,在37 °C温箱中烘干6~12小时,获得NC膜。

[0019] (4) 层析卡的组装

以PVC 底板为衬板,将制备好的样品垫、标记垫、NC膜与吸水滤纸,由左端依次粘贴在底板上,并且相互之间有约1~3 mm的交联。然后用切割机切割成2~6 mm宽、40~80 mm长的板条,装于塑料卡壳中;用压壳机压紧,放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存。层析卡的组装示意图见图1。

[0020] 上述步骤(2)中,所使用的纳米钨荧光微球为表面带有羧基的聚苯乙烯荧光微球,是通过以下步骤获得的:首先采用 β -二酮类螯合剂BHHCT (4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-酰基)-氯磺化邻三联苯)与烯丙基胺($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)反应,引入C=C双键,制备成可聚合的螯合物单体;再与 EuCl_3 反应,转化为基于钨离子发光原理的可聚合荧光螯合物单体。然后采用分散聚合法结合超声波辐照技术,在聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、偶氮二异丁腈(AIBN)的参与下,与苯乙烯单体共价结合,制备出小粒径聚苯乙烯荧光微球。最后采用十一烯酸包覆法,利用微球表面的双键与十一烯酸的双键共聚,实现十一烯酸在微球表面的包覆,从而制备出羧基聚苯乙烯荧光微球。该微球直径为70~100 nm,变异系数(CV值) $<5\%$,激发和发射波长分别为365 nm和615 nm。聚苯乙烯荧光微球的制备反应流程见图2。

[0021] 上述步骤(2)中,所使用的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2,是分别采用抗呕吐毒素杂交瘤细胞株SW-3 F4和SW-3 G12,经过体外培养、小鼠腹腔注射、采集腹水、提取纯化、抗体特异性鉴定而获得的。其中,抗体1与呕吐毒素(DON)交叉反应率100%,与15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-Ac-DON)的交叉反应率 $\geq 100\%$,对DON和15-Ac-DON表现出高度的特异性;抗体2与呕吐毒素(DON)交叉反应率100%、与3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-Ac-DON)的交叉反应率 $\geq 100\%$,对DON和3-Ac-DON表现出高度的特异性。杂交瘤细胞株SW-3 F4和SW-3 G12,已由本发明申请人——江苏省苏微微生物研究有限公司应用于脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物免疫亲和柱的制备,具体参见文献:董曼佳,杨婷婷,陆廷瑾等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物免疫亲和柱的研制[J]. 粮食与食品工业,2018,25(2):73-79页。

[0022] 上述步骤(2)中,所使用的纳米铕荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2,是通过以下步骤获得的:首先采用2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液清洗空白微球,然后用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)活化微球表面的羧基;接着加入抗体1或抗体2,通过EDC的中间介导作用,使微球表面的羧基与抗体的氨基发生酰胺化反应,形成偶联物,再采用BSA与乙醇胺($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)封闭微球表面未反应的羧基,最后得到的标记物抗体偶联率 $\geq 80\%$ 。

[0023] 一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡,用于谷物及其制品中呕吐毒素及其乙酰化衍生物总量的快速定量检测,具体方法如下:

①建立标准曲线

采用DON标准品,配制成 $100.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 标准溶液,再配制成 1000 ng/mL 标准储备溶液,然后稀释成 $0.00\sim 25\text{ ng/mL}$ 标准工作溶液。采用本发明提供的时间分辨荧光免疫层析卡,与便携式时间分辨荧光免疫分析仪联用,由低浓度到高浓度进行检测。以标准工作溶液浓度的自然对数值($\ln C$)为横坐标,以各浓度标准液的T/C值(即T线信号值与C线信号值的比值)与 0 ng/mL 标准液的T/C值(T_0/C_0)的比值乘以100%为纵坐标,建立标准曲线。

[0024] ②待测样本检测

准确称取 2.0 g 样本,粉碎均匀;经加水涡旋提取后,离心得上清液作为被检测样品。吸取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 被检测样品溶液,用样品稀释液稀释后,按照上述建立标准曲线的方法进行检测。仪器读数完成后,会自动计算出被检样本中的DON及其乙酰化衍生物总量。

[0025] 本发明的时间分辨荧光免疫层析卡,基于抗原抗体的免疫学反应原理,应用竞争抑制免疫层析的方法进行检测。样本中若含有DON、3-Ac-DON和15-Ac-DON,则在侧向移动过程中会与纳米铕荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2反应,抑制抗体和NC膜T线上的DON-BSA结合。随着样本中DON及其乙酰化衍生物总量的升高,结合于T线上的抗体量减少,相应的T线荧光强度也随之变弱,使用便携式时间分辨荧光免疫分析仪读数,可定量的测出样本中DON、3-Ac-DON和15-Ac-DON的总量。

[0026] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

①BHHCT是一种多齿 β -二酮型铕螯合剂,与传统螯合剂比较,荧光效率更高,与 Eu^{3+} 的络合常数 $2\times 10^{10}\text{ L/mol}$,形成的荧光螯合物十分稳定,目前该螯合剂仅用于无机/有机荧光微球(例如硅胶基微球)的制备。本发明创新地将该螯合剂与烯丙基胺和 EuCl_3 反应,转化成可聚合荧光螯合物单体;然后采用分散聚合与超声波辐照技术,通过超声波空化作用引发的自由基聚合效应,制备出小粒径聚苯乙烯荧光微球;最后采用十一烯酸包覆法,制备成表面含大量羧基的聚苯乙烯荧光微球。该微球比目前已知聚苯乙烯类有机/有机荧光微球的荧光强度更亮、粒径更小、表面功能基团更多。以上技术创新赋予了本发明制备的时间分辨荧光免疫层析卡,具有灵敏度高、准确度高、稳定性好的优点,成为真菌毒素定量检测的又一重要技术手段。

[0027] ②本发明的时间分辨荧光免疫层析卡,标记垫中固定有两种具有不同抗体特异性的呕吐毒素单抗。在实际免疫反应中,抗体1可以同时检测到DON和15-Ac-DON,抗体2可以同时检测到DON和3-Ac-DON,从而确保了采用一张层析卡即能同时测定样本中呕吐毒素及其乙酰化衍生物的总量,这是本发明区别于其他专利的最显著特征。

[0028] ③与胶体金免疫层析卡相比较,本发明仅用纳米铕荧光微球替代氯金酸来标记单

克隆抗体,其余材料和制备方法均相同,因此兼具胶体金检测卡操作简便、测定快速的优点,特别适合于现场快速定量检测和基层大规模筛选检测。

附图说明

[0029] 图1 时间分辨荧光免疫层析卡的组装示意图,1、样品垫,2、标记垫,3、硝酸纤维素NC膜,4、吸水滤纸,5、PVC底板,6、测试线T线,7、控制线C线。

[0030] 图2 聚苯乙烯荧光微球制备反应流程。

[0031] 图3 时间分辨荧光免疫层析卡的检测标准曲线。

[0032] 图4 不同样品时间分辨荧光免疫层析卡与国标方法的一致性分析。

具体实施方式

[0033] 以下结合具体实施例对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0034] 下述实施例中所用的材料、试剂等,除呕吐毒素单克隆抗体1、呕吐毒素单克隆抗体2外,均可从商业途径购买。呕吐毒素单克隆抗体1、呕吐毒素单克隆抗体2,是分别采用抗呕吐毒素杂交瘤细胞株SW-3 F4、SW-3 G12分泌产生,保证从申请日起二十年内由本专利权人向公众提供。

[0035] 螯合剂BHHCT(4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-酰基)-氯磺化邻三联苯),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,CAS号:200862-70-0,货号:B131449,纯度:90%。

[0036] 呕吐毒素-牛血清白蛋白(DON-BSA),购自大连百奥思科生物科技有限公司,蛋白含量 ≥ 5 mg/mL。

[0037] 羊抗鼠IgG抗体和羊抗鼠IgG辣根过氧化物酶标二抗,购自无锡药明康德生物技术有限公司。

[0038] DON、3-Ac-DON和15-Ac-DON的标准品,购自Sigma公司,产品目录号分别为D0156、A6166和A1556,纯度 $\geq 99\%$ 。

[0039] 实施例1:羧基聚苯乙烯荧光微球的制备

①可聚合螯合物单体(BHHCT-NHCH₂CH=CH₂)的制备

将1.57 g烯丙基胺和9.85 g BHHCT溶于200 mL无水乙醇中,加入1.02 g三乙胺((CH₃CH₂)₃N),在0 °C搅拌反应8小时;然后蒸干溶剂,将固体用冰水洗涤数次,无水硫酸镁干燥过夜;在95%乙醇中重结晶两次,得到鲜黄色固体结晶6.06 g,产率61.5%。

[0040] ②可聚合荧光螯合物单体(Eu³⁺-BHHCT-NHCH₂CH=CH₂)的制备

采用0.05 M pH7.8的碳酸盐缓冲液,溶解5.0 g螯合物BHHCT-NHCH₂CH=CH₂,配制成 2.0×10^{-5} mol/L的标准溶液。然后加入 2.0×10^{-7} mol/L的EuCl₃溶液,使得反应体系中BHHCT-NHCH₂CH=CH₂浓度为 2.0×10^{-7} mol/L,37 °C恒温水浴反应2 小时。反应结束后,真空室温干燥,得到黄色固体荧光螯合物3.83 g,产率76.6%。

[0041] ③采用分散聚合+超声辐照技术,制备纳米级聚苯乙烯荧光微球

将0.2 g PVP、2.0 g荧光螯合物Eu³⁺-BHHCT-NHCH₂CH=CH₂,溶于150 mL乙醇/水(v/v=3:1)中;然后置于超声波反应器中,搅拌条件下缓慢加入溶有0.15 g AIBN的30 mL苯乙烯

溶液。通循环水升温至80℃,并通氮气2小时排除体系中的氧气后,开启超声波发生器进行聚合反应。反应过程中维持恒定温度80℃,恒定超声功率600 W和恒定氮气环境。反应12小时后,将聚合反应产物静置分层,弃去上层清液,下层聚合物微球分别乙醇、冰水洗涤三次,洗涤后保存于去离子水中。

[0042] ④采用十一烯酸包覆法,制备羧基聚苯乙烯荧光微球

向100 mL玻璃容器中依次加入聚苯乙烯荧光微球(粒径74 nm)25 mg/mL、十二烷基磺酸钠7 mg/mL、过硫酸钾15 mg/mL,用去离子水溶解,超声混合均匀,总体积为20 mL。然后加入甲醇1.5 mL,十一烯酸0.1 mL,混匀;通氮气,密封,放入70℃恒温水浴箱中振荡反应8小时。反应结束后将微球离心,醇洗、水洗各三次。最后,微球悬浮于去离子水中,4℃避光保存。

[0043] 实施例2:呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2的制备

①腹水1和腹水2的制备

在细胞培养前2周,取10周龄的雌性BALB/C小鼠,每只注射0.5 mL石蜡预刺激,分笼做标记。将抗呕吐毒素杂交瘤细胞株SW-3 F4、SW-3 G12从冻存状态中取出,分别采用含20%胎牛血清的DMEM培养基,25 cm²培养瓶复苏3天,再采用含15%小牛血清的DMEM培养基扩增至对数生长期及所需注射的细胞数量。

[0044] 选取处于对数生长期的SW-3 F4和SW-3 G12细胞,分别去掉培养液,换成无血清DMEM培养基,将培养瓶中贴壁细胞吹下,置入50 mL灭菌离心管中,800 rpm离心5分钟,去掉上清重新用DMEM悬起细胞,细胞计数板计数,再离心去上清,加入DMEM培养基,调整细胞数量为 1×10^6 /mL。每只小鼠细胞注射剂量为0.5 mL。接种后小鼠在8天左右出现腹部膨大,在12天左右采集腹水,采用一次性收集,腹水经1500 rpm离心5分钟,再4000 rpm离心5分钟去细胞碎片,上清分装小瓶-20℃保存备用。

[0045] ②腹水1和腹水2的纯化

分别取SW-3 F4和SW-3 G12的腹水,解冻后,4℃、10000 rpm,离心15分钟,去沉淀,记录腹水体积。用3倍腹水体积的醋酸钠缓冲液稀释,pH控制在4.5,温度保持在4℃,边搅拌边缓慢滴加正辛酸,添加量按未稀释腹水计40μL/mL。加完继续搅拌15分钟,分装在离心管中,4℃静置3小时。

[0046] 4℃、10000 rpm离心30 min。收集上清液,弃去沉淀,过0.45 μm的滤膜。记录上清液体积,加入10倍浓缩的PBS缓冲液,加入量为上清液体积的1/10,4℃预冷,按277 g/L上清液的量缓慢加入硫酸铵研磨粉末。加完继续磁力搅拌器,搅拌30分钟,4℃静置过夜。

[0047] 4℃、12000 rpm离心15分钟,收集沉淀,弃去上清液。在沉淀中缓慢加入150 mmol/L的PBS溶液,加入量为搅拌后总体积的25%;将溶解的抗体溶液转移至透析袋中,用200倍体积的PBS溶液在4℃磁力搅拌透析。每3小时更换透析液,更换3次,分别得到纯化后的抗体1和抗体2,过无菌0.22μm滤膜,测定其纯度分别为31.2%、34.0%,浓度分别为25.0 mg/mL、28.1mg/mL。

[0048] ③抗体1和抗体2的特异性鉴定

a、抗体1的交叉反应率测定

标准储备液:准确称取DON、3-Ac-DON和 15-Ac-DON的标准品,用甲醇溶液配制成0.1 mg/mL的储备液。

[0049] 标准稀释液:准确移取DON、3-Ac-DON和 15-Ac-DON的标准储备液,用磷酸盐缓冲液稀释成工作液(浓度依次为50、100、250、500和1000 ng/mL)。

[0050] 磷酸盐吐温缓冲液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g、 KH_2PO_4 0.2 g、NaCl 8.0 g和KCl 0.2 g,水1 L,调pH至7.4,最后再加入0.5 mL吐温-20混匀。

[0051] 包被缓冲液: Na_2CO_3 3.15 g、 NaHCO_3 5.88 g,水1 L。

[0052] 封闭液:称取3 g牛血清白蛋白(BSA)溶于100 mL磷酸盐吐温缓冲液中。

[0053] 底物缓冲液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.84 g、 $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.93 g,加水定容至100 mL。

[0054] 底物A储存液:3,3,5,5,-四甲基联苯胺(TMB)0.10 mg,定容至50 mL无水乙醇中,4℃避光保存。

[0055] 底物B储存液:过氧化氢脲3 g,加水定容至100 mL,4℃避光保存。

[0056] 底物显色液:底物缓冲液9.5 mL、底物A储存液0.5 mL、底物B储存液32 μL,混匀,现配现用。

[0057] 终止液:2 mol/L H_2SO_4 水溶液。

[0058] 包被:用包被缓冲液将呕吐毒素-BSA包被原按确定的抗原工作浓度,加入到96孔酶标板内,每孔105 μL,置冰箱中4℃包被过夜,磷酸盐吐温缓冲液250 μL洗板3次。

[0059] 封闭:每孔加入300 μL封闭液,置恒温箱中37℃孵育2小时,磷酸盐吐温缓冲液250 μL洗板3次。

[0060] 抗原抗体反应:分别移取50 μL不同浓度的呕吐毒素标准工作溶液与工作浓度抗体1溶液50 μL混合,加入酶标板孔中,每个试验孔2个重复,置恒温箱中37℃孵育40分钟,同时设阴性对照孔(对照孔以磷酸盐缓冲液代替毒素标准工作液),磷酸盐吐温缓冲液250 μL洗板3次。

[0061] 酶标二抗反应:用磷酸盐缓冲液将羊抗鼠IgG辣根过氧化物酶标二抗稀释10000倍,每孔加入100 μL,置恒温箱中37℃孵育30分钟,磷酸盐吐温缓冲液250 μL洗板5次。

[0062] 显色:加底物显色液,每孔加入100 μL,置恒温箱中37℃作用12分钟。

[0063] 终止显色:每孔加入50 μL终止液。

[0064] 读数:加入后10分钟内酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

[0065] 结果计算:分别以呕吐毒素(DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-Ac-DON)和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-Ac-DON)浓度的对数值为横坐标,以抑制百分率(各浓度标准竞争抑制抗原孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值与不加标准品孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值的百分比)为纵坐标,绘制标准曲线。以各曲线50%抑制百分率的质量浓度 IC_{50} 计算交叉反应率,计算公式如下:

$$S = (y/z) \times 100\%$$

式中:S——交叉反应率(%)

y——DON的 IC_{50} 值

z——DON乙酰化衍生物的 IC_{50} 值

结果表明,纯化的呕吐毒素单克隆抗体1与呕吐毒素(DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-Ac-DON)和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-Ac-DON)的交叉反应率分别为100%、0.1%和453%。

[0066] b、抗体2的交叉反应率测定

采用与上述抗体1相同的方法进行测定。结果表明,纯化的呕吐毒素单克隆抗体2与呕

吐毒素 (DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-Ac-DON) 和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-Ac-DON) 的交叉反应率分别为100%、101%和6%。

[0067] 实施例3:用纳米钨荧光微球标记呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2

①微球的清洗

取100 μ L羧基聚苯乙烯荧光微球(粒径85 nm)置于2.0 mL离心管中,加入200 μ L MES缓冲液(50 mM,pH6.0),混匀,17500 rpm离心15分钟去除上清液,将底部的乳胶微球超声重悬于500 μ L相同的MES缓冲液中。

[0068] ②微球的活化

往离心管中分别滴加入使用 MES缓冲液(50 mM,pH6.0)新鲜配制的20 μ L NHS(50 mg/ml)和EDC(50 mg/ml)反应液,旋涡振荡混匀后,置于混合器中室温旋转孵育 15分钟。

[0069] ③微球与抗体的偶联

孵育结束后,用 500 μ L MES缓冲液清洗2次,17500 rpm离心15分钟去除上清液,然后往微球中加入0.5 mg抗体,旋涡振荡混匀,室温孵育3小时;

④微球表面未结合羧基的封闭

反应完成后,17500 rpm离心15分钟去除上清液,然后往离心管中加入500 μ L封闭液(2% BSA,100 mM乙醇胺溶液,pH8.0),室温孵育2小时。

[0070] ⑤偶联完成后微球的清洗与保存

将偶联后的微球用1 mL封闭液洗涤,重复洗涤2次,然后悬浮于500 μ L PBS缓冲液(50 mM,pH7.4)中,加入终浓度为0.2% 的BSA,置于4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0071] 实施例4:时间分辨荧光免疫层析卡的制备和组装

①样品垫的制备

用含0.8%(m/v)牛血清白蛋白(BSA)、1.5%(v/v)吐温-20的0.1 M pH7.4磷酸缓冲液,浸泡玻璃纤维垫RB45(购自上海金标生物有限公司),然后置于37 $^{\circ}$ C温箱中烘干1.5小时,置于密封干燥包装袋中保存备用。

[0072] ②标记垫的制备

用含0.8%(m/v)牛血清白蛋白(BSA)、1.5%(v/v)吐温-20的0.1 M pH7.4磷酸缓冲液,浸泡玻璃纤维垫SB08(购自上海金标生物有限公司),然后置于37 $^{\circ}$ C温箱中烘干1.5小时。将纳米钨荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2,分别用含有5%(m/v)海藻糖、2%(m/v)蔗糖、0.5%(m/v)BSA、0.5%(v/v)吐温-20的0.1 M pH7.4磷酸缓冲液稀释50倍和100倍;然后用喷金仪喷涂于上述烘干后的SB08垫上,置于37 $^{\circ}$ C温箱中烘干2小时后,置于密封干燥包装袋中保存备用。

[0073] ③NC膜的制备

用含1%(m/v)蔗糖的0.01 M pH7.4磷酸缓冲液,溶解DON-BSA包被抗原,使得浓度为0.5 mg/ml,然后采用自动喷膜仪喷涂在NC膜上,喷量为1 μ L/cm,得到测试线(T线)。用相同的磷酸缓冲液,溶解羊抗鼠IgG,使得浓度为1 mg/ml,然后采用自动喷膜仪喷涂在距离T线右侧4 mm位置处,喷量为1 μ L/cm,得到控制线(C线)。将喷好T线、C线的NC膜,在37 $^{\circ}$ C温箱内烘干8小时。

[0074] ④层析卡的组装

以PVC 底板为衬板,将制备好的样品垫、标记垫、NC膜与吸水滤纸,由左端依次粘贴在

底板上,并且相互之间有约2 mm的交联。然后用切割机切割成4 mm宽、60 mm长的板条,装于塑料卡壳中;用压壳机压紧,放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存。

[0075] 实施例5:时间分辨荧光免疫层析卡用于DON及其乙酰化衍生物总量检测

PBS缓冲液:NaCl 9.0 g,Na₂HP0₄·12H₂O 4.65 g,NaH₂P0₄·2H₂O 0.56 g,水1 L。

[0076] 样品稀释液:取0.4 g吐温-20,溶解于100.0 mL PBS缓冲溶液中。

[0077] 时间分辨荧光免疫分析仪购自上海互恒科学仪器有限公司,激发波长为365 nm,发射波长为615 nm。

[0078] ①标准曲线的建立

采用呕吐毒素(DON)标准品,配制成100.0 μg/mL呕吐毒素标准液。准确吸取该标准液0.05 mL于5 mL容量瓶中,甲醇定容,即成为1000 ng/mL呕吐毒素标准储备液。分别准确吸取标准储备液0.00、0.025、0.05、0.125、0.25、0.5、1.25 mL于50 mL容量瓶中,用样品稀释液定容,分别相当于0.0、0.5、1.0、2.5、5.0、10、25 ng/mL标准工作液。由低浓度到高浓度进行检测,检测前先将未开封的层析卡及标准工作液平衡至室温25 °C;将层析卡平放,取100 μL标准工作液垂直滴加于加样孔中,于室温25 °C下反应10分钟;将层析卡放入时间分辨荧光免疫分析仪中,点击仪器主界面“检测”菜单中的“测试”按钮。

[0079] 以标准工作液浓度的自然对数值(lnC)为横坐标,以各浓度标准液的T/C值(即T线信号值与C线信号值的比值)与0 ng/mL标准液的T/C值(T₀/C₀)的比值乘以100%为纵坐标,建立标准曲线。所得标准曲线如图3所示,曲线方程为: $y = -0.4701x + 0.7804$,线性相关系数 $R^2 = 0.9972$ 。

[0080] ②检出限和定量限的确定

通过对10个独立阴性样品进行测定,该方法检出限(LOD)以空白样品10次测定结果的均值加3倍标准偏差计算,结果为167.66 μg/kg;定量限(LOQ)以阴性样品10次测定结果的均值加10倍标准偏差计算,结果为349.06 μg/kg,检测范围0.168~5 mg/kg,见下表1。

[0081] 表1 时间分辨荧光免疫层析卡的检出限和定量限单位:μg/kg

测定次数	测定值	平均值	标准偏差	检出限	定量限
1	98.12	89.91	25.92	167.66	349.06
2	75.25				
3	51.70				
4	127.56				
5	98.12				
6	89.14				
7	96.28				
8	132.89				
9	70.88				
10	59.17				

③ 样本的检测与准确度

准确称取2.0 g小麦试样,粉碎均匀;量取20 mL去离子水至50 mL离心管中,混匀,密封,至漩涡混匀器上振荡10分钟;4000 rpm离心5分钟,取上清液用去离子水分别稀释成六

个浓度梯度,涡旋振荡混匀。

[0082] 采用国家标准方法(GB 5009.111-2016第二法)和层析卡,分别对六个浓度梯度的小麦样本稀释液进行双试验检测,采用配对t检验法比较两种方法的检测结果是否存在显著性差异。小麦中呕吐毒素及其乙酰化衍生物总量测试结果: $t_d=0.48$,经查t分布表, $t_{0.05,5}=2.5706$, t_d 值未超过查表值;说明层析卡测定结果与国家标准方法测定结果之间无显著性差异,见下表2。层析卡的测定操与标准曲线的建立相同。

[0083] 表2 小麦中DON及其乙酰化衍生物总量准确度单位: $\mu\text{g}/\text{kg}$

样品编号	理论值	测定值	差值 d_i	均值 \bar{d}	标准偏差 S_d	t_d	$t_{0.05,5}$
1	358	327.4	30.6	23.02	117.28	0.48	2.5706
2	648	670.3	-22.3				
3	894	857.1	36.9				
4	1263	1317.4	-54.4				
5	1749	1841.7	-92.7				
6	2157	1917	240				

将不同样品包括小麦、面粉、大麦、玉米、玉米面等的提取液分为2份,一份采用时间分辨荧光免疫层析卡进行DON及其乙酰化衍生物含量的测定,另一份采用国家标准方法(GB 5009.111-2016第二法)进行测定。将样品的测定值进行汇总分析,两种方法的吻合程度 R^2 达到0.9638,见图4。

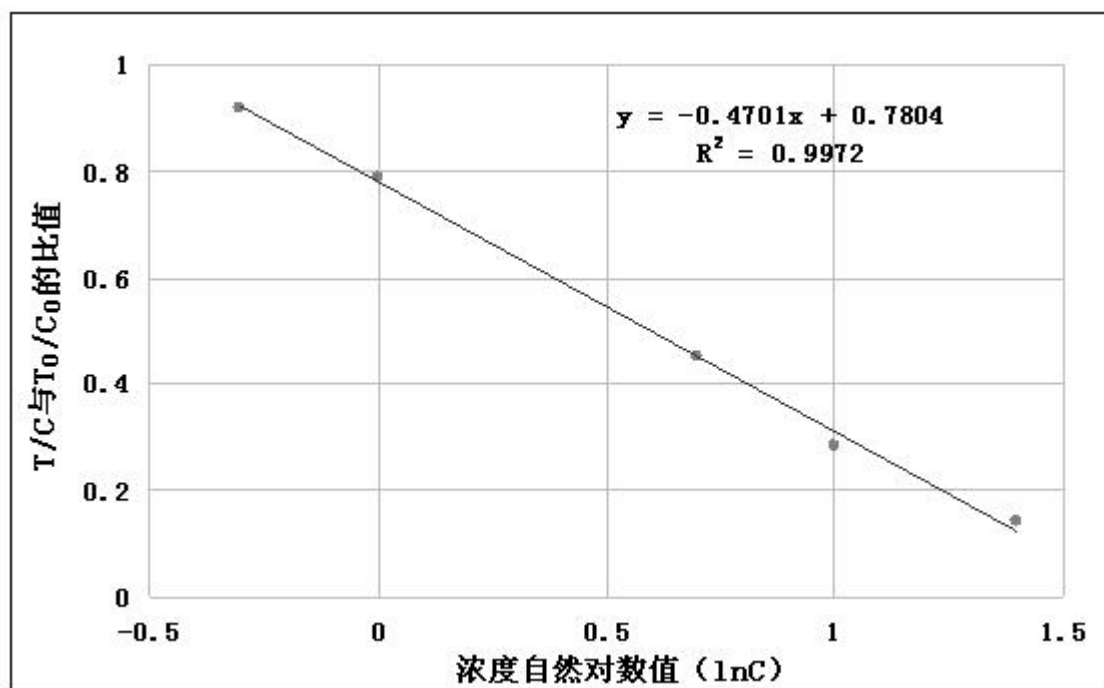


图3

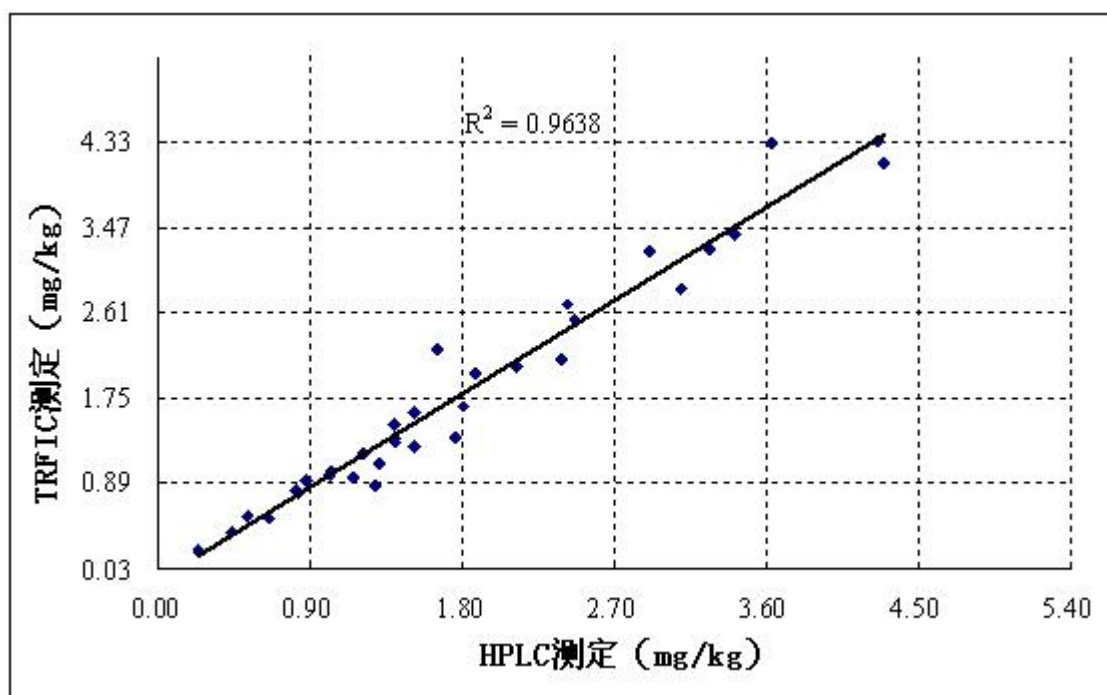


图4

专利名称(译)	一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡		
公开(公告)号	CN108614106A	公开(公告)日	2018-10-02
申请号	CN201810318997.3	申请日	2018-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
[标]发明人	张海涛 张一平 龚燕 董曼佳 杨婷婷 王红连 陆丽婷 华洵璐 秦海萍 叶进 匡群		
发明人	张海涛 张一平 龚燕 董曼佳 杨婷婷 王红连 陆丽婷 华洵璐 秦海萍 叶进 匡群		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测呕吐毒素及其乙酰化衍生物的时间分辨荧光免疫层析卡，属于免疫层析和食品安全检测领域。本层析卡由样品垫、标记垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸和PVC底板组成。标记垫固定有纳米铕荧光微球标记的呕吐毒素单克隆抗体1和抗体2。抗体1对呕吐毒素和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇有高度特异性；抗体2对呕吐毒素和3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇有高度特异性。本发明基于抗原抗体免疫学原理进行检测。本层析卡与便携式时间分辨荧光免疫分析仪联用，用于谷物及其制品中呕吐毒素及其乙酰化衍生物总量的快速定量检测，灵敏度高、稳定性好；检出限0.168 mg/kg，检测范围0.17 ~ 5 mg/kg，时间10 ~ 15min，操作简便，不需专业培训，广泛适用于各种场合和不同层次人员的需要。

