



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110108874 A

(43)申请公布日 2019.08.09

(21)申请号 201910364421.5

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2019.04.30

G01N 33/532(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO. C201871 2018.03.23

(71)申请人 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 张兆威 王督 张奇

张文

(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 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页

序列表2页 附图3页

(54)发明名称

快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试  
纸条、制备及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条、制备及其应用。其包括底板,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,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线和检测线,所述检测线包被有环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生。该试纸条用于检测环匹阿尼酸,具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

1. 快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条,其特征在於: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,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线和检测线,所述检测线包被有环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC N0:C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生。

2. 根据权利要求1所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条,其特征在於:所述的吸水垫长16~18mm,宽2~4mm;检测垫长25~30mm,宽2~4mm;金标垫长6~9mm,宽2~4mm;样品垫长12~18mm,宽2~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm;所述的吸水垫为吸水纸;所述的底板为纸板。

3. 根据权利要求1所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条,其特征在於:所述检测垫上的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,质控线和检测线的间距为5~10mm。

4. 根据权利要求1所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条,其特征在於:所述检测垫上每厘米检测线所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng。

5. 根据权利要求1所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条,其特征在於:所述金标垫中所用的纳米金的粒径为15~20nm;所述金标垫上每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100~200ng。

6. 权利要求1所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的制备方法,其特征在於:包括以下步骤:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物用包被缓冲液配制成0.1~0.5mg/mL的包被液;于距离硝酸纤维素膜上沿为15~20mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线,每厘米检测线上所需环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng,然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成0.5mg/mL的包被液;于距检测线5~10mm的位置,用线喷方式将包被液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100~300ng,然后于37~40℃条件下干燥60~120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℃条件下干燥10~16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10~16小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液横向进行喷

涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体为100~200ng,然后真空冷冻干燥2~6h,置干燥器中室温保存;所述的抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO:C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生;

(5) 试纸条的组装

在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,即得快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条。

7. 根据权利要求6所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的制备方法,其特征在于:所述检测线包被中所使用的包被缓冲液是按照下述方法配制得到的:1g牛血清白蛋白,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;

所述的质控线的包被中所使用的包被缓冲液为:1g卵清蛋白,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;

所述的封闭液是按照下述方法配置得到的:将1~2g卵清蛋白,2~5g蔗糖,0.02~0.05g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。

8. 根据权利要求6所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的制备方法,其特征在于:所述纳米金标记的抗环匹阿尼酸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质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.1mL 0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH;在搅拌的状态下缓慢加入2mL 0.1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/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50.0mL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;所述的标记洗涤保存液是按照下述方法配制得到的: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。

9. 权利要求1所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的应用,其特征在于:应用方法如下:将样品经甲醇提取,获得甲醇提取液,将甲醇提取液用水稀释,使稀释液中甲醇的终浓度为20~30%,得到样品溶液,取稀释好的样品溶液作为检测液逐滴加入一快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的样品垫,将其作为检测试纸条,同时取等体积的甲醇水作为阴性对照液,逐滴加入另一快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的样品垫,将其作为对照试纸条,一段时间后读取结果;

检测结果:

阳性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线不显色时,表明待测样品中的环匹阿尼酸的总含量高于或等于5ng/mL;

当质控线显示出红色线条,而检测线颜色比对照试纸条检测线颜色浅时,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸含量等于或高于1ng/mL并低于5ng/mL;

阴性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,并且检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近时,判为阴性结果,表明待测样品中的环匹阿尼酸的总含量低于1ng/mL;

无效:当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线显示或不显示红色线条,该试纸条

判为无效；

最后经换算即得待测样品中环匹阿尼酸的含量。

10. 根据权利要求9所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的应用,其特征  
在于:所述的甲醇提取为:将待测样品磨细,加入体积浓度为70%的甲醇/2%NaHCO<sub>3</sub>水溶  
液,振荡提取,离心取上清,用正己烷萃取后收集下层水相,加入10%氯化钾溶液,并用HCl  
调节至pH 2-3,用氯仿振荡提取,收集下层氯仿层,旋转蒸发浓缩除去氯仿,将沉淀用甲醇  
溶解,获得甲醇提取液。

## 快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属生物检测领域,具体涉及快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用。

### 背景技术

[0002] 环匹阿尼酸主要是由黄曲霉和寄生曲霉分泌产生的次生代谢产物,是一种能引起人畜各种损害的天然有毒化合物。环匹阿尼酸广泛存在于大米、玉米、花生、饲料等农产品和奶酪等食品中,污染食品及饲料后,会直接或间接进入食物链,威胁人畜的健康和生命安全。因此加强对农产品及食品中环匹阿尼酸的检测、特别是速测,以便及时了解和掌握食品及饲料的卫生信息。

[0003] 现有技术中常用的环匹阿尼酸检测技术主要有薄层层析法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、免疫学分析法。前两种方法的样品前处理步骤耗时费力,仪器价格昂贵,且需要专业技术人员等的缺点。免疫学分析法克服了前两者的缺点,具有特异性强、灵敏度高、样品前处理简单、成本低、对实验人员和环境的污染危害小等优点。最常用的免疫学分析法有酶联免疫吸附法、纳米金免疫层析法等。目前还没有针对环匹阿尼酸免疫层析试纸条问世。因此,研究建立一种针对环匹阿尼酸免疫层析试纸条对于环匹阿尼酸的含量检测具有重要的意义和应用价值。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是针对上述现有技术存在的不足而提供快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用。该试纸条用于检测环匹阿尼酸,具有检测快速,操作简单,灵敏度高的特点。

[0005] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案为:

[0006] 快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条,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,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述检测线包被有环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物(CPA-OVA),质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为 CCTCC NO:C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生。

[0007] 按上述方案,所述的吸水垫长16~18mm,宽2~4mm;检测垫长25~30mm,宽2~4mm;金标垫长6~9mm,宽2~4mm;样品垫长12~18mm,宽2~4mm,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;所述的底板为纸板。

[0009] 按上述方案,所述检测垫上的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,质控线和检测线的间距为5~10mm。

[0010] 按上述方案,所述检测垫上每厘米检测线所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物(CPA-OVA)的包被量为80~400ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng。

[0011] 按上述方案,所述金标垫中所用的纳米金的粒径为15~20nm;所述金标垫上每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的用量为100~200ng。

[0012] 如上所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1)吸水垫的制备

[0014] 将吸水纸剪裁得吸水垫;

[0015] (2)检测垫的制备

[0016] 检测线的包被:

[0017] 将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物用包被缓冲液配制成0.1~0.5mg/mL的包被液;于距离硝酸纤维素膜上沿为15~20mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线,每厘米检测线上所需环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng,然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟;

[0018] 质控线的包被:

[0019] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配制成0.5mg/mL的包被液;于距检测线5~10mm的位置,用线喷方式将包被液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100~300ng,然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟;

[0020] (3)样品垫的制备

[0021] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥10~16小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0022] (4)金标垫的制备

[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10~16小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液横向进行喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体为100~200ng,然后真空冷冻干燥2~6h,置干燥器中室温保存;所述的抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO:C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生;

[0024] (5)试纸条的组装

[0025] 在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,即得快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条。

[0026] 按上述方案,所述检测线包被中所使用的包被缓冲液是按照下述方法配制得到的:1g牛血清白蛋白,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;

[0027] 所述的质控线的包被中所使用的包被缓冲液为:1g卵清蛋白,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;

[0028] 按上述方案,所述的封闭液是按照下述方法配置得到的:将1~2g卵清蛋白,2~5g

蔗糖,0.02~0.05g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;

[0029] 按上述方案,所述纳米金标记的抗环匹阿尼酸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质量浓度为0.01%的纳米金溶液,用0.1mL0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH;在搅拌的状态下缓慢加入2mL 0.1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/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50.0mL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;

[0030] 所述的标记洗涤保存液是按照下述方法配制得到的:2.0g聚乙二醇-20000,0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,纯水定容至1000mL,0.22 $\mu$ m滤膜过滤所得;

[0031] 如上所述的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的应用,方法如下:将样品经甲醇提取,获得甲醇提取液,将甲醇提取液用水稀释,使稀释液中甲醇的终浓度为20~30%,得到样品溶液,取稀释好的样品溶液作为检测液逐滴加入一快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的样品垫,将其作为检测试纸条,同时取等体积的甲醇水作为阴性对照液,逐滴加入另一快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的样品垫,将其作为对照试纸条,一段时间后读取结果;

[0032] 检测结果:

[0033] 阳性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线不显色时,表明待测样品中的环匹阿尼酸的总含量高于或等于5ng/mL;

[0034] 当质控线显示出红色线条,而检测线颜色比对照试纸条检测线颜色浅时,表明待测样品溶液中环匹阿尼酸含量等于或高于1ng/mL并低于5ng/mL;

[0035] 阴性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,并且检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近时,判为阴性结果,表明待测样品中的环匹阿尼酸的总含量低于1ng/mL;

[0036] 无效:当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线显示或不显示红色线条,该试纸条判为无效;

[0037] 最后经换算即得待测样品中环匹阿尼酸的含量。

[0038] 按上述方案,所述的甲醇提取为:将待测样品磨细,加入体积浓度为70%的甲醇/2% NaHCO<sub>3</sub>水溶液,振荡提取,离心取上清,用正己烷萃取后收集下层水相,加入10%氯化钾溶液,并用HCl调节至pH2-3,用氯仿振荡提取,收集下层氯仿层,旋转蒸发浓缩去除氯仿,将沉淀用甲醇溶解,获得甲醇提取液。

[0039] 该快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的工作原理: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,纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体被溶解。当样品中含有环匹阿尼酸时,环匹阿尼酸将和金标垫上的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着抗原的检测线时,抗原将和环匹阿尼酸竞争结合纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中环匹阿尼酸含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体将越少,形成的显色带颜色越浅。当抗原所结合的纳米金标记的少于一定的数量时,检测线处将不会有红色线条出现。无论样

品中是否含有环匹阿尼酸,未被检测线上的抗原截获的纳米金标记的或纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体与环匹阿尼酸的结合物将继续移动到质控线并与质控线上的第二抗体兔抗鼠多克隆抗体兔抗鼠多克隆抗体结合并被富集显色,所以样品中不含环匹阿尼酸,即为阴性时为两条红色条带,即质控线和检测线均为红色;含有一定量环匹阿尼酸,即为阳性时有两种情况:1、只出现一条红色质控线,检测线不显色;2、一条红色质控线和一条浅红色检测线;而质控线没有色带出现则表明试纸条失效。

[0040] 本发明的有益效果在于:

[0041] (1) 检测环匹阿尼酸含量。本发明提供的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条使用的抗体为抗环匹阿尼酸单克隆抗体,用于检测环匹阿尼酸含量灵敏度高,实际应用价值大。本发明提供的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条的最低检测限为1ng/mL。

[0042] (2) 操作简单。用该快速检测环匹阿尼酸含量的免疫层析试纸条进行检测时只需将样品提取液逐滴加到试纸条的样品垫上即可,为一步式操作,不需要专业人员,操作简单方便。

[0043] (3) 检测过程不需要环匹阿尼酸标准溶液作为阳性对照。本发明提供的快速检测环匹阿尼酸含量的免疫层析试纸条检测样品时,不需要使用环匹阿尼酸标准溶液做为阳性对照,而只需用水做为阴性对照即可,从而避免了环匹阿尼酸的二次污染。

## 附图说明

[0044] 图1和图2为本发明的快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条的结构示意图。图中:图中:1底板、2吸水垫;3检测垫;4金标垫;5样品垫;6质控线;7检测线。

[0045] 图3为实施例2中1#玉米粉末样品的结果判定图。图中:a对照试纸条;b检测试纸条。

[0046] 图4实施例2中2#玉米粉末样品的结果判定图。图中:a对照试纸条;b检测试纸条。

## 具体实施方式

[0047] 实施例1:抗环匹阿尼酸单克隆抗体的制备

[0048] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO.C C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生。具体如下:

[0049] 将环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株YTT-2腹腔注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠体内,收集小鼠的腹水,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,过滤后的腹水于4℃,12000r/min离心15min以上,吸取上清,将上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,边搅拌边缓慢加入正辛酸,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,然后4℃,12000r/min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pH7.4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7.4,4℃预冷,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4℃,12000r/min离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用纯水透析,将充分透析好的蛋白溶液置-70℃冰箱冷冻,然后用冷冻真空干燥机冻

干,收集冻干粉,即得纯化好的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,将抗体置-20℃冰箱中备用;

[0050] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容至100mL所得;所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.9g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,磷酸二氢钾0.02g,加水定容至100mL所得。

[0051] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株YTT-2分泌的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的亚型为IgG2a型。

[0052] 用常规间接非竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)法测得YTT-2的鼠腹水抗体的效价可达 $1.2 \times 10^5$ ,即鼠腹水抗体稀释 $1.2 \times 10^5$ 倍时的溶液测定结果为阳性。常规间接竞争ELISA法鉴定其对环匹阿尼酸的灵敏度(IC<sub>50</sub>)为0.84ng/mL,对黄曲霉毒素B1,B2,G1,G2,M1和杂色曲霉毒素的交叉反应率均小于0.1%。

[0053] 杂交瘤细胞株YTT-2的筛选:

[0054] 1. 抗原合成及动物免疫

[0055] 购买市售环匹阿尼酸标准品进行完全抗原合成,具体的合成步骤如下:将1mg CPA溶于1mL0.05M NaHCO<sub>3</sub>的50%甲醇水溶液中;取2mg血蓝蛋白(KLH)加入0.4mL3M醋酸钠,在室温搅拌条件下,1min内逐滴加入0.2mL甲醛,持续搅拌10min;将CPA逐滴缓慢加入到KLH中,室温条件下持续搅拌16h以上。将最终反应产物CPA-KLH置于合适大小透析袋内,于PBS中4℃搅拌透析三天。同样方法合成检测原CPA-OVA。

[0056] 购买6周龄雌性BaLb/c小鼠6只,免疫自行合成的环匹阿尼酸完全抗原CPA-KLH,免疫剂量为100μg/只。第一次免疫将完全抗原CPA-KLH与弗氏完全佐剂混合乳化,进行背部皮下多点注射免疫。初免间隔3周,之后每次间隔2周进行免疫,使用弗氏不完全佐剂乳化进行免疫。从第三次免疫一周后,进行尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA法监测小鼠血清抗体效价,用间接竞争ELISA法测定小鼠血清灵敏度,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冲刺免疫,融合前3天取100μg免疫原溶于200μL PBS直接注射腹腔。弗氏佐剂购于Sigma-Aldrich公司。

[0057] 2. 细胞融合

[0058] 最后一次冲刺免疫3天后,采用50%(重量百分数)的聚乙二醇即PEG(分子量为1450)作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤如下:

[0059] 颈椎脱臼法处死免疫小鼠,在无菌条件下摘取脾脏,研磨分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞SP2/0按5:1个数比混合,用RPMI-1640基础培养液洗混合细胞,用50%PEG融合,融合1分钟,然后加满RPMI-1640基础培养液,离心,移去上清,小鼠脾细胞和鼠源骨髓瘤细胞SP2/0形成的融合细胞用72mLRPMI-1640基础培养液重悬,将重悬起来的细胞滴加到96孔细胞培养板内,2滴/孔,置37℃二氧化碳培养箱养,所述的RPMI-1640基础培养液为含有20%(体积百分数)胎牛血清,2%(重量百分数)生长因子和1%(重量百分数)次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT。上述SP2/0购于上海泛柯生物科技有限公司;RPMI-1640基础培养液购于Hyclone公司;1%次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT购于Sigma-Aldrich公司。

[0060] 3. 细胞株的筛选及克隆待细胞融合后第12天左右,细胞集落长到占孔底1/2面积大小,培养液变黄,即可进行抗体检测。采用ELISA方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选,筛选分两步进行,第一步采用间接非竞争ELISA法筛选出抗环匹阿尼酸而不抗载体蛋

白KLH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，以环匹阿尼酸作为竞争原，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%时的竞争原浓度亦即IC<sub>50</sub>值较小），采用有限稀释法进行克隆，克隆后10天左右采用同样的两步法进行检测，如此重复克隆2-3次后，获得杂交瘤细胞株 YTT-2，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.C201871，保藏日期为2018年3月23日。

[0061] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株系YTT-2抗体可变区序列测定

[0062] (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YTT-2的总RNA。

[0063] (2) 合成cDNA：以步骤1获得的总RNA为模板，oligo(dT)<sub>15</sub>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)<sub>15</sub>由Invitrogen购得；

[0064] (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、55℃50s、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，送至苏州泓迅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'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3'（22mer）和5'-TGA GGA GACGGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3'（32mer）其中S、M、R和W为兼并碱基，M=A/C，R=A/G，S=C/G，W=A/T，轻链可变区引物为5'-GAC ATT GAG CTC ACC CAG CTT GGT GCC-3'（24mer）和5'-CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC-3'（24mer）。

[0065] 得到的基因序列结果：重链可变区编码基因序列长360bp，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120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322bp，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107个氨基酸组成，序列如SEQ ID NO:4所示。

[0066] 实施例2：

[0067] 快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条，包括底板1，底板的一面从上到下依次粘贴吸水垫2、检测垫3、金标垫4和样品垫5，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横向设置质控线6和检测线7，所述检测线包被有环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物（CPA-OVA），质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体；所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体，所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生。

[0068] 快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条的制备方法，包括以下步骤：

[0069] (1) 吸水垫的制备

[0070] 将吸水纸剪裁成16mm即得吸水垫；

[0071] (2) 检测垫的制备

[0072] 检测线的包被：

[0073] 将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物配制成0.5mg/mL的包被液，于距离硝酸纤维素膜

上沿为 15mm的位置,用线喷方式将包被液横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线,每厘米检测线上所需环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为350ng,然后于37℃条件下干燥120分钟;

[0074] 质控线的包被:

[0075] 将兔抗鼠多克隆抗体配制成0.5mg/mL的包被液;于距检测线5mm的位置,用线喷方式将包被液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200ng,然后于37℃条件下干燥120分钟;

[0076] (3) 样品垫的制备:

[0077] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥16小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0078] (4) 金标垫的制备:

[0079] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥16小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液横向进行喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体为150ng,然后真空冷冻干燥6h,置干燥器中室温保存;所述的抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO:C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生;

[0080] (5) 试纸条的组装

[0081] 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,即得快速检测环匹阿尼酸的高灵敏度免疫层析试纸条;

[0082] 所述包被抗原的包被液中所使用的包被缓冲液为:1g牛血清白蛋白,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;

[0083] 所述的包被兔抗鼠多克隆抗体的包被液中所使用的包被缓冲液为:1g卵清蛋白,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;

[0084] 所述的封闭液是按照下述方法配置得到的:将1g卵清蛋白,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;

[0085] 所述纳米金标记的抗环匹阿尼酸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%的纳米金溶液,用0.1mol/L碳酸钾水溶液调节pH;;在搅拌的状态下缓慢加入2mL0.1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%卵清蛋白水溶液至卵清蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,3000r/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50.0mL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。

[0086] 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是按照下述方法配制得到的: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。

[0087] 上述快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条的应用:

[0088] 分别称取1#和2#玉米粉末样品各5g于50mL离心管中,加入20mL甲醇/2%NaHCO<sub>3</sub>水溶液,振荡提取1h,离心取上清。分次加入50mL正己烷,振荡混合萃取,分层后收集下层水相。加入5mL10%氯化钾溶液,并用HCl调节至pH2-3。分次加入30mL氯仿振荡混合多次提取,收集下层氯仿层,旋转蒸发浓缩并用1mL甲醇溶解,加入9mL样品稀释液稀释滤液,混匀。取150 $\mu$ L已稀释好的样品溶液分别作为检测液逐滴加到快速检测环匹阿尼酸的高灵敏度免疫层析试纸条的样品垫,将其作为检测试纸条;15分钟后读取结果;

[0089] 检测结果:1#玉米粉末样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线不显色,则判为阳性结果,表明待测样品中的环匹阿尼酸的含量高于5ng/mL,见图3;2#玉米粉末样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线颜色比对照试纸条检测线颜色浅,则判为阳性结果,表明待测样品中的环匹阿尼酸的含量等于或高于1ng/mL并低于5ng/mL,见图4。

<110> 中国农业科学院油料作物研究所  
 <120> 快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用  
 <160> 4  
 <210> 1  
 <211> 360bp  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠  
 <400> 1  
 gagatccagc tgcagcagtc tggacctgac ctgatgaagc ctggggcttc 50  
 agtgaagata tcctgcaagg cttctggtta ctattcact acctactaca 100  
 tgcactgggt gaagcagagc catggaaaga gccttgagtg gattggatat 150  
 attgatcctt tcaatggtga tactaggtac aaccgaaat tcaaggcca 200  
 ggccacattg actgtagaca aatcttcag cacagcctac atgcagctca 250  
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagtttat 300  
 tactacggta gtagctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac 350  
 tgtctctgca 360  
 <210> 2  
 <211> 322bp  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠  
 <400> 2  
 gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga 50  
 cacagtcacc atcacttgcc atgcaagtca gggcattagc agtaatatag 100  
 ggtggttgca gcagaaacca gggaaatcat ttaaggcct gatctatcaa 150  
 ggaagcaact tggagatgg agttccatca aggttcagtg gcagtggatc 200  
 tggagcagat tattctctca ccatcagcag cctggaatat gaagatcttg 250  
 cagactatta ctgtgtacag tttgctcagt ttctcccac gttcggtgct 300  
 gggaccaagc tggagctgaa ac 322  
 <210> 3  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 3  
 Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Met Lys Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
                   20                    25                    30  
 Thr Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
|   | 35  | 40  | 45  |
| Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Asp Thr Arg Tyr |     |     |     |
|   | 50  | 55  | 60  |
| Asn Pro Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser |     |     |     |
|   | 65  | 70  | 75  |
| Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp |     |     |     |
|   | 80  | 85  | 90  |
| Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser |     |     |     |
|   | 95  | 100 | 105 |
| Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala |     |     |     |
|   | 110 | 115 | 120 |

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

|   |    |     |     |
|---|----|-----|-----|
| Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu |    |     |     |
| 1   | 5  | 10  | 15  |
| Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser |    |     |     |
|   | 20 | 25  | 30  |
| Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys |    |     |     |
|   | 35 | 40  | 45  |
| Gly Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser |    |     |     |
|   | 50 | 55  | 60  |
| Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile |    |     |     |
|   | 65 | 70  | 75  |
| Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln |    |     |     |
|   | 80 | 85  | 90  |
| Phe Ala Gln Phe Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu |    |     |     |
|   | 95 | 100 | 105 |

Leu Lys

107

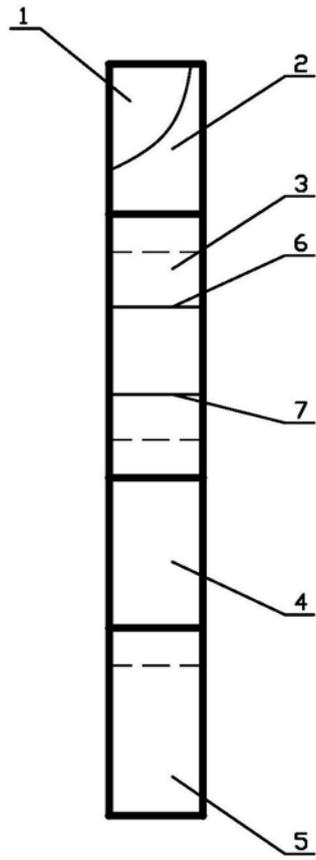


图1

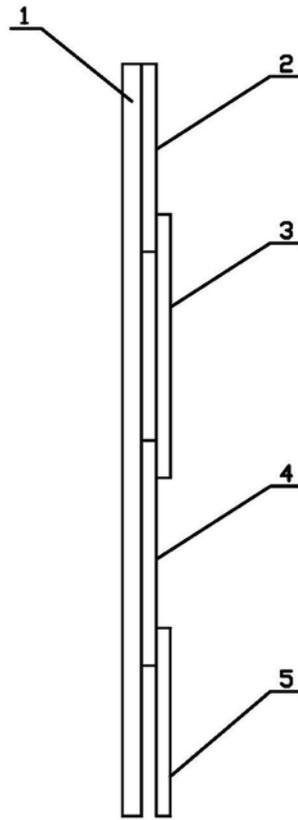


图2

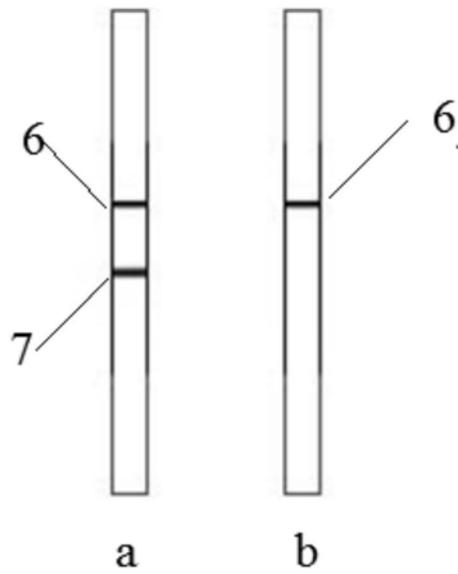


图3

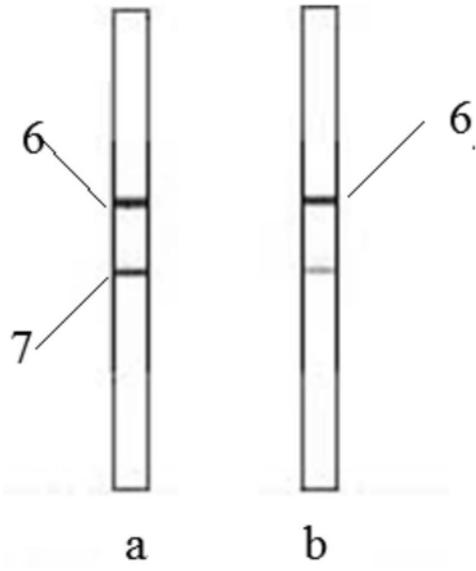


图4

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析试纸条、制备及其应用                    |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN110108874A</a>                   | 公开(公告)日 | 2019-08-09 |
| 申请号            | CN201910364421.5                               | 申请日     | 2019-04-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国农业科学院油料作物研究所                                 |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国农业科学院油料作物研究所                                 |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国农业科学院油料作物研究所                                 |         |            |
| [标]发明人         | 李培武<br>张兆威<br>王督<br>张奇<br>张文                   |         |            |
| 发明人            | 李培武<br>张兆威<br>王督<br>张奇<br>张文                   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/532     |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58     |         |            |
| 代理人(译)         | 乔宇   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测环匹阿尼酸的胶体金免疫分析纸条、制备及其应用。其包括底板，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，硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线和检测线，所述检测线包被有环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物，质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体；所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体，所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生。该试纸条用于检测环匹阿尼酸，具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

