



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110988339 A

(43)申请公布日 2020. 04. 10

(21)申请号 201911388692.0

(22)申请日 2019.12.30

(71)申请人 江南大学

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72)发明人 孙秀兰 李淼 孙嘉笛 王海鸣
纪剑 张银志

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 仇钰莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

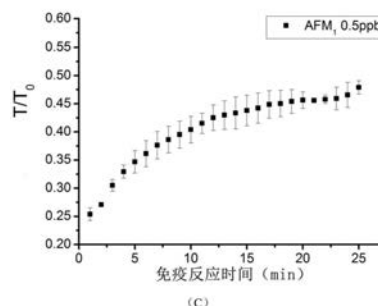
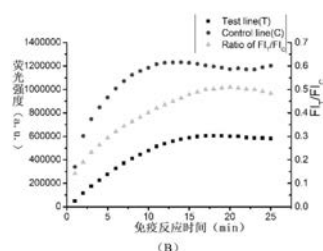
权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

一种检测牛奶中黄曲霉毒素M1的时间分辨免疫定量试纸条

(57)摘要

本发明公开了一种检测牛奶中黄曲霉毒素M1的时间分辨免疫定量试纸条,属于时间分辨免疫分析快速检测技术领域。本发明利用竞争免疫法,通过读取荧光定量免疫分析仪上T线的荧光值,即时定量检测分析牛奶样品中的黄曲霉毒素M1。本发明还提供了一种应用上述试纸条检测乳及乳制品等样品前处理的方法,以期降低基质效应。本发明试纸条检测黄曲霉毒素M1的方法简单快速,稳定可靠且灵敏度高,适合大量样本的筛查和现场监控,具有良好的商业化应用前景。



1. 一种检测黄曲霉毒素M1的时间分辨免疫层析定量试纸条,其特征在于,所述时间分辨免疫层析定量试纸条包括样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述硝酸纤维素膜上设有检测线和质控线,所述检测线上包被黄曲霉毒素M1完全抗原,所述质控线上包被羊抗鼠二抗。

2. 如权利要求1所述的时间分辨免疫层析定量试纸条,其特征在于,所述黄曲霉毒素M1的检测浓度为0.05-2ng/mL。

3. 如权利要求1或2所述的时间分辨免疫层析定量试纸条,其特征在于,所述黄曲霉毒素M1完全抗原的用量为0.1-0.8mg/mL,所述羊抗鼠二抗完全抗原的用量为0.1-1mg/mL。

4. 如权利要求1所述的时间分辨免疫层析定量试纸条,其特征在于,所述检测线和质控线两线之间相距4-6mm;所述试纸条的宽度为3-5mm。

5. 一种检测黄曲霉毒素M1含量的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 将经 Eu^{3+} -荧光微球标记的黄曲霉毒素M1单克隆抗体Eu-AFM1-mAb与黄曲霉毒素M1的标准品混匀,20-30℃孵育使其充分竞争反应,加入到权利要求1-4任一所述时间分辨免疫层析定量试纸条中的样品垫上进行层析,然后测定标准品在检测线和质控线处相应的荧光强度值,分别得到T值和C值;设置阴性对照,即样品中不含有黄曲霉毒素M1,测得荧光强度 T_0 值;

(2) 取 T/T_0 作为参数,与浓度的对数值建立线性模型,得到黄曲霉毒素M1相应的标准曲线;

(3) 将经 Eu^{3+} -荧光微球标记的黄曲霉毒素M1单克隆抗体Eu-AFM1-mAb与待测样品混匀,20-30℃孵育使其充分竞争反应,加入到权利要求1-4任一所述时间分辨免疫层析定量试纸条中的样品垫上进行层析,然后测定待测样品在检测线和质控线处相应的荧光强度,代入步骤(2)所得的标准曲线,即得待测样品中的黄曲霉毒素M1含量结果。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤(1)中孵育时间为10-15min。

7. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中 Eu^{3+} -荧光微球的粒径为100-300nm,固含量1%-10%。

8. 如权利要求5或6所述的方法,其特征在于,Eu-AFM1-mAb制备过程中使用的微球复溶液是含有3%-5%蔗糖,0.5%-1%牛血清白蛋白,0.5%-1%Tween-20的pH6.0-7.0 0.04-0.06M的Tris-HCl溶液。

9. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤(1)中通过抗体基础保护液保护抗体生物活性,所述抗体基础保护液含3%-5%海藻糖、0.1%-0.3%PVPK-30、0.5%-1%BSA、0.1%-0.3%TritonX-100的pH 6.0-7.0 0.04-0.06M的Tris-HCl溶液。

10. 权利要求1-4任一所述时间分辨免疫层析定量试纸条在食品检测领域的应用。

一种检测牛奶中黄曲霉毒素M1的时间分辨免疫定量试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测牛奶中黄曲霉毒素M1的时间分辨免疫定量试纸条,属于时间分辨免疫分析快速检测技术领域。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFT)主要是黄曲霉和寄生曲霉菌的代谢产物,目前已发现20余种,其中黄曲霉毒素B1(Aflatoxin B1, AFB1)的毒性、致癌性、污染频率均居于首位。黄曲霉毒素M1(Aflatoxin M1, AFM1)是哺乳动物摄入污染了AFB1的饲料后在体内代谢的羟基化产物,常分泌到乳汁中,其毒性仅次于AFB1,WHO将其列为IIB类致癌物。AFM1主要存在于动物的乳、肾脏、肝脏、蛋、肉和尿中,其中以乳中最为常见,物理化学性质相当稳定,不被巴氏消毒法破坏。该毒素一旦进入人或动物体内后,除抑制DNA、RNA合成外,也抑制肝脏蛋白质合成,损害组织器官,致癌、致畸、致突变,引发动物及人类的肝癌、肾癌和胃癌,抑制免疫机能。为控制该毒素对食品的污染,各国制定了严格的限量标准。我国明确规定乳及乳制品中AFM1限量值为0.5 μ g/kg。欧盟的相关标准更加严格地规定乳及乳制品AFM1的含量不得超过0.05 μ g/kg,婴儿配方食品中AFM1的含量不得超过0.025 μ g/kg。

[0003] 目前AFM1的检测方法主要有薄层层析法(TLC)、荧光分光光度法、液相色谱-串联质谱法及包括酶联免疫分析、免疫层析、免疫传感器在内的免疫学检测方法,其中免疫层析法因快速、简便和经济在AFM1的筛查中表现出了较强的优势。TLC法虽然是牛奶中黄曲霉毒素M1测定的国标方法之一,但是样品处理繁琐,过程复杂,且提取和净化效果不够理想,双向展开增加了操作步骤和时间,对人和环境污染系数较大。而免疫学检测方法操作简单、灵敏可靠,可快速检测多种牛奶样品,是理想的检测方法。目前检测黄曲霉毒素M1的试纸条虽有各种方法的报道,如中国专利CN110187118A、CN109752553A、CN108254560A的酶联免疫试剂盒、CN104897863A、CN107656060A、CN107561273A的荧光微球试纸条、CN107688016A的化学发光检测试剂盒以及CN202794185U、CN204556639U的胶体金试纸条,但酶联免疫试剂盒检测时间较长,不适合现场及时检测;利用传统有机荧光染料的荧光微球作为探针,传统有机荧光染料发光寿命较短,稳定性欠佳,容易出现光漂白现象,灵敏度相对较低;采用胶体金作为识别探针,胶体金颗粒粒径均一性较差,免疫标记物不稳定,只能进行定性检测,无法快速检测乳及乳制品中的AFM1的含量。目前,仍缺少检测黄曲霉毒素M1的时间分辨荧光微球试纸条。

[0004] 哺乳类动物摄入被AFB1污染的饲料后,通过羟基化作用转化成AFM1,被AFM1污染的原料奶威胁着整个乳品产业链的安全。奶牛采食由霉菌毒素污染的饲料后,可在牛奶中检测到相应的霉菌毒素及其代谢物。AFM1和AFB1的广泛分布,更加大了乳及乳制品污染的风险。近年来,随着我国乳品消耗量的逐年升高,人们愈发重视乳品质量,建立一种更加灵敏快速并大通量地检测乳品中AFM1的方法已成为当务之急。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种利用时间分辨荧光探针快速灵敏检测黄曲霉毒素M1的免疫层析试纸条。本发明采用荧光微球替代传统胶体金,用荧光微球标记黄曲霉毒素M1抗体复合物,利用竞争免疫法,将其作为荧光探针用于免疫层析,通过读取荧光免疫分析仪上检测线的荧光值,可以对牛奶样品中的黄曲霉毒素M1进行快速定量分析。

[0006] 本发明第一个目的是提供一种检测黄曲霉毒素M1的时间分辨免疫层析定量试纸条,所述试纸条包括样品垫、硝酸纤维素膜(NC膜)和吸水纸,所述硝酸纤维素膜上设有检测线(T线)和质控线(C线),所述检测线上包被黄曲霉毒素M1完全抗原(AFM1-OVA),所述质控线包被羊抗鼠二抗。

[0007] 在本发明的一种实施方式中,所述黄曲霉毒素M1的检测浓度为0.05-2ng/mL。

[0008] 在本发明的一种实施方式中,所述黄曲霉毒素M1完全抗原的用量为0.1-0.8mg/mL,所述羊抗鼠二抗完全抗原的用量为0.1-1mg/mL。

[0009] 在本发明的一种实施方式中,所述检测线和质控线两线之间相距4-6mm。

[0010] 在本发明的一种实施方式中,所述时间分辨免疫层析定量试纸条的宽度为3-5mm。

[0011] 在本发明的一种实施方式中,所述检测线是将0.1-0.8mg/mL黄曲霉毒素M1完全抗原喷涂到硝酸纤维素膜上,每厘米的硝酸纤维素膜上检测线宽度喷涂量为1-2 μ L。当硝酸纤维素膜宽度为0.4cm时,喷涂量为0.4-0.8 μ L。

[0012] 在本发明的一种实施方式中,所述质控线是将0.1-1mg/mL羊抗鼠二抗喷涂到硝酸纤维素膜上,每厘米的硝酸纤维素膜上质控线宽度喷涂量为1-2 μ L/cm。当硝酸纤维素膜宽度为0.4cm时,喷涂量为0.4-0.8 μ L。

[0013] 在本发明的一种实施方式中,将喷涂好的硝酸纤维素膜置于37℃真空干燥箱中烘干备用。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,所述黄曲霉毒素M1完全抗原用0.01M pH 7.4的磷酸缓冲液(PBS)稀释至终浓度为0.1mg/mL-0.8mg/mL。

[0015] 在本发明的一种实施方式中,所述羊抗鼠二抗用0.01M pH 7.4的磷酸缓冲液稀释至终浓度0.1mg/mL-0.5mg/mL。

[0016] 在本发明的一种实施方式中,所述时间分辨免疫层析定量试纸条中,吸水纸、硝酸纤维素膜以及样品垫依次相邻,且相邻部位部分重叠区域的长度为2-4mm;所述吸水纸、样品垫与硝酸纤维素膜分别重叠的部分位于硝酸纤维素膜的上侧。

[0017] 本发明的第二个目的是提供一种检测黄曲霉毒素M1的方法,所述方法包括如下步骤:

[0018] (1) 将经Eu³⁺-荧光微球标记的黄曲霉毒素M1单克隆抗体Eu-AFM1-mAb与黄曲霉M1的标准品混匀,20-30℃孵育使其充分竞争反应,加入到上述时间分辨免疫层析定量试纸条中的样品垫上进行层析,然后利用HG-98免疫定量分析仪测定样品在检测线和质控线处相应的荧光强度值:T值和C值;

[0019] 设置阴性对照,即样品中不含有黄曲霉毒素M1,利用HG-98免疫定量分析仪测得荧光强度T₀值;

[0020] (2) 取T/T₀作为参数,与浓度的对数值建立线性模型,得到黄曲霉毒素M1相应的标准曲线;

[0021] (3) 重复步骤(1)层析待测样品,将步骤(1)中的标准品替换为待测样品,得到待测样品的荧光强度值,代入步骤(2)所得的标准曲线,即得待测样品中的黄曲霉毒素M1含量结果。

[0022] 在本发明的一种实施方式中,步骤(1)中孵育时间为10-15min。

[0023] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(1)中标记用的 Eu^{3+} -荧光微球是纳米级的聚苯乙烯微球中包裹了成千上万个经过螯合后的 Eu^{3+} 荧光,而且聚苯乙烯微球表面修饰有羧基化基团用以偶联蛋白,提高蛋白(抗原或抗体)的荧光标记效率,从而有效地提高分析的灵敏度。

[0024] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(1)中 Eu^{3+} -荧光微球的粒径100-300nm,固含量1%-10%,所述百分比为质量百分比。

[0025] 在本发明的一种实施方式中,所述的 Eu^{3+} -荧光微球标记黄曲霉毒素M1单克隆抗体是通过EDC和NHS介导活化作用与抗体分子的氨基结合,形成酰胺键而制备获得的。

[0026] 在本发明的一种实施方式中, Eu -AFM1-mAb制备过程中使用的微球复溶液是含有3%-5%蔗糖,0.5%-1%牛血清白蛋白,0.5%-1%Tween-20的pH6.0-7.0 0.04-0.06M的Tris-HCl溶液,所述百分比为质量百分比。

[0027] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(1)中制备的荧光探针通过抗体基础保护液保护抗体生物活性,所述抗体基础保护液含3%-5%海藻糖、0.1%-0.3%PVPPK-30、0.5%-1%BSA、0.1%-0.3%TritonX-100的pH 6.0-7.0 0.04-0.06M的Tris-HCl溶液,所述百分比为质量百分比。

[0028] 本发明还提供了上述时间分辨免疫层析定量试纸条在食品检测领域的应用。

[0029] 本发明所述的技术方案相比现有技术具有以下优点:

[0030] (1) 本发明提供的方法能够实现快速定量检测各类乳制品中黄曲霉毒素M1的含量,特异性强、灵敏度高,其中当黄曲霉毒素M1的浓度范围为0.05-2ng/mL时,其浓度的对数值与 T/T_0 成线性关系,线性方程为 $Y = -45.53 \lg X + 26.68$, $R^2 = 0.9870$,检测限可达到0.065ng/mL。本发明提供的检测方法的检测范围广,其定量的线性范围能够达到0.05ng/mL-2ng/mL,该检测方法稳定可靠,样品添加回收率为83.28%-114.28%,变异系数均小于5.812%。

[0031] (2) 本发明提供的方法以黄曲霉毒素M1单克隆抗体作为识别靶点,以时间分辨荧光微球为信号源,荧光微球的体积远大于荧光染料分子的体积,不但可以有效消除非特异性荧光干扰,粒径均一,如图1所示,表面功能基团稳定可控,实验重复性较好,检测特异性强,可实现快速定量检测,且灵敏度高、误差小,为即时检测提供了极大的便捷。

[0032] (3) 本发明的试纸条具有灵敏度高、成本低廉、操作简便、快速定量检测、稳定性好、适合工商部门、第三方检测机构、各级政府监管部门、乳制品企业等使用,市场前景广阔,易推广使用。

附图说明

[0033] 图1: Eu^{3+} -荧光微球透射电镜图。

[0034] 图2:黄曲霉毒素M1免疫试纸条结构图。

[0035] 图3:标记荧光微球免疫层析法检测黄曲霉毒素M1的标准曲线(A) 定量曲线(B) 及

紫外灯下的试纸条图(C)。

[0036] 图4:黄曲霉毒素M1免疫层析法的检测线(T线)完全抗原浓度的优化;

[0037] 图5:黄曲霉毒素M1免疫层析法的T线免疫动力学曲线;以T/C为纵坐标,免疫反应时间为横坐标绘制免疫反应动力学曲线(A);以荧光强度值为纵坐标,反应时间为横坐标绘制免疫反应动力学曲线(B);不同免疫反应时间下,竞争抑制率的变化(C)。

[0038] 图6:检测牛奶中黄曲霉毒素M1的标准曲线标准曲线。

[0039] 图7:黄曲霉毒素M1特异性实验。

具体实施方式

[0040] 实施例所述室温的含义为本领域常规的常温含义,能够进行实施例中所记载的反应即可。优选地,为25℃。

[0041] 实施例1Eu³⁺-荧光微球标记黄曲霉毒素M1单克隆抗体的荧光探针制备

[0042] 相关溶液的制备:

[0043] 活化缓冲液:pH 4.5-6.5 0.05M的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES, C₆H₁₃NO₄S • H₂O)溶液;

[0044] 偶联缓冲液:pH 7.0-8.0 0.01M的磷酸缓冲液(PBS)(避免使用存在游离胺的溶剂);

[0045] 活化剂:10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC, C₈H₁₇N₃ • HCl)溶液以及10mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, C₄H₅NO₃)溶液;

[0046] 封闭缓冲液:含1%BSA、0.05%Tween-20的pH 6.0-7.0 0.01M的磷酸缓冲液(PBS);

[0047] 抗体基础保护液:含5%海藻糖、0.1%PVPK-30、0.5%BSA、0.1%TritonX-100的pH 6.0-7.0 0.05M的Tris-HCl;

[0048] 标记洗涤液:含0.1%Tween-20的pH 6.0-7.0 0.05M的Tris-HCl;微球复溶液/反应缓释液:含有5%蔗糖,1%牛血清白蛋白,1%Tween-20的pH6.0-7.0 0.05M的Tris-HCl;

[0049] Eu-AFM1-mAb具体制备方法如下:

[0050] (1)取4℃放置的内部包裹Eu³⁺、表面修饰有羧基官能团的荧光微球(购于厦门迪佰生物科技有限公司,粒径300nm) 50μL (1%固形物含量),超声分散,加入800-1000μL浓度为活化缓冲液,15000rpm于4℃离心10-15min;

[0051] (2)弃上清,加入500-800μL活化缓冲液,超声重悬,重复离心清洗2-3次;

[0052] (3)弃上清,加入200μL活化缓冲液超声重悬,加入50μL 10mg/mL EDC溶液、50μL 10mg/mL的NHS溶液作为活化剂,室温摇床500rpm避光振荡活化40min;

[0053] (4)活化完成后离心,弃上清,加入PBS缓冲液清洗2-3次;

[0054] (5)弃上清,加入400μL偶联缓冲液超声重悬,再加入10μg黄曲霉毒素M1单克隆抗体(制备方法参考文献:[1]管笛.黄曲霉毒素M1单克隆抗体及检测技术研究[D].中国农业科学院,2011.),室温避光振荡标记3h;

[0055] (6)标记结束后加入10%(v/v)的封闭缓冲液和100μL抗体基础保护液,室温避光振荡40min;

[0056] (7)封闭后离心弃上清,用800-1000μL的标记洗涤液清洗2-3次;

[0057] (8) 弃上清,加入200 μ L荧光微球复溶液,得到Eu³⁺-荧光微球标记的黄曲霉毒素M1单克隆抗体Eu-AFM1-mAb,4℃保存备用。

[0058] 实施例2基于标记荧光微球的黄曲霉毒素M1免疫试纸条的制备

[0059] 该试纸条的制备方法主要包括以下两个步骤:

[0060] 1、制备具有包被有黄曲霉毒素M1-OVA完全抗原的检测线和包被有羊抗鼠抗体的质控线的反应膜;

[0061] 2、在硝酸纤维素膜(NC膜)上分别喷涂黄曲霉毒素M1-OVA完全抗原(0.4mg/mL)、羊抗鼠二抗(0.3mg/mL)作为检测线(T线)和质控线(C线),喷涂量均为1 μ L/cm,T线和C线的宽度取决于喷膜仪管路的直径约2mm,T线距离样品垫约5mm,C线距离吸水纸约为5mm,两线之间相距约4-6mm,37℃干燥2-3h。将样品垫,硝酸纤维素膜和吸水纸粘贴在PVC底板上组装成试纸条,试纸条组装的关键是要保证各部分之间具有一致的传递性,其中样品垫叠在NC膜上,二者重叠约3mm,类似地,吸水纸叠在NC膜上,二者重叠约3mm,用切条机将粘贴好的板切成约4mm宽的试纸条,用塑料底座和卡壳组装,4℃密封保存备用。结构图如图2所示,底板上从左到右依次为样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸。

[0062] 实施例3黄曲霉毒素M1免疫试纸条的标准曲线绘制

[0063] 标准曲线的绘制方法是:

[0064] 取黄曲霉毒素M1标准品入阴性牛奶样品中配制成AFM1浓度分别为0、0.05、0.1、0.25、0.5、1、2ng/mL的标准溶液用于荧光试纸条检测(其中标准品释液为含5%甲醇(v:v)的0.01M pH 7.4的PBS溶液;Eu-AFM1-mAb溶液:0.05 μ g/ μ L荧光微球标记的黄曲霉毒素M1单克隆抗体,含有5%蔗糖,1%牛血清白蛋白,1%Tween-20的pH7.0 0.05M的Tris-HCl溶液),将实施例1制得的Eu³⁺-荧光微球标记的黄曲霉毒素M1单克隆抗体(Eu-AFM1-mAb)作为荧光探针,将20 μ L的加标样品溶液和50 μ L的荧光探针混合均匀后室温孵育10min,缓慢滴入试纸条加样孔,37℃层析15min后用HG-98免疫定量分析仪记录试纸条的T线荧光值,每个浓度测定六个平行,设定浓度为0ppb标准液的T线荧光值为T₀,其他加标浓度的T线荧光值为T,以各个黄曲霉M1标准品浓度的对数值为横坐标,T/T₀×100(%)为纵坐标绘制标准曲线,竞争抑制率设为(1-T/T₀)×100%。

[0065] 如图3A可以看出,随着黄曲霉毒素M1浓度的增大,试纸条T线条带上的荧光会越来越浅,所以T/T₀会越来越小,如图3B所示为T/T₀随黄曲霉毒素M1浓度的变化曲线,当黄曲霉毒素M1的浓度为0.05-2ng/mL时,黄曲霉毒素M1浓度的对数值与T/T₀成线性关系,线性方程为Y=-45.53LgX+26.68,R²=0.9870,IC₅₀=0.204ng/mL,检测限LOD可达到0.065ng/mL。

[0066] 实施例4黄曲霉毒素M1免疫试纸条的条件优化

[0067] (1) 黄曲霉毒素M1完全抗原的用量的影响

[0068] 为了提高试纸条检测的灵敏度,研究了实验过程中不同完全抗原浓度对阴性对照组与黄曲霉毒素M1含量为0.5 μ g/L的样本之间的竞争抑制率的影响。

[0069] 具体的实验探究过程如下:制备黄曲霉毒素M1免疫层析试纸条时,在检测线T处喷涂AFM1-OVA完全抗原的过程中,AFM1-OVA浓度选自0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.4mg/mL、0.6mg/mL和0.8mg/mL,选取阴性对照组(5%甲醇-PBS溶液)和阳性试验组(AF₁M1浓度为0.5 μ g/L)进行分析,进而评价不同浓度的AFM1-OVA对免疫层析方法的影响。结果图4所示,随着T线处AFM1-OVA完全抗原浓度的增加,阴性对照组(5%甲醇-PBS溶液)与阳性试验组(AF₁M1=0.5 μ

g/L) 之间的荧光强度逐渐增加后趋于稳定,当AFM1-OVA的浓度为0.4mg/mL时,阴阳样本之间的竞争抑制率($1-T/T_0$)达到最大值0.3。且此时检测线处也有相对较强的荧光信号值,分别为510854a.u. (阴性对照荧光强度:358932a.u.)。因此0.4mg/mL为T线处AFM1-OVA完全抗原的较佳浓度。

[0070] (2) 免疫时间对检测结果的影响

[0071] 图5为黄曲霉毒素M1免疫层析法的T线免疫动力学曲线,实验过程如下:参照实施例3的过程,将20 μ L待测样品和50 μ L荧光微球-AFM1抗体复合物于96孔微孔板中,预孵育5min和10min,取70 μ L混合物加入样品垫层析,用HG-98免疫定量分析仪记录每分钟的T线荧光强度变化。以T/C (FI_T/FT_C ,即T线与C线荧光强度的比值) 为纵坐标,免疫反应时间为横坐标绘制免疫反应动力学曲线,孵育5min和10min对比后由图5A可看出,孵育10min的T/C值更低,为0.15,说明其竞争抑制率更大,此外,孵育10min比孵育5min的T/C值高0.05。因此选择10min作为样品加入试纸条免疫层析之前的预反应时间。

[0072] 以荧光强度值为纵坐标,反应时间为横坐标绘制免疫反应动力学曲线,观察T线和C线荧光强度随时间的变化,以T线荧光值达到稳定的时间作为较佳检测时间。从图5B中可以看出,两条线的荧光强度在5-15min内均随着时间的延长呈现增强的趋势。在15min后,T线和C线的荧光强度值不再明显变化,趋于平稳,由图5C可以看出,阴性对照组(5%甲醇-PBS溶液)与阳性试验组(AFM1=0.5 μ g/L) 之间的竞争抑制率($1-T/T_0$) 在15min趋于稳定,因此层析时间选择15min较为合适。

[0073] 实施例5黄曲霉毒素M1免疫试纸条的性能测试

[0074] 1、精密度试验

[0075] 从同一批次内取出8个AFM1免疫层析试纸条分别检测阴性对照组(5%甲醇-PBS)检测线处的荧光强度值(T_0) 和阳性试验组(AFM1 0.5 μ g/L) T线处的荧光强度值(T) 分析批内差异。通过8个不同批次的AFM1免疫层析试纸条分别检测阴性对照组(5%甲醇-PBS) 检测线处的荧光强度值(T_0) 和阳性试验组(AFM1 0.5 μ g/L) T线处的荧光强度值(T) 分析批间差异。由表1可知,通过变异系数计算公式分析得到 T_0 、T和 T/T_0 (%) 的批内变异系数分别为3.36%、5.74%和2.81%, T_0 、T和 T/T_0 (%) 的批间变异系数分别为4.26%、5.80%和5.54%,表明该试纸条的批内和批间变异系数小,精密度高,准确性好,基本符合定量检测试纸条的要求。

[0076] 表1黄曲霉毒素M1免疫层析试纸条的精密度检测结果

[0077]	批内	T_0	T	T/T_0 (%)	批间	T_0	T	T/T_0 (%)
	1	308062	218937	71.07	1	304912	210053	68.84
	2	315078	221703	70.36	2	294453	201367	68.41
	3	301937	206609	68.43	3	296380	206320	69.62
	4	284703	191820	67.38	4	323695	214793	66.27
	5	296234	193609	65.36	5	311638	184026	59.56

[0078]	6	314312	220046	70.01	6	323078	200570	62.04
	7	296234	193609	65.36	7	335663	223992	66.83
	8	317031	224000	70.66	8	311009	221394	71.19
	Mean	305162	210053	68.78	Mean	312603	207814	66.59
	SD	10256	120633	1.93	SD	13322	12052	3.69
	CV(%)	3.36	5.74	2.81	CV(%)	4.26	5.80	5.54

[0079] 2、准确度试验

[0080] 样品处理：

[0081] 根据不同乳制品的特征选择不同的样品前处理方式,如果该样品为液态奶制品,对于脂肪度大于5%的液态奶制品,将其在4℃下用6000rpm的转速离心5min,去除上层脂肪层后,取下层液体待检;对于脂肪度小于5%的液态奶制品,可直接用于检测。如果该样品为固态奶制品,如奶粉等,将固态奶制品按照1:8 (m/V) 的比例溶于超纯水中配置成液态奶,即向1g的奶粉中加入8g的超纯水,混匀后参照液态奶制品的相关方法对样品进行处理。

[0082] 为了验证黄曲霉毒素M1试纸条的准确性与灵敏度,对几种阴性乳及乳制品样本(生乳、巴士杀菌乳、酸奶、奶粉) 分别进行加标回收试验,每种样本的添加浓度均设置高、中、低三组不同的加标浓度,每组浓度梯度均设置三组平行试验。以加标回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%) 作为精密度评价指标。加标回收率和相对标准偏差的计算公式如下:

$$[0083] \quad \text{加标回收率}(\%) = \frac{\text{加标样品实际检测浓度}}{\text{加标浓度}} \times 100$$

$$[0084] \quad \text{变异系数}(CV, \%) = \frac{\text{标准偏差}(SD)}{\text{平均值}\bar{X}}$$

[0085] 经确证为阴性的乳制品样本分别按照0.1μg/L、0.5μg/L和2μg/L三个浓度梯度进行黄曲霉毒素M1加标回收实验。每个浓度重复10次,取T/T₀的平均值并计算变异系数,结果如表1所示,测定结果CV均小于5.812%,表明在线性范围内,该试纸条具有较好的准确性。本研究以含0.05%吐温-20的PBS溶液作为样品稀释液以确保该方法的性能。

[0086] 准确称量5g奶粉样品,加入40mL 60-80℃的超纯水,超声或者震荡待充分溶解,可直接加样用于免疫层析检测。

[0087] 准确吸取10mL巴士杀菌乳样品,6000rpm,4℃离心10min,取中下层液体,用含0.05%吐温-20的PBS稀释5倍后用于免疫层析检测。

[0088] 准确称量2g酸奶样品,加入5mL甲醇,涡旋3min,置于6000rpm、4℃下离心10min,将适量的上清液转移至干净的离心管中,用于免疫层析检测。

[0089] 取适量生乳样品,可直接加样用于免疫层析检测。

[0090] 表2黄曲霉毒素M1免疫层析试纸条的准确度检测结果

	样品	加标浓度 (ng/mL)	检测浓度	回收率 (%)	变异系数 (CV, %)
			Mean±SD		
[0091]	奶粉	0.1	0.092±0.034	92.07%	4.345
		0.5	0.589±0.087	117.88%	3.817
		2	1.841±0.059	92.05%	5.791
	巴士杀菌乳	0.1	0.089±0.062	89.46%	2.981
		0.5	0.475±0.095	95.19%	3.782
		2	2.195±0.087	109.75%	5.812
	酸奶	0.1	0.083±0.042	83.28%	4.901
		0.5	0.489±0.028	97.81%	3.897
		2	1.901±0.019	95.05%	4.819
	生乳	0.1	0.081±0.071	81.63%	3.618
		0.5	0.571±0.083	114.28%	2.719
		2	2.195±0.059	109.75%	4.113

[0092] 由表2可知,将制备的黄曲霉毒素M1检测免疫层析试纸条用于检测加标的牛奶样品中,最终得出牛奶的加标回收率在83.28%-114.28%之间,变异系数低于5.812%,表明制备的AFM1免疫荧光定量试纸条能够用于现场快速筛查与检测。

[0093] 3、牛奶标准曲线

[0094] 为了进一步确保该方法的准确性,本实验以经LC-MS确证阴性牛奶样品作为基底,向牛奶中加入AFM1标准品配制含有黄曲霉毒素M1 0ppb、0.05ppb、0.1ppb、0.25ppb、0.5ppb、1ppb、2ppb的牛奶样品,并绘制牛奶标准曲线,适合乳及乳制品的现场即时检测。结果如图6所示,当黄曲霉毒素M1的浓度范围为0.05ng/mL-2ng/mL时,其浓度的对数值与T/T₀成线性关系,线性方程为 $Y = -38.56\lg X + 36.24$, $R^2 = 0.9912$,检测限可达到0.424ng/mL。

[0095] 4、交叉反应试验

[0096] 选取与黄曲霉毒素M1具有类似结构或者类似功能的类似物 (AFG1、AFG2、AFB1和AFB2) 和四种常见霉菌毒素 (DON、FB1、OTA和ZEN) 进行评价时间分辨免疫层析试纸条的特异性。通过用本发明提供的试纸条检测阴性样本 (5%甲醇-PBS溶液) 和各个毒素的阳性样本 (20ng/mL), 记录其T线荧光强度值,由图7和表3可以看出,黄曲霉毒素M1与其结构类似物具有一定的交叉反应,而与其他四种霉菌毒素的交叉反应较低,表明该试纸条性能稳定,符合市场需求,具有广阔的市场前景。

[0097] 表3交叉反应试验结果

[0098]	霉菌毒素	Fl _T (a.u.)
	阴性样本	359870.4

[0099]	AFM1	48038.8
	AFG1	62859.0
	AFB1	115834.0
	AFB2	133916.8
	AFG2	235716.8
	OTA	266667.6
	FB1	324795.2
	DON	333668.2
	ZEN	343037.6

[0100] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

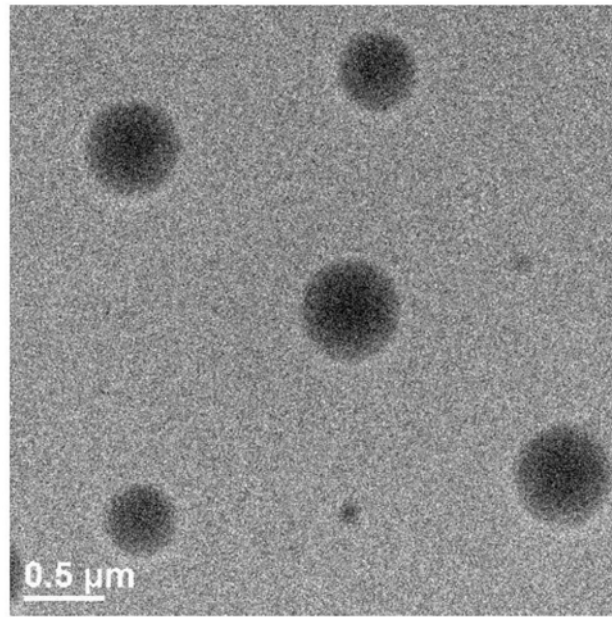


图1

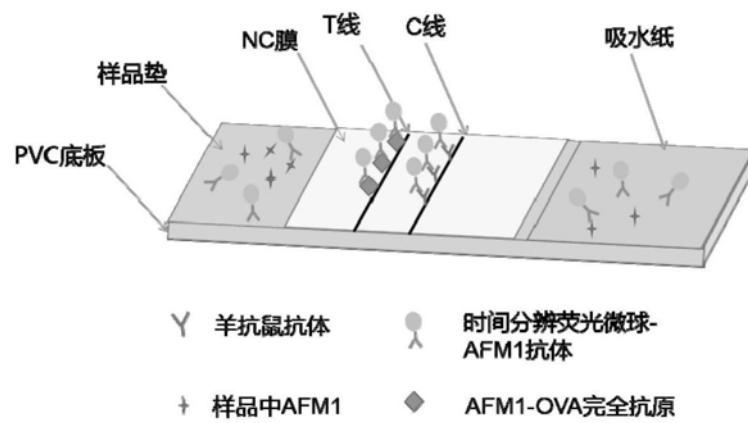


图2

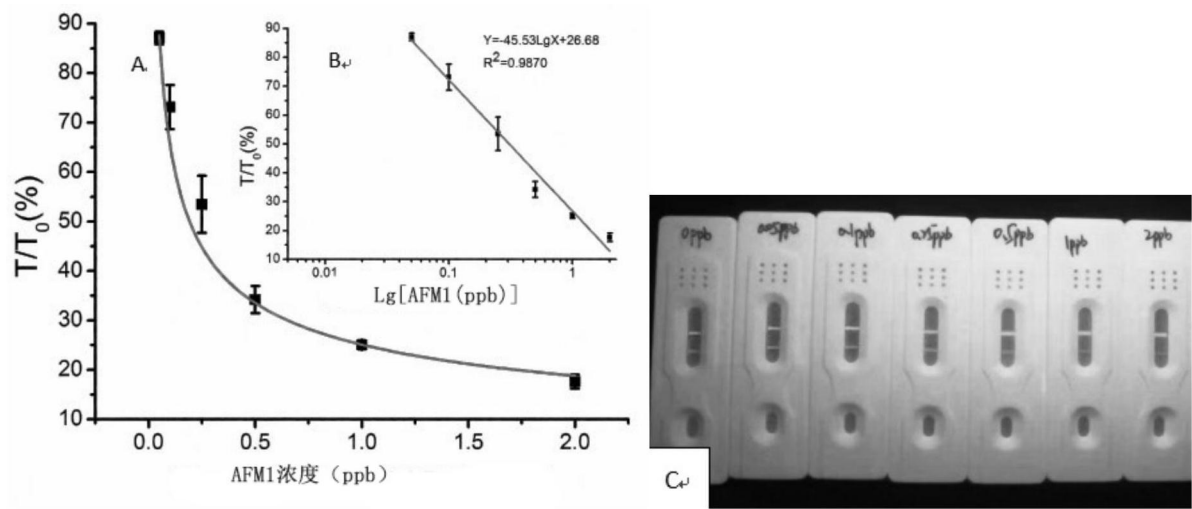


图3

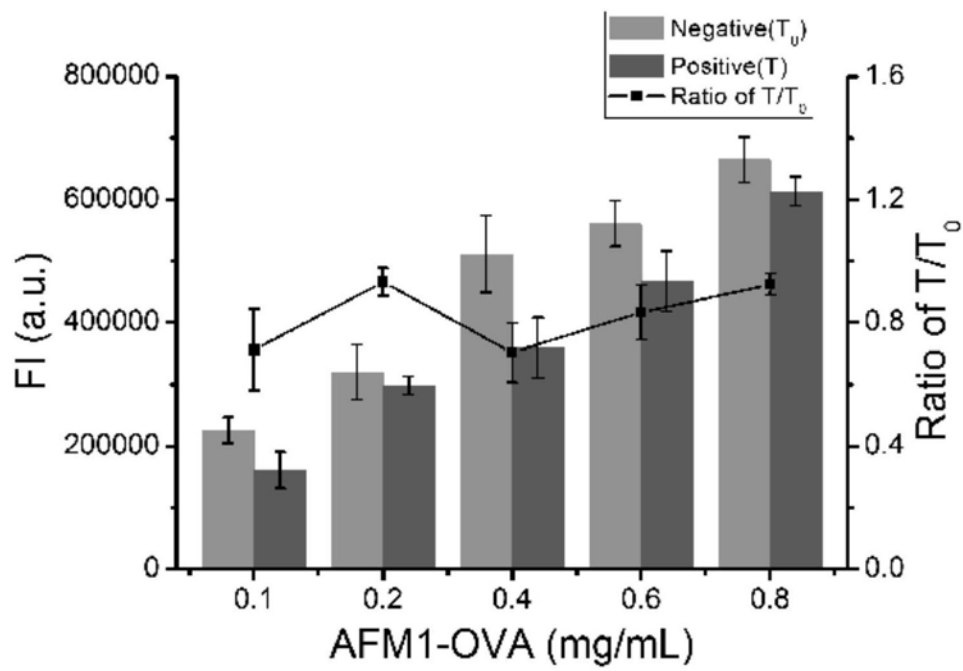
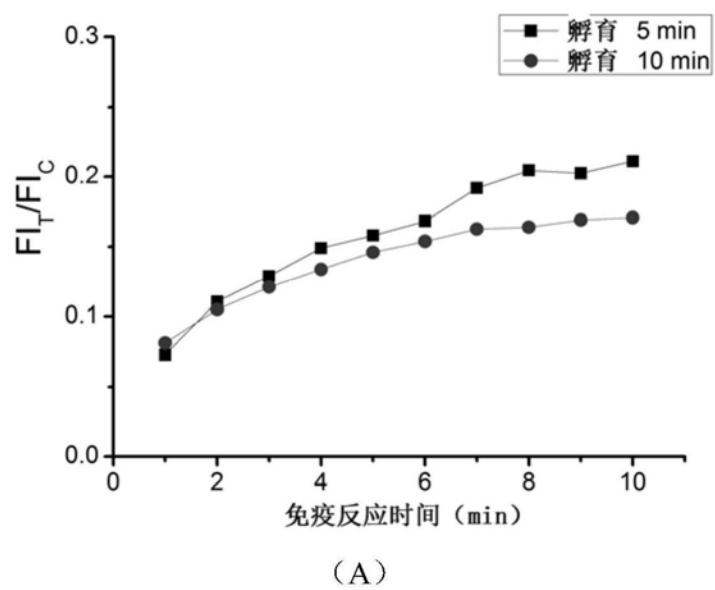


图4



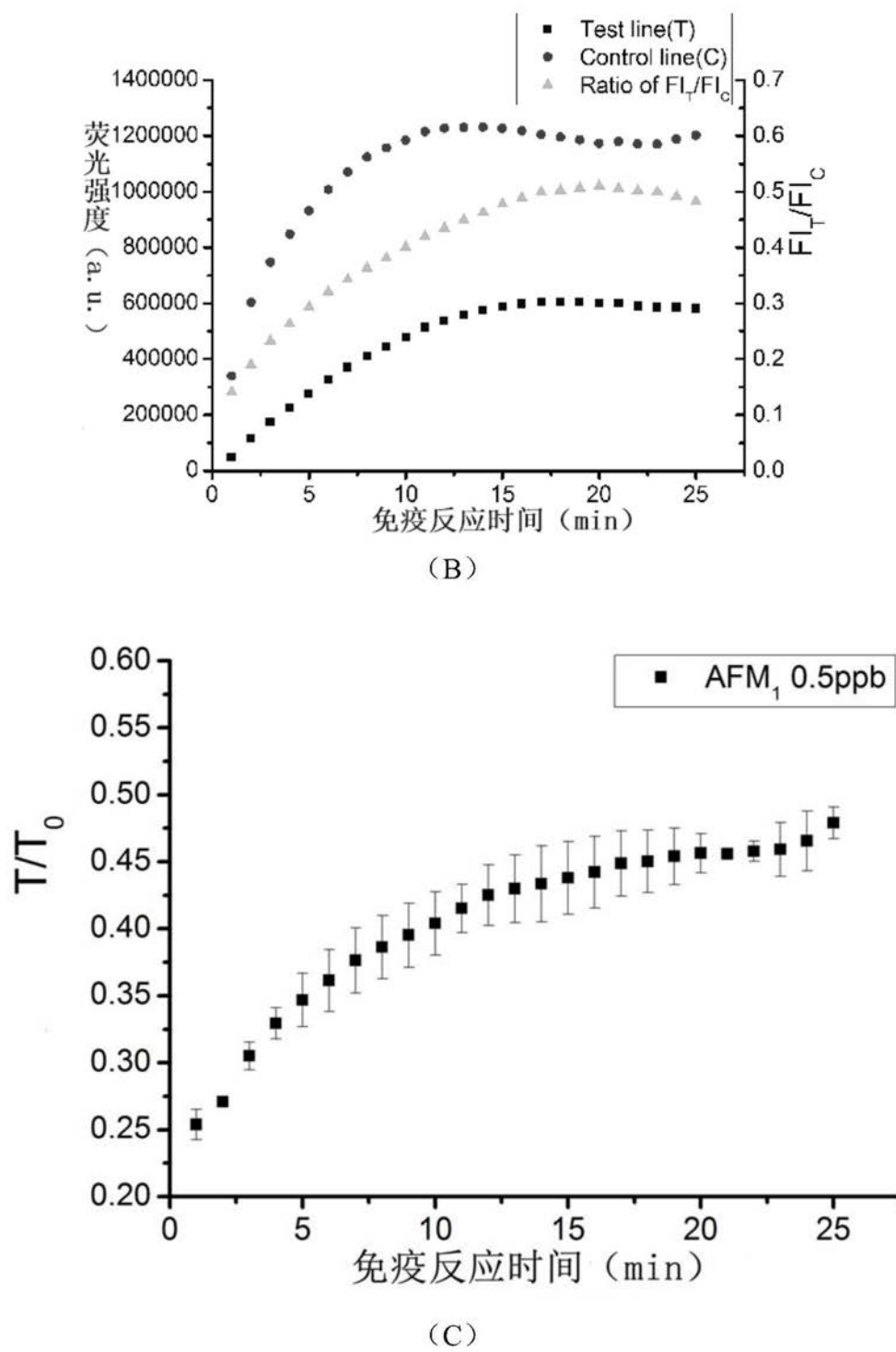


图5

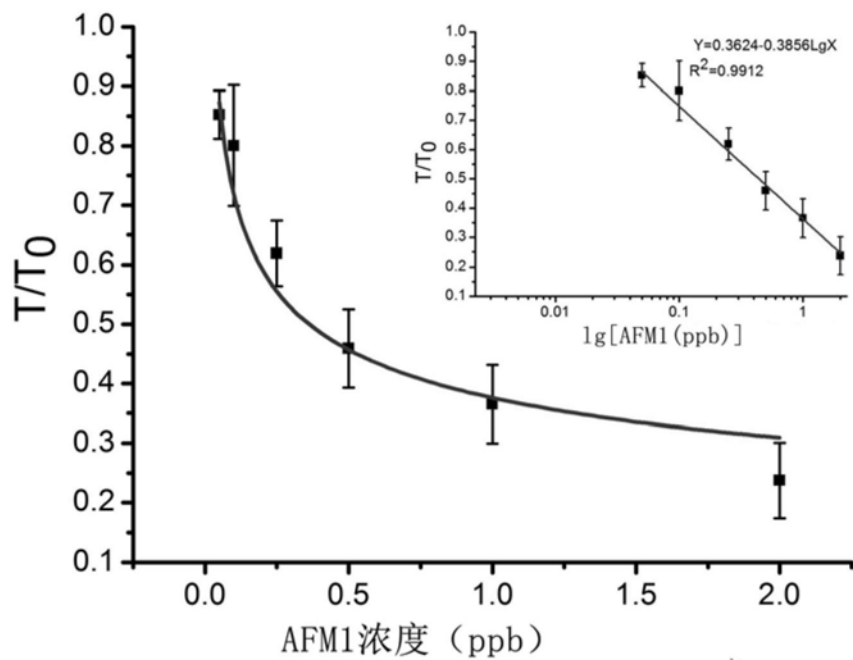


图6

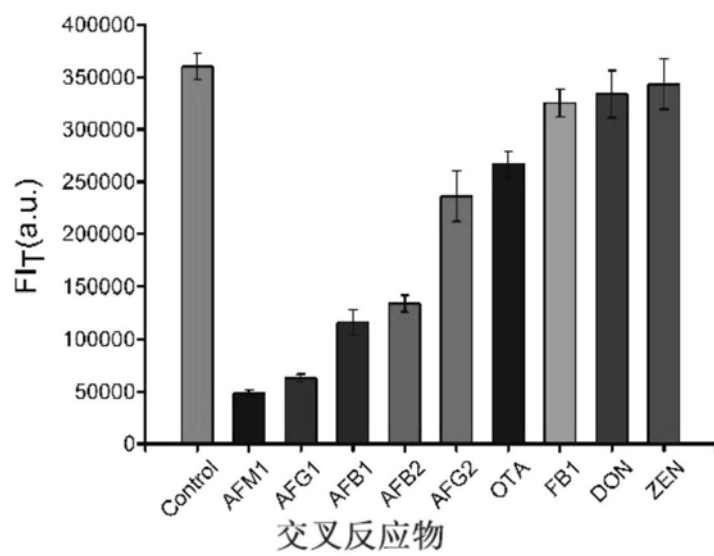


图7

专利名称(译)	一种检测牛奶中黄曲霉毒素M1的时间分辨免疫定量试纸条		
公开(公告)号	CN110988339A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911388692.0	申请日	2019-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	孙秀兰 李淼 孙嘉笛 王海鸣 纪剑 张银志		
发明人	孙秀兰 李淼 孙嘉笛 王海鸣 纪剑 张银志		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测牛奶中黄曲霉毒素M1的时间分辨免疫定量试纸条，属于时间分辨免疫分析快速检测技术领域。本发明利用竞争免疫法，通过读取荧光定量免疫分析仪上T线的荧光值，即时定量检测分析牛奶样品中的黄曲霉毒素M1。本发明还提供了一种应用上述试纸条检测乳及乳制品等样品前处理的方法，以期降低基质效应。本发明试纸条检测黄曲霉毒素毒素M1的方法简单快速，稳定可靠且灵敏度高，适合大量样本的的筛查和现场监控，具有良好的商业化应用前景。

