



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101281195 B

(45) 授权公告日 2013.03.06

(21) 申请号 200810061598.X

(22) 申请日 2008.05.19

(73) 专利权人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区学
源街中国计量学院

专利权人 宁波科瑞特动物药业有限公司

(72) 发明人 张明洲 陈宗伦 刘军 郭瑞忠
施明华 胡华军 储国华

(74) 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公
司 33214

代理人 王鹏举

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101158685 A, 2008.04.09, 权利要求 1,
实施例 1.

Xiang-Hong Wang et al. Enzyme-linked

immunosorbent assay and colloidal gold
immunoassay for ochratoxin A: investigation
of analytical conditions and sample matrix
on assay performance. 《Anal Bioanal
Chem》.2007, 第 389 卷第 903-911 页.

SHUO WANG et al. Rapid Determination
of Fumonisin B1 in Food Samples by
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and
Colloidal Gold Immunoassay. 《J. Agric. Food
Chem》.2006, 第 54 卷(第 7 期), 第 2491-2495
页.

Anna Yu Kolosova et al. Development
of a colloidal gold-based lateral-flow
immunoassay for the rapid simultaneous
detection of zearalenone and
deoxynivalenol. 《Anal Bioanal Chem》.2007,
第 389 卷第 2103-2107 页.

审查员 曹扣

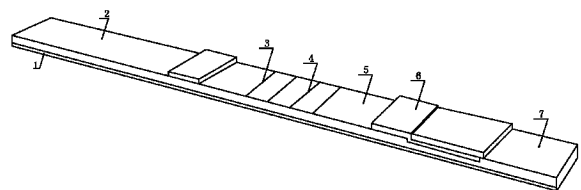
权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图 2 页

(54) 发明名称

检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸及其检
测方法

(57) 摘要

本发明属于生物毒素检测技术领域,尤其涉
及一种检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸及其
检测方法。检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸,
其包括胶体金标记垫、检测线,胶体金标记垫所包
被物质为一种生物毒素抗体或多种生物毒素抗体
的胶体金标记物的混合物,检测线的条数与胶体
金标记垫包被生物毒素抗体的数目相应,每条检
测线上分别包被有与胶体金标记抗体相应的单一
的生物毒素检测用抗原。本发明的胶体金免疫层
析试纸特异性强;操作简单方便,对牛奶、动物尿
液可直接检测,饲料、小麦、玉米、大麦等样品简
单处理后即可检测,3-5min 以后便可观察结果。本
方法适用面宽,能满足食品安全、饲料安全及政府
检测机构快速检测生物毒素残留的需求。



1. 呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 四联胶体金免疫层析检测试纸,其包括在底板上依次粘贴的样品吸收垫、胶体金标记垫、检测反应区及吸收垫,检测反应区上设有包被有检测用抗原的检测线和包被有二抗的质控线,其特征在于:胶体金标记垫所包被的物质为呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 抗体的胶体金标记物的混合物,所述的检测线的条数为四条,分别为 T1、T2、T3、T4,每条检测线上分别包被有与胶体金标记抗体相应的呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 检测用抗原,检测用抗原的浓度为 0.5-2.0mg/mL, T4 距离检测区底部 4-6mm;质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG,距离检测区顶部 4-6mm;C 线与 T1, T1 与 T2, T2 与 T3, T3 与 T4 两条线之间间隔 2-4mm;

上述的呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 检测用抗原制备方法如下:

a、玉米赤霉烯酮偶合抗原的合成方法如下:取 10-20mg 载体蛋白溶于 1mL 的水中,取玉米赤霉烯半抗原 0.01-0.04mmol 溶于二氧六环中,将上述两种溶液缓慢混合;取碳化二亚胺 0.02-0.04mmol,溶于 1mL 水中,逐滴加入到混合液中,在 20-25°C 下,搅拌反应过夜,用盐酸调 PH=6.0,再次加入 0.01-0.02mmol 碳化二亚胺,后放于 4°C 冰箱内 24 ~ 28h,反应完成后将反应液装入透析袋,4°C 下, pH=7.4 的 PBS 中透析,分装,冷冻保存备用;

b、呕吐毒素抗原的合成方法如下:将 10-40mg 呕吐毒素溶解在 0.1-0.8 ml 吡啶中,加入到 10ml 的反应瓶中,在反应瓶中加入 30-120mg 的硼酸,混合物在室温下搅拌过夜,再加入 30-120mg 琥珀酸酐,并通入氮气,密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 2-3h,将吡啶在室温吹干后,加入 5mL 乙酸乙酯溶解残余物,离心,取上清液,室温吹干后,加入 NHS、DCC 溶于 DMF 中,室温振荡 30-60min,离心,取上清液,将上清液缓慢滴加到载体蛋白液中,在 4°C 振荡反应 4h,然后,在 0.01M PBS PH7.4 中透析,分装,冷冻保存备用;

c、伏马菌素 B1 抗原的合成方法如下:取 10-40mg 载体蛋白,伏马菌素 B1 0.01-0.04mmol 溶于 0.02M PBS PH=7.4 中,室温下搅拌混匀;再缓慢加入 0.02-0.06 mmol 的戊二醛,混合物在室温下搅拌过夜,反应完成后将反应液装入透析袋,4°C 下, pH=7.4 的 PBS 中透析,加入 0.01-0.04mmol 的伏马菌素 B1,后放于 4°C 冰箱内 24h,再加入 0.01M Tris 继续搅拌 4h,反应完成后将反应液装入透析袋,在 4°C 下透析,分装,冷冻保存备用;

d、赭曲霉毒素 A 抗原的合成方法如下:取 20-40mg 载体蛋白,赭曲霉毒素 A 0.02-0.04mmol 溶于 0.02M PBS PH=7.4 中,室温下搅拌混匀;再缓慢加入 0.03-0.06 mmol 的戊二醛,混合物在室温下搅拌过夜,反应完成后将反应液装入透析袋,4°C 下, pH=7.4 的 PBS 中透析,透析完成后,分装,-20°C 冷冻保存备用;

所述的呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 抗体采用抗体单克隆抗体,所述的单克隆抗体制备方法如下:

(1) 免疫动物:

取健康 6-10 周龄雌性二级 Balb/c 小鼠 6 只进行免疫;第一次基础免疫将 0.5-1.0mg/mL 生物毒素免疫用抗原与等量完全弗氏佐剂用搅拌器充分混匀乳化,进行皮下多点注射,注射量 0.1-0.3mL/点;三周后开始进行加强免疫,剂量同上,佐剂换为不完全弗氏佐剂,二免后,定期测定抗体效价,每隔三周加强免疫一次,末次免疫 3d 后取脾脏融合;

(2) 脾细胞悬液的制备：

效价高的小鼠，拉颈处死，70%酒精浸泡消毒 10min，用手术剪将小鼠腹部剪开一小口，剥开皮肤，露出腹腔，在无菌条件下取出脾脏，用不完全的培养液洗一次，置平皿中不锈钢筛网上，用注射器针芯研磨成细胞悬液后计数；

(3) 细胞融合和克隆化：

取对数生长的骨髓瘤细胞，1000rpm 离心 5 分钟，弃上清，用不完全培养液混悬细胞后计数，取所需的细胞数，用不完全培养液洗涤 2 次；同时制备免疫脾细胞悬液，用不完全培养液洗涤 2 次；将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1：10 或 1：5 的比例混合在一起，在 50ml 塑料离心管内用不完全培养液洗 1 次，1200rpm，5-10 分钟；弃上清，轻轻弹击离心管底，使细胞沉淀略加松动；在室温下融合：加入预热的 1ml 50%PEG，边加边搅拌；加预热的不完全培养液，终止 PEG 作用；离心，弃上清，先用 6ml 左右 20%小牛血清轻轻混悬；将融合后细胞悬液加入含有饲养细胞的 96 孔板，100 μ l / 孔，37℃、5% CO₂ 条件下培养；融合一天后，加 HAT 选择培养液；融合后 7d，用 HT 培养液换液 1 次，在 13d 后根据增殖情况改用 20% NBS 的完全培养液；待集落长至孔底 1/3 时，可取上清检测相应的特异性抗体；细胞完全克隆化后，将细胞注入小鼠腹腔，将腹水用蛋白 A 免疫亲和层析纯化后，即得到生物毒素单克隆抗体；

所述的胶体金标记垫的制备包括以下的步骤：

(1) 胶体金溶胶的制备：取 250ml 三角瓶一个，加 100 ml 超纯水及 1ml 1% 氯化金，加热沸腾；取 2ml 的 1% 柠檬酸钠加入上述溶液中；混匀，再保持沸腾 30 min，溶液颜色首先变黑，再逐渐变红，即为胶体金溶胶；

(2) 胶体金标记生物毒素抗体：磁力搅拌下，用 0.1M 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 8.2，按 10-20 μ g 抗体/ml 胶体金加入生物毒素抗体，继续搅拌混匀 30min，加入 10%BSA 至终浓度为 0.5%，静置 30min；12000rpm、4℃离心 30min，弃上清，沉淀用 1/20 初始胶体金体积的 0.02M pH9.0 的硼酸盐缓冲液，硼酸盐缓冲液配方：硼酸 0.1237g，PEG-20000 1g，用超纯水定容至 1L，调 pH 至 9.0；重悬，置 4℃备用，有效期 60 天；

(3) 胶体金标记垫处理：将标记好的抗体倒入一槽中，将玻璃纤维纸浸入 1min，取出，室温干燥。

检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物毒素检测技术领域,尤其涉及一种检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸及其检测方法。

背景技术

[0002] 生物毒素是一种存在于饲料和饲料原料中的抗营养因子,是由不同类属的真菌所产生的次级有毒代谢产物。动物饲料中生物毒素的污染是一个全球性问题,生物毒素既可在作物田间生长时产生也可在仓储期间产生,或两方面都有,用生物毒素污染的饲料饲喂动物会引起急、慢性中毒症状甚至死亡,而且还会在动物的肉、蛋、奶中残留,威胁到人类自身的健康。

[0003] 动物饲料中生物毒素主要为霉菌毒素,霉菌毒素是由中温型霉菌产生,在谷物及饲料中常见的产毒素霉菌主要有:曲霉属(*aspergillus*)、青霉属(*penicillium*)、镰孢菌属(*fusarium*)和麦角菌属(*claviceps*)等。各种霉菌可以产生多达数百种霉菌毒素,然而危害畜禽生产的霉菌毒素主要有:呕吐毒素(Vomitoxin,或称脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA)、伏马菌素 B1(fumonisin B1, FB1)、黄曲霉毒素 B1(aflatoxin B1, AFB1)、赭曲霉毒素 A(OchratoxinA, OTA)等。黄曲霉毒素由于毒性最强很早便受到人们的关注,但现已并非主要的霉菌毒素,目前我国的饲料和原料中,赭曲霉毒素 A、呕吐毒素、伏马毒素 B1 和玉米赤霉烯酮的污染最为严重,而由多种原料配制的配合饲料受多种霉菌毒素污染的危险也就大大增加。

[0004] 研究表明,低剂量的霉菌毒素会导致动物免疫抑制,引起疫苗免疫后反应强、抗体水平上不去、影响疫苗的免疫效果,增加疾病感染机率和治疗难度,同时干扰营养物质的利用,极大影响动物的生产性能,如饲料转化率下降、生产速度减慢,繁殖性能降低等。高剂量的霉菌毒素会导致动物中毒发病甚至死亡,其产生的临床中毒症状会因在饲料中的毒素种类、剂量、饲喂时间、毒素间的相互影响以及动物本身的品种、年龄及健康状况而有所不同。在生猪饲养方面,霉菌毒素超标会引起猪轻微的反应,而小猪更为敏感。猪对玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、伏马毒素 B1、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素等多种霉菌毒素均较为敏感,其临床症状通常是患猪不吃,中毒轻者表现生长缓慢,营养不良等慢性征兆以及持续发生轻度传染病,严重者出现持续或间歇性发热,全身皮肤有红点,呕吐,咳嗽,气喘关节肿,蹄部坏疽,顽固性拉稀,便秘,脱肛,流产,假发情,休情,死胎等。

[0005] 鉴于霉菌毒素的危害性,世界范围内 80 多个国家依据不同物品制定了各自的限量或推荐限量。目前,我国 GB2715-2005 食品卫生标准中对小麦、玉米、大麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮做了限量,要求 $DON \leq 1000 \mu g/kg$, $ZEA \leq 60 \mu g/kg$, GB 13078. 2-2006 饲料卫生标准中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的允许量分别为 $100 \mu g/kg$ 、 $500 \mu g/kg$ 。

[0006] 目前,关于霉菌毒素的检测方法主要有三种:生物学检测法、免疫化学检测法和理化检测方法。但这些方法均存在着一定局限性:生物检测法较为简单、成本低,但其所需

时间较长、专一性较差；酶联免疫法（ELISA）是目前被公认为是测定霉菌毒素的最佳方法之一（公开号为：CN1963506A、CN1877332A 的中国发明专利申请），灵敏度高、特异性强、无需贵重仪器设备、对样品纯度要求不高、适用于大批量样品的检测，但该方法仍需要在实验室内完成，耗时 1-2 小时，无法实现现场快速检测的需求；理化检测方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱法以及色谱-质谱联用等，但薄层色谱法检测灵敏度低且该法需要大量接触标准品、不利于保护操作者的健康，高效液相色谱法、气相色谱法以及色谱-质谱联用等方法灵敏准确，但是仪器昂贵、样品处理烦琐费时、成本高、且需专业人员操作。因此，霉菌毒素在动物饲料中快速、稳定可靠残留检测方法的建立成为国内外亟待解决的技术难题。为了保证我国生猪安全生产的可持续发展和保障猪肉食品的安全性，建立生猪饲料中霉菌毒素快速、精确和灵敏的检测方法具有迫切性和必要性。

发明内容

[0007] 为了解决上述的技术问题，本发明的第一个目的是在于提供一种简便、灵敏、价格低廉的生物毒素胶体金免疫层析试纸，本发明的另外一个目的是提供使用上述的免疫层析试纸进行生物毒素检测的方法。

[0008] 为了实现上述的第一个目的，本发明采用了以下的技术方案：

[0009] 检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸，其包括在底板上依次粘贴的样品吸收垫、胶体金标记垫、检测反应区及吸收垫，检测反应区上设有包被有检测用抗原的检测线和包被有二抗的质控线，胶体金标记垫所包被物质为一种生物毒素抗体或多种生物毒素抗体的胶体金标记物的混合物，所述的检测线的条数与胶体金标记垫包被生物毒素抗体的数目相应，每条检测线上分别包被有与胶体金标记抗体相应的单一的生物毒素检测用抗原。

[0010] 作为优选，上述的生物毒素抗体为霉菌毒素抗体，上述的生物毒素检测用抗原为霉菌毒素检测用抗原。作为再优选，上述的生物毒素抗体分别为玉米赤霉烯酮、伏马菌素 B1、赭曲霉毒素 A 或呕吐毒素的多克隆抗体或单克隆抗体中的一种或多种，检测用抗原相应的分别为玉米赤霉烯酮、伏马菌素 B1、赭曲霉毒素 A 或呕吐毒素的检测用抗原中的一种或多种。

[0011] 作为优选，上述的试纸为呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 四联检测试纸，胶体金标记垫包被物质为呕吐毒素抗体、玉米赤霉烯酮抗体、赭曲霉毒素 A 抗体和伏马菌素 B1 抗体胶体金标记物的混合，检测线的条数为 4 条，每条检测线上分别包被呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 的检测用抗原。

[0012] 或者，上述的试纸为呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 三联检测试纸，胶体金标记垫包被物质为呕吐毒素抗体、玉米赤霉烯酮抗体和伏马菌素 B1 抗体胶体金标记物的混合，检测线的条数为 3 条，每条检测线上分别包被呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 的检测用抗原。

[0013] 或者，上述的试纸为呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 三联检测试纸，胶体金标记垫包被物质为呕吐毒素抗体、玉米赤霉烯酮抗体和赭曲霉毒素 A 抗体胶体金标记物的混合，检测线的条数为 3 条，每条检测线上分别包被呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 的检测用抗原。

[0014] 或者，上述的试纸为呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 三联检测试纸，胶体金

标记垫包被物质为呕吐毒素抗体、赭曲霉毒素 A 抗体和伏马菌素 B1 抗体胶体金标记物的混合,检测线的条数为 3 条,每条检测线上分别包被呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 的检测用抗原。

[0015] 或者,上述的试纸为赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 三联检测试纸,胶体金标记垫包被物质为玉米赤霉烯酮抗体、赭曲霉毒素 A 抗体和伏马菌素 B1 抗体胶体金标记物的混合,检测线的条数为 3 条,每条检测线上分别包被玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 的检测用抗原。

[0016] 或者,上述的试纸为呕吐毒素和玉米赤霉烯酮二联检测试纸,胶体金标记垫包被物质为呕吐毒素抗体和玉米赤霉烯酮抗体胶体金标记物的混合,检测线的条数为 2 条,每条检测线上分别包被呕吐毒素和玉米赤霉的检测用抗原。

[0017] 或者,上述的试纸为呕吐毒素和伏马菌素 B1 二联检测试纸,胶体金标记垫包被物质为呕吐毒素抗体和伏马菌素 B1 抗体胶体金标记物的混合,检测线的条数为 2 条,每条检测线上分别包被呕吐毒素和伏马菌素 B1 的检测用抗原。

[0018] 或者,上述的试纸为伏马菌素 B1 和玉米赤霉烯酮二联检测试纸,胶体金标记垫包被物质为伏马菌素 B1 抗体和玉米赤霉烯酮抗体胶体金标记物的混合,检测线的条数为 2 条,每条检测线上分别包被伏马菌素 B1 和玉米赤霉烯酮的检测用抗原。

[0019] 或者,上述的试纸为伏马菌素 B1 和赭曲霉毒素 A 二联检测试纸,胶体金标记垫包被物质为伏马菌素 B1 抗体和赭曲霉毒素 A 抗体胶体金标记物的混合,检测线的条数为 2 条,每条检测线上分别包被伏马菌素 B1 和赭曲霉毒素 A 的检测用抗原。

[0020] 或者,上述的试纸为赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮二联检测试纸,胶体金标记垫包被物质为赭曲霉毒素 A 抗体和玉米赤霉烯酮抗体胶体金标记物的混合,检测线的条数为 2 条,每条检测线上分别包被赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的检测用抗原。

[0021] 或者,上述的试纸为呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 二联检测试纸,胶体金标记垫包被物质为呕吐毒素抗体和赭曲霉毒素 A 抗体胶体金标记物的混合,检测线的条数为 2 条,每条检测线上分别包被呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 的检测用抗原。

[0022] 或者,上述的试纸为玉米赤霉烯酮检测试纸,胶体金标记垫包被物质为玉米赤霉烯酮抗体胶体金标记物,检测线的条数为 1 条,检测线上包被玉米赤霉烯酮的检测用抗原。

[0023] 或者,上述的试纸为伏马菌素 B1 检测试纸,胶体金标记垫包被物质为伏马菌素 B1 抗体胶体金标记物,检测线的条数为 1 条,检测线上包被伏马菌素 B1 的检测用抗原。

[0024] 或者,上述的试纸为赭曲霉毒素 A 检测试纸,胶体金标记垫包被物质为赭曲霉毒素 A 抗体胶体金标记物,检测线的条数为 1 条,检测线上包被赭曲霉毒素 A 的检测用抗原。

[0025] 作为优选,上述的生物毒素抗体可以采用生物毒素单克隆抗体。

[0026] 作为优选,检测用抗原为生物毒素与载体物质偶联形成的偶合物,其中载体物质选自蛋白质或蛋白质片段中的一种,如血清白蛋白、球蛋白、脂蛋白。作为再优选,载体物质选自牛血清白蛋白、卵清白蛋白、血蓝蛋白与甲状腺球蛋白中的一种。

[0027] 本发明的胶体金免疫层析试纸特异性强,4-40℃都可使用;操作简单方便,对牛奶、动物尿液可直接检测,饲料、小麦、玉米、大麦等样品简单处理后即可检测,3-5min 以后便可观察结果。本方法适用面宽,能满足食品安全、饲料安全及政府检测机构快速检测生物毒素残留的需求。

附图说明

[0028] 图 1 为生物毒素胶体金免疫层析试纸的结构示意图,其中附图标记 1 为地板,附图标记 2 为吸收垫、附图标记 3 为 C 带、附图标记 4 为 T 带、附图标记 5 为硝酸纤维素膜、附图标记 6 胶体金垫、附图标记 7 为样品吸收垫。

[0029] 图 2 为四联检测试纸检测结果示意图,结果有效图示。

[0030] 图 3 为四联检测试纸检测结果示意图,结果无效图示。

[0031] 图 4 为三联检测试纸检测结果示意图,结果有效图示。

[0032] 图 5 为三联检测试纸检测结果示意图,结果无效图示。

[0033] 图 6 为二联检测试纸检测结果示意图,结果有效图示。

[0034] 图 7 为二联检测试纸检测结果示意图,结果无效图示。

[0035] 图 8 为单一生物毒素检测试纸检测结果示意图。

具体实施方式

[0036] 1、生物毒素偶合抗原合成：

[0037] (1) 玉米赤霉烯酮偶合抗原合成：

[0038] 取 10-20mg 载体蛋白溶于 1mL 的水中,取 ZEA(玉米赤霉烯酮, zearalenone) 半抗原 0.01-0.04mmol 溶于二氧六环中,将上述两种溶液缓慢混合。取碳化二亚胺 0.02-0.04mmol,溶于 1mL 水中,逐滴加到混合液中,在 20-25℃下,搅拌反应过夜,用盐酸调 $\text{PH} = 6.0$,再次加入 0.01-0.02mmol 碳化二亚胺,后放于 4℃冰箱内 24-28h,反应完成后将反应液装入透析袋,4℃下, $\text{pH} = 7.4$ 的 PBS 中透析,分装, -20℃保存备用。

[0039] (2) 呕吐毒素抗原的合成：

[0040] 将 10-40mgDON(呕吐毒素)溶解在 0.1-0.8ml 吡啶中,加入到 10ml 的反应瓶中,在反应瓶中加入 30-120mg 的硼酸。混合物在室温下搅拌过夜,再加入 30-120mg 琥珀酸酐,并通入氮气,密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 2-3h。将吡啶在室温吹干后,加入 5mL 乙酸乙酯溶解残余物,离心,取上清液,室温吹干后。加入 NHS、DCC 溶于尽可能少的 DMF 中,室温振荡 30-60min,离心,取上清液。将上清液缓慢滴加到载体蛋白液中,在 4℃振荡反应 4h。然后,在 0.01M PBS $\text{PH}7.4$ 中透析,分装, -20℃保存备用。

[0041] (3) 伏马菌素 B1 抗原的合成：

[0042] 取 10-40mg 载体蛋白,伏马菌素 B1 0.01-0.04mmol 溶于 0.02M PBS $\text{PH} = 7.4$ 中,室温下搅拌混匀。再缓慢加入 0.02-0.06mmol 的戊二醛,混合物在室温下搅拌过夜,反应完成后将反应液装入透析袋,4℃下, $\text{pH} = 7.4$ 的 PBS 中透析,加入 0.01-0.04mmol 的伏马菌素 B1,后放于 4℃冰箱内 24h,再加入 0.01M Tris 继续搅拌 4h,反应完成后将反应液装入透析袋,在 4℃下透析,分装, -20℃保存备用。

[0043] (4) 赭曲霉毒素 A 抗原的合成：

[0044] 取 20-40mg 载体蛋白,赭曲霉毒素 A 0.02-0.04mmol 溶于 0.02M PBS $\text{PH} = 7.4$ 中,室温下搅拌混匀;再缓慢加入 0.03-0.06mmol 的戊二醛,混合物在室温下搅拌过夜,反应完成后将反应液装入透析袋,4℃下, $\text{pH} = 7.4$ 的 PBS 中透析,透析完成后,分装, -20℃保存备用。

[0045] 2、生物毒素单克隆抗体制备

[0046] (1) 免疫动物：

[0047] 取健康 6-10 周龄雌性二级 Balb/c 小鼠 6 只进行免疫。第一次基础免疫将 0.5-1.0mg/mL 生物毒素免疫用抗原与等量完全弗氏佐剂用搅拌器充分混匀乳化,进行皮下多点注射,注射量 0.1-0.3mL/点。三周后开始进行加强免疫,剂量同上,佐剂换为不完全弗氏佐剂,二免后,定期测定抗体效价,每隔三周加强免疫一次,末次免疫 3d 后取脾脏融合。

[0048] (2) 脾细胞悬液的制备：

[0049] 效价高的小鼠,拉颈处死,70%酒精浸泡消毒 10min,用手术剪将小鼠腹部剪开一小口,剥开皮肤,露出腹腔,在无菌条件下取出脾脏,用不完全的培养液洗一次,置平皿中不锈钢筛网上,用注射器针芯研磨成细胞悬液后计数。

[0050] (3) 细胞融合和克隆化：

[0051] 取对数生长的骨髓瘤细胞,1000rpm 离心 5 分钟,弃上清,用不完全培养液混悬细胞后计数,取所需的细胞数,用不完全培养液洗涤 2 次。同时制备免疫脾细胞悬液,用不完全培养液洗涤 2 次。将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1 : 10 或 1 : 5 的比例混合在一起,在 50ml 塑料离心管内用不完全培养液洗 1 次,1200rpm,5-10 分钟。弃上清,轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀略加松动。在室温下融合:加入预热的 1ml 50% PEG,边加边搅拌;加预热的不完全培养液,终止 PEG 作用。离心,弃上清,先用 6ml 左右 20%小牛血清轻轻混悬。将融合后细胞悬液加入含有饲养细胞的 96 孔板,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。融合一天后,加 HAT 选择培养液。融合后 7d,用 HT 培养液换液 1 次,在 13d 后根据增殖情况改用 20% NBS 的完全培养液。待集落长至孔底 1/3 时,可取上清检测相应的特异性抗体。细胞完全克隆化后,将细胞注入小鼠腹腔,将腹水用蛋白 A 免疫亲和层析纯化后,即得到生物毒素单克隆抗体。

[0052] 3、样品吸收垫处理

[0053] 将醋酸纤维素纸浸入 pH7.4 的 PBS 中 10min,取出,50 $^{\circ}$ C 烘干或其他方式干燥。

[0054] 4、吸收垫处理

[0055] 将吸水纸室温干燥后,即作为吸收垫。

[0056] 5、试纸组装

[0057] 在试纸的底板上依次粘贴有样品吸收垫、胶体金标记垫、检测反应区及吸收垫,即成生物毒素胶体金免疫检测试纸。

[0058] 本发明所描述的试纸的各部分处理与功能如下：

[0059] 底板:为一面涂有不干胶的不吸水的韧性材料,如 PVC 板,起固定支持试纸其他组成部分的作用。

[0060] 样品吸收垫制备:将醋酸纤维素纸浸入 pH7.4 的 PBS 中 10min,取出,50 $^{\circ}$ C 烘干或其他方式干燥。

[0061] 胶体金标记垫的制备:胶体金溶胶的制备、胶体金标记生物毒素抗体、胶体金标记垫处理。

[0062] (1) 胶体金溶胶的制备:取 250ml 三角瓶一个,加 100ml 超纯水及 1ml 1%氯化金,加热沸腾;取 2ml 的 1%柠檬酸钠加入上述溶液中。混匀,再保持沸腾 30min,溶液颜色首先变黑,再逐渐变红,即为胶体金溶胶。

[0063] (2) 胶体金标记生物毒素抗体:磁力搅拌下,用 0.1M 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 8.2,按 10-20 μ g 抗体/ml 胶体金加入生物毒素抗体,继续搅拌混匀 30min,加入 10% BSA 至终浓度为 0.5%,静置 30min。12000rpm、4℃离心 30min,弃上清,沉淀用 1/20 初始胶体金体积的 0.02M pH9.0 的硼酸盐缓冲液(配方:硼酸 0.1237g, PEG-20000 1g,用超纯水定容至 1L,调 pH 至 9.0)重悬,置 4℃备用,有效期 60 天。

[0064] (3) 胶体金标记垫处理:将标记好的抗体倒入一槽中,将玻璃纤维纸浸入 1min,取出,室温干燥。

[0065] 检测反应区制备:硝酸纤维膜上边包被生物毒素检测用抗原线作为检测线(如图 2,图 3 中的 T1、T2、T3),同时包被羊抗鼠 IgG 线作为质控线(如图 2,图 3 中的 C 线)。此即为检测反应区,该部分主要作用是将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0066] 吸收垫制备:将吸水纸室温干燥后,作为吸收垫,作用在于将移动上来的多余的样品溶液吸收。

[0067] 试纸组装:在试纸的底板上依次粘贴有样品吸收垫、胶体金标记垫、检测反应区及吸收垫,即成生物毒素检测试纸。

[0068] 检测原理:胶体金标记垫的标记对象为生物毒素抗体,如果样品中含有生物毒素,样品溶液被试纸的样品吸收垫吸收并通过毛细作用上移到达胶体金标记部分,样品溶液中的生物毒素与胶体金标记的生物毒素抗体反应形成结合物,结合物继续上移到检测线,因胶体金标记的生物毒素抗体只有一个结合位点,样品溶液中的相应的生物毒素与之结合后,检测线上的相应的检测用抗原就不能再与胶体金标记的生物毒素抗体结合,于是检测线无色,如图 2 所示;当样品中没有或低于检测限的相应生物毒素时,胶体金标记的生物毒素抗体到达检测线时被相应的检测用抗原捕获,则形成肉眼可见红色,此即为阴性,如图 2 所示;无论有无生物毒素,质控线(C 线)都显红色;如果都不显色或者质控线(C 线)不显红色则表明该试纸已经变质失效,如图 3 所示。

[0069] 6、检测方法

[0070] (1) 牛奶、尿样:

[0071] 直接滴 3 滴牛奶或尿于样品垫上,3-5min 后,观察颜色。

[0072] (2) 小麦、玉米、大麦、饲料等样品:

[0073] 准确称取 1g 充分研磨的样品,加入 2mL PBS(0.01mol/L pH 7.4)中,充分混匀,5000rpm 离心 10min,取上清液用于检测(注意不要吸到表面的脂肪层)。直接滴 3 滴于样品垫上,3-5min 后,观察颜色。

[0074] 7、试纸保质期试验:

[0075] 试纸的保存条件为 4-40℃,在常温条件下经过 6 个月的测定,样品的在试纸上的层析速度、阴性的显色深度、检测灵敏度、实际样品检测准确度均在正常范围内。考虑到冬季和夏季的温度条件,将试纸在 40℃和 4℃的保存条件下放置 6 个月,进行稳定性加速试验,结果试纸的各项指标都符合要求。将试纸在 70℃条件下可以放置 2 周,结果试纸的各项指标正常。以上结果表明该试纸可以在常温下的保存时间为 2 年左右,在 40℃和 4℃的保存条件下放置 6 个月以上。

[0076] 实施例 1 呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 四联检测试纸:

[0077] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原,如图 2 所示, T4

距离检测区底部 4-6mm ;质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG,距离检测区顶部 4-6mm ;C 线与 T1, T1 与 T2, T2 与 T3, T3 与 T4 两条线之间间隔 2-4mm。

[0078] 检测结果判定:

[0079] 1、如图 2 中 A 所示检测线 T1、T2、T3、T4 和质控线 C 都显红色,表示检测结果为阴性,表明被检测样品中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 三种生物毒素含量低于检测限。

[0080] 2、如图 2 中 B 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 显红色,检测线 T4 不显色,检测结果为伏马菌素 B1 阳性,呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 阴性,表明被检测样品中伏马菌素 B1 含量高于检测限,呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0081] 3、如图 2 中 C 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 显红色,检测线 T4、T3 不显色,检测结果为呕吐毒素和玉米赤霉烯酮阴性,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量低于检测限,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0082] 4、如图 2 中 D 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色,检测线 T2、T4、T3 不显色,检测结果为呕吐毒素阴性,玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中呕吐毒素含量低于检测限,玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0083] 5、如图 2 中 E 所示检测线 T1、T2、T3、T4 都不显色,质控线 C 显红色,检测结果为呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0084] 6、如图 2 中 F 所示检测线 T2 不显色,检测线 T1、T3、T4 和质控线 C 都显红色,检测结果为玉米赤霉烯酮阳性,赭曲霉毒素 A、呕吐毒素和伏马菌素 B1 阴性,表明被检测样品玉米赤霉烯酮含量高于检测限,赭曲霉毒素 A、呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0085] 7、如图 2 中 G 所示检测线 T1 不显色,检测线 T2、T3、T4 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素阳性,赭曲霉毒素 A、伏马菌素 B1 和玉米赤霉烯酮阴性,表明被检测样品呕吐毒素含量高于检测限,赭曲霉毒素 A、伏马菌素 B1 和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0086] 8、如图 2 中 H 所示检测线 T3 不显色,检测线 T1、T2、T4 和质控线 C 都显红色,检测结果赭曲霉毒素 A 为阳性,伏马菌素 B1、呕吐毒素和玉米赤霉烯酮阴性,表明被检测样品赭曲霉毒素 A 含量高于检测限,伏马菌素 B1、呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0087] 9、如图 2 中 I 所示检测线 T3、T2 不显色,检测线 T1、T4 和质控线 C 都显红色,检测结果为赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮阳性,呕吐毒素和伏马菌素 B1 阴性,表明被检测样品赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量高于检测限,呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0088] 10、如图 2 中 K 所示检测线 T1、T2 不显色,检测线 T3、T4 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素和玉米赤霉烯酮阳性,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 阴性,表明被检测样品呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量高于检测限,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0089] 11、如图 2 中 L 所示检测线 T4、T2 不显色,检测线 T3、T1 和质控线 C 都显红色,检测结果为伏马菌素 B1 和玉米赤霉烯酮阳性,呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 阴性,表明被检测样品伏马菌素 B1 和玉米赤霉烯酮含量高于检测限,呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 含量低于检测限。

[0090] 12、如图 2 中 M 所示检测线 T1、T4 不显色,检测线 T2、T3 和质控线 C 都显红色,检

测结果为呕吐毒素和伏马菌素 B1 阳性,赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮阴性,表明被检测样品呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量高于检测限,赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0091] 13、如图 2 中 N 所示检测线 T1、T3、T4 不显色,检测线 T2 和质控线 C 都显红色,检测结果为玉米赤霉烯酮阳性,赭曲霉毒素 A、呕吐毒素和伏马菌素 B1 阴性,表明被检测样品玉米赤霉烯酮含量高于检测限,赭曲霉毒素 A、呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0092] 14、如图 2 中 O 所示检测线 T3 不显色,检测线 T1、T2、T4 和质控线 C 都显红色,检测结果为赭曲霉毒素 A 阳性,伏马菌素 B1、呕吐毒素和玉米赤霉烯酮阴性,表明被检测样品赭曲霉毒素 A 含量高于检测限,伏马菌素 B1、呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0093] 15、如图 2 中 P 所示检测线 T4 不显色,检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为伏马菌素 B1 阳性,赭曲霉毒素 A、呕吐毒素和玉米赤霉烯酮阴性,表明被检测样品伏马菌素 B1 含量高于检测限,赭曲霉毒素 A、呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0094] 16、如图 3 所示检测线 T1、T2、T3、T4 和质控线 C 都不显色,或者质控线 C 不显红色,检测结果无效。

[0095] 灵敏度试验:

[0096] 用 PBS 配制标准品梯度:0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 1 三批来检测,每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 1 检测玉米赤霉烯酮、呕吐毒素和伏马菌素 B1 的检测限为 20ng/ml,具体结果见表 1、表 2、表 3、表 4。

[0097] 表 1 呕吐毒素试纸 1 灵敏度试验结果

[0098]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 1 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 1 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 1 批 3	-	-	-	+	+	+

[0099] 表 2 玉米赤霉烯酮试纸 1 灵敏度试验结果

[0100]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 1 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 1 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 1 批 3	-	-	-	+	+	+

[0101] 表 3 伏马菌素 B1 试纸 1 灵敏度试验结果

[0102]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 1 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 1 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 1 批 3	-	-	-	+	+	+

[0103] 表 4 赭曲霉毒素 A 试纸 1 灵敏度试验结果

[0104]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 1 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 1 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 1 批 3	-	-	-	+	+	+

[0105] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0106] 试纸的准确度试验

[0107] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 5、表 6、表 7、表 8。

[0108] 表 5 呕吐毒素试纸 1 准确度试验结果

[0109]

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0110] 表 6 玉米赤霉烯酮试纸 1 准确度试验结果

[0111]

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0112] 表 7 伏马菌素 B1 试纸 1 准确度试验结果

[0113]

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+

[0114]

牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+

玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0115] 表 8 赭曲霉毒素 A 试纸 1 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0117] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0118] 实施例 2 呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 三联检测试纸：

[0119] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 4 所示，T3 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2，T2 与 T3 两条线之间间隔 2-4mm。

[0120] 检测结果判定：

[0121] 1、如图 4 中 A 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 三种生物毒素含量低于检测限。

[0122] 2、如图 4 中 B 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 显红色，检测线 T3 不显色，检测结果为伏马菌素 B1 阳性，呕吐毒素、玉米赤霉烯酮阴性，表明被检测样品中伏马菌素 B1 含量高于检测限，呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0123] 3、如图 4 中 C 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2、T3 不显色，检测结果为呕吐毒素阴性，玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 阳性，表明被检测样品中呕吐毒素含量低于检测限，玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0124] 4、如图 4 中 D 所示检测线 T1、T2、T3 不显色，质控线 C 显红色，检测结果为呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 阳性，表明被检测样品中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0125] 5、如图 4 中 E 所示检测线 T1、T2 不显色，检测线 T3 和质控线 C 都显红色，检测结果为呕吐毒素和玉米赤霉烯酮阳性，伏马菌素 B1 阴性，表明被检测样品呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量高于检测限，伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0126] 6、如图 4 中 F 所示检测线 T1 不显色,检测线 T2、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素阳性,玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 地西洋阴性,表明被检测样品中呕吐毒素含量高于检测限,玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0127] 7、如图 4 中 G 所示检测线 T2 不显色,检测线 T1、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素和伏马菌素 B1 阴性,玉米赤霉烯酮阳性,表明被检测样品中呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量低于检测限,玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0128] 8、如图 4 中 H 所示检测线 T1、T3 不显色,检测线 T2 和质控线 C 都显红色,检测结果为玉米赤霉烯酮阴性,呕吐毒素和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中玉米赤霉烯酮含量低于检测限,呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0129] 9、如图 5 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都不显色,或者质控线 C 不显红色,检测结果无效。

[0130] 灵敏度试验:

[0131] 用 PBS 配制标准品梯度:0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 2 三批来检测,每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 2 检测玉米赤霉烯酮、呕吐毒素和伏马菌素 B1 的检测限为 20ng/ml,具体结果见表 1-1、表 2-1、表 3-1。

[0132] 表 1-1 呕吐毒素试纸 2 灵敏度试验结果

[0133]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 2 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 2 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 2 批 3	-	-	-	+	+	+

[0134] 表 2-1 玉米赤霉烯酮试纸 2 灵敏度试验结果

[0135]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 2 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 2 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 2 批 3	-	-	-	+	+	+

[0136] 表 3-1 伏马菌素 B1 试纸 2 灵敏度试验结果

[0137]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 2 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 2 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 2 批 3	-	-	-	+	+	+

[0138] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0139] 试纸的准确度试验

[0140] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 4-1、表 5-1、表 6-1。

[0141] 表 4-1 呕吐毒素试纸 2 准确度试验结果

抗原浓度 样品	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0142] 表 5-1 玉米赤霉烯酮试纸 2 准确度试验结果

[0143] 表 5-1 玉米赤霉烯酮试纸 2 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/m l
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0144] 表 6-1 伏马菌素 B1 试纸 2 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/m l
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0145] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0146] 实施例 3 赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 三联检测试纸：

[0147] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 4 所示，T3 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2，T2 与 T3 两条线之间间隔 2-4mm。

[0148] 检测结果判定：

[0149] 1、如图 4 中 A 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 三种生物毒素含量低于检测限。

[0150] 2、如图 4 中 B 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 显红色，检测线 T3 不显色，检测结果为伏马菌素 B1 阳性，赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮阴性，表明被检测样品中伏马菌素 B1 含量高于检测限，赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0151] 3、如图 4 中 C 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2、T3 不显色，检测结果

为赭曲霉毒素 A 阴性,玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 含量低于检测限,玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0154] 4、如图 4 中 D 所示检测线 T1、T2、T3 不显色,质控线 C 显红色,检测结果为赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0155] 5、如图 4 中 E 所示检测线 T1、T2 不显色,检测线 T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮阳性,伏马菌素 B1 阴性,表明被检测样品赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量高于检测限,伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0156] 6、如图 4 中 F 所示检测线 T1 不显色,检测线 T2、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为赭曲霉毒素 A 阳性,玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 地西洋阴性,表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 含量高于检测限,玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0157] 7、如图 4 中 G 所示检测线 T2 不显色,检测线 T1、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 阴性,玉米赤霉烯酮阳性,表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量低于检测限,玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0158] 8、如图 4 中 H 所示检测线 T1、T3 不显色,检测线 T2 和质控线 C 都显红色,检测结果为玉米赤霉烯酮阴性,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中玉米赤霉烯酮含量低于检测限,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0159] 9、如图 5 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都不显色,或者质控线 C 不显红色,检测结果无效。

[0160] 灵敏度试验:

[0161] 用 PBS 配制标准品梯度:0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 3 三批来检测,每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 3 检测玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 的检测限为 20ng/ml,具体结果见表 1-2、表 2-2、表 3-2。

[0162] 表 1-2 赭曲霉毒素 A 试纸 3 灵敏度试验结果

[0163]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 3 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 3 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 3 批 3	-	-	-	+	+	+

[0164] 表 2-2 玉米赤霉烯酮试纸 3 灵敏度试验结果

[0165]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 3 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 3 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 3 批 3	-	-	-	+	+	+

[0166] 表 3-2 伏马菌素 B1 试纸 3 灵敏度试验结果

[0167]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 3 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 3 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 3 批 3	-	-	-	+	+	+

[0168] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0169] 试纸的准确度试验

[0170] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 4-2、表 5-2、表 6-2。

[0171] 表 4-2 赭曲霉毒素 A 试纸 3 准确度试验结果

[0172]

样品 抗原浓度	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0173] 表 5-2 玉米赤霉烯酮试纸 3 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0174]

[0175] 表 6-2 伏马菌素 B1 试纸 3 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0176]

[0177] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0178] 实施例 4 呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 三联检测试纸：

[0179] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 4 所示，T3 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2，T2 与 T3 两条线之间间隔 2-4mm。

[0180] 检测结果判定：

[0181] 1、如图 4 中 A 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 三种生物毒素含量低于检测限。

[0182] 2、如图 4 中 B 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 显红色，检测线 T3 不显色，检测结果为伏马菌素 B1 阳性，呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 阴性，表明被检测样品中伏马菌素 B1 含量高于检测限，呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 含量低于检测限。

[0183] 3、如图 4 中 C 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2、T3 不显色，检测结果

为呕吐毒素阴性,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中呕吐毒素含量低于检测限,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0184] 4、如图 4 中 D 所示检测线 T1、T2、T3 不显色,质控线 C 显红色,检测结果为呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0185] 5、如图 4 中 E 所示检测线 T1、T2 不显色,检测线 T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 阳性,伏马菌素 B1 阴性,表明被检测样品呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 含量高于检测限,伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0186] 6、如图 4 中 F 所示检测线 T1 不显色,检测线 T2、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素阳性,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 地西洋阴性,表明被检测样品中呕吐毒素含量高于检测限,赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0187] 7、如图 4 中 G 所示检测线 T2 不显色,检测线 T1、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素和伏马菌素 B1 阴性,赭曲霉毒素 A 阳性,表明被检测样品中呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量低于检测限,赭曲霉毒素 A 含量高于检测限。

[0188] 8、如图 4 中 H 所示检测线 T1、T3 不显色,检测线 T2 和质控线 C 都显红色,检测结果为赭曲霉毒素 A 阴性,呕吐毒素和伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 含量低于检测限,呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0189] 9、如图 5 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都不显色,或者质控线 C 不显红色,检测结果无效。

[0190] 灵敏度试验:

[0191] 用 PBS 配制标准品梯度:0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 4 三批来检测,每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 4 检测赭曲霉毒素 A、呕吐毒素和伏马菌素 B1 的检测限为 20ng/ml,具体结果见表 1-3、表 2-3、表 3-3。

[0192] 表 1-3 呕吐毒素试纸 4 灵敏度试验结果

[0193]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 4 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 4 批 2	-	-	-	+	+	+

[0194]

试纸 4 批 3	-	-	-	+	+	+
----------	---	---	---	---	---	---

[0195] 表 2-3 赭曲霉毒素 A 试纸 4 灵敏度试验结果

[0196]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 4 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 4 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 4 批 3	-	-	-	+	+	+

[0197] 表 3-3 伏马菌素 B1 试纸 4 灵敏度试验结果

[0198]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 4 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 4 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 4 批 3	-	-	-	+	+	+

[0199] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0200] 试纸的准确度试验

[0201] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 4-3、表 5-3、表 6-3。

[0202] 表 4-3 呕吐毒素试纸 4 准确度试验结果

样品 抗原浓度	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+

[0204]

小麦	-	-	+	+	+
----	---	---	---	---	---

[0205] 表 5-3 赭曲霉毒素 A 试纸 4 准确度试验结果

样品	抗原浓度					
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml	
牛奶	-	-	+	+	+	
尿	-	-	+	+	+	
饲料	-	-	+	+	+	
玉米	-	-	+	+	+	
大麦	-	-	+	+	+	
小麦	-	-	+	+	+	

[0207] 表 6-3 伏马菌素 B1 试纸 4 准确度试验结果

样品	抗原浓度					
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml	
牛奶	-	-	+	+	+	
尿	-	-	+	+	+	
饲料	-	-	+	+	+	
玉米	-	-	+	+	+	
大麦	-	-	+	+	+	
小麦	-	-	+	+	+	

[0209] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0210] 实施例 5 呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 三联检测试纸：

[0211] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 4 所示，T3 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2，T2 与 T3 两条线之间间隔 2-4mm。

[0212] 检测结果判定：

[0213] 1、如图 4 中 A 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 三种生物毒素含量低于检测限。

[0214] 2、如图 4 中 B 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 显红色，检测线 T3 不显色，检测结果为赭曲霉毒素 A 阳性，呕吐毒素、玉米赤霉烯酮阴性，表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 含量

高于检测限,呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0215] 3、如图 4 中 C 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色,检测线 T2、T3 不显色,检测结果为呕吐毒素阴性,玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 阳性,表明被检测样品中呕吐毒素含量低于检测限,玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 含量高于检测限。

[0216] 4、如图 4 中 D 所示检测线 T1、T2、T3 不显色,质控线 C 显红色,检测结果为呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 阳性,表明被检测样品中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 含量高于检测限。

[0217] 5、如图 4 中 E 所示检测线 T1、T2 不显色,检测线 T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素和玉米赤霉烯酮阳性,赭曲霉毒素 A 阴性,表明被检测样品呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量高于检测限,赭曲霉毒素 A 含量低于检测限。

[0218] 6、如图 4 中 F 所示检测线 T1 不显色,检测线 T2、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素阳性,玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 地西洋阴性,表明被检测样品中呕吐毒素含量高于检测限,玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 含量低于检测限。

[0219] 7、如图 4 中 G 所示检测线 T2 不显色,检测线 T1、T3 和质控线 C 都显红色,检测结果为呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 阴性,玉米赤霉烯酮阳性,表明被检测样品中呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 含量低于检测限,玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0220] 8、如图 4 中 H 所示检测线 T1、T3 不显色,检测线 T2 和质控线 C 都显红色,检测结果为玉米赤霉烯酮阴性,呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 阳性,表明被检测样品中玉米赤霉烯酮含量低于检测限,呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 含量高于检测限。

[0221] 9、如图 5 所示检测线 T1、T2、T3 和质控线 C 都不显色,或者质控线 C 不显红色,检测结果无效。

[0222] 灵敏度试验:

[0223] 用 PBS 配制标准品梯度:0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 5 三批来检测,每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 5 检测玉米赤霉烯酮、呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 的检测限为 20ng/ml,具体结果见表 1-4、表 2-4、表 3-4。

[0224] 表 1-4 呕吐毒素试纸 5 灵敏度试验结果

[0225]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 5 批 1	-	-	-	+	+	+

[0226]

试纸 5 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 5 批 3	-	-	-	+	+	+

[0227] 表 2-4 玉米赤霉烯酮试纸 5 灵敏度试验结果

[0228]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 5 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 5 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 5 批 3	-	-	-	+	+	+

[0229] 表 3-4 赭曲霉毒素 A 试纸 5 灵敏度试验结果

[0230]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 5 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 5 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 5 批 3	-	-	-	+	+	+

[0231] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0232] 试纸的准确度试验

[0233] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 4-4、表 5-4、表 6-4。

[0234] 表 4-4 呕吐毒素试纸 5 准确度试验结果

样品 抗原浓度	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+

[0236]

大麦	-	-	+	+	+
----	---	---	---	---	---

小麦	-	-	+	+	+
----	---	---	---	---	---

[0237] 表 5-4 玉米赤霉烯酮试纸 5 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0239] 表 6-4 赭曲霉毒素 A 试纸 5 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0241] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0242] 实施例 6 赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮二联检测试纸：

[0243] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 6 所示，T2 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2 两条线之间间隔 2-4mm。

[0244] 检测结果判定：

[0245] 1、如图 6 中 A 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0246] 2、如图 6 中 B 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2 不显色，检测结果为赭曲霉毒素 A 阴性，玉米赤霉烯酮阳性，表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 含量低于检测限，玉

米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0247] 3、如图 6 中 C 所示检测线 T1、T2 不显色，质控线 C 显红色，检测结果为赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮阳性，表明被检测样品中赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0248] 4、如图 6 中 D 所示检测线 T1 不显色，检测线 T2 和质控线 C 都显红色，检测结果为赭曲霉毒素 A 阳性，玉米赤霉烯酮阴性，表明被检测样品赭曲霉毒素 A 含量高于检测限，玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0249] 5、如图 7 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都不显色，或者质控线 C 不显红色，检测结果无效。

[0250] 灵敏度试验：

[0251] 用 PBS 配制标准品梯度：0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 6 三批来检测，每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 6 检测玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 的检测限为 20ng/ml，具体结果见表 7-1、表 8-1。

[0252] 表 7-1 赭曲霉毒素 A 试纸 6 灵敏度试验结果

[0253]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 6 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 6 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 6 批 3	-	-	-	+	+	+

[0254] 表 8-1 玉米赤霉烯酮试纸 6 灵敏度试验结果

[0255]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 6 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 6 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 6 批 3	-	-	-	+	+	+

[0256] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0257] 试纸的准确度试验

[0258] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，选用生产的试纸 6 中的其中一批用于检测，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 9-1、表 10-1。

[0259] 表 9-1 赭曲霉毒素 A 试纸 2 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0261] 表 10-1 玉米赤霉烯酮试纸 6 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0263] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0264] 实施例 7 赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 二联检测试纸：

[0265] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 6 所示，T2 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2 两条线之间间隔 2-4mm。

[0266] 检测结果判定：

[0267] 1、如图 6 中 A 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0268] 2、如图 6 中 B 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2 不显色，检测结果为赭曲霉毒素 A 阴性，伏马菌素 B1 阳性，表明被检测样品中赭曲霉毒素 A 含量低于检测限，伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0269] 3、如图 6 中 C 所示检测线 T1、T2 不显色，质控线 C 显红色，检测结果为赭曲霉毒素

A、伏马菌素 B1 阳性,表明被检测样品中赭曲霉毒素 A、伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0270] 4、如图 6 中 D 所示检测线 T1 不显色,检测线 T2 和质控线 C 都显红色,检测结果为赭曲霉毒素 A 阳性,伏马菌素 B1 阴性,表明被检测样品赭曲霉毒素 A 含量高于检测限,伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0271] 5、如图 7 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都不显色,或者质控线 C 不显红色,检测结果无效。

[0272] 灵敏度试验:

[0273] 用 PBS 配制标准品梯度:0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 7 三批来检测,每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 7 检测赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B1 的检测限为 20ng/ml,具体结果见表 7-2、表 8-2。

[0274] 表 7-2 赭曲霉毒素 A 试纸 7 灵敏度试验结果

[0275]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 7 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 7 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 7 批 3	-	-	-	+	+	+

[0276] 表 8-2 伏马菌素 B1 试纸 7 灵敏度试验结果

[0277]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 7 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 7 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 7 批 3	-	-	-	+	+	+

[0278] 注:“-”表示检测结果阴性,“+”表示检测结果阳性。

[0279] 试纸的准确度试验

[0280] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测,每个样品重复 5 次,选用生产的试纸 7 中的其中一批用于检测,检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 9-2、表 10-2。

[0281] 表 9-2 赭曲霉毒素 A 试纸 7 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0282] 表 10-2 伏马菌素 B1 试纸 7 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0285] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0286] 实施例 8 伏马菌素 B1 和玉米赤霉烯酮二联检测试纸：

[0287] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 6 所示，T2 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2 两条线之间间隔 2-4mm。

[0288] 检测结果判定：

[0289] 1、如图 6 中 A 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中伏马菌素 B1 和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0290] 2、如图 6 中 B 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2 不显色，检测结果为伏马菌素 B1 阴性，玉米赤霉烯酮阳性，表明被检测样品中伏马菌素 B1 含量低于检测限，玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0291] 3、如图 6 中 C 所示检测线 T1、T2 不显色，质控线 C 显红色，检测结果为伏马菌素 B1、玉米赤霉烯酮阳性，表明被检测样品中伏马菌素 B1、玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0292] 4、如图 6 中 D 所示检测线 T1 不显色,检测线 T2 和质控线 C 都显红色,检测结果为伏马菌素 B1 阳性,玉米赤霉烯酮阴性,表明被检测样品伏马菌素 B1 含量高于检测限,玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0293] 5、如图 7 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都不显色,或者质控线 C 不显红色,检测结果无效。

[0294] 灵敏度试验:

[0295] 用 PBS 配制标准品梯度:0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 8 三批来检测,每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 8 检测玉米赤霉烯酮、伏马菌素 B1 的检测限为 20ng/ml,具体结果见表 7-3、表 8-3。

[0296] 表 7-3 伏马菌素 B1 试纸 8 灵敏度试验结果

[0297]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 8 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 8 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 8 批 3	-	-	-	+	+	+

[0298] 表 8-3 玉米赤霉烯酮试纸 8 灵敏度试验结果

[0299]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 8 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 8 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 8 批 3	-	-	-	+	+	+

[0300] 注:“-”表示检测结果阴性,“+”表示检测结果阳性。

[0301] 试纸的准确度试验

[0302] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测,每个样品重复 5 次,选用生产的试纸 8 中的其中一批用于检测,检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 9-3、表 10-3。

[0303] 表 9-3 赭曲霉毒素 A 试纸 8 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0304] 表 10-3 玉米赤霉烯酮试纸 8 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0307] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0308] 实施例 9 呕吐毒素和伏马菌素 B1 二联检测试纸：

[0309] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 6 所示，T2 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2 两条线之间间隔 2-4mm。

[0310] 检测结果判定：

[0311] 1、如图 6 中 A 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中呕吐毒素和伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0312] 2、如图 6 中 B 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2 不显色，检测结果为呕吐毒素阴性，伏马菌素 B1 阳性，表明被检测样品中呕吐毒素含量低于检测限，伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0313] 3、如图 6 中 C 所示检测线 T1、T2 不显色，质控线 C 显红色，检测结果为呕吐毒素、伏马菌素 B1 阳性，表明被检测样品中呕吐毒素、伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0314] 4、如图 6 中 D 所示检测线 T1 不显色，检测线 T2 和质控线 C 都显红色，检测结果为呕吐毒素阳性，伏马菌素 B1 阴性，表明被检测样品呕吐毒素含量高于检测限，伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0315] 5、如图 7 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都不显色，或者质控线 C 不显红色，检测结果无效。

[0316] 灵敏度试验：

[0317] 用 PBS 配制标准品梯度：0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 9 三批来检测，每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 9 检测呕吐毒素和伏马菌素 B1 的检测限为 20ng/ml，具体结果见表 7-4、表 8-4。

[0318] 表 7-4 呕吐毒素试纸 9 灵敏度试验结果

[0319]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 9 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 9 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 9 批 3	-	-	-	+	+	+

[0320] 表 8-4 伏马菌素 B1 试纸 9 灵敏度试验结果

[0321]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 9 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 9 批 2	-	-	-	+	+	+

[0322]

试纸 9 批 3	-	-	-	+	+	+
----------	---	---	---	---	---	---

[0323] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0324] 试纸的准确度试验

[0325] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，选用生产的试纸 9 中的其中一批用于检测，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 9-4、表 10-4。

[0326] 表 9-4 呕吐毒素试纸 9 准确度试验结果

样品	抗原浓度					
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/m l	
牛奶	-	-	+	+	+	
尿	-	-	+	+	+	
饲料	-	-	+	+	+	
玉米	-	-	+	+	+	
大麦	-	-	+	+	+	
小麦	-	-	+	+	+	

[0327] 表 10-4 伏马菌素 B1 试纸 9 准确度试验结果

样品	抗原浓度					
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/m l	
牛奶	-	-	+	+	+	
尿	-	-	+	+	+	
饲料	-	-	+	+	+	
玉米	-	-	+	+	+	
大麦	-	-	+	+	+	
小麦	-	-	+	+	+	

[0328] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0329] 实施例 10 呕吐毒素和玉米赤霉烯酮二联检测试纸：

[0330] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 6 所示，T2 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2 两条线之间间隔 2-4mm。

[0331] 检测结果判定：

[0332] 1、如图 6 中 A 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中呕吐毒素和玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0333] 2、如图 6 中 B 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2 不显色，检测结果为呕吐毒素阴性，玉米赤霉烯酮阳性，表明被检测样品中呕吐毒素含量低于检测限，玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0334] 3、如图 6 中 C 所示检测线 T1、T2 不显色，质控线 C 显红色，检测结果为呕吐毒素、玉米赤霉烯酮阳性，表明被检测样品中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0337] 4、如图 6 中 D 所示检测线 T1 不显色，检测线 T2 和质控线 C 都显红色，检测结果为呕吐毒素阳性，玉米赤霉烯酮阴性，表明被检测样品呕吐毒素含量高于检测限，玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0338] 5、如图 7 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都不显色，或者质控线 C 不显红色，检测结果无效。

[0339] 灵敏度试验：

[0340] 用 PBS 配制标准品梯度：0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 10 三批来检测，每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 10 检测玉米赤霉烯酮、呕吐毒素的检测限为 20ng/ml，具体结果见表 7-5、表 8-5。

[0341] 表 7-5 呕吐毒素试纸 10 灵敏度试验结果

[0342]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 10 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 10 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 10 批 3	-	-	-	+	+	+

[0343] 表 8-5 玉米赤霉烯酮试纸 10 灵敏度试验结果

[0344]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 10 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 10 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 10 批 3	-	-	-	+	+	+

[0345]

试纸 10 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 10 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 10 批 3	-	-	-	+	+	+

[0346] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0347] 试纸的准确度试验

[0348] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，选用生产的试纸 10 中的其中一批用于检测，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 9-5、表 10-5。

[0349] 表 9-5 呕吐毒素试纸 10 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/m l
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0351] 表 10-5 玉米赤霉烯酮试纸 10 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/m l
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0353] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0354] 实施例 11 呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 二联检测试纸：

[0355] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 6 所示，T2 距离检测区底部 6-8mm；质控线包被有浓度为 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 6-8mm；C 线与 T1，T1 与 T2 两条线之间间隔 2-4mm。

[0356] 检测结果判定：

[0357] 1、如图 6 中 A 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中呕吐毒素和赭曲霉毒素 A 含量低于检测限。

[0358] 2、如图 6 中 B 所示检测线 T1 和质控线 C 显红色，检测线 T2 不显色，检测结果为呕吐毒素阴性，赭曲霉毒素 A 阳性，表明被检测样品中呕吐毒素含量低于检测限，赭曲霉毒素 A 含量高于检测限。

[0359] 3、如图 6 中 C 所示检测线 T1、T2 不显色，质控线 C 显红色，检测结果为呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 阳性，表明被检测样品中呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 含量高于检测限。

[0360] 4、如图 6 中 D 所示检测线 T1 不显色，检测线 T2 和质控线 C 都显红色，检测结果为呕吐毒素阳性，赭曲霉毒素 A 阴性，表明被检测样品呕吐毒素含量高于检测限，赭曲霉毒素 A 含量低于检测限。

[0361] 5、如图 7 所示检测线 T1、T2 和质控线 C 都不显色，或者质控线 C 不显红色，检测结果无效。

[0362] 灵敏度试验：

[0363] 用 PBS 配制标准品梯度：0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 11 三批来检测，每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 11 检测赭曲霉毒素 A、呕吐毒素的检测限为 20ng/ml，具体结果见表 7-6、表 8-6。

[0364] 表 7-6 呕吐毒素试纸 11 灵敏度试验结果

[0365]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 11 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 11 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 11 批 3	-	-	-	+	+	+

[0366] 表 8-6 赭曲霉毒素 A 试纸 11 灵敏度试验结果

[0367]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 11 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 11 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 11 批 3	-	-	-	+	+	+

[0368] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0369] 试纸的准确度试验

[0370] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，选用生产的试纸 11 中的其中一批用于检测，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 9-6、表 10-6。

[0371] 表 9-6 呕吐毒素试纸 11 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0372] 表 10-6 赈曲霉毒素 A 试纸 11 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+

[0375]

大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0376] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0377] 实施例 12 赈曲霉毒素 A 检测试纸：

[0378] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 8 所示，检测线(T 线)距离检测区底部 8-10mm；质控线包被有浓度 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 8-10mm；两条线之间间隔 4-6mm。

[0379] 检测结果判定：

[0380] 1、如图 8 中 A 所示检测线 T 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中赈曲霉毒素 A 含量低于检测限。

[0381] 2、如图 8 中 B 所示质控线 C 显红色，检测线 T 不显色，检测结果为阳性，表明被检测样品中赈曲霉毒素 A 含量高于检测限。

[0382] 3、如图 8 中 C、D 所示检测线 T 和质控线 C 都不显色，或者质控线 C 不显红色，检测

结果无效。

[0383] 灵敏度试验：

[0384] 用 PBS 配制标准品梯度：0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 12 三批来检测，每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 12 检测赭曲霉毒素 A 的检测限为 20ng/ml，具体结果见表 11。

[0385] 表 11 赭曲霉毒素 A 试纸 12 灵敏度试验结果

[0386]

抗原浓度 试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 12 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 12 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 12 批 3	-	-	-	+	+	+

[0387] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0388] 试纸的准确度试验

[0389] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，选用生产的试纸 5 中的其中一批用于检测，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 12。

[0390] 表 12 赭曲霉毒素 A 试纸 5 准确度试验结果

样品 抗原浓度	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0392] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0393] 实施例 13 玉米赤霉烯酮检测试纸：

[0394] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 8 所示，检测线（T 线）距离检测区底部 8-10mm；质控线包被有浓度 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离

检测区顶部 8-10mm ;两条线之间间隔 4-6mm。

[0395] 检测结果判定：

[0396] 1、如图 8 中 A 所示检测线 T 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中玉米赤霉烯酮含量低于检测限。

[0397] 2、如图 8 中 B 所示质控线 C 显红色，检测线 T 不显色，检测结果为阳性，表明被检测样品中玉米赤霉烯酮含量高于检测限。

[0398] 3、如图 8 中 C、D 所示检测线 T 和质控线 C 都不显色，或者质控线 C 不显红色，检测结果无效。

[0399] 灵敏度试验：

[0400] 用 PBS 配制标准品梯度：0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 13 三批来检测，每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 13 检测玉米赤霉烯酮的检测限为 20ng/ml，具体结果见表 13。

[0401] 表 13 玉米赤霉烯酮试纸 13 灵敏度试验结果

[0402]

抗原浓度 试纸类型	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml

[0403]

试纸 13 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 13 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 13 批 3	-	-	-	+	+	+

[0404] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0405] 试纸的准确度试验

[0406] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，选用生产的试纸 13 中的其中一批用于检测，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 14。

[0407] 表 14 玉米赤霉烯酮试纸 13 准确度试验结果

样品	抗原浓度					
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml	1
[0408] 牛奶	-	-	+	+	+	+
尿	-	-	+	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+	+

[0409] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0410] 实施例 14 伏马菌素 B1 检测试纸：

[0411] 试纸检测线包被有浓度为 0.5-2.0mg/mL 的生物毒素检测用抗原，如图 8 所示，检测线（T 线）距离检测区底部 8-10mm；质控线包被有浓度 0.5-1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG，距离检测区顶部 8-10mm；两条线之间间隔 4-6mm。

[0412] 检测结果判定：

[0413] 1、如图 8 中 A 所示检测线 T 和质控线 C 都显红色，表示检测结果为阴性，表明被检测样品中伏马菌素 B1 含量低于检测限。

[0414] 2、如图 8 中 B 所示质控线 C 显红色，检测线 T 不显色，检测结果为阳性，表明被检测样品中伏马菌素 B1 含量高于检测限。

[0415] 3、如图 8 中 C、D 所示检测线 T 和质控线 C 都不显色，或者质控线 C 不显红色，检测结果无效。

[0416] 灵敏度试验：

[0417] 用 PBS 配制标准品梯度：0、10、20、50、100ng/ml。用生产的试纸 14 三批来检测，每批每个浓度重复试验 5 次。得到的试验结果是以生物毒素试纸 14 检测伏马菌素 B1 的检测限为 20ng/ml，具体结果见表 15。

[0418] 表 15 伏马菌素 B1 试纸 14 灵敏度试验结果

[0419]

试纸类型	抗原浓度					
	0ng/ml	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	50ng/ml	100ng/ml
试纸 14 批 1	-	-	-	+	+	+
试纸 14 批 2	-	-	-	+	+	+
试纸 14 批 3	-	-	-	+	+	+

[0420] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

[0421] 试纸的准确度试验

[0422] 在牛奶、尿样、饲料、玉米、大麦、小麦等经确证为阴性样品中添加生物毒素使样品中的生物毒素浓度为 10ng/g、20ng/g、50ng/g、100ng/g。经过前处理后检测，每个样品重复 5 次，选用生产的试纸 14 中的其中一批用于检测，检测结果与标准品溶液检测结果的检测限符合率 100%。具体结果见表 16。

[0423] 表 16 伏马菌素 B1 试纸 14 准确度试验结果

样品	抗原浓度				
	阴性	10ng/g	20ng/g	50ng/g	100ng/ml
牛奶	-	-	+	+	+
尿	-	-	+	+	+
饲料	-	-	+	+	+
玉米	-	-	+	+	+
大麦	-	-	+	+	+
小麦	-	-	+	+	+

[0425] 注：“-”表示检测结果阴性，“+”表示检测结果阳性。

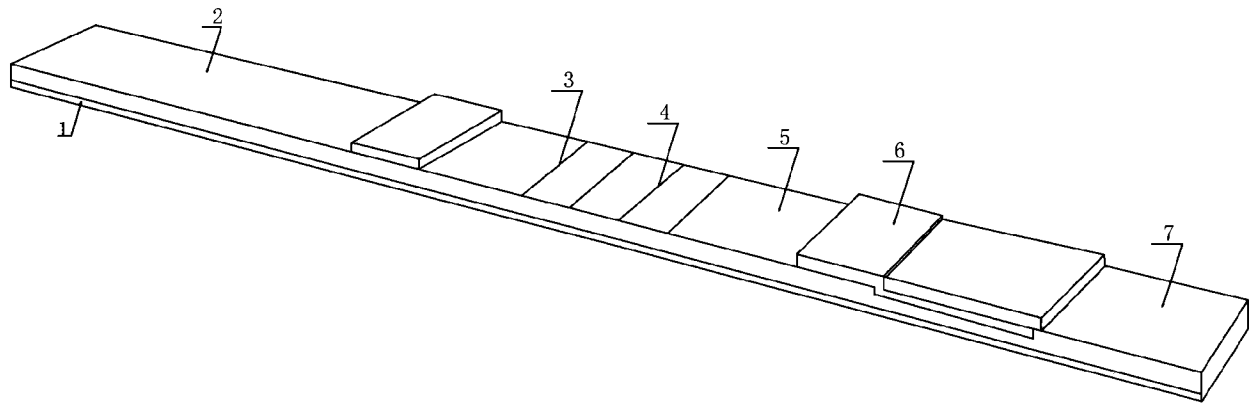


图 1

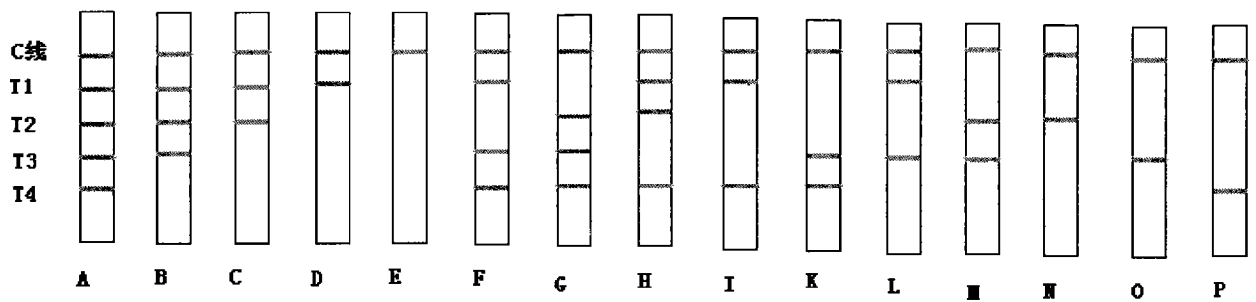


图 2

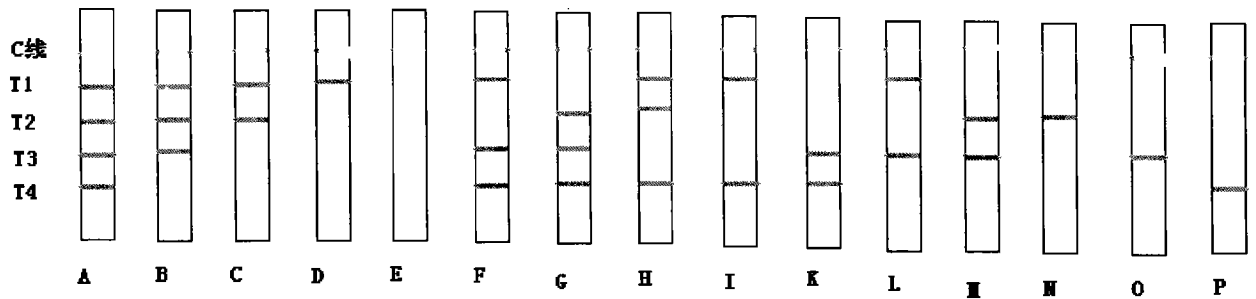


图 3

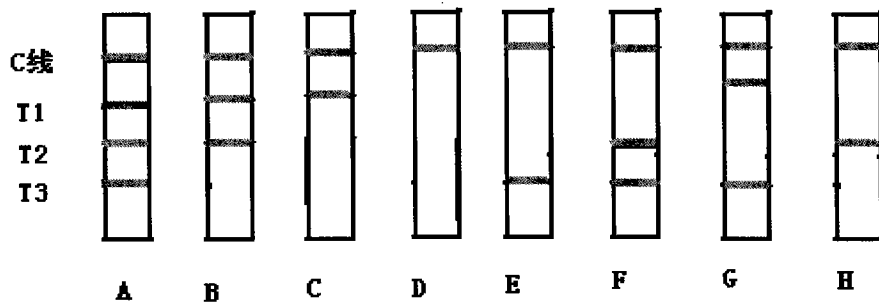


图 4

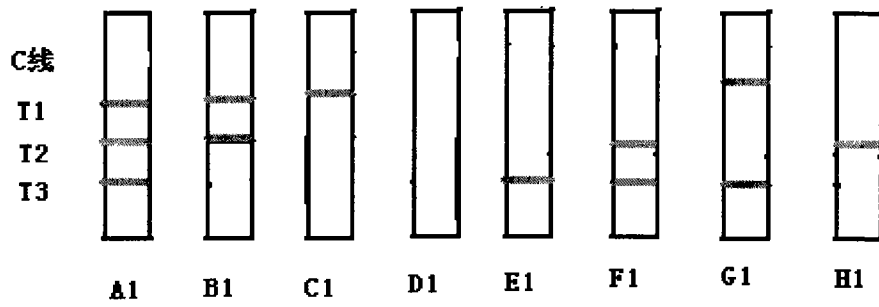


图 5

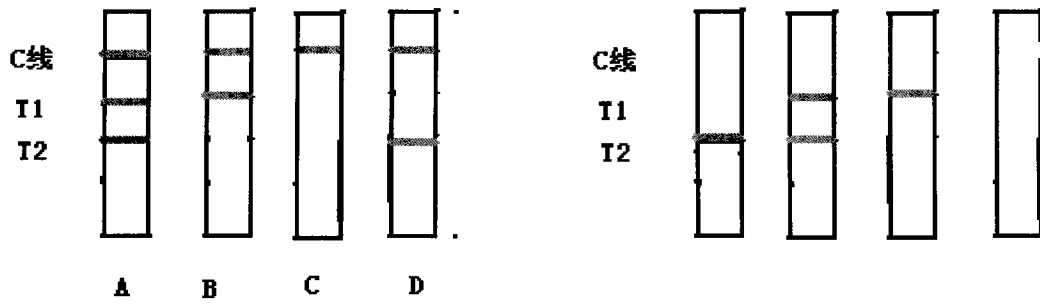


图 6

图 7

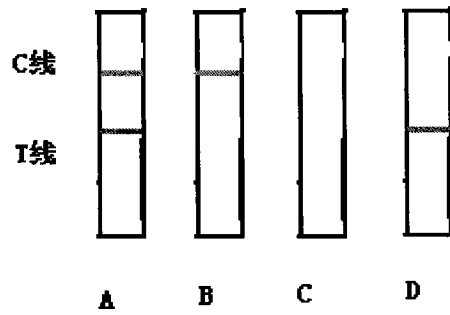


图 8

专利名称(译)	检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸及其检测方法		
公开(公告)号	CN101281195B	公开(公告)日	2013-03-06
申请号	CN200810061598.X	申请日	2008-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学 宁波科瑞特动物药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院 宁波科瑞特动物药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量学院 宁波科瑞特动物药业有限公司		
[标]发明人	张明洲 陈宗伦 刘军 郭瑞忠 施明华 胡华军 储国华		
发明人	张明洲 陈宗伦 刘军 郭瑞忠 施明华 胡华军 储国华		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	王鹏举		
其他公开文献	CN101281195A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物毒素检测技术领域，尤其涉及一种检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸及其检测方法。检测生物毒素的胶体金免疫层析试纸，其包括胶体金标记垫、检测线，胶体金标记垫所包被物质为一种生物毒素抗体或多种生物毒素抗体的胶体金标记物的混合物，检测线的条数与胶体金标记垫包被生物毒素抗体的数目相应，每条检测线上分别包被有与胶体金标记抗体相应的单一的生物毒素检测用抗原。本发明的胶体金免疫层析试纸特异性强；操作简单方便，对牛奶、动物尿液可直接检测，饲料、小麦、玉米、大麦等样品简单处理后即可检测，3-5min以后便可观察结果。本方法适用面宽，能满足食品安全、饲料安全及政府检测机构快速检测生物毒素残留的需求。

