



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110018306 A

(43)申请公布日 2019.07.16

(21)申请号 201910212262.7

(22)申请日 2019.03.20

(71)申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路
301号

(72)发明人 孟辉 黄珊 张祯 曾昆

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

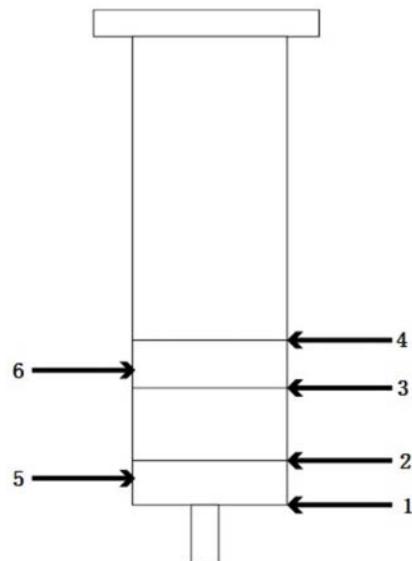
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的
溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法

(57)摘要

本发明属于免疫学检测技术领域，涉及一种
用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶
免疫亲和色谱柱的制备方法；步骤为：水解四甲
氧基硅烷，制备得到抗DON抗体溶胶凝胶、兔抗
HRP抗体溶胶凝胶和空白溶胶凝胶；然后取兔抗
HRP抗体溶胶凝胶与空白溶胶凝胶混合后加入固
相萃取小柱的筛板一上，去除磷酸盐缓冲液后盖
上筛板二，构建控制层；将筛板三置于筛板二之
上；取抗DON抗体溶胶凝胶与空白溶胶凝胶混合
后加入固相萃取小柱的筛板三上，去除磷酸盐缓
冲液后盖上筛板四，构建检测层，得到溶胶-凝胶
免疫亲和色谱柱；本发明不需要复杂的前处理和
大型仪器的辅助，检测时间短、灵敏度和稳定性
高，满足DON污染情况调查的可视化检测需求。



1. 一种用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

S1、将盐酸，蒸馏水和水解四甲氧基硅烷混合，在冰中声振，得到混合液A；

S2、先将抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体加入磷酸盐缓冲液中，再加入步骤S1的混合液A，振荡，混合液A凝胶化得到胶体，进行第一次称重，室温保存后再次称重，直至胶体重量为第一次重量的50%，然后将胶体进行研磨，研磨后经筛网筛选，装入固相萃取小柱中，使用乙腈-水溶液和磷酸盐缓冲液进行清洗，得到的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体溶胶凝胶，用磷酸盐缓冲液悬起，得到悬浮液B；

S3、与步骤S2的操作相同，区别是使用兔抗辣根过氧化物酶抗体替代抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体，得到兔抗辣根过氧化物酶抗体溶胶凝胶，用磷酸盐缓冲液悬起，得到悬浮液C；

S4、将磷酸盐缓冲液加入步骤S1的混合液A，振荡，混合液A凝胶化得到胶体，进行第一次称重，室温保存后再次称重，直至胶体重量为第一次重量的50%，然后将胶体进行研磨，研磨后经筛网筛选，装入固相萃取小柱中，使用乙腈-水溶液和磷酸盐缓冲液进行清洗，得到空白溶胶凝胶，用磷酸盐缓冲液悬起，得到悬浮液D；

S5、首先取固相萃取小柱，然后将筛板一(1)放入固相萃取小柱中；将步骤S3制备的悬浮液C与步骤S4制备的悬浮液D按一定比例混合，加入固相萃取小柱的筛板一(1)上，去除磷酸盐缓冲液后盖上筛板二(2)，筛板一(1)与筛板二(2)之间的区域为控制层(5)；再取筛板三(3)置于筛板二(2)之上，两者之间留有一定距离；然后，将步骤S2制备的悬浮液B与步骤S4制备的悬浮液D按一定比例混合，加入固相萃取小柱的筛板三(3)上，去除磷酸盐缓冲液后盖上筛板四(4)，筛板三(3)与筛板四(4)之间的区域为检测层(6)，得到溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱。

2. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S1中所述盐酸的浓度为0.04M；所述盐酸、蒸馏水和四甲氧基硅烷的体积比为0.1-0.3:0.5-1:3-4。

3. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S1中所述在冰中声振的时间为20-30min。

4. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S2中所述抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体、磷酸盐缓冲液和混合液A的用量比为2-4mg:2-4mL:2-4mL；所述乙腈-水溶液中乙腈和水的体积比为2:3。

5. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S3中所述兔抗辣根过氧化物酶抗体、磷酸盐缓冲液和混合液A的用量比为2-4mg:2-4mL:2-4mL。

6. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S4中所述磷酸盐缓冲液和混合液A的体积比为1:1。

7. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S2中所述筛网的目数为200目。

8. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S5中所述悬浮液C与悬浮液D的体积比为1:70-80；所述悬浮液B与悬浮液D的体积比为1:100。

9. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S5中所述悬浮液C与悬浮液D混合后加入固相萃取小柱的筛板一(1)上的总体积为200~300μL；所述悬浮液B与悬浮液D混合后加入固相萃取小柱的筛板三(3)上的总体积为200~300μL。

10. 根据权利要求1所述的用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法，其特征在于，步骤S5中所述筛板三(3)与筛板二(2)之间的距离为1~3mm。

一种用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测技术领域,具体涉及一种用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法。

背景技术

[0002] 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)是镰刀菌属(Fusarium)的部分菌种(主要有Fusarium, Myrothecium和Stachybotrys)的一种次级代谢产物,主要污染谷物及其制品,人和动物食用污染DON的粮食和饲料后不仅可导致急慢性中毒,而且与很多疾病密切相关,因此有必要建立可靠、有效的检测方法对谷物中的DON污染进行现场监控。

[0003] 目前报导的DON检测方法主要有:薄层层析法(TLC)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)等。薄层层析法这种检测方法具有简便、经济、对设备和检验人员要求不高等特点,但是检测的精确度低,操作过程复杂,分析结果的可重复性和再现性差;酶联免疫吸附试验具有快速、灵敏且操作简单的优点,但由于存在所用抗体与DON的乙酰化类似物的交叉反应致使其检出值偏高,较易出现假阳性;气相色谱法(和高效液相色谱法这些方法虽然能定量分析,但其操作繁琐、不能实现现场快速检测。所以,目前还没有建立可靠、有效的检测方法对谷物中的DON污染情况进行现场监控,实现谷物中DON残留现场快速筛选技术。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明旨在解决上述问题之一;本发明提供一种用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法;结合了免疫亲和色谱法净化、富集及ELISA显色判定结果等特点的谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶胶-凝胶(sol-gel)免疫亲和色谱柱显色快速检测方法;免疫亲和柱是在聚四氟乙烯空柱内设有两层,上层将封闭了抗DON抗体的溶胶凝胶(anti-DON sol-gel)装入构建检测层,待测样品中含有的DON可消除或减弱该层的颜色,从而根据颜色深浅达到检测样品中DON的目的;下层将免抗辣根过氧化物酶抗体的溶胶凝胶(anti-HRP sol-gel)装入构建控制层,只要检测过程中加入酶标记物,该层都会显色;如果该层显色,则检测正常,如果该层无色,则检测失效,从而达到控制的目的。

[0005] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案是:

[0006] S1、将盐酸,蒸馏水和水解四甲氧基硅烷混合,在冰中声振,得到混合液A;

[0007] S2、先将抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体加入磷酸盐缓冲液中,再加入步骤S1的混合液A,振荡,混合液A凝胶化得到胶体,进行第一次称重,室温保存后再次称重,直至胶体重量为第一次重量的50%,然后将胶体进行研磨,研磨后经筛网筛选,装入固相萃取小柱中,使用乙腈-水溶液和磷酸盐缓冲液进行清洗,得到的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体溶胶凝胶,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液B;

[0008] S3、与步骤S2的操作相同,区别是使用兔抗辣根过氧化物酶抗体替代抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体,得到兔抗辣根过氧化物酶抗体溶胶凝胶,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液C;

[0009] S4、将磷酸盐缓冲液加入步骤S1的混合液A,振荡,混合液A凝胶化得到胶体,进行第一次称重,室温保存后再次称重,直至胶体重量为第一次重量的50%,然后将胶体进行研磨,研磨后经筛网筛选,装入固相萃取小柱中,使用乙腈-水溶液和磷酸盐缓冲液进行清洗,得到空白溶胶凝胶,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液D;

[0010] S5、首先取固相萃取小柱,然后将筛板一放入固相萃取小柱中;将步骤S3制备的悬浮液C与步骤S4制备的悬浮液D按一定比例混合,加入固相萃取小柱的筛板一上,去除磷酸盐缓冲液后盖上筛板二,筛板一与筛板二之间的区域为控制层;再取筛板三置于筛板二之上,两者之间留有一定距离;然后,将步骤S2制备的悬浮液B与步骤S4制备的悬浮液D按一定比例混合,加入固相萃取小柱的筛板三上,去除磷酸盐缓冲液后盖上筛板四,筛板三与筛板四之间的区域为检测层,得到溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱。

[0011] 优选的,步骤S1中所述盐酸的浓度为0.04M;所述盐酸、蒸馏水和四甲氧基硅烷的体积比为0.1-0.3:0.5-1:3-4。

[0012] 优选的,步骤S1中所述在冰中声振的时间为20-30min。

[0013] 优选的,步骤S2中所述anti-DON抗体、磷酸盐缓冲液和混合液的用量比为2-4mg:2-4mL:2-4mL;所述乙腈-水溶液中乙腈和水的体积比为2:3。

[0014] 优选的,步骤S2中所述筛网的目数为200目。

[0015] 优选的,步骤S3中所述兔抗辣根过氧化物酶抗体、磷酸盐缓冲液和混合液A的用量比为2-4mg:2-4mL:2-4mL。

[0016] 优选的,步骤S4中所述磷酸盐缓冲液和混合液A的体积比为1:1。

[0017] 优选的,步骤S5中所述悬浮液C与悬浮液D的体积比为1:70-80;所述悬浮液B与悬浮液D的体积比为1:100。

[0018] 优选的,步骤S5中所述悬浮液C与悬浮液D混合后加入固相萃取小柱的筛板一上的总体积为200~300μL;所述悬浮液B与悬浮液D混合后加入固相萃取小柱的筛板三上的总体积为200~300μL。

[0019] 优选的,步骤S5中所述筛板三与筛板二之间的距离为1~3mm。

[0020] 溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱显色快速检测谷物中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇,具体步骤如下

[0021] (1)待测样本提取液:谷物样品预先研磨粉碎,取2g置于离心管中,加入10mL 20%甲醇溶液,涡旋混合提取3-5min后,4℃条件下以5000×g离心15-20min,取上清液;

[0022] (2)免疫亲和色谱柱检测法:将DON-HRP(酶标抗原)加入1.0mL步骤(1)的待测样本提取液中并混匀;将提取液由进口加入免疫亲和色谱柱,并使用注射器控制,使上样时间在3min;加入3.0mL PBST(0.01mol/L,0.01%吐温20)和3.0mL PBS各洗涤1次,使用注射器挤干;将显色底物200μL由出口加入免疫亲和色谱柱,保证显色底物完全浸润控制层和检测层;反应5-10min后对结果进行判定:检测层和控制层同时显蓝色,则判定待测样本为阴性;检测层无色而控制层为蓝色,则判定待测样本为阳性;若二者均不显色,则判定结果无效。

[0023] 本发明的有益效果:

[0024] (1) 本发明使用sol-gel作为填料制备色谱柱进行柱显色,使用的sol-gel材料具有透光性,可视化特性,比传统的琼脂糖凝胶好;同时材料坚硬,廉价易制备。

[0025] (2) 本发明使用TMOS制备的sol-gel填料由二氧化硅分子形成的网状结构构成,抗体被封闭在二氧化硅形成的空腔内,可以自由运动,克服了使用琼脂糖载体固相偶联产生的抗体非定向偶联及空间位阻的缺点,提高了柱容量和免疫亲和色谱柱检测法的灵敏度。

[0026] (3) 本发明使用琼脂糖填料的免疫亲和色谱柱对保存条件要求较高,需要在缓冲液中添加防腐剂4℃保存,而二氧化硅网状结构的孔隙很小,可以保证待测物质与抗体反应的同时微生物及较大杂质不能进入二氧化硅空腔,因此ICTC柱保存条件简单,4℃密封保存即可,不需要缓冲液和防腐措施。

[0027] (4) 本发明中填料的基质是二氧化硅,机械强度远高于琼脂糖填料,对前处理过程操作要求低,能更好地适应复杂现场检测环境的需要。

[0028] (5) 本发明所公开的免疫亲和柱显色分析方法不需要复杂的前处理和大型仪器的辅助,检测时间短,其灵敏度和稳定性可满足谷物中DON污染情况调查的可视化检测需求。

附图说明

[0029] 图1是免疫亲和检测柱的装配图。

[0030] 图2是免疫亲和检测柱的检测流程图。

[0031] 其中,1-筛板一,2-筛板二,3-筛板三,4-筛板四,5-控制层,6-检测层。

具体实施方式

[0032] 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)购自美国sigma公司;抗DON抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司;DON-HRP购自美国sigma公司;辣根过氧化物酶(HRP)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;兔抗辣根过氧化物酶抗体购自北京博尔西科技有限公司。

[0033] 下面结合实施例,对本发明进一步说明。图1是本发明实施例1具体实施时免疫亲和检测柱的装配图,从图中可以看出,选取固相萃取小柱为主体,选取4个筛板,分别记为筛板一1、筛板二2、筛板三3、筛板四4;筛板置于固相萃取小柱中,由下到上依次为筛板一1、控制层5、筛板二2、筛板三3、检测层6、筛板四4。

[0034] 实施例1:

[0035] 本发明是用sol-gel法制备新型柱填料,利用抗原抗体反应的高度特异性,将谷物样本与DON-HRP混合后过柱,使样本中的DON与DON-HRP竞争结合到抗DON抗体上,然后加入底物缓冲液显色;具体实施例为:

[0036] S1、水解TMOS:将0.2mL浓度为0.04M盐酸、0.75mL的蒸馏水和3.4mL的TMOS混合,在冰中声振30min,得到混合液;

[0037] S2、anti-DON sol-gel的制备:将3.0mg anti-DON抗体加入3mL的PBS溶液中,再加入步骤S1的混合液3mL;轻柔摇动烧杯至溶液完全凝胶化,对烧杯进行称重,室温保存,每24h对其进行称重,直至胶体重量为原重量的50%;使用研钵研磨已干燥的胶体,颗粒细度过200目筛,研磨后的产物粒径为75μm;将研磨产物装入固相萃取小柱中,使用15mL乙腈-水和20mL的PBS依次过柱洗涤sol-gel产物,得到的anti-DON sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液B;

[0038] S3、anti-HRP sol-gel的制备:与步骤S2anti-DON sol-gel的制备方法相同,区别是使用anti-HRP抗体替代anti-DON抗体,得到anti-HRP sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液C;

[0039] S4、空白sol-gel的制备:将3mL的磷酸盐缓冲液加入3mL的混合液A中,振荡,混合液A凝胶化得到胶体,进行第一次称重,室温保存后再次称重,直至胶体重量为第一次重量的50%,然后将胶体进行研磨,研磨后经筛网筛选,装入固相萃取小柱中,使用乙腈-水溶液和磷酸盐缓冲液进行清洗,得到空白sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液D;

[0040] S5、免疫亲和色谱柱的制备:取步骤S3制备的悬浮液C与步骤(4)制备的悬浮液D按1:77的比例混合后取200 μ L加入固相萃取小柱筛板一1上,使用注射器将PBS挤干,并将筛板二2置于其上,构建控制层5;将筛板三3置于筛板二2之上,之间留有2.0mm间隔;取步骤S2制备的悬浮液B与步骤(4)制备的悬浮液D按1:100的比例混合后取200 μ L加入固相萃取小柱筛板三3上,使用注射器将PBS挤干,并将筛板四4置于其上,构建检测层6,得到溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱。

[0041] 样本检测:

[0042] (1)待测样本提取液:选取疑似感染DON小麦预先研磨粉碎,过50目筛,-20℃保存;取2g置于50mL离心管中,加入10mL 20%甲醇溶液,涡旋混合提取3min后,4℃5000×g离心15min,取上清;

[0043] (2)免疫亲和色谱柱检测法:将DON-HRP加入1.0mL步骤S1的待测样本提取液中并混匀;将提取液由进口加入ICTC柱,并使用注射器控制,使上样时间在3min;加入3.0mLPBST(0.01mol/L,0.01%吐温20)和3.0mL PBS各洗涤1次,使用注射器挤干;将显色底物200 μ L由出口加入ICTC柱,使用注射器调节保证显色底物可以完全浸润控制层和检测层;反应5min后对结果进行判定:

[0044] 结果显示:检测层无色而控制层为蓝色,说明待测样本为感染DON的小麦。

[0045] 实施例2:

[0046] S1、水解TMOS:将0.1mL 0.04M盐酸、0.5mL蒸馏水和3mL的TMOS混合,在冰中声振20min,得到混合液;

[0047] S2、anti-DON sol-gel的制备:将2.0mg anti-DON抗体加入2mLPBS溶液中,再加入步骤S1的混合液2mL,轻柔摇动烧杯至溶液完全凝胶化;对烧杯进行称重,室温保存,每24h对其进行称重,直至胶体重量为原重量的50%;使用研钵研磨已干燥的胶体,颗粒细度过200目筛,研磨后的产物粒径为75 μ m;将研磨产物装入固相萃取小柱中,使用15mL乙腈-水(40:60,v/v)和20mL PBS依次过柱洗涤sol-gel产物,得到的anti-DON sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液B;

[0048] S3、anti-HRP sol-gel的制备:与步骤S2anti-DON sol-gel的制备方法相同,区别是使用anti-HRP抗体替代anti-DON抗体溶液,得到anti-HRP sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液C;

[0049] S4、空白sol-gel的制备:将2mL的磷酸盐缓冲液加入2mL的混合液A中,振荡,混合液A凝胶化得到胶体,进行第一次称重,室温保存后再次称重,直至胶体重量为第一次重量的50%,然后将胶体进行研磨,研磨后经筛网筛选,装入固相萃取小柱中,使用乙腈-水溶液和磷酸盐缓冲液进行清洗,得到空白sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液D;

[0050] S5、免疫亲和色谱柱的制备:取步骤S3制备的悬浮液C与步骤S4制备的悬浮液D按1:70的比例混合后取250 μ L加入固相萃取小柱筛板一1上,使用注射器将PBS挤干,并将筛板二2置入anti-HRP sol-gel之上,构建控制层5;将筛板三3置于筛板二2之上,之间留有1.0mm间隔;取步骤S2制备的悬浮液B与步骤S4制备的悬浮液D按1:100的比例混合后取250 μ L加入固相萃取小柱筛板三3上,使用注射器将PBS挤干,并将筛板四4置于其上,构建检测层6;得到溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱。

[0051] 样本检测;

[0052] (1)待测样本提取液:大米预先研磨粉碎,过50目筛,-20℃保存;取2g置于50mL离心管中,加入10mL 20%甲醇溶液,涡旋混合提取3min后,4℃5000×g离心15min,取上清;

[0053] (2)免疫亲和色谱柱检测法:将DON-HRP加入1.0mL步骤S1的待测样本提取液中并混匀;将提取液由进口加入ICTC柱,并使用注射器控制,使上样时间在3min;加入3.0mLPBST (0.01mol/L,0.01%吐温20) 和3.0mL PBS各洗涤1次,使用注射器挤干;将显色底物200 μ L由出口加入ICTC柱,使用注射器调节保证显色底物可以完全浸润控制层和检测层;反应5min后对结果进行判定:检测层和控制层同时显蓝色,判定待测样本为未感染DON的大米。

[0054] 实施例3:

[0055] S1、水解TMOS:将0.2mL浓度为0.04M的盐酸、1mL蒸馏水和4mL的TMOS混合,在冰中声振30min,得到混合液;

[0056] S2、anti-DON sol-gel的制备:将4.0mg的anti-DON抗体加入4mL的PBS溶液中,再加入步骤S1的混合液4mL,轻柔摇动烧杯至溶液完全凝胶化;对烧杯进行称重,室温保存,每24h对其进行称重,直至胶体重量为原重量的50%;使用研钵研磨已干燥的胶体,颗粒细度过200目筛,研磨后的产物粒径为75 μ m;将研磨产物装入固相萃取小柱中,使用15mL乙腈-水(40:60,v/v)和20mL PBS依次过柱洗涤sol-gel产物;得到的anti-DON sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液B;

[0057] S3、anti-HRP sol-gel的制备:与步骤S2中anti-DON sol-gel的制备方法相同,区别是使用anti-HRP抗体替代anti-DON抗体溶液,得到anti-HRP sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液C;

[0058] S4、空白sol-gel的制备:将4mL的磷酸盐缓冲液加入4mL的混合液A中,振荡,混合液A凝胶化得到胶体,进行第一次称重,室温保存后再次称重,直至胶体重量为第一次重量的50%,然后将胶体进行研磨,研磨后经筛网筛选,装入固相萃取小柱中,使用乙腈-水溶液和磷酸盐缓冲液进行清洗,得到空白sol-gel,用磷酸盐缓冲液悬起,得到悬浮液D;

[0059] S5、免疫亲和检测柱的制备:取步骤S3制备的悬浮液C与步骤S4制备的悬浮液D按1:80的比例混合后取300 μ L加入固相萃取小柱筛板一1上,使用注射器将PBS挤干,并将筛板二2置于其上,构建控制层5;将筛板三3置于筛板二2之上,之间留有2.0mm间隔;取步骤S2制备的悬浮液B与步骤S4制备的悬浮液D按1:100的比例混合后取300 μ L加入固相萃取小柱筛板三3上,使用注射器将PBS挤干,并将筛板四4置于其上,构建检测层6;得到溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱。

[0060] 样本检测;

[0061] (1)待测样本提取液:选取新鲜玉米预先研磨粉碎,过50目筛,-20℃保存;取2g置于50mL离心管中,加入10mL 20%甲醇溶液,涡旋混合提取3min后,4℃条件下以5000×g离

心15min,取上清;

[0062] (2) 免疫亲和色谱柱检测法:将DON-HRP加入1.0mL步骤S1的待测样本提取液中并混匀;将提取液由进口加入ICTC柱,并使用注射器控制,使上样时间在3min;加入3.0mLPBST (0.01mol/L,0.01%吐温20) 和3.0mL PBS各洗涤1次,使用注射器挤干;将显色底物200μL由出口加入ICTC柱,使用注射器调节保证显色底物可以完全浸润控制层和检测层;反应5min后对结果进行判定:检测层和控制层同时显蓝色,说明判定待测样本为未感染DON的新鲜玉米。

[0063] 说明:以上实施例仅用以说明本发明而并非限制本发明所描述的技术方案;因此,尽管本说明书参照上述的各个实施例对本发明已进行了详细的说明,但是本领域的普通技术人员应当理解,仍然可以对本发明进行修改或等同替换;而一切不脱离本发明的精神和范围的技术方案及其改进,其均应涵盖在本发明的权利要求范围内。

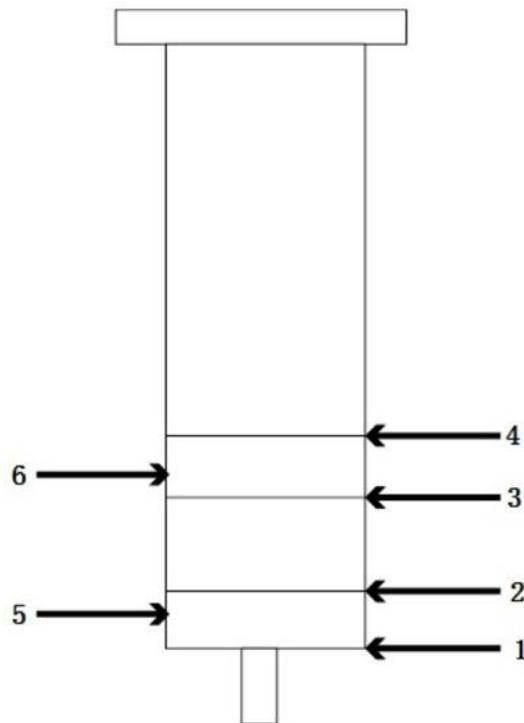


图1

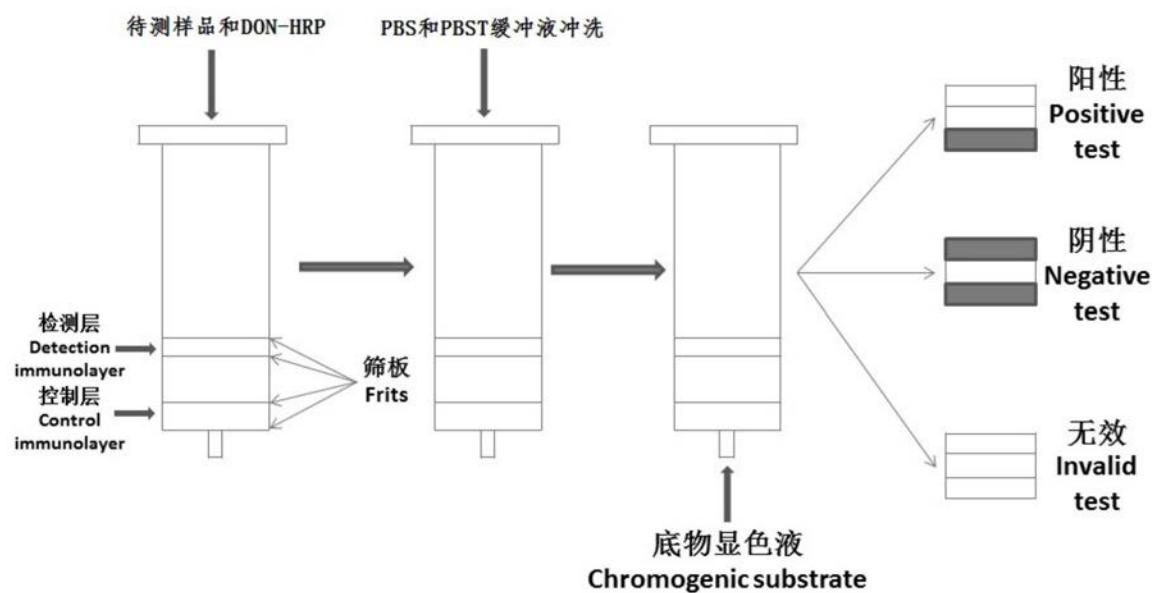


图2

专利名称(译)	一种用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法		
公开(公告)号	CN110018306A	公开(公告)日	2019-07-16
申请号	CN201910212262.7	申请日	2019-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	江苏大学		
申请(专利权)人(译)	江苏大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏大学		
[标]发明人	孟辉 黄珊 张祯 曾昆		
发明人	孟辉 黄珊 张祯 曾昆		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56911 G01N33/581		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明属于免疫学检测技术领域，涉及一种用于快速检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇的溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱的制备方法；步骤为：水解四甲氨基硅烷，制备得到抗DON抗体溶胶凝胶、免抗HRP抗体溶胶凝胶和空白溶胶凝胶；然后取免抗HRP抗体溶胶凝胶与空白溶胶凝胶混合后加入固相萃取小柱的筛板一上，去除磷酸盐缓冲液后盖上筛板二，构建控制层；将筛板三置于筛板二之上；取抗DON抗体溶胶凝胶与空白溶胶凝胶混合后加入固相萃取小柱的筛板三上，去除磷酸盐缓冲液后盖上筛板四，构建检测层，得到溶胶-凝胶免疫亲和色谱柱；本发明不需要复杂的前处理和大型仪器的辅助，检测时间短、灵敏度和稳定性高，满足DON污染情况调查的可视化检测需求。

