



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110488016 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(21)申请号 201910748957.7

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2019.08.14

(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 王海鸣 刘莹
纪剑 张银志 孙嘉笛 付伟

(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 林娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

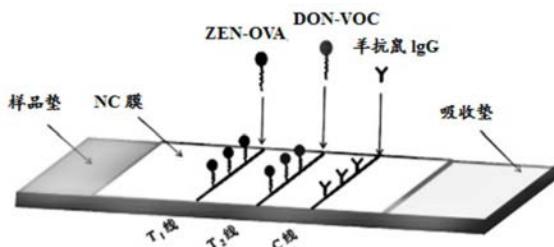
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫定量试纸条

(57)摘要

本发明公开了一种玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫定量试纸条，属于免疫分析快速检测技术领域。本发明通过标记荧光微球制备荧光探针，包括荧光微球-玉米赤霉烯酮单克隆抗体、荧光微球-呕吐毒素单克隆抗体和荧光微球-羊抗兔二抗，将玉米赤霉烯酮人工抗原、荧光微球人工抗原和羊抗鼠二抗分别喷涂于硝酸纤维素膜作为检测线T1线、检测线T2线和质控线C线制得免疫层析试纸条；利用竞争免疫法，通过读取荧光免疫分析仪上检测线的荧光值，对样品中玉米赤霉烯酮和呕吐毒素同时进行定量分析。该方法不但克服了试纸条技术中胶体金不易保存的缺点，而且制备荧光探针的方法简单高效、灵敏度高。



1. 一种玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫定量试纸条，其特征在于，所述试纸条包括样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述硝酸纤维素膜上利用玉米赤霉烯酮人工抗原、呕吐毒素人工抗原和羊抗鼠二抗分别作为检测线T1线、检测线T2线和质控线C线，其中玉米赤霉烯酮人工抗原的用量为0.2-1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}$ ，呕吐毒素人工抗原的用量为0.1-1.2 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 。

2. 根据权利要求1所述的试纸条，其特征在于，所述检测线T1线、检测线T2线和质控线C线三线之间各自相距0.3-0.5cm。

3. 根据权利要求1或2所述的试纸条，其特征在于，所述吸水纸、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。

4. 权利要求1-3任一所述试纸条在检测玉米赤霉烯酮和呕吐毒素中的应用。

5. 一种双通道检测玉米赤霉烯酮和呕吐毒素的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

(1) 将经荧光微球标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体Eu-ZEN-mAb和呕吐毒素单克隆抗体Eu-DON-mAb与玉米赤霉烯酮-呕吐毒素的混标样品混匀，加入到权利要求1-3任一所述试纸条中的样品垫上，进行层析，然后利用免疫定量分析仪分别测定混标样品相应的荧光强度值：T1值、T2值和C值；

(2) 设置阴性对照，即混标样品中不含有玉米赤霉烯酮和呕吐毒素，利用免疫定量分析仪测得荧光强度T₀值；

(3) 分别取T1/T₀、T2/T₀作为参数，与浓度的对数值建立线性模型，得到玉米赤霉烯酮和呕吐毒素相应的标准曲线；

(4) 参照步骤(1)层析待测样品，得到相应的荧光强度值，分别利用步骤(3)所得的两种毒素的标准曲线，即得毒素含量结果。

6. 根据权利要求5所述的方法，其特征在于，所述步骤(1)中的层析时间为10-15min。

7. 根据权利要求5或6所述的方法，其特征在于，所述混标样品的介质是含10%-40%甲醇的PBS溶液。

8. 根据权利要求5-7任一所述的方法，其特征在于，所述抗体复合物溶液是含有1% BSA、0.05%吐温-20的PBS溶液；其中荧光探针的浓度为0.25-5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 。

9. 根据权利要求5所述的方法，其特征在于，所述步骤(1)中的层析时间为10min。

10. 根据权利要求5所述的方法，其特征在于，所述混标样品的介质是含20%甲醇的PBS溶液。

一种玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫定量试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫定量试纸条，属于免疫分析快速检测技术领域。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN)，又称F-2毒素，是由禾谷镰刀菌、三线镰刀菌及串珠镰刀菌等产生的一种雌激素类真菌毒素，广泛存在于玉米、小麦、高粱等谷物及其制品中，具有很强的生殖发育毒性和致畸作用，可导致家禽和牲畜的生长缓慢和免疫抑制等，并能够通过食物链进入人体，产生血液和免疫毒性，并且具有致癌活性可导致肿瘤，对人类健康带来巨大危害。

[0003] 呕吐毒素，学名脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)，是单端孢菌素烯烃中的一种。其作为一种常见的真菌毒素，主要污染物有小麦、大麦、燕麦、玉米等谷物作物。

[0004] 谷物及其制品在生产过程中可能受到多种产毒真菌毒素的污染，或者感染的真菌能同时产生多种毒素，因此会含有不止一种或者一类真菌毒素。目前同时检测真菌毒素的方法主要是HPLC-MS，但是由于其需要昂贵的设备，复杂的样品前处理等要求，不适合用于快速检测谷物中的真菌毒素，因此亟需开发能够在短时间内同时检测多种真菌毒素的检测方法。目前检测呕吐毒素的试纸条虽有报道，如申请号为201720645327.3、201710319370.5的快速检测卡、201720357308.0的荧光免疫层析试剂盒、201620051794.9的胶体金检测卡，此外，检测玉米赤霉烯酮的试纸条也有报道，如申请号为201720453761.1、20210307321.7的荧光定量快速检测试纸条，但缺少同时检测呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的免疫定量试纸条，因此本专利以时间分辨荧光微球为示踪物，根据免疫竞争反应模式建立了一种可以同时检测谷物中玉米赤霉烯酮和呕吐毒素的双通道免疫层析分析法。

[0005] 每年全球粮食总产量的25%受到真菌毒素的污染。所有的农作物在生长、采后贮藏以及加工时期，都可能会被污染产毒真菌进而含有生物毒素，亟需研究出更加灵敏，更加方便的可用于现场快速、高通量、多通道检测的方法。

发明内容

[0006] 针对现有技术存在的上述不足，本发明提供了一种基于荧光微球标记的同时快速检测玉米赤霉烯酮-呕吐毒素的免疫定量试纸条。本发明采用荧光微球替代胶体金，分别用荧光微球标记玉米赤霉烯酮抗体复合物和呕吐毒素抗体复合物，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，对样品中玉米赤霉烯酮和呕吐毒素同时进行定量分析，可以快速定量检测玉米赤霉烯酮和呕吐毒素。

[0007] 本发明第一个目的是提供一种玉米赤霉烯酮-呕吐毒素免疫定量试纸条，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利用玉米赤霉烯酮人工抗原、呕吐毒素人工抗原和羊抗鼠二抗分别作为检测线T1线、检测线T2线和质控线C线，其中玉米赤霉烯酮人工抗原的用量为0.2-1.6 μ g/cm，呕吐毒素人工抗原的用量为

0.1—1.2 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 。

[0008] 在本发明的一种实施方式中，所述检测线T1线、检测线T2线和质控线C线三线之间各自相距0.3—0.5cm。

[0009] 在本发明的一种实施方式中，所述NC膜为0.3—1cm左右的宽度切条。优选0.4cm。

[0010] 在本发明的一种实施方式中，所述检测线T1线是将0.2—0.8mg/mL玉米赤霉烯酮人工抗原喷涂到NC膜上，每cm的NC膜宽度喷涂量为1—2 μL 。当NC膜宽度为0.4cm时，喷涂量为0.4—0.8 μL 。

[0011] 在本发明的一种实施方式中，所述检测线T2线是将0.1—0.6mg/mL呕吐毒素人工抗原，喷涂到NC膜上，每cm的NC膜宽度喷涂量为1—2 μL 。当NC膜宽度为0.4cm时，喷涂量为0.4—0.8 μL 。

[0012] 在本发明的一种实施方式中，所述质控线C线是将0.5—2mg/mL羊抗鼠二抗喷涂到NC膜上，每cm的NC膜宽度喷涂量为1—2 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。当NC膜宽度为0.4cm时，喷涂量为0.4—0.8 μL 。

[0013] 在本发明的一种实施方式中，所述吸水纸、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。

[0014] 在本发明的一种实施方式中，所述吸水纸与硝酸纤维素膜重叠的部分位于硝酸纤维素膜的上侧。

[0015] 在本发明的一种实施方式中，还包括包覆所述试纸条的外壳；所述外壳包括底座和卡壳，所述卡壳上有观察口和加样口，以露出试纸条的局部区域；所述加样口开口于所述样品垫上部，以露出部分或全部所述样品垫区域；所述观察口开口于所述硝酸纤维素膜上侧，以露出全部所述检测带和所述质控带。

[0016] 在本发明的一种实施方式中，所述试纸条的使用方法包括：

[0017] (1) 将经荧光微球标记(Eu)的玉米赤霉烯酮单克隆抗体(Eu-ZEN-mAb)和呕吐毒素单克隆抗体(Eu-DON-mAb)与玉米赤霉烯酮-呕吐毒素的混标样品混匀，加入到上述试纸条中的样品垫上，进行层析，然后利用免疫定量分析仪分别测定混标样品相应的荧光强度值：T1值、T2值和C值；

[0018] (2) 设置阴性对照，即混标样品中不含有玉米赤霉烯酮和呕吐毒素，利用免疫定量分析仪测得荧光强度T₀值；

[0019] (3) 分别取T1/T₀、T2/T₀作为参数，与浓度的对数值建立线性模型，得到玉米赤霉烯酮和呕吐毒素相应的标准曲线；

[0020] (4) 参照步骤(1)层析待测样品，得到相应的荧光强度值，分别利用步骤(3)所得的两种毒素的标准曲线，即得毒素含量结果。

[0021] 本发明的第二个目的是利用上述试纸条提供一种双通道检测玉米赤霉烯酮和呕吐毒素的方法，所述方法包括如下步骤：

[0022] (1) 将经荧光微球标记(Eu)的玉米赤霉烯酮单克隆抗体(Eu-ZEN-mAb)和呕吐毒素单克隆抗体(Eu-DON-mAb)与玉米赤霉烯酮-呕吐毒素的混标样品混匀，加入到上述试纸条中的样品垫上，进行层析，然后利用免疫定量分析仪分别测定混标样品相应的荧光强度值：T1值、T2值和C值；

[0023] (2) 设置阴性对照，即混标样品中不含有玉米赤霉烯酮和呕吐毒素，利用免疫定量分析仪测得荧光强度T₀值；

[0024] (3) 分别取T₁/T₀、T₂/T₀作为参数,与浓度的对数值建立线性模型,得到玉米赤霉烯酮和呕吐毒素相应的标准曲线;

[0025] (4) 参照步骤(1)层析待测样品,得到相应的荧光强度值,分别利用步骤(3)所得的两种毒素的标准曲线,即得毒素含量结果。

[0026] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤(1)中的层析时间为10-15min。优选10min。

[0027] 在本发明的一种实施方式中,所述混标样品的介质是含10%-40%甲醇的pH值为7.4的PBS溶液。甲醇含量优选20%。

[0028] 在本发明的一种实施方式中,将20-50μL的待测样品、40-50μL荧光微球玉米赤霉烯酮抗体复合物(Eu-ZEN-mAb)溶液和40-50μL荧光微球呕吐毒素抗体复合物(Eu-DON-mAb)溶液混合均匀,取混合物100-150μL缓慢滴入试纸条样品垫,35-37℃层析10-15min,然后通过HG-98免疫定量分析仪记录T₁值、T₂值和C值,用T/T₀作为参数,对样品进行定量检测。其中T指加入不同浓度样品时的T₁或者T₂线处的荧光强度;T₀指阴性样品在相应T线处的荧光强度,阴性样品指不含目标物的样品。

[0029] 在本发明的一种实施方式中,所述玉米赤霉烯酮完全抗体、呕吐毒素完全抗体和羊抗鼠单克隆抗体以稀释液的形式使用,稀释液含1%BSA、0.9%NaCl、1%NaN₃,浓度为0.01M的pH值为7.4的PBS溶液。

[0030] 在本发明的一种实施方式中,所述抗体复合物溶液(荧光探针)是含有1%BSA、0.05%吐温-20的PBS溶液;其中荧光探针的浓度为0.25-5μg/μg。

[0031] 在本发明的一种实施方式中,所述玉米赤霉烯酮和呕吐毒素标准品以稀释液的形式使用,稀释液含20%甲醇,浓度为0.01M的pH值为7.4的PBS溶液。

[0032] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针的稀释倍数为200倍。

[0033] 在本发明的一种实施方式中,所述待测样品的上样体积优选40μL。

[0034] 在本发明的一种实施方式中,所述为荧光微球玉米赤霉烯酮抗体复合物上样体积为50μL。

[0035] 在本发明的一种实施方式中,所述为荧光微球呕吐毒素抗体复合物上样体积为50μL。

[0036] 在本发明的一种实施方式中,所述试纸条上混合物的加样体积为140μL。

[0037] 在本发明的一种实施方式中,所述37℃层析时间为10min。

[0038] 本发明所述的技术方案相比现有技术具有以下优点:

[0039] (1) 本发明方法能够实现双通道定量测定玉米赤霉烯酮和呕吐毒素含量,特异性强、灵敏度高,其中当玉米赤霉烯酮浓度为1μg/L-10μg/L时,玉米赤霉烯酮浓度的对数值与T/T₀成线性关系,线性方程为Y=90.04-69.67LogX,R²=0.9947,检测限可达到0.6903μg/L;当呕吐毒素浓度为1μg/L-25μg/L时,呕吐毒素浓度的对数值与T/T₀成线性关系,线性方程为Y=72.90-20.64LogX,R²=0.9974,检测限可达到0.2447μg/L。

[0040] (2) 本发明方法以玉米赤霉烯酮单克隆抗体和呕吐毒素抗体作为识别靶点,以荧光微球为信号源,荧光微球的体积远大于荧光染料分子的体积,不但可以负载大量的荧光染料分子,而且便于荧光染料分子在检测带和质控带处的聚集,起到信号放大的作用,检测特异性强,可实现快速定量检测,且灵敏度高、误差小,为及时检测提供了极大的便利。

[0041] (3) 本发明制备的试纸条是一种能够真正地解决市场需要,精确度高,稳定性强,

操作简单,可重复性高,能够满足工商部门,质检机构,科研高校等检测机构需要的快速检测产品,可供各类粮食谷物加工企业、第三方检测机构、各级政府监管部门等的使用,适用于食品工业、环境保护和生物化学等领域。

附图说明

- [0042] 图1:玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫层析法的检测线T1和T2完全抗原浓度的优化;其中A为呕吐毒素检测线T2相应抗原浓度的优化;B为玉米赤霉烯酮检测线T1相应抗原浓度的优化;
- [0043] 图2:玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫层析法的T线免疫动力学曲线;
- [0044] 图3:样品稀释液中甲醇含量对样品检测结果的影响(A)及荧光强度的抑制率(B);
- [0045] 图4:玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫试纸条结构图;
- [0046] 图5:标记荧光微球免疫层析法同时检测两种毒素的标准曲线;其中A为玉米赤霉烯酮的标准曲线;B为呕吐毒素的标准曲线。

具体实施方式

- [0047] 荧光强度的测定:利用HG-98免疫定量分析仪,在激发波长365nm和发射波长613nm处测得相应的荧光强度值。
- [0048] 实施例1 Eu-荧光微球分别标记玉米赤霉烯酮单克隆抗体和呕吐毒素单克隆抗体的荧光探针制备
- [0049] 具体制备方法如下:
- [0050] (1)取4℃放置的羧基荧光微球(购于厦门挪岛科技,粒径300nm)50μL(1%固形物含量),超声分散,加入800-1000μL浓度为0.05M的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES,C₆H₁₃NO₄S·H₂O)活化缓冲液,14500rpm离心10-15min(离心时温度控制在15℃左右);
- [0051] (2)弃上清,加入600-800μL MES缓冲液,超声重悬,重复离心清洗2-3次;
- [0052] (3)弃上清,加入200μL MES缓冲液超声重悬,加入50μL 10mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC,C₈H₁₇N₃·HCl)、50μL 10mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,C₄H₅NO₃)室温下(25℃)摇床500rpm避光振荡活化30min;
- [0053] (4)离心,弃上清,加入浓度为0.01M pH7.4的磷酸缓冲液(PBS)清洗2-4次;
- [0054] (5)弃上清,加400μL磷酸缓冲液超声重悬,加入10μg玉米赤霉烯酮单克隆抗体(制备方法参考文献:盛建武,何苗,宋保栋,等.MC-LR完全抗原的设计及制备[J].环境科学,2005,26(3):33-37.),室温条件下避光振荡2h;
- [0055] (6)加入10%体积的10倍封闭液,室温条件下避光振荡30min;
- [0056] (7)封闭后离心弃上清,用浓度为0.05M Tris-HCl(含有0.1%Tween-20)缓冲液洗2次;
- [0057] (8)弃上清,加入200μL冻干液复溶,得到荧光探针Eu-荧光微球的玉米赤霉烯酮单克隆抗体Eu-ZEN-mAb,4℃保存备用。
- [0058] 参照上述步骤,将玉米赤霉烯酮单克隆抗体替换为呕吐毒素单克隆抗体,制备得到荧光探针Eu-荧光微球的呕吐毒素单克隆抗体Eu-DON-mAb,4℃保存备用。
- [0059] 实施例2基于标记荧光微球的玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫试纸条的组装

[0060] 玉米赤霉烯酮-呕吐毒素免疫试纸条的结构图如图3所示,底板上从左到右依次为样品垫,硝酸纤维素(NC)膜和吸水纸,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5mm,类似地,吸水纸叠在NC膜上,二者重叠约5mm,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。

[0061] 组装方式如下:在硝酸纤维膜上分别喷涂玉米赤霉烯酮完全抗原(0.2mg/mL)、呕吐毒素完全抗原(0.3mg/mL)作为检测线(T1线)和检测线(T2线),在硝酸纤维膜上分别喷涂羊抗鼠二抗(1mg/mL)作为质控线(C线),喷涂量均为 $1\mu\text{L}/\text{cm}$,三线之间各自相距约5mm,37℃干燥2-3h,喷涂好的试纸条要及时切开组装,4℃密封保存备用。T1线、T2线和C线的宽度取决于喷膜仪管路的直径约2mm,T线和C线的长度即单个试纸条的宽度约4mm。T1线距离样品垫约5mm,T2线距离样品垫约10mm,C线距离吸水纸约为5mm。

[0062] 实施例3基于标记荧光微球的玉米赤霉烯酮-呕吐毒素免疫试纸条的标准曲线的绘制

[0063] 标准曲线的绘制方法是:

[0064] 将实施例1制得的Eu-荧光微球分别标记的玉米赤霉烯酮单克隆抗体(Eu-ZEN-mAb)和呕吐毒素单克隆抗体(Eu-DON-mAb)作为荧光探针,将40 μL 的玉米赤霉烯酮和呕吐毒素混标液、50 $\mu\text{LEu-ZEN-mAb}$ 溶液和50 $\mu\text{LEu-DON-mAb}$ 溶液混合均匀,取混合物140 μL 缓慢滴入试纸条样品垫,37℃层析10min。然后通过HG-98免疫定量分析仪记录T值和C值。其中玉米赤霉烯酮和呕吐毒素混标的浓度梯度(ZEN/DON)分别为:1/1 $\mu\text{g/L}$ 、2/2 $\mu\text{g/L}$ 、4/5 $\mu\text{g/L}$ 、6/10 $\mu\text{g/L}$ 、8/20 $\mu\text{g/L}$ 、10/25 $\mu\text{g/L}$ 。以各个标准品浓度的对数值为横坐标,以 T/T_0 (抑制率)值为纵坐标,绘制曲线。其中,T代表加入不同浓度样品时的T线处的荧光强度, T_0 代表阴性样品T线处的荧光强度;玉米赤霉烯酮和呕吐毒素混标液中包含不同浓度梯度的玉米赤霉烯酮和呕吐毒素,以及含20%甲醇(v:v)的0.01M pH7.4的PBS溶液;Eu-ZEN-mAb溶液:0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 荧光微球标记的ZEN单克隆抗体,0.1g BSA和0.05mL吐温-20的0.05mol/L pH 7.5Tris-HCl溶液;Eu-DON-mAb溶液:0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 荧光微球标记的DON单克隆抗体,0.1g BSA和0.05mL吐温-20的0.05mol/L pH 7.5Tris-HCl溶液。

[0065] 随着玉米赤霉烯酮和呕吐毒素浓度的增大,试纸条T1线和T2线条带会越来越浅,所以 T/T_0 会越来越小,如图5-B所示为 T/T_0 随玉米赤霉烯酮浓度的变化曲线,当玉米赤霉烯酮浓度为1 $\mu\text{g/L}$ -10 $\mu\text{g/L}$ 时,玉米赤霉烯酮浓度的对数值与 T/T_0 成线性关系,线性方程为 $Y=90.04-69.67\log X$, $R^2=0.9947$,检测限可达到0.6903 $\mu\text{g/L}$;如图5-A所示为 T/T_0 随呕吐毒素浓度的变化曲线,当呕吐毒素浓度为1 $\mu\text{g/L}$ -25 $\mu\text{g/L}$ 时,呕吐毒素浓度的对数值与 T/T_0 成线性关系,线性方程为 $Y=72.90-20.64\log X$, $R^2=0.9974$,检测限可达到0.2447 $\mu\text{g/L}$ 。

[0066] 实施例4标记荧光微球同时快速检测玉米赤霉烯酮和呕吐毒素过程中的条件优化

[0067] (1)玉米赤霉烯酮人工抗原和呕吐毒素人工抗原的用量的影响

[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样本中玉米赤霉烯酮含量为4 $\mu\text{g/L}$ 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:制备玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫层析试纸条时,在检测线T1处喷涂DON-OVA人工抗原的过程中,DON-OVA浓度的选择为(0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.5mg/mL和0.8mg/mL),而在检测线T2处喷涂的ZEN-OVA浓度的选择为(0.1mg/

mL、0.2mg/mL、0.4mg/mL和0.6mg/mL),选取阴性对照组(PBS、20%甲醇-PBS溶液)和阳性试验组(DON浓度为5 μ g/L,ZEN浓度为4 μ g/L)进行分析,进而评价不同浓度的DON-OVA和ZEN-OVA对免疫层析方法的影响。结果表1和图1所示:

[0070] 表1两种抗原用量的优化

	抗原浓度	抑制率 (%)	荧光强度 (a.u.)
[0071] 呕吐毒素人工 抗原	0.2	56	38759
	0.3	62	68973
	0.5	55	74586
	0.8	50	90527
玉米赤霉烯酮 人工抗原	0.1	45	67941
	0.2	55	93573
	0.4	52	119840
	0.6	42	125735

[0072] 结合表1和图1A可知,随着T1线处DON-OVA完全抗原浓度的增加,阴性对照组(PBS溶液)检测线处的荧光强度呈现先增加后趋于稳定;当DON-OVA完全抗原的浓度为0.3mg/mL时,阳性试验组(DON=5 μ g/L)与阴性对照组之间的竞争抑制率达到最大值,且此时检测线处也有相对较强的荧光信号值,因此0.3mg/mL被作为T线处DON-OVA完全抗原的最适浓度。结合表1和图1B可知,随着T2线处ZEN-OVA完全抗原浓度的增加,阴性对照组(20%甲醇-PBS溶液)T2线处的荧光强度呈现先增加后趋于稳定;当ZEN-OVA完全抗原的浓度为0.2mg/mL时,阳性试验组(ZEN=4 μ g/L)与阴性对照组之间的竞争抑制率达到最大值,且此时T线处也有相对较强的荧光信号值,因此0.2mg/mL被作为T线处DON-OVA完全抗原的最适浓度。

[0073] (2) 层析时间对检测结果的影响:

[0074] 图2为玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫层析法的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40 μ L待测样品、50 μ L荧光微球-DON抗体复合物和50 μ L荧光微球-ZEN抗体复合物于96孔微孔板中,反应5min后每隔1min取100 μ L混合物加入样品垫层析5min后,用HG-98免疫定量分析仪记录T1线和T2线荧光强度的变化。

[0075] 以荧光强度为纵坐标,反应时间为横坐标绘制免疫反应动力学曲线,观察两条T线荧光强度随时间的变化,以T1线和T2线荧光值达到稳定的时间作为最佳检测时间。从图2中可以看出,两条T线荧光强度在5-15min内均随着时间的延长呈现增强的趋势。在反应初期5min时,荧光强度均较弱,而且各平行组之间误差较大,表明此时反应还不稳定;反应进行10min后,两条T线荧光强度值不再明显变化,趋于平稳,而且平行组之间的误差也逐渐减小,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。

[0076] (3) 样品稀释液中甲醇浓度的优化

[0077] 免疫层析反应中抗体对甲醇具有一定耐受性,高浓度甲醇对抗体具有一定破坏性,甚至使其失活。合适的甲醇浓度对抗体活性影响较小,同时可获得最佳检测效果。

[0078] 图3为研究样品稀释液中甲醇对样品检测结果的影响,本实验将阴性样品溶液的甲醇体积浓度分别设置为5%,10%,20%,30%和40%,每个样品均用相应不同含量甲醇溶液加标至100/60 μ g/L(DON/ZEN),其余过程同实施例3,并用免疫层析试纸条检测,记录T1、

T2处的荧光强度，并分析样品稀释液中的甲醇浓度对阳性样品(加标后的样品)与阴性样品(不含目标物的样品)之间的抑制率的影响。由图3可知，样品稀释液中的甲醇浓度对两条检测线的荧光强度影响较小，但是对抑制率有显著的影响。当甲醇含量为20%时，样品中的DON和ZEN与阴性对照组之间的抑制率最大，当甲醇含量大于20%的时，抑制率明显下降，而且样品稀释液中的甲醇含量对ZEN的抑制率影响更大。

[0079] 实施例5 DON-ZEN双通道免疫层析试纸条准确性评价

[0080] 为了验证双通道免疫层析试纸条的准确性与灵敏度，对阴性小麦粉样本和玉米粉样本进行加标回收试验，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。根据加标回收率的计算公式，计算出各样本的加标回收率，以此来评价该方法的准确性。加标回收率的计算公式如下：

$$[0081] \text{加标回收率}(\%) = \frac{\text{检测得到的标准品浓度}}{\text{添加的标准品浓度}} \times 100$$

[0082] 阴性小麦粉样品和玉米粉样品分别按照50/20μg/L、100/60μg/L和200/80μg/L三个浓度梯度进行DON-ZEN加标回收实验。本研究以含20%甲醇和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。准确称取5.0g样品，加入25mL超纯水涡旋震荡样品，超声提取30min后，5000rpm离心15min，上清液用0.22μm滤膜过滤后用PBST稀释10倍后用于免疫层析检测。

[0083] 由于在样品前处理过程中用了80%甲醇溶液(甲醇:水=80:20)萃取实际样品中的DON和ZEN，因此在检测前用样品稀释液(PBST稀释提取液)将提取液稀释5倍以减弱样品的基质效应和提取液中的甲醇对检测准确度的影响。(样品提取液1μg/L=实际样品10μg/L)

[0084] 表2准确性评价

[0085]	样品	DON-ZEN 混标 (μg/L)	回收率 (%), DON/ZEN)	CV(%)	
				批内	批间
[0086]	小麦粉	50/20	92.71±6.02/84.87±3.98	6.23	11.39
		100/60	80.14±8.90/88.64±7.22	7.21	10.80
		200/80	87.42±11.03/91.24±6.53	10.74	7.98
	玉米粉	50/20	105.73±6.55/91.43±8.20	7.35	8.93
		100/60	87.39±7.30/92.42±7.91	6.77	12.84
		200/80	89.52±3.55/101.70±6.32	5.83	6.52

[0087] 由表2可知，将制备的DON-ZEN双通道检测免疫层析试纸条用于检测加标的小麦和玉米样品，最终得出小麦的加标回收率在80.14%~92.71%之间，玉米加标回收率在87.39%~105.73%之间，表明制备的DON-ZEN双通道免疫荧光定量试纸条能够用于现场快速筛查与检测。

[0088] 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。

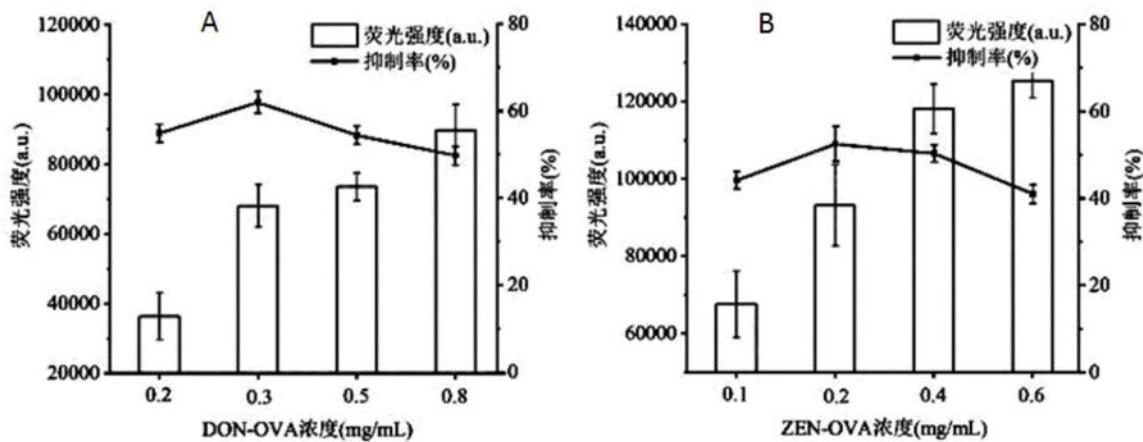


图1

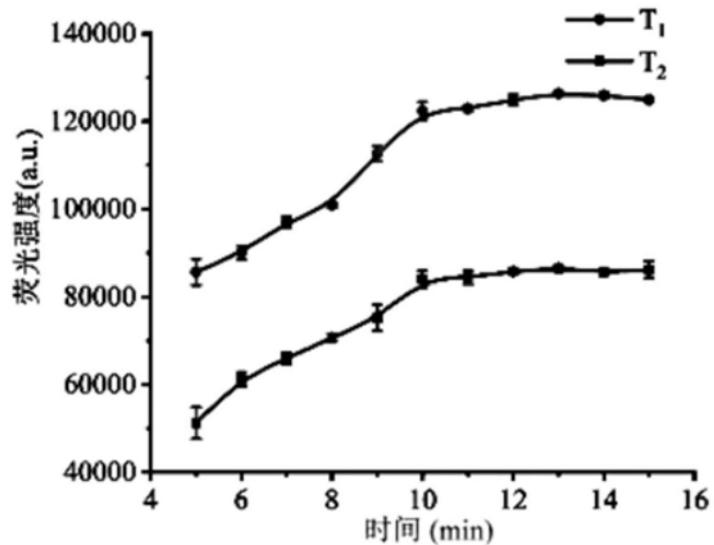


图2

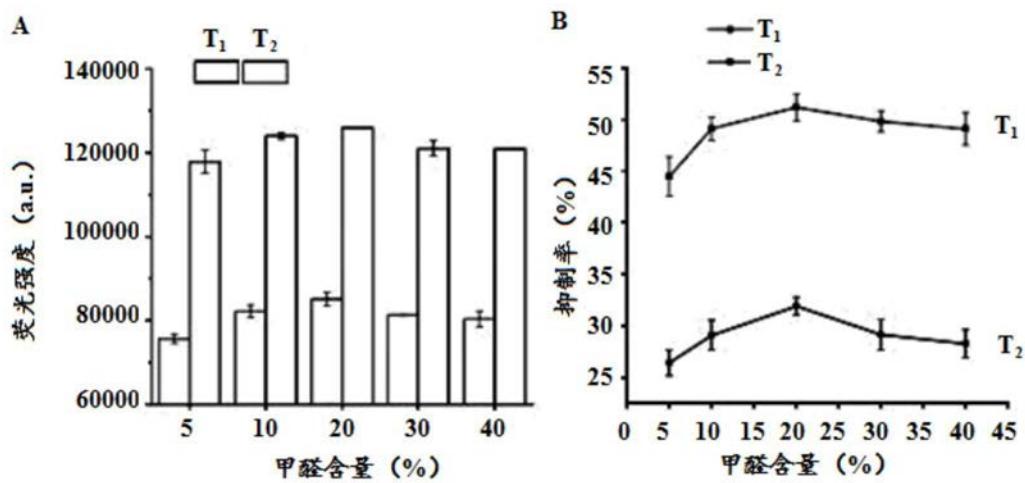


图3

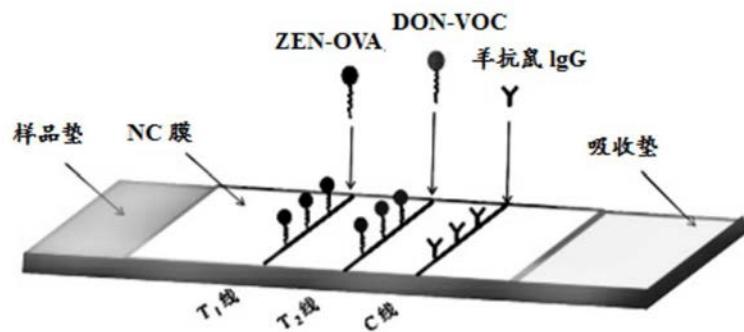


图4

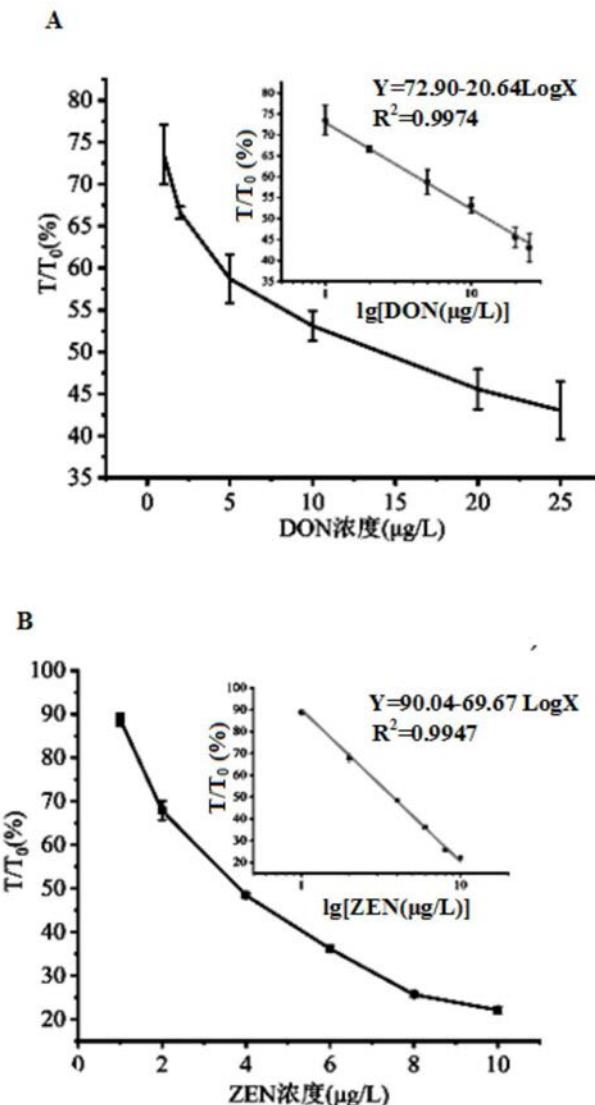


图5

专利名称(译)	一种玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫定量试纸条		
公开(公告)号	CN110488016A	公开(公告)日	2019-11-22
申请号	CN201910748957.7	申请日	2019-08-14
[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 王海鸣 刘莹 纪剑 张银志 孙嘉笛 皮付伟		
发明人	孙秀兰 李淼 王海鸣 刘莹 纪剑 张银志 孙嘉笛 皮付伟		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/582		
代理人(译)	林娟		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种玉米赤霉烯酮-呕吐毒素双通道免疫定量试纸条，属于免疫分析快速检测技术领域。本发明通过标记荧光微球制备荧光探针，包括荧光微球-玉米赤霉烯酮单克隆抗体、荧光微球-呕吐毒素单克隆抗体和荧光微球-羊抗兔二抗，将玉米赤霉烯酮人工抗原、荧光微球人工抗原和羊抗鼠二抗分别喷涂于硝酸纤维素膜作为检测线T1线、检测线T2线和质控线C线制得免疫层析试纸条；利用竞争免疫法，通过读取荧光免疫分析仪上检测线的荧光值，对样品中玉米赤霉烯酮和呕吐毒素同时进行定量分析。该方法不但克服了试纸条技术中胶体金不易保存的缺点，而且制备荧光探针的方法简单高效、灵敏度高。

