



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187961 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201811094211.0

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2018.09.19

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 无限极(中国)有限公司

地址 529156 广东省江门市新会区会城镇
七堡工贸城北区三号

申请人 弘正道(中国)中药研究有限公司

(72)发明人 谭丽容 程敏 陈媛 张勇
张凯义 吕茜

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 潘颖 赵青朵

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及食品安全检测技术领域,特别涉及一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该定性定量免疫层析试纸条,在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体;硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,检测线上包被有荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原,质控线上包被有第二抗体。本发明双显色体系对检测样本中的黄曲霉毒素B₁同时实现定性和定量检测,样本结果在检测中得到双体系验证,结果更加可靠,节约检测时间。

1. 一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;

所述玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体;

所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,所述检测线上包被有荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原,所述质控线上包被有第二抗体。

2. 根据权利要求1所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原为偶联有大分子蛋白和荧光微球的黄曲霉毒素B₁。

3. 根据权利要求2所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述大分子蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

4. 根据权利要求2所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球为直径0.01~10 μ m的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的微球。

5. 根据权利要求4所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光物质为有机或无机的荧光物质,或者为多种荧光物质的掺杂物,或者为量子点。

6. 根据权利要求1所述的定性定量免疫层析试纸条,其特征在于,所述胶体金颗粒为直径10~100nm的金颗粒。

7. 如权利要求1至6中任一项所述定性定量免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

将黄曲霉毒素B₁与大分子偶联,得到黄曲霉毒素B₁人工抗原,然后采用荧光微球对黄曲霉毒素B₁人工抗原进行标记,得到荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原;

在硝酸纤维素膜的检测线位置包被荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原,在硝酸纤维素膜的质控线位置包被第二抗体;

采用胶体金颗粒对黄曲霉毒素B₁单克隆抗体进行标记,得到胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体,将胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体附着于玻璃纤维膜上;

在底板上依次搭接粘贴滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸水纸,得到用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的喷涂量为1.5~2.5 μ L/cm。

9. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原的包被浓度为0.2~3.0mg/mL,喷涂量为0.7~0.8 μ L/cm;所述第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL,喷涂量为0.7~0.8 μ L/cm。

10. 一种定性定量检测黄曲霉毒素B₁的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 定性检测

在权利要求1至6中任一项所述定性定量免疫层析试纸条的样品垫上加入检测样本,反应10~12min后,观察试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况:

检测线和质控线都显示红色条带,则检测样本中黄曲霉毒素B₁的含量小于5 μ g/kg,定性判断为阴性;

检测线不显示红色条带,质控线显示红色条带,则检测样本中黄曲霉毒素B₁含量大于等于5 μ g/kg,定性判断为阳性;

(2) 定量检测

检测定性判断为阳性的试纸条的荧光强度,根据标准曲线得到检测样本中黄曲霉毒素 B₁的含量。

一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,特别涉及一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(aflatoxin B₁,称AFB₁)是真菌的次级代谢产物,主要是由黄曲霉、寄生曲霉和特曲霉产生。它易天然存在于花生、棉籽、玉米、小麦和稻谷等农作物中,具有强烈的毒性和致癌性。它是目前化学致癌物中最强的一种致癌诱变剂,其毒性比氰化钾强10倍,其致癌性比二甲基亚硝胺强75倍。1993年,黄曲霉毒素被世界卫生组织的癌症研究机构划定为I类致癌物,其作用的靶器官主要为肝脏。

[0003] 对于谷物及其制品,玉米、玉米面(渣、片)及玉米制品中黄曲霉毒素B₁的限量标准为20μg/kg,稻谷、糙米、大米为10μg/kg,小麦、大麦、其他谷物为5.0μg/kg,小麦粉、麦片、其他去壳谷物为5.0μg/kg;对于豆类及其制品,发酵豆制品中黄曲霉毒素B₁的限量标准为5.0μg/kg;对于坚果及其籽类,花生及其制品中黄曲霉毒素B₁的限量标准为20μg/kg,其他熟制坚果及其籽类为5.0μg/kg;对于油脂及其制品,植物油脂(花生油、玉米油除外)中黄曲霉毒素B₁的限量标准为10μg/kg,花生油、玉米油为5.0μg/kg;对于调味品,酱油、醋、酿造醋(以粮食为主要原料)中黄曲霉毒素B₁的限量标准为5.0μg/kg。

[0004] 目前,现行的食品安全国家标准食品中第一法为同位素稀释液相色谱-串联质谱,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品、婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品中AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂的测定。第二法为高效液相色谱-柱前衍生法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品、婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品中AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂的测定。第三法为高效液相色谱-柱后衍生法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品、婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品中AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂的测定。第四法为酶联免疫吸附筛选法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品、婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品中AFB₁的测定。第五法为薄层色谱法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品中AFB₁的测定。

[0005] 免疫层析技术是出现于80年代初期的一种独特的免疫分析方式,它通常以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,由于抗原抗体结合的免疫反应,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测线),通过酶反应或直接运用可目测的标记物(如胶体金)而得到直观的实验结果(如检测线出现不同颜色的条带);而游离标记物则越过检测线,达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的目测标记载体有胶体金、乳胶、胶体硒等,其中运用最成功的标记物为胶体金。但是,胶体金免疫层析试纸条存在以下缺陷:

[0006] (1)一般试纸条均为通过肉眼观察结果进行定性分析,无法实现精准的定量检测。

[0007] (2)不同的材料基质效应明显,样本背景干扰较大,易产生假阳性结果。

[0008] (3)检测的阳性结果无法保存,通常超过判断时间后,结果不再准确可靠。

[0009] 市场为了满足对样本进行定量检测的需求,各种基于不同标记物的定量检测试纸条也层出不穷,一般目前的定量检测试纸条,都是单一的标记物标记抗体后,通过小型仪器读取显色信号值,再通过绘制标准曲线进行定量检测。目前基于不同元素标记物的荧光免疫层析方法也已经出现,并获得高灵敏度,但是该定量检测方法也存在以下缺陷:

[0010] (1)实际检测中,阴性结果所占比率很高,但该方法所有试纸条均需要用仪器读取,否则不能得到结果,在做大批量样本检测时,耗时较长;

[0011] (2)定量检测中,检测部门仍然需要一个阈值来区分阴性和阳性,所以数据处理量较大。

发明内容

[0012] 有鉴于此,本发明提供了一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该定性定量免疫层析试纸条灵敏度高、检测时间短、操作简便,并能同时实现定性和定量检测检测样本中黄曲霉毒素B₁。

[0013] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0014] 本发明提供了一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条,在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;

[0015] 玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体;

[0016] 硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,检测线上包被有荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原,质控线上包被有第二抗体。

[0017] 在本发明中,荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原为偶联有大分子蛋白和荧光微球的黄曲霉毒素B₁。

[0018] 作为优选,大分子蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0019] 作为优选,荧光微球为直径0.01~10 μ m的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的微球。

[0020] 作为优选,荧光物质为有机或无机的荧光物质,或者为多种荧光物质的掺杂物,或者为量子点。

[0021] 作为优选,胶体金颗粒为直径10~100nm的金颗粒。

[0022] 作为优选,胶体金颗粒是直径为10~100nm的采用柠檬酸三钠还原氯金酸来制备的金颗粒,其表面带有负电荷,可以与蛋白质进行偶联。

[0023] 本发明还提供了该定性定量免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0024] 将黄曲霉毒素B₁与大分子偶联,得到黄曲霉毒素B₁人工抗原,然后采用荧光微球对黄曲霉毒素B₁人工抗原进行标记,得到荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原;

[0025] 在硝酸纤维素膜的检测线位置包被荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原,在硝酸纤维素膜的质控线位置包被第二抗体;

[0026] 采用胶体金颗粒对黄曲霉毒素B₁单克隆抗体进行标记,得到胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体,将胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体附着于玻璃纤维膜上;

[0027] 在底板上依次搭接粘贴滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸水纸,得到用

于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条。

[0028] 作为优选,胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的喷涂量为1.5~2.5μL/cm。

[0029] 优选地,胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的喷涂量为2.0μL/cm。

[0030] 在本发明中,胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的制备方法如下:

[0031] 取胶体金溶液40mL,用0.02M的碳酸钾调节pH为8.0,加入黄曲霉毒素B₁单克隆抗体,使其终浓度达到5~50μg/mL,混匀后,室温搅拌反应1~4h,然后加入10%牛血清白蛋白(BSA),室温反应0.5h~1h,在(2000~5000)×g离心5~15min,沉淀用0.02M pH 8.0的磷酸盐缓冲液复溶,复溶液体积为起始体积的十分之一,于4℃保存。

[0032] 在本发明提供的具体实施例中,胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的制备方法如下:

[0033] 取胶体金溶液40mL,用0.02M的碳酸钾调节pH为8.0,加入200μg的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体,混匀后,室温搅拌反应1h,然后加入10%牛血清白蛋白(BSA),室温反应0.5h,在5000×g离心5~15min,沉淀用0.02M pH 8.0的磷酸盐缓冲液复溶,复溶液体积为起始体积的十分之一,于4℃保存。

[0034] 在本发明中,将胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体附着于玻璃纤维膜上具体为:将上述复溶液喷涂至玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,喷涂量为2~4μL/cm。

[0035] 作为优选,荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原的包被浓度为0.2~3.0mg/mL,喷涂量为0.7~0.8μL/cm;第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL,喷涂量为0.7~0.8μL/cm。

[0036] 优选地,荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原的包被浓度为0.2~3.0mg/mL,喷涂量为0.74μL/cm;第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL,喷涂量为0.74μL/cm。

[0037] 作为优选,荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原的包被浓度为0.2~3.0mg/mL,喷涂量为0.74μL/cm;第二抗体的包被浓度为0.5~5.0mg/mL,喷涂量为0.74μL/cm。

[0038] 在本发明提供的实施例中,荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原的包被浓度为0.5mg/mL,喷涂量为0.74μL/cm;第二抗体的包被浓度为1mg/mL,喷涂量为0.74μL/cm。

[0039] 作为优选,将荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原和第二抗体包被到硝酸纤维素膜上采用喷涂的方式,硝酸纤维素膜上检测线和质控线的喷涂步骤为:

[0040] 用0.01~0.5M pH7.0的磷酸盐缓冲液调节荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原浓度为0.2~3.0mg/mL,将其喷涂于检测线位置,喷涂量为0.7~0.8μL/cm;

[0041] 用0.01~0.5M pH7.0的磷酸盐缓冲液调节第二抗体浓度为0.5~5.0mg/mL,将其喷涂于质控线位置,喷涂量为0.7~0.8μL/cm;

[0042] 将硝酸纤维素膜在37℃条件下烘干处理8~12h。

[0043] 优选地,用0.02M pH7.0的磷酸盐缓冲液调节荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原浓度为0.5mg/mL。

[0044] 优选地,用0.02M pH7.0的磷酸盐缓冲液调节第二抗体浓度为1.0mg/mL。

[0045] 作为优选,检测线和质控线相隔5~7mm。

[0046] 在本发明提供的具体实施例中,检测线和质控线相隔5mm。

[0047] 在本发明中,与玻璃纤维膜搭接的硝酸纤维素膜一端的膜顶边与检测线相隔10~12mm。

- [0048] 优选地,与玻璃纤维膜搭接的硝酸纤维素膜一端的膜顶边与检测线相隔10mm。
- [0049] 在本发明中,与玻璃纤维膜搭接的硝酸纤维素膜一端的膜顶边与质控线相隔15~19mm。
- [0050] 优选地,与玻璃纤维膜搭接的硝酸纤维素膜一端的膜顶边与质控线相隔15mm。
- [0051] 在本发明提供的具体实施例中,第二抗体为羊抗鼠抗体。
- [0052] 本发明还提供了一种定性定量检测黄曲霉毒素B₁的方法,包括如下步骤:
- [0053] (1) 定性检测
- [0054] 在定性定量免疫层析试纸条的样品垫上加入检测样本,反应10~12min后,观察试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况:
- [0055] 检测线和质控线都显示红色条带,则检测样本中黄曲霉毒素B₁的含量小于5μg/kg,定性判断为阴性;
- [0056] 检测线不显示红色条带,质控线显示红色条带,则检测样本中黄曲霉毒素B₁含量大于等于5μg/kg,定性判断为阳性;
- [0057] 如果定性检测结果在判断时检测线出现微弱的淡红色条带,提示样本中可能含有AFB₁,但浓度低于5μg/kg,则可采用定量方法进行检测。
- [0058] (2) 定量检测
- [0059] 定量检测是根据标准曲线得到检测样本中黄曲霉毒素B₁的含量。
- [0060] 在本发明中,检测样本为决明子。
- [0061] 本发明提供了一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该定性定量免疫层析试纸条,在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单克隆抗体;硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,检测线上包被有荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原,质控线上包被有第二抗体。本发明的有益效果是:
- [0062] 1、双显色体系对检测样本中的黄曲霉毒素B₁同时实现定性和定量检测:本方法在一张试纸条上,先通过胶体金显色系统,目测检测线和质控线红色条带的有无来进行定性检测。如果胶体金显示为阳性样本时,再通过荧光微球读取仪对荧光显色系统进行读取,得到阳性样本的准确浓度,实现定量检测。一张试纸条同时实现两种检测功能,样本结果在检测中得到双体系验证,结果更加可靠。
- [0063] 2、在实际应用中,阴性样本的占有比率是最大的,检测大批量样本时,先通过目测排除阴性结果,可以大大节约检测时间,阳性结果又可以进行再次精确定量,实现结果数据化和方便保存。

附图说明

- [0064] 图1是黄曲霉毒素B₁定性定量免疫层析试纸条的结构示意图;其中,滤纸1,样品垫2,玻璃纤维膜(胶体金抗体复合物垫)3,硝酸纤维素膜(NC膜)4,检测线5,质控线6,吸水纸7,PVC底板8;
- [0065] 图2是黄曲霉毒素B₁定性定量免疫层析试纸条的检测原理图,其中,▲示黄曲霉毒素B₁(AFB₁),●示胶体金-AFB₁抗体复合物,○示荧光微球-AFB₁偶联抗原,Y示抗鼠二

抗。

具体实施方式

[0066] 本发明公开了一种用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0067] 本发明提供一种检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条。它包括底板,以及在底板上依次搭接地粘贴的滤纸,样本垫,玻璃纤维垫,硝酸纤维素膜和吸水纸,其中所述的玻璃纤维垫上喷涂有胶体金标记的黄曲霉毒素B₁单抗复合物,所述的硝酸纤维素膜上包被有荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原作为检测线和包被有抗鼠抗体作为质控线。

[0068] 所述荧光微球是直径为0.01~10μm的采用较长荧光半衰期的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的特殊微球,其表面连接有活性基团;所述荧光物质包括有机或无机的荧光物质或多种荧光物质的掺杂物以及量子点。

[0069] 所述的胶体金颗粒是直径为10~100nm的采用柠檬酸三钠还原氯金酸来制备的金颗粒,其表面带有负电荷,可以与蛋白质进行偶联。

[0070] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种制备上述试纸条的方法,它包括如下的步骤:

[0071] (1)硝酸纤维素膜的制备

[0072] ①制备黄曲霉毒素B₁人工抗原;

[0073] 为了制备硝酸纤维素膜,首先将黄曲霉毒素B₁标准品与蛋白大分子通过共价偶联法制备检测区所需的人工抗原,偶联方法为:EDC-NHS脲化法。偶联蛋白可选:牛血清白蛋白和卵清蛋白,偶联好大分子蛋白质后,再通过EDC-NHS脲化法把荧光微球和全抗原进行标记。

[0074] ②检测线和质控线的制备。

[0075] 分别将荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上,制成检测线和质控线。用0.1~0.5M pH7.0的PBS(磷酸盐缓冲溶液)分别调节包被物浓度为0.2~3.0mg/mL,喷膜量为0.74μL/cm,检测线喷涂黄曲霉毒素B₁人工抗原,质控线喷涂抗鼠抗体,两区相隔5mm;37℃烘干过夜处理后,室温干燥的环境下保存备用。

[0076] (2)胶体金抗体复合物垫的制备

[0077] ①胶体金颗粒通过电荷作用和范德华力标记黄曲霉毒素B₁单抗:取胶体金溶液用0.02M的碳酸钾调节pH为8.0,加入5~50μg的黄曲霉毒素B₁单抗,充分混合后,室温搅拌反应1~4h,然后加入1%牛血清白蛋白,室温反应1h,在2000×g离心5~15min,沉淀用0.02M pH 8.0的磷酸盐缓冲液复溶,复溶体积为起始体积的十分之一,于4℃保存待用。

[0078] ②金标抗体复合物用BIODOT Dispensing System喷涂至玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,置于室温干燥的环境下备用。

[0079] (3)试纸条的组装

[0080] 在底板上依次搭接地粘贴下述材料：

[0081] ①滤纸；

[0082] ②样本垫；

[0083] ③喷涂有胶体金-黄曲霉毒素B₁单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫；

[0084] ④荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原作为检测线和抗鼠抗体作为质控线的硝酸纤维素膜；

[0085] ⑤吸水纸。

[0086] 即组装成本发明的免疫层析试纸条。

[0087] (4)检测方法

[0088] 用上述的免疫层析试纸条检测决明子样本中黄曲霉毒素B₁的方法，包括如下的步骤：

[0089] ①称取决明子2g，加入2mL提取液后震荡1min，取上清液检测；

[0090] ②在试纸加样孔中加入110μL决明子提取液样本，反应10min，目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况；

[0091] ③如果检测线和质控线显色红色条带，则样本中黄曲霉毒素B₁的含量小于5μg/kg，定性判断为阴性，反之，如果检测线不显色，只有质控线显色，则样本中黄曲霉毒素B₁含量大于5μg/kg，定性判断为阳性。

[0092] ④根据胶体金红色条带显示的结果，如果样本为阳性时，将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口，检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示，根据仪器中已经录入的标准曲线，即可计算出样本中黄曲霉毒素B₁的含量，实现阳性样本的定量检测（胶体金显色后，在20分钟内读取的荧光数据均有效）。

[0093] 本发明提供的用于检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用中所用试剂或仪器均可由市场购得。

[0094] 下面结合实施例，进一步阐述本发明：

[0095] 实施例1：决明子中检测黄曲霉毒素B₁的定性定量免疫层析试纸条的制备

[0096] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0097] 1. 硝酸纤维素膜的制备：

[0098] (1) 制备荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁ (AFB₁-BSA) 人工抗原：

[0099] 与蛋白质的偶联方法为EDC-NHS脲化法，偶联比为1:10-1:100，偶联后透析纯化，得到AFB₁-BSA。与荧光微球的标记方法为EDC-NHS法，以人工抗原蛋白浓度计算，与荧光微球的偶联比为1:1。标记后超滤离心洗涤3次，得到荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁人工抗原。

[0100] (2) 检测线和质控线的制备：

[0101] 荧光微球标记的AFB₁-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上：用0.02M pH 7.0的PBS（磷酸盐缓冲液）稀释抗原偶联物的浓度为0.5mg/mL，所得的溶液在膜上喷涂作为检测线；稀释抗鼠抗体的浓度为1mg/mL，所得的溶液在膜上喷涂作为质控线，两线的喷膜体积均为0.74μL/cm，检测线与膜顶边间隔10mm，两线中间间隔5mm，37℃烘干12小时，放置于干燥柜中保存备用。

[0102] 2. 胶体金复合物垫的制备：

[0103] 胶体金标记黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的制备：取40mL胶体金（25nm左右大小），用

碳酸钾溶液调节胶体金的pH为8.0,加入200 μ g黄曲霉毒素B₁单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入10%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心15min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.02M pH 8.0的PBS (其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20) 复溶至起始体积的1/10后进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。该半成品与NC膜组装检测样本结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、1、3、9、15、27ppb, R^2 为0.9912,IC₅₀为5.5ng/mL,线性回归方程式为: $y=-827.1232x+917.2319$ 。

[0104] 3. 组装试纸条:

[0105] (1)滤纸和样本垫规格为1 $\times$ 30cm;

[0106] (2)喷涂有胶体金抗体复合物的玻璃纤维,规格为0.8 $\times$ 30cm;

[0107] (3)已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为2.5 $\times$ 30cm;

[0108] (4)吸水纸,规格为1.2 $\times$ 30cm;

[0109] (5)PVC底板,规格为5.5 $\times$ 30cm。

[0110] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成4 $\times$ 55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为6个月。

[0111] 如图1所示,该免疫层析试纸条的构成为:在PVC底板8上,依次搭接地粘贴喷涂有检测线5和质控线6的NC膜4、喷涂有胶体金抗体复合物的金垫3、样本垫1、滤纸2和吸水纸7,粘贴好后通过切条机切成4 $\times$ 55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,即为一张完整的检测试纸条。

[0112] 如图2所示,检测原理如下:

[0113] 样本加入试纸条后,样本如果是阴性(黄曲霉毒素B₁含量小于5 μ g/kg),样本随层析方向层析,结合垫上的胶体金抗体复合物涌到检测线位置,与检测线上的荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物,胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带;部分未与偶联抗原结合的胶体金抗体复合物涌到质控线位置,抗鼠二抗可以和鼠源性单抗发生结合从而质控线也显示红色条带,通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性,则样本中的黄曲霉毒素B₁先与胶体金抗体复合物结合,结合了黄曲霉毒素B₁的胶体金抗体复合物不能再和检测线上的荧光微球标记的黄曲霉毒素B₁偶联抗原结合,则检测线胶体金显色消失,则肉眼判断为阳性。因为胶体金的显色,会对检测线上的荧光微球进行淬灭,所以显色的阴性结果,荧光值较低,而显色为阳性的结果,因无胶体金的淬灭,荧光值较强,利用这个荧光微球荧光值与样本中黄曲霉毒素B₁呈现的正相关性,用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线上的荧光强度,通过数据分析,得出决明子样本中黄曲霉毒素B₁的具体浓度。本检测体系中,胶体金显色体系用来进行定性检测,荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0114] 二、定性并定量检测样本中的黄曲霉毒素B₁

[0115] 1. 将决明子样本粉碎,过18目筛,准确称取1g,用80%浓度的甲醇溶液进行提取,振荡3min,4 $^{\circ}$ C 4000r/min离心10min,取上清用0.01MPBS (pH7.4) 溶液稀释到甲醇终浓度为20%,过0.22 μ m有机滤头,取110 μ L试样滴加于试纸条样本垫上,反应10min;

[0116] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0117] 3.如果检测线和质控线都显示红色条带,则决明子中黄曲霉毒素B₁的含量小于5μg/kg,定性判断为阴性,反之,如果检测线不显色,只有质控线显示红色条带,则样本中黄曲霉毒素B₁含量大于5μg/kg,定性判断为阳性。

[0118] 4.根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中黄曲霉毒素B₁的含量,实现阳性样本的定量检测(胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效)。

[0119] 5.样本验证:实验过程中,以黄曲霉毒素B₁标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,然后将根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线存入仪器中。对5个已知浓度决明子样本进行检测(该已知样本经GC-MS法定量为0、3、5.3、9.8、15ppb),用本方法检测,完全符合确证样本结果,具体数据见表1。

[0120] 表1:本检测方法与仪器确证方法结果对比n=3

[0121]

样本编号	GC-MS 结果 (μg/kg)	本方法定量检测结果 (μg/kg)	本方法定性检测结果
1	0	0	阴性
2	3	2.5	弱阳性
3	5.3	5	阳性
4	9.8	9.3	阳性
5	15	14.1	阳性

[0122] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

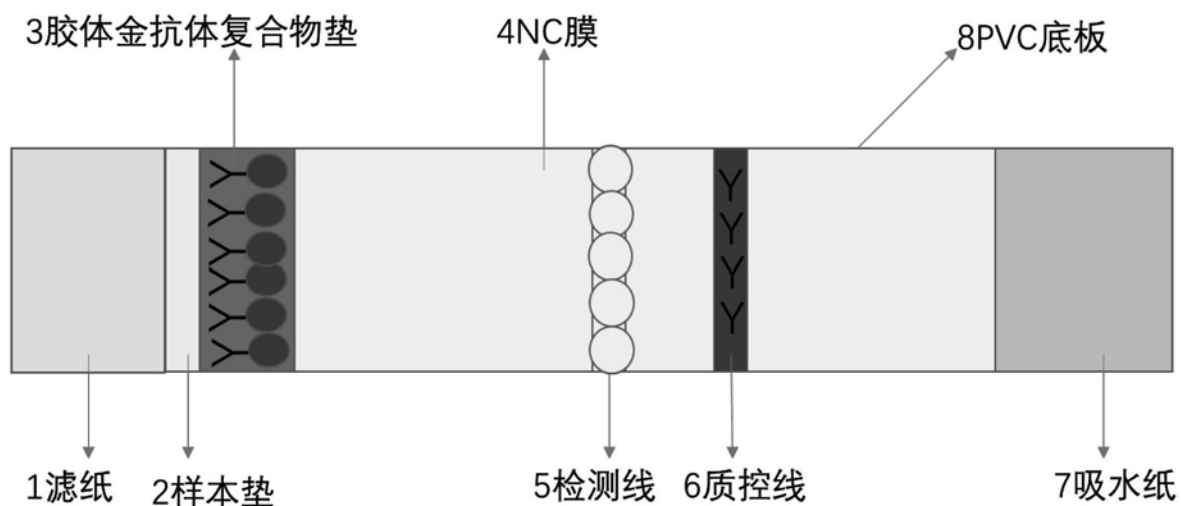


图1

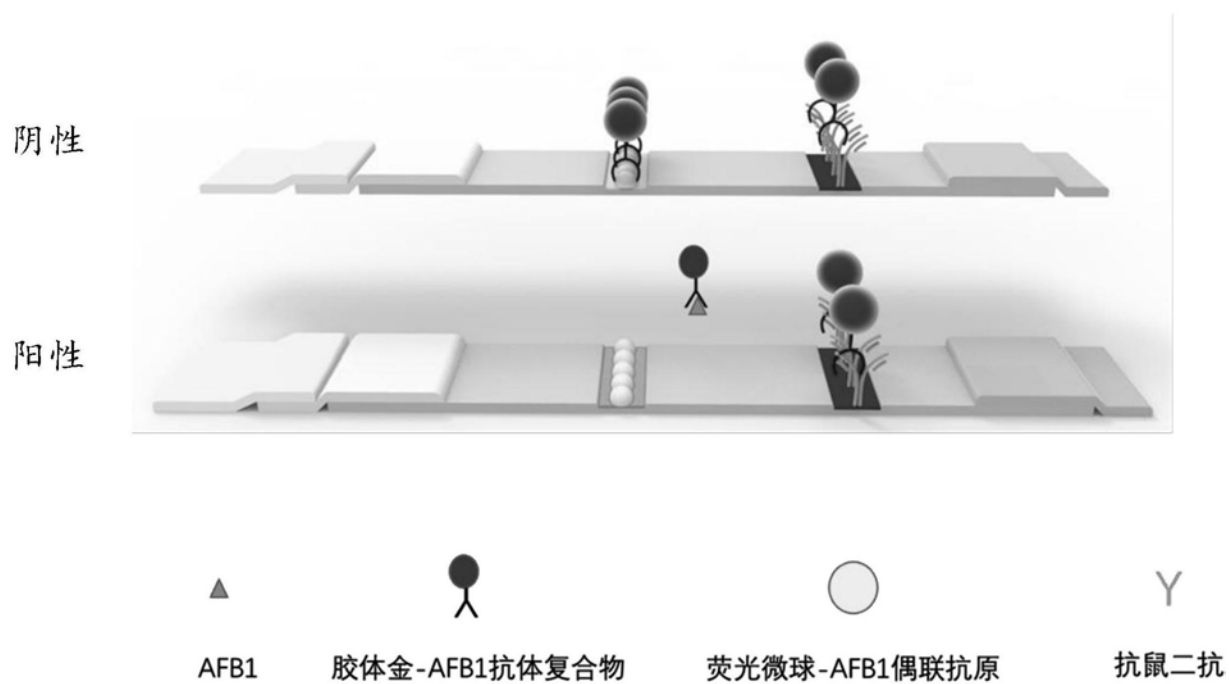


图2

专利名称(译)	一种用于检测黄曲霉毒素B1的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109187961A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201811094211.0	申请日	2018-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	无限极(中国)有限公司		
申请(专利权)人(译)	无限极(中国)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	无限极(中国)有限公司		
[标]发明人	谭丽容 程敏 陈媛 张勇 张凯义 吕茜		
发明人	谭丽容 程敏 陈媛 张勇 张凯义 吕茜		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/558		
代理人(译)	潘颖		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及食品安全检测技术领域，特别涉及一种用于检测黄曲霉毒素B1的定性定量免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该定性定量免疫层析试纸条，在底板上依次搭接设置有滤纸、样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸；玻璃纤维膜上附着有胶体金标记的黄曲霉毒素B1单克隆抗体；硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线，检测线上包被有荧光微球标记的黄曲霉毒素B1人工抗原，质控线上包被有第二抗体。本发明双显色体系对检测样本中的黄曲霉毒素B1同时实现定性和定量检测，样本结果在检测中得到双体系验证，结果更加可靠，节约检测时间。

样本编号	GC-MS 结果 ($\mu\text{g/kg}$)	本方法定量检测结果 ($\mu\text{g/kg}$)	本方法定性检测结果
1	0	0	阴性
2	3	2.5	弱阳性
3	5.3	5	阳性
4	9.8	9.3	阳性
5	15	14.1	阳性