

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101900728 A

(43) 申请公布日 2010.12.01

(21) 申请号 201010245094.0

(22) 申请日 2010.08.05

(71) 申请人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二路
2号

(72) 发明人 李培武 张道宏 张奇 张文

丁小霞 姜俊 陈小媚

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限

公司 42102

代理人 胡建平

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 3 页

(54) 发明名称

半量化检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明属生物检测领域。半量化检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条,包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线、检测线 I、检测线 II 和检测线 III,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线 I、检测线 II 和检测线 III 分别包被有黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA);所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体。该试纸条用于半量化检测黄曲霉毒素 B1,具有检测快速,操作简单,灵敏度高的特点。

1. 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条,其特征在于:包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线、检测线 I、检测线 II 和检测线 III,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线 I、检测线 II 和检测线 III 分别包被有黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条,其特征在于:所述的吸水垫长 16 ~ 18mm,宽 2 ~ 4mm;检测垫长 25 ~ 30mm,宽 2 ~ 4mm;金标垫长 6 ~ 9mm,宽 2 ~ 4mm;样品垫长 12 ~ 18mm,宽 2 ~ 4mm,相邻各垫的交叠长度为 1 ~ 3mm。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫上检测线 I、检测线 II 和检测线 III 距硝酸纤维素膜上沿的距离分别为 11 ~ 17mm、13 ~ 19mm、15 ~ 21mm,且每相邻两条检测线的间距最小为 2mm;所述质控线与检测线 I 的距离为 5 ~ 11mm。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫上每厘米检测线 I、检测线 II 和检测线 III 上所需黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量分别为 120 ~ 600ng,40 ~ 200ng 和 20 ~ 100ng;每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 200 ~ 500ng。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条,其特征在于:所述金标垫中所用的纳米金的粒径为 15 ~ 20nm;所述金标垫上每厘米喷涂长度所需纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的用量为 60 ~ 216ng。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 吸水垫的制备

将吸水纸剪裁即得吸水垫;

(2) 检测垫的制备

检测线的包被:

将市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物配制成 0.1 ~ 0.5mg/mL 的包被液 A;于距硝酸纤维素膜上沿 11 ~ 17mm、13 ~ 19mm、15 ~ 21mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 依次横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线 I、检测线 II 和检测线 III,且每条检测线之间的间距至少为 2mm,每厘米检测线 I、检测线 II 和检测线 III 所需的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 的包被量分别为 120 ~ 600ng,40 ~ 200ng 和 20 ~ 100ng,再于 37 ~ 40°C 条件下干燥 8 ~ 20 分钟;

质控线的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体配制成 0.4 ~ 0.6mg/mL 的包被液 B;于距硝酸纤维素膜上检测线 I 的距离为 5 ~ 11mm,用点喷方式将包被液 B 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 200 ~ 500ng,然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 8 ~ 20 分钟;

(3) 样品垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 37 ~ 40℃ 条件下干燥 10 ~ 16 小时,得样品垫,然后置于干燥器中室温保存;

(4) 金标垫的制备

用点喷方式将纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液横向喷涂于样品垫上,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的量为 60 ~ 216ng,真空冷冻干燥 2 ~ 6h,即得金标垫,然后置于干燥器中室温保存;

(5) 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的组装

在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为 1 ~ 3mm,即得半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条。

7. 根据权利要求 6 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述的包被液 A 为 10 ~ 50mg 市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA),1 ~ 2g 牛血清白蛋白,1 ~ 2g 蔗糖,0.02 ~ 0.05g 叠氮化钠,0.8g 氯化钠,0.29g 十二水磷酸氢二钠,0.02g 氯化钾,0.02g 磷酸二氢钾,加水定容至 100mL 所得;

所述的包被液 B 为 50mg 兔抗鼠多克隆抗体,0.02 ~ 0.05g 叠氮化钠,0.8g 氯化钠,0.29g 十二水磷酸氢二钠,0.02g 氯化钾,0.02g 磷酸二氢钾,加水定容至 100mL 所得。

8. 根据权利要求 6 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述的封闭液 A 为 1 ~ 2g 牛血清白蛋白,0.1 ~ 0.2mL 曲拉通 X-100,0.3g 聚乙烯吡咯烷酮,2 ~ 5g 蔗糖,0.02 ~ 0.05g 叠氮化钠,0.8g 氯化钠,0.29g 十二水磷酸氢二钠,0.02g 氯化钾,0.02g 磷酸二氢钾,加水定容至 100mL 所得。

9. 根据权利要求 6 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述的纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液的制备方法为:量取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 纳米金溶液,调节纳米金溶液的 pH 值为 5.5;在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 的 0.1mg/mL 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入质量浓度为 10% 的牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为 1%,继续搅拌 30min;在 4℃ 条件下放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,吸出上清,弃沉淀;将吸出的上清液 12000r/min 离心 30min,弃上清液,加入 50mL 标记洗涤保存液,再 12000r/min 离心 30min,弃上清液,将得到的沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到 5.0mL 浓缩物,置于 4℃ 保存备用,其中纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.04mg/mL;

所述的标记洗涤保存液为:2.0g 聚乙二醇-20000,0.2g 叠氮化钠,0.1235 克硼酸,加水定容至 1000mL,0.22 μm 滤膜过滤所得。

10. 一种根据权利要求 1 或 2 所述的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的应用,其特征在于:称取已磨细的待测样品,加入体积浓度为 60 ~ 80% 的甲醇水溶液,待测样品和甲醇水溶液的质量体积比为 2g/mL,混匀,在 50 ~ 60℃ 水浴下超声提取 5 ~ 10 分钟,静置 5 ~ 10 分钟,将上层清液即提取液用水稀释 2.5 倍,使稀释液中甲醇的终浓度为 24 ~ 32%,再取 100 μL 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的样品垫,其作为检测试纸条,同时取 100 μL 水做为阴性对照液,逐滴加入另一半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的样品垫,其作为对照试纸条,15 分钟后读取结果;

结果评估:(1) 阳性:待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而若三条检测线中的检测线 I 颜色比对照试纸条稍浅,检测线 II、检测线 III 颜色与对照试纸条基本相同,则样品中的黄曲霉毒素 B1 含量在 0.625 ~ 1.25ng/g 之间;若三条检测线中检测线 I 不显色,检测线 II、检测线 III 颜色与对照试纸条基本相同,则样品中的黄曲霉毒素 B1 含量为 1.25ng/g;若三条检测线中检测线 I 不显色,检测线 II 颜色比对照试纸条浅,检测线 III 颜色与对照试纸条基本相同,则样品中的黄曲霉毒素 B1 含量在 1.25 ~ 2.5ng/g 之间;若试纸条三条检测线的检测线 I、检测线 II 不显色,检测线 III 颜色与对照试纸条基本相同,则样品中的黄曲霉毒素 B1 含量为 2.5ng/g;若三条检测线中检测线 I、II 不显色,检测线 III 颜色比对照试纸条稍浅,则样品中的黄曲霉毒素 B1 含量在 2.5 ~ 10ng/g 之间;若三条检测线均不显色,则样品中的黄曲霉毒素 B1 含量不低于 10ng/g。(2) 阴性:待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,三条检测线的颜色与对照试纸条的相应检测线的颜色均接近,为阴性结果,表明待测样品中的曲霉毒素 B1 含量低于 0.625ng/g。(3) 无效:无论待测样品检测试纸条的检测线显示或不显示出红色线条,只要质控线不显示出红色线条,该试纸条判为无效。

半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属生物检测领域,具体涉及一种半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素主要是由黄曲霉和寄生曲霉分泌产生的次生代谢产物,是一种能引起人畜各种损害的天然有毒化合物。在已经发现的黄曲霉毒素中黄曲霉毒素 B1(aflatoxin B1,简称 AFB1) 是毒性最强的黄曲霉毒素,其毒性、致癌性和污染频率均居生物毒素的首位。

[0003] 黄曲霉毒素污染食品及饲料后,会直接或间接进入人类食品链,威胁人类的健康和生命安全,其危害程度与黄曲霉毒素的摄入量成正比。黄曲霉毒素 B1 广泛存在于大米、玉米、花生、芝麻、大豆、菜籽等农产品和鱼肉等食品中,为此世界各国都规定了食品及饲料中黄曲霉毒素 B1 的最大允许含量并将其作为强制性标准,因此加强对食品及饲料中黄曲霉毒素尤其是黄曲霉毒素 B1 的检测、特别是速测,以便及时了解和掌握食品及饲料的卫生信息,对保障我国食品消费安全具有重要意义。

[0004] 现有技术中常用的黄曲霉毒素 B1 检测技术主要有薄层层析法、精密仪器分析法、免疫学分析法。近年来发展的免疫学分析法克服了前两者的缺点,具有特异性强、灵敏度高、样品前处理简单、成本低、对实验人员和环境的污染危害小、适于现场批量检测等优点。其中基于纳米金的免疫层析快速检测技术具有简便、快速、灵敏、适于现场检测的优点,具有极大的应用价值和前景。但是,传统的黄曲霉毒素 B1 免疫层析检测试纸条仅有一条检测线,只能对样品中的黄曲霉毒素 B1 进行定性检测,且灵敏度较低。所以研究建立针对黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析快速检测试纸条,从而实现对样品中的黄曲霉毒素 B1 高、中、低三个浓度含量的半定量检测,对监控食品和农产品中的黄曲霉毒素 B1 具有重要的意义和很高的应用价值。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条及其制备方法。该半定量检测黄曲霉毒素的多检测线免疫层析试纸条用于半定量检测黄曲霉毒素 B1,具有检测快速,操作简单,灵敏度高的特点。

[0006] 为解决本发明提出的技术问题所采用的技术方案为:

[0007] 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条(见图 1),包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线、检测线 I、检测线 II 和检测线 III,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线 I、检测线 II 和检测线 III 分别包被有黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA);所述金标垫横向

喷涂有纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体。

[0008] 按上述方案,所述的吸水垫长 16-18mm,宽 2-4mm;检测垫长 25-30mm,宽 2-4mm;金标垫长 6-9mm,宽 2-4mm;样品垫长 12-18mm,宽 2-4mm,相邻各垫的交叠长度为 1-3mm。

[0009] 按上述方案,所述的吸水垫为吸水纸。

[0010] 按上述方案,所述检测垫上检测线 I、检测线 II 和检测线 III 距硝酸纤维素膜上沿的距离分别为 11 ~ 17mm、13 ~ 19mm、15 ~ 21mm,且每相邻两条检测线的间距最小为 2mm;所述质控线与检测线 I 的距离为 5 ~ 11mm。

[0011] 按上述方案,所述检测垫上每厘米检测线 I、检测线 II 和检测线 III 上所需黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 的包被量分别为 120 ~ 600ng,40 ~ 200ng 和 20 ~ 100ng;每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 200 ~ 500ng。

[0012] 按上述方案,所述金标垫中所用的纳米金的粒径为 15 ~ 20nm。

[0013] 按上述方案,所述金标垫上每厘米喷涂长度所需纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的用量为 60 ~ 216ng。

[0014] 半量化检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1) 吸水垫的制备

[0016] 将吸水纸剪裁即得吸水垫;

[0017] (2) 检测垫的制备

[0018] 检测线的包被:

[0019] 将市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 配制成 0.1 ~ 0.5mg/mL 的包被液 A;于距硝酸纤维素膜上沿 11 ~ 17mm、13 ~ 19mm、15 ~ 21mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 依次横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线 I、检测线 II 和检测线 III,且每条检测线之间的间距至少为 2mm,每厘米检测线 I、检测线 II 和检测线 III 所需的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 的包被量分别为 120 ~ 600ng,40 ~ 200ng 和 20 ~ 100ng,再于 37 ~ 40°C 条件下干燥 8 ~ 20 分钟;

[0020] 质控线的包被:

[0021] 将兔抗鼠多克隆抗体配制成 0.4 ~ 0.6mg/mL 的包被液 B;于距硝酸纤维素膜上检测线 I 的距离为 5 ~ 11mm,用点喷方式将包被液 B 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 200 ~ 500ng,然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 8 ~ 20 分钟;

[0022] (3) 样品垫的制备

[0023] 将玻璃纤维膜放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 37 ~ 40°C 条件下干燥 10 ~ 16 小时,得样品垫,然后置于干燥器中室温保存;

[0024] (4) 金标垫的制备

[0025] 用点喷方式将纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液横向喷涂于样品垫上,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的量为 60 ~ 216ng,真空冷冻干燥 2 ~ 6h,即得金标垫,然后置于干燥器中室温保存;

[0026] (5) 半量化检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的组装

[0027] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连

接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得半定量检测黄曲霉毒素B1的多检测线免疫层析试纸条(见图1和图2)。

[0028] 按上述方案,所述的包被液A为10~50mg市售黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA),1~2g牛血清白蛋白,1~2g蔗糖,0.02~0.05g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0029] 所述的包被液B为50mg兔抗鼠多克隆抗体,0.02~0.05g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得。

[0030] 按上述方案,所述的封闭液A为1~2g牛血清白蛋白,0.1~0.2mL曲拉通X-100,0.3g聚乙烯吡咯烷酮,2~5g蔗糖,0.02~0.05g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得。

[0031] 按上述方案,所述的纳米金标记的黄曲霉毒素B1单克隆抗体溶液的制备方法为:量取50.0mL市售质量浓度为0.01%纳米金溶液,调节纳米金溶液的pH值为5.5;在搅拌的状态下缓慢加入2mL的0.1mg/mL黄曲霉毒素B1单克隆抗体水溶液,继续搅拌30min;加入质量浓度为10%的牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终质量浓度为1%,继续搅拌30min;在4℃条件下放置2h后,1500r/min离心15min,吸出上清,弃沉淀;将吸出的上清液12000r/min离心30min,弃上清液,加入50mL标记洗涤保存液,再12000r/min离心30min,弃上清液,将得到的沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到5.0mL浓缩物,置于4℃保存备用,其中纳米金标记的黄曲霉毒素B1单克隆抗体溶液的质量浓度为0.04mg/mL;

[0032] 所述的标记洗涤保存液为:2.0g聚乙二醇-20000,0.2g叠氮化钠,0.1235克硼酸,加水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得。

[0033] 如上所述的半定量检测黄曲霉毒素B1多检测线免疫层析试纸条的应用:称取已磨细的待测样品,加入体积浓度为60~80%的甲醇水溶液,待测样品和甲醇水溶液的质量体积比为2g/mL,混匀,在50~60℃水浴下超声提取5~10分钟,静置5~10分钟,将上层清液即提取液用水稀释2.5倍,使稀释液中甲醇的终浓度为24~32%,再取100μL稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入半定量检测黄曲霉毒素B1的多检测线免疫层析试纸条的样品垫,其作为检测试纸条,同时取100μL水做为阴性对照液,逐滴加入另一半定量检测黄曲霉毒素B1的多检测线免疫层析试纸条的样品垫,其作为对照试纸条,15分钟后读取结果。

[0034] 结果评估:(1) 阳性:待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而若三条检测线中的检测线I颜色比对照试纸条稍浅,检测线II、检测线III颜色与对照试纸条基本相同,则样品中的黄曲霉毒素B1含量在0.625~1.25ng/g之间;若三条检测线中检测线I不显色,检测线II、检测线III颜色与对照试纸条基本相同,则样品中的黄曲霉毒素B1含量为1.25ng/g;若三条检测线中检测线I不显色,检测线II颜色比对照试纸条浅,检测线III颜色与对照试纸条基本相同,则样品中的黄曲霉毒素B1含量在1.25~2.5ng/g之间;若试纸条三条检测线的检测线I、检测线II不显色,检测线III颜色与对照试纸条基本相同,则样品中的黄曲霉毒素B1含量为2.5ng/g;若三条检测线中检测线I、II不显色,检测线III颜色比对照试纸条稍浅,则样品中的黄曲霉毒素B1含量在2.5~10ng/g之间;若三条检测线均不显色,则样品中的黄曲霉毒素B1含量不低于10ng/g。(2) 阴性:待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,三条检测线的颜色与对照试纸条的相应检测线的颜色均接

近,为阴性结果,表明待测样品中的曲霉毒素 B1 含量低于 0.625ng/g。(3) 无效:无论待测样品检测试纸条的检测线显示或不显示出红色线条,只要质控线不显示出红色线条,该试纸条判为无效。

[0035] 该试纸条的工作原理为:当样品溶液加入到试纸条下端的样品垫上后,样品溶液通过毛细管作用沿试纸条向吸水垫方向移动,其移动至金标垫时,纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体被溶解。当样品中含有黄曲霉毒素 B1 时,黄曲霉毒素 B1 将和金标垫上的纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着抗原的三条检测线时,抗原将和黄曲霉毒素 B1 竞争结合纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中黄曲霉毒素 B1 含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体将越少,形成的显色带越少、颜色越浅。当抗原所结合的纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体少于一定的数量时,检测线处将不会有红色线条出现。无论样品中是否含有黄曲霉毒素 B1,未被检测线截获的纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体或纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体与黄曲霉毒素 B1 的结合物将继续移动到质控线并与上面的第二抗体结合并被富集显色,所以不管样品中是否含有黄曲霉毒素 B1,质控线都将显色。当样品中不含黄曲霉毒素 B1 即为阴性时,试纸条出现四条红色条带,即质控线和三条检测线均为红色;当样品中含有一定量黄曲霉毒素 B1 即为阳性时,检测后的试纸条上可能观察到以下 6 种情况:(1) 检测线 I 为浅红色,检测线 II、检测线 III 均为红色,质控线为红色;(2) 检测线 I 不显色,检测线 II、检测线 III 均为红色,质控线为红色;(3) 检测线 I 不显色,检测线 II 为浅红色,检测线 III 为红色,质控线为红色;(4) 检测线 I、检测线 II 均不显色,检测线 III 为红色,质控线为红色;(5) 检测线 I、检测线 II 均不显色,检测线 III 为浅红色,质控线为红色;(6) 检测线 I、检测线 II 和检测线 III 均不显色,质控线为红色;而质控线没有色带出现则表明该试纸条失效。

[0036] 本发明的有益效果:

[0037] (1) 半定量检测黄曲霉毒素 B1。本发明提供的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条含有三条检测线,可对黄曲霉毒素 B1 进行高、中、低三个浓度的半定量检测,实际应用价值大。

[0038] (2) 样品前处理方法简单。样品前处理只需要将磨细的待测样品加入甲醇超声提取,静置,然后取上清液稀释后即可进行检测,整个样品前处理过程简单、快速。

[0039] (3) 操作简单。用该半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸进行检测时只需将样品提取液逐滴加到试纸条的样品垫上即可,为一步式操作,不需要专业人员,操作简单、方便。

[0040] (4) 检测过程不需要黄曲霉毒素 B1 标准溶液做为阳性对照。本发明提供的试纸条检测样品时不需要加黄曲霉毒素 B1 标准溶液做为阳性对照,而只需用水做为阴性对照即可,避免了黄曲霉毒素 B1 的二次污染。

[0041] (5) 灵敏度高。本发明提供的半定量多检测线免疫层析试纸条对样品中黄曲霉毒素 B1 的最低检测限为 0.625ng/g,其检测限值低于欧盟对食品中黄曲霉毒素 B1 的最低限量值要求。

附图说明

[0042] 图 1 为本发明提供的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的示意图。图中：1 纸板；2 吸水垫；3 检测垫；4 金标垫；5 样品垫；6 质控线；7 检测线 I；8 检测线 II；9 检测线 III。

[0043] 图 2 为本发明提供的半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的侧视结构示意图。图中：1 纸板；2 吸水垫；3 检测垫；4 金标垫；5 样品垫。

[0044] 图 3 为实施例 1 的结果判定示意图。其中：1 对照试纸条；2 检测试纸条；3 质控线；4 检测线 I；5 检测线 II；6 检测线 III。

[0045] 图 4 为实施例 2 的结果判定示意图。其中：1 对照试纸条；2 检测试纸条；3 质控线；4 检测线 I；5 检测线 II；6 检测线 III。

[0046] 图 5 为实施例 3 的结果判定示意图。其中：1 对照试纸条；2 检测试纸条；3 质控线；4 检测线 I；5 检测线 II；6 检测线 III。

具体实施方式

[0047] 实施例 1-3：半定量检测黄曲霉毒素的高灵敏度免疫层析试纸的制备及应用

[0048] 下述实施例 1-3 中采用市售的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体 A9555，但并不局限于下述实施例中使用的抗体。其他黄曲霉毒素 B1 抗体同样适用，只是其检测灵敏度可能会存在差异。

[0049] 实施例 1：

[0050] 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法，包括以下步骤：

[0051] (1) 吸水垫的制备

[0052] 将吸水纸剪裁成长 16mm 宽 3mm 的规格，得吸水垫；

[0053] (2) 检测垫的制备

[0054] 检测线的包被：

[0055] 将市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 AFB1-BSA 配制成 0.1mg/mL 的包被液 A，于距硝酸纤维素膜上沿 13mm、15mm、17mm 的位置，用点喷方式将包被液 A 依次横向包被于硝酸纤维素膜上，得到检测线 I、检测线 II 和检测线 III，每厘米检测线 I、检测线 II 和检测线 III 上黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 AFB1-BSA 的包被量分别为 120ng、40ng 和 20ng，再于 37℃ 条件下干燥 8 分钟；

[0056] 所述的包被液 A 为 10mg 市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 AFB1-BSA，2g 牛血清白蛋白，2g 蔗糖，0.02g 叠氮化钠，0.8g 氯化钠，0.29g 十二水磷酸氢二钠，0.02g 氯化钾，磷酸二氢钾 0.02g，加水定容至 100mL 所得。

[0057] 质控线的包被：

[0058] 将兔抗鼠多克隆抗体配制成 0.4mg/mL 的包被液 B，于距检测线 I 的距离为 5mm 的位置，用点喷方式将包被液 B 横向包被于硝酸纤维素膜上，得质控线，每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 200ng，然后于 37℃ 条件下干燥 8 分钟；

[0059] 所述的包被液 B 为 50mg 兔抗鼠多克隆抗体，0.02g 叠氮化钠，0.8g 氯化钠，0.29g 十二水磷酸氢二钠，0.02g 氯化钾，磷酸二氢钾 0.02g，加水定容至 100mL 所得。

[0060] 所述的硝酸纤维素膜长 25mm，宽 3mm。

[0061] (3) 样品垫的制备

[0062] 将玻璃纤维膜剪裁成长 15mm 宽 3mm 的规格,放入封闭液 A 中浸湿,于 37℃条件下干燥 10 小时,得样品垫,然后置于干燥器中室温保存;

[0063] 所述的封闭液 A 为 2g 牛血清白蛋白,0.1mL 曲拉通 X-100,0.3g 聚乙烯吡咯烷酮,2.5g 蔗糖,0.02g 叠氮化钠,0.8g 氯化钠,0.29g 十二水磷酸氢二钠,0.02g 氯化钾,磷酸二氢钾 0.02g,加水定容至 100mL 所得。

[0064] (4) 金标垫的制备

[0065] 将样品垫剪裁成长 8mm 宽 3mm 的规格,用点喷方式将纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液横向喷涂于该样品垫上,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的量为 192ng,真空冷冻干燥 6h 即得金标垫,然后置于干燥器中室温保存;

[0066] 所述质量浓度为 0.04mg/mL 的纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液的制备方法为:量取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,用 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节纳米金溶液的 pH 值为 5.5;在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 的 0.1mg/mL 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入 10% 牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终浓度为 1%,继续搅拌 30min;在 4℃ 条件下放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,吸出上清,弃沉淀;将吸出的上清液 12000r/min 离心 30min,弃上清液,加入 50mL 标记洗涤保存液,再 12000r/min 离心 30min,弃上清液,将得到的沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到 5.0mL 浓缩物,置于 4℃ 保存备用,其中纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.04mg/mL;

[0067] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 15nm;

[0068] 所述的 0.1mol/L 碳酸钾溶液为:13.8g 碳酸钾溶于纯水定容至 1000mL,0.22 μm 滤膜过滤所得;所述的 0.1mg/mL 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体水溶液为:1mg 市售黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体加水定容至 10mL 所得;所述的 10% 牛血清白蛋白水溶液为:10g 牛血清白蛋白加水定容至 100mL,0.22 μm 滤膜过滤所得;所述的标记洗涤保存液为:2.0g 聚乙二醇-20000,0.2g 叠氮化钠,0.1235g 硼酸,加水定容至 1000mL,0.22 μm 滤膜过滤所得。

[0069] (5) 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的组装

[0070] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为 1mm,即得黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条(见图 1 和图 2)。

[0071] 上述制备得到的半定量检测黄曲霉毒素 B1 多检测线免疫层析快速检测试纸条的应用,方法如下:称取已磨细的 1# 至 6# 的待测样品,分别加入体积浓度为 60~80% 的甲醇水溶液,待测样品和甲醇水溶液的质量体积比为 2g/mL,混匀,在 50℃ 水浴下超声提取 8 分钟,静置 10 分钟,将提取液即上层清液用水稀释 2.5 倍,使稀释液中甲醇的终浓度为 32%,再取 100 μL 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条(作检测试纸条)的样品垫,同时取 100 μL 水做为阴性对照液,逐滴加入另一半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条(作对照试纸条)的样品垫,15 分钟后读取结果。

[0072] 结果评估:1# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而试纸条三条检测线中的检测线 I 颜色比对照试纸条稍浅,检测线 II、检测线 III 颜色与对照试纸条基本相

同,则为阳性结果,表明样品中的黄曲霉毒素 B1 含量在 0.625 ~ 1.25ng/g 之间,见图 3-1;

[0073] 2# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而试纸条三条检测线中检测线 I 不显色,检测线 II、III 颜色与对照试纸条基本相同,则为阳性结果,表明样品中的黄曲霉毒素 B1 含量为 1.25ng/g,见图 3-2;

[0074] 3# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而试纸条三条检测线中检测线 I 不显色,检测线 II 颜色比对照试纸条浅,检测线 III 颜色与对照试纸条基本相同,则为阳性结果,表明样品中的黄曲霉毒素 B1 含量在 1.25 ~ 2.5ng/g 之间,见图 3-3;

[0075] 4# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而试纸条三条检测线的检测线 I、检测线 II 不显色,检测线 III 颜色与对照试纸条基本相同,则为阳性结果,表明样品中的黄曲霉毒素 B1 含量为 2.5ng/g,见图 3-4;

[0076] 5# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而试纸条三条检测线中检测线 I、II 不显色,检测线 III 颜色比对照试纸条稍浅,则为阳性结果,表明样品中的黄曲霉毒素 B1 含量在 2.5 ~ 10ng/g 之间,见图 3-5;

[0077] 6# 待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,而试纸条三条检测线均不显色,则为阳性结果,表明样品中的黄曲霉毒素 B1 含量不低于 10ng/g,见图 3-6。

[0078] 实施例 2:

[0079] 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0080] (1) 吸水垫的制备

[0081] 将吸水纸剪裁成长 17mm 宽 2mm 的规格,得吸水垫;

[0082] (2) 检测垫的制备

[0083] 检测线的包被:

[0084] 将市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 AFB1-BSA 配制成 0.25mg/mL 的包被液 A,于距硝酸纤维素膜上沿 15mm、17mm、19mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 依次横向包被于硝酸纤维素膜上,即得检测线 I、检测线 II 和检测线 III,每厘米检测线 I、检测线 II 和检测线 III 所需黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量分别为 300ng、100ng 和 50ng,再于 38°C 条件下干燥 10 分钟;

[0085] 所述的包被液 A 为 25mg 市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 AFB1-BSA,1g 牛血清白蛋白,2g 蔗糖,0.03g 叠氮化钠,0.8g 氯化钠,0.29g 十二水磷酸氢二钠,0.02g 氯化钾,磷酸二氢钾 0.02g,加水定容至 100mL 所得;

[0086] 质控线的包被:

[0087] 将兔抗鼠多克隆抗体配制成 0.5mg/mL 的包被液 B,于距检测线 I 的距离为 7mm 的位置,用点喷方式将包被液 B 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线,每厘米质控线所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 300ng,,然后于 38°C 条件下干燥 15 分钟;

[0088] 所述的包被液 B 为 50mg 兔抗鼠多克隆抗体,0.03g 叠氮化钠,0.8g 氯化钠,0.29g 十二水磷酸氢二钠,0.02g 氯化钾,磷酸二氢钾 0.02g,加水定容至 100mL 所得;

[0089] 硝酸纤维素膜长 28mm,宽 2mm。

[0090] (3) 样品垫的制备

[0091] 将玻璃纤维膜剪裁成长 16mm 宽 2mm 的规格,放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 38°C 条

件下干燥 12 小时,得样品垫,然后置于干燥器中室温保存;

[0092] 所述的封闭液 A 为 1 ~ 2g 牛血清白蛋白,0.1 ~ 0.2mL 曲拉通 X-100,0.3g 聚乙烯吡咯烷酮,2 ~ 5g 蔗糖,0.02 ~ 0.05g 叠氮化钠,0.8g 氯化钠,0.29g 十二水磷酸氢二钠,0.02g 氯化钾,磷酸二氢钾 0.02g,加水定容至 100mL 所得;

[0093] (4) 金标垫的制备

[0094] 将样品垫剪裁成长 6mm 宽 2mm 的规格,用点喷方式将纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液横向喷涂于样品垫上,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的量为 120ng,真空冷冻干燥 5h,即得金标垫,然后置于干燥器中室温保存;

[0095] 所述的纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液的制备方法为:量取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,用 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节纳米金溶液的 pH 值为 5.5;在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 的 0.1mg/mL 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入 10% 牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终浓度为 1%,继续搅拌 30min;在 4℃ 条件下放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,吸出上清,弃沉淀;将吸出的上清液 12000r/min 离心 30min,弃上清液,加入 50mL 标记洗涤保存液,再 12000r/min 离心 30min,弃上清液,将得到的沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到 5.0mL 浓缩物,置于 4℃ 保存备用,其中纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液;

[0096] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 18nm;

[0097] 所述的 0.1mol/L 碳酸钾水溶液为:13.8g 碳酸钾溶于纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得;所述的 0.1mg/mL 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体水溶液为:1mg 市售黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体加水定容至 10mL 所得;所述的 10% 牛血清白蛋白水溶液为:10g 牛血清白蛋白加水定容至 100mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得;所述的标记洗涤保存液为:2.0g 聚乙二醇-20000,0.2g 叠氮化钠,0.1235 克硼酸,加水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得。

[0098] (5) 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的组装

[0099] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为 2mm,即得半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条(见图 1 和图 2)。

[0100] 半定量检测黄曲霉毒素 B1 多检测线免疫层析快速检测试纸条的应用,方法如下:称取已磨细待测样品,加入体积浓度为 60 ~ 80% 的甲醇水溶液,待测样品和甲醇水溶液的质量体积比为 2g/mL,混匀,在 50℃ 水浴下超声提取 5 分钟,静置 5 分钟,将上层清液即提取液用水稀释 2.5 倍,使稀释液中甲醇的终浓度为 28%,再取 100 μ L 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条(作检测试纸条)的样品垫,同时取 100 μ L 水做为阴性对照液,逐滴加入另一半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条(作对照试纸条)的样品垫,15 分钟后读取结果。

[0101] 结果评估:待测样品检测试纸条的质控线显示出红色线条,三条检测线的颜色与对照试纸条的相应检测线的颜色均接近,据此判定此为阴性结果,见图 4,这表明待测样品中的曲霉毒素 B1 含量低于 0.625ng/g。

[0102] 实施例 3:

[0103] 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0104] (1) 吸水垫的制备

[0105] 将吸水纸剪裁成长 18mm, 宽 4mm 的规格, 得吸水垫;

[0106] (2) 检测垫的制备

[0107] 检测线的包被:

[0108] 将黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 AFB1-BSA 配制成 0.5mg/mL 的包被液 A, 于距硝酸纤维素膜上沿 17mm、19mm、21mm 的位置, 用点喷方式将包被液 A 依次横向包被得到检测线 I、检测线 II 和检测线 III, 每厘米检测线 I、检测线 II 和检测线 III 所需的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量分别为 600ng、200ng 和 100ng, 再于 39°C 条件下干燥 10 分钟;

[0109] 所述的包被液 A 为 50mg 市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 AFB1-BSA, 1.5g 牛血清白蛋白, 1.5g 蔗糖, 0.02g 叠氮化钠, 0.8g 氯化钠, 0.29g 十二水磷酸氢二钠, 0.02g 氯化钾, 磷酸二氢钾 0.02g, 加水定容至 100mL 所得;

[0110] 质控线的包被:

[0111] 将兔抗鼠多克隆抗体配制成 0.6mg/mL 的包被液 B, 于距检测线 I 的距离为 9mm 的位置, 用点喷方式将包被液 B 横向包被于硝酸纤维素膜上, 得到质控线, 每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 500ng, 然后于 39°C 条件下干燥 10 分钟;

[0112] 所述的包被液 B 为 50mg 兔抗鼠多克隆抗体, 0.02g 叠氮化钠, 0.8g 氯化钠, 0.29g 十二水磷酸氢二钠, 0.02g 氯化钾, 磷酸二氢钾 0.02g, 加水定容至 100mL 所得;

[0113] 所述的硝酸纤维素膜长 30mm, 宽 4mm

[0114] (3) 样品垫的制备

[0115] 将玻璃纤维膜剪裁成长 17mm, 宽 4mm 的规格, 放入封闭液 A 中浸湿, 于 39°C 条件下干燥 10 小时, 得样品垫, 然后置于干燥器中室温保存;

[0116] 所述的封闭液 A 为 1.5g 牛血清白蛋白, 0.15mL 曲拉通 X-100, 0.3g 聚乙烯吡咯烷酮, 4g 蔗糖, 0.02g 叠氮化钠, 0.8g 氯化钠, 0.29g 十二水磷酸氢二钠, 0.02g 氯化钾, 磷酸二氢钾 0.02g, 加水定容至 100mL 所得;

[0117] (4) 金标垫的制备

[0118] 将样品垫剪裁成长 6mm, 宽 4mm 的规格, 用点喷方式将纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液横向喷于该样品垫上, 每厘米喷涂长度所需纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的量为 72ng, 真空冷冻干燥 2h, 即得金标垫, 然后置于干燥器中室温保存;

[0119] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 20nm;

[0120] 所述的纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液的制备方法为: 量取 50.0mL 市售 0.01% 纳米金溶液, 用 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节纳米金溶液的 pH 值为 5.5; 在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 的 0.1mg/mL 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体水溶液, 继续搅拌 30min; 加入 10% 牛血清白蛋白水溶液至牛血清白蛋白的终浓度为 1%, 继续搅拌 30min; 在 4°C 条件下放置 2h 后, 1500r/min 离心 15min, 吸出上清, 弃沉淀; 将吸出的上清液 12,000r/min 离心 30min, 弃上清液, 加入 50mL 标记洗涤保存液, 再 12,000r/min 离心 30min, 弃上清液, 将得到的沉淀用标记洗涤保存液重悬, 得到 5.0mL 浓缩物, 置于 4°C 保存备用, 其中纳米金标记的黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体溶液;

[0121] 所述的 0.1mol/L 碳酸钾水溶液为: 13.8g 碳酸钾溶于纯水定容至 1000mL, 0.22 μm

滤膜过滤所得；所述的 0.1mg/mL 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体水溶液为：1mg 市售黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体加水定容至 10mL 所得；所述的 10% 牛血清白蛋白水溶液为：10g 牛血清白蛋白加水定容至 100mL，0.22 μm 滤膜过滤所得；所述的标记洗涤保存液为：2.0g 聚乙二醇-20000，0.2g 叠氮化钠，0.1235g 硼酸，加水定容至 1000mL，0.22 μm 滤膜过滤所得；

[0122] (5) 半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条的组装

[0123] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，交叠长度为 2mm，即得半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条（见图 2）。

[0124] 半定量检测黄曲霉毒素 B1 多检测线免疫层析快速检测试纸条的应用，方法如下：称取已磨细 1# 和 2# 待测样品，分别加入体积浓度为 60 ~ 80% 的甲醇水溶液，待测样品和甲醇水溶液的质量体积比为 2g/mL，混匀，在 60℃ 水浴下超声提取 8 分钟，静置 8 分钟，将提取液即上层清液用水稀释 2.5 倍，使稀释液中甲醇的终浓度为 24%，再取 100 μL 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条（作检测试纸条）的样品垫，同时取 100 μL 水做为阴性对照液，逐滴加入另一半定量检测黄曲霉毒素 B1 的多检测线免疫层析试纸条（作对照试纸条）的样品垫，15 分钟后读取结果。

[0125] 结果评估：1# 待测样品检测试纸条的检测线显示红色线条，而质控线不显示红色线条，则据此判定该检测试纸条的结果无效，见图 5-1；2# 待测样品检测试纸条的检测线不显示红色线条，而质控线亦不显示红色线条，则据此判定该检测试纸条的结果无效，见图 5-2。

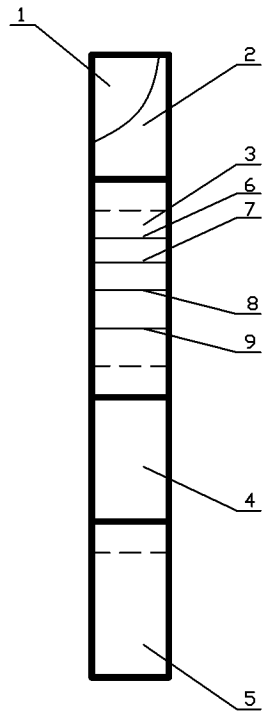


图 1

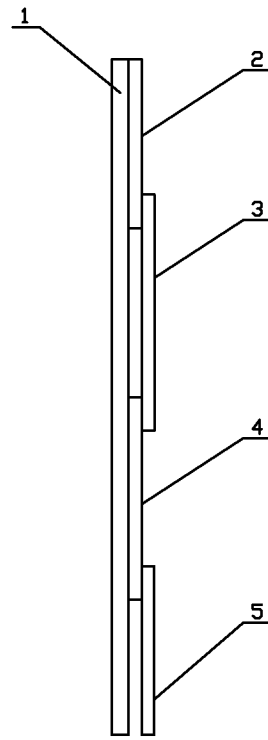
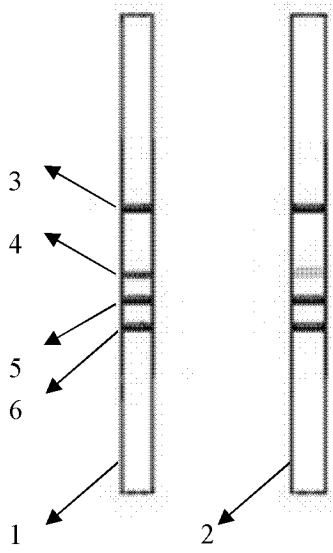
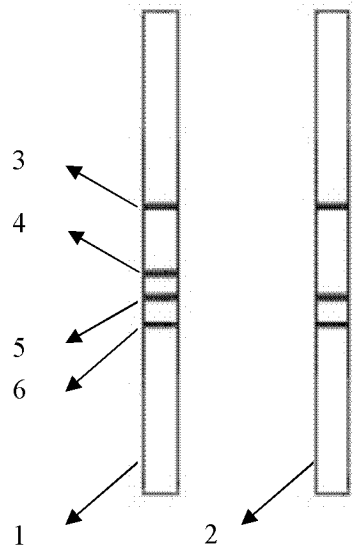


图 2



3-1



3-2

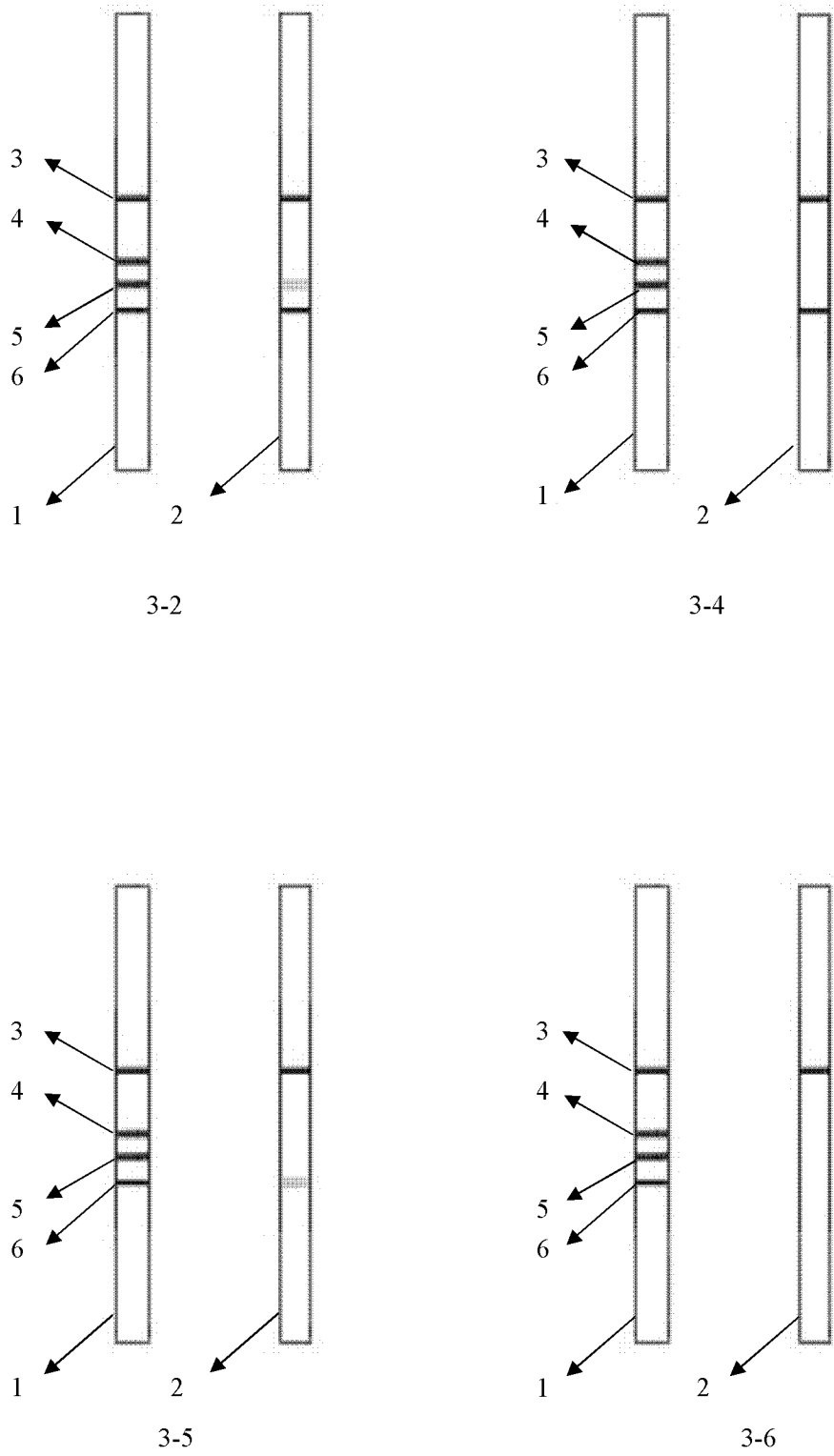


图 3

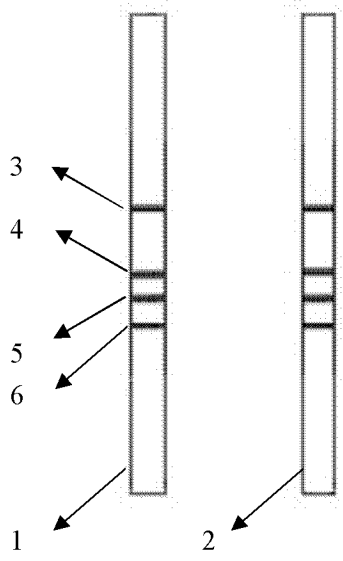


图 4

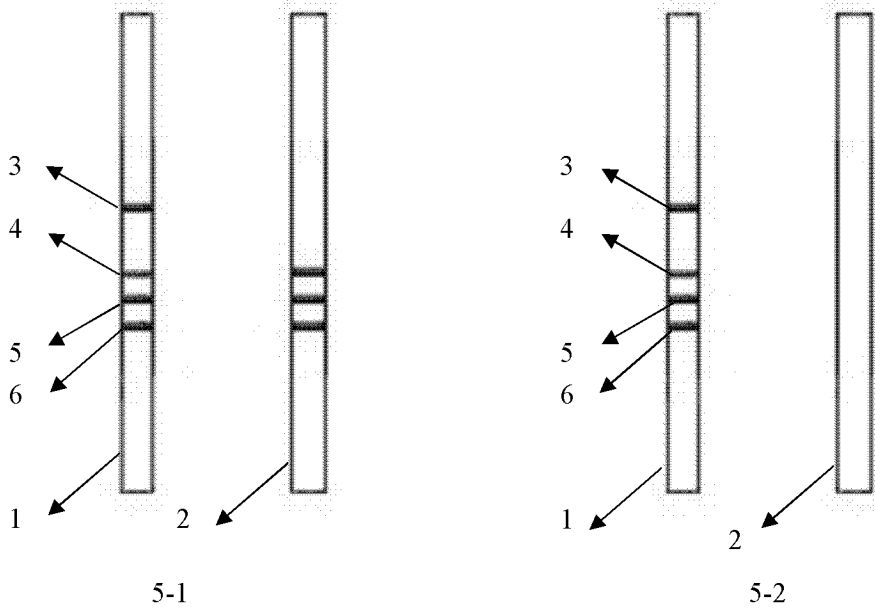


图 5

专利名称(译)	半量化检测黄曲霉毒素B1的多检测线免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101900728A	公开(公告)日	2010-12-01
申请号	CN201010245094.0	申请日	2010-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	李培武 张道宏 张奇 张文 丁小霞 姜俊 陈小媚		
发明人	李培武 张道宏 张奇 张文 丁小霞 姜俊 陈小媚		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/56961 G01N2333/38		
代理人(译)	胡建平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物检测领域。半量化检测黄曲霉毒素B1的多检测线免疫层析试纸条，包括纸板，纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫、样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫，硝酸纤维素膜上自上而下设置横向质控线、检测线I、检测线II和检测线III，所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体，所述检测线I、检测线II和检测线III分别包被有黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)；所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的黄曲霉毒素B1单克隆抗体。该试纸条用于半量化检测黄曲霉毒素B1，具有检测快速，操作简单，灵敏度高的特点。