



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106093381 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(21)申请号 201610539564.1

(22)申请日 2016.07.08

(71)申请人 北京农业质量标准与检测技术研究中心

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号北京市农林科学院质标中心

(72)发明人 满燕 梁刚 潘立刚 付海龙

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

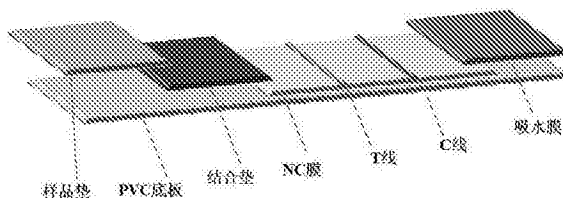
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

链格孢毒素链格孢酚单甲醚胶体金免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明涉及食品安全监测领域,具体公开了一种检测链格孢毒素链格孢酚单甲醚(AME)的免疫层析试纸条,包括样品垫、胶体金结合垫、NC膜、吸水垫和PVC底板,胶体金结合垫上包被有胶体金-AME单抗复合物,NC膜上设置了检测线和质控线,检测线上固定有浓度为1mg/mL的AME-OVA偶联抗原,质控线上固定有浓度为1mg/mL的羊抗鼠二抗。本发明为采用一步间接竞争免疫层析试纸条技术快速定性或半定量检测果蔬样本中链格孢毒素AME含量的胶体金试纸条,检测灵敏度达到10ng/mL,并且检测专一性强,操作简单,经济实用,适合于现场检测,可广泛应用于果蔬大批量样本中AME的分析检测及快速筛查。



1. 检测链格孢毒素链格孢酚单甲醚(AME)的免疫层析试纸条,包括样品垫、胶体金结合垫、NC膜、吸水垫和PVC底板,其特征在于,胶体金结合垫上包被有胶体金-AME单抗复合物。

2. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,NC膜上设置了检测线和质控线;所述检测线上固定有AME-OVA偶联抗原,浓度为1mg/mL。

3. 根据权利要求2所述胶体金试纸条,其特征在于,所述质控线上固定有羊抗鼠二抗,浓度为1mg/mL。

4. 根据权利要求1~3任一项所述胶体金试纸条,其特征在于,所述胶体金-AME单抗复合物的制备方法如下:用还原剂将氯金酸还原成胶体金纳米颗粒;将胶体金与AME单克隆抗体混合孵育30min,加入10%的BSA溶液使其终浓度为1%,反应20min后,加入10%的PEG20000并使其终浓度为0.2%,继续反应20min;离心纯化、浓缩产生胶体金-AME单抗复合物。

5. 根据权利要求4所述胶体金试纸条,其特征在于,所述AME单克隆抗体的制备方法如下:

(1)AME羧基化衍生物半抗原制备:将AME,溴丁酸甲酯和碳酸钾溶于甲酰胺溶液,50℃磁力搅拌反应2h;待反应混合物冷却后,加水稀释,随后用酒精进行萃取得到沉淀中间产物;将沉淀溶于甲醇和四氢呋喃混合液,随后加入到含有氢氧化锂的水溶液中,室温条件下反应5h,得到羧基化修饰的AME半抗原;

(2)AME-BSA抗原制备:将AME半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中;加入二环己基碳二亚胺搅拌;加入N-羟基琥珀酰亚胺,室温避光磁力搅拌;离心,除去沉淀物N,N'-二环己基脲;将上清液逐滴加到由磷酸缓冲液配制的BSA溶液中,室温避光搅拌;用0.1mol/L的PBS溶液透析3d,每天换液3次,即得AME-BSA抗原;

(3)抗体筛选与纯化。

6. 根据权利要求4所述的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述AME单克隆抗体与胶体金的最佳结合量为7.2μg/mL。

7. 根据权利要求4所述的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述AME单克隆抗体与胶体金的最佳结合pH值为8.0。

8. 根据权利要求6或7所述胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述胶体金的纳米颗粒大小为13~40nm。

9. 根据权利要求8所述胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述胶体金的纳米颗粒大小为18nm。

10. 根据权利要求1~3或5~7任一项所述的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述试纸条的宽度为4~5mm。

链格孢毒素链格孢酚单甲醚胶体金免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域中涉及免疫胶体金试纸条和真菌毒素残留检测的领域。具体而言,本发明涉及一种适用于检测果蔬中链格孢毒素——链格孢酚单甲醚(AME)残留的胶体金免疫层析试纸条。

背景技术

[0002] 链格孢霉菌属于丝状真菌,是一种普遍存在于水果、蔬菜等食品中的病原体和腐生菌,它可以在低温潮湿的环境下生长繁殖,因此是导致冷藏或长途运输过程中水果、蔬菜等食品腐烂变质的主要微生物。链格孢酚单甲醚(AME)是链格孢霉菌的主要次生代谢产物之一,由于它具有诱变性、基因毒性、致癌性,能够诱导单链DNA和双链DNA的断裂,并且还鉴定为拓朴异构酶I和II强有力的抑制剂,摄取链格孢毒素侵染的食品会对人体健康造成严重危害。因此,AME成为目前国内外科学家研究较多的主要的链格孢毒素之一。

[0003] 但到目前为止,国内外现行的食品中真菌毒素的限量标准尚不包括链格孢毒素,然而近年来,欧盟已经就食品与饲料中链格孢毒素对人畜的健康风险发布了科学意见,并且在国际贸易中,商家委托第三方检测链格孢毒素的现象已经十分普遍,其检测主要采用实验室中的气相色谱(GC)、气质联用(GC-MS)、液相色谱(LC)、液质联用(LC-MS)等传统检测方法。然而,这些传统的检测方法通常需要大型、昂贵的仪器设备以及专业的技术人员,并且检测只能在实验室中进行,检测时间长,费时费力,不能满足当前食品安全领域所追求的实时、快速、便携式检测的需求。

[0004] 针对链格孢毒素AME传统检测方法的不足,我们设计了一种可用于检测水果、蔬菜等食品中链格孢毒素AME的胶体金免疫层析试纸方法,该方法具有快速、操作简单、高特异性、高灵敏性、检测成本低、不需要检测仪器,并且特别适用于现场大量样本的实时、快速抽样检测,能够更好地辅助我国食品企业及政府职能监管部门等开展相关的检测工作。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的在于提供一种采用一步法间接竞争免疫层析试纸条技术快速检测果蔬样本中链格孢毒素AME残留的胶体金试纸条,链格孢毒素AME的检测灵敏度可达10ng/mL。

[0006] 为了实现本发明的发明目的,本发明提供了一种检测链格孢毒素链格孢酚单甲醚(AME)的免疫层析试纸条,包括样品垫、胶体金结合垫、NC膜、吸水垫和PVC底板,所述NC膜粘附在PVC底板上,胶体金结合垫和吸水垫分别粘附在NC膜的两端,样品垫粘附在胶体金结合垫的另一端;胶体金结合垫上包被有胶体金-AME单抗复合物。

[0007] 进一步地,所述胶体金-AME单抗复合物的制备方法如下:用还原剂将氯金酸还原成胶体金纳米颗粒;将胶体金与AME单克隆抗体混合孵育30min,加入10%的BSA溶液使其终浓度为1%,反应20min后,加入10%的PEG20000并使其终浓度为0.2%,继续反应20min;离心纯化、浓缩产生胶体金-AME单抗复合物。所述还原剂优选柠檬酸三钠。

[0008] 更进一步地,所述AME单克隆抗体的制备方法如下:

[0009] (1)AME羧基化衍生物半抗原制备:将10mg的AME,14.5mg溴丁酸甲酯和30.2mg的碳酸钾溶于1mL的甲酰胺(DMF)溶液,50℃磁力搅拌反应2h;待反应混合物冷却后,加入2mL水稀释,随后用酒精进行萃取得到沉淀中间产物(15mg);将沉淀溶于0.5mL甲醇和0.5mL四氢呋喃(THF)混合液,随后加入到含有1.8mg氢氧化锂的水溶液(0.1mL)中,室温条件下反应5h,得到羧基化修饰的AME半抗原(40mg);

[0010] (2)AME-BSA抗原制备:将15.8mg AME半抗原溶于1.5mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中;加入13.7mg二环己基碳二亚胺(DCC),搅拌30min;加入7.6mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温避光磁力搅拌3.5h;离心,除去沉淀物N,N'-二环己基脲;将上清液逐滴加到由磷酸缓冲液(0.1M,pH 7.4)配制的BSA溶液中,室温避光搅拌2h;用0.1mol/L的PBS溶液透析3d,每天换液3次,即得AME-BSA抗原;分装后,保存于-20℃冰箱中备用;

[0011] (3)抗体筛选与纯化:

[0012] (a)动物免疫:利用AME-BSA抗原对8-10周龄的Balb/c小鼠进行四次间隔免疫,在第四次免疫之后进行一次加强免疫,以激活体内的淋巴细胞,产生AME高亲和性单克隆抗体;(b)细胞融合及克隆:将产生AME高亲和性单克隆抗体的Balb/c小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞SP2/0按照8:1的比例进行细胞融合,并利用间接竞争ELISA方法测定细胞上清液,筛选阳性孔;利用有限稀释法将得到的阳性细胞在检测后的2天内进行亚克隆,得到能够稳定分泌AME单克隆抗体的杂交瘤细胞;(c)单克隆抗体的腹水制备及纯化:利用液体石蜡致敏Balb/c小鼠,并将步骤(2)得到的杂交瘤细胞株用1640培养基进行清洗,并注射于小鼠腹腔;将采集到的腹水,用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化。

[0013] 作为优选,所述胶体金的纳米颗粒大小为13~40nm,更优选为18nm。

[0014] 作为优选,所述AME单克隆抗体与胶体金的最佳结合量为7.2μg/mL。

[0015] 作为优选,所述AME单克隆抗体与胶体金的最佳结合pH值为8.0。

[0016] 进一步地,所述NC膜上设置了检测线和质控线;检测线和质控线的间距为5mm。其中所述NC膜优选Millipore135膜。

[0017] 其中,所述检测线上固定有AME-OVA偶联抗原,浓度为1mg/mL。所述质控线上固定有羊抗鼠二抗,浓度为1mg/mL。

[0018] 所述AME-OVA偶联抗原的偶联方法可采用本领域常规偶联方法。

[0019] 作为优选,本发明提供一个较佳的包被原合成方法,具体过程如下:

[0020] (a)称取前述AME半抗原9.2mg,EDC 7.4mg,加入到2mL DMF溶液中,使之充分溶解,室温磁力搅拌反应20min,称为A液;

[0021] (b)称取卵清白蛋白(OVA)60mg溶解于7mL PBS缓冲液中,称为B液。

[0022] (c)将A液逐滴滴加到B液中,密封避光4℃条件下,磁力搅拌过夜。

[0023] (d)将上述反应液转移至预处理后的透析袋中,4℃层析柜中,用0.05mol/L PBS缓冲液透析3d,其中,前24h每8h换液1次。透析完成后即得OVA-AME包被原。将透析后的产物进行分装,放置于-20℃冰箱中保存备用。

[0024] 需要说明的是,本领域技术人员在上述合成方法的基础上,对各物质用量进行等比例增大或缩小,均在本发明的保护范围之内。

[0025] 所述胶体金结合垫为玻璃纤维素膜,所述胶体金的纳米颗粒大小为13~40nm,优

选18nm。

[0026] 所述样品垫优选为玻璃纤维素膜。

[0027] 所述吸水垫优选为滤纸纤维。

[0028] 进一步地,所述试纸条的宽度为4~5mm。

[0029] 作为优选,所述吸水垫压住NC膜的一端2mm,NC膜的另一端被包被有胶体金-AME抗体复合物的胶体金结合垫压住2mm,样品垫压住胶体金结合垫2mm。

[0030] 进一步地,所述胶体金免疫层析试纸条的具体制备步骤为:

[0031] (1)样品垫预处理:将样品垫放置于预处理缓冲液(0.5g BSA,50 μ L Tween-20溶于50mL的磷酸盐缓冲液)中,并于37 $^{\circ}$ C恒温水浴箱中孵育30min;随后用大量的磷酸盐缓冲液彻底清洗,37 $^{\circ}$ C烘箱中干燥2h,最后4 $^{\circ}$ C干燥条件下保存备用。

[0032] (2)胶体金垫预处理:将胶体金结合垫浸泡在预处理缓冲液(1g BSA,1.5g蔗糖和0.01g叠氮钠溶于50mL 10mM pH 7.4的磷酸盐缓冲液)中,并放置于37 $^{\circ}$ C恒温水浴箱中孵育30min;随后用大量的磷酸盐缓冲液进行彻底清洗,37 $^{\circ}$ C烘箱干燥2h,最后4 $^{\circ}$ C干燥条件下保存备用;

[0033] (3)将前述AME单克隆抗体与18nm的胶体金纳米颗粒孵育形成胶体金-抗体复合物,并将其喷涂于预处理后的胶体金结合垫,其中每1cm胶体金结合垫喷涂0.01mL胶体金-AME抗体偶联复合物溶液;

[0034] (4)检测线T线制备:将AME-OVA包被原(1mg/mL)按照1.0 μ L/cm的包被量固定于NC膜T线预设区域,形成T线;

[0035] (5)质控线C线制备:同样将羊抗鼠二抗(1mg/mL)按照1.0 μ L/cm的包被量固定于NC膜C线预设区域,形成C线;

[0036] (6)试纸条组装:首先,将固定有抗体的NC膜粘贴在PVC底板上;其次,用吸水垫压住NC膜的一端2mm左右,NC膜的另一端被包被有胶体金-AME抗体复合物的胶体金结合垫压住约2mm左右;最后,样品垫压住胶体金结合垫2mm左右。

[0037] 本发明提供了一种利用上述胶体金试纸条检测链格孢毒素AME的方法,其检测是使用一次性吸管吸取70 μ L左右的待检样本溶液滴加于样品吸收垫上,观察检测线和质控线的显色结果。

[0038] 本发明的有益效果在于:

[0039] 本发明从设计AME半抗原结构出发,制备免疫原和包被原,进而筛选高专一性、高亲和性的AME单克隆抗体,并进一步将其应用于胶体金免疫层析试纸条的制备中。

[0040] 本发明的检测果蔬中链格孢毒素AME的胶体金免疫层析试纸条,能够一步实现检测,结果准确,无需洗涤和标准参照,能够对单个或批量样本实时快速定性或半定量检测,检测灵敏度高,检测限达到10ng/mL。所述试纸条对分子结构类似物链格孢酚AOH无交叉响应。

[0041] 本发明的检测果蔬中链格孢毒素AME胶体金免疫层析试纸条,具有制备简单,价格便宜,能够降低因操作繁冗造成的检测误差;另外,试剂保存时间长,现场操作简单方便,可在现场大批量样本中链格孢毒素AME的快速检测及筛查中发挥重要作用。能够更好地辅助我国食品企业及政府职能监管部门等开展相关的检测工作。

附图说明

- [0042] 图1为本发明所述AME半抗原合成路线图。
- [0043] 图2为本发明所述AME半抗原核磁共振氢谱图。
- [0044] 图3为本发明所述AME半抗原LC-MS谱图。
- [0045] 图4为本发明所述AME胶体金免疫层析试纸条结构示意图。
- [0046] 图5为本发明所述AME胶体金试纸条检测结果判定图。
- [0047] 图6为本发明所述胶体金免疫层析试纸条对AME的检测效果图。
- [0048] 图7为本发明所述胶体金免疫层析试纸条的特异性检测效果图。

具体实施方式

[0049] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0050] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0051] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0052] 实施例1AME单克隆抗体的制备

[0053] 1、AME半抗原合成

[0054] 将10mg的AME,14.5mg溴丁酸甲酯和30.2mg的碳酸钾溶于1mL的甲酰胺(DMF)溶液,50℃磁力搅拌反应2h;待反应混合物冷却后,加入2mL水稀释,随后用酒精进行萃取得到沉淀中间产物(15mg);将沉淀溶于0.5mL甲醇和0.5mL四氢呋喃(THF)混合液,随后加入到含有1.8mg氢氧化锂的水溶液(0.1mL)中,室温条件下反应5h,得到羧基化修饰的AME半抗原(40mg)。AME羧基化修饰过程以及核磁共振、LC-MS表征谱图分别见图1、2、3。

[0055] 2、免疫原的合成

[0056] 本发明所述免疫原为AME半抗原与BSA偶联得到。具体制备方法:将15.8mg AME半抗原溶于1.5mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中;加入13.7mg二环己基碳二亚胺(DCC),搅拌30min;加入7.6mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温避光磁力搅拌3.5h;离心,除去沉淀物N,N'-二环己基脲;将上清液逐滴加到由磷酸缓冲液(0.1M,pH 7.4)配制的BSA溶液中,室温避光搅拌2h;透析。用0.1mol/L的PBS溶液透析3d,每天换液3次,即得AME-BSA免疫原,分装后,保存于-20℃冰箱中备用。

[0057] 3、AME单克隆抗体的制备

[0058] (1)动物免疫

[0059] 将合成的AME-BSA免疫原溶于PBS缓冲液(pH 7.0),然后将免疫原与弗氏佐剂按照1:3的比例充分乳化制成油乳剂疫苗。第一次免疫采用弗氏完全佐剂疫苗,对8-10周龄Balb/c小鼠进行免疫,在颈背部皮下进行多点注射,免疫注射剂量为200μg次/只。15天后进行第二次免疫,采用弗氏不完全佐剂,免疫剂量同上;30天后进行第三次免疫,采用弗氏不完全佐剂,免疫剂量同上;44天后进行第四次免疫,同样采用弗氏不完全佐剂,免疫剂量同上;58天后进行加强免疫,不加佐剂,直接采用AME-BSA进行免疫。免疫Balb/c小鼠的时间见表1。

[0060] 表1免疫Balb/c小鼠时间表

免疫过程	免疫原	免疫剂量(μg 次/只)	间隔时间
第一次免疫	AME-BSA (完全佐剂)	200	-
第二次免疫	AME-BSA (不完全佐剂)	200	15
[0061] 第三次免疫	AME-BSA (不完全佐剂)	200	15
第四次免疫	AME-BSA (不完全佐剂)	200	14
加强免疫	AME-BSA	200	14

[0062] (2)细胞融合和克隆

[0063] 将能够稳定产生AME单克隆抗体的Balb/c小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0按照8:1的比例进行混合,随后离心,弃掉上清,将沉淀的细胞制成糊状,放置于37℃水浴箱,并在1min内加入融合剂聚乙二醇(PEG4000),轻轻搅拌细胞反应2min,并在随后的4min内加入20mL无血清的PEG营养液,1000rpm离心10min后弃掉上清。用20mL-50mL完全培养液重悬细胞,并将其接种于含饲养细胞的96孔细胞培养板,每孔100 μL ,并将其置于37℃恒温培养箱中;待细胞长至96孔细胞培养板底部的1/2~1/3时,利用间接竞争ELISA方法测定细胞上清液,筛选阳性孔;利用有限稀释法,将阳性细胞在检测后的2d内进行亚克隆,直到得到能够稳定分泌AME单克隆抗体的杂交瘤细胞株;将此杂交瘤细胞株进行扩大培养和传代,无限量的产生AME特异性单克隆抗体。

[0064] (3)单克隆抗体腹水制备及纯化

[0065] (1)小鼠致敏:利用液体石蜡致敏Balb/c小鼠,6-8周后,注射免疫原500 μL /只,10天后即可制备腹水。

[0066] (2)注射细胞:收集杂交瘤细胞并用1640培养基清洗细胞两次,取100-150万细胞注射于小鼠腹腔,一周后可见小鼠状态不活跃并且小鼠的腹腔肿大。

[0067] (3)腹水采集:注射细胞一周后,用无菌注射器对腹腔肿大的小鼠采集腹水,每隔1d-2d采集一次,多次反复采集直到小鼠自然死亡。

[0068] (4)腹水纯化:用辛酸-饱和硫酸铵法对采集到的腹水进行纯化,纯化后放入-20℃冰箱中保存。使用前,需在4℃条件下利用0.01mol/L NaCl透析48h,每隔6h-8h换液一次。

[0069] 4、抗体效价的测定

[0070] 在酶标板的每个孔中分别包被100 μL 稀释到一定浓度的包被原,37℃孵育2h;清洗液洗板3次后,每孔加入封闭液100 μL ,37℃孵育2h;清洗液洗板3次后,每孔分别加入用常规酶标二抗稀释液稀释2000倍的酶标二抗;再加入梯度稀释的抗体100 μL ,25℃避光反应30min;洗板4-5次后,加入50 μL 底物液A液,50 μL 底物液B液;显色30min后加入50 μL 终止液终止反应;用酶标仪测定吸光度,吸收波长为450/630nm。本发明得到的单克隆抗体的效价可达到1:270000。

[0071] 实施例2AME胶体金免疫层析试纸条的制备

[0072] 2.1胶体金的制备

[0073] 取99mL超纯水和1mL 1%的三氯金酸水溶液,混匀后,磁力搅拌加热煮沸,加入1.8mL 1%柠檬酸三钠溶液,继续加热煮沸。当溶液的颜色由浅黄色变为蓝黑色,最后变为酒红色后,继续加热煮沸10min。当制备好的胶体金溶液的温度降至室温时,将制备好的胶体金溶液定容到100mL。最后,将制备好的胶体金溶液放于洗净的玻璃瓶中,并于4℃环境条件下存放备用。

[0074] 2.2胶体金-AME抗体复合物的制备

[0075] 取制备好的粒径大小为18nm的胶体金溶液2mL,用0.1M K_2CO_3 调节其pH到8.0;随后逐滴加入200 μ L浓度为0.1 μ g/ μ L的AME单克隆抗体(实施例1所得),室温条件下磁力搅拌反应2h;逐滴加入10%的HSA溶液,使其终浓度为0.5%,室温条件下磁力搅拌反应30min;加入10%的PEG20000溶液,并使其终浓度为0.2%,室温条件下磁力搅拌30min;12000rpm离心30min,弃掉上清,留下胶体金沉淀;向沉淀中加入1%的HSA溶液重悬胶体金,然后12000rpm离心,重复进行三次后,用胶体金重悬液(0.025g PEG20000,2.5g蔗糖,0.5g HSA和50 μ L Tween-20溶于50mL 10mM pH 8.0的Tris-HCl缓冲液中)重悬沉淀至原体积的1/10。

[0076] 2.3胶体金-AME抗体复合物在胶体金结合垫上的包被

[0077] 将胶体金结合垫浸泡在预处理缓冲液(1g BSA,1.5g蔗糖和0.01g叠氮钠溶于50mL10mM pH 7.4的磷酸盐缓冲液)中,并放置于37℃恒温水浴箱中孵育30min;随后用大量的磷酸盐缓冲液进行彻底清洗,37℃烘箱干燥2h,最后4℃干燥条件下保存备用;取上述制备好的10 μ L胶体金-AME抗体复合物铺于胶体金结合垫(1cm长 \times 0.5cm宽),37℃烘箱1h后,4℃干燥条件下保存备用。

[0078] 2.4样品垫的制备

[0079] 将样品垫放置于预处理缓冲液(0.5g BSA,50 μ L Tween-20溶于50mL的磷酸盐缓冲液)中,并于37℃恒温水浴箱中孵育30min;随后用大量的磷酸盐缓冲液彻底清洗,37℃烘箱中干燥2h,最后4℃干燥条件下保存备用。

[0080] 2.5硝酸纤维素膜(NC膜)上检测线和质控线的制备

[0081] 检测线T线:将AME-OVA包被原(1mg/mL)按照1.0 μ L/cm的包被量固定于NC膜T线预设区域,形成T线;

[0082] 质控线C线:同样将羊抗鼠二抗(1mg/mL)按照1.0 μ L/cm的包被量固定于NC膜C线预设区域,形成C线;

[0083] 质控线与检测线之间的距离约为5mm,37℃放置2h进行干燥固定。为了防止NC膜的非特异性吸附,我们对干燥后的固定有包被原和二抗的NC膜进行封闭:将固定有包被原和二抗的NC膜浸入到NC膜封闭液(1.2g HSA,0.2g脱脂奶粉和120 μ L Tween-20溶于40mL Tris-HCl缓冲液)中,并放于37℃恒温箱中维持30min。随后用大量的PB缓冲液对其进行彻底清洗后,室温条件下干燥,最后4℃干燥条件下存放备用。

[0084] 2.6试纸条的组装

[0085] 首先,将固定有抗体的NC膜粘贴在PVC底板上;其次,用吸水垫压住NC膜的一端2mm左右,NC膜的另一端被包被有胶体金-AME抗体复合物的胶体金结合垫压住约2mm左右;最后,样品垫压住胶体金结合垫2mm左右。胶体金免疫层析试纸条剖面结构示意图见图4。

[0086] 实施例3AME胶体金免疫层析试纸条检测原理

[0087] 1、检测方法：用一次性吸管吸取待检样本，滴加到3-4滴(约70 μ L)于样品垫上。

[0088] 2、结果判断：

[0089] 胶体金试纸条检测结果判定见图5。

[0090] 阳性：T线不显色，C线显色，表示样本中AME的浓度高于检测限，检测结果为阳性；

[0091] 阴性：T线和C线都显色，表示样本中AME的浓度低于检测限，检测结果为阴性；

[0092] 无效：C线不显色，表示该试纸条已经变质失效，检测结果无效。

[0093] 实施例4本发明胶体金免疫层析试纸条对AME的检测

[0094] 以AME标准品为检测对象，用PB缓冲液依次稀释AME标准品，使其浓度分别为50ng/mL、40ng/mL、30ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、1ng/mL、0.1ng/mL、0ng/mL。分别取70 μ L上述AME标准品，分别滴加到制备的胶体金免疫层析试纸条上进行检测，5-10min后观察显色结果(图6)。

[0095] 从结果中可以看出，当AME浓度小于10ng/mL时，随着AME标准品浓度的降低，检测线上红色强度增加；当AME浓度大于10ng/mL时，检测线不显色。

[0096] 上述结果表明，该试纸条的检测限为10ng/mL。

[0097] 实施例5本发明胶体金试纸条的特异性试验

[0098] 由于链格孢酚AOH和AME具有相似的结构，因此，本发明利用AOH进一步考察此胶体金试纸条的检测特异性。以AOH标准品为检测对象，用PB缓冲液依次稀释AOH标准品，使其浓度分别400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、0ng/mL。依次取70 μ L上述AOH标准品溶液，分别滴加到制备的胶体金免疫层析试纸条上进行检测，5-10min后观察显色结果(图7)。

[0099] 结果显示为：当AOH的浓度分别为400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、0ng/mL时，检测线和质控线均显色，检测结果均为阴性，可以得出本发明的胶体金免疫层析试纸条具有高的检测专一性，无交叉反应。

[0100] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

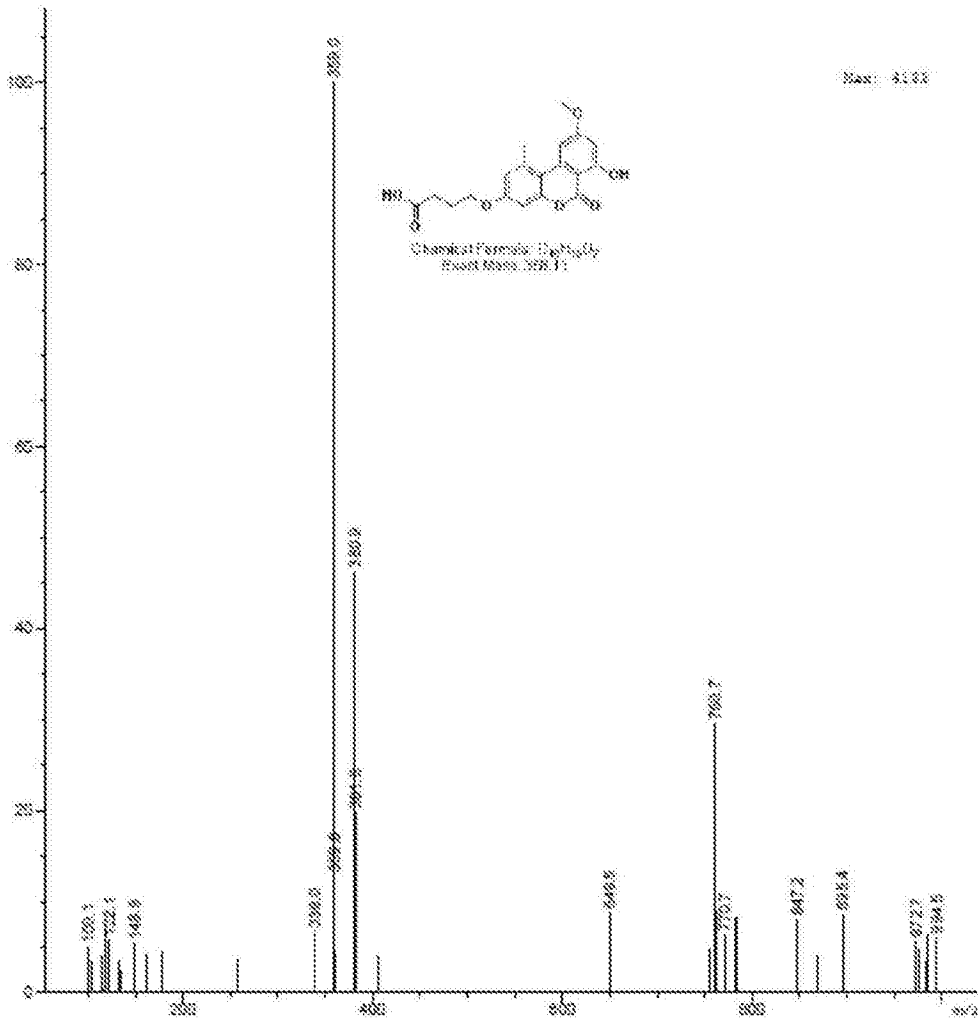


图3

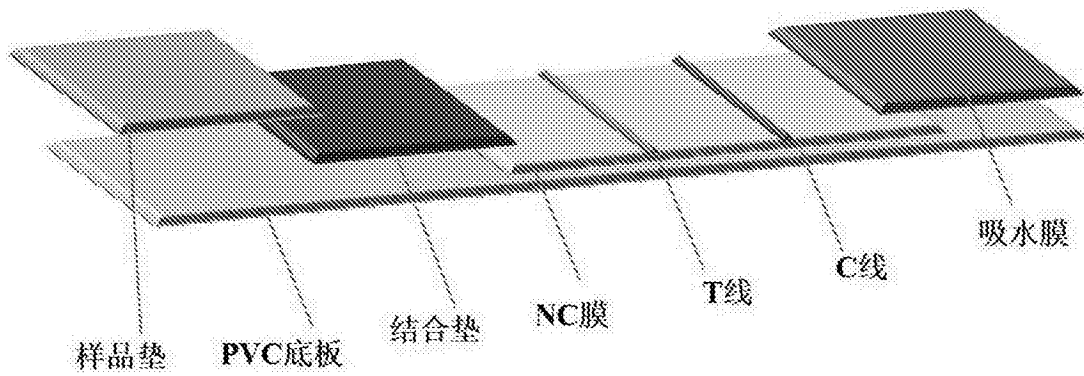


图4

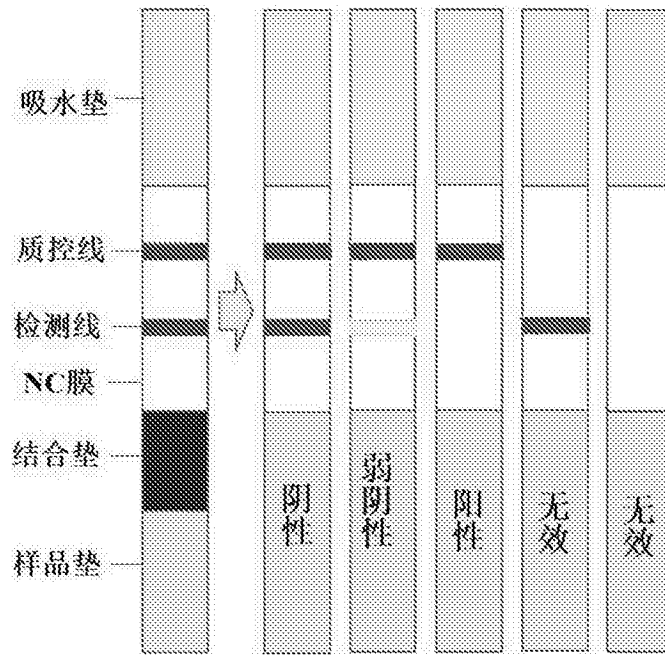


图5

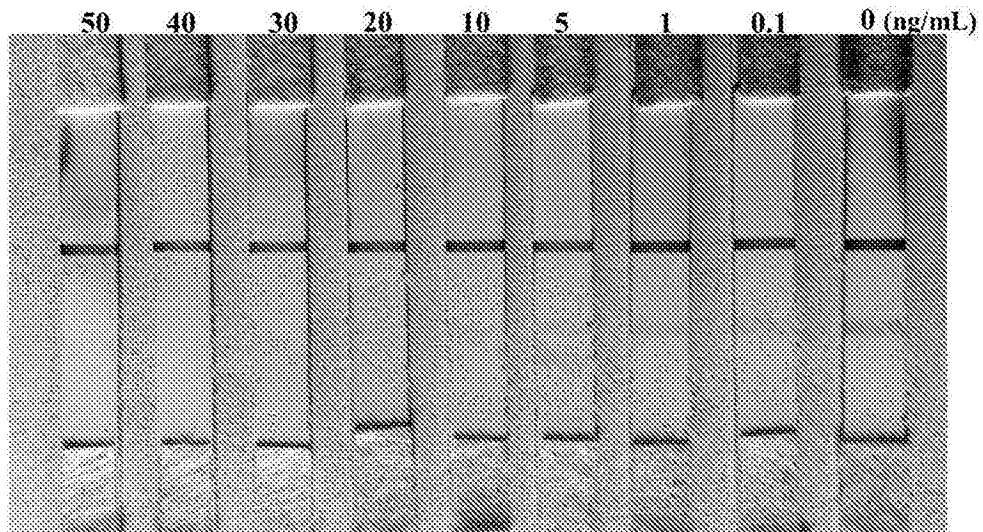


图6

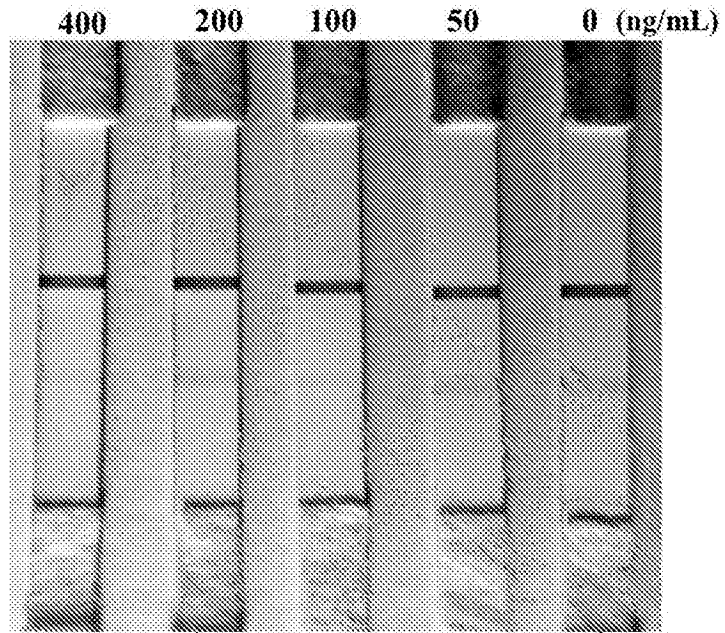


图7

专利名称(译)	链格孢毒素链格孢酚单甲醚胶体金免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN106093381A	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610539564.1	申请日	2016-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
[标]发明人	满燕 梁刚 潘立刚 付海龙		
发明人	满燕 梁刚 潘立刚 付海龙		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N2333/37		
代理人(译)	王文君		
其他公开文献	CN106093381B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及食品安全监测领域，具体公开了一种检测链格孢毒素链格孢酚单甲醚(AME)的免疫层析试纸条，包括样品垫、胶体金结合垫、NC膜、吸水垫和PVC底板，胶体金结合垫上包被有胶体金-AME单抗复合物，NC膜上设置了检测线和质控线，检测线上固定有浓度为1mg/mL的AME-OVA偶联抗原，质控线上固定有浓度为1mg/mL的羊抗鼠二抗。本发明为采用一步间接竞争免疫层析试纸条技术快速定性或半定量检测果蔬样本中链格孢毒素AME含量的胶体金试纸条，检测灵敏度达到10ng/mL，并且检测专一性强，操作简单，经济实用，适合于现场检测，可广泛应用于果蔬大批量样本中AME的分析检测及快速筛查。

