



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110146696 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201910363511.2

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2019.04.30

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO. C201871 2018.03.23

(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 李慧 唐晓倩 张兆威
张文

(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 乔宇

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分
辨荧光试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用。它包括荧光试纸条和含有销标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中所述荧光试纸条包括底板,底板的粘性面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,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和检测线,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,检测线上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物;所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生。其可用于黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的检测,具有操作简单、快速、灵敏度高的特点。

1. 黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:它包括荧光试纸条和含有铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中所述荧光试纸条包括底板,底板的粘性面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,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和检测线,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,检测线上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物;所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生。

2. 根据权利要求1所述的黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:将抗环匹阿尼酸单克隆抗体和活化后的铕标记试剂在硼酸缓冲液中混合、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体;1mL活化后的铕标记试剂偶联抗环匹阿尼酸单克隆抗体:40 μ g~90 μ g。

3. 根据权利要求2所述的黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述的活化方法为取铕标记试剂,用pH 8.2 0.2M的硼酸缓冲液超声分散,然后缓慢加入碳二亚胺溶液,室温振荡活化,离心去上清,用pH 8.2 0.2M的硼酸缓冲液复溶,备用,所述的活化时间为15~30min。

4. 根据权利要求1所述的黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述荧光试纸条中的吸水垫长16~18mm,宽3~4mm;检测垫长18~30mm,宽3~4mm;样品垫长10~12mm,宽3~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm;所述荧光试纸条中检测垫上的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,质控线和检测线的间距为5~10mm;所述的样品反应瓶为1-5mL的卡口瓶。

5. 根据权利要求1所述的黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述荧光试纸条中检测垫上每厘米检测线所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物CPA-OVA的包被量为100~400ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng;所述样品反应瓶中铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的含量为100~200ng。

6. 根据权利要求1所述的黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:其还包括样品稀释液和样品稀释液吸管,所述的样品稀释液为体积分数为0.01~0.30%的吐温-20水溶液。

7. 根据权利要求1所述的黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒,其特征在于:所述的时间分辨荧光试纸条的制备方法如下:

(1) 将吸水纸剪裁得吸水垫;

(2) 检测垫的制备:

将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物CPA-OVA用包被缓冲液配制成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿15~20mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng,然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟;

将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液,于距检测线5~10mm的位置,用线喷方式将其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100~300ng,然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟;

(3) 样品垫的制备:

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

(4) 荧光试纸条的组装:

在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得荧光试纸条。

8. 权利要求1所述的黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒在环匹阿尼酸含量检测中的应用,其特征在于:应用方法为:将待测样品经前处理获得待测样品溶液后,加入样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应6~10分钟后,用时间分辨荧光测试仪进行检测,获得荧光免疫层析试纸条上检测线(T)荧光强度与质控线(C)荧光强度的比值;基于荧光免疫层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值与环匹阿尼酸浓度的关系曲线,获得待测样品溶液中环匹阿尼酸的含量,最后经换算即得待测样品中环匹阿尼酸的含量。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于:所述的前处理为将样品经甲醇提取,具体为:将待测样品磨细,加入体积浓度为70%的甲醇/2%NaHCO₃水溶液,振荡提取,离心取上清,用正己烷萃取后收集下层水相,加入10%氯化钾溶液,并用HCl调节至pH2-3,用氯仿振荡提取,收集下层氯仿层,旋转蒸发浓缩去除氯仿,将沉淀用甲醇溶解,获得甲醇提取液即待测样品溶液。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于:所述的荧光试纸条检测线荧光强度(T)与质控线荧光强度(C)的比值(T/C)与环匹阿尼酸浓度的关系曲线是采用以下方法得到的:

(1) 配制得到一系列浓度的环匹阿尼酸标准品溶液;

(2) 将适量上述各浓度的环匹阿尼酸标准品溶液分别加入到样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应6~10分钟,用时间分辨荧光免疫分析仪检测得到各免疫层析时间分辨荧光试纸条上检测线(T)和质控线的时间分辨荧光强度(C),由此获得各免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C);

(3) 经拟合得到免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值与环匹阿尼酸浓度的关系曲线。

黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 环匹阿尼酸首先在圆弧青霉菌中发现并分离,主要由青霉菌属和曲霉菌属真菌产生一种次级代谢产物。环匹阿尼酸性质稳定,一般的储存条件和加工过程不能破坏,即使经过巴氏杀菌,也几乎完全不能被破坏。环匹阿尼酸可污染花生、玉米、饲料等多种农产品,人和动物摄入后,会引起心肌细胞变性、重量减轻和共济失调等症状,对人们的饮食安全造成重大威胁。

[0003] 目前,现有环匹阿尼酸检测方法包括薄层层析法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等。其中薄层层析法不需要特殊的仪器设备,但试剂用量大、操作繁琐、不能准确定量,且对实验人员和周围环境污染危害较大。高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等精密仪器分析法灵敏度高,准确性好,但又有仪器昂贵,样品前处理过程繁琐,耗时长,对实验环境要求高等不足,难以实现快速检测。免疫分析技术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、对环境的污染危害小、适于现场批量检测等优点,已应用于食品、医疗等多个领域。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的问题是提供一种黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用。该免疫层析时间分辨荧光试剂盒可用于黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的检测,具有操作简单、快速、灵敏度高的特点。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:

[0006] 黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒,它包括荧光试纸条和含有钡标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中所述荧光试纸条包括底板,底板的粘性面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,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和检测线,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,检测线上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物;所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生,所述的杂交瘤细胞株YTT-2于2018年3月23日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址是,中国,武汉,武汉大学,保藏编号为CCTCC NO.C201871。

[0007] 按上述方案,所述钡标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:将抗环匹阿尼酸单克隆抗体和活化后的钡标记试剂在硼酸缓冲液中混合、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物钡标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体;1mL活化后的钡标记试剂可偶联抗环匹阿尼酸单克隆抗体:40 μ g~90 μ g。

[0008] 按上述方案,所述的活化方法为取钡标记试剂,用pH 8.2 0.2M的硼酸缓冲液超声

分散，然后缓慢加入碳二亚胺溶液，室温振荡活化，离心去上清，用pH 8.2 0.2M的硼酸缓冲液复溶，备用，所述的活化时间为15~30min。

[0009] 上述配制好的铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液中备用，使用时，取一定量的铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体放入样品反应瓶中，置于冷冻干燥机中冻干，得到铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品，备用。

[0010] 按上述方案，所述荧光试纸条中的吸水垫长16~18mm，宽3~4mm；检测垫长18~30mm，宽3~4mm；样品垫长10~12mm，宽3~4mm，相邻各垫的交叠长度为1~3mm；所述荧光试纸条中检测垫上的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm，质控线和检测线的间距为5~10mm；所述的样品反应瓶为1-5mL的卡口瓶。

[0011] 按上述方案，所述荧光试纸条中检测垫上每厘米检测线所需的环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物CPA-OVA的包被量为100~400ng；每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng；所述样品反应瓶中铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的含量为100~200ng。

[0012] 按上述方案，所述黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒还包括样品稀释液和样品稀释液吸管，所述的样品稀释液为体积分数为0.01~0.30%的吐温-20水溶液。

[0013] 按上述方案，所述的时间分辨荧光试纸条的制备方法如下：

[0014] (1) 将吸水纸剪裁得吸水垫；

[0015] (2) 检测垫的制备：

[0016] 将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物CPA-OVA用包被缓冲液配制成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液，于距硝酸纤维素膜上沿15~20mm的位置，用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上，得到检测线，每厘米检测线所需环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80~400ng，然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟；

[0017] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液，于距检测线5~10mm的位置，用线喷方式将其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100~300ng，然后于37~40℃条件下干燥60~120分钟；

[0018] (3) 样品垫的制备：

[0019] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿，取出，于37~40℃条件下干燥10~16小时，得样品垫，然后置干燥器中室温保存；

[0020] (4) 荧光试纸条的组装：

[0021] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，交叠长度为1~3mm，即得荧光试纸条。

[0022] 按上述方案，所述荧光试纸条的制备中配制环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物CPA-OVA包被液中所使用的包被缓冲液为：1g牛血清白蛋白，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，0.02g磷酸二氢钾，加水定容至100mL所得；

[0023] 所述的兔抗鼠多克隆抗体的包被液中所使用的包被缓冲液为：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，0.02g磷酸二氢钾，加水定容至100mL

所得;

[0024] 所述荧光试纸条的制备中使用的封闭液为:将2g卵清蛋白,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,0.02g磷酸二氢钾,0.5g吐温-20,加水定容至100mL所得。

[0025] 上述黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒在环匹阿尼酸含量检测中的应用:将待测样品经前处理获得待测样品溶液后,加入样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应6~10分钟后,用时间分辨荧光测试仪进行检测,获得荧光免疫层析试纸条上检测线(T)荧光强度与质控线(C)荧光强度的比值;基于荧光免疫层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值与环匹阿尼酸浓度的关系曲线,获得待测样品溶液中环匹阿尼酸的含量,最后经换算即得待测样品中环匹阿尼酸的含量。

[0026] 按上述方案,所述的前处理为将样品经甲醇提取,具体为:将待测样品磨细,加入体积浓度为70%的甲醇/2%NaHCO₃水溶液,振荡提取,离心取上清,用正己烷萃取后收集下层水相,加入10%氯化钾溶液,并用HCl调节至pH 2-3,用氯仿振荡提取,收集下层氯仿层,旋转蒸发浓缩去除氯仿,将沉淀用甲醇溶解,获得甲醇提取液即待测样品溶液。

[0027] 按上述方案,所述的荧光试纸条检测线荧光强度(T)与质控线荧光强度(C)的比值(T/C)与环匹阿尼酸浓度的关系曲线是采用以下方法得到的:

[0028] (1)配制得到一系列浓度的环匹阿尼酸标准品溶液;

[0029] (2)将适量上述各浓度的环匹阿尼酸标准品溶液分别加入到样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应6~10分钟,用时间分辨荧光免疫分析仪检测得到各免疫层析时间分辨荧光试纸条上检测线(T)和质控线的时间分辨荧光强度(C),由此获得各免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C);

[0030] (3)经拟合得到免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值与环匹阿尼酸浓度的关系曲线。

[0031] 本发明的有益效果:

[0032] (1)快速。本发明提供的免疫层析时间分辨荧光试剂盒可实现对黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的定量检测,灵敏度高,操作简单、快速。

[0033] (2)灵敏度高。本发明提供的免疫层析时间分辨荧光试剂盒对检测溶液中黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的最低检测限为0.5ng/mL。

附图说明

[0034] 图1为本发明提供的黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光速测试剂盒中免疫层析时间分辨荧光试纸条的结构示意图。图中:1吸水垫、2检测垫、3样品垫、4质控线、5环匹阿尼酸检测线。

具体实施方式

[0035] 实施例1抗环匹阿尼酸单克隆抗体的获得

[0036] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO.C C201871的杂交瘤细胞株YTT-2产生。具体如下:

[0037] 将环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株YTT-2腹腔注射预先用弗氏不完全佐剂处

理过的BALB/c小鼠体内,收集小鼠的腹水,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,具体操作为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,过滤后的腹水于4℃,12000r/min离心15min以上,吸取上清,将上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,边搅拌边缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为30~35μL,室温混合30~60min,4℃静置2h以上,然后4℃,12000r/min离心30min以上,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和pH7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4,4℃预冷,缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h以上,然后4℃,12000r/min离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用纯水透析,将充分透析好的蛋白溶液置-70℃冰箱冷冻,然后用冷冻真空干燥机冻干,收集冻干粉,即得纯化好的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,将抗体置-20℃冰箱中备用;

[0038] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容至100mL所得;所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.9g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。

[0039] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株YTT-2分泌的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的亚型为IgG2a型。

[0040] 用常规间接非竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)法测得YTT-2的鼠腹水抗体的效价可达 1.2×10^5 ,即鼠腹水抗体稀释 1.2×10^5 倍时的溶液测定结果为阳性。常规间接竞争ELISA法鉴定其对环匹阿尼酸的灵敏度(IC₅₀)为0.84ng/mL,对黄曲霉毒素B1,B2,G1,G2,M1和杂色曲霉毒素的交叉反应率均小于0.1%。

[0041] 杂交瘤细胞株YTT-2的筛选:

[0042] 1. 抗原合成及动物免疫

[0043] 购买市售环匹阿尼酸标准品进行完全抗原合成,具体的合成步骤如下:将1mg CPA溶于1mL 0.05M NaHCO₃的50%甲醇水溶液中;取2mg血蓝蛋白(KLH)加入0.4mL 3M醋酸钠,在室温搅拌条件下,1min内逐滴加入0.2mL甲醛,持续搅拌10min;将CPA逐滴缓慢加入到KLH中,室温条件下持续搅拌16h以上。将最终反应产物CPA-KLH置于合适大小透析袋内,于PBS中4℃搅拌透析三天。同样方法合成检测原CPA-OVA。

[0044] 购买6周龄雌性BaLb/c小鼠6只,免疫自行合成的环匹阿尼酸完全抗原CPA-KLH,免疫剂量为100μg/只。第一次免疫将完全抗原CPA-KLH与弗氏完全佐剂混合乳化,进行背部皮下多点注射免疫。初免间隔3周,之后每次间隔2周进行免疫,使用弗氏不完全佐剂乳化进行免疫。从第三次免疫一周后,进行尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA法监测小鼠血清抗体效价,用间接竞争ELISA法测定小鼠血清灵敏度,选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行最后一次冲刺免疫,融合前3天取100μg免疫原溶于200μL PBS直接注射腹腔。弗氏佐剂购于Sigma-Aldrich公司。

[0045] 2. 细胞融合

[0046] 最后一次冲刺免疫3天后,采用50%(重量百分数)的聚乙二醇即PEG(分子量为1450)作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤如下:

[0047] 颈椎脱臼法处死免疫小鼠,在无菌条件下摘取脾脏,研磨分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞SP2/0按5:1个数比混合,用RPMI-1640基础培养液洗混合细胞,用50%PEG融合,融合1分钟,然后加满RPMI-1640基础培养液,离心,移去上清,小鼠脾细胞和鼠源骨髓瘤细胞

SP2/0形成的融合细胞用72mLRPMI-1640基础培养液重悬,将重悬起来的细胞滴加到96孔细胞培养板内,2滴/孔,置37℃二氧化碳培养箱养,所述的RPMI-1640基础培养液为含有20% (体积百分数) 胎牛血清,2% (重量百分数) 生长因子和1% (重量百分数) 次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT。上述SP2/0购于上海泛柯生物科技有限公司;RPMI-1640 基础培养液购于Hyclone公司;1% 次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT购于Sigma-Aldrich公司。

[0048] 3. 细胞株的筛选及克隆

[0049] 待细胞融合后第12天左右,细胞集落长到占孔底1/2面积大小,培养液变黄,即可进行抗体检测。采用ELISA方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选,筛选分两步进行,第一步采用间接非竞争ELISA法筛选出抗环匹阿尼酸而不抗载体蛋白KLH的阳性孔;第二步采用间接竞争ELISA法对第一步筛选出的阳性孔进行检测,以环匹阿尼酸作为竞争原,选择吸光值和灵敏度均较高的孔(吸光值较高指竞争原为0的孔即阳性对照孔的最终测定值 较高,灵敏度较高指抑制率为50%时的竞争原浓度亦即IC₅₀值较小),采用有限稀释法进行克隆,克隆后10天左右采用同样的两步法进行检测,如此重复克隆2-3次后,获得杂交瘤细胞株YTT-2,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址是,中国,武汉,武汉大学,保藏编号为CCTCC NO.C201871。

[0050] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株系YTT-2抗体可变区序列测定

[0051] (1) 提取总RNA:采用天根公司的总RNA提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株YTT-2的总RNA。

[0052] (2) 合成cDNA:以步骤1获得的总RNA为模板,oligo(dT)₁₅为引物,按照SuperScript™-2II反转录酶说明书进行反转录,合成cDNA第一链;引物oligo(dT)₁₅由Invitrogen购得;

[0053] (3) PCR法克隆可变区基因:根据GENBANK中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引物,以CDNA为模版扩增抗体重链、轻链可变区基因。PCR程序为:94℃30s、55℃50s、72℃1min,扩增30个循环,最后72℃延伸10min。PCR产物经过1% (重量百分数) 的琼脂糖凝胶电泳分离后,用试剂盒纯化回收DNA片段,连接在载体pMD18-T中,转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞,挑取阳性克隆,送至苏州泓迅生物科技有限公司进行测序。其中引物的 序列分别为:重链可变区引物为5'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3' (22mer) 和5'-TGA GGA GACGGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3' (32mer) 其中S、M、R和W为 兼并碱基,M=A/C,R=A/G,S=C/G,W=A/T,轻链可变区引物为5'-GAC ATT GAG CTC ACC CAG CTT GGT GCC-3' (24mer) 和5'-CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC-3' (24mer)。

[0054] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长360bp,序列如SEQ ID NO:1所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由120个氨基酸组成,序列如 SEQ ID NO:3所示。轻链可变区编码基因序列长322bp,序列如SEQ ID NO:2所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由107个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:4所示。

[0055] 实施例2:黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用

[0056] 黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒,它包括荧光试纸条和含有钨标 记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的样品反应瓶、样品稀释液及样品稀释液

吸管,所述的 荧光试纸条如图1所示,包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫1、检测垫2和样品 垫3,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1mm,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4和环匹阿尼酸检测线5,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗 体,检测线上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物;所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号 为CCTCC NO.C201871的杂交瘤细胞株YTT-2分泌产生;制备方法如下:

[0057] (1)吸水垫的制备

[0058] 将吸水纸剪裁成16mm得吸水垫;

[0059] (2)检测垫的制备

[0060] 检测线的包被:

[0061] 将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物CPA-OVA配制成浓度为0.2mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿15mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为80,然后于37℃条件下干燥60分钟;

[0062] 所述的包被缓冲液为:1g牛血清白蛋白,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,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0063] 质控线的包被:

[0064] 将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度为0.2mg/mL的包被液,于距检测线5mm的位置,用线喷方式将其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100ng,然后于37℃条件下干燥60分钟;

[0065] 所述的包被缓冲液为: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,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0066] (3)样品垫的制备:

[0067] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0068] 所述的封闭液为:将2g卵清蛋白,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,0.02g磷酸二氢钾,0.5g吐温-20,加水定容至100mL所得;

[0069] (4)荧光试纸条的组装:

[0070] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1~3mm,即得荧光试纸条;

[0071] 所述铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的获得:取800μL 0.2mol/L pH 8.2的硼酸缓冲液,加入200μL氧化铈乳胶,上海优你生物科技股份有限公司,用800W超声清洗仪超声10 min;加入40μL的15mg/mL碳二亚胺溶液,涡旋混匀15min;13,300rpm/min离心10分钟,弃上清;将沉淀用1mL含0.5%的BSA的硼酸缓冲液重悬,振荡混匀,再用800W超声清洗仪超声10min;加入1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液40μL,4℃下摇床过夜后;13,300 r/min离心10分钟,弃上清,加入1mL 0.5%BSA溶液复溶,4℃下摇床2小时;13,300rpm/min 离心10分钟,弃上清;用含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液复溶,即得铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,置于4℃保存备用。

[0072] 所述含有铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的样品反应瓶的获得:

[0073] 取一定量复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH

7.4 磷酸缓冲液的铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体,放入样品反应瓶中,置于冷冻干燥机中冻干,得到铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品,含量为100ng。

[0074] 所述黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒在玉米样品环匹阿尼酸检测中的应用:

[0075] 称取5g空白玉米样品于50mL离心管中,加入20mL甲醇/2%NaHCO₃水溶液,振荡提取1h,离心取上清。分次加入50mL正己烷,振荡混合萃取,分层后收集下层水相。加入5mL 10%氯化钾溶液,并用HCl调节至pH 2-3。分次加入30mL氯仿振荡混合多次提取,收集下层氯仿。旋转蒸发浓缩收集到的氯仿,然后准确加入2mL流动相充分溶解,用0.45μm有机滤膜过滤,得到空白基质溶液;

[0076] 配制0ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.25ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL的环匹阿尼酸标准溶液,标准溶液每个浓度点重复5次,用免疫层析时间分辨荧光试纸条进行检测,用时间分辨荧光检测仪检测:将上述标准品溶液150μL加入样品反应瓶中,混匀,插入免疫层析时间分辨荧光试纸条,37℃反应6min后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用时间分辨荧光免疫分析仪检测,(激发波长:365nm,测定波长:615nm),读取检测区域的荧光信号强度值,计算5次重复平均值。以标准系列浓度值自然对数(Lnc)和T线的荧光信号强度值/C线的荧光信号强度值(T/C)得标准曲线: $Y = -1.686 * \ln c + 4.003$, $R^2 = 0.983$ 。

[0077] 称取5g玉米样品于50mL离心管中,加入20mL 70%甲醇/2%NaHCO₃水溶液,振荡提取1h,离心取上清。分次加入50mL正己烷,振荡混合萃取,分层后收集下层水相。加入5mL 10%氯化钾溶液,并用HCl调节至pH 2-3。分次加入30mL氯仿振荡混合多次提取,收集下层氯仿层。旋转蒸发浓缩除去氯仿,然后加入2mL甲醇充分溶解,用0.45μm有机滤膜过滤;取滤液1mL,加入5mL样品稀释液稀释滤液,混匀,得待检玉米样品检测液;取待检玉米样品检测液150μL加入样品反应瓶中,混匀,插入免疫层析时间分辨荧光试纸条,37℃反应6min后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用时间分辨荧光免疫分析仪检测(激发波长:365nm,测定波长:615nm),获得各免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C),代入上述得到的免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与环匹阿尼酸浓度的关系曲线,得该玉米样品中的环匹阿尼酸含量为6.4μg/kg。

[0078] 实施例3:黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用

[0079] 黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒,它包括荧光试纸条和含有铕标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的样品反应瓶、样品稀释液及样品稀释液吸管,所述的荧光试纸条包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1mm;

[0080] (1)吸水垫的制备

[0081] 将吸水纸剪裁成18mm得吸水垫;

[0082] (2)检测垫的制备

[0083] 检测线的包被:

[0084] 将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物CPA-OVA配制成浓度为0.5mg/mL的包被液,于硝酸纤维素膜上沿20mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物的包被量为400,然后于37℃条件下干燥

120分钟；

[0085] 所述的包被缓冲液为：1g牛血清白蛋白，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，0.02g磷酸二氢钾，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成浓度为0.5mg/mL的包被液，于距检测线10mm的位置，用线喷方式将其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300ng，然后于37℃条件下干燥60分钟；

[0088] 所述的包被缓冲液为：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，0.02g磷酸二氢钾，加水定容至100mL所得；

[0089] (3) 样品垫的制备：

[0090] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿，取出，于37℃条件下干燥10小时，得样品垫，然后置干燥器中室温保存；

[0091] 所述的封闭液为：将2g卵清蛋白，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，0.02g磷酸二氢钾，0.5g吐温-20，加水定容至100mL所得；

[0092] (4) 荧光试纸条的组装：

[0093] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，交叠长度为1~3mm，即得荧光试纸条；

[0094] 所述铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的获得：

[0095] 取800μL 0.2mol/L pH 8.2的硼酸缓冲液，加入200μL氧化铈乳胶，用800W超声清洗仪超声10min；加入40μL的15mg/mL碳二亚胺溶液，涡旋混匀15min；13,300rpm/min离心10分钟，弃上清；将沉淀用1mL含0.5%的BSA的硼酸缓冲液重悬，振荡混匀，再用800W超声清洗仪超声10min；加入1mg/mL的抗环匹阿尼酸单克隆抗体溶液40μL，4℃下摇床过夜后；13,300rpm/min离心10分钟，弃上清，加入1mL 0.5%BSA溶液复溶，4℃下摇床2小时；13,300rpm/min离心10分钟，弃上清；用含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液复溶，即得铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体，置于4℃保存备用。

[0096] 所述含有铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体的样品反应瓶的获得：

[0097] 取一定量复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液的铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体，放入样品反应瓶中，置于冷冻干燥机中冻干，得到铈标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为200ng。

[0098] 所述黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的免疫层析时间分辨荧光试剂盒在玉米样品环匹阿尼酸检测中的应用：

[0099] 称取5g空白玉米样品于50mL离心管中，加入20mL甲醇/2%NaHCO₃水溶液，振荡提取1h，离心取上清。分次加入50mL正己烷，振荡混合萃取，分层后收集下层水相。加入5mL 10%氯化钾溶液，并用HCl调节至pH 2-3。分次加入30mL氯仿振荡混合多次提取，收集下层氯仿。旋转蒸发浓缩收集到的氯仿，然后准确加入2mL流动相充分溶解，用0.45μm有机滤膜过滤；

[0100] 用上述得到的阴性样品提取液配制0ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.25ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL的环匹阿尼酸标准溶液，标准溶液每个浓度点重复5次，用免疫层析时间

分辨荧光试纸条进行检测,用时间分辨荧光检测仪检测:将上述标准品溶液150 μ L加入样品反应瓶中,混匀,插入免疫层析时间分辨荧光试纸条,37 $^{\circ}$ C反应6min后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用时间分辨荧光免疫分析仪检测,(激发波长:365nm,测定波长:615nm),读取检测区域的荧光信号强度值,计算5次重复平均值。以标准系列浓度值自然对数(Lnc)和T线的荧光信号强度值/C线的荧光信号强度值(T/C)得标准曲线: $Y=-1.715*\ln c+3.786$, $R^2=0.979$ 。

[0101] 称取5g玉米样品于50mL离心管中,加入20ml甲醇/2%NaHCO₃水溶液,振荡提取1h,离心取上清。分次加入50mL正己烷,振荡混合萃取,分层后收集下层水相。加入5ml 10%氯化钾溶液,并用HCl调节至pH 2-3。分次加入30mL氯仿振荡混合多次提取,收集下层氯仿。旋转蒸发除去氯仿,然后加入2mL甲醇充分溶解,用0.45 μ m有机滤膜过滤;取滤液1mL,加入5mL样品稀释液稀释滤液,混匀;取待检玉米样品检测液150 μ L加入样品反应瓶中,混匀,插入免疫层析时间分辨荧光试纸条,37 $^{\circ}$ C反应6min后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用时间分辨荧光免疫分析仪检测(激发波长:365nm,测定波长:615nm),获得各免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线时间分辨荧光强度与质控线时间分辨荧光强度的比值(T/C),代入上述得到的免疫层析时间分辨荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与环匹阿尼酸浓度的关系曲线,得该玉米样品中的环匹阿尼酸含量为2.4 μ g/kg。

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用

<160> 4

<210> 1

<211> 360bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

```
gagatccagc tgcagcagtc tggacctgac ctgatgaagc ctggggccttc 50
agtgaagata tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact acctactaca 100
tgcactgggt gaagcagagc catggaaaga gccttgagtg gattggatat 150
attgatcctt tcaatggtga tactaggtac aacccgaaat tcaaggccaa 200
ggccacattg actgtagaca aatcttccag cacagcctac atgcagctca 250
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagtttat 300
tactacggta gtagctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac 350
tgtctctgca 360
```

<210> 2

<211> 322bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 2

```
gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga 50
cacagtcacc atcacttgcc atgcaagtca gggcattagc agtaatatag 100
ggtgggttgca gcagaaacca gggaaatcat ttaagggcct gatctatcaa 150
ggaagcaact tggaagatgg agttccatca aggttcagtg gcagtggatc 200
tggagcagat tattctctca ccatcagcag cctggaatat gaagattttg 250
cagactatta ctgtgtacag tttgctcagt ttctctccac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa ac 322
```

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

```
Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Met Lys Pro Gly
1           5           10           15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
           20           25           30
Thr Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
```

	35	40	45
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Asp Thr Arg Tyr			
	50	55	60
Asn Pro Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	65	70	75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp			
	80	85	90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser			
	95	100	105
Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
	110	115	120
<210> 4			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 4			
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu			
1	5	10	15
Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser			
	20	25	30
Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys			
	35	40	45
Gly Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile			
	65	70	75
Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln			
	80	85	90
Phe Ala Gln Phe Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu			
	95	100	105
Leu Lys			
107			

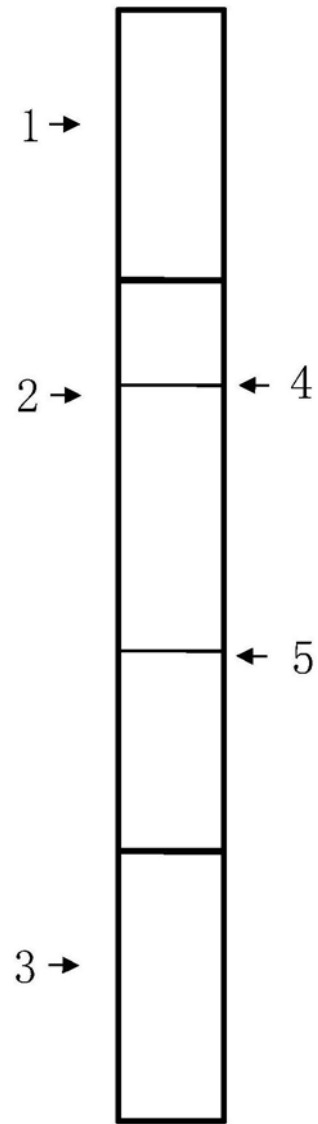


图1

专利名称(译)	黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN110146696A	公开(公告)日	2019-08-20
申请号	CN201910363511.2	申请日	2019-04-30
[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 李慧 唐晓倩 张兆威 张文		
发明人	李培武 李慧 唐晓倩 张兆威 张文		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/582		
代理人(译)	乔宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸免疫层析时间分辨荧光试剂盒及其应用。它包括荧光试纸条和含有销标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的样品反应瓶，其中所述荧光试纸条包括底板，底板的粘性面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫，相邻各垫在连接处交叠连接，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和检测线，质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体，检测线上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物；所述抗环匹阿尼酸单克隆抗体由保藏编号为 CCTCC NO.C201871 的杂交瘤细胞株 YTT-2 分泌产生。其可用于黄曲霉菌毒素-环匹阿尼酸的检测，具有操作简单、快速、灵敏度高的特点。