



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101930006 B

(45) 授权公告日 2012. 08. 22

(21) 申请号 201010245801. 6

(22) 申请日 2010. 08. 05

(73) 专利权人 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

第 4 页, 附图 1, 2.

CN 1673748 A, 2005. 09. 28, 全文.

WO 2008141351 A1, 2008. 11. 27, 全文.

US 2008160538 A1, 2008. 07. 03, 全文.

孙秀兰等. 黄曲霉毒素 B₁ 金标检测体系
建立过程中的影响因素. 《食品与生物技术学
报》. 2006, 第 25 卷 (第 06 期), 37-41.

赵晓联等. 金标免疫层析法检测黄曲霉毒素
B₁ 的方法. 《粮油食品科技》. 2005, 第 13 卷 (第
06 期), 49-51.

审查员 杨冀川

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/52(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1410771 A, 2003. 04. 16, 说明书第 1 页到

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层
析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明属生物检测领域。快速检测黄曲霉毒
素总量的高灵敏度免疫层析试纸条, 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、金标垫和样品垫, 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和检测线, 所
述检测线包被有黄曲霉毒素 B₁- 牛血清白蛋白偶
联物 (AFB₁-BSA), 质控线包被有兔抗鼠多克隆抗
体; 所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲
霉毒素通用单克隆抗体, 所述抗黄曲霉毒素通用
单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201013 的杂
交瘤细胞株 1C11 产生。该试纸条用于检测黄曲霉
毒素总量, 具有检测快速, 操作简单, 灵敏度高的
特点。

CN 101930006 B

1. 快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条,包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,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和检测线,所述检测线包被有黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物,质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体,所述抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201013 的杂交瘤细胞株 1C11 产生。

2. 根据权利要求 1 所述的快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条,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 所述的快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条,其特征在于:所述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。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测垫上每厘米检测线所需的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为 80 ~ 400ng;每厘米质控线所需的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 所述的快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条,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的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的用量为 48 ~ 144ng。

6. 权利要求 1 或 2 所述的快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:它包括以下步骤:

(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:

将黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物配制成 0.1 ~ 0.5mg/mL 的包被液 A;于距离硝酸纤维素膜上沿为 15 ~ 20mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线,每厘米检测线上所需黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物的包被量为 80 ~ 400ng,然后于 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 0.5mg/mL 的包被液 B;于距检测线 5 ~ 10mm 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,每厘米质控线上所需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°C 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) 金标垫的制备

将玻璃纤维膜放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 37 ~ 40°C 条件下干燥 10 ~ 16 小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液横向进行喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体为 48 ~

144ng,然后真空冷冻干燥 2 ~ 6h,置干燥器中室温保存;

所述的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201013 的杂交瘤细胞株 1C11 产生;

(5) 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,即得快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条;

其中:所述的包被液 A 是按照下述方法配制得到的:将 10 ~ 50mg 市售黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物,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 是按照下述方法配制得到的:将 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;

所述的封闭液 A 是按照下述方法配置得到的:将 1 ~ 2g 牛血清白蛋白,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;

所述的封闭液 B 是按照下述方法配制得到的:将 1 ~ 2g 牛血清白蛋白,0.1 ~ 0.2mL 曲拉通 X-100,0.3 ~ 0.5g 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。

7. 根据权利要求 6 所述的快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,调节溶液 pH 值为 5.5;在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入质量浓度为 10% 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;于 4°C 放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,取上清液,弃沉淀;将上清液 12000r/min 离心 30 min,弃去上清液,加入 50.0mL 标记洗涤保存液;再以 12000r/min 离心 30 min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到 5.0mL 浓缩物,置 4°C 冰箱备用,其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用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是按照下述方法配制得到的:2.0g 聚乙二醇-20000,0.2g 叠氮化钠,0.1235 克硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得。

8. 一种权利要求 1 或 2 所述的快速检测黄曲霉毒素总量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 3g/mL,混匀,在 50 ~ 60°C 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%,得到样品溶液,再取 100 μ L 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的样品垫,其作为检测试纸条,同时取 100 μ L 水做为阴性对照液,逐滴加入另一快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度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;

检测结果:(1) 阳性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线不显色时,或者质控线显示出红色线条,而检测线颜色比对照试纸条检测线颜色浅时,判为阳性,表明待测样品中的黄曲霉毒素总量即黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的总含量高于或等于 0.5ng/g ; (2) 阴性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,并且检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近时,判为阴性结果,表明待测样品中的黄曲霉毒素总量即黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的总含量低于 0.5ng/g ; (3) 无效:当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线显示或不显示红色线条,该试纸条判为无效。

快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度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,具体涉及一种快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度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。黄曲霉毒素(AFT)目前已发现20余种,其中最主要的是黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2。

[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,其污染食品及饲料的环节多、而且多种黄曲霉毒素往往同时存在,为此世界各国都规定了食品及饲料中黄曲霉毒素总量(黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2的总量)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总量的检测、特别是速测,以便及时了解和掌握食品及饲料的卫生信息,是增强食品安全性的一个重要环节。

[0004] 现有技术中常用的黄曲霉毒素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。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。目前已有针对黄曲霉毒素单一组分如黄曲霉毒素B1(AFB1)的快速检测试纸条问世,但是因为绝大多数被黄曲霉毒素污染的样品都不止含有AFB1一种黄曲霉毒素,从而易对检测结果造成干扰或交叉污染,并且市售黄曲霉毒素免疫层析检测试纸条灵敏度相对偏低,检测限为5-200ng/g,不能够很好地满足当前更加严格的黄曲霉毒素限量标准的检测需求。因此,研究建立一种针对黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条对于监控食品和农产品中的黄曲霉毒素具有很重要的意义和应用价值。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是针对上述现有技术存在的不足而提供一种快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条及其制备方法。该试纸条用于检测黄曲霉毒素总量(黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2的总量),具有检测快速,操作简单,灵敏度高的特点。

[0006] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案为:

[0007] 快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条(见图1和图2),包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,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和检测线,所述检测线包被有黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA),质控线包被有兔

抗鼠多克隆抗体；所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体，所述抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201013 的杂交瘤细胞株 1C11 产生。

[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。

[0011] 按上述方案，所述检测垫上每厘米检测线所需的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物 (AFB1-BSA) 的包被量为 80 ~ 400ng；每厘米质控线所需的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；所述金标垫上每厘米喷涂长度所需的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的用量为 48 ~ 144ng。

[0013] 如上所述的快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法，包括以下步骤：

[0014] (1) 吸水垫的制备

[0015] 将吸水纸剪裁即得吸水垫；

[0016] (2) 检测垫的制备

[0017] 检测线的包被：

[0018] 将黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物 (AFB1-BSA) 配制成 0.1 ~ 0.5mg/mL 的包被液 A；于距离硝酸纤维素膜上沿为 15 ~ 20mm 的位置，用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线，每厘米检测线上所需黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物 (AFB1-BSA) 的包被量为 80 ~ 400ng，然后于 37 ~ 40℃ 条件下干燥 8 ~ 20 分钟；

[0019] 质控线的包被：

[0020] 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 5 ~ 10mm 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，每厘米质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 200 ~ 500ng，然后于 37 ~ 40℃ 条件下干燥 8 ~ 20 分钟；

[0021] (3) 样品垫的制备

[0022] 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，然后置干燥器中室温保存。

[0023] (4) 金标垫的制备

[0024] 将玻璃纤维膜放入封闭液 B 中浸湿，取出，于 37 ~ 40℃ 条件下干燥 10 ~ 16 小时，于已干燥的玻璃纤维膜上，用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液横向进行喷涂，每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体为 48 ~ 144ng，然后真空冷冻干燥 2 ~ 6h，置干燥器中室温保存；

[0025] 所述的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201013 的杂交瘤细胞株 1C11 产生；

[0026] (5) 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,即得快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条。

[0028] 按上述方案,所述的包被液 A 是按照下述方法配制得到的:将 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 是按照下述方法配制得到的:将 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 是按照下述方法配置得到的:将 1 ~ 2g 牛血清白蛋白,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] 所述的封闭液 B 是按照下述方法配制得到的:将 1 ~ 2g 牛血清白蛋白,0.1 ~ 0.2mL 曲拉通 X-100,0.3 ~ 0.5g 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。

[0032] 按上述方案,所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液是采用不饱和和标记法制备的,其具体方法为:取 50.0mL 市售质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液,调节溶液 pH 值为 5.5;在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入质量浓度为 10% 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;于 4℃ 放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,取上清液,弃沉淀;将上清液 12000r/min 离心 30min,弃去上清液,加入 50.0mL 标记洗涤保存液;再以 12000r/min 离心 30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到 5.0mL 浓缩物,置 4℃ 冰箱备用,其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.04mg/mL;

[0033] 所述的标记洗涤保存液是按照下述方法配制得到的:2.0g 聚乙二醇-20000,0.2g 叠氮钠,0.1235 克硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22 μm 滤膜过滤所得。

[0034] 如上所述的快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的应用,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 3g/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%,得到样品溶液,再取 100 μL 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度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,逐滴加入另一快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度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;

[0035] 检测结果:(1) 阳性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线不显色时,或者质控线显示出红色线条,而检测线颜色比对照试纸条检测线颜色浅时,判为阳性,表明待测样品中的黄曲霉毒素总量即黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的总含量高于或等于 0.5ng/g。(2) 阴性:当检测试纸条的质控线显示出红色线条,并且检测线颜色与对照试纸

条检测线颜色接近时,判为阴性结果,表明待测样品中的黄曲霉毒素总量即黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的总含量低于 0.5ng/g;(3) 无效:当质控线不显色时,无论检测试纸条的检测线显示或不显示红色线条,该试纸条判为无效。

[0036] 该快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的工作原理:当待测样品溶液加入到试纸条下端的样品垫上时,待测样品溶液通过毛细作用沿试纸条向吸水垫方向移动,当其移动至金标垫时,纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体被溶解。当样品中含有黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 中的一种或多种时,黄曲霉毒素将和金标垫上的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体结合并一同向上泳动,其到达固定着抗原的检测线时,抗原将和黄曲霉毒素竞争结合纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体上有限的抗原结合位点,样品中黄曲霉毒素含量越高,检测线上的抗原能够结合的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体将越少,形成的显色带颜色越浅。当抗原所结合的纳米金标记的少于一定的数量时,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,未被检测线上的抗原截获的纳米金标记的或纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体与黄曲霉毒素的结合物将继续移动到质控线并与质控线上的第二抗体结合并被富集显色,所以样品中不含黄曲霉毒素,即为阴性时为两条红色条带,即质控线和检测线均为红色;含有一定量黄曲霉毒素,即为阳性时有两种情况:1、只出现一条红色质控线,检测线不显色;2、一条红色质控线和一条浅红色检测线;而质控线没有色带出现则表明试纸条失效。

[0037] 本发明的有益效果在于:

[0038] (1) 检测黄曲霉毒素总量。本发明提供的快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条使用的抗体为抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体,因此用于检测黄曲霉毒素总量,实际应用价值大。

[0039] (2) 样品前处理方法简单。样品前处理只需要将提取液加入样品中超声提取 5~10 分钟,然后静置 5~10 分钟,取上清液用水稀释 2.5 倍即可进行检测,整个样品前处理过程简单、快速。

[0040] (3) 操作简单。用该快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条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。

[0041] (4) 检测过程不需要黄曲霉毒素标准溶液作为阳性对照。本发明提供的快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条检测样品时不需要使用黄曲霉毒素标准溶液做为阳性对照,而只需用水做为阴性对照即可,从而避免了黄曲霉毒素的二次污染。

[0042] (5) 灵敏度高。本发明提供的快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条对样品中黄曲霉毒素总量的最低检测限为 0.5ng/g,该检测限小于欧盟对食品中黄曲霉毒素总量的最低限量要求值。

附图说明

[0043] 图 1 为本发明的快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条的正视图。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。

[0044] 图 2 为本发明的快速检测黄曲霉毒素总量的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。

[0045] 图 3 为实施例 2 的的结果判定图。图中 :1 对照试纸条 ;2 检测试纸条 ;3 质控线 ;4 检测线。

[0046] 图 4 为实施例 3 的的结果判定图。图中 :1 对照试纸条 ;2 检测试纸条 ;3 质控线 ;4 检测线。

[0047] 图 5 为实施例 4 的的结果判定图。图中 :1 对照试纸条 ;2 检测试纸条 ;3 质控线 ;4 检测线。

具体实施方式

[0048] 实施例 1 :抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的制备方法

[0049] 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏号为 CCTCC NO. C201013 的杂交瘤细胞株 1C11 产生,其制备方法,包括以下步骤 :

[0050] 1. 动物免疫

[0051] 购买 6 周龄 BALB/c 小鼠 6 只,免疫市售的黄曲霉毒素完全抗原 AFB1-BSA。第一次免疫将黄曲霉毒素完全抗原与等量福氏完全佐剂乳化后,于小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于 4 周后进行,采用福氏不完全佐剂与等量黄曲霉毒素完全抗原乳化,于小鼠腹腔注射。第三次免疫与第二次免疫间隔 4 周,免疫方式与其相同,第四次免疫于第三次免疫 3 周后进行,免疫方式与第二次免疫相同,同样为腹腔注射。4 次免疫剂量相同,均为每鼠 $40 \mu\text{g/mL}$ 。前 3 次每次免疫后 8 天,尾静脉采血,分离血清,采用间接 ELISA 法监测小鼠血清效价。第 4 次免疫后 8 天,尾静脉采血,分离血清,采用间接 ELISA 法监测小鼠血清效价,并用间接竞争 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加强免疫,免疫剂量为之前的 2 倍。

[0052] 黄曲霉毒素完全抗原 AFB1-BSA 购于 Sigma-Aldrich 公司。

[0053] 2. 细胞融合

[0054] 于最后一次加强免疫 3 天后,采用 50% 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 :无菌条件下杀死免疫小鼠,分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞 SP2/0 以 5 : 1 的个数比混合,用 RPMI-1640 基础培养液洗混合细胞,用 50% PEG 融合,融合后 1 分钟加满 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°C 二氧化碳培养箱培养,所述的 RPMI-1640 基础培养液为含有 20% 胎牛血清,2% 生长因子和 1% 次黄嘌呤 - 氨基蝶呤 - 胸腺嘧啶核苷即 HAT。

[0055] 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。

[0056] 3. 细胞株的筛选及克隆

[0057] 待细胞融合后第 12 天左右,细胞集落长到占孔底 1/2 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 ELISA 法筛选出抗黄曲霉毒素而不抗载体蛋白 BSA 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,用黄曲霉毒素 B1, B2, G1 和 G2 共 4 种作为竞争原,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 IC_{50} 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 1C11。

[0058] 4. 抗黄曲霉毒素通用体单克隆抗体的制备、纯化

[0059] 1C11 注射预先用福氏不完全佐剂处理过的 BALB/c 小鼠,收集该小鼠的腹水,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,4℃,12000r/min 离心 15min,吸取上清,将所得腹水上清与 4 倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为 33 μL,室温混合 30min,4℃静置 2h,然后 4℃,12000r/min 离心 30min,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 pH 值为 7.4 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 值至 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,然后 4℃,12000r/min 离心 30min,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,对纯水透析,将充分透析好的蛋白溶液置 -70℃冰箱冷冻,之后用冷冻干燥机冻干,收集冻干粉,即得纯化好的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体,将抗体置 -20℃冰箱中备用;

[0060] 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 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液为 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。

[0061] 5. 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的亚型及特性鉴定

[0062] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株 1C11 分泌的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的亚型为 IgG2a。用间接竞争 ELISA 法鉴定其对黄曲霉毒素 B1,B2,G1 和 G2 的灵敏度分别为 1.2,1.3,2.2 和 18.0pg/mL、交叉反应率分别为 100.0%,94.3%,54.5%和 6.7%。

[0063] 实施例 2-4:快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的制备及应用

[0064] 下述实施例 2-4 使用的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体为实施例 1 制备得到的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体。

[0065] 实施例 2

[0066] 快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0067] (1) 吸水垫的制备

[0068] 将吸水纸剪裁成长 16mm 宽 3mm 的规格,即得吸水垫;

[0069] (2) 检测垫的制备

[0070] 检测线的包被:

[0071] 将黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物 AFB1-BSA 配制成 0.1mg/mL 的包被液 A;于距硝酸纤维素膜上沿 15mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物的包被量为 80ng,然后于 37℃条件下干燥 15 分钟;

[0072] 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,1g 牛血清白蛋白,1g 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,加水定容至 100mL 所得。

[0073] 质控线的包被:

[0074] 将兔抗鼠多克隆抗体配成 0.5mg/mL 的包被液 B；于距检测线 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 15 分钟；

[0075] 所述的包被液 B 为将 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，0.02g 磷酸二氢钾，加水定容至 100mL 所得。

[0076] 所述的硝酸纤维素膜长 25mm，宽 3mm。

[0077] (3) 样品垫的制备：

[0078] 将玻璃纤维膜剪裁成长 13mm 宽 3mm 的规格，放入封闭液 A 中浸湿，取出，于 37℃ 条件下干燥 16 小时，得样品垫，然后置干燥器中室温保存；

[0079] 所述的封闭液 A 为 1g 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，0.02g 磷酸二氢钾，加水定容至 100mL 所得。

[0080] (4) 金标垫的制备：

[0081] 将玻璃纤维膜剪裁成长 9mm 宽 3mm 的规格，放入封闭液 B 中浸湿，取出，于 37℃ 条件下干燥 16 小时，于干燥好的玻璃纤维膜上，用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素总量通用单克隆抗体溶液横向喷涂，每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体为 144ng，然后真空冷冻干燥 6h，置干燥器中室温保存；

[0082] 所述的封闭液 B 为 1g 牛血清白蛋白，0.1mL 曲拉通 X-100，0.3g 聚乙烯吡咯烷酮，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，加水定容至 100mL 所得；

[0083] 所述的纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的，其具体方法为：量取 50.0mL 质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液，用 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节溶液 pH 值为 5.5；在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液，继续搅拌 30min；加入质量浓度为 10% 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；于 4℃ 放置 2h 后，1500r/min 离心 15min，取上清液，弃沉淀；将上清液 12000r/min 离心 30min，弃去上清液，加入 50.0mL 标记洗涤保存液；再以 12000r/min 离心 30min，弃去上清液，将沉淀用标记洗涤保存液重悬，得到 5.0mL 浓缩物，置 4℃ 冰箱备用，其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.04mg/mL；

[0084] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 15nm；

[0085] 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 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液为 1mg 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶解在 10mL 纯水中制成；所述的 10% 牛血清白蛋白水溶液为 10g 牛血清白蛋白溶解在 100mL 纯水中，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 叠氮钠，0.1235 克硼酸，纯水定容至 1000mL，0.22 μm 滤膜过滤所得；

[0086] (5) 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 1mm，即得快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条，见图 1 和图 2。

[0087] 上述快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的应用：

[0088] 称取已磨细 1# 和 2# 待测样品，加入体积浓度为 80% 的甲醇水溶液，待测样品与

甲醇水溶液的质量体积比为 3g/mL,混匀,在 50℃水浴下超声提取 8 分钟,静置 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 32%,得样品溶液,再取 100 μ L 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条(作检测试纸条)的样品垫,同时取 100 μ L 水做为阴性对照液,逐滴加入另一快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条(作对照试纸条)的样品垫,15 分钟后读取结果。

[0089] 检测结果:1# 检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线不显色,则判为阳性结果,表明待测样品中的黄曲霉毒素总量即黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的总含量高于 0.5ng/g,见图 3-1;2# 检测试纸条的质控线显示出红色线条,而检测线颜色比对照试纸条检测线颜色浅,则判为阳性结果,表明待测样品中的黄曲霉毒素总量即黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的总含量高于或等于 0.5ng/g,见图 3-2。

[0090] 实施例 3

[0091] 快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0092] (1) 吸水垫的制备

[0093] 将吸水纸剪裁成长 18mm 宽 4mm 的规格,即得吸水垫;

[0094] (2) 检测垫的制备

[0095] 检测线的包被:

[0096] 将黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物 AFB1-BSA 配制成 0.25mg/mL 的包被液 A;于距硝酸纤维素膜上沿 18mm 的位置,用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物的包被量为 200ng,然后于 38℃条件下干燥 10 分钟;

[0097] 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,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,0.02g 磷酸二氢钾,加水定容至 100mL 所得;

[0098] 质控线的包被:

[0099] 将兔抗鼠多克隆抗体配成 0.5mg/mL 的包被液 B;于距检测线 8mm 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 350ng,然后于 38℃条件下干燥 10 分钟;

[0100] 所述的包被液 B 为将 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,0.02g 磷酸二氢钾,加水定容至 100mL 所得;

[0101] 所述的硝酸纤维素膜长 28mm,宽 4mm。

[0102] (3) 样品垫的制备:

[0103] 将玻璃纤维膜剪裁成长 15mm 宽 4mm 的规格,放入封闭液 A 中浸湿,取出,于 38℃条件下干燥 12 小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0104] 所述的封闭液 A 为 1.5g 牛血清白蛋白,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,0.02g 磷酸二氢钾,加水定容至 100mL 所得;

[0105] (4) 金标垫的制备:将玻璃纤维膜剪裁成长 8mm 宽 4mm 的规格,放入封闭液 B 中浸湿,取出,于 38℃条件下干燥 12 小时,于已干燥的玻璃纤维膜上,用点喷方式将纳米金标记

的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液横向喷涂,每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体为 96ng,然后真空冷冻干燥 4h,置干燥器中室温保存;

[0106] 所述的封闭液 B 为 1.5g 牛血清白蛋白,0.1mL 曲拉通 X-100,0.4g 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,0.02g 磷酸二氢钾,加水定容至 100mL 所得;

[0107] 所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的,其具体方法为:量取 50.0mL 质量浓度为 0.01%的纳米金溶液,用 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节溶液 pH 值为 5.5;在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液,继续搅拌 30min;加入质量浓度为 10%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;于 4℃放置 2h 后,1500r/min 离心 15min,取上清液,弃沉淀;将上清液 12000r/min 离心 30min,弃去上清液,加入 50.0mL 标记洗涤保存液;再以 12000r/min 离心 30min,弃去上清液,将沉淀用标记洗涤保存液重悬,得到 5.0mL 浓缩物,置 4℃冰箱备用,其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.04mg/mL;

[0108] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 17nm;

[0109] 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 μ m 滤膜过滤所得;所述的 0.1mg/mL 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液为 1mg 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶解在 10mL 纯水中制成;所述的 10%牛血清白蛋白溶液为 10g 牛血清白蛋白溶解在 100mL 纯水中,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 叠氮钠,0.1235 克硼酸,纯水定容至 1000mL,0.22 μ m 滤膜过滤所得;

[0110] (5) 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 2mm,即得快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条,见图 1 和图 2。

[0111] 如上所述的快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条的应用:

[0112] 称取已磨细待测样品,加入体积浓度为 70%的甲醇水溶液,待测样品与甲醇水溶液的质量体积比为 3g/mL,混匀,在 55℃水浴下超声波提取 8 分钟,静置 8 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%,得样品溶液,再取 100 μ L 稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条(作检测试纸条)的样品垫,同时取 100 μ L 水做为阴性对照液,逐滴加入另一快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条(作对照试纸条),15 分钟后读取结果。

[0113] 检测结果:检测试纸条的质控线显示出红色线条,并且检测线颜色与对照试纸条检测线颜色接近,判为阴性结果,表明待测样品中的黄曲霉毒素总量即黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的总含量低于 0.5ng/g,见图 4。

[0114] 实施例 4

[0115] 快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0116] (1) 吸水垫的制备

[0117] 将吸水纸剪裁成长 17mm 宽 2mm 的规格,即得吸水垫;

[0118] (2) 检测垫的制备

[0119] 检测线的包被：

[0120] 将黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白的偶联物 AFB1-BSA 配制成 0.5mg/mL 的包被液 A；于距硝酸纤维素膜上沿 20mm 的位置，用点喷方式将包被液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上，得到检测线，每厘米检测线所需的黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白偶联物的包被量为 400ng，然后于 39℃ 条件下干燥 8 分钟；

[0121] 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，2g 牛血清白蛋白，2g 蔗糖，0.04g 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；

[0122] 质控线的包被：

[0123] 将兔抗鼠多克隆抗体配成 0.5mg/mL 的包被液 B；于距检测线 10mm 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℃ 条件下干燥 8 分钟；

[0124] 所述的包被液 B 为将 50mg 兔抗鼠多克隆抗体，0.04g 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；

[0125] 所述的硝酸纤维素膜长 30mm，宽 2mm。

[0126] (3) 样品垫的制备

[0127] 将玻璃纤维膜剪裁成长 17mm 宽 2mm 的规格，放入封闭液 A 中浸湿，取出，于 39℃ 条件下干燥 10 小时，得样品垫，然后置干燥器中室温保存；

[0128] 所述的封闭液 A 为 2g 牛血清白蛋白，5g 蔗糖，0.04g 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。

[0129] (4) 金标垫的制备

[0130] 将玻璃纤维膜剪裁成长 6mm 宽 2mm 的规格，放入封闭液 B 中浸湿，取出，于 39℃ 条件下干燥 10 小时，于已干燥的玻璃纤维膜上，用点喷方式将纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液横向喷涂，每厘米喷涂长度所需纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体为 72ng，然后真空冷冻干燥 3h，置干燥器中室温保存；

[0131] 所述的封闭液 B 为 2g 牛血清白蛋白，0.15mL 曲拉通 X-100，0.5g 聚乙烯吡咯烷酮，5g 蔗糖，0.04g 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；

[0132] 所述纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液是采用不饱和标记法制备的，其具体方法为：量取 50.0mL 质量浓度为 0.01% 的纳米金溶液，用 0.1mol/L 碳酸钾水溶液调节溶液 pH 值为 5.5；在搅拌的状态下缓慢加入 2mL 0.1mg/mL 的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液，继续搅拌 30min；加入质量浓度为 10% 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；于 4℃ 放置 2h 后，1500r/min 离心 15min，取上清液，弃沉淀；将上清液 12000r/min 离心 30min，弃去上清液，加入 50.0mL 标记洗涤保存液；再以 12000r/min 离心 30min，弃去上清液，将沉淀用标记洗涤保存液重悬，得到 5.0mL 浓缩物，置 4℃ 冰箱备用，其中纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶液的质量浓度为 0.04mg/mL；

[0133] 所述纳米金溶液中纳米金的粒径为 20nm；

[0134] 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抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体水溶液为1mg抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体溶解在10mL纯水中制成；所述的10%牛血清白蛋白水溶液为10g牛血清白蛋白溶解在100mL纯水中，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叠氮钠，0.1235克硼酸，纯水定容至1000mL，0.22 μm滤膜过滤所得；

[0135] (5) 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3mm，即得快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条，见图1和图2。

[0136] 如上所述的快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条的应用：

[0137] 称取已磨细1#和2#待测样品，加入体积浓度为60%的甲醇水溶液，待测样品与甲醇水溶液的质量体积比为3g/mL，混匀，在60℃水浴下超声波提取10分钟，静置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%，得到样品溶液，再取100 μL稀释好的样品溶液做为检测液逐滴加入一快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条（作检测试纸条）的样品垫，同时取100 μL水做为阴性对照液，逐滴加入另一快速检测黄曲霉毒素总量的免疫层析试纸条（作对照试纸条）的样品垫，15分钟后读取结果。

[0138] 检测结果：1#检测试纸条的质控线不显色，检测试纸条的检测线显示红色线条，则判为无效，见图5-1；2#检测试纸条的质控线不显色，检测试纸条的检测线亦不显示红色线条，则判为无效，见图5-2。

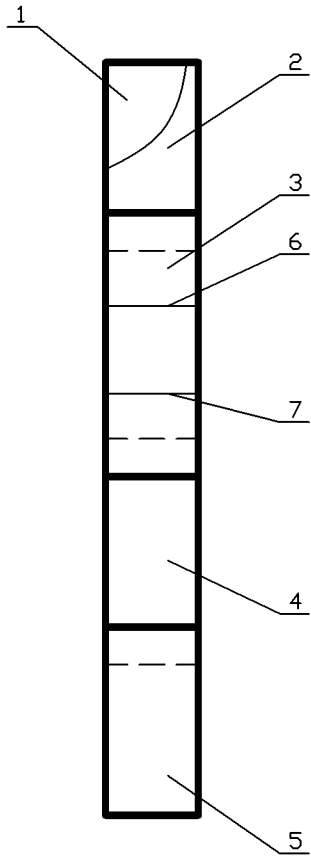


图 1

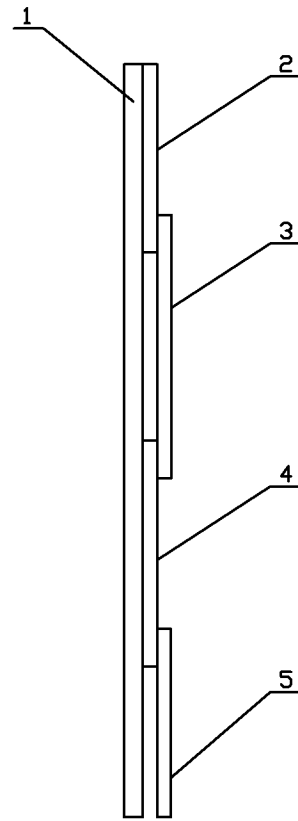
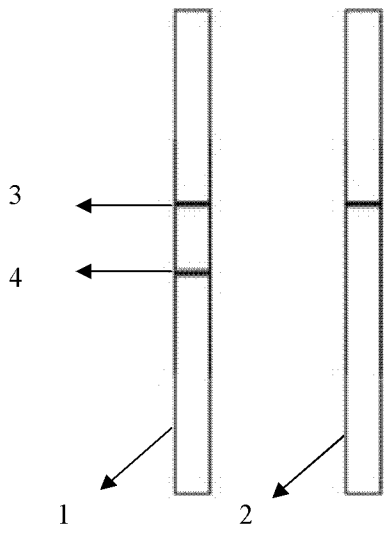
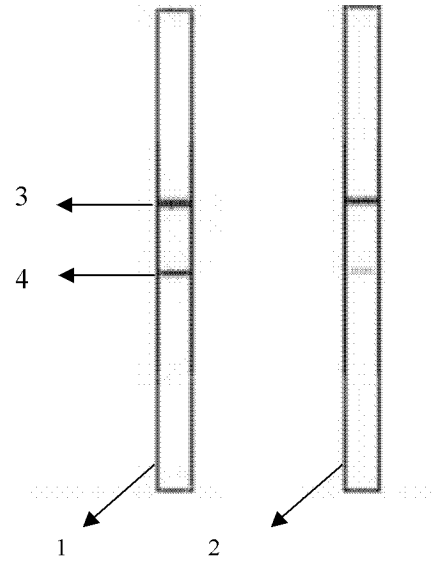


图 2



3-1



3-2

图 3

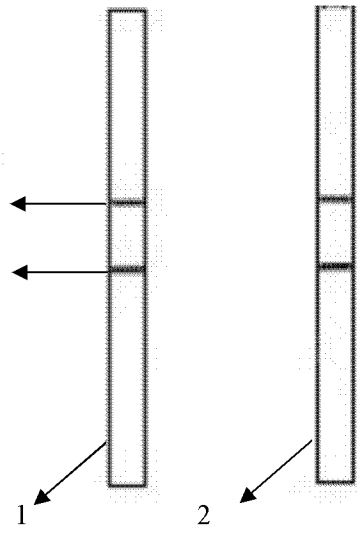


图 4

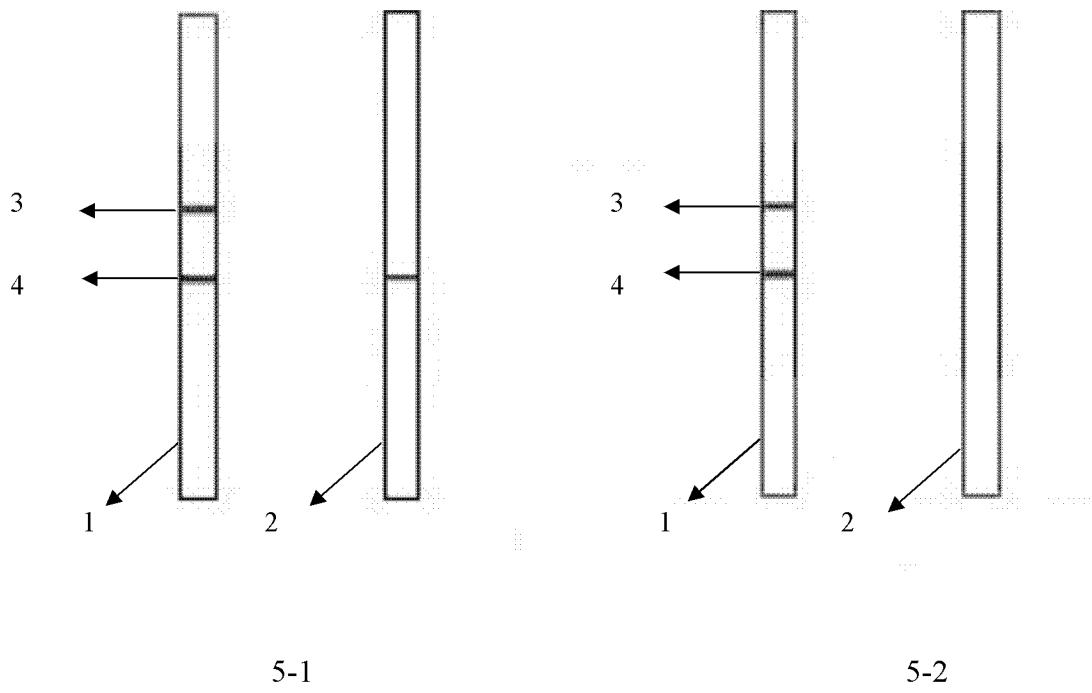


图 5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN101930006B | 公开(公告)日 | 2012-08-22 |
| 申请号 | CN201010245801.6 | 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 | G01N33/577 G01N33/531 G01N33/52 G01N33/558 | | |
| 代理人(译) | 胡建平 | | |
| 其他公开文献 | CN101930006A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明属生物检测领域。快速检测黄曲霉毒素总量的高灵敏度免疫层析试纸条，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、金标垫和样品垫，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和检测线，所述检测线包被有黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物(AFB1-BSA)，质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体；所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体，所述抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11产生。该试纸条用于检测黄曲霉毒素总量，具有检测快速，操作简单，灵敏度高的特点。

