



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110108870 A

(43)申请公布日 2019.08.09

(21)申请号 201910361068.5

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2019.04.30

G01N 33/533(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 张兆威 李培武 张奇 李慧

张文 胡小风

(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3页 说明书11页

序列表2页 附图1页

(54)发明名称

同步检测黄曲霉菌代谢物环匹阿尼酸和黄
曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂
盒

(57)摘要

本发明涉及一种同步检测黄曲霉菌代谢物
环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的免疫层析
量子点荧光微球试剂盒。它包括荧光层析试纸
条,以及含有量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼
酸单克隆抗体和量子点荧光微球标记的抗黄曲
霉毒素单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,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
可用于环匹阿尼酸和黄曲霉毒素的同步检测,操
作简单快速、灵敏度高。

1. 同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,其特征在于:它包括层析试纸条,以及含有量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体和量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中:所述荧光层析试纸条包括底板,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,所述的检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线下方,个数为2条,检测线上分别上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物,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所述的同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,其特征在于:所述抗黄曲霉毒素单克隆抗体为抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体,由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生。

3. 根据权利要求1所述的同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,其特征在于:所述的量子点荧光微球为包埋有油溶性CdSe/ZnS量子点的表面修饰有羧基官能团的多孔聚苯乙烯微球,微球直径2-10 μ m。

4. 根据权利要求1所述的同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,其特征在于:所述量子点荧光微球标记的单克隆抗体是按照以下方法制备得到:

所述量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体将抗环匹阿尼酸单克隆抗体和活化后的量子点荧光微球标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体;1mL活化后的量子点荧光微球标记试剂可偶联抗环匹阿尼酸单克隆抗体:40 μ g-90 μ g;

所述量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体将抗黄曲霉毒素单克隆抗体和活化后的量子点荧光微球标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体;1mL活化后的量子点荧光微球标记试剂可偶联抗黄曲霉毒素单克隆抗体:30 μ g-80 μ g。

5. 根据权利要求4所述的同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,其特征在于:所述量子点荧光微球标记试剂的活化为:量取100-300 μ L量子点纳米球分散于1-5mL 0.1-1mol/L, pH 4-10吗啉乙磺酸缓冲液中,加入50-300 μ L 10-30mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺和20-100 μ L 10-30mg/mL EDC溶液,振荡30-120min。

6. 根据权利要求1所述的同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,其特征在于:所述层析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;所述检测垫上每相邻两条检测线之间的间距为2-3mm,靠近质控线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;

所述的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析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。

7. 根据权利要求1所述的同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,其特征在于:所述层析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;每厘米检测线所需的黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物AFT-BSA的包被量为100~300ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng;所述样品反应瓶中量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为100~200ng,所述样品反应瓶中量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体冻干品的含量为100~300ng。

8. 根据权利要求1所述的同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,其特征在于:所述的层析试纸条的制备方法如下:

(1) 将吸水纸剪裁成16~18mm得吸水垫;

(2) 检测垫的制备:

将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物和黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物配制成浓度为0.2-0.5mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿15~20mm的位置,用线喷方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别间隔包被,得到2条检测线,然后于37-40℃条件下干燥30-60分钟;

将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度为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4-10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

(4) 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、样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1-3mm,即得层析试纸条。

9. 权利要求1所述的量子点荧光微球层析速测试剂盒在环匹阿尼酸和黄曲霉毒素含量检测中的应用,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,插入层析试纸条,37℃反应10分钟后,用荧光测试仪进行检测,获得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;基于预先获得的层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)分别与环匹阿尼酸和黄曲霉毒素浓度的关系曲线,获得待测样品溶液中环匹阿尼酸和黄曲霉毒素的含量,最后经换算即得待测样品中环匹阿尼酸和黄曲霉毒素的含量。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于:应用方法为:所述的层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)分别与环匹阿尼酸和黄曲霉毒素浓度的关系曲线是采用以下方法得到的:

(1) 配制得一系列浓度的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素标准品溶液;

(2) 将适量上述各浓度的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素标准品溶液分别加入到样品反应瓶中,混匀,插入层析试纸条,37℃反应10分钟,用荧光分析仪检测得到各层析试纸条上检测线(T)和质控线(C)的荧光强度值,由此获得各层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C);

(3) 经拟合得到层析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

尼酸和黄曲霉毒素浓度的关系曲线。

同步检测黄曲霉菌代谢物环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染 的量子点荧光微球层析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属生物检测领域,具体涉及一种同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 真菌毒素是产生于有害真菌的一类强毒性的物质,被发现广泛污染我国主要粮油,主要包括稻米、花生、玉米、小麦等。真菌毒素能污染粮油种植、收获、运输、储存过程,进入食物链危及生命健康安全,被世界卫生组织和联合国粮农组织列为食源性疾病的三大根源之首。为了保障粮油质量安全,促进粮油产业高质量发展,我国制定了粮油真菌毒素限量标准(GB 2761-2017)。黄曲霉菌可产生致癌的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素。环匹阿尼酸主要是可致心细胞变性,胞膜通透性增加,神经元坏死等症状;黄曲霉毒素其致癌、致畸、致突变以及免疫抑制作用,已被列为I类致癌物质。随着人们对食品安全要求的提高,需要加强农产品中真菌毒素的检测,开发安全、可靠的检测技术,提高我国食品安全水平。

[0003] 真菌毒素的检测方法包括薄层层析法、精密仪器分析法和免疫检测法。早期真菌毒素检测常用薄层层析法,该法操作易行,可广泛使用,但其试剂用量大、其它组分干扰严重、准确性差,不能准确定量,且对实验人员和周围环境污染危害较大,不适于现场快速检测。精密仪器分析法主要包括液相色谱-质谱联用法和高效液相色谱法,这些方法灵敏度高,准确性好,但又有仪器昂贵,要求真菌毒素样品纯化程度高,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能同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒及其应用。该量子点荧光微球层析试剂盒可用于样品中环匹阿尼酸和黄曲霉毒素含量的同步检测,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,本发明所采用的技术方案为:

[0006] 同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,它包括层析试纸条,以及含有量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体和量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体冻干品的样品反应瓶层析试纸条,其中:所述荧光层析试纸条包括底板,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,所述的检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线下方,个数为2条,检测线上分别上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物,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。

[0007] 按上述方案,所述抗黄曲霉毒素单克隆抗体为抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体,由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生。

[0008] 按上述方案,所述的量子点荧光微球为包埋有油溶性CdSe/ZnS量子点的表面修饰有羧基官能团的多孔聚苯乙烯微球,微球直径2-10 μ m。其激发波长365nm,发射波长520-620nm。其是采用溶胀法将油溶性的CdSe/ZnS量子点通过疏水作用包埋进表面修饰有羧基官能团的多孔聚苯乙烯微球。

[0009] 按上述方案,所述量子点荧光微球标记的单克隆抗体是按照以下方法制备得到:

[0010] 所述量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体将抗环匹阿尼酸单克隆抗体和活化后的量子点荧光微球标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体;1mL活化后的量子点荧光微球标记试剂可偶联抗环匹阿尼酸单克隆抗体:40 μ g-90 μ g。

[0011] 所述量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体将抗黄曲霉毒素单克隆抗体和活化后的量子点荧光微球标记试剂在硼酸缓冲液中溶解、振荡反应,然后经离心、复溶、封闭步骤得到目标产物量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体;1mL活化后的量子点荧光微球标记试剂可偶联抗黄曲霉毒素单克隆抗体:30 μ g-80 μ g。

[0012] 按上述方案,所述量子点荧光微球标记试剂的活化为:量取100-300 μ L量子点纳米球分散于1-5mL 0.1-1mol/L, pH 4-10吗啉乙磺酸缓冲液中,加入50-300 μ L 10-30mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺和20-100 μ L 10-30mg/mL EDC溶液,振荡30-120min。

[0013] 按上述方案,上述配制好的量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、量子点荧光微球标记的黄曲霉毒素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 8.2的磷酸缓冲液中备用,使用时,将其放入样品反应瓶中,置于冷冻干燥机中冻干,得到各量子点荧光微球标记的单克隆抗体冻干品,备用。

[0014] 按上述方案,所述层析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;所述检测垫上每相邻两条检测线之间的间距为2-3mm,靠近质控线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。

[0015] 按上述方案,所述层析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;每厘米检测线所需的黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物AFT-BSA的包被量为100~300ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100~300ng。

[0016] 按上述方案,所述样品反应瓶中量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为100~200ng,所述样品反应瓶中量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体冻干品的含量为100~300ng。

[0017] 按上述方案,所述的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析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。

[0018] 按上述方案,所述的层析试纸条的制备方法如下:

[0019] (1) 将吸水纸剪裁成16~18mm得吸水垫;

[0020] (2) 检测垫的制备:

[0021] 将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物和黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物配制成浓度为0.2~0.5mg/mL的包被液,于距硝酸纤维素膜上沿15~20mm的位置,用线喷方式将其于硝酸纤维素膜上进行分别间隔包被,得到2条检测线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;

[0022] 将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度为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;

[0023] (3) 样品垫的制备:

[0024] 将玻璃纤维膜放入封闭液中浸湿,取出,于37~40℃条件下干燥4~10小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0025] (4) 层析试纸条的组装:

[0026] 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,即得量子点荧光微球层析试纸条;

[0027] 按上述方案,所述层析试纸条的制备中配制环匹阿尼酸-卵清蛋白的偶联物包被液和黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物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;

[0028] 配制兔抗鼠多克隆抗体包被液中所使用的包被缓冲液为:每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;

[0029] 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;

[0030] 上述量子点荧光微球层析速测试剂盒在环匹阿尼酸和黄曲霉毒素含量检测中的应用: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,插入层析试纸条,37℃反应10分钟后,用荧光测试仪进行检测,获得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;基于预先获得的层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)分别与环匹阿尼酸和黄曲霉毒素浓度的关系曲线,获得待测样品溶液中环匹阿尼酸和黄曲霉毒素的含量,最后经换算即得待测样品中环匹阿尼酸和黄曲霉毒素的含量。

[0031] 按上述方案,所述的层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)分别与环匹阿尼酸和黄曲霉毒素浓度的关系曲线是采用以下方法得到的:

[0032] (1) 配制得一系列浓度的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素标准品溶液;

[0033] (2) 将适量上述各浓度的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素标准品溶液分别加入到样品反应瓶中,混匀,插入层析试纸条,37℃反应10分钟,用荧光分析仪检测得到各层析试纸条上检测线(T)和质控线(C)的荧光强度值,由此获得各层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C);

[0034] (3) 经拟合得到层析试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与环匹阿尼酸和黄曲霉毒素浓度的关系曲线。

[0035] 量子点由于自身纳米尺寸表面能较大,常常引发团簇和荧光猝灭,容易发生能量转移;因其胶质层容易被侵蚀,导致缺陷能级,形成非辐射跃迁通道,造成量子点荧光衰退;

本发明提供的以高聚物为介质包埋量子点的荧光量子点微球避免了上述不足,一方面降低了检测体系对量子点的猝灭作用,显著增加了免疫层析稳定性和检测重现性;每个量子点微球内包埋量子点多,可达2000-8000个,远高于单个量子点,实现了检测信号放大。并配合特异性好,灵敏度高的单克隆抗体,提供的同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒,用于环匹阿尼酸和黄曲霉毒素的检测,简单,快速,灵敏度高(对环匹阿尼酸的最低检测限为0.09ng/mL,对黄曲霉毒素的最低检测限为0.007ng/mL)。

[0036] 本发明的有益效果:

[0037] (1) 快速、同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素。本发明提供的量子点荧光微球层析试剂盒能在一条试纸条上实现对环匹阿尼酸和黄曲霉毒素的同步、快速检测,使用的抗体均为单克隆抗体,特异性好、灵敏度高,各真菌毒素的检测之间无干扰,简单、快速。

[0038] (2) 灵敏度高。本发明提供的量子点荧光微球层析试剂盒对检测溶液中对环匹阿尼酸的最低检测限为0.09ng/mL,对黄曲霉毒素的最低检测限为0.007ng/mL,能满足欧盟对食品中的限量要求。

附图说明

[0039] 图1为本发明提供的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素量子点荧光微球层析速测试剂盒中层析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、6、黄曲霉毒素检测线。

具体实施方式

[0040] 实施例1:抗环匹阿尼酸单克隆抗体的获得

[0041] 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:

[0042] 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;

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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%。

[0046] 杂交瘤细胞株YTT-2的筛选:

[0047] 1. 抗原合成及动物免疫

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 2. 细胞融合

[0051] 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:

[0052] 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。

[0053] 3. 细胞株的筛选及克隆

[0054] 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。

[0055] 抗环匹阿尼酸单克隆抗体杂交瘤细胞株YTT-2抗体可变区序列测定

[0056] (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。

[0057] (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;

[0058] (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)。

[0059] 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。

[0060] 实施例2: 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体的获得

[0061] 抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201013的杂交瘤细胞株1C11分泌产生, 具体根据申请号201010245095.5的专利中报道的方法预先制得, 制备方法为: 将获得的杂交瘤细胞株1C11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, 纯化处理后获得抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体。其中, 纯化方法为辛酸-硫酸铵法, 具体操作为: 将腹水从-20℃冰箱拿出室温解冻。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, 即得纯化好的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体, 将抗体置-20℃冰箱中备用;

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 实施例3:同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒及其应用

[0065] 同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染量子点荧光微球层析试剂盒,包括层析试纸条、含有量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸素单克隆抗体冻干品、量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素通用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。所述的层析试纸条如图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,所述的检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线4和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线下方,个数为2条,检测线上分别上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物和黄曲霉毒素B1-牛血清白蛋白偶联物,为环匹阿尼酸检测线5、和黄曲霉毒素检测线6,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。

[0066] 制备方法:

[0067] 层析试纸条的制备:

[0068] (1)吸水垫的制备

[0069] 将吸水纸剪裁成长16mm,宽4mm的规格,得吸水垫;

[0070] (2)检测垫的制备

[0071] 检测线的包被

[0072] 将环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.2mg/mL的包被液,于硝酸纤维素膜上沿15m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I,每厘米检测线I所需包被抗原的包被量为100ng;将黄曲霉毒素-牛血清白蛋白的偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.2mg/mL的包被液,于距检测线I2mm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II,每厘米检测线II所需包被抗原的包被量为100ng;然后于37℃条件下干燥60min;

[0073] 质控线的包被;

[0074] 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I 5mm的位置,用线喷方式将其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100ng,然后于37℃条件下干燥60min;

[0075] 所述的包被液为: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;

[0076] (3)样品垫的制备:

[0077] 将玻璃纤维膜剪裁成长10mm,宽4mm的规格,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;

[0078] 所述的封闭缓冲液为: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;

[0079] (4)层析试纸条的组装:

[0080] 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1mm,即得层析试纸条;

[0081] 所述的样品反应瓶的获得:

[0082] 采用EDC-NHS法偶联量子点微球和环匹阿尼酸抗体。将10mg量子点荧光微球加入到5mL,2-(4-吗啉)乙磺酸(0.05mol/L,pH 5.5)缓冲液中入,混匀并在15000r/min下离心15分钟,弃上清液;加入15mg/mL的EDC和NHS溶液,37℃振荡反应1小时后,20000r/min下离心15分钟,沉淀加入1mL4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(0.1mol/L,pH 7.4)重悬。将环匹阿尼酸抗体加入到上述溶液中,37℃反应2小时,然后加入含有10%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液封闭2小时,之后复溶于含1.5%(m/v)海藻糖、2%(m/v)牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中,4℃储存,备用。

[0083] 采用EDC-NHS法偶联量子点微球和黄曲霉毒素抗体。将10mg量子点荧光微球加入到5mL,2-(4-吗啉)乙磺酸(0.05mol/L,pH 5.5)缓冲液中入,混匀并在15000r/min下离心15分钟,弃上清液;加入15mg/mL的EDC和NHS溶液,37℃振荡反应1小时后,20000r/min下离心15分钟,沉淀加入1mL4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(0.1mol/L,pH 7.4)重悬。将黄曲霉毒素抗体加入到上述溶液中,37℃反应2小时,然后加入含有10%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液封闭2小时,之后复溶于含1.5%(m/v)海藻糖、2%(m/v)牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中,4℃储存,备用。

[0084] 各取一定量上述复溶于含1.5%(m/v)海藻糖、2%(m/v)牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中的量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体、量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体,放入样品反应瓶中,置于冷冻干燥机中冻干。样品反应瓶中量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为100ng,所述样品反应瓶中量子点荧光微球标记的黄曲霉毒素单克隆抗体冻干品的含量为100ng。

[0085] 所述同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒在玉米样品中环匹阿尼酸和黄曲霉毒素含量检测中的应用:

[0086] 配制空白基质溶液:称取已磨细的阴性玉米样品5g,加入体积浓度为70%的甲醇水溶液,玉米样品和甲醇水溶液的质量体积比为4g/mL,混匀,涡旋震荡提取30分钟,离心取上清,将上层清液即提取液用水稀释3倍,使稀释液中甲醇的终体积浓度为23.3%,得到空白基质溶液。

[0087] 用上述得到的空白基质溶液配置环匹阿尼酸和黄曲霉毒素分别对应为以下浓度梯度的环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合标准品溶液6个。环匹阿尼酸浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL;黄曲霉毒素浓度分别为0ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.25ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL。标准溶液每个浓度重复5次,用上述量子点荧光微球层析试剂盒进行检测:将上述标准品溶液150μL加入样品反应瓶中,混匀,插入层析试纸条,37℃反应6分钟后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用荧光分析仪检测(检测波长:365nm,测定波长:615nm),读取检测区域的荧光信号强度值,质控线荧光强度的比值(T/C),计算5次重复平均值;分别以环匹阿尼酸和黄曲霉毒素标准品浓度为横坐标,各浓度标准品溶液相应的检测线与质控线荧光强度的比值即T/C为纵坐标,拟合得到关系曲线。标准曲线公式如 $Y=a*\ln c+b$,3种检测对象的标准曲线参数如下表所示:

[0088]

	A	B	R ²	检测限/ng/mL
环匹阿尼酸	-1.381	2.498	0.990	0.09
黄曲霉毒素	-1.521	3.631	0.982	0.007

[0089] 称取已磨细的待测玉米样品5g,加入体积浓度为70%的甲醇水溶液,待测玉米样品和甲醇水溶液的质量体积比为4g/mL,混匀,涡旋震荡提取30分钟,离心取上清,将上层清液即提取液用水稀释3倍,使稀释液中甲醇的终体积浓度为23.3%,得到待测样品溶液。

[0090] 取待检玉米样品检测液150μL加入样品反应瓶中,混匀,插入层析试纸条,37℃反应6min后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用荧光免疫分析仪检测(激发波长:365nm,测定波长:615nm),获得各层析试纸条3条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C),然后将其分别代入上述得到的层析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、黄曲霉毒素浓度的关系曲线,得该玉米样品中的环匹阿尼酸含量为2.1 μg/kg、黄曲霉毒素含量为5.5 μg/kg。

[0091] 实施例6:同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素浓度混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒及其应用

[0092] 同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素浓度混合污染量子点荧光微球层析试剂盒,包括层析试纸条、含有量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品、含有量子点荧光微球标记的黄曲霉毒素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、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为3mm,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线位于质控线下方,个数为2条,检测线上分别上包被环匹阿尼酸-卵清蛋白偶联物和黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物,为环匹阿尼酸检测线、和黄曲霉毒素检测线,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。

[0093] 制备方法:

[0094] 层析试纸条的制备:

[0095] (1)吸水垫的制备

[0096] 将吸水纸剪裁成长18mm,宽4mm的规格,得吸水垫;

[0097] (2)检测垫的制备

[0098] 检测线的包被

[0099] 将黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物用包被缓冲液配制成浓度为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I,每厘米检测线I所需包被抗原的包被量为300ng;将环匹阿尼酸-卵清蛋白的偶联物用包被缓冲液配制成浓度为0.5mg/mL的包被液,于距检测线I3mm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II,每厘米检测线II所需包被抗原的包被量为400ng;然后于37℃条件下干燥120min;

[0100] 质控线的包被;

[0101] 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I 10mm的位置,用线喷方式将其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37℃条件下干燥120min;

[0102] 所述的包被液为: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;

[0103] (3) 样品垫的制备:

[0104] 将玻璃纤维膜剪裁成长12mm,宽4mm的规格,放入封闭液中浸湿,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;

[0105] 所述的封闭缓冲液为: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;

[0106] (4) 层析试纸条的组装:

[0107] 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3mm,即得层析试纸条;

[0108] 所述的样品反应瓶的获得:

[0109] 采用EDC-NHS法偶联量子点荧光微球和环匹阿尼酸抗体。将10mg量子点荧光微球加入到5mL,2-(4-吗啉)乙磺酸(0.05mol/L,pH 5.5)缓冲液中入,混匀并在15000r/min下离心15分钟,弃上清液;加入15mg/mL的EDC和NHS溶液,37℃振荡反应1小时后,20000r/min下离心15分钟,沉淀加入1mL4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(0.1mol/L,pH 7.4)重悬。将环匹阿尼酸抗体加入到上述溶液中,37℃反应2小时,然后加入含有10%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液封闭2小时,之后复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中,4℃储存,备用。

[0110] 采用EDC-NHS法偶联量子点荧光微球和黄曲霉毒素抗体。将10mg量子点荧光微球加入到5mL,2-(4-吗啉)乙磺酸(0.05mol/L,pH 5.5)缓冲液中入,混匀并在15000r/min下离心15分钟,弃上清液;加入15mg/mL的EDC和NHS溶液,37℃振荡反应1小时后,20000r/min下离心15分钟,沉淀加入1mL4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(0.1mol/L,pH 7.4)重悬。将黄曲霉毒素抗体加入到上述溶液中,37℃反应2小时,然后加入含有10%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液封闭2小时,之后复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中,4℃储存,备用。

[0111] 各取一定量上述复溶于含1.5% (m/v) 海藻糖、2% (m/v) 牛血清白蛋白的0.01mol/L pH 8.2的磷酸缓冲液中的量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体、量子点荧光微球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,备用。样品反应瓶中量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体冻干品的含量为200ng,所述样品反应瓶中量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素通用单克隆抗体冻干品的含量为300ng。

[0112] 所述同步检测环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒在玉米样品中环匹阿尼酸和黄曲霉毒素浓度含量检测中的应用:

[0113] 取经高效液相色谱确认的含多种毒素的玉米样品,环匹阿尼酸含量为2.9μg/kg,黄曲霉毒素含量为3.4μg/kg。

[0114] 称取已磨细的上述玉米样品5g,加入体积浓度为70%的甲醇水溶液,玉米样品和甲醇水溶液的质量体积比为4g/mL,混匀,涡旋震荡提取30分钟,离心取上清,将上层清液即提取液用水稀释3倍,使稀释液中甲醇的终体积浓度为23.3%,得到待测玉米样品检测液。

[0115] 取待检玉米样品检测液150μL加入样品反应瓶中,混匀,插入层析试纸条,37℃反

应6min后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用荧光免疫分析仪检测(激发波长:365nm,测定波长:615nm,获得各层析试纸条3条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C),然后将其分别代入上述得到的层析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、黄曲霉毒素浓度浓度浓度的关系曲线,得该玉米样品中的环匹阿尼酸含量为3.2 μ g/kg、黄曲霉毒素含量为3.1 μ g/kg。

<110> 中国农业科学院油料作物研究所

<120> 同步检测黄曲霉菌代谢物环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微
球层析试剂盒

<160> 4

<210> 1

<211> 360bp

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

```
gagatccagc tgcagcagtc tggacctgac ctgatgaagc ctggggcttc 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 gtagctggtt 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

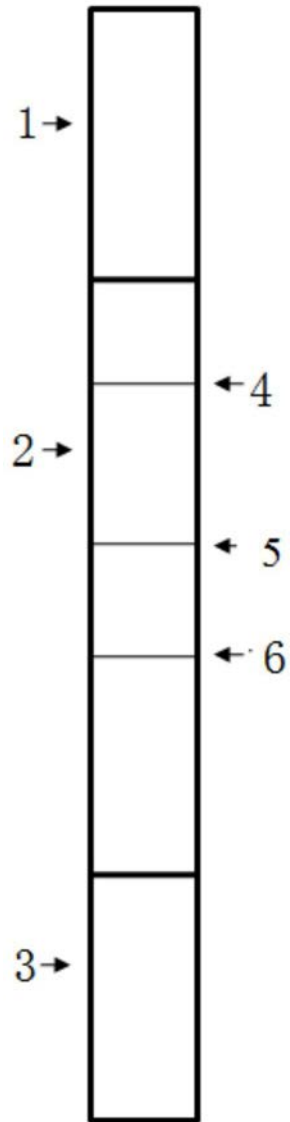


图1

专利名称(译)	同步检测黄曲霉菌代谢物环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的量子点荧光微球层析试剂盒		
公开(公告)号	CN110108870A	公开(公告)日	2019-08-09
申请号	CN201910361068.5	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	张兆威 李培武 张奇 李慧 张文 胡小风		
发明人	张兆威 李培武 张奇 李慧 张文 胡小风		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/582 G01N33/585 G01N33/588		
代理人(译)	乔宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种同步检测黄曲霉菌代谢物环匹阿尼酸和黄曲霉毒素混合污染的免疫层析量子点荧光微球试剂盒。它包括荧光层析试纸条，以及含有量子点荧光微球标记的抗环匹阿尼酸单克隆抗体和量子点荧光微球标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体冻干品的样品反应瓶，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。其可用于环匹阿尼酸和黄曲霉毒素的同步检测，操作简单快速、灵敏度高。

