

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910090038.1

[43] 公开日 2009年12月23日

[11] 公开号 CN 101609091A

[22] 申请日 2009.7.29

[21] 申请号 200910090038.1

[71] 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100025 北京市朝阳区高碑店北路甲3号

[72] 发明人 王静 王景林 聂聪 杨宇
孙肖红 高姗 胡孔新 张晓龙

[74] 专利代理机构 北京中创阳光知识产权代理有限公司

代理人 尹振启

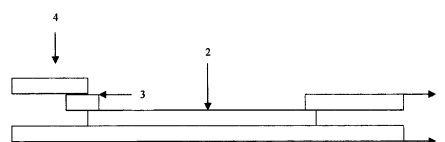
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

[54] 发明名称

一种新的快速定性和定量检测蓖麻毒素的胶体金免疫层析方法

[57] 摘要

本发明利用胶体金标记和双抗体夹心免疫层析技术，建立蓖麻毒素的快速检测方法，建立的检测蓖麻毒素的胶体金免疫层析方法，能快速、灵敏、特异、准确地检测样品中的蓖麻毒素，并可实现定量，适用于现场快速检测。



1、一种方便、快捷地检测蓖麻毒素的方法，其中包括将待测标本与样品稀释液混匀，再将样品混合液加入试纸样品孔处，样品中的液体依靠虹吸作用上行，10-15分钟判读结果；所述检测试纸包括：

(1) 反应支持物；

(2) 吸水垫；

(3) 硝酸纤维膜，该膜包被有重组蓖麻毒素 A 链抗体和质控抗体的检测条带和质控条带；

(4) 金标抗体保护膜，其中含有胶体金标记的重组蓖麻毒素 A 链抗体；

(5) 样品垫；

其中反应支持物为 PCV 板，吸水垫为滤油纸，硝酸纤维膜依次包被羊抗鼠 IgG、兔抗重组蓖麻毒素 A 链多克隆抗体 1mg/ml，金标抗体保护膜为含有胶体金标记的鼠抗重组蓖麻毒素 A 链多克隆抗体玻璃纤维膜或聚脂膜或滤纸纤维，样品垫选用玻璃纤维膜或聚脂膜或滤纸纤维。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中所述检测试纸的构成为：反应支持物 (5) 位于底层，硝酸纤维膜 (2) 位于反应支持物 (5) 上的中部，该膜的 T 处是蓖麻毒素 RCA Sigma 检测条带，并且 C 处是羊抗鼠 IgG 包被的质控条带；金标抗体保护膜 (3) 位于硝酸纤维膜上部的一侧并与之部分重叠，该膜含有胶体金标记的蓖麻毒素兔抗 ricin A 多克隆抗体；吸水垫 (1) 位于硝酸纤维膜 (2) 上部的相对于金标抗体保护膜 (3) 而言的另一侧并与硝酸纤维膜 (2) 部分重叠，样品垫 (4) 位于硝酸纤维膜 (2) 上与吸水垫 (1) 相反的一侧并与金标抗体保护膜 (3) 部分重叠。

3、根据权利要求 2 所述的方法，吸水垫一侧为起始端，样品垫一侧为末端，蓖麻毒素 RCA Sigma 的检测条带位于接近末端，羊抗鼠 IgG 包被的质控条带接近于起始端。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述质控抗体根据金标抗体的免

疫源可选羊抗鼠 IgG。

5、根据权利要求1所述的方法，其中，所述兔抗重组蓖麻毒素 A 链多克隆抗体标记 1ml 胶体金的量为 8-15 ug。

6、根据权利要求1所述的方法，其中，所述鼠抗重组蓖麻毒素 A 链多克隆抗体的标金浓度为 12ug /ml，用 5mM PB 稀释，PH 值为 8.2。

7、一种权利要求 1-6 任一项所述方法中的炭疽芽孢杆菌的检测试纸的制备方法，该方法包括：

(1) 用隔流喷金划线机以一定喷膜速度喷涂抗蓖麻毒素抗体和质控抗体两个条带的硝酸纤维膜；

(2) 制备一种含有胶体金标记的抗重组蓖麻毒素抗体的金标抗体保护膜，将胶体金标记的抗重组蓖麻抗体均匀涂布在玻璃纤维膜上，并烘干或冷冻干燥，制成金标抗体保护膜。

8、根据权利要求7所述的制备方法，其中，在喷涂包被膜的步骤中，喷膜速度优选是 10-100mm/s；所述兔抗重组蓖麻毒素 A 链多克隆抗体，其加入量为 1-5mg/ml，该多克隆抗体的稀释液可以为 5mM PBS；根据权利要求8所述的制备方法，其中，质控羊抗鼠 IgG 的浓度为 0.1-5 mg/ml。

9、根据权利要求8所述的制备方法，其中，将胶体金标记的兔抗重组蓖麻毒素 A 链多克隆抗体均匀涂布在玻璃纤维膜上，其中 pH 为 7-9。

10、由权利要求 7-9 任一项所述的方法制备的检测蓖麻毒素的试纸。

一种新的快速定性和定量检测蓖麻毒素的 胶体金免疫层析方法

技术领域

本发明属于生物检测领域，具体涉及蓖麻毒素的检测快速定性和定量检测方法以及胶体金免疫检测试纸条。

背景技术

蓖麻毒素 (ricin toxin, RT) 是一种从蓖麻种子的胚乳中提取的植物蛋白毒素。由于 RT 来源广泛，毒性较强，已被外军作为武器化的一种毒素加以研究。禁止化学和生物武器公约把 RT 列为最严格的控制对象之一。自美国“9.11”恐怖袭击之后，随着多个恐怖组织和极端分子研制、拥有并携带 RT 惊现英国首都伦敦，使这种致命的毒素成为最有可能被用作恐怖袭击的生物毒素，而引起国际上的广泛关注。为应对生物恐怖，开展对 RT 的检测研究具有十分重要的意义。

蓖麻毒素自发现之日起，其毒性就被人们所知，到目前位置文献报道蓖麻毒素中毒病例已超过 750 例，人们对它的研究就一直没有停止过。其中最著名的“马克夫毒伞案”中，叛逃到英国的保加利亚作家马克夫，就是被保加利亚特工用前苏联装有 RT 的特制雨伞毒杀的近代，欧美国家开始将 RT 用作常规武器进行研制。同时，作为生物恐怖战剂，RT 的获得又极其容易、廉价。根据检出结果分析，研制的蓖麻胶体金试纸条检测系统最低可检测到 1ug/ml，而人致死量约为 7mg。试纸条的灵敏度完全能检测到可疑物中是否含有蓖麻毒素的存在，检验的可行性。可以先从蓖麻种子中获得粗毒，然后利用其对半乳糖的特殊亲和力，采用琼脂糖 4B 柱吸附，用半乳糖洗脱，再用纤维素离子交换柱层析或葡聚糖凝胶过滤进一步纯化；或是根据常规基因工程技术，利用基因克隆的方法来制备 RT。由于气溶胶化的 RT 微粒无色无味，不易被发现，因此侦检非常困难。

最初是用动物实验测定 RT 的毒性和定量检测。现阶段根据 RT 所具有的理化特性、生化特性和免疫原性发展出多种检测方法，其中以免疫

检测法为主。免疫检测法多是依赖于抗原抗体反应的免疫学方法，包括多克隆和（或）单克隆抗体为基础的放射免疫法或酶联免疫吸附法（ELISA），免疫层析试验和电化学发光生物传感器，其中 ELISA 法是国际规定的检测 RT 的金标准[14]。此类方法具有高效、灵敏、样品用量少（ $\text{pmol}-\mu\text{pmol}$ ）、自动化等特点，但缺陷是需要昂贵的仪器设备，且周期长、操作繁琐等缺点，并不适合广泛应用，只适合在实验室应用。

本发明提供一种快速定性和定量检测蓖麻毒素的胶体金免疫层析方法，该方法操作简单，检测时间短，无需专业人员，适合快速现场检测。

发明内容

本发明提供一种快速定性和定量检测蓖麻毒素的胶体金免疫层析方法。本发明采用胶体金标记，实质是抗体蛋白等生物大分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。

胶体金对蛋白质的吸附主要取决于 pH 值和蛋白质的最小稳定浓度，离子浓度和蛋白质分子量等也影响二者之间的吸附。本发明发现在胶体金检测试纸条的制备过程中 pH 值条件是关键，因为胶体金是一种很不稳定的胶体，而 pH 值条件对胶体金探针的影响最大。通常认为，在 pH 值等于蛋白质等电点或较高于等电点时吸附效果最好，易形成牢固的复合物而稳定胶体金。我们将胶体金标记技术应用于免疫层析法时要根据实验需要，选择不同直径大小的胶体金颗粒，来保证较高的灵敏度和稳定性。一般做胶体金检测试纸条用的胶体金颗粒在 20nm 到 50nm 之间。过大可见度高，但稳定性不是很好；过小又影响敏感性。在本发明中尝试过使用 25nm 和 40nm 的胶体金，在对不同的检测对象中使用。例如参见：王俊红，康林。“蓖麻毒素及其检测”，中国检验卫生杂志，2007 年 2 月第 17 卷第 2 期。胶体金颗粒大小对检测试纸条的影响很大，而它的颗粒大小要靠还原剂来调节。具体是氯金酸在还原剂如：柠檬酸三钠、枸橼酸钠等作用下，聚合成特定大小的金颗粒。利用它在碱性环境中带负电荷的性质，与蛋白质的正电荷基团借静电吸引而形成牢固结合。用于标记的蛋白质多为抗体，我们选用纯化的抗体作为金标的标记蛋白。另外，在喷膜时，抗体需要加入封闭剂，如果不加在检测阴性时会出现非特异性，喷膜完毕应立即将 NC 膜放入烘箱以免 T、C 线发生扩散。

本发明的目的是提供一种方便、快捷地检测蓖麻毒素的试纸，同时可利用金标免疫分析仪进行的半定量检测方法。该试纸的工作原理是利用特异性抗原-抗体的结合，用胶体金标记抗体，与待检抗原结合后，使与试纸上结合的捕获抗体显色。本发明还涉及制备上述检测试纸的制备方法。

本发明能够基于一份标本和一个试纸，快速方便地检测出标本中的蓖麻毒素，节省了大量人力物力，方便、快速、简捷。

一种方便、快捷地检测蓖麻毒素的方法，其中包括将待测标本与样品稀释液混匀，再将样品混合液加入试纸样品孔处，样品中的液体依靠虹吸作用上行，10-15分钟判读结果；所述检测试纸包括：

- (1) 反应支持物；
- (2) 吸水垫；
- (3) 硝酸纤维膜，该膜包被有重组蓖麻毒素 A 链抗体和质控抗体的检测条带和质控条带；
- (4) 金标抗体保护膜，其中含有胶体金标记的重组蓖麻毒素 A 链抗体；
- (5) 样品垫；

其中反应支持物为 PCV 板，吸水垫为滤油纸，硝酸纤维膜依次包被羊抗鼠 IgG、兔抗重组蓖麻毒素 A 链多克隆抗体 1mg/ml，金标抗体保护膜为含有胶体金标记的鼠抗重组蓖麻毒素 A 链多克隆抗体玻璃纤维膜或聚脂膜或滤纸纤维，样品垫选用玻璃纤维膜或聚脂膜或滤纸纤维。

本发明方法中涉及的蓖麻毒素的检测试纸，其中吸水垫、硝酸纤维膜、金标抗体保护膜、样品垫和反应支持物按照附图 1 所示方式构成；反应支持物 5 位于底层，硝酸纤维膜 2 位于反应支持物 5 上的中部，该膜的 T 处是蓖麻毒素 RCA Sigma 检测条带，并且 C 处是羊抗鼠 IgG 包被的质控条带；玻璃纤维膜 3 位于硝酸纤维膜上部的一侧并与之部分重叠，该膜含有胶体金标记的蓖麻毒素兔抗 ricin A 多克隆抗体；吸水垫 1 位于硝酸纤维膜 2 上部的相对于玻璃纤维膜 3 而言的另一侧并与 2 部分重叠。样品垫 4 位于 2 上与 1 相反的一侧并与 3 部分重叠。

本发明方法中涉及的蓖麻毒素的检测试纸，以吸水垫一侧为起始端，样品垫一侧为末端，蓖麻毒素 RCA Sigma 的检测条带位于接近末端，羊

抗鼠 IgG 包被的质控条带接近于起始端。

本发明再一个目的是提供制备所述检测蓖麻毒素的试纸的方法，该方法包括以下步骤：胶体金探针的制备，金标垫的制备，硝酸纤维膜的喷涂包被。

1、胶体金探针的制备

(1) 将HAuCl₄先配制为0.01%水溶液。磁力搅拌下准确加入1 ml 1%的HAuCl₄，同时加入1.5-3ml 1%的柠檬酸三钠水溶液。颜色稳定后继续加热，冷却至室温后加纯水补足至100 ml，4 °C避光保存。

(2) 用K₂CO₃调PH值为约7-9，优选为约7.8-8.9，更优选约8.2-8.5。

(3) 将胶体金调至pH 8.2-8.5，用 5 mM PB (pH 7.2) 稀释抗体至0.2 mg/ml。

(4) 保持胶体金稳定。

本发明还在于提供一种获得维持胶体金稳定的抗体最佳标记剂量的方法，该方法包括：

a. 取10 支洁净的1.5 ml离心管，分别加入胶体金溶液1ml。

b. 在1-10 号管内分别加入10 ml、20 ml、30 ml、40 ml、50ml、60 ml、70 ml、80 ml、90 ml、100 ml的PBS，再依次加入稀释好的0.2 mg/ml的待标记抗体90 ml、80 ml、70 ml、60 ml、50 ml、40 ml、30 ml、20 ml、10 ml、0 ml，混匀，静置2分钟。

c. 在10个管内分别加入10% NaCl 溶液100 ml，混匀后室温静置2小时，观察颜色变化。

未加抗体及加入量不足以稳定胶体金的试管中的液体颜色呈现由红变蓝的变化，而加入抗体量达到或超过最低稳定剂量的试管则保持红色不变。与对照管（1号管）相比，颜色最接近、含抗体剂量最低的试管所含的抗体剂量，即为1 ml 胶体金所必须的抗体稳定剂量，在此基础上再加20%抗体，即为抗体最佳标记剂量。本发明经过反复试验和分析，得出的结果表明：维持胶体金溶液适宜抗体量为2-10ug，优选抗体量5-9ug，更优选6.2-8.2ug，最优选为7.2ug。

2、金标垫的制备

取上述 pH 的胶体金以 1ml/管分装于 1.5 ml 的离心管中。每支管中加入 3-8 ug 标记剂量，优选抗体量 4-6 ug，更优选 4.5-5.5 ug，最优

选为 5ug 的抗体，轻摇混匀后放置。每管中加入 10%的 BSA100 ul，混匀放置。将上面初步制得的胶体金探针在 12000 rpm、4℃下离心 30 分钟，弃上清液。每支离心管中加入 1 ml 重悬液悬浮沉淀后同上离心。弃上清液，管底得到暗红色的疏松状沉淀，加入 500 ul 重悬液重悬后于 4℃，1000 rpm，离心 10 分钟；取上清液，均匀滴加在 1cm 宽的玻璃纤维上，37℃干燥。

3、硝酸纤维膜的喷涂包被

(1) 利用隔流喷金划线机以 50mm/s 的喷膜速度包被检测蓖麻毒素 RCA Sigma 和质控羊抗兔 IgG 两个条带的硝酸纤维膜；

在该喷涂包被膜的步骤中，喷膜速度优选是 10 - 100mm/s，更优选是 45 - 55mm/s，最优选是 50mm/s；所述蓖麻毒素 RCA Sigma，其加入量为 1-5mg/ml，该多克隆抗体的稀释液可以为 PB；质控羊抗鼠 IgG 可以购自鼎国生物技术公司，其浓度为 0.1-5 mg/ml 更优选是 0.5-2.5 mg/ml，最优选为 1mg/ml；

(2) 制备一种含有胶体金标记的蓖麻毒素兔抗 ricin A 多克隆抗体的玻璃纤维膜，将胶体金标记的蓖麻毒素兔抗 ricin A 多克隆抗体均匀涂布在玻璃纤维膜上。抗体用 PB 稀释，pH 为 7-9，优选 7.5-9，最适 PH 值为 8.5。

本发明还公开了所述试纸在检测蓖麻毒素型中的应用，参见附图 2。

在本发明检测蓖麻毒素的方法中，先将待测标本放入装有稀释液的小瓶内，再用移液器将样品混合液加入试纸“4”处（即末端），样品中的液体依靠虹吸作用上行，一般需 10-15 分钟判读结果：

如标本中含有蓖麻毒素，则它将与试纸上胶体金标记的蓖麻毒素 RCA Sigma 形成相应的复合物，液体展开上行并与硝酸纤维膜上的蓖麻毒素 RCA Sigma 结合，形成红色线条，即在“T”处形成红色条带。

无论是否含有相对应的抗原，胶体金标记多克隆抗体继续随液体继续上行并与该膜上的羊抗鼠 IgG 形成红色沉淀线，即在“C”处形成红色条带。此线是质控线，如胶体金失效，此线就不会出现，说明试纸失效。如图 5 所示。

阳性结果会出现 2 条红色沉淀线，阴性结果出现 1 条红色沉淀线，如不出现线条说明试纸失效。如若肉眼无法辨别 T 处红色条带，可利用金标

免疫分析仪进行半定量检测。

本发明的技术方案是：采用蓖麻毒素RCA Sigma多克隆抗体、和羊抗鼠IgG分别固相于硝酸纤维膜上，结合胶体金标记的蓖麻毒素兔抗ricin A多克隆抗体，应用膜层析双抗体夹心法的原理检测标本中的蓖麻毒素。

本发明还提供一种将胶体金测试条与胶体金生物传感器有机整合的胶体金定量检测系统。运用胶体金测试条判读仪的优势在于，判读仪能够在人眼无法正确识别可疑物检测是否存在阳性的情况下，正确判读该试纸条检测结果。减少了因人为主观判读带来的错误率，增加了客观性、准确性；并且可实现定量检测。此外，胶体金判读仪携带方便、使用简单、判定准确、结果客观、易保留，为检验工作带来了方便。

本发明采用兔抗蓖麻毒素 A 抗体 (RTA2-G)、兔抗 SEB 抗体，其可以由军事医科院微生物流行病学研究所提供，所用的蓖麻毒素抗体 (RCA) 可购自美国 Sigma 公司，所用的羊抗兔 IgG 可购自鼎国生物技术公司。

本发明所述的方法和产品中使用层析测试条耗材，耗材例如是玻璃纤维的结合垫，硝酸纤维素膜(例如 NC 膜, SHF 1350225)，样品垫及吸水垫、滤纸，可购自 Minipore 公司。

本发明涉及的上述蓖麻毒素的检测试纸，它还包含金标抗体保护膜。

本发明涉及的上述蓖麻毒素的检测试纸，其中反应支持物选用 PVC 板。

本发明涉及的上述蓖麻毒素的检测试纸，其中吸水垫选用滤纸。

本发明涉及的上述蓖麻毒素的检测试纸，其中金标抗体保护膜选用聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维。

附图说明

图 1 是蓖麻毒素胶体金免疫层析试纸条的目测敏感性。1-7 分别表示检测的样品浓度依次为空白对照、0.4625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.925 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

图 2 为特异性检测试验。1 表示蓖麻毒素，2 表示 BSA，3 表示胰蛋白胍，4 表示牛奶，5 表示相思子，6 表示相思子毒素，7 表示空白对照。

图 3 为蓖麻毒素胶体金免疫层析试纸条稳定性检测；其中 1 表示蓖麻毒素 1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，2 表示 BSA，3 表示胰蛋白胍，4 表示空白对照。

图 4A 是本发明试纸的正面示意图;图 4B 本发明试纸的侧面示意图。其中,图 4A 和图 4B: 1: 吸水垫; 2: 硝酸纤维膜, T: 包被兔抗蓖麻毒素 A 多克隆抗体检测条带; C: 包被羊抗鼠 IgG 的质控条带; 3: 含有胶体金标记鼠抗重组相思子毒素 A 链多克隆抗体多克隆抗体的玻璃纤维膜; 4: 样品垫; 5: 反应支持物。

图 5 是本发明的检测结果示意图; T、C 两条线阳性; C 一条线阴性; 无效。

具体实施方式

实施例 1: 胶体金免疫层析试纸条的制备

材料和方法

1、抗原及抗体

兔抗 ricin A 抗体 (RTA2-G)、兔抗 SEB 抗体由军事医科院微生物流行病学研究所提供。蓖麻毒素抗体 (RCA) 购自美国 Sigma 公司。羊抗兔 IgG (购自鼎国生物技术公司)

2、层析测试条耗材

结合垫(玻璃纤维)、硝酸纤维素膜 (NC 膜, SHF 1350225)、样品垫及吸水垫、滤纸购自 Minipore 公司。

3、实验仪器

金标免疫分析仪可购自中国科学院上海光学精密机械研究所、中国检验检疫科学研究院联合研制的分析仪。

4、胶体金免疫层析试纸条的制备

4.1 胶体金结合垫

将 pH 值 8.0~8.5、浓度 0.2mg/ml 的蓖麻毒素兔抗 ricin A 多克隆抗体标记于柠檬酸钠法制备 25nm 的胶体金颗粒的胶体金颗粒, 37°C 干燥 [7]。

4.2 硝酸纤维素膜

检测带: RCA Sigma 2mg/ml +1.5%BSA; 质控带: 羊抗鼠 IgG: 1mg/ml, 37°C 干燥(参见文献: Olsens S. "The history of ricin, abrin and related toxins" *Toxicon*, 2004, 44 (4): 361-370; 王景林. "麻毒素生物恐怖及其医学防护" *科技导报*, 2003, 7: 35-37; Patocka J. *Abrin and ricin: two*

dangerouspoisonousproteins. available at
<http://www.asabktr.cin/newsletter/01-4/article>
m/Abrin&RicinRev.pdf; Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, et al.
Preparation and characterization of Au colloid monolayers [J].
Anal Chem, 1995, 67: 735-743)。

4.3 组装

将样品垫、结合垫、吸水垫依次贴在带有豁合剂的底衬卡，切成 0.4cm 的条，干燥，装壳，室温贮存备用（参见上述文献）。

实施例 2: 样品的定性和定量检测的判定

1、样品的处理

用样品处理液（5mM PB pH7.4）将火腿肠、奶粉、牛奶等粘稠液体样品进行梯度稀释，火腿肠等固体食品按 1/100（W/V）加入样品处理液溶解，静止取上清，静止取上清。分别添加不同剂量的蓖麻毒素作为模拟检测样品。

2 定性检测

将处理后的样品和样品处理液（作为阴性样品）100ul 加到制备好的层析条样品垫端，静置 15min，观察结果。检测带和质控带均出现红色判为阳性，仅质控带出现红色为阴性，检测带和质控带均不显色，则为试纸条失效。

3、定量检测

3.1 判定值（CUT-OFF）的确定

按 1.6.1 将阴性样品检测 20 次，用金标免疫分析仪扫描读取信号 T/C 比值。20 个样品 T/C 比值的平均值（AVERAGE）与 3 倍标准差（STDEVA）之和为 CUT-OFF 值。

3.2 定量检测判定

将显色后的金标条放入金标免疫分析仪扫描，读取信号 T/C 比值，大于判定值为阳性。

实施例 3: 灵敏度试验

1、定量检测的灵敏度

检测不同浓度蓖麻毒素，经过计算判定值 (CUT-OFF) 为 0.037，浓度为 0.925 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蓖麻毒素的平均 T/C 比值分别为的值均高于 0.037 结果为阳性；当蓖麻毒素浓度大于 103cfu/ml 时，T/C 比值平均值大于 0.037，故定量检测灵敏度为 0.925 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

表 1 蓖麻毒素胶体金免疫层析试纸条各浓度检测结果

样品浓度	检测值 T (V) 质控值 C (V)				T/C		T/C 平	结果 判 读
	T1	T2	C1	C2	T/C1	T/C2		
0	0.011	0.007	1.1	1.101	0.01	0	0	-
0.925 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.128	0.013	0.550	0.723	0.23	0.01	0.012	+
1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.026	0.022	0.67	0.416	0.03	0.04	0.035	+
3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.025	0.026	0.523	0.522	0.04	0.05	0.05	+
7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.032	0.033	0.617	0.554	0.05	0.06	0.055	+
14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.054	0.056	0.729	0.680	0.07	0.08	0.075	+

2、直观检测灵敏度评价

按确定的最佳反应条件制备胶体金免疫层析试纸条，检测不同浓度的蓖麻毒素。将蓖麻毒素用样品处理液稀释成浓度依次为浓度依次为 14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.925 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.4625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，同时进行检测。

结果如图 1 所示，直接目测的灵敏度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 显色更加清晰。

3、样品实用性检测

火腿肠 50 mg、奶粉 50 mg、牛奶 250 μl ，分别加入到 1 ml 蓖麻毒素的样品稀释液中，混匀，静置 10 min，再取 1 份天然毒素，用 PB2 倍系列稀释进行检测。试纸条检测模拟污染样品试验的结果表明，该试纸条检测食品中模拟污染的蓖麻毒素仍然能检测到 1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

实施例 4：特异性试验

按确定的最佳反应条件制备胶体金免疫层析试纸条，以样品稀释液同样分别处理金 BSA、胰蛋白胍、奶粉、相思子、相思子毒素、蓖麻天然

毒素,以制备好的胶体金免疫层析试纸条检测,并与同样菌数的蓖麻毒素样品对照,同时检测空白对照。结果如图2所示,该检测试纸条对于这些蛋白及毒素均无非特异现象出现,对蓖麻毒素特异性检测效果良好。

实施例5: 标准曲线拟合

以浓度为横坐标,以 T/C 比值为纵坐标拟合曲线为,拟合标准曲线(参见图2)。

检测蓖麻毒素各个浓度下,经计算判定值(CUTOFF)为0.037的T/C读值。可见小于0.925 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为阴性,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 线性关系良好,拟合曲线见图2。线性方程为: $y = 0.003x + 0.037$; $R^2 = 0.9861$ 。

实施例6: 回收率试验

在线性检测范围内,检测已知浓度的蓖麻毒素,根据金标分析仪读值 T/C 比值和标准曲线计算出检测浓度,检测浓度与理论浓度的比值百分率为回收率。由表2可见,以蓖麻浓度浓度14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和T/C值根据拟合曲线方程来计算回收率,可见3.7~14.8之间回收率在96%~117%之间,理论浓度1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时回收率较低。

表2 蓖麻毒素胶体金免疫层析试纸条检测系统回收率

信号值 T/C	理论浓度值	检测值	回收率
0.08	14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	14.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$	96.8%
0.06	7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	7.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$	103.6%
0.05	3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$	117.1%
0.04	1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	54.1%

实施例7: 稳定性试验

参见图3,取在37 $^{\circ}\text{C}$ 放置的蓖麻毒素胶体金检测试纸条进行检测,第7d的检测结果可见蓖麻毒素测试条的稳定性良好,在37 $^{\circ}\text{C}$ 放置7d后仍能特异性的检出蓖麻毒素,而且敏感性也未下降。和新制备的检测试纸条相比,灵敏度没有明显下降,且特异性良好。

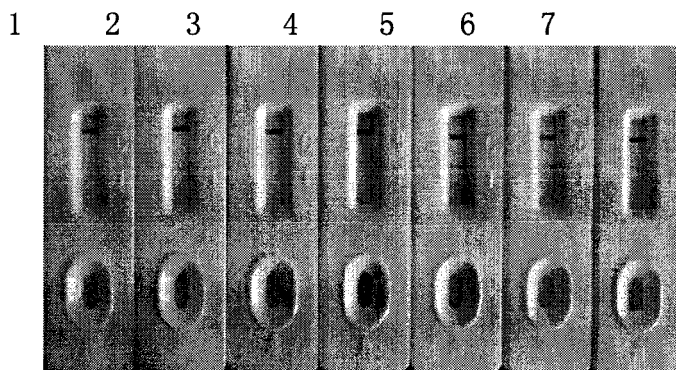


图 1

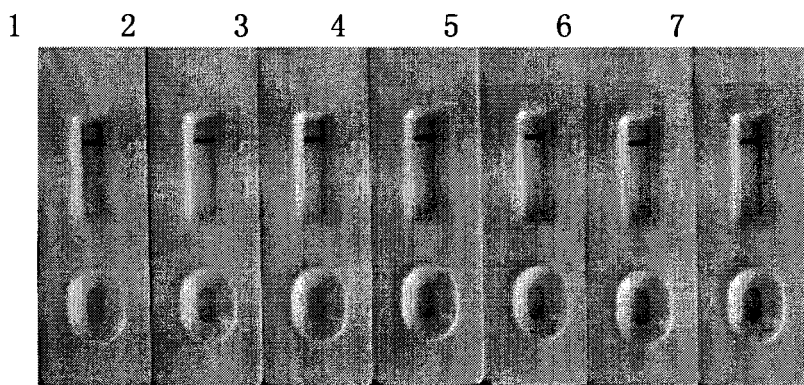


图 2

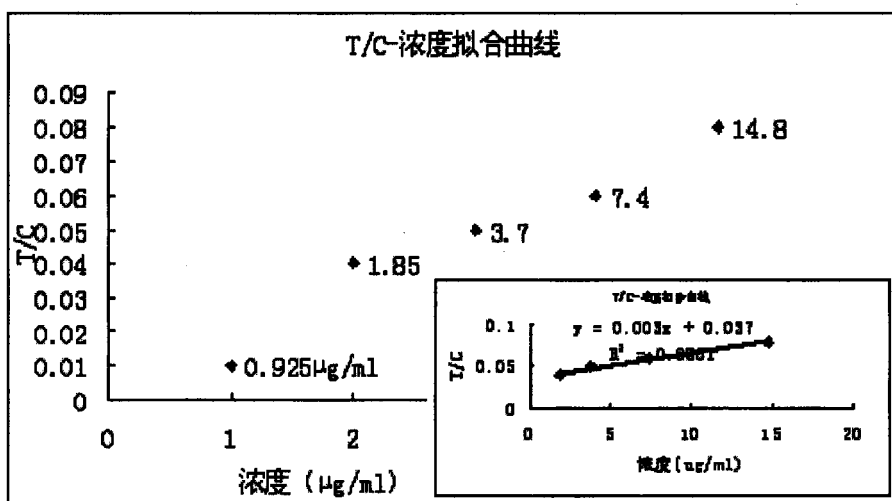


图 3

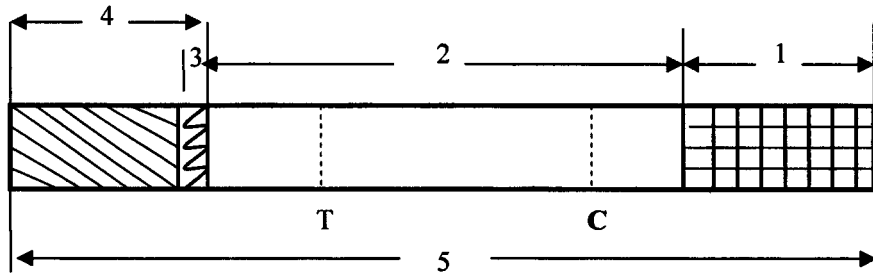


图 4A

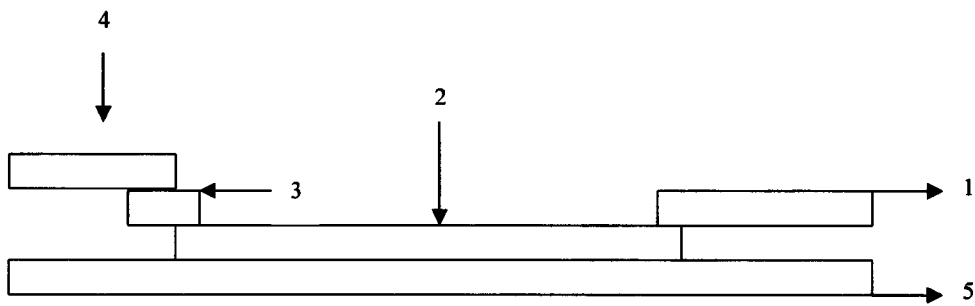


图 4B

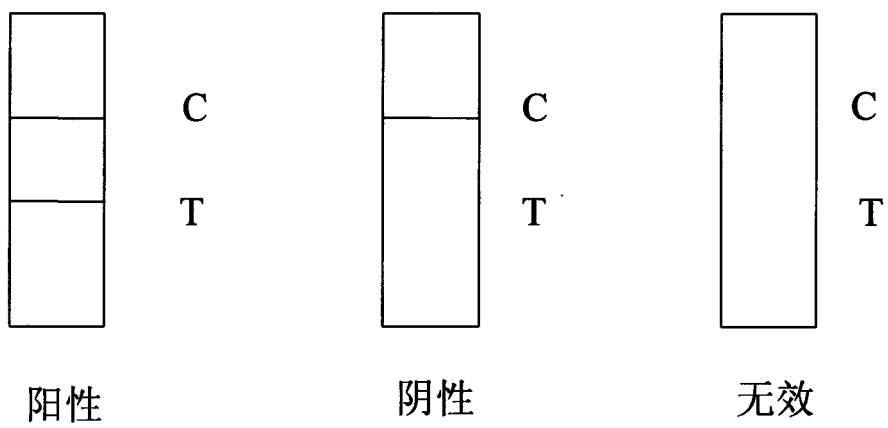


图 5

专利名称(译)	一种新的快速定性和定量检测蓖麻毒素的胶体金免疫层析方法		
公开(公告)号	CN101609091A	公开(公告)日	2009-12-23
申请号	CN200910090038.1	申请日	2009-07-29
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	王静 王景林 聂聪 杨宇 孙肖红 高姗 胡孔新 张晓龙		
发明人	王静 王景林 聂聪 杨宇 孙肖红 高姗 胡孔新 张晓龙		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/532 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明利用胶体金标记和双抗体夹心免疫层析技术，建立蓖麻毒素的快速检测方法，建立的检测蓖麻毒素的胶体金免疫层析方法，能快速、灵敏、特异、准确地检测样品中的蓖麻毒素，并可实现定量，适用于现场快速检测。

