



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103792358 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201210435166. 7

(22) 申请日 2012. 11. 05

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国
家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 王永美

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

黄曲霉毒素 G1 胶体金免疫层析检测板制备
及检测方法

(57) 摘要

本发明是一种可半定量测试饲料中黄曲霉毒素 G1 的胶体金免疫层析检测板,属于生物及食品安全领域。其特征在于:外壳内包括一条试纸条,试纸条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,所述检测板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(C 线)和检测线(T 线),所述检测线包被有黄曲霉毒素 G1-牛血清白蛋白偶联物 (AFG1-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 G1 单克隆抗体。检测板用于检测黄曲霉毒素 G1,具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

1. 黄曲霉毒素 G1 胶体金免疫层析检测板,其特征在于:外壳内包括一条试纸条,试纸条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;金标垫:用胶体金和黄曲霉毒素 G1 抗体结合制成金标抗体;结合过程:将 50 mL 浓度为 1×10^{-4} g/mL 的氯金酸溶液加热到沸腾,然后迅速加入 1.5 mL 柠檬酸三钠,继续加热搅拌反应 15 min 得到胶体金溶液,然后将抗体溶液以 1:1 体积比的比例逐滴加入到胶体金溶液中,边加边搅拌,反应 5 min 后,即得到金标抗体溶液,将制备好的金标抗体调成 $A_{540}=1.0$ 的浓度,均匀分散在玻璃纤维滤膜上,自然干燥后即为金标垫备用;所用检测板为:用划膜仪对硝酸纤维素膜进行检测试剂线性包被,下端横线包被黄曲霉毒素 G1 抗原 AFG1-BSA,浓度为 0.5 mg/mL 为检测线,上端横线包被羊抗鼠 IgG,浓度为 1 mg/mL 为控制线,包被检测线和质控线后的硝酸纤维素膜自然干燥后用 0.1 mol/L 的 BSA 的 pH 7.4 的 PBS 溶液浸泡 30 min 进行封闭处理,干燥后备用;将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫四部分依次相互叠加粘贴于试剂板上,以一定宽度切条后即为黄曲霉毒素 G1 半定量速测检测板。

2. 根据权利要求 1 所述的黄曲霉毒素 G1 免疫层析检测板的制备方法,其特征在于: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(T线)的包被:

将黄曲霉毒素 G1-牛血清白蛋白的偶联物配制成 0.5 mg/mL 的溶液 A;于距离硝酸纤维素膜上沿为 10-15 mm 的位置,用自动划膜仪将溶液 A 横向包被于硝酸纤维素膜上得到检测线,检测线上所需黄曲霉毒素 G1-牛血清白蛋白的偶联物 (AFG1-BSA) 的包被量为 215 ng/cm,然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 5 ~ 20 min;

质控线(C线)的包被:

将兔抗鼠多克隆抗体配制成 1 mg/mL 的溶液 B;于距检测线 5 ~ 10 mm 的位置,用自动划膜仪将溶液 B 横向包被于硝酸纤维素膜上,得到质控线;质控线上所需兔抗鼠多克隆抗体的包被量为 300 ng/cm,然后于 37 ~ 40°C 条件下干燥 5 ~ 20 min;

(3) 金标垫的制备

用胶体金和黄曲霉毒素 G1 抗体结合制成金标抗体,结合过程为:将 50 mL 浓度为 1×10^{-4} g/mL 的氯金酸溶液加热到沸腾,然后迅速加入 1.5 mL 柠檬酸三钠,继续加热搅拌反应 15 min 得到胶体金溶液,然后将抗体溶液以 1:1 体积比的比例逐滴加入到胶体金溶液中,边加边搅拌,反应 5 min 后,即得到金标抗体溶液,将制备好的金标抗体调成 $A_{540}=1.0$ 的浓度,分散在玻璃纤维滤膜上,自然干燥后即为金标垫备用;

(4) 检测板的组装

选用与上述试纸条相匹配的检测卡外壳,将试纸条置入卡壳内,样品垫正对加样孔,硝酸纤维素膜正对检测窗口。

3. 如权利要求 1 所述方法制备的黄曲霉毒素 G1 半定量速测检测板的应用方法,其特征是:

直接提取法(可测 30 μ g/kg 的饲料)

(1) 将饲料、谷物、麦芽样品进行粉碎以使 75% 的样品可以通过 20 目筛,样品的大小颗

粒与速溶咖啡相当；

(2) 称取 3.0 g 粉碎好的样品,加入 9 mL 样品提取液(提取液配制:50 mL 甲醇+50 mL 水,加 4 g 氯化钠混匀即得样品提取液,可按需配置),充分搅拌混合(10 min);

(3) 静置 20 min 后轻轻吸取上清液,按 1:1 比例与样本稀释液混合均匀后进行样品检测;

烘干 / 吹干处理法(可测 20 μ g/kg 的饲料)

(1) 将饲料、谷物、麦芽样品进行粉碎以使 75% 的样品可以通过 20 目筛,样品的大小颗粒与速溶咖啡相当;

(2) 称取 3.0 g 粉碎好的样品,加入 9 mL 样品提取液(提取液配制:先用 20 mL 水将加 4 g 氯化钠溶解,再加入 80 mL 甲醇,即得样品提取液,可按需配置),充分搅拌混合(3 min),静置 20 min;

(3) 轻轻吸取上清液 1 mL,放于 110℃ 烘箱中烘干(约 1 h)或 50 ~ 60℃ 水浴氮气吹干,用 0.5 mL 10% 甲醇充分溶解后即可进行样品检测。

黄曲霉毒素 G1 胶体金免疫层析检测板制备及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属生物及食品安全检测技术领域,具体涉及一种黄曲霉毒素 G1 胶体金检测板的制备及其检测方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(Aflatoxins)是生长在食物及饲料中的黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉代谢的一组化学结构类似的产物。黄曲霉毒素是一种毒性极强的剧毒物质,对人及动物肝脏组织有破坏作用,严重时,可导致肝癌甚至死亡。其中黄曲霉毒素 B1 致癌性和毒性最强。黄曲霉毒素 G1 的毒性仅此于黄曲霉毒素 B1。对人类和动物的健康有着非常严重的危害。

[0003] 各国对黄曲霉毒素在食品中的残留限量均有规定。1995 年,世界卫生组织制定的食品中黄曲霉毒素最高允许浓度为 $15 \mu\text{g/kg}$ 。美国联邦政府相关法律规定人类消费食品和奶牛饲料中的黄曲霉毒含量不能超过 $15 \mu\text{g/kg}$,其他动物饲料中的含量不能超过 $300 \mu\text{g/kg}$ 。中国规定,玉米及花生仁制品(按原料折算)中黄曲霉毒含量不超过 $20 \mu\text{g/kg}$ 。大米、其他食用油中不得超过 $10 \mu\text{g/kg}$,其他粮食、豆类、发酵食品中不得超过 $5 \mu\text{g/kg}$,婴儿代乳食品中不得检出,其他食品可参照以上标准执行。

[0004] 目前测定黄曲霉毒素的方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附测定法、质谱法、放射免疫测定法。这些检测方法在不同时期发挥了很好的作用,但具有样品前处理步骤繁琐,耗时费力,仪器价格昂贵,需要专业人员操作等的缺点,而胶体金免疫层析法具有特异性强、样品前处理简单、成本低、对实验人员和环境的污染危害小并且可同时对大量样本进行检测等优点。是一种可适用于大型养殖场、饲料厂等的快速检测产品。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种黄曲霉毒素 G1 半定量速测胶体金检测板的制备与使用方法,为实现饲料中黄曲霉毒素 G1 的快速检测开辟了广泛的应用前景。

[0006] 本发明的技术方案:一种黄曲霉毒素 G1 半定量速测检测板的制备方法,检测板由外壳、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫四部分组成;金标垫为:用胶体金和黄曲霉毒素 G1 抗体结合制成金标抗体,结合过程为:将 50 mL 浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$ 的氯金酸溶液加热到沸腾,然后迅速加入 1.5 mL 柠檬酸三钠,继续加热搅拌反应 15 min 得到胶体金溶液,然后将抗体溶液以 $1:1$ 体积比的比例逐滴加入到胶体金溶液中,边加边搅拌,反应 5 min 后,即得到金标抗体溶液,将制备好的金标抗体调成 $A_{540} = 1.0$ 的浓度,分散在玻璃纤维滤膜上,自然干燥后即为金标垫备用;所用检测板为:用自动划膜仪对硝酸纤维素膜进行检测试剂线性包被,下端横线包被黄曲霉毒素 G1 抗原 AFG1-B SA,浓度为 0.5 mg/mL 为检测线,上端横线包被羊抗鼠 IgG,浓度为 1 mg/mL 为控制线,包被检测线和控制线后的硝酸纤维素膜自然干燥后用 0.1 mol/L 的 BSA 的 $\text{pH } 7.4$ 的 PBS 溶液浸泡 30 min 进行封闭处理,干燥后备用;将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫四部分依次相互叠加粘贴于试剂板

上,以一定宽度切条后即为黄曲霉毒素 G1 半定量速测检测板。

[0007] 所制备的黄曲霉毒素 G1 半定量速测检测板的应用方法:

直接提取法:将饲料、谷物、麦芽样品进行粉碎以使 75% 的样品可以通过 20 目筛,样品的大小颗粒与速溶咖啡相当。称取 3.0 g 粉碎好的样品,加入 9 mL 样品提取液(提取液配制:50 mL 甲醇+50 mL 水,加 4 g 氯化钠混匀即得样品提取液,可按需配置),充分搅拌混合(10 min),静置 20 min 后轻轻吸取上清液,按 1:1 比例与样本稀释液混合均匀后进行样品检测(此法可测 30 μ g/kg 的饲料);

烘干 / 吹干处理法:将饲料、谷物、麦芽样品进行粉碎以使 75% 的样品可以通过 20 目筛,样品的大小颗粒与速溶咖啡相当。称取 3.0 g 粉碎好的样品,加入 9 mL 样品提取液(提取液配制:先用 20 mL 水将加 4 g 氯化钠溶解,再加入 80 mL 甲醇,即得样品提取液,可按需配置),充分搅拌混合(3 min),静置 20 min,轻轻吸取上清液 1 mL,放于 110℃ 烘箱中烘干(约 1 h)或 50~60℃ 水浴氮气吹干,用 0.5 mL 10% 甲醇充分溶解后即可进行样品检测(此法可测 20 μ g/kg 的饲料)。

[0008] 本发明的有益效果在于:

(1) 检测饲料中黄曲霉毒素 G1。本发明提供的黄曲霉毒素 G1 胶体金免疫层析检测板使用的抗体为抗黄曲霉毒素 G1 特异性单克隆抗体,用于特异性快速检测黄曲霉毒素 G1;

(2) 操作简单。用该黄曲霉毒素 G1 胶体金免疫层析检测板进行检测时只需将样品溶液逐滴加到试纸条的样品垫上即可,为一步式操作,操作简单、方便;

(3) 检测过程不需要黄曲霉毒素 G1 标准溶液作为阳性对照。本发明提供的黄曲霉毒素 G1 胶体金免疫层析检测板检测样品时不需要使用黄曲霉毒素 G1 标准溶液作为阳性对照,而只需用空白样品作为阴性对照即可;

(4) 检测灵敏度高。本发明提供的黄曲霉毒素 G1 胶体金免疫层析检测板对样品中黄曲霉毒素 G1 的最低检测限为 20 ng/mL。

附图说明

[0009] 图 1:黄曲霉毒素 G1 胶体金免疫层析检测板外观图(其中 1、卡壳,2、硝酸纤维素膜,3、加样孔,4、质控线,5、检测线)。

[0010] 图 2:黄曲霉毒素 G1 检测板内试纸条,图 2a 为正面,2b 为侧面(其中 1、吸水垫,2、质控线,3、检测线,4、金标垫,5、样品垫)。

[0011] 图 3:黄曲霉毒素 G1 半定量胶体金免疫层析检测结果(其中图 3a 为阳性结果,图 3b 为阴性,图 3c 为无效结果)。

具体实施方式

[0012] 黄曲霉毒素 G1 半定量胶体金快速检测板的制备如上述技术方案所述。

[0013] 实施例 1 直接提取法测饲料中黄曲霉毒素 G1

样品前处理:

(1) 将饲料、谷物、麦芽样品进行粉碎以使 75% 的样品可以通过 20 目筛,样品的大小颗粒与速溶咖啡相当;

(2) 称取 3.0 g 粉碎好的样品,加入 9 mL 样品提取液(提取液配制:50 mL 甲醇+50 mL

水,加 4 g 氯化钠混匀即得样品提取液,可按需配置),充分搅拌混合(10 min);

(3)静置 20 min 后轻轻吸取上清液,按 1:1 比例与样本稀释液混合均匀后进行样品检测。

[0014] 黄曲霉毒素 G1 半定量胶体金快速检测板的使用方法:

用一次性吸管缓慢垂直滴加 2 滴样本(约 50 μ L)于加样孔,加样后开始计时。加样后切勿移动检测板,8-10 min 判读结果。

[0015] 检测结果:

阴性(-):T 线(检测线,靠近加样孔一端)显色,表明样品中黄曲霉毒素 G1 浓度低于 30 μ g/kg 或不含黄曲霉毒素 G1;阳性(+):T 线无显色,则表明样品中黄曲霉毒素 G1 浓度高于 30 μ g/kg;无效结果:未出现 C 线(对照线),可能是操作不当应用新的检测板重新测试。

[0016] 实施例 2 烘干/吹干处理法测饲料中黄曲霉毒素 G1

样品前处理:

(1)将饲料、谷物、麦芽样品进行粉碎以使 75% 的样品可以通过 20 目筛,样品的大小颗粒与速溶咖啡相当;

(2)称取 3.0 g 粉碎好的样品,加入 9 mL 样品提取液(提取液配制:先用 20 mL 水将加 4 g 氯化钠溶解,再加入 80 mL 甲醇,即得样品提取液,可按需配置),充分搅拌混合(3 min),静置 20 min;

(3)轻轻吸取上清液 1 mL,放于 110℃烘箱中烘干(约 1 h)或 50~60℃水浴氮气吹干,用 0.5 mL 10% 甲醇充分溶解后即可进行样品检测。

[0017] 黄曲霉毒素 G1 半定量胶体金快速检测板的使用方法:

用一次性吸管缓慢垂直滴加 2 滴样本(约 50 μ L)于加样孔,加样后开始计时。加样后切勿移动检测板,8-10 min 判读结果。

[0018] 检测结果:

阴性(-):T 线(检测线,靠近加样孔一端)显色,表明样品中黄曲霉毒素 G1 浓度低于 20 μ g/kg 或不含黄曲霉毒素 G1;阳性(+):T 线无显色,则表明样品中黄曲霉毒素 G1 浓度高于 20 μ g/kg;无效结果:未出现 C 线(对照线),可能是操作不当应用新的检测板重新测试。

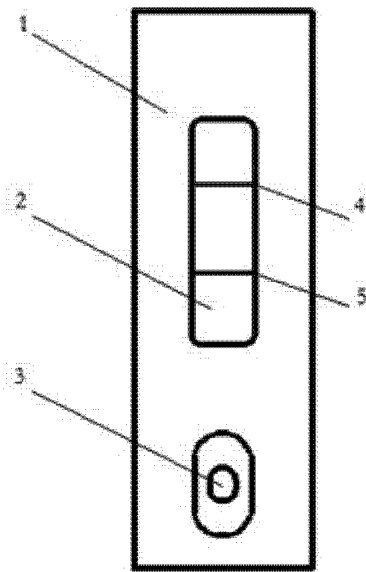


图 1

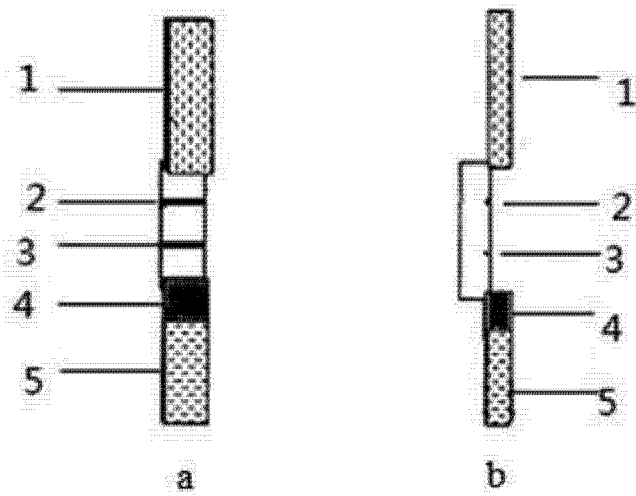


图 2

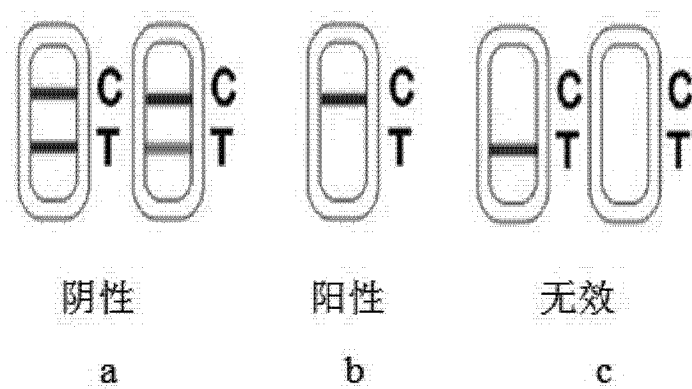


图 3

专利名称(译)	黄曲霉毒素G1胶体金免疫层析检测板制备及检测方法		
公开(公告)号	CN103792358A	公开(公告)日	2014-05-14
申请号	CN201210435166.7	申请日	2012-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 王永美		
发明人	杜道林 王永美		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/544 G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种可半定量测试饲料中黄曲霉毒素G1的胶体金免疫层析检测板，属于生物及食品安全领域。其特征在于：外壳内包括一条试纸条，试纸条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，所述检测板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（C线）和检测线（T线），所述检测线包被有黄曲霉毒素G1-牛血清白蛋白偶联物（AFG1-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G1单克隆抗体。检测板用于检测黄曲霉毒素G1，具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

