



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104569405 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410790403. 0

(22) 申请日 2014. 12. 19

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府  
大道 999 号

(72) 发明人 黄志兵 许杨 李燕萍 任文洁  
季艳伟 何庆华 涂追

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有  
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

同时检测谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马菌素 B<sub>1</sub> 金花纳米颗粒免疫层析试纸条的制备方法

(57) 摘要

一种同时检测谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马菌素 B<sub>1</sub> 金花纳米颗粒免疫层析试纸条的制备方法,包括(1) DON单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物和 FB1 单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物的制备;(2) 金标结合物释放垫的处理;(3) 硝酸纤维素膜的包被;(4)试纸条的制作等步骤。本发明特异性,灵敏度高;检测结果形象、直观;操作简便、快速;易于大范围推广应用。广泛适用于粮食收购现场检测、食品安全检测、海关检疫等需求。

1. 一种同时检测谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马菌素 B1 金花纳米颗粒免疫层析试纸条的制备方法,其特征是包括如下步骤:

(1) DON 单克隆抗体 - 金花纳米颗粒标记物和 FB1 单克隆抗体 - 金花纳米颗粒标记物的制备:

a. 向两个锥型瓶中分别加入 5-10 mL 的 60-70 nm 的金花纳米颗粒溶液,然后分别加入适量  $K_2CO_3$  溶液调节溶液的 pH 为 5.5-7.5;

b. 分别取 0.1-20  $\mu$ L 的浓度为 5 mg/mL DON 抗体和 2 mg/mL FB<sub>1</sub> 抗体,稀释 30-50 倍后,然后分别逐渐加入到步骤(a)的金花纳米颗粒溶液中,快速搅拌反应 60 min;

c. 分别加入 BSA,终浓度为 1.0%,反应 30 min;

d. 分别加入 PEG-20000,终浓度为 0.1%,反应 30 min;

e. 反应后分别采用 10000 rpm 离心 60 min;

f. 弃去上清,沉淀分别采用含 5% 蔗糖、1%BSA、0.5%PEG-20000、2% 海藻糖 PBS 溶液的金子稀释液复溶;

(2) 金标结合物释放垫的处理:

将金标结合物释放垫放入含 0.5%BSA、5%蔗糖、0.5%PEG-20000 的浓度为 0.01 M 的 PBS 溶液中浸泡 30 min,37°C 真空干燥;将步骤(1)制备的 DON 单克隆抗体 - 金花纳米颗粒标记物和 FB<sub>1</sub> 单克隆抗体 - 金花纳米颗粒标记物混合均匀,然后采用喷金机均匀的喷入到金标结合物释放垫上,喷量为 10-15  $\mu$ L/cm,37°C 真空干燥;

(3) 硝酸纤维素膜的包被:

将浓度为 0.1-1.0 mg/mL 的 DON-MBSA 和浓度为 0.1-1.0 mg/mL 的偶联的检测抗原喷在硝酸纤维素膜上,喷量为 0.5-1.0  $\mu$ L/cm,分别作为 DON 和 FB<sub>1</sub> 的检测线,两者间距为 4-7 mm;在距离 DON 检测线 4-7 mm 处喷浓度为 1-2 mg/mL 羊抗鼠 Ig G,作为质控线,喷量为 0.5-1.0  $\mu$ L/cm;37°C 真空干燥,密封;

(4) 试纸条的制作:

将上述喷有 DON 检测抗原、FB<sub>1</sub> 检测抗原和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜粘贴在 PVP 底板上;在底板的质控线一端为吸附垫,另一端为样品垫,NC 膜两端分别与样品吸附垫和金标垫相互交叠连接,金标垫上压有样品垫;以宽度为 3-4 mm/条切条后即同时检测 DON 和 FB<sub>1</sub> 的试纸条。

## 同时检测谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马菌素 B<sub>1</sub> 金花纳米颗粒免疫层析试纸条的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及真菌毒素的快速检测试纸条的制备。

### 背景技术

[0002] 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)是镰刀菌产生的有毒次级代谢产物—单端孢霉烯族化合物中的一种,属于B型单端孢霉烯族化合物。伏马菌素 B<sub>1</sub>(Fumonisin B<sub>1</sub>)是另外一种霉菌毒素,是由串珠镰刀菌产生的水溶性代谢产物。上述两种真菌毒素广泛存在于谷物粮食及其制品中,具有致畸、致癌、免疫抑制毒性、神经毒性等作用,它们不仅造成农作物减产、质量下降等巨大的经济损失,而且对人、畜的健康构成潜在的威胁。

[0003] 目前有关DON和FB<sub>1</sub>的检测方法主要有:薄层层析法、气相色谱法、气相色谱法-质谱法和液相色谱法、液相色谱法-质谱或液相色谱法-质谱-质谱法等;而有关FB<sub>1</sub>的检测方法主要有:薄层层析法、液相色谱法、液相色谱法-质谱等。上述方法一般只适合实验室检测,耗时,费用昂贵,需要复杂的仪器和复杂的样品前处理,且需要专业人员操作,难于在基层普及和推广,更不适合现场和野外大规模的快速检测。

[0004] 虽然目前国内有酶联免疫吸附法(ELISA)的DON和FB<sub>1</sub>的ELISA试剂盒出售,可检测多个样品,可定性也可定量检测,但ELISA也需要专业人员完成,其操作过程比较复杂,检测时间比较长,不同的人员操作可能会出现不同的结果,且还必须配套酶标仪读数,也无法实施现场检测。

[0005] 基于在NC膜上的抗原与抗体反应的胶体金免疫快速检测法具有操作简单、适合现场检测、快速、不需复杂仪器而只需眼睛观测和检测成本低等特点。该法已经成功用于医学和食品安全等领域的快速检测,例如早早孕检测试纸、乙肝表面抗原检测试

纸、瘦肉精检测试纸等。现已有利用胶体金免疫层析试制条分别检测DON的报道:公开专利CN101158685A一种呕吐毒素半定量试纸条的制备与使用方法;公开专利CN101482566快速检测粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇试纸条制备及其应用;公开号CN101650368A用胶体金免疫层析试纸检测玉米赤霉烯酮毒素的方法。

[0006] 目前,商品化的胶体金免疫层析试纸条检测绝大多数为单一检测(即每次只能检测一种目标物),而采用金花状纳米颗粒作为标记探针制备同时检测谷物及其制品中DON和FB<sub>1</sub>的胶体金免疫层析试纸条尚未见报道。此外,我国尚未建立用免疫层析试纸条测定谷物及其制品中DON和FB<sub>1</sub>的标准方法。因此从食品安全的要求出发,鉴于目前我国经济发展状况,在国内建立切实可推广快速、准确、可靠的适用于粮食收购现场同时检测谷物及其制品中DON和FB<sub>1</sub>的胶体金免疫层析试纸条越来越显得日益重要和迫切。

[0007] 到目前为止,尚未见采用金花纳米颗粒作为抗体标记物用于同时检测DON和FB<sub>1</sub>的报道,而采用金花作为抗体标记物用于真菌毒素的快速检测也未见报道。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是提供快速、同时检测粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和伏马菌素 B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>)试纸条的制备及其应用的方法,以适应 DON 和 FB<sub>1</sub>的快速检测。

[0009] 本发明提供的快速、同时检测粮食中 DON 和 FB<sub>1</sub>的试纸条包括硝酸纤维素膜(NC膜)、结合物释放垫、样品垫、底板和吸水垫,NC膜具有包被 DON-MBSA 和 FB<sub>1</sub>-BSA 偶联物的测试区(T线)和包被羊抗鼠 IgG 的质控区(C线),所述结合物释放垫包被了 DON 单克隆抗体和 FB<sub>1</sub>单克隆抗体-金花纳米颗粒(60-70 nm)标记物。

[0010] 本发明所述的制备方法,包括如下步骤。

[0011] (1) DON 单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物和 FB<sub>1</sub>单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物的制备。

[0012] a. 向两个锥型瓶中分别加入 5-10 mL 的 60-70 nm 的金花纳米颗粒溶液,然后分别加入适量 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液调节溶液的 pH 为 5.5-7.5。

[0013] b. 分别取 0.1-20 μL 的浓度为 5 mg/mL DON 抗体和 2 mg/mL FB<sub>1</sub>抗体,稀释 30-50 倍后,然后分别逐渐加入到步骤(a)的金花纳米颗粒溶液中,快速搅拌反应 60 min。

[0014] c. 分别加入 BSA,终浓度为 1.0%,反应 30 min。

[0015] d. 分别加入 PEG-20000,终浓度为 0.1%,反应 30 min。

[0016] e. 反应后分别采用 10000 rpm 离心 60 min。

[0017] f. 弃去上清,沉淀分别采用含 5%蔗糖、1%BSA、0.5%PEG-20000、2%海藻糖 PBS 溶液的金子稀释液复溶。

[0018] (2) 金标结合物释放垫的处理。

[0019] 将金标结合物释放垫放入含 0.5%BSA、5%蔗糖、0.5%PEG-20000 的浓度为 0.01 M 的 PBS 溶液中浸泡 30 min,37°C 真空干燥。将步骤(1)制备的 DON 单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物和 FB<sub>1</sub>单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物混合均匀,然后采用喷金机均匀的喷入到金标结合物释放垫上,喷量为 10-15 μL/cm,37°C 真空干燥。

[0020] (3) 硝酸纤维素膜的包被。

[0021] 将浓度为 0.1-1.0 mg/mL 的 DON-MBSA 和浓度为 0.1-1.0 mg/mL 的偶联的检测抗原喷在硝酸纤维素膜上,喷量为 0.5-1.0 μL/cm,分别作为 DON 和 FB<sub>1</sub>的检测线,两者间距为 4-7 mm;在距离 DON 检测线 4-7 mm 处喷浓度为 1-2 mg/mL 羊抗鼠 Ig G,作为质控线,喷量为 0.5-1.0 μL/cm。37°C 真空干燥,密封。

[0022] 所述的 DON-MBSA 和 FB<sub>1</sub>-BSA 的制备分别参照邓舜洲. DON 无毒 phage-ELISA 检测方法的建立及展青霉素免疫学检测初探,博士学位论文,南昌大学,2006; 邹龙. 抗伏马菌素 B<sub>1</sub> 单链抗体的制备及其免疫学检测初步应用研究,硕士学位论文,南昌大学,2013。

[0023] (4) 试纸条的制作。

[0024] 将上述喷有 DON 检测抗原、FB<sub>1</sub>检测抗原和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜(NC膜)粘贴在 PVP 底板上;在底板的质控线一端为吸附垫,另一端为样品垫,NC膜两端分别与样品吸附垫和金标垫相互交叠连接(连接部分可在 1-2 mm 范围),金标垫上压有样品垫。以宽度为 3-4 mm/条切条后即同时检测 DON 和 FB<sub>1</sub>的试纸条。

[0025] 本发明所制备的快速、同时检测 DON 和 FB<sub>1</sub>的试纸条的应用。

[0026] 同时检测稻谷、小麦和玉米中的 DON 和 FB<sub>1</sub>:称取 1.0 g 粉碎的样品于锥形瓶中,加

入 100 mL 的蒸馏水,充分摇匀 3-5 min,以定性滤纸过滤,收集滤液;再取 0.5 mL 的滤液加入到 1 mL 的蒸馏水中,充分混匀,作为待检测溶液。

[0027] 上样液的制备:取上述待检测溶液,加入 2-6 滴含 0.01-0.5% 的阴离子表面活性剂、0.5%-5% Tween-20 的 PBS (0.05-0.1M) 溶液,作为上样液。

[0028] 取上述上样液滴于试纸条的加样孔中,5 min 后即可观察到检测结果。

[0029] 本发明所述的百分浓度(%)除特别指出的之外,均是指 g/ml。

[0030] 本发明所述的快速、同时检测粮食中 DON 和 FB<sub>1</sub> 试纸条具有如下特点。

[0031] (1) 特异性,灵敏度高。本发明制备的同时检测粮食中 DON 和 FB<sub>1</sub> 试纸条,对 DON 和 FB<sub>1</sub> 的检测灵敏度均为 5 ng/mL,相应的 Cut-off 值均为 1000 μg/kg,且对 AFB<sub>1</sub>、OTA、α-Zearalenol、3-AC-DON、β-Zearalenol、Nivalenol、Citrinin、T-2、和 HT-2 等真菌毒素无明显的交叉反应性。

[0032] (2) 检测结果形象、直观。当试纸条显示三条红色线表示:DON 的含量低于 1000 μg/kg,且 FB<sub>1</sub> 的含量低于 1000 μg/kg;当只有质控线显示红线表示:样品中 DON 的含量高于 1000 μg/kg,且 FB<sub>1</sub> 的含量高于 1000 μg/kg;当质控线和 DON 的检测线显红色表示:样品中 DON 的含量低于 1000 μg/kg,而 FB<sub>1</sub> 的含量高于 1000 μg/kg;当质控线和 FB<sub>1</sub> 的检测线显红色表示:样品中 DON 的含量高于 1000 μg/kg,而 FB<sub>1</sub> 的含量低于 1000 μg/kg;质控线不显色表示:试纸条无效。

[0033] (3) 操作简便、快速。不需专业人员操作,5 min 内可出检测结果。

[0034] (4) 易于大范围推广应用。快速检测试纸条操作简单,不需其他仪器和设备,只需按说明书即可完成检测,易于普及,广泛适用于粮食收购现场检测、食品安全检测、海关检疫等需求,具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。

## 具体实施方式

[0035] 本发明将通过以下实施例作进一步说明。

[0036] 实施例 1。同时快速检测 DON 和 FB<sub>1</sub> 试制条的制备。

[0037] 1、DON 和 FB<sub>1</sub> 单克隆抗体-胶体金标记物的制备。

[0038] (1) 金花纳米颗粒的制备。

[0039] 75 μL 浓度为 100 mM (1g 氯金酸融入 25 毫升去离子水)的氯金酸溶液放入含有 30 mL 去离子水的三角瓶中,剧烈搅拌并加热至沸腾,加入 900 μL 质量分数为 1% 的柠檬酸钠水溶液并保持沸腾直至溶液中颜色变成红色,加热 10 min。放至室温待用。

[0040] 对于一个典型的合成的海胆状纳米粒子,25 μL 含水氯金酸(100 mM)在剧烈搅拌下放入 9.6 mL 的去离子水中,接着,加入 50 μL 金种子,22 μL、1% 的柠檬酸钠,和 1000 μL 的 30 mM 对苯二酚(33 mg 加入 10 mL 的去离子水),该溶液在保持在室温下搅拌 10 min,得到金花纳米颗粒。

[0041] (2) DON 和 FB<sub>1</sub> 单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物的制备。

[0042] 磁力搅拌下,用 1% 碳酸钾将两个盛有 5 mL 胶体金溶液调整为最适 pH 值为 6.5,分别 1 μL 的 5 mg/mL DON 单克隆抗体和 2 mg/mL FB<sub>1</sub> 单克隆抗体,稀释 50 倍后,分别逐滴加入金花纳米颗粒溶液,继续搅拌 60 min。然后加入原体积 10% 的 BSA,继续搅拌 30 min。将已经标记好的探针 10000 g、4 °C 离心 30 min,吸取上清,将沉淀的金花纳米颗粒探针用

金子稀释液复溶分别得到 DON 和 FB<sub>1</sub> 单克隆抗体金花纳米颗粒标记物, 4 °C 保存。

## 2、结合物释放垫的包被。

[0043] 将结合物释放垫放入含 0.1% BSA 和 3% 蔗糖的 PBS 溶液中浸泡 10 min, 37 °C 烘干。将 (2) 中得到的 DON 和 FB<sub>1</sub> 单克隆抗体 - 胶体金标记物混合均匀, 然后用 Biodot 点膜仪将其均匀的喷入到结合物释放垫上, 每 1cm 长的结合垫喷 15 μL DON 和 FB<sub>1</sub> 单克隆抗体 - 胶体金标记物混合物, 真空干燥, 置 4 °C 备用。

## [0044] 3、硝酸纤维素膜的包被。

[0045] 采用 Biodot 点膜仪分别将浓度为 1.0 mg/mL MBSA 偶联 DON 的检测抗原和浓度为 1.0 mg/mL 的 FB<sub>1</sub>-BSA 检测抗原喷在硝酸纤维素膜上, 分别作为 DON 检测线和 FB<sub>1</sub> 检测线, 喷量为 0.74 μL/cm, 在靠近吸水纸一端, 且距离 DON 检测抗原为 3 mm 处喷浓度为 1.5 mg/mL 羊抗鼠 Ig G, 作为质控线 (C 线), 喷量为 0.74 μL/cm。真空干燥, 密封。

## [0046] 4、胶体金试纸条的组装。

[0047] 试纸条的组装包括: 底板一端端头为吸水垫, 另一端端头为样品垫, 硝酸纤维素膜两端分别与吸水垫和结合物释放垫相互交叠连接, 在结合物释放垫上压有样品垫。

[0048] 实施例 2。样本中 DON 和 FB<sub>1</sub> 的同时检测。

[0049] 稻谷、小麦和玉米中 DON 和 FB<sub>1</sub> 的同时检测。

[0050] (1) 样品前处理及检测。

[0051] 称取 1.0 g 粉碎的待检样品 (如稻谷、小麦和玉米) 于三角瓶中, 加入 100 mL 的蒸馏水溶液, 充分摇匀 3-5 min, 以定性滤纸过滤, 收集滤液; 再取 0.5 mL 的滤液加入到 1 mL 的蒸馏水中, 充分混匀, 作为待检测溶液。

[0052] 取上述待检测溶液, 加入 2 滴阴离子表面活性剂、0.5% Tween-20 的 PBS (0.05M) 溶液, 作为上样液。

[0053] 取上述上样液滴于试纸条的加样孔中, 5 min 后即可观察到检测结果。

[0054] (2) 结果分析。

[0055] 当试纸条显示三条红色线表示: DON 的含量低于 1000 μg/kg, 且 FB<sub>1</sub> 的含量低于 1000 μg/kg; 当只有质控线显示红线表示: 样品中 DON 的含量高于 1000 μg/kg, 且 FB<sub>1</sub> 的含量高于 1000 μg/kg; 当质控线和 DON 的检测线显红色表示: 样品中 DON 的含量低于 1000 μg/kg, 而 FB<sub>1</sub> 的含量高于 1000 μg/kg; 当质控线和 FB<sub>1</sub> 的检测线显红色表示: 样品中 DON 的含量高于 1000 μg/kg, 而 FB<sub>1</sub> 的含量低于 1000 μg/kg; 质控线不显色表示: 试纸条无效。

[0056] 实施例 3。(应用实施例)。

[0057] 1、特异性实验。

[0058] 按实施例 2 所述的方法进行实验, 将 3-AC-DON、Nivalenol、T-2、HT-2、AFB、OTA、Citrinin、α-Zearalenol 和 β-Zearalenol 等真菌毒素用本专利试纸条检测, 均出现三条红线, 结果该检测试纸条与 3-AC-DON、Nivalenol、T-2、HT-2、AFB、OTA、Citrinin、α-Zearalenol 和 β-Zearalenol 等真菌毒素等无交叉性反应。

[0059] 2、灵敏度实验。

[0060] 采用实施 2 所述的方法, 用试纸条分别检测浓度分别为 0、0; 2、2; 5、5; 10、10; 和 20、20 ng/mL 的 DON 和 FB<sub>1</sub> 混合标准品, 重复 10 次, 其中当 DON 浓度等于或高于 5 ng/mL 时,

DON 检测线不显红色 ;而当 FB<sub>1</sub>浓度等于或高于 5 ng/mL 时,FB<sub>1</sub>检测线不显红色。因此,本专利制备的试纸条的对 DON 和 FB<sub>1</sub>检测灵敏度均为 5 ng/mL。

[0061] 3、均一性实验。

[0062] 采用实施 2 所述的方法,对 DON 和 FB<sub>1</sub>浓度分别为 0、0 ng/mL ;5、5 ng/mL 的混合液分别进行 10 次平行检测,反应 5 min 后观察结果,0、0 ng/mL 出现三条红线,5、5 ng/mL 则只出现一条红线,检测显色深度均一,反应结果一致。

[0063] 4、稳定性实验。

[0064] 将真空包装好的试纸条放置 37℃烘箱中进行破坏性实验,时间为 10 天,各项指标均符合以上 1-3 项指标,即检测其他毒素无交叉性反应、对 DON 和 FB<sub>1</sub>检测灵敏度均为 5 ng/mL,检测显色深度均一,反映结果一致。

专利名称(译)	同时检测谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马菌素B1金花纳米颗粒免疫层析试纸条的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104569405A</a>	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201410790403.0	申请日	2014-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	黄志兵 许杨 李燕萍 任文洁 季艳伟 何庆华 涂追		
发明人	黄志兵 许杨 李燕萍 任文洁 季艳伟 何庆华 涂追		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/531 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种同时检测谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马菌素B1金花纳米颗粒免疫层析试纸条的制备方法，包括(1) DON单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物和FB1单克隆抗体-金花纳米颗粒标记物的制备；(2) 金标结合物释放垫的处理；(3) 硝酸纤维素膜的包被；(4) 试纸条的制作等步骤。本发明特异性，灵敏度高；检测结果形象、直观；操作简便、快速；易于大范围推广应用。广泛适用于粮食收购现场检测、食品安全检测、海关检疫等需求。