

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200520096088.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 2804866Y

[22] 申请日 2005.4.23

[21] 申请号 200520096088.8

[73] 专利权人 江西中德大地生物工程有限公司

地址 330029 江西省南昌市高新一路建昌工业园海外大厦南 306 号

[72] 设计人 赖卫华 熊勇华 陈高明 李 林
曾祥敏

[74] 专利代理机构 江西省专利事务所
代理人 杨志宇

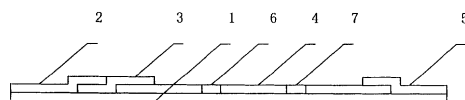
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸

[57] 摘要

本实用新型涉及一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸，它包括底板，样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫，检测线，质控线，其中：在底板上按顺序有样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫；示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成，质控线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。本实用新型生产过程中不需要黄曲霉毒素，避免了黄曲霉毒素的二次污染；检测过程无需黄曲霉毒素标品作为指示，而直接通过颜色判断结果；所耗费用低；灵敏度高；操作简便、快捷。



1、一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸，包括底板（1），样品垫（2），示踪粒子结合物垫（3），硝酸纤维素膜（4），吸水垫（5），检测线（6），质控线（7），其特征在于：在底板（1）上按顺序有样品垫（2），示踪粒子结合物垫（3），硝酸纤维素膜（4），吸水垫（5）；示踪粒子结合物垫（3）上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体，硝酸纤维素膜（4）上还设有检测线（6）和质控线（7），检测线（6）由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成，质控线（7）由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸

技术领域

本实用新型涉及一种检测黄曲霉毒素的试纸，尤其是一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸。

背景技术

黄曲霉毒素是由黄曲霉、寄生曲霉或模式曲霉产生的一种毒素，可引起动物和人的急性中毒、慢性中毒、致癌、致畸和致突变等。由于能产毒的黄曲霉菌株广泛地存在于自然界中，因此它极可能通过食物链进入人体，从而对人体健康构成巨大的威胁。要完全避免黄曲霉毒素对粮食，饲料，副食品，油料作物以及发酵食品等的污染非常困难。唯一有效的办法是加强对该类样品的监控检测，及时发现污染的食品、饲料及其原材料，并立即剔除，防止毒素超标污染的食品进入人类的食物链。

对黄曲霉毒素检测的公知方法，目前主要有薄层层析法、酶联免疫法、液相色谱法、胶体金免疫层析法和乳胶沉淀法。薄层层析法是采用硅胶 G 薄板进行毒素层析分离，在 365 纳米紫外光下观察黄曲霉毒素产生的荧光并与标准毒素的迁移率比较以确定毒素的存在（见 GB/T5009，22-1996），酶联免疫法（CN 1153908）是采用黄曲霉毒素-蛋白复合体包被酶联板，然后将样品与识别黄曲霉毒素的抗体混合，在酶联板的小孔中进行免疫反应，通过比色确定样品中黄曲霉毒素的浓度，液相色谱法测定的黄曲霉毒素的精度与酶联免疫法相似。上述各方法都存在如下缺点：操作程序复杂，只能在实验室进行；需要专业人员操作，用专门的仪器和设备，检测时间长，所需费用高，其费用在 200-1000 元人民币/每个样品。乳胶沉淀法（CN1254843）是快速测定法，具有简单、快速、常温保存、单份测定、除商品试剂外不需任何仪器设备的优点，适合现场黄曲霉毒素的现场快速检测。

免疫层析是出现于 80 年代初期的一种独特的免疫分析方式，它往往以条状纤维层析材料为固相，通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动，并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体（如抗体或抗原）发生高特异高亲和性的免疫反应，层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域（检测带），通过酶反应或直接运用可目测的标记物（如胶体金）而得到直观的实验现象（如显色）。而游离标记物则越过检测带，达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术目前已广泛应用于临床医疗检测中。国内外现有的商品供应及文献报道的检测项目主要包括以下方面：违禁药物检测（苯丙胺、

可卡因、大麻、吗啡、海洛因等)、传染病病原检测(梅毒螺旋体、淋球菌、沙眼衣原体、幽门螺杆菌等)、激素检测、寄生虫、肿瘤标记物、心血管病检测标志物等。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金,乳胶,胶体硒、明胶等,其中运用最成功的标记物为胶体金。黄曲霉毒素胶体金免疫层析法(CN1410771)是将胶体金免疫层析技术运用于黄曲霉毒素检测中的一个成功方法。

上述的这些方法在制备或检测过程中都涉及到要使用黄曲霉毒素标品的问题,如胶体金免疫层析法中检测线上喷的就是黄曲霉毒素-蛋白复合体。

众所周知,黄曲霉毒素毒性很强,其中黄曲霉毒素 B₁ 是已知毒性最强的天然物质,比氰化钾的毒性高 10 倍,以黄曲霉毒素作为材料进行生产或以黄曲霉毒素作为对照品进行检测,极有可能存在二次污染的隐患,对生产和操作人员的健康有极大的危害。再者,我国所需的高浓度的毒素标品目前全部依赖进口,价格昂贵,使检测试剂的成本居高不下。更为麻烦的是,在“9.11”恐怖袭击以后,西方国家加大了对剧毒化学药品的出口管制力度,在我国几乎无法从国外购买到所需的黄曲霉毒素,从而造成了我国该类试剂的生产举步为艰的局面。

应用无毒体系来检测黄曲霉毒素是检测技术发展的一个方向,目前尚未见到应用无毒体系检测黄曲霉毒素的免疫层析法的报道。

发明内容

本实用新型的目的在于提供一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸。

本实用新型的技术方案为:

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸,包括底板,样品垫,示踪粒子结合物垫,硝酸纤维素膜,吸水垫,检测线,质控线,其中:在底板上按顺序有样品垫,示踪粒子结合物垫,硝酸纤维素膜,吸水垫;示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体,硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线,检测线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成,质控线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸的制备,包括如下步骤:

1. 待检样品的处理;
2. 硝酸纤维素膜检测线和质控线的制备

用能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样作为检测线;

用能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样作为质控线。

3. 示踪粒子结合物垫的制备:

选用能与黄曲霉毒素无毒体系(噬菌体)结合的抗黄曲霉毒素单克隆抗体标记示踪粒子。把标记好的示踪粒子,分散在玻璃纤维纸上。

4. 试纸条的组装:

①在底板上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜;②在底板上加上示踪粒子结合物垫;③在底板上加上样品垫;④在底板上加上吸水垫;组装为试纸条。

方案可细分为四部分:

1. 待检样品的处理; 2. 硝酸纤维素膜检测线和质控线的制备; 3. 示踪粒子结合物垫的制备; 4. 试纸条的组装。

1. 待检样品的处理

将被检测的样品粉碎为 20 目并取 20 克粉末放入 25-60 毫升的抽提液(每 100 毫升含 60 毫升甲醇, 40 毫升蒸馏水, 4 克氯化钠)经充分混合 5 分钟, 再静置 10-20 分钟后轻轻吸取上清液, 按 1:3 的比例与样品缓冲液(PBS+0.5%BSA)混合, 混合液用于测定。必要时可用滤纸过滤上清液, 取滤过的样品进行测定。

2. 硝酸纤维素膜检测线和质控线的制备

将硝酸纤维素膜按 20-30mm 宽的尺寸剪裁。将经纯化浓度调整为 0.1-1.0mg/ml 的无毒体系(噬菌体), 在膜上线状点样作为检测线, 检测线点样位置离膜底边 15-18mm。将经纯化浓度调整为 0.2-1.5mg/ml 的相应驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体, 在膜上线状点样作为质控线, 质控线点样位置离膜底边 11-13mm。硝酸纤维素膜室温干燥 30min, 置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min, 取出吸干水分, 于 37 孵育 30min, 置室温下干燥处密封储藏。

3. 示踪粒子结合物垫的制备

(1) 示踪粒子的制备和标记

①胶体金溶胶制备标记:

胶体金溶胶制备: 取 0.01%四氯化金水溶液 200ml, 加热至沸腾, 加入 1-20ml 1%柠檬酸钠水溶液, 煮沸 5min, 出现橙红色, 胶体金颗粒直径由电镜测定为 10-80nm;

胶体金标记抗体: 取 50ml 胶体金, 用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH 至 8.2, 搅拌下将胶体金溶胶和抗黄曲霉毒素的单克隆抗体混合, 再加入聚乙二醇水溶液, 使最终浓度为 0.05%。将粗制品 6000g 离心 45min, 沉淀用生理盐水混悬

至 1.5ml, 4℃保存。

② 胶体硒溶胶制备和抗体标记:

胶体硒溶胶制备: 在 1 升容量的四颈圆底烧瓶内加入去离子水 550ml 和聚丙烯酸 10g, 通氮室温搅拌并加入水合肼 69.5ml, 继续搅拌 20 分钟。亚硒酸 9.63g 溶解于 280ml 水, 室温搅拌下滴入反应混合液内, 得到 120nm 红色硒溶胶。

胶体硒抗体标记: 抗体用 20mmol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液配成 4.6mg/ml 浓度溶液, 加 25 μ l 于 pH7.3 的 25ml 硒溶胶中, 室温搅拌 10 分钟后加 1% PEG8000 1ml, 混匀, 于 4℃以 5000rpm 离心 5 分钟, 得到松软的红色沉淀, 用含 0.05% NaN₃ 的磷酸盐缓冲液配成 1ml 悬液。

③ 乳胶的制备和抗体标记:

彩色乳胶颗粒购自 Bangs LA、B、Oratories 公司。抗体标记程序为: 用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将乳胶稀释到 1%浓度, 搅拌下加入一定量的抗黄曲霉毒素的单克隆抗体溶液, 室温搅拌 30 分钟后于 37℃水浴孵化 60 分钟, 4℃放置 4-5 小时。15000rpm 离心 30 分钟, 用适量磷酸盐缓冲液重悬。

(2) 示踪粒子结合物垫的制备

将标记了示踪粒子的抗黄曲霉毒素的单克隆抗体按比例混合分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上, 烘干或冻干后密封干燥保存。

4. 试纸条的组装:

在底板上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜; ②在底板上加上示踪粒子结合物垫; ③在底板上加上样品垫; ④在底板上加上吸水垫; ⑤将粘贴了硝酸纤维素膜、结合物垫、样品垫和吸水垫的底板用切刀剪成 3-5mm 宽, 组装为试纸条。

本实用新型的优点及应用范围

本实用新型同以往检测粮食、发酵制品和饲料中黄曲霉毒素的技术相比具有如下优点: (1)生产过程中不需要黄曲霉毒素, 避免了黄曲霉毒素的二次污染; (2)检测过程无需黄曲霉毒素标品作为指示, 而直接通过颜色判断结果; (3)除商品试剂外不需任何仪器设备, 所耗费用低; (4)灵敏度较高, 可达 10ppb; (5)室温保存、单份测定, 可现场进行检测; (6)操作简便、快捷, 仅需 10-15 分钟。

本实用新型属于食品安全领域, 主要用于粮食、发酵制品和饲料中黄曲霉毒素的检测。本实用新型的试纸条的使用单位主要是国家相关执法部门, 如农业部门的畜牧局、质量技术监督局、动植物检疫局、商检局、防疫站等, 食品加工企业为了保证其产品的质量可靠性, 保证品牌及市场占有率, 也有大量需求, 同时随着人民群众对食品安全的重视, 黄曲霉毒素试纸条还将走进许多家

庭。

附图说明

图1为本实用新型一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸结构示意图。

附图标记：底板 1、样品垫 2、结合物垫 3、硝酸纤维素膜 4、吸水垫 5、检测线 6、质控线 7。

具体实施方式

实施例 1

一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸，包括底板 1，样品垫 2，示踪粒子结合物垫 3，硝酸纤维素膜 4，吸水垫 5，检测线 6，质控线 7，其中：在底板 1 上按顺序有样品垫 2，示踪粒子结合物垫 3，硝酸纤维素膜 4，吸水垫 5；示踪粒子结合物垫 3 上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体，硝酸纤维素膜 4 上还设有检测线 6 和质控线 7，检测线 6 由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成，质控线 7 由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。

检测原理：在样品垫 2 上滴加样品，如果样品中有足量的黄曲霉毒素，经层析作用移动到结合物垫 3，和示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合，当移动到检测线 6 时抗黄曲霉毒素单克隆抗体不能再与检测线 6 上的黄曲霉毒素的无毒体系抗原结合，因此检测线 6 上无颜色。多余的示踪粒子标记抗体继续向前移动到质控线 7 和质控线 7 上的驴抗小白鼠抗体结合并显色，表示检测试纸条有效。若样品中无黄曲霉毒素，则结合物垫 3 上的示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体和检测线 6 上的检测抗原结合，因此检测线 6 上显色。多余的示踪粒子标记抗体和质控线 7 上驴抗小白鼠抗体结合并显色，表示检测试纸条有效。

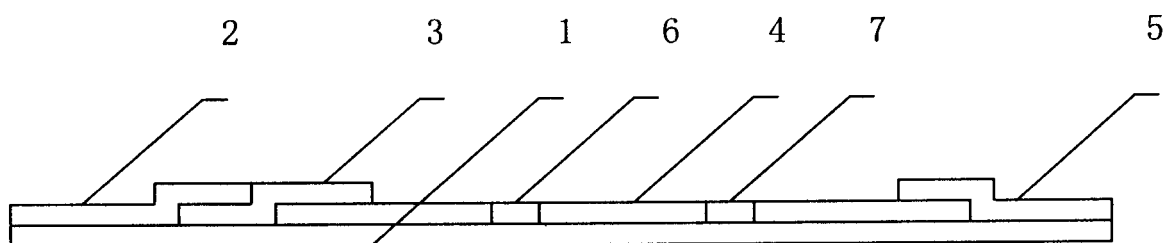


图 1

专利名称(译)	一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸		
公开(公告)号	CN2804866Y	公开(公告)日	2006-08-09
申请号	CN200520096088.8	申请日	2005-04-23
[标]发明人	赖卫华 熊勇华 陈高明 李林 曾祥敏		
发明人	赖卫华 熊勇华 陈高明 李林 曾祥敏		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	杨志宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种无毒体系免疫层析检测黄曲霉毒素的试纸，它包括底板，样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫，检测线，质控线，其中：在底板上按顺序有样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫；示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗黄曲霉毒素单克隆的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合的黄曲霉毒素无毒体系线状点样组成，质控线由能与抗黄曲霉毒素单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体线状点样组成。本实用新型生产过程中不需要黄曲霉毒素，避免了黄曲霉毒素的二次污染；检测过程无需黄曲霉毒素标品作为指示，而直接通过颜色判断结果；所耗费用低；灵敏度高；操作简便、快捷。

