



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108226503 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201611157289.3

(22)申请日 2016.12.15

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家
科技园B11栋3楼

(72)发明人 杜道林 薛永来 洪霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡及其制备方法

(57)摘要

本发明黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡及其制备方法,涉及动物源食品兽药残留检测技术领域。本发明的检测卡外壳中的试纸条,由PVC胶板、样品垫、胶体金结合垫、包被膜和吸水垫组成;胶体金膜为含黄曲霉毒素G1单克隆抗体的玻璃纤维素膜,包被膜是硝酸纤维素膜,其上设有T线和C线,T线包被有黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物,C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测黄曲霉毒素G1,方便、快捷、结果准确。

1. 黄曲霉毒素G1胶体金检测卡,其特征在于按照下述步骤制备得到:

(1) 胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶液5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃保存备用;

(2) 抗体的预处理:将要标记的黄曲霉毒素G1抗体在1000 r/min,4℃条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL,过0.22 μm滤膜;

(3) 胶体金标记物的制备:取步骤(1)中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温1500 r/min离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4℃,12000 r/min离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成黄曲霉毒素G1单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 μL/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37℃烘干3 h,制成含黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜;

(5) 包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 μL/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃包被2 h后,室温自然晾干或者37℃烘干;

(6) 样品垫前处理:将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在空气湿度低于60%的条件下,室温自然晾干;

(7) 检测卡的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度的长条,再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

2. 根据权利要求1所述的黄曲霉毒素G1胶体金检测卡,其特征在于所述步骤(5)中所包被的检测线T设在质控线C的下方;

所述步骤(6)中的样品垫处理液是由1 g小牛血清蛋白(BSA)和0.8 g氯化钠(NaCl),用含有0.5%TRITON-100的0.01 mol/L PBS定容至100 mL。

黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及谷物食品中农药残留检测技术领域,特别是涉及黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(AFT)是一类化学结构类似的化合物,均为二氢呋喃香豆素的衍生物。黄曲霉毒素是主要由黄曲霉(*aspergillus flavus*)寄生曲霉(*a.parasiticus*)产生的次生代谢产物,在湿热地区食品和饲料中出现黄曲霉毒素的机率最高。它们存在于土壤、动植物、各种坚果中,特别是容易污染花生、玉米、稻米、大豆、小麦等粮油产品,1993年黄曲霉毒素被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为1类致癌物,是一种毒性极强的剧毒物质。黄曲霉毒素的危害性在于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。在天然污染的食品中以黄曲霉毒素G1最为多见,其毒性和致癌性也最强。G1是最危险的致癌物,经常在玉米,花生,棉花种子,一些干果中常能检测到。它们在紫外线照射下能产生荧光,根据荧光颜色不同,将其分为B族和G族两大类及其衍生物。AFT已发现20余种。AFT存在于土壤、动植物、各种坚果中,主要污染粮油食品、动植物食品等;如花生、玉米,大米、小麦、豆类、坚果类、肉类、乳及乳制品、水产品等均有黄曲霉毒素污染,是霉菌毒素中毒性最大、对人类健康危害极为突出的一类霉菌毒素。

[0003] 现有技术对于黄曲霉毒素G1的检测主要是气相色谱-质谱法、高效液相色谱法等检测方法,但这些技术的缺陷明显:设备昂贵、操作复杂、难以推广。所以,建立一种简单、有效、适合基层使用的测定方法是极其必要的。本发明的目的是研制一种更适合企业进行现场检测且快捷简便、成本低廉的定性检测方法。

发明内容

[0004] 针对以上情况,本发明的目的就是为了克服现有技术存在的缺陷而提供一种黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡及其制备方法,可有效解决能快速、简便地检测出黄曲霉毒素G1的问题。

[0005] 本发明的黄曲霉毒素G1胶体金检测卡,包括包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫、包被了黄曲霉毒素G1-BSA和羊抗鼠IgG的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、PVC胶板和塑料模具组成,在PVC胶板的一端依次粘附样品垫、结合垫,中间黏贴硝酸纤维素膜,另一端粘附吸水垫。

[0006] 本发明的黄曲霉毒素G1胶体金检测卡的制备方法,是由以下步骤实现:

(1) 胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃保存备用;

(2) 抗体的预处理:将要标记的黄曲霉毒素G1抗体在1000 r/min, 4℃条件下,离心20

min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/ml,过0.22 μ m滤膜;

(3) 胶体金标记物的制备:取步骤(1)中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K₂CO₃调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温低速(1500 r/min)离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4℃,12000 r/min 离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成黄曲霉毒素G1单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 μ L/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37℃烘干3 h,制成含黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜;

(5) 包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 μ L/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃包被2 h后,室温自然晾干或者37℃烘干;

(6) 样品垫前处理:将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在空气湿度低于60%的条件下,室温自然晾干;

(7) 检测卡的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度的长条,再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

[0007] 所述步骤(5)中所包被的检测线T设在质控线C的下方;

所述步骤(6)中的样品垫处理液是由1 g小牛血清蛋白(BSA)和0.8 g氯化钠(NaCl),用含有0.5%TRITON-100的0.01 mol/L PBS定容至100 mL;

本发明可有效用于测定黄曲霉毒素G1,方法简单,方便、快捷,结果准确。

附图说明

[0008] 图1为本发明黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡的结构图:图中1.加样孔 2.检测线 3.质控线 4.检测孔 5.试纸条 6.检测卡外壳。

[0009] 图2为本发明黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡内的试纸条的剖视结构图,图中7.样品垫 8.胶体金结合垫 9.PVC胶板 10.硝酸纤维素膜 11.吸水垫。

具体实施方式

[0010] 实施例1

图1、图2所示的实施例:图中9为PVC胶板;7为样品垫;8为胶体金结合垫,该胶体金结合垫上包被了单克隆抗体胶体金标记物;10为包被膜,即硝酸纤维素膜,该硝酸纤维素膜上包被了黄曲霉毒素G1-BSA和羊抗鼠IgG;11为吸水垫,由吸水材料如滤纸制成。

[0011] 在PVC胶板9的一端上(样品端)粘附样品垫7、结合垫8,样品垫7和结合垫8为并列结构。

[0012] 在PVC胶板9的中间粘附硝酸纤维素膜10。在硝酸纤维素膜10上设置有羊抗鼠IgG质控线3和黄曲霉毒素G1-BSA检测线2。

[0013] 在PVC胶板9的另一端粘附吸水垫11。硝酸纤维素膜10的一端与结合垫8略交叉,另

一端与吸水垫11略交叉。该试纸条5可装入有塑料模具制成的检测卡外壳6中,制成检测卡,在检测卡外壳6的上盖上设有加样孔1和检测孔4,样品垫7正对加样孔1,硝酸纤维素膜10正对检测孔4。

[0014] 实施例2

黄曲霉毒素G1胶体金检测卡制备,是由以下步骤具体实现:

胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃保存备用;

抗体的预处理:将要标记的黄曲霉毒素G1抗体在1000 r/min, 4℃条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/ml,过0.22 μm滤膜;

胶体金标记物的制备:取步骤(1)中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温低速(1500 r/min)离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4℃,12000 r/min 离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成黄曲霉毒素G1单克隆抗体胶体金标记物;

胶体金膜的制备:将步骤(3)黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 μL/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37℃烘干3 h,制成含黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜;

包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 μL/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃包被2 h后,室温自然晾干或者37℃烘干;

样品垫前处理:将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在空气湿度低于60%的条件下,室温自然晾干;

检测卡的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度长条,再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

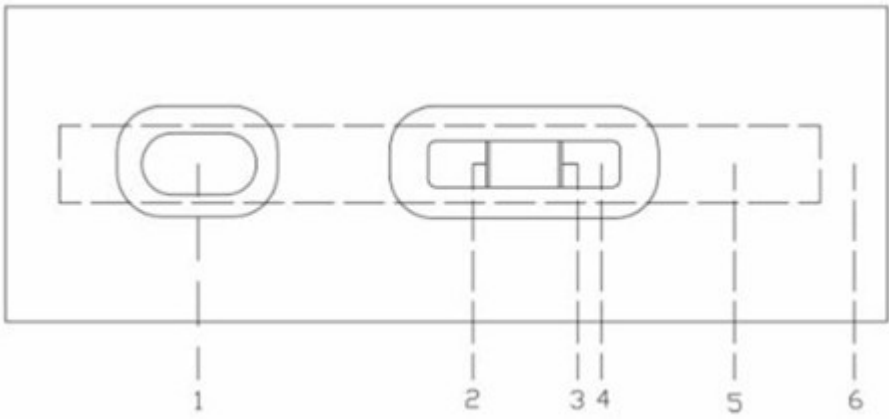


图1

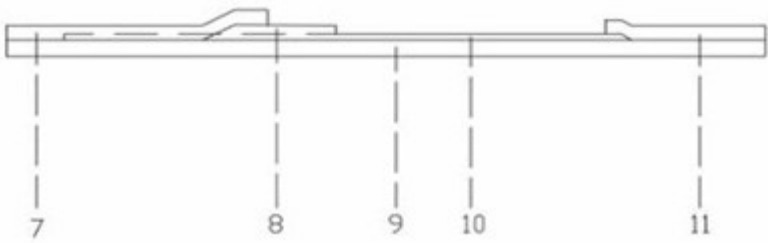


图2

专利名称(译)	黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN108226503A	公开(公告)日	2018-06-29
申请号	CN201611157289.3	申请日	2016-12-15
[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		
当前申请(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 薛永来 洪霞		
发明人	杜道林 薛永来 洪霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/558 G01N2333/38		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明黄曲霉毒素G1的免疫胶体金检测卡及其制备方法，涉及动物源食品兽药残留检测技术领域。本发明的检测卡外壳中的试纸条，由PVC胶板、样品垫、胶体金结合垫、包被膜和吸水垫组成；胶体金膜为含黄曲霉毒素G1单克隆抗体的玻璃纤维素膜，包被膜是硝酸纤维素膜，其上设有T线和C线，T线包被有黄曲霉毒素G1蛋白质偶联物，C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测黄曲霉毒素G1，方便、快捷、结果准确。

