



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 20888251 U

(45)授权公告日 2019.05.21

(21)申请号 201820620218.0

(22)申请日 2018.04.27

(73)专利权人 北京纳百生物科技有限公司

地址 101111 北京市通州区经济技术开发区
科创十四街11号院3号楼

(72)发明人 宋世燕 邵宗洋 郭秀锋 刘彩娟

(74)专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有限公司 11577

代理人 李芙蓉 孙进华

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

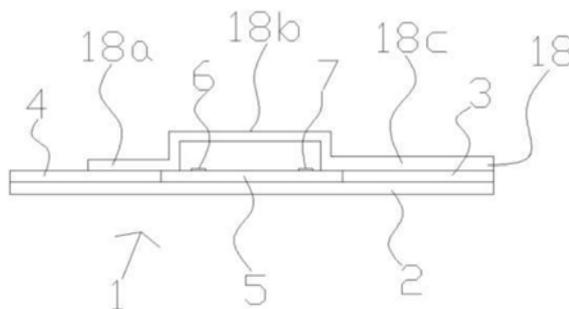
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)实用新型名称

一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件

(57)摘要

本实用新型公开了一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,食品安全免疫检测技术领域,它包括微孔板架、盒体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管。本实用新型与传统仪器方法和国家标准方法相比较,检测灵敏、速度快、操作简便,单个样本检测时间为10min,检测灵敏度满足国家标准要求。并且操作简便,一般的奶站工人无需培训即可上手操作。成本低廉,单个样本检测成本不超过15元,生产过程无需设计黄曲霉毒素M1本身,安全性好。无需特殊仪器设备,适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用,有助于从生产一线控制乳品质量。



1. 一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,其特征在于:它包括微孔板架(10)、盒体(13)、多个胶体金试纸(1)、多个微孔试剂(8)、多个塑料桶(14)和多个一次性塑料吸管;

所述胶体金试纸(1)包括PVC背板(2)以及固结在PVC背板(2)上的透明塑料壳(18),在所述透明塑料壳(18)内的PVC背板(2)顶面上由左至右依次附着有样品垫(4)、硝酸纤维素膜(5)和吸水垫(3),所述透明塑料壳(18)包括压盖在样品垫(4)与硝酸纤维素膜(5)对接处的左壳体(18a)、罩盖在硝酸纤维素膜(5)上方的中央腔壳体(18b)、压盖在硝酸纤维素膜(5)和吸水垫(3)对接处的右壳体(18c),左壳体(18a)、中央腔壳体(18b)和右壳体(18c)依次连接,且所述左壳体(18a)的左端延伸至样品垫(4)的顶面中部,右壳体(18c)的右端延伸至吸水垫(3)上并完全覆盖吸水垫(3)顶面;在中央腔壳体(18b)下方的硝酸纤维素膜(5)上由左至右间隔喷涂有检测线(6)和质控线(7),且在检测线(6)上喷涂有黄曲霉毒素M1的抗独特型抗体,在质控线(7)上喷涂有羊抗鼠IgG抗体;

所述微孔试剂(8)包括包被有胶体金标记黄曲霉毒素M1单克隆抗体的塑料微孔(8a),在塑料微孔(8a)的顶端敞口端通过塑料孔盖帽(9)进行密封,且八个塑料微孔(8a)依次连接形成一组微孔试剂(8);

所述盒体(13)为长方形壳体,盒体(13)的顶端敞口处设置有与盒体(13)一侧连接的扣盖,在盒体(13)的内部放置有纸托(11),在所述纸托(11)上开设有多个孔位(12);

每个塑料桶(14)内放置有一组微孔试剂(8)和八个胶体金试纸(1),且每个塑料桶(14)放置在盒体(13)中纸托(11)上相应的孔位(12)内;

所述检测线(6)与质控线(7)平行设置。

2. 根据权利要求1所述的一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述塑料桶(14)的个数为十二个,所述纸托(11)上开设有的孔位(12)的个数为十二个。

3. 根据权利要求1所述的一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述胶体金试纸(1)的整体长度为7cm,胶体金试纸(1)的整体宽度为4cm;检测线(6)和质控线(7)的整体宽度均为2mm。

4. 根据权利要求1所述的一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述微孔板架(10)为96孔塑料板架。

5. 根据权利要求1所述的一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述一次性塑料吸管为0.2mL的一次性巴士吸管。

一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件

技术领域

[0001] 本实用新型涉及食品安全免疫检测技术领域,具体涉及一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(aflatoxin)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。目前已分离鉴定出12种包括B1,B2,G1,G2,M1,M2等。其中黄曲霉毒素B1是天然污染中含量最大的,也是毒性最大的毒素之一。当人摄入黄曲霉毒素量过大时,可发生急性中毒,出现急性肝炎、出血性坏死、肝细胞脂肪变性和胆管增生。当微量持续摄入,可造成慢性中毒,生长障碍,引起纤维性病变,致使纤维组织增生。黄曲霉毒素的致癌力也居首位,是目前已知最强致癌物之一。

[0003] 被黄曲霉毒素污染的饲料经动物采食代谢后主要以黄曲霉毒素M1的形式排出体外,以奶牛为例,黄曲霉毒素M1主要通过乳汁排泄。以被污染的牛乳作为原料生产婴幼儿配方粉,对婴幼儿身体健康危害更大。为此,国际上对牛乳中的黄曲霉毒素M1的残留限量做出了严格规定,其中以欧盟0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 最为严格,美国和我国的残留限量为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 由于黄曲霉毒素M1属于天然污染物类小分子,其在自然界含量非常低,因此价格极其昂贵,以美国sigma公司黄曲霉毒素M1标准品为例,1mg价格近千元。检测设备在生产时往往成本较高,并且由于黄曲霉毒素M1的毒性较大,也为生产工人带来了潜在的健康威胁,这些也间接导致了黄曲霉毒素M1检测设备普遍市场价格较高,而客户承担的检测成本也较高。

[0005] 综上所述,亟需开发出一种生产过程无须涉及黄曲霉毒素M1分子本身,并且成本低廉,检测能力达标的检测设备。

实用新型内容

[0006] 本实用新型的目的在于提供一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,用以解决目前针对黄曲霉毒素M1免疫检测设备生产成本高,检测过程中对生产人员存在健康威胁,亟需开发出一种生产过程无须涉及黄曲霉毒素M1分子本身,成本低廉,检测能力好,使用操作方便快捷的检测设备的问题。

[0007] 为实现上述目的,本实用新型的技术方案为:一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,它包括微孔板架、盒体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管;

[0008] 所述胶体金试纸包括PVC背板以及固结在PVC背板上的透明塑料壳,在所述透明塑料壳内的PVC背板顶面上由左至右依次附着有样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述透明塑料壳包括压盖在样品垫与硝酸纤维素膜对接处的左壳体、罩盖在硝酸纤维素膜上方的中央

腔壳体、压盖在硝酸纤维素膜和吸水垫对接处的右壳体,左壳体、中央腔壳体和右壳体依次连接,且所述左壳体的左端延伸至样品垫的顶面中部,右壳体的右端延伸至吸水垫上并完全覆盖吸水垫顶面;在中央腔壳体下方的硝酸纤维素膜上由左至右间隔喷涂有检测线和质控线,且在检测线上喷涂有黄曲霉毒素M1的抗独特型抗体,在质控线上喷涂有羊抗鼠IgG抗体;

[0009] 所述微孔试剂包括包被有胶体金标记黄曲霉毒素M1单克隆抗体的塑料微孔,在塑料微孔的顶端敞口端通过塑料孔盖帽进行密封,且八个塑料微孔依次连接形成一组微孔试剂;

[0010] 所述盒体为长方形壳体,盒体的顶端敞口处设置有与盒体一侧连接的扣盖,在盒体的内部放置有纸托,在所述纸托上开设有多个孔位;

[0011] 每个塑料桶内放置有一组微孔试剂和八个胶体金试纸,且每个塑料桶放置在盒体中纸托上相应的孔位内。

[0012] 优选的,所述塑料桶的个数为十二个,所述纸托上开设有的孔位的个数为十二个。

[0013] 优选的,所述胶体金试纸的整体长度为7cm,胶体金试纸的整体宽度为4cm;检测线和质控线的整体宽度均为2mm。

[0014] 优选的,所述微孔板架为96孔塑料板架。

[0015] 优选的,所述一次性塑料吸管为0.2mL的一次性巴士吸管。

[0016] 优选的,所述检测线与质控线平行设置。

[0017] 本实用新型具有如下优点:

[0018] 本实用新型与传统仪器方法和国家标准方法相比较,本实用新型突出优点在于:一、检测灵敏、速度快、操作简便,单个样本检测时间为10min,检测灵敏度满足国家标准要求。并且操作简便,一般的奶站工人无需培训即可上手操作。二、成本低廉,单个样本检测成本不超过15元,是仪器检测方法的十分之一,甚至更少,可以给检测单位节省大量成本,并且生产成本降低,生产过程无需设计黄曲霉毒素M1本身,安全性好。三、无需特殊仪器设备,适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用,有助于从生产一线控制乳品质量。四、稳定性好,由于利用抗独特型抗体替代了现有技术常见的黄曲霉毒素M1与载体蛋白的偶联物,直接提高了检测试纸条的保存稳定性。

附图说明

[0019] 图1为本实用新型中胶体金试纸的主视结构示意图;

[0020] 图2为图1去除透明塑料壳的俯视结构示意图;

[0021] 图3为微孔试剂的结构示意图;

[0022] 图4是塑料桶的结构示意图;

[0023] 图5为微孔板架的结构示意图;

[0024] 图6为盒体及纸托的结构示意图。

具体实施方式

[0025] 以下实施例用于说明本实用新型,但不用来限制本实用新型的范围。

[0026] 实施例1

[0027] 这里需要说明的是,所述方位词左、右、上、下均是以图1所示的视图为基准定义的,应当理解,所述方位词的使用不应限制本申请所请求的保护范围。

[0028] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0029] 如图1至图6所示,一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件,它包括微孔板架10、盒体13、多个胶体金试纸1、多个微孔试剂8、多个塑料桶14和多个一次性塑料吸管;

[0030] 所述胶体金试纸1包括PVC背板2以及固结在PVC背板2上的透明塑料壳18,在所述透明塑料壳18内的PVC背板2顶面上由左至右依次附着有样品垫4、硝酸纤维素膜5和吸水垫3,所述透明塑料壳18包括压盖在样品垫4与硝酸纤维素膜5对接处的左壳体18a、罩盖在硝酸纤维素膜5上方的中央腔壳体18b、压盖在硝酸纤维素膜5和吸水垫3对接处的右壳体18c,左壳体18a、中央腔壳体18b和右壳体18c依次连接,且所述左壳体18a的左端延伸至样品垫4的顶面中部,右壳体18c的右端延伸至吸水垫3上并完全覆盖吸水垫3顶面;在中央腔壳体18b下方的硝酸纤维素膜5上由左至右间隔喷涂有检测线6和质控线7,且在检测线6上喷涂有黄曲霉毒素M1的抗独特型抗体,在质控线7上喷涂有羊抗鼠IgG抗体;

[0031] 所述微孔试剂8包括包被有胶体金标记黄曲霉毒素M1单克隆抗体的塑料微孔8a,在塑料微孔8a的顶端敞口端通过塑料孔盖帽9进行密封,且八个塑料微孔8a依次连接形成一组微孔试剂8;

[0032] 所述盒体13为长方形壳体,盒体13的顶端敞口处设置有与盒体13一侧连接的扣盖,在盒体13的内部放置有纸托11,在所述纸托11上开设有多个孔位12;

[0033] 每个塑料桶14内放置有一组微孔试剂8和八个胶体金试纸1,且每个塑料桶14放置在盒体13中纸托11上相应的孔位12内。

[0034] 同时,将产品操作说明书、质控报告等一起包装于盒体中,形成完整的检测试剂盒。

[0035] 本实用新型的组装方法为:

[0036] 一、黄曲霉毒素M1微孔试剂的准备:

[0037] (一)黄曲霉毒素M1单克隆抗体的制备与筛选:

[0038] 将黄曲霉毒素M1与牛血清白蛋白的偶联物免疫Balb/C小鼠,50 μ g每次,首次免疫时与等量弗氏完全佐剂乳化混匀,后续免疫与弗氏不完全佐剂乳化混匀。免疫方式为皮下多点注射。5次免疫后采血测定效价,然后以100 μ g前述偶联物加强免疫,按照常规方法进行细胞融合,以黄曲霉毒素M1为标准品筛选特异性单克隆抗体。挑选抗体灵敏度接近于0.3ng/mL的单抗细胞株用于后续试纸条生产。

[0039] (二)黄曲霉毒素M1单克隆抗体的纯化

[0040] 采用体内诱生法制备黄曲霉毒素M1腹水单抗,收集腹水后以饱和硫酸铵沉淀法纯化腹水抗体,具体操作参考文献进行。粗纯的腹水抗体继续以Protein G亲和层析柱纯化,具体操作参考亲和柱操作说明书进行,此处不再赘述。亲和纯化获得高纯度的黄曲霉毒素M1单克隆抗体即可直接用于胶体金标记。

[0041] (三)胶体金的制备:

[0042] 取0.01%氯金酸水溶液100ml用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.5ml,继续搅拌加热20min,溶液呈透亮的红色。室温冷却,用去离子水恢复到原体积,4 $^{\circ}$ C保存。

[0043] (四) 胶体金颗粒标记单抗的制备:

[0044] 取制备好的胶体金颗粒溶液,用0.1mol/L K_2CO_3 或0.1mol/L HCl调节胶体金溶液的pH值为8.2。置于磁力搅拌器上,然后将纯化后的黄曲霉毒素M1单克隆抗体以PBS按照1:2000的比例稀释后加入胶体金溶液中搅拌反应60分钟,然后将PEG20000溶液加入混合反应液中,使PEG的最终浓度约为1%,置于在4℃和条件下冷冻离心机上慢速,所述上慢速为11000~13000rpm,通过上慢速离心10分钟后弃去上清液。

[0045] 将下层沉淀用PBS反复洗涤并继续离心弃去多余上清液,最后将沉淀物以PBS缓冲液重悬,使最终的蛋白浓度约为25~50 μ g/mL左右。

[0046] 制备好的金标抗体按照100 μ L的量分装于96孔酶标板孔中,冷冻干燥,然后以酶标板孔盖帽密封,此时,黄曲霉毒素M1试纸条所用的微孔试剂制备完毕。制备好的微孔试剂置于4℃保存备用。

[0047] 二、黄曲霉毒素M1检测线、质控线溶液的准备:

[0048] (一) 黄曲霉毒素M1单克隆抗体Fab片段的制备:

[0049] 参考《分子免疫学实验指南》将纯化的黄曲霉毒素M1单克隆抗体通过木瓜蛋白酶水解,制备获得该抗体的抗原结合片段(fab片段),即:

[0050] 取20mg黄曲霉毒素M1单克隆抗体溶解于10mL PBS中,然后加入10mL含有0.1mg/mL木瓜蛋白酶(sigma,货号为)的PBS缓冲液,置于37℃孵育2h。将水解好的Fab片段以蛋白G柱亲和纯化后,再通过黄曲霉毒素M1亲和层析柱亲和纯化,经SDS-PAGE鉴定纯度,最后以PBS透析除盐,保存备用。

[0051] (二) 黄曲霉毒素M1抗独特型抗体的制备:

[0052] 由于抗独特型抗体与抗体属于内部镜像关系,可以一对一特异性的结合,因此可以作为抗原的替代品。本实用新型即利用黄曲霉毒素M1的抗独特型抗体作为检测抗原包被在硝酸纤维素膜上。黄曲霉毒素M1抗独特型抗体的制备过程如下:

[0053] 将纯化的黄曲霉毒素M1单克隆抗体Fab片段免疫新西兰大耳兔,100 μ g/只/次,首次免疫时与等量弗氏完全佐剂乳化混匀,后续免疫与弗氏不完全佐剂乳化混匀。免疫方式为皮下多点注射。三次免疫后采血测定效价,待血清效价大于1:10000,并且OD450nm大于1.5时采血收集血清。以饱和硫酸铵法沉淀血清IgG后再利用蛋白G亲和纯化,即获得了黄曲霉毒素M1抗独特型抗体IgG。

[0054] (三) 黄曲霉毒素M1检测试纸条检测线6和质控线7的准备:

[0055] 将黄曲霉毒素M1抗独特型抗体IgG以PBS稀释至20 μ g/mL备用。

[0056] 将商品化的羊抗鼠二抗以PBS稀释至200 μ g/mL备用。

[0057] 三、胶体金试纸的组装:

[0058] 用划膜仪在硝酸纤维素膜5上喷涂出两条线,即检测线6和质控线7,包被量分别为1.0 μ L/cm²和1.0 μ L/cm²;将喷涂好的硝酸纤维素膜5置于37℃干燥2h;然后将硝酸纤维素膜5粘贴在PVC背板2上,同时在PVE背板2靠近质控线7的一端粘贴上吸水垫3,在另一端粘贴上样品垫4。将粘贴好的PVC大板用切条机切成宽度为4mm的单条状。挑选其中吸水垫3、样品垫4完整,且质控线7、检测线6无损坏的单条作为备用。

[0059] 四、胶体金检测试剂盒的组装:

[0060] 将一组微孔试剂8和八个胶体金试纸1装在含有干燥剂的塑料桶14中,贴好标签;

十二个塑料桶14装在盒体13中纸托11上相应的孔位12内,然后贴好外标签,盒体13塑封后放置于2-8℃保存。

[0061] 五、本实用新型检测操作时的使用方法如下:

[0062] (一)准备样本和试纸条:将牛奶样本和试纸条从冷藏环境中取出,置于室温30min以上,使其充分回温。

[0063] (二)打开盒体13,根据检测样本的数量取相应数量的胶体金试纸1、微孔试剂8、一次性吸管和微孔板架。

[0064] (三)将准备好的微孔试剂8放置在微孔板架10上,用一次性塑料吸管吸取0.2mL牛奶样本加入微孔试剂8的塑料微孔8a内,上下吸打3次,使得牛奶样本与冷冻干燥的胶体金标记的黄曲霉毒素M1单克隆抗体充分混合,然后室温静置5min;

[0065] (四)取出胶体金试纸1,将样品垫4端插入混匀的牛奶样本中,开始计时5min,完毕,根据试纸条说明书判断检测结果。

[0066] (五)如果检测线6比质控线7的颜色浅或者不显色,则为阳性,如果检测线6比质控线7的颜色深,则为阴性。如果质控线7不显色,则结果作废,需要更换胶体金试纸1重新检测。

[0067] 通过在PVC背板2上设置透明塑料壳18,左壳体18a压盖在样品垫4与硝酸纤维素膜5对接处,右壳体18c压盖在硝酸纤维素膜5和吸水垫3对接处,进而对样品垫4、硝酸纤维素膜5和吸水垫3起到加固作用,防止在使用时其位置发生窜动,影响检测效果。中央腔壳体18b方便观看检测结果。

[0068] 同时,左壳体18a的左端延伸至样品垫4的顶面中部,使得样品垫4的左半部露出来插入血清样本,起到截流作用防止插入过深,血清样本过盛而发生冲样。右壳体18c的右端延伸至吸水垫3上并完全覆盖吸水垫3顶面,将吸水垫3完全盖住,右壳体18c处可做为胶体金试纸1的手持部分,防止在胶体金试纸1在插入取出等转移的过程中受到污染,方便使用。

[0069] 实施例2

[0070] 在上述技术方案基础上,所述塑料桶14的个数为十二个,所述纸托11上开设有的孔位12的个数为十二个。如此设置,配备数量充足,满足实际需要。

[0071] 实施例3

[0072] 在上述技术方案基础上,所述胶体金试纸1的整体长度为7cm,胶体金试纸1的整体宽度为4cm;检测线6和质控线7的整体宽度均为2mm。如此设置,体积小,操作方便,满足实际需要。

[0073] 实施例4

[0074] 在上述技术方案基础上,所述微孔板架10为96孔塑料板架。如此设置,塑料板架工作性能稳定,用于提供检测反应的支撑载体,满足实际需要。

[0075] 实施例5

[0076] 在上述技术方案基础上,所述一次性塑料吸管的管径为0.2mL的一次性巴士吸管。如此设置,工作性能稳定,使用方便,满足实际需要。

[0077] 实施例6

[0078] 在上述技术方案基础上,所述检测线6与质控线7平行设置。如此设置,确保检测效果,满足实际需要。

[0079] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本实用新型作了详尽的描述,但在本实用新型基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本实用新型精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本实用新型要求保护的范畴。

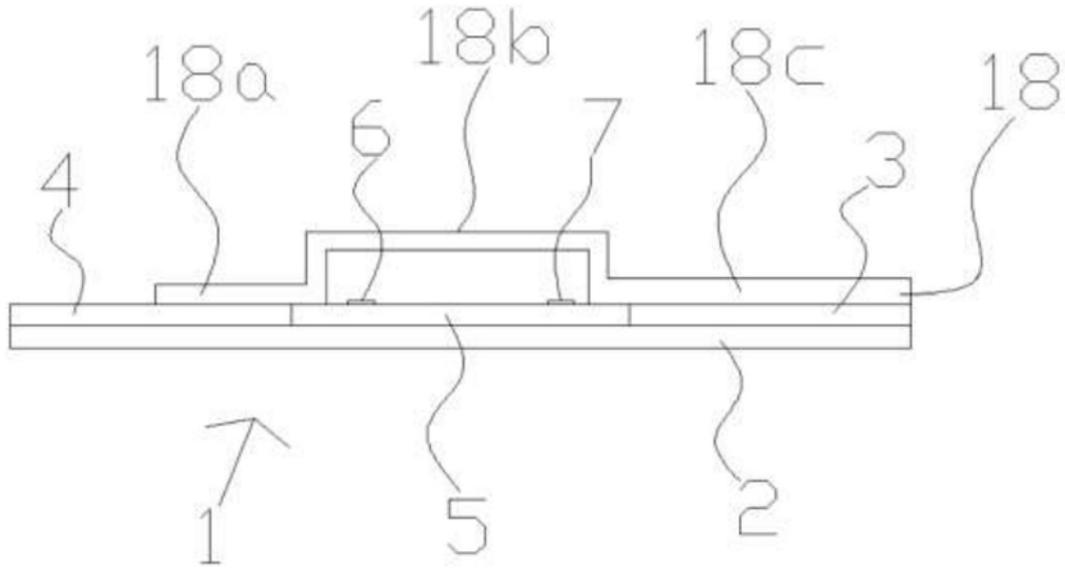


图1

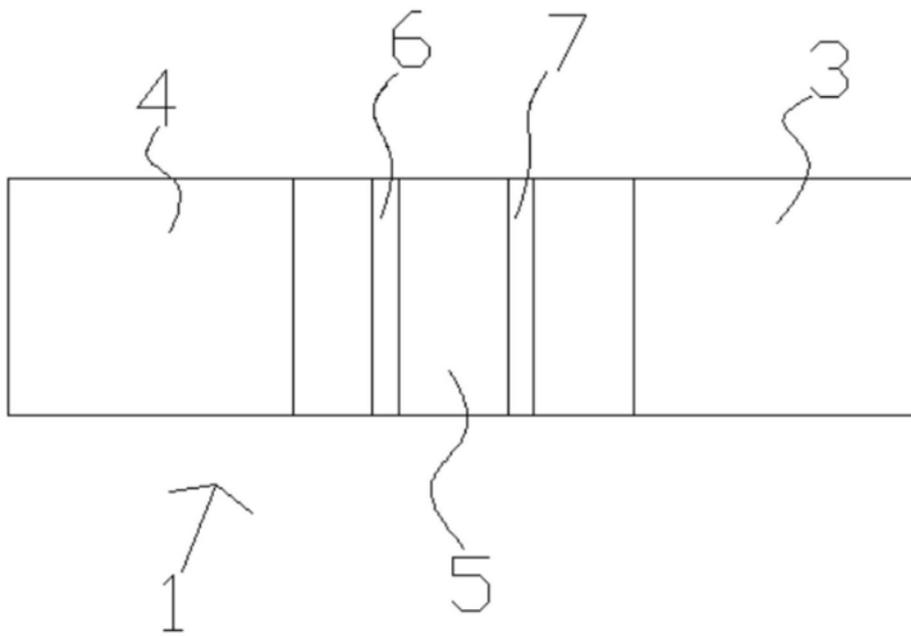


图2

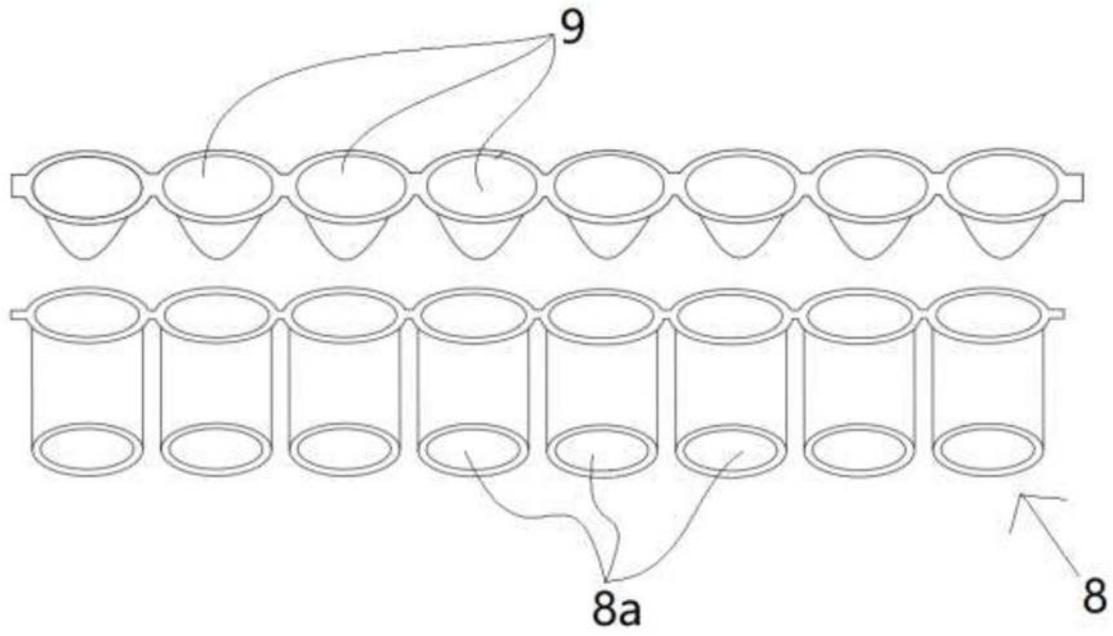


图3

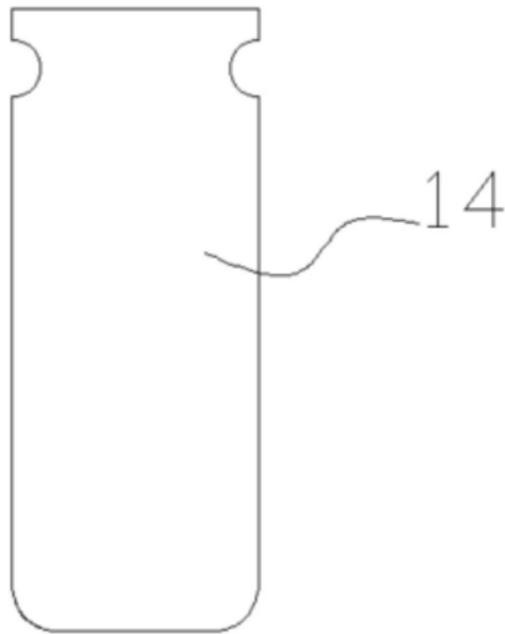


图4

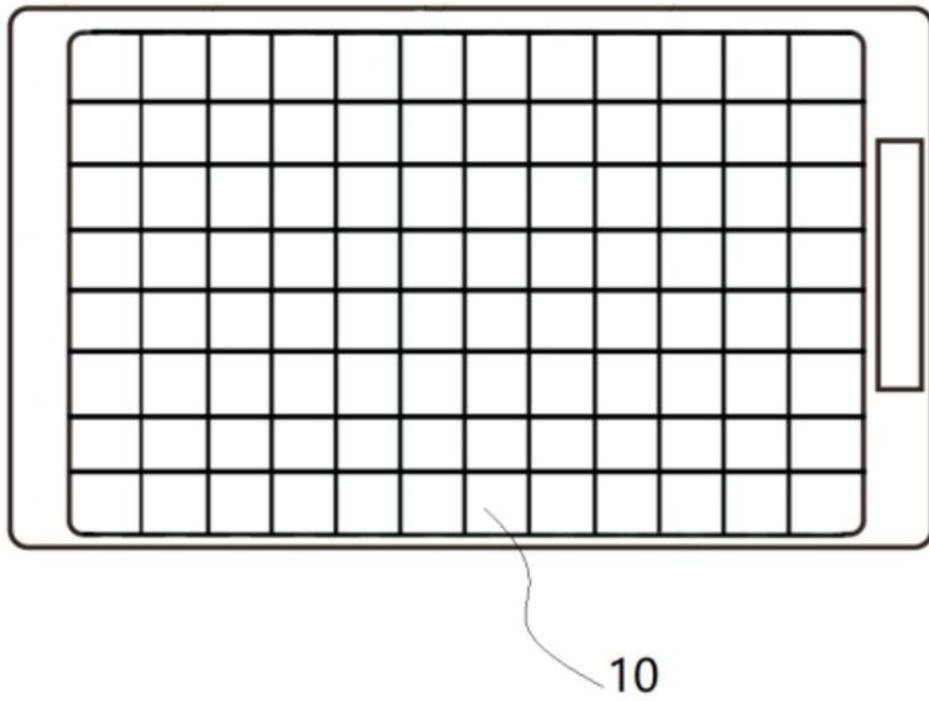


图5

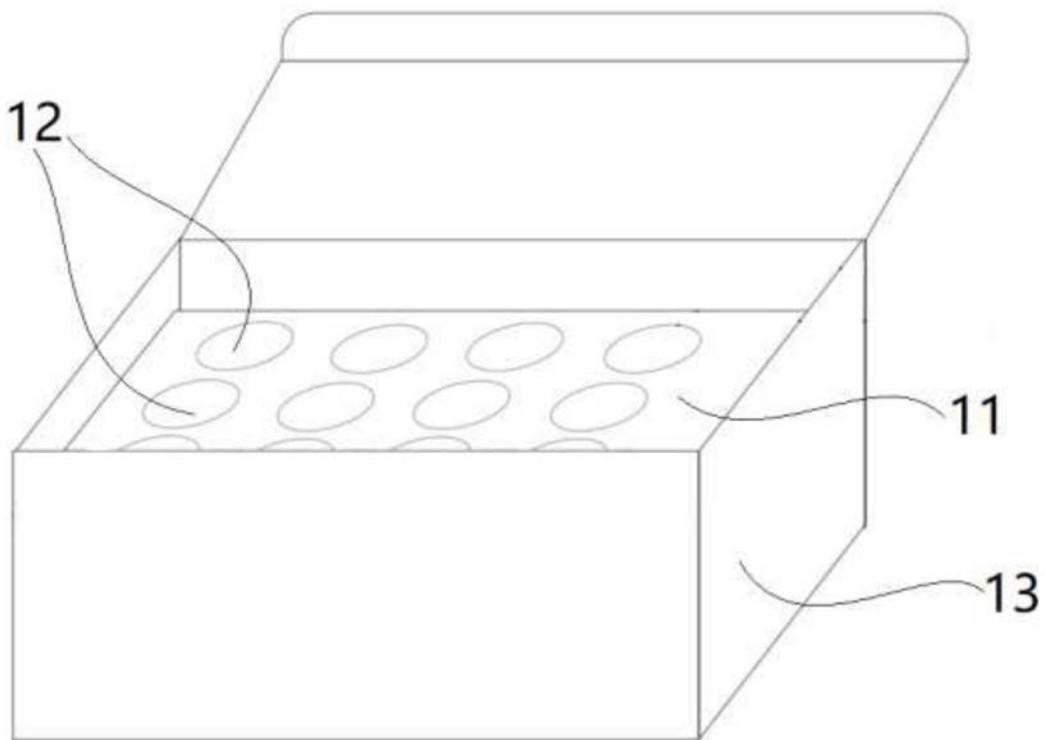


图6

专利名称(译)	一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件		
公开(公告)号	CN208888251U	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201820620218.0	申请日	2018-04-27
[标]发明人	宋世燕 邵宗洋 郭秀锋 刘彩娟		
发明人	宋世燕 邵宗洋 郭秀锋 刘彩娟		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	孙进华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种检测黄曲霉毒素M1的胶体金试纸条组件，食品安全免疫检测技术领域，它包括微孔板架、箱体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管。本实用新型与传统仪器方法和国家标准方法相比较，检测灵敏、速度快、操作简便，单个样本检测时间为10min，检测灵敏度满足国家标准要求。并且操作简便，一般的奶站工人无需培训即可上手操作。成本低廉，单个样本检测成本不超过15元，生产过程无需设计黄曲霉毒素M1本身，安全性好。无需特殊仪器设备，适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用，有助于从生产一线控制乳品质量。

