



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111007245 B

(45) 授权公告日 2021.09.21

(21) 申请号 201911122490.1

G01N 33/533 (2006.01)

(22) 申请日 2019.11.15

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103278631 A, 2013.09.04

申请公布号 CN 111007245 A

CN 103215230 A, 2013.07.24

CN 106932586 A, 2017.07.07

(43) 申请公布日 2020.04.14

Richard Dietrich, et al..Use of

(83) 生物保藏信息

Monoclonal Antibodies for the Analysis of Mycotoxins..《Natural Toxins》.1995,第3卷(第4期),摘要,第289页.

CCTCC NO:C201881 2018.04.03

(73) 专利权人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二路2号

E.N.Clare Mills, et al..An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Diacetoxyscirpenol Applied to the Analysis of Wheat..《J.SCI.FOOD.AGRIC.》.1988,225-233.

(72) 发明人 张奇 唐晓倩 白艺珍 张文

李培武

李业鹏,等.二乙酰镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备..《卫生研究》.1992,254-257.

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限公司 42102

代理人 乔宇

审查员 张绚

(51) Int.Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

G01N 33/558 (2006.01)

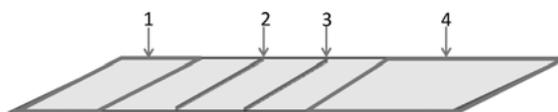
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒。它包括荧光试纸条和含有标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中:所述的荧光试纸条包括衬板,衬板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线上包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(DAS-OVA)。可准确、快速的测定二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量。



1. 二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,其特征在於:它包括荧光试纸条和含有铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中:所述的荧光试纸条包括衬板,衬板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线上包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原DAS-OVA;所述的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为 CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生。

2. 根据权利要求1所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,其特征在於:所述铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体是按照以下方法制得:将抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体用碳酸盐缓冲溶液透析后和铈标记试剂以质量比为 0.5 ~ 2:1 的比例充分混匀后静置过夜,然后经 Sephadex G-50 层析柱分离铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体,洗脱,收集目标产物。

3. 根据权利要求1所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,其特征在於:所述荧光试纸条中的吸水垫长 15 ~ 20mm,宽 3 ~ 4mm;检测垫长 25 ~ 30mm,宽 3 ~ 4mm;样品垫长 12 ~ 18mm,宽 3 ~ 4mm,相邻各垫的交叠长度为 1 ~ 3mm。

4. 根据权利要求1所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,其特征在於:所述荧光试纸条中检测垫上的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15 ~ 20mm,质控线和检测线的间距为 5~10mm;所述的样品反应瓶为 1 ~ 5mL的卡口瓶。

5. 根据权利要求1所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,其特征在於:所述荧光试纸条中检测垫上每厘米检测线所需的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原包被量480 ~ 1000ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量100 ~ 900 ng;所述样品反应瓶中铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的含量 0.2 ~ 1.0 μg 。

6. 根据权利要求1所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,其特征在於:所述的荧光试纸条是采用以下方法获得的:

(1) 将吸水纸剪裁成所需大小得吸水垫;

(2) 检测垫的制备:

将二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原DAS-OVA配制成浓度为0.125 ~ 0.8mg/mL的DAS-OVA抗原包被液,用划膜方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,然后于37 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥 30 ~ 60分钟;将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度0.1 ~ 1.0mg/mL的包被液,用划膜方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,然后于37~40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥 30 ~ 60分钟;

(3) 样品垫的制备:

将玻璃纤维膜放入封闭液中完全浸湿,取出后于37 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥 3 ~ 6小时,得所需样品垫,置干燥器中室温保存;

(4) 荧光试纸条的组装 :

依次将吸水垫、检测垫、样品垫粘贴在衬板的一面,相邻各垫在连接处交叠连接即得荧光试纸条。

7. 根据权利要求6所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂

盒,其特征在于:所述荧光试纸条的制备中配制二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原DAS-OVA包被液中所使用的包被缓冲液为:每 10mL 中含有牛血清白蛋白 0.1g,氯化钠 0.08g,氯化钾 0.002g,叠氮化钠 0.002g,十二水磷酸氢二钠 0.029g,磷酸二氢钾 0.002g;

配制兔抗鼠多克隆抗体包被液中所使用的包被缓冲液为:每 10mL 中含有氯化钠 0.08g,氯化钾 0.002g,叠氮化钠0.002g,十二水磷酸氢二钠 0.029g,磷酸二氢钾 0.002g;

所述荧光试纸条的制备中使用的封闭液为:每 100mL 中含有卵清白蛋白 0.5 ~ 2g,蔗糖 1 ~ 2g,氯化钠 0.8g,氯化钾 0.02g,叠氮化钠 0.02g,十二水磷酸氢二钠 0.29g,磷酸二氢钾0.02g。

8. 根据权利要求1所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,其特征在于:所述二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒还包括样品稀释液及样品稀释液吸管,所述的样品稀释液为体积分数为 0.01 ~ 0.30% 的吐温 20水溶液。

9. 权利要求1所述的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒在二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量检测中的应用:将待测样品液加入样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应 6 ~ 10分钟后,用时间分辨荧光测试仪进行检测,获得荧光试纸条上检测线荧光强度值和质控线荧光强度值的比值;基于预先获得的荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值与二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线,获得待测样品液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于:所述的荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值与二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线是采用以下方法得到的:

(1) 配制得到一系列浓度梯度的二乙酰镰草镰刀菌烯醇标准品溶液;

(2) 将适量上述各浓度的二乙酰镰草镰刀菌烯醇标准品溶液分别加入到样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应 6 分钟,用时间分辨荧光免疫分析仪检测得到各荧光试纸条上检测线和质控线的时间分辨荧光强度值,由此获得各荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值;

(3) 经拟合得到荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值与二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线。

二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属真菌毒素检测领域,具体涉及二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后时间分辨荧光速测试剂盒。

背景技术

[0002] 真菌毒素(mycotoxins)是真菌在生长过程中产生的有毒次生代谢产物,真菌毒素通常是低分子物质,而且绝大多数真菌毒素都属热稳定物质。从霉菌毒素被发现以来,已经确认的真菌毒素大约有300多种之多,其中镰刀菌毒素具有毒性强和污染频率高的特点,单端孢霉烯族化合物又是镰刀菌毒素中污染水平较高,危害较大的一类。单端孢霉毒素分为A和B两类,二乙酰镰草镰刀菌烯醇属于单端孢霉毒素A类。二乙酰镰草镰刀菌烯醇急性毒性较强,对大鼠的LD₅₀为0.75mg/kg,热稳定性也较强,一般烹调手段不能破坏毒素。中毒后临床表现为严重的皮炎、恶心、呕吐、血性腹泻、骨髓造血系统损害、神经系统紊乱、厌食和死亡。鉴于其危害作用及其在粮食和饲料中的广泛发生,世界各国对其含量进行了严格限定。随着生活水平的不断提高,人们对食品质量安全的要求越来越高。为了提高我国食品质量安全水平,更大程度的满足人们的安全消费需求,应加强对粮食中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的监测,开发准确、高效的检测技术。

[0003] 目前真菌毒素的检测方法主要是仪器分析法和免疫分析法。仪器分析法如高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等灵敏度高,准确性好,但仪器昂贵,样品前处理过程繁琐,耗时长,对实验环境要求高等不足,难以实现快速检测。免疫分析法是以抗原与抗体的特异性识别作用和可逆性结合反应为基础的分析方法,该方法具有很高的选择性和灵敏度,与仪器分析法相比大大简化缩短样品处理时间,节约了检测成本。时间分辨荧光免疫分析(TRFICA)利用镧作为高亲和力探针,具有灵敏度高、性质稳定、避免荧光背景的干扰,检测时间短等优点,非常适合开发农药残留快速检测方法。

[0004] 因此开发一种二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,具有很大的必要性和十分重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的问题是提供二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒。

[0006] 二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,它包括荧光试纸条和含有镧标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的样品反应瓶,其中:所述的荧光试纸条包括衬板,衬板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线上包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(DAS-OVA);所述的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号

为CCTCC NO.C201881的杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌产生。所述的杂交瘤细胞株DAS5G11E7于2018年4月3日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址是,中国,武汉,武汉大学,保藏编号为CCTCC NO.C201881。

[0007] 按上述方案,所述铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体是按照以下方法制得:将抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体用碳酸盐缓冲溶液透析后和铈标记试剂以质量比为0.5~2:1的比例充分混匀后静置过夜,然后经Sephadex G-50层析柱分离铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体,洗脱,收集目标产物。

[0008] 按上述方案,所述荧光试纸条中的吸水垫长15~20mm,宽3~4mm;检测垫长25~30mm,宽3~4mm;样品垫长12~18mm,宽3~4mm,相邻各垫的交叠长度为1~3mm。

[0009] 按上述方案,所述荧光试纸条中检测垫上的检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15~20mm,质控线和检测线的间距为5~10mm;所述的样品反应瓶为1~5mL的卡口瓶。

[0010] 按上述方案,所述荧光试纸条中检测垫上每厘米检测线所需的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原包被量480~1000ng;每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量100~900ng;所述样品反应瓶中铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的含量0.2~1.0ug。

[0011] 按上述方案,所述的荧光试纸条是采用以下方法获得的:

[0012] (1) 将吸水纸剪裁成所需大小得吸水垫;

[0013] (2) 检测垫的制备:

[0014] 将二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(DAS-OVA)配制成浓度为0.125~0.8mg/mL的DAS-OVA抗原包被液,用划膜方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;将兔抗鼠多克隆抗体配成浓度0.1~1.0mg/mL的包被液,用划膜方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,然后于37~40℃条件下干燥30~60分钟;

[0015] (3) 样品垫的制备:

[0016] 将玻璃纤维膜放入封闭液中完全浸湿,取出后于37~40℃条件下干燥3~6小时,得所需样品垫,置干燥器中室温保存;

[0017] (4) 荧光试纸条的组装:

[0018] 依次将吸水垫、检测垫、样品垫粘贴在衬板的一面,相邻各垫在连接处交叠连接即得荧光试纸条。

[0019] 按上述方案,所述荧光试纸条的制备中配制二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(DAS-OVA)包被液中所使用的包被缓冲液为:每10mL中含有牛血清白蛋白0.1g,氯化钠0.08g,氯化钾0.002g,叠氮化钠0.002g,十二水磷酸氢二钠0.029g,磷酸二氢钾0.002g;

[0020] 配制兔抗鼠多克隆抗体包被液中所使用的包被缓冲液为:每10mL中含有氯化钠0.08g,氯化钾0.002g,叠氮化钠0.002g,十二水磷酸氢二钠0.029g,磷酸二氢钾0.002g;

[0021] 所述荧光试纸条的制备中使用的封闭液为:每100mL中含有卵清白蛋白0.5~2g,蔗糖1~2g,氯化钠0.8g,氯化钾0.02g,叠氮化钠0.02g,十二水磷酸氢二钠0.29g,磷酸二氢钾0.02g。

[0022] 按上述方案,所述二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒还包括样品稀释液及样品稀释液吸管,所述的样品稀释液为体积分数为0.01~0.30%的吐

温20水溶液。

[0023] 上述二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒在二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量检测中的应用:将待测样品液加入样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应6~10分钟后,用时间分辨荧光测试仪进行检测,获得荧光试纸条上检测线(T)荧光强度值和质控线(C)荧光强度值的比值;基于预先获得的荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线,获得待测样品液中二乙酰镰草镰刀菌烯醇的含量。

[0024] 按上述方案,所述的荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线是采用以下方法得到的:

[0025] (1) 配制得到一系列浓度梯度的二乙酰镰草镰刀菌烯醇标准品溶液;

[0026] (2) 将适量上述各浓度的二乙酰镰草镰刀菌烯醇标准品溶液分别加入到样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应6分钟,用时间分辨荧光免疫分析仪检测得到各荧光试纸条上检测线(T)和质控线(C)的时间分辨荧光强度值,由此获得各荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C);

[0027] (3) 经拟合得到荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C)与二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线。

[0028] 本研究将二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体与稀土元素铕标记试剂相偶联,研制出了高灵敏的二乙酰镰草镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析试纸条,利用时间分辨荧光仪进行定量,建立了时间分辨荧光免疫层析方法,具有灵敏度高、性质稳定、避免荧光背景的干扰,检测时间短(一般检测只需6-8min)等优点,非常适合开发农药残留快速检测方法,可快速灵敏的检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇。

[0029] 本发明的有益效果:

[0030] 本发明提供的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒可准确、快速的测定二乙酰镰草镰刀菌烯醇含量。其对二乙酰镰草镰刀菌烯醇的样品检出限为0.1ng/mL(空白样品检测11次,计算SD值,检出限为3SD)。该试纸条应用于实际样品的检测,检测结果与HPLC方法进行比对,回收率在87.7%-115.3%之间,结果符合相关系数达到0.988(R2),可用于二乙酰镰草镰刀菌烯醇实际样品检测。

附图说明

[0031] 图1为本发明提供的二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒中荧光试纸条的结构示意图。图中:1样品垫、2检测线、3质控线、4吸水垫。

[0032] 图2为本发明提供的二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体亲和力测定数据;

[0033] 图3(a)为本发明提供的二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体与其他真菌毒素交叉反应结果;(b)本发明提供的二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体建立的二乙酰镰草镰刀菌烯醇酶联免疫方法标准曲线。

具体实施方式

[0034] 抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的获得

[0035] 抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO.C201881的杂交瘤

细胞株DAS5G11E7分泌产生,制备方法为:

[0036] 将杂交瘤细胞株DAS5G11E7注射预先用弗氏不完全佐剂处理过的BALB/c小鼠,收集该小鼠的腹水,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,具体操作为:用双层滤纸过滤小鼠腹水,4℃,12000r/min离心15min以上,吸取上清,将所得腹水上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸,每毫升腹水所需的正辛酸体积为30-35μL,室温混合30-60min,4℃静置2h以上。12000r/min,4℃离心30min以上,弃沉淀,将得到的上清液用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的摩尔浓度为0.1mol/L和pH为7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L的氢氧化钠溶液调节该混合液的pH至7.4,冰浴中缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h以上,然后12000r/min,4℃离心30min以上,弃上清,将所得沉淀用原腹水体积1/10体积的摩尔浓度为0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用0.01mol/LPBS透析两天,再改用PB透析两天,将透析袋中蛋白溶液取出,离心,收集上清,弃沉淀,放入-70℃预冻后放入冻干机中冻干。收集冻干粉,即为纯化好的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体;

[0037] 所述的醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容到100mL所得;所述的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得;所述的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液为8g氯化钠,2.9g十二水磷酸氢二钠,0.2g氯化钾,0.2g磷酸二氢钾,加水定容到100mL所得。

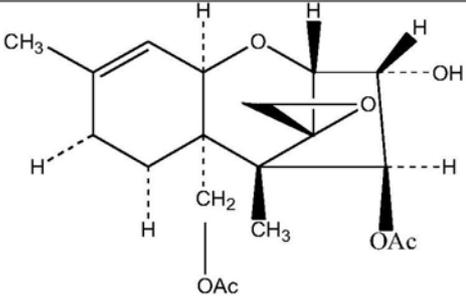
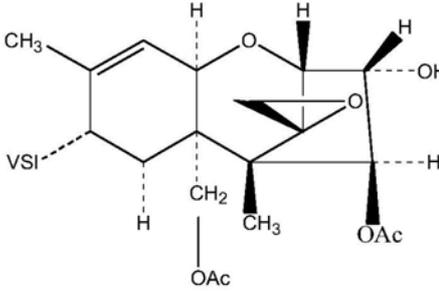
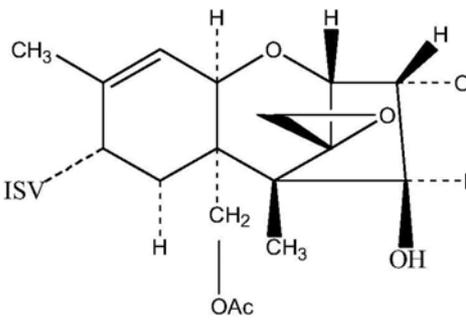
[0038] 用市售亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞株DAS5G11E7分泌的抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的亚型为IgG2b。

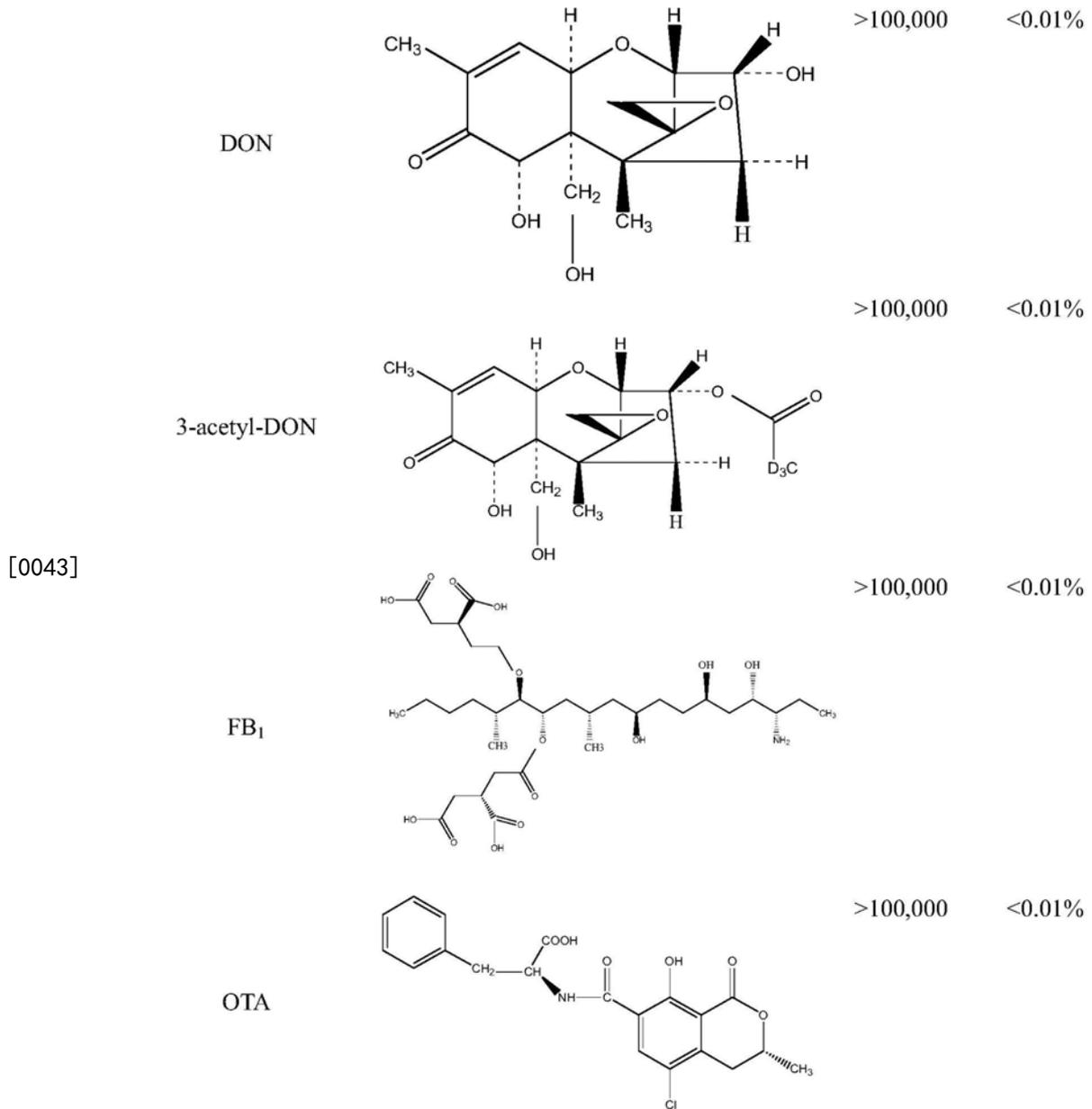
[0039] 用常规非竞争酶联免疫吸附法(ELISA)测得小鼠腹水纯化得到的抗体效价可达到 3.2×10^5 ,即抗体稀释 3.2×10^5 倍时溶液测定结果为阳性。用常规间接竞争ELISA测定其对二乙酸镰草镰刀菌烯醇灵敏度为3.08ng/mL。与其他真菌毒素,T2毒素、HT2毒素、呕吐毒素、3-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇、赭曲霉毒素、伏马毒素的交叉反应均小于0.01%(表1;图3)。抗体的特异性高低可用交叉反应率来评价。采用间接竞争ELISA方法测定DAS5G11E7单克隆抗体,将DAS、T2毒素、HT2毒素、DON、3-ACDON、OTA、FB₁配制系列浓度的标准溶液,分别与等体积抗体共同加入酶标板中,孵育1h,其他步骤同间接竞争ELISA方法。以上述毒素标准品浓度为横坐标,以酶标仪测定的450nm下OD值B/B₀为纵坐标,绘制竞争抑制曲线,通过计算DAS与其他毒素的IC₅₀值比值来判定交叉反应率。计算公式如下:

[0040] $CR\% = (IC_{50}DAS / IC_{50}其他毒素) \times 100$ 。

[0041] 表1.DAS5G11E7与其他毒素的交叉反应。

[0042]

毒素名称	结构	IC50	交叉反应率
DAS		3.08	100%
T-2 毒素		>100,000	<0.01%
HT-2 毒素		>100,000	<0.01%



[0044] 利用间接非竞争ELISA测定DAS5G11E7的亲和力。用DAS-OVA按1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$,2h;封闭液封闭1h后,将用PBS稀释好的抗体(稀释因子1:2)加入酶标板,其余步骤同间接非竞争ELISA方法。以测定的OD450值为纵坐标,抗体浓度(mol/L)的对数值为横坐标,做出4个浓度的4条S形曲线。找出每条S曲线最顶部的最大OD值即OD_{max},找出每条曲线50%OD_{max}值对应的抗体浓度。将4个浓度任意两两一组,根据公式 $K_a = (n-1) / 2 (n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算抗体的亲和力常数,其中 $[Ab']_t$ 、 $[Ab]_t$ 为每组中两个50%最大OD值对应的抗体浓度,n为每组中包被抗原浓度的倍数(包括1:2,1:4,1:8三个比值),共得到6个K_a值。将得到的六个K_a值取平均,得抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇小鼠腹水抗体酶联免疫吸附分析(ELISA)法亲和力可达 $5.4 \times 10^8 \text{L}/\text{mol}$ (图2)。

[0045] 杂交瘤细胞株DAS5G11E7的筛选

[0046] 1. 动物免疫

[0047] 采用实验室制备的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原DAS-BSA对6-7周龄BALB/c小

鼠进行免疫。第一次免疫将二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原与等体积的弗氏完全佐剂乳化后,于小鼠颈背部皮下多点注射。第二次免疫于4周后进行,采用福氏不完全佐剂与等体积的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原乳化,于小鼠腹腔注射。第三次免疫与第二次免疫间隔4周,免疫方式与其相同,第四次免疫于第三次免疫3周后进行,免疫方式与第二次免疫相同,同样为腹腔注射。4次免疫剂量相同,均为每鼠70 μ g。前3次每次免疫后8~10天,尾静脉采血,分离血清,采用间接ELISA对小鼠的血清效价进行检测。第3次免疫后8天,断尾采血,选择效价、灵敏度均相对较高的血清对应的小鼠进行最后一次加强免疫,免疫剂量为前面的2倍。

[0048] 2. 细胞融合

[0049] 加强免疫3天后,采用重量百分数为50%的聚乙二醇分子量为1450的PEG作融合剂,按常规方法进行细胞融合,具体步骤:无菌条件下脱颈处死小鼠,取出脾脏,用均质器碾碎脾脏,采用过滤网分离脾细胞,与鼠源骨髓瘤细胞SP2/0以5:1的个数比混合,离心,用RPMI-1640基础培养液重悬混合细胞,离心,弃上清。加入50%PEG 1-2mL,共用时1分钟,贴壁加入RPMI-1640基础培养液10-20mL,离心,弃上清,管底的融合细胞用20mL含1%HAT的细胞完全培养基重悬,将悬起的细胞加入到80mL半固体培养基中,混匀后加到6孔细胞培养板上,1.5mL/孔,置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱培养。所述的含1%HAT的细胞完全培养基含有20% (体积百分数)胎牛血清,75% (体积百分数)RPMI-1640基础培养液,1% (重量百分数)L-谷氨酰胺,1% (体积百分数)HEPES,1% (体积百分数)双抗(10000单位每毫升青霉素和10000微克每毫升链霉素),2% (体积百分数)生长因子(HFCS)和1% (重量百分数)次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷即HAT和甲基纤维素购于sigma-Aldrich公司。

[0050] 细胞株的筛选及克隆

[0051] 待细胞融合后2-3周,细胞集落长至肉眼可见时,用微量移液器将克隆从培养基中挑出,转移至96孔细胞培养板采用HAT液体培养,待细胞长至2/3孔底时,吸取培养上清进行检测。采用两步筛选法,第一步采用间接ELISA方法,筛选出抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇而不抗载体蛋白BSA的阳性孔;第二步采用间接竞争ELISA法对第一步筛选出的阳性孔进行检测,用二乙酸镰草镰刀菌烯醇作为竞争原,选择吸光值和灵敏度均较高的孔(吸光值较高指竞争原为0的孔即阳性对照孔的最终测定值较高,灵敏度较高指抑制率为50%时的竞争原浓度亦IC₅₀值较小),采用有限稀释法进行亚克隆,亚克隆后采用同样的两步法进行检测,如此重复亚克隆4-5次后,获得杂交瘤细胞株DAS5G11E7。该杂交瘤细胞株已于2018年4月3日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址是,中国,武汉,武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:C201881。

[0052] 抗二乙酸镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体杂交瘤细胞株DAS5G11E7抗体可变区序列测定

[0053] (1) 提取总RNA:采用天根公司的总RNA提取试剂盒并按照说明书提取可产生杂交瘤细胞株DAS5G11E7的总RNA;

[0054] (2) 合成cDNA:以步骤1获得的总RNA为模板,oligo(dT)15为引物,按照SuperScriptTM-2II反转录酶说明书进行反转录,合成cDNA第一链;引物oligo(dT)15由Invitrogen购得;

[0055] (3) PCR法克隆可变区基因:根据GENBANK中小鼠抗体基因序列的保守位点设计引

物,以CDNA为模版扩增抗体重链、轻链可变区基因。PCR程序为:94℃30s、58℃45s、72℃1min,扩增30个循环,最后72℃延伸10min。PCR产物经过1% (重量百分数)的琼脂糖凝胶电泳分离后,用试剂盒纯化回收DNA片段,连接在载体pMD18-T中,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆,送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序。其中引物的序列分别为:重链可变区引物为5'-CAG GTS MAR CTG MAG GAG TCW G-3' (22mer)和5'-CAG GGG CCA GTG GAT AGA CAG ATG GGG G-3' (28mer),其中S、M、R和W为兼并碱基,M=A/C,R=A/G,S=G/C,W=A/T,轻链可变区引物为5'-GAC ATC AAG ATG ACC CAG TCT CCA-3' (24mer)和5'-CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC-3' (24mer)。

[0056] 得到的基因序列结果:重链可变区编码基因序列长351bp,序列如SEQ ID NO:1所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的重链可变区由117个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:3所示。轻链可变区编码基因序列长324bp,序列如SEQ ID NO:2所示,根据所获得的基因序列推导出该基因序列所编码的轻链可变区由108个氨基酸组成,序列如SEQ ID NO:4所示。

[0057] 实施例1:二乙酰镰草镰刀菌烯醇免疫时间分辨荧光速测试剂盒及其应用

[0058] 二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒包括荧光试纸条、样品反应瓶(含有钡标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品)、样品稀释液及样品稀释液吸管。所述的荧光试纸条包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1-2mm,其中:吸水垫长15mm,宽4mm;检测垫长25mm,宽4mm;样品垫长13mm,宽4mm。所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下横向设置质控线和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,所述检测线上包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原,检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为15mm,质控线和检测线的间距为5mm。

[0059] 所述荧光试纸条的获得:

[0060] (1)吸水垫的制备

[0061] 将吸水纸剪裁成长15mm,宽4mm的规格,即得吸水垫;

[0062] (2)检测垫的制备

[0063] 检测线的包被:

[0064] 将二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(DAS-OVA)用包被缓冲液配制成浓度为0.8mg/mL的包被液;于距硝酸纤维素膜上沿15mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需DAS-OVA的包被量为480ng,然后于37℃条件下干燥30分钟;

[0065] 所述的包被缓冲液为:0.1g牛血清白蛋白,0.002g叠氮化钠,0.08g氯化钠,0.029g十二水磷酸氢二钠,0.002g氯化钾,0.002g磷酸二氢钾,加水定容到10mL所得;

[0066] 质控线的包被:

[0067] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配成浓度为0.25mg/mL的包被液;于距检测线6mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为100ng,然后于37℃条件下干燥1小时;

[0068] 所述的包被缓冲液为0.002g叠氮化钠,0.08g氯化钠,0.029g十二水磷酸氢二钠,0.002g氯化钾,0.002g磷酸二氢钾,加水定容至10mL所得;

[0069] (3) 样品垫的制备:

[0070] 将玻璃纤维膜剪裁成长13mm,宽4mm的规格,放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥6小时,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0071] 所述的封闭液为1g卵清白蛋白,2g蔗糖,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0072] (4) 荧光试纸条的组装:

[0073] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、荧光标记抗体反应垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为2mm,即得荧光试纸条(见图2)。

[0074] 所述钬标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的获得:取1mg上述单克隆抗体,用100mmol/L pH 9.3的碳酸盐缓冲液反复洗涤6次后,将其和2mg钬标记试剂充分混匀,于4℃过夜。然后将其加入到1.9cm×60cm的Sephadex G-50层析柱中,用含0.9%NaCl的50mmol/L Tris-HCl洗脱液洗脱,收集流出液(1ml/管),逐管测量吸光值(A280nm),合并峰管,获得目标产物钬标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体。上述钬标记试剂购于上海优你生物科技有限公司,但不限于此。

[0075] 所述含有钬标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干粉的样品反应瓶的获得:取上述钬标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体0.25μg放于3mL卡口瓶中,采用常规冷冻真空干燥方法抽干后,即得钬标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干粉,4℃保存,备用。

[0076] 上述流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒在玉米样品二乙酰镰草镰刀菌烯醇检测中的应用:

[0077] 荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比(T/C)与二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线的建立:

[0078] (1) 对经高效液相色谱(HPLC)检测二乙酰镰草镰刀菌烯醇为阴性的玉米样品进行前处理,将二乙酰镰草镰刀菌烯醇加标至浓度为0.5μg/mL、0.25μg/mL、0.125μg/mL、0.0625μg/mL、0.0312μg/mL、0.0156μg/mL的标准溶液。

[0079] (2) 取上述各浓度的二乙酰镰草镰刀菌烯醇标准品溶液各100μL,分别加入到样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37℃反应6分钟,用吸水纸吸干样品垫残留液体,即刻用时间分辨荧光免疫分析仪检测(激发波长:365nm,测定波长:615nm),得到各荧光试纸条上检测线处(T)和质控线(C)处的荧光强度值,由此获得各荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T/C);

[0080] (3) 以标准品浓度为横坐标,T/C值为纵坐标,建立标准曲线。其定量检测限为0.10ng/mL。

[0081] (4) 在玉米空白样品中添加二乙酰镰草镰刀菌烯醇标准品浓度为0.1μg/mL、0.05μg/mL、0.01μg/mL,以荧光试纸条测得二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度为横坐标,HPLC测得二乙酰镰草镰刀菌烯醇为纵坐标,该方法的添加回收率在87.7%-115.3%之间。

[0082] 实施例2:二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒及其应用

[0083] 二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒,它包括荧光试纸条、含有钬标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干品的样品反应瓶、样品稀释液

及样品稀释液吸管,所述的荧光试纸条包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,交叠长度为1mm,其中:吸水垫长18mm,宽3mm;检测垫长28mm,宽3mm;样品垫长15mm,宽3mm。所述检测垫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和检测线,所述质控线包被有兔抗鼠多克隆抗体,其包被量为150ng/cm质控线,所述检测线上包被二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(DAS-OVA),其包被量为650ng/cm检测线,检测线与硝酸纤维素膜上沿的间距为20mm,质控线和检测线的间距为10mm。

[0084] 所述荧光试纸条的获得:

[0085] (1) 吸水垫的制备

[0086] 将吸水纸剪裁成长18mm,宽3mm的规格,即得吸水垫;

[0087] (2) 检测垫的制备

[0088] 检测线的包被:

[0089] 将二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(DAS-OVA))用包被缓冲液配制成浓度为0.25mg/mL的包被液于距硝酸纤维素膜上沿20mm的位置,用划膜方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得到检测线,每厘米检测线所需的二乙酰镰草镰刀菌烯醇完全抗原(DAS-OVA)包被量为650ng,然后于40℃条件下干燥30分钟;

[0090] 所述的包被缓冲液为:0.1g牛血清白蛋白,0.002g叠氮化钠,0.08g氯化钠,0.029g十二水磷酸氢二钠,0.002g氯化钾,0.002g磷酸二氢钾,加水定容到10mL所得;

[0091] 质控线的包被:

[0092] 将兔抗鼠多克隆抗体用包被缓冲液配成浓度为0.25mg/mL的包被液于距检测线6mm的位置,用线喷方式将其横向包被于硝酸纤维素膜上,得质控线,每厘米质控线所需的兔抗鼠多克隆抗体的包被量为150ng,然后于40℃条件下干燥30min;

[0093] 所述的包被缓冲液为0.002g叠氮化钠,0.08g氯化钠,0.029g十二水磷酸氢二钠,0.002g氯化钾,0.002g磷酸二氢钾,加水定容至10mL所得;

[0094] 所述的硝酸纤维素膜长28mm,宽3mm。

[0095] (3) 样品垫的制备:

[0096] 将玻璃纤维膜剪裁成长15mm,宽3mm的规格,放入封闭液中浸湿,取出,于37℃条件下干燥6小时得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0097] 所述的封闭液为1g卵清白蛋白,2g蔗糖,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾,加水定容至100mL所得;

[0098] (4) 荧光试纸条的组装:

[0099] 在纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫。相邻各部分在连接处交叠连接,交叠长度为2mm,即得荧光试纸条。

[0100] 所述钼标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体的获得:

[0101] 取1mg上述抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体,用100mmol/L pH9.3的碳酸盐缓冲液反复洗涤6次后,将其和2mg钼标记试剂充分混匀,于4℃过夜。然后将其加入到1.9cm×60cm的Sephadex G-50层析柱中,用含0.9%NaCl的50mmol/L Tris-HCl洗脱液洗脱,收集流出液(1ml/管),逐管测量吸光值(A280nm),合并峰管,获得目标产物钼标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体。上述钼标记试剂购于上海优你生物科技有限公司,但不限于此。

[0102] 所述含有铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干粉的样品反应瓶的获得:取上述铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体0.25 μ g放于3mL卡口瓶中,采用常规冷冻真空干燥方法抽干后,得铈标记的抗二乙酰镰草镰刀菌烯醇单克隆抗体冻干粉,4 $^{\circ}$ C保存,备用。

[0103] 所述的样品稀释液为:体积分数为0.30%的吐温20水溶液。

[0104] 上述流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒在玉米样品二乙酰镰草镰刀菌烯醇检测中的应用:

[0105] 在空白玉米样品中添加系列浓度的二乙酰镰草镰刀菌烯醇标准品(1000,200,40,8,1.6,0.32,0.06ng/mL)。前处理后得样品提取液,将各浓度的样品加标提取液取200 μ L加入样品反应瓶中,混匀,插入荧光试纸条,37 $^{\circ}$ C反应6分钟后,用吸水纸吸干样品垫残留液体,立即用时间分辨荧光免疫分析仪检测(激发波长:365nm,测定波长:615nm),测得各浓度荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T_x/C),利用origin 8.5建立 T_x/C 比值与对应的毒素浓度之间的关系曲线。

[0106] 取待测玉米样品五个,前处理后检测步骤同上,采用时间分辨荧光免疫分析仪检测,获得各荧光试纸条检测线荧光强度与质控线荧光强度的比值(T_x/C),然后将其代入荧光试纸条检测线荧光强度与质控荧光强度的比值(T_x/C)与二乙酰镰草镰刀菌烯醇浓度的关系曲线,得:检测回收率在87.7%-115.3%之间,试剂盒与HPLC检测结果相关系数达到0.988(R²)。

[0001] <110> 中国农业科学院油料作物研究所

[0002] <120> 二乙酰镰草镰刀菌烯醇流动滞后免疫时间分辨荧光速测试剂盒

[0003] <160> 4

[0004] <210> 1

[0005] <211> 351bp

[0006] <212> DNA

[0007] <213> 小鼠

[0008] <400> 1

[0009] gaagtgaac tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

[0010] tcctgttcag cctccggatt cactttcaat tactatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

[0011] ccagacaacc tcctggagtg ggtcgcaggc attagtagtg gtggttctta cacctattat 180

[0012] tctgacagtg tgaagggacg attcaccatc tccagagaca gtgccacgaa caccctgtac 240

[0013] ctgcaaatga ccagtctgaa gtctcaagac acagccatgt attattgtat tagactcccg 300

[0014] tttgggtcta tggactattg gggtaagga accgcagtca cegtctcctc a 351

[0015] <210> 1

[0016] <211> 324bp

[0017] <212> DNA

[0018] <213> 小鼠

[0019] <400> 2

[0020] caggctgttg tgactcagga acctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc 60

[0021] acttgctcgt caagtactgg ggctgtaaca actggtaatt atgtcaactg ggtccaagag 120

[0022] aaaccagatc atttattcag tggcttaata ggtaatacca ataaccgagc tccaggtggt 180

[0023] cctgccagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg ccctcaccat cacagggaca 240

[0024] cagactgagg atgaggcaat atatttctgt gctctatggt acaccgacca tttgggtgttc 300

[0025] ggtggaggaa ccaaattgac tgtc 324

[0026] <210> 1

[0027] <211> 117

[0028] <212> PRT

[0029] <213> 小鼠

[0030] <400> 3

[0031] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

[0032] 1 5 10 15

[0033] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Tyr Tyr

[0034] 20 25 30

[0035] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Asn Leu Leu Glu Trp Val

[0036] 35 40 45

[0037] Ala Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

[0038] 50 55 60

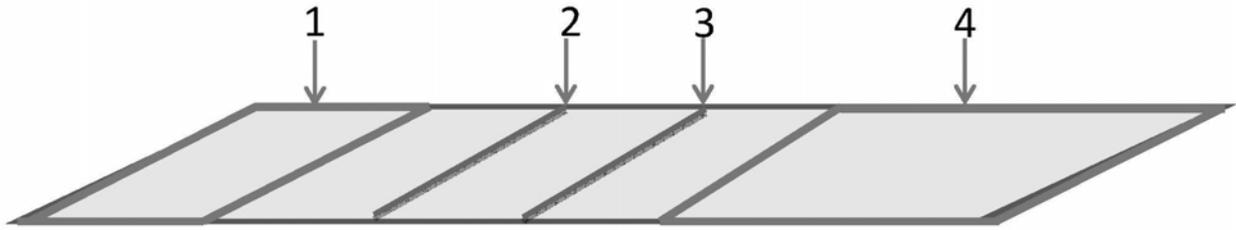


图1

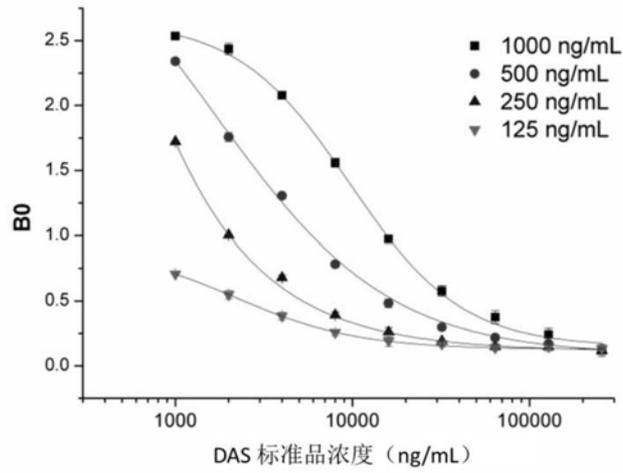


图2

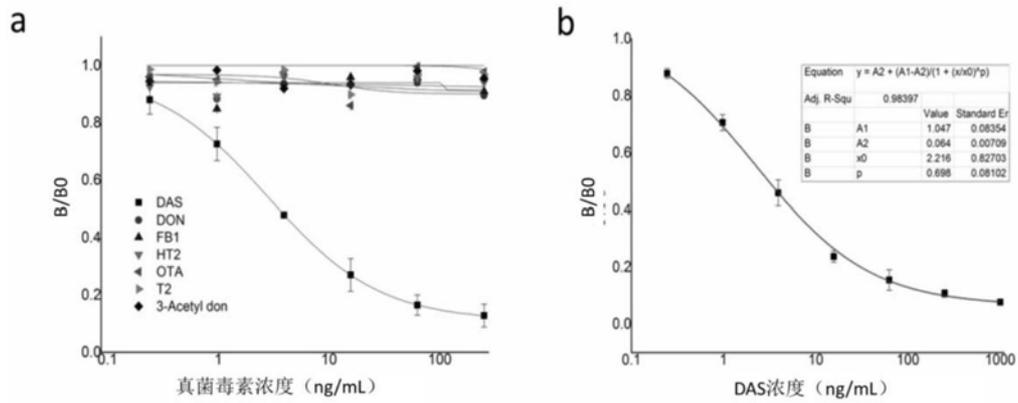


图3