



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110873794 A

(43)申请公布日 2020.03.10

(21)申请号 201810994765.X

(22)申请日 2018.08.29

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学西校区

(72)发明人 江海洋 郑丕苗 王战辉 沈建忠
温凯 吴聪明 史为民 曹兴元
丁双阳 李建成 张艳芳 王梓乐

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 陈晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种高通量超灵敏双标记时间分辨免疫层析试纸条及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种高通量超灵敏双标记时间分辨免疫层析试纸条及其应用。该高通量超灵敏双标记时间分辨免疫层析试纸条包括样本垫、硝酸纤维素薄膜、吸水垫和PVC底板,所述硝酸纤维素薄膜上有两条检测线和一条质控线;所述检测线上分别包被小分子化合物A和小分子化合物B的抗原;所述质控线上包被羊抗鸡抗体。本发明还公开了成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针,其由时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物A的抗体、时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物B的抗体和时间分辨荧光微球标记的鸡IgY抗体组成。利用本发明试纸条和成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针可以实现快速、灵敏、准确的检测多种小分子有害化合物。

1. 一种试剂盒,其包括试纸条和成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针;

所述成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针由时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物A的抗体、时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物B的抗体和时间分辨荧光微球标记的鸡IgY抗体组成;

所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜,以及吸水垫组成;

所述检测线T1、所述检测线T2和所述质控线相互分离;

所述检测线T1处包被小分子化合物A抗原;所述抗小分子化合物A的抗体能够特异性结合小分子化合物A抗原;

所述检测线T2处包被小分子化合物B抗原;所述抗小分子化合物B的抗体能够特异结合小分子化合物B抗原;

所述质控线处包被有羊抗鸡二抗;所述羊抗鸡二抗能够特异性结合鸡IgY抗体;

所述检测线T1位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端;

所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:

所述时间分辨荧光微球是将稀土元素包埋在球形聚苯乙烯材料中形成的聚苯乙烯稀土离子配合物;

或,所述时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物A的抗体、所述时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物B的抗体和所述时间分辨荧光微球标记的鸡IgY抗体均通过活泼酯法将时间分辨荧光微球的氨基与抗体表面的羧基偶联制备得到。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于:

所述抗小分子化合物A的抗体为抗小分子化合物A的多克隆抗体或单克隆抗体;

或,所述抗小分子化合物B的抗体为抗小分子化合物B的多克隆抗体或单克隆抗体。

4. 根据权利要求1-3任一所述的试剂盒,其特征在于:

所述稀土元素为铈;

或,所述抗小分子化合物A的抗体为抗小分子化合物A的单克隆抗体;

或,所述抗小分子化合物B的抗体为抗小分子化合物B的单克隆抗体。

5. 根据权利要求1-4任一所述的试剂盒,其特征在于:

所述基底层的材料为聚氯乙烯;

或,所述样品垫为玻璃纤维素膜;

或,所述包被膜为硝酸纤维素膜;

或,所述检测线T1与所述检测线T2之间的距离为3mm;

或,所述检测线T2与所述质控线之间的距离为3mm。

6. 根据权利要求1-5任一所述的试剂盒,其特征在于:

所述小分子化合物A为黄曲霉毒素B1;所述小分子化合物B为玉米赤霉烯酮。

7. 权利要求1-6任一所述的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:分别制备权利要求1-6任一所述的试剂盒中的试纸条和权利要求1-6任一所述的试剂盒中的成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针;

制备所述试纸条的方法包括如下步骤:

I、分别制备所述样品垫、所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜,以及所述吸水垫;

II、将步骤I得到的所述样品垫、步骤I得到的所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜与所述吸水垫依次粘贴到所述基底层上,得到所述试纸条;

所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜按照如下方法制备:将所述小分子化合物A抗原、所述小分子化合物B抗原和所述羊抗鸡二抗分别喷涂在所述包被膜的检测线T1区域、检测线T2区域和质控线区域,形成所述检测线T1、检测线T2和所述质控线,得到所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜;

制备所述成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针的方法为权利要求1-6中所述的时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物A的抗体、时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物B的抗体和时间分辨荧光微球标记的鸡IgY抗体的制备方法。

8. 权利要求1-6任一所述的试剂盒或权利要求7所述的制备方法在同时检测两种不同的小分子化合物中的应用;

或,权利要求1-6任一所述的试剂盒或权利要求7所述的制备方法在同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物中的应用;

或,权利要求1-6任一所述的试剂盒或权利要求7所述的制备方法在同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量中的应用。

9. 一种同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物的方法,包括如下步骤:

(a1) 向待测样本中加入权利要求1-6中任一所述的成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针,得到混合溶液;

(a2) 将所述混合溶液孵育5min,然后加入权利要求1-6中任一所述的试纸条的样品垫上,层析5min后,在紫外凝胶成像仪下观察检测线T1、检测线T2和质控线的显色情况;

若T1线不显色,T2线不显色,C线显白色,则待测样本中含有小分子化合物A和小分子化合物B;

若T1线不显色,T2线显白色,C线显白色,则待测样本中含有小分子化合物A,且不含有小分子化合物B;

若T1线显白色,T2线不显色,C线显白色,则待测样本中不含有小分子化合物A,且含有小分子化合物B。

若T1线显白色,T2线显白色,C线显白色,则待测样本中不含有小分子化合物A和小分子化合物B。

10. 一种同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量的方法,包括如下步骤:

(b1) 绘制标准曲线

配制系列浓度的小分子化合物A和小分子化合物B的标准品溶液,将所得的若干份含有不同浓度的标准品溶液分别与权利要求1-6中任一所述的成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针混合,得到混合液;然后将所述混合液分别加入权利要求1-6中任一所述的试纸条的样品垫上,层析5min后,使用时间分辨免疫定量分析仪测定T1、T2和C线的荧光强度;以所述小分子化合物A和小分子化合物B的标准品溶液的浓度为横坐标,以所述检测线T1和所述质控线的荧光强度的比值或所述检测线T2和所述质控线的荧光强度的比值为纵坐标绘制标准

曲线图,得到标准曲线方程;

(b2) 待测样本检测

将所述待测样本与权利要求1-6中任一所述的成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针混合,得到混合液;然后将所述混合液分别加入权利要求1-6中任一所述的试纸条的样品垫上,层析5min后,使用时间分辨免疫定量分析仪测定T1、T2和C线的荧光强度;将所述检测线T1和所述质控线的荧光强度的比值或所述检测线T2和所述质控线的荧光强度的比值代入步骤b1)所得标准曲线方程,计算得到所述待测样本中的小分子化合物A和小分子化合物B的浓度值。

一种高通量超灵敏双标记时间分辨免疫层析试纸条及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域中的小分子有害化合物检测,具体涉及一种高通量超灵敏双标记时间分辨免疫层析试纸条及其应用。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是将免疫技术和色谱层析技术优点融为一体的近几年快速兴起的免疫分析技术。该方法已广泛应用于小分子物质检测等方面。以硝酸纤维素膜材料为固相,待测样本为流动相,通过毛细层析作用使得待测物与膜上针对待测物的受体发生特异性反应,层析过程中样品溶液中的待测物与NC膜上的检测线发生反应,通过检测或者肉眼观看标记物的颜色来确定检测结果。免疫层析技术的核心除了抗原抗体的特异性结合外,还有标记物的选择。标记物偶联着抗原或抗体,通过标记物的显色强度来定性定量分析待测物。传统的胶体金标记物灵敏度难以满足人们的要求。因此,还需用寻求更加灵敏的标记物。

[0003] 镧系元素(Ln)是指包括镧、铈、镨、钕等15种从第57号元素镧到第71号元素镱的稀土元素。稀土元素因其荧光寿命长、斯托克位移大、发射峰极窄、生物相容性好的优点,常用来作为生物标记材料使用。时间分辨荧光微球是将大量的稀土元素嵌入或者包埋在聚合物材料中,形成稳定的微球结构。与传统的荧光纳米标记材料相比,时间分辨荧光微球除了具有荧光稳定性好、荧光信号强、荧光寿命长等优点,还能减少基质干扰、降低本底值,进一步提高检测灵敏度高。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是如何同时简便、快速、高灵敏的检测两种不同的化合物。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明首先提供了一种试剂盒。

[0006] 所述试剂盒包括操作简便的高通量超灵敏双标记时间分辨免疫层析试纸条和成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针;

[0007] 所述成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针由时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物A的抗体、时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物B的抗体和时间分辨荧光微球标记的鸡IgY抗体组成;

[0008] 所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜,以及吸水垫组成;

[0009] 所述检测线T1、所述检测线T2和所述质控线相互分离;

[0010] 所述检测线T1处包被有小分子化合物A抗原;所述抗小分子化合物A的抗体能够特异性结合小分子化合物A抗原;

[0011] 所述检测线T2处包被有小分子化合物B抗原;所述抗小分子化合物B的抗体能够特异结合小分子化合物B抗原;

[0012] 所述质控线处包被有羊抗鸡二抗;所述羊抗鸡二抗能够特异性结合鸡IgY抗体;

- [0013] 所述检测线T1位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端；
- [0014] 所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。
- [0015] 上述试剂盒中,所述时间分辨荧光微球是将稀土元素包埋在球形聚苯乙烯材料中形成的聚苯乙烯稀土离子配合物。
- [0016] 所述时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物A的抗体、所述时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物B的抗体和所述时间分辨荧光微球标记的鸡IgY抗体均通过活泼酯法将时间分辨荧光微球的氨基与抗体表面的羧基偶联制备得到。具体制备方法如下:
- [0017] (1) 取5 μ L时间分辨荧光微球溶液加入到500 μ L的0.2mol/L硼酸硼砂缓冲液(pH 8.0)中,涡旋混匀后加入分别加入1 μ g EDC和1 μ g NHS,在摇床上避光活化15min。
- [0018] (2) 完成步骤(1)后,加入8 μ g黄曲霉毒素B1单克隆抗体或1 μ g玉米赤霉烯酮单克隆抗体或5 μ g的鸡IgY抗体,室温反应2h或4 $^{\circ}$ C反应过夜。
- [0019] (3) 完成步骤(2)后,加入50 μ L含有1%Tween 20的10%BSA溶液,摇床上室温封闭2h,充分封闭微球表面多余的活化位点。
- [0020] (4) 完成步骤(3)后,将封闭后的荧光探针,在4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10min,弃上清,收集沉淀。
- [0021] (5) 完成步骤(4)后,向沉淀中加入200 μ L复溶液复溶,超声混悬,得到浓度为0.04 μ g/mL的时间分辨荧光微球偶联黄曲霉毒素B1单克隆抗体溶液、浓度为5 μ g/mL的时间分辨荧光微球偶联玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液、浓度为25 μ g/mL的时间分辨荧光微球偶联鸡IgY抗体溶液。
- [0022] 上述试剂盒中,所述抗小分子化合物A的抗体为抗小分子化合物A的多克隆抗体或单克隆抗体;
- [0023] 所述抗小分子化合物B的抗体为抗小分子化合物B的多克隆抗体或单克隆抗体;
- [0024] 所述检测线T1处包被有小分子化合物A抗原与羧甲基胍和牛血清白蛋白的偶联物;
- [0025] 所述检测线T2处包被有小分子化合物B抗原与羧甲基胍和牛血清白蛋白的偶联物。
- [0026] 上述试剂盒中,所述稀土元素为铈;
- [0027] 所述抗小分子化合物A的抗体为抗小分子化合物A的单克隆抗体;
- [0028] 所述抗小分子化合物B的抗体为抗小分子化合物B的单克隆抗体;
- [0029] 所述抗小分子化合物A的单克隆抗体和所述抗小分子化合物B的单克隆抗体均为鼠源单克隆抗体。
- [0030] 上述试剂盒中,所述基底层的材料为聚氯乙烯;
- [0031] 所述样品垫为玻璃纤维素膜;
- [0032] 所述包被膜为硝酸纤维素膜;
- [0033] 所述检测线T1与所述检测线T2之间的距离为3mm;
- [0034] 所述检测线T2与所述质控线之间的距离为3mm。
- [0035] 上述试剂盒中,所述小分子化合物A具体为黄曲霉毒素B1;所述小分子化合物B具体为玉米赤霉烯酮。
- [0036] 为了解决上述技术问题,本发明又提供了上述试剂盒的制备方法。

[0037] 本发明提供的上述试剂盒的制备方法包括如下步骤：分别制备上述试剂盒中的试纸条和成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针；

[0038] 制备所述试纸条的方法包括如下步骤：

[0039] I、分别制备所述样品垫、所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜，以及所述吸水垫；

[0040] II、将步骤I得到的所述样品垫、步骤I得到的所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜与所述吸水垫依次粘贴到所述基层上，得到所述试纸条；

[0041] 所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜按照如下方法制备：将所述小分子化合物A抗原、所述小分子化合物B抗原和所述羊抗鸡二抗分别喷涂在所述包被膜的检测线T1区域、检测线T2区域和质控线区域，形成所述检测线T1、检测线T2和所述质控线，得到所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜；

[0042] 制备所述成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针的方法为上述时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物A的抗体、时间分辨荧光微球标记的抗小分子化合物B的抗体和时间分辨荧光微球标记的鸡IgY抗体的制备方法。

[0043] 为了解决上述技术问题，本发明还提供了上述试剂盒或上述方法的新用途。

[0044] 本发明提供了上述试剂盒或上述方法在同时检测两种不同的小分子化合物中的应用。

[0045] 本发明还提供了上述试剂盒或上述方法在同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物中的应用。

[0046] 本发明还提供了上述试剂盒或上述方法在同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量中的应用。

[0047] 为了解决上述技术问题，本发明还提供了一种同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物的方法。

[0048] 本发明提供的同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物的方法包括如下步骤：

[0049] (a1) 向待测样本中加入上述成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针，得到混合溶液；

[0050] (a2) 将所述混合溶液孵育5min，然后加入上述试纸条的样品垫上，层析5min后，在紫外凝胶成像仪下观察检测线T1、检测线T2和质控线C的显色情况；

[0051] 若T1线不显色，T2线不显色，C线显白色，则待测样本中含有小分子化合物A和小分子化合物B；

[0052] 若T1线不显色，T2线显白色，C线显白色，则待测样本中含有小分子化合物A，且不含有小分子化合物B；

[0053] 若T1线显白色，T2线不显色，C线显白色，则待测样本中不含有小分子化合物A，且含有小分子化合物B。

[0054] 若T1线显白色，T2线显白色，C线显白色，则待测样本中不含有小分子化合物A和小分子化合物B。

[0055] 为了解决上述技术问题，本发明最后提供了一种同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量的方法。

[0056] 本发明提供的同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量的方法包括如下步骤：

[0057] (b1) 绘制标准曲线

[0058] 配制系列浓度的小分子化合物A和小分子化合物B的标准品溶液，将所得的若干份含有不同浓度的标准品溶液分别与上述成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针混合，得到混合液；然后将所述混合液分别加入上述试纸条的样品垫上，层析5min后，使用时间分辨免疫定量分析仪测定T1、T2和C线的荧光强度；以所述小分子化合物A和小分子化合物B的标准品溶液的浓度为横坐标，以所述检测线T1和所述质控线的荧光强度的比值或所述检测线T2和所述质控线的荧光强度的比值为纵坐标绘制标准曲线图，得到标准曲线方程；

[0059] (b2) 待测样本检测

[0060] 将所述待测样本与上述成套时间分辨荧光微球偶联抗体探针混合，得到混合液；然后将所述混合液分别加入上述试纸条的样品垫上，层析5min后，使用时间分辨免疫定量分析仪测定T1、T2和C线的荧光强度；将所述检测线T1和所述质控线的荧光强度的比值或所述检测线T2和所述质控线的荧光强度的比值代入步骤b1) 所得标准曲线方程，计算得到所述待测样本中的小分子化合物A和小分子化合物B的浓度值。

[0061] 本发明的定量检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量的方法是与时间分辨读数仪联用，将试纸条上T线和C的荧光信号转换为电信号并输出为具体数值。

[0062] 上述应用或方法中，所述小分子化合物A具体为黄曲霉毒素B1；所述小分子化合物B具体为玉米赤霉烯酮。

[0063] 本发明的创新性在于，首先标记物用的是时间分辨荧光微球，与普通的胶体金和荧光微球不同，它因具有不易受背景干扰等优点而具有更高的灵敏度；其次使用的是双标记模式，即时间分辨荧光微球偶联的抗体分别为小鼠抗体和鸡抗体，C线包被羊抗鸡二抗。比起传统试纸条单标记模式，双标记模式因C线荧光值不会受T线荧光值变化，而具有更好的稳定性，也有助于提高方法的准确度和精确度。

[0064] 本发明的有益效果如下：本发明提供的高通量超灵敏双标记时间分辨免疫层析试纸条可以进行多种小分子化合物的同时、灵敏、快速检测，实现对食品中有害物质的实时监控，为食品安全保驾护航。相比于传统的胶体金免疫层析试纸条和荧光微球试纸条可以获得更高的检测效率和更高的灵敏度。此外，本发明的免疫层析试纸条应用范围广泛，能满足多种样本的检测，并且操作简便、结果准确，适合推广运用。

附图说明

[0065] 图1是时间分辨荧光微球的电镜图。

[0066] 图2是高通量超灵敏双标记时间分辨免疫层析试纸条结构示意图。

[0067] 图3是同时检测黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮的定量标准曲线。

具体实施方式

[0068] 以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。

[0069] 下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验，

均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0070] 下述实施例中的时间分辨荧光微球是南京微测生物科技有限公司的产品,产品目录号为MD021,其结构电镜图如图1所示,其是将稀土元素铕包埋在粒径为200nm的球形聚苯乙烯材料中,形成均一、稳定的微球结构。

[0071] 下述实施例中的硼酸硼砂缓冲液(pH 8.0)的配方如下:Na₂B₄O₇:2.28822g;H₃BO₃:3.46248g;去离子水定容至400mL。

[0072] 下述实施例中的EDC和NHS均为阿拉丁试剂有限公司的产品。

[0073] 下述实施例中的复溶液的配方如下:0.1M TRIS:1.2114g;0.5%BSA:0.5g;0.5% Tween 20:0.5mL;0.9%NaCl:0.9g;5%蔗糖:5g;去离子水定容至100mL。

[0074] 下述实施例中的样本稀释液的配方如下:Tris 6.06g;NaCl 9g;Tween-20 1mL;HCl 3mL;Proclin 100μL;去离子水定容至1L。

[0075] 实施例一:黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮双标记时间分辨免疫层析试纸条的制备

[0076] 一、时间分辨荧光微球偶联抗体探针的制备

[0077] 1、时间分辨荧光微球偶联黄曲霉毒素B1单克隆抗体

[0078] (1)取5μL时间分辨荧光微球溶液加入到500μL的0.2mol/L硼酸硼砂缓冲液(pH 8.0)中,涡旋混匀后加入分别加入1μg EDC和1μg NHS,在摇床上避光活化15min。

[0079] (2)完成步骤(1)后,加入8μg黄曲霉毒素B1单克隆抗体(购自北京维德维康生物技术有限公司,产品目录号为AFB-12A8),室温反应2h或4℃反应过夜。

[0080] (3)完成步骤(2)后,加入50μL含有1%Tween 20的10%BSA溶液,摇床上室温封闭2h,充分封闭微球表面多余的活化位点。

[0081] (4)完成步骤(3)后,将封闭后的荧光探针,在4℃,12000rpm离心10min,弃上清,收集沉淀。

[0082] (5)完成步骤(4)后,向沉淀中加入200μL复溶液复溶,超声混悬,得到浓度为0.04μg/mL的时间分辨荧光微球偶联黄曲霉毒素B1单克隆抗体溶液。4℃避光保存。

[0083] 2、时间分辨荧光微球偶联玉米赤霉烯酮单克隆抗体

[0084] (1)取5μL时间分辨荧光微球溶液加入到500μL的硼酸硼砂缓冲液中,涡旋混匀后分别加入1μg EDC和1μg NHS,在摇床上避光活化15min。

[0085] (2)完成步骤(1)后,加入1μg玉米赤霉烯酮单克隆抗体(购自北京维德维康生物技术有限公司,产品目录号为ZEN-3D4),室温反应2h或4℃反应过夜。

[0086] (3)完成步骤(2)后,加入50μL含有1%Tween 20的10%BSA溶液,摇床上室温封闭2h,充分封闭微球表面多余的活化位点。

[0087] (4)完成步骤(3)后,将封闭后的荧光探针,在4℃,12000rpm离心10min,弃上清,收集沉淀。

[0088] (5)完成步骤(4)后,向沉淀中加入200μL复溶液复溶,超声混悬,得到浓度为5μg/mL的时间分辨荧光微球偶联玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液。4℃避光保存。

[0089] 3、时间分辨荧光微球偶联鸡IgY抗体

[0090] (1)取5μL时间分辨荧光微球溶液加入到500μL的硼酸硼砂缓冲液中,涡旋混匀后分别加入1μg EDC和1μg NHS,在摇床上避光活化15min。

[0091] (2)完成步骤(1)后,加入5μg的鸡IgY抗体(购自北京博奥龙免疫技术有限公司,产

品目录号为BF01015), 室温反应2h或4℃反应过夜。

[0092] (3) 完成步骤(2)后, 加入50μL含有1% Tween 20的10% BSA溶液, 摇床上室温封闭2h, 充分封闭微球表面多余的活化位点。

[0093] (4) 完成步骤(3)后, 将封闭后的荧光探针, 在4℃, 12000rpm离心10min, 弃上清, 收集沉淀。

[0094] (5) 完成步骤(4)后, 向沉淀中加入200μL复溶液复溶, 超声混悬, 得到浓度为25μg/mL的时间分辨荧光微球偶联鸡IgY抗体溶液。4℃避光保存。

[0095] 二、试纸条组装

[0096] 1、分别将浓度为1.47mg/mL的AFB1-CMO-BSA (AFB1-CMO-BSA是黄曲霉毒素B1与羧甲基胍和牛血清白蛋白的偶联物, 购自北京维德维康生物技术有限公司, 产品目录号为AFB1-G1385)、浓度为0.622mg/mL的ZEN-CMO-BSA (ZEN-CMO-BSA是玉米赤霉烯酮与羧甲基胍和牛血清白蛋白的偶联物, 购自北京维德维康生物技术有限公司, 产品目录号为ZEN-G1076-2) 和浓度为0.5mg/mL的羊抗鸡抗体 (购自北京博奥龙免疫技术有限公司产品目录号为BF02029) 用划膜仪以0.7μL/cm的喷速依次喷涂NC膜上的检测线1 (T1) 检测线2 (T2) 和质控线 (C) 位置, 间距依次是3mm。将划好的NC膜, 放置在37℃烘箱中过夜。

[0097] 2、将烘干的NC膜、样品垫 (玻璃纤维素膜) 和吸水垫依次粘在PVC底板 (购自上海金标生物科技有限公司, 产品目录号为SMNF31-40) 上。样品垫和吸水垫在两端各压住NC膜2mm。

[0098] 3、将处理好的大板用切条机切成宽度为4.72mm的试纸条, 安装在塑料卡壳里组装成检测卡, 再置于干燥封闭的铝箔袋里, 备用。

[0099] 本发明时间分辨免疫层析试纸条的结构示意图如图2所示, 本发明的免疫层析试纸条可以同时检测黄曲霉毒素B1 (AFB1) 和玉米赤霉烯酮 (ZEN)。

[0100] 实施例二: 黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮的定性定量检测

[0101] 一、黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮的定性检测方法 (消线法)

[0102] 1、取1g样本添加4mL 70% (体积分数) 甲醇溶液, 震荡5分钟后, 8000转离心10分钟, 收集上清液并用样本稀释液将其稀释10倍, 得到处理后样本。取处理后的样本120μL, 其中加入1μL实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联黄曲霉毒素B1单克隆抗体溶液、1μL实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液和1μL实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联鸡IgY抗体溶液, 混匀, 得到混合溶液。

[0103] 2、完成步骤1后, 将混合溶液孵育5min, 然后加入实施例一步骤二制备的检测卡的样品垫上, 层析5min后, 在紫外凝胶成像仪下观察T1、T2和C线的显色情况。

[0104] 若T1线不显色, T2线不显色, C线显白色, 则待测样本中含有黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮;

[0105] 若T1线不显色, T2线显白色, C线显白色, 则待测样本中含有黄曲霉毒素B1, 且不含有玉米赤霉烯酮;

[0106] 若T1线显白色, T2线不显色, C线显白色, 则待测样本中不含有黄曲霉毒素B1, 且含有玉米赤霉烯酮。

[0107] 若T1线显白色, T2线显白色, C线显白色, 则待测样本中不含有黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮。

[0108] 二、黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮的定量检测方法

[0109] 1、标准曲线的绘制

[0110] (1) 分别制备如下含有不同浓度的AFB1和ZEN的标准品溶液: AFB1浓度为0ng/mL和ZEN浓度为0ng/mL的标准品溶液1; AFB1浓度为0.0007ng/mL和ZEN浓度为0.0007ng/mL的标准品溶液2; AFB1浓度为0.0015ng/mL和ZEN浓度为0.0015ng/mL的标准品溶液3; AFB1浓度为0.0031ng/mL和ZEN浓度为0.0031ng/mL的标准品溶液4; AFB1浓度为0.0063ng/mL和ZEN浓度为0.0063ng/mL的标准品溶液5; AFB1浓度为0.0125ng/mL和ZEN浓度为0.0125ng/mL的标准品溶液6; AFB1浓度为0.025ng/mL和ZEN浓度为0.025ng/mL的标准品溶液7; AFB1浓度为0.05ng/mL和ZEN浓度为0.05ng/mL的标准品溶液8; AFB1浓度为0.1ng/mL和ZEN浓度为0.1ng/mL的标准品溶液9。

[0111] (2) 向120 μ L待测样本(标准品溶液1-9)中加入1 μ L实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联黄曲霉毒素B1单克隆抗体溶液、1 μ L实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液和1 μ L实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联鸡IgY抗体溶液,混匀,得到混合溶液。

[0112] (3) 完成步骤(2)后,将混合溶液孵育5min,然后加入实施例一步骤二制备的检测卡的样品垫上,层析5min后,使用时间分辨免疫定量分析仪(购自南京微测生物技术有限公司)测定T1、T2和C线的荧光强度。将C线荧光值定义为B,添加不同浓度AFB1和ZEN标准品后的T1和T2线的荧光强度定义为B1和B2,以B1/B和B2/B为纵坐标,以各标准品溶液中AFB1和ZEN的浓度为横坐标建立标准曲线(图3),得到标准曲线方程。

[0113] 2、待测样本中AFB1和ZEN含量检测

[0114] (1) 向120 μ L待测样本中加入1 μ L实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联黄曲霉毒素B1单克隆抗体溶液、1 μ L实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联玉米赤霉烯酮单克隆抗体溶液和1 μ L实施例一中制备的时间分辨荧光微球偶联鸡IgY抗体溶液,混匀,得到混合溶液。

[0115] (2) 完成步骤(1)后,将混合溶液孵育5min,然后加入实施例一步骤二制备的检测卡的样品垫上,层析5min后,使用时间分辨免疫定量分析仪测定T1、T2和C线的荧光强度。将C线荧光值定义为B,待测样本的T1和T2线的荧光强度定义为B1和B2,分别将B1/B和B2/B带入步骤1中的标准曲线中计算得到待测样本中AFB1和ZEN含量。

[0116] 实施例三:双标记时间分辨免疫层析方法的应用

[0117] 一、待测样本的制备

[0118] 分别以经高效液相二级质谱法(UPLC-MS/MS)鉴定的不含有黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮的薏苡仁、山药、桔梗作为样本,按照如下方法进行处理:将样本进行研磨,得到研磨样本;取1g研磨样本添加4mL 70%(体积分数)甲醇溶液,震荡5分钟后,8000转离心10分钟,收集上清液并用样本稀释液将其稀释10倍,得到处理后样本。

[0119] 向处理后样本中添加不同浓度的黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮,得到含有不同浓度黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮的待测样本溶液。以薏苡仁为例,当待测样本溶液中AFB1的添加量为1 μ g/kg时,ZEN添加量分别为0.4 μ g/kg、0.8 μ g/kg和1.2 μ g/kg;当待测样本溶液中AFB1的添加量为2 μ g/kg时,ZEN添加量分别为0.4 μ g/kg、0.8 μ g/kg和1.2 μ g/kg;当待测样本溶液中AFB1的添加量为3 μ g/kg时,ZEN添加量分别为0.4 μ g/kg、0.8 μ g/kg和1.2 μ g/kg。

[0120] 二、目标物的检测

[0121] 采用实施例二步骤二中的定量检测方法检测各个待测样本溶液中的目标物含量，并计算回收率和变异系数，以确定本发明的准确度和精确度。添加回收率(%) = (检测量/添加量) × 100%；变异系数CV = 标准偏差/平均数。

[0122] 结果如表1所示。从表中可以看出：添加回收率在73%–95%之间，变异系数小于9.08%，说明本发明双标记时间分辨免疫层析方法的准确度和精确度良好。

[0123] 表1黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮在薏苡仁、山药和桔梗三种样本中的加标回收率

[0124]

样本	目标物	添加量(μg/kg)	检测量(μg/kg)	回收率 (%)	CV (%)
薏苡仁	AFB1	1	0.91	91.00	3.91
		2	1.67	83.50	3.05
		3	2.35	78.33	5.88
	ZEN	0.4	0.31	77.50	5.03
		0.8	0.69	86.25	4.74
		1.2	0.96	80.00	6.18
山药	AFB1	1	0.95	95.00	8.32
		2	1.71	85.50	7.33
		3	2.19	73.00	5.30
	ZEN	0.4	0.36	90.00	2.16
		0.8	0.66	82.50	4.22
		1.2	0.95	79.17	3.86
桔梗	AFB1	1	0.90	90.00	3.27
		2	1.73	86.50	4.41
		3	2.46	82.00	6.35
	ZEN	0.4	0.35	87.50	3.72
		0.8	0.62	77.50	5.43
		1.20	0.91	75.83	9.08

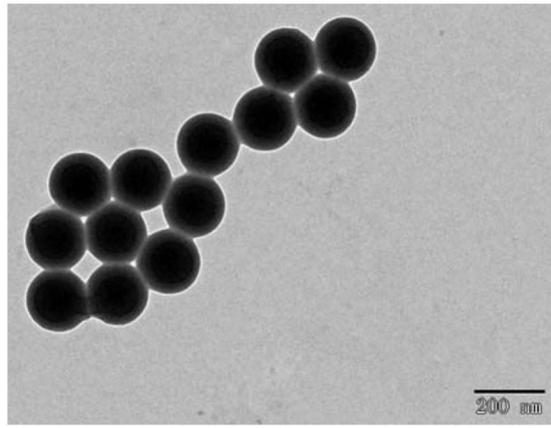


图1

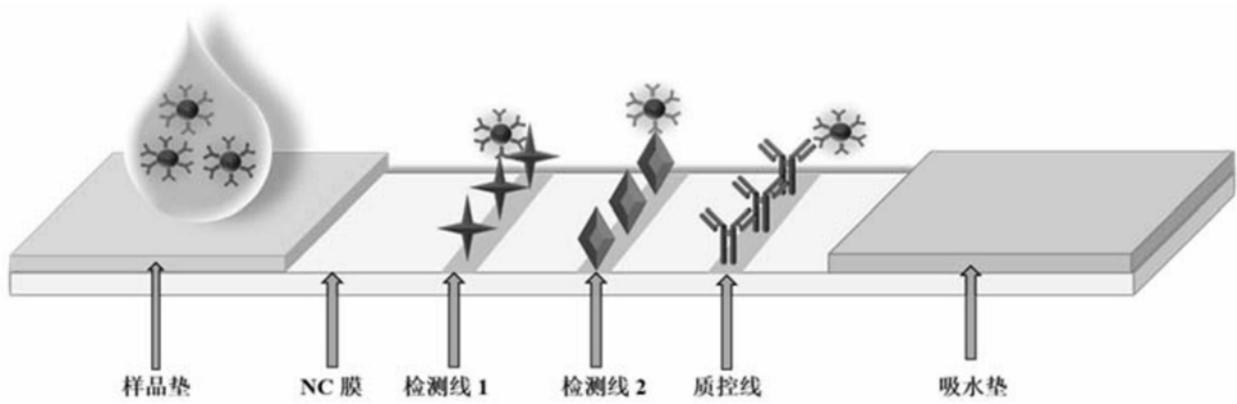


图2

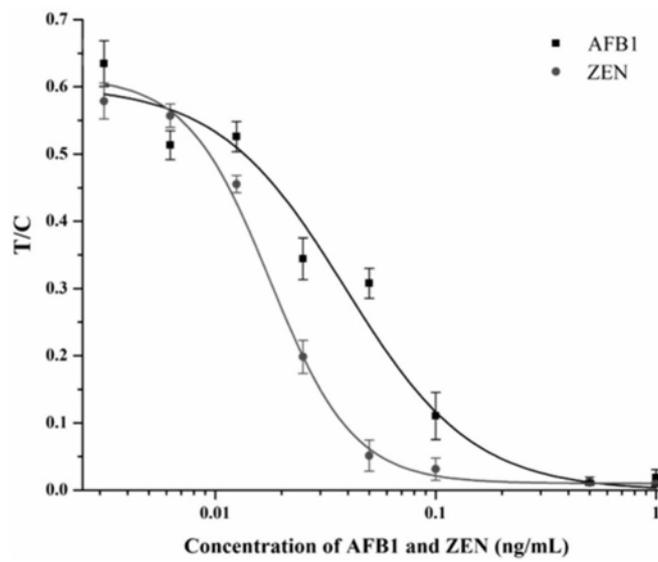


图3