



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113588959 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 02

(21) 申请号 202111061005.1

G01N 33/533 (2006.01)

(22) 申请日 2021.09.10

G01N 33/53 (2006.01)

(71) 申请人 河南农业大学

地址 450002 河南省郑州市金水区文化路95号

(72) 发明人 张西亚 丁明月 党梦 毛焯炫 黄现青 谢新华 宋莲军 王田林 张彤彤 李子哲 王尤一

(74) 专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通合伙) 41104

代理人 时立新

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

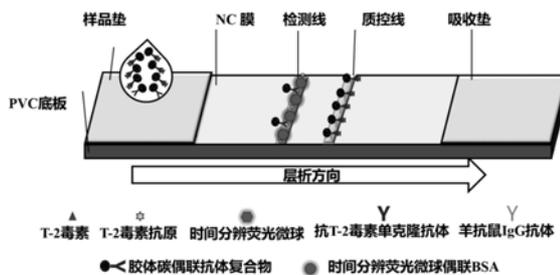
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条及其制备方法,属于食品快速检测技术领域。该试纸条由底板、样品垫、吸收垫和硝酸纤维素膜(NC膜)组成。通过选用时间分辨荧光微球作为荧光材料,将其与BSA牛血清白蛋白进行偶联,将制备的复合物固定在试纸条上,用作荧光供体;以胶体碳标记抗体复合物为猝灭剂,在NC膜上喷涂时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物和T-2抗原的混合物作为检测线,喷涂羊抗鼠IgG抗体作为质控线,组装成turn-on型侧流层析检测试纸条。可以用于T-2毒素的现场检测,增加检测的灵敏度和检测速度,适合大规模应用和批量化生产,具有很好的应用开发前景。



1. 一种用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条,由PVC底板、样品垫、吸收垫和硝酸纤维素膜组成,其特征在于,以时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物作为荧光供体,以胶体碳标记抗体复合物作为猝灭剂;

所述时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物为BSA加入到活化的时间分辨荧光微球中,室温孵育,得到;

所述胶体碳标记抗体复合物为T-2毒素的单克隆抗体与胶体碳溶液混匀,室温反应;加入BSA牛血清白蛋白溶液,室温封闭,经离心,弃上清,复溶,得到。

2. 制备如权利要求1所述的用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条的方法,其特征在于,方法如下:

(1) 清洗时间分辨荧光微球:用pH 6.0 MES缓冲液稀释时间分辨荧光微球,混匀后,离心,弃上清,沉淀,按相同的步骤再次洗涤,将其重悬于pH 6.0 MES缓冲液中;

(2) 活化时间分辨荧光微球:在步骤(1)所得的溶液中依次加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺,室温孵育,然后将活化的时间分辨荧光微球离心,弃上清,将沉淀重悬于pH 6.0 MES缓冲液中;

(3) 制备时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白:将BSA牛血清白蛋白加入到活化后的时间分辨荧光微球中,室温孵育,得到时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物;

(4) 清洗:将步骤(3)制备的时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物溶液经过离心,弃上清,加入到pH 7.4 PBS缓冲液重悬,再重复一次离心,弃上清,最终重悬于pH 7.4 PBS缓冲液;

(5) 制备胶体碳标记抗体复合物:将T-2毒素的单克隆抗体与胶体碳溶液混匀,室温反应;加入BSA牛血清蛋白溶液,室温封闭,将封闭后的混合液离心,弃上清,复溶,得到胶体碳标记抗体复合物;

(6) 组装turn-on型侧流层析检测试纸条:将硝酸纤维素膜粘贴到底板中间,在NC膜上喷涂时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物和T-2抗原的混合物作为检测线,喷涂羊抗鼠IgG抗体作为质控线,置于烘箱中干燥,然后分别将吸收垫和样品垫粘贴在底板两端,最后将组装好的试纸条切条,密封干燥保存。

3. 根据权利要求2所述的用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(3)中时间分辨荧光微球和BSA牛血清白蛋白的体积质量比为0.1mL:4mg。

4. 根据权利要求2所述的用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(5)中0.11 mg/mL的T-2单克隆抗体与1×胶体碳溶液的体积比为50  $\mu$ L:1 mL。

5. 根据权利要求2所述的用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条的制备方法,其特征在于,以时间分辨荧光微球的添加量计算,步骤(6)中所述时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物和T-2抗原的混合物中时间分辨荧光微球标记BSA复合物的浓度为TRFM-BSA 0.03  $\mu$ g/mL;T-2抗原的浓度为0.9 mg/mL,混合物的喷量为0.8  $\mu$ L/cm;所述羊抗鼠IgG抗体浓度为0.67 mg/mL,喷量为0.8  $\mu$ L/cm。

## 一种用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种turn-on型试纸条,尤其涉及一种用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条及其制备方法,属于食品快速检测技术领域。

### 背景技术

[0002] T-2毒素是倍半萜烯类化合物,广泛分布于自然界,主要由三线镰刀菌(*Fusarium triseinctum*)和梨孢镰刀菌(*Fusarium poae*)产生,是联合国粮农组织统计的全世界每年污染约25%农产品的真菌毒素之一。T-2毒素是单端孢霉烯族毒素之一,是单端孢毒性最强的毒素,不仅可以引起恶心、头晕、呕吐、腹部扩张及疼痛、畏寒及腹泻等急性中毒,也能抑制DNA、RNA和蛋白质的合成,具有较强的基因毒性、免疫毒性和血液毒性。由毒素污染造成的农产品营养和经济直接损失及中毒引发的应急抢救等间接损失巨大,世界各国制定了T-2毒素限量标准和法规,而且不断降低限量标准值。在现有的T-2毒素含量测定方法中,高效液相色谱法和酶联免疫分析法灵敏度较差、检测时间长,逐渐不能满足需求。因此发展对T-2毒素高灵敏的检测方法成为当务之急。

[0003] Turn-on型检测模式试纸条作为一种提高灵敏度的新型检测模式发展迅猛。与turn-off型竞争模式相比,turn-on型检测模式的检测信号随着目标化合物浓度的增加而增强,它的灵敏度定义为信号开始出现的目标物浓度。一般来说,识别暗状态下的光信号增强要比检测光猝灭过程容易得多。因此,大多数turn-on模式的试纸条在实际应用中表现出的灵敏度在 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 数量级,而大多数turn-off型模式的试纸条的灵敏度在 $\text{mg}/\text{kg}$ 到 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 数量级。Turn-on模式的试纸条目前被用于检测凝血酶、玉米赤霉烯酮、四环素等。无论基于哪种机理制备turn-on模式的试纸条,荧光供体材料和荧光猝灭剂的选择对提高检测灵敏度有非常重要作用。目前常用的荧光供体材料包括量子点、上转换纳米粒子,时间分辨荧光材料,荧光猝灭材料包括胶体金,银纳米粒子。量子点和上转换纳米粒子等荧光供体材料的合成条件苛刻,贵重金属猝灭剂成本较高,因此阻碍了turn-on模式的侧流层析检测的进一步应用。胶体碳是由蜡烛等物质燃烧制备,有合成简单、无毒、稳定性高、不需要活化、偶联简单等特点。在胶体碳作为标记物的侧流层析应用中,凭借其黑色而与白色的NC膜对比形成很高的信噪比,大大提高灵敏度。在胶体碳作为荧光猝灭材料的检测应用中,胶体碳展现宽的吸收波谱,对上转换纳米粒子的荧光展现高达89%猝灭效率。时间分辨荧光微球由稀土元素组成,具有来源广,化学稳定性高、发光寿命长、耐光漂白程度高、发射峰窄,斯托克斯位移大,荧光延迟发射而降低背景噪音的特性,被用来提高检测的灵敏度。因此,以胶体碳为荧光猝灭剂,以时间分辨荧光微球为荧光供体材料,制备出一种高灵敏度、成本低检测速度快的试纸条,具有潜在的应用前景,目前未见相关报道。

### 发明内容

[0004] 鉴于此,本发明旨在提出一种用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条及其制备方法,该试纸条以时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物作为荧光供体,将胶体碳与

抗体偶联复合物作为猝灭剂,实现高灵敏度、成本低快速检测。

[0005] 为达到本发明目的,所述试纸条通过如下方法制备而成:

[0006] (1) 清洗时间分辨荧光微球:用pH 6.0MES缓冲液稀释时间分辨荧光微球,混匀后,离心,弃上清,沉淀,按相同的步骤再次洗涤,将其重悬于pH 6.0MES缓冲液中。

[0007] (2) 活化时间分辨荧光微球:在(1)所得的溶液中依次加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温孵育。然后将活化的时间分辨荧光微球离心,弃上清,将沉淀重悬于pH 6.0MES缓冲液中。

[0008] (3) 制备时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物:将BSA牛血清白蛋白加入到活化后的时间分辨荧光微球中,室温孵育,得到时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物。最后将其重悬于pH 7.4PBS缓冲液中。

[0009] (4) 清洗:将步骤(3)制备的时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物溶液经过离心,弃上清,加入到pH 7.4PBS缓冲液重悬,再重复一次离心,弃上清,最终重悬于pH 7.4PBS缓冲液;

[0010] (5) 制备胶体碳标记抗体复合物:将T-2毒素的单克隆抗体与胶体碳溶液混匀,室温静止,使抗体与胶体碳充分反应;加入BSA牛血清白蛋白溶液,室温静止,进行封闭,将封闭后的混合液离心,弃上清,用 $\text{NaN}_3$ 水溶液复溶,得到胶体碳标记抗体复合物。

[0011] (6) 组装turn-on型侧流层析检测试纸条:该试纸条由PVC底板、样品垫、吸收垫和硝酸纤维素膜(NC膜)组成。该试纸条以时间分辨荧光微球标记抗原复合物为荧光供体,胶体碳标记抗体复合物为受体。将NC膜粘贴到PVC底板中间,用划膜喷金标机在NC膜上喷涂时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物和T-2抗原的混合物( $0.8\mu\text{L}/\text{cm}$ )作为检测线,喷涂羊抗鼠IgG抗体( $0.8\mu\text{L}/\text{cm}$ )作为质控线,将该PVC膜置于烘箱中干燥,分别将吸收垫和样品垫粘贴在PVC底板两端,最后将组装好的试纸条通过微电脑自动斩切机进行切条,密封干燥保存。

[0012] 相对于现有技术,本发明提供的免疫荧光试纸条采用竞争法定量检测缓冲液中的T-2毒素含量:缓冲液中的T-2毒素首先与猝灭剂胶体碳标记抗体复合物中的T-2毒素的单克隆抗体结合,经所述样品垫不断层析,该复合物依靠层析作用在硝酸纤维素膜上缓慢移动,在检测线区域不与所述荧光供体结合,检测线区域的荧光不被猝灭,胶体碳标记抗体结合T-2毒素复合物在质控线区域与羊抗鼠IgG抗体结合,通过荧光定量分析仪即可自动读取试纸条上的检测线和质控线的荧光信号强度,计算出待测缓冲液中的T-2毒素的线性范围为 $0.41-1.55\text{ng}/\text{mL}$ ,具有良好的准确度和特异性。

[0013] 步骤(3)中时间分辨荧光微球和BSA牛血清白蛋白的体积质量比为 $0.1\text{mL}:4\text{mg}$ 。

[0014] 步骤(5)中 $0.11\text{mg}/\text{mL}$ 的T-2单克隆抗体与 $1\times$ 胶体碳溶液的体积比为 $50\mu\text{L}:1\text{mL}$ 。

[0015] 步骤(6)中所述样品垫的制备方法为:向pH为7.4的PBS缓冲液中加入如下质量百分比计量的混合溶液: $0.05\%$ 的吐温-20、 $5\%$ 的蔗糖、 $1\%$ 的BSA牛血清白蛋白和 $0.02\%$ 的Proclin300,将样品垫浸入所得混合溶液中,取出烘干即得。

[0016] 步骤(6)中所述时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物和T-2抗原的混合物中时间分辨荧光微球标记BSA复合物的浓度为TRFM-BSA  $0.03\mu\text{g}/\text{mL}$ (以时间分辨荧光微球的添加量计算);T-2抗原的浓度为 $0.9\text{mg}/\text{mL}$ ,混合物的喷量为 $0.8\mu\text{L}/\text{cm}$ ;所述羊抗鼠IgG抗体浓度为 $0.67\text{mg}/\text{mL}$ ,喷量为 $0.8\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0017] 步骤(6)中吸收垫和样品垫与NC膜重叠的宽度为2mm,组装好的试纸条经自动斩切机切成的宽度为3.2mm。

[0018] 本发明未使用结合垫,优选:5 $\mu$ L胶体碳标记抗体复合物与200 $\mu$ L待检测溶液混匀。

[0019] 优选:猝灭剂的添加量可以保证抗体与质控线内荧光标记物的结合效率,提供准确的荧光强度和最大的抑制率。随着猝灭剂添加量从3 $\mu$ L到5 $\mu$ L增加时,检测线的荧光信号逐渐增加,抑制率增加。当进一步增加猝灭剂添加量时,荧光强度维持恒定,抑制率下降。当猝灭剂的添加量为5 $\mu$ L时,检测线可显示出足够的荧光强度和最大的抑制率,因此猝灭剂的添加量优选为5 $\mu$ L。

[0020] 本发明创新点和优点:本发明通过选用时间分辨荧光微球作为荧光材料,将其与BSA牛血清白蛋白进行偶联的复合物用作荧光供体,利用时间分辨荧光微球的化学稳定性高、发光寿命长、耐光漂白程度高、发射峰窄,斯托克斯位移大,荧光延迟发射而降低背景噪音的特性提高检测的灵敏度。且以胶体碳标记抗体作为猝灭剂,利用猝灭剂与荧光供体的高效、快速的荧光猝灭进一步增加检测的灵敏度和检测速度。本发明选用的时间分辨荧光微球和胶体碳纳米粒子合成方法简单、受控,适合大规模应用和批量化生产。可以作为T-2毒素的现场检测,具有很好的应用开发前景。

## 附图说明

[0021] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0022] 图1为本发明用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条的结构示意图。

[0023] 图2为本发明具体检测时的T-2毒素阳性结果的俯视示意图。(A)为可见光下的试纸条,其中质控线和检测线分别呈现黑色和白色。(B)为紫外光下的试纸条,其中质控线和检测线分别呈现黑色和红色。

[0024] 图3为本发明具体检测时的T-2毒素阴性结果的俯视示意图。(A)为可见光下的试纸条,其中质控线和检测线均呈现黑色。(B)为紫外光下的试纸条,其中质控线和检测线均呈现黑色。

[0025] 图4为本发明具体检测时无效结果的俯视示意图。(A)和(C)为可见光下的试纸条,其中质控线处均无明显现象。(B)和(D)为紫外光下的试纸条,其中质控线处均无明显现象。

[0026] 图5为本发明实施例2采用本发明turn-on型试纸条检测T-2毒素的标准曲线图。

[0027] 图6为本发明实施例2采用本发明turn-on型试纸条检测T-2毒素的特异性。(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)、(G)、(H)、(I)分别是在可见光下试纸条对PBS缓冲液、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素B1、赭曲霉毒素A、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2四醇毒素、HT-2毒素和T-2毒素的检测结果。(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)分别是紫外光下试纸条对PBS缓冲液、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素B1、赭曲霉毒素A、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2四醇毒素、HT-2毒素和T-2毒素检测结果。

## 具体实施方式

[0028] 为了使本发明上述特征和优点更加清楚和容易理解,下面将结合附图对本发明的实施方式作进一步详细描述,以下没有特别说明,百分比均为质量百分含量。

[0029] 实施例1所述试纸条的制备:

[0030] (1) 清洗时间分辨荧光微球:取0.1mL时间分辨荧光微球(1%),用0.9mL 50mmol/L pH 6.0MES缓冲液稀释,混匀后,8500转离心15min,弃上清,沉淀按相同的步骤再次洗涤一次。最后将其重悬于1.0mL 50mmol/L pH 6.0MES缓冲液中。

[0031] (2) 活化时间分辨荧光微球:在(1)所得的溶液中依次加入5.0 $\mu$ L 20mg/mL EDC和20.0 $\mu$ L 20mg/mL NHS,室温孵育30min。将活化的时间分辨荧光微球8500转离心15min,弃上清,将沉淀重悬于1.0mL 50mmol/L pH 6.0MES缓冲液中。

[0032] (3) 制备时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物:将20mg/mL 200 $\mu$ L的BSA牛血清白蛋白加入到0.1mL活化后的10mg/mL时间分辨荧光微球中,室温孵育12h,得到时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物。

[0033] (4) 清洗:将步骤(3)制备的时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物溶液经过离心,弃上清,加入到pH 7.4PBS缓冲液重悬,再重复一次离心,弃上清,最终重悬于pH 7.4PBS缓冲液;

[0034] (5) 制备胶体碳标记抗体复合物:用去离子水将10 $\times$ 胶体碳溶液(OD<sub>600</sub>=60)稀释成1 $\times$ 胶体碳溶液,取50 $\mu$ L浓度为0.11mg/mL的T-2的单克隆抗体与1mL的1 $\times$ 胶体碳溶液混匀,室温静止30min,使抗体与胶体碳充分反应;加入40 $\mu$ L 10%BSA溶液,室温静止30min,进行封闭,将封闭后的混合液经8500转,离心10min,弃上清,用200 $\mu$ L 0.05%NaN<sub>3</sub>水溶液复溶,得到胶体碳标记抗体复合物。

[0035] (6) 组装turn-on型侧流层析检测试纸条:该试纸条由PVC底板、样品垫、吸收垫和硝酸纤维素膜(NC膜)组成。该试纸条以时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物为荧光供体,胶体碳标记抗体复合物为受体。将NC膜粘贴到PVC底板中间,用划膜喷金标机在NC膜上喷涂时间分辨荧光微球标记BSA牛血清白蛋白复合物和T-2抗原的混合物(0.8 $\mu$ L/cm)作为检测线,喷涂羊抗鼠IgG抗体(0.67mg/mL,0.8 $\mu$ L/cm)作为质控线,将该PVC膜置于37 $^{\circ}$ C烘箱中干燥12h后,分别将吸收垫和样品垫粘贴在PVC底板两端,最后将组装好的试纸条通过微电脑自动斩切机进行切条,密封干燥保存。

[0036] 实施例2检测方法的建立

[0037] 1、用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条的检测方法和检测原理

[0038] 本发明提供turn-on型试纸条采用竞争法定量检测缓冲液中T-2毒素的含量:

[0039] 加入5 $\mu$ L猝灭剂胶体碳标记抗体复合物到微孔板内,然后加入200 $\mu$ L待测缓冲液,缓冲液中的T-2毒素首先与猝灭剂胶体碳标记抗体复合物中的T-2毒素的单克隆抗体结合,将试纸条置于微孔板中,经样品垫不断层析,该复合物依靠层析作用在NC膜上缓慢移动,在检测线区域不与所述荧光供体结合,检测线区域的荧光不被猝灭,胶体碳标记抗体偶联T-2毒素复合物在质控线区域与羊抗兔IgG抗体结合,通过荧光分析仪即可自动读取试纸条上的检测线和质控线的荧光信号强度,计算出待测缓冲液中的T-2毒素含量。

[0040] 2、绘制标准检测曲线

[0041] 使用标准稀释液对T-2毒素标准品进行倍比稀释,采用本发明试纸条进行重复检测3次,取平均值,以T-2毒素的浓度为横坐标,以抑制率 $(F-F_0)/(F_{\max}-F_0)$ 为纵坐标绘制标准曲线,结果如图5所示。从图5可以看出,T-2毒素浓度在20%-80%抑制率即0.41-1.55ng/mL范围内时,线性关系良好。标准曲线的回归方程为 $y=52.75x-1.65$ , $R^2=0.9921$ 。最低检测

限的定义为10%抑制率,即本试纸条对T-2毒素的最低检测限为0.22ng/mL,IC<sub>50</sub>为0.98ng/mL。

[0042] F为加入待测物T-2毒素时,检测线的荧光值,

[0043] F<sub>0</sub>为待测物T-2毒素浓度为0时,检测线的荧光值,

[0044] F<sub>max</sub>为待测物T-2毒素饱和时检测线的荧光完全恢复的荧光值。

[0045] 3、用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条的特异性

[0046] 采用本发明试纸条分别对PBS缓冲液、100ng/mL呕吐毒素、100ng/mL玉米赤霉烯酮、100ng/mL伏马毒素B1、100ng/mL赭曲霉毒素A、100ng/mL脱氧雪腐镰刀菌烯醇、100ng/mL T-2四醇毒素、100ng/mL HT-2毒素和2ng/mL T-2毒素进行检测,记录检测不同毒素时可见光和荧光信号,结果如图6所示。根据图6可知,当使用试纸条对T-2毒素和谷物中存在的除了HT-2毒素的其他7种真菌毒素进行检测时,试纸条在可见光下和紫外光下的图像均与T-2毒素的检测结果形成明显的差异。从而证明本发明提供的免疫荧光检测试纸具有很好的特异性。

[0047] 4、用于检测T-2毒素的turn-on型试纸条的特异性的准确度

[0048] 通过添加回收率实验来测定本发明免疫荧光试纸条的检测准确度,回收率在80%-120%范围内满足准确率要求。用免疫荧光试纸条分别对低、中、高三种不同的浓度水平分别为50μg/kg、100μg/kg、200μg/kg的T-2标准品进行检测,结果见表1。据表1可以看出,本发明免疫荧光试纸条的回收率在94.17~106.81%之间,表明该试纸条具有良好的准确度。

[0049] 表1准确度的结果

[0050]

标准样品添加浓度(μg/kg)	测得T-2浓度(μg/kg) ± SD	回收率%	CV%
50	51.22 ± 0.033	102.44	6.53
100	106.81 ± 0.060	106.81	11.18
200	188.34 ± 0.047	94.17	4.73

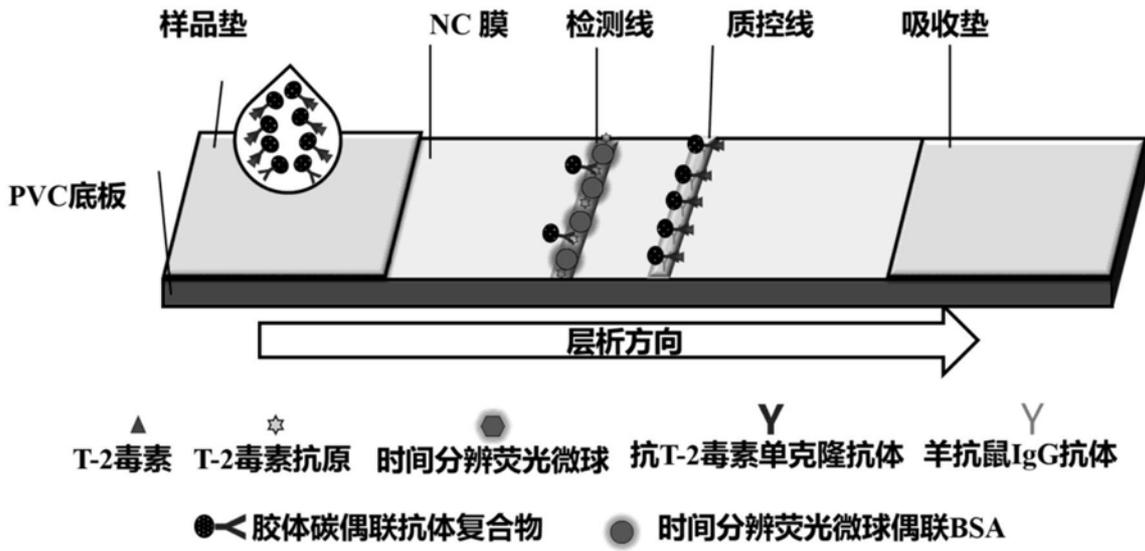


图1

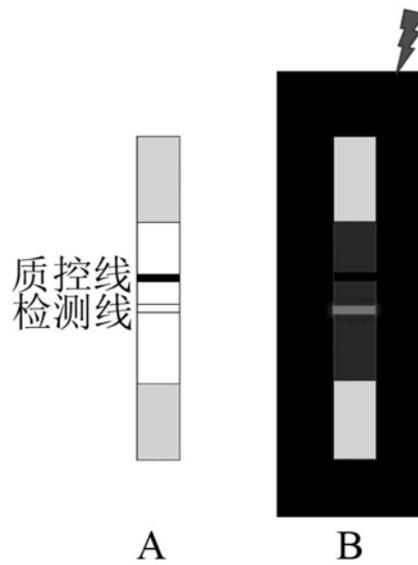


图2

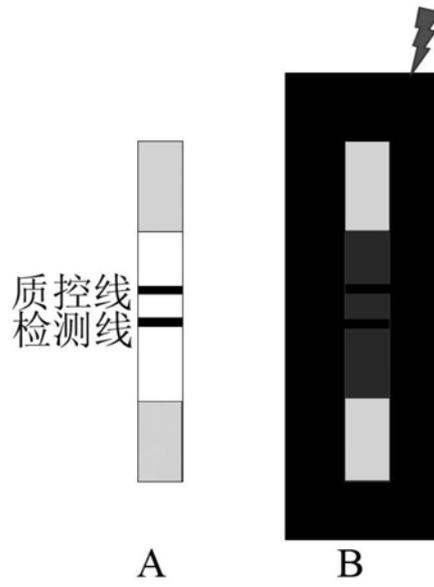


图3

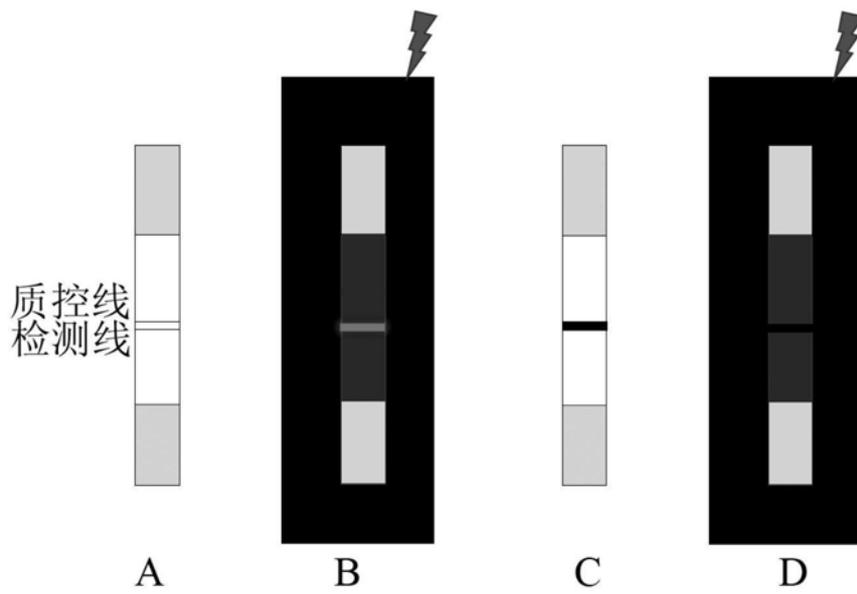


图4

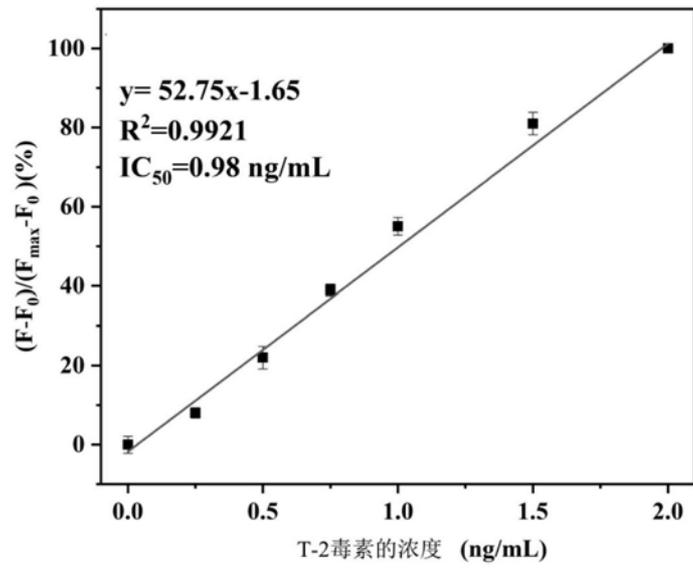


图5

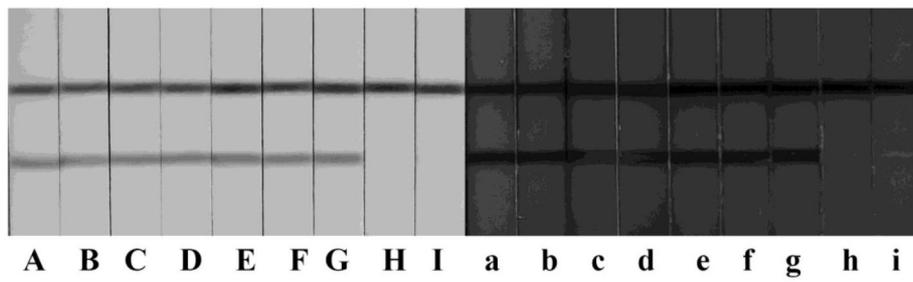


图6