



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109738637 A

(43)申请公布日 2019.05.10

(21)申请号 201910045001.0

(22)申请日 2019.01.17

(71)申请人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市白云区广州大道北1838号

(72)发明人 李婷婷 王奇 黎诚耀

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈卫

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

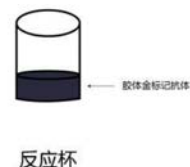
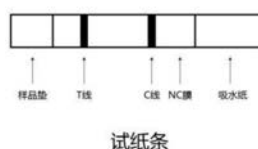
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒,包括前处理试剂、EGF胶体金检测试纸条和反应杯;所述前处理试剂为乙腈和复溶液;所述EGF胶体金检测试纸条从上往下依次由吸水纸、硝酸纤维素膜和样品垫组成,统一粘贴在底板上,硝酸纤维素膜上标记有兔抗鼠抗体和EGF偶联抗原,分别用于质控C线和检测T线;所述反应杯中含有胶体金标记的EGF单克隆抗体。本发明试剂盒应用层析式胶体金原理,试纸中检测线与质控线比色来定量检测样品中的EGF,在短时间内快速准确地检测出样品中是否含有EGF,能够满足含EGF标签产品中EGF的确定检测,能满足检测部门、检测机构现场监督执法的需要。



1. 一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒,其特征在于,包括前处理试剂、EGF胶体金检测试纸条和反应杯;所述前处理试剂为乙腈和复溶液,所述复溶液由以下重量百分数的各组分组成:0.5~2% BSA,3~6% Tris-HCl,0.02~0.06%吐温20,0.02~0.06% S9表面活性剂,余量为纯水;所述EGF胶体金检测试纸条从上往下依次由吸水纸、硝酸纤维素膜和样品垫组成,统一粘贴在底板上,硝酸纤维素膜上标记有兔抗鼠二抗和EGF偶联抗原,分别用于质控C线和检测T线;所述反应杯中含有胶体金标记的EGF单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的快速检测试剂盒,其特征在于,所述质控线C线包被的兔抗鼠二抗浓度为0.1~0.3mg/mL。

3. 根据权利要求1所述的快速检测试剂盒,其特征在于,所述检测线T线包被的EGF偶联抗原浓度为0.3~0.5mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的快速检测试剂盒,其特征在于,所述EGF偶联抗原的制备方法为将活化后的EGF半抗原与牛血清蛋白或卵清蛋白偶联制得EGF偶联抗原。

5. 根据权利要求1所述的快速检测试剂盒,其特征在于,所述EGF单克隆抗体的制备方法为将EGF偶联抗原免疫小鼠后,取加强免疫的小鼠制备脾细胞,将小鼠脾细胞与生长旺盛的小鼠骨髓瘤细胞融合,经筛选后得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,再将杂交瘤细胞扩大培养,采用小鼠体内诱生腹水法生产得到EGF单克隆抗体。

6. 根据权利要求1所述的快速检测试剂盒,其特征在于,所述兔抗鼠二抗的制备方法为用偶联抗原免疫新西兰白兔,免疫剂量为50~100 μ g/次,背部皮下分多点注射;首免,用合成的人工抗原与等量的弗氏完全佐剂乳化;加强免疫,用合成的人工抗原与弗氏不完全佐剂乳化,连续免疫4~5次,每次间隔4~8周,最后一次免疫后10~15天,以ELISA法检测其效价达到 10^5 以上时,采血并分离收集血清,以饱和硫酸铵盐析法提取IgG抗体,冻储备用。

7. 根据权利要求1所述的快速检测试剂盒,其特征在于,所述EGF胶体金检测试纸条的制备方法为先制备硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜上形成检测线和质控线,再在底板上依次粘贴硝酸纤维素膜、样品垫和吸水纸;所述检测线为能与EGF单克隆抗体结合的EGF偶联抗原在硝酸纤维素膜上进行线状点样制得;所述质控线为能与EGF单克隆抗体结合的兔抗鼠抗体在硝酸纤维素膜上进行现状点样制得。

8. 根据权利要求1所述的快速检测试剂盒,其特征在于,所述胶体金标记的EGF单克隆抗体的制备方法为调节胶体金pH值至7~9,然后加入EGF单克隆抗体后立即混匀,25~35min后加入1/10体积的10%BSA,继续搅拌25~35min,离心获得均一的胶体金标记的EGF单克隆抗体沉淀,加入PBS重悬。

9. 一种使用权利要求1~8任一项所述试剂盒进行护肤品中表皮细胞生长因子快速检测的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1. 样品预处理

溶液状样品:取待测样品于容器中,在40~60℃水浴加热以除去有机溶剂,然后加入乙腈稀释,过0.22 μ m滤膜,过滤液浓缩,再加入复溶液,振荡混匀后进行检测;

膏状、乳状样品:取待测样品于容器中,加入乙腈,振荡混匀后超声提取,离心,取上清液过0.22 μ m滤膜,过滤液浓缩,再加入复溶液,振荡混匀后进行检测;

S2. 标准曲线建立

配置EGF标准溶液,将不同浓度的标准加入到反应杯中,混匀,室温孵育;再插入试纸条

反应,然后将试纸条置于胶体金分析仪上,读取质控线和检测线对应的OD值,建立OD值与EGF浓度之间的标准曲线;

S3.检测

吸取步骤S1的样本待测液加入到反应杯中,混匀,室温孵育;再插入试纸条反应,直接观察试纸条颜色变化;或将试纸条置于胶体金分析仪上,读取质控线和检测线对应的OD值,根据OD值计算EGF的浓度结果。

10.根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,所述待测样品与乙腈的质量体积比为1:1~2g/mL。

一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及护肤品活性物质检测技术领域,更具体地,涉及一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 表皮细胞生长因子(Epidermal growth factor,EGF)是人体内存在的一种生长因子,它的主要功能是促进皮肤细胞的分裂。研究表明,极微量的EGF即能强烈刺激细胞生长,抑制衰老基因表达,阻止皮肤衰老,使皮肤各组成份保持最佳生理状态。此外,它还能刺激细胞外一些大分子(如透明质酸和胶原蛋白等)的合成与分泌,滋润皮肤,是决定皮肤活力和健康的关键因素。

[0003] 近年来,EGF被越来越多的应用于护肤品中,由于其在细胞修复和抗衰老中发挥的积极作用,已经成为许多护肤品中的必要添加物。然而对市场上标称含有EGF的护肤品加以检测,发现存在不少伪冒添加的情况,这无疑对消费者的利益造成巨大损害。因此,有必要对护肤品中的EGF进行检测。

[0004] 目前对EGF的检测主要集中在血清,血浆及相关液体样本中,而对于护肤品中的EGF检测的研究相对较少,仅陈科等(2010)公开了一种化妆品中表皮生长因子的快速检测方法(陈科,郭狄,苏志坚,et al. 化妆品中表皮生长因子的快速检测[J]. 日用化学工业,2010,40(1):67-70.),采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、免疫印迹法(WB)和噻唑蓝(MTT)比色法对化妆品中表皮生长因子(EGF)进行快速检测,然而上述检测方法均存在着操作繁琐,检验所需时间长,仪器设备复杂等问题,不能满足现场快速检验的要求。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是克服上述现有EGF检测存在的缺陷和不足,提供一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测方法。

[0007] 本发明的上述目的是通过以下技术方案给予实现的:

一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒,包括前处理试剂、EGF胶体金检测试纸条和反应杯;所述前处理试剂为乙腈和复溶液,所述复溶液由以下重量百分数的各组分组成:0.5~2% BSA,3~6% Tris-HCl,0.02~0.06%吐温20,0.02~0.06% S9表面活性剂,余量为纯水;所述EGF胶体金检测试纸条从上往下依次由吸水纸、硝酸纤维素膜和样品垫组成,统一粘贴在底板上,硝酸纤维素膜上标记有兔抗鼠二抗和EGF偶联抗原,分别用于质控C线和检测T线;所述反应杯中含有胶体金标记的EGF单克隆抗体。

[0008] 本发明的表皮细胞生长因子检测试剂盒通过竞争法进行检测,检测T线包被的抗原和待测样品中的抗原竞争结合反应杯中的金标抗体,如果待测样品中无抗原存在,金标

抗体在泳动过程中先和T线包被抗原结合,形成肉眼可见红线,多余金标抗体继续泳动和质控线C线包被的兔抗鼠二抗,也形成一条肉眼可见红线,此结果判为阴性(双红线判为阴性,和非竞争法相反);如果待测样品中有抗原存在,则样品中的抗原、包被抗原和金标抗体竞争结合,包被抗原被抑制,样品中的抗原和金标抗体结合后继续泳动,直到和C线的二抗再次结合,此时,T先不显色,而C先显红色,结果判为阳性(T线无色,C线红色,为阳性);如果结果中C线不显色,则试纸条已报废,不能再使用。

[0009] 优选地,所述质控线C线包被的兔抗鼠二抗浓度为0.1~0.3mg/mL。

[0010] 优选地,所述检测线T线包被的EGF偶联抗原浓度为0.3~0.5mg/mL。

[0011] 优选地,所述EGF偶联抗原的制备方法为将活化后的EGF半抗原与牛血清蛋白或卵清蛋白偶联制得EGF偶联抗原。

[0012] 更优选地,所述EGF抗原的制备方法为:取EGF半抗原8~12mg溶于1~3mL PBS中,边搅拌边加入8~12mg BSA/OVA,继续边搅拌边加入8~12mg mgEDC,室温反应1~3h后使用PBS透析2~3天,4~6h换液一次,得到EGF偶联抗原。

[0013] 优选地,所述EGF单克隆抗体的制备方法为将EGF偶联抗原免疫小鼠后,取加强免疫的小鼠制备脾细胞,将小鼠脾细胞与生长旺盛的小鼠骨髓瘤细胞融合,经筛选后得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,再将杂交瘤细胞扩大培养,采用小鼠体内诱生腹水法生产得到EGF单克隆抗体。

[0014] 更优选地,所述EGF单克隆抗体制备方法为:使用EGF偶联抗原免疫小鼠,免疫两次后检测效价,选取效价高的小鼠继续免疫三次后加强免疫,三天后处死小鼠,在无菌的环境下制备脾细胞,与生长旺盛的小鼠骨髓瘤细胞按照7:1的比例混合,加入无血清的IPMI1640培养基,离心弃上清,将细胞轻轻振荡,置于37℃水浴中;往细胞培养液中加入0.05倍体积的50%v/vPEG-4000,同时轻轻振荡底部沉淀,静置1~3min后,30s内沿管壁缓慢加入0.05倍体积的无血清细胞培养基,然后再在30s内加入0.1倍体积的无血清培养基,接着快速加入1倍体积的无血清细胞培养基终止融合,离心弃上清,使用HAT选择性培养基重悬后加入到已铺设饲养层细胞的细胞培养板中,37℃、体积分数5%CO₂条件下培养7天后换HT培养液,筛选强阳性、细胞生长旺盛的细胞进行有限稀释克隆,经三次以上的克隆培养和检测,均呈阳性的细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞;

将杂交瘤细胞扩大培养以用于单克隆抗体的制备,采用体内诱生腹水法生产EGF单克隆抗体,在小鼠腹腔注射液体石蜡1mL/只,7~14天后腹腔注射杂交瘤细胞 1×10^6 /只,10天后,收集腹水,用正辛酸-硫酸铵沉淀法来纯化腹水,得到EGF单克隆抗体。

[0015] 优选地,所述兔抗鼠二抗的制备方法为用偶联抗原免疫新西兰白兔,免疫剂量为50~100μg/次,背部皮下分多点注射;首免,用合成的人工抗原与等量的弗氏完全佐剂乳化;加强免疫,用合成的人工抗原与弗氏不完全佐剂乳化,连续免疫4~5次,每次间隔4~8周,最后一次免疫后10~15天,以ELISA法检测其效价达到 10^5 以上时,采血并分离收集血清,以饱和硫酸铵盐析法提取IgG抗体,冻储备用。

[0016] 优选地,所述EGF胶体金检测试纸条的制备方法为先制备硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜上形成检测线和质控线,再在在底板上依次粘贴硝酸纤维素膜、样品垫和吸水纸;所述检测线为能与EGF单克隆抗体结合的EGF偶联抗原在硝酸纤维素膜上进行线状点样制得;所述质控线为能与EGF单克隆抗体结合的兔抗鼠抗体在硝酸纤维素膜上进行现状点样制

得。

[0017] 优选地,所述胶体金标记的EGF单克隆抗体的制备方法为调节胶体金pH值至7~9,然后加入EGF单克隆抗体后立即混匀,25~35min后加入1/10体积的10%BSA,继续搅拌25~35min,离心获得均一的胶体金标记的EGF单克隆抗体沉淀,加入PBS重悬。

[0018] 优选地,每毫升胶体金标记鼠抗EGF单克隆抗体的质量为20~25 μ g。

[0019] 更优选地,所述胶体金的制备方法为:取1%氯金酸溶液1mL,加入100mL超纯水制成氯金酸溶液,加热至沸腾后,取1%柠檬酸三钠2mL迅速加入沸腾的氯金酸溶液中,继续加热至溶液由黄色转变为蓝黑色最终转变为亮红的,颜色稳定后继续加热5min,室温冷却,补充失水至原体积。

[0020] 本发明还保护一种使用上述任一所述试剂盒进行护肤品中表皮细胞生长因子快速检测的方法,包括如下步骤:

S1. 样品预处理

溶液状样品:取待测样品于容器中,在40~60 $^{\circ}$ C水浴加热以除去有机溶剂,然后加入乙腈稀释,过0.22 μ m滤膜,过滤液浓缩,再加入复溶液,振荡混匀后进行检测;

膏状、乳状样品:取待测样品于容器中,加入乙腈,振荡混匀后超声提取,离心,取上清液过0.22 μ m滤膜,过滤液浓缩,再加入复溶液,振荡混匀后进行检测;

S2. 标准曲线建立

配置EGF标准溶液,将不同浓度的标准加入到反应杯中,混匀,室温孵育;再插入试纸条反应,然后将试纸条置于胶体金分析仪上,读取质控线和检测线对应的OD值,建立OD值与EGF浓度之间的标准曲线;

S3. 检测

吸取步骤S1的样本待测液加入到反应杯中,混匀,室温孵育;再插入试纸条反应,直接观察试纸条颜色变化;或将试纸条置于胶体金分析仪上,读取质控线和检测线对应的OD值,根据OD值计算EGF的浓度结果。

[0021] 所述检测方法可根据需求对不同来源和形态的护肤品进行定性或定量检测。

[0022] 优选地,S1所述加热时间为4~6min。

[0023] 优选地,S1所述离心为8000~10000 r/min离心8~10 min。

[0024] 优选地,所述待测样品与乙腈的质量体积比为1:1~2g/mL。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

本发明提供了一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒,应用层析式胶体金原理,试纸中检测线与质控线比色来定量检测样品中的EGF,在短时间内快速准确地检测出样品中是否含有EGF,所述试剂条对EGF的检测范围为下限可达到1 μ g/L。能够满足含EGF标签产品中EGF的确定检测,能满足检测部门、检测机构现场监督执法的需要。与现有技术相比,具有使用方便、经济快捷,制作简单、成本低廉的特点。

附图说明

[0026] 图1为本发明护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒的组成示意图。

[0027] 图2为本发明待测样品的前处理步骤。

[0028] 图3为本发明检测方法OD值与EGF浓度之间的标准曲线图。

具体实施方式

[0029] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0030] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0031] 实施例1

1、EGF抗原的制备

取EGF半抗原10mg溶于2mL PBS中,边搅拌边加入10mg BSA,继续边搅拌边加入10mg EDC,室温反应2h后使用PBS透析2天,4~6h换液一次,得到EGF偶联抗原。

[0032] 2、EGF单克隆抗体的制备

使用EGF偶联抗原免疫小鼠,免疫两次后检测效价,选取效价高的小鼠继续免疫三次后加强免疫,三天后处死小鼠,在无菌的环境下制备脾细胞,与生长旺盛的小鼠骨髓瘤细胞按照7:1的比例混合,加入无血清的IPMI1640培养基,离心弃上清,将细胞轻轻振荡,置于37℃水浴中;往细胞培养液中加入0.05倍体积的50%v/vPEG-4000,同时轻轻振荡底部沉淀,静置1min后,30s内沿管壁缓慢加入0.05倍体积的无血清细胞培养基,然后再在30s内加入0.1倍体积的无血清培养基,接着快速加入1倍体积的无血清细胞培养基终止融合,离心弃上清,使用HAT选择性培养基重悬后加入到已铺设饲养层细胞的细胞培养板中,37℃、体积分数5% CO₂条件下培养7天后换HT培养液,筛选强阳性、细胞生长旺盛的细胞进行有限稀释克隆,经三次以上的克隆培养和检测,均呈阳性的细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞;

将杂交瘤细胞扩大培养以用于单克隆抗体的制备,采用体内诱生腹水法生产EGF单克隆抗体,在小鼠腹腔注射液体石蜡1mL/只,7~14天后腹腔注射杂交瘤细胞 1×10^6 /只,10天后,收集腹水,用正辛酸-硫酸铵沉淀法来纯化腹水,得到EGF单克隆抗体。

[0033] 3、兔抗鼠抗体的制备

用EGF偶联抗原免疫新西兰白兔,免疫剂量为100μg/次,背部皮下分多点注射;首免,用合成的BSA偶联抗原与等量的弗氏完全佐剂乳化;加强免疫,用合成的BSA偶联抗原与弗氏不完全佐剂乳化,连续免疫4~5次,每次间隔4~8周,最后一次免疫后10~15天,以ELISA法检测其效价达到 10^5 以上时,采血并分离收集血清,以饱和硫酸铵盐析法提取IgG抗体,冻存备用。

[0034] 4、EGF胶体金检测试纸条的制备

(1) 制备硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜上形成检测线和质控线;所述检测线为能与EGF单克隆抗体结合的EGF偶联抗原在硝酸纤维素膜上进行线状点样制得;所述质控线为能与EGF单克隆抗体结合的兔抗鼠抗体在硝酸纤维素膜上进行线状点样制得;使质控线C线包被的兔抗鼠二抗浓度为0.2 mg/mL,T线包被的EGF偶联抗原浓度为0.4 mg/mL。

[0035] (2) 在底板上依次粘贴硝酸纤维素膜,吸水纸,样品垫;

5、胶体金标记的EGF单克隆抗体的制备

(1) 胶体金的制备

取1%氯金酸溶液1mL,加入100mL超纯水制成氯金酸溶液,加热至沸腾后,取1%柠檬酸三钠2mL迅速加入沸腾的氯金酸溶液中,继续加热至溶液由黄色转变为蓝黑色最终转变为亮红的,颜色稳定后继续加热5min,室温冷却,补充失水至原体积。

[0036] (2) 胶体金标记EGF单克隆抗体的制备

调节胶体金溶液PH值至8,加入EGF单克隆抗体后立即混匀,30min后加入1/10体积的10%BSA,继续搅拌30min,离心获得均一的胶体金标记的EGF单克隆抗体沉淀,加入PBS重悬。使每毫升胶体金标记EGF单克隆抗体的质量为23 μ g。

[0037] 6、检测试剂盒

如图1所示,一种由上述步骤制备得到的产品组合得到护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒,包括前处理试剂、EGF胶体金检测试纸条和反应杯;所述前处理试剂为乙腈和复溶液,所述复溶液由以下重量百分比的各组分组成:1% BSA,5% Tris-HCl,0.05%吐温20,0.05% S9表面活性剂,余量为纯水;具体制备方发为将相应重量百分数的BSA,Tris-HCl,吐温20及S9表面活性剂溶于纯水中,搅拌混匀即得;所述EGF胶体金检测试纸条从上往下依次由吸水纸、硝酸纤维素膜和样品垫组成,统一粘贴在底板上,硝酸纤维素膜上标记有兔抗鼠二抗和EGF偶联抗原,分别用于质控C线和检测T线;所述反应杯中含有胶体金标记的EGF单克隆抗体。

[0038] 实施例2

1、EFG抗原的制备

取EGF半抗原8 mg溶于1mL PBS中,边搅拌边加入8mg OVA,继续边搅拌边加入8mg EDC,室温反应1h后使用PBS透析2天,4~6h换液一次,得到EGF偶联抗原。

[0039] 2、EGF单克隆抗体的制备

与实施例1相同。

[0040] 3、兔抗鼠抗体的制备

与实施例1相同。

[0041] 4、EGF胶体金检测试纸条的制备

与实施例1相同。使质控线C线包被的兔抗鼠二抗浓度为0.1mg/mL,T线包被的EGF偶联抗原浓度为0.3 mg/mL。

[0042] 5、胶体金标记的EGF单克隆抗体的制备

(1) 胶体金的制备

与实施例1相同;

(2) 胶体金标记EGF单克隆抗体的制备

调节胶体金溶液PH值至7,加入EGF单克隆抗体后立即混匀,25min后加入1/10体积的10%BSA,继续搅拌,25min,离心获得均一的胶体金标记的EGF单克隆抗体沉淀,加入PBS重悬。使每毫升胶体金标记EGF单克隆抗体的质量为20 μ g。

[0043] 6、检测试剂盒

一种由上述步骤制备得到的产品组合得到护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒,包括前处理试剂、EGF胶体金检测试纸条和反应杯;所述复溶液由以下重量百分比的各组分组成:0.5% BSA,6% Tris-HCl,0.02%吐温20,0.06% S9表面活性剂,余量为纯水;具体制备方发为将相应重量百分数的BSA,Tris-HCl,吐温20及S9表面活性剂溶于纯水中,搅拌混匀即得。所述EGF胶体金检测试纸条从上往下依次由吸水纸、硝酸纤维素膜和样品垫组成,统一粘贴在底板上,硝酸纤维素膜上标记有兔抗鼠二抗和EGF偶联抗原,分别用于质控C线和检测T线;所述反应杯中含有胶体金标记的EGF单克隆抗体。

[0044] 实施例3

1、EGF抗原的制备

取EGF半抗原12mg溶于3mL PBS中,边搅拌边加入12mg BSA,继续边搅拌边加入12mg EDC,室温反应3h后使用PBS透析3天,4~6h换液一次,得到EGF偶联抗原。

[0045] 2、EGF单克隆抗体的制备

与实施例1相同。

[0046] 3、兔抗鼠抗体的制备

与实施例1相同。

[0047] 4、EGF胶体金检测试纸条的制备

与实施例1相同。使质控线C线包被的兔抗鼠二抗浓度为0.3mg/mL,T线包被的EGF偶联抗原浓度为0.5 mg/mL。

[0048] 5、胶体金标记的EGF单克隆抗体的制备

(1) 胶体金的制备

与实施例1相同;

(2) 胶体金标记EGF单克隆抗体的制备

调节胶体金溶液PH值至9,加入EGF单克隆抗体后立即混匀,35min后加入1/10体积的10%BSA,继续搅拌35min,离心获得均一的胶体金标记的EGF单克隆抗体沉淀,加入PBS重悬。使每毫升胶体金标记EGF单克隆抗体的质量为25 μ g。

[0049] 6、检测试剂盒

一种由上述步骤制备得到的产品组合得到护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒,包括前处理试剂、EGF胶体金检测试纸条和反应杯;所述复溶液由以下重量百分比的各组分组成:2% BSA,3% Tris-HCl,0.06%吐温20,0.02% S9表面活性剂,余量为纯水;具体制备方发为将相应重量百分数的BSA,Tris-HCl,吐温20及S9表面活性剂溶于纯水中,搅拌混匀即得。所述EGF胶体金检测试纸条从上往下依次由吸水纸、硝酸纤维素膜和样品垫组成,统一粘贴在底板上,硝酸纤维素膜上标记有兔抗鼠二抗和EGF偶联抗原,分别用于质控C线和检测T线;所述反应杯中含有胶体金标记的EGF单克隆抗体。

[0050] 实施例4 护肤品中表皮细胞生长因子的检测方法

使用实施例1的表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒对护肤品样品进行检测,主要包括如下步骤:

1、样品预处理

溶液状样品:准确称取样品5 g于15mL离心管中,在50℃水浴加热5min除去有机溶剂,加入乙腈稀释到10 mL,过0.22 μ m滤膜过滤,过滤液体使用氮吹仪吹干,加入复溶液300 μ L,振荡混匀后取120 μ L进行检测。

[0051] 膏状、乳状样品:准确称取样品5g于15mL 离心管中,加入10 mL乙腈,涡旋3 min,超声提取10 min,9000 r/min离心10 min,吸取上清过0.22 μ m 滤膜过滤,过滤液体使用氮吹仪吹干,加入复溶液300 μ L,振荡混匀后取120 μ L进行检测。上述样品预处理过程如图2所示。

[0052] 2、标准曲线建立

分别配置不同浓度的EGF标准溶液(0 μ g/kg,2.5 μ g/kg,5 μ g/kg,10 μ g/kg,20 μ g/kg),将

不同浓度的标准加入到反应杯中,混匀,室温孵育;再插入试纸条反应,然后将试纸条置于胶体金分析仪上,读取质控线和检测线对应的OD值,以测得的OD值为纵坐标,EGF浓度为横坐标,建立OD值与EGF浓度之间的标准曲线;其结果如图3所示,可见OD值与EGF浓度之间存在线性关系,可用于未知样品中的EGF定量检测。

[0053] 3、待测样品检测

吸取步骤1的样本待测液120 μ L加入到反应杯中,混匀,室温孵育2min;插入试纸条,计时5min;取出试纸条,然后将试剂条插置于胶体金分析仪上,经10min后读取质控线和检测线对应的OD值,根据OD值计算EGF的浓度结果。

[0054] 4、检测结果

所述EGF浓度的计算依据图3得到的标准EGF浓度与OD值对应的线性方程式进行计算。使用上述定量检测方法进行批内重复实验,结果如表1所示,上述定量检测方法重复性好。

[0055] 表1 EGF试纸条检测批内重复结果

样品序号	重复孔号 (μ g/kg)			平均值	标准差	变异系数 (%)
	1	2	3			
1	5.452	5.405	5.237	5.365	0.092	1.715
2	2.376	2.35	2.193	2.306	0.081	3.513
3	8.53	8.495	8.58	8.535	0.035	0.41
4	1.293	1.238	1.205	1.245	0.036	2.892
5	4.364	4.312	4.404	4.360	0.038	0.872
6	12.375	12.29	12.287	12.317	0.041	0.333

同时,采用本发明定量检测EGF的试纸条和酶联免疫检测试剂盒对20份样品(添加标准品的量为0.5~20 μ g/kg)进行检测,结果如表2所示,上述定量检测方法的检出率要显著高于酶联免疫检测试剂盒。同时,对EGF的检测范围为下限可达到1 μ g/L。

[0056] 表2 EGF的试纸条和酶联免疫检测试剂盒检测效果比较

检测方法	样品数总数	检出数	检出率 (%)
本发明定量检测试纸条	50	48	96
酶联免疫检测试剂盒	50	28	56

以上结果表明,本发明的检测试剂盒和检测方法可在短时间内快速准确地检测出样品中是否含有EGF,所述试剂条对EGF的检测范围为下限可达到1 μ g/L。能够满足含EGF标签产品中EGF的确定检测,能满足检测部门、检测机构现场监督执法的需要。与现有技术相比,具有使用方便、经济快捷,制作简单、成本低廉的特点。

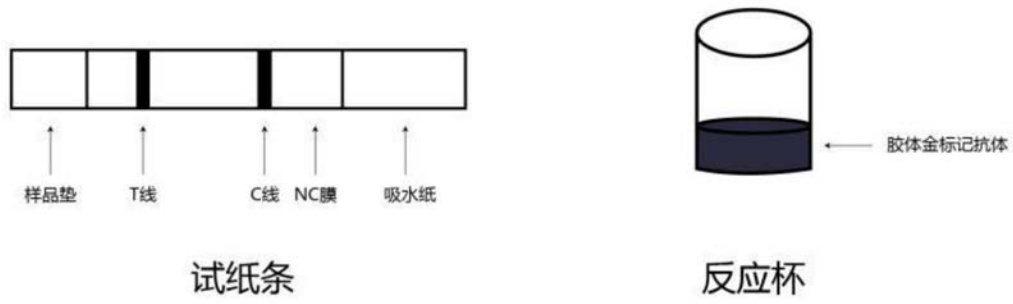


图1

膏状、乳状

溶液状

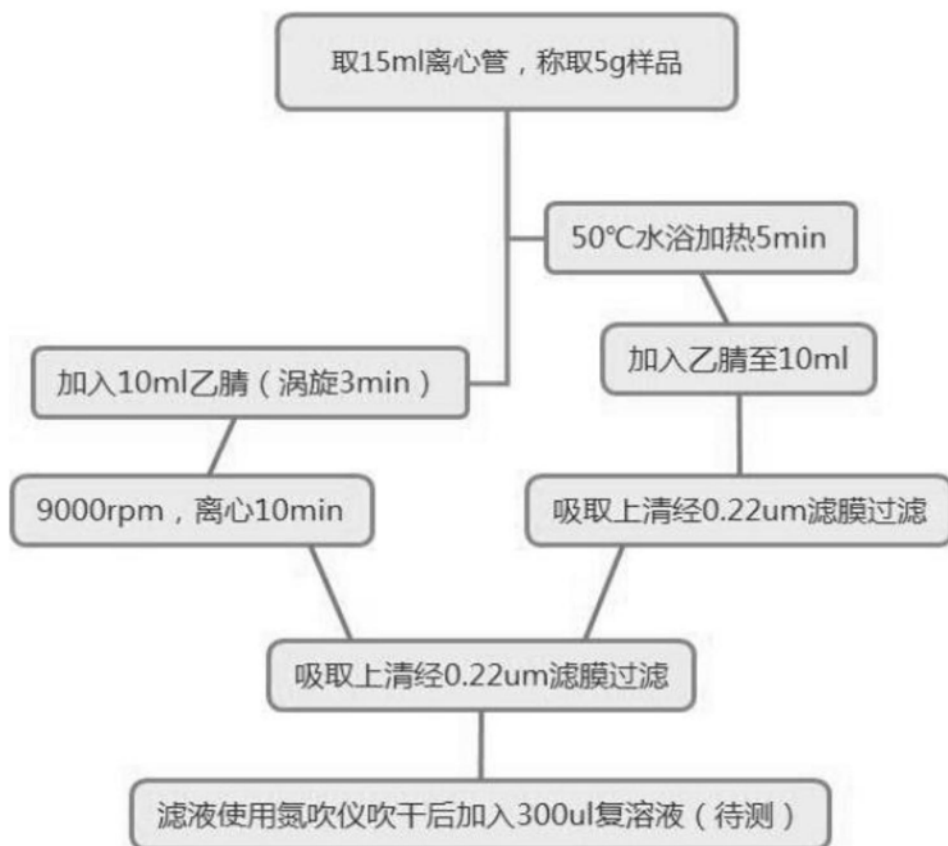


图2

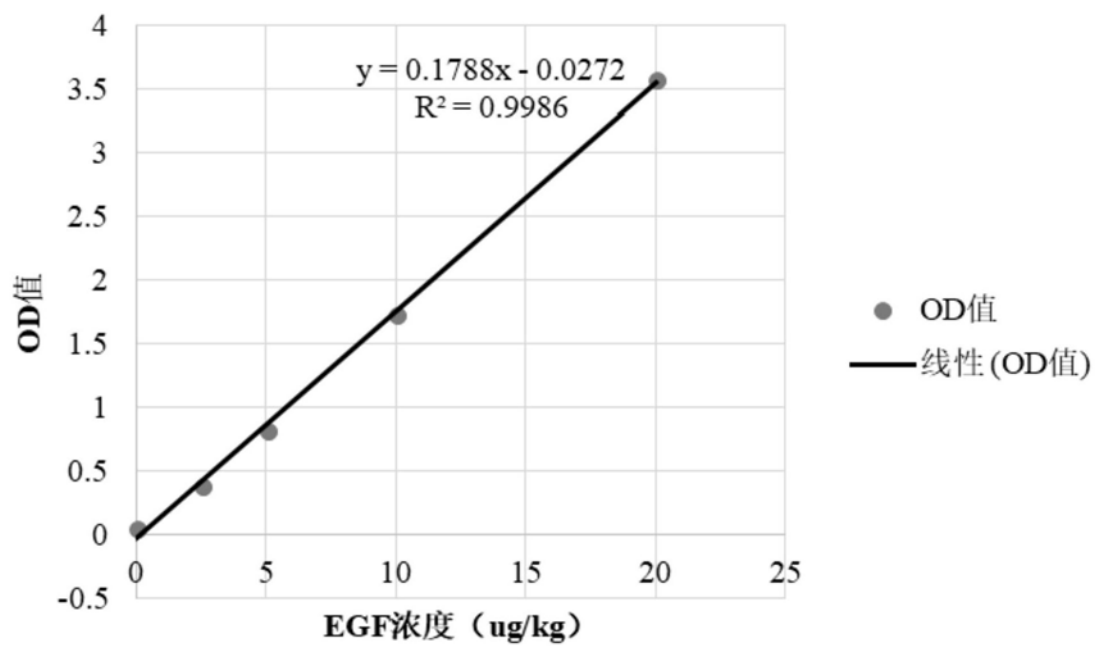


图3

专利名称(译)	一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN109738637A	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201910045001.0	申请日	2019-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	李婷婷 王奇 黎诚耀		
发明人	李婷婷 王奇 黎诚耀		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532		
代理人(译)	陈卫		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种护肤品中表皮细胞生长因子的快速检测试剂盒，包括前处理试剂、EGF胶体金检测试纸条和反应杯；所述前处理试剂为乙腈和复溶液；所述EGF胶体金检测试纸条从上往下依次由吸水纸、硝酸纤维素膜和样品垫组成，统一粘贴在底板上，硝酸纤维素膜上标记有兔抗鼠抗体和EGF偶联抗原，分别用于质控C线和检测T线；所述反应杯中含有胶体金标记的EGF单克隆抗体。本发明试剂盒应用层析式胶体金原理，试纸中检测线与质控线比色来定量检测样品中的EGF，在短时间内快速准确地检测出样品中是否含有EGF，能够满足含EGF标签产品中EGF的确定检测，能满足检测部门、检测机构现场监督执法的需要。

