



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102384973 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201110228315. 8

CN 102023211 A, 2011. 04. 20, 权利要求 1, 5, 9, 附图.

(22) 申请日 2011. 08. 10

CN 101738470 A, 2010. 06. 16, 全文.

(73) 专利权人 华南理工大学

EP 1091755 A1, 2001. 04. 18, 全文.

地址 510640 广东省广州市天河区五山路 381 号

EP 1642571 A2, 2006. 04. 05, 全文.

US 2006210622 A1, 2006. 09. 21, 全文.

(72) 发明人 于淑娟 俞思明 吴鑫兰 管永光

审查员 杨冀川

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 罗观祥

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101017168 A, 2007. 08. 15, 权利要求 1-3, 6, 附图.

CN 101435823 A, 2009. 05. 20, 权利要求 4, 5, 附图.

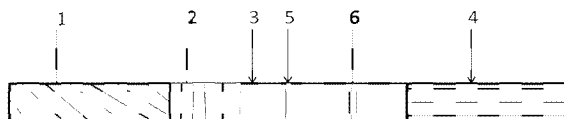
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条及其制备方法。该免疫层析试纸条包括样品垫、荧光胶乳垫、包被膜、吸水纸和聚乙烯塑料底板；以聚乙烯塑料底板为支持底板，按从左到右样品垫、荧光胶乳垫、包被膜和吸水纸顺次搭接在支持底板上；将质量浓度为 0. 1mg/ml ~ 2mg/ml 的羊抗兔免疫球蛋白 G 和质量浓度为 0. 5mg/ml ~ 5mg/ml 的羟甲基糠醛完全抗原溶液分别均匀喷涂于硝酸纤维素膜上对应的质控区和检测区，然后将硝酸纤维素膜烘干，制成包被膜。应用本发明的免疫层析试纸条可定量检测出食品药品中羟甲基糠醛含量，且简便、快速、灵敏。



1. 一种快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条,其特征在于:包括样品垫、荧光胶乳垫、包被膜、吸水纸和聚乙烯塑料底板;以聚乙烯塑料底板为支持底板,按从左到右样品垫、荧光胶乳垫、包被膜和吸水纸顺次搭接在支持底板上;

所述荧光胶乳垫由如下方法制备形成:将羟甲基糠醛完全抗原用于免疫实验动物家兔,获得羟甲基糠醛多克隆抗体并进行亲和层析纯化;用荧光胶乳微球标记已纯化好的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔免疫球蛋白G;将荧光胶乳标记好的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔免疫球蛋白G按质量比为1:10~1:2000均匀混合,并将混合液均匀喷涂于聚酯纤维膜上,然后将聚酯纤维膜烘干,备用;

所述包被膜由检测区和质控区组成;由如下方法制备:将质量浓度为0.1mg/ml~2mg/ml的羊抗兔免疫球蛋白G和质量浓度为0.5mg/ml~5mg/ml的羟甲基糠醛完全抗原溶液分别均匀喷涂于硝酸纤维素膜上对应的质控区和检测区,然后将硝酸纤维素膜烘干,备用;

所述样品垫为玻璃纤维膜;所述吸水纸为植物纤维滤纸;所述羟甲基糠醛完全抗原为羟甲基糠醛-牛血清白蛋白。

2. 根据权利要求1所述的快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条,其特征在于:所述搭接是指样品垫、荧光胶乳垫、包被膜和吸水纸相邻两块左右两侧有1~3mm重叠。

3. 根据权利要求1所述的快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条,其特征在于:所述试纸条宽为0.3~0.4cm,长为7~8cm。

4. 根据权利要求1所述的快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条,其特征在于:所述荧光胶乳微球的颜色为橘黄色、蓝色和红色中的一种;所述的荧光胶乳微球的粒径为0.05 μ m~0.5 μ m;所述的荧光胶乳微球的激发波长为300nm~600nm;所述的荧光胶乳微球标记的羟甲基糠醛多克隆抗体的终浓度为0.1mg/ml~1mg/ml,荧光胶乳微球标记的兔免疫球蛋白G的终浓度为0.1mg/ml~1mg/ml。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 多抗的制备:将羟甲基糠醛完全抗原用于免疫实验动物家兔,获得羟甲基糠醛多克隆抗体并进行亲和层析纯化;

(2) 蛋白的标记:用荧光胶乳微球标记已纯化好的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔免疫球蛋白G;

(3) 荧光胶乳垫的制备:将荧光胶乳标记好的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔免疫球蛋白G均匀混合,并将混合液均匀喷涂于聚酯纤维膜上,然后将聚酯纤维膜烘干,备用;

(4) 包被膜的制备:将质量浓度为0.1mg/ml~2mg/ml的羊抗兔免疫球蛋白G和质量浓度为0.5mg/ml~5mg/ml的羟甲基糠醛完全抗原溶液分别均匀喷涂于硝酸纤维素膜上对应的质控区和检测区,然后将硝酸纤维素膜烘干,备用;

(5) 免疫层析试纸条的制备:以聚乙烯塑料板为支持底板,将样品垫、荧光胶乳垫、包被膜以及吸水纸顺次相互搭接在底板上,即组装成可快速检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条,然后按要求切割成适当宽度的免疫层析试纸条。

快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 5-羟甲基糠醛检测技术,具体是一种快速定量检测 5-羟甲基糠醛的免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 5-羟甲基糠醛(又名 5-羟甲基-2-糠醛、羟甲基糠醛、5-羟甲基呋喃甲醛或 5-羟甲基-2-呋喃甲醛),英文名 5-hydroxymethyl-2-furfural 或 5-HMF,为针状结晶。羟甲基糠醛分子中有一个醛基和一个羟甲基,可以通过加氢、氧化脱氧、酯化、卤化、聚合、水解以及其它化学反应,用于合成许多有用化学物和新型高分子材料,包括医药、树脂类塑料等。然而,据有关文献报道 5-羟甲基糠醛对人体横纹肌和内脏有损害,同时也是导致神经性疾病的主要因素,其在食品药品中的大量存在会严重危害人体健康,世界卫生组织已经对蜂蜜中 5-羟甲基糠醛的含量加以控制,中国药典也对葛根素葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛的含量有非常严格的控制。因此,通过检测进而控制食品药品中 5-羟甲基糠醛的含量具有重要的现实意义。

[0003] 目前,国内外有关检测 5-羟甲基糠醛的方法主要有:比色法、紫外法以及高效液相色谱法(HPLC)。比色法中由于 5-羟甲基糠醛并非葡萄糖注射液变色的唯一因素,该法专属性性和准确性较差;紫外法对被测样品的浓度,各个国家有不同的要求,没有统一的标准,很难确定最终的检测结果;使用高效液相色谱法,虽然可以非常准确的测出样品中 5-羟甲基糠醛的含量,但是,此法需要昂贵的仪器设备和专业技术人员,对被检材料要求较高,样品预处理及操作过程复杂,费时又费力,已经不能满足现代检测对方便、快速、准确的要求。目前,国内利用快速定量检测免疫层析试纸条检测食品药品中 5-羟甲基糠醛含量的专利文献及相关报道为空白。

发明内容

[0004] 本发明针对现有检测羟甲基糠醛技术的缺点和不足,提供了一种快速定量检测羟甲基糠醛免疫层析试纸条及其制备方法,利用荧光胶乳微球标记抗体技术检测羟甲基糠醛的手段更加简便、快速、灵敏。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现:

[0006] 一种快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条,包括样品垫、荧光胶乳垫、包被膜、吸水纸和聚乙烯塑料底板;以聚乙烯塑料底板为支持底板,按从左到右样品垫、荧光胶乳垫、包被膜和吸水纸顺次搭接在支持底板上;

[0007] 所述荧光胶乳垫由如下方法制备形成:将羟甲基糠醛完全抗原用于免疫实验动物家兔,获得羟甲基糠醛多克隆抗体并进行亲和层析纯化;用荧光胶乳微球标记已纯化好的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔免疫球蛋白 G;将荧光胶乳标记好的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔免疫球蛋白 G 按质量比为 1:10~1:2000 均匀混合,并将混合液均匀喷涂于聚酯纤维膜上,然后将聚酯纤维膜烘干,备用;

[0008] 所述包被膜由检测区和质控区组成；由如下方法制备：将质量浓度为 0.1mg/ml ~ 2mg/ml 的羊抗兔免疫球蛋白 G 和质量浓度为 0.5mg/ml ~ 5mg/ml 的羟甲基糠醛完全抗原溶液分别均匀喷涂于硝酸纤维素膜上对应的质控区和检测区，然后将硝酸纤维素膜烘干，备用；

[0009] 所述样品垫为玻璃纤维膜；所述吸水纸为植物纤维滤纸；所述羟甲基糠醛完全抗原为羟甲基糠醛-牛血清白蛋白。

[0010] 进一步地，所述搭接是指样品垫、荧光胶乳垫、包被膜和吸水纸中相邻两块左右两侧有 1 ~ 3mm 重叠。

[0011] 所述试纸条宽优选为 0.3 ~ 0.4cm，长优选为 7 ~ 8cm。

[0012] 所述荧光胶乳微球的颜色为橘黄色、蓝色和红色中的一种；所述的荧光胶乳微球的粒径为 0.05 μm ~ 0.5 μm ；所述的荧光胶乳微球的激发波长为 300nm ~ 600nm；所述的荧光胶乳微球标记的羟甲基糠醛多克隆抗体的终浓度为 0.1mg/ml ~ 1mg/ml，荧光胶乳微球标记的兔免疫球蛋白 G 的终浓度为 0.1mg/ml ~ 1mg/ml。

[0013] 快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条的制备方法，包括以下步骤：

[0014] (1) 多抗的制备：将羟甲基糠醛完全抗原用于免疫实验动物家兔，获得羟甲基糠醛多克隆抗体并进行亲和层析纯化；

[0015] (2) 蛋白的标记：用荧光胶乳微球标记已纯化好的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔免疫球蛋白 G；

[0016] (3) 荧光胶乳垫的制备：将荧光胶乳标记好的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔免疫球蛋白 G 均匀混合，并将混合液均匀喷涂于聚酯纤维膜上，然后将聚酯纤维膜烘干，备用；

[0017] (4) 包被膜的制备：将质量浓度为 0.1mg/ml ~ 2mg/ml 的羊抗兔免疫球蛋白 G 和质量浓度为 0.5mg/ml ~ 5mg/ml 的羟甲基糠醛完全抗原溶液分别均匀喷涂于硝酸纤维素膜上对应的质控区和检测区，然后将硝酸纤维素膜烘干，备用；

[0018] (5) 免疫层析试纸条的制备：以聚乙烯塑料板为支持底板，将样品垫、荧光胶乳垫、包被膜以及吸水纸顺次相互搭接在底板上，即组装成可快速检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸板，然后按要求切割成适当宽度的免疫层析试纸条。

[0019] 本发明所述的一种快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条的检测原理是竞争法。在硝酸纤维素膜的检测区包被有羟甲基糠醛完全抗原，在质控区包被有羊抗兔 IgG，荧光胶乳垫上涂有荧光胶乳标记的羟甲基糠醛多抗和兔 IgG。当被检样品中含有羟甲基糠醛抗原时，样品中的羟甲基糠醛就会和荧光胶乳标记垫上的羟甲基糠醛多抗结合形成抗原-荧光胶乳标记抗体复合物，在层析力的作用下，沿着硝酸纤维素膜依次经过检测区和质控区，由于荧光胶乳标记的多抗已和样品中的羟甲基糠醛形成复合物，因此，在检测区，荧光胶乳标记的多抗不再与此处包被的羟甲基糠醛结合，将不会出现荧光信号，而在质控区，荧光胶乳标记的兔 IgG 与包被的羊抗兔 IgG 结合，将出现强荧光信号，此时的检测结果为阳性。当被检样品中没有羟甲基糠醛时，在层析力的作用下，只有荧光胶乳垫上的羟甲基糠醛多抗和兔 IgG 向质控区和检测区扩散，此时，质控区和检测区都出现强的荧光信号，检测结果为阴性。最后，根据检测区荧光信号的强弱，显示样品中羟甲基糠醛抗原的浓度。

[0020] 相对于现有技术，本发明的优点为：应用本发明快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条，仅需 5min 就能实现对食品药品中羟甲基糠醛进行定量检测，最低检测限达到

4ppb, 该检测方法快速、简便、灵敏。

附图说明

[0021] 图 1 为本发明的一种快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条的结构示意图。

[0022] 图 2 为本发明的一种快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条的组装模式图。

[0023] 图 3 为 5-羟甲基糠醛完全抗原制备前后的紫外扫描图。

具体实施方式

[0024] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述, 但是本发明要求保护的范围并不局限于实施例表述的范围。

[0025] 如图 1、2 所示, 一种快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条包括样品垫 1 (玻璃纤维膜, 厚度 0.25 ~ 0.75mm, 宽度 3.2cm)、荧光胶乳垫 2 (宽度 1cm)、包被膜 3 (宽度 3cm)、吸水纸 4 (植物纤维滤纸, 厚度 0.45 ~ 1.25mm, 宽度 1.7cm)、检测区 5、质控区 6、聚乙烯塑料底板 7; 以聚乙烯塑料底板 7 为支持底板, 按从左到右的顺序, 顺次将样品垫 1 搭接于荧光胶乳垫 2 上距离 2 左边边缘 1 ~ 3mm 处, 荧光胶乳垫 2 搭接于包被膜 3 (检测区 5 在左, 质控区 6 在右) 上距离 3 左边边缘 1 ~ 3mm 处, 优选 2mm 处, 吸水纸 4 搭接于包被膜 3 上距离 3 右边边缘 1 ~ 3mm 处, 试纸条优选并切割成宽 0.3 ~ 0.4cm 宽, 长 7 ~ 8cm。

[0026] 实施例 1 羟甲基糠醛 - 牛血清白蛋白完全抗原的制备:

[0027] 将 15mg 的 5-羟甲基糠醛溶解于 5mL, 浓度为 1.0mol/L, pH 为 2 的戊二醛水溶液中, 配制成 5-羟甲基糠醛质量浓度为 3.0g/L 的混合液, 在 30℃ 下反应 1.5h, 制备 A 液;

[0028] 将 20mg 的牛血清白蛋白溶解于 5mL, 浓度为 0.2mol/L, pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (0.2mol/L 的磷酸二氢钠与 0.2mol/L 的磷酸氢二钠水溶液按体积比 81 : 19 配置) 中, 配制成牛血清白蛋白质量浓度为 4.0g/L 的 B 溶液, 放置于 4℃ 冰箱中保存;

[0029] 在磁力搅拌器的充分搅拌 A 液的同时, 将 B 液缓慢滴加到 A 液中, 使两者充分反应, 在 10℃ 下反应 5h, 反应完成后, 即得到人工抗原混合液;

[0030] 将人工抗原混合液装入能透过分子量为 50kDa 的透析袋中, 用浓度为 0.2mol/L, pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (0.2mol/L 的磷酸二氢钠与 0.2mol/L 的磷酸氢二钠水溶液按体积比 81 : 19 配置) 透析 1 天, 每隔 12h 更换一次磷酸盐缓冲液; 透析结束后, 将人工抗原混合液进行冷冻干燥, 即得到人工抗原: 5-羟甲基糠醛 - 牛血清白蛋白产品。

[0031] 5-羟甲基糠醛人工抗原的鉴定: 采用紫外分光光度计测定其紫外扫描图谱。本实施例中 5-羟甲基糠醛完全抗原制备前后的紫外扫描图如附图 3 所示。从图中可以看出牛血清白蛋白在 280nm 左右出现吸收峰, 5-羟甲基糠醛在 280nm 左右出现吸收峰, 另外在 280nm 左右出现一更强吸收峰, 峰值比牛血清白蛋白比 5-羟甲基糠醛的吸收峰要高, 认为这是 5-羟甲基糠醛与牛血清白蛋白成功偶联后峰相互迭加的结果, 说明已成功合成 5-羟甲基糠醛 - 牛血清白蛋白完全抗原。

[0032] 实施例 2

[0033] ①制备羟甲基糠醛多克隆抗体并测定多抗效价。

[0034] 步骤一: 将 1mg 实施例 1 制备的羟甲基糠醛 - 牛血清白蛋白完全抗原溶解于 1ml 质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液中, 再与 1ml 弗氏完全佐剂充分乳化后, 按照每千克实验动物

家兔注射 0.5mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原的剂量进行兔背部皮下多点注射；

[0035] 步骤二：间隔 14 天后，将 1mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原溶解于 1ml 质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液中，再与 1ml 的弗氏不完全佐剂充分乳化后，按照每千克实验动物家兔注射 0.5mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原的剂量进行兔背部皮下多点注射，然后每隔 14 天重复步骤二 1 次，共重复 3 次。最后一次免疫十天后，对兔子进行颈静脉取血，分离血清，用饱和硫酸铵法沉淀抗体，并用亲和层析法纯化分离羟甲基糠醛抗体。用间接酶联免疫吸附法 (ELISA) 法检测出多抗的效价为 1 : 256000。

[0036] ② 荧光胶乳标记羟甲基糠醛抗体和兔免疫球蛋白 G (兔 IgG)。取 0.1ml 质量浓度为 10% 的荧光胶乳微球 (颜色为红色，粒径为 0.05 μm，激发波长为 300nm)，用 0.9ml, 0.1mol/L pH 6 的 MES 缓冲液将荧光胶乳微球的浓度调整为 1%，然后顺序加入 5mg EDC 和 5mg Sulfo-NHS 活化，室温下温和搅拌 30min，活化结束后，溶液在 1000rpm 转速下离心 30min，沉淀用 0.1mol/L pH 4 的 PBS 缓冲液溶解，经超声重悬后，分别加入 120 μl 质量浓度为 10mg/ml 兔 IgG (ZI103-1 兔 IgG，上海信然生物技术有限公司) 和步骤①制备的羟甲基糠醛多克隆抗体，经振荡器均匀混合后，室温下温和搅拌反应 5h，反应结束后，溶液在 1000rpm 转速下离心 30min，沉淀用溶解有 0.05% Tween 20 的 PBS 缓冲液 (0.1mol/L pH 7.0) 重复清洗三次以除去未标记上的蛋白，1000rpm 转速下离心 30min，沉淀用 0.1mol/L, pH 7.4 同时溶解有 1% 牛血清白蛋白和 0.05% Na₃N 的 PBS 缓冲液重新溶解，经超声重悬后，放置于 4℃ 冰箱中待用，此时经过荧光胶乳标记的羟甲基糠醛抗体和兔 IgG 的终浓度为 1mg/ml。

[0037] ③ 制备荧光胶乳垫。用 0.1mol/L, pH 7.4 同时溶解有 1% 牛血清白蛋白和 0.05% Na₃N 的 PBS 缓冲液将步骤②制备的荧光标记的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔 IgG 同时稀释 100 倍，按质量比为 1 : 2000 的比例均匀混合，将其混合液均匀喷涂至聚酯纤维膜 (SB06 上海金标生物技术有限公司) 上，将聚酯纤维膜置于室温下干燥 36h，备用。

[0038] ④ 制备包被膜。用 0.1mol/L, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液将羟甲基糠醛-牛血清白蛋白质量浓度调整为 0.5mg/ml，羊抗兔 IgG (上海信然生物技术有限公司) 的质量浓度调整为 0.1mg/ml，将羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原和羊抗兔 IgG 分别均匀喷涂于硝酸纤维素膜的检测区和质控区上的不同区域，形成条带状的检测区和质控区，其中检测区和质控区间隔 5mm，将包被膜放置于 50℃ 烘箱中干燥 36h，备用。

[0039] ⑤ 制备免疫层析试纸条。以聚乙烯塑料底板 7 为支持底板，按从左到右的顺序，顺次将样品垫 1 搭接于荧光胶乳垫 2 上距离 2 左边边缘 3mm 处，荧光胶乳垫 2 搭接于包被膜 3 (检测区 5 在左，质控区 6 在右) 上距离 3 左边边缘 3mm 处，吸水纸 4 搭接于包被膜 3 上距离 3 右边边缘 3mm 处，并切割成 0.4cm 宽，7.7cm 长的试纸条。

[0040] 将本发明制得的试纸条装于带有加样孔和显示孔的塑料盒 (深圳金灿华实业有限公司) 中，然后将此装有试纸条的塑料盒放于铝箔袋中，密封，室温保存待用。

[0041] 为了验证本试纸条的效果，分别抽取了面包、咖啡、蜂蜜，薯片作为被检样品。

[0042] 检测前，先对样品进行预处理：分别准确称取面包、咖啡、蜂蜜和薯片各 2.000g，将样品溶于 1ml 三蒸水中，分别添加 0.5mL 乙酸锌 (100g/L) 和 1mL 亚铁氰化钾 (200g/L)，超声振荡提取 5min，然后在 6000rpm 条件下离心 10min，将上清液转移至 100ml 容量瓶中；沉淀再经 0.5mL 乙酸锌 (100g/L) 和 1mL 亚铁氰化钾 (200g/L) 溶解，超声振荡提取 5min，然后在 6000rpm 条件下离心 10min，收集上清，转移至 100ml 容量瓶中定容。

[0043] 分别吸取 100 μ l 处理好的样品溶液,滴于装有试纸条的塑料盒的加样孔中,5min 后,将此塑料盒放置于荧光仪中相应的检测位置,由荧光仪自动显示出检测结果。测定结果为:面包中羟甲基糠醛的含量为 3.5ppm,咖啡中羟甲基糠醛的含量为 32.3ppm,蜂蜜中羟甲基糠醛的含量为 16.3ppm,薯片中羟甲基糠醛的含量为 1.2ppm。

[0044] 同时用液相色谱法对上述样品进行检测。过程严格按照液相色谱的步骤进行。测定结果为:面包中羟甲基糠醛的含量为 2.8ppm,咖啡中羟甲基糠醛的含量为 27.1ppm,蜂蜜中羟甲基糠醛的含量为 14.9ppm,薯片中羟甲基糠醛的含量为 0.98ppm。

[0045] 通过对比试验测试结果可知,本发明检测出羟甲基糠醛含量的结果与液相色谱的检测结果非常接近,可能是由于检测时间短,以致没能达到与液相色谱完全一致的检测结果但用本产品检测羟甲基糠醛时,样品处理时间为 30min,测定时间为 5min;而用液相色谱法检测羟甲基糠醛时,样品处理时间为 120min,测定时间为 30min。可见,相对于液相色谱法而言,本方明显得更简单、省时,完全可以应用于食品药品中羟甲基糠醛的快速和定量的检测。

[0046] 实施例 3

[0047] ①制备羟甲基糠醛多克隆抗体并测定多抗效价。

[0048] 步骤一:将 1mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原溶解于 1ml 质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液中,再与 1ml 弗氏完全佐剂充分乳化后,按照每千克实验动物家兔注射 0.5mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原的剂量进行兔背部皮下多点注射;

[0049] 步骤二:间隔 14 天后,将 1mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原溶解于 1ml 质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液中,再与 1ml 的弗氏不完全佐剂充分乳化后,按照每千克实验动物家兔注射 0.5mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原的剂量进行兔背部皮下多点注射,然后每隔 14 天重复步骤二 1 次,共重复 3 次。最后一次免疫十天后,对兔子进行颈静脉取血,分离血清,用饱和硫酸铵法沉淀抗体,并用亲和层析法纯化分离羟甲基糠醛抗体。用间接酶联免疫吸附法 (ELISA) 法检测出多抗的效价为 1 : 256000。

[0050] ②荧光胶乳标记羟甲基糠醛抗体和兔 IgG。荧光胶乳标记羟甲基糠醛抗体和兔免疫球蛋白 G (兔 IgG)。取 0.1ml 质量浓度为 10% 的荧光胶乳微球 (颜色为橘黄色,粒径为 0.5 μ m,激发波长为 600nm),用 0.9ml,0.1mol/L pH 6 的 MES 缓冲液将荧光胶乳微球的浓度调整为 1%,然后顺序加入 5mg EDC 和 5mg Sulfo-NHS 活化,室温下温和搅拌 30min,活化结束后,溶液在 1000rpm 转速下离心 30min,沉淀用 0.1mol/L pH 6 的 PBS 缓冲液溶解,经超声重悬后,分别加入 40 μ l 质量浓度为 10mg/ml 兔 IgG (ZI103-1 兔 IgG,上海信然生物技术有限公司) 和步骤①制备的羟甲基糠醛多克隆抗体,经振荡器均匀混合后,室温下温和搅拌反应 3h,反应结束后,溶液在 1000rpm 转速下离心 30min,沉淀用溶解有 0.05% Tween 20 的 PBS 缓冲液 (0.1mol/L pH 7.0) 重复清洗三次以除去未标记上的蛋白,1000rpm 转速下离心 30min,沉淀用 0.1mol/L, pH 7.4 同时溶解有 1% 牛血清白蛋白和 0.05% Na₃N 的 PBS 缓冲液重新溶解,经超声重悬后,放置于 4℃ 冰箱中待用,此时经过荧光胶乳标记的羟甲基糠醛抗体和兔 IgG 的终浓度为 0.3mg/ml。

[0051] ③制备荧光胶乳垫。用 0.1mol/L, pH 7.4 同时溶解有 1% 牛血清白蛋白和 0.05% Na₃N 的 PBS 缓冲液将步骤②制备的荧光标记的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔 IgG 同时稀释 100 倍,按质量比为 1 : 500 的比例均匀混合,将其混合液均匀喷涂至聚酯纤维膜 (SB06 上

海金标生物有限公司)上,将聚酯纤维膜置于室温下干燥 36h,备用。

[0052] ④制备包被膜。用 0.1mol/L, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液将羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原质量浓度调整为 2mg/ml,羊抗兔 IgG(上海信然生物技术有限公司)的质量浓度调整为 0.25mg/ml,将羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原和羊抗兔 IgG 分别均匀喷涂于硝酸纤维素膜上的不同区域,形成条带状的检测区和质控区,其中检测区和质控区间隔 5mm,将包被膜放置于 50℃烘箱中干燥 36h,备用。

[0053] ⑤制备免疫层析试纸条。以聚乙烯塑料底板 7 为支持底板,按从左到右的顺序,顺次将样品垫 1 搭接于荧光胶乳垫 2 上距离 2 左边边缘 1mm 处,荧光胶乳垫 2 搭接于包被膜 3(检测区 5 在左,质控区 6 在右)上距离 3 左边边缘 1mm 处,吸水纸 4 搭接于包被膜 3 上距离 3 右边边缘 1mm 处,并切割成 0.3cm 宽,7cm 长的试纸条。

[0054] 按照实施例 1 的检测步骤对本实施例试纸条的效果进行评价。检测结果为:面包中羟甲基糠醛的含量为 4.0ppm,咖啡中羟甲基糠醛的含量为 35.1ppm,蜂蜜中羟甲基糠醛的含量为 18.2ppm,薯片中羟甲基糠醛的含量为 1.3ppm。本实施例检测出的羟甲基糠醛含量的结果与液相色谱的检测结果也很接近,说明本实施例制备的免疫层析试纸条也完全可以应用于食品药品中羟甲基糠醛的快速和定量的检测。

[0055] 实施例 4

[0056] ①制备羟甲基糠醛多克隆抗体并测定多抗效价。

[0057] 步骤一:将 1mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原溶解于 1ml 质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液中,再与 1ml 弗氏完全佐剂充分乳化后,按照每千克实验动物家兔注射 0.5mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原的剂量进行兔背部皮下多点注射;

[0058] 步骤二:间隔 14 天后,将 1mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原溶解于 1ml 质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液中,再与 1ml 的弗氏不完全佐剂充分乳化后,按照每千克实验动物家兔注射 0.5mg 羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原的剂量进行兔背部皮下多点注射,然后每隔 14 天重复步骤二 1 次,共重复 3 次。最后一次免疫十天后,对兔子进行颈静脉取血,分离血清,用饱和硫酸铵法沉淀抗体,并用亲和层析法纯化分离羟甲基糠醛抗体。用间接酶联免疫吸附法(ELISA)法检测出多抗的效价为 1:256000。

[0059] ②荧光胶乳标记羟甲基糠醛抗体和兔免疫球蛋白 G(兔 IgG)。取 0.1ml 质量浓度为 10% 的荧光胶乳微球(颜色为蓝色,粒径为 0.2 μ m,激发波长为 450nm),用 0.9ml, 0.1mol/L pH 6 的 MES 缓冲液将荧光胶乳微球的浓度调整为 1%,然后顺序加入 5mg EDC 和 5mg Sulfo-NHS 活化,室温下温和搅拌 30min,活化结束后,溶液在 1000rpm 转速下离心 30min,沉淀用 0.1mol/L pH 6 的 PBS 缓冲液溶解,经超声重悬后,分别加入 10 μ l 质量浓度为 10mg/ml 兔 IgG(ZI103-1 兔 IgG,上海信然生物技术有限公司)和步骤①制备的羟甲基糠醛多克隆抗体,经振荡器均匀混合后,室温下温和搅拌反应 3h,反应结束后,溶液在 1000rpm 转速下离心 30min,沉淀用溶解有 0.05% Tween 20 的 PBS 缓冲液(0.1mol/L pH 7.0)重复清洗三次以除去未标记上的蛋白,1000rpm 转速下离心 30min,沉淀用溶解有 1% 牛血清白蛋白和 0.05% Na₃N 的 PBS 缓冲液重新溶解,经超声重悬后,放置于 4℃冰箱中待用,此时经过荧光胶乳标记的羟甲基糠醛抗体和兔 IgG 的终浓度为 0.1mg/ml。

[0060] ③制备荧光胶乳垫。用 0.1mol/L, pH 7.4 同时溶解有 1% 牛血清白蛋白和 0.05% Na₃N 的 PBS 缓冲液将步骤②制备的荧光标记的羟甲基糠醛多克隆抗体和兔 IgG 同时稀释

100 倍,按质量比为 1 : 10 的比例均匀混合,将其混合液均匀喷涂至聚酯纤维膜(SB06 上海金标生物有限公司)上,将聚酯纤维膜置于室温下干燥 36h,备用。

[0061] ④制备包被膜。用 0.1mol/L, pH 7.4PBS 缓冲液将羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原质量浓度调整为 5mg/ml,羊抗兔的质量浓度调整为 1mg/ml,将羟甲基糠醛-牛血清白蛋白完全抗原均匀喷涂于硝酸纤维素膜上的检测区,将羊抗兔均匀喷涂于硝酸纤维素膜上的质控区,检测区和质控区间隔 5mm,放置于 50℃烘箱中干燥 36h,备用。

[0062] ⑤制备免疫层析试纸条具体实施过程同实施例 1。以聚乙烯塑料底板 7 为支持底板,按从左到右的顺序,顺次将样品垫 1 搭接于荧光胶乳垫 2 上距离 2 左边边缘 1.5mm 处,荧光胶乳垫 2 搭接于包被膜 3(检测区 5 在左,质控区 6 在右)上距离 3 左边边缘 1.5mm 处,吸水纸 4 搭接于包被膜 3 上距离 3 右边边缘 1.5mm 处,并切割成 0.35cm 宽,8cm 长的试纸条。

[0063] 按照实施例一的步骤对本实施例试纸条的效果进行评价。检测结果为:面包中羟甲基糠醛的含量为 3.1ppm,咖啡中羟甲基糠醛的含量为 29.2ppm,蜂蜜中中羟甲基糠醛的含量为 15.3ppm,薯片中中羟甲基糠醛的含量为 1.0ppm。本实施例检测出的羟甲基糠醛含量的结果与液相色谱的检测结果同样很接近,说明本实施例制备的免疫层析试纸条也完全可以应用于食品药品中羟甲基糠醛的快速和定量的检测。

[0064] 由以上实施例可以看出,虽然每个实施例的检测结果并不一样,但是本发明制备的免疫层析试纸条耗时少,操作简便,且能达到与液相色谱相当的检测水平,总体效果优于液相色谱及其它现有检测技术。说明本发明制备的一种快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条能够快速、简便、准确、灵敏的检测出羟甲基糠醛的含量,克服了现有方法检测时需要昂贵的仪器设备以及耗时、耗力的缺点和不足。

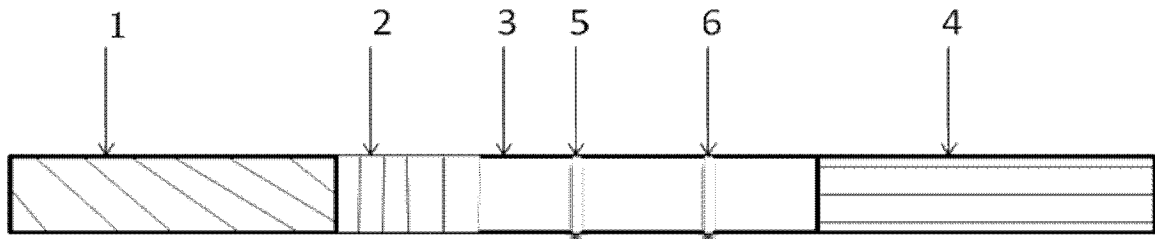


图 1

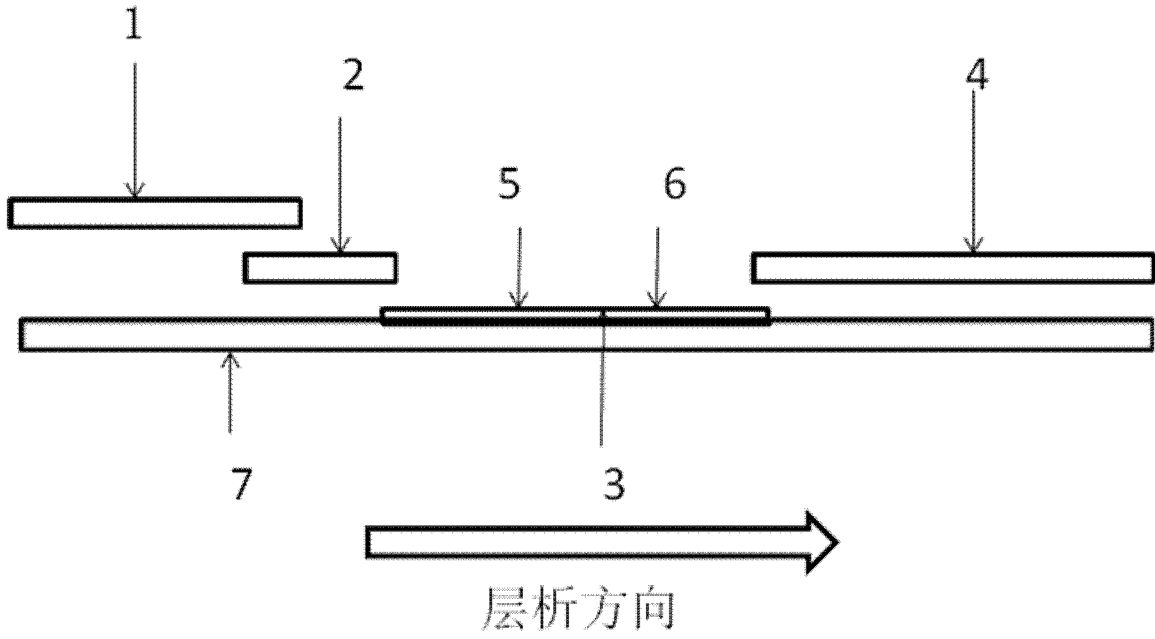


图 2

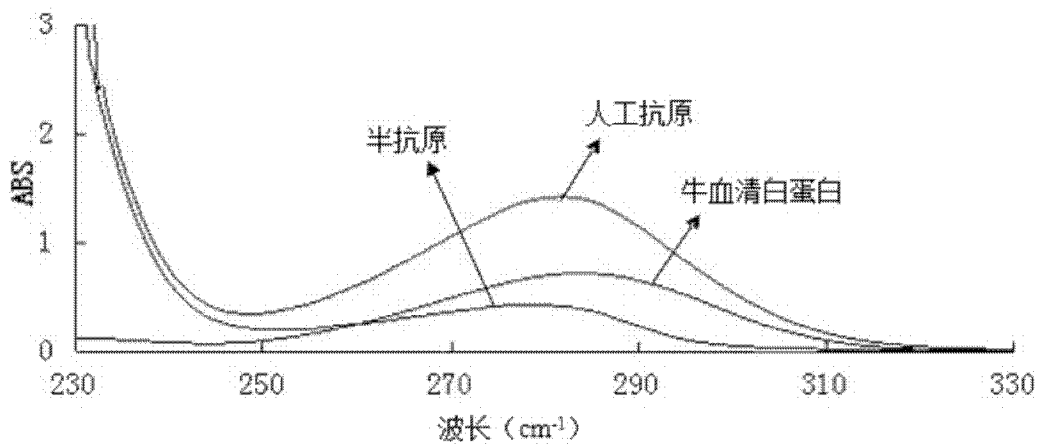


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN102384973B | 公开(公告)日 | 2014-09-10 |
| 申请号 | CN201110228315.8 | 申请日 | 2011-08-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 华南理工大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 华南理工大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 华南理工大学 | | |
| [标]发明人 | 于淑娟 俞思明 吴鑫兰 管永光 | | |
| 发明人 | 于淑娟 俞思明 吴鑫兰 管永光 | | |
| IPC分类号 | G01N33/558 G01N33/531 | | |
| 其他公开文献 | CN102384973A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了快速定量检测羟甲基糠醛的免疫层析试纸条及其制备方法。该免疫层析试纸条包括样品垫、荧光胶乳垫、包被膜、吸水纸和聚乙烯塑料底板；以聚乙烯塑料底板为支持底板，按从左到右样品垫、荧光胶乳垫、包被膜和吸水纸顺次搭接在支持底板上；将质量浓度为0.1mg/ml ~ 2mg/ml的羊抗兔免疫球蛋白G和质量浓度为0.5mg/ml ~ 5mg/ml的羟甲基糠醛完全抗原溶液分别均匀喷涂于硝酸纤维素膜上对应的质控区和检测区，然后将硝酸纤维素膜烘干，制成包被膜。应用本发明的免疫层析试纸条可定量检测出食品药品中羟甲基糠醛含量，且简便、快速、灵敏。

