



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101881769 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 10

(21) 申请号 201010201694. 7

(22) 申请日 2010. 06. 08

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800
号江南大学食品学院

(72) 发明人 胥传来 邓小芳 勇倩倩 马文蔚
陈莲君 严文静 屈昌龙 吴晓玲

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

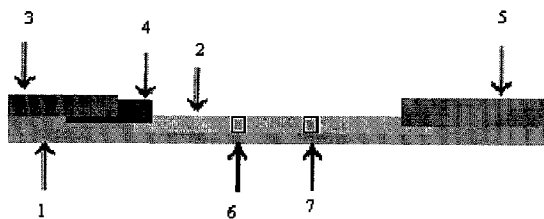
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

检测虾过敏原的免疫胶体金层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

检测虾过敏原的免疫胶体金层析试纸条及其制备方法,属于免疫学检测技术领域。本发明公开了以虾过敏原-原肌球蛋白的簇特异性抗体与显色物质胶体金的结合物作为检测试剂组装试剂条,进行食品中虾过敏原的检测,成本低廉,快速,便携。本发明应用的抗体是利用提取纯化的原肌球蛋白免疫健康的新西兰大白兔得到的多克隆抗体。由于采用的是多克隆抗体,费用较低并且稳定性和重复性较好,可以用于不同样品的检测。



1. 一种检测虾过敏原 - 虾原肌球蛋白的免疫胶体金层析试纸条,其特征在于由样品垫(3)、胶体金结合垫(4)、硝酸纤维素膜(2)、吸水垫(5)和PVC背衬(1)组成,PVC背衬一端依次粘贴样品垫、胶体金结合垫,中间粘贴硝酸纤维素膜,另一端粘贴吸水垫,胶体金结合垫上包被了抗虾原肌球蛋白的簇特异性抗体 - 胶体金标记物,硝酸纤维素膜上依次包被有虾原肌球蛋白检测线(6)和羊抗兔 IgG 控制线(7)。

2. 权利要求1所述检测虾过敏原 - 虾原肌球蛋白的免疫胶体金层析试纸条的制备方法,其特征不在于制备步骤为:

(1) 提取纯化虾原肌球蛋白:将虾肉匀浆,用 pH 7.4、0.01M PBS 缓冲溶液浸取 24h,用饱和硫酸铵溶液沉淀,4℃、8000g 离心 15min 后收集沉淀溶于 pH 7.4、0.01M PBS 缓冲溶液中,然后在 PBS 缓冲溶液中透析 48h 脱盐,最后凝胶柱过滤,获得纯化的虾原肌球蛋白;

(2) 制备抗虾原肌球蛋白多克隆抗体:以纯化的虾原肌球蛋白为免疫原,免疫制备抗虾原肌球蛋白多克隆抗体;

(3) 制备胶体金:用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20nm-40nm 胶体金颗粒;

(4) 制备抗虾原肌球蛋白多克隆抗体 - 胶体金标记物:将 3mL 胶体金调至 pH 9,搅拌下逐滴加入蛋白浓度为 0.075mg/mL 的抗虾原肌球蛋白多克隆抗体 0.2mL,放置 30min 后加入牛血清白蛋白 BSA 使终质量浓度为 1%,放置至少 30min 后,10000rpm 离心 50min,并用重悬液 0.002mol/L、pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 3mL 重悬两次,最后用 0.3mL 重悬液重悬,得到抗虾原肌球蛋白多克隆抗体 - 胶体金标记物;

(5) 将抗虾原肌球蛋白多克隆抗体 - 胶体金标记物包被在胶体金结合垫上,将虾原肌球蛋白、羊抗兔 IgG 分别包被在硝酸纤维素膜上作为检测线及控制线,在 37℃ 烘箱干燥;

(6) 试纸条的组装:将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫由一端依次粘贴在 PVC 背衬上,即得到用于检测虾过敏原 - 虾原肌球蛋白的免疫胶体金层析试纸条。

检测虾过敏原的免疫胶体金层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及到一种检测虾过敏原的免疫胶体金层析试纸条及试纸条的制备,属于免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 近年来,食物过敏已成为一个公众性的食品安全问题,而虾是最常见的八大食品过敏原之一。过敏疾病严重危害人们的身体健康,虽然激发过敏反应的最低过敏原的量随着人群的不同而不同,但是微量的过敏原就可以使绝大部分患者产生过敏症状。为了避免接触微量的过敏原,过敏原的检测成为当务之急。现在,虽然有许多过敏原检测方法可供借鉴,但在具体应用上都存在着各自不同的问题。体内实验方法可提供最为直接的证据,但由于安全因素等方面的考虑,只有在不得已的情况下在医院进行,而且费用昂贵、风险大;与此相比体外实验方法具有方便、安全的优点,但却存在着准确性差的缺点。目前体外微量的检测方法有免疫法、PCR法、组胺释放实验法、过敏原指纹快速检测法等。虽然目前有关过敏原检测的方法很多,但都存在各自不同的问题,如检测速度慢、成本高、需要特定的分析仪器等,这些制约了食品中过敏原检测方法的发展。因此实现准确、安全、经济、快速、高通量、高灵敏的体外检测技术方法具有现实意义。

发明内容

[0003] (一)要解决的技术问题

[0004] 本发明的目的在于建立一种具有高灵敏度、高特异性、高准确度、高精度度、操作方法简单的免疫层析色谱检测方法,用于食品中虾原肌球蛋白的批量、快速检测。

[0005] (二)技术方案

[0006] 一种检测虾过敏原-虾原肌球蛋白的免疫胶体金层析试纸条,由1、PVC背衬,2、硝酸纤维素膜,3、样品垫,4、胶体金结合垫和5、吸水垫组成,PVC背衬一端依次粘贴样品垫、胶体金结合垫,中间粘贴硝酸纤维素膜,另一端粘贴吸水垫,胶体金结合垫上包被了抗虾原肌球蛋白的簇特异性抗体-胶体金标记物,硝酸纤维素膜上依次包被有虾原肌球蛋白检测线(6)和羊抗兔IgG控制线(7)。

[0007] 该检测层析试纸条及所用试剂的制备方法包括以下步骤:

[0008] (1)提取纯化的虾原肌球蛋白:将虾肉匀浆,0.01M PBS(pH7.4)溶液浸取24h,50%饱和硫酸铵溶液沉淀,4℃ 8000g离心15min后收集沉淀溶于0.01MPBS(pH 7.4)溶液中,然后在PBS溶液中透析48h脱盐,最后凝胶柱过滤(柱子:Superdex 75 10/300 GL(GE公司生产);缓冲液:pH 7.4、0.01M PBS;流速:0.35mL/min),获得纯化的虾原肌球蛋白;

[0009] (2)制备抗虾原肌球蛋白多克隆抗体:用上述提取纯化的虾原肌球蛋白为免疫原,多次免疫新西兰纯种大白兔,并在三次加强免疫后测定其效价和抑制率,在适合的时候心脏采血,分离血清。血清用proteinG亲和柱进行纯化即可得到高纯度的抗虾原肌球蛋白

多克隆抗体；

[0010] (3) 制备胶体金：用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20nm-40nm 胶体金颗粒；

[0011] (4) 制备抗虾原肌球蛋白多克隆抗体-胶体金标记物：将 3mL 胶体金调至 pH 9，搅拌下逐滴加入蛋白浓度为 0.075mg/mL 的抗虾原肌球蛋白多克隆抗体 0.2mL，放置 30min 后加入牛血清白蛋白 BSA 使终质量浓度为 1%，放置至少 30min 后，10000rpm 离心 50min，并用重悬液 0.002mol/L、pH9.0 的硼酸盐缓冲液 3mL 重悬两次，最后用 0.3mL 重悬液重悬，得到稳定的抗虾原肌球蛋白多克隆抗体-胶体金标记物；

[0012] (5) 将抗虾原肌球蛋白多克隆抗体-胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将虾原肌球蛋白、羊抗兔 IgG 分别包被在硝酸纤维素膜上作为检测线及控制线，在 37℃ 烘箱干燥；

[0013] (6) 试纸条的组装：将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫由一端依次粘贴在 PVC 背衬上，即得到用于检测虾过敏原-虾原肌球蛋白的免疫胶体金层析试纸条。

[0014] 本发明的积极效果在于：快速，仅需要 5-10 分钟；便携，适合现场检测；操作简便，不需要专业技术人员。实现了准确、安全、经济、快速、高通量、高灵敏的体外检测虾过敏原的技术方法。

附图说明

[0015] 图 1 组装完成的免疫层析试纸条结构。1、PVC 背衬，2、硝酸纤维素膜，3、样品垫，4、胶体金结合垫，5、吸水垫，6、检测线，7、羊抗兔 IgG 控制线。

图 2 组装完成的免疫层析试纸条结构俯视图。

具体实施方式

[0016] 实施例 1

[0017] PVC 背衬一端依次粘贴样品垫、胶体金结合垫，中间粘贴硝酸纤维素膜，另一端粘贴吸水垫，结合垫上包被了抗虾原肌球蛋白簇特异性抗体-胶体金标记物，硝酸纤维素膜上包被了虾原肌球蛋白和羊抗兔 IgG。

[0018] 按以下步骤制备：

[0019] (1) 提取纯化虾原肌球蛋白：将虾肉匀浆，用 0.01M PBS (pH7.4) 溶液浸取 24h，50% 饱和硫酸铵溶液沉淀，4℃ 8000g 离心 15min 后收集沉淀溶于 0.01MPBS (pH 7.4) 溶液中，然后在 PBS 溶液中透析 48h 脱盐，最后凝胶过滤（柱子：Superdex 75 10/300 GL；缓冲液：pH 7.4、0.01M PBS；流速：0.35ml/min）；

[0020] (2) 制备抗虾原肌球蛋白多克隆抗体：用上述提取纯化的虾原肌球蛋白多次免疫新西兰纯种大白兔，并在三次加强免疫后测定其效价和抑制率，在合适的时候心脏采血，分离血清。血清用 proteinG 亲和柱进行纯化即可得到高纯度的抗虾原肌球蛋白多克隆抗体；

[0021] (3) 制备胶体金：用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20nm-40nm 胶体金颗粒。

[0022] 柠檬酸三钠还原法制备胶体金：由于氯化金极易吸湿，因此使用小剂量封装的氯化金时，必须一次配完。将 1g 的氯化金一次溶解于双蒸水中配成 1% 的水溶液。放在 4℃ 冰箱内保存，保存时间长达几个月至 1 年左右。再取 1% 的氯金酸溶液 10mL，配制成浓度为 0.1g/L 的氯金酸溶液。取 0.1g/L 氯金酸溶液 50mL 放入锥形瓶，用恒温电磁搅拌器加热至

沸腾并持续 2min, 在 100r/min 磁力搅拌下, 加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2mL, 保持温度和搅拌速度不变, 继续搅拌加热 6min, 直至溶液呈透亮的酒红色。室温冷却, 4℃ 保存备用。获得直径为 20-40nm 的胶体金溶液。

[0023] (4) 制备抗虾原肌球蛋白多克隆抗体-胶体金标记物: 将胶体金调至 pH 9 左右, 搅拌下逐滴加入最佳标记量的抗虾原肌球蛋白多克隆抗体, 放置 30min 后加入适量 BSA, 放置至少 30min 后, 10000 转 50min 离心并重悬两次, 最后一次用 1/10 量的重悬液重悬, 得到稳定的抗虾原肌球蛋白多克隆抗体-胶体金标记物;

[0024] (5) 将抗虾原肌球蛋白多克隆抗体-胶体金标记物包被在胶体金结合垫上, 将虾原肌球蛋白和羊抗兔 IgG 分别包被在作为反应垫的硝酸纤维素膜的检测线和控制线, 在 37℃ 烘箱充分干燥;

[0025] (6) 试纸条的组装: 将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫由一端依次粘贴在 PVC 背衬上, 用切条机切割成 3mm 宽的细条。即得到用于检测虾过敏原-虾原肌球蛋白的免疫层析试纸条。4℃ 冷藏备用。

[0026] 样品前处理: 称取可能含虾过敏原的食品 2.0g (海鲜酱) 用均质器均质, 加入 6mL 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液, 充分混合后放入 60℃ 水浴环境中 60min, 取出后 6000r 离心 10min, 取上清液, 以上清液: 去离子水为 1:9 的体积比进行稀释, 取 20 μL 进行分析。

[0027] 检测时将吸水垫浸入样本溶液, 10s 后取出平放在操作台上; 5-15min 内可以判定结果, 30min 后结果无效。结果判断: 样品中有虾原肌球蛋白存在且达到 0.1 μg/mL, 则检测线将不出现红色条带, 而在控制线出现红色条带, 此时结果为阳性; 如果样本中没有虾过敏原 (原肌球蛋白) 存在或数量在 0.1 μg/mL 以下, 则检测线出现红色条带, 控制线也同时出现红色条带, 此时结果为阴性; 无论检测线是否出现红色条带, 控制线如果没有红色条带出现则表示该试纸条无效。

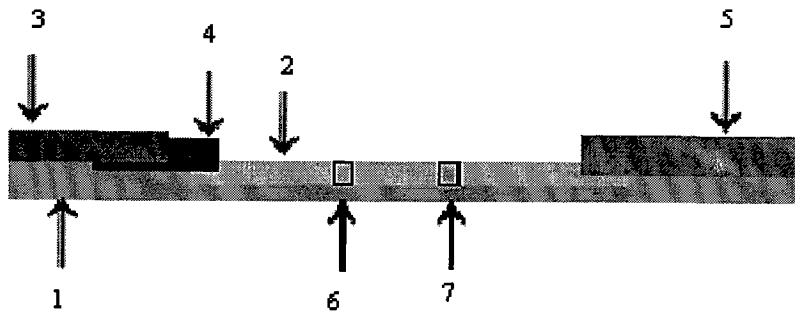


图 1

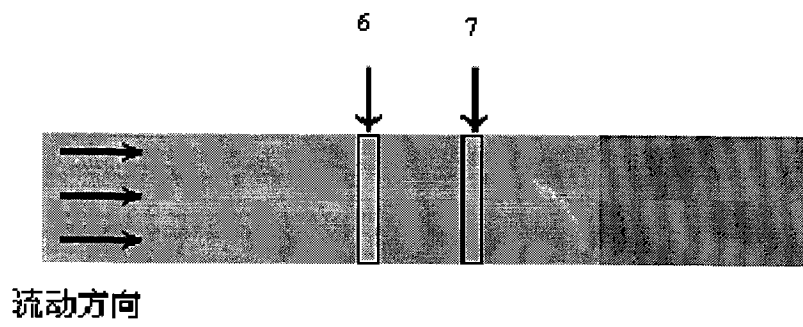


图 2

专利名称(译)	检测虾过敏原的免疫胶体金层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101881769A	公开(公告)日	2010-11-10
申请号	CN201010201694.7	申请日	2010-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 邓小芳 勇倩倩 马文蔚 陈莲君 严文静 屈昌龙 吴晓玲		
发明人	胥传来 邓小芳 勇倩倩 马文蔚 陈莲君 严文静 屈昌龙 吴晓玲		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

检测虾过敏原的免疫胶体金层析试纸条及其制备方法，属于免疫学检测技术领域。本发明公开了以虾过敏原-原肌球蛋白的簇特异性抗体与显色物质胶体金的结合物作为检测试剂组装试剂条，进行食品中虾过敏原的检测，成本低廉，快速，便携。本发明应用的抗体是利用提取纯化的原肌球蛋白免疫健康的新西兰大白兔得到的多克隆抗体。由于采用的是多克隆抗体，费用较低并且稳定性和重复性较好，可以用于不同样品的检测。

