



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107561271 A

(43)申请公布日 2018.01.09

(21)申请号 201710716638.9

(22)申请日 2017.08.21

(71)申请人 安徽大学

地址 230601 安徽省合肥市九龙路111号

申请人 贝若凡生物科技(合肥)有限公司

(72)发明人 唐恒立 周祚琴 赵亮

杰森 M.罗博特姆 肯尼斯 H.鲁

亨利 格赖斯 张部昌 唐小迪

(74)专利代理机构 安徽合肥华信知识产权代理有限公司 34112

代理人 余成俊

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

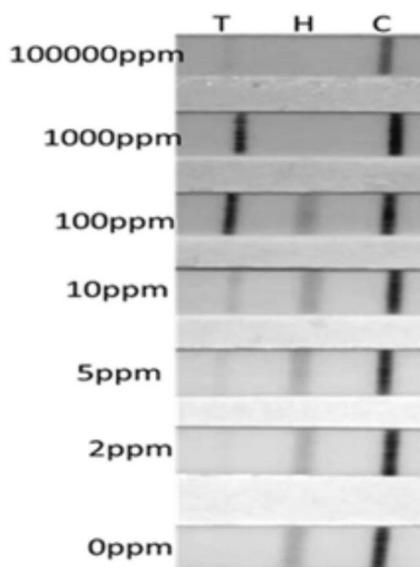
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法,该层析试纸条包括依次连接的吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫,还可以包括承载底板;硝酸纤维素膜上设有检测线、抗原线和质控线,金标垫上固定一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物,硝酸纤维素膜的检测线上包被另一种捕获榛子蛋白的单克隆抗体,抗原线包被榛子蛋白,质控线包被羊抗鼠IgG;当试纸条出现一条质控线、一条抗原线是阴性,出现检测线(不管有没有抗原线)都是阳性,与现有榛子蛋白过敏原检测技术相比,灵敏度高,特异性强,还可以对过敏原的浓度做出直观的评价,可直接用于食品检测。



1. 食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,包括依次组装的吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫,所述的金标垫上固定一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物,所述的硝酸纤维素膜上依次包被有与胶体金标记的抗榛子蛋白单克隆抗体配位的另一种抗榛子蛋白单克隆抗体检测线、抗原线和羊抗鼠IgG质控线。

2. 如权利要求1所述的食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,还包括承载吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫的底板。

3. 如权利要求1或2所述的食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述的吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫之间相互交叠连接。

4. 如权利要求1或2所述的食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述的一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物中单克隆抗体的浓度为4-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

5. 如权利要求1或2所述的食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述的检测线中另一种抗榛子蛋白单克隆抗体的浓度为0.5-2.5mg /mL。

6. 如权利要求1或2所述的食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述的抗原线是由pH为7.0-8.5,浓度为0.01 mol/L的含有榛子蛋白的 PBS溶液作为包被液划膜得到,其中榛子蛋白的浓度为500-10000ppm。

7. 如权利要求1或2所述的食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述的质控线中羊抗鼠IgG的浓度为0.5-3mg/mL。

8. 如权利要求1-7任一所述的食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将抗榛子蛋白单克隆抗体中的一种作为标记抗体,与胶体金按照(0.04-0.16):1的体积比混匀,经纯化、浓缩后得一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物;

(2) 将步骤(1)制备的胶体金标记物喷涂固定到金标垫上,在硝酸纤维素膜上包被检测线、抗原线、质控线,处理完毕后用60-65 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1-2h,放入防潮柜中储存备用;

(3) 样品垫处理:

选用含有0.2%Tween20、浓度为0.01mol/L-0.05mol/L的BBS溶液作为样品垫稀释液对样品垫进行浸泡处理,处理结束后用60-65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱鼓风干燥1-2h后备用;

(4) 试纸条的组装:

将吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫依次组装或承载在底板上,即得所述的用于检测食品中榛子过敏原胶体金免疫层析纸条。

## 食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测技术领域,具体涉及一种检测食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 榛子,又称榛栗、山板栗、尖栗等,其富含蛋白质、油脂(大多为不饱和脂肪酸)、胡萝卜素、维生素、矿物质等,有“坚果之王”的美称。榛子既可直接食用,也可作为食品配料用于制作各种糕点、糖果。榛子虽营养丰富,但同时也是最常见的食品过敏原之一。国际食品法典委员会在《预包装食品通用标签标准》中明确规定,包括榛子在内的坚果及其制品在食品标签中应始终加以说明。美国、欧盟、日本、新西兰、澳大利亚等国家和地区均将榛子列为强制标识的食品过敏原。目前榛子过敏检测方法有ELISA、免疫传感器检测技术、实时荧光定量PCR技术、SPR,质谱技术等,这些检测方法对仪器设备、表面环境、操作人员等有很高的要求并且检测时间较长、费用高,因而建立一种新型快速稳定的试纸条检测是十分必要的。

[0003] 胶体金免疫层析技术(colloidal gold immunochromatography assay, GICA)一种将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术。1971年 Faulk 和Taylor首次将胶体金标记技术引入免疫组织化学,胶体金标记技术得到了快速发展。目前,由这一技术开发出的胶体金检测试纸已广泛应用于临床诊断、药物检测、环境污染等领域。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于研制一种能快速且无害的检测食品中的榛子过敏原试纸条,不仅能检验出食品中微量的过敏原蛋白,也可运用于食品加工过程的质量管控,如进料、生产过程及成品检测,提前预防不必要的过敏困扰。

[0005] 本发明是基于一对能够检测榛子蛋白的相互配位的单克隆配对抗体,这对单克隆配对抗体由美国BioFront公司提供,通过制备40nm胶体金,标记纯化后的抗体,优化各项层析条件等完成了该试纸条发明。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条,包括依次组装的吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫,所述的金标垫上固定一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物,所述的硝酸纤维素膜上依次包被有与胶体金标记的抗榛子蛋白单克隆抗体配位的另一种抗榛子蛋白单克隆抗体检测线、抗原线和羊抗鼠IgG质控线。

[0007] 所述食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条还包括承载吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫的底板。

[0008] 所述的吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫之间相互交叠连接。

[0009] 所述的一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物中单克隆抗体的浓度为4-16 $\mu$ g/mL。

[0010] 所述的检测线中另一种抗榛子蛋白单克隆抗体的浓度为0.5-2.5mg /mL。

[0011] 所述的抗原线是由pH为7.0-8.5,浓度为0.01 mol/L的含有榛子蛋白的 PBS溶液作为包被液划膜得到,其中榛子蛋白的浓度为500-10000ppm。

[0012] 所述的质控线中羊抗鼠IgG的浓度为0.5-3mg/mL。

[0013] 所述的食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)将抗榛子蛋白单克隆抗体中的一种作为标记抗体,与胶体金按照(0.04-0.16):1的体积比混匀,经纯化、浓缩后得一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物;

(2)将步骤(1)制备的胶体金标记物喷涂固定到金标垫上,在硝酸纤维素膜上包被检测线、抗原线、质控线,处理完毕后用60-65℃干燥1-2h,放入防潮柜中储存备用;

(3)样品垫处理:

选用含有0.2%Tween20、浓度为0.01mol/L-0.05mol/L的BBS溶液作为样品垫稀释液对样品垫进行浸泡处理,处理结束后用60-65℃烘箱鼓风干燥1-2h后备用;

(4)试纸条的组装:

将吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫依次连接组装或承载在底板上,即得所述的用于检测食品中榛子过敏原胶体金免疫层析纸条。

[0014] 本发明的检测原理为:将一种抗榛子蛋白单克隆抗体标记到胶体金纳米颗粒上成为本发明的金标抗体,使其能够捕获榛子过敏原蛋白。在硝酸纤维素膜上固定另外一种抗榛子蛋白单克隆抗体作为检测线,同时固定合适的质控抗体作为质控线。当样品滴加至样品垫时,样品会利用膜上微孔的毛细管作用在层析条上做横向泳动。当样品中含有榛子待检测物质时,榛子待测物会与金标抗体结合形成复合物,并与检测线上的捕获蛋白结合而被截获,复合物中的胶体金聚集形成肉眼可见的红色线条(T线),故会出现TC两条线;如果金标抗体没有完全被捕获,会在抗原线结合,形成H线,故会出现THC三条线;如果待测物浓度太高,金标抗体都已经跟待测物结合,故没有多余的金标抗体被T线捕获,故会出现C线一条线。当样品中不含待检测物质时,未与待测物结合的金标抗体会被抗原线捕获,胶体金聚集形成明显的红色线条(H线),故会出现HC两条线。因此,可以根据试纸条上检测线和质控线的显色情况判断样品中是否含有待测物以及试纸条是否失效。

[0015] 本发明所用的制备榛子过敏原检测试纸条的检测方法属于夹心法,结果判定当试纸条出现一条质控线、一条抗原线是阴性,出现检测线(不管有没有抗原线)都是阳性,与现有榛子蛋白过敏原检测技术相比,灵敏度高,特异性强,还可以对过敏原的浓度做出直观的评价,可直接用于食品检测。

[0016] 下面结合具体实施例进行进一步详细说明。

## 附图说明

[0017] 图1为本发明实施例2所述的榛子试纸条灵敏度测定结果图;

图2为本发明实施例3所述的榛子试纸条特异性测定结果图;

图3为本发明实施例4所述的榛子试纸条重复性测定结果图;

图4为本发明实施例5的检测结果图。

[0018] 附图标记:T、检测线;H、抗原线;C、质控线;SAM1、巴西坚果样品;SAM2、花生样品;SAM3、榛子样品;Lot1、第一批次试纸条;Lot2、第二批次试纸条;SAM4、阴性对照;SAM5、4ppm

榛子巧克力样品;SAM6、40ppm榛子巧克力样品。

## 具体实施方式

### [0019] 实施例1、食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条的制备

食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

#### (1) 溶液配制:

柠檬酸三钠的配制:准确称取 0.1g 柠檬酸三钠,用超纯水溶解,并定容至 10mL,0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤,现配现用;

氯金酸溶液配制:准确称取 1.0g 柠檬酸三钠,用超纯水溶解,并定容至 100mL,0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤,棕色试剂瓶储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用;

碳酸钾溶液的配制:准确称取1.38g碳酸钾,用超纯水溶解,并定容至 50mL,0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用;

5%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液的配制:准确称取0.5g碳酸钾,用超纯水溶解,并定容至 10mL,0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用;

#### (2) 胶体金的制备:

取250mL锥形瓶,加入99mL超纯水,再加入1mL1%氯金酸溶液,将其放在磁力搅拌器上,加热搅拌至沸腾,迅速加入1mL现配制的1%柠檬酸三钠溶液,继续加热至酒红色出现,颜色稳定后继续加热搅拌10min,冷却后用超纯水定容到100mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 棕色瓶保存备用;

#### (3) 一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物的制备及纯化:

取2mL胶体金溶液,加入4 $\mu\text{L}$  0.2mol/L 的碳酸钾溶液,水平摇床上低速混匀;

将一对检测榛子蛋白的单克隆抗体中的一种作为标记抗体,取 16 $\mu\text{g}$ 至胶体金溶液中,混匀30min,然后加入5%牛血清白蛋白 (BSA) 至浓度为1%,混匀30min,得一种抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物;

将制得的抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物分装到2mL离心管中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000rpm条件下离心30min,接着加入等体积的Tris-HCl,在4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000rpm条件下离心30min,除去上清,加入复溶液,浓缩至原体积的1/10倍,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;

(4) 将抗榛子蛋白单克隆抗体-胶体金标记物固定到金标垫上,处理完毕后用65 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1h,放入防潮柜中储存备用;

#### (5) 样品垫处理:

选取含有0.2%Tween2的0.01mol/L BBS溶液作为样品垫稀释液对样品垫进行浸泡处理,处理结束后用65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱鼓风干燥1h后备用;

#### (6) 硝酸纤维素膜的制备:

硝酸纤维素膜选自密理博公司,层压仪组装好后,分别划THC线;其中T线划浓度为1mg/mL的另一种抗榛子蛋白单克隆抗体,H线划浓度为2500ppm的抗原液,该抗原液的溶剂为pH=7.0、0.01 mol/L PBS溶液,C线划1.5mg/mL的羊抗鼠IgG。包被后的硝酸纤维素膜送入干燥箱,65 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1h,防潮柜中储存备用。

#### [0020] (7) 试纸条的组装:

将吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫依次按照头尾部分交叠的方式粘贴在 PVC底板上,得到用于检测食品中榛子过敏原胶体金免疫层析纸条。

[0021] 使用时,将样品加到样品垫上,当样品中含有榛子待检测物质时,榛子待测物会与金标抗体结合形成复合物,并与检测线上的捕获蛋白结合而被截获,复合物中的胶体金聚集形成肉眼可见的红色检测线条(T线),故会出现TC两条线;如果金标抗体没有完全被捕获,会在抗原线结合,形成H线,故会出现THC三条线;如果待测物浓度太高,金标抗体都已经跟待测物结合,故没有多余的金标抗体被T线捕获,故会出现C线一条线。当样品中不含待检测物质时,未与待测物结合的金标抗体会被抗原线捕获,胶体金聚集形成明显的红色线条(H线),故会出现HC两条线。因此,可以根据试纸条上检测线和质控线的显色情况判断样品中是否含有待测物以及试纸条是否失效。C线显色,判读为高浓度阳性(+++);TC线显色,判读为较高浓度阳性(++);THC均显色,判读为阳性(+);HC显色,判读为阴性(-);C线不显色,说明试纸条失效。

[0022] 实施例2、食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条的灵敏度测定

用样品稀释液将标准品稀释成不同浓度:100000ppm、1000ppm、100ppm、10ppm、5ppm、2ppm、0ppm,用实施例1制备的试纸进行检测,用样品稀释液作为阴性对照(0ppm),5min后观察结果,检测结果如图1所示。结果显示,100000ppm为高浓度阳性,C线显色;100-1000ppm为较高浓度阳性,TC线显色;2-10ppm为阳性,THC显色;0ppm是阴性对照,HC线显色。该试纸条的灵敏度为2ppm。

[0023] 实施例3、食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条的特异性测定

分别取巴西坚果、花生、杏仁作为测试样品,研磨破碎后稀释成100ppm,用实施例1制备的试纸条进行检测,5min后观察结果,检测结果如图2所示。结果显示,巴西坚果、花生、杏仁在100ppm处均显示C线,该试纸与巴西坚果、花生、杏仁无交叉反应,显示出本试纸条具有良好的特异性。

[0024] 实施例4、食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条的重复性测定

分别在不同的时间里按照实施例1的方法完成2个批次的试纸条,2个批次的试纸条间隔时间为4天,对比批间差异。用样品稀释液将标准品稀释成不同浓度:1000ppm、100ppm、10ppm、5ppm、2ppm、0ppm,分别用2个批次的试纸条进行检测,5min后观察结果,检测结果如图3所示。结果显示,2个批次的试纸条对比没有显著批间差异。

[0025] 实施例5、食品中榛子过敏原测定的可行性

由FAPAS提供含有40ppm榛子的巧克力食品、4ppm榛子的巧克力食品、阴性对照为纯巧克力食品(不含榛子成分),利用实施例4制备的两批试纸条分别进行检测,检测结果如图4所示。结果显示,能够检测出FAPAS提供的40ppm榛子的巧克力食品、4ppm榛子的巧克力食品、阴性对照显示正确。巧克力类食品属于较难检测的样品,能够顺利并且重复检测出来,说明试纸具有良好的可行性。

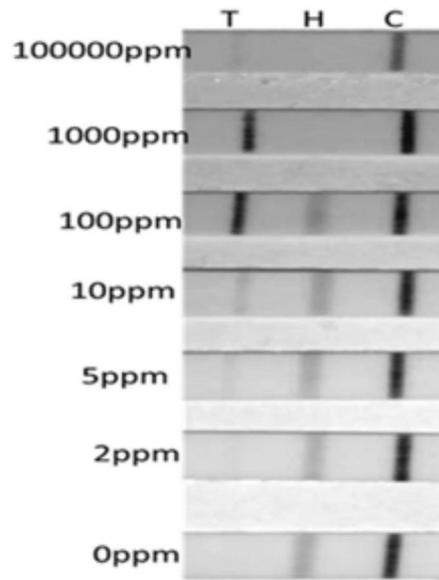


图1

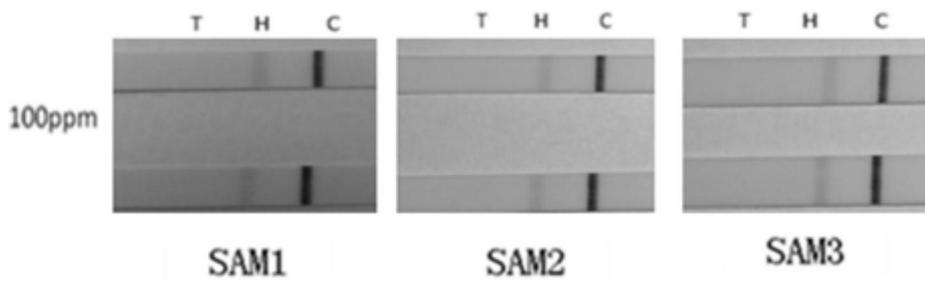


图2

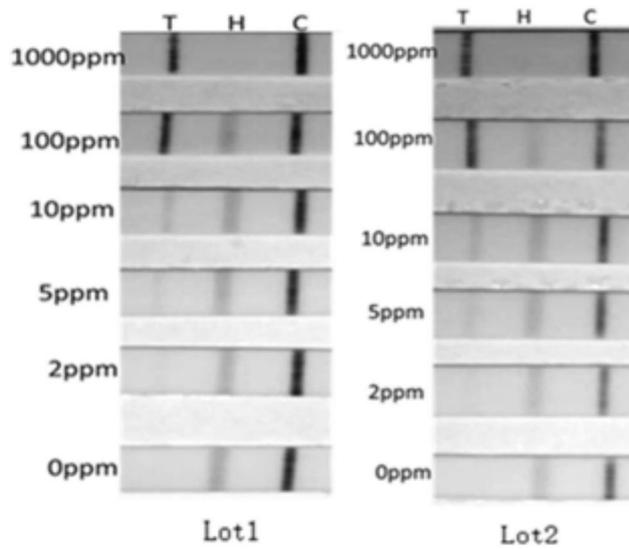


图3

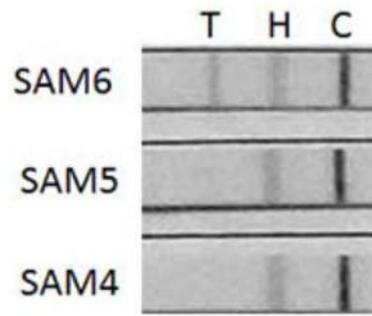


图4

专利名称(译)	食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107561271A</a>	公开(公告)日	2018-01-09
申请号	CN2017110716638.9	申请日	2017-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	安徽大学		
申请(专利权)人(译)	安徽大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽大学		
[标]发明人	唐恒立 周祚琴 赵亮 杰森 M 罗博特姆 肯尼斯 H 鲁 亨利格赖斯 张部昌 唐小迪		
发明人	唐恒立 周祚琴 赵亮 杰森 M.罗博特姆 肯尼斯 H.鲁 亨利 格赖斯 张部昌 唐小迪		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了食品中榛子过敏原的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法，该层析试纸条包括依次连接的吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫，还可以包括承载底板；硝酸纤维素膜上设有检测线、抗原线和质控线，金标垫上固定一种抗榛子蛋白单克隆抗体?胶体金标记物，硝酸纤维素膜的检测线上包被另一种捕获榛子蛋白的单克隆抗体，抗原线包被榛子蛋白，质控线包被羊抗鼠IgG；当试纸条出现一条质控线、一条抗原线是阴性，出现检测线（不管有没有抗原线）都是阳性，与现有榛子蛋白过敏原检测技术相比，灵敏度高，特异性强，还可以对过敏原的浓度做出直观的评价，可直接用于食品检测。

