



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956981 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810580905.9

(22)申请日 2018.06.07

(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 王敏娜 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

赵苹

(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)

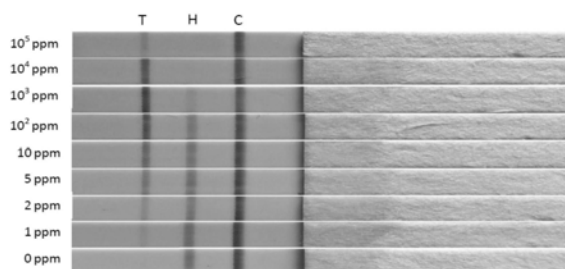
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

食品中椰子过敏原横向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椰子过敏原的横向免疫层析试纸条及其制备方法,该层析试纸条包括依次组装的吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫,还包括承载底板;硝酸纤维素膜上设有检测线、抗原线和质控线,金标垫上含有胶体金标记的一种抗椰子蛋白单克隆抗体,硝酸纤维素膜的检测线上包被另一种捕获抗椰子蛋白的单克隆抗体,抗原线包被椰子蛋白,质控线包被羊抗鼠IgG;当试纸条出现一条质控线C、一条抗原线H是阴性,出现检测线T(不管有没有抗原线)都是阳性,与现有椰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. 食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,其特征在于,包括依次组装的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,所述金标垫上固定一种抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物;所述硝酸纤维素膜上依次固定有检测线、抗原线和羊抗鼠IgG质控线,所述检测线成分为与胶体金标记的抗椰子蛋白单克隆抗体处于不同表位的另一种抗椰子蛋白单克隆抗体。

2. 如权利要求1所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,其特征在于,还包括承载样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫的底板。

3. 如权利要求1或2所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,其特征在于,所述的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫之间依次部分相互重叠连接。

4. 如权利要求1或2所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,其特征在于,所述的一种抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物中单克隆抗体的浓度为 $2.5\text{--}20\mu\text{g/mL}$ 。

5. 如权利要求1或2所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,其特征在于,所述检测线中的另一种抗椰子蛋白单克隆抗体的浓度为 $1\text{--}2\text{mg/mL}$ 。

6. 如权利要求1或2所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,其特征在于,所述的抗原线是通过对抗原工作液进行划膜而得到,所述抗原工作液的成分是由pH为 $6.5\text{--}7.4$,浓度为 0.01 mol/L 的PB溶液包被的椰子蛋白,其中椰子蛋白的浓度为 $50000\text{--}100000\text{ppm}$ 。

7. 如权利要求1或2所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,其特征在于,所述的质控线中羊抗鼠IgG浓度为 $1\text{--}2\text{ mg/mL}$ 。

8. 如权利要求1-7任一所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将抗椰子蛋白单克隆抗体中的一种作为标记抗体,与胶体金按照 $(0.05\text{--}0.20):1$ 的体积比混匀,经纯化、浓缩后得一种抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物;

(2) 在金标垫上喷涂固定由步骤(1)制得的抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物,在硝酸纤维素膜上包被检测线、抗原线、质控线,处理完毕后,在 $37\text{--}65^{\circ}\text{C}$ 的条件下干燥 $1\text{--}5\text{h}$,放入防潮柜中储存储备用;

(3) 试纸条的组装:

通过层压仪,将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次组装或承载在底板上,即得所述的用于检测食品中椰子过敏原的横向免疫层析纸条。

食品中椰子过敏原横向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椰子过敏原的横向免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 椰子(*Cocos nucifera*)是属于棕榈科的单子叶植物。迄今为止,报道中描述的大多数与椰子有关的病例是过敏性反应,而且该反应是全身性的,所以椰子过敏对过敏患者来说具有很大的威胁潜能。胚乳是椰果的可食用部分,它由25%的白蛋白和75%的球蛋白组成,后者含有与过敏反应有关的蛋白质,如Cocn2,7S球蛋白和Cocn4,11S球蛋白(称为cocosin)。目前有关椰子过敏原检测的报道很少,但基于实验室检测食物过敏原的ELISA、免疫传感器检测技术、实时荧光定量PCR技术、SPR、质谱等技术方法具有对仪器设备、表面环境、操作人员等有很高的要求并且检测时间较长、费用高等缺点,所以建立一种新型快速稳定的试纸条检测技术是十分必要的。

[0003] 胶体金免疫层析技术(colloidal gold immunochromatography assay, GICA)是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] 本发明旨在研制一种成本较低且能快速高效地检测食品中椰子过敏原的试纸条,该试纸不仅可以用于检验食品中微量的过敏原蛋白,还可以用于食品加工过程的质量管控,比如进料、生产过程及成品检测等,从而达到提前预防的目的,以避免给椰子过敏患者带来不必要的过敏困扰或危害。

[0005] 本发明基于一对能够检测椰子蛋白的单克隆配对抗体,这对单克隆配对抗体由美国BioFront公司提供,实验室制备40nm胶体金,进而对纯化后的抗体进行标记,最后通过对各项层析条件进行优化,从而完成了该试纸条的发明。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,包括依次组装的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,所述的金标垫上固定一种抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物,所述的硝酸纤维素膜上依次包被有与胶体金标记的抗椰子蛋白单克隆抗体处于不同表位的另一种抗椰子蛋白单克隆抗体检测线、抗原线和羊抗鼠IgG质控线。

[0007] 所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条,还包括承载样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫的底板。

[0008] 所述的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫之间依次部分相互重叠连接。

[0009] 所述的抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物中单克隆抗体的浓度为2.5-20 μ g/

mL。

[0010] 所述的检测线中另一种抗椰子蛋白单克隆抗体浓度为1-2mg/mL的。

[0011] 所述的抗原线是通过对抗原工作液进行划膜而得到,抗原工作液的成分是由pH为6.5-7.4,浓度为0.01 mol/L的PB溶液包被的椰子蛋白,其中椰子蛋白的浓度为50000-100000ppm。

[0012] 所述的质控线中羊抗鼠IgG浓度为1-2 mg/mL。

[0013] 所述的食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)将抗椰子蛋白单克隆抗体中的一种作为标记抗体,与胶体金按照(0.05-0.20):1的体积比混匀,经纯化、浓缩后得一种抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物;

(2)在金标垫上喷涂固定由步骤(1)制得的抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物,在硝酸纤维素膜上包被检测线、抗原线、质控线,处理完毕后,在37-65℃的条件下干燥1-5h,放入防潮柜中储存备用;

(3)试纸条的组装:

使用层压仪将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次组装或承载在底板上,即得所述的用于检测食品中椰子过敏原的横向免疫层析纸条。

[0014] 本发明的检测原理为:在胶体金纳米颗粒上标记一种抗椰子蛋白的单克隆抗体,得到的单克隆抗体-胶体金复合物作为本发明的金标抗体,使其能够捕获椰子过敏原蛋白。在硝酸纤维素膜上固定另外一种抗椰子蛋白单克隆抗体作为检测线,同时固定羊抗鼠IgG作为质控线。将样品滴加至样品垫时,样品在毛细管的作用下沿层析条横向流动,当样品中含有椰子过敏原蛋白时,椰子过敏原蛋白会通过金标抗体中的抗体结合从而形成椰子过敏原蛋白-胶体金-抗体三元复合物。该三元复合物在流经检测线时,会通过三元复合物中的椰子过敏原蛋白与检测线上的捕获抗体的结合进而被截获。从而,在检测线上,由于复合物中的胶体金不断聚集,进而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。

[0015] 本发明所用的制备椰子过敏原检测试纸条的检测方法属于夹心法,阴性结果判定为试纸条出现一条质控线、一条抗原线;阳性结果判定为试纸条上出现一条质控线、一条抗原线、一条检测线或者试纸条上出现一条质控线、一条检测线或者纸条上出现一条质控线。该检测技术与现有椰子蛋白过敏原检测技术相比,具有灵敏度高、特异性强、成本低等优点,同时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。

附图说明

[0016] 图1为本发明实施例2所述的椰子试纸条灵敏度测定结果图;

图2为本发明实施例3所述的椰子试纸条特异性测定结果图;

图3为本发明实施例4所述的椰子试纸条重复性测定结果图;

附图标记:T、检测线;H、抗原线;C、质控线;SAM1、巴西坚果样品组;SAM2、碧根果样品

组;SAM3、核桃样品组;SAM4、杏仁样品组;SAM5、榛子样品组;Lot1、第一批次试纸条;Lot2、第二批次试纸条。

具体实施方式

[0017] 下面结合具体实施例与附图对本发明进行进一步详细说明。

[0018] 实施例1、食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条的制备

食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)溶液配制:

配制1%四氯金酸溶液:用电子天平准确称取 1.0g 柠檬酸三钠,用90ml超纯水溶解至完全,定容至100mL,然后用0.22 μ m滤膜过滤,棕色试剂瓶储存于4℃备用;

配制1%柠檬酸三钠:用电子天平准确称取 0.1g 柠檬酸三钠,用9ml超纯水溶解至完全,定容至 10mL,然后用0.22 μ m滤膜过滤,现配现用;

配制0.2 mol/L碳酸钾溶液:用电子天平准确称取2.76g碳酸钾,用90ml超纯水溶解至完全,定容至 100mL,然后用0.22 μ m滤膜过滤,4℃储存备用;

配制5%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液的配制:准确称取0.05g碳酸钾,用超纯水溶解,并定容至 1mL,0.22 μ m滤膜过滤,现配现用。

[0019] (2)胶体金的制备:

用100mL量筒量取99mL超纯水,将其转移至绝对干净的250mL锥形瓶中,再向锥形瓶中加入1mL1%氯金酸溶液;将锥形瓶放在磁力搅拌器上,加热搅拌至沸腾,迅速向其中加入1mL现配制的1%柠檬酸三钠溶液,继续加热,直至锥形瓶中的液体颜色呈现酒红色,待颜色稳定后继续加热搅拌10min,冷却后用超纯水定容到100mL,放入棕色瓶中,4℃保存备用;

(3)一种抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物的制备及纯化:

取一支量程为25ml的烧杯,用清水冲洗干净,并用适量胶体金溶液润洗1遍;取2ml胶体金溶液至该烧杯中,加入4 μ L 0.2mol/L 的碳酸钾溶液,在水平摇床上低速混匀;

取一对检测椰子蛋白的单克隆抗体中的一种作为标记抗体,取 10 μ g至胶体金溶液中,混匀60min,然后加入新鲜配制的5%牛血清白蛋白 (BSA)至浓度为1%,混匀60min,得到抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物;

将上述抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物平均分装到2支2mL离心管中,在4℃、9000rpm条件下离心30min,除去上清,加入适量复溶液浓缩至原体积的1/10倍,4℃保存备用;

(4)将上述抗椰子蛋白单克隆抗体-胶体金缀合物固定到金标垫上,然后放入37℃烘箱干燥2h,取出放入防潮柜中储存备用;

(5)质控线、检测线、抗原线的制备:

用层压仪将硝酸纤维素膜(购自密理博公司)层压至底板上,然后在硝酸纤维素膜上分别固定THC线;其中T线为另一种抗椰子蛋白单克隆抗体,划线浓度为1.5mg/m;H线为椰子蛋白抗原液,划线浓度为800000ppm,其中抗原液的溶剂为pH=7.0、0.01 mol/L 的PB溶液;C线为羊抗鼠IgG,划线浓度为1mg/ml。将固定有质控线、检测线和抗原线的硝酸纤维素膜放入烘箱中,37℃干燥2h,放入防潮柜中储存备用。

[0020] (6)试纸条的组装:

用层压仪,将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次按照头尾部分适当重叠的方式粘贴在 PVC底板上,然后用切条机进行切条,得到所述的用于检测食品中椰子过敏原的胶体金免疫层析纸条。

[0021] 检测时,取110ul检测样品放入检测管中,向其中快速插入试纸条。当样品中含有椰子待检测物质时,椰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),故试纸条上会出现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,故试纸条上会出现THC三条线;如果待测物浓度过高,金标抗体全部与待测物结合,故没有多余的金标抗体被T线捕获,故在试纸条上只现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),故试纸条上会出现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、食品中椰子过敏原的横向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、10000ppm、100ppm、10ppm、5ppm、2ppm、1ppm,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,10000-100000ppm为较高浓度阳性,TC线显色;2-1000ppm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1ppm。

[0023] 实施例3、食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条的特异性测定

分别取巴西坚果、碧根果、核桃、杏仁、榛子粉末作为测试样品,用抽提液进行抽提,用样品稀释液将有效成分稀释成1000ppm,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、碧根果、核桃、杏仁、榛子样品在1000ppm处均只显示HC线,说明该试纸与巴西坚果、碧根果、核桃、杏仁、榛子无交叉反应,显示出本试纸条具有良好的特异性。

[0024] 实施例4、食品中椰子过敏原的横向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2天,对比试纸条的批间差异。用样品稀释液将标准品稀释成不同浓度:100000ppm、10000ppm、1000ppm、100ppm、10ppm、5ppm、2ppm、1ppm、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的批间差异。

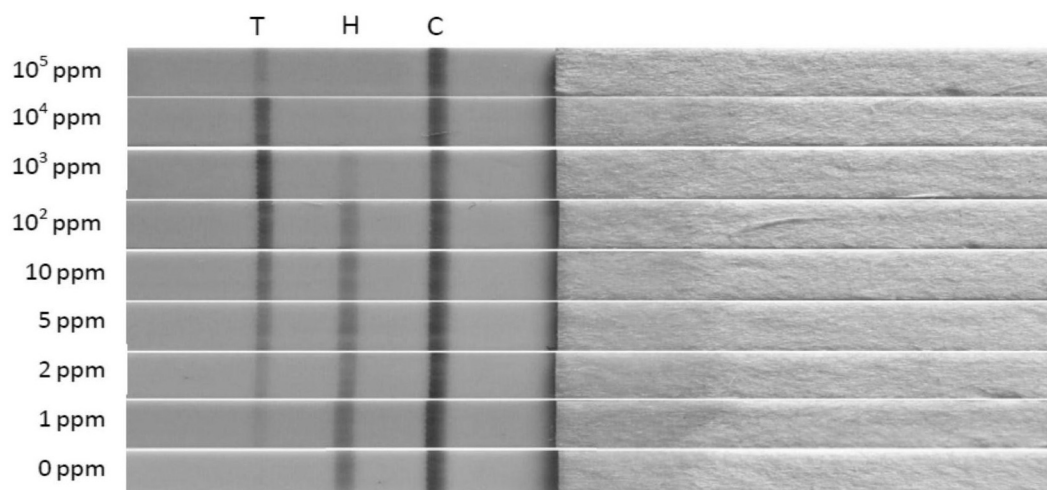


图1

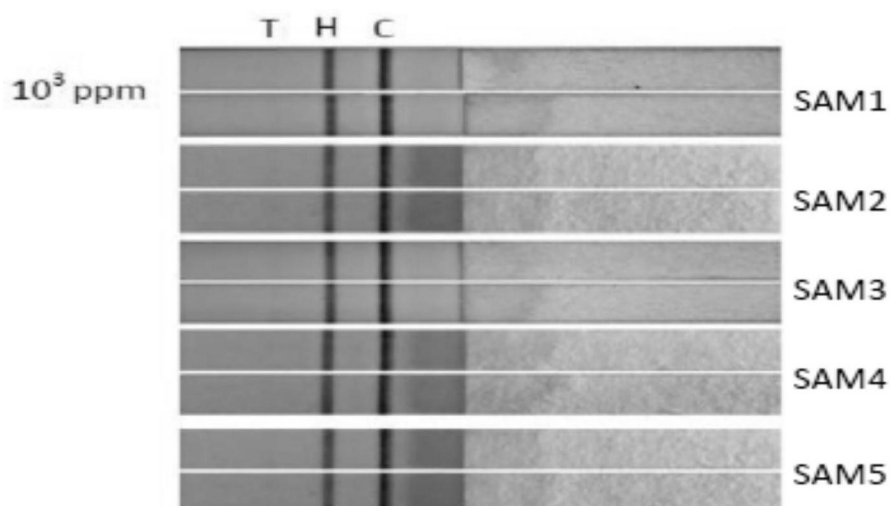


图2

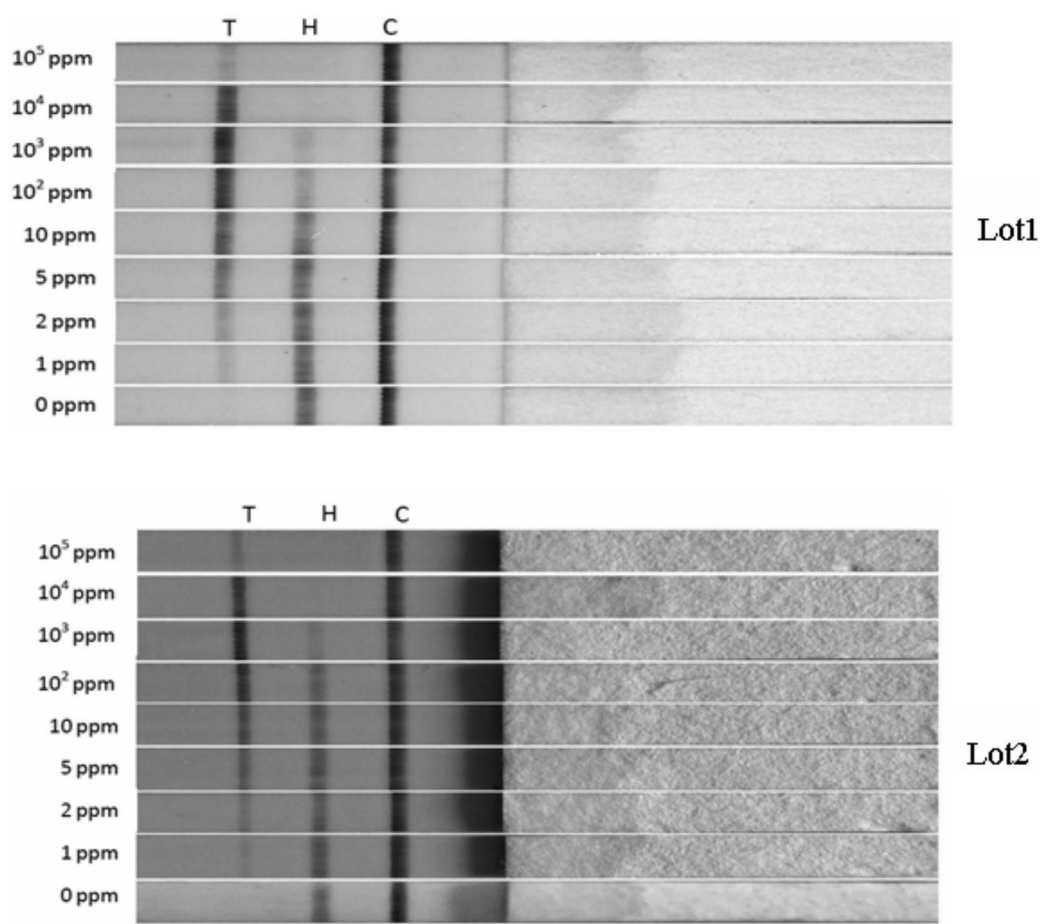


图3

专利名称(译)	食品中椰子过敏原横向免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN108956981A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN201810580905.9	申请日	2018-06-07
[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 王敏娜 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 赵萃		
发明人	唐恒立 王敏娜 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 赵萃		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了食品中椰子过敏原的横向免疫层析试纸条及其制备方法，该层析试纸条包括依次组装的吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫，还包括承载底板；硝酸纤维素膜上设有检测线、抗原线和质控线，金标垫上含有胶体金标记的一种抗椰子蛋白单克隆抗体，硝酸纤维素膜的检测线上包被另一种捕获抗椰子蛋白的单克隆抗体，抗原线包被椰子蛋白，质控线包被羊抗鼠IgG；当试纸条出现一条质控线C、一条抗原线H是阴性，出现检测线T（不管有没有抗原线）都是阳性，与现有椰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。

