



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101943698 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 12

(21) 申请号 201010273938. 2

(22) 申请日 2010. 09. 03

(71) 申请人 山西大学

地址 030006 山西省太原市小店区坞城路  
92 号

(72) 发明人 张学尧

(74) 专利代理机构 山西五维专利事务所(有限  
公司) 14105

代理人 杨耀田

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

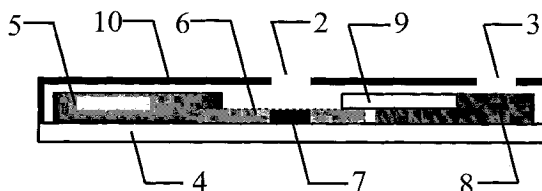
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种乳中皮革水解物金标快速检测卡及其制备方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种乳中皮革水解物金标快速检测卡及其制备方法,检测卡由样品层、金标层、检测层、吸水层、塑料衬板和塑料盖板组成;制备方法:胶体金标记的皮革水解蛋白溶液及金标层的制备;皮革水解蛋白多克隆抗体溶液和检测层上检测线的制备;检测卡的组装。该检测卡具有操作简便、检测结果准确、可肉眼判读,无需复杂操作和特殊设备等优点,适合乳制品企业和检验和检疫部门对乳中皮革水解物的现场抽检,应用前景十分广阔。



1. 一种乳中皮革水解物金标快速检测卡,其特征在于由样品层(8)、金标层(9)、检测层(6)、吸水层(5)、塑料衬板(4)和塑料盖板(10)组成;塑料衬板(4)的首部是样品层(8)前端,样品层(8)的后端与金标层(9)前端层叠相连,金标层(9)后端与检测层(6)前端层叠相连,检测层(6)后端与吸水层(5)前端层叠相连,吸水层(5)后端位于塑料衬板(4)的尾部;塑料衬板(4)的上方覆盖有塑料盖板(10),塑料盖板(10)上设有加样孔(3)和观察孔(2),加样孔(3)正对样品层(8),观察孔(2)正对检测层(6)上的检测线(7);

所述的样品层(8)由玻璃纤维制成,吸水层(5)由多层滤纸制成,检测层(6)是硝酸纤维素膜,其上包被有皮革水解蛋白多克隆抗体制成的检测线(7),金标层(9)是玻璃纤维,其上涂覆有胶体金标记的皮革水解蛋白。

2. 如权利要求1所述的一种乳中皮革水解物金标快速检测卡,其特征在于所述的吸水层(5)由玻璃纤维制成。

3. 如权利要求1所述的一种乳中皮革水解物金标快速检测卡的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1)、胶体金标记的皮革水解蛋白溶液及金标层的制备

(a) 胶体金溶液的制备;

(b) 胶体金标记的皮革水解蛋白溶液的制备:调节胶体金溶液 pH 至 7.0-8.0,在 1L 胶体金溶液中加入 5-20mg 的皮革水解蛋白,振荡混匀,再加入 5g-20g 的牛血清白蛋白,15,000g 离心 15-30min,所得沉淀用含有质量百分浓度 0.5%-2% 的牛血清白蛋白和质量百分浓度 0.5% 的叠氮化钠的 10-50mmol/L pH 7.0-8.0 的磷酸缓冲液稀释,得胶体金标记的皮革水解蛋白溶液;

(c) 金标层的制备:将玻璃纤维膜浸入胶体金标记的皮革水解蛋白溶液,取出,自然晾干得金标层(9);

(2)、皮革水解蛋白多克隆抗体溶液和检测层上检测线的制备

(a) 皮革水解蛋白多克隆抗体溶液的制备:选择家兔、小鼠或大鼠进行免疫,首次免疫用皮革水解蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合后注射;两周后进行加强免疫,用皮革水解蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合后注射;间隔两周加强免疫 3-5 次,取血,分离血清,纯化得皮革水解蛋白多克隆抗体溶液;

(b) 检测层上检测线的制备:在硝酸纤维素膜中段用皮革水解蛋白多克隆抗体溶液划线,自然晾干得检测线(7);

(3)、检测卡的组装:在塑料衬板(4)的前后两端分别粘贴样品层(8)和吸水层(5);在样品层(8)和吸水层(5)中间粘贴检测层(6),并使检测层(6)后端与吸水层(5)前端层叠相连;在检测层(6)和样品层(8)之间粘贴金标层(9),并使金标层(9)大部分压入样品层(8),小部分压入检测层(6);然后盖上塑料盖板(10),使塑料盖板(10)上的加样孔(3)正对样品层(8),观察孔(2)正对检测层(6),制得检测卡(1)。

4. 如权利要求3所述的一种乳中皮革水解物金标快速检测卡的制备方法,其特征在于,所述的纯化方法是抗原亲和层析法、Protein A 亲和层析法、正辛酸沉淀法和硫酸铵沉淀法中的一种或几种。

## 一种乳中皮革水解物金标快速检测卡及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测,具体属于一种乳中皮革水解物金标快速检测卡及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 乳及乳制品是大众化的食品,不法经营者为牟取暴利向乳中掺假的现象时有发生,严重危害消费者的合法权益,已成为困扰我国乳制品行业健康发展,制约乳制品质量提升的重要因素。常见乳掺假手段有:兑水增加重量,添加食盐、硝酸盐和亚硝酸盐增加比重,掺抗生素、碱性物质和甲醛延缓腐败,添加脂肪粉提高脂肪含量;为提高乳蛋白含量添加尿素、三聚氰胺等含氮类物质。为此各级政府加大整治力度,不法商贩为逃避打击开始添加一种新型掺假物——皮革水解物。

[0003] 皮革水解物是从皮毛中水解出的物质,主要成分是皮革水解蛋白。它是将皮革企业的下脚料、皮毛等经过浸泡还原、清洗、添加复合酶和活性炭后熬煮制成。制革废料中含有重铬酸钾和重铬酸钠,用它们生产皮革水解蛋白,重铬酸钾和重铬酸钠就会被带入产品中。重铬酸钾和重铬酸钠是强致癌物,有刺激性和腐蚀性,食用后可刺激和腐蚀消化道,对肝肾也有毒性。更为严重的是它们在体内无法分解,可缓慢积累,导致慢性中毒,使关节疏松肿大,甚至引发婴幼儿死亡。

[0004] 皮革水解物与其他的掺假物不同之处在于,皮革水解物的主要成分皮革水解蛋白是一种真正的蛋白质,具有蛋白质的一般理化特性,因此很难把它与乳中正常的蛋白质区分。目前乳中皮革水解物的检测方法大致有三种:检测皮革水解物中皮革水解蛋白的L(-)-羟脯氨酸法、硝酸汞-苦味酸法和检测皮革水解物中重铬酸根的离子色谱法。分别介绍如下:

[0005] 1、L(-)-羟脯氨酸法

[0006] L(-)-羟脯氨酸法是《食品中可能违法添加的非食用物质名单》(第二批)中提供的标准检测方法。其原理是皮革水解蛋白羟脯氨酸的含量较高,达10%以上,而正常牛奶蛋白中不含有此成分。通过测定牛奶中L(-)-羟脯氨酸含量,可推算出皮革水解蛋白含量,从而确定有无添加皮革水解物。试样经盐酸水解,释放出羟脯氨酸,经氯胺T氧化,生成含有吡咯环的氧化物。用高氯酸破坏过量的氯胺T。羟脯氨酸氧化物与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物,在波长558nm处进行比色测定。该方法优点是:检测限低、判定准确、不易受干扰。缺点是:1、反应时间长,仅样品的酸解就需要16-24小时。2、试剂腐蚀性高,大量使用盐酸、氢氧化钠和苯酚等腐蚀性物质,要求工作人员有专门的实验技能。3、仪器要求高,需要分光光度计、恒温水浴和加热器等专门仪器。

[0007] 2、硝酸汞-苦味酸法

[0008] 苦味酸法是鲜奶收购中常用的检测方法。其原理是:硝酸汞可沉淀乳酪蛋白,而皮革水解蛋白不会被去除,后者可与饱和苦味酸发生沉淀反应。向待测样品中添加硝酸汞溶液,用滤纸将乳酪蛋白沉淀过滤后,再缓缓加入饱和苦味酸。若是正常乳,过滤后滤液清

亮,加苦味酸试剂后接触面无变化;而掺皮革水解蛋白的乳,过滤后滤液呈半透明,略带乳青色,加苦味酸试剂后接触面呈白色环状。该方法优点是:试剂易得,成本低廉。但也有明显缺点:所用酪蛋白沉淀剂硝酸汞为重金属盐,毒性大;且该法结果不易准确判读,易受牛奶酸度和外来物的干扰,出现假阳性。

### [0009] 3、离子色谱法

[0010] 离子色谱法的原理是皮革水解物中含有微量的重铬酸根,通过测定牛奶中是否含有重铬酸根,就可以判断牛奶中是否添加了皮革水解物。该方法具有检验结果准确,灵敏度高、稳定性好、样品处理简单等诸多优点,但需要昂贵的离子色谱仪,难以推广使用。因此迫切需要一种简便、灵敏、可靠的乳皮革水解物的检验方法。

## 发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种乳中皮革水解物金标快速检测卡及其制备方法。

[0012] 本发明提供的一种乳中皮革水解物金标快速检测卡,由样品层、金标层、检测层、吸水层、塑料衬板和塑料盖板组成;塑料衬板的首部是样品层前端,样品层的后端与金标层前端层叠相连,金标层后端与检测层前端层叠相连,检测层后端与吸水层前端层叠相连,吸水层后端位于塑料衬板的尾部;塑料衬板的上方覆盖有塑料盖板,塑料盖板上设有加样孔和观察孔,加样孔正对样品层,观察孔正对检测层上的检测线;

[0013] 所述的样品层由玻璃纤维制成,吸水层由多层滤纸制成或玻璃纤维制成,检测层是硝酸纤维素膜,其上包被有皮革水解蛋白多克隆抗体制成的检测线,金标层是玻璃纤维,其上涂覆有胶体金标记的皮革水解蛋白。

[0014] 一种乳中皮革水解物金标快速检测卡的制备方法,包括如下步骤:

[0015] (1)、胶体金标记的皮革水解蛋白溶液及金标层的制备

[0016] (a) 胶体金溶液的制备:按柠檬酸三钠-氯金酸法制备胶体金溶液;

[0017] (b) 胶体金标记的皮革水解蛋白溶液的制备:调节胶体金溶液 pH 至 7.0-8.0,在 1L 胶体金溶液中加入 5-20mg 的皮革水解蛋白,振荡混匀,再加入 5g-20g 的牛血清白蛋白,15,000g 离心 15-30min,所得沉淀用含有质量百分浓度 0.5%-2% 的牛血清白蛋白和质量百分浓度 0.5% 的叠氮化钠的 10-50mmol/L pH 7.0-8.0 的磷酸缓冲液稀释,得胶体金标记的皮革水解蛋白溶液;

[0018] (c) 金标层的制备:将玻璃纤维膜浸入胶体金标记的皮革水解蛋白溶液,取出,自然晾干得金标层;

[0019] (2)、皮革水解蛋白多克隆抗体溶液和检测层上检测线的制备

[0020] (a) 皮革水解蛋白多克隆抗体溶液的制备:选择家兔、小鼠或大鼠进行免疫,首次免疫用皮革水解蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合后注射;两周后进行加强免疫,用皮革水解蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合后注射;间隔两周加强免疫 3-5 次,取血,分离血清,纯化得皮革水解蛋白多克隆抗体;所述的纯化方法是抗原亲和层析法、Protein A 亲和层析法、正辛酸沉淀法和硫酸铵沉淀法中的一种或几种;

[0021] (b) 检测层上检测线的制备:在硝酸纤维素膜中段用皮革水解蛋白多克隆抗体溶液划线,自然晾干得检测线;

[0022] (3)、检测卡的组装:在塑料衬板的前后两端分别粘贴样品层和吸水层;在样品层

和吸水层中间粘贴检测层,并使检测层后端与吸水层前端层叠相连;在检测层和样品层之间粘贴金标层,并使金标层大部分压入样品层,小部分压入检测层;然后盖上塑料盖板,使塑料盖板上的加样孔正对样品层,观察孔正对检测层;将检测卡与干燥剂一同封装在铝箔袋内,避光保存。

[0023] 为了保证检测卡的有效性,本发明还可包括阳性对照液和阴性对照液,它们的制备方法:在 1L 牛奶中加入 20g-50g 的皮革水解蛋白和 5g 的叠氮化钠得到阳性对照液;在 1L 牛奶中加入 5g 的叠氮化钠得到阴性对照液。

[0024] 本发明检测卡的工作原理:利用抗原和抗体能够特异识别、结合的特性,将皮革水解蛋白用胶体金标记,涂覆在玻璃纤维膜上作为金标层,将皮革水解蛋白多克隆抗体包被在硝酸纤维素膜上作为检测线。当液体滴加在样品层上,随即向吸水层方向扩散,当到达金标层时,金标皮革水解蛋白被溶解,随液体一同扩散至检测线。若测样品中不含有皮革水解蛋白,金标皮革水解蛋白就会与检测线上的多克隆抗体结合,呈现红色条带;若测样品中含有皮革水解蛋白,金标皮革水解蛋白和样品中的皮革水解蛋白就会与检测线上的多克隆抗体竞争结合,无条带或呈现淡红色条带。

[0025] 乳中皮革水解物金标检测卡的使用方法:用一次性滴管分别取阳性对照液、阴性对照液和待测样品液,依次滴入三支检测卡的样品层上。若滴加阴性对照液的检测卡显示检测线,而滴加阳性对照液的检测卡不显示检测线说明检测卡有效,否则为无效。若滴加待测样品检测卡出现红色检测线则待测样品为阴性,待测样品中不含有皮革水解物;否则为阳性,待测样品中含有皮革水解物。

[0026] 本发明与现有技术相比有如下优点:

[0027] 1、操作步骤简便,仅需滴管滴加样品即可。

[0028] 2、结果直观、可肉眼判定,无需专门的实验仪器。

[0029] 3、反应时间短,检测全程所需时间不超过 10 分钟。

[0030] 4、成本低廉,适合大范围现场普查,易于推广。

[0031] 5、本发明的检测卡制备方法简便。

## 附图说明

[0032] 图 1 是本发明检测卡的外观示意图

[0033] 图中:1- 检测卡,2- 观察孔,3- 加样孔

[0034] 图 2 是本发明检测卡的内部结构示意图

[0035] 图中:2- 观察孔,3- 加样孔,4- 塑料衬板,5- 吸水层,6- 检测层,7- 检测线,8- 样品层,9- 金标层,10- 塑料盖板

## 具体实施方式

[0036] 本发明的内容可以通过以下实例作进一步说明,但不限制本发明的范围。

[0037] 实施例 1、一种乳中皮革水解物金标快速检测卡,如图 1、图 2 所示,由样品层 8、金标层 9、检测层 6、吸水层 5、塑料衬板 4 和塑料盖板 10 组成;塑料衬板 4 的首部是样品层 8 前端,样品层 8 的后端与金标层 9 前端层叠相连,金标层 9 后端与检测层 6 前端层叠相连,检测层 6 后端与吸水层 5 前端层叠相连,吸水层 5 后端位于塑料衬板 4 的尾部;塑料衬板 4

的上方覆盖有塑料盖板 10, 塑料盖板 10 上设有加样孔 3 和观察孔 2, 加样孔 3 正对样品层 8, 观察孔 2 正对检测层 6 上的检测线 7; 所述的样品层 8 由玻璃纤维制成, 吸水层 5 由多层滤纸制成, 也可以用玻璃纤维制成, 检测层 6 是硝酸纤维素膜, 其上包被有皮革水解蛋白多克隆抗体制成的检测线 7, 金标层 9 是玻璃纤维, 其上涂覆有胶体金标记的皮革水解蛋白。

[0038] 实施例 2、乳中皮革水解物金标快速检测卡的制备方法, 步骤如下:

[0039] (1)、胶体金标记的皮革水解蛋白溶液及金标层的制备

[0040] (a) 胶体金溶液的制备: 按柠檬酸三钠——氯金酸法操作; 取 100mL 质量百分浓度 0.01% 的氯金酸搅拌加热至沸腾, 加入质量百分浓度 0.1% 的柠檬酸三钠 1.5mL, 继续搅拌加热 15min, 得到胶体金溶液;

[0041] (b) 胶体金标记的皮革水解蛋白溶液的制备: 调节胶体金溶液 pH 至 7.5, 在 1L 胶体金溶液中加入 10mg 的皮革水解蛋白, 振荡混匀, 再加入 10g 的牛血清白蛋白, 15,000g 离心 20min, 所得沉淀用含有质量百分浓度 1% 的牛血清白蛋白和质量百分浓度 0.5% 的叠氮化钠的 20mmol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液稀释, 得胶体金标记的皮革水解蛋白溶液;

[0042] (c) 金标层的制备: 将玻璃纤维膜浸入胶体金标记的皮革水解蛋白溶液, 取出, 自然晾干得金标层 9;

[0043] (2)、皮革水解蛋白多克隆抗体溶液和检测层上检测线的制备

[0044] (a) 皮革水解蛋白多克隆抗体溶液的制备: 选择家兔进行免疫。首次免疫用 2mg 皮革水解蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合后, 进行皮下多点注射; 两周后进行加强免疫, 用 1mg 皮革水解蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合, 皮下注射。间隔两周加强免疫 5 次, 家兔耳静脉取血, 静置后分离血块得血清。每 5mL 血清用醋酸钠缓冲液 60mmol/L pH 4.5 稀释至 5 倍体积, 再将 0.625mL 正辛酸逐滴搅拌加入稀释血清中, 继续搅拌 30min, 10,000g 离心 30min。上清液经滤纸过滤, 装入透析袋, 用 50mmol/L 的磷酸缓冲液 pH 7.5, 4℃透析过夜, 期间换液 4 次。透析液中搅拌加入固体硫酸铵至 45% 饱和度, 继续搅拌 30min, 10,000g 离心 30min, 弃上清。沉淀用 50mmol/L 的磷酸缓冲液 pH 7.5 溶解后, 用 50mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.5 于 4℃透析至无铵根离子检出。透析液经 10,000g 离心 30min, 所得上清液即为纯化后的皮革水解蛋白多克隆抗体溶液。

[0045] (b) 检测层上检测线的制备: 在硝酸纤维素膜中段用皮革水解蛋白多克隆抗体溶液划线, 自然晾干得检测线 7;

[0046] (3)、检测卡的组装: 在塑料衬板 4 的前后两端分别粘贴样品层 8 和吸水层 5; 在样品层 8 和吸水层 5 中间粘贴检测层 6, 使检测层 6 后端与吸水层 5 前端层叠相连。在检测层 6 和样品层 8 之间夹贴金标层 9, 金标层 9 的 4/5 部分夹入样品层 8, 1/5 部分压在检测层 6 上; 然后盖上塑料盖板 10, 使塑料盖板 10 上的加样孔 3 正对样品层 8, 观察孔 2 正对检测层 6 上的检测线 7; 将检测卡与干燥剂一同封装在铝箔袋内, 避光保存。

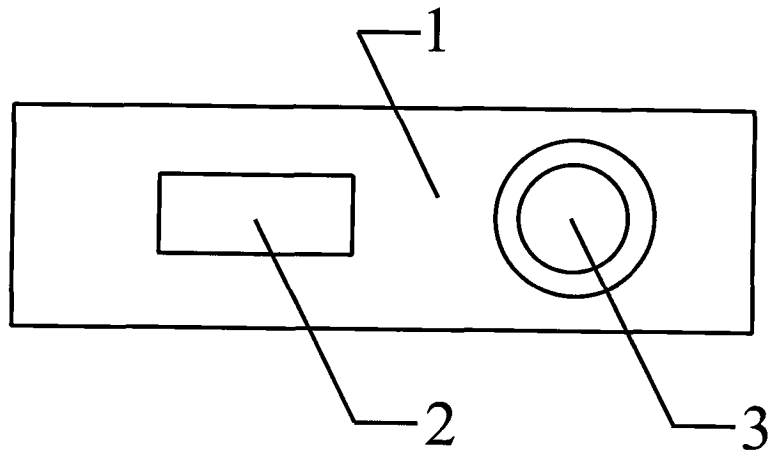


图 1

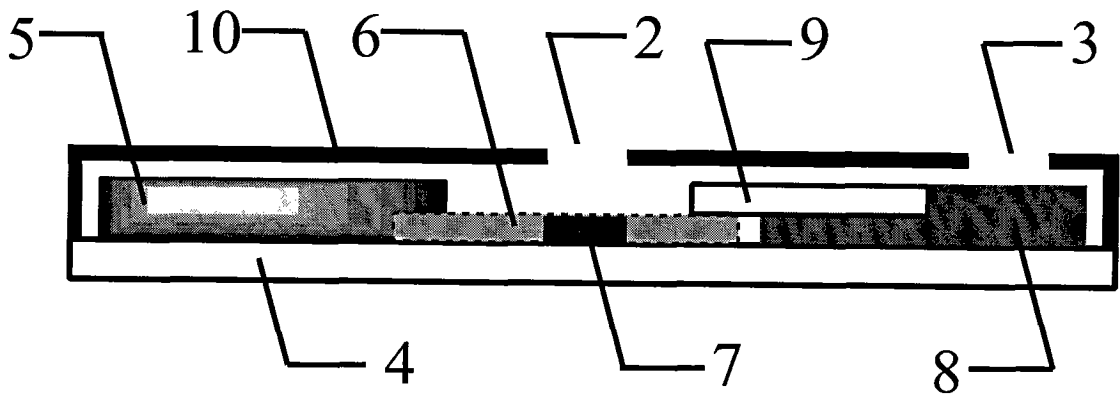


图 2

专利名称(译)	一种乳中皮革水解物金标快速检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101943698A</a>	公开(公告)日	2011-01-12
申请号	CN201010273938.2	申请日	2010-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	山西大学		
申请(专利权)人(译)	山西大学		
当前申请(专利权)人(译)	山西大学		
[标]发明人	张学尧		
发明人	张学尧		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种乳中皮革水解物金标快速检测卡及其制备方法，检测卡由样品层、金标层、检测层、吸水层、塑料衬板和塑料盖板组成；制备方法：胶体金标记的皮革水解蛋白溶液及金标层的制备；皮革水解蛋白多克隆抗体溶液和检测层上检测线的制备；检测卡的组装。该检测卡具有操作简便、检测结果准确、可肉眼判读，无需复杂操作和特殊设备等优点，适合乳制品企业和检验和检疫部门对乳中皮革水解物的现场抽检，应用前景十分广阔。

