



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110927133 A

(43)申请公布日 2020.03.27

(21)申请号 201911301305.5

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2019.12.17

(71)申请人 四川省轻工业研究设计院

地址 610000 四川省成都市金牛区白马寺街19号

(72)发明人 邓莉 王立博 张永辉 王毅

罗丹 张朝霞 陈晨 田丽 舒玲
苏明

(74)专利代理机构 成都九鼎天元知识产权代理有限公司 51214

代理人 胡东东

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

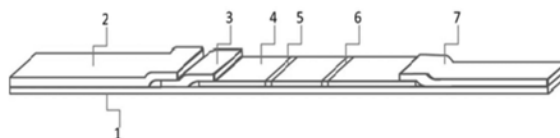
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,包括底板,所述底板上依次并相互交错粘贴有样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述包被膜一端的上端面与结合垫的一端贴合,包被膜的另一端的上端面与吸水纸的一端贴合,包被膜上包被有检测线和质控线,结合垫另一端的上端面与样品垫的一端贴合,所述结合垫上包被有荧光微球标记的铅特异性抗体,所述检测线由铅离子完全抗原构成,所述质控线由羊抗鼠IgG构成。本发明通过以荧光微球为标记物,以荧光为检测信号,在紫外灯下观察检测结果,进而减小了检测基质的影响,提高了抗干扰性,不仅能快速进行检测,而且其灵敏度高,克服了现有检测方式的不足。



1. 一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,包括底板(1),其特征在于,所述底板(1)上依次并相互交错粘贴有样品垫(2)、结合垫(3)、包被膜(4)和吸水纸(7),所述包被膜(4)一端的上端面与结合垫(3)的一端贴合,包被膜(4)的另一端的上端面与吸水纸(7)的一端贴合,包被膜(4)上包被有检测线(5)和质控线(6),结合垫(3)另一端的上端面与样品垫(2)的一端贴合,检测线(5)和质控线(6)相互不交叉,所述结合垫(3)上包被有荧光微球标记的铅特异性抗体,所述检测线(5)由铅离子完全抗原构成,所述质控线(6)由羊抗鼠IgG构成。

2. 如权利要求1所述的快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述样品垫(2)为玻璃纤维棉,所述结合垫(3)为聚酯纤维膜,所述包被膜(4)为硝酸纤维素膜。

3. 如权利要求2所述的快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述检测线(5)和质控线(6)相互平行且留有间距,所述检测线(5)靠近结合垫(3),所述质控线(6)靠近吸水纸(7)。

4. 如权利要求1—3之一所述的快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述铅特异性抗体为鼠源性单克隆抗体,所述荧光微球为直径为100—300nm的稀土镧离子螯合物掺杂的微球,微球表面带有活性基团羧基。

5. 如权利要求4所述的快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述铅离子完全抗原为铅离子、螯合剂以及载体蛋白形成的偶合物。

6. 如权利要求5所述的快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述螯合剂为乙二胺四乙酸,载体蛋白为牛血清蛋白。

7. 如权利要求6所述的快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,其特征在于,结合垫(3)上的荧光微球标记的铅特异性抗体喷涂层的形成方法包括以下步骤:

步骤1、将设计量的镧离子螯合物荧光微球加入到预先配比好的硼酸缓冲溶液中,然后超声分散;

步骤2、步骤1完成后,向溶液中加入设计量的碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,振荡反应后进行离心洗涤,然后分散于硼酸缓冲溶液中;

步骤3、步骤2完成后,向溶液中加入设计量的铅离子抗体溶液,振荡反应8h以上;

步骤4、对步骤3得到的溶液进行离心分离,然后用含牛血清蛋白的硼酸缓冲溶液封闭保存1—3h,然后再离心洗涤后置于硼酸缓冲溶液中于3—6℃下保存,得到储存液;

步骤5、将储存液按体积比1:(90—100)的比例稀释于含牛血清蛋白、Tween—20、聚乙烯吡咯烷酮、海藻糖、叠氮化钠的硼酸缓冲溶液中,使用定量喷膜仪喷涂于结合垫(3)上,在30—40℃下鼓风烘干,然后在3—6℃下避光干燥即得。

8. 如权利要求7所述的快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,其特征在于,在步骤5中,所述硼酸缓冲溶液中,含有质量浓度为0.4—0.6%的牛血清蛋白、体积分数为2—3%的Tween—20、质量浓度为0.4—0.6%的聚乙烯吡咯烷酮、质量浓度为1—3%的海藻糖和质量浓度为0.01—0.03%的叠氮化钠,该硼酸缓冲溶液的pH值为8.0—8.5。

一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全重金属快速检测技术领域,特别涉及一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸。

背景技术

[0002] 随着城市化和工业化的发展,重金属污染问题在大气、土壤、水和食品中日趋严重,对食品安全、人体健康、经济效益造成了严重的影响。铅是已知的具有潜在危害最大的重金属离子之一。重金属铅以化合物的形式存在于食品中,通过消化道进入人体并不易代谢而在体内累积,对人体的危害是多系统、多器官和不可逆的,严重危害人类健康。

[0003] 传统的铅检测方法有原子吸收光谱法、荧光光谱法、电感耦合等离子体质谱法等,这些检测方法需要进行复杂的样品预处理,耗时且成本高不易普及,很难做到现场检测和便携性使用。目前一些新兴的快速检测手段如比色法、电化学方法、酶联免疫法、胶体金免疫层析试纸等,虽然操作简单,但灵敏度较低,易受基质复杂性的影响,抗干扰性不高。因此建立一种快速可靠,操作简便,低成本的检测食品中重金属铅的方法是十分有必要的。

[0004] 中国专利CN204882566U公开了一种快速检测重金属铅的免疫胶体金试剂板,并具体公开了以下技术特征:包括上下两块塑料模板、PVC底衬、样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,PVC底衬从左到右粘结样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,并形成搭接结构,硝酸纤维素膜上喷有平行的检测线和控制线,两者相距5mm,检测线为人工包被抗原的印记,控制线为羊抗鼠IgG的印记,金标抗体结合垫上喷有胶体金标记的特异性抗体,样品垫和金标抗体结合垫均有玻璃纤维制成。该技术方案是通过金标抗体与人工抗原特异性反应的情况,根据肉眼观察控制线上颜色深浅程度来判断检测结果,主要达到了特异性好、抗干扰性强等优点,但是,该检测试剂板的检测方式主要存在以下缺点:

[0005] (1) 灵敏度低,该检测试剂板的灵敏度为:对水中重金属铅的最低检出限为 $100\mu\text{g/L}$,即 $100\mu\text{g/kg}$,虽然满足国家限量要求,但是对于低于铅含量 $100\mu\text{g/kg}$ 的检测环境,该检测试剂板就无法适用了,因此,其灵敏度低,对于铅含量低于 $100\mu\text{g/kg}$ 的食品领域铅含量检测时,该检测试剂板就无法检测;

[0006] (2) 易受基质复杂性的影响,该检测试剂板在判定结果时,是根据肉眼观察检测线颜色深浅来判定结果,其显然易受到检测基质着色干扰,易产生判定错误,因此易受基质复杂性的影响;

[0007] (3) 成本较高,该金标抗体使用的胶体金是由胶体金颗粒制成的,金属于昂贵的贵金属,使用昂贵的贵金属来标记检测,显然使其制造和使用成本大幅升高,故其成本较高。

发明内容

[0008] 本发明的发明目的在于:针对上述存在的问题,提供一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,通过以荧光微球为标记物,以荧光为检测信号,在紫外灯下观察检测结果,进而减小样品提取液基质的影响,提高其抗干扰性,同时采用该检测方式,不仅能

快速进行检测,还使其灵敏度大幅升高,由此克服现有检测方式的不足。

[0009] 本发明采用的技术方案如下:一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,包括底板,所述底板上依次并相互交错粘贴有样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述包被膜一端的上端面与结合垫的一端贴合,包被膜的另一端的上端面与吸水纸的一端贴合,包被膜上包被有检测线和质控线,结合垫另一端的上端面与样品垫的一端贴合,检测线和质控线相互不交叉,所述结合垫上包被有荧光微球标记的铅特异性抗体,所述检测线由铅离子完全抗原构成,所述质控线由羊抗鼠 IgG 构成。

[0010] 进一步,所述样品垫为玻璃纤维棉,所述结合垫为聚酯纤维膜,所述包被膜为硝酸纤维素膜。

[0011] 进一步,所述检测线和质控线相互平行且留有间距,所述检测线靠近结合垫,所述质控线靠近吸水纸。

[0012] 进一步,所述铅特异性抗体为鼠源性单克隆抗体,所述荧光微球为直径为100—300nm的稀土铕离子螯合物掺杂的微球,微球表面带有活性基团羧基。

[0013] 进一步,所述铅离子完全抗原为铅离子、螯合剂以及载体蛋白形成的偶合物。

[0014] 进一步,所述螯合剂为乙二胺四乙酸,载体蛋白为牛血清蛋白。

[0015] 进一步,结合垫上的荧光微球标记的铅特异性抗体喷涂层的形成方法包括以下步骤:

[0016] 步骤1、将设计量的铕离子螯合物荧光微球加入到预先配比好的硼酸缓冲溶液中,然后超声分散;

[0017] 步骤2、步骤1完成后,向溶液中加入设计量的碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,振荡反应后进行离心洗涤,然后分散于硼酸缓冲溶液中;

[0018] 步骤3、步骤2完成后,向溶液中加入设计量的铅离子抗体溶液,振荡反应8h以上;

[0019] 步骤4、对步骤3得到的溶液进行离心分离,然后用含牛血清蛋白的硼酸缓冲溶液封闭保存1—3h,然后再离心洗涤后置于硼酸缓冲溶液中于3—6℃下保存,得到储存液;

[0020] 步骤5、将储存液按体积比1:(90—100)的比例稀释于含牛血清蛋白、Tween—20、聚乙烯吡咯烷酮、海藻糖、叠氮化钠的硼酸缓冲溶液中,使用定量喷膜仪喷涂于结合垫上,在30—40℃下鼓风烘干,然后在3—6℃下避光干燥即得。

[0021] 进一步,在步骤5中,所述硼酸缓冲溶液中,含有质量浓度为0.4—0.6%的牛血清蛋白、体积分数为2—3%的Tween—20、质量浓度为0.4—0.6%的聚乙烯吡咯烷酮、质量浓度为1—3%的海藻糖和质量浓度为0.01—0.03%的叠氮化钠,该硼酸缓冲溶液的pH值为8.0—8.5。

[0022] 本发明的荧光免疫层析试纸的检测原理为:本发明应用了竞争抑制免疫层析的原理,以荧光为检测信号,样品待测液滴加在样品垫上,通过层析作用在试纸上泳动,若样品待测液中含有Pb(II)—EDTA(即是铅离子(Pb(II))与螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)的偶合物),则Pb(II)—EDTA与结合垫中荧光微球标记的铅特异性抗体免疫结合,进而封闭荧光微球—抗体上Pb(II)—EDTA的抗原结合点,抑制抗体与检测线上的抗原(Pb(II)—EDTA—BSA偶合物)结合,随着样品中Pb(II)—EDTA含量的升高,结合于检测线上的抗体量减少,相应检测线上的荧光强度也随之减弱,而质控线上的羊抗鼠IgG不受Pb(II)—EDTA浓度而影响荧光微球标记的抗体的结合。

[0023] 由于铈离子螯合物荧光微球在紫外灯下发出鲜亮的红光,待测液滴加5分钟后,将其置于365nm的紫外灯下观察,阴性结果呈现两条红色荧光线,即检测线和质控线,而当Pb(II)-EDTA高于或等于10 μ g/kg时,检测线消失,只出现一条质控线,此时则为阳性结果,检测过程快速简便,结果直观。

[0024] 综上所述,由于采用了上述技术方案,本发明的有益效果是:

[0025] 1、灵敏度高,可用于重金属铅的定性检测,本发明的荧光免疫层析试纸的灵敏度低至10 μ g/kg,灵敏度远高于背景技术中使用金标记物的检测方式的灵敏度,能够满足食品领域重金属铅的检测;

[0026] 2、受基质复杂性的影响小,本发明由于采用了以荧光微球为标记物,以荧光为检测信号,然后在紫外灯下观察检测结果,由此完全避免了检测基质着色影响判断的问题,大幅削弱了检测基质影响;

[0027] 3、检测简单快速,抗干扰性强,本发明的荧光免疫层析试纸检测、处理、判断等过程简单,10min内就可得到检测结果,检测简单快速,同时由于采用了竞争抑制免疫层析技术,通过特异性免疫反应实现食品中重金属铅的检测,其特异性好,抗干扰性强;

[0028] 4、本发明使用的标记物、抗体、抗原等材料成本不高,结构不复杂,生产工艺简单,流程成熟,值得应用推广。

附图说明

[0029] 图1是本发明的一种荧光免疫层析试纸结构示意图。

[0030] 图中标记:1为底板,2为样品垫,3为结合垫,4为包被膜,5为检测线,6为质控线,7为吸水纸。

具体实施方式

[0031] 下面结合附图,对本发明作详细的说明。

[0032] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0033] 如图1所示,一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,包括底板1,所述底板1上依次并相互交错粘贴有样品垫2、结合垫3、包被膜4和吸水纸7,所述包被膜4一端的上端面与结合垫3的一端贴合,包被膜4的另一端的上端面与吸水纸7的一端贴合,包被膜4上包被有检测线5和质控线6,结合垫3另一端的上端面与样品垫2的一端贴合,检测线5和质控线6相互不交叉,所述结合垫3上包被有荧光微球标记的铅特异性抗体,所述检测线5由铅离子完全抗原构成,所述质控线6由羊抗鼠IgG构成。

[0034] 在上述中,所述样品垫2可以由玻璃纤维棉构成,所述结合垫3可以由聚酯纤维膜构成,所述包被膜4可以由硝酸纤维素膜构成,当然,这些具体材料并不形成唯一限定作用,其也可以使用与该材料具有相同性能的其他材料。

[0035] 进一步地,为了便于检测和对比观察,所述检测线5和质控线6相互平行且留有间距,间距可以在4-8mm之间,所述检测线5靠近结合垫3,所述质控线6靠近吸水纸7。

[0036] 作为一种优选地实施方式,所述铅特异性抗体优选为鼠源性单克隆抗体,所述荧

光微球为直径为100—300nm的稀土铈离子螯合物掺杂的微球,微球表面带有活性基团羧基。

[0037] 进一步地,所述铅离子完全抗原为铅离子、螯合剂以及载体蛋白形成的偶合物。优选地,所述螯合剂为乙二胺四乙酸,所述载体蛋白为牛血清蛋白。

[0038] 进一步地,结合垫3上的荧光微球标记的铅特异性抗体喷涂层的形成方法包括以下步骤:

[0039] 步骤1、将设计量的铈离子螯合物荧光微球加入到预先配比好的硼酸缓冲溶液中,然后超声分散;

[0040] 步骤2、步骤1完成后,向溶液中加入设计量的碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,振荡反应后进行离心洗涤,然后分散于硼酸缓冲溶液中;

[0041] 步骤3、步骤2完成后,向溶液中加入设计量的铅离子抗体溶液,振荡反应8h以上;

[0042] 步骤4、对步骤3得到的溶液进行离心分离,然后用含牛血清蛋白的硼酸缓冲溶液封闭保存1—3h,然后再离心洗涤后置于硼酸缓冲溶液中于3—6℃下保存,得到储存液;

[0043] 步骤5、将储存液按体积比1:(90—100)的比例稀释于含牛血清蛋白、Tween—20、聚乙烯吡咯烷酮、海藻糖、叠氮化钠的硼酸缓冲溶液中,使用定量喷膜仪喷涂于结合垫上,在30—40℃下鼓风烘干,然后在3—6℃下避光干燥即得。

[0044] 在上述中,步骤5中的硼酸缓冲溶液中,含有质量浓度为0.4—0.6%的牛血清蛋白、体积分数为2—3%的Tween—20、质量浓度为0.4—0.6%的聚乙烯吡咯烷酮、质量浓度为1—3%的海藻糖和质量浓度为0.01—0.03%的叠氮化钠,该硼酸缓冲溶液的pH值为8.0—8.5。

[0045] 为了更好地实施本发明,以下列举实例来予以说明。

[0046] 实施例1

[0047] 一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸,其按以下步骤制得:

[0048] (1) 荧光微球标记的铅离子抗体的复合物的制备

[0049] 将200μL、1% (w/v) 的铈离子螯合物荧光微球加入到800μL、0.2mol/L、pH=8.2的硼酸缓冲溶液中,超声分散后再加入20mg碳二亚胺(EDC)和10mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),振荡反应2小时后,离心洗涤后分散于1mL硼酸缓冲溶液中,后加入160μL、1.0mg/mL的铅离子抗体溶液,振荡反应过夜(8h以上),即得;

[0050] (2) 荧光微球标记的铅离子抗体的复合物的保存

[0051] 将步骤(1)得到的溶液离心分离后用含0.5% (w/v) BSA的硼酸缓冲溶液封闭2小时,离心洗涤后置于1mL硼酸缓冲溶液中4℃保存,得到储存液;

[0052] (3) 结合垫3喷涂

[0053] 将储存液按1:100的比例稀释于含0.5% (w/v) BSA、2.5% (v/v) Tween—20,0.5% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮、2% (w/v) 海藻糖、0.02% (w/v) 叠氮化钠、pH8.2的硼酸缓冲溶液中,使用定量喷膜仪喷涂于结合垫3上,在37℃鼓风烘干2小时后,在4℃避光干燥保存备用;

[0054] (4) 形成检测线5和质控线6

[0055] 在包被膜4的不同位置分别包被铅离子完全抗原(Pb(II)—EDTA—BSA偶合物)和羊抗鼠IgG,形成检测线5和质控线6;

[0056] 包被膜4的制备方法为:将0.5mg/mL的Pb(II)—EDTA—BSA偶合物和0.5mg/mL的羊

抗鼠IgG以0.50cm的间隔喷涂于包被膜4(即硝酸纤维素膜)上,形成检测线5和质控线6,再在37℃烘干2小时,放入干燥器中保存备用;

[0057] (5) 试纸组装

[0058] 在底板1上依次相互交错的粘贴上样品垫2、结合垫3、包被膜4和吸水纸7,然后切割成0.4cm大小,在4℃避光干燥保存,即得。

[0059] 试纸检测:

[0060] 荧光免疫层析试纸用于食品中重金属铅的检测,包括样品前处理、荧光试纸的使用以及结果判定,检测过程中,以市售调味品——孜然粉中的铅含量检测为例:

[0061] 先对孜然粉进行前处理:称取孜然粉1g,加入2%(v/v)硝酸2mL,超声提取3分钟,静置后取上清液用氢氧化钠溶液调至中性,再取100μL中性溶液置于9倍体积的含乙二胺四乙酸(EDTA)10mg/L的磷酸缓冲溶液(0.02mol/L, pH7.4)中混匀,所得即为样品待测液,如上处理方法即把样品中化合物形式存在的重金属铅转化为具有三维结构的Pb(II)-EDTA,便于其与相应抗体的免疫反应。

[0062] 检测时,将70μL样品待测液滴加在样品垫2上,通过层析作用在试纸上泳动,若样品待测液中含有Pb(II)-EDTA,则Pb(II)-EDTA与结合垫中荧光微球标记的铅特异性抗体免疫结合,进而封闭荧光微球-抗体上Pb(II)-EDTA的抗原结合点,抑制抗体与检测线5上的抗原(Pb(II)-EDTA-BSA偶合物)结合,随着样品中Pb(II)-EDTA含量的升高,结合于检测线5上的抗体量减少,相应检测线上的荧光强度也随之减弱,而质控线6上的羊抗鼠IgG不受Pb(II)-EDTA浓度而影响荧光微球标记的抗体的结合。

[0063] 由于镧离子螯合物荧光微球在紫外灯下发出鲜亮的红光,待测液滴加5分钟后,将其置于365nm的紫外灯下观察,阴性结果呈现两条红色荧光带,即检测线5和质控线6,而当Pb(II)-EDTA高于或等于10μg/kg时,检测线5消失,只出现一条质控线6,此时则为阳性结果,检测过程快速简便,结果直观。

[0064] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

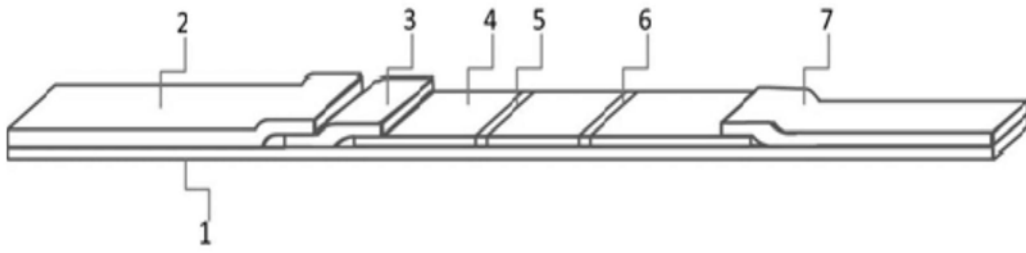


图1

专利名称(译)	一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN110927133A	公开(公告)日	2020-03-27
申请号	CN201911301305.5	申请日	2019-12-17
[标]发明人	邓莉 王立博 张永辉 王毅 罗丹 张朝霞 陈晨 田丽 舒玲 苏明		
发明人	邓莉 王立博 张永辉 王毅 罗丹 张朝霞 陈晨 田丽 舒玲 苏明		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/558		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N2021/6439		
代理人(译)	胡东东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测食品中重金属铅的荧光免疫层析试纸，包括底板，所述底板上依次并相互交错粘贴有样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸，所述包被膜一端的上端面与结合垫的一端贴合，包被膜的另一端的上端面与吸水纸的一端贴合，包被膜上包被有检测线和质控线，结合垫另一端的上端面与样品垫的一端贴合，所述结合垫上包被有荧光微球标记的铅特异性抗体，所述检测线由铅离子完全抗原构成，所述质控线由羊抗鼠IgG构成。本发明通过以荧光微球为标记物，以荧光为检测信号，在紫外灯下观察检测结果，进而减小了检测基质的影响，提高了抗干扰性，不仅能快速进行检测，而且其灵敏度高，克服了现有检测方式的不足。

