



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105277681 A

(43) 申请公布日 2016.01.27

(21) 申请号 201410351075.4

(22) 申请日 2014.07.23

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 吴明慧 杜霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

用于检测甜蜜素的胶体金免疫层析检测卡的制备

(57) 摘要

本发明为检测甜蜜素的胶体金免疫层析检测卡的制备。主要用于快速检测食品中甜蜜素的含量,该方法在试纸的背衬上依次粘贴有样液吸收部分、胶体金标记部分、检测反应部分及吸水部分。检测反应部分上面包被有检测用抗原作为检测线,同时还包被有抗第二种属动物蛋白的 IgG1 条作为参照线。该快速检测试纸条特异性强,能够半定量检测,环境温度为 4-35℃ 都可以使用,适合于个体养殖户、食品卫生质检部门、海关等动物源食品进行甜蜜素残留的快速检测。本发明具有特异性强、灵敏性高、能够实现半定量检测,且操作简单方便等有益效果。

1. 甜蜜素胶体金免疫层析检测卡,其特征在于:在试纸的背衬上依次贴有样液吸收部分、胶体金标记部分、检测反应部分和吸水部分,胶体金标记部分被标记的物质为第二种属动物蛋白和甜蜜素抗体的混合物;检测反应部分包被有检测用甜蜜素抗原作为检测线,同时还包被有抗第二种属动物蛋白的 IgG 1 条作为参照线。

2. 根据权利要求 1 所述的甜蜜素胶体金免疫层析检测卡,其特征在于:甜蜜素检测用抗原为甜蜜素与载体物质形成的偶合物。

3. 根据权利要求 2 所述的甜蜜素胶体金免疫层析检测卡,其特征在于:所述的载体物质,为蛋白质、蛋白质片段、合成多肽、半合成多肽或多糖。

4. 根据权利要求 1 所述的甜蜜素胶体金免疫层析检测卡,其特征在于:所述的第二种属动物蛋白为非抗体来源动物的蛋白质。

## 用于检测甜蜜素的胶体金免疫层析检测卡的制备

### 技术领域

[0001] 属于食品安全检测领域,具体涉及食品中有害残留物的检测方法,特别是用于检测甜蜜素的胶体金免疫层析检测卡。

### 背景技术

[0002] 甜蜜素(英文名称:(Beet) molasses ;Sodium N-cyclohexylsulfamate;Sodium cyclamate)化学名称为环己基氨基磺酸钠,分子式: $C_6H_{11}NHSO_3Na$ ,白色针状、片状结晶或结晶状粉末、无臭、味甜,其稀溶液的甜度约为蔗糖的30倍。甜度为蔗糖的40~50倍,为无营养甜味剂。10%水溶液呈中性(PH值6.5),对热、光、空气稳定。加热后略有苦味。分解温度约280℃,不发生焦糖化反应。酸性环境下略有分解,碱性时稳定。溶于水(1g/5ml)和丙二醇(1g/5ml),几乎不溶于乙醇、乙醚、苯和氯仿。其浓度大于0.4%时带苦味,溶于亚硝酸盐、亚硫酸盐含量高的水中,产生石油或橡胶样的气味。具有非吸湿性,不支持霉菌或其他细菌生长。

[0003] 在美国曾成为一种消费量很大的人工甜味剂,公认为安全物质,这种情况一直持续到1969年。这一年美国国家科学院研究委员会收到有关甜蜜素为致癌物的实验证据,美国食品与药物管理局(FDA)为此立即发布规定严格限制使用,并于1970年8月发出了全面禁止的命令。1982年9月,Abbott实验室和能量控制委员会在大量试验事实的基础上,以最新的研究事实证明甜蜜素的食用安全性,许多国际组织也相继发表大量评论明确表示甜蜜素为安全物质,但FDA至今还没有最终解决这个问题。尽管如此,仍有许多国家(包括中国)继续承认甜蜜素的甜味剂地位,允许甜蜜素的使用。

[0004] 根据我国《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760)的规定,“甜蜜素”可以作为甜味剂,其使用范围为:一,酱菜、调味酱汁、配置酒、糕点、饼干、面包、雪糕、冰淇淋、冰棍、饮料等,其最大使用量为0.65g/kg;二,蜜饯,最大使用量为1.0g/kg;三,陈皮、话梅、话李、杨梅干等,最大使用量8.0g/kg。GB2760-2007《食品添加剂使用卫生标准》中规定,膨化食品、小油炸食品在生产中不得使用甜蜜素。

### 发明内容

[0005] 本发明目的在于提供快速检测出食品中甜蜜素的残留。

[0006] 本发明的技术方案是甜蜜素的检测卡及其检测样品的处理方法。甜蜜素的检测卡是在长条扁平薄壳状的检测卡外壳内设置检测条,检测卡外壳表面有检测窗孔和加样孔,其特征在于测试条是由支承背板上粘贴四种原件组成:支承背板中部粘贴硝酸纤维素膜,支承背板一端上粘贴吸水纸,另一端粘贴样品垫,吸水纸内端与硝酸纤维素膜搭接,样品垫与硝酸纤维素膜之间则有一段金标垫,由金标垫将样品垫与硝酸纤维素膜连接在一起。金标垫中是含有第二种属蛋白和甜蜜素抗体的混合物,硝酸纤维素膜上横向有2条间隔开的显色印记带,一条是含甜蜜素蛋白质偶联物的检测带,另一条是第二种属动物蛋白的IgG(常用的为抗兔抗体或抗鼠抗体);测试条置入检测卡外壳内,样品垫正对加样孔,硝酸纤维

素膜正对检测窗孔。

[0007] 样品处理方法是：称取试样  $2 \pm 0.05$  g 于 50 mL 的离心管中，加入 10 mL 超纯水，在 1800 r/min 条件下用高速组织粉碎机打碎（约 1 min），取粘稠液加 50% 三氯乙酸 2 mL 和二氯甲烷 10 mL，在回旋式振荡器上高速振摇 30 min。然后在 4℃ 5000 rpm 条件下离心 30 min，取上清 10 mL，加二氯甲烷 2 mL，在回旋加速器上振荡混合 20 min，再在 4℃ 12000 rpm 条件下离心 30 min，上清液即为药物的抽提液。

[0008] 本发明的优点是能快速检测出样品中含有的甜蜜素，且节省检测成本，使用方便，检测快速，灵敏度高，结果准确。

## 附图说明

[0009] 图 1 是甜蜜素检测卡外壳及检测试纸条在外壳内的安置图。

[0010] 图 2 是甜蜜素检测卡检测试纸条结构示意图。

[0011] 图 3 是检测试纸条硝酸纤维素膜上显示印迹带示意图。

## 具体实施方式

### [0012] 1. 标记胶体金的制备

胶体金溶液的制备：先将 1 g 氯金酸 ( $\text{HAuCl}_4$ ) 粉末溶于 100 mL 超纯水配置成 1% 的氯金酸溶液；再取 1 L 超纯水于特质电炉上加热，至沸腾后加入 10 mL 1% 的柠檬酸三钠水溶液，沸腾后继续加热，5 分钟后加 10 mL 1% 的氯金酸溶液，再次加热至沸腾，等待颜色变为酒红色后开始计时，10 分钟后停止加热，取下后自然冷却、定容至 1 L，即为胶体金溶液；

抗体标记：确定抗体所需的 0.1 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  的比例，取 100 mL 胶体金溶液，加入此比例 0.1 mol/L 的  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ，混匀（约 5 min），再将甜蜜素和第二种属动物蛋白分别用 PBS (0.01 mol/L, pH7.4) 溶解稀释至 2 mg/mL，加入 2 mL 2 mg/mL 的甜蜜素抗体（或 2 mL 2 mg/mL 第二种属动物蛋白），混匀（5 min），最后加入 10% BSA 2 mL，混匀（5 min）。离心三次留沉淀，此三次收集的沉淀即为金标甜蜜素抗体；

胶体金标记部分处理：将甜蜜素抗体稀释后，按一定比例将载体（如玻璃纤维、聚酯膜等）浸透，铺均匀，取出放于 37℃ 恒温烘箱烘制 8-12 h，干燥后即作为胶体金标记部分。

### [0013] 2. 免疫层析专用高分子复合膜制备

首先用一种硝酸纤维素膜制成透明背衬膜，在背衬膜上覆盖一层对蛋白质结合力强，浸润性能好的具有一定孔径的层析膜。背衬膜的作用是阻止粘合剂中的有机溶剂对层析膜上蛋白质的破坏。

### [0014] 3. 层析膜的点样方法

将一定浓度的甜蜜抗原（甜蜜素与载体物质形成的偶合物）精确定量；以一定间距（5 mm）呈横条状点定于层析膜上，供检测用。

[0015] 甜蜜素检测卡是在检测卡外壳 1 中设置检测试纸条 2，检测卡外壳 1 的结构及检测试纸条 2 的设置见附图 1，检测卡外壳 1 为长条扁平薄壳状外壳，长 70 mm，宽 20 mm，厚 5 mm，薄壳壁厚 1 mm，由工程塑料制成，检测卡外壳 1 由上盖和下盖两半连接而成，在检测卡外壳 1 上盖上有检测窗孔 3 和加样孔 4。检测试纸条 2 放置在检测卡外壳 1 的下盖内。

[0016] 检测试纸条 2 是多层结构的窄条薄片，片长 60 mm，片宽约 4 mm，厚度小于 2.5 mm。

检测试纸条 2 是多层结构：底层是支承背板 5，为聚乙烯薄片，厚度约 0.5 mm，长 60 mm，宽 4 mm；支承背板 5 中部粘贴硝酸纤维素膜 6，硝酸纤维素膜厚 0.5 mm，长 20 mm，宽 4 mm。硝酸纤维素膜 6 上有两条间隔开的横向显示印迹带，参见附图 3，两条显示印迹中，一条是检测线 10，含甜蜜素偶联物，另一条是参照线 11，含第二种属动物蛋白的 IgG。支承背板 5 一端上粘贴吸水纸 9，另一端粘贴样品垫 8，吸水纸 9 内端与硝酸纤维素膜 6 搭接，样品垫 8 与硝酸纤维素膜 6 之间则有一段金标垫 7，由金标垫 7 将样品垫 8 与硝酸纤维素膜 6 连接在一起，搭接宽度在 1-2 mm。样品垫 8 材料为吸水玻璃纤维或聚酯膜。

[0017] 使用甜蜜素胶体金免疫层析检测卡时，先将待检测的样品液（药物的抽提液稀释后，直接用于检测）从加样孔 4 中滴入甜蜜素检测试纸条 2 的样品垫 8，由于虹作用原理，带动待检测的样品液及胶体金膜 7 所含的抗甜蜜素单克隆抗体胶体金标记物一起向硝酸纤维素膜 6 扩散，5-10 分钟内观察结果。

[0018] 检测卡的主要反应是免疫学的抗原和抗体反应，在硝酸纤维素膜上迁移的胶体金标记的抗体，在测试线上与含有甜蜜素蛋白质偶联物，以及参照线含第二种属动物蛋白的 IgG 反应，形成棕红色条带。若样品中相应的待测甜蜜素高于允许值，样品加入后先与金标垫中的抗体反应，而不会与检测带所带有的甜蜜素蛋白质偶联物反应，从而不显色。主要有以下 3 种检测结果：

1. 检测线 10 和参照线 11 同时显现棕红色印迹，表示检测结果为阴性，说明被测样品中不含甜蜜素或含量低于允许值；

2. 检测线 10 不显色，参照线 11 显现棕红色印迹，表示检测结果为阳性，说明被测样品中甜蜜素含量高于允许值；

3. 检测线 10 显现棕红色印迹，参照线 11 不显色，或检测线 10 和参照线 11 均不显色，表示检测试纸条失效。

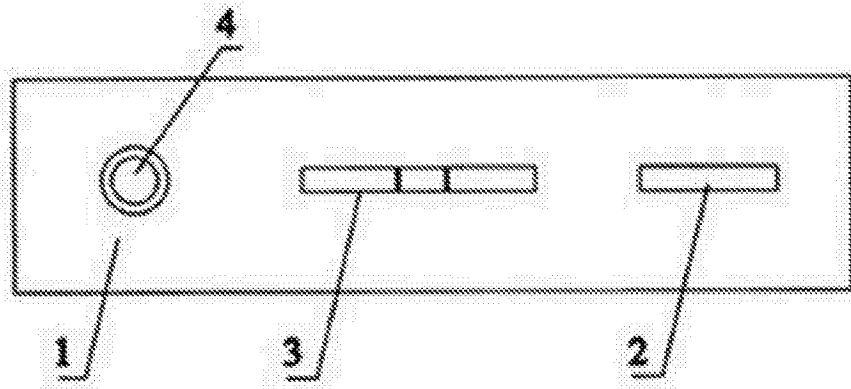


图 1

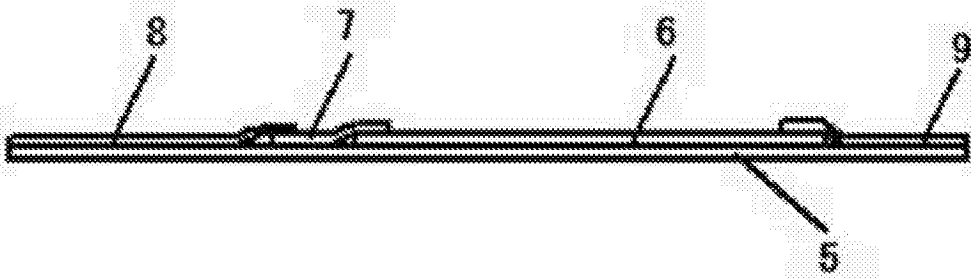


图 2

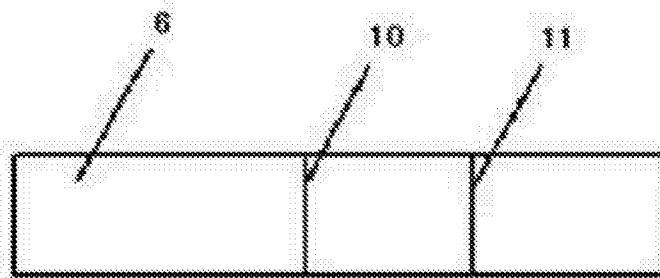


图 3

专利名称(译)	用于检测甜蜜素的胶体金免疫层析检测卡的制备		
公开(公告)号	<a href="#">CN105277681A</a>	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410351075.4	申请日	2014-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 吴明慧 杜霞		
发明人	洪霞 吴明慧 杜霞		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/28 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明为检测甜蜜素的胶体金免疫层析检测卡的制备。主要用于快速检测食品中甜蜜素的含量，该方法在试纸的背衬上依次粘贴有样液吸收部分、胶体金标记部分、检测反应部分及吸水部分。检测反应部分上面包被有检测用抗原作为检测线，同时还包被有抗第二种属动物蛋白的IgG1条作为参照线。该快速检测试纸条特异性强，能够半定量检测，环境温度在4-35°C都可以使用，适合于个体养殖户、食品卫生质检部门、海关等动物源食品进行甜蜜素残留的快速检测。本发明具有特异性强、灵敏度高、能够实现半定量检测，且操作简单方便等有益效果。

