



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104101703 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201310124277. 0

(22) 申请日 2013. 04. 11

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府
大道 999 号

(72) 发明人 赖卫华 倪小琴 刘道峰 山珊
彭涛

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种快速检测食品中牛乳过敏原的装置及其
制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速、方便、高效、定量检测食品中牛乳过敏成分的检测装置及其制备方法,属于荧光微球标记的检测技术。本发明包括标记了特殊性质的具有生物特异性的生物大分子,以具有吸附移动性的聚合材料薄膜作载体,在便携轻巧的方形设备内进行的检测。本发明的优点是利用标记物的特殊性质对食品基质中含有的微量牛乳过敏原成分进行检测。这种特殊的标记物克服了常见标记物的不稳定性,检测值低的问题。本发明主要应用于食品安全中残余牛乳致敏物的定量检测方面。

1. 一种快速检测食品中牛乳过敏原的装置,其特征在于包括用于检测牛乳过敏原的免疫层析试纸条;所述免疫层析试纸条为粘性底板上依次搭接滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、NC膜和吸水纸;所述玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体;所述NC膜的检测区喷涂牛乳过敏原;所述NC膜的质控区上喷涂羊抗兔IgG;所述所述荧光微球是直径为 $0.01 \sim 10 \mu\text{m}$ 的用聚合材料或二氧化硅包裹荧光物质的微球,其表面连接有活性基团。

2. 如权利要求1所述的装置,其特征在于还包括底卡和面卡,免疫层析试纸条固定在底卡上,试纸条表面用面卡压紧;所述面卡上预留有加样孔和观察窗,加样孔的位置与试纸条的样本垫对应,观察窗的位置与试纸条的NC膜对应,所述底卡和面卡为塑料卡。

3. 如权利要求1所述的装置,其特征在于所述聚合材料为聚苯乙烯、聚乙烯和聚氯乙烯,所述的活性基团为 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{SH}$,所述荧光物质为菲咯啉联钋有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、荧光烷衍生物类、1,8-萘二酰亚胺类、香豆素类有机荧光染料或其掺杂物或量子点;所述牛乳过敏原用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2的磷酸盐缓冲液调节至包被物浓度为 1.0 mg/mL ,喷膜量为 $0.80 \mu\text{L/cm}$;所述羊抗兔IgG用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2的磷酸盐缓冲液调节至包被物浓度为 1.0 mg/mL ,喷膜量为 $0.80 \mu\text{L/cm}$ 。

4. 权利要求1所述的装置的制备方法,其特征在于包括如下步骤:(1) NC膜上检测区和质控区的制备;(2) 荧光微球垫的制备;(3) 装置组装;所述的NC膜上检测区和质控区的制备,包括所述NC膜的检测区喷涂牛乳过敏原,牛乳过敏原用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2的磷酸盐缓冲液调节至包被物浓度为 1 mg/mL ,喷膜量为 $0.8 \mu\text{L/cm}$;所述NC膜的质控区上喷涂羊抗兔IgG,羊抗兔IgG用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2的磷酸盐缓冲液调节至包被物浓度为 1 mg/mL ,喷膜量为 $0.8 \mu\text{L/cm}$;所述的荧光微球垫的制备,包括如下的步骤:(1) 荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体的制备(2) 将荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体喷涂在玻璃纤维膜上制备荧光微球垫;所述的装置组装为在粘性底板上依次搭接滤纸、样本垫、有荧光微球垫的玻璃纤维膜、固定有检测区和质控区的NC膜、吸水纸制成免疫层析试纸条,并剪成合适大小。

5. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在于所述检测区和质控区的制备方法如下:用BIODOT Dispensing System将牛乳过敏原和羊抗兔IgG包被到NC膜上:分别用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2的磷酸盐缓冲液调节包被物浓度为 1 mg/mL ,喷膜量为 $0.8 \mu\text{L/cm}$,检测区上喷涂牛乳过敏原,质控区上喷涂羊抗兔IgG,两区相隔 5 mm ; 37°C 烘干处理过夜后,室温干燥的环境下保存备用。

6. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在于荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体制备方法如下:取微球在 $1000 \times g$ 离心 $10 \sim 15 \text{ min}$,离心后收集沉淀,用 0.01 M pH 4.8的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $\text{OD}_{450}=0.2$,然后分别加入 $20 \sim 100 \text{ mg/mL}$ 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺EDC,和 $2 \sim 20 \text{ mg/mL}$ N-羟基丁二酰亚胺NHS,振荡混匀,室温孵育 $10 \sim 30 \text{ min}$ 后, $1000 \times g$ 离心 $5 \sim 15 \text{ min}$,沉淀用 0.01 M pH 4.8的硼酸盐缓冲液溶解,并调节微球浓度为 OD_{450} 为 $0.2 \sim 1.0$, 1 mL 该荧光微球中加入 $0.1 \sim 100 \mu\text{g}$ 的牛乳过敏原多克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应 $1 \sim 4 \text{ h}$;超纯水离心洗涤 $2 \sim 5$ 次,沉淀用 0.01 M pH 7.2的磷酸盐缓冲液复溶沉淀至起始体积;用BIODOT Dispensing System将标记好的荧光

微球喷涂至玻璃纤维膜上,25℃真空干燥 1 ~ 2 h,置于室温干燥的环境下备用。

7. 用权利要求 1~4 任一所述装置定性检测牛乳过敏原的方法,其特征在于包括如下步骤:a. 在装置的加样孔上滴加待测样本,反应 10 min 后,将检测装置放入荧光分析仪检测窗口;b. 荧光微球在灯源激发下,发出强烈的荧光;c. 当样本中不含有被检测牛乳过敏原时,观察窗内只出现两条荧光条带,即检测区和质控区分别有一条荧光带,则检测样本为阴性;当待测样本中含有过量的被检测牛乳过敏原时,观察窗内只出现一条荧光条带,即检测区无荧光条带,质控区有一条荧光带,则检测样本即为阳性。

8. 用权利要求 1~3 任一所述装置定量检测牛乳过敏原的方法,其特征在于包括如下步骤:在装置加样孔上加入待测样本,反应 10 min 后,将检测装置放入荧光分析仪检测窗口;截留在检测区和质控区的荧光微球在灯源激发下,发出强烈的荧光条带;发射的荧光经 CCD 扫描系统汇聚后,经过光电聚集管,送入光电倍增管,光信号得到增强,再经过信号转换元件,软件处理后,荧光的强弱以数值的高低在显示器上显示;以不同已知浓度的待测牛乳过敏原作检测,获得一系列数值后,绘制待检测牛乳过敏原浓度与荧光强弱数值关系的标准曲线;根据检测样本的显示数值,以及上述标准曲线得出检测样本中牛乳过敏原的浓度。

一种快速检测食品中牛乳过敏原的装置及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全中食品中牛乳过敏原的检测领域,具体涉及一种定性和定量快速地检测食品中牛乳过敏原的荧光微球标记的装置及其制备方法。

背景技术

[0002] 近年来,随着人们的生活水平日渐提高,食品的安全问题越来越突出,包括食物过敏等。食物过敏是指机体对食品中的某种物质或成分产生的一种变态反应,是一种由 IgE 介导和非 IgE 介导的超敏反应,可引起皮肤、肠胃道、呼吸系统的反应,严重时甚至会导致系统过敏反应或休克。

[0003] 牛乳制品是一种营养丰富的蛋白制品,同时也是常见的八大过敏物质之一,其致敏性严重影响了婴幼儿的身体健康。根据修订后的 2007/68/EC,欧盟法规规定在食品的生产加工过程中,无论是可致敏的原料或添加剂,必须在食品标签上明确标出这些物质的成分。据调查,在发达国家中,牛乳过敏占过敏事件的 3%~7.5%,严重影响了婴幼儿的健康,部分甚至导致儿童死亡。而目前,对于食物过敏的最好最直接的办法是严格避免食用含过敏原的食物,但在食品的加工生产过程中,会掺杂着少量潜在的致敏物质,所以,人们亟需研究出能够快速检测食物中致敏物质的方法,达到预防的目的。

[0004] 目前,有关过敏原的检测手段包括主要包括基于免疫学的方法、聚合酶链式反应技术、毛细管电泳分析、色谱法、质谱法等,这些检测手法都比较繁琐,且需要一定的设备仪器和专业人才,不适用于食品的快速检测判断。随着新技术的开发应用,过敏原的检测逐渐向高灵敏度、简便快速、准确性高方向发展。

[0005] 这种装置是建立在免疫层析技术的基础上的一种独特的免疫分析方式,它通常以条状纤维层析材料为固相,通过虹吸作用原理使样品溶液在层析条上扩散,并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体发生高特异高亲和性的免疫反应,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域,通过酶反应或直接运用可目测的标记物而得到直观的实验结果。而游离标记物则越过检测带,达到与结合标记物自动分离之目的。这种技术目前常见的标记粒子包括胶体金,乳胶,胶体硒、明胶等,其中运用最多和成熟的是胶体金。

[0006] 但是,胶体金标记的装置存在以下缺陷:

(1) 胶体金标记过程是静电吸附过程,是一种物理吸附,故在液相中稳定性较差,往往造成已标记上的蛋白分子又再次脱落。

[0007] (2) 结果通过显示单一的紫红色条带来判断,颜色单一,难以实现多检和联检。

[0008] (3) 只有当金颗粒集聚到一定量时,人肉眼才能观察到紫红的条带,且该颜色条带与背景对比度不大,从而限制了检测灵敏度。

[0009] (4) 不同的材料基质效应明显,背景干扰非常大。

[0010] (5) 检测灵敏度较低。

[0011] (6) 无法实现准确定量检测。

[0012] 目前也出现了利用彩色乳胶等标记的检测方法,但是这些方法并不能完全实现对检测物的定量检测。

[0013] 专利 200910085054.1 公开了一种采用荧光微球免疫层析检测卡来同时检测氯胺酮与甲基苯丙胺,反应灵敏度较胶体金法有很大提高,快速方便。

[0014] 专利 200910117820.8 公开了一种荧光微球免疫层析试纸条,改进荧光微球的制备方法来实现对样品进行定性和定量检测。

[0015] 但是牛乳过敏原用常规的荧光微球免疫层析方法来定量检测仍然难以达到灵敏度、检测稳定性方面的要求。

发明内容

[0016] 本发明针对上述现有技术的缺陷,提供一种针对牛乳过敏原的荧光微球免疫层析装置,简单快速、在定量检测牛乳过敏原时具有灵敏度高、稳定性高的优点。本发明的另一个目的是提供上述装置的制备方法。

[0017] 一种快速检测食品中牛乳过敏原的装置,包括用于检测牛乳过敏原的免疫层析试纸条;所述免疫层析试纸条为粘性底板上依次搭接滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、NC 膜和吸水纸;所述玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体;所述 NC 膜的检测区喷涂牛乳过敏原;所述 NC 膜的质控区上喷涂羊抗兔 IgG;所述所述荧光微球是直径为 $0.01 \sim 10 \mu\text{m}$ 的用聚合材料或二氧化硅包裹荧光物质的微球,其表面连接有活性基团。

[0018] 所述的装置,还包括底卡和面卡,免疫层析试纸条固定在底卡上,试纸条表面用面卡压紧;所述面卡上预留有加样孔和观察窗,加样孔的位置与试纸条的样本垫对应,观察窗的位置与试纸条的 NC 膜对应,所述底卡和面卡为塑料卡。

[0019] 所述聚合材料为聚苯乙烯、聚乙烯和聚氯乙烯,所述的活性基团为一 CHO、-COOH、-OH、-NH₂ 或 -SH,所述荧光物质为菲咯啉联钋有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、荧光烷衍生物类、1,8-萘二酰亚胺类、香豆素类有机荧光染料或其掺杂物或量子点。

[0020] 所述牛乳过敏原用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2 的磷酸盐缓冲液调节至包被物浓度为 1.0 mg/mL ,喷膜量为 $0.80 \mu\text{L/cm}$;所述羊抗兔 IgG 用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2 的磷酸盐缓冲液调节至包被物浓度为 1.0 mg/mL ,喷膜量为 $0.80 \mu\text{L/cm}$ 。

[0021] 前述述的装置的制备方法,包括如下步骤:(1) NC 膜上检测区和质控区的制备;(2) 荧光微球垫的制备;(3) 装置组装;所述的 NC 膜上检测区和质控区的制备,包括所述 NC 膜的检测区喷涂牛乳过敏原,牛乳过敏原用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2 的磷酸盐缓冲液调节至包被物浓度为 1.0 mg/mL ,喷膜量为 $0.8 \mu\text{L/cm}$;所述 NC 膜的质控区上喷涂羊抗兔 IgG,羊抗兔 IgG 用 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ pH 7.2 的磷酸盐缓冲液调节至包被物浓度为 1.0 mg/mL ,喷膜量为 $0.8 \mu\text{L/cm}$;所述的荧光微球垫的制备,包括如下的步骤:(1) 荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体的制备(2) 将荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体喷涂在玻璃纤维膜上制备荧光微球垫。所述的装置组装为在粘性底板上依次搭接滤纸、样本垫、有荧光微球垫的玻璃纤维膜、固定有检测区和质控区的 NC 膜、吸水纸制成免疫层析试纸条,并剪成合适大小;

所述检测区和质控区的制备方法如下：用BIODOT Dispensing System将牛乳过敏原和羊抗兔 IgG 包被到 NC 膜上：分别用 0.01 ~ 0.1 M pH 7.2 的磷酸盐缓冲液调节包被物浓度为 1.0 mg/mL，喷膜量为 0.8 μ L/cm，检测区上喷涂牛乳过敏原，质控区上喷涂羊抗兔 IgG，两区相隔 5 mm；37℃烘干处理过夜后，室温干燥的环境下保存备用。

[0022] 如权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体制备方法如下：取微球在 1000×g 离心 10 ~ 15 min，离心后收集沉淀，用 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 OD₄₅₀=0.2，然后分别加入 20 ~ 100 mg/mL 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 EDC，和 2 ~ 20 mg/mL N-羟基丁二酰亚胺 NHS，振荡混匀，室温孵育 10 ~ 30 min 后，1000×g 离心 5 ~ 15 min，沉淀用 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液溶解，并调节微球浓度为 OD₄₅₀ 为 0.2-1.0，1 mL 该荧光微球中加入 100 μ g 的牛乳过敏原多克隆抗体，充分混合后，室温搅拌反应 3 h；超纯水离心洗涤 2 ~ 5 次，沉淀用 0.01 M pH 7.2 的磷酸盐缓冲液复溶沉淀至起始体积；用BIODOT Dispensing System将标记好的荧光微球喷涂至玻璃纤维膜上，25℃真空干燥 1 ~ 2 h，置于室温干燥的环境下备用。

[0023] 前述装置定性检测牛乳过敏原的方法，包括如下步骤：a. 在装置的加样孔上滴加待测样本，反应 10 min 后，将检测装置放入荧光分析仪检测窗口；b. 荧光微球在灯源激发下，发出强烈的荧光；c. 当样本中不含有被检测牛乳过敏原时，观察窗内只出现两条荧光条带，即检测区和质控区分别有一条荧光带，则检测样本为阴性；当待测样本中含有过量的被检测牛乳过敏原时，观察窗内只出现一条荧光条带，即检测区无荧光条带，质控区有一条荧光带，则检测样本即为阳性。

[0024] 前述装置定量检测牛乳过敏原的方法，其特征在于包括如下步骤：在装置加样孔上加入待测样本，反应 10 min 后，将检测装置放入荧光分析仪检测窗口；截留在检测区和质控区的荧光微球在灯源激发下，发出强烈的荧光条带；发射的荧光经 CCD 扫描系统汇聚后，经过光电聚集管，送入光电倍增管，光信号得到增强，再经过信号转换元件，软件处理后，荧光的强弱以数值的高低在显示器上显示；以不同已知浓度的待测牛乳过敏原作检测，获得一系列数值后，绘制待检测牛乳过敏原浓度与荧光强弱数值关系的标准曲线；根据检测样本的显示数值，以及上述标准曲线得出检测样本中牛乳过敏原的浓度。

[0025] 图 2 是定性和定量检测牛乳过敏原的荧光微球标记的装置的检测原理图；

图 3 是一种简易荧光检测仪的检测原理及其结构示意图。

[0026] 本发明的有益效果是：

1) 本发明制备的荧光微球使用寿命长，易于制造，制备稳定且具有良好的单分散性，与牛乳过敏原多克隆抗体稳固结合，制备的荧光微球抗体荧光量等非常适宜于牛乳过敏原的检测。

[0027] 2) 本发明技术方案针对牛乳过敏原本身的特性，经过大量的试验得出荧光标记抗体喷涂量、质控线上羊抗兔 IgG、检测线牛乳过敏原喷涂量，能灵敏地定量检测牛乳过敏原。

[0028] 3) 本发明能够快速准确地对食品中的牛乳过敏原实现定性和定量检测。

[0029] 4) 通过 CCD 扫描技术把过滤后的发射光谱收集后，再发送到荧光分析检测仪以及经过软件处理，把荧光信号数值化，从而实现定量检测。

[0030] 5) 不同粒径和种类的量子点在相同的激发光谱下，能够发出多种颜色的条带；不同无机或者有机荧光染料按照不同比例掺混时能够发射不同的颜色，从而实现多检和联检。

附图说明

[0031] 图 1 是检测牛乳过敏原的荧光微球标记的装置的结构图；

图 2 是定性和定量检测牛乳过敏原的荧光微球标记的装置的检测原理图；

图 3 是一种简易荧光检测仪的检测原理及其结构示意图。

[0032] 如图 1 所示,该荧光微球免疫层析装置的构成为:在粘性底板 18 上,依次搭接地粘贴滤纸 11、样本垫 12、喷涂有荧光微球标记的牛乳过敏原多克隆抗体的玻璃纤维膜 13、包被有牛乳过敏原的检测区 15 和包被有羊抗兔 IgG 的质控区 16 的 NC 膜 14 和吸水纸 17。质控区距吸水纸 2 mm,质控区和检测区间隔 5 mm。

[0033] 如图 1 和 2 所示,检测原理如下:在样本垫 12 上滴加样品,检测装置放入检测窗口 41;当检测样本中不包含待检测牛乳过敏原时,待测物与标记的抗体结合,在毛细作用下,与检测线上包被的抗原发生特异性的结合,形成免疫复合物,多余的荧光标记复合物继续流动与质控线上的羊抗兔 IgG 结合,固定在质控线上,在简易荧光检测仪上可观察到,检测区和质控区能看到两条清晰的荧光条带;当检测样品中含有待检测牛乳过敏原时,待测物与标记的抗体发生特异性结合,而不与检测线上的抗原发生结合,在毛细作用下,而只与质控区 16 上的羊抗兔 IgG 特异性结合,待检样本 43 在光源 42 激发下,发射的荧光 44 通过单色光滤光片 35 过滤后,通过观察窗口 36 在质控区 16 能够观察到一条清晰的荧光条带检测区 15 无荧光条带。所以在简易荧光检测仪上观察到,检测区和质控区只能看到一条清晰的荧光条带。用荧光分析仪检测检测带与质控带的荧光强度,其中检测带的荧光强度与待测物浓度成反比。

[0034] 如图 3 所示,用荧光微球标记的装置定性检测牛乳过敏原的检测步骤如下:

[1] 在装置上加入样本,反应 10 min 后,将检测装置放入检测窗口 41;

[2] 荧光微球 43 在灯源 42 激发下,发出强烈的荧光;

[3] 当样本中不含有被检测牛乳过敏原时,观察窗内只出现两条荧光条带,即检测样本为阴性;当样本中含有过量的被检测牛乳过敏原时,观察窗内只出现一条荧光条带,检测样本即为阳性。

[0035] 如图 3 所示,用荧光微球标记的装置定量检测牛乳过敏原的检测步骤如下:

(1)在样本垫上滴加样品,反应 10 min 后,检测装置放入检测窗口 41;

(2)检测区或质控区被截留的荧光微球 43 在光源 42 激发下,发出强烈的荧光条带;

(3)发射的荧光 44 经 CCD 扫描系统 45 汇聚后,经过光电聚集管 46,送入光电倍增管 47,光信号得到增强,再经过信号转换元件 48,经过软件处理 49 后,荧光的强弱以数值的高低在数据输出 410 的显示器上显示出来;

(4)检测过程中,以不同已知浓度的被检测牛乳过敏原作检测,获得一系列数值后,绘制被检测牛乳过敏原浓度与荧光强弱数值关系的标准曲线。最后根据检测样本的数据输出 410 的数值,查标准曲线图得出检测样本中牛乳过敏原的浓度。

具体实施方式

[0036] 实施例一

一、荧光标记装置的组装;

1. NC 膜的制备：

检测区和质控区的制备：用 0.05 M pH 7.2 的 PBS (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节牛乳过敏原的浓度为 1.0 mg/mL, 所得的溶液喷涂在膜上的检测区, 用 0.01 M pH 7.2 的 PBS (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节羊抗兔 IgG 的浓度为 1.0 mg/mL, 所得的溶液喷涂在膜上的质控区, 两区的喷膜量均为 0.8 μ L/cm, 两区位置相隔 5 mm, 质控区距 NC 膜一端 2 mm, 37℃ 烘干处理过夜后, 于干燥的环境下保存备用。

[0037] 2. 荧光微球垫的制备：

荧光微球标记牛乳过敏原多克隆抗体的制备：取 1 mg 包裹有菲咯啉联苕染料的市售荧光微球 (0.01 ~ 10 μ m) (购自默克公司) 在 1000×g 离心 15 min, 离心后收集沉淀, 用 0.01M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 OD₄₅₀=0.2。然后分别加入 90 μ L 的 50 mg/mL 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 EDC, 和 150 μ L 的 5 mg/mL N-羟基丁二酰亚胺 NHS, 振荡混匀, 室温孵育 15 min 后, 1000×g 离心 15 min, 沉淀用 0.01M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 调节微球浓度 OD₄₅₀ 为 0.5。向 0.1 mL 荧光微球中加入 10 μ g 的牛乳过敏原多克隆抗体, 充分混合后, 室温搅拌反应 3 h, 超纯水离心洗涤 3 次后, 沉淀用 0.01 M pH 7.2 的 PBS (其中包含 5 % 蔗糖和 0.05 % Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 用 BIODOT Dispensing System, 按照 4 μ L/cm 的量喷涂至玻璃纤维膜 (30×0.8 cm) 上, 25℃ 真空干燥 2 h, 放于干燥环境备用。

[0038] 3. 组装装置：

在 PVC 塑料底板上依次搭接地粘贴：(1) 滤纸和样本垫, 样本垫为一种经过 5 % Tween-20 处理的玻璃纤维膜；(2) 喷涂有荧光微球标记牛乳过敏原多克隆抗体的荧光微球垫；(3) 有牛乳过敏原作为检测区和有羊抗兔 IgG 作为质控区的 NC 膜；(4) 吸水纸。切割组装好后, 放到准备好的装置盒中, 装入铝箔袋, 加入干燥剂后, 封口保存, 于室温干燥的环境下至少可保存一年。

[0039] 二、定性和定量检测食品中牛乳过敏原：

1. 定性检测：称取 2g 粉状样品 (若不是, 需要先研磨), 加入 18ml 的碳酸盐缓冲液, 涡旋 1min, 4℃ 下离心 15min, 吸取 50 μ L 上清液加入样本垫上进行检测, 十分钟后, 将检测装置放入简易荧光检测仪中检测窗口内, 荧光微球在 LED 灯源激发下, 发射特定颜色的荧光, 经过单色滤光片过滤后, 选择只能透过红色光的滤光片, 从观察窗口观察, 在简易荧光检测仪上观察到只有质控区有一条清晰的红色荧光条带。说明检测样本中含有牛乳过敏原。

[0040] 2. 定量检测：

(1) 在装置的样本垫上加入样本, 反应 10 min 后, 检测装置放入检测窗口；

(2) 荧光微球在 LED 灯源激发下, 发出强烈的荧光；

(3) 发射的荧光经 CCD 扫描系统汇聚后, 经过光电聚集管, 送入光电倍增管, 光信号得到增强, 在经过信号转换元件, 经过软件处理后, 荧光的强弱以数值的高低在数据输出 410 的显示器上显示出来。

[0041] (4) 实验过程中, 将含牛乳过敏原的标准样品配制成不同浓度, 测出其对应的荧光强度的数值, 从而根据这一系列数值与对应浓度建立一条标准曲线。样本经过前处理后, 吸取 50 μ L 悬液, 进行检测。根据实验数据绘制的标准曲线可知, 在 0.5~200ng/ml 的范围内具有很好的线性关系, 检测限值可达到 0.1ng/ml, 经过多次实验, 变异系数 CV<5%, 稳定性好。

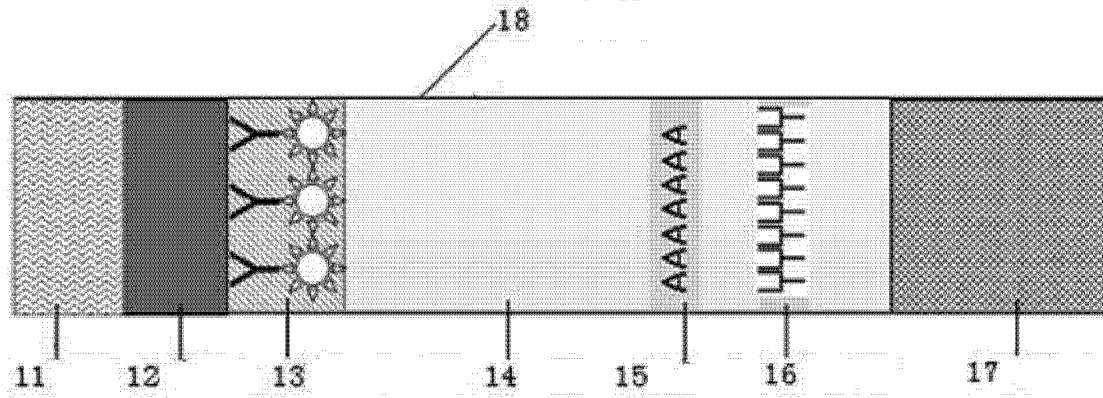


图 1

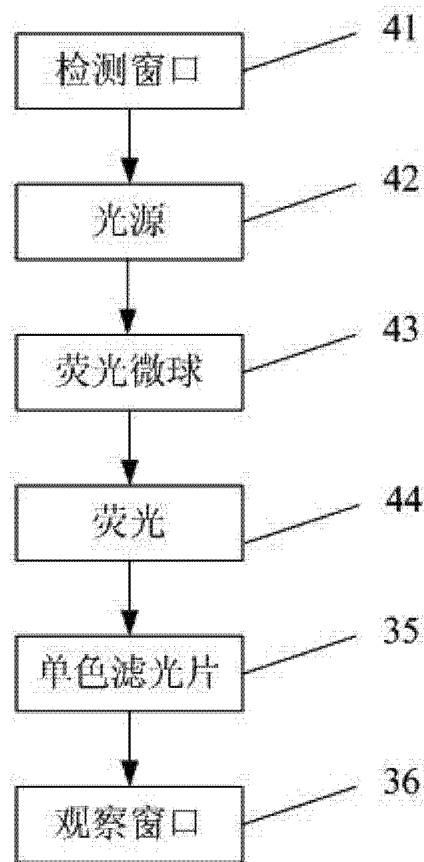


图 2

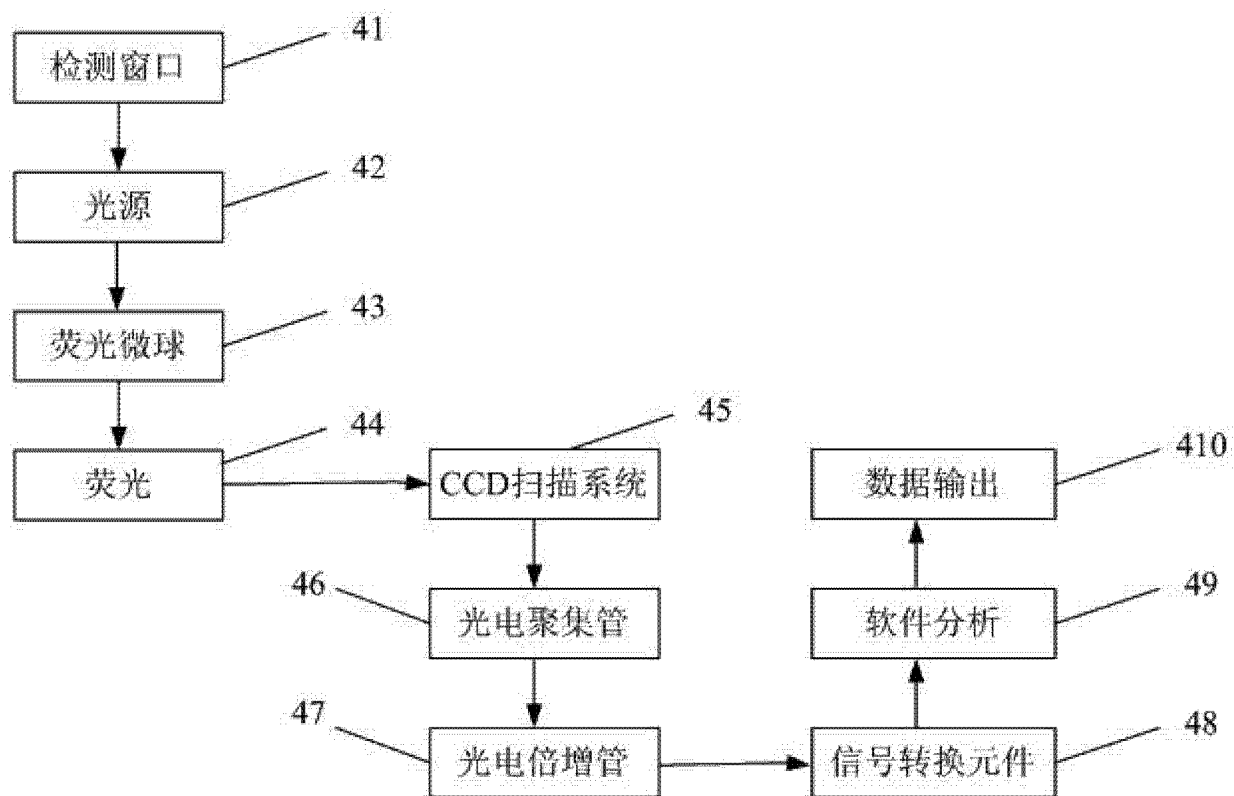


图 3

专利名称(译)	一种快速检测食品中牛乳过敏原的装置及其制备方法		
公开(公告)号	CN104101703A	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	CN201310124277.0	申请日	2013-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	赖卫华 倪小琴 刘道峰 山珊 彭涛		
发明人	赖卫华 倪小琴 刘道峰 山珊 彭涛		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/558 G01N21/6402 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速、方便、高效、定量检测食品中牛乳过敏成分的检测装置及其制备方法，属于荧光微球标记的检测技术。本发明包括标记了特殊性质的具有生物特异性的生物大分子，以具有吸附移动性的聚合材料薄膜作载体，在便携轻巧的方形设备内进行的检测。本发明的优点是利用标记物的特殊性质对食品基质中含有的微量牛乳过敏原成分进行检测。这种特殊的标记物克服了常见标记物的不稳定性，检测值低的问题。本发明主要应用于食品安全中残余牛乳致敏物的定量检测方面。

