



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111366721 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 201811586339.9

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 南京亿特生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区江宁科
学园芝兰路18号

(72)发明人 洪霞 秦悦

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种检测咖啡因残留的免疫层析试纸条的
制备与应用

(57)摘要

本发明涉及一种咖啡因超标的检测试纸及其制备。该方法在试纸的被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,适合于罐装饮料生产厂,食品卫生质检部门,个人家庭等进行咖啡因超标的快速检测。该试纸条用于检测咖啡因,具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

1. 检测咖啡因检测卡,其特征在于由包被了咖啡因单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫、包被了咖啡因蛋白质偶联物和抗第二种属动物蛋白的IgG 1 条的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水棉、PVC胶板及塑料模具组成,在PVC胶板的一端;依次粘附样品垫、结合垫,中间贴硝酸纤维素膜,另一端粘附吸水棉。

2. 根据权利要求1所述的饮料中咖啡因的试纸条,其特征在於:咖啡因检测用抗原为咖啡因与载体物质形成的偶合物。

3. 根据权利要求2所述的饮料中咖啡因的试纸条,其特征在於: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所述的饮料中咖啡因的试纸条,其特征在於:所述的抗第二种属动物蛋白的IgG 是非抗体来源动物的蛋白质。

5. 根据权利要求1所述的抗体的预处理:将要标记咖啡因单克隆抗体在1000 r/min,4℃条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS将要标记的咖啡因单克隆抗体稀释成1 mg/mL,过0.22 nm滤膜。

一种检测咖啡因残留的免疫层析试纸条的制备与应用

技术领域

[0001] 属于食品安全检测领域,具体涉及食品中有还超标物质的检测方法,特别是一种咖啡因试纸检测方法。

背景技术

[0002] 咖啡因是从茶叶、咖啡果中提炼出来的一种生物碱,适度地使用有祛除疲劳、兴奋神经的作用,临床上用于治疗神经衰弱和昏迷复苏。但是,大剂量或长期使用也会对人体造成损害,特别是它也有成瘾性,一旦停用会出现精神萎靡、浑身困乏疲软等各种戒断症状,虽然其成瘾性较弱,戒断症状也不十分严重。但由于药物的耐受性而导致用药量不断增加时,咖啡因就不仅作用于大脑皮层,还能直接兴奋延髓,引起阵发性惊厥和骨骼震颤,损害肝、胃、肾等重要内脏器官,诱发呼吸道炎症、妇女乳腺癌等疾病,甚至导致吸食者下一代智能低下,肢体畸形。因此也被列入受国家管制的精神药品范围。滥用咖啡因通常也有吸食和注射两种形式,其兴奋刺激作用及毒副反应、症状、药物依赖性与苯丙胺相近。

发明内容

[0003] 本发明的目的是为了克服现有技术的不足,提供一种特快捷简便、成本低廉、结果准确的检测方法,且操作简单方便,对样品经过简单处理即可检测的咖啡因快速试纸定量检测方法。

[0004] 本发明的目的可通过以下技术方案来实现:

咖啡因免疫层析试纸检测方法其技术要点是:试纸的被衬上依次贴有样液吸收部分和胶体金标记部分和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咖啡因检测用抗体;检测反应部分上面包被有咖啡因抗原作为检测线,同时还包被有抗同种属动物蛋白的二抗 作为参考线。在试纸制备时通过调节检测线和参考线包被物的浓度,控制检测时检测线和参考线的显色深浅,并将其显色深浅与标准物质浓度对应起来,达到半定量检测。

[0005] 所述的检测用抗原是指咖啡因与载体物质明胶形成的偶合物,免疫用抗原是指咖啡因与载体物质牛血清白蛋白(BSA)形成的偶合物。

[0006] 所述的载体物质也可以选用其他大分子物质,如:脂蛋白、多聚氨基酸、葡聚糖、卵清白蛋白等,但要求检测用抗原与免疫用抗原的载体无交叉免疫反应。

[0007] 所述的同种属动物蛋白的二抗指抗体来源属动物的蛋白,例如,抗体为兔源性,则同种属动物蛋白的二抗也是兔源性动物蛋白。

[0008] 本发明所描述的试纸的各部分处理与功能如下:

被衬:为一面涂有不干胶的不吸水的韧性材料,如PVC板,起固定支持试纸其他组成部分的作用。

[0009] 样液吸收部分制备:将聚酯膜或玻璃纤维纸浸入pH7.4的PBS中约2 min,取出,45℃左右烘干,即作为样液吸收部分,检测时起吸收样品溶液的作用,便于样品溶液向上移动。

[0010] 胶体金标记部分的制备:该部分起固定胶体金标记的抗原或抗体的作用。制备步骤包括胶体金溶液的制备、胶体金标记咖啡因抗原或咖啡因抗体。胶体金标记部分处理。

[0011] (1) 氯金酸水溶液的配制:将10g氯金酸用1000ml双蒸水溶解,配成1%的水溶液,置于

4℃备用,有效期为3天。

[0012] (2) 胶体金溶液的制备:用双蒸水将1%氯金酸稀释成0.01%,置电炉煮沸,按每100ml 0.01%氯金酸加入4ml 1%柠檬酸三纳,继续煮沸,直到液体呈亮红色即停止加热,冷却至室温后补足失水。外观应纯净,透亮,无沉淀和漂浮物。

[0013] (3) 金标抗体保存液的配置:将10g BSA, 5g脱脂奶粉、0.5g NaN₃和1ml Tween-20在1000ml 0.01M, pH7.0的PBS中溶解,用0.22μ膜滤过,置于40℃备用,有效期为15天。

[0014] (4) 胶体金标记咖啡因抗体:用0.1M碳酸钾水溶液调胶体金pH值至7.6,按20μg抗体

/ml胶体金加入抗咖啡因的单克隆抗体,混匀,静置30分钟,以12000rpm离心30分钟,弃去上清液,沉淀用标记洗涤液洗涤两次,最后一次弃去上清液,将沉淀用十分之一初始胶体金体积的金标抗体保存液溶解,置于4℃备用,有效期为7天,产物作为金标咖啡因抗体。

[0015] (5) 胶体金标记部分处理:将稀释后的金标咖啡因抗原或金标咖啡因抗体倒入一槽中,将玻璃纤维或滤纸浸入1min,取出,37℃干燥后,即作为胶体金标记部分。

[0016] 检测反应部分制备:用0.8%的戊二醛溶液或0.2%的碳二亚胺溶液浸泡硝酸纤维素膜30min,取出,37℃烘干,上边包被1条不同浓度的咖啡因检测用抗原线或咖啡因抗体线作为检测线,同时包被1条抗同种属动物蛋白的二抗线作为参考线。当胶体金标记部分标记对象为咖啡因检测用抗原时,检测线则包被咖啡因抗体。此即为检测反应部分,该部分主要作用是将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0017] 吸水部分制备:将玻璃纤维纸或滤纸或吸水纸室温干燥后,即作为吸水部分。该部分主要作用在于将移动上来的多余的样品溶液吸收。

[0018] 试纸组装:在背衬上依次粘贴样液吸收部分、胶体金标记部分、检测反应部分和吸水部分,即成咖啡因检测试纸。

[0019] 检测原理:检测原理因胶体金标记的对象不同,而稍有差异。

[0020] 由于胶体金标记部分标记对象为咖啡因抗体,所以样品中若含有咖啡因,样品溶液被试纸的样液吸收部分吸收并通过毛细作用上移到达胶体金标记部分,样品溶液中的咖啡因与胶体金标记的咖啡因抗体反应形成结合物,结合物继续上移到检测线,因胶体金标记的咖啡因抗体只有特定的结合位点,样品溶液中的咖啡因与之结合后,检测线上的检测用抗原就不能再与胶体金标记的咖啡因抗体结合,于是检测线无色,此即为阳性;当样品中没有咖啡因时,胶体金标记的咖啡因抗体到达检测线时被检测用抗原捕获,则形成肉眼可见的红色。无论样品中是否含有咖啡因,胶体金标记的咖啡因抗体和其中的杂蛋白上移到达参考线时都可被参考线上包被的抗同种属动物蛋白的二抗捕获形成肉眼可见的红色,此即为参考线。

[0021] 在试纸制备时通过调节检测线和参考线包被物浓度,从而控制检测时检测线和参考线的显色深浅,并将其显色深浅与标准物质浓度对应起来,即可达到半定量检测目的。

附图说明

[0022] 图1是咖啡因检测卡检测试纸条结构示意图。

具体实施方式

[0023] 底衬1、样品垫2和吸水纸5是本领域通用的部件。将上述硝酸纤维素膜4、覆金标抗体的玻璃纤维膜3、底衬1、样品垫2和吸水纸5依次粘贴起来,得到试纸板,最后将该试纸板切割成不同宽度的试纸条即可。

[0024] 上述的胶体金试纸条在检测咖啡因中的应用

本试纸条可以用来检测饮料、食品中含有咖啡因的液体样品,操作时,把待检测的样品液(药物的抽提液稀释后,直接用于检测)直接滴加在本试纸条的样品垫2上,由于虹作用原理,带动待检测的样品液及胶体金膜3所含的咖啡因单克隆抗体胶体金标记物一起向硝酸纤维素膜4扩散,5-10分钟内观察结果。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,在测试线上与含有咖啡因蛋白质偶联物,以及参照线含第二种属动物蛋白的IgG反应,形成紫红色条带。若样品中相应的待测咖啡因高于允许值,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咖啡因蛋白质偶联物反应,从而不显色。

[0025] 出现的结果为一下三种结果:

1. 在试纸条的咖啡因的抗体的检测线6和控制线7位置上各出现一条紫红色条带时,结果为阳性结果;

2. 仅试纸条的控制线7位置上出现一条紫红色条带时,为阴性结果;

3. 在试纸条的控制线8位置上未出现紫红色条带时为无效结果;

以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非是对本发明作其它形式的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。

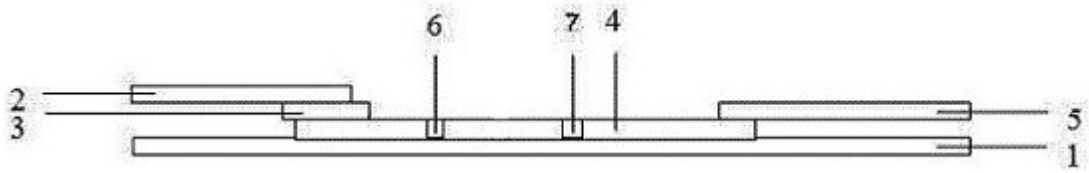


图1

专利名称(译)	一种检测咖啡因残留的免疫层析试纸条的制备与应用		
公开(公告)号	CN111366721A	公开(公告)日	2020-07-03
申请号	CN201811586339.9	申请日	2018-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
[标]发明人	洪霞 秦悦		
发明人	洪霞 秦悦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种咖啡因超标的检测试纸及其制备。该方法在试纸的被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，适合于罐装饮料生产厂，食品卫生质检部门，个人家庭等进行咖啡因超标的快速检测。该试纸条用于检测咖啡因，具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

