



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102317780 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 11

(21) 申请号 201080007948. X	FERM BP-10273 2005. 02. 24
(22) 申请日 2010. 02. 23	FERM BP-10277 2005. 02. 24
(30) 优先权数据	FERM BP-10278 2005. 02. 24
2009-039881 2009. 02. 23 JP	FERM BP-10279 2005. 02. 24
2009-079540 2009. 03. 27 JP	FERM BP-11238 2006. 02. 02
(85) PCT申请进入国家阶段日	FERM BP-11237 2006. 02. 02
2011. 08. 16	FERM BP-11236 2005. 09. 06
(86) PCT申请的申请数据	FERM BP-11235 2005. 09. 06
PCT/JP2010/001209 2010. 02. 23	FERM BP-11240 2006. 07. 20
(87) PCT申请的公布数据	(71) 申请人 普利玛食品株式会社
W02010/095469 JA 2010. 08. 26	地址 日本东京都
(83) 生物保藏信息	(72) 发明人 加藤重城 秋元政信
FERM BP-11239 2006. 07. 20	(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
FERM BP-10280 2005. 02. 24	司 72001
FERM BP-11241 2008. 09. 22	代理人 庞立志 郭文洁
FERM BP-10263 2004. 09. 07	(51) Int. Cl.
FERM BP-10264 2004. 09. 07	G01N 33/53(2006. 01)
FERM BP-10267 2004. 09. 07	G01N 33/543(2006. 01)
FERM BP-10268 2004. 09. 07	

权利要求书 1 页 说明书 18 页

(54) 发明名称

利用免疫层析法的变应原检测方法

(57) 摘要

可从含有各变应原的食品等被测试样中高效地提取各变应原,且由于不使用还原剂而消除伴随着结合于抗体的胶体金的崩解的非特异性反应,从而迅速且精度良好地检测变应原。使用将胶体金结合于抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的胶体金标记抗体、固定有与上述胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的单克隆抗体的展开支持体、使用 SDS 等阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或 SDS 等阴离子型表面活性剂和 Tween20 等非离子型表面活性剂而从被测试样中提取出的变应原的测定样品、和展开液,将展开液在展开支持体上展开后,根据有无胶体金的聚集来检测变应原的免疫层析法,其中,使用含有 FBS 至少 10% 的展开液。

CN 102317780 A

1. 利用免疫层析法的变应原的检测方法,其为使用将胶体金结合于抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的胶体金标记抗体、在规定位置固定有与上述胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的展开支持体、和含有使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂而从含有变应原的食品等被测试样中提取的变性和未变性的变应原的测定样品的展开液,在展开支持体上展开,然后根据有无胶体金的聚集来检测变应原的免疫层析法,其特征在于,使用含有胎牛血清(FBS)至少 10 重量%的展开液。

2. 权利要求 1 所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,使用含有胎牛血清(FBS)至少 30 重量%的展开液。

3. 权利要求 2 所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,使用含有胎牛血清(FBS)至少 50 重量%的展开液。

4. 权利要求 1~3 中任一项所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体为特异性地识别选自作为乳变应原的主要成分的  $\alpha$  s1 酪蛋白、作为乳清变应原的主要成分的  $\beta$  乳球蛋白、作为卵白变应原的卵白蛋白和卵类粘蛋白、作为小麦变应原的主要成分的麸蛋白、作为荞麦的主要蛋白质的分子量 24kDa 和 76kDa 的蛋白质、作为花生的主要蛋白质的 Arah1 中的变性和未变性的变应原的 2 种单克隆抗体。

5. 权利要求 1~4 中任一项所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,使用十二烷基硫酸钠作为阴离子型表面活性剂。

6. 权利要求 1~5 中任一项所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,使用 Tween20 作为非离子型表面活性剂。

7. 免疫层析用变应原的检测试剂盒,其特征在于,具备:担载有将胶体金结合于抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的胶体金标记抗体的胶体金标记抗体担载体、在规定位置固定有与上述胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的展开支持体、含有用于从含有变应原的食品等被测试样中提取变性和未变性的变应原的阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的缓冲液、可担载使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂而从含有变应原的食品等被测试样中提取的变性和未变性的变应原的测定样品的样品用载体、以及胎牛血清(FBS)或含有胎牛血清(FBS)的展开液。

8. 权利要求 7 所述的免疫层析用变应原的检测试剂盒,其特征在于,抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体为特异性地识别选自作为乳变应原的主要成分的  $\alpha$  s1 酪蛋白、作为乳清变应原的主要成分的  $\beta$  乳球蛋白、作为卵白变应原的卵白蛋白和卵类粘蛋白、作为小麦变应原的主要成分的麸蛋白、作为荞麦的主要蛋白质的分子量 24kDa 和 76kDa 的蛋白质、作为花生的主要蛋白质的 Arah1 中的变性和未变性的变应原的 2 种单克隆抗体。

9. 权利要求 7 或 8 所述的免疫层析用变应原的检测试剂盒,其特征在于,含有十二烷基硫酸钠作为阴离子型表面活性剂。

## 利用免疫层析法的变应原检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及利用免疫层析法的变应原的检测方法和可在其中使用的免疫层析用变应原的检测试剂盒,所述方法中,使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐从含有各种变应原的食品等被测试样中提取各变应原,不论是各变应原为变性 / 未变性的哪一状态,都可用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂高效地提取,此外,可抑制伴随着结合于抗体的胶体金的崩解的非特异性反应、而迅速地进行检测。

### 背景技术

[0002] 由于自然环境的减少、从车辆和工厂等排放的废气、居住情况等、或食物的变化等各种因素,现今,据说 3 人中就有 1 人患有某种过敏疾病。尤其是,食物过敏是食品中含有的过敏诱发物质(下面称为食物变应原)的摄取所引起的有害免疫反应,引起皮炎、哮喘、胃肠道紊乱、过敏性休克等,随着这种食物变应原性患者的增加,在医学上和食品工业上产生深刻的问题。这些危害有时导致死亡,故需要在其发生前实施处置。因此,通过标示(indication)来向消费者提供信息的必要性提高,FAO/WHO 联合食品标准委员会,针对含有已知为过敏物质的 8 种原材料的食品,就含有其的要旨的标示达成一致,认为成员国应探讨适于各国制度的标示方法(1999 年 6 月)。在日本,考虑到过去的健康危害等的程度、频率而对引起过重变态反应症状的 24 种食品规定了其标示方法(2002 年 4 月起施行)。作为引起变态反应的食品,已知有蛋类、乳类、肉类、鱼类、甲壳类和软体动物类、谷类、豆类和坚果类、果实类、蔬菜类、啤酒酵母或明胶等。

[0003] 为了迅速简便地检测上述变应原,作为利用依赖于抗原 - 抗体的特异性反应检测由特定的抗原或抗体构成的被检测物质的免疫测定法,通过免疫反应使样品中的被检测物质与对微粒敏感的抗体或抗原结合,测定由于结合而产生的微粒的凝集状态的凝集法是简便的免疫测定法,尤其是从可以目视判断这点考虑,是通常使用的方法。

[0004] 此外,利用免疫反应使试样中的被检测物质与由包括放射性同位素、酶或荧光物质的标记物质标记的抗体或抗原结合,测定该结合的标记物质的放射免疫测定法、酶免疫测定法或荧光免疫测定法也正在被采用。在这些免疫测定法中,竞争型反应、夹心型反应正在被广泛使用。其中,作为所谓的夹心型反应的测定法,已知有免疫层析法(例如,参照专利文献 1),除了归因于抗原抗体反应的高特异性之外,以简便、迅速为特征的各种变应原检测试剂盒正在被销售。

[0005] 作为适用于所述免疫层析法的试样,有生物试样和来自食品的提取物等,但是根据试样的种类不同,有时尽管不存在标本(specimen),也会发生在捕获部位呈现淡显色的所谓非特异性反应,有时导致检测的准确性的降低。因此,提出了防止测定时的非特异性凝集和非特异性反应,因而可高准确度地进行测定的展开溶剂,其特征在于,在缓冲液中以 0.005~0.3w/v% 的浓度含有具有磷酸胆碱基团的聚合物且该聚合物的数均分子量为 40,000 以上(例如,参照专利文献 2)。

[0006] 此外,在上述免疫测定法中,在由于对蛋白质加热或加压等而发生变性等时,确认到测定结果变低或不能测定的情形。作为特定原材料的检测方法,在由厚生劳动省发出的食安发第 0122001 号中刊载的夹心 ELISA 法中,为了充分地加热过的被测试样中提取各变应原,利用使用了变性剂和还原剂(2-巯基乙醇)的提取溶液进行提取的方法正在被采用。其应用了传统上一一直使用的蛋白质的分析中使用的 SDS-聚丙烯酰胺电泳法的样品制备方法,认为变性剂和还原剂对于提高各变应原从被测试样的提取效率是必不可少的。此外,当将其应用于免疫层析法时,因为可观察到很多非特异性反应,所以不能正确检测,在测定变性蛋白质时成为问题。

[0007] 本申请人提出了利用使用了变性剂和还原剂的提取溶液进行提取,即使在应用于免疫层析法时,也可抑制伴随着胶体金的崩解的非特异性反应,而迅速且精度良好地检测变应原的免疫层析法(例如,参照专利文献 3 参照)。该方法中,可充分地加热过的被测试样中提取各变应原,而且可利用简便的免疫层析法检测,因此可飞跃性地提升精度和简便性。但是,使用的还原剂(2-巯基乙醇)有特殊的气味,并且 2-巯基乙醇从 2008 年 7 月 1 日起被指定为有毒物质,因此,在食品制造工厂等中的简便的使用变得困难。因此,期求更安全有效的提取方法,和在将其应用于免疫层析法时观察不到非特异性反应而可正确地检测的免疫层析法。

[0008] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1:日本特开平 5-010950 号公报

专利文献 2:日本特开 2003-344406 号公报

专利文献 3:日本特开 2007-278773 号公报。

## 发明内容

[0009] 发明要解决的课题

本发明的课题在于提供利用免疫层析法的变应原的检测方法和可在其中使用的免疫层析用变应原的检测试剂盒,该方法中,使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂而从含有各变应原的食品等被测试样中提取各变应原,不论是各变应原为变性/未变性的哪一状态,都可用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂高效地提取,而且可抑制伴随着结合于抗体的胶体金的崩解的非特异性反应、而迅速且精度良好地检测变应原。

[0010] 解决课题的手段

本发明人等发现,在不使用曾被认为是从加热过的被测试样中充分地提取各变应原所必不可少的 2-巯基乙醇的情况下,不论是各变应原为变性/未变性的哪一状态,都可使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂高效地提取以及简便地检测的免疫层析法中,若使用含有胎牛血清(FBS:fetal bovine serum)的展开液,则可解决上述课题,从而完成了本发明。

[0011] 即,本发明涉及:(1)利用免疫层析法的变应原的检测方法,其为使用将胶体金结合于抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的胶体金标记抗体、在规定位置固定有与上述胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的展开

支持体、和含有使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂而从含有变应原的食品等被测试样中提取的变性和未变性的变应原的测定样品的展开液,在展开支持体上展开,然后根据有无胶体金的聚集来检测变应原的免疫层析法,其特征在于,使用含有胎牛血清(FBS)至少 10 重量%的展开液;(2)上述(1)所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,使用含有胎牛血清(FBS)至少 30 重量%的展开液;(3)上述(2)所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,使用含有胎牛血清(FBS)至少 50 重量%的展开液;(4)上述(1)~(3)中任一项所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体为特异性地识别选自作为乳变应原的主要成分的  $\alpha$  s1 酪蛋白、作为乳清变应原的主要成分的  $\beta$  乳球蛋白、作为卵白(egg white)变应原的卵白蛋白和卵类粘蛋白、作为小麦变应原的主要成分的麸蛋白、作为荞麦的主要蛋白质的分子量 24kDa 和 76kDa 的蛋白质、作为花生的主要蛋白质的 Arah1 中的变性和未变性的变应原的 2 种单克隆抗体;(5)上述(1)~(4)中任一项所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,使用十二烷基硫酸钠作为阴离子型表面活性剂;(6)上述(1)~(5)中任一项所述的利用免疫层析法的变应原的检测方法,其特征在于,使用 Tween20 作为非离子型表面活性剂。

[0012] 此外,本发明涉及(7)免疫层析用变应原的检测试剂盒,其特征在于,具备:担载有将胶体金结合于抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的胶体金标记抗体的胶体金标记抗体担载体、在规定位置固定有与上述胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的展开支持体、含有用于从含有变应原的食品等被测试样中提取变性和未变性的变应原的阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的缓冲液、可担载使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂而从含有变应原的食品等被测试样中提取的变性和未变性的变应原的测定样品的样品用载体、和胎牛血清(FBS)或含有胎牛血清(FBS)的展开液;(8)上述(7)所述的免疫层析用变应原的检测试剂盒,其特征在于,抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体为特异性地识别选自作为乳变应原的主要成分的  $\alpha$  s1 酪蛋白、作为乳清变应原的主要成分的  $\beta$  乳球蛋白、作为卵白变应原的卵白蛋白和卵类粘蛋白、作为小麦变应原的主要成分的麸蛋白、作为荞麦的主要蛋白质的分子量 24kDa 和 76kDa 的蛋白质、作为花生的主要蛋白质的 Arah1 中的变性和未变性的变应原的 2 种单克隆抗体;(9)上述(7)或(8)所述的免疫层析用变应原的检测试剂盒,其特征在于,含有十二烷基硫酸钠作为阴离子型表面活性剂。

#### [0013] 发明效果

根据本发明的利用免疫层析法的变应原的检测方法,即使在使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂时,也可抑制伴随着结合于抗体的胶体金的崩解的非特异性反应,可迅速且精度良好地检测各种变应原。

#### 具体实施方式

[0014] 作为本发明的利用免疫层析法的变应原的检测方法,只要是在使用将胶体金结合于抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的胶体金标记抗体、在规定位置固定有与上述胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的展开支

持体、和含有使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂而从含有变应原的食品等被测试样中提取的变性和未变性的变应原的测定样品的展开液,在展开支持体上展开,然后根据有无胶体金的聚集来检测变应原的免疫层析法中,使用含有胎牛血清(FBS)至少 10 重量%的展开液的方法,就没有特别限制,但优选使用含有胎牛血清(FBS) 20~100 重量%的展开液,更优选使用含有 30~100 重量%的展开液,特别优选使用含有 40~100 重量%的展开液,更进一步优选使用含有 50~100 重量%的展开液。

[0015] 作为本发明的免疫层析用变应原的检测试剂盒,只要是具备: 担载有将胶体金结合于抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的胶体金标记抗体的胶体金标记抗体担载体、在规定位置固定有与上述胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的展开支持体、含有用于从含有变应原的食品等被测试样中提取变性和未变性的变应原的阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的缓冲液、可担载使用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂而从含有变应原的食品等被测试样中提取的变性和未变性的变应原的测定样品的样品用载体、和胎牛血清(FBS) 或含有胎牛血清(FBS) 的展开液的检测试剂盒,就没有特别限制,但期待其为具备含有胎牛血清(FBS) 至少 10 重量%的展开液、优选含有至少 20 重量%的展开液、更优选含有至少 30 重量%的展开液、特别优选含有至少 40 重量%的展开液、更进一步优选含有至少 50 重量%、例如含有 50~100 重量%的展开液作为上述展开液的试剂盒。

[0016] 当上述展开液中的胎牛血清(FBS) 浓度不足 10 重量%时,容易发生非特异性反应,因而不优选。此外,展开液可这样制备:除了胎牛血清(FBS) 之外,根据需要,使其它的表面活性剂、防腐剂、无机盐等各种添加剂悬浮、乳化或溶解于缓冲液中。对于缓冲液,其 pH 优选为 4~10、特别优选为 pH6~8,例如,可优选例示磷酸缓冲液(PBS) 或 Tris 缓冲液等。

[0017] 上述将胶体金结合于单克隆抗体的胶体金标记抗体的制作方法包括现有公知的方法而没有特别限制,例如,可举出这样的方法: 用 0.2M 碳酸钾溶液制备为 pH9.0 的胶体金溶液中加入在 2mM 硼酸缓冲液(pH9.0) 中溶解了单克隆抗体的溶液,在室温下进行 30 分钟反应,然后加入 10% BSA 溶液,进一步进行 15 分钟反应,离心分离。此外,上述胶体金标记抗体担载体可通过这样的方法来制备:将上述制备的胶体金标记抗体涂布在例如玻璃棉制结合垫(Conjugate pad) 上,并使其干燥。

[0018] 上述展开支持体可通过如下方法来制备:将含有与胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的缓冲液直线状地涂布于例如硝酸纤维素膜并使其干燥,然后,进行封闭处理。

[0019] 作为在提取变性和未变性的变应原来制备测定样品时使用的缓冲液中的阴离子型表面活性剂,可列举高级醇硫酸酯盐、烷基萘磺酸盐、烷基苯磺酸盐、烷基磷酸酯盐等,具体而言,可优选例示十二烷基硫酸钠(SDS)。作为硫代硫酸盐,可列举硫代硫酸钠、硫代硫酸钾、硫代硫酸铵等,具体而言,可优选例示硫代硫酸钠。作为非离子型表面活性剂,可列举聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪酸酰胺、聚氧乙烯烷基胺、失水山梨糖醇脂肪酸酯等,具体而言,可优选例示聚氧乙烯(20) 失水山梨糖醇单月桂酸酯(Tween20)。上述阴离子型表面活性剂的浓度为 0.1~2.0%、优选

为 0.25%~0.5%，硫代硫酸盐的浓度为 0.1~5.0%、优选为 0.1%~1.0%，非离子型表面活性剂的浓度为 0.01~1.0%、优选为 0.05~0.2%，若使用含有这些浓度范围的阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的缓冲液，则在提取效率高且可抑制非特异性反应方面优选。

[0020] 作为可承载上述测定样品的样品用载体，可例示玻璃棉制的样品垫。而且，通过将样品用载体、上述胶体金标记抗体担载体、上述展开支持体依次连接、优选在该展开支持体的另一端连接吸收展开液的吸收垫等吸收体，由此可制成免疫层析测定用试片。而且，若对样品用载体点样测定样品，并用含有胎牛血清的展开液浸渍，则测定样品中的变应原由于毛细管现象等而移动，与胶体金标记抗体结合，该抗原抗体复合体仍由于毛细管现象等而在展开支持体上移动，在固定有与胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的规定位置，抗原抗体复合体被捕获，根据规定位置出现的染色线的有无，可检测变应原。

[0021] 作为上述抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体，可优选例示特异性地识别选自作为乳变应原的主要成分的  $\alpha$  s1 酪蛋白、作为乳清变应原的主要成分的  $\beta$  乳球蛋白、作为卵白变应原的卵白蛋白和卵类粘蛋白、作为小麦变应原的主要成分的麸蛋白、作为荞麦的主要蛋白质的分子量 24kDa 和 76kDa 的蛋白质、作为花生的主要蛋白质的 Arah1 中的变性和未变性的变应原的 2 种单克隆抗体。

[0022] 更具体而言，本发明人等制备的、作为抗  $\alpha$  s1 酪蛋白单克隆抗体，可列举杂交瘤细胞(FERM-BP-10263)产生的抗  $\alpha$  s1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN1、杂交瘤细胞(FERM-BP-10264)产生的抗  $\alpha$  s1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN2，作为抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体，可列举杂交瘤细胞(FERM-BP-11237)产生的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 P $\beta$ LG3、杂交瘤细胞(FERM-BP-11238)产生的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 P $\beta$ LG4。杂交瘤细胞(FERM-BP-10263)、和杂交瘤细胞(FERM-BP-10264)于 2005 年 2 月 24 日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(地址：茨城县筑波市东 1-1-1 筑波中心中央第 6)，杂交瘤细胞(FERM-BP-11237)和杂交瘤细胞(FERM-BP-11238)于 2010 年 2 月 22 日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(地址：茨城县筑波市东 1-1-1 筑波中心中央第 6)。

[0023] 此外，可列举杂交瘤细胞(FERM-BP-11235)产生的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA3、杂交瘤细胞(FERM-BP-11236)产生的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA4，作为抗卵类粘蛋白单克隆抗体，可列举杂交瘤细胞(FERM-BP-10279)产生的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM1、杂交瘤细胞(FERM-BP-10280)产生的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM2、杂交瘤细胞(FERM-BP-10277)产生的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM1、杂交瘤细胞(FERM-BP-10278)产生的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM2。杂交瘤细胞(FERM-BP-11235)、和杂交瘤细胞(FERM-BP-11236)于 2010 年 2 月 22 日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(地址：茨城县筑波市东 1-1-1 筑波中心中央第 6)，杂交瘤细胞(FERM-BP-10279)、杂交瘤细胞(FERM-BP-10280)、杂交瘤细胞(FERM-BP-10277)、和杂交瘤细胞(FERM-BP-10278)于 2005 年 2 月 24 日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(地址：茨城县筑波市东 1-1-1 筑波中心中央第 6)。

[0024] 此外，作为抗小麦麸蛋白单克隆抗体，可列举杂交瘤细胞(FERM-BP-10267)产生的

抗小麦麸蛋白单克隆抗体 PGL1、杂交瘤细胞(FERM-BP-10268)产生的抗小麦麸蛋白单克隆抗体 PGL2。杂交瘤细胞(FERM-BP-10267)、和杂交瘤细胞(FERM-BP-10268)于2005年2月24日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(地址:茨城县筑波市东1-1-1筑波中心中央第6)。

[0025] 此外,作为抗荞麦蛋白单克隆抗体,可列举杂交瘤细胞(FERM-BP-11241)产生的抗24kDa蛋白质单克隆抗体PBW5、杂交瘤细胞(FERM-BP-10273)产生的抗76kDa蛋白质单克隆抗体PBW2。杂交瘤细胞(FERM-BP-11241)于2010年2月22日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(地址:茨城县筑波市东1-1-1筑波中心中央第6),杂交瘤细胞(FERM-BP-10273)于2005年2月24日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(地址:茨城县筑波市东1-1-1筑波中心中央第6)。

[0026] 作为抗花生Arah1蛋白质单克隆抗体,可列举杂交瘤细胞(FERM-BP-11240)产生的抗未变性Arah1蛋白质单克隆抗体PAh1-5、杂交瘤细胞(FERM-BP-11239)产生的抗未变性Arah1蛋白质单克隆抗体PAh1-4。杂交瘤细胞(FERM-BP-11240)、和杂交瘤细胞(FERM-BP-11239)于2010年2月22日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(地址:茨城县筑波市东1-1-1筑波中心中央第6)。

[0027] 下面,通过实施例来更具体地说明本发明,但是本发明的技术范围并不受这些例示的限制。

#### [0028] 实施例1

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐提取的卵白蛋白]

##### 1. 材料和方法

##### (1) 胶体金标记抗体的制备

用2mM硼酸缓冲液(pH9.0)来制备PDOA4(FERM-BP-11236)的MAb溶液使其为1mg/ml。向预先用0.2M碳酸钾溶液制备为pH9.0的胶体金溶液(シグマ社制)5ml中加入MAb溶液500 $\mu$ l,在室温下进行30分钟反应,然后加入10%BSA溶液635 $\mu$ l,进一步进行15分钟反应。进行离心分离,用1%BSA溶液制备成OD525 = 1.0。

##### [0029] (2) 抗体固定化膜的制备

用PBS来制备PDOA3(FERM-BP-11235)的MAb溶液使其为4mg/ml,将其直线状地涂布于硝酸纤维素膜并使其干燥。然后,用含有1%脱脂乳的TBS在37 $^{\circ}$ C下封闭1小时后,用TBS洗涤并使其干燥。

##### [0030] (3) 免疫层析条的组装

除了抗体固定化膜之外,另准备被测液点样用玻璃棉制样品垫、被测液吸收用玻璃棉制吸收垫,按照样品垫、抗体固定化膜、吸收垫的顺序分别贴合,制成免疫层析条。将下面的模型肉食制品供试于检测用样品。

##### [0031] 1) 卵蛋白的制备

穉山等按照(特定原材料(卵)测定的厚生劳动省公布ELISA法的多个机构进行的评价研究. 食品卫生学杂志,44, 2003, 213-219),由市售鸡蛋来制备卵蛋白。

##### [0032] 2) 模型肉食制品

选择肉食制品作为用于定量试验的模型食品,按照表1所示的配合来制备含有各浓度的卵蛋白的模型肉食制品。猪红肉使用从猪腰肉去除脂肪、筋膜并将其弄碎成5mm大小的

碎肉。按照各配合称量添加物,用食物处理机混合,然后将其充填至聚氯乙烯管中。

[0033] [表 1]

<模型肉食制品的配合表[卵]>

原材料	卵 1 0 p p m	卵 2 p p m	对照
猪红肉 (%)	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0
聚磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (ppm)	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300
水 (%)	14.5	14.5	14.5
卵蛋白 (ppm)	10	2	0
合计 (%)	99.744	99.7422	99.742

### 3) 加热温度·时间

对于加热,准备在 75℃ 加热 30 分钟的混合物。加热后,用食物处理机混合均匀,将所得物作为检测用样品。

### [0034] 4) 样品的前处理

量取检测用样品 1g,向其中加入作为提取液的含有 0.5% SDS 和以最终浓度计为 0%~10.0% 的硫代硫酸钠的 PBS 19ml 并搅拌,在沸水中进行 1 小时加热,冷却离心后,将上清作为测定样品。

### [0035] (4) 利用免疫层析的检测的确认

加入制备的胶体金标记抗体 20 μ l、作为展开液的胎牛血清(FBS) 30 μ l、测定样品 50 μ l,供试于免疫层析条,确认检测。

### [0036] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 2。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为+、+w、+-,将阴性标记为-。

### [0037] [表 2]

<在 75℃ 加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(卵)>

75℃30分	硫代硫酸钠浓度						
	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%	10.0%
10ppm	+	+	+	+	+	+	-
2ppm	+-	+w	+w	+w	+w	+-	-
0ppm	-	-	-	-	-	-	-

如表 2 所示,硫代硫酸钠浓度为 0%~5.0% 时,检测到直至 2ppm,0.1%~2.0% 时判定为 +w,可见性最好。0ppm 时没有非特异性反应。由此表明,组合了阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

### [0038] 实施例 2

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂提取的卵白蛋白]

## 1. 材料和方法

1) 除了下面的“加热温度·时间”、“样品的前处理”和“利用免疫层析的检测的确认”之外,按照与实施例 1 相同的方法进行。

## [0039] 2) 加热温度·时间

对于加热,准备在 75℃ 加热 30 分钟和在 121℃ 加热 20 分钟的混合物。

## [0040] 3) 样品的前处理

加热后,用食物处理机混合均匀,将所得物作为检测用样品。量取检测用样品 1g,向其中加入含有 0.5% SDS 的 PBS 19ml 并搅拌,在沸水中进行 1 小时加热,冷却离心后,将上清作为测定样品(1)。此外,向测定样品(1)中加入 Tween20 以使最终浓度为 0.2%,将所得物作为测定样品(2)。进一步地,加入含有 0.5% SDS 和 0.2% Tween20 的 PBS 19ml 并搅拌,在沸水中进行 1 小时加热,冷却离心后,将上清作为测定样品(3)。上述测定样品(2)用于这样的用途:由于在 SDS 提取后加入 Tween20,所以并不参与提取,当用免疫层析试剂盒测定样品时,用于研究 Tween20 的存在是否与免疫层析试剂盒的灵敏度有关,上述测定样品(3)用于这样的用途:由于使 SDS 和 Tween20 共存来提取,故用于研究 Tween20 对提取效率是否有贡献。

## [0041] 4) 利用免疫层析的检测的确认

加入制备的胶体金标记抗体 20 μl、作为展开液的胎牛血清(FBS) 30 μl、测定样品(1)、测定样品(2)、测定样品(3) 50 μl,供试于免疫层析条,确认检测。

## [0042] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 3 和表 4。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为+、+w、+-,将阴性标记为-。

## [0043] [表 3]

< 在 75℃ 加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(卵) >

75℃30分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品(1)	+	+	-
测定样品(2)	+	+	-
测定样品(3)	+	+	-

## [表 4]

< 在 121℃ 加热了 20 分钟的模型肉食制品的检测结果(卵) >

121℃20分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品(1)	+	-	-
测定样品(2)	+w	-	-
测定样品(3)	+	+w	-

如表 3 所示,对于 75℃ 30 分钟加热的模型肉食制品,所有的测定样品直至 2ppm 均判定为+、0ppm 时没有非特异性反应。另一方面,如表 4 所示,对于 121℃ 20 分钟加热的模型肉

食制品,测定样品(3)直至 2ppm 判定为 + w,卵蛋白可检测到直至 2ppm。0ppm 时没有非特异性反应。由此表明,组合了阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

#### [0044] 实施例 3

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐提取的酪蛋白]

##### 1. 材料和方法

##### (1) 胶体金标记抗体的制备

用 2mM 硼酸缓冲液 (pH9.0) 来制备 P $\alpha$ s1CN2 (FERM-BP-10264) 的 MAb 溶液使其为 1mg/ml。向预先用 0.2M 碳酸钾溶液制备为 pH9.0 的胶体金溶液 (シグマ社制) 5ml 中加入 MAb 溶液 500  $\mu$ l, 在室温下进行 30 分钟反应, 然后加入 10% BSA 溶液 635  $\mu$ l, 进一步进行 15 分钟反应。进行离心分离, 用 1% BSA 溶液制备成 OD525 = 1.0。

##### [0045] (2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 来制备 P $\alpha$ s1CN1 (FERM-BP-10263) 的 MAb 溶液使其为 4mg/ml, 将其直线状地涂布于硝酸纤维素膜并使其干燥。然后, 用含有 0.1% 牛皮明胶的 TBS 在 37°C 下封闭 1 小时后, 用 TBS 洗涤并使其干燥。

##### [0046] (3) 免疫层析条的组装

除了抗体固定化膜之外, 另准备被测液点样用玻璃棉制样品垫、被测液吸收用玻璃棉制吸收垫, 按照样品垫、抗体固定化膜、吸收垫的顺序分别贴合, 制成免疫层析条。乳蛋白按照 穂山等的方法, 用荷兰乳牛种的鲜乳来制备。此外, 对于检测用样品, 供试如表 5 所示配合的模型肉食制品, 加热温度·时间、样品的前处理在与实施例 1 相同的条件下进行。

#### [0047] [表 5]

< 模型肉食制品的配合表 [ 乳 ] >

原材料	乳 1 0 p p m	乳 2 p p m	对照
猪红肉 (%)	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0
聚磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (ppm)	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300
水 (%)	14.5	14.5	14.5
乳蛋白 (ppm)	10	2	0
合计 (%)	99.744	99.7422	99.742

##### (4) 利用免疫层析的检测的确认

加入制备的胶体金标记抗体 20  $\mu$ l、作为展开液的胎牛血清 (FBS) 30  $\mu$ l、测定样品 50  $\mu$ l, 供试于免疫层析条, 确认检测。

#### [0048] 2. 结果

接着, 将检测结果示于表 6。判定按照线条强度降低的顺序, 依次标记为 +、+ w、+ -, 将阴性标记为 -。

#### [0049] [表 6]

< 在 75℃加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(酪蛋白)>

75℃30分	硫代硫酸钠浓度						
	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%	10.0%
10ppm	+	+	+	+	+	+W	-
2ppm	+ -	+W	+W	+W	+ -	-	-
0ppm	-	-	-	-	-	-	-

如表 6 所示,硫代硫酸钠浓度为 0%~2.0%时检测至 2ppm,0.1%~1.0%时判定为 +w,可见性最好。0ppm 时没有非特异性反应。由此,在组合了阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

#### [0050] 实施例 4

[利用免疫层析的用阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂提取的酪蛋白的检测]

##### 1. 材料和方法

1)除了在与实施例 2 相同的条件下进行模型肉食制品的加热温度·时间、样品的前处理、和利用免疫层析的检测的确认之外,按照与实施例 3 相同的方法进行。

##### [0051] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 7 和表 8。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为 +、+w、+ -,将阴性标记为 -。

##### [0052] [表 7]

< 在 75℃加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(酪蛋白)>

75℃30分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品 (1)	+	+ -	-
测定样品 (2)	+	+ -	-
测定样品 (3)	+	+W	-

##### [表 8]

< 在 121℃加热了 20 分钟的模型肉食制品的检测结果(酪蛋白)>

121℃20分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品 (1)	+	+ -	-
测定样品 (2)	+	+ -	-
测定样品 (3)	+	+W	-

如表 7 和表 8 所示,测定样品 (3) 直至 2ppm 判定为 +w,乳蛋白可检测到直至 2ppm。0ppm 时没有非特异性反应。由此表明,如测定样品 (3) 那样,组合了阴离子型表面活性剂和

非离子型表面活性剂的提取方法的情况下提取效率最高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

#### [0053] 实施例 5

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐提取的乳清]

##### 1. 材料和方法

##### (1) 胶体金标记抗体的制备

用 2mM 硼酸缓冲液 (pH9.0) 来制备 P $\beta$  LG4 (FERM-BP-11238) 的 MAb 溶液使其为 1mg/ml。向预先用 0.2M 碳酸钾溶液制备为 pH9.0 的胶体金溶液 (シグマ社制) 5ml 中加入 MAb 溶液 500  $\mu$  l, 在室温下进行 30 分钟反应, 然后加入 10% BSA 溶液 635  $\mu$  l, 进一步进行 15 分钟反应。进行离心分离, 用 1% BSA 溶液制备成 OD525 = 1.0。

##### [0054] (2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 来制备 P $\beta$  LG3 (FERM-BP-11237) 的 MAb 溶液使其为 4mg/ml, 将其直线状地涂布于硝酸纤维素膜并使其干燥。然后, 用含有 0.1% 牛皮明胶的 TBS 在 37°C 下封闭 1 小时后, 用 TBS 洗涤并使其干燥。

##### [0055] (3) 免疫层析条的组装

除了抗体固定化膜之外, 另准备被测液点样用玻璃棉制样品垫、被测液吸收用玻璃棉制吸收垫, 按照样品垫、抗体固定化膜、吸收垫的顺序分别贴合, 制成免疫层析条。乳蛋白按照穂山等的方法, 用荷兰乳牛种的鲜乳来制备。此外, 对于检测用样品, 供试如表 3 所示的配合的模型肉食制品, 加热温度·时间、样品的前处理在与上述相同的条件下进行。

##### [0056] (4) 利用免疫层析的检测的确认

加入制备的胶体金标记抗体 20  $\mu$  l、作为展开液的胎牛血清 (FBS) 30  $\mu$  l、测定样品 50  $\mu$  l, 供试于免疫层析条, 确认检测。

#### [0057] 2. 结果

接着, 将检测结果示于表 9。判定按照线条强度降低的顺序, 依次标记为 +、+w、+-, 将阴性标记为 -。

#### [0058] [表 9]

< 在 75°C 加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果 (乳清) >

75°C30分	硫代硫酸钠浓度						
	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%	10.0%
10ppm	+	+	+	+W	+-	-	-
2ppm	+W	+W	+-	+-	-	-	-
0ppm	-	-	-	-	-	-	-

如表 9 所示, 硫代硫酸钠浓度为 0% ~ 1.0% 时直至 2ppm 被检测到, 0.1% 时可见性最好。0ppm 时没有非特异性反应。由此表明, 组合了阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐的提取方法的情况下提取效率高, 此外, 由于使用 FBS 作为展开液, 因而没有非特异性反应, 可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

#### [0059] 实施例 6

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂提取的乳清]

##### 1. 材料和方法

1) 除了在与实施例 2 相同的条件下进行模型肉食制品的加热温度·时间、样品的前处理、和利用免疫层析的检测的确认之外,按照与实施例 5 相同的方法进行。

## [0060] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 10 和表 11。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为+、+w、+-,将阴性标记为-。

### [0061] [表 10]

< 在 75℃加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(乳清)>

75℃30分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品(1)	+	+w	-
测定样品(2)	+	+w	-
测定样品(3)	+	+w	-

### [表 11]

< 在 121℃加热了 20 分钟的模型肉食制品的检测结果(乳清)>

121℃20分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品(1)	+	-	-
测定样品(2)	+	-	-
测定样品(3)	+	-	-

如表 10 所示,所有的测定样品直至 2ppm 均判定为 +w,乳蛋白可检测到直至 2ppm。0ppm 时没有非特异性反应。如表 11 所示,所有的测定样品直至 10ppm 均可检测为+,但是如测定样品(3)那样,组合了阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的提取方法的情况下,可见性最好,因此,组合了阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

## [0062] 实施例 7

[利用免疫层析检测的用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐提取的小麦蛋白的]

### 1. 材料和方法

#### (1) 胶体金标记抗体的制备

用 2mM 硼酸缓冲液(pH9.0)来制备 PGL2 (FERM-BP-10268)的 MAb 溶液使其为 1mg/ml。向预先用 0.2M 碳酸钾溶液制备为 pH9.0 的胶体金溶液(シグマ社制)5ml 中加入 MAb 溶液 500 $\mu$ l,在室温下进行 30 分钟反应,然后加入 10% BSA 溶液 635 $\mu$ l,进一步进行 15 分钟反应。进行离心分离,用 1% BSA 溶液制备成 OD525 = 1.0。

#### [0063] (2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 来制备 PGL1 (FERM-BP-10267)的 MAb 溶液使其为 4mg/ml,将其直线状地涂布于硝酸纤维素膜并使其干燥。然后,用含有 1.0%牛皮明胶的 TBS 在 37℃下封闭 1 小时后,用

TBS 洗涤并使其干燥。

### [0064] (3) 免疫层析条的组装

除了抗体固定化膜之外,另准备被测液点样用玻璃棉制样品垫、被测液吸收用玻璃棉制吸收垫,按照样品垫、抗体固定化膜、吸收垫的顺序分别贴合,制成免疫层析条。小麦蛋白按照穗山等的方法由市售小麦粉未来制备。此外,对于检测用样品,供试如表 12 所示配合的模型肉食制品,加热温度·时间、样品的前处理在与上述相同的条件下进行。

### [0065] [表 12]

< 模型肉食制品的配合表(小麦) >

原材料	小麦 1 0 p p m	小麦 2 p p m	对照
猪红肉 (%)	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0
聚磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (ppm)	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300
水 (%)	14.5	14.5	14.5
小麦蛋白 (ppm)	10	2	0
合计 (%)	99.744	99.7422	99.742

### (4) 利用免疫层析的检测的确认

加入制备的胶体金标记抗体 20  $\mu$  l、作为展开液的胎牛血清 (FBS) 30  $\mu$  l、测定样品 50  $\mu$  l,供试于免疫层析条,确认检测。

### [0066] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 13。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为 +、+w、+-,将阴性标记为 -。

### [0067] [表 13]

< 在 75 $^{\circ}$ C 加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(小麦) >

75 $^{\circ}$ C30分	硫代硫酸钠浓度						
	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%	10.0%
1 0 p p m	+	+	+	+	+	+	+W
2 p p m	+	+	+	+	+	+	+-
0 p p m	-	-	-	-	-	-	-

如表 13 所示,硫代硫酸钠浓度为 0%~10.0% 时,可检测到直至 2ppm,为 0%~5.0% 时,判定为 +,尤其是 0.1%~2.0% 时,可见性最好。0ppm 时没有非特异性反应。由此表明,组合了阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

### [0068] 实施例 8

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂提取的小麦蛋白]

#### 1. 材料和方法

1) 除了在与实施例 2 相同的条件下进行模型肉食制品的加热温度·时间、样品的前处理、和利用免疫层析的检测的确认之外,按照与实施例 7 相同的方法进行。

## [0069] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 14 和表 15。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为+、+w、+-,将阴性标记为-。

## [0070] [表 14]

< 在 75℃加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(小麦) >

75℃30分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品 (1)	+	+	-
测定样品 (2)	+	+	-
测定样品 (3)	+	+	-

## [表 15]

< 在 121℃加热了 20 分钟的模型肉食制品的检测结果(小麦) >

121℃20分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品 (1)	+	+	-
测定样品 (2)	+	+	-
测定样品 (3)	+	+	-

如表 14 和表 15 所示,所有测定样品直至 2ppm 均判定为+,可检测到小麦蛋白直至 2ppm。0ppm 时没有非特异性反应。此外,如测定样品 (3) 那样,在组合了阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的提取方法的情况下,可见性最好,因此,组合了阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

## [0071] 实施例 9

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐提取的荞麦蛋白]

## 1. 材料和方法

## (1) 胶体金标记抗体的制备

用 2mM 硼酸缓冲液 (pH9.0) 来制备 PBW2 (FERM-BP-10273) 的 MAb 溶液使其为 1mg/ml。向预先用 0.2M 碳酸钾溶液制备为 pH9.0 的胶体金溶液 (シグマ社制) 5ml 中加入 MAb 溶液 500  $\mu$ l, 在室温下进行 30 分钟反应, 然后加入 10% BSA 溶液 635  $\mu$ l, 进一步进行 15 分钟反应。进行离心分离, 用 1% BSA 溶液制备成 OD525 = 1.0。

## [0072] (2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 来制备 PBW5 (FERM-BP-11241) 的 MAb 溶液使其为 4mg/ml, 将其直线状地涂布于硝酸纤维素膜并使其干燥。然后, 用含有 1% 脱脂乳的 TBS 在 37℃ 下封闭 1 小时后, 用 TBS 洗涤并使其干燥。

## [0073] (3) 免疫层析条的组装

除了抗体固定化膜之外,另准备被测液点样用玻璃棉制样品垫、被测液吸收用玻璃棉制吸收垫,按照样品垫、抗体固定化膜、吸收垫的顺序分别贴合,制成免疫层析条。荞麦蛋白按照穉山等的方法由市售荞麦粉未来制备。此外,对于检测用样品,供试如表 16 所示配合的模型肉食制品,加热温度·时间、样品的前处理在与上述相同的条件下进行。

[0074] [表 16]

< 模型肉食制品的配合表(荞麦) >

原材料	荞麦1 0 p p m	荞麦2 p p m	对照
猪红肉 (%)	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0
聚磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (ppm)	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300
水 (%)	14.5	14.5	14.5
荞麦蛋白 (ppm)	10	2	0
合计 (%)	99.744	99.7422	99.742

(4) 利用免疫层析的检测的确认

加入制备的胶体金标记抗体 20  $\mu$  l、作为展开液的胎牛血清(FBS) 30  $\mu$  l、测定样品 50  $\mu$  l,供试于免疫层析条,确认检测。

[0075] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 17。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为+、+w、+-,将阴性标记为-。

[0076] [表 17]

< 在 75℃加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(荞麦) >

75℃30分	硫代硫酸钠浓度						
	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%	10.0%
10 p p m	+	+	+	+	+	+	+W
2 p p m	-	+-	+W	+-	+-	+W	+-
0 p p m	-	-	-	-	-	-	-

如表 17 所示,硫代硫酸钠浓度为 0%~5.0%时,可检测到直至 2ppm,尤其是 0.5%和 5.0%时判定为+w,可见性最好。0ppm时没有非特异性反应。由此表明,组合了阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

[0077] 实施例 10

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂提取的荞麦蛋白]

1. 材料和方法

1) 除了在与实施例 2 相同的条件下进行模型肉食制品的加热温度·时间、样品的前处理、和利用免疫层析的检测的确认之外,按照与实施例 9 相同的方法进行。

[0078] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 18 和表 19。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为+、+

w、+-,将阴性标记为-。

[0079] [表 18]

〈在 75℃加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(荞麦)〉

75℃30分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品 (1)	+-	-	-
测定样品 (2)	+	-	-
测定样品 (3)	+	+-	-

[表 19]

〈在 121℃加热了 20 分钟的模型肉食制品的检测结果(荞麦)〉

121℃20分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品 (1)	+	+-	-
测定样品 (2)	+	+-	-
测定样品 (3)	+	+w	-

如表 18 所示,对于在 75℃加热了 30 分钟的模型肉食制品,测定样品 (3) 直至 2ppm 判定为+-,0ppm 没有非特异性反应。此外,如表 19 所示,对于在 121℃加热了 20 分钟的模型肉食制品,测定样品 (3) 直至 2ppm 判定为+w,可检测到荞麦蛋白直至 2ppm。0ppm 时没有非特异性反应。由此表明,组合了阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

[0080] 实施例 11

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐提取的花生蛋白]

#### 1. 材料和方法

##### (1) 胶体金标记抗体的制备

用 2mM 硼酸缓冲液(pH9.0)来制备 PAh1-4 (FERM-BP-11239) 的 MAb 溶液使其为 1mg/ml。向预先用 0.2M 碳酸钾溶液制备为 pH9.0 的胶体金溶液(シグマ社制)5ml 中加入 MAb 溶液 500  $\mu$ l,在室温下进行 30 分钟反应,然后加入 10% BSA 溶液 635  $\mu$ l,进一步进行 15 分钟反应。进行离心分离,用 1% BSA 溶液制备成 OD525 = 1.0。

##### [0081] (2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 来制备 PAh1-5 (FERM-BP-11240) 的 MAb 溶液使其为 4mg/ml,将其直线状地涂布于硝酸纤维素膜并使其干燥。然后,用含有 1% 脱脂乳的 TBS 在 37℃ 下封闭 1 小时后,用 TBS 洗涤并使其干燥。

##### [0082] (3) 免疫层析条的组装

除了抗体固定化膜之外,另准备被测液点样用玻璃棉制样品垫、被测液吸收用玻璃棉

制吸收垫,按照样品垫、抗体固定化膜、吸收垫的顺序分别贴合,制成免疫层析条。荞麦蛋白按照穗山等的方法由脱脂花生来制备。此外,对于检测用样品,供试如表 20 所示配合的模型肉食制品,加热温度·时间、样品的前处理在与上述相同的条件下进行。

[0083] [表 20]

< 模型肉食制品的配合表(花生) >

原材料	花生 10 ppm	花生 2 ppm	对照
猪红肉(%)	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0
聚磷酸钠(%)	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠(ppm)	120	120	120
抗坏血酸钠(ppm)	300	300	300
水(%)	14.5	14.5	14.5
花生蛋白(ppm)	10	2	0
合计(%)	99.744	99.7422	99.742

(4) 利用免疫层析的检测的确认

加入制备的胶体金标记抗体 20  $\mu$  l、作为展开液的胎牛血清(FBS) 30  $\mu$  l、测定样品 50  $\mu$  l,供试于免疫层析条,确认检测。

[0084] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 21。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为+、+w、+-,将阴性标记为-。

[0085] [表 21]

< 在 75 $^{\circ}$ C 加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(花生) >

75 $^{\circ}$ C30分	硫代硫酸钠浓度						
	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%	10.0%
10 ppm	+	+	+	+	+	+	+W
2 ppm	+W	+W	+W	+W	+W	+W	+-
0 ppm	-	-	-	-	-	-	-

如表 21 所示,硫代硫酸钠浓度为 0%~10.0%时,可检测到直至 2ppm,尤其是 0.1%~2.0%时判定为+w,可见性最好。0ppm 时没有非特异性反应。由此表明,组合了阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

[0086] 实施例 12

[利用免疫层析检测用阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂提取的花生蛋白]

1. 材料和方法

1) 除了在与实施例 2 相同的条件下进行模型肉食制品的加热温度·时间、样品的前处理、和利用免疫层析的检测的确认之外,按照与实施例 11 相同的方法进行。

[0087] 2. 结果

接着,将检测结果示于表 22 和表 23。判定按照线条强度降低的顺序,依次标记为+、+w、+-,将阴性标记为-。

[0088] [表 22]

〈在 75℃加热了 30 分钟的模型肉食制品的检测结果(花生)〉

75℃30分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品 (1)	+	+	-
测定样品 (2)	+	+	-
测定样品 (3)	+	+	-

[表 23]

〈在 121℃加热了 20 分钟的模型肉食制品的检测结果(花生)〉

121℃20分	模型肉食制品		
	10ppm	2ppm	0ppm
测定样品 (1)	+	+	-
测定样品 (2)	+	+	-
测定样品 (3)	+	+	-

如表 22 和表 23 所示,所有测定样品直至 2ppm 均判定为+,花生蛋白可检测到直至 2ppm。0ppm 时没有非特异性反应。其中,如测定样品 (3)那样,组合了阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的提取方法的情况下可见性最好,因此,组合了阴离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂的提取方法的情况下提取效率高,此外,由于使用 FBS 作为展开液,因而没有非特异性反应,可迅速且精度良好地构建免疫层析试剂盒。

[0089] 工业适用性

提供可迅速且精度良好地检测乳变应原、卵白变应原、小麦变应原、荞麦变应原、花生变应原等食物变应原的利用免疫层析法的变应原的检测方法和可在其中使用的免疫层析用变应原的检测试剂盒。

专利名称(译)	利用免疫层析法的变应原检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102317780A</a>	公开(公告)日	2012-01-11
申请号	CN201080007948.X	申请日	2010-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	普利玛食品株式会社		
申请(专利权)人(译)	普利玛食品株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	普利玛食品株式会社		
[标]发明人	加藤重城 秋元政信		
发明人	加藤重城 秋元政信		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N2800/24 G01N33/558		
代理人(译)	庞立志 郭文洁		
优先权	2009079540 2009-03-27 JP 2009039881 2009-02-23 JP		
其他公开文献	CN102317780B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

可从含有各变应原的食品等被测试样中高效地提取各变应原，且由于不使用还原剂而消除伴随着结合于抗体的胶体金的崩解的非特异性反应，从而迅速且精度良好地检测变应原。使用将胶体金结合于抗变性和未变性的变应原的单克隆抗体的胶体金标记抗体、固定有与上述胶体金标记抗体识别不同的抗原决定簇的单克隆抗体的展开支持体、使用SDS等阴离子型表面活性剂和硫代硫酸盐、或SDS等阴离子型表面活性剂和 Tween20等非离子型表面活性剂而从被测试样中提取出的变应原的测定样品、和展开液，将展开液在展开支持体上展开后，根据有无胶体金的聚集来检测变应原的免疫层析法，其中，使用含有FBS至少10%的展开液。

#### <模型肉食制品的配合表[卵]>

原材料	卵 10 ppm	卵 2 ppm	对照
猪瘦肉 (X)	83.0	83.0	83.0
NaCl (X)	2.0	2.0	2.0
聚磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (ppm)	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300
水 (X)	14.5	14.5	14.5
卵蛋白 (ppm)	10	2	0
合计 (%)	99.744	99.7422	99.742