

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580006993.2

[43] 公开日 2007年3月14日

[11] 公开号 CN 1930474A

[22] 申请日 2005.3.4

[21] 申请号 200580006993.2

[30] 优先权

[32] 2004. 3. 5 [33] JP [31] 063071/2004

[32] 2004. 9. 29 [33] JP [31] 285542/2004

[32] 2004. 9. 29 [33] JP [31] 285543/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/003799 2005. 3. 4

[87] 国际公布 WO2005/085847 日 2005. 9. 15

[85] 进入国家阶段日期 2006. 9. 4

[71] 申请人 普利玛食品株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 秋元政信 加藤重城 浪冈真

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 郭文洁 吴娟

权利要求书 11 页 说明书 60 页 附图 8 页

[54] 发明名称

变应原的检测方法

[57] 摘要

本发明提供在含有乳变应原、卵清蛋白、小麦、荞麦、花生的变应原的食品中，这些变应原即使是变性/未变性的任何状态，也可以进行检测的高灵敏度免疫学检测方法以及使用该方法的检测试剂盒。该方法是使用识别未变性和变性的乳变应原、未变性和变性的卵清蛋白变应原、未变性和变性的小麦变应原、未变性和变性的荞麦变应原、或未变性和变性的花生变应原的各 2 种或多种单克隆抗体的变应原检测方法，以  $\alpha$   $\delta$  酪蛋白的主要蛋白质  $\alpha$   $\delta$   $\alpha$   $\delta$  酪蛋白、乳清的主要蛋白质  $\beta$  乳球蛋白、卵清蛋白的主要蛋白质卵白蛋白和卵类粘蛋白、小麦的主要蛋白质麦醇溶蛋白、荞麦的主要蛋白质——分子量 24kDa 和 76kDa 的蛋白质，或者花生的主要蛋白质 Ara h1 为指标。

1. 变应原的检测方法, 该变应原检测方法是使用识别未变性和变性的乳变应原、未变性和变性的卵清蛋白变应原、未变性和变性的小麦变应原、未变性和变性的荞麦变应原、或未变性和变性的花生变应原的各2种或多种单克隆抗体进行的, 其特征在于: 以 $\alpha$ s1酪蛋白的主要蛋白质 $\alpha$ s1酪蛋白、乳清的主要蛋白质 $\beta$ 乳球蛋白、卵清蛋白的主要蛋白质卵白蛋白和卵类粘蛋白、小麦的主要蛋白质麦醇溶蛋白、荞麦的主要蛋白质——分子量24 kDa和76 kDa的蛋白质, 或者花生的主要蛋白质Ara h1为指标。

2. 变应原的检测方法, 其特征在于: 将识别未变性乳变应原的单克隆抗体和识别变性乳变应原的单克隆抗体结合使用。

3. 权利要求2的乳变应原的检测方法, 其特征在于: 使用分别识别不同表位的2种或以上单克隆抗体作为识别未变性乳变应原和/或变性乳变应原的单克隆抗体。

4. 权利要求2或3的乳变应原的检测方法, 其特征在于: 识别未变性乳变应原和/或变性乳变应原的单克隆抗体是抗 $\alpha$ s1酪蛋白单克隆抗体。

5. 权利要求4的乳变应原的检测方法, 其特征在于: 抗 $\alpha$ s1酪蛋白单克隆抗体是识别未变性 $\alpha$ s1酪蛋白、尿素处理 $\alpha$ s1酪蛋白、未变性酪蛋白钠和变性酪蛋白钠的抗 $\alpha$ s1酪蛋白单克隆抗体。

6. 权利要求4或5的乳变应原的检测方法, 其特征在于: 抗 $\alpha$ s1酪蛋白单克隆抗体是识别SEQ ID NO.1所示的 $\alpha$ s1酪蛋白的氨基酸序列第132号-第193区域的单克隆抗体。

7. 权利要求4-6中任一项的乳变应原的检测方法, 其特征在于: 抗 $\alpha$ s1酪蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10263)生成的抗 $\alpha$ s1酪蛋白单克隆抗体Pas1CN1和/或杂交瘤(FERM ABP-10264)生成的抗 $\alpha$ s1酪蛋白单克隆抗体Pas1CN2。

8. 权利要求4-7中任一项的乳变应原的检测方法, 其特征在于: 通过夹层ELISA, 可以在10-1000 ppb的浓度范围内对食品中的未变性 $\alpha$ s1酪蛋白和尿素处理 $\alpha$ s1酪蛋白进行定性且定量的分析。

9. 权利要求2或3的乳变应原的检测方法, 其特征在于: 识别未变性乳变应原和/或变性乳变应原的单克隆抗体是抗 $\beta$ 乳球蛋白单克隆

抗体。

10. 权利要求 9 的乳变应原的检测方法，其特征在于：抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体是识别未变性  $\beta$  乳球蛋白、尿素处理  $\beta$  乳球蛋白、还原羧甲基化  $\beta$  乳球蛋白的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体。

11. 权利要求 9 或 10 的乳变应原的检测方法，其特征在于：抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10281)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PBLG1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10282)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PBLG2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10283)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PBLG3。

12. 权利要求 9-11 中任一项的乳变应原的检测方法，其特征在于：可通过夹层 ELISA，在 30-1000 ppb 的浓度范围内对食品中的未变性  $\beta$  乳球蛋白和尿素处理  $\beta$  乳球蛋白进行定性且定量的分析。

13. 权利要求 2-12 中任一项的乳变应原的检测方法，其特征在于：使用尿素和 2-巯基乙醇，从检样中萃取酪蛋白和/或乳清蛋白。

14. 权利要求 1-13 中任一项的乳变应原的检测方法，其特征在于：该方法使用识别未变性酪蛋白的一或多种单克隆抗体和识别变性酪蛋白的一或多种单克隆抗体，以及使用识别未变性  $\beta$  乳球蛋白的一或多种单克隆抗体和识别变性  $\beta$  乳球蛋白的一或多种单克隆抗体。

15. 乳变应原检测试剂盒，该试剂盒具备识别未变性乳变应原的单克隆抗体和识别变性乳变应原的单克隆抗体，并在将识别未变性乳变应原的单克隆抗体和识别变性乳变应原的单克隆抗体结合使用的条件下使用。

16. 权利要求 15 的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒中的识别未变性乳变应原和/或变性乳变应原的单克隆抗体是具备分别识别不同表位的两种或以上的单克隆抗体。

17. 权利要求 15 或 16 的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：识别未变性乳变应原和/或变性乳变应原的单克隆抗体是抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体。

18. 权利要求 17 的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体是识别未变性  $\alpha$ s1 酪蛋白、尿素处理  $\alpha$ s1 酪蛋白、未变性酪蛋白钠和变性酪蛋白钠的抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体。

19. 权利要求 17 或 18 的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：抗

$\alpha$ 1 酪蛋白单克隆抗体是识别 SEQ ID NO.1 所示的  $\alpha$ 1 酪蛋白的氨基酸序列第 132 号-193 号区域的单克隆抗体。

20. 权利要求 17-19 中任一项的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：抗  $\alpha$ 1 酪蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10263)生成的抗  $\alpha$ 1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10264)生成的抗  $\alpha$ 1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN2。

21. 权利要求 15 或 16 的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：识别未变性乳变应原和/或变性乳变应原的单克隆抗体是抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体。

22. 权利要求 21 的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体是识别未变性  $\beta$  乳球蛋白、尿素处理  $\beta$  乳球蛋白、还原羧甲基化  $\beta$  乳球蛋白的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体。

23. 权利要求 21 或 22 的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10281)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 P $\beta$ LG1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10282)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 P $\beta$ LG2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10283)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 P $\beta$ LG3。

24. 权利要求 15-23 中任一项的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：识别不同表位的 2 种单克隆抗体中的至少一种是在免疫色谱中使用的胶体金标记的单克隆抗体。

25. 权利要求 15-24 中任一项的乳变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒具备识别未变性酪蛋白的一或多种单克隆抗体和识别变性酪蛋白的一或多种单克隆抗体、以及识别未变性  $\beta$  乳球蛋白的一或多种单克隆抗体和识别变性  $\beta$  乳球蛋白的一或多种单克隆抗体。

26. 抗  $\alpha$ 1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN1，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10263)生成的。

27. 抗  $\alpha$ 1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN2，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10264)生成的。

28. 抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 P $\beta$ LG1，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10281)生成的。

29. 抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 P $\beta$ LG2，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10282)生成的。

30. 抗 $\beta$ 乳球蛋白单克隆抗体 PBLG3, 该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10283)生成的。

31. 卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 将识别未变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体和识别变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体结合使用。

32. 权利要求 31 的卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 使用分别识别不同的表位的 2 种或以上的单克隆抗体作为识别未变性卵清蛋白变应原和/或变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体。

33. 权利要求 31 或 32 的卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 识别未变性卵清蛋白变应原和/或变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体是抗卵白蛋白单克隆抗体。

34. 权利要求 33 的卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 抗卵白蛋白单克隆抗体是识别未变性卵白蛋白和/或还原羧甲基化卵白蛋白的抗卵白蛋白单克隆抗体。

35. 权利要求 33 或 34 的卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 抗卵白蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10265)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10266)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10275)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10276)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA2。

36. 权利要求 33-35 中任一项的卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 该方法可通过夹层 ELISA, 在 1.0-10.0 ppb 浓度范围内对食品中的未变性卵白蛋白和/或变性卵白蛋白进行定性且定量的分析。

37. 权利要求 31 或 32 的卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 识别未变性卵清蛋白变应原和/或变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体是抗卵类粘蛋白单克隆抗体。

38. 权利要求 37 的卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 抗卵类粘蛋白单克隆抗体是识别未变性卵类粘蛋白和/或尿素变性卵类粘蛋白的抗卵类粘蛋白单克隆抗体。

39. 权利要求 37 或 38 的卵清蛋白变应原的检测方法, 其特征在于: 抗卵类粘蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10279)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10280)生成的

抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10277)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10278)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM2。

40. 权利要求 34-36 中任一项的卵清蛋白变应原的检测方法，其特征在于：该方法可通过夹层 ELISA，在 10-100 ppb 浓度范围内对食品中的未变性卵类粘蛋白和/或变性卵类粘蛋白进行定性且定量的分析。

41. 权利要求 31-40 中任一项的卵清蛋白变应原的检测方法，其特征在于：该方法是使用尿素和 2-巯基乙醇，从检样中萃取卵白蛋白和/或卵类粘蛋白。

42. 权利要求 31-41 中任一项的卵清蛋白变应原的检测方法，其特征在于：该方法使用识别未变性卵白蛋白的 1 或多种单克隆抗体和识别变性卵白蛋白的 1 或多种单克隆抗体、以及识别未变性卵类粘蛋白的 1 或多种单克隆抗体和识别变性卵类粘蛋白的 1 或多种单克隆抗体。

43. 卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒具备识别未变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体和识别变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体，在将识别未变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体和识别变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体结合使用的条件下使用。

44. 权利要求 43 的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒中的识别未变性卵清蛋白变应原和/或变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体具备分别识别不同的表位的两种或以上的单克隆抗体。

45. 权利要求 43 或 44 的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：识别未变性卵清蛋白变应原和/或变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体是抗卵白蛋白单克隆抗体。

46. 权利要求 45 的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：抗卵白蛋白单克隆抗体是识别未变性卵白蛋白和/或还原羧甲基化卵白蛋白的抗卵白蛋白单克隆抗体。

47. 权利要求 45 或 46 的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：抗卵白蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10265)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10266)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10275)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10276)生成的抗卵白

蛋白单克隆抗体 PDOA2。

48. 权利要求 43 或 44 的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：识别未变性卵清蛋白变应原和/或变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体是抗卵类粘蛋白单克隆抗体。

49. 权利要求 48 的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：抗卵类粘蛋白单克隆抗体是识别未变性卵类粘蛋白和/或尿素变性卵类粘蛋白的抗卵类粘蛋白单克隆抗体。

50. 权利要求 48 或 49 的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：抗卵类粘蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10279)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10280)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10277)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10278)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM2。

51. 权利要求 43-50 中任一项的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：识别不同表位的 2 种或以上的单克隆抗体中的至少一种是免疫色谱中使用的胶体金标记的单克隆抗体。

52. 权利要求 43-51 中任一项的卵清蛋白变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒具备识别未变性卵白蛋白的 1 或多种单克隆抗体和识别变性卵白蛋白的 1 或多种单克隆抗体、以及识别未变性卵类粘蛋白的 1 或多种单克隆抗体和识别变性卵类粘蛋白的 1 或多种单克隆抗体。

53. 抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA1，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10265)生成的。

54. 抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA2，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10266)生成的。

55. 抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA1，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10275)生成的。

56. 抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA2，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10276)生成的。

57. 抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM1，该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10279)生成的。

58. 抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM2，该抗体是由杂交瘤(FERM

ABP-10280)生成的。

59. 抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM1, 该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10277)生成的。

60. 抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM2, 该抗体是由杂交瘤(FERM ABP-10278)生成的。

61. 小麦变应原的检测方法, 其特征在于: 该方法使用识别未变性小麦麦醇溶蛋白和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体。

62. 小麦变应原的检测方法, 其特征在于: 该方法将识别未变性小麦麦醇溶蛋白和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白、且识别不同表位的两种抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体结合使用。

63. 权利要求 61 或 62 的小麦变应原的检测方法, 其特征在于: 抗小麦麦醇溶单克隆抗体是识别未变性小麦麦醇溶蛋白、还原羧甲基化小麦麦醇溶蛋白、0.1 M 乙酸增溶小麦麦醇溶蛋白、70%乙醇增溶小麦麦醇溶蛋白、和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体。

64. 权利要求 61-63 中任一项的小麦变应原的检测方法, 其特征在于: 抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10267)生成的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10268)生成的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL2。

65. 权利要求 61-64 中任一项的小麦变应原的检测方法, 其特征在于: 该方法可通过夹层 ELISA, 在 10-100 ppb 的浓度范围内对食品中的未变性小麦麦醇溶蛋白、还原羧甲基化小麦麦醇溶蛋白、0.1 M 乙酸增溶小麦麦醇溶蛋白、70%乙醇增溶小麦麦醇溶蛋白、和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白进行定性且定量的分析。

66. 小麦变应原检测试剂盒, 其特征在于: 该试剂盒具备识别未变性小麦麦醇溶蛋白和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体。

67. 小麦变应原检测试剂盒, 其特征在于: 该试剂盒具备识别未变性小麦麦醇溶蛋白和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白、且识别不同表位的 2 种抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体。

68. 权利要求 66 或 67 的小麦变应原检测试剂盒, 其特征在于:

抗小麦麦醇溶单克隆抗体是识别未变性小麦麦醇溶蛋白、还原羧甲基化小麦麦醇溶蛋白、0.1 M 乙酸增溶小麦麦醇溶蛋白、70%乙醇增溶小麦麦醇溶蛋白、和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体。

69. 权利要求 66-68 中任一项的小麦变应原检测试剂盒，其特征在于：抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10267)生成的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10268)生成的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL2。

70. 权利要求 66-69 中任一项的小麦变应原检测试剂盒，其特征在于：识别不同表位的 2 种单克隆抗体的至少一种是在免疫色谱中使用的用胶体金标记的单克隆抗体。

71. 抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL1，该抗体由杂交瘤(FERM ABP-10267)生成。

72. 抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL2，该抗体由杂交瘤(FERM ABP-10268)生成。

73. 荞麦变应原的检测方法，其特征在于：该方法使用识别未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体。

74. 荞麦变应原的检测方法，其特征在于：该方法将识别未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白、且识别不同的表位的 2 种抗荞麦粗蛋白单克隆抗体结合使用。

75. 权利要求 73 或 74 的荞麦变应原的检测方法，其特征在于：抗荞麦粗蛋白单克隆抗体是识别 24 kDa 蛋白质和加热变性荞麦粗蛋白单的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体，或者是识别 76 kDa 蛋白质和未变性荞麦粗蛋白单的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体。

76. 权利要求 73-75 中任一项的荞麦变应原的检测方法，其特征在于：抗荞麦粗蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10272)生成的抗 24 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10273)生成的抗 76 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10274)生成的抗 76 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW3。

77. 权利要求 73-76 中任一项的荞麦变应原的检测方法，其特征在于：该方法可通过夹层 ELISA，在 10-1000 ppb 的浓度范围内对未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白进行定性且定量的分析。

78. 权利要求 73-77 中任一项的荞麦变应原的检测方法，其特征在于：该方法是使用尿素和 2-巯基乙醇，从检样中萃取加热变性荞麦粗蛋白。

79. 荞麦变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒具备识别未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体。

80. 荞麦变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒具备识别未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白、且识别不同的表位的 2 种抗荞麦粗蛋白单克隆抗体。

81. 权利要求 79 或 80 的荞麦变应原检测试剂盒，其特征在于：抗荞麦粗蛋白单克隆抗体是识别 24 kDa 蛋白质和加热变性荞麦粗蛋白单的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体，或者是识别 76 kDa 蛋白质和未变性荞麦粗蛋白单的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体。

82. 权利要求 79-81 中任一项的荞麦变应原检测试剂盒，其特征在于：抗荞麦粗蛋白单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10272)生成的抗 24 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10273)生成的抗 76 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10274)生成的抗 76 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW3。

83. 权利要求 79-82 中任一项的荞麦变应原检测试剂盒，其特征在于：识别不同表位的 2 种单克隆抗体的至少一种是免疫色谱中使用的胶体金标记的单克隆抗体。

84. 权利要求 79-83 中任一项的荞麦变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒具备尿素和 2-巯基乙醇，作为从检样中萃取荞麦粗蛋白的萃取剂。

85. 抗 24 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW1，该抗体是杂交瘤(FERM ABP-10272)生成的。

86. 抗 76 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW2，该抗体是杂交瘤(FERM ABP-10273)生成的。

87. 抗 76 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW3，该抗体是杂交瘤(FERM ABP-10274)生成的。

88. 花生变应原的检测方法，其特征在于：该方法使用识别未变性花生 Ara h1 蛋白质和加热变性花生 Ara h1 蛋白质的抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体。

89. 花生变应原的检测方法，其特征在于：该方法是将识别未变性花生 Ara h1 蛋白质和加热变性花生 Ara h1 蛋白质、且识别不同表位的 2 种抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体结合使用。

90. 权利要求 88 或 89 的花生变应原的检测方法，其特征在于：抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体是识别未变性 Ara h1 蛋白质和未变性花生粗蛋白、和/或尿素处理 Ara h1 蛋白质和尿素处理花生粗蛋白的抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体。

91. 权利要求 88-90 中任一项花生变应原的检测方法，其特征在于：抗花生 Ara h1 蛋白质单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10269)生成的抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10270)生成的抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10271)生成的抗加热变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-3。

92. 权利要求 88-91 中任一项的花生变应原的检测方法，其特征在于：该方法通过夹层 ELISA，在 10-1000 ppb 的浓度范围内对未变性花生 Ara h1 蛋白质和加热变性花生 Ara h1 蛋白质进行定性且定量的分析。

93. 权利要求 88-92 中任一项花生变应原的检测方法，其特征在于：该方法是用尿素和 2-巯基乙醇，从检样中萃取加热变性花生 Ara h1 蛋白质。

94. 花生变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒具备识别未变性花生 Ara h1 蛋白质和加热变性花生 Ara h1 蛋白质的抗花生 Ara h1 蛋白质单克隆抗体。

95. 花生变应原检测试剂盒，其特征在于：该试剂盒具备识别未变性花生 Ara h1 蛋白质和加热变性花生 Ara h1 蛋白质、且识别不同表位的 2 种抗花生 Ara h1 蛋白质单克隆抗体。

96. 权利要求 94 或 95 的花生变应原检测试剂盒，其特征在于：抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体是识别未变性 Ara h1 蛋白质和未变性花生粗蛋白、和/或尿素处理 Ara h1 蛋白质和尿素处理花生粗蛋白的抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体。

97. 权利要求 94-96 中任一项的花生变应原检测试剂盒，其特征在于：抗花生 Ara h1 蛋白质单克隆抗体是杂交瘤(FERM ABP-10269)生

成的抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-1 和/或杂交瘤(FERM ABP-10270)生成的抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-2 和/或杂交瘤(FERM ABP-10271)生成的抗加热变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-3。

98. 权利要求 94-97 中任一项的花生变应原检测试剂盒, 其特征在于: 识别不同的表位的 2 种单克隆抗体的至少一种是免疫色谱中使用的胶体金标记的单克隆抗体。

99. 权利要求 94-98 中任一项的花生变应原检测试剂盒, 其特征在于: 该试剂盒具备尿素和 2-巯基乙醇, 作为从检体中萃取乳清蛋白的萃取剂。

100. 抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-1, 该抗体由杂交瘤(FERM ABP-10269)生成。

101. 抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-2, 该抗体由杂交瘤(FERM ABP-10270)生成。

102. 抗加热变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-3, 该抗体由杂交瘤(FERM ABP-10271)生成。

## 变应原的检测方法

### 技术领域

本发明涉及以食品等试样中所含的未变性和变性的乳变应原、未变性和变性的卵清蛋白变应原（卵白アレルギー）、未变性和变性的小麦变应原、未变性和变性的荞麦变应原、或者未变性和变性的花生变应原为指标的乳变应原的检测方法，以及其中所使用的乳变应原检测试剂盒。

本发明涉及可定性且定量、高灵敏度地对食品等试样中所含的未变性或变性的乳变应原进行分析，并以酪蛋白的主要蛋白质—— $\alpha$ s1 酪蛋白、或者乳清的主要蛋白质—— $\beta$  乳球蛋白为指标的变应原的检测方法，以及其中所使用的变应原的检测试剂盒。

本发明还涉及可定性且定量、高灵敏度对食品等试样中所含的未变性或变性的卵白蛋白或卵类粘蛋白的卵清蛋白变应原进行分析的、并以卵白蛋白（オボアルブミン）和/或卵类粘蛋白为指标的卵清蛋白变应原的检测方法，以及其中所使用的卵清蛋白变应原的检测试剂盒。

本发明还涉及可定性且定量、高灵敏度对食品等试样中所含的未变性或变性的小麦变应原进行分析的、以小麦的主要蛋白质——麦醇溶蛋白为指标的小麦变应原的检测方法，以及其中使用的小麦变应原的检测试剂盒。

本发明还涉及可定性且定量、高灵敏度对食品等试样中所含的未变性或变性的荞麦变应原进行分析的、以荞麦的主要蛋白质——分子量 24 kDa 和 76 kDa 蛋白质为指标的荞麦变应原的检测方法，以及其中所使用的荞麦变应原的检测试剂盒。

本发明还涉及可定性且定量、高灵敏度对食品等试样中所含的未变性或变性的花生变应原进行分析的、以花生的主要蛋白质——Ara h1 为指标的花生变应原的检测方法，以及其中使用的花生变应原的检测试剂盒。

### 背景技术

由于自然环境的恶化、车辆或工厂等的排气、住宅的开发等、或者食物的变化等各种因素，目前每3人中即有1人患有各种变态反应疾病。特别是食物变态反应是由于摄取了食品中所含的变态反应诱发物质(以下称为食物变应原)而引起的有害免疫反应，引发皮炎、哮喘、消化道障碍、过敏性休克等，上述食物变态反应的患者逐渐增加，因此在医学上和食品工业上产生了深刻的问题。这些危害甚至威胁到生命，必需采取措施防患于未然。因此，通过标识向消费者提供信息的必要性提高，FAO/WHO食品规格起草联合委员会同意在含有已知为变态反应物质的8种原材料的食品上进行上述内容的标识，成员国分别研讨了适合各国制度的标识方法(1999年6月)。日本研讨了以往的健康危害等的程度、频率，对于有引起严重的变态反应症状的实例的24种食品规定了其标识方法(自2002年4月起实行)。已知引起变态反应的食物有卵类、牛乳类、肉类、鱼类、贝壳类和软体动物类、谷类、豆类和干果类、果实类、蔬菜类、啤酒酵母或明胶等，还特别已知乳变应原的主要成分是 $\alpha$ s1酪蛋白、乳清变应原的主要成分是 $\beta$ 乳球蛋白、卵清蛋白变应原成分是卵白蛋白和卵类粘蛋白、小麦变应原的主要成分是麦醇溶蛋白、荞麦的主要蛋白质是分子量24 kDa和76 kDa的蛋白质、花生的主要蛋白质是Ara h1。

以往，变应原的检测方法例如有：对与变应原特异性反应的免疫球蛋白进行定量的方法(参照日本特开平05-249111号公报)、或者对含有抗原抗体复合物的检样中的该抗原抗体复合物进行酸处理等，使其解离，根据需要用碱进行中和处理，然后测定该检样中的变应原特异性IgE抗体的方法(参照日本特开平07-140144号公报)等。

现在检测乳、卵、小麦、荞麦、花生的特定原材料的公定方法是：使用由加热·非加热复合抗原得到的多克隆抗体进行的免疫学检测方法(参照日本特开2003-155297号公报；以下称为“市售公定法A”)，或者使用由纯化抗原得到的多克隆抗体进行的免疫学检测方法(以下称为“市售公定法B”)。它们都是特异性检测变应原的有效的方法，但是也存在很多问题。例如，在市售公定法A中，由于使用复合抗原，是针对何种物质的抗体不明确，交叉性高，例如无法通过免疫印迹法等进行抗原的鉴定，另外有非特异性反应增加的可能性。而市售公定法B中，抗原得到纯化，因此抗体的特异性是明确的，但是由于使用了用

未变性的抗原制备的抗体，而变性/未变性导致的抗体结合程度有很大差别，因此即使相同的添加量，在加热前、加热后，其定量值也不同。特别是小麦在其它特定原材料(卵、乳、荞麦、花生)中常被实施严酷的加热处理(例如面包、油炸等)，小麦变应原由未变性至加热变性，以广范的状态存在。因此为了检测小麦变应原，必须制备明确了与何种状态的变应原结合的单克隆抗体，根据其特性加以利用。

关于卵的鉴定、定量，已知有以卵类粘蛋白为指标，使用多克隆抗体的方法(例如参照 *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, 75, 8-15, 1984) 或者使用单克隆抗体的方法(例如参照 *Nutr. Sci. Vitaminol.* 45, 491-500, 1999)。还有报告提出了：作为识别卵类粘蛋白的单克隆抗体，使用与未变性卵类粘蛋白反应但不与热变性卵类粘蛋白反应的单克隆抗体、与热变性卵类粘蛋白反应但不与未变性卵类粘蛋白反应的单克隆抗体、以及与未变性卵类粘蛋白和热变性卵类粘蛋白反应的单克隆抗体，也识别加热变性状态，并对卵类粘蛋白进行定量，由此可以对卵变应原进行鉴定和正确的定量的免疫学定量方法(例如参照日本特开 2002-253230 号公报)。

### 发明内容

本发明的目的在于提供：在含有乳变应原、卵清蛋白变应原、小麦变应原、荞麦变应原或花生变应原的食品中，在变性/未变性的任何状态都可以检测乳变应原、卵清蛋白变应原、小麦变应原、荞麦变应原或花生变应原的高灵敏度的免疫学检测方法和其中所使用的检测试剂盒等。

本发明人对于检测特定原材料乳、卵清蛋白、小麦、荞麦或花生的各变应原的方法进行了深入研究，发现：使用识别未变性和变性的乳变应原、未变性和变性的卵清蛋白变应原、未变性和变性的小麦变应原、未变性和变性的荞麦变应原、或未变性和变性的花生变应原的各两种或以上单克隆抗体，则可以检测这些特定原材料的各变应原。

在对特定原材料之一的乳的检测方法进行的研究时，以酪蛋白的主要蛋白质  $\alpha$ s1 酪蛋白为指标，制备了抗该蛋白的单克隆抗体(以下可称为 MAb)，从其中选择多个可识别未变性  $\alpha$ s1 酪蛋白、尿素处理  $\alpha$ s1 酪蛋白、未变性酪蛋白钠、和变性酪蛋白钠的 MAb，通过夹层 ELISA，

发现了可在 100-1000 ppb 的浓度范围内对未变性  $\alpha$ 1 酪蛋白、尿素处理  $\alpha$ 1 酪蛋白、未变性酪蛋白钠、和变性酪蛋白钠进行定性且定量分析的 MAb 的组合。还确认：使用这些 MAb，无论食品中的乳变应原经受任何加工步骤，利用本发明检测方法或检测试剂盒的人都可以更简便地从检查对象制品中检测出乳变应原。

在对特定原材料之一的乳的检测方法进行研究时，以乳清的主要蛋白质  $\beta$  乳球蛋白为指标，制备抗该蛋白的单克隆抗体，从其中选择多个可识别未变性  $\beta$  乳球蛋白、尿素处理  $\beta$  乳球蛋白、还原羧甲基化  $\beta$  乳球蛋白等的 MAb，通过夹层 ELISA，发现了可在 30-1000 ppb 的浓度范围内对未变性  $\beta$  乳球蛋白、尿素处理  $\beta$  乳球蛋白、还原羧甲基化  $\beta$  乳球蛋白进行定性且定量分析的 MAb 的组合。并确认：使用这些 MAb，则不管食品中的乳变应原经过任何加工步骤，利用本发明的检测方法或检测试剂盒的人都可以更简便的从检查对象制品中检测出乳变应原。

在对特定原材料之一的卵清蛋白的检测方法进行研究时，制备抗纯化卵白蛋白或卵类粘蛋白的单克隆抗体，从其中分别选择多个可与未变性抗原结合的 MAb 和可与变性抗原结合的 MAb，发现：通过未变性抗原结合 MAb 群和变性抗原结合的 MAb 群的组合，不管作为抗原的卵白蛋白或卵类粘蛋白处于变性/未变性的任何状态，都可高灵敏度检测，特别是将未变性抗原结合 MAb 群和变性抗原结合 MAb 群组合使用时，即使只存在未变性卵白蛋白或卵类粘蛋白、或者只存在变性卵白蛋白或卵类粘蛋白，也可以以比单独使用未变性抗原结合 Mab (群)或单独使用变性抗原结合 Mab (群)更优异的检测灵敏度进行检测。通过将卵清蛋白变应原——卵白蛋白和卵类粘蛋白的 MAb 组合使用，无论食品中的卵清蛋白经过任何加工步骤，利用本发明的检测方法或检测试剂盒的人都可以更简便地从检查对象制品中检测出卵清蛋白变应原。

在对特定原材料之一的小麦的检测方法进行研究时，制备抗纯化麦醇溶蛋白的单克隆抗体，从其中选择多个可识别未变性小麦麦醇溶蛋白、还原羧甲基化小麦麦醇溶蛋白、0.1 M 乙酸增溶的小麦麦醇溶蛋白、70%乙醇增溶的小麦麦醇溶蛋白、以及变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白的 MAb，通过夹层 ELISA，发现了可在 10-100 ppb 的浓度范围内

对未变性小麦麦醇溶蛋白、还原羧甲基化小麦麦醇溶蛋白、0.1 M 乙酸增溶的小麦麦醇溶蛋白、70%乙醇增溶的小麦麦醇溶蛋白、和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白进行定性且定量的分析的 MAb 的组合。使用这些 MAb，食品中的小麦变应原无论经过任何加工步骤，利用本发明的检测方法或检测试剂盒的人都可以更简便的从检查对象制品中检测出小麦变应原。

在对特定原材料之一的荞麦的检测方法进行研究时，制备抗纯化的 24 kDa 蛋白质或纯化的 76 kDa 蛋白质的单克隆抗体，从其中选择多个可识别 24 kDa 蛋白质或 76 kDa 蛋白质的 MAb，通过夹层 ELISA，发现了即使是未加热(未变性)、加热(变性)的任何状态的荞麦蛋白质，都可以进行高灵敏度分析的、可与未变性荞麦蛋白质结合的 MAb 和可与变性荞麦蛋白质结合的 MAb 的组合。使用这些 MAb，无论食品中的荞麦变应原经过任何加工步骤，利用本发明的检测方法或检测试剂盒的人都可以更简便的从检查对象制品中检测出荞麦变应原。

在对特定原材料之一的花生的检测方法进行研究时，制备抗纯化的未变性 Ara h1(以下可称为“NAh1”)或用尿素和 2-巯基乙醇对纯化的 Ara h1 进行变性的 Ara h1(以下可称为“DAh1”)的单克隆抗体，从其中选择多个可识别 NAh1、DAh1、未变性的花生粗蛋白(以下可称为“NP-e”)、和/或尿素处理的花生粗蛋白(以下可称为“DP-e”)的 MAb，通过夹层 ELISA，发现了对未加热(未变性)、加热(变性)的任何状态的花生蛋白质都可以高灵敏度分析的 MAb 的组合。使用这些 MAb，无论食品中的花生变应原经过任何加工步骤，利用本发明的检测方法或检测试剂盒的人都可以更简便的从检查对象制品中检测出花生变应原。

#### 附图简述

图 1 是表示使用本发明(乳变应原)的两种抗  $\alpha$ s1 酪蛋白 MAb 对各种状态的  $\alpha$ s1 酪蛋白的反应的夹层 ELISA 结果图。

图 2 是表示本发明(乳变应原)的 Pas1CN1 和 Pas1CN2 所识别的小麦  $\alpha$ s1 酪蛋白的构成蛋白质的差异的图。

图 3 是通过夹层 ELISA，表示本发明(乳变应原)的 PLG2 和 PLG1 对各种  $\beta$  乳球蛋白的反应性的图。

图 4 是通过夹层 ELISA，表示本发明(乳变应原)的 PLG2 和 PLG3

对各种 $\beta$ 乳球蛋白的反应性的图。

图5是通过夹层ELISA,表示本发明(乳变应原)的MAB混合系对未变性乳球蛋白的反应性的图。

图6是通过夹层ELISA,表示本发明(乳变应原)的MAB混合系对尿素变性的乳球蛋白的反应性的图。

图7是抗卵白蛋白MAB对本发明(卵清蛋白变应原)试验1中各稀释梯度的反应性的图。

图8是表示抗卵白蛋白MAB对本发明(卵清蛋白变应原)试验2中各稀释梯度的反应性的图。

图9是表示抗卵白蛋白MAB对本发明(卵清蛋白变应原)的试验3中各稀释梯度的反应性的图。

图10是通过夹层ELISA,表示本发明(卵清蛋白变应原)的PNOM1和PNOM2对变性/未变性卵类粘蛋白的反应性的图。

图11是通过夹层ELISA,表示本发明(卵清蛋白变应原)的PDOM1和PDOM2对变性/未变性卵类粘蛋白的反应性的图。

图12是表示本发明(卵清蛋白变应原)的PNOM2和PDOM2以及PNOM1和PDOM1对变性/未变性卵类粘蛋白的反应性的图。

图13是使用本发明(小麦变应原)的两种抗麦醇溶蛋白MAB对各种状态的麦醇溶蛋白的反应的夹层ELISA结果图。

图14是表示本发明(小麦变应原)的PGL1和PGL2所识别的小麦麦醇溶蛋白的构成蛋白质的差异的图。

图15是通过夹层ELISA,表示本发明(荞麦变应原)的PBW2和PBW3对各种荞麦粗蛋白的反应性的图。

图16是通过夹层ELISA,表示本发明(荞麦变应原)的PBW1和PBW2对各种荞麦粗蛋白的反应性的图。

图17是通过夹层ELISA,表示本发明(荞麦变应原)的PBW1、PBW2和PBW3的MAB混合系对未变性荞麦粗蛋白的反应性的图。

图18是通过夹层ELISA,表示本发明(荞麦变应原)的PBW1、PBW2和PBW3的MAB混合系对变性荞麦粗蛋白的反应性的图。

图19是通过夹层ELISA,表示本发明(花生变应原)的PAh1-1、PAh1-2对各种花生粗蛋白的反应性的图。

图20是通过夹层ELISA,表示本发明(花生变应原)的PAh1-2和

PAh1-3对各种花生粗蛋白的反应性的图。

图 21 是通过夹层 ELISA, 表示本发明(花生变应原)的 PAh1-1、PAh1-2 和 PAh1-3 的 MAb 混合系对未变性花生粗蛋白的反应性的图。

图 22 是过夹层 ELISA, 表示本发明(花生变应原)的 PAh1-1、PAh1-2 和 PAh1-3 的 MAb 混合系对变性花生粗蛋白的反应性的图。

### 实施发明的最佳方式

本发明的食品中的变应原的检测方法是使用识别未变性和变性的乳变应原、未变性和变性的卵清蛋白变应原、未变性和变性的小麦变应原、未变性和变性的荞麦变应原、或者未变性和变性的花生变应原的各两种或以上单克隆抗体进行的变应原的检测方法, 只要是以  $\alpha$ s1 酪蛋白的主要蛋白质  $\alpha$ s1 酪蛋白、乳清的主要蛋白质  $\beta$  乳球蛋白、卵清蛋白的主要蛋白质卵白蛋白和卵类粘蛋白、小麦的主要蛋白质麦醇溶蛋白、荞麦的主要蛋白质——分子量 24 kDa 和 76 kDa 的蛋白质、或花生的主要蛋白质 Ara h1 为指标的、食品等中所含的变应原的检测方法即可, 没有特别限定。

本发明的乳变应原的检测方法只要是将识别未变性乳变应原的单克隆抗体和识别变性乳变应原的单克隆抗体结合使用的乳变应原的免疫学检测方法即可, 没有特别限定, 另外本发明的乳变应原检测试剂盒只要是具备识别未变性乳变应原的单克隆抗体、识别变性乳变应原的单克隆抗体, 在将识别未变性乳变应原的单克隆抗体和识别变性乳变应原的单克隆抗体结合使用的条件下使用的免疫学变应原检测试剂盒即可, 没有特别限定, 但优选具备分别识别不同表位的 2 种或以上的单克隆抗体作为识别未变性乳变应原和/或变性乳变应原的单克隆抗体。所述识别未变性乳变应原和/或变性乳变应原的单克隆抗体, 可具体例如抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体或抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体。这里, “乳变应原”是指含有乳酪蛋白的主要蛋白质  $\alpha$ s1 酪蛋白和/或乳清的主要蛋白质  $\beta$  乳球蛋白的物质。

上述抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体可以是识别未变性  $\alpha$ s1 酪蛋白、尿素处理  $\alpha$ s1 酪蛋白、未变性酪蛋白钠和变性酪蛋白钠的抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体, 优选例如识别 SEQ ID NO.1 所示的  $\alpha$ s1 酪蛋白的氨基酸序列中从第 132 号-第 193 号的区域的单克隆抗体, 具体来说, 优选例如杂

交瘤(FERM ABP-10263)生成的抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN1、杂交瘤(FERM ABP-10264)生成的抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN2 等。将 Pas1CN1 和 Pas1CN2 组合,可特别有利于进行夹层 ELISA 或免疫色谱。例如,使用这些抗体,通过夹层 ELISA,可以在 10-1000 ppb 的浓度范围内对食品中的未变性  $\alpha$ s1 酪蛋白和尿素处理  $\alpha$ s1 酪蛋白进行定性且定量的分析。

上述抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体可以是识别未变性  $\beta$  乳球蛋白、尿素处理  $\beta$  乳球蛋白、还原羧甲基化  $\beta$  乳球蛋白的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体,具体可优选例如:杂交瘤(FERM ABP-10281)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PLG1、杂交瘤(FERM ABP-10282)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PLG2、杂交瘤(FERM ABP-10283)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PLG3 等。另外,通过将 PLG2 和 PLG1、PLG2 和 PLG3、PLG2 和 PLG1 和 PLG3 组合,可特别有利于进行夹层 ELISA 或免疫色谱。例如使用这些抗体,通过夹层 ELISA,可以在 30-1000 ppb 的浓度范围内对食品中的未变性  $\beta$  乳球蛋白和尿素处理  $\beta$  乳球蛋白进行定性且定量的分析。

本发明的乳变应原的检测方法中,优选使用尿素和 2-巯基乙醇从检样中萃取酪蛋白和/或乳清蛋白,还优选使用识别未变性酪蛋白的 1 种或多种单克隆抗体和识别变性酪蛋白的 1 种或多种单克隆抗体,以及识别未变性  $\beta$  乳球蛋白的 1 种或多种单克隆抗体和识别变性  $\beta$  乳球蛋白的 1 种或多种单克隆抗体。本发明的乳变应原检测试剂盒中,优选含有用于萃取酪蛋白和/或乳清蛋白的尿素和 2-巯基乙醇,还优选具备识别未变性酪蛋白的 1 种或多种单克隆抗体和识别变性酪蛋白的 1 种或多种单克隆抗体,以及识别未变性  $\beta$  乳球蛋白的 1 种或多种单克隆抗体和识别变性  $\beta$  乳球蛋白的 1 种或多种单克隆抗体。

作为本发明的卵清蛋白变应原的检测方法,只要是将识别未变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体和识别变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体结合使用的卵清蛋白变应原的免疫学检测方法即可,没有特别限制,另外本发明的卵清蛋白变应原检测试剂盒只要是具备识别未变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体和识别变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体,在将识别未变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体和识别变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体结合使用的条件下使用的免疫学变应原检测试

剂盒即可，没有特别限定，优选具备识别分别不同的表位的 2 种或以上的单克隆抗体，作为识别未变性卵清蛋白变应原和/或变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体。所述识别未变性卵清蛋白变应原和/或变性卵清蛋白变应原的单克隆抗体可具体例如抗卵白蛋白单克隆抗体或抗卵类粘蛋白单克隆抗体。这里“卵清蛋白变应原”是指含有卵清蛋白的主要蛋白质卵白蛋白和/或卵类粘蛋白的物质。

上述抗卵白蛋白单克隆抗体优选为识别未变性卵白蛋白和/或还原羧甲基化卵白蛋白的抗卵白蛋白单克隆抗体，具体例子有：杂交瘤(FERM ABP-10265)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA1、杂交瘤(FERM ABP-10266)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA2、杂交瘤(FERM ABP-10275)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA1、杂交瘤(FERM ABP-10276)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA2 等。通过 PNOA1 和 PNOA2 等抗未变性卵白蛋白单克隆抗体、或者 PDOA1 和 PDOA2 等抗变性卵白蛋白单克隆抗体的组合，特别是将 PNOA1 和 PNOA2 等抗未变性卵白蛋白单克隆抗体与 PDOA1 和 PDOA2 等抗变性卵白蛋白单克隆抗体组合，可特别有利于进行夹层 ELISA 或免疫色谱。例如，使用这些抗体，通过夹层 ELISA，可以在 1.0-10.0 ppb 的浓度范围内对食品中的未变性卵白蛋白和/或变性卵白蛋白进行定性且定量的分析。

上述抗卵类粘蛋白单克隆抗体可例如识别未变性卵类粘蛋白和/或尿素变性卵类粘蛋白的抗卵类粘蛋白单克隆抗体，具体例子有：杂交瘤(FERM ABP-10279)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM1、杂交瘤(FERM ABP-10280)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM2、杂交瘤(FERM ABP-10277)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM1、杂交瘤(FERM ABP-10278)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM2 等。通过 PNOM1 和 PNOM2 等抗未变性卵类粘蛋白单克隆抗体、或者 PDOM1 和 PDOM2 等抗变性卵类粘蛋白单克隆抗体的组合，特别是通过将 PNOM1 和 PNOM2 等抗未变性卵类粘蛋白单克隆抗体与 PDOM1 和 PDOM2 等抗变性卵类粘蛋白单克隆抗体组合，可特别有利于进行夹层 ELISA 或免疫色谱。例如，使用这些抗体，通过夹层 ELISA，可以在 10-100 ppb 的浓度范围内对食品中的未变性卵类粘蛋白和/或变性卵类粘蛋白进行定性且定量的分析。

本发明的卵清蛋白变应原的检测方法中，优选使用尿素和 2-巯基乙醇对卵白蛋白和/或卵类粘蛋白进行萃取，还优选使用识别未变性卵白蛋白的 1 种或多种单克隆抗体和识别变性卵白蛋白的 1 种或多种单克隆抗体，以及识别未变性卵类粘蛋白的 1 种或多种单克隆抗体和识别变性卵类粘蛋白的 1 种或多种单克隆抗体。本发明的卵清蛋白变应原检测试剂盒中，优选含有用于萃取卵白蛋白和/或卵类粘蛋白的尿素和 2-巯基乙醇，还优选具备识别未变性卵白蛋白的 1 种或多种单克隆抗体和识别变性卵白蛋白的 1 种或多种单克隆抗体，以及识别未变性卵类粘蛋白的 1 种或多种单克隆抗体和识别变性卵类粘蛋白的 1 种或多种单克隆抗体。

本发明的小麦变应原的检测方法只要是使用识别未变性小麦麦醇溶蛋白和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体进行的小麦变应原的免疫学检测方法，或者是识别未变性小麦麦醇溶蛋白和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白、且将识别不同表位的两种抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体结合使用的小麦变应原的免疫学检测方法即可，没有特别限制，本发明的小麦变应原检测试剂盒只要是具备识别未变性小麦麦醇溶蛋白和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体的免疫学变应原检测试剂盒，或者是具备识别未变性小麦麦醇溶蛋白和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白、且识别不同表位的两种抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体的免疫学变应原检测试剂盒即可，没有特别限制，上述抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体优选为识别未变性小麦麦醇溶蛋白、还原羧甲基化小麦麦醇溶蛋白、0.1 M 乙酸增溶的小麦麦醇溶蛋白、70%乙醇增溶的小麦麦醇溶蛋白、以及变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体，具体例子有：杂交瘤(FERM ABP-10267)生成的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL1、杂交瘤(FERM ABP-10268)生成的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL2 等。将这些抗体组合，特别有利于进行夹层 ELISA 或免疫色谱。例如通过夹层 ELISA，可以在 10-100 ppb 的浓度范围内对食品中的未变性小麦麦醇溶蛋白、还原羧甲基化小麦麦醇溶蛋白、0.1 M 乙酸增溶的小麦麦醇溶蛋白、70%乙醇增溶的小麦麦醇溶蛋白、和变性剂增溶的小麦麦醇溶蛋白进行定性且定量的分析。

本发明的荞麦变应原的检测方法只要是使用识别未变性荞麦粗蛋

白和加热变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体进行的荞麦变应原的免疫学检测方法，或者是将识别未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白、且识别不同表位的两种抗荞麦粗蛋白单克隆抗体结合使用的荞麦变应原的免疫学检测方法即可，没有特别限制，本发明的荞麦变应原检测试剂盒只要是具备识别未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体的免疫学变应原检测试剂盒，或者是具备识别未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白、且识别不同表位的2种抗荞麦粗蛋白单克隆抗体的免疫学变应原检测试剂盒即可，没有特别限制，抗荞麦粗蛋白单克隆抗体优选识别24 kDa蛋白质和加热变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体、或者识别76 kDa蛋白质和未变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体，具体例子有：杂交瘤(FERM ABP-10272)生成的抗24 kDa蛋白质单克隆抗体PBW1、杂交瘤(FERM ABP-10273)生成的抗76 kDa蛋白质单克隆抗体PBW2、杂交瘤(FERM ABP-10274)生成的抗76 kDa蛋白质单克隆抗体PBW3等。通过PBW1等识别24 kDa蛋白质和加热变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体和PBW2等识别76 kDa蛋白质和未变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体的组合，或者PBW2和PBW3等均识别未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白的抗荞麦粗蛋白单克隆抗体的组合，其中，以这些单克隆抗体的混合系的形式组合，特别有利于进行夹层ELISA或免疫色谱。例如通过夹层ELISA，可在10-1000 ppb的浓度范围内对未变性荞麦粗蛋白和加热变性荞麦粗蛋白进行定性且定量的分析。

本发明的荞麦变应原的检测方法中，优选使用尿素和2-巯基乙醇从检样中萃取加热变性荞麦粗蛋白，本发明的荞麦变应原检测试剂盒优选具备尿素和2-巯基乙醇，以作为从检样中萃取荞麦粗蛋白的萃取剂。

本发明的花生变应原的检测方法只要是使用识别未变性花生Ara h1蛋白质和加热变性花生Ara h1蛋白质的抗Ara h1蛋白质单克隆抗体进行的花生变应原的免疫学检测方法，或者是将识别未变性花生Ara h1蛋白质和加热变性花生Ara h1蛋白质、且识别不同表位的2种抗Ara h1蛋白质单克隆抗体结合使用的花生变应原的免疫学检测方法即可，没有特别限定，本发明的花生变应原检测试剂盒只要是具备识别

未变性花生 Ara h1 蛋白质和加热变性花生 Ara h1 蛋白质的抗花生 Ara h1 蛋白质单克隆抗体的免疫学变应原检测试剂盒，或者是具备识别未变性花生 Ara h1 蛋白质和加热变性花生 Ara h1 蛋白质、且识别不同表位的 2 种抗花生 Ara h1 蛋白质单克隆抗体的免疫学变应原检测试剂盒即可，没有特别限定，抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体优选识别未变性 Ara h1 蛋白质和未变性花生粗蛋白、和/或尿素处理的 Ara h1 蛋白质和尿素处理的花生粗蛋白的抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体，具体例子有：杂交瘤(FERM ABP-10269)生成的抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-1、杂交瘤(FERM ABP-10270)生成的抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-2、杂交瘤(FERM ABP-10271)生成的抗加热变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-3 等。通过 PAh1-1 等识别未变性 Ara h1 蛋白质和未变性花生粗蛋白的抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体、和 PAh1-2 等识别未变性/变性 Ara h1 蛋白质和未变性/变性花生粗蛋白的抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体的组合，或者 PAh1-2 和 PAh1-3 等识别未变性/变性 Ara h1 蛋白质和未变性/变性花生粗蛋白的抗 Ara h1 蛋白质单克隆抗体之间的组合，其中通过以这些单克隆抗体的混合系的形式组合，特别有利于进行夹层 ELISA 或免疫色谱。例如通过夹层 ELISA，可以在 10-1000 ppb 的浓度范围内对未变性花生 Ara h1 蛋白质和加热变性花生 Ara h1 蛋白质进行定性且定量的分析。

本发明的花生变应原的检测方法中，优选使用尿素和 2-巯基乙醇从检样中萃取加热变性花生粗蛋白，本发明的花生变应原检测试剂盒优选具备尿素和 2-巯基乙醇，以作为从检样中萃取加热变性花生粗蛋白的萃取剂。

以上本发明的免疫学变应原检测方法包含以下阶段：将含有未变性/变性的乳变应原、未变性和变性的卵清蛋白变应原、未变性和变性的小麦变应原、未变性和变性的荞麦变应原、或未变性和变性的花生变应原(以下可称为“食物变应原”)的试样与标记的抗食物变应原 MAbs 接触，或者在标记抗体存在下与食物变应原 MAbs 接触，通过抗原抗体反应，标记免疫复合物的形式捕捉的免疫反应阶段；使用存在于该分子中的标记物质对生成的该免疫复合物进行分离·测定的检测阶段，所述免疫反应阶段中的抗原抗体反应方法没有特别限定，例如有以下方法。

将试样中的食物变应原捕捉到与不溶性载体结合的本发明的抗食物变应原 Mab 上, 然后与标记抗 IgG 抗体反应的夹层法; 使用标记抗食物变应原 MAb(第二抗体)的夹层双抗法, 其中所述第二抗体识别与抗食物变应原 MAb 不同的表位, 所述抗食物变应原 Mab 与不溶性载体结合; 在标记抗原存在下, 使与不溶性载体结合的抗食物变应原 Mab 与试样中的食物变应原反应的竞争法; 使含有食物变应原的试样和与其特异性反应的磁珠结合标记抗食物变应原 MAb 作用, 然后通过磁力进行分离的检测免疫复合物中的标记物质的磁珠法; 使含有食物变应原的试样和与其特异性反应的标记抗食物变应原 MAb 作用, 凝集沉淀, 然后通过离心进行分离的检测免疫复合物中的标记物质的凝集沉淀法; 用胶体金等标记的抗食物变应原 MAb 与作为食物变应原的蛋白质结合, 所得抗原抗体复合物通毛细管现象等在测试条上移动, 在这个过程中, 预先将与食物变应原结合的抗食物变应原 MAb 固定, 通过捕捉抗原抗体复合物而出现染色条带, 通过该染色条带的有无进行定性分析的免疫色谱法; 除此之外还可利用双重免疫扩散法、放射免疫扩散法等公知的免疫测定法, 优选使用分别识别不同的表位的 2 种或以上单克隆抗体作为抗食物变应原 MAb 的方法, 例如从可在 100-1000 ppb 的浓度范围内对食品中的未变性变应原和/或变性变应原进行定性且定量分析的高灵敏度方面考虑, 优选夹层双抗法, 从定性简便性考虑, 优选免疫色谱法。另外, 从肉食制品等食品试样中萃取变应原时, 优选使用尿素和 2-巯基乙醇。

上述抗原抗体反应中使用的不溶性载体例如有: 聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、聚丙烯腈、氟树脂、交联葡聚糖、多糖等高分子化合物, 其它有玻璃、金属、磁性颗粒及它们的组合等, 不溶性载体的形状例如可使用托盘状、球状、纤维状、棒状、盘状、容器状、胞状、微孔板状、试管、胶乳珠状等各种形状。抗原或抗体向这些不溶性载体上固体的方法没有特别限定, 可以使用物理吸附法、共价键法、离子键法等。

本发明的食物变应原检测方法或食物变应原检测试剂盒中所使用的抗食物变应原 MAb 的免疫球蛋白的类和型没有特别限定, 抗食物变应原 MAb 优选使用 IgG 类  $\kappa$  型的抗体。单克隆抗体的形式可以采用完整抗体或  $F(ab')_2$ 、Fab 等片段。抗体的来源没有特别限定, 可以是小

鼠、大鼠、人、兔、鸡等。从制备的简便性考虑，优选使用来自小鼠的单克隆抗体。抗食物变应原 MAb 可如下制备：用未变性或变性的  $\alpha 1$  酪蛋白免疫动物，将从中采集的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合，将制备的杂交瘤在培养基上培养，或者施用于动物腹腔内，在腹水内增殖，然后从该培养物或腹水中采集。

生成抗食物变应原 Mab 的杂交瘤可如下制备：例如使用未变性和/或变性的食物变应原免疫 BALB/c 小鼠，将免疫小鼠的抗体生成细胞与小鼠杂交瘤细胞按照常规方法进行细胞融合，通过免疫荧光染色图谱进行筛选，制备生成抗食物变应原 Mab 的杂交瘤。上述抗体生成细胞可以是：例如施用未变性和/或变性的食物变应原或含有该变应原的组合物，从免疫动物得到的脾脏细胞、淋巴结细胞、B-淋巴细胞等。免疫动物有：小鼠、大鼠、兔、马等。免疫可如下进行：例如将未变性和/或变性的食物变应原直接或与适当的佐剂一起施用于动物的皮下、肌肉或腹腔内，以 1-2 次/月、1-6 个月的频率和期间施用。抗体生成细胞的分离可通过从最终免疫 2-4 天后的免疫动物中采集。骨髓瘤细胞可使用来自小鼠、大鼠的骨髓瘤细胞等。优选抗体生成细胞和骨髓瘤细胞来自同种动物。

细胞融合可如下进行：例如在 Dulbecco's 改良 eagle 培养基(DMEM)等培养基中、在聚乙二醇等融合促进剂存在下，将抗体生成细胞和骨髓瘤细胞混合。细胞融合结束后，用 DMEM 等适当稀释、离心，将沉淀悬浮于 HAT 培养基等选择性培养基中进行培养，选择杂交瘤，接着使用培养上清，通过酶抗体法选择生成抗体的杂交瘤，通过有限稀释法等进行克隆，可得到生成抗食物变应原 MAb 的杂交瘤。另外也可以从只使用  $\alpha 1$  酪蛋白等未变性的食物变应原进行免疫的抗免疫动物中有效地得到抗变性食物变应原 MAb。此时，可以筛选抗变性  $\alpha 1$  酪蛋白 MAb 等生成抗变性食物变应原 Mab 的杂交瘤，或者通过固相状态的 ELISA，选择生成抗未变性的  $\alpha 1$  酪蛋白等未变性食物变应原的单克隆抗体的杂交瘤，从该生成抗体的杂交瘤所生成的单克隆抗体中，可以得到只在液相状态下与未变性的食物变应原特异性反应的抗食物变应原 MAb。如上所述，可以将生成抗体的杂交瘤在培养基中或生物体内培养，从培养物中采集单克隆抗体，不过从培养物或腹水中分离·纯化单克隆抗体的方法只要是蛋白质纯化常用的方法即可，可以

是任何方法，例如可以通过 IgG 纯化中通常使用的硫酸铵分离法、阴离子交换物或蛋白 A、G 等的柱层析法进行。

另外，标记抗体制备中所使用的标记物只要是通过单独或与其它物质反应产生可检测的信号标记物即可，可以使用酶、荧光物质、化学发光物质、放射性物质、胶体金等，酶有：过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、葡糖过氧化物酶、葡糖-6-磷酸脱氢酶、乙醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、青霉素酶、过氧化氢酶、脱辅基葡糖氧化酶(アポグルコースオキシダーゼ)、脲酶、萤光素酶或乙酰胆碱酯酶等，荧光物质有荧光素异硫氰酸酯、藻胆蛋白、稀土金属螯合物、丹磺酰氯或四甲基罗丹明异硫氰酸酯等，发光物质有：鲁米诺类、ジオキセタン、吖啶鎓盐类等，放射性物质有  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$  或  $^{131}\text{I}$  等。标记物质为酶时，为测定其活性，可以使用底物、根据需要使用显色剂、荧光剂、发光剂等。

本发明的食物变应原检测试剂盒含有作为有效成分的抗食物变应原 MAb，优选分别识别不同的表位的 2 种或以上的抗食物变应原 MAb，从保存稳定性角度考虑，与溶液状态相比，优选以冻干物的形式保存，检测试剂盒除含有所述抗食物变应原 MAb 溶解所需的缓冲液或培养液之外，还可以含有用于制备试样的缓冲液等。更优选的本发明抗食物变应原检测试剂盒方案是上述免疫色谱法中的测试条。这种情况下，优选将识别不同表位的两种单克隆抗体的至少一种制成免疫色谱中使用的胶体金标记的单克隆抗体。

本发明的单克隆抗体有：杂交瘤(FERM ABP-10263)生成的抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN1、杂交瘤(FERM ABP-10264)生成的抗  $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体 Pas1CN2、杂交瘤(FERM ABP-10281)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PLG1、杂交瘤(FERM ABP-10282)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PLG2、杂交瘤(FERM ABP-10283)生成的抗  $\beta$  乳球蛋白单克隆抗体 PLG3、杂交瘤(FERM ABP-10265)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA1、杂交瘤(FERM ABP-10266)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PNOA2、杂交瘤(FERM ABP-10275)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA1、杂交瘤(FERM ABP-10276)生成的抗卵白蛋白单克隆抗体 PDOA2、杂交瘤(FERM ABP-10279)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PNOM1、杂交瘤(FERM ABP-10280)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗

体 PNOM2、杂交瘤(FERM ABP-10277)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM1、杂交瘤(FERM ABP-10278)生成的抗卵类粘蛋白单克隆抗体 PDOM2、杂交瘤(FERM ABP-10267)生成的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL1、杂交瘤(FERM ABP-10268)生成的抗小麦麦醇溶蛋白单克隆抗体 PGL2、杂交瘤(FERM ABP-10272)生成的抗 24 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW1、杂交瘤(FERM ABP-10273)生成的抗 76 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW2、杂交瘤(FERM ABP-10274)生成的抗 76 kDa 蛋白质单克隆抗体 PBW3、杂交瘤(FERM ABP-10269)生成的抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-1、杂交瘤(FERM ABP-10270)生成的抗未变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-2、杂交瘤(FERM ABP-10271)生成的抗加热变性 Ara h1 蛋白质单克隆抗体 PAh1-3, 这些杂交瘤于 2005 年 2 月 14 日(领受日)被独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心(〒305-5466 日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第六)领受。上述 Pas1CN1(FERM P-20206)、Pas1CN2(FERM P-20207)、PNOA1(FERM P-20208)、PNOA2(FERM P-20209)、PGL1(FERM P-20210)、PGL2(FERM P-20211)于 2004 年 9 月 7 日(受托日)保藏于独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心。

以下通过实施例更具体的说明本发明, 本发明的技术范围并不受这些举例的限定。

## 实施例 1

### 1. 抗 $\alpha$ s1 酪蛋白单克隆抗体的确立

#### 1-1 材料和方法

##### 1) $\alpha$ s1 酪蛋白(以下称为“ $\alpha$ CN”)的制备

按照 Zittle (1959)的方法, 从新鲜的牛乳中得到  $\alpha$ CN 的粗组分。再使用 TSK 凝胶 DEAE 650S(TOSOH), 通过含有 50mM 咪唑-HCl 缓冲液(pH 6.4)、4M 尿素的 NaCl 线性梯度(0-0.3 M), 对该粗组分进行纯化。将纯化的  $\alpha$ CN 组分用蒸馏水进行透析, 然后冷冻干燥。用生理盐水制成该冻干物的 0.1%溶液, 分别以 500  $\mu$ l 分注到 1ml 容量的 Eppendorf 管中, 在免疫之前在 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存, 作为抗原溶液。

##### 2) 免疫

使用 5 只 6 周龄的 BALB/c 小鼠(日本クレア株式会社)作为供试动

物。初次免疫时，将完全弗氏佐剂(Difco 制造)等量加入到装有 500  $\mu\text{l}$  0.1%的  $\alpha\text{CN}$  的 Eppendorf 管中，用漩涡混合器搅拌，将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150  $\mu\text{l}$  腹腔内注射该乳液。另外以 3 周的间隔进行两次追加免疫。免疫时，将不完全弗氏佐剂(Difco)等量加入到装有 500  $\mu\text{l}$  0.1%的  $\alpha\text{CN}$  的 Eppendorf 管中，用漩涡混合器搅拌，将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150  $\mu\text{l}$  腹腔内注射该乳液。

### 3) 血液中抗体效价的测定

在初次或追加免疫中，在注射  $\alpha\text{CN}$  一周后，从各 BALB/c 小鼠的尾部静脉采血。采集的血液在室温下放置两小时，然后离心，得到血清。制备这些血清的 10 倍稀释梯度，通过非竞争法 ELISA，检测小鼠血液中的抗  $\alpha\text{CN}$  抗体效价。二次抗体采用碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG(H+L)抗体(Jackson ImmunoReserch Laboratories Inc.)。

### 4) 杂交瘤的制备

杂交瘤的制备按照 Köhler 和 Milstein 的方法(1975)进行。即，对抗体效价充分提高的小鼠由尾部静脉注射 100  $\mu\text{l}$  0.1%  $\alpha\text{CN}$  溶液。静脉注射 4 天后，从小鼠体内无菌摘除脾脏。将脾脏切细后，用 RPMI1640 清洗，过灭菌尼龙网(细胞筛网，70 mm, Becton Dickinson 制造)，得到脾细胞悬浮液。通过 1000 rpm $\times$ 10 分钟的离心，收集脾细胞，再次悬浮于 RPMI1640，进行细胞计数。将该脾细胞悬浮液和骨髓瘤细胞(P3X63Ag8.653)悬浮液按照细胞数 10: 1 混合，再次进行 1000 rpm $\times$ 10 分钟的离心，得到颗粒。向该颗粒中滴加平均分子量为 3,350 的 45% 聚乙二醇，进行细胞融合。向细胞溶液中加入 RPMI1640，稀释后通过离心得到颗粒。向该颗粒中加入 HAT 选择性培养基，分注到 24 孔细胞培养板(Becton Dickinson)中，使细胞数为  $5\times 10^6$  个细胞/孔，在 5%CO<sub>2</sub> 下、在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养。其中所述 HAT 选择性培养基是杂交瘤用培养基(含有 10%胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素等 RPMI1640 培养基)中加入 100  $\mu\text{M}$  次黄嘌呤、0.4  $\mu\text{M}$  氨基蝶呤、16  $\mu\text{M}$  胸腺嘧啶的培养基。

### 5) 有限稀释法克隆

将细胞培养板各孔的培养上清作为 ELISA 的一次抗体用于试验，测定生成抗  $\alpha\text{CN}$  抗体的杂交瘤的存在。将 ELISA 测定中对  $\alpha\text{CN}$  显示阳性的孔的杂交瘤转移到 96 孔细胞培养板(Becton Dickinson)，使细胞

数为 0.9 个细胞/孔, 进行有限稀释法克隆。将 4 周龄 BALB/c 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞, 以  $5 \times 10^6$  个细胞/孔加入到 96 孔细胞培养板的各孔中。克隆的杂交瘤的培养使用含有 10% 胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基。

#### 6) 抗体的筛选

单克隆抗体的筛选通过检测对未变性  $\alpha$ CN (以下称为“N- $\alpha$ CN”)、尿素处理  $\alpha$ CN (以下称为“D- $\alpha$ CN”)、市售的酪蛋白钠的未变性物(以下称为“N-CN”)或市售的酪蛋白钠的尿素处理物(以下称为“D-CN”)四种蛋白质的反应性的不同来得到特异性不同的克隆。D- $\alpha$ CN 如下获得: 称量 1 mg 纯化  $\alpha$ CN, 加入 100  $\mu$ l 5% EDTA、6.0 g 尿素、0.2 ml 2-巯基乙醇、1 ml 50 mM Tris-盐酸缓冲液(pH 8.6)、1.5 ml 蒸馏水, 用铝箔覆盖, 在 100 $^{\circ}$ C 油浴中加热 1 小时, 进行变性处理。培养上清对 N- $\alpha$ CN、D- $\alpha$ CN、N-CN 或 D-CN 的反应性通过非竞争法 ELISA 检测。

#### 7) 腹水的采集和 MAb 的纯化

按照 Jones 等人(1990)的方法, 首先对 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.2 ml 不完全弗氏佐剂。一周后, 对每只小鼠接种  $5 \times 10^6$  个细胞的克隆的杂交瘤。腹水滞留后, 用针筒采集腹水。通过蛋白 G 柱(アマシヤム・フアルマシア)对采集的腹水进行纯化。

#### 8) MAb 的类、亚类和型

通过 Monoclonal mouse immunoglobulin isotyping kit (Pharmingen), MAb 的类和亚类确定为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL( $\kappa$ )和 IgL( $\gamma$ )。

#### 9) MAb 的生物素化

将纯化的 Mab 用于夹层 ELISA, 分别进行生物素化处理。用 50 mM 的碳酸缓冲液(pH 8.5)制成 20 mg/ml, 加入 10  $\mu$ l 以 3 mg/100 $\mu$ l 溶解于 DMSO 的 NHS-生物素溶液, 搅拌, 然后一边冰冷却一边静置 2 小时。然后用 PBS 置换为 20 mg/ml。

## 1-2 结果

### 1) MAb 的选择

得到了 6 种特异性识别乳的主要变应原  $\alpha$ s1 酪蛋白( $\alpha$ CN)的 MAb。通过直接 ELISA 检测这 6 种 MAb 对于分别制成固相的各抗原 N-

$\alpha$ CN、D- $\alpha$ CN、N-CN、或 D-CN 的特异性。还对这些 MAb 的类、亚类进行了检测。结果如表 1 所示。表 1 中，+表示对各固相抗原为阳性，-表示阴性。如表 1 所示，选择出与所有状态的抗原结合的 MAb——Pas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3。

[表1]

MAb名	N- $\alpha$ CN	D- $\alpha$ CN	N-CN	D-CN	类、亚类和型
Pas1CN1	+	+	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
Pas1CN2	+	+	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
Pas1CN3	+	+	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
Pas1CN4	-	-	+	-	IgG1 ( $\kappa$ )
Pas1CN5	+	-	+	-	IgG1 ( $\kappa$ )
Pas1CN6	-	-	+	-	IgG1 ( $\kappa$ )

## 2) 夹层 ELISA 中的组合条件

使用通过直接 ELISA 选择的 Pas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3，对全部的 MAb 的组合进行夹层 ELISA。将 Pas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3 分别制成固相或生物素化抗体，通过夹层 ELISA 选出了用于检测  $\alpha$ CN 或 CN 的 MAb 的组合。结果选择出 Pas1CN1 (FERM ABP-10263)和 Pas1CN2 (FERM ABP-10264)作为可以检测 N- $\alpha$ CN、D- $\alpha$ CN、N-CN、D-CN 的组合。结果如图 1 所示。

## 2. Pas1CN1、Pas1CN2 所识别的表位

将  $\alpha$ s1 酪蛋白溶液用赖氨酰内切蛋白酶分解，通过トリミン-SDS-PAGE (16.5%分离凝胶、5%浓缩凝胶)分离分解物。使用分离的凝胶，通过电印迹转印 PVDF 膜。将 Pas1CN1 和 Pas1CN2 的培养上清(1/1000)与转印的 PVDF 膜反应，然后显色，确认所识别的表位。结果如图 2 所示。结果，Pas1CN1 和 Pas1CN2 均识别分子量约 7000、SEQ ID NO.1 所示的  $\alpha$ s1 酪蛋白氨基酸序列第 132 号-193 号的区域。

## 3. 通过夹层 ELISA 检测食品中变性或未变性酪蛋白

通过上述 1 中选择的 Pas1CN1 和 Pas1CN2 的组合，尝试检测实际食品中的酪蛋白。

### 3-1 材料和方法

### 1) 模型肉食制品的制备

选择肉食制品作为定量试验的模型食品，按照表 2 所示的配比制备含有各浓度酪蛋白钠的模型肉食制品。猪瘦肉是从猪上等肉中除去脂肪、筋，制成 5 mm 绞肉使用。

[表2]

模型肉食制品的配比表

原材料	测试1	测试2	测试3	对照
猪瘦肉 (%)	83.0	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0	2.0
多磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (ppm)	120	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300	300
水	14.5	14.5	14.5	14.5
酪蛋白钠 (ppm)	200	20	2	0
合计 (%)	99.762	99.744	99.7422	99.742

按照各配比称量添加物，用食品加工机混合，进行氯乙烯管的填充，在 75℃ 加热 30 分钟。

### 2) 通过夹层 ELISA 进行定量分析

将各模型肉食制品用食物处理机均匀磨碎，作为分析用样品。称量 2 g 样品，加入 38 g 含有 1M 尿素和 0.1% 2-巯基乙醇的 PBST，在 100℃ 进行 1 小时加热处理。冷却后，进行 3,000 rpm×20 分钟的离心，向 0.5 ml 上清中加入 9.5 ml PBST，作为 ELISA 用样品。校正曲线使用同样进行了尿素、2-巯基乙醇处理的酪蛋白钠的梯度稀释品。与用 PBST 从分析样品中进行萃取、使用溶解于 PBST (向 PBS 中加入 0.5% 聚氧乙烯脱水山梨醇一月桂酸酯) 的酪蛋白钠作为校正曲线、但不使用尿素和 2-巯基乙醇的情况进行比较。

### 3-2 结果

关于通过夹层 ELISA 对模型肉食制品中的酪蛋白钠进行的分析，使用尿素和 2-巯基乙醇的结果如表 3 所示，只用 PBST 萃取的结果如表 4 所示。

[表3]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	235.4	16.4	1.5	N. D. *2
回收率 (%) *1	117.7	82.0	75.0	-

\*1 : (分析值/添加量) × 100

\*2 : 未检出

[表4]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	16.1	1.7	N. D. *2	N. D.
回收率 (%) *1	8.1	8.5	-	-

\*1 : (分析值/添加量) × 100

\*2 : 未检出

由以上结果可知：将尿素和 2-巯基乙醇加入到萃取液中时，可以以高回收率检测模型肉食制品中的酪蛋白钠，而用 PBST 萃取则回收率非常低。由此可知：使用尿素和 2-巯基乙醇对从食品中萃取酪蛋白钠非常有效，这种情况下可利用的 MAb 的特性必须是可以与尿素增溶的酪蛋白结合。

#### 4. 通过免疫色谱检测变性和未变性酪蛋白钠

##### 4-1 材料和方法

##### 1) 胶体金标记和结合垫的制备

用 2 mM 硼酸缓冲液(pH 9.0)制备成 1 mg/ml Pas1CN1 的 MAb 溶液。向 5ml 预先用 0.2 M 碳酸钾溶液制备成 pH 9.0 的胶体金溶液(シグマ制造)中加入 500  $\mu$ l MAb 溶液，在室温下反应 30 分钟，然后加入 625  $\mu$ l 10% BSA 溶液，再反应 15 分钟。进行离心，用 1% BSA 溶制成 OD525=1.0。在玻璃纤维制的结合垫上涂布成 68  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>，进行干燥。

## 2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 制成 4 mg/ml 的 Pas1CN2 的 MAb 溶液，呈直线状涂布于硝基纤维素膜上，干燥。然后用含有 1% BSA、0.1%吐温 20 的 PBS、在 37℃ 封闭 2 小时，然后用 PBS 清洗，干燥。

## 3) 免疫色谱条的组装和评价

分别贴装上述制备的样品垫、结合垫、抗体固定化膜、吸收垫，制成免疫色谱条。将上述制备的模型肉食制品进行适当稀释，作为被检液使用。

## 4-2 结果

通过 Pas1CN2 和胶体金标记 Pas1CN1 的组合，无论酪蛋白钠加热或非加热，都可以以最低 50 ppb (食品中 2 ppm) 检测。该结果表明，不管是以制造过程中混入的未变性酪蛋白钠为对象，还是以加热后的制品为对象，可以设计出在任何情况下都可以应对的免疫色谱条。

作为对照，在市售的变应原检测用免疫色谱条中滴加只含有 0.01 M 尿素的 PBS，此时产生非特异性条带，为假阳性。这表明：如果不使用蛋白质变性剂，那么可作为变应原检测的对象可能被限制在极狭窄的范围内。其中所述蛋白质变性剂用于有效从因加热等而变性的食品蛋白质中萃取变应原。

## 5. 抗 $\beta$ 乳球蛋白单克隆抗体的确立

### 5-1 材料和方法

#### 1) $\beta$ 乳球蛋白(以下可称为“ $\beta$ LG”)的制备

按照 Zittle (1959) 的方法，从新鲜的牛乳中得到乳清的粗组分。再使用 TSK 凝胶 DEAE 650S (TOSOH)，通过 50 mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.5)、NaCl 的线性梯度 (0-0.4 M) 对该粗组分进行纯化。通过蒸馏水对该纯化的  $\beta$ LG 组分进行透析，然后冷冻干燥，制成未变性  $\beta$ LG (以下可称为“N- $\beta$ LG”)。称量 10 mg 该 N- $\beta$ LG，加入 1 ml 1.4 M 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.6)、100  $\mu$ l 5% EDTA、1.2 g 尿素、33  $\mu$ l 2-巯基乙醇，定容为 2.5 ml，然后进行氮气置换，在 37℃ 进行 1 小时的还原处理，再加入 89 mg 溶解于 300  $\mu$ l 1M NaOH 的一碘乙酸，用氮气置换，然后在室温下进行 1 小时的羧甲基化，制成还原羧甲基化  $\beta$ LG (以下可称为

“R-βLG”)。用生理盐水将这些冻干物制成 0.1% 的溶液，分别以 500 μl 分注于 1 ml 容量的 Eppendorf 管中，在进行免疫之前在 -20℃ 冷冻保存，作为抗原溶液。

## 2) 免疫

使用 5 只 5 周龄的 BALB/c 小鼠作为供试动物。初次免疫时，向装有 500 μl 0.1% N-βLG 或 R-βLG 的 Eppendorf 管中等量加入完全弗氏佐剂(Difco)，用漩涡混合器搅拌，将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150 μl 腹腔内注射该乳液。追加免疫以 2 周的间隔进行 3 次。免疫是将不完弗氏佐剂(Difco)等量加入装有 500 μl 0.1% N-βLG 或 R-βLG 的 Eppendorf 管中，用漩涡混合器搅拌，将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150 μl 腹腔内注射该乳液。

## 3) 血液中抗体效价的测定

在初次或追加免疫中，在注射 N-βLG 或 R-βLG 一周后，分别从各 BALB/c 小鼠的尾部静脉采血。采集的血液在室温下放置 2 小时，然后进行离心，得到血清。制备这些血清的 10 倍稀释梯度，通过非竞争法 ELISA，测定小鼠血液中抗 N-βLG 抗体效价和抗 R-βLG 抗体效价。二次抗体采用碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG(H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)。

## 4) 杂交瘤的制备

杂交瘤的制备按照 Köhler 和 Milstein 的方法(1975)进行。即，对抗体效价充分提高的小鼠由尾部静脉注射 100 μl 0.1% N-βLG 溶液或 R-βLG 溶液。静脉注射 4 天后，从小鼠体中无菌摘除脾脏。将脾脏切细，然后用 RPMI1640 清洗，过无菌尼龙网(细胞筛网，70 mm, Becton Dickinson)，得到脾细胞悬浮液。通过 1,000 rpm×10 分钟的离心，收集脾细胞，再悬浮于 RPMI1640，计数细胞数。将该脾细胞悬浮液和小鼠骨髓瘤细胞(P3X63Ag8.653)悬浮液按照细胞数 10: 1 混合，再次进行 1,000 rpm×10 分钟的离心，得到颗粒。向该颗粒中滴加平均分子量为 3,350 的 45% 聚乙二醇，进行细胞融合。向细胞溶液中加入 RPMI1640，稀释，通过离心制成颗粒。向该颗粒中加入 HAT 选择培养基，以  $5 \times 10^6$  个细胞/孔分注到 24 孔细胞培养板上(Becton Dickinson)，在 5% CO<sub>2</sub> 下、在 37℃ 培养。其中所述 HAT 选择培养基是杂交瘤用培养基(含有 10% 胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉

素的 RPMI1640 培养基)中加入 100  $\mu\text{M}$  次黄嘌呤、0.4  $\mu\text{M}$  氨基蝶呤、16  $\mu\text{M}$  胸腺嘧啶的培养基。

#### 5) 有限稀释法克隆

将细胞培养板各孔的培养上清作为 ELISA 的一次抗体用于试验,检测生成抗 N- $\beta$ LG 或抗 R- $\beta$ LG 抗体的杂交瘤的存在。将通过 ELISA 对 N- $\beta$ LG 或 R- $\beta$ LG 显示阳性的孔的杂交瘤转移到 96 孔细胞培养板 (Becton Dickinson), 形成 0.9 个细胞/孔, 进行有限稀释法克隆。另外将 4 周龄 BALB/c 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞, 以  $5 \times 10^6$  个细胞/孔加入到 96 孔细胞培养板的各孔中。克隆的杂交瘤的培养使用含有 10% 胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素的 RPMI1640 培养基进行。

#### 6) 抗体的筛选

单克隆抗体的筛选通过检测对 N- $\beta$ LG、R- $\beta$ LG 和尿素处理  $\beta$ LG(以下称为“D- $\beta$ LG”)三种蛋白质的反应性的不同来获得特异性不同的克隆。D- $\beta$ LG 如下制备: 称量 1 mg N- $\beta$ LG, 加入 6.0 g 尿素、0.2 ml 2-巯基乙醇, 1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 8.6)、1.5 ml 蒸馏水, 用铝箔覆盖, 然后在 100 $^{\circ}\text{C}$  的油浴中加热 1 小时, 进行变性处理。通过非竞争法 ELISA, 检测培养上清对 N- $\beta$ LG、R- $\beta$ LG 或 D- $\beta$ LG 的反应性。

#### 7) 腹水的采集和 MAb 的纯化

按照 Jones 等的方法(1990), 首先向 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.2 ml 不完全弗氏佐剂。一周后, 对每只小鼠接种  $5 \times 10^6$  个细胞的克隆杂交瘤。腹水滞留后, 通过针筒采集腹水。通过蛋白 G 柱(アマシヤム・フアルマシア)对采集的腹水进行纯化。

#### 8) MAb 的类、亚类和型

为了确定抗 N- $\beta$ LG MAb 或抗 R- $\beta$ LG MAb 的特性, 采用固相法。固相法是将 N- $\beta$ LG、R- $\beta$ LG 或 D- $\beta$ LG 预先固定于细胞培养板的孔内, 使抗 N- $\beta$ LG MAb 或抗 R- $\beta$ LG MAb 作用于该固定化抗原的方法。通过 Monoclonal mouse immuno $\alpha$ C Nobulin isotyping kit (Pharmlngen), MAb 的类和亚类确定为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL( $\kappa$ ) 和 IgL( $\gamma$ )。

#### 9) MAb 的生物素化

为了用于夹层 ELISA, 分别将纯化的 MAb 进行了生物素化处理。

用 50 mM 的碳酸缓冲液(pH 8.5)制备成 20 mg/ml, 加入 10  $\mu$ l 以 3 mg/100 ml 溶解于 DMSO 的 NHS-生物素溶液, 搅拌, 然后一边冰冷却一边静置 2 小时。然后用 PBS 置换成 20 mg/ml。

## 5-2 结果

### 1) 抗 N- $\beta$ LG MAb 和抗 R- $\beta$ LG MAb 的特性和类、亚类

得到了 13 种对 N- $\beta$ LG 具有特异性的 MAb。表 5 表示它们分别对固相抗原的特异性。

[表5]

MAb名	N- $\beta$ LG	R- $\beta$ LG	D- $\beta$ LG	类、亚类和型
751 ( P $\beta$ LG1)	+	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
752	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
753	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
756	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
758	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
759	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
761	+	+	-	IgG2a ( $\kappa$ )
763 ( P $\beta$ LG2)	+	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
773	+	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
778	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
781	+	-	+	IgG1 ( $\kappa$ )
788	+	+	-	IgG1 ( $\kappa$ )
790	-	+	-	IgG1 ( $\kappa$ )
796 ( P $\beta$ LG3)	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )

### 2) 夹层 ELISA 中的组合条件

将对固相抗原显示阳性的各 MAb 分别制成固相或生物素化抗体, 从夹层 ELISA 的检测灵敏度考虑, 选择出用于检测 N- $\beta$ LG 和 D- $\beta$ LG 的 MAb 的组合。结果, 选择出平板固定化抗体 PLG2 (FERM ABP-10282)、生物素化抗体 PLG1 (FERM ABP-10281)或 PLG3 (FERM ABP-10283)作为可检测 N- $\beta$ LG 和 D- $\beta$ LG 的组合。PLG2 和 PLG1 对 N- $\beta$ LG 和 D- $\beta$ LG 的反应性的夹层 ELISA 结果如图 3 所示。PLG2 和 PLG3 对 N- $\beta$ LG 和 D- $\beta$ LG 的反应性的夹层 ELISA 结果如图 4 所示。

### 3) 通过 MAb 混合系检测 N- $\beta$ LG、D- $\beta$ LG

使用通过夹层 ELISA 选择的组合(固相化 PLG2、生物素化 PLG1 和 PLG3)确认 N- $\beta$ LG 和 D- $\beta$ LG 的检测灵敏度, 如图 5 和图 6 所示,

MAb 混合系中，MAb 混合系对 N-βLG、D-βLG 的吸光值高，表明可以提高检测灵敏度。

## 6. 通过夹层 ELISA 检测食品中的乳清蛋白

通过上述 1 中选择的 PLG2 和 PLG1、以及 PLG2 和 PLG3 的组合，尝试是否可以检测实际食品中的乳清蛋白。

### 6-1 材料和方法

#### 1) 模型肉食制品的制备

选择肉食制品作为定量试验的模型食品，按照表 6 所示的配比制备含有各浓度的乳清蛋白的模型肉食制品。猪瘦肉是从猪上等肉中去除脂肪、筋，制成 5 mm 的绞肉使用。按照各配比称量添加物，用食品加工机混合，然后进行氯乙烯管的充填，在 75℃ 加热 30 分钟。

[表6]

原材料	测试1	测试2	测试3	对照
猪瘦肉 (%)	83.0	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0	2.0
多磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (ppm)	120	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300	300
水	14.5	14.5	14.5	14.5
酪蛋白钠 (ppm)	200	20	2	0
合计 (%)	99.762	99.744	99.7422	99.742

#### 2) 通过夹层 ELISA 进行定量分析

将各模型肉食制品用食品加工机均匀磨碎，作为分析样品。称量 1 g 样品，加入 19 g 含 10 M 尿素和 0.1% 2-巯基乙醇的 PBST(向 PBS 中加入 0.5% 聚氧乙烯脱水山梨醇一月桂酸酯所得)，用匀浆器搅拌 30 秒，然后在 100℃ 进行 1 小时加热处理。冷却后，进行 3,000 rpm×20 分钟的离心，向 0.5 ml 上清中加入 9.5 ml PBST，用作 ELISA 样品。校正曲线同样使用经 10 M 尿素和 0.1% 2-巯基乙醇处理的乳清蛋白的梯度稀释品。还与用 PBST 从分析样品中萃取、以溶解于 PBST 的乳清蛋白

作为检量线、不使用尿素和 2-巯基乙醇的情况进行了比较。

## 6-2 结果

对于通过夹层 ELISA 对模型肉食制品中的乳清蛋白的分析，使用尿素和 2-巯基乙醇萃取的模型肉食制品中的乳清蛋白分析结果如表 7 所示，仅用 PBST 萃取的模型肉食制品中的乳清蛋白分析结果如表 8 所示。

[表7]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	170.5	18.7	2.3	N.D. *2
回收率 (%) *1	85.3	93.5	115.0	—

\*1 : (分析值/添加量) × 100

\*2 : 未检出

[表8]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	0.1	N.D. *2	N.D.	N.D.
回收率 (%) *1	0.05	—	—	—

\*1 : (分析值/添加量) × 100

\*2 : 未检出

以上结果可知：将尿素和 2-巯基乙醇加入到萃取液中时，可以以高回收率检测模型肉食制品中的乳清蛋白，用 PBST 萃取则不能检测。由此表明：使用尿素和 2-巯基乙醇对于从食品中萃取乳清蛋白是有效的，此时要利用的 MAb 的特性必须是可与尿素变性的  $\beta$ LG 结合。

## 7. 通过免疫色谱检测变性和未变性酪蛋白钠

### 7-1 材料和方法

#### 1) 胶体金标记和结合垫的制备

用 2 mM 硼酸缓冲液(pH 9.0)制备成 1 mg/ml 的 PLG1 和 PLG3 的 MAb 溶液。在 5 ml 预先用 0.2 M 碳酸钾溶液制备成 pH 9.0 的胶体金溶

液(シグマ制造)中加入 500  $\mu\text{l}$  MAb 溶液, 在室温下反应 30 分钟, 然后加入 625  $\mu\text{l}$  10% BSA 溶液, 再反应 15 分钟。进行离心, 用 1% BSA 溶液制备成 OD525=2.0, 以 1:1 的比例混合。以 68  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  涂布于玻璃纤维制的结合垫上, 进行干燥。

## 2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 制备成 4 mg/ml 的 PLG2 的 MAb 溶液, 呈直线状涂布于硝基纤维素膜上, 干燥。然后用含有 1% BSA 的 10 mM 磷酸缓冲液(pH 7.5) 在 37°C 封闭 1 小时, 用 10 mM 磷酸缓冲液(pH 7.5)清洗, 干燥。

## 3) 免疫色谱条的组装和评价

分别贴装上述制备的样品垫、结合垫、抗体固定化膜、吸收垫, 制成免疫色谱条。将上述 2 中制备的模型肉食制品适当稀释, 作为被检液使用。

## 7-2 结果

通过涂布于膜上的 MAb-PLG2 和胶体金标记 MAb —— PLG1+PLG3 的组合, 不管乳清蛋白加热或非加热, 都可以以最低 50 ppb(食品中的 2 ppm)检测。该结果可知: 无论是以制造工艺中混入的乳清蛋白为对象, 还是以加热后的制品为对象, 可以设计出在任何情况下都可以对应的免疫色谱条。

在市售的变应原检测用免疫色谱条中, 作为对照滴加含有 0.1 M 尿素、0.2% 2-ME 的 PBS 时, 会产生非特异性条带, 结果为假阳性。这表明: 如果不使用蛋白质变性剂, 则可作为变应原检测的对象被限制在极狭窄的范围内, 该蛋白质变性剂有效地从因加热等而变性的食品蛋白质中萃取变应原。

## 实施例 2

### 1. 可与变性/未变性卵白蛋白结合的 MAb 的确立

#### 1-1 材料和方法

##### 1) 鸡卵白蛋白(以下可称为“OA”)的制备

从新鲜的鸡蛋中只取蛋白, 匀浆至不发泡, 然后加入等量的饱和硫酸铵, 用滤纸 No.1 (アドバンテック东洋)过滤。然后向得到的滤液中添加 0.5 M 的硫酸, 调节至 pH 4.6, 然后放置过夜。通过 8,000 rpm  $\times$  20 分钟的离心得到沉淀, 将沉淀溶解于蒸馏水, 用相同方法重结晶, 得到粗 OA 组分。粗 OA 再通过使用 TSK 凝胶 DEAE 650S (Tosoh)的

离子交换色谱进行纯化。使用 50 mM 咪唑-盐酸缓冲液(pH 6.4)作为移动相, 通过 NaCl 的 0-0.3 M 的线性梯度分离 OA, 通过透析进行脱盐, 然后进行冷冻干燥。使用该冷冻干燥 OA, 用生理盐水制备 0.1% 的 OA 溶液, 分别将 500  $\mu$ l 分注到 1 ml 容量的 Eppendorf 管中, 作为抗原溶液, 在免疫前在 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

## 2) 免疫

使用 4 只 6 周龄的 BALB/c 小鼠(日本クレア株式会社)作为供试动物。初次免疫时, 向加入有 500  $\mu$ l 0.1% 的 OA 的 Eppendorf 管中等量加入完全弗氏佐剂(Difco), 用漩涡混合器搅拌, 将制备的乳液用于试验。对每只小鼠以 150  $\mu$ l 腹腔内注射该乳液, 另外追加免疫以每 3 周的间隔进行 2 次。免疫时, 向加入有 500  $\mu$ l 0.1% OA 的 Eppendorf 管中等量加入不完全弗氏佐剂(Difco), 用漩涡混合器搅拌, 将制备的乳液用于试验。向每只小鼠以 150  $\mu$ l 腹腔内注射该乳液。要获得抗变性 OAMAb, 则只在最终免疫时使用后述的还原羧甲基化 OA。

## 3) 血液中抗体效价的测定

在初次或追加免疫中, 在注射 OA 一周后, 从各 BALB/c 小鼠的尾部静脉采血。采集的血液在室温下放置 2 小时, 进行离心, 得到血清。制备这些血清的 10 倍稀释梯度, 通过非竞争法 ELISA 检测小鼠血液中的抗 OA 抗体效价。二次抗体采用碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG(H+L)抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)。

## 4) 杂交瘤的制备

杂交瘤的制备按照 Köhler 和 Milstein 的方法(1975)进行。即, 对抗体效价充分提高的小鼠由尾部静脉注射 100  $\mu$ l 0.1% OA 溶液。静脉注射 4 天后, 从小鼠体内无菌摘除脾脏。将脾脏切细后, 用 RPMI1640 清洗, 过灭菌尼龙网(细胞筛网, 70 mm, Becton Dickinson 制造), 得到脾细胞悬浮液。通过 1,000 rpm  $\times$  10 分钟的离心, 收集脾细胞, 再次悬浮于 RPMI1640, 计数细胞数。将该脾细胞悬浮液和小鼠骨髓瘤细胞(P3X63Ag8.653)悬浮液按照细胞数 10:1 混合, 再次以 1,000 rpm  $\times$  10 分钟进行离心, 得到颗粒。向该颗粒中滴加平均分子量为 3,350 的 45% 聚乙二醇, 进行细胞融合。向细胞液中加入 RPMI1640 进行稀释, 然后离心得到颗粒。向该颗粒中加入 HAT 选择培养基, 以  $5 \times 10^6$  个细胞/孔分注到 24 孔细胞培养板(Becton Dickinson)中, 在 5%CO<sub>2</sub> 下、在 37

℃培养。其中所述 HAT 选择培养基是在杂交瘤用培养基(含有 10%胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基)中加入 100 μM 次黄嘌呤、0.4 μM 氨基蝶呤、16 μM 胸腺嘧啶所得培养基。

#### 5) 有限稀释法克隆

将细胞培养板各孔的培养上清作为 ELISA 的一次抗体用于试验,检测生成抗 OA 抗体的杂交瘤的存在。将通过 ELISA 对 OA 显示阳性的孔的杂交瘤转移至 96 孔细胞培养板(Becton Dickinson),进行有限稀释法克隆,形成 0.9 个细胞/孔。向 96 孔细胞培养板的各孔中加入 4 周龄 BALB/c 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞,形成  $5 \times 10^6$  个细胞/孔。克隆的杂交瘤的培养采用含有 10%胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基。

#### 6) 抗体的筛选

单克隆抗体的筛选通过检测对未变性 OA (以下可称为“NOA”)或还原羧甲基化 OA (以下可称为“RCMOA”)的反应性的不同来获得特异性不同的克隆。RCMOA 如下获得:称量 10 mg 纯化 OA (上述冻干物),加入 1 ml 1.4 M Tris-盐酸缓冲液(pH 8.6)、100 μl 5%EDTA、1.2 g 尿素、33 μl 2-巯基乙醇,定容为 2.5 ml,然后进行氮气置换,在 37℃进行 1 小时的还原处理。再加入 89 mg 溶解于 300 μl 1M NaOH 的一碘乙酸,进行氮气置换,然后在室温下进行 1 小时的羧甲基化,制成 RCMOA。通过非竞争法 ELISA 检测培养上清对 NOA 或 RCMOA 的反应性。

#### 7) 腹水的采集和 MAb 的纯化

按照 Jones 等人(1990)的方法,首先向 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.2 ml 不完全弗氏佐剂。一周后,对每只小鼠接种  $5 \times 10^6$  个细胞的克隆的杂交瘤。腹水潴留后,通过针筒采集腹水。通过蛋白 G 柱(アマシヤム・フアルマシア)对采集的腹水进行纯化。

#### 8) MAb 的特性和 MAb 的类、亚类和型

为了确定抗 OAMAb 的特性,使用固相法和液相法。固相法是将 NOA 或 RCMOA 预先固定于细胞培养板的孔内,将抗未变性/变性 OAMAb 与该固定化抗原(NOA 或 RCMOA)作用的方法,液相法是将兔抗 OA 多克隆抗体预先固定在细胞培养板的孔内,在 NOA 或 RCMOA 与该多克隆抗体结合的状态下使抗未变性/变性 OAMAb 与其

作用的方法。通过单克隆小鼠免疫球蛋白同种型试剂盒(Pharmingen)确定了 MAb 的类和亚类为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL( $\kappa$ )和 IgL( $\gamma$ )。

### 9) MAb 的生物素化

为了用于夹层 ELISA 试验,对纯化的 MAb 分别进行了生物素化处理。使用 50 mM 的碳酸缓冲液(pH 8.5)制备成 20 mg/ml,加入 10  $\mu$ l 以 3 mg/100  $\mu$ l 溶解于 DMSO 的 NHS-生物素溶液,搅拌,然后一边冰冷却一边静置 2 小时。然后用 PBS 置换为 20 mg/ml。

### 1-2 结果

#### 1) 抗 OAMAb 的特性和类、亚类

得到了 9 种与 NOA 具有特异性的 MAb, 10 种与 RCMOA 具有特异性的 MAb。它们分别对液相或固相抗原的特异性表示在表 9 中。

[表9]

MAb名	固相NOA	液相NOA	固相RCMOA	液相RCMOA	类、亚类和型
301B5	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
304E4(PNOA1)	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
305G5	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
306B2(PNOA2)	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
307G4	+	-	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
310G7	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )

311E11	+	-	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
314E12	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
316G1	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
63E5	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
65F2	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
68G4	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
69H6	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
74G2	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
115F8	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
117F9	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
119D11	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
948G11 (PDOA1)	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
962B8 (PDOA2)	+	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )

## 2) 组合条件

考虑到夹层 ELISA 的检测灵敏度, 选择出用于检测 NOA 的 MAb 或用于检测 RCMOA 的 MAb 的组合。结果 NOA 中, 选择了 301B5 和 316 G1 或 304E4 (PNOA1; FERM ABP-10265)和 306B2 (PNOA2; FERM ABP-10266)的高组合, 在 RCMOA 中选择了 117F9 和 119D11 或 948G11 (PDOA1; FERM ABP -10275)和 962B8 (PDOA2; FERM ABP -10276)的高组合。

以下实施例中, 可以将 301B5 和 316G1/117F9 和 119D11 改写成 304E4 和 306B2/948G11 和 962B8。

## 2. 通过夹层 ELISA 检测变性和未变性抗原

### 2-1 材料和方法

NOA 溶液是用 PBS 将纯化 OA 制备成 100 ppb 溶液, 制备 3 倍的稀释梯度(稀释梯度 A)。另一方面在玻璃试管中称量 1 mg 纯化 OA, 加入 6 g 尿素、0.2 ml 2-巯基乙醇, 1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 8.6)、1.5 ml 蒸馏水, 用铝箔覆盖, 在 100℃的油浴中加热 1 小时, 进行变性处理。冷却后, 转移至 100 ml 容量的容量瓶中, 用 PBS 定容为 100 ml。再用 PBS 将其稀释 100 倍, 制成 100 ppb 尿素变性 OA (以下称为“UDOA”)。再将尿素浓度保持 0.01 M, 制备 3 倍的稀释梯度(稀释梯度 B)。将 100 ppb NOA 溶液和 100 ppb UDOA 溶液等量混合(形成 NOA 和 UDOA 各为 50 ppb 的溶液), 将尿素浓度保持 0.005 M, 制备 3 倍的稀释梯度(稀释梯度 C)。用作夹层 ELISA 的条件如表 10 所示。包被 MAb 的浓度单独情况下为 25 µg/ml, 混合时各为 12.5 µg/ml, 合计为 25 µg/ml。

[表10]

试验 No.	包被MAb	抗原	二次抗体
试验1	301B5	稀释梯度A (未改性)	316 g1和117F9的混合
	119D11		
	301B5和119D11的混合		
试验2	301B5	稀释梯度B (改性)	
	119D11		
	301B5和119D11的混合		
试验3	301B5	稀释梯度C (未改性+改性)	
	119D11		
	301B5和119D11的混合		

## 2-2 结果

如图7所示,以未变性OA为对象的试验(试验1)中,301B5单独、301B5和119D11的混合的曲线几乎重叠,但在10 ppb或以下更稀薄的状态下,301B5与119D11的混合的曲线与301B5单独的曲线相比,混合的吸光值高,可认为可提高检测灵敏度。在以变性OA为对象的试验2的UDOA中,301B5单独未见吸光值,可认为301B5和316G1未参与UDOA,但119D11单独以及301B5和119D11的混合曲线中,混合的吸光值明显高,可认为通过将MAb混合,可提高检测灵敏度(图8)。这在以未变性/变性OA为对象的(试验3)中也可以得到确认,301B5与119D11的混合与301B5单独相比,吸光值明显高(图9)。在试验1-3的任何情况下,单独包被的抗体浓度为25 mg/ml,如果是混合则分别为一半的浓度12.5 mg/ml,因此通过使用使MAb种类的混合系,抗体浓度即使相同或减少,也可以进一步提高抗原的检测灵敏度。

## 3. 通过免疫色谱检测变性和未变性的OA

### 3-1 材料和方法

#### 1) 胶体金标记和结合垫的制备

用2 mM 硼酸缓冲液(pH 9.0)制成1 mg/ml的119D11和316G1的MAb单独或混合溶液。向5 ml预先用0.2 M 碳酸钾溶液制备成pH 9.0的胶体金溶液(シグマ)中加入500  $\mu$ l MAb溶液,在室温下反应30分钟,然后加入625  $\mu$ l 10% BSA溶液,再反应15分钟。进行离心,用

1% BSA 溶液制备成  $OD_{525}=1.0$ 。以  $68 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  涂布于玻璃纤维制结合垫上, 进行干燥。

## 2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 以  $4 \text{ mg}/\text{ml}$  制备 117F9 和 301B5 的 MAb 单独或混合溶液, 呈直线状涂布于硝基纤维素膜上, 进行干燥。然后用含有 1% BSA、0.1% 吐温 20 的 PBS 在  $37^\circ\text{C}$  封闭两小时, 然后用 PBS 清洗并干燥。

## 3) 免疫色谱条的组装和评价

除上述制备的结合垫、抗体固定化膜之外, 另外准备被检液点样用的玻璃纤维制样品垫、被检液吸收用的玻璃纤维制吸收垫, 分别贴装样品垫、结合垫、抗体固定化膜、吸收垫, 制成免疫色谱条。将上述 2 中制备的 NOA 和 UDOA 适当稀释, 用作被检液。

## 3-2 结果

通过 301B5 和胶体金标记 316G1 的组合, 可以以最低 10 ppb 的浓度检测 NOA, 但对于 UDOA, 即使是 1 ppm 也无法检测。而通过 117F9 和胶体金标记 119D11 的组合, 可以以最低 10 ppb 检测 UDOA, 但对于 NOA, 即使是 1 ppm 也不能检测。与其相对, 制作使用 301B5 和 117F9 的固定化抗体混合物、以及 316G1 和 119D11 的胶体金抗体混合物的免疫色谱条, 则可以以最低 10 ppb 检测变性 OA 或未变性 OA。这样, 通过将可与变性 OA 结合的 MAb 和可以与未变性 OA 结合的 MAb 组合, 无论是以制备工艺中混入的未变性卵清蛋白为对象, 或以加热后的制品为对象, 可设计出在任何场合都可对应的免疫色谱条。

在市售的卵变应原检测用免疫色谱条中, 作为对照滴加只含有 0.01 M 尿素的 PBS, 结果产生非特异性条带, 成假阳性。这可以认为, 如果在卵清蛋白变应原检查中不使用作为蛋白质变性剂的尿素, 则可作为变应原检测的对象就被限定在极狭窄的范围内, 该蛋白质变性剂用于萃取因热等而变得不溶的卵清蛋白变应原。

## 4. 可与变性/未变性卵类粘蛋白结合的 MAb 的确立

### 4-1 材料和方法

#### 1) 鸡卵类粘蛋白(以下称为“OM”)的制备

从新鲜的鸡蛋中只采集蛋白, 匀浆至不发泡, 然后与等量的 0.1 M

乙酸缓冲液(pH 3.8)混合。再用 0.1 M 乙酸缓冲液进行透析, 然后进行 8,000 rpm × 20 的离心, 回收上清。再通过使用 TSK 凝胶 DEAE 650S (Tosoh) 的离子交换色谱进行纯化。移动相使用 50 mM 咪唑-HCl 缓冲液(pH 6.4), 通过 NaCl 的 0-0.3 M 线性梯度, 分离 OM 组分, 通过透析进行脱盐, 然后冷冻干燥, 将其作为未变性 OM (以下可称为“NOM”)。称量 1 mg 该纯化 OM, 加入 6 g 尿素、0.2 ml 2-巯基乙醇、1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 8.6)、1.5 ml 蒸馏水, 用铝箔覆盖, 然后在 100℃ 油浴中加热 1 小时, 进行变性处理, 制成尿素变性 OM(以下可称为“DOM”)。用生理盐水将这些冻干物制成 0.1% 的溶液, 分别将 500 μl 分注到 1 ml 容量的 Eppendorf 管中, 作为抗原溶液, 在免疫之前于 -20℃ 进行冷冻保存。

## 2) 免疫

分别使用 4 只 6 周龄的 BALB/c 小鼠(日本クレア株式会社)作为供试动物。初次免疫中, 向装有 500 μl 0.1% NOM 或 DOM 的 Eppendorf 管中分别等量加入完全弗氏佐剂(Difco), 用漩涡混合器搅拌, 将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150 μl 腹腔内注射该乳液。另外, 追加免疫以每 3 周的间隔进行两次。免疫时, 向加入有 500 μl 0.1% NOM 或 DOM Eppendorf 管中分别等量加入不完全弗氏佐剂(Difco), 用漩涡混合器搅拌, 将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150 μl 腹腔内注射该乳液。

## 3) 血液中抗体效价的测定

初次或追加免疫时, 在注射 DOM 或 NOM 一周后, 从各 BALB/c 小鼠的尾部静脉采血。采集的血液在室温中放置 2 小时, 然后进行离心, 得到血清。制备这些血清的 10 倍稀释梯度, 通过非竞争法 ELISA 检测小鼠血液中的抗 OM 抗体效价。二次抗体使用碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG(H+L)抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)。

## 4) 杂交瘤的制备

杂交瘤的制备按照 Köhler 和 Milstein 的方法(1975)进行。对抗体效价充分提高的小鼠由尾部静脉注射 100 μl 0.1% NOM 溶液或 DOM 溶液。静脉注射 4 天后, 从小鼠体中无菌摘除脾脏。将脾脏切细后, 用 RPMI1640 清洗, 过灭菌尼龙网(细胞筛网, 70 mm, Becton Dickinson

制造), 得到脾细胞悬浮液。通过 1,000 rpm × 10 分钟的离心, 收集脾细胞, 再悬浮于 RPMI1640, 计数细胞数。将该脾细胞悬浮液和小鼠骨髓瘤细胞(P3X63Ag8.653)悬浮液按照细胞数 10:1 混合, 再次以 1,000 rpm × 10 分钟进行离心, 得到颗粒。向该颗粒中滴加平均分子量为 3,350 的 45% 聚乙二醇, 进行细胞融合。向细胞溶液中加入 RPMI1640, 然后通过离心制成颗粒。向该颗粒中加入 HAT 选择培养基, 分注到 24 孔细胞培养板上, 在 5% CO<sub>2</sub> 下、在 37℃ 培养, 形成 5 × 10<sup>6</sup> 个细胞/孔。其中所述 HAT 选择培养基是在杂交瘤用培养基(含有 10% 胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基)中加入 100 μM 次黄嘌呤、0.4 μM 氨基蝶呤、16 μM 胸腺嘧啶的培养基。

#### 5) 有限稀释法克隆

将细胞培养板的各孔的培养上清作为 ELISA 的一次抗体, 用于试验, 检测生成抗 NOM 抗体或 DOM 抗体的杂交瘤的存在。将通过 ELISA 对 NOM 或 DOM 显示阳性的孔的杂交瘤转移至 96 孔细胞培养板 (Becton Dickinson), 进行有限稀释法克隆, 形成 0.9 个细胞/孔。向 96 孔细胞培养板的各孔中加入 4 周龄 BALB/c 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞, 形成 5 × 10<sup>6</sup> 个细胞/孔。克隆的杂交瘤的培养使用含有 10% 胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基。

#### 6) 腹水的采集和 MAb 的纯化

按照 Jones 等人(1990)的方法, 首先对 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.2 ml 不完全弗氏佐剂。一周后, 对每只小鼠接种 5 × 10<sup>6</sup> 个细胞的克隆的杂交瘤。腹水潴留后, 通过针筒采集腹水。通过蛋白 G 柱(アマシヤム・フアルマシア)对采集的腹水进行纯化。

#### 7) MAb 的特性和 MAb 的类、亚类和型

采用固相法和液相法确定抗 NOMMAb 和抗 DOMMAb 的特性。固相法采用将 NOM 或 DOM 预先固定在细胞培养板的孔内, 使 MAb 与该固定化 NOM 或 DOM 作用的方法, 液相法采用预先将兔抗卵类粘蛋白多克隆抗体固定在细胞培养板的孔内, 在 NOM 或 DOM 与该多克隆抗体结合的状态下, 使 MAb 与其作用的方法。另外通过单克隆小鼠免疫球蛋白同种型试剂盒, 对 MAb 的类和亚类确定为 IgG1、IgG2a、

IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL( $\kappa$ )和 IgG( $\gamma$ )。

#### 8) MAb 的生物素化

为了进行夹层 ELISA 试验,对纯化的 MAb 分别进行生物素化处理。使用 50 mM 的碳酸缓冲液(pH 8.5)制备成 20 mg/ml,加入 10 ml 以 3 mg/100  $\mu$ l 溶解于 DMSO 的 NHS-生物素溶液,搅拌后,一边冰冷却一边静置 2 小时。然后用 PBS 置换成 20 mg/ml。

### 4-2 结果

#### 1) 抗 NOMMAb 和抗 DOMMAb 的特性和类、亚类

得到 7 种与 NOM 具有特异性的 MAb、10 种与 DOM 具有特异性的 MAb。它们对液相或固相抗原的特异性分别如表 11 所示。

[表11]

MAb名	未改性固相OM	未改性液相OM	改性固相OM	改性液相OM	类、亚类和型
47E5(PNOM1)	+	+	-	-	IgG2n ( $\kappa$ )
50A12(PNOM2)	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
52C6	+	+	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
53E11	+	-	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
56E4	+	+	-	-	IgM ( $\kappa$ )
57G12	+	-	-	-	IgM ( $\kappa$ )
60C11	+	-	-	-	IgG1 ( $\kappa$ )
628E1 (PDOM1)	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
640G11	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
645B5	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
648A9 (PDOM2)	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
658B6	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
663A9	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
668D6	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
670E1	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
671H8	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
674A4	-	-	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )

#### 2) 组合条件

从夹层 ELISA 的检测灵敏度考虑,选择出用于检测 NOM 的 MAb

的组合。结果选择出 47E5 (PNOM1; FERM ABP-10279)和 50A12 (PNOM2; FERM ABP-10280)的高组合。还使用上述 10 个单克隆抗体进行夹层 ELISA, 选择出灵敏度最高的 628E1 (PDOM1; FERM ABP-10277)和 648A9(PDOM2; FERM ABP-10278)作为高组合。

### 3) 通过夹层 ELISA 测定各单克隆抗体与 OM 的反应性

在 PNOM1 和 PNOM2 的夹层 ELISA 中, 检测出未变性卵类粘蛋白, 但完全未检测出变性卵类粘蛋白(图 10)。另外在 PDOM1 和 PNOM2 的夹层 ELISA 中, 检测出变性 OM, 但未变性 OM 在 10-100 ppb 之间灵敏度低(图 11)。但是在使用 PNOM2 和 PDOM2 作为抗体、使用 PNOM1 和 PDOM1 作为生物素化抗体的各单克隆抗体组合的夹层 ELISA 中, 特别可见未变性的 OM 在 10-100 ppb 下检测灵敏度提高(图 12)。

## 5. 通过免疫色谱检测以 OM 为指标的卵清蛋白

### 5-1 材料和方法

#### 1) 胶体金和结合垫的制备

用 2 mM 硼酸缓冲液(pH 9.0)将 PNOM1 的 MAb 溶液制备成 1 mg/ml。向 5 ml 预先用 0.2 M 碳酸钾溶液制成 pH 9.0 的胶体金溶液(シグマ制造)中加入 500  $\mu$ l MAb 溶液, 在室温下反应 30 分钟, 然后加入 625  $\mu$ l 10% BSA 溶液, 再反应 15 分钟。进行离心, 用 1% BSA 溶液制成 OD525=1.0。以 68  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 涂布于玻璃纤维制结合垫上, 进行干燥。

#### 2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 将 PNOM2 的 MAb 溶液制备成 4 mg/ml, 呈直线状涂布于硝基纤维素膜, 并干燥。然后用含有 1% BSA、0.1%吐温 20 的 PBS、在 37℃ 封闭 2 小时, 然后用 PBS 洗涤并干燥。

#### 3) 免疫色谱条的组装和评价

除上述制备的结合垫、抗体固定化膜之外, 另外准备被检液点样用玻璃纤维制样品垫、被检液吸收用玻璃纤维制吸收垫, 分别依次贴装样品垫、结合垫、抗体固定化膜、吸收垫, 制成免疫色谱条。将冷冻干燥卵清蛋白粉末的 0.1% 溶液分别在室温、50℃、75℃、100℃ 处理 1 小时, 将其适当稀释, 用作被检液。

## 5-2 结果

通过 PNOM1 和胶体金标记 PNOM2 的组合,在室温和 50℃处理 1 小时的卵清蛋白溶液可以以最低 10 ppb 检测出来。在 75、100℃处理 1 小时的卵清蛋白可以以最低 100 ppb 检测出来。该结果表明,对于相当于在 100℃处理 1 小时的加热处理食品,即使不使用尿素等变性剂,通过使用该抗 OMMAb 的免疫色谱条,也可以通过简便的萃取,检测出最低 100 ppb 的卵清蛋白。但是,进行超过 100℃的热处理,则 OM 的免疫色谱不能检测,需要如上所述,进行尿素增溶处理。

## 6. 抗 OAMAb 和 OMMAb 的联合使用效果

### 6-1 方法

根据上述结果,如上制备了采用 PNOA1、PDOA1 和 PNOM1 的固体化混合物,以及 PNOA2、PDOA2 和 PNOM2 的胶体金抗体混合物的免疫色谱条,尝试进行卵清蛋白的检测。

### 6-2 结果

分别如上所示,PNOA1 和 PNOA2、PDOA1 和 PDOA2 以及 PNOM1 和 PNOM2 的组合可以以各不同灵敏度检测出目标变性/未变性 OA 或 OM。由此可开发出在加工食品的制造过程中,在未加热状态下,MAb 与未变性 OA 和 OM 反应,在 50-100℃时,MAb 与未变性/变性 OA 和 OM 反应,在上述温度以上时,通过尿素增溶处理,变性 OA 反应的卵清蛋白检测方法。

## 实施例 3

### 1. 可与变性/未变性小麦麦醇溶蛋白结合的 MAb 的确立

#### 1-1 材料和方法

##### 1) 小麦麦醇溶蛋白(以下称为“GL”)的制备

向小麦粉中加入 2 倍量的正丁醇,进行脱脂,风干过夜。向所得脱脂小麦粉中加入 2 倍量 0.1% NaCl 溶液,进行 10,000 rpm × 15 分钟的离心。向所得沉淀中加入 20 倍量的 0.01 N 乙酸,搅拌,然后以 10,000 rpm × 15 分钟离心。将所得上清用蒸馏水透析,进行冷冻干燥。向所得冻干物中加入乙醇至 70%,以 10,000 rpm × 15 分钟离心。将所得上

清用蒸馏水透析，得到粗 GL 组分。粗 GL 组分再通过使用 Sephacryl S-200HR (Amersham Biosciences)的凝胶过滤进行纯化。移动相使用 0.1 N 乙酸，分离 GL，用蒸馏水透析，然后冷冻干燥。用生理盐水制成该冻干物制成 0.1%溶液，分别以 500  $\mu$ l 分注入 1 ml 容量的 Eppendorf 管中，免疫前在 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存，作为抗原溶液。

## 2) 免疫

使用 5 只 5 周龄的 BALB/c 小鼠(日本クレア株式会社)作为供试动物。初次免疫时，向装有 500  $\mu$ l 0.1% GL 的 Eppendorf 管中等量加入完全弗氏佐剂(Difco)，用漩涡混合器搅拌，将制备的乳液用于试验。将每只小鼠以 150  $\mu$ l 腹腔内注射该乳液。另外，追加免疫时，以 3 周的间隔进行两次。免疫时，向装有 500  $\mu$ l 0.1% GL 的 Eppendorf 管中等量加入不完全弗氏佐剂(Difco)，用漩涡混合器搅拌，将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150  $\mu$ l 腹腔内注射该乳液。

## 3) 血液中抗体效价的测定

初次或追加免疫时，在注射了 GL 一周后，从各 BALB/c 小鼠的尾部静脉采血。采集的血液在室温下放置 2 小时，然后进行离心，得到血清。制备这些血清的 10 倍稀释梯度，通过非竞争法 ELISA，检测小鼠血液中的抗 GL 抗体效价。二次抗体采用碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG(H+L)抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)。

## 4) 杂交瘤的制备

杂交瘤的制备按照 Köhler 和 Milstein 的方法(1975)进行。即，对抗体效价充分提高的小鼠由尾部静脉注射 100  $\mu$ l 0.1% GL 溶液。静脉注射 4 天后，从小鼠体内无菌摘除脾脏。将脾脏切细后，用 RPMI1640 清洗，过灭菌尼龙网(细胞筛网，70 mm, Becton Dickinson 制造)，得到脾细胞悬浮液。通过 1,000 rpm  $\times$  10 分钟的离心收集脾细胞，再次悬浮于 RPMI1640，计数细胞数。将该脾细胞悬浮液和小鼠骨髓瘤细胞(P3X63Ag8.653)悬浮液以细胞数 10:1 混合，再次进行 1,000 rpm  $\times$  10 分钟的离心，得到颗粒。向该颗粒中滴加平均分子量 3,350 的 45%聚乙二醇，进行细胞融合。向细胞溶液中加入 RPMI1640，然后离心得到颗粒。向该颗粒中加入 HAT 选择培养基，分注到 24 孔细胞培养板(Becton Dickinson)中，在 5% CO<sub>2</sub> 下、在 37 $^{\circ}$ C 培养，形成  $5 \times 10^6$  个细胞/孔。其中所述 HAT 选择培养基是在杂交瘤用培养基(含有 10%胎牛血清、

40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基)中加入 100  $\mu$ M 次黄嘌呤、0.4  $\mu$ M 氨基蝶呤、16  $\mu$ M 胸腺嘧啶的培养基。

#### 5) 有限稀释法克隆

将细胞培养板的各孔中的培养上清作为 ELISA 的一次抗体,用于试验,检测生成抗 GL 抗体的杂交瘤的存在。将通过 ELISA 对 GL 显示阳性的孔的杂交瘤转移到 96 孔细胞培养板(Becton Dickinson),进行有限稀释法克隆,形成 0.9 个细胞/孔。向 96 孔细胞培养板的各孔中加入 4 周龄 BALB/c 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞,形成  $5 \times 10^6$  个细胞/孔。克隆的杂交瘤的培养采用含有 10%胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基。

#### 6) 抗体的筛选

单克隆抗体的筛选通过检测对未变性 GL (以下称为“NGL”)或还原羧甲基化 GL (以下称为“RCMGL”)、0.1 M 乙酸增溶 GL(以下称为“AGL”)、70%乙醇增溶 GL(以下称为“EGL”)、变性剂增溶的 GL(以下称为“DGL”)的反应性的不同,得到特异性不同的克隆。RCMGL 如下制备:称量 10 mg 纯化 GL,加入 1 ml 1.4 M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.6)、100  $\mu$ l 5% EDTA、1.2 g 尿素、33  $\mu$ l 2-巯基乙醇,定容至 2.5 ml,然后进行氮气置换,在 37 $^{\circ}$ C 进行 1 小时的还原处理。在加入 89 mg 溶解于 300  $\mu$ l 1 M NaOH 的一碘乙酸,进行氮气置换,然后在室温下进行 1 小时的羧甲基化,得到 RCMGL。通过非竞争法 ELISA 检测培养上清对 NGL、RCMGL、AGL、EGL 和 DGL 的反应性。

#### 7) 腹水的采集和 MAb 的纯化

按照 Jones 等人(1990)的方法,首先向 BALB/c 小鼠中腹腔内注射 0.2 mL 不完全弗氏佐剂。一周后,对每只小鼠接种  $5 \times 10^6$  个细胞的克隆的杂交瘤。腹水滞留后,通过针筒采集腹水。通过蛋白 G 柱(アマシヤム・ファルマシア)对采集的腹水进行纯化。

#### 8) MAb 的类、亚类和型

通过单克隆小鼠免疫球蛋白同种型试剂盒,MAb 的类和亚类确定为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL( $\kappa$ )和 IgL( $\gamma$ )。

#### 9) MAb 的生物素化

为了进行夹层 ELISA 试验,对纯化的 MAb 分别进行生物素化处

理。使用 50 mM 碳酸缓冲液(pH 8.5)制备成 20 mg/ml, 加入 10  $\mu$ l 以 3 mg/100  $\mu$ l 溶解于 DMSO 的 NHS-生物素溶液, 搅拌, 然后一边冰冷却一边静置 2 小时。然后用 PBS 置换为 20 mg/ml。

## 2-2 结果

### 1) MAb 的选择

小麦的主要变应原麦醇溶蛋白(GL)是不溶于水但溶解于乙酸和乙醇的蛋白质。制备溶解于 PBS 的 GL (NGL)、还原羧甲基化 GL (RCMGL)、0.1 M 乙酸增溶 GL (AGL)、70%乙醇增溶 GL (EGL)、变性剂增溶 GL (DGL), 验证为与哪种状态的 GL 特异性结合的 MAb。抗 GLMAb 与各状态的 GL 的直接 ELISA 结果如表 12 所示。如表 1 所示, 选择了与所有状态的 GL 结合的 MAb——PGL1 (FERM ABP-10267)、PGL2 (FERM ABP-10268)、PGL4、PGL7。

[表12]

	NGL	RGL	AGL	EGL	DGL	类、亚类和型
PGL1	○	○	○	○	○	IgG1( $\kappa$ )
PGL2	○	○	○	○	○	IgG1( $\kappa$ )
PGL3	○	△	○	x	○	IgG1( $\kappa$ )
PGL4	○	○	○	○	○	IgG1( $\kappa$ )
PGL5	○	△	○	△	△	IgG1( $\kappa$ )
PGL6	○	x	○	○	○	IgG1( $\kappa$ )
PGL7	○	○	○	○	○	IgG1( $\kappa$ )
PGL8	○	△	○	x	○	IgG1( $\kappa$ )

### 2) 夹层 ELISA 中的组合条件

使用通过直接 ELISA 选择的 PGL1、PGL2、PGL4、PGL7, 对于全部的 MAb 的组合进行夹层 ELISA。麦醇溶蛋白使用 NGL、RCMGL、AGL、EGL、DGL。结果, 对任何状态的 GL 均可以以最高灵敏度检测的是 PGL1 和 PGL2 的组合。使用 PGL1 和 PGL2 进行的夹层 ELISA 的结果如图 13 所示。对其它组合进行夹层 ELISA, 都不能检测全部的 GL, 或者检测灵敏度极低。从以上结果选择出了 PGL1 和 PGL2 作为检测食品以各种状态含有的 GL 的 MAb。

## 2. PGL1 和 PGL2 所识别的表位的区别

通过免疫印迹法限定各抗体所识别的表位，因此在 A-PAGE 和电印迹之后在进行免疫印迹。首先按照 Lafiandra,D.&Kasarda,D.D.的方案，通过 A-PAGE (Cereal Chemistry,,62,314-319,1985)进行小麦麦醇溶蛋白的分离。使用分离出的凝胶，通过电印迹转印到 PVDF 膜上。使 PGL1 和 PGL2 的培养上清(1/1000)与转印的 PVDF 膜反应，然后显色，确认所识别的表位。结果如图 14 所示，PGL1 所识别的蛋白质分解条带不能被 PGL2 识别。由此可知 PGL1 和 PGL2 识别不同的表位。

### 3. 通过免疫色谱检测变性和未变性 GL

#### 3-1 材料和方法

##### 1) 胶体金标记和结合垫的制备

用 2 mM 硼酸缓冲液(pH 9.0)将 PGL1 (或 PGL2)溶液制备成 1 mg/ml。向 5 ml 预先用 0.2 M 碳酸钾溶液制成 pH 9.0 的胶体金溶液(シグマ制造)中加入 500  $\mu$ l MAb 溶液，在室温下反应 30 分钟，然后加入 625  $\mu$ l 10% BSA 溶液，再反应 15 分钟。进行离心，用 1% BSA 溶液制备成 OD525=1.0。以 68  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>涂布在玻璃纤维制结合垫(日本ミリポア)上并干燥。

##### 2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 将 PGL2(或 PGL1)溶液制成 4 mg/ml，呈直线状涂布于硝基纤维素膜上并干燥。然后用含有 1% BSA、0.1%吐温 20 的 PBS、在 37℃封闭 2 小时，然后用 PBS 清洗并干燥。

##### 3) 免疫色谱条的组装和评价

除上述制备的结合垫、抗体固定化膜之外，另外准备被检液点样用的玻璃纤维制样品垫、被检液吸收用的玻璃纤维制吸收垫，依次分别贴装样品垫、结合垫、抗体固定化膜、吸收垫，制成免疫色谱条。

向小麦粉中加入 20 倍量的 PBST (PBS 中加入 0.5%聚氧乙烯脱水山梨醇一月桂酸酯所得)，在 4℃搅拌过夜，离心后进行脱脂处理，回收上清，透析后进行冷冻干燥，得到小麦粉萃取物。使用制备的小麦粉萃取物，未变性的用 PBS 稀释，变性的用变性剂增溶，以此作为被检液。

#### 3-2 结果

可以通过夹层 ELISA 检测各种状态的 GL，由此构建并评价了免疫色谱检测系统，以此作为更简易的检测方法。评价时，对于使用与目前市场销售的变应原检测试剂盒相同的抗体的市售 A 和市售 B 进行了比较。结果如表 13 所示。表 13 中，“非特异反应”是仅供给缓冲液时也判定为阳性，此时为“有非特异反应”。结果，市售 A 中，可以检测出未变性小麦粉萃取物，但是对于变性小麦粉萃取物则可见非特异反应，无法判断。市售 B 中，未能检测 1 ppm 的未变性小麦粉萃取物，对于变性小麦粉萃取物可见非特异反应，因此无法判断。而使用本发明的试剂盒的方法中，对于未变性小麦粉萃取物、变性小麦粉萃取物都可以检测到最低 50 ppb 左右。并且对于变性小麦粉萃取物未见非特异反应。

[表13]

小麦粉萃取物(未改性)

	1ppm	100ppb	50ppb	10ppb	非特异反应
本发明方法	○	○	○	×	无
市售A	○	○	○	×	无
市售B	×	×	×	×	无

小麦粉萃取物(改性)

	1ppm	100ppb	50ppb	10ppb	非特异反应
本发明方法	○	○	○	△	无
市售A	-	-	-	-	有
市售B	-	-	-	-	有

接着考虑从实际的食物中检测变应原，使用市场销售的食用面包进行评价。评价时，与使用目前市售的变应原检测试剂盒的市售 A 和市售 B 进行了比较。结果如表 14 所示。表 14 中，“非特异反应”是只供给缓冲液时却判定为阳性，此时为“有非特异反应”。食用面包的蛋白质约为 8%，因此以下的浓度是假定将 8% 作为全部萃取的数字。评价结果如下：市售 A 中，对于未变性面包无法检测出 4 ppm 或以下的浓度，对于变性面包则可见非特异反应，无法判定。市售 B 中，可检测出 4 ppm 左右，但是除此以外的浓度无法检测，对于变性面包可见非特异反应，无法判定。使用本发明的试剂盒的方法中，对于未变性面包、变性面包都以 40 ppb 左右的低浓度检测出，变性中没有非特

异反应，可以进行检测。

[表14]

未改性 食用面包(浓度换算为蛋白质浓度)

	400ppm	4ppm	400ppb	40ppb	非特异反应
本发明方法	○	○	○	△	无
市售A	×	○	×	×	无
市售B	○	×	×	×	无

改性 食用面包(浓度换算为蛋白质浓度)

	400ppm	4ppm	400ppb	40ppb	非特异反应
本发明方法	○	○	○	△	无
市售A	-	-	-	-	有
市售B	-	-	-	-	有

#### 实施例 4

##### 1. 抗 24 kDa 蛋白质 MAb 和抗 76 kDa 蛋白质 MAb 的确立

###### 1-1 材料和方法

###### 1) 荞麦 24 kDa 蛋白质 MAb 和抗 76 kDa 蛋白质的制备

向市售荞麦粉中加入 5 倍量的纯净水，搅拌后以 12000 rpm 离心，得到沉淀。向所得沉淀中加入 5 倍量 1 M NaCl，搅拌后以 12000 rpm 离心，得到上清。通过透析使上清脱盐，进行冷冻干燥，将所得组分作为荞麦粗蛋白组分。再使用プレップセル 960 (BioRad) 对该荞麦粗蛋白组分进行纯化。24 kDa 蛋白质的纯化如下进行：将荞麦粗蛋白组分溶解于含有 2.0% SDS 和 5% 2-巯基乙醇的样品缓冲液中，然后在 95 °C 加热 4 分钟，以此作为样品用于试验，通过采用 12% 丙烯酰胺分离凝胶的プレップセル 960 进行分离，得到 24 kDa 蛋白质。76 kDa 蛋白质的纯化如下进行：将荞麦粗蛋白组分溶解于含有 2.0% SDS 但不含有 2-巯基乙醇的样品缓冲液中，以此作为样品用于试验，通过采用了 12% 丙烯酰胺分离凝胶的プレップセル 960 进行分离，得到 76 kDa 蛋白质。所得各组分在透析后进行冷冻干燥。使用这些冻干物，用生理盐水分别制备 0.1% 的 24 kDa 蛋白质溶液和 0.1% 的 76 kDa 蛋白质溶液，以 500 μl 分注到 1 ml 容量的 Eppendorf 管中，作为抗原溶液，免疫前在 -20 °C 冷冻保存。

## 2) 免疫

使用 5 只 5 周龄的 BALB/c 小鼠(日本クレア株式会社)作为供试动物。初次免疫时,向分别装有 500  $\mu$ l 0.1% 24 kDa 蛋白质溶液和 0.1% 76 kDa 蛋白质溶液的 Eppendorf 管中等量加入完全弗氏佐剂(Difco),用漩涡混合器搅拌,将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150  $\mu$ l 腹腔内注射该乳液。另外,追加免疫时,以 3 周的间隔进行两次。免疫时,向分别装有 500  $\mu$ l 0.1% 的 24 kDa 蛋白质溶液和 0.1% 的 76 kDa 蛋白质溶液的 Eppendorf 管中等量加入不完全弗氏佐剂(Difco),用漩涡混合器搅拌,将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150  $\mu$ l 腹腔内注射该乳液。

## 3) 血液中抗体效价的测定

初次或追加免疫时,在注射了 24 kDa 蛋白质溶液或 76 kDa 蛋白质溶液一周后,由各 BALB/c 小鼠的尾部静脉采血。采集的血液在室温中放置 2 小时,然后离心,得到血清。制备这些血清的 10 倍稀释梯度,通过非竞争法 ELISA 检测小鼠血液中抗 24 kDa 蛋白质抗体效价和抗 76 kDa 蛋白质抗体效价。二次抗体采用碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG(H+L)抗体(Jackson ImmunoReserch Laboratories Inc.)。

## 4) 杂交瘤的制备

杂交瘤的制备按照 Köhler 和 Milstein 的方法(1975)进行。即,对抗体效价充分提高的小鼠从尾部静脉分别以 100  $\mu$ l 注射 0.1% 的 24 kDa 蛋白质溶液或 0.1% 的 76 kDa 蛋白质溶液。静脉注射 4 天后,由小鼠体内无菌摘除脾脏。将脾脏切细后,用 RPMI1640 清洗,过灭菌尼龙网(细胞筛网,70 mm, Becton Dickinson 制造),得到脾细胞悬浮液。通过 1,000 rpm  $\times$  10 分钟的离心,收集脾细胞,再次悬浮于 RPMI1640,计数细胞数。将该脾细胞悬浮液和小鼠骨髓瘤细胞(P3X63Ag8.653)悬浮液以细胞数 10:1 混合,再以 1,000 rpm  $\times$  10 分钟进行离心,得到颗粒。向该颗粒中滴加平均分子量 3,350 的 45% 聚乙二醇,进行细胞融合。向细胞溶液中加入 RPMI1640,稀释后,离心得到颗粒。向该颗粒中加入 HAT 选择培养基,分注到 24 孔细胞培养板(Becton Dickinson)中,在 5%CO<sub>2</sub> 下、在 37℃ 培养,形成  $5 \times 10^6$  细胞/孔。其中所述 HAT 选择培养基是在杂交瘤用培养基(含有 10% 胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基)中加入 100  $\mu$ M 次黄嘌呤、0.4  $\mu$ M 氨基蝶呤、16  $\mu$ M 胸腺嘧啶的培养基。

### 5) 有限稀释法克隆

将细胞培养板各孔的培养上清作为 ELISA 的一次抗体, 用于试验, 检测生成抗 24 kDa 蛋白质抗体或 76 kDa 蛋白质抗体的杂交瘤的存在。将通过 ELISA 对 24 kDa 蛋白质或 76 kDa 蛋白质显示阳性的孔的杂交瘤转移至 96 孔细胞培养板(Becton Dickinson), 进行有限稀释法克隆, 形成 0.9 个细胞/孔。向 96 孔细胞培养板的各孔中加入 4 周龄 BALB/c 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞, 形成  $5 \times 10^6$  个细胞/孔。克隆的杂交瘤的培养使用含有 10% 胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 的链霉素的 RPMI1640 培养基。

### 6) 抗体的筛选

单克隆抗体的筛选通过检测对 24 kDa 蛋白质、76 kDa 蛋白质、用 PBS 稀释的荞麦粗蛋白(以下可称为“NBW”)或者变性剂增溶的荞麦粗蛋白(以下可称为“DBW”)的反应性的不同来获得特异性不同的克隆。荞麦粗蛋白如下制备: 向荞麦粉中加入 20 倍量的 PBST, 在 4℃ 搅拌过夜, 离心后进行脱脂处理, 回收上清, 透析, 然后冷冻干燥, 制备成荞麦粉萃取物。变性剂增溶如下进行: 称量 10 mg 荞麦粗蛋白, 加入 6 g 尿素、0.2 ml 2-巯基乙醇、1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 8.6)、1.5 ml 蒸馏水, 用铝箔覆盖, 然后在 100℃ 油浴加热 1 小时, 进行变性处理, 将其作为 DBW。通过非竞争法 ELISA 检测培养上清对 24 kDa 蛋白质、76 kDa 蛋白质、NBW、DBW 的反应性。

### 7) 腹水的采集和 MAb 的纯化

按照 Jones 等人(1990)的方法, 首先向 BALB/c 小鼠中腹腔内注射 0.2 ml 不完全弗氏佐剂。一周后, 对每只小鼠接种  $5 \times 10^6$  个细胞的克隆杂交瘤。腹水潴留后, 通过针筒采集腹水。通过蛋白 G 柱(アマシヤム・ファルマシア)对采集的腹水进行纯化。

### 8) MAb 的特性和 MAb 的类、亚类和型

使用固相法确定抗 24 kDa 蛋白质 MAb 或抗 76 kDa 蛋白质 MAb 的特性。固相法是采用预先将 24 kDa 蛋白质、76 kDa 蛋白质、NBW 或 DBW 固定在细胞培养板的孔内, 使抗 24 kDa 蛋白质 MAb 或 76 kDa 蛋白质 MAb 与该固定化抗原作用的方法。通过单克隆小鼠免疫球蛋白同种型试剂盒(Pharminogen), 对 MAb 的类和亚类确定为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL( $\kappa$ )和 IgL( $\gamma$ )。

### 9) MAb 的生物素化

为了进行夹层 ELISA 试验, 对纯化的 MAb 分别进行生物素化处理。使用 50 mM 的碳酸缓冲液(pH 8.5)制备成 20 mg/ml, 加入 10  $\mu$ l 以 3 mg/100  $\mu$ l 溶解于 DMSO 的 NHS-生物素溶液, 搅拌, 然后一边冰冷却一边静置 2 小时。然后用 PBS 置换为 20 mg/ml。

#### 1-2 结果

1) 抗 24 kDa 蛋白质 MAb 和 76 kDa 蛋白质 MAb 的特性和类、亚类

得到了 5 种对 24 kDa 蛋白质具有特异性的 MAb、4 种对 76 kDa 蛋白质具有特异性的 MAb。它们分别对固相抗原的特异性如表 15 和表 16 所示。

[表15]

MAb名	24 kDa	NBW	DBW	类、亚类和型
376 (PBW 1)	+	-	+	IgG1 ( $\kappa$ )
384	+	-	+	IgG1 ( $\kappa$ )
389	+	-	+	IgG1 ( $\kappa$ )
398	+	-	+	IgG1 ( $\kappa$ )
401	+	-	+	IgG1 ( $\kappa$ )

[表16]

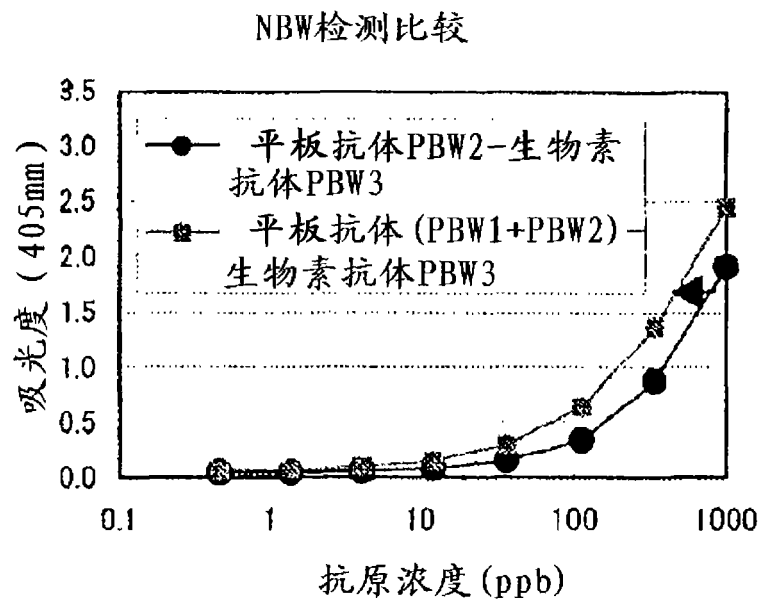
MAb名	76 kDa	NBW	DBW	类、亚类和型
505 (PBW 2)	+	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
506 (PBW 3)	+	+	+	IgG1 ( $\kappa$ )
504	+	+	-	IgG1 ( $\kappa$ )
512	+	+	-	IgG1 ( $\kappa$ )
501	+	+	-	IgG1 ( $\kappa$ )

## 2) 组合条件

以对固相抗原显示阳性反应的各 MAb 分别作为固相或生物素化抗体，从夹层 ELISA 的检测灵敏度考虑，选择出用于检测 NBW 和 DBW 的 MAb 的组合。结果，选择出平板固定化抗体 PBW2 (FERM ABP-10273) 和生物素化抗体 PBW3 (FERM ABP-10274) 作为可检测 NBW 的组合，选择出平板固定化抗体 PBW1 (FERM ABP-10272) 和生物素化抗体 PBW2 作为可检测 DBW 的组合。通过夹层 ELISA 进行的 PBW2 和 PBW3 对各种荞麦粗蛋白的反应性结果如图 15 所示。通过夹层 ELISA 进行的 PBW1 和 PBW2 对各种荞麦粗蛋白的反应性如图 16 所示。

## 3) 通过 MAb 混合系对 NBW、DBW 的检测

将通过夹层 ELISA 选择的 MAb 混合，确认 NBW、DBW 的检测灵敏度。即，对于 NBW，以生物素化 PBW3 作为二次抗体，将以单独 PBW2 作为平板固定化抗体的情况、将 PBW1 和 PBW2 混合的情况的情况进行比较。对于 DBW，以生物素化 PBW3 为二次抗体，将高检测灵敏度的平板固定化抗体 PBW1 和生物素化 PBW2 的组合、将 PBW1 和 PBW2 混合的平板固定化抗体的情况进行了比较。如图 17 和图 18 所示，将平板抗体（プレート抗体）混合的情况对于 NBW、DBW 都显示吸光值高，表明可提高检测度。



## 2. 通过夹层 ELISA 检测食品中的 NBW、DBW

通过上述 1 中选择的 PBW1、PBW2、PBW3 的组合，尝试是否可以检测实际食品中的荞麦粗蛋白

### 2-1 材料和方法

#### 1) 模型肉食制品的制备

选择肉食制品作为定量试验的模型食品，按照表 17 所示的配比制备含有各浓度荞麦粗蛋白的模型肉食制品。猪瘦肉是从猪上等肉中除去脂肪、筋，制成 5mm 的绞肉使用。按照各配比称量添加物，用食品加工机混合，然后充填到氯乙烯管中，在 75℃ 加热 30 分钟。

[表17]

原材料	测试1	测试2	测试3	对照
猪瘦肉 (%)	83.0	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0	2.0
多磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (%)	120	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300	300
水	14.5	14.5	14.5	14.5
荞麦粗蛋白 (ppm)	200	20	2	0
合计 (%)	99.762	99.744	99.7422	99.742

## 2) 通过夹层 ELISA 进行定量分析

### (模型咸肉)

将各模型咸肉用食品加工机均匀磨碎，作为分析样品。称量 1 g 样品，加入 19 g PBST，用匀浆器搅拌 30 秒。进行 3,000 rpm × 20 分钟的离心，用滤纸过滤上清，称量 0.5 ml 该上清，加入 9.5 ml PBST，作为 ELISA 用样品。校正曲线同样采用使用 PBST 的荞麦粗蛋白的梯度稀释品。

### (模型加热制品)

将各模型加热制品用食品加工机均匀磨碎，作为分析用样品。称

量 1 g 样品，加入 19 g 含有 1% SDS、1% 2-巯基乙醇的 PBS，用匀浆器搅拌 30 秒。然后在 100℃ 加热 1 小时。冷却后进行 3,000 rpm × 20 分钟的离心，用滤纸过滤上清，量取 0.5 ml 该上清，加入 9.5 ml PBST，作为 ELISA 用样品。校正曲线同样使用经 SDS、2-巯基乙醇处理的荞麦粗蛋白的梯度稀释品。

## 2-2 结果

通过夹层 ELISA 对模型肉食制品中的荞麦粗蛋白进行分析，模型咸肉的结果如表 18 所示，模型加热制品的结果如表 19 所示。

[表18]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	189.3	16.2	1.8	N. D. *2
回收率 (%) * 1	94.6%	81.0%	90.5%	-

\* 1 : (分析值/添加量) × 100

\* 2 : 未检出

[表19]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	156.6	18.0	2.6	N. D.
回收率 (%) * 1	78.3%	90.0%	133%	-

\* 1 : (分析值/添加量) × 100 )

\* 2 : 未检出

由以上结果表明：不管是像模型咸肉那样未加热的荞麦粗蛋白，还是像模型加热制品那样加热变性的荞麦粗蛋白，都可以以高回收率

检测出荞麦粗蛋白。由此可知：通过可与未变性荞麦蛋白结合的 MAb 和可与变性荞麦粗蛋白结合的 MAb 的组合，对于未加热(未变性)、加热(变性)的任何状态的荞麦蛋白都可以以高灵敏度进行分析。

### 3. 通过免疫色谱检测变性和未变性荞麦粗蛋白

#### 3-1 材料和方法

##### 1) 胶体金标记和结合垫的制备

用 2 mM 硼酸缓冲液(pH 9.0)将 PBW3 MAb 溶液制备成 1 mg/ml。向 5 ml 预先用 0.2 M 碳酸钾溶液制备成 pH 9.0 的胶体金溶液(シグマ制造)中加入 500  $\mu$ l MAb 溶液，在室温下反应 30 分钟，然后加入 625  $\mu$ l 10% BSA 溶液，再反应 15 分钟。进行离心，用 1% BSA 溶液制成 OD525=1.0。以 68  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 涂布在玻璃纤维制结合垫(日本ミリポア)上并干燥。

##### 2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 将 PBW1 和 PBW2 的 MAb 溶液制备成 8 mg/ml，以 1:1 的比例混合，将其呈直线状涂布于硝基纤维素膜上并干燥。然后用含有 1% 脱脂乳的 10 mM 磷酸缓冲液(pH 7.5)、在 37℃ 封闭 1 小时，用 10 mM 磷酸缓冲液(pH 7.5)清洗并干燥。

##### 3) 免疫色谱条的组装和评价

分别贴装上述制备的样品垫、结合垫、抗体固定化膜、吸收垫，制成免疫色谱条。将上述 2 中制备的模型肉食制品适当稀释，用作被检液。

#### 3-2 结果

通过膜涂布 MAb PBW1+PBW2 和胶体金标记 MAb PBW3 的组合，无论荞麦蛋白加热、非加热，都可以以最低 50 ppb (食品中的 2 ppm) 检测。该结果表明：不管是以制造工艺中混入的荞麦蛋白为对象，还是以加热后的制品为对象，可以设计出可对应上述任何情况的免疫色谱条。

在市售的变应原检测用免疫色谱条中滴加含有 0.1 M 尿素+0.2% 2-巯基乙醇的 PBS，以此作对照，则产生非特异性条带，为假阳性。这说明如果不使用蛋白质变性剂，则可作为变应原检测的对象被限制在

极狭窄的范围内，该蛋白质变性剂用于从因加热等而变性的食品蛋白中有效萃取变应原。

## 实施例 5

### 1. 抗 Ara h1MAb 的确立

#### 1-1 材料和方法

##### 1) Ara h1 蛋白质的制备

向市售花生中加入 5 倍量的 20 mM 双 tris-丙烷缓冲液(pH 7.2)，在室温下搅拌 2 小时，然后进行 3000 × g 的离心，除去沉淀和油分。将所得水溶性组分再次进行 10000 × g 离心，得到上清。再用 SourceQ (アマシヤム・フアルマシア)、通过 20 mM 双 tris-丙烷缓冲液(pH 7.2)、NaCl 的线性梯度(0-1M)对上清进行纯化。将纯化的 Ara h1 组分用蒸馏水透析，然后冷冻干燥，制成未变性 Ara h1(以下称为“NAh1”)。变性 Ara h1(以下称为“DAh1”)如下获得：称量 10 mg NAh1、6 g 尿素、0.2 ml 2-巯基乙醇(以下称为 2-ME)、1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 8.6)、1.5 ml 蒸馏水，用铝箔覆盖，然后在 100℃ 油浴中加热 1 小时，进行变性处理。然后透析，冷冻干燥。用该冻干物、用生理盐水分别制备 0.1% 的 DAh1 溶液和 0.1% 的 NAh1 溶液，以 500 μl 分别分注到 1 ml 容量的 Eppendorf 管中，免疫前在 -20℃ 冷冻保存。

##### 2) 免疫

使用 5 只 5 周龄的 BALB/c 小鼠(日本クレア株式会社)作为供试动物。初次免疫时，向分别装入有 500 μl 0.1% NAh1 溶液和 0.1% DAh1 溶液的 Eppendorf 管中等量加入完全弗氏佐剂(Difco)，用漩涡混合器搅拌，将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150 μl 腹腔内注射该乳液。追加免疫时，以每 2 周的间隔进行 3 次。免疫时，向分别装有 0.1% NAh1 溶液和 0.1% DAh1 溶液的 Eppendorf 管中等量加入不完全弗氏佐剂(Difco)，用漩涡混合器搅拌，将制备的乳液用于试验。每只小鼠以 150 μl 腹腔内注射该乳液。

##### 3) 血液中抗体效价的测定

初次或追加免疫时，在注射 NAh1 溶液或 DAh1 溶液一周后，由各 BALB/c 小鼠的尾部静脉采血。采集的血液在室温下放置 2 小时，进行离心，得到血清。制备该血清的 10 倍稀释梯度，通过非竞争法 ELISA 检测小鼠血液中抗 NAh1 抗体效价和抗 DAh1 抗体效价。二次抗体使用

碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG(H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)。

#### 4) 杂交瘤的制备

杂交瘤的制备按照 Köhler 和 Milstein 的方法(1975)进行。即, 对抗体效价充分提高的小鼠, 从尾部静脉分别注射 100  $\mu$ l 0.1%的 NAh1 溶液或 0.1%的 DAh1 溶液。静脉注射 4 天后, 从小鼠体内无菌摘除脾脏。将脾脏切细后, 用 RPMI1640 清洗, 过灭菌尼龙网(细胞筛网, 70 mm, Becton Dickinson 制造), 得到脾细胞悬浮液。通过 1,000 rpm  $\times$  10 分钟的离心收集脾细胞, 再次悬浮于 RPMI1640 中, 计数细胞数。将该脾细胞悬浮液和小鼠骨髓瘤细胞(P3X63Ag8.653)悬浮液按照细胞数 10:1 混合, 再次以 1,000 rpm  $\times$  10 分钟进行离心, 得到颗粒。向该颗粒中滴加平均分子量为 3,350 的 45%聚乙二醇, 进行细胞融合。向细胞溶液中加入 RPMI1640, 然后离心得到颗粒。向该颗粒中加入 HAT 选择培养基, 分注到 24 孔细胞培养板(Becton Dickinson)中, 在 5% CO<sub>2</sub> 下、在 37 $^{\circ}$ C 培养, 使细胞数为  $5 \times 10^6$  个细胞/孔。其中所述 HAT 选择培养基是在杂交瘤用培养基(含有 10%胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基)中加入 100  $\mu$ M 次黄嘌呤、0.4  $\mu$ M 氨基蝶呤、16  $\mu$ M 胸腺嘧啶的培养基。

#### 5) 有限稀释法克隆

将细胞培养板各孔的培养上清作为 ELISA 的一次抗体, 用于试验, 检测生成抗 NAh1 抗体或 DAh1 抗体的杂交瘤的存在。将通过 ELISA 对 NAh1 或 DAh1 显示阳性的孔的杂交瘤转移至 96 孔细胞培养板(Becton Dickinson)上, 进行有限稀释法克隆, 形成 0.9 个细胞/孔。向 96 孔细胞培养板的各孔中加入 4 周龄 BALB/c 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞, 形成  $5 \times 10^6$  个细胞/孔。克隆的杂交瘤的培养使用含有 10%胎牛血清、40 mM 2-巯基乙醇、100 U/ml 青霉素、100g/ml 的链霉素的 RPMI1640 培养基。

#### 6) 抗体的筛选

单克隆抗体的筛选通过检测对 NAh1、DAh1、或花生粗蛋白的未变性物(以下称为“NP-e”)、尿素处理(以下称为“DP-e”)四种的反应性的不同而得到特异性不同的克隆。NP-e 如下获得: 向花生中加入 5 倍量的 20 mM 双 Tris-丙烷缓冲液(pH 7.2), 在室温下搅拌 2 小时, 然后进

行 2 次离心, 将所得上清进行透析, 冷冻干燥。DP-e 如下制备: 称量 10 mg NP-e, 加入 6 g 尿素、0.2 ml 2-ME、1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 8.6)、1.5 ml 蒸馏水, 用铝箔覆盖, 然后在 100℃ 油浴中加热 1 小时, 进行变性处理。通过非竞争法 ELISA 检测培养上清对 NAh1、NP-e、DAh1 或 DP-e 的反应性。

#### 7) 腹水的采集和 MAb 的纯化

按照 Jones 等人(1990)的方法, 首先对 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.2 ml 不完全弗氏佐剂。一周后, 对每只小鼠接种  $5 \times 10^6$  个细胞克隆的杂交瘤。腹水滞留后, 通过针筒采集腹水。通过蛋白 G 柱(アマシヤム・フアルマシア)对采集的腹水进行纯化。

#### 8) MAb 的特性和 MAb 的类、亚类和型

使用固相法确定抗 NAh1MAb 或抗 DAh1MAb 的特性。固相法采用将 NAh1、DAh1、NP-e 或 DP-e 预先固定在细胞培养板的孔中, 使抗 NAh1MAb 或抗 DAh1MAb 与该固定化抗原作用的方法。通过单克隆小鼠免疫球蛋白同种型试剂盒(Pharmingen)对 MAb 的类和亚类确定为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL 和 IgL( $\gamma$ )。

#### 9) MAb 的生物素化

为了进行夹层 ELISA 试验, 对纯化的 MAb 分别进行生物素化处理。使用 50 mM 的碳酸缓冲液(pH 8.5)制备成 20 mg/ml, 加入 10  $\mu$ l 以 3 mg/100  $\mu$ l 溶解于 DMSO 的 NHS-生物素溶液, 搅拌, 然后一边冰冷却一边静置 2 小时。然后用 PBS 置换为 20 mg/ml。

### 1-2 结果

#### 1) 抗 NAh1MAb 和 DAh1MAb 的特性和类、亚类

得到 7 种对 NAh1 具有特异性的 MAb、3 种对 DAh1 具有特异性的 MAb。它们对固相抗原的特异性分别如表 20 和表 21 所示。

[表20]

MAb名	NAh l	DAh l	NP-e	DP-e	类、亚类和型
203	+*	-	+	-	IgG1 (κ)
217 (PAh1-1)	+	-	+	-	IgG1 (κ)
223	+	-	+	-	IgG1 (κ)
236 (PAh1-2)	+	+	+	+	IgG1 (κ)
427	+	-	+	-	IgG1 (κ)
432	+	+	+	+	IgG1 (κ)
451	+	+	+	+	IgG1 (κ)

[表21]

MAb名	NAh l	DAh l	NP-e	DP-e	类、亚类和型
967	-*	+	-	+	IgG1 (κ)
970	-	+	-	+	IgG3 (κ)
971 (PAh1-3)	-	+	-	+	IgG1 (κ)

## 2) 组合条件

以对固相抗原显示阳性的各 MAb 分别作为固相或生物素化抗体，从夹层 ELISA 的检测灵敏度考虑，选择出用于检测 NP-e 和 DP-e 的 MAb 的组合。结果选择出平板抗体 PAh1-2 (FERM ABP-10270) 和生物素化抗体 PAh1-1 (FERM ABP-10269) 作为可检测 NP-e 的组合，选择出平板抗体 PAh1-2 和生物素化抗体 PAh1-3 (FERM ABP-10271) 作为可检测 DP-e 的组合(图 19 和图 20)。

## 3) 通过 MAb 混合系检测 NP-e、DP-e

在固相中混合 PAh1-2 (细胞保藏号)、生物素化 PAh1-2 (细胞保藏号) 和 PAh1-3 (细胞保藏号)，确认 NP-e、DP-e 的检测灵敏度。各 MAb 的浓度设定为 50 μg/ml。结果，通过 MAB 混合系均可检测出 NP-e、DP-e (图 21 和图 22)。

## 2. 通过夹层 ELISA 检测食品中的花生粗蛋白

通过上述 1 中选择的 PAh1-1、PAh1-2、PAh1-3 的组合, 尝试是否可检测出实际食品中的花生粗蛋白。

## 2-1 材料和方法

### 1) 模型肉食制品的制备

选择肉食制品作为定量试验的模型食品, 按照表 22 所示配比制备含有各浓度的花生粗蛋白的模型肉食制品。猪瘦肉是从猪上等肉中除去脂肪、筋, 制成 5mm 的绞肉使用。按照各配比称量添加物, 用食品加工机混合, 然后充填到氯乙烯管中, 在 75℃ 加热 30 分钟。

[表22]

原材料	测试1	测试2	测试3	对照
猪瘦肉 (%)	83.0	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0	2.0
多磷酸钠 (%)	0.2	0.2	0.2	0.2
亚硝酸钠 (%)	120	120	120	120
抗坏血酸钠 (ppm)	300	300	300	300
水	14.5	14.5	14.5	14.5
花生粗蛋白 (ppm)	200	20	2	0
合计 (%)	99.762	99.744	99.7422	99.742

### 2) 通过夹层 ELISA 进行定量分析

#### (模型咸肉)

将各模型咸肉用食品加工机均匀磨碎, 制成分析样品。称量 1 g 样品, 加入 19 g PBST, 用匀浆器搅拌 30 秒。进行 3000 rpm × 20 分钟的离心, 用滤纸过滤上清, 量取 0.5 ml 所得上清, 加入 9.5 ml PBST, 作为 ELISA 用样品。校正曲线同样使用溶解于 PBST 的花生粗蛋白的梯度稀释品。

#### (模型加热制品)

用食品加工机将各模型加热制品均匀磨碎, 作为分析样品。称量 1 g 样品, 加入 19 g 含有 1 M 尿素、1% 2-ME 的 PBS, 用匀浆器搅拌 30

秒。然后在 100℃ 进行 1 小时加热处理。冷却后进行 3000 rpm × 20 分钟的离心，用滤纸过滤上清，量取 0.5 ml 上清，加入 9.5 ml PBST，作为 ELISA 用样品。校正曲线同样使用进行了 1M 尿素和 0.1% 2-ME 处理的花生粗蛋白的梯度稀释品。还与用 PBST 从分析用样品中萃取并溶解于 PBST 的花生粗蛋白作为校正曲线、但不使用尿素和 2-ME 的情况进行比较。

## 2-2 结果

关于通过夹层 ELISA 对模型肉食制品中的花生粗蛋白的分析，模型咸肉的结果如表 23 所示，模型加热制品的结果如表 24 所示，仅由 PBST 萃取的结果如表 25 所示。

[表23]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	206.0	18.4	1.8	N.D. *2
回收率 (%) * 1	103.0	92.0	90.0	-

\* 1 : (分析值/添加量) × 100

\* 2 : 未检出

[表24]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	137.0	19.5	10.3	N.D. *2
回收率 (%) * 1	68.5	97.5	515.0	-

\* 1 : (分析值/添加量) × 100

\* 2 : 未检出

[表25]

	测试1	测试2	测试3	对照
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析值 (ppm)	N.D. *2	N.D.	N.D.	N.D.
回收率 (%) * 1	-	-	-	-

以上结果表明：不管是像模型咸肉的未加热的花生粗蛋白，还是如模型加热制品的加热变性花生粗蛋白，都可以以高回收率检测出花生粗蛋白。由此可知：通过将可与未变性蛋白质结合的 MAb 和与变性蛋白质结合的 MAb 组合，对于未加热(未变性)、加热(变性)的任何状态的花生蛋白，都可以以高灵敏度分析。还得知：将尿素和 2-ME 用于食品中花生粗蛋白的萃取是有效的，并且必须可与尿素变性的 Ah1 结合。

### 3. 通过免疫色谱检测未变性和变性花生粗蛋白

#### 3-1 材料和方法

##### 1) 胶体金标记和结合垫的制备

用 2 mM 硼酸缓冲液(pH 9.0)将 PAh1-1 和 PAh1-3 的 MAb 溶液制备成 1 mg/ml。向 5 ml 预先用 0.2 M 碳酸钾溶液制备成 pH 9.0 的胶体金溶液(シグマ制造)中加入 500  $\mu$ l MAb 溶液，在室温下反应 30 分钟，然后加入 625  $\mu$ l 10% BSA 溶液，再反应 15 分钟。进行离心，用 1% BSA 溶液制成 OD525=2.0，以 1:1 的比例混合。以 68  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 涂布于玻璃纤维制结合垫上并干燥。

##### 2) 抗体固定化膜的制备

用 PBS 将 PAh1-2 的 MAb 溶液制成 4 mg/ml，呈直线状涂布于硝基纤维素膜上并干燥。然后用含有 1% 脱脂乳的 10 mM 磷酸缓冲液(pH 7.5)、在 37℃ 封闭 1 小时，然后用 10 mM 磷酸缓冲液(pH 7.5)清洗并干燥。

##### 3) 免疫色谱条的组装和评价

分别贴装上述制备的样品垫、结合垫、抗体固定化膜、吸收垫，制成免疫色谱条。将上述 2 中制备的模型肉食制品适当稀释，用作被检液。

### 3-2 结果

通过膜涂布 MAb PAh1-2、胶体金标记 MAb PAh1-1 和 PAh1-3 的组合，不管加热或非加热，都可以以最低 50 ppb (食品中的 2 ppm) 检测出花生粗蛋白。该结果表明：无论以制造工艺中混入的花生粗蛋白为对象或加热后的制品为对象，可以设计出可以对应任何情况的免疫色谱条。

在市售的变应原检测用免疫色谱条中滴加含有 0.01 M 尿素、0.2% 2-ME 的 PBS，以此作为对照，则产生非特异性条带，为假阳性。这说明：如果不使用蛋白质变性剂，则可作为变应原检测的对象被限制在极狭窄的范围内，该蛋白质变性剂用于从因加热而变性的食品蛋白中有效萃取变应原。

### 产业实用性

根据本发明，在食品等中所含的乳变应原、卵清蛋白变应原、小麦变应原、荞麦变应原、花生变应原的免疫学检测方法中，在变性/未变性的任何状态下，都可以定性且定量的检测出这些变应原。





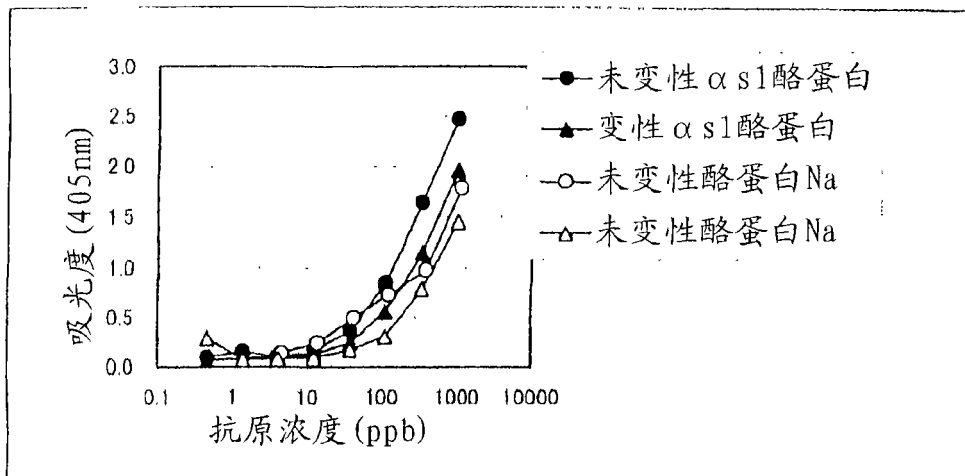


图 1

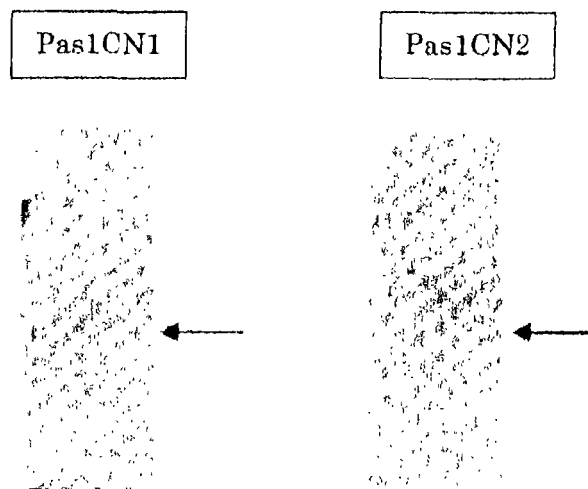


图 2

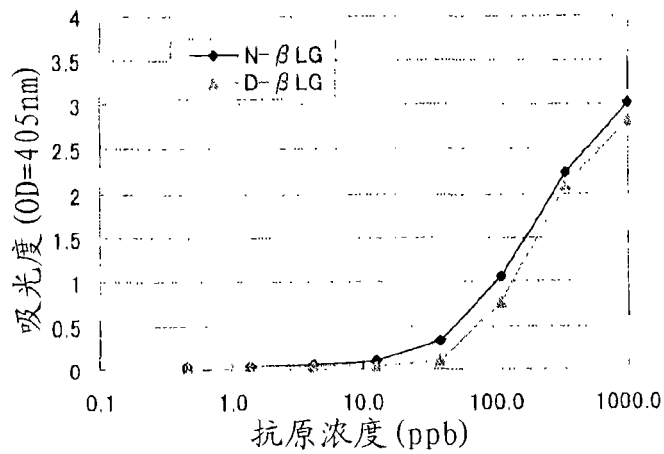


图 3

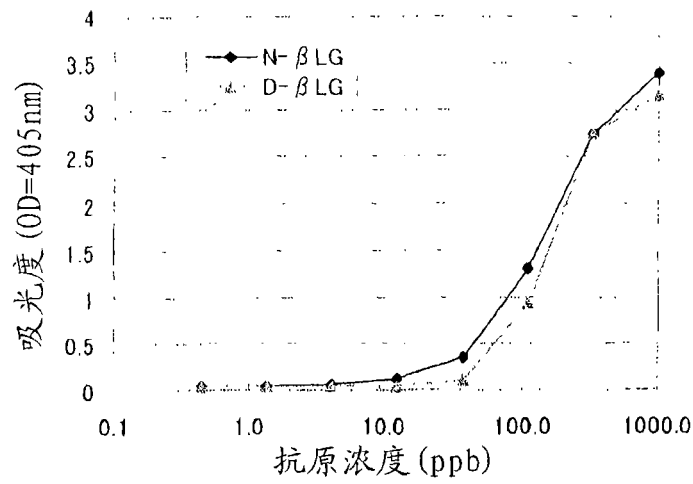


图 4

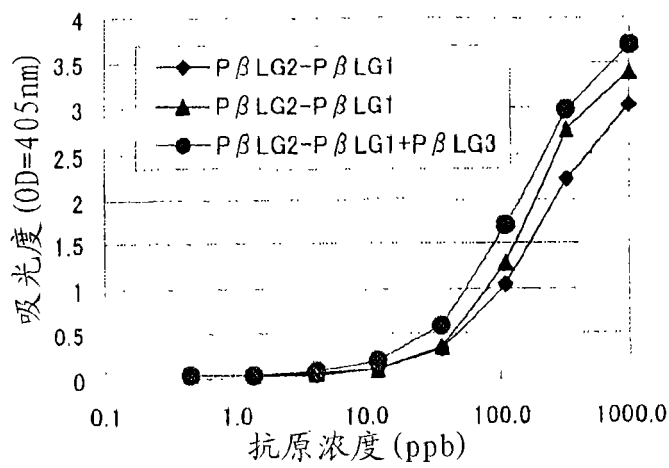


图 5

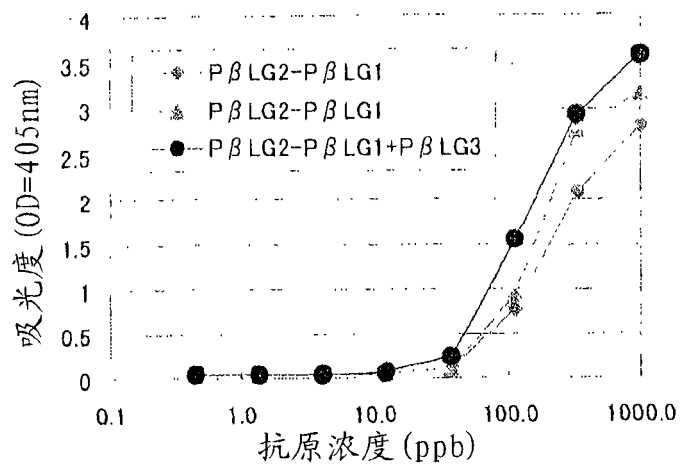


图 6

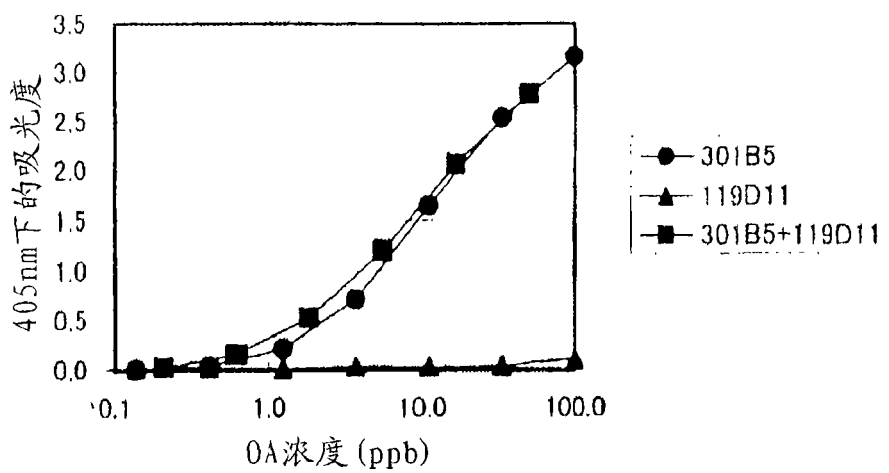


图 7

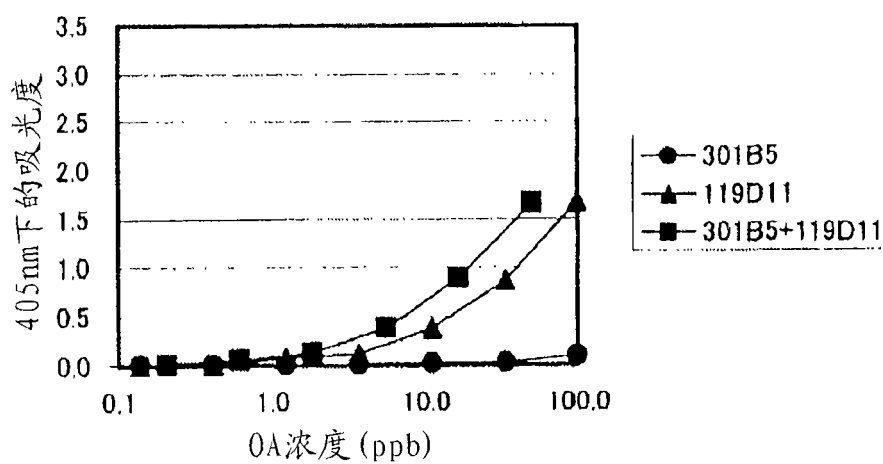


图 8

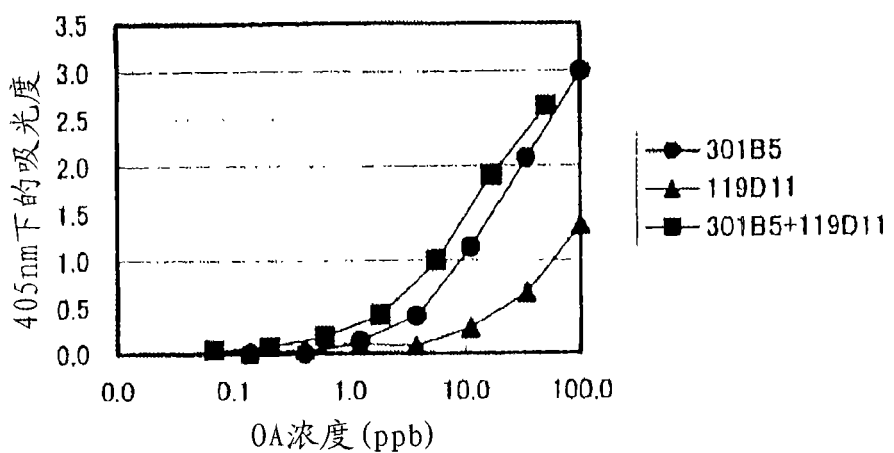


图 9

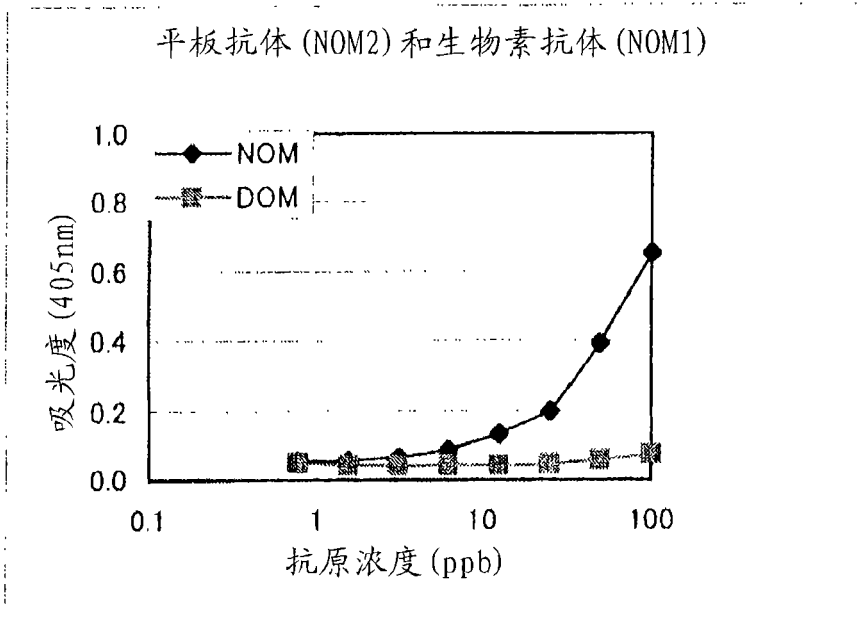


图 10

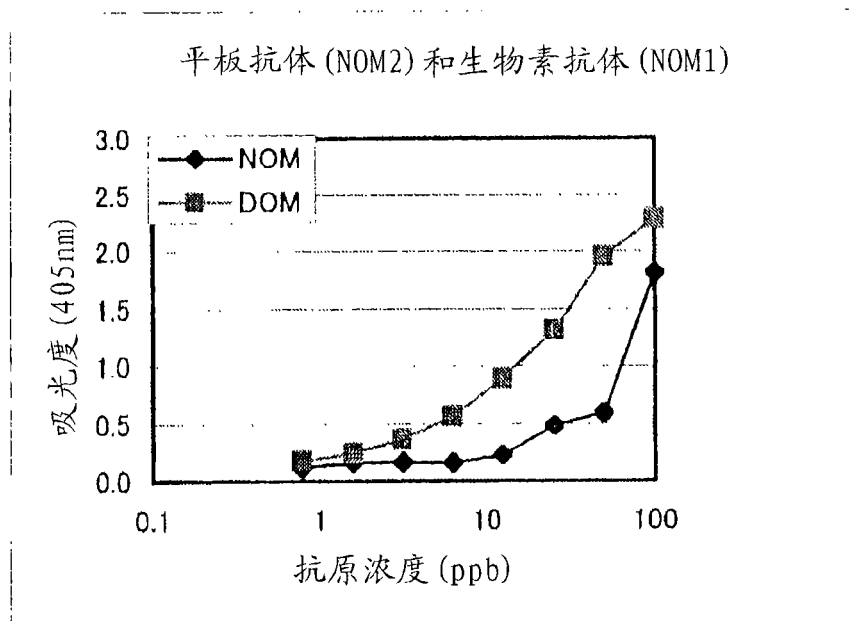


图 11

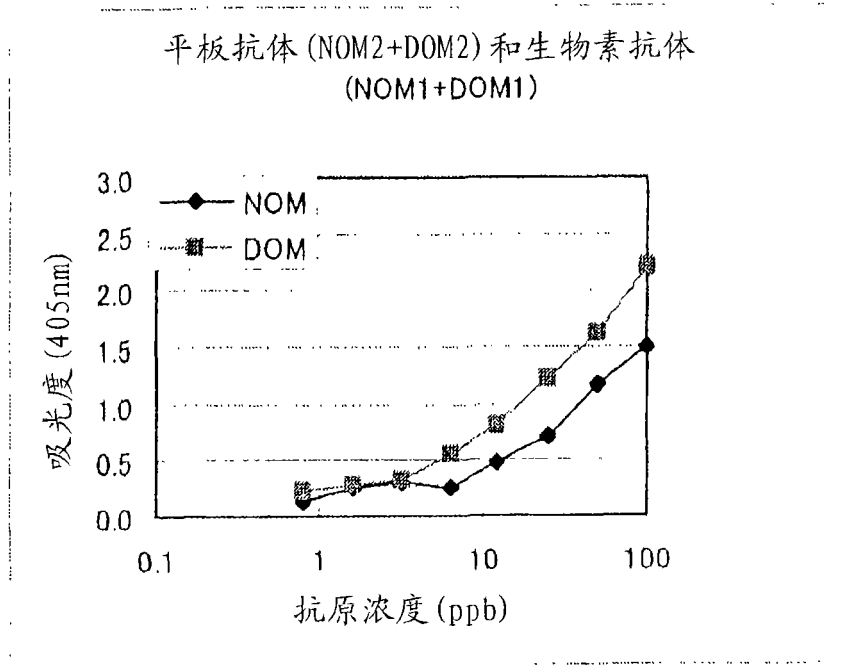


图 12

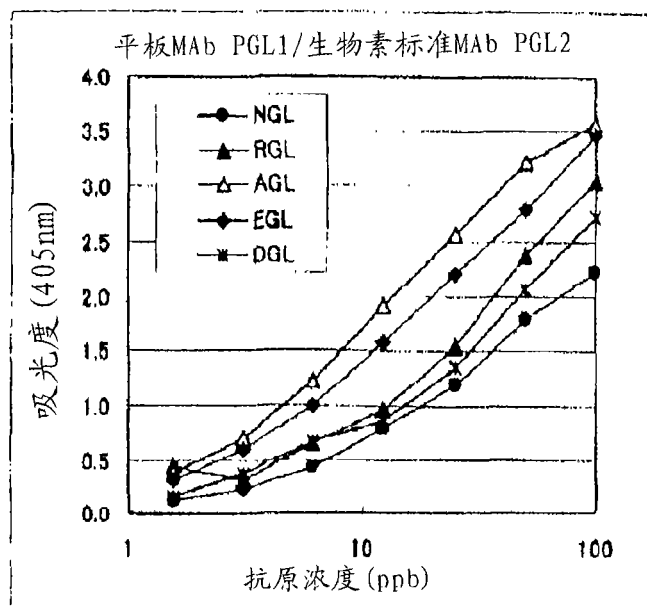


图 13

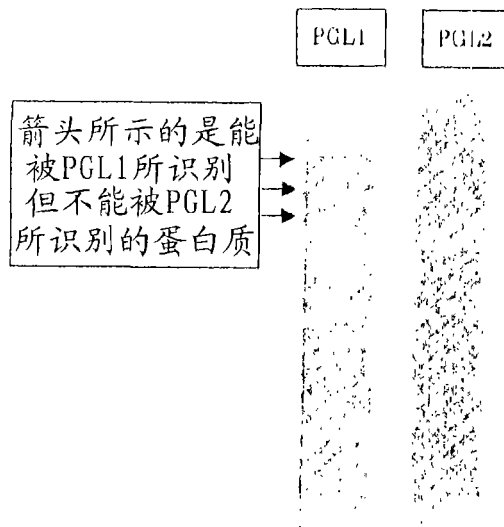


图 14

根据夹层ELISA的MAb组合  
(平板抗体PBW2-生物素抗体PBW3)

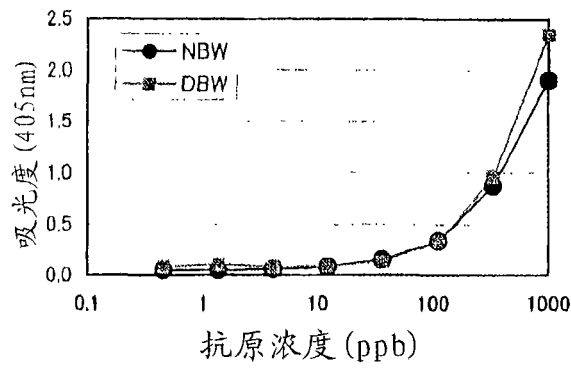


图 15

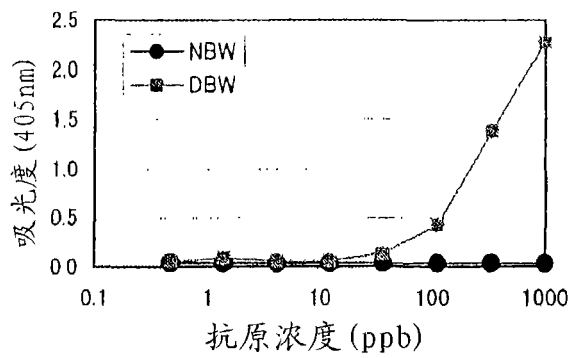


图 16

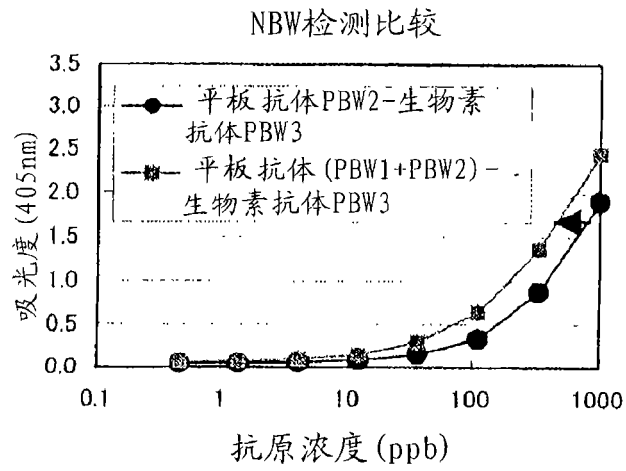


图 17

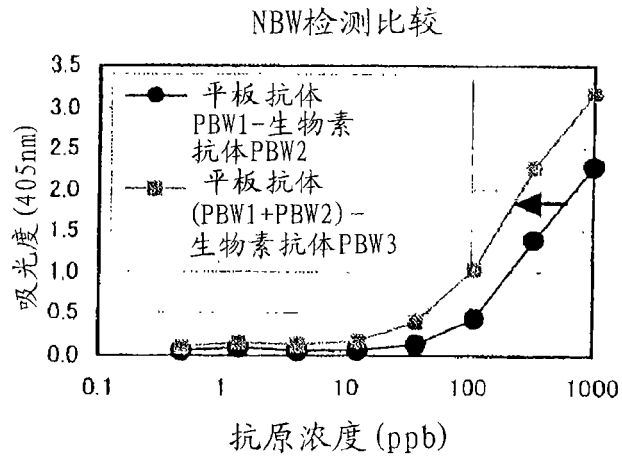


图 18

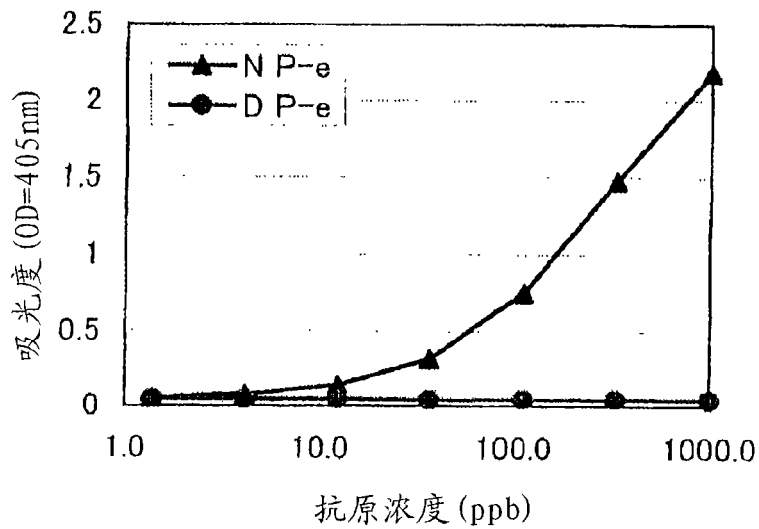


图 19

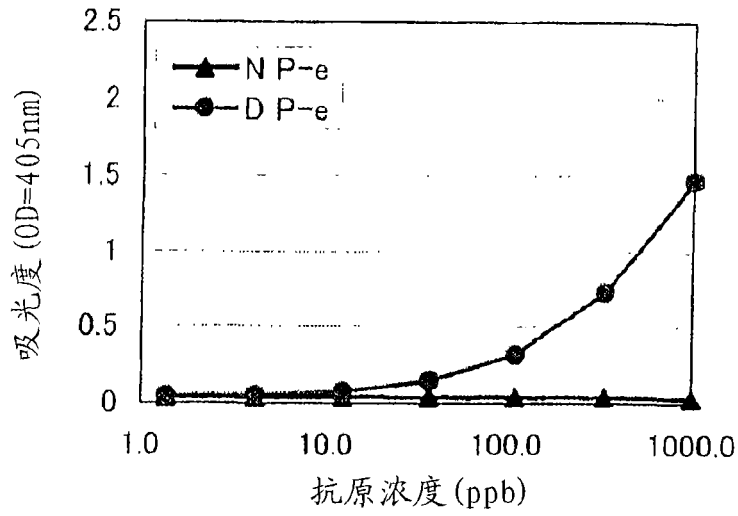


图 20

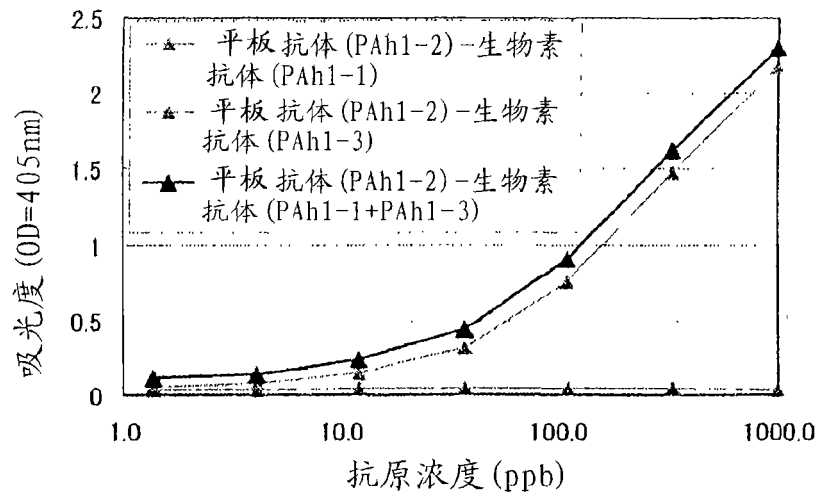


图 21

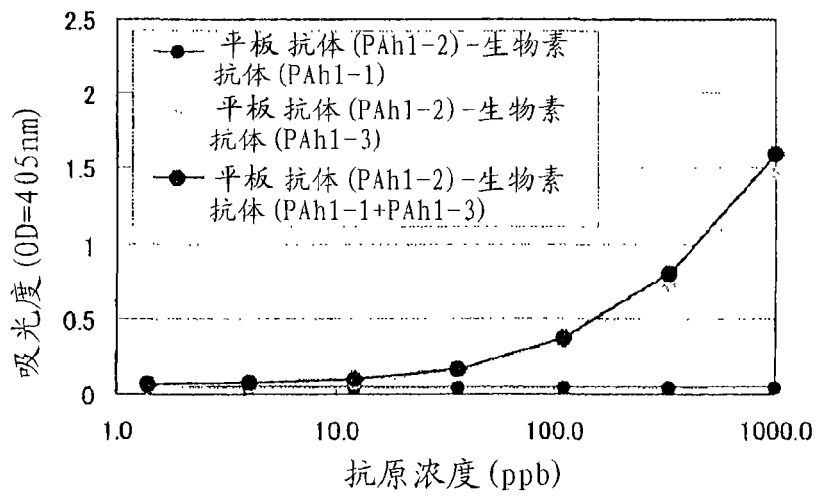


图 22

专利名称(译)	变应原的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1930474A</a>	公开(公告)日	2007-03-14
申请号	CN200580006993.2	申请日	2005-03-04
[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	秋元政信 加藤重城 浪冈真		
发明人	秋元政信 加藤重城 浪冈真		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/16 C07K16/18 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5308 Y10S530/85 Y10S530/868 C07K16/18 G01N33/68 G01N2333/4731 C07K16/16		
代理人(译)	郭文洁 吴娟		
优先权	2004285542 2004-09-29 JP 2004285543 2004-09-29 JP 2004063071 2004-03-05 JP		
其他公开文献	CN1930474B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供在含有乳变应原、卵清蛋白、小麦、荞麦、花生的变应原的食品中，这些变应原即使是变性/未变性的任何状态，也可以进行检测的高灵敏度免疫学检测方法以及使用该方法的检测试剂盒。该方法是使用识别未变性和变性的乳变应原、未变性和变性的卵清蛋白变应原、未变性和变性的小麦变应原、未变性和变性的荞麦变应原、或未变性和变性的花生变应原的各2种或多种单克隆抗体的变应原检测方法，以 $\alpha$ s1酪蛋白的主要蛋白质 $\alpha$ s1酪蛋白、乳清的主要蛋白质 $\beta$ 乳球蛋白、卵清蛋白的主要蛋白质卵白蛋白和卵类粘蛋白、小麦的主要蛋白质麦醇溶蛋白、荞麦的主要蛋白质——分子量24kDa和76kDa的蛋白质，或者花生的主要蛋白质Ara h1为指标。

NBW检测比较

