



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102993299 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201210311198.6

(22)申请日 2002.09.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102993299 A

(43)申请公布日 2013.03.27

(30)优先权数据
269592/2001 2001.09.05 JP

(62)分案原申请数据
02822093.5 2002.09.05

(73)专利权人 日本肉类批发商株式会社
地址 日本大阪府大阪市

(72)发明人 森松文毅 高畑能久 松本贵之
宫泽伊都美 清水宗茂

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 高旭轶 孟慧岚

(51)Int.Cl.
G07K 16/06(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件
WO 9711368 A, 1997.03.27,
JP 10191935 A, 1998.07.28,
卢大用,等.食品中的蛋白过敏原及其检测.
《食物研究与开发》.2000,第21卷(第2期),49-50.

审查员 吴永庆

权利要求书1页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

食物致敏原,检测食物过敏原的方法和检测诱导食物过敏原的食物的方法

(57)摘要

本发明涉及食物致敏原,检测食物过敏原的方法和检测诱导食物过敏原的食物的方法。本发明提供一种检测食物过敏原的方法、抗体和用于制备该抗体的抗原。本发明的抗原是包含食物过敏性病人的IgE能够识别的多种未变性和/或变性的食物过敏原的混合物。本发明的抗体通过利用上述的抗原接种动物制备。本发明中检测食物过敏原的方法涉及到上述抗体。该方法能够对食物过敏原和诱导食物过敏反应的食物进行检测,因此有助于确保食物过敏性病人的安全性。

1. 分离的多克隆兔血清的抗体混合物,其由特异性识别汇集的血清能够识别的下述天然的和加热变性的食物过敏原组分的兔抗体组成,所述抗体混合物识别汇集的血清能够识别的下述天然的和加热变性的食物过敏原组分,但不识别汇集的血清也不特异性识别的过敏原组分,其中,所述汇集的血清是将RAST即放射变应原吸附试验评分为2或更高,即特异性IgE抗体 >0.7 UA/ml的病人体内获得的血清等量相混合而制备的,所述病人是因为摄入包含下述过敏原组分的食物而引起过敏的过敏性病人,所述过敏原组分如下:

- (1) 蛋中的卵清蛋白、类卵粘蛋白、溶菌酶和卵转铁蛋白;
- (2) 奶中的酪蛋白、 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白;
- (3) 小麦中的gliadin和 α -淀粉酶抑制剂;
- (4) 荞麦的132-kDa、84-kDa、27-kDa和11-kDa物质;或
- (5) 花生的107-kDa、72-kDa、35-kDa和28-kDa物质,

所述食物过敏原组分是按照下述方法制备的:

- (i) 对食物成分进行SDS-PAGE,并转移到膜上,
- (ii) 利用膜、汇集的病人血清、抗人IgE的偶联抗体和显色试剂进行Western印迹分析,
- (iii) 利用膜、将食物成分免疫兔制备的兔血清、偶联的抗兔IgG的抗体和显色试剂进行Western印迹分析,然后
- (iv) 比较(ii)和(iii)二者的Western印迹分析图谱,测定(ii)中不存在而(iii)中存在的条带的分子大小,即测定食物过敏性病人的IgE不能够识别的多种物质的分子大小,并
- (v) 根据上述结果,通过凝胶过滤层析从食物成分中分离食物过敏性病人的IgE抗体和兔抗体都能够识别的多种食物过敏原组分。

2. 利用权利要求1的抗体混合物检测食物过敏原的方法。

3. 权利要求2的方法,其中所述被检测的食物过敏原是蛋中的卵清蛋白、类卵粘蛋白、溶菌酶和卵转铁蛋白。

4. 权利要求2的方法,其中所述被检测的食物过敏原是奶中的酪蛋白、 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白。

5. 权利要求2的方法,其中所述被检测的食物过敏原是小麦中的gliadin和 α -淀粉酶抑制剂。

6. 权利要求2的方法,其中所述被检测的食物过敏原是荞麦的132-kDa、84-kDa、27-kDa和11-kDa物质。

7. 权利要求2的方法,其中所述被检测的食物过敏原是花生的107-kDa、72-kDa、35-kDa和28-kDa物质。

8. 利用权利要求1的抗体混合物检测诱导食物过敏反应的食物物的方法。

9. 权利要求8的方法,其中所述诱导食物过敏反应的食物是蛋、奶、小麦、荞麦或花生或包含其中一项或多项的食物。

食物致敏原,检测食物过敏原的方法和检测诱导食物过敏原的食物的方法

[0001] 本发明申请是PCT专利申请PCT/JP02/09066,申请日为2002年9月5日发明名称为“食物致敏原,检测食物过敏原的方法和检测诱导食物过敏原的食物的方法”的发明专利申请的分案申请,母案进入中国的申请号为02822093.5。

[0002] 发明背景

[0003] 本发明涉及一种包含食物过敏性病人体内IgE抗体能够识别的多种天然和/或变性过敏原的混合物、通过使用该混合物免疫动物制备的抗体、利用所述抗体检测食物过敏原和诱导过敏反应的食物方法。本发明给对食物过敏的病人提供了安全性,这是因为本发明有助于理解食物过敏反应的发生机制,开发和检验低过敏原性的食物,检测食物、食物原料和诸如食物制作机器及过程之类的食物制作环境中的过敏原。

[0004] 食物过敏反应是易感个体摄取的食物中诱导过敏反应的物质(以下称为食物过敏原)所导致的有害免疫反应。食物过敏反应能够导致皮炎、哮喘、消化道障碍、过敏反应性休克等。根据疾病发生的机制将过敏反应分为I型至IV型。食物过敏反应主要是I型过敏反应,其中IgE抗体和摄入体内的食物过敏原发生反应。近年来,食物过敏病人的数目一直在上升。这种现象导致了医学和食品工业领域中的严重问题。

[0005] 为了预防这种危害,有必要通过标签给消费者提供有关信息。FAO/WHO联合食品标准委员会(食品法规联合委员会(Codex Alimentarius Commission))已经认识到食品标签上注明包含已知为食物过敏原的八种原料中任何一种的必要性,并建议各成员国实施该标签系统(1999年6月)。考虑到食物过敏原的严重性和经常性,日本已颁布了24条标签法规(2002年4月生效)。应该注意的是这些规定不是要求注明过敏原性物质或食物过敏原本身,而是要求注明包含过敏原性物质和食物过敏原的食物,即诱导过敏反应的食物。

[0006] 诱导过敏反应的食物包括蛋、奶、肉、鱼、甲壳动物和软体动物、谷类、豆类和坚果、水果、蔬菜、啤酒酵母或明胶。类似地,卵清蛋白、类卵粘蛋白、溶菌酶、酪蛋白、 β -乳球蛋白、 α -乳清蛋白、面筋、 α -淀粉酶抑制剂等都是诱导过敏反应的食物。

[0007] 另外,(1)不考虑现有的知识,必然还有许多其他食物和成分(食物过敏原)能够导致食物过敏反应;(2)诱导过敏反应的食物和成分(食物过敏原)是多样的,对这些过敏原的反应根据不同的食物过敏性病人而异;和(3)如后面的实施例中所述,在诱导过敏反应的单一食物中存在有多种已知和未知的过敏原。然而,使用传统的方法不易于检测如此众多的诱导过敏反应的食物或食物过敏原。

[0008] 食物通过加热、冷冻、干燥、盐化、发酵、酶处理等方法(以下称为食物加工方法)制作,以改善和稳定它们的可消化性、保存期限、口感、物理特性等。虽然食物加工方法影响蛋白质,改变它们的分子结构(如使蛋白质变性),但是很少论及这些食物加工方法是否能够导致食物过敏原的形成。

[0009] 本发明阐明了以下一些事实:(1)一些加热过的食物成分表现出变应原性;(2)取决于该食物加热与否,诱导过敏反应的单一食物中诱导过敏反应的组分或表位可能发生改变。即,制备了a)未加热过的蛋类抗原,b)通过对a)中的抗原加热制作的加热过的蛋类抗

原,c)通过将从多个食物过敏性病人汇集(pooled)的血清(称为汇集的病人血清)和a)(去除了(depleted)未加热过的蛋类抗原的血清)相混合制备的血清,和d)通过将汇集的病人血清和b)(去除了加热过的蛋类抗原的血清)相混合制备的血清。a)和c)或a)和d)之间,和b)和c)或b)和d)之间反应的结果表明,去除了未加热过的蛋类抗原的血清不能和未加热过的蛋类抗原发生免疫反应,但能够和加热过的蛋类抗原发生反应;类似地,去除了加热过的蛋类抗原的血清不能和加热过的蛋类抗原发生免疫反应,但能够和未加热过的蛋类抗原发生反应。总之,食物过敏性病人携带有对加工和未加工食物都特异的IgE抗体,导致食物过敏反应。但是目前为止,还没有简单的方法能够检测加工后食物中的过敏原或其成分。

[0010] 筛选鸡蛋、花生、酪蛋白、 β -乳球蛋白、面筋中食物过敏原的方法能够由商业途径获得(食品与开发,Vol.35,p10-11)。但是,所有这些方法或其中的一些具有以下一种或多种缺陷:(1)这些方法不能总是检测到食物过敏性病人对之敏感的抗原。也就是说,它们不能够总是检测到病人IgE抗体所能识别的物质;(2)这些方法能够检测已知抗原,且每种方法仅能检测到一种过敏原(单一的抗原);(3)这些利用检测单一抗原的抗体的方法不适用于含抑制性物质的食物;(4)如下面的实施例中所示,这些利用检测单一抗原的抗体的方法不能对诱导过敏反应的食物进行精确的定量;(5)这些利用检测单一抗原的抗体的方法不适用于检查不含抗原的诱导过敏反应的食物(如利用通过和卵白中的卵清蛋白相接触制备的单一抗体的方法不适用于检查蛋黄、蛋黄酱等。而已知食物过敏反应由蛋黄所致);(6)这些利用检测单一抗原的抗体的方法不适用于检查加工过的食物,这是因为它们不能够检测变性或分子修饰过的过敏原;和(7)抗天然和变性 β -乳球蛋白、卵清蛋白和 α -酪蛋白的单克隆抗体已有报道(Allergy,Vol.50,p309)。但如果食物加工方法去除或改变了其表位,则这些方法的用途就会减小,这是因为单克隆抗体仅能检测食物过敏原分子中的单一表位。

[0011] 虽然利用从对大米(日本专利公开2000-65820)、蛋和奶(日本肉类科学,vol.39,p166-169)过敏的病人体内获得的血清筛选食物过敏原的方法已有报道,并在医院里得以应用,但是不适用于检查团体,也不适用于食品加工厂,这是因为这些方法需要从病人体内获得大量血清。虽然依赖于过敏反应的食物抗原检测法已有报道(FFI J.,No.180,p77-82),但是复杂的方法学和实验室动物饲养使得该方法在多数食品加工厂里不适用。虽然已经建立了利用流式系统和酶标抗体和利用微电极的过敏原感受器的方法(日本食品工业,Vol.42,p53-56),在这些方法投入实际应用之前有许多问题尚待解决。

发明内容

[0012] 本发明的完成是为了解决上述传统方法中的问题。本发明的目的是提供(1)包含食物敏感性病人的IgE抗体能够识别的多种已知和/或未知以及天然和/或变性食物过敏原的混合物(为方便起见,称为本发明的第一项发明),(2)通过用混合物免疫动物而制备的抗体(称为本发明的第二项发明),和(3)利用所述抗体检测食物过敏原和诱导过敏反应的食物(称为本发明的第三项发明)。

[0013] 附图简述

[0014] 图1所示为标准抗原和病人IgE抗体之间的反应,以及标准抗原和本发明中的抗标准抗原抗体的抗体之间的反应。

[0015] 图2所示为携带有对天然和变性蛋类蛋白特异的IgE抗体的病人血清。

[0016] 实施本发明的最佳方式

[0017] 本发明的第一项发明可以这样完成：

[0018] (1-i) 从食物过敏性病人汇集的血清中分离IgE抗体，和

[0019] (1-ii) 利用亲和层析和免疫沉淀之类的免疫学方法，从经过或不经食物制作方法处理的食物或其成分(下面总称为食物)中分离上述IgE抗体能够识别的多种物质(换句话说，食物过敏性病人的IgE抗体能够识别的多种食物过敏原)。

[0020] 本发明的第一项发明也可以这样完成：

[0021] (2-i) 按常规方法对食物成分进行SDS-PAGE，并转移到膜上，

[0022] (2-ii) 利用膜、汇集的病人血清、抗人IgE的偶联抗体和显色试剂进行Western印迹分析(换句话说，制作食物过敏性病人的IgE抗体能够识别的多种食物过敏原的图谱)，

[0023] (2-iii) 类似地，利用膜、按常规方法将食物成分免疫动物制备的动物血清、偶联的抗动物IgG的抗体和显色试剂进行Western印迹分析，然后

[0024] (2-iv) 比较二者的Western印迹分析图谱，测定前者中不存在而后者中存在的条带(换句话说，就是食物过敏性病人的IgE不能够识别的多种物质)的分子大小，并

[0025] (2-v) 根据上述结果，通过凝胶过滤层析之类的传统方法从食物成分中分离食物过敏性病人的IgE抗体能够识别的多种食物过敏原。

[0026] 本发明的第二项发明是抗食物过敏原的动物抗体(被称为识别多种抗原的抗体)，该抗体通过将多种食物过敏原(包括加工和/或未加工的食物过敏原)免疫动物而制备，其中的食物过敏原通过上述的第一项发明制备，且能够被食物过敏性病人的IgE抗体所识别。

[0027] 本发明的第三项发明是检测食物过敏原和诱导过敏反应的食物的方法，该方法的特征在于利用识别多种抗原的抗体。

[0028] 上述的食品制作方法中热处理的温度范围和食品加工方法的温度范围相同，优选在40和250摄氏度之间，更优选在60和120摄氏度之间。通过将原料抗原和在两个至六个不同的温度下加热过的抗原相混合，制备抗原。食物过敏性病人的IgE抗体能够识别的食物过敏原组分根据本发明的第一项发明从混合物制备，并用其接种动物。

[0029] 如果检测的目标仅限于加热过的食物，则食物过敏性病人的IgE抗体能够识别的食物过敏原组分用本发明的第一项发明从加热过的食物制备，并用其接种动物。

[0030] 举例来说，接种的动物可以是兔、山羊、绵羊、大鼠、小鼠、豚鼠、马、猪、鸡等。在免疫期间，需要部分采血，测定抗食物过敏原抗体的滴度。本发明的抗体可以是单克隆抗体，也可以是多克隆抗体。如下面所述的实施例所示，即使在一种食物过敏反应诱导性食物中也存在食物过敏性病人的IgE抗体能够识别的多种已知和未知食物过敏原。通过使用多种食物过敏原免疫动物，易于制备识别多种食物过敏原的多价抗体，即识别多种抗原的抗体。

[0031] 作为针对食物过敏性病人IgE抗体能够识别的食物过敏原的动物抗体，动物的抗血清可以直接使用。对于含食物过敏性病人IgE抗体不能识别的组分，进行吸收处理及传统的IgG纯化后使用抗血清。

[0032] 本发明中检测食物过敏原和诱导食物过敏反应的食物的方法无限制地适用于包含过敏原的食物。举例来说，诱导过敏反应的食物的例子是蛋、奶、肉、鱼、甲壳动物和软体动物、谷类、豆类和坚果、水果、蔬菜、啤酒酵母和明胶。更具体地说，蛋的蛋白和蛋黄、奶及其奶酪、肉类的猪肉、牛肉、鸡肉和羊肉，鱼类的鲑鱼、日本花鲑、沙丁鱼、金枪鱼、鲑鱼、鳕

鱼、平鱼和鲑鱼鱼子酱,甲壳动物和软体动物类的蟹、小虾、贻贝、鱿鱼、章鱼、龙虾和鲍鱼,谷类的小麦、米、荞麦、黑麦、大麦、燕麦、玉米、黍、谷子和稗,豆类和坚果类的大豆、花生、可可豆、豌豆、腰果、榛子、巴西坚果、杏仁、椰子果和核桃,水果类的苹果、香蕉、橘、桃、猕猴桃、草莓、瓜、鳄梨、葡萄、芒果、梨、芝麻和芥菜,蔬菜类的西红柿、萝卜、土豆、菠菜、洋葱、大蒜、竹笋、南瓜、地瓜、芹菜、欧芹、山药、松蘑,含有它们的食物及其成分(如卵清蛋白、类卵粘蛋白、溶菌酶、酪蛋白、 β -乳球蛋白、 α -乳清蛋白、面筋、 α -淀粉酶抑制剂)。这些食物可以通过加热、冷冻、干燥、盐化、发酵、酶加工等进行处理。

[0033] 一般说来,食物过敏性病人的IgE抗体的识别可能性为50%或更大的过敏原被称作主要过敏原,否则称作次要过敏原。有些病人对主要过敏原不敏感,而对次要过敏原敏感。因此,筛选食物过敏原的方法应该既检测主要过敏原,又检测次要过敏原。本发明的筛选方法能够检测食物过敏性病人能够识别的天然和变性的多种过敏原。

[0034] 为了制备符合这种要求的抗体,本发明作了研究并有以下发现。

[0035] 即,按常规方法对食物成分进行SDS-PAGE分析,并将凝胶转移到膜上:

[0036] (i) 利用膜、汇集的病人血清、抗人IgE的偶联抗体和显色试剂进行Western印迹分析;

[0037] (ii) 类似地,利用膜、通过常规地将食物成分免疫动物制备的动物血清、偶联的抗动物IgG的抗体和显色试剂进行Western印迹分析;

[0038] (iii) 比较二者的Western印迹分析图谱,有以下发现:(1) 存在有在两块膜上都得以染色的条带,(2) 存在有在前者未得以染色,而在后者得以染色的条带(换句话说,就是食物过敏性病人的IgE能够识别的多种非过敏原性物质),和(3) 和前者染色条带相比,仅后者染色条带分布在更大和/或更小分子量位置上;

[0039] (iv) 根据上述结果,通过凝胶过滤层析方法从食物成分中分离食物过敏性病人的IgE抗体能够识别的多种食物过敏性组分,并用之接种动物,制备抗多种食物过敏原的抗体。可以对兔、山羊、绵羊、大鼠、小鼠、豚鼠、马、猪和鸡等恒温动物进行接种。可以采用本技术领域的熟练人员所掌握的任何一种接种方法。

[0040] 如上所述制备的抗体可在本发明的食物过敏原检测方法中使用。抗体可以固定在微量滴定板、PVDF膜、硝酸纤维素膜、层析条、试管、小珠、尼龙膜等上面,应用在酶免分析、免疫印迹分析、点印迹分析、免疫层析和抗体芯片等免疫学方法中。

[0041] 如上所述,本发明的食物过敏原检测方法旨在检测食物和食品制作机器和加工过程之类的环境中的多种食物过敏原。优选使用从食物获得的液体提取物进行分析。虽然提取介质通常是水、磷酸缓冲液、Tris-HCl缓冲液、酒精等,但并不局限于这些,只要过敏原能够得以提取即可。为了提高过敏原从食物中的提取效率,可以根据需要加入蛋白质变性剂(如SDS或脲)、含有SH的抗氧化剂(如2-巯基乙醇)等。可以通过擦拭(用拭子等拭抹)环境获取的液体和用洗瓶捕获的气体进行测定,确定在机器或加工过程等食品制作环境中存在的多种过敏原。

[0042] 只要本发明中食物过敏原检测方法的原理是酶免分析、免疫印迹分析和荧光多免疫珠法等免疫学方法即可,并不局限于一种特定的方法。举例来说,三明治ELISA、竞争法、直接法等都是酶免分析方法。如果对抗体加以标记,可以使用酶(如过氧化物酶、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶)、荧光物质(如异硫氰酸荧光素)、生物发光物质(如荧光素-荧光素酶)、

化学发光物质(如发光氨,吡啶衍生物和金刚烷衍生物)、生物素、抗生物素蛋白、胶体金、放射活性物质(如³²P)等。

[0043] 下面列举本发明检测方法的实例,说明三明治ELISA、竞争法和直接法程序的要点。

[0044] 为了实施三明治ELISA,制备本发明中识别多种过敏原的标记抗体(识别多种抗原的抗体)。通过吸附或化学结合将识别本发明中多种抗体的非标记抗体固定在ELISA板上。然后,使用不干扰反应体系的蛋白质如明胶和兔血清白蛋白封闭板上未固定有抗体的区域。将从食物、食物成分或食物制作环境中获得的提取物(此后称为样品)或标准抗原加到板上,进行第一次抗原-抗体反应。反应结束后,洗板。为了进行第二次抗原-抗体反应,往板上加入上述的标记抗体,固定在板上的抗体能够捕捉过敏原。洗板,去除过量的标记抗体,加入检测试剂(如过氧化物酶的情况下加入1,2-苯二胺和H₂O₂,碱性磷酸酶的情况下加入对-硝基苯磷酸盐)。通过检测标记物和检测试剂之间反应物的量对过敏原进行检测或定量。

[0045] 改变往ELISA板上加入的标准抗原或诱导食物过敏反应的食物(如蛋和奶)的量来绘制标准曲线。利用标准曲线对食物过敏原或诱导食物过敏反应的食物进行定量。如果定量的值是1ppm或更多,则样品可能是诱导过敏反应的食物。

[0046] 由于利用检测单一抗原的抗体的方法必须将通过检测单一抗原的抗体得到的值转化为诱导过敏反应的食物含量,这样会产生定量误差。

[0047] 单一抗原以类卵粘蛋白和卵清蛋白为例,整个蛋中类卵粘蛋白和卵清蛋白的浓度分别约为4%和2%。然而,蛋黄既不含类卵粘蛋白,也不含卵清蛋白。相应地,(1)仅检测类卵粘蛋白或卵清蛋白的方法不适用于检测蛋黄蛋白质;(2)如果通过整蛋绘制的标准曲线用于检测蛋白,则进行两次或更多次定量,而非一次;和(3)如果实际值超出了定量范围,则确认为极高的定量值。

[0048] 类似地,由于酪蛋白和β-乳球蛋白在全部奶类蛋白中的含量分别约为80%和10%,因此存在一个问题,就是识别单一抗原的抗体不能对利用酪蛋白钠、乳清蛋白等进行强化加工的奶类进行精确定量,

[0049] 本发明中识别多种抗原的抗体就不存在或较少存在这种问题。

[0050] 对于竞争法,将定量的标准抗原直接固定在用非反应性蛋白封闭的固相上。然后,将识别过敏原的酶联抗体和样品同时加到板上。将板静置一定时间,然后洗板,去除未结合的物质。往板上加入显色底物,随后终止反应。对固定的过敏原和经样品预处理的酶联抗体之间的反应进行检测。

[0051] 对于直接法,使样品直接吸附在用非反应性蛋白封闭的固相上,使样品和识别过敏原的酶联抗体反应。随后,应用上述的同样步骤检测样品中的过敏原。

[0052] 对于上述的三明治ELISA、竞争法和直接法中的任何一种方法,都可以使用荧光、生物发光和化学发光底物进行显色。根据该测定的目的、样品性质、原理等,本技术领域熟练的技术人员可以对本发明方法的其他条件作相应变动。

[0053] 本发明中检测食物过敏原的方法能够灵敏地检测食物和食物原料的提取物中0.1或1.0ng/ml或更多的过敏原。

[0054] 工业适用性

[0055] 包含食物过敏性病人IgE抗体能够识别的多种天然和/或变性过敏原和本发明抗体的混合物有助于理解食物过敏反应发生的机制,开发降低食物过敏原变应原性的技术。本发明中检测食物过敏原的方法有助于验证低过敏反应性技术的实用性,检测食物中的食物过敏原、诱导食物过敏反应的食物和诸如食物制作机器和方法之类的食物制作环境。相应地,本发明有助于为保障食物过敏性病人的安全性,解决最近食物过敏性病人的增加引发的医疗和工业问题。

实施例

[0056] 下面的实施例更具体地解释了本发明,但对本发明的范围不作限制。本说明书中的缩略词是本技术领域常用的。

[0057] 实施例1(制备各种食物的标准抗原)

[0058] (1) 鸡蛋、鹌鹑蛋和鸭蛋

[0059] 1kg鸡蛋去壳,匀浆,冻干,研细,制备标准鸡蛋抗原。10-g抗原悬于10倍体积的pH7.0磷酸盐缓冲液(以下缩写为PBS)后,分在5个试管中,不加热或分别在60、80、100、120摄氏度加热30分钟。然后,混合在一起,混匀制备样品。以类似方法制备鹌鹑蛋和鸭蛋的样品。

[0060] (2) 牛奶

[0061] 1L奶在低温下搅拌,使之固化,沉积奶类脂肪,并通过能吸收的棉花将之过滤。该程序重复3次,将滤液冻干,研细,制备标准牛奶抗原。类似地,如(1)中所述制备样品。

[0062] (3) 小麦和大米

[0063] 室温下,1kg小麦粉用5倍量的加有4M尿素的0.1M Tris-HCl缓冲液(pH8.6)提取2小时,并同时加以搅拌,然后离心。对上清液进行透析,冻干,然后研细,制备标准小麦抗原。类似地,如(1)中所述制备样品。类似地,从大米粉中制备样品。

[0064] (4) 荞麦

[0065] 室温下,1kg荞麦粉用5倍量的加有1%NaCl的0.1M Tris-HCl缓冲液(pH8.4)提取2小时,并同时加以搅拌,然后离心。对上清液进行透析,冻干,然后研细,制备标准荞麦抗原。类似地,如(1)中所述制备样品。

[0066] (5) 花生

[0067] 1kg花生研细,用5倍量的正己烷脱脂2小时,并同时加以搅拌。将该程序重复3次后,去除正己烷,室温下将制备物用5倍量的加有1%NaCl的0.1M Tris-HCl缓冲液(pH8.4)提取2小时,并同时加以搅拌,然后离心。对上清液进行透析,冻干,然后研细,制备标准花生抗原。类似地,如(1)中所述制备样品。

[0068] (6) 大豆

[0069] 如(5)中所述制备大豆标准抗原。类似地,如(1)中所述制备样品。

[0070] 实施例2(各种纯化的食物过敏原)

[0071] (1) 纯化的鸡蛋过敏原

[0072] 将鸡蛋中的主要过敏原之一——卵清蛋白悬于10倍体积的pH7.0磷酸盐缓冲液(以下缩写为PBS)后,分在5个试管中,不加热或分别在60、80、100、120摄氏度加热30分钟。然后,混合在一起,混匀制备样品。以类似方法制备类卵粘蛋白样品。已知卵清蛋白和类卵

粘蛋白是位于蛋清中的蛋白质。

[0073] (2) 纯化的牛奶过敏原

[0074] 如实施例2(1)所述类似方法制备酪蛋白、 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白样品。已知 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白是位于奶类乳清蛋白中的蛋白质。

[0075] 实施例3(抗体的制备)

[0076] (1) 抗各种标准食物抗原的兔抗体的制备

[0077] 实施例1中制备的各种样品用弗氏完全佐剂(用于第一次接种)和非完全佐剂(用于第二次及其后的接种)进行乳化,接种日本白兔 4至6次。在接种期间,部分采血,确定针对抗原的抗体的产生,然后采集全部血液。这样,抗体即得以制备。

[0078] (2) 抗各种纯化食物抗原的抗体的制备

[0079] 类似地,如上所述制备抗各种纯化食物抗原的抗体。

[0080] 实施例4(用免疫印迹法检测各种食物过敏原)

[0081] (1) 汇集的病人血清和兔抗体

[0082] 将20例RAST(放射变应原吸附试验)评分为2或以上(特异性IgE抗体 $>0.7\text{UA}/\text{ml}$)的病人体内获得的、抗蛋、奶或小麦的血清等量相混合,制备汇集的血清。抗蛋、奶和小麦的兔抗体是实施例3(1)中制备的。

[0083] (2) 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[0084] 上述的标准蛋抗原、奶抗原和小麦抗原和2-巯基乙醇一起加热3分钟,在浓度为10%的微型平板胶上进行电泳。凝胶电转移至PVDF(聚偏二氟乙烯)膜上。使用胶体金染色试剂盒(BioRad)检测部分膜上的蛋白质。

[0085] (3) 免疫染色

[0086] 用1%人血清白蛋白(HSA)对上述的PVDF膜进行封闭。然后,将膜用包含0.05%吐温20的PBS(PBST)洗,和汇集的病人血清(100倍稀释液)或兔抗体(1000倍稀释液)于室温下反应2小时。洗膜,和二级抗体,即碱性磷酸酶偶联的抗人IgE- ϵ 链山羊抗体(2500倍稀释)或碱性磷酸酶偶联的抗兔IgG抗体(4000倍稀释液)于室温下反应1小时。用PBST洗膜,和化学发光底物4-甲基-4(3-磷酸苯基)螺[1,2-二氧环烷-3,2-金刚烷]钠盐于室温下反应30分钟,使之在感光片上曝光,检测碱性磷酸酶的去磷酸化反应产生的光子。结果如图1所示。

[0087] 如图1所示,汇集的病人血清产生了多条带(图1的泳道1、4和7)和存在于各食物中病人IgE能够识别的多种过敏原。

[0088] 然而,兔抗体检测到了病人IgE能够识别的食物过敏原(图1的泳道2、5和8)。

[0089] 两种血清都能够识别的物质如下:蛋中的卵清蛋白、类卵粘蛋白、溶菌酶和卵转铁蛋白;奶中的酪蛋白、 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白;小麦中的glyadine和 α -淀粉酶抑制剂;荞麦的132-kDa、84-kDa、27-kDa和11-kDa物质;花生的107-kDa、72-kDa、35-kDa和28-kDa物质。

[0090] 另外,兔抗体不能检测病人IgE不能识别的非食物性过敏原。

[0091] (4) 过敏原的浓缩和分离

[0092] 不能识别过敏原之外物质的抗体如以下方法制备:

[0093] 将用汇集的病人血清染色的条带分子量分布和用动物抗体染色的条带分子量分布相比较,发现与前者相比后者中有些条带分布在更高或更低分子量位置(图1)。通过凝胶

过滤层析,从标准抗原中收集和食物过敏性病人IgE能够识别的食物过敏原分子量相当的组分(以下称为过敏原组分)。样品如实施例1所述制备,并将之免疫动物,制备抗过敏原组分的抗体。利用抗体如上所述进行Western印迹分析,结果发现抗体通常识别收集的病人血清能够识别的食物抗原(图1的泳道3、6和9)。

[0094] 通过免疫沉淀、利用病人IgE抗体的亲和层析和离子交换层析,完成这些过敏原的浓缩和分离。

[0095] 实施例5(点印迹法检测主要过敏原和其加热过的制备物)

[0096] 在PBS中浸泡的PVDF膜置于点印迹装置后,使纯化的主要过敏原(卵清蛋白、类卵粘蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶、酪蛋白、 β -乳球蛋白、 α -乳清蛋白、 α -淀粉酶抑制剂和glyadine)和其加热过的制备物吸附在膜上,用添加有3%RSA的TBS封闭,并用TBST洗膜。抗蛋-过敏原组分、奶过敏原组分和小麦过敏原组分的抗体(稀释2000倍)加到膜上,室温下反应1小时。然后,将生物素偶联的抗兔IgG绵羊抗体和HRP偶联的抗生物素蛋白(4000倍)加到膜上,洗膜,将膜和化学发光试剂反应,并通过感光片检测产生的光子。

[0097] 上述的抗体检测到了卵清蛋白、类卵粘蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶、酪蛋白、 β -乳球蛋白、 α -乳清蛋白、 α -淀粉酶抑制剂和glyadine等主要过敏原。这些抗体还检测到了上述纯化敏原的加热制备物。

[0098] 实施例6(通过三明治ELISA检测蛋、奶和小麦过敏原)

[0099] (1) 抗体

[0100] 下面实验程序使用实施例4(4)中制备的抗蛋、奶和小麦中过敏原组分的抗体,和根据传统方法制备的偶联有生物素的抗体。

[0101] (2) 包被和封闭微孔板上的抗体

[0102] 100 μ l上述抗体(10 μ g/ml)分别加到ELISA板(Nunc)的各孔中,4摄氏度静置过夜,洗板(添加有150mM-NaCl和0.05%吐温20的20mM Tris-HCl缓冲液,pH7.4),25摄氏度下用0.1%RSA(Sigma)封闭1小时。

[0103] (3) 蛋、奶及小麦过敏原的检测

[0104] 去除孔中的封闭溶液,每孔各加95 μ l稀释液(添加有0.1%RSA、150mM NaCl和0.05%吐温20的20mM Tris-HCl缓冲液,pH7.4)和5 μ l各食物的PBS提取物,25摄氏度下静置2小时。类似地,每孔各加实施例1中所述的5 μ l蛋、奶和小麦标准抗原的悬液,25摄氏度下静置2小时。用300 μ l洗液洗5次后,每孔各加100 μ l生物素偶联的抗体(10000倍稀释液),25摄氏度下静置1h。然后每孔各加100 μ l过氧化物酶偶联的抗生物素蛋白(2500倍稀释液),25摄氏度下静置30分钟。洗板后,每孔各加100 μ l 3,3',5,5'-四联苯胺溶液,25摄氏度下避光反应30分钟。通过微孔板读数仪读取各孔的光密度值(检测波长450nm,参照波长630nm)。

[0105] 结果如表1所示。表1表明各种食物提取物中的蛋、奶和小麦过敏原能够得以检测。

[0106] 表1. 检测各种食物中的蛋、奶和小麦过敏原

[0107]

食物	抗蛋过敏原 组分的抗体	抗奶过敏原 组分的抗体	抗小麦过敏原 组分的抗体
煮好的蛋	○	×	×
奶	×	○	×
面包（实验室制作的）	×	×	○
布丁（实验室中使用蛋 和奶制作）	○	○	×
法式吐司（实验室中使 用蛋、奶和小麦制作）	○	○	○

[0108] ○：检测到；×：未检测到（下列的表相同）

[0109] 实施例7（用三明治ELISA方法评价食物过敏原检测试剂盒的基本特性）

[0110] (1) 标准抗原的稀释试验

[0111] 根据实施例6,对实施例1中制备的蛋、奶和小麦标准过敏原进行定量。在作图纸上对这些结果作图,绘制大致通过原点的标准曲线。

[0112] (2) 同批分析之间的再现性评价

[0113] 根据上述方法,制备位于检测范围内的5个不同浓度的蛋标准过敏原样品A和样品E,并同时进行分析。如表2所示,CV值低于5%。因此,确证了同批重复性。

[0114] 表2.用三明治ELISA方法对蛋标准过敏原检测检测进行同批分析之间的重现性评价

[0115]

	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV(%)
A	1.165	1.079	1.068	1.075	1.064	1.090	0.042	3.87
B	0.756	0.711	0.699	0.689	0.693	0.710	0.027	3.84
C	0.544	0.505	0.500	0.497	0.507	0.511	0.019	3.74
D	0.233	0.222	0.236	0.222	0.227	0.228	0.006	2.79
E	0.175	0.165	0.179	0.173	0.170	0.172	0.005	3.06

[0116] (3) 评价日间(day-to-day)分析的再现性

[0117] 根据上述方法,制备位于检测范围内的5个不同浓度的奶标准过敏原样品A和样品E,并连续5天进行分析。如表2所示,CV值低于5%。因此,确证了日间重复性。

[0118] 表3.用三明治ELISA方法对奶标准过敏原检测检测进行日间分析之间的再现性评价

[0119]

	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV(%)
A	2.356	2.387	2.346	2.321	2.241	2.330	0.055	2.37
B	1.353	1.306	1.274	1.246	1.254	1.287	0.044	3.40
C	0.956	0.949	0.928	0.921	0.899	0.931	0.023	2.45
D	0.295	0.292	0.275	0.281	0.278	0.284	0.009	3.10
E	0.195	0.183	0.186	0.184	0.182	0.186	0.005	2.82

[0120] 这些结果表明本方法能够快速、稳定地检测分布在食物和其成分中的多种食物过敏原。经证实,该方法能够检测0.5ng/ml或更多的食物过敏原或包含食物过敏原的食物。

[0121] 实施例8(食物过敏性病人携带有抗天然和加热食物过敏原的IgE抗体)

[0122] 以蛋过敏原为例,证实了食物过敏性病人携带有抗天然和加热食物过敏原的IgE抗体。将整个蛋(未加热过的蛋抗原)溶解于PBS(1.0%,w/v)中。一半体积的溶液于120摄氏度加热30分钟(加热过的蛋抗原)。10倍稀释的各溶液加到ELISA板上,每孔各100 μ l。包被,洗板,用添加有1%HAS的PBS封闭,并再次洗板。由此制备包被有天然蛋抗原的板和包被有加热过的蛋抗原的板。

[0123] 然后,天然蛋抗原或加热过的蛋抗原(1、5、50、100、500和1000ng/ml)加到实施例4(1)(1000倍稀释液)中所述汇集的病人血清中,37摄氏度下反应2小时,加以离心。由此制备两种类型的血清。前者 and 后者分别称为去除天然蛋抗原的血清和去除加热过的蛋抗原的血清。

[0124] 然后,往包被有天然蛋抗原的板和包被有加热过的蛋抗原的板中加入去除天然蛋抗原的血清和去除加热过的蛋抗原的血清,每孔各100 μ l,37摄氏度下静置2小时,用PBST洗板。往板中加入生物素偶联的抗人IgE- ϵ 山羊抗体(2500倍稀释液),每孔各100 μ l,37摄氏度下静置1小时,用PBST洗板。加入碱性磷酸酶偶联的抗生物素蛋白(37摄氏度下静置30分钟)和发光底物,读取发光程度(发光计CT-9000D,Diatron)。结果如图2所示。

[0125] 如图2所示,证实了去除了加热过的蛋抗原的血清(图2中表示为○)能够特异地和天然蛋抗原发生反应(图2中左图),但是该血清不能和加热过的抗原发生反应(图2中右图)。而去除了天然蛋抗原的血清(图2中表示为●)能够特异地和加热过的蛋抗原发生反应(图2中右图),但是该血清不能和天然抗原发生反应(图2中左图)。

[0126] 这些结果证明了食物过敏性病人携带有特异性识别天然和加热蛋的IgE抗体。

[0127] 因此,检测食物过敏原的方法能够检测加热过的和天然的过敏原。

[0128] 实施例9(使用通过接种加热抗体制备的抗体增强ELISA强度)

[0129] 即使对实施例4所述的抗过敏原组分的抗体进行了测定,通过抗体和加热过的样品之间的反应获得的ELISA强度(光强度,OD值)可能比抗体和天然样品之间的反应低。这可能依赖于(1)从加热过的样品中提取的蛋白质浓度比从天然样品中提取的蛋白质浓度低;和(2)即使蛋白质浓度调成一致,加热过的样品和抗体之间的反应性也比天然样品和抗体之间的反应性低。因此,研究制备反应性更强的抗体。

[0130] 实施例4(1)中所述的蛋过敏原组分于120摄氏度高压处理30分钟,冷却,用加有4M

豚的PBS匀浆,离心。上清液加以冷冻干燥,研细制备抗原,并如实施例3(1)所述用它制备兔抗体(此后称为抗高压处理蛋抗原的抗体)。根据实施例6所述方法,抗体和实施例8中包被有天然蛋抗原的板和包被有加热过的蛋抗原的板进行反应。

[0131] 结果如表4所示。表4表明利用通过免疫高压处理的食物过敏原制备的抗体检测到了天然和加热过的蛋抗原,且ELISA强度几乎相同。因此上述的问题得到了解决。

[0132] 表4.利用通过免疫加热过的抗体制备的抗体增强ELISA强度

[0133]

抗体	ELISA 强度	
	包被有天然蛋抗原的板	包被有加热过的蛋抗原的板
抗蛋过敏原组分的抗体	100	36
抗高压处理的蛋抗原的抗体	100	118

[0134] 抗蛋过敏原组分的抗体和标准蛋抗原板之间的反应获得的ELISA强度(OD值)表示为100。

[0135] 实施例10(测定食物过敏原和诱导食物过敏反应的食物-1)

[0136] 验证本发明中识别多种抗原的抗体(实施例3所述抗体)和实施例7所述方法是否能够检测含有食物过敏原的食物。利用实施例7所述绘制的标准曲线,进行定量,计算量化指数(测定值/实际值 \times 100)。从蛋黄、蛋清、蛋黄酱和整蛋酱获得的结果如表5所示。

[0137] 测定利用蛋清中的单一抗原制备的抗体时,表5说明(1)不能够检测到蛋黄,而能够检测到蛋清,和(2)从标准曲线获得的标准蛋抗原的测量值是实际值的2至60倍。

[0138] 测定本发明中识别多种抗原的抗标准蛋抗原的抗体时,表5说明(3)能够检测到蛋黄和蛋清,和(4)标准蛋抗原的测量值和实际值几乎相等。从这些结果,我们发现本发明中识别多种抗原的抗标准蛋抗原的抗体能够检测蛋类中诱导过敏反应的事物或蛋类加工食品中的成分,并加以定量。

[0139] 表5.利用各种抗体对蛋和蛋产品进行检测和/或定量的可能性

[0140]

样品	测定	识别多种抗原的 抗体（抗标准蛋 抗原的抗体）	识别单一抗原的 抗体（抗类卵粘 蛋白的抗体）	识别单一抗原的 抗体（抗卵白蛋 白的抗体）
蛋黄	检测的可 能性 量化指数	○ 74-106	×	×
蛋清	检测的可 能性 量化指数	○ 105-170	○ 240-310	○ 6,330-13,150
蛋黄 酱	检测的可 能性	○	×	×
整蛋 酱	检测的可 能性	○	○	○

[0141] 实施例11 (测定食物过敏原和诱导食物过敏反应的食物-2)

[0142] 如实施例10所述检验乳清、酪蛋白、乳铁蛋白和酪蛋白水解物。结果如表6所示。

[0143] 表6显示(1)本发明中识别多种抗原的抗标准奶抗原的抗体能够检测诱导过敏反应的奶和其成分,并加以定量;但是(2)通过免疫乳清中的物质制备的识别单一抗原的抗体不能对它们加以定量。表6中符号△表示能够加以定量,但是量化指数低于表5。

[0144] 表6.利用各种抗体对标准奶抗原进行检测和/或定量的可能性

[0145]

样品	测定	识别多种抗原的 抗体 (抗标准奶 抗原的抗体)	识别单一抗原的 抗体 (抗酪蛋白 的抗体)	识别单一抗原的 抗体 (抗 β -乳球 蛋白的抗体)
乳清	检测的可 能性	○	×	○
	量化指数	160-230		320-1,080
酪蛋 白	检测的可 能性	○	○	×
	量化指数	38-47	170-180	
乳铁 蛋白	检测的可 能性	○	△	×
酪蛋 白水 解物	检测的可 能性	○	×	△

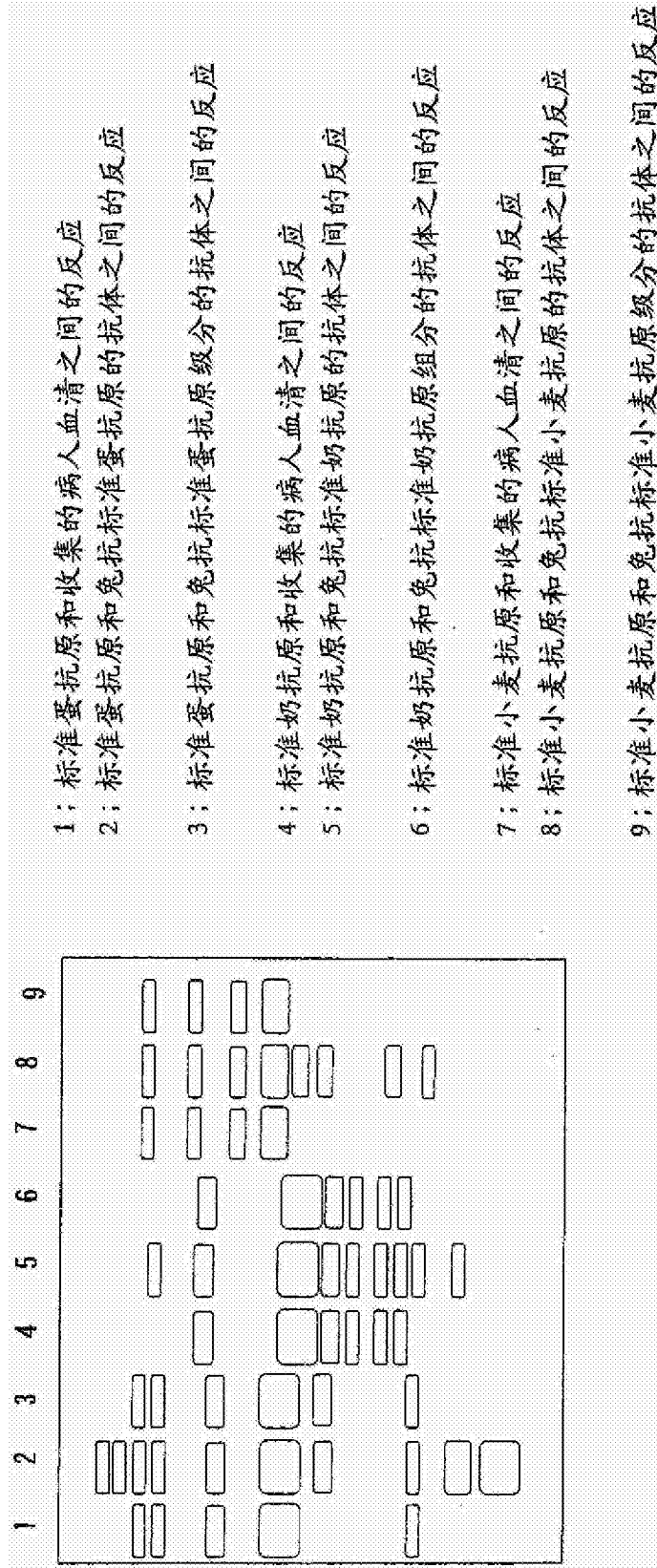


图1

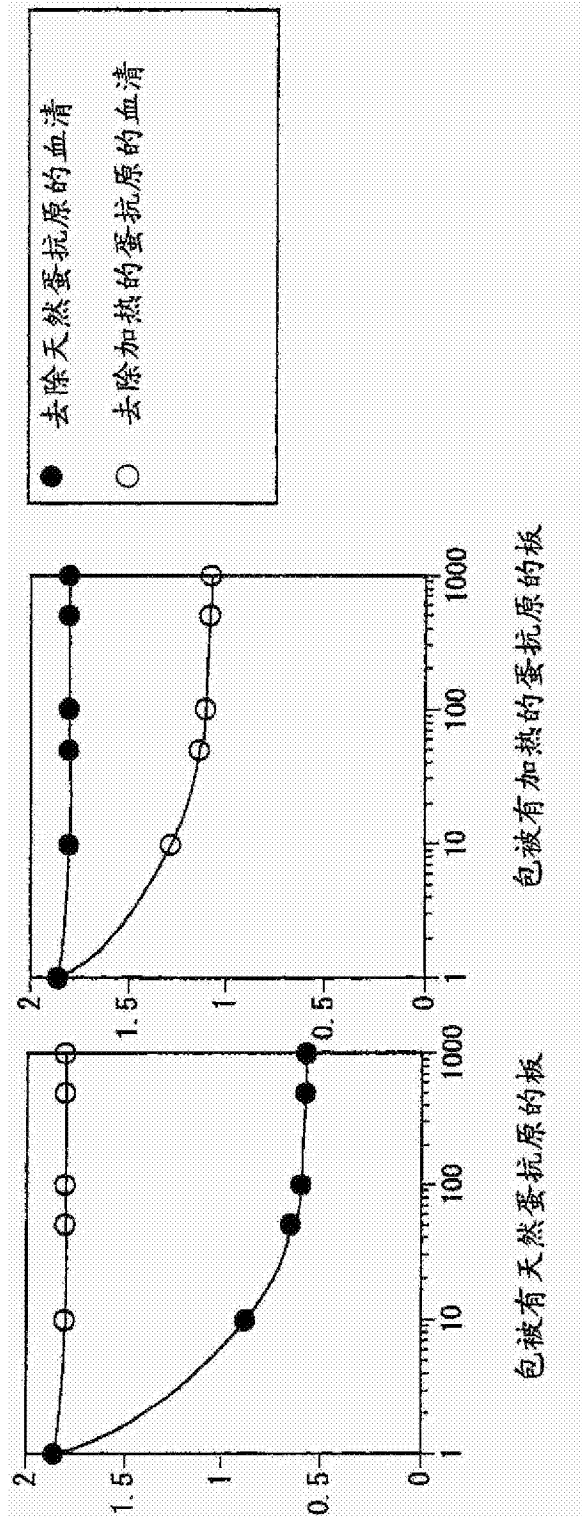


图2

专利名称(译)	食物致敏原，检测食物过敏原的方法和检测诱导食物过敏原的食物的方法		
公开(公告)号	CN102993299B	公开(公告)日	2017-04-12
申请号	CN201210311198.6	申请日	2002-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	日本火腿股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	日本肉类批发商株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日本肉类批发商株式会社		
[标]发明人	森松文毅 高畑能久 松本贵之 宫泽伊都美 清水宗茂		
发明人	森松文毅 高畑能久 松本贵之 宫泽伊都美 清水宗茂		
IPC分类号	C07K16/06 G01N33/53 C07K16/00 G01N33/02 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/68 C07K16/16 C07K16/18 G01N33/02 G01N33/5308		
审查员(译)	吴永庆		
优先权	2001269592 2001-09-05 JP		
其他公开文献	CN102993299A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明涉及食物致敏原，检测食物过敏原的方法和检测诱导食物过敏原的食物的方法。本发明提供一种检测食物过敏原的方法、抗体和用于制备该抗体的抗原。本发明的抗原是包含食物过敏性病人的IgE能够识别的多种未变性和/或变性的食物过敏原的混合物。本发明的抗体通过利用上述的抗原接种动物制备。本发明中检测食物过敏原的方法涉及到上述抗体。该方法能够对食物过敏原和诱导食物过敏反应的食物进行检测，因此有助于确保食物过敏性病人的安全性。

食物	抗蛋过敏原 组分的抗体	抗奶过敏原 组分的抗体	抗小麦过敏原 组分的抗体
煮好的蛋	0	x	x
奶	x	0	x
面包(实验室制作的)	x	x	0
布丁(实验室中使用蛋和奶制作)	0	0	x
法式吐司(实验室中使用蛋、奶和小麦制作)	0	0	0