



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108530513 B

(45) 授权公告日 2021.08.17

(21) 申请号 201810339651.1

(22) 申请日 2018.04.16

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108530513 A

(43) 申请公布日 2018.09.14

(73) 专利权人 河北农业大学

地址 071001 河北省保定市莲池区乐凯南大街2596号

专利权人 石家庄加麦佳生物制品有限公司

(72) 发明人 李慧静 姚亚亚 刘阳星月 王芳 李宁

(74) 专利代理机构 北京中企鸿阳知识产权代理事务所(普通合伙) 11487

代理人 郭鸿雁

(51) Int.Cl.

C07K 1/14 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101256186 A, 2008.09.03

CN 105044334 A, 2015.11.11

Ingrid Sander PhD et

al..Identification of wheat flour

allergens by means of 2-dimensional

immunoblotting.《Journal of Allergy and

Clinical Immunology》.2001,第107卷(第5期), 907-913.

宏宇伟等.花生过敏原及其检测方法研究进展.《食品安全质量检测学报》.2015,第6卷(第1期), 226-233.

路雪蕊等.小麦蛋白过敏原的研究进展.《食品安全质量检测学报》.2015,第6卷(第7期), 2783-2788.

王楠.粉尘螨过敏原提取工艺的选择.《生物技术世界》.2015, 256.

审查员 孙琳

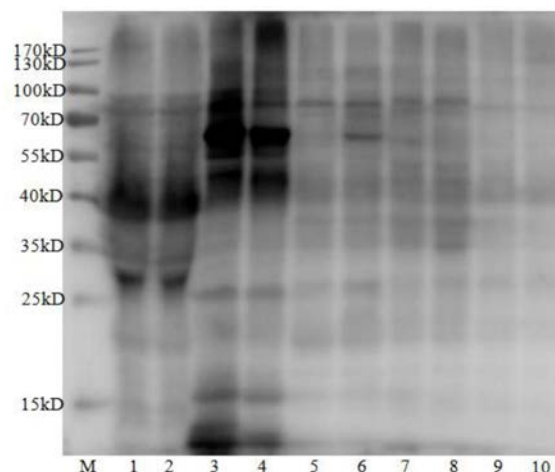
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

小麦粉过敏原高效提取剂及其使用方法

(57) 摘要

本发明小麦粉过敏原高效提取剂及其使用方法,涉及蛋白提取领域。其目的是为了提供一种提取率高、所提取小麦过敏原过敏免疫活性高的小麦过敏原高效提取剂及其使用方法。本发明小麦粉过敏原高效提取剂包括柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述柠檬酸磷酸盐缓冲液中柠檬酸的浓度为 $3\sim 5\text{mmol/L}$,磷酸盐的浓度为 $70.3\sim 147.3\text{mmol/L}$,所述柠檬酸磷酸盐缓冲液的pH值为 $7.0\sim 9.0$ 。本发明的小麦粉过敏原高效提取剂的使用方法包括以下步骤:称取;提取;检测。本发明的小麦粉过敏原高效提取剂提取得到的过敏原含量分别较磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸、Coca's液提高了 $59.4\sim 106.3\%$ 、 $54.5\sim 100\%$ 、 $70\sim 120\%$;并且采用本发明的提取剂所得过敏原亚基种类丰富且过敏免疫活性高。



1. 一种小麦粉过敏原高效提取剂的使用方法,其特征在于:所述使用方法包括以下步骤:

(1) 称取:将小麦粉加入小麦粉过敏原高效提取剂中,得到混合液1,每0.1g小麦粉加入1~2.5mL小麦粉过敏原高效提取剂中;所述小麦粉过敏原高效提取剂为柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述柠檬酸磷酸盐缓冲液中柠檬酸的浓度为3~5mmol/L,磷酸盐的浓度为70.3~147.3mmol/L,所述柠檬酸磷酸盐缓冲液的pH值为7.0~9.0;

(2) 提取:将混合液1在4~20℃搅拌18~24h,然后8000~12000g离心20min,收集上清;

(3) 检测:上清采用生物素双抗体夹芯式酶联免疫法测定小麦粉过敏原含量,以我国小麦过敏患者血清池为探针,正常者血清池为阴性对照,进行免疫印迹分析。

2. 根据权利要求1所述的小麦粉过敏原高效提取剂的使用方法,其特征在于:所述步骤(1)中每0.1g小麦粉加入2mL小麦粉过敏原高效提取剂中。

3. 根据权利要求1所述的小麦粉过敏原高效提取剂的使用方法,其特征在于:所述步骤(2)中搅拌的温度为18℃,搅拌时长为20h。

小麦粉过敏原高效提取剂及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白提取领域,特别是涉及一种用于小麦粉过敏原的提取剂及其使用方法。

背景技术

[0002] 小麦粉中含有丰富的营养物质,蛋白含量占12.5%~13.4%。小麦过敏原是小麦粉蛋白的一部分。小麦过敏反应的临床表现与诊断:其侵犯人体的系统有消化系统、皮肤、呼吸系统、心血管系统、神经系统及全身性表现,症状主要包括乳糜泻、腹腔疾病、过敏性休克、小麦运动激发过敏症、特异性皮炎、鼻炎、面包师哮喘症、恶心、呕吐、腹泻等。

[0003] 小麦粉过敏原是小麦粉中能导致小麦粉过敏患者过敏的蛋白,小麦过敏主要是指由小麦致敏蛋白引起的I型超敏反应。小麦过敏,根据其致敏蛋白、致敏途径以及致敏机体的不同,引发不同的患病症状。小麦过敏反应涉及免疫球蛋白(IgE)对小麦蛋白反应,是免疫系统反应。在小麦过敏的情况下,免疫系统把小麦蛋白当作有害物质进行攻击。有些人只对一种小麦蛋白过敏,而有的人则对两种或多种小麦蛋白过敏。根据世界卫生组织和国际免疫学会联合会(WHO/IUIS)过敏原命名小组委员,截止到2016年11月29日已批准13种食源性小麦过敏原,包括抑制蛋白、非特异性脂转换蛋白、同工麦胚凝集素、 ω 5-醇溶蛋白、 α 淀粉酶CM17、硫氧还蛋白、高分子量麦谷蛋白、低分子质量谷蛋白GluB3-23、Y-醇溶蛋白、 α -嘌呤硫素、线粒体NFKB1的泛素连接酶原激活剂、假定小麦蛋白、胚乳传递细胞特异性PR60前体、延伸因子1,其致敏亚基分子量分布为9.5、12、13、16、17、20、26、27、32~38、39.5、65、83、88kDa的蛋白。

[0004] 目前小麦粉蛋白的提取方法主要有蛋白酶提取法、碱溶酸沉法、超声波辅助酶法、超声波辅助碱溶法、Osborne分级分离法、磷酸盐缓冲液法(PBS)等,虽然方法较多,但是每种方法均有一些不足之处。其中蛋白酶提取法、碱溶酸沉法、超声波辅助酶法、超声波辅助碱溶法不用于小麦粉过敏原提取,因为该四种方法不仅提取纯度低,而且还会在一定程度上降低小麦粉的致敏性,部分过敏原失去致敏性,Osborne分级分离法通过小麦中清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白四种主要蛋白成分的溶解度不同,进行分步提取,分别为水溶性的清蛋白、盐溶性的球蛋白、醇溶蛋白及稀酸或稀碱溶的麦谷蛋白,该方法提取过程复杂,提取过程中损失较多,所提蛋白为小麦粉过敏原致敏亚基种类少,免疫活性低,磷酸盐缓冲液法是目前用于小麦过敏原提取的最常用的方法,所提蛋白亚基丰富度与本发明方法差异较小,但所提过敏原致敏亚基免疫活性低。

发明内容

[0005] 本发明是为了解决以上技术问题而提供一种提取率高、所提取小麦过敏原过敏免疫活性高的小麦过敏原高效提取剂及其使用方法。

[0006] 本发明涉及一种小麦粉过敏原高效提取剂,所述提取剂包括柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述柠檬酸磷酸盐缓冲液中柠檬酸的浓度为3~5mmol/L,磷酸盐的浓度为70.3~

147.3mmol/L,所述柠檬酸磷酸盐缓冲液的pH值为7.0~9.0。

[0007] 优选地,柠檬酸磷酸盐缓冲液中柠檬酸的浓度为4mmol/L,磷酸盐的浓度为90.2~119.1mmol/L,柠檬酸磷酸盐缓冲液的pH值为8.0

[0008] 优选地,柠檬酸磷酸盐缓冲液的浓度为30mmol/L,柠檬酸磷酸盐缓冲液的pH值为8.0。

[0009] 本发明还涉及一种小麦粉过敏原高效提取剂的使用方法,所述使用方法包括以下步骤:

[0010] (1)称取:将小麦粉加入权利要求1中的小麦粉过敏原高效提取剂中,得到混合液1;每0.1g小麦粉加入1~2.5mL小麦粉过敏原高效提取剂中;

[0011] (2)提取:将混合液1在4~20℃搅拌18~24h,然后8000~12000g离心20min,收集上清;

[0012] (3)检测:上清采用生物素双抗体夹芯式酶联免疫法测定小麦粉过敏原含量,以我国小麦过敏患者血清池为探针,正常者血清池为阴性对照,进行免疫印迹分析。

[0013] 优选地,所述步骤(1)中每0.1g小麦粉加入2mL小麦粉过敏原高效提取剂中。

[0014] 优选地,所述步骤(2)中搅拌的温度为18℃,搅拌时长为20h。

[0015] 优选地,所述步骤(3)中测定小麦粉过敏原含量采用北京诺亚杰生物科技有限公司的小麦过敏原(OVA)ELISA检测试剂盒,操作步骤依照试剂盒的说明书进行,具体如下:

[0016] 从冷藏室取出试剂盒,平衡至室温。根据说明首先稀释标准品,然后设置空白孔、标准品孔、样本反应孔,空白孔中不加样品,生物素标记的抗小麦过敏原(OVA)抗体,链霉亲和素-HRP,其各步骤操作相同;标准品孔加入标准品50μL,链霉亲和素-HRP50μL;样本反应孔加入样本40μL,然后各加入抗小麦过敏原(OVA)抗体10μL,链霉亲和素-HRP50μL。盖上封板膜,轻轻震荡混匀,37℃温育60min。然后配制洗涤液,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加如250μL洗涤液,静置30s后弃去,重复5次,拍干。再者每孔加入显色剂A,再加入显色剂B,轻轻震荡混匀,37℃避光显色10min。每孔加终止液,终止反应,此时蓝色立转为黄色,在酶标仪上测定450nm波长的吸光度值。通过标准品的吸光度值制定的标准曲线即可计算得到样品中小麦粉过敏原的含量。

[0017] 本发明小麦粉过敏原高效提取剂及其使用方法与现有技术不同之处在于:

[0018] 1、本发明小麦粉过敏原高效提取剂相对于磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸、Coca's液等常用的食品过敏原提取剂所提过敏原含量分别提高28.1-137.5%、24.2-130.3%、36.7-153.3%。

[0019] 2、将本发明小麦粉过敏原高效提取剂所提取小麦粉过敏原与磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸、Coca's液等常用的食品过敏原提取剂所提过敏原相比较,进行免疫印迹分析(我国小麦过敏患者血清池为探针,正常者血清池为阴性对照),鉴定结果显示,本发明的柠檬酸磷酸盐缓冲液(小麦粉过敏原高效提取剂)较其它三种食品过敏原提取剂检测出的引起我国小麦过敏患者致敏亚基检出种类分别多出2、3、7种;其免疫印迹图谱颜色的深度显著高于其他三种食品过敏原提取液,表明其提取液的过敏免疫活性显著高于其他三种提取剂所得提取液。

附图说明

[0020] 图1为采用不同提取剂处理小麦粉的小麦粉提取液过敏原含量对比图;

[0021] 图2为采用不同提取剂处理小麦粉的小麦粉提取液还原态一维免疫印迹图,其中:M:标准蛋白;1,2:小麦粉;3,4:小麦粉柠檬酸磷酸盐缓冲液;5,6:小麦粉PBS缓冲液;7,8:小麦粉Tris-HCl缓冲液;9,10:小麦粉Coca's液。

具体实施方式

[0022] 通过以下实施例和验证试验对本发明的小麦粉过敏原高效提取剂及其使用方法作进一步的说明。

[0023] 实施例1

[0024] 本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂按以下步骤配制:

[0025] (1) 称取7.60g磷酸三钠放入烧杯,用适量蒸馏水溶解,定容至100mL,得到溶液A(200mmol/L的磷酸三钠)。

[0026] (2) 称取0.63g柠檬酸放入烧杯,用适量蒸馏水溶解,定容至100mL,得到溶液B(30mmol/L的柠檬酸)。

[0027] (3) 取适量溶液B与烧杯中,加入溶液A用pH计调节至所需pH7.0,即得到本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂。

[0028] 本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂的使用方法按以下步骤进行:

[0029] (1) 称取:将小麦粉加入上述小麦粉过敏原高效提取剂中,得到混合液1;每0.1g小麦粉加入1mL小麦粉过敏原高效提取剂中;

[0030] (2) 提取:将混合液1在18℃搅拌20h,然后10000g离心20min,收集上清;

[0031] (3) 检测:上清采用生物素双抗体夹芯式酶联免疫法测定小麦粉过敏原含量,以我国小麦过敏患者血清池为探针,正常者血清池为阴性对照,进行免疫印迹分析。

[0032] 测定小麦粉过敏原含量采用北京诺亚杰生物科技有限公司的小麦过敏原(OVA)ELISA检测试剂盒,操作步骤依照试剂盒的说明书进行,具体如下:

[0033] 从冷藏室取出试剂盒,平衡至室温。根据说明首先稀释标准品,然后设置空白孔、标准品孔、样本反应孔,空白孔中不加样品,生物素标记的抗小麦过敏原(OVA)抗体,链霉亲和素-HRP,其各步骤操作相同;标准品孔加入标准品50μL,链霉亲和素-HRP50μL;样本反应孔加入样本40μL,然后各加入抗小麦过敏原(OVA)抗体10μL,链霉亲和素-HRP50μL。盖上封板膜,轻轻震荡混匀,37℃温育60min。然后配制洗涤液,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加如250μL洗涤液,静置30s后弃去,重复5次,拍干。再者每孔加入显色剂A,再加入显色剂B,轻轻震荡混匀,37℃避光显色10min。每孔加终止液,终止反应,此时蓝色立转为黄色,在酶标仪上测定450nm波长的吸光度值。通过标准品的吸光度值制定的标准曲线即可计算得到样品中小麦粉过敏原的含量。

[0034] 实施例2

[0035] 本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂按以下步骤配制:

[0036] (1) 称取7.60g磷酸三钠放入烧杯,用适量蒸馏水溶解,定容至100mL。得到溶液A(200mmol/L的磷酸三钠)。

[0037] (2) 称取0.84g柠檬酸放入烧杯,用适量蒸馏水溶解,定容至100mL,得到溶液B

(40mmol/L的柠檬酸)。

[0038] (3) 取适量溶液B与烧杯中,加入溶液A用pH计调节至所需pH8.0,即得到本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂。

[0039] 本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂的使用方法按以下步骤进行:

[0040] (1) 称取:将小麦粉加入上述小麦粉过敏原高效提取剂中,得到混合液1;每0.1g小麦粉加入2mL小麦粉过敏原高效提取剂中;

[0041] (2) 提取:将混合液1在20℃搅拌20h,然后10000g离心20min,收集上清;

[0042] (3) 检测:上清用商用试剂盒采用生物素双抗体夹芯式酶联免疫法测定小麦粉过敏原含量,以我国小麦过敏患者血清池为探针,正常者血清池为阴性对照,进行免疫印迹分析。

[0043] 测定小麦粉过敏原含量采用北京诺亚杰生物科技有限公司的小麦过敏原(OVA)ELISA检测试剂盒,操作步骤依照试剂盒的说明书进行,具体如下:

[0044] 从冷藏室取出试剂盒,平衡至室温。根据说明首先稀释标准品,然后设置空白孔、标准品孔、样本反应孔,空白孔中不加样品,生物素标记的抗小麦过敏原(OVA)抗体,链霉亲和素-HRP,其各步骤操作相同;标准品孔加入标准品50μL,链霉亲和素-HRP50μL;样本反应孔加入样本40μL,然后各加入抗小麦过敏原(OVA)抗体10μL,链霉亲和素-HRP50μL。盖上封板膜,轻轻震荡混匀,37℃温育60min。然后配制洗涤液,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加如250μL洗涤液,静置30s后弃去,重复5次,拍干。再者每孔加入显色剂A,再加入显色剂B,轻轻震荡混匀,37℃避光显色10min。每孔加终止液,终止反应,此时蓝色立转为黄色,在酶标仪上测定450nm波长的吸光度值。通过标准品的吸光度值制定的标准曲线即可计算得到样品中小麦粉过敏原的含量。

[0045] 实施例3

[0046] 本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂按以下步骤配制:

[0047] (1) 称取7.60g磷酸三钠放入烧杯,用适量蒸馏水溶解,定容至100mL。得到溶液A(200mmol/L的磷酸三钠)。

[0048] (2) 称取1.05g柠檬酸放入烧杯,用适量蒸馏水溶解,定容至100mL,得到溶液B(50mmol/L的柠檬酸)。

[0049] (3) 取适量溶液B与烧杯中,加入溶液A用pH计调节至所需pH8.0,即得到本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂。

[0050] 本实施例的小麦粉过敏原高效提取剂的使用方法按以下步骤进行:

[0051] (1) 称取:将小麦粉加入上述小麦粉过敏原高效提取剂中,得到混合液1;每0.1g小麦粉加入1.5mL小麦粉过敏原高效提取剂中;

[0052] (2) 提取:将混合液1在10℃搅拌18h,然后10000g离心20min,收集上清;

[0053] (3) 检测:上清用商用试剂盒采用生物素双抗体夹芯式酶联免疫法测定小麦粉过敏原含量。

[0054] 测定小麦粉过敏原含量采用北京诺亚杰生物科技有限公司的小麦过敏原(OVA)ELISA检测试剂盒,操作步骤依照试剂盒的说明书进行,具体如下:

[0055] 从冷藏室取出试剂盒,平衡至室温。根据说明首先稀释标准品,然后设置空白孔、标准品孔、样本反应孔,空白孔中不加样品,生物素标记的抗小麦过敏原(OVA)抗体,链霉亲

和素-HRP,其各步骤操作相同;标准品孔加入标准品50 μ L,链霉亲和素-HRP50 μ L;样本反应孔加入样本40 μ L,然后各加入抗小麦过敏原(OVA)抗体10 μ L,链霉亲和素-HRP50 μ L。盖上封板膜,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C温育60min。然后配制洗涤液,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加如250 μ L洗涤液,静置30s后弃去,重复5次,拍干。再者每孔加入显色剂A,再加入显色剂B,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C避光显色10min。每孔加终止液,终止反应,此时蓝色立转为黄色,在酶标仪上测定450nm波长的吸光度值。通过标准品的吸光度值制定的标准曲线即可计算得到样品中小麦粉过敏原的含量。

[0056] 其中,柠檬酸磷酸盐缓冲液具体的制备规则如下,

[0057] (1) 制备柠檬酸浓度为3mmol/L的柠檬酸磷酸盐缓冲液:

[0058] 10mL 30mmol/L柠檬酸+X mL 200mmol/L磷酸三钠,加水稀释至100mL。

[0059] 表1柠檬酸浓度为3mmol/L的柠檬酸磷酸盐缓冲液中磷酸三钠的用量

	pH 值	X
[0060]	7	35.15
	8	43.35
	9	46.10

[0061] (2) 制备柠檬酸浓度为4mmol/L的柠檬酸磷酸盐缓冲液:

[0062] 10mL 40mmol/L柠檬酸+X mL 200mmol/L磷酸三钠,加水稀释至100mL。

[0063] 表2柠檬酸浓度为4mmol/L的柠檬酸磷酸盐缓冲液中磷酸三钠的用量

	pH 值	X
[0064]	7	45.10
	8	57.15
	9	59.55

[0065] (3) 制备柠檬酸浓度为5mmol/L的柠檬酸磷酸盐缓冲液:

[0066] 10mL 50mmol/L柠檬酸+X mL 200mmol/L磷酸三钠,加水稀释至100mL。

[0067] 表3柠檬酸浓度为5mmol/L的柠檬酸磷酸盐缓冲液中磷酸三钠的用量

	pH 值	X
[0068]	7	55.80
	8	70.35
	9	73.65

[0069] 验证试验1

[0070] 将上述实施例1-4的小麦粉过敏原高效提取剂与现有提取剂提取得到的小麦粉过敏原含量进行对比,结果如表4所示:

[0071] 表4本发明小麦粉过敏原高效提取剂与现有提取剂提取得到的小麦粉过敏原含量

	提取剂	实施例 1	实施例 2	实施例 3	磷酸盐缓冲液	三羟甲基氨基甲烷盐酸	Coca's 液
[0072]	含量 (μ g/g)	0.066	0.054	0.051	0.032	0.033	0.030

[0073] 通过表4中数据可知,本发明小麦粉过敏原高效提取剂相对于磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸、Coca's液等常用的食品过敏原提取剂所提过敏原含量分别提高59.4-106.3%、54.5-100%、70-120% (图1)。

[0074] 验证试验2

[0075] 对比本发明小麦粉过敏原高效提取剂与磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸、Coca's液常用的食品过敏原提取剂所提取的过敏原活性种类和活性。以我国小麦过敏患者血清池为探针,正常者血清池为阴性对照,通过免疫印迹图谱(图2)比较致敏亚基检测数目及图谱颜色深浅来比较致敏免疫活性的高低。

[0076] 表5小麦过敏者血清与不同提取剂处理的小麦粉还原态一维电泳的免疫印迹亚基分子量(kDa)分析结果。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0077]	87	87	85	85	85	85	85	82	80	123
	77	77	77	77	77	77	77	62	45	80
	60	60	60	60	35	60	60	43	40	40
	55	55	55	55	31	49	49	35	26	26
	54	54	54	54	26	45	45	32	-	-
	45	45	45	45	23	35	35	28	-	-
	38	38	26	26	-	31	31	19	-	-
	30	30	20	20	-	26	26	14	-	-
	26	26	16	16	-	23	-	-	-	-
	23	23	15	15	-	-	-	-	-	-
	15	15	12	12	-	-	-	-	-	-

[0078] 通过小麦过敏者血清与不同提取剂处理的小麦粉还原态一维电泳的免疫印迹亚基分子量(kDa)分析表5可知,本发明小麦粉过敏原高效提取剂所提取小麦粉过敏原与磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸、Coca's液等常用的食品过敏原提取剂所提过敏原相比,本发明的柠檬酸磷酸盐缓冲液(小麦粉过敏原高效提取剂)较其它三种食品过敏原提取剂检测出的引起我国小麦过敏患者致敏亚基检出种类分别多出2、3、7种,说明本发明的提取剂所提小麦粉过敏原致敏亚基种类丰富;其免疫印迹图谱颜色的深度显著高于其他三种食品过敏原提取液,表明其提取液的过敏免疫活性显著高于其他三种提取剂所得提取液。

[0079] 虽然以上描述了本发明的具体实施方式,但是本领域的技术人员应当理解,这些仅是举例说明,本发明的保护范围是由所附权利要求书限定的。本领域的技术人员在不背离本发明的原理和实质的前提下,可以对这些实施方式作出多种变更或修改,但这些变更和修改均落入本发明的保护范围。

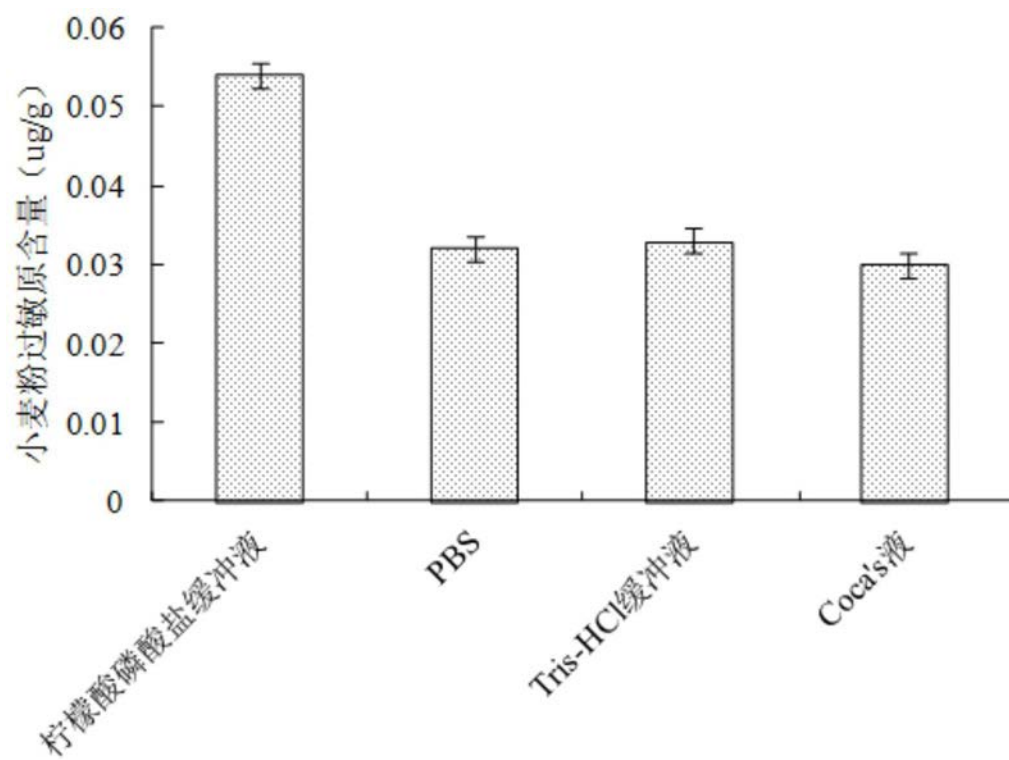


图1

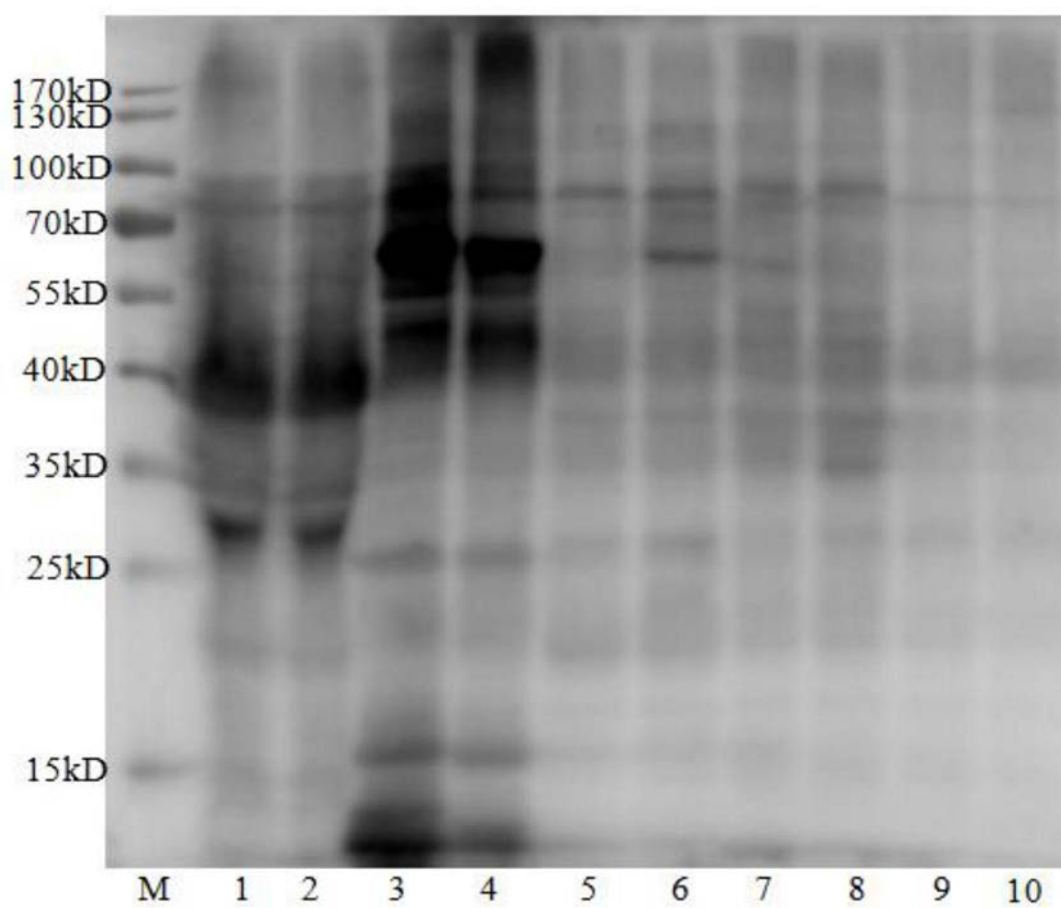


图2