



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103792363 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201210425604. 1

(22) 申请日 2012. 10. 31

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038
号

(72) 发明人 王硕 张燕 生威 王俊平
张洁琼

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

绿豆过敏原抗体及其制备方法与应用

(57) 摘要

绿豆过敏源蛋白抗体的制备方法, 涉及兔抗绿豆过敏原多克隆抗体和鼠抗绿豆过敏原多克隆抗体的制备及其免疫分析方法的建立等方面。本发明建立的检测分析方法比其他的分析方法简便、快速、灵敏、准确。绿豆过敏原分别经大白兔与老鼠免疫、取血、分出抗血清、纯化制得抗体。该抗体具有良好的特异性和灵敏度, 可用于食品中各类绿豆过敏原的快速免疫检测, 具有良好的应用前景。

1. 绿豆过敏原多克隆抗体使用绿豆过敏原蛋白作为免疫原免疫兔子和小鼠进行制备。
2. 权利要求 1 所述的绿豆过敏原蛋白兔多抗的制备方法,其特征在于使用下述步骤制得:

得:

初次免疫:取 1mg 纯化的绿豆过敏原蛋白溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,采用皮下和肌肉注射免疫雌性大白兔;

加强免疫:用 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液,初免后进行四次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次,此后间隔一个月,第五次免疫完后 7-10 天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测进行动物免疫;

抗体纯化:定时监测动物抗体效价,当抗体对绿豆过敏原蛋白的效价达到 1 : 150000 时,采集血液,并离心获得抗血清,使用 ProteinA-Sepharose4B 免疫层析亲利柱对抗血清进行纯化,得到纯化的兔抗多克隆抗体。

3. 权利要求 1 所述的绿豆过敏原蛋白鼠多抗的制备方法,其特征在于是用下述步骤制得:

免疫:免疫动物选用,,。洁净等级:SPF 级。注射方式;免疫周期:

初次免疫:取 0.1mg 上述纯化的绿豆过敏原蛋白溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,采用腹腔注射免疫 7-8 周大 BALB/c 雌性小鼠;

加强免疫:取 0.1mg 上述纯化的过敏原蛋白溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液中,在除免后进行加强免疫,此后每两周一免,免疫四次;最后一次免疫七天后对小鼠摘眼球取全血;

抗体纯化:定时监测动物抗体效价,当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时,采集血液,并离心获得抗血清。

4. 权利要求 1 所述的绿豆蛋白过敏原和抗体在免疫检测方法中的应用,其特征在于方法如下:

(1) 包被:纯化后的兔抗绿豆蛋白抗体经包被液稀释,然后以 100 μ L/well 包被于酶标板上。4 $^{\circ}$ C 孵育 12-16 小时后弃去孔中液体,用 PBST 洗液洗板 3 次,每次 2 分钟。

(2) 封闭:在酶标板中加入 200 μ L/well 封闭液,室温封闭 1 小时后弃去封闭液,用 PBST 洗液洗板 3 次,每次 2 分钟。

(3) 加样:加入梯度稀释的绿豆蛋白溶液,100 μ L/well。室温孵育 1 小时后弃去孔中液体,用 PBST 洗液洗板 4 次,每次 2 分钟。

(4) 加鼠抗血清:将鼠抗绿豆蛋白血清用 PBS 稀释,加入酶标板中 100 μ L/well,室温孵育 1 小时,然后用 PBST 洗液洗板 4 次,每次 2 分钟。

(5) 加酶标二抗:加入 PBS 稀释 10000 倍的 HRP 标记的羊抗鼠二抗,100 μ L/well,室温反应 30 分钟后用 PBST 洗液洗板 5 次,每次 2 分钟。

(6) 显色:提前 15 分钟配制好底物溶液,每孔中加入 100 μ L,室温暗处显色 20 分钟。

(7) 终止:在每孔中加 50 μ L 终止液。

(8) 读数:在双波长方式 (450-650nm) 下用酶标仪读取吸光度值 (OD 值)。

绿豆过敏原抗体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品过敏原免疫化学和检测分析技术领域；涉及免疫化学，生物化学及物化测试技术等；特别涉及绿豆过敏原蛋白免疫动物特异性抗体的制备及其免疫分析方法的建立。

背景技术

[0002] 食品过敏原非常广泛，据美国 FDA 统计，目前已经知道能导致人体出现过敏反应的食物共有 170 多种，大致可以分为八类：一、奶（牛奶、山羊奶等）；二、坚果类（杏仁、胡桃、山核桃、榛子、松子、栗子、腰果等）；三、花生；四、豆类及其制品（大豆、豌豆、蚕豆等）；五、麸质的谷类；六、禽蛋类及其制品；七、鱼类（包括海水鱼、淡水鱼）；八、甲壳动物及其制品（虾、对虾、螃蟹、大小龙虾、蛤蜊等）。实际上除此之外，其它许多油料作物，例如芝麻、向日葵籽、棉花籽、杂豆类以及禾本科谷物如荞麦、燕麦、大麦等都是潜在的食品过敏原。90%的过敏都是由上述食品引起的。

[0003] 食品过敏原问题属于食品安全的范畴。由于其种类多，危害广，症状复杂，并且与人民的生活生产活动息息相关，当前已经成为社会关注的热点，越来越多地被提上国务院的议事日程。在此背景下，食品过敏原的研究将越来越受到国内外专家学者的重视。

[0004] 首先，食品过敏原基础研究薄弱，要加强对食品过敏原的监测评价，就要加强食品过敏原的基础研究。对食品过敏原的结构进行分析鉴定，建立食品过敏原数据库，将已得到的过敏原结构录入数据库，为以后的研究发展提供基础。针对敏感人群的过敏反应情况，研究食品过敏原激发人体过敏反应的阈值。研究消除过敏物质中过敏原危害的适当前处理方法。过敏原多具有抗热及蛋白水解酶，生物活性高及皮试反应阳性的特点。

[0005] 全世界相当多的人口来自于种子的植物蛋白，所以研究种子蛋白过敏性有着极为重要的意义。其中豆类是人类三大食用作物之一，在农作物中的地位仅次于谷类，而豆类中的绿豆蛋白质高达 19.5% - 33.1%。自古以来中国人民喜爱食用绿豆，许多传统食品都以其为原料。尤其夏天，中国人喜欢食用绿豆汤，因为绿豆具有清热、祛暑、解毒的功效。由于食用频繁，增加了敏感人群潜在绿豆过敏原致敏的可能性。

[0006] 2007 年一名男性患者因食用绿豆汤致过敏性喉头水肿病，症状为：口唇发麻，四肢痒，无力；随后胸前也出现同样症状，且双上肢出现对称性风团样药疹等过敏性反应。进入医院就医后，患者出现吸气性呼吸困难、呛咳、口唇发紫，短暂性尿失禁。经过系列抢救治疗、护理后，患者很快恢复正常。观察 24h 痊愈。

[0007] 过敏性喉头水肿及休克是人体摄入外界某种抗原物质，通过免疫应答短时间内发生的累及多器官临床危急症候群，属于过敏型变态反应。通常突然发生且症状剧烈，如不及时处理，将会危及生命。这种病症的特点是发生快，消退快；由生理功能紊乱引起临床症状明显，如上述患者出现的过敏性荨麻疹。

[0008] 免疫技术是指利用动物免疫反应的特异性原理来建立的各种检测分析技术，同时包括建立这些技术的各种制备方法。主要包括用于检测抗原或抗体的免疫检测技术，研究

机体细胞免疫功能和状态的细胞学免疫技术,以及用来建立免疫检测法的免疫制备技术(包括抗原和抗体的制备、抗体纯化及标记等技术)。

发明内容

[0009] 需要解决的问题:

[0010] 本发明提供了一种可以有效地检测绿豆中过敏原的方法,绿豆过敏原免疫动物制备针对绿豆过敏原的特异性抗体,利用抗原抗体的特异性免疫学反应,从而定性定量地检测样本中超微量目标分析物,即可用于样本测定。其选择性决定于免疫学反应的特异性,其灵敏度取决于抗体的亲合性和标记物的可检性。因此可以快速准确地分析食品中的绿豆过敏原。该技术研究的关键是绿豆过敏原抗体的制备。

[0011] 目前,公众普遍认为双抗夹心酶联免疫检测方法具有简单、快速、灵敏度高、特异性强,操作简单,分析容量大、成本低,以及一次检测样品量较大的优点,而且不需要贵重仪器,对使用人员的专门技术要求不高,容易普及和推广。若开发成试剂盒,可广泛用于现场样品和大量样品的快速监测。

[0012] 迄今为止,国内外还没有对食品中绿豆过敏原酶联免疫检测方法的报道。本论文将研究建立绿豆致敏蛋白的快速免疫检测方法从而实现对食品中绿豆致敏蛋白的实时监控,防止潜在的过敏原对敏感人群的健康产生威胁。同时,为健全食品过敏原数据库作出努力。

[0013] 利用纯化绿豆过敏原免疫动物,取血清,分离纯化得到特异性抗体。

[0014] 其中上述人工抗原再经动物免疫,取血,分出抗全血清,纯化制得特异性抗体。

[0015] 绿豆过敏原特异性抗体的制备方法:

[0016] (1) 绿豆过敏原兔多抗的制备

[0017] 免疫:免疫动物选用雌性大白兔,免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初免后进行四次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后2周、4周和6周后免疫三次,此后间隔一个月,第五次免疫完后7-10天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测;具体做法是:

[0018] 初次免疫:取1mg上述纯化的过敏原蛋白溶于0.9%的NaCl溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,进行动物免疫;

[0019] 加强免疫:用0.5mg上述人工抗原溶于0.9%的NaCl溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液,进行动物免疫;

[0020] 抗体纯化:定时监测动物抗体效价,当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时,采集血液,并离心获得抗血清,使用ProteinA-Sepharose4B免疫层析亲利柱对抗血清进行纯化,得到纯化的兔抗多克隆抗体。

[0021] (2) 绿豆过敏原鼠多抗

[0022] 免疫:免疫动物选用BALB/c小鼠,7-8周大,雌性。洁净等级:SPF级。注射方式采用腹腔注射;免疫周期:两周一免;免疫次数:四次;最后一次免疫七天后对小鼠摘眼球取全血。具体做法是:

[0023] 初次免疫:取0.1mg纯化的过敏原蛋白溶于0.9%的NaCl溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,进行动物免疫;

[0024] 加强免疫:取0.1mg纯化的过敏原蛋白溶于0.9%的NaCl溶液和弗氏不完全佐剂

等体积所配制的溶液中,进行动物免疫;

[0025] 抗体纯化:定时监测动物抗体效价,当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时,采集血液,并离心获得抗血清,使用 Protein G-Sepharose 亲和层析柱对抗血清进行纯化,得到了纯化的鼠抗多克隆抗体。

[0026] 上述制备的绿豆过敏原抗体可用于绿豆过敏原的免疫检测。

[0027] 免疫分析方法的建立和测定条件的优选:

[0028] 利用单因素实验分别确定抗原抗体结合效价、亲和性以及 ELISA 方法的包被抗体、检测抗体和酶标二抗的最适稀释倍数。本发明建立了绿豆过敏原的快速免疫检测方法,确定最佳工作条件,建立标准曲线:即目标分析物浓度对吸光度值相关曲线。

[0029] 对于双抗体夹心酶联免疫检测方法,检测限(limit of detection, LOD) 定义为空白加三倍标准偏差,定量限(limit of quantification, LOQ) 定义为空白加十倍标准偏差,然后将上述值带入标准曲线中求出相应的值。可以根据上述实验得到的标准曲线确定检测的线性范围,计算检测限和定量限。

[0030] 抗体特异性:抗体的特异性通过交叉反应测定。本实验选择九种食品用于交叉反应的测定,这九种食品均属于八大食品过敏原,也是日常生活中最常见的食品。主要包括以下九种:鸡蛋,花生,白芝麻,绿豆,燕麦,牛奶,大豆,大米和小麦。按照提取绿豆蛋白的方法提取上述九种食品蛋白。蛋白溶液浓度的确定考马斯亮蓝 G-250 蛋白定量法,用 BSA 作为标准蛋白。每种蛋白用 PBS 稀释成三个浓度,10 μ g/mL、1 μ g/mL 和 0.1 μ g/mL,用 PBS 作阴性对照。然后用于已建立的双抗体夹心酶联免疫检测方法,在双波长方式(450-650nm)下,用酶标仪读取吸光度值,如果交叉反应物孔的吸光度值 P(positive) 是阴性孔值 N(negative) 的 2 倍以上,即 $P/N > 2$,说明抗体对此种蛋白有交叉;若 $P/N < 2$,则表示抗体没有交叉,特异性好。

[0031] 上述制备的抗体可用于绿豆蛋白的免疫检测方法中,其方法如下:

[0032] (1) 包被:纯化后的兔抗绿豆蛋白抗体经包被液稀释,然后以 100 μ L/well 包被于酶标板上。4 $^{\circ}$ C 孵育 12-16 小时后弃去孔中液体,用 PBST 洗液洗板 3 次,每次 2 分钟。

[0033] (2) 封闭:在酶标板中加入 200 μ L/well 封闭液,室温封闭 1 小时后弃去封闭液,用 PBST 洗液洗板 3 次,每次 2 分钟。

[0034] (3) 加样:加入梯度稀释的绿豆蛋白溶液,100 μ L/well。室温孵育 1 小时后弃去孔中液体,用 PBST 洗液洗板 4 次,每次 2 分钟。

[0035] (4) 加鼠抗血清:将鼠抗绿豆蛋白血清用 PBS 稀释,加入酶标板中 100 μ L/well,室温孵育 1 小时,然后用 PBST 洗液洗板 4 次,每次 2 分钟。

[0036] (5) 加酶标二抗:加入 PBS 稀释 10000 倍的 HRP 标记的羊抗鼠二抗,100 μ L/well,室温反应 30 分钟后用 PBST 洗液洗板 5 次,每次 2 分钟。

[0037] (6) 显色:提前 15 分钟配制好底物溶液,每孔中加入 100 μ L,室温暗处显色 20 分钟。

[0038] (7) 终止:在每孔中加 50 μ L 终止液。

[0039] (8) 读数:在双波长方式(450-650nm)下用酶标仪读取吸光度值(OD 值)。

[0040] 根据测量得到的吸光度值,绘制吸光度值与蛋白浓度的曲线。

附图说明：

[0041] 图 1：不同浓度的绿豆过敏原蛋白与吸光度值关系曲线

[0042] 有益效果：

[0043] 与其他同类方法相比，本发明具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点。制备特异性良好的抗体是本检测方法的基础。其抗体具有良好的特异性和灵敏度，对建立的双抗体夹心酶联免疫检测方法进行评价：检测限为 4.99ng/mL，定量限为 15.47ng/mL，检测曲线的线性范围为 19.53-312.5ng/mL。

[0044] 本发明提供的快速检测方法操作简便、快速，而且检测的精确度可达 90% 以上，非常适合现场检测的需要。因此，本发明不仅在实验室检测中表现出色，并为开发出成本低廉、检测效率高、操作简便的酶联免疫快速检测工具，奠定了基础，具有良好的应用前景；既有经济效益又有社会效益。

具体实施方式

[0045] • 灵敏度和特异性分析：

[0046] (1) 灵敏度

[0047] 在确定的最优条件下，建立了如图所示的 ELISA 方法的标准曲线，由方程可以求出方法的灵敏度，检测限为 4.99ng/mL，定量限为 15.47ng/mL，检测曲线的线性范围为 19.53-312.5ng/mL。

[0048] (2) 特异性

[0049] 本实验选择九种食品用于交叉反应的测定，这九种食品均属于八大食品过敏原，也是日常生活中最常见的易致敏食品。将上述九种蛋白用 PBS 稀释成三个浓度，10 μ g/mL、1 μ g/mL 和 0.1 μ g/mL，用 PBS 作阴性对照。用于双抗体夹心酶联免疫检测方法，读取吸光度值。交叉反应结果见下表。可见，抗体特异性很好。

[0050] 双抗夹心酶联免疫检测方法交叉反应

[0051]

交叉 反应物 ^a	蛋白浓度 ^b (mg/mL)	N	P/N 值		
			0.1 μ g/mL	1 μ g/mL	10 μ g/mL
鸡蛋	1.00	0.133	0.94	1.24	1.24
花生	2.33	0.131	1.18	1.23	1.40
白芝麻	0.51	0.147	0.94	1.13	1.22
绿豆	2.61	0.141	1.12	1.08	1.17
燕麦	0.53	0.155	1.10	1.07	1.06
牛奶	2.07	0.163	0.71	0.63	1.60
大豆	2.13	0.142	0.95	1.12	1.83
大米	0.85	0.129	0.96	1.07	1.46
小麦	0.32	0.180	1.26	1.01	1.29

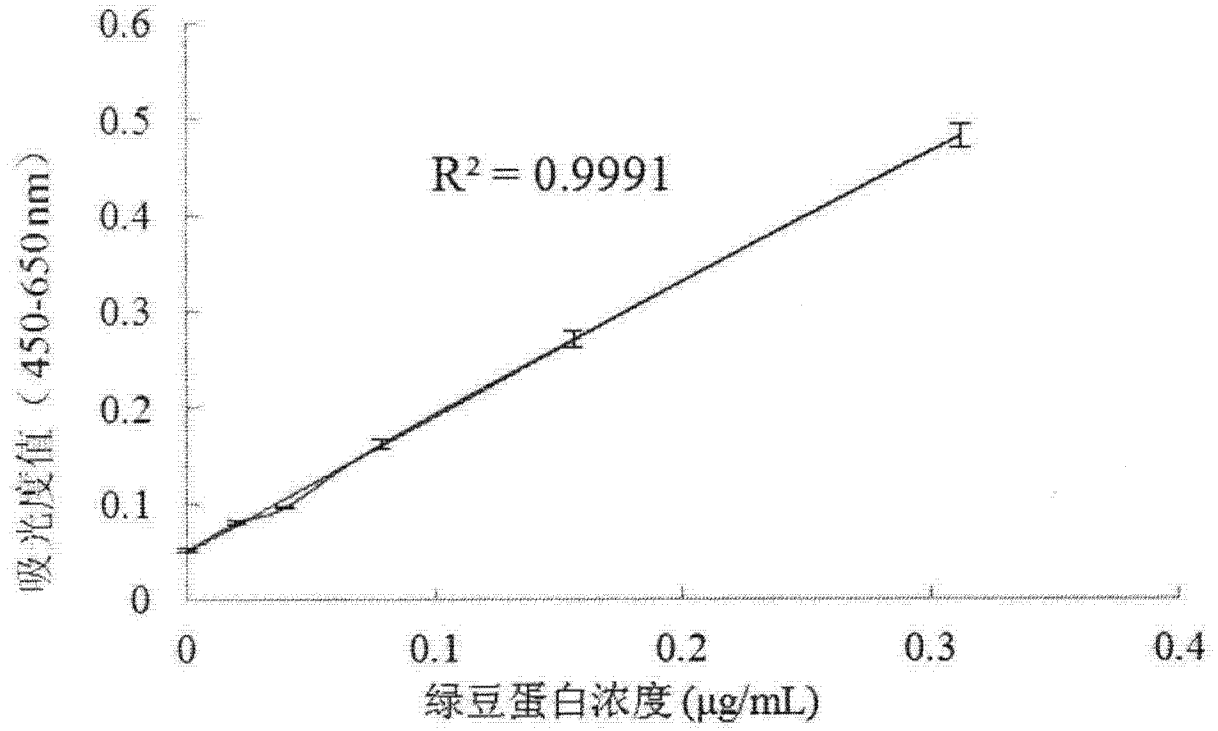


图 1

专利名称(译)	绿豆过敏原抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN103792363A	公开(公告)日	2014-05-14
申请号	CN201210425604.1	申请日	2012-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学学报ISSN : 1672-3910		
[标]发明人	王硕 张燕 生威 王俊平 张洁琼		
发明人	王硕 张燕 生威 王俊平 张洁琼		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6803 C07K16/065 C07K16/16		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

绿豆过敏源蛋白抗体的制备方法，涉及兔抗绿豆过敏原多克隆抗体和鼠抗绿豆过敏原多克隆抗体的制备及其免疫分析方法的建立等方面。本发明建立的检测分析方法比其他的分析方法简便、快速、灵敏、准确。绿豆过敏原分别经大白兔与老鼠免疫、取血、分出抗血清、纯化制得抗体。该抗体具有良好的特异性和灵敏度，可用于食品中各类绿豆过敏原的快速免疫检测，具有良好的应用前景。

