



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102914524 A

(43) 申请公布日 2013.02.06

(21) 申请号 201110223649.6

(22) 申请日 2011.08.05

(71) 申请人 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心

地址 518000 广东省深圳市福田区福强路  
1011 号 A 座 13 楼

(72) 发明人 汤慕瑾 刘志刚 吕敬章 张恒  
万志刚 陈昊翰 蔡伟增

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

过敏原花生蛋白的时间分辨免疫荧光分析检测方法

### (57) 摘要

一种检测食品过敏原花生蛋白成分的检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术领域,用于对食品中过敏原花生蛋白的含量检测。本发明测定的基础是双单抗夹心免疫反应以及时间分辨免疫荧光技术。使用包被抗花生过敏原 Arah1 蛋白单克隆抗体 5G4 的微孔板,生物素标记的抗花生过敏原 Arah1 蛋白单克隆抗体 2G9 为捕捉抗体,使用 EU<sup>3+</sup>-链霉亲和素识别双夹心抗原-抗体复合物,加增强液振荡后,用时间分辨荧光仪测定荧光强度 cps,对照标准曲线即可确定样品中花生过敏原 Arah1 蛋白含量,因为花生中 Arah1 蛋白占花生总蛋白的 12-16%,由此换算出样品中的过敏原花生蛋白含量。本发明提供的食品中过敏原花生蛋白成分检测方法简单、廉价、灵敏度高,在食品安全中过敏原检测领域将有良好的应用前景。

1. 一种检测食品中过敏原花生成分的检测方法,其特征是采用时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)检测花生中主要过敏原Ara h1 蛋白含量成分。

2. 如权利1所述方法,其特征是双单抗夹心TRFIA检测方法。

3. 如权利2所述方法,其特征是包被在微孔板上的抗体和捕捉抗体为花生过敏原Ara h1 蛋白的单克隆抗体,两种抗体识别Ara h1 蛋白的表位相近。

4. 如权利1所述方法,其特征是使用生物素标记花生过敏原Ara h1 蛋白的单克隆抗体作为捕捉抗体,使用钨标记的链霉亲和素识别双夹心抗体-抗原复合物。

5. 如权利1所述方法,其特征是以下步骤:包被有抗花生过敏原Ara h1 蛋白单克隆抗体5G4 (3)的微孔板,加入花生过敏原Ara h1 蛋白标准品或已处理好的样品到各自的微孔中,振荡反应后洗涤液洗涤,加入生物素标记的抗花生过敏原Ara h1 蛋白单克隆抗体2G9 (3,4),振荡反应,洗涤液洗涤3次;加入EU3+-链霉亲和素(4),振荡反应,洗涤液洗涤3次;加增强液振荡后,在紫外光的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps,荧光强度与样品中的浓度成正比,对照标准曲线即可确定样品中花生过敏原Ara h1 蛋白含量。

## 过敏原花生蛋白的时间分辨免疫荧光分析检测方法

### 技术领域

[0001] 一种检测食品过敏原花生蛋白成分的检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术领域,用于对食品中过敏原花生蛋白的含量检测。

### 背景技术

[0002] 在食物过敏中,花生过敏反应表现的症状最为严重,即使微量的食入也能诱导明显的花生过敏反应,会出现过敏性休克和过敏性至死的现象。目前,对于这一花生过敏症状至今尚无有效的治疗方法。避开花生过敏原的食入可有效地防止严重过敏反应的发生,成为了预防花生过敏的有效途径之一。美国及欧盟等国家食品标签法中规定必须把花生作为主要过敏原成分加以标示并开始对部分进口食品进行花生过敏原检测,甚至将食品过敏原成分的标签成为食品国际贸易技术壁垒的新手段之一。

[0003] 在当前商用的花生过敏原检测试剂中,主要是有三种方法:ELISA,胶体金法(LFIA)和实时荧光定量PCR法。ELISA和LFIA的蛋白检测方法主要是检测食品中的花生总蛋白或花生主要过敏原(Ara h 1或Ara h 2),LFIA仅能提供是/否的检测结果,ELISA可以半定量或全定量检测更为灵敏一些但需要更多的时间。而商用的实时荧光定量PCR试剂主要是检测食品中的花生主要过敏原基因DNA水平,LOD约10-50 ppm。

[0004] TRFIA是上世纪八十年代初发展起来的新的免疫测定技术,该技术比ELISA的灵敏度有很大的提高。其原理是利用镧系元素独特的荧光发光特点,镧系元素荧光光谱的激发光与发射光之间的Stokes位移较大,同时被激发的荧光光带极窄,荧光的发射峰非常尖锐,可使仪器调整在极窄的波长范围内测定,几乎完全消除了背景荧光的干扰,继而通过时间延迟和波长分辨,将强特异性荧光和背景荧光分辨开(称为时间分辨),使干扰达到几乎为零。同时增强液的使用是另一个关键因素,免疫反应完成后复合物中镧系离子自身荧光信号很微弱,加入一种增强剂,使镧系元素从复合物中解离下来,并与增强液中所含的 $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮( $\beta$ -NTA)重新形成微胶囊,在紫外等光的激发下发射很强的荧光,增强效果上百万倍。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种检测食品中花生过敏原蛋白成分的检测方法,用于对食品中花生蛋白含量的检测。

[0006] 本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)检测食品中过敏原花生成分的含量。技术方案:测定的基础是双单克隆抗体夹心免疫反应。包被有抗花生过敏原Ara h1蛋白单克隆抗体5G4的微孔板,加入花生过敏原Ara h1蛋白标准品或已处理好的样品到各自的微孔中,振荡反应后洗涤液洗涤,加入生物素标记的抗花生过敏原Ara h1蛋白单克隆抗体2G9,振荡反应,洗涤液洗涤3次,没有结合的抗体在洗涤步骤中被除去。加入 $EU^{3+}$ -链霉亲和素,振荡反应,洗涤液洗涤3次,反应后没有结合的 $EU^{3+}$ -链霉亲和素在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后,在紫外光的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强

度 cps, 荧光强度与样品中的浓度成正比, 对照标准曲线即可确定样品中花生过敏原 Ara h1 蛋白含量, 因为花生中 Ara h1 蛋白占花生总蛋白的 12-16%, 由此换算出样品中的过敏原花生蛋白含量。

### 附图说明

[0007] 图 1: 花生过敏原蛋白-TRFIA 反应示意图。A: 花生过敏原 Ara h1 单克隆抗体; B: 花生过敏原 Ara h1 蛋白; C: 生物素标记的花生过敏原 Ara h1 单克隆抗体; D: 链霉亲和素。

[0008] 图 2: 花生过敏原蛋白-TRFIA 标准曲线图。

### 具体实施方式

[0009] 实施例是对本发明所提供的过敏原花生蛋白的时间分辨免疫荧光分析检测方法的进一步说明, 但发明的实施方式不限于此。

[0010] (1) 抗体生物素标记:

将纯化后过敏原 Ara h1 蛋白单克隆抗体 2G9 的原缓冲液替换成磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 然后将单克隆抗体 5G4 与 NHS 活化的生物素 (NSH-Biotin) 按合适的比例混合, 避光反应 30min, 用 50kDa 的超滤膜柱去除可能未参与标记的 NSH-Biotin。

[0011] (2) 包被板的制备:

将纯化的抗花生过敏原 Ara h1 蛋白单克隆抗体 5G4 用 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  pH9.6 缓冲液稀释至合适浓度, 96 孔微孔板各孔加 100  $\mu\text{l}$ , 4 $^\circ\text{C}$  放置过夜。弃去包被液, 用含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 冲洗两次, 加 150  $\mu\text{l}$  含 3g/L BSA 的上述缓冲液封闭, 4 $^\circ\text{C}$  放置过夜。弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20 $^\circ\text{C}$  冷冻保存。

[0012] (3) 试剂的配制:

A. 花生过敏原 Ara h1 蛋白提取物: (0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml, 160 ng/ml) 以标准的花生总蛋白提取液系列稀释得到。

[0013] B. 洗涤液: 含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST)

C. 增强液: 1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 $\mu\text{mol}$   $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮 ( $\beta$ -NTA), 50 $\mu\text{mol}$  三正辛基氧化膦 (TOPO), 1ml 曲拉通 X-100 (Triton X-100)。

[0014] (4) 测定之前注意事项:

A. 使用之前将所有试剂回升至室温 (18-30 $^\circ\text{C}$ )。

[0015] B. 使用之后立即将所有试剂放回 2-8 $^\circ\text{C}$ 。

[0016] C. 如果样品量大建议使用多通道移液器。

[0017] D. 在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用盖子盖住微孔。

[0018] (5) 具体检测步骤如下:

用液氮研磨食品成粉末, 取 1 g 样品加入 20 ml 提取液 (20 mmol/L Tris HCl, 1 M NaCl, 2% 吐温-20, pH 8.0), 50  $^\circ\text{C}$  30 min, 每 10 min 大力摇匀, 离心收集上清。取样品上清可直接用于检测。

[0019] 取包被抗体的微孔板板条, 加入 100  $\mu\text{l}$  的不同浓度的花生过敏原 Ara h1 蛋白标准品或处理好的样品上清液到各自的微孔中, 阴性对照孔用 PBS 代替。37  $^\circ\text{C}$  振荡 1h 后, 洗

洗涤液洗 3 次。每孔加入 100  $\mu$ l 生物素标记的抗花生过敏原 Ara h1 单克隆抗体 2G9, 37  $^{\circ}$ C 振荡 1h 后, 洗涤液洗 3 次。每孔加入 100  $\mu$ l Eu- 链酶亲和素, 37 $^{\circ}$ C 振荡 1h, 37  $^{\circ}$ C 振荡 1h 后, 洗涤液洗 3 次后每孔加 200 $\mu$ l 的增强液, 37  $^{\circ}$ C 振荡 15min, 于时间分辨仪读数。从标准曲线计算样品中的花生过敏原 Ara h1 蛋白成分含量, 见图 2。进一步换算出样品中的过敏原花生蛋白含量。

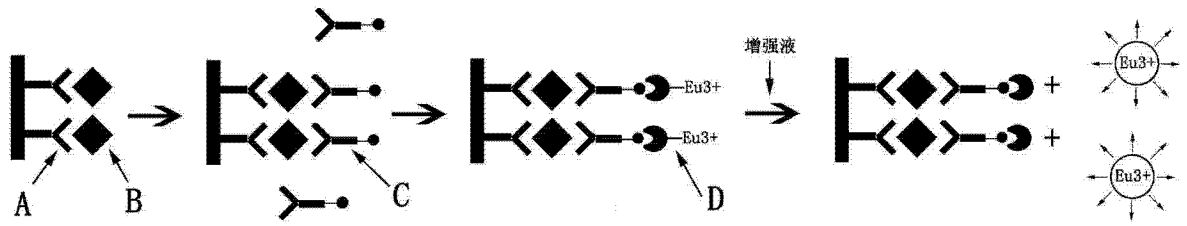


图 1

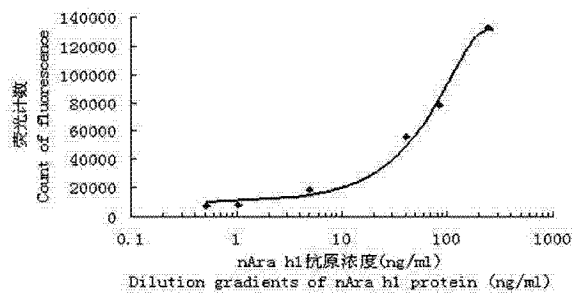


图 2

专利名称(译)	过敏原花生蛋白的时间分辨免疫荧光分析检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102914524A</a>	公开(公告)日	2013-02-06
申请号	CN201110223649.6	申请日	2011-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心		
[标]发明人	汤慕瑾 刘志刚 吕敬章 张恒 万志刚 陈昊翰 蔡伟增		
发明人	汤慕瑾 刘志刚 吕敬章 张恒 万志刚 陈昊翰 蔡伟增		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测食品过敏原花生蛋白成分的检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析（TRFIA）技术领域，用于对食品中过敏原花生蛋白的含量检测。本发明测定的基础是双单抗夹心免疫反应以及时间分辨免疫荧光技术。使用包被抗花生过敏原Arah1蛋白单克隆抗体5G4的微孔板，生物素标记的抗花生过敏原Arah1蛋白单克隆抗体2G9为捕捉抗体，使用EU3+-链霉亲和素识别双夹心抗原-抗体复合物，加增强液振荡后，用时间分辨荧光仪测定荧光强度cps，对照标准曲线即可确定样品中花生过敏原Arah1蛋白含量，因为花生中Arah1蛋白占花生总蛋白的12-16%，由此换算出样品中的过敏原花生蛋白含量。本发明提供的食品中过敏原花生蛋白成分检测方法简单、廉价、灵敏度高，在食品安全中过敏原检测领域将有良好的应用前景。

