



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102687013 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201180004959. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 02. 18

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/12 (2006. 01)

2010-034120 2010. 02. 18 JP

G01N 33/543 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2011/053438 2011. 02. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02011/102437 JA 2011. 08. 25

(71) 申请人 田中贵金属工业株式会社

地址 日本东京市千代田区丸内 2 丁目 7 番 3 号

(72) 发明人 榊原雄広 首藤达也 岩本久彦

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 刘华联

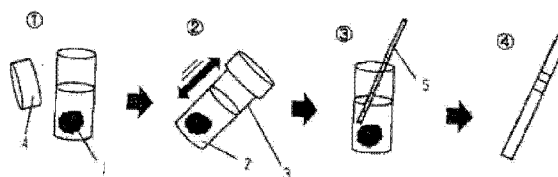
权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 1 页

(54) 发明名称

加工食品中的猪肉的检测法及其检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种作为检测抗体使用的多克隆抗体的制备方法, 该多克隆抗体适用于特异性地、高性能且高灵敏度地通过免疫测定法对加热加工食品中猪肉的进行检测, 不会引发非特异性反应。本发明还提供了一种使用该多克隆抗体进行简便的、高精度的检测法以及用于该检测方法的检测试剂盒。利用免疫层析法来检测试样中的检测对象物时, 在一处或两处地方使用可特异性识别加热处理的猪肉中所含的 23kD (分子量 23, 000) 附近的蛋白质的多克隆抗体作为检测抗体, 检测加热加工食品中来自猪肉的蛋白质。



1. 一种利用多克隆抗体作为检测抗体对来自加热加工食品中的猪肉的蛋白质进行免疫层析检测的方法,其中所述多克隆抗体能特异性识别经加热处理的猪肉中所含的分子量处于 20kD (分子量 20,000) 到 26kD (分子量 26,000) 范围内的 23kD (分子量 23,000) 附近的蛋白质,所述多克隆抗体是利用免疫用抗原对动物进行免疫得到的,所述免疫用抗原是由从生猪肉中提取的提取物的离子交换纯化组分中所含的处于 40kD (分子量 40,000) 到 60kD (分子量 60,000) 范围内的蛋白质,所述蛋白质具有在经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的考马斯染色分析时在 50kD (分子量 50,000) 附近显示出强显色的分子量。

2. 一种多克隆抗体,利用免疫用抗原对动物进行免疫得到,所述免疫用抗原是由从生猪肉中提取的提取物的离子交换纯化组分中所含的处于 40kD (分子量 40,000) 到 60kD (分子量 60,000) 范围内的蛋白质,所述蛋白质具有在经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的考马斯染色分析时在 50kD (分子量 50,000) 附近显示出强显色的分子量,所述多克隆抗体能特异性识别经加热处理的猪肉中所含的分子量处于 20kD (分子量 20,000) 到 26kD (分子量 26,000) 范围内的 23kD (分子量 23,000) 附近的蛋白质。

3. 一种针对加热加工食品中的来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测用装置,所述装置包括标记物保持部和检测部,所述标记物保持部保持有作为用标记物标记根据权利要求 2 所述的多克隆抗体所得的标记抗体,所述检测部固定有根据权利要求 2 所述的多克隆抗体。

4. 根据权利要求 3 所述的免疫层析检测用装置,其特征在于,所述装置基本上由试样添加部、标记物保持部、层析介质、检测部和吸收部构成。

5. 一种针对加热加工食品中的来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测用试剂盒,该检测用试剂盒基本上由试样添加部、标记物保持部、层析介质、检测部和吸收部构成,其中所述标记物保持部保持有作为用标记物标记根据权利要求 2 所述的多克隆抗体所得的标记抗体,所述检测部固定有根据权利要求 2 所述的多克隆抗体。

加工食品中的猪肉的检测法及其检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及针对加工食品、特别是加热处理的加工食品中的猪肉的检测方法及其检测试剂盒。更具体地说,本发明涉及加工食品、特别是加热处理的加工食品中的来自动物种类的检测用抗原的制备方法,以及用该检测用抗原得到的抗体。

背景技术

[0002] 欧盟科学运营委员会在其意见中报告了牛脑海绵状病(BSE)等牛传染病对人传染的危险性,自此,BSE感染牛的肉骨粉在家畜饲料中使用的问题受到重视。另外,假冒品牌肉或伪装成品牌牛肉的问题以及用其它肉类伪装成牛肉的问题也是一般消费者所关心的问题。

[0003] 另一方面,食物变态反应患者会因食品中所含的食物变态反应原而引发哮喘、皮炎、胃肠功能障碍、过敏性休克等各种变态反应症状,有时还有造成了非常严重的后果的病例。食物变态反应患者还有增加的倾向,消费者对于食品的安全性的关注也非常高。

[0004] 通常已知的含有食物变态反应原的代表性食品有:谷类(荞麦、小麦等)、蛋类、肉类(牛、猪、鸡等)、鱼类(鲭鱼、沙丁鱼等)、牛乳类、甲壳类(蟹等)、软体动物类、豆类(花生、大豆等)、果实类(芒果等)、蔬菜类(蒜等)等,这些食物变态反应诱发食品中含有谷蛋白、明胶、酪蛋白、卵清蛋白、卵类粘蛋白、溶菌酶、 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白等食物变态反应诱发成分。加工食品中的很多食品或食物也含有变态反应原,目前的现状是无法简便地检测出它们。

[0005] 另外,对于进行了加工处理(加热、加压、酶解处理、冷冻、干燥、盐藏等)的食品,由于处理而使食品中的蛋白质成分发生分子结构性的改性或分子修饰。因此,为了简便地检测出加工食品中的这些成分,针对加工处理过的成分和未经加工处理的生鲜成分分别使用与其对应的适当的抗原或表位是非常重要的,这方面的探索和研究也得到了进展。

[0006] 例如,人们发现:作为用于检测在高温、例如超过100℃的温度条件下加热处理过的存在于罐装食品或家畜用饲料等试样中的来自以牛、猪、鸡为代表的动物性组织的原料的检测试剂,人们已开发了一种具有标记抗体和载体的检测试剂,所述标记抗体是在120℃以上的温度下加热处理的上述来自动物性组织的原料中的血清白蛋白的抗体或其抗原结合性片段,并用标记物标记得到的;所述载体具备固定有上述来自动物性组织的原料中的血清白蛋白的抗体或其抗原结合性片段的检测区域。也就是说,人们发现用加热改性的血清白蛋白作为免疫原对动物进行免疫所生产的抗体可特异性地识别该加热改性的血清白蛋白,而对非加热的血清白蛋白不显示交叉反应性,从而提供了一种用于检测试样中是否存在加热处理过的来自动物性组织的原料的方法(包含免疫层析法)。(参照专利文献1、专利文献2)

[0007] 将含有未改性和/或改性物质的食物变态反应原的混合物(蛋白质)对动物免疫所得到的IgE(免疫球蛋白E)抗体,以及使用该抗体检测食物变态反应原和食物变态反应诱发性食品的方法(包含免疫层析法)是公知的。(参照专利文献3)

[0008] 不仅如此,将已经保藏的特定细胞(加热的猪肉中的特定蛋白质对动物免疫所得的细胞)生产的单克隆抗体用于 ELISA (免疫学测定的一种)方法中以检测加热处理的食品中的猪肉也是公知的。(参照专利文献 4)

[0009] 由于该检测方法使用了由特定细胞(加热过的猪肉中的特定蛋白质对动物免疫所得的细胞)生产的单克隆抗体,因此可以准确地进行检测。然而,单克隆抗体的制备需要高额费用,因此该方法不适合在医疗领域中针对多数患者的普及。

[0010] 本发明人使用多克隆抗体代替上述单克隆抗体,利用免疫层析法进行了同样的试验。结果发现,其与加热食品中的猪肉以外的原料、如牛肉等有交叉反应性,在精度方面未能得到令人满意的结果。

[0011] 如上所述,在使用多克隆抗体通过免疫层析法检测试样中的检测对象物—加热食品中的猪肉时,可观察到会发生非特异性反应、无法充分抑制非特异性反应的问题依然存在。

[0012] 另外,在通过免疫学测定法来检测食品中的变态反应原物质(蛋白质)时,所使用的检体稀释液含有 Tween20 等表面活性剂或氯化钠等无机盐也是公知的(参照专利文献 5)。

[0013] 现有技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献 1 :日本特开 2006-317226

[0016] 专利文献 2 :日本特开 2005-164583

[0017] 专利文献 3 :日本特开 2003-155297

[0018] 专利文献 4 :美国专利 6288215

[0019] 专利文献 5 :日本特开 2009-085911

发明内容

[0020] 本发明所要解决的问题

[0021] 本发明的目的在于:提供一种来自检体的成分的制备方法,该成分可通过免疫测定法高性能且高灵敏度地检测加热加工食品中的猪肉,不会引发非特异性反应;还提供一种使用由该成分得到的多克隆抗体来进行的简便且高精度的检测方法,以及该检测方法使用的检查试剂盒。

[0022] 解决该问题的手段

[0023] 本发明涉及对加热加工食品中的来自猪肉的蛋白质进行免疫层析检测。本发明使用的展开液组成和试验试剂盒中使用的化学物质(生物物质以外)的组成是以往在免疫层析法中常用的试剂。例如,展开液是在纯净水或缓冲液中加入非离子性表面活性剂(例如 Tween20、Triton-100 等)和氯化钠,根据情况还加入酪蛋白(脱脂粉乳)等。

[0024] 本发明人意外地发现:由生猪肉中提出的提取物、即生猪肉中所含的约 50kD (分子量 50,000)的蛋白质最为适合作为免疫用抗原用于制备在加热食品检测系统中使用的抗体。

[0025] 因此,本发明的用于检测来自加热加工食品中来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测所使用的检测抗体(生物物质)特别适合于加热食品的检测系统。该检测抗体不仅与针对非

加热食品中的来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测系统中所用的检测抗体不同,也与以往公知的针对加热加工食品中的来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测中所用的检测抗体(生物物质)不同。在确定了该检测抗体的基础上,本发明人首次完成了通过免疫层析法检查(探测)加热加工食品中有无猪肉的方法及其检查(检测)试剂盒。

[0026] 在本发明的加热食品的检测系统中,优选使用可特异性识别经过加热处理、例如在 100℃ 以上的温度下加热处理的猪肉中所含的约 23kD (分子量 23,000) 的蛋白质的多克隆抗体作为检测抗体。

[0027] 本发明提供下述 (a)–(e) 的免疫层析检测法、该方法中使用的抗体、检测装置,以及检测试剂盒。

[0028] (a) 本发明的第一方面涉及一种利用多克隆抗体作为检测抗体对来自加热加工食品中的猪肉的蛋白质进行免疫层析检测的方法,其中所述多克隆抗体可特异性识别经加热的猪肉中所含的分子量处于 20kD (分子量 20,000) 到 26kD (分子量 26,000) 范围内的 23kD (分子量 23,000) 附近的蛋白质,所述多克隆抗体是利用免疫用抗原对动物进行免疫得到的,所述免疫用抗原是由从生猪肉中提取的提取物的离子交换纯化组分中所含的处于 40kD (分子量 40,000) 到 60kD (分子量 60,000) 范围内的蛋白质,其具有在经过十二烷基硫酸钠 – 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的考马斯染色分析时在 50kD (分子量 50,000) 附近显示出强显色的分子量。

[0029] (b) 本发明的第二方面涉及一种多克隆抗体,该多克隆抗体可特异性识别经加热的猪肉中所含的分子量处于 20kD (分子量 20,000) 到 26kD (分子量 26,000) 范围内的 23kD (分子量 23,000) 附近的蛋白质,所述多克隆抗体是利用免疫用抗原对动物进行免疫得到的,所述免疫用抗原是由从生猪肉中提取的提取物的离子交换纯化组分中所含的处于 40kD (分子量 40,000) 到 60kD (分子量 60,000) 范围内的蛋白质,其具有在经过十二烷基硫酸钠 – 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的考马斯染色分析时在 50kD (分子量 50,000) 附近显示出强显色的分子量。

[0030] (c) 本发明的第三方面涉及一种针对加热加工食品中的来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测用装置,该装置具备标记物保持部和检测部,所述标记物保持部保持有作为用标记物标记根据 (b) 的多克隆抗体所得的标记抗体,所述检测部固定有根据 (b) 的多克隆抗体。

[0031] (d) 本发明的第四方面涉及根据 (c) 的免疫层析检测用装置,该装置基本上由试样添加部、标记物保持部、层析介质、检测部和吸收部构成。

[0032] (e) 本发明的第五方面涉及针对加热加工食品中的来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测用试剂盒,该检测用试剂盒基本上由试样添加部、标记物保持部、层析介质、检测部和吸收部构成,其中所述标记物保持部保持有将根据 (b) 的多克隆抗体用标记物标记所得的标记抗体,所述检测部固定有根据 (b) 的多克隆抗体。

[0033] 发明效果

[0034] 在本发明的加热加工食品中来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测方法中,将由生猪肉提取的提取物、即生猪肉中所含的 50kD (分子量 50,000) 附近的蛋白质对兔或山羊(并不限于此,也可以是除此以外的其它动物,例如马、绵羊、猪、鸡、小鼠、大鼠或豚鼠等) 免疫得到的多克隆抗体作为检测抗体(生物物质) 使用,与使用单克隆抗体相比,其价格便宜,可以

对众多需求者、例如医疗领域中的很多患者进行有效的普及。

[0035] 在本发明中,将由生猪肉提取的提取物、即生猪肉中所含的 50kD (分子量 50,000)附近的蛋白质作为免疫抗原对动物免疫,所得的多克隆抗体作为检测抗体(生物物质)使用。因此,不仅对大豆等来自植物的蛋白质没有交叉反应,对来自牛、鸡、羊等的猪以外动物的蛋白质也没有交叉反应,可正确且容易地对加热加工食品中来自猪肉的蛋白质的免疫层析法的检测结果进行判定,且灵敏度不会降低。

[0036] 根据本发明的针对来自加热处理猪肉的蛋白质的免疫层析检测法不仅能简便且低成本地应用于检测来自加热加工食品中的猪肉的蛋白质,而且能同样地应用于检测在会引起蛋白质改性的温度条件下实施了加工处理(加热、加热/加压、干燥等)的健康食品、药品、家畜饲料、宠物食品等中的来自猪肉的蛋白质。因此,对于生猪肉可引发变态反应的患者或者基于嗜好上或饮食文化上不食用猪肉的一般消费者,本发明能够为解决这些问题作出贡献。

[0037] 与 PCR 或 ELISA 法相比,本发明的免疫层析检测法的装置简便,可以迅速且低成本地检测加热加工食品中的来自猪肉的蛋白质,因此具有能够解决一般消费者的需求的优点。

附图说明

[0038] 图 1 是本发明的免疫层析检测用试剂盒的使用概略图。

具体实施方式

[0039] 以下详细说明本发明。

[0040] 在本发明的加热食品检测系统中,优选使用可特异性识别经过加热处理、例如经过 100℃ 以上温度加热处理的猪肉中所含的 23kD (分子量 23,000)附近的蛋白质的多克隆抗体作为检测抗体。

[0041] 在本发明的加热加工食品中来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测法中,使用来自生猪肉的提取物、即生猪肉中所含的 50kD (分子量 50,000)附近的蛋白质作为免疫用抗原,用其对动物(如兔、山羊、马、绵羊、猪、鸡、小鼠、大鼠、豚鼠等)进行免疫,所得的多克隆抗体作为检测抗体(生物物质)。

[0042] 用语“50kD (分子量 50,000)附近”的含义对于本领域的技术人员来说并不会带来特别的技术性问题。特别在为了定量表示时,考虑到作为天然产物的蛋白质的不规则情况,在对由生猪肉提取的蛋白质的离子交换柱纯化组分进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、然后通过考马斯染色对蛋白质进行分析(SDS-PAGE 分析)时,生猪肉中的主要的特征性蛋白质具有主要为 50kD 的分子量(分子量 50,000),其在经验上认为是完全处于 40kD (分子量 40,000)到 60kD (分子量 60,000)左右的范围内,即,“50kD (分子量 50,000)附近”的蛋白质大部分集中在组分 1-5 的范围内。可以推定,该蛋白质并不只是单体的形式,除此之外也可多聚体的形式,例如二聚体、三聚体等,但无论如何,在该分子量的分析中,发现具有“50kD 附近”的分子量的蛋白质在猪肉中是特征性的、且适合作为免疫用抗原的主要蛋白质。

[0043] 在本发明中,优选生猪肉中所含的 50kD (分子量 50,000)附近的蛋白质作为免疫

用抗原使用。该免疫用抗原可以是指是在聚丙烯酰胺凝胶电泳等分析方法中显示为具有 50kD 附近的分子量的蛋白质组分,也可以是主要含有显示为具有 50kD 附近的分子量的蛋白质组分的蛋白质群。

[0044] 另外,在本发明中,使用将由生猪肉提取的提取物、即生猪肉中所含的 50kD (分子量 50,000) 附近的蛋白质用作免疫抗原对动物进行免疫得到的多克隆抗体作为检测抗体(生物物质)。因此,不仅对来自大豆等植物的蛋白质没有交叉反应,对于来自牛、鸡、羊等猪以外的动物的蛋白质也完全没有交叉反应,可以正确且容易地针对加热加工食品中来自猪肉的蛋白质的免疫层析检测的结果进行判定,并且灵敏度不会降低,表现出优异的性能。

[0045] 本发明进一步对比较容易且可正确识别加工猪肉的方法进行了研究。结果,通过加工猪肉中所含的蛋白质而研究了该可识别的蛋白质的特性与识别抗体之间的关系。结果发现,在通过蛋白质印迹分析(以下简称为“WB 分析”)对加工猪肉中所含的蛋白质进行分子量确认时,作为经验上认为可能的表示范围,发现加工猪肉中所含的可特异性识别的蛋白质是 23kD (分子量 23,000) 附近的蛋白质。

[0046] 如果从全部肉类均为天然蛋白质的特性考虑,容易预测到构成加工肉类的蛋白质的分子量是从低分子量至超高分子量。使用将生猪肉中所含的具有 50kD (分子量 50,000) 附近的蛋白质作为免疫抗原对动物进行免疫得到多克隆抗体,然后对来自各种加工肉类提取的蛋白质进行电泳,之后对具有处于 0kD (分子量 0) 到 250kD (分子量 250,000) 左右范围内的各种分子量的蛋白质进行 WB 分析。作为经验上认为可能的表示范围,发现所述多克隆抗体对主要含有属于 20kD (分子量 20,000) 到 26kD (分子量 26000) 左右范围内的以 23kD (分子量 23,000) 的分子量为主的蛋白质可强烈地识别,即,可以强烈地识别具有“23kD (分子量 23,000) 附近”的猪蛋白质,而不识别猪蛋白质以外的牛、羊、鸡的蛋白质。使用可识别猪肌钙蛋白 I 的单克隆抗体,同样地将由各种加工肉类中提取的蛋白质进行电泳,然后进行 WB 分析,得到与本发明同样的结果。

[0047] 在本发明中,当涉及到对 23kD 附近的猪蛋白质进行识别时,该用语“23kD 附近”是指作为以加工猪肉为检测对象的蛋白质分子量的按照常用测定方法来确定蛋白质的分子量。23kD 这个特定值可发挥非常有效的功能,在作为检测用蛋白质的应用上没有任何特别的问题。它限定了 23kD 附近的蛋白质,是用加工猪肉检测领域中的技术人员是能充分地测定且可识别的分子量来限定的表述。如果需要进一步定量表示该“23kD 附近”的含义,考虑到加工肉这一天然产物的分子量、结构等的不规则的情况,作为数值上可能的表示范围,如果表达为大部分蛋白质的分子量集中在 20kD-26kD 左右的范围,则为更明确的定量表示。总之,只要通过 WB 分析确定具有 23kD 附近分子量的蛋白质,本发明的检测方法就可以正确地实施。而且,根据本发明人的发现,本发明人制作的多克隆抗体可特异性识别加工猪肉中的 23kD 附近的蛋白质,根据其原理,可以容易、迅速且低成本地实现该检测方法。

[0048] 本发明中使用的展开液组成或试验试剂盒中使用的化学物质(非生物物质)的组成是以往的免疫层析法中常用的试剂。作为上述免疫层析用试剂,可以使用各种化学物质,例如缓冲剂、非离子性表面活性剂、根据情况使用的螯合剂等,以实现其功能/作用。

[0049] 在本发明的免疫层析用试剂组合物如提取展开液中,缓冲剂没有特别的限定,只要它能够实现其作用(缓冲作用),不会因试样的添加、或试样的蒸发或稀释所导致的浓度变化、也不会因为自外部混入少许杂质而产生显著的影响。

[0050] 本发明的缓冲剂的例子有：乙酸缓冲液(乙酸 + 乙酸钠)、磷酸缓冲液(磷酸 + 磷酸钠)、柠檬酸缓冲液(柠檬酸 + 柠檬酸钠)、硼酸缓冲液、Tris 盐酸缓冲液(三(羟基甲基)氨基甲烷 + 盐酸)、TE 缓冲液(Tris + 乙二胺四乙酸)、TAE 缓冲液(Tris + 乙酸 + 乙二胺四乙酸)、TBE 缓冲液(Tris + 硼酸 + 乙二胺四乙酸)、HEPES 缓冲液(2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸)等。优选乙酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris 盐酸缓冲液、HEPES 缓冲液。

[0051] 本发明的免疫层析用试剂组合物中使用的缓冲剂的浓度为 0.01-250mM 的范围，优选 10-200mM 的范围，更优选 30-180mM 的范围。浓度低于 0.01mM，缓冲作用不充分。浓度为 250mM 以上，则浓度高于所需，不经济，浪费。

[0052] 可在本发明的免疫层析用试剂组合物中使用的非离子性表面活性剂的例子有：聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯 / 聚氧丙烯烷基醚、聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯(商品名“Tween”系列)、聚氧乙烯对叔辛基苯基醚(商品名“Triton”系列)、聚氧乙烯对叔壬基苯基醚(商品名“TritonN”系列)、烷基聚葡萄糖苷、脂肪酸二乙醇酰胺、烷基单甘油基醚等。非离子性表面活性剂可以单独地使用，或将两种以上混合使用。

[0053] 在本发明的免疫层析用试剂组合物中使用的非离子性表面活性剂的含量为相对于免疫层析用试剂组合物的 0.01-10% 重量的范围，优选在 0.05-5% 重量的范围。含量低于 0.05% 重量时，无法抑制非特异性反应，导致不正确的判定。含量为 10% 重量以上，则高于所需的浓度，不仅不会对非特异性反应的抑制带来有利的影响，并且不经济，浪费。

[0054] 非离子性表面活性剂还可以任选地配合其它非离子性表面活性剂、离子性表面活性剂等结合使用。

[0055] 在本发明的免疫层析用试剂组合物中，根据需要使用的螯合剂没有特别的限定，只要它可用作具有多个配位基的配位体即可。

[0056] 在本发明中，螯合剂的例子有：乙二胺、二吡啶、乙二胺四乙酸(以下称为“EDTA”)、EDTA · 2Na、EDTA · 3Na、EDTA · 4Na、EDTA 衍生物(例如 EDTA · 2NH₄、EDTA · 3K、EDTA · 特殊铵盐等)、EDTA 金属盐(例如 EDTA · Ca · 2Na 等)、羟基乙基乙二胺三乙酸(HEDTA)系、二羟基乙基乙二胺二乙酸(DHEDDA)系、1,3-丙烷二胺四乙酸(1,3-PDPA)系、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)系、三乙烯四胺六乙酸(TTHA)系、亚硝基三乙酸(NTA)系、葡糖酸系、羟乙基亚氨基二乙酸(HIMDA)系、L-天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)系、氨基三亚甲基膦酸(NTMP)系、羟基乙烷膦酸(HEDP)系、3-羟基-2,2'-亚氨基二琥珀酸四钠、菲咯啉、卟啉、冠醚等。

[0057] 在本发明的免疫层析用试剂组合物中，根据需要含有的螯合剂的浓度为 0.01-10mM 的范围，优选 0.1-5mM 的范围，更优选 0.5-2mM 的范围。浓度低于 0.01mM，则无法抑制非特异性反应，从而无法进行正确的判定。浓度为 10mM 以上，则高于所需浓度，不经济，浪费。

[0058] 在本发明的免疫层析用试剂组合物中，可以添加公知的能抑制基于生物学亲和性的副反应或抑制非特异性反应的添加剂，例如用于促进抗原抗体反应或抑制非特异性反应的蛋白质(例如牛血清白蛋白、酪蛋白、明胶等)、高分子化合物(例如聚乙二醇、甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯基醇、葡聚糖等)、离子性表面活性剂或聚阴离子(例如硫酸葡聚糖、肝素、聚苯乙烯磺酸、硫酸软骨素等)，以及防腐剂或抗菌剂等。这些添加剂可以单独地使用，或两种以上相结合地使用，其使用有效，没有任何限制。这些用于促进抗原抗体

反应或抑制非特异性反应的蛋白质、高分子化合物、离子性表面活性剂或聚阴离子以及防腐剂或抗菌剂等中的一种或多种添加剂可以保持在构成固定相的层析介质上的流动相的流路上,其使用有效,没有任何限制。

[0059] 本发明的免疫层析用试剂组合物的使用方法可以是:将组合物涂布在免疫层析装置的样品板(试样添加部分)中,或将样品板浸渍在组合物中,然后进行干燥,由此将组合物保持在样品板上。将本发明的免疫层析用试剂组合物保持在免疫层析介质上的其它方式可以是:在试样添加部位的端部和吸收部位之间的适当位置处设置添加剂保持部,以这样的方式将组合物保持在其中。例如,组合物的施加区域可以在试样添加部分的附近、标记物保持部位或其附近。其中,优选将组合物只保持在试样添加部分和/或标记物保持部上。

[0060] 本发明的免疫层析用试剂组合物的使用方法并不限于上述使用方式,该组合物可以提取展开液的形式使用,也可以试样的稀释液的形式使用。例如,本发明的提取展开液是超纯水或缓冲液,其中加入了非离子性表面活性剂(如 Tween 20、Triton-100 等)、氯化钠,以及根据情况加入的酪蛋白(脱脂粉乳)等。

[0061] 提取展开液通常是使用水作为溶剂,在其中加入缓冲液、非离子表面活性剂、蛋白质和高分子化合物,还可以根据需要进行进一步加入整合剂等。加入的顺序没有特别限定,也可以同时加入。在该组合物作为提取展开液使用时,可以根据所要检测的试样的状态、例如为固体状还是糊剂状来选择合适提取展开液的使用方式。可以将所要检测的试样与展开液预先混合,将混合物供给/滴加到样品板(试样添加部)上以展开,也可以先将试样供给/滴加到样品板(试样添加部)上,然后将展开液供给/滴加到样品板(试样添加部)上以展开。在该组合物作为试样稀释液使用时,将试样稀释为稀释液,然后直接以展开液的形式供给、滴加到样品板(试样添加部)上。

[0062] 本发明的含有检测对象物的试样(检体)的代表性例子有:主要采用在可使蛋白质变性的温度下经加热加工或灭菌处理的食物、健康食品等,但并不限于此,家畜饲料或药品等也可以作为试样(检体)使用。

[0063] 在本发明中,优选生猪肉中所含的 50kD(分子量 50,000)附近的蛋白质作为免疫用抗原。该免疫用抗原可以是在聚丙烯酰胺凝胶电泳等分析方法中显示为分子量在 50kD 附近的蛋白质组分,或者也可以是主要含有显示为分子量在 50kD 附近的蛋白质组分的蛋白质群。

[0064] 本发明的免疫用抗原的制备方法如下所示。

[0065]

[试剂]	(每 1 kg 肉的使用量)
• 氯化钠	0.14 M 水溶液 2 L

[0066]

- 乙酸钠 1 M 水溶液 200 mL
0.1 M 水溶液 500 mL
- 硫酸铵 2872 g
- 1 N 盐酸 适量 (通常: 250 mL)
- 聚乙二醇 20000 30%水溶液 1 L
- 乙酸钠缓冲液(pH=3.7) 0.1M 溶液 3.2 L

[0067] [装置]

- [0068] • 剪刀、镊子(处理肉用)
- [0069] • 烧杯
- [0070] • 食品加工机
- [0071] • 超声波匀浆机
- [0072] • 离心机和离心管(Kokusan 制造的离心机)
- [0073] • 吸滤器具(吸引瓶、布式漏斗)
- [0074] • 磁力搅拌机
- [0075] • pH 计
- [0076] • 透析膜(在使用前煮沸,除去甘油、硫)
- [0077] • AKTA (蛋白质纯化装置)

[0078] [操作顺序]

[0079] I. 除去抗原以外的蛋白质

[0080] (1) 使用食品加工机,将 500g 剔除了脂肪的红肉(无骨肉)制成绞肉,加入 1L 的 0.14M 氯化钠水溶液。用超声波匀浆机分散,制备成肉浆。在室温下温育 1 小时,然后进行离心(10,000g,4℃,20 分钟),用 KimWipes(低尘擦拭纸)过滤上清液。然后用 Whatman No. 42 滤纸对上清液进行吸滤,将滤液用 IEW 稀释到 1900mL,加入 100mL 的 1M 乙酸钠水溶液。在冰浴条件下,边搅拌边加入 722g 硫酸铵,然后冰浴(4℃)搅拌 2 小时。在 4℃下温育过夜。

[0081] (2) 将沉淀物充分搅拌,离心(10,000g,4℃,20 分钟),收集上清液(舍去颗粒),然后加入 1N 盐酸,调节为 pH 4.9。在 4℃下温育过夜。

[0082] (3) 将沉淀物充分搅拌,离心(10,000g,4℃,20 分钟),收集上清液(舍去颗粒),然后加入 1N 盐酸,调节为 pH 3.7。在温度为 4℃的条件下温育过夜。

[0083] (4) 离心(10,000g,4℃,20 分钟),收集上清液(舍去颗粒),然后在冰浴条件下边搅拌边缓慢加入 714g 硫酸铵,在温度为 4℃的条件下搅拌 2 小时。然后在温度 4℃的条件下温育过夜。

[0084] (5) 离心(19,000g,4℃,20 分钟),舍去上清液,用 120mL 灭菌纯净水使颗粒物悬浮。在 4℃下温育过夜。

[0085] (6) 离心(19,000g,4℃,20 分钟),将上清置于透析膜中,用 2-3L 灭菌纯净水透析。然后再用 2-3L 灭菌纯净水透析。

[0086] (7) 用 1-2L PEG 20000 的 30% 水溶液进行透析,将透析后的液体浓缩为 40mL。然后用 2000mL 0.01M 乙酸缓冲液(pH3.7)透析。后再次用 2000mL 0.01M 乙酸缓冲液(pH3.7)透析。

[0087] II. 抗原的纯化

[0088] 纯化经上述 (1)-(7) 的顺序得到的抗原,其按照以下顺序进行:

[0089] (8) 将上述 (7) 中所得的产物进行离心 (10,000g, 4℃, 20 分钟), 将上清液经过阳离子交换柱进行纯化。使用 0.01M 乙酸缓冲液 (pH3.7) 进行最初的柱平衡和柱洗涤, 样品溶出及其之后的柱洗涤是使用 0.8M 乙酸钠水溶液 (pH3.7)。得到组分 f1-f10 作为阳离子交换纯化组分。

[0090] (9) 收集主要的峰部分的组分 (在 UV 谱中蛋白质浓度最高的组分)。将收集到的组分用适量的 PBS (0.01M 磷酸盐缓冲盐水) 进行透析, 然后用 1000mL 的 PEG 20000 的 30% 水溶液进行透析, 浓缩至浓度为 2mg 蛋白质 /mL 的液体。

[0091] (10) 收集组分 f1-f5, 然后对收集的组分进行蛋白质定量测定 (蛋白质测定)。通过上述操作, 制备得到来自生猪肉的免疫用抗原。

[0092] 对离子交换纯化组分 f1-f10 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) (150V, 45-55 分钟), 然后用考马斯染色对蛋白质进行染色。组分 f1-f5 在 50kD (分子量 50,000) 附近可见较强的色带。

[0093] 对离子交换纯化组分 f1-f10 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) (150V, 45-55 分钟), 然后使用田中贵金属工业株式会社制备的多克隆抗体与其反应, 并对蛋白质进行印迹分析 (15V, 60 分钟)。组分 f1-f5 在 50kD 附近可见较强的色带。

[0094] [多克隆抗体的制备]

[0095] 使用上述由生猪肉制备的免疫用抗原, 按照常规方法对兔进行免疫, 获得抗血清。对来自抗血清的多克隆抗体进行纯化, 这是经 50% 饱和硫酸铵盐析后再用 DEAE 柱 (阴离子交换柱) 进行纯化和回收来实现的。

[0096] 使用由田中贵金属工业株式会社制备的多克隆抗体, 对经 100℃ 加热处理的市售的 4 种肉类 (猪、牛、羊、鸡) 进行蛋白质印迹分析, 检测出了强烈识别出的 23kD (分子量 23,000) 附近的来自猪肉的蛋白质的色带。与猪以外的多种肉类相比, 该抗体对猪的特异性高。另外, 通过蛋白质印迹分析可以确认, 该多克隆抗体可以识别生猪肉中所含的 50kD 附近的蛋白质。因此可知, 生猪肉中所含的 50kD 附近的蛋白质适合作为本发明的免疫抗原。

[0097] 以下对本发明的免疫层析装置或检测试剂盒的结构进行说明。

[0098] 试样添加部由多孔片构成, 它具有可以使试样被迅速吸收, 但保持力弱, 使得试样迅速地向反应部移动的性质。多孔片的例子有: 纤维素滤纸、玻璃滤纸、聚氨酯、聚乙酸酯、乙酸纤维素、尼龙、棉布等。本发明的多孔片优选使用玻璃滤纸。在本发明中, 为了抑制非特异性反应, 可以采取以下方案: 预先用含有缓冲液、非离子表面活性剂和蛋白质等添加剂以及根据需要使用的螯合剂的免疫层析用试剂组合物浸渍样品板 (试样添加部), 然后通过干燥等方法使其保持在样品板上。

[0099] 标记物保持部构造保持有由标记成分所标记的试剂成分构成的标记试剂。可使用的标记成分的例子包括: 胶体金颗粒、胶体银颗粒等胶体金属颗粒、通过对使各种单体 (共) 聚合合成的合成高分子进行染色得到的染色胶乳颗粒、酶、荧光化合物、其它材料。其中, 优选使用显色强、制造容易、标记简单的胶体金颗粒。胶体金颗粒的粒径的大小为 1-500nm, 优选 10-250nm, 更优选 30-100nm。试剂成分是具有识别分析物的能力的颗粒或分子、单克隆抗体、多克隆抗体或其片段 (第二试剂)。

[0100] 层析介质由形成在膜载体上的检测部(或者称为“反应部”)构成。膜载体没有特别的限制,只要是可以通过毛细现象吸收试样检体并使其移动的材料即可。例如,膜载体可选自硝基纤维素、乙酸纤维素、尼龙、聚醚砜、聚乙烯基醇、聚酯、玻璃纤维、聚烯烃、纤维素、含有这些混合纤维的人造聚合物。在检测部中,多克隆抗体或其片段(第一试剂)担载并固定于硝基纤维素的片上。

[0101] 吸收部可使用具有迅速吸收过剩试样的能力的材料,可以使用玻璃滤纸等。

[0102] 背板是基材。通过在背板的一个面上涂布胶粘剂或者粘贴胶带,使其具有胶粘性,在该胶粘面上贴合设置试样添加部、标记物保持部、层析介质(具有检测部),以及吸收部的一部分或全部。背板作为基材没有特别的限制,只要是可通过胶粘剂使其对试样液体和湿气具有非透过性即可。

[0103] 在检测部(或称为“反应部”)中使用的试剂成分(第一试剂)和在标记物保持部中使用的试剂成分(第二试剂)中,其中的一方或者两方含有多克隆抗体,在保持特异性的基础上考虑到制造成本或抗体的稳定供应,两种试剂成分均可以使用多克隆抗体。

[0104] 单克隆抗体和多克隆抗体及其片段可通过公知的方法制备。作为可产生抗体的动物五种通常有兔、山羊、小鼠、大鼠等。

[0105] 单克隆抗体可以按照常规的方法,将经过抗原(由生猪肉提取的提取物、生猪肉中所含的 50kD (分子量 50,000) 附近的蛋白质)免疫过的小鼠的骨髓细胞与脾细胞进行杂交,选择产生目标抗体的杂交瘤,获得由该杂交瘤生成的单克隆抗体。例如可参照Köhler和 Milstein 的方法 (Nature, 256 (1975), P495-497)。

[0106] 多克隆抗体可按照常规方法,利用抗原(由生猪肉提取的提取物、生猪肉中所含的 50kD (分子量 50,000) 附近的蛋白质)对可产生抗体的动物(例如兔、山羊、小鼠、大鼠、马、猪、鸡等)进行免疫得到抗血清,在所得的抗血清中分离获得目标抗体。例如可参照 Berger 等人的文献 (J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. VOL. 71, NO. 2, 1988)。

[0107] 以下概括论述判定的原理:

[0108] 1. 将试样(例如含有肉类的非加热食品的提取展开液)以规定量(通常为 0.1-2ml)滴加到样品板上。滴加在样品板上的试样在样品板中移动。当用特定的免疫层析用试剂组合物浸渍样品板时,免疫层析用试剂组合物溶解于试样的水分中,并与试样一起移动。

[0109] 2. 试样(例如含有肉类的非加热食品的提取展开液)或溶解有免疫层析用试剂组合物的试样首先向标记物保持部移动。在试样通过标记物保持部的期间,保持在标记物保持部上的标记试剂(第二试剂)溶解于试样的水分中,并与试样一起移动。

[0110] 3. 接着,溶解于试样的水分中的标记试剂经过层析介质上的检测部。这里,当试样中含有猪肉时,猪肉中的抗原通过抗原抗体的特异性结合反应而与保持于固定于检测部上的抗体和标记试剂发生特异性反应,形成夹心状复合体,这导致检测部着色。当试样中不含猪肉时,即使溶解于试样的水分的标记试剂通过层析介质上的检测部,也不发生特异性结合反应,因此检测部不会着色。

[0111] 4. 最后,试样的水分移动至吸收部。

[0112] 如上所述,可以正确地判定试样中有无猪肉。

[0113] 实施例

[0114] 以下详细说明在本发明中使用的免疫层析装置,这只是一个例子,本发明并不限

于此。

[0115] 1. 层析介质上的反应部位的制作

[0116] 使用抗体涂布机(BioDot 公司制造)在 25×2.5cm 的硝基纤维素膜(Millipore 公司制造的 HF120)上涂布经过 2% 的 StabiliGuard (SurModics 制造)、5% 的异丙醇以及碳酸缓冲液 (pH9.0) 稀释的浓度为 0.65mg/mL 的抗猪多克隆抗体,在 40–50℃ 下干燥 60 分钟,然后在室温下干燥过夜,制作层析介质上的反应部位。

[0117] 2. 标记物溶液的制备

[0118] 在 0.5mL 胶体金悬浮液(田中贵金属工业株式会社制造,平均粒径 60nm)中加入 0.1mL 用 HEPES 缓冲液 (pH8.5) 稀释为 0.02mg/mL 浓度的抗猪多克隆抗体,所得混合物在室温下静置 10 分钟。接着加入 0.1mL CE510 (JSR 公司)和 0.05mL 溶解于磷酸钾溶液 (pH7.5) 的 1% 聚乙二醇,充分搅拌后在室温下静置 10 分钟。以 8000×g 离心 15 分钟。除去上清后,加入 0.1mL 含有 1% 重量牛血清白蛋白的缓冲液 (pH7.4),制成标记物溶液。

[0119] 3. 层析介质的制备

[0120] 将上述制备的标记物溶液均匀地施加于玻璃纤维板上,然后用真空干燥机干燥,作为检测试剂保持部件。接着,在由背板形成的基材上贴合如上制备的层析介质、检测试剂保持部件、作为添加试样的部分使用的样品板,以及用于吸收所展开的试样和不溶性载体的吸收板。最后粘贴层压密封贴,用切裁机切裁成 5mm 的宽度,作为层析介质。

[0121] 4. 提取展开液的制备

[0122] 在 HEPES 缓冲液 (pH8.0) 中加入 0.2% 脱脂乳、0.15% Tween 20、0.05M 氯化钠,进一步加入作为防腐剂的叠氮化钠至浓度为 0.1%,之后混合。

[0123] 5. 试样的制备

[0124] 对于 0.5mL 上述提取展开液,加入 0.1–0.2g 加工猪肉或来自猪以外的动物种类的加工肉,用手振荡 30 秒。

[0125] 6. 测定

[0126] 使用上述制备的层析介质,按照以下方法测定试样中是否存在猪肉。以上述制备的含有猪肉的试样作为阳性检体,以上述制备的含有来自猪以外的动物种类的肉的试样作为阴性检体,将层析介质的一端浸渍于各试样溶液中。在确认胶体金由玻璃纤维制板中流出后,从溶液中取出浸入的层析介质,放置于水平台上,10–15 分钟后目视判定。

[0127] 使用上述制备的层析装置(检查试剂盒)来检查试验食品中是否有猪肉,其方法如图 1 所示。检查按以下顺序 1–5 进行。

[0128] 1. 将 0.1–0.2g 左右试验食品添加到加入了 0.5mL 上述提取展开液的试管中。

[0129] 2. 将试管用塞子盖紧,用手将试管振荡约 30 秒左右。

[0130] 3. 打开塞子,将检查试剂盒的试样添加部的一端浸于溶液中,确认红色溶液在检查试剂盒上展开。

[0131] 4. 确认红色溶液上升后取出检查试剂盒,放置于水平的场所。

[0132] 5. 10–15 分钟后确认是否有条带出现。

[0133] 以下说明本发明的试验例,但它们只是一些例子,本发明并不限于这些试验例。

[0134] 在试样滴加后 10 分钟时进行目视判定,将在检测部处显示有红线的试样判定为“+”,将可强烈(浓色)地、更清楚地显示出红线的试样判定为“++”,将极为强烈地显示出红

线的试样判定为“+++”，将未显示出红线的试样判定为“-”，显示出较弱（浅色）的红线的试样判定为（±）。

[0135] [试验例 1]

[0136] 作为试验加工食品，对牛肉中所含的猪肉的比例（猪肉 / 牛肉）为 0% 重量、0.1% 重量、0.5% 重量、1% 重量、5% 重量的各情形进行评价，结果如“表 1”所示。

[0137] 在制造批次 No. 1-3 中，使用从生猪肉中得到的提取物（蛋白质）对兔进行免疫所得的多克隆抗体作为检测试剂进行评价。

[0138] 结果显示，并未发生非特异性反应（假阳性），可以检测出牛肉中所含的 0.1% 重量以上的猪肉。在该试验例中并未发生制造批次之间的差异和重复试验的偏差。

[0139] 比较例是将生猪肉进行加热处理，将得到的提取物（蛋白质）对兔进行免疫，使用所得多克隆抗体作为检测试剂，与试验例进行同样的检测。

[0140] 结果发生了非特异性反应（假阳性）。不仅检测出了牛肉，猪肉特异性也很低。

[0141] [表 1]

[0142] 加工肉（加热食品）中的猪肉检测

		%重量（猪肉/牛肉）				
制造批次 No.	N=3	0	0.1%	0.5%	1%	5%
1	1	-	+	++	+++	+++
	2	-	+	++	+++	+++
	3	-	+	++	+++	+++
2	1	-	+	++	+++	+++
	2	-	+	++	+++	+++
	3	-	+	++	+++	+++
3	1	-	+	++	+++	+++
	2	-	+	++	+++	+++
	3	-	+	++	+++	+++
比较例	1	+	+	++	+++	+++
	2	+	+	++	+++	+++
	3	+	+	++	+++	+++

[0144]

[0145] [试验例 2]

[0146] 作为试验加工食品，对鸡肉中所含的猪肉的比例（猪肉 / 鸡肉）为 0% 重量、0.25% 重量、0.5% 重量、1% 重量、5% 重量的各情形进行评价，结果如表 2 所示。

[0147] 在制造批次 No. 1-3 中，使用由生猪肉得到的提取物（蛋白质）对兔进行免疫所得多克隆抗体作为检测试剂进行评价。

[0148] 结果显示,并未发生非特异性反应(假阳性),可以检测出鸡肉中所含的 0.25% 重量以上的猪肉。在该试验例中并未发生制造批次之间的差异和重复试验的偏差。

[0149] [表 2]

制造批次 No.	N=3	%重量 (猪肉/鸡肉)				
		0	0.25%	0.5%	1%	5%
1	1	-	+	++	++	+++
	2	-	+	++	++	+++
	3	-	+	++	++	+++
2	1	-	+	++	++	+++
	2	-	+	++	++	+++
	3	-	+	++	++	+++
3	1	-	+	++	++	+++
	2	-	+	++	++	+++
	3	-	+	++	++	+++

[0151]

[0152] [试验例 3]

[0153] 使用本发明的检测试剂盒,以来自猪肉、牛肉、鸡肉、羊肉、大豆的各种加热的单一食品(100%)的提取液作为检测试样,进行测定评价。结果如表 3 所示。

[0154] 结果显示,并未检测出由牛肉、鸡肉、羊肉、大豆中提取的蛋白质,只检测出来自猪肉的蛋白质。该结果表明猪肉的特异性明显。在该试验例中并未发生制造批次之间的差异和重复试验的偏差。

[0155] [表 3]

制造批次 No.	N=3	猪肉	牛肉	鸡肉	羊肉	大豆
1	1	+++	-	-	-	-
	2	+++	-	-	-	-
	3	+++	-	-	-	-
2	1	+++	-	-	-	-
	2	+++	-	-	-	-
	3	+++	-	-	-	-
3	1	+++	-	-	-	-
	2	+++	-	-	-	-
	3	+++	-	-	-	-

[0157] [试验例 4]

[0158] < 本发明的检测试剂盒(免疫层析法)与 PCR 法的比较 >

[0159] 使用本发明的检测试剂盒,以来自市售的加热食品类的提取物作为检测试样,对该加热食品类中所含的材料标识(猪肉、牛肉或鸡肉)进行判定评价。另外,利用遗传学方法中已知的 PCR 法代替本发明的检测试剂盒,同样地使用来自该加热食品类的提取物作为检测试样,进行判定评价。该结果如表 4 所示。

[0160] 结果,利用免疫层析法的本发明的检测试剂盒的结果与 PCR 法得到的检测结果大致相同。在两种方法中均检测出在标签上标识了猪肉的食品。未检测出来自牛肉、鸡肉提取的蛋白质,只检测出来自猪肉的蛋白质。该结果表明猪肉的特异性明显。由该结果可见,利用免疫层析法的本发明的检测试剂盒的结果是:可以特异性地检测出加热食品类中所含的猪肉,并且其精度不输于被认为特异性高、高性能的 PCR 法。

[0161] [表 4]

[0162]	食品	材料标识	制造国	PCR 数据	本发明试剂盒数据
	咖喱牛肉	牛肉	日本	-	-
	咖喱鸡肉	鸡肉	日本	-	-
	阿根廷牛肉饼	牛肉	菲律宾	-	-
	阿根廷鸡肉	鸡肉	菲律宾	-	-
	阿根廷玉米牛肉	牛肉	菲律宾	-	-
	酱汁肉	鸡肉	菲律宾	-	-
	玉米牛肉	牛肉	中国	-	-
	猪肉午餐肉	猪肉	中国	+	+
	咖喱玉米牛肉	牛肉	中国	-	-

[0163] 产业实用性

[0164] 本发明的检测试剂盒基于免疫层析法。因此,通过使用固定于不溶性载体上的本发明抗原、抗体,就可以在适用免疫学测定法的领域中广泛使用。本发明可以简便且迅速地、低成本地、特异性地检测加热加工食品中是否有猪肉。因此,对于猪肉可引发变态反应的患者、或者在嗜好上或饮食文化上不食用猪肉的一般消费者们,本发明可对这些问题的解决作出贡献。

[0165] 与 PCR 法或 ELISA 法比较,本发明的免疫层析检测法可以简便、迅速且低成本地实施,因此产业实用性大。

[0166] 附图标记说明

[0167] 1 试验食品

[0168] 2 提取展开液

[0169] 3 试管

[0170] 4 盖子

[0171] 5 检测片

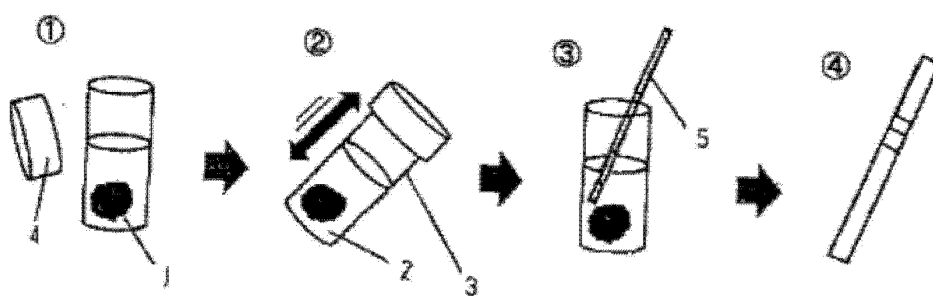


图 1

专利名称(译)	加工食品中的猪肉的检测法及其检测试剂盒		
公开(公告)号	CN102687013A	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	CN201180004959.7	申请日	2011-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
[标]发明人	榊原雄広 首藤达也 岩本久彦		
发明人	榊原雄広 首藤达也 岩本久彦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/12 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54386 G01N33/6854 C07K16/18		
代理人(译)	刘华联		
优先权	2010034120 2010-02-18 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种作为检测抗体使用的多克隆抗体的制备方法，该多克隆抗体适用于特异性地、高性能且高灵敏度地通过免疫测定法对加热加工食品中猪肉的进行检测，不会引发非特异性反应。本发明还提供了一种使用该多克隆抗体进行简便的、高精度的检测法以及用于该检测方法的检测试剂盒。利用免疫层析法来检测试样中的检测对象物时，在一处或两处地方使用可特异性识别加热处理的猪肉中所含的23kD（分子量23,000）附近的蛋白质的多克隆抗体作为检测抗体，检测加热加工食品中来自猪肉的蛋白质。

