



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102707064 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201110196761. 5

审查员 赵晓明

(22) 申请日 2011. 07. 14

(73) 专利权人 集美大学

地址 361000 福建省厦门市集美区银江路  
185 号

(72) 发明人 蔡秋凤 曹敏杰 刘光明 苏文金

(74) 专利代理机构 厦门市新华专利商标代理有  
限公司 35203

代理人 李宁

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102043055 A, 2011. 05. 04,

US 2006140969 A1, 2006. 06. 29,

CN 101250583 A, 2008. 08. 27,

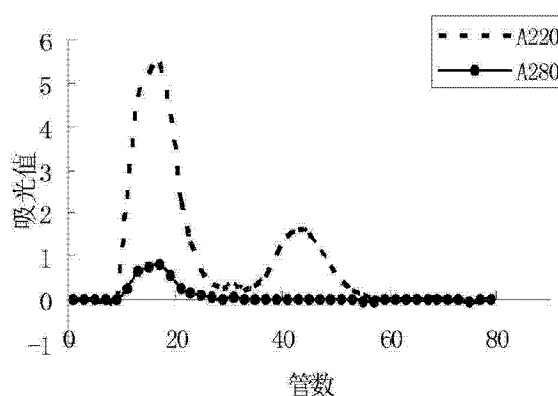
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,其特征包括以下步骤:1) 淡水鱼鲢鱼小清蛋白标准品的制备;2) 抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的制备;3) 抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的生物素标记;4) 鱼类小清蛋白竞争性 ELISA 检测方法的建立;5) 待检样品中鱼类小清蛋白的检测。本发明能实现对食品中痕量鱼类小清蛋白的检出。



1. 一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,其特征包括以下步骤:

1) 淡水鱼鲢鱼小清蛋白标准品的制备:将鲢鱼白色肉于 Tris-HCl 缓冲液中组织捣碎,离心得到的上清用硫酸铵盐析后,采用离子交换柱过柱收集未吸附部分进行浓缩,然后利用凝胶过滤柱层析,得到纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品;

2) 抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的制备:将纯化的鲢鱼小清蛋白免疫 BALB/c 小鼠,经细胞融合后,筛选获得能分泌抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的细胞株,经腹水诱生法获得大量的单克隆抗体;并通过 Protein G Sepharose 亲和柱进行纯化;

3) 抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的生物素标记:将单克隆抗体经 HiTrap 脱盐柱处理,将生物素和经 HiTrap 脱盐柱处理后的单克隆抗体混匀,于冰上孵育得到生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体;

4) 鱼类小清蛋白竞争性 ELISA 检测方法的建立:将步骤 1) 纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品,配成浓度为 200ng/孔,进行 96 孔板包被;同时采用 0.625 ~ 10240 ng/mL 浓度范围内的步骤 1) 纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品为样品分别与等体积步骤 3) 制备的生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体同时加入到 96 孔板包被孔中孵育;以辣根过氧化物酶标记的亲和素为二抗进行检测,以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺作为显色剂,用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止后,测定吸光值;并绘制标准曲线;

5) 待检样品中鱼类小清蛋白的检测:利用步骤 1) 的方法制备待检样品的标准品,并同样配成抗原浓度为 200 ng/孔,然后进行 96 孔板包被,用 TBST 洗涤 5 次后,以 5% 脱脂奶封闭,再用 TBST 洗涤 5 次;将待检样品和等体积的步骤 3) 生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体于 37 °C 孵育 1 h;TBST 洗涤 5 次后,以辣根过氧化物酶标记的亲和素为二抗进行检测,TBST 洗涤 5 次后,以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 作为显色剂,用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止后,在 96 孔板酶标仪测定 450 nm 的吸光值,将待检样品的 OD 值换算成  $B/B_0$ ,其中  $B$  为待检标准品各浓度在 450 nm 的 OD 值, $B_0$  是空白对照的 OD 值根据步骤 4) 绘制的标准曲线即可计算样品中小清蛋白的含量,当其测定的 OD 值位于标准曲线线性区域内,即为待检样品中有小清蛋白检出,反之即为未检出。

2. 如权利要求 1 所述的一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,其特征包括所述的步骤 1) 具体为:将鲢鱼白色肉于 4 倍体积 pH 7.5,20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中组织捣碎,经离心得到的上清用 60 ~ 100 % 饱和度的硫酸铵盐析;盐析后的沉淀再次溶于 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中透析,透析后的样品上样于预先用 pH 7.5,20 mmol/L Tris-HCl 平衡的 DEAE-Sepharose 离子交换柱,收集未吸附部分进行浓缩后,上样于 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱层析,纯化后即得到鲢鱼小清蛋白。

3. 如权利要求 2 所述的一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,其特征包括:所述的 DEAE-Sepharose 离子交换柱洗脱时的洗脱液为 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,流速 1mL/min。

4. 如权利要求 1 所述的一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,其特征包括所述的步骤 3) 具体为:将纯化的单克隆抗体经 HiTrap 脱盐柱处理,其中采用含 NaCl 的 PBS 溶液作为流洗液;临用前配制 10 mmol/L 生物素溶液;然后以摩尔比为 100:1 的比例将生物素和经 HiTrap 脱盐柱处理后的单克隆抗体混匀,于冰上孵育 2 h 得到生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体;并再次通过 HiTrap 脱盐柱去除未结合的生物素。

5. 如权利要求 4 所述的一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,其特征在于:所述的 PBS 的配方为含有 0.15 mol/L NaCl 的 pH 7.2 的 0.1 mol/L PBS,所述的生物素溶液采用超纯水配成 10 mM 的生物素溶液。

6. 如权利要求 1 所述的一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,其特征在于所述的步骤 4)具体为:利用所述的步骤 1)纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品,配成浓度为 200ng/孔进行 96 孔板包被,然后用 TBST 洗涤 5 次后,以 5 % 脱脂奶封闭,再用 TBST 洗涤 5 次;然后配制 6-10 个浓度在 0.625~10240 ng/mL 范围内的步骤 1)所制备的鲢鱼小清蛋白标准品为样品分别与等体积步骤 2)所制备的生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体,于 37 °C 加入到 96 孔板包被孔中孵育 1 h;然后用 TBST 洗涤 5 次后,以辣根过氧化物酶标记的亲合素为二抗进行检测;再使用 TBST 洗涤 5 次后,以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺作为显色剂,用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止后,在 96 孔板酶标仪测定 450 nm 的吸光值;将标准品各浓度的 OD 值换算成  $B/B_0$ :其中  $B$  为标准品各浓度在 450 nm 的 OD 值, $B_0$  是空白对照的 OD 值;然后以  $B/B_0$  为纵坐标,相应的标准品各浓度的对数值为横坐标即可绘制标准曲线。

7. 如权利要求 6 所述的一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,其特征在于:所述的 TBST 由 20 mmol/L Tris-HCl;pH 8.0,0.145 mol/L NaCl;0.05 % Tween-20 配制而成。

## 一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,特别涉及淡水鱼小清蛋白的特殊制备工艺及检测方法。

### 背景技术

[0002] 食物过敏(food allergy)已成为全世界重要的健康问题。尽管各种食物都可能引发人体产生过敏反应,目前公认的“主要致敏食物”是指那些能引发机体产生严重不良反应的八大类食物,包括牛奶、鸡蛋、花生、坚果、甲壳类动物、鱼类、小麦和大豆。虽然现代生物及医学相关技术日新月异,但目前应对食物过敏最有效的预防方法仍是严格避免摄入过敏原。因此,对于过敏患者来说,了解食物的确切组分,特别是潜在的致敏成分或污染物尤其重要。

[0003] 为了保护消费者,欧盟、美国、加拿大、英国等国家颁布了一系列关于规定食物组分标签方面的法案。我国目前虽然还没有相关法规出台,但在奥运会期间为了保证运动员和裁判员等的健康和饮食安全,奥运组委会通过了一项奥运期间特殊的管理规章,即要求对供应的食品中存在的过敏原进行明确标识。该临时规章的设立表明,尽管现在在全国范围推行过敏原标识的法规时机尚未成熟,但在食品中明确标识过敏原的重要性已具有一定的认知基础,国内相关法规的出台也指日可待。

[0004] 目前,以蛋白质或核酸为检测对象包括双抗夹心 ELISA、PCR、SDS-PAGE 等方法广泛应用于多种食物过敏原的检测,如甲壳类动物、软体动物、花生、鸡蛋、大豆、牛奶等。但对鱼类过敏原的分析方法仍较为缺乏,尚无有效的对小清蛋白进行定量检测的商品化 ELISA 试剂盒。另外,由于过敏原的免疫学特性不仅和来源的种属有关,不同的人群由于体质的区别,对同一过敏原的反应也有较大的差异,因此,很有必要根据我国水产品食用情况及人群体质,开发适用于本国人群的过敏原检测试剂盒。

[0005] 我国是鱼类特别是淡水鱼类生产和消费大国。根据农业部渔业局 2010 年统计数据,2009 年全国水产品产量约为 5116 万吨,其中,鱼类的产量就达到 2990 万吨,为水产品总产量的 58.4%,淡水养殖鱼类(1957 万吨)更是占了养殖鱼类(2725 万吨)总产量的 71.8%。鱼类的主要过敏原为小清蛋白(parvalbumin, PV)。研究表明,小清蛋白在不同鱼类中的同源性很高,因此,以小清蛋白为检测对象,建立对淡水鱼过敏原的灵敏检测方法在我国具有重要的应用价值。但以往对小清蛋白的主要从性质上进行研究,纯化小清蛋白的得率低,或者采用加热的方式,未能得到天然的小清蛋白,均不利于后期检测试剂盒的开发。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供了一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法;本发明能实现对食品中痕量鱼类小清蛋白的检出。

[0007] 为了达成上述目的,本发明的解决方案是:

[0008] 一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 淡水鱼鲢鱼小清蛋白标准品的制备:将鲢鱼白色肉于 Tris-HCl 缓冲液中组织捣碎,离心得到的上清用硫酸铵盐析后,采用离子交换柱过柱收集未吸附部分进行浓缩,然后利用凝胶过滤柱层析后得到纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品;

[0010] 2) 抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的制备:将纯化的鲢鱼小清蛋白免疫 BALB/c 小鼠,经细胞融合后,筛选获得能分泌抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的细胞株,经腹水诱生法获得大量的单克隆抗体;并通过 Protein G Sepharose 亲和柱进行纯化;

[0011] 3) 抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的生物素标记:将单克隆抗体经 HiTrap 脱盐柱处理,将生物素和经 HiTrap 脱盐柱处理后的单克隆抗体混匀,于冰上孵育得到生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体;

[0012] 4) 鱼类小清蛋白竞争性 ELISA 检测方法的建立:将步骤 1) 纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品,配成浓度为 200ng/孔,进行 96 孔板包被;同时采用 0.625~10240 ng/mL 浓度范围内的步骤 1) 纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品为样品分别与等体积步骤 3) 制备的生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体同时加入到 96 孔板包被孔中孵育;以辣根过氧化物酶标记的亲合素(Sigma)为二抗进行检测,即抗体的抗体,其主要作用是检测抗体的存在,放大一抗(生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体)的信号。以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine,TMB)作为显色剂,用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止后,测定吸光值;并绘制标准曲线。

[0013] 5) 待检样品中鱼类小清蛋白的检测:待检样品按照步骤 1) 的方法进行处理并进行稀释,稀释的目的是使待检样品中小清蛋白的浓度进行准确定量,当其测定的 OD 值位于标准曲线线性区域内;即为待检样品中有小清蛋白检出,反之即为未检出。本发明的检测方法是基于竞争性 ELISA 的实验方法,以高质量的鲢鱼小清蛋白为抗原为基础,联合竞争性 ELISA 法的优势,使本发明的检测灵敏度进一步提高。

[0014] 所述的步骤 1) 具体为:将鲢鱼白色肉于 4 倍体积 pH 7.5,20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中组织捣碎,经离心得到的上清用 60~100 % 饱和度的硫酸铵盐析;盐析后的沉淀再次溶于 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中透析,透析后的样品上样于预先用 pH 7.5,20 mmol/L Tris-HCl 平衡的 DEAE-Sepharose 离子交换柱(Amersham Biosciences),收集未吸附部分进行浓缩后,上样于 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱(Amersham Biosciences)层析,纯化后即得到鲢鱼小清蛋白标准品。

[0015] 所述的步骤 1) 中,DEAE-Sepharose 离子交换柱洗脱时,洗脱液为 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,流速 1mL/min,由于目的蛋白与离子交换树脂存在极微弱的吸附特性,根据这一特性控制流洗时间可高效除去杂蛋白的干扰,并使目的蛋白得到浓缩。

[0016] 所述的步骤 3) 具体为:将纯化的单克隆抗体经 HiTrap 脱盐柱处理,其中采用含 NaCl 的 PBS 作为流洗液;然后以摩尔比为 100:1 的比例将生物素和经 HiTrap 脱盐柱处理后的单克隆抗体混匀,于冰上孵育 2 h 得到生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体;并再次通过 HiTrap 脱盐柱去除未结合的生物素;本过程采用生物素标记的抗体对于本发明所制备的淡水鱼小清蛋白的检测灵敏度非常重要,因为生物素与亲和素的特异性相互作用可使检测信号有效放大,从而大大提高检测体系的灵敏度。

[0017] 所述的 PBS 的配方为含有 0.15 mol/L NaCl 的 pH 7.2 的 0.1 mol/L PBS,所述的生物素溶液采用超纯水配成 10 mM 的生物素溶液。

[0018] 所述的步骤4)具体为:利用所述的步骤1)纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品,配成浓度为200ng/孔进行96孔板包被,然后用TBST洗涤5次后,以5%脱脂奶封闭,再用TBST洗涤5次;然后配制6-10个浓度在0.625~10240 ng/mL范围内的步骤1)所制备的鲢鱼小清蛋白标准品为样品分别与等体积步骤3)所制备的生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体,于37℃加入到96孔板包被孔中孵育1h;然后用TBST洗涤5次后,以辣根过氧化物酶标记的亲合素为二抗进行检测;再使用TBST洗涤5次后,以3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine,TMB)作为显色剂,用2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止后,在96孔板酶标仪测定450 nm的吸光值;将标准品各浓度的OD值换算成 $B/B_0$ :其中B为标准品各浓度在450 nm的OD值, $B_0$ 是空白对照的OD值;然后以 $B/B_0$ 为纵坐标,相应的标准品各浓度的对数值为横坐标即可绘制标准曲线。

[0019] 所述的TBST由20 mmol/L Tris-HCl;pH 8.0,0.145 mol/L NaCl;0.05% Tween-20配制而成。

[0020] 本发明的有益效果为:在鲢鱼小清蛋白的纯化过程中,通过控制离子交换柱层析的上样和流洗条件,使目的蛋白与杂蛋白得到很好的分离,保证了小清蛋白的高得率和高纯度。此外,在竞争性ELISA法中引入生物素亲和素系统,使检测的灵敏度达到0.8 ng/mL,即0.04 mg/kg食物。建立的竞争性ELISA法还实现了对样品中小清蛋白的定量检测。建立的竞争性ELISA法的组内误差4.4%,组间误差8.4%,表明重复性很好。

## 附图说明

[0021] 图1是本发明纯化鲢鱼小清蛋白的关键工艺,即样品经DEAE-Sepharose离子交换柱分离后的样品在280nm和220nm下的吸光值曲线图;

[0022] 图2是本发明鲢鱼小清蛋白纯化工艺过程的SDS-PAGE分析;

[0023] M. 蛋白分子量标准;1. 鲢鱼肌肉小清蛋白粗提物;2. 硫酸铵盐析后的样品;3. DEAE-Sepharose柱层析后的样品;4. Sephacryl S-200柱层析后的样品;

[0024] 图3是本发明实施例的竞争性ELISA法检测小清蛋白的标准曲线;

[0025] 表1是用建立的竞争性ELISA法检测不同鱼类制品中小清蛋白的含量表。

## 具体实施方式

[0026] 实施例1

[0027] 本发明的具体实施方式如下:

[0028] 1):淡水鱼鲢鱼小清蛋白标准品的制备:

[0029] (1) 小清蛋白粗提物的制备:将20 g鲢鱼白色肉于4倍体积20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)缓冲液中组织捣碎,8000 g离心30 min后即得小清蛋白粗提物。鲢鱼肌肉小清蛋白粗提物SDS-PAGE分析结果见图2所示。

[0030] (2) 硫酸铵盐析:将小清蛋白粗提物86 mL进行60%硫酸铵盐析,即将31.05 g硫酸铵加入粗提物中搅拌60 min后,静置2 h,于15000 g离心30 min。取上清95 mL,加入26.51 g硫酸铵搅拌60 min后,静置2 h,于15000 g离心30 min。取沉淀溶解于10 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),并于该缓冲液中透析16 h。

[0031] (3) 离子交换柱层析:将透析后的样品上样于预先用20 mmol/L Tris-HCl (pH

7.5)平衡的DEAE-Sephacryl 离子交换柱,DEAE-Sephacryl 离子交换柱洗脱时,洗脱液为 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,流速 1mL/min,由于目的蛋白与离子交换树脂存在极微弱的吸附特性,根据这一特性控制流洗时间可高效除去杂蛋白的干扰,使目的蛋白与杂蛋白得到很好的分离,并使目的蛋白得到浓缩,保证了小清蛋白的高得率和高纯度。并测定纯化后的鲢鱼小清蛋白在 280 nm 和 220 nm 时的吸光值。由于小清蛋白在 280 nm 几乎没有吸光值,在 220 nm 具有强的吸光值,如图 1 所示,在未吸附部分 35 ~ 55 管之间有较纯的目的蛋白,收集该部分样品进行超滤浓缩。

[0032] (4) 凝胶过滤柱层析:将浓缩后的样品上样于 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱层析,即得纯化的鲢鱼小清蛋白。纯化过程中监测样品在 280 nm 和 220 nm 吸光值,并通过 SDS-PAGE 分析各部分蛋白组成,如图 2 所示,硫酸铵盐析可有效去除 66 kDa 以上的杂蛋白,DEAE-Sephacryl 可有效去除大部分杂蛋白,最后经过凝胶过滤柱层析即能得到纯度很高的鲢鱼小清蛋白。

[0033] 2)抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的制备:选择 5 只雌性、6 ~ 8 周龄的 BALB/c 小鼠,将步骤 1) 纯化的鲢鱼小清蛋白与等体积的弗氏完全佐剂(Sigma)混匀,进行腹腔注射,剂量为每只小鼠 100  $\mu$ g 抗原;之后每隔 2 周以相同剂量的抗原进行腹腔注射,加强免疫;在细胞融合前 4 天,选抗体滴度最高的小鼠进行强化免疫 1 次。

[0034] 分离强化免疫的小鼠的脾脏淋巴细胞,将其与 SP2/0 骨髓瘤细胞(中国科学院细胞库)在聚乙二醇(Sigma)的介导下进行融合;将融合后的细胞在含有 20 % 胎牛血清(Invitrogen)和 1 % HAT (Sigma)的 RPMI 1640 (Invitrogen)培养基上,于 37 °C 进行培养;杂交瘤细胞通过 ELISA 法进行筛选。筛选出的阳性细胞采用有限稀释法进行克隆化培养,该操作重复 3 次以保证筛选出能分泌抗小清蛋白抗体的单克隆阳性细胞株,筛选的阳性细胞株保存于液氮中。

[0035] 筛选的能分泌抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的阳性细胞株进行扩大培养,同时以液体石蜡对 BALB/c 小鼠进行腹腔注射(剂量 0.5 ml/只),以敏化小鼠;1 ~ 2 周后将杂交瘤细胞对敏化的小鼠进行腹腔注射( $10^6$  个/只);在腹水尽可能多,小鼠濒临死亡前(1 ~ 2 周),用注射器收获腹水;将腹水混合后,在 56 °C 热灭活 45 min,1500 g 离心 10 min 取上清即得抗小清蛋白单克隆抗体。

[0036] 将得到的单克隆抗体离心过滤,与平衡缓冲液(20 mmol/L 的 PBS, pH 7.0)混合后,上样于预先用 20 mmol/L 的 PBS (pH 7.0)平衡的 Protein G Sepharose (Amersham Biosciences);用平衡缓冲液流洗至 A280 nm 为基线后,以 0.1 mol/L glycine-HCl (pH 2.7)进行洗脱至 A280 nm 为基线;收集各部分样品进行 SDS-PAGE 电泳分析,即可得到纯化的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体。

[0037] 3)抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的生物素标记:将纯化的单克隆抗体经 HiTrap 脱盐柱处理,使抗体缓冲液置换成含有 0.15 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.2)。临用前用超纯化配制 10 mmol/L 生物素溶液。

[0038] 以 100:1(摩尔比)的比例将生物素和经 HiTrap 脱盐柱处理后的单克隆抗体混匀,于冰上孵育 2 h。最后,再通过 HiTrap 脱盐柱去除未结合的生物素。本过程采用生物素标记的抗体对于本发明所制备的淡水鱼小清蛋白的检测灵敏度非常重要,因为生物素与亲和素的特异性相互作用可使检测信号有效放大,从而大大提高检测体系的灵敏度。

[0039] 4) 鱼类小清蛋白竞争性 ELISA 检测方法的建立

[0040] 利用所述的步骤 1) 纯化后的鲢鱼小清蛋白标准品,用超纯水配成浓度为 200ng/孔进行 96 孔板包被,用 TBST (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.145 mol/L NaCl, 0.05 % Tween-20) 洗涤 5 次后,以 5% 脱脂奶封闭,再用 TBST 洗涤 5 次。然后配制 8 个浓度分别为 0.625、2.5、10、40、160、640、2560 和 10240 ng/mL 的鲢鱼小清蛋白标准品作为样品分别与等体积步骤 3) 所制备的生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体,于 37 °C 孵育 1 h。TBST 洗涤 5 次后,以辣根过氧化物酶标记的亲合素为二抗进行检测,即抗体的抗体,其主要作用是检测抗体的存在,放大一抗(生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体)的信号。TBST 洗涤 5 次后,以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 作为显色剂,用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止后,在 96 孔板酶标仪测定 450 nm 的吸光值:将标准品各浓度的 OD 值换算成  $B/B_0$ 。其中  $B$  为标准品各浓度在 450 nm 的 OD 值, $B_0$  是空白对照的 OD 值。以  $B/B_0$  为纵坐标,相应的各标准品浓度的对数值为横坐标即可绘制标准曲线,如图 3 所示。

[0041] 5) 待检样品中鱼类小清蛋白的检测

[0042] 利用步骤 1) 的方法制备待检样品的标准品,并同样配成抗原浓度为 200 ng/孔,然后进行 96 孔板包被,用 TBST (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.145 mol/L NaCl, 0.05 % Tween-20) 洗涤 5 次后,以 5 % 脱脂奶封闭,再用 TBST 洗涤 5 次。将待检样品和等体积的步骤 3) 生物素标记的抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体于 37 °C 孵育 1 h;TBST 洗涤 5 次后,以辣根过氧化物酶标记的亲合素为二抗进行检测。TBST 洗涤 5 次后,以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 作为显色剂,用 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止后,在 96 孔板酶标仪测定 450 nm 的吸光值。将待检样品的 OD 值换算成  $B/B_0$ 。其中  $B$  为待检标准品各浓度在 450 nm 的 OD 值, $B_0$  是空白对照的 OD 值。根据步骤 4) 绘制的标准曲线即可计算样品中小清蛋白的含量,本实施例作了如表 1 所示的 10 个待检样品,如表 1 所示。

[0043] 为了对待检样品中小清蛋白的浓度进行准确定量,本实施例对待检样品进行至少 10 倍的稀释,使其测定的 OD 值位于标准曲线线性区域内。从表 1 可以看出,建立的竞争性 ELISA 法可实现对鱼糜制品中微量小清蛋白的检出,并能用于部分判断食物的制备原料。如鱼豆腐中未能检出小清蛋白的存在,推测该制品主要由豆制品制作而成。另外,不同的加工方式也会影响过敏原的免疫活性。如在鱼露中未能检出小清蛋白,表明鱼露生产过程中的酶解作用能有效除去过敏原的免疫活性。另外,表 1 中的鱼松和肉松是来源于同一生产作坊,结果表明,同一作坊中的猪肉松未收到鱼松污染,验证了本方法的高灵敏度。

[0044] 本实施例在竞争性 ELISA 法中引入生物素亲和素系统,使检测的灵敏度达到 0.8 ng/mL,即 0.04 mg/kg 食物。建立的竞争性 ELISA 法还实现了对样品中小清蛋白的定量检测。建立的竞争性 ELISA 法的组内误差 4.4 %,组间误差 8.4 %,表明重复性很好。

[0045] 表 1

[0046]

商品化食物	小清蛋白含量 (mg/kg)
炸武昌鱼	80.8±10.8
鲫鱼罐头	40.6±3.6
鲢鱼罐头	51.0±2.4
沙丁鱼罐头	0.1
鳕鱼丸	1.7±0.1
鲑鱼丸	1.5±0.1
鱼松	1.8±0.1
猪肉松	ND
鱼豆腐	ND
鱼露	ND

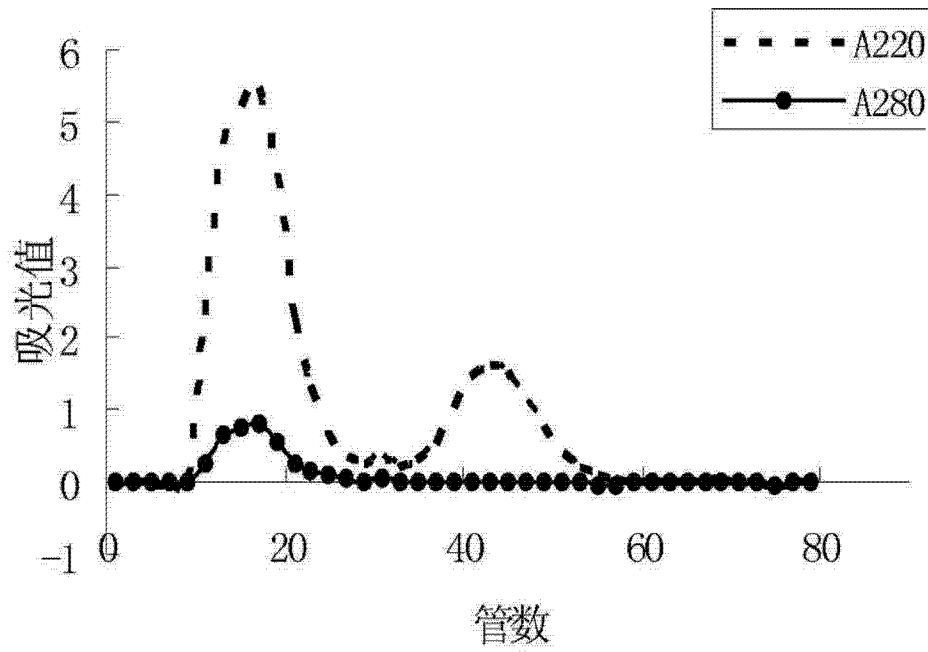


图 1

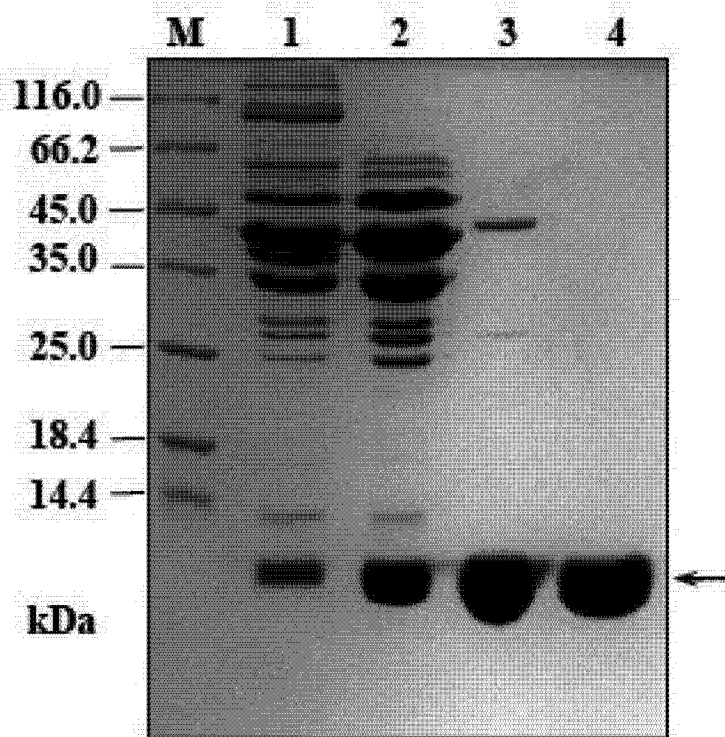


图 2

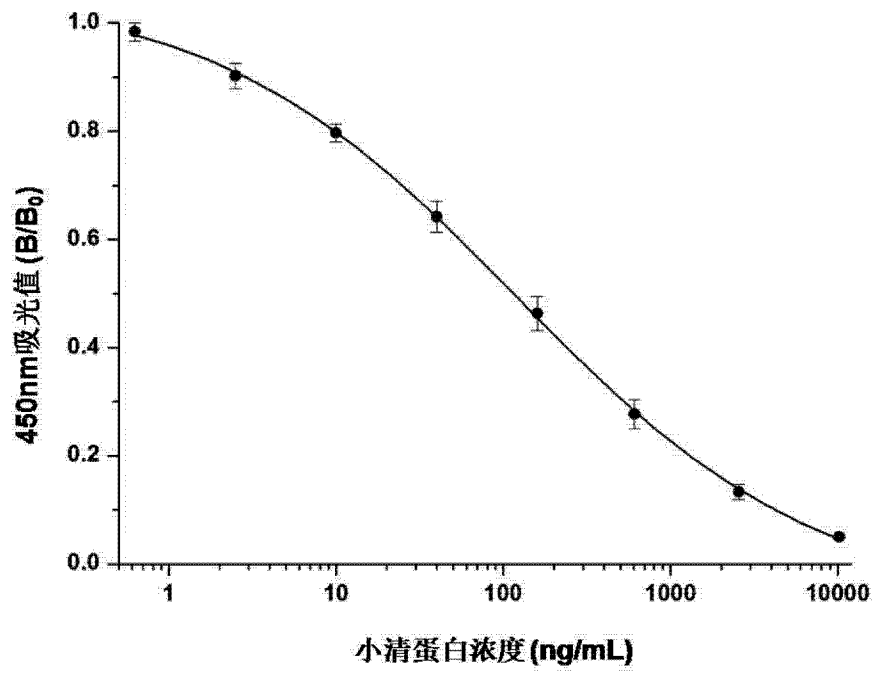


图 3

专利名称(译)	一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102707064B</a>	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	CN201110196761.5	申请日	2011-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	集美大学		
申请(专利权)人(译)	集美大学		
当前申请(专利权)人(译)	集美大学		
[标]发明人	蔡秋凤 曹敏杰 刘光明 苏文金		
发明人	蔡秋凤 曹敏杰 刘光明 苏文金		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
代理人(译)	李宁		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN102707064A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种能灵敏检测出淡水鱼主要过敏原小清蛋白的方法，其特征在于包括以下步骤：1)淡水鱼鲢鱼小清蛋白标准品的制备；2)抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的制备；3)抗鲢鱼小清蛋白单克隆抗体的生物素标记；4)鱼类小清蛋白竞争性ELISA检测方法的建立；5)待检样品中鱼类小清蛋白的检测。本发明能实现对食品中痕量鱼类小清蛋白的检出。

