

间接竞争ELISA法检测坚果类过敏原特异性研究

范建涛¹, 张爱琳^{1,2,*}, 姚尧¹, 张钰鑫¹, 苗颖^{1,2}

(1.天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300384;

2.天津市农副产品深加工技术工程中心, 天津 300384)

摘要:以腰果蛋白为过敏抗原,腰果蛋白致敏的阳性小鼠血清作为一抗,羊抗鼠IgE-HRP为二抗建立双抗体间接酶联免疫吸附实验(ELISA)体系,通过棋盘法确定腰果蛋白最佳反应条件工作浓度为15.92 μg/mL,最佳一抗稀释度均为1:400,最佳酶标二抗的稀释度为1:1000,腰果蛋白浓度为1.99 μg/mL。并用该方法分别对腰果、核桃、榛子、开心果、板栗、杏仁等六种坚果进行检测分析,未发现有交叉反应,本实验建立的间接竞争性ELISA诊断方法具有良好的敏感性和特异性,为坚果过敏性食品的监测及时而准确的诊断奠定了基础。

关键词:坚果,过敏原,ELISA,棋盘法

The specific detection research of nuts allergen with indirect-competitive ELISA

FAN Jian-tao¹, ZHANG Ai-lin^{1,2,*}, YAO Yao¹, ZHANG Yu-xin¹, MIAO Ying^{1,2}

(1.Tianjin Agricultural University College of Food Science and Biotechnology, Tianjin 300384, China;

2.Tianjin Engineering and Technology Center of Agricultural Products Processing, Tianjin 300384, China)

Abstract:The methods of the indirect competitive ELISA for determining allergen in nuts were developed by using the self-prepared positive mice serum as a resistance in Cashew protein sensitization. The immunoglobulin IgE-HRP for 2 resistance was adopted. Cashew protein was identified through checkerboard microdilution method, the optimal solution was 15.92 μg/mL, the equal dilution multiples of mice IgE and antibody-HRP were 400 and 1000, cashew protein concentration was 1.99 μg/mL. Using the method of cashew nuts and walnuts, hazelnuts, pistachios, chestnut, almond nuts, six test cross reaction in nuts analysis had not been found. The method for rapid detection to allergen about nuts was established firstly by using and sensitivity and reliability, accurately specificity.

Key words: nuts; allergens; ELISA; checker board microdilution methods

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0064-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.004

随着食品行业的加速发展,食品过敏的发病率和流行情况日益加剧,食品过敏性疾病已成为一个新兴的、公众性、全球性的健康问题^[1-2]。加之,食物过敏原的种类和来源急剧增加,与食物过敏直接相关的过敏性疾病亦趋于多样化、复杂化和严重化^[3],国外流行病学调查表明,约1%~2%的成人和5%~7%的儿童对一种或者几种食品过敏^[4],因此食物过敏已被视为一种严重的世界公共卫生问题^[5]。坚果类食品具有极高的营养价值及其独特的风味,作为疗效食品和休闲食品备受消费者的喜爱,但是坚果类食品过敏问题涉及食物过敏症的90%^[6],在食品标签上标明

过敏原的存在是避免过敏患者摄入潜在过敏原的最有效的途径。目前,ELISA酶联免疫分析检测技术是将免疫反应与现代检测手段相结合而建立的超微量测定技术,是以抗原与抗体的特异性、可逆性结合反应为基础的分析技术,在过敏原的检测中也有较广泛的应用^[7]。本研究通过建立间接ELISA法来检测核桃蛋白过敏原的最佳工作浓度、灵敏度与特异性,建立一种可靠的过敏原检测方法确保食品标签一致性,应用酶联免疫吸附实验测定坚果过敏蛋白及其特异性IgE抗体的方法,为坚果蛋白过敏的研究和诊断提供方法和技术参数^[8]。

收稿日期:2014-04-02

作者简介:范建涛(1992-),男,大学本科,研究方向:食品质量与安全,E-mail:630101458@qq.com。

* 通讯作者:张爱琳(1977-),女,博士,研究方向:食品安全与检测,E-mail:anlinye_zth@163.com。

基金项目:中国博士后基金面上项目(2013M541181);2014年大学生国家创新项目(201410061071);天津农学院大学生科技创新项目。

1 材料与方

1.1 材料与仪器

腰果、板栗、开心果、榛子、杏仁、核桃 均购自天津市物美超市,产地河北省;坚果各类过敏蛋白由天津农学院食品质量与安全实验室提供;BCA蛋白定量试剂盒 博士德生物;ECL化学发光显色液 上海西唐生物科技有限公司;HRP标记山羊抗人IgE抗体(进口) 艾美捷科技有限公司;坚果过敏病人阳性血清(7人混合) 天津市某医院。

超净工作台 苏净集团安泰公司;立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;酶标仪 赛默飞科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质含量的测定 解冻蛋白质样品之后用BCA蛋白定量试剂盒进行测定,参照操作说明进行,蛋白质样品分别稀释2、4、8倍。

1.2.2 过敏阳性小鼠血清制备 1:10稀释液配制:在超净工作台中用移液枪吸取100 μL 阳性小鼠血清加入900 μL 高压蒸汽灭菌过的磷酸盐缓冲液后混匀。1:100稀释液,1:200稀释液,1:400稀释液方法同1:10稀释液配制。

羊抗鼠IgE-HRP抗体:配制母液:在超净台下用移液枪吸取1 mL高压蒸汽灭菌过的PBST加入羊抗鼠IgE-HRP抗体后混匀,加入1 mL甘油后4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。各稀释液配制同上。

1.2.3 抗原、包被抗体及酶标二抗工作浓度的选择 采用棋盘法^[9]实验来筛选优化抗原、抗体及酶标二抗的最佳工作浓度。将稀释为1:100、1:200、1:400的小鼠血清分别加入96孔酶标板中,封闭好后4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温包被过夜。吸取去除包被液,每孔加入洗涤液(PBST)洗板3次。加入封闭液(PBST),200 μL /孔,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育2 h。去除封闭液,接着继续加入洗涤缓冲液(PBST)洗板3次。然后分别加入坚果蛋白母液及稀释为2倍、4倍、8倍的蛋白液,同时设PBS阴性对照,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育1 h。去掉蛋白液,再用洗涤缓冲液(PBST)洗板3次。将稀释为1:500,1:1000,1:2000的羊抗鼠IgE-HRP抗体,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育1 h。去除酶标二抗,再用洗涤缓冲液(PBST)洗板10次。加入底物OPD溶液(显色液),在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育30 min,

加入2 mol/L硫酸(终止液),50 μL /孔,终止反应,用酶标仪测定OD₄₉₂的值。每孔加液量均为:100 μL /孔。

1.2.4 间接ELISA法灵敏度的测定 根据上述建立的ELISA法,测定不同稀释度的坚果蛋白液的吸光度值。根据待测孔与对照孔的吸光度之比(P/N值)及OD₄₉₂来判断灵敏度,当P/N大于等于2.1时,为阳性;当P/N小于2.1时,为阴性。以最高的坚果蛋白液稀释度作为间接ELISA法的检测灵敏度。

1.2.5 间接ELISA的特异性检测 通过坚果脱脂、盐析、透析及过葡聚糖凝胶柱得到各种坚果(腰果、核桃、榛子、开心果、板栗、杏仁)的蛋白液为抗原,进行间接ELISA实验,检测OD₄₉₂值。实验中分别以开心果、板栗、杏仁、核桃为抗原,测出OD₄₉₂值,当P/N大于等于2.1时,为阳性;当P/N小于2.1时,为阴性。根据其各自OD₄₉₂值及P/N值以判断其特异性。

1.3 数据统计及图形分析

用Excel 2003统计分析所有数据,计算误差并制图。

2 结果与分析

2.1 腰果蛋白抗原最佳工作浓度的选择

抗原(腰果蛋白)的浓度和抗体(腰果蛋白致敏的小鼠血清、酶标二抗)的稀释度棋盘式组合采用间接ELISA法检测结果,如表1所示。

由表1可知,以不同浓度腰果蛋白液为抗原,不同稀释度的抗体(小鼠血清、酶标二抗)的ELISA法实验所检测得到的OD₄₉₂值及阴性对照组的OD₄₉₂值,其中P/N均大于2.1,均显阳性^[9]。抗原的浓度与稀释度的关系,随着蛋白液的浓度降低吸光度值减小。一抗(小鼠阳性血清)的稀释度越高其吸光度越高。酶标二抗的稀释度升高其吸光度降低。当包被腰果蛋白浓度为15.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包被一抗(小鼠血清)稀释度为1:400,酶标二抗的稀释度为1:1000时OD₄₉₂值为0.292,且此时的P/N值为4.29为最高,所以此双抗体间接法包被抗原最佳浓度为15.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最佳一抗稀释度为1:400,最佳酶标二抗的稀释度为1:1000。

2.2 蛋白质标准曲线的绘制

根据BCA蛋白定量试剂盒分析方法配制标准蛋白后测得的标准蛋白曲线如图1所示。

由图1可知,蛋白质含量的标准曲线方程为 $y=1.4053x-0.1777$, $R^2=0.9931$,方程呈线性相关。

表1 棋盘式组合双抗体夹心ELISA法检测坚果过敏结果分析

Table 1 The analysis of the Cashew nuts allergen with checker-board combination double sandwich ELISA

二抗稀释度		1:500				1:1000			1:2000		
一抗稀释度		1:100	1:200	1:400	1:100	1:200	1:400	1:100	1:200	1:400	
抗原浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	31.84	0.363±0.006	0.379±0.009	0.392±0.005	0.252±0.007	0.279±0.005	0.277±0.004	0.158±0.007	0.160±0.004	0.163±0.006	
	15.92	0.375±0.008	0.398±0.006	0.385±0.004	0.250±0.012	0.256±0.007	0.292±0.010	0.160±0.009	0.164±0.008	0.170±0.008	
	7.96	0.346±0.007	0.385±0.009	0.386±0.013	0.245±0.011	0.271±0.008	0.278±0.005	0.154±0.004	0.170±0.007	0.173±0.004	
	3.98	0.347±0.010	0.368±0.011	0.378±0.014	0.245±0.007	0.262±0.009	0.271±0.012	0.143±0.005	0.161±0.008	0.180±0.009	
	0	0.104±0.008	0.105±0.003	0.102±0.006	0.098±0.002	0.074±0.002	0.068±0.004	0.064±0.009	0.062±0.011	0.064±0.008	
P/N	31.84	3.49	3.61	3.84	2.57	3.77	4.07	2.44	2.58	2.55	
	15.92	3.61	3.79	3.77	2.55	3.46	4.29	2.50	2.65	2.66	
	7.96	3.33	3.67	3.78	2.50	3.66	4.09	2.41	2.74	2.70	
	3.98	3.34	3.50	3.71	2.50	3.54	3.98	2.23	2.60	2.81	

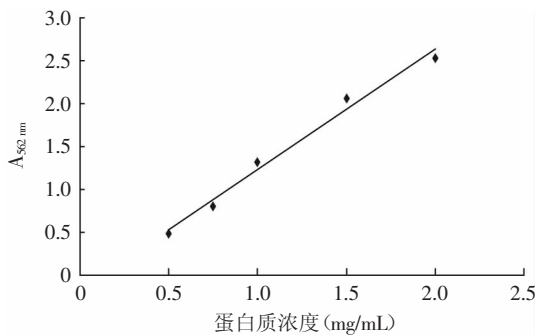


图1 蛋白质标准曲线

Fig.1 The standard curves of BCA

2.3 腰果过敏蛋白抗原最佳工作浓度的选择

抗原的使用浓度过高,既不经济,又可使本底增高;使用浓度过低,则酶标板上有大量位点未吸附抗原,增加了非特异性反应,又影响检测的灵敏性。所以必须对抗原的使用浓度予以选择。

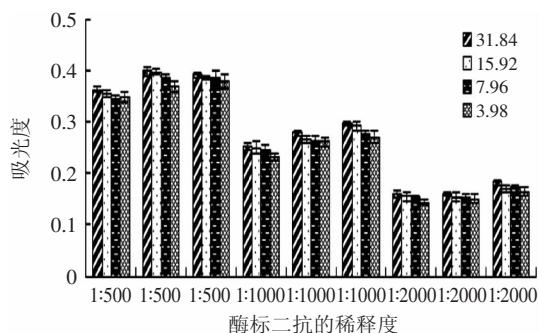


图2 包被抗原浓度的确定

Fig.2 The determination of envelope antigen concentration

注:每一相同酶标二抗的3组的柱形图一抗浓度分别为1:100、1:200、1:400。

如图2所示,在不同稀释度的酶标二抗下随着抗原的浓度降低吸光度值减小。在ELISA中,用抗原吸附在固相载体选择浓度时如浓度太高,则低效价抗体测不出来,或抗原过量形成多层抗原吸附,故在操作过程中可能脱落从而降低敏感性和可重复性。而

随着抗原浓度的降低,减少了空间因素对抗原抗体结合的影响。所以吸光度随着抗原浓度减低而减小。

2.4 腰果蛋白酶标二抗最佳工作浓度的选择

抗体浓度以,抗原浓度多少对酶标二抗进行最佳选择,结果见图3。

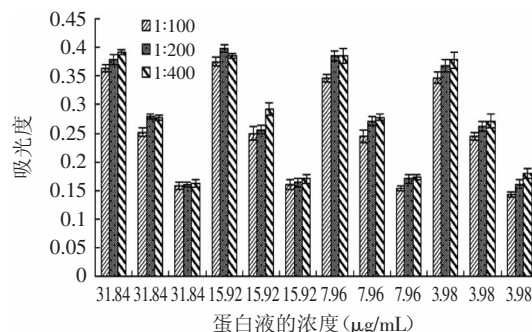


图3 酶标二抗最佳工作浓度的确定

Fig.3 The determination of enzyme mark 2 against the best work concentration

注:每一相同抗原的3组的柱形图酶标二抗浓度分别为1:500、1:1000、1:2000。

由图3可知,在正常阳性小鼠血清中IgE含量极低,而通过腰果蛋白致敏后IgE含量异常增高,提取此时的血清作为一抗。当进行间接ELISA实验包被抗体时特异抗体与抗原结合,形成固相抗原抗体复合物。经洗涤后,固相载体上只留下特异性抗体。其他免疫球蛋白及血清中的杂质由于不能与固相抗原结合,在洗涤过程中被洗去。当血清浓度过高时与抗原浓度差异过大产生空间位阻。所以,在同一抗原浓度下阳性小鼠血清稀释度越大吸光度越大。最适的工作浓度就是指酶标二抗稀释至这一浓度时,产生的本底较低,且可获得最佳灵敏度,达到最适的测定条件和测定费用的节省。当酶标二抗稀释度过高时,固相载体上为达到饱和状态。所以,随着酶标二抗的稀释度增大吸光度减小。

2.5 腰果过敏蛋白灵敏度的测定

通过建立的双抗体夹心ELISA法检测灵敏度,如表2所示。

表2 间接ELISA法灵敏度检测

Table 2 The detection sensitivity of double sandwich ELISA

腰果蛋白液的稀释倍数	原液	2倍	4倍	8倍	16倍
阳性血清的OD ₄₉₂	0.306±0.009	0.278±0.007	0.259±0.011	0.225±0.003	0.189±0.013
阴性血清的OD ₄₉₂	0.102±0.009	0.101±0.003	0.104±0.007	0.092±0.009	0.100±0.010
P/N	3.00	2.75	2.49	2.45	0.189

表3 腰果蛋白致敏小鼠血清特异性检测

Table 3 The specificity detection of cashew protein sensitization in mice serum

小鼠血清(一抗)	腰果蛋白致敏			
过敏原	开心果蛋白液	杏仁蛋白液	核桃蛋白液	板栗蛋白液
阳性血清OD ₄₉₂	0.117±0.005	0.109±0.008	0.130±0.010	0.122±0.006
阴性血清OD ₄₉₂	0.105±0.006	0.108±0.010	0.098±0.003	0.102±0.006
P/N	1.11	1.01	1.33	1.20

(下转第70页)

建立了一种快速测定辣椒粉中苏丹红染料的在线固相萃取-高效液相色谱分析方法。该方法实现了样品的进样、富集和净化过程的完全自动化,成功地完成了辣椒粉中苏丹红 I-IV 4种染料的同时测定,有效地避免了离线固相萃取中人工操作带来的误差,并克服了标准方法中使用特定活性的中性氧化铝净化样品耗时、耗力的缺陷。方法操作简便快速、且具有很好的精密度和准确度,可用于辣椒粉中苏丹红染料的日常监测。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 苏丹红危险性评估报告[R]. 北京:中华人民共和国卫生部,2005.
- [2] HOU X L, LI Y G, GAO S J, et al. Analysis of para red and sudandyes in egg yolk by UPLC-MS-MS[J]. *Chromatographia*, 2010, 71(1-2): 135-138.
- [3] GB/T 19681—2005. 食品中苏丹红染料的检测方法[S]. 北京:中国标准出版社.
- [4] 王坤, 赵浩军, 张燕. 高效液相色谱法测定辣椒油中的苏丹红染料[J]. *云南化工*, 2015, 42(1): 38-41.
- [5] 杨春林, 李佳峻, 吴蔚, 等. 固相分散萃取-高效液相色谱法测定郫县豆瓣中四种苏丹红染料的研究[J]. *中国调味品*, 2012, 37(3): 96-100.
- [6] 张剑峰, 陈彦凤, 孙艳芳, 等. 固相萃取-液质联用法同时测定调味品中罗丹明B和苏丹红工业染料[J]. *中国卫生工程学*, 2013, 12(5): 398-401.

- [7] 李军, 雍伟, 李刚, 等. 食品中苏丹色素的液相色谱分析方法[J]. *食品工业科技*, 2005, 26(11): 157-160.
- [8] 励建荣, 张蕾, 丁献荣. HPLC快速测定辣椒及其制品中苏丹红 I 号方法的建立[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(1): 145-147.
- [9] 侯晓琳, 孙英健, 吴国娟, 等. 基质固相分散术-UPLC法检测禽蛋中对位红和苏丹红[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 285-288.
- [10] 吴银良, 杨挺, 赵健, 等. 固相萃取高效液相色谱法测定辣椒油中苏丹红和对位红染料[J]. *食品科学*, 2009, 30(36): 243-246.
- [11] 吴宁鹏, 彭丽, 班付国, 等. 凝胶渗透色谱-超高效液相色谱法测定鸡蛋中苏丹红 I、II、III、IV 残留[J]. *中国兽药杂志*, 2012, 46(2): 27-29, 32.
- [12] 赵珊, 张晶, 丁晓静, 等. 凝胶净化/超高效液相色谱电喷雾质谱法检测调味油中11种禁用偶氮染料及罗丹明B[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(4): 448-452.
- [13] 张云, 李今中, 郑敬峰, 等. 液相色谱-串联质谱法快速检测番茄制品中苏丹红[J]. *分析实验室*, 2012, 31(12): 78-81.
- [14] Mazzetti M, Fascioli R. Determination of 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in chilli powder and in chilli-containing food products by GPC clear-up and HPLC with LC/MS confirmation[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2004, 21(10): 935-937.
- [15] 冯雷, 孙文通, 李军明, 等. 食品中苏丹红的HPLC/DAD/MS分离分析方法研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(2): 215-217.
- [16] 郭新东, 洗燕萍, 罗海英, 等. 凝胶净化/超高效液相色谱串联质谱法测定调味酱中32种工业染料[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(6): 658-663.

(上接第66页)

从表2可以看出,由于酶标记抗体是酶分子与抗体分子的结合物,它可以催化底物分子发生反应,产生放大作用,正因为此种放大作用而使本法具有很高的敏感性。在不同抗原浓度下建立间接ELISA法进行实验,以蛋白的最高稀释度作为该双抗体夹心ELISA的检测灵敏度。当腰果蛋白稀释为原蛋白液浓度的8倍时,P/N为2.45,显阳性。但当腰果蛋白稀释为原蛋白液浓度的16倍时,P/N为1.89,显阴性。所以本实验建立的间接ELISA法检测最低腰果蛋白浓度为1.99 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 腰果过敏蛋白特异性的测定

对提取的六种坚果(腰果、核桃、榛子、开心果、板栗、杏仁)的蛋白液为抗原,进行ELISA实验,测出 OD_{492} 值。

如表3所示,开心果蛋白、杏仁蛋白、核桃蛋白、板栗蛋白、榛子蛋白的P/N值均小于2.1,即均为阴性。表明间接ELISA法对腰果过敏具有一定的特异性。

3 结论

本次实验以阳性小鼠血清为一抗,羊抗鼠IgE-HRP为二抗,优化间接ELISA法,显示出了良好的特异性,可用于食品中腰果过敏原的检测。以腰果蛋白液作为抗原,找出的较佳检测腰果蛋白过敏的抗原、抗体浓度,磷酸盐缓冲液(PBS)包被酶标板,在4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。血清稀释度为1:400,牛血清白蛋白(BSA)封闭2 h,包被腰果蛋白浓度15.92 $\mu\text{g/mL}$,酶标二抗的稀释度为1:1000,此检测方法灵敏度较高,最低检出限为

1.99 $\mu\text{g/mL}$,该方法对腰果过敏蛋白具有一定特异性。

参考文献

- [1] 王文枝, 温焕斌, 靳淑敏. 世界各国食品过敏原种类及标识情况概述[J]. *食品工业科技*, 2011(4): 419-422.
- [2] 周健文, 李欣, 陈红兵, 等. 表面等离子共振技术及其在食物过敏原检测中的应用[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(15): 376-379.
- [3] 王海艳, 袁飞, 吴亚君. 食品中过敏原胡桃蛋白间接竞争ELISA检测方法研究[J]. *中国食品学报*, 2010(10): 217-221.
- [4] Reihaneh Noorbakhsh, Seyed Ali Mortazavi Ortazawi, Mojtaba Sankian. Influence of processing on the allergenic properties of pistachio nut assessed *in vitro*[J]. *Agric Food Chem*, 2010, 58: 10231-10235.
- [5] 孙秀兰, 管露, 单晓红, 等. 食品过敏原体外检测方法研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2012, 43(2): 126-132.
- [6] Hamid Reza Nouri, Danial Afsharzadeh, Abdolreza Varasteh. Diagnosis of *Chenopodium album* allergy with a cocktail of recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 3169-3178.
- [7] 刘春霞, 杭果. 过敏原检测与过敏性疾病治疗的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(1): 37-39.
- [8] 吴序栋, 陈莉娜, 刘志刚, 等. 芝麻过敏原的分离、鉴定与纯化[J]. *中国粮油学报*, 2009, 24(5): 85-86.
- [9] 宋廷君, 张宏, 李水秀, 等. 以棋盘法测定并评价汉防己甲素与酮康唑联合对白念珠菌的体外抗真菌活性[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(9): 890-893.