

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220030

胶体金免疫层析试纸条检测芝麻过敏原

令狐晓盼, 王 芮, 陆 旻

(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了实现芝麻过敏原的快速检测,建立了基于芝麻单克隆抗体间接竞争胶体金免疫层析法.首先通过盐提法提取白芝麻中全蛋白,并使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行鉴定,所提取的全蛋白中含有芝麻主要过敏原 Ses i 1 和 Ses i 2、Ses i 4 和 Ses i 5,相对分子质量分别为 $7 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$ 、 $1.5 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^4$.该方法经过优化的检测限(LOD)为 $1\ 000\ \mu\text{g/L}$.选用饼干、面包、火腿进行加标回收实验.3种样品提取液稀释 8 倍后进行检测,结果表明 3 种样品的检测限均为 $8\ \text{mg/kg}$.该结果与标准溶液的检测限一致,说明该检测方法具有较好的准确性.该方法可以应用于芝麻过敏原的快速检测,检测时间仅 20 min.

关键词: 芝麻过敏原;胶体金;免疫层析试纸条;单克隆抗体

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2022)05-0001-07

Sesame Allergens Detection by Colloidal Gold Immunochromatographic Test Strips

LINGHU Xiaopan, WANG Rui, LU Yang

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457)

Abstract: In order to detect sesame allergens, an indirect competitive colloidal gold immunochromatography method based on sesame monoclonal antibody was established. First, the whole protein in white sesame was extracted by salt extraction and identified by SDS-PAGE. The extracted whole protein contained the main allergens of sesame, Ses i 1-2 and Ses i 4-5, with relative molecular weights of 7×10^3 - 1.1×10^4 and 1.5×10^4 - 1.7×10^4 , respectively. The optimized limit of detection (LOD) of this assay was $1\ 000\ \mu\text{g/L}$. Biscuits, bread, and ham were selected for the spike and recovery experiments. The extracts of the three samples were tested after being diluted 8 times. The results showed that the LODs of the three samples were all $8\ \text{mg/kg}$. The results were consistent with detection limit of standard solution, indicating that the detection method had good accuracy. This method was applied to the rapid detection of sesame allergens, and the detection time was only 20 minutes.

Key words: sesame allergens; colloidal gold; immunochromatographic test strip; monoclonal antibody

食物过敏原主要是一组引发人类过敏反应的蛋白质.在过去的几十年里,食物过敏报告在世界范围内迅速增加.这种增加的原因被认为是由食物成分的多样化、食物来源的多样化、环境、文化习俗和食物监管措施等^[1-3]引起的.

芝麻是一种全球农业作物,其产量从 1994 年的 230 万吨增加到 2017 年的 550 万吨^[4].芝麻是一种公认的、受国际监管的食物过敏原,芝麻过敏报告也

在增加^[5-9].与花生过敏一样,免疫球蛋白 E(IgE)诱导的芝麻过敏在生命早期就开始了,通常在两岁之前,并可能在 80% 的患者中持续一生^[10-13].

经国际免疫学联合会(International Union of Immunological Societies, IUIS)确认的芝麻中主要过敏原蛋白包括 2 种 2S 白蛋白 Ses i 1 和 Ses i 2、1 种 7S 球蛋白 Ses i 3、2 种油质蛋白 Ses i 4 和 Ses i 5、2 种 11S 球蛋白 Ses i 6 和 Ses i 7^[14-18],其中 2S 白蛋白、

收稿日期: 2022-02-24; 修回日期: 2022-04-02

作者简介: 令狐晓盼(1996—),女,山西运城人,硕士研究生;通信作者: 陆 旻,副教授, luyang@tust.edu.cn

11S 球蛋白和 7S 球蛋白是主要的过敏原蛋白。2S 白蛋白占芝麻总蛋白的 25% 左右^[19], 富含精氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和半胱氨酸残基^[20]。Ses i 1 含有 153 个氨基酸, 相对分子质量约为 9×10^4 ^[15], 有较好的水溶性; Ses i 2 含有 148 个氨基酸, 相对分子质量约为 7×10^4 ^[16]。研究^[21-22]认为 2S 白蛋白在通过胃肠道时就会发生过敏反应, 其可以穿过肠道黏膜屏障, 使黏膜系统处于过敏状态并引起过敏反应。7S 球蛋白中 Ses i 3 为主要的过敏原蛋白, 相对分子质量约为 4.5×10^4 , 由 585 个氨基酸构成, 其缺乏二硫键。Ses i 3 在经过胃肠道时容易被胃蛋白酶酶解, 但不容易被胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶酶解, 具有较好的抵抗力^[23]。2 种油质蛋白 Ses i 4、Ses i 5 分别由 166、153 个氨基酸构成, 相对分子质量在 $1.5 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^4$ 之间^[17]。2 种 11S 球蛋白中 Ses i 6 由 459 个氨基酸构成, 相对分子质量为 5.3×10^4 ; Ses i 7 由 497 个氨基酸构成, 相对分子质量为 5.66×10^4 , 与 Ses i 3 相似, 易被胃蛋白酶消化, 但对胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶具有较好的抗性。目前已知芝麻过敏原为 Ses i 1—Ses i 7, 其致敏反应主要由其抗原表位决定。目前国内对芝麻过敏原的限量还没有明确规定, 欧盟规定的芝麻过敏原在实际样品中的限量标准为 12.4 mg/kg ^[24]。

目前, 芝麻过敏原最常用的检测方法包括核酸检测法、质谱 (MS) 法、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法、实时荧光聚合酶链反应 (real-time fluorescence PCR) 法等。实时荧光聚合酶链反应以 DNA 分子为模板, 经过高温变性、低温退火和适温延伸多次循环, 使目的基因以接近指数级进行扩增。该方法广泛应用于芝麻过敏原检测与过敏原蛋白的提取^[25], 但其对样品处理、实验环境和温度要求严格。如果实验环境污染或操作不当, 就会造成假阳性或假阴性的结果。在免疫检测法中, ELISA 是广泛用于芝麻过敏原检测的方法, 主要是由于其出色的灵敏度和操作的简便性, 但其孵育时间较长, 检测较为耗时。质谱技术的基本原理是将芝麻过敏原中的蛋白质酶解成多肽, 将多肽混合物进行色谱分离后, 再进行 MS 或串联 MS (tandem mass spectrometry, MS/MS) 分析, 得到的数据与过敏原蛋白数据库进行比对, 从而鉴定过敏原蛋白质^[26]。该方法检测限低, 但要求专业人员操作, 检测时间长且样品处理繁琐。胶体金免疫层析检测技术具有操作简单、便携、成本低、快速及不需要大型仪器等优点。该检测技术是将免疫标记和色谱层析技术结合发展而来的一种用于检测抗原和抗体的

检测技术。其检测原理是基于毛细管作用力使样品自发地从样品垫向上层析, 样品与示踪颗粒共同层析至信号发出区, 由于抗原和抗体特异性结合以及示踪颗粒上的信号输出, 通过示踪颗粒在信号发出区产生的颜色就可以直接观察检测结果, 从而对样品进行定性与定量分析。因此该技术被广泛应用于临床诊断、食品检测、目标分析物现场检测等领域。

本课题组开发了胶体金免疫层析试纸条检测芝麻过敏原, 其检测时间短, 适用于商业化大规模生产。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小鼠芝麻单克隆抗体 (Ab) 由本团队制备; 牛血清白蛋白 (BSA)、三水合四氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、柠檬酸三钠 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)、聚乙二醇 200 (PEG200)、聚乙二醇 20000 (PEG20000) 和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), Sigma-Aldrich 公司; 羊抗鼠多克隆抗体 (羊抗鼠二抗), 美国 Promega 公司; 胶体金免疫层析优化剂 (SDS-L)、蔗糖、泊洛沙姆 188 溶液 (F68) 和三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 硝酸纤维素 (NC) 膜 (HF135s), 美国 Millipore 公司; 聚氯乙烯吸收垫、样品垫和结合垫, 上海金标生物科技有限公司; 食品样品为超市购买。

所有溶液均用电阻率为 $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 的去离子水配制。将 1.21 g Tris、 5 g 蔗糖、 0.5 g BSA 和 0.5 g PVP 溶解在 100 mL 去离子水中配制金标抗体工作溶液。在使用前分别加入 5 mL F68、 0.5 mL PEG200 和 1 mL SDS-L。

使用平台分配器和可编程条带切割机 (上海金标生物科技有限公司) 分别在膜上划上涂层抗原或羊抗鼠多克隆抗体。

1.2 芝麻过敏原的提取

将芝麻充分研磨, 芝麻粉与丙酮以 $1 : 10 (\text{g} : \text{mL})$ 的比例混合, 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中磁力搅拌 2 h , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 8000 r/min 离心 30 min 后得到沉淀, 该沉淀需要重复脱脂 $3 \sim 4$ 次。将该沉淀放置于通风橱中过夜, 使有机试剂挥发完全, 得到干燥的、无脂肪的芝麻粉末。称量上述所得脱脂粉末, 按照每克样品加入 5 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 1.0 mol/L NaCl, pH 8.0) 的比例提取蛋白, 并于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下磁力搅拌过夜; 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 11000 r/min 条件下离心 15 min , 取上清液置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中, 此上清液即为芝麻过敏原浸提

液.将前一步骤中获得的溶液置于透析袋中,用夹子密封透析袋,在4℃冰箱中用PBS缓冲液透析3d,每4h更换一次透析液.将透析好的芝麻过敏原置于-20℃冰箱保存.

1.3 胶体金的合成

向铬酸溶液浸泡处理过的三角瓶中加入足量的双蒸水,放置于恒温加热磁力搅拌器上,加热至沸腾,约2min后倒掉沸水.量取99mL双蒸水并与1mL1%氯金酸溶液混合,搅拌均匀后加热至沸腾.准确量取2.25mL1%柠檬酸三钠溶液迅速加入上述溶液中,约2min后可观察到溶液的颜色发生变化,直至最终呈现稳定的酒红色;用双蒸水定容至100mL,4℃避光保存.

1.4 金标抗体的制备

将芝麻单克隆抗体加到1mL胶体金溶液中,并用0.2mol/L碳酸钾(K₂CO₃)溶液调节pH,混合均匀后置于4℃冰箱中避光反应1h;加入20%BSA溶液和10%PEG20000溶液,反应30min.在4℃、2000r/min条件下离心15min,取上清液;在4℃10000r/min条件下离心30min,得到金标抗体.用金标工作液复溶金标抗体,置于4℃冰箱中避光保存.

1.5 实验条件优化

1.5.1 金标抗体制备中碳酸钾溶液添加量和抗体的优化

在实验中,C线包被羊抗鼠二抗作为质控线,T线包被芝麻过敏原作为检测线.在金标抗体制备过程中,抗体(1mg/mL)添加量分别为2.5、5、10μL,0.2mol/LK₂CO₃溶液添加量分别为1、3、5、7μL,制备完成后根据试纸条显色情况确定最佳抗体添加量和K₂CO₃溶液添加量.

1.5.2 羊抗鼠二抗和包被原稀释倍数的选择

用PBS缓冲液将芝麻过敏原溶液(4mg/mL)分别稀释4、8、16倍,羊抗鼠二抗分别稀释10、15、20倍,划膜后置于37℃烘箱中干燥6h,组装试纸条,将金标抗体(AuNPs-Ab)探针与100μL上样缓冲液混合滴加到样品垫上,观察结果.选择T线和C线颜色较为一致的稀释倍数作为实验条件.

1.5.3 AuNPs-Ab添加量的优化

分别取0.5、0.7、0.9、1.1μLAuNPs-Ab与100μLPBS缓冲液混合进行免疫层析试纸条实验,观察试纸条结果,选择最佳的AuNPs-Ab添加量.

1.5.4 上样缓冲液的选择及pH的优化

分别取100μLPB、PBS、PBST、BB上样缓冲液与AuNPs-Ab混合后进行免疫层析试纸条实验,根

据试纸条C线、T线的出线情况,确定最适上样缓冲液.

根据上述确定好的上样缓冲液,对上样缓冲液pH进行优化,分别用不同pH(5.7、7.4、8.5)的PBS缓冲液与AuNPs-Ab混合后进行免疫层析试纸条实验,根据试纸条C线、T线的出线情况,选择条带清晰、背景干扰小的实验结果所对应的pH作为上样缓冲液pH.

1.6 试纸条检测限的确定

用上样缓冲液稀释芝麻过敏原标准品,终质量浓度为31、62、125、250、500、1000μg/L,分别添加等量的AuNPs-Ab,混合均匀后滴加到样品垫上,20min后观察试纸条C线、T线条带.随着标准品质量浓度的增加,试纸条C线颜色保持不变,T线颜色逐渐减弱;当标准品质量浓度增大到一定程度时,试纸条T线消失,此时标准品的质量浓度就是胶体金免疫层析试纸条的检测限.

1.7 胶体金免疫层析法特异性的测定

为了评估该方法的特异性,选取了4种常见的过敏原蛋白进行测定,分别为核桃蛋白、花生蛋白、羽扇豆蛋白、BSA.若在C线、T线均有红色条带出现,则说明该方法对其他过敏原有交叉反应.用于特异性测定的芝麻蛋白的质量浓度为1mg/L,其余4种蛋白质的质量浓度为10mg/L,观察T线条带颜色变化,对该方法的特异性进行评价.

1.8 胶体金免疫层析法测定实际样品

选取3种不含芝麻过敏原的实际样品饼干、面包、火腿进行加标回收实验.样品添加芝麻过敏原标准溶液(0.5、2.0、8.0mg/kg),经基质消除后用PBS缓冲液稀释8倍,20min后观察试纸条C线、T线条带的颜色变化.

2 结果与讨论

2.1 芝麻过敏原蛋白的提取

白芝麻经盐析法粗提蛋白后,使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对所提取的蛋白进行鉴定,结果如图1所示.

从图1中可以看出,所提取的全蛋白相对分子质量为 $1.1 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^4$ 、 $3.0 \times 10^4 \sim 3.5 \times 10^4$ 、 4.8×10^4 .这其中含有Sesi1和Sesi2($0.7 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$)、Sesi3(4.8×10^4)、Sesi4和Sesi5($1.5 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^4$)主要过敏原蛋白,除了相对分子质量 3.5×10^4 不是芝麻主要过敏原蛋白的,其他均为芝麻中主

要过敏原蛋白的相对分子质量.

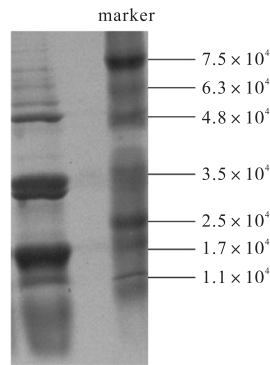


图1 芝麻过敏原蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of sesame allergen protein

2.2 羊抗鼠二抗和包被原稀释倍数的优化

从提高检测方法灵敏度和节约成本的角度考虑,对试纸条包被原和羊抗鼠二抗稀释倍数进行优化.芝麻过敏原蛋白包被原(4 mg/mL)和羊抗鼠二抗(100 μg/mL)的稀释倍数优化结果见表 1.随着羊抗鼠二抗和包被原稀释倍数的增加,C 线、T 线颜色都逐渐变浅;当包被原稀释倍数为 8 倍、羊抗鼠二抗稀释倍数为 15 倍时,试纸条的 C 线、T 线颜色深浅适中且一致.因此,选择芝麻过敏原蛋白包被原稀释 8 倍、羊抗鼠二抗稀释 15 倍进行后续实验.

表 1 羊抗鼠二抗和包被原稀释倍数的优化

Tab.1 Optimization of titration of goat anti-mouse secondary antibody and the coating antigen

包被原 稀释倍数	羊抗鼠二抗稀释倍数		
	1 : 10	1 : 15	1 : 20
1 : 4	C+++/T+++	C++/T+++	C+/T+++
1 : 8	C+++/T++	C++/T++	C+/T++
1 : 16	C+++/T-	C++/T-	C+/T-

注: C 表示质控线, T 表示检测线, “+”表示有颜色,“-”表示无颜色;“+”越多表示颜色越深

2.3 金标抗体制备中 K₂CO₃ 溶液添加量和抗体添加量的优化

在金标抗体的制备过程中,K₂CO₃ 溶液添加量会影响溶液的 pH,进而影响胶体金与抗体的偶联效果,因此本实验对 K₂CO₃ 溶液添加量进行了优化.在金标抗体的制备过程中,K₂CO₃ 溶液(0.2 mol/L)添加量分别为 1、3、5、7 μL,制备得到 AuNPs-Ab.如图 2(a)所示,当 K₂CO₃ 溶液添加量为 1 μL 和 3 μL 时,试纸条 C 线、T 线颜色较浅;当 K₂CO₃ 溶液添加量为 5 μL 时,试纸条 C 线的颜色比 T 线的深,C 线、T 线颜色不一致;当 K₂CO₃ 溶液添加量为 7 μL 时,C 线、T 线的颜色清晰且一致.因此,选择 K₂CO₃ 溶液添加量 7 μL 为最优条件.

抗体的添加量会影响方法的灵敏度和检测限,抗体添加量越少灵敏度越高.在保证 C 线、T 线出线情况一致的前提下降低抗体的添加量,不仅可以提高灵敏度,而且还可以节约成本.因此,对抗体的添加量进行优化,抗体添加量分别为 2.5、5、10 μL 制备得到 AuNPs-Ab.如图 2(b)所示,抗体添加量为 2.5 μL 时,T 线的颜色比 C 线的浅;抗体添加量为 5 μL 和 10 μL 时,C 线、T 线颜色较为一致,考虑试剂成本及灵敏度,选择抗体添加量 5 μL 为最优条件.

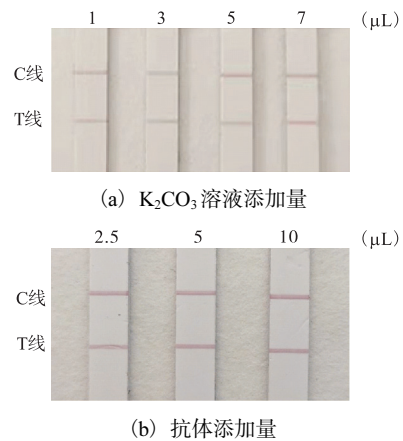


图 2 金标抗体制备中 K₂CO₃ 溶液添加量和抗体添加量的优化

Fig.2 Optimization of additional K₂CO₃ solution volume and the antibodies volume in the preparation of gold-labeled antibodies

2.4 AuNPs-Ab 添加量的优化

AuNPs-Ab 作为检测探针,其添加量将决定能否使试纸条 T 线消线,同时也决定了试纸条的灵敏度.因此,对 AuNPs-Ab 添加量进行优化.按照上述优化好的条件,向上样缓冲液中分别添加 0.5、0.7、0.9、1.1 μL AuNPs-Ab 后上样,观察 C 线、T 线出线情况,结果如图 3 所示.随着 AuNPs-Ab 添加量的增加,C 线颜色适中且一致,T 线颜色逐渐加深;当 AuNPs-Ab 添加量为 0.9 μL 时,条带颜色与 AuNPs-Ab 添加量为 1.1 μL 的 T 线条带颜色几乎一致.因此,从提高试纸条灵敏度方面考虑,选择 0.9 μL 为 AuNPs-Ab 最优添加量.

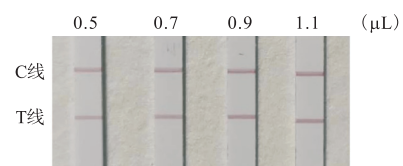


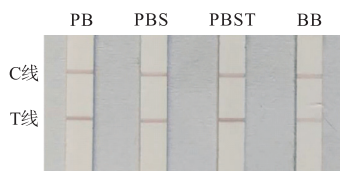
图 3 AuNPs-Ab 添加量优化结果

Fig.3 Optimization results of the additional volume of AuNPs-Ab

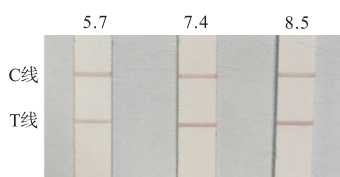
2.5 上样缓冲液种类及 pH 优化

上样缓冲液为探针、样品、试纸条的 C 线和 T 线包被的物质提供了反应环境, 其可能会影响试纸条 C 线、T 线的清晰度. 因此, 对上样缓冲液的种类进行了优化. 将 AuNPs-Ab、工作液分别与 pH 7.4 的 PB、PBS、PBST、BB 上样缓冲液混合, 上样后观察 C 线、T 线颜色情况, 确定最佳的上样缓冲液种类. 如图 4(a) 所示: 当用 pH 7.4 PBS 缓冲液上样时, 试纸条 C 线、T 线颜色较为一致, 颜色适中; BB 缓冲液使 C 线、T 线颜色较浅; 然而用 PB、PBST 上样缓冲液时, 试纸条 C 线、T 线颜色不一致. 所以, 确定最佳上样缓冲液为 PBS 缓冲液.

上样缓冲液的 pH 对抗体活性有一定的影响, 进而影响抗原和抗体的结合, 并反映在 C 线、T 线颜色的深浅上, 所以对 PBS 缓冲液的 pH 进行优化. 如图 4(b) 所示, 可以看出: 使用 pH 5.7 的 PBS 缓冲液时, C 线、T 线的颜色较浅; 使用 pH 8.5 的 PBS 缓冲液时, C 线、T 线不一致; 使用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液时, C 线、T 线颜色适中且一致. 这可能是因为抗体在中性环境中比较稳定. 因此, 选择 pH 7.4 的 PBS 缓冲液作为最优条件进行后续实验.



(a) 缓冲液种类



(b) PBS 缓冲液 pH

图 4 上样缓冲液种类及 pH 优化

Fig. 4 Optimization of different solution buffers and pH

2.6 胶体金免疫层析法芝麻过敏原检测限的确定

在上述优化条件下, 配制不同质量浓度的芝麻过敏原标准品进行测定. 随着芝麻过敏原标准品质量浓度的增加, 芝麻过敏原与 AuNPs-Ab 的结合量逐渐增多, 故试纸条 T 线包被的蛋白与 AuNPs-Ab 的结合量就会减少. 对于可视化检测, 其可视化检测限 (vLOD) 定义为 T 线颜色明显弱于 C 线时芝麻过敏原的最低质量浓度, 检测限 (LOD) 定义为 T 线条带消失所对应的芝麻过敏原的质量浓度. 从图 5 可以

看出: 随着芝麻过敏原质量浓度的增加, 试纸条 C 线颜色适中且保持稳定, 试纸条 T 线颜色逐渐变浅直至消失. 当芝麻过敏原质量浓度为 $31 \mu\text{g/L}$ 时, T 线颜色明显比 C 线浅; 当芝麻过敏原质量浓度为 $1000 \mu\text{g/L}$ 时, T 线颜色消失. 以上结果说明该方法的 vLOD 和 LOD 分别为 $31 \mu\text{g/L}$ 和 $1000 \mu\text{g/L}$.

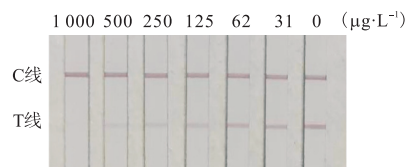
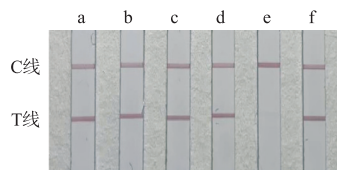


图 5 胶体金免疫层析试纸条的检测限

Fig. 5 Detection limit of colloidal gold immunochromatographic test strips

2.7 胶体金免疫层析法的特异性

用 PBS 缓冲液将核桃蛋白、花生蛋白、羽扇豆蛋白、BSA 稀释成质量浓度为 10mg/L 的标准品, 将芝麻过敏原稀释成质量浓度为 $1000 \mu\text{g/L}$ 的标准品, 按照上述优化好的条件上样, 根据试纸条结果进行判定. 胶体金免疫层析试纸条的特异性结果如图 6 所示.



a. 核桃蛋白; b. 花生蛋白; c. 羽扇豆蛋白; d. BSA; e. 芝麻过敏原; f. 对照组

图 6 胶体金免疫层析试纸条的特异性

Fig. 6 Specificity of colloidal gold immunochromatographic test strips

由图 6 可知: 芝麻过敏原标准品能够与 AuNPs-Ab 特异性结合使试纸条 T 线条带消失; 然而其他 4 种高质量浓度的常见过敏原标准品溶液均不能与 AuNPs-Ab 结合, 游离的 AuNPs-Ab 与 T 线处的过敏原蛋白结合, 导致试纸条 T 线条带出现. 这说明 AuNPs-Ab 只能与其对应的过敏原结合, 与其他常见过敏原不存在交叉反应. 因此, 胶体金免疫层析试纸条与其他 4 种常见的过敏原蛋白无交叉反应, 特异性良好.

2.8 胶体金免疫层析法测定实际样品的特异性

对 3 种不含芝麻过敏原的实际样品 (饼干、面包、火腿) 进行加标回收实验的测定. 样品添加芝麻过敏原标准溶液 (0.5 、 2.0 、 8.0mg/kg), 经基质消除后用 PBS 缓冲液稀释 8 倍进行测定, 每个实验重复 3 次, 结果如图 7 所示. 随着标准品含量的增加, C 线

颜色保持不变, T 线颜色逐渐消失, 与标准品检测方法的检测限结果一致。

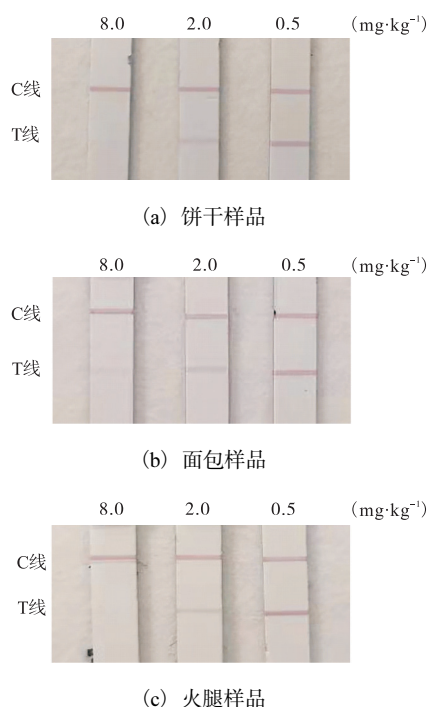


图7 胶体金免疫层析试纸条测定实际样品的特异性
Fig.7 Specificity of colloidal gold immunochromatographic test strips in the determination of real samples

3 结论

本实验开发了胶体金免疫层析试纸条法. AuNPs-Ab 作为检测探针检测芝麻过敏原. 经优化, 芝麻过敏原包被原质量浓度为 0.5 mg/mL, 羊抗鼠二抗质量浓度为 6.6 μ g/mL, 分别包被于试纸条的 C 线、T 线. 选用 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液为上样缓冲液. AuNPs-Ab 探针制备时选择 7 μ L K_2CO_3 溶液 (0.2 mol/L) 添加量和 5 μ L 抗体 (1 mg/mL) 添加量连接 AuNPs. 之后, 优化 AuNPs-Ab 添加量为 0.9 μ L. 在上述优化条件下, 该方法的检测限为 1 000 μ g/L. 最后对饼干样品、面包样品、火腿样品进行了加标回收实验, 3 种样品的检测限均为 8 mg/kg, 与标准溶液的检测限一致, 并且可在 20 min 内完成检测. 本方法的实际样品检测限低于欧盟的限量标准.

参考文献:

- [1] STEVENSON S E, WOODS C A, HONG B, et al. Environmental effects on allergen levels in commercially grown non-genetically modified soybeans : assessing variation across north America [J]. *Frontiers in plant science*, 2012, 3: 196.
- [2] PARKER C H, KHUDA S E, PEREIRA M, et al. Multi-allergen quantitation and the impact of thermal treatment in industry-processed baked goods by ELISA and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63 : 10669–10680.
- [3] PIOVESANA S, CAPRIOTTI A L, CARUSO G, et al. Labeling and label free shotgun proteomics approaches to characterize muscle tissue from farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2016, 1428: 193–201.
- [4] 王秀华. 中国芝麻油现状及发展趋势分析 [C]//中国食品土畜进出口商会. 第六届中国国际豌豆、亚麻籽产业展望高峰论坛论文集. 青岛: 中国食品土畜进出口商会, 2017: 1–51.
- [5] LI P H, GUNAWARDANA N, THOMAS I, et al. Sesame allergy in adults: investigation and outcomes of oral food challenges [J]. *Annals of allergy asthma & immunology*, 2017, 119 (3) : 285–287.
- [6] SARINHO E, LINS M G M. Severe forms of food allergy [J]. *Jornal de pediatria*, 2017, 93 (S1) : 53–59.
- [7] GOTO S, TAKAOKA Y, FUTAMURA M, et al. Characteristics of sesame seed allergy and sesame-specific IgE test [J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2008, 121 (2) : S247.
- [8] ALEXIS A, SAFIER B, ROSENTHAL D W, et al. Sesame food allergy and sensitization in children: a growing concern in the USA [J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2009, 123 (2) : S32.
- [9] DERBY C J, GOWLAND M H, HOURIHANE J O B. Sesame allergy in Britain: a questionnaire survey of members of the anaphylaxis campaign [J]. *Pediatric allergy and immunology*, 2005, 16 (2) : 171–175.
- [10] FOX A T. Clinical characteristics of and predictive diagnostic factors for sesame seed allergy in food-allergic children: original research [J]. *Current allergy and clinical immunology*, 2013, 26 (2) : 78–81.
- [11] COHEN A, GOLDBERG M, LEVY B, et al. Sesame food allergy and sensitization in children: the natural history and long-term follow-up [J]. *Pediatric allergy and immunology*, 2010, 18 (3) : 217–223.
- [12] BOCK S A. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3

- years of life[J]. *Pediatrics*, 1987, 79(5): 683–688.
- [13] SOLLER L, BEN-SHOSHAN M, HARRINGTON D W, et al. Adjusting for nonresponse bias corrects overestimates of food allergy prevalence[J]. *The journal of allergy & clinical immunology in practice*, 2015, 3(2): 291–293.
- [14] WOLFF N, COGAN U, ADMON A, et al. Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 1.4×10^4 2S albumin precursor[J]. *Food & chemical toxicology*, 2003, 41(8): 1165–1174.
- [15] PASTORELLO E A, VARIN E, FARIOLI L, et al. The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin[J]. *Journal of chromatography B biomedical sciences & applications*, 2001, 756(1): 85–93.
- [16] BEYER K, BARDINA L, GRISHINA G, et al. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens[J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2002, 110(1): 154–159.
- [17] LEDUC V, MOMERET-VAUTRIN D A, TZEN J, et al. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients[J]. *Allergy*, 2010, 61(3): 349–356.
- [18] BETER K, GRISHINA G, BARDINA L, et al. Identification of 2 new sesame seed allergens: Ses i 6 and Ses i 7[J]. *Journal of allergy & clinical immunology*, 2007, 119(6): 1554–1556.
- [19] RAJENDRAN S, PRAKASH V. Isolation and characterization of beta-globulin low molecular weight protein fraction from sesame seed (*Sesamum indicum* L.) [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1988, 36(2): 269–275.
- [20] MILLS E, JENKINS J A, ALCOCER M, et al. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2004, 44(5): 379–407.
- [21] TAI S, WU L, CHEN E, et al. Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage proteins in sesame[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1999, 47(12): 4932–4938.
- [22] NEOMI G, WOLIFF R. Identification and characterization of linear B-cell epitopes of β -globulin, a major allergen of sesame seeds[J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2004, 114(5): 1151–1158.
- [23] ORRUNO E, MORGAN M. Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum* L.) to proteolytic digestive enzymes[J]. *Food chemistry*, 2011, 128(4): 923–929.
- [24] DAUL C B, MORGAN J E, HUGHES J, et al. Provocation-challenge studies in shrimp-sensitive individuals[J]. *Journal allergy and clinical immunology*, 1988, 81(6): 1180–1186.
- [25] SCARAVELLI E, BROHEE M, MARCHELLI R, et al. The effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR[J]. *Analytical & bioanalytical chemistry*, 2009, 395(1): 127–137.
- [26] 古淑青, 赵超敏, 程甲, 等. 基于质谱技术的食品过敏原检测方法研究进展[J]. *色谱*, 2016, 34(7): 639–646.

责任编辑: 郎婧