



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

## 《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：双抗体夹心 ELISA 检测杏仁过敏原 Amandin  
作者：李明新, 巴巨伟, 刘俊伟, 陆旸  
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240041  
收稿日期: 2024-03-08  
网络首发日期: 2024-09-30  
引用格式: 李明新, 巴巨伟, 刘俊伟, 陆旸. 双抗体夹心 ELISA 检测杏仁过敏原 Amandin[J/OL]. 天津科技大学学报.  
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20240041>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240041

## 双抗体夹心 ELISA 检测杏仁过敏原 Amandin

李明新<sup>1</sup>, 巴巨伟<sup>1</sup>, 刘俊伟<sup>2</sup>, 陆 旻<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457; 2. 天津市滨海新区城乡居民基本医疗保险服务中心, 天津 300456)

**摘要:** 本研究以提取纯化的甜杏仁主要过敏原 amandin 为目标物制备高亲和力的抗 amandin 单克隆抗体。以鼠单克隆抗体为捕获抗体、兔多克隆抗体为检测抗体, 通过优化封闭液以及缓冲液 pH 等条件, 建立了双抗体夹心 ELISA 方法检测 amandin。该方法检测限为  $(0.8 \pm 0.08)$  ng/mL, 线性范围为 5.86~187.5 ng/mL。该方法与芝麻、花生、核桃以及  $\beta$  乳球蛋白均无交叉反应, 表明特异性良好。添加回收试验中面包、饼干、巧克力回收率范围为 82.16%~112.04%, 实际样中检测限分别为  $(9.07 \pm 0.23)$  ng/mL、 $(7.78 \pm 0.18)$  ng/mL 和  $(327.37 \pm 0.25)$  ng/mL, 说明能够用于实际样品中 amandin 的准确定量分析。

**关键词:** 杏仁过敏原; amandin; 双抗夹心 ELISA

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(0000)00-0000-00

## Development of Sandwich ELISA for Detection of Almond Allergen Amandin

LI Mingxin<sup>1</sup>, BA Juwei<sup>1</sup>, LIU Junwei<sup>2</sup>, LU Yang<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science &amp; Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Binhai New Area Urban and Rural Residents Basic Medical Insurance Service Center, Tianjin 300456, China)

**Abstract:** In this study, a high-affinity anti-amandin monoclonal antibody was prepared using extracted and purified amandin, the main allergen of sweet almonds, as the target. Using the mouse monoclonal antibody as the capture antibody and the rabbit polyclonal antibody as the detection antibody, a double-antibody sandwich ELISA method was established for the detection of amandin protein by optimizing the conditions of the sealing solution and the pH of the buffer. The detection limit was  $0.8 \pm 0.08$  ng/mL, and the linear range was 5.86~187.5 ng/mL. The method showed no cross-reactivity with sesame, peanut, walnut, and  $\beta$ -lactoglobulin, indicating good specificity. The recoveries of bread, cookie, and chocolate in the spiked recovery test ranged from 82.16%~112.04%, and the limits of detection (LODs) in the actual samples were  $(9.07 \pm 0.23)$  ng/mL,  $(7.78 \pm 0.18)$  ng/mL, and  $(327.37 \pm 0.25)$  ng/mL, respectively, which indicated that they can be used for the accurate quantitative analysis of amandin proteins in the actual samples.

**Key words:** almond allergen; amandin; double antibody sandwich ELISA

杏仁作为一种树坚果是常见的八大主要食品过敏原之一, 富含多种营养成分。amandin 是具有高度水溶性的苦杏仁球蛋白, 亦称为 AMP<sup>[1]</sup>。amandin 占杏仁种子可溶性蛋白的 65%<sup>[2]</sup>, 是杏仁的主要过敏原, 是杏仁过敏患者血清 IgE 识别的关键多肽。由两组相对分子质量在  $2.0 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4$  和  $4.0 \times 10^4 \sim 4.2 \times 10^4$  范围内的多肽链组成<sup>[3]</sup>。

目前对于食物过敏还没有有效的医疗办法, 最

有效地手段就是严格避免接触相关食物。而食物过敏标签是避免易感人群引起过敏反应的有效办法。此外, 由于缺乏相关研究数据, 过敏原人群阈值尚不能明确, 痕量过敏原也有可能引起严重的过敏反应<sup>[4]</sup>。

目前杏仁过敏原检测方法主要有聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法、免疫分析法、质谱法和过敏原微阵列芯片等<sup>[5-7]</sup>, 然而每种检

收稿日期: 2024-03-08; 修回日期: 2024-05-11

作者简介: 李明新(1997-), 女, 河北保定人, 硕士研究生; 通信作者: 陆 旻, 副教授, luyang@tust.edu.cn

测方法都有其局限性。免疫分析方法仍然是如今使用最广泛的检测手段,其中酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法具有灵敏度高、检测技术成熟、特异性好、不需要昂贵的仪器等优点。针对过敏原等生物大分子物质的检测适合采用双抗体夹心 ELISA 法。该方法对目标物的双重特异性识别机制使得灵敏度高于竞争 ELISA 法,商品化试剂盒也大都采用夹心 ELISA 法的检测模式。此外,制备高亲和力和强特异性的抗体是建立高灵敏度 ELISA 方法的关键环节。张洁琼等<sup>[8]</sup>通过制备兔和鼠多克隆抗体建立了杏仁蛋白双抗体夹心 ELISA 方法,特异性高,检测限为  $6.36 \pm 1.02 \mu\text{g/L}$ 。Civera 等<sup>[9]</sup>建立的基于兔多克隆抗体的夹心 ELISA 方法检测限为  $2 \text{ ng/mL}$ 。Su 等<sup>[10]</sup>以兔多克隆抗体为捕获抗体,鼠单克隆抗体为检测抗体,也建立了一种双抗夹心 ELISA 方法检测食品中的杏仁蛋白,检测范围是  $3 \sim 200 \text{ ng/mL}$ 。

目前现有的 amandin 检测产品主要为德国 R-Biopharm 公司、美国 Neogen 公司等进口的 ELISA 试剂盒,而我国在食物过敏原的基础性和应用性研究、国家标准制定以及消费者的认知程度等方面还存在诸多不足。因此,开发快速、灵敏的杏仁过敏原检测方法具有重要意义。

本研究拟提取甜杏仁中的 amandin 致敏蛋白,制备单克隆抗体,最终建立基于单克隆抗体捕获、多克隆抗体检测的双抗体夹心 ELISA 方法,用于食品中杏仁过敏蛋白的快速检测,基本方案设计如图 1 所示。

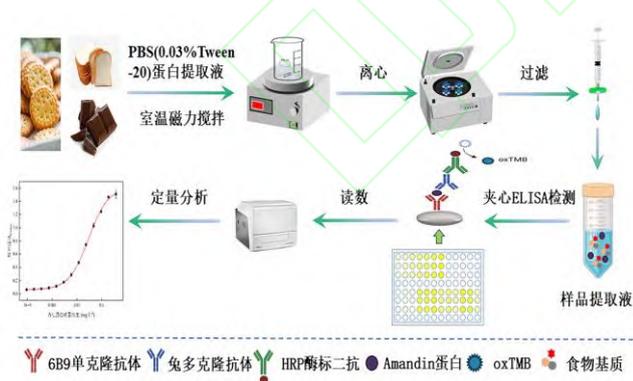


图 1 双抗体夹心 ELISA 检测食品中 amandin 过敏原示意图

Fig. 1 Schematic diagram of amandin allergen detection in food by double antibody sandwich ELISA

## 1 材料与方

### 1.1 材料

BALB/c 小鼠, 斯贝福北京生物技术有限公司; 甜杏仁产自河北承德; 法式小面包、饼干、巧克力等购自天津超市。

弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)、HRP-羊抗兔二抗、3'3'5'5'-四甲基联苯胺(TMB)、过氧化氢脲( $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$ )、二甲基亚砜(DMSO)、PEG(50%, w/v)、HT、HAT 补充剂、明胶, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 胎牛血清, 上海宸功生物科技有限公司; DMEM 低糖培养基, 美国 Gibco 公司; 正辛酸、无水乙酸钠、柠檬酸、 $\beta$ -糊精、碳酸氢钠、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、硫酸铵, 国药集团化学试剂有限公司; 吐温-20、青链霉素混合液(100 X)、BCA 试剂盒、石蜡油, 北京索莱宝生物科技有限公司; 脱脂乳粉, 美国 BD 公司; 浓硫酸, 天津市化学试剂一厂;  $\beta$ -乳球蛋白, 上海源叶生物有限公司; 杏仁 amandin 兔多克隆抗体, 天津国际生物医药联合研究院提供; 核桃全蛋白、花生全蛋白、芝麻全蛋白过敏原由本实验室前期制备。本实验试剂均为分析纯, 实验用水均为超纯水。

超纯水系统, 美国 Millipore 公司; 酶标仪、 $\text{CO}_2$  细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 低温恒温培养箱, 上海 EYELA 公司; BL610 型分析天平, 德国 Sartorius 公司; 磁力搅拌器、涡旋振荡仪, 德国 IKA 公司; pH 计, 天津亿诺科学试剂有限公司; 165-8000 型小垂直板电泳槽, 美国 BIO-RAD 公司; Quick Gel 6200 型凝胶成像系统, 北京普迈精医科技有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 脱脂杏仁粉制备

取适量杏仁去皮并充分研磨, 按照质量体积比 1:10 比例加入正己烷, 恒温磁力搅拌脱脂, 抽滤弃去有机溶剂, 将沉淀置于通风橱过夜得到脱脂杏仁粉充分研磨后  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存<sup>[2]</sup>。

### 1.2.2 Amandin 的提取

取  $100 \text{ g}$  脱脂杏仁粉, 按照质量比 1:30 加入双蒸水, 磁力搅拌室温提取  $1 \text{ h}$ , 混合物  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $8000 \text{ r/min}$  离心  $20 \text{ min}$ , 取上清液, 过滤得到澄清的淡黄色液体,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  放置过夜后,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10000 \text{ r/min}$  离心  $30 \text{ min}$ , 得到乳白色沉淀。溶于 PBS (pH 7.4) 中双蒸水透析后  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存<sup>[2-3]</sup>。

### 1.2.3 Amandin 的鉴定

首先配制 12% 分离胶, 5% 浓缩胶灌于制胶板后制备凝胶, 然后将 amandin 与上样缓冲液、 $\beta$ -巯基乙醇按照体积比为 5:4:1 混合均匀, 将待测样品  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  沸水浴  $5 \text{ min}$  后离心, 样品上样量为  $10 \mu\text{L/孔}$ , 预染

Marker 5  $\mu\text{L}$ 。待电泳结束后将凝胶染色 2 h, 脱色 1 h 后置于成像仪中曝光成像。

#### 1.2.4 单克隆抗体的制备、效价与亲和力测定

将纯化后的甜杏仁过敏原 amandin 作为免疫原对 BALB/c 小鼠进行腹腔注射。当效价达到预期要求后取小鼠脾脏与骨髓瘤细胞进行 PEG 化学融合, 经过 3~4 次亚克隆筛选稳定持续分泌抗体的强阳性单克隆细胞株, 最后采用小鼠体内诱生法进行单克隆抗体的大量制备<sup>[11]</sup>。采用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化抗体, 然后用间接 ELISA 方法测定纯化后抗体效价, 蛋白包被量为 1  $\mu\text{g}/\text{孔}$ <sup>[12]</sup>。最后用 BCA 试剂盒测定抗体浓度后于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

采用间接 ELISA 测定纯化后抗体亲和力常数<sup>[13]</sup>。将 amandin 依次稀释为 1、0.5、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包板, 单克隆抗体从 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  开始 2 倍梯度稀释 10 个浓度分别加入 3 个包被量的酶标板中, 其余步骤不变, 以抗体浓度的对数值为横坐标、450 nm 处吸光度  $A_{450}$  为纵坐标拟合曲线, 按照式 (1) 计算, 最后取平均值即为抗体亲和力常数 ( $K_a$ )

$$K_a = \frac{n-1}{2(n\rho' - \rho)} \quad (1)$$

式中:  $n$  为每组中两个包被原浓度的倍数,  $\rho'$  和  $\rho$  分别为每组中两个 50% 最大  $A_{450}$  所对应的抗体浓度。

#### 1.2.5 双抗体夹心 ELISA 方法

双抗体夹心 ELISA 方法基本操作参考文献<sup>[14-15]</sup>。将纯化后的抗杏仁蛋白单克隆抗体用包被液稀释后包被于酶标板, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 12~16 h 后弃去孔中液体, 用 PBST 洗板 3 次。加入封闭液 200  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后弃去, PBST 洗 3 次。加入梯度稀释的 amandin 溶液, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后弃去孔中液体, PBST 洗板 4 次。加入稀释一定倍数的兔多克隆抗体, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, PBST 洗板 4 次。加入 HRP 标记的兔二抗, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, PBST 洗板 5 次。提前 15 min 配制底物溶液, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 暗处显色 10 min。加入终止液 (1.25 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液) 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。

#### 1.2.6 方法特异性

特异性是指在检测样品时, 分析方法能够精准、专一地检测目标物质, 即使存在干扰成分也能保持较高准确度。选择 4 种常见过敏原, 分别为核桃全蛋白、芝麻全蛋白、花生全蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白进行特异性实验, 评价检测方法的特异性。以 PBS 作为阴性对照, 交叉反应物对应的吸光度为  $P$ , 阴性对照吸

光度为  $N$ , 当  $P/N > 2$  时认为检测方法对该蛋白存在交叉反应<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.7 实际样品的基质消除

选择超市中 3 种标签上标注未含有杏仁过敏原的面包、饼干及巧克力作为阴性样品, 以含 0.03% 吐温-20 的 PBS 缓冲液为提取液, 按照不同比例混合均匀, 经磁力搅拌提取 1 h, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用<sup>[18]</sup>。

向各稀释液中加入杏仁蛋白 amandin 标准品, 按照上述前处理步骤使各提取液的终质量浓度依次为 375、187.5、93.75、46.88、23.44、11.72、5.86、2.93、1.46  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。随后使用双抗体夹心 ELISA 对溶液中的 amandin 进行定量检测, 并将拟合结果与标准曲线进行比较来确定基质消除的最佳条件。

#### 1.2.8 实际样品的添加回收试验

分别在 3 种实际样品中添加 amandin 标准品, 通过上述确定的前处理及最佳基质消除条件提取蛋白, 使其终质量浓度分别为 7.5、15、30、60、120  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 并以未添加 amandin 的原始样品作为阴性对照。使用双抗体夹心 ELISA 对溶液中的 amandin 进行定量检测, 蛋白理论添加质量浓度为  $\rho_{\text{理论}}$ , 计算样品中 amandin 的实际检测质量浓度 ( $\rho_{\text{检测}}$ ) 并按照式 (2) 计算回收率 ( $R$ ), 以验证该方法在实际应用中的准确性。

$$R = \frac{\rho_{\text{检测}}}{\rho_{\text{理论}}} \times 100\% \quad (2)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 amandin 鉴定

amandin 作为杏仁中最主要过敏蛋白, 属于 11S 球蛋白家族, 水溶性好, 通过二硫键将相对分子质量不同的酸性多肽 ( $4.0 \times 10^4 \sim 4.2 \times 10^4$ ) 和碱性多肽 ( $2.0 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4$ ) 连接, 因此具有良好的热稳定性<sup>[17-19]</sup>, 是一种良好的稳定标记蛋白<sup>[20]</sup>。杏仁 amandin 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 相对分子质量条带分布位置正确, 表明提取蛋白为 amandin 且杂带较少, 纯度较高, 可以作为免疫原进行后续实验。

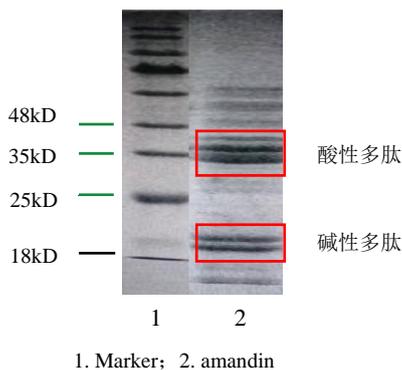


图 2 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis

### 2.2 杏仁 amandin 单克隆抗体效价测定

最终制备纯化了 3 株抗 amandin 单克隆抗体, 分别命名为: 5G8、6B9、5E12。通过包被 1 μg/孔的 amandin 用间接 ELISA 测定纯化后的抗体效价, 结果见表 1。制备的 3 株单克隆抗体效价对应的 A<sub>450</sub> 均在 0.8~1.2 之间, 都能够与 amandin 进行特异性识别。6B9、5G8 对应抗体效价比 5E12 略高, 表明其中有效抗体的浓度比较高。

表 1 单克隆抗体效价测定结果

Tab. 1 Monoclonal antibody titer assay results

细胞株编号	A <sub>450</sub>	效价
6B9	1.129	5.12×10 <sup>5</sup>
5G8	0.966	5.12×10 <sup>5</sup>
5E12	1.075	2.56×10 <sup>5</sup>

### 2.3 amandin 单克隆抗体亲和力测定

亲和力体现了抗体识别结合抗原能力的强弱也是评价抗体灵敏度的重要指标, 更是免疫检测方法建立的基础。单克隆抗体亲和力测定结果见表 2。最终选择亲和力最高的 6B9 单克隆抗体进行后续 ELISA 方法建立。

表 2 单克隆抗体亲和力测定结果

Tab. 2 Table 1 Monoclonal antibody affinity test results

抗体	包被浓度 (μg/mL)	抗体浓度 (μg/mL)	K <sub>a</sub> (L/mol)	K <sub>a</sub> 均值
5G8	1	4.31×10 <sup>-2</sup>	6.43×10 <sup>9</sup>	3.38×10 <sup>9</sup>
	0.5	1.10×10 <sup>-1</sup>	1.05×10 <sup>9</sup>	
	0.25	1.75×10 <sup>-1</sup>	2.64×10 <sup>9</sup>	
6B9	1	6.25×10 <sup>-3</sup>	1.16×10 <sup>10</sup>	1.23×10 <sup>10</sup>
	0.5	5.78×10 <sup>-3</sup>	1.33×10 <sup>10</sup>	
	0.25	6.07×10 <sup>-3</sup>	1.20×10 <sup>10</sup>	
5E12	1	3.31×10 <sup>-2</sup>	7.32×10 <sup>9</sup>	3.87×10 <sup>9</sup>
	0.5	7.88×10 <sup>-2</sup>	1.20×10 <sup>9</sup>	
	0.25	1.12×10 <sup>-1</sup>	3.08×10 <sup>9</sup>	

### 2.4 封闭液的选择与浓度优化

利用棋盘滴定方法对捕获抗体与检测抗体的最佳工作浓度进行了筛选, 确定捕获单克隆抗体包被量为 0.1 μg/孔, 兔多克隆抗体稀释倍数为 6.4×10<sup>4</sup> 进行后续实验。双抗体夹心 ELISA 最佳条件判定标准: 阴性对照液 (PBS) 吸光度小于 0.1 且 P/N 最大。

基于双抗体夹心 ELISA 方法的检测限与空白值密切相关, 初步尝试通过优化封闭液来尽可能除去其他非特异性吸附, 降低本底值。考察常见的 10 种封闭剂的作用效果 (表 3)。由表 3 可知, 不同封闭液的 P/N 存在较大差别, 因此有必要进行封闭操作。由于 0.5% 脱脂乳粉 P/N=25.234 为最大值, 虽然 1% 脱脂乳粉阴性值更低, 但考虑到方法灵敏度和成本方面最终选择最佳封闭液为 0.5% 脱脂乳粉。

表 3 双抗体夹心 ELISA 封闭液的选择

Tab. 3 Selection of blocking solution for sandwich ELISA

封闭液	P	N	P/N
0.5% 脱脂乳粉	1.767	0.070	25.234
1% 脱脂乳粉	1.635	0.065	25.137
2% 脱脂乳粉	1.524	0.063	23.903
5% 脱脂乳粉	1.397	0.061	22.896
PBST	1.942	0.175	11.068
PBS	1.479	0.174	8.475
0.5% BSA	1.628	0.110	14.795
1% BSA	1.664	0.122	13.633
0.5% 明胶	1.919	0.182	10.491
1% 明胶	1.980	0.240	8.219

### 2.5 样品稀释液 pH 值优化

免疫检测方法的灵敏度依赖抗原抗体特异性识别, 而缓冲液的酸碱性是影响蛋白质空间结构的关键因素, 所以需考察不同 pH 的 amandin 稀释液对免疫反应的影响, 进一步优化方法的灵敏度。上样量为 100 μL/孔, 其他条件不变, 按照基本程序操作, 结果见表 4。当蛋白稀释液 pH 为 6.5 时阳性孔吸光度最高, 表明在偏酸性的环境下抗体和抗原之间的识别能力最强, 这可能是因为 amandin 的酸性多肽位于分子表面, 相比于碱性多肽更容易被抗体识别<sup>[1]</sup>。但考虑到其阴性对照孔吸光度略高于中性条件影响方法检测限。根据判定标准 P/N, 最终选择 pH 7.4 为最佳条件。

表 4 双抗体夹心 ELISA pH 选择

Tab. 4 P/N of sandwich ELISA with different pH values

pH	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>P/N</i>
4.6	0.988	0.058	16.755
5.5	1.272	0.064	19.737
6.5	1.329	0.062	21.283
7.4	1.259	0.058	21.497
8.7	1.161	0.058	19.767

2.6 双抗体夹心 ELISA 标准曲线的建立

杏仁过敏原双抗体夹心 ELISA 标准曲线如图 3 所示。检测限 (limit of detection, LOD) 定义为 10 个空白对照孔吸光度平均值+3 倍标准偏差对应的蛋白浓度。定量限 (limit of quantification, LOQ) 定义为 10 个空白对照孔吸光度平均值+10 倍标准偏差对应的蛋白浓度<sup>[21]</sup>。结果如图 3 所示, 标曲线性方程为  $y=0.86319x+2.13949$ ,  $R^2=0.997$ 。检测限达到  $(0.88 \pm 0.08)$  ng/mL, 线性范围为 5.86~187.5 ng/mL。推测该夹心 ELISA 方法良好的灵敏度不仅依赖于制备的高亲和力单克隆抗体, 也得益于多克隆抗体作为检测抗体的信号放大作用。

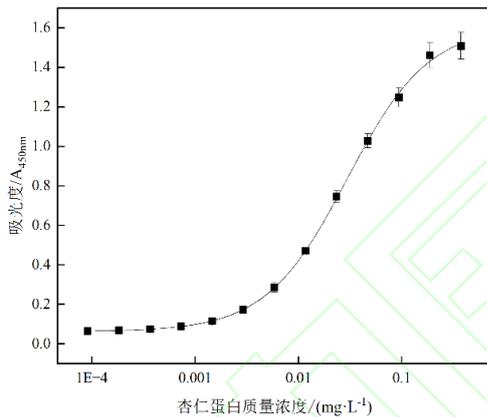


图 3 杏仁过敏原双抗体夹心 ELISA 标准曲线(n = 3)

Fig. 3 Establishment of sandwich ELISA standard curve(n = 3)

2.7 方法特异性

特异性是评价方法实用性的重要一环, 在一定程

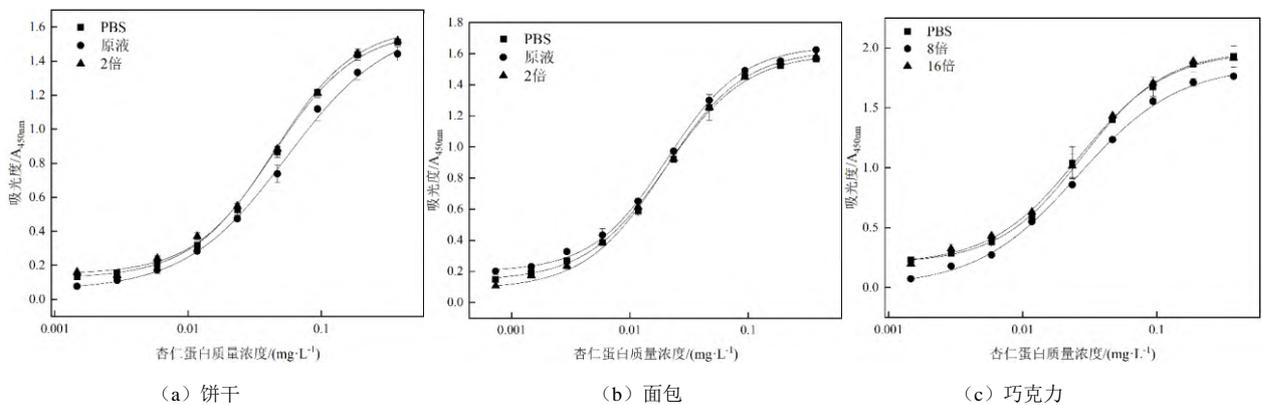


图 5 不同稀释倍数的饼干、面包、巧克力的样品溶液及 PBS 溶液的标准曲线(n = 3)

Fig. 5 Standard curves for biscuit, bread and chocolate sample solutions and PBS solutions at different dilutions(n = 3)

度上反应了抗体的专一性。通过选择几种常见的过敏原蛋白如核桃全蛋白、花生全蛋白、芝麻全蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白进行特异性实验评价检测方法的特异性, 结果如图 4 所示。其他 4 种过敏原的 *P/N* 远低于杏仁蛋白且比值均小于 2, 表明该方法不存在交叉反应, 具有良好的特异性。

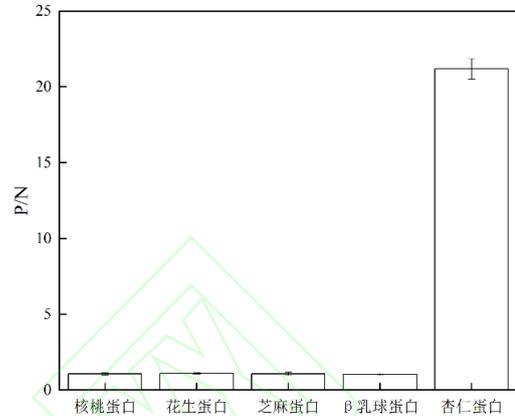


图 4 基于 ELISA 双抗夹心法的特异性分析(n = 3)

Fig. 4 Specificity of the developed sandwich ELISA(n = 3)

2.8 实际样品的基质消除试验

食品中碳水化合物及脂肪等物质的存在会降低抗原抗体的特异性识别使得检测结果不准确, 在实际应用中往往需要复杂的前处理操作来达到消除基质影响的目的, 致使拖慢了检测效率。所以简单有效的前处理方法显得尤为重要, 提取液中加入适量的表面活性剂和掩蔽剂能有效消除基质干扰。不同稀释倍数的饼干、面包、巧克力样品溶液及 PBS 溶液的标准曲线如图 5 所示。

当饼干样品提取液用 PBS (pH 7.4) 2 倍稀释时, 加标后拟合趋势线与标准曲线基本重合, 表明在该稀释倍数下, 样品溶液的基质不会影响抗原抗体特异性结合, 因此选用 2 倍稀释来消除饼干提取液的基质影响且最终检测限为 (7.78±0.18) ng/mL。

当面包样品提取液用 PBS (pH 7.4) 2 倍稀释时, 加标后拟合趋势线与标准曲线基本重合, 表明在该稀释倍数下, 样品溶液的基质不会影响抗原抗体特异性结合, 因此选用 2 倍稀释来消除面包提取液的基质影响, 检测限为 (9.07±0.23) ng/mL。

当巧克力样品提取液用 PBS (pH 7.4) 16 倍稀释时, 加标后拟合趋势线与标准曲线基本重合, 表明在该稀释倍数下, 样品溶液的基质不会影响抗原抗体特异性结合, 基质影响基本消除, 相比于饼干和面包, 巧克力基质对检测准确性影响比较大的原因可能是其复杂的成分组成和色素影响, 检测限为 (327.37±0.25) ng/mL。

### 2.9 实际样品的添加回收试验

为了评价该方法在实际应用中的准确性, 将上述 3 种不含 amandin 的食品样品加入 5 种终浓度分别为 7.5、15、30、60 和 120 µg/L 的 amandin, 样品制备后, 用双抗体夹心 ELISA 方法测定提取液中 amandin 并验证回收率结果。实验结果如表 5 所示, 3 种样品原始样均为阴性结果且回收率均在 82.16%~112.04% 的范围内, 表明该方法可用于真实食品样品中 amandin 的准确检测。

表 5 杏仁实际样添加回收测定结果 ( $n=3$ )

Tab. 5 Results of spike and recovery assay of food samples

( $n=3$ )

样品	添加终浓度 (µg/L)	测定量±SD	回收率(%)
面包	0.0	ND	—
	7.5	7.27±0.558	96.93
	15	15.03±0.234	100.22
	30	24.65±0.548	82.16
	60	61.05±4.116	101.74
	120	122.36±3.931	101.97
饼干	0.0	ND	—
	7.5	6.22±1.339	82.93
	15	14.25±0.411	95.00
	30	33.61±3.081	112.04
	60	64.19±0.679	106.98

	120	105.14±8.249	87.62
巧克力	0.0	ND	—
	7.5	7.52±0.793	100.31
	15	15.66±0.694	104.42
	30	30.12±1.818	100.41
	60	53.05±5.322	88.33
	120	119.97±3.248	99.98

## 3 结论

通过提取杏仁主要过敏原 amandin, 制备了高亲和力和单克隆抗体, 并将其作为捕获抗体, 兔多克隆抗体作为检测抗体, 通过各条件优化的基础上建立了双抗体夹心 ELISA 方法检测食品中的杏仁蛋白 amandin, 检测限为 (0.8±0.08) ng/mL, 线性范围为 5.86~187.5 ng/mL。特异性实验证明该方法与芝麻全蛋白、花生全蛋白、核桃全蛋白和 β-乳球蛋白均无交叉反应。添加回收试验中面包、饼干、巧克力样品的回收率范围为 82.16%~112.04%, 可进一步用于实际样品中 amandin 的准确定量分析。

本研究首先通过建立的双抗体夹心 ELISA 方法可以高效准确的检测食品中的微量杏仁过敏原, 灵敏度优于目前报道的其他双抗体夹心 ELISA 方法。其次, 针对检测体系中关键试剂的优化为国内商业化试剂盒的开发提供技术性参考并且为我国食品过敏原检测标准的制定提供有益借鉴。最后, 对于实际应用方面, 方法的建立有利于实现后续成果转化, 进而为规范市场食品包装中过敏原标签提供助力。

### 参考文献:

- [1] LONG F F, FAN X H, ZHANG Q A. Effects of ultrasound on the immunoreactivity of amandin, an allergen in apricot kernels during debitterizing[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 95:1-10.
- [2] LUO X, AI M Y, WU Y Y, et al. Malondialdehyde treatment reduced immunoreactivity of amandin and delayed its digestion[J]. Food Quality and Safety, 2023, 7:1-14.
- [3] 刘俊伟, 吴雨晴, 李明新, 等. 间接竞争 ELISA 检测杏仁过敏原 Amandin[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(04): 172-176.
- [4] MANDALARI G, MACKIE A R. Almond Allergy: An

- Overview on Prevalence, Thresholds, Regulations and Allergen Detection[J]. *Nutrients*, 2018, 10(11):1-12.
- [5] COSTA J, MAFRA I, CARRAPATOSO I, et al. Almond allergens: molecular characterization, detection, and clinical relevance[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(6):1337-1349.
- [6] BEZERRA M, RIBEIRO M, IGREJAS G. An Updated Overview of Almond Allergens[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8):1-20.
- [7] PRIETO N, INIESTO E, BURBANO C, et al. Detection of almond allergen coding sequences in processed foods by real time PCR[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(24):5617-5624.
- [8] 张洁琼, 高淑霞, 生威, 等. 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测杏仁过敏原苦杏仁球蛋白[J]. *食品科学*, 2013, 34(16): 173-177.
- [9] CIVERA A, GALAN-MALO P, SEGURA-GIL I, et al. Development of sandwich ELISA and lateral flow immunoassay to detect almond in processed food[J]. *Food Chemistry*, 2022, 371:1-9.
- [10] SU M, VENKATACHALAM M, LIU C, et al. A murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for almond (*Prunus dulcis* L.) detection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(45):10823-10833.
- [11] 邓小芳. 食品中四种重要过敏原酶联免疫检测方法的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [12] 王文彬. 乳及乳制品中主要食源性致病菌的免疫快速检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [13] 孙凤霞. 三聚氰胺单克隆抗体制备及其高灵敏快速检测技术研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [14] 朱礼艳, 李思越, 黄建联, 等. 大豆过敏原夹心 ELISA 和竞争 ELISA 方法的建立及其在加工食品中应用研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(24): 180-188.
- [15] 丰东升, 马颖清, 陈柔含, 等. 乳铁蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. *食品工业*, 2022, 43(11): 295-299.
- [16] 朱永智. 牛乳中三种主要过敏原双抗夹心 ELISA 检测方法的建立[D]. 上海: 上海师范大学, 2020.
- [17] ZAFFRAN V D, SATHE S K. Immunoreactivity of Biochemically Purified Amandin from Thermally Processed Almonds (*Prunus dulcis* L.)[J]. *Journal of food science*, 2018, 83(7):1805-1809.
- [18] VENKATACHALAM M, TEUBER S S, ROUX K H, et al. Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(12):3544-3548.
- [19] SU M, LIU C, ROUX K H, et al. Effects of processing and storage on almond (*Prunus dulcis* L.) amandin immunoreactivity[J]. *Food Research International*, 2017, 100:87-95.
- [20] ROUX K H, TEUBER S S, ROBOTHAM J M, et al. Detection and stability of the major almond allergen in foods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(5):2131-2136.
- [21] 杭天, 赵金龙, 林洪, 等. 榛子过敏原双抗夹心酶联免疫吸附方法的建立及应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(01): 110-119.