

压电免疫传感技术快速筛检花生中过敏原

王毅谦¹, 许琼², 郭 旻³, 沈伟健¹, 吴福平³, 邵景东^{3*}

(1. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210000; 2. 江苏梁丰食品集团有限公司, 张家港 215600;
3. 张家港出入境检验检疫局, 张家港 215600)

摘 要: **目的** 采用压电免疫传感技术快速筛检花生过敏原。**方法** 对花生主要过敏蛋白进行分离纯化, 免疫新西兰大白兔获得花生抗体, 对其的效价, 半数抑制浓度等值进行测定。运用自组装的压电免疫传感器包被花生抗体, 制作标准曲线, 确定灵敏度, 回收率及重现性。**结果** 分离纯化花生过敏原蛋白纯度为 90.7%, 最适的花生包被抗原浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 自组装的压电传感器检测花生过敏原浓度在 1~316 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有较好的线性关系, 灵敏度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 回收率介于 92.3%~113.4%之间, 重现性变异系数为 6.04%。**结论** 本项目建立的压电免疫传感技术检测花生过敏原与目前较多的光学分析相比灵敏度更高, 实现了快速、在线检测, 成本低, 仪器简单, 具有广阔的应用空间。

关键词: 压电免疫传感器; 花生过敏原; 胶体金

Rapid screening of peanut allergen by piezoelectric immunosensing technique

WANG Yi-Qian¹, XU Qiong², GUO Yang³, SHEN Wei-Jian¹, WU Fu-Ping³, SHAO Jing-Dong^{3*}

(1. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210000, China;
2. Jiangsu Liang Feng Food Group Co., Ltd, Zhangjiagang 215600, China;
3. Zhangjiagang entry-exit inspection and quarantine bureau, Zhangjiagang 215600, China)

ABSTRACT: Objective The study was to establish a new method for the rapid screening of peanut allergen by piezoelectric immunosensing technique. **Methods** Peanut major allergen proteins were isolated and purified. Peanut antibodies were gotten by immunizing New Zealand white rabbits. The potency, IC_{50} equivalents were determined. The use of self-assembly of a piezoelectric sensor coated peanuts immune antibodies, making the standard curve to determine the sensitivity, recovery and reproducibility. The sensitivity, recovery and reproducibility were detected by the standard curve of using self-assembly piezoelectric immunosensor coated peanut antibody. **Results** The purity of peanut allergen protein was 90.7%, and the most suitable concentration of coated peanut antigen was 0.1 $\mu\text{g/mL}$. There is a good linear relationship in range of 1 $\mu\text{g/mL}$ to 316 $\mu\text{g/mL}$ by self-assembly piezoelectric sensors to detect peanut allergen concentration. The detection sensitivity was 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Recovery rate was between 92.3%~113.4% and repeatability coefficient of variation was 6.04%. **Conclusion** Compared with other optical methods, this method has a higher sensitivity and also has other advantages such as rapid detection, online detection, low costs, with simple equipment, and it can be widely applied.

基金项目: 张家港市科技计划项目(ZKS0808)

Fund: Supported by Projects of Zhangjiagang Science and Technology Plans(ZKS0808)

*通讯作者: 邵景东, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品检验、卫生检疫等。E-mail: sjdcq@126.com

*Corresponding author: SHAO Jing-Dong, Director Technicians, Zhangjiagang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.59, Renming Road, Zhangjiagang 215600, China. E-mail: sjdcq@126.com

KEY WORDS: piezoelectric immunosensor; peanut allergen; colloidal gold

1 引言

花生是FAO报告的8类常见过敏食品之一,花生过敏甚至可以由最小剂量触发,症状包括水肿、皮肤风团疹、呼吸困难,儿童花生过敏通常会产生严重的变态反应,有时会引起休克并危及生命。花生过敏反应因其潜在的危险性、长期性以及不断增加的发病率而日益受到重视^[1,2]。食品的过敏原是国内外检测、监控的一个重点、难点,目前已有多种ELISA、PCR检测试剂盒面世,然而这些方法往往需要酶标反应物,分析过程繁琐,检测时间长或需要昂贵仪器,很难满足现场快速检测的要求。因此设计建立一套先进、快速、适用的食品过敏原检测方法对于确保食品质量和消费者安全十分必要。

压电传感器是上世纪60年代建立起的一种能够检测ng水平质量变化的表面分析新型传感器技术^[3],它的敏感元件由压电材料制成,包括换能器件、各种有机、无机分子膜等。压电材料受力后表面产生电荷,电荷经电荷放大器和测量电路放大并且变换阻抗后就成为正比于所受外力的电量输出。压电免疫传感器可促使免疫诊断方法向定量化、操作自动化的方向发展,有利于进行生命体活动的研究,因此成为生物传感器的研究热点之一,目前它的应用已涉及到临床医学与生物检测技术、食品工业、环境监测与处理等广泛领域^[4-7]。

本研究尝试采用自组装的压电免疫传感器对花生过敏原检测,以期实现过敏原检测方法领域的新突破以及压电传感器的新应用,为今后二者领域研究提供建议和数据参考。

2 材料与方法

2.1 主要试剂与仪器

实验材料:红皮小粒花生于本地市场购买。

试剂:牛血清蛋白(BSA)购自上海华美生物工程有限公司;氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)购自上海第一化学试剂厂;1%柠檬酸三钠购自中国医药集团上海化学试剂公司;弗氏完全(不完全)佐剂购自Sigma公司;2月龄雄性新西兰大白兔(二级)购自上海陈行实验用兔有

限公司;其余试剂(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司。

仪器:DELTA-320型酸度计、AB104-N型电子分析天平、PB4001-E型精密电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);DF-101S型集热式磁力搅拌器(江苏省金坛市正基仪器有限公司);H7000透射电镜(日立公司);Multiskan MK3酶标仪(Thermo Labsystems公司,美国);垂直板电泳仪和转移系统(Bio-Rad公司,美国);CHI-400型石英晶微天平(QCM)、石英晶片、三电极系统(上海辰华仪器厂);AKTA蛋白纯化系统(瑞典GE Healthcare公司)。

2.2 方法

2.2.1 花生过敏蛋白的制备

花生仁去红衣磨粉后,将粉末按正己烷1:10(w:v)脱脂得花生脱脂粉,与含0.01 mol/L β -巯基乙醇和0.5 g/L EDTA $\cdot$ 2Na的预冷PBS 1:10(w:v)混合浸提,4℃下静置过夜。花生浸液16000 r/min离心30 min后取上清。花生浸液缓慢加入硫酸铵使其饱和度达40%,4℃下静置过夜,16000 r/min离心30 min,上清液继续缓慢加入硫酸铵至饱和度达65%,16000 r/min离心30 min,沉淀用PBS复溶,在pH计的监控下等电点沉淀,加2 mol/L的 H_2SO_4 至花生过敏原Ara h2 pH 5.2,25000 r/min离心30 min,上清液进一步沉淀,调pH至花生过敏原Ara h1 pH 4.55;所得沉淀物均复溶于PBS中。蛋白液在透析袋中充分透析后使用AKTA系统进行纯化:经Superdex 200(10 mm $\times$ 300 mm)凝胶柱层析,以pH 7.0的含0.15 mol/L NaCl的50 mmol/L磷酸缓冲液进行洗脱。对得到的洗脱峰分别收集,SDS-PAGE分析鉴定后冻干^[6-9]。

2.2.2 胶体金的制备及鉴定

参考相关文献,采用双蒸水配制100 mL 0.1 g/L氯金酸溶液,加热至沸腾,迅速加入37℃ 10 g/L柠檬酸三钠溶液4.5 mL,搅拌加热15 min,至溶液呈现清亮的酒红色^[10-12]。4℃冰箱保存备用。采用紫外扫描和透射电镜鉴定制备后的胶体金,在390~700 nm波长下扫描,检测其最大吸收波长及峰宽。拍片测量胶体金颗粒直径。

2.2.3 动物免疫与抗体的纯化

用纯化后的花生抗原免疫12只健康雄性新西兰

大白兔,将其分为2组,每组6只,免疫前一周从耳缘静脉采血作阴性对照。首次免疫采用背部皮下多点注射(1组:花生抗原+完全弗氏佐剂 40 μg ; 2组:花生抗原+胶体金 40 μg)一个月后进行加强免疫采用四肢内部肌肉注射,加强免疫共4次,每次间隔2周(1组:花生抗原+不完全弗氏佐剂 40 μg ; 2组:花生抗原+胶体金 40 μg)。效价合格后,采血,待血液凝集后,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温箱静置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 20 min, 取上清。采用饱和硫酸铵盐析法纯化抗体^[13]。

2.2.4 采用间接 ELISA 法测定花生过敏原的效价,将阳性血清的 $A_{450} \geq$ 阴性对照的 2.1 倍作为抗血清效价^[14]。

2.2.5 自组装压电传感器抗体包被浓度的选择

将抗体梯度稀释为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下浸泡 3 h 后测定频率, 记录频率 F1; 3% BSA 孵育 1 h, 分别与 1 mg/mL 对应的抗原进行反应, 记录频率 F2, 频移值 $\Delta F(F1-F2)$ 最高时作为抗体包被浓度^[15,16]。

2.2.6 回收率^[16]

加标回收包被有混合抗体的传感器: 市场采购花生牛奶 1 mL, 稀释 50 倍后加入浓度分别为 10、31.62、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的过敏原蛋白, 测定回收率。公式如下:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{加标试样测定值} - \text{试样测定值}}{\text{加标量}} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 花生蛋白的分离纯化

花生蛋白浸液经过硫酸铵分级沉淀, 等电点沉淀后, AKTA 蛋白纯化系统纯化过敏原蛋白, 纯化后得到三个洗脱峰(图 1), 分离纯化花生过敏原蛋白纯度为 90.7%。

3.2 SDS-PAGE 鉴定

通过检索资料^[15-17], 花生主要过敏原成分为 Ara h 1(相对分子量 64 kDa)、Ara h 2(相对分子量 18 kDa), 图 1 中蛋白收集峰 3 中花生蛋白相对分子量 65 kDa、19 kDa 处条带确定为目标峰。

3.3 胶体金制备结果

向煮沸后氯金酸溶液中加入 1% 柠檬酸三钠水溶

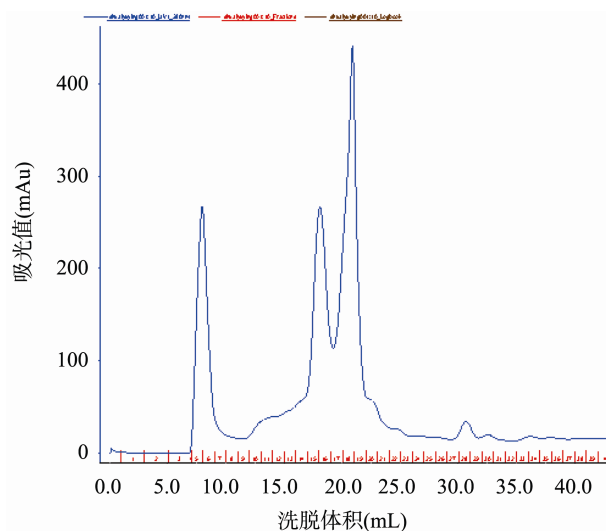


图 1 花生蛋白洗脱峰

Fig.1 Peanut protein elution peak

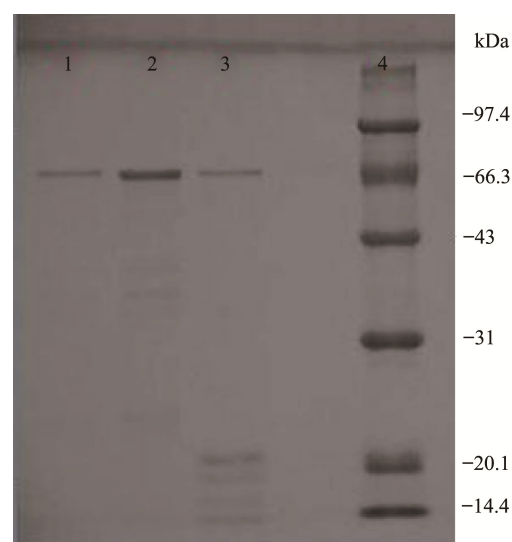


图 2 花生过敏原 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of proteins extracted from peanuts

液, 最初的金黄色在 2 min 内渐变为淡蓝色-紫色-紫红色-酒红色。光谱扫描检测显示最大吸收峰为 521 nm(图 3)。胶体金电镜检测呈现良好的分散状态, 平均粒径为 16.5 nm, SD 小于 3 nm(图 4)。

3.4 采用间接 ELISA 法测定花生过敏原的效价, 以阳性血清的 $A_{450} \geq$ 阴性对照的 2.1 倍作为抗血清的效价, 花生包被抗原最适浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗体最佳稀释度为 1:4000。

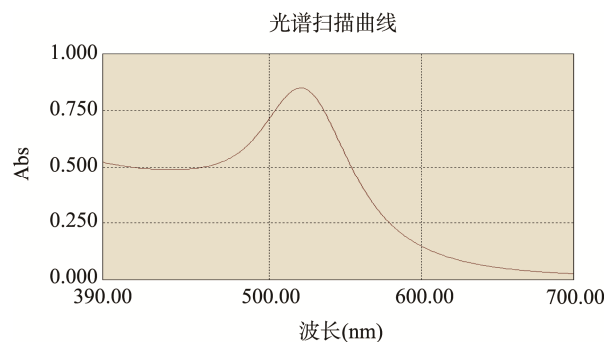


图 3 胶体金溶液的紫外扫描图谱
Fig.3 UV spectrum of colloidal gold solution

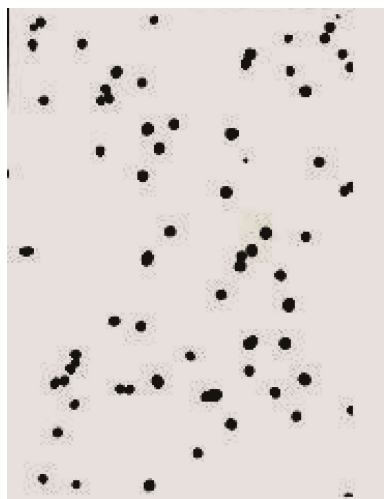


图 4 胶体金的 TEM 照片(×80000)
Fig. 4 TEM photos of colloidal gold(×80000)

3.5 制作竞争ELISA标准曲线并确定半数抑制浓度 IC₅₀ 值

以 A/A_0 为纵坐标, 以 100 倍的标准溶液浓度的对数值为横坐标作图, 绘制竞争标准曲线, 花生抗原浓度在 0.01~30 ng/mL 范围内具有较好的线性关系(图 5), 标准曲线为 $Y=-0.1212X+0.9285(R=0.9819)$, IC₅₀ 为 34.28 ng/mL, 检测限为 0.1 ng/mL。

3.6 结果显示花生抗体包被浓度为 0.1 mg/mL 时频率变化最大(表 1)。

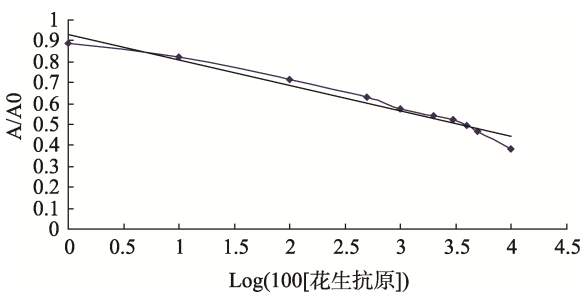


图 5 花生的抑制率曲线
Fig.5 Inhibition curve of peanut

表 1 抗体包被浓度的选择(n=5)

Table 1 Coating concentration of antibody on the electrode (n=5)

浓度(mg/mL)	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
花生ΔF (Hz)	253.76	332.19	397.48	435.33	418.17	362.93
SD	6.17	5.42	10.22	12.34	9.65	7.37

3.7 灵敏度

将包被混合抗体的传感器分别检测 1、0.5、0.25、0.1、0.05、0.01、0.005 μg/mL 花生抗原, 频率变化直至没有响应信号出现为止, 此时最低过敏原的浓度即为检测灵敏度。

检测显示花生过敏原浓度为 0.1 μg/mL 时, 频率变化值为 17.28±2.75 Hz, 降低浓度至 0.05 μg/mL 时则无规则信号, 确定检测灵敏度为 0.1 μg/mL(表 2)。

3.8 回收实验

通过标准曲线计算, 花生样品中过敏原的平均值为 11.20 μg/mL, 五个梯度加标实验回收率范围为 92.3%~113.4%, 平均值为 105%, 位于 90%~110%之间(表 3)。

3.9 重现性

间接竞争 ELISA 法检测梯度为 1、10、50、100、200 μg/mL 花生蛋白的平均变异系数为 4.98%, 免疫传感检测的平均变异系数为 9.62%(表 4), 平均变异系数均在 15%以内, 重复性良好, 适用于样品检测。

表 2 传感器灵敏度限的确定(n=5)
Table 2 The sensitivity by immunosensor (n=5)

蛋白浓度(μg/mL)	1.0	0.5	0.25	0.1	0.05	0.01	0.005
频率±标准差(Hz)	35.67±3.21	24.92±5.27	19.41±4.36	17.28±2.75	/	/	/

“/” 表示无信号

表 3 回收实验($n=5$)
Table 3 Recovery of allergen ($n=5$)

加标试样($\mu\text{g/mL}$)	加标量($\mu\text{g/mL}$)	回收率(%)
21.91	10	107.1
44.15	31.62	104.2
57.35	50	92.3
124.6	100	113.4
227.6	200	108.2

表 4 方法重现性试验($n=5$)
Table 4 The reproducibility of the assay ($n=5$)

蛋白($\mu\text{g/mL}$)	$\Delta F \pm \text{SD}(\text{Hz})$	变异系数(CV, %)
1	32.73 $\pm$ 2.07	6.32
10	74.26 $\pm$ 2.30	3.10
50	108.85 $\pm$ 4.59	4.22
100	136.71 $\pm$ 12.36	9.04
200	140.32 $\pm$ 10.57	7.53
平均 CV		6.04

4 讨 论

生物传感器具有高效、灵敏、特异、结构小巧、经济实用等诸多优点,作为一种新兴的检测手段,可以在物质分子层面进行快速、微量检测,目前正成为一种强有力的通用分析工具发展到临床医学与生物检测技术、食品工业、环境监测与处理等广泛领域^[18]。

本项目将电子器械压电传感器与生物技术中的免疫学方法相结合,促进免疫诊断方法向定量化、操作自动化的方向发展,有利于进行生命体活动的研究。项目建立的过敏原电化学分析与目前较多的光学分析相比有其特有优势,不但实现了过敏原的快速筛检,同时解决了在线检测,不受样品颜色、浊度的影响(即液体样品可以不经处理,不需分离),所需仪器设备相对简单,因此具有广阔的应用空间^[19]。

实验证明,自主研发组装包被花生抗体的压电传感器,检测浓度在 1~316 $\mu\text{g/mL}$ 范围内花生过敏原线性关系良好,线性回归方程为 $Y=51.423X+27.996(R=0.9900)$,灵敏度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$,检测时间短,成本低,可重复利用并实现现场检测和在线检测。作为目前生物传感器的研究热点之一,该项目研发产品不仅实现过敏原检测领域的突破,也为我国食品

过敏原监控和管理标准方法提供新的选择。

参考文献

[1] 李宏, 张宏誉. 花生过敏原致敏组分分析[J]. 中国微生物学和免疫学杂志, 2001, (21): 12-15.
Li H, Zhang HY. Analysis of sensitization components for peanut allergen [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2001, (21): 12-15.

[2] Al-Muhsen S, Clarke AE, Kagan RS. Peanut allergy: an overview[J]. Can Med Assoc J, 2003, 168(10): 1279-1285.

[3] 陈昕, 周康源, 顾宇, 等. 压电生物传感器研究进展[J]. 传感技术学报, 2002, 24(1): 35-38.
Chen X, Zhou KY, Gu Y, *et al.* The development and application of Piezoelectric biosensor[J]. J Transluction Technol, 2002, 24(1): 35-38.

[4] Su X, Chew FT, Li SFY. Self-assembled monolayer-based piezoelectric crystal immunosensor for the quantification of total human immunoglobulin E [J]. Anal Biochem, 1999, 273(1): 66-72.

[5] Suri C, Raje M, Mishra GC. Determination of immunoglobulin M concentration by piezoelectric crystal immunobiosensor coated with protamine[J]. Biosensors Bioelectr, 1994, 9(7): 535-542.

[6] 宁炜. 花生、河虾过敏原抗体的制备及压电免疫传感同步检测[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
Ning W. Preparation of the Antibodies of Peanuts and Shrimp Allergen and Simultaneous Detemination by Piezoelectric Immunosensor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.

[7] 沈丽燕. 食品过敏原压电型免疫传感快速检测技术的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
Shen LY. Determination of Food Allergen by Piezoelectric Immunosensor Detecting Assay[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.

[8] 贺昕, 熊晓东, 梁敬博, 等. 免疫检测用纳米胶体金的制备及粒径控制[J]. 稀有金属, 2005, 19(4): 471-474.
He X, Xiong XD, Liang JB, *et al.* Preparation of Colloidal Gold Used in Immunoassay and Cont Chinese rol of Particle Size[J]. J Rare Metals, 2005, 19(4): 471-474.

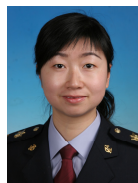
[9] 孙秀兰, 赵晓联, 汤坚. 单分散性胶体金的制备工艺优化[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(002): 151-154.
Sun XL, Zhao XL, Tang J. Optimization of preparation technique of monodispersion colloidal gold[J]. Immunol J, 2004, 20(002): 151-154.

[10] 彭剑淳, 刘晓达, 丁晓萍, 等. 可见光光谱法评价胶体金粒径及分布[J]. 军事医学科学院院刊, 2000, 24(003): 212-214.
Peng JC, Liu XD, Ding XP, *et al.* Evaluation of the particle diameter of collcidal gold and its distribution through visible spectroscopy[J]. Bull Acad Mil Med Sci, 2000, 24(003): 212-214.

- [11] 曹春梅, 焦新安, 刘海侠, 等. 斑点免疫金渗滤法快速检测沙门氏菌 O9 抗原的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(003): 210–212.
- Cao CM, Jiao XA, Liu HX, *et al.* Rapid detection of O9 antigen of Salmonella by dot immune-gold filtration assay[J]. Chin J Zoonoses, 2005, 21(003): 210–212.
- [12] John B, Hansen K, Mørk E, *et al.* Colloidal gold conjugated monoclonal antibodies, studied in the BIAcore biosensor and in the Nycocard immunoassay format[J]. J Immunol Methods, 1995, 183(1): 167–174.
- [13] 王通, 梁炫强, 李玲. 花生致敏原的研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(003): 353–358.
- Wang T, Liang XQ, Li L. Progress of peanut allergens[J]. Chin J Oil Crop Sci, 2007, 29(003): 353–358.
- [14] 张在军, 毛露甜, 向军俭, 等. Dot-ELISA 法同时检测多种食品过敏原的实验研究[J]. 食品科技, 2005, (004): 69–71.
- Zhang ZJ, Mao LT, Xiang JJ, *et al.* Experimental study on a protocol of simultaneous detection to multiple food allergens by Dot-ELISA[J]. Food Sci Technol, 2005, (004): 69–71.
- [15] 张波. 压电石英晶体凝血分析及微阵列免疫传感器的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2002.
- Zhang B. Experimental study of piezoelectric quartz crystal coagulation analysis and microarray immunosensor[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2002.
- [16] 缪璐, 刘仲明, 张水华. 用于乙肝表面抗原及其抗体同步检测压电免疫传感器阵列的研制[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(11): 1283–1284.
- Miao L, Liu ZM, Zhang SH. Development of a piezoelectric immunosensor array for detection of HBsAg and antiHBs[J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(11): 1283–1284.
- [17] Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, *et al.* Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2[J]. J Immunol, 2003, 172(1): 445–453.
- [18] 刘慧玲, 吕敬章, 朱智壕, 等. 生物传感器检测食源性大肠杆菌 O157:H7 研究新进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1828–1833.
- Liu HL, Lv JZ, Zhu ZH, *et al.* New progress in detection of foodborne pathogenic Escherichia coli O157:H7 based on biosensors[J]. J Food Safe Qual, 2013, 4(6): 1828–1833.
- [19] 邵景东, 孙秀兰, 张银志, 等. 酶联免疫吸附分析法检测花生过敏原的研究[J]. 分析科学学报, 2011, 27(1): 89–92.
- Shao JD, Sun XL, Zhang YZ. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay Method for Detection of Allergens in Peanut[J]. J Anal Sci, 2011, 27(1): 89–92.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



王毅谦, 硕士, 工程师, 主要研究方向为微生物检测, 粮油食品检测。
E-mail: w1000319@163.com



邵景东, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品检验、卫生检疫。
E-mail: sjdcjq@126.com