

小麦球蛋白单克隆和多克隆抗体制备及建立酶联免疫吸附法快速检测技术

赵凯^{1,2}, 贾彦博^{3*}, 王啸², 丁枫芸², 肖海龙³, 黄建萍³

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058; 2. 杭州市质量技术监督检测院, 杭州 310019;
3. 杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310022)

摘要: **目的** 建立小麦球蛋白的 ELISA 检测技术, 用于蛋白质掺假以及过敏原成分的快速检测。**方法** 从麦胚粉中提取球蛋白, 抗原免疫 Balb/c 小鼠进行 4 次免疫后, 通过脾脏细胞杂交瘤技术及间接 ELISA 筛选制备单克隆抗体, 同时制备兔抗小麦球蛋白的多克隆抗体。通过棋盘滴定法, 初步确定单克隆抗体和多克隆抗体的最佳工作浓度, 建立双抗夹心 ELISA。**结果** 通过免疫和杂交瘤技术获得了抗小麦球蛋白的单克隆抗体, 纯化后抗体的效价均达到 $1:10^7$, 通过免疫制备的多克隆抗体经纯化后效价在 $1:2.4 \times 10^5$ 左右, 所建立的双抗体夹心 ELISA 方法最低检测限为 10 ng/mL, 与其他物种的蛋白不发生交叉反应。**结论** 本文建立的双抗体夹心 ELISA 方法具有良好的特异性和灵敏度, 为建立乳品中小麦成分掺假及过敏原成分快速检测提供理论依据。

关键词: 小麦球蛋白; 单克隆抗体; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附法

Study on monoclonal antibody and polyclonal antibody preparation and establishment of ELISA detection method of wheat globulin

ZHAO Kai^{1,2}, JIA Yan-Bo^{3*}, WANG Xiao², DING Feng-Yun², XIAO Hai-Long³, HUANG Jian-Ping³

(1. School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Hangzhou Institute of Calibration and Testing for Quality and Technical Supervision, Hangzhou 310019, China;
3. Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China)

ABSTRACT: Objective To establish an immunoassay method of wheat globulin for the rapid detection of allergen and potential protein adulteration. **Methods** Globulin was extracted and purified from wheat germ powder. Balb/c mice were immunized for 4 times, and the mice spleen cells and myeloma cells SP2/0 were fused as the routine cell-fusion technology. The monoclonal antibodies were obtained by immune and hybridoma technology after purification of ascites. The polyclonal antibody against wheat globulin was also prepared from rabbit serum immunized by antigen. The double antibody sandwich ELISA for wheat globulin was successfully established by optimizing parameters. **Results** The results showed that the titer of purified monoclonal antibody of wheat globulin was over $1:10^7$, and the polyclonal antibody titer was about $1:2.4 \times 10^5$. The minimum detection limits of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit was about 10 ng/mL, and no cross reaction was observed among proteins of different species. **Conclusion** The double antibody sandwich ELISA method was sensitive, specific, and provided a theoretical foundation for detection of wheat

基金项目: 浙江省质量技术监督系统科研计划重大项目(20100107)

Fund: Supported by Quality and Technical Supervision System Research Major Projects of Zhejiang Province (20100107)

*通讯作者: 贾彦博, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。E-mail: 82998580@qq.com

*Corresponding author: JIA Yan-Bo, Senior Engineer, Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China. E-mail: 82998580@qq.com

ingredients adulteration and allergens in dairy products.

KEY WORDS: wheat globulin; monoclonal antibodies; polyclonal antibody; enzyme linked immunosorbent assay

1 引言

过敏原已经成为全世界关注的公共卫生热点问题^[1], 据统计, 目前全世界约有 2%~3% 的成年人和 5%~8% 的儿童患有食物过敏症^[2]。小麦是一种主要的食源性过敏原, 它是 8 类常见过敏食物之一^[3], 作为重要原料, 其潜在的过敏性不良影响广^[4], 小麦食源性过敏会引发运动激发过敏症、职业哮喘、鼻炎、接触性荨麻疹、乳糜泻肠炎、麻风皮肤病等不良症状^[5]。2010 年, 我国修订了 GB/T 23779-2009《预包装食品中的致敏原成分》^[6]标准, 增加了食物过敏原标示要求。关于食物过敏, 目前还没有有效的治疗手段, 患者只能通过严格避免或者减少接触过敏源来避免症状的发生。因此, 食品中过敏原的广泛检测也就成为食源性过敏控制的主要手段。同时, 由于生产成本较低, 小麦粉以及小麦蛋白也可能用作牛奶掺假的成分, 这更要求有一种高灵敏的检测技术来鉴别。

球蛋白是小麦中主要蛋白之一, 也是重要的过敏原成分。目前关于小麦中球蛋白的快速定性方法鲜见报道。目前关于蛋白成分检测技术主要有聚合酶链式反应(PCR)^[7]、等电点沉淀法^[8]、毛细管电泳法^[9]、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和液相色谱法^[10,11]等。酶联免疫吸附法(ELISA)具有高灵敏、简便、快速等优点, 因此, 适合于食品质量安全的快速筛查检验。本研究从麦胚粉中提取球蛋白作为抗原, 纯化和制备单克隆抗体和多克隆抗体, 建立了一套 ELISA 检测技术, 并且探讨了小麦球蛋白快速定性测试的方法, 为今后进一步研制灵敏、简便、快速定性试剂盒提供了理论依据。

2 材料和方法

2.1 主要试剂和仪器

正己烷、青霉素、链霉素、次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶、聚乙二醇 1500 等购自华东医药股份有限公司。弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、牛血清白蛋白(BSA)、HAT 选择性培养基购自美国 Sigma 公司; 四季清胎牛血清购自长春宝泰克生物制品有限公司;

RPMI-1640 基础培养基购自 GIBCO 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 购自鼎国生物技术有限公司; 8 wk 雌性健康 Balb/c 小鼠、新西兰白兔购自浙江医学科学院; 小鼠骨髓瘤细胞 sp2/0 由本实验室保存; 其他试剂均为分析纯。酶标仪(MK3)、二氧化碳培养箱购自上海 Thermo 公司, 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司。

2.2 试验方法

2.2.1 小麦球蛋白提取与纯化

麦胚粉干热灭酶, 正己烷脱脂。用去离子水反复洗涤, 充分洗去麦胚粉中水溶的清蛋白, 洗涤后的沉淀溶于 3% NaCl 溶液, 取上清为小麦球蛋白盐溶液粗提物。将粗提小麦蛋白盐溶液对去离子水透析过夜, 有大量沉淀析出, 取沉淀, 用去离子水反复洗涤沉淀 3 次, 冷冻干燥, 即为纯化小麦球蛋白。

2.2.2 动物免疫

首次免疫抗原用弗氏完全佐剂 1:1 比例混合, 采取皮下及肌肉多点注射的方式免疫小鼠, 后续免疫抗原用弗氏不完全佐剂 1:1 比例混合, 间隔 4 wk 后进行第 2 次免疫, 间隔 3 wk 后进行第 3 次免疫, 间隔 3 wk 后进行第 4 次免疫。每次免疫抗原剂量为 50 μg /只。ELISA 检测效价, 选取血清效价检测大于 $1:10^5$ 的小鼠, 用于免疫 B 细胞的制备及细胞融合。

2.2.3 单克隆抗体的纯化与效价测定

取小鼠脾脏细胞, 按 5:1~10:1 的比例混合脾细胞和 sp2/0 骨髓瘤细胞, 进行细胞融合, 阳性杂交瘤细胞用 HAT 培养基按 1×10^5 个细胞/孔铺板培养, 连续进行 3~4 轮后克隆筛选, 挑选效价高的阳性克隆扩大培养。采用小鼠体内诱生腹水的方法生产单克隆抗体, 每只小鼠大约注射 1×10^6 个细胞, 8~10 d 后即开始采集腹水。腹水经硫酸铵沉淀并透析、protein G 亲和层析纯化, SDS-PAGE 分析抗体纯度。用 ELISA 方法检测未纯化腹水及纯化后抗体的效价。

2.2.4 多克隆抗体制备与纯化

采用弗氏完全佐剂与小麦球蛋白 1:1 的比例进行混合, 对新西兰白兔进行首次免疫, 采取皮下及肌肉多点注射, 后续免疫采用弗氏不完全佐剂与抗原

1:1 的比例进行混合, 间隔4周后进行第2次免疫, 间隔3周后进行第3次免疫, 间隔3周后进行第4次免疫。一次性采取颈动脉放血, 取上清, 硫酸铵沉淀, 透析去盐。用 Protein A 亲和层析对抗小麦球蛋白血清进行纯化, 得到高效价、高纯度的抗小麦球蛋白多克隆抗体。用 ELISA 方法来检测抗体效价。

2.2.5 双抗夹心 ELISA 方法及其灵敏度和特异性

以鼠源单克隆抗体包被酶标板, 兔源多克隆抗体为夹心二抗, 用 HRP 标记的羊抗体和兔抗体进行检测, 建立 ELISA 方法。将抗原稀释至 $1 \mu\text{g/mL}$, 之后连续2倍稀释, 用优化后的 ELISA 方法检测, 选取 P/N 值大于2来检验该方法的灵敏度。特异性检验分别用抗原和其他来源的蛋白测试抗体的交叉反应状况。

3 实验结果

3.1 小麦球蛋白提取与纯化

麦胚粉经过灭酶、脱脂、水洗去清蛋白、3%盐溶液溶解球蛋白以及反复洗涤后, 得到纯度较高的球蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳(见图1)结果表明, 球蛋白主要有6条谱带, 其分子量依次为 57.8、41.8、38.7、24.1、16.5 和 14.3 kDa。经粗测, 所提取的小麦球蛋白纯度达到95%以上。用3% NaCl 将球蛋白配制浓度为 2 mg/L 的溶液, 作为免疫抗原, 用于单、多克隆抗体的制备。

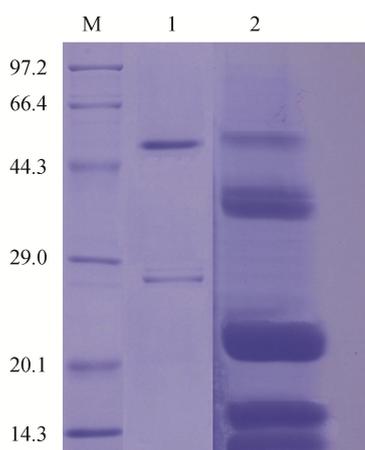


图1 纯化后的小麦球蛋白及其单克隆抗体电泳图

Fig. 1 Electropherogram of purified wheat globulin and its monoclonal antibody

M: 蛋白分子 Marker; 1: 小麦球蛋白单克隆抗体; 2: 小麦球蛋白
M: protein Marker; 1: wheat globulin monoclonal antibody; 2: wheat globulin

3.2 单克隆抗体

通过免疫原的制备、Balb/c 小鼠免疫、细胞融合、间接 ELISA 筛选及3次阳性细胞亚克隆, 获得分泌小麦球蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 将筛选得到的阳性杂交细胞株扩大培养、注射小鼠, 获得腹水, 含单抗的腹水经盐析、透析后过 protein G 亲和层析纯化后, 获得高纯度的单克隆抗体, 纯化后的单抗 SDS-PAGE 电泳结果见图1。

将纯化单克隆抗体从 1:100 开始作10倍梯度稀释测定效价, 以 405 nm 吸光值为纵坐标, 抗体稀释倍数为横坐标绘图, 以阴性血清为对照, 小麦球蛋白单抗效价测定结果见图2。以抗体吸光值两倍于阴性血清吸光值时的最大稀释倍数作为抗体效价。从图2中得知, 抗体的效价均达到 $1:10^7$ 。

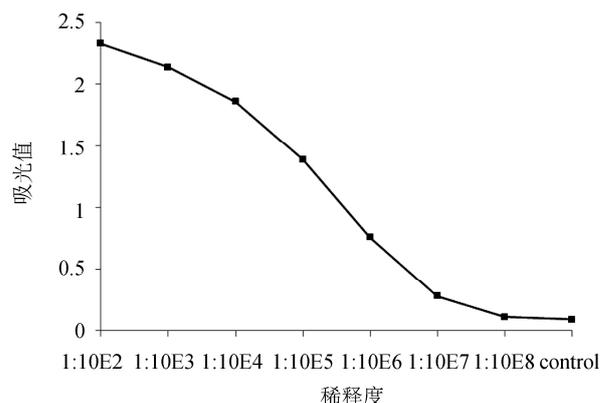


图2 小麦球蛋白单克隆抗体效价

Fig. 2 Titers of wheat globulin monoclonal antibody

3.3 多克隆抗体

用纯化后的小麦球蛋白为抗原, 免疫新西兰白兔, 3次免疫兔子后耳静脉采血, 分离血清, 同样盐析、透析和 Protein A 亲和层析, 获得高纯度的多克隆抗体, 按3倍梯度稀释抗体, 以阴性血清作为对照, 采用常规 ELISA 方法测定其效价, 结果见表1。从表1中可以看出, 经纯化后的多克隆抗体的效价在 $1:2.4 \times 10^5$ 左右。

3.4 ELISA 方法的灵敏度

采用棋盘滴定法, 初步确定小麦秋蛋白的单克隆抗体与其兔源多克隆抗体的最佳工作浓度, 建立 ELISA 方法。将纯化抗原的浓度稀释到 $0.5 \mu\text{g/mL}$,

之后连续作 2 倍梯度稀释, 按确定的 ELISA 条件进行测定, 小麦球蛋白的 ELISA 方法灵敏度测试结果见图 3。由图 3 可知, 球蛋白 ELISA 方法的检测限均在 10 ng/mL 左右, 显示出良好的灵敏度。

表 1 小麦球蛋白多克隆抗体效价(n=6)
Table 1 Titers of wheat globulin polyclonal antibodies (n=6)

抗体稀释倍数	小麦球蛋白多抗 OD 值
1000	2.387±0.121
3000	2.351±0.109
9000	2.204±0.117
27000	1.557±0.103
81000	0.692±0.095
243000	0.219±0.074
729000	0.105±0.038
Control	0.103±0.041

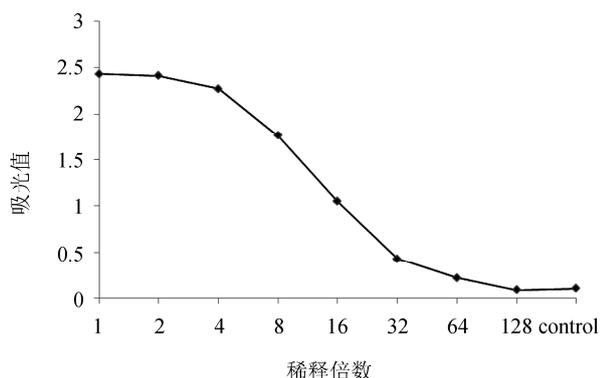


图 3 小麦球蛋白 ELISA 检测方法灵敏度
Fig. 3 ELISA sensitivities of wheat globulin

3.5 ELISA 方法的特异性

分别用牛奶 α -酪蛋白(α -casein)、大麦球蛋白(barley globulin)、小麦清蛋白(wheat albumin)、小麦醇溶蛋白(wheat gliadin)、玉米醇溶蛋白(zein)和花生

球蛋白(arachin)包被酶标板, 按 ELISA 步骤测试方法的特异性, 结果发现, 小麦球蛋白 ELISA 试剂盒与小麦清蛋白有交叉反应, 与其他蛋白无交叉情况, 见表 2。

3.6 实际样品测试

为验证建立的 ELISA 方法的实际应用效果, 本研究采用荞麦粉、小麦粉、豆浆、玉米汁、鸡蛋面条作为测试样品, 进行 ELISA 检测。结果表明, 本研究建立的小麦球蛋白 ELISA 方法分别能正确识别小麦粉和鸡蛋面条, 而对其他样品测试结果显示为阴性, 见表 2。

4 讨 论

近年来随着生物技术的发展, 免疫学技术已逐渐应用于食品安全检测领域。与常规理化分析相比, 虽然免疫学技术在定量方面也还有不足, 但却具有快速、灵敏、低成本和简便的优点, 更适用于消费者对产品自行快速筛查检验。酶联免疫检测技术的准确度和灵敏度取决于所用抗体的特异性和效价。就两者相对而言, 多克隆抗体具有较高的灵敏度, 而单克隆抗体具有较好的特异性^[12]。综合考虑特异性和灵敏度的要求, 本文分别制备了小麦球蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体, 通过单抗和多抗的夹心组合建立 ELISA 检测技术, 因考虑到抗原表面位点可能会被多克隆抗体覆盖, 而导致单克隆抗体亲和力下降, 故在本实验中选择单克隆抗体包被酶标板。从实验结果来看, 所建立的方法具有较高的灵敏度, 最低检测限达到 10 ng/mL, 可以满足食品中微量过敏原的检测需求; 在特异性方面, 小麦球蛋白的 ELISA 测试结果则表明, 小麦清蛋白与小麦球蛋白有交叉反应, 极有可能是因为纯化后的小麦球蛋白中含有少量清蛋白的缘故, 但这种同物种蛋白间的交叉不影响本研究的目的, 同时与其他蛋白和样品的交叉反应测试又表现良好的特异性。本文旨在建立一种适于消费者应用的快速筛查方法, 除了特异性和灵敏性外, 检测

表 2 小麦球蛋白 ELISA 方法的特异性和实际样品测试
Table 2 ELISA specificities of wheat globulin and samples test

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ELISA 测试	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+

注: 1- α -酪蛋白; 2-大麦球蛋白; 3-小麦清蛋白; 4-小麦醇溶蛋白; 5-玉米醇溶蛋白; 6-花生球蛋白; 7-荞麦粉; 8-小麦粉; 9-豆浆; 10-玉米汁; 11-鸡蛋面条

未涉及到定量方面,以定性为主,因此,在一定程度上降低了检测成本,也简化了步骤,具备经济、简便的特点,适合推广应用于广大消费群体,具有良好的产业化应用前景。通过小麦蛋白单抗、多抗及双抗夹心 ELISA 快速定性检测技术的研究,为今后进一步开发简便、快速、灵敏、低成本的试剂盒,识别小麦过敏原成分和可能蛋白掺假提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Taylor SL, Hefle SL. Food allergen labeling in the USA and Europe [J]. *Curr Opin Allergy*, 2006, 6(3): 186–190.
- [2] Moreno FJ. Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity [J]. *Biomed Pharm*, 2007, 61(1): 50–60.
- [3] 毛炜翔, 高金燕, 陈红兵. 小麦过敏研究进展[J]. *食品科学*, 2007, 28(8): 559–562.
Mao WX, Gao JY, Chen HB. Research progress of wheat food allergy [J]. *Food Sci*, 2007, 28(8): 559–562.
- [4] Battais F, Pineau F, Popineau Y, *et al.* Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour [J]. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33(7): 962–970.
- [5] Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, *et al.* A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force [J]. *Allergy*, 2001, 56(9): 813–824.
- [6] GB/T 23779-2009 预包装食品中的致敏原成分[S].
GB/T 23779-2009 Allergenic ingredients in prepackaged foods [S].
- [7] 董薇, 曹际娟, 郑秋周, 等. 实时荧光 PCR 技术检测过敏原小麦的研究[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(5): 1053–1055.
Dong W, Cao JJ, Zheng QZ, *et al.* Detecting sensitinogen wheat in food by real-time PCR [J]. *Hubei Agric Sci*, 2011, 50(5): 1053–1055.
- [8] 李宏梁, 焦茜楠, 黄峻榕, 等. 酪蛋白沉淀检测方法及其在年乳经济掺假鉴定中的应用[J]. *食品科技*, 2008, 33(12): 262–266.
Li HL, Jiao QN, Huang JR, *et al.* Precipitation determination of casein and its application for economic adulteration identification in milk [J]. *Food Sci Technol*, 2008, 33(12): 262–266.
- [9] 张东送, 庞广昌, 高法国, 等. 毛细管电泳在牛乳中酪蛋白含量测定及掺假检测方面的应用[J]. *食品发酵工业*, 2005, 31(1): 130–132.
Zhang DS, Pang GC, Gao FG, *et al.* Application of capillary electrophoresis in determination of casein quantity and detection of adulteration in milk [J]. *Food Ferment Ind*, 2005, 31(1): 130–132.
- [10] 王浩, 张志国, 常彦忠, 等. RP-HPLC 法对乳制品中主要牛奶蛋白的分离及定量测定[J]. *食品科学*, 2009, 30(24): 376–380.
Wang H, Zhang ZG, Chang YZ, *et al.* Isolation and quantification of main milk proteins in dairy products with reverse-phase HPLC [J]. *Food Sci*, 2009, 30(24): 376–380.
- [11] 王娟, 张庆合, 王志华, 等. 反相高效液相色谱法测定牛奶中的主要蛋白质[J]. *分析化学*, 2009, 37(11): 1667–1670.
Wang J, Zhang QH, Wang ZH, *et al.* Determination of major bovine milk proteins by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37(11): 1667–1670.
- [12] 肖海龙, 赵凯, 林赛君, 等. 牛奶 β -酪蛋白和大豆 β -伴球蛋白双抗制备及夹 ELISA 快速定性检测技术的建立[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2013, 39(2): 222–226.
Xiao HL, Zhao K, Lin SJ, *et al.* Preparation of double-antibody and establishment of sandwich ELISA against milk β -casein and soybean β -conglycinin [J]. *J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci Ed)*, 2013, 39(2): 222–226.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



赵凯, 本科, 主要研究方向为食品安全检测研究。

E-mail: zhaok@hzzjy.net



贾彦博, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: 82998580@qq.com