

基于虾类原肌球蛋白共同表位肽抗体的 过敏原检测方法

刘玉敏, 梁占丽, 李兆杰*, 徐成钢, 魏 玮, 张玉春

(威海出入境检验检疫局, 威海 264205)

摘 要: 目的 建立一种能够同时检测多种虾原肌球蛋白的方法。**方法** 通过合成不同虾类的共同表位肽, 制备能够识别多种虾类原肌球蛋白的共同表位肽多克隆抗体, 建立快速灵敏的虾类原肌球蛋白酶联免疫检测方法。**结果** 该检测方法在 4.79~1400 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好, 其线性回归方程为 $Y=-19.083X+98.303(R^2=0.9813)$, 最低检出限(IC₁₀)为 1.85 ng/mL; 样品加标回收率在 94.37%~103.45%之间; 该检测方法 with 软体动物的原肌球蛋白有交叉反应, 与鱼肉蛋白、牛奶、花生蛋白等无交叉反应; 批内变异系数为 3.4%~9.1%, 板间变异系数为 12.9%~19.6%, 贮藏试验显示该酶联免疫试剂盒可以在 4 °C 下保存 6 个月以上, 能够应用于食品中虾类过敏原的检测。**结论** 采用共同表位抗体, 成功建立了基于酶联免疫的过敏原检测方法。

关键词: 虾类过敏原; 酶联免疫法; 共同表位肽; 抗体

Rapid detection of shrimp allergens based against the polyclonal antibodies of shrimp tropomyosin common peptide epitopes

LIU Yu-Min, LIANG Zhan-Li, LI Zhao-Jie*, XU Cheng-Gang, WEI Wei, ZHANG Yu-Chun

(Weihai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264205, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of various shrimp tropomyosins. **Methods** By synthesis of common peptide epitopes from different kinds of shrimp, polyclonal antibodies were produced which could identify a variety of shrimp tropomyosins. A rapid and sensitive ELISA method was established for the detection of shrimp tropomyosins. **Results** The method had a good linear relationship in the range of 4.79~1400 ng/mL, and the linear regression equation was $Y=-19.083X+98.303(R^2=0.9813)$. The limit of detection was 1.85 ng/mL(IC₁₀), while the recovery rates were 94.37%~103.45%. The detection method was cross-responsive with invertebrate tropomyosin and had no cross reaction with fish protein, milk, and peanut protein. The coefficients of variation of the batch were 3.4%~9.1%, and the coefficients of variation of the plates were 12.9%~19.6%. The storage test showed that the ELISA kit could be stored more than 6 months at 4 °C, which could be applied for the detection of shrimp allergens in food. **Conclusion** A simultaneous detection method of a variety of shrimp tropomyosins is established successfully based on ELISA using common peptide epitopes.

KEY WORDS: shrimp allergen; ELISA; common epitopes peptide; antibody

基金项目: 山东检验检疫局科研计划项目(SK201615)、国家质量监督检验检疫总局科研项目(2015IK204)

Fund: Supported by Shandong Inspection and Quarantine Bureau Science and Technology Research Plan Project (SK201615) and State Administration for Quality Supervision and Inspection and Quarantine Research Projects (2015IK204)

*通讯作者: 李兆杰, 高级工程师, 博士, 主要研究方向为食品安全检测及方法开发。E-mail: hunterlee_81@163.com

*Corresponding author: LI Zhao-Jie, Senior Engineer, Ph.D, Weihai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264205, China. E-mail: hunterlee_81@163.com

1 引言

近年来食物过敏问题日益受到广大消费者的关注,中国疾病预防控制中心针对大学生过敏原的调查显示,虾蟹等甲壳类是引发我国人群过敏的重要种类之一^[1],也是联合国粮农组织公布的八大类食物过敏原之一。出于保护消费者安全及贸易保护等目的,欧美等发达国家针对食物过敏原制定了严格的检测标准,已经形成了贸易技术壁垒^[2]。由于食品中存在不明过敏原而导致被扣留、退回和终止合同的事件时有发生,因此虾蟹等甲壳类过敏原问题已经成为制约行业发展的重要瓶颈因素。

为了有效消除或缓解虾蟹等甲壳类水产品过敏原对人们身体健康及相关行业所造成的危害,建立方便快速的检测方法成为当务之急。目前针对虾蟹类过敏原,已经建立了一些检测方法,Zhang等^[3]利用酶联免疫法建立了无脊椎水产动物中原肌球蛋白的检测方法,其中对日本对虾原肌球蛋白的检测限能够达到0.09 ng/mL,对太平洋鲑鱼中原肌球蛋白的检测限达到0.64 ng/mL;Rahman等^[4]利用液相色谱-质谱联用技术建立了雪蟹中原肌球蛋白的绝对定量检测方法;Li等^[5]建立了基于荧光免疫芯片的虾类原肌球蛋白的高通量检测方法。以上检测方法为虾蟹类过敏原的控制提供了必要的技术基础。但由于虾蟹类水产品产量大、种类繁多、特别是以虾蟹类水产品为原料的调理食品呈现快速增长的现实情况,水产品过敏原快速筛选技术的研究和开发显得尤为重要。

针对虾蟹类原肌球蛋白,现有的研究表明,不同虾蟹类中的原肌球蛋白的氨基酸序列存在较大的相似性^[6],有关抗原表位的研究显示,不同种类的甲壳类水产品其原肌球蛋白中存在共同的表位^[7],因此如果能够利用不同甲壳类水产品原肌球蛋白存在共同表位的特点,通过合成共同表位肽,并制备特异性抗体,并建立基于免疫学的检测方法,则能够实现一种检测方法同时对多种虾蟹类水产品过敏原进行检测。本研究通过合成不同虾蟹类水产品中原肌球蛋白的共同表位肽,制备具有高亲和力的表位肽抗体,建立基于共同表位肽抗体的酶联免疫检测方法。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

原肌球蛋白(实验室自制);牛血清白蛋白、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国Sigma公司);BALB/c小鼠(北京动物中心);辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记羊抗鼠IgG二抗(北京索莱宝生物科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 共同表位肽的合成

根据前期筛选得到的同源表位

(EKEKYKSITDELDTQTFSE)^[6],采用以9-芴甲氧羰基(9-fluorenylmethoxycarbonyl, Fmoc)为 α -氨基保护基的多肽固相合成法合成表位多肽,委托上海吉尔生化有限公司完成。所制备多表位多肽的分析和纯化采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)方法进行,并利用电喷雾离子化质谱(electrospray ionization-mass spectrometry, ESI-MS)对其进行质谱分析鉴定其分子量,验证合成的准确性。

2.2.2 表位肽多克隆抗体的制备

以表位肽为抗原,结合血蓝蛋白合成完全抗原后,免疫BALB/c小鼠,制备表位肽的多克隆抗体,并通过protein G Sepharose亲和柱进行纯化,得表位肽多克隆抗体,第3次免疫后7 d,断尾采血,测定抗血清的效价,若效价未达到要求,继续免疫。效价达到要求后,虾过敏原蛋白溶液腹腔注射,冲击免疫1次,5 d后摘眼球采血,收集于2 mL灭菌塑料离心管中。室温静置4 h,5000 r/min离心15 min,取上清液,protein G Sepharose亲和柱纯化后,加入硫柳汞,使其终浓度为0.01%,分装,-80℃冰箱中保存。

2.2.3 海产品原肌球蛋白竞争性ELISA检测方法的建立

以虾原肌球蛋白(虾过敏原蛋白)为标准品,稀释后以虾原肌球蛋白100 ng/孔的包被量进行96孔板(肽)包被,将梯度浓度的虾原肌球蛋白液分别与等体积的表位肽多克隆抗体液共同加入96孔板包被孔中孵育,以辣根过氧化物酶标记的二抗进行检测,以3,3',5,5'-四甲基联苯胺作为显色剂,用H₂SO₄终止后,测定450 nm的吸光值,并绘制标准曲线(横坐标为抗原浓度,纵坐标为吸光值),实验结果取3次的平均值。

2.2.4 待检样品中原肌球蛋白的检测

将待检样品中的原肌球蛋白进行抽提,以虾原肌球蛋白100 ng/孔的包被量进行96孔板包被,将抽提得到的待检样品中的原肌球蛋白液与等体积的表位肽多克隆抗体液共同加入96孔板包被孔中孵育,以辣根过氧化物酶标记的二抗进行检测,以3,3',5,5'-四甲基联苯胺作为显色剂,用H₂SO₄终止后,测定450 nm的吸光值,将待检样品的OD值换算成B/B₀,其中B为待检样品在450 nm的OD值,B₀为空白对照的OD值,绘制标准曲线计算出待检样品中原肌球蛋白的含量,当测定的OD值位于标准曲线线性区域内,即为待测样品中有原肌球蛋白检出,反之视为未检出。

2.2.5 该酶联免疫方法各参数的确定

采用加标回收的方式,设置3个不同的加标浓度,每个浓度共进行5次实验,获得该检测方法的回收率。方法的稳定性通过37℃加速破坏实验进行,即将构建的酶联免疫试剂盒在37℃放置24 h相当于在4~10℃放置45 d^[8];精密度实验采用批内和批间重复性检验,即采用同一批和

不同批配置的试剂进行检测, 并计算检测结果; 方法的特异性则采用不同的蛋白质样品, 测定该酶联免疫方法对其他蛋白质样品的识别情况。

3 结果与分析

3.1 共同表位肽的合成

根据前期获得的表位肽序列, 采用固相合成法合

成虾共同表位肽, 并采用液相色谱进行纯化, 结果如图 1 所示, 从图中可以看出, 该表位肽纯度较高, 杂峰少。为了进一步验证表位肽的准确性, 采用 ESI-MS 进行鉴定, 从图 2 可以看出, 该表位肽的 m/z $[M+K+3H]^4+$ 、 $[M+3H]^3+$ 、 $[M+2H]^2+$ 离子峰所得到的分子量均与理论分子量 1873.09 相吻合, 从分子量角度验证了合成多肽序列的准确性。

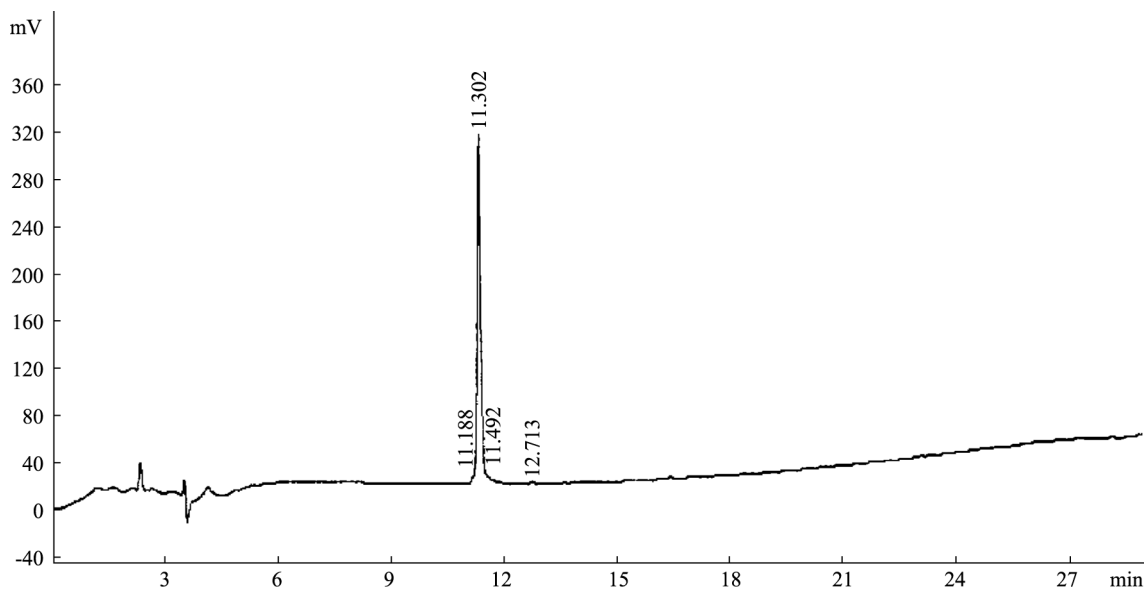


图 1 共同表位肽的高效液相色谱分离效果
Fig. 1 Separation of common epitope peptides by HPLC

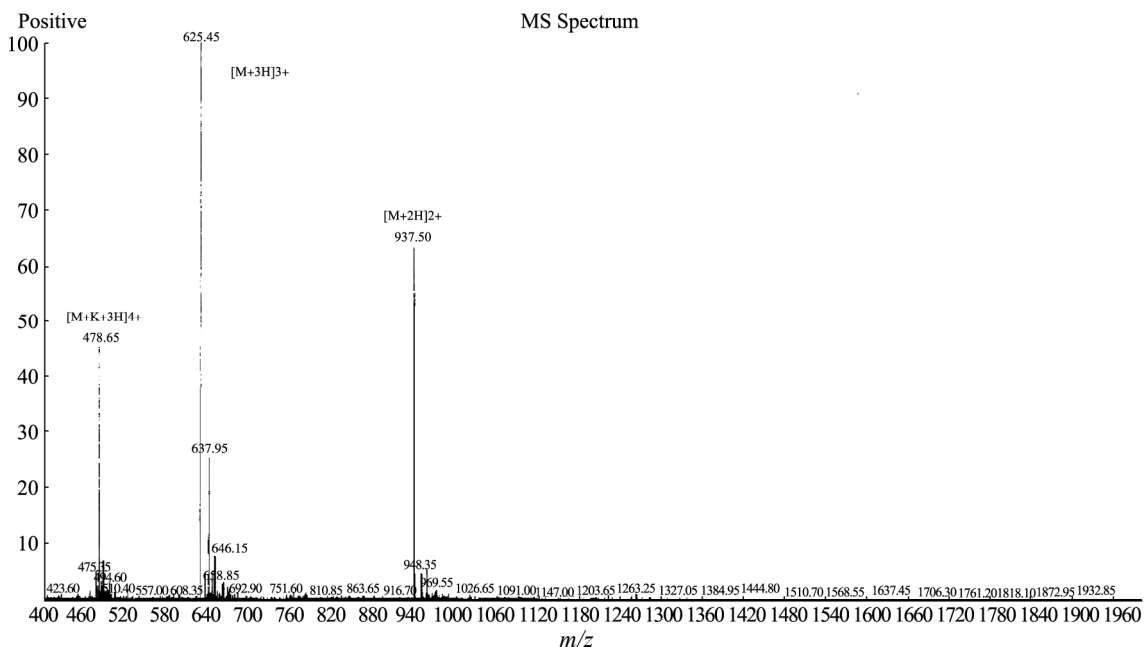


图 2 共同表位肽的 ESI-MS 质谱分析
Fig. 2 Analysis of common epitope peptides by ESI-MS

表 1 包被表位肽及表位肽抗体浓度的确定
Table 1 Determination of concentrations of coated epitope peptide and antibody

梯度($\mu\text{g/mL}$)	磷酸盐缓冲液	阴性	5000 倍	2000 倍	1000 倍	500 倍
0.1	0.021	0.081	0.536	0.954	0.943	0.951
1	0.034	0.069	0.724	1.021	1.135	1.067
10	0.042	0.001	0.879	1.034	1.182	1.125
100	0.017	0.094	0.854	1.015	0.914	0.923
1000	0.054	0.102	0.831	1.006	0.835	0.524

3.2 虾类原肌球蛋白共同表位肽抗体的制备

采用考马斯亮蓝法对抗体浓度进行测定,经测定,表位肽抗体的浓度为 2.137 mg/mL。在此基础上,采用间接 ELISA 法测定抗表位肽的效价,以阳性血清 $OD_{450\text{nm}} \geq$ 阴性对照的 2.1 倍作为抗血清的效价^[8],本实验制得的小鼠抗血清效价为 2×10^5 。

3.3 竞争抑制 ELISA 方法的建立

3.3.1 包被表位肽及表位肽抗体浓度的确定

抗原表位肽以 0.1、1、10、100、1000 $\mu\text{g/mL}$ 进行梯度稀释,表位肽抗体以 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 等倍数进行梯度稀释。如表 1 所示,抗体浓度和包被浓度均比较大或均比较小的时候, OD 值相差不是很大。原因可能是,浓度太高时,空间因素影响了抗原抗体的结合;而包被浓度太低时,各抗体浓度均已达到饱和所致^[9]。包被抗原浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,各稀释度的抗体的 OD 值最大。当抗血清的稀释浓度为 1:2000,包被表位肽浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, OD 值分别为 1.034,接近 1.0。因此,选择 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 1:2000 分别作为虾过敏原共同表位肽和抗血清的工作浓度。

3.3.2 标准曲线

用间接竞争 ELISA 制作标准曲线,将表位肽标准品按照 0.1、1、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 ng/mL 进行梯度稀释,结果如图 3 所示。最大、最小 OD 值分别为 1.05 和 0.16,检出限(90%抑制率对应的浓度)为 1.85 ng/mL,定量限(20%~80%抑制率对应的浓度)为 4.79~1400 ng/mL。18 个空白孔的平均 OD 值为 0.092,标准差(standard deviation, SD)为 0.003,则平均 $OD \pm 2SD$ 的值为 0.086~0.098,与 10%抑制率对应浓度 0.096 相符,检测限与国外同类试剂盒的最低检测限(0.78 ng/mL)接近^[10]。

3.3.3 精密度

由表 2 可以看出,不同浓度表位肽抗原的孔间变异系数为 3.4%~9.1%,板间变异系数为 12.9%~19.6%,各浓度组孔间和板间的变异系数小于 20%。各浓度组板间变异程度大于孔间变异程度。说明总体上,本试验方法的平行性要好于重复性。不同的酶标板之间存在吸附能力和光滑程度等的差异,从而影响到试验结果的准确性。

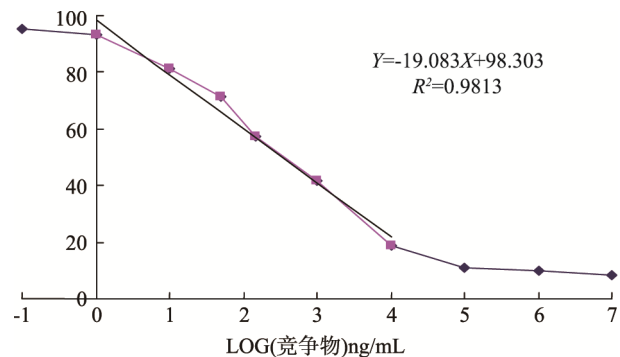


图 3 Ci-ELISA 检测虾共同表位肽抗原的标准曲线($n=3$)
Fig. 3 Standard curve of shrimp allergen detected by Ci-ELISA ($n=3$)

表 2 Ci-ELISA 方法的精密度($n=3$)
Table 2 Precision of Ci-ELISA method ($n=3$)

	虾共同表位肽抗原浓度(ng/mL)			
	20	50	100	500
孔间 CV(%)	8.9	9.1	3.4	7.5
板间 CV(%)	19.6	15.4	12.9	14.1

3.3.4 回收率测定

采用所建立的竞争酶联免疫方法对虾共同表位肽抗原进行加标测定。由表 3 可知,对鱼肉的 3 个加标水平的平均回收率分别为 98.67%、103.45%和 94.37%,而牛奶的 3 个加标水平的平均回收率分别为 98.87%、99.23%、95.78%,符合技术要求(70%~120%),在理想回收率(90%~105%)范围之内。

表 3 样品的加标回收率
Table 3 Recovery rates of spiked samples

加标水平($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率(%)		标准差(%)	
	鱼肉	牛奶	鱼肉	牛奶
20	98.67	98.87	2.135	1.057
500	103.45	99.23	1.768	1.219
5000	94.37	95.78	1.245	1.023

3.3.5 方法的稳定性实验

采用棕色试剂瓶对试剂进行密封, 采用真空包装的方式对酶标板进行密封后, 采用经典的 37 °C 稳定性实验对该方法的稳定性进行测定, 结果发现各试剂及包被酶标板在温度为 37 °C/相对湿度为 75% 的条件下存放 96 h 后, 所测光密度值 $OD_{492}/OD_{630} \leq 2.1$, 由此可见, 该试剂及酶标板可以在 4 °C 的条件下存放 6 个月以上。

3.3.6 方法的特异性测定

采用间接竞争 ELISA 测定鱼肉蛋白、鸡蛋蛋清蛋白、花生蛋白、牛奶、菲律宾蛤仔蛋白, 结果见表 4。从表中可以看出, 竞争曲线除鱼肉蛋白、鸡蛋蛋清蛋白、花生蛋白、牛奶趋于平缓外, 菲律宾蛤仔蛋白随着抑制蛋白浓度的增加而下降, 这说明了该共同表位抗体与菲律宾蛤仔中的原肌球蛋白有交叉反应, 与传统认为的甲壳类水产品中原肌球蛋白与软体动物中的原肌球蛋白有交叉反应吻合^[11], 所以该检测方法不仅可以用于虾类等甲壳类水产品中原肌球蛋白的检测, 同时也可以用于软体类水产品中过敏原-原肌球蛋白的检测。

表 4 方法的特异性
Table 4 Specificity of the method

食品基质蛋白	抽提物蛋白浓度 (mg/mL)	原肌球蛋白的相对含量(μg/g)
鱼肉蛋白	2.34	<0.054
鸡蛋蛋清蛋白	2.15	<0.054
花生蛋白	1.57	<0.054
牛奶	1.32	<0.054
菲律宾蛤仔蛋白	2.14	0.965

表 5 不同产品中虾类过敏成分的测定
Table 5 Detection of shrimp allergens in different samples

食品	产地	包装标识是否含有虾	定性检测结果
红烧丸子	潍坊	否	阳性
香菇风味丸	潍坊	是	阳性
虾味苏打饼干	广州	是	阳性
鱼豆腐	厦门	否	阴性
星星鱼饼	韩国	是	阳性
土司面包	青岛	不详	阴性

3.3.7 食品中虾类过敏成分的检测

从市面上选择 6 种食品, 抽提其中的蛋白组分, 以本研究所建立的 ELISA 方法进行检测, 重复检测 3 次, 检测结果见表 5。在 6 种食品中, 有 3 种食品含有虾肉成分, 检测结果均呈现阳性。2 种食品标识不含虾肉成分, 但其中

一种食品检测出含有虾肉成分。在 1 种没有标识的散装食品中, 没有检测到虾肉成分。红烧丸子虽然没有标识含有虾肉成分, 但作者了解到该公司以丸子类产品为住, 红烧丸子和虾肉丸采用的是同一生产线, 很可能会有没有清洗干净的物料混入, 此类情况在同一生产线生产的不同产品中也屡见不鲜。

4 结论与讨论

虾类过敏严重影响了一些过敏人群的生活质量, 严重的甚至会导致休克甚至死亡。由于当前没有安全有效的治疗手段, 欧美等发达国家早在 2006 年就陆续出台了规范食品中过敏物质标识的法律法规^[12], 对食品标签上的过敏成分标识做出了严格的规定, 并已经形成技术性贸易壁垒, 每年因为检测出未标识的过敏原导致的召回事件很多, 给企业带来了很大的损失。我国在食品过敏方面的研究刚刚起步, 在食品过敏的流行病学调查, 过敏原的鉴定、检测、评价等方面与发达国家相比还存在很大的差距。在最新颁布的 GB 7718-2011《预包装食品标签通则》中^[13], 规定了预包装食品中的致敏原成分, 并增加了食品中可能含有致敏性物质的推荐性标识要求, 但没有强制各个食品加工企业对过敏原进行强制标识。其主要原因是我国食品过敏原的研究还存在很大的缺陷, 没有建立一套完整的过敏原快速检测技术, 每年因过敏原导致的食品召回事件逐年增多, 因此检测快速、高通量、高灵敏度的食品过敏原检测技术极其重要。

虽然当前在市面上已经有了检测虾类过敏原浓度试剂盒和试剂条, 但这些检测试剂盒和试剂条的检测对象通常是某一种虾的过敏原。众所周知, 虽然不同虾类的过敏原有很大的相似性, 但还是存在很大的不同, 表现在过敏现象上就是有的消费者对南美白对虾过敏, 而有的消费者对河虾过敏, 这就说明虽然现在的虾类过敏原检测结果直观可见, 但只能对某种虾类过敏原进行检测^[14,15]。而本研究采用间接竞争酶联免疫法进行检测, 以不同种类虾过敏原的共同表位为抗原, 制备了共同表位的抗体, 能够实现不同虾类过敏原的同时检测。该方法具有更高的检测范围和更低的检测限, 能够更加广泛地应用于食品中虾类过敏原浓度筛查工作。

参考文献

- [1] 吕相征, 刘秀梅, 杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 119-121.
Lv XZ, Liu XM, Yang XG. A preliminary investigation into food allergies in healthy people [J]. Chin J Food Hyg, 2005, 17(2): 119-121.
- [2] 高培钧, 程劲松, 肖国荣. 中国与欧盟、美国和日本食物标识法规标准的比较研究[J]. 食品工业科技, 2013(21): 269-277.
Gao PJ, Cheng JS, Xiao GR. Comparative study of food standards in China and EU, the United States and Japan [J]. Sci Technol Food Ind,

- 2013(21): 269–277.
- [3] Zhang H, Lu Y, Ushio H, *et al.* Development of sandwich ELISA for detection and quantification of invertebrate major allergen tropomyosin by a monoclonal antibody [J]. *Food Chem*, 2014, 150: 151–157.
- [4] Rahman AMA, Lopata AL, Randell EW, *et al.* Absolute quantification method and validation of airborne snow crab allergen tropomyosin using tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 681(1): 49–55.
- [5] Li Z, Zhang Y, Lin H, *et al.* Quantitative analysis of shrimp allergen in food matrices using a protein chip based on sandwich immunoassay [J]. *Eur Food Res Technol*, 2010, 231(1): 47–54.
- [6] 郑礼娜. 虾类过敏原的活性分析及其抗原表位的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
Zheng LN. Study on the active analysis of shrimp allergens and its epitope [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [7] Leung NYH, Wai CYY, Ho MHK, *et al.* Screening and identification of mimotopes of the major shrimp allergen tropomyosin using one-bead-one-compound peptide libraries [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(3): 308–318.
- [8] 宋宏新, 赵晓红. 食品免疫学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009.
Song HX, Zhao XH. *Food Immunology* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009.
- [9] Osuchowski MF, Siddiqui J, Copeland S, *et al.* Sequential ELISA to profile multiple cytokines from small volumes [J]. *J Immunol Methods*, 2005, 302(1): 172–181.
- [10] Jayasena S, Smits M, Fiechter D, *et al.* Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(6): 1849–1855.
- [11] Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen [J]. *Int Arch Allergy Imm*, 1999, 119(4): 247–258.
- [12] 谢力, 相大鹏, 韦晓群, 等. 主要贸易国和地区食品中致敏原标识措施比较及其对我国的启示[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(5): 449–452.
Xie L, Xiang DP, Wei XQ, *et al.* Comparison of the measures of allergen identification in major trading countries and regional foods and their implications for China [J]. *Chin J Food Hyg*, 2011, 23(5): 449–452.
- [13] GB/T7718-2011 预包装食品标签通则[S].
GB/T7718-2011 Prepackaged food label general rules [S].
- [14] 李振兴, 林洪, 李明华, 等. 不同虾类的过敏原及其过敏性[J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 281–284.
Li ZX, Lin H, Li MH, *et al.* Allergens of different shrimp and their allergens [J]. *J Fish China*, 2006, 30(2): 281–284.
- [15] Pascal M, Grishina G, Yang AC, *et al.* Molecular diagnosis of shrimp allergy: efficiency of several allergens to predict clinical reactivity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 3(4): 521–529.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘玉敏, 工程师, 主要研究方向为食品微生物、过敏原研究。
E-mail: liuym0408@163.com



李兆杰, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测及方法开发。
E-mail: hunterlee_81@163.com