

榛子过敏原双抗夹心酶联免疫吸附方法的建立及应用

杭天¹, 赵金龙¹, 林洪¹, 张自业¹, 王皓¹, 张九凯², 李振兴^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266000;
2. 中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心, 北京 100176)

摘要: **目的** 建立榛子过敏原双抗夹心酶联免疫吸附法(sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, sELISA)快速检测食品中微量榛子的方法。**方法** 对两株抗体进行配对, 确定捕获抗体和检测抗体, 利用棋盘法确定捕获抗体、检测抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG(horseradish peroxidase-IgG, HRP-IgG)的最佳稀释浓度, 然后对各工作步骤的孵育时间进行优化, 并应用于实际食品的检测。**结果** 使用兔抗作为捕获抗体, 鼠抗作为检测抗体, 兔抗血清稀释度为 1:10000 (V:V)、鼠抗血清稀释度为 1:10000 (V:V)、HRP-兔抗大鼠稀释度为 1:20000 (V:V)。各步骤最佳反应时间为抗原孵育 30 min、检测抗体孵育 30 min、酶标二抗孵育 45 min 及四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)显色 8 min。此方法的线性回归方程为 $Y=0.4504 \ln(X)+2.1194$, $r^2=0.9934$, 定量限为 10 ng/mL、检出限为 0.1 ng/mL。该方法特异性强, 仅与核桃产生轻微的交叉反应, 在面包、酸奶和咖啡基质中的回收率在 80%到 120%之间, 批内、批间变异系数均小于 15%。**结论** 本方法具有较高的灵敏度和特异性, 适用于商业加工食品中榛子残留的快速、准确检测。

关键词: 榛子; 过敏原; 酶联免疫吸附方法; 检测

Establishment and application of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hazelnut allergen

HANG Tian¹, ZHAO Jin-Long¹, LIN Hong¹, ZHANG Zi-Ye¹, WANG Hao¹,
ZHANG Jiu-Kai², LI Zhen-Xing^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China; 2. Agro-product Safety Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid determination for trace hazelnuts in food by hazelnut allergen sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (sELISA). **Methods** The two antisera were paired to determine the captured antibody and detection antibody, the optimal dilution concentration of capture antibody, detection antibody and horseradish peroxidase-labeled rabbit anti-rat IgG (HRP-IgG) were determined by chessboard method, then the incubation time of each working step were optimized and applied it to the actual food detection. **Results** The rabbit antibody was used as the capture antibody, and the mouse antibody was used as the detection

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871719)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871719)

*通信作者: 李振兴, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

*Corresponding author: LI Zhen-Xing, Professor, Ocean University of China, No.5, Yushan Road, Shinan District, Qingdao 266000, China. E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

antibody. The dilution of rabbit antiserum was 1:10000 (*V:V*), mouse antiserum was 1:10000 (*V:V*), and HRP-rabbit antiserum was 1:20000 (*V:V*). The optimal reaction time of each step was determined as 30 min of antigen incubation, 30 min of detection antibody incubation, 45 min of HRP-rabbit anti-mice incubation and 8 min of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) color rendering. The linear regression equation of this method was $Y=0.4504 \ln(X)+2.1194$, $r^2=0.9934$, the limit of quantitation was 10 ng/mL, the limit of detection was 0.1 ng/mL. The method had strong specificity and only slightly cross-reacted with walnuts. The recovery rates in bread, yogurt and coffee matrix were between 80% and 120%, and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were both less than 15%. **Conclusion** This method has high sensitivity and specificity, and is suitable for rapid and accurate determination of hazelnut residues in commercial processed foods.

KEY WORDS: hazelnut; allergen; enzyme linked immunosorbent assay; detection

0 引 言

1995 年, 联合国粮食及农业组织报告中列举了全球范围内 8 大类常见过敏食物, 大约占所有食物过敏原的 90%以上, 分别为奶、蛋、鱼、甲壳类、花生、大豆、坚果及小麦^[1]。榛子是目前最受欢迎的可食用坚果之一^[2], 被广泛应用在各种加工食品(蛋糕、奶油、巧克力和糖果)中, 具有巨大的经济价值^[3]。虽然榛子被认为是一种安全的食品, 但全球有一部分人在食用榛子后会产生不良的免疫反应。目前, 据研究估计榛子过敏的总发病率为 0.2%^[4], 其中高达 4.5%的成年人和 0.2%的儿童受到榛子过敏的影响, 伴随着异常免疫反应^[5]。世界卫生组织和国际免疫学联合会认定出的榛子过敏原有 Cor a 1、Cor a 2、Cor a 8、Cor a 9、Cor a 10、Cor a 11、Cor a 12、Cor a 13、Cor a 14 和 Cor a thaumatin-like protein (TLP), 这些榛子过敏原均会导致过敏患者产生不良免疫反应, 严重时甚至导致休克或死亡^[6]。然而, 目前针对榛子过敏并没有有效的临床根治手段, 因此, 榛子过敏患者必须避免摄入含有榛子的食品。欧洲、美国等国家强制要求在食品包装上标注含有榛子的食品, 这些国家对违反规定的产品都会采取禁止销售和召回等一系列处罚措施。我国 GB 7718—2004《预包装食品标签通则》也推荐在食物包装上对榛子致敏成分进行标识。随着人们食品安全意识的增加, 以及国外对我国出口食品的限制, 建立过敏原标签, 开发灵敏、快速、大通量的食物过敏原检测方法至关重要^[7-8]。

目前, 针对榛子过敏原的检测方法主要有酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、液相色谱技术^[9]、生物传感器技术^[10-13]、生物质谱技术^[14-16]等。其中 ELISA 方法因具有操作简便、快速、灵敏度高、特异性强、经济等优点, 是目前应用最广泛的一种检测食品过敏原的分析方法, 而且我国已经将检测过敏原的 ELISA 方法作为推荐性国家标准进行了立项^[17-19]。目前建立榛子过敏原的 ELISA 检测方法所使用的抗原标准品分为混合过敏原和单一过敏原, 有研究针对主要过敏原 Cor a 9 建立了

ELISA 检测方法, 该方法虽然检测限很低, 能够检测到加工食品中的微量榛子残留, 但与核桃、椰子、豆类、澳洲坚果等多种树坚果发生交叉反应, 导致检测方法特异性较差, 在实际检测中容易出现误检情况。食品的生产加工过程会导致蛋白的构象、结构发生变化甚至是蛋白降解, 从而造成抗体不能检测到抗原^[20], 使用单一过敏原建立的 ELISA 检测方法增加了对实际食品误检、漏检的风险。而使用混合过敏原蛋白可以制备出含有诸多结合位点的抗体^[21], 使抗体在最大程度上与抗原及待检样品结合, 不容易出现漏检的情况^[22]。已有的研究虽然也针对榛子混合过敏原建立了 ELISA 检测方法, 但是存在检测限较高的问题, 可能无法检测出加工食品中所含有的微量过敏原。此外并不是所有食物中的致敏成分都是已知的, 会存在一些可能导致过敏的蛋白, 但是其未被鉴定为过敏原, 为了提高检测的准确性, 在建立 ELISA 检测方法时选用的抗原应尽可能地包含榛子的所有蛋白。同时不同地域的榛子所含有的蛋白具有地域上的差异, 国外的 ELISA 试剂盒在对国内的榛子加工食品的检测中很容易出现误检情况, 因此建立一种用于检测国内榛子过敏原的 ELISA 检测方法至关重要。

本研究使用含有榛子过敏原的混合蛋白作为抗原对新西兰大白兔以及 SD 大鼠进行免疫, 制备兔多克隆抗血清和大鼠多克隆抗血清, 并对这 2 种抗血清中的抗体的特异性和稳定性等性能进行评价和分析, 开发出适用于国内加工食品的榛子过敏原的双抗夹心 ELISA 方法^[23-25], 为榛子过敏原准确、便捷、快速检测提供新的途径。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

榛子(*Corylus avellana*, 中国辽宁本溪生产); SD 大鼠、新西兰大白兔(武汉普罗金蛋白公司); 核桃(*Juglans regia*)、板栗(*Castanea sativa*)、腰果(*Anacardium occidentale*)、松仁(*Pinus koraiensis*)、杏仁(*Prunus armeniaca*)、开心果(*Pistacia*

vera)、巴旦木(*Prunus dulcis*)、花生(*Arachis hypogaea*)、小麦(*Triticum aestivum*)、大豆(*Glycine max*)(青岛利群超市); 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔 IgG、兔抗大鼠 IgG(河南洛阳佰奥通公司); 四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)单组分显色液、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(北京索莱宝科技有限公司); 吐温 20、磷酸二氢钾、氯化钾、氯化钠、磷酸氢二钠、浓硫酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

96 孔聚苯乙烯酶标板(美国 Costar 公司); 800TS 吸收光酶标仪(美国 BioTek 公司); iBlot2 免疫印迹转膜仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Tanon-4200SF 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 榛子混合过敏原的提取

先将去壳后的榛子研磨成细小粉末, 加入一定量的丙酮对榛子粉进行脱脂、脱色处理; 按照 1:10 (g/mL)比例加入含有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS, 0.01 mol/L, pH=7.4), 在室温条件下充分混匀(约 3 h), 之后在 10000 r/min, 4 °C 条件下离心 20 min, 上清液依次通过 0.45、0.22 μm 的滤膜过滤, 得到榛子混合过敏原溶液, -20 °C 保存。

1.2.2 榛子多克隆抗血清的制备

实验动物饲养于标准化实验动物房, 连续观察 7 d, 确定动物健康状况正常后进行免疫。用 1.2.1 提取得到的榛子混合过敏原作为免疫原, 初次免疫采用肌肉注射和皮下注射, 生理盐水稀释的免疫原蛋白溶液与弗氏完全佐剂按照 1:1 (V/V, 以下同)充分乳化, 免疫剂量为 1 mg/只。之后采用皮下多位点免疫注射, 每隔两周加强免疫 1 次, 共免疫 4 次。免疫原蛋白溶液经生理盐水稀释后与弗氏不完全佐剂 1:1 完全乳化, 免疫剂量为 0.5 mg/只。用榛子混合过敏原溶液分别经腹腔与皮下对大鼠进行免疫, 初次免疫采用弗氏完全佐剂与经生理盐水的稀释免疫原蛋白溶液 1:1 完全乳化, 每两周进行 1 次加强免疫, 加强免疫 3 次, 免疫原蛋白溶液与弗氏不完全佐剂完全乳化, 免疫剂量均为 100 μg/只。采血前这 2 种动物禁食 24 h, 以防血脂过高。得到的血液于 37 °C 静置 2 h, 之后 4 °C 过夜, 次日 9500 r/min, 4 °C 条件下离心 20 min, 分装后置于 -80 °C 保存备用。

1.2.3 榛子多克隆抗血清对榛子蛋白的特异性评估

(1)聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

根据 LAEMMLI^[26]的方法, 将榛子蛋白和其他粗提蛋白的样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析。将样品(每孔 10 μg)与溴酚蓝缓冲液 4:1 (V/V)混合, 并在 100 °C 下加热 7 min。用 5%浓缩胶和 12%分离胶制备 SDS-PAGE 凝胶, 蛋白电泳在 120 V 下进行 1.5 h。使用考马斯亮蓝 R-250 染液对凝胶染色, 然后使用脱色液脱色直至

溶液变澄清。

(2)免疫印迹(Western-Blot)分析

如前所述, 用 SDS-PAGE 分离样品, 并在室温下使用 iBlot2 免疫印记转膜仪进行转膜, 转膜时间为 4 min。然后以 1:20000 (V/V)稀释的兔多克隆抗血清或 1:10000 (V/V)稀释的鼠多克隆抗血清作为第一抗体进行孵育 1 h, 然后与 1:20000 (V/V)稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 或 1:5000 (V/V)稀释的 HRP-兔抗大鼠 IgG 作为第二抗体在室温下孵育 1 h, 用超纯水洗涤后, 使用 Western Blot 化学发光底物, 将 PVDF 胶片曝光 60 s, 然后用凝胶成像仪捕获图像。

1.2.4 夹心 ELISA 定量检测方法的建立

(1)夹心 ELISA 基本检测程序

将兔多克隆抗血清和鼠多克隆抗血清进行配对, 同时采用相应的酶标二抗进行表征定量, 最终得到如下 ELISA 程序。

用碳酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 9.6)稀释兔多克隆抗血清到适当浓度, 加入 96 孔酶标板中, 每孔 100 μL, 4 °C 过夜孵育。然后用 PBST (0.01 mol/L PBS 含 0.05%吐温-20, pH=7.4)溶液洗涤 3 次, 每孔 300 μL, 每次 5 min, 弃去洗涤液, 在吸水纸上将酶标板拍干, 之后的洗涤步骤与此步骤完全相同。用 1% BSA 封闭, 37 °C 温育 2 h 左右, 洗涤拍干后, 每孔加入 100 μL 标准溶液(榛子混合过敏原溶液、PBST 作为对照), 37 °C 孵育 1 h 后洗涤拍干, 接着每孔加入 100 μL 适当浓度的鼠多克隆抗血清, 37 °C 孵育 1 h 后洗涤拍干; 之后每孔加入 100 μL 稀释到一定倍数的酶标抗体溶液, 在 37 °C 反应 1 h 后洗涤拍干, TMB 底物溶液避光显色 10 min, 最后以 2 mol/L H₂SO₄ 溶液终止反应, 测定 450~630 nm 时 OD 值。

(2)抗原工作浓度的确定

设置 12 个不同质量浓度(1、5、10、25、50、100、250、500、750、1000、2000、5000 ng/mL)的抗原标准液, 得到校准曲线, 在校准曲线中进行挑选, 确定具有线性关系的标准工作浓度范围, 确定范围内的 7 个浓度点作为标准曲线的工作浓度。

1.2.5 夹心 ELISA 定量检测方法的条件优化

(1)最佳捕获抗体、检测抗体工作浓度的选择

根据参考文献^[27]中 ELISA 检测方法的工作浓度优化, 用 PBST 缓冲液稀释兔多克隆抗血清, 稀释倍比为 (1:10000、1:20000、1:40000、1:50000、1:80000、1:160000) (V/V)、用 PBST 稀释大鼠多抗血清(1:4000、1:6000、1:8000、1:10000、1:20000、1:40000、1:80000) (V/V), HRP-酶标抗体至 1:30000 (V/V)进行检测。利用棋盘法, 筛选最佳稀释度。用 750 ng/mL 的榛子蛋白溶液作为阳性孔, 用 PBST 缓冲液作为阴性对照孔, 根据判定 P/N 值最大时, 为最佳工作浓度。P/N 值=P 值(阳性值)/N 值(阴性值或空白值)。

(2)最佳检测抗体、HRP-酶标二抗工作浓度的选择

根据 1.2.5 (1)中确定的捕获抗体、检测抗体最佳工作

浓度, 对 HRP-兔抗大鼠最佳稀释浓度进行筛选。用 PBST 稀释大鼠多克隆抗血清(1:5000、1:10000、1:20000) (*V:V*), HRP-酶标抗体至(1:10000、1:20000、1:30000、1:40000、1:60000) (*V:V*)进行检测。用 750 ng/mL 的榛子蛋白溶液作为阳性孔, PBST 代替抗原为阴性, 测定 OD 值, 根据判定 *P/N* 值最大时, 为最佳工作浓度。

(3) 孵育时间的优化

在抗体最佳工作浓度条件下, 采用 1.2.4 (1) 节的步骤分别对抗原孵育时间(30、45、60 min)、检测抗体孵育时间(30、45、60 min)、酶标二抗孵育时间(30、45、60 min)、TMB 显色时间(8、10、12 min)进行优化实验。使用 10、25、50、100、250、500、750 ng/mL 的榛子过敏原溶液建立标准曲线, 根据标准曲线对 OD 值的斜率趋势及线性拟合情况, 确定最佳孵育时间。

1.2.6 方法学评价及应用

根据《Eurachem Guide》中的方法评估夹心 ELISA 的灵敏度、特异性、精密度和准确性^[23,27]。

(1) 灵敏度实验

灵敏度包括检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ), LOD 和 LOQ 是分别根据 10 个空白 OD 值的平均值加上 3 倍或 10 倍标准差(*S*)时的 OD 值对应的抗原浓度计算出。通过优化后的标准曲线计算出 LOD 和 LOQ。

(2) 精密度实验

批内实验: 将不同质量浓度的抗原(0、10、25、50、100、250、500、750 ng/mL), 设置 5 个重复孔加入同一 ELISA 板上, 测定其 OD 值和空白标准差(*S*)。

批间实验: 每 2 d 进行一次上述测定, 连续 10 d, 每次重复测定 5 次, 测定其 OD 值并计算出相应的标准差(*S*)。按照公式(1)计算批内精密度的相对标准偏差(relative standard deviation, RSDr)和批间精密度的相对标准偏差 RSDR。

$$RSDr (RSDR) = \frac{\text{标准差}}{\text{平均值}} \times 100\% \quad (1)$$

(3) 特异性实验

抗体的特异性通过交叉反应测定。选择核桃、板栗、腰果、松仁、杏仁、开心果、巴旦木、花生、小麦、大豆, 按照 1.2.1 的方法提取其过敏原蛋白, BCA 试剂盒进行蛋白定量, 然后用 PBST 稀释成 1000 ng/mL, PBST 作为阴性对照, 用双抗夹心 ELISA 法检测, 分别得到对应的吸光度值。交叉反应物样品孔的吸光度值为 *P*, 阴性孔 PBST 的吸光度值为 *N*, 如 *P/N* > 2 时, 则说明该 ELISA 检测方法对此蛋白有交叉反应。

(4) 准确性实验

通过进行回收率实验来评价该 ELISA 方法的准确性。将 3 种不含榛子的食物(饼干、面包、酸奶)打碎, 然后将 1 g 食物碎加入总体积为 5 mL 的 PBST (pH=7.4)中, 用提取

得到的榛子混合过敏原溶液进行加标, 使终质量浓度为 20、300、600 ng/mL。在室温下涡旋振荡孵育 1 h, 然后 10000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液, 用 ELISA 方法检测, 每个梯度重复 3 次, 计算得出实际检测浓度, 并按照公式(2)计算回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{实际检测浓度}}{\text{理论添加浓度}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.7 真实食品检测

采用本夹心 ELISA 方法对 18 种市售食品进行检测, 并将其结果与食品过敏原标签信息对比以评估该方法的应用价值。真实食品根据本 ELISA 方法检测结果和标签信息分为两大类, 无榛子过敏原食品和含榛子过敏原食品。含榛子过敏原的真实食品可以进一步分 3 类, 标记含有榛子过敏原的食品、没有标记的食品或可能含有的食品。将每种真实食品(牛奶、水果罐头、果冻、咖啡、薯片、海苔饼干、沙琪玛、椰子水、榛子巧克力、榛子脆脆鲨饼干、榛子棒、榛子巧克力派、榛子乳、豆浆、威化奶酪饼干、鸡蛋卷、坚果棒)打碎, 然后按照 1.2.1 中的提取步骤获得提取物, 并应用本夹心 ELISA 方法进行检测, 根据标准曲线对检测结果进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 多克隆抗血清的特异性分析

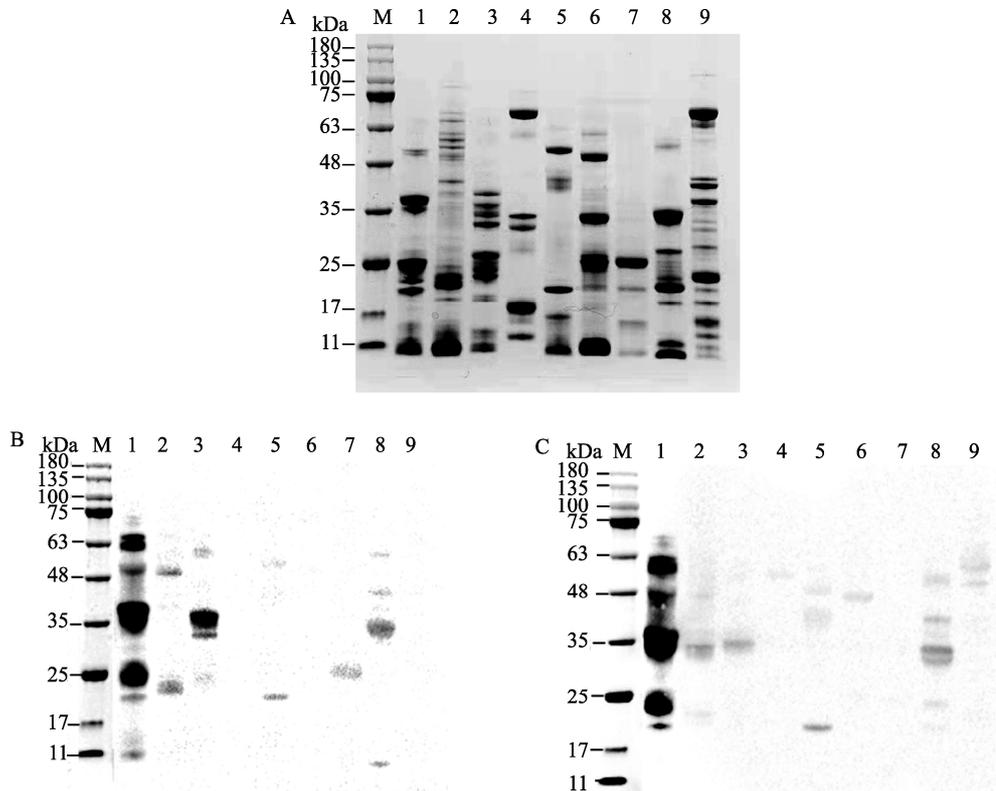
采用 Western-Blot 法对兔多抗血清和鼠多抗血清进行特异性分析, 选取可能与榛子发生交叉反应的 8 种坚果的粗蛋白溶液来进行交叉反应性实验。结果如图 1 所示。

图 1A 为提取 9 个不同物种粗提蛋白的 SDS-PAGE 图谱, 每个泳道的蛋白条带能够包含该物种的主要过敏原。通过对榛子粗蛋白与兔、鼠多克隆抗血清免疫印迹的研究, 发现兔和大鼠的抗血清与榛子粗蛋白的结合范围均在 9~70 kDa 范围内, 其中均和主要过敏原 Cor a 6、9、10、11 有特异性结合。兔抗血清中的抗体与开心果位于 35 kDa 左右的蛋白结合较强, 与核桃、夏威夷果、板栗和腰果蛋白样品轻微结合, 而与杏仁和花生过敏原没有结合(图 1B)。此外, 大鼠抗血清与核桃、开心果、夏威夷果、腰果和花生的结合较弱, 而与杏仁和板栗均没有结合(图 1C)。虽然 2 种抗血清中与其他坚果中部分蛋白组分有交叉反应的现象, 但是交叉反应较弱, 且交叉反应条带仅出现在部分蛋白, 因此在双抗夹心 ELISA 检测方法中不会检测到其他蛋白, 这极大降低了所建立的 ELISA 检测方法假阳性的风险。

2.2 夹心 ELISA 定量检测方法的建立与优化

2.2.1 捕获抗体和检测抗体的确定

将榛子过敏原质量浓度设置为 0.005、0.010、0.050、0.100、0.250、0.500 和 1.000 μg/mL, 兔抗血清(1:50000) (*V:V*) 稀释和鼠抗血清(1:10000) (*V:V*) 分别作为捕获抗体和检测抗体进行夹心 ELISA 实验, 实验结果见图 2。



注: A: 9种坚果类的 SDS-PAGE 电泳图谱; B: 兔多克隆抗体对不同坚果类的免疫印迹图谱; C: 鼠多克隆抗体对不同坚果类的免疫印迹图谱。M: Marker; 1: 榛子粗蛋白; 2: 核桃粗蛋白; 3: 开心果粗蛋白; 4: 杏仁粗蛋白; 5: 夏威夷果粗蛋白; 6: 松仁粗蛋白; 7: 板栗粗蛋白; 8: 腰果粗蛋白; 9: 花生粗蛋白。

图 1 9种不同坚果类的 SDS-PAGE 结果和两株抗体的特异性结果

Fig.1 SDS-PAGE results of 9 kinds of different nuts and specific results of 2 strains of antibodies

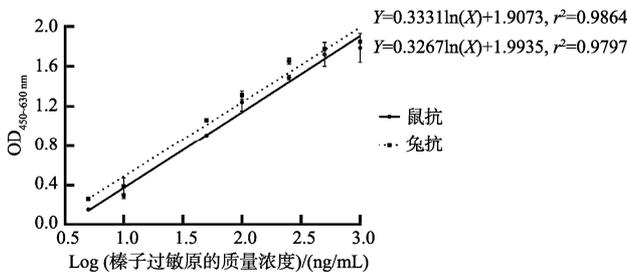


图 2 2种多克隆抗血清的配对

Fig.2 Pairing of 2 kinds of polyclonal antisera

2种配对方式, OD值都会随着抗原浓度的增加而增加。但是兔抗血清作为捕获抗体时, 线性拟合结果为 $r^2=0.9864$, 而鼠抗血清作为捕获抗体时, 线性拟合结果 $r^2=0.9797$, 兔抗血清作为捕获抗体的线性拟合程度更好, 表明此种配对方式效果更好。故将兔多克隆抗血清作为夹心 ELISA 检测方法的捕获抗体, 鼠多克隆抗血清作为检测抗体。

同时选取其中具有线性关系的标准浓度范围(10、25、50、100、250、500、750 ng/mL), 这7个质量浓度的榛子过敏原作为 ELISA 检测方法的标准抗原浓度。

2.2.2 最佳捕获抗体、检测抗体工作浓度的确定

空白样品的检测结果 OD 值均在 0.007~0.01 之间(结果没有列出), 表明不同捕获抗体、检测抗体的工作浓度不会对检测结果产生假阳性的影响。表 1 结果表明, 当捕获抗体稀释倍数为 10000 时, 检测抗体稀释倍数为 10000 倍时, 所得到的检测结果计算得出的 P/N 最大, 最大值为 314.429。因此选择将捕获抗体 1:10000 (V/V), 检测抗体 1:10000 (V/V) 稀释。

2.2.3 最佳检测抗体、HRP-酶标二抗工作浓度的确定

空白样品的检测结果 OD 值均在 0.007~0.012 之间(结果没有列出), 表明不同捕获抗体、检测抗体的工作浓度不会对检测结果产生假阳性的影响。表 2 结果表明, HRP-酶标二抗浓度的变化对 P/N 值变化影响最大, 可能由于酶标二抗是最终显色的抗体, 最接近显色步骤, 其变化更容易被表征。当检测抗体稀释 10000 倍, HRP-兔抗大鼠稀释 20000 倍时, P/N 值为 213.778, 达到最大值。因此兔多克隆抗血清作为捕获抗体的最佳工作浓度为 1:10000 (V/V) 稀释, 鼠多克隆抗血清作为检测抗体的最佳工作浓度为 1:10000 (V/V) 稀释, 最佳 HRP-酶标二抗的工作浓度为 1:20000 (V/V) 稀释。

2.2.4 最佳孵育时间的确定

在确定抗体组合以及抗体稀释倍数后, 再次进行了孵育时间的优化, 如图 3 显示, 随着 3 种抗体浓度的升高,

整体 OD 值逐渐上升。图 3A 的结果表明, 随着孵育抗原的增加, 会使相同浓度的 OD 值增加, 孵育的时间变化对整体 OD 值影响不大, 抗原孵育 5 min 的结果未列出, 但是其标准曲线与孵育 30 min 基本无差异。由于, 微量含量榛子过敏原也会对过敏消费者带来食品安全风险, 为更好地检测出实际样品中所含有的微量榛子残留, 因此适当加长抗原孵育时间可以在一定程度上提高对微量过敏原的风险控制。当抗原孵育 30 min 时, 所建立的 ELISA 标准曲线的线性拟合程度也是最高的, 故选择抗原孵育时间为 30 min。图 3B 的结果表明随着检测抗体孵育时间的增加, 相同浓度抗原所对应的 OD 值也相应增加, 且增加幅度较大, 表明检测抗体孵育时间对检测结果影响较大。当检测抗体孵育时间仅为 5 min 时, 最高抗原浓度所对应的 OD 值低于 1.0, 导致所建立的标准曲线的斜率较低, 这极大程度上降低了标准曲线计算检测结果的准确度。同时结合标准曲线拟合的线性程度来看, 检测抗体孵育 30 min 时线性拟合结果最优。图 3C 的结果表明, 随着 HRP-酶标二抗孵育时间的增加, 使相同浓度的抗原所对应的 OD 值增加, 且增加幅度较大, 同样是由于酶标二抗最接近显色步骤, 它的变

化更容易在结果中被表征。当孵育时间为 30 和 45 min 时, 所得到的标准曲线的线性拟合程度是相同的, 均大于孵育 60 min 时的线性拟合结果。而当 HRP-兔抗大鼠孵育 30 min 时所得到的标准曲线的斜率远低于孵育 45 min, 会导致标准曲线计算检测结果的不准确。图 3D 的结果表明, 随着 TMB 显色时间的增加, 相同抗原浓度所对应的 OD 值基本无差异, 表明所设置的 3 个显色时间点对检测结果影响较小。从标准曲线的线性拟合系数比较, TMB 显色 8 min 时标曲的线性拟合结果最优。

考虑抗体等试剂的经济因素、孵育时间长短的便利因素和食品安全风险因素等最终确定了如下的夹心 ELISA 检测程序, 抗原孵育 30 min, 鼠多克隆抗血清孵育 30 min, HRP-兔抗大鼠孵育 45 min 和 TMB 显色 8 min。

2.2.5 标准曲线的确立

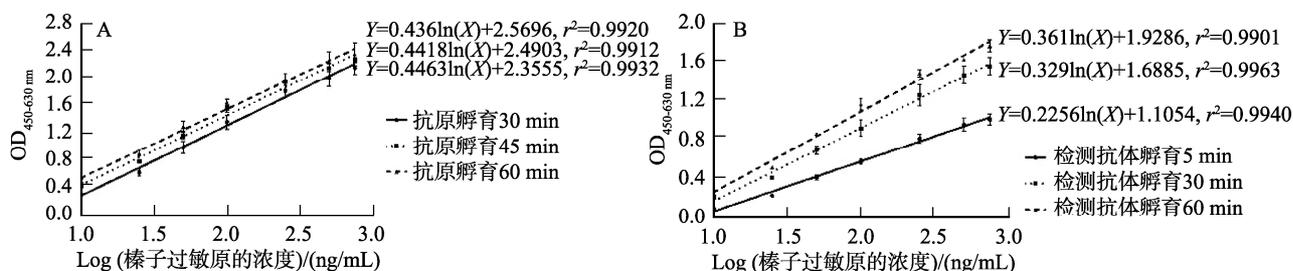
本夹心 ELISA 标准曲线选取具有线性关系的标准质量浓度(10、25、50、100、250、500、750 ng/mL)绘制标准曲线, 如图 4 所示。此曲线的线性回归方程为 $Y=0.4504\ln(X)+2.1194$, r^2 为 0.9934, 表明该标准曲线的线性拟合关系良好。

表 1 不同捕获抗体、检测抗体工作浓度的检测结果(P/N)
Table 1 Detection results of different working concentrations of captured antibody and detected antibody (P/N)

检测抗体(V:V)	捕获抗体(V:V)					
	1:10000	1:20000	1:40000	1:50000	1:80000	1:160000
1:4000	241.300	282.250	192.125	146.625	120.875	66.125
1:6000	258.111	240.375	163.500	157.429	99.500	53.500
1:8000	240.222	236.875	191.857	153.429	136.333	63.111
1:10000	314.429	250.143	158.625	148.714	109.143	59.429
1:20000	204.875	193.375	136.500	121.571	71.250	54.750
1:40000	175.000	142.429	99.625	91.286	61.857	34.857

表 2 在不同检测抗体、HRP-酶标二抗工作浓度的检测结果(P/N)
Table 2 Optimization of antibody detection and HRP-rabbit anti mice concentration (P/N)

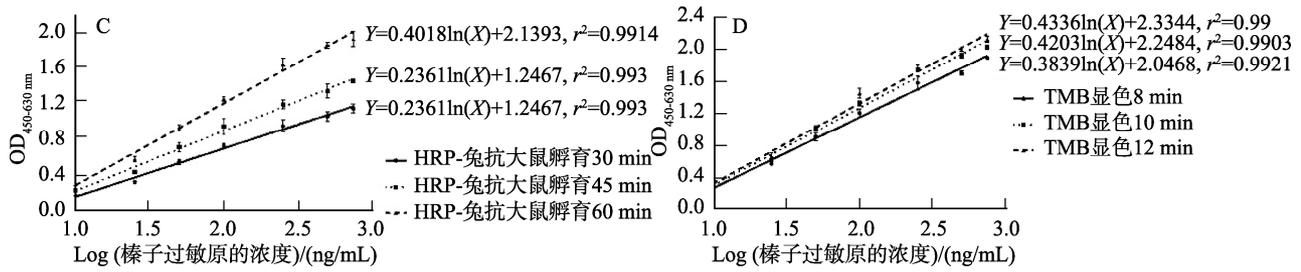
检测抗体(V:V)	HRP-兔抗大鼠(V:V)				
	1:10000	1:20000	1:30000	1:40000	1:60000
1:5000	212.438	195.909	140.818	109.455	88.600
1:10000	201.000	213.778	135.400	121.444	84.556
1:20000	192.750	160.889	129.375	97.000	69.250



注: A: 抗原孵育时间的优化; B: 检测抗体孵育时间的优化。

图 3 夹心 ELISA 的工作时间优化

Fig.3 Optimization of sandwich ELISA working time



注: C: 酶标二抗工作时间的优化; D: TMB 显色时间的优化。

图 3(续) 夹心 ELISA 的工作时间优化

Fig.3 Optimization of sandwich ELISA working time

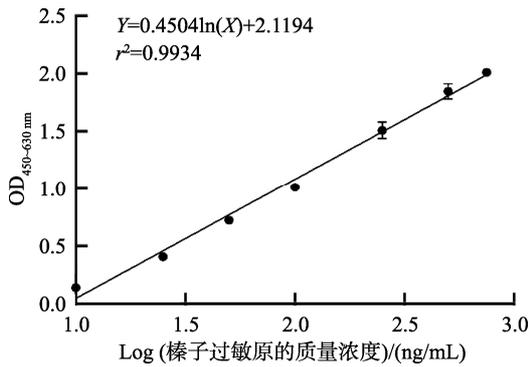


图 4 夹心 ELISA 的标准曲线

Fig.4 Standard curve of sandwich ELISA

2.3 夹心 ELISA 检测方法的评价

2.3.1 灵敏度实验结果

根据 1.2.6 (1)中 LOD、LOQ 的计算方法,本研究建立的 ELISA 方法的 LOD 及 LOQ 分别为 0.1、10 ng/mL,检测范围为 10~750 ng/mL,检测灵敏度是判断食品中过敏原残留检测方法适用性的一个关键参数。一种理想的检测方法可以检测到过敏性食物的水平低于诱发最敏感受试者过敏反应的阈值,据文献报道,1 mg 榛子是引起不良免疫反应的最低限量,被认为是导致榛子过敏的阈值^[6]。其他文献中所报道的榛子 ELISA 检测方法的检测限为 0.2~1.2 mg/kg^[27-28],本研究的 ELISA 检测方法的检测限要远低于其他文献中检测榛子的 LOD。但是考虑到在实际样品检测中会有提取损失,对于开发的检测方法,LOD 要求尽可能低。如前所述的

检测方法可能难以满足要求,而本研究开发的 ELISA 的 LOD 为 0.1 ng/mL,可以满足目前参考阈值上的要求,同时能够检测到加工食品中的微量榛子过敏原。

2.3.2 精密度分析

在相同的实验条件下,按照 1.2.6 (2)中实验方法进行批内、批间实验,结果见表 3。根据美国分析化学家协会出台的针对过敏原的 ELISA 检测的标准方法性能要求,RSDr 应小于 20%,RSDR 应小于 30%^[23]。在相同的试剂和实验条件下于一式 5 份进行批内变异系数的测定。如表 3 所示,批内变异系数在 3.64%~11.30%范围内,表明精度较高。而批间变异系数的测定是在多个时间点的不同实验条件下完成的即每 2 d 进行一次测定,连续 10 d,观察到的变异系数的结果在 6.75%~11.17%的范围内。本夹心 ELISA 方法满足这一要求,在标准化实验条件下具有较小的变化,并且具有较高的准确性和可重复性。

2.3.3 特异性结果分析

根据对榛子过敏原的同源性进行生物信息学分析,坚果(开心果、核桃、杏仁等)、花生、大豆与榛子的过敏原具有较高的同源性,这些同源蛋白可以在检测时识别来自相似食物来源的蛋白质,这种交叉反应有可能会限制 ELISA 的用途。因此在建立 ELISA 时评估潜在的交叉反应性就显得尤为重要。采用 1000 ng/mL 的核桃、板栗、腰果、松仁、杏仁、开心果、巴旦木、花生、小麦、大豆的常见过敏原的提取物来评估夹心 ELISA 检测方法的特异性,结果如表 4 所示。

表 3 夹心 ELISA 的精密度评估
Table 3 Precision evaluation of sandwich ELISA

榛子蛋白质量浓度/(ng/mL)	批内差		批间差	
	(平均值±标准差)/(ng/mL)	RSDRs/%	(平均值±标准差)/(ng/mL)	RSDRs/%
10	9.68±0.96	11.30	10.01±0.96	11.17
25	23.32±2.55	6.30	22.80±3.95	9.42
50	52.06±7.66	6.11	54.55±15.41	10.11
100	126.83±16.19	3.80	115.81±37.31	10.27
250	251.68±37.72	3.64	282.64±82.99	7.85
500	428.11±81.86	4.06	452.93±133.39	6.75
750	823.84±214.79	5.38	812.87±299.54	8.19

表 4 榛子与其他种类的粗提蛋白对本夹心 ELISA 的特异性评估

Table 4 Specificity assessment of hazelnut and other crude extracted proteins for sandwich ELISA

交叉反应物	<i>P/N</i> 值	OD 值
核桃	12.97	0.130
板栗	0.88	0.007
腰果	1.63	0.015
松仁	0.63	0.005
杏仁	0.95	0.007
开心果	0.74	0.007
巴旦木	1.33	0.012
花生	0.74	0.007
小麦	0.90	0.006
大豆	0.67	0.007

表 4 的结果表明, 本夹心 ELISA 检测方法显示出对榛子蛋白的高特异性和反应性, 仅观察到对核桃的 ELISA 检测出现 *P/N* 值大于 2.0, 呈现出阳性结果。但其 OD 值小于 0.15, *P/N* 值较大是由于空白值过低, 空白值小于 0.01(结果未列出), 表明核桃与榛子的交叉反应性和结合性较弱。而 ELISA 检测其他物种的结果计算出的 *P/N* 值都远低于 2.0, 且检测的 OD 值都远低于 0.1, 表明没有交叉反应的存在, 说明该 ELISA 检测方法的特异性良好。文献中所建立的榛子 ELISA 方法与腰果、核桃、巴西坚果、杏仁、松仁和花生都会有交叉反应性^[29], 本研究所建立的 ELISA 检测方法极大地提高了试剂盒的特异性。在蛋白质印迹过程中榛子兔多克隆抗血清中的抗体、鼠多克隆抗血清中的抗体与其他坚果蛋白有微弱的结合性, 但在 ELISA 检测中却趋近于空白值, 推测是由于 ELISA 的方法的配对过程将在一定程度上降低抗体的识别能力, 抗体存在微弱的竞争^[28]。

2.4 ELISA 检测方法在食品中的应用

2.4.1 回收率实验结果

为验证 ELISA 检测方法的准确性, 本研究选取了咖啡、面包、酸奶 3 种不含榛子的食品, 并在这 3 种食品中以 20、300 和 600 ng/mL 的质量浓度加标榛子全组分混合过敏原进行回收实验。结果如表 5 所示, 在咖啡中, 添加榛子蛋白的回收率为 97.61%~114.77%。在面包中, 添加榛子蛋白的回收率为 83.47%~115.18%。在酸奶中, 添加榛子的回收率为 87.28%~112.36%。根据美国分析化学家协会出台的针对过敏原的 ELISA 检测的标准方法性能要求回收率应在 50%到 150%之间^[23], 本夹心 ELISA 方法满足这一要求, 表明通过本夹心 ELISA 方法检测准确度良好。回收率数据的变化范围较大表明可能存在基质干扰, 食物基质在进行免疫测定时可能有干扰化合物存在于检测样品和随后的提取物中而降低目标蛋白质的提取能力, 同时干扰抗体抗原结合或干扰测定的酶活性, 进而降低检测的灵敏度。比较 3 种实际样品检测的回收率可以发现, 面包的回收率范围最大,

表明其检测结果受食物基质影响最大, 可能是由于面包经过了热高温烘焙, 热加工通过改变蛋白质的三维结构或通过引起蛋白质的聚集, 破坏蛋白结构同时降低蛋白的溶解度^[29-30]。热加工还会导致食品中的各种生化反应和酶反应, 如美拉德褐变, 这些都会导致检测结果的不准确性^[24]。

2.4.2 真实食品检测结果

为了验证本 ELISA 方法的检测效率, 在市面上采购了 18 种商业食品进行检测。真实食品根据检测结果和标签信息分为两大类, 无榛子过敏原食品和含榛子过敏原食品。含榛子过敏原的真实食品可以进一步分 3 类, 标记含有榛子过敏原的食品、没有标记的食品或可能含有的食品。如表 6, 对照的阴性样品均未检测到榛子蛋白的存在。

结果如表 6 所示, 在 8 种外包装上标注不含有榛子过敏原成分的食品中, 未有食品被检测出阳性, 表明该 ELISA 检测方法在实际食品的检测中没有发生误检。在 5 种标签标注含有榛子过敏原的食品中均检测到了榛子过敏原的存在, 表明该 ELISA 检测方法具有很高的准确性。而在 5 种标签中可能存在榛子的食品中, 有 1 种食品出现阳性结果, 可能是因为坚果棒中确实含有榛子, 也有可能是在加工的过程中生产线被榛子微量残留物污染^[31], 这说明了过敏原检测对于监控包装食品中过敏原的重要性。这些结果表明, 本夹心 ELISA 方法可以适用于检测加工食品中的榛子过敏原, 并能够检测可疑食品样品中的榛子过敏原含量。

3 结论与讨论

本研究建立了一种双抗夹心 ELISA 方法, 用于检测榛子蛋白。优化了各抗体的工作浓度, 其中兔抗血清作为捕获抗体 1:10000 稀释, 鼠抗血清作为检测抗体 1:10000(*V/V*)稀释, HRP-兔抗大鼠 1:20000 (*V/V*)稀释。同时, 对各步骤工作时间优化, 抗原孵育 30 min, 检测抗体孵育 30 min, HRP-兔抗大鼠孵育 45 min、TMB 显色 8 min。该 ELISA 检测方法检测灵敏度、精密度较高, 比以往报道的使用的多克隆抗体体系 ELISA 的检测限(1 μg/mL)低 100 倍以上。在食品基质中的平均回收率在 80%到 120%之间, 批内、批间变异系数均小于 15%, 该方法的准确性、精密度都满足要求。并将本方法应用于实际样品检测, 可以对市售的食品做出较准确的检测, 说明本方法可以有效地识别给定加工食品中的微量榛子蛋白。这些结果表明, 本夹心 ELISA 方法是一种可靠的检测方法, 可以应用于市场上的产品, 以满足消费者的需求, 从而确保食品食用的安全性。

热加工过程会导致蛋白结构被破坏, 抗体无法识别相应的抗原, 造成无法检测到食物中的榛子。而使用含有榛子过敏原的混合蛋白作为抗原所制备出的抗体, 含有与不同抗原结合的多个位点, 实验中采用了包含榛子过敏原的混合蛋白作为抗原, 极大地提高了检测方法的准确性。规避了抗原无法与抗体识别的风险。鉴于单

克隆抗体的假阴性风险,本研究采用了多克隆抗体建立的检测方法,仅与核桃有微弱的交叉反应,该检测方法的特异性要优于其他 ELISA 检测方法,同时极大地节省了生产成本和时间。此外,可尝试对检测抗体进行标记,减少使用酶标抗体反应的时间来提高检测效率。除此之外,在进行回收率的实验中,发现有基质效应的存在,

越是复杂的食物体系,回收率会越低,可能是因为食品基质的复杂组分之间会产生相互作用来影响过敏原的检测,并且基质组分和加工时的相互作用等因素可能会加大对过敏原检测的影响。所以在今后的研究中可增强对食品基质效应的影响以及食品加工对食物致敏性影响的研究。

表 5 夹心 ELISA 的准确性评估
Table 5 Accuracy evaluation of sandwich ELISA

添加质量浓度/(ng/mL)	咖啡		面包		酸奶	
	回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%
600	114.77	7.87	83.47	4.19	87.28	6.54
300	104.48	4.83	115.18	6.92	103.35	5.93
20	97.61	5.30	92.1	5.16	112.36	6.12
0	ND		ND		ND	

注: ND: 未检出。

表 6 本夹心 ELISA 对真实食品榛子过敏原的含量检测结果
Table 6 Determination of soybean allergens in commercial food by sandwich ELISA

食物样品	榛子过敏原含量 ($\mu\text{g/mL}$)
不含榛子过敏原	
牛奶	ND
水果罐头	ND
果冻	ND
咖啡	ND
薯片	ND
海苔饼干	ND
沙琪玛	ND
椰子水	ND
标签含有榛子过敏原	
榛子巧克力	0.76 \pm 0.22
榛子脆脆鲨	0.56 \pm 0.13
榛子棒	0.52 \pm 0.11
榛子巧克力派	0.62 \pm 0.18
榛子乳	1.98 \pm 0.53
可能含有榛子过敏原(标签标注坚果)	
豆浆	ND
威化奶酪饼干	<LOQ
鸡蛋卷	<LOQ
牛奶脆脆鲨	ND
坚果棒	0.23 \pm 0.07

注: 结果表示为平均值 \pm 标准差($n=3$); LOQ=10 ng/mL; ND: 未检出。

综上所述,本研究初步建立了榛子过敏原的双抗夹心 ELISA 定量检测方法,对食物样品中榛子过敏原的快速检测和筛选有积极的作用,具有一定的应用前景和应用价值。

参考文献

- [1] SICHERER SH, SAMPSON HA. Food allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(2): 116–125.
- [2] FLINTERMAN AE, AKKERDAAS JH, KNULST AC, *et al.* Hazelnut allergy: From pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008, 8(3): 261–265.
- [3] COSTA J, MAFRA I, CARRAPATOSO I, *et al.* Almond allergens: Molecular characterization, detection, and clinical relevance [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(6): 1337–1349.
- [4] BOUSQUET PJ, CASTELLI C, DAURES JP, *et al.* Assessment of allergen sensitization in a general population-based survey (European community respiratory health survey I) [J]. *Ann Epidemiol*, 2010, 20(11): 797–803.
- [5] BLOM WM, VLIEG-BOERSTRA BJ, KRUIZINGA AG, *et al.* Threshold dose distributions for 5 major allergenic foods in children [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(1): 172–179.
- [6] ELLER E, HANSEN TK, BINDSLEV-JENSEN C. Clinical thresholds to egg, hazelnut, milk and peanut: Results from a single-center study using standardized challenges [J]. *Ann Allerg Asthma Immunol*, 2012, 108(5): 332–336.
- [7] MURARO A, HALKEN S, ARSHAD SH, *et al.* EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy [J]. *Allergy*, 2014, 69(5): 590–601.
- [8] COSTA J, ANSARI P, MAFRA I, *et al.* Assessing hazelnut allergens by protein- and DNA-based approaches: LC-MS/MS, ELISA and real-time PCR [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(11): 2581–2590.
- [9] HARRER A, EGGER M, GADERMAIER G, *et al.* Characterization of plant food allergens: An overview on physicochemical and immunological techniques [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(1): 93–112.
- [10] PILOLLI R, MONACI L, VISCONTI A. Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management [J]. *TRAC-Trend Anal Chem*, 2013, 47: 12–26.
- [11] TRASHIN SA, CUCU T, DEVREESE B, *et al.* Development of a highly sensitive and robust Cor a 9 specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of hazelnut traces [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 708(1-2): 116–122.
- [12] REBE RS, LIU H, NORDE W, *et al.* Food allergens profiling with an imaging surface plasmon resonance-based biosensor [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(20): 8485–8491.
- [13] AQUINO A, CONTE-JUNIOR CA. A systematic review of food allergy: Nanobiosensor and food allergen detection [J]. *Biosensors*, 2020, 10(12): 194.
- [14] PICARIELLO G, MAMONE G, ADDEO F, *et al.* The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(42): 7386–7398.
- [15] HEICK J, FISCHER M, KERBACH S, *et al.* Application of a liquid

- chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of seven allergenic foods in flour and bread and comparison of the method with commercially available ELISA test kits [J]. *J AoAC Int*, 2011, 94(4): 1060–1068.
- [16] PLANQUE M, ARNOULD T, RENARD P, *et al.* Highlight on bottlenecks in food allergen analysis: Detection and quantification by mass spectrometry [J]. *JAOAC Int*, 2017, 100(4): 1126–1130.
- [17] LI YS, MENG XY, ZHOU Y, *et al.* Magnetic bead and gold nanoparticle probes based immunoassay for β -casein detection in bovine milk samples [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 66: 559–564.
- [18] WU L, LI GH, XU X, *et al.* Application of nano-ELISA in food analysis: Recent advances and challenges [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2019, 113: 140–156.
- [19] TÖRÖK K, HAJAS L, BUGYI Z, *et al.* Investigation of the effects of food processing and matrix components on the analytical results of ELISA using an incurred gliadin reference material candidate [J]. *Acta Aliment Hung*, 2015, 44(3): 390–399.
- [20] GEISELHART S, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, BUBLIN M. Tree nut allergens [J]. *Mol Immunol*, 2018, 100: 71–81.
- [21] COSTA J, MAFRA I, CARRAPATOSO I, *et al.* Hazelnut allergens: Molecular characterization, detection, and clinical relevance [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2016, 56(15): 2579–2605.
- [22] ZENG L, SONG SS, ZHENG QK, *et al.* Development of a sandwich ELISA and immunochromatographic strip for the detection of shrimp tropomyosin [J]. *Food Agric Immunol*, 2019, 30(1): 606–619.
- [23] GODEFROY S, YEUNG J, ALBORNOZ G, *et al.* Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) 2018.003: Quantitation of milk by ELISA-based methods [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(4): 1276–1278.
- [24] KESHAVARZ B, JIANG X, HSIEH YP, *et al.* Matrix effect on food allergen detection—A case study of fish parvalbumin [J]. *Food Chem*, 2019, 274: 526–534.
- [25] MATTAROZZI M, CARERI M. The role of incurred materials in method development and validation to account for food processing effects in food allergen analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(19): 4465–4480.
- [26] LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [27] 李明. CSBV 重组结构蛋白抗原性研究和双抗夹心 ELISA 试剂盒研制 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- LI M. Study on antigenicity of CSBV recombinant structural protein and development of double-antibody sandwich ELISA kit [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.
- [28] AN LL, WANG YL, PAN YH, *et al.* Development and validation of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of florfenicol and thiamphenicol in edible animal tissue and feed [J]. *Food Anal Method*, 2016, 9(9): 2434–2443.
- [29] FAESTE CK, HOLDEN L, PLASSEN C, *et al.* Sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of hazelnut (*Corylus avellana*) protein traces in food matrices [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 314(1-2): 114–122.
- [30] HOLZHAUSER T, VIETHS S. Quantitative sandwich ELISA for determination of traces of hazelnut (*Corylus avellana*) protein in complex food matrixes [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(10): 4209–4218.
- [31] KIENING M, NIESSNER R, DRS E, *et al.* Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(9): 3321–3327.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



杭 天, 硕士, 主要研究方向为食物过敏原检测。

E-mail: hangtian201903@163.com



李振兴, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。

E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn