



甲壳类水产品主要过敏原原肌球蛋白胶体金免疫层析快速检测方法的建立及应用

高红艳¹, 赵金龙¹, 王雅晴^{1,2}, 蒋秋燕³,
黄玉浩¹, 林洪¹, 李振兴^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋食品营养与健康创新研究院, 山东 青岛 266109;

3. 山东商业职业技术学院, 山东 济南 250103)

摘要: 为实现甲壳类水产品主要过敏原的快速检测, 实验使用凡纳滨对虾原肌球蛋白(TM)作为检测靶标, 构建了胶体金免疫层析检测方法。使用天然 TM 分别免疫 SD 大鼠和新西兰大白兔制备多克隆抗体, 以 40 nm 胶体金标记的鼠多抗作为检测抗体, 以兔多抗为捕获抗体, 基于双抗体夹心原理组装免疫层析试纸条, 并应用于市售食物样品的检测。结果显示, 组建的免疫层析试纸条可在 5 min 之内显示结果, 视觉检出限为 10 ng/mL, 对虾、蟹、克氏原螯虾及美洲螯龙虾等甲壳类水产品的特异性高, 但与蛤蜊、扇贝存在微弱的交叉反应; 在不含甲壳类水产品的市售食品中的加标回收率为 81%~126%, 准确性良好; 试纸条的批内、批间变异系数低于 15%, 市售实际食物样品的检测结果与食物过敏原标签一致。研究表明, 该方法具有高灵敏度与检测特异性, 可在多种基质与商业化食品中实现甲壳类过敏原的有效检测, 具有较强的实际应用价值。

关键词: 凡纳滨对虾; 甲壳类; 原肌球蛋白; 胶体金免疫层析; 过敏原检测

中图分类号: TS 254.7

文献标志码: A

甲壳类水产品及其制品属于国际免疫联合会(IUIS)及世界卫生组织(WHO)认定并命名的“八大类”过敏原食物之一, 主要过敏原是原肌球蛋白(tropomyosin, TM)^[1-2], 其广泛存在于无脊椎动物的肌肉组织中。有研究报道只有无脊椎动物的 TM 可诱发机体产生过敏反应^[3]。TM 是细肌丝中肌动蛋白的结合蛋白, 相对分子质量为 34~39 ku, 由两条平行多肽链相互缠绕组成 α 螺旋构型, 耐高温高压、稳定性高^[4-5], TM 的氨基酸序列具有高度相似性, 所以也是甲壳类水产品 and 软体类水产品之间发生交叉反应的主要过敏原^[6-7]。

我国城市化人群的人均水产品消费呈现上升趋势, 2021 年甲壳类养殖量为 603.29 万 t, 同比增长 1.79%; 甲壳类海水养殖面积为 2.95×10^7 hm², 同比增长 2.54%。随着海产品消费量的增加, 消费者及海产品加工商中出现食物过敏的报道也越来越频繁。有关水产品过敏的准确流行病学数据有限, 根据相关文献报道, 甲壳类水产品过敏在西方国家较为常见, 但在亚洲沿海地区更为普遍^[8]。据估计, 高达 2.5% 的人口对海产品有过不良反应, 其中虾、蟹等甲壳类食物是引起儿童和成人过敏反应的主要原因^[9-10]。

收稿日期: 2022-05-05 修回日期: 2022-06-02

资助项目: 国家自然科学基金(32072338)

第一作者: 高红艳(照片), 从事水产品安全与质量控制研究, E-mail: gaohongyan1129@163.com

通信作者: 李振兴, 从事食品安全与品质调控研究, E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn



近年来,食物过敏已成为全球食品安全与公共卫生问题,发病率逐年升高^[1],严重影响了消费者的身体健康及生活水平,增加了社会保障的负担。最早欧盟、美国规定必须在食品包装上标识过敏原成分,后续加拿大、日本等国家陆续颁布了对食物过敏原强制标识的法规^[2]。我国起步相对较晚,GB 7718—2011《预包装食品标签通则》^[3]中提出了推荐在食品包装上对甲壳类等水产品及其加工食品进行标识,并未做强制要求。现代餐饮食品配方的复杂性及食品在加工运输过程中受到外来过敏原的污染等原因,会导致食物过敏患者意外接触到已知过敏原,导致食物过敏的发生。过敏原检测是食品生产企业实施过敏原管理以及我国食品过敏原标签强制标识制度实施的重要技术手段,对食物过敏原进行快速、准确的检测十分必要。

目前甲壳类过敏原检测主要有酶联免疫吸附法、PCR法^[4]和液相色谱-串联质谱法^[5]等。免疫学方法是过敏原快速检测的首选方法,其主要利用抗原抗体特异性结合,具有操作简单、特异性强、灵敏度高等特点。其中免疫层析检测技术操作简捷、成本低廉、检测结果快速直观,目前多用于定性半定量检测和大批量样品筛选^[6]。

本研究建立了一种灵敏度高、耗时短、成本低廉的快速检测方法,以便用于肉制品、水产品及市售食品中甲壳类水产品过敏原的快速检测,为食品加工企业进行过敏原快速筛查及预防过敏原污染提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验试剂 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG、HRP标记的兔抗大鼠IgG,河南洛阳佰奥通公司;羊抗鼠IgG,长沙博优生物科技有限公司;氯化金(20190617)、二水合柠檬酸三钠、氯化钾、氯化钠及盐酸,国药集团化学试剂有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、N-三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、吐温-20(Tween-20)、rProtein G Beads 4FF重力柱及rProtein A Beads 4FF重力柱,北京索莱宝科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

实验仪器 XYZ三维划膜喷金仪及微电脑

自动斩切机,上海金标生物科技有限公司;WD-9405F型脱色摇床,北京六一生物科技有限公司;TGL-16M离心机,长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司;MS-H280-Pro型数显加热型磁力搅拌器,大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;800TS型吸收光酶标仪,美国BioTek公司;iBlot2免疫印迹转膜仪,美国Thermo Fisher公司;Tanon-4200SF型凝胶成像仪,上海天能科技有限公司;实验室用水均为超纯水,由Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司)制得。

实验对象 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) TM抗原由中国海洋大学食品安全实验室提供,纯度高于90%;大鼠和兔抗凡纳滨对虾TM多克隆抗体血清由湖北普罗金科技有限公司免疫制备:使用纯化得到的天然TM作为抗原,免疫SD大鼠和新西兰大白兔获得阳性血清;试纸条材料:H5072型吸水纸、Pall vivid 120型硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)及DB-6型PVC底板购于上海杰一生物技术有限公司;VL98型聚酯膜样品垫及RB-45型玻璃纤维膜金标垫购于上海金标生物科技有限公司。

1.2 多克隆抗体的纯化及特异性验证

多克隆抗体的纯化 参照索莱宝 rProtein G A/G Beads说明书,分别使用 rProtein A Beads 4FF 和 rProtein G Beads 4FF 重力柱进行抗体纯化,简述为:使用 5 mL 结合/洗涤 Buffer (0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L Na₂HPO₄, pH 7.0) 平衡层析柱;取 1 mL 多抗血清 1:1 加入结合 Buffer,离心 (12 000 r/min, 2 min) 取上清液,上清液过 3~4 次重力柱;使用 15 mL 洗涤 Buffer 清洗柱子,随后使用 7 mL 洗脱 Buffer (0.1 mol/L 甘氨酸, pH 3.0) 对目标蛋白进行洗脱;使用低盐缓冲液 (0.01 mol/L PBS, pH 7.4) 透析洗脱液,混匀后分装于 1.5 mL EP 管中, -80 °C 长期保存。使用 BCA 试剂盒、SDS-PAGE 和 Image J 软件对抗体进行蛋白浓度及纯度分析。

抗体的特异性验证 采用含 TM 的花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)、沟螺(*Busycon canaliculatu*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、鸡肉、牛肉、猪肉等不同物种的粗蛋白溶液,通过免疫印迹实验(Western Blot, WB)评估纯化的鼠

抗、兔抗对 TM 的特异性, 流程根据 Mahmood 等^[17]的方法略加修改后简述为: 将蛋白电泳凝胶取出置于转印膜组中, 通过转膜仪将凝胶上的蛋白转印 (20 V, 4.5 min) 至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 将 PVDF 膜置于孵育盒中, 使用 30 mL 封闭液 (PBST 含 1% 的 BSA 和 5% 脱脂奶粉) 封闭 2 h, 加入 30 mL 一抗稀释溶液 (兔抗稀释 2 万倍、鼠抗稀释 1 万倍) 摇床孵育 1 h, 加入 30 mL 酶标二抗稀释液 (羊抗兔 IgG-HRP 稀释 2 万倍, 兔抗大鼠 IgG-HRP 稀释 1 万倍) 孵育 1 h, 每次抗体孵育前, 用 PBST 洗涤 3 次, 避光 1:1 (V/V) 配制 WB 显色液, 使其均匀浸润 PVDF 膜, 暗处孵育 1~2 min, 使用凝胶成像仪曝光 10~120 s, 采集 60 张图像进行分析。

1.3 纳米金颗粒的制备及表征

胶体金溶液的制备 采用柠檬酸三钠还原法^[18], 略加修改后制备 40 nm 的胶体金溶液, 制备前使用铬酸洗液过夜浸泡所使用的玻璃容器和转子, 超纯水多次清洗干净后使用。量取 100 mL 超纯水于 250 mL 锥形瓶中, 置于恒温数显磁力搅拌仪上, 调整转速为 200 r/min, 匀速搅拌后加入 1 mL 1% 的氯金酸溶液, 200 °C 加热至沸腾, 迅速加入 1 mL 新鲜配置的 1% 柠檬酸三钠溶液, 待胶体金溶液特征颜色稳定时停止加热, 持续搅拌至溶液冷却, 4 °C 保存胶体金溶液。分别通过视觉、紫外-分光光度法、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 扫描法及 nano zs90 粒度仪对胶体金溶液进行质量鉴定^[19-20]。

胶体金的质量鉴定 视觉观察是最直观的胶体金质量鉴定方法, 可根据溶液的状态、颜色、澄清透明程度初步判断所制备的胶体金是否需要进一步鉴定及标记抗体。取 5~10 mL 胶体金溶液于玻璃容器中, 仔细观察其特征颜色及溶液状态。

取 150 μ L 胶体金溶液于 96 孔板中, 使用紫外-分光光度计在 400~700 nm 进行全波长扫描, 记录其吸收光谱, 通过最大吸收峰的波长判断胶体金的粒径。

TEM 是判断胶体金粒径大小及形态均匀程度的最直接有效的方法, 取 200 μ L 胶体金溶液滴加在铜网上, 孵育 10 min, 滤纸吸取剩余的胶体金溶液, 待网膜干燥后继续滴加胶体金溶液 2~3 次, 室温条件下晾干。通过透射电镜放大观察胶体金纳米颗粒的直径大小、形态及分布情况, 取多点

观察记录粒径大小、形态以及分布情况。

Zetasizer 仪器系统使用动态光散射 (DLS) 技术测量自纳米级以下至几微米的颗粒粒度及分子尺寸, 使用已建立的理论拟合实验原始数据从而得到粒子的粒径和分布。取 1 mL 制备好的胶体金溶液置于马尔文样品池中, 进行粒径的测量。

1.4 胶体金标记抗体的制备

通过金标抗体制备的最适 pH 和最适蛋白标记量的探究优化实验, 根据 Omidfar 等^[21]的方法, 通过条件优化, 确定标记流程: 取 1 mL 胶体金溶液, 加入 50 μ L 0.02 mol/L K_2CO_3 溶液将 pH 调至最适值, 涡旋混匀, 加入 9.3 μ g/mL 纯化的鼠抗, 室温下孵育 15 min, 加入 50 μ L 10% BSA 孵育 30 min 进行封闭, 离心 (8 410 r/min, 4 °C, 20 min) 后弃上清液, 使用 100 μ L 复溶液 (0.01 mol/L PBS, pH 7.4, 含 1% BSA 和 10% 蔗糖) 重悬沉淀。采用紫外可见分光光度计扫描测得其最大吸收峰波长, 4 °C 保存。

1.5 胶体金免疫层析检测卡的组装

NC 膜在 40% 湿度环境下平衡 30 min, 使用 XYZ 三维划膜喷金仪的划线模式将 1 mg/mL 纯化的兔抗和羊抗鼠 IgG 包被在 NC 膜上, 划线 30 cm, 包被量为 0.7 μ L/cm, 37 °C 恒温烘箱干燥 2 h 作为试纸条的检测线 (T 线) 和质控线 (C 线); 使用喷金模式, 将金标抗体喷涂在金标垫上, 喷涂量为 3.3 μ L/cm, 37 °C 干燥 2 h, 样品垫处理后 37 °C 干燥。基于双抗体夹心原理, 按照吸水垫、NC 膜、金标垫、样品垫的顺序将其粘贴在 PVC 底板上, 使用微电脑自动斩切机将其斩切为 4 mm 试纸条, 取切割完整的试纸条进一步组装塑料卡壳, 完成检测卡的组装, 取 100 μ L 待检测样品滴加到加样孔, 5 min 视觉判定结果, 检测卡及试纸条室温干燥保存。

1.6 方法检测性能的验证

灵敏度验证实验 使用层析稀释液 (0.05 mol/L Tris-HCl, pH 9.0, 含 1% Tween-20) 将天然 TM 分别稀释至 10、1、0.1、0.05、0.025、0.01、0.005、0.001 和 0 μ g/mL, 使用组装好的检测卡对不同浓度的 TM 溶液进行检测, 5 min 之内读取结果; 于黑板背景处拍照, 使用 Adobe Photoshop CC 2019 和 Excel 2019 软件读取计算 T 线灰度值, TM 浓度为横坐标, T 线灰度值为纵坐标, 绘制曲线。

特异性验证实验 目标过敏原的提取方法, 参考 Kamath 等^[5]的方法并略做修改, 分别称取 1 g 牛肉、猪肉、鸡肉、羊肉、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)、小管枪乌贼 (*Loligo oshimai*)、菲律宾蛤仔、栉孔扇贝、沟螺、口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)、美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*)、三疣梭子蟹、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和凡纳滨对虾的肌肉组织, 1 : 5 (*W/V*) 加入 5 mL 提取液 [0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.2, 含 0.2 mol/L KCl 和 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)], 使用高速组织分散机对上述肌肉组织高速分散 5~10 min, 使提取液和肌肉组织混合均匀, 振荡提取 10 min, 离心 (4 °C, 9 000 r/min, 10 min), 取上清液, 0.22 μm 滤膜过滤, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 使用层析稀释液将其稀释至 1 μg/mL, 取 100 μL 滴加在加样孔, 5 min 内读取结果。

精密度实验 使用批内和批间变异系数 (coefficient of variation, CV) 来反映胶体金免疫层析方法的精密度, 取同一批次检测卡, 在同一天内对 10、1 和 0.1 μg/mL 3 个浓度水平的天然 TM 溶液进行重复检测 (*n*=10), 取不同批次检测卡对 3 个浓度水平的天然 TM 溶液分别在第 1、2、3、4、5 天进行检测, 通过 T 线灰度值来计算批内、批间的变异系数。

稳定性验证实验 参考文献所述方法^[21-22], 对试纸条的稳定性进行验证, 取同一批次制备并组装好的试纸条, 于 37 °C 恒温烘箱保存, 在保存的第 0、1、3 和 7 天对 0.1、1 和 10 μg/mL 3 个浓度水平的天然 TM 溶液进行检测 (*n*=3), 分别与制备当天的试纸条进行比较, 通过计算 T 线灰度值的变化率表征试纸条的稳定性。

准确性验证实验 通过计算回收实验的加标回收率来分析方法的准确性^[19]。将终浓度分别为 0、0.1、1 和 10 μg/mL 的天然 TM 溶液加入到不含目标蛋白的空白食物基质样品中进行提取, 然后对提取液进行检测 (*n*=3)。分别称取 4 份粉碎后的挂面、薯片、馒头和牛肉香菇酱各 1 g, 其中 3 份分别加入终浓度为 0.1、1 和 10 μg/mL 的天然 TM 溶液, 1 份作为空白对照组, 室温下孵育 5~10 min, 加入终体积为 5 mL 的提取液, 振荡混合提取 15 min, 离心 (12 000 r/min, 10 min) 后取

上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 取 100 μL 滤液进行检测。

1.7 市售食物样品的检测

使用建立的方法对市售实际食物样品进行检测, 进一步评估方法的检测性能及实际应用性。于超市购买膨化食品、调味食品及酱料等食物样品, 根据包装标识的过敏原标签将样品分为 3 类: 含甲壳类过敏物质, 包装标识含甲壳类过敏物质; 可能含甲壳类过敏物质, 标签未标注含有甲壳类物质, 但标注了生产线也生产含甲壳类过敏物质的产品; 不含甲壳类过敏物质, 食物本身无肉眼可见甲壳类添加物、配料表及过敏原标签未提及甲壳类物质 (表 1)。

准确称取粉碎后的样品 (10.00±0.01) g 于 50 mL 离心管, 1 : 5 (*W/V*) 加入丙酮除去样品中的油脂和色素, 将沉淀物置于通风橱风干, 使用高速研磨仪将丙酮沉淀粉碎, 制备成为丙酮粉。取 0.5 g 丙酮粉, 1 : 15 (*W/V*) 加入 7.5 mL 蛋白提取液, 振荡提取 10 min, 离心 (4 °C, 9 000 r/min, 10 min) 取上清液, 0.22 μm 滤膜过滤除杂。取 100 μL 待测液, 滴加在检测卡上样区。等待 5 min 读取检测结果。

1.8 数据分析

使用 Adobe Photoshop CC 2019 软件读取检测卡 T 线灰度值, 使用 Image J 软件对 SDS-PAGE 中纯化抗体的蛋白条带进行灰度分析, 使用 Excel 2019 软件对实验数据进行统计分析, 所有数据以 3 次平行实验的平均值和标准偏差的形式显示, 使用 Origin 2018 软件进行数据作图分析。

2 结果

2.1 抗体纯化及特异性评估

基于 rProtein G 和 rProtein A 对抗体的高度亲和力和, 对大鼠、兔多克隆抗体血清进行纯化, IgG 抗体分子由重链 (H 链) 和轻链 (L 链) 组成, 其中重链约 50 ku, 轻链约 25 ku^[23]。泳道 1 和 2 分别为纯化的鼠抗和兔抗, 两株抗体均显示为 25 ku 的轻链和 50 ku 的重链, 说明对血清纯化后, 除去了血清中其他复杂成分, 通过 SDS-PAGE 蛋白电泳验证分析及 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析, 得出两株抗体的纯度均高于 95% (图 1)。

WB 实验验证两株纯化抗体的特异识别能力,

表 1 食物样品致敏原标识信息

Tab. 1 Allergen labels of food samples

编号 number	样品名称 sample names	配料表 ingredients	致敏原标签 allergen label
含甲壳类过敏物质 labeled crustaceans foods			
1	米多奇馍斗士	虾粉、小龙虾味香料	含小麦、大豆、虾及其制品
2	上好佳鲜虾条	虾 (5.5%)	含小麦和甲壳类 (虾)成分
3	比逗士大只虾	鲜虾 (40%)	含小麦粉、甲壳类及其制品
4	乐事鲜虾薯片	香精中含甲壳类、鱼	含小麦、大豆、牛奶、甲壳类和鱼
5	胚芽劲爆脆	小龙虾调味粉中含虾粉	含麸质谷制品、甲壳类及其制品、豆制品
6	可比克马铃薯片	小龙虾调味粉中含虾粉	含小麦、大豆和虾粉的产品
7	浓番海鲜味玉米角	添加虾粉	含乳制品、甲壳类、鱼类
8	刺猬阿甘烧烤味薯片	虾粉	含麸质的谷物及制品、甲壳类及其制品
9	亲亲虾条经典原味	虾7%以上	小麦、甲壳类 (虾)
10	豚骨拉面面包	虾粉、海鲜粉调味料	含虾、贝类制品、鱼类、花生, 可能含蟹类制品
11	虾片 (生)	添加虾粉	未标注
12	草原红太阳火锅蘸料	海鲜粉调味料	花生、大豆、甲壳类及其制品、鱼类及其制品
13	深海鲷虾酱	海虾	含海虾、鸡蛋成分
可能含甲壳类过敏物质 may contain traces of crustaceans			
14	鱼糜制品	不含	含有鱼类, 生产线也加工甲壳类制品
15	青瓜味薯片	不含	含小麦、大豆, 生产线也加工含虾粉的制品
16	浪味仙创意花式薯卷	不含	生产线也生产大豆、麸质谷物、甲壳类及其制品
17	旺旺小小酥	不含	加工线也生产鱼、甲壳类及其制品
18	好人家火锅蘸料	不含	生产线也加工鱼类及制品、甲壳类及其制品
不含甲壳类过敏物质 does not contain crustaceans			
19	高邦喜鲳鱼肠	不含	产品含大豆、鱼类
20	原味肉松	不含	未标注, 肉松使用猪肉制备

注: 表中所列配料及致敏原标签主要涉及甲壳类物种, 其他致敏原信息未全部列出; 表中14号样品鱼糜制品为“龙虾风味球”、“海参汁捞丸”、“鲍汁捞丸”三种可能含甲壳类物质食品的混合物; 表中数字5.5%和40%为配料表中添加虾粉的量
Notes: the ingredients and allergen labels listed in the table mainly involve crustacean species, and other allergen information is not all listed; sample no. 14 fish surimi products in the table is a mixture of "lobster flavor balls", "sea cucumber juice fish balls" and "abalone juice fish balls ", three kinds of food products that may contain crustaceans; the numbers 5.5% and 40% in the table are the amount of shrimp powder added to the ingredients

纯化的鼠抗与虾、蟹的 TM 有着较高的结合力, 和其他物种不结合 (图 2-b)。纯化的兔抗同样与虾、蟹的 TM 结合能力强, 但与蛤蜊、扇贝的 TM 结合能力微弱, 和其他物种不结合 (图 2-c)。兔抗与 TM 的结合能力略强于鼠抗, 鼠抗与杂蛋白结合能力强于兔抗 (图 2), 由于甲壳类 TM 氨基酸序列的高度相似性, 使得两株抗体均与虾、蟹的结合能力较强。

2.2 胶体金质量鉴定

视觉鉴定 高质量的胶体金溶液表层无油状漂浮物、底部无杂质沉淀、液体均匀澄清透亮, 灯光下无细小颗粒, 若液体浑浊会导致金颗粒大小不均匀, 则无法保证金标抗体的质量。实验制备的 40 nm 胶体金视觉观察溶液呈澄清透亮的紫红色 (酒红色), 溶液上层无漂浮物, 底部无黑色聚集物

(图 3-a), 与刘悦^[19]的研究结果一致, 视觉检验结果表明胶体金溶液具有良好的胶体稳定性及水溶性。

UV-Vis 鉴定 胶体金在 510~550 nm 的可见区范围内呈现单一吸收峰, 最大吸收波长随粒径的增加而加长, 颗粒大小的分布范围决定吸收峰的宽度, 颗粒越小, 金颗粒越接近球状。结果显示胶体金在 530 nm 处有最大吸收峰, 且峰宽较窄 (图 3-b), 与王耀^[20]的研究结果一致, 紫外-可见分光光度法结合视觉检验可以进一步鉴定金颗粒的质量。

TEM 和 Zetasizer Nano 粒度仪鉴定 结果显示, 经过 TEM 扫描和粒度仪测定, 金颗粒呈球形、粒径大小较为均一, 平均粒径分别为 41.6 nm 和 43.8 nm (图 3-c, d); 鉴定结果均说明实验制得的胶体金溶液颗粒分布较均匀, 粒径大小均一,

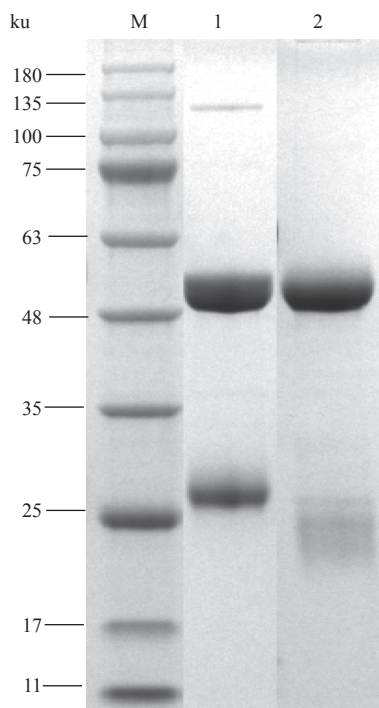


图1 纯化抗体电泳图谱

M.标准物质; 1.鼠多克隆抗体; 2.兔多克隆抗体

Fig. 1 SDS-PAGE results of purified polyclonal antibodies

M. marker; 1. rat polyclonal antibody; 2. rabbit polyclonal antibody

满足免疫层析检测方法的要求。

2.3 方法的灵敏度

随着天然 TM 溶液浓度的升高, T 线的显色强度及灰度值也随之升高 (图 4), 与阴性对照品相比, TM 浓度为 10 ng/mL 时, T 线显色强度和灰

度值明显降低且视觉辨识困难, 因此方法的视觉检出限确定为 10 ng/mL。方法的灵敏度与文献^[14-16]报道甲壳类海产品的检测方法相当, 均在 10~100 ng/mL 范围内。将本方法的 10 倍前处理提取比考虑在内, 则方法对样品的检测灵敏度为 100 μg/kg, 达到过敏原快速检测 1~100 mg/kg 通用阈值要求。

2.4 方法的特异性

凡纳滨对虾、中国明对虾、克氏原螯虾、美洲螯龙虾、三疣梭子蟹和中华绒螯蟹等甲壳类水产品的检测结果为阳性, 鸡肉、猪肉、牛肉和鱼肉等脊椎动物样品检测结果为阴性, 检测结果符合实际情况。在 19 种样本的检测中, 对于软体类水产品如蛤蜊、扇贝检测结果呈弱阳性 (图 5)。软体类水产品检测 T 线显色原因为虾、蟹等甲壳类物种和某些软体动物的 TM 之间有着高度的同源性, 经 TM 多序列同源性分析和文献查阅^[2], 可知甲壳类 TM 之间的同源性高达 86%~98%, 与软体动物 TM 同源性高达 63%~82%。其氨基酸序列和蛋白质结构也有着一定的相似性, 所制备的多克隆抗体可以识别这些表位相近的非靶标蛋白, 从而产生交叉反应^[24], 导致检测扇贝和蛤蜊样本时, 结果显示为弱阳性, 该结果与抗体特异性评估结果相吻合, 与甲壳类水产品的 TM 结合能力强, 与蛤蜊和扇贝 TM 有着微弱的结合。

2.5 方法的精密度及稳定性

通过检测卡的批内和批间 CV 来评估建立检测方法的重复性, 批间和批内 CV 值分别为 5.60%~

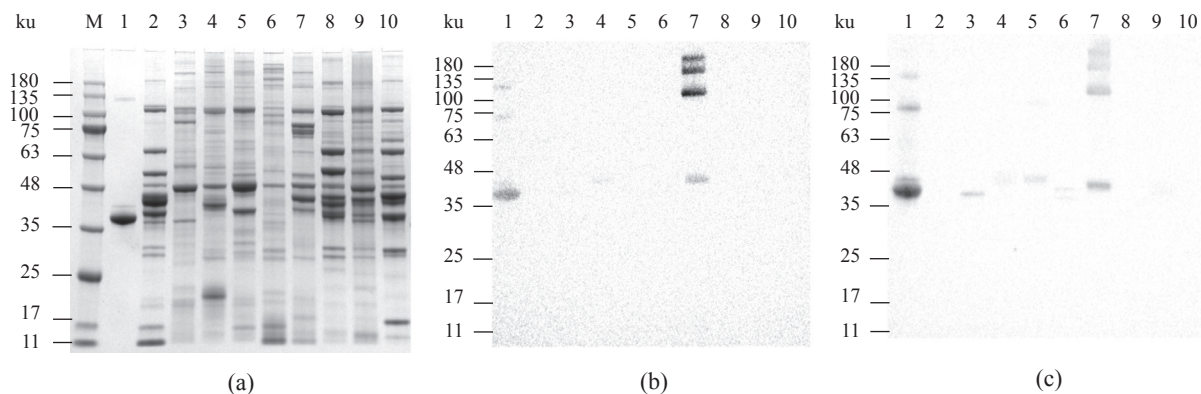


图2 免疫印迹评估纯化抗体特异性结果

(a) 蛋白电泳图谱; (b) 鼠抗免疫印迹图谱; (c) 兔抗免疫印迹图谱; M. marker, 1. TM, 2. 花鲈; 3. 菲律宾蛤仔; 4. 长牡蛎; 5. 栉孔扇贝; 6. 沟螺; 7. 三疣梭子蟹; 8. 鸡肉; 9. 牛肉; 10. 猪肉

Fig. 2 Assessing the specificity of purified antibodies by Western Blot (WB)

(a) SDS-PAGE results; (b) WB results of rat polyclonal antibody; (c) WB results of rabbit polyclonal antibody; M. marker, 1. TM; 2. *L. japonicas*; 3. *R. philippinarum*; 4. *C. gigas*; 5. *C. farreri*; 6. *B. canaliculatus*; 7. *P. trituberculatus*; 8. chicken; 9. beef; 10. pork

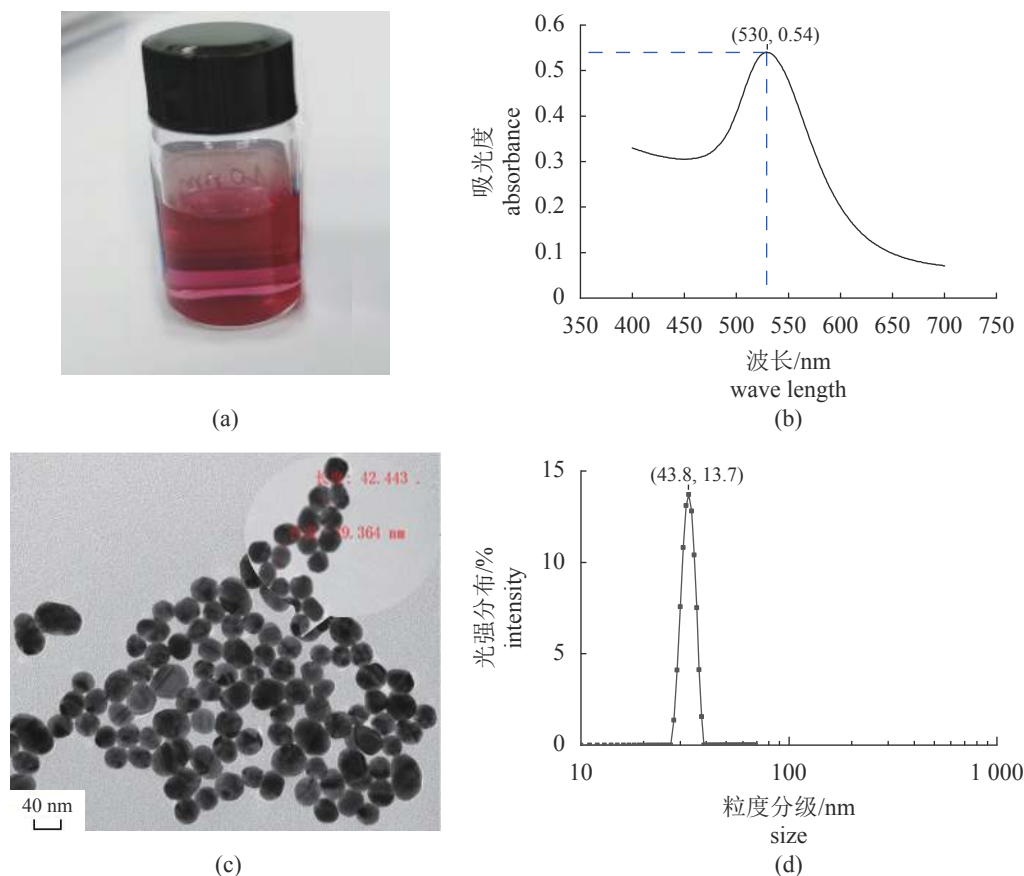


图3 金纳米颗粒的表征

(a) 视觉检验; (b) 紫外可见吸收光谱图; (c) 透射电子显微镜图像; (d) 粒度仪测定结果。图(c)中, 显微镜 JEM-1200EX, 加速电压 100 kV, 放大倍率 400 000×

Fig. 3 Characterization of gold nanoparticles

(a) visual identification; (b) UV-Vis absorption spectra; (c) TEM image; (d) result of Zetasizer Nano. In Fig. (c), microscope JEM-1200EX, accelerating voltage 100 kV, magnification 400 000×

15.18% 和 1.91%~7.21% (表 2), 批内差小于 20%, 批间差小于 30%, 和王耀^[20] 构建的大豆过敏原检测方法的 CV 值相似, 表明方法的稳定性较好。

结果显示在 37 °C 条件下、不同的保存时间内, T 线显色强度无明显差异, 其灰度值的变化率低于 30%, 该试纸条稳定性较好。37 °C 下保存 3 和 7 d, 可见 C 线显色变浅 (图 6-a), 推测由于 C 线包被的质控抗体稳定性不足, 高温加速后结合减弱, 导致 C 线显色强度下降。

2.6 方法的准确性

为进一步评估所建方法的准确性, 本研究选择了 4 种不含甲壳类水产品成分的食物作为空白基质, 进行加标试验, 判读结果与加标情况相符。挂面、馒头、薯片及牛肉香菇酱 4 种空白基质样品提取液检测结果均显示为阴性 (图 7)。在基质中添加天然 TM 溶液, 加标浓度由低到高, T 线显

色强度及灰度值也随之升高, 结果符合实际情况 (图 7)。目标蛋白在挂面中的回收率为 81.64%~97.87%、在馒头中的回收率为 85.67%~104.63%、在薯片中的回收率为 113.63%~126.66%、在牛肉香菇酱中的回收率为 82.64%~100.71% (表 3), 在 4 种食品基质中的 3 种不同加标浓度下的加标回收率为 81%~126%, 表明方法对于所选 4 种食物具有良好的准确性。

2.7 实际食物样品检测

食物过敏原标签标注含有甲壳类水产品过敏物质的 13 种样品中, 11 种均成功检出, 虾酱和火锅蘸料两种样品检测结果显示为阴性, 在 5 种可能含和 2 种不含甲壳类过敏原食物中无检出, 除虾酱和火锅蘸料样品外, 检测结果均与过敏原标识一致 (图 8)。结合以往的研究结果^[25-27] 分析本研究中虾酱和火锅蘸料未成功检测的可能原因:

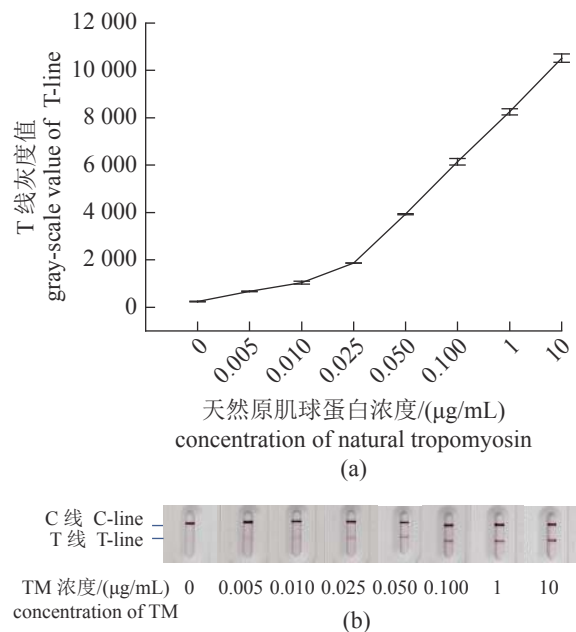


图 4 不同浓度 TM 的胶体金免疫层析检测结果

(a) T 线灰度值的变化趋势; (b) 视觉检测结果

Fig. 4 Detection results of TM standard solutions of different concentrations

(a) the changing trend of the gray value of T-line; (b) results of visual inspection

蘸料中添加的是海鲜粉调味料, 目标物本身含量极低, 低于方法的检出限; 添加的海鲜粉中不含虾、蟹相关肌肉组织, 而是一些其他贝类水产品;

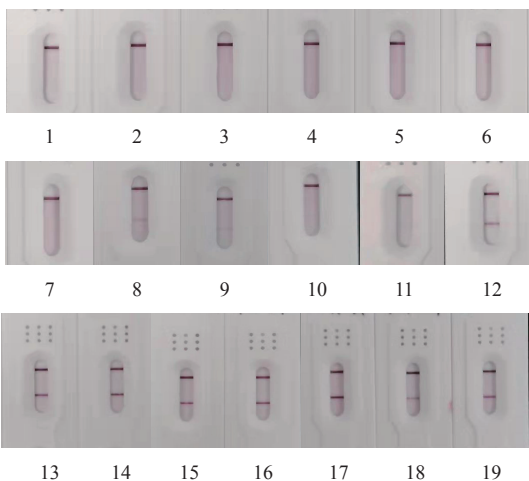


图 5 检测方法特异性验证结果

1.牛肉, 2.猪肉, 3.鸡肉, 4.羊肉, 5.小黄鱼, 6.大菱鲆, 7.大西洋鲑, 8.菲律宾蛤仔, 9.栉孔扇贝, 10.沟螺, 11.小管枪乌贼, 12.口虾蛄, 13.克氏原螯虾, 14.美洲螯龙虾, 15~16. 三疣梭子蟹, 17.中华绒螯蟹, 18.中国明对虾, 19.凡纳滨对虾

Fig. 5 Evaluation results of specificity of developed method

1. beef; 2. pork; 3. chicken; 4. mutton; 5. *L. polyactis*; 6. *S. maximus*; 7. *G. morhua*; 8. *R. philippinarum*; 9. *C. farreri*; 10. *B. canaliculatus*; 11. *L. oshimai*; 12. *O. oratoria*; 13. *P. clarkii*; 14. *H. americanus*; 15-16. *P. trituberculatus*; 17. *E. sinensis*; 18. *F. chinensis*; 19. *L. vannamei*

由于食物发酵等生物反应导致 TM 被降解, 构象表位甚至线性表位遭到破坏, 从而导致 TM 无法被检出, Park 等^[28]也发现发酵会降低虾过敏原的

表 2 检测方法精密度评估结果

TM浓度/(μg/mL) concentration of TM	批内变异系数 CV of intra-assay		批间变异系数 CV of inter-assay	
	平均T线灰度值 grayscale average of T-line	CV/%	平均T线灰度值 grayscale average of T-line	CV/%
0.1	3 075.60	3.19	2 955.28	15.18
1	6 279.54	7.27	6 343.73	12.64
10	12 738.04	1.91	12 539.60	5.60

表 3 检测方法准确性评估结果

TM浓度/(μg/mL) concentration of TM	加标回收率/% recovery rate of standard addition			
	挂面 noodles	馒头 steamed bread	牛肉香菇酱 beef mushroom sauce	黄爪薯片 potato chips
0	—	—	—	—
0.1	89.78	99.97	91.26	113.63
1	97.87	104.63	100.71	126.66
10	81.64	85.67	82.64	118.41

注: “—”表示为检测结果为阴性
Notes: means the test result id negative

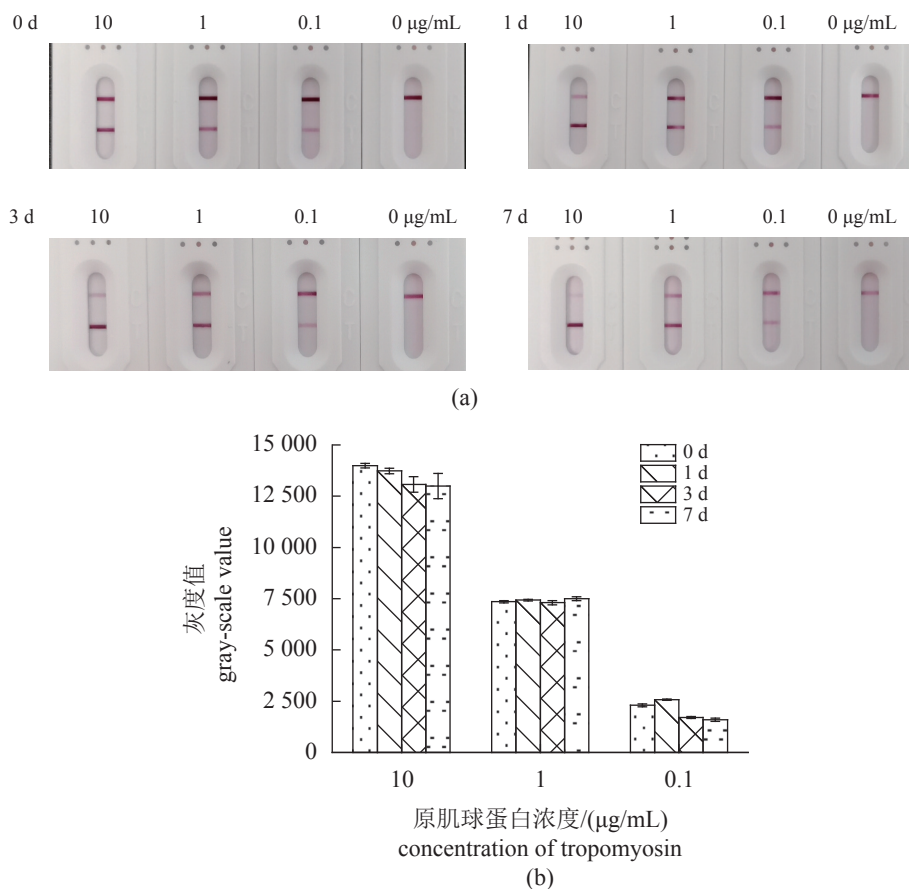


图 6 方法稳定性验证结果

(a) 试纸条 CT 线显色强度变化; (b) T 线灰度值变化幅度

Fig. 6 Evaluation results of the stability of the detection method

(a) color intensity change of C line and T line of test strip; (b) variation range of gray value of T-line

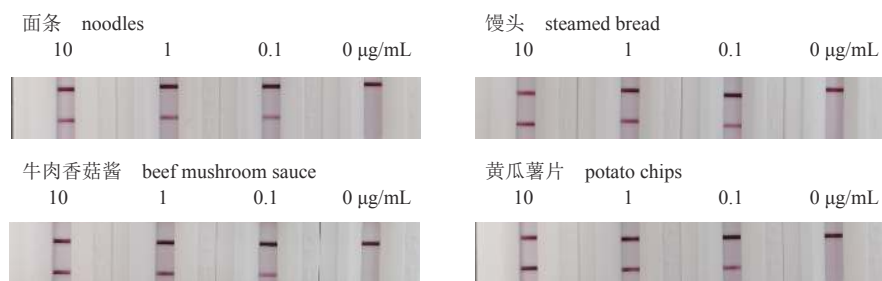


图 7 回收实验检测结果

Fig. 7 Results of recovery experiment

免疫反应性; 本实验所使用的前处理方法不适用于蘸料一类的样品, 导致无法剥离目标物与酱料中其他复杂成分, 所得提取液中不含目标蛋白。以上结果表明, 本研究建立的检测方法可用于部分食品的快速检测, 具有一定的实际应用价值。

3 讨论

近年来, 食物过敏发病率逐年升高, 严重影

响着消费者身体健康及生活水平, 且目前国内外对于食物过敏尚无有效的治疗措施, 只能通过避免摄入相关过敏原来预防食物过敏的发生, 对食物过敏原进行有效、快速、准确地检测具有重要的研究意义。因此, 本研究基于甲壳类水产品 TM 氨基酸序列高度保守性的特点, 采用 40 nm 胶体金对纯化的鼠抗进行标记, 纯化的兔抗作为捕获抗体, 建立了甲壳类水产品主要过敏原 TM

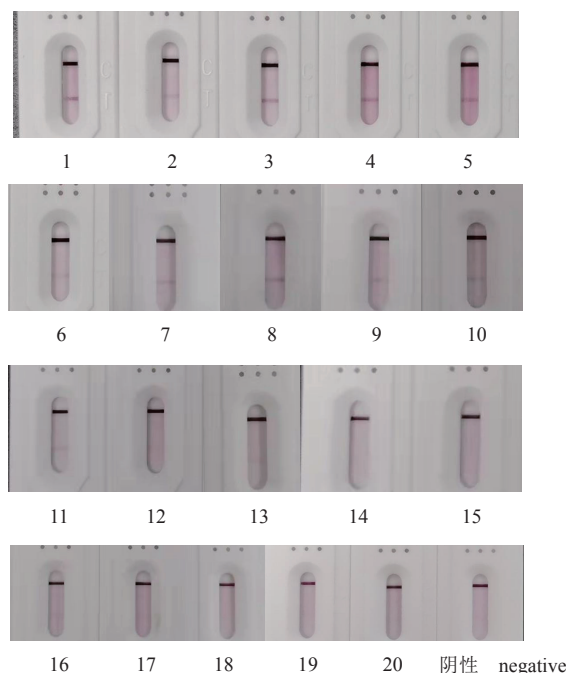


图 8 市售食物样品检测结果

图中编号样品对应表 1 中食物样品致敏原标识信息

Fig. 8 Results of testing commercial food samples

The numbered samples in the figure correspond to Tab. 1-allergen labels of food samples

的胶体金免疫层析快速检测方法, 从而实现甲壳类过敏原的快速检测。与黄素文等^[29]胶体金快速检测试纸条相比, 本研究可同时实现数十种不同经济型甲壳类水产品的检测, 不局限于单个虾或蟹物种, 黄文素等^[29]的研究中对克氏原螯虾、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)、虾蛄、鲫 (*Carassius auratus*)、带鱼 (*Trichiurus japonicus*)、猪肉和牛肉 7 种样品进行检测, 对克氏原螯虾过敏原灵敏度高, 未涉及其他甲壳类水产品过敏原的检测。本研究使用自制胶体金传统标记材料, 相较于 Wang 等^[30]使用量子点竞争性免疫层析法检测甲壳类 TM, 无需使用量子点材料及荧光仪器进行结果判读, 成本更加低廉, 检测结果肉眼可直接判定, 结果显示更加直观。Koizumi 等^[31]使用试纸条对甲壳类 TM 进行检测, 其视觉检出限为 25 $\mu\text{g/L}$, 检测时间为 20 min, 相比之下, 本方法的视觉检出限为 10 ng/mL , 免疫层析至结果判定仅需 5 min, 本方法的灵敏度及检测时间均较之更灵敏快速。此外本研究的前处理方法及检测时间较其他方法检测甲壳类过敏原更加便捷、快速, 如 Nagai 等^[15]使用液相色谱-串联质谱法对甲壳类过敏原进行检测时, 仅蛋白酶解步骤就需要

过夜处理, 耗时太长, 不利于过敏原的现场快速检测。Zagon 等^[32]使用实时荧光定量 PCR 对食物中甲壳类过敏原进行检测, 仅 DNA 提取步骤就较为繁琐, 所需时长为 1.5 h, 前期还需要引物设计等实验操作, 相比较之下, 胶体金免疫层析检测方法更有利于实验过敏原的现场快速检测。Zeng 等^[33]利用两株单克隆抗体, 构建免疫层析试纸条, 对虾 TM 的检出限低至 0.5 ng/mL , 检测结果 10 min 后判读, 单抗的特异性很高, 比较适用于单一物种过敏原的快速准确检测, 且单抗只识别抗原上的一个表位, 抗基质干扰能力较弱, 更易受化学处理造成的抗原表位的丢失。相比而言, 本研究使用两株纯度高于 95% 的多克隆抗体, 基于双抗体夹心法构建免疫层析试纸条, 多克隆抗体可识别多个表位, 可提供更有利的检测, 比单抗更能容许抗原中的微小变化, 抗基质干扰能力强, 对于甲壳类水产品及其加工产品中 TM 的通检, 多克隆抗体检测更加准确。另一方面有研究^[34]提及一些单克隆抗体可能识别过敏原蛋白在加热过程中发生变化的构象表位, 另外 TM 氨基酸序列相似度很高, 微小的序列差异可能会限制单克隆抗体检测的物种范围。

综上所述, 本研究建立的胶体金免疫层析检测方法操作简单、灵敏度高, 适用于肉制品、水产品样品中 TM 的检测, 可用于生产线进行甲壳类过敏原的快速筛查工作, 以防食物过敏原的交叉污染。对于含有甲壳类水产品的火锅蘸料、酱料等食物成分复杂、经多种不同加工程序处理的样品, 检测结果显示为阴性, 经方法学验证, 本研究方法在肉制品、水产品、膨化食品及糜状肉制品中有着较强的应用价值。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Lopata A L, O'Hehir R E, Lehrer S B. Shellfish allergy[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2010, 40(6): 850-858.
- [2] Ruethers T, Taki A C, Johnston E B, et al. Seafood allergy: a comprehensive review of fish and shellfish allergens[J]. *Molecular Immunology*, 2018, 100: 28-57.
- [3] Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, et al. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tro-

- pomyosins[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2002, 129(1): 38-48.
- [4] Kamath S D, Rahman A M A, Voskamp A, *et al.* Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: a comprehensive allergenomic approach[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(5): 1144-1155.
- [5] Kamath S D, Rahman A M A, Komoda T, *et al.* Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(4): 4031-4039.
- [6] Faber M A, Pascal M, El Kharbouchi O, *et al.* Shellfish allergens: tropomyosin and beyond[J]. *Allergy*, 2017, 72(6): 842-848.
- [7] Lin S Y, Lee C H, Huang E S, *et al.* Quantification of crustacean tropomyosin, a major food allergen, in eight species of Taiwanese shrimp based on immunoassay[J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(9): 2607-2613.
- [8] Dunlop J H, Keet C A. Epidemiology of food allergy[J]. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2018, 38(1): 13-25.
- [9] Pedrosa M, Boyano-Martinez T, García-Ara C, *et al.* Shellfish allergy: a comprehensive review[J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2015, 49(2): 203-216.
- [10] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(1): 41-58.
- [11] Loh W, Tang M L K. The epidemiology of food allergy in the global context[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(9): 2043.
- [12] Gendel S M. Comparison of international food allergen labeling regulations[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2012, 63(2): 279-285.
- [13] 中华人民共和国卫生部. GB 7718—2011 食品安全国家标准,预包装食品标签通则 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 7718-2011 National food safety standard, general standard for the labeling of prepackaged foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2011 (in Chinese).
- [14] Eischeid A C, Stadig S R. A group-specific, quantitative real-time PCR assay for detection of crab, a crustacean shellfish allergen, in complex food matrices[J]. *Food Chemistry*, 2018, 244: 224-231.
- [15] Nagai H, Minatani T, Goto K. Development of a method for crustacean allergens using liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Journal of AOAC International*, 2015, 98(5): 1355-1365.
- [16] Schubert-Ullrich P, Rudolf J, Ansari P, *et al.* Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(1): 69-81.
- [17] Mahmood T, Yang P C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting[J]. *North American Journal of Medical Sciences*, 2012, 4(9): 429.
- [18] Turkevich J, Stevenson P C, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold[J]. *Discussions of the Faraday Society*, 1951, 11: 55-75.
- [19] 刘悦. 食物过敏原胶体金免疫层析检测试纸条的研制 [D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
- Liu Y. Development of colloidal gold-based immunochromatographic strips for the detection of food allergen[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015 (in Chinese).
- [20] 王耀. 大豆致敏蛋白 glycinin 和 β -conglycinin 免疫学快速检测技术研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- Wang Y. Studies on immunological rapid determination of soybean allergenic proteins glycinin and β -conglycinin[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015 (in Chinese).
- [21] Omidfar K, Kia S, Larijani B. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic test strip for screening of microalbuminuria[J]. *Hybridoma*, 2011, 30(2): 117-124.
- [22] 李梦银. 鱼类主要过敏原小清蛋白金磁免疫层析试纸条的研制 [D]. 上海: 上海师范大学, 2019.
- Li M Y. Development of a gold-magnetic immunochromatographic test strip for the main allergen of fish[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2019 (in Chinese).
- [23] Verdoliva A, Pannone F, Rossi M, *et al.* Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and

- protein G[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 271(1-2): 77-88.
- [24] Reese G, Ayuso R, Lehrer S B. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1999, 119(4): 247-258.
- [25] Frias J, Song Y S, Martínez-Villaluenga C, *et al.* Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(1): 99-105.
- [26] Ivens K O, Baumert J L, Hutkins R L, *et al.* The effect of different methods of fermentation on the detection of milk protein residues in retail cheese by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. *Journal of Food Science*, 2017, 82(11): 2752-2758.
- [27] Yu Z W, Wang Y Q, Li Z X, *et al.* Development of ELISA method for detecting crustacean major allergen tropomyosin in processed food samples[J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(12): 2719-2729.
- [28] Park J G, Saeki H, Nakamura A, *et al.* Allergenicity changes in raw shrimp (*Acetes japonicus*) and *Saeujeot* (salted and fermented shrimp) in cabbage *Kimchi* due to fermentation conditions[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2007, 16(6): 1011-1017.
- [29] 黄素文, 王建峰, 朱海, 等. 淡水小龙虾过敏原胶体金快速检测试纸条的研制[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(10): 1414-1417.
- Huang S W, Wang J F, Zhu H, *et al.* Development of colloidal gold strip for rapid detection of the allergen in freshwater crayfish[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2014, 24(10): 1414-1417 (in Chinese).
- [30] Wang Y Q, Li Z X, Lin H, *et al.* Quantum-dot-based lateral flow immunoassay for the rapid detection of crustacean major allergen tropomyosin[J]. *Food Control*, 2019, 106: 106714.
- [31] Koizumi D, Shiota K, Akita R, *et al.* Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods[J]. *Food Chemistry*, 2014, 150: 348-352.
- [32] Zagon J, Schmidt J, Schmidt A S, *et al.* A novel screening approach based on six real-time PCR systems for the detection of crustacean species in food[J]. *Food Control*, 2017, 79: 27-34.
- [33] Zeng L, Song S S, Zheng Q K, *et al.* Development of a sandwich ELISA and immunochromatographic strip for the detection of shrimp tropomyosin[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2019, 30(1): 606-619.
- [34] Fuller H R, Goodwin P R, Morris G E. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin, in food[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2006, 17(1): 43-52.

Establishment and application of colloidal gold immunochromatographic method for rapid detection of major allergen tropomyosin in crustacean aquatic products

GAO Hongyan¹, ZHAO Jinlong¹, WANG Yaqing^{1,2}, JIANG Qiuyan³,
HUANG Yuhao¹, LIN Hong¹, LI Zhenxing^{1*}

(1. Ocean University of China, College of Food Science and Engineering, Qingdao 266003, China;

2. Qingdao Marine Food Nutrition and Health Innovation Research Institute, Qingdao 266109, China;

3. Shandong Institute of Commerce and Technology, Jinan 250103, China)

Abstract: Currently, food allergy has become a food safety issue of global concern, and there is no effective cure at home and abroad. Avoiding the intake of allergens is the best solution to prevent food allergies; therefore, the construction of a rapid and sensitive allergen detection system is of great research significance to ensure the safety of consumers. A colloidal gold immunochromatographic method was established with tropomyosin (TM) of *Litopenaeus vannamei* as the detection target for the rapid detection of major allergens TM in crustacean aquatic products. SD rats and New Zealand rabbits were immunized with natural TM to prepare polyclonal antibodies. Then, the immunochromatographic test strips were assembled based on the double antibody sandwich principle using 40 nm colloidal gold labeled rat anti-TM IgG as detection antibodies and rabbit anti-TM IgG as capture antibodies for the detection of commercial food samples. The test strip can display the results within 5 min with a 10 ng/mL visual detection limit. The developed immunochromatographic test strips showed high specificity to crustacean, such as shrimp, crab, *Procambarus clarkii* and *Homarus americanus*, although there is a weak cross reaction with clams and scallops. The recoveries of standard addition in commercial food products without crustaceans were 81%-126%, indicating the method's high accuracy. The intra-and inter-batch coefficient of variation of the test strip was less than 15%. Additionally, the test results of the actual food samples were consistent with the food allergen label. The results show that the developed method possesses sufficient sensitivity and specificity. Therefore, it can effectively detect crustacean residues in a variety of matrices and commercial food samples and has strong practical application value.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; crustacean; tropomyosin; colloidal gold immunochromatography; allergen detection

Corresponding author: LI Zhenxing. E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32072338)