

实验技术与方法

双抗夹心酶联免疫吸附法检测 β -伴大豆球蛋白和大豆球蛋白肖昊坤^{1,2}, 汪洋翰¹, 张浩³, 付永康¹, 王倩男⁴, 车会莲^{1,2}

(1. 四川成都中农大现代农业产业研究院, 四川 成都 611430; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 3. 河南轻工职业学院, 河南 郑州 450011; 4. 华测检测认证集团北京有限公司, 北京 101111)

摘要:目的 以大豆中主要过敏原 β -伴大豆球蛋白(β -Conglycinin)和大豆球蛋白(glycinin)为目标, 分别建立双抗体夹心酶联免疫吸附(sELISA)法。方法 使用单因素试验优化从脱脂大豆蛋白粉中分离富集 β -Conglycinin和glycinin的方法, 确定沉淀剂 CaCl_2 和 NaHSO_3 的添加量, 分离时间和转速提高对分离效果的影响; 使用棋盘法确定捕获抗体和检测抗体的最佳工作浓度, 确定各步骤反应时间, 确定目标蛋白稀释溶剂, 建立ELISA检测方法并对其性能进行评价。结果 在离心分离 β -Conglycinin和glycinin前添加10 mmol/L沉淀剂 CaCl_2 和0.01 mmol/L还原剂 NaHSO_3 , 沉淀过夜并将离心转速提高至10 000 r/min, 使 β -Conglycinin和glycinin的提取率分别达到41.81%和54.06%, 且蛋白条带分离清晰; β -Conglycinin双抗sELISA以0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3A9 mAb作为捕获抗体, 以1:4 000稀释2E2mAb-HRP作为检测抗体, 抗原和检测抗体各孵育90 min, 显色15 min, 采用四参数拟合和线性拟合绘制标准曲线。该方法的检出限(LOD)为1.36 ng/mL, 标准曲线在5~1 215 ng/mL的浓度下线性良好, 在实际样品加标回收试验中回收率在96%~108%。批次内和批次间变异系数均<15%; glycinin的双抗sELISA以0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的7D3 mAb作为捕获抗体, 以1:1 000稀释4G4mAb-HRP作为检测抗体, 抗原和检测抗体各孵育120 min, 显色15 min, 采用线性拟合绘制标准曲线。该方法的LOD为28.75 ng/mL, 标准曲线在31.25~8 000 ng/mL的浓度下线性良好, 在实际样品加标回收试验中回收率在90.3%~107.2%。批次内和批次间变异系数均<15%, 且两种检测方法均与其他过敏原无交叉反应, 特异性良好。结论 建立的两种双抗sELISA方法灵敏、快速、准确、稳定性好, 可用于食品中 β -Conglycinin和glycinin的检测。

关键词:大豆; 过敏; β -伴大豆球蛋白; 大豆球蛋白; 分离富集; 双抗体夹心酶联免疫吸附法

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2025)04-0316-11

DOI: 10.13590/j.cjfh.2025.04.003

Development of sandwich ELISA for detection of soybean allergens β -Conglycinin and glycininXIAO Haoran^{1,2}, WANG Yanghan¹, ZHANG Hao³, FU Yongkang¹, WANG Qiannan⁴, CHE Huilian^{1,2}

(1. China Agricultural University-Sichuan Advanced Agricultural & Industrial Institute, Sichuan Chengdu 611430, China; 2. College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 3. He'nan Light Industry Vocational College, He'nan Zhengzhou 450011, China; 4. CTI Certification Group Beijing Co. Ltd, Beijing 101111, China)

Abstract: Objective In this study, we established sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sELISA) methods to detect major soybean allergens β -Conglycinin and glycinin. **Methods** A single-factor experiment was conducted to optimize the method for isolating and enriching β -Conglycinin and glycinin from defatted soy protein powder, determining the addition amounts of the precipitants CaCl_2 and NaHSO_3 , and the effect of the separation time and speed on the separation. The checkerboard method was used to determine the optimal working concentrations of the capture and detection antibodies, the reaction time for each step, and the dilution solvent for the target protein. An ELISA detection method was established and its performance was evaluated. **Results** Before centrifugal separation of β -Conglycinin and glycinin, 10 mmol/L CaCl_2 and 0.01 mmol/L NaHSO_3 were added as precipitants and reducing agents, respectively. The precipitation was left overnight and the centrifugation speed was increased to 10 000 r/min, resulting in extraction rates of

收稿日期: 2024-01-09

基金项目: 四川成都中农大现代农业产业研究院建设省市农业补助专项

作者简介: 肖昊坤 男 研究生 研究方向为食品安全 E-mail: XHR20010415@126.com

通信作者: 车会莲 女 教授 研究方向为食物过敏、免疫学 E-mail: chehuilian@cau.edu.cn

41.81% and 54.06% for β -Conglycinin and glycinin, respectively, with clear protein bands. For the sELISA of β -Conglycinin, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 3A9 mAb was used as the capture antibody, and 2E2mAb-HRP was diluted 1:4000 as the detection antibody. The antigen and detection antibody were incubated for 90 min each, and the color development was for 15 min. A four-parameter fit and linear fit were used to draw the standard curve. The LOD of this method was 1.36 ng/mL, and the standard curve shows good linearity in the concentration range of 5-1 215 ng/mL. In the actual sample spiked recovery experiment, the recovery rate was between 96% and 108%, and the intra-batch and inter-batch coefficient of variation were both less than 15%. For the sELISA of glycinin, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 7D3 mAb was used as the capture antibody, and 4G4mAb-HRP was diluted 1:1 000 as the detection antibody. The antigen and detection antibody were incubated for 120 min each, and the color development was for 15 min. A linear fit was used to draw the standard curve. The LOD of this method was 28.75 ng/mL, and the standard curve shows good linearity in the concentration range of 31.25-8 000 ng/mL. In the actual sample spiked recovery experiment, the recovery rate was between 90.3% and 107.2%, and the intra-batch and inter-batch coefficient of variation were both less than 15%, both two detection methods had no cross-reaction with other allergens, and the specificity was good. **Conclusion** The sELISA methods established are sensitive, rapid, accurate, and stable, and can be used for the detection of β -Conglycinin and glycinin in food.

Key words: Soybean; allergy; β -conglycinin; glycinin; separation enrichment; sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

大豆数千年来一直作为人类的食物,是我国重要的粮食和油料兼用作物之一^[1]。大豆中含有高质量的蛋白质、多不饱和脂肪酸、碳水化合物和膳食纤维,还有功能化学物质磷脂、甾醇、维生素 E、皂苷等^[2]。但同时,大豆也是粮农组织与世界卫生组织(FAO/WHO)认定的导致人类食物过敏的八大类食物之一^[3]。

大豆过敏的患病率在约为 0.3%~0.4%,幼儿更易受到影响。大豆过敏患者症状包括嘴唇或面部肿胀、皮肤红肿、抽搐、呕吐、腹痛与腹泻,严重时可能会导致过敏性休克,甚至死亡^[4]。据相关研究报告,大豆中存在 16 种及以上的过敏原可以与大豆过敏患者血清的 IgE 结合^[5],根据致敏蛋白的组分含量及其致敏能力的差异, β -伴大豆球蛋白(β -Conglycinin)和大豆球蛋白(Glycinin)是其中主要的两种过敏原^[4],其中 β -伴大豆球蛋白约占大豆总球蛋白含量的 30%^[6],分子质量约为 180 kDa,由 α' (72 kDa)、 α (68 kDa)和 β (48 kDa)3 种亚基组成三聚体复合物^[7];大豆球蛋白约占大豆总蛋白含量的 19.5%~23.1%,由氢键连接的 5 个主要亚基对组成,其酸性组分 A1~A4 的分子质量约为 33 kDa,碱性组分 A5 的分子质量约为 20 kDa。目前,预防食物过敏唯一有效的方法是避免食用这些食物,大豆及其产品被广泛应用于食品工业,同时由于加工工艺的影响,在食品中往往肉眼不可见^[9],因此食品中的大豆成分残留难以发现并排除。大豆过敏影响儿童和成年人,严重危害身体健康和食品安全。因此,建立针对大豆过敏原的方便、快捷、灵敏、特异的检测方法,对于保护大豆过敏患者的消费安全和身体健康有重要的现实意义,同时也为市场中食品包装的过敏原标签的规范提供帮助。

目前的大豆过敏原检测方法主要有聚合酶链式反应法、质谱法^[9]、免疫学检测法^[9,11]。其中酶联免疫法在过敏原定量分析中的应用最为广泛,同时成本低、耗时短、准确度高、灵敏度高、易操作、技术成熟^[12],适于产业化生产。目前有研究建立了 ELISA 检测 β -Conglycinin 和 glycinin,但定量检测范围较小^[11],或使用多克隆抗体作为检测抗体^[9],可能导致非特异性结合。从大豆中高效地分离纯化出两种过敏原对于建立的两种 ELISA 方法定量检测具有重要的应用意义。目前大豆中 β -Conglycinin 和 glycinin 的分离富集方法主要使用等电点沉淀、低温沉淀、分级盐析、超速离心等方法^[13-15]。本研究参考王昱婷的方法^[15],对其中的关键提取步骤进行优化,包括添加不同量沉淀剂 CaCl_2 ^[13],添加不同量还原剂 NaHSO_3 ^[6],延长低温沉淀时间和超速离心的转速。通过对蛋白提取率和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白条带清晰度的影响进行优化,选择合适的分离富集条件。本研究分别建立了 β -Conglycinin 和 glycinin 的双抗夹心 ELISA 检测方法,并对其性能进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

M μ Liskan FC 型酶标仪(Thermo Scientific 美国),恒温恒湿培养箱,不同量程单/十二通道移液枪,FA1004 电子天平,664R 低温离心机,S-6 磁力搅拌器。

脱脂大豆蛋白粉(河南鲲华生物技术有限公司),大豆 11S-4G4、11S-7D3、7S-3A9、7S-2E2 鼠源单克隆抗体(无锡迪腾敏生物科技有限公司),牛血清

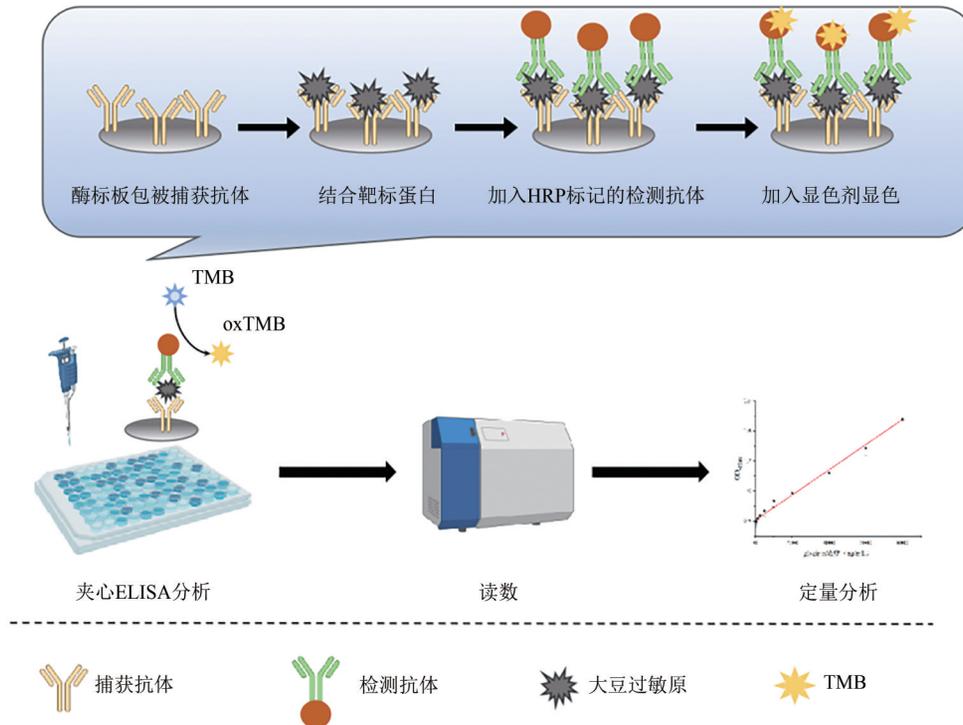


图1 双抗夹心ELISA检测大豆过敏原 β -Conglycinin和glycinin示意图

Figure 1 Schematic diagram of sandwich ELISA for detection of soybean aLLergens β -Conglycinin and glycinin

白蛋白(北京 SoLarbio 公司);PBS(pH=7.4)缓冲液(武汉 Servicebio 公司);TMB 显色液(上海碧云天有限公司);BCA 蛋白质定量试剂盒(北京百瑞极生物科技有限公司);电泳凝胶试剂盒(达科为生物技术有限公司);HRP 标记试剂盒(博奥龙生物科技有限公司);碳酸钠(西陇科学股份有限公司);碳酸氢钠(北京化学工业集团有限公司);氯化钙(北京沃凯生物科技有限公司);碳酸氢铵、乳清蛋白、鸡蛋清白蛋白(上海源叶生物科技有限公司); β -乳球蛋白(上海麦克林生化科技股份有限公司);脱脂牛奶(内蒙古蒙牛乳业集团股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制

包被液(1% CBS 溶液):取无水 Na_2CO_3 1.06 g, NaHCO_3 0.84 g,用 160 mL 超纯水溶解,调节 pH 至 9.6 后,定容至 200 mL,室温保存;封闭液:含有 1% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液;洗涤液(PBST):0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 溶液中含有 0.5 mL/L 的洗涤剂 Tween-20,室温保存;抗体稀释液:含有 0.1% 牛血清白蛋白的 10% PBS 溶液;终止液(2 mol/L H_2SO_4):浓硫酸(18 mol/L)约 56 mL,缓慢加入超纯水中,然后定容至 500 mL。

1.2.2 β -Conglycinin 和 glycinin 提取方法及优化

参考蒋栋磊等^[15]和司晓霞等^[7]的提取方法,并对提取中沉淀剂 CaCl_2 和 NaHSO_3 的添加量、分离时间和转速对分离效果的影响进行优化。优化后的

提取方法如图 2。

1.2.3 β -Conglycinin 和 glycinin 的提取率鉴定

使用 BCA 试剂盒中提供的标准品,配置梯度浓度(0、31.25、62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的蛋白标准品。在 96 孔板中依次加入工作液、标准品或样品后,混匀,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。孵育结束后,利用酶标仪测定 $\text{OD}_{562\text{nm}}$ 。蛋白提取率公式为:蛋白提取率=提取样品冻干粉中蛋白质量/脱脂大豆蛋白冻干后的蛋白含量。

1.2.4 β -Conglycinin 和 glycinin 的 SDS-PAGE 鉴定

配置 10% 分离胶与 5% 浓缩胶,稀释目标蛋白至 2 mg/mL,与蛋白上样缓冲液(DTT)1:3 稀释至 10 μL ,沸水浴 5 min。上样 10 μL 样品或 5 μL Marker。待电泳结束后用含有 0.1% (W/V) CBBR-250、50% (V/V) 甲醇、10% (V/V) 乙酸的溶液染色,用含有 25% 甲醇和 10% 乙酸的溶液脱色,置于成像仪中曝光成像。

1.2.5 HRP 标记单克隆抗体制备检测抗体及验证

取待标记抗体 1 mg(2 mg/mL),加入预活化 HRP(100 μL , 1 mg)移液器反复吹打,加入 HRP 标记启动液 108 μL ,继续混匀。避光 30~37 $^\circ\text{C}$ 反应 2~3 h,取 50 μL 终止液加入反应液中混匀,4 $^\circ\text{C}$ 反应 2 h,加入等体积的标记物保存液,充分混匀,置于-20 $^\circ\text{C}$ 保存。

分别包被提取出的 β -Conglycinin 和 glycinin 进行直接 ELISA 检测,标记抗体稀释 1:1 000,抗原包

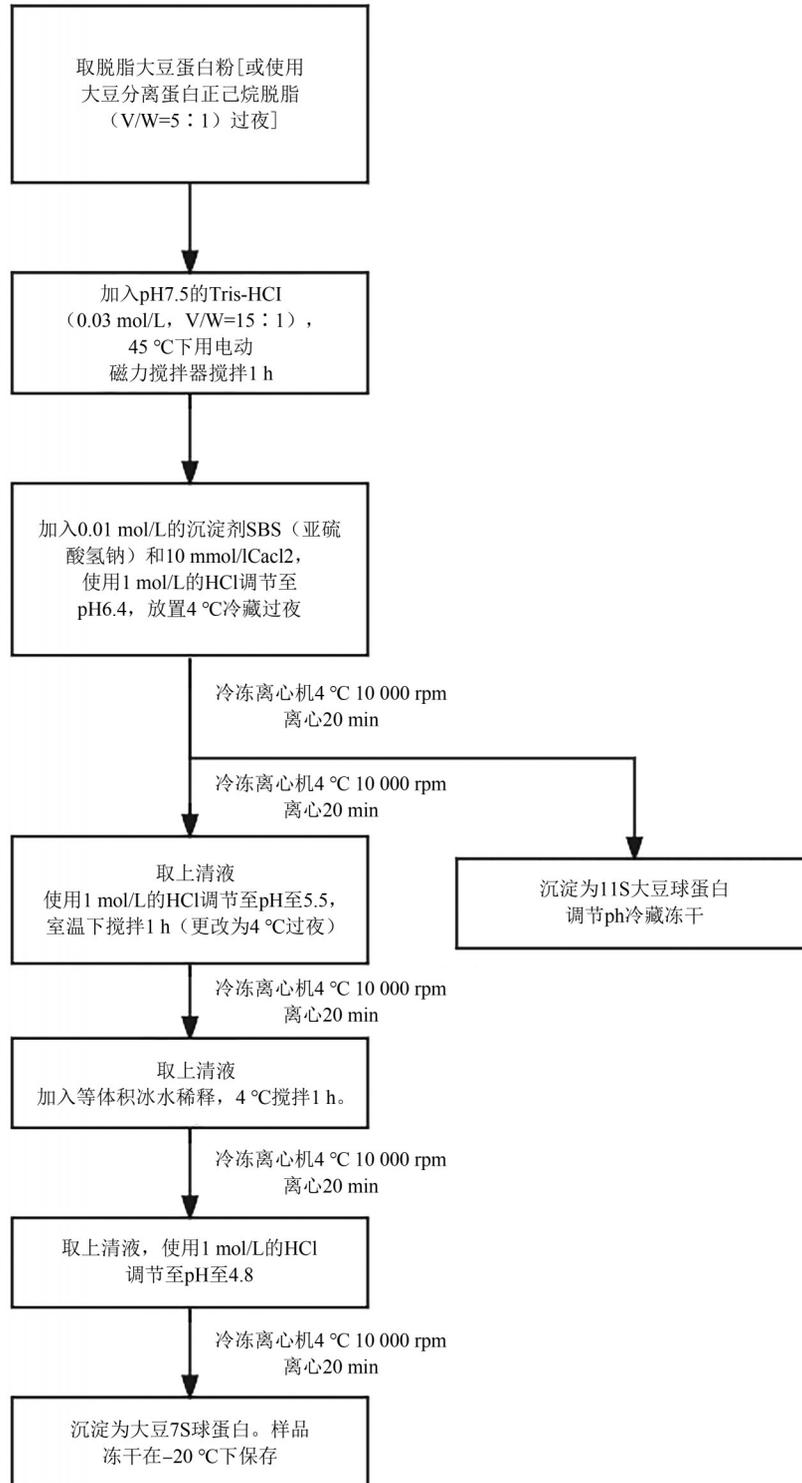


图2 β -Conglycinin 和 glycinin 的分离富集流程图

Figure 2 Flow chart of separation and enrichment of β -Conglycinin and glycinin

被浓度为 1、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 OD 值为阳性 (>0.2), 且阳性孔/阴性孔 (P/N) 值 >3 , 证明偶联成功。

1.2.6 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

按照 1.2.1 配制溶液, 使用包被液稀释捕获抗体, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 16 h, 弃去板中液体, 洗涤液洗板 3 次, 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 拍干; 加入封闭液, 150 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1.5 h, 弃去板中液体, 洗板 3 次; 加入抗体稀释液稀释的蛋白样品, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,

37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1.5~2 h 后, 弃去板中液体, 洗板 3 次; 加入酶标抗体, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1~1.5 h 后, 弃去板中液体, 洗板 6 次; 加入底物 TMB, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15~20 min 后, 加入终止液, 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 10 min 内测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 。

1.2.7 ELISA 方法优化

捕获抗体包被浓度及检测抗体工作浓度的确定: 稀释合适浓度目标蛋白, 设置捕获抗体浓度 4、

2、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$,纵向加入 96 孔板中,检测抗体(HRP 标记)的稀释倍数为 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000。横向加入 96 孔板中。计算 P/N 值(其中 P 为阳性样品值,N 为阴性对照值)选择最终工作浓度;ELISA 反应时间优化:检测室温下不同孵育反应时间的 P/N 值;ELISA 溶剂体系:不同溶剂(水、水-60% 乙醇、PBS)稀释目标蛋白,分别检测不同溶剂稀释蛋白的 P/N 值。

1.2.8 双抗夹心 ELISA 工作曲线绘制

将起始浓度为 32 805 ng/mL 的 β -Conglycinin 三倍梯度稀释为 10 个浓度;将起始浓度为 8 000 ng/mL 的 glycinin 二倍梯度稀释为 10 个浓度,基于 1.2.7 确定的条件,按 1.2.6 步骤操作测定不同浓度目标蛋白的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 。

取不含所检致敏蛋白的空白样品,进行 10 次重复实验,求出其吸光度均值(X)和标准偏差(SD),计算 $X-3SD$,带入线性回归方程,计算出的对应浓度即为检测限(公式 1)。

$$\text{LOD} = X - 3SD \quad (\text{公式 1})$$

式中:LOD:检测限(ng/mL);X:空白样品测得的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值的平均值;SD:测定 10 次的空白值的标准偏差。

1.2.9 添加回收率与精密度

在脱脂乳中加入 0.01 mol/L NaHSO_3 (V/W=15:1)搅拌溶解,调节溶液 pH 至 9.0,45 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 1 h,随后 10 000 r/min 室温离心 30 min,所得上清液按本试验方法进行检测。

将两种致敏蛋白分别以 0.1、0.5、1.5 mg/kg 的量添加至乳样品中,批内差异为在同一批试验内,每个添加浓度的样品重复检测 6 次;批间差异为在不同时间分别进行三次检测。批间和批内差异均使用公式 2 计算平均回收率和批内及批间变异系数 CV 来评价试剂盒的准确度和精密度。

$$P = \frac{X - X_0}{A} \times 100\% \quad (\text{公式 2})$$

式中:P:回收率(%);X:加标样品测得的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值的平均值; X_0 :空白样品测得的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值的平均值;A:样品加标量(ng/mL)。

1.2.10 方法特异性

使用大豆中及其他食物中常见致敏蛋白作为主要研究对象,将 5 种交叉反应物蛋白及阳性对照蛋白: β -乳球蛋白、OVA、乳清蛋白、牛血清白蛋白(BSA)和 β -Conglycinin 或 glycinin 稀释至 10、100、1 000 ng/mL ,用建立的两种双抗夹心 ELISA 方法检测其 $\text{OD}_{450\text{nm}}$,每个梯度重复检测 3 次,使用 PBS 和水作为阴性对照,计算 P/N 值;若 $P/N < 2.1$,则说明与这几种致敏蛋白无交叉,检测方法的特异性良好。

1.3 数据分析

所有试验均独立平行重复至少 3 次。采用 Microsoft Excel 软件进行数据统计,使用 Origin 软件处理数据并绘制图表。所有数据为 3 次重复的平均值 \pm 标准差。

2 结果

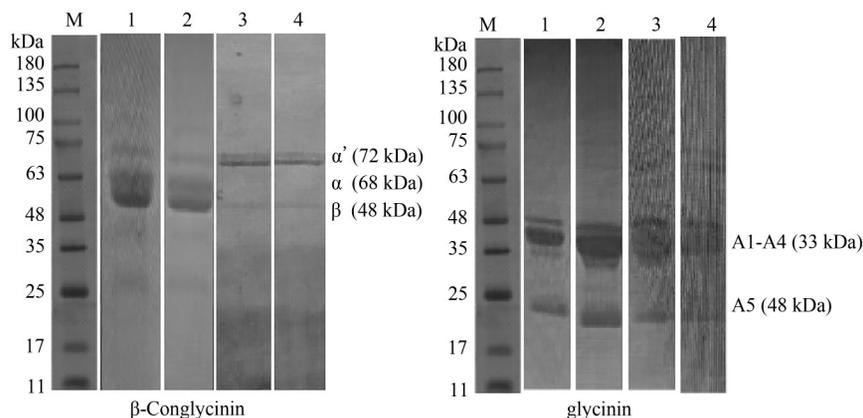
2.1 β -Conglycinin 和 glycinin 提取方法及优化

2.1.1 不同沉淀剂对钙盐沉淀法大豆蛋白提取的影响

比较加入 0~30 mmol/L 的 CaCl_2 对 SDS-PAGE 条带和 BCA 测定的 β -Conglycinin 和 glycinin 的蛋白提取率的影响,如图 3 所示,当 CaCl_2 添加量为 10 mmol/L 时,两种蛋白条带最清晰。由表 1 可以看出,当 CaCl_2 添加量为 10 mmol/L 时,两种蛋白提取率最高。

2.1.2 NaHSO_3 解聚大豆蛋白提高提取率

比较不同 NaHSO_3 添加量(0.01、0.02、0.03 mmol/L)



注:M:分子量标准;1~4 分别对应 CaCl_2 添加量 0、10、20、30 mmol/L 所得的 β -Conglycinin 和 glycinin 提取物

图3 不同 CaCl_2 提取大豆蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Figure 3 SDS-PAGE profiles of soybean proteins extracted with different CaCl_2

表1 不同 CaCl_2 提取大豆蛋白的提取率

Table 1 Extraction yield of soybean protein with different

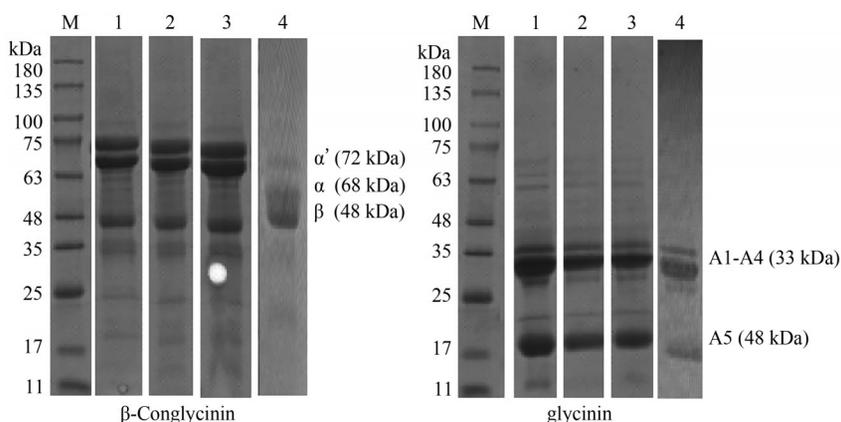
CaCl ₂ 添加量/(mmol/L)	大豆蛋白提取率/%	
	β -Conglycinin	glycinin
0	38.43	25.11
10	33.52	45.28
20	17.14	32.12
30	16.68	28.61

对 SDS-PAGE 条带与 BCA 测定的 β -Conglycinin 和 glycinin 蛋白提取率的影响,如图 4 所示,添加 NaHSO_3 使两种蛋白条带清晰。由表 2 所示,添加 0.01 mmol/L 的 NaHSO_3 两种蛋白提取率最高。

表2 不同 NaHSO_3 提取大豆蛋白的提取率

Table 2 Extraction yield of soybean protein with different NaHSO_3

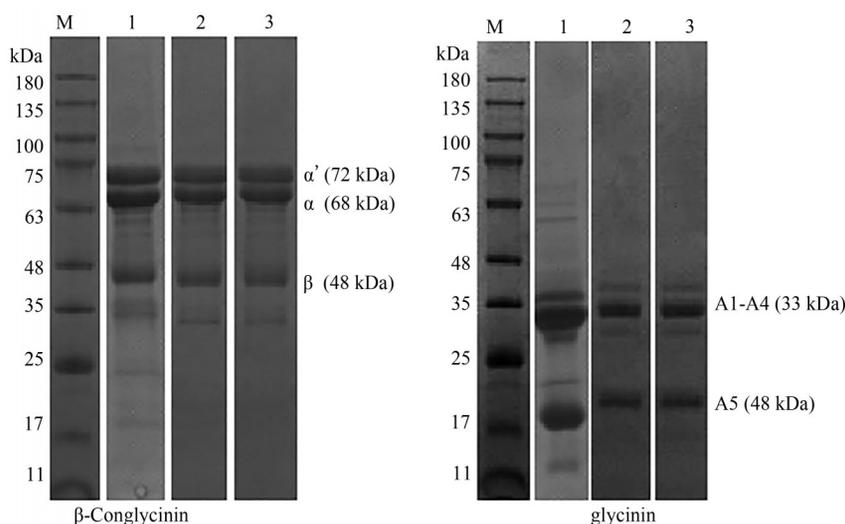
NaHSO_3 添加量/(mmol/L)	大豆蛋白提取率/%	
	β -Conglycinin	glycinin
0.01	41.81	54.06
0.02	39.54	50.2
0.03	37.09	48.81



注:M:分子量标准;1~4 分别对应 NaHSO_3 添加量 0.01、0.02、0.03、0 mmol/L 所得的 β -Conglycinin 和 glycinin 提取物

图4 不同 NaHSO_3 提取大豆蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Figure 4 SDS-PAGE profiles of soybean proteins extracted with different NaHSO_3



注:M:分子量标准;1:调节 pH 后 4 度静置 1 h;2:调节 pH 后 4 度过夜静置;3:提高离心转速为 10 000 r/min 所得的 β -Conglycinin 和 glycinin 提取物

图5 增加沉淀时间和离心转速提取大豆蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Figure 5 SDS-PAGE profile of soybean protein extracted by increasing precipitation time and centrifugal speed

2.1.3 增加沉淀时间和离心转速对分离纯度影响

为使蛋白条带更加清晰,增加额外分离条件。由图 5 所示,相比于 4 °C 静置 1 h,离心转速 6 500~9 000 r/min 的方法,调节 pH 后 4 °C 过夜沉淀,同时提高离心机转速至 10 000 r/min,可以使蛋白条带更清晰。

2.2 双抗夹心 ELISA 检测 β -Conglycinin 和 glycinin 的方法建立及优化

2.2.1 HRP 标记单克隆抗体制备检测抗体及验证

按照 1.2.6 步骤操作,结果如表 3,可以看到四种抗体偶联 HRP 后直接 ELISA 的 P/N 值 > 3,判断偶联成功。

2.2.2 捕获抗体包被浓度以及检测抗体工作浓度的确定

将 β -Conglycinin 和 glycinin 分别稀释至 2 和 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为阳性样品,按照 1.2.8 所示方法进行检测,计算 P/N 值(其中 P 为阳性样品值,N 为阴性对照

表3 直接ELISA验证HRP标记四种抗体作为检测抗体

Table 3 Direct ELISA validation of HRP-labeled four antibodies as detection antibodies

包被蛋白浓度/($\mu\text{g/mL}$)	HRP偶联抗体浓度/($\mu\text{g/mL}$)		3A9-HRP	2E2-HRP	4G4-HRP	7D3-HRP
1	1:1 000	P	1.627	2.511	1.601	1.315
		N	0.45	0.431	0.356	0.321
		P/N	3.615	5.825	4.497	4.096
0.1	1:1 000	P	1.471	1.273	0.971	0.799
		N	0.419	0.39	0.356	0.427
		P/N	3.510	3.264	2.727	1.871

值)选择工作浓度。如图6所示,捕获抗体3A9 mAb以0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度包被ELISA板,检测抗体2E2-HRP以1:4 000稀释,检测 β -Conglycinin的P/N值较

大且N值较小。由图7所示,捕获抗体7D3以2 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度包被ELISA板,检测抗体4G4-HRP以1:1 000稀释,检测glycinin的P/N值较大且N值较小。

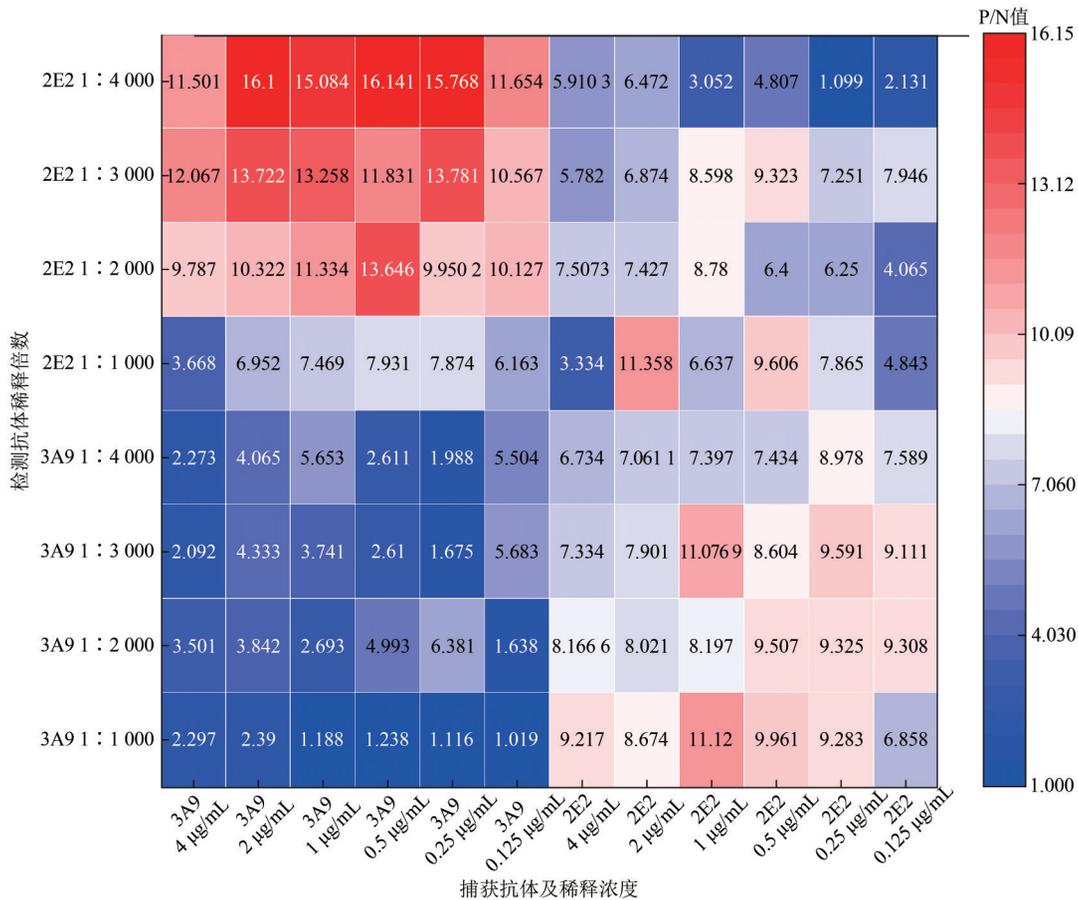


图6 β -Conglycinin双抗夹心ELISA的捕获抗体与检测抗体浓度优化

Figure 6 Optimization of capture antibody and detection antibody concentration in β -Conglycinin sandwich ELISA

2.2.3 ELISA反应时间和溶剂体系的优化

分别以1 000和4 000 ng/mL 的 β -Conglycinin和glycinin作为阳性样品,使用水、水-60%乙醇、PBS作为溶剂体系进行稀释,按照最佳体系条件以1.2.6的步骤操作,检测室温下不同孵育反应时间的P/N值。检测 β -Conglycinin的ELISA最佳反应时间为90 min, PBS为最佳溶剂(图8);检测glycinin的ELISA最佳反应时间为120 min,水为最佳溶剂(图9)。

2.2.4 双抗夹心ELISA工作曲线绘制

按照1.2.8所述进行检测,依据线性回归方程对该曲线进行拟合。 β -Conglycinin的标准曲线在5~

1 215 ng/mL 的浓度下线性良好,拟合线性回归方程为 $y=0.001 4x+0.297 9$, R^2 为0.997。10次重复测定不含所检致敏蛋白的空白样品的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值的平均值为0.169,标准偏差(SD)为0.043 6,依据1.2.8的(公式1)进行计算,该方法的LOD为1.36 ng/mL (图10)。Glycinin的标准曲线在31.25~8 000 ng/mL 的浓度下线性良好,拟合线性回归方程为 $y=0.000 08x+0.810 9$, R^2 为0.991 9。10次重复测定不含所检致敏蛋白的空白样品的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值的平均值为0.685,标准偏差(SD)为0.042 5, LOD为28.75 ng/mL (图11)。

2.2.5 添加回收率与精密度

按照1.2.9所述进行检测, β -Conglycinin双抗

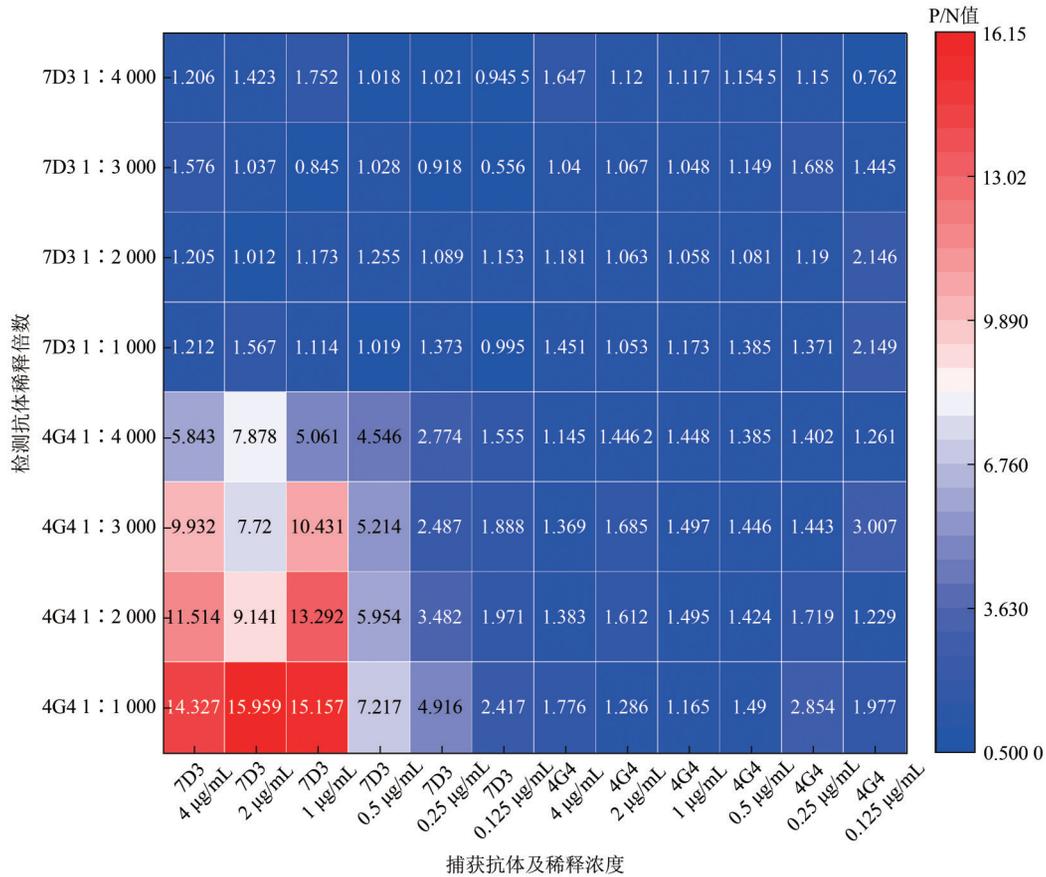
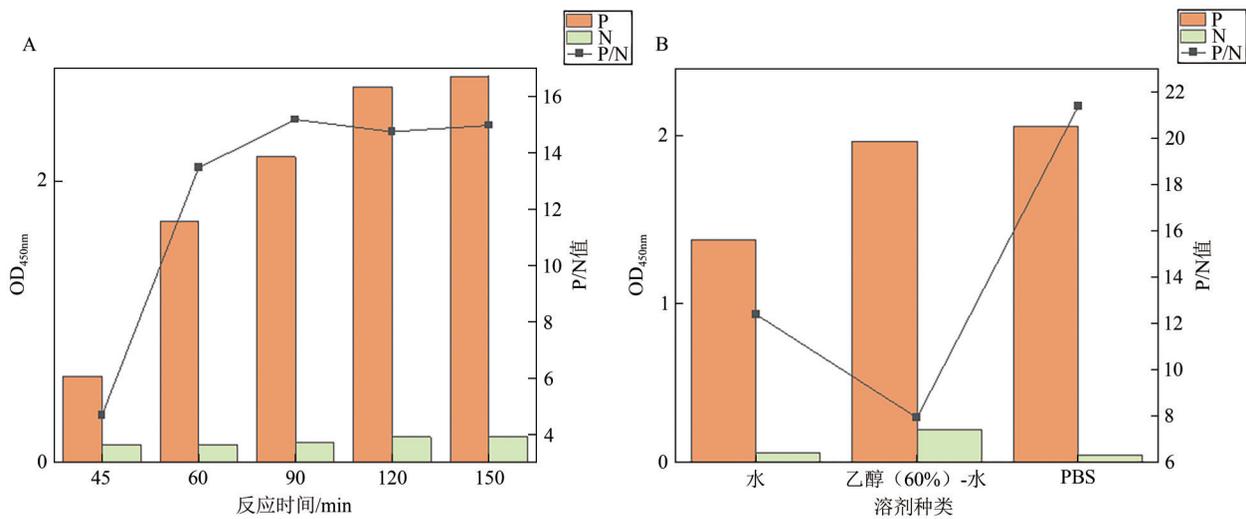


图7 glycinin 双抗夹心 ELISA 的捕获抗体与检测抗体浓度优化

Figure 7 Optimization of capture antibody and detection antibody concentration in glycinin sandwich ELISA



注:A为检测β-Conglycinin的ELISA最佳反应时间;B为检测β-Conglycinin的ELISA最佳溶剂种类;P为阳性样品值,N为阴性对照值

图8 β-Conglycinin 双抗夹心 ELISA 反应时间与稀释蛋白溶剂优化

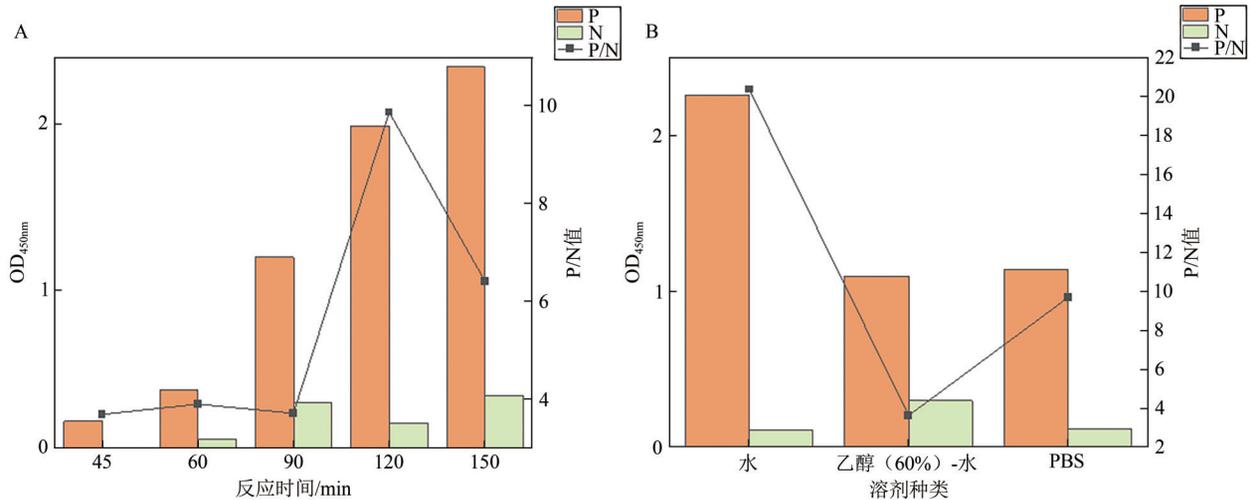
Figure 8 β-Conglycinin sandwich ELISA reaction time and dilution protein solvent optimization

夹心 ELISA 的回收率如表 4。该方法在脱脂乳中添加 0.1、0.5、1.5 mg/kg 的批内回收率分别为 102%、107%、104%，在三个不同批次中的添加回收率分别为 96%、107%、108%。批内和批间的添加回收率在正常范围内，CV<15%。Glycinin 双抗夹心 ELISA 的回收率显示，该方法在脱脂乳中添加 0.5、1、5 mg/kg 的批内回收率分别为 95.3%、95.6%、90.3%，在

三个不同批次中的添加回收率分别为 105.8%、92.5%、107.2%。批内和批间的添加回收率在正常范围内，CV<15%。表明两种方法均可以用于食品中的 β-Conglycinin 和 glycinin 检测。

2.2.6 方法特异性

按照 1.2.10 所述进行检测，β-Conglycinin 和 glycinin 的双抗夹心 ELISA 的特异性见表 6。结果



注:A为glycinin的ELISA最佳反应时间;B为检测glycinin的ELISA最佳溶剂种类;P为阳性样品值,N为阴性对照值

图9 glycinin双抗夹心ELISA反应时间与稀释蛋白溶剂优化

Figure 9 glycinin sandwich ELISA reaction time and dilution protein solvent optimization

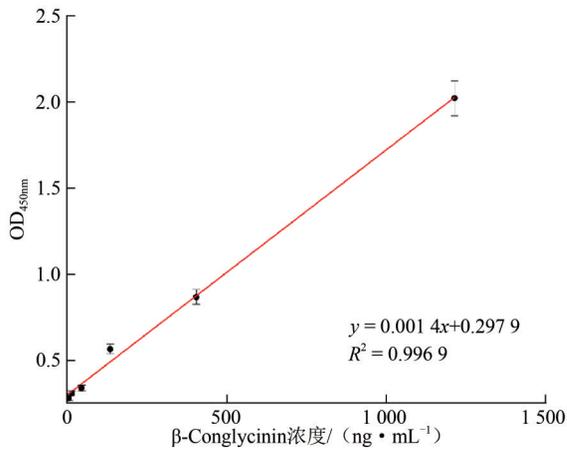


图10 β-Conglycinin双抗夹心ELISA标准曲线(n=10)

Figure 10 Standard curve of sandwich ELISA for β-Conglycinin (n=10)

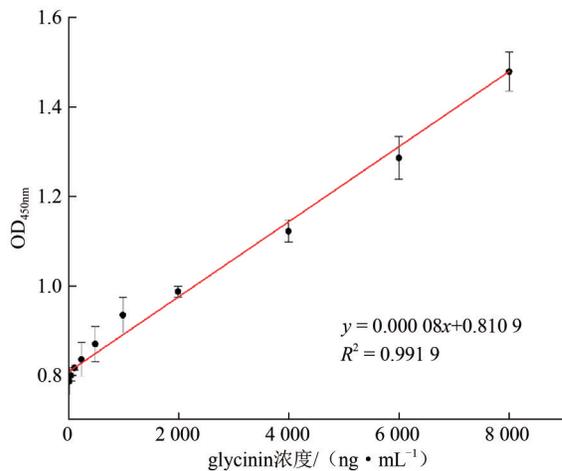


图11 glycinin双抗夹心ELISA标准曲线(n=10)

Figure 11 Standard curve of sandwich ELISA for glycinin (n=10)

表明两种方法检测其他几种常见的过敏原蛋白与大豆中其他过敏原蛋白的P/N值均小于2.1,表明两种检测方法的特异性良好。

3 小结

本研究优化王昱婷等^[13]提取大豆中β-Conglycinin和glycinin的方法,确定添加10 mmol/L沉淀剂CaCl₂和0.01 mmol/L还原剂NaHSO₃,沉淀过夜并将离心转速提高至10 000 r/min,使β-Conglycinin和glycinin的提取率更高,分别达到41.81%和54.06%,且蛋白条带清晰。使用该高纯度过敏原蛋白作为靶标,建立了β-Conglycinin和glycinin的双抗sELISA检测方法。其中,β-Conglycinin双抗夹心ELISA使用捕获抗体3A9 mAb以0.5 μg/mL的浓度包被ELISA板,检测抗体2E2mAb-HRP以1:4 000稀释,抗原和检测抗体各孵育90 min,显色15 min,该方法的LOD为1.36 ng/mL,LOQ为5 ng/mL;glycinin双抗夹心ELISA使用捕获抗体7D3 mAb以0.5 μg/mL的浓度包被ELISA板,检测抗体4G4mAb-HRP以1:1 000稀释,抗原和检测抗体各孵育120 min,显色15 min,该方法的LOD为28.75 ng/mL,LOQ为32.5 ng/mL。两种方法在实际样品加标回收试验中都具有较高的准确度,在脱脂牛乳中的检测回收率在90.3%~108%。批次内和批次间变异系数均小于15%,具有良好的可重复性,且与其他过敏原无交叉反应,特异性良好。可满足实际检测的需要。比较以往研究的夹心ELISA方法^[11,14],检测限更低,线性范围更宽。且该方法不需要二抗间接显色,直接使用包被捕获抗体和检测抗体进行夹心ELISA,不但缩短了反应时间,且降低了成本,更适于商业化生产大豆过敏原试剂盒,为市场中食品包装的过敏原标签的规范提供帮助,并为后续开发其他快速检测方法具有技术参考的积极作用。

表4 β-Conglycinin 和 glycinin 双抗夹心 ELISA 精密度评估
Table 4 Precision evaluation of β-Conglycinin and glycinin sandwich ELISA

名称	β-Conglycinin			
	添加量/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	回收率/%	变异系数 CV/%
批内(n=6)	0	0.011±0.035	—	11.27
	0.1	0.115±0.035	102	8.04
	0.5	0.548±0.107	107	10.13
	1	1.058±0.023	104	7.73
批间(n=3)	0	-0.042±0.023	—	8.05
	0.1	0.092±0.022	96	5.27
	0.5	0.534±0.091	107	8.74
	1	1.076±0.143	108	1.30
名称	glycinin			
	添加量/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	回收率/%	变异系数 CV/%
批内(n=6)	0	0.059±0.075	—	9.2
	0.5	0.536±0.038	95.3	4.5
	1	1.016±0.121	95.6	13.5
	5	4.576±0.098	90.3	8.3
批间(n=3)	0	0.130±0.026	—	3.2
	0.5	0.659±0.067	105.8	7.8
	1	1.055±0.117	92.5	13.1
	5	5.492±0.108	107.2	8.6

注:—无

表5 β-Conglycinin 和 glycinin 双抗夹心 ELISA 特异性(P/N)(n=3)
Table 5 Specificity of β-Conglycinin and glycinin sandwich ELISA Specificity (P/N)

过敏原蛋白种类	β-Conglycinin			glycinin		
	10 ng/mL	100 ng/mL	1 000 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	1 000 ng/mL
β-乳球蛋白	0.812	1.046	0.989	1.767	1.818	1.807
OVA	1.351	1.106	1.080	0.994	1.037	0.987
乳清蛋白	1.372	1.141	1.129	1.025	0.965	1.031
牛血清白蛋白	1.425	1.155	1.045	0.997	0.966	1.132
glycinin	1.485	1.320	1.028	1.713	4.288	5.326
β-Conglycinin	4.231	12.813	13.663	1.007	1.058	1.024

参考文献

- [1] 王禹, 许世卫, 李干琼. 2023年上半年中国大豆市场形势回顾和后期展望[J]. 农业展望, 2023, 19(7): 3-8.
WANG Y, XU S W, LI Q Q. Review of China soybean market situation in the first half of 2023 and future outlook [J]. Agricultural Prospects, 2020, 19(7): 3-8.
- [2] SINGH P, KUMAR R, SABAPATHY S N, et al. Functional and edible uses of soy protein products [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2008, 7(1): 14-28.
- [3] 胡晓利, 布冠好, 张晓旭. 大豆蛋白过敏原及常见脱敏方法研究进展[C]//中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十五届年会论文摘要集, 2018: 1.
HU X L, BU G H, ZHANG X X. Research progress of soybean protein allergens and common desensitization methods [C]// Chinese Institute of Food Science and Technology. Abstracts of the 15th Annual Meeting of the Chinese Society of Food Science and Technology, 2018: 1.
- [4] 惠天然, 施一凡, 唐婷, 等. 大豆过敏原蛋白及致敏性消减技术的研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10): 357-364.
HUI T R, SHI Y F, TANG T, et al. Soy protein allergen and the research progress of allergenic cut technology [J]. Journal of Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 357-364.
- [5] 朱婷伟, 陈复生, 布冠好, 等. 大豆蛋白过敏原结构与功能的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 377-380.
ZHU T W, CHEN F S, BU G H, et al. Research progress on structure and function of soybean protein allergen [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(21): 377-380.
- [6] 贺梦雪, 席俊, 闫慧丽, 等. β-伴大豆球蛋白的分离纯化及免疫活性鉴定[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(6): 24-27.
HE M X, XI J, YAN H L, et al. Isolation, purification and immunological activity identification of β-associated soybean globulin [J]. Journal of He'nan University of Technology (Natural Science Edition), 2016, 37(6): 24-27.
- [7] 司晓霞, 王志, 霍斐, 等. 大豆中β-伴大豆球蛋白提纯方法的优化[J]. 植物研究, 2011, 31(4): 397-402.
SI X X, WANG Z, HUO F, et al. Optimization of purification method of β-associated soybean globulin from soybean [J]. Plant Research, 2011, 31(4): 397-402.
- [8] MARUYAMA N, MATSUOKA Y, YOKOYAMA K, et al. A vacuolar sorting receptor-independent sorting mechanism for storage vacuoles in soybean seeds [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1108.
- [9] 朱礼艳, 李思越, 黄建联, 等. 大豆过敏原夹心ELISA和竞争ELISA方法的建立及其在加工食品中应用研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 180-188.
ZHU L Y, LI S Y, HUANG J L, et al. Development of sandwich ELISA and competitive ELISA for soybean allergen and its application in processed food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 180-188.

- [10] 李丽芳, 黄文胜, 张九凯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测大豆主要过敏原蛋白[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 316-324.
- LI L F, HUANG W S, ZHANG J K, et al. Determination of major allergen proteins in soybean by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 2020, 41(24): 316-324.
- [11] SEGURA-GIL I, BLÁZQUEZ-SORO A, GALÁN-MALO P, et al. Development of sandwich and competitive ELISA formats to determine β -Conglycinin: evaluation of their performance to detect soy in processed food[J]. Food Control, 2019, 103: 78-85.
- [12] 朱文嘉, 陈江平, 秦智慧, 等. 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测鱼糜制品中鸡蛋卵白蛋白[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(6): 190-197.
- ZHU W J, CHEN J P, QIN Z H, etc. The double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent method to detect egg ovalbumin in minced fish products [J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2023, 14(6): 190-197.
- [13] 王昱婷, 王笑宇, 许晶. 大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白的富集分离研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(8): 24-29.
- WANG Y T, WANG X Y, XU J. Enrichment and separation of soybean globulin and β -associated soybean globulin [J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2016, 31(8): 24-29.
- [14] 田少君, 何有缘, 谈天. 不同因素对CaCl₂透析诱导大豆分离蛋白冷凝胶特性的影响[J]. 中国油脂, 2007(3): 22-25.
- TIAN S J, HE Y Y, TAN T. Effects of different factors on the cold gel properties of CaCl₂ dialysis-induced soybean protein isolate [J]. China Oils and Fats, 2007(3): 22-25.
- [15] 蒋栋磊, 葛攀玮, 俞程凯, 等. 大豆过敏原 β -伴大豆球蛋白提取纯化工艺研究[J]. 食品安全导刊, 2017(24): 134-135.
- JIANG D L, GE P W, YU C K, et al. Soybean allergen beta with soybean globulin extraction and purification technology research [J]. Journal of Food Safety Tribune, 2017(24): 134-135.
- [16] 王耀. 大豆致敏蛋白glycinin和 β -Conglycinin免疫学快速检测技术研究[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2015.
- WANG Y. Rapid detection of soybean allergenic proteins glycinin and β -Conglycinin by immunoassays [D]. Shaanxi: Northwest A & F University, 2015.