

菲律宾蛤仔过敏原可视化抗体微阵列玻片的检测方法

李小燕¹, 李振兴¹, 林洪^{1*}, SAMEE Haider², 张轶群¹

(1. 中国海洋大学水产品安全性实验室, 山东 青岛 266003;

2. Food and Marine Research Center, PCSIR Laboratories Complex, Off University Road, Karachi, Pakistan)

摘要:采用辣根过氧化物酶(HRP)与3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)-H₂O₂作为信号示踪系统,建立了一种可视化抗体微阵列检测菲律宾蛤仔过敏原的方法。对孵育时间、抗体浓度等免疫条件进行了优化。采用改良双抗体夹心法,将菲律宾蛤仔过敏原的兔多克隆抗体固定于琼脂糖三维芯片上,依次加入待检样品、菲律宾蛤仔鼠多克隆抗体和HRP-羊抗鼠IgG,孵育后加TMB显色,肉眼观察后,用平板扫描仪获取扫描图象,采用GenePixPro 6.0软件分析灰度值。试验结果表明,该方法最低可检出10 ng/mL的菲律宾蛤仔过敏原,片内平均变异系数(CV)为5.99%,片间为10.3%;香肠及蟹棒中3个不同浓度的加标回收率为73.54%~95.44%;4℃存放4个月内抗体微阵列玻片活性保持稳定。该方法不需要大型精密仪器,结果直观可见,可以发展为对多种过敏原进行同时检测,具有良好的实用和推广价值。

关键词:菲律宾蛤仔;过敏原;夹心法;抗体微阵列;可视化

中图分类号:R 392.8; TS 254.7

文献标识码:A

过敏问题日益成为严重影响人们生活质量的重大问题。流行病学调查表明,美国有3.5%~4%的成人受到食物过敏疾病的困扰,其中1/2以上由虾、贝等海产品引起,特别是在大量消费或加工海产食品的地区,过敏的几率更高^[1-3]。到目前为止,食物过敏还没有非常有效的治疗方法,唯一有效的方法是避免接触过敏原。随着新资源食品的出现及食品加工业的现代化,因误食导致的食物过敏事件日益增多,因此,发展便捷的食物过敏原检测技术具有重要的意义。

目前食物过敏原的检测技术大致有聚合酶链式反应法、过敏原指纹图谱检测法^[4]及免疫分析法。即时PCR及过敏原指纹图谱法准确度高但操作繁琐、耗时且需要精密的仪器,不易推广应用;酶免疫分析法以其特异性好、易操作等特点,在过敏原的检测中已有较多应用,但通量化及操作要求方面有待改进。

随着技术日趋成熟,蛋白微阵列技术是在蛋白质组学研究中发展起来的一种高通量、自动化

及微型化的蛋白质分析技术^[5-7],已在蛋白质组的功能研究、疾病诊断、药物开发及病原微生物的检测等领域得到广泛应用^[5,8-10]。蛋白质微阵列检测方法依信号产生机理可分为10种^[7],主要可归结为两大类:其一,基于荧光或者化学发光的检测方法,通常需要借助精密仪器,且荧光剂易淬灭;其二,基于胶体金及金磁微粒等标记物的可视化检测方法,其中以胶体金及金磁微粒作为蛋白标记物的蛋白芯片检测法,灵敏度高,可目视化判读结果^[11-12],因标记物稳定性差,应用时常受到一定限制。

目前,蛋白微阵列在过敏原检测方面的研究尚未见报道,本实验以菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*,以下简称杂色蛤)为研究对象,将蛋白微阵列技术与改良双抗体夹心检测抗原的原理相结合,采用辣根过氧化物酶(HRP)与3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)-H₂O₂作为信号示踪系统,旨在建立一种适于过敏原通量化检测的可视化抗体微阵列玻片检测方法,对提高食品安全性、

保护过敏人群的健康具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与amp;仪器

试剂 3-氨基丙基-三甲氧基硅烷 (APTES, sigma); 琼脂糖 (genetech 公司); 牛血清白蛋白 (BSA V, 北京索莱宝科技有限公司); HRP-羊抗鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); A B 双液 TMB 显色液 (济南泰天和生物科技有限公司); 香肠 (主料为猪肉、淀粉) 及模拟蟹棒 (主料为淀粉、鱼糜) 购于本地超市; 其它试剂均为国产分析纯, 实验用水为双蒸水。

菲律宾蛤仔、凡纳滨对虾及蓝点马鲛过敏原为电泳纯级抗原 (实验室自制); 杂色蛤兔多克隆抗体、鼠多克隆抗体为硫酸铵纯化抗体 (实验室自制)。

点样缓冲液为 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (CBS, pH 9.6, 含 5% 甘油); 洗涤缓冲液为含 0.1% Tween-20 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBST, pH 7.4); 封闭液为含 3% BSA 的 PBST。

仪器 八针式手动微阵列点样仪 (英国 whatman 公司); 平板扫描仪 (Lenovo M 7120)。

1.2 实验方法

琼脂糖三维基片的制备 参照 Nisnevitch 等^[13]及金世辉等^[14]的方法, 并略有改动。将玻片依次以酸碱清洗后, 以含 3% APTES (V/V) 的丙酮浸泡活化 5 min, 依次以无水丙酮、无水乙醚漂洗 3 次; 将 1.2% (m/V) 的琼脂糖溶液加热至沸腾, 迅速将 2 mL 琼脂糖溶液覆盖在 60 °C 预热的玻片上; 待琼脂糖凝固后, 置 37 °C 干燥过夜; 使用前以 20 mmol/L NaIO₄ 溶液活化 30 min, 超纯水浸洗 3 次, 5 min/次, 离心甩去玻片表面的水, 置 37 °C 干燥 0.5 h。

抗体微阵列玻片的制备 以点样缓冲液稀释杂色蛤兔多克隆抗体 (捕获抗体) 至 0.8 mg/mL, 以小型八针手动点样仪点到基片上, 形成 8 个阵列 (行间距: 750 μm, 列间距: 1 250 μm, 点直径约为 750 μm), 放入湿盒中, 4 °C 过夜固定, 以 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 洗去未结合的蛋白, 离心甩去玻片表面的水, 以封闭液于 37 °C 封闭 90 min, 以 PBST 洗涤 3 次, 离心, 4 °C 保存备用。

抗体微阵列玻片的可视化检测 将稀释好的抗原加至抗体微阵列玻片上, 37 °C 作用 60 min

后, 以 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入鼠多克隆抗体 (检测抗体) 孵育 90 min, 以 PBST 洗涤后加入 HRP-羊抗鼠 IgG 孵育 90 min, 同上洗涤后加入 A B 双液 TMB 底物发色 20 min, 水洗中止反应, 离心, 肉眼观察并用平板扫描仪扫描图像。采用 GenePix Pro 6.0 软件分析图像中各点的显色强度, 比较其灰度值。

标准曲线的制作 将杂色蛤过敏原稀释成 1 mg/mL, 100 μg/mL, 10 μg/mL, 1 μg/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL。按照上述方法进行检测, 以 PBS 代替过敏原作为阴性对照, 并且以杂色蛤过敏原浓度作横坐标, 以相应的灰度值作纵坐标绘制标准曲线。

加标试验 将杂色蛤过敏原蛋白分别加入到香肠和模拟蟹棒中, 加标浓度为 1 mg/kg, 5 mg/kg 和 25 mg/kg。取 1 g 加标样品, 按照加标样品: PBS = 1: 5 (g/mL) 的比例充分匀浆抽提, 10 000 × g 离心 15 min, 取上清, 以正己烷脱脂, 按前述方法检测并计算回收率。

2 结果与amp;讨论

2.1 最优检测条件的确定

捕获抗体浓度的确定 以点样缓冲液将杂色蛤兔多克隆抗体梯度稀释成 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 mg/mL, 固定于三维基片上, 结果如图 1 所示。实验结果表明: 提高捕获抗体的浓度在一定范围内可以增加信号强度, 浓度增加到 1.6 mg/mL 时, 信号强度不再有较大的变化。琼脂糖的羟基在高碘酸钠的作用下被氧化成醛基, 可以与抗体分子中的氨基共价结合, 其三维多孔结构还会使抗体分子以物理吸附的方式固定在其表面, 当抗体到达一定浓度后, 琼脂糖层所有可能的结合位点接近饱和, 此时若继续增加抗体的浓度, 可形成抗体多层吸附, 部分位点被遮蔽, 且在操作过程中可能结层脱落从而降低敏感性和可重复性, 影响分析结果。故实验中捕获抗体的浓度采用 1.6 mg/mL。

鼠多克隆抗体作用浓度的影响 以封闭液将杂色蛤鼠多克隆抗体梯度稀释成 1.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL, 不同浓度检测抗体得到的灰度值如图 2 所示, 结果表明杂色蛤鼠多克隆抗体浓度达到 0.2 mg/mL 时, 信号强度进入平台

期。Nielsen 等^[7]研究发现,在一定范围内增加检测抗体浓度可提高检测灵敏度,但同时会增加非特异性反应,实验中鼠抗浓度在 0.2 ~ 1.6 mg/mL 的范围内变化时,信号强度变化趋缓,故确立杂色蛤鼠多克隆抗体的工作浓度为 0.2 mg/mL。

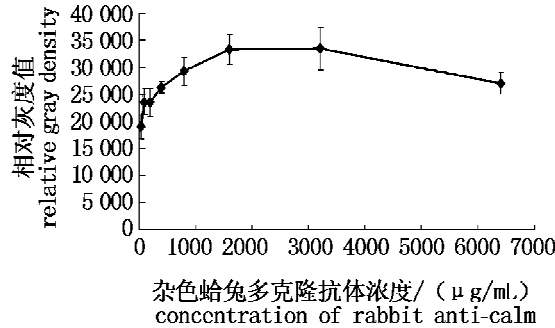


图1 捕获抗体浓度-灰度值曲线

Fig.1 The curve of capture antibody concentrations versus gray density

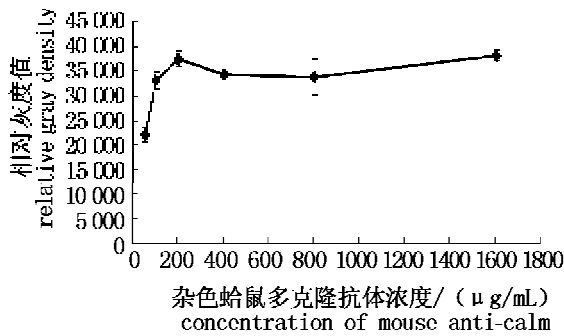


图2 检测抗体浓度-灰度值曲线

Fig.2 The curve of detection antibody concentrations versus gray density

孵育时间的确立 依次对杂色蛤过敏原、杂色蛤鼠多克隆抗体及 HRP-羊抗鼠 IgG 进行孵育时间的确立,选定 30、45、60、90、120 min 等 5 个时间段进行实验,结果如图 3 所示。抗原、抗体及抗体-抗体间的结合随时间的延长而增强,达到最大结合后,灰度值进入平台期,孵育时间继续延长,非特异性结合增强导致信噪比下降,最终确立各因素的作用时间为:过敏原孵育 90 min,鼠多克隆抗体孵育 60 min,HRP-羊抗鼠 IgG 孵育 90 min。

2.2 方法学评价

检测灵敏度 由图 4 和图 5 得到标准曲线回归方程为 $y = 2\,872.4x + 18\,828$,线性相关系数 $R^2 = 0.973\,9$ 。定义最低检测限(LOD)为阴性对

照 + 3SD(阴性对照),通过标准曲线得到该方法的 LOD 为 10 ng/mL,该曲线线性范围为 100 ~ 100 000 ng/mL。

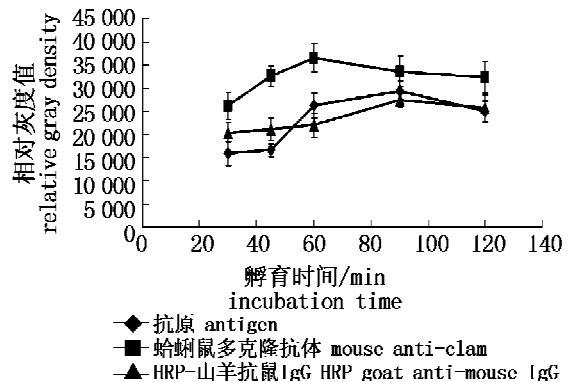


图3 作用时间-灰度值曲线

Fig.3 The curve of time versus gray density

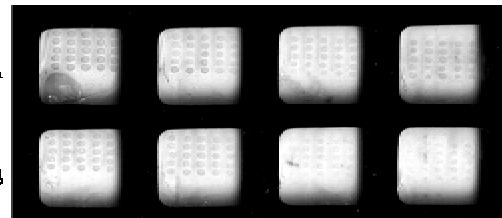


图4 过敏原检测标准曲线扫描图

Fig.4 Typical allergen detection pictures of standard curve

A: 1 mg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL,
B: 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, negative control

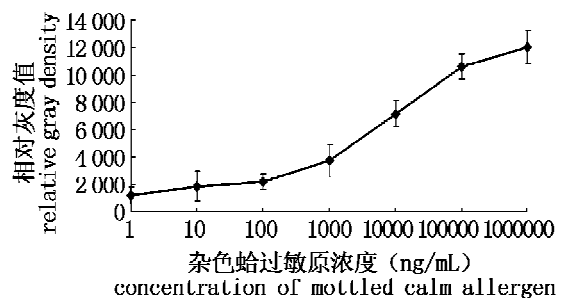


图5 杂色蛤过敏原标准曲线

Fig.5 The standard curve of mottled clam allergen

精密度 将杂色蛤过敏原稀释至 1、5、及 10 µg/mL,按此方法进行检测,重复检测 3 次,每次每个浓度设 9 个平行,读取每个点样点的灰度值,计算平均值及标准偏差。实验结果如表 1 所示,其片内平均变异系数在 5.99%,片间平均变异

系数在 10.3%,表明该方法具有较好的重复性。

稳定性 以杂色蛤兔多抗制备的抗体微阵列玻片于 4℃湿盒中存放,分别于第 30、60、120 天对抗体芯片进行活性检测。实验结果表明:4℃湿盒中存放 120 d 后,抗体微阵列玻片检测限保持不变。目前国内关于抗体微阵列稳定性研究的报导较少,Karoonuthaisiri 等^[9]制备的用于食源性致病菌检测的抗体微阵列玻片,4℃存放 2 个月时信号强度保持不变。

表 1 可视化过敏原检测方法的精密度
Tab.1 Accuracy of the visible protein chip for allergen detection

抗原浓度(μg/mL) concentration of antigen	片内差异(%) intra-assay CV	片间差异(%) inter-assay CV
1	5.84	11.18
5	5.78	8.13
10	6.34	11.5

琼脂糖修饰的玻片是一种三维多孔结构的载体,其表面和蛋白质的接触面积增加,结合蛋白质的能力较强,同时三维化空间具有亲水性,可防止抗体分子的聚集,减弱由固相界面诱导的分

子变性^[15-16]。点样缓冲液中的甘油,具有较强的水分结合能力,可保持凝琼脂糖凝胶内湿润的环境,有利于保持抗体蛋白构象的稳定^[17];同时其分子中富含羟基,可以取代水分子与抗体蛋白分子形成氢键,减少了蛋白质的变性失活^[18],这对后续的抗原的特异结合尤为重要,保障了检测结果的可靠性,延长了抗体微阵列玻片的存放时间。

特异性 以杂色蛤抗体微阵列检测体系检测 10 μg/mL 的凡纳滨对虾及蓝点马鲛过敏原,蓝点马鲛过敏原检出量小于 100 ng/mL,凡纳滨对虾的检出量为(2.1 ± 0.16) μg/mL,表现出一定的交叉反应性。Emoto 等^[19]研究发现:杂色蛤与虾等甲壳类的肌球蛋白氨基酸序列有 60% 的同源性,这种同源性是产生交叉反应的一个重要原因。

2.3 加标检测

加标试验的结果如表 2 所示,各浓度下加标样品的回收率在 73.54% ~ 95.44%,标准偏差均小于 16%,证实该可视化检测方法具有较好的重复性和较高的回收率。

表 2 香肠及模拟蟹棒中杂色蛤过敏原回收率测定

Tab.2 Recovery and percent recovery of mottled clam allergen from the sausage and surimi stick *n* = 3

样品 sample	加标浓度(mg/kg) spike levels	检出浓度(mg/kg) levels detected	回收率(%) recovery	标准偏差(%) standard deviation
香肠 sausage	1	0.825 ± 0.152	82.53	15.20
	5	4.070 ± 0.611	81.41	12.22
	25	23.859 ± 1.795	95.44	7.18
模拟蟹棒 surimi stick	1	0.735 ± 0.119	73.54	11.86
	5	4.277 ± 0.428	85.54	8.55
	25	23.449 ± 2.105	93.79	8.42

3 结论

在三维琼脂糖基片上实现改良双抗体夹心 ELISA 的微阵列化,以 HRP-TMB-H₂O₂ 作为信号示踪系统,通过优化免疫反应的条件,建立了杂色蛤过敏原的可视化抗体微阵列玻片检测方法。对建立的方法进行方法学评价,该方法最低可检出 10 ng/mL 的杂色蛤过敏原;片内平均变异系数为 5.99%,片间平均变异系数为 10.3%,精密度较好;4℃存放 4 个月内抗体微阵列玻片活性保持稳定;制备的杂色蛤抗体微阵列玻片与凡纳滨对虾有一定的交叉反应;香肠及模拟蟹棒中的平

均加标回收率 > 70%。该法无需制备标记物,最大限度地保持了抗体的活性,操作简便,具有结果直观、试剂用量少等特点,可以发展为多种过敏原的通量化检测方法,检测成本低,实用性强。

参考文献:

- [1] Furlong A M, Sampson H A, Sicherer S H. Prevalence of self-reported seafood allergy in the U. S [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 113(2):100.
- [2] Sampson H A. Update on food allergy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 113(5):805-819.

- [3] Lehrer S B, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens; a review [J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5: 339 - 348.
- [4] Besler M. Determination of allergens in foods [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2001, 20(11): 662 - 672.
- [5] Mezzasoma L, Hanilton T B, Cristina M D, *et al.* Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases [J]. *Clinical Chemistry*, 2002, 48(1): 121 - 130.
- [6] Poetz O, Schwenk J, Kramer S, *et al.* Protein microarrays: catching the proteome [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2005, 126(1): 161 - 170.
- [7] Nielsen U, Geierstanger B. Multiplexed sandwich assays in microarray format [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2004, 290(1 - 2): 107 - 120.
- [8] Huels C, Muellner S, Meyer H E, *et al.* The impact of protein biochips and microarrays on the drug development process high-throughput technologies [J]. *Drug Discovery Today*, 2002, 7(18): 119 - 124.
- [9] Karoonuthaisiri N, Charlernroj R, Uawisetwathana U, *et al.* Development of antibody array for simultaneous detection of foodborne pathogens [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(6): 1641 - 1648.
- [10] 张国军, 吕虹, 王雅杰, 等. 检测过敏性疾病的蛋白芯片制作及临床应用的初步研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2007, 5(11): 229 - 232.
- [11] Sauer U, Preinger C, Krumpel G, *et al.* Signal enhancement of protein chips [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, 107(1): 178 - 183.
- [12] 唐金凡, 简强, 崔亚丽, 等. 基于金磁微粒标记技术的可可视化蛋白质芯片检测方法的建立[J]. *临床检验杂志*, 2007, 25(4): 263 - 265.
- [13] Nisnevitch M, Kolog-Gulco M, Trombka D, *et al.* Immobilization of antibodies onto glass wool [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 738(2): 217 - 223.
- [14] 金世辉, 刘必成, 张春秀, 等. 蛋白质微阵列生产用琼脂糖修饰玻片制备的条件优化[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(2): 57 - 60.
- [15] 蒋犁, 余章斌, 张春秀, 等. 不同方法修饰玻璃表面制备蛋白质芯片的对比[J]. *东南大学学报(自然科学版)*, 2007, 37(1): 136 - 140.
- [16] Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips [J]. *Analytical Biochemistry*, 1997, 250(2): 203 - 211.
- [17] MacBeath G, Schreiber S L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination [J]. *Science*, 2000, 289(5485): 1760 - 1763.
- [18] Champagne C P, Gardner N, Brochu E, *et al.* The freeze-drying of lactic acid bacteria [J]. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1991, 24(3/4): 118 - 128.
- [19] Emoto A, Ishizaki S, Shiomi K. Tropomyosins in gastropods and bivalves: identification as major allergens and amino acid sequence features [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(2): 634 - 641.

Development of visible antibody microarray chips for detecting mottled calm (*Ruditapes philippinarum*) allergen

LI Xiao-yan¹, LI Zhen-xing¹, LIN Hong^{1*}, SAMEE Haider², ZHANG Yi-qun¹

(1. Aquatic Products Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

2. Food and Marine Research Center, PCSIR Laboratories Complex, Off University Road, Karachi, Pakistan)

Abstract: *Ruditapes philippinarum* has a widespread consumption in China. It is enjoyed for the uniqueness of its flavour and has a wide variety of applications in foods, such as soup and flavouring. Associated with the diversiform consumption of *Ruditapes philippinarum* is the general increase of allergic disorder. To provide guarantee for the allergy sufferers, it is important to establish a more convenient method for the detection of food allergen. A visible antibody microarray for detecting *Ruditapes philippinarum* allergen was developed in this study, which was based on the 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) — H₂O₂ reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRP). Several physicochemical parameters such as the incubation time and the dilution ratio of antibodies were optimized. A modified sandwich reaction was performed with immobilization of rabbit-anti-*Ruditapes philippinarum* antibody onto the three-dimensional slide, followed by adding antigen, mouse-anti-*Ruditapes philippinarum*, HRP-goat-anti-mouse IgG. After incubating, TMB was employed to give signals, the slides were observed by naked eyes and recorded with flatbed scanner, analysed with GenePix Pro 6.0. The results showed that allergen from *Ruditapes philippinarum* can be detected sensitively with a sensitivity of 10 ng/mL. The method has good reproducibility with average intra-assay CV of 5.9% and average inter-assay CV of 10.3%. The recoveries of three different spiked concentrations in sausage and surimi stick ranged from 73.54% to 95.44%. During storage at 4 °C, the activity of the chips kept stable for 4 months. Moreover, some cross-reactivity with *Penaeus vannamei* was found. With visible and stable results, this method has shown great potential in the massive parallel analysis of various food allergens simultaneously.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; allergen; sandwich; antibody microarray; visualization

Corresponding author: LIN Hong. E-mail: linhong@ouc.edu.cn