DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2020.07.012

花生致敏蛋白 Ara h 1 双抗体夹心 ELISA 法的建立

Establishment of double antibody sandwich ELISA for peanut allergenic protein Ara h 1

王 耀[1] 陈 曦[1] 武汉良[2] 卫 星[3]

WANG Yao[1] *CHEN Xi*[1] *WU Han-liang*[2] *WEI Xing*[3]

张国庆[3] 张淑霞[4] 刘胜男[5]

ZHANG Guo-qing[3] *ZHANG Shu-xia*[4] *LIU Sheng-nan*[5]

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院,河南 洛阳 471023;2. 中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院检验科,河南 洛阳 471031;3. 三门峡市检验检疫中心,河南 三门峡 472000;4. 郑州海关技术中心,河南 郑州 450002;5. 三门峡海关,河南 三门峡 472000;)

(1. *College of Food and Bioengineering, Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan* 471023, *China*; 2. *Clinical Laboratory, No.989 Military Hospital, Joint Logistics Support Force of PLA, Luoyang, Henan* 471031, *China*; 3. *Sanmenxia Inspection and Quarantine Center, Sanmenxia, Henan* 472000, *China*; 4. *Technology Center of Zhengzhou Customs, Zhengzhou, Henan* 450002, *China*; 5. *Sanmenxia Customs District, Sanmenxia, Henan* 472000, *China*)

摘要:为建立用于花生致敏蛋白 Ara h 1 快速、灵敏、特异检测的双抗体夹心 ELISA 法,以 Ara h 1 鼠源单抗(mAb)为捕获抗体,以 Ara h 1 兔源多抗(pAb)为检测抗体,通过棋盘法优化抗体工作浓度建立方法,并对方法的灵敏度、特异性、准确度、稳定性等检测特性进行鉴定。结果表明,双抗体夹心 ELISA 法的 mAb 和 pAb 最佳工作浓度分别为 1∶10 000 稀释和 1∶8 000 稀释;ELISA 标准曲线线性范围为 4~256 ng/mL,检测限为 4.16 ng/mL;样品添加回收试验的平均回收率为 85.9%~94.5%,且该方法与其他常见致敏蛋白无交叉反应;并能在 4 ℃条件下避光密封保存 90 d 内保持检测结果稳定。说明所建立的双抗体夹心 ELISA 法灵敏特异、准确稳定,能够用于花生致敏蛋白 Ara h 1 的快速筛查。

关键词:花生;Ara h 1 蛋白;双抗体夹心法;酶联免疫吸附

Abstract: In order to establish a double antibody sandwich ELISA method for the rapid, sensitive and specific detection of peanut allergenic protein Ara h 1. Taking Ara h 1 murine monoclonal antibody (mAb) as capture antibody, and Ara h 1 rabbit polyclonal antibody (pAb) as detection antibody, the checkerboard method was used to optimize the antibody working concentration to establish the method, and the detection characteristics were identified, including sensitivity, specificity, accuracy and stability of the method. Results: The optimal working concentrations of mAb and pAb were 1 ∶ 10 000 and 1 ∶ 8 000 dilution, respectively. The linear range of the ELISA standard curve was 4~256 ng/mL, and the limit of detection was 4.16 ng/mL. The average recovery ranged from 85.9% to 94.5%, and there was no cross reaction with other common allergenic proteins. In addition, the detection results stable within 90 days under the condition of 4 ℃ in the dark and sealed. The established double antibody sandwich ELISA method is sensitive, specific, accurate and stable, which can be used for the rapid screening of peanut allergenic protein Ara h 1.

Keywords: peanut; Ara h 1 protein; double antibody sandwich method; ELISA

近年来,食物过敏患病率日趋上升[1-2],由于目前仍缺乏致敏阈值研究以及过敏症状有效治疗方法研究,食物过敏患者只能通过药物缓解过敏症状,并避免接触致敏食物以保护自身[3]。因此,许多国家已通过制定法规或标准,强制要求在食品标签中标识致敏物质[4]。中国

基金项目:海关总署科技计划项目(编号:2017IK284,2017IK283);河南省高等学校重点科研项目(编号:18B550001)

作者简介:王耀,男,河南科技大学副教授,博士。

通信作者:刘胜男(1987—),女,三门峡海关工程师,硕士。E-mail:389455177@qq.com

收稿日期:2020-03-05

食品安全国家标准审评委员会在 2018 年底公布的《预包装食品标签通则》(GB 7718)修订草案征求意见稿中也已将致敏物质标示作为预包装食品标签标示的基本内容。花生是八大常见致敏食物之一[5],也是诸多食品标签标准中要求标示的主要致敏成分。花生含有多种致敏蛋白,其中 Ara h 1 是主要致敏蛋白之一,能被大部分的过敏患者血清识别[6]。Ara h 1 约占花生蛋白总量的 12%~16%,也是花生中含量最多的致敏蛋白[7],其三聚体具有很强的稳定性,胃肠道的消化作用和加热均难以破坏其致敏性[8]。因此,为了更好地保障过敏消费者的食品安全,研究食品中花生致敏物质的灵敏、特异、高效检测方法尤为必要。目前,用于花生致敏物质检测的方法主要包括聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction,PCR)[9-10]、酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)[11-12]和质谱法(Mass spectrometry,MS)[13-14],其中 PCR 和 ELISA 是实验室、食品企业及监管机构筛查食品致敏成分最常用的快速定性和定量分析方法[15]。PCR 是基于致敏蛋白标志性基因的检测方法,不能直接反映是否含有致敏物质[16],而 ELISA 是基于蛋白质的检测方法,可利用抗体针对性的检测致敏蛋白。现有用于花生致敏物质检测的 ELISA 法常基于多抗建立,而利用多抗进行检测时存在特异性不足的问题[17]。试验拟利用所制备的 Ara h 1 鼠源单抗提高致敏蛋白捕获特异性,再通过 Ara h 1 兔源多抗进行夹心检测,建立花生致敏蛋白 Ara h 1 的双抗体夹心 ELISA 法并对其检测特性进行鉴定,以期为食品中花生致敏蛋白的快速筛查提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　试剂溶液

花生致敏蛋白 Ara h 1 和 Ara h 2:美国 INDOOR 公司;

大豆球蛋白、卵清蛋白、酪蛋白、牛血清蛋白 4 种常见致敏蛋白,3,3',5,5'-四甲基联苯胺(Tetramethyl benzidine,TMB):美国 Sigma-Aldrich 公司;

HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(GaRIgG-HRP):索莱宝生物科技公司;

其他试剂均为市售分析级;

Ara h 1 兔源多抗(Polyclonal antibody,pAb)、Ara h 1 鼠源单抗(Monoclonal antibody,mAb)及超纯水:实验室制备;

ELISA 包被液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液,CBS)、稀释液(0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液,PBS)、洗涤液(含 0.05% Tween-20 的 PBS,PBST)、封闭液(含 5%脱脂奶的 PBST 溶液)、显色液(TMB 缓冲液)、终止液(2 mol/L H_2SO_4)等溶液:实验室配置。

1.2　主要仪器

电子天平:BSA224S 型,德国 Sartorius 公司;

酶标仪:Multiskan FC 型,美国 Thermo Scientific 公司;

振荡器:Vortex2 型,艾卡(广州)仪器设备有限公司;

控温磁力搅拌器:SZCL-2 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

恒温培养箱:HPX-9052MBE 型,上海博迅实业有限公司。

1.3　方法

1.3.1　pAb 与 mAb 的制备　pAb 为 Ara h 1 免疫新西兰白兔,经纯化血清制备,其效价达 2.56×10^5 以上;mAb 为 Ara h 1 免疫 BLAB/c 小鼠,通过细胞融合筛选阳性杂交瘤细胞株,经体外诱生腹水法制备[18],其效价达 5.12×10^5 以上,亲和常数 Ka 为 2.65×10^8 L/mol,亲和力较高且具有良好的特异性。

1.3.2　双抗体夹心 ELISA 步骤　将 Ara h 1 鼠源 mAb 作为捕获抗体包被酶标板,首先用 CBS 稀释 mAb,100 μL/孔加入酶标板,在 4 ℃条件下过夜包被,用 PBST 洗板 4 次后拍干,再向酶标板加入封闭液 200 μL/孔,在 37 ℃条件下封闭 1 h,洗板(同上)后备用。

检测时首先将样液 100 μL/孔加入酶标板,并设置阴性孔(PBS 100 μL/孔加入),在 37 ℃条件下孵育 1 h 后洗板;将 Ara h 1 兔源 pAb 作为检测抗体,用封闭液稀释 pAb,100 μL/孔加入酶标板,在 37 ℃条件下孵育 30 min 后洗板;用封闭液 1∶5 000 倍稀释 GaRIgG-HRP,100 μL/孔加入酶标板,在 37 ℃条件下孵育 30 min 后洗板;显色液 100 μL/孔加入酶标板,室温反应显色 10 min;最后加入终止液 100 μL/孔终止反应,用酶标仪读取 $OD_{450\ nm}$ 值。

1.3.3　捕获抗体和检测抗体工作浓度的优化　采用棋盘法优化抗体工作浓度[19]。将 mAb 用 CBS 稀释为 1∶5 000,1∶7 500,1∶10 000,1∶12 500 的稀释度,每个稀释度 100 μL/孔包被酶标板两行;第 1 行加入 100 μL/孔确定浓度的 Ara h 1 标准溶液,第 2 行加入 100 μL/孔 PBS 作为阴性对照;孵育、洗板后,将 pAb 用封闭液稀释为 1∶2 000,1∶4 000,1∶6 000,1∶8 000 的稀释度,每个稀释度 100 μL/孔加入酶标板 3 列;孵育、洗板后,加入封闭液稀释的 GaRIgG-HRP 进行孵育,然后显色、终止,并测定 $OD_{450\ nm}$ 值。当所测定的 $OD_{450\ nm}$ 值(P)和阴性对照 $OD_{450\ nm}$ 值(N)的比值(P/N)最大时,其所对应的捕获抗体 mAb 和检测抗体 pAb 的稀释度分别作为最优工作浓度。

1.3.4　双抗体夹心 ELISA 法的特性鉴定

(1) 灵敏度:通过检测限(Limit of detection,LOD)的确定以鉴定方法的灵敏度。用 PBS 配制不同浓度的 Ara h 1 标准溶液,利用优化抗体工作浓度的双抗体夹心

ELISA 法进行检测。以标准溶液浓度的对数值为横坐标,以各标准溶液检测所得 $OD_{450\ nm}$ 值为纵坐标,绘制双抗体夹心 ELISA 法的标准曲线。然后将空白样品进行 20 次重复测定,根据标准曲线回归方程得到对应浓度,计算重复测定结果的平均值(X)和标准差(SD),以 $X+3SD$ 作为检测限[20]。

(2) 特异性:通过交叉反应试验鉴定检测方法的特异性[21]。利用双抗体夹心 ELISA 法分别检测高浓度的其他致敏蛋白(花生致敏蛋白 Ara h 2、大豆球蛋白、卵清蛋白、酪蛋白、牛血清蛋白)。若测定 $OD_{450\ nm}$ 值(P)和阴性对照 $OD_{450\ nm}$ 值(N)的比值 $P/N<2.1$,则说明方法与其他致敏蛋白无交叉反应,特异性良好。

(3) 准确度:通过添加回收试验鉴定方法的准确度[22]。在 5%脱脂奶中添加 Ara h 1,分别配制成 10,100,200 ng/mL 添加浓度的样品,每个浓度的添加样品利用双抗体夹心 ELISA 法重复检测 6 次,通过计算每个添加浓度样品的平均回收率以及变异系数(CV)以鉴定方法的准确度。

(4) 稳定性:在 4 ℃条件下避光密封保存已包被捕获抗体的酶标板,利用双抗体夹心 ELISA 法分别在保存前和保存的第 30,60,90 天检测同一浓度 Ara h 1 标准溶液,通过对比不同保存时间测定同一浓度溶液的 P/N 值的差异,以鉴定方法的稳定性[23]。

2　结果与分析

2.1　捕获抗体和检测抗体最佳工作浓度

用 PBS 配制 100 ng/mL 的 Ara h 1 标准溶液,利用已包被不同稀释度 mAb 的酶标板进行棋盘试验,通过不同稀释度的 pAb 对 Ara h 1 标准溶液及阴性对照进行检测,得到不同抗体稀释度下的各孔 $OD_{450\ nm}$ 值。结果如表 1 所示,当捕获抗体 mAb 以 1∶10 000 的稀释度包被 ELISA 板,检测抗体 pAb 以 1∶8 000 的稀释度作为工作浓度时,计算所得 P/N 值最大,所以捕获抗体 mAb 和检测抗体 pAb 最佳工作浓度分别为 1∶10 000 和 1∶8 000 稀释。

表 1　捕获抗体和检测抗体最佳工作浓度的优化

Table 1　Optimal dilution of capture antibody (mAb) and detection antibody (pAb)

mAb 稀释倍数	pAb 稀释倍数			
	4 000	6 000	8 000	10 000
5 000	11.84	12.77	14.03	13.18
7 500	12.93	14.41	14.57	13.72
10 000	12.75	15.48	16.15	14.53
12 500	10.29	11.45	14.84	13.53

2.2　灵敏度鉴定

配制浓度分别为 2,4,8,16,32,64,128,256,512 ng/mL 的 Ara h 1 标准溶液,经双抗体夹心 ELISA 法检测后,以各标准溶液浓度的对数值为横坐标,以检测所得 $OD_{450\ nm}$ 值为纵坐标,绘制标准曲线如图 1 所示,标准曲线的线性范围为 4～256 ng/mL,线性回归方程为 $y=1.145\ 7x-0.587\ 5$,$R^2=0.991\ 1$。重复测定空白样品 20 次,将测定所得 $OD_{450\ nm}$ 值代入线性回归方程求得测定浓度,计算平均值(X)+3×标准差(SD),得到方法检测限为 4.16 ng/mL,表明所建立的双抗体夹心 ELISA 法具有良好的灵敏度。

2.3　特异性鉴定

利用双抗体夹心 ELISA 法分别检测浓度为 500 ng/mL 的花生致敏蛋白 Ara h 2、大豆球蛋白、卵清蛋白、酪蛋白和牛血清蛋白。所得测定 $OD_{450\ nm}$ 值(P)和阴性对照 $OD_{450\ nm}$ 值(N)结果如表 2 所示,P/N 值均<2.1,表明双抗体夹心 ELISA 法与其他常见致敏蛋白无交叉反应。由于方法建立所使用的捕获抗体为特异性良好的鼠源 mAb,因此能够对单一致敏蛋白识别捕获,使检测方法显示出良好的特异性。

2.4　准确度鉴定

将 Ara h 1 添加至 5%脱脂奶中,分别配制成 10,100,200 ng/mL 3 个添加浓度的样品,通过利用双抗体夹心 ELISA 法重复检测 6 次,计算每个添加浓度样品的平均回收率及 CV,结果如表 3 所示,平均回收率为85.9%～

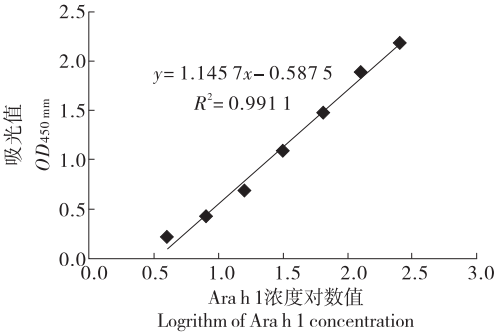


图 1　双抗体夹心 ELISA 法标准曲线

Figure 1　Standard curve of double antibody sandwich ELISA

表 2　双抗体夹心 ELISA 法特异性鉴定结果

Table 2　Specificity identification results of double antibody sandwich ELISA

致敏蛋白	P	N	P/N
Ara h 2	0.207	0.112	1.85
大豆球蛋白	0.183	0.095	1.93
卵清蛋白	0.162	0.110	1.47
酪蛋白	0.172	0.099	1.74
牛血清蛋白	0.149	0.106	1.41

表 3　双抗体夹心 ELISA 法准确度鉴定结果

Table 3　Accuracy identification results of double antibody sandwich ELISA

添加量/(ng·mL^{-1})	测定值/(ng·mL^{-1})	回收率/%	*CV*/%
10	8.59±0.52	85.9	6.1
100	91.69±7.44	91.7	8.1
200	188.97±16.46	94.5	8.7

94.5%，*CV* 为 6.1%～8.7%，表明检测方法具有较高的准确度。

2.5　稳定性鉴定

将已包被捕获抗体的酶标板在 4 ℃条件下避光密封保存，分别在保存的不同时间利用双抗体夹心 ELISA 法检测 100 ng/mL 的 Ara h 1 标准溶液，结果如表 4 所示，不同保存时间测定所得的 P/N 值均无明显变化，说明 4 ℃ 避光密封保存条件下，酶标板至少可稳定保存 90 d，表明方法的稳定性良好。

表 4　双抗体夹心 ELISA 法稳定性鉴定结果

Table 4　Stability identification results of double antibody sandwich ELISA

保存时间/d	*P*	*N*	*P*/*N*
0	1.704	0.106	16.08
30	1.719	0.110	15.63
60	1.691	0.107	15.80
90	1.655	0.105	15.76

3　结论

试验依据双抗体夹心检测原理，利用 Ara h 1 鼠源 mAb 作为捕获抗体，Ara h 1 兔源 pAb 作为检测抗体，通过棋盘法优化抗体工作浓度，建立 Ara h 1 的双抗体夹心 ELISA 法。通过对方法检测特性进行鉴定，其检测限为 4.16 ng/mL，具有较高的灵敏度；交叉反应试验表明与其他致敏蛋白无交叉，特异性强；添加回收试验平均回收率为 85.9%～94.5%，具有较高的准确度；且在 4 ℃条件下避光密封保存 90 d 内检测结果稳定；能够对快速灵敏、准确特异的对花生致敏蛋白 Ara h 1 进行检测。与已有的一些基于多抗研制的商品化 ELISA 试剂盒相比[24]，试验方法通过 mAb 提高对于单一致敏蛋白的高亲和力特异性捕获能力，再以 pAb 作为夹心检测抗体，进一步增强对致敏蛋白的高效识别，在检测特异性和灵敏度上表现出了一定优势。能够用于食品标签中致敏物质标示信息的快速筛查，提升花生过敏患者的饮食安全性。

参考文献

[1] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(1): 41-58.

[2] SATHE S K, LIU Chang-qi, ZAFFRAN V D. Food allergy[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2016, 7(1): 191-220.

[3] 何强. 天然食品原料中的过敏原及其控制方法研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 253-256.

[4] JOHNSON P E, SAYERS R L, GETHINGS L A, et al. Quantitative proteomic profiling of peanut allergens in food ingredients used for oral food challenges[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(11): 5 689-5 695.

[5] 郭颖希, 王满生, 成军虎, 等. 非热加工技术消减食物过敏原研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 219-223.

[6] FILEP S, BLOCK D S, SMITH B R E, et al. Specific allergen profiles of peanut foods and diagnostic or therapeutic allergenic products[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(2): 626-631.

[7] 吴序栎, 肖杰, 刘志刚, 等. 花生主要过敏原 Ara h1 的纯化[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 12-15.

[8] PETERSEN A, KULL S, RENNERT S, et al. Peanut defensins: Novel allergens isolated from lipophilic peanut extract[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2015, 136(5): 1 295-1 301.

[9] 蔡琴, 张文举, 陈沁. 含扩增内标的花生过敏原 PCR 检测方法[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 63-66.

[10] LÓPEZ-CALLEJA I M, DE LA CRUZ S, PEGELS N, et al. Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods[J]. Food Control, 2013, 30(2): 480-490.

[11] MONTSERRAT M, SANZ D, JUAN T, et al. Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergens in processed foods by immunoassay: Influence of selected target protein and ELISA format applied[J]. Food Control, 2015, 54(3): 300-307.

[12] 邵景东, 孙秀兰, 张银志, 等. 酶联免疫吸附分析法检测花生过敏原的研究[J]. 分析科学学报, 2011, 27(1): 89-92.

[13] SAYERS R L, JOHNSON P E, MARSH J T, et al. The effect of thermal processing on the behaviour of peanut allergen peptide targets used in multiple reaction monitoring mass spectrometry experiments[J]. Analyst, 2016, 141(13): 4 130-4 141.

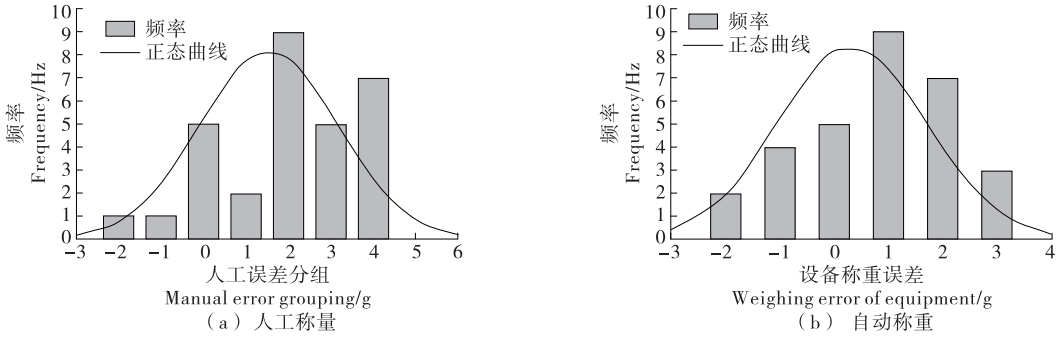
[14] 周红菲, 吴志华, 陈红兵. 质谱技术在食物过敏原检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1 757-1 762.

[15] 陈红兵. 食物过敏原检测技术的新动态[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1 743-1 744.

[16] POMS R E, KLEIN C L, ANKLAM E. Methods for allergen analysis in food: A review[J]. Food Additives and Contaminants, 2004, 21(1): 1-31.

[17] HEI Wen-jing, LI Zhen, MA Xi, et al. Determination of β-conglycinin in soybean and soybean products using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 734: 62-68.

（下转第 113 页）



（a）人工称量　　（b） 自动称重

图 8　正态分布曲线

Figure 8　Normal distribution curve

分布越集中在 μ 附近，σ 越大，概率分布越分散。将试验曲线转换成标准正态函数，当取称重误差值范围为±3 g 时，查表得人工称重满足要求的概率约为 79%，使用设备自动称重时满足的概率约为 96.7%。因此，该设备称重精度和可靠性高于人工方式。

5　结论

设计了适用于食品行业中饼干配料过程的自动化设备，该设备采用 PLC 作为控制核心，对螺旋供料和称重过程采用闭环控制，对供料电机进行分级调速，并且增加了空中物料补偿修正，提高了设备称量精度。根据试验对比数据，设备准确性、可靠性高于人工称重方式。该设备也适用于其他食品、化工、制药等对精确称重和自动配料有需求的企业，具备推广价值。后续将开展对设备的模块化、参数化设计，方便设备成组使用。

参考文献

[1] 田智慧，张永胜，王国平. 自动称量配料控制系统设计[J]. 包装工程，2019，40(1)：140-144.

[2] 赵国军，李忠虎，张祥. 粉状稀土原料定量称重包装控制系统的设计[J]. 仪表技术与传感器，2016(4)：46-53.

[3] 贾丽娜，张辉，陈文庆. 颗粒状物料自动称量机研究[J]. 机电工程，2012，29(1)：46-48.

[4] 杨健，王艳芳，豆昌军. 基于 Ansys Workbench 的特殊高速绞龙螺旋设计[J]. 包装工程，2017，38(15)：126-131.

[5] 韩慧，倪荣军，孙计赞. 基于 PLC 食品检测实验室自动加液装置的设计与实现[J]. 食品与机械，2014，30(1)：130-132.

[6] 周建民，周其显，徐冬冬，等. 基于 PLC、HMI 和伺服技术的粉末针剂分装控制系统[J]. 仪表技术与传感器，2010(2)：103-105.

[7] 刘宝廷. 步进电动机及其驱动控制系统[M]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学出版社，1997：217-261.

[8] 张建新，李磊. 移动式数控火焰切割机料架研制[J]. 制造技术与机床，2016，12(5)：149-152.

[9] 钱振华，王荣扬，左希庆. 基于 HMI 和 PLC 的食品包装箱码垛机控制系统设计[J]. 食品与机械，2016，32(10)：105-108.

[10] 苏俊明，李振亮，李亚，等. 称重式包装机两级给料最优切换点的确定方法[J]. 食品与机械，2015，31(1)：99-103.

[11] 陈锐鸿. 在线动态称重系统开发及质量采集算法研究[J]. 食品与机械，2019，35(3)：94-98.

[12] 温国强，胡顺堂，陈宽，等. 提高自动化生产线实训台异步电机定位精度自适应控制方法研究[J]. 实验技术与管理，2019，36(9)：145-148.

[13] 辛秀东. 正态分布统计技术在线缆质量控制中的应用[J]. 电线电缆，2005(5)：35-39.

（上接第 62 页）

[18] ZHANG Gai-ping, WANG Xuan-nian, YANG Ji-fei, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β-adrenergic agonist Clenbuterol residues[J]. Journal of Immunological Methods, 2006, 312(1/2): 27-33.

[19] PENG Juan, SONG Shan-shan, LIU Li-qiang, et al. Development of sandwich ELISA and immunochromatographic strip for the detection of peanut allergen Ara h 2[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(10): 2 605-2 611.

[20] 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.

[21] XU Li-guang, SONG Yue-hong, LIU Li-qiang, et al. Sandwich ELISA and immunochromatographic strip of Kunitz trypsin inhibitor using sensitive monoclonal antibodies[J]. Food and Agricultural Immunology, 2016, 27(6): 772-782.

[22] WANG Yao, LI Yan-hong, WU Jia-bei, et al. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of soybean Bowman-Birk inhibitor[J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 1 202-1 211.

[23] 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，2015：56.

[24] 梁文文. 食物过敏原研究进展及我国应如何应对[J]. 食品安全导刊，2018(19)：36-41.