

大豆 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子单克隆抗体的制备与鉴定

Preparation and identification of the monoclonal antibody of Kunitz trypsin inhibitor from soybean

王 耀^{1,2} 李燕虹^{1,2} 曹金博^{1,2} 孙亚宁²

WANG Yao^{1,2} LI Yan-hong^{1,2} CAO Jin-bo^{1,2} SUN Ya-ning²

邢云瑞² 陈秀金¹ 邓瑞广² 胡晓飞²

XING Yun-rui² CHEN Xiu-jin¹ DENG Rui-guang² HU Xiao-fei²

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023;

2. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China)

摘要:为制备免疫学特性良好的大豆 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子(Kunitz trypsin inhibitor, KTI)单克隆抗体,以 50 μg /只的免疫剂量将 KTI 免疫 BALB/c 小鼠,利用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 鉴定多抗血清效价和敏感性,选择血清效价和敏感性较优的小鼠进行细胞融合,多次筛选得到稳定分泌 KTI 单克隆抗体(Monoclonal antibody, mAb)的杂交瘤细胞株,采用体内诱生腹水法制备 mAb 并对其免疫学特性进行鉴定。结果表明,1 号小鼠经免疫后效价最高且敏感性最好,半数抑制浓度(IC_{50})为 157.33 ng/mL,经细胞融合筛选得到 4E6-E9 阳性杂交瘤细胞株,所制备的抗体效价达到 1 : 1 638 400,亚型为 IgG1 型,亲和常数为 1.45×10^8 L/mol, IC_{50} 为 28.39 ng/mL,且特异性强。说明试验所制备的 mAb 免疫学特性良好,能够为建立灵敏、特异的 KTI 免疫学检测方法提供良好的抗体保障。

关键词: Kunitz 胰蛋白酶抑制因子;单克隆抗体;免疫学

基金项目:国家自然科学基金(编号:31702218);河南省自然科学基金(编号:182300410038);河南省科技攻关项目(编号:182102110445,182102310230);河南省高等学校重点科研项目(编号:18B550001);河南省动物免疫学重点实验室开放课题(编号:PKLAI20170603);河南科技大学大学生研究训练计划项目(编号:2018155)

作者简介:王耀,男,河南科技大学讲师,博士。

通信作者:胡晓飞(1972—),男,河南省农业科学院研究员,博士。

E-mail: huxf1972@126.com

收稿日期:2019-04-20

特性

Abstract: To prepare monoclonal antibodies against soybean Kunitz trypsin inhibitor (KTI) with good immunological characteristics, BALB/c mice were used to immunize with 50 μg of KTI, the antiserum titer and sensitivity were identified via indirect ELISA and indirect competitive ELISA. The mice which serum has better titer and sensitivity were selected for cell fusing, then the hybridoma cell strain which stabilization secreted KTI monoclonal antibody (mAb) were screened. Thereafter, mAb was prepared by inducing ascites in vivo and identified the immunological characteristics. The result indicated that the NO.1 mouse was confirmed to produce the antibody with the highest titer, IC_{50} was 157.33 ng/mL. After cell fusing, 4E6-E9 positive hybrid tumor cell lines were obtained, and the 4E6-E9 mAb titer was above 1 : 1 638 400, of which subtype was IgG1, with affinity constant 1.45×10^8 L/mol, IC_{50} 28.39 ng/mL, and high specificity. Our results demonstrated the mAb had good immunological characteristics, and could provide a good antibody basis for the sensitivity and specificity immunological detection of KTI.

Keywords: Kunitz trypsin inhibitor; monoclonal antibody; immunological characteristics

大豆含有丰富的蛋白质和油脂资源,是重要的食品和饲料加工原料,但其也含有多种抗营养因子和致敏蛋白^[1],这些物质可能诱发过敏反应,降低大豆营养价值,影响大豆利用率^[2]。大豆胰蛋白酶抑制因子(Soybean

trypsin inhibitor, STI) 是其中重要的一种, 主要包括 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子(Kunitz trypsin inhibitor, KTI) 和 Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制因子(Bowman-Birk trypsin inhibitor, BBI) 两种类型, 分别约占大豆蛋白总量的 1.4%, 0.6%^[3]。STI 虽已被证明具有抗癌和抗炎生物活性^[4], 在医药领域具有潜在应用价值^[5], 但其也可抑制机体胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性, 导致消化不良, 阻碍生长发育^[6]。因此建立特异、高效的检测方法来监测大豆及其制品中 STI 的含量显得尤为重要。

目前, 胰蛋白酶抑制因子多采用脲酶检测法、酶化学分析法进行检测, 但是这些检测方法的灵敏度、特异性和稳定性较差^[7]。近年来, 利用特异性抗体建立起来的酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)能够准确、灵敏地检测 STI 含量, 已成为 STI 快速检测方法研究的主要趋势^[8]。张国龙等^[9]利用兔源多克隆抗体建立了可用于大豆和大豆制品中 KTI 定量检测的直接竞争 ELISA 方法; 邢春芳等^[10]也利用兔源多克隆抗体建立了 STI 的间接竞争 ELISA 检测方法, 能够代替酶化学分析法用于豆粕及豆制品中胰蛋白酶抑制因子的检测。而单克隆抗体(Monoclonal antibody, mAb)相对于多克隆抗体具有均一性和特异性强等优势, 更有利于建立灵敏、特异的 ELISA 方法。目前已有相关研究^[11-12]利用 mAb 建立了用于 KTI 定量分析的 ELISA 检测方法, 但缺乏对抗体免疫学特性的鉴定与描述。试验拟通过动物免疫和细胞融合, 筛选稳定分泌 KTI mAb 的杂交瘤细胞株, 并对所制备抗体的效价、亚型、敏感性、亲和力、特异性等免疫学特性进行鉴定, 旨在为建立 KTI 的 ELISA 检测方法及其他免疫学检测方法提供可靠的抗体保障, 为大豆及其制品中 KTI 的高效监测提供有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂溶液

弗氏佐剂(Freund's complete/incomplete adjuvant, FCA/FIA), KTI、BBI、大豆凝集素(Soybean agglutinin, SBA)、大豆球蛋白(Glycinin)、 β -伴大豆球蛋白(β -conglycinin)等标准品, 鼠源 mAb 分型试剂; 美国 Sigma-Aldrich 公司;

胎牛血清、选择性培养基(HAT、HT)、不完全培养基(RPMI-1640)等细胞培养试剂, SDS-PAGE 蛋白 Marker, 酶标羊抗鼠 IgG 抗体(GaMIgG-HRP), NC 膜等试验材料; 索莱宝生物科技公司;

ELISA 所用包被液(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)、封闭液(含 5% 脱脂奶的 PBST 溶液)、显色液(TMB 磷酸-柠檬酸缓冲液)、终止液包被液(2 mol/L H_2SO_4 溶液)等溶液;

实验室配置;

其他试剂均为市售分析级试剂。

1.2 主要仪器

电子天平: ME204E 型, 德国 Mettler Toledo 公司;

CO₂ 培养箱: INCO153 型, 德国 Memmert 公司;

倒置生物显微镜: DMI3000 型, 德国 Leica 公司;

生物洁净工作台: BCM-1000A 型, 苏净安泰有限公司;

酶标仪: iMark450/550 型, 美国 Bio-Rad 公司;

蛋白凝胶电泳系统: Mini-PROTEAN 型, 美国 Bio-Rad 公司;

转膜系统: Trans-Blot 型, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 试验动物及骨髓瘤细胞

免疫动物为 6~8 周龄无特定病原体(SPF)级雌性 BALB/c 小鼠, 液体石蜡预处理的 SPF 级 BALB/c 小鼠用于腹水制备。骨髓瘤细胞为小鼠 NS0 骨髓瘤细胞。

1.4 小鼠免疫及多抗血清鉴定

首次免疫, 将 KTI 与等量 FCA 混合, 取 3 只小鼠以 50 μ g/(200 μ L·只)的剂量背部皮下多点注射。此后每隔 3 周加强免疫 1 次, 免疫剂量和方式与首次免疫相同。共进行 4 次免疫, 免疫结束 3 周后, 对小鼠断尾采血, 获得多抗血清。

多抗血清效价采用间接 ELISA 进行测定^[13], 首先在已包被抗原的酶标板中加入倍比稀释的抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 洗板后加入 GaMIgG-HRP, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 洗板后加入显色液, 10 min 后终止显色并读取 OD_{450 nm} 值, 以测定 OD_{450 nm} 的 P/N 值 ≥ 2.1 判定多抗血清效价(P 为阳性孔 OD_{450 nm} 值, N 为阴性孔 OD_{450 nm} 值)。

多抗血清敏感性采用间接竞争 ELISA 进行鉴定^[13], 首先向酶标板中加入效价测定中 OD_{450 nm} 值为 1.0 左右的血清稀释液和具有梯度抗原标准溶液(作为酶标板上已包被抗原的竞争物), 余下步骤按上述效价测定步骤进行。待酶标仪读取 OD_{450 nm} 值之后, 求出抑制率 B/B_0 , 其中 B_0 为抗原浓度为 0 时的 OD_{450 nm} 值, B 为抗原不同标准浓度所对应的 OD_{450 nm} 值。然后将抗原浓度对数值和抑制率分别作为横、纵坐标绘制抑制曲线, 根据曲线线性回归方程计算半数抑制浓度 IC₅₀ 衡量多抗血清敏感性。

1.5 细胞融合与筛选

复苏 NS0 瘤细胞, 选取生长状态良好的瘤细胞进行扩大培养准备融合。取多抗血清效价高、敏感性好的小鼠进行腹腔注射超免, 剂量仍为 50 μ g/(200 μ L·只), 但不加佐剂, 超免 3 d 后, 取小鼠脾脏分离脾细胞与 NS0 细胞进行融合^[14]³⁴, 将细胞悬液铺于细胞培养板并进行培养, 7 d 后用 HT 培养基半量换液, 并密切观察细胞生长情况, 10 d 左右抽取细胞培养上清液, 同样采用间接

ELISA 和间接竞争 ELISA 进行筛选,挑选效价高、敏感性好、生长旺盛的细胞采用有限稀释法进行亚克隆^[15],反复筛选直至建立稳定分泌 KTI mAb 的阳性杂交瘤细胞株。

1.6 KTI mAb 的大量制备及免疫学特性鉴定

扩大培养已筛选的阳性杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞(约 10⁶ 个)腹腔注射经液体石蜡预处理的 BLAB/c 小鼠。待小鼠腹部明显肿胀时便可用无菌注射器采集腹水,将腹水以 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液采用饱和硫酸铵盐析法纯化^[14]²²,并用 PBS 透析 3 d 得到 KTI mAb。

抗体免疫学特性鉴定包括效价、亚型、亲和常数、敏感性和特异性 5 个方面。效价和敏感性鉴定方法同 1.3 中多抗血清效价测定和敏感性的鉴定。

亚型通过鼠源 mAb 分型试剂进行鉴定,利用间接 ELISA 原理将 mAb 稀释包被酶标板,然后加入 IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM 分型试剂,最终根据 OD_{450 nm} 值判断 mAb 亚型。

亲和常数 (Affinity constant, Ka) 根据饱和 ELISA 法^[16],在不同浓度抗原包被情况下,测定抗体半饱和浓度,按式(1)计算。

$$Ka = (n - 1) / 2(n[Ab']_t - [Ab]_t), \tag{1}$$

表 1 多抗血清效价的间接 ELISA 测定结果

Table 1 Titer of mouse antiserum detected by indirect ELISA (OD_{450 nm})

编号	稀释倍数							阴性	空白
	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800		
1	2.601	2.173	2.502	1.734	1.644	1.542	0.929	0.060	0.052
2	2.239	1.966	1.752	1.458	1.366	0.860	0.590	0.051	0.063
3	2.512	1.816	1.525	1.334	1.070	0.878	0.537	0.064	0.049

通过间接竞争 ELISA 鉴定各小鼠多抗血清的敏感性,其中 1 号小鼠多抗血清敏感性最好,间接竞争 ELISA 抑制曲线如图 1 所示,KTI 对 1 号小鼠多抗血清产生了明显的抑制效果,将抑制率 B/B₀作为纵坐标,KTI 浓度对数值作为横坐标绘制抑制曲线,得到线性方程,计算抑制率 B/B₀为 0.5 时的多抗血清的 IC₅₀为 157.33 ng/mL。

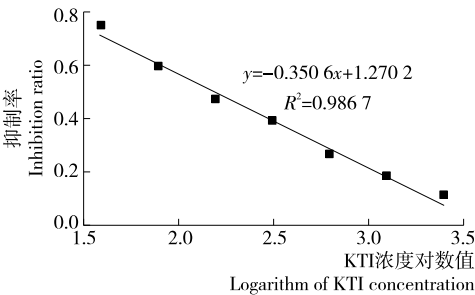


图 1 KTI 对多抗血清的抑制曲线

Figure 1 Inhibitive curve for antiserum to KTI

式中:

Ka——亲和常数,L/mol;

n——不同包被浓度的比值;

[Ab]_t、[Ab']_t——不同包被浓度下抗体半饱和浓度,mol/L。

特异性通过测定交叉反应率和免疫印迹试验进行鉴定,交叉反应率通过间接竞争 ELISA 测定大豆中其他抗营养因子和致敏蛋白竞争物(大豆球蛋白、β-伴大豆球蛋白、SBA、BBD)的 IC₅₀进行计算(交叉反应率 CR=KTI 的 IC₅₀/其他竞争物的 IC₅₀)^[17];免疫印迹试验首先将上述交叉反应竞争物与 KTI 以同一浓度进行 SDS-PAGE,试验时在同一凝胶上做一重复,一半用于考马斯亮蓝染色并脱色观察,另一半进行转膜后,加入抗体 37 ℃ 条件下孵育 2 h,经过 PBST 洗涤,再与 GaMIgG-HRP 孵育 2 h,经 PBST 洗涤后 ECL 荧光显色液显色,将显色结果与 SDS-PAGE 结果进行对照,判断 KTI mAb 的特异性^[18]。

2 结果与分析

2.1 小鼠多抗血清的鉴定

间接 ELISA 方法测定多抗血清的效价结果(见表 1)表明,3 只小鼠免疫效果良好,效价均能达到 1:12 800 以上,其中 1 号小鼠免疫效果最为显著。

2.2 KTI mAb 的制备

根据免疫小鼠多抗血清效价及敏感性鉴定结果选择 1 号小鼠进行细胞融合,初次筛选 96 孔细胞板中强阳性细胞株,然后转入 24 孔细胞板中扩大培养后复筛,挑选强阳性细胞株,将阳性细胞株进行亚克隆,最终筛选到 1 株效价高、敏感性好的杂交瘤细胞,命名为 4E6-E9,经过多次冻存与复苏后,仍能够稳定分泌抗体。通过小鼠体内诱生腹水法得到 4E6-E9 腹水,纯化后用于鉴定抗体的免疫学特性。

2.3 KTI mAb 效价的测定

通过间接 ELISA 测定 4E6-E9 mAb 的效价结果如表 2 所示,3 次平行重复测定 4E6-E9 mAb 效价 OD_{450 nm} 值较为稳定,效价能够达到 1:1 638 400,相对于小鼠多抗血清有显著提高,且高于张国龙等^[9]制备的兔源多抗血清效价(1:128 000)。

表 2 4E6-E9 mAb 效价测定

Table 2 Determination of the titer of 4E6-E9 mAb ($OD_{450\text{ nm}}$)

稀释倍数									阴性	空白
6 400	12 800	25 600	51 200	102 400	204 800	409 600	819 200	1 638 400		
2.728	2.251	1.699	1.080	0.645	0.432	0.269	0.203	0.147	0.066	0.053
2.685	2.340	1.650	1.114	0.754	0.463	0.250	0.218	0.152	0.072	0.041
2.650	2.373	1.763	1.103	0.667	0.471	0.278	0.190	0.143	0.067	0.058

2.4 KTI mAb 亚型的鉴定

采用 mAb 分型试剂通过间接 ELISA 方法对 4E6-E9 mAb 亚型进行鉴定,结果如图 2 所示,根据分型试剂与 4E6-E9 mAb 结合的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值判断获得抗体亚型,结果 IgG1 分型试剂对应的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值最高,且其他分型试剂对应的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值均较小,说明所制备的 4E6-E9 mAb 亚型为 IgG1 型。

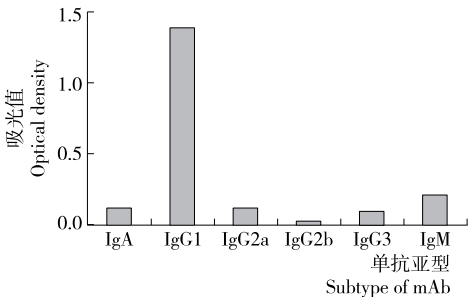


图 2 4E6-E9 mAb 亚型鉴定

Figure 2 Identification of subtype of 4E6-E9 mAb

2.5 KTI mAb 亲和常数的测定

将 KTI 以 5,1 $\mu\text{g/mL}$ 两个浓度分别包被 ELISA 酶标板,通过 ELISA 饱和法绘制的亲和常数测定曲线如图 3 所示,5 $\mu\text{g/mL}$ 包被时,4E6-E9 mAb 与 KTI 结合达到半饱和状态的浓度为 794.18 ng/mL ;1 $\mu\text{g/mL}$ 包被时,4E6-E9 mAb 与 KTI 结合达到半饱和状态的浓度为 600.96 ng/mL 。根据公式计算可得 $Ka = 1.45 \times 10^8 \text{ L/mol}$,通常 $Ka > 10^7 \text{ L/mol}$ 即为高亲和力抗体^[19]。

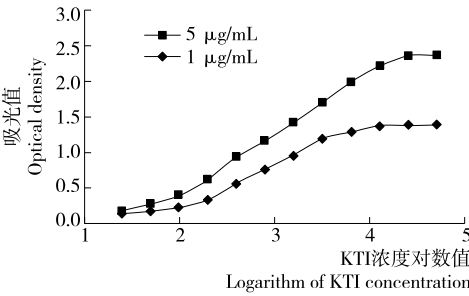


图 3 4E6-E9 mAb 亲和常数测定曲线

Figure 3 Affinity constant measurement curve of 4E6-E9 mAb

因此试验所制备的 4E6-E9 mAb 具有较高的亲和力。

2.6 KTI mAb 敏感性的鉴定

间接竞争 ELISA 抑制曲线如图 4 所示。由抑制曲线的线性回归方程可以计算得到 4E6-E9 mAb 的 IC_{50} 为 28.39 ng/mL ,相对于小鼠多抗血清,敏感性有了显著提升。邢春芳等^[10]制备兔源多抗血清所建立的 ELISA 方法的 IC_{50} 为 360 ng/mL ,与其相比,试验所制备的 4E6-E9 mAb 具有较低的 IC_{50} ,说明单抗的敏感性高于多抗敏感性,更有利于 ELISA 检测方法的建立。

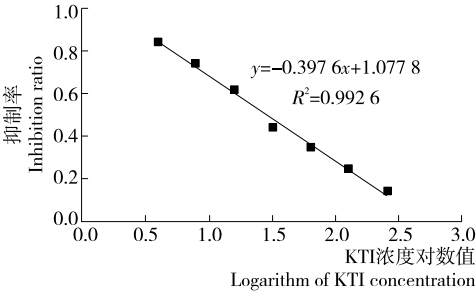


图 4 KTI 对 4E6-E9 mAb 的抑制曲线

Figure 4 Inhibitive curve for 4E6-E9 mAb to KTI

2.7 KTI mAb 特异性的鉴定

由表 3 可知,4E6-E9 mAb 与大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、BBI、SBA 的交叉反应率 $> 0.3\%$,表明 4 种竞争物与 4E6-E9 mAb 之间基本没有交叉反应。

将 4 种竞争物与 KTI 进行 SDS-PAGE,同一凝胶上做一重复,将所做重复进行免疫印迹试验。4E6-E9 mAb 特异性鉴定结果如图 5 所示,对比结果表明 4E6-E9 mAb 仅与第 6 泳道 KTI 蛋白结合,表明试验所制备的 4E6-E9 mAb 具有较强的特异性。

表 3 4E6-E9 mAb 的交叉反应结果

Table 3 The cross-reactivity of 4E6-E9 mAb

竞争物	$IC_{50}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	交叉反应率/%
大豆球蛋白	$>1.0 \times 10^4$	<0.3
β -伴大豆球蛋白	$>1.0 \times 10^4$	<0.3
BBI	$>1.0 \times 10^4$	<0.3
SBA	$>1.0 \times 10^4$	<0.3

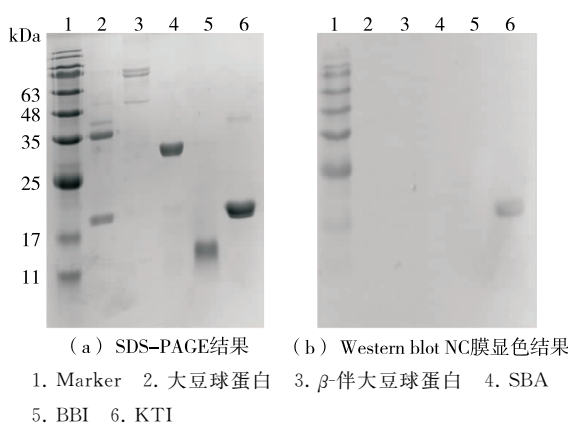


图5 4E6-E9 mAb 特异性的免疫印迹试验鉴定结果

Figure 5 Western blot identification result of 4E6-E9 mAb specificity

3 结论

试验在免疫 BALB/c 小鼠, 获得效价和敏感性良好的多抗血清基础上, 进行细胞融合, 筛选阳性杂交瘤细胞株, 得到稳定分泌 KTI mAb 的 4E6-E9 杂交瘤细胞株。通过体内诱生腹水法制备 4E6-E9 mAb, 并对抗体免疫学特性进行充分鉴定, 其效价达到 $1:1\ 638\ 400$, 亚型为 IgG1 型, 亲和常数为 1.45×10^8 L/mol, IC_{50} 为 28.39 ng/mL, 且只与 KTI 特异性结合, 与其他抗营养因子和致敏蛋白结合无交叉反应。试验制备的 KTI mAb 具备良好的免疫学特性, 可用于灵敏、特异的大豆及其制品中 KTI 免疫学检测方法的建立, 但在具体免疫学检测方法研究中, 仍需对其应用条件和方式进行进一步探索, 若将其与功能性纳米材料及高通量传感技术相结合, 开发新型快速检测方法, 将会为饲料中抗营养因子以及食品中大豆致敏蛋白的高效监测提供有力技术支撑。

参考文献

[1] 杨玉娟, 姚怡莎, 秦玉昌, 等. 豆粕与发酵豆粕中主要抗营养因子调查分析[J]. 中国农业科学, 2016, 49(3): 573-580.

[2] 姚怡莎, 谷旭, 商方方, 等. 大豆和膨化大豆主要抗营养因子分析[J]. 中国农业科学, 2016, 49(11): 2174-2182.

[3] BIRK Y. The Bowman-Birk inhibitor: Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans [J]. Chemical Biology & Drug Design, 1985, 25(2): 113-131.

[4] KOBAYASHI H. Prevention of cancer and inflammation by soybean protease inhibitors [J]. Frontiers in Bioscience, 2013, 5: 966-973.

[5] 程芬芬, 刘春, 杨晓泉. 大豆胰蛋白酶抑制剂的制备及性质[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 37-44.

[6] LIU Chun, LUO Li-juan, WU Ying, et al. Inactivation of soybean Bowman-Birk inhibitor by stevioside: Interaction studies and application to soymilk[J]. Journal of Agricultural

and Food Chemistry, 2019, 67(8): 2255-2264.

[7] 孙喆, 赵元, 贺承光, 等. 大豆主要抗营养因子检测方法的研究进展[J]. 中国石油和化工标准与质量, 2012, 32(1): 15-16.

[8] 周天骄, 譙仕彦, 马曦, 等. 大豆饲料产品中主要抗营养因子含量的检测与分析[J]. 动物营养学报, 2015, 27(1): 221-229.

[9] 张国龙, 李德发. 大豆胰蛋白酶抑制因子酶联免疫吸附测定方法的研究[J]. 动物营养学报, 1997, 9(1): 12-20.

[10] 邢春芳, 葛向阳. 豆粕中胰蛋白酶抑制剂间接竞争酶联免疫吸附检测方法的研究[J]. 饲料工业, 2010, 31(10): 58-60.

[11] 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.

[12] BRANDON D L, BATES A H, FRIEDMAN M. Immunoassays for bowman-birk and kunitz soybean trypsin inhibitors in infant formula[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(1): 11-15.

[13] WANG Yao, DENG Rui-guang, ZHANG Gai-ping, et al. Rapid and sensitive detection of the food allergen glycinin in powdered milk using a lateral flow colloidal gold immunoassay strip test[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(8): 2172-2178.

[14] 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.

[15] 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.

[16] BEATTY J D, BEATTY B G, VLAHOS W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. Journal of Immunological Methods, 1987, 100(1/2): 173-179.

[17] SHELVER W L, SMITH D J. Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine[J]. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2000, 21(1): 1-23.

[18] WANG Yao, LI Zhao-zhou, PEI Ya-feng, et al. Establishment of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of soybean allergen β -conglycinin[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(7): 2429-2435.

[19] GODING J W. Monoclonal antibodies: Principles and practice[M]. London: Academic Press, 1996: 142-147.