牛奶过敏原 β-乳球蛋白抗体的制备及免疫检测方法的建立

李亚璞[1]，麻云莲[1]，樊丹[2]，张小兵[1]

（1.河北省科学院生物研究所，河北石家庄 050081）（2.河北工业大学化工学院，天津 300132）

摘要：本文将牛奶过敏原 β-乳球蛋白抗原分别免疫新西兰大白兔和 BALB/c 小鼠制备其多克隆抗体和单克隆抗体，并对所获得的抗体进行了效价等特性测定；采用蛋白 A 亲和层析法将多克隆抗体进行了纯化，采用辛酸-硫酸铵法对单抗细胞株 3A7 进行了纯化；实验建立了双抗体夹心的 ELISA 检测方法，并对一些蛋白样品进行了初步的检测。实验结果表明，所制备的抗 β-乳球蛋白兔多克隆抗体效价达到了 1:6.56×10^6；Western-blotting 鉴定结果显示所制备的多克隆抗体能够与 β-乳球蛋白特异性反应；3 株单抗的效价均在 10^6 以上，纯化后多抗仅与酪蛋白有一定的交叉反应，而纯化后单抗与乳中主要蛋白及其它过敏原蛋白基本没有交叉反应，特异性很好；利用所建立的方法对一些蛋白样品进行检测，准确率 100%。

关键词：β-乳球蛋白；酶联免疫吸附法；多克隆抗体；单克隆抗体

文章篇号：1673-9078(2018)10-225-230 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.030

Preparation of Antibodies and Preliminary Establishment of Immunoassay Method against Allergen β-Lactoglobulin from Milk

LI Ya-pu[1], MA Yun-lian[1], FAN Dan[2], ZHANG Xiao-bing[1]

(1.Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050081, China)

(2.Institute of Chemical Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300132, China)

Abstract: The β-lactoglobulin antigen was used with injection to immunonize the New Zealand white rabbit and the BALB/c mice so as to get the rabbit polyclonal antibody serum (PcAb) and the monoclonal antibody (McAb), and the titers of antibodies were analyzed; The polyclonal antibody was purified by protein A affinity chromatography and the 3A7 monoclonal antibody was purified by Caprylic acid precipitation. The experiment was operated by the double-antibody sandwich procedure and some samples were detected. The results showed that the titer of polyclonal antibody was over 1:6.56×10^6, and the polyclonal antibody serum could bind to β-lactoglobulin specifically, and its specificity was low reactivity with casein. The titers of the three strains of monoclonal antibodies were above 10^6 and the 3A7 monoclonal antibody had almost no cross reactivities with other proteins in milk and other allergen proteins. The accuracy was 100% for the detection of samples.

Key words: β-lactoglobulin; ELISA; polyclonal antibody; monoclonal antibody

近年来食品过敏性疾病的发病率呈持续快速上升的趋势，食品过敏原的种类和来源急剧增加，与食品过敏直接相关的过敏疾病亦趋于多样化、复杂化的趋势[1]，食物过敏问题被认为是一个不容忽视的食品安全问题[2]。常见的食物过敏反应主要由八大类食物引起，包括牛奶、大豆、蛋类、花生、坚果、小麦、鱼虾和水生贝壳类动物，美国和欧盟已先后颁布了新的食品标签法规，要求八大类过敏食品都应在食品标签中明确标示[3,4]。牛奶过敏是其中最重要的一个方面，牛奶过敏极大地影响了婴幼儿的身体健康，可以引起婴幼儿腹泻、皮疹、发育不良，严重时可引起过敏性休克等。

导致牛奶过敏的蛋白质主要有酪蛋白（CN）、β-乳球蛋白(β-Lg)、α-乳白蛋白（α-La）等，其中 β-Lg 被认为是其中重要的致敏蛋白质之一[5]。β-Lg 是牛乳中主要的蛋白质，在乳清蛋白中总含量达 50%，占牛乳总蛋白的 10%，它是由乳腺上皮细胞合成的牛乳特有蛋白，β-Lg 单体的分子质量大约为 18.3 ku，含有 162 个氨基酸残基，等电点为 5.3[6]。目前，国内外对

收稿日期：2018-06-08

基金项目：河北省高层次人才资助项目（A2017002024）

作者简介：李亚璞（1980-），女，副研究员，研究方向：抗体工程

通讯作者：张小兵（1973-），男，博士，高级工程师，研究方向：分子生物学

食品中 β-Lg 的检测方法主要有色谱法（HPLC）[7]、酶联免疫吸附法(ELISA)[8]以及聚合酶链反应(PCR)[9]等，由于 ELISA 方法具有高灵敏度、高通量、操作简单等方面的优势，目前市场上出现的商业化试剂盒多以 ELISA 技术为主，而且多数都是进口产品，价格昂贵，检测成本较高，因此很有必要研制成本较低的检测产品，以满足国内检测机构的需要。因此，本研究以牛奶 β-Lg 为免疫原，制备其多克隆抗体和单克隆抗体，尝试研制出能够用来检测 β-Lg 的 ELISA 试剂盒，以满足国内检测机构的需要。

1 材料与方法

1.1 实验动物

免疫用 BALB/c 小鼠购自河北医科大学实验动物中心，许可证号：SCXK（冀）2013-1-003；免疫用新西兰大白兔购自鹿泉当地养殖场。

1.2 实验试剂

β-乳球蛋白标准品、酪蛋白、α-乳白蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、甘油、吐温-20 均为 Sigma 公司产品；胎牛血清、DMEM 均为 Gibco 公司产品；HRP 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗鼠 IgG、HRP 标记兔抗山羊 IgG 均为北京中杉金桥公司产品，其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 实验仪器

洗板机，Thermo；酶标仪，Bio-TEK；37 ℃恒温培养箱，SANYO；超高速低温离心机，HITACHI；ND-2000 核酸蛋白测定仪，Thermo；灭菌锅，Panasonic；CO_2 培养箱，Edison；倒置显微镜，OLYMPUS。

1.4 实验方法

1.4.1 免疫抗原的制备

在天平上准确称取一定量 β-Lg 标准品，用超纯水稀释至 1 mg/mL，然后将抗原液分装，-20 ℃保存备用。

1.4.2 动物免疫

用 β-Lg 抗原免疫新西兰大白兔 1 只，免疫剂量 400 μg/只，初次免疫用弗氏完全佐剂，每隔 2 周免疫 1 次，第二次免疫剂量不变，免疫佐剂换为弗氏不完全佐剂，三次免疫后耳缘静脉取血，离心取上清初步测定抗血清效价，接着继续进行免疫，直到血清效价没有变化即可取血，离心所得上清即为抗 β-Lg 兔多克隆抗体。同上述方法免疫 3 只 BALB/c 小鼠，免疫剂量为 40 μg/只，经过三次免疫后断尾取血，离心取上清测定小鼠血清效价，选取效价最高的小鼠进行加强免疫，剂量减半，准备细胞融合。

1.4.3 血清效价测定

抗体效价表明有效抗体浓度，是抗体质量的基本指标。试验采用间接 ELISA 法进行血清效价测定：用碳酸盐缓冲液稀释 β-Lg 抗原至浓度为 10 μg/mL，将抗原液 100 μL/孔加入到酶标板孔中，4 ℃包被过夜；取出包被板洗涤 3 次后每孔加入 200 μL 封闭液，37 ℃放置 1 h；洗涤后加入抗血清 100 μL，首孔抗血清以 1:200 倍稀释，接着进行倍比稀释，连续稀释 23 孔，并设空白对照，阴性对照血清处理同上，37 ℃放置 45 min；洗涤后加入相应酶标二抗，37 ℃放置 30 min；洗涤后加入底物显色液 100 μL，37 ℃避光反应 15 min；每孔加入 50 μL H_2SO_4 终止反应，用酶标仪测定吸光度 OD_{450nm}。结果判定：抗血清 OD_{450nm} 值记为 P，阴性对照 OD_{450nm} 值记为 N，以 P/N≥2.1 的血清稀释倍数即为抗血清效价。上述实验所用主要液体中，ELISA 洗液配方为含 0.05%吐温-20 的生理盐水溶液，封闭液为含 1%明胶的洗液。

1.4.4 抗 β-Lg 单克隆抗体细胞株的建立

1.4.4.1 细胞融合

准备细胞融合前应将实验所需各种液体放置于 37 ℃培养箱中进行预热，然后将脾细胞和 SP2/0 细胞在 50 mL 无菌离心管内进行混合，充分混匀，离心，用手轻轻弹击离心管底部的细胞，然后向其中加入 1 mL PEG 溶液，时间控制在 1 min 内，之后加入 DMEM 不完全培养基，离心，沉淀用 HAT 完全培养基重悬，然后将重悬液加入已铺有饲养细胞的酶标板中，最后将酶标板置于 CO_2 培养箱中进行培养。

1.4.4.2 亚克隆筛选及单克隆抗体的制备

通过有限稀释法对检测较好并且为单克隆的阳性孔进行 3~6 次的亚克隆筛选，待检测结果全阳性时进行扩大培养细胞，待细胞数目达到一定量后采用小鼠体内诱生腹水的方法制备单克隆抗体，向每只经过处理的小鼠腹腔内注射细胞，经过一段时间后取腹水，离心弃脂肪，所得液体即为腹水单抗，并将腹水置于 -20 ℃保存，同时还要进行细胞建株及液氮保存工作。

1.4.5 抗体特性测定

1.4.5.1 多克隆抗体的特性测定

采用免疫印迹法对抗 β-Lg 多抗进行鉴定，将 β-Lg 抗原进行 SDS-PAGE 电泳，然后电转到硝酸纤维素膜上，以抗 β-Lg 兔多抗为一抗，以 HRP 标记的山羊抗

兔 IgG 为二抗，最后用 DAB 显色。由于 Protein A 和 Protein G 对不同种属及类型的免疫球蛋白有不同的亲和力，因此应根据所要纯化的免疫球蛋白的种属和类型选择合适的纯化方法，一般纯化兔多克隆抗体需选用 ProteinA 的分离纯化方法。首先采用饱和硫酸铵法对多抗血清进行纯化，然后再将所得上清液采用 ProteinA 柱进一步纯化，透析后所得液体即为纯化多抗，用 ND-2000 测定纯化抗体蛋白浓度。

采用间接 ELISA 法对纯化多抗进行特异性测定，分别以乳中其它主要蛋白 CN、α-La 和 BSA 以及其它主要过敏原蛋白如鸡卵清蛋白、虾原肌球蛋白、花生蛋白和大豆蛋白包被酶标板，其它步骤同多克隆抗体效价测定，以确定纯化多抗的特异性。

1.4.5.2 单克隆抗体的特性测定

单克隆抗体的效价测定同血清效价测定，抗体亚型采用亚型测定试剂盒进行测定，具体方法如下：将 β-LG 抗原包板，包被浓度为 10 μg/mL，将 1A4、3A7、2B10 3 株抗体分别用洗液按 1:10000 进行稀释，3C10 抗体因为效价比较低，按照 1:2000 进行稀释，将稀释好的抗体加入到酶标板孔中，每个抗体 3 个重复，37 ℃反应 45 min；洗涤后加入分型抗体，分型抗体用洗液进行稀释，按照 1:1000 稀释比例进行稀释，37 ℃反应 30 min；洗涤后加入 HRP 标记兔抗山羊 IgG，稀释液为加入 10%小牛血清的洗液，按照 1:10000 进行稀释，37 ℃反应 30 min；再次洗涤后加入显色液，37 ℃反应 10 min，H_2SO_4 终止反应，酶标仪读数。

单抗腹水采用辛酸-硫酸铵法[10]进行纯化，用 ND-2000 测定纯化抗体蛋白浓度，单克隆抗体特异性测定同多克隆抗体测定方法。

1.4.6 双抗体夹心 ELISA 检测方法的初步建立

双抗体夹心 ELISA 法是常用的检测食品过敏原的方法之一[11]。首先用碳酸盐缓冲液稀释 β-Lg 纯化多抗至浓度为 10 μg/mL 包被过夜，倒掉包被液，洗涤后每孔加入 200 μL 封闭液，37 ℃孵育 1 h，倒掉封闭液，加入待检测样品，每孔加 100 μL，阴性对照孔用 PBS 代替，37 ℃反应 1 h，洗涤后再加入按 1:10000 比例稀释的 3A7 纯化单抗，每孔加入 100 μL，37 ℃反应 45 min，再次洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG，每孔加 100 μL，37 ℃反应 30 min，经过洗涤后加入显色底物液，37 ℃反应 10 min，H_2SO_4 终止反应，酶标仪读数。

将乳中主要蛋白以及其它主要过敏原蛋白标准品分别配制成一定浓度作为待检样品，并对这些样品进行编号，利用所建立的检测方法对这些样品进行测定，依据显色情况及测定数值判断所检测样品中是否含有 β-Lg，同时用色谱法进行验证。

2 结果与讨论

2.1 多克隆抗体测定结果

2.1.1 多克隆抗体效价测定结果

采用间接 ELISA 法进行多克隆抗体效价测定，测定结果如表 1 所示，依据血清效价的判定方法可知，经过三次免疫后，β-Lg 兔多抗血清效价很高，已达到 $1:3.28\times10^6$，第四次免疫后，效价有所提高，达到了 $1:6.56\times10^6$，而第五次免疫后效价不再有变化。抗血清的效价随着免疫次数增加而提高，经过几次加强免疫后，血清效价就会达到一个最高值而稳定在某一水平。因此，新西兰大白兔经过 5 次免疫后取血，离心后得到 35 mL 多抗血清。

表 1 β-Lg 兔多克隆抗体效价测定

Table 1 The titers of the rabbit PcAb against β-Lactoglobulin

血清稀释倍数	OD_{450nm}		
	三免	四免	五免
3.05×10^5	1.96	2.18	2.22
4.10×10^5	1.48	1.76	2.02
8.20×10^5	0.96	0.95	1.25
1.64×10^6	0.49	0.72	0.67
3.28×10^6	0.28	0.39	0.40
6.56×10^6	0.18	0.25	0.28
阴性血清	0.12	0.09	0.11
血清效价	$1:3.28\times10^6$	$1:6.56\times10^6$	$1:6.56\times10^6$

2.1.2 Western-blotting 鉴定结果

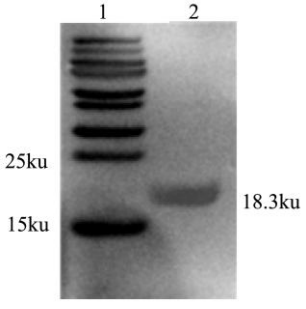


图 1 抗 β-Lg 多克隆抗体的免疫印迹鉴定

Fig.1 Western-blotting analysis of PcAb against β-lactoglobulin

注：样品顺序:1 蛋白分子量标准；2 抗 β-Lg 多抗血清。

Western-blotting 鉴定结果如图 1 所示，用兔抗牛奶过敏原 β-Lg 多克隆抗体与 β-Lg 抗原进行免疫印迹，结果显示该多抗能够与 β-Lg 蛋白呈强阳性反应，大约在 18.3 ku 处有明显的阳性条带出现，条带位置正确，说明该实验制备的兔多克隆抗体与 β-Lg 免疫反应良

好。

2.1.3 兔多克隆抗体的纯化及浓度测定

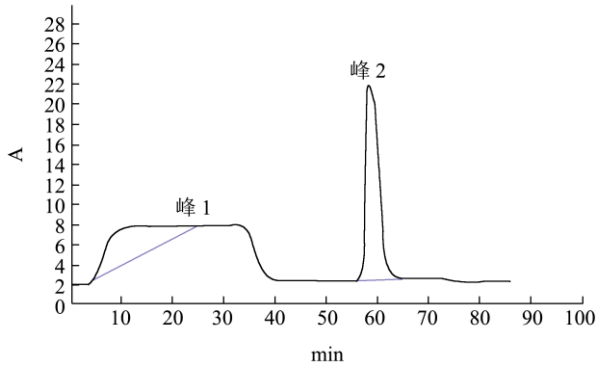


图 2 ProteinA 亲和纯化色谱图

Fig.2 The affinity chromatography of PcAb

将兔多抗血清首先经过饱和硫酸铵纯化，再经 Protein A 柱进一步纯化，Protein A 纯化过程如图 2 所示，首先将 ProteinA 柱平衡，然后用 0.01 mol/L PBS 将待纯化血清稀释后进行上样，峰 1 为杂蛋白，然后将上样缓冲液换成洗脱缓冲液，峰 2 为洗脱出的特异性蛋白，即目标蛋白。

由于峰 2 峰尖较尖，峰形较好，初步说明该抗体的纯化效果较好。洗脱完毕后换成清洗缓冲液以洗脱少量顽固结合的杂蛋白。将目标蛋白再用 0.01 mol/L PBS 液进行透析，透析后的液体即为纯化的兔多抗，用 ND-2000 测定抗体蛋白浓度为 2.07 mg/mL，然后将透析液进行分装，备用。

2.1.4 纯化多抗的特异性测定

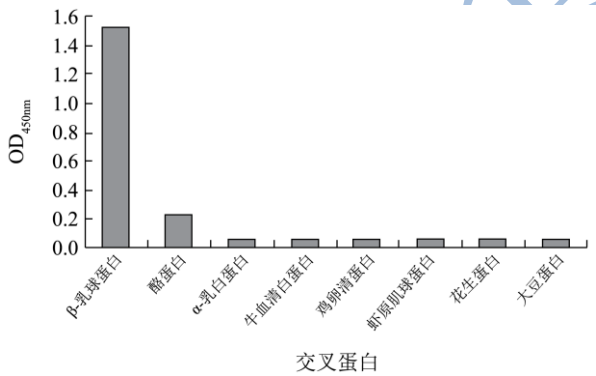


图 3 纯化多抗特异性测定

Fig.3 The detection of the specificity of the purified PcAb

交叉反应的测定是用来表征抗体与不同结构抗原发生结合的能力，同时也是衡量抗体特异性的指标。本实验采用间接竞争 ELISA 法，将乳中主要交叉蛋白以及主要过敏原蛋白包被酶标板，包被浓度均为 10 μg/mL，测定结果如图 3 所示，该纯化多抗仅与 CN 有一定的交叉反应，而与乳中其它蛋白以及主要过敏原蛋白完全没有交叉反应，因此该多抗具有一定的特异性。

2.2 单克隆抗体测定结果

经过三次免疫，测定 3# 小鼠血清效价为 1:8.20×10^5，1#和 2#小鼠血清效价为 1:4.10×10^5，因此挑选 3#小鼠进行细胞融合。细胞融合后 7 d 观察细胞培养板，6 块细胞培养板共计有 576 孔，其中有 518 孔有杂交瘤细胞形成，融合率为 90%。用间接竞争 ELISA 检测细胞上清液，选其中 OD_{450nm} 值较高的 10 孔进行亚克隆筛选，然后进行了扩大培养。在扩大培养的过程中通过测定细胞培养上清又进行了特异性筛选，最后得到了 4 株能稳定分泌单克隆抗体而特异性较好的细胞株，分别为 1A4、3A7、2B10 和 3C10，然后对这些抗体进行了效价等特异性测定。

2.2.1 单抗细胞株效价测定结果

实验采用动物体内诱生法制备腹水，每株抗体大约都获得了 10 mL 的腹水抗体。采用间接 ELISA 法测定单抗细胞株效价，测定结果如表 2，除 3C10 抗体外，其余 3 株抗体效价均在 10^6 以上，较之融合前小鼠血清效价有很大的提高，该抗体效价完全能够满足免疫分析的要求。

表 2 单抗细胞株效价测定结果

Table 2 The titers of the McAbs against *β*-Lactoglobulin

细胞株名称	抗体效价
1A4	1:6.55×10^6
3A7	1:1.31×10^7
3C10	1:5.12×10^4
2B10	1:6.55×10^6

2.2.2 单抗亚型测定结果

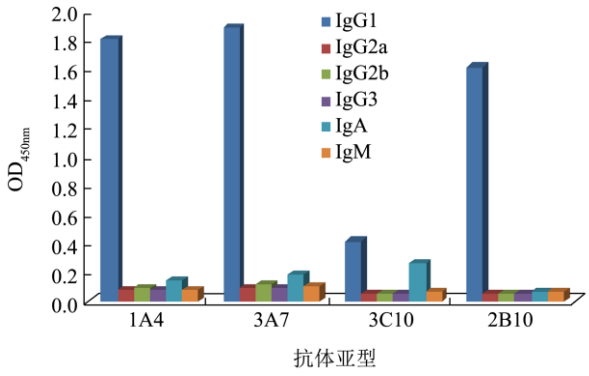


图 4 抗体亚型测定

Fig.4 The detection of the subclass of McAbs

将筛选得到的 4 株杂交瘤细胞制备的腹水抗体进行亚型鉴定，测定结果如图 4 所示，由测定结果可知，该 4 株抗体亚型均为 IgG1 型，只有 3C10 抗体对 IgA 亚类抗体有一定的反应。因为单抗亚型是选择单抗纯化方法的基础，辛酸-硫酸铵法主要用于 IgG1 和 IgG2b 亚类抗体的纯化，而且这种方法对抗体的活性影响较

小，产率较高，并且获得抗体的纯度也较高，因此本实验对单抗的纯化选择辛酸-硫酸铵法。

2.2.3 纯化单抗特异性测定结果

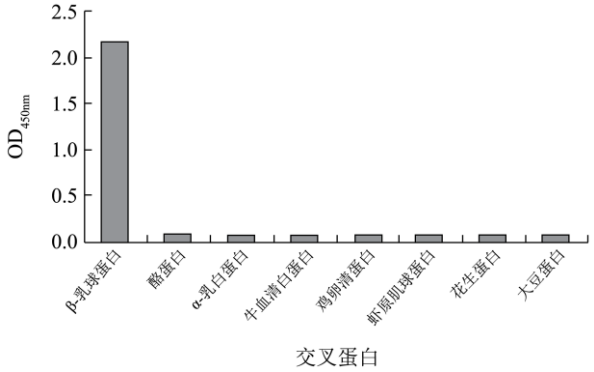


图 5 3A7 抗体特异性测定

Fig.5 The detection of the specificity of 3A7 McAb

本实验采用辛酸-硫酸铵法对其中效价最高的 3A7 抗体进行了纯化，纯化后抗体蛋白浓度为 5.06 mg/mL，对这株纯化抗体特异性测定结果如图 5 所示，由图可知，该纯化抗体与 β-Lg 反应的 OD_{450nm} 值与其它蛋白反应的 OD_{450nm} 值相比有明显的差异，说明该纯化单抗特异性很好，与乳中其它相关蛋白及主要过敏原蛋白基本无交叉反应，特异性优于多克隆抗体。

2.3 样品的初步检测

利用所建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法对蛋白样品进行检测，结果如表 3 所示，只有 3#检测孔变为黄色，该孔 P/N 值为 19.51，判为阳性；而其余孔没有任何颜色变化，P/N 值均在 1 左右，说明这些样品与阴性对照接近，判为阴性；同时将这些样品用色谱法进行验证，结果显示只有 3#样品含有 β-Lg，两种方法的检测结果一致，因此该实验所建立的检测方法可以定性的检测样品中的 β-Lg。

表 3 样品检测结果

Table 3 The test results of samples

样品编号	样品	P/N
1	酪蛋白	1.12
2	α-乳白蛋白	1.08
3	β-乳球蛋白	19.51
4	牛血清白蛋白	1.08
5	鸡卵清蛋白	1.06
6	花生蛋白	1.05
7	虾原肌球蛋白	1.07
8	大豆蛋白	1.05

3 结论

3.1 ELISA 法是检测食品过敏原常用的方法之一，它是利用酶标记物同抗原抗体复合物的免疫反应与酶的催化放大作用相结合，即可保持酶催化反应的敏感性，又保持了抗原抗体反应的特异性[12]。酶联免疫检测技术的灵敏度和准确度取决于所用抗体的效价和特异性，因此制备高效价、高特异性的抗体是建立 ELISA 检测方法的关键因素。因为单克隆抗体具有较好的特异性，而多克隆抗体具有较高的灵敏度，这二者的结合所建立的双抗体夹心 ELISA 法就可以将食品中的微量物质检测出来。

3.2 目前，ELISA 法用于牛奶过敏原的检测主要集中在对牛奶蛋白全组分以及 CN 单一组分方面的研究，而对 β-Lg 单组分的研究还比较少。高淑霞[13]通过将 β-Lg 抗原分别免疫新西兰大白兔和 BALB/c 小鼠制备了兔多克隆抗体和鼠多克隆抗体，并建立了竞争 ELISA 检测方法。李欣等[14]通过纯化水牛乳的 β-Lg，制备了抗水牛乳 β-Lg 的兔多克隆抗体，并通过实验证明所制备的兔多克隆抗体与牛乳中主要蛋白都存在交叉反应，这可能是由免疫抗原纯度造成的。本实验为了得到特异性较好的抗体，所用抗原为 β-Lg 的标准品。

3.3 本实验将 β-Lg 抗原免疫新西兰大白兔制备了抗 β-Lg 多克隆抗体，所制备的多抗血清效价高达 $1:6.56\times10^6$，通过特异性测定结果及 Western-blotting 鉴定结果可知，该多抗具有较好的特异性，仅与 CN 具有一定的交叉反应。在单克隆抗体的制备过程中，细胞融合是最关键的步骤，而影响细胞融合效果的因素有很多，如 SP2/0 细胞和脾细胞的生长状态和融合比例、PEG 的用量以及 PEG 的作用时间等等，通过对以上几个方面的控制，本次实验的细胞融合率高达 90%。在细胞亚克隆筛选的过程中，通过对细胞上清特异性的测定，最后筛选得到了 4 株特异性好的抗 β-Lg 单克隆抗体细胞株，从而保证了腹水抗体的特异性。实验选择了其中效价最高的 3A7 抗体进行了辛酸-硫酸铵纯化，特异性测定结果显示该纯化抗体与乳中其它蛋白以及主要过敏原蛋白没有任何交叉反应，特异性很好。利用所建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法对一些蛋白样品进行了定性测定，并且用色谱法对实验结果进行验证，两者的符合率为 100%。目前本工作所得的抗 β-Lg 单克隆抗体和多克隆抗体是建立双抗体夹心 ELISA 检测方法的基础，若要进一步应用其建立双抗体夹心的 ELISA 定量检测方法，还需从反应体系组成、反应条件等方面进行深入的研究。

参考文献

[1] Hanson L, Telemo E. The growing allergy problem [J]. Acta

Pediatr, 1997, 86(9): 916-918

[2] Crevel R. Industrial dimensions of food allergy [J]. Biochem Soc Trans, 2001, 30: 941-944

[3] FDA. Food allergen labeling and consumer protection act of 2004 [S]

[4] The European Parliament and the Council of the European Union. Directive2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003[S]

[5] Massimo N, Carolina B, Giovanna M, et al. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry [J]. Mol. Nutr. Food Res., 2004, 48(5): 363-369

[6] Apenten R, Khokhar S, Galani D. Stability parameters for β-lactoglobulin thermal dissociation and unfolding in phosphate buffer at pH 7 [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(2): 95-103

[7] 朱宏,邢志恩,戴蕴青,等.反相高效液相色谱法同时检测多种乳清蛋白成分[J].中国农业大学学报,2012,17(3):127-130
ZHU Hong, XING Zhi-en, DAI Yun-qing, et al. Determination of components of whey protein by reversed-phase HPLC method [J]. Journal of China Agricultural University, 2012, 17(3): 127-130

[8] 张海英,刘旸,吴冬雪,等.食品中 β-乳球蛋白过敏原检测方法的比较[J].食品安全质量检测学报,2012,3(4):295-299
ZHANG Hai-ying, LIU Yang, WU Dong-xue, et al. Comparison of two detection methods of β-lactoglobulin allergens in food [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2012, 3(4): 295-299

[9] 贾敏,张银志,张亦凡,等.牛奶 β-乳球蛋白质实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].食品与生物技术学报,2015,34(6): 605-612
JIA Min, ZHANG Yin-zhi, ZHANG Yi-fan, et al. Establishment of a taqman real-time quantitative pcr for the detection of β-lactoglobulin gene [J]. Journal of Food Science and Biotecnology, 2015, 34(6): 605-612

[10] 周玉,李岩松,潘风光,等.小鼠腹水 IgG 类单克隆抗体纯化方法的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2006,10:14-16
ZHOU Yu, LI Yan-song, PAN Feng-guang, et al. The study of purified methods of mice ascites IgG McAb [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2006, 10: 14-16

[11] Niemann L, Taylor SL, Hefle S L. Detection of walnut residues in foods using an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Inst Food Technol., 2009, 74(6): 51-57

[12] 焦奎,张书圣.酶联免疫分析技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2004

[13] 高淑霞.牛乳过敏原酶联免疫分析方法的建立[D].天津:天津科技大学,2014
GAO Shu-xia. Development of enzyme-linked immune-sorbent assay for cow's milk allergens [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2014

[14] 李欣,文学方,武涌,等.食物过敏原水牛乳 β-乳球蛋白的交叉反应研究[J].食品工业科技,2010,31(8):149-153
LI Xin, WEN Xue-fang, WU Yong, et al. Study on cross-reactivity of food allergen buffalo β-lactoglobulin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(8): 149-153