

分类号:

密 级:

单位代码: 10433

学 号: 20503020333

山东理工大学

生物与医药硕士学位论文

餐厨废弃油脂掺伪标志物免疫分析
检测技术研究

Study on rapid immunoassay and detection techniques for the
adulteration marker of gutter cooking oil

研 究 生: 张佳丽

指 导 教 师: 杨青青 (副教授)

协 助 指 导 教 师: _____

学 位 类 别: 生物与医药硕士专业学位

专 业 领 域: 生物与医药 (食品工程)

研 究 方 向: 食品安全检测

论 文 完 成 日 期: 2023 年 3 月 10 日

摘要

餐厨废弃油脂经精炼加工微量掺入正常食用油后难以发现，常规的鉴定手段需要结合经不同的样品前处理的多个指标作为判断依据。为实现餐厨废弃油脂的快速检测，寻找新的检测指标和同步检测手段迫在眉睫。已有大量的研究表明辣椒素类物质作为餐厨废弃油脂掺伪标志物的可行性。此外，生姜广泛用于食品烹饪，其主要成分姜辣素类物质在餐厨废弃油脂加工过程中存在物质间的相互转化。因此，也可作为重要的餐厨废弃油脂掺伪标志物。免疫分析中广谱性抗体可以识别一组具有相似化学结构化合物的特性可以满足我们的需求。针对广谱性抗体筛选效率低、工作量大等问题，本研究提出基于分子对接辅助设计辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原的策略，并从理论和实际两个层面验证了方法的可行性。最终实现了辣椒素、姜辣素类物质广谱性抗体的有效筛选，将其初步应用。同时，荧光偏振免疫分析（Fluorescence polarization immunoassay, FPIA）检测方法实现了餐厨废弃油脂掺伪标志物的快速现场检测。本课题的主要研究成果如下：

为解决餐厨废弃油脂检测指标单一、广谱性抗体制备工作量大、耗时长、难度大等问题，本研究提出将辣椒素、姜辣素类物质作为掺伪标志物，利用已有辣椒素类物质通用单克隆抗体 CPC Ab-D8 进行同源建模，与姜辣素类物质进行分子对接，在明确重要官能团的基础上反向设计半抗原，并利用制备完全抗原免疫小鼠，最终获得产辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体细胞株。经分子对接发现姜辣素中苯环，酚羟基，甲氧基，长链烷基中的羰基等是能与 CPC Ab-D8 形成氢键等关键作用力的主要官能团。基于此，成功设计合成 2 种辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原 Hapten 1 和 Hapten 7，并制备了对应的完全抗原 Hapten 1-BSA/OVA 和 Hapten 7-BSA/OVA。最终获得 3 株对辣椒素、姜辣素类物质有良好识别的广谱性单克隆抗体，分别为 1-F12、1-G12 和 1-D6，效价分别为 128000、64000 和 126000。其中，特异性及灵敏度最高的辣椒素、姜辣素广谱性单克隆抗体 1-F12 对 6 个分析物（辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素、6-姜酚、6-姜稀酚、姜酮）的 IC_{50} 介于 251.58~974.98 ng/mL。基于分子对接反向设计广谱性半抗原的策略为广谱抗体制备提供了重要的保障。广谱性单克隆抗体的获得显著提高了检测判别结果的可靠性，也从实际检测的角度验证了我们基于分子对接设计广谱性半抗原策略的可行性。

为解决免疫半抗原分子结构对辣椒素、姜辣素类物质抗原-抗体识别机制尚不明确的问题，本研究通过半抗原及半抗原-多肽静电势模型的建立及验证，证明了基于分子对接方向设计半抗原策略的可行性。同时交叉组合实验可以很好的反应不同官能团及连接臂位置、长度对识别机制的重要作用。通过对已报道辣椒素类物质通用半抗原（Hapten X、Hapten A、Vanillic acid、N-vanillylnonanamide、Hapten 2、Hapten 3、Hapten 4、Hapten 5、

Hapten 6) 及通用半抗原与赖氨酸三肽偶联物 (Hap-X-3T-a、Hap-4-3T、Hap-5-3T) 进行静电势分析, 在结合已有研究数据建立静电势模型的同时从理论层面验证了基于分子对接设计广谱性半抗原策略的可行性及静电势分析在半抗原高效筛选中扮演着重要的作用; 收集了 5 种已报道的抗原及抗体进行交叉组合, 最终明确了最佳组合 (Hapten 5-OVA/1-F12) 及关键官能团; 在最优组合的条件下, 对所有分析物的 IC_{50} 介于 88.13~499.16 ng/mL。这些研究为后续广谱性抗原设计提供了理论依据。同时, 免疫层析试纸条的前期试验验证了辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体在实际监测中应用的可能。这些研究为食用油中多种小分子外源标志物同步免疫分析提供理论依据和技术支撑。

针对餐厨废弃油脂成分的复杂性及现场快速检测的特殊要求, 本研究利用已有的辣椒素类物质单克隆抗体 CPC Ab-D8 进行 FPIA 检测方法的建立。将制备的荧光素硫代氨基甲酰基乙二胺与辣椒素类物质通用半抗原 Hapten 5 偶联获得示踪剂。经薄层层析法纯化后的示踪剂与 CPC Ab-D8 表现出良好的结合。通过示踪剂及识别元件的浓度、缓冲液的种类及酸碱度、孵育时间等实验条件的优化, 建立的 FPIA 线性范围 (IC_{20} ~ IC_{80}) 为 0.00397~0.09799 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} 值为 0.01973 $\mu\text{g/mL}$ 。玉米胚芽油、大豆油与花生调和油的加标回收率在 90~135%之间。与其他检测辣椒素的方法相比, FPIA 表现出灵敏度高、特异性高、操作简单、设备体积小和孵育时间短等全面的优势, 实现了餐厨废弃油脂简单快速的现场甄别。

关键词: 餐厨废弃油脂; 虚拟筛选; 广谱性单克隆抗体; 荧光偏振免疫分析

Abstract

It is difficult to find gutter cooking oil after being micromixed into edible oil through refining and processing. Routine identification methods need to combine multiple indicators of different sample pretreatment as the basis for judgment. In order to realize the rapid detection of gutter cooking oil, it is urgent to find new detection indicators and synchronous detection means. A large number of studies have shown the feasibility of capsaicinoids as a marker of gutter cooking oil adulteration. In addition, ginger is widely used in food cooking. The main components of gingerols have interconversion in the process of gutter cooking oil processing. Therefore, it can also be used as an important marker of kitchen waste oil adulteration. Broad-spectrum antibodies in immunoassays that identify a set of compounds with similar chemical structures can meet our needs. Considering the problems of low efficiency and heavy workload of broad-spectrum antibody screening, this study proposed a strategy to design broad-spectrum haptens of capsaicinoids and gingerols based on molecular docking, and verified the feasibility of the method from both theoretical and practical levels. Finally, broad-spectrum antibodies of capsaicinoids and gingerols was realized the effective screening, and it was initially applied. At the same time, the Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) detection method realized the rapid field detection of gutter cooking oil adulteration markers. The main research results of this topic were as follows:

In order to solve the problems of single detection index, large workload, long time consuming and great difficulty of broad-spectrum antibody preparation, this study proposed to use capsaicinoids and gingerols as adulteration markers. The CPC Ab-D8 of capsaicinoids was used for homology modeling, and molecular docking was conducted with gingerols, and the hapten was designed in reverse on the basis of identifying important functional groups. The mice were immunized with complete antigen and finally obtained the broad-spectrum monoclonal antibody cell lines producing antibodies against capsaicinoids and gingerols. Through molecular docking, it was found that the benzene ring, phenol hydroxyl group, methoxy and the carbonyl in long chain alkyl in gingerols are the main functional groups that could form hydrogen bonds with CPC Ab-D8. Based on this, Hapten 1 and Hapten 7 of capsaicinoids and gingerols were successfully designed and synthesized, and the corresponding complete antigens Hapten 1-BSA / OVA and Hapten 7-BSA / OVA were prepared. Finally,

three broad-spectrum monoclonal antibodies with good recognition against capsaicinoids and gingerols were obtained, 1-F12, 1-G12 and 1-D6, with titer of 128000, 64000 and 126000, respectively. The IC_{50} of broad-spectrum monoclonal antibody 1-F12 of capsaicinoids and gingerols to six analytes (Capsaicin, Dihydrocapsaicin, N-Vanillylnonanamide, 6-Shogaol, 6-Gingerol and Vanillylacetone) ranged between 251.58 and 974.98 ng/mL.

The reversed strategy of designing broad-spectrum hapten based on molecular docking provides an important guarantee for broad-spectrum prepared. The availability of broad-spectrum monoclonal antibodies significantly improves the reliability of the detection discrimination results, and also verified the feasibility of designing a broad-spectrum hapten strategy based on molecular docking from the perspective of practical detection. To solve the problem that the recognition mechanism of antigen-antibody for capsaicinoids and gingerols was not clear. This study demonstrated the feasibility of the reversed strategy of designing broad-spectrum hapten through the establishment and validation of electrostatic potential model of the hapten and hapten-polypeptide. At the same time, the cross-reactivity experiment can well reflect the important role of different functional groups, the position and length of the connecting arms on the recognition mechanism. Electrostatic potential (ESP) analysis of haptens (Hapten X, Hapten A, Vanillic acid, N-vanillylnonanamide, Hapten 2, Hapten 3, Hapten 4, Hapten 5, Hapten 6) and universal hapten with lysine tripeptide conjugates (Hap-X-3T-A, Hap-4-3T and Hap-5-3T) was conducted. Combined with the existing data, this proved the important potential role of ESP in the efficient screening of haptens. Five reported antigens and antibodies were collected for cross-combination, and finally the best combination (Hapten 5-OVA/1-F12) and key functional groups were identified. With the optimal combination, the IC_{50} of all analytes was intermediate between 88.13~499.16 ng/mL. These studies provided a theoretical basis for the subsequent broad-spectrum antigen design. At the same time, the preliminary test of lateral flow immunoassay (LFIA) verified the possibility of broad-spectrum monoclonal antibodies of capsaicinoids and gingerols applied in practical monitoring. These studies provided theoretical basis and technical support for simultaneous immunoanalysis of various small molecule exogenous markers in edible oil.

In view of the complexity of ingredient of gutter cooking oil and the special requirements of rapid field detection, the FPIA detection method was established by using CPC Ab-D8 to realize the rapid field detection of gutter cooking oil. The tracer was obtained by coupling the

prepared fluoresceinthiocarbamyl ethylenediamine with the universal Hapten 5 to capsaicinoids. The tracer purified by TLC showed good binding to CPC Ab-D8. Through the optimization of the concentration of tracer and recognition element, the type and pH of buffer and incubation time, the linear range (IC_{20} ~ IC_{80}) of established FPIA was 0.00397~0.09799 $\mu\text{g/mL}$, and the IC_{50} was 0.01973 $\mu\text{g/mL}$. The recovery rate of corn germ oil, soybean oil and peanut blend oil were between 90 and 135%. Compared with other methods for the detection of capsaicinoids, FPIA showed the comprehensive advantages of high sensitivity, high specificity, simple operation, small equipment volume and short incubation time, realized the simple and rapid on-site detection of gutter cooking oils.

Keywords: Gutter cooking oil; Virtual screening; Broad-spectrum antibody; Fluorescence polarization immunoassay

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 食用植物油及其安全现状	1
1.2 餐厨废弃油脂检测指标研究进展	1
1.2.1 常规检测指标.....	2
1.2.2 外源标志物.....	2
1.3 餐厨废弃油脂快速检测方法的研究进展	3
1.3.1 色谱法.....	3
1.3.2 新型光谱法.....	4
1.3.3 电子鼻法.....	4
1.3.4 电导率.....	4
1.3.5 免疫分析检测技术.....	5
1.4 抗原抗体识别机制研究.....	7
1.5 研究目的及意义.....	8
1.6 研究内容及技术路线.....	8
第二章 基于分子对接辅助设计广谱性半抗原及完全抗原的合成....	10
2.1 引言.....	10
2.2 实验材料.....	10
2.2.1 主要试剂与仪器.....	10
2.2.2 主要溶液配制.....	11
2.3 实验方法.....	11
2.3.1 基于辣椒素类物质单克隆抗体同源建模	11
2.3.2 基于分子对接辅助设计筛选辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原	12
2.3.3 半抗原及其三肽偶联物静电势能分析	12
2.3.4 辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原的合成及鉴定	12
2.3.5 辣椒素、姜辣素类物质广谱性人工完全抗原的合成及浓度测定	14
2.4 结果与讨论.....	15
2.4.1 抗体 Fv 与姜辣素类物质的分子对接	15
2.4.2 计算机静电势能辅助分析.....	17
2.4.3 辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原合成与鉴定	20
2.4.4 辣椒素、姜辣素类物质广谱性人工完全抗原的合成及浓度测定	23
2.5 本章小结.....	23

第三章 单克隆抗体制备及抗原-抗体识别机制的研究.....	24
3.1 引言.....	24
3.2 实验材料.....	24
3.2.1 试剂与仪器.....	24
3.2.2 主要试剂配制.....	25
3.2.3 实验动物与小鼠骨髓瘤细胞.....	26
3.3 实验方法.....	26
3.3.1 Balb/c 小鼠免疫及抗血清检测.....	26
3.3.2 杂交瘤细胞的制备.....	27
3.3.3 阳性细胞株的筛选及单克隆化.....	27
3.3.4 阳性杂交瘤细胞的腹水制备与细胞冻存.....	28
3.3.5 腹水纯化与单抗制备.....	28
3.3.6 辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体鉴定及性能评价.....	28
3.3.7 不同来源抗原抗体交叉组合.....	30
3.4 结果与讨论.....	30
3.4.1 小鼠免疫效果检测.....	30
3.4.2 杂交瘤细胞筛选单克隆化鉴定.....	32
3.4.3 腹水抗体的制备与纯化.....	33
3.4.4 辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体鉴定及性能评价.....	33
3.4.5 不同来源抗原抗体的 ELISA 交叉组合.....	37
3.5 本章小结.....	41
第四章 基于 FPIA 方法快速监测餐厨废弃油脂.....	43
4.1 引言.....	43
4.2 实验材料.....	43
4.2.1 试剂与仪器.....	43
4.2.2 主要溶液配制.....	45
4.3 实验方法.....	46
4.3.1 荧光素硫代氨基甲酰基乙二胺(EDF)示踪剂的制备.....	46
4.3.2 示踪剂的合成、分离和纯化.....	47
4.3.3 荧光偏正免疫分析方法(FPIA)的建立及优化.....	47
4.4 结果与讨论.....	50
4.4.1 FPIA 方法原理.....	50
4.4.2 示踪剂纯化鉴定.....	51
4.4.3 FPIA 检测方法的建立.....	52
4.4.4 荧光偏正免疫分析校准曲线.....	56
4.4.5 检测方法的比较.....	58

4.4.6 基质效应的实验.....	58
4.4.7 加标回收实验.....	59
4.5 本章小结.....	59
第五章 结论与展望	60
5.1 结论.....	60
5.2 展望.....	61
参考文献.....	62

第一章 绪论

1.1 食用植物油及其安全现状

食用植物油作为人类有规律代谢的重要营养物质的来源，通常来源于植物的果实、种子和胚芽等，如花生、大豆、玉米和芝麻等^[1,2]。食用植物油中的不饱和脂肪酸可减少高血压、高血脂等疾病的发生^[3,4]，二十二碳六烯酸（Docosahexaenoic acid, DHA）和二十碳五烯酸（Eicosapentaenoic acid, EPA）^[5,6]能够加快血液流通、预防血管堵塞，DHA还利于儿童智力的发育、可以防止老年痴呆、提升记忆力。近年来，较高的营养价值和独特的物理性质使食用植物油成为膳食和烹饪中不可或缺的一部分^[7,8]。

我国是世界上最大的食用植物油生产和消费国，与食用油相关的工业在国民经济发展中具有重要地位。餐厨废弃油脂是一种不同来源的废弃食用油，经精炼加工后的餐厨废弃油脂微量掺入正常食用油后难以发现^[9]。由于国内食用油供给形势严峻，且不同种类的食用植物油价格差异较大。在利益的驱使下，不法商家将对人类健康有巨大威胁的餐厨废弃油脂不同程度的掺入正常食用油中进行售卖，以此谋取暴利^[10]。由于潜在的市场和巨大的利益，食用油领域掺假、伪造等食用油安全问题频发^[11-13]，废油掺食用油是发展中国家当前食品质量控制中最令人关注的问题之一^[14]。由此也可以看出，食用油安全问题是现如今威胁人类健康发展、社会和谐稳定的一个难题和挑战^[15-17]，鉴定植物油中餐厨废弃油脂掺假成为急需解决的问题^[2]。

食用油质量安全问题也是发达国家面临的世界级难题。美国科学家建立的食品成分欺诈和经济利益驱动掺伪数据库对世界范围内食品违禁成分非法添加和利益驱动的掺伪报道及论文进行了梳理，分析发现食用油违禁成分非法添加和掺伪的报道在所有食品掺伪造假问题中居首位，占总数的24%^[18]，例如橄榄油、花生油^[19]、芝麻油^[20]掺伪等。可见食用油违禁成分非法添加和利益驱动的掺伪问题是广受关注的世界性重大食品安全问题，也是全球食品质量安全领域的热点和难点问题。

1.2 餐厨废弃油脂检测指标研究进展

目前，食用油脂掺伪鉴别研究主要是通过检测内源性指标和外源性指标来实现的。虽然内源性指标具有稳定性和准确性等优点，但对于成分复杂的餐厨废弃油脂来说难以统一划定，而潜在致癌物和化学毒素等外源性指标（如黄曲霉毒素、辣椒素类物质、重金属离子、碳氢化合物、过氧化物等^[21,22]）的鉴别有其明确性以及简单的优势，可以更好的适用于餐厨废弃油脂的鉴别。现有的研究报道中发现，只检测单一外源标志物的含

量不足以准确判别餐厨废弃油脂,还需要结合其它外源标志物进行同步检测才能使判别结果更加准确^[23]。因国情差异,餐厨废弃油脂检测技术国外研究甚少,缺乏可以直接借鉴的经验。

1.2.1 常规检测指标

根据许多相关文献,常规检测指标作为餐厨废弃油脂检测的内源性标志物,需要结合多项指标作为判断油样是否为餐厨废弃油脂的判断依据,如过氧化值、胆固醇、电导率、酸价、碘价等^[9,24,25]。这些指标在餐厨废弃油脂出现的初期对食用油的甄别发挥了重要的作用。如大豆原油酸价不大于 5 mg/g,过氧化值不大于 5 mmol/kg,曹维金^[26]和赵鑫超^[27]的研究均对此做出了证明。陈丽花^[28]的研究证明了酸价和皂化值检测指标的可行性。虽然这些指标的检测可以提高识别效率,但不同指标需要进行不同的样品前处理^[24,29,30]。同时,需要精通不同大型设备的技术人员进行大型分析设备操作或复杂的样品预处理^[25,31,32]。因此,为实现餐厨废弃油脂的快速检测,克服耗时长、操作复杂、餐厨废弃油脂检测的单一性指标等缺陷已经成为了有待斟酌的问题^[2]。

1.2.2 外源标志物

(1) 辣椒素类物质

辣椒素是辣椒家族成员中发现的一类化合物,是辣椒种子中的一种酰胺化合物^[33]。与天然辣椒素相比,合成辣椒素是测定辣椒素含量的常用分析物^[34]。作为一种工业类辣椒素,它比天然辣椒素价格更便宜,而且味道辛辣。辣椒有强烈的辣味,其含有多种高营养价值的成分^[35],能够促进代谢^[36],并对健康有多种影响^[36-40],被广泛用作刺激食欲^[37]的调味剂。辛辣食物因其味道辛辣,深受世界各地消费者的喜爱^[41]。近年来,人们每天都在食用辣椒产品,包括辣椒油、辣椒酱、辣的薯片和其他辛辣食物^[42,43]。由于其易溶于油脂,并在高温、精炼等过程难以完全除去,化学性质稳定等而引起研究者注意^[25,43-47]。这使其在高温、真空、水洗等苛刻的条件下都不会发生改变^[48-50]。除此之外,良好的脂溶性使其难以从油脂中分离^[51,52]。

已有大量的研究表明了辣椒素类物质作为餐厨废弃油脂掺伪标志物的可行性^[45,47,53]。国振^[54]研究发现,大多数食用油中未能检出辣椒碱,花生油中辣椒碱的本底含量在 0~1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。已有研究机构将其作为初步判定餐厨废弃油脂的掺伪标志物,该标准规定,所测定的样品中辣椒素(合成辣椒素、天然辣椒素、二氢辣椒素)总含量大于或等于 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,表明该油脂样品可能有异常,存在使用餐厨废弃油脂的可能^[51]。因此,可以利用辣椒素含量这一指标对正常食用油中餐厨废弃油脂掺假问题进行快速监测^[55]。

(2) 姜辣素类物质

姜辣素是以姜酚为主的系列衍生物,适用于需要高温加工的食品,是一种高品质的调味料和食品配料^[56]。大量研究表明,6-姜酚是生姜的主要活性成分^[57,58],且含量最高,这为餐厨废弃油脂外源性鉴别标志物提供了新的选择。然而,6-姜酚化学性质不稳定,分子结构中C4的活泼氢易与C5羟基一起脱水形成姜稀酚;在加热和碱性条件下,C4和C5羟基一起脱水导致姜稀酚间的碳碳键断裂形成姜酮和相应的醛^[59]。餐厨废弃油脂的常规加工过程中,如过滤、脱色、脱水、煮沸、去杂质^[60]、脱臭、冷凝^[61],存在6-姜酚和6-姜稀酚、姜酮间的相互转化^[59]。由于传统方法的酸价测定存在瓶颈,尤其是脱水过程和抗氧化剂的加入。因此,6-姜酚、6-姜稀酚和姜酮成为餐厨废弃油脂中姜辣素类物质存在的代表性成分。

(3) 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素(Aflatoxins,简称AFT)是由黄曲餐厨废弃油脂霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等真菌产生的此生代谢产物^[45]。由于餐厨废弃油脂的不当处理及环境温湿度的适宜使其受真菌污染并大量繁殖。由于黄曲霉毒素二呋喃环的存在而表现出巨大的毒性和致癌性,且黄曲霉对光、热,耐高温。有研究发现,餐厨废弃油脂中黄曲霉毒素B1的含量超出国家标准5%。不仅如此,AFT也是造成食用植物油油料污染的重要源头,这也引起人们的广泛关注。

(4) 苯并吡

苯并吡作为一种含苯环的稠环芳烃,有强致癌性。因其来源于工业生产及食品烧制过程中蛋白质、碳水化合物、酯类等在高温条件下发生裂解、环化、聚合的产物,所以被列为环境监测的常规项目。正常植物油中苯并吡的含量低于10 μg/kg,这一标准与世界卫生组织、欧盟制定的标准基本一致,而餐厨废弃油脂的微量掺入使其含量大幅增加,严重危害人民身体健康。

1.3 餐厨废弃油脂快速检测方法的研究进展

对于餐厨废弃油脂成分的复杂性及现场快速检测的特殊要求,迫切需要一种简单、快速的现场检测方法^[24,25,29]。近年来,除色谱当大型仪器方法外,一些新的检测方法的出现让餐厨废弃油脂的监测对精炼后的餐厨废弃油脂掺假评估中表现出显著优势。

1.3.1 色谱法

目前,食用油脂掺伪标志物的检测主要依赖各种仪器检测方法,包括经典的液相色谱-串联质谱(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS)^[62]、高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)^[63,64]、色谱-质谱联用法^[65]等。

此外, 基于黄曲霉毒素、苯并吡^[66]、反式脂肪酸^[67]、胆固醇、甾醇^[68]、不皂化物等^[69]指纹杂质的气质联用技术^[70,71]也被开发出来。虽然仪器检测方法具有灵敏度高、稳定性好等优点, 但是其设备昂贵、前处理过程繁琐、需要专业操作人员, 并且一次只能检测一到两种分析物, 无法满足快速、现场检测的要求^[31,32,72]。实际上, 经过餐厨废弃油脂精制过程后, 常规检测指标很难继续用于餐厨废弃油脂甄别。

1.3.2 新型光谱法

由于餐厨废弃油脂较正常食用油成分的复杂性, 基于一些特殊信号可以建立相应的光谱信号。近年来已有很多新型光谱法应用于餐厨废弃油脂的检测。例如依据羟基或羰基等官能团的特征吸收峰的傅里叶变换红外光谱法; 基于拉曼光谱^[73]、核磁共振光谱^[19, 72]等所获得特殊指纹图谱; 基于显著差异的波普信号太赫兹频谱的近红外线发射光谱; 基于餐厨废弃油脂中低聚物、碘值、维生素 E 等荧光信号的荧光光谱^[10]。这些新的监测方法表现出无需样品前处理、适用于超低浓度的样品检测、快速、高灵敏、非接触式等显著的优势, 但对实验的仪器和实验条件等要求较高, 仪器成本高, 结果分析耗时, 需要专业培训等缺陷使其在现场监测中不具优势。除此之外, 基于金属离子的原子吸收光谱法更为成熟。王利等^[74]发现原子吸收法可以通过一项或多项指标对餐厨废弃油脂进行甄别。但由于精炼过程可以很大程度的去除溶于水的物质, 使得该指标的有效性大大降低。

1.3.3 电子鼻法

电子鼻通过模拟嗅觉器官以在短时间内感知、分析和判断样品中的挥发、特异性成分等整体信息加以检测, 已广泛应用于诸多领域^[75]。由于存储、收集、精炼等过程的不当性, 使其发生一系列氧化、酸败等现象, 相应也发生化合物的分解, 其气味分子也发生显著变化。基于气敏传感、信号处理和模拟系统, 电子鼻法通过采集经加热后样品中的挥发性成分并分析处理后做出判断。根据是由化学学会标准测定了食用油样品酸度、氧化值、甲氧基苯胺等, 并结合主成分分析、聚类分析、主成分回归分析等对结果进行分析, 发现其准确率在 88%-98%。其高准确性及免样品前处理使其显著的优势。

1.3.4 电导率

餐厨废弃油脂因金属离子和醛、酮等一些副产物的产生而表现出电导率的异常。陈丽花、罗世霞等^[28]的研究表明, 餐厨废弃油脂的电导率可达 95.45 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 胡欣宇^[76]的研究发现餐厨废弃油脂萃取水相电导率高于 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 而正常食用油电导率低于 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。黄韬睿^[77]则证明了正常食用油中餐厨废弃油脂的参与比例与电导率呈线性关系。

电导率法鉴别餐厨废弃油脂对应的仪器和实验条件简单，但其操作要求高，并且只能用于初步鉴定。

1.3.5 免疫分析检测技术

近年来，基于抗原-抗体特异性结合的免疫检测技术因具备应用简单、快速、灵敏、准确、价廉以及能在现场和实验室内进行大批量样本检测等优点^[78,79]而得到迅速发展^[80]，例如纳米抗体及基因工程抗体等新兴抗体研制技术^[81]、上转换免疫分析方法^[82]、基于光学或电化学信号的免疫传感器^[83]、以及新型免疫快速检测装置等^[84]，已广泛应用于食品、环境、医药等检测领域^[85]。

(1) 识别元件

抗体作为免疫分析方法的重要鉴定组成部分，对免疫分析方法的敏感性和特异性起着至关重要的作用。现已开发的针对餐厨废弃油脂监测的抗体，主要监测黄曲霉毒素、辣椒素类物质等单一或单类目标分析物。广谱性抗体可以识别一组具有相似化学结构的化合物，它提供了一种经济的方式检测多种污染物^[86]。这为解决餐厨废弃油脂单一性指标问题提供了一个有效的思路。因此，为解决餐厨废弃油脂掺伪问题，有必要开发广谱性单克隆抗体。免疫半抗原的分子结构是影响小分子物质抗体质量的核心因素，是广谱性抗体产生的前提^[87,88]，分析物类别的选择及广谱性半抗原结构的设计是实现多指标检测的关键，对获得高灵敏的广谱性抗体具有重要意义。在免疫半抗原结构设计方面，许多学者报道了不同连接臂位点、长度和不同连接臂结构的半抗原对免疫效果、分析方法具有很大差异。针对单一化合物设计半抗原时，其原则是尽可能保持待测分子原有的结构特征，但要制备某一类化合物的广谱性特异性抗体时，所设计的半抗原必须最大程度地保留该类化合物的共同结构特征。即使这样，也会有较多的结构组合，如何实现广谱性半抗原的有效筛选，提高抗体制备效率需要我们的思考和探索。

半抗原结构对抗体诱导及识别特性的影响被发现与人工抗原空间构象变化有重要关系。分析半抗原连接臂长度和连接臂结构对免疫效果及分析方法的影响可能是由于半抗原与载体蛋白偶联复合物的空间构象发生变化而引起的。Xu 等人^[89]利用赖氨酸代替大分子的载体蛋白，建立“半抗原-赖氨酸偶联物”模型研究了半抗原与载体蛋白偶联后的空间构象，并且利用所建模型初步解释了半抗原手臂结构对抗体质量的重要影响。根据这一研究结果可知，在设计合成半抗原时，还应综合分析半抗原与人工抗原空间构象关系。然而，目前针对半抗原/人工抗原构象关系对抗体识别机制的研究仍然缺乏，无法形成系统的结论以用于指导其它小分子物质免疫分析方法中。尽管赖氨酸片段无法准确地代表载体蛋白结构，但完全可以作为参考应用于姜辣素及辣椒素类物质广谱性半抗原与载体蛋白的互作研究中，对于指导食用油外源标志物广谱性半抗原设计与合成具有重

要意义。

(2) 免疫分析检测方法

电化学目前被认为是一种低成本、高效、快速的检测方法^[90]。它是一种基于溶液的电化学性质的化学分析方法，最早由德国化学家 C.温克勒在 19 世纪的提出^[46]。电化学分析因其灵敏度和精度高、设备简单、价格低的优点^[91,92]，被广泛应用于环境检验、生命科学、出入境检验、检疫、食品安全等公共安全领域^[93]。赵庆雪等人^[46]开发了一种用于血清中辣椒素定量检测的双信号扩增电化学免疫传感器，在最佳条件下，该免疫传感器呈 0.01~1000 ng/mL 的线性范围，检测限为 0.01 ng/mL，具有良好的回收率（85.12~104.25%）和较高的稳定性。此外，为了保护辣椒素抗原和抗体的关键识别位点不受损伤，孙霞等人^[31]利用 Fe₃O₄NPs@CeO₂ 良好的电导率和优良的氧化还原特性，构建了一种竞争性免疫传感器。在最佳条件下，所提出的免疫传感器的检测范围为 10⁻³~10⁴ ng/mL，检测限为 0.33 pg/mL，为辣椒素的检测提供一种新的方法。

酶联免疫吸附测定（Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）是快速检测的代表性方法^[25]。杨顺东等人^[94]利用 ELISA 分析了辣椒中辣椒素的含量，检测限为 2.5 mg/kg，且方法表现出良好的相关性；杨青青等人^[45]利用筛选获得的辣椒素类物质单克隆抗体建立了 ELISA，将其用于餐厨废弃油脂的实际样品检测，在空白标准曲线、稀释基质标准曲线和浓缩基质标准曲线的 IC₅₀ 分别为 5.93、6.64、8.36 ng/mL。然而，ELISA 为非均相检测，反复和较长的检测周期、严谨的操作技术限制了其广泛应用。

免疫层析试纸条（Lateral flow immunoassay, LFIA）作为定性和半定量的检测方法，不具有高准确度和灵敏度^[30,95]，但在实际现场检测中有着明显的优势。虽然吴倩等人^[25]利用时间分辨荧光微球开发了一种荧光侧流条（Lateral flow fluorescent-strip, LFS）方法，其中辣椒素的检测限为 2.3 ng/mL，但该方法对环境有严格的要求，存储环境的湿度和光强对检测结果有很大的影响。

FPIA 作为一种均相荧光法，使用荧光素标记的小分子抗原和分析物在均质反应系统中竞争性地结合有限的特异性大分子抗体。偏振荧光的强度与荧光分子的大小呈正相关，与激发时的旋转速度呈负相关^[30,96-98]，在短时间内确定分析物，达到高灵敏度、准确、快速现场检测的目的^[32]。此外，为了实现对分析物的监测，将测得的配合物与未反应的标记分子或可能影响分析信号的测试样品成分进行分离是必要的^[96]。因此，固相免疫分析需要使用各种载体和多阶段的操作，如洗涤、离心等^[99]。在这方面，FPIA 可以克服分析工作中费时费力的缺陷，实现快速监测的目的。它已广泛应用于环境监测、食品安全分析、药物发现、生物代谢物等领域^[30,98]。

1.4 抗原抗体识别机制研究

抗原-抗体的识别机制是整个免疫检测技术的基础,了解广谱性抗体的识别机制对于广谱性半抗原的设计、优质抗体的筛选、抗体的应用性能的提高以及免疫分析方法的建立有着重要的理论意义和实践价值^[31]。计算机建模技术是阐明配体和受体之间相互作用的有力工具,它具有非试剂耗用、高通量、不那么费力和成本效益等优势^[86]。

(1) 静电势 (Electrostatic potential, ESP) 分析

ESP 分析对动物的免疫反应和抗体识别具有重要意义^[51]。其在化学结构优化、小分子药物筛选、半抗原结构优化等方面得到了广泛的应用,并在半抗原结构的优化方面取得了重大进展。Xu 等^[89]利用分子模拟技术对半赖氨酸偶联物的三维结构进行了优化,发现对蛋白-半抗原偶联物的构象变化可以提高有机磷农药酶联免疫吸附试验的广泛特异性和敏感性。Bai 等^[100]利用 ESP 对辣椒素进行了综合分析,最后分别设计了四种烷烃链和酰胺部分的半抗原。他们发现最大限度地暴露疏水烷烃链可以产生高亲和力和准确识别辣椒素的抗体。然而,免疫系统是复杂的,影响抗体敏感性的因素有很多,有待进一步研究。

(2) 同源建模、分子对接技术

同源建模、分子对接等在探明分子机制方面扮演者重要的角色,广泛应用于药物筛选^[101,102]、免疫分析^[86,100]、食品研究^[103]等诸多领域。现代分子对接技术完全可以被用来模拟抗体与目标分子稳定结合时的空间取向,探索免疫半抗原结构对广谱性抗体与目标分子互作的空间取向规律,从而为广谱性半抗原的设计以及检测抗原的选择提供有力的科学理论支撑,进而建立餐厨废弃油脂外源标志物辣椒素、姜辣素类物质高灵敏免疫分析方法。Sotriffer 等人^[104]曾成功采用分子对接技术研究了抗体与半抗原的互作,并为抗体分子在互作中构象的柔性表现提供有力证据,但并没有揭示免疫半抗原结构对抗体与小分子互作的影响。孙霞等人^[31]基于已有辣椒素抗原和抗体进行了相关识别机制的研究,分析了不同辣椒素化合物的共同关键官能团和抗体的关键氨基酸识别位点,并在此基础上有效指导了辣椒素电化学免疫分析方法的建立,进一步提高了免疫传感器的灵敏度、特异性和稳定性。除此之外,为探究计算机辅助与实际的统一性,从实验层面上对重要官能团等识别机制的研究是有必要的。抗体多特异性识别机制的研究对半抗原设计及免疫分析方法的建立至关重要,利用已有抗体,加快广谱性半抗原筛选及抗体制备是有意义的研究。

(3) 定量构效模型

为了解这种常见的部分和取代基如何影响抗体的识别能力,Wang 等^[105]人使用比较分子场分析 (Comparative molecular field analysis, CoMFA) 和比较分子相似性指数分析 (Comparative molecular similarity indices analysis, CoMSIA) 方法构建了抗体与 33 种类

化合物之间的三维定量构效关系 (Three-dimensional quantitative structure activity relationship, 3D-QSAR); 陈金秀等人^[106]构建了三种定量构效模型 (QSAR), 分别为二维定量构效模型 (Two-dimensional QSAR, 2D-QSAR)、全息定量构效模型 (Holographic QSAR, HQSAR) 和虚拟定量构效模型 (Topomer QSAR), 分析发现抗体活性和菊酯的疏水性有很大的相关性, 并解释了拟除虫菊酯群选择性抗体的交叉反应; Yuan 等^[107]利用结构活性定量关系 (QSAR) 模型研究苯基脲类除草剂多特异性抗体与苯基脲类除草剂识别机理, 尝试揭示半抗原分子合理设计规律, 并取得一定成果。但目前对免疫半抗原结构特点与广谱性抗体识别特性之间内在联系的认识仍十分缺乏, 因此免疫半抗原分子设计理论仍有待进一步研究。

1.5 研究目的及意义

食用植物油质量安全关乎人民生命健康, 针对餐厨废弃油脂常规检测需要结合多个指标且操作复杂、专业性强等问题, 本论文将辣椒素、姜辣素作为餐厨废弃油脂鉴别指标, 采用分子对接辅助设计筛选广谱性半抗原的策略, 在明确重要官能团的基础上设计合成了辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原。静电势分析和辣椒素、姜辣素类物质单克隆抗体的制备从理论和实际层面验证了我们半抗原设计方案的可行性。此外, 不同来源抗原抗体的交叉组合在为食用油中多种小分子外源标志物同步免疫分析提供理论依据和技术支撑的同时, 最佳抗原抗体组合使餐厨废弃油脂中辣椒素、姜辣素的同时检测成为可能。以上研究为广谱性半抗原的设计及单克隆抗体的制备提供了一定的参考价值, LFIA 的初步实验也验证了方法的可行性。最终, 均相 FPIA 方法的建立实现了餐厨废弃油脂中辣椒素类物质的实时快速高灵敏监测。

1.6 研究内容及技术路线

本课题的研究内容主要包括以下三个部分:

(1) 基于分子对接辅助设计辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原

本研究基于已有的辣椒素抗体与目标分析物的分子对接结果, 分析并设计合成了 2 种针对辣椒素、姜辣素类物质的广谱性半抗原。分子结构、半抗原及其与三肽偶联物的静电势分析为新型半抗原的可行性提供了理论支撑。基于以上研究, 在明确关键官能团的前提下, 设计合成辣椒素、姜辣素类物质半抗原, 并制备人工完全抗原。

(2) 辣椒素、姜辣素类物质单克隆抗体的制备及识别机制研究

采用酶联免疫法测定人工完全抗原免疫获得的小鼠血清, 以选取对辣椒素 (包括辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素)、姜辣素类物质 (包括 6-姜酚、6-姜稀酚、姜酮) 均有良好识别的小鼠。通过将最优小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合后筛选得到高质量辣椒

素、姜辣素类物质单克隆抗体。利用收集的抗原抗体同制备的辣椒素、姜辣素类物质抗原和单克隆抗体进行交叉组合，在探明抗原抗体识别机制的同时明确抗原抗体最优组合。

(3) 基于均相 FPIA 实时快速监测餐厨废弃油脂中辣椒素

利用合成的荧光素硫代氨基甲酰基乙二醇与辣椒素类物质 Hapten 5 的长链烷基部位偶联，在有效保护半抗原关键官能团的同时，提高了检测方法的灵敏度。通过对示踪剂浓度和抗体稀释度、缓冲液种类和 pH 等实验条件的优化，构建了基于辣椒素类物质单克隆抗体的 FPIA 方法。最后利用玉米胚芽油、大豆油与花生调和油进行基质效应实验，实现餐厨废弃油脂的快速有效现场甄别。

本课题的技术路线如下所示：

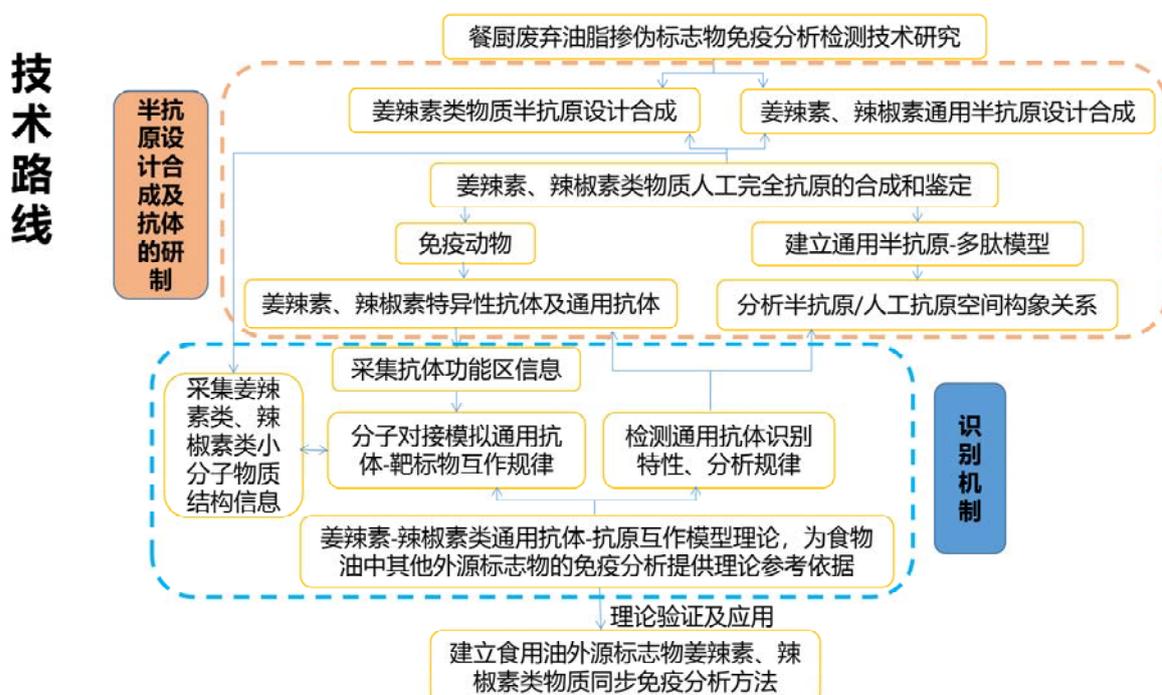


图 1.1 研究技术路线

Fig. 1.1 The technical route of this project

第二章 基于分子对接辅助设计广谱性半抗原及完全抗原的合成

2.1 引言

近年来,食用油安全问题频发^[9-13],废油掺食用油是发展中国家当前食品质量控制中最令人关注的问题之一。根据许多相关文献,常规检测需要结合多项指标作为判断油样是否为废食用油的判断依据,如胆固醇、电导率、酸价、碘价等^[9,24]。虽然这些指标的检测可以提高识别效率,但不同指标需要进行不同的样品前处理,并且需要熟练的技术人员进行大型分析设备操作或复杂的样品预处理^[25,31,32]。为实现餐厨废弃油脂的快速检测,克服耗时长、操作复杂、餐厨废弃油脂检测的单一性指标等缺陷已经成为有待斟酌的问题。

基于以上思考和分析,本研究利用已有辣椒素抗体 CPC Ab-D8 进行同源建模^[31],并与姜辣素类物质进行分子对接,明确关键官能团,这为广谱性半抗原的设计提供了一定的理论基础,在大幅减少工作量及实验和物质资源浪费的同时实现半抗原的有效筛选,提高了广谱性抗体制备效率。为开发辣椒素、姜辣素类物质广谱性抗体,解决餐厨废弃油脂单一性指标问题,显著提高了餐厨废弃油脂监测判别结果的可靠性。

2.2 实验材料

2.2.1 主要试剂与仪器

(1) 主要试剂

羟基-3-甲氧基苯甲醛、四氢吡咯、醋酸(AcOH)、甲苯、乙酰丙酸、甲醇、二氯甲烷、10%钯碳(10%Pd/C)、羟基-3-甲氧基苯甲酸甲酯、三氟乙酸(TFA)、乌洛托品、乙酸乙酯、Na₂SO₄、L-脯氨酸等试剂购自国药集团。牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA, 98%)、卵清蛋白(Ovalbumin, OVA, 98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、考马斯亮蓝 G-250 购自美国 Sigma 公司,所有试剂均为分析纯。

(2) 主要仪器

本实验所用的主要仪器如表 2.1 所示。

表 2.1 本实验的主要仪器

Tab. 2.1 Main instruments of this experiment

仪器	型号	厂家
超纯水仪	LS MK2	美国 PALL 公司
磁力搅拌器	MYP11-2	上海梅颖浦仪器仪表制造
分析天平	AL 104	德国梅特勒托利多仪器
pH 计	FE20-K	上海智光仪器仪表
旋转蒸发仪	RE-2000A	上海亚荣生化仪器厂
循环水多用真空泵	SHZ-D (III)	河南省予华仪器有限公司
电子分析天平	AL-104	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
核磁共振仪	DRX-400	德国 Bruker 公司
液相色谱-质谱仪	Orbitrap LTQ XL	美国 Thermo 公司

2.2.2 主要溶液配制

考马斯亮蓝工作液：称取 50 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 25 mL 95%的乙醇中，混匀后加入 50 mL 85%的磷酸，超纯水定容至 500 mL，滤纸过滤后冰箱 4°C 保存。

0.1M 磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4)：称取 24.0 g 氯化钠 (NaCl)，8.7 g 十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)，0.6 g 氯化钾 (KCl)，0.6 g 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)，用超纯水溶解后定容至 3 L，pH 调至 7.4。

2.3 实验方法

2.3.1 基于辣椒素类物质单克隆抗体同源建模

本研究利用前人已开发的高灵敏度辣椒素类物质单克隆抗体 CPC Ab-D8 用于构建抗体结构模型^[108]，其相关分子操作环境软件(MOE v2018.01; Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada)的设置及建模方法参考已有报道的相关研究^[109]。具体的：选择 force field 模块下的 Amber10:EHT 设置力场条件。从抗体数据库 (www.rcsb.org) 中导入合适的模板框架 (FR)，构建 Fv 区域。其中，FR 区域分配的指定模板为：VL 为 1F8T.L，VH 为 1L8T.H。CDR 循环分配的模板分别为 L1、L2、L3、H1、H2、H3 分别为：1F8T.L、1F8T.L、1F8T.L、5E2W.H、5E2W.H11GT.B。主链模型的最大数量设置为 5 个，每个主链的侧链模型数量默认为 25 个。为了进一步评分，建立了多达 125 个中间模型。采用 GB/VI 溶剂化法对中间模型进行排序。选择 GB/VI 得分最好的模型进行最终能量最小化。在 MOE 软件 Protein Geometry 模块通过抗体 Phi-Psi angles (aka. Ramachandran Plot) 的计算对模型质量进行评估。Profiles-3D Verify 模块用来评估抗体构象的合理性。

2.3.2 基于分子对接辅助设计筛选辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原

6-姜酚、姜酮与 CPC Ab-D8 的分子对接模拟在 MOE v2018.011 中进行, 其相关软件操作参考孙霞等人的报道^[35]。具体操作如下: 在 MOE 中的分子和蛋白质构建模块构建了两个小分子的二维结构, 并通过能量最小化转化为三维结构。选择同源建模优化后的 CPC Ab-D8 作为受体, 利用 MOE 中的 site Finder 模块对结合位点的周围残基进行鉴定。在对接前, 选择 AMBER10:EHT 的力场和反应场的隐式溶剂化模型(R-field)。对接工作流程遵循“诱导匹配”方案, 即允许受体结合位点的侧链根据配体的构象移动, 并对其位置进行限制。对于配体, 首先根据 London dG 评分对其进行排序, 对排名前 30 位的配体进行力场优化, 然后对 GBVI/WSA dG 进行评分, 最终选出最佳排名姿势。小分子的 2D 结构使用 ChemBiodraw 2014 绘制, 3D 构象是通过能量最小化转化。抗体结构在“结构准备”模块构建。采用韦恩图对辣椒素、姜辣素类物质与 CPC Ab-D8 对接的氨基酸残基进行分类。

2.3.3 半抗原及其三肽偶联物静电势能分析

为了研究半抗原结构对抗体诱导和免疫特性及其变化与人工抗原的空间构象, 利用定量计算软件 Gaussian software (G16 C.01, Gaussian 公司, 美国) 和 GaussView 6 (GV6.1.1, 高斯公司, 美国) 进行辣椒素、姜辣素类物质通用半抗原的最低能量构象和静电势分析。在目前的工作中, 密度泛函理论 (Density functional theory, DFT) 是研究有机化合物^[110]的电子结构和几何结构的一种有效和准确的方法, B3LYP 杂化密度泛函作为探索所有相关物质的电子结构和相互作用的传统方法。对于基组, 选择 6-311G(d, p)来描述波函数。对于自洽场的迭代, 能量阈值设置为 1×10^{-8} A.U.。而原子力的阈值设定为 4.5×10^{-4} Au。利用 Gaussian16 程序对几何优化过程中的所有坐标进行了松弛。为了绘制静电电位的等高线, 它从一个特定值(-0.04 到 0.04 A.U.)中生成。映射到总电子密度上。红色区域代表负电位区域, 而蓝色区域代表正电位区域, 过渡颜色区域表示表面的电中性。从静电相互作用定律来看, 一个给定分子的红色区域更倾向于与另一个分子的蓝色区域相互作用。为了解包被抗原结构与动物免疫反应和抗体识别之间的关系, 在半抗原 ESP 分析的基础上, 进一步捕获 BSA 中含赖氨酸片段的三肽 (Asp-Lys-His) 与半抗原结合, 分析不同半抗原-多肽结构的构象对免疫效应的影响, 这在一定程度上反映了半抗原结构与人工抗原空间构象及静电势变化之间的关系。

2.3.4 辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原的合成及鉴定

辣椒素、姜辣素类物质半抗原的合成路线如图 2.1 所示。

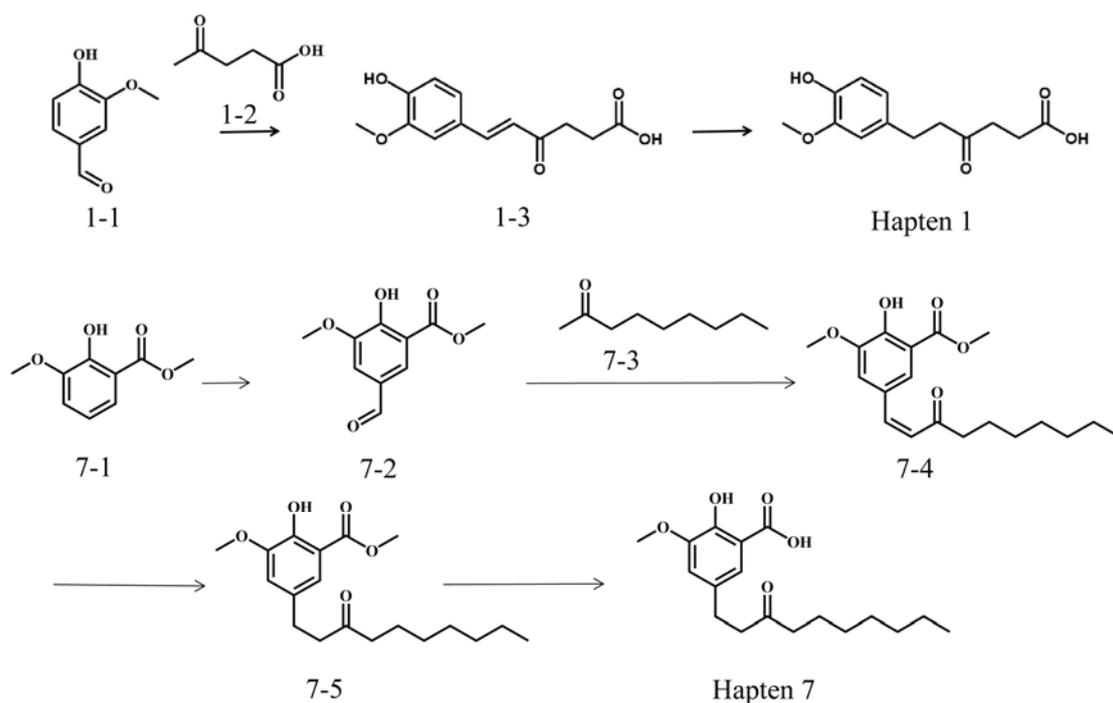


图 2.1 辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原合成路线

Fig. 2.1 Synthesis route of broad-spectrum hapten of capsaicinoids and gingerols

半抗原 Hapten 1 的合成步骤：将化合物 1-1 (1.16 g, 0.01 mol)、四氢吡咯 (0.071 g, 0.001 mol)、AcOH (0.06 g, 0.001 mol) 溶于 10 mL 的甲苯中，升温至 40°C，再将溶有化合物 1-2 (1.52 g, 0.01 mol) 的 26 mL 甲苯滴入，滴毕，升温至 100°C 搅拌 1 h，再升温至 140°C，搅拌 6 h。将反应液浓缩，粗品过柱 (TLC: DCM: MeOH=20:1) 得到纯品约 0.5 g。将化合物 1-3 (0.3 g) 溶于 50 mL 甲醇中，加入 0.2 g 的 10% Pd/C，排空，通入氢气，搅拌 2 h。抽滤去除 Pd/C，浓缩，加入少量 DCM，加热至 40°C，再补加 DCM 刚好使溶液溶清，恢复室温，有白色固体析出，抽滤，粗品经过柱子纯化 (TLC: DCM: MeOH=20:1) 得到纯品约 0.15 g。即辣椒素、姜辣素类物质半抗原 6-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-4-氧己烷酸。

Hapten 7 合成步骤：将化合物 7-1 (2.28 g, 0.0125 mol) 溶于 20 mL 的 TFA 中，加入乌洛托品 (1.75 g, 0.0125 mol)，加热至 75°C，搅拌 3 h。浓缩去除部分 TFA，再加 HCl 水溶液与乙酸乙酯萃取 (2 次左右)，Na₂SO₄ 干燥，减压浓缩，粗品经过柱子纯化 (TLC: PE: EA=2:1) 得到纯品 7-2 约 0.97 g。氮气保护下，将化合物 7-2 (0.97 g, 4.6 mmol) 溶于 10 mL 甲醇中，室温下，将 L-脯氨酸 (0.66 g, 5.75 mmol) 与化合物 7-3 (0.55 g, 3.85 mmol) 加入，搅拌 0.5 h，再将 TEA (1.16 g, 11.5 mmol) 滴入，滴毕，搅拌过夜。加入水与乙酸乙酯萃取 2 次，有机层用 Na₂SO₄ 干燥，减压浓缩，过柱子纯化 (TLC: PE: EA=3:1) 得到纯品 7-4 约 0.6 g。将化合物 7-4 (0.6 g, 1.79 mmol) 溶于 10 mL 甲醇中，加入 0.2 g 的 10% Pd/C，排空，通入氢气，搅拌 3 h。抽滤去除 Pd/C，滤液减

压浓缩，粗品经过柱子纯化 (TLC:PE:EA=5:1) 得到纯品化合物 7-5 约 0.22 g。将化合物 7-5 (0.2 g, 0.59 mmol) 溶于 6 mL THF 中，加入 6 mL 的 NaOH 溶液 (2 mol/L)，加热至 80°C，搅拌 1h。将 HCl 将 pH 调至 3 左右，用乙酸乙酯萃取 3 次，有机层用 Na₂SO₄ 干燥，滤液减压浓缩，粗品经过柱子纯化 (TLC:PE:EA=5:1) 得到纯品约 100 mg，即辣椒素、姜辣素类物质半抗原 2-羟基-3-甲氧基-5-(3-氧代环)苯甲酸。

采用液质联用仪鉴定其纯度，采用核磁共振氢谱 (¹HNMR，共振频率为 400 MHz) 鉴定半抗原结构。

2.3.5 辣椒素、姜辣素类物质广谱性人工完全抗原的合成及浓度测定

分别称取 20.16 mg 6-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-4-氧己烷酸，25.76 mg 2-羟基-3-甲氧基-5-(3-氧代环)苯甲酸(均约 0.08 mmol)于 2 个 4 mL 离心管中，加入体积小于 400 μ L DMF 溶解，分别称取 11.6 mg (约 0.1 mmol) NHS 于离心管中，室温搅拌反应 30 min。称取 20.6 mg (约 0.1 mmol) DCC 溶于 100 μ L DMF 中，将 DCC/DMF 溶液用 100 μ L 移液枪分别逐滴滴加到离心管中，室温搅拌 4 h 后，4°C 静置过夜。各配制二份 6 mL，7 mg/mL BSA 和 OVA 蛋白液，稀释液为 PBS (0.01 mol/L，pH 7.4)，前者用于制备免疫原，后者用于制备包被原。取过夜后的上述反应液于离心管中 8000 rpm 离心 5 min，取上清活泼酯液，用 100 μ L 移液枪在 30 min 之内分别逐滴滴加到上述蛋白液中，一般每滴加一滴时间间隔为 1.5~2 min。边滴加边在磁力搅拌机下搅拌，加样结束后，混合液于室温下搅拌 4 h。搅拌结束后，将反应液置于透析袋内，加入 PBS (0.01 mol/L，pH 7.4) 于 4°C 冰箱内进行透析，每 4 h 更换一次透析液，共透析 60 h。透析结束后，测定蛋白质浓度，置于 -20°C 冰箱备用。

采用考马斯亮蓝法测定完全抗原浓度。具体步骤为：每种包被抗原对应 11 个 1.5 mL 离心管，并编号，1~8 号管中加入标准蛋白溶液，9~11 为样品管。按照表 2.2 进行 0.4 mg/mL 及待测样品的添加，继续加入超纯水至总体积为 0.1 mL。各管充分混匀后均加入 1 mL 考马斯亮蓝染色剂工作液，立即混匀后反应 2~5 min，按照 3 孔/样，200 μ L/孔于酶标板中在 30 min 内，设置酶标仪 595 nm 处及时测定吸光度。

表 2.2 考马斯亮蓝法绘制标准曲线及待测样品

Tab. 2.2 The Coomassie blue method draws the standard curve and the samples to be tested

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	样品		
									1	2	3
BSA (μ L)	0	1	5	10	15	20	25	30	1	1.5	2
超纯水 (μ L)	100	99	95	90	85	80	75	70	99	98.5	98
考马斯亮蓝溶液 (μ L)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

2.4 结果与讨论

2.4.1 抗体 Fv 与姜辣素类物质的分子对接

我们利用已有的 CPC Ab-D8 同源建模结果与姜辣素类物质进行分子对接（图 2.2，表 2.3）。通过对接模拟来预测小分子与 CPC Ab-D8 的结合模式和结合亲和力，抗体 CDRs 包围的口袋被定义为假定的结合位点。结合已有的 CPC Ab-D8 与辣椒素类物质对接的研究结果^[31]发现，5 个分子的结合自由能得分如表 2.2 所示，对接化合物与抗体的结合亲和力预测顺序为：二氢辣椒素>辣椒素>合成辣椒素>6-姜酚>姜酮。这与实际检测结果表现出一致性，也验证了我们方法的可行性。

表 2.3 CPC Ab-D8 与辣椒素、姜辣素的对接得分

Tab. 2.3 The docking score of capsaicinoids and gingerols with CPC Ab-D8

配体名称	结合能(kcal/mol)	数据来源
二氢辣椒素	-6.361	[31]
辣椒素	-6.221	
合成辣椒素	-6.196	
6-姜酚	-5.82	This work
姜酮	-4.83	

如图 2.2，从 6-姜酚、姜酮与 CPC Ab-D8 的结合模式可以看出，6-姜酚、姜酮与 CPC Ab-D8 的结合位点形成了合适的空间互补性。另外，6-姜酚、姜酮与 CPC Ab-D8 之间形成氢键，与周围残基之间形成 VDW 相互作用。配体的苯环与 H-CDR3 中的 Ser96 侧链形成 OH- π 相互作用。这些相互作用主要有助于 6-姜酚、姜酮与 CPC Ab-D8 的结合。此外，6-姜酚的酚羟基氧原子作为氢键供体，与受体 L-CDR3 的 Thr90 主链中的氧原子形成氢键。6-姜酚的羟基氧原子作为氢键供体，与受体 H-CDR3 的 Gly94 主链中的氧原子形成氢键。姜酮的碳烷基氧原子作为氢键受体，与受体 H-CDR1 的 Tyr27 侧链中的氧原子形成氢键，该配体与 L-CDR3 中 Trp94 的侧链形成 CH- π 相互作用。

为了更直观地显示不同的小分子与抗体对接的作用力，我们使用维恩图表示 5 种分析物与 CPC Ab-D8 的对接结果。我们发现苯环，酚羟基，甲氧基，长链烷基中的羰基等基团是与 CPC Ab-D8 形成氢键等关键作用力的主要官能团。这也说明，这些基团对产生辣椒素、姜辣素类物质广谱性抗体的免疫体系有着举足轻重的作用。因此，我们将这些基团作为设计辣椒素、姜辣素类物质半抗原的关键因素。从对接模型还可以看出，长链烷基和羰基在辣椒素和姜辣素的共同识别中作用明显。

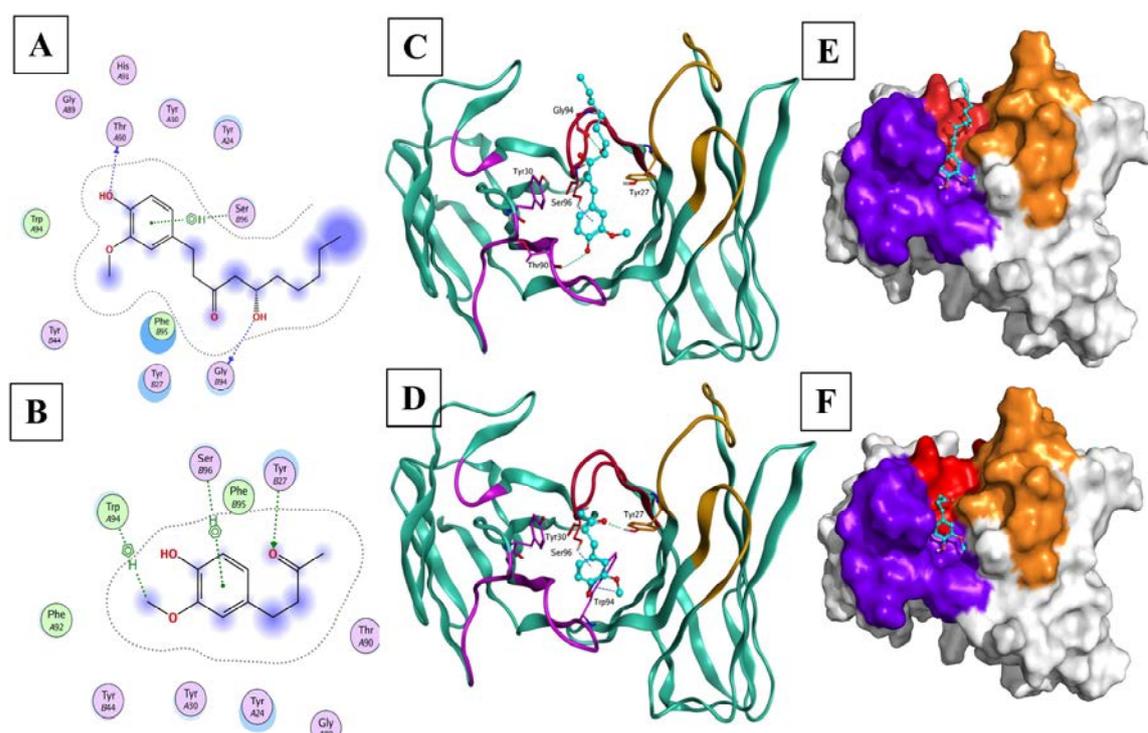


图 2.2 (A、B) / (C、D) : CPC Ab-D8 与小分子 6-姜酚和姜酮对接复合物的 2D/3D 形貌图;
(E、F) : 6-姜酚和姜酮分别与 CPC Ab-D8 结合的表面形态

Fig. 2.2 (A, B)/(C, D): 2D/3D binding mode depiction of the docked complex of CPC Ab-D8 and the small molecule 6-Gingerol and Vanillylacetone, respectively;
(E, F): surface morphology of 6-Gingerol and Vanillylacetone binding with CPC Ab-D8, respectively

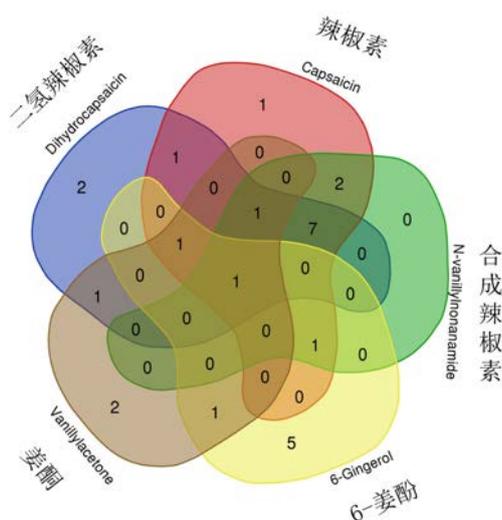


图 2.3 辣椒素、姜辣素类物质与 CPC Ab-D8 对接的氨基酸残基分类维恩图

Fig. 2.3 The Venn diagram of classification of amino residues of CPC Ab-D8 docked to capsaicinoids and gingerols

表 2.4 CPC Ab-D8 与小分子之间的强分子作用力

Tab. 2.4 Strong intermolecular contacts between CPC Ab-D8 and small molecules.

对接分析物	数量	作用力、识别位点及决定簇互补区	
6-姜酚、辣椒素、二氢辣椒素 合成辣椒素、姜酮	1	VDW Phe95 H-CDR3	
辣椒素、二氢辣椒素、 合成辣椒素、姜酮	1	VDW Phe92 L-CDR3	
6-姜酚、辣椒素、 7-二氢辣椒素、姜酮	1	VDW Gly89 L-CDR3	
辣椒素、二氢辣椒素、 合成辣椒素	7	CHPi Tyr27 H-CDR1 HB Ser96 H-CDR3 HB Tyr30 L-CDR1	VDW His26 H-CDR1 VDW Tyr44 H-CDR2 VDW Gly94 H-CDR3 CHPi Tyr24 L-CDR1
6-姜酚、辣椒素、合成辣椒素	1	VDW Trp94 L-CDR3	
辣椒素、合成辣椒素	1	VDW Gly25 H-CDR1	
合成辣椒素、姜酮	1	VDW Thr90 L-CDR3	
辣椒素、合成辣椒素	2	HP Tyr47 H-CDR2	VDW Lys52 H-CDR2
6-姜酚、姜酮	1	OHPi Ser96 H-CDR3	
二氢辣椒素	2	CHPi Tyr47 H-CDR2	NHPi Trp94 L-CDR3
辣椒素	1	VDW Thr92 H-CDR3	
6-姜酚	5	HB Gly94 H-CDR3 HB Thr90 L-CDR3	VDW Tyr27 H-CDR1 VDW Tyr24 L-CDR1 VDW His91 L-CDR3
姜酮	2	HB Tyr27 H-CDR1	CHPi Trp94 L-CDR3

注：HB 代表氢键,CHPi 代表 C-H... π 相互作用,NHPi 代表 C-H... π 相互作用,
VDW 代表范德华力,HP 表示疏水相互作用.

2.4.2 计算机静电势能辅助分析

由电子性质引起的空间位阻和相互作用被认为是影响抗原-抗体识别的关键因素^[88]。为了指导半抗原的设计和合成，筛选出理想的辣椒素类物质抗体，我们利用计算机软件绘制了分析物几何结构和 ESP。从图 2.4 可以发现，Hapten X、Hapten 4 和 Hapten 5 的 ESP 与辣椒素（Hapten 2）、二氢辣椒素（Hapten 3）和合成辣椒素最为相似，电极面积集中在-OH 和-C=O 基的中心，而电极的正极面积集中在-NH 基的中心，这表明酰胺基团在免疫反应中起着重要作用。与 Hapten 4 和 Hapten 5 相比，Hapten X 的几何构象和 ESP 分布表明（图 2.4-a），侧链增加的长链烷基的电中性表面具有较高的疏水性。对于 Hapten 4 和 5（图 2.4-f, 2.4-g），电磁域集中在 O 原子上，而正电域集中在 H-O 和 H-N 基团的 H 原子上。这表明酚类物质对免疫反应的重要性不能被低估，这与已有研究的实验结果相一致^[111]。辣椒素类物质抗体对 Hapten 4 和 Hapten 5（IC₅₀<1.4 μ g/mL）

具有较高的敏感性,但 Hapten 4 间隔臂的碳碳双键 (C=C) 不能通过几何结构和 ESP 分析对免疫分析的影响进行有效预测。对于香草酸和阿魏酸 (图 2.4-c, 2.4-f), 它们的 ESP 分布相似,电极域集中在 O 原子上,而正电域集中在 H-O 基团的 H 原子上。然而,由于缺乏酰胺基团,其免疫原性较弱。

在辣椒素半抗原的设计中, -NH 的正电域明显,但免疫效应与偶联蛋白后完全抗原的分子间力存在一定的关系,因此需要进行深入研究。从总体分布来看, Hapten X、Hapten 4、Hapten 5 和辣椒素的静电势分布更为相似,但这三种物质的免疫作用有所不同。Hapten 4 的敏感性高于 Hapten 5, Hapten X 排名第三^[111]。据推测,小分子与载体蛋白偶联后,更多的氨基酸残基会与半抗原发生相互作用,最终导致相关活性位点的暴露或隐藏。我们采用半抗原与 BSA 的赖氨酸三肽片段 (Asp-Lys-His) 偶联的方法,通过定量计算完全抗原以模拟其空间构象。从图 2.4 可以发现, Hapten X 和 Asp-Lys-His 三肽的缩合产物 Hap-X-3T-a 的结构更弯曲和灵活。然而,甲氧基的存在引起了空间位阻,限制了甲氧基苄基胺的旋转,阻止了一些活性位点的暴露。Hap-4-3T 和 Hap-5-3T (图 2.4-f, 2.4-g) 的 ESP 在结构上趋于线性,这与 Hap-X-3T-a 形成鲜明的对比。其负电区集中在 Asp 周围,而正电区集中在 His 周围。此外,它们含有更多的含氧官能团,从而形成更多的分子间氢键,使其可能更亲水^[112],这对分析和检测的效率非常重要。无论使用 Hapten A-GA-OVA、Hapten 4-OVA 或 Hapten 5-OVA 作为包衣抗原,抗血清 Pa-B2 对辣椒素、合成辣椒素和二氢辣椒素的敏感性依次降低^[111]。这可能是辣椒素长碳链末端的碳-碳双键 (C=C) 降低了长碳链空间结构的灵活性。这也表明使用刚性间隔臂将半抗原连接到蛋白质上可以降低灵活性,并暴露出更多的活性位点。同时,疏水相互作用和静电相互作用均得到增强。此外,异丙基 (-CH(CH)₂) 的空间结构可能比无支链的长碳链更稳定,从而可能有助于提高辣椒素抗体的结合能力,提高检测的灵敏度。

为了产生对辣椒素、姜辣素类物质具有高亲和力和特异性的单克隆抗体,本研究借助已有的 CPC Ab-D8 与姜辣素类物质的分子对接,明确了苯环,酚羟基,甲氧基,长链烷基中的羰基等重要官能团。我们已有研究数据发现静电势分析可以有效的提高半抗原的筛选效率,从而大大减轻高质量抗体制备过程中的工作量^[111]。除此之外,刚性间隔臂可以提高免疫原性^[89,111]。在半抗原设计中,除了关键官能团对免疫原性至关重要以外,连接臂位点及连接臂长度对于关键官能团的暴露也十分重要^[113,114]。基于以上分析,我们设计合成了 2 种新的半抗原 (图 2.1), 他们均保留了上文中提到的关键官能团,不同的是 Hapten 1 将羧基引入长链末端,而 Hapten 7 在苯环上引入羧基基团和葵酮。另外,分析物辣椒素、二氢辣椒素及阿魏酸也作为半抗原以进行全面的分析研究^[53]。除此之外,选择已有报道的两种辣椒素类物质半抗原也是有必要的^[45]。

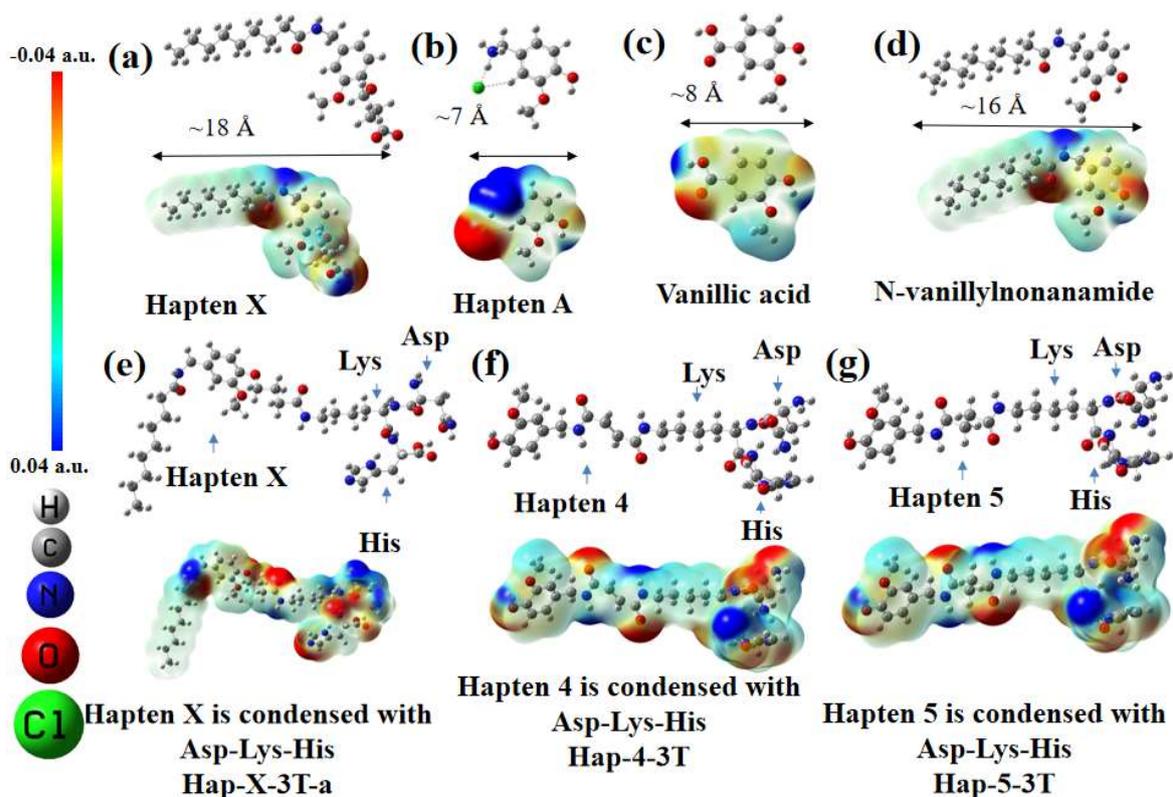


图 2.4 在 B3LYP/6-311g (d, p) 处, 预测的优化结构及其对应的静电势能面, 将 ESP 设置为 -0.04~0.04a.u., (a-c) 辣椒素半抗原; (d) 合成辣椒素; (e-g) 半抗原和赖氨酸三肽偶联物

Fig. 2.4 The optimized structure predicted and its corresponding ESP energy surface at B3LYP/6-311g (d, p), the equivalent of ESP is set to -0.04 to 0.04 a.u., (a-c) capsaicinoids haptens; (d) N-vanillylnonanamide; (e-g) the hapten and lysine tripeptide conjugates

为了验证半抗原设计的可靠性, 我们采用几何构象和静电势分析对设计的半抗原进行分析。如图 2.5 所示, 电极面积集中在酚羟基和长链烷基中的羰基以及酯基的中心。Hapten 1-5 具有相似的几何构象和静电势表面分布。它们都具有带负电的酚羟基、甲氧基上带负电的氧原子, 带正电的甲基基团、几乎电中性的苯环, 侧链中都具有电负性的羰基和末端羧基(负电性的酯基以及正电性的羧基上的氢原子)。同时, 侧链中的氮原子或氢原子都提供了正电性的表面, 这些强正电或负电区域及空间分布, 可能容易与具有高极性的结构相互作用, 刺激机体产生高亲和力、高灵敏度的抗体。这与免疫实验结果相一致。对于 Hapten 7, 苯环上引入羧基基团和葵酮, 这增加了苯环附近的强正电性(羧基上的氢原子)和强负电性区域(羧基上的酯基)。同时, 侧链增加的长链烷基的电中性表面具有较高的疏水性。半抗原的静电势分析进一步证明了利用已有抗体与分析物进行分子对接以明确关键官能团, 设计广谱性半抗原策略的可行性。

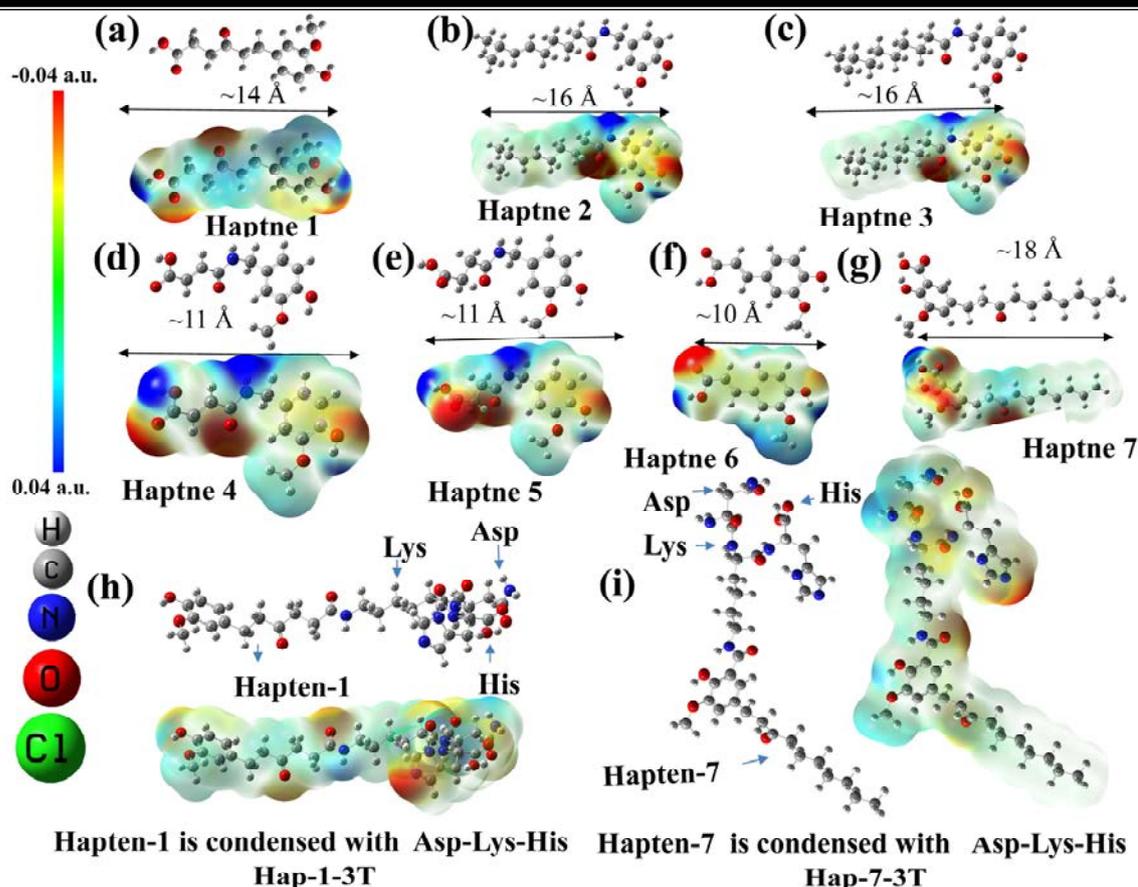


图 2.5 在 B3LYP/6-311g (d, p) 处, 预测的优化结构及其对应的静电势能面, 将 ESP 设置为 -0.04~0.04a.u (a-g) Hapten 1-7; (h-i) 半抗原和赖氨酸三肽偶联物

Fig. 2.5 The optimized structure predicted and its corresponding ESP energy surface at B3LYP/6-311g (d, p), the equivalent of ESP is set to -0.04 to 0.04 a.u. (a-g) Hapten 1-7; (h-i) the hapten and lysine tripeptide conjugates

免疫效应与蛋白偶联后完全抗原的分子间力存在一定的关系^[89]。为探究连接臂位点对免疫效果的影响, 将 Hapten 1 和 Hapten 7 与 BSA 的赖氨酸三肽片段 (Asp-Lys-His) 偶联, 模拟其空间构象, 计算其潜在的表面分布是有必要的。从图 2.5-h, 2.5-i 可以发现, Hap-1-3T 的 ESP 构象在结构上趋于线性, 且将蛋白偶联在长链烷基的末端更利于苯环, 酚羟基, 甲氧基, 长链烷基中的羰基等重要官能团的暴露。相反, Hap-7-3T 则因蛋白折叠以及空间位阻等因素不利于酚羟基、甲氧基及酮基的暴露。

2.4.3 辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原合成与鉴定

借助于已有的 CPC Ab-D8 与姜辣素类物质分子对接明确了苯环, 酚羟基, 甲氧基, 长链烷基中的羰基等重要官能团。我们设计合成了两种新的半抗原 (图 2.1), 他们均保留了这些关键官能团, 不同的是 Hapten 1 将羧基引入长链末端, 而 Hapten 7 在苯环上引入羧基基团和萘酮。

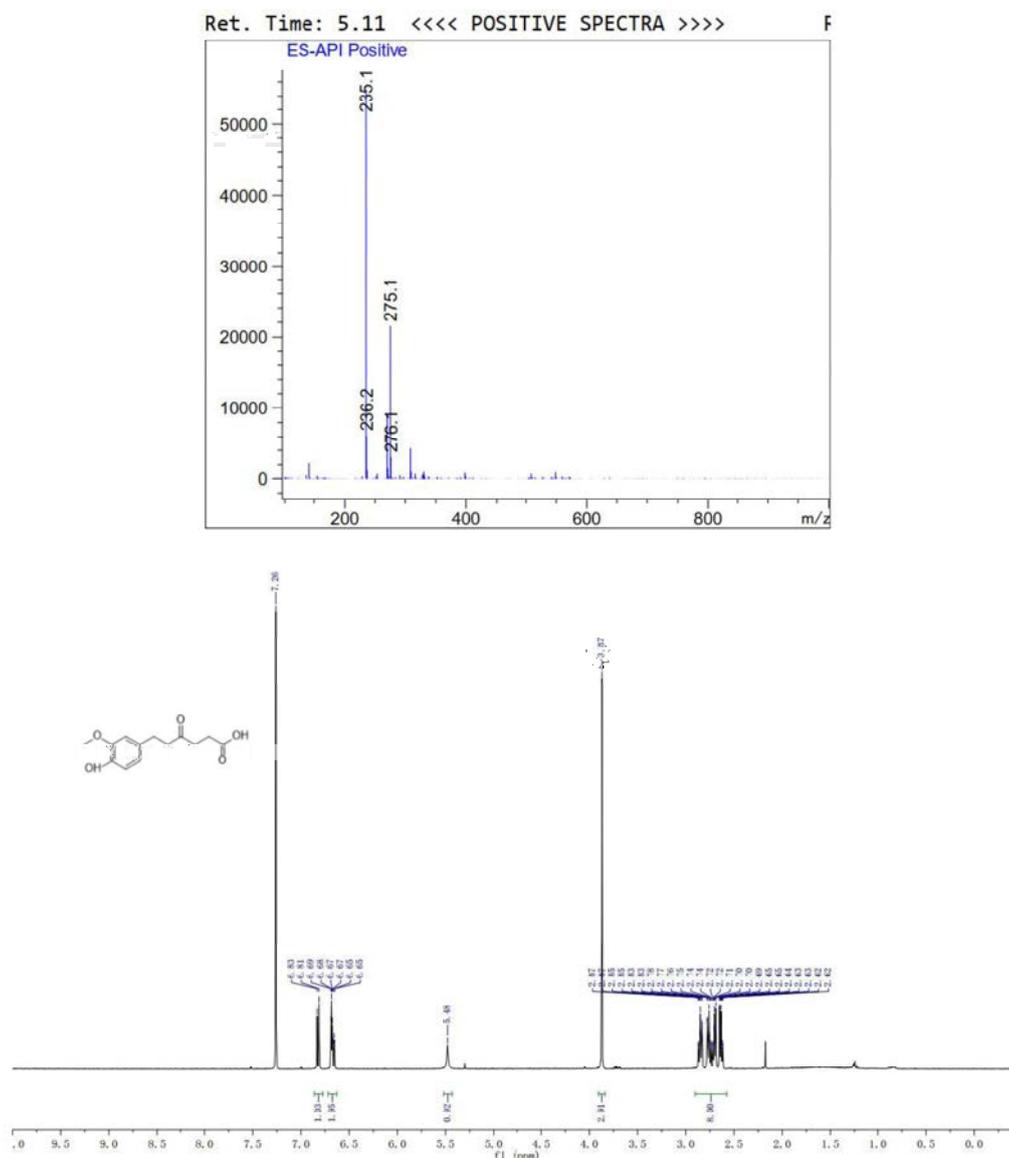


图 2.6 Hapten 1 的质谱和 ^1H 核磁共振图谱

Fig. 2.6 The mass spectra and ^1H NMR spectra of Hapten 1

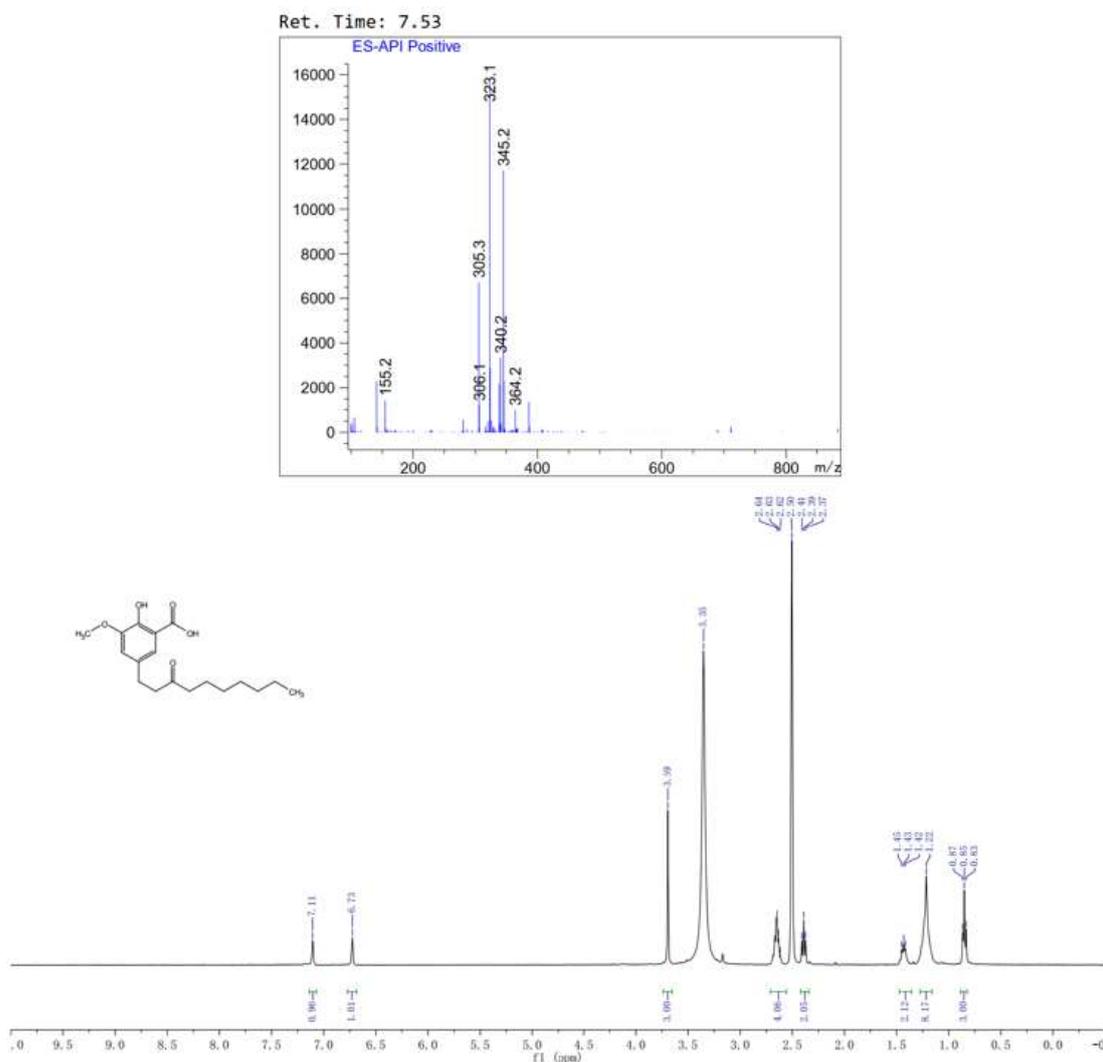


图 2.7 Hapten 7 的质谱和 ^1H 核磁共振图谱

Fig. 2.7 The mass spectra and ^1H NMR spectra of Hapten 7

Hapten 1 的核磁鉴定图谱及数据为： ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 6.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.72 – 6.62 (m, 2H), 5.48 (brs, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.89 – 2.61 (m, 8H).

Hapten 7 的核磁鉴定图谱及数据为： ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.11 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.70 – 2.60 (m, 4H), 2.39 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.41-1.46 (m, 2H), 1.21-1.30 (m, 8H), 0.85 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H).

Hapten 1 的液相色谱鉴定图见图 2.6，出峰时间为 5.11，其含量为 98.3%；Hapten 7 的液相色谱鉴定图见图 2.7，出峰时间为 7.53，其含量为 99.3%。以上结果说明合成的两种半抗原化合物具有较高的纯度，具备用于合成人工完全抗原的条件。

2.4.4 辣椒素、姜辣素类物质广谱性人工完全抗原的合成及浓度测定

采用考马斯亮蓝法测定人工完全抗原浓度^[108]，以标准蛋白浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线，如图 2.8 所示，其线性回归方程为 $Y=21.35818X+0.33518$ ， $R^2=0.991$ 。依据回归方程计算可知，4 种人工完全抗原的浓度分别为：Hapten 1-OVA：2.79 mg/mL；Hapten 1-BSA：5.11 mg/mL；Hapten 7-OVA：2.00 mg/mL；Hapten 7-BSA：7.00 mg/mL。

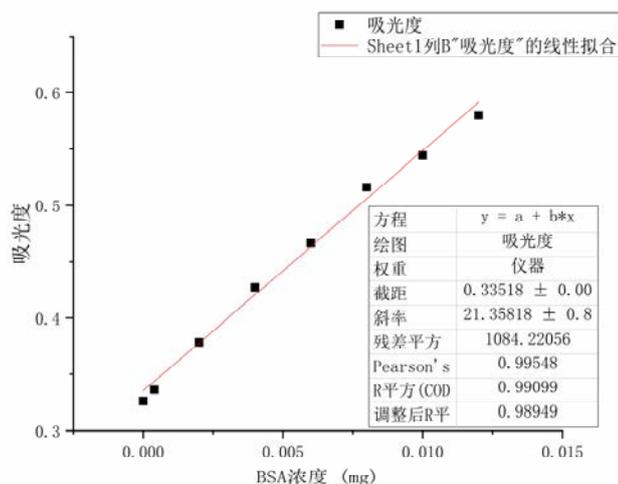


图 2.8 BSA 浓度标准曲线（考马斯亮蓝法）

Fig. 2.8 BSA concentration standard curve (Coomassie blue method)

2.5 本章小结

本章利用分子对接辅助设计筛选辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原的策略，在明确重要官能团的基础上设计合成了两种辣椒素姜辣素类物质广谱性半抗原，分别为 Hapten 1 和 Hapten 7，在大幅减少工作量的同时实现半抗原的有效筛选，同时为解决餐厨废弃油脂单一性指标问题提供了可能。

利用高斯软件进一步研究已有辣椒素类物质半抗原/人工抗原的几何结构和 ESP。为全面研究，我们结合前人实验结果分析发现，ESP 分析能有效地提高半抗原的筛选效率。然而，我们只分析了三肽和半抗原的偶联物。这与实际的免疫抗原很大不同。因此，半抗原与偶联蛋白之间的弱相互作用以及免疫抗原对抗体质量的影响有待进一步研究。同时，半抗原的静电势分析进一步证明了利用已有 CPC Ab-D8 与姜辣素类物质分子对接，明确关键官能团设计广谱性半抗原的策略的可行性。

将获得的辣椒素、姜辣素类物质半抗原与 OVA 和 BSA 偶联作为包被抗原和免疫抗原，并完成了半抗原的合成和纯度鉴定，同时，采用考马斯亮蓝法测定人工完全抗原浓度。

第三章 单克隆抗体制备及抗原-抗体识别机制的研究

3.1 引言

免疫分析作为一种广泛使用的检测方法，在现场检测方面具有显著的优势，已广泛应用于食品、环境、医药等检测领域^[85]。抗体作为识别原件，在免疫分析方法中有着举足轻重的作用。广谱性抗体可以识别一组具有相似化学结构的化合物，它提供了一种经济的方式检测多种污染物^[86,115]。这为解决餐厨废弃油脂单一性指标问题提供了一个有效的思路。因此，为解决餐厨废弃油脂掺假问题，有必要开发广谱性单克隆抗体。辣椒素、姜辣素类物质通用抗体的研制成为解决单一性指标问题的有效方法，可以显著提高检测判别结果的可靠性。除此之外，抗原-抗体的识别机制是整个免疫检测技术的基础。了解广谱性抗体的识别机制对于广谱性半抗原的设计、优质抗体的筛选、抗体的应用性能的提高以及免疫分析方法的建立有着重要的理论意义和实践价值。

基于以上分析和思考，我们利用制备的完全抗原对小鼠进行免疫，将免疫效果好的小鼠用于细胞融合。通过采用标准品浓度依筛选次数增大而递减的筛选策略，以期获得对辣椒素、姜辣素类物质都有较好识别的广谱性抗体。同时，本研究利用收集的5种完全抗原及对应抗体与我们的完全抗原及抗体进行交叉组合，进一步明确抗原抗体识别机制，为食用油中多种小分子外源标志物同步免疫分析提供理论依据和技术支撑，并选取的最佳组合（Hapten 5-OVA/1-F12）通过 LFIA 进行验证。

3.2 实验材料

3.2.1 试剂与仪器

本章所用到的仪器与表 2.1 中的仪器相同，除此之外，还用到的其他试剂如表 3.1、3.2 所示。

表 3.1 收集的抗原抗体来源

Tab. 3.1 Sources of the collected antigens and antibodies

抗原	规格	对应抗体	来源
Hapten 2-BSA/OVA	2 mg/mL	2-LD2	山东绿都
Hapten 3-BSA/OVA	2 mg/mL	3-LD3	山东绿都
Hapten 4-BSA/OVA	7 mg/mL	4-AT4	深圳安提生物
Hapten 5-BSA/OVA	5 mg	5-3H1 5-D8 (CPC Ab-D8)	中国农业科学院
Hapten 6-BSA/OVA	6 mg/mL	6-AT6	深圳安提生物

表 3.2 本实验所用的主要试剂

Tab. 3.2 Main reagents of this experiment

试剂	化学式	规格	厂家
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	100 g	美国 Sigma
L-谷氨酰胺	$C_5HN_2O_3$	100 g	美国 Sigma
RPMI-1640 基础培养基	/	500 mL	美国 Cytiva
双抗 (青链霉素) (100×)	/	100 mL	美国 Thermofisher
胎牛血清	/	100 mL	浙江天航
非必需氨基酸 (100×)	/	100 mL	美国 Thermofisher
生长因子	/	100 mL	北京博奥龙
HAT/HT (50×)	/	10 瓶	美国 Sigma
PEG1450	$H(CH_2CH_2O)_nOH$	500 g	美国 Sigma
二甲基亚砜	C_2H_6OS	50 mL (生物无菌级)	美国 Sigma
羊抗鼠 IgG-HRP	/	2 mg/mL	山东绿都
脱脂奶粉	/	450 g (18 小袋)	内蒙古伊利
BSA	/	100 g	美国 Sigma
一水合柠檬酸	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	500 g (分析纯)	上海国药
3,3',5,5'-四甲基联苯胺	$C_{16}H_{20}N_2$	5 g	上海阿拉丁
过氧化氢脲	$CH_4N_2O \cdot H_2O_2$	25 g	上海阿拉丁
AFB ₁ -BSA	/	1 mg	美国 Sigma
AFB ₁ -BSA	/	2.5 mg/mL	中国农业科学院
96 孔聚苯乙烯酶标板	/	3590	美国 Costar 公司
阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	20 mg	上海阿拉丁
反式阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	5 g	上海阿拉丁
异阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	10 mg	上海阿拉丁
香草醛	$C_8H_8O_3$	25 g	上海阿拉丁
香草酸	$C_8H_8O_4$	5 g	上海阿拉丁
2-羟基-3-甲氧基-5-(3-氧代环)苯甲酸	$C_{18}H_{26}O_5$	100 mg	美国 Jack Moore Associates Inc.
2-Cyano-N-(3-methoxybenzyl)acetamide	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	50 mg	美国 Sigma
3-(4-羟基-3-甲氧苯基)丙酸	$C_{10}H_{12}O_4$	1 g	上海阿拉丁

3.2.2 主要试剂配制

(1) 分析物存储液的配置

所有分析物 (辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素、6-姜酚、6-姜稀酚、姜酮) 标准

存储液：准确称取 5 mg 分析物标准品，溶于 1 mL 70% 浓度的甲醇水（700 μ L 甲醇与 300 μ L 超纯水混合均匀），配置成 5 mg/mL 的母液。

(2) ELISA 主要试剂

参考杨青青博士论文进行配置^[108]。

(3) 小鼠免疫原乳化（现配现用）

将 80 μ g（以蛋白的量计）免疫抗原（提前于 4°C 冰箱溶解），用 0.9% 的生理盐水稀释，并加入等体积的弗氏不完全佐剂（除第一次为弗氏完全佐剂外）于 1.5 mL 离心管中。将封口膜封好的离心管置于调合银汞机内，设置参数为 440 r/min，震荡 20 s，每次震荡后于冰渣中冷却 2 min，重复操作 8 次后完成乳化。

(4) 动物细胞实验主要试剂配制

参考查传云硕士论文进行配置^[116]。

(5) SDS-PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）相关溶液配置

参考张宁硕士论文进行配置^[117]，其中 10% 分离胶和 5% 凝缩胶的配置按照碧云天试剂使用说明书进行配置。

3.2.3 实验动物与小鼠骨髓瘤细胞

(1) 4~6 周龄，SPF 级，雌性 Balb/c 小鼠，购自山东省济南市朋悦实验动物繁育有限公司，许可证号：SCXK（鲁）20190003。

(2) 小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 来源于山东风华生物技术有限公司（中国，山东省淄博市）。

3.3 实验方法

3.3.1 Balb/c 小鼠免疫及抗血清检测

使用 1 mL 无菌注射器吸取免疫试剂（期间需要低速离心含有免疫原的离心管），最后检查注射器中空气是否排尽。将 8 只 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠分为两组，分别用 Hapten 1-BSA 和 Hapten 7-BSA 免疫。小鼠采用的是常规免疫策略，详细的免疫策略如表 3.3 所示。从第二次免疫开始，每次免疫后第 8 天采集小鼠抗血清样本，采用间接 ELISA 检测其亲和力和特异性。检测中分析物浓度为 1 mg/mL，且各分析物等量混合使用，终浓度均为 1 μ g/mL。细胞融合前 3 天对小鼠进行冲击免疫，具体为将 100 μ g 免疫原用生理盐水稀释至 200 μ L 后对小鼠进行腹腔注射。

在小鼠二免至五免七天后，采用断尾取血的方法对小鼠进行血清采集，采集的血清及时进行离心（7084 \times g，5 min，去除血浆等干扰物），等体积混甘油后 -20°C 保存，利用间接 ELISA 对抗血清进行亲和力、灵敏度测定。数据经 Origin 9.0 软件处理得到 IC₅₀ 值用于评价小鼠血清灵敏度。

表 3.3 小鼠的免疫策略

Tab. 3.3 Immune strategies of mice

免疫次序	间隔 (天)	免疫剂量 ($\mu\text{g}/\text{只}$)	部位/方法	佐剂类型
一	0	80 μg	颈背部皮下多点注射	弗氏完全
二	21	80 μg	同上	弗氏不完全
三	42	80 μg	同上	弗氏不完全
四	63	80 μg	同上	弗氏不完全
五	84	80 μg	同上	弗氏不完全
冲击免疫	细胞融合前 3 天	100 μg	腹腔注射	无

间接非竞争 ELISA 步骤如下:

(1) 包被: 将 2.86 μL , 1.75 mg/mL 的 Hapten 1-BSA (2.50 μL , 2.00 mg/mL 的 Hapten 7-BSA) 用 10 mL 碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 9.6) 稀释混匀, 按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 96 孔酶标板微孔中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h, 弃去包被液, 用 0.05% PBST 洗涤酶标板 3 次, 扣干;

(2) 后续实验步骤参考查传云硕士论文^[116]。

(3) 结果判读: 以 OD₄₅₀ 值大于或等于 1 时所对应的抗血清最高稀释倍数为 ELISA 效价值 (抗血清滴度)。

间接竞争 ELISA 步骤如下: 除第 (1) 步骤外, 其他步骤参考查传云硕士论文^[116]。另外, 血清检测时所用分析物为辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素、6-姜酚的混合标准品, 各标品终浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 混合均匀后倍比稀释。

3.3.2 杂交瘤细胞的制备

(1) 冲击免疫: 分析小鼠抗血清 ELISA 检测结果, 挑选效价和灵敏度高的两只小鼠进行细胞融合。在细胞融合前三天对该小鼠进行冲击免疫, 具体剂量及操作见表 3.3。

(2) 细胞融合的准备工作及实验操作参考杨青青博士论文完成^[108]。

3.3.3 阳性细胞株的筛选及单克隆化

将融合后的细胞于 2% HAT 重悬混匀后用灭菌玻璃滴管逐滴平铺于酶标板 (2 滴/孔), 置于恒温培养箱 (5% CO₂, 37 $^{\circ}\text{C}$) 中静止培养。融合七天后在倒置显微镜下观察细胞团及细胞状态, 并于每孔中补加 50 μL 1% HAT 培养液。待 50% 有细胞的孔中细胞生长至 1/6~1/4 孔时进行细胞上清检测。检测时每列细胞板对应酶标板的两列 (一列分别加 50 μL 10% 甲醇 PBS 和 50 μL 对应细胞孔中细胞上清液, 记为 B₀; 另一列分别加入 50 μL 10% 甲醇 PBS 稀释的混合标准品和 50 μL 对应细胞孔中细胞上清液, 标准品浓度

依筛选次数增大而递减, 记为 B)。以检测获得的 B_0 值及 $(1-B/B_0)$ 值为依据, 根据总体细胞孔样本为参考设置当次的细胞筛选标准, 最终挑选出较好的阳性孔, 后续继续采用有限稀释亚克隆法对阳性细胞株进行单克隆化, 具体操作为: 将阳性孔中杂交瘤细胞重悬并用显微镜进行计数后, 采用梯度稀释法将细胞稀释至 10^3 作为稀释母液, 并用母液将细胞稀释为 30 个/mL 和 5 个/mL, 分别铺板至细胞板的前四列和后八列。筛选过程中细胞培养液逐渐过渡为 RPMI-1640 完全培养基, 标准品为辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素、6-姜酚的混合标准品。经过多轮筛选, 获得单克隆化细胞株。

3.3.4 阳性杂交瘤细胞的腹水制备与细胞冻存

(1) 腹水制备

a) 小鼠致敏 (腹腔注射): 挑选体重为 20 g 的雄性 Balb/c 小鼠, 使用弗氏不完全佐剂对空白小鼠进行致敏, 剂量为 0.5 mL/只。

b) 细胞复苏与培养: 于液氮罐冻存盒中取阳性杂交瘤细胞, 快速置于稍高于 37°C 的超纯水进行快速解冻, 解冻过程中快速摇晃且防止超纯水没过冻存管盖。溶解后在超净台中无菌操作, 使用 RPMI-1640 基础培养液将复苏细胞重悬, 离心 ($1062 \times g$, 5 min), 弃上清。反复清洗 2 次, 以免冻存液对复苏细胞产生伤害。将清洗后细胞用 RPMI-1640 完全培养液重悬, 置于恒温培养箱 ($5\%\text{CO}_2$, 37°C) 中静止培养。

c) 腹水制备: 采用腹腔注射的方法, 用 RPMI-1640 基础培养液重悬的阳性细胞株接种于致敏 5 天后的小鼠细胞密度为, $1\sim 10 \times 10^6$ 个/mL。待一周后, 选取腹部膨大, 活动缓慢小鼠进行腹水的收集。

(2) 细胞冻存

将可传代细胞重悬后离心, 使用细胞冻存液稀释至细胞密度为 $1\sim 5 \times 10^6$ 个/mL, 按照 1 mL/管分装于 2 mL 冻存管。采用程序降温 (4°C , 10 min \rightarrow -20°C , 30 min \rightarrow 液氮上方过夜 \rightarrow 液氮长期保存) 完成细胞冻存。

3.3.5 腹水纯化与单抗制备

将收集的腹水离心 (4°C , $4427.5 \times g$, 10 min), 采用辛酸-硫酸铵沉淀法对腹水中单克隆抗体进行纯化, 具体实验操作依据张宁硕士学位论文^[17]。

3.3.6 辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体鉴定及性能评价

(1) 单克隆抗体纯度鉴定

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对纯化后的单克隆抗体进行鉴定。具体操作如下:

a) 组合制胶槽后检测底部是否平齐制胶槽密封的严谨性 (注意手不要碰到玻璃板内

测)，组合后检测底部是否平齐，并注入蒸馏水 20 min 左右（检查制胶槽密封严谨），此时可以顺带量一下分离胶和浓缩胶需要的体积。在确认制胶槽密封严谨的情况下，用定性滤纸将水吸出。

b) 配制 10%分离胶 4 mL (pH 8.8, 根据实际用量配置, 顺序: 去离子水、Tris-HCl 缓冲液、SDS、丙烯酰胺、30% Acr-Bis, 这时确定制胶槽没有漏且用滤纸吸干水后的情况下加入 TEMED (注意味道刺鼻)), 完成后搅拌均匀, 分离胶的高度为制胶槽横杠上多一点点。

c) 加入 10%分离胶 (用 1 mL 枪头加, 枪头抵在长端加入) 后, 用 1 mL 移液枪在顶端均匀的、滑动的加入超纯水进行水封 (高度约 1 cm), 等待 40 min。分离胶凝缩后 (制胶板出现分层以后), 用定性滤纸将超纯水析出。

d) 配置 5%浓缩胶 3 mL (pH 6.8) (配置顺序: 超纯水、Tris-HCl 缓冲液、SDS、丙烯酰胺、30% Acr-Bis、TEMED (注意味道刺鼻)), 并混合均匀后, 用 1 mL 移液枪注入制胶槽 (枪头抵在长端加入), 加满液, 如果此时出现气泡, 则用注射器针头清理。

e) 将梳子插入制胶槽 (梳子有字的一面向里, 0.1 mm 厚的十孔梳), 室温下静置 40 min 后, 将制好的凝胶从制胶板上取下, 安置进电泳槽 (制胶玻璃板的短侧朝向电极一侧)。

f) 安置好后, 将电泳缓冲液注入电泳槽中, (里面加满, 外面的液面高度高于 1/2 电泳槽, 使凝胶的上端和下端全部浸泡在电泳液中, 保证形成正常电场), 双手均匀用力将梳子垂直拔出。水平观察凝胶板胶孔是否正常, 如出现拔梳子时使胶孔拔弯, 则用注射器针头进行调整。

g) 样品从冰箱取出恢复至室温后, 吸取一定量 5X 上样缓冲液 (可能较为粘稠, 枪头多吸打两次再加) 于 PCR 管中, 再加入 40 μg 待测抗体 (SDS 与蛋白的结合质量比例为: 1.4 g SDS/g 蛋白质), 轻微震荡混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min, 离心机 10000 r/min 离心 5 min, 取上清加样 (加样前离心防止拖尾)。

h) 上样: 每个跑道的蛋白上样量为 40 μg , 与上样缓冲液混合液的总体积小于等于 20 μL , 加样枪头多余样品用卫生纸擦除, 枪头沿着凝胶板长的一端慢慢下移, 找到凝胶孔后, 加入凝胶版中的孔中; 吸取 5 μL 蛋白 Marker 加入凝胶板的孔中。

i) 安装电泳仪: 按照红正黑负 (红对红, 黑对黑) 进行安装, 并将其连接在电泳仪电源。检查电泳仪通电成功 (电泳仪底部冒出很多气泡)。

j) 凝缩: 电压 80 V 的条件下进行电泳, 时长根据实际情况进行停止 (即样品带跑到凝缩胶和分离胶界面时, 凝缩完毕)。

k) 分离: 电压 120 V 的条件下进行电泳, 时长根据实际情况进行停止 (即样品带跑到分离胶底部时, 电泳完毕)。

l) 考马斯亮蓝染色: 用梳子将玻璃板撬开后, 用注射器针头划胶的两端, 使两端松

动,切胶板切去浓缩胶,倒扣着小心取出凝胶。先于超纯水中并煮沸保持沸腾状态 1 min,摇床染色 10 min;倒掉液体加入考马斯亮蓝染色液,煮沸,保持沸腾状态 1 min,摇床摇 10 min(考马斯染色液中,用考马斯亮蓝染色液于摇床上对凝胶进行染色,30 min)。

m) 超纯水煮沸 1 min,摇床摇 10 mins,观察条带是否清晰(脱色液脱色,脱色时间为(15~30 min),带凝胶可以看到蛋白条带时停止脱色。

n) 成像、拍照:将要拍照的电泳胶放入后,排除气泡,擦干水珠。

(2) 辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体效价、灵敏度和特异性评价

参考之前工作中开发的 icELISA^[111],我们在最优条件下对抗体进行了效价、灵敏度和特异性评价。通过 Origin 9.0 软件计算 IC₅₀ 值(半抑制浓度,导致半最大抑制的浓度)。采用半抑制浓度和交叉反应率(CR)分别评价抗体对辣椒素类物质(辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素)、姜辣素类物质(6-姜酚、6-姜稀酚、姜酮)以及其他 8 种化合物的敏感性和特异性。

CR 计算公式: $CR(\%) = [IC_{50}(6\text{-姜酚})/IC_{50}(\text{结构类似物})] \times 100\%$ 。 (3.1)

3.3.7 不同来源抗原抗体交叉组合

为了克服同源包被可能导致的低抑制率的问题,不同来源抗体与不同包被原组合是有必要的。在我们的研究中,Hapten 1-5 保留了诸如苯环,酚羟基,甲氧基,长链烷基中的羰基等重要官能团。其中 Hapten 2 和 3 直接利用辣椒素类物质作为半抗原,而 Hapten 4 和 5 在其他人的研究中已有报道。这些为异源包被提高广谱性抗体灵敏度和特异性奠定了基础。除此之外,Hapten 6-7 用于明确羰基以及连接臂长度和位点对辣椒素-姜辣素类广谱性抗体产生的影响。同时,抗体与分析物(样品中游离半抗原)之间的高亲和力很容易导致低滴度和高抑制率^[118]。通过不同来源抗原抗体交叉组合,明确最佳抗原抗体组合,在探明抗原抗体识别机制的基础上,提高抗体的灵敏度,为后期快速现场检测方法的建立奠定了良好的基础。

3.4 结果与讨论

3.4.1 小鼠免疫效果检测

(1) 小鼠血清效价

将制备的人工完全抗原进行小鼠免疫,免疫一周后采用非竞争 ELISA 测定抗血清效价,这在一定程度上可以反应小鼠体内免疫反应的强弱。如图 3.1 所示,随着免疫次数的增多,小鼠抗血清效价不断增高。小鼠第五次免疫所得抗血清效价与四次免疫抗血清效价相当,说明小鼠已经产生免疫耐受。经过五次免疫,Hapten 1-BSA 和 Hapten 7-BSA 免疫的小鼠抗血清效价分别可以达到 128000 和 64000。因此,选择五免后的小鼠进行细

胞融合。

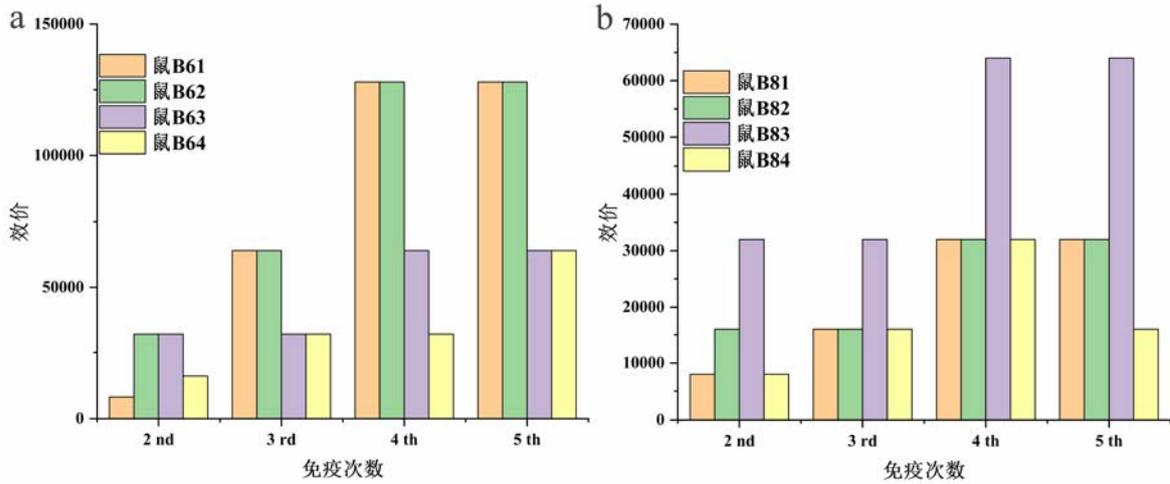


图 3.1 不同免疫次数下小鼠的抗血清效价, a: Hapten 1-BSA; b: Hapten 7-BSA

Fig. 3.1 Antiserum titers of mice under different immunization times, a: Hapten 1-BSA; b: Hapten 7-BSA

(2) 小鼠血清灵敏度

采用间接竞争 ELISA 测定抗血清灵敏度,这在一定程度上可以反应抗血清中抗体对分析物的识别能力。本研究以辣椒素、姜辣素类物质混合标准品(辣椒素、二氢辣椒素、合成姜辣素、6-姜酚、6-姜稀酚、姜酮)为横坐标,以吸光度值的比值 B/B_0 为纵坐标绘制标准曲线。经 Origin 2018 处理获得 IC_{50} 值用于评价小鼠抗血清的灵敏度。

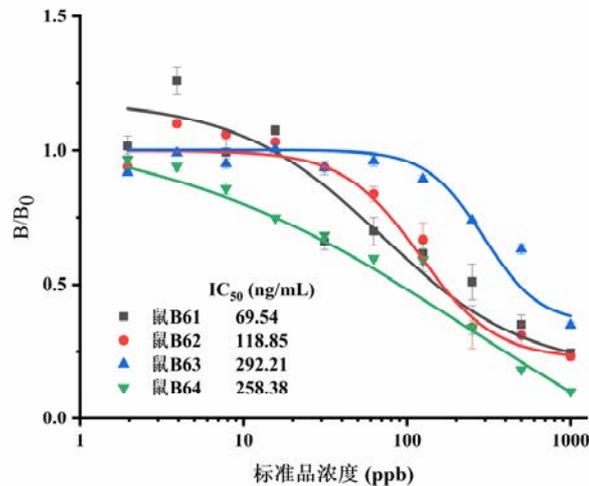


图 3.2 Hapten 1-BSA 免疫小鼠抗血清的竞争曲线

Fig. 3.2 Competition curves of antisera from mice immunized with Hapten 1-BSA

图 3.2 可知,采用 Hapten 1-BSA 对小鼠五次免疫后,鼠 B61 的 IC_{50} 值最低且检测

范围广，B62 次之。由表 3.4 可知，Hapten 7-BSA 免疫小鼠抗血清效价虽能高于 64000，但其对辣椒素等标准品没有表现出亲和力，不能实现有效的识别。Hapten 7-BSA 未能诱导显著的免疫反应（Best IC₅₀ of antiserum>1000），这也印证了我们的假设，即偶联蛋白与半抗原之间存在空间位阻，进而导致关键官能团不能得到有效暴露。也反应出连接臂位点对免疫反应有着重要的影响。综合小鼠效价和灵敏度，选择 B61、B62 进行细胞融合。

表 3.4 小鼠血清间接 ELISA 的检测结果

Tab. 3.4 Results of the indirect ELISA in mouse serum

免疫原	阳性血清比例	滴度值	最好抗血清的 IC ₅₀ 值 (ng/mL)			
			2 nd immuization	3 rd immuization	4 th immuization	5 th immuization
Hapten 1-BSA	100%	128000	234.03	247.48	289.89	69.54
Hapten 7-BSA	25%	64000	>1000	>1000	>1000	>1000

3.4.2 杂交瘤细胞筛选单克隆化鉴定

本实验对融合后的小鼠细胞采用有限稀释亚克隆法进行筛选，且随着筛选次数的增加，标准品浓度逐渐降低，以获得高灵敏度单克隆细胞株。如图 3.3 所示，以 OD 值为横坐标，以抑制率（1-B/B₀）为纵坐标绘制细胞筛选过程中的散点图。

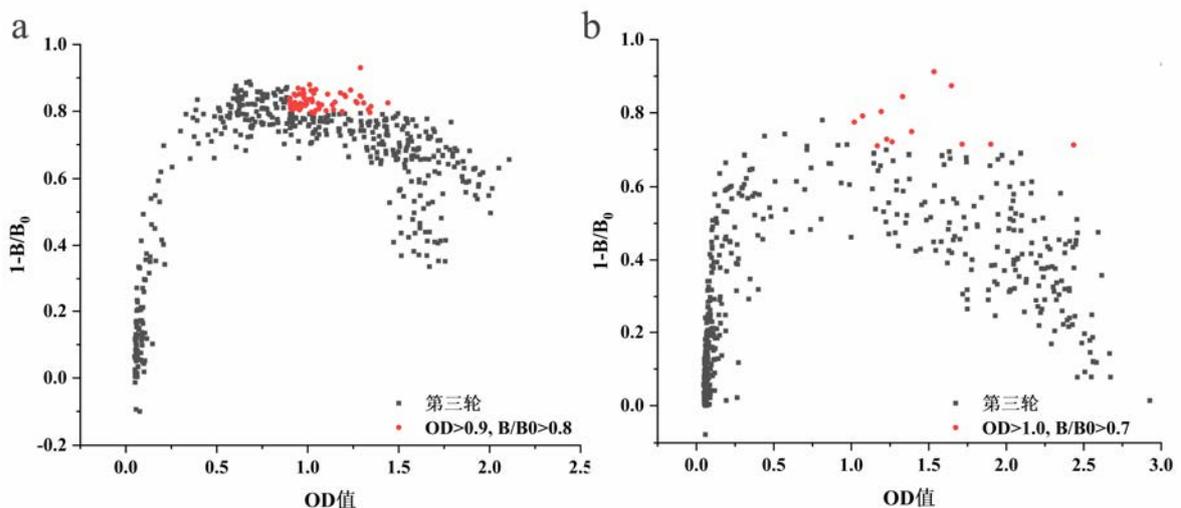


图 3.3 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株第三轮散点图，a: B61；b: B62

Fig. 3.3 Third-round scatter diagram of positive hybridoma cell lines screened by ELISA, a: B61; b: B62

经过多轮的筛选，最终挑选三株杂交瘤细胞进行扩大培养，分别为 1-F12、1-G12、1-D6，其中，1-F12、1-G12 来自同一只老鼠。

3.4.3 腹水抗体的制备与纯化

采用动物体内诱生法制备富含抗体的腹水，并用辛酸硫酸铵法进行抗体的纯化。通过 SDS-PAGE 鉴定抗体纯度（图 3.4），纯化后抗体在通道中存在很少的其他蛋白，且抗体经热处理后分解为两条主要条带，分别为 25 kDa 和 70 kDa 的轻链和重链，说明纯化效果良好。

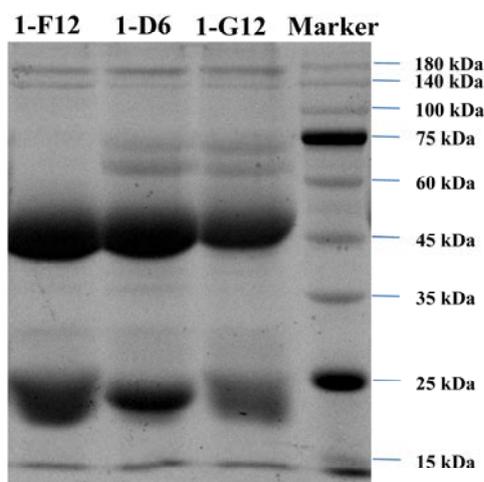


图 3.4 抗体纯化后的还原结果（SDS-PAGE）

Fig. 3.4 The reduction reaction results after antibodies purification (SDS-PAGE)

3.4.4 辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体鉴定及性能评价

（1）辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体效价与灵敏度评价

为保证纯化后抗体的质量，对纯化后抗体进行亲和力和灵敏度测定是有必要的。本研究采用间接 ELISA 对制备的单克隆抗体进行亲和力、灵敏度评价。辣椒素、姜辣素类物质标准品各自从 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始进行系列浓度梯度稀释。由表 3.6 可知，1-F12、1-G12、1-D6 的效价分别为 1:128000、1:64000、1:126000，抗体对所有分析物均表现出较好的识别。另外，由表 3.6 可知，利用 Hapten 1-BSA 制备的单克隆抗体在多个组合中可以满足我们的真实需求，即既具有广谱性，又能满足实际检测中灵敏度的要求。

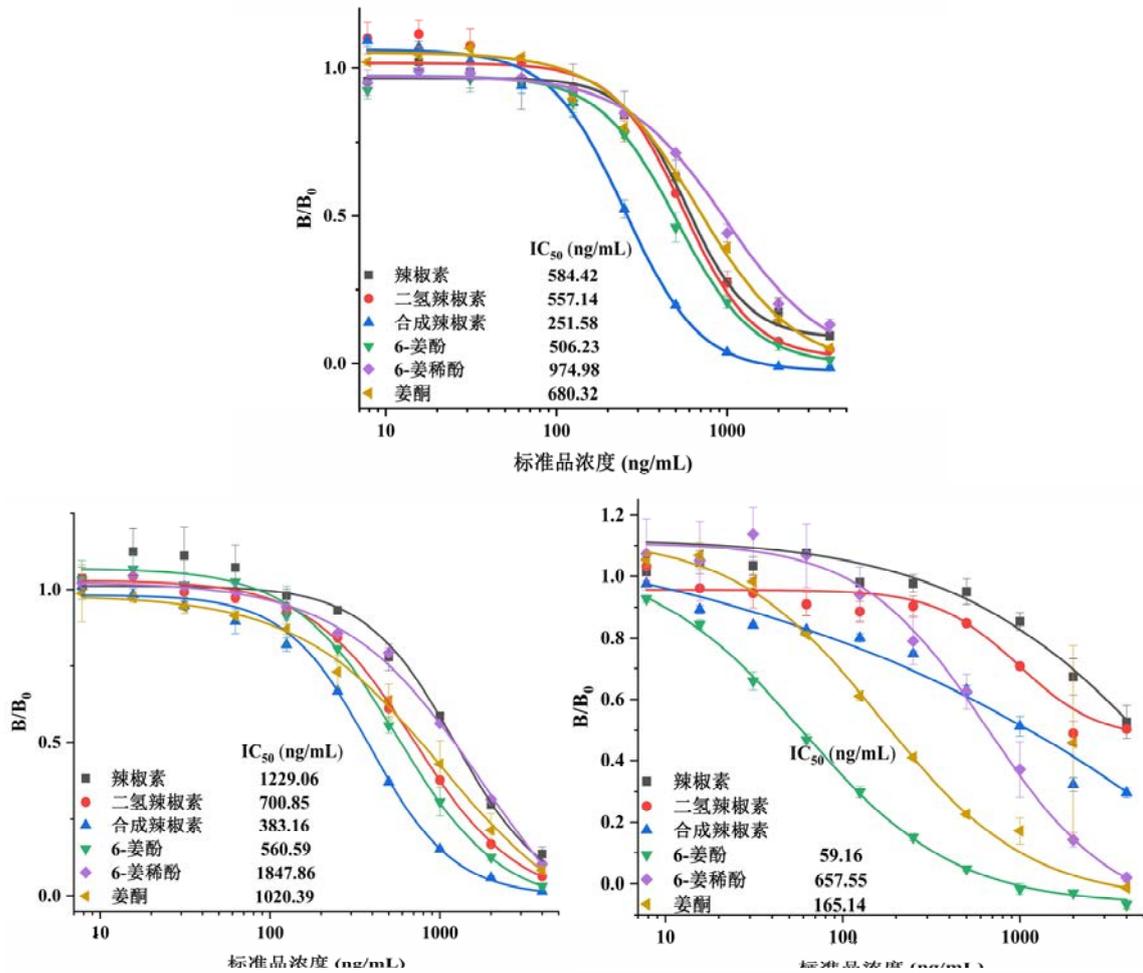


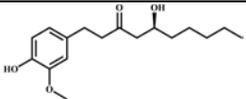
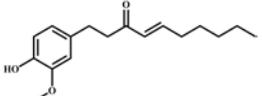
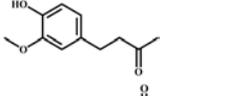
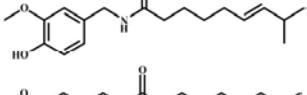
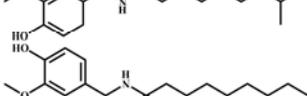
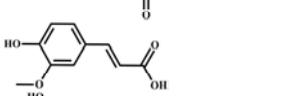
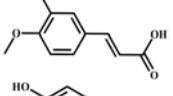
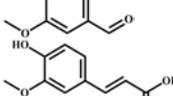
图 3.5 辣椒素、姜辣素类物质单抗的竞争曲线 A: 1-F12; B: 1-G12; C: 1-D6

Fig. 3.5 The competition curve of mAbs. A: 1-F12; B: 1-G12; C: 1-D6

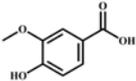
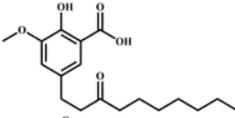
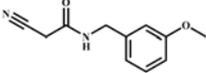
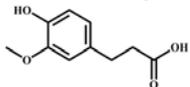
(2) 辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体特异性评价

由于烹饪过程中辣椒素、姜辣素类物质的广泛使用，因此多种辣椒素、姜辣素类物质可能同时存在于餐厨废弃油脂中。如表 3.5 所示，6-姜酚、6-姜稀酚、姜酮、辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素和其他 8 种结构类似物被用于评估 Hapten 1-BSA 制备的三株单克隆抗体的特异性。三株单克隆抗体均能对辣椒素、姜辣素类物质产生较好的识别，而抗体对其他类似物的 CR 值均较低。除此之外，1-D6 对姜辣素类物质具有更高的灵敏度和特异性，但对辣椒素类物质识别相对较差。因此后续以另外两个广谱性抗体进行分析。

表 3.5 辣椒素、姜辣素类物质广谱性单克隆抗体的特异性评价
Tab. 3.5 Specific evaluation of monoclonal antibodies to capsaicinoids and gingerols

化合物及其结构	1-F12		1-G12		1-D6	
	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
6-姜酚 	506.23	100.00	560.59	100.00	59.17	100.00
6-姜稀酚 	974.99	51.92	1847.86	30.31	657.56	9.00
姜酮 	680.32	74.41	1020.39	54.94	165.14	35.83
辣椒素 	584.43	86.62	1229.06	45.61	>4000	<1.48
二氢辣椒素 	557.14	90.86	700.85	79.99	969.82	6.10
合成辣椒素 	251.58	201.22	383.16	146.31	2126.35	2.78
阿魏酸 	>4000	<12.66	>4000	<14.01	1927.36	3.07
异阿魏酸 	>4000	<12.66	>4000	<14.01	2128.07	2.78
香草醛 	>4000	<12.66	>4000	<14.01	1981.61	2.99
反式阿魏酸 	>4000	<12.66	>4000	<14.01	>4000	<1.48

续表

香草酸		>4000	<12.66	>4000	<14.01	1717.20	3.45
2-羟基-3-甲氧基-5-(3-氧代环)苯甲酸		>4000	<12.66	>4000	<14.01	1952.80	3.03
2-Cyano-N-(3-methoxybenzyl) acetamide		>4000	<12.66	>4000	<14.01	>4000	<1.48
3-(4-羟基-3-甲氧苯基)丙酸		>4000	<12.66	>4000	<14.01	2175.33	2.72

3.4.5 不同来源抗原抗体的 ELISA 交叉组合

3.4.5.1 辣椒素、姜辣素类物质最佳抗原抗体组合

通过制备的辣椒素、姜辣素类物质抗原抗体同收集的抗原抗体交叉组合（表 3.6）发现，Hapten 5-OVA/1-F12 表现出极好的亲和力和灵敏度（图 3.6）。

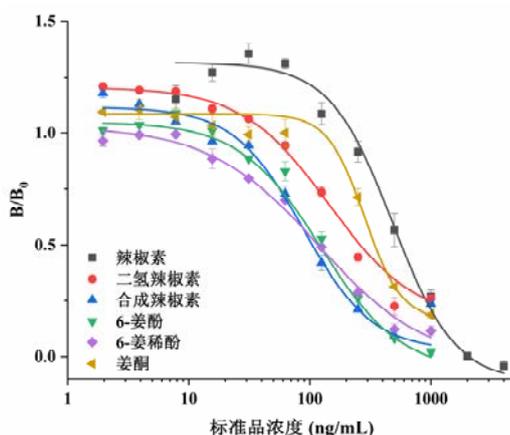


图 3.6 最优组合条件下的 ELISA 抑制曲线 (Hapten 5-OVA/1-F12)

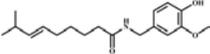
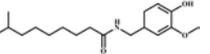
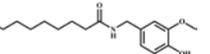
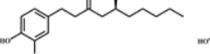
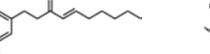
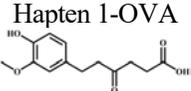
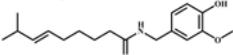
Fig. 3.6 ELISA inhibition curves under the optimal combination (Hapten 5-OVA/1-F12)

3.4.5.2 抗原-抗体识别机制研究

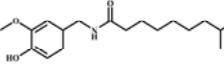
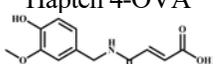
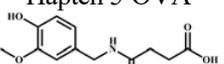
分析表 3.6 发现，利用 Hapten 1-BSA 制备的单克隆抗体在多个组合中均可以有效识别 6 种分析物。令人惊奇的是，利用 Hapten 2-BSA 和 Hapten 3-BSA 制备的抗体虽然在同源 ELISA 中对姜酮不能实现有效识别，但对另外五种分析物表现出高灵敏度，检测范围窄是其存在的缺陷。以广谱性抗体为主要研究对象，分析数据可以发现，Hapten 5-OVA 作为包被原时，广谱性抗体的灵敏度最高，其次是 Hapten 4-OVA（即抗体对 Hapten 4-OVA 的亲和力更好）。结合这两个人工完全抗原在包被条件下，相同抗体所得滴度的数据也印证了这一点。这说明双键的存在使得半抗原长链烷基形成刚性间隔臂，这利于 Hapten 4-OVA 中关键活性位点的暴露。实验结果也再次证实了我们之前的研究结论^[11]。当 Hapten 6-OVA 作为包被原时，只有 Hapten 1-BSA 产生的抗体可以对分析物有效识别。说明连接臂长度、长链烷基和羰基在免疫反应中扮演着重要的角色；而当 Hapten 2, 3-OVA 作为包被原时，Hapten 1-BSA 和 Hapten 6-BSA 产生的抗体对分析物都没有较好的识别。这说明 Hapten 1-BSA 产生的抗体能够有效识别 Hapten 2, 3-OVA，而对 Hapten 6-OVA 识别能力弱。而分析物中辣椒素、二氢辣椒素分子结构分别与 Hapten 2, 3 相同，这充分说明与 OVA 偶联后，半抗原构象发生变化，且活性位点得到暴露。而 Hapten 2, 3 对应的抗体却对姜酮识别能力差。猜测酰胺基团的存在不利于辣椒素、姜辣素类物质广谱性抗体的产生，这与我们预测的结果一致。此外，由于分析物的多样性，对长链烷基适当的修改可以有效提高广谱性抗体对所有分析物的灵敏度。

表 3.6 不同来源抗体/包被抗原的交叉组合

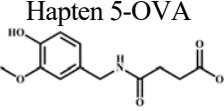
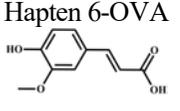
Tab. 3.6 Cross-over combinations of antibodies/coated antigens from different sources

包被原	抗体	滴度值 ^a	IC ₅₀ (ng/mL)					
			辣椒素 	二氢辣椒素 	合成辣椒素 	6-姜酚 	6-姜稀酚 	姜酮 
Hapten 1-OVA 	1-F12	1:128000	584.43	557.14	251.58	506.23	974.99	680.32
	1-G12	1:64000	1229.06	700.85	383.16	560.59	1847.86	1020.39
	1-D6	1:126000	>4000	969.82	2126.35	59.17	657.56	165.14
	2-LD2	1:1000	118.75	9.47	6.50	24.79	11.72	>4000
	3-LD3	<1000	- ^b	-	-	-	-	-
	4-AT4	1:15000	5.02	5.81	20.14	4.93	25.66	>4000
	5-3H1	1:24000	1159.67	15.98	21.57	38.97	441.24	>4000
	5-D8	1:7000	39.87	5.82	20.61	23.28	223.58	>4000
6-AT6	1:3000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	
Hapten 2-OVA 	1-F12	1:64000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
	1-G12	1:34000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
	1-D6	1:96000	>4000	>4000	1780.11	1147.33	1897.43	2769.82
	2-LD2	1:32000	9.61	4.85	1.70	1436.16	0.57	>4000
	3-LD3	1:30000	10.16	1.24	1.73	1821.65	6.82	>4000
	4-AT4	1:3000	132.83	57.33	135.50	>4000	>4000	>4000
	5-3H1	1:32000	547	102.63	8.30	>4000	>4000	>4000
	5-D8	1:6000	540.41	166.52	59.50	>4000	>4000	>4000

续表

Hapten 2-OVA	6-AT6	1:16000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
	1-F12	1:64000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
	1-G12	1:34000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
	1-D6	1:96000	>4000	>4000	>4000	27.78	1025.79	23.55
Hapten 3-OVA 	2-LD2	1:40000	17.15	1.54	1.21	1.78	3.26	>4000
	3-LD3	1:32000	30.08	0.62	1.46	2182.32	4.99	>4000
	4-AT4	1:3000	270.36	253.87	41.57	>4000	>4000	>4000
	5-3H1	1:64000	794.17	253.86	242.95	>4000	>4000	>4000
	5-D8	1:8000	564.57	55.75	100.25	>4000	>4000	>4000
	6-AT6	1:16000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
	1-F12	1:128000	796.54	415.85	202.52	401.26	134.01	380.79
	1-G12	1:64000	835.06	724.69	177.53	410.84	136.05	423.72
	1-D6	1:16000	917.16	701.28	223.85	297.53	133.75	331.25
	2-LD2	1:32000	1.19	0.73	0.03	1.01	2.38	1249.17
Hapten 4-OVA 	3-LD3	1:16000	3.87	1.84	4.75	271.08	1.37	>4000
	4-AT4	1:8000	6.51	10.68	4.37	>4000	61.38	>4000
	5-3H1	1:64000	25.86	11.35	4.04	1062.82	128.01	>4000
	5-D8	1:8000	28.78	10.90	2.74	1030.07	359.44	>4000
	6-AT6	1:36000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
	Hapten 5-OVA 	1-F12	1:128000	481.51	143.57553	88.13	122.83	117.6092
1-G12		1:64000	339.39	373.58	143.29	195.53	107.14	114.02
1-D6		1:32000	939.17	588.73	223.33	132.86	71.79	121.68

续表

 <p>Hapten 5-OVA</p>	2-LD2	<1000	-	-	-	-	-	-
	3-LD3	<1000	-	-	-	-	-	-
	4-AT4	1:4000	3.79	3.13	2.00	481.65	19.64	>4000
	5-3H1	1:48000	103.27	31.24	5.46	670.41	310.76	>4000
	5-D8	1:12000	45.59	13.19	9.81	1036.51	310.76	>4000
	6-AT6	1:15000	>4000	1460.54	637.10	425.62	2926.40	2191.15
 <p>Hapten 6-OVA</p>	1-F12	1:4000	1354.43	884.10	438.54	631.69	233.65	219.94
	1-G12	1:4000	661.85	351.51	251.65	284.44	86.21	263.37
	1-D6	1:1000	264.34	167.92	152.52	150.56	50.30	199.80
	2-LD2	<1000	-	-	-	-	-	-
	3-LD3	<1000	-	-	-	-	-	-
	4-AT4	<1000	-	-	-	-	-	-
	5-3H1	<1000	-	-	-	-	-	-
	5-D8	<1000	-	-	-	-	-	-
6-AT6	1:32000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000

注: ^a 滴度为当 OD₄₅₀ 值为 1.00±0.20 时抗血清稀释比;

^b 由于效价值较低, 因此未测量半抑制浓度;

^c 半抗原 7-OVA 免疫的小鼠未能诱导显著的免疫反应 (抗血清滴度值小于 1000)

3.4.5.3 试纸条初步实验

为探究实用性，我们将制备的抗体在最优组合的条件下进行初步实验，实验效果可观，横向免疫层析试纸条在加入标准品以后表现出条带抑制。

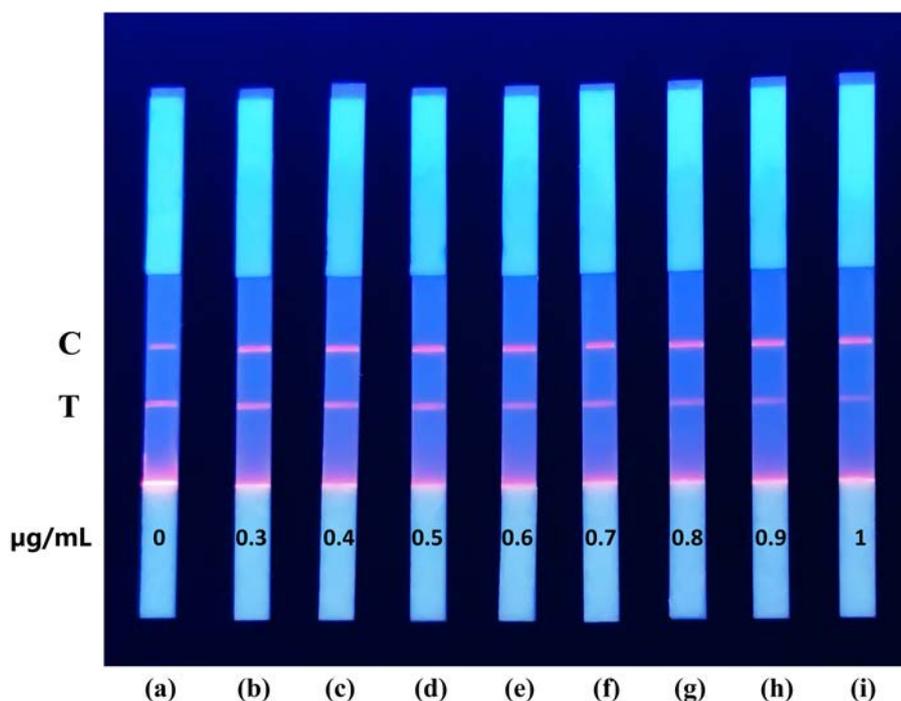


图 3.7 基于横向免疫层析试纸条的单抗 1-F12 选择性评价

Fig. 3.7 Evaluation of mAb 1-F12 selectivity based on lateral flow immunochromatographic strips

3.5 本章小结

利用制备的辣椒素、姜辣素类物质完全抗原 Hapten 1-BSA, Hapten 7-BSA 免疫小鼠，小鼠血清检测效价随免疫次数增加而增加，且 Hapten 1-BSA 免疫的小鼠表现出较高的灵敏度，说明小鼠免疫效果良好；但 Hapten 7-BSA 未能诱导显著的免疫反应。

取免疫效果最好的两只小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合，经过标准品浓度逐渐降低的筛选策略对融合细胞进行多轮筛选后，最终筛选获得 3 株对辣椒素、姜辣素类物质具有良好识别和特异性的单克隆细胞株，分别为 1-F12、1-G12、1-D6。其中，1-F12 分泌的单克隆抗体对辣椒素、姜辣素类物质均能得到有效识别，1-D6 对姜辣素类物质表现出高灵敏性。

通过不同来源抗原抗体 ELISA 交叉组合发现，半抗原刚性间隔臂的形成可能有利于完全抗原中关键活性位点的暴露；连接臂长度、长链烷基和羰基在免疫反应中扮演着重要的角色；半抗原与 BSA、OVA 的偶联可能会改变半抗原的构象，从而影响活性位点

的暴露；酰胺基团的存在不利于辣椒素、姜辣素类物质广谱性抗体的产生，酮基则相反；由于待测分析物的多样性，对长链烷基适当的修改可以有效提高制备广谱性抗体对所有分析物的灵敏度。最终明确了检测辣椒素、姜辣素类物质的最佳抗原抗体组合，即 Hapten 5-OVA/1-F12。这在探明抗原抗体识别机制的基础上，提高了抗体的灵敏度，为后期快速现场检测方法的建立奠定了良好的基础。

利用最佳抗原抗体组合进行了 LFIA 的初步实验，试纸条在加入标准品以后表现出明显的条带变化。

第四章 基于 FPIA 方法快速监测餐厨废弃油脂

4.1 引言

对于餐厨废弃油脂成分的复杂性及现场快速检测的特殊要求,迫切需要一种简单、快速的现场检测方法。传统的检测手段需要大型设备以及专业技术人员,无法满足快速、现场检测的要求。ELISA 和 LFIA 是快速检测的代表性方法。然而,ELISA 为非均相检测,反复和较长的检测周期、严谨的操作技术限制了其广泛应用。LFIA 作为定性和半定量的检测方法,不具有高准确度和灵敏度。FPIA 作为一种均相荧光法,通过荧光标记的抗原衍生物(示踪剂)和特异性抗体的相互作用,在短时间内确定分析物,达到高灵敏度、准确、快速现场检测的目的^[97]。已广泛应用于环境检测、食品安全分析、药物筛选、生物代谢物等领域。

为解决受广泛关注的食用油领域掺假、伪造等食品安全问题,本实验以化学性质稳定的辣椒素为餐厨废弃油脂掺伪标志物,开发了一种基于均相溶液体系中使用单克隆抗体测定餐厨废弃油脂中辣椒素的荧光偏振免疫测定(FPIA)。将制备的荧光素硫代氨基甲酰基乙二胺(Fluoresceinthiocarbamyl ethylenediamine, EDF)与辣椒碱半抗原 Hapten 5 偶联,通过薄层层析法(Thin layer chromatography, TLC)纯化合成的示踪剂与 CPC Ab-D8 表现出良好的结合。研究了示踪剂及识别元件的浓度、缓冲液的种类及酸碱度、孵育时间对 FPIA 性能的影响。与其他检测辣椒素的方法相比, FPIA 表现出灵敏度高、特异性高、操作简单、设备体积小和孵育时间短等全面的优势。实验结果证明,荧光偏振检测技术能够实现辣椒素的快速检测,具有实现餐厨废弃油脂现场甄别的潜力。

4.2 实验材料

4.2.1 试剂与仪器

本章所用到的所有化合物结构用 Chem draw 19.0, 软件绘制,所有数据使用 Origin 9.0 软件处理,试剂和耗材如表 4.1 所示,主要仪器如表 4.2 所示。

表 4.1 实验所用的试剂和耗材

Tab. 4.1 Main reagents and material of the experiment

试剂名称	纯度	生产厂家
硼酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
十水合四硼酸钠	AR	烟台市双双化工有限公司
氯化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
十二水合磷酸氢二钠	AR (99%)	上海麦克林生化有限公司
二水合磷酸二氢钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	BR	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
三氯甲烷	AR	国药集团化学试剂有限公司
丙三醇 (甘油)	AR	烟台市双双化工有限公司
合成辣椒碱	>98%	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
Hapten 5-BSA	5 mg/mL	中国农业科学院油料作物研究所
CPC Ab-D8	6 mol/L	中国农业科学院油料作物研究所
玉米胚芽油	/	西王食品股份有限公司
大豆油	/	山东香驰粮油有限公司
花生调和油	/	中粮黄海粮油工业 (山东) 有限公司

表 4.2 实验所用的主要仪器

Tab. 4.2 Main instrument of the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
便捷式荧光偏振检测仪	SENTRY 201	Ellie 国际集团股份有限责任公司
旋转蒸发仪	RE-2000A	上海亚荣生化仪器厂
循环水试多用真空泵	SHZ-D (III)	河南省予华仪器有限公司
电子分析天平	AL-104	梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司
超声波清洗仪	SK 3300H	上海科导超声仪器有限公司
超纯水系统	Cascagda	美国 PALL 公司
实验室 pH 计	FE20K	上海智光仪器仪表有限公司
快速混匀器	SZ-1	常州普天仪器制造有限公司
高速冷冻离心机	ST 16R	赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9070A	上海飞越实验仪器有限公司
移液枪	0.5~5000 μ L	德国艾本德 (Eppendorf) 股份公司
通风橱	BM221	淄博豪迈实验室装备有限公司
三用紫外分析仪	ZF-1	凯林贝尔实验室仪器

4.2.2 主要溶液配制

(1) 硼酸缓冲液:

A 液: 1.2368 g 硼酸+0.2928 g NaCl+100 mL 超纯水; B 液: 1.9070 g 十水合四硼酸钠+100 mL 超纯水。通过使用 pH 计和下表 4.3 调配硼酸缓冲溶液的 pH 值, 比如当配制 pH 值为 7.8 时, 需要 A 液 8 mL, B 液 2 mL, 配制 10 mL 的缓冲液。

表 4.3 不同 pH 的硼酸缓冲液配制表

Tab. 4.3 Preparation table of borate buffer for different pH

pH 值	A 液 (mL)	B 液 (mL)	pH 值	A 液 (mL)	B 液 (mL)
7.4	9.0	1.0	8.2	6.5	3.5
7.6	8.5	1.5	8.4	5.5	4.5
7.8	8.0	2.0	8.7	4.0	6.0
8.0	7.0	3.0	9.0	2.0	8.0

(2) PBS 缓冲液:

A 液: 3.5822 g 十二水合磷酸氢二钠+100 mL 超纯水; B 液: 1.5603 g 二水合磷酸二氢钠+100 mL 超纯水。按照下表 4.4 中的体积比配制, 如 A 液取 8.1 mL, B 液取 1.9 mL, 配制成 pH 为 7.4 的硼酸缓冲液, 表 4.4 中 pH 值为此次实验所使用的 pH 值。

表 4.4 不同 pH 的 PBS 缓冲溶液配制表

Tab. 4.4 Preparation table of PBS buffer solutions for different pH

pH 值	A 液 (mL)	B 液 (mL)	pH 值	A 液 (mL)	B 液 (mL)
6.0	1.23	8.77	7.4	8.10	1.90
6.5	3.15	6.85	7.5	8.40	1.60
7.0	6.20	3.80	8.0	9.47	0.53

(3) Tris-HCl 缓冲液:

Tris 碱溶液: 12.113 g Tris+100 mL 超纯水; 0.1 mol/L HCl 溶液: 1.2 mL 6 mol/L HCl+998.8 mL 超纯水。配制方法为 50 mL 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液与 X mL 0.1 mol/L 盐酸混合后, 加水稀释至 100 mL。X 按表 4.5 中的体积。

表 4.5 不同 pH 值时 X 的体积表
Tab. 4.5 Volume table of X at different pH values

pH 值	X (mL)	pH 值	X (mL)
7.1	45.7	8.1	26.2
7.4	42.0	8.6	12.4
7.6	38.5	8.9	7.0

4.3 实验方法

4.3.1 荧光素硫代氨基甲酰基乙二胺 (EDF) 示踪剂的制备

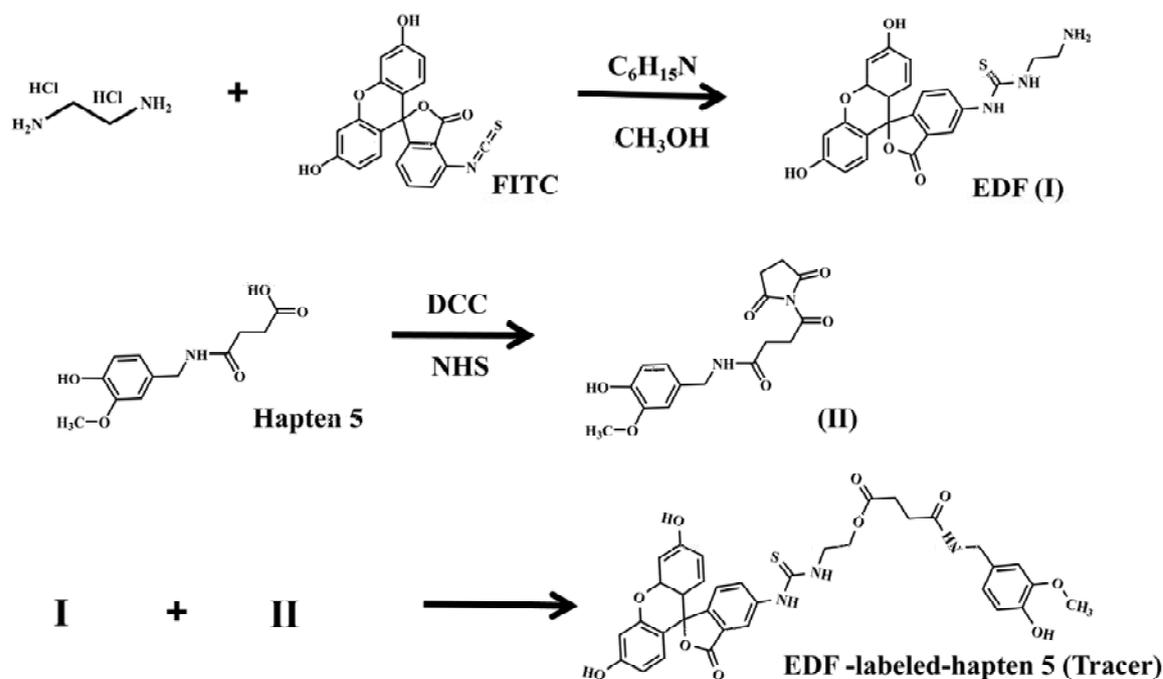


图 4.1 示踪剂 EDF 的合成路线及其结构

Fig. 4.1 Synthetic route for EDF tracers and its structure

本研究参照 Pourfarzaneh 等人^[119]的方法，利用 FITC 合成 EDF，如图 4.1 所示。首先，将 200 mg (1.5 mmol) 的盐酸乙二胺溶解在 50 mL 甲醇和 0.5 mL 三乙胺的混合物中。同时，将 117 mg (0.3 mmol) 的 FITC 溶解在 10 mL 甲醇和 100 μL 三乙胺的混合物中。然后，将 FITC 溶液滴加入乙二胺溶液中搅拌 30 分钟。将反应混合物在室温黑暗中搅拌 1~2 h，在室温黑暗中保存过夜（不搅拌）。橙色沉淀通过 Watman 滤纸过滤，然后用 10 mL 甲醇洗涤，在室温黑暗的空气中干燥。最后，得到了 90 mg 的 EDF。

4.3.2 示踪剂的合成、分离和纯化

(1) 示踪剂的合成

考虑到辣椒素类物质的关键基团为甲氧基、酚羟基和酰胺基，间隔臂的存在可以有效保护关键基团，从而达到抗原抗体特异性识别的目的，提高方法的灵敏度。然而，间隔臂过短则半抗原与荧光素之间的空间位阻影响活性基团的暴露，间隔臂过长则可能因氢键、疏水作用或其他作用力使半抗原发生折叠。前期研究表明，Hapten 5 的分子结构可以最大限度的暴露辣椒素类物质的关键活性基团。通过在辣椒素类物质 Hapten 5 的长链烷基部位偶联加长间隔臂的氨基化异硫氰酸荧光素 (FITC)，即将 Hapten 5 与 EDF 偶联制备荧光探针，得到 CPC-EDF 示踪剂。将称取的 NHS (2.30 mg, 0.20 mmol) 和 DHCC (4.10 mg, 0.1 mg, 0.20 mmol) 分别溶解在 0.25 mL DMF 中，标记为溶液 1、溶液 2。称取 2.50 mg Hapten 5，分别加入 0.25 mL 的溶液 1、2 中，混匀后避光反应过夜；取 100 μ L Hapten 5 反应液与 1 mg 的 EDF 混合，合成 CPC-2-EDF。如图 4.1 所示。

(2) 示踪剂的分离和纯化

首先用三氯甲烷-甲醇 (4: 1, v/v) 作为洗脱液^[120]，采用 TLC 对已获得的辣椒素半抗原荧光标记物 CPC-EDF 进行纯化，分离一小部分反应混合物 (约 20~50 μ L)，消除杂质对实验的影响。层析吹干后，用紫外灯观察，精确黄色条带的位置，分别刮下收集不同位置的产物，并用 0.5 mL 甲醇洗脱提取，得到过滤纯化后的示踪剂，在黑暗中保存 4 $^{\circ}$ C 至使用。

采用荧光偏振检测系统消除了杂质的干扰，成功筛选出 CPC-EDF。首先，以硼酸作为缓冲溶液稀释上述示踪剂，使其荧光强度为硼酸缓冲液 (BB) 背景值的 10~15 倍^[121]。FP 以 mP 表示，检测并记录 mP_{min} 的数据。第二，在反应管中加入 2 μ L CPC Ab-D8，读取荧光偏振信号值 (FP)，偏振信号值记录为 mP_{max}。通过测量在测试溶液 (包含示踪剂) 和测试溶液 (包含示踪剂和 CPC Ab-D8 浓度) 之间观察到的最大极化位移 (Δ mP, Δ mP = mP_{max} - mP_{min}) 来评估 CPC Ab-D8 与示踪剂的结合。根据 Δ mP 的大小，选择了最佳的示踪剂。

4.3.3 荧光偏正免疫分析方法 (FPIA) 的建立及优化

荧光偏振检测体系的建立中待检测溶液的配制方法为：取 0.5 mL 示踪剂加入到硅酸盐试管中，再加入 50 μ L 的不同浓度的辣椒碱标准品溶液，混匀，最后加入 0.5 mL 的 CPC Ab-D8 溶液，混匀，等待一段时间，检测该待测溶液的 FP 和 FI，并且检测合成辣椒碱标准品浓度为 0 (此时为空白值) 时的荧光偏振信号值 (记 mP₀ 值) 与荧光强度值 (记为 Int₀ 值)，选横坐标为合成辣椒素浓度，抑制率 (mP/mP₀) 为纵坐标，绘制曲线，选取最佳的曲线作为竞争抑制曲线^[122]。

在使用荧光偏振检测技术时，为了提高检测的灵敏度、准确性，需要对荧光偏振检

测体系中各个成分进行优化,包括示踪剂稀释比、抗体工作液浓度、缓冲溶液种类及酸碱度、孵育时间等。

4.3.3.1 实验试管处理

本实验采用小型便捷式荧光偏振检测仪,主要的检测方法为取 1 mL 待检测溶液于反应的硅酸盐试管中,通过仪器检测该待检测溶液的荧光偏振信号值 (FP) 及荧光强度值 (FI)。为消除硅酸盐试管对实验结果的影响,此次需要测量空试管的 mP 值及 Int 值,选出数值基本相同的试管。实验方法为:清洗空试管,读取数据,选出 mP 值及 Int 值基本相同的试管,并且在试管上方及仪器上做标记,每次对应标记位置放置试管,消除不同位置管壁对测试结果的影响;再清洗两次,分别测量两次的 mP 值及 Int 值,选出数值基本不变的试管用于后续实验。

4.3.3.2 辣椒素偶联 EDF 的结合实验

采用所选取的 CPC-EDF 与 CPC Ab-D8 进行结合实验。实验步骤与 (EDF 的分离纯化) 基本相同,同时检测不同时间段数值的变化。

4.3.3.3 FPIA 的建立

荧光偏振检测系统是基于竞争性免疫分析法开发的。具体实验操作如下:将 0.5 mL 示踪剂和 50 μ L 不同浓度的合成辣椒素标准品溶液加入到硅酸盐试管中并混合。最后,加入 0.5 mL 的 CPC Ab-D8 溶液。等待一段时间后,测定溶液的 FP 和 FI。建立空白组 (合成辣椒素标准品浓度为空白),FP 和 FI 分别标记为 mP₀ 和 Int₀。水平坐标为合成辣椒素标准品浓度,以抑制率 (mP/mP₀)^[122]为纵坐标,绘制竞争性抑制曲线。半抑制浓度是所开发的检测方法的主要参数。示踪剂-抗体对的半抑制浓度较低,FPIA 的敏感性越高。LOD 定义为提供 10% mP/mP₀ (IC₁₀)^[34]的分析物的浓度。

为了提高检测的灵敏度和准确性,需要对荧光偏振检测系统中的各组分进行优化,包括示踪剂稀释比、CPC Ab-D8 工作液浓度、缓冲液类型及其 pH 值、孵育时间等。

(1) 示踪剂稀释比优化

荧光示踪剂的荧光强度为缓冲液背景的 10~15 倍左右时,不仅能够保证检测的灵敏度,还能关系到检测技术的检测限。首先检测 1 mL 硼酸缓冲溶液的荧光强度值,并记录数据。取 1 μ L 示踪剂加入 1 mL 硼酸缓冲溶液中检测荧光强度并记录数值;再依次加入硼酸缓冲溶液进行稀释,分别检测在 BB 中连续稀释至 1/1、1/10、1/20、1/30、1/40、1/50 和 1/60 的示踪剂的 FP 和 FI,选出最佳示踪剂稀释比。

(2) 抗体浓度

适宜的抗体浓度不仅可以节约成本,还能提高荧光偏振检测技术的准确性,同时为

竞争实验做好准备。首先进行粗检测，取 1 mL 稀释到最佳浓度的示踪剂于硅酸盐试管中，依次加入 1 μ L 的抗体，读取荧光偏振信号值，当荧光偏振信号没有继续增大时，停止加入，测得荧光偏振信号最大值，记录数据。

检测不同浓度 CPC Ab-D8 的工作液与稀释后的示踪剂的结合程度，选取最佳浓度的抗体溶液。依照本实验待测液的配制方法（即取 0.5 mL 稀释好的示踪剂工作液，加入 50 μ L 10% 甲醇水，混匀，再加入 1 μ L 不同浓度的抗体工作液），示踪剂浓度比检测后 BB 的本底值高 20~30 倍（在检测过程中，示踪剂的浓度会被稀释一半左右）。配制不同浓度的抗体缓冲液（选取硼酸缓冲液为稀释液），抗体浓度依照表 4.6。根据本实验中待检测液空白值的配制方法，配制待检测液，测定 FP 和 FI，记录数据，选取最佳的 CPC Ab-D8 浓度。

表 4.6 CPC Ab-D8 浓度

Tab. 4.6 The CPC Ab-D8 concentration

抗体浓度 (μ g/mL)	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1
	5.6	2.8	1.4	0.7	0.35	0.175	0.0875

(3) 缓冲液种类

缓冲溶液的种类也会影响荧光偏振检测技术的灵敏度，适宜的缓冲溶液会提升检测数值，利于荧光偏振的检测。本实验选取硼酸缓冲溶液（Boric acid buffer, BB）、PBS 缓冲溶液以及 Tris-HCl 缓冲溶液进行实验，比较 PH 值为 7.4 时，抗原与抗体特异性结合程度。实验方法同（优化抗体浓度），不同的是使用不同的缓冲液对示踪剂和 CPC Ab-D8 进行稀释

(4) 缓冲液 pH

抗原、抗体的理化性质会受到缓冲溶液酸碱度的影响，选取最佳缓冲溶液后，当 PH 值为 7.4 时，比较抗原与 CPC Ab-D8 的特异性结合程度。实验方法同（优化抗体浓度），改变缓冲液的 PH 值以测试最佳结合能力，制备待检测的最佳溶液，间隔 10 min 检测 FP。

(5) 孵育时间

对于检测体系而言，CPC-EDF 及合成辣椒碱标准品与 CPC Ab-D8 特异性结合需要时间。由于 CPC-EDF 与合成辣椒素同抗体的结合方式相同，两者混匀后，会与抗体竞争性结合，因此检测 CPC-EDF 与抗体的结合时间，即可代表示踪剂与合成辣椒碱标准品混合后同抗体的孵育时间。

确定好抗原与抗体的最佳稀释浓度、最佳缓冲溶液及酸碱度后，配制最佳的待测溶液，每隔十分钟检测一次荧光偏振值，检测两个小时内的数值变化，记录数据。对时间

段内数值变化明显的时间进行检测,每隔一分钟检测一次,检测半小时左右,记录数据。

4.3.3.4 标曲的建立及优化

将 1 mg/mL 合成辣椒素标准品溶液用 10%甲醇溶液稀释至 0、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 。最终示踪剂的荧光强度是 BB 本底值的 13 倍,我们分别选择了 5 种浓度的 CPC Ab-D8,分别为 1.4、0.7、0.35、0.175、0.0875 $\mu\text{g/mL}$ 。在优化条件下,记录 FP 和 FI,并绘制竞争曲线。为了进一步确定最佳的实验条件,我们对 CPC Ab-D8 和示踪剂浓度进行了交叉实验。因此,可以选择 2 种浓度的 CPC Ab-D8s 和 3 种荧光稀释比进行交叉实验,以获得最佳的竞争抑制曲线。

4.3.3.5 基质效应实验

基质干扰是生物系统检测方法测定复杂样品最普遍的挑战之一^[34]。不同基质中存在的大量非靶向化学物质可能影响受体与靶向配体的结合效率,从而降低方法的灵敏度和可靠性^[123]。本研究以玉米胚芽油、大豆油、花生调和油作为基质,进行样品基质消除实验。由于荧光偏振检测技术是均相反应体系,基质会对反应产生较大的影响,为提高样品检测的灵敏度,采用如下方法对食用油样品进行前处理。称取 6 g 食用油,加入 240 mL 无水甲醇冲击搅拌 1 min,在 50°C 条件下进行 5 分钟超声处理,取 200 mL 处理后的甲醇相,用旋转蒸发仪蒸干,再加入 5 mL 10%甲醇-PBS 复溶得到样品提取液。按竞争实验的方法,用处理好的基质提取液稀释辣椒碱标准品,配制待检测样品液,检测荧光偏振信号值和荧光强度值,记录数据,绘制曲线。

4.3.3.6 加标回收实验

通过回收率试验^[56,57,59],验证了 FPIA 法检测食用植物油中辣椒素的准确性。以玉米胚芽油、大豆油和花生共混油为基质,进行回收实验,并设置三种不同的标准品浓度。根据基质效应,采用荧光偏振检测系统对样品进行标记和分析。根据优化后的标准曲线方程,计算了不同基质作用下的回收率。

$$\text{回收率}(\%) = (\text{检测值}/\text{标记值}) \times 100\%。 \quad (4.1)$$

4.4 结果与讨论

4.4.1 FPIA 方法原理

本研究中辣椒素含量的测定是基于竞争 FPIA。简单地说,将合成的辣椒素半抗原利用能够产生偏振光的荧光物质进行标记作为示踪剂,它能够与辣椒素标准物竞争性地结合 CPC Ab-D8。当样品不包含辣椒素标准时,反应系统中的示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$)

将与 CPC Ab-D8 结合。此时，示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 和 CPC Ab-D8 结合后体积变大，分子旋转变慢，导致更高的 FP 值。相反，样品中辣椒素的存在导致其与示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 在反应体系中竞争性结合 CPC Ab-D8。未结合示踪剂则体积较小，分子旋转速度较快，FP 值较低。

4.4.2 示踪剂纯化鉴定

采用薄层色谱法对合成的示踪剂的纯化结果如图 4.2 所示，在紫外灯照射下，可以看到 5 条不同的条带，位置分别为 $R_f=0.9$ 、 $R_f=0.85$ 、 $R_f=0.8$ 、 $R_f=0.5$ 、 $R_f=0.3$ 。

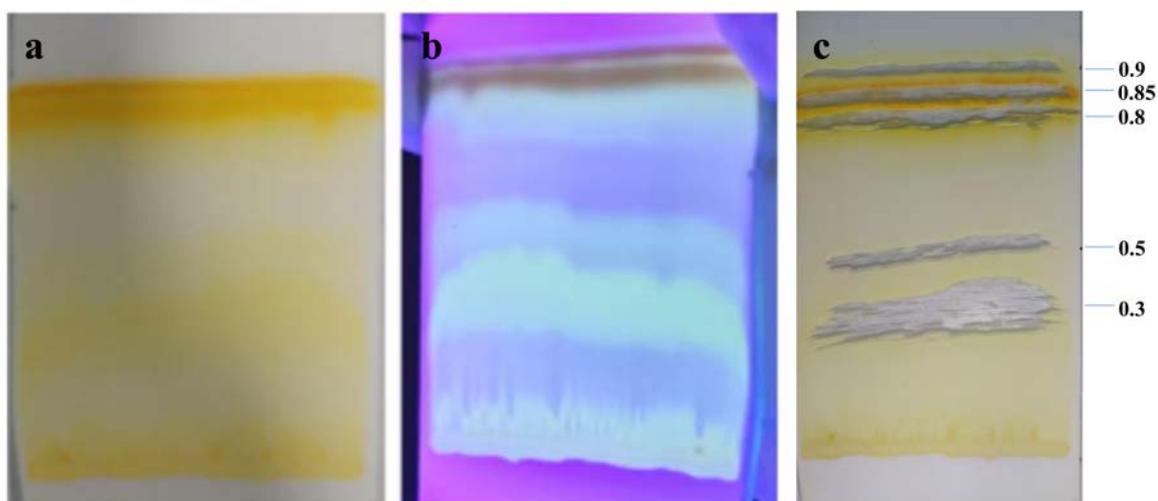


图 4.2 CPC-EDF 纯化样的结果图

(a) 自然光条件下；(b) 紫外灯照射下；(c) 刮取以后自然光条件下

Fig. 4.2 Results plots of the CPC-EDF purification sample

(a) under natural light conditions; (b) under ultraviolet light;

(c) After scraping, under the natural light conditions

所制备的示踪剂在薄层色谱法分离纯化后，首先用 CPC Ab-D8 进行 FPIA 表征。如图 4.3 所示，加入 CPC Ab-D8 后，FP 变化显著的示踪剂为 CPC-EDF ($R_f=0.8$)， ΔmP 差异为 118.45，而其他辣椒素抗原荧光示踪剂的 ΔmP 值均小于 70。综上所述，我们选择 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 作为结合实验的示踪剂。综上所述，选用 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 为示踪物，进行结合实验。

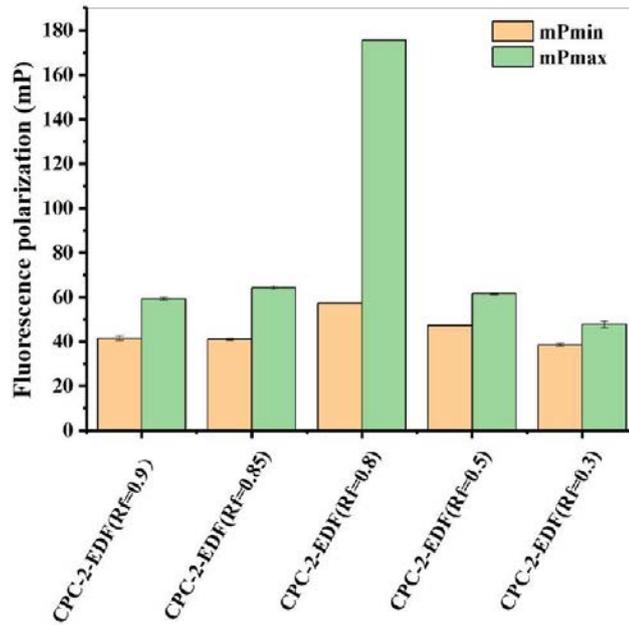


图 4.3 CPC-EDF 示踪剂与 CPC Ab-D8 的结合鉴定

Fig. 4.3 Binding identification of CPC-EDF tracer with CPC Ab-D8

4.4.3 FPIA 检测方法的建立

(1) 试管处理

从 35 个空试管中选择 11 个空试管，其 mP 值为 490~510，Int 值为 15000~17000。数值变化均在允许范围内，可用于后续实验，基本可以避免试管环境的影响，取值的变化如图 4.4 所示。

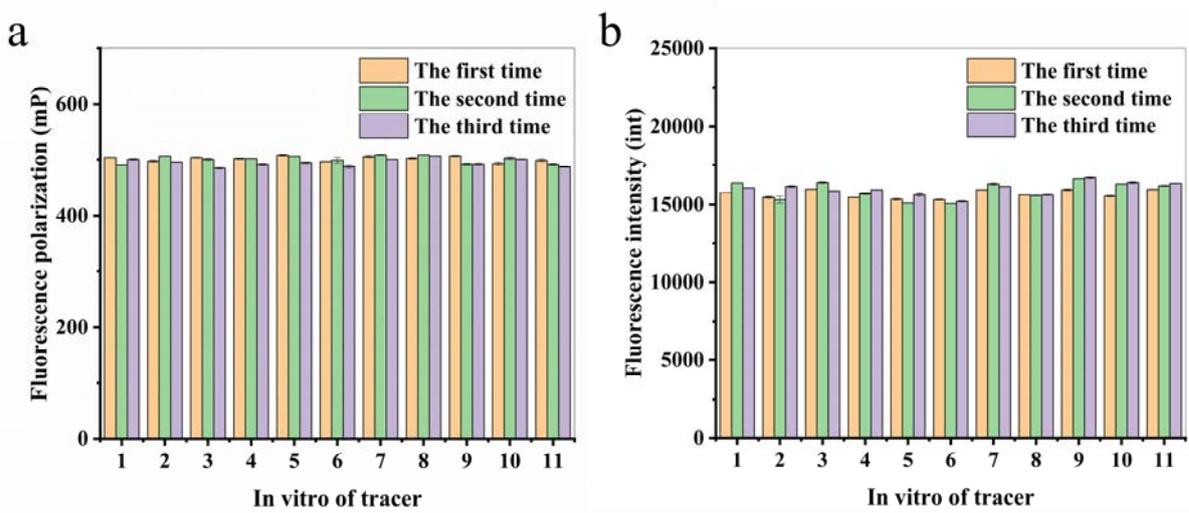


图 4.4 荧光偏振检测空管：(a) FP, (b) FI

Fig. 4.4 Fluorescence polarization detection empty tube: (a) FP, (b) FI

(2) CPC-EDF 的结合实验

适当的抗体浓度不仅可以节省成本，而且可以提高荧光偏振检测系统的准确性，同时为竞争实验做准备。从图 4.3 中可以看出，经示踪剂纯化后，2 μL CPC Ab-D8 可以与示踪剂高度结合。考虑到成本，在进行结合实验时，添加 2 μL 的识别元件。结果如图 4.5 所示，示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 与 CPC Ab-D8 具有较好的结合力，将其选择为最佳示踪剂，CPC Ab-D8 为最佳识别元件，建立了一种用于辣椒素检测的荧光偏振检测系统。

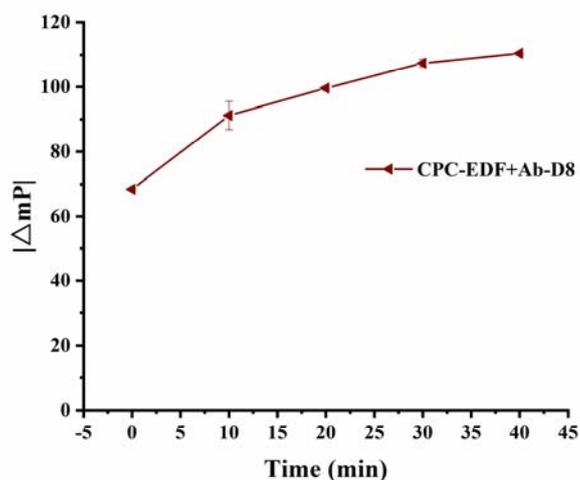


图 4.5 荧光示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 和 CPC Ab-D8 的结合动力学曲线

Fig. 4.5 The binding kinetic curves of fluorescent tracer CPC-EDF ($R_f=0.8$) and CPC Ab-D8

(3) 实验条件优化

首先，优化了影响检测性能的影响因素，包括示踪剂稀释比、抗体浓度、缓冲液类型及 pH 值、孵育时间等。

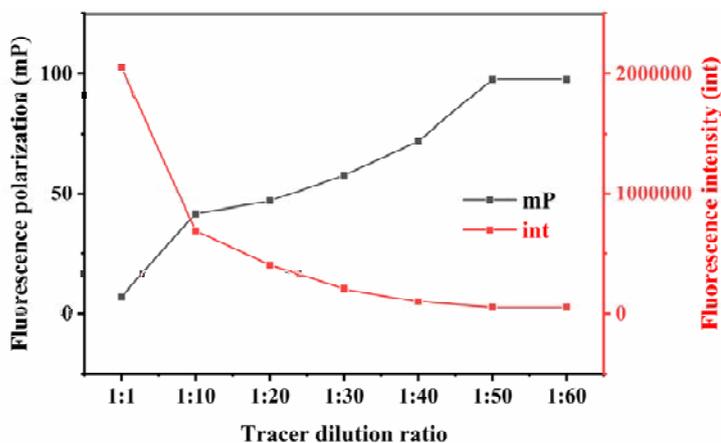


图 4.6 示踪剂稀释曲线

Fig. 4.6 Tracer dilution curve

当荧光示踪剂的荧光强度约为缓冲背景的 10~15 倍时，不仅保证了检测的灵敏度，而且也影响了检测技术的检测限。示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 稀释浓度曲线如图 4.6 所示。随着示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 稀释比的增加，FI 也不断增加，而 FP 随着比值的增加而降低。此时，主要根据 FI 选择最佳稀释浓度，BB 的背景值约为 7500~8500，相应的示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 的 FI 约为 100000 左右。综上所述，示踪剂 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 与 BB 的稀释比为 1 μ L: 38~43 mL。

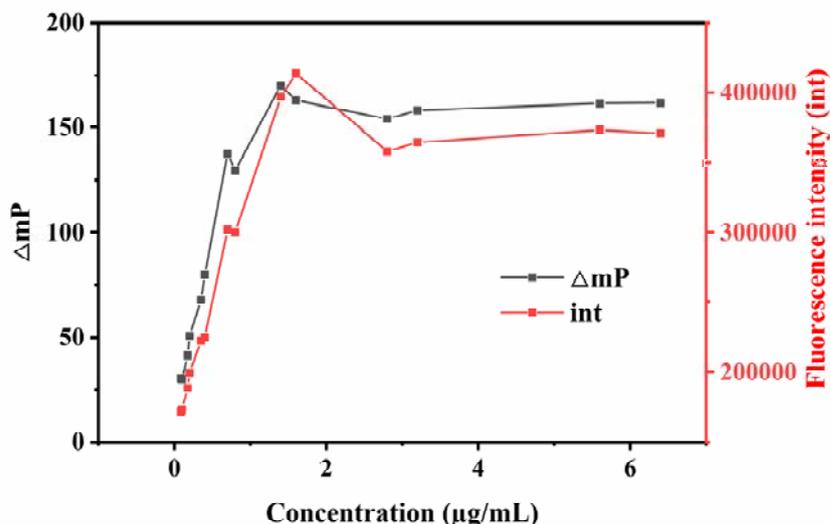


图 4.7 CPC Ab-D8 浓度变化曲线

Fig. 4.7 Change curve of CPC Ab-D8 concentration

适当的抗体浓度不仅可以节省成本，而且可以提高荧光偏振检测系统的准确性，同时为竞争实验做准备。从图 4.7 可以看出，当抗原浓度固定不变时，随着 CPC Ab-D8 浓度的增加，荧光偏振值整体趋势为先上升后趋于平缓。当 CPC Ab-D8 浓度高于 0.35 μ g/mL 时，数值快速上升，且有较大的上升空间；当 CPC Ab-D8 浓度大于 1.40 μ g/mL 时，荧光偏振值趋于平缓，证明辣椒碱类半抗原物质已经基本与 CPC Ab-D8 完全结合。因此，选择浓度为 0.35 μ g/mL 的 CPC Ab-D8 溶液进行后续优化实验。

不同缓冲溶液对 CPC-EDF ($R_f=0.8$) 和 CPC Ab-D8 的结合力的影响如图 4.8，当缓冲溶液的 PH 值都为 7.4 时，在硼酸缓冲溶液中抗原与 CPC Ab-D8 特异性结合后 mP 值变化最大，在 PBS 缓冲溶液中 mP 值变化最小，三种缓冲溶液对应的 ΔmP 值分别为 100.45、91.30、55.15，故选硼酸缓冲液为最佳缓冲溶液。

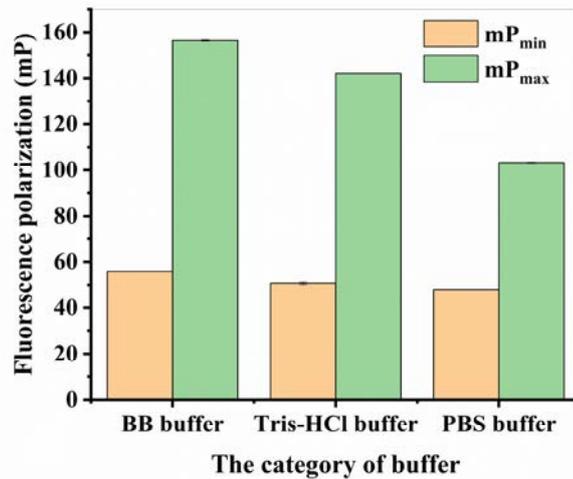


图 4.8 不同缓冲溶液对 CPC-EDF (Rf=0.8) 和 CPC Ab-D8 的结合力的影响
 Fig. 4.8 The effect of different buffer solutions on the binding force of CPC-EDF (Rf = 0.8) and CPC Ab-D8

选择合适的缓冲液会增加检测值，而缓冲液的 pH 值会对抗原和抗体的理化性质产生影响。如图 4.9 所示，当 pH 值为 7.1~7.9 时，结合力最高，其 ΔmP 值在 85~95 范围内。当 pH 值为 7.6 时，其约束力相对优于其他值。因此，我们选择 pH 值为 7.6 的 BB 进行竞争实验。

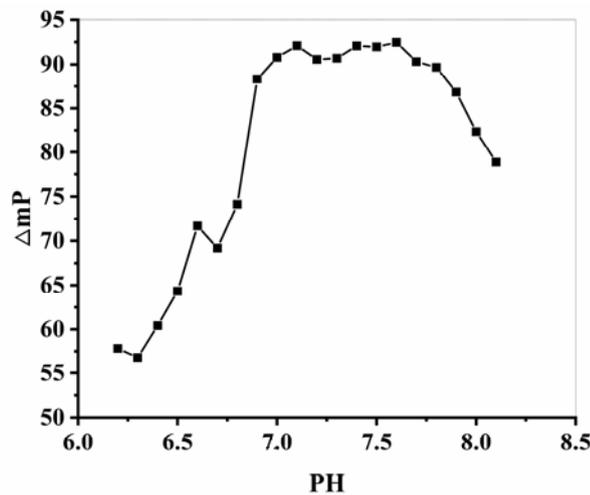


图 4.9 缓冲液 pH 的影响
 Fig. 4.9 Effect of pH of buffer

对于检测系统，示踪剂 CPC-EDF (Rf=0.8) 和辣椒素标准品与 CPC Ab-D8 特异性结合需要时间。从图 4.10-a 可以看出，随着时间的增长，该值也在不断增加，而 10 分钟后该值的生长变化不大 (图 4.10-b)，因此 10 分钟是最佳的孵育时间。

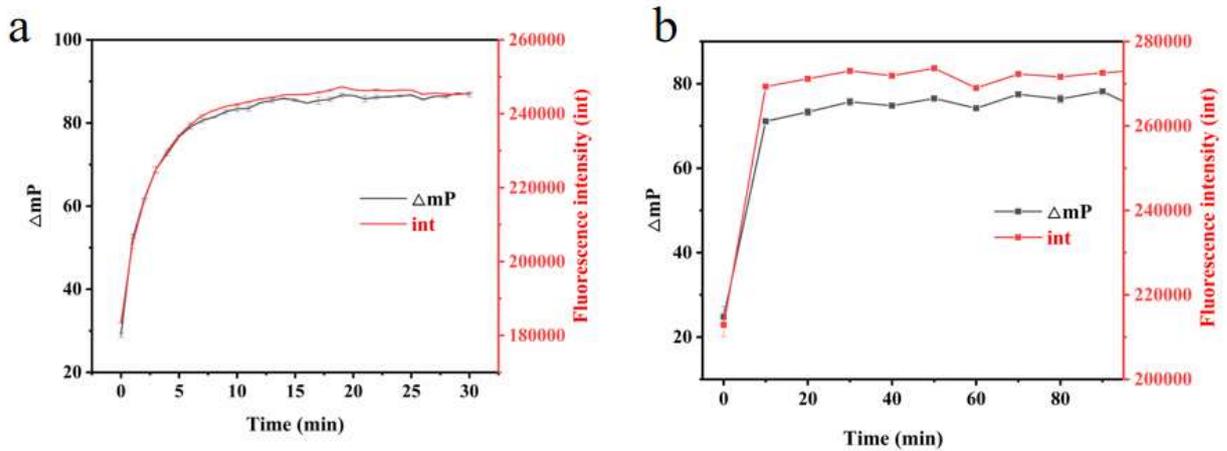


图 4.10 示踪剂 CPC-EDF (Rf=0.8) 的结合动力学曲线, (a) 间隔 1 min; (b) 间隔 10 mins

Fig. 4.10 The binding kinetic of tracer CPC-EDF (Rf=0.8), measured at a time interval of: (a) one minute, (b) ten minutes

4.4.4 荧光偏正免疫分析校准曲线

抗体作为关键的识别成分, 在检测性能中起着重要的作用。半抗原和荧光素之间的链长可能会影响抗体对示踪剂的亲和力^[34]。辣椒素半抗原荧光标记物的形成可能会影响示踪剂 CPC-EDF (Rf=0.8) 与 CPC Ab-D8 之间的相互作用。

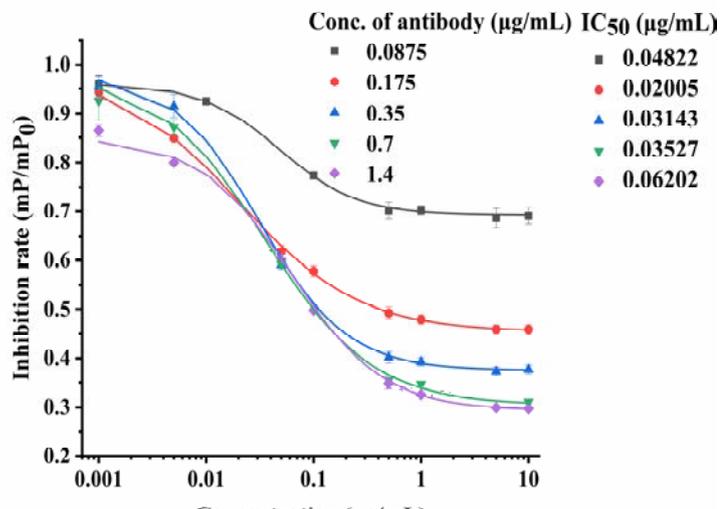


图 4.11 抗体浓度优化曲线

Fig. 4.11 Antibody concentration optimization curve

如图 4.5 所示, 示踪剂 CPC-EDF (Rf=0.8) 和 CPC Ab-D8 结合显著。本文采用半抑制浓度作为评价免疫分析方法的重要指标, 固定示踪剂稀释浓度后, 选择 5 种浓度的 CPC Ab-D8 进行竞争实验。以合成辣椒素标准品浓度为横坐标, 以 mP/mP₀ 为纵坐标 (图 4.11) 绘制抑制曲线。当 CPC Ab-D8 的浓度分别为 0.35 和 0.7 μg/mL 时, 曲线更接近 S

型，半抑制浓度值较低，灵敏度较高，检测范围较广。

基于以上实验结果，CPC Ab-D8 的浓度分别为 0.35 和 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 。示踪剂的稀释倍数的荧光强度为背景缓冲溶液背景值的 11、13、15 倍，进行竞争优化实验。图 4.12 分别为 CPC Ab-D8 浓度为 0.35 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 时不同示踪剂浓度的标准曲线。可以看出，当示踪剂的检测值稀释到 BB 背景值的 15 倍时，CPC Ab-D8 浓度为 0.35 $\mu\text{g/mL}$ 。该曲线更倾向于 S 型，最小半抑制浓度值为 19.73 ng/mL ，LOD 值为 1.56 ng/mL 。检测范围（ $\text{IC}_{20}\sim\text{IC}_{80}$ ）为 3.97~97.99 ng/mL ，曲线方程为 $y=(1.00846-0.37212)/(1+(x/0.01973)^{0.86503})+0.37212$ 。

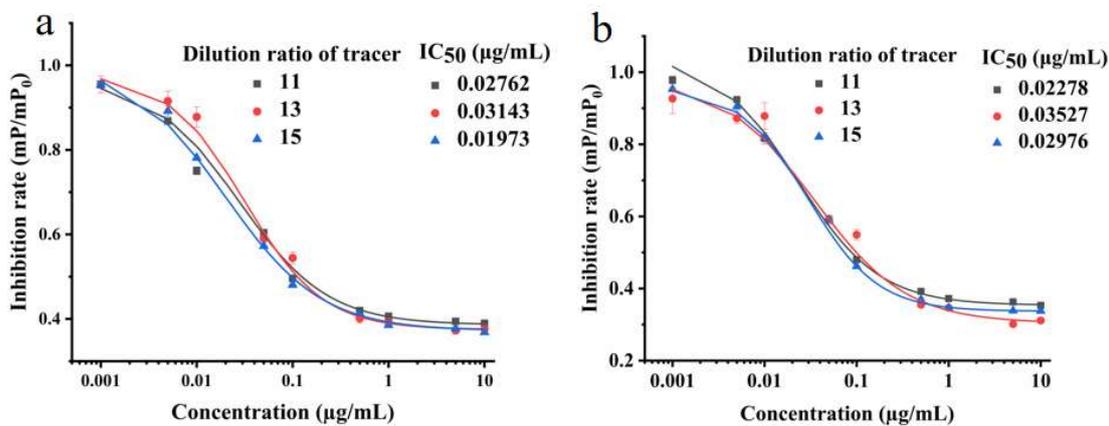


图 4.12 不同浓度示踪剂与抗体交叉组合曲线，抗体浓度：（a）0.35 $\mu\text{g/mL}$ ；（b）0.7 $\mu\text{g/mL}$
 Fig. 4.12 Cross-combination curves of different concentrations of tracer with antibody, antibody concentration: (a) 0.35 $\mu\text{g/mL}$; (b) 0.7 $\mu\text{g/mL}$

为了进一步分析这条曲线，我们选择了中间线性部分的几个点进行线性拟合，如图 4.13 所示，线性曲线方程为 $y= -0.29997x+0.18129$ 。

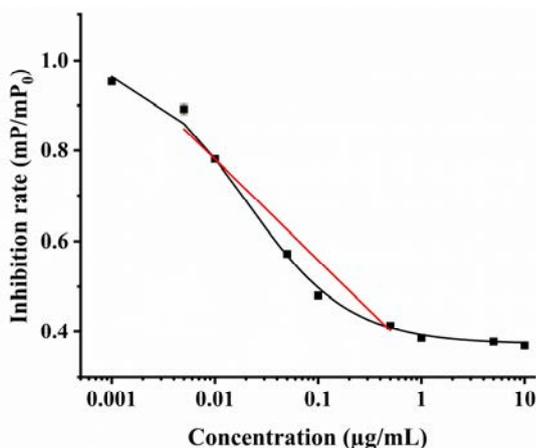


图 4.13 FPIA 法测定合成辣椒素的标准曲线。 $y= -0.29997x+0.18129$, $R^2 = 0.9999$, $n=3$
 Fig. 4.13 Standard curves of N-Vanillylnonanamide by FPIA, $y= -0.29997x+0.18129$, $R^2 = 0.9999$, $n=3$

4.4.5 检测方法的比较

为了证明我们开发的 FPIA 在快速现场检测方面的优越性能,我们将 FPIA 获得的检测合成辣椒素的数据与文献中已经报道的方法进行了比较。对比表 4.7 数据发现,虽然与现有免疫传感器相比灵敏度不够,但综合现场检测所需的检测范围和检测时间方面具有显著优势。

表 4.7 FPIA 与其他辣椒素分析方法的测定性能比较

Tab. 4.7 Comparison of the assay performance of FPIA with other analytical methods for capsaicinoids

分析方法	分析物	线性范围(ng/mL)	检测限(ng/mL)	时间(min)	参考文献
免疫亲和层析结合 LC-MS/MS	辣椒素	-	0.02	>30 min	[59]
	二氢辣椒素	-	0.03		
HPLC	辣椒素	-	250	>30 min	[124]
	二氢辣椒素	-	340		
电化学免疫传感器	辣椒素类物质	$10^{-3}\sim 10^4$	3.3×10^{-4}	>30 min	[35]
ELISA	辣椒素类物质	1.1~27.0	-	>30 min	[57]
TR-LFS	辣椒素	-	2.3	≤10 min	[15]
SERS	辣椒素	$0.305\sim 3.05\times 10^3$	3.05	≤10 min	[125]
TLC-PAD	辣椒素类物质	$5\times 10^4\sim 10^6$	5×10^4	>30 min	[126]
FPIA	合成辣椒素	3.97~97.99	1.56	10 min	本研究

4.4.6 基质效应的实验

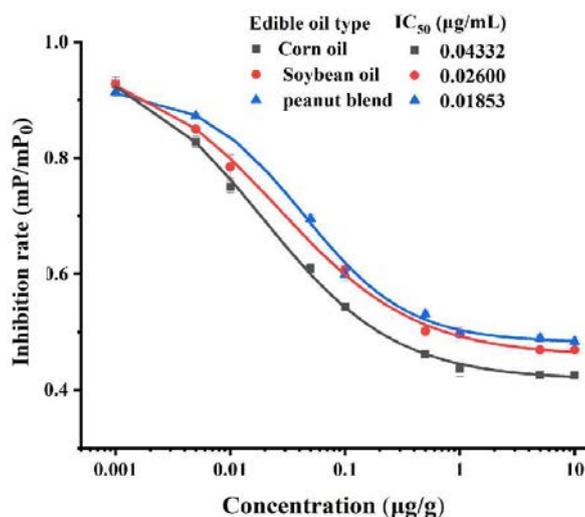


图 4.14 合成辣椒素的基质效应曲线

Fig. 4.14 Matrix effect: the matrix curves for N-Vanillylononamide

从图 4.14 中可以看出大豆油与玉米胚芽油的曲线优于花生调和油的曲线,花生调和油曲线的检测范围 ($IC_{20} \sim IC_{80}$) 明显低于其他曲线。因此可知,像大豆油、玉米胚芽油等非调和油,基质曲线在很大程度上与标准曲线重叠,这表明样品经过前处理后的标准曲线可以取代基质曲线。

4.4.7 加标回收实验

将三种不同浓度的合成辣椒素溶解在不同品种的食用植物油中。由表 4.8 可知,玉米胚芽油、大豆油和花生混合油的回收率均在 94.7~132.3% 范围内。

表 4.8 荧光偏振法测定合成辣椒素在不同食用油中的加标回收率

Tab. 4.8 The recovery rates of N-Vanillylnonanamide in different edible oils were determined by fluorescence polarization

样品	加标量 ($\mu\text{g/g}$)	检出值 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)
玉米油	0.03	0.028	94.7
	0.2	0.247	123.3
	0.3	0.333	111.0
大豆油	0.03	0.032	107.6
	0.2	0.265	132.3
	0.3	0.299	99.8
花生调和油	0.03	0.036	119.6
	0.2	0.232	116.0
	0.3	0.356	118.8

4.5 本章小结

本研究开发了一种以辣椒素为分析物的快速检测餐厨废弃油脂的均相检测方法。由于辣椒素和二氢辣椒素可通过 CPC Ab-D8 进行特异性识别,因此该方法可用于快速监测普通食用植物油中餐厨废弃油脂的掺伪问题。基于活性基团保护策略,我们选用可以最大限度暴露辣椒素类物质关键活性官能团的 Hapten 5, 将其长链烷基部位偶联间隔臂适当加长的氨基化荧光素 FITC, 最终合成的 CPC-EDF 荧光探针, 并利用 CPC Ab-D8 建立荧光偏正免疫分析方法 (FTIA)。在最佳条件下, 该方法具有较高的灵敏度, LOD 为 1.56 ng/mL, IC_{50} 为 19.73 ng/mL, 线性范围 ($IC_{20} \sim IC_{80}$) 为 3.97~97.99 ng/mL。基质效应实验表明样品前处理后标准曲线可以取代基质曲线。加标回收实验发现玉米胚芽油、大豆油与花生调和油的加标回收率在 94.7~132.3% 之间。这些结果表明, 该 FPIA 可适用于油样中辣椒素的检测, 以实现餐厨废弃油脂的快速有效现场甄别。

第五章 结论与展望

5.1 结论

本研究以辣椒素和姜辣素类物质作为餐厨废弃油脂的掺伪标志物,采用分子对接和抗原空间构像反向设计半抗原的策略及标准品浓度依筛选次数增大而递减的筛选策略,高效的实现了广谱单克隆抗体的制备,从理论和实际检测的角度验证了广谱性半抗原设计策略的可行性。在利用收集的辣椒素类物质抗原抗体一同进行了识别机制研究的同时确定了最优抗原抗体组合,并进行了 LFIA 的初步实验。此外,利用高灵敏 CPC Ab-D8 建立的 FPIA 方法,实现了均相溶液体系中快速监测餐厨废弃油脂中辣椒素。

本课题的主要研究成果如下:

(1) 基于分子对接辅助设计辣椒素、姜辣素类物质广谱性半抗原

本研究将目标分析物与 CPC Ab-D8 进行同源建模、分子对接,明确了目标分析物中关键官能团——苯环,酚羟基,甲氧基,长链烷基中的羰基等,并设计合成 2 种针对辣椒素和姜辣素类物质的广谱性半抗原,分别为 Hapten 1、Hapten 7;结合已有研究发现 ESP 分析能有效地提高半抗原的筛选效率;在以上研究的基础上,利用活泼酯法制备了人工完全抗原。

(2) 辣椒素、姜辣素类物质单克隆抗体的制备及识别机制研究

选取 Hapten 1-BSA 免疫效果好的两只小鼠(效价为 128000, IC_{50} 为 69.54 和 118.85 ng/mL)进行细胞融合,采用标准品浓度逐渐降低的筛选策略成功筛选获得 3 株具有良好识别和特异性的辣椒素、姜辣素类物质广谱单克隆抗体细胞株,分别为 1-F12、1-G12、1-D6。另外利用收集的 5 种完全抗原及对应抗体共同进行交叉组合发现,半抗原刚性间隔臂的保留、连接臂的加长、长链烷基的适当修改和羰基的保留均有利于免疫反应产生辣椒素、姜辣素类物质优质抗体;酰胺基团的存在虽利于高灵敏辣椒素抗体的产生,但不利于辣椒素、姜辣素类物质广谱抗体的产生。最终利用最佳抗原抗体组合 Hapten 5-OVA/1-F12(效价为 128000, IC_{50} 为 88.13~481.51 ng/mL)进行了 LFIA 的初步实验,试纸条在加入标准品以后表现出明显的条带变化。

(3) 基于均相 FPIA 法实时快速监测餐厨废弃油脂中辣椒素

利用异硫氰酸荧光素乙二胺与已有的辣椒素半抗原偶联,在最大限度的暴露辣椒素类物质的关键活性官能团的同时制备 CPC-EDF 示踪剂。采用 TLC 纯化后的示踪剂与 CPC Ab-D8 表现出良好的结合特性。基于此,建立的 FPIA 检测方法线性范围(IC_{20} ~ IC_{80})为 3.97~97.99 ng/mL, IC_{50} 为 19.73 ng/mL, LOD 为 1.56 ng/mL。基质效应实验结果表明,玉米胚芽油、大豆油和花生混合油的回收率均在 94.7~132.3% 范围内。这为实现植物油中非法掺假餐厨废弃油脂鉴定提供了一种简单、快速、高通量的可行性方案。

5.2 展望

本研究仍存在一些不足之处，希望在后续研究中得以完善：

(1) ESP 分析能有效地提高半抗原的筛选效率。然而，我们只分析了三肽和半抗原的偶联物，这与实际的免疫抗原很大不同。因此，半抗原与偶联蛋白之间的弱相互作用以及免疫抗原对抗体质量的影响有待进一步研究。

(2) 快速实时监测方法近年来需求量显著增加，利用筛选获得的单克隆抗体建立简单快速的实时监测方法有待进一步开发，其中 LFIA 有着潜在的意义和价值。

参考文献

- [1] Zhou Y, Zhao W, Lai Y, Zhang B, Zhang D. Edible plant oil: global status, health issues, and perspectives[J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11:1315.
- [2] Huang Z M, Xin J X, Sun S S, Li Y, Wei D X, Zhu J, Wang X L, Wang J, Yao Y F. Rapid identification of adulteration in edible vegetable oils based on low-field nuclear magnetic resonance relaxation fingerprints[J]. *Foods*, 2021, 10(12):3068.
- [3] Chapa-Oliver A M, Mejía-Teniente L. Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent[J]. *Molecules*, 2016, 21(8):931.
- [4] Kim D H, Lee W Y. Highly sensitive electrochemical capsaicin sensor based on graphene-titania-Nafion composite film[J]. *J Electroanalytical Chem*, 2016, 776:74-81.
- [5] Dewey A, Baughan C, Dean T P, Higgins B, Johnson I. Eicosapentaenoic acid (EPA, an omega-3 fatty acid from fish oils) for the treatment of cancer cachexia[J]. *Cochrane Db Syst Rev*, 2007, 7(1):CD004597.
- [6] He Z, Wang Y, Wang L, Peng Y, Wang W, Liu X. Determination of 255 pesticides in edible vegetable oils using QuEChERS method and gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Analy Bioanal Chem*, 2017, 409(4):1017-1030.
- [7] Sganzerla M, Coutinho J P, de Melo A M T, Godoy H T. Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits[J]. *Food Res Int*, 2014, 64(0):718-725.
- [8] Einolghozati M, Talebi-Ghane E, Ranjbar A, Mehri F. Concentration of aflatoxins in edible vegetable oils: a systematic meta-analysis review[J]. *Eur Food Res Technol*, 2021, 247(12):2887-2897.
- [9] Wang T, Wu H, Long W, Hu Y, Cheng L, Chen A, Yu R. Rapid identification and quantification of cheaper vegetable oil adulteration in camellia oil by using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy combined with chemometrics[J]. *Food Chem*, 2019, 293:348-357.
- [10] Tan J, Li R, Jiang Z, Tang S, Wang Y, Shi M, Xiao Y, Jia B, Lu T, Wang H. Synchronous front-face fluorescence spectroscopy for authentication of the adulteration of edible vegetable oil with refined used frying oil[J]. *Food Chem*, 2017, 217:274-280.
- [11] Rifna E J, Pandiselvam R, Kothakota A, Subba Rao K V, Dwivedi M, Kumar M, Thirumdas R, Ramesh S V. Advanced process analytical tools for identification of adulterants in edible oils - A review[J]. *Food Chem*, 2022, 369:130898.
- [12] Peng G, Chang M, Fang M, Liao C, Tsai C, Tseng S, Kao Y, Chou H, Cheng H. Incidents of major food adulteration in Taiwan between 2011 and 2015[J]. *Food Control*, 2017, 72:145-152.
- [13] Visciano P, Schirone M. Food frauds: Global incidents and misleading situations[J]. *Trends Food Sci Tech*, 2021, 114(2):424-442.
- [14] Yang Z, Zhou Q, Wu W, Zhang D, Mo L, Liu J, Yang X. Food fraud vulnerability assessment in the edible vegetable oil supply chain: A perspective of Chinese enterprises[J]. *Food Control*, 2022, 138:109005.
- [15] Wang M, Gao B, Xing Y, Xiong X. Preparation of an electrochemical sensor based on multi-walled carbon nanotubes/molecularly imprinted polymers for the detection of capsaicin in gutter oil by differential pulse voltammetry[J]. *Int J Electrochem Sc*, 2020, 15:8437-8449.
- [16] Ye Q, Meng X. Highly efficient authentication of edible oils by FTIR spectroscopy coupled with chemometrics[J]. *Food Chem*, 2022, 385:132661.

- [17] 石亚新, 葛武鹏, 吴小勇, 耿炜, 杨静, 袁亚娟. 地沟油甄别检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(7):276-281.
- [18] Moore J C, Spink J, Lipp M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010[J]. J Food Sci, 2012, (77): R118-R126.
- [19] Zhu W, Wang X, Chen L. Rapid detection of peanut oil adulteration using low-field nuclear magnetic resonance and chemometrics[J]. Food Chem, 2017, 216:268-274.
- [20] Zhang L., Huang X., Li P, Na W, Jiang J, Mao J, Ding X, Zhang Q. Multivariate adulteration detection for sesame oil[J]. Chemometr Intell Lab, 2017, 161:147-150.
- [21] Xu L, Xu X, Xiong H, Chen L, Li Y. Rapid detection of vegetable cooking oils adulterated with inedible used oil using fluorescence quenching method with aqueous CTAB-coated quantumdots[J]. Sensors Actuat B-Chem, 2014, 203:697-704.
- [22] Zhang L, Li P, Sun X, Wang X, Xu B, Wang X, Ma F, Zhang Q, Ding X. Classification and adulteration detection of vegetable oils based on fatty acid profiles[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62:8745-8751
- [23] 刘晓毅, 食用植物油中外源性物质检测技术研究进展[J]. 农业机械, 2013, 29:51-54.
- [24] Tan J, Li R, Jiang Z, Tang S, Wang Y, Shi M, Xiao Y, Jia B, Lu T, Wang H. Synchronous front-face fluorescence spectroscopy for authentication of the adulteration of edible vegetable oil with refined used frying oil[J]. Food Chem, 2017, 217:274-280.
- [25] Wu Q, Li Y, Qin P, Xu J, Sun X, Yao B, Ren F. Time-resolved fluorescent lateral flow strip for easy and rapid quality control of edible oil[J]. Food Chem, 2021, 357, 129739.
- [26] 曹维金, 杨永存, 招辉, 等. 基于常规指标鉴别“地沟油”与食用植物油的有效性评估[J]. 卫生研究, 2014, 43(2):311-312+316.
- [27] 赵鑫超, 吴振鹏, 王鹏, 等. 油脂样品过氧化值的测定与评价[J]. 科技创新与应用, 2018(4):7+10.
- [28] 陈丽花, 郝德兰, 朱楚楚, 等. 地沟油的分析鉴别方法研究[J]. 食品工业, 2017, 38(8):169-173.
- [29] Amirav A, Neumark B, Margolin Eren K J, Fialkov A B, Tal N. Cannabis and its cannabinoids analysis by gas chromatography-mass spectrometry with Cold EI[J]. J Mass Spectrom, 2021, 56(6):e4726.
- [30] Yang H, He Q, Eremin S A, Pan J, Zou Y, Cui X, Zhao S. Fluorescence polarization immunoassay for rapid determination of dehydroepiandrosterone in human urine[J]. Ana Bioanal Chem, 2021, 413(17):4459-4469.
- [31] Sun X, Zhao Q, Zha C, Zhang J, Zhou Z, Dong H, Yang Q, Guo Y, Zhao S. Competitive electrochemical immunosensor for detection of capsaicinoids in edible vegetable oil based on computer aided molecular modeling[J]. J Electrochem Soc, 2022, 169:057502.
- [32] 吴倩, 徐建国. 基于辣椒碱标志物的试纸条快速检测地沟油[D]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2021, 44(07):982-986+1008.
- [33] Garcés-Claver A, Arnedo-Andrés M S, Abadía J, et al. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54:9303-9311.
- [34] Daood H G, Halasz G, Palotas G, Palotas G, Bodai Z, Helyes L. HPLC determination of capsaicinoids with cross-linked C18 column and buffer-free eluent[J]. J chromatogr sci, 2015, 53:135-143.
- [35] da Silveira Agostini-Costa T, da Silva Gomes I, de Melo L A M P, Reifschneider F J B, da Costa Ribeiro C S. Carotenoid and total vitamin C content of peppers from selected Brazilian cultivars[J]. J Food Compos Anal, 2017, 57:73-79.

- [36] Shen J, Shan J, Zhu X, Yang P, Zhang D, Liang B, Li M, Zang X, Dai Z. Sex specific effects of capsaicin on longevity regulation[J]. *Exp Gerontol*, 2020, 130:110788.
- [37] Yang S, Liu L, Meng L, Hu X. Capsaicin Is Beneficial to Hyperlipidemia, Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis in Guinea Pigs Fed on a High-Fat Diet[J]. *Chem-Biol Interact*, 2019, 297:1-7.
- [38] Bogusz Jr S, Libardi S H, Dias F F G, Coutinho J P, Bochi V C, Rodrigues D, Melo A M, Godoy H T. Brazilian Capsicum peppers: Capsaicinoid content and antioxidant activity[J]. *J Sci Food Agr*, 2018, 98(1):217-224.
- [39] Crapnell R D, Banks C E. Electroanalytical overview: The pungency of chile and chilli products determined via the sensing of capsaicinoids[J]. *Analyst*, 2021, 146(9):2769-2783.
- [40] Aziz F, Xin M, Gao Y, Chakroborty A, Khan I, Monts J, Monson K, Bode A M, Dong Z. Induction and Prevention of Gastric Cancer with Combined Helicobacter Pylori and Capsaicin Administration and DFMO Treatment, Respectively[J]. *Cancers*, 2020, 12(4):816.
- [41] Loizzo M R, Pugliese A, Bonesi M, Bonesi M, Menichini F. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from Capsicum annum, Capsicum baccatum, Capsicum chacoense and Capsicum chinense: A comparison between fresh and processed peppers[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 64:623-631.
- [42] Charles S. Why is piquant/spicy food so popular[J]? *Int J Gastron Food S*, 2018, 12:16-21.
- [43] Gu Q, Lu C, Chen K, Chen X, Ma P, Wang Z. Electrochemical Determination of Capsaicinoids Content in Soy Sauce and Pot-Roast Meat Products Based on Glassy Carbon Electrode Modified with B-Cyclodextrin/Carboxylated Multi-Wall Carbon Nanotubes[J]. *Foods*, 2021, 10(8):1743.
- [44] Bai Y, Jiang H, Zhang Y, Dou L, Liu M, Yu W, Wen K, Shen J, Ke Y, Yu X, Wang Z. Hydrophobic moiety of capsaicinoids haptens enhancing antibody performance in immunoassay: evidence from computational chemistry and molecular recognition[J]. *J Agr Food Chem*, 2021, 69(34):9957-9967.
- [45] Yang Q, Zhu J, Ma F, Li P, Zhang L, Zhang W, Ding X, Zhang Q. Quantitative determination of major capsaicinoids in serum by ELISA and time-resolved fluorescent immunoassay based on monoclonal antibodies[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 81:229-235.
- [46] Zhao Q, Wu Y, Shi X, Dong H, Liu H, Zheng Y, Yang Q, Sun X, Guo Y, Zhao S. Rapid quantitative detection of capsaicinoids in serum based on an electrochemical immunosensor with a dual-signal amplification strategy[J]. *J Solid State Electr*, 2020, 25(2):671-681.
- [47] Ma F, Yang Q, Matthäus B, Li P, Zhang Q, Zhang L. Simultaneous determination of capsaicin and dihydrocapsaicin for vegetable oil adulteration by immunoaffinity chromatography cleanup coupled with LC-MS/MS[J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1021:137-144.
- [48] Cunha S C, Oliveira M. Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD[J]. *Food Chem*, 2006, 95(3):518-524.
- [49] Salghi R, Armbruster W, Schwack W. Detection of argan oil adulteration with vegetable oils by high-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection[J]. *Food Chem*, 2014, 153:387-392.
- [50] Tian K, Wang W, Yao Y, Nie X, Lu A, Wu Y, Han C. Rapid identification of gutter oil by detecting the capsaicin using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *J Raman Spectrosc*, 2018, 49(3):472-481.

- [51] Zhang J, Zhang M, Yang Q, Wei L, Yuan B, Pang C, Zhang Y, Sun X, Guo Y. A simple and rapid homogeneous fluorescence polarization immunoassay for rapid identification of gutter cooking oil by detecting capsaicinoids[J]. *Anal bioanal chem*, 2022, 414(20):6127-6137.
- [52] Wang L, Jin J, Wang S, Wang X, Tian Y, Chen J. A novel method for the identification of illegal cooking oil (1): detection of three capsaicinoids with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(11):1094-1099.
- [53] Wu Y, Liu J, Yu J, Zhuang J, Ma F, Tan J, Shen Z. A monoclonal antibody for identifying capsaicin congeners in illegal cooking oil and its applications[J]. *Talanta*, 2022, 250:123686.
- [54] Guo Z, Li X, Gao F, Zhang Q, Li H. Determination of capsaicinoids in edible oil by liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry[J]. *Chemical Reagents*, 2016, 38(6):491-495.
- [55] Lisha M, Honghe L, Li K, Jie J, Shicheng L, Guihua L, Pingjian D. Efficiency evaluation of capsaicinoids to discriminate bio-waste oils from edible vegetable oils[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2014, 43(4):614-619.
- [56] Dalsasso R R, Valencia G A, Monteiro A R. Impact of drying and extractions processes on the recovery of gingerols and shogaols, the main bioactive compounds of ginger[J]. *Food Res Int*, 2022, 154:111043.
- [57] Promdam N, Khuituan P, Panichayupakaranant P. Effects of standardized [6]-gingerol extracts and [6]-gingerol on isolated ileum and lower esophageal sphincter contractions in mice[J]. *Food Chem*, 2022, 378(1):132077.
- [58] Semwal R B, Semwal D K, Combrinck S, Viljoen A M. Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger[J]. *Phytochemistry*, 2015, 117:554-568.
- [59] Bhattarai S, Tran V H, Duke C C. The Stability of Gingerol and Shogaol in Aqueous Solutions[J]. *J Pharm Sci*, 2001, 90(10):1658-1664.
- [60] Lu Fangqi, Wu Xuli. China food safety hits the “gutter”[J]. *Food Control*, 2014, 41:134-138.
- [61] Xu L, Xu X, Xiong H, Chen L, Li Y. Rapid detection of vegetable cooking oils adulterated with inedible used oil using fluorescence quenching method with aqueous CTAB-coated quantum dots[J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2014, 203:697-704.
- [62] Franek M, Diblikova I, Cernoch I, Vass M, Hruska K. Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(5):1559-1567.
- [63] Pastor-Navarro N, Gallego-Iglesias E, Maquieira Á, Puchades R. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides: Application to bee honey analysis[J]. *Talanta*, 2007, 71(2):923-933.
- [64] Hoffman P G, Lego M C, Galetto W G. Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high-pressure liquid chromatography[J]. *J Agr Food Chem*, 1983, 31(6):1326-1330.
- [65] Kuzma M, Fodor K, Boros B, Perjési P. Development and validation of an HPLC-DAD analysis for pharmacopoeial qualification of industrial *Capsicum* extracts[J]. *Talanta*, 2015, 53(1):206-212.
- [66] 吴春英, 白鹭, 谷风, 等. UPLC-MS/MS 测定地沟油中黄曲霉毒素和苯并芘[J]. *食品工业*, 2017, 38(1):285-288.
- [67] 孙娜. 测定食用油中反式脂肪酸含量的方法探讨[J]. *食品安全导刊*, 2018, (36):110.

- [68] Wu L, Zhao J, Wu L, Zhang Y, Li J. Simultaneous determination of squalene, tocopherols and phytosterols in edible vegetable oil by SPE combined with saponification and GC-MS[J]. *LWT*, 2022, 169(1):114026.
- [69] 成兰兴, 赵增兵, 刘菲, 等. 高效液相色谱法测定苯胺法合成 2-巯基苯并噻唑的萃取液[J]. *化学世界*, 2020, 61(5): 350-354.
- [70] Cao G, Ding C, Ruan D, et al. Gas chromatography-mass spectrometry based profiling reveals six monoglycerides as markers of used cooking oil[J]. *Food Control*, 2019, 96:494-498.
- [71] Zheng D, Hu X, Fu X, Xia Z, Zhou Y, Peng L, Yu Q, Peng X. Flowerlike Ni-NiO composite as magnetic solid-phase extraction sorbent for analysis of carbendazim and thiabendazole in edible vegetable oils by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*, 2022, 374(16):131761.
- [72] Huang Z, Xin J, Sun S, Li Y, Wei D, Zhu J, Wang X, Wang J, Yao Y. Rapid Identification of Adulteration in Edible Vegetable Oils Based on Low-Field Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Fingerprints[J]. *Foods*, 2021, 10(12):3068.
- [73] 陈少永, 陶兆林, 张翊, 等. 微波消解-原子吸收光谱法测定地沟油中 5 种微量元素山[J]. *蚌埠医学院学报*, 2015, 9:1244-1247.
- [74] Jin H, Li H, Yin Z, Zhu Y, Lu A, Zhao D, Li C. Application of Raman spectroscopy in the rapid detection of waste cooking oil[J]. *Food Chem*, 2021, 362(15), 130191.
- [75] Carami H, Rasekh M, Mirzaee-Ghaleh E. Application of the E-nose machine system to detect adulterations in mixed edible oils using chemometrics methods[J]. *Chinese Phys B*, 2014, 23(04):334-338.
- [76] 胡欣宇. 基于电导率法的地沟油含量测定[J]. *物联网技术*, 2017, 7(5):26-28+31.
- [77] 黄韬睿, 王鑫. 电导率测定法鉴别地沟油的研究及其应用[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(5):84-86.
- [78] Wang J, Peng T, Zhang X, Yao zk, Bing S, Wang Z, Shen J, Jiang H. A novel hapten and monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for simultaneous analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in wheat[J]. *Food Control*, 2018, 94:65-70.
- [79] Ceballos-Alcantarilla E, Abad-Fuentes A, Agulló C, Abad-Somovilla A, Mercader J V. Immunochemical method for penthiopyrad detection through thermodynamic and kinetic characterization of monoclonal antibodies[J]. *Talanta*, 2021, 226:122123.
- [80] Qu H, Zhang Y, Qu B, Kong H, Qin GLiu S, Cheng J, Wang Q, Zhao Y. Rapid lateral-flow immunoassay for the quantum dot-based detection of puerarin[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 81:358-362.
- [81] Singh A., Pasha S. K., Manickam P. et al., Single-domain antibody based thermally stable electrochemical immunosensor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 83:162-168.
- [82] Li C., Zuo J., Li Q, Chang Y, Zhang Y, Tu L, Liu X, Xue B, Zhao H, Zhang H, Kong X. One-step in situ solid-substrate-based whole blood immunoassay based on FRET between upconversion and gold nanoparticles[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 92: 335-341.
- [83] Leonardo S, Rambla-Alegre M, Samdal I A, Miles C O, Kilcoyne J, Diogène J, O'Sullivan C K, Campàs M. Immunorecognition magnetic supports for the development of an electrochemical immunoassay for azaspiracid detection in mussels[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 92:200-206.
- [84] Song C, Liu J, Li J, Liu Q. Dual FITC lateral flow immunoassay for sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 in food samples[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85:734-739.
- [85] Li L, Hou R, Shen W, Chen Y, Wu S, Wang Y, Wang X Yuan Z, Peng D. Development of a monoclonal-based ic-ELISA for the determination of kitasamycin in animal tissues

- and simulation studying its molecular recognition mechanism[J]. *Food Chem*, 2021, 363:129465.
- [86] Zou R, Guo Y, Chen Y, Zhao Y, Zhao L, Zhu G, Liu Y, Peters J, Guo Y. Computer-aided profiling of a unique broad-specific antibody and its application to an ultrasensitive fluoroimmunoassay for five N-methyl carbamate pesticides[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 426:127845.
- [87] Zeng L, Guo L, Wang Z, Xu X, Song S, Xu L, Kuang H, Li A, Xu C. Immunoassays for the rapid detection of pantothenic acid in pharmaceutical and food products[J]. *Food Chem*, 2021, 348:129114.
- [88] Chen Z J, Wu H L, Xiao Z L, Fu H J, Shen Y D, Luo L, Wang H, Lei H T, Hongsi Song S, Xu Z L. Rational hapten design to produce high-quality antibodies against carbamate pesticides and development of immunochromatographic assays for simultaneous pesticide screening[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 412:125241.
- [89] Xu Z, Wang H, Shen Y, Nichkova M, Lei H, Beier R C, Zheng W, Yang J, She Z, Sun Y. Conformational changes of hapten-protein conjugates resulting in improved broad-specificity and sensitivity of an ELISA for organophosphorus pesticides[J]. *Analyst*, 2011, 136(12):2512-2520.
- [90] Zhai C, Sun X, Zhao W P, Gong Z L, Wang X Y. Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electrodeposition[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 42:124-130.
- [91] Fu J Y, An X S, Yao Y, Guo Y M, Sun X. Electrochemical aptasensor based on one step co-electrodeposition of aptamer and GO-CuNPs nanocomposite for organophosphorus pesticide detection[J]. *Sensors Actuators B Chem*, 2019, 287:503-509.
- [92] Li F L, Wang X Y, Sun X, Guo Y M, Zhao W P. A dual-signal amplification strategy for kanamycin based on ordered mesoporous carbon-chitosan/gold nanoparticles-streptavidin and ferrocene labelled DNA[J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1033:185-192.
- [93] 吉艳. 基于金纳米材料的辣椒素的电化学传感器的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2020.
- [94] Leonardo S, Rambla-Alegre M, Samdal I A. Immunorecognition supports for the development of an electrochemical immunoassay for azaspiracid detection in mussels[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 92:200-206.
- [95] Nishiyama K, Takeda Y, Takahashi K, Fukuyama M, Maeki M, Ishida A, Tani H, Shigemura k, Hibara A, Ogawa H, Manabu T. Non-competitive fluorescence polarization immunoassay for detection of H5 avian influenza virus using a portable analyzer[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(18):4916-4623.
- [96] Hendrickson O D, Taranova N A, Zherdev A V, Dzantiev B B, Eremin S A. Fluorescence polarization-based bioassays: new horizons[J]. *Sensors-basel*, 2020, 20(24):7132.
- [97] Li Y, Zhao Q. Antibody-and aptamer-based competitive fluorescence polarization/anisotropy assays for ochratoxin A with tetramethylrhodamine-labeled ochratoxin A[J]. *Anal Methods*, 2021, 13(13):1612-1617.
- [98] Ma P, Ye H, Deng J, Khan I M, Yue L, Wang Z. A fluorescence polarization aptasensor coupled with polymerase chain reaction and streptavidin for chloramphenicol detection[J]. *Talanta*, 2019, 205:120119.
- [99] Johannsen B, Karpíšek M, Baumgartner D, Klein V, Bostanci N, Paust N, Früh S M, Zengerle R, Mitsakakis K. One-step, wash-free, bead-based immunoassay employing bound-free phase detection[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1153:338280.
- [100] Bai Y, Jiang H, Zhang Y, Bai Y, Jiang H, Zhang Y, Dou L, Liu M, Yu W, Wen K, Shen J, Ke Y, Yu X, Wang Z. Hydrophobic moiety of capsaicinoids haptens enhancing

- antibody performance in immunoassay: Evidence from computational chemistry and molecular recognition[J]. *Journal of Agricultural and Food Chem*, 2021, 69(34):9957-9967.
- [101] Najar-Ahmadi S, Haghaei H, Farajnia S, Yekta R, Dolatabadi J E N, Rashidi M. Interaction of donepezil with tau protein: Insights from surface plasmon resonance and molecular modeling methods[J]. *J Mol Liq*, 2021, 333:115924.
- [102] Abdu-Allah H H M, Wu S, Lin C, Tseng Y. Design, synthesis and molecular docking study of a-triazolylysialosides as non-hydrolyzable and potent CD22 ligands[J]. 2020, *Eur J Med Chem*, 208:112707.
- [103] Javaheri-Ghezeldizaj F, Mahmoudpour M, Yekta R, Dolatabadi J E N. Albumin binding study to sodium lactate food additive using spectroscopic and molecular docking approaches[J]. *J Mol Liq*, 2020, 310:113.
- [104] Sotriffer C.A., Flader W., Winger R.H, Rode B M, Liedl K R, Varga J M. Automated Docking of Ligands to Antibodies: Methods and Applications[J]. *Methods*, 2000, 20:280-291.
- [105] Wang J, Peng T, Zhang X, Xie S, Zheng P, Yao K, Ke Y, Wang Z, Jiang H. Application of quantitative structure-activity relationship analysis on an antibody and alternariol-like compounds interaction study[J]. *J Mol Recognit*, 2019, 32(6):e2776.
- [106] 陈秀金. 拟除虫菊酯类农药免疫快速检测方法及其定量构效模型的建立[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [107] Yuan M, Liu B, Liu E, Sheng W, Zhang Y, Crossan A, Kennedy I, Wang S. Immunoassay for phenylurea herbicides: application of molecular modeling and quantitative structure-activity relationship analysis on an antigen-antibody interaction study[J]. *Anal chem*, 2011, 83:4767-4774.
- [108] 杨青青. 食用植物油外源污染物辣椒素及黄曲霉毒素免疫检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院油料作物研究所, 2016.
- [109] 赵庆雪. 食用植物油中辣椒素类掺伪标志物电化学免疫传感方法的构建与应用[D]. 淄博: 山东理工大学, 2021.
- [110] Pizzagalli L, David M L. Atomistic simulations of a helium bubble in silicon carbide[J]. *J Nucl Mater*, 2020, 531:151990.
- [111] Zhang J, Ma F, Zha C, Yang Q, Zhang Q, Zhang W, Li P, Sun X. Effect of hapten structures on development of novel antibody against capsaicin and dihydrocapsaicin[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2022, 50(9):100134.
- [112] Estévez M C, Kreuzer M, Sánchez-Baeza F, Marco M P. Analysis of Nonylphenol: Advances and Improvements in the Immunochemical Determination Using Antibodies Raised against the Technical Mixture and Hydrophilic Immunoreagents[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(2):559.
- [113] Ma M, Chen M, Feng L, You H, Yang R, Boioduleva A, Hua X, Eremin S A, Wang M. Fluorescence Polarization Immunoassay for Highly Efficient Detection of Imidacloprid in Agricultural Samples[J]. *Food Anal, Method*, 2016, 9(9):1-8.
- [114] Spinks C A. Broad-specificity immunoassay of low molecular weight food contaminants new paths to Utopia[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2000, 11:210-217.
- [115] Xu Z, Xie G, Li Y, Wang B, Beier R C, Lei H, Wang H, Shen Y, Sun Y. Production and characterization of a broad-specificity polyclonal antibody for O, O-diethyl organophosphorus pesticides and a quantitative structure-activity relationship study of antibody recognition[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 647(1):90-96.
- [116] 查传云. 农产品中黄曲霉毒素和伏马毒素免疫快速检测方法研究[D]. 淄博: 山东理工大学, 2022.

- [117] 张宁. T-2 毒素杂交瘤细胞株的选育及免疫检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院油料作物研究所, 2013.
- [118] Shen R, Guan T, Li Z, Hong Z, Dzantiev B B, Zherdev A V, Koidis A, Yao X, Lei H. Identifying an emergent adulterant hydrochlorothiazide in food: A simple lateral flow strip with high sensitivity by time-resolved fluorescence[J]. *Food Control*, 2023, 143:109265.
- [119] Pourfarzaneh M, White G W, Landon J, Smith D S. Cortisol directly determination in serum by fluoroimmunoassay with magnetizable solid phase[J]. *Clin Chem*, 1980, 26(6):730-733.
- [120] Han X, Li L, Diao J. Qualitative and quantitative analyses of labiatic acid, apigenin and buddleoside in *Hyssopus officinalis* by high-performance thin-layer chromatography[J]. *JPC-J Planar Chromat*, 2021, 34(1):45-53.
- [121] He Q, Cui X, Shen D, Shen D, Chen Y, Jiang Z, Lv R, Eremin S A, Zhao S. Development of a simple, rapid and high-throughput fluorescence polarization immunoassay for glycocholic acid in human urine[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2018, 158:431-437.
- [122] Ren L, Meng M, Wang P, Xu Z, Eremin S A, Zhao J, Yin Y, Xi R. Determination of sodium benzoate in food products by fluorescence polarization immunoassay[J]. *Talanta*, 2014, 121:136-143.
- [123] Wang Q, Haughey S A, Sun Y, Eremin S A, Li Z, Liu H, Xu Z, Shen Yu, Lei H. Development of a fluorescence polarization immunoassay for the detection of melamine in milk and milk powder[J]. *Ana bioanal chem*, 2011, 399(6):2275-2284.
- [124] Shim Y S, Kim J C, Jeong S W. Simultaneous determination of piperine, capsaicin, and dihydrocapsaicin in korean instant-noodle (Ramyun) soup base using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Aoac Int*, 2016, 99(1):187-0192.
- [125] Liu Z, Yu S, Xu S, Zhao B, Xu W. Ultrasensitive detection of capsaicin in oil for fast identification of illegal cooking oil by serrs[J]. *Acs Omega*, 2017, 2(11):8401-8406.
- [126] Dawan P, Satarpai T, Tuchinda P, Shiowatana J, Siripinyanond A. A simple analytical platform based on thin-layer chromatography coupled with paper-based analytical device for determination of total capsaicinoids in chilli samples[J]. *Talanta*, 2017, 162:460-465.