

刘红, 张惠林, 刘庆梅, 等. 基于纸基比色传感器检测血清中虾致敏原组分 sIgE[J]. 食品工业科技, 2026, 47(9): 290-298. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040388

LIU Hong, ZHANG Huilin, LIU Qingmei, et al. Paper-based Colorimetric Sensor for Detection of Shrimp Allergenic Component sIgE in Serum[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(9): 290-298. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040388

· 分析检测 ·

基于纸基比色传感器检测血清中 虾致敏原组分 sIgE

刘红¹, 张惠林¹, 刘庆梅¹, 陈巧钦², 刘妍妘², 刘光明^{1,3,*}

(1.集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021;

2.厦门市波生生物技术有限公司, 福建厦门 361021;

3.厦门海洋职业技术学院, 福建厦门 361102)

摘要:目的: 构建纸基比色传感器用于虾过敏患者致敏原组分特异性 IgE (Specific immunoglobulin E, sIgE) 定量分析。方法: 制备凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 重要致敏原组分原肌球蛋白 (Lit v 1)、精氨酸激酶 (Lit v 2)、肌质钙结合蛋白 (Lit v 4) 特异性抗体 (Specific antibody, sAb) 并进行效价评估, 以致敏原为识别元件, 制作包括覆盖层、工作层和废液流出层的纸基比色传感器, 对其进行条件优化和性能评价。结果: 在二抗稀释倍数为 1:2000、目标物孵育时间为 15 min 等最优条件下检测 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb、Lit v 4-sAb, 回收率为 95.14%~103.25%, 相对标准偏差 < 10%。在虾过敏患者血清样本 sIgE 的检测中, 检出限为 0.22 ng/mL, 定量限为 0.73 ng/mL, Lit v 1-sIgE、Lit v 2-sIgE、Lit v 4-sIgE 的检测灵敏度为 80.00%~100.00%, 特异性为 91.67%~100.00%, 与酶联免疫吸附试验检测结果一致性达到 88.10%。结论: 该传感器具有良好的灵敏度和准确度, 该方法简单、快速, 能够应用于虾过敏患者致敏原组分 sIgE 定量分析, 为甲壳类水产品致敏原组分诊断提供技术支撑。

关键词: 凡纳滨对虾, 致敏原组分检测, 纸基比色传感器, 特异性 IgE

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2026)09-0290-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040388

本文网刊:



Paper-based Colorimetric Sensor for Detection of Shrimp Allergenic Component sIgE in Serum

LIU Hong¹, ZHANG Huilin¹, LIU Qingmei¹, CHEN Qiaoqin², LIU Yanyun², LIU Guangming^{1,3,*}

(1.College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2.Xiamen Boson Biotech Co., Ltd., Xiamen 361021, China;

3.Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361102, China)

Abstract: Objective: In this study, a paper-based colorimetric sensor was constructed and applied to detect the specific immunoglobulin E (sIgE) of shrimp allergic patients. Methods: The specific antibody (sAb) of the important allergen components in *Litopenaeus vannamei*, including tropomyosin (Lit v 1), arginine kinase (Lit v 2) and sarcoplasmic calcium-binding protein (Lit v 4), were prepared and their titer were evaluated. The paper-based colorimetric sensor was prepared with allergens as recognition elements, comprising a covering layer, a working layer and a waste liquid outflow layer. The reaction conditions of the paper-based sensor were optimized and its analytical performance was systematically evaluated. Results: Under the optimal conditions (secondary antibody dilution of 1:2000, target incubation time of 15 min etc.), Lit v 1-sAb, Lit v 2-sAb, Lit v 4-sAb were detected. Their recoveries were from 95.14% to 103.25%, with the relative standard

收稿日期: 2025-05-06

基金项目: 国家自然科学基金 (U23A20266, 32472449); 厦门市科技计划项目 (2023CXY0307)。

作者简介: 刘红 (1989-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 水产品质量检测, E-mail: liuhong@jmu.edu.cn。

* 通信作者: 刘光明 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工与安全, E-mail: gmlu@jmu.edu.cn。

deviations of less than 10%. The sensor was applied to the detection of sIgE in serum samples from shrimp allergic patients with a detection limit of 0.22 ng/mL and a quantitation limit of 0.73 ng/mL. In addition, the sensitivities of the Lit v 1-sIgE, Lit v 2-sIgE, and Lit v 4-sIgE ranged from 80.00% to 100%, and the specificities of the three ranged from 91.67% to 100.00%. The consistency of this method with ELISA results reached 88.10%. Conclusion: The sensor has good sensitivity and accuracy. The method is simple, rapid, and suitable for quantitative analysis of allergen component sIgE in shrimp allergic patients. This provides technical support for the component resolved diagnosis of crustacean aquatic products.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; detection of allergen components; paper-based colorimetric sensor; sIgE

食物过敏是全球日益严重的公共卫生问题^[1],食物过敏患病率呈上升趋势^[2-4],影响着全世界约 8% 的儿童和 10% 的成年人^[5]。在我国,食物过敏患病率在十年中由 3.5% 上升到了 7.7%^[6]。食物过敏指暴露于特定食物后机体产生具有反复性、速发性不良反应现象^[7],大多数食物过敏是由免疫球蛋白 E(Immunoglobulin E, IgE)介导,发病机制是机体产生针对食物致敏原的特异性 IgE(Specific IgE, sIgE),导致靶器官的肥大细胞、嗜碱性粒细胞脱颗粒释放组胺等生物活性物质引起过敏性炎症^[8-9]。甲壳类水产品被联合国粮农组织认定为八大类过敏食物之一,其富含优质蛋白且营养价值高,是沿海城市餐桌必备食物^[10]。流行病学调查发现,全球范围内甲壳类水产品的过敏发病率为 0.2%~0.9%^[11];在亚洲,对虾蟹等甲壳类食物过敏约有 40% 的儿童和 33% 的成人^[12];而在中国,自我报告的虾过敏患病率高达 28.1%,位居第一^[13]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)因肉质鲜美、营养丰富,深受消费者喜爱,根据 2024 中国渔业年鉴数据统计显示,2023 年其养殖产量年达 142.9 万吨,约占全国海虾养殖总产量 80.9%^[14]。随着其消费量出现的大幅度增长,由其引发的食物过敏问题也不可忽视。因此,发展精确的虾过敏诊断方法对于适当的预防和管理策略至关重要,特别是体外组分诊断,避免了受试者与过敏原之间的接触,成为评估食物过敏反应风险最安全的方法^[15]。目前,已在世界卫生组织和国际免疫学会联合会注册的虾类过敏原蛋白有原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)、精氨酸激酶(Arginine kinase, AK)、肌质钙结合蛋白(Sarcoplasmic calcium-binding protein, SCP)、肌球蛋白轻链(Myosin light chain, MLC)等^[16-17]。致敏原组分诊断(Component-resolved diagnosis, CRD)是针对单一致敏组分 sIgE 检测的一种新方法,可以避免使用粗提浸液混合物分析带来的检测不确定性和交叉免疫,提高体外诊断的敏感性^[18]。以重组技术作为 CRD 的基础,通过重组表达以获得生产程序标准化、高纯度、低成本的致敏蛋白^[19],为免疫治疗和致敏原组分诊断提供更大的潜力。目前 sIgE 定量的金标准是 ImmunoCAP^[20],还有酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、化学发光分析、免疫印迹、聚合酶链反应等也已经运用于 sIgE 检测^[21]。尽管这些方法灵敏度高,但需要大量的血液和大型的仪器设备进行分析。纸基分析装

置(Paper-based analytical devices, PAD)是将实验室分析转移到便携式纸基芯片上,可以实现分析的小型化和集成化。纸基传感器以滤纸、色谱纸等不同材料为基材,通过丝网印刷、激光切割、3D 打印等制备技术,结合电化学、拉曼光谱、色度测定等检测方法,广泛应用于食品、生物医学、环境检测和疾病诊断等各个检测领域^[22-25]。其中比色分析法因成本低,操作简单,能快速获取结果无需仪器检测,是 PAD 检测中应用最为广泛的方法。纸张高度多孔的结构允许在免疫测定中简单地固定各种试剂(例如抗体、蛋白质)^[23],液体样品可由纸基材料毛细作用自驱动无需外力泵,小巧便携。此外,纸基芯片与智能手机相结合已经成为一种新的纸基传感器研究趋势,不仅操作快速方便,而且检测结果更加科学和准确。

基于上述我国虾过敏患病的高发生率,发展精确的、便携的虾致敏原体外组分诊断方法迫在眉睫。本研究以凡纳滨对虾为研究对象,制备致敏原 TM(Lit v 1)、AK(Lit v 2)、SCP(Lit v 4)多克隆抗体,建立基于纸基比色传感器检测过敏患者血清 sIgE 抗体的方法。利用免疫反应的特异性,将致敏原作为识别元件,根据抗原-抗体发生的特异性结合所产生信号值变化来实现过敏患者血清 sIgE 抗体分析,通过智能手机拍照成像可实现定量检测,并将其与 ELISA 进行比较,弥补国内虾致敏原组分 sIgE 检测的缺口,为虾过敏人群提供精准诊断的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

鲜活凡纳滨对虾 购于厦门朴朴超市;新西兰大白兔 养于厦门大学实验动物中心(翔安校区)用于多克隆抗体制备(实验动物伦理号:XMULAC 20231000);凡纳滨对虾过敏患者血清样本 由厦门大学附属妇女儿童医院(伦理委员会批准编号:No.KY-2019-014)提供;辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗人 IgE 抗体 英国 Abcam 公司;HRP 标记的羊抗兔免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG)抗体 美国 Pierce 公司;人 IgE 美国 MCE 公司;人抗 IgE 美国 BETHYL 公司;牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA) 美国 Sigma 公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 上海碧云天生物技术股份有限公司;Whatman 1 号滤纸 GE 医疗公司。

PT-2100 组织捣碎机 瑞士 Kinematica 公司;

EPS 300 琼脂糖凝胶电泳装置 Tanon 公司; ST-I 半干式转移电泳槽 大连竞迈公司; Infinite® M200 PRO 多功能酶标仪 瑞士 Tecan 公司; LaserPro Spirit II 激光切割机 GCC world 公司; 600 化学发光成像系统 美国 Azure Biosystems 公司; PowerPac300 蛋白质电泳仪 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 多克隆抗体的制备及效价分析 选择本实验室前阶段重组表达致敏原 rLit v 1、rLit v 2 和 rLit v 4 各 1 mL (1 mg/mL) 分多次免疫新西兰大白兔, 制备兔抗 Lit v 1、Lit v 2 和 Lit v 4 多克隆抗体 (Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb), 免疫结束后采集兔血于 4 °C 放置过夜, 离心 (30 min, 3500×g, 4 °C) 以分离血清, 并采用 Dot blot 及 ELISA 进行抗体效价测定^[26], 实验过程中以梯度稀释的多克隆抗体 (1:1×10³~1:5×10⁵) 作为一抗, 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG (稀释度为 1:2×10⁴) 作为二抗。

1.2.2 纸基分析装置的制作 用 CorelDRAW 2019 软件设计绘制 4×3 阵列四层, 一层孔径为 6 mm×6 mm 用于装载纸基芯片, 另一层孔径为 1 mm×1 mm 用于废液流出, 另外两层为覆盖层对纸基芯片起到保护作用, 再利用激光切割机对聚甲基丙烯酸甲酯板进行雕刻。随后对纸基进行预处理, 将 5.0 μL 的 0.5 mg/mL 壳聚糖溶液滴加到纸基反应 20 min, 再添加 5.0 μL 的 2.5% 的戊二醛溶液与其在室温反应 2 h。然后分别滴加 5.0 μL 的 50 μg/mL 致敏原 Lit v 1、Lit v 2、Lit v 4 于纸基上孵育 30 min, 再滴加 5.0 μL 的 1% BSA (目的是避免发生非特异性结合, 因 BSA 可占据反应区域上蛋白未能结合的位点)。至此 PAD 可在 4 °C 下封装贮存备用。

1.2.3 可行性分析 利用 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb 作为 PAD 中的检测目标, 建立不同的 PAD 对照组, 各组分别为 (i) 致敏原+sAb+HRP+TMB, (ii) 戊二醛+TMB, (iii) 戊二醛+致敏原+TMB, (iv) 戊二醛+致敏原+sAb+TMB, (v) 戊二醛+致敏原+sAb+HRP+TMB, (vi) 戊二醛+致敏原+HRP+TMB (空白对照组)。

1.2.4 纸基比色传感器的工作流程 将 5.0 μL 特异性抗体 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb 分别添加到纸基检测区域反应 15 min, 随后用 50 μL TBST 冲洗。再将 5.0 μL 的二抗 HRP-IgG 添加到纸基检测区域中孵育 10 min, 再使用 100 μL TBST 冲洗。最后将 5.0 μL 的 TMB 显色液滴加到每个检测区域, 并使其反应 5 min, 反应完成之后对显色结果进行拍照记录, 利用智能手机识色应用程序分析色度 R 值, 用 ΔR 值 (空白对照组在 PAD 上的 R 值减去样本在 PAD 的 R 值) 表征实验结果。

1.2.5 实验参数的优化 将 Lit v 4-sAb 添加到纸基检测区域, 选取不同的二抗稀释倍数 (HRP 标记抗体

的稀释度为 1:500、1:1000、1:2000、1:5000、1:8000、1:10000、1:20000、1:50000), 设置不同的 TMB 显色时间 (0、1、2、5、8、10、15、20 min)、目标物孵育时间 (0、2、5、10、15、30、90、150 min)、二抗孵育时间 (0、2、5、10、20、30、60、90 min), 分别固定二抗稀释倍数为 1:2000、TMB 显色时间为 5 min, 目标物孵育时间为 15 min, 二抗孵育时间为 10 min, 其他所有条件保持一致进行 PAD 的检测。

1.2.6 线性关系验证 将不同浓度的 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb (0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0 ng/mL) 分别添加到纸基检测区域, 在最优实验条件下进行 PAD 的测定。PAD 方法以每种 sAb 添加量 (ng/mL) 为横坐标, 对应的 ΔR 值为纵坐标进行线性计算; ELISA 方法以每种 sAb 添加量 (ng/mL) 为横坐标, 对应的 OD_{450 nm} 为纵坐标进行线性计算。

1.2.7 稳定性评价 将 2.00 ng/mL 和 20.00 ng/mL 的 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb 分别添加到纸基检测区域, 在最优实验条件下进行 PAD 的测定。以样品的添加浓度与校准关系得出的测定浓度来评估 PAD 检测的稳定性。

1.2.8 抗干扰性评估 将 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb、Lit v 4-sAb (40 ng/mL) 及血清样品中可能的干扰物质人 IgG、钠、钾、甘氨酸、葡萄糖和尿素 (100 μg/mL) 分别添加到纸基检测区域, 在最优实验条件下进行 PAD 检测。

1.2.9 IgE 标准曲线的建立 制作 PAD 过程中将致敏原换作人 IgE, 滴加到纸基上孵育 30 min, 之后滴加 5.0 μL 的 1% BSA, 在 4 °C 下封装贮存备用。配制人抗 IgE 标准溶液 (1、5、10、20、30、40、50、60、70、80 ng/mL) 分别添加到纸基检测区域, 将特异性抗体换作人抗 IgE, 二抗换作羊抗人 HRP-IgE, 在最优实验条件下进行 PAD 检测, 绘制标准曲线。

1.2.10 血清样本 sIgE 检测 将血清样本按 1:1、1:2、1:5、1:10、1:20 进行稀释, 添加 5.0 μL 血清样本到每个检测区域, 将特异性抗体换作血清样本, 二抗换作羊抗人 HRP-IgE, 在最优实验条件下进行 PAD 的检测。

1.3 数据处理

每组实验均做 3 次平行, 实验数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 运用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Lit v 1、Lit v 2 和 Lit v 4 多克隆抗体的效价评估

Chen 等^[27]发现口虾蛄天然 AK 与重组 AK 的免疫结合活性无明显差异, 二者还具有相似的 IgG 结合活性; Hu 等^[28]研究表明拟穴青蟹重组 SCP 与天然 SCP 的理化特性及免疫学特性相似, 二者均无显著差异。Johnston 等^[29]证实, 虾重组蛋白 TM 为

致敏原的精确诊断提供了有效手段, 对其他各种致敏原的研究也在进行中。同样, 本实验室前期研究发现凡纳滨对虾重组表达致敏原 rLit v 1、rLit v 2 和 rLit v 4 与天然蛋白 nLit v 1、nLit v 2 和 nLit v 4 的 IgE 结合能力没有显著性差异, 故本研究选择 rLit v 1、rLit v 2 和 rLit v 4 免疫新西兰大白兔获得相应特异性抗体(Specific antibody, sAb)。利用 Dot-blot 分析兔血清 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb、Lit v 4-sAb 的效价, 随着兔抗血清稀释倍数的增加, 点印迹的显色强度逐渐减弱(图 1A), 后利用 ELISA 分析三者 sAb 的效价与 Dot-blot 呈相似趋势(图 1B), Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb、Lit v 4-sAb 在 $1:5 \times 10^5$ 均具有良好的效价, 满足检测要求。因此, 后续可利用重组 sAb 构建检测体系, 用于致敏原 sIgE 的组分诊断。

2.2 纸基比色传感器的工作流程及可行性分析

本方法 PAD 构造如图 2A 所示, I、IV 为覆盖层起保护作用, II 为工作层即纸基检测区域, III 为废液流出层方便洗涤时废液流出。为了在纸基传感器上实现血清样品中 sIgE 的检测, 其检测流程如图 2B 所示, 需要预先将致敏原 Lit v 1、Lit v 2 和 Lit v 4 固定在纸基检测区域, 利用壳聚糖与戊二醛对纸基芯片进行预处理, 从而纸基上裸露出醛基, 致敏原上的氨基会与纸基上的醛基进行共价交联, 使致敏原能够有效地固化在纸基芯片上为 sIgE 的检测提供条件。检测时利用免疫反应的特异性, 将致敏原作为识别元

件, 利用抗原-抗体发生的特异性结合, 通过 HRP 介导的 TMB 氧化获得颜色变化, 肉眼可视化实现半定量分析, 结合智能手机分析颜色信号 RGB 值构建数学模型可实现定量分析。由于 IgG 抗体作为阻断抗体^[30], 血清 IgE 具有与兔 IgG 类似的结合作用^[31-32]。因此, 本研究前期使用 sIgG 即 sAb 代替 sIgE 作为靶点来评估 PAD 的性能。为了验证纸基比色传感器的可行性, 利用 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb 作 PAD 中的检测目标, 建立了不同的对照组, 如图 2C 所示, 与空白对照组相比, 当添加含有 sAb 的样品时, 实验组 v 列的 ΔR 值显示出较强的信号, 显色效果显著增强。所有组的纸基照片如图 2D 所示, 这些结果验证了 PAD 的适用性。

2.3 实验参数的优化

为了获得最佳的分析性能, 对所有重要的实验参数进行了优化, 条件优化均利用 Lit v 4-sAb 进行实验。HRP 标记抗体(二抗)会与靶标物结合进而影响显色效果, 因此, 优化了二抗的稀释度, 如图 3A 所示, ΔR 值随着二抗稀释倍数增加而减小, 显色效果逐渐减弱, 当二抗稀释倍数增加到 1:2000 之后显色效果显著减弱, 考虑试剂成本, 选择 1:2000 作为 HRP 标记抗体的最佳稀释度。此外, 孵育时间对颜色变化的感知效率和稳定性起着重要作用, 因此, 对 TMB 显色时间、目标物孵育时间、二抗孵育时间进行优化, 如图 3B~图 3D 所示, ΔR 值随着各时间的增

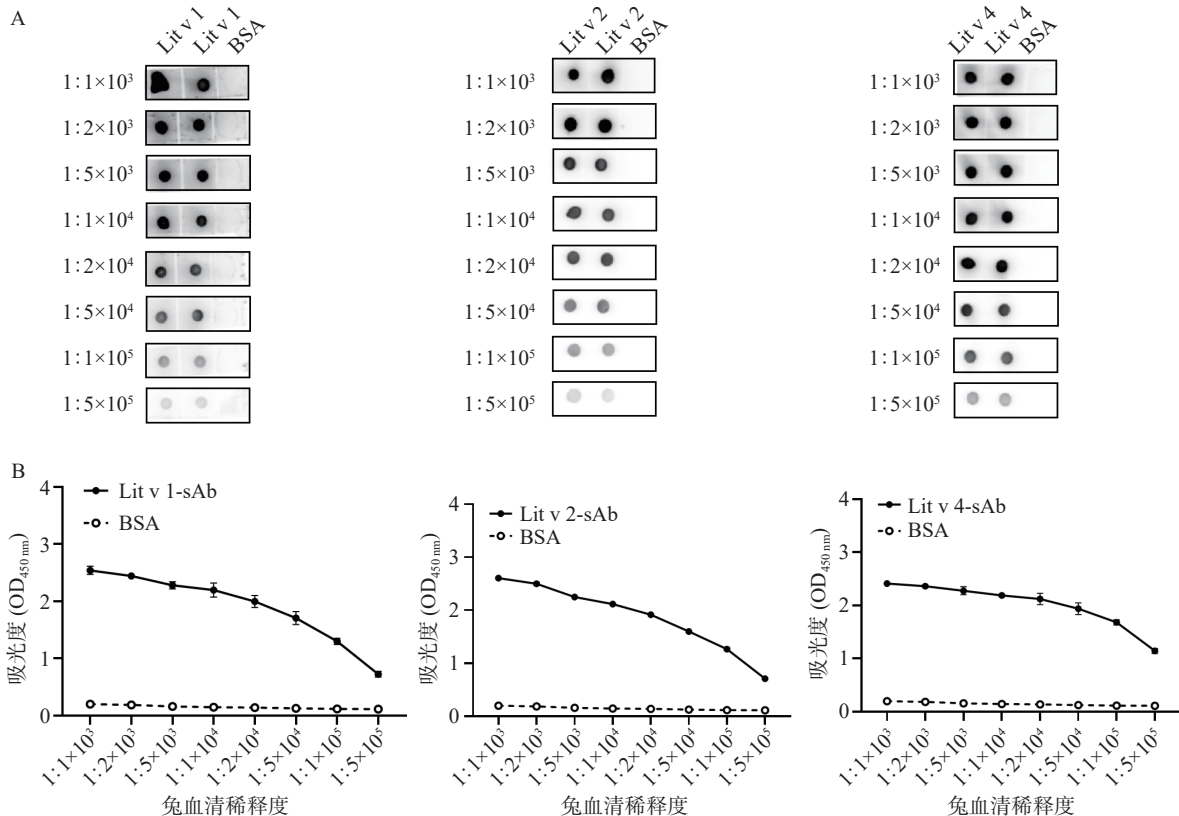


图 1 兔抗 Lit v 1、Lit v 2 和 Lit v 4 多克隆抗体效价分析

Fig.1 Titer analysis of rabbit anti-Lit v 1, Lit v 2 and Lit v 4 polyclonal antibody

注: A, Dot-blot; B, ELISA, $1:1 \times 10^3 \sim 1:5 \times 10^5$ 为 sAb 稀释倍数。

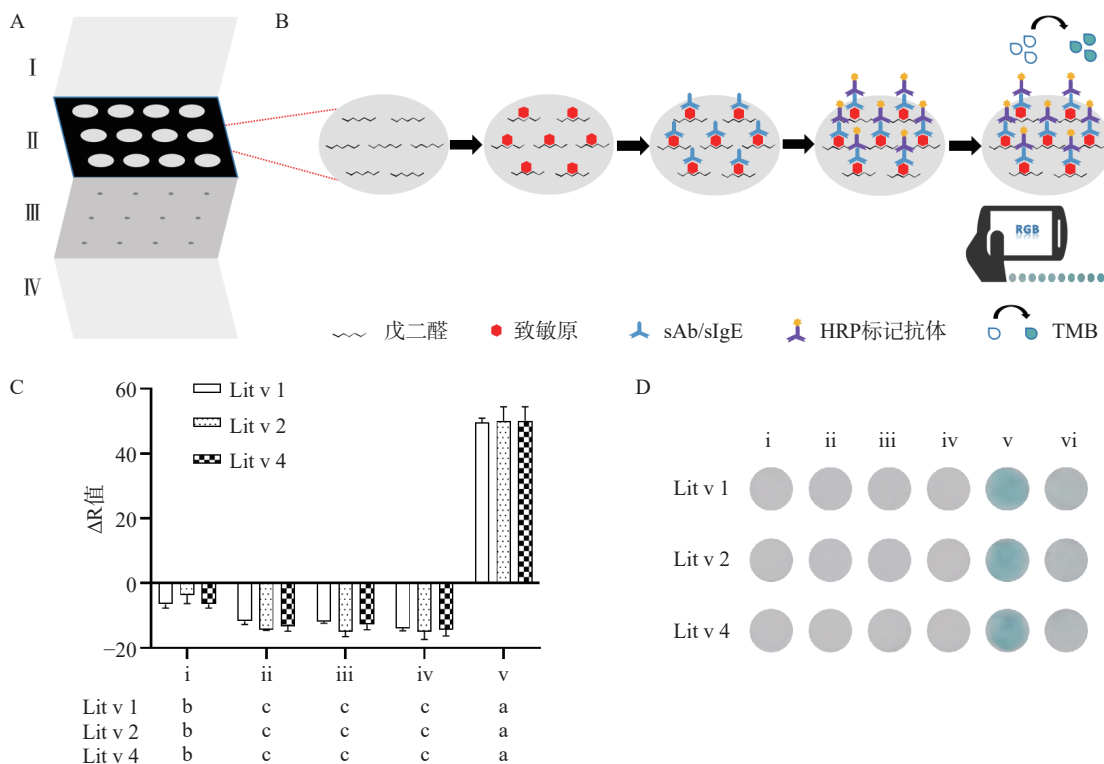


图 2 纸基比色传感器检测 sIgE 的示意图及可行性分析

Fig.2 Schematic and the feasibility of the paper-based colorimetric sensor for detection of sIgE

注: A, PAD 构造图, I、II、III、IV 分别为覆盖层、工作层、废液流出层、覆盖层; B, 检测流程图; C, 检测区域的 ΔR 值的变化, 图中不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.01$); D, 纸基照片; (i) 致敏原+sAb+HRP+TMB, (ii) 戊二醛+TMB, (iii) 戊二醛+致敏原+TMB, (iv) 戊二醛+致敏原+sAb+TMB, (v) 戊二醛+致敏原+sAb+HRP+TMB, (vi) 戊二醛+致敏原+HRP+TMB(空白对照组)。

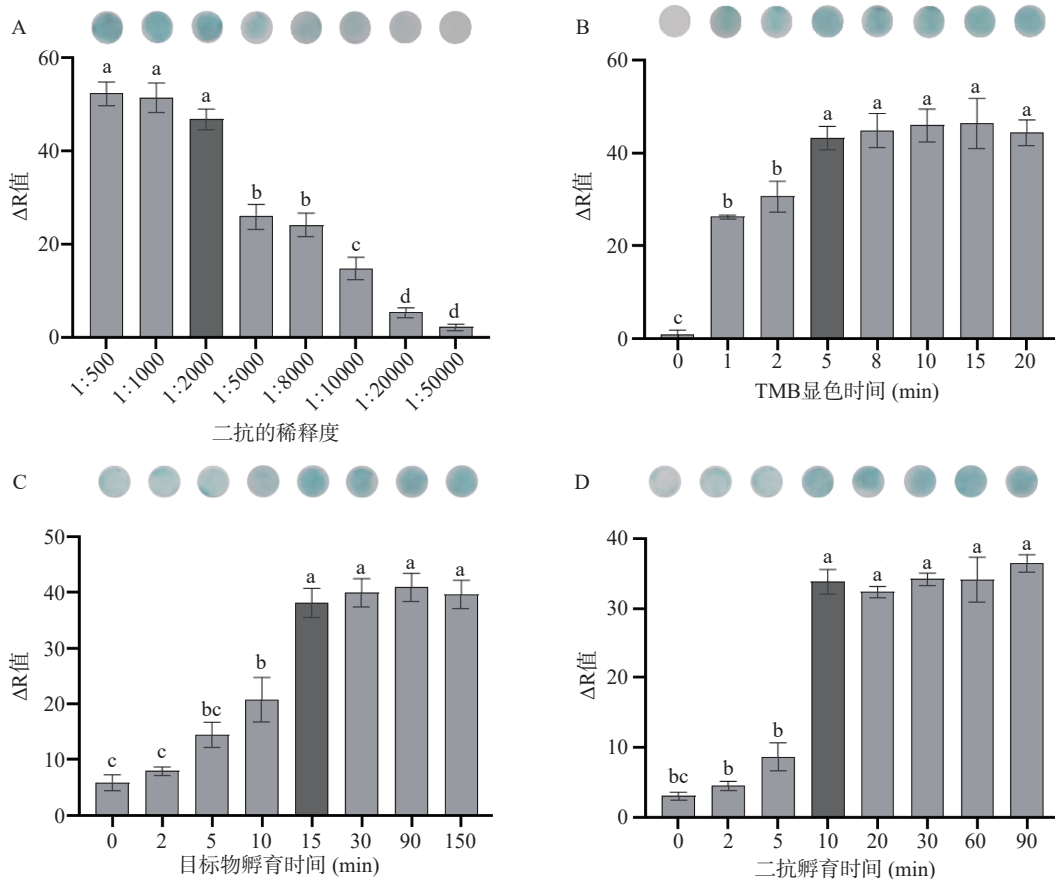


图 3 纸基比色传感器检测条件优化

Fig.3 Optimization of assay conditions on paper-based colorimetric sensor

注: A, 二抗稀释度; B, TMB 显色时间; C, 目标物孵育时间; D, 二抗孵育时间; 图中不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.01$)。

加而增大, 显色效果均逐渐增强, 当 TMB 显色时间 5 min 后, 目标物孵育时间 15 min 后, 二抗孵育时间 10 min 后, 各显色效果显著增强, 考虑时间成本, 选择 5 min 作为 TMB 显色时间, 15 min 作为目标物孵育时间, 10 min 作为二抗孵育时间。

2.4 纸基比色传感器的线性关系及稳定性分析

为了评估纸基比色传感器对不同浓度的 sAb 的分析性能, 在最佳实验条件下, 对不同浓度的 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb 进行测定, 如图 4 所示, 用肉眼可以很容易地辨别蓝色逐渐加深(图 4), 线性结果见表 1, 每种 sAb 在各自的范围内线性关系良好, 决定系数 R^2 均大于 0.9695。由于 ELISA 是一种传统可靠用于多种免疫分析方法^[26], 因此, 本研究用 ELISA 测定了 sAb 校准曲线, 显示 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb 在各自的范围内具有良好的相关性(表 1)。根据空白样品响应的三倍标准偏差与标准曲线斜率的比值确定方法的检出限(Limit of detection, LOD), 空白样品响应的十倍标准偏差与标准曲线斜率的比值确定方法的定量限(Limit of quantitation, LOQ), PAD 测定 Lit v 1-sAb 的 LOD 和 LOQ 与 ELISA 相当, 测定 Lit v 2-sAb 有更低的 LOD 和 LOQ。综上, 利用 PAD 检测 sAb 有较好的分析性能。

基于 PAD 检测, 对每种 sAb 添加 2.00 ng/mL 和 20.00 ng/mL 2 个含量水平进行回收实验, 回收率和相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)结果分析见表 2, 2 个添加水平回收率均在 95.14%~103.25% 之间, RSD 均小于 10%, 表明 PAD 测定 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb 和 Lit v 4-sAb 具有优异的准确度和精密度。

表 2 纸基比色传感器检测不同浓度抗体的回收率、RSD 值(n=3)

Table 2 Recoveries and RSD values of different concentrations of antibodies measured by paper-based colorimetric sensor (n=3)

添加物	添加浓度(ng/mL)	测定浓度(ng/mL)	回收率(%)	RSD(%)
Lit v 1-sAb	2.00	1.90±0.06	95.14	2.91
	20.00	20.30±0.29	101.49	1.42
Lit v 2-sAb	2.00	1.91±0.06	95.44	3.10
	20.00	20.03±1.91	100.17	9.55
Lit v 4-sAb	2.00	2.01±0.07	100.25	3.41
	20.00	20.65±0.74	103.25	3.61

2.5 纸基比色传感器抗干扰能力评估及其 IgE 标准曲线的建立

为了评估纸基比色传感器对实际血清样品的分析性能, 进一步选择了血清样品中可能的干扰物包括人 IgG、钠、钾、甘氨酸、葡萄糖和尿素进行测定。干扰物质在检测区域添加浓度是待测抗体浓度上千倍, 如图 5A 所示, 可看到待测抗体组有明显的蓝色信号, 干扰物质组与空白组颜色相当近乎无色, 且待测抗体组与其他干扰组的显色数字信号值(ΔR 值)也有显著性差异, 表明该 PAD 有良好的抗干扰性。由于前期实验是利用 sAb 即 sIgG 进行探索, PAD 对于人血清 sIgE 的线性关系尚不清楚, 故需要利用人抗 IgE 作为标品对纸基比色传感器建立标准曲线, 以用于后续实际血清样本 sIgE 的检测。如图 5B 所示, 对于人抗 IgE 的检测, 显色(蓝色)强度随着浓度的增大逐渐变深, 在 1~80 ng/mL 范围内 ΔR 值与人抗 IgE 浓度的线性方程为 $y=0.6896x+13.78$, $R^2=0.9808$, LOD 为 0.22 ng/mL, LOQ 为 0.73 ng/mL。利用 ELISA 对 IgE 标准曲线进行测定, 线性方程为 $y=0.01166x+0.06586$, $R^2=0.9900$, LOD 为 0.45 ng/mL, LOQ 为

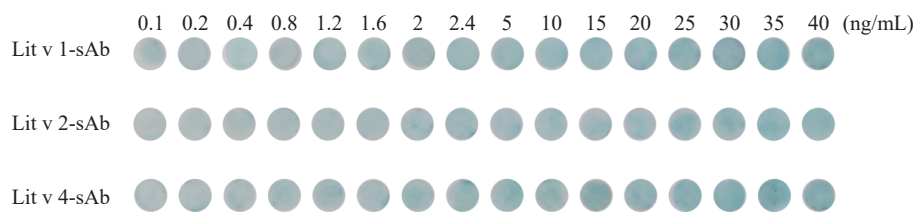


图 4 不同浓度 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb、Lit v 4-sAb 的纸基照片

Fig.4 Paper-based photos of Lit v 1-sAb, Lit v 2-sAb and Lit v 4-sAb at different concentrations

表 1 纸基比色传感器和传统 ELISA 测定 Lit v 1-sAb、Lit v 2-sAb、Lit v 4-sAb 的检出限、定量限、线性相关系数及线性范围(n=3)

Table 1 Limit of detection, limit of quantitation, correlation coefficients and linear ranges of Lit v 1-sAb, Lit v 2-sAb and Lit v 4-sAb measured by paper-based colorimetric sensor and traditional ELISA (n=3)

目标物	线性范围(ng/mL)	PAD				ELISA			
		线性方程	R^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	线性方程	R^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Lit v 1-sAb	0.2~2.4	$y=6.401x+6.747$	0.9734	0.2799	0.9330	$y=0.06160x+0.1416$	0.9907	0.2796	0.9320
	5.0~40.0	$y=0.8707x+21.08$	0.9888			$y=0.02758x+0.3616$	0.9906		
Lit v 2-sAb	0.2~2.4	$y=8.011x+5.546$	0.9695	0.3406	1.1353	$y=0.02721x+0.1498$	0.9911	0.7656	2.5520
	5.0~40.0	$y=0.6707x+24.15$	0.9852			$y=0.01886x+0.1741$	0.9922		
Lit v 4-sAb	0.2~2.4	$y=7.915x+4.394$	0.9856	0.2657	0.8857	$y=0.04882x+0.2170$	0.9909	0.1375	0.4583
	5.0~40.0	$y=0.9495x+21.81$	0.9840			$y=0.03023x+0.68031$	0.9934		

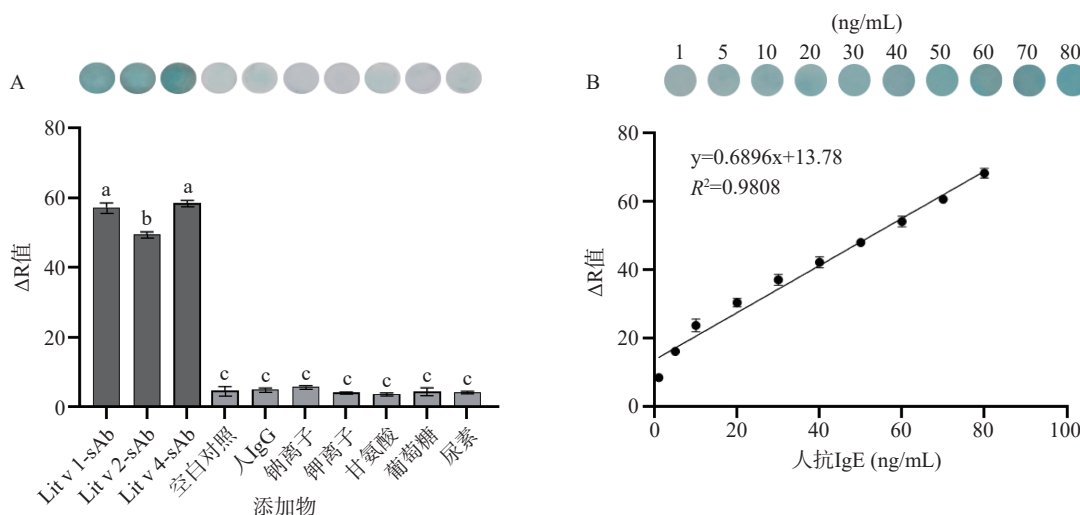


图5 纸基比色传感器的抗干扰能力评估及IgE标准曲线测定

Fig.5 Evaluation of interference immunity of paper-based colorimetric sensor and IgE standard curve determination by PAD

注: A, 血清干扰物, 图中不同字母表示组间差异显著($P < 0.01$); B, 人抗IgE检测的标准曲线。

1.50 ng/mL。对于人抗IgE的测定PAD的LOD低于ELISA, ImmunoCAP的临床临界值为0.84 ng/mL (0.35 kUA/L)^[33], 因此, PAD满足临床测试的要求。

2.6 血清样本sIgE检测

为了验证纸基比色传感器对凡纳滨对虾过敏患者sIgE的分析性能, 本研究对54例人体血清样本(包括42例过敏患者血清样本和12例健康志愿者血清样本)进行分析, 如图6A所示, 其中15例Lit v 1过敏患者、12例Lit v 2过敏患者、15例Lit v 4过敏患者, 与12例健康志愿者相比, 在凡纳滨对虾过敏个体的血清中观察到sIgE水平极显著增加($P < 0.001$), 并分析三者检测灵敏度(阳性样本测得阳性

样本数/阳性样本总数)和特异性(阴性样本测得阴性样本数/阴性样本总数)见表3, 经计算, Lit v 1-sIgE、Lit v 2-sIgE、Lit v 4-sIgE的检测灵敏度为80.00%~100.00%, 特异性为91.67%~100.00%。为了验证该方法的可靠性, 将纸基比色传感器对sIgE检测结果与传统ELISA检测结果进行比较, 如图6B所示, 42例过敏患者PAD检测结果中, PAD上有37例与ELISA结果一致, 一致性达到88.10%, 证明该方法是可靠的。PAD上有2个样本(Lit v 2)和3个样本(Lit v 4)的sIgE反应性显著低于ELISA, 出现偏差的原因有: 一方面, 可能是由于血清因素导致假阴性结果, 包括口服外源性生物素补充剂^[34-35]。另一方

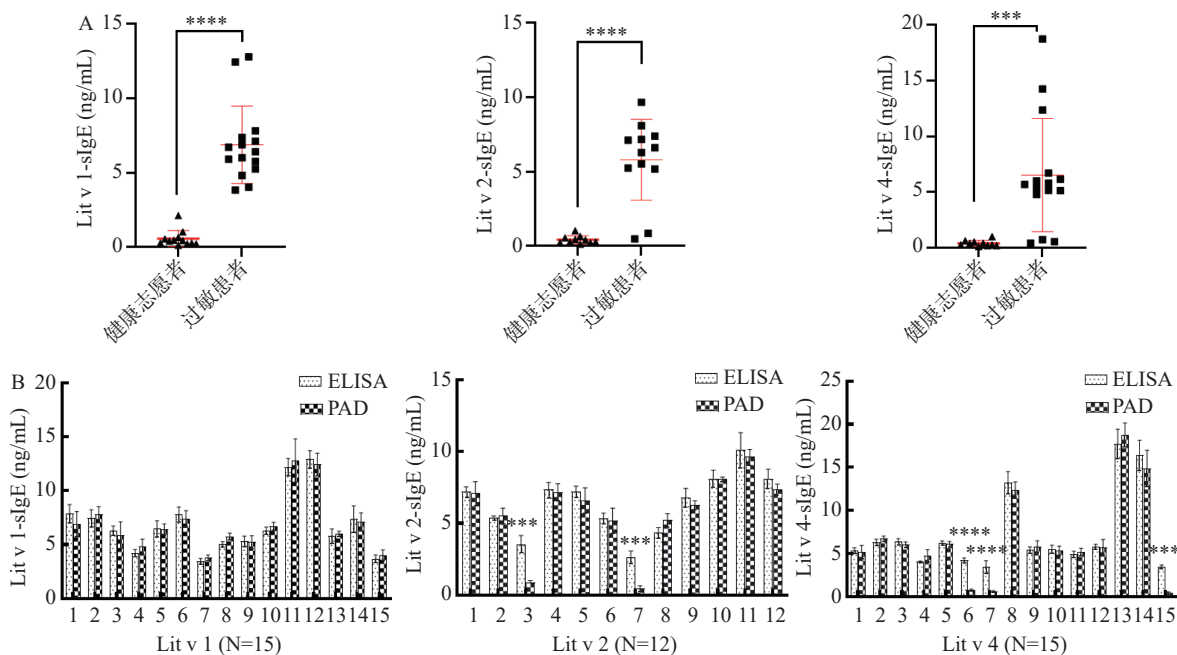


图6 血清样本sIgE检测结果

Fig.6 Detection results of sIgE in serum samples

注: A, PAD测定; B, PAD和ELISA比较(显著性分析是每个血清样本PAD和ELISA之间相比); *差异显著($P < 0.05$), **差异极显著($P < 0.01$), ***差异极显著($P < 0.001$), ****差异极显著($P < 0.0001$)。

表 3 纸基比色传感器对 sIgE 敏感性和特异性分析

Table 3 Sensitivity and specificity analysis of sIgE by paper-based colorimetric sensor

目标物	灵敏度(%)	特异性(%)
Lit v 1-sIgE	100.00(15/15)	91.67(11/12)
Lit v 2-sIgE	83.33(10/12)	100.00(12/12)
Lit v 4-sIgE	80.00(12/15)	100.00(12/12)

面, 本研究的血清样本数量可能不足, 后续研究需要采集更多的血清样本进行分析, 进一步验证该方法的准确性。

3 结论

本研究建立了基于纸基比色传感器检测过敏患者血清 sIgE 抗体的方法, 制作了 PAD 集成洗涤检测分析于一体, 实现了同时检测多个致敏原组分。以致敏原作为识别元件, 通过纸基芯片快速读取抗原-抗体发生的特异性结合产生的信号值, 依靠智能手机应用程序分析色度值进行定量分析, 该方法实现了虾过敏患者血清 sIgE 抗体即时快速检测分析。与传统 ELISA 相比, 该方法具有以下优点: a. PAD 方法更具成本效益, 其需要更少的试剂和时间来完成测定, 进行多重检测 sIgE 仅需 5 μ L 血清、检测时间 30 min; b. PAD 方法更敏感, 其可以在较低浓度下检测血清中的 sIgE, LOD 为 0.22 ng/mL, LOQ 为 0.73 ng/mL, 并具有较高的灵敏度和准确性; c. PAD 方法更便携, 其不需要使用专门的设备。本方法针对凡纳滨对虾致敏患者 sIgE 的检测具备良好的应用价值, 为甲壳类水产品致敏原组分诊断提供技术支撑。后期仍有一些工作有待深入, 可以利用纳米材料实现信号放大, 提高方法的稳定性; 也可以结合磁性纳米颗粒直接分离 sIgE, 省去洗涤步骤进一步提高本方法的检测效率; 还可以利用量子点偶联抗体进一步提高检测的灵敏度和特异性; 同时可以提取其他水产品致敏原组分, 以期实现更全面的水产品致敏组分诊断。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] CAFAROTTI A, GIOVANNINI M, BEGÌN P, et al. Management of IgE-mediated food allergy in the 21st century[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2023, 53(1): 25–38.

[2] LOGAN K, du TOIT G, GIOVANNINI M, et al. Pediatric allergic diseases, food allergy, and oral tolerance[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2020, 36: 511–528.

[3] CHAABAN M R, WARREN Z, BAILLARGEON J G, et al. Epidemiology and trends of anaphylaxis in the United States, 2004–2016[J]. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 2019, 9(6): 607–614.

[4] BASEGGIO A, IERODIAKONOU D, GOWLAND M H, et al. Food anaphylaxis in the United Kingdom: Analysis of national data, 1998–2018[J]. *Bmj*, 2021: n251.

[5] BARTHA I, ALMULHEM N, SANTOS A F. Feast for thought: A comprehensive review of food allergy 2021–2023[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2024, 153(3): 576–594.

[6] HU Yan, CHEN Jing, LI Haiqi. Comparison of food allergy prevalence among Chinese infants in Chongqing, 2009 versus 1999 [J]. *Pediatrics International*, 2010, 52(5): 820–824.

[7] KANCHAN K, CLAY S, IRIZAR H, et al. Current insights into the genetics of food allergy[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2021, 147(1): 15–28.

[8] YU W, FREELAND D M H, NADEAU K C. Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(12): 751–765.

[9] 吴欢, 陈碧华, 吴雨泓, 等. 食物过敏对炎症性肠病的影响[J]. *食品工业科技*, 2025, 46(20): 419–428. [WU Huan, CHEN Bihua, WU Yuhong, et al. Effect of food allergy on inflammatory bowel disease[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2025, 46(20): 419–428.]

[10] 李梦思, 夏菲, 刘庆梅, 等. 甲壳类水产品致敏原及特异性免疫制品的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2025, 46(1): 403–412. [LI Mengsi, XIA Fei, LIU Qingmei, et al. Research progress of crustacean allergens and allergens specific immunological products [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2025, 46(1): 403–412.]

[11] DUNLOP J H, KEET C A. Epidemiology of food allergy[J]. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2018, 38(1): 13–25.

[12] HAJEB P, SELAMAT J. A contemporary review of seafood allergy[J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2012, 42(3): 365–385.

[13] FENG Hua, CHEN Yan, CHEN Hongbing, et al. A methodology of epidemiologic study in the general population focusing on food allergy-China, 2020[J]. *China CDC Weekly*, 2022, 4(34): 749–755.

[14] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴-2024[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024: 42–43. [Bureau of Fisheries and Aquatic Products Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs. *China fishery statistical yearbook-2024*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024: 42–43.]

[15] HAMILTON R G, HEMMER W, NOPP A, et al. Advances in IgE testing for diagnosis of allergic disease[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: in Practice*, 2020, 8(8): 2495–2504.

[16] TAYLOR S L. Molluscan shellfish allergy[M]. *Advances in Food and Nutrition Research*. Amsterdam: Elsevier, 2008: 139–177.

[17] 方瑶雁, 赵莘芷, 徐大伦, 等. 水产品致敏蛋白的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(17): 381–388. [FANG Yaoyan, ZHAO Shenzhi, XU Dalun, et al. Research progress of allergen proteins in aquatic products[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(17): 381–388.]

[18] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, PFEIFER S, BUBLIN M. Applications of molecular diagnostic testing in food allergy[J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2015, 15(9): 56.

[19] AZEMI N F H, MISNAN R, KEONG B P, et al. Molecular and allergenic characterization of recombinant tropomyosin from mud crab *Scylla olivacea*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(10): 6709–6718.

[20] AL HAWI Y, NAGAO M, FURUYA K, et al. Agreement between predictive, allergen-specific IgE values assessed by ImmunoCAP and IMMULITE 2000 3gAllergy™ assay systems for milk and

- wheat allergies[J]. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2021, 13(1): 141–153.
- [21] 陈浩, 祝戎飞, 廖晓棠, 等. 过敏原组分检测在 IgE 介导的食物过敏中的研究进展[J]. *中华预防医学杂志*, 2023, 57(3): 333–340. [CHEN Hao, ZHU Rongfei, LIAO Xiaotang, et al. The advances of allergen component detection in IgE-mediated food allergy[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2023, 57(3): 333–340.]
- [22] MARTINEZ A, PHILLIPS S, BUTTE M, et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays[J]. *Angewandte Chemie*, 2007, 119(8): 1340–1342.
- [23] LI Fei, YOU Minli, LI Shaoxiong, et al. Paper-based point-of-care immunoassays: Recent advances and emerging trends[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 39: 107442.
- [24] QIN Xiaoxiao, LIU Jiajing, ZHANG Zhong, et al. Microfluidic paper-based chips in rapid detection: Current status, challenges, and perspectives[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 143: 116371.
- [25] LI Yanqi, FENG Liang. Progress in paper-based colorimetric sensor array[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(11): 1448–1457.
- [26] HAN Tianjiao, LIU Meng, HUAN Fei, et al. Identification and cross-reactivity analysis of sarcoplasmic-calcium-binding protein: A novel allergen in *Crassostrea angulata*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(18): 5221–5231.
- [27] CHEN Yexin, HE Xinrong, YANG Shiqiang, et al. IgE epitope analysis and hypo-immunoreactivity derivative of arginine kinase in Mantis shrimp (*Oratosquilla oratoria*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(24): 9508–9518.
- [28] HU Mengjun, LIU Guangyu, YANG Yang, et al. Cloning, expression, and the effects of processing on sarcoplasmic-calcium-binding protein: An important allergen in mud crab[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(30): 6247–6257.
- [29] JOHNSTON E B, KAMATH S D, IYER S P, et al. Defining specific allergens for improved component-resolved diagnosis of shrimp allergy in adults[J]. *Molecular Immunology*, 2019, 112: 330–337.
- [30] FREIDL R, GSTOETTNER A, BARANYI U, et al. Blocking antibodies induced by immunization with a hypoallergenic parvalbumin mutant reduce allergic symptoms in a mouse model of fish allergy[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 139(6): 1897–1905.
- [31] AHMED I, LÜ L T, LIN H, et al. Effect of tyrosinase-aided crosslinking on the IgE binding potential and conformational structure of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin[J]. *Food Chemistry*, 2018, 248: 287–295.
- [32] ZHAO Jinlong, LI Yonghong, XU Lili, et al. Insight into IgG/IgE binding ability, *in vitro* digestibility and structural changes of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) soluble extracts with thermal processing[J]. *Food Chemistry*, 2022, 381: 132177.
- [33] CAO Mengda, HAN Xisi, LU Chen, et al. A novel method for precise detection of allergen-specific IgE via immobilizing His-tagged allergens to paper-based device[J]. *Allergy*, 2021, 76(2): 567–571.
- [34] LI J L, WAGAR E A, MENG Q H. Comprehensive assessment of biotin interference in immunoassays[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2018, 487: 293–298.
- [35] LUONG J H T, MALE K B, GLENNON J D. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept (avidin) chemistry: An emerging threat[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(5): 634–641.