

澳洲坚果蛋白夹心 ELISA 方法的建立及应用

Establishment and application of macadamia protein sandwich ELISA method

贾增艳^{1,2} 王晓敏^{1,2} 沙志聪^{1,2}

JIA Zeng-yan^{1,2} WANG Xiao-min^{1,2} SHA Zhi-cong^{1,2}

周柔柔^{1,2} 生威^{1,2} 张燕^{3,4}

ZHOU Rou-rou^{1,2} SHENG Wei^{1,2} ZHANG Yan^{3,4}

(1. 食品营养与安全国家重点实验室〔天津科技大学〕, 天津 300457; 2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457; 3. 天津市食品科学与健康重点实验室〔南开大学〕, 天津 300071; 4. 南开大学医学院, 天津 300071)
(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety [Tianjin University of Science and Technology], Tianjin 300457, China; 2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin 300457, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Food Science and Health [Nankai University], Tianjin 300071, China; 4. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China)

摘要:利用碱溶酸沉法提取未加工的澳洲坚果蛋白, 分别制备鼠、兔多克隆抗体, 并以兔多抗为捕获抗体, 鼠多抗为检测抗体建立了双抗夹心酶联免疫检测方法。该方法的检出限为(0.95±0.17) ng/mL。方法与大豆、核桃、榛果、杏仁、花生、开心果、腰果和小麦蛋白无明显交叉反应, 证明该方法特异性良好。烘烤的澳洲坚果和烘焙饼干中澳洲坚果蛋白的添加回收率为73.67%~77.03%, 说明该方法不仅适用于未加工澳洲坚果蛋白的准确检测, 也适用于热加工后以及烘焙食品中澳洲坚果蛋白的定量检测。

关键词:澳洲坚果蛋白; 过敏原; 双抗夹心 ELISA; 烘焙食品

Abstract: The unprocessed macadamia protein was extracted by alkali-soluble acid precipitation method, and the rat and rabbit polyclonal antibodies were prepared respectively. The rabbit and the murine polyclonal antibodies were used as the capture and detection antibodies respectively to establish a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. The detection limit of this method was (0.95±0.17) ng/mL. The method had no obvious cross-reaction with soybean, walnut, hazelnut, almond, peanut, pistachio, cashew and wheat protein, which proved that the method was specific. The recovery rate of macadamia protein in baked macadamia nuts and baked biscuits is in the range of 73.67%~77.03%. This method was not only suitable for the accurate detection of unprocessed macadamia

protein, but also for the quantitative detection of macadamia protein after hot processing and baked goods.

Keywords: macadamia protein; allergen; sandwich ELISA; baked goods

坚果是八大类过敏原之一, 其中澳洲坚果营养丰富, 临床试验^[1-2]表明, 天然澳洲坚果、经烘焙加工的澳洲坚果都会引起患者不同程度的过敏反应, 出现全身瘙痒、眼睛、嘴唇肿胀呼吸困难甚至晕厥等症状。Ekbote 等^[3]对过敏患者进行皮肤点刺试验(SPT)发现, 澳洲坚果中可能存在一种分子量约为 17 kDa 的主要过敏原; Herbst 等^[4]通过免疫印迹分析, 报道了澳洲坚果中另 2 种过敏原蛋白, 其分子量分别在 12, 45 kDa 左右。过敏原的有效检测是避免易致敏人群误食过敏原的有效手段之一, 当前研究最多、应用最广泛的检测方法是基于蛋白过敏原的酶联免疫吸附分析法(ELISA)^[5]和基于 DNA 的 PCR 检测法^[6-7]。Brezna 等^[8]建立了一种实时 PCR 方法, 用于检测食品中的澳洲坚果, 检测限为 1.45 pg/mL, 并通过 14 种样品验证 PCR 方法的实际适用性, 此方法能够灵敏地检测食物样品中的澳洲坚果, 但并未报道是否适用于热加工后的坚果中过敏原的检测。经过热加工后食物中的 DNA 会受损难以提取, 极易造成 PCR 检测结果的假阴性, 因此 PCR 法检测食物中过敏原会对检测结果的准确性造成影响^[9]。热处理会使蛋白结构发生变化从而对与抗体的结合造成不同程度的影响。因此, 基于抗原抗体特异性结合原理建立的 ELISA 方法应用于热加工食品中过敏原蛋白的检测也存在检测适用性的难题。Maleki 等^[10]研究表明烘烤花生比花生过敏原与 IgE 有更强的结合能

基金项目:“十三五”国家重点研发计划(编号:2016YFD0400401)

作者简介:贾增艳, 女, 天津科技大学在读硕士研究生。

通信作者:张燕(1970—), 女, 南开大学医学院教授, 博士。

E-mail: yzhang@nankai.edu.cn

收稿日期:2018-08-21

力。刘珂等^[11]研究表明加热使得 OVT、OVA、OVM 蛋白结构发生变化,相比于未处理蛋白,与抗体结合能力减弱。不同的过敏原蛋白热稳定性不同,对澳洲坚果蛋白在经过热加工后的结构变化及过敏原的定量检测尚未有报道。本研究拟针对澳洲坚果蛋白制备多克隆抗体,建立双抗夹心 ELISA 方法,并对该方法应用于热加工后的澳洲坚果及焙烤食品中的澳洲坚果蛋白的定量检测进行评价,以期加工食品中澳洲坚果过敏原的检测提供有效方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

澳洲坚果 (*Macadamia integrifolia*): HAEA294, 云南江城中澳农业科技发展公司;

大豆、核桃、榛果、杏仁、花生、开心果、腰果和小麦: 市售;

免疫动物: 3 月龄雄性新西兰白兔、6~7 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 中国食品药品检定研究所;

弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、牛血清白蛋白 (BSA)、羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP、Tris、甘氨酸、BCA 蛋白定量试剂盒、十二烷基磺酸钠 (SDS)、过氧化氢脲 ($\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、脱脂乳粉、鱼皮胶、明胶、酶标稳定剂: 含量 $\geq 99\%$, 美国 Sigma 公司;

Tween 20: 化学纯, 海浦东化工试剂厂;

β -环糊精、二甲基亚砷 (DMSO): 化学纯, 德国 Merck 公司;

预制胶: 12%, 美国 Bio-Rad 公司;

其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

免疫亲和层析柱: Protein A-Sepharose 4B、Protein G-Sepharose 4B 型, 美国 Amersham 公司;

蛋白纯化仪: 731-8300 型, 美国 BIO-RAD 公司;

酶标仪: F200 PRO 型, 美国 Thermo 公司;

磁力搅拌器: RH-KT 型, 德国 IKA 公司。

1.2 方 法

1.2.1 澳洲坚果蛋白的制备与验证

(1) 除脂: 将无壳生澳洲坚果仁充分研磨, 用料液比为 1:20 (g/mL) 的正己烷室温下搅拌浸提 16 h, 经过 $0.45 \mu\text{m}$ 有机系纤维素膜过滤, 收集果粉重复上述操作, 挥发残留的正己烷。将得到的坚果粉过 50 目筛, 真空包装后于 -20°C 保存备用。

(2) 提取: 采用正己烷脱脂、碱提取 (MAPI) 方法提取澳洲坚果蛋白^[12], 用去离子水溶解得到的蛋白沉淀冷冻干燥, 将得到的蛋白质粉在 -20°C 保存备用^[13-15]。

(3) SDS-PAGE: 参照 Zhang 等^[16] 方法, 对制备的澳洲坚果蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.2 澳洲坚果蛋白的兔多克隆抗体制备 以所制备的澳洲坚果蛋白为免疫原对雌性新西兰白兔进行免疫, 2 周免疫 1 次。初次免疫的乳化剂使用完全佐剂, 免疫剂量 1 mg/只,

后 4 次增强免疫选择不完全佐剂, 免疫剂量 0.5 mg/只。第 2 次免疫 1 周后开始耳部静脉取血, 第 5 次免疫结束 1 周后采股动脉全血, 用 IC-ELISA 法测定血清效价, 用 Protein A-Sepharose-4B 免疫亲和层析柱纯化获得抗体^[17]。

1.2.3 澳洲坚果蛋白鼠多克隆抗体的制备 选择 6~7 周龄雌性 BALB/c 小鼠进行免疫。初次免疫时免疫原与弗氏完全佐剂 1:1 体积混合乳化, 每隔 2 周与不完全佐剂混合加强免疫, 免疫剂量均为 100 μg /只, 第 5 次免疫结束 1 周后取全血, Protein G-Sepharose-4B 免疫亲和层析纯化, 于 -20°C 保存备用。

1.2.4 澳洲坚果蛋白双抗夹心 ELISA 检测步骤 将兔抗澳洲坚果蛋白抗体以 100 μL /孔包被于 96 孔酶标板上, 在 4°C 下孵育 12 h 后用 PBST 洗板 3 次, 加封闭液 (200 μL /孔) 于 37°C 下封闭 1 h。用 PBST 洗板 3 次, 加入梯度稀释的澳洲坚果蛋白溶液 (100 μL /孔), 室温下孵育 1 h 后 PBST 洗板 4 次。加入鼠抗血清 (100 μL /孔), 室温下孵育 1 h 后用 PBST 洗板 4 次。将 HRP 标记的鼠二抗 (100 μL /孔) 加到酶标板上, 室温反应 30 min 后用 PBST 洗板 5 次, 加入底物 A 和 B 的混合液 (100 μL /孔), 37°C 下显色 (15~20 min), 每孔加入 50 μL 硫酸终止液后在波长 450~650 nm 读取吸光度值。以蛋白浓度为横坐标, 吸光度值 ($A_{450} - A_{650}$) 为纵坐标绘制标准曲线。检出限 (LOD) 为 $A_{\text{空白}}$ 平均值 $\pm 3\text{SD}$ 对应的蛋白浓度, 定量限 (LOQ) 为 $A_{\text{空白}}$ 平均值 $\pm 10\text{SD}$ 对应的蛋白浓度。

1.2.5 双抗夹心 ELISA 检测方法特异性的测定 选择大豆、核桃、榛果、杏仁、花生、开心果、腰果和小麦 8 种常见过敏原, 采用与澳洲坚果蛋白相同的方法制备相应的蛋白, 采用建立的双抗夹心 ELISA 方法进行检测。PBS 缓冲液作为阴性对照。样品孔和阴性对照孔的吸光度值分别用 P 和 N 来表示。如果 $P/N > 2$, 则表明样品中的蛋白与抗体有交叉反应。

1.2.6 双抗夹心 ELISA 检测方法的应用 自制饼干, 定量添加澳洲坚果, 同时以不含澳洲坚果的饼干为对照, 采用本研究建立的蛋白提取方法提取样品中的澳洲坚果蛋白, 采用建立的双抗夹心 ELISA 方法检测饼干中澳洲坚果过敏原蛋白的含量, 按式 (1) 计算回收率:

$$P = \frac{C_1 - C_0}{C_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

P ——回收率, %;

C_1 ——添加澳洲坚果蛋白样品的检测值, mg;

C_0 ——未添加澳洲坚果蛋白样品的检测值, mg;

C_2 ——澳洲坚果蛋白理论添加值, mg。

1.3 数据处理

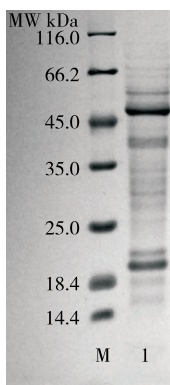
所有试验平行测定 3 次, 利用统计学软件 SPSS 22.0 对试验结果进行方差分析 ($P < 0.05$), 用 Origin 8.0 绘制检测方法的相关曲线图。

2 结果与分析

2.1 澳洲坚果蛋白的验证

将所制备的澳洲坚果蛋白 (1 mg/mL) 通过 SDS-PAGE

分析(图 1),由图 1 可见,澳洲坚果蛋白分子量主要分布在 15~50 kDa 左右,其中分子量在 20,45 kDa 左右的蛋白含量较高,与 Herbst 等^[4]研究结果一致。



M. 蛋白分子量标准参照 1. 澳洲坚果蛋白

图 1 澳洲坚果蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Figure 1 SDS-PAGE of macadamia nut protein

2.2 双抗夹心 ELISA 免疫检测方法的建立

在以澳洲坚果蛋白为免疫原制备的兔多克隆抗体和鼠多克隆抗体基础上,优化双抗夹心 ELISA 免疫检测条件。

2.2.1 捕获抗体及封闭液的选择 由于夹心 ELISA 方法检出限与空白值大小密切相关,先对捕获抗体和封闭液进行优化。将兔抗和鼠抗分别作为捕获抗体包被于酶标板上,1 g/100 mL 的脱脂乳粉、BSA、鱼皮胶、明胶、酪蛋白作为封闭液,检测抗体分别为鼠抗和兔抗,测得空白的吸光度值见表 1。

表 1 不同封闭液下空白的平均吸光度值

Table 1 Absorption values at the different blocking buffer

封闭液	吸光度值	
	兔抗	鼠抗
1 g/100 mL 脱脂乳粉	0.130	0.139
1 g/100 mL BSA	0.193	0.212
1 g/100 mL 明胶	0.204	0.234
1 g/100 mL 酪蛋白	0.125	0.135
1 g/100 mL 鱼皮胶	0.218	0.263

由表 1 可见,以兔多克隆抗体作为捕获抗体时,采用不同封闭液的空白吸光度值均低于鼠抗,说明所制备的兔多抗的特异性要好于鼠多抗,以其为捕获抗体时非特异性吸附较小,因此确定该方法的捕获抗体为兔多抗,检测抗体为鼠多抗,可在一定程度上提高检测方法的灵敏度和特异性。同时,1 g/100 mL 脱脂乳粉为封闭液时空白值最小,说明脱脂乳粉对酶标板上空余位点的封闭效果最好,且与鼠抗的非特异性吸附最弱,有助于提高检测的灵敏度。因此选择脱脂乳粉作为封闭液,并进一步优化封闭液浓度。

由表 2 可知 0.5 g/100 mL 的脱脂乳粉空白值最小,低浓度(0.1 g/100 mL)脱脂乳粉封闭的空白值比 0.5 g/100 mL 脱脂乳粉的大,可能是封闭液中蛋白浓度小导致未能完全封

表 2 不同脱脂乳粉浓度下空白的平均吸光度值

Table 2 Absorption values at the different concentration buffer of skimmed milk

脱脂乳粉浓度/(10 ⁻² g · mL ⁻¹)	吸光度值
0.1	0.131
0.5	0.128
1.0	0.131

闭酶标板上未被捕获抗体占据的空余位点,造成检测抗体与空余位点结合的非特异性吸附;1.0 g/100 mL 脱脂乳粉空白值最大,可能是浓度大使非特异性吸附增加所致。因此优化后的封闭液为浓度 0.5 g/100 mL 的脱脂乳粉。

2.2.2 捕获抗体包被量的优化 将兔多克隆抗体作为捕获抗体,分别稀释至 0.025,0.050,0.100 μg/孔进行包被,分别绘制标准曲线(图 2)。捕获抗体的包被量对检测方法的灵敏度有很大影响,捕获抗体量越多,特异性结合的过敏原越多,因此会对待测过敏原起到富集的作用,相应提高方法的灵敏度。但捕获抗体过高,会造成非特异性吸附增加,使空白值增大,又会降低检测灵敏度。因此捕获抗体量需要通过试验优化确定。结果表明,包被量为 0.050,0.100 μg/孔时空白值相差不大且都具有良好的线性相关性,同时比 0.025 μg/孔包被量在同一浓度蛋白对应的检测吸光度值高,从节约抗体角度考虑,将捕获抗体的包被量确定为 0.050 μg/孔。

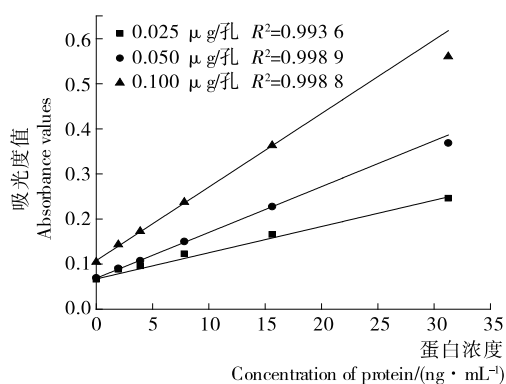


图 2 捕获抗体包被量对澳洲坚果蛋白双抗夹心酶联免疫检测方法的影响

Figure 2 Effect of coating quantity of capture antibody on macadamia nut protein sandwich ELISA

2.2.3 检测抗体稀释倍数的优化 固定优化后的捕获抗体包被量和封闭液,将检测抗体(鼠多抗)分别按 1:1 000,1:1 500,1:2 000,1:2 500 的比例进行稀释,绘制标准曲线(图 3)。检测抗体(鼠多抗)除与澳洲坚果蛋白过敏原发生特异性结合外,当其浓度过高时会使非特异性吸附增加造成空白值增大,降低特异性检测的灵敏度。结果说明,1 000 倍稀释抗体所得到的空白值最高,而以 1 500,2 000,2 500 倍稀释检测抗体得到的空白值相差不大,以 1:2 000 比例进行稀释检测抗体得到线性相关性最好,因此检测抗体的最佳稀释倍数确定为 2 000。

2.2.4 酶标二抗稀释倍数的优化 固定优化后的捕获抗体

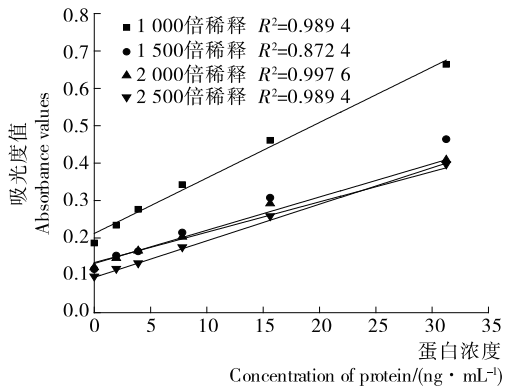


图3 检测抗体稀释倍数对澳洲坚果蛋白双抗夹心 ELISA 的影响

Figure 3 Effect of detection antibody dilution factor on macadamia nut protein sandwich ELISA

包被量、封闭液和检测抗体浓度,用 PBS(pH 7.4,0.1 mol/L) 缓冲液将羊抗鼠酶标二抗按 1 : 10 000,1 : 20 000,1 : 30 000 进行稀释,绘制标曲,结果见图 4。羊抗鼠酶标二抗能特异性识别检测抗体鼠多抗,利用二抗上结合的酶作为整个体系的检测信号,理论上其浓度越大,催化酶底物产生的信号越强,方法越灵敏,但酶浓度过高时会导致蛋白类物质的非特异性结合,造成酶标二抗的非特异性吸附,会降低待测物与检测信号间的线性相关性,因此酶标二抗浓度的优化非常关键。优化结果表明,以 1 : 20 000,1 : 30 000 稀释时 R^2 均接近于 1,吸光度值无明显差异,为节约抗体,选择羊抗鼠酶标二抗的稀释倍数为 30 000 倍。

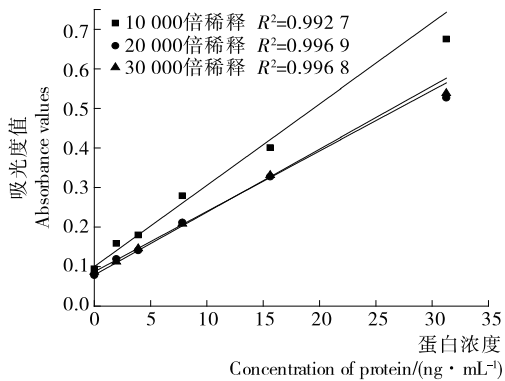


图4 酶标二抗稀释倍数对澳洲坚果蛋白双抗夹心酶联免疫检测的影响

Figure 4 Effect of dilution factor of enzyme labeled second antibody on macadamia nut protein sandwich ELISA

2.2.5 双抗夹心 ELISA 法标准曲线的绘制 配制系列蛋白标准溶液,采用优化的分析条件进行检测,以蛋白浓度作为横坐标,吸光度值作为纵坐标绘制双抗夹心 ELISA 检测澳洲坚果过敏原蛋白的标准曲线(图 5),计算得 LOD 值为 (0.95 ± 0.17) ng/mL,LOQ 值为 (3.13 ± 0.57) ng/mL。

2.2.6 双抗夹心 ELISA 方法的特异性 为评价所建立方法的特异性,将大豆、核桃、榛果、杏仁、花生、开心果、腰果和小

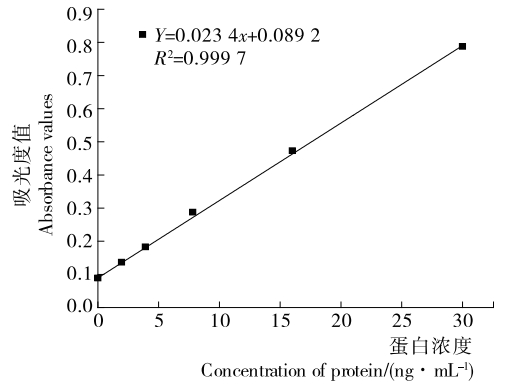


图5 澳洲坚果过敏原蛋白双抗夹心酶联免疫检测方法的 标准曲线

Figure 5 Standard curve of sandwich ELISA on macadamia nut proteins ($n=8$)

麦蛋白用 PBS 缓冲液分别配制成浓度分别为 0.1,1.0,10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白溶液。以 PBS 缓冲液作为阴性对照,采用建立的澳洲坚果蛋白双抗夹心 ELISA 方法测定,读取相应的吸光度值,结果见表 3。

表3 双抗夹心酶联免疫检测方法的特异性

Table 3 Specificity of sandwich ELISA on macadamia nut proteins

交叉反应物	阴性对照吸光度值	P/N 值		
		0.1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 $\mu\text{g/mL}$	10.0 $\mu\text{g/mL}$
大豆	0.145	1.12	1.28	1.34
核桃	0.143	0.75	0.87	0.90
榛果	0.159	1.58	1.90	2.33
杏仁	0.141	0.98	1.25	1.40
开心果	0.148	1.43	1.86	2.04
花生	0.132	0.94	1.03	1.12
腰果	0.125	0.84	1.01	1.09
小麦	0.126	0.89	1.11	1.28

从表 3 中可以看出,榛果和开心果蛋白与澳洲坚果抗体有较弱的结合反应,其他 6 种过敏原蛋白均无交叉反应。说明榛果蛋白和开心果蛋白与澳洲坚果蛋白具有相似的结构,与 Sutherland 等^[18]的研究结果一致。

2.3 双抗夹心 ELISA 检测方法的检测稳定性

用 PBS 缓冲液稀释澳洲坚果蛋白,浓度为 30.0,16.0,8.0,4.0 ng/mL,以板内变异与板间变异对建立的双抗夹心 ELISA 进行精密度测试。

将 4 个浓度的蛋白溶液在同一酶标板上分别进行 5 个平行测试,计算 $A_{450} - A_{650}$ 的板内变异系数为 3.36%~7.20%。相同条件综合 5 d 测得的吸光度值,计算板间变异系数为 3.83%~12.05%,均低于 15%,说明该方法具有较好的稳定。

2.4 双抗夹心 ELISA 方法的应用

2.4.1 烘焙加工处理对澳洲坚果蛋白提取率的影响 将澳洲坚果经 170 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20 min,以未处理的生澳洲坚果作为对

照样品,探讨常见焙烤条件对澳洲坚果蛋白提取率的影响,结果见表 5。

澳洲坚果经 170 °C 加热处理后,蛋白得率显著降低($P < 0.05$),是未加工处理蛋白得率的 90% 左右,说明热加工在一定程度上降低了蛋白提取率,可能是加热改变了蛋白的结构,使蛋白溶解度降低。

表 4 澳洲坚果蛋白双抗夹心 ELISA 检测的板内及板间变异

Table 4 Intraplate and interplate variation of sandwich ELISA on macadamia protein ($n=5$)

浓度/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	板内变异			板间变异		
	$A_{\text{空白}}$ 测定平均值	SD 值/%	CV/%	$A_{\text{空白}}$ 测定平均值	SD 值/%	CV/%
30.0	0.890	3.52	3.95	0.779	9.63	12.05
16.0	0.586	1.97	3.36	0.575	4.50	7.83
8.0	0.372	2.23	6.01	0.352	4.07	11.56
4.0	0.226	1.63	7.20	0.222	0.85	3.83

表 5 焙烤加工处理对蛋白提取率的影响[†]

Table 5 Effect of baking process on the extraction ratio of protein from macadamia nut ($n=3$)

处理条件	澳洲坚果总质量/g	提取的蛋白质量/g	蛋白得率/%	相对蛋白提取率/%
未经热处理	25.16±0.047	1.96±0.006 ^a	7.78±0.012 ^a	—
170 °C 处理 20 min	24.24±0.010	1.70±0.006 ^b	7.03±0.021 ^b	90.4±0.43

† 同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

表 6 双抗夹心 ELISA 检测饼干中澳洲坚果蛋白的添加回收率

Table 6 Recovery of sandwich ELISA on macadamia protein in biscuits ($n=5$)

添加澳洲坚果 的质量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Biscuits)	澳洲坚果蛋白 的理论添加量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Biscuits)	热加工后蛋白 的理论含量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Biscuits)	ELISA 测定值/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Biscuits)	回收率/%	
				焙烤后澳洲 坚果蛋白	未处理澳洲 坚果蛋白
80	6.224	5.608	4.77±0.53	83.56±0.58	75.44±0.45
40	3.112	2.804	2.48±0.42	85.49±0.33	77.03±0.33
20	1.556	1.402	1.23±0.27	82.07±0.27	73.67±0.27

不考虑热加工处理对澳洲坚果蛋白得率的影响,以焙烤后的澳洲坚果蛋白理论含量计算,添加回收率为 82.07%~85.49%,表明该方法用于澳洲坚果蛋白检测的准确度较好。以未处理的澳洲坚果蛋白的理论添加量计算,添加回收率为 73.67%~77.03%,回收率偏低的原因可能是热加工使部分澳洲坚果蛋白的结构发生变化,导致样品中蛋白提取率降低,另外空间结构的变化可能导致抗原表位变化,从而与抗体识别力下降,表现为 ELISA 检测结果整体偏低。

3 结论

本试验优化封闭液、捕获抗体的包被浓度,检测抗体、酶标二抗的稀释倍数,建立了澳洲坚果蛋白的双抗夹心 ELISA 方法。选用抗体包被量为 0.05 $\mu\text{g}/\text{孔}$,封闭液为 0.5 g/100 mL 脱脂乳粉,检测抗体稀释倍数为 2 000,羊抗鼠 HRP-酶标二抗稀释倍数为 30 000,方法的最低检出限为 (0.95±0.17) ng/mL,定量限为 (3.13±0.57) ng/mL,检测线性范围为 3.13~30.00 ng/mL。测定结果的变异系数 <12.05%,说明所建立的澳洲坚果蛋白双抗夹心 ELISA 方

2.4.2 饼干中澳洲坚果蛋白的测定 自制定量添加澳洲坚果的饼干,用碱溶酸沉法提取饼干中的澳洲坚果蛋白。用建立的双抗夹心 ELISA 法进行测定,以未添加澳洲坚果的饼干为对照。根据表 5 蛋白得率计算澳洲坚果蛋白的理论添加量,以及焙烤饼干中可被提取的澳洲坚果蛋白的理论含量,按照式(1)分别计算回收率,结果见表 6。

法有良好的特异性与稳定性。该法应用于焙烤的澳洲坚果和饼干中澳洲坚果蛋白检测,回收率较高,说明该方法适用于焙烤食品中澳洲坚果蛋白的定量检测。

参考文献

- [1] DE Knop K J, HAGENDORENS M M, BRIDTS C H, et al. Macadamia nut allergy: 2 case reports and a review of the literature[J]. Acta Clinica Belgica, 2010, 65(2): 129-132.
- [2] LERCH M, EGGER C, BIRCHER A J. Allergic reactions to macadamia nut[J]. Allergy, 2005, 60(1): 130-131.
- [3] EKBOTE A, HAYMAN G, BANSAL A. Macadamia nut allergy: potentially misleading specific IgE results [J]. Allergy, 2010, 65(10): 1 345-1 345.
- [4] HERBST R A, WAHL R, FROSCH P J. Specific IgE reactivity and identification of potential allergens in macadamia allergy[J]. Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology Jeadv, 2010, 24(11): 1 361-1 363.

(下转第 69 页)

- 现代化农业, 2016, 10(1): 12-14.
- [2] 路伟明. 黑龙江省玉米霉变粒发生原因及解决对策[J]. 现代化农业, 2016, 8(4): 16-17.
- [3] 唐秋菊. 玉米霉变中毒的危害性及疾病预防[J]. 农业开发与装备, 2014, 11(5): 100-104.
- [4] 张保华, 李江波, 樊书祥. 高光谱成像技术在果蔬品质与安全无损检测中的原理及应用[J]. 光谱学与光谱法分析, 2014, 34(10): 2 743-2 751.
- [5] JONES J L. Application of DNA probes in the food industry[J]. Trends Food Science Technology, 2009(2): 28-32.
- [6] 黄海泉. 实时荧光定量 PCR 技术在植物检疫中应用的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(1): 5-8.
- [7] 王俊双, 许定花, 孙秀兰. 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇三种检测方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2008(2): 287-290.
- [8] 孙俊, 金夏明, 毛罕平, 等. 高光谱图像技术在掺假大米检测中的应用[J]. 农业工程学报, 2014, 30(21): 301-307.
- [9] 梁琨, 杜莹莹, 卢伟, 等. 基于高光谱成像技术的小麦籽粒赤霉病识别[J]. 农业机械学报, 2016, 47(2): 309-315.
- [10] 刘德华, 张淑娟, 王斌, 等. 基于高光谱成像技术的山楂损伤和虫害缺陷识别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(11): 3 167-3 171.
- [11] 李金梦, 叶旭君. 高光谱成像技术的柑橘植株叶片含氮量预测模型[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(1): 212-216.
- [12] SUN Jing-tao, MA Ben-xue, DONG Juan, et al. Detection of internal qualities of hami melons using hyperspectral imaging technology based on variable selection algorithms[J]. Journal of Food Process Engineering, 2017, 40(3): e12496.
- [13] 文韬, 洪添胜, 李立君, 等. 基于高光谱技术的霉变稻谷脂肪酸含量无损检测[J]. 农业工程学报, 2015, 31(18): 233-239.
- [14] 李小昱, 徐森森, 冯耀泽, 等. 基于高光谱图像与果蝇优化算法的马铃薯轻微碰伤检测[J]. 农业机械学报, 2016, 47(1): 221-226.
- [15] QIN Jian-wei, LU Ren-fu. Detecting pits in tart cherries by hyperspectral transmission imaging[J]. The International Society for Opticals Engineering, 2014, 48(5): 1 963-1 970.
- [16] 朱瑶迪, 邹小波, 石吉勇, 等. 高光谱图像技术快速预测发酵醋酯总酸分布[J]. 农业机械学报, 2014, 30(16): 320-327.
- [17] 孙俊, 武小红. 基于高光谱图像的生菜叶片水分预测研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(2): 522-526.
- [18] YIN Yong, HAO Yin-feng, YU Hui-chun. Detection potential of multi-features representation of e-nose data in classification of moldy maize samples[J]. Food & Bioprocess Technology, 2017, 10(12): 2 226-2 239.
- [19] 郭志明, 赵春江, 黄文倩, 等. 苹果糖度高光谱图像可视化预测的光强度校正方法[J]. 农业机械学报, 2015, 46(7): 227-232.
- [20] 徐义. 基于高光谱成像技术的花生仁质量无损检测研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2015: 34-45.
- [21] 郭恩有, 刘木华, 赵杰文, 等. 脐橙糖度的高光谱图像无损检测技术[J]. 农业机械学报, 2008, 39(5): 91-93, 103.
- [22] LI Dao-liang. Computer and computing technologies in agriculture[J]. Computer & Computing Technologies in Agriculture II, 2016, 295(29): 104-112.
- [23] 王彩玲, 胡柄樑, 王洪伟, 等. 约束最大相关系数的高光谱影像目标探测研究[J]. 激光与红外, 2016, 46(1): 98-102.
- [24] 李金梦, 叶旭君. 高光谱成像技术的柑橘植株叶片含氮量预测模型[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(1): 212-216.
- [25] 张楠楠, 刘伟, 王伟, 等. 玉米霉变及黄曲霉毒素的图像处理检测方法[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(2): 82-88.

(上接第 59 页)

- [5] GHORBANI M, MORGAN M R A. Protein characterisation and immunochemical measurements of residual macadamia nut proteins in foodstuffs[J]. Food & Agricultural Immunology, 2010, 21(4): 347-360.
- [6] 方娟, 陈朝银, 赵声兰, 等. 核桃过敏原及其检测方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 361-365.
- [7] LÓPEZ-CALLEJA I M, CRUZ S D L, GONZÁLEZ I, et al. Development of real-time PCR assays to detect cashew (*Anacardium occidentale*) and macadamia (*Macadamia intergrifolia*) residues in market analysis of processed food products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(1): 233-241.
- [8] BREZNÁ B, DUDÁSOVÁ H, KUČHTA T. A novel real-time polymerase chain reaction method for the detection of Brazil nuts in food [J]. Journal of AOAC International, 2010, 93(1): 197-201.
- [9] 石良, 王锡昌, 刘源, 等. 食物过敏原免疫学检测技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2010, 29(9): 981-986.
- [10] MALEKI S J, CHUNG S Y, CHAMPAGNE E T, et al. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins[J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2000, 106(4): 763-768.
- [11] 刘珂, 熊丽姬, 高金燕, 等. 热加工对鸡蛋中 4 种主要过敏原结构的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 51-58.
- [12] 陈豪, 钟俊楨, 黄宗兰, 等. 三种方法提取的澳洲坚果蛋白的功能性质与构象的关系[J/OL]. 食品科学: 1-12 [2018-09-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20180112.1641.004.html>.
- [13] 许英一, 徐艳霞, 王宇. 不同方式提取的燕麦蛋白功能特性比较[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 166-169.
- [14] 朱效兵, 石晶红, 郭瑞, 等. 超声处理结合碱提酸沉法提取葵花粕蛋白的工艺研究[J]. 食品工业, 2017, 38(8): 95-99.
- [15] 刘建奎, 郝利平. 影响碱提酸沉法提取燕麦蛋白因素的分析[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2013, 33(5): 429-435.
- [16] ZHANG Yan, WANG Wei, ZHOU Rou-rou, et al. Effects of heating, autoclaving and ultra-high pressure on the solubility, immunoreactivity and structure of major allergens in egg[J]. Food & Agricultural Immunology, 2017, 29(1): 412-423.
- [17] 杨元元. 不同加工条件对卵白蛋白免疫反应性的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2016: 17-18.
- [18] SUTHERLAND M F, O'HEHIR R E, CZARNY D, et al. Macadamia nut anaphylaxis: demonstration of specific IgE reactivity and partial cross-reactivity with hazelnut[J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 1999, 104(4): 889-890.