

间接竞争ELISA检测核桃制品中核桃蛋白含量

赖心田, 冯荣虎, 张世伟, 王士峰, 杨国武*

深圳市计量质量检测研究院(深圳 518102)

摘要 通过核桃蛋白组分分析, 确定核桃丰度蛋白, 以其作为抗原免疫小鼠, 制备可特异性识别核桃蛋白的单克隆抗体, 建立间接竞争ELISA检测方法。筛选出一株能稳定分泌抗核桃蛋白的杂交瘤细胞株HT-1, 对间接竞争ELISA方法的反应条件进行优化后, 建立了检测核桃蛋白的间接竞争ELISA方法, 核桃蛋白的检测线性范围在 $4.6\sim 64.2 \mu\text{g/mL}$, IC_{50} 为 $17.2 \mu\text{g/mL}$, 最低检测限为 $0.67 \mu\text{g/mL}$ 。抗体特异性较好, 与其他的植物蛋白没有交叉反应。该方法适用于检测核桃制品中的核桃蛋白含量。

关键词 核桃; 核桃蛋白; 间接竞争法ELISA

Detection and Quantification of Walnut Protein in Walnut Products by an

Indirect Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Lai Xin-tian, Feng Rong-hu, Zhang Shi-wei, Wang Shi-feng, Yang Guo-wu*

Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection (Shenzhen 518102)

Abstract Walnut abundance proteins were found by proteomic analysis. A monoclonal antibody H1 recognizing walnut protein was selected and characterized after immunization of mice with walnut protein. One clone of the hybridoma cell stably secreting anti-walnut antibody was obtained and named HT-1. After optimization of the reactive condition, the method of indirect competitive ELISA for detection of walnut protein was established. The linear detection range was $4.6\sim 64.2 \mu\text{g/mL}$, the IC_{50} inhibitory concentration of ELISA was $17.2 \mu\text{g/mL}$. The detection limit for walnut was $0.67 \mu\text{g/mL}$. H1 exhibited no cross-reactivity among the six food ingredients and high specificity with walnut. This method was suitable for detecting walnut protein from the walnut products.

Keywords walnut; walnut protein; indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay

核桃营养丰富, 是世界四大干果之一, 是一种深受广大群众喜欢的食品。中国是核桃主要产区之一, 面积产量居世界首位^[1]。数据显示, 每百克核桃含有 26.1 g 核桃蛋白^[2]。其中主要由4种蛋白质构成, 为清蛋白、球蛋白、醇溶谷蛋白和谷蛋白, 分别占核桃蛋白总量 6.81% , 17.57% , 5.33% 和 70.11% ^[3]。核桃蛋白中含有18种氨基酸, 种类齐全, 且人体所需的8种必需氨基酸含量合理。对人体生理作用有着重要功能的谷氨酸、天冬氨酸和精氨酸含量较高。

目前, 以核桃为原料的各种加工食品越来越多的出现在了市场上。核桃蛋白饮料中核桃蛋白的含量造假报道越来越引起关注。国家标准GB 16322—2003“植物蛋白饮料卫生标准”只能依据凯氏定氮法对其总蛋白进行定量。三聚氰胺事件给依赖这一传统的技术手段进行蛋白检测的方法敲响了警钟。虽然, 现在对三聚氰胺的控制卓有成效, 但是对非法添加物的监控仍然是针对已知的、具体的物质进行检测。合成化学的飞速发展导致可以冒充蛋白质的物质众多, 制假者的手段也在不断翻新, 假如利用其它物质冒充蛋白, 现有技术很难发现。另外, 一些厂商还可能使用廉价的蛋白替代核桃蛋白, 如在核桃乳中掺入大

豆粉或花生乳。具体掺入多少也因缺乏检测方法, 全凭企业声称。

为探索一种能够快速有效检测核桃制品中核桃蛋白的方法, 试验采用单克隆抗体技术和酶联免疫吸附测定等技术, 制备抗原, 筛选核桃蛋白单克隆抗体, 旨在建立检测食品中核桃蛋白含量的ELISA测定法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂

新疆核桃; 市售; 免疫佐剂Quickantibody; 北京康碧泉公司; 5周龄BALB/c小鼠; 广东省医学实验动物中心; SP2/0小鼠骨髓瘤细胞; 实验室保存; RPMI-1640培养基、胎牛血清和双抗(Penicillin-Streptomycin Solution); GIBCO公司。

TMB、牛血清白蛋白(BSA); sigma公司; HRP标记山羊抗小鼠二抗; Proteintech公司; PAGE胶蛋白微量回收试剂盒; 上海生工。其它试验试剂均为国产分析纯, 实验室用水均为去离子水。ELISA其他溶液配方见文献^[9]。

1.1.2 仪器与设备

*通讯作者

蛋白电泳仪: Bio-rad; 酶标仪: Biotek, 美国; 96孔酶标板和细胞培养瓶: Corning, 美国; 洗板机: Biotek, 美国; 电热恒温振荡水槽: 上海一恒; 手持式酸度计: Beckman Coulter, 美国。其他常规试验仪器。

1.2 试验方法

1.2.1 抗原及抗体制备

核桃仁中脂肪含量很高, 因此要先将其除去。破碎核桃, 称取5 g核桃仁, 将其磨碎。加入20 mL石油醚, 在室温下脱脂0.5 h, 之后离心去液体, 重复脱脂3次, 置于通风厨风干。称取1 g风干的核桃末, 加入10 mL 8 mol/L尿素, 用匀浆器打成乳状, 得到核桃提取液。

将核桃提取液进行SDS-PAGE电泳分析, 选用12%分离胶, 5%浓缩胶。用5x的上样处理液与核桃提取液混合; 恒压80 V, 30 min, 120 V, 1 h; 染色0.5 h, 脱色过夜。

依据凝胶过滤的洗脱体积, 标准曲线和斯托克斯半径, 研究者估算出核桃谷蛋白的相对分子量为 48.68 ± 26.95 (平均值±标准偏差, $n=4$)^[2]。因此, 切胶回收40 kDa左右的条带, 用PAGE胶蛋白微量回收试剂盒回收。回收好的蛋白放入冻干机中冻干。冻干的粉末再用8 mol/L尿素溶解, 用PBS稀释后质量浓度为200 $\mu\text{g/mL}$, 和等体积的免疫佐剂Q $\mu\text{ickantibody}$ 等体积混匀, 大腿肌肉注射免疫100 $\mu\text{g/只}$, 第21天等剂量加强免疫, 第35天后尾部采血检测, 测量血清多抗效价。单克隆抗体及腹水制备方法见文献^[10]。

1.2.2 ELISA方法

用棋盘滴定法确定ELISA的抗原包被浓度、一抗、样品和酶标二抗的稀释倍数。其他ELISA条件: 96微孔板每孔用100 μL , 质量浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 核桃蛋白包被, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日弃上清液, 用200 μL 含有2% BSA的PBST溶液37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h, 弃上清液, 用PBST洗涤5遍拍干后, 微孔板可密封4 $^{\circ}\text{C}$ 保存或者立即使用。

间接竞争ELISA: 取封闭好的微孔板室温平衡30 min, 先加入50 μL 标准液或检测样本稀释液, 再加入50 μL 单抗稀释液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min, 弃上清液, 洗涤拍干后, 加入HRP标记山羊抗小鼠二抗100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min, 弃上清液, 洗涤拍干后, 加入TMB显色液, 避光37 $^{\circ}\text{C}$ 反应10 min后, 加入50 μL 终止液终止反应, 酶标仪450 nm检测吸光度。

1.2.3 ELISA方法的建立

日常实际的核桃制品都是以水作为溶剂, 因此标准品以水作为提取溶剂。将核桃破碎, 称取5 g核桃仁, 将其磨碎。加入20 mL石油醚, 在室温下脱脂0.5 h, 之后离心去液体, 重复脱脂3次, 置于通风厨风干。称取1 g风干的核桃末, 加入7 mL水进行溶解, 之

后用匀浆器混匀, 离心后的上清溶液即为核桃水溶性蛋白。用凯氏定氮测量可溶性蛋白含量, 先用PBST倍比稀释, 按照优化的ELISA条件进行竞争试验, 每个浓度重复4次, 建立logit-log回归标准曲线。

1.2.4 热稳定性与乳化剂影响

核桃蛋白主要以球蛋白为主, 在水中的溶解性差, 对热极为敏感, 核桃乳在加工和存储过程中易出现沉淀和脂肪上浮现象, 在工业生产中会加入乳化剂来提高稳定性。因此, 试验模仿核桃乳的加工工艺, 观察这些条件是否对核桃蛋白的定量产生影响。在15 $\mu\text{g/mL}$ 核桃蛋白液中加入0.1%的乳化剂, 分别用巴氏杀菌法(70 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)、100 $^{\circ}\text{C}$ 高温处理和超高温瞬时灭菌(121 $^{\circ}\text{C}$, 5 s)进行处理, 用ELISA方法进行测定。

1.2.5 回收率与精密度

在牛奶、花生乳及水溶液中加入100 $\mu\text{g/g}$ 、10 $\mu\text{g/g}$ 的核桃标准蛋白, 计算添加回收率: 回收率=测量值/添加值 $\times 100\%$ 。同理计算批内和批间的变异系数: $\text{CV}=\text{标准差}(\text{STD})/\text{均值}(X)\times 100\%$ 。

1.2.6 交叉反应及实际样品测定

用间接竞争ELISA测定其他蛋白样品作交叉反应试验, 用PBS作为阴性对照。收集市场上的核桃制品, 用间接竞争ELISA检测核桃蛋白的含量。

2 结果与分析

2.1 抗原蛋白的制备

将核桃蛋白提取后, 用12%的胶进行SDS-PAGE电泳, 结果见图1, 通过电泳图分析, 核桃的丰度蛋白主要在20~40 kDa左右, 最终选取高丰度的40 kDa蛋白作为抗原, 通过胶回收试剂盒进行回收纯化。定量蛋白质量浓度到1 mg/mL, 作为抗原免疫小鼠。

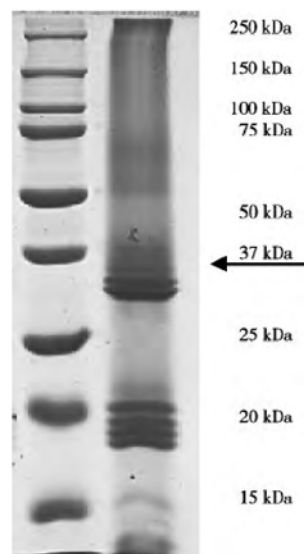


图1 核桃蛋白提取电泳图

2.2 ELISA条件优化

通过单克隆抗体的制备, 筛选出特异性及亲和力都较好的细胞株, 命名为HT-1。采用棋盘法确定抗原包被浓度及一抗的稀释倍数, 结果见图2。最终确定核桃包被浓度为4 μg/mL, 单抗的稀释倍数为1:20 000。

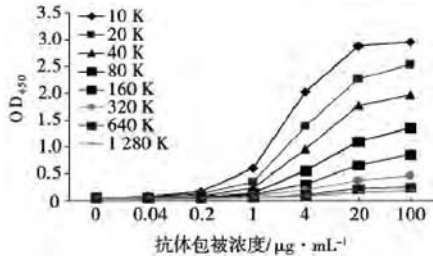


图2 抗原包被浓度及一抗稀释倍数优化

由图3可知, 以横坐标 $x=\lg(\text{蛋白浓度})$, $y=\ln(B/B_0)$, 得到抑制回归曲线 $y=3.034 10-2.497 31x$, 相关系数 $R^2=0.998 5$, 线性检测范围为4.6~64.2 μg/mL, 半数抑制浓度 $IC_{50}=17.2 \mu\text{g/mL}$, 最低检测限 $0.67 \mu\text{g/mL}$ 。其中, B_0 为PBST空白对照 OD_{450} , B 为不同试验组 OD_{450} 。

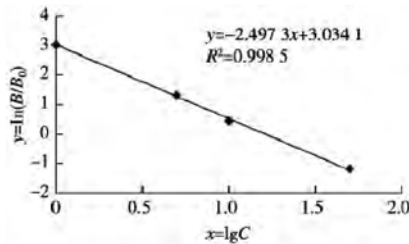


图3 ELISA标准曲线

2.3 回收率与精密度检测

在牛奶和椰子乳中分别加入核桃蛋白, 计算ELISA方法的回收率, 结果见表1。从表1可知, 在牛奶中样品的平均回收率为109%, 在椰子乳中的平均回收率为101.7%, 平均相对标准偏差值为5.1%, 最大值不超过10%, 说明该方法准确度高, 稳定性好。

表1 核桃添加回收率

| 样品 | 添加量/ μg · g ⁻¹ | 回收量±标准 偏差/μg · g ⁻¹ | 回收率/% | 相对标准偏差/% |
|-----|------------------------------|-----------------------------------|-------|----------|
| 牛奶 | 100 | 100±3.5 | 100 | 3.5 |
| | 50 | 48±3.2 | 96 | 6.6 |
| | 20 | 26.2±1.4 | 131 | 5.3 |
| 椰子乳 | 100 | 94±6.9 | 94 | 7.3 |
| | 50 | 48±0.35 | 96 | 0.7 |
| | 20 | 21.5±1.6 | 105 | 7.4 |

2.4 热稳定性与交叉反应

用3种不同的加热方式及乳化剂对核桃蛋白进行处理, 结果见表2。从表2可知, 巴斯消毒、100℃高温处理和超高温瞬时灭菌在是否加入乳化剂的条件下所测的核桃浓度与实际的添加浓度差别很小, 表明100℃高温处理及乳化剂不会影响核桃抗原表位的识

别, 因此该方法可以用于检测高温及乳化处理的核桃制品。

表2 加热及乳化剂添加结果

| 处理方式 | 加入乳化剂/μg · mL ⁻¹ | 未加乳化剂/μg · mL ⁻¹ |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|
| 巴氏消毒 | 13.2±1.3 | 14.3±0.5 |
| 100℃高温处理 | 14.4±2.4 | 15.3±0.8 |
| 超高温瞬时灭菌 | 14.8±0.9 | 15.8±0.34 |
| 未处理 | 15.4±0.5 | 14.1±1.2 |

ELISA方法的特异性试验用交叉率表示, 交叉率越高交叉范围越大, 说明ELISA检测的特异性越差。由表3可知, 采用间接竞争ELISA方法评估抗体对几种食品中常见蛋白和干扰物的交叉反应。除了跟核桃有反应外, 其他植物蛋白反应率低于1%, 说明此方法特异性良好, 对食品几种常见的蛋白无交叉反应, 不易出现结果误判。

表3 与各蛋白的交叉反应率

| 反应物 | $IC_{50}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 交叉反应率/% |
|------|--|---------|
| 核桃 | 19.8 | 100 |
| 芸豆 | >10 ⁴ | <1.0 |
| 白莲 | >10 ⁴ | <1.0 |
| 花生牛奶 | >10 ⁴ | <1.0 |
| 椰汁 | >10 ⁴ | <1.0 |
| 红枣牛奶 | >10 ⁴ | <1.0 |
| 大豆 | >10 ⁴ | <1.0 |
| 杏仁露 | >10 ⁴ | <1.0 |

2.5 ELISA方法测定实际样品中核桃蛋白浓度

从深圳市场上购买到3种核桃乳和4种核桃粉, 由表4可知, 其中2种核桃乳核桃蛋白浓度较高, 样品3是复合核桃乳, 核桃只是其中一种成分, 测得的核桃乳核桃蛋白含量很低, 4种核桃粉的核桃蛋白浓度相对较低。由于核桃蛋白以球蛋白为主, 在水中溶解性差, 而日常的核桃制品都是水溶性为主, 因此, 核桃粉类制品在实际检测中核桃蛋白含量会相对较低。核桃乳经过加工处理后核桃蛋白含量相对较高。

表4 市售核桃制品中核桃蛋白检测结果

| 样品编号 | 分类 | 检测结果/mg · mL ⁻¹ |
|------|-----|----------------------------|
| 1 | 核桃乳 | 29.2 |
| 2 | 核桃乳 | 27 |
| 3 | 核桃乳 | 0.1 |
| 4 | 核桃粉 | 0.5 |
| 5 | 核桃粉 | 0.79 |
| 6 | 核桃粉 | 0.34 |
| 7 | 核桃粉 | 0.42 |

3 结论

试验以核桃制品掺假问题作为出发点, 通过单克隆抗体技术筛选出一株能特异性识别核桃可溶性蛋白的细胞株HT-1, 建立间接竞争ELISA方法对核桃蛋白进行定量。此方法检测实际样品稳定可靠, 不易受乳化剂及高温的干扰, 具有较好的实际应用价值和开发

顶空-GC/MS法测定水产品中6种含硫类致嗅物质

蒋玲波, 薛超波, 王萍亚, 戴意飞, 赵巧灵

浙江省海洋水产品质量检验中心, 舟山市食品药品检验检测研究院(舟山 316021)

摘要 建立了自动顶空-气质联用技术同时测定水产品中6种挥发性含硫类致嗅物质含量的分析方法。水产品经过正己烷超声提取后, 提取液用自动顶空-气质检测分析。结果表明, 水产品中6种含硫类致嗅物质的检测限低: 除甲硫醚为1 ng/mL之外, 其他5种含硫类致嗅物质为2 ng/mL, 加标回收率为78%~108%, 相对标准偏差小于10%; 在10~1 000 ng/mL线性范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.995。该方法快速简单、灵敏度高, 可应用于水产品中6种挥发性含硫类致嗅物质的实际检测分析。

关键词 顶空-气质联用; 水产品; 含硫类致嗅物质

Determination of 6 Odorous Sulfur Compounds in Aquatic Products by Headspace Gas Chromatography-mass Spectrometry

Jiang Ling-bo, Xue Chao-bo, Wang Ping-ya, Dai Yi-fei, Zhao Qiao-ling

Zhejiang Ocean Food Quality Inspection Center, Zhoushan Institute for Food and Drug Control (Zhoushan 316021)

Abstract A method was developed for the determination of 6 odorous sulfur compounds in aquatic products by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC/MS). The analytes in aquatic products were extracted with hexane by ultrasonic extraction, then the extract solution was directly analysed by HS-GC/MS. The results showed that low detection limits (DMS: 1 ng/mL, the others: 2 ng/mL), and the average recoveries of 6 odorous sulfur compounds in aquatic products were 78%~108% and relative standard deviations were less than 10%. The 6 analytes behaved linearly in the wide-range of 10~1 000 ng/mL with the correlation coefficients more than 0.995. This method could be applied to the analysis of the 6 odorous sulfur compounds in aquatic products due to its fastness, simplicity and relatively high sensitivity.

Keywords headspace gas chromatography-mass spectrometry; aquatic products; odorous sulfur compounds

含硫类致嗅物质多为挥发性含硫化合物 (Volatile sulfur compounds, VSC), 主要包括硫化氢 (Hydrogen disulfide, H₂S)、甲硫醇 (Methanethiol, MT)、羰基硫 (Carbonyl sulfide, COS)、甲硫醚 (Dimethyl

sulfide, DMS)、二硫化碳 (Carbon disulfide, CS₂)、二甲二硫 (Dimethyl disulfide, DMDS)、二甲三硫 (Dimethyl trisulfide, DMTS) 和二甲四硫 (Dimethyl tetrasulfide, DMTeS), 其嗅阈值 (Odor

成商品化试剂盒的潜力。目前, 市场上核桃蛋白定量的试剂盒仍是空白, 试验能够为核桃制品的监督提供一种高效稳定的检测方法, 为广大消费者提供保障。

参考文献:

- [1] ER C ISLIS, SAYI N C IB, KARA M, et al Determination of size and shape features of walnut (*Juglans regia* L) cultivars using image processing[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012 (133): 47-55.
- [2] SZE-TAO KW C, SATHESK. Walnuts (*Juglans regia* L): Proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein *in vitro* digestibility[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80 (9): 1393-1401.
- [3] MAO XY, HUA YF. Chemical composition, molecular weight distribution, secondary structure and effect of NaCl on functional properties of walnut (*Juglans regia* L) protein isolates and concentrates[J]. *Journal of Food Science Technology*, 2012 (13): 1561-1581.
- [4] LI Y, HAN CZ. Analysis on present situation and strategies of walnut industry in Yunnan province[J]. *Nonwood Forest Research*, 2012, 4 (30): 163-167.
- [5] HAIDER S, BATOOL Z, TABASSUM S, et al Effects of walnuts (*Juglans regia*) on learning and memory functions[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2011, 66 (4): 335-340.
- [6] 张庆祝, 丁晓雯, 陈宗道, 等. 核桃蛋白质研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2003 (5): 21-23.
- [7] 毛晓英, 华欲飞, 卢伟. 核桃蛋白质的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2009 (30): 328-330.
- [8] 邢玮玮, 王榕妹, 王俊卿, 等. 酶联免疫吸附分析法测定水产品及水中孔雀石绿和无色孔雀石绿[J]. *化学研究与应*, 2010 (1): 42-46.
- [9] 彭方毅, 姜海蓉, 陈远翔, 等. 吡虫啉的酶联免疫吸附分析方法研究[J]. *分析化学*, 2010, 38 (12): 1737-1741.