

食品中酪蛋白过敏原检测方法的比较

张霞^{1,2}, 吴冬雪², 刘国红², 刘红梅², 郑文杰^{2*}

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

2. 天津出入境检验检疫局, 天津 300461)

摘要: **目的** 比较市场上销售的三种检测牛奶中酪蛋白 ELISA 试剂盒效果。**方法** 以脱脂奶粉、酪蛋白做作阳性添加成分, 对三个品牌的 ELISA 试剂盒从回收率、精密度、特异性等方面进行比较。**结果** ELISA 试剂盒可以对多种食品进行酪蛋白含量检测, 回收率、精密度等各项检测性能指标均可满足相关检测低限要求。**结论** ELISA 检测试剂盒无需大型分析仪器、操作简便快捷、适用于大量样品快速初筛和各种基层实验室食品品质监控。

关键词: 酪蛋白; 过敏原; 酶联免疫吸附试验

Comparison of three detection methods of casein allergens in food

ZHANG Xia^{1,2}, WU Dong-Xue², LIU Guo-Hong², LIU Hong-Mei², ZHENG Wen-Jie^{2*}

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300456, China)

ABSTRACT: Objective To compare the detection effect of three kinds of casein ELISA kits on the market. **Methods** The recovery, precision and specificity of three brands of ELISA kits were compared by adding positive ingredients, such as skim milk powder and casein. **Results** ELISA kits could detect casein content in a variety of foods. The recovery, precision and other performance could meet the relevant detection limit requirements. **Conclusion** The method is easy to operate and does not require any complex equipment. It is applicable to rapid screening for a large number of samples and a variety of primary laboratory food quality monitoring. **KEY WORDS:** casein; allergen; ELISA

1 引言

牛乳是优质的营养食品, 同时又是较易引起过敏的食物之一, 尤其是对以牛乳为主要食物的婴幼儿来说, 乳蛋白过敏严重地影响了婴幼儿对乳蛋白的吸收^[1]。据报道约 3% 的成年人对乳制品过敏, 症状主要表现为皮肤、呼吸道、胃肠道症状及全身性的症状(如过敏性昏厥等)。这些症状是由于乳中具有过敏原性的蛋白质, 能够避开肠道黏膜上皮细胞中

存在的免疫球蛋白, 被吸附在肠道黏膜上产生免疫反应而引起过敏。

酪蛋白是乳蛋白中的主要组分, 占牛乳总蛋白的 80%, 也是其中的主要过敏原, 可分为 α s1-酪蛋白、 α s2-酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白。有文献报道, 大约 65% 的牛乳过敏病人对酪蛋白过敏, 大部分对酪蛋白过敏的病人对其 4 种酪蛋白都过敏^[2]。

市场上广泛存在着被酪蛋白污染的食品, 严重危害着过敏儿童的健康。美国一项研究表明, 177 份

基金项目: 公益性行业科研专项: 常见食品过敏原的定量检测方法研究(10-46-1)

*通讯作者: 郑文杰, 女, 研究员, 研究方向为食品安全。Email: tianjiniq@yahoo.com.cn

被消费者或科技人员怀疑可能含有过敏原的食品样本,发现4%样本含有至少一种过敏原,其中以乳制品情形最为严重,在72份受检样本中,28份检出酪蛋白^[3]。可是,这些过敏原却无一在标签上标明,对于消费者生命健康的潜在威胁不言而喻。

目前针对牛奶过敏蛋白的检测研究主要集中在两种主要过敏成分酪蛋白、 β -乳球蛋白方面,检测方法采用免疫印迹法、多肽微阵列技术、质谱技术、蛋白质分离芯片等^[4-7],但在实际检测工作中以ELISA技术为主。本研究特针对市场上广泛销售和应用的三种酪蛋白ELISA检测试剂盒进行比较实验。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 检测试剂盒

A、B、C三种ELISA检测试剂盒,购自澳大利亚ElisaSystems、德国R-biopharm、美国Neogen三家公司。

2.1.2 阳性添加物

脱脂奶粉(天津口岸新西兰进口原料脱脂奶粉)、酪蛋白(sigma公司)做作阳性添加成分;酪蛋白过敏原(德国IFP公司)。

2.1.3 食品样品

由天津出入境检验检疫局提供的经验证不含酪蛋白成分的早餐谷物、米粉、果汁;牛血清白蛋白(美国MPBio)、 β -乳球蛋白(sigma公司)、 α -乳白蛋白(sigma公司);市售麦粉、粟米粉、大麦粉、豆浆、全蛋粉、卵磷脂、牛胶质、羊奶粉、鸡肉、鱼肉、虾。

2.2 方法

2.2.1 技术细节比较

对三种试剂盒从检测样品范围、样品制备及提取步骤时间、检测时间、定量目标及范围等技术细节比较。

2.2.2 准确度试验

2.2.2.1 添加试验

根据试剂盒检测样品范围,将不含酪蛋白成分的早餐谷物、米粉、果汁为代表作为添加试验的基质。分别将早餐谷物研磨成粉状按照拜发公司提供的《样品中过敏原添加方法》做早餐谷物、米粉及果汁添加^[8]。

以脱脂奶粉、酪蛋白做作阳性添加成分。脱脂奶粉为添加成分:取10g脱脂奶粉添加至90g的基质粉或100mL果汁中充分混匀,形成含10%脱脂奶粉

的混合物。以此比例添加至新的基质粉中分别形成含1mg/kg脱脂奶粉的三种混合物。在添加过程中充分混匀,保证脱脂奶粉均匀散布。

酪蛋白为添加成分:取1g酪蛋白添加至9g的基质粉或10mL果汁中充分混匀,形成含10%酪蛋白的混合物。以此比例添加至新的基质粉中直至形成含0.5mg/kg酪蛋白混合物。在添加过程中充分混匀,保证酪蛋白均匀散布。

2.2.2.2 ELISA检测

以回收率作为准确度评价指标,回收率计算公式为:回收率(%)=实际测定值/真实值 $\times$ 100%,其中真实值为模拟样品的添加浓度。

由于A试剂盒检测低限在三种试剂盒中最低,酪蛋白定量检测低限为0.26mg/kg,脱脂奶粉定量低限为1mg/kg,故采用脱脂奶粉1、2.5、5、10mg/kg四个添加浓度;酪蛋白0.5、1、2.5、5、10mg/kg五个添加浓度。

将上述添加样品由2个实验员操作。每个实验员在酶标仪上完成的检测内容为每个样品取3份按照说明书进行样品前处理及检测。

2.2.3 精密度试验

以重复测定某一浓度样品的检测结果变异系数(CV%)作为精密度评价指标。以酪蛋白过敏原参考物质,浓度分别为5、12.5mg/kg黑巧克力,由两个实验员操作,每个参考物质重复测定3次,检测结果以变异系数(CV%)作为精密度评价指标。

CV%计算公式为:CV(%)=SD/X $\times$ 100%,其中SD为测定数据的标准偏差,X为测定数据的平均值。

2.2.4 特异性试验

选择麦粉、粟米粉、大麦粉、米粉、豆浆、全蛋粉、卵磷脂、牛血清白蛋白、 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白、牛胶质、羊奶粉、鸡肉、鱼肉、虾等作为特异性实验比对的阴性样品。

按照上述添加回收试验的制样方法在基质中加入阴性样品成为100mg/kg混合物进行检测。

3 结果

3.1 技术细节比较

对A、B、C三种试剂盒从检测样品范围、样品制备及提取步骤时间、检测时间、定量目标及范围等技术细节比较,结果见表1。

表 1 试剂盒技术细节比较
Table 1 Comparison of the technical details of kits

	A 试剂盒	B 试剂盒	C 试剂盒
检测样品	加工食品及含多酚类食品, 如黑巧克力、红酒、果汁、丹宁和环境检测	烘焙食品、巧克力、香肠、冰淇淋、红酒及其他饮料	果汁、调味酱料, 果汁冰糕和环境检测
样品提取	均质, 缓冲液 60℃ 提取, 离心	均质, 缓冲液 60℃ 提取, 离心	均质, 提取试剂盒, 离心
样品处理时间	30 min	45 min	45 min
检测时间	40 min	30 min	30 min
定量范围	1.0~10 mg/kg	0.5~13.5 mg/kg	2.5~15 mg/kg
结果表述	脱脂奶粉/酪蛋白	酪蛋白	牛奶蛋白
抗体	特异性酪蛋白抗体	特异性酪蛋白抗体	特异性酪蛋白抗体

三个试剂盒样品提取及检测操作均简单可行, 所需时间大致相同。差别较大的地方主要体现在以下三个方面:

(1) 检测范围: A、B 两种试剂盒检测较为广泛, 包括加工食品、巧克力、红酒、果汁等, C 试剂盒不能对加工食品、巧克力等进行检测, 范围较窄。

(2) 检测结果报告: A 试剂盒可以通过转化表可以对脱脂奶粉、全脂奶粉、酪蛋白、脱脂奶、全脂奶进行定量, 根据检测目标要求出具不同的报告; B 试剂盒专门针对牛奶酪蛋白进行检测及报告; C 试剂盒对食品中牛奶致敏蛋白进行定量。

(3) 定量检测范围及下限: A 试剂盒直接定量结果是脱脂奶粉, 范围是 1.0~10 mg/kg, 如果转化为酪蛋白则定量检测范围是 0.26~2.6 mg/kg; B 试剂盒对酪蛋白定量范围为 0.5~13.5 mg/kg; C 试剂盒对牛奶致敏蛋白定量为 2.5~15 mg/kg。比较三种试剂盒, A 试剂盒定量检测限最低, 相对灵敏。

3.2 准确度试验

将 2 个实验员对各种添加物在每种基质中的每一浓度水平实测值求平均, 将两种不同添加物质在三种基质中回收率范围列表说明, 见表 2~表 3。

C 试剂盒对牛奶过敏蛋白检测, 实验结果表明实际是对样品中酪蛋白的定量检测, 定量低限为 2.5 mg/kg, 回收率为 86.2%~121%。A 试剂盒对酪蛋白定量检测低限为 0.26 mg/kg, 回收率为 76%~119%, 但高回收率只出现在 0.26 mg/kg 的检测低限, 其余浓度的回收率均偏低在 82%~98%; B 试剂盒定量检测低限为 0.5mg/kg, 回收率为 76.2%~123%。

3.3 精密度试验

将 5、12.5 mg/kg 黑巧克力酪蛋白作为过敏原参考物质, 由两个实验员操作检测, 结果见表 4。

从表 4 可知 A 试剂盒变异系数在 3%左右, B 试剂盒在 5.2%以下, 精密度均较好。而且检测回收率均在添加试验的回收率范围内, 说明自行添加样品较为准确。

由于 C 试剂盒不能对巧克力进行检测, 所以不能对参考物质进行检测。

3.4 特异性试验

对特异性实验比对的阴性样品进行检测, B、C 试剂盒检测均为阴性, 特异性很好, 可以特异性检测食品中牛奶酪蛋白含量。

A 试剂盒对羊奶粉检测结果为阳性, 其余均为阴性。经查询, 其为特异性检测哺乳动物乳汁(如牛奶、羊奶等)的酪蛋白含量, 而不是特异性检测牛乳中酪蛋白含量。由于其余哺乳动物酪蛋白制品不太容易得到, 且国内外均是对牛奶中酪蛋白进行广泛的研究, 关于其它哺乳动物的酪蛋白含量及致敏性各方面研究未见详细报道, 所以没有做其余哺乳动物酪蛋白定量检测的评估试验。

4 讨 论

乳制品已被世界各国公认为是引起人类食物过敏的主要过敏原之一。FDA 于 2005 年 10 月 5 日发布《食品过敏原标识和消费者保护法—2004》(FALCPA), 规定主要食物过敏原包括乳制品等八种食物的成分。欧盟在 2007 年 11 月 27 日发布乳制品由于引起过敏反应, 其作为食品中成分必须在食品标签中标注, 由于乳清蛋白(主要 β -乳球蛋白)和酪蛋白^[9]常被添加在食品中, 因此建议做酪蛋白及乳清蛋白的检测。为保护消费者的健康和安全及我国食品加工出口企业顺利出口, 我国于 2009 年国家质检总局发布了《预包装食品中的致敏原成分》的国家标准,

表 2 脱脂奶粉在三种基质中回收率范围(n=18)
Table 2 The recovery rate range of skimmed milk powder in the three matrices(n=18)

添加量 mg/kg	酪蛋白含 量 mg/kg	A 试剂盒		B 试剂盒		C 试剂盒	
		酪蛋白实测值 mg/kg	回收率范围(%)	酪蛋白实测值 mg/kg	回收率范围(%)	牛奶蛋白实测值* mg/kg	回收率范围 (%)
1.0	0.26	0.27~0.31	103.8~119	<0.5	/	<2.5	/
2.5	0.64	0.58~0.61	90.6~95.3	0.68~0.71	106.3~111.0	<2.5	/
5.0	1.28	1.05~1.23	82.0~96.1	1.17~1.39	91.4~108.6	<2.5	/
10.0	2.56	2.13~2.26	83.2~88.3	2.19~2.62	85.5~102.3	3.10	121.1

*注: 由于 C 试剂盒不能检测米粉及早餐谷物, 所以只是果汁为基质的检测平均值。

表 3 酪蛋白在三种基质中回收率范围(n=18)
Table 3 The recovery rate range of Casein in the three matrices(n=18)

添加量 mg/kg	酪蛋白含 量 mg/kg	A 试剂盒		B 试剂盒		C 试剂盒	
		酪蛋白实测值 mg/kg	回收率范围(%)	酪蛋白实测值 mg/kg	回收率范围(%)	牛奶蛋白实测值* mg/kg	回收率范围 (%)
0.5	0.5	0.38~0.47	76~94	0.53~0.62	106~122	< 2.5	/
1.0	1.0	0.87~0.91	87~91	0.78~1.06	78~106	< 2.5	/
2.5	2.5	2.15~2.41	86~96.4	2.49~2.67	99.6~106.8	2.69	107.6
5.0	5.0	4.56~4.79	91.2~95.8	4.61~5.20	92.2~104	4.31	86.2
10.0	10.0	8.92~9.63	89.2~96.3	76.2~96.4	76.2~96.4	11.4	114

*注: 由于 C 试剂盒不能检测米粉及早餐谷物, 所以只是果汁为基质的检测平均值。

表 4 IFP 参考物质 ELISA 检测结果
Table 4 ELISA results of IFP reference materials

实验员	平行样序号	ELISA 检测结果(mg/kg)			
		A		B	
		5.00	12.50	5.00	12.50
实验员 A	1	4.63	10.95	5.39	12.68
	2	4.84	11.23	5.36	13.26
	3	4.78	10.86	5.26	12.98
实验员 B	1	5.02	11.68	5.25	14.06
	2	5.18	11.44	5.16	14.77
	3	5.08	11.98	5.38	13.37
	平均值($\bar{x}$, mg/kg)	4.92	11.36	5.30	13.52
	标准差(SD, mg/kg)	0.19	0.40	0.08	0.70
	变异系数 (CV, %)	3.86	3.52	1.51	5.2
	回收率(%)	98.4	90.88	106.00	108.16

该标准规定了预包装食品中致敏原成分的 8 种食物中包括乳及其它制品。

ELISA 试剂盒主要是应用针对不同特异性过敏原蛋白的抗体进行定量检测。目前市场上有针对牛奶过敏蛋白、酪蛋白或 β -乳球蛋白进行定量检测的试剂盒, 但正如在该次评估实验中 C 试剂盒虽然表述为牛奶过敏蛋白, 实际是对样品中酪蛋白的定量检测。所以在选择试剂盒时, 为避免发生漏检或误检, 应向销售商明确实际检测的目标物。

三种试剂盒虽然在样品提取及检测操作均简单

可行, 所需时间大致相同, 但是针对检测样品范围、特异性及检测低限上均有不同, 所以在检测酪蛋白选择试剂盒时要明确检测样品类型、检测低限及检测目标物。

在本次评估实验结果表明, 三个试剂盒对多种食品进行酪蛋白含量检测, 准确度、精密度等各项检测性能指标均达到 ELISA 检测技术要求, 检测低限满足欧盟关于主要致敏物声称指南(Major Allergen Declaration (MAD) Guidelines)相关限量要求低于 3 mg/kg, 其中 A、B 试剂盒检测还可满足欧盟关于 3

岁以下婴幼儿食品低于 1 mg/kg 的限量要求, 并且无需大型分析仪器、操作简便快捷、成本低廉, 尤其适用于大量样品快速初筛和各种基层实验室食品品质监控。

注: 本研究结果只针对本批试剂盒和所采集的样本, 不作为商业评价标准。

参考文献

- [1] 苏静, 张书军. 牛奶蛋白不耐症和过敏症[J]. 中国乳品工业, 1992, 20(4): 183-184.
- [2] 蒋红玲, 向军俭, 王宏, 等. 牛奶中过敏原组分的分离纯化及主要过敏原的鉴定[J]. 暨南大学学报(医学版), 2008, 29(4): 43-45.
- [3] Taylor SL, Hefle SL, Lambrecht DM, *et al.* Immunochemical analyses for food residues Call be used to confirm presence of hidden allergens in food implicated in consumer complaints [J]. Amer Acad Allergy. Asthma Immunol Annual Meeting, 2004.
- [4] Matsumoto N, Okochi M, Matsushima M, *et al.* Peptide array-based analysis of the specific IgE and IgG4 in cow's milk allergens and its use in allergy evaluation [J]. Peptides, 2009, 30(10): 1840-1847.
- [5] Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, *et al.* Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(3): 589-594.
- [6] Matsumoto N, Okochi M, Matsushima M, *et al.* Development of peptide arrays for detection of IgE-binding epitopes in cow's milk allergens [J]. J Biosci Bioeng, 2009, 107(3): 324-330.
- [7] Okada H, Kaji N, Tokeshi M, *et al.* Analysis of potent milk allergen using highly sensitive protein separation chip [J]. Nanomed: Nanotechnol, Biology Med, 2009, 3(4): 351.
- [8] Spiked Samples for Allergen Determination (February 2006) [DB/OL] www.r-biopharm.com
- [9] Monaci L, Tregoat V, Hengel AJ. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review [J]. Eur Food Res Technol, 2006, 223: 149-179.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



张霞, 女, 高级工程师, 研究方向为食品安全。

E-mail: zhangxia_75@126.com



郑文杰, 女, 研究员, 研究方向为食品安全。

E-mail: tianjiniq@yahoo.com.cn

“食品加工与质量控制”专题约稿

《食品安全质量检测学报》感谢各位专家的大力支持! 本刊自 2010 年 1 月创刊以来, 得到本领域专家及管理部門的充分肯定, 在国内食品安全与质量研究领域的影响越来越大。

近年来, 食品安全得到了国家越来越多的重视, 但我国的食品安全问题仍较严重。鉴于此, 本刊特别策划了“食品加工与质量控制”专题, 围绕食品加工技术、加工过程污染物的检测、食品加工的安全质量控制等的相关技术和方法等问题展开讨论, 计划在 2013 年出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部