

食品中 β -乳球蛋白过敏原检测方法的比较

张海英¹, 刘 旻¹, 吴冬雪¹, 梁 靖¹, 张 霞^{1,2*}

(1. 天津出入境检验检疫局, 天津 300461;

2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘 要: **目的** 比较市场上销售的两种检测牛奶中 β -乳球蛋白 ELISA 试剂盒效果。**方法** 以脱脂奶粉、 β -乳球蛋白作阳性添加成分, 对两个品牌的 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 β -乳球蛋白含量检测, 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: β -乳球蛋白; 过敏原; 酶联免疫吸附法

Comparison of two detection methods of β -lactoglobulin allergens in food

ZHANG Hai-Ying¹, LIU Yang¹, WU Dong-Xue¹, LIANG Jing¹, ZHANG Xia^{1,2}

(1. Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300456, China; 2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT: Objective To compare the detection effect of two kinds of β -lactoglobulin ELISA kits on the market. **Methods** The recovery, precision and specificity of the two 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 equipments. It is applicable to rapid screening for a large number of samples, and a variety of primary laboratory food quality monitoring

KEY WORDS: β -lactoglobulin; allergen; ELISA

1 引言

牛乳过敏是由乳及乳制品中的蛋白过敏原所引发的一种变态反应, 它是由 IgE 介导或非 IgE 介导的免疫反应, 在儿童中的发病率为 0.1%~7.5%^[1-2], 且主要见于较小的婴幼儿, 一般是暂时性的, 随着年龄的增长, 会自动消失, 但它严重危害婴幼儿健康^[3]。绝大多数的牛乳蛋白都具有潜在的致敏性, 但目前普遍认为酪蛋白、 β -乳球蛋白及 α -乳白蛋白是主要

的过敏原^[4]。

β -乳球蛋白是乳清中含量最多的蛋白, 占牛乳总蛋白的 10%, 乳清蛋白的 50%, 在鲜牛乳中以 36 kDa 的二聚体形式存在, 属 Lipocalin 蛋白, 其单体由 162 个氨基酸残基组成。 β -乳球蛋白不存在于母乳中, 且胃蛋白酶不能将其消化水解, 因此可通过胃肠道进入血液循环。据报道, 这一类蛋白具有强致敏性, 作为牛乳中的首要过敏成分, 刺激婴儿免疫系统的发生超敏反应^[5]。

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: 张霞, 女, 高级工程师, 研究方向为食品安全。Email: zhangxia_75@126.com

目前,国内外对食品中 β -乳球蛋白的检测方法包括:以检测蛋白为基础的免疫化学检测方法,如放射性过敏原吸附抑制法、酶标记过敏原吸附抑制法、火箭免疫电泳法、免疫印迹法、酶联免疫吸附法(ELISA);以检测DNA为基础的测试方法聚合酶链反应、组胺释放法以及生物传感器、质谱技术、多肽微阵列、生物芯片等新技术^[6-9]。

随着ELISA方法检测方法的成熟,目前市场上出现多种商业化试剂盒。虽然市场上也有检测牛奶过敏原的PCR试剂盒,但在实际样品检测中,由于鸡肉、牛肉容易造成假阳性反应,目前一般很少选取PCR方法检测牛奶过敏原。在实际检测工作中仍以ELISA技术为主,所以本研究特针对市场上广泛销售和应用的两种 β -乳球蛋白ELISA检测试剂盒进行评估研究。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 检测试剂盒

A、B两种 β -乳球蛋白ELISA检测试剂盒,购自澳大利亚ElisaSystems公司和德国R-biopharm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)、 β -乳球蛋白(L-8005, Sigma公司)做作阳性添加成分; β -乳球蛋白过敏原参考物质(德国IFP公司)。

2.1.3 食品基质

由天津出入境检验检疫局提供的经验证不含 β -乳球蛋白成分的早餐谷物、米粉、果汁;牛血清白蛋白(美国MPBio公司)、酪蛋白(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

对两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 β -乳球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^[10]。

以脱脂奶粉、 β -乳球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脱脂奶粉混合物。在添加过程中充分混匀,保证脱脂奶粉均匀散布。

β -乳球蛋白为添加成分:取1g β -乳球蛋白添加至9g的基质粉或10mL果汁中充分混匀,形成含10% β -乳球蛋白的混合物。以此比例添加至新的基质粉中直至形成含0.1mg/kg β -乳球蛋白混合物。在添加过程中充分混匀,保证 β -乳球蛋白均匀散布。

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、B试剂盒 β -乳球蛋白定量检测低限分别为0.10、5mg/kg,故取不同含量的混合物进行检测,脱脂奶粉5、10、150、200mg/kg四个添加浓度; β -乳球蛋白0.1、1、5、10mg/kg四个添加浓度。

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 β -乳球蛋白过敏原参考物质,其为浓度为5、12.5mg/kg香肠,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、酪蛋白、 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两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
检测样品	奶粉, 含多酚食品, 如酸奶、面包干、红酒、果汁、香肠, 黑巧克力等及环境检测。	低致敏性的婴儿食品(水解乳制品, 奶粉)及饮料和食品(酸奶、香肠等)
	均质	均质
样品提取	缓冲液 60 ℃提取	缓冲液 60 ℃提取
	离心	离心
样品处理时间	30 min	30 min
检测时间	30 min	165 min
定量范围	0.1~1.0 mg/kg	0.01~0.81 mg/kg
结果表述	β -乳球蛋白	β -乳球蛋白
标准品浓度	0 mg/kg, 0.10 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.50 mg/kg, 1.00 mg/kg	0 mg/kg, 0.01mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.09 mg/kg, 0.27 mg/kg, 0.81mg/kg
抗体	特异性 β -乳球蛋白抗体	特异性 β -乳球蛋白抗体

两个试剂盒样品提取及检测操作均简单可行, 检测范围包含香肠、果汁、巧克力等, 应用较广泛, 但 B 试剂盒试验检测时间较长, 须 165 min。其他较大差别体现在以下两个方面:

(1) 检测结果报告: A 试剂盒通过转化表可以对脱脂奶粉、全脂奶粉、 β -乳球蛋白、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 试剂盒针对 β -乳球蛋白进行检测及报告。

(2) 定量检测范围及下限: A 试剂盒直接定量 β -乳球蛋白范围是 0.1~1.0 mg/kg; B 试剂盒对 β -乳球蛋白定量范围为 0.01~0.81 mg/kg, 但是只能对婴儿食品进行定量检测, 稀释倍数为 50 倍, 所以其定量检测下限为 5 mg/kg。

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。

A 试剂盒对 β -乳球蛋白定量检测下限为 0.10 mg/kg, 回收率为 78%~110%, 但总体回收率偏低; B 试剂盒虽然标准品范围在 0.01~0.81 mg/kg, 但算入样品稀释倍数 50 倍, 其定量检测下限为 5 mg/kg, 回收率为 86.1%~116.6%。

3.3 精密度试验

将 5、12.5 mg/kg 两种香肠 β -乳球蛋白过敏原作为参考物质, 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 8%左右, B 试剂盒在 12%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。

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 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 β -乳球蛋白含量。

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 β -乳球蛋白含量, 而不是特异性检测牛乳中 β -乳球蛋白含量。

4 讨论

在食品安全方面 ELISA 技术已广泛应用于兽药残留、农药残留、疫情、有害微生物、动植物毒素等的快速检测分析, 并取得了较好的效果。随着人们对食品过敏认识的深入和重视程度的加强, 现在发展了很多种 ELISA 方法用于食品过敏原总蛋白提取物和特殊食品过敏原的检测和定量分析。ELISA 已经成为一种系列化、微量化、商品化的食品安全快速检测方法, 是目前应用最广泛的生物检测技术之一。

食品过敏原问题属于食品安全范畴, 它与食品生产厂商和消费者密切相关。由于科技进步、管理水平和社会发展的不平衡性, 对食品过敏原问题的理解在不同国家、不同地区各不相同, 公众对它的认同意识也有较大的差异。与上述发达国家相比, 我国对食品过敏原的研究和关注仍较少。FDA《食品过敏原标识和消费者保护法案—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

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	β-乳球蛋白含量 (mg/kg)	A 试剂盒		B 试剂盒	
		β-乳球蛋白实测值 mg/kg	回收率范围(%)	β-乳球蛋白实测值*mg/kg	回收率范围(%)
5.0	0.16	0.14~0.17	87.5~106.2	< 5	/
10.0	0.32	0.27~0.31	84.3~96.9	< 5	/
150.0	4.8	4.2~4.9	87.5~102.1	< 5	/
200.0	9.6	9.1~9.4	94.7~97.9	10.8	112.5

*注: B 试剂盒只能对婴儿米粉进行定量检测

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

添加量 mg/kg	β-乳球蛋白含量 (mg/kg)	A 试剂盒		B 试剂盒	
		β-乳球蛋白实测值 mg/kg	回收率范围(%)	β-乳球蛋白实测*mg/kg	回收率范围(%)
0.10	0.10	0.09~0.11	90.0~110.0	< 5	/
1.00	1.00	0.82~0.93	82.0~93.0	< 5	/
5.00	5.00	4.61~4.93	92.2~98.6	5.6	112
10.0	10.0	8.76~9.68	87.6~96.8	86.1	86.1

*注: B 试剂盒只能对婴儿米粉进行定量检测

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

		ELISA 检测结果(mg/kg)			
		ElisaSystems		R-biopharm	
实验员	平行样序号	5.00	12.50	5.00	12.50
实验员 A	1	4.52	10.61	6.02	14.62
	2	4.53	10.83	5.98	13.98
	3	4.52	10.55	5.84	13.89
实验员 B	1	5.25	9.89	5.36	15.21
	2	5.31	9.93	5.64	14.68
	3	5.22	9.97	5.45	15.46
平均值 ($\bar{x}$, mg/kg)		4.89	10.29	5.72	14.64
标准差 (SD, mg/kg)		0.40	0.41	0.67	0.63
变异系数(CV, %)		8.18	3.98	11.7	4.30
回收率(%)		97.8	82.3	114.4	117.1

2007 年发布乳制品由于引起过敏反应, 乳清蛋白(主要 β-乳球蛋白)作为牛乳中主要过敏蛋白^[11]必须在食品标签中标注。我国在 2008 年奥运会期间特地编制的《奥运会食品安全食品过敏原标识标注》首次出现了包括乳及乳制品在内的过敏原标识。

欧盟关于主要致敏物声称指南(Major Allergen

Declaration (MAD) Guidelines)相关限量没有关于 β-乳球蛋白的要求, 但本次评估实验结果表明, 市场上销售的两种试剂盒对多种食品进行 β-乳球蛋白含量检测, 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, 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] Hosta, Halkensa. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life clinical course in relation clinical and immunological type of hypersensitivity reaction [J]. Allergy, 1990, 45: 587-596.

[2] Hosta, Bahnasl. Food hypersensitivity and adverse reactions:a practical guide for diagnosis and management [M]. New York: Marcel Dekker, 1999: 99-111.

[3] Brownlow S, Morais JH, Cooper R, *et al.* Bovine -lactoglobulin at 1.8 Å resolution still an enigmatic lipocalin [J]. Structure, 1997, (5): 481-495.

[4] 罗曾玲, 高金燕, 陈红兵. 牛乳中主要过敏原的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 346-348.

[5] 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.

- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Spiked Samples for Allergen Determination (February 2006) [DB/OL]. www.r-biopharm.com
- [11] 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



张海英, 女, 工程师, 研究方向为食品安全。

E-mail: zhanghy@126.com



张霞, 女, 高级工程师, 研究方向为食品安全。

E-mail: zhangxia_75@126.com

“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