

加工食品中虾蟹类过敏原 ELISA 检测前 处理方法的研究

高静贤¹, 于治文², 王雅晴², 李振兴^{2*}

(1. 江苏省医疗器械检验所, 南京 210019; 2. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘 要: 目的 建立了一种可应用于加工食品中虾蟹类过敏原检测的前处理方法。**方法** 针对提取液和提取步骤 2 个部分选取条件先后进行优化, 通过对相应样品提取后的蛋白溶出量等进行评估, 选取最适合本 ELISA 检测的条件。**结果** 采用含有 0.5% SDS 和 0.5% DTT 的磷酸盐缓冲液(pH 8.5), 按照食物样品与提取液的 1:9 (m/V)进行混合, 在室温下均质 30 min, 3020×g 离心 15 min, 取上清液进行检测效果最佳, 此方法与 PBS(pH 7.4)溶液提取方法相比, 蛋白质溶出量增加了约 5 倍。**结论** 在已建立的检测虾蟹类过敏原夹心 ELISA 的基础上, 建立优化前处理方法进一步提高了加工食品中过敏原的提取率。

关键词: 前处理; 虾; 过敏原; 酶联免疫; 加工食品

Study on the pre-treatment method for the detection of shrimp and crab allergens in processed foods by ELISA

GAO Jing-Xian¹, YU Zhi-Wen², WANG Ya-Qing², LI Zhen-Xing^{2*}

(1. Jiangsu Testing and Inspection Institute for Medical Devices, Nanjing 210019, China; 2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: Objective To establish a pretreatment method for the detection of shrimp and crab allergens in processed foods. **Methods** The selected conditions for the two parts of the extraction solution and the extraction step were optimized successively. By evaluating the amount of protein dissolution after extraction of the corresponding samples, the most suitable conditions for this ELISA were selected. **Results** A phosphate buffer solution (pH 8.5) containing 0.5% SDS and 0.5% DTT was chosen to mix the food sample and the extract at a ratio of 1:9 (m/V). It was homogenized at room temperature for 30 min and centrifuged at 3020×g for 15 min. The result of the determination of the supernatant was the best. Compared with the PBS (pH 7.4) solution extraction method, the amount of protein extracted by this method was increased about 5 times. **Conclusion** Based on the established sandwich ELISA for the detection of allergens in shrimp and crab, the optimized pre-treatment method was established to further improve the extraction rate of allergens in processed food.

KEY WORDS: pretreatment; shrimp; allergen; ELISA; processed food

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771892)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31771892)

*通讯作者: 李振兴, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

*Corresponding author: LI Zhen-Xing, Professor, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China. E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

1 前 言

目前, 应对食物过敏最有效的方法是检测并对过敏原进行准确标注, 以供消费者识别。其中 ELISA 是食品过敏原检测中使用的主要检测方法, 其灵敏度足以检测食品中的低浓度蛋白质^[1,2]。夹心 ELISA 是目前食品行业和监管机构用于检测食品来监控食品安全性的最可靠、最常用的技术^[3]。大多数 ELISA 检测方法需要在检测前使用提取缓冲液尽可能多的溶解样品中的过敏原蛋白^[4-7], 这是由于检测过敏原含量与蛋白质在提取过程中的溶解度有关, 只有提取并溶解在缓冲液中的蛋白质才能够被检测到^[8]。然而, 市售的食品多数都是经过加工的, 研究表明食品加工等手段可能会加大免疫化学方法检测过敏原的难度^[6,9,10]。这是由于过敏原的变性或与其他组分的相互作用(如美拉德反应)导致溶解度降低或形成不溶性复合物^[9]。因此, 一些研究表明添加温和的表面活性剂如 Tween-20、SDS 和还原剂如 DTT、2-ME、Na₂SO₃ 等可降低疏水性相互作用并在变性蛋白质中裂解二硫键, 从而增加它们的溶解性^[4,7,11,12]。这也是目前前处理的主流方法, 采用变性剂和还原剂复配起到变性蛋白和断裂二硫键的目的, 最终提高蛋白的溶出情况。

过敏原前处理方法的优化目前没有系统性的方法, 本研究针对虾蟹类过敏原的 ELISA 建立了优化方法体系, 旨在优化前处理方法来为加工食品中过敏原的准确检测提供一定的技术支持, 以期提高加工食品中过敏原的提取率。

2 材料与方法

2.1 材料及仪器

鲜活南美白对虾、鱼丸等采购于青岛利群超市。兔抗

和鼠抗虾原肌球蛋白多克隆抗体(北京华大蛋白公司制备); HRP 标记的羊抗鼠 IgG(台湾 MD 公司)。

MuLtiskan MK3 酶标仪(芬兰 Labsystems 公司); TDL-5M 台式大容量冷冻离心机(长沙湘仪离心机有限公司)。

磷酸盐缓冲液(PBS, pH 2.0、6.7、7.4、8.0); Tris 盐酸缓冲液(TBS, pH 7.4、8.5); 柠檬酸盐缓冲液(CPBS, pH 4.5); 50 mmol/L Tris(pH 7.4)。

SDS 或者 DTT 的 PBS 溶液: PBS(pH 7.4), 加入 DTT 或者 SDS, 用 HCl 或 NaOH 调节 pH 至 6.7±0.10、7.8±0.10、8.5±0.10。

硼酸钠溶液(pH 9.2); 碳酸钠溶液(pH 10.6)。

2.2 虾肉蛋白粗提取

除非另有说明, 以下实验均采用隔水加热的熟虾肉(100 °C, 6 min)与提取液 1:9 (m/V)进行蛋白粗提取。

提取步骤采用了提取液均质提取、离心的方法, 因此选取了 4 个条件的优化, 分别为提取液成分浓度、离心参数、均质温度和均质时间。按照表 1 的方法改变提取条件, 通过蛋白溶出率的高低和电泳等结果综合分析来确定提取步骤中所采用的最优条件。在优化提取液成分浓度及离心参数时选取条件室温 60 min 提取粗蛋白。另外, 在优化提取剂浓度时, 为了评估在实际检测的食品基质状况, 除了提取隔水加热的熟虾肉, 还选取了生虾肉和鱼丸制品共 3 种基质同时提取进行优化实验。优化提取温度时在 4 °C、室温(room temperature, RT)、40 °C 和 60 °C 的条件下均质 60 min 提取粗蛋白。在优化均质时间时, 选取之前优化的条件并在均质时间为 1、30、60 和 120 min 的条件下提取粗蛋白。

表 1 前处理方法所有的优化条件
Table 1 All optimization conditions of preprocessing method

实验目的	图示	提取液	离心参数	温度/°C	时间/min
提取液成分优化	1	共 14 种如表 2, 包括含 SDS 和 DTT 的 PBS(pH 8.5)	3020×g, 30 min	RT	60
提取剂浓度优化	2、3	共 16 种如表 3, 包括 0.5%SDS+0.5%DTT 的 PBS(pH 8.5)	3020×g, 30 min	RT	60
离心参数优化	4	0.5%SDS+0.5%DTT 的 PBS(pH 8.5)	共 6 种, 包括 3020×g, 15 min	RT	60
均质温度优化	5	0.5%SDS+0.5%DTT 的 PBS(pH 8.5)	3020×g, 15 min	4、RT、40、60	60
均质时间优化	6	0.5%SDS+0.5%DTT 的 PBS(pH 8.5)	3020×g, 15 min	RT	1、30、60、120

注: 实验按照时间顺序先后排列。在实验过程中, 进行了条件的优化, 黑体为后续采取的实验条件, 离心参数 6 种为 3020×g, 5 min; 3020×g, 15 min; 3020×g, 30 min; 10000×g, 5 min; 10000×g, 15 min, 10000×g, 30 min。RT 为室温。

2.3 缓冲液的提取

2.3.1 提取液成分优化

提取液成分包括了缓冲液成分和 pH, 提取剂成分 3 个部分。使用 14 种不同的提取剂成分、缓冲体系和 pH 的提取液来进行虾肉蛋白粗提取。提取液成分及 pH 如表 2。提取后进行蛋白浓度的测定和 SDS-PAGE 分析。

表 2 优化提取液成分时选取的 14 种不同提取剂、缓冲液及其 pH
Table 2 Fourteen different extractants, buffers and their pHs selected when optimizing the composition of the extract

编号	提取剂或缓冲液成分	pH
1	PBS	2.0
2	CPBS	4.5
3	PBS	6.7
4	含 SDS 的 PBS	6.7
5	PBS	7.4
6	TBS	7.4
7	50 mmol/L Tris	7.4
8	含 DTT 的 PBS	7.8
9	PBS	8.0
10	TBS	8.5
11	含 DTT 的 PBS	8.5
12	含 SDS 和 DTT 的 PBS	8.5
13	硼酸钠	9.2
14	碳酸钠	10.6

注: 所有提取液按照 2.1 的方法进行配制, SDS 和 DTT 的浓度均为 0.5%。

2.3.2 提取剂浓度

在确定提取液成分后对提取剂的浓度进行进一步优化, 同时采取了熟虾, 生虾, 鱼丸 3 种基质进行提取优化。提取后进行蛋白浓度的测定和 SDS-PAGE 分析。

2.4 提取步骤

2.4.1 离心参数

选取了 2 个离心转速(3020×g 和 10000×g)和 3 种离心时间(5、15 和 30 min)。共 6 种离心参数进行提取后进行蛋白浓度和过敏原原肌球蛋白的浓度测定。

2.4.2 均质温度

选取了 4 个均质温度、4 °C、RT、40 °C 和 60 °C 提取后进行蛋白浓度和过敏原原肌球蛋白的浓度测定。

2.4.3 均质时间

选取了 4 个均质时间 1、30、60 和 120 min 提取后进行蛋白浓度和过敏原原肌球蛋白的浓度测定。

表 3 优化提取剂浓度时所选取的缓冲液成分

Table 3 Buffer components selected when optimizing the extract concentration

编号	SDS 浓度/%	DTT 浓度/%
1	1	2
2	0.5	2
3	0.25	2
4	0	2
5	1	1
6	0.5	1
7	0.25	1
8	0	1
9	1	0.5
10	0.5	0.5
11	0.25	0.5
12	0	0.5
13	1	0
14	0.5	0
15	0.25	0
16	0	0

注: 提取缓冲体系均为 PBS, pH 为 8.5。

2.5 蛋白浓度测定

蛋白溶出率是评定提取优化结果的关键性数据之一, 由于提取剂成分复杂, 所含有的 SDS、DTT 等成分会对 BCA 和考马斯亮蓝等主流的蛋白浓度测定方法产品负面影响而不能准确定量。因此经过预实验分析最终选用考马斯亮蓝的蛋白浓度测定方法, 在一定的稀释倍数后, 提取剂的某些成分不会对检测产生影响。

2.6 SDS-PAGE 分析

参考文献的方法略改动。实验中所用到的分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%。上样量 10 μg, 电泳结束后使用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 2 h, 换用脱色液进行脱色, 拍照保存^[13]。

2.7 夹心 ELISA

本方法采用本团队先前建立的夹心 ELISA 方法^[14]对提取液及提取步骤优化的样品进行测定, 对优化结果进一步分析。将兔多克隆抗体用 CBS 包被缓冲液稀释 2000 倍, 每孔加 100 μL, 4 °C 下过夜。倒掉包被液, 用 PBST 洗 3 次, 拍干。每孔再加 300 μL 封闭液, 37 °C 下孵育 2 h, 然后用 PBST 洗 3 次, 拍干。将原肌球蛋白用 PBS 梯度稀释分别

为 13.67、27.3、54.69、109.38、218.75、437.5 ng/mL, 每孔加 100 μ L, 空白对照孔用 PBS 代替原肌球蛋白。37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5 h, 之后拍掉, 用 PBST 冲洗 3 次。再将鼠多克隆抗体和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 分别稀释 2500 倍, 再将 2 种抗体充分混合, 每孔加入 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5 h, 之后拍掉, 用 PBST 冲洗 3 次, 拍干。每孔加入 100 μ L TMB 单组份显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min。取出后马上每孔加入 50 μ L 终止液来终止反应, 450 nm 下测吸光值。

3 结果与分析

3.1 提取缓冲液优化

提取缓冲液的优化分为提取液成分优化和提取剂浓度优化 2 个部分, 首先通过提取液成分优化确定了含有 SDS 和 DTT 的 PBS 溶液, pH 8.5, 再通过提取剂浓度的优化确定 SDS 和 DTT 的最佳浓度, 最终选取了 0.5% SDS 和 0.5% DTT 的 PBS 溶液, pH 8.5 进行后续的提取步骤优化。

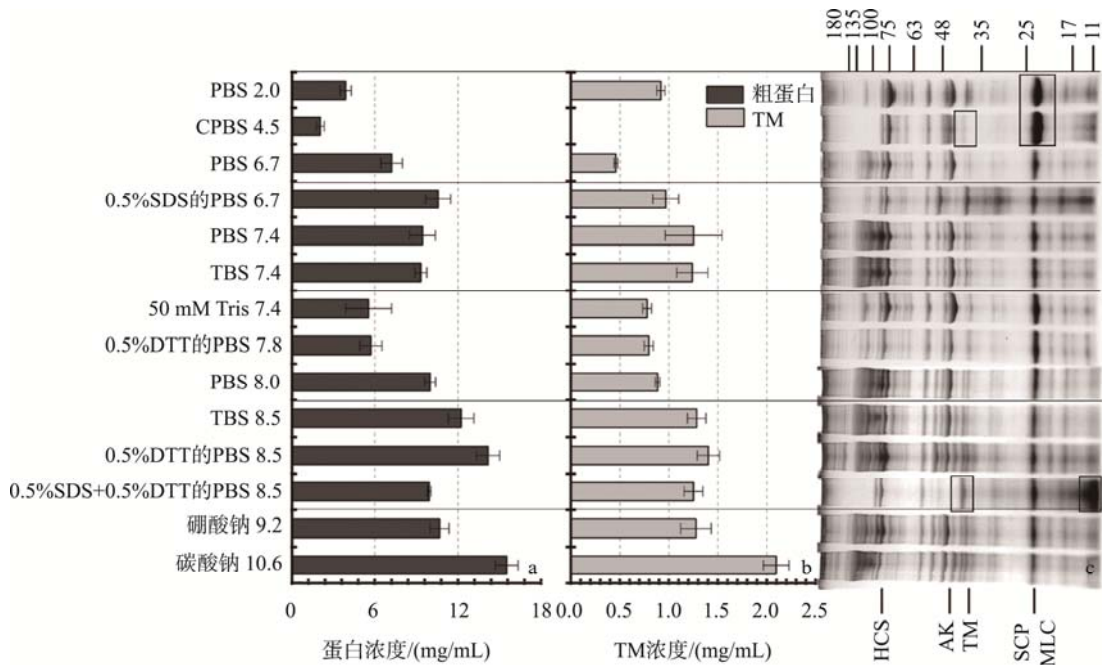
3.1.1 提取液成分优化

在提取液的优化上有很多相关研究, 大都是在一定的缓冲液体系下, 选择数种提取剂成分和一定的 pH 环境来提高蛋白的溶出量。在缓冲液体系上主要有磷酸缓冲体系、Tris 缓冲液体系, 提取剂成份上有变性剂、还原剂, 变性剂主要起到使蛋白质变性的作用, 而还原剂可以打开蛋白质间的二硫键来提高蛋白溶出率。本研究综合了缓冲液、提取剂和 pH 3 个方面的要求选取了 14 种提取液进行优化。

14 种不同提取剂和 pH 下的提取液对虾肉粗蛋白提取的结果如图 1a 所示, 从 pH 的变化上分析, 可以看出 PBS、TBS 和 DTT 提取剂组分在 pH 8.0~8.5 时和相同组分在 pH 6.7~7.8 时的蛋白浓度提高了 38.6%~148.3%, 而且在各种缓冲液中, pH 8.0 时蛋白浓度基本是最高的。在柠檬酸缓冲液(CPBS, pH 4.5)中, 蛋白溶出浓度最低, 在碳酸钠溶液(pH 10.6)中, 蛋白溶出浓度最高。

在相同 pH 下的不同缓冲液的蛋白溶出率不同(图 1a), 在 pH 7.4 时, PBS 与 TBS 相比溶出蛋白浓度变化不显著, 但 PBS 比 50 mmol/L Tris 高了 70.0%。在 pH 7.4~7.8 时, 向 PBS 中加入还原剂 DTT 会减少蛋白浓度 39.5%, pH 6.7 时加入变性剂 SDS 会增加蛋白浓度 46.6%, 在 pH 8.0~8.5 时, 同时加入 SDS 和 DTT 不会显著改变蛋白浓度。提取得到的过敏原原肌球蛋白 TM 的浓度和蛋白浓度的规律变化基本一致(图 1b)。

目前已经鉴定出的水产品甲壳类过敏原有原肌球蛋白(tropomyosin, TM)、精氨酸激酶(arginine kinase, AK)、肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)、肌质钙结合蛋白(sarcoplasmic calcium-binding protein, SCP)和血蓝蛋白亚基(hemocyanin subunits, HCS)^[15]。通过图 1c 的电泳图对虾粗蛋白的上述蛋白组分进行分析, 不同的提取剂对所提取的蛋白组分也存在影响。在提取液中存在 SDS 时, 原肌球蛋白分子量处的条带占全蛋白的主要蛋白, 而在提取剂为 CPBS 时, 原肌球蛋白的分子量处未现出明显条带, 并且



注: a. 提取液蛋白浓度; b. 提取液中 TM 浓度; c. 提取液的 SDS-PAGE 分析。

图 1 采用 14 种不同 pH、缓冲液及提取剂的提取液提取熟虾肉的蛋白溶出和过敏原原肌球蛋白

Fig.1 Fourteen different pH, buffer and extractant extracts were used to extract the protein dissolution and allergen tropomyosin of cooked shrimp

如图 1b 未检出过敏原原肌球蛋白, 这是由于 pH 4.5 为原肌球蛋白的等电点^[16,17], 导致原肌球蛋白沉淀未溶解, 这也可以从侧面说明本文采用的前处理方式可以充分发挥提取剂成分的功能。甲壳类动物重要过敏原精氨酸激酶(AK), 其相对分子质量约为 40 kDa^[18,19], 仅在 0.5%SDS+0.5%DTT 的 PBS 提取剂下在 40 kDa 处未现明显条带。Ayuso 等发现肌球蛋白轻链(MLC)是凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)新型过敏原^[20], MLC 在 pH 2.0~4.5 时, 在其分子量 20 kDa 处的条带颜色较深。Shiomi 等发现肌质钙结合蛋白(SCP)是斑节对虾(*Penaeus monodon*)的新型过敏原^[21], 其分子量 20 kDa 与 MLC 一致, 因此 20 kDa 处的条带较深可能是由于存在 2 种过敏原蛋白。作为甲壳类过敏原之一的血蓝蛋白亚基(HCS)分子量在 73~75 kDa^[22], 它的分子量处的条带在各种提取剂之间差距不大。

综合分析, 采用 SDS 和 DTT 为提取剂, PBS 为缓冲体系时的提取液, 提取的蛋白浓度较高, 高分子量的杂蛋白少, TM 占主要的过敏原。对比以往的研究, Lin 等研究表明, 采用 DTT 和 Tween-20 作为提取剂的缓冲液可以提高虾肉的提取蛋白浓度^[23]。Seiki 和 Watanabe 等均采用 SDS 和 2-ME 复配的提取剂成分^[24-27], 前者团队中 Koizumi 等对此方法进行了后续改良, 将 2-ME 替换成 Na_2SO_3 ^[12], 将 Na_2SO_3 作为还原剂替代了高挥发性有毒性的 2-ME。这些过敏原的提取液均采用了变性剂和还原剂的复配, 来达到提高蛋白溶出的目的, 但是并没有对不同 pH 进行优化, 而且变性剂和还原剂的浓度采用的也没有依据。因此在确定采用 SDS 和 DTT 为提取剂、PBS 为缓冲体系时的提取液、pH 为 8.5 的提取液成分及 pH 后还有必要对提取剂浓度其进行进一步优化。

3.1.2 前处理提取剂浓度优化

通过前一节我们确定了提取剂(SDS 和 DTT)和缓冲液(PBS)的成分和 pH(8.5), 下面对提取剂的浓度进一步优化, 通过不同浓度提取剂提取下的蛋白溶出情况来评估。参考以往文献中的提取剂浓度经过修改, 选择了 SDS 浓度分别为 0、0.25%、0.5%、1%; DTT 浓度分别为 0、0.5%、1%、2%, 如表 3, 配置了 16 种不同提取剂浓度的提取液, 并且为了模拟在实际检测时食品基质多样性的情况, 同时提取了 3 种基质, 鱼丸制品, 生虾肉和隔水加热的熟虾肉。

16 种不同浓度提取剂的提取液对 3 种基质下提取的粗蛋白浓度如图 2 所示, 在 3 种基质中, 蛋白溶出浓度的整体趋势是随着 SDS 和 DTT 浓度升高而升高的。在鱼丸基质中(图 2a), 提取剂含有 DTT 时, 随着 SDS 浓度从 0.25%提升至 0.5%, 蛋白溶出度增加了 24.6%~60.7%, 而随着 SDS 浓度从 0.5%提升至 1%, 蛋白溶出度减少了 29.6%~36.9%。而当提取剂含有 SDS 时, 蛋白溶出浓度随 DTT 浓度变化不显著。在生虾基质中(图 2b), 随着 SDS 浓

度从 0.25% 提升至 0.5%, 蛋白溶出度增加了 28.5%~113.8%。当 SDS 浓度继续提高无显著性变化, 并且 DTT 的加入对蛋白溶出也无显著性影响。在熟虾基质中(图 2c), 在 DTT 浓度为 0~1%时, 随着 SDS 浓度从 0.25%提升至 0.5%, 蛋白溶出度增加了 26.9%~29.6%, 随着 SDS 浓度从 0.5%提升至 0.1%, 蛋白溶出度增加了 53.2%~81.6%。而在 DTT 浓度为 2%时, 随着 SDS 浓度从 0.25%提升至 0.5%, 蛋白溶出度增加了 140.2%。综合分析表明, 鱼丸基质下, SDS 和 DTT 都会增加基质的提取蛋白浓度, 都在 0.5%浓度时可达到最高水平, 并且当 SDS 增加到 1%的浓度时反而起到反作用, 推测是由于鱼丸基质相比于纯虾肉基质所含的蛋白相对较少, 较高的 SDS 浓度起到了反作用将蛋白质沉淀而不能溶于提取液。生虾基质中, SDS 和 DTT 同样在均为 0.5%的浓度时蛋白溶出浓度达到最高水平, 但继续提高提取剂浓度无显著降低。熟虾基质中, SDS 和 DTT 浓度分别在 1%和 2%时蛋白溶出浓度达到最高水平。

再进一步分析, 当 SDS 和 DTT 浓度均为 0.5%时, 3 种基质下提取的蛋白溶出浓度相比于未加任何提取剂时平均增加了 5 倍。相比于 Watanabe 等针对蛋类过敏原提取剂的优化上, 采用 SDS 和 2-ME 将提取的蛋白提高的 10~100 倍^[27], 本方法可以显著提高所提取的蛋白浓度。

为了更直观的显示出提取剂提取全蛋白的情况, 进行 SDS-PAGE 分析, 通过图 3 可以看出, 电泳上条带的深浅和多少整体趋势与蛋白浓度一致。通过电泳图谱上的原肌球蛋白分子量处观察, 所有的提取剂都有明显的条带出现。

因此我们最终优化的提取液为 0.5% SDS, 0.5% DTT 的 PBS 溶液, pH 8.5。

3.2 前处理提取步骤优化

提取液优化完毕, 为 0.5% SDS 和 0.5% DTT 的 PBS 溶液, pH 8.5。根据表 1 继续对提取步骤进行优化, 分为离心参数优化、均质温度优化和均质时间优化。

3.2.1 离心参数优化

离心参数选取了转速 3020×g、10000×g; 时间 5、15、30 min。如图 4 所示, 6 种离心参数下, 提取的蛋白浓度和 TM 浓度并未随着参数的高低有规律性变化, 但是在 3020 g, 15 min 的离心参数条件下提取蛋白浓度最高, 检测 TM 浓度也较高, 因此选择了离心参数 3020 g, 15 min 作为后续实验参数。

3.2.2 均质时间优化

均质时间选取了 1 min、30 min、1 h(60 min)和 2 h(120 min)4 个参数, 从蛋白溶出浓度变化上(图 5a), 均质时间从 1 min 增加到 1 h 后, 蛋白溶出浓度提高了 51.2%, 而 2 h 均质时间的蛋白溶出浓度相比于 1 h 的反而降低了 32.5%。这与 Walczyk 等^[28]的研究结果相似, 较长的提取均质时间

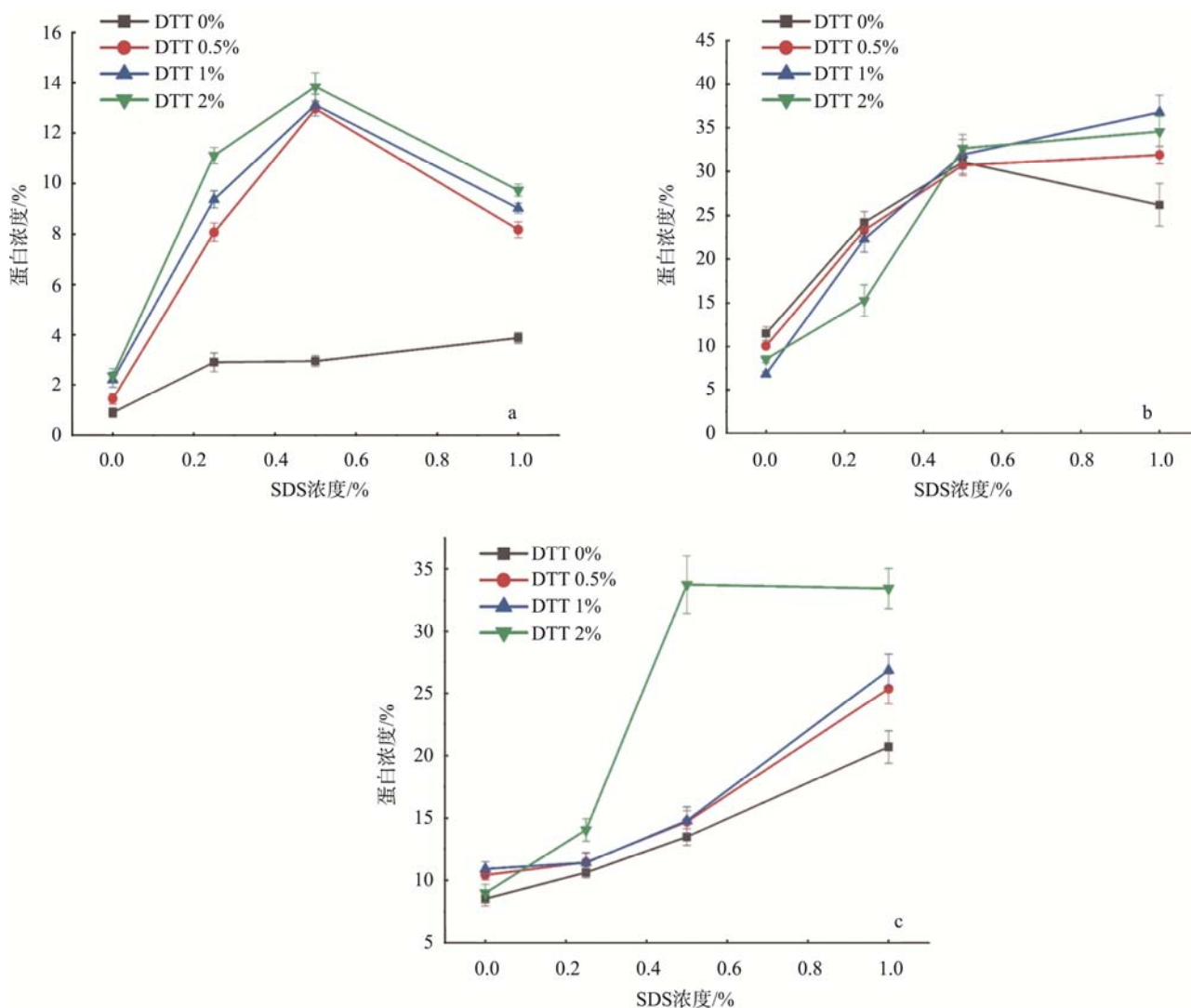
会降低蛋白溶出量。在过敏原原肌球蛋白的提取上(图 5b), 30 min 的均质时间提取率最高为 47.2%。同时考虑缩短检测时间等因素, 最终选取 30 min 的均质时间继续如下实验。

3.2.3 均质温度优化

均质温度同样选取了 4 个参数, 分别为 4 °C、RT、40 °C 和 60 °C。从蛋白溶出浓度变化上(图 6a), 均质温度从 4 °C 增加到 60 °C 后, 蛋白溶出浓度降低了 51.7%, 并且在 4 °C 时蛋白溶出浓度最高, 随着温度的升高, 提取的蛋白含量逐渐减少, 推测是由于较高的温度导致蛋白变性沉淀。最终考虑检测便捷等因素, 最终选取室温(room temperature, RT)的均质温度继续如下实验。

3.3 前处理方法的应用

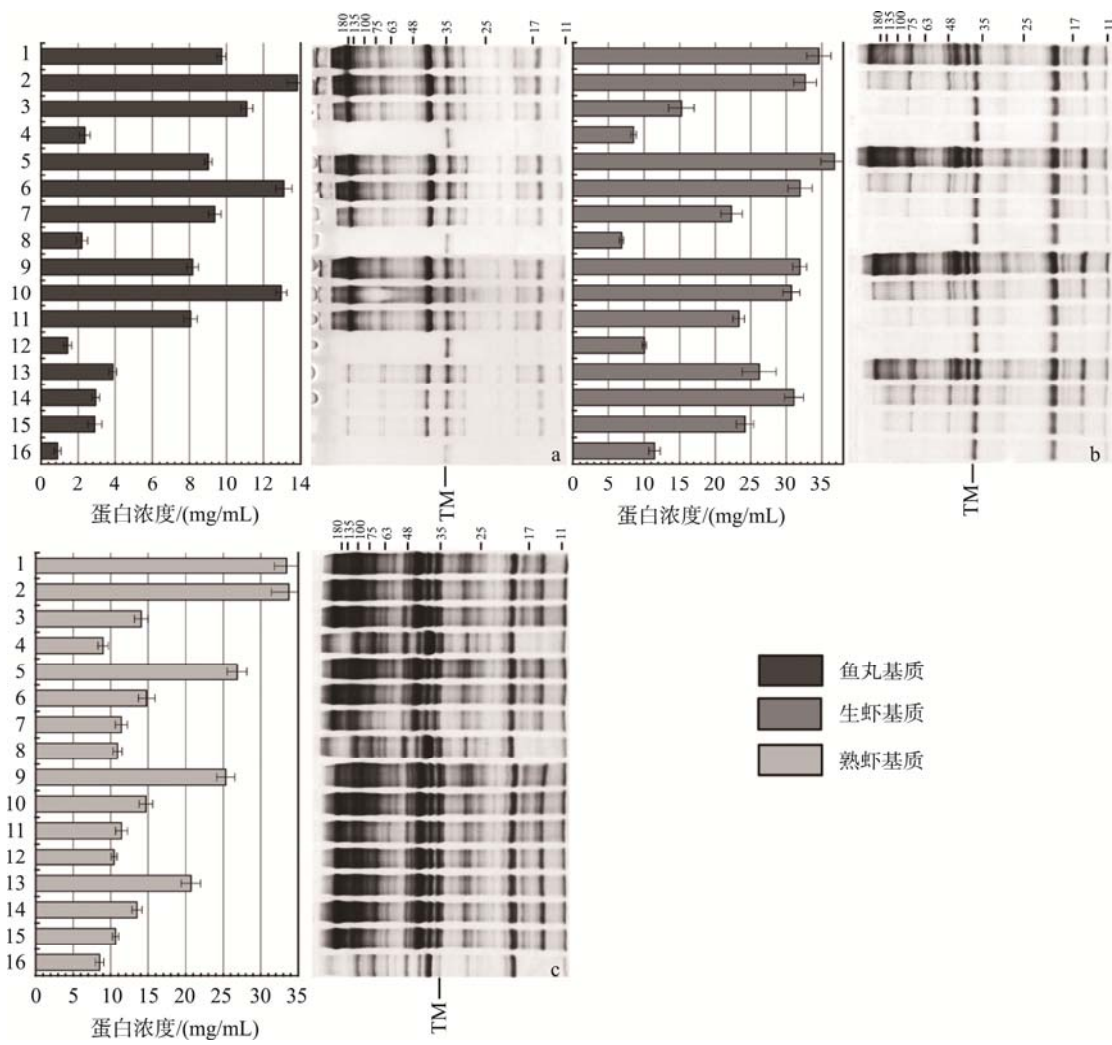
选购了市面上 5 种加工食品虾味饼干、虾味豌豆、鱼肉丸、虾酱和三文鱼火腿肠, 5 种食品的标签标注均为“含有甲壳类过敏原”或“可能含有甲壳类过敏原”。对这 5 种食品采用优化的前处理方法和 PBS(pH 7.4)提取 2 种方法提取后经过 ELISA 检测, 通过检测到的 TM 含量的高低进行对比评估。如图 7 的结果所示, PBS(pH 7.4)提取未检出可能含有过敏原的鱼丸样品, 所以本前处理方法在鱼丸等虾蟹类常见的基质中明显优于 PBS(pH 7.4)提取, 在其他类型基质中优化的前处理方法的检测 TM 含量也是高于 PBS(pH 7.4)提取的, 因此本方法在对于虾蟹类常见的食品基质有更高的提取过敏原能力。



注: a. 鱼丸基质; b. 生虾基质; c. 熟虾基质。

图 2 使用不同配比的提取液在 3 种基质中的蛋白溶出情况

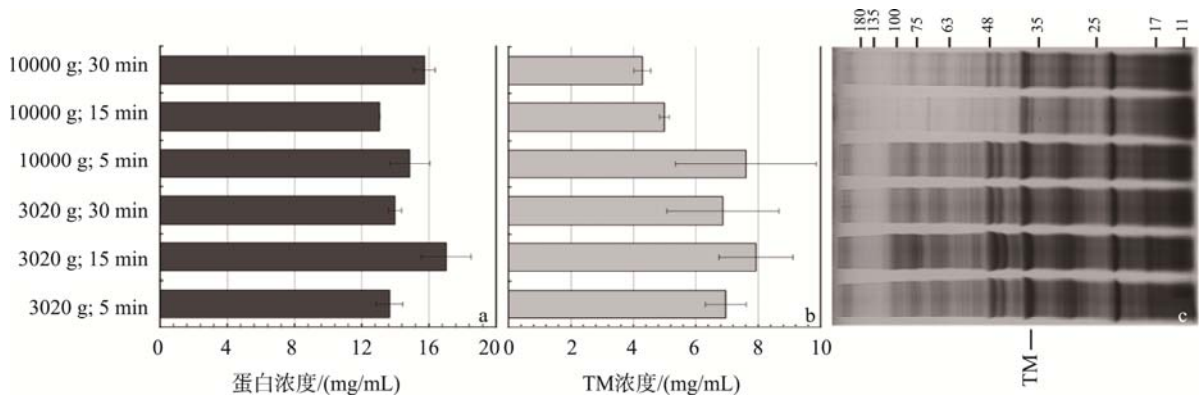
Fig.2 Protein dissolution in three matrices using different ratios of extraction solutions



注: a. 鱼丸基质; b. 生虾基质; c. 熟虾基质。(纵坐标 1~16 如表 3)

图 3 使用不同配比的提取液在 3 种基质中的蛋白溶出情况和 SDS-PAGE 分析

Fig.3 Protein dissolution and SDS-PAGE analysis in three matrices using different ratios of extracts



注: a. 蛋白浓度; b. TM 浓度; c. SDS-PAGE。

图 4 不同离心参数对粗蛋白和原肌球蛋白提取及检测的影响

Fig.4 Effects of different centrifugation parameters on the extraction and detection of crude protein and tropomyosin

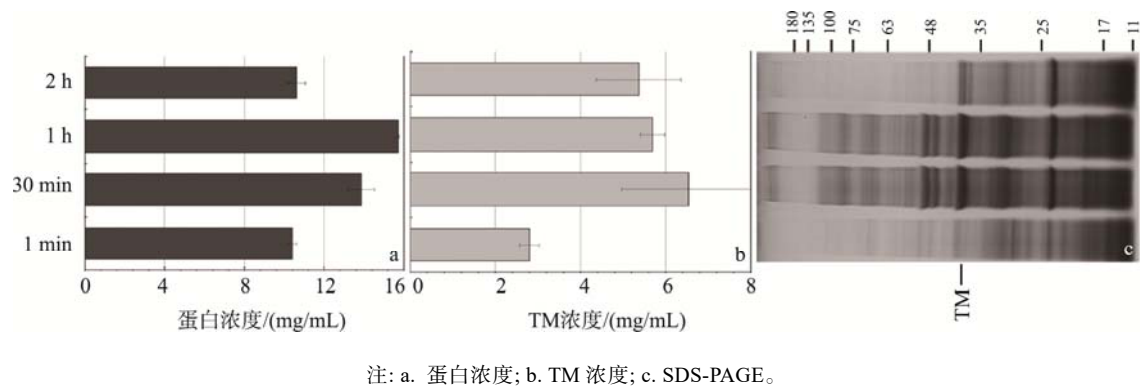


图 5 不同均质时间对粗蛋白和原肌球蛋白提取及检测的影响

Fig.5 Effect of different homogenization times on extraction and detection of crude protein and tropomyosin

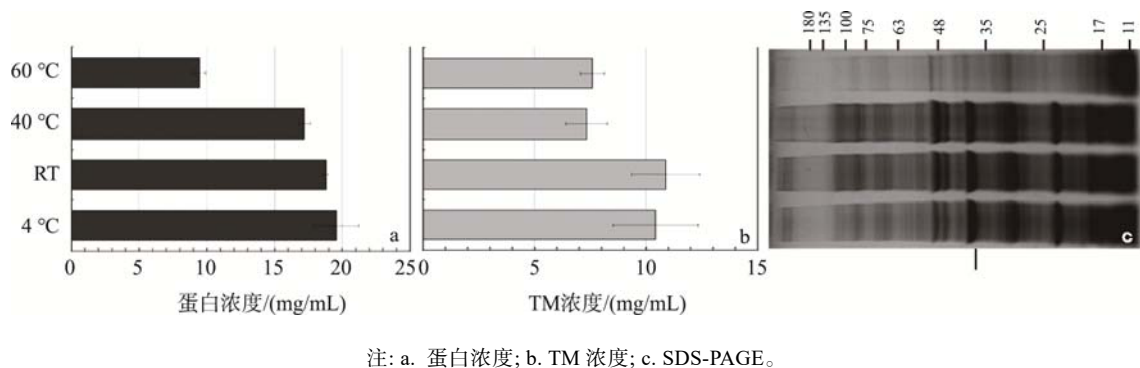


图 6 不同均质温度对粗蛋白和原肌球蛋白提取及检测的影响

Fig.6 Effects of different homogenization temperatures on extraction and detection of crude protein and tropomyosin

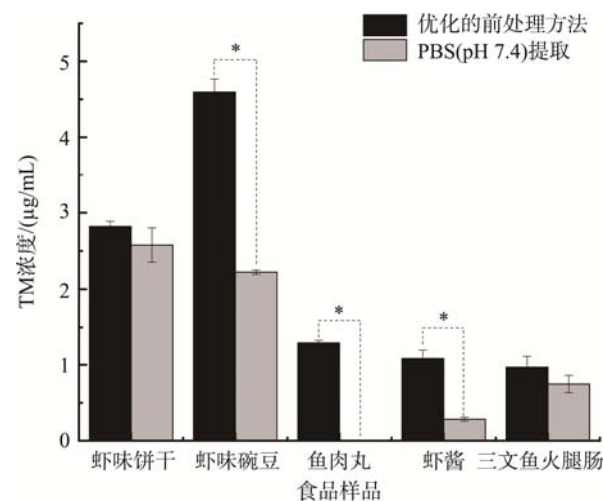


图 7 2 种前处理方法下的食品样品 ELISA 过敏原 TM 检测浓度
Fig.7 Concentrations of commercial food ELISA allergen TM detected by two pretreatment methods

4 结 论

本研究在本实验室先前开发建立的 ELISA 基础上, 建立了一种应用于食品基质下检测过敏原的前处理方法即

含 0.5% SDS 和 0.5% DTT 的 PBS 提取液, 溶液 pH 8.5, 室温下均质 30 min, 最终 3020 $\times$ g 离心 15 min 取得上清进行检测。此方法较 PBS(pH 7.4)溶液提取的方法, 其蛋白质溶出量增加了 5 倍。

参考文献

[1] Monaci L, Visconti A. Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives [J]. *Trend Food Sci Tech*, 2010, 21(6): 272–283.

[2] Yeung J. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in foods [M]. Netherlands: Elsevier, 2006.

[3] Poms R, Agazzi M, Bau A, *et al.* Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate [J]. *Food Addit Contam*, 2005, 22(2): 104–112.

[4] Albillos SM, Al-Taher F, Maks N. Increasing extractability of protein for allergen detection after food processing [J]. *Food Chem*, 2011, 127(4): 1831–1834.

[5] Poms RE, Capelletti C, Anklam E. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2004, 48(6): 459–464.

[6] Schmitt DA, Nesbit JB, Hurlburt BK, *et al.* Processing can alter the properties of peanut extract preparations [J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58(2): 1138–1143.

- [7] Steinhoff M, Fischer M, Paschke-Kratzin A. Comparison of extraction conditions for milk and hen's egg allergens [J]. Food Addit Contam, 2011, 28(4): 373–383.
- [8] Poms R, Klein C, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review [J]. Food Addit Contam, 2004, 21(1): 1–31.
- [9] Downs ML, Taylor SL. Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix [J]. J Agr Food Chem, 2010, 58(18): 10085–10091.
- [10] Fu TJ, Maks N. Impact of thermal processing on ELISA detection of peanut allergens [J]. J Agr Food Chem, 2013, 61(24): 5649–5658.
- [11] Hildebrandt S, Steinhart H, Paschke A. Comparison of different extraction solutions for the analysis of allergens in hen's egg [J]. Food Chem, 2008, 108(3): 1088–1093.
- [12] Koizumi D, Shirota K, Oda H, et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using a nonpoisonous extraction system for the determination of crustacean protein in processed foods [J]. J AOAC Int, 2018, 101(3): 798–804.
- [13] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- [14] Yu Z, Wang Y, Li Z, et al. Development of ELISA method for detecting crustacean major allergen tropomyosin in processed food samples [J]. Food Anal Method, 2019.
- [15] Lehrer S, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review [J]. Mar Biotechnol, 2003, 5(4): 339–348.
- [16] Reese G, Jeoung BJ, Daul CB, et al. Characterization of recombinant shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) [J]. Int Arch Allergy Imm, 1997, 113(1-3): 240–242.
- [17] 王晓斐. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)主要过敏原的鉴定及性质研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- Wang XF. Identification and properties of major allergen from Chinese shrimp, *Penaeus chinensis* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [18] Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, et al. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Penm2 [J]. J Immunol, 2003, 170(1): 445–453.
- [19] Shen Y, Cao MJ, Cai QF, et al. Purification, cloning, expression and immunological analysis of *Scylla serrata* arginine kinase, the crab allergen [J]. J Sci Food Agr, 2011, 91(7): 1326–1335.
- [20] Ayuso R, Grishina G, Bardina L, et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3 [J]. J Allergy Clin Immun, 2008, 122(4): 795–802.
- [21] Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, et al. Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Int Arch Allergy Imm, 2008, 146(2): 91–98.
- [22] 宋益银, 林蕾, 苏秀榕, 等. 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)特异性过敏原的研究 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 62–67.
- Song YY, Lin L, Su XR, Wang CL, et al. The specific allergens in crab *Scylla Serrata* [J]. Oceanologia Limnologia Sin, 2009, 40(1): 62–67.
- [23] Lin SY, Lee CH, Huang ES, et al. Quantification of crustacean tropomyosin, a major food allergen, in eight species of taiwanese shrimp based on immunoassay [J]. Food Anal Method, 2018, 11(9): 2607–2613.
- [24] Seiki K, Oda H, Yoshioka H, et al. A Reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods [J]. J Agr Food Chem, 2007, 55(23): 9345–9350.
- [25] Wu L, Lin H, Wang G, et al. Comparative study on the allergenicity of different *Litopenaeus vannamei* extract solutions [J]. J Ocean Univ Chin, 2014, 13(1): 157–162.
- [26] Zhenxing L, Hong L, Limin C, et al. Impact of irradiation and thermal processing on the immunoreactivity of shrimp (*Penaeus vannamei*) proteins [J]. J Sci Food Agr, 2007, 87(6): 951–956.
- [27] Watanabe Y, Aburatani K, Mizumura T, et al. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent [J]. J Immun Method, 2005, 300(1-2): 115–123.
- [28] Walczyk NE, Smith PM, Tovey ER, et al. Peanut protein extraction conditions strongly influence yield of allergens Ara h 1 and 2 and sensitivity of immunoassays [J]. Food Chem, 2017, 221: 335–344.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



高静贤, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为临床检验相关产品审评和验证工作。
E-mail: gaojxnuaa@sina.com



李振兴, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn