

燕窝唾液酸糖蛋白间接竞争酶联免疫 检测方法的建立

何金麟¹, 王仍瑞¹, 张世伟², 冯荣虎², 范群艳³, 柳训才³, 徐敦明^{1*}

(1. 厦门海关技术中心, 厦门 361026; 2. 深圳市计量质量检测研究院, 深圳 518102;
3. 厦门市燕之屋丝浓食品有限公司, 厦门 361100)

摘要: **目的** 建立间接竞争酶联免疫(indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, IC-ELISA)检测燕窝中唾液酸糖蛋白的分析方法。**方法** 以唾液酸糖蛋白为抗原, 制备单克隆抗体, 对 IC-ELISA 步骤中相关参数进行优化, 确定最佳反应条件。**结果** 最佳包被抗原为 1:2000, 抗体稀释倍数为 1:5000; 封闭液浓度为 1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), 封闭时间为 150 min; 竞争时间 30 min; 酶标二抗浓度稀释倍数为 1:1000, 孵育时间 30 min; 显色时间为 10 min。建立的 IC-ELISA 检测方法半抑制浓度(50% inhibition concentration, IC₅₀)为 8.61 μg/mL, 线性范围为 2.23~33.25 μg/mL, 回收率为 82.7%~92.0%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSDs)为 1.7%~8.9%。**结论** 该方法灵敏度较高、特异性强, 可以有效地鉴别假冒伪劣燕窝产品, 具有较好的实际应用价值。

关键词: 燕窝; 唾液酸糖蛋白; 间接竞争酶联免疫分析法

Establishment of indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of sialoglycoprotein of edible bird's nest

HE Jin-Lin¹, WANG Reng-Rui¹, ZHANG Shi-Wei², FENG Rong-Hu²,
FAN Qun-Yan³, LIU Xun-Cai³, XU Dun-Ming^{1*}

(1. Technical Center of Xiamen Customs, Xiamen 361026, China; 2. Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen 518102, China; 3. Yan Palace Seelong Food Co., Ltd., Xiamen 361100, China)

ABSTRACT: Objective To establish an indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay (IC-ELISA) method for the detection of sialoglycoprotein in edible bird's nest. **Methods** Monoclonal antibody was prepared with sialoglycoprotein as antigen, and the relevant parameters in IC-ELISA step were optimized to determine the optimal reaction conditions. **Results** The optimal coating antigen was determined to be 1:2000, and the dilution of antibody was 1:5000. The concentration of blocking liquid was 1% bovine serum albumin (BSA) and the blocking time was 150 min. Competition time was 30 min. The concentration dilution of enzyme-conjugate secondary antibody was 1:1000. The incubation time was 30 min and colouration time was 10 min. The results showed that the 50% inhibition concentration (IC₅₀) of the established IC-ELISA was 8.61 μg/mL. The linear range was 2.23–33.25 μg/mL and the recoveries were between 82.7%–92.0%, with relative standard deviations (RSDs) of 1.7%–8.9%. **Conclusion** This method has high

基金项目: 海关总署科研项目(2021HK198)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of the General Administrator of Customs (2021HK198)

*通信作者: 徐敦明, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: Dunmingxu@163.com

*Corresponding author: XU Dun-Ming, Ph.D, Professor, Technical Center of Xiamen Customs, No.259, Dongdu Road, Huli District, Xiamen 361026, China. E-mail: Dunmingxu@163.com

sensitivity and specificity, which can be used for effectively identify fake bird's nest products and has good practical application value.

KEY WORDS: edible bird's nest; sialoglycoprotein; indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay

0 引言

燕窝是由雨燕科(Apodidae)金丝燕(*Aerodramus*)、侏金丝燕(*Collocalia*)、雨燕(*Apus*)属等燕类用舌下腺分泌物与绒羽等混合凝结所筑的巢窝^[1-2], 主产于东南亚沿海地区^[3-5], 如印度尼西亚、马来西亚、泰国等。燕窝提取物具有多种功效, 如抗氧化^[6]、改善免疫^[7-8]、延缓衰老^[9]、抗病毒^[10]、抑制血凝^[11]、提高学习和记忆能力^[12-13]等, 深受广大消费者喜爱。燕窝价格昂贵, 不法商人因利益驱使利用掺假手段销售假燕窝牟取暴利, 仅凭感官评价很难区分真假燕窝。目前燕窝的真伪鉴别方法有经验鉴别和显微鉴别^[14]、一般理化分析^[15-18]、酶联免疫分析^[19]和分子生物学检测^[20-24]等方法。燕窝是唾液腺的分泌物, 并不存在组织细胞的特征, 因此经验鉴别和显微鉴别法可靠性不高且不适用于燕窝加工品。燕窝糖蛋白中含有大量的唾液酸^[25], 过去将唾液酸的检测来鉴别燕窝真伪^[26], 然而唾液酸作为一种可以人工添加的工业产品, 用理化分析检测唾液酸来评价即食燕窝的质量指标意义不大。分子生物学检测技术因其灵敏度和特异性高得到广泛应用^[27]。LIN 等^[28]建立了以线粒体细胞色素 b 基因为靶标的燕窝遗传学分子鉴定方法, 认为该方法具有用于燕窝真伪鉴定的可能性。WU 等^[29]采用实时荧光聚合酶链式反应法(polymerase chain reaction, PCR)和双向电泳法, 以上两种方法可用于燕窝真伪的鉴别, 但由于燕窝制品需要经长时间的热处理过程, 核酸高温降解, 导致扩增难度大且不易实现定量。

酶联免疫分析方法因其快速、高通量、低成本^[30-31]等优势被越来越多地应用于食品检测领域。燕窝中的唾液酸大部分以糖蛋白的形式存在^[32], 可以作为燕窝中的特征物质且目前无法通过燕窝以外的其他渠道获得。该蛋白在不同燕窝中含量稳定, 可作为燕窝的指示蛋白^[33]和燕窝真实性的鉴定靶标。张世伟等^[34]利用双抗夹心酶联免疫分析方法检测燕窝中唾液酸糖蛋白, 实验结果显示该方法灵敏度高、重复性好。但因蛋白质的降解或变性会破坏抗原决定因子, 该方法无法检测经过热处理后的唾液酸糖蛋白。相比而言, 间接竞争酶联免疫(indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, IC-ELISA)分析法可以与经过热处理后的唾液酸糖蛋白反应, 且通常具有更快的分析速度, 重复性好。因此本研究建立检测燕窝中唾液酸糖蛋白的 IC-ELISA 分析方法, 对燕窝尤其是燕窝加工制品的唾液酸糖蛋白进行定量检测, 一方面可以为执法部门提供技术支持, 打击市场上的假冒伪劣产品, 保护消费者利益; 另

一方面为研究和开展其他食品的属性鉴别技术研究提供思路 and 参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)、卵白蛋白、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司); 氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)、碳酸钠(Na₂CO₃)、碳酸氢钠(NaHCO₃)、浓硫酸(H₂SO₄)、吐温-20 (Tween-20)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 尿素(分析纯, 北京雷根生物公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(horseradish peroxidase-immunoglobulin G, HRP-IgG)(分析纯, 英国 Abcam 公司); BALB/c 小鼠 A 购自中山大学医学院动物中心。

1.1.2 仪器

Bio-Rad 伯乐高电压等电聚焦电泳(美国伯乐公司); T25 均质器、MS3 振荡器、MS3 BASIC 漩涡混匀器(德国 IKA 公司); P/ACE MDQ 毛细管电泳系统(美国 Sciex 公司); JY92-IIN 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); KBF240 恒温恒湿培养箱(德国宾德公司); TGL-16G 高速离心机(上海安亭公司); SPARK 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); BSA224S-CW 万分之一电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); Step One Plus 荧光 PCR 仪(美国赛默飞世尔公司); Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 燕窝抗原及抗体的制备

燕窝样品均质成粉状后测定蛋白质含量。称取研磨后的燕窝均质样品 50 mg, 加入 5 mL 8 mol/L 尿素水溶液, 在振荡器上均质 10 min, 浸泡 12 h。使用超声破碎仪提取 5 min 后离心。采用 ZHANG 等^[33]和张世伟等^[34]的方法对燕窝唾液酸糖蛋白进行分离纯化, 将其作为抗原免疫 BALB/c 小鼠制备单克隆抗体。

1.2.2 IC-ELISA 方法的建立

包被: 将燕窝唾液酸糖蛋白标准溶液稀释后, 每孔加入 100 μ L 于 96 孔板中, 4 $^{\circ}$ C 过夜反应。每孔加磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline tween-20, PBST)溶液 250 μ L 洗板一遍。封闭: 每孔加入 200 μ L 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 反应封闭一段时间。然后加入 250 μ L 的 PBST 溶液洗板, 重复 3 次。加样: 每孔加入 50 μ L 标准燕窝标准溶液或样品溶液, 再

加 50 μL 稀释后的腹水抗体工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应, 洗板同上。二抗反应: 每孔加入 100 μL 酶标二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 洗板同上。显色: 加入 100 μL 底物显色液, 室温避光反应。终止: 每孔加入 50 μL 的 H_2SO_4 溶液终止反应, 用酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值。采用齐荫等^[35]方法配制 ELISA 反应检测试液。

1.2.3 IC-ELISA 方法的优化

(1) 包被原、抗体最佳浓度的选择

设置包被抗原稀释倍数为 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000 和 1:16000, 单克隆抗体用稀释倍数为 1:1250、1:2500、1:5000、1:10000、1:20000、1:40000 和 1:80000 的不同梯度稀释倍数。测定 OD 值, 确定包被抗原和单克隆抗体最佳工作浓度。

(2) 封闭条件的筛选

分别建立 BSA 浓度为 0.5%、1.0%、2.0% ($m:V$) 以及封闭时间为 90、120、150 和 180 min 的抑制曲线, 确定封闭条件对分析的影响。

(3) 最佳竞争时间

分别建立标品与单克隆抗体竞争时间为 15、30、60 和 90 min 的抑制曲线, 确定竞争时间对分析的影响。

(4) HRP-IgG 工作条件的优化

HRP-IgG 按照 1:500、1:1000、1:2000、1:4000 和 1:8000 进行稀释, 建立 HRP-IgG 作用时间为 20、25、30 和 40 min 的抑制曲线, 确定 HRP-IgG 不同条件对分析的影响。

(5) 底物最佳作用时间的优化

分别建立显色时间为 5、10、15 和 20 min 的抑制曲线, 确定底物作用时间对分析的影响。

1.2.4 IC-ELISA 灵敏度的测定

配制质量浓度为 80.0、40.0、20.0、10.0、5.0、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的燕窝标准溶液, 按照已优化的 IC-ELISA 条件操作, 以浓度对数值为横坐标(X), 抑制率(inhibition)为纵坐标(Y , %) 绘制标准曲线, 并计算半抑制浓度(50% inhibition concentration, IC_{50})和线性范围。

1.2.5 IC-ELISA 特异性分析

用 IC-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。交叉反应率(cross reactivity, CR)= IC_{50} (燕窝唾液酸糖蛋白标准品)/ IC_{50} (各干扰物) $\times 100\%$ 。

1.2.6 回收率与精密度

选 BSA、胶原蛋白、假燕窝(经液相色谱分析, 不含唾液酸)为加标样本, 分别以 5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 燕窝标准溶液加标, 计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.3 数据处理

使用 Origin 2017 版软件绘制 IC-ELISA 图表及标准曲线。

2 结果与分析

2.1 抗原、抗体的分析

通过十二烷基硫酸钠——聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析发现, 燕窝条带的 106 kDa 和 128 kDa 占燕窝总蛋白质的 80% 以上, 因此选择这些蛋白质作为抗原制备抗体。使用 SDS-PAGE 分离和回收这两种蛋白质。ELISA 方法结果表明, 单克隆抗体可以与这两种唾液酸糖蛋白同等结合, 两种唾液酸糖蛋白具有相同的潜在抗原性结构域。用毛细管电泳进一步检测分离的糖蛋白的纯度, 分离的 106 kDa 蛋白在 8.8 min 时有单一峰, 表明 106 kDa 蛋白纯度足以作为标准蛋白。具体分析参考张世伟等^[34]的报道。

2.2 抗原、抗体最佳反应浓度

IC-ELISA 法包被原和单克隆抗体的不同工作浓度如表 1 所示, 按照经济的原则, 选择 OD 值在 1 左右的组合为最佳工作浓度。由表 1 可见, 选择包被原的稀释倍数为 1:2000、单克隆抗体的稀释倍数为 1:5000 为 ELISA 法的最佳工作浓度。

2.3 封闭条件的确定

封闭液能封闭酶标板上未结合的位点, 减少抗原或抗体的非特异性结合。根据上述确定的最佳包被抗原和单克隆抗体浓度, 用 PBST 溶液将 BSA 制成 0.5%、1.0%、2.0% ($m:V$) 的溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别封闭 90、120、150 和 180 min, 其余步骤与上述一致, 比较不同条件下的 IC_{50} 和 $\text{OD}_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 。根据检测结果, 以浓度和时间为横坐标, IC_{50} 和 $\text{OD}_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 为纵坐标绘图。由图 1 可知, 当 BSA 浓度为 1.0%, 封闭时间为 150 min 时, IC_{50} 最低, $\text{OD}_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 值最大。故选择 1.0% BSA、150 min 为封闭液和封闭时间。

表 1 不同包被原和单克隆抗体稀释倍数下 OD 值($n=3$)

Table 1 OD values of different dilution of coating antigen and monoclonal antibody ($n=3$)

抗体稀释倍数	包被原稀释倍数				
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
1:1250	1.824 \pm 0.0087	1.645 \pm 0.0064	1.457 \pm 0.0291	1.291 \pm 0.0021	0.898 \pm 0.0075
1:2500	1.567 \pm 0.0351	1.302 \pm 0.0293	1.114 \pm 0.0043	0.911 \pm 0.0111	0.841 \pm 0.0042
1:5000	1.312 \pm 0.0077	1.093 \pm 0.0005	1.013 \pm 0.0107	0.791 \pm 0.0211	0.763 \pm 0.0081
1:10000	1.054 \pm 0.0122	0.945 \pm 0.0101	0.859 \pm 0.0026	0.671 \pm 0.0323	0.615 \pm 0.0011
1:20000	0.880 \pm 0.0022	0.740 \pm 0.0218	0.661 \pm 0.0175	0.530 \pm 0.0092	0.469 \pm 0.0008
1:40000	0.759 \pm 0.0009	0.617 \pm 0.0024	0.485 \pm 0.0296	0.349 \pm 0.0068	0.333 \pm 0.0074
1:80000	0.603 \pm 0.0077	0.550 \pm 0.0018	0.331 \pm 0.0094	0.238 \pm 0.0043	0.165 \pm 0.0017

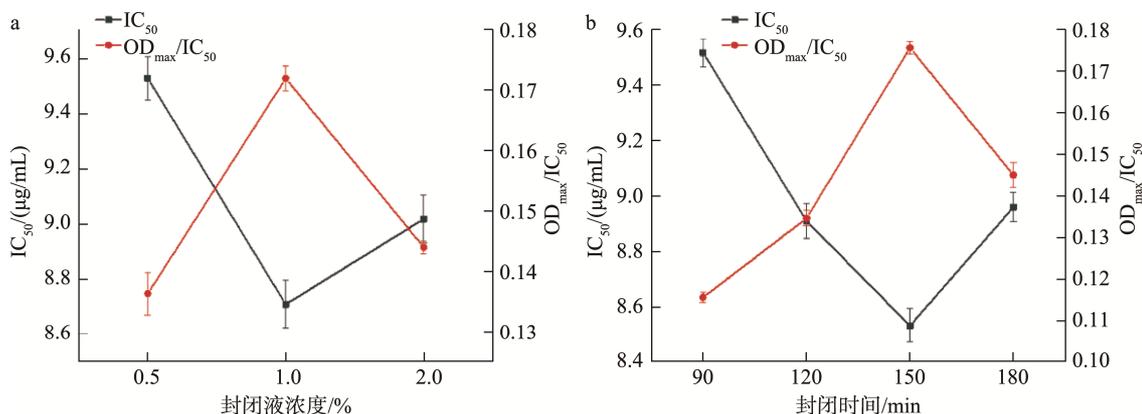


图 1 封闭液浓度(a)和时间(b)的优化(n=3)

Fig.1 Optimization of blocking buffer (a) and time (b) (n=3)

2.4 竞争时间的选择

利用上述已经优化好的最佳条件, 设置 37°C 条件下竞争时间分别为 15、30、60 和 90 min。根据检测结果, 以竞争时间为横坐标, IC₅₀ 和 OD_{max}/IC₅₀ 为纵坐标绘图。

由图 2 可知, 随着竞争时间的延长, IC₅₀ 与 OD_{max}/IC₅₀ 值的变化趋势相反, 当竞争时间为 30 min 时, IC₅₀ 最低, OD_{max}/IC₅₀ 值最大, 故选择 30 min 为最适竞争时间。

2.5 HRP-IgG 工作条件的优化

利用上述已经优化好的最佳条件, 设置 HRP-IgG 稀释倍数为 1:500、1:1000、1:2000、1:4000 和 1:8000, 在 37°C 条件下分别孵育 20、25、30 和 40 min, 其余步骤与上述一致。根据检测结果, 以孵育时间和浓度为横坐标, IC₅₀ 和 OD_{max}/IC₅₀ 为纵坐标绘图。由图 3 可知, 当孵育时间为 30 min、稀释倍数为 1:1000 时, IC₅₀ 值最小, OD_{max}/IC₅₀ 值最大, 故选择孵育时间为 30 min、稀释倍数为 1:1000 时作为最佳条件。

2.6 底物最佳作用时间的优化

在上述优化的最佳条件下, 设置显色时间为 5、10、

15 和 20 min。其余操作同上述步骤一致, 绘制不同条件下的标准曲线, 计算 IC₅₀ 和 OD_{max}/IC₅₀。由图 4 可知, 当反应时间为 10 min 时, IC₅₀ 值最小, OD_{max}/IC₅₀ 值最大, 故选择 10 min 为底物最佳作用时间。

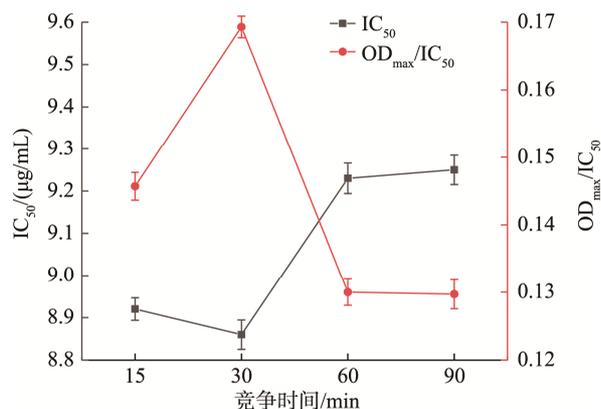


图 2 竞争时间的优化(n=3)

Fig.2 Optimization of competitive reaction time (n=3)

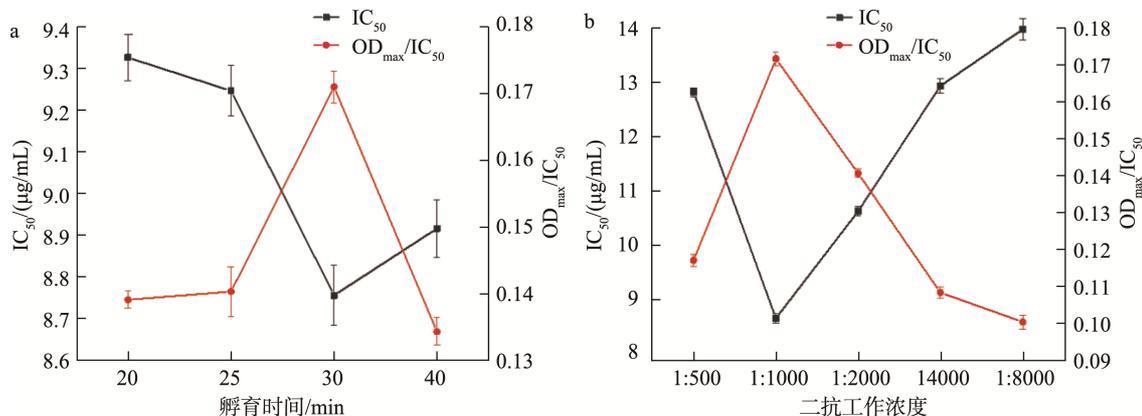


图 3 二抗孵育时间(a)和工作浓度(b)的优化(n=3)

Fig.3 Optimization of incubation time (a) and working concentration of secondary antibody (b) (n=3)

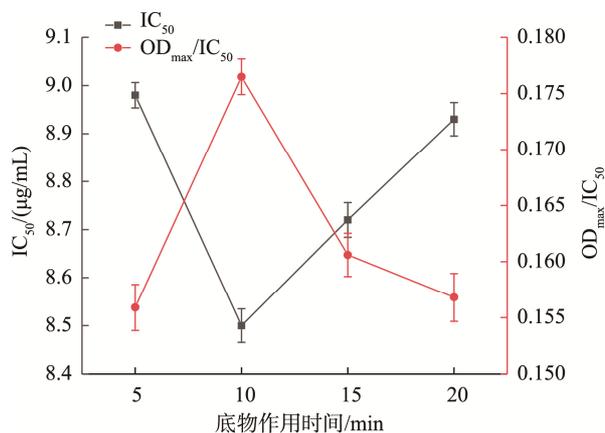


图 4 底物作用时间的优化(n=3)

Fig.4 Optimization of reaction time (n=3)

2.7 IC-ELISA 灵敏度的测定

IC-ELISA 法检测燕窝唾液酸糖蛋白的标准曲线为 $Y=51.134X+2.1831$ ($r^2=0.9909$), IC_{50} 为 $8.61 \mu\text{g/mL}$, IC_{10} 为 $1.42 \mu\text{g/mL}$, 检测范围(IC_{20} ~ IC_{80})为 2.23 ~ $33.25 \mu\text{g/mL}$, 该方法线性范围较宽, 灵敏度较高, 可实现燕窝唾液酸糖蛋白的精准检测。

2.8 特异性分析

分别研究了燕窝唾液酸糖蛋白、BSA、卵白蛋白、胶原蛋白等几种食品中常见蛋白和干扰物进行方法特异性测定, 结果如表 2 所示, 该方法特异性良好, 对食品几种常见的蛋白、干扰物无交叉反应, 不易出现结果误判。

2.9 回收率与精密度检测

本研究选 BSA、胶原蛋白、假燕窝为加标样本, 分别以 3 种浓度加标。用本研究所建立的 IC-ELISA 方法检测得到的结果如表 3 所示。结果表明本研究对燕窝糖蛋白添加回收率为 82.7% ~ 92.0% , RSDs 为 1.7% ~ 8.9% 。说明该方法准确度高, 稳定性好。

表 2 特异性测定结果(n=3)

Table 2 Results of specificity (n=3)

反应物	交叉反应率/%
燕窝唾液酸糖蛋白	100
BSA	<0.1
卵白蛋白	<0.1
胶原蛋白	<0.1
银耳提取物	<0.1
猪皮提取物	<0.1
明胶	<0.1
卡拉胶	<0.1
海藻酸钠	<0.1
聚丙烯酸钠	<0.1

表 3 3 种样品的添加回收实验(n=3)

Table 3 Recoveries test of 3 kinds of samples (n=3)

样本	添加水平/(µg/mL)	ELISA	
		回收率/%	RSDs/%
牛血清蛋白	5	88.5±5.5	5.8
	10	86.3±4.8	4.2
	20	83.8±7.7	1.7
胶原蛋白	5	90.1±7.5	3.8
	10	83.6±2.6	4.8
	20	89.7±6.1	8.9
假燕窝	5	84.3±7.3	3.2
	10	92.0±4.2	5.9
	20	82.7±5.9	8.1

2.10 实际燕窝样本检测

从市场上收集 6 个燕窝及燕窝饮品样本, 采用 IC-ELISA 法和实时荧光 PCR 法进行检测。如表 4 所示, 荧光 PCR 法共检测到 5 个样本含有燕窝成分, 与 IC-ELISA 法一致, 结果显示 IC-ELISA 法有效而且能得出定量参考结果。

表 4 实际样本检测(n=3)

Table 4 Actual sample testing (n=3)

样本编号	样品名称	荧光 PCR 法检测结果	IC-ELISA 法检测唾液酸糖蛋白含量/(mg/g)
1	即食燕窝	含有燕窝成分	1.3
2	燕窝(白燕盏)	含有燕窝成分	1.1×10^2
3	即炖纯鲜燕窝	含有燕窝成分	13.0
4	燕窝饮料	不含有燕窝成分	未检出
5	即炖燕窝	含有燕窝成分	2.6
6	无糖鲜炖燕窝	含有燕窝成分	3.0

3 结论

本研究首次建立了定量检测燕窝唾液酸糖蛋白的 IC-ELISA 方法。该方法具有较好的灵敏度和良好的重复性, 分析速度快。通过对燕窝饮品样品的定量检测, 说明该方法可以检测经热处理的燕窝及其制品, 操作简单, 检测成本低。目前, 市场上燕窝唾液酸糖蛋白定量的试剂盒仍是空白, 此方法具有开发成商品化试剂盒的潜力, 为广大消费者提供保障, 具有较好的实际应用价值。

参考文献

[1] 徐敦明, 范群艳, 施能文, 等. 燕窝的研究[M]. 北京: 中国质检出版社, 中国标准出版社, 2017.

XU DM, FAN QY, SHI NW, et al. Research on bird's nest [M]. Beijing:

- China Quality Inspection Press, China Standard Press, 2017.
- [2] DAI YW, CAO J, WANG YY, *et al.* A comprehensive review of edible's nest [J]. *Food Res Int*, 2021, 140: 1–15.
- [3] SATIZÁBAL P, DRESSLER WH, GUIEB IIIER, *et al.* Seascape shadows: Life in the ruins of the edible bird's nest harvest in northern Palawan, the Philippines [J]. *Environ Plann E*, 2021. DOI: org/0000-0001-5293-4081
- [4] DAI Y, CAO J, WANG Y, *et al.* A comprehensive review of edible bird's nest [J]. *Food Res Int*, 2021, 140: 109875.
- [5] ELSHEIKHA AF. Why the importance of geo-origin tracing of edible bird nests is arising? [J]. *Food Res Int*, 2021, 150: 110806.
- [6] 白伟娟, 柳训才, 张晓婷, 等. 燕窝成分及功效研究进展[J]. *食品科技*, 2020, 45(5): 96–100.
- BAI WJ, LIU XC, ZHANG XT, *et al.* Research progress on the composition and efficacy of bird's nest [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(5): 96–100.
- [7] 黄知几. 燕窝对断乳后仔鼠智力水平及母鼠免疫功能的影响研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- HUANG ZJ. Study on the effect of bird's nest on the intelligence level of the offspring and the immune function of the mother after weaning [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017.
- [8] 樊耀华, 范群艳, 李宗晖, 等. 燕窝功效考[J]. *广东药科大学学报*, 2020, 36(4): 590–593.
- FAN YH, FAN QY, LI ZH, *et al.* A Study on efficacy of bird's nest in traditional Chinese medicine [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2020, 36(4): 590–593.
- [9] 姚海燕. 燕窝延缓果蝇衰老的作用研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- YAO HY. Research on the effect of bird's nest on delaying aging of fruit flies [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2013.
- [10] GLANZ VY, MYASOEDOVA VA, GRECHKO AV, *et al.* Inhibition of sialidase activity as a therapeutic approach [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2018, 12: 3431–3437.
- [11] 简叶叶, 李庆旺, 黄知几, 等. 燕窝的营养功效与真伪鉴别研究进展[J]. *亚热带农业研究*, 2016, 12(2): 136–144.
- JIAN YY, LI QW, HUANG ZJ, *et al.* Research progress on the nutritional efficacy and authenticity of bird's nest [J]. *Subtrop Agric Res*, 2016, 12(2): 136–144.
- [12] XIE Y, ZENG HL, HUANG ZJ, *et al.* Effect of maternal administration of edible bird's nest on the learning and memory abilities of suckling offspring in mice [J]. *Neural Plast*, 2018. DOI: 10.1155/2018/7697261
- [13] 卢芳, 张冶, 邬天雨, 等. 燕窝对大鼠子代学习记忆能力的影响及基于肠道菌群结构的作用机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(1): 110–116.
- LU F, ZHANG Y, WU TY, *et al.* Effect of bird's nest soup on learning and memory ability of rat offspring and its mechanism based on the composition of intestinal microflora [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2021, 37(1): 110–116.
- [14] 王羚邴, 黄松, 蒋东旭, 等. 燕窝的鉴别和药理研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2013, 15(1): 146–150.
- WANG LL, HUANG S, JIANG DX, *et al.* Identification and pharmacological progress on cubilose [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol*, 2013, 15(1): 146–150.
- [15] DAUD NA, MOHAMAD YS, BABJIA S, *et al.* Edible bird's nest: Physicochemical properties, production, and application of bioactive extracts and glycopeptides [J]. *Food Rev Int*, 2021, 37(2): 177–196.
- [16] 李小玉, 刘敬, 杨懋勋. 燕窝及其伪品电化学指纹图谱的研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(8): 130–133.
- LI XY, LIU J, YANG MX. Study on the electrochemical fingerprint of bird's nest and its fake [J]. *Food Res Dev*, 2020, 41(8): 130–133.
- [17] 孔晨, 徐敦明, 黄慧英. 基于核磁共振-二维氢谱法鉴定燕窝真伪的研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2015, 54(6): 819–824.
- KONG C, XU DM, HUANG HY. Identification of true and fake cubilose using a H-NMR-based method [J]. *J Xiamen Univ (Nat Sci Ed)*, 2015, 54(6): 819–824.
- [18] GUO L, WU Y, LIU M, *et al.* Rapid authentication of edible bird's nest by FTIR spectroscopy combined with chemometrics [J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98(8): 3057–3065.
- [19] 张世伟, 赖心田, 杨国武. 燕窝掺伪检测技术研究进展及展望[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(1): 195–200.
- ZHANG SW, LAI XT, YANG GW. Progress and perspective on edible bird's nest identification methods [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(1): 195–200.
- [20] 陈月娟, 刘文简, 陈丹娜, 等. 燕窝 DNA 条形码的鉴定研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(23): 4593–4597.
- CHEN YJ, LIU WJ, CHEN DN, *et al.* A study on identification of edible bird's nests by DNA barcodes [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2017, 42(23): 4593–4597.
- [21] 陈筱婷. 多重 RT-PCR 法检测燕窝及其制品掺伪成分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(11): 3495–3500.
- CHEN XT. Determination of adulterated components in edible bird's nests and their products by multiplex RT-PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(11): 3495–3500.
- [22] 吴茂勇, 廖津, 麦泳诗, 等. 环介导等温扩增联合核酸层析试纸快速鉴定燕窝基原[J]. *中药材*, 2018, 41(8): 1837–1841.
- WU MY, LIAO F, MAI YS, *et al.* Rapid identification of edible bird's nest by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with a nucleic acid lateral-flow device (LFD) [J]. *J Chin Med Mater*, 2018, 41(8): 1837–1841.
- [23] LIU K, WU M, LIN X, *et al.* Molecular analysis of edible bird's nest and rapid authentication of *Aerodramus fuciphagus* from its subspecies by PCR-RFLP based on the *Cytb* gene [J]. *Anal Methods*, 2020, 12(21): 2710–2717.
- [24] LV D, FAN Y, ZHONG W, *et al.* Genetic identification of edible bird's nest in Thailand based on ARMS-PCR [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 1–13.
- [25] LING AJW, CHANG LS, BABJIA S, *et al.* Review of sialic acid's biochemistry, sources, extraction and functions with special reference to

- edible bird's nest [J]. *Food Chem*, 2022, 367: 130755.
- [26] 胡国昌, 陈文锐, 陈捷, 等. 燕窝及其制品的检测方法[J]. *食品科学*, 1996, 17(11): 47–50.
HU GC, CHEN WR, CHEN J, *et al.* Test methods for bird's nest and its products [J]. *Food Sci*, 1996, 17(11): 47–50.
- [27] LI X, ZHANG X, SHI X, *et al.* Review in isothermal amplification technology in food microbiological detection [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2022. DOI: org/10.1007/s10068-022-01160-6
- [28] LIN JR, ZHOU H, LAI XP, *et al.* Genetic identification of edible birds' nest based on mitochondrial DNA sequences [J]. *Food Res Int*, 2009, 42: 1053–1061.
- [29] WU Y, YING C, WANG B, *et al.* Application of SYBR green PCR and 2DGE methods to authenticate edible bird's nest food [J]. *Food Res Int*, 2010, 43(8): 2020–2026.
- [30] SONG G, HUANG L, HUANG Y, *et al.* Electrofusion preparation of anti-triazophos monoclonal antibodies for development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Immunol Methods*, 2022, 500: 113184.
- [31] JIN G, WU X, CUI G, *et al.* Development of an ic-ELISA and immunochromatographic strip assay for the detection of diacetoxyscirpenol in rice [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(29): 17876–17882.
- [32] CHONGP K, MUNS L, CHANGL S, *et al.* Fractionation of edible bird's nest glycoprotein hydrolysates: Characterisation and antioxidative activities of the fractions [J]. *Food Sci Hum Well*, 2022, 11(4): 886–894.
- [33] ZHANG SW, LAI XT, LIU XQ, *et al.* Competitive enzyme linked immunoassay for sialoglycoprotein of edible bird's nest in food and cosmetics [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 3580–3585.
- [34] 张世伟, 赖心田, 陈血剑, 等. 双抗夹心酶联免疫分析法检测燕窝中唾液酸糖蛋白[J]. *食品工业*, 2013, 34(6): 195–197.
ZHANG SW, LAI XT, CHEN XJ, *et al.* Establishment of sandwich enzyme linked immunosorbent assay for sialoglycoprotein of edible bird's nest [J]. *Food Ind*, 2013, 34(6): 195–197.
- [35] 齐萌, 周惠, 霍静倩, 等. 驼源莠去津多克隆抗体的制备及间接竞争酶联免疫吸附分析方法的建立[J]. *河北农业大学学报* 2022, 7(4): 43–50.
QI M, ZHOU H, HUO JQ, *et al.* Development of atrazine polyclonal antibody and establishment of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Agric Univ Hebei*, 2022, 7(4): 43–50.

(责任编辑: 黄周梅 韩晓红)

作者简介



何金麟, 工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 398397568@qq.com



徐敦明, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: Dunmingxu@163.com