

冷冻鱼糜中微生物谷氨酰胺转胺酶 ELISA 检测方法的建立及应用

李轶¹, 范大明¹, 顾震南¹, 黄建联², 连惠章³, 赵建新¹, 陈卫¹, 张灏¹

(1. 江南大学食品学院食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122)

(2. 福建安井食品股份有限公司, 福建厦门 361022) (3. 无锡华顺民生食品有限公司, 江苏无锡 214218)

摘要: 本文研究了冷冻鱼糜中微生物谷氨酰胺转胺酶 (MTG) 的双抗体夹心酶联免疫检测方法 (sandwich-ELISA 法), 以抗 MTG 兔多抗为包被抗体, 抗 MTG 鼠单抗为检测抗体, 再结合 HRP 标记的抗 IgG1 二抗, 构成 sandwich-ELISA 检测方法, 对冷冻鱼糜中是否添加 MTG 进行定量检测, 防止冷冻鱼糜原料掺假。实验结果表明, 包被抗体的最佳工作浓度是 2.00 $\mu\text{g/mL}$, 检测抗体的最佳工作浓度为 0.10 $\mu\text{g/mL}$, 酶标二抗的最佳稀释倍数为 1:5000。方法的检测限为 20 ng/mL, 该检测方法在 0.6 mg/mL~10 mg/mL 范围内 OD₄₅₀ 值与 MTG 浓度的 log 值呈线性关系。建立掺假冷冻鱼糜样品模拟体系, 测定其中 MTG 的添加量: MTG 的添加回收率为 94% 以上, 测定过程中回收率结果的板内变异系数为 1.12%~4.02%, 板间变异系数为 5.43%~6.87%。经试验证明该方法灵敏度高, 样品前处理简便, 适用于冷冻鱼糜中 MTG 的定量检测。

关键词: 微生物谷氨酰胺转胺酶冷冻鱼糜双抗体夹心酶联免疫检测法

文章编号: 1673-9078(2014)9-275-279

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.045

ELISA-based Method to Detect Microbial Transglutaminase in Frozen Surimi

LI Yi¹, FAN Da-ming¹, GU Zhen-nan¹, HUANG Jian-lian², LIAN Hui-zhang³, ZHAO Jian-xin¹, CHEN Wei¹,
ZHANG Hao¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China) (2. Fujian Anjoyfood Share Co. Ltd., Xiamen 361022, China) (3. Wuxi Huashunminsheng Food Co. Ltd., Wuxi 214218, China)

Abstract: In this study, a sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect microbial transglutaminase (MTG) in frozen surimi, using rabbit anti-MTG polyclonal antibody as the capture antibody and mouse anti-MTG monoclonal antibody as the detection antibody. Combined with anti-IgG1 secondary antibody horseradish peroxidase (HRP) conjugate, the sandwich ELISA was developed to quantitatively detect MTG in frozen surimi samples, thus providing a means to prevent adulteration of frozen surimi. The results showed that the optimum working concentration of the capture antibody was 2 $\mu\text{g/mL}$ whereas that of the detection antibody was 0.1 $\mu\text{g/mL}$, and the optimum dilution of HRP-conjugated secondary antibody was 1:5,000. The visual detection limit of the assay was 20 ng/mL, and a linear relationship between OD₄₅₀ values and the log values of MTG concentration was observed in the range of 0.6~10 mg/mL. A simulation model of adulteration in frozen surimi was established to determine the amount of added MTG. The recovery rate of MTG was over 94%, whereas the intra- and inter-plate coefficients of variation during the measurement were 1.12%~4.02% and 5.43%~6.87%, respectively. These results proved that this method was sensitive, required simple sample pretreatment, and was suitable for the quantitative detection of MTG added to frozen surimi.

Key words: microbial transglutaminase; frozen surimi; sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay; detection

收稿日期: 2014-03-26

基金项目: 厦门市重大产业技术攻关项目 (3502Z20121034); “十二五”农村领域国家科技计划课题项目 (2012BAD28B05-04); 江苏省产学研联合创新资金项目 (BY2013015-01)

作者简介: 李轶 (1990-), 女, 学生, 硕士在读, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 范大明 (1983-) 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

随着生活水平不断提高,生活节奏日益加快,人们对既安全卫生又富含营养、方便快捷的水产加工食品越发青睐,促使冷冻鱼糜及其制品加工工业的蓬勃发展。目前,生产冷冻鱼糜的原料主要集中于阿拉斯加狭鳕、太平洋鳕等海水鱼。但由于以往过大的海洋捕捞强度以及环境污染等原因,近年来主要海洋经济鱼类已严重枯竭,导致海水鱼糜的生产成本上升。一些不良商贩在制作冷冻鱼糜的过程中通过添加微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)来增强低级冷冻鱼糜的凝胶强度将其当做高级冷冻鱼糜进行贩卖,此种行为严重地损害了鱼糜制品企业的利益,不利于冷冻鱼糜行业健康有序地发展。

MTG 是微生物发酵产的谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, TGase, EC 2.3.2.13),它通过催化酰基转移反应促进蛋白质之间产生交联反应生成网络状超大蛋白质分子,从而提高蛋白质的凝胶强度,进而改善食品中蛋白质的质构、外观和风味^[1-2]。为了规范鱼糜原料市场,预防掺伪原料导致鱼糜制品加工过程产生品质劣变,建立一种可靠的 MTG 检测方法迫在眉睫。目前国内对 MTG 的检测研究仅限于 MTG 的酶活检测^[3],对于含有内源性 TGase 的鱼糜而言,酶活检测并不能确定冷冻鱼糜中是否添加了 MTG。ELISA(酶联免疫吸附法)是一种把抗原抗体反应的特异性和酶的专一高效催化底物能力二者相结合而设计的检测方法,该检测方法将具有灵敏度高、特异性强等特点,已经广泛应用于生物学、医学等领域^[4-5]。本研究通过建立双抗体夹心 ELISA 方法对冷冻鱼糜中的 MTG 进行定量检测,为鱼糜加工企业检测冷冻鱼糜原料中是否添加了 MTG 提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

1.1.1 主要试剂

抗 MTG 兔多抗,德国 Zedira 公司;抗 MTG 鼠单抗,法国 Covalab 公司;抗 IgG1 的 HRP-二抗,美国 SouthernBiotech 公司;微生物谷氨酰胺转氨酶,日本味之素公司;铜盆鱼冷冻鱼糜,宁波锦海水产食品有限公司;其余试剂均购买自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要设备

酶标仪 Multiscan Go 型,美国 Thermo 公司;酶标板,丹麦 NUNC 公司;离心机 4K15 型,美国 sigma 公司;隔水式恒温培养箱 GRP-9160 型,上海森信实验仪器有限公司;电子天平 AB104-N 型,美国

Mettler.Toledo 公司;高速乳化机 FA25 型,中国 FLUKO 公司;脱色摇床 TS-1000 型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 冷冻鱼糜凝胶强度的测定

冷冻鱼糜预解冻后在低温下斩拌,斩拌结束后立即用灌肠机将浆料灌入折径为 52 mm 的肠衣中,扎牢二端口。将鱼肠放入 90 °C±1 °C 水浴锅中,保持温度加热 30 min 后,立即取出并投入冰水中,充分冷却 15 min~20 min,取出置于 4 °C 冰箱中,静置 12 h。将冷却后的鱼肠剥去肠衣,切成 25 mm 鱼糕段,用质构仪测定其凝胶强度,每个样品 10 个平行。

1.2.2 抗体夹心 ELISA 检测方法

ELISA 检测所需溶液:包被缓冲液:0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液;洗涤液:含 0.05% (V/V) Tween-20 的 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液;封闭液/抗体稀释液:含 0.5% (m/V) BSA 的洗涤液;样品稀释液:0.05 mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液;显色液 A 液:5 mg/mL 的 TMB 二甲亚砷溶液;显色液 B 液:pH 5.0 柠檬酸缓冲液;终止液:2 mol/L H₂SO₄ 溶液^[6-12]。

检测方法:①包被:抗 MTG 兔多抗用包被缓冲液进行稀释,以每孔 100 μL 的量加入酶标板进行包被,4 °C 冰箱反应 12 h。②洗涤:将酶标板甩干,每孔加入 200 μL 洗涤液,振荡 3 min,甩干液体并拍干酶标板。按上述方法重复洗涤 3 次。③封闭:每孔 100 μL 封闭液,37 °C 烘箱反应 1 h,反应结束后重复上述洗涤步骤。④加抗原:抗原样品与样品稀释液在乳化机作用下匀浆 3 min,得到的浆液磁力搅拌 12 h,之后再 6000 r/min 离心 15 min,取上清液再次离心(6000 r/min 15 min),离心得到的上清液即为待测样品。每孔加入 100 μL 待测样品,37 °C 烘箱反应 1 h,反应结束后重复上述洗涤步骤。⑤加检测抗体:抗 MTG 鼠单抗用抗体稀释液进行稀释,每孔加入 100 μL,37 °C 烘箱反应 1 h,反应结束后重复上述洗涤步骤。⑥加酶标二抗:酶标二抗用抗体稀释液进行稀释,每孔加入 100 μL,37 °C 烘箱反应 1 h,反应结束后重复上述洗涤步骤。⑦加显色液:将显色 A 液、显色 B 液、30% H₂O₂ 以 200:5000:1 的比例混合,每孔加入 100 μL,37 °C 烘箱反应 15 min。⑧加终止液:每孔加入 100 μL 终止液,用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值^[6-12]。

1.2.3 抗体最佳工作浓度和稀释倍数的确定

控制变量法:抗体优化顺序为首先优化包被抗体浓度,再优化检测抗体浓度,最后优化酶标二抗浓度。

优化的结果为选择 ELISA 显色 OD 值在 1.0 左右的最小抗体浓度为抗体最佳工作浓度^[9~10]。①包被抗体：用包被缓冲液将抗 MTG 兔多抗分别稀释至 0.10、1.00、5.00 μg/mL，按 1.2.2 的检测方法进行操作。根据实验结果缩小抗体浓度范围，再次稀释抗 MTG 兔多抗进行 ELISA 实验，最终确定包被抗体最佳工作浓度。②检测抗体：用抗体稀释液将抗 MTG 鼠单抗分别稀释至 0.01、0.10、1.00 μg/mL，按 1.2.2 的检测方法进行操作。根据实验结果缩小抗体浓度范围，再次稀释抗 MTG 鼠单抗进行 ELISA 实验，最终确定检测抗体最佳工作浓度。③酶标二抗：将酶标二抗按 1:5000、1:6000、1:7000、1:8000 进行稀释，按 1.2.2 的检测方法进行操作，确定酶标二抗最佳稀释倍数。

1.2.4 抗原最佳稀释倍数及检测灵敏度的确定

将 MTG 样品分别以 1:10、1:20、1:50、1:100、1:200、1:500、1:1000、1:1500、1:2000、1:3000、1:4000、1:5000、1:10000、1:50000 的稀释倍数稀释，按 1.2.2 的检测方法进行操作，绘制双抗体夹心 ELISA 法 MTG 浓度测定曲线，以抗原浓度的 log 值为横坐标，各孔的 OD₄₅₀ 值为纵坐标。

1.2.5 标准曲线的绘制

根据 1.2.4 的双抗体夹心 ELISA 法 MTG 浓度测定曲线，在与 OD₄₅₀ 值有线性相关性的抗原浓度范围内，以 1.2.3 测定的抗体最佳工作浓度按 1.2.2 的检测方法进行操作，绘制冷冻鱼糜中 MTG 测定的标准曲线，以抗原浓度的 log 值为横坐标，各孔的 OD₄₅₀ 值为纵坐标，作图得到 MTG 浓度测定的标准曲线，如图 1 所示。OD₄₅₀ 值与抗原浓度 log 值呈现明显的正相关，标准曲线的回归方程为 $Y = 0.7633X - 1.6448$ ， $R^2 = 0.9928$ 。

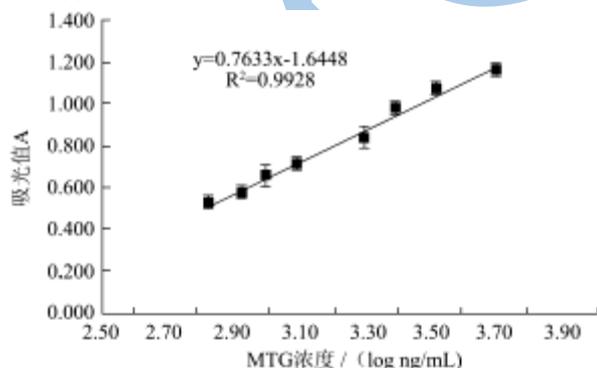


图 1 MTG 含量标准曲线

Fig.1 Standard curve of MTG concentration

1.2.6 冷冻鱼糜中 MTG 的回收实验

根据 1.2.1 的实验结果，向冷冻鱼糜中添加不同浓度 MTG 模拟掺假冷冻鱼糜。按 1.2.4 得到的最佳抗原稀释倍数对掺假样品进行稀释处理，然后按照 1.2.2

的检测方法进行操作。根据 1.2.5 的标准曲线计算添加 MTG 的回收率，以及板内、板间样品测定的变异系数^[13]。

回收率 = 测定浓度 (mg/kg) / 添加浓度 (mg/kg) × 100%

变异系数 = 测得浓度的标准差 (mg/kg) / 测得浓度的平均值 (mg/kg) × 100%

2 结果与讨论

2.1 冷冻鱼糜中 MTG 的添加量

要建立冷冻鱼糜中 MTG 的检测方法首先就要明确冷冻鱼糜中 MTG 的添加量。目前鱼糜制品企业主要以冷冻鱼糜的凝胶强度来衡量冷冻鱼糜的品质，且冷冻鱼糜的凝胶强度每增大 100 g·cm 冷冻鱼糜的等级就上升一级，因此本试验以较空白样品增大冷冻鱼糜凝胶强度 100 g·cm 的 MTG 添加量视为冷冻鱼糜中 MTG 的最小添加量。添加不同浓度 MTG 后鱼糜的凝胶强度如图 2 所示，考虑到凝胶强度测定过程中的实验误差，本试验选定 0.04% 为掺假冷冻鱼糜中 MTG 的最小添加量。

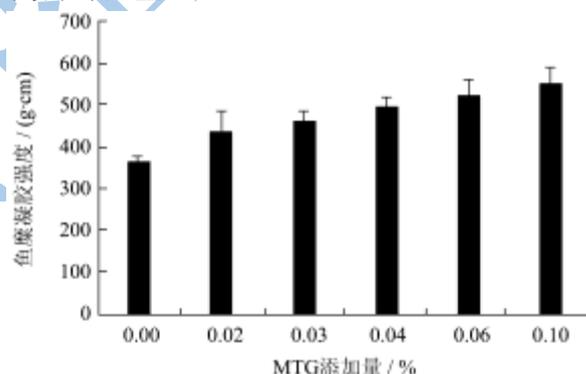


图 2 冷冻鱼糜 MTG 最小添加量的确定

Fig.2 The minimum addition of MTG in frozen surimi

2.2 抗体最佳工作浓度和稀释倍数的确定

表 1 包被抗体最佳工作浓度的确定

Table 1 Determination of optimum working concentration of coating antibodies

包被抗体浓度 (μg/mL)	0.10	1.00	2.00	3.00	5.00	空白
OD ₄₅₀ 平均值	0.147	0.211	1.070	1.424	1.984	0.060
标准偏差	0.002	0.010	0.032	0.021	0.034	0.005

用控制变量法确定包被抗体、检测抗体、酶标二抗的最佳稀释倍数。实验过程中抗体的浓度会影响检测反应的准确性和灵敏度，当抗体浓度过低时，孔板内抗体少，可供抗原结合的抗原决定簇少，抗原不能

被充分地特异性结合, 检测结果偏低不准确。当抗体浓度过高时基质效应可能比较明显, 降低了反应的灵敏度。一般情况下, OD 值在 1.0 左右时误差相对较小, 所以选择 OD₄₅₀ 值在 1.0 左右, 阴性对照小的抗体浓度作为最佳工作浓度, 结果见表 1~3。由表 1~3 可知, 本试验中包被抗体最佳工作浓度为 2.00 μg/mL, 检测抗体最佳工作浓度为 0.10 μg/mL, 酶标二抗最佳稀释倍数为 1:5000。

表 2 检测抗体的最佳工作浓度的确定

Table 2 Determination of optimum working concentration of detecting antibodies

检测抗体浓度/(μg/mL)	0.01	0.05	0.10	0.15	1.00	空白
OD ₄₅₀ 平均值	0.411	0.859	0.999	1.0843	1.330	0.054
标准偏差	0.011	0.026	0.009	0.033	0.026	0.002

表 3 酶标二抗的最佳稀释倍数的确定

Table 3 Determination of dilute times of HRP- antibodies

酶标二抗稀释倍数	1/5000	1/6000	1/7000	1/8000	空白
OD ₄₅₀ 平均值	0.969	0.853	0.816	0.7184	0.050
标准偏差	0.033	0.023	0.009	0.007	0.005

2.3 抗原最佳稀释倍数及检测灵敏度的确定

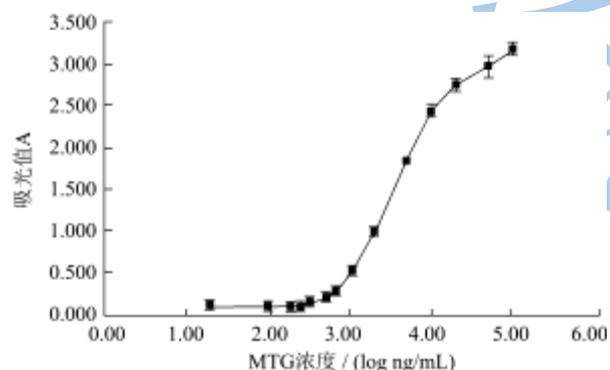


图 3 多抗-抗原-单抗夹心 ELISA 结果

Fig.3 The result of PcAb-Ag-McAb sandwich ELISA

将 MTG 样品用 Tris-HCl 缓冲液稀释至不同稀释倍数, 通过双抗体夹心 ELISA 法测定 MTG 的检测曲线, 以抗原浓度的 log 值为横坐标, 各孔的 OD₄₅₀ 值为纵坐标, MTG 浓度的检测曲线如图 2 所示。试验中空白组 OD₄₅₀ 值为 0.050±0.002, 以阳性值/阴性值>2.1 作为判定阳性的标准, 本试验中双抗体夹心 ELISA 法的检测限为 20 ng/mL。由图 2 可知, 抗原的吸光值随抗原浓度 log 值的变化情况为: 当抗原浓度为 20 ng/mL~250 ng/mL 时, 随着抗原浓度的增大吸光值几乎无变化; 当抗原浓度为 250 ng/mL~600 ng/mL 时, 随着抗原浓度的增大吸光值缓慢增大; 当抗原浓度为

0.6 mg/mL~10 mg/mL 时, 吸光值与抗原浓度 log 值呈线性正相关; 当抗原浓度大于 10 mg/mL 时, 随着抗原浓度的增大吸光值的增大趋势逐渐减小趋于平缓。从双抗体夹心 ELISA 法 MTG 检测曲线可知, 应在 MTG 的浓度为 0.6 mg/mL~10 mg/mL 范围内, 绘制 MTG 浓度定量测定的标准曲线。

2.4 冷冻鱼糜中 MTG 的回收实验

根据 2.1 的试验结果, 通过斩拌的方法按 MTG 浓度分别为 0.04%、0.06%、0.08%、0.10% 的比例将其添加到冷冻鱼糜中, 制得掺假模拟样品, 掺假样品置于 -20 °C 冰箱冷冻保存。用 Tris-HCl 缓冲液提取样品中的 MTG, 并根据 2.3 的试验结果将样品稀释 400 倍, 将样品测得的吸光值带入标准曲线回归方程中计算样品的测定浓度, 再计算以双抗体夹心法检测样品中 MTG 的回收率以及变异系数, 实验结果见表 4。

表 4 双抗体夹心 ELISA 测定冷冻鱼糜中 MTG 的回收率

Table 4 Recovery of MTG in frozen surimi by sandwich ELISA

添加量/(mg/kg)	测定浓度/(mg/kg)	平均回收率/%	板内变异系数/%	板间变异系数/%
400	382.19	95.55	2.50	5.43
600	565.71	94.28	1.12	6.87
800	772.62	96.58	4.02	5.64
1000	971.47	97.15	3.04	6.28

由表 4 可知, MTG 的添加回收率在 94% 以上, 板内变异系数范围为 1.12%~4.02%, 板间变异系数范围为 5.43%~6.87%。由于不同批次试验可能受到 96 孔板、试剂、反应时间等因素的影响, 板间变异系数大于板内变异系数, 但最终的变异系数均在检测方法的允许范围内。

3 结论

本试验以双抗体夹心 ELISA 法为检测方法对模拟掺假冷冻鱼糜中 MTG 的含量进行了测定, 该方法的检测限为 20 ng/mL, 添加回收实验中回收率在 94% 以上, 板内变异系数为 1.12%~4.02%, 板间变异系数为 5.43%~6.87%。该方法灵敏度高、回收率高、变异系数小, 且易于操作, 为应用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测冷冻鱼糜中 MTG 提供了实验依据。目前市场上没有检测 MTG 的商业化 ELISA 试剂盒, 可以以本试验的结果为基础, 进一步构建 MTG 检测的商业化 ELISA 试剂盒。

参考文献

[1] Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. Transglutaminase: its

- utilization in the food industry [J]. Food Reviews International, 2001, 17: 221-246
- [2] Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64: 447-454
- [3] 包莹玲,潘力.微生物谷氨酰胺转氨酶作用机制及检测方法研究进展[J].食品工业科技,2008,29(7):265-269
BAO Ying-ling, PAN Li. Research progress of mechanism and activity assay of microbial transglutaminase [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(7): 265-269
- [4] 张学学.免疫学实验技术[M].北京:科学出版社,2007
ZHANG Wen-xue. Immunology experimental techniques [M]. Beijing: Science Press, 2007
- [5] 王延华,李官成,Xin-Fu ZHOU.抗体理论与技术[M].北京:科学出版社,2004
WANG yan-hua, LI Guan-cheng, Xin-Fu ZHOU. Antibodies theory and technology [M]. Beijing: Science Press, 2004
- [6] A Kaufmann, R Köppel, M Widmer. Determination of microbial transglutaminase in meat and meat products [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2012, 29(9): 1364-1373
- [7] T Ohtsuka, K Seguro, M Motoki. Microbial transglutaminase estimation in enzyme-treated surimi-based products by enzyme immunosorbent assay [J]. Journal of Food Science, 1996, 61(1): 81-84
- [8] W Schloegl, A Klein, R Fürst et al. Residual transglutaminase in collagen-effects, detection, quantification, and removal [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012, 80(2): 282-288
- [9] Eva Engvall, Peter Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G [J]. Immunochemistry, 1971, 8(9): 871-874
- [10] Loizou S, McCrea J D, Rudge A C, et al. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results [J]. Clinical and Experimental Immunology, 1985, 62(3): 738-745
- [11] Ecker Christina, Cichna-Markl Margit. Development and validation of a sandwich ELISA for the determination of potentially allergenic lupine in food [J]. Food Chemistry, 2012, 130(3): 759-766
- [12] Christina Eckera, Anna Ertla, Walter Pulverera, et al. Validation and comparison of a sandwich ELISA, two competitive ELISAs and a real-time PCR method for the detection of lupine in food [J]. Food Chemistry, 2013, 141(1): 407-418
- [13] 周映霞.杀菌剂抑霉唑免疫分析技术的研究[D].西南大学,2010
ZHOU Ying-xia. Studies on immunoassay technique for the imazal ilresidues [D]. Southwest Univeristy, 2010