

扁桃仁蛋白饮料中扁桃仁蛋白高特异性的定量方法

张世伟, 赖心田, 王士峰, 冯龙虎, 唐栋, 杨国武

(深圳市计量质量检测研究院, 广东深圳 518102)

摘要: 建立基于竞争酶联免疫分析 (ELISA) 的扁桃仁蛋白饮料中扁桃仁蛋白定量方法。使用双向电泳比较了扁桃仁和杏仁的蛋白质组上的差异, 并且测序了杏仁 prunin 蛋白的氨基酸序列。鉴定, 提取, 纯化了扁桃仁分子量 27 ku 且 pI 5.5~8.0 的 prunin 蛋白亚基片段并且将其作为抗原制备特异性抗扁桃仁 prunin 蛋白单克隆抗体。使用单克隆抗体建立了检测扁桃仁蛋白的竞争酶联免疫分析方法。基于扁桃仁可溶全蛋白作为标准品, 该方法的 IC_{50} 为 10.3 $\mu\text{g/mL}$, 线性范围为 2.0~100 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.991$)。该方法特异性良好, 与杏仁和其他可食种子蛋白无交叉反应。样品前处理使用含有 0.1% 二硫苏糖醇 (DTT) 的 7M 尿素作为提取液。检测植物蛋白饮料样品的检出限为 300 $\mu\text{g/mL}$, 相对标准偏差 <10%。使用巴氏杀菌, 超高温瞬时灭菌和高压灭菌的蛋白平均回收率分别为 97%, 93% 和 84%。

关键词: 扁桃仁; 蛋白饮料; ELISA; 定量分析

文章编号: 1673-9078(2016)1-320-325

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.050

Highly Specific Quantitative Estimation of Almond Kernel Protein in Almond Protein Beverag

ZHANG Shi-wei, LAI Xin-tian, WANG Shi-feng, FENG Long-hu, TANG Dong, YANG Guo-wu

(Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen 518102, China)

Abstract: A new method was established to quantitatively estimate almond kernel protein in almond protein beverage using competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Subsequently, two-dimensional electrophoresis (2-DE) was used to compare the proteomic differences between almond kernel and apricot kernel. Amino acid sequences of apricot pruning protein were determined and a Pru-1 subunit fragment with a mass of 27 kDa and pI (isoelectric point) of 5.5 to 8.0 was identified, extracted, purified, and used as an antigen to prepare a specific monoclonal antibody. This was used to establish the highly specific ELISA method to detect almond kernel protein. With almond soluble protein as standard, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of this new method was found to be 10.3 $\mu\text{g/mL}$ and linear detection range was from 2.0 to 100 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.991$). The method exhibited good specificity and had no cross-reactivity with the proteins of test apricot kernels and other edible plant seeds. In the pre-treatment procedure, 7 M urea with 0.5% dithiothreitol (DTT) was used as sample extraction solution. The limit of detection for plant protein beverage was 300 $\mu\text{g/mL}$, with relative standard deviation less than 10%. The average recoveries of pasteurization, ultra high-temperature sterilization, and autoclave sterilization were 97%, 93%, and 84%, respectively.

Key words: almond kernel; protein beverage; enzyme linked immunosorbent assay; quantitative analysis

扁桃 (*Amygdalus Communis. L*) 又名巴旦木、巴旦杏, 属李亚科、桃属, 为灌木或者中型乔木, 是世界上著名的干果树种和木本油料树种。扁桃的种仁是其主要食用部分, 种仁肥大, 营养丰富, 深受消费者, 其营养价值很高, 是一种不可多得的滋补品, 长期食用, 身体抵抗力显著增强。扁桃仁蛋白含量为 20.81%, 其中必需氨基酸含量高达 5.43%, 并且味道香美, 是

收稿日期: 2015-03-30

基金项目: 广东省质量技术监督局科技计划 (2013GZ05)

作者简介: 张世伟 (1985-), 男, 高级工程师, 研究方向: 食品质量安全

通讯作者: 杨国武 (1968-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品质量安全

理想的植物蛋白饮料原料, 由其加工而成的植物蛋白饮料大量走向市场^[1]。

国家标准 GB 16322-2003 《植物蛋白饮料卫生标准》规定植物蛋白饮料中的蛋白质含量应不低于 5 g/L。由于技术所限, 目前只能依据凯氏定氮法对其总蛋白进行定量。三聚氰胺事件给依赖这一传统的蛋白检测技术敲响了警钟。虽然现在对三聚氰胺的控制卓有成效, 但是对非法添加物的监控仍然是针对已知的、具体的物质进行检测。合成化学的飞速发展导致可以冒充蛋白质的物质众多, 制假者的手段也在不断翻新, 假如利用其它物质冒充蛋白, 现有技术很难发现。另外, 一些厂商基于口感或是成本的考虑, 使用廉价的

蛋白替代扁桃仁蛋白,如加入牛乳、大豆粉或花生乳。虽然该行为并不危害食品安全并且部分企业会在配料表上明示,但具体掺入多少也因缺乏检测方法,完全依赖于企业的诚信。

随着蛋白质组学和免疫学检测技术的发展,一些研究发现,组织中存在一些蛋白,其与总蛋白的比例不会因物种的品系或产地不同而产生较大的变化,可作为蛋白定量标志物^[2,3]。通过对这些蛋白定量标识物的测定即可推算出物种的总蛋白含量,实现物种蛋白的特异性定量。虽然近年来关于扁桃仁蛋白免疫学测定的研究较多^[4,5],各厂家也推出了商品化试剂盒,但是均以检测扁桃仁过敏原为目的,对热加工产品中扁桃仁蛋白的定量并不准确^[6]。更重要的是,扁桃仁与我国消费量较大的另一种可食植物种子-杏仁具有很高的同源性。我们实验室测试的几种商品化试剂盒均与杏仁产生明显的交叉反应。因为杏仁和扁桃仁在外观和口感上均极为相似,市场上对两者的加工品标注较为混乱,很多实为扁桃仁的产品标注为杏仁,因此使用有交叉反应的检测方法对扁桃仁蛋白饮料进行定量是不准确的。制备针对扁桃仁蛋白的高特异性抗体成为建立扁桃仁蛋白免疫学定量检测方法的关键。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和样品

二甲基亚砜(DMSO)、四甲基联苯胺(TMB)、福氏完全佐剂及福氏不完全佐剂、辣根过氧化物酶、卵白蛋白、牛血清白蛋白、二硫苏糖醇(DTT)(Sigma公司);醛基活化的辣根过氧化物酶(Thermo公司)。IPG胶条、IPG Buffer、尿素(蛋白质组学级)、硫脲(蛋白质组学级)、碘乙酰胺(蛋白质组学级)美国GE公司;二硫苏糖醇(DTT,蛋白质组学级)、CHAPS(蛋白质组学级)、考马斯亮兰R250(超纯级)均为Amresco分装。其余试剂为国产分析纯。ELISA反应检测用试液配制见冷泉港实验室手册^[7]。扁桃仁、杏仁蛋白饮料随机采购于深圳市场和网络。

1.1.2 主要仪器设备

酶标仪为iMARK(BIORAD公司),超声破碎仪为Uibracell VCX750(Sonics and Materials公司),蛋白测定仪为Kjeltec 8400(Foss公司),垂直电泳仪为Mini-PROTEAN Tetra Cell(BIORAD公司),电聚焦仪为EttanIPGphor 3(GE公司),匀浆仪为B-400(BUCHI公司),以及高速离心机、精密电子天平等常规仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 SDS 凝胶电泳

扁桃仁液氮研磨粉碎,使用正己烷脱脂,7 M尿素按(1:10 *m/V*)超声提取,提取液透析过夜脱盐,冻干得扁桃仁蛋白粉。将得到的扁桃仁蛋白粉进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,凝胶为4%浓缩胶和10%分离胶。电泳条件为30V,恒压预电泳30min,随即升压至60V恒压电泳2-3 h。电泳结束后采用考马斯亮蓝染色法染色。

1.2.2 双向电泳

胶条为7 cm非线性pH3-10固相IPG胶条,上样量100 μg 。蛋白质样品采取被动水化方式进胶,20 $^{\circ}\text{C}$ 放置12 h。一向等电聚焦在20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件进行,聚集程序如下:分步升压:100 V、2 h,300 V、1 h,500 V、0.5 h;线性升压:500-4000 V、4 h;分步升压:4000 V、4 h。等电聚焦电泳结束后IPG胶条的平衡。平衡结束后二向SDS电泳条件及染色、脱色均同单向SDS凝胶电泳1.2.1节,凝胶用Umax Powerlook 2100 XL扫描后保存。目标蛋白点送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行MALDI-TOF/MS分析。

1.2.3 杏仁 RNA 提取

采用Trizol法提杏仁RNA。称取100 mg甜杏仁,迅速放入液氮研磨成粉末状,加入1 mL左右trizol试剂匀浆2 min,室温放置5~10 min。将匀浆液转移到一无RNase的无菌管中,加入0.2 mL的氯仿,剧烈震荡15 s后,10000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min。上层水相转移到新的无RNase的离心管中,加入等体积的异丙醇,室温放置10 min,10000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min。加入1 mL的75%乙醇洗涤沉淀两次,4度10000 r/min离心5 min,弃上清,室温干燥后,加入50 μL 的无RNase灭菌水溶解,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 反转录 PCR 及测序

使用one step PrimisScript RT-PCR(Takara)反转录PCR,参考扁桃仁Pru-1 cDNA序列设计引物。引物:Pru1-F:5' ATGGCTAAGGCTTTCGTTTTTTCGC 3'; Pru1-R:5' AGCTAGACTCTCTCCTCTTACATTA 3'。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,用胶回收试剂盒(TAKARA)进行纯化,将PCR产物连接到pMD18-T Vector(TAKARA),样品送至北京华大公司测序,得到杏仁Pru-1 cDNA序列。

1.2.6 抗体的制备

目标抗原扁桃仁26 kDa prunin亚基采用我课题组报道的切胶回收方法进行分离纯化^[3]。将抗原溶解于

0.1% DTT 的 7M 尿素中进行变性处理,浓度为 10 mg/mL,免疫前使用 0.01 M pH 7.4 PBS 稀释 10 倍。皮下免疫 Balb/c,每只剂量 0.1 mL。单克隆抗体制备方法参考冷泉港实验室手册的方法进行^[7]。

1.2.7 ELISA 标准品

扁桃仁于 40 °C 鼓风干燥箱内继续干燥 48 h 后,使用锤式旋风磨进行细粉碎,使 90% 以上通过 60 目筛。称取扁桃仁粉 10 g,于 40 °C 恒温条件下,使用 1000 mL 蒸馏水,分 5 次超声提取扁桃仁蛋白,每次提取时间为 1 h。5 次取的提取液合并后使用 GB 5009.5-2010《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中规定的凯氏定氮法测定可溶蛋白含量。使用含 0.07 M 尿素,0.001% DTT 的 PBS 配制成 400 μg/mL、200 μg/mL、100 μg/mL、50 μg/mL、20 μg/mL、10 μg/mL、5 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL、0.5 μg/mL、0.2 μg/mL、0.1 μg/mL 的标准溶液。

1.2.8 竞争 ELISA 操作

每孔加包被液 100 μL 4 °C 孵育过夜。第二天倒掉包被液,用洗涤液洗一遍,每孔再加 200 μL 封闭液,37 °C 孵育 3 h,倒掉封闭液。每孔加 50 μL 酶标单克隆抗体和 50 μL 样品(或为蛋白标准溶液),阴性对照孔用 PBS 代替。37 °C 反应 0.5 h,完后用 PBST 洗 3 次。每孔加 100 μL 酶标羊抗小鼠二抗。37 °C 反应 0.5 h,完后用 PBST 洗 3 次。加底物液 100 μL,37 °C 反应 10 min, H₂SO₄ 终止反应后上酶标仪读数。以扁桃仁蛋白浓度为横坐标, B/B₀ 为纵坐标绘制标准曲线(B 为样品或标准品的吸光度值, B₀ 为空白溶液的吸光度值)。使用 Origin 7.5 四参数拟合计算标准曲线的 IC₅₀。同时,采用棋盘法试验优化包被抗原和酶标抗体的最佳稀释倍数。

1.2.9 ELISA 检测抗体特异性

采用 1.2.7 所述的提取方法提取其他植物或食品中常见的可溶蛋白,采用竞争 ELISA 检测抗体与其之间的交叉反应。

1.2.10 检测样品的前处理

扁桃仁饮料按 1:1 加入含 0.2% DTT 的 12 M 尿素。超声提取 10 min 后离心。上清液使用 0.01 M pH 7.4 PBS 适当稀释至 ELISA 标准曲线线性范围(为避免变性剂和还原剂对 ELISA 的影响,至少需稀释 100 倍)。

1.2.11 扁桃仁蛋白饮料的模拟加工

扁桃仁的模拟热加工工艺参考张彩等^[8]的报道。将扁桃仁按 1.2.7 所述的方法制备成扁桃仁粉后,与蒸馏水按料液比 1:8 (m/V) 匀浆 1 h (匀浆 10 s, 暂停 20 s 为一个循环,总计 120 个循环),加入蔗糖 8%,

单甘油脂肪酸酯 0.08%, 蔗糖脂肪酸酯 0.12%, 黄原胶 0.04% 和 0.05% 海藻酸钠。按相同方法继续匀浆提取 1 h, 3000 r/min 离心 10 min, 保留上清。上清液采用 1.2.8 建立的 ELISA 方法测定扁桃仁蛋白含量, 将上清液用上述配方提取液稀释至扁桃仁蛋白浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL。分别采用巴氏杀菌 (65 °C 30 min), 超高温灭菌 (137 °C 4 s), 高压灭菌 (121 °C 15 min) 进行热加工, 再使用相同的 ELISA 方法进行检测。

2 结果与讨论

2.1 扁桃仁和杏仁的蛋白组比较

扁桃仁和杏仁均为蔷薇科 (*Rosaceae*) 植物种仁, 具有很高的同源性^[9]。Prunin 是其种仁中的超宏量蛋白, 据 Wolf^[10] 的报道, 扁桃仁中 70% 的蛋白为 prunin 蛋白。因此目前的免疫学检测方法所采用的抗体基本都基于扁桃仁的 Prunin 全蛋白做为抗原, 但是两者的高同源性极大的增加了随机筛选出特异性抗体的难度, 因此有必要对两者的蛋白质组进行比较。

本研究基于不同产地和加工方式, 选取了 7 个扁桃仁样本和 5 个杏仁样本进行 SDS-PAGE 分析 (样品信息见表 1, 图谱见图 1)。不同产地的扁桃仁蛋白具有较大的相似性。扁桃仁蛋白比杏仁蛋白多出 1 条 26 kDa 的蛋白条带, 但是 SDS-PAGE 分辨率较差, 因此本研究采用双向电泳更深入的比较两者的差异。图 2-A 和 2-B 分别为杏仁和扁桃仁的双向电泳图谱, 其中图中标注的区域 I、II、III、IV、V 为杏仁和扁桃仁共有的蛋白, 区域 VI (即 SDS-PAGE 上的 26kDa 蛋白) 为扁桃仁独有。使用 MALDI-TOF/MS 分别对杏仁和扁桃仁上述区域进行鉴定, 鉴定结果结合分子量分析这 6 个区域分别为 Pru-1 的 α 链, Pru-2 的 α 链, Pru-1 的 β 链, Pru-2 的 β 链, 完整的 Pru-1 (α 链与 β 链未断裂), Pru-1 的 α 链的水解肽段。从量来看, 扁桃仁的 Pru-2 占 Prunin 蛋白家族的比例为 10%~20%, 而杏仁高达 40%~60%。但是由于 NCBI 上并没有杏仁的数据库, 所以对杏仁蛋白的鉴定结果均匹配到扁桃仁的数据, 因此质谱结果也未进一步得到两者蛋白更具体的差异。

由于 Pru-1 在扁桃仁蛋白中的高丰度, 本研究针对扁桃仁 Pru-1 抗体制备抗体。但是因为扁桃仁和杏仁蛋白的高度同源性, 首先必须研究两者蛋白的差异点。本研究根据已公布的扁桃仁 Pru-1 cDNA 序列设计引物测序杏仁的 Pru-1 cDNA 序列, 其中上游引物起始于 Pru-1 的起始密码子, 下游引物接近 Poly A,

由于蛋白在热加工中会发生变性,水解,聚集等作用,这些作用严重影响到定量的准确性。本课题组在前期的研究中发现,使用含 0.1% DTT 的 7 M 尿素能显著提高变性蛋白的溶解度^[11],并且能将不同变性程度的蛋白还原为较为统一的状态,从而获得更准确的定量结果。另外,在热加工蛋白定量上,采用竞争 ELISA 法也比传统的蛋白检测模式——双抗夹心 ELISA 更为准确。在 ELISA 方法中,双抗夹心法是检测大分子蛋白的经典反应模式。其使用两个抗体识别一个抗原,具有特异性高、反应灵敏等优势。但是,双抗夹心需要一个蛋白分子提供两个抗体识别位点。

然而在热处理过程中,部分蛋白发生水解使其不能同时被两个抗体结合。竞争法中一个抗原分子只结合一个抗体,即使被水解,只要抗原决定簇不受破坏仍然可被抗体识别,可以较好的应用于热处理蛋白的检测。

本研究模拟扁桃仁蛋白饮料的加工工艺考察了 3 种杀菌方式对蛋白测定的影响。图 5 所示,基于以上优化的前处理方法和 ELISA 反应模式,对巴氏杀菌,超高温瞬时灭菌和高压灭菌的蛋白平均回收率分别为 97%, 94% 和 84%,说明本方法对热加工的扁桃仁蛋白定量较为可靠,但剧烈的热加工方式仍然会对扁桃仁蛋白定量产生一定影响。

表 2 与各蛋白的交叉反应率

Table 2 Cross-reactivity of antibody with various proteins

反应物	IC ₅₀ /(μg/mL)	交叉反应率/%	反应物	IC ₅₀ /(μg/mL)	交叉反应率/%
杏仁可溶蛋白	>1200	<1.0	榛子可溶蛋白	>1200	<1.0
红豆可溶蛋白	>1200	<1.0	核桃可溶蛋白	>1200	<1.0
绿豆可溶蛋白	>1200	<1.0	花生可溶蛋白	>1200	<1.0
大豆可溶蛋白	>1200	<1.0	α-乳白蛋白	>1200	<1.0
芸豆可溶蛋白	>1200	<1.0	β-乳球蛋白	>1200	<1.0
椰子可溶蛋白	>1200	<1.0	酪蛋白	>1200	<1.0

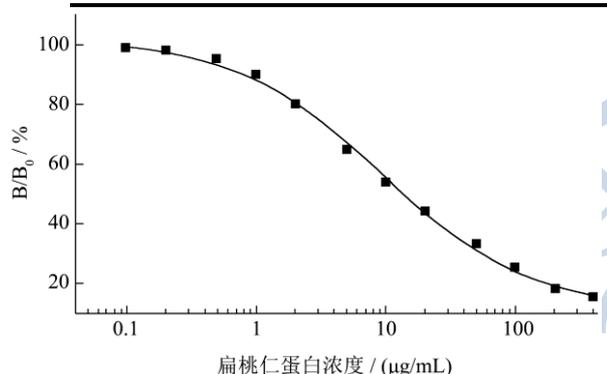


图 4 扁桃仁蛋白的 ELISA 竞争曲线

Fig.4 Representative detection standard curves for almond protein in competitive ELISA

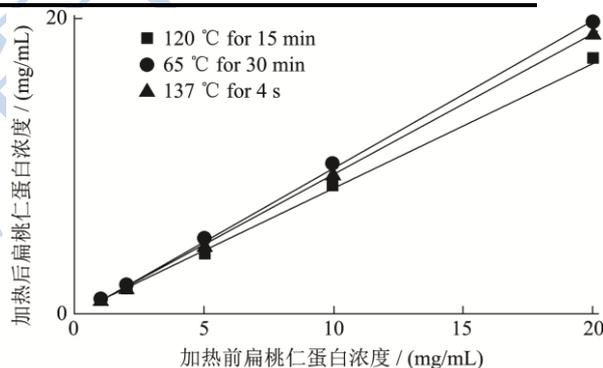


图 5 不同加热方式的扁桃仁蛋白 ELISA 检测结果比较

Fig.5 Comparison of almond proteins treated with different heating methods by ELISA

表 3 市售样品中扁桃仁蛋白含量检测结果 (n=6)

Table 3 Determination of almond protein content in various commercial products

样品	扁桃仁蛋白含量/(mg/mL)		样品	扁桃仁蛋白含量/(mg/mL)	
	ELISA	凯氏定氮法		ELISA	凯氏定氮法
扁桃仁露 1	7.6±0.6	8.2±0.3	杏仁露 1	未检出	9.2±0.3
扁桃仁露 2	11.2±0.9	12.3±0.3	杏仁露 2	8.5±0.7	10.3±0.4
扁桃仁露 3	8.2±0.7	10.6±0.4	杏仁露 3	未检出	15±0.7
扁桃仁露 4	2.7±0.1	6.2±0.3	杏仁露 4	未检出	7.2±0.3
扁桃仁露 5	2.8±0.2	5.3±0.2	杏仁露 5	5.6±0.5	6.8±0.3

2.4 实际样品检测

本研究从深圳和网络随机购买扁桃仁饮料和杏仁蛋白饮料各 5 份,采用所建立的 ELISA 方法和国标

GB 5009.5-2010 规定的凯氏定氮法进行检测。以 10 个不含扁桃仁成分的植物蛋白饮料的测定结果平均值加 3 倍标准偏差作为方法检出限,检出限为 0.3 mg/mL。表 3 所示,所有明示为扁桃仁蛋白饮料的样

品均检出扁桃仁, 平行样品间的相对标准偏差<10%。1~3号扁桃仁露的扁桃仁蛋白测定结果和凯氏定氮的结果较为接近, 但4和5号样品差距较大, 可能该样品混有一定的其他蛋白成分。5个杏仁露有2个实际以扁桃仁作为原料, 原因既有可能是两者外观口感相近导致的错误标记, 也有可能在于扁桃仁和甜杏仁的价格差驱使的有意误导。

3 结论

食品中各原料所含有的营养有所不同, 其价格也相差巨大, 使用低价原料掺伪高价原料的事件时有发生, 如核桃露中加入大量的花生, 燕窝和雪蛤饮品中加入大量的明胶, 虽然传统的蛋白定量结果并无异常, 但商品的价值却大大降低。因此需要研究相应的检测方法对商品的原料用料情况进行监控。本研究提供的方法可准确检测扁桃仁饮料中的扁桃仁蛋白含量, 为进一步引导厂商在食品外包装上标注特征蛋白含量, 更清晰的向消费者展示其商品的某些特定原料的含量提供检测技术支撑, 也为其他热加工食品的蛋白特异性定量提供了思路。

参考文献

- [1] 李芳,孔令明,杨清香,等.巴旦杏蛋白饮料的工艺优化及其稳定性研究[J].现代食品科技,2009,25(7):786-789
LI Fang, KONG Ling-ming, Yang Qing-xiang, et al. Preparation and stability of *Amygdalus communis* L protein beverage [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(7): 786-789
- [2] Ayako Y, Yutaka T, Takahiro N. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of *Spirulina* Color in foods [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(1): 57-60
- [3] Zhang S, Lai X, Liu X, et al. Competitive enzyme-linked immunoassay for sialoglycoprotein of edible bird's nest in food and cosmetics [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 3580-3585
- [4] Su M, Venkatachalam M, Liu C, et al. A murine monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for almond (*Prunus dulcis* L.) detection [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(45): 10823-10833
- [5] Su M, Venkatachalam M, Gradziel T M, et al. Application of mouse monoclonal antibody (mAb) 4C10-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for amandin detection in almond (*Prunus dulcis* L.) genotypes and hybrids [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 535-543
- [6] Garber E A E, Perry J. Detection of hazelnuts and almonds using commercial ELISA test kits [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396: 1939-1945
- [7] Harlow E, Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988: 139-242
- [8] 张彩,童华荣,章道明,等.植物蛋白饮料配方优化研究[J].西南农业大学学报,2006,28(2):197-200
ZHANG Cai, TONG Hong-rong, ZHANG Dao-ming, et al. Study on optimization of the formula for vegetable protein drinks [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2006, 28(2): 197-200
- [9] Costa J, Mafra I, Oliveira M B P P. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods [J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 1062-1069
- [10] Wolf W J, Sathe S K. Ultracentrifugal and polyacrylamide gel electrophoretic studies of extractability and stability of almond meal proteins [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 78(4): 511-521
- [11] Zhang S, Lai X, Yang G. Enzyme-linked Fab' fragment based competitive immunoassay for ovalbumin in hot-processed food [J]. Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 2013, 34: 393-403