APPLICATION NOTE

ASBC 推荐的 ELISA 方法针对啤酒中谷蛋白进行定量

Cathy Olsen, PhD | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices
Joyce Itatani | Applications Scientist | Molecular Devices

优势

- 采用经过认证的方法定量检测啤酒和其他食品中的谷蛋白含量
- MultiWash+ 微孔板洗板机自动进行 ELISA 洗板，节省时间
- 使用 SoftMax Pro 软件快速获得分析结果

简介

定量啤酒中谷蛋白

由于最近乳糜泻患病率呈上升趋势，对于越来越多的需要避免谷蛋白摄入的人们来说，监测食品和饮料中的谷蛋白水平变得尤为重要。FDA 指南中明确指出食品标签上标明“gluten-free”、“no gluten”、“free of gluten”或“without gluten”的，谷蛋白含量必须小于 20 ppm。这是目前检测方法能够接受的定量限。

谷蛋白天然存在于小麦、黑麦、大麦和这类谷物中。在这些谷物中，它是存在于这些谷物中的丙氨酸和谷氨酸蛋白的混合物。在食品生产和食物消化工程中，完整的醇溶谷蛋白分解成小肽片段，这些小肽对乳糜泻患者仍然是有危害的。这些小肽片段无法用三明治 ELISA 检测，因为这种分析方法需要 2 个抗原表位。然而，RIDASCREEN 麦醇溶蛋白竞争 ELISA 可以检测这些小肽片段，它是通过一个新的标准品，小麦，黑麦和大麦的水解产物来检测的（图 1）。这个试剂盒中的 R5 抗体用来识别来自小麦的醇溶蛋白和来自黑麦和大麦的醇溶谷蛋白这些可能有害的多肽片段 (Kahlenberg et al., 2005)。

很多产品能够检测不同类型样品中的谷蛋白含量，但是不是所有能够定量检测，不是所有都通过了认证检测。RIDASCREEN 麦醇溶蛋白竞争 ELISA 试剂盒是 AACC 国际认证 (38-55.01) 和 AOAC 官方认证的分析方法（第一行动 OMA 2015.05），经过国际上 18 个实验室用啤酒，淀粉糖浆和酵母评估。在第二国际协作研究中，美国酿酒化学家协会 (ASBC) 选出 15 个实验室，通过 5 种不同啤酒对 RIDASCREEN 麦醇溶蛋白竞争 ELISA 试剂盒进行评估。这种 ELISA 方法现在是 ASBC 国际认证的方法 (Beer-49)。

本文我们利用 RIDASCREEN 麦醇溶蛋白竞争 ELISA 试剂盒检测了 6 种市场上买到的啤酒中的麦醇溶蛋白水平。检测的啤酒包括无谷蛋白，低谷蛋白，小麦啤酒和其他种类的啤酒。ELISA 通过 SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机读板，数据结果通过 SoftMax Pro 软件分析。定量分析结果证实，无谷蛋白和低谷蛋白啤酒的谷蛋白含量低于 20 ppm。

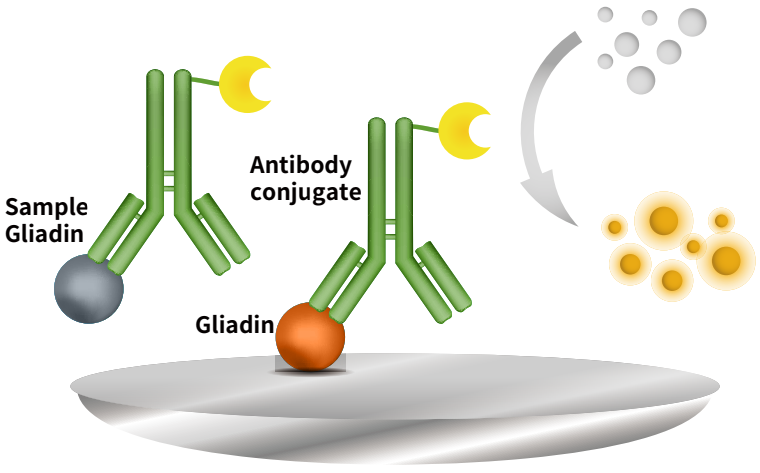

图 1 RIDASCREEN 麦醇溶蛋白竞争 ELISA。微孔板的孔中用麦醇溶蛋白预包被。当加入样品和抗体结合物后，样品中的谷蛋白和抗体结合，导致检测信号降低

材料

- RIDASCREEN 麦醇溶蛋白竞争试剂盒 (Art. No. R7021)
- 市面上买到的啤酒：
  - 低谷蛋白
  - 无谷蛋白
  - 小麦啤酒
  - 金色麦芽酒
  - 美式波特
  - 印度麦酒
- 40%冷水鱼皮明胶 (Electron Microscopy Sciences cat. #25560)
- Multi-Wash+ 微孔板洗板机 (Molecular Devices cat. #MultiWash+)
- SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #ABS Plus)

试剂制备

试剂盒中所有试剂都按照产品说明书制备。

- 缓冲液 (样品稀释液) 去离子水 1：5 稀释
- 洗涤缓冲液 37°C 温育去除结晶，去离子水 1：10 稀释
- 抗体酶结合物混匀，去离子水 1：11 稀释。现用现稀释
- 底物和终止液即开即用

啤酒样品制备

1 mL 啤酒和 9 mL 含有 10% 冷水鱼皮明胶的 60% 乙醇混合于 15 mL 离心管中，涡旋混合均匀。2500 rpm 离心 10 分钟。上清即可用于分析检测，也可存储在密闭容器中黑暗下置于室温 4 周。上清用稀释好的样品稀释液 1：50 稀释后再分析检测。

ELISA

取出 3 列复孔板条放置在微孔板条支架上，其余存放在有干燥剂的铝箔小袋中。将 50 µL 麦醇溶蛋白标准品 (0、10、30、90 和 270 ng/mL) 或制备好的样品加入复孔中。同时留有复孔 (没加标准品或样品) 作为板空白。每孔中加入 50 µL 稀释好的抗体酶结合物并轻摇板子混匀。板子室温孵育 30 分钟。然后，用 MultiWash+ 微孔板洗板机 250 µL 稀释的洗涤缓冲液洗板3次。

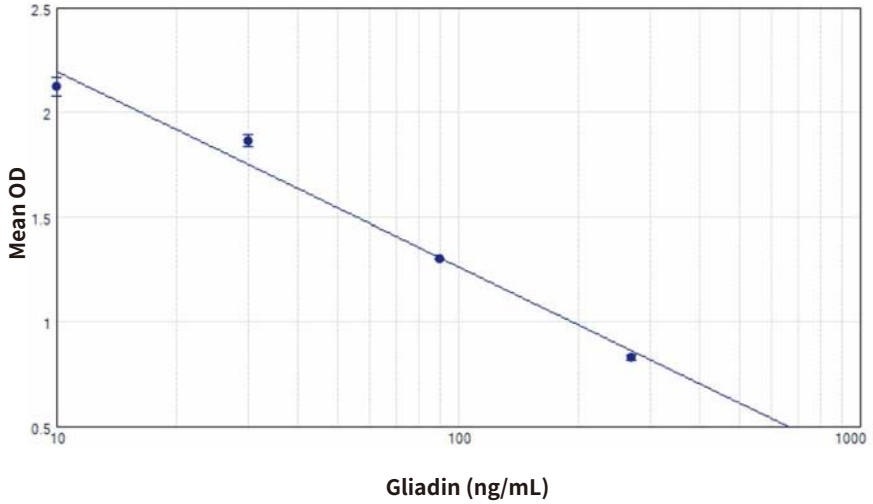

图 2　麦醇溶蛋白 ELISA 标准曲线。SoftMax Pro 软件把 10，30，90 和 270 ng/mL 麦醇溶蛋白标准品用 semi-log 方式进行曲线拟合 (R^2 = 0.981)

Sample	Wells	OD	R	Conc	AvgConc	SD	CV	Dilution Factor	AdjConc (ng/mL)	Gliadin (ppm)	Gluten (ppm)
01 Reduced Gluten	C2	2.061		13.922	16.763	4.0	24.0	500	8381.445	8.381	16.763
	D2	1.923		19.604							
02 Gluten Free	E2	2.098		12.717	9.032	5.2	57.7	500	4516.246	4.516	9.032
	F2	2.448	R	5.348							
03 Weizenbier	G2	0.486	R	683.442	706.316	32.3	4.6	500	353157.865	353.158	706.316
	H2	0.460	R	729.189							
04 Blond Ale	A3	1.298		91.844	87.242	6.5	7.5	500	43620.893	43.621	87.242
	B3	1.341		82.640							
05 American Porter	C3	1.230		108.663	118.153	13.4	11.4	500	59076.491	59.076	118.153
	D3	1.165		127.643							
06 India Pale Ale	E3	2.035		14.858	14.055	1.1	8.1	500	7027.733	7.028	14.055
	F3	2.081		13.253							

R - Outside standard range

图 3　SoftMax Pro 软件中显示的各组信息。啤酒样品中的麦醇溶蛋白含量代入标准曲线中计算得到，乘以稀释倍数计算出最终含量 (ng/mL)。麦醇溶蛋白 ppm 和谷蛋白 ppm 由最终浓度计算得出

每孔加入 100µL 底物，包括板空白。轻摇板混匀，黑暗下室温放置 10 分钟。每孔加入 100 µL 终止液，轻摇板混匀。10 分钟后，用 SpectraMax ABS Plus 调用 SoftMax Pro 软件中预存的 ELISA 方法在 450 nm 处检测光吸收值。
在 SoftMax Pro 软件中用 semi-log 拟合出标准曲线，样品浓度通过代入标准曲线中计算得出。

结果

通过麦醇溶蛋白标准曲线 (图 2)，软件自动计算出麦醇溶蛋白浓度。最终浓度 (ng/mL) 用计算出的浓度乘以原始啤酒样品的稀释因子 (500) 得出，麦醇溶蛋白 (ng/mL) 除以 1000 转变成麦醇溶蛋白 (ppm)。为了将麦醇溶蛋白转变成谷蛋白，使用因子 2 (国际食品药典定义)，最终结果用谷蛋白 ppm 表示 (图 3)。这些计算都已添加在 SoftMax Pro 软件 ‘Unknow’ 样品组的图表中。

标有低谷蛋白和无谷蛋白的啤酒检测出的谷蛋白含量均低于 20 ppm，符合 FDA 指南要求。一个无谷蛋白啤酒样品的重复，检测出的 OD 值低于麦醇溶蛋白标准品的最低值，这个重复标记为超出检测范围，在分组图表中表示为 ‘R’ (图 3)。谷蛋白含量高的小麦啤酒，实际结果显示麦醇溶蛋白检测值超过标准品上限 270 ng/ mL，在分组图中也显示超出检测范围。为了得到更准确的定量谷蛋白，应该继续稀释这款啤酒。其他啤酒检测范围在 14-118 ppm 谷蛋白，印度麦酒的谷蛋白含量低于 20 ppm ‘无谷蛋白’ 水平。

金色麦芽酒 87 ppm 谷蛋白，按照国际食品法典标准可以贴上 ‘谷蛋白含量极低’ 的标签。

在 SpectraMa x 多功能微孔板读板机上获得了同样的检测结果 (结果未显示) 。

结论

RIDASCREEN 麦醇溶蛋白竞争 ELISA 试剂盒能够定量啤酒中的谷蛋白含量。使用 MultiWash+ 洗板机自动洗板可以大大减少手动操作时间。采用 SpectraMax ABS Plus 微孔板读板机检测光吸收值，采用 SoftMax Pro 软件中的方法计算检测结果，以后还可以进一步简化 ELISA 工作流程并标记所有结果。从样品到结果，检测得到可靠的谷蛋白含量仅需 1 小时。

参考文献

Kahlenberg F., Sanchez D., Lachmann I., Tuckova L., Tlaskalova H., Mendez E., Mothes T. (2005). Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. European Food Research and Technology 222 (1-2), 78-82.

更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司
全国咨询服务热线: 400-820-3586 www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com
上海 电话: 86-21-3372 1088 传真: 86-21-3372 1066 地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
北京 电话: 86-10-6410 8669 传真: 86-10-6410 8601 地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124
成都 电话: 86-28-6558 8820 传真: 86-28-6558 8831 地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
台北 电话: 886-2-2656 7585 传真: 886-2-2894 8267 地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
香港 传真: 852-2289 5385 地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

MOLECULAR DEVICES