



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104502582 A

(43) 申请公布日 2015.04.08

---

(21) 申请号 201410767465.X

(22) 申请日 2014.12.12

(71) 申请人 深圳市计量质量检测研究院

地址 518000 广东省深圳市南山区西丽同发  
路4号

(72) 发明人 赖晓芳 张世伟 赖心田 李碧芳  
黄静敏 王士峰 冯荣虎 唐栋  
马广东 杨国武

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 唐致明

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/14(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

---

(54) 发明名称

一种检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒。发明人从椰子果肉中分离纯化制备得到20~25kDa,等电点为6~8的椰子特异性蛋白,其纯度满足免疫要求。同时利用该椰子特异性蛋白诱导产生椰子特异性蛋白抗体,并进一步制备检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒。本发明所制备的试剂盒中椰子特异性蛋白抗体针对的抗原决定簇耐热,可对椰子及其相关产品进行蛋白定量检测,适用范围广,有利于消费者合法权益的保障;特异性好,灵敏度高,抗基质干扰效果好,检测结果准确性好,重复性好;样品的前处理简单,检测操作简单,试剂均以工作液的形式提供,可方便地进行大量样本的筛查。

1. 一种椰子特异性蛋白的纯化方法,包括以下步骤:

1)蛋白提取:将椰子果肉用粉碎机粉碎后,取部分样品,使用缓冲液超声提取5~7小时,去除杂质后得到上清液;

2)初次分离纯化:对上清液利用等电聚焦仪进行初次分离纯化,截取等电点为6~8的组分;

3)二次分离纯化:初分离的样品使用SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳分别进行浓缩和分离,75~85V电泳1.5~2.5h后,切取分子量为20~25kDa的蛋白凝胶条带;

4)回收制备:将蛋白凝胶使用研钵粉碎后,加入电洗脱仪,使用洗脱缓冲液对目标蛋白进行洗脱,而后透析和冻干得到目标蛋白,记为椰子中性糖蛋白。

2. 根据权利要求1所述的一种椰子特异性蛋白的纯化方法,其特征在于:步骤1)所述的缓冲液为Tris-HCl Buffer缓冲液,其配方为50mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5mM KCl, 10mM DTT。

3. 根据权利要求1所述的一种椰子特异性蛋白的纯化方法,其特征在于:步骤3)所述的SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳分别是4%的浓缩胶和12%的分离胶。

4. 根据权利要求1所述的一种椰子特异性蛋白的纯化方法,其特征在于:步骤3)中的洗脱缓冲液为7M的尿素溶液,洗脱电流为10A。

5. 一种椰子蛋白特异性抗体,由权利要求1~4任意一项权利要求所述方法纯化得到的椰子中性糖蛋白直接或间接诱导动物体产生。

6. 根据权利要求5所述的椰子蛋白特异性抗体,其特征在于:所述抗体为单克隆抗体。

7. 一种检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒,包括包被了椰子中性糖蛋白的酶标板、抗椰子中性糖蛋白酶标抗体、底物显色液、终止液和椰子中性糖蛋白标准液,其特征在于:所述酶联免疫试剂盒中使用的抗体为权利要求5或6任意一项所述的抗体,椰子中性糖蛋白按权利要求1~4任意一项权利要求所述的方法制备得到。

8. 根据权利要求7所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶联免疫试剂盒中有椰子中性糖蛋白标准液7瓶,其浓度分别为0 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、8 μg/mL、16 μg/mL、32 μg/mL。

## 一种检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测领域,具体涉及食品中椰子蛋白的快速定量检测。

### 背景技术

[0002] 椰子蛋白饮料具备“天然、绿色、营养、健康”的品类特征,符合饮料市场发展潮流和趋势,深受消费者的喜爱,消费人群正在快速增长。不少企业看好椰子蛋白饮料的市场纷纷进入该领域并取得不小的佳绩。然而随着植物蛋白饮料的快速发展,椰子蛋白饮料中植物蛋白的含量造假的报道越来越引起关注,消费者报道杂志 2014 年 3 月 18 日刊文披露,部分椰子蛋白饮料产品以三聚氰胺冒充蛋白,并且指出植物蛋白饮料真实的植物蛋白含量存疑。固体饮料——椰子粉也深陷奶精门。据中国食品安全报 2014 年 3 月 14 日报道,海风堂和春光速溶椰子粉的植物蛋白含量存在严重问题,椰子汁含量极低。

[0003] 造成这种乱象和质疑的根本原因在于缺少植物蛋白饮料中所含有植物蛋白的定量方法。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 5g/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。凯氏定氮法是通过测定样品中总氮的含量推算出蛋白含量。这就导致了不法分子可以三聚氰胺等高氮小分子非法添加物冒充植物蛋白,或以大豆蛋白、牛奶蛋白等相对廉价的蛋白掺伪价格较高的椰子蛋白。植物蛋白饮料对其总氮的测定不能真实反映添加的植物蛋白的含量或者乳蛋白含量。这不仅涉及到欺骗消费者,更严重的是掺伪过程因风味常需要添加过量的或非法的香精香料,极大威胁食品安全。

[0004] 目前,对于食品中的椰子蛋白含量的测定方法目前国内外还未见相关报道。植物生物属性鉴定主要通过 PCR 法,所见报道一般用于过敏原成分的检测。但由于 DNA 在细胞中的拷贝数不一致, DNA 在食品热加工中部分断裂等缺点,因此, PCR 方法只适用于定性检测,定量检测准确性较差,导致掺伪产品无法鉴别。因此,为客观准确定量食品中的椰子蛋白,迫切需要建立能检测椰子蛋白含量的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明涉及一种检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒。

[0006] 本发明所采取的技术方案是:

一种椰子特异性蛋白的纯化方法,包括以下步骤:

1) 蛋白提取:将椰子果肉用粉碎机粉碎后,取部分样品,使用缓冲液超声提取 5~7 小时,去除杂质后得到上清液;

2) 初次分离纯化:对上清液利用等电聚焦仪进行初次分离纯化,截取等电点为 6~8 的组分;

3) 二次分离纯化:初分离的样品使用 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分别进行浓缩和分离,75~85V 电泳 1.5~2.5h 后,切取分子量为 20~25kDa 的蛋白凝胶条带;

4) 回收制备:将蛋白凝胶使用研钵粉碎后,加入电洗脱仪,使用洗脱缓冲液对目标蛋

白进行洗脱,而后透析和冻干得到目标蛋白,记为椰子中性糖蛋白。

[0007] 进一步的,步骤 1) 所述的缓冲液为 Tris-HCl Buffer 缓冲液,其配方为 50mM Tris-HCl, pH8.8, 1.5mM KCl, 10mM DTT。

[0008] 进一步的,步骤 3) 所述的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分别是 4% 的浓缩胶和 12% 的分离胶。

[0009] 进一步的,步骤 3) 中的洗脱缓冲液为 7M 的尿素溶液,洗脱电流为 10A。

[0010] 一种椰子蛋白特异性抗体,由上述方法纯化得到的椰子中性糖蛋白直接或间接诱导动物体产生。

[0011] 进一步的,所述椰子蛋白特异性抗体为单克隆抗体。

[0012] 一种检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒,包括包被了椰子中性糖蛋白的酶标板、抗椰子中性糖蛋白酶标抗体、底物显色液、终止液和椰子中性糖蛋白标准液,其特征在于:所述酶联免疫试剂盒中使用的抗体为权利要求 5 或 6 任意一项所述的抗体,椰子中性糖蛋白按权利要求 1 ~ 4 任意一项权利要求所述的方法制备得到。

[0013] 进一步的,所述检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒中有椰子中性糖蛋白标准液 7 瓶,其浓度分别为 0 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、8 μg/mL、16 μg/mL、32 μg/mL。

[0014] 本发明的有益效果是:

1) 本发明通过超声提取以及二次分离纯化制备得到 20 ~ 25kDa,等电点为 6 ~ 8 的椰子特异性蛋白。

[0015] 2) 本发明利用已制备的椰子特异性蛋白直接或间接诱导动物体产生椰子特异性蛋白抗体,并进一步制备检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒。

[0016] 3) 本发明所制备的试剂盒中椰子特异性蛋白抗体针对的抗原决定簇耐热,可对椰子及其相关产品进行蛋白定量检测,适用范围广,有利于消费者合法权益的保障;特异性好:和其他核果、坚果蛋白及其他植物蛋白饮料中的原料蛋白无交叉反应;灵敏度高:最低可识别 1 μg/mL 椰子中性糖蛋白;抗基质干扰效果好,不易受到食品中其他原辅料的干扰;检测结果准确性好,重复性好;样品的前处理简单,检测操作简单,试剂均以工作液的形式提供,可方便地进行大量样本的筛查。

## 附图说明

[0017] 图 1 为椰子中性糖蛋白双向电泳蛋白图谱;

图 2 为椰子中性糖蛋白酶联免疫检测标准曲线。

## 具体实施方式

[0018] 以下结合具体实验,对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0019] 椰子特异性蛋白的分离纯化

将椰子果肉部分粉碎机粉碎后,取样品 100g,使用 Tris-HCl Buffer(配方:50mM Tris-HCl, pH8.8, 1.5mM KCl, 10mM DTT)超声提取 5 ~ 7h。离心取上清,使用液相等电聚焦仪进行初次分离纯化,截取等电点为 6 ~ 8 的组分;

初分离得到的样品使用垂直电泳仪进行再纯化:将初分离的样品使用 4% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,同时使用预染蛋白标准品作为分子量

参照。80V 电泳 2h 后, 参照预染蛋白标准品切取分子量为 20 ~ 25kDa 的蛋白凝胶条带。将蛋白凝胶使用研钵粉碎后, 加入电洗脱仪, 使用 7M 尿素 10A 电流洗脱 8h。对收集帽中的富集蛋白进行透析, 冻干。通过双向电泳检测分析(图 1), 目标蛋白为 22kDa 蛋白, 未见其他杂蛋白, 纯度满足免疫要求。纯化得到的椰子特异性目标蛋白记名为椰子中性糖蛋白。

#### [0020] 抗椰子中性糖蛋白抗体的制备和纯化

1) 用椰子中性糖蛋白分别免疫 6 周雌性 balb/c 鼠, 每组 3 只。首次免疫注射时, 取 100 μg/mL 的免疫抗原 100 μl, 与等量弗氏完全佐剂充分乳化, 腹腔直接注射。间隔两周后, 取同样的抗原 100 μl, 与等量不完全佐剂乳化, 同样方法注射;

2) 在细胞融合前 1d 或当天拉颈处死昆明鼠, 浸泡在 70% 酒精中, 体表消毒; 用大头针固定昆明鼠在蜡板上, 超净工作台上剪开腹部, 用小镊子挑起腹膜, 注入 5mL RPMI-1640 完全培养液(由 GIBICO RPMI-1640 基础培养液加入 15% 胎牛血清而得), 用手轻轻揉动腹腔, 将其体内液体用无菌吸管移入 75mL HAT 完全培养液(由 74.25mL RPMI-1640 完全培养液加入 0.75mL 100×HAT 液而得)中, 用吸管混匀, 铺 24 孔板, 每孔加 0.5mL, 置于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中;

3) 小鼠眼眶放血, 收集血清, 拉颈处死, 70% 酒精浸泡消毒体表, 无菌取出脾脏, 放入 RPMI-1640 基础培养液(购自 GIBICO, 货号为 A10491-01) 中, 并小心剔除筋膜及脂肪, 剪碎, 置于 100 目的不锈钢筛内, 无菌研磨, 释放出单个脾细胞, 吸取含有脾细胞的液体置于 50mL 无菌离心管中, 离心;

4) 将骨髓瘤细胞和上述制备好的脾细胞以个数 5 : 1 的比例加入同一 50mL 的离心管中, 加入 37°C 温浴的 RPMI-1640 不完全培养液(购自 GIBICO, 货号为 61870-036) 20mL, 混合均匀, 1500r/min 离心 6min, 弃去上清, 用手指轻击离心管底部, 使沉淀混匀如糊状; 用移液管取 37°C 预热的 PEG 1mL, 滴入离心管, 静置 1min 后, 于 37°C 水浴中在 2min 内滴加 RPMI-1640 完全培养液 10mL, 1000r/min 离心 6min, 弃去上清, 加 75mL HAT 培养液, 轻轻混匀, 将混匀悬液分装于有饲养细胞的 24 孔板中, 每孔 0.5mL, 于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中孵育;

5) 融合后 6 ~ 9d, 用 HAT 培养液半量换液 1 次, 在 12 ~ 14d 后根据增殖情况改用 RPMI-1640 完全培养液; 待细胞贴壁至占板孔 1/3 时, 计杂交瘤细胞生长的孔数及细胞总数, 取上清液, 间接 ELISA 选择效价高和间接竞争 ELISA 选择药物抑制强的阳性杂交瘤细胞;

6) 采用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞筛选, 显示阳性并出现竞争抑制反应的孔为产椰子中性糖蛋白抗体的孔, 并可用于进一步的亚克隆;

7) 无菌条件下, 洗脱阳性孔内的细胞, 用弯头吸管将细胞转移至预先以饲养细胞铺板的 96 孔培养板中, 每个原始孔克隆成 8 孔, 待细胞贴壁长满 1/2 ~ 1/3 孔底后, 取上清液, 间接 ELISA 检测; 取呈阳性强的亚克隆, 如此反复 2 ~ 5 次, 待所克隆的 8 个孔上清液中抗体阳性率为 100% 时, 挑取单细胞克隆, 检测为全阳性者转移至 24 孔细胞培养板或 25mL 细胞培养瓶扩大培养, 建株并以分装、冻存。提前一周注射 0.5mL 降植烷至 Balb/c 小鼠腹腔。取冻存细胞株, 复苏后, 经大量培养繁殖, 收集细胞, 用不完全培养基洗涤二次后, 再用 10mL 不完全培养基悬浮, 计数; 将细胞(每只小鼠 1mL, 含 3.1 × 10<sup>7</sup> 个细胞) 腹腔注射小鼠腹部, 10 ~ 15d 后, 待小鼠腹部明显膨大时用 16 号注射器无菌采集腹水; 2000r/min 离心 10min,

去除上层脂肪和下层纤维蛋白及细胞,收集中层,分装 -70℃冻存备用;

8) 取腹水离心后的中层部分 3mL,加入 2 倍体积的 0.06mol/L、pH 4.5 醋酸钠缓冲液。将正辛酸逐滴慢慢加入样品中,至终浓度 33 μg/mL 腹水,边加边搅拌,加完后继续搅拌 30min,4℃下 10000r/min 离心 30min,去沉淀(白蛋白和其它非 IgG 蛋白)。取上清经 0.45 μm 微孔膜过滤,与 1/10 体积 10×PBS 混合(10×PBS 由 80gNaCl、2g KCl、11.5g Na<sub>2</sub>HP04、2gKH<sub>2</sub>PO4、0.5845g EDTA 用 950mL 蒸馏水溶解后,调 pH 至 7.4 并定容至 1000mL 而得),用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 值到 7.4。上清冷却到 4℃,加硫酸铵至终浓度为 0.277g/mL。搅拌 30min,4℃下 10000r/min 离心 30min,弃上清。用少量 PBS 溶液溶解沉淀,用 50~100 倍体积的 PBS 透析过夜,换液 3 次。得到纯化后的抗椰子中性糖蛋白抗体,4℃下贮藏备用。

#### [0021] 椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒的构建

##### 1) 预包被酶标板:

将 0.1mL 1mg/L 的目标抗原(椰子中性糖蛋白)加入高吸附酶标板,包被过夜,采用封闭液封闭 2h,封闭液的配方为(1%牛血清白蛋白,1%牛酪蛋白,0.5%大豆蛋白粉,0.05%吐温-80,溶于 0.01M pH7.4PBS),封闭后洗版真空干燥;

##### 2) 抗椰子中性糖蛋白酶标抗体:

称取 5mg 辣根过氧化物酶溶解于 1mL 蒸馏水中,加入 0.2mL 新配的 0.1M NaIO<sub>4</sub>溶液,室温下避光搅拌 20 分钟。将上述溶液装入透析袋中,对 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜。加 20 μl 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液, pH 升高到 9.0~9.5,然后立即加入 10mg 抗椰子中性糖蛋白单克隆抗体在 1ml 0.01M 碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌 2 小时。加 0.1mL 新配的 4mg/ml NaBH<sub>4</sub> 液,混匀,再置 4℃ 2 小时。将上述液装入透析袋中,对 0.15M pH7.4PBS 透析,4℃过夜,加入 1% 的牛血清白蛋白,0.05% 吐温-80 和 15mM 的叠氮化钠分装 14mL 至每个试剂盒;

##### 3) 底物显色液:

由显色剂 A 和显色剂 B 等体积混匀而得;称取 23mg 四甲基联苯胺,加 1mL DMSO 溶解,然后加 0.1M pH5.5 乙酸-醋酸钠缓冲液 66mL,得到显色剂 A;取双蒸水 100mL,加过氧化脲 10 μg,得到显色剂 B。将显色液 A 和显色液 B 按体积比 1:1 混合,分装 14mL 至每个试剂盒;

##### 4) 终止液:为 2M 硫酸溶液,分装 7mL 至每个试剂盒;

本发明提供的椰子蛋白免疫检测试剂盒包括:椰子中性糖蛋白标准液 7 瓶,浓度分别为 0 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、8 μg/mL、16 μg/mL、32 μg/mL;抗椰子中性糖蛋白酶标抗体;包被了椰子中性糖蛋白的酶标板,底物显色液,终止液。

#### [0022] 本发明提供的椰子蛋白免疫检测试剂盒在 4℃环境下贮藏,可保质 1 年以上。

#### [0023] 椰子蛋白酶联免疫试剂盒对椰子相关产品进行检测

##### 1) 样品前处理:

椰子饮料:将椰子饮料均质,称取 1g,加入 20mL 0.01M pH7.4 的 PBS 超声连续提取 2min,离心,取上清液为样品检测溶液,如果样品检测溶液的检测结果超过线性范围上限,需再酌情稀释;

含有椰子成分的固体食品:将固体样品研磨至粉状,称取 0.1g,加入 10mL 0.01M pH7.4 的 PBS 超声连续提取 2min,离心,取上清液稀释 1000 倍后,得到样品检测溶液;

2) 椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒进行检测：

将所需试剂从冷藏环境中取出，在室温下平衡 30min 以上，各种试剂使用前均须摇匀；加系列浓度的椰子中性糖蛋白标准液或样品检测溶液 50ul 到相应的微孔中，标准液均需做 2 个平行试验，然后加 50  $\mu$ l 酶标抗体工作液，室温避光反应 30 分钟；

小心揭开盖板膜，弃去微孔中液体，并将微孔中剩余残液在吸水纸上拍干，往微孔中注满洗涤液，轻轻振荡，放置 2 分钟，弃去微孔中液体，并在吸水纸上拍干，重复洗涤 4 次或机洗 5 次；

加 100  $\mu$ l 底物显色液到相应的微孔中，并在室温下避光反应 15 分钟；

加 50  $\mu$ l 终止液到相应的微孔中，使用酶标仪于 450nm 波长下测定 OD 值；

3) 绘制标准曲线：

根据椰子中性糖蛋白标准液的实验数据建立标准曲线

标准曲线如图 2 所示。标准曲线的回归方程  $R^2 > 0.99$ ，说明 OD 值与椰子中性糖蛋白浓度具有很好的线性关系。根据标准曲线的线性回归方程，计算出样品中的椰子中性糖蛋白含量，将此含量乘以系数 6.5，得到椰子全蛋白含量。

[0024] 椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒的特异性

使用椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒对食品其他常见蛋白进行检测，结果如表 1 所示。从表 1 可知，椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒与食品中其他蛋白成分无交叉反应，特异性好，检测结果不会受影响。

[0025] 表 1 椰子蛋白酶联免疫试剂盒与食品中其他蛋白成分的交叉反应

	交叉反应率(%)		交叉反应率(%)
椰子中性糖蛋白	100	夏威夷果全蛋白	0
北杏全蛋白	0	腰果全蛋白	0
南杏全蛋白	0	小麦粉全蛋白	0
花生全蛋白	0	马蹄粉全蛋白	0
核桃全蛋白	0	黑芝麻全蛋白	0
白芸豆全蛋白	0	大米粉全蛋白	0
红芸豆全蛋白	0	孜然粉全蛋白	0
绿豆全蛋白	0	黑胡椒全蛋白	0
蚕豆全蛋白	0	白胡椒全蛋白	0

	交叉反应率(%)		交叉反应率(%)
赤小豆全蛋白	0	燕麦全蛋白	0
黄豆全蛋白	0	生鸡蛋全蛋白	0
黑豆全蛋白	0	熟鸡蛋全蛋白	0
白莲全蛋白	0	纯牛奶全蛋白	0

### 椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒的重复性

使用椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒连续 6 天重复测定 10 个样品的椰子蛋白含量, 结果如表 2 所示。从表 2 可知, 椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒进行样品检测的相对标准偏差 <5%, 重复性好。

[0026] 表 2 连续 6 天测定 12 个椰子制品的椰子蛋白含量及相对标准偏差

样品	椰子蛋白含量 (mg/kg)						RSD (%)
	测定 1	测定 2	测定 3	测定 4	测定 5	测定 6	
椰奶 1	$2.46 \times 10^4$	$2.22 \times 10^4$	$2.51 \times 10^4$	$2.42 \times 10^4$	$2.53 \times 10^4$	$2.31 \times 10^4$	4.1%
椰奶 2	$3.56 \times 10^4$	$3.30 \times 10^4$	$3.61 \times 10^4$	$3.42 \times 10^4$	$3.48 \times 10^4$	$3.52 \times 10^4$	4.3%
椰奶 3	$3.16 \times 10^3$	$3.02 \times 10^3$	$3.03 \times 10^3$	$3.14 \times 10^3$	$3.22 \times 10^3$	$3.25 \times 10^3$	3.0%
椰奶 4	$3.56 \times 10^3$	$3.71 \times 10^3$	$3.56 \times 10^3$	$3.62 \times 10^3$	$3.66 \times 10^3$	$3.49 \times 10^3$	2.2%
椰子糖 1	$3.98 \times 10^3$	$3.72 \times 10^3$	$3.95 \times 10^3$	$3.86 \times 10^3$	$3.87 \times 10^3$	$3.85 \times 10^3$	2.4%
椰子糖 2	$5.01 \times 10^3$	$5.26 \times 10^3$	$5.13 \times 10^3$	$5.21 \times 10^3$	$5.19 \times 10^3$	$5.06 \times 10^3$	1.8%
椰子糖 3	$5.32 \times 10^3$	$5.57 \times 10^3$	$5.23 \times 10^3$	$5.44 \times 10^3$	$5.36 \times 10^3$	$5.31 \times 10^3$	2.2%
椰子糖 4	$6.41 \times 10^5$	$6.52 \times 10^5$	$6.45 \times 10^5$	$6.53 \times 10^5$	$6.48 \times 10^5$	$6.20 \times 10^5$	1.9%
椰子粉 1	$5.37 \times 10^5$	$5.11 \times 10^5$	$5.36 \times 10^5$	$5.29 \times 10^5$	$5.37 \times 10^5$	$5.56 \times 10^5$	2.7%
椰子粉 2	$1.26 \times 10^6$	$1.33 \times 10^6$	$1.22 \times 10^6$	$1.28 \times 10^6$	$1.25 \times 10^6$	$1.25 \times 10^6$	2.9%
椰子粉 3	$6.33 \times 10^5$	$6.12 \times 10^5$	$6.50 \times 10^5$	$6.41 \times 10^5$	$6.44 \times 10^5$	$6.23 \times 10^5$	2.2%
椰子粉 4	$5.56 \times 10^5$	$5.22 \times 10^5$	$5.63 \times 10^5$	$5.70 \times 10^5$	$5.62 \times 10^5$	$5.55 \times 10^5$	3.0%

### 椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒的基质效应

使用椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒对样品 (包括阴性样品和阳性样品) 中食盐、葡萄糖和果糖等一些常见干扰物进行基质效应的检测, 结果如表 3 所示。由表 3 可知, 在对阴性样品和阳性样品的检测中, 质量浓度 1% 的葡萄糖、1% 的果糖、1% 的淀粉、1% 的氯化钠对

检测结果的影响均无显著差异 ( $p>0.05$ )，说明本发明提供的椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒抗基质干扰效果好，只需对样品进行超声提取和稀释，即可完成样品前处理。

[0027] 表 3 常见干扰物对椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒检测结果的影响

常见干扰物	抑制率 (%)	常见干扰物	抑制率 (%)
1%食盐	0	0.1%卡拉胶	0
1%葡萄糖	0	0.1%明胶	0
1%蔗糖	0	0.1%海藻酸钠	0
1%果糖	0	0.1%黄原胶	0
1%淀粉	0	0.1%果胶	0
0.1%谷氨酸	0	0.1%聚丙烯酸钠	0

从表中数据可知，本发明的椰子蛋白酶联免疫检测试剂盒的特异性好，不易受到其他物质的干扰，检测结果可靠。

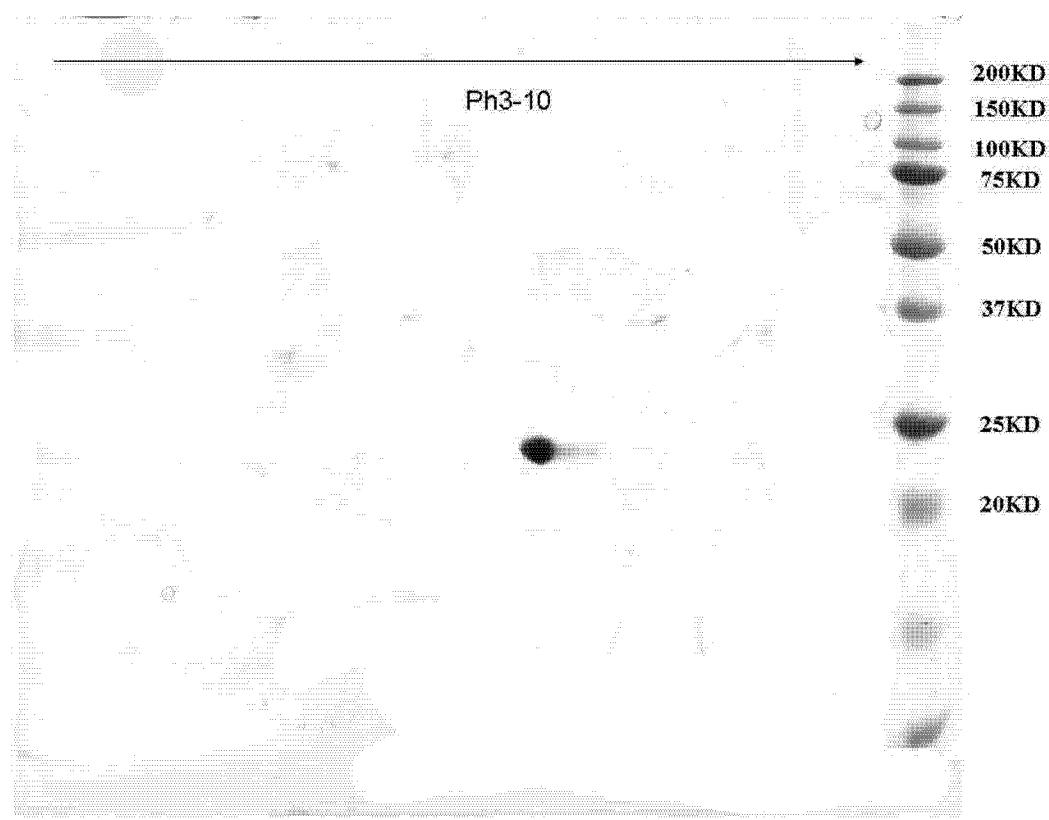


图 1

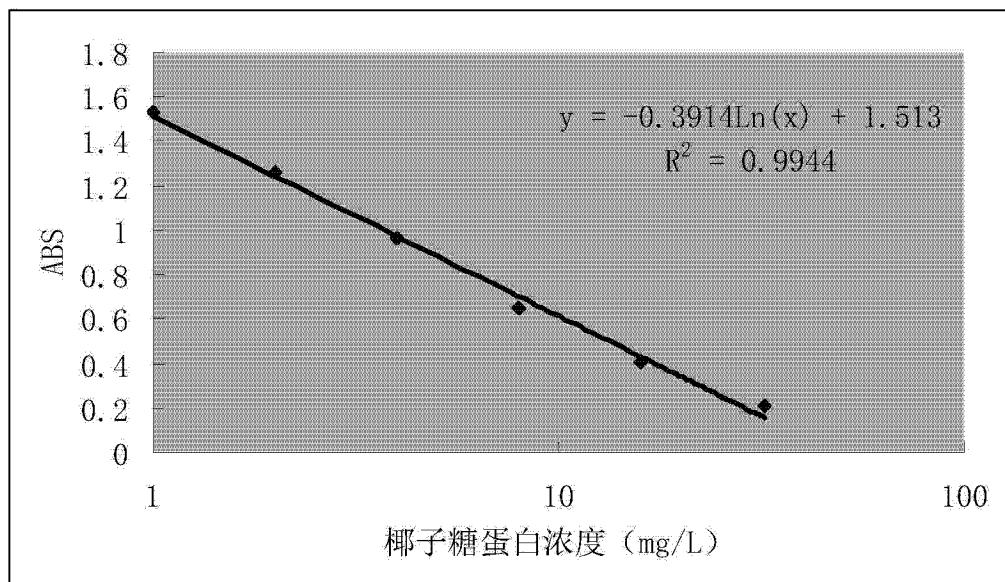


图 2

专利名称(译)	一种检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN104502582A</a>	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	CN201410767465.X	申请日	2014-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市计量质量检测研究院		
申请(专利权)人(译)	深圳市计量质量检测研究院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市计量质量检测研究院		
[标]发明人	赖晓芳 张世伟 赖心田 李碧芳 黄静敏 王士峰 冯荣虎 唐栋 马广东 杨国武		
发明人	赖晓芳 张世伟 赖心田 李碧芳 黄静敏 王士峰 冯荣虎 唐栋 马广东 杨国武		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/14 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/14 G01N33/531 G01N33/68		
其他公开文献	<a href="#">CN104502582B</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了一种检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒。发明人从椰子果肉中分离纯化制备得到20~25kDa,等电点为6~8的椰子特异性蛋白,其纯度满足免疫要求。同时利用该椰子特异性蛋白诱导产生椰子特异性蛋白抗体,并进一步制备检测椰子蛋白的酶联免疫试剂盒。本发明所制备的试剂盒中椰子特异性蛋白抗体针对的抗原决定簇耐热,可对椰子及其相关产品进行蛋白定量检测,适用范围广,有利于消费者合法权益的保障;特异性好,灵敏度高,抗基质干扰效果好,检测结果准确性好,重复性好;样品的前处理简单,检测操作简单,试剂均以工作液的形式提供,可方便地进行大量样本的筛查。

	交叉反应率(%)		交叉反应率(%)
椰子中性糖蛋白	100	夏威夷果全蛋白	0
杏仁全蛋白	0	腰果全蛋白	0
南杏全蛋白	0	小麦粉全蛋白	0
花生全蛋白	0	马蹄粉全蛋白	0
核桃全蛋白	0	黑芝麻全蛋白	0
白芸豆全蛋白	0	大米粉全蛋白	0
红芸豆全蛋白	0	孜然粉全蛋白	0
绿豆全蛋白	0	黑胡椒全蛋白	0
蚕豆全蛋白	0	白胡椒全蛋白	0

