

## بهینه‌سازی آزمایشات ELISA برای تشخیص و شناسایی پروتئین پسته در مواد غذایی

\*محمد قربانی<sup>۱</sup> و مایکل مورگان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، <sup>۲</sup>استاد گروه علوم غذایی، دانشگاه لیدز انگلستان

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۲

### چکیده

میوه‌های آجیلی از جمله پسته دارای پروتئین‌هایی هستند که سبب ظهور عوارض آلرژی غذایی در برخی افراد حساس می‌شوند. مقررات جدید برچسب‌گذاری و روش‌های نظارتی موجود، مستلزم به‌کارگیری روش‌های دقیق تشخیص و شناسایی باقی‌مانده پروتئین‌های آلرژی‌زا در سطح پی‌پی‌ام می‌باشد. در تحقیق حاضر پروتئین‌های پسته به‌وسیله سه محلول PBS، آب نمک ۰٫۱ درصد و بافر تریس استخراج شدند تا بهترین محیط استخراج برای یک پروتئین خاص انتخاب شود. با توجه به نتایج الکتروفورز و پروفیل پروتئین‌های استخراج شده، در مرحله بعد، از اشیاع‌سازی سولفات آمونیوم به‌صورت تدریجی (۲۰ تا ۹۰ درصد) و کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل برای خالص‌سازی پروتئین استفاده شد. در بخش سوم، از پروتئین خالص شده به‌عنوان آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی ویژه در بدن خرگوش استفاده گردید. پس از تولید آنتی‌بادی و ارزیابی میزان واکنش‌پذیری و ویژه بودن آنها، روش‌های ELIS حساس و ویژه برای بازیافت و شناسایی پروتئین‌های مربوطه در ۱۲ نمونه مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که میزان بیشتر پروتئین استخراج شده در یک محیط خاص همواره نشانه کارا تر بودن آن محیط برای جدا کردن یک باند پروتئینی معین نیست. نتایج اندازه‌گیری باقی‌مانده پروتئین پسته به‌وسیله چهار محیط استخراج و سه سطح رقت آنتی‌بادی، همچنین نشان دادند که برای غذاهای مورد مطالعه و انواع مشابه حداقل یک روش استخراج و یک سطح رقت آنتی‌بادی وجود دارد که با استفاده از آنها می‌توان باقی‌مانده پروتئین پسته را به‌طور دقیق و قابل اعتمادی تشخیص داده و اندازه‌گیری نمود.

**واژه‌های کلیدی:** پسته، آلیزا، آنتی‌بادی، آلرژی‌زایی، خالص‌سازی پروتئین، سولفات آمونیوم

### مقدمه

آلرژی‌زا قرارگیرد. مطالعات زیادی روی علل و عوامل بروز آلرژی پس از مصرف میوه‌هایی نظیر پسته انجام شده و محققان به این نتیجه رسیده‌اند که آنتی‌بادی‌های فرد حساس، پروتئین این نوع میوه‌ها را به‌عنوان یک جسم خارجی شناخته و بر اثر این مقابله، ترکیبات واسطه‌ای نظیر هیستامین ترشح شده و عوارض آلرژی نظیر اگزما،

به‌رغم کیفیت و ارزش غذایی بالای پسته، وجود پروتئین‌های آلرژی‌زا باعث شده تا این میوه به همراه برخی دیگر از میوه‌های خشک نظیر فندق جزو غذاهای

ساترلند و همکاران ۱۹۹۹؛ گارسیا و همکاران، ۲۰۰۰؛ ایباز و همکاران، ۲۰۰۳).

استخراج و خالص سازی پروتئین‌ها از میوه‌های خشک درختی نظیر پسته، بادام، فندق و بادام زمینی برای مقاصد مختلف، موضوع تحقیق بسیاری از محققان بوده است، از جمله پومز و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از بافرهای مختلف (بافر سیترات، بافر تریس به همراه نمک، بافر فسفات به همراه نمک، محلول اوره ۶ مولار و بافر کربنات سدیم) و شرایط مختلف دما و زمان (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه) و نسبت پودر به بافر ۱ به ۲۵ پروتئین‌های بادام زمینی را استخراج و میزان پروتئین محلول را در شرایط مختلف مقایسه کردند. پاسینی و همکاران (۲۰۰۰) نیز با استفاده از محلول ۰/۵ مولار نمک طعام و نسبت پودر به محلول ۱ به ۱۰۰ پروتئین‌های بادام را استخراج و سپس با استفاده از استون محلول حاصل را چربی‌گیری نمودند. در تحقیقی مشابه توسط بایر و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از PBS<sup>۱</sup> و چربی‌گیری با استون یک باند پروتئینی خاص را از فندق استخراج و ویژگی‌های آن را مورد مطالعه قرار دادند.

در این تحقیق روش‌های مختلف استخراج پروتئین‌های پسته از نظر کارایی استخراج با یکدیگر مقایسه شده و پس از انتخاب بهترین روش، یکی از کوچک‌ترین پروتئین‌های آن به صورت خالص ایزوله و آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه آن در خون خرگوش تولید گردید. پس از آزمون فعالیت و ویژه بودن آنتی‌بادی نسبت به پروتئین خالص شده، با استفاده از روش الیزا میزان باقی‌مانده این پروتئین در ۱۲ نوع ماده غذایی مختلف با، بدون و یا مجهول از نظر وجود پسته تعیین گردید. هدف اصلی از تحقیق حاضر بهینه کردن شرایط آزمایش‌های ایمونوشیمیایی برای اندازه‌گیری باقی‌مانده پروتئین پسته

آسم، آبریزش از بینی و... به وجود می‌آید (ارشاد، ۲۰۰۵). ایران قرن‌ها بدون رقیب، عمده‌ترین تولیدکننده پسته جهان بود؛ اما در حال حاضر کشورهای دیگر در زمینه تولید و تجارت پسته به رقابت با ایران پرداخته‌اند؛ به طوری که ترکیه و آمریکا که در یکصد سال پیش در زمره مشتریان ایران بودند، در سال‌های اخیر تولید محصول خود را بالا برده و به رقیبی برای ایران مبدل شده‌اند. تبلیغات منفی علیه پسته ایران به بهانه آلوده بودن به افلاتوکسین و همچنین، انبارداری پسته و بسته‌بندی آن از چالش‌ها و مشکلات پیش روی این محصول در ایران است (وزارت جهاد کشاورزی ایران، ۲۰۰۸).

جدا از مسائل اقتصادی و سیاسی، وجود پروتئین‌های آلرژی‌زا در پسته و میوه‌های مشابه و اثرات آن روی سلامت افراد حساس به آن به موضوعی مهم در اروپا و آمریکا تبدیل شده است تا جایی که مقررات جدید اتحادیه اروپا تمام تولیدکنندگان و واردکنندگان را ملزم می‌کند برچسب‌های "may contain nut" و یا "contains nut" را بر روی محصولات که حاوی مقادیری هر چند ناچیز از مغزها و یا بادام زمینی باشند الصاق کنند. تشدید مقررات اتحادیه اروپا درباره مواد غذایی که به نحوی عامل بروز بیماری در افراد حساس می‌باشند سبب شده تا انجام تحقیقات بر روی عوامل طبیعی موجود در غذاها که به نوعی در این زمینه ارتباط دارند سرعت و گستردگی بیشتری پیدا کند. گزارش‌های متعددی در دست است که حاکی از خطرناک بودن پسته برای برخی افراد خردسال حساس به پروتئین‌ها است. در موارد بسیاری بروز شوک ناگهانی<sup>۱</sup> پس از خوردن پسته، فندق، ماکادامیا<sup>۲</sup> و پاین نات<sup>۳</sup>، بادام هندی و... گزارش شده است (فرناندز و همکاران، ۱۹۹۵؛ هوریهان، ۱۹۹۸؛

1- Anaphylaxis  
2- Macadamia  
3- Pine Nut

4- Phosphate Buffered Saline

نسبت پودر به محلول ۱ به ۱۰ انتخاب شد و عمل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت در حالی که به آرامی با هم‌زن مغناطیسی به هم زده می‌شد، انجام گرفت. مواد جامد غیرمحلول ابتدا توسط پارچه و سپس در سانتریفوژ (۱۴۰۰ دور در دقیقه) جدا شدند. مایع زلال‌رویی در لوله‌های پلاستیکی ۲ میلی‌متری به تعداد لازم تقسیم و برای استفاده در مراحل بعد در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد غلظت پروتئین در همه نمونه‌ها به روش کوماسی بریلیانت بلو<sup>۳</sup> (با اندکی تغییر در روش برادفورد<sup>۴</sup>، ۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد.

**ب- مشخص کردن باندهای پروتئینی توسط الکتروفورز:**  
الگوی پراکنش باندهای پروتئینی پسته در هر سه روش استخراج به وسیله الکتروفورز ژل اس دی اس- پلی‌اکریل آمید<sup>۵</sup> به دو روش طبیعی و غیرطبیعی انجام شد. در روش طبیعی تنها از حرارت برای شکستن باندهای پروتئینی استفاده می‌شود ولی در روش غیرطبیعی علاوه بر حرارت، DTT<sup>۶</sup> هم اضافه می‌شود تا پیوندهای دی‌سولفیدی شکسته شوند. در این صورت پروتئین‌ها تا اندازه ممکن به زیر واحدهای<sup>۷</sup> کوچک‌تر شکسته می‌شوند. الگوی الکتروفورز باندهای پروتئینی راهنمای مفیدی برای بررسی کمی و کیفی پروتئین‌های موجود در نمونه ماده غذایی و انتخاب نوع محلول برای استخراج یک پروتئین خاص می‌باشد.

**ج- خالص‌سازی پروتئین با استفاده از سولفات آمونیوم:** کوچک‌ترین باند پروتئینی پسته با توجه به الگوی الکتروفورز باندهای پروتئینی آن در محلول استخراج‌کننده انتخاب و با استفاده از روش اشباع‌سازی با

در انواع مختلف غذاها بود. به‌کارگیری روش‌های استخراج پروتئین به‌کار گرفته شده و سطوح متفاوت رقت آنتی‌بادی در این تحقیق راهنمای مفیدی در اختیار محققان دیگر قرار می‌دهد تا بهترین روش استخراج و مناسب‌ترین سطح رقت آنتی‌بادی جهت به‌دست آوردن بهترین نتیجه را انتخاب کنند.

## مواد و روش‌ها

به‌استثنای موادی که به‌طور مشخص ذکر می‌شوند کلیه مواد شیمیایی از شرکت فیشر<sup>۱</sup> خریداری شدند. پسته خشک و بدون نمک تولید ایران که از بازار محلی تهیه گردید. اندازه‌گیری ترکیبات اصلی پسته شامل پروتئین، آب، چربی و کربوهیدرات به روش‌های استاندارد انجمن رسمی شیمی‌دانان تجزیه<sup>۲</sup> (هورویتز، ۲۰۰۵) انجام گرفت. آزمایش‌ها در چهار بخش و به‌صورت زیر انجام شدند:

**الف- استخراج پروتئین:** از آنجا که روش مشخص و مؤثری که همه محققان بر آن اتفاق نظر داشته باشند وجود ندارد از سه محلول مختلف (آب نمک ۱۰ درصد، بافر نمکی فسفات و بافر نمکی تریس) برای استخراج پروتئین استفاده شد. مراحل استخراج در همه روش‌ها یکسان و به‌صورت زیر انجام شدند:

پس از پوست‌گیری، ۵۰۰ گرم پسته با استفاده از خردکن خانگی به‌صورت پودر درآمد و سپس استخراج روغن با استفاده از هگزان، در همان روز با استفاده از دستگاه سوکسله به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. پس از خارج کردن روغن، باقی‌مانده حاصل در سینی با عمق کم به مدت ۲۴ ساعت در زیر هود قرار داده شد تا هگزان همراه آن تبخیر و سپس پروتئین موجود در پودر پسته بدون روغن با استفاده از محلول‌های فوق استخراج شوند.

3- Coomasee Brilliant Blue

4- Bradford method

5- SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

6- Dithietriol

7- Subunits

1- Fisher Scientific, UK

2- Association of Official Analytical Chemists (AOAC)

سولفات آمونیوم خالص سازی شد. انتخاب نوع محلول استخراج کننده (تریس) براساس وضوح باند و بازیافت بیشترین پروتئین نوع 2S در الگوی الکتروفورز بود. برای پیدا کردن مناسب ترین درصد اشباع سولفات آمونیوم از روش اشباع سازی پله ای، که در نوع خود برای اولین بار انجام می شد، استفاده شد. در این روش مقدار ۵۰ گرم پودر پسته بدون روغن با ۵۰۰ میلی لیتر از محلول PBS مخلوط و به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت پایین هم زده شد. مخلوط حاصل توسط سانتریفوژ صاف و بلافاصله با سولفات آمونیوم کریستال تا حد ۲۰ درصد به صورت تدریجی اشباع شد. پس از اشباع سازی، با استفاده از سانتریفوژ مایع رویی و رسوب از یکدیگر تفکیک و از هر بخش نمونه ای جهت بررسی الگوی الکتروفورز برداشته و مایع رویی دوباره به همین روش تا مرز ۳۰ درصد اشباع و نمونه هایی از مایه رویی و رسوب تهیه گردید. عملیات اشباع سازی پله ای تا ۹۰ درصد (افزایش ۱۰ درصد در هر مرحله) و به روش مشابه انجام و در مجموع ۸ نمونه از رسوب و ۸ نمونه از مایع رویی جهت بررسی الگوی الکتروفورز برداشته شد. از لوله های دیالیز (3500MWC) برای حذف نمک از نمونه ها استفاده شد و نمونه ها توسط خشک کن انجمادی تا غلیظ شدن به اندازه غلظت قبل از دیالیز غلیظ شدند. با استفاده از الگوی الکتروفورز حضور یا حضور نداشتن یک پروتئین خاص در مایع رویی یا رسوب حاصل از یک اشباعیت معین مشخص گردید.

**د- کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل:** پس از مشخص شدن درصد اشباعیت حاوی باند پروتئینی مورد نظر، در این مرحله مقدار بیشتری از پودر پسته به وسیله PBS استخراج و میزان اشباعیت سولفات آمونیوم در دو مرحله به درصد مورد نظر رسانده شد. مایع رویی و رسوب توسط سانتریفوژ از هم جدا و جزء حاوی پروتئین هدف (مایع رویی اشباعیت ۸۰ درصد) با استفاده از لوله های

دیالیز (3500MWC) در مقابل مقادیر زیاد آب بدون یون دیالیز و تمام محلول حاصل توسط خشک کن انجمادی خشک و به صورت پودری سفید رنگ درآمد. به دلیل آنکه الگوی الکتروفورز این جزء نشان دهنده بیش از یک باند پروتئین بود از دستگاه کروماتوگرافی ستونی گرادیفراگ<sup>۱</sup> برای خالص سازی بیشتر استفاده شد. از رزین Sephacryl S-200 HR در ستونی با ابعاد ۹۶×۱/۶ سانتی متر برای تفکیک باندهای پروتئینی براساس اندازه مولکولی استفاده گردید. پس از پر کردن ستون با رزین مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با عبور دادن بافر اسید کلریدریک- تریس ۰/۱ مولار حاوی ۰/۳ درصد کلرید سدیم باندازه ۴ حجم ستون رزین به تعادل رسیده و آماده تزریق نمونه بود. از پودر خشک شده حاصل از مرحله اشباع سازی محلولی با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و پس از انحلال کامل با استفاده از سانتریفوژ کاملاً صاف و در ۲۰ لوله ۲ میلی متری اپندورف توزیع و برای استفاده بعدی در کروماتوگرافی در فریزر نگهداری شدند. جهت تزریق نمونه پروتئینی تا حدی خالص شده، ابتدا لوله حاوی آن از یخ باز شده و با دبی ۲ میلی لیتر در دقیقه به ستون تزریق شد. سپس با استفاده از ۳۰۰ میلی لیتر بافر اسید کلریدریک- تریس (۰/۱ مولار، pH=۷/۵) حاوی ۰/۳ درصد کلرید سدیم و با دبی ۲ میلی لیتر در دقیقه شستشو و اجزاء ۶ میلی لیتری پس از گذشتن از یک نمایانگر ماورای بنفش تک مسیر UV-1 در یک جمع کننده جمع آوری شدند. هم زمان منحنی های مربوط به هر پروتئین نیز بر روی کاغذ گراف توسط یک ثبت کننده رسم می گردید. به این ترتیب با توجه به منحنی های به دست آمده و تفکیک خروجی بافر شستشو دهنده فراکسیون های حاوی پروتئین از میان ۵۰ لوله جمع آوری شده قابل تشخیص بودند. نتایج آزمایش های جانبی الکتروفورز بر روی لوله های مربوط به

1- Gradifrac Pharmacia UKB, Upsala, Sweden

استفاده از فعال‌ترین آنتی‌بادی تهیه گردیدند. روش الیزای رقابتی<sup>۵</sup> در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای<sup>۶</sup> اجرا و از دستگاه جذب خوان پلیتی الیزا<sup>۷</sup> برای قرائت میزان جذب نمونه‌ها استفاده شد. جهت انجام آزمایش‌های ایمونولوژی برای اندازه‌گیری باقی‌مانده پروتئین پسته در مواد غذایی چهار روش استخراج به‌کار گرفته شد. این روش‌ها عبارت بودند از:

**استخراج به‌وسیله محلول PBS:** در این روش مقدار ۳۰ گرم نمونه غذایی در یک خردکن خانگی خرد و در یک مخلوط‌کن وارینگ با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول PBS به‌مدت ۴۵ ثانیه استخراج و سپس مایع رویی آن در سانتریفیوژ (۹۰۰۰ جی، ۳۰ دقیقه) جدا و در لوله‌های ۵ میلی‌لیتری در فریزر نگهداری شدند.

**استخراج به‌وسیله محلول اوره:** در این روش از محلول اوره غلیظ (۸ مولار، pH=۱۰) برای استخراج پروتئین نمونه‌های مواد غذایی استفاده شد. چگونگی عمل مشابه روش قبل بود تنها با این تفاوت که به‌دلیل خطرات اوره غلیظ احتیاط و مراقبت بیشتری لازم بود.

**استخراج به‌وسیله استون و محلول PBS:** این روش با مقداری تغییر مشابه روش مولر (هیوکا و همکاران، ۲۰۰۰) اجرا گردید. استون بسیار سرد از طریق فرو بردن یک بالن محتوی استون در ظرفی حاوی مخلوط استون و دی‌اکسیدکربن خشک تهیه شد. مقدار ۶۰ گرم نمونه غذایی تا حد امکان خرد شده به همراه ۱۵۰ میلی‌لیتر استون سرد در یک مخلوط‌کن وارینگ ریخته و به‌مدت ۴۵ ثانیه با دور کند هم‌زده شد. مخلوط حاصل توسط قیف بوختر و تحت خلا صاف و باقی‌مانده جامد نیز دو بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر استون سرد آب‌کشی شد. ماده جامد باقی‌مانده در زیر هود به‌مدت ۲ ساعت قرار داده شد تا

منحنی‌های به‌دست آمده نشان داد که لوله شماره ۲۱ مناسب‌ترین فراکسیون برای جمع‌آوری پروتئین در خالص‌ترین شکل ممکن بود. به این ترتیب عملیات کروماتوگرافی به تعداد ۲۰ مرتبه تکرار و فراکسیون مربوط به لوله شماره ۲۱ در ظرفی بزرگ‌تر جمع‌آوری و در فریزر نگهداری شد. پس از اتمام عملیات کروماتوگرافی ظرف حاوی فراکسیون مورد نظر از یخ باز شده و برای خارج کردن نمک‌های اضافی از یک لوله دیالیز در مقابل آب بدون یون دیالیز و بلافاصله توسط خشک‌کن انجمادی خشک و به‌صورت پودری سفید رنگ درآمد. پودر پروتئینی خالص‌شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده در مرحله بعد نگهداری گردید.

۵- **آزمایش‌های ایمونوشیمیایی (ELISA):** جهت انجام آزمایش‌های تعیین باقی‌مانده پروتئین پسته به روش ELISA در مواد غذایی لازم بود ابتدا آنتی‌بادی‌های ویژه این پروتئین در بدن یک حیوان تولید و جمع‌آوری گردد. برای این کار مقدار ۱۰ میلی‌گرم از پروتئین پسته خالص‌شده (PS70S) تحت شرایط یخچال به شرکت هارلان<sup>۲</sup> فرستاده شد تا آنتی‌بادی مورد نیاز جهت آزمایش‌های الیزا تولید شود. ۰/۵ میلی‌لیتر (۲۰۰ میکروگرم پروتئین خالص‌شده) به‌صورت محلول ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر ماده همراه<sup>۳</sup> به بدن دو خرگوش تزریق و با کاربرد یک برنامه آزمایشی ۷۷ روزه آنتی‌بادی‌های مربوطه تولید و با احتساب یک‌بار خون‌گیری در قبل از تزریق در مجموع ۵ مرتبه نمونه‌های سرم خرگوش‌ها تهیه و تحت شرایط یخچال به آزمایشگاه ارسال شدند. در بدو ورود به آزمایشگاه، آزمایش واکنش‌پذیری بر روی سرم‌ها از طریق رسم منحنی تیتر<sup>۴</sup> انجام و سپس منحنی‌های استاندارد با

5- Competitive ELISA

6- Nunc, Maxisorp, Neerijse, Belgium

7- Labsystems, Uxbridge, UK

1- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

2- Harlan Sera-Lab (Hillcrest, UK)

3- Adjuvant

4- Titre Curve

خشک شود. ۱/۵ گرم پودر خشک بدون چربی در ۲۰ میلی لیتر PBS مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد استخراج گردید. مایع استخراجی حاصل پس از سانتریفوژ در لوله های ۵ میلی لیتری تقسیم و برای آزمایش های بعدی در فریزر نگهداری شدند.

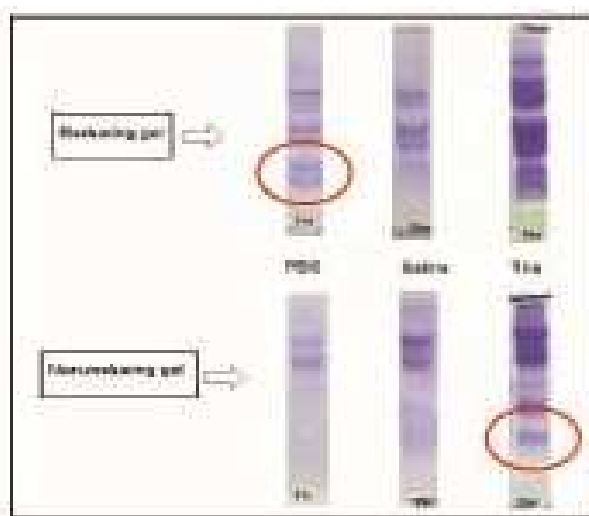
استخراج به وسیله استون به همراه محلول اوره: این روش به طور دقیق مطابق روش قبل بود با این تفاوت که از اوره ۸ مولار به جای PBS استفاده شد.

### نتایج و بحث

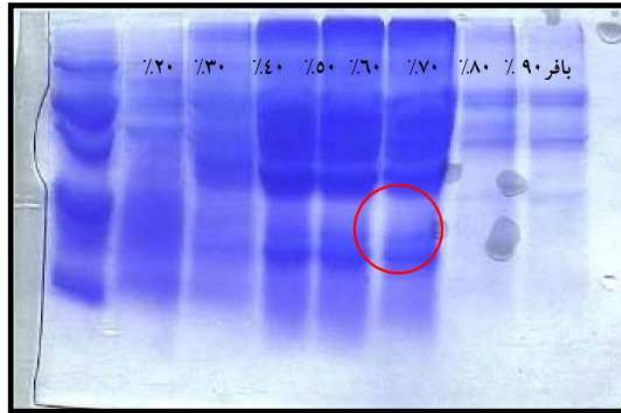
استخراج پروتئین: غلظت پروتئین در سه روش استخراج PBS، آب نمک ۱۰ درصد و بافر تریس به ترتیب  $0.75 \pm 0.07$ ،  $1.64 \pm 0.89$  و  $2.32 \pm 0.84$  میلی گرم در میلی لیتر برآورد شد. ارقام به دست آمده، میانگین سه بار اندازه گیری می باشند. از آنجا که عملیات استخراج در سه محلول فوق در شرایط یکسان انجام شد وجود اختلاف در غلظت پروتئین می توانست نشان دهنده اثرات متفاوت بافرها بر میزان استخراج پروتئین باشد. همچنین الگوی الکتروفورز پروتئین های استخراج شده پسته (شکل ۱) در این سه محیط با یکدیگر تفاوت هایی در محل قرارگیری

باند ها و کمیت آنها داشت. از وجود تفاوت در آرایش باندهای پروتئینی می توان برای انتخاب نوع محلول استخراج کننده استفاده نمود به این معنی که محیطی برای استخراج یک پروتئین خاص مناسب تر است که باند مربوطه به صورت مشخص، مجزا از دیگر باندها و در مقدار به نسبت بالاتری در الگوی الکتروفورز ظاهر گردد. با توجه به این که در این تحقیق کوچک ترین پروتئین پسته، مورد نظر بود محیط PBS و تریس قابل انتخاب بودند که به دلیل کاربرد PBS در مراحل بعدی الیزا، از آن برای استخراج پروتئین های کوچک در پسته استفاده شد.

**خالص سازی پروتئین:** نتایج عملیات خالص سازی پروتئین در پسته به روش اشباع سازی تدریجی به صورت آرایش باندهای پروتئینی در شکل ۲ نشان داده شده است. همان گونه که در شکل دیده می شود یک باند پروتئینی که در محل اشباعیت ۷۰ درصد با علامت دایره مشخص شده است در اشباعیت ۸۰ درصد ناپدید شده است و این نشان دهنده این بود که باید به مایع رویی منتقل شده باشد. الگوی الکتروفورز پروتئین های موجود در مایع رویی مربوط به اشباعیت ۷۰ و ۹۰ درصد نیز نشان دهنده وجود پروتئین های کوچک و به نسبت متمایز می باشد.



شکل ۱- الگوی الکتروفورز به روش طبیعی و غیرطبیعی برای پروتئین های پسته استخراج شده در PBS، آب نمک ۱۰ درصد و بافر تریس.

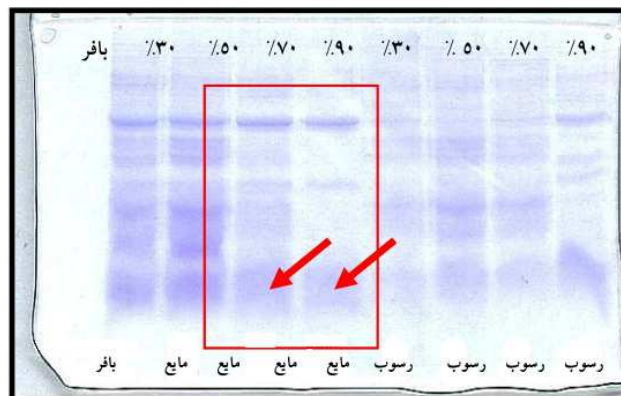


شکل ۲- آرایش باندهای پروتئینی که بر روی ژل اکریل آمید (۱۵ درصد) و تحت شرایط غیرطبیعی از یکدیگر جدا شده‌اند. ارقام روی شکل نشان‌دهنده درصد اشباعیت سولفات آمونیوم از ۲۰ تا ۹۰ درصد در بخش رسوب می‌باشد.

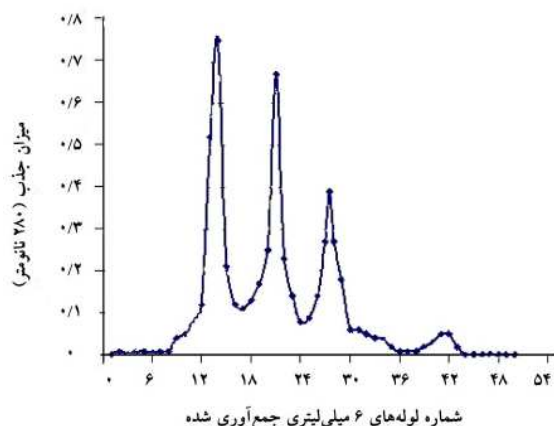
این تحقیق بود. روش به نسبت مشابهی را قریشی و همکاران (۲۰۰۶) برای خالص‌سازی پروتئینی با اندازه ۲۴ kDa از دانه نخود هندی (*Lathyrus sativus*) به کار گرفتند.

کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل: نتایج عبور دادن جزء پروتئینی تا حدی خالص‌شده (PS70S) از ستون کروماتوگرافی به صورت ۳ پیک مجزا در شکل ۴ آورده شده است. این پیک‌ها در وهله نخست نشان‌دهنده این است که PS70S کاملاً خالص نبوده و حداقل از سه پروتئین یا زیرمجموعه پروتئینی تشکیل شده است. دیگر این‌که از وجود تمایز بین منحنی‌ها می‌توان برای جداسازی اجزاء تشکیل‌دهنده PS70S استفاده نمود.

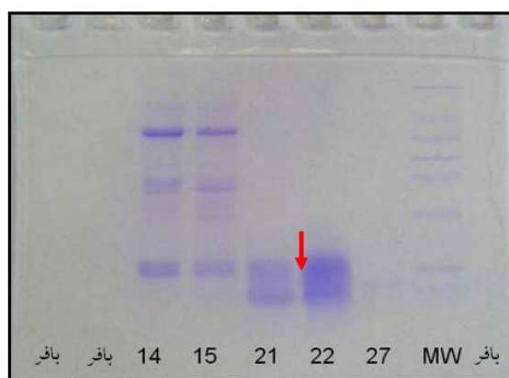
از آنجا که بین اشباعیت ۷۰ و ۹۰ درصد تفاوتی از نظر هدف آزمایش وجود نداشت (این امر در شکل ۳ نیز مشهود است) اشباعیت ۷۰ درصد در بخش مایع رویی برای تفکیک پروتئین‌های کوچک در پسته انتخاب و به‌عنوان جزء تفکیک‌شده PS70S نام‌گذاری گردید. علت استفاده از دامنه وسیع اشباعیت (۹۰ درصد-۲۰ درصد) نمایان ساختن کامل‌تر پروتئین در اشباعیت‌های مختلف بود. نتایج حاصل نه تنها برای هدف این پروژه کیفیت می‌کرد بلکه امکان به‌کارگیری آن برای خالص‌سازی پروتئین‌ها با اندازه‌های مختلف را نیز فراهم می‌آورد. ردیابی آسان‌تر یک پروتئین خاص و انتخاب دقیق‌تر غلظت سولفات آمونیوم برای خالص‌سازی یک پروتئین خاص از ویژگی‌های روش به‌کار گرفته شده در



شکل ۳- آرایش باندهای پروتئینی که بر روی ژل اکریل آمید (۱۵ درصد) و تحت شرایط غیرطبیعی از یکدیگر جدا شده‌اند. ارقام روی شکل نشان‌دهنده درصد اشباعیت سولفات آمونیوم از ۳۰ تا ۹۰ درصد در بخش رسوب و مایع رویی می‌باشد.



شکل ۴- منحنی جذب در کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل برای مایع رویی اشباعیت ۷۰ درصد (جزء پروتئینی PS70S).



شکل ۵- الگوی الکتروفورز اجزاء تفکیک شده در کروماتوگرافی ستونی. ارقام نشان دهنده شماره لوله های حاوی هر جزء به همراه مارکهای وزن مولکولی MW و بافر بدون نمونه هستند.

حاوی پروتئین خاص بود که پس از دیالیز و خشک کردن تحت انجاماد برای تولید آنتی بادی در بدن خرگوش به شرکت تولیدکننده آنتی بادی ارسال گردید. آزمایش های ایمونولوژی:

۱- تعیین فعالیت آنتی بادی: برای مقایسه فعالیت آنتی بادی سرم های حیوان پیش و پس از تزریق از منحنی تیترا استفاده گردید. در شکل ۶ منحنی های غلظت آنتی بادی تولید شده در بدن یکی از حیوانات آورده شده است.

میزان جذب پایین در قبل از تزریق طبیعی بوده و چنانچه از حد معینی بیشتر باشد نشان دهنده تغذیه حیوان با منابع مشابه با پروتئین تزریق شده می باشد. با استفاده از این نتایج امکان انتخاب بهترین آنتی سرم برای استفاده در

از نتایج الگوی الکتروفورز بخش های جدا شده مربوط به هر کدام از منحنی ها که در شکل ۵ دیده می شود به عنوان راهنمایی برای انتخاب مناسب ترین جزء برای یک جاسازی<sup>۱</sup> استفاده شد. همان گونه که در شکل ۵ دیده می شود لوله های ۱۴ و ۱۵ که سازنده اولین منحنی در شکل ۴ بودند خود از چندین جزء دیگر تشکیل شده و نمی توانستند به عنوان جزئی خالص برای یک جاسازی به کار روند. از بین دو جزء دیگر لوله شماره ۲۱ به دلیل کم عرض تر و مشخص تر بودن باند انتخاب و عملیات یک جاسازی بر روی آن انجام شد.

حاصل تکرار کروماتوگرافی ستونی به تعداد ۲۰ مرتبه و جمع آوری جزء مربوط به لوله شماره ۲۱، یک محلول



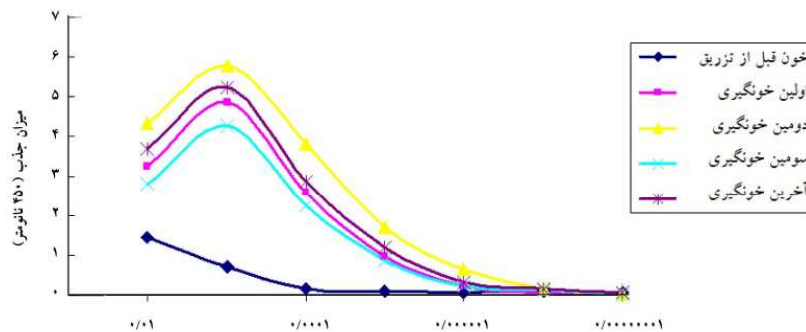
Labsystem بوده و به راحتی مقادیر جذب‌های قرائت

شده را تبدیل به ارقام معنی‌دار می‌کرد.

## ۲- غلظت پروتئین نمونه‌های غذایی پیش از الیزا:

غلظت پروتئین در نمونه‌های غذایی به چهار روش ذکر شده در شکل ۷ نشان داده شده است. همان‌طور که انتظار می‌رفت نتایج غلظت پروتئین استخراج‌شده به روش‌های مختلف بسیار متفاوت بودند، بنابراین ثابت شد که محلول اوره محیط بسیار قوی برای استخراج پروتئین‌ها است.

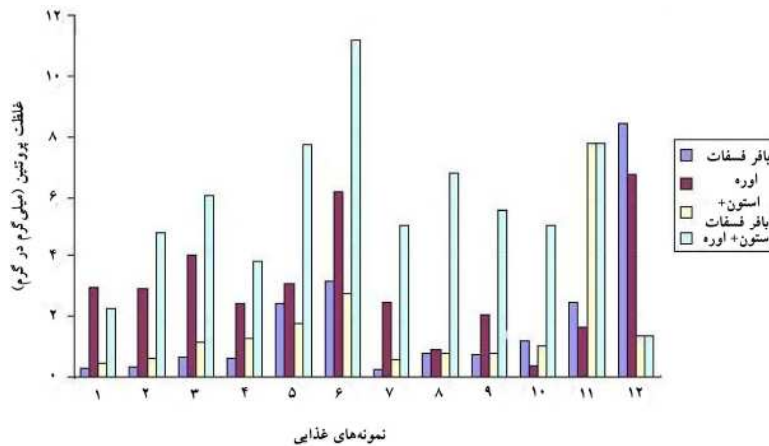
آزمایش‌های الیزا فراهم گردید. سرم شماره ۲ یعنی خون‌گیری پس از ۲۸ روز در هر دو حیوان، فعال‌ترین آنتی‌سرم برای اجرای آزمایش‌های ایمنولوژی بود. برای حفظ شرایط یکسان مقایسه، منحنی استاندارد با استفاده از این سرم به دست آمد. لازم به ذکر است در عمل از نرم‌افزار **Ascent Multiscan** برای رسم منحنی‌ها و اندازه‌گیری مقادیر معادل پروتئین خالص شده استفاده شد. این نرم‌افزار یکی از ابزارهای جانبی دستگاه الیزای



لگاریتم رقت آنتی‌بادی

شکل ۶- منحنی‌های تیتراژ که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌سرم خرگوش بر علیه پروتئین خالص‌شده پسته (PS70S)

قبل از تزریق و ۴ بار پس از تزریق هستند.



شکل ۷- غلظت پروتئین در ۱۲ نمونه غذایی که به ۴ روش **PBS** با استون، **PBS** بدون استون، اوره با استون و اوره بدون استون استخراج شده‌اند. نمونه‌ها عبارت بودند از: ۱- کیک با لایه گردو، ۲- مخلوط میوه و انواع آجیل، ۳- فشرده حاوی مخلوط بلوبری، پسته و ماست، ۴- تخته حاوی ماکادامیا و انواع میوه، ۵- شکلات حاوی فندق، بادام و برزیل نات<sup>۱</sup>، ۶- تخته حاوی انواع میوه و آجیل، ۷- مخلوط کرن‌بری و ماکادامیا، ۸- کلوچه فندق، ۹- باقلوا حاوی پسته، ۱۰- بیسکویت پسته و بادام، ۱۱- پاوا ایدلی<sup>۲</sup> (آردی حاوی بادام هندی)، ۱۲- پودری با پایه شیر ولی نامعلوم از نظر دیگر ترکیبات.

1- Brazil Nut  
2- Pava Idli

جدول ۱- اندازه گیری پروتئین PS70S (میکروگرم در گرم) به وسیله الیزا در سه رقت آنتی بادی و ۴ روش استخراج.

| نمونه غذایی   | روش استخراج پروتئین |              |              |             | رقت آنتی بادی |
|---|---------------------|--------------|--------------|-------------|---------------|
|   | PBS + استون         | Urea + استون | PBS          | Urea        |               |
|   | ۰/۱۲±۰/۰۱۵          | ۰/۴۸±۰/۰۵۱   | ۰/۰۴±۰/۰۰۷   | ۸۷±۳/۴      | ۰/۱           |
| ۱- کیک با لایه گردو                                   | ۰/۵۶±۰/۰۵۳          | ۰/۷۶±۰/۰۰۷   | ۰/۰۷±۰/۰۰۸   | ۹۸/۶۷±۷/۱۳  | ۰/۰۱          |
|   | ۴/۸۴±۱/۱۲           | ۲/۶۴±۱/۰۶    | ۰/۷۵±۰/۰۶۲   | ۳۱۷/۶±۱۱/۷۵ | ۰/۰۰۱         |
|   | ۰/۱۲±۰/۰۱۶          | ۰/۳۲±۰/۰۴۶   | ۰/۰۴±۰/۰۰۷   | ۰/۶۰±۰/۰۵۵  | ۰/۱           |
| ۲- مخلوط میوه و انواع آجیل                            | ۱/۰۴±۰/۲۸           | ۰/۵۲±۰/۰۵۲   | ۴/۳۴±۰/۹۹    | ۰/۱۵±۰/۰۱۶  | ۰/۰۱          |
|   | ۵/۲۴±۱/۱۶           | ۲/۱۲±۱/۱۴    | ۲/۲۷±۱/۱۶    | >           | ۰/۰۰۱         |
|   | ۳۰۵۳±۱۹۴            | <            | <            | <           | ۰/۱           |
| ۳- فشرده حاوی مخلوط بلو بری، پسته و ماست              | <                   | ۱۶۹۳±۱۲۳     | <            | <           | ۰/۰۱          |
|   | ۱۸۹۳۳±۸۹۲           | ۳۱۴۷±۲۰۱     | <            | <           | ۰/۰۰۱         |
|   | ۱۰/۰۴±۲/۲۳          | ۱۰/۲±۲/۲۴    | <            | >           | ۰/۱           |
| ۴- فشرده حاوی ماکادامیا و انواع میوه                  | ۵/۸۸±۱/۱۴           | ۴/۴±۰/۹۹     | ۶۵/۳۳±۴/۵۵   | ۱۲/۵±۲/۵    | ۰/۰۱          |
|   | ۴/۲۸±۱/۰۳           | ۲/۱۶±۱/۰۸    | ۲۱/۸۲±۳/۷۳   | ۹۲/۶۷±۶/۲۱  | ۰/۰۰۱         |
|   | ۰/۸۴±۰/۰۶۳          | ۱۱۵۳±۱۰۵     | ۶/۳۸±۱/۵۲    | >           | ۰/۱           |
| ۵- شکلات حاوی فندق، بادام و برزیل نات                 | ۰/۹۲±۰/۰۸۷          | ۱۵/۴±۲/۷۸    | ۳/۱۲±۱/۰۵    | ۵۲۳/۳±۵۲    | ۰/۰۱          |
|   | ۱/۸۸±۰/۳۳           | ۱۳/۶۸±۲/۰۶   | ۴/۴۹±۰/۸۹    | ۳۳۳۳±۲۰۳    | ۰/۰۰۱         |
|   | ۰/۳۶±۰/۰۴۴          | ۱/۶±۰/۳۳     | ۰/۵۹±۰/۰۵۸   | ۳۱/۳۹±۴/۰۱  | ۰/۱           |
| ۶- فشرده حاوی انواع میوه و آجیل                       | ۰/۴±۰/۰۴۱           | ۰/۵۲±۰/۰۵۵   | ۰/۸۴±۰/۰۷۱   | ۸۵±۶/۲۳     | ۰/۰۱          |
|   | ۲/۳۲±۱/۰۱           | ۱/۲۸±۱/۰۲    | ۲/۹۷±۱/۰۲    | ۵۱۶/۶۷±۴۸   | ۰/۰۰۱         |
|   | ۰/۰۴±۰/۰۰۷          | ۰/۴±۰/۰۰۷    | ۰/۰۸±۰/۰۰۷   | ۴/۰۸±۱/۰۶   | ۰/۱           |
| ۷- مخلوط کرن بری و ماکادامیا                          | ۰/۱۲±۰/۰۱۵          | ۰/۵۲±۰/۰۵۱   | ۰/۴۱±۰/۰۴۷   | ۰/۱۲±۰/۰۱۵  | ۰/۰۱          |
|   | ۰/۲۸±۰/۰۴۱          | ۲/۶۴±۱/۱۶    | ۱/۰۶±۰/۰۳۶   | ۰/۲۵±۰/۰۳۶  | ۰/۰۰۱         |
|   | ۵/۵۲±۰/۰۹۶          | ۲۲/۳۶        | ۰/۱۹±۰/۰۱۸   | ۰/۰۳±۰/۰۰۲  | ۰/۱           |
| ۸- کلوجه فندق   | ۴/۲۸±۱/۰۱           | ۹/۱۶±۱/۸۶    | ۰/۵۱±۰/۰۵۲   | ۰/۰۹±۰/۰۰۳  | ۰/۰۱          |
|   | ۲/۹۲±۰/۸۷           | ۵/۶۴±۱/۹۲    | ۱/۲۵±۰/۴۵    | ۰/۱۲±۰/۰۱۵  | ۰/۰۰۱         |
|   | <                   | <            | <            | <           | ۰/۱           |
| ۹- باقلو حاوی پسته                                    | ۴۵/۹۶±۴/۶۵          | ۴۹۲±۱۸/۵     | <            | <           | ۰/۰۱          |
|   | ۹۸۶۰±۴۷۲            | ۲۳۴۷±۱۱۳۳    | <            | ۲۸۳۰±۱۶۱    | ۰/۰۰۱         |
|   | ۶۰۰±۳۲              | <            | <            | <           | ۰/۱           |
| ۱۰- بیسکویت پسته و بادام                              | ۱۸۸±۱۴              | ۱۷۸/۶۸±۱۴/۱۲ | ۹۶۳/۳۳±۴۵/۴۳ | <           | ۰/۰۱          |
|   | ۳۷۳/۳±۲۳/۱۵         | ۲۳۲±۱۸       | ۱۱۰±۹/۴۵     | <           | ۰/۰۰۱         |
|   | ۱/۹۲±۰/۶۴           | ۱۱/۲۸±۲/۴۸   | ۱/۵۱±۰/۳۸    | ۰/۲۴±۰/۰۴   | ۰/۱           |
| ۱۱- پاپوا ایدلی (آردی حاوی بادام هندی)                | ۴/۵۶±۱/۱۲           | ۸/۵۲±۱/۷۸    | ۲/۱۰±۱/۱۱    | ۰/۵۴±۰/۰۴۸  | ۰/۰۱          |
|   | ۲۰/۰۸±۲/۰۴          | ۶/۶±۱/۱۲     | ۵/۳۱±۰/۹۵    | ۱۲/۹۹±۲/۶۵  | ۰/۰۰۱         |
|   | ۱/۵۶±۰/۴۵           | ۳/۵۶±۰/۷۶    | ۴/۱۱±۰/۸۸    | >           | ۰/۱           |
| ۱۲- پودری با پایه شیر ولی نامعلوم از نظر دیگر ترکیبات | ۰/۶۴±۰/۰۵۸          | ۱۶/۶۴±۱/۸۶   | ۳/۰۴±۱/۲۲    | ۰/۲۶±۰/۰۴۴  | ۰/۰۱          |
|   | ۱۳/۲۴±۲/۴۴          | ۵/۱۲±۱/۰۶    | ۷/۹۲±۱/۷۶    | ۶/۵۰±۱/۶۸   | ۰/۰۰۱         |

که میزان ممانعت به اندازه ای بود که قابل اندازه گیری نبوده است و به عبارتی میزان باقی مانده پروتئین هدف بیشتر از حد بالایی تشخیص بوده است. و علامت > نشان دهنده کمتر بودن میزان پروتئین از پایین ترین حد

ارقام ثبت شده میزان پروتئین به وسیله الیزا در جدول ۱ خلاصه شده است. رقت های مختلف آنتی بادی و ۴ روش استخراج پروتئین در این جدول گنجانده شده است. درج علامت < به وسیله نرم افزار به این معنی است

تشخیص داده شده است. اگر در یک روش به خصوص علامت < یا > برای هر سه رقت آنتی‌بادی وجود دارند به این معنی است که رقت آنتی‌بادی باید افزایش یا کاهش داده شود تا میزان پروتئین در محدوده حساسیت اندازه‌گیری قرار گیرد.

استفاده از روش الیزا برای تعیین باقی‌مانده پروتئین مغزها در مواد غذایی توسط دیگر محققان نیز سابقه داشته است از جمله یونگ و کالینز (۱۹۹۶) از آنتی‌بادی پلی‌کلونال برای تعیین باقی‌مانده بادام‌زمینی در ۲۲ ماده غذایی با حساسیت ۴۰۰ppb استفاده نمودند.

همچنین مقایسه ارقام به‌دست آمده برای محلول‌های با و بدون استون مبین اثر چربی‌گیری در افزایش راندمان استخراج پروتئین‌ها بود. اگرچه محلول اوره باعث استخراج بیشترین مقدار پروتئین می‌شود ولی کار با اوره مشکل بوده و نیاز به دقت و مراقبت بیشتری داشته و به‌علاوه اینکه غلظت پروتئین بالا لزوماً منجر به افزایش میزان پروتئین خاص اندازه‌گیری شده در روش الیزا نمی‌شود. به‌عنوان مثال مقادیر باقی‌مانده پروتئین پسته در نمونه شماره ۹ روش استخراج با اوره ۲۸۳۰ میکروگرم در گرم بود در حالی‌که رقم مربوط به استون+ PBS، ۹۶۸۰ میکروگرم در گرم برآورد گردید.

انواع مختلف الیزا با حساسیت‌های متفاوت برای تعیین باقی‌مانده پروتئین در محصولات مشابه به‌کار گرفته شده است از جمله آکاستا و همکاران (۱۹۹۹) که باقی‌مانده پروتئین بادام به‌نام AMP<sup>۱</sup> را تا حساسیت ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش کردند. همچنین ویی و همکاران (۲۰۰۳) روش الیزایی را بر پایه آنتی‌بادی پلی‌کلونال بنا نهادند که قادر بود پروتئینی به‌نام *Ano a 2* در بادام هندی را با حساسیت ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اندازه بگیرد. نتایج ایمونوشیمیایی این تحقیق نیز نشان داد که می‌توان باقی‌مانده پروتئین پسته را با حساسیت یک پی‌پی‌ام در مواد غذایی تشخیص داده و اندازه‌گیری نمود. کاپلمن و همکاران (۱۹۹۹) نیز تحقیق مشابهی با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال برای اندازه‌گیری باقی‌مانده پروتئین فندق با حساسیت یک پی‌پی‌ام گزارش نمودند.

بسیاری از محققان امروزه سرگرم انجام آزمایش‌های الیزا برای اندازه‌گیری باقی‌مانده پروتئین‌های آلرژی‌زا در پسته و فراورده‌های مشابه می‌باشد و نتایج آزمایش‌های الیزا در این تحقیق با ۴ روش استخراج و ۳ سطح رقت آنتی‌بادی می‌تواند راهنمای خوبی برای انتخاب روش استخراج و غلظت مناسب آنتی‌بادی جهت آزمایش‌های تعیین باقی‌مانده پروتئین پسته و میوه‌های مشابه باشد.

## منابع

1. Acosta, M.R., Roux, K.H., Teuber, S.S., and Sathe, S.K. 1999. Production and characterization of rabbit polyclonal antibodies to almond (*Prunus dulcis* L.) major storage protein. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 47: 4053-4059.
2. Arshad, H., Holgate, S.T., Adkinson N.F., and Babu, K.S. 2005. *Allergy: An Atlas of Investigation and Management*. Elsevier Health Sciences. London, UK. 120p.
3. Beyer, K., Grishina, G., Bardina, L., Grishin, A., and Sampson, H.A. 2002. Identification of an 11 S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110: 517-523.
4. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
5. Fernandez, C., Fiandor, A., Martinez-Garate, A., and Quesada, J.M. 1995. Allergy to pistachio: crossreactivity between pistachio nut and other Anacardiaceae. *Clinical and Experimental Allergy*. 25: 1254-1259.

6. Garcia, F., Moneo, I., Fernandez, B., Garcia-Menaya, J., Blanco, M.J., and Juste, S. 2000. Allergy to Anacardiaceae: description of cashew and pistachio nut allergens. *Journal Investigation Allergy of and Clinical Immunology*. 10: 173-177.
7. Hiywka, J.J., Hefle, S.L., and Taylor, S.L. 2000. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of almonds in foods. *Journal of Food Prot.* 63: 252-257.
8. Hourihane, J.O.B. 1998. Prevalence and severity of food allergy: need for control. *Allergy*. 53: 84-88.
9. Horwitz, W. 2005. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Journal AOAC 18<sup>th</sup> Edition.
10. Ibanez, M.D., Lombardero, M., San Ireneo, M.M., and Munoz, M.C. 2003. Anaphylaxis induced by pine nuts in two young girls. *Pediatric Allergy and Immunology*. 14: 317-319.
11. Iran's Ministry of Jihad of Agriculture. Buying and selling Iran's 3000 year old crop. Available at: <http://www.magiran.com/npview.asp?ID=1547570>. Accessed May 14, 2008.
12. Koppelman, S.J., Knuist, A.C., Koers, W.J., Penninks, A.H., Peppelman, H., Vlooswijk, R., Pigmans, I., Duijn, G., and Hessing, M. 1999. Comparison of different immunochemical methods for the detection and quantification of hazelnut proteins in food products. *Immunological Methods*. 229: 107-120.
13. Pasini, G., Simonato, B., Giannattasio, M., Gemignani, C., and Curioni, A. 2000. IgE binding to almond proteins in two CAP-FEIA-negative patients with allergic symptoms to almond as compared to three CAP-FEIA-false positive subjects. *Allergy*. 55: 955-958.
14. Poms, R.E., Ulberth, F., Klein, C.L., and Anklam, E. 2004. Peanut allergens in food products. *GIT Laboratory Journal Europe*. 3: 132-135.
15. Qureshi, I.A., Sethi, D.K., and Salunke, D.M. 2006. Purification, identification and preliminary crystallographic studies of an allergenic protein from *Lathyrus sativus*. *Acta Crystalisation*. 62: 869-872.
16. Sutherland, M.F., O'Hehir, R.E.D., and Czamy, C.S. 1999. Macadamia nut anaphylaxis: demonstration of specific IgE reactivity and partial cross-reactivity with hazelnut. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 104: 889-890.
17. Yeung, J.M., and Collins, P.G. 1996. Enzyme immunoassay for determination of peanut proteins in food products. *Journal of AOAC International*. 79: 1411-1416.
18. Wei, Y.H., Sathe, S.K., Teuber, S.S., and Roux, K.H. 2003. A sensitive sandwich ELISA for the detection of trace amounts of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut in foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 3215-3221.

## **Optimisation of ELISA experiments for detection and quantification of pistachio protein in foods**

**\*M. Ghorbani<sup>1</sup> and M. Morgan<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Assistant Prof., Department of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, <sup>2</sup>Professor, Department of Food Sciences, Leeds University, Leeds, UK

---

---

### **Abstract**

Like other tree nuts, despite its high nutritional quality, pistachio carries specific proteins that elicit food-induced allergy symptoms in certain individuals. In contrast to other tree nuts, little is known about the way of detecting pistachio allergenic proteins in foods. New labelling regulations require precise detection techniques to trace a specified list of allergenic food residues to the ppm level. In the present study pistachios were extracted using three extraction media *i.e.*, (i) saline 10%, (ii) phosphate-buffered saline, and (iii) Tris buffer at pH 7.5 to find the best solution in order to optimise the extraction condition for a particular protein. In the second part, 2S proteins were isolated and purified from pistachios. Protein purification was carried out through a multiple stage procedure starting with an ammonium sulfate precipitation in which the concentration of the salt was increased step-by-step from 20% to 90%. The semi-purified protein fraction obtained was further purified using gel filtration chromatography. In the third part, antigens in the form of the purified 2S proteins from pistachio nut were used to produce antibodies in rabbits. Sensitive, specific ELISAs were set up and applied to 12 selected food samples extracted by 4 different methods of extraction (PBS, urea, PBS followed by acetone and urea followed by acetone) and 3 levels of antibody dilutions. The results showed that the higher total protein yield was not always an indication of an efficient extraction method for a particular protein. The results of determination of pistachio protein residues also proved that immunochemical techniques can reliably detect traces amounts of pistachios in food samples.

**Keywords:** Pistachio; ELISA; Allergenicity; Protein purification; Ammonium sulfate