مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد شانزدهم، شماره اول، ۱۳۸۸
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

بهینه‌سازی آزمایشات ELISA برای تشخیص و شناسایی پروتئین پسته درمواد غذایی

*محمد قربانی[۱] و مایکل مورگان[۲]

[۱]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]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 ۱۰درصد 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 اشباع‌سازی 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 ازتولید 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 کاراتر 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، آنتی بادی، آلرژی‌زایی، خالص‌سازی پروتئین، سولفات آمونیوم

مقدمه

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 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،

*- مسئول مکاتبه: moghorbani@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

آسم، آب‌ریزش از بینی و... به‌وجود 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؛ به‌طوری‌که 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 برروی محصولاتی که حاوی مقادیری هر چند ناچیز از مغزها و یا بادام‌زمینی باشند الصاق کنند. تشدید مقررات اتحادیه اروپا درباره مواد غذایی که به‌نحوی عامل بروز بیماری در افراد حساس می‌باشند سبب شده تا انجام تحقیقات برروی 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[1] پس از خوردن پسته، فندق، ماکادمیا[2] و پاین نات[3]، بادام هندی و... گزارش شده است (فرناندز و همکاران، ۱۹۹۵؛ هوریهان، ۱۹۹۸؛ ساترلند و همکاران ۱۹۹۹؛ گارسیا و همکاران، ۲۰۰۰؛ ایبانز و همکاران، ۲۰۰۳).

استخراج و خالص‌سازی پروتئین‌ها از میوه‌های خشک درختی نظیر پسته، بادام، فندق و بادام‌زمینی 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 به‌همراه نمک، بافر فسفات به‌همراه نمک، محلول اوره ۶ مولار و بافر کربنات سدیم) و شرایط مختلف دما و زمان (۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه) و نسبت پودر به بافر ۱ به ۲۵ پروتئین‌های بادام‌زمینی 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[4] 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 به‌صورت خالص ایزوله و آنتی‌بادی پلی‌کلونال برعلیه 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

1- Anaphylaxis
2- Macadamia
3- Pine Nut

4- Phosphate Buffered Saline

Archive of SID

www.SID.ir

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[1] 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[2] (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 به‌مدت ۱۶ ساعت انجام شد. پس از خارج کردن روغن، باقی‌مانده حاصل در سینی با عمق کم به‌مدت 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.

نسبت پودر به محلول ۱ به ۱۰ انتخاب شد و عمل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت در حالی‌که به آرامی با هم‌زن مغناطیسی به‌هم 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[3] (با اندکی تغییر در روش برادفورد[4]، ۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد.

ب- مشخص‌کردن باندهای پروتئینی توسط الکتروفورز: الگوی پراکنش باندهای پروتئینی پسته در هر سه روش استخراج به‌وسیله الکتروفورز ژل اس دی اس- پلی‌اکریل آمید[5] به دو روش طبیعی و غیرطبیعی انجام شد. در روش طبیعی تنها از حرارت برای شکستن باندهای پروتئینی استفاده می‌شود ولی در روش غیرطبیعی علاوه‌بر حرارت، DTT[6] هم اضافه می‌شود تا پیوندهای دی‌سولفیدی شکسته شوند. در این‌صورت پروتئین‌ها تا اندازه ممکن به زیر واحدهای[7] 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

1- Fisher Scientific, UK
2-Association of Official Analytical Chemists (AOAC)

3- Coomasee Brilliant Blue
4- Bradford method
5- SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
6- Dithietriol
7- Subunits

Archive of SID

www.SID.ir

سولفات آمونیوم خالص‌سازی شد. انتخاب نوع محلول استخراج‌کننده (تریس) براساس وضوح باند و بازیافت بیشترین پروتئین نوع 2S در الگوی الکتروفورز بود. برای پیدا کردن مناسب‌ترین درصد اشباع سولفات آمونیوم از روش اشباع‌سازی پله‌ای، که در نوع خود برای اولین بار انجام می‌شد، استفاده شد. در این روش مقدار ۵۰ گرم پودر پسته بدون روغن با ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول PBS مخلوط و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت پایین هم‌زده شد. مخلوط حاصل توسط سانتریفوژ صاف و بلافاصله با سولفات آمونیوم کریستال تا حد ۲۰ درصد به‌صورت تدریجی اشباع شد. پس از اشباع‌سازی، با استفاده از سانتریفوژ مایع رویی و رسوب از یکدیگر تفکیک و از هر بخش نمونه‌ای جهت بررسی الگوی الکتروفورز برداشته و مایع رویی دوباره به‌همین روش تا مرز ۳۰ درصد اشباع و نمونه‌هایی از مایه رویی و رسوب تهیه گردید. عملیات اشباع‌سازی پله‌ای 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 لوله‌های دیالیز (3500MWCO) برای حذف نمک از نمونه‌ها استفاده شد و نمونه‌ها توسط خشک‌کن 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 به‌وسیله 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 ازلوله‌های دیالیز (3500MWCO) در مقابل مقادیر زیاد آب بدون یون دیالیز و تمام محلول حاصل توسط خشک‌کن انجمادی خشک و به‌صورت پودری سفید رنگ درآمد. به‌دلیل آنکه الگوی الکتروفورز این جزء نشان‌دهنده بیش از یک باند پروتئین بود از دستگاه کروماتوگرافی ستونی گرادیفراگ[1] برای خالص‌سازی بیشتر استفاده شد. از رزین Sephacryl S-200 HR در ستونی با ابعاد ۱/۶×۹۶ سانتی‌متر برای تفکیک باندهای پروتئینی براساس اندازه مولکولی استفاده گردید. پس از پر کردن ستون با رزین مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با عبوردادن 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 خشک‌شده حاصل از مرحله اشباع‌سازی محلولی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و پس از انحلال کامل با استفاده از سانتریفوژ کاملاً صاف و در ۲۰ لوله ۲ میلی‌متری 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 میلی‌لیتر در دقیقه به ستون تزریق شد. سپس با استفاده از۳۰۰ میلی‌لیتر بافر اسید کلریدریک- تریس (۰/۱ مولار، pH=۷/۵) حاوی ۰/۳ درصد کلرید سدیم و با دبی ۲ میلی‌لیتر در دقیقه شستشو و اجزاء ۶ میلی‌لیتری پس از گذشتن از یک نمایانگر ماورای بنفش تک مسیر UV-1 در یک جمع‌کننده جمع‌آوری شدند. هم‌زمان منحنی‌های مربوط به هر پروتئین نیز برروی کاغذ گراف توسط یک ثبت‌کننده رسم می‌گردید. به این ترتیب با توجه به منحنی‌های به‌دست آمده و تفکیک خروجی بافر شستشودهنده فراکسیون‌های حاوی پروتئین از میان ۵۰ لوله جمع‌آوری شده قابل تشخیص بودند. نتایج آزمایش‌های جانبی الکتروفورز برروی لوله‌های مربوط به

1- Gradifrac Pharmacia UKB, Upsala, Sweden

Archive of SID

www.SID.ir

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.

ه- آزمایش‌های ایمونوشیمیایی (ELISA)[1]: 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[2] 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[3] 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 برروی سرم‌ها از طریق رسم منحنی تیتر[4] انجام و سپس منحنی‌های استاندارد با استفاده از فعال‌ترین آنتی‌بادی تهیه گردیدند. روش الیزای رقابتی[5] در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای[6] اجرا و از دستگاه جذب خوان پلیتی الیزا[7] 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 سانتریفوژ (۹۰۰۰جی، 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 بوخنر 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

1- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
2- Harlan Sera-Lab (Hillcrest, UK)
3- Adjuvant
4- Titre Curve

5- Competitive ELISA
6- Nunc, Maxisorp, Neerijse, Belgium
7- Labsystems, Uxbridge, UK

Archive of SID

www.SID.ir

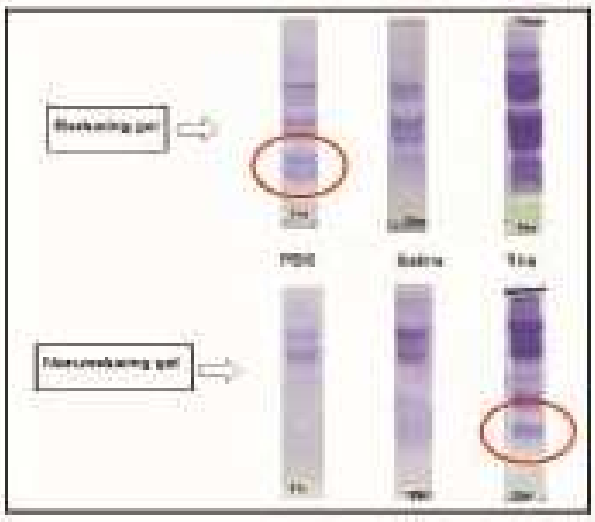
خشک شود. ۱/۵ گرم پودر خشک بدون چربی در ۲۰ میلی‌لیتر PBS مخلوط و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استخراج گردید. مایع استخراجی حاصل پس از سانتریفوژ در لوله‌های ۵ میلی‌لیتری تقسیم و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر نگهداری شدند.

استخراج به‌وسیله استون به همراه محلول اوره: این روش به‌طور دقیق مطابق روش قبل بود با این تفاوت که از اوره ۸ مولار به‌جای PBS استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج پروتئین: غلظت پروتئین در سه روش استخراج PBS، آب نمک ۱۰ درصد و بافر تریس به‌ترتیب ۰/۷۵±۷/۶، ۱/۶۴±۱۶/۸۹ و ۲/۳۲±۲۷/۸۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برآورد شد. ارقام به‌دست آمده، میانگین سه بار اندازه‌گیری می‌باشند. از آنجا که عملیات استخراج در سه محلول فوق در شرایط یکسان انجام شد وجود اختلاف در غلظت پروتئین می‌توانست نشان‌دهنده اثرات متفاوت بافرها بر میزان استخراج پروتئین باشد. همچنین الگوی الکتروفورز پروتئین‌های استخراج‌شده پسته (شکل ۱) در این سه محیط با یکدیگر تفاوت‌هایی در محل قرارگیری باندها و کمیت آنها داشت. از وجود تفاوت در آرایش باندهای پروتئینی می‌توان برای انتخاب نوع محلول استخراج‌کننده استفاده نمود به این معنی که محیطی برای استخراج یک پروتئین خاص مناسب‌تر است که باند مربوطه به‌صورت مشخص، مجزا از دیگر باندها و در مقدار به نسبت بالاتری در الگوی الکتروفورز ظاهر گردد. با توجه به این که در این تحقیق کوچک‌ترین پروتئین پسته، مورد نظر بود محیط PBS و تریس قابل انتخاب بودند که به‌دلیل کاربرد PBS در مراحل بعدی الیزا، از آن برای استخراج پروتئین‌های کوچک در پسته استفاده شد.

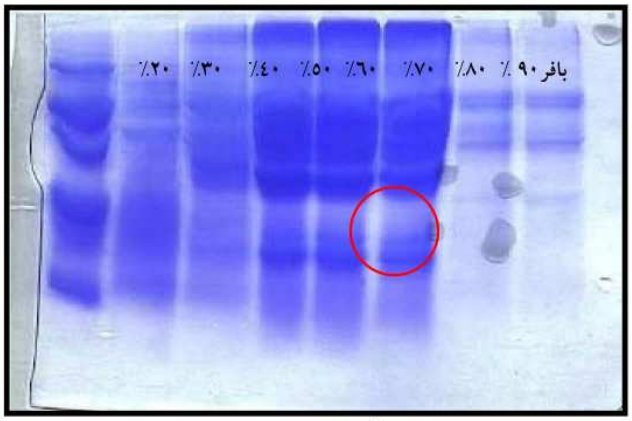
خالص‌سازی پروتئین: نتایج عملیات خالص‌سازی پروتئین در پسته به روش اشباع‌سازی تدریجی به‌صورت آرایش باندهای پروتئینی در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل دیده می‌شود یک باند پروتئینی که در محل اشباعیت ۷۰ درصد با علامت دایره مشخص شده است در اشباعیت ۸۰ درصد ناپدید شده است و این نشان‌دهنده این بود که باید به مایع رویی منتقل شده باشد. الگوی الکتروفورز پروتئین‌های موجود درمایع رویی مربوط به اشباعیت ۷۰ و۹۰ درصد نیز نشان‌دهنده وجود پروتئین‌های کوچک و به نسبت متمایز می‌باشد.



شکل ۱- الگوی الکتروفورز به روش طبیعی و غیرطبیعی برای پروتئین‌های پسته استخراج‌شده در PBS، آب نمک ۱۰درصد و بافر تریس.

Archive of SID

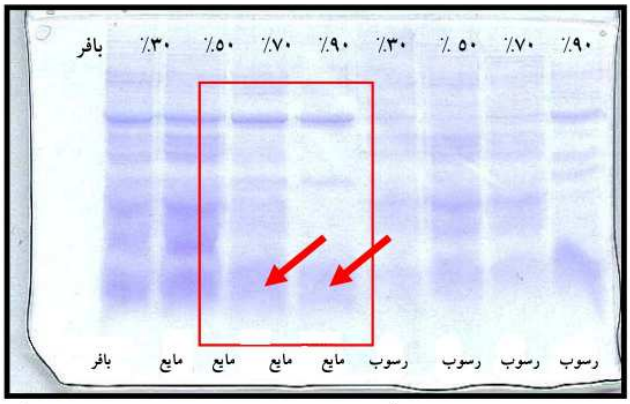
www.SID.ir



شکل ۲- آرایش باندهای پروتئینی که برروی 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.

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 پروفیل پروتئینی در اشباعیت‌های مختلف بود. نتایج حاصل نه تنها برای هدف این پروژه کفایت 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 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*) به‌کار گرفتند.

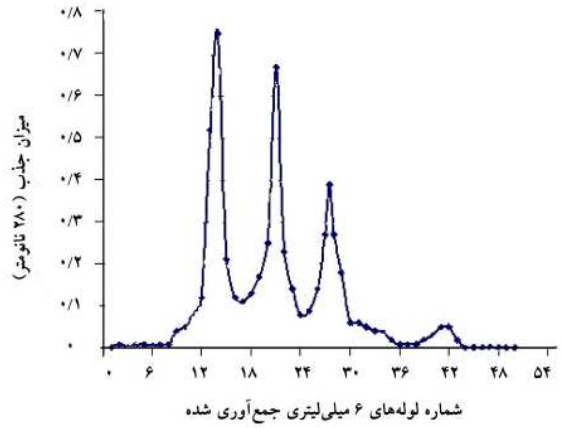
کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل: نتایج عبور دادن جزء پروتئینی تا حدی خالص‌شده (PS70S) از ستون کروماتوگرافی به‌صورت ۳ پیک مجزا در شکل ۴ آورده شده است. این پیک‌ها در وهله نخست نشان‌دهنده این است که PS70S کاملاً خالص نبوده و حداقل از سه پروتئین یا زیرمجموعه پروتئینی تشکیل شده است. دیگر این‌که از وجود تمایز بین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



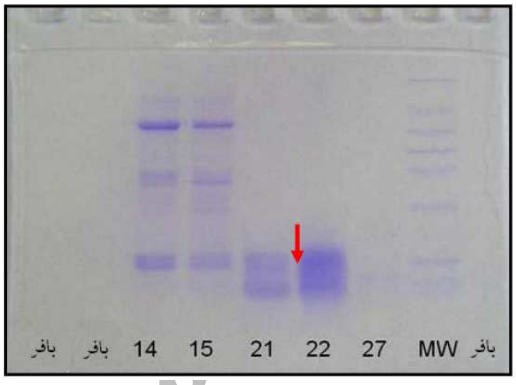
شکل ۳- آرایش باندهای پروتئینی که برروی ژل اکریل آمید (۱۵ درصد) و تحت شرایط غیرطبیعی از یکدیگر جدا شده‌اند. ارقام روی شکل نشان‌دهنده درصد اشباعیت سولفات آمونیوم از ۳۰ تا ۹۰ درصد در بخش رسوب و مایع رویی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



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



شکل ۵- الگوی الکتروفورز اجزاء تفکیک‌شده در کروماتوگرافی ستونی. ارقام نشان‌دهنده شماره لوله‌های حاوی هر جزء به‌همراه مارکرهای وزن مولکولی MW و بافر بدون نمونه هستند.

از نتایج الگوی الکتروفورز بخش‌های جدا شده مربوط به هر کدام از منحنی‌ها که در شکل ۵ دیده می‌شود به‌عنوان راهنمایی برای انتخاب مناسب‌ترین جزء برای یک‌جاسازی[1] استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۵ دیده می‌شود لوله‌های ۱۴ و۱۵ که سازنده اولین منحنی در شکل ۴ بودند خود از چندین جزء دیگر تشکیل شده و نمی‌توانستند به‌عنوان جزیی خالص برای یک‌جاسازی به‌کار روند. از بین دو جزء دیگر لوله شماره ۲۱ به‌دلیل کم‌عرض‌تر و مشخص‌تر بودن باند انتخاب و عملیات یک‌جاسازی برروی آن انجام شد.

حاصل تکرار کروماتوگرافی ستونی به تعداد ۲۰ مرتبه و جمع‌آوری جزء مربوط به لوله شماره ۲۱، یک محلول حاوی پروتئین خاص بود که پس از دیالیز و خشک‌کردن تحت انجماد برای تولید آنتی‌بادی در بدن خرگوش به شرکت تولیدکننده آنتی‌بادی ارسال گردید.

آزمایش‌های ایمونولوژی:

۱- تعیین فعالیت آنتی‌بادی: برای مقایسه فعالیت آنتی‌بادی سرم‌های حیوان پیش و پس از تزریق از منحنی تیتر استفاده گردید. در شکل ۶ منحنی‌های غلظت آنتی‌بادی 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 نشان‌دهنده تغذیه حیوان با منابع مشابه با پروتئین تزریق شده می‌باشد. با استفاده از این نتایج امکان انتخاب بهترین آنتی‌سرم برای استفاده در

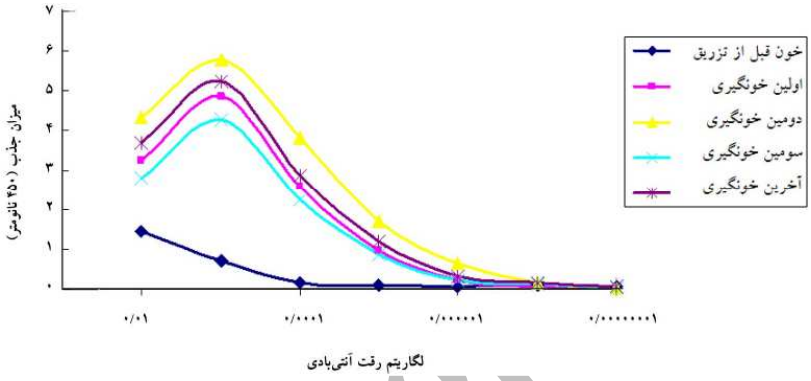
1- Pooling

Archive of SID

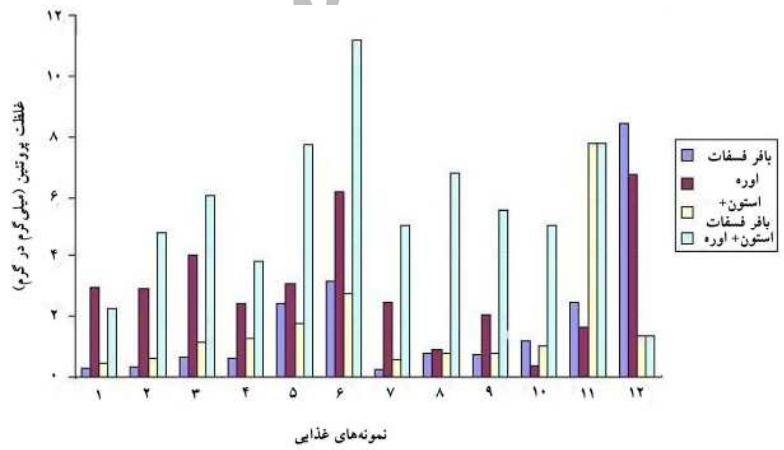
www.SID.ir

آزمایش‌های الیزا فراهم گردید. سرم شماره ۲ یعنی خون‌گیری پس از ۲۸ روز در هر دو حیوان، فعال‌ترین آنتی‌سرم برای اجرای آزمایش‌های ایمونولوژی بود. برای حفظ شرایط یکسان مقایسه، منحنی استاندارد با استفاده از این سرم به‌دست 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 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.



شکل ۶- منحنی‌های تیتر 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[1]، ۶-تخته حاوی انواع میوه و آجیل، ۷- مخلوط کرنبری و ماکادامیا، ۸- کلوچه فندق، ۹- باقلوا حاوی پسته، ۱۰- بیسکوئیت پسته و بادام، ۱۱- پاوا ایدلی[2] (آردی حاوی بادام هندی)، ۱۲- پودری با پایه شیر ولی نامعلوم از نظر دیگر ترکیبات.

1- Brazil Nut
2- Pava Idli

www.SID.ir

جدول ۱- اندازه‌گیری پروتئین PS70S (میکروگرم در گرم) به‌وسیله الیزا در سه رقت آنتی‌بادی و ۴ روش استخراج.

نمونه غذایی	رقت آنتی‌بادی	روش استخراج پروتئین			
		Urea	**PBS**	استون + **Urea**	استون + **PBS**
	۰/۱	۸۷±۳/۴	۰/۰۴±۰/۰۰۷	۰/۴۸±۰/۰۵۱	۰/۱۲±۰/۰۱۵
۱- کیک با لایه گردو	۰/۰۱	۹۸/۶۷±۷/۱۳	۰/۰۷±۰/۰۰۸	۰/۷۶±۰/۰۷	۰/۵۶±۰/۰۵۳
	۰/۰۰۱	۳۱۷/۶±۱۱/۷۵	۰/۷۵±۰/۰۶۲	۲/۶۴±۱/۰۶	۴/۸۴±۱/۱۲
	۰/۱	۰/۶۰±۰/۰۵۵	۰/۰۴±۰/۰۰۷	۰/۳۲±۰/۰۴۶	۰/۱۲±۰/۰۱۶
۲- مخلوط میوه و انواع آجیل	۰/۰۱	۰/۱۵±۰/۰۱۶	۴/۳۴±۰/۹۹	۰/۵۲±۰/۰۵۲	۱/۰۴±۰/۲۸
	۰/۰۰۱	>	۲/۲۷±۱/۱۶	۲/۱۲±۱/۱۴	۵/۲۴±۱/۱۶
	۰/۱	<	<	<	۳۰۵۳±۱۹۴
۳-فشرده حاوی مخلوط بلو بری، پسته و ماست	۰/۰۱	<	<	۱۶۹۳±۱۲۳	<
	۰/۰۰۱	<	<	۳۱۴۷±۲۰۱	۱۸۹۳۳±۸۹۲
	۰/۱	>	<	۱۰/۲±۲/۲۴	۱۰/۰۴±۲/۲۳
۴- فشرده حاوی ماکادامیا و انواع میوه	۰/۰۱	۱۲/۵±۲/۵	۶۵/۳۳±۴/۵۵	۴/۴±۰/۹۹	۵/۸۸±۱/۱۴
	۰/۰۰۱	۹۲/۶۷±۶/۲۱	۲۱/۸۲±۳/۷۳	۲/۱۶±۱/۰۸	۴/۲۸±۱/۰۳
	۰/۱	>	۶/۳۸±۱/۵۲	۱۱۵۳±۱۰۵	۰/۸۴±۰/۰۶۳
۵- شکلات حاوی فندق، بادام و برزیل نات	۰/۰۱	۵۲۳/۳±۵۲	۳/۱۲±۱/۰۵	۱۵/۴±۲/۷۸	۰/۹۲±۰/۰۸۷
	۰/۰۰۱	۳۳۳۳±۲۰۳	۴/۴۹±۰/۸۹	۱۳/۶۸±۲/۰۶	۱/۸۸±۰/۳۳
	۰/۱	۳۱/۳۹±۴/۰۱	۰/۵۹±۰/۰۵۸	۱/۶±۰/۳۳	۰/۳۶±۰/۰۴۴
۶- فشرده حاوی انواع میوه و آجیل	۰/۰۱	۸۵±۶/۲۳	۰/۸۴±۰/۰۷۱	۰/۵۲±۰/۰۵۵	۰/۴±۰/۰۴۱
	۰/۰۰۱	۵۱۶/۶۷±۴۸	۲/۹۷±۱/۰۲	۱/۲۸±۱/۰۲	۲/۳۲±۱/۰۱
	۰/۱	۴/۰۸±۱/۰۶	۰/۰۸±۰/۰۰۷	۰/۴±۰/۰۰۷	۰/۰۴±۰/۰۰۷
۷- مخلوط کرن بری و ماکادامیا	۰/۰۱	۰/۱۲±۰/۰۱۵	۰/۴۱±۰/۰۴۷	۰/۵۲±۰/۰۵۱	۰/۱۲±۰/۰۱۵
	۰/۰۰۱	۰/۲۵±۰/۰۳۶	۱/۰۶±۰/۳۶	۲/۶۴±۱/۱۶	۰/۲۸±۰/۰۴۱
	۰/۱	۰/۰۳±۰/۰۰۲	۰/۱۹±۰/۰۱۸	۲۲/۳۶	۵/۵۲±۰/۹۶
۸- کلوچه فندق	۰/۰۱	۰/۰۹±۰/۰۰۳	۰/۵۱±۰/۰۵۲	۹/۱۶±۱/۸۶	۴/۲۸±۱/۰۱
	۰/۰۰۱	۰/۱۲±۰/۰۱۵	۱/۲۵±۰/۴۵	۵/۶۴±۱/۹۲	۲/۹۲±۰/۸۷
	۰/۱	<	<	<	<
۹- باقلو حاوی پسته	۰/۰۱	<	<	۴۹۲±۱۸/۵	۴۵/۹۶±۴/۶۵
	۰/۰۰۱	۲۸۳۰±۱۶۱	<	۲۳۴۷±۱۳۳	۹۸۶۰±۴۷۲
	۰/۱	<	<	<	۶۰۰±۳۲
۱۰- بیسکویت پسته و بادام	۰/۰۱	<	۹۶۳/۳۳±۴۵/۴۳	۱۷۸/۶۸±۱۴/۱۲	۱۸۸±۱۴
	۰/۰۰۱	<	۱۱۰±۹/۴۵	۲۳۲±۱۸	۳۷۳/۳±۲۳/۱۵
	۰/۱	۰/۲۴±۰/۰۴	۱/۵۱±۰/۳۸	۱۱/۲۸±۲/۴۸	۱/۹۲±۰/۶۴
۱۱-پاوا ایدلی (آردی حاوی بادام هندی)	۰/۰۱	۰/۵۴±۰/۰۴۸	۲/۱۰±۱/۱۱	۸/۵۲±۱/۷۸	۴/۵۶±۱/۱۲
	۰/۰۰۱	۱۲/۹۹±۲/۶۵	۵/۳۱±۰/۹۵	۶/۶±۱/۱۲	۲۰/۰۸±۲/۰۴
	۰/۱	>	۴/۱۱±۰/۸۸	۳/۵۶±۰/۷۶	۱/۵۶±۰/۴۵
۱۲- پودری با پایه شیر ولی نامعلوم از نظر دیگر ترکیبات	۰/۰۱	۰/۲۶±۰/۰۴۴	۳/۰۴±۱/۲۲	۱۶/۶۴±۱/۸۶	۰/۶۴±۰/۰۵۸
	۰/۰۰۱	۶/۵۰±۱/۶۸	۷/۹۲±۱/۷۶	۵/۱۲±۱/۰۶	۱۳/۲۴±۲/۴۴

ارقام ثبت شده میزان پروتئین به‌وسیله الیزا در جدول ۱ خلاصه شده است. رقت‌های مختلف آنتی‌بادی و ۴ روش استخراج پروتئین در این جدول گنجانده شده است. درج علامت > به‌وسیله نرم‌افزار به این معنی است که میزان ممانعت به اندازه‌ای بود که قابل اندازه‌گیری نبوده است و به‌عبارتی میزان باقی‌مانده پروتئین هدف بیشتر از حد بالایی تشخیص بوده است. و علامت < نشان‌دهنده کمتر بودن میزان پروتئین از پایین‌ترین حد

Archive of SID

www.SID.ir

تشخیص بوده است. اگر در یک روش به‌خصوص 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[1] 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 quantitites 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 Exprimental Allergy. 25: 1254-1259.

1- Almond major protein

Archive of SID

www.SID.ir

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 18th 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.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 16(1), 2009
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

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

[*]M. Ghorbani[1] and M. Morgan[2]
[1]Assistant Prof., Department of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]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

Archive of SID

*- Corresponding Author; Email: moghorbani@yahoo.com

www.SID.ir