



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110018311 A

(43)申请公布日 2019.07.16

(21)申请号 201910223481.5

(22)申请日 2019.03.22

(71)申请人 新疆大学

地址 830046 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐
市天山区胜利路14号

(72)发明人 杨洁 邓露 李敏婧 王雪
岳海涛 申彤 陈红征

(74)专利代理机构 西安亚信智佳知识产权代理
事务所(普通合伙) 61241

代理人 段国刚

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

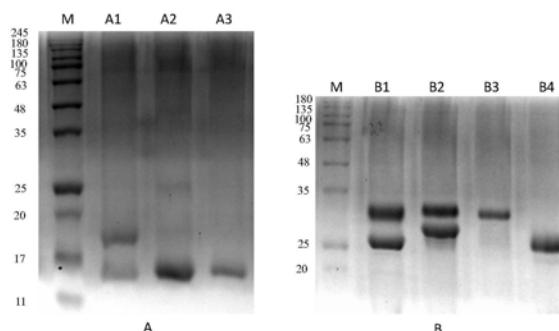
权利要求书3页 说明书10页 附图5页

(54)发明名称

一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用,将骆驼乳中 α -乳白蛋白、 α_{s1} -酪蛋白作为骆驼乳特征蛋白,牛乳中 β -乳球蛋白、 κ -酪蛋白作为牛乳特征蛋白。分离纯化骆驼乳特征蛋白后,采用商品化牛乳特征蛋白以及自制骆驼乳特征蛋白制备的多克隆抗体及单克隆抗体能够应用于ELISA检验。试剂盒主要采用间接ELISA方法定性或定量检测驼奶中驼源性 α -乳白蛋白、 α_{s1} -酪蛋白或牛源性 β -乳球蛋白、 κ -酪蛋白的含量,样品前处理过程简单,骆驼乳样品经反复离心获得乳样后,用稀释液稀释后可直接测定,并且能同时检测大批样品。测定方法准确、快速,便捷,在骆驼乳的掺伪监测领域具有广泛的实用性和开发价值。



1. 一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,包括包被液、聚苯乙烯微孔板、洗涤液、样品稀释液、一抗、二抗、封闭液、底物显色液和终止液。

2. 如权利要求1所述的一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述一抗为自制多克隆抗体或单克隆抗体,分别为牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体或单克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体或单克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体或单克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体或单克隆抗体和阴性对照血清,抗原为牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白以及骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白,将免疫前所制备的血清作为阴性对照。

3. 如权利要求1所述的一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述二抗为生物素标记山羊抗兔IgG或生物素标记鼠抗兔IgG。

4. 如权利要求2所述的一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体和阴性血清的制备方法:筛选健康新西兰雄性大白兔,以耳缘静脉采血,离心获得阴性血清备用;分别牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白以及自制的骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白混合弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂免疫大白兔,以间接ELISA技术检测牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体的效价,各蛋白抗体效价至少达到1:20000以上时处死兔子以心脏采血的方法收集血清,纯化,获得多克隆抗体。

5. 如权利要求2所述的一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述牛乳 β -乳球蛋白单克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白单克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白单克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白单克隆抗体和阴性血清的制备方法:选取约7周龄的雌性Balb/c小鼠作为免疫动物,免疫原为牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白和骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白,免疫原与弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂免疫经超声充分混匀乳化后,皮下多点及腹腔注射免疫小鼠;分离血清采用间接ELISA法测定效价,当血清效价达到1:64000以上,对反应值最高小鼠尾静脉和腹腔分别注射不含佐剂的100 μ g免疫原进行最后加强免疫;取脾脏制备淋巴细胞诱导细胞融合,采用间接ELISA法筛选与羊、马、驴、骆驼或牛乳无交叉反应且与牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白反应值较高的阳性克隆进一步扩大培养,注射扩大培养后的细胞进小鼠体内诱生腹水,纯化,获得单克隆抗体,冻干备用。

6. 如权利要求4或5任一项所述的一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述自制的骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的提取方法,包括以下步骤:

(1) 硫酸铵分级沉淀法粗提骆驼乳 α -乳白蛋白:取脱脂骆驼乳,调pH至4.3~4.8,3000~12000r/min离心10~60min,反复多次离心,上清液按硫酸铵饱和度70%~100%进行分级沉淀,得到沉淀经脱盐冻干备用;

(2) 钙离子沉淀法粗提取骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白:取脱脂骆驼乳,将pH调至10~12,加入钙离子产生沉淀,调pH至6~8,3000~8000r/min离心10~30min,取沉淀溶于3.3mol/L尿素,调pH至4~5,3000~8000r/min离心10~30min,得到沉淀烘干后备用;

(3) 超滤离心粗分离骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白:取脱脂骆驼乳,调pH至4.3~4.8,3000~12000r/min离心10~60min,反复多次离心,得到上清液与沉淀,上清液使用超滤

管5000~10000r/min离心20~30min,分离出分子量低于20kDa的蛋白质为骆驼乳 α -乳白蛋白,沉淀溶解使用超滤管5000~10000r/min离心20~30min,分离出分子量低于30kDa的蛋白质为骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白。

7.如权利要求4所述的一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体的效价检测,包括以下步骤:

(1)包被:向聚苯乙烯微孔板中每孔加入100 μ L的2 μ g/mL牛乳 β -乳球蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α -乳白蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白稀释液或2 μ g/mL牛乳 κ -酪蛋白稀释液,4 $^{\circ}$ C过夜包被或37 $^{\circ}$ C包被2~4h;

(2)洗涤:当聚苯乙烯微孔板恢复室温后,每孔加入200~300 μ L洗涤液,弃去残留液体,重复2~5次;

(3)封闭:每孔加入100~200 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C条件下封闭1~3h;

(4)加一抗:按步骤(2)洗涤,每孔加牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体或骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体或牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体或阴性血清100~200 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h;

(5)加酶标二抗:按步骤(2)洗涤后,用稀释液稀释二抗,按体积比计,二抗:稀释液=1:10000,置冰上待用,每孔加梯度稀释后的二抗100~200 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h;

(6)显色:按步骤(2)洗涤后,每孔加入TMB显色液100 μ L,室温避光显色时间为10min;

(7)终止反应:每孔加入50~100 μ L终止液,终止反应;

(8)测定450nm波长下的吸光度值,获得牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体效价。

8.如权利要求5所述的一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述牛乳 β -乳球蛋白单克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白单克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白单克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白单克隆抗体的效价检测,包括以下步骤:用2 μ g/mL牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白包被酶标板,50 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C包被2~4h。倾去包被液,用PBST洗涤3~5次后,加入0.4%鱼皮明胶封闭,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,1~3h。弃去封闭液,加入PBST洗涤3~5次后,加入自1000倍母液,浓度为1mg/ml,开始倍比稀释纯化抗体,空白对照为PBS,50~100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h。PBST人工洗板3次后,加入1:5000稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h。PBST人工洗板5次后,加入显色底物pNPP,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C显色0.5~1h。测定405nm波长下的吸光度值。

9.如权利要求7或8任一项所述的一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述2 μ g/mL牛乳 β -乳球蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α -乳白蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白稀释液或2 μ g/mL牛乳 κ -酪蛋白稀释液,是通过牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白标准品及自制骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白分别用包被液稀释获得。

10.一种如权利要求1所述检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒的应用,其特征在于,具体采用以下技术步骤:

(1)样品前处理:取鲜乳4 $^{\circ}$ C条件下,12000 r/min,离心30 min,去除上层的乳脂和下层沉淀,将得到的乳样进行反复离心后备用,乳样用包被液稀释,按体积比计,乳样:稀释液=1:10,制得样本溶液;

(2) 用试剂盒检测:向聚苯乙烯微孔板微孔中加入100~200 μ L由步骤(1)制备的样本溶液,4 $^{\circ}$ C过夜包被或37 $^{\circ}$ C包被2~4h,300 μ L洗涤液洗涤3~5次,弃去残留液体,每孔加入100 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育2~4h,300 μ L洗涤液洗涤3~5次,弃去残留液体,用稀释液稀释多克隆抗体或单克隆抗体,按体积比计,抗体:稀释液=1:2000~1:4000,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C放置1~3h,300 μ L 洗涤液洗涤3~5次,弃去残留液体,用稀释液稀释二抗,按体积比计,二抗:稀释液=1:10000,置冰上待用,每孔加稀释后的二抗100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h,洗涤3~5次,弃去残留液体,每孔加入TMB 100 μ L,室温避光显色时间10~30min,每孔加入50~100 μ L终止液,测定450nm波长处吸光度值;

(3) 检测结果分析:计算公式为:百分吸光度值(%) = $(B/B_0) \times 100\%$;公式中B为标准溶液的平均吸光度值, B_0 为0 μ g/L标准溶液的平均吸光度值;以牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白浓度为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图;用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应出一个样品的浓度,从标准曲线上读出样品中牛乳 β -乳球蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的浓度。

一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明主要涉及免疫检测的技术领域,具体地说,本发明涉及一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒的技术领域。

背景技术

[0002] 随着经济发展,人们保健意识增强,骆驼乳制品逐渐进入人们的日常生活中,国内外学者对骆驼乳营养价值、功效等的研究日益加深,发现其在抗肿瘤、治疗糖尿病等方面具有一定的辅助治疗作用,骆驼大部分来自牧民的小规模饲养,骆驼乳产量较低,有向高价骆驼乳中掺入低价牛乳的可能性,影响骆驼乳产业发展。

[0003] 牛乳中常见的过敏原为 β -乳球蛋白,约占新鲜牛奶蛋白质的7~12%。 β -乳球蛋白对消化系统尚未发育完全的婴儿来说,是主要的过敏原,容易造成婴儿的过敏。骆驼乳中不含有牛乳中的过敏原 β -乳球蛋白,且营养成分丰富,可替代牛乳成为过敏婴幼儿乳品。若在骆驼乳中掺入牛乳可能对过敏体质婴儿造成伤害,因此快速和精确检测骆驼乳中掺入的牛乳成分是很有必要的。国内外现有的掺伪检测技术多是针对羊乳、水牛乳中掺入牛乳的检测方法,在骆驼乳中掺入牛乳的检测方法尚不多见。

[0004] 目前,能够应用于骆驼乳中掺入牛乳的检测方法主要有:(1)电泳检测技术:虽然该方法操作简便,但其灵敏度低,且不适合大量样品的检测。(2)液相色谱分析:该方法灵敏度高,检测所需样品量少,适合大量样品检测,但该方法需要昂贵仪器以及熟练的仪器操作人员且操作复杂,不适合现场检验。(3)核酸差异分析:该方法灵敏度较高,但遗传物质提取过程较为复杂。(4)免疫学检测:免疫学检测是基于抗原-抗体的特异性反应的方法,较多应用于检测的技术是酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)以及胶体金免疫层析技术,其反应结果可以通过反应是否有颜色变化以及颜色变化的深浅来辨别检测物中是否有相应的抗原或抗体,能够定性或定量检测待检物中的目标物质。

[0005] 目前,常见的ELISA技术有夹心ELISA、间接ELISA、竞争ELISA等,其中应用最为广泛的是间接ELISA技术。间接ELISA检测过程中,每加入一种孵育试剂,会通过洗涤剂洗去未反应的游离物质,因而能够确保反应结果的特异性及稳定性,同时由于酶具有较高的催化效率,因此间接ELISA技术具有高度的灵敏性和特异性。该方法操作简便、快速,无需昂贵设备,能够同时检验大批样品。

发明内容

[0006] 针对目前国内对于骆驼乳掺伪检测并没有明确的标准,对骆驼乳及其相关产品的检测,国内多见于针对骆驼乳中营养成分以及药物残留的检测等,而针对骆驼乳掺伪的检测较少的技术问题,本发明旨在提供检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用,该试剂盒通过采用骆驼乳中 α -乳白蛋白以及 α_{s1} -酪蛋白作为骆驼乳特征蛋白检测骆驼乳组分,并通过牛乳中 β -乳球蛋白以及 κ -酪蛋白作为牛乳特征蛋白来检测骆驼乳中是否掺入牛乳,在骆驼乳的掺伪监测领域具有广泛的实用性和开发价值。

[0007] 本发明通过以下技术方案实现：

[0008] 本发明提供一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒，其中设置有以下成分：包被液、聚苯乙烯微孔板、洗涤液、样品稀释液、一抗、二抗、封闭液、底物显色液和终止液。

[0009] 本发明中，所述包被液为0.05mol/L的碳酸盐缓冲液，pH9.6。

[0010] 本发明中，所述洗涤液为PBST，即含有0.1%吐温-20的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0011] 本发明中，所述样品稀释液为0.1~0.5g BSA用PBST定容至10~50ml。

[0012] 本发明中，所述一抗为自制多克隆抗体或单克隆抗体，分别为牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体或单克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体或单克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体或单克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体或单克隆抗体和阴性血清，抗原为牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白以及骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白，将免疫前所制备的血清作为阴性血清。

[0013] 本发明中，所述二抗为生物素标记山羊抗兔IgG或生物素标记鼠抗兔IgG。

[0014] 本发明中，所述封闭液为0.3~3g BSA用PBST定容至10~100ml。

[0015] 本发明中，所述封闭液优选采用为0.3g BSA用PBST定容至10ml，经滤膜过滤后，置4℃保存备用。

[0016] 本发明中，所述终止液为2mol/L H_2SO_4 ，量取蒸馏水178.3mL，缓慢加入21.7mL 98% H_2SO_4 。

[0017] 本发明中，所述底物显色液为TMB使用液，0.1mol/L柠檬酸5.6mL、0.2mol/L Na_2HPO_4 4.4mL、10mg/mL TMB 100 μ L、0.75% H_2O_2 42 μ L均匀混合。

[0018] 本发明中选用的聚苯乙烯微孔板属于体外诊断或免疫诊断常用装置，微孔板是全黑或全白聚丙烯微孔板，有圆底或平底，和黑底透的规格，比如常见的96孔聚苯乙烯微孔板、384孔黑或白底透聚苯乙烯微孔板。

[0019] 本发明中，所述牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体的效价检测过程为：

[0020] (1) 包被：向聚苯乙烯微孔板中每孔加入100 μ L的2 μ g/mL牛乳 β -乳球蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α -乳白蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白稀释液或2 μ g/mL牛乳 κ -酪蛋白稀释液，4℃过夜包被或37℃包被2~4h；

[0021] (2) 洗涤：当聚苯乙烯微孔板恢复室温后，每孔加入200~300 μ L洗涤液，弃去残留液体，重复2~5次；

[0022] (3) 封闭：每孔加入100~200 μ L封闭液，37℃条件下封闭1~3h；

[0023] (4) 加一抗：当聚苯乙烯微孔板恢复室温后，按步骤(2)洗涤，每孔加牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体或骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体或牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体或阴性血清100~200 μ L，37℃孵育1~3h；

[0024] (5) 加酶标二抗：按步骤(2)洗涤后，用稀释液稀释二抗，按体积比计，二抗：稀释液=1:10000，置冰上待用，每孔加梯度稀释后的二抗100~200 μ L，37℃孵育1~3h；

[0025] (6) 显色：按步骤(2)洗涤后，每孔加入TMB显色液100 μ L，室温避光显色时间为10min；

[0026] (7) 终止反应：每孔加入50~100 μ L终止液，终止反应；

[0027] (8) 测定450nm波长下的吸光度值,获得多克隆抗体效价。

[0028] 本发明中,所述牛乳 β -乳球蛋白单克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白单克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白单克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白单克隆抗体的效价检测过程为:

[0029] 用2 μ g/mL牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白包被酶标板,50 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C包被2~4h。倾去包被液,用PBST洗涤3~5次后,加入0.4%鱼皮明胶封闭,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,1~3h。弃去封闭液,加入PBST洗涤3~5次后,加入自1000倍母液,浓度为1mg/ml,开始倍比稀释纯化抗体,空白对照为PBS,50~100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h。PBST人工洗板3次后,加入1:5000稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h。PBST人工洗板5次后,加入显色底物pNPP,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C显色0.5~1h。测定405nm波长下的吸光度值,获得单克隆抗体效价。

[0030] 本发明中,所述2 μ g/mL牛乳 β -乳球蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α -乳白蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白稀释液或2 μ g/mL牛乳 κ -酪蛋白稀释液,是通过牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白标准品及自制骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白分别用包被液稀释获得。

[0031] 本发明中,所述牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体和阴性血清的制备方法:筛选健康新西兰雄性大白兔,以耳缘静脉采血,离心获得阴性血清备用;分别以Sigma公司制备的牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白以及自制的骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白混合弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂免疫大白兔,以间接ELISA技术检测 β -乳球蛋白多克隆抗体、 α -乳白蛋白多克隆抗体、 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体、 κ -酪蛋白多克隆抗体的效价,各蛋白抗体效价至少达到1:20000以上时处死兔子以心脏采血的方法收集血清,纯化,获得多克隆抗体。

[0032] 本发明中,所述牛乳 β -乳球蛋白单克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白单克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白单克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白单克隆抗体和阴性血清的制备方法:选取约7周龄的雌性Balb/c小鼠作为免疫动物,免疫原为牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白和骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白,免疫原与弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂免疫经超声充分混匀乳化后,皮下多点及腹腔注射免疫小鼠;分离血清采用间接ELISA法测定效价,当血清效价达到1:64000以上,对反应值最高小鼠尾静脉和腹腔分别注射不含佐剂的100 μ g免疫原进行最后加强免疫;取脾脏制备淋巴细胞诱导细胞融合,采用间接ELISA法筛选与羊、马、驴、骆驼或牛乳无交叉反应且与牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白反应值较高的阳性克隆进一步扩大培养,注射扩大培养后的细胞进小鼠体内诱生腹水,纯化,获得单克隆抗体,冻干备用。

[0033] 本发明中,所述自制的骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的提取方法,包括以下技术步骤:

[0034] (1) 硫酸铵分级沉淀法粗提骆驼乳 α -乳白蛋白:取脱脂骆驼乳,调pH至4.3~4.8,3000~12000r/min离心10~60min,反复多次离心,上清液按硫酸铵饱和度70%~100%进行分级沉淀,得到沉淀经过脱盐冻干备用;

[0035] (2) 钙离子沉淀法粗提取骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白:取脱脂骆驼乳,将pH调至10~12,加入钙离子产生沉淀,调pH至6~8,3000~8000r/min离心10~30min,取沉淀溶于3.3mol/L尿素,调pH至4~5,3000~8000r/min离心10~30min,得到沉淀烘干后备用;

[0036] (3) 超滤离心粗分离骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白:取脱脂骆驼乳,调pH

至4.3~4.8,3000~12000r/min离心10~60min,反复多次离心,得到上清液与沉淀,上清液使用超滤管5000~10000r/min离心20~30min,分离出分子量低于20kDa的蛋白质为骆驼乳 α -乳白蛋白,沉淀溶解后使用超滤管5000~10000r/min离心20~30min,分离出分子量低于30kDa的蛋白质为骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白。

[0037] 另外,本发明提供一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒的应用方法,具体包括以下步骤:

[0038] (1) 样品前处理:取鲜乳8000~12000r/min离心10~60min,去除上层的乳脂和下层沉淀,将得到的乳清在上述条件下进行反复离心,乳清用包被液稀释,按体积比计,乳清:稀释液=1:5~1:20,制得样本溶液;

[0039] (2) 用试剂盒检测:向聚苯乙烯微孔板微孔中加入100~200 μ L由步骤(1)制备的样本溶液,4 $^{\circ}$ C过夜包被,300 μ L洗涤液洗涤3~5次,弃去残留液体,每孔加入100 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育2~4h,300 μ L洗涤液洗涤3~5次,弃去残留液体,用稀释液稀释多克隆抗体或单克隆抗体,按体积比计,抗体:稀释液=1:2000~1:4000,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C放置1~3h,300 μ L洗涤液洗涤3~5次,弃去残留液体,用稀释液稀释二抗,按体积比计,二抗:稀释液=1:10000,置冰上待用,每孔加稀释后的二抗100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h,洗涤3~5次,弃去残留液体,每孔加入TMB 100 μ L,室温避光显色时间10~30min,每孔加入50~100 μ L终止液,用酶标仪测定450nm波长下的吸光度值;

[0040] (3) 检测结果分析:百分吸光度值(%)=(B/B₀) $\times$ 100%;公式中B为标准溶液的平均吸光度值,B₀为0 μ g/L标准溶液的平均吸光度值;以牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白浓度为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图;用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应出一个样品的浓度,从标准曲线上读出样品中牛乳 β -乳球蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的浓度。

[0041] 优选的,本发明中,所述鲜乳10000r/min离心30min。

[0042] 优选的,本发明中,所述样本溶液,按体积比计,乳清:稀释液=1:10。

[0043] 优选的,本发明中,所述向聚苯乙烯微孔板微孔中加入100 μ L由步骤(1)制备的样本溶液。

[0044] 优选的,本发明中,所述洗涤液洗涤3次。

[0045] 优选的,本发明中,所述稀释多克隆抗体37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0046] 优选的,本发明中,所述按体积比计,牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体:稀释液=1:2000,骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体:稀释液=1:4000。

[0047] 优选的,本发明中,所述稀释后的二抗37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0048] 优选的,本发明中,所述室温避光显色时间10min。

[0049] 通过实施本发明的技术方案,可以达到以下有益效果:

[0050] 1、本发明提供一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用,基于免疫学的检测方法,依据抗原抗体特异性结合的原理,定性定量检测待检物,经在微孔板上包被样本溶液或标准蛋白溶液后,再加入牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体或单克隆抗体或骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体或单克隆抗体或牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体或单克隆抗体或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体或单克隆抗体与微孔板上包被溶液中的牛乳 β -乳球蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白发生抗原抗体特异性结合,加入生物素标记二

抗,用显色液显色后,在450nm波长处检测吸光度。可通过标准曲线计算样本中牛乳 β -乳球蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的浓度。

[0051] 2、本发明提供一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用,试剂盒主要采用间接ELISA方法定性或定量检测驼奶中牛乳 β -乳球蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的含量,样品前处理过程简单,骆驼乳样品经离心获得乳样后,用稀释液稀释后可直接测定,并且能同时检测大批样品,其测定方法准确、快速,便捷。

[0052] 3、本发明提供一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用,骆驼乳中掺牛乳的最低检出限均为5%,当骆驼乳样中掺入的牛乳小于5%时不再有经济价值,因此该方法满足检测要求。掺入掺伪乳浓度在0~50%范围内,牛乳 β -乳球蛋白蛋白浓度呈线性其回归方程为: $y = -0.2252x + 2.0117$, $R^2 = 0.9494$;骆驼乳 α -乳白蛋白蛋白浓度呈线性其回归方程为: $y = -0.2577x + 1.9902$, $R^2 = 0.9464$ 。在检测乳样品掺伪中相对误差较小其变异系数表明该方法稳定性及重复性良好可以用于乳间掺伪的检测。该方法能够检测骆驼乳中掺入的牛乳并验证骆驼乳的存在。

附图说明

[0053] 图1显示为骆驼乳与牛乳差异蛋白组比较及骆驼乳特征蛋白纯度检验图;其中,A为牛乳与骆驼乳乳清差异蛋白比较图,A1为牛乳乳清,A2为骆驼乳乳清,A3为自制骆驼乳 α -乳白蛋白;B为牛乳与骆驼乳酪蛋白差异蛋白比较图,B1为牛乳酪蛋白,B2为骆驼乳酪蛋白,B3为自制骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白,B4为商品化牛乳 κ -酪蛋白。

[0054] 图2显示为牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体效价图。

[0055] 图3显示为骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体效价图。

[0056] 图4显示为牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体效价图。

[0057] 图5显示为骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体效价图。

[0058] 图6显示为牛乳 β -乳球蛋白单克隆抗体效价图。

[0059] 图7显示为骆驼乳 α -乳白蛋白单克隆抗体效价图。

[0060] 图8显示为牛乳 κ -酪蛋白单克隆抗体效价图。

[0061] 图9显示为骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白单克隆抗体效价图。

[0062] 图10显示为标准牛乳 β -乳球蛋白标准曲线图。

[0063] 图11显示为骆驼乳 α -乳白蛋白标准曲线图。

[0064] 图12显示为间接ELISA技术检测乳间掺伪线性图,其中,A[#]为骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体检测掺伪乳样线性图,B[#]为牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体检测掺伪乳样线性图。

具体实施方式

[0065] 下面,举实施例说明本发明,但是,本发明并不限于下述的实施例。

[0066] 采用的主要试剂:丙烯酰胺、双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、溴酚蓝、 β -巯基乙醇、甲醇、冰醋酸、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、10% SDS、 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、 KH_2PO_4 、 NaCl 、 KCl 、Tween-20、BSA、柠檬酸均为分析纯, β -乳球蛋白标准品购自美国Sigma公司,BSA购自美国Sigma公司,低分子量Marker购自北京索莱宝科技有限公司,辣根酶标记山羊抗兔IgG购自中杉金桥公司,生物素标记山羊抗兔IgG、生物素标记鼠抗

兔IgG均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

[0067] 采用的主要的仪器设备:Multifuge XIR离心机,Gel Doc XR+凝胶成像仪,Benchmark plus酶标仪,DYCZ-24F电泳槽,LRH-150-S恒温恒湿培养,MSI Minishaker微型旋涡混合仪。

[0068] 本发明采用的试剂和设备均可通过公共渠道购买或定制。

[0069] 本发明中选用的所有材料、试剂和仪器都为本领域熟知的,但不限制本发明的实施,其他本领域熟知的一些试剂和设备都可适用于本发明以下实施方式的实施。

[0070] 实施例一:牛乳及骆驼乳蛋白组成比较

[0071] 骆驼乳乳清、牛乳乳清、骆驼乳酪蛋白、牛乳酪蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),考马斯亮蓝染色凝胶并脱色后采用凝胶成像仪记录结果,如附图1所示,发现骆驼乳清相对于牛乳清缺失 β -乳球蛋白蛋白,骆驼乳清中 α -乳白蛋白蛋白含量显著高于牛乳清,因此选用牛乳 β -乳球蛋白以及骆驼乳 α -乳白蛋白进行多克隆抗体的制备;相对于牛乳,骆驼乳酪蛋白中 κ 酪蛋白含量较少、 α_{s1} -酪蛋白分子量较大,因此选用牛乳 κ 酪蛋白以及骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白进行多克隆抗体或单克隆抗体的制备。

[0072] 实施例二:骆驼乳 α -乳白蛋白以及 α_{s1} -酪蛋白的提取

[0073] (1) 硫酸铵分级沉淀法粗提骆驼乳 α -乳白蛋白

[0074] 取脱脂骆驼乳,调pH至4.3~4.8,3000~12000r/min离心10~60min,反复多次离心,上清液按硫酸铵饱和度70%~100%进行分级沉淀,得到沉淀经脱盐冻干备用。

[0075] (2) 钙离子沉淀法粗提取骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白

[0076] 取脱脂骆驼乳,将pH调至10~12,加入钙离子产生沉淀,调pH至6~8,3000~8000r/min离心10~30min,取沉淀溶于3.3mol/L尿素,调pH至4~5,3000~8000r/min离心10~30min,得到沉淀烘干后备用。

[0077] (3) 超滤离心粗分离骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白

[0078] 取脱脂骆驼乳,调pH至4.3~4.8,3000~12000r/min离心10~60min,反复多次离心,得到上清液与沉淀,上清液使用超滤管5000~10000r/min离心20~30min,分离出分子量低于20kDa的蛋白质为骆驼乳 α -乳白蛋白,沉淀溶解后使用超滤管5000~10000r/min离心20~30min,分离出分子量低于30kDa的蛋白质为骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白。

[0079] (4) SDS-PAGE检测骆驼乳 α -乳白蛋白以及骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白纯度

[0080] 取自制骆驼乳 α -乳白蛋白以及骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白进行SDS-PAGE检验蛋白纯度,如附图1所示,A3为自制骆驼乳 α -乳白蛋白,B3为自制骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白,发现两种蛋白质纯度较高,可以用于制备多克隆抗体或单克隆抗体。

[0081] 实施例三: α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、 α_{s1} -酪蛋白、 κ -酪蛋白多克隆抗体的制备

[0082] 1、牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体、牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体的制备

[0083] 本实验分别以Sigma公司制备的牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白以及自制的骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白为免疫抗原,混合弗氏完全佐剂(初次免疫)或弗氏不完全佐剂(加强免疫)免疫大白兔,以间接ELISA技术检测多克隆抗体效价,各蛋白抗体效价至少达到1:20000以上有效时处死兔子以心脏采血的方法收集血清,纯化,获得多克隆抗体。

[0084] 2、间接ELISA法检测牛乳 β -乳球蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳

α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体效价

[0085] 间接ELISA法检测牛乳 β -乳球蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体效价实验过程如下：一抗为待检抗体，抗体：稀释液梯度稀释倍比为1：16000至1：3276800，将免疫前所制备的血清作为阴性对照，PBST作为空白对照。

[0086] (1) 包被：向聚苯乙烯微孔板中每孔加入100 μ L的2 μ g/mL牛乳 β -乳球蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α -乳白蛋白稀释液或2 μ g/mL骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白稀释液或2 μ g/mL牛乳 κ -酪蛋白稀释液，4 $^{\circ}$ C过夜包被或37 $^{\circ}$ C包被2~4h；

[0087] (2) 洗涤：当聚苯乙烯微孔板恢复室温后，每孔加入200~300 μ L洗涤液，弃去残留液体，重复2~5次；

[0088] (3) 封闭：每孔加入100~200 μ L封闭液，37 $^{\circ}$ C条件下封闭1~3h；

[0089] (4) 加一抗：按步骤(2)洗涤，每孔加牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体或骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体或牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体或阴性血清100~200 μ L，37 $^{\circ}$ C孵育1~3h；

[0090] (5) 加酶标二抗：按步骤(2)洗涤后，用稀释液稀释二抗，按体积比计，二抗：稀释液=1：10000，置冰上待用，每孔加梯度稀释后的二抗100~200 μ L，37 $^{\circ}$ C孵育1~3h；

[0091] (6) 显色：按步骤(2)洗涤后，每孔加入TMB显色液100 μ L，室温避光显色时间为10min；

[0092] (7) 终止反应：每孔加入50~100 μ L终止液，终止反应，测定450nm波长下吸光度值。以P(待检验血清)/N(未免血清)>2，P(待检验血清)>0.2为阳性，抗体血清的最高稀释倍数为该多克隆抗体效价。

[0093] 3、试验结果

[0094] (1) 牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体效价

[0095] 对牛乳 β -乳球蛋白多克隆抗体进行梯度稀释：1：16000，1：32000，1：64000，1：128000，1：256000，1：512000，1：1024000，1：204800，1：409600，1：819200，1：1638400和1：3276800。

[0096] P/N值接近2.5对应的多克隆抗体稀释度的吸光值即为多克隆抗体效价。 β -乳球蛋白多克隆抗体稀释度1：819200所对应P/N值为2.72，因此确定 β -乳球蛋白多克隆抗体效价为1：819200，结果见附图2所示。

[0097] (2) 骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体效价

[0098] 骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体稀释度选择1：128000，1：256000，1：512000，1：1024000，1：204800，1：409600，1：819200和1：1638400。

[0099] 骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体稀释度1：1638400所对应P/N值为2.74，因此确定骆驼乳 α -乳白蛋白多克隆抗体效价为1：1638400，结果见附图3所示。

[0100] (3) 牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体效价

[0101] 牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体稀释度选择1：64000，1：128000，1：256000，1：512000，1：1024000，1：204800，1：409600，1：819200和1：1638400。

[0102] 牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体稀释度1：819200所对应P/N值为2.82，因此确定牛乳 κ -酪蛋白多克隆抗体效价为1：819200，结果见附图4所示。

[0103] (4) 骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体效价

[0104] 骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体稀释度选择1:64000,1:128000,1:256000,1:512000,1:1024000,1:204800,1:409600,1:819200和1:1638400。

[0105] 骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体稀释度1:204800所对应P/N值为2.68,因此确定骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白多克隆抗体效价为1:204800,结果见附图5所示。

[0106] 实施例四:牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的单克隆抗体制备

[0107] (1)牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的单克隆抗体制备:

[0108] 选取约7周龄的雌性Balb/c小鼠作为免疫动物,免疫原为牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白和骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白,免疫原与弗氏完全佐剂(初次免疫)或弗氏不完全佐剂(加强免疫)免疫经超声充分混匀乳化后,皮下多点及腹腔注射免疫小鼠。分离血清采用间接ELISA法测定效价,当血清效价达到1:64000以上,对反应值最高小鼠尾静脉和腹腔分别注射不含佐剂的100 μ g免疫原进行最后加强免疫。取脾脏制备淋巴细胞诱导细胞融合,采用间接ELISA法筛选与羊、马、驴、驼或牛乳无交叉反应且与牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白反应值较高的阳性克隆进一步扩大培养,注射扩大培养后细胞进小鼠体内诱生腹水,纯化,获得单克隆抗体,冻干备用。

[0109] (2)牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的单克隆抗体效价检测:

[0110] 用2 μ g/mL牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白包被酶标板,50 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C包被2~4h。倾去包被液,用PBST洗涤3~5次后,加入0.4%鱼皮明胶封闭,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,1~3h。弃去封闭液,加入PBST洗涤3~5次后,加入自1000倍(母液浓度为1mg/ml)开始倍比稀释纯化抗体,空白对照为PBS,50~100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h。PBST人工洗板3次后,加入1:5000稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1~3h。PBST人工洗板5次后,加入显色底物pNPP,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C显色0.5~1h。用酶标仪测定450nm波长下的吸光度值。

[0111] 试验结果:结果参见附图6、附图7、附图8和附图9所示,结果显示牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 κ -酪蛋白、骆驼乳 α -乳白蛋白、骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白单克隆抗体的效价均达到1:16000以上,效价分别为1:16000、1:16000、1:64000、1:16000。

[0112] 实施例五:间接ELISA检测掺伪骆驼乳的标准曲线

[0113] 用稀释液将牛乳 β -乳球蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白从10 μ g/mL进行两倍梯度稀释(0.156~10 μ g/mL),检测不同浓度的标准蛋白样品,不同的稀释梯度设立三个重复孔,得出其吸光值的平均值,以 β -乳球蛋白或 α -乳白蛋白标准蛋白样品的浓度为横坐标,以波长为450nm下的吸光度值为纵坐标,绘制牛乳 β -乳球蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白的标准曲线。

[0114] 当标准牛乳 β -乳球蛋白浓度在0.156~5 μ g/mL范围时,吸光度值与牛乳 β -乳球蛋白的浓度呈较好的线性关系 $R^2=0.9884$ 。当标准骆驼乳 α -乳白蛋白浓度在0.313~10 μ g/mL范围内时,吸光度值与骆驼乳 α -乳白蛋白的含量呈较好的线性关系 $R^2=0.9911$,如附图10和附图11所示。

[0115] 实施例六:间接ELISA技术检测乳间掺伪

[0116] 将处理过的不同掺伪浓度的乳样用包被液稀释成1:10抗原使用液,每孔100~200

μL , 4°C 过夜包被; $200\sim 300\mu\text{L}$ PBST 洗涤 $3\sim 5$ 次, 拍板至无液体残留; 每孔加入 $100\sim 200\mu\text{L}$ 封闭液, 37°C 孵育 2h ; $200\sim 300\mu\text{L}$ PBST 洗涤 3 次, 拍板至无液体残留; 用稀释液将抗体稀释至 $1:2000$, 每孔加入 $100\sim 200\mu\text{L}$, 37°C 放置 1h ; $200\sim 300\mu\text{L}$ PBST 洗涤 $3\sim 5$ 次, 拍板至无液体残留; 用稀释液将二抗稀释至 $1:10000$, 置冰上待用, 每孔加二抗 $100\sim 200\mu\text{L}$, 37°C 孵育 1h ; $200\sim 300\mu\text{L}$ PBST 洗涤 $3\sim 5$ 次, 拍板至无液体残留; 每孔加入 TMB $100\sim 200\mu\text{L}$, 室温避光显色时间 10min ; 每孔加入 $50\sim 100\mu\text{L}$ 终止液; 在波长 450nm 下测吸光度值。

[0117] 将牛乳按梯度掺入骆驼乳样品中, 依照相同梯度将骆驼乳掺入牛乳中作为待测样品, 建立间接 ELISA 检测掺伪骆驼乳。以牛乳 β -乳球蛋白为抗原检测样品乳时, 当掺入牛乳的量在 $0\sim 50\%$ 范围内时其线性回归方程分别为: $y = -0.2252x + 2.0117$, $R^2 = 0.9494$; 以骆驼乳 α -乳白蛋白为抗原检测样品乳时, 当骆驼乳掺入量在 $0\sim 50\%$ 的范围时, 线性回归方程为: $y = -0.2577x + 1.9902$, $R^2 = 0.9464$, 结果见附图 12 所示。

[0118] 实施例七: 间接 ELISA 检测掺伪骆驼乳

[0119] 通过实施例一至实施例五的试验, 获得间接 ELISA 技术检测乳间掺伪方法:

[0120] 本发明提供一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒的应用方法, 具体包括以下步骤:

[0121] (1) 样品前处理: 取鲜乳 $8000\sim 12000\text{r/min}$ 离心 $10\sim 60\text{min}$, 去除上层的乳脂和下层沉淀, 将得到的乳清在上述条件下进行反复离心, 乳清用包被液稀释, 按体积比计, 乳清: 稀释液 = $1:5\sim 1:20$, 制得样本溶液;

[0122] (2) 用试剂盒检测: 向聚苯乙烯微孔板微孔中加入 $100\sim 200\mu\text{L}$ 由步骤 (1) 制备的样本溶液, 4°C 过夜包被, $300\mu\text{L}$ 洗涤液洗涤 $3\sim 5$ 次, 弃去残留液体, 每孔加入 $100\mu\text{L}$ 封闭液, 37°C 孵育 $2\sim 4\text{h}$, $300\mu\text{L}$ 洗涤液洗涤 $3\sim 5$ 次, 弃去残留液体, 用稀释液稀释抗体, 按体积比计, 抗体: 稀释液 = $1:2000\sim 1:4000$, 每孔加入 $100\mu\text{L}$, 37°C 放置 $1\sim 3\text{h}$, $300\mu\text{L}$ 洗涤液洗涤 $3\sim 5$ 次, 弃去残留液体, 用稀释液稀释二抗, 按体积比计, 二抗: 稀释液 = $1:10000$, 置冰上待用, 每孔加稀释后的二抗 $100\mu\text{L}$, 37°C 孵育 $1\sim 3\text{h}$, 洗涤 $3\sim 5$ 次, 弃去残留液体, 每孔加入 TMB $100\mu\text{L}$, 室温避光显色时间 $10\sim 30\text{min}$, 每孔加入 $50\sim 100\mu\text{L}$ 终止液, 测定波长 450nm 处吸光度值;

[0123] (3) 检测结果分析: 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100\%$; 公式中 B 为标准溶液的平均吸光度值, B_0 为 $0\mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值; 以牛乳 β -乳球蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白浓度为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图; 用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值, 相对应出一个样品的浓度, 从标准曲线上读出样品中牛乳 β -乳球蛋白或骆驼乳 α -乳白蛋白或牛乳 κ -酪蛋白或骆驼乳 α_{s1} -酪蛋白的浓度。

[0124] 优选的, 本发明中, 所述鲜乳 10000r/min 离心 30min 。

[0125] 优选的, 本发明中, 所述样本溶液, 按体积比计, 乳清: 稀释液 = $1:10$ 。

[0126] 优选的, 本发明中, 所述向聚苯乙烯微孔板微孔中加入 $100\mu\text{L}$ 由步骤 (1) 制备的样本溶液。

[0127] 优选的, 本发明中, 所述洗涤液洗涤 3 次。

[0128] 优选的, 本发明中, 所述稀释抗体 37°C 孵育 2h 。

[0129] 优选的, 本发明中, 所述按体积比计, 牛乳 β -乳球蛋白抗体: 稀释液 = $1:2000$, 骆驼乳 α -乳白蛋白抗体: 稀释液 = $1:4000$ 。

[0130] 优选的, 本发明中, 所述稀释后的二抗 37°C 孵育 1h 。

[0131] 优选的,本发明中,所述室温避光显色时间10min。

[0132] 如上所述,即可较好地实现本发明,上述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种改变和改进,均应落入本发明确定的保护范围内。

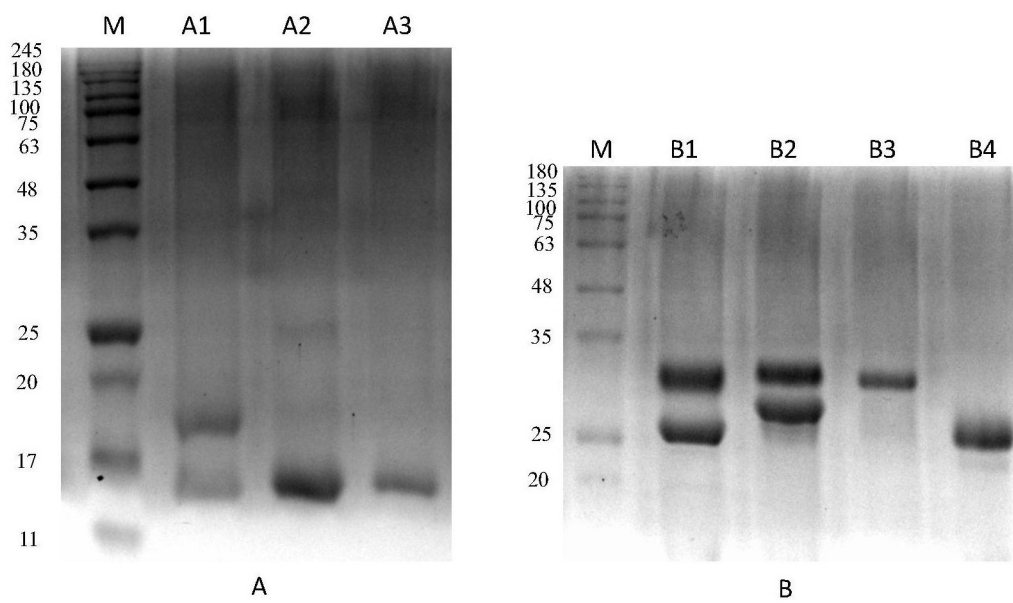


图1

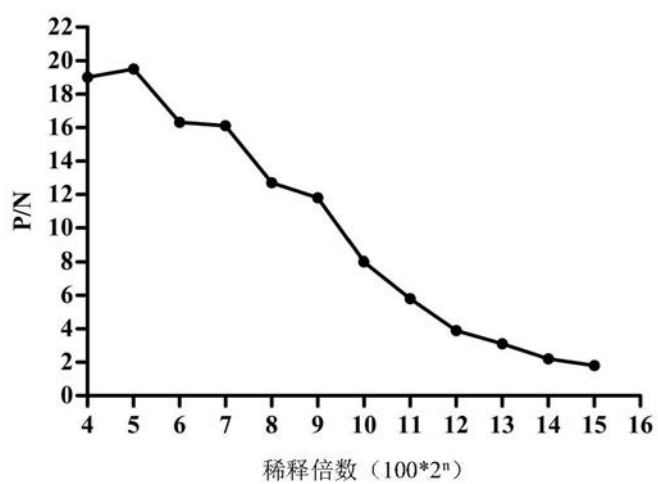


图2

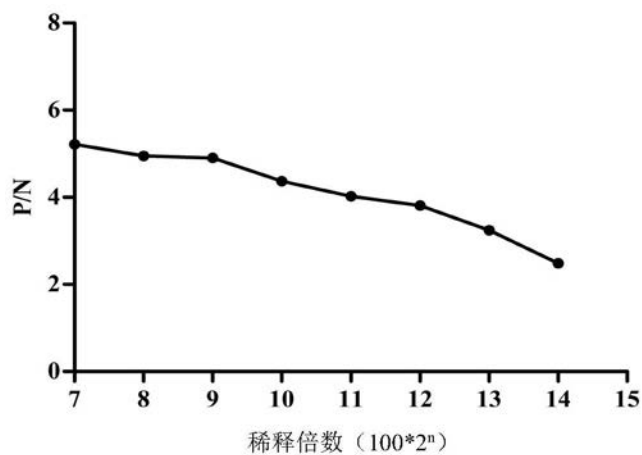


图3

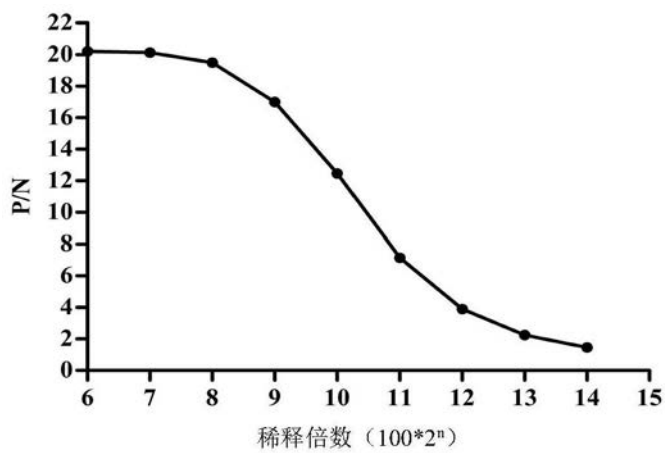


图4

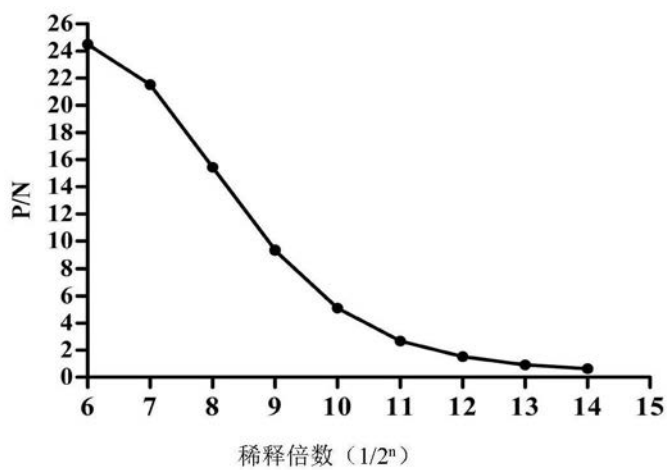


图5

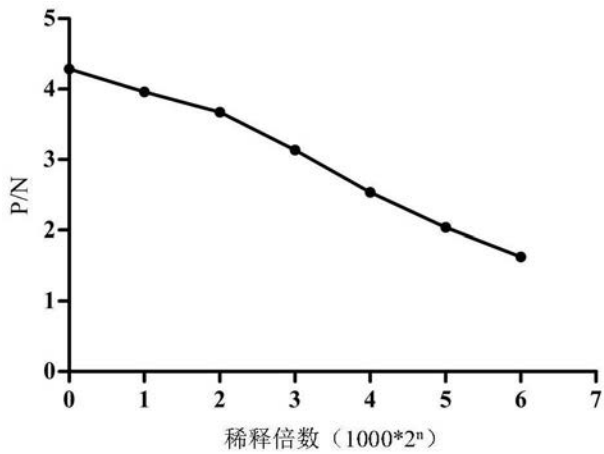


图6

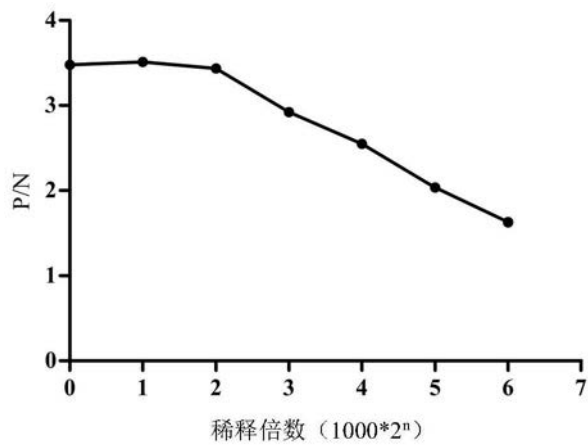


图7

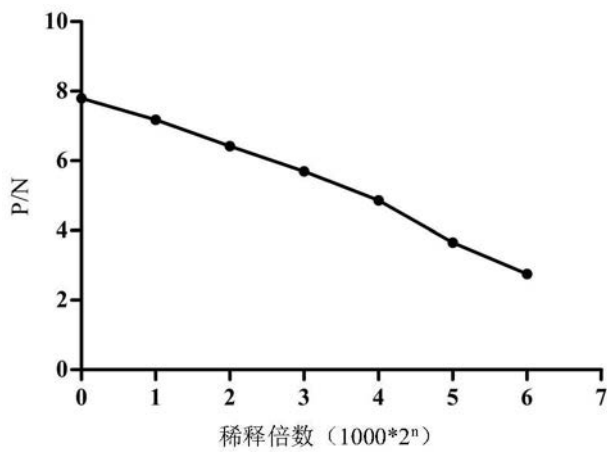


图8

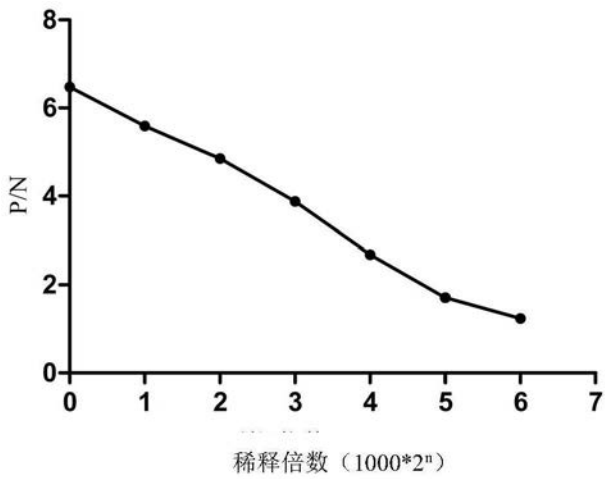


图9

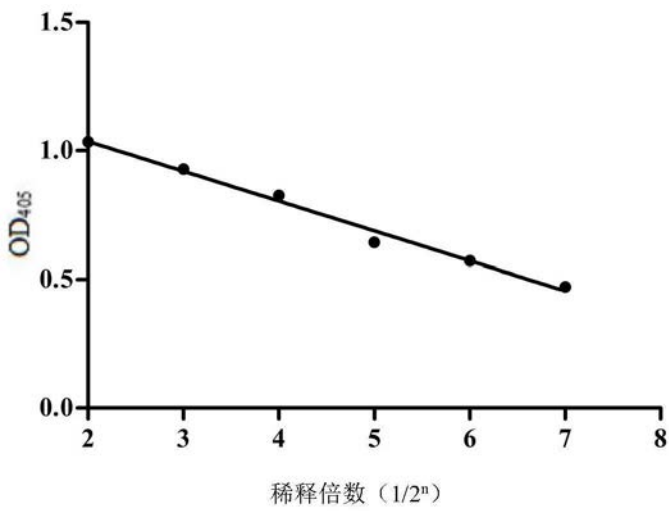


图10

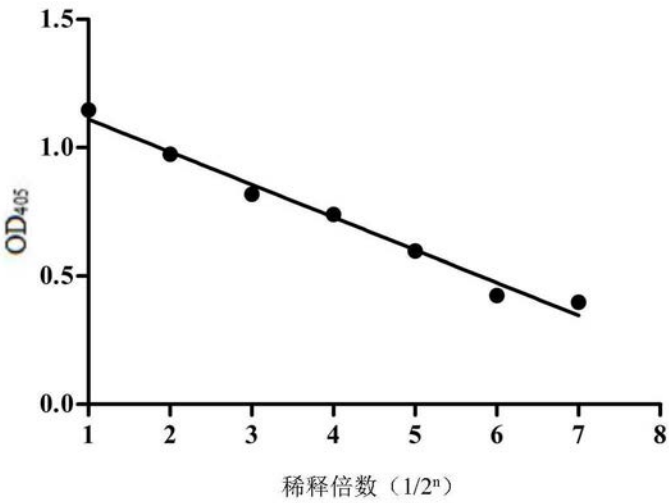


图11

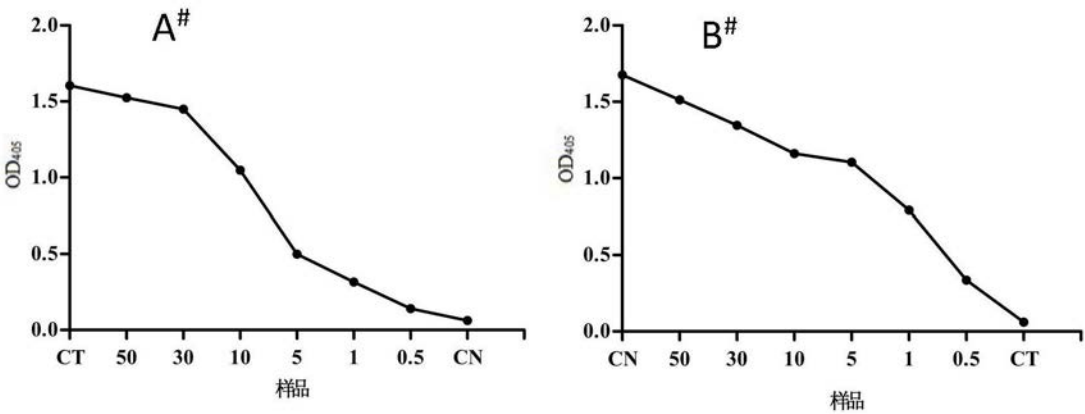


图12

专利名称(译)	一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN110018311A	公开(公告)日	2019-07-16
申请号	CN201910223481.5	申请日	2019-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	新疆大学		
申请(专利权)人(译)	新疆大学		
当前申请(专利权)人(译)	新疆大学		
[标]发明人	杨洁 邓露 王雪 岳海涛 申彤 陈红征		
发明人	杨洁 邓露 李敏婧 王雪 岳海涛 申彤 陈红征		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/577 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/531 G01N33/577 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种检测骆驼乳中掺伪牛乳的免疫检测试剂盒及其应用，将骆驼乳中 α -乳白蛋白、 α s1-酪蛋白作为骆驼乳特征蛋白，牛乳中 β -乳球蛋白、 κ 酪蛋白作为牛乳特征蛋白。分离纯化骆驼乳特征蛋白后，采用商品化牛乳特征蛋白以及自制骆驼乳特征蛋白制备的多克隆抗体及单克隆抗体能够应用于ELISA检验。试剂盒主要采用间接ELISA方法定性或定量检测驼奶中驼源性 α -乳白蛋白、 α s1-酪蛋白或牛源性 β -乳球蛋白、 κ 酪蛋白的含量，样品前处理过程简单，骆驼乳样品经反复离心获得乳样后，用稀释液稀释后可直接测定，并且能同时检测大批样品。测定方法准确、快速，便捷，在骆驼乳的掺伪监测领域具有广泛的实用性和开发价值。

