



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101271107 B

(45) 授权公告日 2013.01.02

(21) 申请号 200810017913.9

(22) 申请日 2008.04.09

(73) 专利权人 陕西科技大学

地址 710021 陕西省西安市未央大学城陕西科技大学

(72) 发明人 宋宏新 韩燕 薛海燕

(74) 专利代理机构 西安新思维专利商标事务所有限公司 61114

代理人 李罡

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(56) 对比文件

Elena Rodriguez et al. Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA).《J sci food agric》.1993, 第61卷全文.

Wolfgang Richter et al. An inditect competitive ELISA for the detection of

cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine  $\gamma$ 0caseins.《Z Lebensm Unters Forsch A》.1997, 第204卷摘要、第22页左栏第1段至23页左栏第1段.

Wolfgang Richter et al. An inditect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine  $\gamma$ 0caseins.《Z Lebensm Unters Forsch A》.1997, 第204卷摘要、第22页左栏第1段至23页左栏第1段.

宋宏新等. 免疫学检测羊乳中掺入牛乳成分.《中国乳品工业》.2007, 第35卷(第10期), 第44页右栏第1段至45页右栏第1段.

审查员 黎舒婷

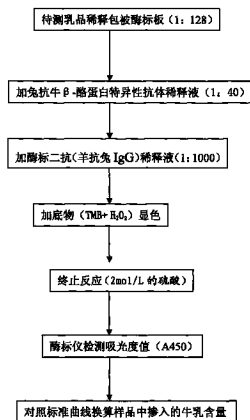
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

羊乳及其乳制品中掺入牛乳的快速免疫学检测方法

(57) 摘要

本发明为食品质量与安全的免疫学快速检测技术,具体是一种羊乳及其乳制品中掺入牛乳成分的快速免疫检测方法。为克服现有技术存在的问题,本发明采用牛乳特异性酪蛋白免疫哺乳动物产生抗体,将制备的血清抗体与羊乳的共同抗原反应得到特异性抗体,再将待测羊乳(疑是掺假样品)进行脱脂处理,应用制备特异抗体建立间接 ELISA 定量出羊乳中掺入的牛乳含量。本发明试剂价格低廉,实验操作方便,不需特殊的仪器设备,适合现场快速检测需要,可以满足有关研究单位,质检部门批量检测相关乳品质量的需要。



CN 101271107 B

1. 羊乳及其制品中掺入牛乳的免疫学检测方法,其特征在于:包括下述步骤:

(1) 选择牛乳酪蛋白的特异稳定组分为抗原免疫哺乳动物新西兰白兔产生抗体;

(2) 处理兔血清抗体,制备得到检测用高特异性抗体:将免疫血清抗体以抗体浓度 2.0mg/ml 稀释于 PBST 缓冲液中,然后与羊乳  $\beta$ -酪蛋白混合,按 1.0mg/ml 冻干蛋白加入,置 37°C 培养 2 小时,再于 4°C 下过夜,目的是免疫吸收消除多克隆血清抗体与羊乳中存在的交叉抗原的非特异反应即交叉反应,从而得到特异性高的检测用抗体;

(3) 用免疫学检测方法进行检测;

上述步骤(1)的具体步骤包括

①选择牛乳中含量高,组成稳定的  $\beta$ -酪蛋白作为抗原:牛  $\beta$ -酪蛋白的制备是将干酪素 5g 溶于 100ml pH12.0 的 3.3mol/L 的尿素中,调节 pH4.6,3000r/min 离心 10 分钟得到沉淀和上清液,向上清液加水使尿素浓度稀释至 0.5mol/L,再一次离心得到沉淀,后者得到  $\beta$ -酪蛋白, $\beta$ -酪蛋白作为抗原用于免疫及抗体检测的标准;

②兔抗牛  $\beta$ -酪蛋白多克隆抗体的制备:用牛  $\beta$ -酪蛋白免疫新西兰白兔,以 2mg/只 为免疫剂量,初次注射用弗式完全佐剂混合,充分乳化后于背部皮下多点注射,10 天后,与等量弗式不全佐剂充分乳化后,进行第一次加强免疫,每隔 7 天后加强一次共三次,到第 35 天效价达到最高  $1:10^4$  以上并维持一周后,对兔进行颈脉放血,室温放置 1 小时后,800×g 离心分离并收集血清,存放于 -20°C 冰箱备用,血清的纯化采用饱和硫酸铵分级沉淀法,依次以 50%、40%、33% 的饱和硫酸铵纯化一次;

上述步骤(2)中羊乳  $\beta$ -酪蛋白的制备方法是:将干酪素 5g 溶于 100ml pH12.0 的 3.3mol/L 的尿素中,调节 pH4.6,3000r/min 离心 10 分钟得到沉淀和上清液,向上清液加水使尿素浓度稀释至 0.5mol/L,再一次离心得到沉淀,后者得到  $\beta$ -酪蛋白;

上述步骤(3)中的检测方法是应用得到的特异抗体应用间接 ELISA 定量检测羊乳及其乳制品中掺入的牛乳成分。

2. 根据权利要求 1 所述的羊乳及其制品中掺入牛乳的免疫学检测方法,其特征在于:所述步骤(3)中检测应用时最适抗原包被浓度,抗体最佳工作浓度可根据棋盘滴定法来确定,样品的最佳包被浓度为 1:128,免疫吸收后的抗体稀释为 1:40,酶标二抗稀释度为 1:1000。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的羊乳及其制品中掺入牛乳的免疫学检测方法,其特征在于:上述步骤(3)中用包被缓冲液将待测样品适当稀释包被酶标板,100  $\mu$ l/孔,4°C 过夜,用 PBST 洗板 3 次,加入 100  $\mu$ l 1% 明胶封闭 1 小时,洗板;加入免疫吸收后的兔抗牛  $\beta$ -酪蛋白多抗 100  $\mu$ l/孔,37°C 孵育 2 小时,洗板 5 次后,将残留的异种抗原以及未吸附的抗体除去;加 100  $\mu$ l/孔体积比为 1:1000 稀释的酶标羊抗兔 IgG,37°C 孵育 1 小时,洗板;加入 HRP 的底物缓冲液即 TMB+  $H_2O_2$  100  $\mu$ l/孔,室温下避光孵育 20 分钟后,用浓度为 2mol/L 的硫酸终止反应,50  $\mu$ l/孔;酶联检测仪上 450nm 处读取吸光度,记作  $A_{450nm}$ 。

4. 根据权利要求 3 所述的羊乳及其制品中掺入牛乳的免疫学检测方法,其特征在于:所述步骤(3)中在定量时,使用标准的脂纯山羊乳为阴性和羊乳中掺入一定量牛乳样品为阳性作控制,阳性样品采用脱脂羊乳中掺入牛乳的不同梯度含量 V/V 为:0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10%,以此浓度梯度样品制作标准曲线,或作为目视比色标准样品;抗原抗体反应结合后使用酶标二抗再进行间接的显色测定,定量测定可以采用酶标仪在

450nm 波长下测定吸光值,也可在现场采用与相应的系列阳性标准显色的酶标板直接目视比色判断。

5. 根据权利要求 1 所述的羊乳及其制品中掺入牛乳的免疫学检测方法,其特征在于:所述步骤(3)中的检测方法是竞争性 ELISA 检测方法。

6. 根据权利要求 1 所述的羊乳及其制品中掺入牛乳的免疫学检测方法,其特征在于:所述方法包括下述步骤

① 对抗体的纯化:将本发明方法处理兔血清抗体采用 SephadexG-100 凝胶过滤纯化,制得的纯化抗体用于竞争法检测;

② 抗原的酶标:将纯化的牛  $\beta$ -酪蛋白使用辣根过氧化物酶 HRP 酶标采用过碘酸钠氧化法,透析后再用 SephadexG-100 凝胶过滤纯化,冷冻干燥;

③ 建立竞争 ELISA 用于羊乳中掺入的牛乳成分的快速检测:

a、用以上纯化的抗体包被酶标板,其浓度由棋盘法确定;

b、设测定管和对照管

测定管加待测羊乳样品和一定量的酶标抗原,温育使二者与固相抗体竞争结合;对照管只加一定量酶标抗原与固相抗体直接结合;分别充分洗涤,除去未结合的成分;

c、加底物显色,分别测定两管的光密度 OD 值,根据对照管与测定管 OD 值之比,计算标本中待测抗原含量。

## 羊乳及其乳制品中掺入牛乳的快速免疫学检测方法

### 一、技术领域：

[0001] 本发明为食品质量与安全的免疫学快速检测技术，具体是一种羊乳及其乳制品中掺入牛乳成分的快速免疫检测方法。

### 二、技术背景：

[0003] 1. 国内羊乳生产的现状与掺假检验技术的需要

[0004] 与牛乳相，羊乳及其制品比由于其更易消化，具有特殊的风味，对一些牛乳过敏者的不良反应较少，是人类重要的特色营养食品。而中国奶羊养殖规模一般较小，多为高多分散的农户散养，同时受到季节波动性影响致使羊乳的价格比牛奶高，在羊乳中掺入牛乳的现象时有发生<sup>[1]</sup>，这种掺假不仅在液态羊乳和羊乳粉等终产品中，更多地会出现在原料乳的收购过程，所以为了保护羊乳加工生产者和消费者的利益，急需建立一种适宜于现场快速检测羊乳掺入牛乳的方法，以确保羊乳制品的质量和安全性。我国羊乳的生产加工与流通领域的快速检测主要应用于以下三方面：

[0005] ①我国奶羊养殖的特点是高度分散，且很容易受到季节波动的影响，羊乳原料乳的收购主要针对小规模的千家万户，急需一种适应这种生产状况的原料乳检验方法；

[0006] ②羊乳粉原料主要面向国内的羊乳制品生产者及出口贸易，对羊乳粉的要求高，如出口东南亚的羊乳粉贸易对其中牛乳成分的可检出率必须不大于5%的苛刻要求，也对检测的灵敏度和方便快捷有较高的要求；

[0007] ③个体消费者从市场购买羊乳制品更需要一种快速检验方法。

[0008] 综上所述，国内急需一种不需要特殊的仪器设备的快速检验方法。

[0009] 2. 羊乳中掺入牛乳检验方法研究现状

[0010] 羊乳中掺入牛乳不同于一般的乳品掺假检验（常见的一类是掺入危及人体健康的有害物质，如为了提高掺水比重的尿素，防止牛乳中细菌超标的甲醛、硼酸等有害防腐剂；另一类是掺入无害的价廉物质，包括水、米汤和面汤、豆浆、蔗糖、食盐等，为了应付脂肪指标加入植物油，加入淀粉和糊精提高固形物，以及廉价的明胶、大豆蛋白粉和乳清粉等以提高蛋白质，其目的在于以低值成分充高值成分），这种针对羊乳中的乳源性掺假检验，由于羊乳与牛乳的化学同源性更强，一般的理化性质差别小，仅通过简单的密度、电导、色度、滋味等，一般的化学分析（总固形物、脂肪通用的蛋白质）测定是难以区分的，这种需要区别乳源性的对方法的鉴别检验要求高。

[0011] 国外对检测羊乳中掺入牛乳成分的方法的研究综合起来可分为非免疫学方法和免疫学两大类：

[0012] ①非免疫学方法：

[0013] 国内外近年用于羊乳的乳源性掺假的非免疫学方法包括色谱技术（高效液相色谱技术等），电泳技术（聚丙烯酰胺凝胶电泳，等电点聚焦以及毛细管电泳等），PCR技术。气相色谱、各种电泳（SDS-PADE、IEF、CF）和PCR技术等，其结果虽然准确可靠，但对仪器技术的依耐性强，试剂种类多，实验费用高，实验需要的时间费时长，不适合现场分析检测。

[0014] 色谱技术，常用的包括气象和液相色谱技术。气相色谱法是以牛乳与羊乳中所含

脂肪酸含量的不同为依据进行检测分析的。液相色谱主要应用高效液相色谱技术 (HPLC)、反相色谱技术、离子交换色谱技术,通过将乳中脂肪、蛋白质等成分高效分离进行检测比较,这种类方法都需要比较专业化的大型仪器,既耗时又费力,而且只能检测羊乳中是否含有牛乳成分,较难准确定量。

[0015] 电泳技术,电泳分析是将蛋白质至于一定的电场中,利用不同蛋白质的电荷和分子量所决定的电迁移率不同进行高效分离,实现对乳品多种蛋白质组分同时定性定量分析,多数实验室采用凝胶电泳 (SDS-PAGE),费时费力,实验重复性较差,研究最热的是毛细管电泳 (CE),可以实现自动化速度高效分析,但是需要昂贵的大型仪器,仅海关和质检部门使用,电泳方法对仪器设备和操作技术有较高要求,不适应现场快速检测需要。

[0016] PCR 技术,以 DNA 为基础的聚合酶链式反应 (PCR) 方法成功地应用于乳品掺假检测中。它是以牛特异性基因—线粒体 12S rRNA 基因中的 223bp 片段为靶基因进行检测的。PCR 方法有较强的专一性更强。但是,PCR 所需的专业技术较强,所需试剂昂贵。但是现在发展的用于此方面的 PCR 技术 [17] 只能用于鉴别,而不能检测出其中牛乳的具体掺入量。

[0017] ②免疫学方法:

[0018] 免疫学方法是能够实现这一要求的分析检验方法。传统的琼脂扩散试验、火箭免疫电泳、红细胞凝集抑制试验和免疫印迹法] 虽然从方法的精确灵敏度反面能满足,但是这些方法存在的缺点明显,一是需要的实验时间较长,二是要求很高的抗血清浓度。

[0019] 酶联免疫吸附方法 (ELISA) 在乳品鉴定掺假方面具有很大的应用潜力。它与其他现代分析方法不同之处在于其高科技建立于试剂而不是设备,无需高昂的设备或者专业的操作人员,就能实现明确、可靠的成分探索分析。

[0020] Rodriguez, E., Martin, R 等 (1990) 用牛乳清蛋白 (BWP) 作为抗原免疫兔,抗血清经过亲和色谱纯化用生物素标记后建立 ELISA 检测方法。Beer 等 (1995) 利用牛乳中的  $\beta$ -乳球蛋白作为抗原免疫鸡,将获得的鸡抗血清纯化后得到鸡抗牛  $\beta$ -乳球蛋白抗体,同时将羊抗鸡碱性磷酸酶结合物作为竞争物建立间接竞争型 ELISA 检测方法。Richter, W 和 Krause, I 等 (1997) 用牛乳中的  $\gamma$ -酪蛋白作为抗原免疫注射兔和鸡得到抗血清,将抗血清通过以牛酪蛋白作为配基的亲和色谱柱纯化获得抗牛  $\beta$ -CN 的特异性多克隆抗体建立间接竞争型 ELISA 检测方法。

[0021] Martin, R 等 (1995-2005) 用牛乳中的  $\beta$ -CN 为抗原,通过杂交瘤技术制备了单克隆抗体,并且结合酶标兔抗鼠抗体建立了间接 ELISA 方法。Hurley 等 (2004) 用牛乳中的 IgG 为抗原制备单克隆抗体建立了间接竞争和夹心 IgGELISA 方法检测羊乳中掺入的牛乳含量。单克隆抗体具有非常高的专一性,方法检测最低限度为百分之一以下,但是单克隆抗体研发技术路线复杂,成本高,针对原料乳收购等低端市场在国内还难以应用,国外针对羊乳掺假检验不同于中国,主要是针对山羊乳中掺入绵羊乳 (以羊奶酪制品为多),目前国内缺乏一种有效简捷的方法来定量检测羊乳及其乳制品中掺入的牛乳成分。

### 三、发明内容:

[0022] 本发明的目的是要提供一种羊乳及其乳制品中掺入牛乳的快速免疫学检测方法,以克服现有技术存在的技术路线复杂、不易于操作、成本高且需时长的问题。

[0023] 本发明的设计路线是以牛乳的一种代表性酪蛋白作为抗原产生哺乳动物血清抗

体,将抗体采用特殊的选择性处理,再将待测羊乳(疑是掺假样品)进行脱脂处理,应用制备的抗体建立了适合现场快速检测的检测羊乳中掺入牛乳含量的 ELISA 方法。

[0024] 本发明所提供的技术方案是:

[0025] 一种羊乳及其制品中掺入牛乳的免疫学检测方法,其特征在于:包括下述步骤

[0026] (1) 选择牛乳酪蛋白的特异稳定组分为抗原免疫哺乳动物产生抗体:

[0027] (2) 处理兔血清抗体,制备得到检测用高特异性抗体:将免疫血清抗体稀释于 PBST 缓冲液中(抗体浓度 2.0mg/ml),然后与羊乳  $\beta$ -酪蛋白混合(按 1.0mg/ml 冻干蛋白加入,置 37℃ 培养 2 小时,再于 4℃ 下过夜,目的是免疫吸收消除多克隆血清抗体与羊乳中存在的交叉抗原的非特异反应(交叉反应),从而得到特异性高的检测用抗体;

[0028] (3) 用免疫学检测方法进行检测。

[0029] 上述步骤(1)的具体步骤包括:

[0030] ①选择牛乳中含量高,组成稳定的  $\beta$ -酪蛋白作为抗原:牛  $\beta$ -酪蛋白的制备是将干酪素 5g 溶于 100ml pH12.0 的 3.3mol/L 的尿素中,调节 pH4.6,3000r/min 离心 10 分钟得到沉淀和上清液。向上清液加水使尿素浓度稀释至 0.5mol/L,再一次离心得到沉淀,后者得到  $\beta$ -酪蛋白, $\beta$ -酪蛋白作为抗原用于免疫及抗体检测的标准;

[0031] ②兔抗牛  $\beta$ -酪蛋白多克隆抗体的制备:用牛  $\beta$ -酪蛋白免疫新西兰白兔。以 2mg/只 为免疫剂量,初次注射用弗式完全佐剂混合,充分乳化后于背部皮下多点注射,10 天后,与等量弗式不全佐剂充分乳化后,进行第一次加强免疫。以后间隔 7 天再加强三次,到第 35 天效价达到最高  $1:10^4$  以上并维持一周后,对兔进行颈脉放血,室温放置 1 小时后,800×g 离心分离并收集血清,存放于 -20℃ 冰箱备用。血清的纯化采用饱和硫酸铵分级沉淀法,依次以 50%、40%、33% 的饱和硫酸铵纯化一次;

[0032] 上述步骤(2)中羊乳  $\beta$ -酪蛋白的制备方法是:将干酪素 5g 溶于 100ml pH12.0 的 3.3mol/L 的尿素中,调节 pH4.6,3000r/min 离心 10 分钟得到沉淀和上清液。向上清液加水使尿素浓度稀释至 0.5mol/L,再一次离心得到沉淀,后者得到  $\beta$ -酪蛋白。

[0033] 上述步骤(3)中的检测方法是应用得到的特异抗体应用间接 ELISA 定量检测羊乳及其乳制品中掺入的牛乳成分,

[0034] 上述步骤(3)中检测应用时最适抗原包被浓度,抗体最佳工作浓度可根据棋盘滴定法来确定,样品的最佳包被浓度为  $1:128$ ,免疫吸收后的抗体稀释为  $1:40$ ,酶标二抗稀释度为  $1:1000$ 。

[0035] 上述步骤(3)中用包被缓冲液将待测样品适当稀释包被酶标板,100  $\mu$ l/孔,4℃ 过夜,用 PBST 洗板 3 次,加入 100  $\mu$ l 1% 明胶封闭 1 小时,洗板;加入免疫吸收后的兔抗牛  $\beta$ -酪蛋白多抗 100  $\mu$ l/孔,37℃ 孵育 2 小时。洗板 5 次后,将残留的异种抗原以及为吸附的抗体除去;加 100  $\mu$ l/孔体积比为  $1:1000$  稀释的酶标羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 1 小时,洗板;加入 HRP 的底物缓冲液(TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)100  $\mu$ l/孔,室温下避光孵育 20 分钟后,用浓度为 2mol/L 的硫酸终止反应,50  $\mu$ l/孔;酶联检测仪上 450nm 处读取吸光度(A<sub>450nm</sub>)。

[0036] 上述步骤(3)中在定量时,使用标准的阴性(脱脂纯山羊乳)和阳性(羊乳中掺入一定量牛乳)样品作控制,阳性样品采用脱脂羊乳中掺入牛乳的不同梯度含量(V/V)为:0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10%,以此浓度梯度样品制作标准曲线,或作为目视比色标准样品;抗原抗体反应结合后使用酶标二抗在进行间接的显色测定,定量测定可以采用酶标仪在

450nm 波长下测定吸光值,也可在现场采用与相应的系列阳性标准显色的酶标板直接目视比色判断。

[0037] 上述步骤 (3) 中的检测方法是竞争性 ELISA 检测方法。

[0038] 上述方法的具体步骤包括:

[0039] ①对抗体的纯化:将本发明方法处理兔血清抗体采用凝胶过滤 (SephadexG-100) 纯化,制得的纯化抗体用于竞争法检测;

[0040] ②抗原的酶标:将纯化的牛  $\beta$ -酪蛋白使用辣根过氧化物酶 (HRP) 酶标 (采用过碘酸钠氧化法,透析后再用 SephadexG-100 凝胶过滤纯化),冷冻干燥;

[0041] ③建立竞争 ELISA 用于羊乳中掺入的牛乳成分的快速检测:

[0042] A、用以上纯化的抗体包被酶标板 (浓度由棋盘法确定);

[0043] B、设测定管和对照管

[0044] 测定管加待测羊乳样品和一定量的酶标抗原,温育使二者与固相抗体竞争结合;对照管只加一定量酶标抗原与固相抗体直接结合;分别充分洗涤,除去未结合的成分;

[0045] C、加底物显色,分别测定两管的光密度 (OD) 值,根据对照管与测定管 OD 值之比,计算标本中待测抗原含量。

[0046] 与现有技术相比,本发明的优点是:

[0047] 1、检测效果好:本发明特异性与灵敏度高,检测时间短,该法检测羊乳中所掺入牛乳含量的最低限为 1-2% (V/V)。

[0048] 2、成本低:本发明中提供的试剂价格低廉,实验操作方便,不需特殊的仪器设备,适合现场快速检测需要,可以满足有关研究单位,质检部门批量检测相关乳品质量的需要。

[0049] 3、适用范围广:可用于新鲜的羊乳原料、羊乳粉及液态灭菌羊乳 (复原羊乳) 等羊乳产品中掺入牛乳的快速检测。

[0050] 四、说明书附图:

[0051] 图 1 羊乳及其乳制品中掺入牛乳成分的免疫学检测流程;

[0052] 图 2 新西兰白兔免疫后抗体效价变化 ( $\downarrow$  表示加强免疫时)。

## 五:具体实施方式:

[0053] 下面将通过具体实施例对本发明做详细的说明。

[0054] 一种羊乳及其制品中掺入牛乳的免疫学检测方法,包括下述步骤:

[0055] (1) 选择牛乳酪蛋白的特异稳定组分为抗原免疫哺乳动物产生抗体;

[0056] ①选择牛乳中含量高,组成稳定的  $\beta$ -酪蛋白作为抗原。

[0057] 牛  $\beta$ -酪蛋白的制备:将干酪素 5g 溶于 100ml pH12.0 的 3.3mol/L 的尿素中,调节 pH4.6,3000r/min 离心 10 分钟得到沉淀和上清液。向上清液加水使尿素浓度稀释至 0.5mol/L,再一次离心得到沉淀,后者得到  $\beta$ -酪蛋白。

[0058]  $\beta$ -酪蛋白作为抗原用于免疫及抗体检测的标准。

[0059] ②兔抗牛  $\beta$ -酪蛋白多克隆抗体的制备。

[0060] 用牛  $\beta$ -酪蛋白免疫新西兰白兔。以 2mg/ 只为免疫剂量,初次注射用弗式完全佐剂混合,充分乳化后于背部皮下多点注射。10 天后,与等量弗式不全佐剂充分乳化后,进行第一次加强免疫。以后间隔 7 天再加强三次,到第 35 天效价达到最高  $1:10^4$  以上并维持

一周后,对兔进行颈脉放血。室温放置 1 小时后,800×g 离心分离并收集血清,存放于 -20℃ 冰箱备用;血清的纯化采用饱和硫酸铵分级沉淀法,依次以 50%、40%、33% 的饱和硫酸铵纯化一次。

[0061] 选用牛乳  $\beta$ -酪蛋白作为抗原制备动物多克隆抗体是本发明重要部分,由于酪蛋白是乳中含量最高的蛋白质,约占总乳蛋白质的 80%~85%,而牛乳中的  $\beta$ -酪蛋白又是酪蛋白中含量最稳定的一种,同时牛乳  $\beta$ -酪蛋白具有良好的免疫原性,从其免疫血清抗体的效价变化曲线已明确显示。(参见图 2)

[0062] (2) 处理兔血清抗体,制备得到检测用高特异性抗体。

[0063] 将免疫血清抗体稀释于 PBST 缓冲液中(抗体浓度 2.0mg/ml),然后与羊乳  $\beta$ -酪蛋白混合(按 1.0mg/ml 冻干蛋白加入,羊乳  $\beta$ -酪蛋白的制备与 1.①牛  $\beta$ -酪蛋白的制备方法相同),置 37℃ 培养 2 小时,再于 4℃ 下过夜,目的是免疫吸收消除多克隆血清抗体与羊乳中存在的交叉抗原的非特异反应(交叉反应),从而得到特异性高的检测用抗体。

[0064] 这一步是本发明的核心内容,通过用羊乳中存在的共同抗原对多克隆抗体的充分反应(羊乳  $\beta$ -酪蛋白冻干粉混合),如此可将与羊乳酪蛋白产生交叉反应的抗体封堵(blocking),从而去除非专一的抗体而得到种源专一性的抗体,该方法可称为抗体的区分特异化技术(Rending),不需要通过复杂的(亲和层析的方法)纯化消除抗体的交叉反应,本实验方法操作简单,反应混和液不需专门的纯化分离步骤(在其后的间接 ELISA 洗涤步骤可将残留的羊乳抗原以及交叉反应后的产物除去,不影响检测反应)。

[0065] 通过本步骤操作可以大大提高多克隆抗体免疫反应的专一性(实验结果见表,可以提高检测方法的灵敏度实现,而血清多克隆抗体的制备方便,成本低廉,使用能满足要求,这是本发明最大的特点)。

[0066] 表 1 原抗体与牛乳、羊乳酪蛋白的间接 ELISA 结果

	抗体稀释倍数	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	阴性对照
[0067]	牛乳酪蛋白	2.125	2.013	1.758	1.533	1.320	1.195	0.216
	羊乳酪蛋白	2.113	1.922	1.745	1.501	1.320	1.191	0.158

[0068] 表 2 抗体经免疫吸附后与牛乳、羊乳酪蛋白的间接 ELISA 结果

	抗体稀释倍数	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	阴性对照
[0069]	牛乳酪蛋白	1.531	1.387	1.090	0.532	0.211	0.104	0.217
	羊乳酪蛋白	1.482	1.398	1.074	0.364	0.199	0.158	0.111

[0070] (3) 用免疫学检测方法进行检测:下面提供了两种方法

[0071] 第一种方法:建立间接酶联免疫吸附(间接 ELISA)测定方法,即直接使用处理的抗体应用间接 ELISA 检测

[0072] 应用得到的特异抗体应用间接 ELISA 定量检测羊乳及其乳制品中掺入的牛乳成分,其操作程序见图 1,具体步骤是:用包被缓冲液将待测样品适当稀释包被酶标板,100  $\mu$ l/孔,4℃ 过夜。用 PBST 洗板 3 次。加入 100  $\mu$ l 1% 明胶封闭 1 小时,洗板;加入免疫吸收后的兔抗牛  $\beta$ -酪蛋白多抗 100  $\mu$ l/孔,37℃ 孵育 2 小时。洗板 5 次后,将残留的异种抗原以及为吸附的抗体除去;加 100  $\mu$ l/孔体积比为 1:1000 稀释的酶标羊抗兔 IgG,

37℃孵育 1 小时,洗板;加入 HRP 的底物缓冲液 (TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100 μl/孔,室温下避光孵育 20 分钟后,用浓度为 2mol/L 的硫酸终止反应,50 μl/孔;酶联检测仪上 450nm 处读取吸光度 (A<sub>450nm</sub>)。

[0073] 本发明检测应用时最适抗原包被浓度,抗体最佳工作浓度可根据棋盘滴定法来确定。样品的最佳包被浓度为 1 : 128,免疫吸收后的抗体稀释为 1 : 40,酶标二抗稀释度为 1 : 1000。

[0074] 本发明在定量时,使用标准的阴性(脱脂纯山羊乳)和阳性(羊乳中掺入一定量牛乳)样品作控制,阳性样品采用脱脂羊乳中掺入牛乳的不同梯度含量(V/V)为:0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10%,以此浓度梯度样品制作标准曲线,或作为目视比色标准样品。该法的检测羊乳中所掺入牛乳含量的最低限为 1-2% (V/V)。

[0075] 抗原抗体反应结合后使用酶标二抗在进行间接的显色测定,定量测定可以采用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光值,也可在现场采用与相应的系列阳性标准显色的酶标板直接目视比色判断。

[0076] 实施例 1:免疫学检测原料羊乳中掺入的牛乳成分

[0077] ①样品准备

[0078] 将待检羊乳离心 13000×g,10 分钟后过滤得到脱脂乳。

[0079] 同时用羊乳中掺入牛乳不同含量(V/V)(0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10%梯度)

[0080] 样品作为制作标准曲线的样品。

[0081] ②样品及标准曲线样品包被酶标板

[0082] 样品及标准曲线样品按 1 : 128 稀释包被酶标板。

[0083] 用 PBST 洗板 3 次;加入 100 μl 1%明胶封闭 1 小时,洗板。

[0084] ③免疫反应

[0085] 向酶标板加入免疫吸收后的兔抗牛 β-酪蛋白多抗 100 μl/孔,37℃孵育 2 小时。洗板 5 次后;

[0086] ④加二抗检测

[0087] 加 100 μl/孔体积比为 1 : 1000 稀释的酶标羊抗兔 IgG,37℃孵育 1 小时,洗板;

[0088] ⑤酶显色反应

[0089] 加入 HRP 的底物缓冲液 (TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100 μl/孔,室温下避光孵育 20 分钟后,用浓度为 2mol/L 的硫酸终止反应,50 μl/孔;

[0090] ⑥结果检测与计算

[0091] 酶联检测仪上 450nm 处读取吸光度 (A<sub>450nm</sub>)。

[0092] 绘制标准曲线,由标准曲线换算出待测样品中掺入的牛乳含量。

[0093] 利用建立的间接 ELISA 对样品进行检测,原料羊乳中掺入的牛乳成分最低检测限度为 1%~2%。

[0094] 实施例 2:免疫学检测羊乳粉中掺入的牛乳成分

[0095] ①样品准备

[0096] 将羊乳粉按比例 (1 : 6) 加水充分溶解制得复原乳,再按以上的液态原料乳制样。

[0097] ②~⑤步骤操作同实施例一的②~⑤。

[0098] ⑥结果检测与计算

- [0099] 采用实例 1 相同的测定。
- [0100] 计算时乘上羊乳粉溶解时的稀释倍数即可。
- [0101] 实施例 3 :免疫学检测复原羊乳中掺入的牛乳成分
- [0102] ①样品准备
- [0103] 商品供应的巴氏灭菌羊乳 (62℃, 30 分钟) 以及高温灭菌 (121℃, 20 分钟) 羊乳, 直接取样, 处理实例 1 相同的样品处理方。
- [0104] 以不同 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% 梯度含量 (V/V) 将牛乳掺入复原羊乳中作为样品。
- [0105] ②~⑥同实施例 1 的②~⑥步骤。
- [0106] 第二种方法 :对处理的抗体酶标建立竞争法快速检测方法
- [0107] ①对抗体的纯化 :将本发明方法处理兔血清抗体采用凝胶过滤 (SephadexG-100) 纯化, 制得的纯化抗体用于竞争法检测。
- [0108] ②抗原的酶标 :将纯化的牛  $\beta$ -酪蛋白使用辣根过氧化物酶 (HRP) 酶标 (采用过碘酸钠氧化法, 透析后再用 SephadexG-100 凝胶过滤纯化), 冷冻干燥 ;
- [0109] ⑨建立竞争 ELISA 用于羊乳中掺入的牛乳成分的快速检测
- [0110] a 用以上纯化的抗体包被酶标板 (浓度由棋盘法确定) ;
- [0111] b 设测定管和对照管
- [0112] 测定管加待测羊乳样品和一定量的酶标抗原, 温育使二者与固相抗体竞争结合。
- [0113] 对照管只加一定量酶标抗原与固相抗体直接结合。
- [0114] 分别充分洗涤, 除去未结合的成分 ;
- [0115] c 加底物显色, 分别测定两管的光密度 (OD) 值, 根据对照管与测定管 OD 值之比, 计算标本中待测抗原含量。结合于固相的酶标抗原与待测抗原含量呈负相关。同实例一, 制作相应的用羊乳中掺入牛乳不同含量 (V/V) (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% 梯度) 样品作为制作标准曲线的样品。

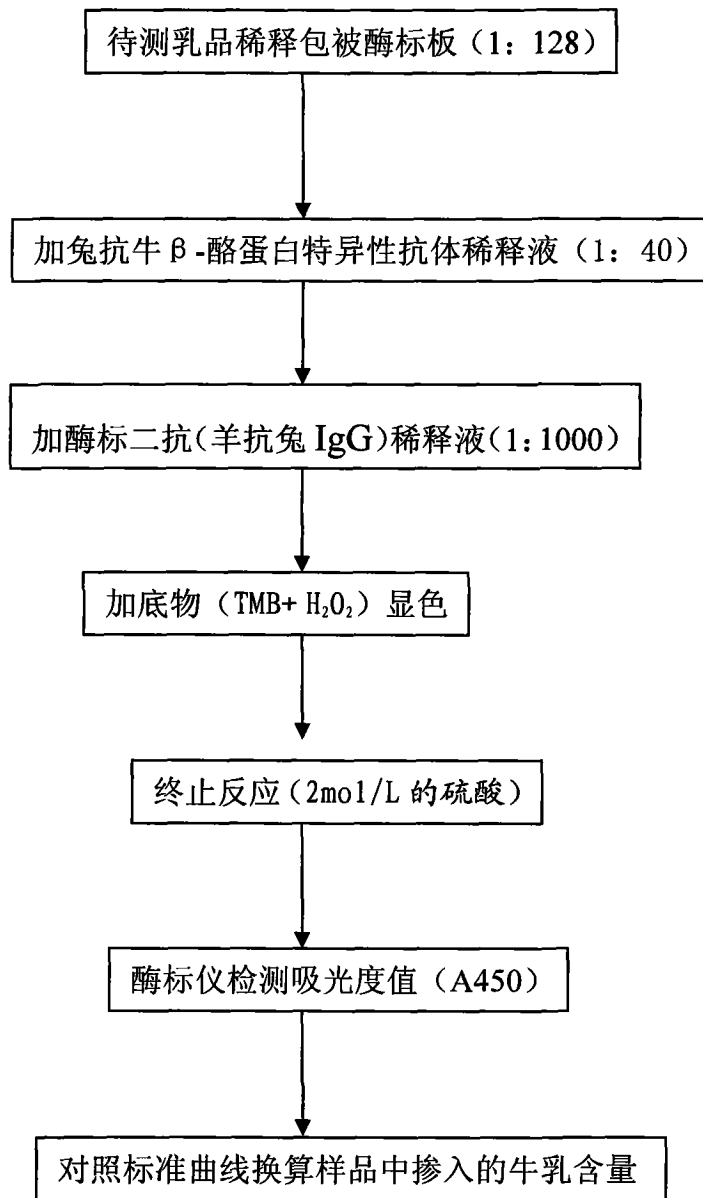


图 1

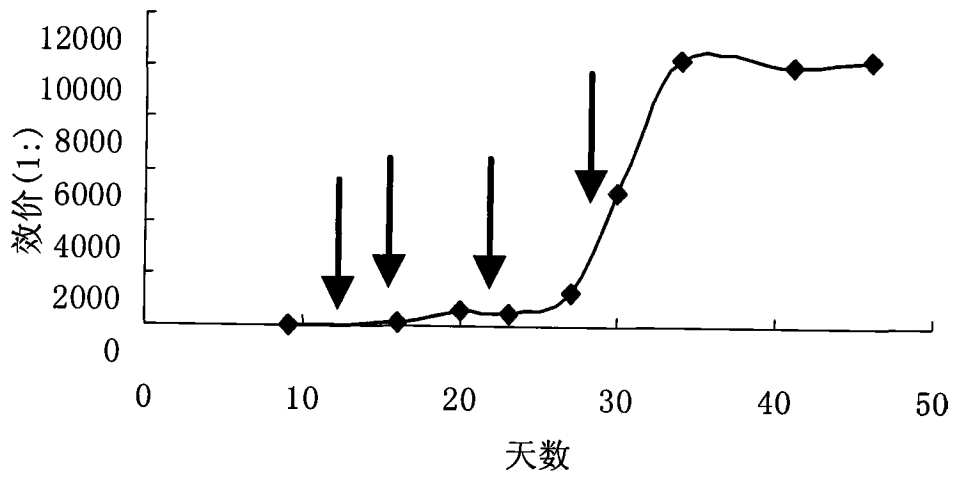


图 2

专利名称(译)	羊乳及其乳制品中掺入牛乳的快速免疫学检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101271107B</a>	公开(公告)日	2013-01-02
申请号	CN200810017913.9	申请日	2008-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
[标]发明人	宋宏新 韩燕 薛海燕		
发明人	宋宏新 韩燕 薛海燕		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	李罡		
其他公开文献	CN101271107A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明为食品质量与安全的免疫学快速检测技术，具体是一种羊乳及其乳制品中掺入牛乳成分的快速免疫检测方法。为克服现有技术存在的问题，本发明采用牛乳特异性酪蛋白免疫哺乳动物产生抗体，将制备的血清抗体与羊乳的共同抗原反应得到特异性抗体，再将待测羊乳(疑是掺假样品)进行脱脂处理，应用制备特异抗体建立间接ELISA定量出羊乳中掺入的牛乳含量。本发明试剂价格低廉，实验操作方便，不需特殊的仪器设备，适合现场快速检测需要，可以满足有关研究单位，质检部门批量检测相关乳品质量的需要。

