



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109374879 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811086511.4

(22)申请日 2018.09.18

(71)申请人 北京纳百生物科技有限公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术
开发区科创十四街11号院3号楼

(72)发明人 杨春江 于在江 吴迪 孙海霞
冯海玲 秦丽丽 张久龙 郑云鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图1页

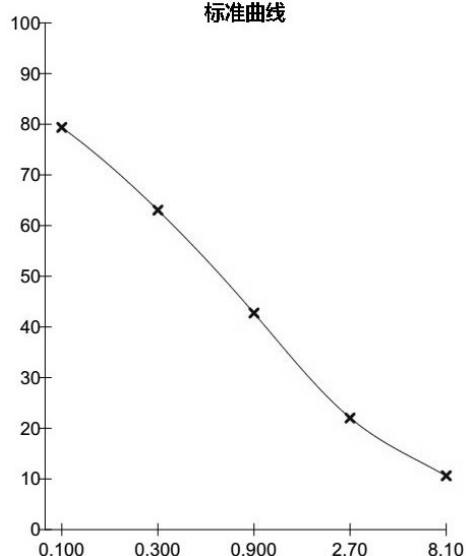
(54)发明名称

一种羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的检测
试剂盒及其检测方法

(57)摘要

提供了一种检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的快检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括以下成分:1)阴性质控品、2)阳性质控品、3)包被有多克隆抗体的酶标板、4)酶标多肽特异性单克隆抗体溶液、5)显色底物、6)终止液、7)洗涤液。利用该试剂盒,可在较短时间内检测出羊乳及羊乳粉中牛乳成分掺假,维护市场。针对当前乳品质量监管的复杂形势,具有非常广阔的市场前景,可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

标准曲线



1. 一种检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的快速检测试剂盒,其特征在于,试剂盒包括以下成分:

- 1) 阴性质控品;
- 2) 阳性质控品;
- 3) 包被有多克隆抗体的酶标板;
- 4) 酶标多肽特异性单克隆抗体溶液;
- 5) 显色底物;
- 6) 终止液;
- 7) 洗涤液;

其中所述阴性质控为不含有牛乳成分的复原羊乳,含有0.03%的叠氮钠作为防腐剂;

所述阳性质控为经过亲和纯化的牛酪蛋白标准品溶液,其中酪蛋白浓度为1mg/mL,稀释液为0.01mol/L pH7.2的磷酸盐缓冲液,含有0.05%的叠氮钠作为防腐剂;

所述包被有多克隆抗体的酶标板,其包被的多克隆抗体为有序列为SEQ ID No.1 所示的多肽与载体蛋白偶联后免疫新西兰兔制备的;

所述酶标多肽特异性单克隆抗体溶液为利用如序列SEQ ID No.1所列的多肽与载体蛋白偶联作为免疫原制备的单克隆抗体,其能特异性地与牛酪蛋白反应,而与羊酪蛋白反应较小(交叉反应<1%);

所述显色底物为单组份TMB显色底物等;

所述终止液为0.5~2M硫酸溶液;

所述浓缩洗液为添加有吐温-20的PBS溶液。

2. 根据权利要求1所述的检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的快速检测试剂盒,其特征在于所述阳性质控中经过亲和纯化的牛酪蛋白标准品是将采购的牛酪蛋白标准品用上述SEQ ID No.1所列的多肽与载体蛋白偶联作为免疫原制备的单克隆抗体亲和纯化的,去除其中杂质和与所述单克隆抗体不发生反应的成分。

3. 根据权利要求1所述的检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的快速检测试剂盒,其特征在于所述试剂盒组成中还可包括经亲和纯化的牛酪蛋白系列标准品,标准品的浓度可为0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1mg/mL,通过酶标仪测定吸光度值,绘制试剂盒反应的标准曲线,对未知样本定量检测。

4. 根据权利要求1所述的检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的快速检测试剂盒,其特征在于所述试剂盒可用于检测羊乳及羊乳粉中牛乳掺假。

5. 根据权利要求1所述的检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的快速检测试剂盒,其特征在于所述试剂盒检测方法为:

- (1) 将待测样本用0.01M PBS (pH7.2) 按照一定比例稀释备用;
- (2) 将准备好的样品按照检测试剂盒的操作方法进行操作;
- (3) 利用分析软件分析数据,将检测样本与质控品对照;
- (4) 根据数据分析结果判定样本中是否添加有牛乳成分。

一种羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于乳品质量检测领域,涉及一种羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 乳及其制品已经成为重要动物源性食品。特别是近些年来,随着人们生活水平的提高和我国奶业的迅速发展,生鲜乳作为普通食品已被广泛接受。羊乳作为重要乳品,其蛋白质和维生素含量高,脂肪颗粒小,与牛乳相比较更容易吸收,市售价格也是牛乳的数倍。陕西、山东等地是我国羊奶及羊奶粉的重要产区,产品已经出口至欧盟。由于羊奶价格高、产量低,生产者为了获取更多经济利益,往往在其中掺入部分牛乳,以提高经济效益。牛乳掺入后,虽没有带来风险因子,但其降低了羊奶的营养水平及最后羊奶粉产出的质量,就有可能造成易感人群过敏反应,以及产生国际贸易争端和扰乱市场秩序。因此非常有必要建立快速方便的检测方法,对羊乳中掺有牛乳成分检测,以确保优质羊乳及羊乳粉的品质,维护市场秩序。

[0003] 羊乳与牛乳均为天然产品,成分近似,主要区别在于部分营养指标含量不同,以及部分蛋白质成分差异,这也是目前区分牛羊乳成分的重要参数。如西班牙ZEU Lab公司开发的生鲜羊乳中牛乳成分检测试剂盒,利用牛免疫球蛋白(IgG)成分与羊乳IgG的差异,通过免疫胶体金检测方法检测,整个过程耗时短,检测灵敏度高,受到了市场的认可。但该方法还有一定缺陷,羊乳(牛乳)在高温喷粉之后,IgG成分几乎损失殆尽,以IgG检测标志物就无法检测羊乳粉中牛乳成分;以 β -乳球蛋白为检测标志物也有类似缺陷。此外,利用PCR检测乳品中残留的DNA成分也可以用于区分羊乳与牛乳差异,但其操作繁琐复杂,无法现场检测及在基层开展应用。

[0004] 研究表明,牛羊乳中的酪蛋白是一种热稳定性蛋白,高温处理并不能使其破坏,因此可以用酪蛋白的差异来判定羊乳和牛乳差别。进一步对牛羊乳酪蛋白成分分析表明,牛乳中含有的 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 γ -酪蛋白等与羊乳中的相应成分有一定差异。通过合适的方法检测此差异并与质控样本对比,即可检测羊乳中是否添加牛乳成分。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种快速检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的快速检测试剂盒,该试剂盒可以在较短时间内检测出羊乳中是否添加牛乳,并与试剂盒中提供的参考样品相比给出半定量及定量参考结果。

[0006] 本发明提供的检测试剂盒无需昂贵设备,操作简便,无需特殊培训,检测灵敏度高,非常适合基层实验室检测应用。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明提供一种快速检测羊乳及羊乳粉中掺有中牛乳成分的检测试剂盒,包括:

- 1) 阴性质控品;
- 2) 阳性质控品;
- 3) 包被有多克隆抗体的酶标板;
- 4) 酶标多肽特异性单克隆抗体溶液;
- 5) 显色底物;
- 6) 终止液;
- 7) 洗涤液。

[0008] 其中,所述阴性质控为不含有牛乳成分的复原羊乳,含有0.03%的叠氮钠作为防腐剂,所述阳性质控为经过亲和纯化的牛酪蛋白标准品溶液,其中酪蛋白浓度为1mg/mL,稀释液为0.01mol/L pH7.2的磷酸盐缓冲液,含有0.05%的叠氮钠作为防腐剂。

[0009] 所述包被有多克隆抗体的酶标板,其包被的多克隆抗体为有序列为SEQ ID No.1所示的多肽与载体蛋白偶联后免疫新西兰兔制备的。

[0010] 所述酶标多肽特异性单克隆抗体溶液为利用如序列SEQ ID No.1所列的多肽与载体蛋白偶联作为免疫原制备的单克隆抗体,其能特异性地与牛酪蛋白反应,而与羊酪蛋白反应较小(交叉反应<1%)。

[0011] 所述显色底物为单组份TMB显色底物等。

[0012] 所述终止液为0.5~2M硫酸溶液。

[0013] 所述浓缩洗液为添加有吐温-20的PBS溶液。

[0014] 进一步地,上述阳性质控中经过亲和纯化的牛酪蛋白标准品是将采购的牛酪蛋白标准品用上述SEQ ID No.1所列的多肽与载体蛋白偶联作为免疫原制备的单克隆抗体亲和纯化,并除去其中杂质和与所述单克隆抗体不发生反应的成分后获得的亲和纯化酪蛋白。

[0015] 进一步地,为了定量检测待测样本中牛酪蛋白含量,所述试剂盒组成中还加入经亲和纯化的牛酪蛋白系列标准品,例如标准品的浓度可为0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1mg/mL,通过试剂盒检测后酶标仪测定吸光度值,绘制试剂盒反应的标准曲线,对未知样本中的酪蛋白定量检测。

[0016] 本发明还涉及一种使用检测试剂盒检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的检测方法,其中包括如下步骤:

- 第一步,将待测样本用0.01M PBS (pH7.2) 按照一定比例稀释备用;
- 第二步,将准备好的样品按照检测试剂盒的操作方法进行操作;
- 第三步,利用分析软件分析数据,将检测样本与质控品对照;
- 第四步,根据数据分析结果判定样本中是否添加有牛乳成分。

[0017] 与传统的仪器分析方法相比,本发明具有以下有益效果:

1) 操作简单,无需特殊仪器设备。从试剂、仪器设备来看,本方法无需有机试剂,检测样本经稀释后可以直接检测,降低了操作难度,非常适合于基层检测实验室推广应用。

[0018] 2) 耗时短,检测效率高。整体检测时间即酶联吸附检测的反应时间不超过1h。利用酶标板96孔检测,做双孔平行,可以单次实验中同时检测至少40份样本,效率高。

[0019] 3) 检测灵敏度高,成本低。方法利用免疫检测技术优势,具有极高的检测灵敏度,可以达到 10^{-6} ,单次检测成本不超过10元。

[0020] 4) 检测结果可定性定量。在有酶标仪的情况下,测定吸光度值,绘制校准曲线,可

以定量检测样本中牛乳成分掺入量。没有酶标仪,可以将样本孔的显色与生鲜羊乳(复原羊乳)及牛乳质控品的显色相比较,定性判定样本是否掺有牛乳成分。

[0021] 更为重要的是本发明提供的方法可检测乳粉复原后的牛乳掺假,给羊乳粉生产企业及消费者带来了更大方便,给相关产品质量和市场维护提供了有力工具。

[0022] 本发明提供的羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的检测试剂盒与传统技术相比较,优势明显,技术改进明显,特别是针对当前乳品质量监管的复杂形势,具有非常广阔的市场前景,可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

附图说明

[0023] 图1为试剂盒检测的校准曲线,其中x轴为标准品浓度(mg/L),y轴为百分比吸光度值(标准品的吸光度值与0mg/L标准品吸光度值的百分比比值)。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施方式来进一步描述本发明。本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚,但这些实施例仅是范例性质,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或者替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围。所有材料未说明来源,均可从商业渠道获取。

[0025] 实施例1:免疫抗原的制备

通过对Uniprot数据库公布的牛、羊的酪蛋白及 β -乳球蛋白的序列信息进行分析,利用生物信息学手段,筛选如SEQ ID No. 1所示的多肽序列,并委托第三方服务商合成。

[0026] 具体操作为:利用序列号为P02662的牛 α s1酪蛋白序列、序列号为P18626羊 α s1酪蛋白序列、序列号为P02754的牛 β -乳球蛋白、序列为P02756的羊 β -乳球蛋白序列,利用序列比对软件分析P02662和P18626的不同位点氨基酸序列、分析P02754和P02756的不同位点氨基酸序列,将两次分析的氨基酸序列分别经过组合、分析,判断其抗原决定簇,最终获得如SEQ ID No. 1所示的多肽序列,交第三方公司合成。

[0027] 合成抗原与载体蛋白按照常规方法偶联后备用,偶联抗原可以是任何大分子蛋白,常用载体蛋白有血蓝蛋白、卵清蛋白、血清白蛋白等。根据实际实验结果,以血蓝蛋白(KLH)偶联小分子之后形成的抗原作为免疫原效果较好,而以卵清蛋白(OVA)偶联后的抗原作为包被原效果较好。

[0028] 例如采用碳化二亚胺(EDC)法将血蓝蛋白(KLH)与合成的多肽偶联,具体操作为:配制0.1mol/L的乙烷磺酸(MES)溶液,平衡至室温,取400 μ l,向其中加入4mg血蓝蛋白(KLH),并用超纯水稀释,确保最终体积为0.5mL;称取3mg合成好的多肽,用200 μ l 0.01mol/L pH7.2 PBS溶解后,加入到之前配制的BSA溶液中,室温反应4h;然后用脱盐柱纯化,取纯化的偶联产物用SDS-PAGE鉴定后分装成50 μ l/管备用。

[0029] 实施例2:特异性单克隆抗体与多克隆抗体的制备及纯化

将制备好的偶联抗原按照50 μ g的量,与等量弗氏佐剂乳化后,皮下多点注射免疫若干只Balb/C小鼠。首次免疫时佐剂为弗氏完全佐剂,后续免疫佐剂为弗氏不完全佐剂佐剂。免疫间隔为2周,3次免疫后以直接ELISA测定血清效价,同时以间接竞争ELISA测定血清抑制

率和血清对不同源酪蛋白的交叉反应。筛选血清效价高、有一定抑制率、交叉反应较小的小鼠按常规方法细胞融合,筛选分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0030] 筛选抗原为羊酪蛋白、牛酪蛋白,并用牛乳、羊乳作为参考对照,通过筛选排除对羊酪蛋白、羊乳有反应的单抗细胞株,保留只与牛源蛋白反应的细胞株。扩大培养后以体内法诱生腹水,收集后经过饱和硫酸铵沉淀后,以Protein G柱纯化,测定蛋白浓度后冻存。

[0031] 此外,按照常规方法以偶联抗原免疫新西兰兔制备多克隆抗体并纯化作为包被抗体。

[0032] 实施例3:酶标抗体的制备

参考文献资料,采用戊二醛法将辣根过氧化物酶(HRP)与前期纯化好的单克隆抗体进行标记,具体操作如下:

(1) 称取辣根过氧化物酶(HRP, sigma货号:V900503) 25mg溶于1.25%戊二醛溶液中,室温静置过夜;

(2) 反应后的酶溶液经Sephadex G-25层析柱,用生理盐水洗脱。流速控制在1ml/min,收集棕色流出液。如体积大于5ml,则以PEG浓缩至5ml。放置25ml小烧杯中,缓慢搅拌;

(3) 将待标记的抗体12.5mg用生理盐水稀释至5ml,搅拌下逐滴加入酶溶液中;

(4) 用1M pH9.5碳酸缓冲液0.25ml,继续搅拌3小时;

(5) 加0.2M赖氨酸0.25ml,混匀后,置室温2小时;

(6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃1小时;

(7) 3000rpm离心半小时,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量0.15M PH7.4的PBS中;

(8) 将上述溶液装入透析袋中,对0.15M PH7.4的PB缓冲盐水透析,去除铵离子后(用茚氏试剂检测),10000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶标抗体,分装后,冰冻保存。

[0033] 实施例4:牛酪蛋白的亲亲和层析纯化

取制备好的多肽特异性单克隆抗体与溴化氰活化的Sephrose 4B偶联,自制亲和层析柱,纯化购买的牛酪蛋白标准品。具体操作为:

(1) 取纯化的多肽特异性单克隆抗体150mg用0.1mol/L pH 9.0 NaHCO₃溶解备用;

(2) 将溴化氰活化的Sephrose 4B倒入上述抗体溶液中,确保载体与偶联抗体的比例为18mg抗体:1g载体,4℃搅拌过夜;

(3) 用200ml偶联缓冲液(0.1mol/L NaHCO₃, 0.5mol/L NaCl, pH 8.3)洗上述偶联物1~2次;

(4) 转移偶联物至含100ml阻断缓冲液(1mol/L乙醇胺, pH 8.0)的烧瓶内,4℃过夜;

(5) 用100ml偶联缓冲液、100ml醋酸盐缓冲液(0.1mol/L醋酸钠, 0.5mol/L NaCl, pH4.0)洗偶联物,并按此步骤重复3~5次;

(6) 选柱10cm的层析柱,将已与蛋白偶联的琼脂糖装入层析柱内,拧紧下口夹,让其下沉,数分钟后松开下口夹,使溶液约以1ml/min的速度流出;

(7) 以0.2mol/L pH 9.0 NaHCO₃(含0.1 mol/L NaCl)洗涤至洗出液的OD₂₈₀<0.02为止,并收集全部的洗脱液,计算偶联率,确保偶联成功;

(8) 取牛酪蛋白标准品用PBS稀释至1.5mg/mL,取1mL上样,使其缓慢流出,控制流速在1mL/min,以PBS继续洗脱至洗脱液OD₂₈₀<0.2;

(9) 然后使用0.1 mol/L pH2.4甘氨酸盐酸缓冲液洗脱,流速1mL/min,收集洗脱液,以1 mol/L NaHCO₃中和;

(10) 洗脱液进一步用SDS-PAGE鉴定,并透析后分装冻存,亲和层析的牛酪蛋白即制备完毕,亲和柱用PBS继续洗涤,平衡后保存于2~8℃备用。

[0034] 实施例5:酶标板的制备

以制备的多克隆抗体包被酶标板,具体操作为将纯化好的多克隆抗体按照1:2000倍以pH9.6碳酸盐缓冲液稀释后以100μL每孔加入酶标板孔,4℃孵育过夜;甩干后以PBST洗板3次,以不含有牛源成分(特别是酪蛋白,牛血清白蛋白)的封闭液封闭,例如以1%明胶封闭液37℃封闭2h;甩干后密封,4℃保存备用。

[0035] 实施例6:试剂盒组装及ELISA检测操作

(1) 试剂盒组分:

以亲和层析纯化的牛酪蛋白用PBS稀释至0、0.1、0.3、0.9、2.7和8.1mg/L作为ELISA试剂盒标准品;以HRP标记多肽特异性单克隆抗体用商品化酶标稀释液稀释至1:3000,作为酶标记物;以商品化单组份TMB显色液作为底物;以PBST(含有0.05%吐温-20的0.01M PBS)作为洗涤液;以0.01M PBS作为样本稀释液;以1M硫酸为终止液;以不含有牛乳成分的复原羊乳作为阴性对照,其中含有0.03%的叠氮钠作为防腐剂。

[0036] (2) ELISA操作步骤:

- 1) 将备好的酶标板取出后放置室温至少30min;
- 2) 将待检乳粉复原、阴性对照按照1:9的比例用去离子水复原;将浓缩洗涤液、浓缩样本稀释液分别按照比例稀释备用;
- 3) 将所有样本用稀释液稀释,稀释比例1:200;
- 4) 将标准品、稀释后的待检样本、质控对照品等以50μL每孔加入酶标板孔,室温孵育15min;
- 5) 取出后洗板3次,加入50μL酶标抗体,室温孵育15min;
- 6) 取出后洗板3次,加入TMB底物100μL,室温孵育10min;
- 7) 加入终止液50μL,以酶标仪450/630nm读取吸光度值,以数据分析软件计算检测结果,或者将检测样本显色与质控品显色相比较判定结果。

[0037] 例如:阴性对照显色OD值为0.209,阳性对照显色值为1.631,样本显色值介于两者之间,表示样本中有可能添加有牛乳成分。

[0038] 另外,可以绘制试剂盒标准品的校准曲线,根据校准曲线定量计算检测样本中(如图1)。根据曲线可判定本试剂盒对亲和层析纯化的牛酪蛋白最终检测灵敏度可达到0.1mg/L。

[0039] 实施例7:实际样本的检测

实验室内准备复原羊乳,将牛乳(酪蛋白含量为12.6mg/mL)按照以0.5%、1%、5%、10%等比例添加后以本发明研制方法测定,具体结果如下表。

[0040] 表1 实际添加样本检测结果

添加浓度	理 论 值 (mg/mL)	稀 释 后 浓 度 (mg/L)	OD 值	检 出 值 (mg/mL)	回收率
0.50%	0.063	0.315	1.138	0.323	102.5%
1%	0.126	0.63	0.876	0.705	111.9%
5%	0.63	3.15	0.401	2.754	87.4%
10%	1.26	6.3	0.245	5.831	92.6%
阴性质控	0	0	1.912	0	—
阳性质控	1	5	0.266	5.138	102.8%

数据统计可知本方法回收率为92.6%-111.9%，平均回收率为99.4%。

序列表

<110> 北京纳百生物科技有限公司

<120> 一种羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的检测试剂盒及其检测方法

<130> F005

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列(未知)

<400> 1

Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys His Ile His Ala Gln

1 5 10 15

Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr Phe Tyr

20 25 30

Pro Glu Leu

35

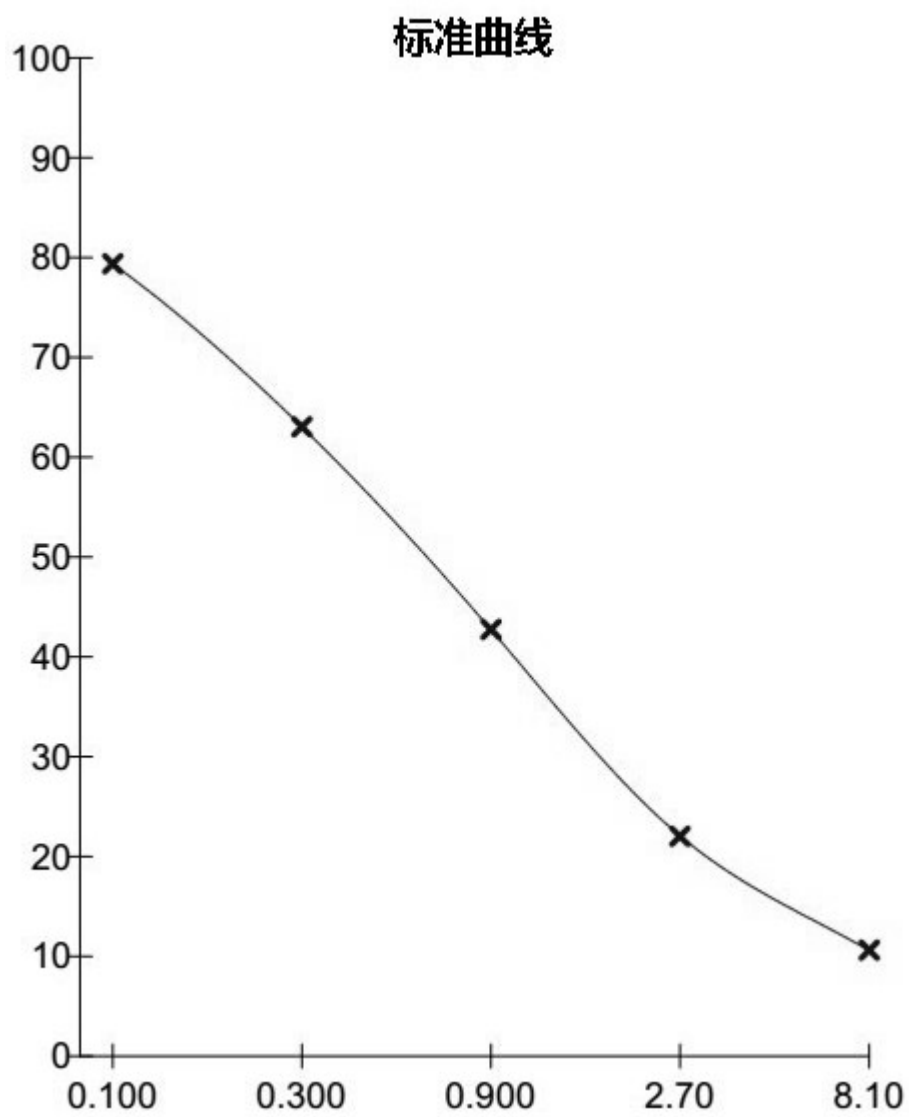


图1

专利名称(译)	一种羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN109374879A	公开(公告)日	2019-02-22
申请号	CN201811086511.4	申请日	2018-09-18
[标]发明人	杨春江 于在江 吴迪 孙海霞 冯海玲 秦丽丽 张久龙 郑云鹏		
发明人	杨春江 于在江 吴迪 孙海霞 冯海玲 秦丽丽 张久龙 郑云鹏		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了一种检测羊乳及羊乳粉中掺有牛乳成分的快检测试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括以下成分：1) 阴性质控品、2) 阳性质控品、3) 包被有多克隆抗体的酶标板、4) 酶标多肽特异性单克隆抗体溶液、5) 显色底物、6) 终止液、7) 洗涤液。利用该试剂盒，可在较短时间内检测出羊乳及羊乳粉中牛乳成分掺假，维护市场。针对当前乳品质量监管的复杂形势，具有非常广阔的市场前景，可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

