高灵敏间接竞争ELISA检测羊乳样本中的牛乳成分

王士峰，张世伟，赖心田，冯荣虎，伍聪，杨国武
（深圳市计量质量检测研究院，广东 深圳 518102）

摘　要：建立可检测羊乳中掺伪牛乳的间接竞争ELISA方法。通过用牛β-酪蛋白免疫小鼠，制备可特异识别牛乳酪蛋白的单克隆抗体3B9。基于此抗体建立的ELISA的IC_{50}值为92.8 ng/mL牛奶蛋白，理论最低检测限0.35 ng/mL，相对标准偏差小于12%。该方法也适用于检测高温高压处理的乳制品，加之操作简单高效，适合大规模高通量样品筛查及羊乳样本中牛奶蛋白半定量分析。

关键词：羊乳；掺假；牛奶；单克隆抗体；酶联免疫分析　ELISA
中图分类号：TS252.7　　文献标识码：A　　文章编号：1001-2230(2015)10-0041-04

Detection of adulteration of bovine milk into goat milk by a high specific indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay

WANG Shi-feng, ZHANG Shi-wei, LAI Xin-tian, FENG Rong-hu, WU Cong, YANG Guo-wu
(Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen 518102,China)

Abstract: The aim of the research was to develop an indirect, competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting adulteration of bovine milk into goat milk. A monoclonal antibody 3B9 recognizing bovine caseins was selected and characterized after immunization of mice with bovine β-casein.Once optimized, the half inhibitory concentration (IC_{50}) of mAb3B9-based ELISA was 92.8 ng/mL of bovine protein, with limit of detection of 0.35 ng/mL, the RSD were less than 12%. This assay is also capable of detecting dairy products treated by pasteurization or other severe heat pressure treatment.The method was simple, effective and sensitive, make it suitable for high throughput screening and semi-quantitative analysis of bovine protein in goat milk.

Key words: goat milk; adulteration; bovine milk; monoclonal antibody; Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

0　引　言

羊乳比牛乳更接近人乳而广受欢迎[1]，由于产量有限，市场价格较高。因暴利驱使，在羊乳中非法添加价廉牛乳等侵害消费者权益的事件时有发生。目前羊奶掺假牛奶主要检测方法包括电泳或等电聚焦[2-3]，色谱技术[4]，PCR技术[5-6]，免疫学技术[7-11]及电子鼻技术[12]等。欧盟推荐检测方法为检测牛乳γ-酪蛋白（γ-casein，γ-CN）的等点聚焦技术，但操作繁琐，对人员素质要求较高。相比其他方法，免疫学检测技术（如ELISA）拥有简单灵敏，成本低的优点，主要检测牛乳中的蛋白成分，如β-酪蛋白（β-casein，β-CN）[7, 11]，γ-CN[8]，IgG[9, 10]等。牛羊乳蛋白构象相似，故针对牛乳蛋白多克隆抗体可能存在交叉反应；抗牛注入IgG的抗体特异性最高，但牛乳中IgG历经高温易变性，不适用于检测加热处理过的样本。danbairotein大，大师和本研究在前人的基础上，针对牛乳酪蛋白中含量最高的β-CN制备特异单克隆抗体，建立高灵敏可检测加热处理样本的ELISA方法，为国内羊乳掺伪的执法检测提供技术支持。

1　实　验

1.1　材料

1.1.1　抗原和实验动物

牛β-酪蛋白（β-CN）；免疫佐剂Quickantibody；五周龄BALB/c小鼠；SP2/0小鼠骨髓瘤细胞为本实验室保存；RPMI-1640培养基、胎牛血清和双抗（Penicillin-Streptomycin Solution）。

1.1.2　材料与试剂

标准品脱脂羊乳粉和脱脂牛乳粉，实验前用去离子水稀释为蛋白质量分数为3%的“复原乳”。生牛乳和生山羊乳分别采集于广东省深圳市和广州市本地农场，分装-20 ℃保存，使用前室温解冻，涡旋震荡后备用。标准品乳粉和生乳均经过SN/T 2051-2008《食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法》检测，证明不含其他非本物种乳成分。另外本地超市和网购收集商品化羊乳粉，婴幼儿配方羊奶粉，灭菌全脂山羊乳，以及本地小区实地收集上门配送的纯山羊乳。α-CN、γ-CN、TMB、明胶、大豆球蛋白、乳白蛋白和牛血清白蛋白（BSA）购自sigma公司；HRP标记

收稿日期:2015-06-03
作者简介:王士峰(1988-),男,工程师,研究方向为食品生物技术。
通讯作者:杨国武

山羊抗小鼠二抗购自 Proteintech 公司。其他实验试剂均为国产分析纯，实验使用水均为去离子水。ELISA 其他溶液配方见文献[13]。

1.1.3 仪器与设备

酶标仪，96孔酶标板和细胞培养瓶，洗板机，电热恒温振荡水槽，手持式酸度计等其他常规实验仪器。

1.2 方法

1.2.1 抗体制备

用尿素溶液配置β-CN 母液，用PBS稀释为质量浓度200 μg/mL，和等体积免疫佐剂 Quickantibody 等体积混匀，小鼠大腿肌肉免疫100 μg/只，第21天等剂量加强免疫，第35天后尾部采血检测，测量血清多抗效价。单克隆抗体及腹水制备方法见文献[14]。

1.2.2 ELISA 方法

用棋盘滴定法确定包被抗原、一抗、样品和酶标二抗稀释倍数。其他ELISA条件：96微孔板每孔用100 μL适当浓度β-CN包被，4 ℃孵育过夜，次日弃上清，用200 μL 含有质量分数2%BSA的PBST溶液37 ℃封闭2 h，弃上清用PBST洗涤5遍拍干后，微孔板可密封4 ℃保存或立即使用。

间接竞争ELISA：取封闭好的微孔板室温平衡30 min，先加入50 μL标液或检测样本稀释液，再加入50 μL适合浓度单抗稀释液，37 ℃反应30 min，弃上清洗涤拍干后，加入HRP标记山羊抗小鼠二抗100 μL，37 ℃反应30 min，洗涤拍干后，加入TMB显色液，避光37 ℃反应10 min后，加入50 μL终止液终止反应，酶标仪450 nm检测吸光度值。

1.2.3 间接竞争ELISA标准曲线

本研究中选用的标准品脱脂牛乳粉蛋白质量分数为33.5%左右，先用去离子水制备蛋白质量分数3%的复原牛奶，先用PBST倍比稀释，按照优化好的ELISA条件进行竞争实验，每个浓度4个重复，建立logit-log回归标准曲线。

1.2.4 热稳定性与交叉反应

将生牛奶62 ℃水浴加热30 min，即得到巴氏杀菌乳；生牛乳121 ℃高压蒸汽灭菌20 min，即为高温灭菌乳。将生牛奶、巴氏杀菌乳、高温灭菌乳和复原牛乳用PBST倍比稀释，绘制竞争曲线。间接竞争ELISA检测不同蛋白样本的交叉反应率。交叉反应率=牛奶蛋白IC_{50}/其他蛋白IC_{50}×100%。

1.2.5 回收率与精密度

用复原牛乳和复原羊乳配置含20%，10%，5%，1%牛乳的羊乳样本，每质量分数4个重复，检测羊奶中牛奶比例，计算添加回收率：回收率=测量值/添加值×100%。同理计算相对标准偏差。

1.2.6 实际样本检测

称取等量标准品脱脂牛乳粉和待检乳粉样本，先用等量水稀释标准品和样本配置复原乳，再用PBST适当稀释，检测标准品和样本中的牛奶蛋白质量分数；液态鲜羊乳样本可直接用PBST稀释检测牛奶蛋白质量分数。样品中牛奶比例=蛋白质量分数(样本)/蛋白质量分数(标准品)×100%。

2 结果与分析

2.1 ELISA条件优化

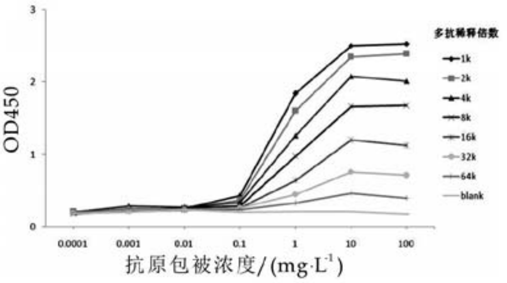

图1 包被抗原及一抗稀释倍数优化

棋盘法确定包被抗原，一抗稀释倍数，结果如图1所示。选用OD_{450}接近1.0为最佳浓度，最终确定β-CN包被质量浓度为1 μg/mL，多抗的稀释倍数为1∶8 000，筛选到的杂交瘤细胞株命名为3B9。用类似方法确定3B9单抗稀释倍数为1∶100 000。

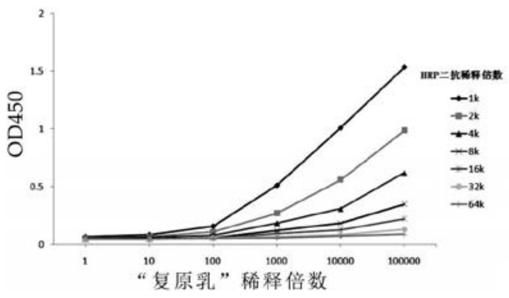

图2 竞争抗原及酶标二抗稀释倍数优化

确定鲜乳及复原乳稀释倍数为100倍，二抗稀释倍数为1∶2000，结果如图2所示。由于鲜乳及乳制品成分复杂，推荐先将鲜乳(鲜乳蛋白含量3%左右)用PBST稀释100倍后进行实验；关于乳粉制品，先配置成蛋白质量分数3%左右的复原乳，稀释100倍后进行实验，此举有助于统一样品间的缓冲环境，提高ELISA系统稳定性。

2.2 多抗和单抗B39特异性比较

采用上述ELISA条件，使用血清多抗和3B9分别与复原牛奶和复原羊奶进行交叉反应，结果如图3和图4所示。由图3和图4可以看出，单抗3B9特异性明显优于血清多抗，但在样品浓度高的情况下，单抗与羊奶之间存在轻微交叉反应，可能是由于蛋白浓度过高抑制了系统反应，随着稀释倍数增加，交叉反应逐渐消失，说明3B9适用于建立ELISA方法。

2.3 热稳定性与交叉反应

用建立的ELISA方法检测生牛奶、巴氏灭菌乳、高温灭菌乳，选用标准品复原牛乳做对照，结果如图5所示。由图5可以看出，FDS乳生牛奶、巴氏灭菌乳、高温灭菌乳和标准批内务生牛奶、巴氏杀菌乳和高温

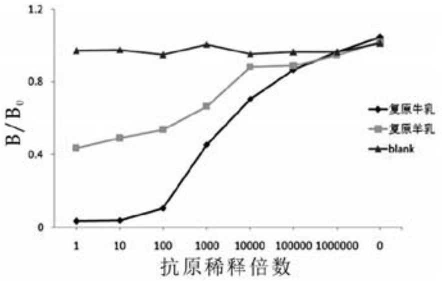

图3　血清多抗和牛羊乳间接竞争曲线

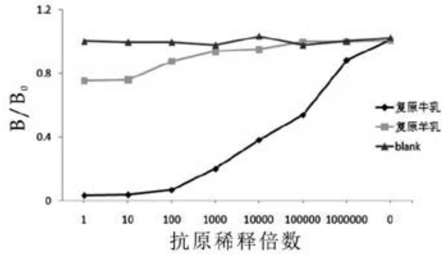

图4　单抗3B9和牛羊乳间接竞争曲线

灭菌乳的竞争抑制曲线并无明显不同，表明即使高达121 ℃高温并未对抗体识别表位造成影响。所以该方法适用于检测高温处理的液态乳和乳粉制品。

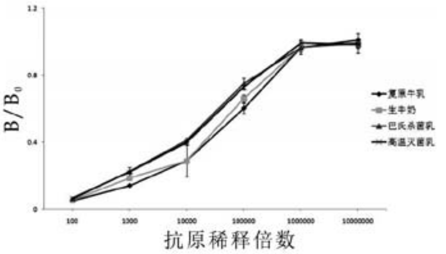

图5　不同热处理乳的竞争曲线

B39抗体的交叉反应结果如表1所示。表1中，B39与各种牛酪蛋白均存在交叉反应，故本研究中选用牛奶总蛋白做标准竞争抗原；另外，抗体与羊奶总蛋白，大豆奶，BSA等常用蛋白样品无交叉反应，故特异性满足一般检测需要。

表1　mAb3B9交叉反应率

反应物	IC_{50}/(ng·mL^{-1})	交叉反应率/ %
牛β-CN	154	100
牛α-CN	458	34
牛κ-CN	320	48
脱脂羊乳粉	>10^4	<1.0
淀粉	>10^4	<1.0
BSA	>10^4	<1.0
明胶	>10^4	<1.0
大豆球蛋白	>10^4	<1.0
乳白蛋白	>10^4	<1.0

2.4　间接竞争ELISA标准曲线

令横坐标x=lg(蛋白浓度)，y=In(B/B_0)，得到抑制回归曲线y=−0.92988−0.90047x，相关系数r^2= 0.9966，线性检测范围为2.68 ng～3.21 μg/mL，半数抑制质量浓度IC_{50}值为92.8 ng/mL，最低检测限0.35 ng/mL。其中，B_0为PBST空白对照OD_{450}，B为不同实验组OD_{450}。

2.5　回收率与精密度检测

采用ELISA检测不同比例掺杂样本，结果如表2所示。由表2可以看出，样本平均回收率在121%，平均相对标准偏差为9.7，最大值不超过12%，表明该方法重复性好，但回收率偏大，浓度越低时偏差越大。由于样本要经过上百倍稀释，极易引起结果偏差，但是对一般检测半定量检测需要已经足够。

表2　牛奶添加回收率

实际添加量/%	检测量/ %	回收率/%	相对标准偏差(RSD)/ %
20	21.3±2.4	106	11.3
10	11.4±0.7	114	7.9
5	6.1±1.4	122	6.6
1	1.41±0.13	141	9.2
平均值		121	8.7

2.6　实际羊乳粉样本

分别采用ELISA方法和SN/T 2051−2008实时PCR法检测收集的配方羊奶粉和液态山羊奶样本。如表3所示，荧光PCR共检测到8个样本有牛基因成分，但是ELISA分析只有7个。结果显示由于标准缺失，市面上羊乳粉掺杂牛乳的情况确有发生，需要执法部门加强监管；此外荧光PCR显示出极高的灵敏性，但无法得出定量参考结果，而ELISA阳性结果中，2个样品添加低于5%，此程度掺杂利润已经不大，究其原因可能是生产加工过程中无意污染，相比那些大比例掺假，低于5%的阳性样本理应区别对待。

表3　实际羊奶样本检测

样本编号	类型	荧光PCR结果	ELISA结果/%
1	脱脂牛奶粉	阳性	100
2	新西兰全脂羊奶粉1	阴性	0
3	新西兰全脂羊奶粉2	阳性	0
4	全脂灭菌纯山羊奶	阳性	31
5	婴幼儿配方羊奶粉1	阳性	4.4
6	婴幼儿配方羊奶粉2	阳性	20
7	婴幼儿配方羊奶粉3	阳性	17
8	婴幼儿配方羊奶粉4	阳性	1.2
9	现场采集生羊奶	阴性	0
10	小区配送生羊奶1	阳性	17.7
11	小区配送生羊奶2	阳性	25

3　结　论

本研究制备特异识别牛酪蛋白的单克隆抗体3B9，建立了可半定量检测羊乳样本中牛乳成分的间接竞争ELISA，理论最低检测限为3.24 ng/mL，显示出较高的灵敏度，且重复性好。该方法 （下转第46页）

霉酮残留的快速检测。

参 考 文 献:

[1] 吴延晖，许泓，何佳，等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中非类固醇激素残留量[J]. 食品研究与开发，2010，31(9)：140-144.

[2] 张艳，陈剑刚，冯翠霞. 液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中7种雌激素类药物残留[J]. 实用预防医学，2013，20(6)：740-743.

[3] 刘宏程，邹艳红，黎其万，等. 高效液相色谱分离牛奶中己烯雌酚、己烷雌酚和双烯雌酚[J]. 分析化学，2008，36(2)：245-248.

[4] 周建科，岳强，宿书芳，等. 牛奶中雌性激素的高效液相色谱分析[J]. 中国乳品工业，2005，33(11): 56-58.

[5] 周建科，唐翠苓，韩朝家，等. 固相分散萃取-液相色谱法测定奶酪中3种雌激素[J]. 中国乳品工业，2012，40(1): 56-58.

[6] 刘艳琴，王浩，杨红梅，等. 液质联用法测定婴儿乳粉中双酚A和己烯雌酚[J]. 食品研究与开发，2013，34(17)：80-83.

（上接第43页）比基于多抗的ELISA拥有更高的灵敏度，且样品热处理不会对检测结果有明显影响。虽然该方法的灵敏度不及荧光PCR，但是操作时间短，步骤简单，技术要求低，适用执法大规模高通量筛查，此外可半定量检测样品中的牛奶蛋白成分，可排除微量无意污染样本，提高执法公正性。

参 考 文 献:

[1] 徐颖，汪璇，刘小丹，等. 羊奶的优势与发展前景[J]. 新农业，2010，12: 62.

[2] ASCHAFFENBURG R, DANCE J E. Detection of cow's milk in goat's milk by gel electrophoresis [J]. Journal of dairy research, 1968, 35(3): 383-384.

[3] CARTONI G, COCCIOLI F, JASIONOWSKA R, et al. Determination of cow milk in buffalo milk and mozzarella cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions [J]. Italian journal of food science, 1998, 10(2): 127-135.

[4] CHEN R K, CHANG L W, CHUNG Y Y, et al. Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high - performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004, 18(10): 1167-1171.

[5] MAUDET C, TABERLET P. Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism [J]. Journal of dairy research, 2001, 68(02): 229-235.

[6] LOPEZ-CALLEJA I M, GONZ LEZ I, FAJARDO V, et al. Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses [J]. International Dairy Journal, 2007, 17(1): 87-93.

[7] ANGUITA G, MART N R, GARC A T, et al. Indirect ELISA for detection of cows' milk in ewes' and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine β -casein [J]. Journal of dairy research, 1995, 62(04): 655-659.

[8] RICHTER W, KRAUSE I, GRAF C, et al. An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ -caseins [J]. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1997, 204(1): 21-26.

[9] HURLEY I P, COLEMAN R C, IRELAND H E, et al. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese [J]. International Dairy Journal, 2006, 16 (7): 805-812.

[10] HURLEY I P, COLEMAN R C, IRELAND H E, et al. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration [J]. Journal of dairy science, 2004, 87(3): 543-549.

[11] 薛海燕，胡围围，宋宏新，等. 羊乳中掺入牛乳的间接 ELISA 定量检测 [J]. 食品科学，2010，24): 370-373.

[12] 马利杰，贾茹，杨春杰，等. 基于电子鼻技术对羊奶粉中掺假牛奶粉的快速检测 [J]. 中国乳品工业，2014，42(11): 47-50.

[13] 邢玮玮，王榕妹，王俊卿，等. 酶联免疫吸附分析法测定水产品及水中孔雀石绿和无色孔雀石绿 [J]. 化学研究与应用，2010(1): 42-46.

[14] 彭方毅，姜海蓉，陈远翔，等. 吡虫啉的酶联免疫吸附分析方法研究 [J]. 分析化学，2010，38(12): 1737-1741.