

牛 β -乳球蛋白胶体金免疫层析试纸条的研制及检测应用

薛海燕¹, 吴剑¹, 张颖¹, 宋宏新¹, 贺宝元²

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021)

(2. 陕西科技大学轻工科学与工程学院, 陕西西安 710021)

摘要: 研制了一种可快速检测羊乳及制品中牛源 β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin, β -lg) 的胶体金免疫层析试纸条。通过杂交瘤技术制备牛 β -lg 特异性单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb), 利用柠檬酸钠还原氯金酸, 形成 30 nm 胶体金颗粒, 并用于标记牛 β -lgmAb。采用竞争法研制免疫层析试纸条, 将胶体金标记的牛 β -lgmAb 包被于金标垫, 牛 β -lg 和羊抗鼠 IgG 标记于硝酸纤维素膜分别作为检测线 (T 线) 和质控线 (C 线), 牛 β -lg 和二抗的最佳包被浓度均为 1.0 mg/mL。制得的单克隆抗体纯度都在 90% 以上, 效价均在 10000 以上且特异性较好。该试纸条对牛 β -lg 的检测限 (limit of detection, LOD) 值为 3.13 μ g/mL, 对牛源 α -CN, 牛源 β -CN, 牛源 κ -CN, 牛源 α -LA, BSA 均未产生交叉反应, 对脱脂羊乳粉中掺杂脱脂牛奶粉的 LOD 值为 5%, 并用该方法对市售羊奶及配方羊奶粉进行分析, 检测结果与商品化的 ELISA 试剂盒一致。该方法前处理快速简单, 可在 5 min 内对牛 β -lg 进行检测, 可用于羊乳制品的现场快速检测。

关键词: 牛 β -乳球蛋白; β -lg 单克隆抗体; 免疫层析; 市售羊乳粉; 掺伪

文章编号: 1673-9078(2021)03-259-266

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.3.0862

Development and Application of Bovine β -lactoglobulin Gold Immunoassay Strip

XUE Hai-yan¹, WU Jian¹, ZHANG Ying¹, SONG Hong-xin¹, HE Bao-yuan²

(1. Institute of Food Biotechnology, Shaanxi University of Science and Technology of Science and Technology, Xi'an 710021, China) (2. Institute of Light Industry Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: A colloidal gold immunochromatography method for the rapid determination of β -lactoglobulin (β -lg) in goat milk and its products were established. Bovine β -lg specific monoclonal antibody (monoclonal antibody, mAb) was prepared by hybridoma technique. Sodium citrate was used to reduce chloroauric acid. The 30 nm colloidal gold particles were formed and used to label bovine β -lgmAb. The competition method was used to develop immunochromatographic strips. A bovine β -lgmAb bag labeled with colloidal gold was placed on the gold label pad. Bovine β -lg and sheep anti-mouse IgG were labeled on nitrocellulose film as detection line (T line) and quality control line (C line), respectively. The optimal encapsulation concentration of bovine β -lg and secondary antibodies were both 1.0 mg/mL. The purity and titer of monoclonal antibody were all above 90% and above 10000 with high specificity. The limit of detection (LOD) of bovine β -lg was 3.13 μ g/mL. There was no cross-reaction against other substrate components (bovine α -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, BSA). The LOD of whole fat goat milk powder adulterated with skimmed cow milk powder was 0.5 %. The method was used to analyze the commercial goat milk and formula goat

引文格式:

薛海燕, 吴剑, 张颖, 等. 牛 β -乳球蛋白胶体金免疫层析试纸条的研制及检测应用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 259-266

XUE Hai-yan, WU Jian, ZHANG Ying, et al. Development and application of bovine β -lactoglobulin gold immunoassay strip [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 259-266

收稿日期: 2020-09-14

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2020ZDLNY02-09); 陕西省教育厅服务地方专项项目(19JC05); 西安市科技计划农业科技创新工程项目(201903035YF023NS023; 20NYF0016)

作者简介: 薛海燕 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与质量控制技术

milk powder. The results of this method were consistent with that of the commercial ELISA kit. This method could be used to detect bovine β -lg in 5 min, and could be used to on-site rapid detection of sheep milk products.

Key words: bovine β -lactoglobulin; β -lg monoclonal antibody; immunochromatography; commercially available sheep milk powder; adulteration

β -乳球蛋白是牛乳中的主要蛋白质, 分子量 18.2 ku, 等电点 5.3^[1]。 β -乳球蛋白是反刍动物如牛、羊和单胃动物乳中的主要成分, 容易引发免疫反应出现过敏现象, 是牛乳中最主要的过敏原之一^[2]。羊乳 β -lg 与牛乳 β -lg 的天然构象不同, 而且羊乳中的 β -lg 含量低于牛乳, 羊乳的过敏发生率较低^[3]。羊乳的营养成分和牛乳接近, 但是羊乳的营养比例比牛乳更加合理, 更容易消化吸收^[4]。Native-PAGE 电泳图谱显示, 牛羊乳蛋白差异主要体现在清蛋白上, 牛乳 β -lg 位于凝胶底部, 且是两条变异条带, 而羊乳 β -lg 仅有一条条带, 位于电泳图的中间^[5]。我国山羊养殖规模不大, 山羊的生长周期长, 泌乳期短, 羊乳产量少, 且极易受季节的影响^[6,7], 因此羊乳资源相对匮乏, 市场价格较高。牛乳与羊乳在外观、营养成分上极为相似, 一些不法商家借在羊乳中掺入牛乳来降低生产成本, 达到盈利的目的。这种行为不仅损害了消费者的权益, 还会对牛乳过敏的消费群者造成极大的伤害。因此, 迫切需要建立一种快速检测羊乳中掺入牛乳的方法。

最常用的检测牛羊乳掺假的方法有电泳检测技术, 色谱技术, PCR 技术, ELISA 技术等。传统的 SDS-PAGE 方法很复杂, 难以量化, 而且牛羊乳的成分和性质也比较相似, 用该技术检测更加困难。如果电泳和色谱技术联用, 测定结果更加准确, 并且不仅可以实现定性检测, 还可以用于定量。但其实验设备繁重, 时间长; 气相和液相色谱法准确且可重复^[8,9], 但制备样品过程繁琐, 时间长且需要大量样品; PCR 检测技术特异性强, 速度快, 但此法需要较高的专业技能, 所需试剂成本也高, 不适用于快速的现场检测^[10,11]; ELISA 技术灵敏度高, 特异性好, 操作也相对简单^[12]。但该方法不仅需要特定的仪器, 实验时间也长, 现场大规模乳制品的检测不适合采用此法。与其他技术相比, 胶体金免疫层析技术是一种简单而快速的检测技术^[13,14]。它是目前快速准确适用于现场的检测技术手段。该技术操作简单, 时间短, 易携带, 结果直观, 适合于现场大规模的检测。

本文选择牛乳 β -乳球蛋白作为抗原, 免疫小鼠, 经过细胞融合, 筛选了 6 株杂交瘤细胞, 并对细胞株进行培养, 根据小鼠体内诱生腹水法制备特异性高的单克隆抗体。利用该抗体研制可快速检测羊乳中牛 β -乳球蛋白胶体金免疫层析试纸条。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胶体金、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC 底板, 上海杰一生物技术有限公司; 牛 β -乳球蛋白、牛 α -乳白蛋白、BSA、牛 α -酪蛋白、牛 β -酪蛋白、牛 κ -酪蛋白, 西安优博生物科技有限公司; 单克隆抗体, 上海友科生物科技有限公司; 羊抗鼠 IgG, 北京博奥森生物技术有限公司; 全脂羊奶粉、脱脂羊奶粉, 实验室自制; 液态羊乳, 本地牧场; 配方羊奶粉, 本地超市购买。其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

全波长扫描式多功能读数仪, 赛默飞世尔科技有限公司(芬兰); 移液枪, 德国 Brand 公司; 酶标板(聚苯乙烯板) 96 孔, 北京鼎国生物技术有限公司; Smart 系列超纯水仪, 力康生物医疗科技控股有限公司; 101-2A 型电热鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 酶联免疫检测仪 MK3, 热电(上海)仪器有限公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 郑州科丰仪器设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 抗体制备

以牛 β -乳球蛋白为免疫原, 采用腹腔注射法免疫 BALB/c 小鼠, 经细胞融合, 筛选能稳定分泌 β -lg 单克隆抗体的细胞株, 通过小鼠体内诱生腹水法可以大量制备单克隆抗体, 并对抗体的纯度进行鉴定。

1.3.2 抗体效价及亲和力的测定

用碳酸盐包被缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.6)包被抗原(200 μ L/孔), 4 $^{\circ}$ C 放一夜, 第二天, 先倒出板内前一天包被的液体, 然后用 300 μ L PBST 溶液进行洗涤, 洗涤三次, 每次 3 min; 每孔加 100 μ L 明胶进行封闭, 在 37 $^{\circ}$ C 烘箱内放置 50 min, 同上述洗涤一样, 加入抗体, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 恒温于湿盒内孵育 1.5 h, 洗涤同上, 加羊抗鼠酶标二抗, 100 μ L/孔, 再次于恒温箱中孵育 1.5 h, 洗涤后加入显色液和终止液, 用酶标仪在 450 nm 的波长下, 测定其吸光值。

利用间接 ELISA 测单抗亲和力。牛 β -lg 按 5、2.5、

1.25、0.625 $\mu\text{g/mL}$ 包被酶标板。单克隆抗体从 10 倍开始倍比稀释。以单克隆抗体 (mol/L) 的对数为横坐标、 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 为纵坐标, 绘制 4 条 S 形曲线。以 S 形曲线的顶部为最大光密度 OD_{max} , 求出各曲线 50% OD_{max} 对应的单克隆抗体浓度 (IC_{50} , mol/L)。将 4 个浓度两两分组, 根据公式计算亲合力常数。

$$Ka = \frac{n-1}{2(n[Ab']t - [Ab]t)}$$

式中: Ka 为亲合力常数; n 为每组中两个包被抗原浓度的倍数; $[Ab']t$ 和 $[Ab]t$ 分别为每组中两条曲线 IC_{50} 对应的抗体浓度 (mol/L)。

1.3.3 单抗特异性分析

以牛 α -CN、羊 α -CN、牛 α -LA (α -Lactalbumin, α -LA) 和牛血清白蛋白 (BSA) 为抗原, 一抗为牛 β -lg 单抗, 二抗为酶标羊抗鼠, 以阴性血清作为对照, 采用间接 ELISA 法进行测定, 步骤参照小鼠血清效价的方法。

1.3.4 胶体金的制备和表征

用柠檬酸三钠还原法制备胶体金。100 mL 去离子水放在磁力搅拌器上加热搅拌, 沸腾后加入 2 mL 1% 氯金酸, 煮沸后再迅速加入 1 mL 1% 柠檬酸三钠溶液颜色变为稳定的酒红色, 冷却后定容至 100 mL, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.3.4.1 最适标记胶体金 PH 值确定

取 5 个 1.5 mL 的 EP 管, 加入 1 mL 胶体金, 分别加入 5、10、15、20、25 μL 0.02 M 的 K_2CO_3 溶液调节 pH, 再分别加入 4 μL 单抗, 混匀放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 20 min, 加入 100 μL 10% NaCl 溶液, 混匀静置 10 min, 观察 EP 管颜色变化, 使溶液保持红色的最低 pH 值确定为最适 pH 值。

1.3.4.2 最适标记抗体浓度

取 6 个 1.5 mL 的 EP 管, 各加入 1 mL 胶体金溶液, 分别加入 0.02 M K_2CO_3 溶液 10 μL , 分别加入浓度 50、25、12.5、6.25、3.1、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的单抗 5 μL 。混匀静置 20 min, 加入 100 μL 10% NaCl 溶液, 混匀静置 10 min, 观察 EP 管颜色变化, 使溶液保持红色的最低 pH 值确定为最适抗体浓度。

1.3.4.3 最适标记抗体量

取 6 个 1.5 mL 的 EP 管, 各加入 1 mL 胶体金溶液, 分别加入 0.02 M K_2CO_3 溶液 10 μL , 分别加入浓度 25 $\mu\text{g/mL}$ 的单抗 2、3、4、5、6、7 μL 。混匀静置 20 min, 加入 100 μL 10% NaCl 溶液, 混匀静置 10 min, 观察 EP 管颜色变化, 使溶液保持红色的最低 pH 值确定为最适抗体量。

1.3.5 胶体金试纸条的方法的建立

1.3.5.1 金标垫和金标溶液的制备

向 10 mL 离心管中加入 1 mL 胶体金溶液, 加入最适 K_2CO_3 溶液, 再加入最适浓度的单抗, 混匀静置 20 min, 加入 20.0 μL 20% 的 BSA, 混匀静置 20 min。4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 使用金标抗体复溶液 200 μL 进行复溶。

将玻璃纤维素膜裁剪成 2 cm $\times$ 1.4 cm 大小的条带, 把制备的胶体金标溶液均匀的覆盖在玻璃纤维素膜条带上, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.5.2 NC 膜的处理

将硝酸纤维素膜裁剪成 2 cm $\times$ 2 cm 大小的条带, 离膜上端 0.75 cm 处用划膜机包被 1 mg/mL 的单克隆抗体作为检测线, 离膜下端 0.5 cm 处包被 1 mg/mL 的羊抗鼠 IgG 二抗作为质控线。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.5.3 胶体金试纸条的组装

在 PVC 板上依次粘贴 NC 膜、金标垫、样品垫、吸水垫, 各部分重叠约 2 mm, 用切条机切成 0.5 cm 宽的试纸条, 装入塑料外壳中。

1.3.6 试纸条灵敏度测试

用 PBS 将牛 β -lg 标准品稀释至 100、50、25、12.5、6.75、3.37、1.6 $\mu\text{g/mL}$ 。各加 100 μL 于加样处, 反应 15 min, 观察 NC 膜的显色情况, 以 T 线显色最浅时的稀释度作为试纸条最低检测浓度。

1.3.7 试纸条特异性测试

用 PBS 缓冲液配制 12 $\mu\text{g/mL}$ 牛 α -CN, β -CN, κ -CN, BSA, α -LA, β -lg 标品溶液。用试纸条检测不同蛋白溶液, 观察 NC 膜的显色情况。

1.3.8 脱脂羊乳掺假的间接 ELISA 法

向脱脂羊乳中加入脱脂牛乳, 加入的体积分数分别为 0%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、100%, 以掺入后的样本为检测目标, 采用间接 ELISA 法进行检测, 观察牛乳掺入量与吸光值的关系, 操作如 1.3.2。

1.3.9 牛羊乳混合样品及市售羊乳的检测

向羊乳中分别加入 1%、2%、5%、10%、30%、40%、60%、80%、100% 的牛乳形成牛羊乳混合样品。收集市售全脂羊乳粉及婴幼儿配方羊乳粉样本 7 个 (全脂羊奶粉, 液态羊奶, 配方羊奶粉), 用所制备的试纸条检测, 并和 ELISA 检测方法做对照。

1.3.10 数据处理

单克隆抗体效价、特异性、亲和力的测定均做 3 次平行试验, 结果以平均值表示, 文中图表采用 Excel 2010 和 Origin 9.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 β -lg 单克隆抗体纯度的鉴定结果

筛选 6 株细胞株用做亚克隆并制备单克隆抗体，编号为 1-6，用 SDS-PAGE 的方法检测纯化后的单克隆抗体纯度。由图 1 可知，2-7 号泳道单抗的电泳图谱只有 2 个条带，分子量分别为 26 ku 和 50 ku，和标准 IgG 一致，表明纯化后的抗体纯度较高。Quantity One 软件对泳道的条带进行分析，得出抗体纯度都在 90%以上，可用于进行下一步的实验。

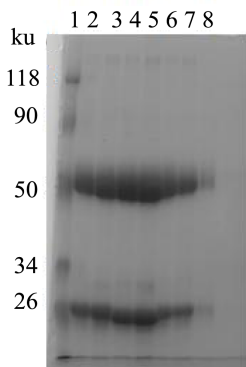


图 1 单抗纯度鉴定结果

Fig.1 Etermination of mouse antiserum titer

注：1：Marker；2-7：单抗 1-6；8：标准 IgG。

2.1.1 抗体效价和亲和力的测定

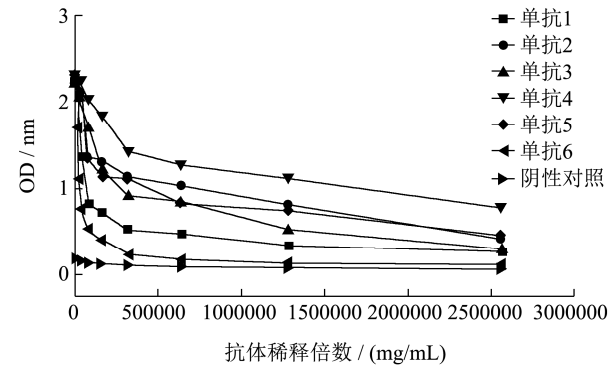


图 2 单抗效价的检测

Fig.2 Monoclonal antibody titer assay

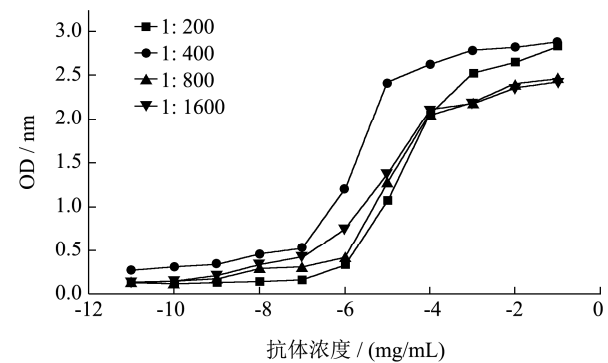


图 3 亲和力测定结果

Fig.3 Affinity measurement result

单抗效价检测采用间接 ELISA 法。由图 2 可知，

这 6 株单抗的效价均达到 10000 以上，其中单抗 4 的效价最高为 $1:1.28 \times 10^6$ ，单抗 6 的效价最低为 $1:2.0 \times 10^4$ 。单抗 4 的效价远远高于其他 5 种单抗，如图 3 所示，经计算，单抗 4 的亲合力常数为 2.6×10^7 ，是高亲和力抗体。因此本试验选择效价高亲和力高的抗体 4 作为后续的实验研究。

2.1.2 单抗特异性鉴定结果

由表 1 可知，牛 β -lg 单克隆抗体与牛 α -CN、羊 α -CN、牛 α -LA、牛 β -lg 和 BSA 发生反应，算得 P/N 值都小于 2.1，说明该试验制得的单抗特异性高。

表 1 单克隆抗体特异性

Table 1 The immune scheme for mouse

蛋白样品	OD _{450 nm}	阴性对照	P/N
牛 α -CN	0.093	0.051	1.82
羊 α -CN	0.079	0.058	1.36
牛 α -LA	0.116	0.069	1.68
牛 β -lg	0.045	0.084	0.54
牛血清白蛋白 (BSA)	0.037	0.039	0.95

2.2 胶体金的制备和表征

2.2.1 胶体金的鉴定

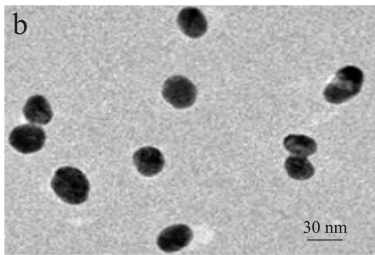
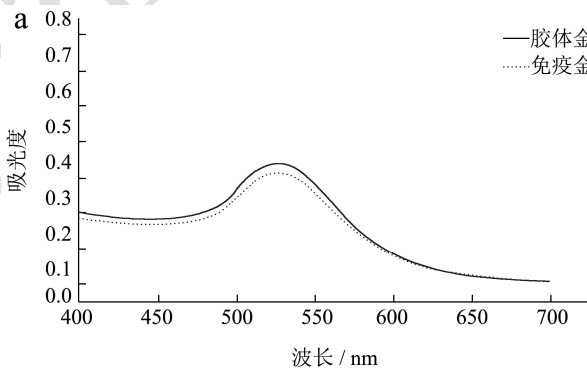


图 4 胶体金颗粒性质

Fig.4 Properties of colloidal gold nanoparticles

注：a：紫外可见全波长扫描图；b：透射电镜图。

图 4a 为胶体金和免疫金的紫外-可见全波长扫描，体系的最大吸收波长和半峰宽并无明显变化，说明标记结果稳定。金纳米粒径为 30~40 nm 之间最适合应用于胶体金免疫层析检测^[15]。通过透射电镜扫描，本实验所获得的胶体金颗粒直径为 30 nm，适合用于抗体标记。

2.2.2 最适标记胶体金 pH 值

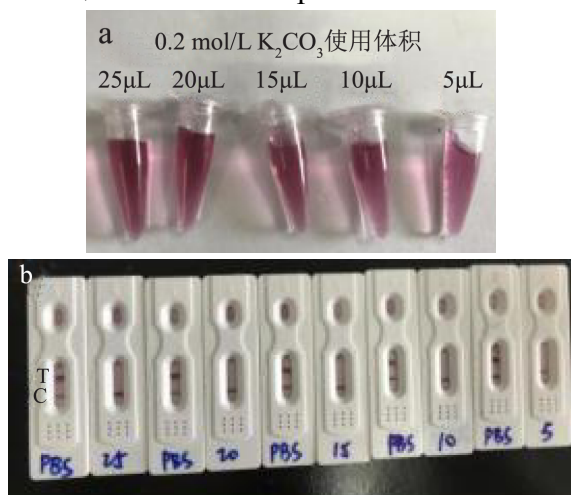


图5 胶体金标记 β -IgmAb 的最适 pH 值的确定

Fig.5 Determination of the optimal pH value of colloidal gold labeled β -IgmAb

抗体加进胶体金后,其活性和结合效率受 pH 值的影响^[16]。但是金纳米粒会对 pH 计的电极有影响^[17],故本实验采用不同体积的 0.1 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液的 pH 值。如图 5a 所示,随着 K_2CO_3 加入量的增加,免疫金的颜色也从蓝紫色变为酒红色,通过同样条件检测(T 线 1 mg/mL, C 线 0.5 mg/mL, 阴性为 0.01 mol/L PBS 缓冲液,阳性为 50 μ g/mL 牛 β -lg 溶液),选择阴性 T 线显色明显,阳性 T 线褪色明显的条件。如图 5b,选择 1.0 mL 胶体金溶液中加入 0.2 mol/L 的 K_2CO_3 溶液 10.0 μ L。

2.2.3 最适标记抗体浓度



图6 胶体金标记 β -IgmAb 的最适抗体浓度的确定

Fig.6 Determination of optimal antibody concentration of colloidal gold labeled β -IgmAb

在 1.0 mL 胶体金中加入不同浓度 β -lg 抗体,通过同样条件检测(同上),由图 6b 可知,抗体加入浓度小于 3.13 μ g/mL 时,T 线颜色不明显,当抗体浓度为 12.5 μ g/mL 时,T 线颜色明显。当 T 线和 C 线显色明显时,抗体用量越少,T 线上包被的抗原与待测物质的竞争越激烈,试纸条的反应性越高^[18]。当标记抗体浓度为 12.5 μ g/mL 时,符合检测要求,而且在后期实验中有很好的稳定性。

2.2.4 最适标记抗体量

在 1.0 mL 胶体金中加入不同体积的 β -lg 抗体,通过同样条件检测(同上),由图 7a 可知,胶体金颜色为酒红色,颜色稳定不再变化,如图 7b 所示,标记的抗体加入体积小于 5.0 μ L 时阴性 T 线颜色不明显,当抗体加入量为 6.0 μ L 时阴性 T 线显色明显。当标记抗体量 6.0 μ L 时,能满足检测要求。因此选择 1.0 mL 胶体金溶液中加入 6 μ L 抗体进行标记。

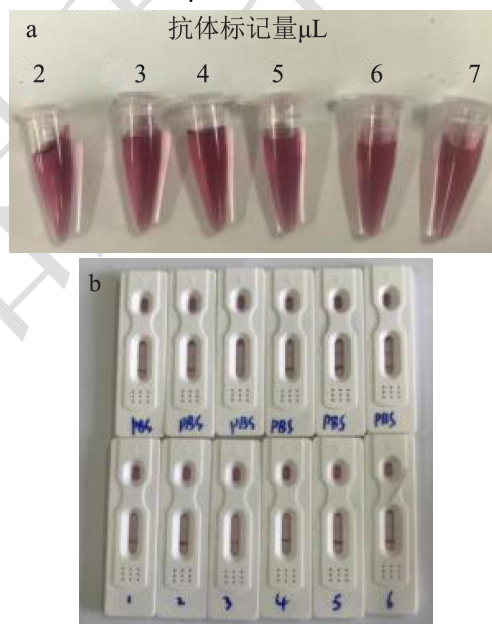


图7 胶体金标记 β -IgmAb 的最适抗体量的确定

Fig.7 Determination of the optimal amount of antibody to colloidal gold labeled β -IgmAb

2.3 试纸条灵敏度试验

从图 8 和表 2 可知, β -lg 浓度增加,NC 膜上 T 线颜色逐渐变浅。当样本中 β -lg 浓度为 0.78 μ g/mL 和 1.56 μ g/mL 时,NC 膜的颜色清晰;当 β -lg 浓度大于 3.13 μ g/mL 时,NC 膜上 T 线上没有颜色,是因为检测溶液中的 β -lg 与金标抗体反应,形成金标抗体复合物,该复合物经过 NC 膜时,与 T 线上的抗原结合较少,颜色会越来越浅。因此本试验牛 β -lg 浓度为 3.13 μ g/mL 作为最低检测限。

He^[19]以 β -LG 为抗原制备单克隆抗体,并建立间

接 ELISA 法来检测牛乳, 不仅具有较高的特异性, 灵敏度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。ELISA 检测方法特异性高, 结果准确可靠, 但该方法耗时, 不适用在现场检测。本试验是以牛 $\beta\text{-lg}$ 为抗原制备单克隆抗体, 并研制胶体金免疫层析试纸条, 灵敏度是 3.13 $\mu\text{g/mL}$ 。该方法提高了检测的灵敏度和准确性, 更适用于现场检测。



图8 $\beta\text{-lg}$ 快速检测试纸条的灵敏度

Fig.8 Detection limit of $\beta\text{-lg}$ rapid test strip

表2 试纸条反应性检测的结果

Table 2 The reactivity test results of the strip

$\beta\text{-lg}$ 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	T 线	C 线
0.78	++	++
1.56	+	++
3.13	+	+
6.25	-	+
12.5	-	+
25	-	+
50	-	+
100	-	+

注: “++”表示强阳性; “+”表示阳性; “-”表示阴性。

2.4 试纸条特异性试验



图9 $\beta\text{-lg}$ 快速检测试纸条的特异性

Fig.9 Specificity of $\beta\text{-lg}$ rapid test strip

用该试纸条检测其他蛋白溶液, 结果如图9和表3。由表3和图9可知, 检测 $\beta\text{-lg}$ 溶液的试纸条 T 线不显色, 其他五种蛋白溶液的检测试纸条 T 线均有颜色。这是因为 $\beta\text{-lg}$ 溶液中的抗原与金标抗体发生反应, 形成金标抗体抗原复合物, 移至 NC 膜检测线 T 上时, T 线上的抗原表位没有与抗体结合。其他五种蛋白溶

液的检测线上有颜色是因为溶液中的蛋白抗原没有与抗体发生反应, 当金标抗体经过 NC 膜上 T 线时, 金标抗体被固定下来, 胶体金颗粒发生聚集, 在 T 线上显色红色条带。说明该试纸条对 $\beta\text{-lg}$ 有良好的特异性。

表3 试纸条特异性检测

Table 3 Test strip specificity

检测抗原	T 线	C 线
$\beta\text{-lg}$	-	+
$\beta\text{-CN}$	+	+
$\kappa\text{-CN}$	+	+
$\alpha\text{-CN}$	+	+
$\alpha\text{-LA}$	+	+
BSA	+	+

2.5 间接 ELISA 法检测脱脂牛羊乳混合样品

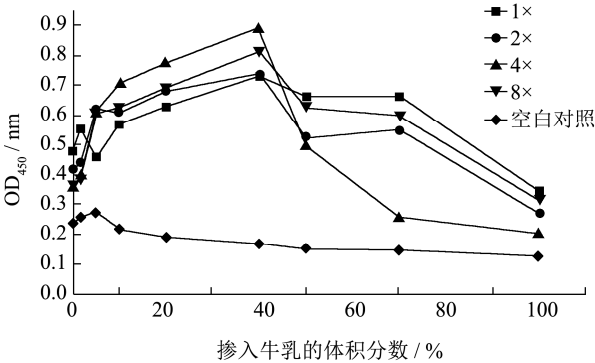


图10 脱脂牛羊乳混合样品的吸光值

Fig.10 Absorbance value of mixed sample of skim cow and goat milk

如图10所示, 把不同体积分数的牛乳掺入脱脂羊乳中, 随着掺入牛乳体积分数的增大, 吸光值在逐渐增大, 原因是牛乳蛋白质在 ELISA 板上吸附牢固, 不易被洗掉, 可以与抗体发生反应的蛋白抗原多, 吸光值升高; 当掺入量增加到 40% 以上后, 吸光度在逐渐减小, 是因为牛乳蛋白质含量太高, 在包被过程中, 形成多层吸附, 在洗板时, ELISA 板上的蛋白质大都被洗掉, 能与抗体发生反应的蛋白抗原减少, 吸光值降低。

2.6 竞争法试纸条检测脱脂牛羊乳混合样品

由图11和表4可知, 随着牛乳掺入量的增加, NC 膜上 T 线的颜色由深变浅, 再到看不见。加入 1% 脱脂牛乳时, NC 膜 T 线颜色清晰; 加入 2% 牛乳时, NC 膜上 C 线的颜色变淡; 可以检测出羊乳中掺假的牛乳。当加入的牛乳量大于 5% 时, NC 膜上 T 线不显色, 这是因为加入牛乳的量增多时, 能和抗体反应的抗原多, 可以与 T 线上的抗原反应的金标抗体减少了,

颜色就会变浅直至没有。所以脱脂羊乳中加入 5% 的脱脂牛乳是该试纸条的最小检测限。



图 11 牛羊乳掺假检测

Fig.11 Detection of milk adulteration

表 4 牛羊乳掺假检测

Table 4 Detection of milk adulteration

牛乳掺入量/(m/V, %)	T 线	C 线
1	++	+
2	+	+
5	-	+
10	-	+
30	-	+
40	-	+
60	-	+
80	-	+
100	-	+

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

Bulent 等^[20]以牛 IgG 为抗原，获得特异性高，与羊乳交叉反应小的单克隆抗体，并研制了胶体金免疫层析试纸条，该法可准确检出样品中牛乳 IgG 含量，确定牛乳 IgG 的最小检测浓度为 60.5 μg/mL。张欢等

表 5 免疫层析法和 ELISA 检测结果的比较

Table 5 Comparison of immunochromatography and ELISA results

样品类型	编号	样品成分	竞争法层析试纸条	ELISA
配方羊奶粉	1	鲜羊乳、脱盐乳清粉	+	>1% (+)
	2	鲜羊乳、脱盐乳清粉	+	>1% (+)
	3	鲜羊乳、脱盐乳清粉	+	>1% (+)
液态羊乳	4	脱脂乳粉、羊奶粉	+	>1% (+)
	5	鲜羊奶	-	<0.5% (-)
全脂羊奶粉	6	纯羊奶粉	-	<0.5% (-)
	7	生羊乳	-	<0.5% (-)

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。ELISA 试剂盒内含 0%、0.5% 牛奶三个标准品，>1% 为阳性 (+)，<0.5% 为阴性 (-)。

3 结论

本试验根据半固体培养基的方法来进行杂交瘤细胞的融合，筛选了 6 株杂交瘤阳性细胞株，对其进行培养，腹腔法来获得单克隆抗体，并对单克隆抗体的特性进行鉴定，最后得到了纯度高达 90%，效价都在

^[21]以牛 β-Ig 为研究对象，建立了竞争性免疫层析法，并检测了羊乳中乳蛋白含量，可在 3~10 min 内出结果，得出最低检出限为 2%。本试验以牛 β-Ig 为抗原制备高特异性单克隆抗体，并建立竞争性免疫层析法，检测了羊乳中牛 β-Ig 含量，得出最低检测限为 5%。

2.7 市售羊乳制品的掺假结果

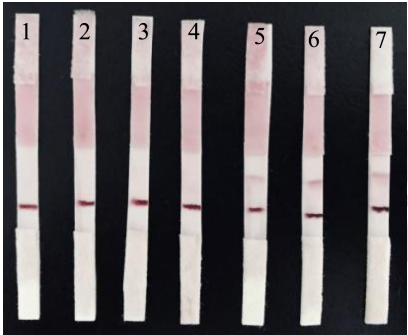


图 12 羊乳制品的检测

Fig. 12 Detection of sheep milk products

用试纸条检测采买的羊乳及其制品。检测结果见图 12。结果显示 7 个样品中，4 个显示阳性，表明这些样品均有牛乳蛋白成分。同时，用牛乳蛋白 ELISA 试剂盒检测，两种检测方法结果一致（表 5），表明本方法结果准确可靠。3 个阴性样本，配料表上标注了“生羊乳，羊奶粉”，而阳性样本配料表上均未表明乳清蛋白的动物来源，只标注“脱盐乳清粉”。故阳性样本中的蛋白可能来自“脱盐乳清粉或浓缩乳清蛋白粉”。该试纸条检测实际样品的结果表明，它可以应用在羊乳及其制品的现场快速检测。

10000 以上，且特异性很高。研制了可快速检测牛 β-Ig 的胶体金免疫层析试纸条。该试纸条成本低廉，稳定性良好，检测范围广，样品前处理简单，点样后 5 min 后裸眼即可判定结果，对 β-Ig 的 LOD 值是 3.13 μg/mL，脱脂羊乳中掺假脱脂牛乳的 LOD 值是 0.5%。通过对市售羊乳制品检测，结果和商品化 ELISA 试剂盒一

致,故本试验研制的免疫层析试纸条可用于掺杂牛乳的羊乳及其制品的现场快速筛查。

参考文献

- [1] 徐雨佳,钟俊桢,刘成梅,等.糖基化对 β -乳球蛋白致敏性的影响[J].食品与机械,2012,28(1):82-85
XU Yu-jia, ZHONG Jun-zhen, LIU Cheng-mei, et al. Effects of glycosylation on β -lactoglobulin sensitization [J]. Food and Machinery, 2012, 28(1): 82-85
- [2] Li T, Hu P, Dai T, et al. Comparing the binding interaction between, β -lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 201(4): 197-206
- [3] Hattori M, Numamoto K, Kobayashi K, et al. Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(6): 2050-2056
- [4] 穆闯录.不同泌乳阶段牛羊乳及母乳中蛋白质和总氨基酸分析及评价[D].杨陵:西北农林科技大学,2017
MU Chuang-lu. Comparative analysis and evaluation of protein and total amino acid in different stages in cow's, goat's and breast milk [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2017
- [5] 程妮.牛羊乳蛋白质的双向电泳分析及免疫检测技术研究[D].西安:陕西科技大学,2017
CHENG Ni. Two-dimensional electrophoresis analysis and immunoassay of bovine and goat milk proteins [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2017
- [6] 宋宏新,张小苗,薛海燕.牛羊乳蛋白组分比较研究[J].中国酿造,2012,2:21-23
SONG Hong-xin, ZHANG Xiao-miao, XUE Hai-yan. Comparative study on protein components of bovine and goat milk [J]. China Brewing, 2012, 2: 21-23
- [7] H Wang, C N Wang, M R Guo. Effectsof addition of strawberry juice pre or postfermentation on physiochemical and sensory properties of fermented goat milk [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(6)
- [8] 李慧,陈敏,李赫,等.反相高效液相色谱法测定乳清蛋白中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白[J].色谱,2007,1:116-117
LI Hui, CHEN Min, LI He, et al. The contents of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in whey proteins were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chromatography, 2007, 1: 116-117
- [9] Heidebrecht H J, Kainz B, Schopf R, et al. Isolation of biofunctional bovine immunoglobulin G from milk and colostral whey with mixed-mode chromatography at lab and pilot scale [J]. Journal of Chromatography A, 2018,1562(23): 59-68
- [10] 李洁,童锐,李向伟.实时荧光定量PCR法鉴别生鲜羊乳中牛源性成分[J].中国乳品工业,2016,10:38-39
LI Jie, TONG Rui, LI Xiang-wei. Identification of bovine origin components in fresh sheep milk by real-time fluorescence quantitative PCR [J]. China Dairy Industry, 2016, 10: 38-39
- [11] Zeinab Abiri, Mohammad Khalili, Polycronis Kostoulas, et al. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of a PCR method to detect *Coxiella burnetii* in milk and vaginal secretions in sheep and goat samples [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(6): 4954-4559
- [12] 张世伟,王士峰,赖心田,等.水牛乳和羊乳中掺伪牛乳高特异性酶联免疫检测方法[J].食品工业,2015,5:191-194
ZHANG Shi-wei, WANG Shi-feng, LAI Xin-tian, et al. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for the detection of adulterated buffalo milk and goat milk [J]. Food Industry, 2015, 5: 191-194
- [13] Rui Xu, Jintao Feng, Yang Hong, et al. A novel colloidal gold immunochromatography assay strip for the diagnosis of schistosomiasis japonica in domestic animals [J]. Infectious Diseases of Poverty, 2017, 84(6): 1-11
- [14] Ailong Zhang, Tong Gao, Shenlan Wu, et al. Feasibility of using colloidal gold immunochromatography for point-of-care identification of parathyroid glands during thyroidectomy [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 507(1-4): 110-113
- [15] Byzova N A, Smirnova N I, Zherdev A V, et al. Rapid immunochromatographic assay for ofloxacin in animal original foodstuffs using native antisera labeled by colloidal gold [J]. Talanta, 2014, 119: 125-132
- [16] Chen Y, Xin Y, Yang H L, et al. Immobilization and stabilization of cholesterol oxidase on modified sepharose particles [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 56: 6-13
- [17] 胡淑荣.黄曲霉毒素 B1 胶体金免疫层析技术在中药中应用研究[D].长春:吉林农业大学,2018
HU Shu-rong. Study on the application of aflatoxin B1 colloidal gold immunochromatography in traditional Chinese medicine [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018

(下转第 201 页)