(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108226513 A
(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201611159873.2

(22)申请日 2016.12.15

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司
地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家科技园B11栋3楼

(72)发明人 洪霞 张淑雅 立雯馨

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒，包括包被的抗牛IgG的多克隆和高特异性单克隆抗体和以牛IgG和牛IgG的Fc片段为抗原。本发明使用高特异性抗体所建立的ELISA方法检测实际样品稳定可靠，不易受基质干扰，具有较好的实际应用价值和开发成商品化试剂盒的潜力，将打破牛乳掺伪检测产品国外试剂盒垄断的局面。更重要的是，通过建立具有自主知识产权的检测方法，将为我国乳品掺伪的发生提供有效的预警技术手段，保障消费者合法权益。

CN 108226513 A

1.一种检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒，其特征在于：由多孔包被板，缓冲液，牛IgG标准溶液，抗牛IgG的多克隆和高特异性单克隆抗体，酶标记的羊抗鼠抗体，洗涤液所组成。

2.一种根据权利要求1所述检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒的检测方法，包括免疫原、包被抗体和单克隆抗体的制备及样本前处理，其特征在于：

(1)抗体和抗体标记物的制备：使用牛IgG免疫新西兰大白兔，制备多克隆抗

体；使用本课题组先前报道的方法制备牛IgG的Fc片段，将其作为抗原免疫BALB/c小鼠制备抗牛IgG的Fc片段单克隆抗体；抗体制备方法参考文献进行；使用分别包被牛IgG、绵羊IgG、山羊IgG、水牛IgG的ELISA板按间接法对细胞株进行特异性筛选；使用硫酸铵沉淀法纯化抗体；抗体的辣根过氧化物酶标记按课题报道过的抗原结合位点保护标记法进行；(2)单克隆抗体的选择：5株效价较高的阳性细胞株被筛选出，并使用分别包被有1μg/m L黄牛IgG、绵羊IgG、山羊IgG、水牛IgG的ELISA板测试其特异性；表1可知，5株细胞中有3株对绵羊IgG、山羊IgG和水牛IgG产生了不同程度的交叉反应，其中6E7的交叉反应接近100%，说明不同种属具有某些相同的IgG抗原表位；李玲曾采用牛Ig G制备抗体检测水牛的Ig G含量，也从侧面证明了这种交叉反应；因此研究必须通过细胞筛选避免这种交叉反应的发生；表1显示，有2株细胞只对牛IgG产生反应，显示了良好的特异性；效价较高的2D9制备的抗体被用于后续ELISA试验；ELISA试验中抗体的特异性至关重要，目前使用比较多的特异性抗体主要是经过免疫吸附的多克隆抗体和通过随机细胞筛选制备的单克隆抗体；免疫吸附法是一种制备多克隆特异性抗体的常用方法，其将可以发生交叉反应的蛋白固定在活化树脂上，吸附多克隆抗体中可以发生交叉反应的抗体；该方法研发时间短、成本低，但是免疫吸附只能降低交叉反应，并不能消除，仍然不能满足高特异性ELISA的要求；并且如果需要避免和多个抗原的交叉，需进行多次免疫吸吸附，将放大多克隆抗体的批间差异，导致不适用于商品化试剂盒的开发；于是，通过随机细胞筛选制备单克隆抗体，就成了获得稳定且特异抗体的重要途径；课题组曾选用完整的牛IgG作为抗原免疫小鼠制备单抗，但是未获得理想的特异性抗体；其原因在于，完整的IgG具有众多的抗原决定簇；Fab片段主要是抗体的可变区，分布着同种异型和独特型抗原表位，所制备单克隆抗体可能会对同物种来源的样品产生识别差异；而Fc片段为抗体的恒定区，有多个同种型抗原表位，是区分不同种属的重要标示物；因此为了减少Fab片段的干扰，提高随机细胞株筛选的成功率，研究以Fc片段作为抗原制备单抗，分泌特异性抗体细胞株的获得率达到了40%；(3)包被抗体的确定：研究分别对两种反应模式的灵敏度进行了考察：一种是采用抗牛IgG兔多抗作为包被抗体配对酶标抗牛IgG Fc片段单抗作为二抗，另外一种是抗牛IgG Fc片段单抗作为包被抗体配对酶标抗牛IgG兔多抗作为二抗；由图1可知，这两种模式的IC_{50}分别为8.9μg/m L和4.3μg/m L，采用抗第二种反应模式(包被单抗)更为灵敏；单克隆抗体只结合蛋白上的一个表位，而多抗可和蛋白上的多个抗原表位相结合；使用多克隆抗体作为包被抗体将封闭一部分抗原上的单抗识别表位，从而使一部分抗原无法再和作为二抗的单抗相结合；而使用单克隆抗体作为包被抗体则能克服这一缺点，从而获得更高的灵敏度；所以试验采用包被单抗的方式建立ELISA方法；在孵育时间的选择上，延长样品溶液以及二抗的孵育时间能增加抗原抗体的结合量，从而获得更高的灵敏度；但是掺伪检测不同于有害物检测，不需要极低的灵敏度，反而检测时间才是最为宝贵的；所以试验所建立的方法，采用短时间孵育的方式，将ELISA的

总孵育时间缩短在50min内完成，灵敏度达到100 ng/m L。

3.根据权利要求1所述检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒的检测方法，其特征在于：所述的固相载体是多孔包被板，采用48或者96孔的多微孔包被板作为固相载体。

4.根据权利要求1所述检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒的检测方法，其特征在于：

(1)ELISA操作：每孔加纯化的抗牛IgG包被抗体100μL 4 ℃孵育过夜；第2天弃去包被液，用洗涤液洗一遍，每孔再加200μL封闭液，37℃孵育3h，倒掉封闭液；每孔加100μL的牛IgG标准溶液或样品溶液，阴性对照孔用PBS代替；37℃反应20 min，完后用PBST洗3次；每孔加入100μL辣根过氧化物酶标记的抗牛Ig G识别抗体，37℃反应20 min，完后用PBST洗3次；加底物液，37℃反应10 min，H_2SO4终止反应后上酶标仪读数；同时，采用棋盘法试验优化包被抗体和二抗的最佳稀释倍数；

其特征在于：所述试剂盒还包括A ，B ，C ，D ，E ，F试剂液、G试剂液、H试剂液、I试剂液、J试剂液；(2)ELISA检测抗体特异性：采用其他食品中常见的蛋白作考察对象，以测定孔与阴性孔OD值之比大于2.1为阳性判断标准，采用双抗夹心E LISA检测抗体与其之间的交叉反应；(3)ELISA应用于实际样品的测定：从深圳市场和网上购买多种山羊乳、水牛乳、牛乳样品，然后通过双抗夹心ELISA法定性测定样品中的牛IgG。

5.根据权利要求1所述检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒的检测方法，其特征在于：所述的固相载体是多孔包被板，采用48或者96孔的多微孔包被板作为固相载体。

一种检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 羊乳营养价值高，在国际营养界被誉为“乳中之王”。羊乳的脂肪颗粒较小，更易于人体消化吸收，而且长期饮用羊乳不会引起肥胖。羊乳中的维生素及微量元素含量也明显高于牛乳。羊乳粉是国内外营养专家一致认为最接近人乳的乳品，羊乳粉的蛋白质结构构成与人乳的基本相同，含有大量的乳清蛋白，且不含牛乳中的某些可致过敏的异性蛋白。美国、欧洲的部分国家均把羊乳视为营养佳品，欧洲鲜羊乳的售价是牛乳的7倍。

[0003] 水牛是我国南方重要的役用家畜，水牛乳也是老少皆宜的营养佳品，以水牛乳加工的乳制品如广东顺德双皮奶等更是供不应求。水牛乳乳汁浓厚，清香无腋气，味道醇厚甜美，不但乳脂肪和乳蛋白含量高，乳质佳，还富含锌、铁等矿物元素，且易于吸收，脂肪球大，香味浓，既可加工成灭菌乳、酸乳供人们食用，也可加工成乳粉、炼乳、乳油等多种制品满足人们的不同需要。

[0004] 羊乳和水牛乳作为乳制品的补充，越来越受到消费者的推崇，但是随着其市场的扩大，也出现了有关羊乳和水牛乳质量的问题。由于牛乳较羊乳和水牛乳价格便宜，一些不法商贩在羊乳或水牛乳中掺牛乳成份以此来欺骗消费者。虽然羊乳、水牛乳与普通牛乳营养成分不同，但表观理化性质相似，在羊乳和水牛乳中掺入普通牛乳靠感官和一般理化分析难以辨别。目前报道用于羊乳和水牛乳的乳源性掺假的非免疫学方法包括气相色谱、液相色谱、聚丙烯凝胶电泳，毛细管电泳和PCR技术等，但这些方法均操作繁琐，检测时间长。以特征蛋白为分析目标的酶联免疫检测(ELISA)以其简单、快速和高通量等优点成为乳品掺伪研究的热点方法。但是这些方法基本都基于乳品的高丰度蛋白，如酪蛋白和β-乳球蛋白，这些方法可以高灵敏度的检测使用羊乳中的掺伪情况，但是由于牛和水牛亲缘关系较近，所制备的抗体易于和水牛乳蛋白产生交叉反应，因此不能检测掺伪的水牛乳。IgG以其某些特有的抗原表位，成为反映物种属性的标志蛋白，而液态乳中IgG含量高，容易被检出，使得以其作为目标检测物区分羊乳和水牛乳中掺伪牛乳成为可能。试验通过制备特异性识别牛IgG Fc片段的同种型表位的单克隆抗体，建立了水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的双抗夹心ELISA方法。

发明创造内容

[0005] 本发明的目的是提供一种检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒。

[0006] 本发明所提供的检测检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒，包括包括免疫原、包被抗体和单克隆抗体的制备及样本前处理。

[0007] 为了更方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括A ，B ，C ，D ，E ，F试剂液、G试剂液、H试剂液、I试剂液、J试剂液。

[0008] 所述A ，B ，C ，D ，E ，F试剂液为牛IgG标准溶液。

[0009] 所述G试剂液为酶标二抗。

[0010] 所述H试剂液为四甲基联苯胺。

[0011] 所述I试剂液为PBS洗涤液。

[0012] 所述J试剂液为终止液。

[0013] 可作为固定抗体与载体蛋白的偶联物的载体的物质很多，如聚苯乙烯等。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

[0014] 本发明的检测原理为分别以牛IgG和牛IgG的Fc片段为抗原，制备抗牛IgG的多克隆和高特异性单克隆抗体，并将以此蛋白作为包被抗体，构建双抗夹心ELISA方法，显色后终止，测定样品吸光值，该值与样品中伪牛乳含量呈正相关，与标准曲线比较即可得出伪牛乳的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

[0015] 本发明主要采用直接竞争ELISA方法定性或定量检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒，使用高特异性抗体所建立的ELISA方法检测实际样品稳定可靠，不易受基质干扰，具有较好的实际应用价值和开发成商品化试剂盒的潜力，将打破牛乳掺伪检测产品国外试剂盒垄断的局面。更重要的是，通过建立具有自主知识产权的检测方法，将为我国乳品掺伪的发生提供有效的预警技术手段，保障消费者合法权益。

附图说明

[0016] 图1 双抗夹心ELISA标准曲线。

[0017] 图2 混合乳样品的ELISA检测结果。

具体实施方式

[0018] 实施例1、抗体及酶标抗体的制备

(1)抗体和抗体标记物的制备：使用牛IgG免疫新西兰大白兔，制备多克隆抗体。使用本课题组先前报道的方法制备牛IgG的Fc片段，将其作为抗原免疫BALB/c小鼠制备抗牛IgG的Fc片段单克隆抗体。抗体制备方法参考文献进行。使用分别包被牛IgG、绵羊IgG、山羊IgG、水牛IgG的ELISA板按间接法对细胞株进行特异性筛选。使用硫酸铵沉淀法纯化抗体。抗体的辣根过氧化物酶标记按课题报道过的抗原结合位点保护标记法进行。

[0019] (2)单克隆抗体的选择：5株效价较高的阳性细胞株被筛选出，并使用分别包被有1μg/m L黄牛IgG、绵羊IgG、山羊IgG、水牛IgG的ELISA板测试其特异性。表1可知，5株细胞中有3株对绵羊Ig G、山羊IgG和水牛IgG产生了不同程度的交叉反应，其中6E7的交叉反应接近100%，说明不同种属具有某些相同的IgG抗原表位。李玲曾采用牛Ig G制备抗体检测水牛的IgG含量，也从侧面证明了这种交叉反应。因此研究必须通过细胞筛选避免这种交叉反应的发生。表1显示，有2株细胞只对牛IgG产生反应，显示了良好的特异性。效价较高的2D9制备的抗体被用于后续ELISA试验。ELISA试验中抗体的特异性至关重要，目前使用比较多的特异性抗体主要是经过免疫吸附的多克隆抗体和通过随机细胞筛选制备的单克隆抗体。免疫吸附法是一种制备多克隆特异性抗体的常用方法，其将可以发生交叉反应的蛋白固定在活化树脂上，吸附多克隆抗体中可以发生交叉反应的抗体。该方法研发时间短、成本低，但是免疫吸附只能降低交叉反应，并 不能消除，仍然不能满足高特异性ELISA的要求。并且如

果需要避免和多个抗原的交叉，需进行多次免疫吸吸附，将放大多克隆抗体的批间差异，导致不适用于商品化试剂盒的开发。于是，通过随机细胞筛选制备单克隆抗体，就成了获得稳定且特异抗体的重要途径。课题组曾选用完整的牛IgG作为抗原免疫小鼠制备单抗，但是未获得理想的特异性抗体。其原因在于，完整的IgG具有众多的抗原决定簇。Fab片段主要是抗体的可变区，分布着同种异型和独特型抗原表位，所制备单克隆抗体可能会对同物种来源的样品产生识别差异。而Fc片段为抗体的恒定区，有多个同种型抗原表位，是区分不同种属的重要标示物。因此为了减少Fab片段的干扰，提高随机细胞株筛选的成功率，研究以Fc片段作为抗原制备单抗，分泌特异性抗体细胞株的获得率达到了40%。

[0020] (3) 包被抗体的确定：研究分别对两种反应模式的灵敏度进行了考察：一种是采用抗牛IgG兔多抗作为包被抗体配对酶标抗牛IgG Fc片段单抗作为二抗，另外一种是抗牛IgG Fc片段单抗作为包被抗体配对酶标抗牛IgG兔多抗作为二抗。由图1可知，这两种模式的IC_{50}分别为8.9μg/m L和4.3μg/m L，采用抗第二种反应模式(包被单抗)更为灵敏。单克隆抗体只结合蛋白上的一个表位，而多抗可和蛋白上的多个抗原表位相结合。使用多克隆抗体作为包被抗体将封闭一部分抗原上的单抗识别表位，从而使一部分抗原无法再和作为二抗的单抗相结合。而使用单克隆抗体作为包被抗体则能克服这一缺点，从而获得更高的灵敏度。所以试验采用包被单抗的方式建立ELISA方法。

[0021] 在孵育时间的选择上，延长样品溶液以及二抗的孵育时间能增加抗原抗体的结合量，从而获得更高的灵敏度。但是掺伪检测不同于有害物检测，不需要极低的灵敏度，反而检测时间才是最为宝贵的。所以试验所建立的方法，采用短时间孵育的方式，将ELISA的总孵育时间缩短在50min内完成，灵敏度达到100 ng/m L。

[0022] 根据权利要求1所述检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒的检测方法，其特征在于：所述的固相载体是多孔包被板，采用48或者96孔的多微孔包被板作为固相载体。

[0023] 实施例2、检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒

(1)检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒的结构

该试剂盒主要由盒体、铝膜真空包装96/40孔孔酶标板、A ，B ，C ，D ，E ，F试剂液、G试剂液、H试剂液、I试剂液、J试剂液。酶标板由塑料支架和各自分开的带孔的塑料条组成。

[0024] (2)所用试剂的配制

A ，B ，C ，D ，E，F试剂液：牛Ig G标准溶液，其浓度分别为0、0.01、0.1、1、10、100μg/mL。

[0025] 所述G试剂液为酶标二抗。

[0026] 所述H试剂液为四甲基联苯胺。

[0027] 所述I试剂液为PBS洗涤液。

[0028] 所述J试剂液为终止液。

[0029] 实施例3、样品检测

每孔加纯化的抗牛IgG包被抗体100μL 4 ℃孵育过夜。第2天弃去包被液，用洗涤液洗一遍，每孔再加200μL封闭液，37℃孵育3 h，倒掉封闭液。每孔加100μL的牛IgG标准溶液或样品溶液，阴性对照孔用PBS代替。37℃反应20 min，完后用PBST洗3次。每孔加入100μL辣根

过氧化物酶标记的抗牛Ig G识别抗体，37℃反应20 min，完后用PBST洗3次。加底物液，37℃反应10 min，H_2SO4终止反应后上酶标仪读数。同时，采用棋盘法试验优化包被抗体和二抗的最佳稀释倍数。

[0030] 实施例4、试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度

1.试剂盒灵敏度试验

将2种不同杀菌工艺的牛乳样品按不同比例掺入水牛乳中进行ELISA检测。图2显示，试验所建立的方法对巴氏杀菌乳灵敏度较好，巴氏杀菌牛乳在混合乳中的含量在0.2%时即可被检出，UHT灭菌牛乳由于经过高温处理会使部分IgG变性，导致低于1.0%的掺入量后，检测结果为阴性。但是实际上为了谋取非法利益，掺伪产品的掺入量将远高于1.0%，所以1.0%的检出限仍能满足实际检测工作的需要。

[0031] 2.抗体的交叉反应

采用ELISA方法评估抗体对几种食品中常见蛋白和干扰物的交叉反应。由表2可知，该方法特异性良好，对食品几种常见的蛋白无交叉反应，不易出现结果误判。

[0032] 3.方法的添加回收率

液态乳不需要经过复杂的前处理，只需要12000 r/min离心5 min除去脂肪即可用于ELISA检测，试验分别在山羊乳、绵羊乳和水牛乳中添加牛IgG，结果见

表3。表3表明，该方法的平均回收率在98.7%，平均相对标准偏差为9.9，最大值不超过12%，说明该方法准确度高，稳定性好。

[0033] 表1 间接ELISA测定细胞上清抗体的交叉反应

细胞株编号	ABS			
	牛 IgG	山羊 IgG	绵羊 IgG	水牛 IgG
1F6	2.987	1.806	1.670	1.952
2D9	3.064	0.138	0.097	0.122
2E6	2.621	1.342	1.032	2.081
4E8	2.026	0.106	0.132	0.105
6E7	2.752	2.632	2.403	2.598
注：（1）所有细胞上清的稀释倍数为 100 倍。				

表2 与各蛋白的交叉反应率

反应物	$IC_{50}/\mu g\cdot mL^{-1}$	交叉反应率/%
牛IgG	9.3	100
A-酪蛋白	$>10^4$	<1.0
β-酪蛋白	$>10^4$	<1.0
κ-酪蛋白	$>10^4$	<1.0
γ-酪蛋白	$>10^4$	<1.0
A-乳白蛋白	$>10^4$	<1.0
乳铁蛋白	$>10^4$	<1.0
B-乳球蛋白	$>10^4$	<1.0
山羊IgG	$>10^4$	<1.0

表3 方法的添加回收率

样品	添加量/μg•g^{-1}	回收量±标准偏差/μg•g^{-1}	回收率/%	相对标准偏差/%
山羊乳	100	96±10	96	10.4
	10.0	98±1.1	98	11.2
绵羊乳	100	102±9	102	8.8
	10.0	97±0.8	97	8.2
水牛乳	100	95±9	95	9.5
	10.0	10.4±1.2	104	11.5
平均值			98.7	9.9
注：（1）由于未在国内购买到液态绵羊乳，试验使用的绵羊乳样品是绵羊乳粉的复原乳。				

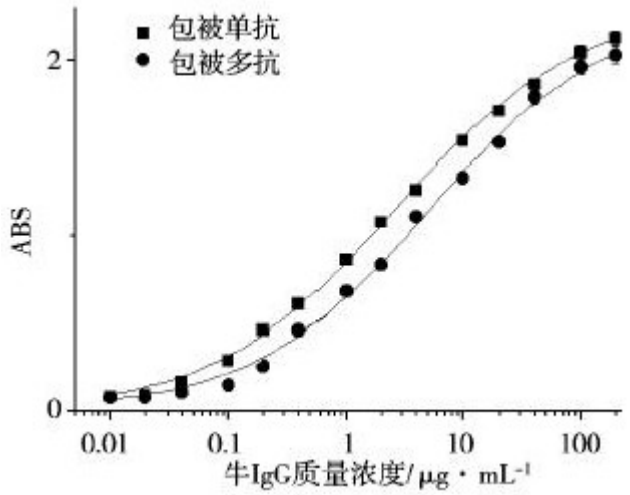

包被单抗
包被多抗
ABS
2
0
0.01
0.1
1
10
100
牛IgG质量浓度/μg · mL⁻¹

图1

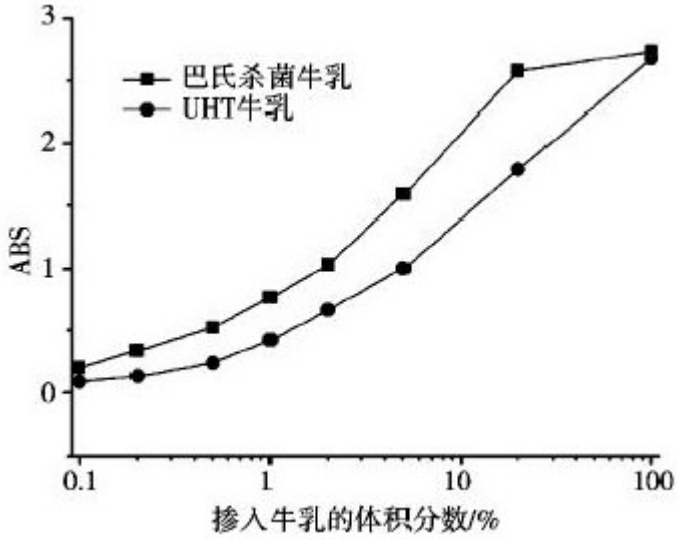
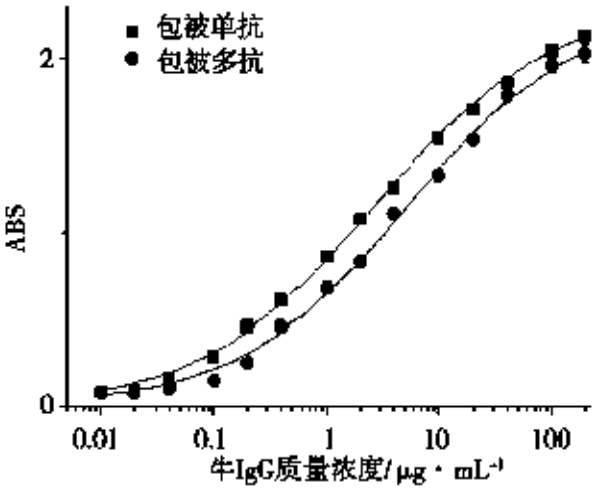

巴氏杀菌牛乳
UHT牛乳
ABS
3
2
1
0
0.1
1
10
100
掺入牛乳的体积分数/%

图2

专利名称(译)	一种检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN108226513A	公开(公告)日	2018-06-29
申请号	CN201611159873.2	申请日	2016-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 张淑雅 立雯馨		
发明人	洪霞 张淑雅 立雯馨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/531 G01N33/54393		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测水牛乳和羊乳中掺伪牛乳的酶联免疫试剂盒，包括包被的抗牛IgG的多克隆和高特异性单克隆抗体和以牛IgG和牛IgG的Fc片段为抗原。本发明使用高特异性抗体所建立的ELISA方法检测实际样品稳定可靠，不易受基质干扰，具有较好的实际应用价值和开发成商品化试剂盒的潜力，将打破牛乳掺伪检测产品国外试剂盒垄断的局面。更重要的是，通过建立具有自主知识产权的检测方法，将为我国乳品掺伪的发生提供有效的预警技术手段，保障消费者合法权益。