



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107436351 B

(45)授权公告日 2020.04.17

(21)申请号 201710638818.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.07.31

G01N 33/535(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 21/31(2006.01)

申请公布号 CN 107436351 A

审查员 李倩

(43)申请公布日 2017.12.05

(73)专利权人 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六街88号生物医药园E1-506室

(72)发明人 杨春江 莫勋 于在江 赵荣茂

吴迪 马孝斌 刘彩娟

(74)专利代理机构 北京圣州专利代理事务所

(普通合伙) 11818

代理人 王振佳

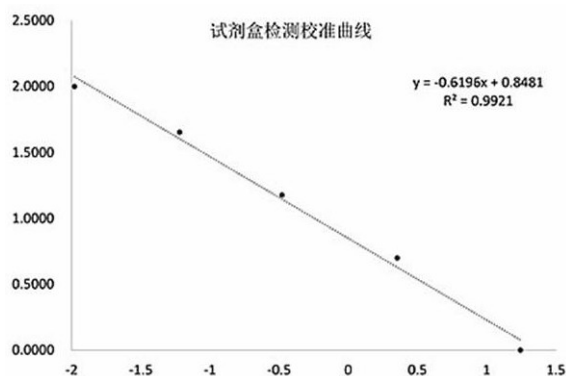
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种生鲜乳中复原乳掺假检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

一种检测生鲜乳中掺有复原乳的快速检测试剂盒,其特征在于,试剂盒包括以下成分:1)胆固醇氧化物系列标准品;2)包被有包被原的酶标板;3)特异性结合物溶液;4)酶标记物溶液;5)显色底物;6)终止液;7)浓缩洗液。其中,所述的胆固醇氧化物为7-酮基胆固醇、7 α 羟基胆固醇、25 α 羟基胆固醇的任何一种;所述包被原为上述任何一种化合物与载体蛋白偶联的包被原;所述特异性结合物为上述化合物的相应单克隆抗体或者多克隆抗体,或者是能与上述化合物特异性结合的蛋白,如胆固醇氧化物及衍生物结合蛋白(oysterol binding protein,OBP)。针对当前乳品质量监管的复杂形势,利用本发明可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。



1. 一种检测生鲜乳中掺有复原乳的快速检测试剂盒,通过检测样本中的7-酮基胆固醇而判定样本是否掺有复原乳,其复原乳掺假检测限为0.5%,所述试剂盒特征在于,包括以下成分:

- 1) 7-酮基胆固醇标准品6瓶,浓度分别为:0、1、5、15、45、100 $\mu\text{g}/\text{L}$;
- 2) 包被有包被原的酶标板,所述包被原为7-酮基胆固醇与琥珀酸酐的反应产物7-kc-SA与卵清蛋白的偶联物;免疫原为7-kc-SA与血蓝蛋白的偶联物;
- 3) 特异性结合物溶液:7-酮基胆固醇特异性单克隆抗体;
- 4) 酶标记物溶液:酶标的OBP单克隆抗体或者OBP多克隆抗体;
- 5) TMB显色底物;
- 6) 终止液:低浓度硫酸溶液;
- 7) 浓缩洗液:添加有吐温-20的PBS溶液;
- 8) 生鲜质控品:生鲜牛乳;
- 9) 复原乳质控品:复原牛乳;

所述7-酮基胆固醇与琥珀酸酐的反应产物7-kc-SA的合成过程为:称取7-酮基胆固醇100mg,溶解于20mLDMF中,加入琥珀酸酐25mg、无水吡啶50mL,加热回流反应24h,采用薄层色谱监测反应进程,最后减压蒸馏出去有机溶剂,所得即为半抗原7-kc-SA,合成所用7-酮基胆固醇与琥珀酸酐的摩尔比为1:1;

7-酮基胆固醇抗体的制备及纯化:将7-kc-SA与KLH(血蓝蛋白)偶联抗原按照250 $\mu\text{g}/\text{每只}$ 的量,与等量佐剂乳化后,皮下多点注射免疫若干只新西兰兔,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,筛选灵敏度合适的血清作为ELISA检测试剂盒用的抗体,制备好的抗体经过饱和硫酸铵沉淀后,以ProteinG亲和层析柱纯化,测定蛋白浓度后分装冻存;

酶标抗体的制备:

- (1) 称取HRP25mg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SephadexG-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;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 $^{\circ}\text{C}$ 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,用萘氏试剂检测合格,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;

试剂盒的使用方法为:

- (1) 将浓度分别为0、1、5、15、45、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的7-酮基胆固醇标准品以50 μL 每孔加入酶标板,同时准备好的样品、质控品也按照此量加入;
- (2) 加入特异性单克隆抗体50 μL 每孔,室温在19-25 $^{\circ}\text{C}$,孵育30min,取出后以PBST洗板3次,拍干;

- (3) 加入HRP酶标二抗50 μ L每孔,室温孵育15min,洗板3次,拍干;
 - (4) 加入TMB单组份显色底物100 μ L每孔,室温孵育15min;
 - (5) 加入终止液50 μ L,以酶标仪450/630nm读取吸光度值;
 - (6) 以数据分析软件计算检测结果。
2. 如权利要求1所述的检测试剂盒在检测生鲜乳中掺复原乳的应用。

一种生鲜乳中复原乳掺假检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于乳品安全检测领域,涉及一种生鲜乳中掺有复原乳的检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 牛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。生鲜牛乳中含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素和微量元素等,特别适合老人、儿童等消化吸收。

[0003] 近些年来,受到进口乳品的大量倾销,国内生鲜乳价格上涨等因素,部分生产企业为了降低成本,将乳粉溶解复原后添加至普通生鲜乳中作为纯生鲜乳销售,严重地影响了国内乳业的正常发展,对奶牛养殖和牛奶生产造成了较大的负面影响,因此非常有必要建立快速方便的检测方法,对生鲜乳中掺有复原乳检测,以确保优质生鲜乳的品质,维护市场秩序。

[0004] 目前生鲜乳中复原乳掺假检测的指标主要是以牛乳加热过程中产生的糠氨酸为主,检测方法有高效液相色谱法、液相色谱质谱联用法、荧光分光光度法等。这些方法的缺陷在于所需设备昂贵、操作繁琐、复杂,无法在基层实验室开展,特别是中小型的乳品加工企业、奶站等。如发明专利201510788655.4中公开的高效液相色谱法检测糠氨酸时,有机试剂、仪器设备等相当复杂,无法作为快速方法现场检测应用;发明专利201510404963.2中公开的液相色谱串联质谱法也有类似缺陷。

[0005] 研究表明,当新鲜牛乳经过高温处理后,其中的胆固醇会因受热氧化等发生化学反应生成一系列氧化代谢物,未经高温处理的生鲜乳则含量甚微。目前乳粉的主要加工工艺是将生鲜乳经高温喷粉干燥获得,因此其中的胆固醇含量以及胆固醇代谢物含量与生鲜乳有明显差异。通过合适的方法检测此差异并与生鲜乳和乳粉质控样本对比,即可判断检测样本中是否添加有复原乳。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种快速检测生鲜乳中掺有复原乳的快速检测试剂盒,该试剂盒可以在较短时间内检测出生鲜乳中是否添加复原乳,并与试剂盒中提供的参考样品相比给出半定量参考结果。

[0007] 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。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明提供一种快速检测生鲜乳中复原乳掺假的试剂盒,包括:

[0009] 1)胆固醇氧化物系列标准品;

[0010] 2)包被有包被原的酶标板;

[0011] 3)特异性结合物溶液;

[0012] 4) 酶标记物溶液;

[0013] 5) 显色底物;

[0014] 6) 终止液;

[0015] 7) 浓缩洗液。

[0016] 其中,所述的胆固醇氧化物为7-酮基胆固醇、7 α 羟基胆固醇、25 α 羟基胆固醇的任何一种;

[0017] 所述包被原为上述任何一种化合物与载体蛋白偶联的包被原;

[0018] 所述特异性结合物为上述化合物的相应单克隆抗体或者多克隆抗体,或者是能与上述化合物特异性结合的蛋白,如胆固醇氧化物及衍生物结合蛋白(oysterol binding protein,OBP)。

[0019] 当特异性结合物为鼠源单克隆抗体时,所述酶标记物为羊抗鼠或者兔抗鼠等酶标记二抗,其中的标记酶可为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶及荧光素等常用标记;当特异性结合物为OBP时,所述酶标记物为酶标的OBP特异性单克隆抗体或者OBP多克隆抗体;

[0020] 所述显色底物为与酶标记物相匹配的显色底物液,比如与辣根过氧化物酶相匹配的TMB显色底物等;

[0021] 所述终止液为低浓度硫酸溶液或者相应的具有终止酶反应的化学物质;

[0022] 所述浓缩洗液为添加有吐温-20的PBS溶液。

[0023] 此外,还可根据实验材料选择将特异性抗体包被在酶标板上,以标准品和酶标小分子进行竞争ELISA反应。

[0024] 另外还可以将羊抗鼠或者羊抗兔抗体预先包被在酶标板上之后继续加入相应的特异性抗体继续包被,提高反应的灵敏度。

[0025] 本发明还涉及一种使用检测试剂盒检测生鲜乳中掺有复原乳的检测方法,其中包括如下步骤:

[0026] 第一步,将待测生鲜乳、生鲜乳质控品、复原乳质控品按照一定比例稀释备用;

[0027] 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;

[0028] 第三步,利用分析软件分析数据,将检测样本与质控品对照;

[0029] 第四步,根据数据分析结果判定样本中是否添加有复原乳。

[0030] 与传统的仪器分析方法相比,本发明具有以下有益效果:

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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^{-9} 水平,单次检测成本不超过20元。

[0034] 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复原乳掺入量。没有酶标仪,可以将样本孔的显色与生鲜乳和复原乳质控品的显色相比较,定性判定样本是否掺有复原乳。

[0035] 本发明提供的生鲜乳中掺有复原乳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

[0036] 图1为7-酮基胆固醇化学结构改造图,其中A为7-酮基胆固醇,B为琥珀酸酐,C为合成的半抗原。

[0037] 图2为试剂盒检测的校准曲线。

具体实施方式

[0038] 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。

[0039] 实施例1: 7-酮基胆固醇抗原的合成

[0040] 如图1中A所示,7-酮基胆固醇(7-kc)化学结构式简单,分子量仅为400.64,没有免疫原性,需要与载体蛋白偶联后才能作为抗原使用。根据其结构特点,选择利用琥珀酸酐法与载体蛋白偶联,具体操作为:

[0041] 称取7-酮基胆固醇(sigma,货号:C2394)100mg,溶解于20mL DMF中,加入琥珀酸酐25mg、无水吡啶50mL,加热回流反应24h,采用薄层色谱监测反应进程。最后减压蒸馏除去有机溶剂,所得即为半抗原7-kc-SA。

[0042] 偶联抗原可以是常用载体蛋白,常见的有血蓝蛋白、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。

[0043] 参考前人研究(赵朋玲等,2010)采用活化酯法利用二环己基碳二亚胺(DCC)和N-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)将所合成的7-kc-SA分别于载体蛋白KLH和OVA偶联。所得反应物透析后备用。

[0044] 7 α 羟基胆固醇、25 α 羟基胆固醇等的抗原合成操作基本类似。透析好的抗原经紫外分光光度计检测测定小分子与载体蛋白偶联率后备用。

[0045] 实施例2: 7-酮基胆固醇抗体的制备及纯化

[0046] 将7-kc-SA与KLH偶联抗原按照250 μ g/每只的量,与等量佐剂乳化后,皮下多点注射免疫若干只新西兰兔,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。筛选灵敏度合适的血清作为ELISA检测试剂盒用的抗体。

[0047] 此外,还可用制备的偶联抗原免疫Ba1b/C小鼠,按照常规方法筛选获得能与免疫抗原有反应且灵敏度合适的单克隆抗体。

[0048] 制备好的抗体经过饱和硫酸铵沉淀后,以Protein G亲和层析柱纯化,测定蛋白浓度后分装冻存。

[0049] 实施例3:胆固醇氧化物及衍生物结合蛋白(OBP)的重组表达

[0050] 根据Genbank公布的序列,以基因工程手段克隆表达OBP蛋白,并纯化后备用,具体操作参考《分子克隆实验指南》(J. 萨姆布鲁克等著,科学出版社,2015)。

[0051] 实施例4:OBP特异性抗体的制备及纯化

[0052] 将纯化的OBP蛋白按照250 μ g/每只的量,与等量佐剂乳化后,皮下多点注射免疫若干只新西兰兔,免疫间隔为2周,3次免疫后以直接ELISA测定血清效价,5次免疫后第10天,处死动物,采集血清,以饱和硫酸铵沉淀后,经蛋白G亲和层析纯化后备用。

[0053] 实施例5:酶标抗体的制备

[0054] 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:

[0055] (1)称取HRP(sigma,货号:V900503)25mg溶于1.25%戊二醛溶液中,室温静置过夜。

[0056] (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。

[0057] (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。

[0058] (4)用1M pH9.5碳酸缓冲液0.25ml,继续搅拌3小时。

[0059] (5)加0.2M赖氨酸0.25ml,混匀后,置室温2小时。

[0060] (6)在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4 $^{\circ}$ C 1小时。

[0061] (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。

[0062] (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(用萘氏试剂检测),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。

[0063] 利用HRP酶标记兔多克隆抗体方法同上操作。

[0064] 实施例6:酶联吸附检测方法的操作

[0065] (1)以OVA偶联抗原包被好酶标板备用,检测时将待测样本以去离子水20倍稀释备用,生鲜乳和复原乳质控品也以同样比例稀释。

[0066] (2)将7-酮基胆固醇标准品按照0、1、5、15、45、100 μ g/L梯度浓度准备后,以50 μ L每孔加入酶标板,同时准备好的样品、质控品也按照此量加入。

[0067] (3)加入特异性单克隆抗体50 μ L每孔,室温(19-25 $^{\circ}$ C)孵育30min,取出后以PBST洗板3次,拍干。

[0068] (4)加入HRP酶标二抗50 μ L每孔,室温孵育15min,洗板3次,拍干。

[0069] (5)加入TMB单组份显色底物100 μ L每孔,室温孵育15min。

[0070] (6)加入终止液50 μ L,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。图2为方法的双对数(Logit-Log)校准曲线示例,其中X轴是浓度对数,Y轴是Logit值。

[0071] 例如:生鲜乳显色OD值为1.432,复原乳对照显色值为0.619,样本显色值介于两者之间,表示样本中有可能添加有复原乳;如果样本检测值大于1.432,则表明没有添加复原乳。针对有复原乳添加的样本,可以进一步以传统的高效液相色谱法、液相色谱质谱联用法仲裁检测。

[0072] 实施例7:实际样本的检测

[0073] 实验室内准备生鲜乳及复原乳,并将复原乳以0.5%、1%、10%、20%等比例添加后以本发明所列方法测定,具体结果如下表。

[0074] 表1 实际添加样本检测结果

[0075]

样本添加浓度(%)	7-kc 检出结果 ($\mu\text{g/L}$)
0.5	113.4
1.0	118.1
10.0	145.2
20.0	161.6
生鲜乳对照	108
复原乳对照	325

[0076] 由结果可知,当添加浓度为1%时,方法检测结果较生鲜乳对照有差异;添加浓度为10%时,添加样本检测结果与对照差异显著。生产实际中,为了获取较大的经济利益,复原乳添加或者利用的比例较大,因此本方法完全可以满足实际检测的需要。

[0077] 在整个说明书中,“一个”或“一”实施例的表述表示,与该实施例关联描述的具体特征、结构、或特性包括在本发明的至少一个实施例中。因此,在整个说明书中的各个地方中出现的术语“在一个实施例中”或“在一实施例中”不必须都参考相同实施例。

[0078] 此外,具体特征、结构、或特性可以以合适的方式组合在一个或多个实施例中。可以认识到,在不脱离它的精神和范围情况下,本领域的技术人员可以以不同于上述方式的方式实施本发明,并且可以简化变形。

[0079] 在本说明书中的任何讨论或文献、设备、动作或知识被包括来解释本发明的内容。不应该看做是省略,任何材料形成在本说明书附属于的本申请的提交日或之前,相关领域中、任何国家中的现有技术基础或已知一般知识的一部分。

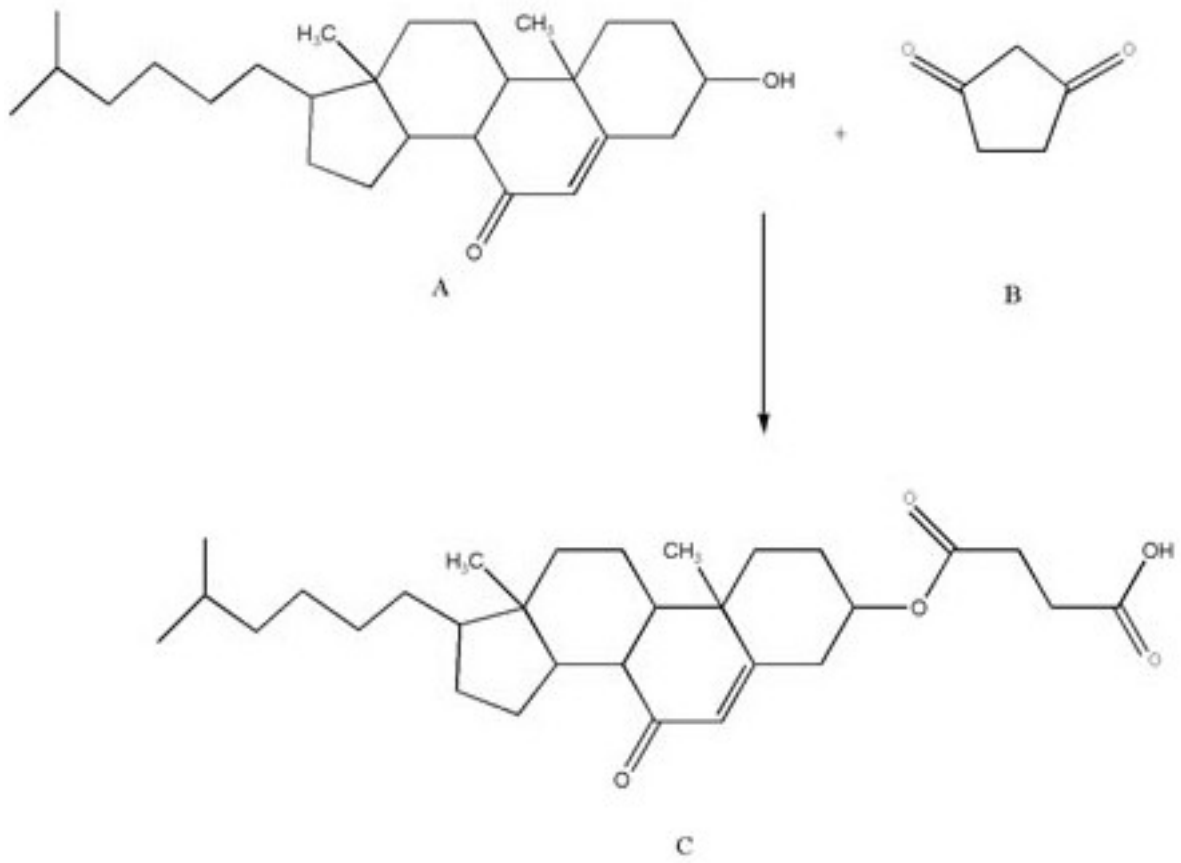


图 1

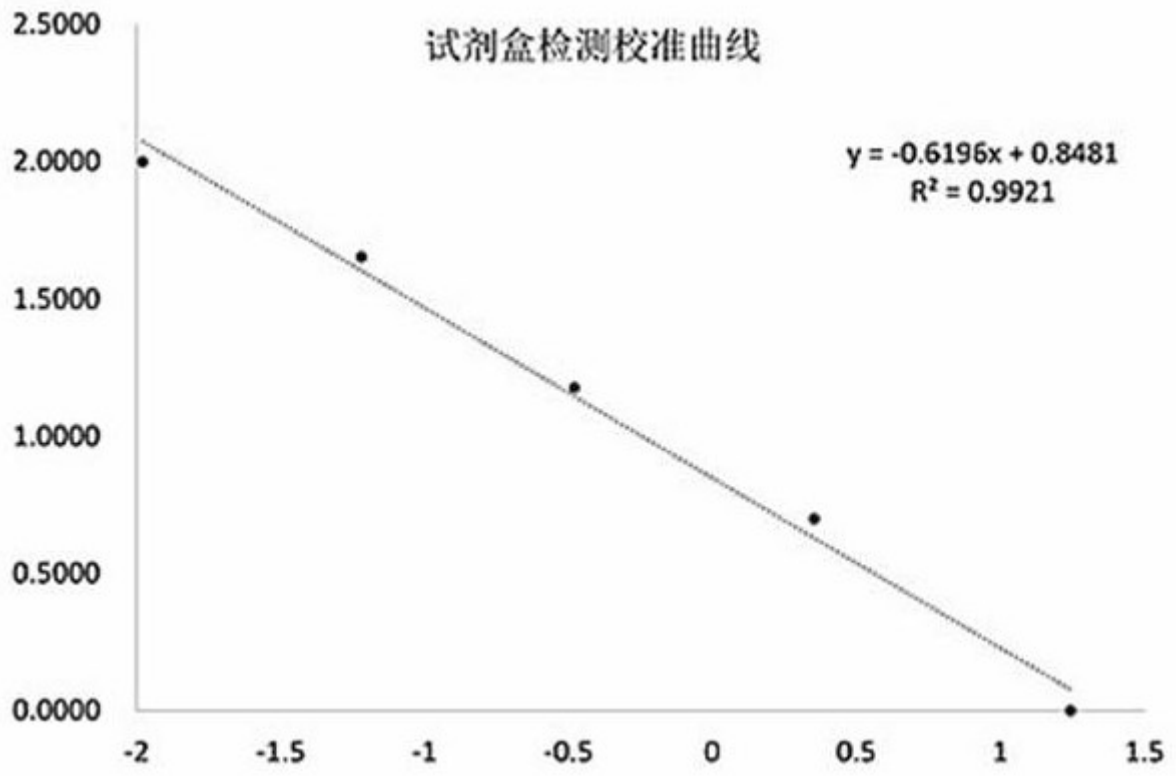


图 2

专利名称(译)	一种生鲜乳中复原乳掺假检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN107436351B	公开(公告)日	2020-04-17
申请号	CN2017110638818.X	申请日	2017-07-31
[标]发明人	杨春江 莫勋 于在江 赵荣茂 吴迪 马孝斌 刘彩娟		
发明人	杨春江 莫勋 于在江 赵荣茂 吴迪 马孝斌 刘彩娟		
IPC分类号	G01N33/535 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/535		
代理人(译)	王振佳		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN107436351A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测生鲜乳中掺有复原乳的快速检测试剂盒，其特征在于，试剂盒包括以下成分：1) 胆固醇氧化物系列标准品；2) 包被有包被原的酶标板；3) 特异性结合物溶液；4) 酶标记物溶液；5) 显色底物；6) 终止液；7) 浓缩洗液。其中，所述的胆固醇氧化物为7-酮基胆固醇、7 α 羟基胆固醇、25 α 羟基胆固醇的任何一种；所述包被原为上述任何一种化合物与载体蛋白偶联的包被原；所述特异性结合物为上述化合物的相应单克隆抗体或者多克隆抗体，或者是能与上述化合物特异性结合的蛋白，如胆固醇氧化物及衍生物结合蛋白（oxysterol binding protein，OBP）。针对当前乳品质量监管的复杂形势，利用本发明可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

