

羊乳中牛乳成分快速检测方法的建立

赵芳¹, 张欢^{2*}

(1. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 广东深圳 518045; 2. 抚顺市产品质量监督检验所, 辽宁抚顺 113006)

摘要 [目的]建立一种快速简便检测羊原乳中牛原乳成分的方法。[方法]以牛 IgG 为检测对象,建立了检测羊乳中牛乳成分的竞争免疫层析法。[结果]试验建立的方法可以检测出含有 2% 牛原乳的羊原乳,受基质干扰较小。[结论]该方法具有简便快捷等特点,可以用于羊原乳中牛原乳成分的快速检测。

关键词 羊原乳;牛原乳;牛 IgG;竞争免疫层析法

中图分类号 S879.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)32-11496-02

Use of Competitive Immunochromatographic Method for the Detection of Adulteration of Goats' Milk

ZHAO Fang¹, ZHANG Huan^{2*} (1. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Food Inspection and Quarantine Technology Center, Shenzhen, Guangdong 518067; 2. Fushun City Product Quality Supervision and Inspection, Fushun, Liaoning 113006)

Abstract [Objective] Bovine IgG was used as detection protein and a competitive immunochromatography assay was established for the detection of adulteration of goats' milk. [Method] A lateral-flow (LF) device was applied to detect bovine IgG in the goats' milk. [Result] The detection limits of the method was 2% cows' milk adulteration of goat. [Conclusion] The lateral-flow (LF) device performance makes it suitable for development as a kit for use in routine surveillance of milk.

Key words Goat milk; Cow milk; Bovine IgG; Lateral-flow (LF) device

近年来,羊乳以营养丰富、易于吸收、不易导致过敏等优点得到消费者的广泛认可,成为我国乳制品消费市场中增长速度最快的产品。最近 10 年我国羊乳产业发展迅速,涌现出陕西、山东、河南等奶山羊养殖大省和一批羊乳加工龙头企业,羊乳业已经成为我国乳业的重要组成部分。2009 年,我国羊乳产量 121.79 万 t,占奶类总产量的 3.3%。

羊乳制品主要销往长三角、珠三角等地区,年产值数十亿元。由于羊乳营养价值较高且量少,其市场零售价是牛乳的 1.5~2.0 倍。企业收购羊乳的价格比牛乳高约 20%。因而,羊乳掺假现象屡见不鲜,严重损害了消费者的利益。常见的羊乳掺假方式有掺水、掺牛乳、掺蔗糖、掺淀粉、掺米汤、掺硫酸盐、掺豆浆、掺水解动物蛋白等。由于我国奶羊的饲养多采用“公司+基地+农户”的经营模式,使得羊乳掺假现象更为严重,因而有必要采取各种有效的手段打击羊乳掺假现象,维护消费者的合法权益。

免疫学检测以其高特异性、高灵敏性、简便易行等优势已成为一种重要的快速检测方法。笔者针对羊乳中掺入牛乳成分这一问题建立了一种快速简便的免疫层析检测方法,为羊乳产品的生产销售提供一种行之有效的质控方法。

1 材料与方法

1.1 材料 兔抗牛 IgG、牛 IgG,购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)、牛血清白蛋白(BSA)、蔗糖、柠檬酸钠、碳酸钾,购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Tween-20、NaCl、Tris、NaOH,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;氯金酸,购自国药集团化学试剂有限公司。PVC(聚氯乙烯)底板、8964 玻璃纤维膜、吸水纸、硝酸纤维素膜(Sartorius 95),购自上海捷宁生物科技有限公司。1

份山羊奶采集自陕西渭南农户,1 份绵阳奶采集自陕西渭南某农户,1 份牛奶(荷斯坦奶牛)采集自辽宁锦州某奶牛场,1 份超高温灭菌乳购自抚顺某超市。豆浆自制:取 100 g 黄豆,加 1 000 ml 水,用九阳植物奶牛豆浆机磨成豆浆,用纱网滤除豆渣,备用。

1.2 方法

1.2.1 纳米金颗粒的制备^[1]。将 100 ml 超纯水煮沸,加入 1 ml 1% 氯金酸,快速搅拌,加入 1 ml 1% 柠檬酸钠,继续快速搅拌 30 s,低速搅拌 14.5 min,按照 3 μl/ml 的比例加入 0.2 mol/L 碳酸钾,混匀,备用。

1.2.2 金标记牛 IgG。取 10 ml 胶体金颗粒,加入 30 μl 0.2 mol/L 碳酸钾,涡旋混匀;加入 10 μg 牛 IgG,涡旋混匀,室温静置 15 min;加入 1 ml 10% BSA,涡旋混匀,室温静置 15 min;10 000 r/min 离心 10 min;加入 5 ml 复溶液[20 mmol/L Tris(pH 7.0),0.5% BSA,5% 蔗糖],重悬颗粒,备用。

1.2.3 结合垫的制备。将 6 mm 宽 8964 玻璃纤维膜浸入处理液[100 mmol/L Tris(pH 7.0),1% 蔗糖,1% BSA,0.5% Tween-20],取出,置于室温干燥过夜,备用;将处理过的 8964 玻璃纤维膜浸入金标记兔抗牛 IgG 液体中,取出,37℃过夜晾干,两端各剪掉 1 cm,备用。

1.2.4 样品垫的制备。将 10 mm 宽 8964 玻璃纤维膜浸入处理液[100 mmol/L Tris(pH 7.0),1% 蔗糖,1% BSA,0.5% Tween-20],取出,置于室温干燥过夜,备用。

1.2.5 硝酸纤维素膜。T 线:用包被液[50 mmol/L Tris(pH 7.5),3% 蔗糖]将兔抗牛 IgG 稀释至 2 mg/ml,按照 1 μl/cm 喷膜,37℃干燥 3 d,备用。C 线:将 SPA 稀释至 0.2 mg/ml,按照 1 μl/cm 喷膜,室温干燥过夜,备用。

1.2.6 试纸条组装。将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次搭接粘贴在 PVC 底板上,裁成 3.5 mm 宽的试纸条,2~8℃干燥保存。

1.2.7 检测样品。将样品用 50 mmol/L NaCl 稀释 1 倍。将

作者简介 赵芳(1981-),女,青海贵南人,工程师,硕士,从事食品安全检测研究。* 通讯作者,工程师,从事食品安全检测研究。

收稿日期 2014-09-28

试纸条平放于台面上,取 50 μl 稀释过的样品于样品垫上,3 ~ 10 min 观察结果,T、C 线均为红色时为含牛乳成分奶,只有 C 线显色时样品中不含牛乳成分或者含有低于此方法检测下限的牛乳成分,T、C 线均为不显色或者 C 线不显色时结果无效。

2 结果与分析

2.1 检测下限 向山羊奶中添加牛奶,使牛奶含量分别达到 0.1%、2%、5%、10%、20%、40%、80%、100%,用所制备的试纸条检测上述样品,每个浓度重复检测 5 次。由表 1 可知,当牛奶含量达到 2% 时即可被稳定检测出。

表 1 试纸条检测羊乳中牛乳检测下限分析			
牛奶含量	检测结果(阳	牛奶含量	检测结果
%	性/检测数)	%	(阳性/检测数)
0	0/5	20	5/5
1	3/5	40	5/5
2	5/5	80	5/5
5	5/5	100	5/5
10	5/5		

2.2 基质对检测结果的影响 分别向山羊奶中添加绵阳奶、豆浆,使之含量分别达到 0、0.75%、1.50%、3.10%、6.25%、12.50%、25.00%、50.00%、100%,用所制备的试纸条检测上述样品,每个浓度重复检测 5 次,详细结果见表 2。检测结果显示,添加绵阳奶并不会出现假阳性,而添加豆浆到 1.50% 即可出现假阳性。

表 2 基质对免疫层析检测的影响		
含量//%	绵阳奶(阳性/检测数)	豆浆(阳性/检测数)
0	0/5	0/5
0.75	0/5	0/5
1.50	0/5	3/5
3.10	0/5	3/5
6.25	0/5	4/5
12.50	0/5	5/5
25.00	0/5	3/5
50.00	0/5	5/5
100	0/5	5/5

2.3 蛋白质变性对检测结果的影响 分别往羊奶中添加煮沸的牛奶、超高温灭菌乳,使其含量分别达到 0、0.75%、1.50%、3.10%、6.25%、12.50%、25.00%、50.00%、100%,采用该研究研制的试纸条对其进行检测,检测结果均为阴性(详细见表 3)。

3 讨论

向羊乳中掺水、掺牛乳、掺蔗糖、掺淀粉、掺米汤、掺硫氰酸盐、掺豆浆、掺水解动物蛋白等严重损害了消费者的利益。目前,已有多种方法检测这一损害消费者利益的现象。主要有电泳分析^[2-3]、色谱分析^[4]、分子生物学分析^[5]、免疫学分析^[6-7]等。其中,免疫学方法以其简便、快捷、检测成本低等

表 3 蛋白质变性对检测结果的影响

含量//%	煮沸牛奶(阳性/检测数)	超高温灭菌乳(阳性/检测数)
0	0/5	0/5
0.75	0/5	0/5
1.50	0/5	0/5
3.10	0/5	0/5
6.25	0/5	0/5
12.50	0/5	0/5
25.00	0/5	0/5
50.00	0/5	0/5
100	0/5	0/5

优势成为一种重要的检测方法。目前,针对羊乳掺杂牛乳的免疫学方法主要是针对牛乳中特定蛋白进行免疫学检测,如:牛乳清蛋白^[6]、 β -酪蛋白^[8]、 γ -酪蛋白^[9]、牛 IgG^[10-11]等。该研究以牛乳中 IgG 为检测对象,建立了快速检测羊乳掺杂牛乳的竞争免疫学检测方法。该方法具有合适的检测下限,既可避免在羊乳生产过程中因容器具受牛源成分污染而引起假阳性,又可检测出人为添加牛乳到羊乳问题,而且具有较强的抗基质干扰能力(除豆浆会导致假阳性出现外),适用于羊原乳中牛原乳成分的快速检测。

参考文献

[1] FRENS G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. Nature Physical Science,1973,241:20-22.

[2] ASCHAFFENBURGA1 R,DANCEA1 J E. Detection of cows' milk in goats' milk by gel electrophoresis[J]. Journal of Dairy Research,1968,35(3):383-384.

[3] FURTADO M M. Detection of cow milk in goat milk by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. J Dairy Sci,1983,66(9):1822-1824.

[4] VELOSO A C,TEIXEIRA N,FERREIRA I M. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations[J]. J Chromatogr A,2002,967(2):209-218.

[5] RODRIGUES N P A,GIVISEIEZ P E N,QUEIROGA R C R E,et al. Milk adulteration;Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by small-holders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay[J]. J Dairy Sci,2012,95(5):2749-2752.

[6] GARCIA T,MARTIN R,RODRIGUE Z E,et al. Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-Linked immunosorbent assay[J]. Dairy Sci,1990,73(6):1489-1493.

[7] ANGUITA G,MARTIN R,GARCÍA T,et al. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein[J]. J Food Prot,1997,60(1):64-66.

[8] ANGUITA G,MARTÍN R,GARCÍA T. Indirect ELISA for detection of cow's milk in ewes' and goats' milk using a monoclonal antibody against bovin β -casein[J]. Journal of Dairy Research,1995,62:655-659.

[9] RICHTER W,KRAUSE I,GRAF C. An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese usingpoly clonal antibodies against bovine γ -caseins[J]. Chemistry and Materials Science,1997,204(1):21-26.

[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,2004,87:215-221.

[11] 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,2006,16:805-812.