

胶体金免疫层析法快速检测 配方羊奶粉中的牛 β -乳球蛋白

王士峰,姚添淇,冯荣虎,胡桂平,劳翠瑜,张世伟*

(深圳市计量质量检测研究院,广东深圳 518102)

摘要:建立了一种可快速检测配方羊奶粉中牛 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -lg)的胶体金免疫层析检测方法。通过杂交瘤技术制备 β -lg 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb),半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC_{50})为5.87 μ g/mL。将胶体金标记的 β -lg mAb 包被于金标垫, β -lg 和山羊抗小鼠 IgG 标记于硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC 膜)分别作为检测线(T 线)和质控线(C 线),开发了可检测 β -lg 的免疫层析试纸条。该试纸条对 β -lg 的检测限(limit of detection, LOD)值为50 μ g/mL,与其他基质成分均未产生有效交叉反应,对全脂山羊奶粉中掺杂脱脂牛奶粉(nonfat skim milk, NFSM)、脱盐乳清粉(desalted whey powder, DWP)和乳清蛋白粉(whey protein powder, WPP)的 LOD 值分别为5%、5%和0.1%。运用该方法对9个市售配方羊奶粉进行分析,检测结果与商品化酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒一致。该方法前处理快速简单,5 min 即可肉眼判定结果,可用于配方羊奶粉商品的现场快速检测。

关键词:牛 β -乳球蛋白,免疫层析,配方羊奶粉,掺杂

Colloidal Gold Immunochromatographic Assay for Rapid Detection of Bovine β -lactoglobulin in Goat Milk Formulas

WANG Shi-feng, YAO Tian-qi, FENG Rong-hu, HU Gui-ping, LAO Cui-yu, ZHANG Shi-wei*

(Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen 518102, China)

Abstract: The aim of this study was to develop a colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection bovine β -lactoglobulin(β -lg) in commercial goat milk formulas. Firstly, an anti- β -lg monoclonal antibody (mAb) was prepared using the hybridoma technique with 50% inhibitory concentration (IC_{50}) value of 5.87 μ g/mL. To develop an immunochromatographic test strip for detection β -lg, gold labeled β -lg mAbs were sprayed on gold conjugation pad, and nitrocellulose membrane was lined with β -lg and goat anti-mouse immunoglobulins as test line (T-line) and control line (C-line). The limit of detection (LOD) value of the test strip was 50 μ g/mL for β -lg, and no effective cross-reactivities with other matrix ingredients were observed. The LOD of adulteration of whole goat milk powder with cow's nonfat skim milk (NFSM), desalted whey powder (DWP) and whey protein powder (WPP) were 5%, 5% and 0.1%, respectively. Furthermore, 9 commercial goat milk formulas were analyzed by this assay, and the results were in accordance with that obtained by commercial enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The assay includes a rapid and simple treatment of sample, could be finished in 5 min, which could be evaluated by naked-eye, was qualified for on-site monitoring goat formula milk adulteration.

Key words: bovine β -lactoglobulin; immunochromatographic assay; goat milk formula; adulteration

中图分类号: TS252.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)15-0060-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.15.012

引文格式:王士峰,姚添淇,冯荣虎,等.胶体金免疫层析法快速检测配方羊奶粉中的牛 β -乳球蛋白[J].食品工业科技,2018,39(15):60-64.

近年来,羊奶的营养保健功效正逐渐被人们认识和接受,婴幼儿配方羊奶粉以营养丰富、不易导致过敏等优点受到消费者欢迎,成为我国乳制品中增长最快的产品^[1]。因为羊奶产量较低,且受季节波动影响,配方羊奶粉的价格也普遍高于牛奶。配方奶

粉生产过程中常需额外添加乳清粉使各种蛋白比例接近母乳水平,相比牛乳清,市场上羊乳清粉量小价高,故一些厂商在配方羊奶粉中添加牛乳清粉,且没有进行明确标识,这不仅危及整个行业的可持续发展,而且严重威胁牛奶过敏消费者的身体健康^[2]。

收稿日期:2017-11-14

作者简介:王士峰(1988-),男,硕士,研究方向:食品生物技术,E-mail:sfwang0719@163.com。

* 通讯作者:张世伟(1985-),男,硕士,高级工程师,研究方向:食品质量安全,E-mail:zsw_8506@163.com。

2016年6月8日,国家食品药品监督管理总局发布了《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》,第三十一条规定,产品名称中有动物性来源的,应当根据产品配方在配料表中如实标明使用的生乳、乳粉、乳清(蛋白)粉等乳制品原料的动物性来源^[3]。而目前却缺乏相应的检测方法。

牛 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -lg)由162个氨基酸残基组成,含5个半胱氨酸,占总乳清蛋白含量的50%,占牛奶总蛋白12%左右,可作为牛乳清粉的主要标识物^[4]。目前发表检测 β -lg方法主要包括酶联免疫分析法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[5-7]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[8]、毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)^[9]、表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)^[10]、生物传感器^[11-12]等,目前我国农业行业标准 NY/T 1663-2008 也可检测乳球蛋白的含量^[13],有厂商亦推出了可检测 β -lg的检测卡^[14]。但以上研究方法主要是将 β -lg作为一类过敏原进行检测,并未对能否检测其他非牛家畜乳制品中掺入的牛 β -lg进行研究。目前可用于检测羊乳产品中牛 β -lg的方法主要是ELISA方法^[15-16]。MASIRI等制备了可同时检测牛酪蛋白和 β -lg的胶体金试纸条,anti-酪蛋白与anti- β -lg多抗混合物包被在NC膜上作检测线1,脱脂奶粉作为检测线2,该试纸条同时应用夹心法和竞争法,对乳清分离蛋白的检测限(limit of detection, LOD)值为0.01 ppm^[17],但是并不能区分信号来自样品中的残留酪蛋白还是乳清蛋白,随着分析物浓度升高,夹心法信号强度衰减易出现假阴性。

本研究拟针对牛乳清蛋白中主要成分 β -lg制备相应的单克隆抗体,继而开发采用可快速检测牛 β -lg的胶体金竞争免疫试纸条,可方便、快速地对配方羊奶粉中的牛 β -lg进行快速检测,有效维护消费者的合法权益。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛 β -lg、 α -乳白蛋白(α -Lactalbumin, α -la)、酪蛋白钠盐、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、聚乙二醇20000(polyethylene glycol 20000, PEG20000)、鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)、抗体亚类鉴定试剂盒、氯金酸 美国Sigma公司;山羊抗小鼠IgG 美国Arista Biologicals公司;5%碱溶酪蛋白 德国Merck Millipore;PVC胶板、金标垫、吸水纸、样品垫 上海金标生物科技;硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC膜) 德国Sartorius公司;RIDASCREEN®牛奶蛋白ELISA检测试剂盒 德国R-Biopharm;BCA蛋白定量试剂盒 湖南艾佳生物科技;脱脂牛奶粉(nonfat skim milk, NFSM) 美国BD公司;生牛乳 深圳晨光乳业;全脂山羊乳粉、山羊乳清粉、脱盐乳清粉(demineralized whey powder, DWP)、乳清蛋白粉(whey protein powder, WPP) 北安宜品努卡乳业;豆浆粉(配料:东北大豆、麦芽糖浆)、杏仁露(配料:杏仁、白砂糖

等)、婴幼儿配方羊奶粉样本 购自本地超市;其他试剂 均为国产分析纯;实验用水 均为MILLIPORE超纯水;除特殊说明,实验中使用的 β -lg、酪蛋白、 α -la、NFSM、DWP和WPP均为牛属性;实验中使用的全脂山羊乳粉、山羊乳清粉经RIDASCREEN®牛奶蛋白ELISA检测试剂盒检测,牛奶成分检测结果低于最低检测限($\leq 0.5\%$)。

SynergyH1酶标仪 美国Biotek公司;XYZ3060胶体金点样系统 美国BioDot公司;HGS201可编程切条机 杭州峰航科技;V0200真空干燥箱 德国Mettler公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抗体制备及表征 常规方法建立杂交瘤细胞株^[18],牛 β -lg作为免疫原,经小鼠免疫、细胞融合、筛选能稳定分泌 β -lg单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)的细胞株。采用动物体内生产法制备腹水单抗。抗体腹水收集后采用辛酸硫酸铵联合沉淀法纯化^[19],磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)充分透析,后收集抗体用BCA蛋白定量法测定抗体浓度,使用抗体亚类鉴定试剂盒鉴别抗体亚类。

采用间接ELISA测定抗体效价:用碳酸盐包被缓冲液(0.05 mol/L, pH9.6)包被抗原(200 ng/孔),用PBS-T溶液(内含0.05% Tween20的PBS溶液)倍比稀释抗体,定义光密度(optical density, OD)值1.0左右的抗体稀释倍数为抗体效价,并作为最佳稀释度。使用间接竞争法确定抗体 IC_{50} 值:包被条件为200 ng/孔,抗体稀释度为最佳稀释度的2倍,配制牛 β -lg标准品母液10 mg/mL,再用PBS-T梯度稀释至100、50、25、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8 μ g/mL, PBS-T做空白对照进行抑制实验,以 β -lg浓度为横坐标X, OD值为纵坐标Y,利用Origin 8.0建立抗体S形抑制标准曲线,确定抗体 IC_{50} 值。使用间接竞争法确定抗体特异性,检测抗体与其他牛奶蛋白及其他常见基质蛋白的交叉反应率。计算公式为:交叉反应率(%) = $IC_{50}(\beta\text{-lg})/IC_{50}(\text{其他分析物}) \times 100$ 。

1.2.2 试纸条制备与表征 胶体金制备采用柠檬酸三钠还原法。将100 mL的0.01%氯金酸溶液加热至沸腾,在持续搅拌下快速加入2.5 mL的1%柠檬酸钠溶液持续加热15 min至颜色不再变化,停止加热,待溶液恢复到室温,用水补齐至原体积,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。确定胶体金标记抗体最适pH、最低抗体标记量^[20]。取制备好的胶体金溶液50 mL,用 K_2CO_3 调节至最适pH,在持续搅拌下加入1.2倍最低抗体标记量,继续搅拌20 min,再加入1/10体积的封闭液(10% BSA, 1% PEG20000),再搅拌20 min,10000 r/min离心浓缩后用1/5体积复溶液(含1% BSA、2%蔗糖、0.05% PEG20000、0.02% $NaNO_3$)重悬,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将金标抗体复合物以15 μ g/cm均匀喷洒到金标垫上,25 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱干燥6 h。用PBS溶液稀释 β -lg和山羊抗小鼠IgG至0.3、0.5 mg/mL,以1 μ L/cm包被在NC膜上作为检测线(T线)和质控线(C线),25 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥1 h。在PVC胶板上依次装贴样品垫、金标垫、

NC 膜和吸水纸,用切条机裁剪成 4 mm 试纸条^[18],真空干燥保存。

试纸条使用方法:将样品用水适当稀释后,用移液枪吸取 40 μL 滴加到试纸条样品垫,5 min 后裸眼判定,用水为空白对照。本研究定义可使 T 线完全消失的样品浓度或百分比浓度作为试纸条的 LOD 值。

用水梯度稀释标准品 $\beta\text{-lg}$ 母液至 500、100、50、10、5、1 $\mu\text{g/mL}$,水做空白对照,确定试纸条对 $\beta\text{-lg}$ 的 LOD 值。选用全脂山羊乳粉、山羊乳清粉、豆浆粉、OVA、杏仁露等测试试纸条特异性。固体材料直接用 50 倍体积的水涡旋振荡溶解;杏仁露用水 5 倍稀释;5% 碱溶酪蛋白用水稀释至 20 mg/mL ;配制淀粉溶液时,先配制 2% 可溶性淀粉溶液,不断搅拌下迅速煮沸后再微沸 3 min,冷却到室温备用。每种样品平行检测三次。

将制作好的试纸条放入带干燥剂的密封塑料袋中,分别置于 45、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱和常温环境下,于第 7、14、21、28 d 后取出,滴加水检测,观察金标垫金标抗体是否滞留,C/T 线出线时间及颜色变化,评价试纸条稳定性;选用 $\beta\text{-lg}$ 梯度稀释液测试试纸条灵敏度。

1.2.3 掺杂样品检测 在全脂山羊乳粉中分别添加不同比例 (weight/weight, w/w) 的 NFSM、DWP 和 WPP,称取 1 g 掺杂样品,水溶解定容到 50 mL。使用试纸条进行检测,每个样品平行检测三次。

1.2.4 配方羊奶粉样品分析 在本地超市随机采购不同产地,不同阶段的婴幼儿配方羊奶粉样本,用水 50 倍稀释进行检测,每个样品平行检测三次。同时使用德国 R-Biopharm 公司牛奶蛋白 ELISA 试剂盒对奶粉样本进行检测,操作方法参见产品说明书。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体表征

由于牛 $\beta\text{-lg}$ 是牛乳清蛋白的主要成分,故本研究选取 $\beta\text{-lg}$ 为研究对象。羊乳 $\beta\text{-lg}$ 和牛一样,均含有 162 个氨基酸残基,两者氨基酸残基有 6 处不同^[21]。经小鼠免疫,细胞融合、筛选及单克隆化,筛选到一株分泌 $\beta\text{-lg}$ mAb 的杂交瘤细胞株,命名为 1G8。细胞扩大培养制备腹水单抗。 $\beta\text{-lg}$ mAb 腹水单抗纯化后测得抗体浓度为 7.2 mg/mL ,经抗体亚类试剂盒鉴定,抗体属于 IgG2b 类抗体。间接 ELISA 测得抗体效价为 1:10000,抗体 IC_{50} 值为 5.87 $\mu\text{g/mL}$ 。 $\beta\text{-lg}$ 竞争标准曲线见图 1,该抗体与酪蛋白、羊奶等常见基质蛋白的交叉反应结果见表 1。 $\beta\text{-lg}$ mAb 和酪蛋白、 $\alpha\text{-la}$ 、全脂山羊乳粉、山羊乳清粉、豆浆粉等均未见明显的交叉反应,故使用抗体进行后续免疫层析实验。

2.2 试纸条敏感性和特异性测试

本研究中制备的免疫层析试纸条基于竞争法,具体结构见图 2(a),金标垫附着金标 $\beta\text{-lg}$ mAb,NC 膜上包被 $\beta\text{-lg}$ 、山羊抗小鼠 IgG 分别作为 T 线和 C 线。将样品溶液滴加到试纸条样品垫,若样品中含有 $\beta\text{-lg}$,会率先与金标 $\beta\text{-lg}$ mAb 结合,T 线抗原被抑制无法显线,仅显示 C 线,即为阳性;若样品中未含

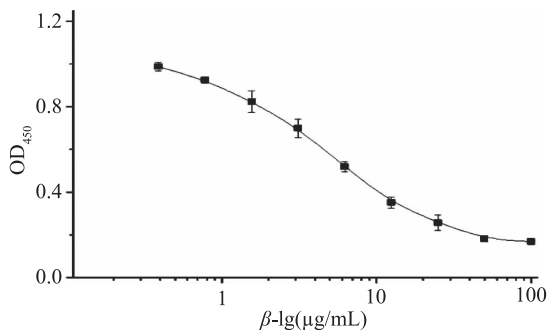


图 1 $\beta\text{-lg}$ 间接竞争 ELISA 标准曲线 ($n=4$)

Fig.1 Standard curves for $\beta\text{-lg}$ in indirect competitive ELISA ($n=4$)

表 1 $\beta\text{-lg}$ mAb 与相关基质蛋白的交叉反应率

Table 1 Cross-reactivity of related matrix proteins with $\beta\text{-lg}$ mAb

	IC_{50} 值 ($\mu\text{g/mL}$)	交叉反应率 (%)
酪蛋白钠盐	> 1200	< 0.5
$\alpha\text{-la}$	> 1200	< 0.5
$\beta\text{-lg}$	5.87	100
碱溶酪蛋白	> 1200	< 0.5
全脂山羊乳粉	> 1200	< 0.5
山羊乳清粉	> 1200	< 0.5
BSA	> 1200	< 0.5
OVA	> 1200	< 0.5
豆浆粉	> 1200	< 0.5

$\beta\text{-lg}$,金标 $\beta\text{-lg}$ mAb 与 T 线抗原结合显示 T 线,与 C 线二抗结合显示 C 线,即阴性。

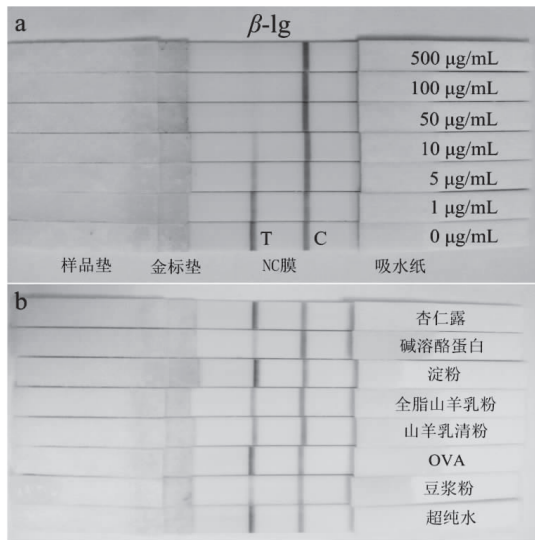


图 2 试纸条的灵敏度(a)和特异性(b)测试结果

Fig.2 The results of sensitivity(a) and specificity(b) of strip

用水梯度稀释标准品 $\beta\text{-lg}$ 母液,确定试纸条对 $\beta\text{-lg}$ 的 LOD 值,结果见图 2(a)。在 0 $\mu\text{g/mL}$ 时,试纸条显示两条带,当标准品浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,T 线抗原被抑制,颜色开始变浅,当浓度达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,T 线完全消失,裸眼几不可见,故试纸条对 $\beta\text{-lg}$ 的 LOD 值为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。液态牛奶中总蛋白含量约为 3.2%,而 $\beta\text{-lg}$ 占牛奶蛋白 12% 左右^[4],故试纸条

对牛奶蛋白的理论 LOD 值约为 420 $\mu\text{g/mL}$, 对液体牛奶的 LOD 值约为 13 mg/mL (即体系中含有 1.3% 的牛奶)。事实上生牛奶经 75 倍稀释 (相当于 1.3% 的牛奶含量) 后, 确可消除 T 线 (结果未展示)。

用试纸条分别对杏仁露、碱溶酪蛋白、淀粉、豆浆粉、全脂山羊乳粉等进行检测, 结果见图 2(b)。杏仁露、淀粉、OVA 检测结果和空白对照组无明显区别, 表明这些基质成分不会影响试纸条检测结果。全脂山羊乳粉、乳清蛋白、豆浆蛋白和碱溶酪蛋白组 T 线相比对照组变淡, 可见此浓度全脂山羊乳粉、山羊乳清蛋白、豆浆蛋白和碱溶酪蛋白会抑制 T 线的免疫反应。由于实验中固态样品前处理均采用统一的稀释条件, 且仅以消 T 线作为判定标准, 故这些基质成分也不会影响试纸条的检测结果。

试纸条于不同温度放置不同时间后, 分别滴水、 $\beta\text{-lg}$ 标准液进行测试。结果显示, 阴性实验 C/T 线出线时间均在 1 min 左右, 5 min 时趋于稳定, 线型鲜亮如初, 无肉眼可辨之异常; $\beta\text{-lg}$ 的 LOD 值均稳定在 50 $\mu\text{g/mL}$ 左右 (结果未展示)。试纸条老化实验表明, 试纸条在 4 周内稳定性、灵敏度保持不变。

2.3 掺杂样本检测

配方奶粉生产过程中通常不会直接添加 $\beta\text{-lg}$, 而是使用 DWP、WPP 调节乳清蛋白含量, 所以本研究选择 NFSM、DWP 和 WPP 进行掺杂实验。本研究中使用的全脂山羊乳粉、NFSM、DWP、WPP 粉经 GB 5009.5-2016 第一法凯氏定氮法检测, 总蛋白含量分别为 34.2%、34.8%、12.7% 和 79%; 理化特征均满足相应的国标 (GB 19644-2010 和 GB 11674-2010) 要求, 且经 SN/T 2051-2008 检测显示山羊乳粉仅含羊源性成分, NFSM、DWP、WPP 均为牛属性。图 3 中, 全脂山羊乳粉中分别掺入不同比例 NFSM、DWP 和 WPP, 用免疫层析试纸条进行检测分析, T 线消失时对应掺杂百分比浓度, 即 LOD 值分别为 5% (图 3a)、5% (图 3b) 和 0.1% (图 3c)。

由于 NFSM、DWP 与 WPP 蛋白含量分别为 34.8%、12.7%、79%, 若按 $\beta\text{-lg}$ 占牛奶总蛋白 12%, 占总乳清蛋白含量 50% 粗略估计^[4], NFSM、DWP 与 WPP 的 $\beta\text{-lg}$ 含量大约为 4.2%、6.4%、40%。因为试纸条对 $\beta\text{-lg}$ 标准品的 LOD 值为 50 $\mu\text{g/mL}$, 故试纸条对 NFSM、DWP 与 WPP 的 LOD 值应为 1.2、0.78、0.13 mg/mL 。因掺杂样品采用 50 倍稀释, 即样品浓度为 20 mg/mL , 则 T 线消失对应的理论掺杂百分比为 6%、3.9%、0.65%。考虑到样品纯度、 $\beta\text{-lg}$ 含量波动、稀释条件等因素, 实际结果和理论检测限位于同一数量级, 基本吻合。

国标 GB 10765-2010 规定乳基婴儿配方食品中乳清蛋白含量应 $\geq 60\%$, 而天然牛羊乳中乳清蛋白含量却不及总蛋白的 20%^[22], 所以配方奶粉生产过程中均需添加大量的 DWP 或 WPP。本方法对羊乳粉中掺杂 DWP 与 WPP 的 LOD 值可达到 5%、0.1%, 可满足配方羊奶粉生产过程中掺杂牛乳清蛋白的检测要求。

2.4 奶粉样本检测

将采购的配方羊奶粉样品编号, 用试纸条进行

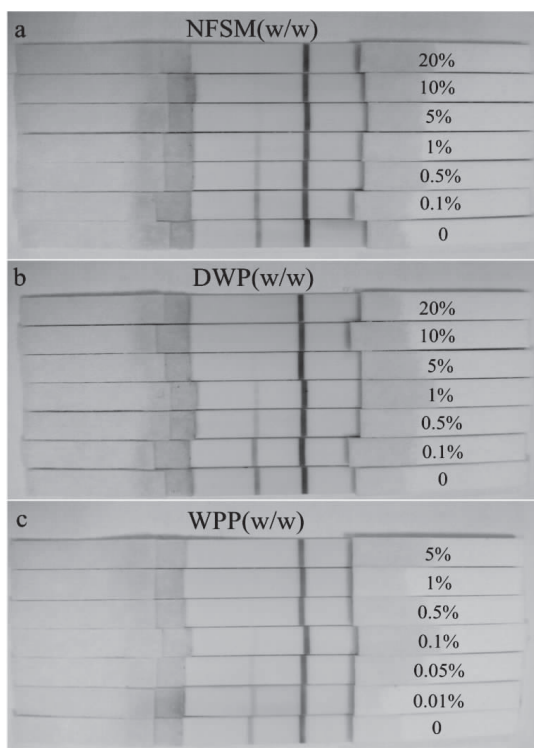


图 3 阴性全脂山羊乳粉中添加脱脂奶粉(a)、脱盐乳清粉(b)和乳清蛋白粉(c)的胶体金免疫层析检测结果

Fig.3 Results obtained by colloidal gold immunochromatographic assay for negative goat milk powder spiked with NFSM (a), DWP (b) and WPP (c)

检测, 检测结果见图 4。结果显示 9 个样品中, 除 5 号和 7 号, 其余 7 个样品均显示阳性, 表明这些样品均有牛奶蛋白成分。同时用牛奶蛋白 ELISA 试剂盒进行分析, 两种分析方法检测结果一致 (表 2), 表明本方法结果准确可靠。值得注意的是 2 个阴性样本, 配料表上确实标注“山羊乳清蛋白粉”、“浓缩羊乳清蛋白粉”; 而阳性样本配料表上却均未表明乳清蛋白的动物来源, 只模糊标注“脱盐乳清粉”、“浓缩乳清蛋白粉”。故阳性样本中的牛奶蛋白可能来自“脱盐乳清粉”和“浓缩乳清蛋白粉”。实际样品检测结果表明, 该试纸条可应用市售配方羊奶粉的现场快速检测。



图 4 市售 9 个配方羊奶粉样品胶体金免疫层析法检测结果

Fig.4 Results obtained by colloidal gold immunochromatographic assay for 9 commercial goat milk formulas

3 结论

本研究成功制备了 $\beta\text{-lg}$ 的单克隆抗体, 开发了

表2 ELISA 和胶体金免疫层析法检测结果的比较

Table 2 Comparison of results obtained by ELISA and colloidal gold immunochromatographic assay

编号	样品信息	ELISA	胶体金免疫层析法
1	金装较大婴儿配方羊奶粉(2段)	>1% (+)	+
2	金装婴儿配方羊奶粉(1段)1	>1% (+)	+
3	金装婴儿配方羊奶粉(1段)2	>1% (+)	+
4	金装婴儿配方羊奶粉(1段)3	>1% (+)	+
5	铂金装婴儿配方羊奶粉(1段)	<0.5% (-)	-
6	婴儿配方羊奶粉(1段)1	>1% (+)	+
7	优装婴儿配方羊奶粉(1段)	<0.5% (-)	-
8	较大婴儿配方羊奶粉(2段)	>1% (+)	+
9	婴儿配方羊奶粉(1段)2	>1% (+)	+

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

可快速检测 β -lg 的胶体金免疫层析试纸条。该试纸条成本低廉,稳定性良好,样品前处理简单,点样后 5 min 后肉眼即可判定结果,对 β -lg 的 LOD 值为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对全脂山羊乳粉中掺杂牛脱脂奶粉、脱盐乳清粉和乳清蛋白粉的 LOD 值分别为 5%、5% 和 0.1%。通过对市售配方羊奶粉样品进行分析,检测结果和商品化 ELISA 试剂盒一致,故本研究开发的免疫层析试纸条可用于掺杂牛乳清配方羊奶粉的现场快速筛查。

参考文献

[1] 刘畅,许晓丹,史永翠,等.羊奶的营养保健功能与研究现状[J].乳业科学与技术,2013,36(1):25-28.

[2] 刘国信.奶粉标准缺失成短板[J].兽药市场指南,2015(5):6-6.

[3] 国家食品药品监督管理总局.婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法[EB/OL].[2016-06-08].http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0053/155260.html.

[4] 兰欣怡,王加启,卜登攀,等.牛奶 β -乳球蛋白研究进展[J].中国畜牧兽医,2009,36(6):109-112.

[5] De Luis R, Lavilla M, Sanchez L, et al. Development and evaluation of two ELISA formats for the detection of β -lactoglobulin in model processed and commercial foods[J].Food Control,2009,20(7):643-647.

[6] Pelaez-lorenzo C, Diez-masa J C, Vasallo I, et al. Development of an optimized ELISA and a sample preparation method for the detection of beta-lactoglobulin traces in baby foods[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(3):1664-1671.

[7] 袁水林,鼎熊,陈红兵,等.间接竞争 ELISA 法检测牛乳中 β -乳球蛋白含量的准确性评价[J].食品科学,2014,35(18):100-104.

[8] 王莹,屈玉霄,刘春红,等.高效液相色谱法测定 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白[J].食品研究与开发,2013,34(2):57-60.

[9] Pelaez-lorenzo C, Diez-masa J C, Vasallo I, et al. A new sample preparation method compatible with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence for improving detection of low levels of beta-lactoglobulin in infant foods[J].Anal Chim Acta,2009,649(2):202-210.

[10] Wu X, Li Y, Liu B, et al. Two-site antibody immunoanalytical detection of food allergens by surface plasmon

resonance[J].Food Analytical Methods,2015,9(3):582-588.

[11] Ruiz-valdepenas montiel V, Campuzano S, Conzuelo F, et al. Electrochemical magnetosensing platform for determination of the milk allergen beta-lactoglobulin[J].Talanta,2015,131:156-162.

[12] Eissa S, Zourob M. In vitro selection of DNA aptamers targeting beta-lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen[J].Biosensors & Bioelectronics,2017,91:169-174.

[13] 全国畜牧业标准化技术委员会.NYT 1663-2008 乳与乳制品中 β -乳球蛋白的测定聚丙烯酰胺凝胶电泳法[S].北京:中国农业出版社,2008:1-4.

[14] Courtney R C, Taylor S L, Baumert J L. Evaluation of commercial milk-specific lateral flow devices[J].Journal of Food Protection,2016,79(10):1767-1774.

[15] Leveux D, Venien A. Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies[J].Journal of Dairy Research,1994,61(1):91-99.

[16] Beer M, Krause I, Stapf M, et al. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of native and heat-denatured bovine β -lactoglobulin in ewes' and goats' milk cheese[J].Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung,1996,203(1):21-26.

[17] Masiri J, Barrios-lopez B, Benoit L, et al. Development and validation of a lateral flow immunoassay test kit for dual detection of casein and beta-lactoglobulin residues[J].Journal of Food Protection,2016,79(3):477-483.

[18] 骆敏儿,唐勇,向军俭,等.玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析法的建立[J].细胞与分子免疫学杂志,2013,29(7):729-733.

[19] 陈丹,孙广瑞,柳增善.辛酸-硫酸铵联合沉淀法在单克隆抗体纯化中的应用[J].安徽农业科学,2007,35(26):8105-8105.

[20] 王丽哲,赵瑜,唐慧林,等.新霉素半定量胶体金试纸条的研制[J].食品科学,2014,35(8):309-312.

[21] 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,2012,31(2):21-23.

[22] Ceballos L S, Morales E R, De la Torre Adarve G, et al. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology[J].Journal of Food Composition and Analysis,2009,22(4):322-329.