

张咪,高璐,印伯星,等. 基于 α_s -酪蛋白特异性的牛乳总蛋白质 ELISA 定量检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 87-92.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.013

基于 α_s -酪蛋白特异性的牛乳总蛋白质 ELISA 定量检测方法的建立

张咪¹, 高璐¹, 印伯星², 苏万业^{1,3}, 杨振泉^{1,3}, 顾瑞霞^{1,3}

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 扬州市康源乳业有限公司, 江苏 扬州 225009; 3. 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏 扬州 225127)

摘要: 本研究旨在建立牛乳中总蛋白质的 ELISA 定量检测方法, 并评价该方法在牛乳掺假辨识中的应用效果。首先用 α_s -酪蛋白标准品免疫新西兰白兔, 制备 α_s -酪蛋白特异性抗血清, 并建立 α_s -酪蛋白的间接 ELISA 检测方法, 结果显示血清效价为 1:640, α_s -酪蛋白检测的线性范围是 25~600 ng/ml, $R^2=0.9995$, 回收率是 96.6%~105.2%。再应用乳成分分析仪, 凯氏定氮法和所建立的 ELISA 法测定 8 份来源不同的原料乳中总蛋白和 α_s -酪蛋白含量, 结果显示不同牛乳中总蛋白质含量在 0.029 2~0.029 8 g/ml, α_s -酪蛋白含量在 0.008 4~0.009 2 g/ml, 占牛乳总蛋白质的比例恒定, 平均为 0.3, 并用该系数建立牛乳中总蛋白质的定量方法。最后对 5 份人为兑水稀释、添加尿素、BSA 和三聚氰胺的模拟掺杂牛乳样品进行检测, 测定结果表明基于 α_s -酪蛋白的 ELISA 方法比乳成分分析仪法和凯氏定氮法具有更高的灵敏性和特异性, 含氮添加剂对测定结果无显著影响($P>0.05$), 更适用于作为原料乳及含乳产品中牛乳蛋白质的定量分析。

关键词: 牛乳; α_s -酪蛋白; ELISA; 总蛋白

中图分类号: TS252.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)01-0087-06

Establishment of a quantitative ELISA method for detection of total milk protein based on the specificity of α_s -casein

ZHANG Mi¹, GAO Lu¹, YIN Bo-xing², SU Wan-ye^{1,3}, YANG Zhen-quan^{1,3}, GU Rui-xia^{1,3}

(1. College of Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China; 2. Yangzhou Kangyuan Dairy Ltd, Yangzhou 225009, China; 3. Jiangsu Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Safety Control, Yangzhou 225127, China)

Abstract: This study aims to establish a ELISA method to quantify the total protein (TP) in milk and to evaluate its application in identification of the adulterated milk. Here, α_s -casein (α_s -CN) standard sample was used to immunize New Zealand white rabbits for preparing anti- α_s -CN polyclonal antibody (PcAb). The result showed that the titer of PcAb was 1:640, and the linear range of the detection of α_s -CN was 25~600 ng/ml with correlation coefficient of 0.9995 and the recovery rate between 96.6% and 105.2%. The contents of α_s -CN and TP in milk from 8 different resources ranged from 0.008 4 to 0.009 2 g/ml and from 0.029 2 to 0.029 8 g/ml detected by milk analyzer and kjeldah method. The percentage of α_s -CN to TP stayed constant at 0.3, which led to the successful development of α_s -CN-based ELISA for detection of TP in milk. The ELISA method showed better sensitivity and specificity than the other two approaches

收稿日期: 2014-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371806); 扬州市科技攻关项目(yz2011090); 江苏省青蓝工程资助项目

作者简介: 张咪(1990-), 女, 江苏宜兴人, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物应用与控制研究。(E-mail) zhangmi900911@sina.com

通讯作者: 杨振泉, (E-mail) yangzq@yzu.edu.cn

in four milk samples which were diluted with water and artificially added with urea, BSA and melamine, respectively. The content of α_s -CN was independent of nitrogen additives. In conclusion, the established ELISA method was suitable for analyzing the TP content in the milk and milk products.

Key words: milk; α_s -casein; ELISA; total protein

随着生活水平的提高,人们对牛奶及其制品的需求量也日益增加。另一方面,受利益的驱使,在牛奶及其制品中掺杂掺假的事件时有发生。牛乳中的掺假物主要包括小分子含氮物,如尿素、三聚氰胺以及水解的低价非乳蛋白,以弥补牛乳兑水后乳蛋白比重下降。传统的凯氏定氮检测方法需要费时的样品前处理,通过测定牛乳中的总氮含量来反映总蛋白含量,特异性差,不能排除小分子含氮物质以及掺入杂蛋白对测定结果的干扰^[1]。乳成分分析仪虽然能够快捷地分析牛乳中的蛋白含量,但是设备昂贵,而且有研究表明当牛乳中掺入蛋白粉和脲时,乳成分分析仪的测定数据也会上升,测定结果会受到一定干扰^[2]。因此建立牛乳中蛋白成分特异性的定量测定方法,实现掺假牛乳的快速廉价检测,对杜绝乳制品掺假现象的发生具有重要意义。

国内已有部分研究报道基于牛乳中 α_s -酪蛋白的 ELISA 测定方法,结果显示该方法是一种廉价、灵敏、特异的方法^[3],但目前尚未明确牛乳中 α_s -酪蛋白含量与总蛋白含量的换算系数,而凯氏定氮法和乳成分分析仪测定法分析的均为总蛋白含量,因此 ELISA 法测定结果不能与凯氏定氮法和乳成分分析仪测定结果直接进行比较。本研究通过制备 α_s -酪蛋白的多克隆抗体,建立牛乳中 α_s -酪蛋白定量检测方法。通过测定结果与乳成分分析仪和凯氏定氮法测定的总蛋白含量比较分析,获得牛乳中 α_s -酪蛋白与总蛋白的换算系数。同时应用这三种方法对模拟的掺假牛乳进行测定,评价了 ELISA 法的特异性和灵敏性。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

α_s -酪蛋白标准品购自日本 WAKO 公司;新西兰健康雄性白兔来自扬州大学比较医学中心;弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG、TMB、BSA 购自上海生工生物工程有 限 公 司;新 鲜 原 料 乳 样 品 分 别 来 自 扬 州 地

区不同的牧场,贮藏于 4 °C 冰箱备用。

1.2 仪器与设备

Bio-Tek Elx-800 全自动酶标仪,美国宝特公司生产;UDK159 全自动凯氏定氮仪,意大利 VELP 公司生产;UL80BC 型乳成分分析仪,杭州浙大优创科技有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 α_s -酪蛋白多克隆抗体的制备 参照文献[4]制备 α_s -酪蛋白多克隆抗体。健康新西兰白兔在新环境下预养一周后进行耳缘静脉采血,分离血清作为抗血清效价检测时的阴性对照。 α_s -酪蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合乳化,腹部皮下多点注射新西兰白兔,初次免疫剂量为 0.2 mg/(kg·bw);分别于第 4 周、第 5 周、第 6 周进行加强免疫[免疫剂量为 0.1 mg/(kg·bw)];最后一次加强免疫 5 d 后耳静脉取血,4 °C 放置 2 h,以 3 000 r/min 的转速离心 10 min,收集抗血清,-20 °C 保存。

1.3.2 抗血清效价的测定 参照文献[5]测定抗血清效价。将 α_s -酪蛋白标准品稀释至 100 μ g/ml 进行包被,每孔 100 μ l,4 °C 过夜;倾去包被液,每孔加 200 μ l PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,甩干后加入 100 μ l 含 2.5% BSA 的 PBS,37 °C 封闭 1 h;倾去封闭液,洗涤 3 次,每次 10 min;将经过 10 倍稀释的兔抗血清以每孔 100 μ l 的量加入酶标板倍比稀释,阴性血清稀释溶液作为对照,每样重复 3 次,37 °C 温育 1 h,洗涤 3 次,每次 10 min;每孔加入 100 μ l HRP 标记的羊抗兔 IgG,37 °C 保温 1 h;洗涤 3 次,每次 10 min,每孔加入 100 μ l TMB 工作液,37 °C 避光反应 10 min,加入 50 μ l 终止液(2 mol/L H₂SO₄)后,用酶标仪测定 450 nm 处吸光值。抗体的效价以抗血清的稀释度表示,检测结果以 $P(\text{血清})/N(\text{阴性血清}) \geq 2.1$, $P(\text{血清}) > 0.2$ 为阳性判断依据。

1.3.3 ELISA 反应条件优化 参照文献[6]应用方阵滴定法选择包被抗原和抗体的最佳工作浓度。将 α_s -酪蛋白标准品进行梯度稀释后包被,4 °C 过夜;洗涤 3 次后,加入 10 倍稀释的兔抗血清倍比稀释,

阴性血清做对照,37 °C 温育后,洗涤 3 次;加入酶标抗体;底物显色后测定 OD 值。选择强阳性血清的 OD 值为 0.8 左右,阴性血清 OD 值小于 0.1 的包被抗原稀释度为最适工作浓度,此时对应的血清稀释度为抗体最佳工作浓度。

1.3.4 标准曲线的建立 制备浓度为 50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、400 ng/ml、800 ng/ml、1 000 ng/ml、1 200 ng/ml、1 500 ng/ml、2 000 ng/ml 的 α_s -酪蛋白标准液,各取 100 μ l 包被酶标板,每样 3 孔平行,用已知最佳工作浓度的兔血清作为检测抗体,进行 ELISA 测定。测定结果以 α_s -酪蛋白标准品的浓度为横坐标,吸光度值 (OD_{450}) 为纵坐标,绘制曲线并寻找线性范围建立标准曲线回归方程。应用建立的线性回归方程计算变异系数(标准偏差/均值)和回收率(测定 α_s -酪蛋白浓度/制备 α_s -酪蛋白浓度),评价稳定性和准确性。

1.3.5 牛乳中 α_s -酪蛋白的测定 将牛乳样品进行梯度稀释后包被 96 孔酶标板,用已知最佳工作浓度的抗血清作为一抗,HRP-羊抗兔 IgG 作为二抗,按优化条件(同标准曲线)进行 ELISA 测定,根据吸光度值 (OD_{450}) 随稀释度变化规律确定线性范围。取 OD_{450} 在 0.2 至 0.8 之间对应的稀释度用于计算牛乳样品中的 α_s -酪蛋白含量。

1.3.6 牛乳中总蛋白质测定 凯氏定氮法参照国标^[7]取 5 ml 牛乳样品进行总蛋白质含量测定,乳成分分析仪根据操作说明取 20 ml 牛乳样品进行总蛋白质含量测定,每个样品平行测定 3 次,取平均数用于分析。ELISA 法总蛋白质定量按公式:

$$X = (A - b) / (a \times F) \times n$$

式中: X 为牛乳中总蛋白质含量,单位为 ng/ml; A 为 450 nm 处吸光度; b 为标准曲线回归方程截距; a 为标准曲线回归方程斜率; F 是 α_s -酪蛋白换算为总蛋白质的系数; n 为牛乳样品稀释倍数。

1.3.7 模拟掺杂牛乳蛋白质定量 取 400 ml 原料乳,平均分成 4 份,1 份作为空白对照,其余 3 份分别加入 1 g 尿素、BSA、三聚氰胺(即含氮物的浓度为 10 g/L)。用所建立的 ELISA 法、凯氏定氮和乳成分分析仪 3 种方法对样品总蛋白质含量进行检测,将测定结果与对照组进行比较,评价测定结果的特异性。

用蒸馏水对原料乳及模拟样品进行 10 倍稀释,应用 ELISA 法、凯氏定氮和乳成分分析仪 3 种方法

对样品中总蛋白质含量进行检测,根据测定结果评价测定方法的灵敏性。

2 结果与分析

2.1 抗血清效价

将经过 10 倍稀释的兔抗血清按 2^n 倍比稀释,ELISA 测定反应后的吸光度值, N (阴性血清)均值为 0.086,当兔抗血清稀释 2^6 倍时, P (阴性血清)均值为 0.362, $P > 0.2$, $P/N \geq 2.1$,所以抗血清效价为 1 : 640。

2.2 ELISA 反应条件优化

α_s -酪蛋白标准品初始浓度为 100 μ g/ml,根据方阵滴定法,当抗原稀释 160 倍时,强阳性血清的 OD_{450} 值为 0.833,阴性血清 OD_{450} 值为 0.107,包被抗原的最适工作浓度为 625 ng/ml,对应的抗血清最佳稀释倍数为 1 : 320。

2.3 ELISA 检测标准曲线测定

应用 1 : 320 的抗血清作为检测抗体,以质量浓度为 0 ~ 2 000 ng/ml 梯度稀释的 α_s -酪蛋白溶液作为包被抗原,测定结果显示 α_s -酪蛋白质量浓度为 25 ~ 600 ng/ml 时, OD_{450} 值与 α_s -酪蛋白浓度呈显著线性相关,绘制标准曲线(图 1),所得线性回归方程为 $Y = 0.0013x + 0.0259$, $R^2 = 0.9995$ 。将 OD_{450} 测定值代入线性方程,计算 α_s -酪蛋白浓度测定值。结果显示,回收率为 96.6% ~ 105.2%,平行测定值的变异系数为 0 ~ 4.14%,表明 α_s -酪蛋白 ELISA 定量方法具有较好的重复性和准确性。

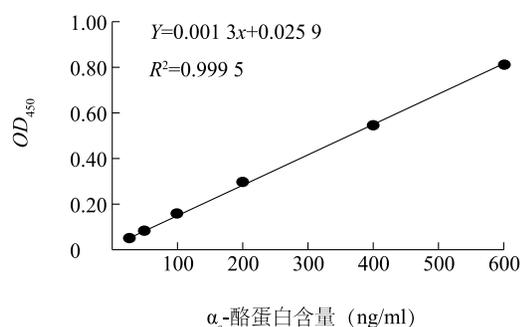


图 1 α_s -酪蛋白标准曲线

Fig. 1 The standard curve of α_s -casein

2.4 牛乳中总蛋白质及 α_s -酪蛋白的测定结果

通过对 8 种原料乳样品进行 ELISA 测定,结果

显示稀释度为 10 000 ~ 12 500 时, OD_{450} 在 0.2 ~ 0.8 时呈线性变化。选择 12 500 作为稀释参数(n), 根据线性方程计算出原料乳中 α_s -酪蛋白含量。定量结果与乳成分分析仪测定的总蛋白含量比较分析, 结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出不同原料乳中 α_s -酪蛋白在总蛋白质含量中所占的比例为 0.29 ~

0.32, 含量相对稳定, 平均值为 0.30。因此, 牛乳中 α_s -酪蛋白与总蛋白质的换算系数(F)为 0.30, 计算得出 ELISA 法总蛋白质定量公式为: $X=2\ 564.1An-66.4n$, 式中 X 为牛乳中总蛋白质含量; A 为 450 nm 处吸光度; n 为牛乳样品稀释倍数。

表 1 牛乳中 α_s -酪蛋白与总蛋白质比例测定

Table 1 The determination of the ratio of α_s -casein to total protein in the milk

| 原料乳样品 | α_s -酪蛋白含量(g/ml) | 总蛋白质含量(g/ml) | α_s -酪蛋白与总蛋白质比例 |
|-------|-------------------------|-----------------|------------------------|
| S1 | 0.008 6±0.000 5 | 0.029 6±0.000 1 | 0.29 |
| S2 | 0.008 6±0.000 6 | 0.029 7±0.000 1 | 0.29 |
| S3 | 0.009 1±0.000 2 | 0.029 8±0.000 1 | 0.30 |
| S4 | 0.009 2±0.000 7 | 0.029 7±0.000 1 | 0.32 |
| S5 | 0.008 7±0.000 6 | 0.029 6±0.000 1 | 0.30 |
| S6 | 0.008 5±0.000 6 | 0.029 5±0.000 1 | 0.29 |
| S7 | 0.008 7±0.000 7 | 0.029 7±0.000 1 | 0.29 |
| S8 | 0.008 4±0.000 4 | 0.029 2±0.000 1 | 0.29 |
| 平均值 | 0.008 8±0.000 3 | 0.029 6±0.000 2 | 0.30 |

α_s -酪蛋白含量由 ELISA 法测得; 总蛋白质含量由乳成分分析仪测得。

2.5 ELISA 定量检测方法在掺杂牛乳检测中的应用

2.5.1 模拟掺杂牛乳样品总蛋白质定量结果 应用所建立的 ELISA 法, 凯氏定氮法和乳成分分析仪测定法对人为掺入尿素、BSA 和三聚氰胺的原料乳(含氮物浓度 10 g/L) 总蛋白质含量进行测定。由表 2 中可以看出, 应用乳成分分析仪, 测得对照样品的总蛋白质含量为 0.029 6 ~ 0.029 8 g/ml; 凯氏定氮法对照样品的总蛋白质含量结果为 0.025 3 ~ 0.033 4 g/ml; ELISA 法测定对照样品的总蛋白质含量结果为 0.029 0 ~ 0.031 0 g/ml。

当原料乳中掺入尿素、BSA、三聚氰胺时, 凯氏定氮法测得的总蛋白含量值均显著上升, 其中掺入三聚氰胺对凯氏定氮法检测结果影响最为显著, 上升值为 0.031 8 ~ 0.045 1 g/ml, 掺入尿素对凯氏定氮法检测结果影响也较为显著, 上升值为 0.026 3 ~ 0.028 5 g/ml; 乳成分分析仪测得的蛋白含量也有明显上升, 其中掺入尿素对乳成分分析仪分析法结果影响较为明显, 上升值在 0.006 4 至 0.007 6 g/ml 之间。本研究用尿素和三聚氰胺含氮量分别为 46.6%、66.6%, 说明含氮物质干扰对凯氏定氮法检测牛乳中蛋白质含量影响最为明显, 且含氮量越高, 影响越大。而采用本研究所建立的

ELISA 法测定的掺入尿素、BSA、三聚氰胺牛乳蛋白质含量, 与对照牛乳相比没有显著变化, 说明牛乳中掺入尿素、BSA、三聚氰胺对 ELISA 定量检测乳品中总蛋白含量没有明显的影响, 与凯氏定氮法和乳成分分析仪的检测方法相比, ELISA 法具有很好的特异性和稳定性。

2.5.2 稀释牛乳中总蛋白质定量结果 用蒸馏水对原料乳及模拟掺假样品进行 10 倍稀释, 应用所建立的 ELISA 法, 凯氏定氮法和乳成分分析仪对样品中总蛋白质含量进行检测, 测定结果如表 3 所示。由表 3 可以看出, 当原料乳稀释 10 倍后, 乳成分分析仪测得的蛋白质含量值 0.000 2 g/ml 与预计值(未稀释浓度/稀释倍数) 0.003 0 g/ml 相比有显著变化, 而凯氏定氮和所建立的 ELISA 法测出的牛乳总蛋白质含量均与预计值一致, 没有显著变化, 说明掺水对乳成分分析仪测定结果影响很大; 当原料乳稀释 100 倍、1 000 倍后, 乳成分分析仪已无法测出牛乳的总蛋白质含量, 而凯氏定氮和所建立的 ELISA 法仍能对总蛋白质含量进行准确定量, 与预计值相比没有显著变化, 说明这两种方法在检测掺水牛乳样品时比乳成分分析仪测定更为灵敏。

表 2 原料乳中模拟掺杂物对三种方法测定的蛋白质含量的影响

Table 2 Influence of adulterants on the protein quantification in the raw milk by three methods

| 原料乳样品 | 测定方法 | 样品中总蛋白质测定值(g/100 ml) | | | | | | |
|-------|--------|----------------------|--------------|-------|---------------|-------|----------------|-------|
| | | 对照组 | 掺杂 10 g/L 尿素 | | 掺杂 10 g/L BSA | | 掺杂 10 g/L 三聚氰胺 | |
| | | | 测定值 | 变化值 | 测定值 | 变化值 | 测定值 | 变化值 |
| S1 | 乳成分分析仪 | 2.96±0.01 | 3.66±0.01 * | +0.70 | 3.49±0.01 * | +0.53 | 3.48±0.01 * | +0.52 |
| | 凯氏定氮 | 2.95±0.02 | 5.80±0.05 * | +2.85 | 3.84±0.09 * | +0.89 | 6.13±0.42 * | +3.18 |
| | ELISA | 2.90±0.10 | 2.86±0.09 | -0.04 | 2.83±0.02 | -0.07 | 2.86±0.02 | -0.04 |
| S2 | 乳成分分析仪 | 2.97±0.01 | 3.61±0.01 * | +0.64 | 3.49±0.01 * | +0.52 | 3.38±0.01 * | +0.41 |
| | 凯氏定氮 | 3.34±0.04 | 5.97±0.02 * | +2.63 | 4.09±0.01 * | +0.75 | 6.57±0.44 * | +3.23 |
| | ELISA | 2.90±0.07 | 2.90±0.02 | 0 | 2.86±0.04 | -0.04 | 2.83±0.06 | -0.07 |
| S3 | 乳成分分析仪 | 2.98±0.01 | 3.72±0.01 * | +0.74 | 3.56±0.01 * | +0.58 | 3.40±0.01 * | +0.42 |
| | 凯氏定氮 | 3.26±0.03 | 5.94±0.06 * | +2.68 | 4.08±0.01 * | +0.82 | 7.77±0.27 * | +4.51 |
| | ELISA | 3.06±0.06 | 3.06±0.02 | 0 | 3.03±0.03 | -0.03 | 3.06±0.01 | 0 |
| S4 | 乳成分分析仪 | 2.97±0.01 | 3.69±0.01 * | +0.72 | 3.56±0.01 * | +0.59 | 3.40±0.01 * | +0.43 |
| | 凯氏定氮 | 3.18±0.03 | 5.82±0.06 * | +2.64 | 3.99±0.04 * | +0.81 | 6.76±0.61 * | +3.58 |
| | ELISA | 3.10±0.05 | 3.03±0.08 | -0.07 | 3.06±0.09 | -0.04 | 3.03±0.05 | -0.07 |
| S5 | 乳成分分析仪 | 2.96±0.01 | 3.72±0.01 * | +0.76 | 3.62±0.01 * | +0.66 | 3.51±0.01 * | +0.55 |
| | 凯氏定氮 | 2.53±0.01 | 5.30±0.03 * | +2.77 | 3.38±0.05 * | +0.85 | 6.14±0.88 * | +3.61 |
| | ELISA | 2.93±0.05 | 2.90±0.10 | -0.03 | 2.90±0.05 | -0.03 | 2.90±0.06 | -0.03 |

* 表示与对照组相比有显著变化($P>0.05$)。

模拟掺假样品稀释 10 倍后,应用乳成分分析仪测定的总蛋白质含量与预计值 0.003 0 g/ml 相比均显著下降,其中三聚氰胺的影响最大,下降值为 0.001 5 g/ml,其次是 BSA 和尿素;用凯氏定氮测得总蛋白质含量与预计值 0.000 3 g/ml 均有不同程度

的上升,其中掺入尿素和三聚氰胺的模拟稀释样品的总蛋白质测定值上升显著;而用所建立的 ELISA 法对 3 份稀释后的模拟样品进行总蛋白质定量时,测定值近似于预计值 0.002 9 g/ml,表明 ELISA 法在低浓度下灵敏度依然很强,且特异性不受影响。

表 3 原料乳加水稀释对三种方法测定的蛋白质含量的影响

Table 3 Influence of dilution with water on the protein quantification by three methods

| 样 品 | 稀释倍数 | 样品中总蛋白测定值(g/100ml) | | |
|----------------|-----------------|--------------------|---------------|-------------|
| | | 乳成分分析仪 | 凯氏定氮 | ELISA |
| S1 | 10 ⁰ | 2.960±0.010 | 2.950±0.020 | 2.900±0.100 |
| | 10 ¹ | 0.020±0.007 * | 0.300±0.004 | 0.290±0.001 |
| | 10 ² | 0 * | 0.030±0.001 | 0.030±0.001 |
| | 10 ³ | 0 * | 0.003±0.001 | 0.003±0.001 |
| S1+10 g/L 尿素 | 10 ¹ | 0.210±0.007 * | 0.403±0.004 * | 0.286±0.002 |
| S1+10 g/L BSA | 10 ¹ | 0.170±0.007 * | 0.313±0.005 | 0.283±0.002 |
| S1+10 g/L 三聚氰胺 | 10 ¹ | 0.150±0.007 * | 0.631±0.002 * | 0.286±0.009 |

* 表示测量值与预计值(未稀释浓度/稀释倍数)相比有显著变化($P<0.05$)。

3 讨论

乳成分分析仪虽然可以方便、快捷地测定牛乳中总蛋白质含量,精密度高,但设备昂贵,而且当牛乳中掺入含氮物质时,测得的蛋白质含量值显著上升;掺入水时,测得的蛋白质含量值与预计值相比显著下降,表明掺杂、掺水对乳成分分析法测定精确度具有较大影响。

原料乳兑水稀释后,凯氏定氮法仍能准确测量样品中总蛋白质含量,表明其灵敏性高,但传统的凯氏定氮法是通过测定牛乳中总氮元素含量来反映总蛋白质含量,并且需要进行费时的样品前处理,当原料乳中掺入含氮量高的尿素和三聚氰胺时,凯氏定氮法测得蛋白质含量理论值应分别增加0.029 7 g/ml、0.042 5 g/ml,由于操作过程中掺入的物质未溶解完全,实际测量值比理论值低了4.0%~11.4%、16.1%~25.2%,表明凯氏定氮法特异性差,不能排除小分子含氮物质以及掺入杂蛋白质对测定结果的干扰,与此同时,人为操作对测定结果的影响也很大。

目前研究酪蛋白质含量的测定大多基于酪蛋白质沉淀检验方法,由于等电点沉淀测得的是粗酪蛋白质含量,纯度不高,不能准确定量,而且不能鉴别大豆分离蛋白粉的掺假行为^[8];毛细管电泳技术虽然可以快速分析牛乳中的蛋白质组分,检测牛乳中添加杂蛋白质的掺假情况^[9],但其设备昂贵,操作人员需要一定的训练,制约了此项技术的普及。

本试验通过建立牛乳中 α_s -酪蛋白质定量的线性回归方程 $Y=0.0013x+0.0259$ ($R^2=0.9995$),并将测得 α_s -酪蛋白质含量与乳成分分析仪测得的牛乳中总蛋白质含量进行比较,得到牛乳中 α_s -酪蛋白质与总蛋白质的换算系数(F)为0.30,最终得出

基于 α_s -酪蛋白质特异的ELISA法测定牛乳总蛋白质的定量公式: $X=2564.1An-66.4n$ (式中: X 为牛乳中总蛋白质含量; A 为450 nm处吸光度, n 为牛乳样品稀释倍数)。

应用所建立的基于 α_s -酪蛋白质的ELISA法对不同原料乳、人为掺假牛乳、兑水牛乳和掺假兑水牛乳进行检测时,表现了较好的稳定性、特异性和灵敏性,因而此法更适用于作为原料乳及含乳产品中牛乳蛋白质的定量分析。在此研究的基础上,可以进行 α_s -酪蛋白质快速检测试剂盒研制,实现掺假牛乳的快速廉价检测。

参考文献:

- [1] 袁炳秋,吕媛,马钰,等. 尿素、氯化铵、碳酸铵对牛奶样品微量凯氏定氮法的干扰[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2010, 33(1): 66-70.
- [2] 王衍彬,刘东红,叶兴乾,等. 超声乳成分分析仪对牛乳掺水解动物蛋白粉和脲的检测效果研究[J]. 中国食品学报, 2005, 5(2): 98-101.
- [3] 张涛,庞广昌. 酶联免疫法快速测定原料乳中 α_s -酪蛋白质浓度[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(2): 56-58.
- [4] 何昭阳,胡桂学,王春风. 动物免疫学研究技术[M]. 吉林:吉林科技出版社, 2002:10.
- [5] 李萌,许会会,高晋渝,等. 定量检测牛奶中蛋白质ELISA方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(4): 84-87.
- [6] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 湖北:湖北科学技术出版社, 2002:1.
- [7] GB50095-2010 食品中蛋白质的测定[S].
- [8] 李宏梁,焦茜楠,黄峻榕,等. 酪蛋白沉淀检测方法及其在牛乳经济掺假鉴定中的应用[J]. 食品科技, 2008, 33(12): 262-266.
- [9] 张东送,庞广昌,高法国,等. 毛细管电泳在牛乳中酪蛋白含量测定及掺假检测方面的应用[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 130-132.

(责任编辑:陈海霞)