

生乳中体细胞快速检测技术的对比研究

王丹*, 李梅, 王丹慧, 郭丽娟, 李慧, 高鹏飞, 智丽慧, 孟庆红, 赵军妮

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

摘要: **目的** 建立一种检测生乳中体细胞含量的快速检测方法(试剂盒法)。**方法** 本试剂盒法通过生物酶溶解奶样中的蛋白质, 缓冲液稳定脂肪球和蛋白并改变体细胞通透性, 细胞裂解液及荧光染料快速渗透进入体细胞并沾染 DNA, 培养过程中, 染液进入 DNA 的双螺旋结构, 与 DNA 结合后荧光量子产率明显提高, 最后通过荧光信号探测系统捕捉荧光强度来测定生乳中的体细胞数量。**结果** 该方法与快速仪器法对比, 相关系数达 94%以上, 2 种方法在统计学上无显著性差异($P>0.05$)。与标准方法对比, 针对同一样品的检测结果的 Log 差值小于 0.25, 2 种方法统计学上也无显著性差异($P>0.05$)。对不同样品进行重复性检测, 相对标准偏差均小于 15%。**结论** 该试剂盒法具有较高的准确度和精密度, 检测结果与标准方法和市售仪器快速检测法无明显差异, 检测时间缩短 50%, 提升了检测效率。由于无需大型的检测设备及配套试剂, 适合牧场和企业实验室的快速定量检测。

关键词: 体细胞数; 生乳; 试剂盒法; 快速仪器法; 显微镜法

Comparative study on rapid detection of somatic cells in raw milk

WANG Dan*, LI Mei, WANG Dan-Hui, GUO Li-Juan, LI Hui, GAO Peng-Fei,
ZHI Li-Hui, MENG Qing-Hong, ZHAO Jun-Ni

(Inner Mongolia Mengniu Dairy(guoup)Co., LTD, Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid detection method(kit method) for the content of somatic cells in raw milk. **Methods** In this kit method, proteins in milk samples were dissolved by biological enzymes. The buffer solution stabilized fat globules and proteins, and changed the permeability of somatic cells. Cell lysate and fluorescent dyes quickly penetrated into the somatic cells and stained with DNA. During the culture process, the dye solution entered the double helix structure of DNA. After binding with DNA, the fluorescence quantum yield was significantly increased. Finally, the fluorescence intensity was captured by fluorescence signal detection system to determine the number of somatic cells in raw milk. **Results** Compared with the rapid instrument method, the correlation coefficient was over 94%, and there was no significant difference between the two methods ($P>0.05$). The Log difference for the same sample was less than 0.25 compared with the standard method, and there was no significant difference between the two methods statistically ($P>0.05$). When the repeatability of different samples was tested, the relative standard deviation were less than 15%. **Conclusion** The rapid detection technology has high accuracy and precision, and there is no significant difference of the results between the standard method and the rapid detection method of the market instrument. The detection time is shortened by 50%, and the detection efficiency is

基金项目: 呼和浩特市科技计划项目(2017-高-2)

Fund: Supported by the Hohhot Science and Technology Project (2017-high-2)

*通讯作者: 王丹, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wangdan3@mengniu.cn

*Corresponding author: WANG Dan, Master, Engineer, Inner Mongolia Mengniu Dairy(guoup)Co., LTD, Hohhot 011500, China. E-mail: wangdan3@mengniu.cn

improved. Because no large-scale testing equipment and matching reagents are needed, it is suitable for rapid quantitative detection in pastures and enterprise laboratories.

KEY WORDS: somatic cell count; raw milk; kit method; rapid instrument method; microscopic method

1 引言

随着人民生活水平的提高,对于牛奶的需求日益增加^[1]。而体细胞数(somatic cell count, SCC)是衡量生乳质量和牛乳腺健康的一个重要指标。生乳体细胞数是指每毫升生乳中的体细胞总数^[2],通常由 98%~99%的巨噬细胞、淋巴细胞、多形核嗜中性白细胞和 1%~2%的乳腺组织上皮细胞组成^[3,4]。它是一种动态生物学现象,可反映奶牛的健康状况,是诊断牛体是否患有隐性乳房炎的重要手段;也可作为生乳质量的重要指标,间接反映奶牛场的饲养管理水平、环境卫生状况和经营状况^[5-9]。根据国际乳业通识,体细胞数越低,生乳质量越高;体细胞数越高,抗生素和致病菌的潜在风险增加,对生乳的质量影响增大,并对下游乳制品的产量、质量、风味等产生影响^[10,11]。

20 世纪 80 年代奶业发达国家就把体细胞数列入生乳质量安全监控和计价的范畴,并制定了收购标准,而我国一直未将体细胞列为检测指标^[12,13]予以监控。

现阶段,国内体细胞的通用检测方法为 NY/T 800-2004《生鲜牛乳中体细胞测定方法》,本方法操作复杂、对人员操作及经验要求较高、检测时间长,不适用于企业大批量快速收奶的要求。电子计数法和加利福尼亚法(CMT)易出现假阳性,福斯仪器检测法,设备昂贵、检测成本过高^[14,15]。

本研究针对生乳的特定基质,利用细胞裂解液及荧光染料,快速渗透进入体细胞并沾染 DNA,培养过程中,荧光标记液快速渗入体细胞,与 DNA 结合后荧光量子产率明显提高,通过稳定的荧光信号检测系统检测荧光强度来测定生乳中的体细胞数量。本研究操作方法便捷、检测效率高、规避了检测人员操作经验的影响,且无需大型的检测设备,适合牧场和企业实验室的快速检测。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

试验样品:来自于各牧场,部分样品为人为污染样品。

亚甲基蓝(纯度 99%,天津市福晨化学试剂厂);95%乙醇(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);四氯化乙烷(纯度 98%,天津市光复精细化工研究所)。

2.2 仪器与设备

CX31 显微镜(日本奥林巴斯光学工业株式会社);Bacto Count 生乳微生物快速检测仪(美国本特利仪器公司);

RSDA-M 加热器(55 °C±1 °C,美国 CHARM 公司);DH6000BII 恒温箱(天津市泰斯特仪器有限公司);HHW-21CU-600B 水浴锅(上海福玛实验设备有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 仪器快速检测法

(1)原理

Bacto Count IBCm 体细胞检测仪是一款采用流式细胞技术对生乳中的体细胞进行快速技术的半自动型仪器,即采用荧光染色剂使细胞内的 DNA 染色,样品经过染色后被压进喷嘴中央,同时鞘液也被压入形成鞘液流,使细胞以单列进入样品室,用流式细胞仪对其进行检测和计数。

(2)检测步骤

按照 Bacto Count 生乳细菌数及体细胞检测仪厂家说明书进行操作。

2.3.2 直接镜检法

按照 NY/T 800-2004《生鲜牛乳中体细胞测定方法》制备溶液并检测。

2.3.3 试剂盒法

(1)原理

本试剂盒法主要由常备缓冲液、荧光标记液、蛋白水解酶组成,通过生物酶溶解奶样中的蛋白质,常备缓冲液稳定脂肪球和蛋白,并改变体细胞的通透性,使得染液能渗入细菌,利用细胞裂解液及荧光染料,快速渗透进入体细胞并沾染 DNA,培养过程中,染液进入 DNA 的双螺旋结构,与 DNA 结合后荧光量子产率将明显提高,通过稳定的荧光信号检测系统检测荧光强度来测定生乳中的体细胞数量。

(2)检测步骤

①打开仪器,选择体细胞检测模块(Somatic cell count by microscopy, SCC)检测;

②试剂盒和奶样恢复室温(25±3) °C;

③开启加热器预热至 55 °C;

④取出 2 个微孔杯放置于加热器上;

⑤吸取 100 μL SCC 缓冲液于微孔中,并保持 5~10 min;

⑥55 °C加热结束后,先向含有 SCC 缓冲液的第 2 个微孔中加入 50 μL 校准品,并反复吸打混匀,再向含有缓冲液的第 1 个微孔中加入 50 μL 待测奶样,并反复吸打混匀;

⑦55 °C温育反应 1 min;

⑧在仪器界面扫 SCC 试剂盒条码并同一窗口扫描校准品码,并输入样品编号;

⑨将微孔放置仪器卡槽中,运行 SCC 程序进行检测。

2.3.4 数据分析方法

采用 SPSS 软件对不同方法的检测数据进行统计学分析,得出统计学结论。

3 结果与分析

3.1 方法优缺点对比

从方法范围、试剂种类、方法特性等多个维度对 3 个方法进行对比,具体情况见下表 1。试剂盒法检测效率、工作强度均优于直接镜检法,且与仪器快速检测法有相同的精确度,可用于生乳中体细胞的快速检测。

3.2 方法对比实验

3.2.1 与仪器快速检测法对比

选取 140 个牧场试验样品,分别用试剂盒法和仪器快速检测法同时检测样品中的体细胞数,结果分布及见数据分析见图 1 和表 2。

由表 2 可看出,试剂盒法与仪器快速检测法 2 方法保持较好的一致性,相关系数达 94%以上,2 方法之间无显著性差异($P>0.05$)。

3.2.2 与标准方法对比

取 8 个试验样品,采用试剂盒法和直接镜检法分别检

测体细胞数,结果如表 3 所示。2 个方法针对同一样品的检测结果的 Log 差值小于 0.25,符合 SN/T 1800-2006 食品和动物饲料微生物学 30 °C 菌落计数方法的偏差要求,两方法也无显著性差异($P>0.05$)。

3.3 方法重复性实验

随机选取 5 批试验样品,采用试剂盒法按照 2.3.3 的步骤对不同的样品进行 6 次重复测定实验,计算相对标准偏差(RSD%),结果如表 4 所示。

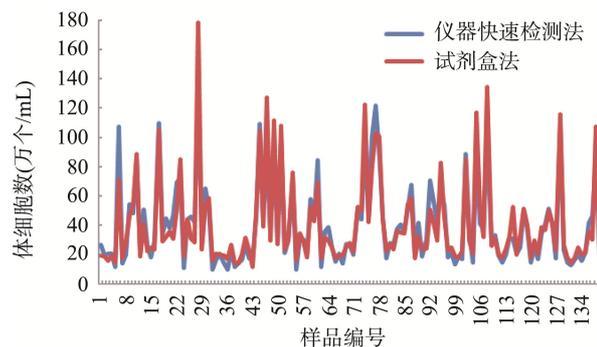


图 1 不同方法检测结果对比图

Fig.1 Comparison of results of different methods

表 1 不同检测方法优缺点对比

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of different detection methods

序号	对比维度	直接镜检法	仪器快速检测法	试剂盒法
1	适用范围	生鲜牛乳	生乳	生乳
2	需制备试剂	4 种	3 种	无
3	检测时间	30 min	5 min	8~10 min
4	人员工作强度	强度大, 依赖经验	强度小	强度小
5	方法特性	人员计数, 较粗犷	方法精确	方法精确
6	售后服务	无	由于进口仪器, 技术依赖, 异常处理流程较长	国产技术, 异常处理响应快

表 2 不同方法样本统计学检验

Table 2 Statistical Test for Different Methods

方法	平均值	标准差	<i>N</i>	相关系数	<i>t</i>	<i>d</i>	<i>P</i> 值(双侧)
试剂盒法	41.39	31.50	140	0.9405	-0.2310	139	0.8175
仪器快速检测法	40.57	28.29					

表 3 与标准方法对比测定结果
Table 3 Comparison of results with standard methods

序号	试剂盒法结果/(万个/mL)	直接镜检法结果/(万个/mL)	2 个方法的 log 值之差	P 值(双侧)
1	40.8	41	0.002	0.484
2	18.5	24	0.113	
3	30.9	24.5	0.101	
4	56.8	43.3	0.118	
5	32.7	43.9	0.128	
6	54.2	48.5	0.048	
7	29.9	23.1	0.112	
8	9	10.6	0.071	

表 4 体细胞重复性测定实验结果(万个/mL)
Table 4 Reproducibility results of somatic cell (Million/mL)

次数	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
1	77.3	21.6	55.9	76.9	40.8
2	69.1	23.1	60.7	69.3	45.4
3	66.7	20.9	54.9	66.7	39.3
4	71.9	18.1	48.9	68.4	48.6
5	68.4	19.5	55.3	81.6	49.7
6	82.8	17.7	58.6	72.4	46.5
平均值	72.7	20.15	55.72	74.22	45.05
标准偏差	5.65	1.91	3.66	5.71	3.82
RSD%	7.77	9.50	6.57	7.69	8.48

由上表可以看出, 样品相对标准偏差均小于 15%, 该试剂盒法的重复性较好, 满足使用要求。

4 结 论

本研究通过对不同的体细胞检测技术进行对比研究, 本研究的试剂盒法具有较高的准确度和精密度, 与标准方法和仪器快速检测法对比无显著性差异, 且显著缩短检测时间(缩短 50%), 提升检测效率, 规避人员操作及经验的影响, 可用于生乳中体细胞数的快速定量检测。同时, 由于无需大型的检测设备, 适合牧场和企业实验室的快速检测。

该方法适合全国各乳品企业引入使用, 进而实现体细胞的全面监控, 一方面填补国内体细胞快速检测技术短板, 同时实现体细胞检测技术与国际技术的接轨, 缩小与国际做法的差距。同时, 为生乳中体细胞国家标准的制定提供数据支撑, 进一步推动乳制品质量监控体系的完善。

参考文献

- [1] 杨佳怡, 牛春艳, 刘瑛颖, 等. 生鲜牛乳体细胞检测与计量校准必要性研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(5): 1-6.
Yang JY, Niu CY, Liu YY, *et al.* Analysis on detection methods for somatic cells in raw milk and necessity of measurement calibration [J]. *Biotechnol Bull*, 2020, 36(5): 1-6.
- [2] Sierra D, Sanchez A, Luengo C, *et al.* Temperature effects on somatic cell counts in goats milk [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(4): 385-387.
- [3] 石红丽, 杨永龙, 任先锋, 等. 生乳中体细胞数对酸奶成品品质的影响 [J]. 中国乳业, 2010, 11: 46-48.
Shi HL, Yang YL, Ren XF, *et al.* Effect of somatic cell number on quality of yogurt finished products [J]. *China Dairy*, 2010, 11: 46-48.
- [4] 宋洁, 王丽芳, 张三粉, 等. 采用 SCC-100 型体细胞计数仪研究不同保存条件对生鲜乳体细胞数的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 10: 21-23.
Song J, Wang LF, Zhang SF, *et al.* The effects of different preservation conditions on raw milk somatic cell count using the SCC-100 cell counter [J]. *Heilongjiang Anim Sci Veter Med*, 2017, 10: 21-23.
- [5] Maréchal CL, Thiéry R, Vautor E, *et al.* Mastitis impact on technological

- properties of milk and quality of milk products-A review [J]. Dairy Sci Technol, 2011, 91(3): 247-282.
- [6] 佟晓林. 生乳中体细胞数对乳品质量安全的影响研究进展[J]. 现代食品, 2019, (3): 13-15.
- Tong XL. Advances in research on the effect of somatic cell number in raw milk on dairy quality and safety [J]. Mod Food, 2019, (3): 13-15.
- [7] 宋洁, 张三粉, 敖长金, 等. 内蒙古地区生鲜乳中体细胞数分析及其对产奶量、乳品质的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(4): 1904-1909.
- Song J, Zhang SF, Ao CJ, *et al.* Analysis of somatic cell count in fresh milk and its effects on milk production and milk quality in inner mongoliaregion [J]. J Anim Nutr, 2019, 31(4): 1904-1909.
- [8] 李爱军, 庞学良, 张建雄, 等. 唐山地区生鲜乳体细胞变化规律研究[J]. 当代畜牧, 2018, 12: 30-32.
- Li AJ, Pang XL, Zhang JX, *et al.* Study on the change law of fresh milk cell in Tangshan area [J]. Contemp Anim Husb, 2018, 12: 30-32.
- [9] O'Brien B, Meaney WJ, Mcdonagh D, *et al.* Influence of somatic cell count and storage interval on composition and processing characteristics of milk from cows in late lactation [J]. Aus J Dairy Technol, 2001, 56(3): 213-218.
- [10] 苏传友, 郑楠, 李松励, 等. 生乳中体细胞数对乳品质量安全的影响研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 299-305.
- Su CY, Zheng N, Li SL, *et al.* A review of the literature on the effect of somatic cell count in raw milk on the quality and safety of milk [J]. Food Sci, 2018, 39(23): 299-305.
- [11] Koop G, Nielen M, Van WT. Bulk milk somatic cell counts are related to bulk milk total bacterial counts and several herd level risk factors in dairy goats [J]. J Dairy Sci, 2009, 92(9): 4355-4364.
- [12] 江跃德, 曾国熙, 吴志敏, 等. 生鲜乳中体细胞数升高带来的影响及控制措施[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2017, 33(9): 126.
- Jiang YD, Zeng GX, Wu ZM, *et al.* Effects and control measures of increased somatic cell numbers in fresh milk [J]. Chin Ani Husb Vet Abs, 2017, 33(9): 126.
- [13] 赵连生, 王加启, 郑楠, 等. 牛奶质量安全主要风险因子分析[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(7): 1-5.
- Zhao LS, Wang JQ, Zheng N, *et al.* Main risk factor analysis for milk quality and safety [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2012, 39(7): 1-5.
- [14] 付天骄, 田雨, 管勇佳, 等. 生乳体细胞数检测方法的研究[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(7): 57-59.
- Fu TJ, Tian Y, Guan YJ, *et al.* Study on the determination of somatic cell count in raw milk [J]. China Dairy Ind, 2012, 40(7): 57-59.
- [15] 杜欣军, 郭睿莉, 董峰, 等. 生鲜奶中体细胞计数方法的改进[C]. 第十三届中国科学技术协会会议论文集, 2011.
- Du XJ, Guo RL, Dong F, *et al.* Development of microscope detection of somatic cell in raw milk [C]. Pro of the 13th China Sci and Tec Asso Con, 2011.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



王丹, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: wangdan3@mengniu.cn