

酶联免疫吸附测定法在古代牛奶残留物检测中的应用

洪川^{1,2} 蒋洪恩^{1,2} 杨益民^{1,2} 吕恩国³ 王昌燧^{1,2}

(1. 中国科学院人类演化与科技考古实验室, 北京 100044;

2. 中国科学院研究生院科技史与科技考古系, 北京 100049;

3. 新疆文物考古研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 古代牛奶残留物研究是国际科技考古界的热点方向之一, 分析方法主要有脂肪酸单体碳同位素分析和蛋白质免疫性分析, 但国内相关研究尚未开展。本研究利用商品化的酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒, 对新疆吐鲁番地区鄯善县苏贝希遗址出土的黑色块状残留物进行分析。结果发现, 其中含有少量牛酪蛋白, 可见该残留物可能为牛奶制品或掺杂了牛奶, 这说明最迟在公元前3到5世纪牛奶就已出现在我国新疆先民的食谱中。分析手段的成熟, 可广泛应用于我国古代牛奶残留物的快速检测。

关键词: ELISA; 牛酪蛋白; 苏贝希遗址; 奶制品

中图分类号: K875.9 **文献标识码:** A

0 引言

牛是人类最早驯化的家畜之一, 随着文明的发展, 家牛逐渐用于食用、产奶、运输和耕作等^[1]。牛奶由于其独特的营养价值, 在欧洲农业文化和欧亚草原的游牧文化中占有重要地位^[2]。古代牛奶的传播和食用, 取决于人类的迁徙和家牛的传播; 因而相关研究, 有助于深入了解先民的生活模式、迁徙活动和文化交流^[3]。鉴于此, 探索史前时期牛奶的起源和传播, 一直是国际上学术研究热点之一。相关研究主要通过四种途径: 1) 牛奶的有机残留物。如出土陶器的有机残留物分析表明, 人类食用牛奶的历史至少可提早到公元前7000年, 位于土耳其西北地区^[4]; 2) 出土家牛的年龄结构。如巴基斯坦哈拉帕遗址出土的牛的种群数量和屠宰年龄分布表明, 当时的成年母牛已经被长期饲养, 可能用于产奶^[5]; 3) 乳糖耐受基因的分布。如乳糖耐受能力可能最早出现在乌拉尔西部地区和高加索北部地区的人群中^[6]; (4) 通过氮同位素手段判断牛犊的断奶时间^[7]。

牛奶的有机残留物分析对象主要为脂肪酸和蛋

白质。脂肪酸分析方面主要采用脂肪酸单体的碳同位素分析法^[8-9]; 蛋白质分析方面主要采用质谱法(DTMS)和多维分析(MVA)结合^[10]、消化分析和免疫吸附测定法(DACIA)^[11]以及酶联免疫吸附试验法(ELISA)^[12]等。目前, 国内关于古代牛奶残留物的报道甚少, 非常需要开展这方面的研究工作, 以弥补空白并为相关研究提供参考。

新疆吐鲁番地区长年干燥少雨, 古代蛋白质类有机遗物如皮革、毛织品保存相对较好。在这种气候条件下, 奶制品中的蛋白质也有可能保存下来。ELISA方法检测牛酪蛋白, 具有超低检测限、准确度高和操作方便等优点, 至今未在国内牛奶残留物研究中加以应用; 本研究利用该方法, 对吐鲁番盆地苏贝希遗址出土的黑色块状残留物加以分析, 研究该残留物中牛酪蛋白的保存情况, 从而推测其生物来源。

1 材料与方法

1.1 方法

试验采用德国R-Biopharm公司生产的牛酪蛋白快速检测ELISA试剂盒, 此试剂盒经欧盟认可,

收稿日期: 2010-02-25; 修回日期: 2010-06-28

基金项目: 中科院-德国马普伙伴小组项目资助、中科院规划局项目资助(KACX1-YW-0830)、中科院知识创新工程方向性项目资助(KJXC3.SYW.N12)、国家自然科学基金资助(40702003和40802002)

作者简介: 洪川(1983—), 女, 中国科学院研究生院科技史与科技考古系2007级硕士研究生, 从事生物考古中残留物研究。E-mail:

chuan.hong1101@gmail.com

可以快速准确地鉴定出牛酪蛋白,在现代食品检测等领域被广泛使用,但尚未见到在科技考古领域中的应用报道。试剂盒中使用的单克隆抗体可特异性识别牛奶中的 α -、 β -和 κ -酪蛋白,并且与 β -乳球蛋白没有交叉反应,与其他动物(绵羊、山羊)的酪蛋白也没有交叉反应。方法为 ELISA 夹心酶法,其原理为抗原抗体反应^[13]。微孔板包被有牛酪蛋白特异性抗体,加入标准品或样品溶液后,其中含有的牛酪蛋白会和特异性抗体结合,形成抗体-抗原复合物。没有结合的部分在洗涤步骤中会被除去。然后加入酶标记的抗体,即酶连接物和抗体-抗原复合物结合,形成抗体-抗原-抗体复合物(“三明治”夹心法)。洗涤后在孔中加入发色剂,结合的酶连接物将发色剂转化为蓝色。加入反应终止液后颜色由蓝色转变为黄色。用酶标仪在 450nm 处检测其吸光值。吸光度值与样品中的牛酪蛋白浓度成正比。该试剂盒的检出限为 0.12mg/kg,定量限为0.5mg/kg。

1.2 样品

吐鲁番地区鄯善县苏贝希遗址 3 号墓地年代为公元前 3~5 世纪,一陶钵(编号 M27:9)中盛有黑色块状残留物,质地坚硬,为分析的样品^[14]。通过二喹啉甲酸(BCA)法确定该残留物中含有相当多的蛋白质,浓度为 0.53g/g。

1.3 仪器和试剂

微孔板酶标仪,离心机,水浴锅,电子天平,微量移液器,研钵,蒸馏水,现代牛奶和牛酪蛋白快速检测 ELISA 试剂盒(德国 R-Biopharm 公司)。

1.4 ELISA 法的检测流程

1.4.1 检测前处理 (1) 冰箱冷藏室中(4℃)取出试剂盒,升至室温待用。(2) 按照说明书稀释试剂盒自带的蛋白提取缓冲液、酶连接物和洗涤缓冲液。

1.4.2 样品处理 取 0.1g 古代样品,在研钵中充分研细;取得的粉末样品放入干净试管中,加入 2mL 稀释好的蛋白提取缓冲液,充分混合,在恒温水浴 60℃ 条件下将蛋白充分释放,期间偶尔震荡。操作中佩带一次性医用手套,确保考古样品未被污染。完成后等样品降至室温,离心分离(10min,2500g),提取上清液放置于洁净无蛋白污染的一次性离心管中用于检测。

取 0.1mL 现代牛奶样品,放入干净试管中,加入 2mL 稀释好的蛋白提取缓冲液,充分混合,在恒温水浴 60℃ 条件下充分释放蛋白,偶尔震荡。后取出至室温后,离心分离(10min,2500g),取上清液于一个洁净无蛋白污染的一次性离心管中,稀释 1000

倍后用于检测。

1.4.3 样品检测 有 8 个步骤:

- (1) 取相应数量的微量孔条插入微孔板架。
- (2) 按照表 1 的配置安排将不同浓度梯度酪蛋白标准品,提取好的古代样品蛋白溶液和现代牛奶样品蛋白溶液分别取 100 μ L 添加到微孔中,在室温(20~25℃)下孵育 10min。
- (3) 倒出孔中的液体,将微孔板架倒置在吸水纸上拍打以除去孔中的液体,在每孔加入 250 μ L 洗涤缓冲液洗涤微孔。上述操作重复进行两遍。
- (4) 向每个微孔中加入 100 μ L 稀释后的酶连接物溶液,小心混匀,在室温条件下(20~25℃)继续孵育 10min。
- (5) 倒出孔中的液体,将微孔板架倒置在吸水纸上拍打以除去孔中的液体,再每孔加入 250 μ L 洗涤缓冲液洗涤微孔。上述操作重复进行两遍。
- (6) 向每个微孔中加入 100 μ L 发色剂,充分混合后在室温(20~25℃)条件下暗处孵育 10 min。
- (7) 向每个微孔中加入 100 μ L 反应终止液,充分混合。
- (8) 在加入反应终止液后 10min 内,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。利用标准酪蛋白溶液浓度和吸收值(OD 值)计算标准曲线,在此基础上即可计算样品所含的牛酪蛋白浓度。

表 1 标准酪蛋白溶液浓度和样品 OD 吸收值

Table 1 The concentration of standard bovine casein and samples' OD absorbance

编号	加入溶液的名称	酪蛋白浓度/mg. kg ⁻¹	OD 值/450nm
1	稀释缓冲液	0	0.073
2	酪蛋白标准品 1	0.5	0.218
3	酪蛋白标准品 2	1.5	0.366
4	酪蛋白标准品 3	4.5	0.735
5	酪蛋白标准品 4	13.5	1.507
6	古代样品提取液	0.432	0.180
7	现代牛奶提取液	—	1.779

2 结果与讨论

以表 1 中的标样浓度为自变量,标样 OD 值为纵坐标,建立标准牛酪蛋白曲线图(图 1)和回归方程如下,相关系数 R² 为 0.999,说明试剂盒质量较好。

$$y = -1.5216x^3 + 6.8975x^2 + 2.1414x - 0.1839$$

(R² = 0.999)

根据回归方程和表 1 中的样品 OD 吸收值计算,古代样品提取液中的牛酪蛋白浓度为 0.432 mg/kg,

这个浓度高于检测限 0.12 mg/kg 而低于定量限 0.5 mg/kg,故只能用于定性分析而不可以作为定量分析,即检测结果为阳性,说明该可见残留物含有牛酪蛋白成分。而现代牛奶样品的 OD 值过高,已超出标准曲线的定量范围;但该现代样品可作为阳性对照,验证该 ELISA 试剂盒可以检测牛酪蛋白。

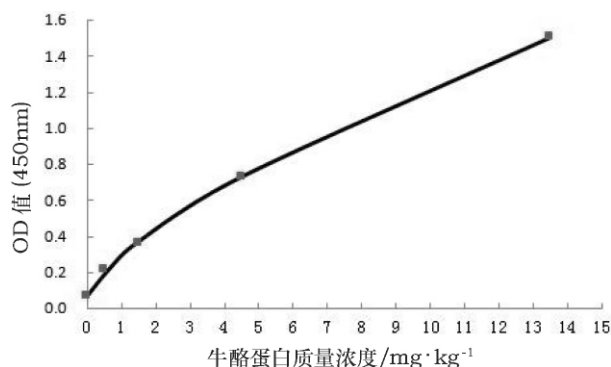


图1 牛酪蛋白标准曲线

Fig. 1 The standard curve of bovine casein

试验结果表明,该古代残留物中含有少量牛酪蛋白,为牛奶的特异性蛋白^[15]。因此该残留物在其制作过程中使用了牛奶,推测此黑色块状古代残留物为牛奶制品或牛奶掺杂物。这表明公元前3到5世纪时期,牛奶已经出现在吐鲁番地区先民的生活中。从动物考古角度判断奶制品生产,需要较多的样品^[5];而苏贝希遗址出土牛骨较少^[14],因此本研究的分析深化了对当时家牛利用方式的了解。

考古学资料和文献表明,古代新疆饮食文化起源于西域历史文化,同时受到中华文化、西亚、南亚,甚至地中海周围历史文化的影响。随着人类社会的发展,我国古代新疆地区逐渐形成了自身独特的饮食文化特色^[16]。然而,相关研究工作主要依据历史资料和肉眼观察,如专家推测早在秦汉时期新疆地区先民就已开始以奶和奶酪为食^[17];孔雀河古墓沟发现“在草篓内有糊干的白色浆状物”,推测为乳饼之类^[18]。本工作是国内首次对古代牛奶制品开展的科技分析,今后的深入研究有助于进一步了解牛奶在中国的传播、农牧文化地区的农业生产模式和饮食文化等。

目前通过免疫学方法,可以很好地区分不同种类的蛋白,如胶原蛋白,蛋清蛋白和牛酪蛋白等;也可以区分同一蛋白的不同种属,如牛胶原蛋白,兔胶原蛋白和羊胶原蛋白等^[12]。ELISA 法操作简单,用时少,检出限高,十分适合古代蛋白质类残留物的分析鉴定;在样品量较少时,也能获得较好结果,因此该方法在国外也被应用于陶片、石器或艺术品中吸

附或掺杂的微量不可见残留物分析^[19~23]。本工作采用商品化的 ELISA 试剂盒,免去了制备抗体等试验环节,样品检测更加方便和快捷,提高了实验的重复性和可靠性。同时,本研究可为今后的相似研究工作提供借鉴,从而推动免疫法在国内科技考古和文物保护领域中的应用。

3 结 论

通过 ELISA 法,检测出新疆吐鲁番地区苏贝希遗址3号墓地出土的黑色块状残留物中含有牛酪蛋白成分,根据这一结果推测其为牛奶制品或是牛奶掺杂物;首次从科技角度证实,公元前3到5世纪时期,牛奶已经出现在我国新疆地区先民的生活中。

参考文献:

- [1] Greenfield H J. The origins of milk and wool production in the old world: A zooarchaeological perspective from the central Balkan [J]. *Current Anthropol*, 1988, **29**(4): 573–593.
- [2] 易 华. 青铜之路: 上古西东文化交流概说. 东亚古物[M](A卷). 北京: 文物出版社, 2004: 76–96.
- [3] YI Hua. Bronze roads: A introduction to archaic cultural exchange in Eurasia. *Antiquities of Eastern Asia* [M](A). Beijing: Cultural Relics Press, 2004: 76–96.
- [4] Enattah N S, Jensen T G K, Nielsen M *et al.* Independent introduction of two Lactase – Persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to Milk Culture [J]. *Am J Human Genetics*, 2008, **82**: 57–72.
- [5] Evershed R P, Payne S, Sherratt A G *et al.* Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding [J]. *Nature*, 2008, **455**: 528–531.
- [6] Miller L J. Urban economies in early states: the secondary products revolution in the Indus Civilization [D]. New York University: Ph. D thesis, 2004.
- [7] Enattah N S, Trudeau A, Pimenoff V *et al.* Evidence of still – ongoing convergence evolution of the lactase persistence T – 13910 alleles in humans [J]. *Am J Human Genetics*, 2007, **81**(3): 615–625.
- [8] Vigne J D, Helmer D. Was milk a “secondary product” in the Old World Neolithisation process? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats [J]. *Anthropozoologica*, 2007, **42**(2): 9–40.
- [9] Spangenberg J E, Jacomet S, Schibler J. Chemical analyses of organic residues in archaeological pottery from Arbon Bleiche 3, Switzerland – evidence for dairying in the late Neolithic [J]. *J Archaeol Sci*, 2006, **33**: 1–13.
- [10] Copley M S, Berstan R, Dudd S N *et al.* Dairying in antiquity I Evidence from absorbed lipid residues dating to the British Iron Age [J]. *J Archaeol Sci*, 2005, **32**: 485–503.
- [11] Oudemans T F M, Eijkel G B, Boon J J. Identifying biomolecular origins of solid organic residues preserved in Iron Age Pottery using DTMS and MVA [J]. *J Archaeol Sci*, 2007, **34**: 173–193.
- [12] Craig O E, Taylor G, Mulville J *et al.* The identification of prehistoric dairying activities in the Western Isles of Scotland: an inte-

- grated biomolecular approach [J]. *J Archaeol Sci* 2005 **32**: 91 – 103.
- [12] Heginbotham A, Millay V, Quick M. The use of immunofluorescence microscopy (IFM) and Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA) as complementary techniques for protein identification in artists' materials [C] // Postprints of the Wooden Artifacts Group 2004. United States ,Washington ,D. C. : American Institute for Conservation. Wooden Artifacts Group 2004: 3 – 24.
- [13] 李健武, 陈丽蓉, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 390 – 396.
- LI Jian – wu, CHEN Li – rong, YU Rui – yuan *et al.* Experimental principle and methodology of biochemistry [M]. Beijing: Peking University Press, 1994: 390 – 396.
- [14] 新疆文物考古研究所, 吐鲁番地区博物馆. 新疆鄯善县苏北希遗址及墓地 [J]. *考古* 2002 (6) : 42 – 57.
- Xinjiang Institute of Antiquity and Archaeology & Turfan Prefectural Museum. The Subeixi site and cemeteries in Shanshan County, Xinjiang [J]. *Archaeology* 2002 (6) : 42 – 57.
- [15] 董晓丽, 王加启, 赵国琦, 等. 牛奶中免疫活性蛋白的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医* 2008 **35**(2) : 67 – 70.
- DONG Xiao – li, WANG Jia – qi, ZHAO Guo *et al.* The research and development of immunoreactive proteins in milk [J]. *China Animal Husbandry Veter Med* 2008 **35**(2) : 67 – 70.
- [16] 贺菊莲. 西域饮食文化初探 [J]. *新疆大学学报(哲学 · 人文社会科学版)* 2007 **35**(4) : 73 – 77.
- HE Ju – lian. An Exploration of Cuisine in the Western Region [J]. *J Xinjiang Univ (Phil Social Sci)* 2007 **35**(4) : 73 – 77.
- [17] 薛宗正. 中国新疆古代社会生活史 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1997: 70.
- XUE Zong – zheng. History of ancient society in Xinjiang [M]. Urumqi: Xinjiang Renmin Press, 1997: 70.
- [18] 贺菊莲. 从新疆史前考古初探其古代居民饮食文化 [J]. *中国农史* 2007 (3) : 3 – 10.
- HE Ju – lian. On Prehistoric Inhabitants' diet Culture in Xinjiang from Its Archaeology Discoveries [J]. *Agr Hist China* 2007 (3) : 3 – 10.
- [19] Cattaneo C, Gelsthorpe K, Phillips P *et al.* Identification of ancient blood and tissue – ELISA and DNA analysis [J]. *Antiquity* 1991, **65**(249) : 878 – 881.
- [20] Scott D A, Newman M, Schilling M *et al.* Blood as a binding medium in a Chumash Indian pigment cake [J]. *Archaeometry* 1996, **38**(1) : 103 – 112.
- [21] Gaylarde C C. Advances in detection of microbiologically induced corrosion [J]. *Int Biodeter* 1990 **26**(1) : 11 – 22.
- [22] Tayler S, May E. Detection of specific bacteria on stone using an enzyme – linked immunosorbent assay [J]. *Int Biodeter Biodegr*, 1994 **34**(2) : 155 – 167.
- [23] Schweiter M, Hill C, Asara J *et al.* Identification of immunoreactive material in mammoth fossils [J]. *J Mol Evol* 2002 **55**(6) : 696 – 705.

Application of enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) method in the detection of ancient milk residues

HONG Chuan^{1 2}, JIANG Hong – en^{1 2}, YANG Yi – min^{1 2}, LU En – guo³, WANG Chang – sui^{1 2}

(1. Laboratory of Human evolution and Scientific Archeology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100044, China;

2. Department of Scientific History and Archaeometry, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Xinjiang Institute of Antiquity and Archaeology, Urumqi 830011, China)

Abstract: Ancient milk residues research is a hot spot of international scientific archeology. Major analytical methods currently in use include stable carbon isotope composition of individual fatty acid and protein immunoassay. Such research has not been developed in China. In this research, a commercial ELISA kit was adopted to analyze the black block residue from the Subeixi Site in Shanshan county, Turpan district, Xinjiang Uygur Autonomous Region. ELISA analysis demonstrated the presence of a small amount of bovine casein in the residue. Thus, the detected residue could be a milk product or a certain substance blended with milk. It suggested that the milk had been included in an ancient diet no later than the third to fifth century B. C. among the people in Xinjiang area. This analytical method is well developed and could be widely applied to the fast detection of ancient milk residues in China.

Key words: ELISA; Bovine casein; The Subeixi Site; Milk product

(责任编辑 谢 燕)