



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101710122 A

(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号 200910175355.3

(22) 申请日 2009.12.16

(71) 申请人 河北省科学院生物研究所

地址 050081 河北省石家庄市桥西区友谊南大街 46 号河北省科学院生物研究所

(72) 发明人 闫静辉 张小兵 吴萌 李春生  
邸禄芹 齐颖颖 李君华 高志肖  
陈英珠 程华 董超 李亚璞  
谢莉 时玮

(74) 专利代理机构 石家庄新世纪专利商标事务  
所有限公司 13100

代理人 张贰群

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

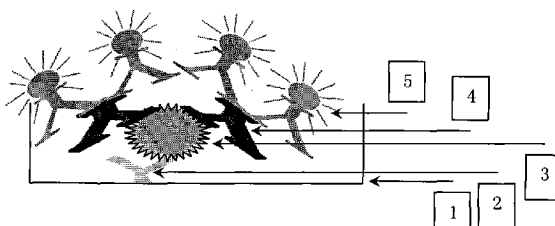
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,属于免疫检测技术领域。其特征在于利用包被于酶标板上的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体,与兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体组成三抗体夹心法试剂,进行三抗体夹心法免疫学检测,检测原料乳中的  $\beta$ -内酰胺酶。与现有技术相比,本发明可以准确、特异和快速地免疫检测非法添加到牛奶中的  $\beta$ -内酰胺酶,以便于从源头上及时监测和把控原奶质量,保证牛奶的安全性和人类健康,社会及经济效率好。



1. 一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,其特征在于利用包被于酶标板上的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体,与兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体组成三抗体夹心法试剂,进行三抗体夹心法免疫学检测,检测原料乳中的  $\beta$ -内酰胺酶。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,其特征不在于所述的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体是采用  $\beta$ -内酰胺酶免疫 BALB/c 小鼠制备的。

3. 根据权利要求 2 所述的一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,其特征不在于所述的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体的效价为 1 : 655 万~ 1310 万,亚型是 IgG1,亲和力为  $1.000 \times 10^9 \text{L/mol} \sim 1.046 \times 10^{10} \text{L/mol}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,其特征不在于所述的兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体是采用  $\beta$ -内酰胺酶免疫新西兰大白兔制备的。

5. 根据权利要求 4 所述的一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,其特征不在于所述的兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体效价为 1 : 320 万~ 655 万。

6. 根据权利要求 1 所述的一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,其特征不在于所述的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体与兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体都采用蛋白 A 纯化后应用。

## 一种快速免疫检测牛奶中 $\beta$ -内酰胺酶的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体是一种动物性食品安全或畜牧业生产领域原料乳中添加的  $\beta$ -内酰胺酶的 ELISA 检测方法。

### 背景技术

[0002] 目前,青霉素作为  $\beta$ -内酰胺类药物是治疗牛乳腺炎的首选药物,是牛奶中最常见的残留抗生素。由于国内多数乳品企业对抗生素残留超标的牛乳采取拒绝收购的原则,出于经济利益的驱动,一些不法奶站为了谋求自己的经济利益,人为地使用一些生物制剂去降解牛乳中残留的抗生素,生产所谓的人造“无抗奶”。2005 年至今,已有数家公司公开宣称出售分解牛乳中残留抗生素的解抗剂。该解抗剂的主要成分是  $\beta$ -内酰胺酶,它是由革兰氏阳性细菌产生和分泌的,可选择性分解牛奶中残留的  $\beta$ -内酰胺类抗生素。 $\beta$ -内酰胺酶为我国不允许使用的食品添加剂,该酶的使用掩盖了牛奶中实际含有的抗生素。 $\beta$ -内酰胺酶能够使青霉素内酰胺结构破坏而失去活性,导致青霉素、头孢菌素等抗生素类药物耐药性增高,从而大大降低了人们抵抗传染病的能力,给消费者的身体健康带来危害。

[0003] 当前,牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的检查技术,有杯碟法、碘量法和酸度法等几种方法,但都缺乏特异性。并且, $\beta$ -内酰胺酶,有内源性和外源性之区别。外源性就是人为添加的,危害巨大;内源性的量很少,但会对利用上述几种方法所检测的结果,产生干扰,测量误差大。目前尚没有一种可以准确、特异和快速地免疫检测非法添加到牛奶中的  $\beta$ -内酰胺酶的方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的提供一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,利用此法,可以准确、特异和快速地免疫检测非法添加到牛奶中的  $\beta$ -内酰胺酶,以便于从源头上及时监测和把控原奶质量,保证牛奶的安全性和人类健康,社会及经济效率好。

[0005] 本发明目的是这样实现的:一种快速免疫检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺酶的方法,其特征在于利用包被于酶标板上的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体,与兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体组成三抗体夹心 (Tas-ELISA) 法试剂,进行三抗体夹心 (Tas-ELISA) 法免疫学检测,检测原料乳中的  $\beta$ -内酰胺酶。

[0006] 所述的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体是采用  $\beta$ -内酰胺酶免疫 BALB/c 小鼠制备的。

[0007] 所述的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体的效价为 1 : 655 万 ~ 1310 万,亚型是 IgG1,亲和力为  $1.000 \times 10^9 \text{L/mol} \sim 1.046 \times 10^{10} \text{L/mol}$ ,较佳。

[0008] 所述的兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体是采用  $\beta$ -内酰胺酶免疫新西兰大白兔制备的,或日本大耳白兔等制备的。

[0009] 所述的兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体效价为 1 : 320 万 ~ 655 万,较佳。

[0010] 所述的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体与兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体都采用蛋白

A 纯化后应用, 较佳。

[0011] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0012] 一、特异性强: 由于鼠抗单克隆抗体和兔抗多克隆抗体均是特异的, 仅对原料乳中添加的  $\beta$ -内酰胺酶有阳性反应, 其内源性的  $\beta$ -内酰胺酶的干扰可被排除, 准确性高。

[0013] 二、检测快速、成本低: 原料乳样品的检测可在 3 个小时左右, 可一次可检测 96 个样本, 并且由于所用试剂均为常规试剂, 不需特殊设备, 一般基层检验检测实验室均可进行, 成本低。

[0014] 三、社会效益好: 从食品安全的源头实现对原料乳的检查、监控, 确保广大消费群众的饮食安全, 有利于人民的身体健康。

#### 附图说明

[0015] 附图是本发明的检测原理示意图。

[0016] 图中 1. 酶标板, 2. 鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体, 3.  $\beta$ -内酰胺酶, 4. 兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体, 5. 辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体。

#### 具体实施方式

[0017] 为了更好的实施本发明, 特举较佳实施例如下。

[0018] 采用  $\beta$ -内酰胺酶分别免疫 BALB/c 小鼠和新西兰大白兔, 制备出了鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体和兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体。鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体的效价为 1 : 1310 万, 亚型是 IgG1 亲和力为  $1.046 \times 10^{10} \text{L/mol}$ , 与其他相关物质反应阴性, 仅与抗原  $\beta$ -内酰胺酶有阳性反应; 兔抗  $\beta$ -内酰胺酶效价为 1 : 655 万, 仅与抗原  $\beta$ -内酰胺酶反应阳性。单克隆抗体与多克隆抗体都采用蛋白 A 纯化后应用。用于包被的鼠抗  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体与兔抗  $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体一起可以实现对原料乳中  $\beta$ -内酰胺酶的三抗体夹心法检测。检测灵敏度为 40U/mL。该发明的检测步骤是:

[0019] 1、用 0.01mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将单克隆抗体稀释至  $5 \mu\text{g/mL}$  包被酶标板, 每孔  $100 \mu\text{L}$ ,  $4^\circ\text{C}$  过夜;

[0020] 2、用 PBS/T20 洗板 3 次, 每孔  $200 \mu\text{L}$ , 每次 3 分钟;

[0021] 3、用含 3% 小牛血清的 PBS/T20 封闭, 每孔  $200 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 小时;

[0022] 4、洗板, 同步骤 2; 加入牛奶样品, 每孔  $100 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 分钟;

[0023] 5、洗板, 同步骤 2; 加入 0.75mg/L 的多克隆抗体, 每孔  $100 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 30 分钟;

[0024] 6、洗板, 同步骤 2; 加入 0.08mg/L 的辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体, 每孔  $100 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 30 分钟;

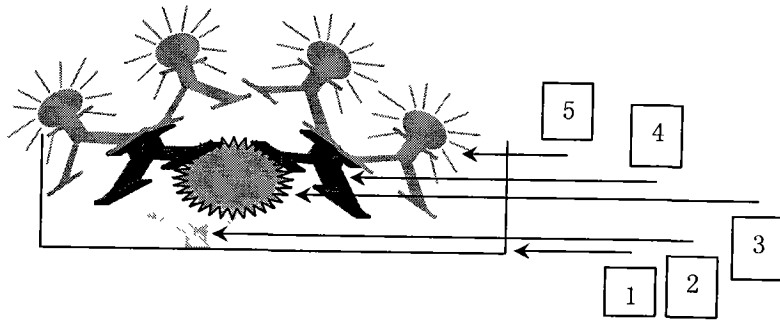
[0025] 7、洗板, 同步骤 2; 加入四甲基联苯胺 (TMB) 显色液, 每孔  $100 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  避光反应 15 分钟后, 加入  $50 \mu\text{L}$   $2\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液; 读取波长为 450nm 时的 O.D. 值。

[0026] 8、判定标准: 阳性阈值 =  $2.1 \times$  空白对照, 空白对照  $< 0.2$ 。如样品 O.D. 值大于等于阳性阈值, 则该样品中含有  $\beta$ -内酰胺酶。

[0027] 9、结果: 空白对照均值等于 0.106, 阳性阈值是 0.223。

[0028] 样品一: O.D. 值为 0.248, 则该样品中含有添加的  $\beta$ -内酰胺酶;

[0029] 样品二 :O. D. 值为 0. 101, 则该样品中不含有添加的  $\beta$ -内酰胺酶。



专利名称(译)	一种快速免疫检测牛奶中 $\beta$ -内酰胺酶的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101710122A</a>	公开(公告)日	2010-05-19
申请号	CN200910175355.3	申请日	2009-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
[标]发明人	闫静辉 张小兵 吴萌 李春生 邱禄芹 齐颖颖 李君华 高志肖 陈英珠 程华 董超 李亚璞 谢莉 时玮		
发明人	闫静辉 张小兵 吴萌 李春生 邱禄芹 齐颖颖 李君华 高志肖 陈英珠 程华 董超 李亚璞 谢莉 时玮		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	<a href="#">CN101710122B</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种快速免疫检测牛奶中 $\beta$ -内酰胺酶的方法，属于免疫检测技术领域。其特征在于利用包被于酶标板上的鼠抗 $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体，与兔抗 $\beta$ -内酰胺酶多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体组成三抗体夹心法试剂，进行三抗体夹心法免疫学检测，检测原料乳中的 $\beta$ -内酰胺酶。与现有技术相比，本发明可以准确、特异和快速地免疫检测非法添加到牛奶中的 $\beta$ -内酰胺酶，以便于从源头上及时监测和把控原奶质量，保证牛奶的安全性和人类健康，社会及经济效率好。

