

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103105494 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 15

(21) 申请号 201110356761. 7

(22) 申请日 2011. 11. 11

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 何方洋 万宇平 吴鹏 罗晓琴

郭旭 崔海峰 冯静 段盈盈
崔彦虎 聂雯莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的
试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的试剂盒及方法。试剂盒包括微孔条、微孔试剂、试纸条和微孔塞,所述的微孔试剂为冻干的胶体金标记的头孢类和三聚氰胺特异性抗体,所述头孢类药物特异性抗体可为头孢类药物单克隆抗体或头孢类药物多克隆抗体;所述三聚氰胺特异性抗体可分为三聚氰胺单克隆抗体或三聚氰胺多克隆抗体;所述试纸条由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜、底板,依次连接组成,所述反应膜上包括两条检测线和一条质控线,两条检测线分别包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物和三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物,质控线包被有抗抗体。用本发明试剂盒检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的方法,简便、快速、直观、准确、便于携带、适用范围广、成本低、易推广使用。

1. 一种检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的试剂盒,其特征在于包括试纸条、微孔条、微孔试剂和微孔塞,所述试纸条包括反应膜、样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板,所述反应膜上有两条检测线和一条质控线,两条检测线分别包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物和三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物,质控线包被有抗抗体,所述微孔试剂为冻干的头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述试纸条由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜依次黏贴在底板上组成,所述微孔条上具有微孔塞。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于:所述保护膜粘贴在试纸条的样品吸收垫上,为检测端,上面有MAX标记线。

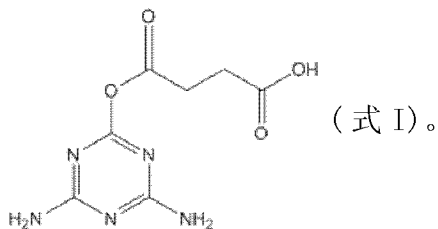
4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的三聚氰胺检测线靠近样品吸收垫一端,质控线靠近吸水垫一端, β -内酰胺类药物检测线在三聚氰胺检测线和质控线之间。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述微孔条底部含有冻干的头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述微孔塞能够紧密地塞在微孔条中。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述头孢类药物-载体蛋白偶联物由头孢类药物与载体蛋白偶联得到,所述三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物由三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:三聚氰胺半抗原是通过三聚氰酸二酰胺和琥珀酸酐反应,得到的三聚氰酸二酰胺的半琥珀酸酯的半抗原。分子结构如式I所示:



9. 根据权利要求1或8所述的试剂盒,其特征在于:头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物中的头孢类药物特异性抗体是以头孢类药物-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述头孢类药物特异性抗体可为头孢类药物单克隆抗体或头孢类药物多克隆抗体;三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物中的三聚氰胺特异性抗体是以式I化合物与载体蛋白偶联得到的三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述三聚氰胺特异性抗体可为三聚氰胺单克隆抗体或三聚氰胺多克隆抗体。

10. 一种制备权利要求1-9任一项所述的试剂盒方法,其包括步骤:

1) 分别制备冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂;

2) 分别制备具有包被头孢类药物-载体蛋白偶联物和包被有三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被抗抗体的质控线的反应膜;

3) 将2)制备好的反应膜与样品吸收垫、保护膜、吸水垫、底板组装成试纸条;

4) 将1)和3)制备好的冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂、微孔条、微孔塞和试纸条组装成试剂盒。

11. 一种牛奶样本中能够同时检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留的方法,其包括步骤:

- 1) 用权利要求 1-9 任一项所述的试剂盒进行检测;
- 2) 分析检测结果。

一种检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测 β -内酰胺类和三聚氰胺的试剂盒及方法。

背景技术

[0002] β -内酰胺类药物是医学和兽医学上的一类重要的抗菌药物,应用十分广泛。但由于过敏反应及细菌产生的耐药性等原因,许多国家都对该类药物在动物上的使用及在动物源性食品中的残留进行了严格控制。美国食品和药品监督管理局(FDA)的调查表明:不注意休药期、用药不合理或是使用违禁药物,是导致动物性食品中抗生素残留的主要原因。长期摄入含抗生素的食品,可造成药物积累,当达到一定浓度后,就会对人体的健康带来一系列负面影响,如产生过敏反应、破坏胃肠道菌群平衡和增强细菌耐药性等。更为重要的是,抗生素被过量食入健康人肠道,会破坏健康人的正常菌群环境,导致人体免疫力的降低,从而危害消费者的身体健康,同时也影响牛奶及乳制品的出口贸易。我国的原料乳中 β -内酰胺类抗生素残留严重,对其开展监控检测是我国乳品业发展中极为关注的问题。欧盟、美国等多个国家都制定了牛奶、肌肉和肾脏等动物源性食品中该类药物的最高残留限量(MRL),我国农业部 235 号文件公告对其 MRL 也做了严格规定,该类药物在牛奶中的 MRL 为 $4 \sim 100 \mu\text{g/L}$,在肌肉、肝脏和肾脏中的 MRL 为 $50 \sim 1000 \mu\text{g/kg}$ 。

[0003] 三聚氰胺(melamine),简称三胺,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物。食品工业中常需要测定食品中的蛋白质含量。由于直接测量蛋白质技术比较复杂,所以常用凯氏定氮法间接确定食品中蛋白质的含量。由于三聚氰胺与蛋白质相比含有更高比例的氮原子,所以三聚氰胺非法添加剂常被一些不法商贩用作食品添加剂,以提升食品检测中的蛋白质含量指标。2008 年 8 月以来,中国一些医院陆续检查到部分婴儿患有胆结石,而这些患有胆结石的婴儿均喝了含有三聚氰胺的奶粉,这是影响全国的“三鹿奶粉”事件。在之后的调查中发现,有些不法商人为获取更高的利润,直接在原料奶中添加三聚氰胺。随后在全国奶粉和液态奶的检测中,发现市场上很大部分产品中均含有三聚氰胺,导致了乳品行业的诚信危机,也给人们的日常生活造成了巨大的负面影响。我国卫生部等五部门联合发布公告,规定了我国婴儿配方食品中三聚氰胺限量值为 1mg/kg ,其他食品中三聚氰胺的限量值为 2.5mg/kg 。

[0004] 乳制品中的抗生素和三聚氰胺添加剂的残留目前已经成为消费者所迫切关注的焦点问题,为使牛奶中抗生素和三聚氰胺添加剂残留问题得到有效监控,符合最大残留限量标准,奶牧场、乳制品厂、政府监督部门、出入境检测、大型食品流通领域等都在努力寻求准确可行的检测方法,许多大型化学试剂和仪器公司也致力于开发 β -内酰胺类和三聚氰胺残留检测的方法和仪器。

[0005] 目前,牛奶及生鲜奶中 β -内酰胺类和三聚氰胺残留的检测方法依据不同的检测原理,大体可分为三大类:微生物受阻检测、仪器检测法、免疫学分析法。微生物受阻检测方法,主要有抑菌圈试验、浑浊度试验、变色型检测金标试剂盒方法,微生物检测方法检测成本价低,但是灵敏度低、耗时长、耐药菌的存在容易导致误检;仪器检测方法,是目前检测

β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的主要方法,有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱法、气相色谱-串联质谱法等,仪器检测方法精确度高,但其存在检测成本高,检测设备复杂,对检测人员的要求较高,检测耗时长等缺点,目前常用的免疫学分析法,主要为酶联免疫检测法和放射免疫分析法,两种方法的前处理过程较为复杂,对于现场大规模筛查样品还存在着一定局限性。

[0006] 中国发明专利 200810162588.5(CN101429241A) 中公开了“青霉素与载体蛋白偶联产物和 β -内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途”,该方法中的青霉素单克隆抗体制备的酶联免疫试剂盒仅能检测青霉素 G、氨苄青霉素、羧苄青霉素三种 β -内酰胺类抗生素,检测药物种类少,制备的胶体金试纸条检测灵敏度低。目前免疫分析领域缺乏能够同时检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的技术及其应用。因此,在实践中有必要建立一种检测药物种类多、敏感度高、操作简单、成本低、适合大规模推广的检测方法。

发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供一种能够同时检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的试剂盒。

[0008] 本发明所提供的试剂盒包括微孔条、微孔试剂、微孔塞和试纸条,试纸条包括底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜,其依次连接;所述微孔试剂为冻干的头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物;头孢类药物特异性抗体可为头孢类药物单克隆抗体或头孢类药物多克隆抗体,三聚氰胺特异性抗体可为三聚氰胺单克隆抗体或三聚氰胺多克隆抗体;反应膜上包被有两条检测线和一条质控线;当头孢类药物特异性抗体为头孢类药物单克隆抗体时,微孔试剂中包含头孢类单克隆抗体-胶体金标记物, β -内酰胺类药物检测线包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物,质控线包被羊抗鼠抗体;当头孢类药物特异性抗体为头孢类药物多克隆抗体时,微孔试剂中包含头孢类多克隆抗体-胶体金标记物, β -内酰胺类药物检测线包被头孢类药物-载体蛋白偶联物,质控线包被羊抗兔抗体;当三聚氰胺特异性抗体为三聚氰胺单克隆抗体时,微孔试剂中包含三聚氰胺单克隆抗体-胶体金标记物,三聚氰胺检测线包被有三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物,质控线包被羊抗鼠抗体;当三聚氰胺特异性抗体为三聚氰胺多克隆抗体时,微孔试剂中包含三聚氰胺多克隆抗体-胶体金标记物,三聚氰胺检测线包被三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物,质控线包被羊抗兔抗体;三聚氰胺半抗原是通过三聚氰酸二酰胺与琥珀酸酐反应,得到的三聚氰酸二酰胺的半琥珀酸酯半抗原。

[0009] 所述保护膜粘贴在样品吸收垫上的检测端,上面有 MAX 标记线。

[0010] 所述的三聚氰胺检测线靠近样品吸收垫一端,质控线靠近吸水垫一端, β -内酰胺类药物检测线在三聚氰胺检测线和质控线之间。其中三聚氰胺检测线用检测线 (T) 表示, β -内酰胺类药物检测线用检测线 (B) 表示,质控线用质控线 (C) 表示。以试纸条的样品吸收垫一端为始端,以试纸条的吸水垫一端为末端,质控线 (C) 距离反应膜与吸水垫始端相连的一端为 5-8mm,检测线 (B) 距离质控线 (C) 4-6mm,检测线 (T) 距离检测线 (B) 4-6mm。

[0011] 所述头孢类药物-载体蛋白偶联物是由头孢类药物与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0012] 所述三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物是由三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联得

到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0013] 所述头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物中的头孢类药物特异性抗体是以头孢类药物-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得。

[0014] 所述头三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物中的三聚氰胺特异性抗体是以三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得。

[0015] 所述底板可为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;样品吸收垫可为吸滤纸或滤油纸;吸水垫为吸水纸;反应膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜;吸水垫为吸水纸;保护膜为PE材质保护膜。

[0016] 本发明的另一个目的是提供了一种制备上述试剂盒的方法,其包括步骤:

[0017] 1) 在微孔条上制备冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂,并用微孔塞该盖在微孔条上;

[0018] 2) 制备两条分别具有包被头孢类药物-载体蛋白偶联物和三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和一条包被抗抗体的质控线的反应膜;

[0019] 3) 将2)制备好的反应膜与样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板组装成试纸条;

[0020] 4) 将1)和3)制备好的冻干有头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物和三聚氰胺单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂、试纸条、微孔条以及微孔塞组装成试剂盒。

[0021] 具体的说,步骤包括:

[0022] 1、 β -内酰胺类药物抗原的合成及其抗体的制备

[0023] 1) 将头孢类药物与载体蛋白偶联,形成头孢类药物-载体蛋白偶联物;

[0024] 2) 用头孢类药物-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌头孢类药物单克隆抗体的杂交瘤细胞株或用头孢类药物-载体蛋白免疫兔,得到头孢类药物多克隆抗体;

[0025] 3) 提取小鼠IgG或兔IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠IgG抗体或羊抗兔抗抗体;

[0026] 2、三聚氰胺抗原合成及其抗体制备

[0027] 1) 取0.64g三聚氰酸二酰胺和1.0g琥珀酸酐,再加入10ml吡啶,于室温下搅拌12-24h,时间优选为24h,除去溶剂后在乙醇-水中重结晶得到白色粉末状晶体,得到三聚氰酸二酰胺的半琥珀酸酯,即为三聚氰胺半抗原;

[0028] 2) 将三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联,形成三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物;

[0029] 3) 用三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌三聚氰胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株或用三聚氰胺半抗原-载体蛋白免疫兔,得到三聚氰胺多克隆抗体;

[0030] 4) 提取小鼠IgG或兔IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠IgG抗体或羊抗兔抗抗体;

[0031] 3、用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0032] 4、将制备的头孢类药物特异性抗体和三聚氰胺特异性抗体分别加入到制备的胶体金中,得到头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂;

[0033] 5、将头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂冻干在微孔条中后,将微孔条上盖上微孔塞;

[0034] 6、将样品吸收垫用含牛血清白蛋白(牛血清白蛋白在缓冲液中的终浓度为0.5%)

(体积百分含量))、pH 为 7.2、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液浸泡 2h,在 37℃ 下烘干 2h。

[0035] 7、在底板上按顺序贴上样品吸收垫、反应膜、吸水垫和保护膜；

[0036] 8、将制备好的微孔试剂、试纸条、微孔条和微孔塞组装成试剂盒,2-8℃ 条件下保存 12 个月。

[0037] 本发明的另一个目的提供了一种牛奶样本中同时检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留的方法。

[0038] 用本发明上述任一所述试剂盒进行检测,可同时检测 β -内酰胺类药物,包括:青霉素 G、萘夫西林、氨苄青霉素、头孢哌酮、阿莫西林、头孢曲松、苯唑青霉素、头孢噻吩、邻青霉素、头孢洛宁、双青霉素、头孢唑肟以及三聚氰胺。

[0039] 本发明试剂盒的检测原理:将待检牛奶样本滴加于包含有微孔试剂的微孔条中,混匀后,孵育 5min,将标有 MAX 标记线端向下,插入包含有孵育后的微孔试剂的微孔条中,待检样品液与微孔中的金标抗体结合后一起向反应膜扩散;若待检样品液中 β -内酰胺类抗生素或(和)三聚氰胺的含量高,则扩散过程中待测样品液中的 β -内酰胺类抗生素或(和)三聚氰胺可与金标抗体相结合,进而完全封闭金标抗体上 β -内酰胺类抗生素或(和)三聚氰胺的抗原结合点,阻止金标抗体与反应膜上头孢类药物-载体蛋白偶联物结合或(和)反应膜上的三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物的结合,相对应的 β -内酰胺类抗生素检测线或(和)三聚氰胺检测线不能显色,而抗抗体则可与头孢类金标抗体或三聚氰胺金标抗体结合,质控线显色;若待检样品液中 β -内酰胺类抗生素或(和)三聚氰胺的含量低或者无,则对应的头孢类金标抗体或(和)三聚氰胺金标抗体上的抗原结合位点不能被封闭,进而头孢类金标抗体会与反应膜上头孢类药物-载体蛋白偶联抗原结合或三聚氰胺金标抗体会与反应膜上三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物结合,对应的 β -内酰胺类药物检测线显色或三聚氰胺检测线显色,同时抗抗体也可与头孢类金标抗体或三聚氰胺金标抗体结合,质控线显色;如果质控线不显色,则试纸条失效。

[0040] 阴性:质控线(C)和检测线(B)和检测线(T)都显示出红色条带,判为阴性,用“-”表示。其中检测线(B)表示 β -内酰胺类药物检测线,检测线(T)表示三聚氰胺检测线。

[0041] β -内酰胺类药物呈阳性:质控线(C)和检测线(T)显示出红色条带,而检测线(B)不显色,判为阳性,用“+”表示。

[0042] 三聚氰胺呈阳性:质控线(C)和检测线(B)显示出红色条带,而检测线(T)不显色,判为阳性,用“+”表示。

[0043] β -内酰胺类和三聚氰胺均呈阳性:质控线(C)显示出红色条带,检测线(T)和检测线(B)均不显色,判为阳性,用“+”表示。

[0044] 无效:当质控线(C)不显示红色条带,则无论检测线(T)和检测线(B)是否出现红色条带,试纸条均失效。

[0045] 本发明的试剂盒具有敏感度高、检测药物种类多、成本低、操作简单、便于携带、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。其中,采用高特异性的头孢类药物单克隆抗体和三聚氰胺单克隆抗体,保证了检测结果的可靠性;将金标抗体冻干在微孔条中,在检测过程中,能够使金标抗体与待检样品液充分接触,充分反应,从而减少误差,增加整个体系的反应灵敏度。本发明试剂盒能够同时检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺非法添加剂,实现了一个试纸条对多种药物的检测,满足了市场上对 β -内酰胺类抗生素

和三聚氰胺同时检测的需求。用本发明试剂盒检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的方法,简便、快速、直观、准确,适用范围广,成本低,易推广使用。

附图说明

- [0046] 图 1 冻干有金标抗体的微孔条图。
- [0047] 图 2 微孔塞俯视图。
- [0048] 图 3 微孔塞剖面结构示意图。
- [0049] 图 4 试纸条剖面结构示意图。
- [0050] 图 5 试纸条的俯视图。
- [0051] 图 6 三聚氰胺半抗原合成路线图。
- [0052] 图 7 试纸条检测方法示意图。
- [0053] 图 8 试纸条检测结果判定图。

具体实施方式

- [0054] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0055] 实施例 1、检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的试剂盒的构成
- [0056] 一、冻干有金标抗体的微孔条
- [0057] 所述微孔试剂装于微孔条之中,其中 1 为微孔条,2 为冻干的头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物和三聚氰胺单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂;
- [0058] 所述包含有微孔试剂的微孔条上具有微孔塞 3(图 2 和图 3);
- [0059] 所述微孔条中冻干的头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂,两种药物金标抗体包被量均为 0.20-0.25 μ g/ml;
- [0060] 二、试纸条(图 4 和图 5)
- [0061] 所述试纸条是由底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜组成;
- [0062] 所述样品吸收垫 4、反应膜 5、吸水垫 6 和保护膜 7 依次按顺序黏贴在所述底板 8 上,样品吸收垫的末端与反应膜相连,反应膜的末端与吸水垫相连,样品吸收垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐;
- [0063] 保护膜 7 覆盖在样品吸收垫上的检测端,在检测端保护膜上应有 MAX 字样。
- [0064] 所述反应膜上有两条检测线分别为检测线(T)9-1 和检测线(B)9-2 以及一条质控线(C)10,两条检测线和一条质控线均为与所述试纸条的长相垂直的条带状,两条检测线位于近于有 MAX 标记线的保护膜的一侧,质控线位于远离所述有 MAX 标记的保护膜的一侧。以试纸条的样品吸收垫一端为始端,以试纸条的吸水垫一端为末端,质控线(C)距离反应膜与吸水垫始端相连的一端为 5-8mm,检测线(B)距离质控线(C)4-6mm,检测线(T)距离检测线(B)4-6mm。检测线(T)包被有三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物(三聚氰胺-卵清白蛋白),检测线(B)包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物(头孢类药物-卵清白蛋白的偶联物),质控线(C)包被有羊抗鼠抗抗体。
- [0065] 底板为 PVC 底板;样品吸收垫为吸滤纸;吸水垫为吸水纸;反应膜为硝酸纤维素膜;所述保护膜为 PE 材质保护膜。
- [0066] 将上述试纸条与微孔试剂、微孔条以及微孔塞组装成试剂盒,在 2~8 $^{\circ}$ C 的环境中

储存,有效期 12 个月。

[0067] 实施例 2、实施例 1 中所述试剂盒的制备方法

[0068] 一、试剂盒的制备

[0069] 该试剂盒的制备方法主要包括如下步骤:

[0070] 1) 在微孔条上制备冻干有头孢类药物特异性抗体-胶体金标记物和三聚氰胺特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂,并用微孔塞该盖在微孔条上;

[0071] 2) 制备具有包被头孢类药物-载体蛋白偶联物的检测线(B)、包被三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物的检测线(T)和包被羊抗鼠抗抗体的质控线(C)的反应膜;

[0072] 3) 将 2) 制备好的反应膜与样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板组装成试纸条;

[0073] 4) 将 1) 和 3) 制备好的冻干有头孢类药物单克隆抗体-胶体金标记物和三聚氰胺单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂、试纸条、微孔条以及微孔塞组装成试剂盒。

[0074] 下面分步详细叙述:

[0075] (一) 各部件的制备

[0076] 1、抗原的制备

[0077] 1)、头孢类药物-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

[0078] 头孢类药物是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

[0079] a. 免疫原的制备-头孢类药物与卵清白蛋白(OVA)偶联物合成

[0080] 取头孢菌素 C16mg 加入 1ml 二甲基甲酰胺(DMF)溶解得到溶液 I,取 30.5mg 的 EDC 用 0.5ml 的水完全溶解后,在搅拌条件下加入到溶液 I 中,室温反应 24h 得到溶液 II;取 40mg 牛血清白蛋白(BSA)与 5ml 0.01mmol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)混合,振荡溶解,得到溶液 III;在磁力搅拌下,将溶液 II 逐滴加入到溶液 III 中,密封,室温下搅拌反应 6h 得到反应液 IV 即为 β -内酰胺类药物免疫原;将反应液 IV 装入透析袋中,4℃透析三天,分装,于 -20℃保存备用。

[0081] b. 包被原的制备-头孢类药物与牛血清白蛋白偶联物合成

[0082] 取头孢菌素 C12mg 加入 1ml 二甲基甲酰胺(DMF)溶解得到溶液 I,取 24mg 的 EDC 用 0.5ml 的水完全溶解后,在搅拌条件下加入到溶液 I 中,室温反应 24h 得到溶液 II;取 40mg 卵清白蛋白(OVA)与 5ml 0.01mmol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)混合,振荡溶解,得到溶液 III;在磁力搅拌下,将溶液 II 逐滴加入到溶液 III 中,密封,室温下搅拌反应 6h 得到反应液 IV 即为 β -内酰胺类药物包被原;将反应液 IV 装入透析袋中,4℃透析三天,分装,于 -20℃保存备用。

[0083] c. 头孢类药物-载体偶联物的鉴定

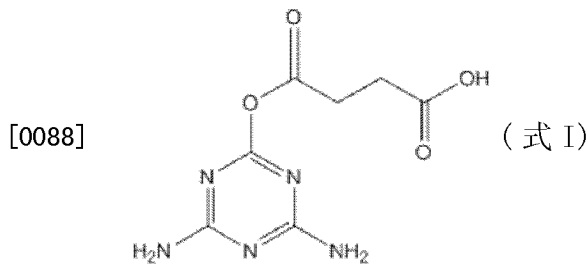
[0084] 将载体蛋白、头孢类药物、头孢类药物-载体蛋白偶联物用 pH7.4 的 PBS 配成 0.5mg/ml 的溶液,以 0.01mol/L pH7.4PBS 调零,用紫外分光光度计在波长 200-800nm 范围内扫描,得到载体蛋白、头孢类药物、头孢类药物-载体蛋白偶联物的吸收曲线。三者出现不同的吸收曲线,表明头孢类药物与载体蛋白偶联成功。

[0085] 2)、三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

[0086] a. 三聚氰胺半抗原合成(图 6)

[0087] 取 0.64g 三聚氰酸二酰胺和 1.0g 琥珀酸酐,加入 10ml 吡啶,室温下搅拌 24h,除去

溶剂后在乙醇-水中重结晶得到白色粉末状晶体,为三聚氰胺的半琥珀酸酯,即为三聚氰胺半抗原,分子结构如式 I 所示:



[0089] b. 免疫原的制备 - 三聚氰胺半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联物合成

[0090] 取 20mg 三聚氰胺半抗原,溶解于 1.0ml DMF 中得到溶液 I,再取 15mg 的 EDC 用 0.1m 水充分溶解后加入到溶液 I 中,室温搅拌 24h,即可得到溶液 II;称取 BSA30mg,使之充分溶解在 7.8ml pH 为 7.2 的 PBS 中,将溶液 II 逐滴缓慢滴加到上述 BSA 溶液中,于室温下搅拌 24h 得到溶液 III;用 0.01mol/L PBS 在 4℃ 下透析 3 天,以除去未反应的小分子物质。将得到的免疫原分装,于 -20℃ 保存备用。

[0091] c. 包被原的制备 - 三聚氰胺半抗原与卵清白蛋白偶联物合成

[0092] 取 20mg 三聚氰胺半抗原,溶解于 1.0ml DMF 中得到溶液 I,再取 15mg 的 EDC 用 0.1ml 水充分溶解后加入到溶液 I 中,室温搅拌 24h,即得溶液 II;称取 OVA40mg,使之充分溶解在 4.8ml pH 为 7.2 的 PBS 中,将溶液 II 逐滴缓慢滴加到上述 OVA 溶液中,并于室温下搅拌 24h 得到溶液 III;用 0.01mol/L 的 PBS 在 4℃ 下透析 3 天,以除去未反应的小分子物质;将得到的包被原分装,于 -20℃ 保存备用。

[0093] d. 三聚氰胺半抗原 - 载体偶联物的鉴定

[0094] 将载体蛋白、三聚氰胺半抗原、三聚氰胺半抗原 - 载体蛋白偶联物用 pH7.4 的 PBS 配成 0.5mg/ml 的溶液,以 0.01mol/L pH7.4PBS 调零,用紫外分光光度计在波长 200-800nm 范围内扫描,得到载体蛋白、三聚氰胺半抗原、三聚氰胺半抗原 - 载体蛋白偶联物的吸收曲线。三者出现不同的吸收曲线,表明三聚氰胺半抗原与载体蛋白偶联成功。

[0095] 2、头孢类药物和三聚氰胺的单克隆抗体的制备

[0096] (1) 制备单抗

[0097] a. 动物免疫

[0098] 将步骤 1 得到的两种免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 150 μg/ 只,使其产生抗血清。

[0099] b. 细胞融合和克隆化

[0100] 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 9 : 1 (数量配比) 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选得到稳定分泌头孢类药物单克隆抗体的头孢类药物单克隆杂交瘤细胞株和分泌三聚氰胺单克隆抗体的三聚氰胺单克隆杂交瘤细胞株。

[0101] c. 细胞冻存和复苏

[0102] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^9 个 /ml 的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0103] d. 单克隆抗体的制备与纯化

[0104] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在 37℃ 条件下进行培养,用辛

酸 - 饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体, -20°C 保存。

[0105] 所述细胞培养基为向 RPMI-1640 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (质量百分含量),使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为 0.2% (质量百分含量);所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

[0106] 3、羊抗鼠抗抗体的制备

[0107] 以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0108] 4、单克隆抗体 - 胶体金标记物的制备

[0109] (1) 胶体金的制备

[0110] 用双蒸去离子水将 1% 氯金酸 (购于 sigma 公司,产品目录号 T09041) 稀释成 0.01% (质量百分含量),置磁力加热棒搅拌器上搅拌煮沸,每 100ml 0.01% 氯金酸加入 2.5ml 1% 柠檬酸三钠 (购于广州化学试剂厂,产品目录号 BG11-AR-01KG),继续搅拌加热反应至液体呈红色时停止加热,冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。

[0111] (2) 单克隆抗体 - 胶体金标记物的制备

[0112] 在磁力搅拌下,用 0.2mol/L 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 7.0,按 50-100 μg 抗体/ml 胶体金的标准向胶体金溶液中分别加入上述头孢类药物单克隆抗体和三聚氰胺单克隆抗体,继续搅拌混匀 30min,加入 10% BSA 至 BSA 在胶体金溶液中的终浓度为 1% (体积百分含量),静置 30min。12000rpm、 4°C 离心 30min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积 1/20 的复溶缓冲液将沉淀重悬,得到的头孢类药物单克隆抗体 - 胶体金标记物溶液和三聚氰胺单克隆抗体 - 胶体金标记物溶液的浓度分别为 50 μg 单抗/ml 溶液,置 4°C 备用。

[0113] 复溶缓冲液:含酪蛋白、吐温 -80 的 0.02mol/L、pH7.2 的磷酸盐溶液,其中酪蛋白在复溶缓冲液中的终浓度为 0.05% -0.1% (体积百分含量),吐温 -80 在复溶缓冲液中的终浓度为 0.05% -0.15% (质量百分含量)。

[0114] 5、单克隆抗体 - 胶体金标记物微孔试剂冻干到微孔条中

[0115] 向微孔条中加入 50 μl 头孢类药物单克隆抗体 - 胶体金标记物和 50 μl 三聚氰胺单克隆抗体 - 胶体金标记物,放入冷冻干燥机中,冷阱温度为 -70°C 条件下,预冻 4h 后,再冻干 14h,即可取出,得到的微孔条中冻干有头孢类药物单克隆抗体 - 胶体金标记物和三聚氰胺单克隆抗体 - 胶体金标记物的微孔试剂。头孢类药物特异性抗体 - 胶体金标记物的冻干量为 0.20-0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$;三聚氰胺特异性抗体 - 胶体金标记物的冻干量为 0.20-0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0116] 6、样品吸收垫的准备:将样品吸收垫置于含 BSA (BSA 在缓冲液中的终浓度为 0.5% (体积百分含量))、pH 为 7.2、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液浸泡 2h, 37°C 烘 2h 备用。

[0117] 7、反应膜的制备

[0118] 包被过程:用磷酸缓冲液将头孢类药物 - 牛血清白蛋白偶联物稀释到 10mg/mL,用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线 (B) 包被量为 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;用磷酸缓冲液将三聚氰胺半抗原 - 卵清白蛋白偶联物稀释到 10mg/mL,用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线 (T),包被量为 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;用 0.01mol/L、pH 7.4PBS 缓冲液将羊抗

鼠 IgG 抗体稀释到 200 $\mu\text{g/ml}$, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线 (C), 包被量为 1.0 $\mu\text{g/cm}^2$ 。将包被好的反应膜置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥 2h, 备用。

[0119] (二) 各部件的组装

[0120] 1、试纸条的组装

[0121] 将所述样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜依次按顺序黏贴在所述底板上; 样品吸收垫的末端与反应膜的始端相连, 反应膜的末端与吸水垫的始端相连, 样品吸收垫的始端与底板的始端对齐, 吸水垫的末端与底板的末端对齐; 在组装好试纸条的吸收垫一端黏贴保护膜。

[0122] 2、试剂盒组装

[0123] 将上述步骤 1 得到试纸条、微孔试剂、微孔条及微孔塞组装成试剂盒, 在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中储存, 有效期 12 个月。

[0124] 二、试剂盒的灵敏度和特异性检验

[0125] (一) 灵敏度试验

[0126] 将 β -内酰胺类药物: 青霉素 G、萘夫西林、氨苄青霉素、头孢哌酮、阿莫西林、头孢曲松、苯唑青霉素、头孢噻吩、邻青霉素、头孢洛宁、双青霉素、头孢喹肟以及三聚氰胺标准品 (购自德国 Dr 和中国兽医药品监察所) 稀释成如下不同浓度: 1、2、4 $\mu\text{g/L}$ 青霉素 G; 1.5、3、6 $\mu\text{g/L}$ 氨苄青霉素; 2、4、8 $\mu\text{g/L}$ 阿莫西林; 3、6、12 $\mu\text{g/L}$ 苯唑青霉素、邻青霉素、双青霉素; 10、20、40 $\mu\text{g/L}$ 萘夫西林、头孢喹肟; 20、40、80 $\mu\text{g/L}$ 头孢哌酮; 25、50、100 $\mu\text{g/L}$ 头孢曲松; 45、90、180 $\mu\text{g/L}$ 头孢噻吩; 5、10、20 $\mu\text{g/L}$ 头孢洛宁; 25、50、100 $\mu\text{g/L}$ 三聚氰胺。所用的稀释液为 pH 为 7.4、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0127] 用试剂盒进行检测。每次向包含有金标抗体微孔试剂的微孔条中滴加 200 μl 样品, 混匀, 孵育 5min 后, 将试纸条插入检测, 结果为: 滴试 β -内酰胺类药物: 1 $\mu\text{g/L}$ 青霉素 G; 1.5 $\mu\text{g/L}$ 氨苄青霉素; 2 $\mu\text{g/L}$ 阿莫西林; 3 $\mu\text{g/L}$ 苯唑青霉素、邻青霉素、双青霉素; 10 $\mu\text{g/L}$ 萘夫西林、头孢喹肟; 20 $\mu\text{g/L}$ 头孢哌酮; 25 $\mu\text{g/L}$ 头孢曲松; 45 $\mu\text{g/L}$ 头孢噻吩; 5 $\mu\text{g/L}$ 头孢洛宁; 25 $\mu\text{g/L}$ 三聚氰胺时, 试纸条上显示出肉眼可见的三条红色条线, 呈阴性; 当滴试 2、4 $\mu\text{g/L}$ 青霉素 G; 3、6 $\mu\text{g/L}$ 氨苄青霉素; 4、8 $\mu\text{g/L}$ 阿莫西林; 6、12 $\mu\text{g/L}$ 苯唑青霉素、邻青霉素和双青霉素; 20、40 $\mu\text{g/L}$ 萘夫西林和头孢喹肟; 40、80 $\mu\text{g/L}$ 头孢哌酮; 50、100 $\mu\text{g/L}$ 头孢曲松; 90、180 $\mu\text{g/L}$ 头孢噻吩; 10、20 $\mu\text{g/L}$ 头孢洛宁时, 试纸条质控线显色, 检测线 (B) 不显色, 呈阳性; 当滴试 50、100 $\mu\text{g/L}$ 三聚氰胺时, 试纸条质控线显色, 检测线 (T) 不显色, 呈阳性; 表明, 本试剂盒对 β -内酰胺类药物检测灵敏度分别为: 青霉素 G 2 $\mu\text{g/L}$ 、氨苄青霉素 3 $\mu\text{g/L}$ 、阿莫西林 4 $\mu\text{g/L}$ 、苯唑青霉素 6 $\mu\text{g/L}$ 、邻青霉素 6 $\mu\text{g/L}$ 、双青霉素 6 $\mu\text{g/L}$ 、萘夫西林 20 $\mu\text{g/L}$ 、头孢喹肟 20 $\mu\text{g/L}$ 、头孢哌酮 40 $\mu\text{g/L}$ 、头孢曲松 50 $\mu\text{g/L}$ 、头孢噻吩 90 $\mu\text{g/L}$ 、头孢洛宁 10 $\mu\text{g/L}$ 。本试剂盒对三聚氰胺检测限 50 $\mu\text{g/L}$ 。

[0128] (二) 特异性试验

[0129] 特异性常用交叉反应率表示, 是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。本试剂盒对 β -内酰胺类药物: 青霉素 G、氨苄青霉素、阿莫西林、苯唑青霉素、邻青霉素、双青霉素、萘夫西林、头孢喹肟、头孢哌酮、头孢曲松、头孢洛宁、头孢噻吩检测限分别为 2 $\mu\text{g/L}$ 、3 $\mu\text{g/L}$ 、4 $\mu\text{g/L}$ 、6 $\mu\text{g/L}$ 、6 $\mu\text{g/L}$ 、6 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、40 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、90 $\mu\text{g/L}$; 本试剂盒对三聚氰胺检测限为 50 $\mu\text{g/L}$ 。将牛奶中常检的其他药物 (克

仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、群勃龙醋酸酯、磺胺类、氯霉素类、大环内酯类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类、四环素类)用 pH 为 7.2、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液进行稀释。用实施例 1 中所述的试剂盒进行检测,结果显示克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、群勃龙醋酸酯、磺胺类药物、氯霉素类药物、大环内酯类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类和四环素类药物在 500 μ g/L 浓度时,试纸条的一条质控线和两条检测线均显色,可以得出本试剂盒未对这些药物发生交叉反应。

[0130] 实施例 3、试纸条的应用

[0131] 一、用实施例 1 中所述试剂盒检测牛奶中 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺

[0132] 本发明的试剂盒可以检测牛奶样品。一般的检测方法如下:

[0133] 1、检测方法

[0134] 将盖在微孔条上的微孔塞揭掉,向包含有微孔试剂的微孔条中滴加需检测的样品溶液,得到微孔试剂和样品溶液的混合溶液 11,混匀后,孵育 5min,将试纸条 12 有 MAX 线标记端朝下插入微孔条中,在 5min 内观看结果,如图 7 所示。

[0135] 2、检测结果判定

[0136] β -内酰胺类抗生素或(和)三聚氰胺在样品中浓度高于或等于试剂盒最低检测限时,胶体金抗体与 β -内酰胺类抗生素或(和)三聚氰胺结合,从而在检测线内因为竞争反应不会与头孢类药物偶联物或(和)三聚氰胺偶联物结合而不出现红色检测线(B)或(和)检测线(T),呈阳性。阴性样品或只含有 β -内酰胺类药物或只含有三聚氰胺,在检测过程中由于缺少抗体抗原竞争反应,检测线(B)或(和)检测线(T)以及质控线(C)将会呈现红色条状带。如图 8 所示。

[0137] 阴性:质控线(C)和检测线(B)和检测线(T)都显示出红色条带,判为阴性,用“-”表示。如图 8a 所示。

[0138] β -内酰胺类药物呈阳性:质控线(C)和检测线(T)显示出红色条带,而检测线(B)不显色,判为阳性,用“+”表示。如图 8b 所示。

[0139] 三聚氰胺呈阳性:质控线(C)和检测线(B)显示出红色条带,而检测线(T)不显色,判为阳性,用“+”表示。如图 8c 所示。

[0140] β -内酰胺类和三聚氰胺均呈阳性:质控线(C)显示出红色条带,检测线(T)和检测线(B)均不显色,判为阳性,用“+”表示。如图 8d 所示。

[0141] 无效:当质控线(C)不显示红色条带,则无论检测区(T)和检测线(B)是否出现红色条带,试纸条均失效。如图 8e1、8e2、8e3、8e4 所示。

[0142] 下面具体举例:

[0143] 1、假阳性率测定

[0144] 取经过 LC-MS/MS 确证的阴性牛奶样品 50 份,编号为 1#-50#,将样品用本发明试纸条进行检测,计算其假阳性率。

[0145] 结果:在 50 份阴性牛奶样品测定中,试纸条检测结果为全部阴性,本发明试纸条假阳性率为 0。

[0146] 2、假阴性率测定

[0147] 取经 LC-MS/MS 确证的阴性牛奶样品 130 份,分别按规定的检测限浓度添加青霉素 G、氨苄青霉素、阿莫西林、苯唑青霉素、邻青霉素、双青霉素、萘夫西林、头孢唑肟、头孢哌

酮、头孢曲松、头孢洛宁、头孢噻吩、三聚氰胺,每种药物添加各 10 份样品,将样品用本发明试纸条进行检测,计算其假阴性率。

[0148] 结果:在 130 份阳性牛奶样品的测定中,试纸条检测出的阴性样品为 0 份,假阴性率为 0。本发明的检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的试剂盒可以同时检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留进行快速检测。

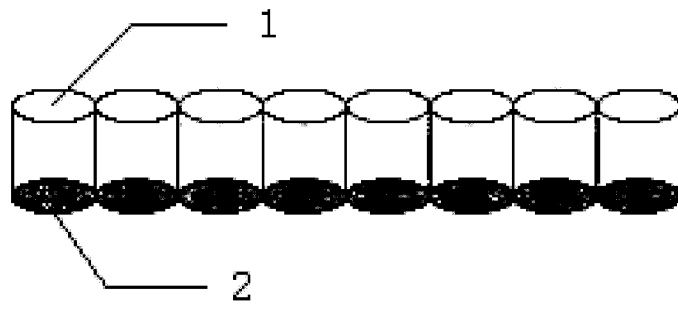


图 1

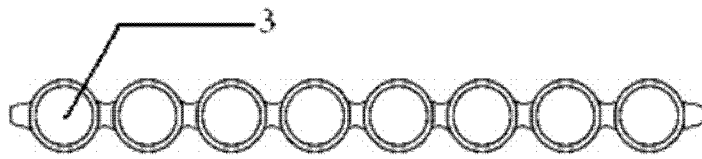


图 2

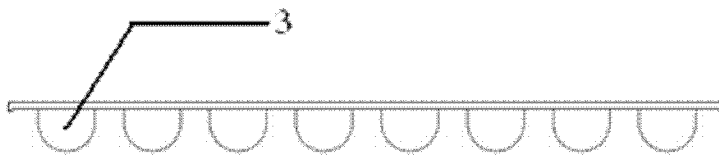


图 3

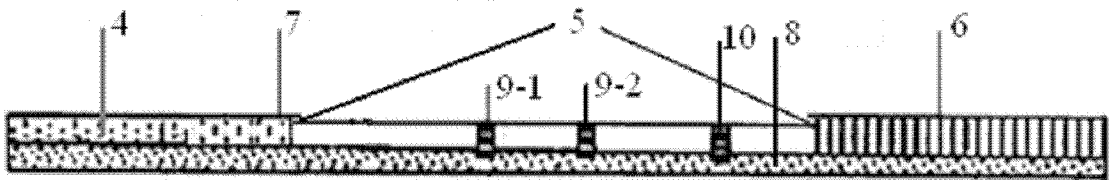


图 4

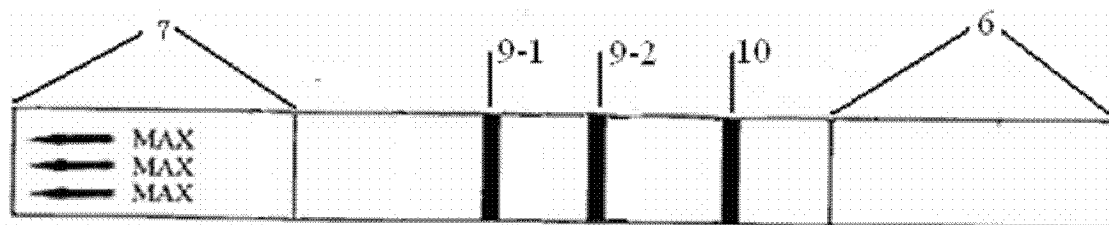


图 5

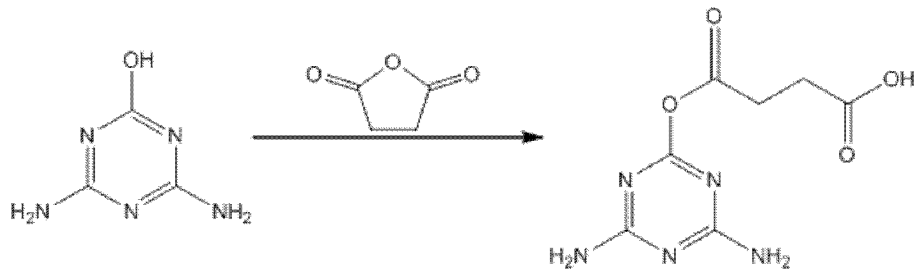


图 6

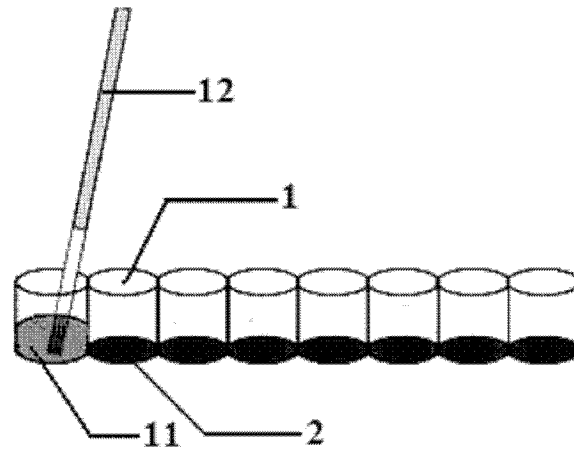


图 7

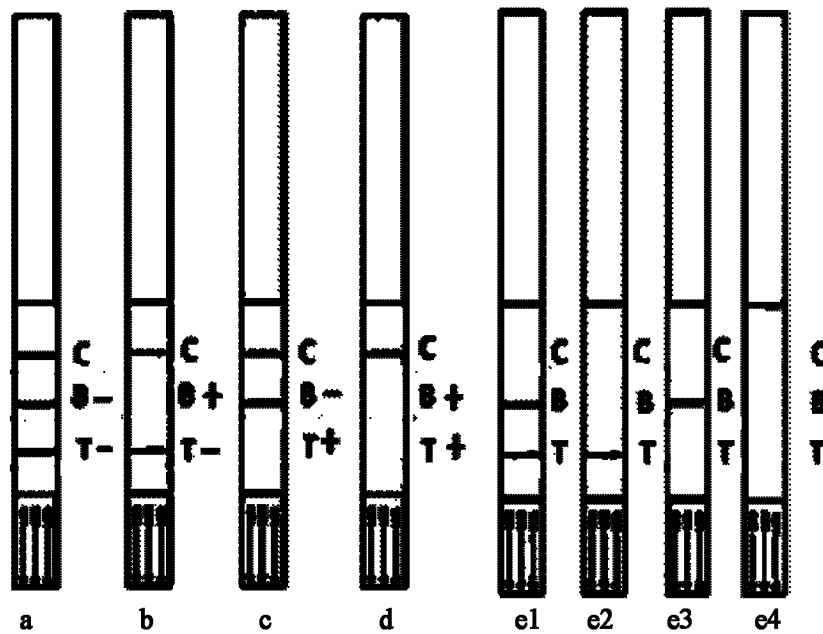


图 8

专利名称(译)	一种检测β-内酰胺类抗生素和三聚氰胺的试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN103105494A	公开(公告)日	2013-05-15
申请号	CN201110356761.7	申请日	2011-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 万宇平 吴鹏 罗晓琴 郭旭 崔海峰 冯静 段盈盈 崔彦虎 聂雯莹		
发明人	何方洋 万宇平 吴鹏 罗晓琴 郭旭 崔海峰 冯静 段盈盈 崔彦虎 聂雯莹		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
其他公开文献	CN103105494B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测β-内酰胺类抗生素和三聚氰胺的试剂盒及方法。试剂盒包括微孔条、微孔试剂、试纸条和微孔塞，所述的微孔试剂为冻干的胶体金标记的头孢类和三聚氰胺特异性抗体，所述头孢类药物特异性抗体可为头孢类药物单克隆抗体或头孢类药物多克隆抗体；所述三聚氰胺特异性抗体可分为三聚氰胺单克隆抗体或三聚氰胺多克隆抗体；所述试纸条由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜、底板，依次连接组成，所述反应膜上包括两条检测线和一条质控线，两条检测线分别包被有头孢类药物-载体蛋白偶联物和三聚氰胺半抗原-载体蛋白偶联物，质控线包被有抗抗体。用本发明试剂盒检测β-内酰胺类抗生素和三聚氰胺的方法，简便、快速、直观、准确、便于携带、适用范围广、成本低、易推广使用。

