

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910184031.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月6日

[11] 公开号 CN 101620230A

[22] 申请日 2009.8.11

[21] 申请号 200910184031.6

[71] 申请人 无锡益达生物技术有限公司

地址 214072 江苏省无锡市滨湖区震泽路 27 号

[72] 发明人 张建中 赵晓联 赵春城 徐祖奇
蔡建荣 马祯婉

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种乳制品中 β - 内酰胺酶的金标试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种半定量快速检测 β - 内酰胺酶的胶体金试纸条及其制备方法。根据抗原抗体特异性结合的免疫学原理,将抗 β - 内酰胺酶单克隆抗体用胶体金标记,包被在玻璃纤维膜上作为金标垫, β - 内酰胺酶抗原和羊抗鼠 IgG 分别包被在硝酸纤维素膜(NC 膜)上作为检测线和质控线,当被检样品中含有 β - 内酰胺酶时,可在检测线上形成抗原抗体结合物,并在 NC 膜上呈现紫红色条带,通过肉眼能够简易、快捷地对液态牛奶、奶粉、固体样品等乳制品中含有的 β - 内酰胺酶进行检测。

1、一种半定量快速检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条及其制备方法，其特征在于它是由底板、样品垫、结合垫、吸水板等组成，其特征在于：结合垫中喷有胶体金标记的抗 β -内酰胺酶单克隆抗体，硝酸纤维素膜上的质控线和检测线分别为羊抗鼠 IgG 和 β -内酰胺酶抗原。

2、根据权利要求 1 所述的 β -内酰胺酶胶体金试纸条的制备方法，其特征在于其中所述的结合垫上金标抗体的制备方法包括下述步骤：

(1) 胶体金溶液制备

用新制双蒸水配制 100mL 0.01% 氯金酸溶液，置于锥形瓶中，用恒温电磁搅拌器加热至沸，在 100r/min 磁力搅拌下，迅速加入预先在 37℃ 保温的 1% 柠檬酸三钠溶液 4.5mL，保持温度和转速不变，继续搅拌加热 15min 左右，直至溶液呈现清亮的酒红色，胶体金的大小为 20~30nm。。室温冷却，4℃ 冰箱保存备用。

(2) 胶体金标记抗体

取 30mL 胶体金溶液加于 50mL 离心管中，用 0.1M K_2CO_3 或 0.1M HCl 调节 pH 至 7.0~7.5，用铝箔纸包住离心管，轻轻振荡；边振荡边逐滴加入 3mL 含 250 μ g β -内酰胺酶单克隆抗体溶液，继续振荡 20min 左右；逐滴加入 1.5mL 1%BSA 溶液以饱和游离的胶体金，然后于 4℃，9000rpm，离心 45min；离心后取出离心管，将上清液轻轻吸掉一部分后，用移液枪将管底沉淀小心吸至 1.5mL 离心管中，4℃ 保存备用。

(3) 金标垫制备

将上述标记好的抗体用稀释液（20mM PB，150mM NaCl，1%BSA，0.1% TritonX-100，2% Sucrose，0.01% Proclin 300）10 倍稀释后浸泡或喷点玻璃纤维，37℃ 真空干燥，即制成金标垫。

3、根据权利要求 1 所述的 β -内酰胺酶胶体金试纸条的制备方法，其特征在于 NC 膜上的检测线为 β -内酰胺酶抗原，质控线为羊抗鼠 IgG。

一种乳制品中 β -内酰胺酶的金标试剂盒及制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测乳制品中 β -内酰胺酶的金标试剂盒及制备方法,属于生物技术领域。

背景技术

“解抗剂”学名 β -内酰胺酶,它是针对 β -内酰胺类抗生素提炼出来的一种化学品,是一种抗生素分解剂,它能够有效分解牛奶中残留的抗生素。一些不法生产厂家用来降解牛乳中残留的抗生素,生产所谓的“人造无抗奶”,致使抗生素酶解后的残留物进入乳制品,对人体健康造成伤害,同时也可能造成病菌的耐药性。因此,迫切需要快速的检测方法,从而能快速准确的检测乳制品中 β -内酰胺酶。

金标法又叫“胶体金法”,是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术,有其独特的优点。免疫金标记技术是以胶体金作为示踪标志物或显色剂,应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。由于它不存在内源酶干扰及放射性同位素污染等问题,且利用不同颗粒大小的胶体金还可以作双重甚至多重标记,使定位更加精确。因此已成为继荧光素、酶、同位素及乳胶标记技术之后的一种新型标记技术。

关于乳制品中 β -内酰胺酶的检测报道较少,本发明利用免疫金标记技术建立了检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条方法,能够真正实现乳品中 β -内酰胺酶的一步法快速检测。

发明内容

本发明的目的是提供一种 β -内酰胺酶的胶体金免疫层析试纸条及其制备工艺,能够简易、快速地检测乳品中非法添加的 β -内酰胺酶。

本发明根据抗原抗体特异性结合的免疫学基本原理,将抗 β -内酰胺酶单克隆抗体用胶体金标记,包被在玻璃纤维膜上作为金标垫, β -内酰胺酶抗原和羊抗鼠 IgG 分别包被在硝酸纤维素膜(NC膜)上作为检测线和质控线,当被检样品中含有 β -内酰胺酶时,可在检测线上形成抗原抗体结合物,并在NC膜上呈现紫红色条带,通过肉眼能够简易、快捷地对液态牛奶、奶粉、固体样品等乳制品中含有的 β -内酰胺酶进行检测。

为了解决上述技术问题,本发明提供了一种检测乳制品中 β -内酰胺酶的金标试剂盒的制备方法,主要涉及以下几方面内容:

1、抗 β -内酰胺酶单克隆抗体的制备

以 β -内酰胺酶作为免疫原,选用8周龄雌性BABL/C小鼠作为免疫动物,免疫剂量300 μ g/只,采取腹腔注射,每次免疫间隔为2周,免疫5次。最后一次不加佐剂,免疫原剂量减半,3~4天后取小鼠脾细胞与SP-2/o骨髓瘤细胞杂交融合,制备杂交瘤细胞。采取有限稀释法筛选杂交瘤细胞,筛选能够稳定分泌 β -内酰胺酶单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

2、胶体金溶液及金标抗体的制备

用新制双蒸水配制100mL 0.01%氯金酸溶液,置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至

沸，在 100r/min 磁力搅拌下，迅速加入预先在 37℃ 保温的 1%柠檬酸三钠溶液 4.5mL，保持温度和转速不变，继续搅拌加热 15min 左右，直至溶液呈现清亮的酒红色，胶体金的大小为 20~30nm。室温冷却，4℃ 冰箱保存备用。

取 30mL 胶体金溶液加于 50mL 离心管中，用 0.1M K_2CO_3 或 0.1M HCl 调节 pH 至 7.0~7.5，用铝箔纸包住离心管，轻轻振荡；边振荡边逐滴加入 3mL 含 250 μ g β -内酰胺酶单克隆抗体溶液，继续振荡 20min 左右；逐滴加入 1.5mL 1%BSA 溶液以饱和游离的胶体金，然后于 4℃，9000rpm，离心 45min；离心后取出离心管，将上清液轻轻吸掉一部分后，用移液枪将管底沉淀小心吸至 1.5mL 离心管中，4℃ 保存备用。

3、金标垫制备

将上述标记好的胶体金用胶体金稀释液（20mM PB，150mM NaCl，1%BSA，0.1% TritonX-100，2% Sucrose，0.01% Proclin 300）10 倍稀释后浸泡或喷点玻璃纤维，37℃ 真空干燥，即制成金标垫。

4、硝酸纤维素膜的处理

用金标点样仪喷涂两条平行线于硝酸纤维素膜上，NC 膜上的检测线为 β -内酰胺酶抗原，质控线为羊抗鼠 IgG，置 37℃ 真空干燥后备用。

5、胶体金试纸条的组装

取制作试纸条专用的底板，先将干燥好的硝酸纤维素膜粘贴在相应位置，再将吸水纸和干燥好的金标垫粘贴在相应位置并稍微压住硝酸纤维素膜，最后将样品垫粘好并压住金标垫，用切条机切割成 3 mm 宽的试纸条装入检测卡中，此时，样品垫的位置正对检测卡的加样孔、硝酸纤维素膜位置正对检测卡的观测孔，与干燥剂一起装入铝箔袋中，密封包装。

与现有技术相比，本发明具有如下的积极效果：

(1) 本发明首次公开了一种检测乳制品中 β -内酰胺酶的金标试剂盒及制备方法，可检测样品中的 β -内酰胺酶。

(2) 反应时间短。该试剂盒只有 2 步检测步骤，即加样、反应，均通过渗滤完成，检测全过程仅需数分钟。

(3) 检测结果不受仪器的影响；不受反应环境的影响。

(4) 操作步骤简单，而且试剂可在室温长期保存。

具体实施例

本发明的内容可通过以下实施例作进一步详细阐述，但不以任何方式限制本发明的范围。

实施例 1

β -内酰胺酶单克隆抗体的制备

将含 1mg/mL 的 β -内酰胺酶溶液 0.5mL 与等体积完全弗氏佐剂混匀，充分乳化，供首次免疫用，选用 8 周龄雌性 BABL/C 小鼠作为免疫动物，免疫剂量 300 μ g/只，采取腹腔注射，以后每隔 2 周加强免疫一次，加强免疫采用尾静脉注射，免疫剂量 250 μ g/只，最后一次免疫采用脾内注射，3~4 天后取脾融合，将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细

胞 SP-2/o 以 10:1 比例混合, 离心, 去除上清, 在 50S~90S 内将 1mL 50%聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中, 充分混匀, 使其融合, 1min 后加入 20mL DMEM 培养液 (Dulbecco Modified Eagle Medium), 终止融合, 水浴静置 10 min 后离心, 去除上清; 将融合细胞用含 20%小牛血清的 HAT 选择性培养基(在培养液中加入次黄嘌呤(hypoxanthine), 氨基碟呤(Aminopterin)和胸腺嘧啶(thymidine)制成选择培养液, 简称 HAT 培养液)悬浮后, 以最后浓度为 1×10^4 饲养细胞/0.1 mL 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中, 于 5%CO₂, 37℃ 条件下培养, 7~8 天后, 每培养孔更换 2/3 HT 培养液(在培养液中加入次黄嘌呤(hypoxanthine)和胸腺嘧啶(thymidine)制成选择培养液, 简称 HT 培养液)。10~20 天后, 开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔, 取上清液进行筛选, 对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆, 杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞争 ELISA 法进行, 以 β -内酰胺酶为包被抗原, 以免疫小鼠的血清为阳性对照, 以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照。阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$; 对分泌阳性抗体的细胞进行克隆。采用有限稀释法, 将阳性克隆细胞吹匀, 取一微滴至培养瓶内, 倒置显微镜下准确计数细胞个数, 稀释为 70 个/mL 再取 1mL 稀释 20 倍, 接种入 96 孔培养板中进行亚克隆。直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止; 对 10~13 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.3mL/只~0.5mL/只, 8~10 天后, 腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞/只, 3~5 天后注意观察, 收集腹水, 离心去除沉淀, 加甘油于 -20℃ 保存。

实施例 2

试纸条的生产工艺流程:

1、胶体金溶液及金标抗体的制备

用新制双蒸水配制 100mL 0.01%氯金酸溶液, 置于锥形瓶中, 用恒温电磁搅拌器加热至沸, 在 100r/min 磁力搅拌下, 迅速加入预先在 37℃ 保温的 1%柠檬酸三钠溶液 4.5mL, 保持温度和转速不变, 继续搅拌加热 15min 左右, 直至溶液呈现清亮的酒红色, 胶体金的大小为 20~30nm。室温冷却, 4℃ 冰箱保存备用

取 30mL 胶体金溶液加于 50mL 离心管中, 用 0.1M K₂CO₃ 或 0.1M HCl 调节 pH 至 7.0~7.5, 用铝箔纸包住离心管, 轻轻振荡; 边振荡边逐滴加入 3mL 含 250 μ g β -内酰胺酶单克隆抗体溶液, 继续振荡 20min 左右; 逐滴加入 1.5mL 1%BSA 溶液以饱和游离的胶体金, 然后于 4℃, 9000rpm, 离心 45min; 离心后取出离心管, 将上清液轻轻吸掉一部分后, 用移液枪将管底沉淀小心吸至 1.5mL 离心管中, 4℃ 保存备用。

2、金标垫制备

将上述标记好的抗体用稀释液 (20mM PB, 150mM NaCl, 1%BSA, 0.1% TritonX-100, 2% Sucrose, 0.01% Proclin 300) 10 倍稀释后浸泡或喷点玻璃纤维, 37℃ 真空干燥, 即制成金标垫。

3、硝酸纤维素膜的处理

用金标点样仪喷涂两条平行线于硝酸纤维素膜上, NC 膜上的检测线为 β -内酰胺酶抗原, 质控线为羊抗鼠 IgG, 置 37℃ 真空干燥后备用。

4、具体实施方式

见图 1、图 2，一种快速检测 β -内酰胺酶的胶体金检测卡，其包括检测卡壳体 1 和试纸条 2，试纸条 2 封装于检测卡壳体 1 中，检测卡壳体 1 上开有加样孔 3 和观测孔 4，试纸条 2 包括底板 5，试纸条 2 的底板 5 上依次粘贴有吸水纸 6、硝酸纤维素膜 7、金标垫 8、样品垫 9，吸水纸 6 和金标垫 8 分别粘贴在硝酸纤维素膜 7 两侧，在硝酸纤维素膜 7 的两端结合处，吸水纸 6 和金标垫 8 的一小段重叠压在硝酸纤维素膜 7 上，样品垫 9 粘贴在金标垫 8 的另一侧，样品垫 9 的一小段重叠在金标垫 8 上；金标垫 8 上喷涂有金标抗 β -内酰胺酶单克隆抗体；硝酸纤维素膜 7 上依次喷涂有材质为 β -内酰胺酶的检测线 10、材质为羊抗鼠 IgG 的质控线 11。

实施例 3

β -内酰胺酶试剂盒的检测方法

1、样品的预处理

取 10ml 样品，12000rpm 离心 10 分钟。用塑料吸管小心吸取上层液体，准确吸取 1ml 上清于具塞试管中，加入 4ml 20mM PBS 溶液，盖上盖子，充分混匀。此稀释的样品为待测样品，可直接用于试验。

2、试剂盒检测

- (1) 从铝箔袋中取出测试卡，将其置于干净的水平桌面；
- (2) 加入待测样品 100 μ l 于加样孔内；
- (3) 3~15 分钟内即可判断结果。

结果判断：阳性 (+)：仅质控线出现一条紫红色条带，检测线上无紫红色条带出现，此时结果为表明 β -内酰胺酶含量在 50ppm 以上；阴性 (-)：质控线和检测线均出现紫红色条带。如果结果表明， β -内酰胺酶含量在 50ppm 以下；无效：质控线未出现紫红色条带，表明操作过程不正确或试剂盒已损坏变质。

本发明的快速检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条，其检测快速，检测时间在 10min 以内，能够满足现场快速检测的需要，且检测准确率高、特异性强，改变了对 β -内酰胺酶的检测必须由专业机构的专业人员才能进行检测的局限性，携带方便，操作简便，各个牛奶收购站、各级检验检疫部门及消费者均可即时进行检验；检测试纸条的制备工艺简单，成本低，且在常温下即可保存，无需特殊设备和仪器，检测重复性好。

附图说明

图 1 为本发明快速检测 β -内酰胺酶的胶体金检测卡示意图；

图 2 为本发明快速检测 β -内酰胺酶的胶体金检测卡中所述试纸条的结构示意图；

图 3 为图 2 的侧视图。

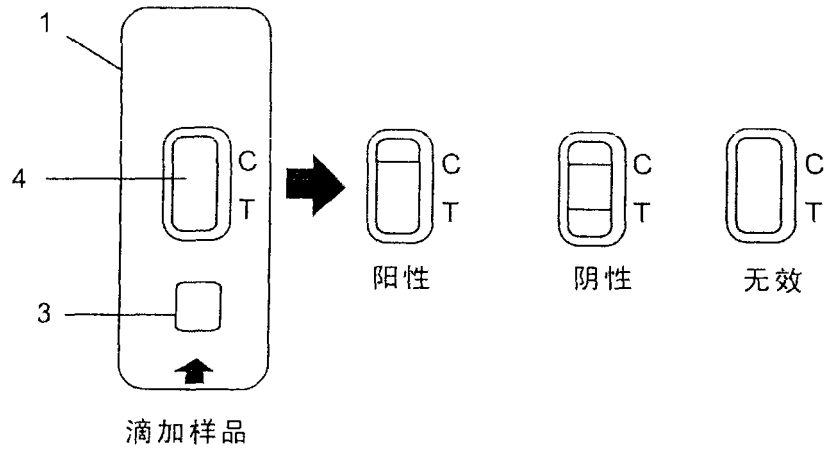


图 1

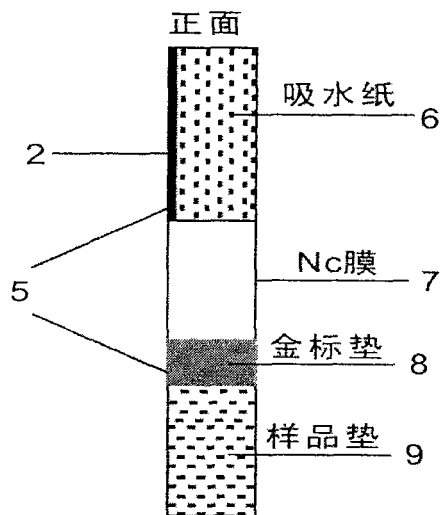


图 2

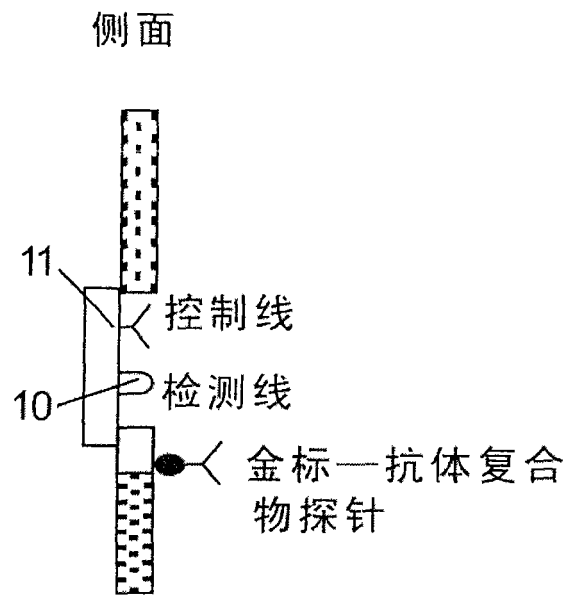


图3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种乳制品中 β -内酰胺酶的金标试剂盒及制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN101620230A | 公开(公告)日 | 2010-01-06 |
| 申请号 | CN200910184031.6 | 申请日 | 2009-08-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 无锡益达生物技术有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 无锡益达生物技术有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 无锡益达生物技术有限公司 | | |
| [标]发明人 | 张建中 赵晓联 赵春城 徐祖奇 蔡建荣 马祯婉 | | |
| 发明人 | 张建中 赵晓联 赵春城 徐祖奇 蔡建荣 马祯婉 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供了一种半定量快速检测 β -内酰胺酶的胶体金试纸条及其制备方法。根据抗原抗体特异性结合的免疫学原理，将抗 β -内酰胺酶单克隆抗体用胶体金标记，包被在玻璃纤维膜上作为金标垫， β -内酰胺酶抗原和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜(NC膜)上作为检测线和质控线，当被检样品中含有 β -内酰胺酶时，可在检测线上形成抗原抗体结合物，并在NC膜上呈现紫红色条带，通过肉眼能够简易、快捷地对液态牛奶、奶粉、固体样品等乳制品中含有的 β -内酰胺酶进行检测。

