



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101806801 A

(43) 申请公布日 2010.08.18

(21) 申请号 201010156566.5

(22) 申请日 2010.04.27

(71) 申请人 杭州南开日新生物技术有限公司
地址 310051 浙江省杭州市滨江区滨文路
95号活水工业园6幢4楼

(72) 发明人 张少恩 桑丽雅 卜令杰 邵伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/52(2006.01)

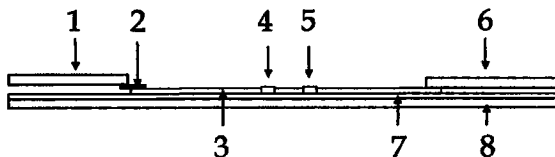
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

快速检测乳制品中 β -内酰胺酶的试剂板制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种快速检测乳制品中 β -内酰胺酶残留的试剂板,可用于检测乳制品中的 β -内酰胺酶。本发明试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成,背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和质控线,可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。该试剂板可进行半定量直观检测,整个操作过程仅需 20~30min,且无需任何昂贵实验设备辅助,利于大规模样本筛选,适合工商部门、检验检疫机构、奶站及乳制品生产加工企业对原料及成品进行大规模快速检测。



1. 一种快速检测乳制品中 β -内酰胺酶残留的试剂板的制备方法,其特征在於醋酸纤维膜上的胶体金结合垫上包被有抗青霉素单克隆抗体-胶体金标记物,从样品垫到吸水垫方向依次是检测线和质控线,包被有青霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG。

2. 如权利要求书 1 所说的标记物,其特征在於将胶体金与抗青霉素单克隆抗体按一定比例混匀,使胶体金与抗青霉素单克隆抗体形成稳定的纳米级胶体金颗粒,通过浓缩形成抗青霉素单克隆抗体-胶体金标记物。

3. 如权利要求书 1 所说的检测线,其特征在於偶联青霉素的载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白。

4. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在於样品中的 β -内酰胺酶含量超过试剂板检出限时,试剂板上的检测线显色较控制线深或一样深,判定为阳性;反之,当样品中 β -内酰胺酶含量在试剂板检出限以下或无残留时,试剂板上的检测线显色比控制线浅,判定为阴性。

5. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在於工艺流程包括制备青霉素-牛血清白蛋白偶联物、制备抗青霉素单克隆抗体、制备胶体金溶液、制备胶体金标记抗青霉素单克隆抗体和组装 β -内酰胺酶免疫胶体金快速检测试剂板。

快速检测乳制品中 β -内酰胺酶的试剂板制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速检测乳制品中 β -内酰胺酶残留的试剂板的制备方法,具体涉及一种检测 β -内酰胺酶药物残留的免疫胶体金快速检测试剂板的制备方法。

背景技术

[0002] β -内酰胺酶 (β -lactamase) 是 β -内酰胺类抗生素耐药细菌分泌的一种胞外酶,可选择性地分解牛奶中残留的 β -内酰胺类抗生素,俗称“解抗剂”,常被用来人为添加到生鲜乳中降解残留的青霉素类、头孢类等抗生素,以达到“无抗奶”标准。

[0003] β -内酰胺酶作为添加剂看似起到了消除奶制品中 β -内酰胺类抗生素残留的效果,但是牛奶中添加“解抗剂”会导致病菌对青霉素、头孢菌素等抗生素类药物耐药性增高,从而使喝奶的人抵抗传染病的能力大大降低;(2) 虽然目前尚无 β -内酰胺酶直接危害人体健康的相关资料,但 β -内酰胺类抗生素酶解后,可能引进其他有害物质;(3) 这种做法纵容了奶牛饲养过程中抗生素的滥用。

[0004] 据调查,北京市场 6 成以上样品奶检出“解抗剂”。2006 年 5 月至 8 月间,中国药品生物制品检定所的崔生辉等人分 3 次从北京零售市场上随机采集了 5 个厂家生产的 38 份牛奶样品进行检测,结果有 63.12% (24/38) 检出了 β -内酰胺酶。由此,当前乳品市场 β -内酰胺酶的普遍违规添加现象可见一斑。

[0005] 针对此种现象,2008 年底卫生部会同工信部、农业部等 9 部门印发了卫监督发(2008)60 号文《关于开展全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治的紧急通知》,2009 年 2 月 4 日专项整治专家委员会发布了食品整治办(2009)5 号文件《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》,严令禁止 β -内酰胺酶在乳与乳制品中的添加。为保障消费者的利益,建立对“解抗剂”(β -内酰胺酶) 的快速检测方法是十分必要的。

[0006] 目前,国内外检测乳及乳制品中 β -内酰胺酶的方法主要有杯碟法、碘量法、纸片法(产色头孢菌素法)和高效液相色谱法。

[0007] 杯碟法是卫生部指定检验乳及乳制品中 β -内酰胺酶的检验方法,检出限为 4U/mL。该方法在微生物实验室推广性强,但存在重复性差的问题,由于检测所需时间长,需要微生物常规灭菌及培养等仪器设备支撑,不适宜现场检测。

[0008] 相对于杯碟法,碘量法操作快速简便,整个检测约需 60 ~ 80min,可作为快速筛选方法,但是碘量法在每次实验时均需要做阳性和阴性对照,对反应时间要求严格,且不同牛奶样品检测现象差别较大,容易出现假阳和假阴,需要做进一步研究。

[0009] 纸片法,又称产色头孢菌素法,操作简便快速,相比杯碟法来说更能被广大实验室所接受。

[0010] 高效液相色谱法测定乳品中 β -内酰胺酶不仅操作方法复杂、费时,且不论是直接测定还是间接测定均只能定性判断样品中是否含 β -内酰胺酶,故相比之下该法的适用性很有限。

发明内容

[0011] 本发明针对乳及乳制品中非法添加现象普遍的 β -内酰胺酶药物开展研究,拟开发一种用于现场快速筛选 β -内酰胺酶阳性牛奶样本的检测技术,并开发成可用于现场检测乳品中 β -内酰胺酶含量的试剂板。

[0012] 本发明应用层析式抗体免疫竞争原理,通过抗原和金标抗体反应显色,特异性检测原奶样品中的 β -内酰胺酶含量。如果样品溶液中 β -内酰胺酶残留高于检测限,则 β -内酰胺类药物将被完全分解掉,不与胶体金结合垫上的金标抗体活性位点结合,金标颗粒上的全部活性位点与 T 线上的特异性抗原结合,此时 T 线较 C 线显色深或差不多,判定为阳性;反之,当样品溶液 β -内酰胺酶残留低于检测限时,金标抗体活性位点被未完全分解掉的 β -内酰胺类药物占据,从而无法与 T 线上特异性抗原结合,此时 T 线较 C 线显色浅甚至无显色,判定为阴性。

[0013] 本发明中该检测方法涉及的试剂板由上下两块塑料模板、背衬及粘附在背衬上依次紧密相连的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫组成。

[0014] 其中样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫相邻各部分间有 1-2mm 的重叠,其目的的一方面是保证层析作用从样品垫到吸水垫部位顺利进行,另一方面是为了使样品溶液与样品垫有充分反应时间,样品垫上的缓冲体系可以中和样品溶液的酸碱度,保证样品溶液中的有效成分与胶体金结合垫上的金标抗体顺利发生反应。

[0015] 胶体金结合垫上包被有青霉素单克隆抗体与胶体金的结合物;硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有青霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和质控线。偶联青霉素的载体蛋白可为牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、血蓝蛋白 (KLH) 等。

[0016] 本发明试剂板的各部分组成成分与功能如下:

[0017] 塑料模板,起固定试纸条及标示功能区(加样孔、检测区、控制区)的作用。

[0018] 背衬为一面涂有不干胶的不吸水的韧性材料,如 PVC 板,起固定支持试纸其他组成部分的作用。

[0019] 样品垫由玻璃纤维制成,起吸收样品溶液与缓冲样品溶液 pH 值的作用。

[0020] 胶体金结合垫由聚酯膜制成,其上标记有青霉素 G 单克隆抗体与胶体金的结合物,是样品溶液中的有效成分与金标抗体发生反应的场所。

[0021] 硝酸纤维素膜部分主要作用是将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0022] 吸水垫为滤纸,作为吸水部分其作用是将移动上来的多余的溶液吸收。

[0023] 本发明试剂板具有如下有益效果:

[0024] (1) 特异性好,本发明试剂板与青霉素 G 的交叉反应率为 100%,与氨苄青霉素的交叉反应率为 80%,与卡那霉素、链霉素、庆大霉素、四环素、氯霉素的交叉反应率均小于 0.1%。对青霉素类抗生素反应均有高度专一性。

[0025] (2) 灵敏度高,本发明试剂板对 β -内酰胺酶的最低检出限为 3U/mL。同时,可实现随温浴时间变化灵敏度灵活可调。

[0026] (3) 操作简单快捷,不依赖任何实验设备,不需任何专业培训。本发明试剂板将反应所需的大部分原料整合到试剂条中,滴样后抗原抗体反应在固相膜上快速进行,大大缩短了检样时间,且样品无需特殊处理,滴样后 3-5 分钟内即可用肉眼通过判断硝酸纤维素

膜上的检测线和质控线的颜色深浅读取结果,检测过程无需特殊仪器辅助,普通人员均可操作,不需要专业培训,极易推广使用。

[0027] (4) 成本低,效益好。本发明试剂板生产工艺成熟、流程简单,生产成本低廉,投资少,收效快。

附图说明

[0028] 图 1 为 β -内酰胺酶免疫胶体金快速检测试剂板结构示意图,其中 1 为样品垫,2 为胶体金结合垫,3 为硝酸纤维素膜,4 为检测线,5 为控制线,6 为吸水垫,7 为不干胶,8 为 PVC 板。

[0029] 图 2 为 β -内酰胺酶免疫胶体金快速检测试剂板操作示意图,其中 S 为加样孔, C 为控制区, T 为检测区。

[0030] 图 3 为 β -内酰胺酶免疫胶体金快速检测试剂板结果判定示意图,其中 C 为控制区, T 为检测区。

具体实施方式

[0031] 本发明试剂板的制备包括青霉素-BSA 偶联物的制备,抗青霉素单克隆抗体的制备,胶体金溶液的制备,胶体金标记抗青霉素单克隆抗体的制备和 β -内酰胺酶免疫胶体金快速检测试剂板的组装。

[0032] 1. 青霉素 G 与载体蛋白的偶联

[0033] 采用戊二醛法将青霉素 G 钠盐与载体蛋白偶联制备免疫抗原和包被抗原。称取 50mg 青霉素 G 钠盐溶于 3mL 水中,用 10mL PB 缓冲液 (0.1mol/L PH 6.0) 溶解 50mg 牛血清白蛋白,加入到上述溶液中,再缓慢加入 2mL 10% 戊二醛溶液,将混合溶液室温下搅拌 2h,双蒸水透析 5 天,滤膜过滤后,收集。

[0034] 卵清蛋白 (OVA) 替代 BSA,同同样方法制备氯霉素-OVA 偶联物。

[0035] 2. 抗青霉素单克隆抗体的制备

[0036] 取 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,将作为免疫原的青霉素 G-BSA 偶联物与等体积的弗氏完全佐剂乳化,按 100 μ g/只剂量皮下注射,之后每隔 3 周加强免疫 1 次,用不完全佐剂腹腔注射。融合前 3d 强化免疫 1 次,不用佐剂,剂量加倍。细胞融合按常规方法进行:将 Sp2/0 多发性骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1:10 的比例混合,在 50% PEG 作用下融合,HAT 培养基悬浮,分种于 96 孔培养板中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

[0037] 融合后,待细胞生长到培养孔面积的 1/4 时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初筛选择 10mg/L 青霉素 G-OVA 偶联物 (此处载体蛋白与作为免疫原的载体蛋白应为不同种类) 包被酶联板,被测孔加培养上清,孵育、清洗后,加入羊抗鼠 IgG-HRP (1:1000),OPD 显色。筛选出的阳性孔再用青霉素 G-OVA 偶联物 (同初筛) 包被的酶联板进行阻断间接 ELISA。将细胞培养上清与 2×10^{-3} mol/L 青霉素溶液等量混合,37 $^{\circ}$ C 感作 1h,加入已包被的酶标板中。另外用 PBS (0.01mol/L、pH7.4) 替代青霉素溶液作对照,其余步骤同上。若青霉素阻断后的 OD 值降至对照孔的 50% 以下,则判为阳性孔。经 2~3 次检测都呈阳性的孔,立即用有限稀释法进行克隆化。

[0038] 体外培养:将克隆化的细胞株扩大培养,细胞浓度达 5×10^5 mL⁻¹ 时停止换液,细胞

全部死亡后收集培养液。体内诱生腹水：给腹腔注射液体石蜡 10 天后的小鼠腹腔注射克隆化细胞株 10^7 个细胞，7 天后抽取腹水。

[0039] 3. 胶体金溶液的制备

[0040] 胶体金颗粒的平均大小为 30nm，其制备方法为在 100mL 去离子水中加入 1mL 1% 柠檬酸三钠，煮沸后迅速加入 1mL 1% 氯金酸，继续煮沸 10min，冷却后，4℃ 下保存备用。

[0041] 4. 胶体金标记抗青霉素单克隆抗体的制备

[0042] 取已制备好的 100mL 胶体金溶液，用 0.1mol/L 碳酸钾溶液调 pH 到 8.0。边搅拌边加入 1.5mg 抗青霉素单抗，搅拌 20min，再逐滴加入 2mL 25mol/L 聚乙二醇 20000 (PEG 20000)，搅拌 15min。20,000rpm 离心 15min，弃上清液，加入 10mL pH 7.4PBS 缓冲液（含 0.4mol/LPEG）清洗 2 次。将沉淀用 5mL 含 2% BSA 的 PBS 缓冲液（pH 7.4）溶解，用 0.22 μm 无菌过滤器过滤后，4℃ 保存备用。

[0043] 5. β-内酰胺酶免疫胶体金快速检测试剂板的组装

[0044] 参照图 1，用点膜机把适当浓度的青霉素 G-BSA 偶联物及羊抗鼠 IgG 喷在硝酸纤维素膜上，分别作为检测线和控制线，37℃ 烘箱干燥 8h。以同样方法，将制备好的金标记青霉素单克隆抗体包被在胶体金结合垫上。

[0045] 检测试剂组成为一个 PVC 背衬，在其上按顺序粘上样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。用切割机将贴好的大卡切割成 4mm 宽的条，装入塑料模板中制成检测试剂板，再放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存。

[0046] 7. β-内酰胺酶免疫胶体金快速检测试剂板检测实施例操作方法

[0047] 7.1 样品制备

[0048] 在试剂板中附带的配备有药片的离心管中加入 1mL 待检牛奶和 1mL β-内酰胺酶专用缓冲溶液，放入 37℃ 水中温浴。

[0049] 温浴时间与检测灵敏度关系见表 1。

[0050] 表 1 温浴时间与产品灵敏度关系表

[0051]

温浴时间	30min	20min	10min	6min
检测灵敏度	3U	5U	10U	20U

[0052] 7.2 检测步骤

[0053] 取本发明中的试剂板，用滴管吸取待检溶液，在加样孔中滴入 3 滴（约 100 μL，加样时注意离心管不可离开水浴锅），加样后开始计时，结果应在 3 ~ 5 分钟读取，其他时间判读无效。当室温低于 20℃ 时，试剂板在检测前须放在试管架上（注意：贴近水面，不能触水）预热活化约 5min 后再使用。

[0054] 7.3 结果判断

[0055] 读取结果时，将试剂板水平置于观察者正面，如图 2 右侧所示。

[0056] 阳性 (+)：T 线显色比 C 线深或一样深，表明样品中 β-内酰胺酶类药物浓度高于 4ng/mL。如图 3. a 所示。

[0057] 阴性 (-)：T 线显色比 C 线浅，表明样品中 β-内酰胺酶类药物浓度低于 4ng/mL 或

无 β -内酰胺酶类药物残留。如图 3. b 所示。

[0058] 无效 :未出现 C 线,可能操作不当或试剂板已失效。应再次阅读说明书,并用新试剂板重新测试。如图 3. c 所示。

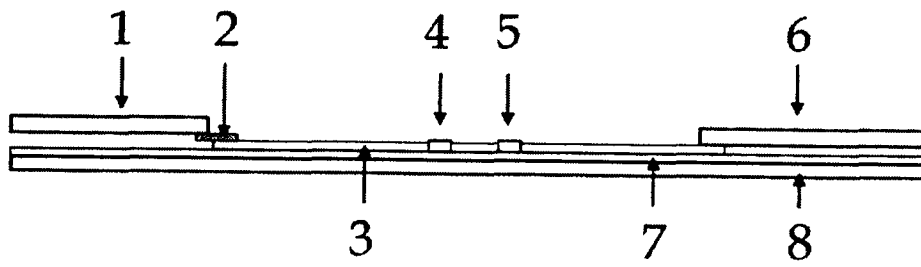


图 1

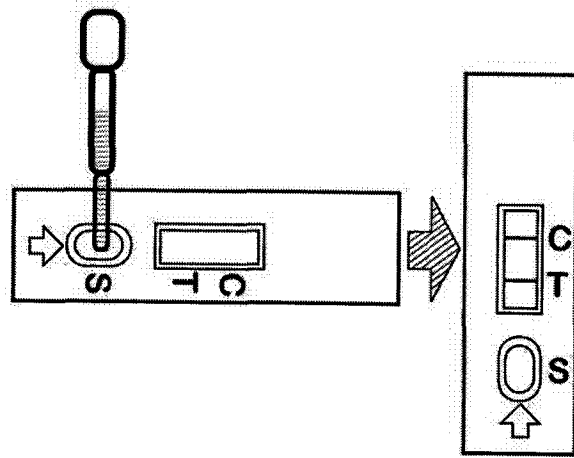


图 2

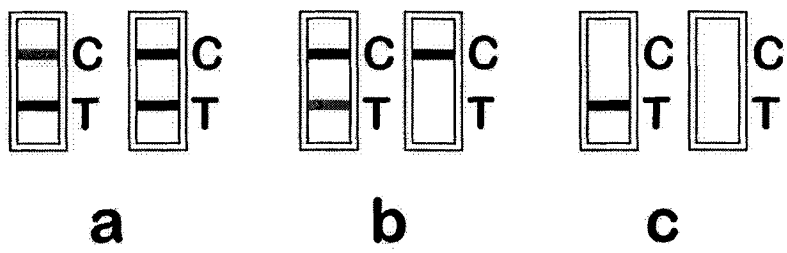


图 3

专利名称(译)	快速检测乳制品中 β -内酰胺酶的试剂板制备方法		
公开(公告)号	CN101806801A	公开(公告)日	2010-08-18
申请号	CN201010156566.5	申请日	2010-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
[标]发明人	张少恩 桑丽雅 卜令杰 邵伟		
发明人	张少恩 桑丽雅 卜令杰 邵伟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531 G01N33/52		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测乳制品中 β -内酰胺酶残留的试剂板，可用于检测乳制品中的 β -内酰胺酶。本发明试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成，背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和质控线，可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。该试剂板可进行半定量直观检测，整个操作过程仅需20~30min，且无需任何昂贵实验设备辅助，利于大规模样本筛选，适合工商部门、检验检疫机构、奶站及乳制品生产加工企业对原料及成品进行大规模快速检测。

